

高等学校配套实验教材

供基础、临床、药学、预防、护理、精神类专业用

医学微生物学实验指导

主编 吕厚东 李秀真



人民卫生出版社

医学影像学及实验指导

第1版 第1次印刷 2015年12月 2015年12月 2015年12月 2015年12月 2015年12月 2015年12月

医学影像学实验指导

主编 王卫 副主编 王卫

人民卫生出版社

高等学校配套实验教材

供基础、临床、药学、预防、护理、精神类专业用

医学微生物学实验指导

主 编 吕厚东 李秀真

副主编 薛庆节 章洪华 杨媛媛 胡文洁 杨 廷

编 委 (按姓氏笔画为序)

王 辉 刘昌平 吕厚东 李秀真

杨 廷 杨媛媛 胡文洁 曹 卉

章洪华 薛庆节

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学微生物学实验指导/吕厚东等主编. —北京:
人民卫生出版社, 2010. 7

ISBN 978-7-117-13045-5

I. ①医… II. ①吕… III. ①医药学: 微生物学-
实验-高等学校-教学参考资料 IV. ①R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 096045 号

门户网: www.pmph.com	出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com	护士、医师、药师、中医 师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

医学微生物学实验指导

主 编: 吕厚东 李秀真

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

010-59787586 010-59787592

印 刷: 北京蓝迪彩色印务有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 13

字 数: 324 千字

版 次: 2010 年 7 月第 1 版 2010 年 7 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-13045-5/R·13046

定 价: 39.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

前言

医学微生物学是高等医药院校学生的一门必修基础课程,而实验教学则是体现三基(基础理论、基本知识、基本技能)中基本技能的重要手段,它是加深、验证基础理论和基本知识的唯一途径,也是提高教学质量的重要环节。根据卫生部规划教材《医学微生物学》第七版的教学需要与培养目标,在总结多年实验教学的基础上,并汲取了兄弟院校的成熟经验,我们编写了《医学微生物学实验指导》一书。

《医学微生物学实验指导》涵盖了本科医学微生物学教材中所要求的全部实验内容,并有所创新。本书分为7章,共61个实验项目。该书以其基础性、实用性、科学性、先进性为原则,它不但能满足本、专科各层次、各专业学生实验要求,还增设了有关分子生物学实验内容及“各种临床标本的微生物学检查”,更提高了它的实用价值。每项实验都分别介绍了“实验目的”、“实验用品”、“实验原理及实验方法”。对于操作复杂、难度较高的实验项目,根据多年的教学经验,对学生实验中常出现的问题,增设了“注意事项”,并在每项实验后增加了问题思考,有助于提高学生分析问题、解决问题的能力。

本书中各实验内容相对独立,各学校在教学过程中可根据其专业层次分配实验学时、选择其相应实验内容。本书亦可作为从事相关专业的教师、科技工作者和临床检验人员的参考用书。在参编人员所在学校领导的支持、关注下,在出版社的大力支持帮助下,该书得以出版,在此表示衷心的感谢。

由于时间仓促,各校实验条件不同,专业有别层次不一,且我们的编写能力有限,在内容和安排上难免有不足之处,恳请同道及读者提出宝贵意见。

吕厚东

2010年1月

目 录

第一章 实验的目的要求及实验室规则	1
第二章 医学微生物学基础	3
实验一 显微镜油镜的使用	3
实验二 细菌的基本形态观察	5
实验三 细菌的特殊结构观察	6
实验四 细菌动力的观察	7
实验五 细菌涂片标本的制备	8
实验六 常用的细菌染色法	10
实验七 显微测微尺与血球计数板的使用	17
实验八 常用培养基的制备	20
实验九 细菌的分离培养及生长现象观察	31
实验十 细菌的代谢产物检查	39
实验十一 自然界与人体的细菌检查	43
实验十二 消毒灭菌法	46
实验十三 细菌的药物敏感性试验	53
实验十四 噬菌体试验	57
实验十五 细菌的变异性试验	59
实验十六 细菌的致病性试验	65
实验十七 吞噬细胞吞噬功能检测	69
第三章 细菌学各论	73
第一节 病原性球菌	73
实验一 葡萄球菌属	73
实验二 链球菌属	76
实验三 奈瑟菌属	82
第二节 肠杆菌科	85
实验一 大肠埃希菌	85
实验二 沙门菌属	87
实验三 志贺菌属	92
实验四 霍乱弧菌	94
实验五 幽门螺杆菌	96
实验六 弯曲菌属	97
第三节 厌氧性细菌	99
实验一 厌氧芽胞梭菌	99

第四节 呼吸道感染细菌	101
实验一 结核分枝杆菌的分离、鉴定	102
实验二 白喉棒状杆菌的分离与鉴定	104
第五节 动物源性细菌	106
实验一 炭疽芽胞杆菌	106
实验二 布鲁菌属	109
第六节 支原体、立克次体、衣原体和螺旋体	109
实验一 支原体	110
实验二 衣原体	112
实验三 立克次体	113
实验四 螺旋体	114
第四章 微生物自动分析	118
实验一 微生物鉴定的自动化系统	118
实验二 大肠杆菌的自动分析仪分析	120
第五章 病毒	123
第一节 病毒的形态检查	123
实验一 病毒的形态观察	123
第二节 病毒培养法	124
实验一 鸡胚培养法	124
实验二 组织培养法	127
实验三 动物接种法	130
实验四 蚀斑试验	134
实验五 TCID ₅₀ 测定	135
第三节 病毒的检测技术	136
实验一 间接免疫荧光试验	136
实验二 间接酶联免疫吸附试验	137
实验三 病毒血凝及血凝抑制试验	138
实验四 乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)反向间接血凝检查法	141
实验五 反向被动血凝抑制试验	141
实验六 Southern 印迹试验	142
实验七 免疫印迹法	145
实验八 PCR 技术	147
第六章 病原性真菌	150
实验一 真菌的培养方法	152
实验二 浅部真菌感染临床标本的检查	153
第七章 综合性实验:临床标本的微生物学检查	155
实验一 血液标本中常见病原微生物的分离鉴定	155
实验二 粪便标本中常见病原微生物的分离鉴定	158
实验三 尿液标本中常见病原微生物的分离鉴定	162
实验四 生殖道标本中常见病原微生物的分离鉴定	165

实验五 痰液及呼吸道标本中常见病原微生物的分离鉴定·····	167
实验六 脓汁标本中常见病原微生物的分离鉴定·····	170
实验七 脑脊液标本中常见病原微生物的分离鉴定·····	172
实验八 穿刺液标本中常见病原微生物的分离鉴定·····	174
附录一 染色液的配制·····	177
附录二 常用试剂的配制·····	179
附录三 常用培养基的制备·····	183
附录四 微生物的菌种保藏方法·····	196

1

第一章

实验的目的要求及 实验室规则

(Objective and Request of Experiment and Laboratory regulations)

一、实验的目的要求

医学微生物学是实践性较强的基础学科之一。实验课既是本学科教学过程的重要环节,又是相对独立、自成体系的一门课程。实验的目的在于加强学生能力的培养,通过实验课进行专业基本技能训练,培养学生发现问题、分析问题和解决问题的能力;同时,通过实验可加深和巩固对理论内容的理解和体会。在掌握本学科系统理论知识和基本操作技术的基础上,培养学生严谨的科学作风和独立思考、独立工作的能力,树立牢固的无菌观念,为今后临床实践与科研工作打下良好基础。

实验形式分教师示教和学生操作两种。前者主要是验证理论,后者则从不同角度进行基本技术训练和反复练习,以掌握其有关的基本技能。

为了提高实验课效果,保证实验课质量,要求做到下列各点:

1. 实验前必须做好预习,以了解实验的内容、目的、理论依据、操作方法及注意事项,避免或减少错误的发生。
2. 实验过程中要坚持严肃性、严格性与严密性,对所操作的实验要在全面理解的基础上,按要求依次进行操作,并进行积极地思考;对示教内容要仔细观察并与有关理论密切联系。
3. 如实记录、分析结果,并得出结论。如结果与理论不符时,应分析、探讨其产生的原因,以培养、训练自己的思维能力,最后写出实验报告。
4. 切实遵守实验室规则,防止发生各种事故。

二、实验室规则

微生物学实验的对象主要是病原微生物,如果不注意,可能发生感染,甚至传播,为防止实验室感染,并提高实验课的效果,必须严格遵循下列规则。

1. 进实验室必须穿工作衣(白大衣),并按指定的位置入座。
2. 实验室内严禁吸烟和饮食,与实验无关物品勿带入室内。
3. 实验操作应严格按照实验指导和教师的讲授进行,以期获得正确的实验结果。
4. 在实验过程中,如果不慎发生培养物或传染性材料污染桌、凳、地面和衣物等,应立即报告教师,可用 2% 来苏水处理半小时,然后洗净;若手上沾有活菌,应尽快浸泡于 2% 来苏水中维持 5~10min,再以肥皂及水洗刷。
5. 用过的带菌材料、器材(吸管、试管、玻片等)应放入指定的消毒缸内。

6. 自觉保持实验室内肃静、整洁。爱护公物,注意节约水电及实验材料。如有损坏,应立即向指导教师报告,主动在破损物品登记本上登记,某些物品需按规定酌情赔偿。

7. 每次实验完毕,值日生负责整理清洁实验室(包括桌面、地面、实验设备等),然后关好水、电、门、窗,洗手后离开实验室。

8. 未经许可,不得将实验室内任何物品(特别是菌种)带出室外。

2

第二章

医学微生物学基础

(foundation of medical microbiology)

实验一 显微镜油镜的使用

(apply of microscope with immersion oil)

实验目的

1. 熟悉光学显微镜的结构。
2. 掌握油镜的使用原理及正确的使用方法。

实验用品

1. 器材 普通光学显微镜、香柏油、乙醚酒精、擦镜纸。
2. 标本 细菌革兰染色玻片标本、大肠杆菌 24h 培养液。

试验原理

细菌个体微小,一般最大不超过几微米(μm)。而人肉眼分辨力约为 $250\mu\text{m}$,所以必须借助于普通光学显微镜(light microscope)将其放大 1000 倍左右才能看清细菌。光学显微镜(图 2-1)利用透镜的放大原理,故放大倍数与透镜的大小有关。油镜的透镜小,镜孔也小,观察时由于聚光器聚集的光源要通过载玻片、空气后才能进入物镜中,由于玻璃与空气的折光率不同,故易产生折射,使进入物镜的光线减少,致使所观察视野暗淡,物象不清。如在油镜与玻片中间加入和玻璃折光率($n=1.52$)相仿的香柏油($n=1.515$)则可减少折射(表 2-1),增加视野光线亮度,从而提高分辨率(图 2-2)。

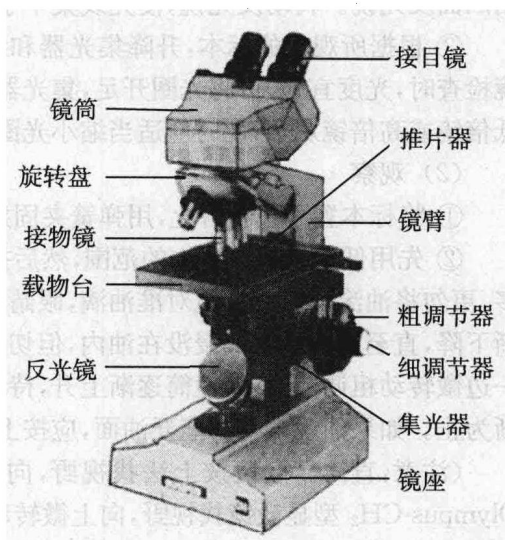


图 2-1 普通光学显微镜的构造

表 2-1 实验室中几种常用物质的折光指数

品名	玻璃	檀香油	香柏油	加拿大树胶	二甲苯	液体石蜡	松节油	甘油	水
折光指数	1.52	1.52	1.51	1.52	1.49	1.48	1.47	1.47	1.33

使用方法

1. 油镜辨认 普通光学显微镜的接物镜有低倍镜、高倍镜及油镜三种,检查微生物时

常用油镜,油镜头常见的标志是:

(1) 透镜直径最小(孔径数最大,为 1.25);

(2) 油镜头长度大于低倍镜和高倍镜,油镜头的下缘有一圈黑线或两圈红线;

(3) 有 oil 等字样;

(4) 有放大倍数 $100\times$ 或 $90\times$ 或 $95\times$ 的标记:若镜筒的长度不变,显微镜的放大倍数=接目镜倍数 $\times$ 接物镜的倍数。例如接目镜倍数为 $10\times$,接物镜倍数为 $100\times$,则放大倍数为 1000 倍。

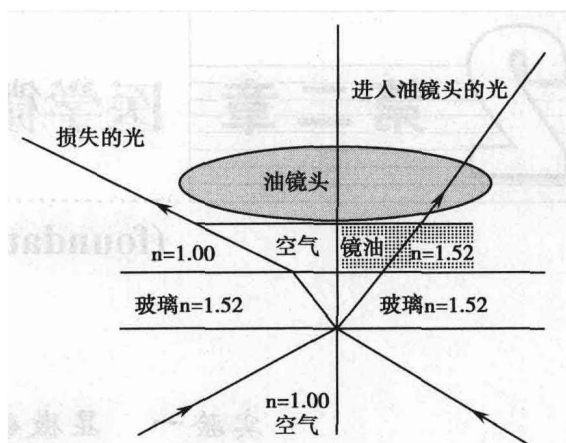


图 2-2 油镜加香柏油的原理

2. 具体应用 双手托持显微镜,轻放

于自己面前的试验台上,镜座距试验台边缘约 5 厘米。显微镜应直立于桌上,不要将镜臂和载物台倾斜,避免油滴外溢,影响观察。

(1) 对光

① 先用低倍镜对光,显微镜不能采用直接阳光作光源,因其光线过强,反而不易看清,且反射热有损光学装置,应采取间接日光为光源,使用平面反光镜;如采用灯光为光源时,宜用凹面反光镜。转动反光镜,使光线集中于集光器。

② 根据所观察的标本,升降集光器和缩放光圈,以获得最佳光度。一般染色标本用油镜检查时,光度宜强,可将光圈开足,集光器上升至与载物台相平。检查未染色标本时常用低倍镜或高倍镜观察,此时应适当缩小光圈,下降集光器,使光度减弱。

(2) 观察

① 将标本置于载物台上,用弹簧夹固定住标本,移动待检部位位于物镜下。

② 先用低倍镜找出标本的范围,然后提高镜筒,在标本的待检部位加一滴镜油,量勿过多,更勿将油涂开。用油镜对准油滴,眼睛从侧面看着油镜,将粗调节器缓缓移动,使镜筒逐渐下降,直至油镜的末端浸没在油内,但切勿碰到玻片,然后眼睛转移至目镜处,一边观察,一边微转动粗调节器,使镜筒逐渐上升,待看到模糊物象时,再改用细调节器转动到物象清晰为止。如果油镜末端已离开油面,应按上述过程重复操作。

(注意:直筒显微镜按上法找视野,向上微转动粗调节器是使镜筒徐徐上升,而使用 Olympus CH₂ 型显微镜找视野,向上微转动粗调节器则要使载物台徐徐上升。两者方向正好相反,一定要千万小心,以免压碎标本和损坏油镜头。)

③ 检查完毕,直筒镜则向上转动粗调节器将镜筒提起,双筒 Olympus 型显微镜则向下转动粗调节器将载物台下降,然后取下标本,用擦镜纸将油镜头上的油擦净。按要求将显微镜摆好、装好,放入镜箱中。

3. 显微镜的保护法

显微镜是精密的光学仪器,要特别注意爱护。

(1) 取送搬移时,要一手握住镜臂,一手托住镜座,轻拿轻放,避免碰撞。

(2) 细调节器是显微镜最精细而脆弱的部分,只能做轻微的来回旋转,不要只向一个方向转动数周以上。目镜、物镜、反光镜等光学部分,必须保持清洁,避免日光直接照射。各部

分结构切勿自行拆卸,以免损坏。强酸、强碱、氯仿、乙醚和酒精等均能去漆或损坏机件,应避免与显微镜接触。

(3) 油镜每次使用完毕,立即用擦镜纸(不能用布类或其他纸)拭去镜油,如油已干或透镜模糊不清,可用擦镜纸蘸乙醚酒精少许擦净,但必须随即用另一干擦镜纸拭去残留的乙醚酒精,以免掺入油镜内溶解用以粘固透镜的胶质,造成透镜移位或脱落,因此应尽量少用乙醚酒精。

(4) 保存:显微镜不用时,必须将接物镜转成“品”字形,并下降集光器和镜筒,用软绸拭净各部件后覆盖于接目镜上,放入镜箱或罩内,避免直射日光,置于干燥处,以防受潮。

注意事项

1. 显微镜是贵重精密仪器,使用时要精心爱护,不得随意拆装和碰撞。
2. 取送显微镜时应轻拿轻放,双手托持,一手握镜柱,一手托镜座,防止因震动受损。
3. 显微镜的调节器是精密而脆弱的部分,只能做有限的旋转,当旋转感到有阻力则表明已达极限,绝不能再继续向此方向旋转,必须立即向反方向旋转退回。
4. 油镜用完后一定要擦拭,以防油干而影响其使用寿命。
5. 使用油镜时,一定要等标本干后才能加香柏油,滴镜油时避免形成气泡。
6. 显微镜应放置在背阴干燥处,以防止透镜生霉。

思考题

1. 普通光学显微镜的最大放大倍数与分辨率是多少?
2. 使用油浸镜时为什么要加镜油?
3. 使用油镜时为什么选用香柏油作为物镜与玻片间的介质?是否可用液体石蜡代替香柏油?
4. 油浸镜有哪些标志?
5. 观察标本时,用左眼还是右眼或两眼都睁开?

实验二 细菌的基本形态观察

(Observation on the basic morphology of bacteria)

细菌属于原核细胞型微生物,细菌具有三种基本形态(球形、杆形和螺旋形)、四种基本结构(细胞壁、细胞膜、细胞质和核质)。由于细菌微小且为无色半透明,故需经适当染色并用显微镜放大后才能清楚地观察。根据细菌的形态、大小、排列方式及染色特性等,可对细菌进行初步鉴别。

实验目的

1. 掌握细菌的基本形态。
2. 熟悉各种细菌的排列方式及染色特性。

实验用品

革兰染色标本片

1. 细菌基本形态标本片

(1) 球菌(coccus): 葡萄球菌(*staphylococcus*)、链球菌(*streptococcus*)、淋病奈瑟菌(*N. gonorrhoeae*)、脑膜炎双球菌(*N. meningitidis*)。

(2) 杆菌(bacilli): 大肠埃希菌(*E. coli*)、炭疽芽胞杆菌(*B. anthracis*)、白喉棒状杆菌(*C. diphtheriae*)。

(3) 弧菌(vibrio):霍乱弧菌(*V. cholera*)。

2. 其他物品 光学显微镜、香柏油、乙醚酒精、擦镜纸。

实验方法

用显微镜油镜观察上述细菌革兰染色标本片,认识细菌的三种基本形态。观察时要注意细菌的形态、大小、排列及染色特性。

实验结果

1. 球形 革兰阴性菌(脑膜炎奈瑟菌和淋病奈瑟菌):镜下菌体呈红色,多数细菌成双排列。

革兰阳性细菌:葡萄球菌为紫色,呈葡萄状排列;链球菌呈紫色,链状排列。

2. 杆形 革兰阴性菌(大肠埃希菌):为短杆菌,菌体呈红色,排列不规则。

革兰阳性菌(白喉棒状杆菌和炭疽芽胞杆菌):均呈紫色,白喉棒状杆菌的一端或两端粗大呈棒状,并可见着色较深的颗粒;炭疽芽胞杆菌的菌体粗大,两端平齐,似竹节状排列。

3. 弧形 革兰阴性弧菌(霍乱弧菌):菌体只有一个弯曲,为逗点状,霍乱弧菌涂片染色后可见相互排列如“鱼群”状。

思考题

1. 观察细菌的基本形态有什么意义?
2. 细菌的基本形态有几种?

实验三 细菌的特殊结构观察

(observation of special structure of bacteria)

细菌具有四种特殊结构(荚膜、鞭毛、芽胞和菌毛),在体内或营养丰富的培养基上易形成荚膜;在体外、在营养等条件较差的情况下易形成芽胞,芽胞对外界抵抗力极强,进行消毒灭菌时,以是否杀死芽胞作为判断灭菌效果的指标。由于一个细菌只能形成一个芽胞,所以,芽胞的形成不是细菌的繁殖方式,而是细菌的一种休眠状态。鞭毛是细菌的运动器官。荚膜、鞭毛和菌毛位于菌体表面,与细菌的致病性及诱发免疫应答有关。

细菌的荚膜、鞭毛、芽胞和菌毛等特殊结构必须经过特殊染色后用光学显微镜或电子显微镜(如菌毛)才能看到,细菌的特殊结构有助于细菌的鉴别。

实验目的

熟悉细菌的特殊结构及其在医疗实践中的意义。

实验材料

1. 细菌的特殊结构标本片

(1) 鞭毛(flagellum):伤寒沙门菌(*S. typhi*)、霍乱弧菌(*V. cholera*)。

(2) 荚膜(capsule):肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)、产气荚膜梭菌(*C. perfringens*)。

(3) 芽胞(spore):破伤风梭菌(*C. tetani*)、炭疽芽胞杆菌(*B. anthracis*)。

2. 其他物品 光学显微镜、香柏油、乙醚酒精、擦镜纸。

实验方法

用显微镜油镜观察细菌的荚膜、鞭毛、芽胞特殊染色标本片。肺炎链球菌与产气荚膜杆菌的荚膜(荚膜染色法),注意观察菌体及荚膜的染色、形态特点。伤寒沙门菌与霍乱弧菌鞭毛(鞭毛染色法),注意观察菌体与鞭毛的染色、形态特点,鞭毛的数目、长短、位置。破伤风梭菌及炭疽芽胞杆菌(芽胞染色法),注意观察菌体、芽胞的形态、染色及芽胞在菌体中的

位置。

实验结果

1. 伤寒沙门菌(周毛菌) 为革兰阴性菌,经鞭毛染色后可见菌体周围有细长的数根丝状物,即为鞭毛。

2. 霍乱弧菌(单毛菌) 为革兰阴性菌,经鞭毛染色后可见菌体一端有细长的单根鞭毛。

3. 肺炎链球菌(荚膜) 为革兰阳性菌,成双排列。经荚膜染色后在菌体外周有一层透明的区域,即为荚膜。

4. 产气荚膜梭菌(荚膜) 为革兰阳性粗大杆菌,在菌体外有较厚的荚膜。

5. 破伤风梭菌(芽胞) 为革兰阳性菌,菌体顶端有一圆形、比菌体宽的结构,即为芽胞。芽胞与菌体相连似鼓槌状,是其独有的形态。

思考题

1. 细菌的特殊结构有几种?为什么在油镜下看不到菌毛?

2. 观察细菌的特殊结构有什么意义?

3. 细菌的特殊结构为什么要采用特殊染色法?

实验四 细菌动力的观察 (observation of bacterial motility)

有些细菌具有鞭毛,鞭毛是细菌的运动器官,具有鞭毛的细菌在液体环境中能够运动。无鞭毛的细菌在液体环境中受到液体分子冲击时,可发生原位颤动,称为布朗运动(Brownian movement)。在显微镜下观察细菌有无动力(即有无鞭毛)是鉴别细菌的依据之一。

实验目的

1. 了解镜下观察细菌动力的方法,学会区分真正的细菌运动与布朗运动。

2. 熟悉细菌不染色标本的观察方法。

试验原理

有鞭毛的细菌在液体培养基中从一处游到另一处,而无鞭毛的细菌无动力,当受到环境中液体分子的冲击,可发生细菌的颤动,以此可观察、了解细菌的运动能力。

实验用品

1. 菌种 变形杆菌及葡萄球菌 8~12h 肉汤培养物。

2. 器具 盖玻片、载玻片、凹玻片。

3. 试剂 凡士林。

实验方法

1. 悬滴法

(1) 取盖片一张,用取菌环取变形杆菌肉汤培养物一滴置于盖片中央,盖片四角涂少许凡士林。

(2) 使凹玻片反转,使凹窝对准盖片中央,粘住盖片后反转,使标本成悬滴(图 2-3)。

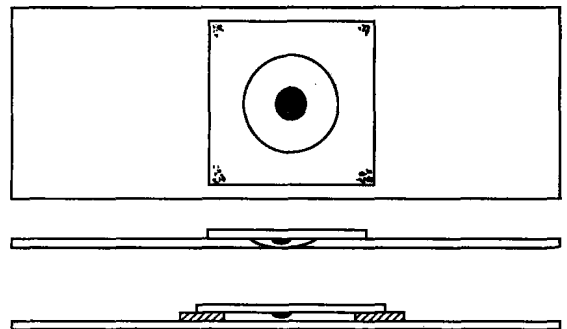


图 2-3 悬滴法

(3) 先用低倍镜找到悬滴边缘后,再换用高倍镜观察(因凹玻片较厚而油镜焦距很短,故一般不用油镜观察)。

2. 压滴法

(1) 用接种环取变形杆菌、葡萄球菌菌液 2~3 环,置于载玻片中央。

(2) 用镊子夹住盖玻片,覆盖在菌液上,放置时先使盖玻片一端轻触菌液,缓缓放下,以免产生气泡。

(3) 先用低倍镜找好位置,再换高倍镜观察。

实验结果

无论是悬滴法还是压滴法,均可见到有鞭毛的细菌(变形杆菌)发生位移现象,而没有鞭毛的细菌(葡萄球菌)则不发生位置变化。

思考题

1. 细菌动力检查有何实际意义?
2. 如何区分活菌运动与布朗运动?

实验五 细菌涂片标本的制备

(prepared nacterial smear of bacteria)

细菌染色前要先制备标本片,其过程分为涂片、干燥和固定三步。不同的标本可采取不同的涂片方法。

实验目的

1. 正确掌握细菌涂片标本的制备。
2. 熟悉涂片固定的目的和注意事项。

实验材料

1. 细菌培养物或临床标本。
2. 器具 玻片、取菌环、生理盐水等。

实验方法

1. 载玻片处理 载玻片应清晰透明,清洁而无油渍,滴上水后,能均匀展开,附着性好,如有残余油渍,可按下列方法处理。

(1) 滴上 95%酒精 2~3 滴,用清洁纱布擦拭,然后以钟摆速度通过酒精灯焰 3~4 次。

(2) 若上法仍未能除去油渍,可再滴上 1~2 滴冰醋酸,用纱布擦净,再在酒精灯火焰上轻轻拖过。

2. 涂片 取清洁无油脂的载玻片一张,用蜡笔做好标记,先画两个直径约 1.5 厘米的圆圈。用接种环在圆圈内各滴加少许生理盐水(注意:生理盐水切勿贪多)。将接种环灭菌后,从大肠杆菌平板或斜面培养物上取少许菌苔,混于盐水中涂成直径约 1 厘米的均匀薄膜,将接种环灭菌后,以同法将葡萄球菌在另一侧盐水中涂成薄膜,将接种环灭菌后才能放回架上。

若用液体培养物、痰、浓汁等材料制作涂片时,则不必先加盐水,可用接种环直接取标本涂成薄膜,接种环使用前后均须灭菌(图 2-4)。

3. 干燥 涂片最好在室温中自然干燥,必要时可将涂布面向上,断续地在弱火处略烘干,但切勿紧靠火焰,以免涂膜烤枯,细菌变形,染色后难以检视。

4. 固定 涂片干燥后,手持玻片的一端,涂布面向上,在酒精灯火焰上快速地来回通过

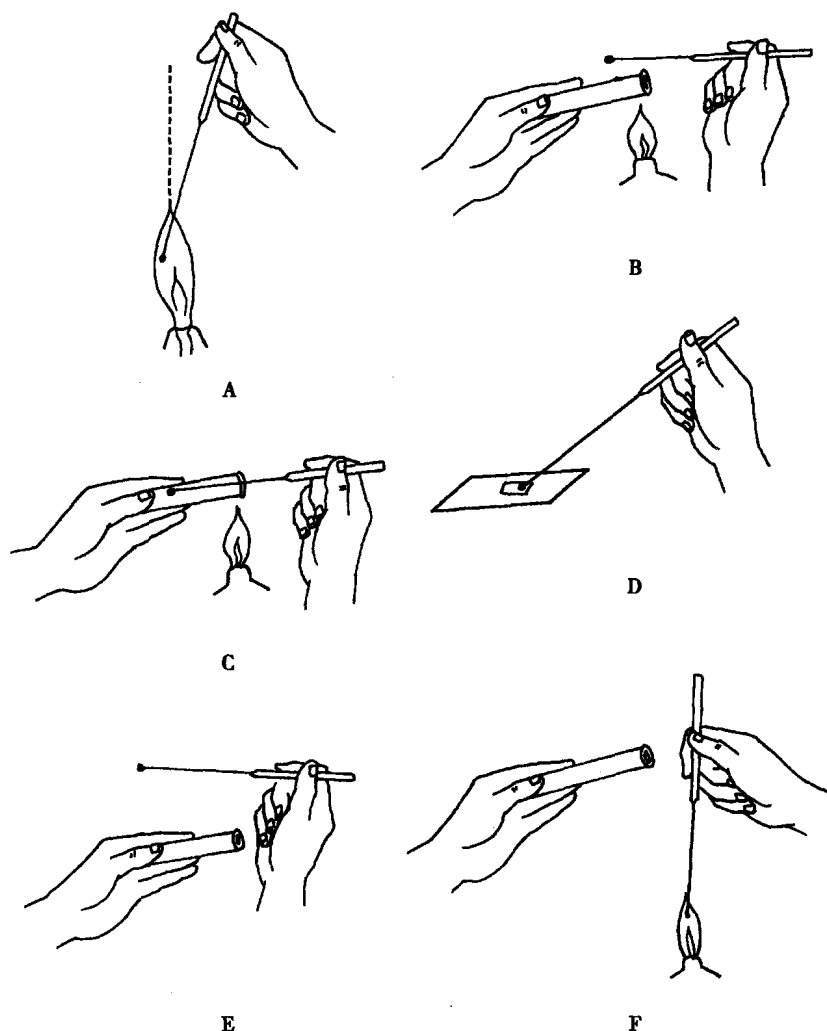


图 2-4 细菌涂片的制作

三次,共约 2~3 秒钟,注意温度不可太高,以玻片加温面触及皮肤觉微烫而尚能忍受为度。固定完毕,放置待冷后再进行染色。

根据染色类型的不同,除火焰固定外,有时可采用化学固定,将干燥好的玻片浸入甲醇中 2~3min 后取出晾干,或在涂片上滴加数滴甲醇使其作用 2~3min 后自然挥发干燥。此外,丙酮和酒精也可用作化学固定剂;而作瑞特氏染色的涂片则不需要固定,因染色液中含有甲醇,本身即有固定作用。

固定的目的是:

- (1) 使菌体蛋白凝固附着在载玻片上,以防染色过程中被水冲掉。
- (2) 改变细菌对染料的通透性,有利于细菌着色,因活细菌一般不允许染料进入细菌体内。
- (3) 能杀死涂片中的部分微生物。

注意事项

1. 在抹片固定过程中,实际上并不能保证杀死全部细菌,也不能完全避免在染色水洗时不将部分涂抹物冲掉。因此,在制备烈性病原菌,特别是带芽胞的病原菌抹片和染色时,