

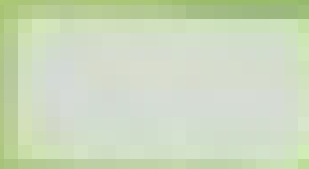
医药院校实验教材

病原生物学 实验指导



主编 韩 俭

清华大学出版社



中国植物志系列

植物生物学

实验指导

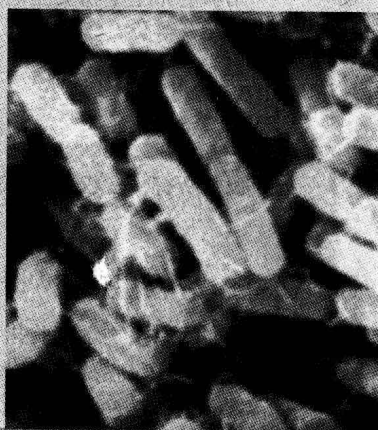
第三版



科学出版社

全国高等医药院校实验教材

病原生物学 实验指导



主编 韩 俭

清华大学出版社
北京

内 容 简 介

本实验指导将原属于医学微生物学实验教学的内容和人体寄生虫学实验教学的内容进行了合理、科学的归并和融合,在注重验证基本原理,培养基本技能的基础上,进一步密切结合临床实际,删除了部分已经被临床检验淘汰的实验,做到了基础结合临床。补充了病原微生物实验室生物安全的内容,有助于从源头上培养医科大学生树立生物安全的观念。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13701121933

图书在版编目(CIP)数据

病原生物学实验指导/韩俭主编. --北京:清华大学出版社, 2012.6

(全国高等医药院校实验教材)

ISBN 978-7-302-28600-4

I. ①病… II. ①韩… III. ①病原微生物—实验—医学院校—教材 IV. ①R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 072288 号

责任编辑:罗 健 王 华

封面设计:戴国印

责任校对:赵丽敏

责任印制:沈 露

出版发行:清华大学出版社

网 址: <http://www.tup.com.cn>, <http://www.wqbook.com>

地 址:北京清华大学学研大厦 A 座 邮 编:100084

社 总 机:010-62770175 邮 购:010-62786544

投稿与读者服务:010-62776969, c-service@tup.tsinghua.edu.cn

质 量 反 馈:010-62772015, zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn

印 装 者:北京国马印刷厂

经 销:全国新华书店

开 本:185mm×260mm

印 张:8.25

字 数:210 千字

版 次:2012 年 6 月第 1 版

印 次:2012 年 6 月第 1 次印刷

印 数:1~3000

定 价:16.80 元

产品编号:032419-01

编者名单

主 编 韩 俭

副主编 包根书

编者 (以姓氏拼音为序)

包根书 (兰州大学)

窦建琳 (兰州大学)

郭 璐 (兰州大学)

刘登宇 (广西医科大学)

杨海波 (广西医科大学)

周海霞 (兰州大学)

陈 根 (兰州大学)

杜宝忠 (西藏大学)

韩 俭 (兰州大学)

米友军 (西北民族大学)

殷祎隆 (西北民族大学)

祝秉东 (兰州大学)

PREFACE

前言

教育部于 1997 年进行了学科归并，将原来的医学微生物学和人体寄生虫学归并为病原生物学，随之不同版本的《病原生物学》教材相继问世，一定程度上推动了病原生物学学科的发展。《病原生物学实验指导》是根据当前学科建设和发展需求，为适应病原生物学医学本科实验教学而编写。同时，随着生命科学的迅速发展，新技术不断出现且逐渐应用于临床，而传统的医科类病原生物学实验教学往往注重验证基本理论和原理，因此亟待对基础实验内容进行补充和修改。

本实验指导将原属于医学微生物学实验教学和人体寄生虫学实验教学的内容进行了合理、科学的归并和融合，在尊重原学科特点的基础上主要做了以下改进：

注重共性和个性的关系。本实验指导中，尊重微生物和寄生虫实验个性特征的同时，将二者共同的实验内容部分汇总，总结出了实验技术、分子生物学方法、免疫学方法等章节，减少了篇幅。

在注重验证基本原理，培养基本技能的基础上，进一步密切结合临床实际，删除了部分已经被临床检验淘汰的实验，做到了基础结合临床。

补充了病原微生物实验室生物安全的内容，有助于从源头上培养医科大学生树立生物安全的观念。

本实验指导是由兰州大学、广西医科大学、西北民族大学和西藏大学四所大学从事病原生物学教学工作的教师共同完成。适用于临床、预防、口腔、检验、影像、麻醉医学及护理学专业本科教学。

由于作者的能力所限，教材中肯定存在许多不足之处，敬请同仁指正。

编 者

2012 年 2 月

第 1 篇 医学微生物学

第 1 章 病原微生物实验室生物安全····· 3

- 一、病原微生物分类及安全防护
级别····· 3
- 二、病原微生物实验室生物安全
防护····· 4
- 三、生物安全标识····· 5

第 2 章 细菌的形态检查····· 6

- 一、普通光学显微镜油镜的使用和
保护····· 6
- 二、细菌不染色标本检查法····· 7
- 三、细菌的革兰染色····· 8
- 四、细菌的基本形态和特殊结构
观察····· 9
- 思考题····· 9

第 3 章 细菌的生长与代谢····· 10

- 一、细菌培养基及制备····· 10
- 二、细菌的接种技术及培养物的
观察····· 11
- 三、细菌的培养方法····· 14
- 四、细菌的代谢产物检查····· 14
- 五、数字编码鉴定技术····· 17
- 思考题····· 18

第 4 章 外界因素对细菌代谢的影响····· 19

- 一、微生物分布检查····· 19
- 二、物理因素对细菌代谢的影响····· 20

- 三、化学因素对细菌代谢的影响····· 22
- 四、噬菌体裂菌试验····· 24
- 思考题····· 25

第 5 章 细菌的遗传与变异····· 26

- 一、细菌的形态变异····· 26
- 二、细菌的 H-O 变异····· 27
- 三、细菌的 S-R 变异····· 27
- 四、细菌的耐药性变异 (R 质粒接合
传递试验)····· 28
- 思考题····· 29

第 6 章 病原菌致病作用及动物实验····· 30

- 一、实验动物的选择原则及接种····· 30
- 二、肺炎链球菌致病性····· 32
- 三、细菌侵袭性酶的侵袭作用
观察····· 33
- 四、内毒素的致热作用及内毒素
检测····· 33
- 五、外毒素致病和抗毒素中和
试验····· 34
- 思考题····· 35

第 7 章 病原性球菌····· 36

- 一、病原性球菌的形态观察····· 36
- 二、病原性球菌血平板培养物
观察····· 36
- 三、血浆凝固酶试验····· 37
- 四、抗链球菌溶血素“O”测定····· 37

五、脓汁标本中病原性球菌的分离与鉴定	38	思考题	54
思考题	40	第 12 章 其他原核细胞型微生物	55
第 8 章 胃肠道感染细菌	41	一、螺旋体	55
一、常见胃肠道定居或感染细菌的形态观察	41	二、支原体	57
二、肠道杆菌的主要生化反应及菌落观察	41	三、衣原体	58
三、粪便标本中致病性肠道菌的分离和鉴定	43	四、立克次体	58
四、肥达反应	43	五、放线菌	60
第 9 章 厌氧性细菌	46	思考题	60
一、厌氧培养法	46	第 13 章 真菌学实验	61
二、厌氧芽胞梭菌和无芽胞厌氧菌的形态观察	47	一、真菌的形态结构观察	61
三、破伤风梭菌和产气荚膜梭菌培养物观察	47	二、真菌的培养物观察	61
四、破伤风外毒素与抗毒素中和试验	48	三、真菌性皮肤的镜检	62
五、产气荚膜梭菌的动物试验	48	四、白假丝酵母菌芽管形成试验	62
思考题	48	五、白假丝酵母菌厚膜孢子形成试验	62
第 10 章 分枝杆菌	49	思考题	63
一、齐-尼 (Ziehl-Neelsen) 抗酸染色法和金胺“O”荧光染色法	49	第 14 章 病毒学实验	64
二、结核分枝杆菌、麻风分枝杆菌的形态观察	50	一、鸡胚的接种和观察	64
三、结核分枝杆菌的培养	50	二、病毒的细胞培养法	65
思考题	51	三、病毒包涵体观察	67
第 11 章 其他病原菌	52	四、血球凝集和血球凝集抑制试验	67
一、病原菌形态观察	52	五、ELISA 法检测患者血清乙肝表面抗原	69
二、白喉棒状杆菌培养物观察	52	六、PCR 技术检测乙型肝炎病毒	70
三、白喉棒状杆菌的毒力试验	53	七、ELISA 法检测 HIV 抗体	71
四、铜绿假单胞菌培养物观察	54	思考题	72
五、流感嗜血杆菌培养时的卫星现象观察	54	第 2 篇 人体寄生虫学	
		第 15 章 线虫	75
		一、似蚓蛔线虫	75
		二、毛首鞭形线虫	75
		三、蠕形住肠线虫	76
		四、十二指肠钩口线虫与美洲板口线虫	76

五、班氏吴策线虫与马来布鲁 线虫..... 77	六、婢..... 92
六、旋毛形线虫..... 77	七、螨..... 93
思考题..... 77	思考题..... 93
第 16 章 绦虫..... 78	第 3 篇 病原生物实验室检测技术
一、肥胖带绦虫..... 78	第 20 章 病原生物形态检测及培养
二、链状带绦虫..... 79	常用技术..... 97
三、细粒棘球绦虫..... 80	一、细菌形态检测技术..... 97
四、微小膜壳绦虫、缩小膜壳 绦虫..... 81	二、细菌培养技术..... 99
五、曼氏迭宫绦虫..... 81	三、病毒形态检测技术..... 99
思考题..... 82	四、病毒培养技术..... 99
第 17 章 吸虫..... 83	五、真菌形态检测技术..... 102
一、日本血吸虫..... 83	六、真菌培养技术..... 103
二、华支睾吸虫..... 84	七、寄生虫形态学检测技术..... 103
三、卫氏并殖吸虫..... 85	八、原虫培养技术..... 109
四、布氏姜片吸虫..... 85	第 21 章 病原生物检测常用免疫学
思考题..... 86	技术..... 110
第 18 章 原虫..... 87	一、玻片凝集试验..... 110
一、阿米巴原虫..... 87	二、试管凝集反应..... 110
二、蓝氏贾第鞭毛虫..... 88	三、对流免疫电泳..... 110
三、阴道毛滴虫..... 88	四、血凝抑制试验..... 111
四、疟原虫..... 88	五、酶联免疫吸附试验..... 111
五、杜氏利什曼原虫..... 89	六、蛋白印迹技术介绍..... 112
六、刚地弓形虫..... 90	思考题..... 113
七、隐孢子虫..... 90	第 22 章 病原生物检测常用分子
思考题..... 90	生物学技术..... 114
第 19 章 医学节肢动物..... 91	一、细菌基因组 DNA 制备..... 114
一、蚊..... 91	二、细菌 DNA 中 (G+C) mol% 测定..... 115
二、白蛉..... 91	三、多聚酶链式反应..... 116
三、蝇..... 92	四、细菌 16s rRNA 基因分析..... 117
四、蚤..... 92	五、DNA 芯片技术介绍..... 117
五、虱..... 92	参考文献..... 119

第 1 篇

医学微生物学

第 1 章 病原微生物实验室 生物安全

〔目的〕

1. 掌握病原微生物安全分类及安全防护级别。
2. 熟悉病原微生物实验室生物安全防护，熟知生物安全标识。

一、病原微生物分类及安全防护级别

根据病原微生物的传染性、感染后对个体或者群体的危害程度，中华人民共和国第 424 号国务院令《病原微生物实验室生物安全管理条例》中将病原微生物可分为以下 4 类。根据卫生部制定的《人间传染的病原微生物名录》（2006 年 1 月 11 日），每一类又包括若干种（表 1-1）。

表 1-1 病原微生物生物安全分类

病原微生物生物安全分类	要 求	数 目
第一类	指能够引起人类或者动物非常严重疾病的微生物，以及我国尚未发现或者已经宣布消灭的微生物	包括 29 种病毒
第二类	指能够引起人类或者动物严重疾病，比较容易直接或者间接在人与人、动物与人、动物与动物间传播的微生物	包括 51 种病毒、4 种朊粒、10 种原核细胞型微生物、4 种真菌
第三类	指能够引起人类或者动物疾病，但一般情况下对人、动物或者环境不构成严重危害，传播风险有限，实验室感染后很少引起严重疾病，并且具备有效治疗和预防措施微生物	给人类致病的常见微生物主要属于第三类微生物
第四类	指在通常情况下不会引起人类或者动物疾病的微生物	

第一类、第二类病原微生物统称为高致病性病原微生物。

根据病原体的危害程度，病原微生物实验室的生物安全防护水平（biosafety level, BSL）可分为 4 级，分别以 BSL-1、BSL-2、BSL-3 和 BSL-4 表示，其中 BSL-4 的防护级别最高。不同生物安全防护水平的实验室的基本要求简介如下。

1. BSL-1 实验室：普通建筑物即可，有防止节肢动物和啮齿动物进入的设计。在靠近出口处设洗手池、挂衣装置。墙壁、天花板和地面应平整、易清洁。实验室有适当的消毒设备。

2. BSL-2 实验室：满足 BSL-1 要求。实验室门应带锁、可自动关闭并有可视窗。在实验室内应使用专门的工作服，应戴乳胶手套。配备生物安全柜、高压蒸汽灭菌器和洗眼设施。实验室出口应有在黑暗中可明确辨认的标识。

3. BSL-3 实验室：在建筑物中自成隔离区或为独立建筑物。由清洁区、半污染区和污染区组成，应有备用电源。安装独立的送排风系统以控制实验室气流方向和压力梯度，确保实验室内不出现正压和生物安全柜内气流不倒流。有符合生物安全工作要求的Ⅱ级和Ⅲ级生物安全柜。在污

染区和半污染区出口处设非手动开关洗手装置。清洁区设置淋浴装置。下水直接通往独立的液体消毒系统集中收集，经有效消毒后处置。

4. BSL-4 实验室：分为安全柜型、正压服型和混合型实验室。

安全柜型 BSL-4 实验室建造在独立建筑物内或建筑物中独立的完全隔离区域内，该建筑物远离城区。由清洁区、半污染区和安放有Ⅲ级生物安全柜的污染区组成。气流及压力梯度的要求同 BSL-3 实验室。

正压服型 BSL-4 实验室由 BSL-4 级实验设施、Ⅱ级生物安全柜和具有生命支持供气系统的正压防护服组成。进入污染区的工作人员应穿着正压防护服。

BSL-1 和 BSL-2 防护级别的实验室不得从事高致病性病原微生物实验活动。BSL-3 和 BSL-4 实验室在满足相关条件后方可从事高致病性病原微生物的实验活动。

在动物感染的实验研究中，以 ABSL-1、ABSL-2、ABSL-3、ABSL-4 表示包括从事动物在体 (in vivo) 操作实验室的相应生物安全防护水平。动物实验室同时应考虑动物实验操作（如染毒、医学检查、取样、解剖、动物尸体及排泄物的处置等）过程产生的潜在生物危害的防护。应特别注意对动物源性气溶胶的防护，例如对感染动物的剖检应在负压剖检台上进行。

二、病原微生物实验室生物安全防护

1. 生物安全柜 (biological safety cabinet, BSC)：生物安全柜为负压过滤排风柜。可防止操作

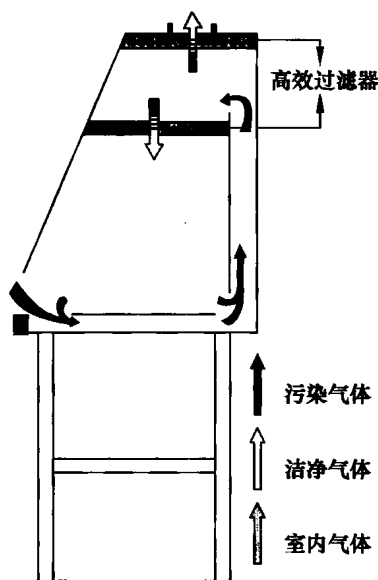


图 1-1 生物安全柜工作原理示意图 (侧面)

者和环境暴露于实验过程中产生的生物气溶胶。其防护原理如下：送入安全柜工作区的空气经过高效空气过滤器 (high efficiency particulate air filter, HEPA) 过滤，在安全柜内形成百级洁净度的环境，从而保护了操作对象；从安全柜排出的空气经过 HEPA 过滤释放，以保护环境；安全柜内形成的副压和气幕可以防止气溶胶外泄，从而保护了操作者 (图 1-1)。根据正面气流速度，送风、排风方式，将生物安全柜分为Ⅰ级、Ⅱ级和Ⅲ级 3 种类型。可产生含生物因子气溶胶的操作均应在生物安全柜中进行。

2. 个人防护装备：生物安全实验室必须要求有符合国家标准的相关个人防护装备。包括防护服、口罩 (包括 N95 口罩和 N98 口罩)、手套、安全眼镜、面部防护罩、防水鞋套、紧急洗眼器等，必要时配备个体独立呼吸器。当防护服被危险材料污染时应立即更换，离开实验室区域之前应脱去防护服。

高致病性病原微生物必须在 BSL-3 和 BSL-4 防护级别的实验室从事实验活动，个人防护要求级别高。

生物安全第三类的病原微生物，在进行活菌操作时，一般要求在符合 BSL-2 防护级别实验室的生物安全柜中进行，要求穿工

作服，戴手套。试验时如发生污染要及时进行消毒处理。

3. 建立实验室安全管理体系：病原微生物实验室必须建立完善的实验室生物安全管理体系。

(1) 成立生物安全委员会：明确实验室生物安全负责人及责任制；强化实验室日常管理如人员培训考核，领取登记、灭菌登记制度，研究人员的免疫，消毒隔离制度，实验室准入制度，事件、伤害、事故和职业性疾病的报告制度，危险标识制度，意外事故的紧急处理及撤离制度，各类垃圾的处理制度等。

(2) 制定、完善和执行标准操作规程。

(3) 安全的工作行为：进入病原微生物实验室的各类工作人员，必须熟悉和执行各项管理制度。养成良好的洗手习惯；接触生物源性材料时做好防护工作，使用合适、合格的器械和材料。应培训实验室工作人员安全操作尖利器具及装置。禁止用手对任何利器剪、弯、折断、重新戴套或从注射器上移去针头。实验室内尽可能减少使用刀、剪等利器，尽量采用替代品；正确使用生物安全柜，防范气溶胶产生、扩散及吸入；妥善处理感染性、损伤性及化学性废弃物。

(4) 对进入实验室工作的各类人员进行病原微生物实验生物安全培训和考核，考核合格者方可进入实验室工作和学习。

医学类本科生初次进入病原微生物实验室，任课或辅导教师必须对他们进行实验室生物安全的系统培训，培养他们建立病原微生物实验室的安全工作行为。这将对顺利、安全地完成《医学微生物学》实验教学及今后从事病原微生物相关的工作打下坚实的基础。



图 1-2 生物安全标识

三、生物安全标识

生物安全标识见图 1-2。

(韩 俭)

第2章 细菌的形态检查

[目的]

1. 熟悉普通光学显微镜油镜的使用和保护技术。
2. 掌握细菌染色制片及革兰染色方法、结果判断。
3. 掌握细菌的基本形态和特殊结构。
4. 了解细菌不染色标本的观察方法。

一、普通光学显微镜油镜的使用和保护

微生物的个体微小，肉眼难以看见，必须借助显微镜（microscope）才能观察到，因此，显微镜是进行微生物研究必需的实验工具。显微镜种类很多，包括光学显微镜、电子显微镜、相差显微镜、暗视野显微镜、荧光显微镜等。不同显微镜的原理和用途各异。此处仅介绍普通光学显微镜的使用及其保护。

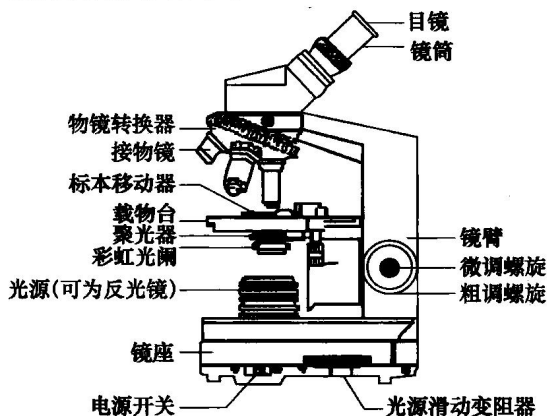


图 2-1 光学显微镜结构模式图

普通光学显微镜是 1676 年由荷兰人 Antony van Leeuwenhoek 发明，由一组光学系统和支持及调节光学系统的机械系统组成（图 2-1）。光学显微镜的接物镜包括低倍镜、高倍镜和油镜，其放大倍数依次为 10 倍、40 倍和 100 倍。目镜的放大倍数为 10 倍。显微镜的放大倍数以接物镜放大倍数乘以目镜的放大倍数计算。光学显微镜以可见光为光源，可见光的波长为 $0.4\sim 0.7\mu\text{m}$ ，平均约 $0.5\mu\text{m}$ 。光学显微镜的分辨率为光波波长的一半，即 $0.25\mu\text{m}$ ，经油镜放大 1000 倍后可达 0.25mm 。人的肉眼便能看清。一般细菌直径都大于 $0.25\mu\text{m}$ ，因此可用光学显微镜观察形态。

1. 油镜的使用原理：油镜头的放大倍数大，但是透镜的孔径小。当光线经过玻片经空气进入镜头时，由于玻璃和空气的介质密度不同而发生折射现象，使得进入镜头的光线少而视野不清。采用与玻璃折光率（ $n=1.52$ ）相近的介质香柏油（ $n=1.515$ ）加于玻片和油镜之间，减少了光的折射，增加了进入透镜的光线，使视野的亮度增加，获得清晰的物象（图 2-2）。

2. 油镜的使用方法

（1）显微镜直立于桌面，勿将镜臂弯曲，以免液体标本和镜油流出。将标本（标本面向上）置于载物台上。

（2）光源及调光：显微镜可以以间接自然光、日光灯或钨丝灯光作为光源。用低倍镜（ $10\times$ ）对光，左眼通过目镜观察，用手调节反光镜，自然光源用平面镜，日光灯用凹面反光镜。如果是

钨丝灯光，需加蓝色滤光片除去黄光。自带电源灯光的显微镜，在开启电源后可用光源滑动变阻器调节光线的强弱。根据需要调节聚光器的高低和光圈的大小。一般检查未染色标本（如活菌运动）时，光线应弱一些，此时需降低聚光器，缩小光圈。检查染色标本时需光线强，应将聚光器升到最上，光圈完全打开。

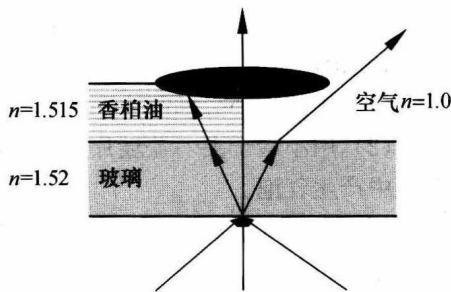


图 2-2 使用油镜时加镜油的原理

(3) 显微镜调节：将载玻片上标本所在部位移动到视野中央，用低倍镜找出标本的视野，寻找到需要观察的目标，移动到视野最中央。微生物标本可能在低倍镜下看不清具体的目标，可将标本存在的部位移到视野中央。于标本上滴加镜油 1 滴，换用油镜观察。要

准确识别油镜头，油镜头上标有放大倍数（100×）或刻有“HI”（homogore immersions）、“oil immersion”的字样（切忌将高倍镜误认为油镜使用）。将油镜头转到中央后，用眼从侧面观察，转动粗螺旋，使载物台缓缓上升（或油镜头缓缓下降），至油镜浸入油中接近玻片为止（注意调节粗螺旋时不要用力过猛、过急，以免损坏镜头或压坏标本）。然后用左眼通过目镜观察，同时再沿相反方向缓缓转动粗螺旋下降载物台或上升油镜头，当见到模糊图像时，停止使用粗螺旋，转动细螺旋，上下调节即可见到清晰的物象。

(4) 标本观察：观察标本时，两眼宜同时睁开，减少眼睛疲劳，最好用左眼观察，右眼配合绘图和记录。一边观察，一边移动标本片，寻找理想的视野仔细观察。

(5) 油镜使用后的处置：转动粗螺旋，使载物台下降（或使镜筒上升），取出标本玻片，用擦镜纸擦去油镜上的香柏油，再用擦镜纸蘸少量二甲苯（不能用酒精）擦去沾在油镜上的镜油，最后用擦镜纸擦净二甲苯。长期不用时，把镜头转成“八”字形，套上镜套放入显微镜柜中。

3. 显微镜的保护要点

(1) 显微镜应放置在通风干燥，灰尘少，不受阳光直接曝晒的地方，不使用时，用有机玻璃或塑料布防尘罩罩起来，也可套上布罩后放入显微镜箱内或显微镜柜内，并在箱或柜内放置干燥剂，防止长霉。

(2) 显微镜要避免与酸、碱、乙醚和酒精等化学物品接触，以免受损。

(3) 搬动时应一手提镜壁，另一手托镜座，让显微镜直立，防止目镜从镜筒中脱落。不得随意拆卸零部件。

(4) 保持目镜和接物镜的清洁。特别是油镜使用后，用擦镜纸蘸少量二甲苯擦去镜油，再用擦镜纸擦净二甲苯。

二、细菌不染色标本检查法

〔原理〕鞭毛（flagellum）是细菌的运动器官，有鞭毛的细菌能在液体环境中自由运动，其运动有趋向性，常向营养物质处运动或逃离有害物质。许多杆菌与弧菌有鞭毛，球菌一般无鞭毛。不染色标本直接观察可用于某些细菌活菌运动的鉴别和诊断。如患者“米泔水样”的粪便滴片观察有助于霍乱弧菌感染的快速诊断。常用压滴法或悬滴法。

〔仪器和材料〕

1. 培养基和菌种：肉汤培养基、葡萄球菌、变形杆菌。

2. 器材：光学显微镜、载玻片、凹玻片、盖玻片、凡士林、小镊子。

[方法] 取葡萄球菌和变形杆菌菌种，接种肉汤培养基，37℃培养 12 小时备用。

1. 压滴法

(1) 用接种环分别蘸取葡萄球菌及变形杆菌菌液 2~3 环，置于洁净载玻片中央。

(2) 用小镊子夹一盖玻片，先使盖玻片一边接触菌液，然后缓慢放下，覆盖于菌液上，避免菌液中产生气泡。

(3) 先用低倍镜观察，找到标本所在部位，再换高倍镜观察细菌运动。在观察时应下降聚光器、缩小光圈，以减少光亮，使视野变暗，有助于观察。

2. 悬滴法

(1) 取洁净凹玻片 2 张，在每个凹窝四周涂凡士林少许。

(2) 用接种环分别取 1 环变形杆菌和葡萄球菌肉汤培养物加于盖玻片中央。

(3) 将 2 张凹玻片分别倒合于盖玻片上，使凹窝中央正对菌液。

(4) 迅速翻转载玻片，用小镊子轻压盖玻片，使之与凹窝边缘粘紧封闭，以防水分蒸发。

(5) 先用低倍镜找到悬滴，再换高倍镜观察。

[结果] 变形杆菌运动活泼，可向不同方向迅速运动，位置移动明显。葡萄球菌不能作真正运动，但受水分子的撞击即在一定范围内作往复颤动（布朗运动），位置移动不大。

三、细菌的革兰染色

细菌菌体小且呈半透明，除观察活菌运动外，一般需染色后才能较清楚观察。常用的染色方法包括单染法、复合染色法和负染法 3 大类（详见第 3 篇）。此处仅介绍常用的革兰染色法（Gram stain）。

革兰染色法是 1884 年由丹麦细菌学家 Hans Christian Gram 发明的染色方法。通过革兰染色，可将细菌分为革兰阳性菌和革兰阴性菌。革兰染色的结果具有重要意义：① 鉴别细菌：标本中的细菌经革兰染色后，可根据其形态、排列和染色性初步识别细菌，缩小鉴别范围，有助于进一步鉴定；② 帮助临床选择用药：革兰阳性菌和革兰阴性菌对不同抗生素的敏感性不同；③ 判断细菌的致病性：革兰阳性菌和革兰阴性菌产生的致病物质及致病机制不同，前者主要通过产生外毒素致病，后者既可能产生外毒素，又可能产生内毒素致病。

[原理] 革兰染色的原理尚未完全明确，一般认为和细菌细胞壁结构、等电点等有关。革兰阳性菌细胞壁厚，肽聚糖达 20~50 层，肽聚糖立体网状分子形成一种透性障，当乙醇脱色时，肽聚糖脱水而孔隙缩小，阻止结晶紫-碘复合物被脱掉，同时，革兰阳性菌的等电点为 2~3，与碱性染料结合更牢固。因此最后呈紫色。革兰阴性菌肽聚糖层薄，交联松散，乙醇脱色不能使其结构收缩，同时乙醇可以破坏细胞壁外层的脂含量高的外膜，将结晶紫-碘复合物溶出细胞壁。同时革兰阴性菌的等电点为 4~5，与碱性染料的结合不及革兰阳性菌牢固。因此用稀释复红复染后被染成红色。

[仪器和材料]

1. 取葡萄球菌和大肠埃希菌 18 小时的肉汤培养液各 1ml，混合后制成试验用菌液。

2. 染色液：结晶紫溶液，卢戈（Lugol）碘液，95%乙醇溶液，稀释复红染液。

3. 其他：显微镜、载玻片、吸水纸、记号笔、接种环、酒精灯、香柏油、擦镜纸、二甲苯。

[方法]

1. 制片：取洁净载玻片 1 张，用记号笔在一面的中央画一约 $\phi 1\text{cm}$ 的圈。接种环灭菌后蘸取菌液一环，小心涂在载玻片另一面的圈内。涂片时必须注意应轻轻操作。猛烈的动作会改变菌细胞原有的排列形式，或造成细菌鞭毛脱落，影响结果的准确性。涂片后自然干燥，并经火焰 3 次