

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材配套教材

国家卫生和计划生育委员会“十二五”规划教材配套教材  
全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材配套教材

全国高等学校配套教材

供医学检验技术专业用

# 临床微生物学检验技术 实验指导

主 编 楼永良

副主编 邵世和  
张玉妥



人民卫生出版社  
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材配套教材

国家卫生和计划生育委员会“十二五”规划教材配套教材

全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材配套教材

全国高等学校配套教材

供医学检验技术专业用

# 临床微生物学检验技术 实验指导

主 编 楼永良

副主编 邵世和 张玉妥

编 者 (以姓氏笔画为序)

王海河 (哈尔滨医科大学)

申艳娜 (天津医科大学)

刘永华 (包头医学院)

刘延菊 (河北工程大学医学院)

刘根焰 (南京医科大学)

孙丽媛 (北华大学医学检验  
学院)

杜季梅 (温州医科大学)

杨维青 (广东医学院)

张玉妥 (河北北方学院)

张晓延 (山西医科大学)

邵世和 (江苏大学医学院)

陶传敏 (四川大学华西临床医学院)

梁宏洁 (广西医科大学)

蒋月婷 (广州医科大学)

焦凤萍 (泰山医学院)

楼永良 (温州医科大学)

管俊昌 (蚌埠医学院)

人民卫生出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

临床微生物学检验技术实验指导/楼永良主编. —北京:人民卫生出版社, 2015

全国高等学校医学检验专业第六轮暨医学检验技术专业第一轮规划教材配套教材

ISBN 978-7-117-20446-0

I. ①临… II. ①楼… III. ①病原微生物-医学检验-医学院校-教学参考资料 IV. ①R446.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 054079 号

人卫社官网	<a href="http://www.pmph.com">www.pmph.com</a>	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	<a href="http://www.ipmph.com">www.ipmph.com</a>	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

## 临床微生物学检验技术实验指导

主 编: 楼永良

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](mailto:pmph@pmph.com)

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 北京中新伟业印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 15

字 数: 374 千字

版 次: 2015 年 4 月第 1 版 2015 年 4 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-20446-0/R · 20447

定 价: 33.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: [WQ@pmph.com](mailto:WQ@pmph.com)

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

---

## 前 言

---

2012年教育部颁布《普通高等学校本科专业目录》，医学检验技术专业学制由五年改为四年，授予理学学位，据此，临床微生物学检验的教学目标和内容应有相应变化。《临床微生物学检验技术实验指导》是新编的《临床微生物学检验技术》的配套教材，可供高等院校医学检验技术专业使用，也可供从事临床检验工作和医学研究的人员参考。

本实验指导根据《临床微生物学检验技术》教学大纲要求，共编写了八章三十一个实验。结合课程特点，第一章为临床微生物学检验技术教学实验室生物安全防护和实验室规则；第二章为临床微生物学基本技术，包括形态学检查、分离培养和鉴定技术、抗菌药物敏感试验及细菌耐药性检测、医院感染微生物监测等；第三章为临床常见细菌的培养与鉴定；第四章为临床常见真菌的培养和鉴定；第五章为病毒的分离培养与鉴定；第六章为常见临床标本的微生物学检验；第七章为设计性实验，包括选题设计实验和创新型实验设计；第八章为标准化实验考核；最后为附录，包括常用培养基、染色液与试剂的配方和用途以及菌种、毒种的保存。本书大部分内容采用传统格式编写，包括实验目的、仪器和材料、方法和步骤、结果、注意事项和思考题等，新增加了“我的结果”，便于学生记录实验结果。

全体编者和编辑的辛勤工作，保证了本书的顺利出版，在此一并致谢。由于编者水平有限，时间仓促，缺点和不当之处在所难免，诚请各学校老师、同学和读者多提宝贵意见，以便再版时修正。

楼永良

2015年1月

# 目 录

第一章 临床微生物学检验技术教学实验室生物安全防护和实验室规则 .....	1
一、临床微生物学检验技术教学实验室生物安全防护 .....	1
二、常见临床微生物学检验技术教学实验室意外事故处理 .....	2
三、临床微生物学检验技术教学实验室规则 .....	3
第二章 临床微生物学基本技术 .....	4
实验一 细菌形态学检查 .....	4
一、不染色标本检查法 .....	4
二、染色标本检查法 .....	5
三、特殊染色检查法 .....	7
实验二 细菌分离培养技术 .....	10
一、培养基的制备 .....	10
二、培养方法(需氧、厌氧、二氧化碳培养法) .....	13
三、分离培养和接种技术 .....	15
四、细菌计数 .....	20
实验三 细菌鉴定技术 .....	22
一、生理生化鉴定 .....	22
二、血清学鉴定 .....	31
三、数字编码鉴定 .....	32
四、动物实验与细菌毒素检测 .....	33
实验四 抗菌药物敏感性试验与细菌耐药性检测 .....	35
一、纸片扩散法 .....	35
二、稀释法 .....	39
三、E-Test 法 .....	42
四、联合药敏试验 .....	42
五、特殊耐药菌及耐药酶的表型检测 .....	43
六、分子生物学 .....	48
实验五 医院感染的微生物监测 .....	50
一、消毒灭菌效果监测 .....	50
二、耐药性监测 .....	52
三、同源性分析 .....	53

第三章 临床常见细菌的培养与鉴定 .....	57
实验六 球菌 .....	57
一、葡萄球菌属 .....	57
二、链球菌属 .....	59
三、肠球菌属 .....	61
四、奈瑟菌属 .....	63
五、莫拉菌属 .....	64
实验七 肠杆菌科 .....	65
一、埃希菌属 .....	65
二、志贺菌属 .....	70
三、沙门菌属 .....	72
四、枸橼酸杆菌属 .....	75
五、克雷伯菌属、肠杆菌属和沙雷菌属 .....	77
六、变形杆菌属、普罗维登菌属和摩根菌属 .....	80
七、小肠结肠炎耶尔森菌 .....	82
实验八 不发酵革兰阴性杆菌和其他革兰阴性杆菌 .....	84
一、假单胞菌属 .....	84
二、不动杆菌属 .....	85
三、嗜麦芽窄食单胞菌 .....	86
四、伯克霍尔德菌属 .....	87
五、流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌 .....	88
六、布鲁菌属 .....	90
实验九 弧菌属、弯曲菌属和螺杆菌属 .....	91
一、弧菌属 .....	91
二、空肠弯曲菌 .....	93
三、幽门螺杆菌 .....	94
实验十 需氧革兰阳性杆菌 .....	95
一、棒状杆菌属 .....	95
二、需氧芽胞杆菌属 .....	98
三、产单核李斯特菌 .....	103
四、阴道加特纳菌 .....	104
实验十一 分枝杆菌属、放线菌属和诺卡菌属 .....	105
一、结核分枝杆菌 .....	105
二、快速生长非结核分枝杆菌 .....	108
三、放线菌属 .....	108
四、诺卡菌属 .....	109
实验十二 厌氧菌 .....	110
一、无芽胞厌氧菌 .....	110
二、厌氧芽胞梭菌 .....	112
实验十三 螺旋体 .....	116

一、染色和形态观察 .....	116
二、问号钩端螺旋体培养技术和显微镜凝集试验 .....	117
三、梅毒螺旋体血清学试验 .....	119
实验十四 支原体、衣原体和立克次体 .....	120
一、支原体 .....	120
二、衣原体 .....	122
三、立克次体 .....	123
<b>第四章 临床常见真菌的培养与鉴定 .....</b>	<b>125</b>
实验十五 临床真菌检验基本技术 .....	125
一、真菌染色技术和形态结构观察 .....	125
二、真菌分离培养 .....	127
三、真菌鉴定 .....	128
实验十六 皮肤软组织(黏膜)真菌的培养和鉴定 .....	129
一、毛癣菌属 .....	129
二、小孢子菌属 .....	131
三、表皮癣菌属 .....	132
实验十七 侵袭性真菌培养和鉴定 .....	133
一、念珠菌属 .....	133
二、隐球菌属 .....	136
三、曲霉属(烟曲霉) .....	137
四、青霉属(马尔尼菲青霉) .....	138
<b>第五章 病毒的分离培养与鉴定 .....</b>	<b>141</b>
实验十八 病毒的分离培养 .....	141
一、鸡胚接种 .....	141
二、动物接种 .....	143
三、组织细胞培养 .....	144
实验十九 病毒的鉴定 .....	147
一、病毒的形态学鉴定 .....	147
二、病毒的生理生化鉴定 .....	148
三、病毒的免疫学鉴定 .....	150
实验二十 病毒的血清学检测 .....	151
一、肝炎病毒 .....	151
二、人类免疫缺陷病毒 .....	153
三、轮状病毒 .....	157
实验二十一 病毒的分子生物学检测 .....	158
一、乙型肝炎病毒 .....	158
二、丙型肝炎病毒 .....	161
三、人类免疫缺陷病毒 .....	162

四、流行性感冒病毒 .....	164
<b>第六章 临床标本的微生物学检验 .....</b>	<b>166</b>
实验二十二 血液及骨髓标本 .....	166
实验二十三 尿液标本 .....	169
实验二十四 胃肠道标本 .....	172
实验二十五 生殖道标本 .....	176
实验二十六 呼吸道标本 .....	178
实验二十七 脓液及创伤分泌物标本 .....	182
实验二十八 穿刺液标本 .....	185
<b>第七章 设计性实验 .....</b>	<b>188</b>
实验二十九 选题设计实验 .....	188
选题一 温度对细菌的影响 .....	188
选题二 临床标本的细菌学检验 .....	189
实验三十 创新型实验设计 .....	192
<b>第八章 标准化实验考核 .....</b>	<b>194</b>
实验三十一 标准化实验考核 .....	194
<b>附录 .....</b>	<b>200</b>
附录一 培养基 .....	200
附录二 试剂和染液 .....	219
附录三 菌种、毒种保存 .....	224
<b>参考文献 .....</b>	<b>227</b>



# 临床微生物学检验技术教学实验室生物安全防护和实验室规则

### 一、临床微生物学检验技术教学实验室生物安全防护

临床微生物学检验技术教学实验室(以下简称实验室)涉及各种正常菌群和常见病原微生物的操作,可能对实验室工作人员以及周围环境造成一定的生物污染,熟悉生物安全防护并掌握实验室生物安全防护措施是开始实验前所必备的知识。

实验室生物安全防护是指避免生物危险因子,特别是偶然的和有意利用的生物因子,对生物体包括实验室工作者在内的伤害和对环境的污染的意识 and 措施。实验室生物安全防护包括标准化的操作技术和流程、实验室安全设备、个人防护装置和措施以及实验室设计和建筑要求。

1. 实验室生物安全防护水平一般为 BSL-2 级(少数致病性强的需 BSL-3 级),主要进行对人和环境具有中等潜在危害(少数为高致病性)微生物相关实验。

2. 实验室分为三个区域 ①清洁区:正常情况下没有生物危险因子污染的区域,此区可存放个人物品,一般位于实验室外。②半污染区:正常情况下有轻微污染的区域。此区放置低温冰箱,主要进行准备工作,如培养基、细胞、制剂的配制等。在此区操作应做好个人防护,穿工作服或防护服,戴口罩和手套等,禁止带入个人物品。③污染区:操作实验区,穿工作服或防护服,戴口罩和手套等,严格无菌操作,禁止带入个人物品。

3. 实验室安全设备包括生物安全柜、高压蒸汽灭菌器、微型加热灭菌器、超声清洗器、护目镜、面(眼)罩、应急喷淋装置、洗眼装置、干手机、酒精灯、紫外灯等。应了解仪器的位置,并严格按照规定操作方法和正确步骤使用及维护。

#### 4. 实验室生物安全基本要求

(1)生物安全柜是实验教学控制生物危害所必需的设备之一,可根据需要选择合适的型号,并应根据不同型号产品要求进行安装、使用和维修。常规操作过程中容易产生气溶胶,如混匀、超声雾化和剧烈搅拌等操作应尽量使用生物安全柜。

(2)配备常用消毒剂及应用指南:血液或其他体液发生泄漏,应及时消毒;被血液或其他体液污染的设备在实验室内或外送商家进行维修之前,应清洗和消毒;无法消毒的设备须贴上生物危害标签。

(3)所有锐利物品在使用后,应集中放入专用锐器盒内,用完后拧紧盖子,整体按照医疗废物进行处理。

(4)使用机械移液装置,禁止口吸移液。

(5)实验完成后,应使用合适消毒剂对工作台面进行消毒。

(6)手或皮肤在接触血液或其他体液后必须立即彻底清洗,实验结束后或取下手套后应立即洗手,离开实验室之前应脱下隔离衣等所有的个人防护装备,并存放在指定地方。

## 二、常见临床微生物学检验技术教学实验室意外事故处理

1. 菌(毒)种外溢在台面、地面和其他表面 戴手套(必要时穿防护服及对脸和眼睛进行防护)立即用布或纸巾覆盖并吸收溢出物;向布或纸巾上倾倒适当消毒剂,并覆盖周围区域,通常可以使用5%次氯酸钠溶液;如有碎玻璃或其他锐器,则要使用簸箕或硬的厚纸板来收集处理过的物品,并将其置于可防刺透的容器中以待处理。对溢出区域再次清洁并消毒,将污染材料置于防漏、防穿透的废弃物处理容器中。污染的防护服用消毒液浸泡后进行高压灭菌处理。

2. 菌(毒)种外溢到皮肤黏膜 及时停止实验,能用消毒液的部位可直接进行消毒,然后用水冲洗15~20分钟;若皮肤被刺破视为有极大危险,应立即停止实验,对伤口进行挤血,用水冲洗消毒。视情况隔离观察,其间根据条件进行适当的预防治疗。

3. 非封闭离心桶的离心机内盛有潜在感染性物质的离心管发生破裂 这种情况视为发生气溶胶暴露事故,应立即加强个人防护力度,处理方法如下:①如果机器正在运行时发生破裂或怀疑发生破裂,应关闭机器电源,停止后密闭离心筒至少30分钟,使气溶胶沉积;②如果机器停止后发现破裂,应立即将盖子盖上,并密闭至少30分钟。发生这两种情况时都应报告实验室负责人。随后的所有操作都应加强个人呼吸保护并戴厚橡胶手套,必要时可在外面戴一次性手套。清理玻璃碎片时应当使用镊子,或用镊子夹着的棉花来进行。所有破碎的离心管、玻璃碎片、离心桶、十字轴和转子都应放在无腐蚀性的、已知对相关微生物具有杀灭活性的消毒剂内。未破损的带盖离心管应放在另一个有消毒剂的容器中,然后回收。离心机内腔应用适当浓度的同种消毒剂反复擦拭,然后用水冲洗并干燥。清理时所使用的全部材料都应按感染性废弃物处理。

4. 在封闭离心桶(安全杯)内离心管发生破裂 所有密封离心桶都应在生物安全柜内装卸。如果怀疑在安全杯内发生破损,应该松开安全杯盖子并将离心桶高压灭菌,还可以采用化学方法消毒安全杯。

5. 操作者或其所在实验室工作人员出现与被操作病原微生物导致疾病类似的症状 应被视为可能发生实验室感染,需及时到医院就诊,并如实主诉工作性质和发病情况。

6. 皮肤刺伤、切割伤或擦伤 被血液、体液污染的针头或其他锐器刺伤皮肤后,应立即用力捏住受伤部位,向离心力方向挤出伤口的血液,同时用流动水冲洗伤口;再用75%酒精或碘伏消毒伤口,并用防水敷料覆盖。如果黏膜破损,应用生理盐水(或清水)反复冲洗,伤口应使用适当的皮肤消毒剂(如70%酒精、0.2%次氯酸钠、0.2%~0.5%过氧乙酸、0.5%聚维酮碘等)浸泡或涂抹消毒,必要时进行医学处理。意外受伤后必须立即报告。

7. 液体溅入眼睛 立即用洗眼器或生理盐水冲洗至少10分钟(注意避免揉眼睛),然后再进行相应的医学处理。

8. 菌液或标本污染 倾倒适量消毒液于污染面,浸泡半小时后抹去;若手上沾有活菌,亦应于上述消毒液中浸泡10分钟,再用肥皂及自来水冲洗。

9. 化学药品腐蚀伤 先用大量清水冲洗,若为强酸则以5%碳酸氢钠或5%氢氧化铵溶液中和;若为强碱则以5%醋酸或5%硼酸洗涤中和;必要时进行医学处理。

10. 实验书籍、材料、衣物等被污染 将原件置于盛放污染性废弃物的容器内,高压灭菌处理。

11. 在生物安全柜以外发生有潜在危害性的气溶胶释放 所有人员必须立即撤离相关

区域,并通知实验室负责人,任何暴露人员都应该接受医学咨询。为了使气溶胶排出和较大的粒子沉降,在一定时间内(如24小时)应在实验室门上张贴“禁止进入”的标志。过了相应时间后,在相关人员的指导下清除污染。

12. 意外发生火灾 应沉着处理,切勿慌张。如因电源起火,立即关闭电源,再行灭火;如系酒精、二甲苯、乙醚等起火,切忌用水,应迅速用沾水的布类和沙土覆盖扑灭。

13. 感染的实验动物逃跑,应立即抓回并对污染区进行处理。

### 三、临床微生物学检验技术教学实验室规则

临床微生物学检验技术实验内容涉及的大多微生物具有感染性,进入实验室前应充分了解微生物的特性及潜在的生物危害,学习并掌握生物安全基本知识,加强防范意识;了解实验室的大致布局和流动方向;了解实验仪器和器具的使用方法;熟悉应急处理措施,避免污染和发生实验室感染;遵守实验室有关规定,听从教师安排和指导,并严格遵守以下规则:

1. 课前认真复习相关理论知识并预习当次实验内容,熟悉实验目的、实验内容和基本过程。

2. 衣着整齐、规范 进入实验室应穿好工作服或隔离衣,必要时戴手套、口罩和帽子;鞋子应防滑、防渗、不露脚趾,尽可能不穿高跟鞋和日常拖鞋。

3. 个人物品按规定位置摆放 允许随身携带纸、笔等必需物品进入实验区;尽可能不带个人物品进入实验室,书籍、背包、手机、衣物等应放于规定位置。

4. 认真按实验步骤有序进行各项试验,严格无菌操作,认真记录。

5. 实验室内物品按指定位置存放 吸过菌液的吸管、毛细滴管应放到指定的消毒缸内;用过的注射器放入回收盒内;用过的玻片、L形玻棒等放入有消毒液的搪瓷缸中,不可乱放在桌面上或洗手槽中;其余试剂等物品用后随时放回原处。

6. 严禁在实验室内饮食、吸烟、喝水以及用嘴湿润标签、铅笔等物品。不可把物品放入口中,操作时最好不戴饰品,长发须扎好或放入帽中。

7. 试验中发生差错或意外事故,应立即报告带教教师进行及时处理,不可擅自处理或隐瞒。

8. 爱护实验室内各种仪器设备,按使用规则操作,并按规定登记使用情况。不得随意拨动电器开关;培养箱等开门后应及时关好;显微镜使用后要擦净,各功能部件复位后放回。如不慎损害器材,应报告带教教师。

9. 实验完毕后,将需培养的材料做好标记(如学号、姓名、标本号等),放入培养箱中培育;培养物在结果观察完毕后放入污物桶,送消毒室处理。

10. 保持实验室清洁卫生,实验结束后需对台面、地面等用消毒剂擦拭,并用紫外灯照射进行空气消毒。

11. 离开实验室前,脱下实验服反折放入指定位置,在消毒液中将手浸泡5~10分钟,再用自来水冲洗干净。

12. 值日生应仔细检查实验设施并关好水、电、门、窗后方可离开实验室。

(楼永良)

## 第二章

# 临床微生物学基本技术

### 实验一 细菌形态学检查

#### 一、不染色标本检查法

##### 【实验目的】

1. 掌握细菌不染色标本片的制备及细菌动力的显微镜检查方法。
2. 了解不染色标本检查法在细菌鉴定中的意义。

##### 【仪器和材料】

1. 菌种 表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌 8~12 小时肉汤培养物及 18~24 小时普通琼脂斜面培养物。
2. 试剂及材料 生理盐水,酒精灯,接种环,载玻片,凹玻片,盖玻片,凡士林,擦镜纸,镊子,记号笔等。
3. 仪器 普通光学显微镜。

##### 【原理】

细菌未染色时呈无色,在显微镜下主要靠细菌的折光率与周围环境不同进行观察。

鞭毛是细菌的运动器官,有鞭毛的细菌动力阳性,在液体中能自主运动;无鞭毛的细菌则无动力,在液体环境中只受到液体分子布朗运动的冲击,发生位置变更不大的颤动。细菌的动力常通过不染色标本检查法进行观察。

##### 【方法和步骤】

##### 1. 压滴法

(1)用灭菌后的接种环取菌液 2~3 环于载玻片中央(或将少许固体培养物标本混悬于一滴生理盐水中),灭菌接种环。

(2)用镊子夹一张盖玻片,倾斜盖玻片使其一边接触菌液边缘,然后缓慢放下盖玻片,菌液正好铺满盖玻片和载玻片间的空隙。

(3)将制好的标本片置于显微镜载物台上,将聚光器降低,调暗视野,先用低倍镜找到合适视野,再用高倍镜观察。

##### 2. 悬滴法

(1)取盖玻片,于盖玻片四角涂少许凡士林。

(2)加一滴液体培养物于盖玻片中央。

(3)将凹玻片凹面向下,凹孔对准液滴盖于盖玻片上,然后迅速翻转玻片,以小镊子轻加压力,使盖玻片与凹孔边缘粘紧。

(4)将悬滴标本置于显微镜载物台上,先用低倍镜找到合适视野,将聚光器降低,调暗视

野,再用高倍镜观察。

### 【结果】

有鞭毛的铜绿假单胞菌可观察到运动活泼,动力阳性。无鞭毛的表皮葡萄球菌仅有布朗运动,动力阴性。

我的结果:

### 【注意事项】

1. 检查细菌动力的载玻片和盖玻片都要洁净无油,否则影响细菌的运动。
2. 压滴法加液体量要适中,过多易溢出,过少将产生气泡,不易观察。放置盖玻片时,角度要低,动作要缓慢,防止产生气泡。
3. 悬滴法用接种环加菌液不易形成液滴,可用毛细吸管滴加,或在接种环取菌后,滴加一滴生理盐水于菌液上。盖玻片易碎,涂菌和压紧盖玻片时要小心。
4. 观察细菌动力时视野宜暗,可通过降低聚光器、调小光圈来实现。
5. 标本片制作完成后及时观察,以免蒸干或细菌动力减弱。
6. 实验过程要遵守无菌操作和《实验室生物安全通用要求》,废弃的接触过菌种的材料(如接触细菌的玻片、平板、试管、吸管、一次性接种环等)均需灭菌后再清洗或处理。

### 【思考题】

1. 细菌的动力除了使用不染色标本检查法外,还可通过什么方法来检查?
2. 如何观察厌氧菌的动力?
3. 为什么进行不染色标本检查时视野应稍暗?如何调节视野的明暗程度?

## 二、染色标本检查法

### 【实验目的】

1. 掌握细菌染色标本片的制备方法。
2. 掌握单染法、革兰染色法原理和方法。
3. 了解细菌染色检查在细菌分类和鉴定中的意义。

### 【仪器和材料】

1. 菌种 表皮葡萄球菌、草绿色链球菌、大肠埃希菌、变形杆菌等 8~12 小时肉汤培养物及 18~24 小时普通琼脂斜面培养物。
2. 仪器 普通光学显微镜。
3. 试剂及材料 生理盐水,结晶紫染液,卢戈氏碘液,95% 酒精,稀释石炭酸复红染液,吕氏碱性亚甲蓝(美蓝)染液,香柏油,二甲苯(可用醇醚混合液代替),酒精灯,接种环,载玻片,擦镜纸,吸水纸,记号笔等。

### 【原理】

染色标本检查法分为单染法和复染法。单染法是使用一种染料对细菌染色,复染法是指使用两种或两种以上的染料对细菌进行染色。单染法中细菌只能被染成一种颜色,用于对菌体形态、排列方式的初步观察。复染法可将不同细菌或同一细菌的不同结构染成不同的颜色,既可观察细菌的形态结构,还可根据染色反应及着色深浅鉴别细菌的种类,又称鉴

别染色法,如革兰染色法和抗酸染色法。

革兰染色法将细菌分为革兰阳性菌( $G^+$ 菌)和革兰阴性菌( $G^-$ 菌)两大类。革兰染色法的原理有以下几种学说:①等电点学说: $G^+$ 菌的等电点(pH 2~3)比 $G^-$ 菌的等电点(pH 4~5)低,在同一pH条件下,革兰阳性菌比革兰阴性菌所带负电荷要多,与带正电荷的碱性染料结合力牢固,不易脱色。②化学学说: $G^+$ 菌含有大量核糖核酸镁盐,与进入胞浆内的结晶紫和碘牢固结合成大分子复合物,不易被95%乙醇脱色;而 $G^-$ 菌含此种物质量少,故易被乙醇脱色。③细胞壁结构学说: $G^+$ 菌细胞壁结构较致密,肽聚糖层厚并具有三维空间结构,脂类含量低,乙醇不易透入,而且95%乙醇可使细胞壁脱水,细胞壁间隙缩小、通透性降低,阻碍结晶紫与碘的复合物渗出;而 $G^-$ 菌的细胞壁结构较疏松,肽聚糖层薄且无三维空间结构,含脂质量多,易被乙醇溶解,致使细胞壁通透性增高,细胞内的结晶紫与碘复合物被溶出而脱色。目前认为,细胞壁结构与化学组成上的差异是革兰染色结果不同的主要原因。

### 【方法和步骤】

#### 1. 细菌涂片的制备

(1)涂片:先以接种环取少量生理盐水置载玻片中央或略偏右侧,然后取少许菌苔在生理盐水中磨匀,涂布成约 $1\text{cm}^2$ 大小的均匀乳浊、半透明的菌膜。临床液体标本或细菌液体培养物可直接涂布在载玻片上。

(2)干燥:室温自然干燥。

(3)固定:将已干燥的细菌涂片有菌膜的面向上,以中等速度通过火焰3次。特殊目的时也可用冷冻固定法或化学固定法。

固定的目的有:①杀死细菌,凝固细菌蛋白和其他结构,使染料易于着色;②改变细菌对染料的通透性,以利其进入细胞内(染料通常难以进入活菌细胞);③使细菌附着于玻片上,不至于在染色过程中被水冲掉;④尽可能保持细菌的原有形态和结构。

2. 单染色法 在制备好的细菌涂片上滴加结晶紫染液或稀释石炭酸复红液染色1分钟,或用吕氏碱性亚甲蓝液染色1~2分钟,细流水冲洗后吸干镜检。

3. 革兰染色法 包括四个染色步骤。

(1)初染:滴加结晶紫染液1~2滴,使其完全覆盖菌膜,室温染色1分钟。细流水冲洗去染液。

(2)媒染:滴加卢戈氏碘液,室温染色1分钟后,用细流水冲洗去染液。

(3)脱色:95%酒精滴加于载玻片菌膜部位,不停摇动,并补充酒精,边滴边观察,直至流过菌膜的酒精无色为止(约30秒)。用细流水冲洗去染液。

(4)复染:加稀释石炭酸复红染液1~2滴,染色30秒钟。用细流水冲洗去染液,用吸水纸吸干玻片水分。

4. 显微镜观察 用低倍镜找到视野后,滴加香柏油,在油镜下观察细菌染色性、菌体形态及排列方式。

### 【结果】

1. 单染色法 结晶紫染色后菌体呈紫色,稀释石炭酸复红染色后菌体呈红色,碱性亚甲蓝染色后菌体呈蓝色。

2. 革兰染色法 革兰阳性菌被染成紫色,革兰阴性菌被染成红色。

我的结果:

**【注意事项】**

1. 涂片以薄且保持菌体均匀分散无重叠为好。
2. 不能直接倾倒染色液,否则会有染液残渣留在玻片上影响观察。
3. 脱色是染色中的关键步骤,脱色过度可使  $G^+$  菌染为  $G^-$  菌;脱色不够,则  $G^-$  菌可被染为  $G^+$  菌。脱色时间还与涂片厚薄有关,应灵活掌握。
4. 观察细菌染色标本时,视野宜亮,可通过上升聚光器、调大光圈来实现。
5. 所有染液均应防止水分蒸发而影响浓度。碘液不可久存,以免失去媒染作用;脱色酒精浓度以 95% 为宜,若密封不好或涂片上积水过多,均可使酒精浓度下降而影响其脱色能力。
6. 细菌的染色结果还受多种因素如菌龄、染色时间、pH、染液浓度等的影响。同批实验要加入质控菌来判断实验结果的准确性。
7. 实验过程要遵守无菌操作和《实验室生物安全通用要求》,废弃的接触过菌种的材料(如接触细菌的玻片、平板、试管、一次性接种环等)均应灭菌后再清洗或处理。

**【思考题】**

1. 细菌涂片固定的目的是什么?
2. 为什么脱色是革兰染色中的关键步骤?
3. 影响革兰染色结果的主要因素有哪些?
4. 革兰染色中如果将初染液与复染液交换使用,结果将如何?

### 三、特殊染色检查法

**【实验目的】**

1. 掌握墨汁负染方法的原理、步骤。
2. 熟悉细菌细胞壁、鞭毛、芽胞、荚膜等特殊染色方法。
3. 了解细菌细胞壁染色及特殊结构染色在细菌分类鉴定中的意义。

**【仪器和材料】**

1. 菌种 普通变形杆菌 18 小时普通营养琼脂平板培养物,肺炎链球菌血琼脂培养物,枯草芽胞杆菌、蜡样芽胞杆菌 18~24 小时培养物,金黄色葡萄球菌普通营养琼脂斜面培养物及金黄色葡萄球菌细菌 L 型培养物。

2. 试剂及材料 生理盐水,100g/L 鞣酸,5g/L 结晶紫溶液,石炭酸复红,改良 Ryu 法鞭毛染色媒染剂,碱性复红法鞭毛染色甲液、乙液,1% 结晶紫溶液,20% 硫酸铜溶液,碱性亚甲蓝,墨汁,无菌蒸馏水,香柏油,二甲苯(可用醇醚混合液代替),酒精灯,接种环,载玻片,擦镜纸,吸水纸,记号笔等。

3. 仪器 普通光学显微镜。

**(一) 细胞壁染色法****【原理】**

组成细菌细胞壁主要成分的肽聚糖与染料结合的能力差,不易着色。在细菌染色过程中,一般染料均可通过细胞壁的渗透、扩散等作用进入细胞,细胞壁本身不能染色。鞣酸和

磷钼酸均可起媒染作用,使细胞壁形成可着色的复合物,而细胞质不易被染色,媒染剂处理后用结晶紫等染料染色,便可在普通光学显微镜下观察到细胞壁。细菌 L 型为细胞壁缺陷型,可通过细胞壁染色来鉴别。

### 【方法和步骤】

1. 取金黄色葡萄球菌普通营养琼脂斜面培养物及诱导的金黄色葡萄球菌细菌 L 型培养物制成细菌涂片。

2. 滴加 100g/L 鞣酸染 15 分钟,水洗。

3. 滴加 5g/L 结晶紫溶液染 3~5 分钟,水洗后吸干镜检。

### 【结果】

有细胞壁的细菌仅菌体周边染成紫色,菌体内部无色;无细胞壁的细菌(如细菌 L 型)染料可渗入菌体,使整个菌体染成紫色。

我的结果:

## (二) 鞭毛染色法

### 【原理】

采用不稳定的胶体溶液做媒染剂,并使其沉淀于细菌鞭毛上而使鞭毛加粗,进一步染色后可在油镜下观察。根据染色剂的不同,分为碱性复红法、副品红法、结晶紫法、维多利亚蓝 B 法、镀银染色法和荧光蛋白染色法等。

### 【方法和步骤】

#### 1. 改良 Ryu 法

(1) 准备染液:将媒染剂(5% 石炭酸 10ml, 2g 单宁酸和 10ml 饱和硫酸钾铝)与染色剂(饱和结晶紫乙醇溶液,即 12g 结晶紫溶于 100ml 无水乙醇中)按 10:1 混合,室温保存待用。

(2) 载玻片处理:将载玻片用洗衣粉液煮沸 10 分钟,水洗,再用清洁液浸泡,加温 10 分钟,水洗,再浸入 95% 酒精中脱脂后取出,待酒精挥发后备用。

(3) 在处理后的玻片上加一滴无菌蒸馏水,用接种环在普通营养琼脂平板上菌膜延伸处挑菌,将细菌轻轻点置于玻片蒸馏水液面上,勿搅动和研磨,自然干燥。

(4) 滴加染色液染 10~15 分钟,轻轻水洗,自然干燥。

(5) 显微镜下从涂片的边缘开始,寻找有单个细菌分布的视野,观察鞭毛位置及数量。

#### 2. 碱性复红法

(1) 准备染液:将 9 份甲液(明矾饱和液 2ml, 50g/L 石炭酸 5ml, 200g/L 鞣酸液 2ml 混匀)和 1 份(碱性复红乙醇饱和液)乙液混合并过滤,滤后第三天使用最佳。

(2) 载玻片处理:将载玻片用洗衣粉液煮沸 10 分钟,水洗,再用清洁液浸泡,加温 10 分钟,水洗,再浸入 95% 酒精中脱脂后取出,待酒精挥发后备用。

(3) 在处理后的玻片上加一滴无菌蒸馏水,用接种环在普通营养琼脂平板上菌膜延伸处挑菌,将细菌轻轻点置于玻片蒸馏水液面上,勿搅动和研磨,自然干燥。

(4) 滴加染色液染 1~2 分钟,轻轻水洗,自然干燥后镜检。

(5) 显微镜下从涂片的边缘开始,寻找有单个细菌分布的视野,观察鞭毛位置及数量。

### 【结果】

改良 Ryu 法菌体和鞭毛均染成紫色,碱性复红法菌体和鞭毛均染成红色。



我的结果:

### 【注意事项】

1. 使用新鲜细菌培养物。
2. 载玻片要洁净无油污,以免影响菌体形态。
3. 在玻片上涂菌时要尽量使细菌自由分散于蒸馏水中,切勿搅动和研磨,以免鞭毛脱落。
4. 接菌后让菌膜自然干燥,不能用火焰加热,以免破坏鞭毛的形态。

### (三) 荚膜染色法(Hiss 硫酸铜法)

#### 【原理】

荚膜是细菌体外的一层黏液性多糖物质,与染料的亲和力弱,不易着色。通常采用负染色法,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。Hiss 硫酸铜染色法是用结晶紫初染,使荚膜和菌体均被染成紫色,由于荚膜与结晶紫结合不牢,经硫酸铜冲洗时荚膜被洗脱去结晶紫而与硫酸铜结合,故荚膜被染成蓝色。

#### 【方法和步骤】

1. 取肺炎链球菌血琼脂培养物涂片,自然干燥。
2. 滴加 1% 结晶紫溶液于玻片上,微微加热玻片至染液冒蒸汽为止。
3. 用 20% 的硫酸铜溶液冲洗去染液,倾去硫酸铜溶液(切勿用水冲洗),自然干燥后镜检。

#### 【结果】

细菌菌体及背景呈紫色,荚膜呈淡蓝色。

我的结果:

### 【注意事项】

1. 由于荚膜的含水量在 90% 以上,在染色时一般不加热固定,以免荚膜皱缩变形。
2. 每步染色后均不能用水洗。

### (四) 芽胞染色法

#### 【原理】

细菌芽胞壁较厚,着色、脱色均较困难。加热条件下进行,染料进入芽胞和菌体;酒精可使进入菌体的染料脱色,菌体被染成复染剂的颜色;但酒精不能脱去进入芽胞的染料,用复染剂染色后芽胞仍然保留初染剂的颜色。菌体和芽胞分别染成不同颜色,易于区分。

#### 【方法和步骤】

1. 取枯草芽胞杆菌培养物涂片,自然干燥后固定。
2. 加石炭酸复红液,微微加热染色 5 分钟,冷却后细流水冲洗。
3. 用 95% 乙醇脱色 2 分钟,细流水冲洗。
4. 用碱性亚甲蓝复染半分钟,水洗后吸干镜检。

#### 【结果】

细菌菌体呈蓝色,芽胞呈红色。

我的结果: