

供基础医学、临床医学、口腔医学、预防、检验、药学等专业使用

医学微生物学 实验教程

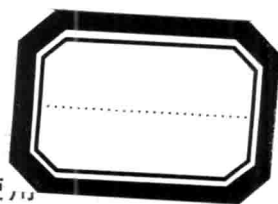
YIXUE WEISHENGWUXUE SHIYAN JIAOCHENG

● 主审 徐志凯 ● 主编 吴兴安 张芳琳



第四军医大学出版社

供基础医学、临床医学、口腔医学、预防、检验、药学等专业使用



医学微生物学实验教程

主 审 徐志凯

主 编 吴兴安 张芳琳

副主编 丁天兵 尹 文 吕 欣

编 者 (按姓氏笔画排序)

丁天兵 于 澜 王 芳 王丽梅

尹 文 吕 欣 李璞媛 杨 敬

吴兴安 张 蕾 张芳琳 雷迎峰

黎志东

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目(CIP)数据

医学微生物学实验教程/吴兴安, 张芳琳主编. —西安:
第四军医大学出版社, 2013.1

ISBN 978-7-5662-0302-1

I. ①医… II. ①吴… ②张… III. ①医学微生物
学-实验-医学院校-教材 IV. ①R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 017420 号

医学微生物学实验教程

主 编 吴兴安 张芳琳

责任编辑 张永利

出版发行 第四军医大学出版社

地 址 西安市长乐西路 17 号(邮编:710032)

电 话 029-84776765

传 真 029-84776764

网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>

印 刷 西安市建明工贸有限责任公司

版 次 2013 年 1 月第 1 版 2013 年 1 月第 1 次印刷

开 本 787×1092 1/16

印 张 9.5

字 数 230 千字

书 号 ISBN 978-7-5662-0302-1/R·1167

定 价 26.00 元

版权所有 盗版必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

前 言

《医学微生物学实验教程》是与医学微生物学课程相配套的实验教材,在内容上体现了基础理论与基本技术的有机结合。通过实验验证理论,使学生达到巩固医学微生物学理论知识的目的。同时,在实验过程中培养学生严谨的科学态度以及独立操作、独立分析问题和解决问题的能力。

本书编写过程中参考了国内多所医学院校编写的医学微生物学实验教材,既保留了传统、经典的微生物学实验,又根据微生物学的新进展,增加了一些新的实验内容。全书分为四篇,前三篇包括 53 个实验,其实验方法具体,具有良好的可操作性。第四篇附录列出了微生物学实验常用的试剂、菌种的保藏及实验动物的管理,便于广大师生查阅。

本书主要供基础医学、临床医学、口腔医学、预防、检验、药学等医药专业的本科生及硕士研究生使用,也可供从事医学微生物学教学的青年教师和实验技术人员参考使用。

本书的编写人员主要是第四军医大学微生物学教研室从事一线教学工作多年的骨干教师,他们均具有丰富的教学经验;此外,我们还邀请了著名的微生物学与免疫学专家徐志凯教授对本书进行了审阅,在此对他们表示衷心感谢!

虽然我们做了最大的努力,但书中难免存在疏漏及不足之处,恳请使用本书的广大读者多提宝贵意见,以期再版时修正。

吴兴安 张芳琳

2012 年 12 月

目 录

医学微生物学实验的目的与要求	(1)
微生物学实验室规则	(2)

第一篇 细菌学实验

第一章 细菌的染色与形态、结构观察	(3)
实验一 油浸显微镜的使用和保护	(3)
实验二 细菌的染色法	(5)
实验三 细菌的形态观察	(13)
实验四 活菌运动观察	(14)
实验五 放线菌的形态观察	(15)
第二章 细菌的培养、检查	(18)
实验六 细菌的分离、培养与性状观察	(18)
实验七 厌氧细菌的培养	(22)
第三章 环境因素对细菌的影响及消毒与灭菌	(24)
实验八 环境因素对细菌的影响	(24)
实验九 环境中细菌的检测	(29)
第四章 细菌常用的生化反应试验	(31)
实验十 糖发酵试验	(31)
实验十一 蛋白质代谢试验	(34)
实验十二 其他代谢试验	(36)
第五章 动物实验	(38)
实验十三 小白鼠腹腔接种实验	(42)
实验十四 小白鼠尸体解剖与细菌学检查	(43)
附 动物采血法	(44)
第六章 细菌变异现象	(47)
实验十五 细菌的 L 型变异的观察	(47)
实验十六 细菌菌落形态变异的观察	(49)
实验十七 细菌的耐药性变异	(50)
第七章 病原性球菌的检验	(52)
实验十八 病原性球菌生物学性状的观察	(52)
实验十九 脓汁标本的检验	(53)



实验二十 血浆凝固酶试验	(54)
实验二十一 抗链球菌溶血素“O”(ASO)试验——乳胶凝集法	(55)
第八章 肠道杆菌的检验	(56)
实验二十二 粪便标本的检验	(56)
实验二十三 肥达试验	(59)
第九章 呼吸道感染细菌的检验	(61)
实验二十四 结核分枝杆菌的检验	(61)
实验二十五 白喉棒状杆菌的检验	(65)
实验二十六 麻风分枝杆菌、流感嗜血杆菌及百日咳鲍特菌形态观察	(68)
第十章 动物疫源菌的检验	(69)
实验二十七 炭疽芽胞杆菌的检验	(69)
实验二十八 布鲁菌的检验	(72)
实验二十九 鼠疫耶尔森菌的检验	(75)

第二篇 病毒学实验

第十一章 病毒的形态学观察	(76)
实验三十 电子显微镜观察负染病毒	(76)
实验三十一 病毒包涵体的观察	(77)
第十二章 病毒的培养方法	(78)
实验三十二 动物接种	(78)
实验三十三 鸡胚接种	(79)
实验三十四 细胞培养	(82)
第十三章 病毒感染性及数量测定	(85)
实验三十五 TCID ₅₀ 的测定	(85)
实验三十六 空(蚀)斑形成实验	(87)
第十四章 病毒抗原的检测	(88)
实验三十七 直接免疫荧光试验	(88)
实验三十八 酶联免疫吸附试验(ELISA)	(90)
实验三十九 Western blot	(92)
第十五章 病毒抗体的检测	(94)
实验四十 酶联免疫吸附试验(ELISA)	(94)
实验四十一 间接免疫荧光试验	(97)
实验四十二 血凝抑制试验	(98)
实验四十三 补体结合试验	(101)
实验四十四 空(蚀)斑减少中和试验	(103)
实验四十五 微量细胞培养中和试验	(104)

第十六章 病毒核酸的检测	(106)
实验四十六 多聚酶链反应定性检测 HBV DNA	(106)
实验四十七 荧光定量 PCR 检测 HBV DNA	(107)
实验四十八 原位杂交法检测人乳头瘤病毒	(109)

第三篇 其他病原微生物实验

实验四十九 衣原体的检验	(111)
实验五十 支原体的检验	(113)
实验五十一 立克次体的检验	(116)
实验五十二 钩端螺旋体的检验	(118)
实验五十三 病原性真菌的检验	(122)

第四篇 附 录

微生物学实验常用的试剂	(125)
一、染色液的配制	(125)
二、培养基的制备	(127)
三、常用溶液的配制	(129)
菌种的保藏	(132)
一、短期保存方法	(132)
二、长期保存方法	(133)
实验动物的管理	(135)
一、实验动物的选择	(135)
二、实验动物的管理	(135)
参考文献	(137)

医学微生物学实验的目的与要求

医学微生物学是为医学类专业开设的一门必修专业基础课程。实验课则是医学微生物学教学过程中的重要环节之一。

医学微生物学实验的目的：

一、通过实验课验证已知的基本理论，进一步巩固和加深对基本理论知识的理解，掌握必要的基本技术。

二、通过实验课初步掌握实验设计的方法。

三、通过实验操作和实验报告的撰写，养成严谨的科学态度，追求实事求是的实验作风和团结协作精神。

四、重视创新思维能力和创造力的培养，为今后临床实践和科学研究培训基本技能。

医学微生物学实验课要求：

一、实验前要做好预习，明确实验的目的、要求、原理及其理论依据，对实验操作的全过程做到心中有数。

二、认真进行实验，严格按照操作规范进行，重视独立操作；同时也要注意分工合作。

三、对于教师示教，要仔细地观察示教，并联系相关理论知识，认真思考，达到深刻的理解。

四、客观地观察、记录、分析与判断实验结果，结合复习思考题进行讨论。对于与理论知识不符的实验结果，也应实事求是地记录下来，分析其原因，总结经验教训。

五、实验课也应随时简明扼要地记笔记，以便课后复习。

六、按时按要求上交实验报告，重视教师的批改，加以必要的修正。

七、按照生物安全规程操作，如果工作草率，可能发生事故。必须注意无菌操作，严格遵守实验室规则。

微生物学实验室规则

医学微生物学的实验对象一般都是对人类有致病性的微生物，有一定的传染危险，因此进入实验室进行实验操作时，必须严格遵守以下规则：

一、进入实验室内必须穿着实验工作服，离室前脱下，将其反折、叠好，放在室内指定地点。

二、实验室内绝对禁止饮食（水）、吸烟、用嘴湿润铅笔和标签、以手抚摸头面部等。

三、凡具有传染性的培养物、带菌材料、动物、器具（如吸管、试管、玻片）等，均须按规定处理，不得随便乱放、用水洗，带菌液体不得倾倒入水槽。

四、实验中一旦发生意外，如吸入菌液、划破皮肤、菌液溅入眼以及细菌污染实验台或地面等处时，应立即报告指导教师，进行处理。

五、实验室内须经常保持安静、整洁。每次实验完毕，所用物品均应放回原处。

六、如打破实验器材时，须向指导教师报告，进行登记；未经许可，不得随意将实验室内任何物品携出室外。

七、实验操作中注意节约水、电、煤气、染色液以及其他材料。

八、实验完毕，按要求清理桌面及处理实验用品，然后先用消毒液浸手，再以清水冲洗后，才准离开实验室。

第一篇 细菌学实验

第一章 细菌的染色与形态、结构观察

细菌的形态学检查是细菌检验中极为重要的手段之一。观察细菌的形态，一是借助显微镜进行放大，二是进行颜色衬托。可根据细菌的基本形态和结构以及某些细菌的特殊形态和特殊结构，对不同类别的细菌进行初步鉴别。

实验一 油浸显微镜的使用和保护

用显微镜检查细菌的形态是微生物学实验中基本技术之一。可以观察不染色和染色的微生物。不染色标本主要用于检查细菌的动力、螺旋体及真菌等。染色标本用以检查细菌及其他微生物的形状、大小、构造及染色性，操作简便，是常用的检查法。油浸显微镜（简称油镜）是最为常用的一种。油镜的使用原理是：香柏油具有与玻璃相近似的折射率（香柏油的折射率为 1.515，玻璃的折射率为 1.52，空气的折射率为 1.0）。镜检时，滴加香柏油使光线尽可能多地进入物镜中，避免光线通过折射率低的空气而散失，以提高物镜的分辨力，使物像明亮清晰（图 1-1）。

【实验材料】

显微镜、香柏油、二甲苯及擦镜纸。

各种细菌染色标本：球菌、杆菌、螺（弧）菌、荚膜、芽胞及鞭毛。

【实验方法与步骤】

1. 对光 依据光源的强弱调整反光镜的位置。若是天然光源或较强的光线，宜用平面反光镜；若是普通灯光或较弱的光线，则用凹面反光镜。

2. 加油 将标本片放在镜台上，染色的部位正对集光器的中央，用玻片夹固定。

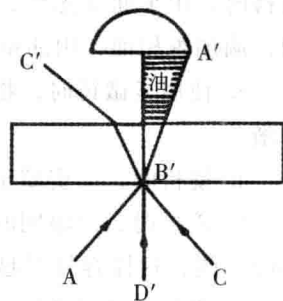


图 1-1 油浸镜使用的原理

1. 光线 A、B'、A' 是通过载物片经香柏油折射的情况，油镜加香柏油后，使光线进入物镜中的量较不加香柏油的多
2. 光线 C、B'、C' 是通过载物片经空气的折射情况，光线没有进入物镜中



先用低倍镜对好光，滴加香柏油一滴，再换油镜检查。使用油镜时，不要倾斜镜柱，以免香柏油流溢。

3. 调焦点 换用油镜检查时，先从侧面观察，谨慎旋转粗螺旋，使油镜头下降，浸入油滴中，注意勿用力下降过度，否则有压碎玻片和损坏油镜头的危险！然后用眼看目镜，用右手微转动粗螺旋，使油镜头慢慢上升，待看到模糊物像时，即改用左手轻轻转动细螺旋，使整个视野中的物像均能清楚识别为止。

4. 看物像 在观察时，只准调节细螺旋，使镜筒微微上升，调节焦点；绝不可将镜头下降过度，避免压破玻片或损伤镜头。如没有看清视野，再照上法重新操作。

5. 换视野 看清物像后，如想观察其他视野时，可调动移动架，使标本片向前后左右移动。

6. 用毕处理 镜检完毕，将镜筒向上升起，取出玻片，以擦镜纸拭净镜面油滴，如油滴已干在镜头上，可以擦镜纸浸少许二甲苯（Xylol）单方向擦拭镜头，再立即用干净擦镜纸拭净。最后将物镜转成“八”字形，并将集光器向下降落，下降镜筒固定，或在镜台与镜头间垫以厚层纱布，放入箱内。

【注意事项】

1. 镜检时，白天通常使用自然光源，用人工光源时，要以蓝色玻片滤去黄色光线。
2. 不染色标本镜检时，用凹面反光镜，将光圈缩小，或下降集光器，并用高倍镜检查；如用油镜检查，要适当调节光圈或上升集光器，使视野中光线合适。染色标本镜检时，用平面反光镜，如光源中有窗影时，则用凹面反光镜，上升集光器，打开光圈，滴加香柏油，用油镜检查。
3. 使用显微镜时，物镜最好用高倍（油镜），目镜最好用低倍放大，否则物像欠清晰。
4. 镜检时，坐姿端正，胸背挺直，高低不适时，可升高坐凳，加以适当调节。
5. 镜检时，两眼同时睁开，便于镜下绘图，最好练习左眼看镜，右眼绘图，切忌一睁一闭，这样容易引起视力疲劳。
6. 必须爱护显微镜，像爱护我们自己的眼睛一样。

（吕 欣）

实验二 细菌的染色法

一、简单染色法

染色是细菌形态学检查中的一项基本技术。细菌标本经染色后,可使细菌与环境在颜色上形成鲜明对比,在普通显微镜下可清楚地看到细菌的形态、大小和排列特点。此法仅能显示细菌的形态,而不能鉴别细菌。

【实验材料】

1. 玻片、接种环、酒精灯等。
2. 培养 18 ~ 24h 的金黄色葡萄球菌及大肠埃希菌斜面培养物。
3. 碱性美蓝染液。

【实验方法与步骤】

1. 无菌取材

(1) 取材之前,将接种环末端直立火焰中,烧红后,斜过火焰,并将准备进入试管内部的接种环的金属握柄部分,旋转着缓慢地通过火焰 3 遍。

(2) 用右小指和手掌拔去棉花塞,将管口通过火焰,并将已通过火焰后冷却了的接种环自管内蘸取少量细菌培养物。然后再将管口通过火焰,塞好棉塞。接种环使用后,再经火焰烧灼灭菌(图 2-1)。

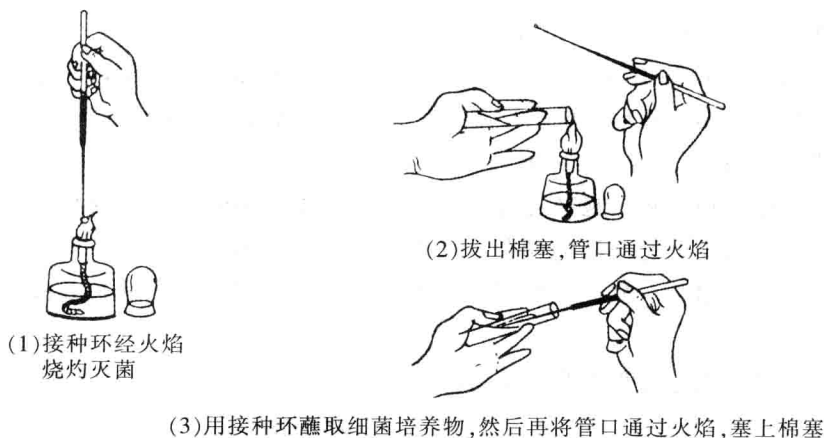


图 2-1 无菌取材的基本步骤

2. 涂抹标本的制备和简单染色

涂抹→干燥→固定→染色

(1) 涂抹 取洁净无油脂载玻片一张,以接种环蘸取生理盐水一小滴,放在载玻片中央,用来稀释检材(盐水不要过多,以便干燥)。再将接种环在火焰上灭菌,待冷却后,钩取斜面细菌培养物少许(如是纯培养物,不要过多),与生理盐水混合,涂成均匀薄膜,涂毕,再将接种环烧灼灭菌。如为液体检材,可直接取材涂成抹片(如为



咳痰、脓汁等被检材料，因所含病菌甚少，涂片可酌情厚些）。

(2) 干燥 标本涂抹完毕，在室温中自然干燥，不可加热，以免细菌变形。

(3) 固定 将已经干燥的涂片，通过火焰 3 次，目的是杀死细菌，使其蛋白质凝固，固定于玻片上，以免染色和水洗时被冲掉（咳痰和脓汁涂抹标本应通过火焰 5 次）。也可浸入乙醇中 10 ~ 15min 或甲醇中 2 ~ 3min 进行固定。

(4) 染色 将美蓝染液数滴覆盖于涂抹标本上，染色 1 ~ 2min，将染液倒掉，水洗，晾干或以滤纸吸干。

(5) 镜检 滴加香柏油，用油浸显微镜检查，并绘图记录结果。绘图时，要选择有代表性的形象，并注明染色方法及放大倍数。

二、革兰染色法

革兰染色法是最常用的细菌鉴别染色法。细菌经革兰染色后，可根据染色结果将细菌分为两大类（图 2 - 2），即革兰阳性菌（染为紫蓝色）和革兰阴性菌（染为红色），这样有助于对细菌的鉴别，同时还能分析细菌的致病性和选用抗菌药物提供依据。

细菌染色的机制尚未完全清楚，主要有以下几种学说：

1. 物理学说 基于毛细血管现象和渗透作用，由于溶解和吸收作用使染料进入细胞内，或者是由于阴阳电荷的吸附或结合使细菌着色等。细菌在中性环境下通常都是带负电的，容易被培养基中的阳离子相吸附，这些已被吸附的阳离子若与染料中的阳离子相交换（离子交换作用），则细菌着色。

2. 化学学说 该学说认为菌体内某些化合物同染料结合，细菌即着色。在结合过程中生成新的化合物，其理化性质与原来有所不同，而且不易为脱色剂所脱色。

3. 胞壁结构学说 革兰阴性菌细胞壁含有较多类脂质，肽聚糖含量较少，当用酒精脱色时，类脂质被溶解，胞壁通透性增加，使结晶紫和碘的复合物易于渗出，使菌细胞脱色，复染后染上复染液的颜色。反之，革兰阳性菌细胞壁中肽聚糖含量多且交联度大，类脂质含量少，经酒精脱色后，肽聚糖层的孔径变小，通透性降低，菌细胞仍保留结晶紫的颜色。

有证据表明，染色过程既非全是物理也非全是化学的过程，而是两者的结合。

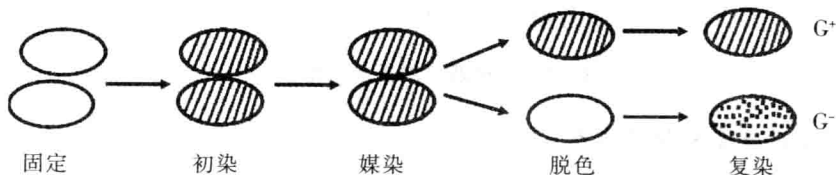


图 2 - 2 革兰染色示意图

【实验材料】

1. 玻片、蜡笔、接种环、酒精灯。

2. 培养 18 ~ 24h 的金黄色葡萄球菌及大肠埃希菌斜面培养物。
3. 染色试剂：结晶紫（龙胆紫）溶液、碘液、95% 乙醇、稀释石炭酸复红溶液。

【实验方法与步骤】

1. 涂片 取洁净玻片一张，用蜡笔在中间划条线，将玻片划分为两个区域。各滴加一滴生理盐水，用灭菌接种环分别钩取金黄色葡萄球菌及大肠埃希菌制成涂抹标本，自然干燥后，火焰固定。
2. 染色 见图 2-3。
3. 镜检 油浸显微镜检查。绘图、记录结果。注意细菌形态及染色特性。

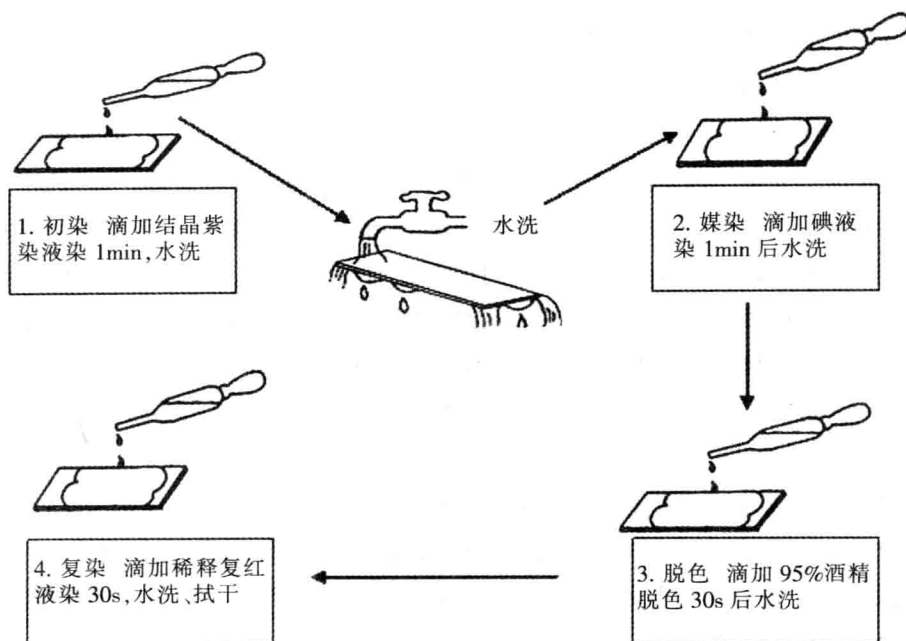


图 2-3 革兰染色步骤

【实验结果观察】

若保持初染的紫色，未被脱掉，为革兰阳性。若初染紫色脱掉，染上复染的红色，为革兰阴性（表 2-1）（见彩图页）。

表 2-1 主要病原微生物的革兰染色性

革兰阳性		革兰阴性	
球菌	葡萄球菌、链球菌、肺炎链球菌	脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌、奈瑟卡他球菌	
杆菌	白喉棒状杆菌、结核分枝杆菌、破伤风梭菌、产气荚膜梭菌、炭疽芽胞杆菌	痢疾志贺菌、伤寒沙门菌、大肠埃希菌、变形杆菌、铜绿假单胞菌、布鲁菌、鼠疫耶尔森菌	
弧菌	—	霍乱弧菌	
其他	各类放线菌、各类真菌	各类螺旋体、立克次体	



【注意事项】

1. 涂片不宜太厚或太薄，菌体要涂抹均匀，固定时要避免菌体过分受热。
2. 选用 18 ~ 24h 的细菌培养物，菌龄过老或幼龄菌会影响染色结果。
3. 媒染液要注意避光保存，脱色酒精在保存过程中要注意密封，涂片上的水要尽量吸干（不是用吸水纸擦干），否则会因浓度下降减弱其脱色能力。
4. 冲洗时可冲洗玻片背面，防止将标本冲洗掉。

三、细菌特殊结构的染色法

采用特定的染色法，可观察到细菌的一些特殊结构，如鞭毛、荚膜和芽孢等。

（一）芽孢染色法

芽孢是某些革兰阳性细菌发育到一定阶段，在细胞内形成的，对不良环境有较强抗性的休眠体。芽孢一般为圆形、椭圆形或圆柱形。芽孢壁厚而致密，透性低，着色、脱色均较困难。芽孢染色法是利用细菌的芽孢和菌体对染料的亲合力不同的原理，用不同染料进行着色，使芽孢和菌体呈不同的颜色而便于区别。若先用一种弱碱性染料在加热条件下染色时，菌体和芽孢都被着色，但进入菌体的染料可经水洗脱色，进入芽孢的染料则不易被水洗脱色，再用另一种染料复染，可使菌体和芽孢染成不同颜色，便于观察。芽孢能否形成及其大小、形状和着生位置都是细菌鉴定的依据。

【实验材料】

1. 破伤风梭菌 48 ~ 72h 疱肉培养基培养物。
2. 5% 孔雀绿染液、番红水溶液，或石炭酸复红液、吕氏碱性美蓝液。
3. 载玻片、香柏油、小试管、二甲苯、擦镜纸、吸水纸、染色缸、显微镜等。

【实验方法与步骤】

1. 孔雀绿染色法

（1）常规方法涂片，干燥，固定。

（2）染色 滴加孔雀绿染液于涂片上，将载玻片放在玻璃架上，在火焰上加热，使染料冒蒸汽，维持冒微蒸汽 5min 但不沸腾，切勿蒸干，必要时可添加染液。加热时间从染液冒蒸汽时开始计算 4 ~ 5min。这一步也可不加热，改用孔雀绿水溶液染 10min。

（3）水洗 待玻片冷却后用自来水清洗，洗到孔雀绿不再褪色为止。

（4）复染 用番红水溶液复染 1min，水洗。

（5）镜检 待干燥后，置油镜下观察。

2. 石炭酸复红染色法

（1）在一支小试管中，滴入 3 ~ 4 滴蒸馏水，用接种环取菌于水中，充分搅匀，使菌体分散，制成较浓的菌悬液。

（2）染色 滴加等体积的（3 ~ 4 滴）石炭酸复红液摇匀。将此试管放入沸水浴中

煮 10~15min, 使芽胞及菌体着色。

(3) 涂片及水洗 取此菌液体 2~3 接种环在洁净的载片上做成涂片, 自然干燥通过火焰固定后, 在自来水下缓冲洗, 使菌体脱色。

(4) 复染 再用吕氏碱性美蓝液复染 1~2min。用水洗去多余染液, 轻轻用吸水纸吸去水分。

(5) 镜检 待干燥后, 置油镜下观察。

【实验结果观察】

1. 孔雀绿染色法 芽胞呈绿色, 菌体呈红色。

2. 石炭酸复红染色法 芽胞被染成红色, 菌体呈现蓝色。

【注意事项】

载玻片在火焰上加热, 使染液冒蒸汽但勿沸腾, 切忌使染液蒸干, 必要时可添加少许染液。

(二) 荚膜染色法

荚膜是包围在一些细菌细胞壁外面的黏液状物质, 主要成分为多糖。荚膜与染料间的亲和力弱, 故常用负染色法, 使菌体和背景着色而荚膜不着色, 荚膜在菌体周围呈一透明圈, 从而使荚膜被衬托出来。由于荚膜很薄, 易变形, 含水量在 90% 以上, 故染色时一般不采用加热固定, 以免荚膜皱缩变形。

【实验材料】

1. 培养约 18~24h 的产气肠杆菌肉汤培养物或固体平板培养物。

2. 刚果红、明胶水溶液, 吕氏碱性美蓝染液 (或墨汁, 或结晶紫染液) 和 20% CuSO_4 等。

3. 显微镜、载玻片、接种环、酒精灯、香柏油、二甲苯、无菌水、1% 盐酸、电炉、20% CuSO_4 、95% 乙醇等。

【实验方法与步骤】

1. 刚果红盐酸负染色法

(1) 涂片及染色 将刚果红水溶液和明胶水溶液各一滴滴于干净载玻片上, 用接种环蘸取细菌培养液或悬浮液在载玻片上, 与上述两滴溶液混匀, 自然干燥, 滴加 1% HCl 冲洗, 使涂片呈蓝色; 用蒸馏水漂洗, 除去 HCl 。

(2) 复染 用美蓝复染 1min, 水洗。

(3) 镜检 自然干燥后, 置油镜下观察。

2. 湿墨汁法

(1) 制菌液 加一滴墨汁于洁净的玻片上, 并挑少量菌与其充分混合。

(2) 加盖玻片 放一清洁盖玻片于混合液上, 然后在盖玻片上放一张滤纸, 向下轻压, 吸收多余菌液。

(3) 镜检 置油镜下观察。



3. Tyler 法

- (1) 涂片 常规接种环取菌后涂片，在空气中自然干燥。
- (2) 染色 用结晶紫染液染 5~7min。
- (3) 脱色 用 20% CuSO_4 水溶液洗去结晶紫，脱色要适度（冲洗 2 遍）再用毛边滤纸吸干，并立即加 1~2 滴香柏油于涂片处，防止 CuSO_4 结晶的形成。
- (4) 镜检 置油镜下观察。

【实验结果观察】

1. 刚果红盐酸负染色法 有荚膜的细菌，菌体蓝色，荚膜不着色，背景蓝紫色；无荚膜的细菌，菌体蓝色，背景蓝紫色。由于干燥菌体收缩，菌体四周也可能有一圈狭窄的不着色环，但这不是荚膜。荚膜不着色的部分宽。
2. 湿墨汁法 背景灰色，菌体较暗，在其周围呈现一明亮的透明圈即荚膜。
3. Tyler 法 荚膜呈蓝紫色，菌体呈暗蓝色。

【注意事项】

1. 由于荚膜很薄，易变形，含水量在 90% 以上，故染色时一般不采用加热固定，以免荚膜皱缩变形。
2. 在采用 Tyler 法染色时，标本经染色后不可用水洗，必须用 20% CuSO_4 冲洗。

（三）鞭毛染色法

鞭毛是从有些细菌（主要是杆菌和螺菌）细胞内伸出的，着生在细菌表面的，细长和波浪弯曲的丝状体。鞭毛有偏端单生、两端单生、偏端丛生以及周生等多种情况。鞭毛在普通光学显微镜下不易观察到，故只能用特殊染色方法才能使鞭毛显示出来。常采用不稳定胶体溶液作媒染剂，在鞭毛上生成沉淀，加粗鞭毛，然后再染色。细菌只有在个体发育到一定的时期才具有鞭毛，一般在多次移种之后，在其旺盛生长阶段染色。

【实验材料】

1. 培养 18h 的普通变形杆菌营养琼脂斜面培养物。
2. 硝酸银染色液（A、B 液）或 Leifson 染色液（A、B、C 液）。

【实验方法与步骤】

1. 银盐染色法

(1) 清洗玻片 选择光滑无裂痕的玻片（最好选用新的）。为了避免玻片向后重叠，应将玻片插在专用金属架上。然后将玻片置洗衣粉滤过液中（洗衣粉先经煮沸，再用滤纸过滤，以除去粗颗粒），煮沸 20min。取出稍冷后即用水冲洗，晾干。再放入浓洗液中浸泡 5~6d。使用前取出玻片，用水冲去残酸，再用蒸馏水洗。将水沥干后，放入 95% 乙醇中脱水。取出玻片，在火焰上烧去酒精，立即使用。

(2) 菌液的制备及涂片 用于染色的菌种应预先连续移接 5~7 代。染色前用于接菌的培养基应是新鲜制备的，表面较湿润，在斜面底部应有少许冷凝水。将变形杆菌