

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

病原生物学实验

主 编 金志雄 杨树国



科学出版社

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

病原生物学实验

主 编 金志雄 杨树国

副主编 郭鄂平 李 蓓 李 健

编 委 (按姓氏笔画排序)

王 娅	冯桂香	朱名胜	朱明磊
杨飞翔	杨树国	杨 靖	李 健
李 蓓	邱 红	欧 琴	金志雄
胡筱梅	徐 祥	郭鄂平	熊 琛

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话：010-64030229；010-64034315；13501151303（打假办）

内 容 简 介

本教材包括医学微生物学和人体寄生虫学实验，适用于医学本科相关专业，可选择性应用于医学专科和非医学专业教学的需要。实验内容分为基本实验、经典验证型实验、综合型实验和科研创新型实验四个板块，内容编排遵循由易到难、由基础到创新的原则。实验内容结合我校正进行的感染模块教学改革和科研方向，具有实用性和创新性。

图书在版编目(CIP)数据

病原生物学实验 / 金志雄, 杨树国主编. —北京: 科学出版社, 2014.8
高等医药院校基础医学实验教学系列教材
ISBN 978-7-03-041646-9

I. 病… II. ①金… ②杨… III. 病原微生物-实验-医学院校-教材
IV. R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 186638 号

责任编辑：邹梦娜 / 责任校对：包志虹
责任印制：肖 兴 / 封面设计：范璧合

版权所有，违者必究。未经本社许可，数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

新科印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014 年 8 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2014 年 8 月第一次印刷 印张：12 彩插：8

字数：277 000

定价：38.00 元

（如有印装质量问题，我社负责调换）

《高等医药院校基础医学实验教学系列教材》

编写指导委员会

主 任	涂汉军				
副 主 任	魏文芳	严世荣			
委 员	(按姓氏笔画排序)				
	王汉琴	朱名安	刘 涛	严世荣	李国华
	张 鹏	赵万红	郭 阳	涂汉军	魏文芳
丛 书 主 编	赵万红	朱名安			
丛书副主编	王汉琴	郭 阳	张 鹏		
编 委	(按姓氏笔画排序)				
	王汉琴	石 蕾	朱名安	刘长俊	李文春
	杨 虹	杨树国	张 鹏	国宏莉	金志雄
	赵万红	姚柏春	郭 阳	郭怀兰	唐 微
	黄 琪	曾凡龙	鄢红春		

总 序

随着现代生命科学及其各种实验技术的飞速发展和高校教学模式的改革,现代高等医学教育更加强调培养学生的探索精神、科学思维、实践能力和创新能力。这就要求从根本上改变实验教学依附于理论教学的传统观念,要从人才培养体系的整体出发,建立以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的科学实验教学体系,使实验教学与理论教学既有机结合又相对独立。同时,必须加大对实验项目、实验条件、实验教学体系的改革力度,改革传统的以教研室为单位的教学实验室模式,整合完善现代医学实验室功能和管理,从而提高医学实验教学质量。

本系列实验教材共9种,包括《医学大体形态学实验(人体解剖学分册)》《医学大体形态学实验(系统解剖学与局部解剖学分册)》《医学显微形态学实验》《病原生物学实验》《医学免疫学实验》《医学生物化学与分子生物学实验》《医学细胞生物学与医学遗传学实验》《预防医学实验》和《医用化学实验》。系统介绍了系统解剖学、局部解剖学、组织胚胎学、病理学、医学免疫学、病原生物学、生物化学与分子生物学、医学细胞生物学和医学遗传学、预防医学和医用化学的实验研究所必需的知识与技术。编写理念是将实验教学按照建设国家实验教学示范中心要求的实验教学模式,借鉴国内外同类实验教材的编写方法,力求做到体系创新、理念创新及编写精美。内容上将基础医学实验教学按照基础医学实验体系进行重组和有机融合,按照实验教学逻辑和规律,将实验内容按模块层次进行编写,基本上包括:①实验操作及常用仪器使用;②基本实验或经典验证性实验;③综合性实验;④研究创新性实验等。不同层次学生可按照本专业培养特点和要求,对不同板块的必选实验项目和自选实验项目进行适当取舍。

其基本理念和设计思路具有以下特点:

1. 明确目标,准确定位 本系列实验教材编写过程中增加了临床应用多、意义较大的实验内容,适当选编新的内容,力求突出基础医学知识在医学相关专业临床工作中的应用。

2. 突出能力,结合专业 以“自主学习能力、临床执业能力”培养为根本,将各学科的相关知识与临床实践应用“链接”为一体,增强学生学习兴趣,突出应用能力培养,提高学生自主学习能力和学习效果。教材重视生命科学研究中如何发挥学生观察、分析与思辨能力的培养,主要任务是使大学生通过动手,得到实验技术的基本操作技能训练、科学思维和创新能力的培养,同时也要使他们初步了解或掌握先进技术和方法,与迅速发展的学科前沿接轨。

3. 增减内容,突出重点 本系列实验教材在编写过程中,坚持基本理论和基本知识以“必须、实用、够用”的原则。实验内容去旧增新,删繁就简。将原来一些经典实验与现代科学思维相结合,适当压缩,并进行内容和教学方法的改革。对原书的插图进行了精选。对所开设的每一个实验要求达到的培养目标作了清晰而明确的阐述。

4. 整体优化,彰显特色 教材在整体结构上,既考虑到教与学的传统习惯,力求整体上系统化,又考虑到教材内容的创新,体现教材的思想性和先进性;在教材内容的编写

上突出专业特色,体现专业特点,强化知识应用,部分教材增加实验流程图以及实验要点和实验结果图的应用,使系列教材具有更广泛的适应性;在结构及内容编排上条理清楚,层次分明,充分体现规范化特点。为扩大学生的知识面,启发其思维,根据每个部分的内容在临床工作中的应用情况,精选相关内容与临床密切相关的学科知识和有应用前景的新进展和新技术,将各相关学科有机结合在一起,具有基础扎实、应用性强、科研创新性突出的优势。

本系列教材的使用对象以本科临床医学专业为主,兼顾预防、麻醉、口腔、影像、药学、检验、护理、康复、生物科学与生物技术、公共事业管理、信息管理与信息系统等专业需求,涵盖全部医学生的基础医学实验教学。

由于基础医学实验教学模式尚存在地区和校际间的差异,本系列教材可能存在偏颇之处,也会有不足和疏漏,敬请广大医学教育专家和同学提出宝贵意见,以便修订再版。

《高等医药院校基础医学实验教学系列教材》编委会

2014年7月

前 言

《病原生物学实验》包括医学微生物学和人体寄生虫学两个学科的内容，是一本服务基础、临床和科研的实验教材。本书编写的原则是以加快实用、创新型医学本科人才培养为目标，强调学生观察能力、操作能力、运用能力和创新能力的培养。教材内容按照基本实验、经典验证性实验、综合性实验和科研创新性实验等顺序编写、排列，体现了操作技术由基本到验证，由综合应用到创新的过程。依据湖北医药学院构建新型模块教学的大纲要求，以病原学科目前开展的科研方向为主，为优秀学生提供了研究方向，也有利于学科研究水平的有序推进。

本教材适用于临床、麻醉、影像、检验、口腔、药学、全科医学和生物科学等本科专业，兼顾护理本、专科的病原生物学实验教学。同时，本教材也是指导本科生开展科研工作的参考书。

本书的出版得到了湖北医药学院领导、教务处及教材科的大力支持与帮助，在此表示衷心的感谢。

本教材编写过程中，广泛征求了参加《病原生物学实验》教材主编和编委们的意见。但限于编者的水平和能力，在内容和安排上难免有不足之处，恳请广大同行和读者批评指正。谢谢！

金志雄 杨树国

2014年6月12日

目 录

绪言	1
----------	---

上篇 医学微生物学实验

第一章 基本实验	3
第一节 细菌形态结构的观察	3
第二节 细菌的人工培养	9
第三节 消毒灭菌技术	14
第四节 细菌的药物敏感性试验	19
第五节 细菌的遗传与变异	22
第六节 细菌代谢产物的检测	26
第二章 经典验证性实验	31
第一节 化脓性球菌	31
第二节 肠道杆菌	36
第三节 厌氧性细菌	40
第四节 呼吸道感染细菌	44
第五节 其他微生物	48
第六节 真菌	53
第七节 病毒	58
第三章 综合性实验	67
第四章 科研创新性实验	87
附录	92

下篇 人体寄生虫学实验

第五章 基本实验	104
第六章 经典验证性实验	109
第一节 医学蠕虫	109
第二节 医学原虫	133
第三节 医学节肢动物	142
第七章 综合性实验	154
第八章 科研创新性实验	163
第九章 病例分析	165
第一节 医学微生物学实验	165
第二节 人体寄生虫学	168

彩图

绪 言

随着社会经济的发展、世界文化的交流、人类生活的改善和行为方式的改变以及环境、气候的变化,人类感染性疾病的“病原谱”也在发生着变化,多重耐药性病原体的产生和新发病原体因子的出现,使人类仍面临着与病原生物斗争的严峻挑战。

病原生物学实验是病原生物学理论教学的重要组成部分,是临床微生物(包括病毒、细菌、立克次体、衣原体等)和寄生虫(包括原虫、蠕虫、医学节肢动物等)等感染疾病的主要诊断依据,也是培养学生实际操作、思维、科研和创新能力的基礎。

一、实验目的与要求

通过实验,加深、巩固对理论内容的理解与记忆;学习、掌握病原学的基本实验方法和操作技术,树立无菌观念;通过综合型和创新型实验设计的讨论和实验结果的分析,培养学生科学的态度、思维方法以及独立分析问题和解决问题的能力。病例分析做到了理论联系实际,为以后的临床工作奠定坚实的基础。

为了提高实验课效果,保证实验课质量,要求学生做到:

- (1) 每次实验前必须做好预习,明确实验目的、原理、方法及操作中的注意事项等,避免和减少发生错误。
- (2) 实验过程中必须持严肃认真的态度。对操作的实验要按步骤依次进行操作,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,得出结论。
- (4) 独立或协同完成实验,书写实验报告要字迹清楚,语言简练,表格清晰,画图应力求反映实际标本的原状。
- (5) 遵守实验室规则。

二、实验室规则

病原生物学实验的对象大多为病原微生物和寄生虫,教学活动涉及实验室生物安全。避免实验操作人员感染,防治实验室污染源泄露对环境和公众健康的威胁。同时,为培养学生严肃态度、严格作风、严密方法的科学工作习惯,保证实验的效果,在实验教学中应严格遵守实验室生物安全的规范:

- (1) 书包、衣物等勿带入室内。实验必备的书籍和文具等应放置的非操作区,以免污染。
- (2) 进入实验室应穿好隔离衣、戴好帽子和口罩。
- (3) 保持实验室肃静,维持室内秩序,不得高声谈笑和随处走动。
- (4) 实验室内禁止饮食和吸烟,不得用嘴舔湿铅笔和标签等。
- (5) 认真进行各项实验,严格掌握无菌技术。
- (6) 实验中发生差错或意外事故时,应立即报告教师及时处理。切勿隐瞒或自作主张

不按规定处理。如发生有病原材料污染桌面、衣物等,应立即用抹布浸蘸 2%~3%甲酚皂溶液(来苏儿)或 5%苯酚溶液,覆在污染部位,经 30min 后方可抹去。如手上沾有活病原微生物也应用上述消毒液浸泡 10min 左右,再以肥皂及自来水反复洗净。

(7) 易燃物品(乙醇、二甲苯等)不准接近火源。一旦起火,应迅速用沾水的布类和沙土覆盖扑火。

(8) 要爱护室内仪器设备,按使用规则操作,不得随意拨动电器开关。显微镜用后要擦净,各功能部件复位,登记使用情况后放入显微镜柜内。要节约使用实验材料,如不慎损坏,应报告教师进行登记。

(9) 实验完毕应整理桌面,关好水、电及煤气开关。

(10) 离开实验室前应洗手,必要时消毒液泡手,用自来水冲洗干净。轮流值日,负责实验室的卫生,关好水电、门窗再行离去。

三、实验内容和方法

1. 电视录像 实验教学中,多安排有电视录像播放,规范的实验操作或临床标本检测技术有助于缺乏临床经验的学生理解和掌握实验技能。

2. 标本观察 微生物标本一般分为借助显微镜的玻璃片染色标本和肉眼观的菌落标本两种,菌体可为死、活菌,部分具有传染性。寄生虫标本一般分为大体标本(福尔马林固定或浸制标本)、针插标本和玻片标本(包括封片标本和染色标本)。观察时应分别采用不同的方法:

(1) 大体标本:主要为较大的寄生虫虫体及其所引起的病理标本,可用肉眼或放大镜观察其形态、大小、颜色和结构或所致机体病理改变的特征。

(2) 针插标本:一般为昆虫标本,装在透明管中,用肉眼或放大镜观察,了解其外观基本结构特征。

(3) 玻片标本:微生物主要是一些细菌、真菌形态的观察。寄生虫标本一般为某些体积较小的寄生虫成虫、幼虫及蠕虫虫卵和原虫。一般观察方法为:

1) 细菌用 1000 倍的油镜观察,多数真菌可用 400 倍的高倍镜观察。

2) 寄生虫较大的虫体,用放大镜或体视显微镜(解剖镜)观察,或明视野显微镜观(低倍镜下确定标本,移至视野中央,高倍镜观察其细微结构;原虫标本需用油镜观察)。镜检标本时,必须按如下图顺序仔细观察标本,以免影响被检结果的准确性(图 0-1)。

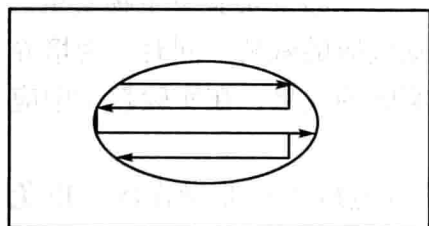


图 0-1 顺序观察标本示意图

3) 观察标本时,适当调整显微镜聚光器的高度、光圈的大小和光源的强度,使物像清晰。

3. 污染物处理 实验过程产生的废弃物、玻片、标本和培养物等必须放入固定收集器或消毒缸中,由实验室管理人员集中处理,不得擅自丢弃或排入下水道。实验结束,只有未受到污染的物品才能带出实验室。

上篇 医学微生物学实验

第一章 基本实验

第一节 细菌形态结构的观察

一、显微镜油镜使用

观察细菌最常用的仪器是光学显微镜,其大小以微米(μm)为单位,借助油镜,放大 1000 倍才能看清。

【实验目的】

掌握油镜的使用方法;了解显微镜的基本结构。

【实验材料】

显微镜、被检细菌标本片、香柏油、镜头清洗液、擦镜纸。

【实验方法】

1. 油镜的识别 油镜头上标有 $90\times$ 或 $100\times$;镜头前端有黑、白或红色的圆圈;刻有“III”或“Oil”等,其入光孔径也较其他物镜小。

2. 油镜的使用

(1) 取镜:一手紧握镜臂,另一手托住镜座拿出显微镜,将其平稳地安放在实验台适宜处。

(2) 固片:标本(涂面向上)置于载物台上,载物台不能倾斜,以免液体标本和油流出。

(3) 对光:打开显微镜底座电源开关,聚光器升到最高,打开光圈,使光线通过涂片区。检查不染色的标本时,可适当用弱光(聚光器适当下降,光圈适当缩小)。

(4) 查找:在低倍镜(头)下找到标本涂片区,换用油镜(头);先在标本上滴加香柏油一滴,然后用眼从侧面观察,缓慢转动粗调节器,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(注意调节粗调节器时不要用力过猛、过急,以免损坏镜头或压坏标本)。通过目镜观察,仔细转动粗调节器,若发现有物像闪过,再来回转动细调节器,直到获得清晰的物像。

3. 显微镜维护 操作结束后,先用擦镜纸擦去镜头上的油,然后用擦镜纸蘸少许镜头清洗液擦拭,再用干净的擦镜纸擦干。最后,转动两个物镜(头)呈“八”字形,降低聚光器,转动粗调节器下移镜筒,将显微镜装入镜箱。

【实验原理】

由于玻片和空气的密度差异,部分光线发生折射而散失,进入物镜的光线减少,物像不清。如图 1-1 所示,当在油镜与标本片之间滴加香柏油后,香柏油的折射率($n=1.515$)和

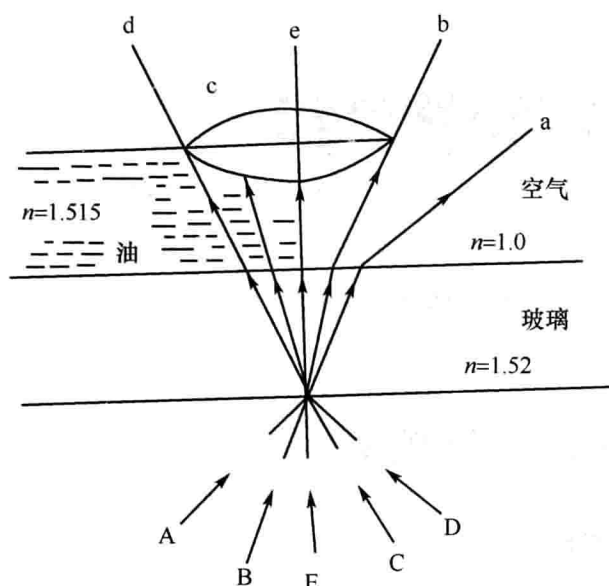


图 1-1 油镜加香柏油的原理

玻璃的折射率($n=1.52$)相仿,增加了进入物镜光线的强度,使物像清晰。

二、细菌基本形态及特殊结构的观察

细菌按其外形可分为球菌、杆菌和螺形菌三大类。球菌按其分裂后的排列方式又分为双球菌、链球菌、四联球菌、八叠球菌、葡萄球菌等。杆菌分为球杆菌、链杆菌、分枝杆菌、棒状杆菌等。螺形菌菌体弯曲,有的菌体只有一个弯曲,呈弧形或逗点状称为弧菌;有的菌体有数个弯曲,称为螺菌。某些细菌除了有细胞壁、细胞膜、细胞质和核质等基本结构外,还具有其他特殊结构,如荚膜、鞭毛、菌毛和

芽孢。这些特殊结构有着各自不同的意义。

【实验目的】

掌握细菌的基本形态、特殊结构。

【实验材料】

1. 显微镜。

2. 观察标本

(1) 球菌: 葡萄球菌、链球菌、脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌。

(2) 杆菌: 大肠埃希菌。

(3) 螺形菌: 霍乱弧菌。

(4) 荚膜: 肺炎链球菌荚膜。

(5) 鞭毛: 变形杆菌鞭毛。

(6) 芽孢: 破伤风杆菌芽孢。

【实验方法】

利用显微镜的油镜观察细菌形态与特殊结构。

【实验结果】

1. 球菌 见排列方式不同的各种球菌, 而且革兰染色性亦不同(彩图 1 ~ 彩图 5)。

2. 杆菌 革兰阴性的短杆菌(彩图 6)。

3. 弧菌 革兰阴性菌, 菌体略带弯曲, 呈弧形(彩图 7)。

4. 细菌特殊结构观察

(1) 荚膜: 菌体外围有一层较宽的透明区域(彩图 3)。

(2) 芽孢: 经芽孢染色后, 可见菌体顶端或内部有一圆形直径大于菌体的结构(彩图 8、彩图 9)。

(3) 鞭毛: 通过鞭毛染色, 可见菌体周围有细长弯曲的数根丝状物(彩图 10)。

三、细菌不染色标本检查

细菌标本不经染色直接镜检,可观察活细菌的形态及其运动情况。许多杆菌和螺形菌有鞭毛,能运动,可定向地朝着一定方向移动。没有鞭毛的细菌,由于体重轻而受所处环境中液体分子的冲击,呈左右前后位置变更不大的颤动,无定向移动能力。利用不染色标本检查法,可在普通光学显微镜下直接观察活细菌的形态和运动,可鉴别细菌,包括悬滴法和压滴法。

【实验目的】

了解细菌动力的显微镜检查法,观察有鞭毛与无鞭毛菌运动的特点。

【实验材料】

- (1) 菌种 变形杆菌及葡萄球菌 8~12h 肉汤培养物。
- (2) 载玻片、凹玻片、凡士林、盖玻片、接种环、煤气灯等。

【实验方法】

1. 悬滴法

- (1) 取洁净凹玻片和盖玻片各一张,涂少许凡士林于凹玻片窝的周围。
- (2) 分别取一环变形杆菌和葡萄球菌培养物,放于对应的盖玻片中央。
- (3) 将涂凡士林的凹玻片反转(凹向下),使凹窝对准盖玻片的菌液滴置于其上,粘住盖玻片后再反转凹玻片(此时液滴悬于盖玻片下)用接种环柄轻压盖片周围,使其固定并密封,防止菌液变干,便于长时间观察(图 1-2)。

- (4) 凹玻片置于镜台上,将集光器稍降下,使视野内光线变暗。用低倍镜找出悬滴的边缘,然后换用高倍镜或油镜观察滴内细菌的形态和运动。

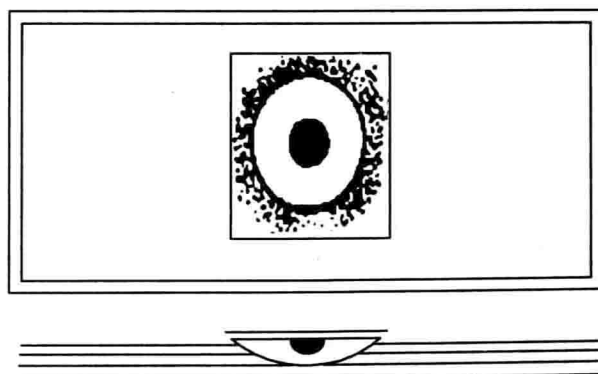


图 1-2 悬滴法
上:正面;下:侧面

2. 压滴法

- (1) 用接种环取菌液置于洁净的载玻片中央。
- (2) 将擦净的盖玻片置于菌液上,加盖时,先用盖片一边接触菌液(或先使中央与液滴接触)缓缓放下盖片,防止玻片间产生气泡(否则视野过高影响观察结果),滴加菌液量以盖片后无菌液溢出盖片为度。
- (3) 将载片置于镜台上,用低倍物镜找到标本,再换高倍物镜观察。本法较悬滴法简单,但标本容易干涸,不能长时间观察。

【实验结果】

- (1) 变形杆菌有鞭毛,有改变位置的运动,即真正运动。
- (2) 葡萄球菌无鞭毛,只在局部颤动,即布朗运动。

【实验原理】

有鞭毛的细菌运动称真正运动,也叫固有运动,其特点是细菌从一个地方游到另一个地方,可以改变位置;无鞭毛的细菌运动叫布朗运动,特点是不能改变位置,只在局部闪动,是因液体分子的冲击,致使细菌在局部颤动,这种运动也称分子运动。

接种环又称为白金耳，接种针又称为白金线，是细菌取材或接种的常用工具。

1. 结构 接种环(针)由三部分组成，环(针)部分以用白金丝制成为佳，因易于传热、散热，不生锈而经久耐用。但因价格昂贵，通常多用镍合金丝代替。常用的接种环直径为3~4mm，长40~50mm，其一端固定于金属杆(多为铝制)上，金属杆的另一端为绝热柄(图1-3)。

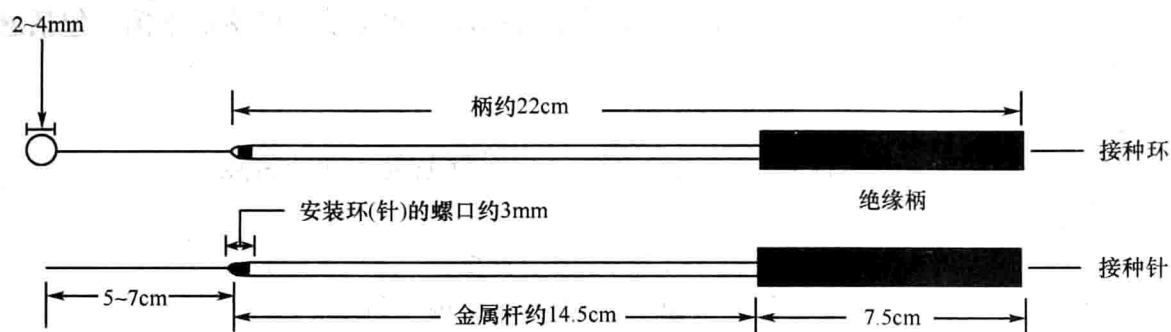


图 1-3 接种环结构示意图

2. 用法 使用时手持绝热柄，先在氧化焰中烧红镍丝部分，再平持接种环(针)使金属杆在火焰中通过3次灭菌，冷却后即可取菌或待检标本。用毕后立即将染菌的镍丝部分先于还原焰中烧灼，再移于氧化焰中烧红，随后按上法将金属杆部分在火焰中通过3次，搁置于架上，切勿随手弃置，以免灼焦台面或其他物件。

四、革兰染色

形态学检查是鉴定细菌的重要一环。由于细菌个体小，无色透明，不染色在镜下不易观察清晰，菌体着色后，可在镜下清晰地观察其形态特征，协助鉴别细菌。

因细菌蛋白质等电点较低(pH2~5)，当它生长于中性、碱性或弱酸性的溶液中时常带负电荷，通常采用碱性染料(如亚甲蓝、复红、甲紫等)使其着色。

染色方法有单染色与复染色之分。只用一种染料使细菌着色的方法称单染色法，如亚甲蓝(美蓝)染色法；用两种以上染料染色的方法叫复染色法，主要有革兰染色法、抗酸染色法，此外还有多种特殊染色法。革兰染色法是最常用的复染色法，可用于鉴别细菌、选择抗菌药物及细菌致病性等研究。

【实验目的】

掌握细菌涂片制作、革兰染色的方法及意义；熟悉革兰染色法的原理。

【实验材料】

1. 菌种 葡萄球菌和大肠埃希菌混合液(18~24h培养物)、牙垢。

2. 染液 I：结晶紫染液；II：碘液(媒染剂)；III：95%乙醇(脱色剂)；IV：稀释苯酚复红液(复染剂)。

3. 其他物品 生理盐水、载玻片、接种环、酒精灯、牙签、显微镜、擦镜纸等。

【实验方法】

1. 涂片标本的制作(图1-4)

(1) 涂片：取洁净的载玻片一张，用蜡笔标记两区，用灭菌接种环取一环葡萄球菌和大肠埃希菌混合液，在一端涂抹成直径约1cm大的涂片。再用灭菌后的接种环取一环生理

盐水放入玻片另一端,以牙签取口腔牙垢与生理盐水混匀,涂片(注意初次涂片,取菌量不应过大,以免造成菌体重叠)。

(2) 干燥:在空气中自然干燥,或在弱火焰上方烘干(切勿紧靠火焰,以防涂膜受损或变性)

(3) 固定:将已干燥的涂片来回通过火焰3次(往返为1次)固定。固定的作用为:杀死细菌;使菌体蛋白质凝固,菌体牢固黏附于载片上,染色时不被染液或水冲掉;增加菌体对染料的结合力,使涂片易着色。

2. 染色(图 1-4)

(1) 初染:加结晶紫染液盖满标本处,染色 1min 后水洗,并将玻片上的积水轻轻甩掉。

(2) 媒染:加碘液媒染 1min,水洗并甩掉积水。

(3) 脱色:滴加 95%乙醇盖满标本,轻轻摇动玻片,直至流下的乙醇无色或稍呈淡紫色为止(约 30s),水洗甩干。

(4) 复染:用稀释苯酚复红染液复染 30s,水洗,用滤纸轻轻吸干,待标本充分干燥后进行油镜镜检。

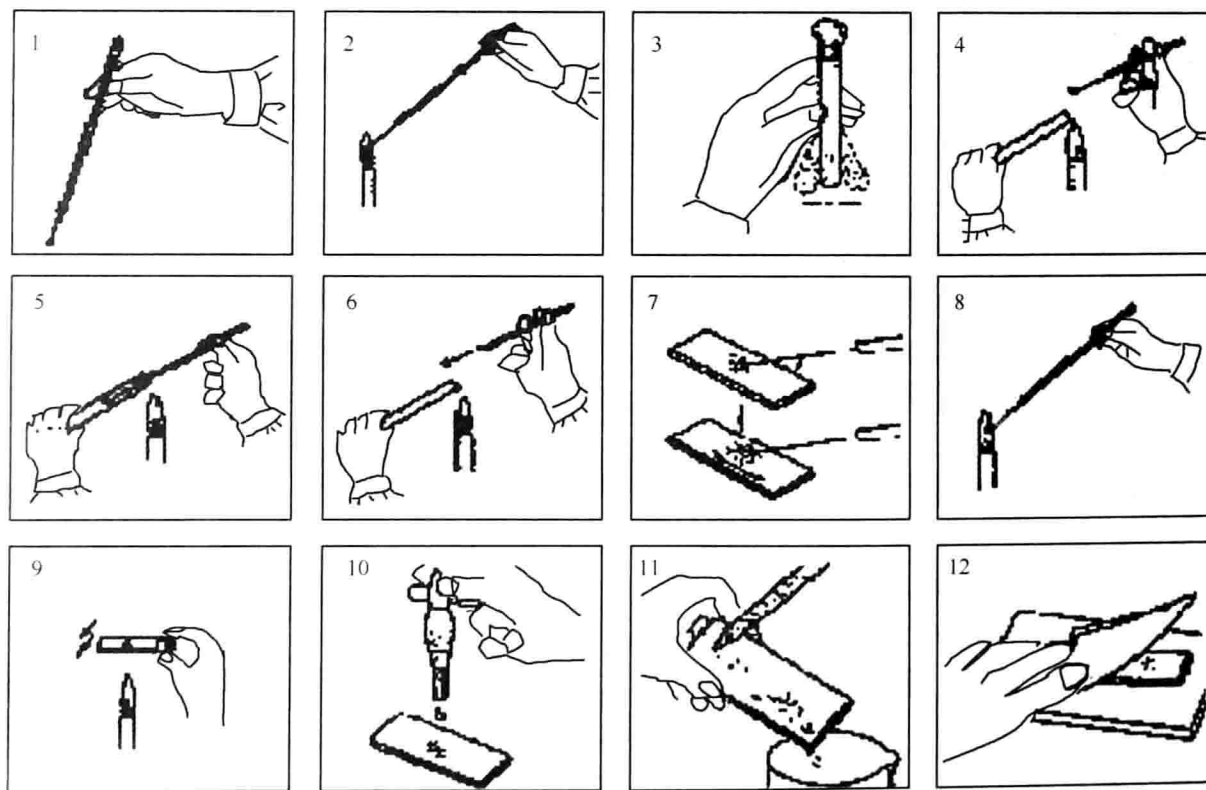


图 1-4 细菌染色标本制作及染色过程

1.取接种环;2.烧灼接种环;3.摇匀细菌;4.烧灼管口;5.取一环菌液;6.取菌毕,烧灼管口,塞上塞子;7.将菌液涂布在玻片上;8.烧灼接种环;9.固定;10.染色;11.水洗;12.吸干

【实验结果】

显微镜下可见两种细菌的形态及染色性,葡萄球菌被染成紫色为革兰阳性菌(G^+),大肠埃希菌被染成红色为革兰阴性菌(G^-)。牙垢涂片可见大量细菌,从形态上有球菌、杆菌和螺形菌,从染色性上可见紫色(G^+)和红色(G^-)。

【影响因素】

1. 操作因素 涂片太厚或太薄,菌体分散不均匀;染色过程中,使用强水流直接冲洗

涂片区,影响结果观察。

2. **染色因素** 乙醇脱色过度,革兰阳性菌可能被误染为革兰阴性菌,反之则革兰阴性菌可能被误染为革兰阳性菌,所以脱色时间要掌握好。

3. **细菌因素** 被检菌的培养条件、培养基成分、菌龄的不同等原因会影响染色结果,如革兰阳性菌的陈旧培养物也有出现革兰阴性菌的概率,所以被检菌的菌龄一般最好在18~24h之内。

【革兰染色原理】

1. **等电学说** 革兰阳性菌等电点(pH2~3)比革兰阴性菌(pH4~5)低,一般染色时染液的酸碱度在pH7.0左右,电离后阳性菌带的负电荷比阴性菌多,因此与带正电荷的甲紫(结晶紫)染料结合牢固,不易脱色。

2. **通透性学说** 革兰阳性菌细胞壁结构比较致密,肽聚糖层厚,脂质含量少,乙醇不易透入,反而可使细胞壁脱水而形成一道屏障,阻止染料向细胞外渗。革兰阴性细菌细胞壁疏松,肽聚糖层很薄,而外膜、脂蛋白、脂多糖均含有大量脂质,易被乙醇溶解,致使细胞壁通透性增高,细胞内的结晶紫-碘复合物容易被乙醇溶解而脱出。

3. **化学学说** 革兰阳性菌细胞内含有某种特殊化学成分,一般认为是核糖核酸镁盐与多糖的复合物,它和染料—媒染剂复合物相互结合,使已着色的细菌不易脱色。

五、细菌特殊结构染色

在细菌的四种特殊结构中,只有菌毛在普通光学显微镜下看不到,而荚膜、芽孢和鞭毛可用普通的光学显微镜检查,它们都是菌种分类鉴定的重要指标,但这些结构用普通染色方法很难被染上颜色,通常采用特殊的染色方法使其着色。细菌特殊结构染色方法较多,本书主要介绍细菌的鞭毛染色法。

【实验目的】

了解细菌的鞭毛染色。

【实验材料】

1. **菌种** 变形杆菌。

2. **染色液** Leifson 染色液。

3. **其他** 滤纸片、酒精灯、接种环、吸水纸、擦镜纸、载玻片、盖玻片、蒸馏水、显微镜等。

【实验方法】

1. **清洗玻片** 取光滑无划痕的玻片。为避免玻片彼此磨损,应将玻片放在特制的架上,然后用洗衣粉过滤液(洗衣粉煮沸后用滤纸过滤)煮沸20min。煮毕稍冷却后取出,用清水洗净,再放入浓洗液中浸泡24h左右,取出用清水冲洗残酸,最后用蒸馏水洗净,沥干水并放于95%乙醇中脱水,取出玻片,用火焰烧去乙醇,立即使用。

2. **菌液的制备** 将变形杆菌在新制备的肉膏蛋白胨斜面培养基上(斜面下部要有少量冷凝水),连续移种5~7次,每次培养12~16h,最后一代培养9~12h。向斜面培养基中加3~5ml先在恒温箱中预热的无菌水,静置10~20min,使细菌游出配成稀薄的菌悬液,注意静置的时间不能太长,因为时间长了鞭毛可能脱落。

3. **制片** 在洁净载玻片上用尖蜡笔划4个相等的区域。将载玻片斜放,用接种环在每

小格顶端加一滴菌悬液，流下的菌悬液用纸吸去，平放，自然干燥。

4. **染色** 在第一个小格加 5 滴染色液，经过 5、10、15s 后，分别在第二、三、四个小格中滴加染色液，仔细观察染色液中有很细的沉淀物(铁锈色云雾状物)产生，当第一、二小格已产生沉淀时，立即用水洗去染色液，室温下使载玻片干燥，然后油镜下镜检。

注意事项：①载玻片要求干净无油污、无划痕。②菌种必须活化，即要连续移种几次。③菌龄要合适，一般在幼龄时鞭毛情况最好，易于染色。④染色液处理时间一定要严格掌握，处理时间太短，鞭毛上没有足够的沉积物看不清楚；处理时间太长，玻片上沉积物太多，也看不清楚。⑤涂片后只能自然干燥，不能用热风吹干，不能热固定，这是由于加热后菌体易变形，鞭毛易脱落，影响观察。

5. **镜检结果** 菌体和鞭毛均染成红色(彩图10)。

【实验原理】

鞭毛是细菌的运动“器官”，一般细菌的鞭毛都非常纤细，直径为 10~20 nm，只有用电子显微镜才能观察到。但是，如采用特殊的鞭毛染色法，则可在普通光学显微镜下看到。鞭毛染色法较多，但其基本原理都相同，即在染色前先用媒染剂处理，使其沉积在鞭毛上，这样可加粗鞭毛直径，然后再进行染色。常用的媒染剂由单宁酸(鞣酸)与三氯化铁或甲明矾配制而成。

【思考题】

1. 用油镜时，为什么选用香柏油作为物镜与玻片间的介质？
 2. 细菌不染色标本检查法有何优缺点？
 3. 影响革兰染色结果的因素有哪些？
 4. 革兰染色所用染液的顺序是()
- | | |
|-------------------|-------------------|
| A. 稀释复红-碘液-乙醇-结晶紫 | B. 结晶紫-乙醇-碘液-稀释复红 |
| C. 结晶紫-碘液-乙醇-稀释复红 | D. 稀释复红-乙醇-结晶紫-碘液 |
| E. 稀释复红-结晶紫-碘液-乙醇 | |

(金志雄 王 娅)

第二节 细菌的人工培养

一、常用培养基制备

培养基 (culture medium)是由人工方法配制而成的，专供微生物生长繁殖使用的混合营养基质。由于微生物种类繁多，对营养物质的要求各异，加之实验和研究的目的不同，所以培养基在组成成分上也各有差异。但是，不同种类或不同组成的培养基中，均应含有满足微生物生长繁殖所需的水、碳、氮、无机盐、生长因子及某些必需的微量元素等。此外，培养基还应具有适宜的酸碱度pH、气体、缓冲能力、氧化还原电位和渗透压等。

【实验目的】

- (1) 了解基础培养基的主要成分和制备方法。
- (2) 树立无菌观念。