

全国普通高等教育基础医学类系列配套教材

杨靖 欧琴 主编

# 医学微生物学 实验教程

MEDICAL MICROBIOLOGY  
EXPERIMENT INSTRUCTION

供基础、临床、预防、口腔、护理等  
医学类专业使用



科学出版社

全国普通高等教育基础医学类系列配套教材

供基础、临床、预防、口腔、护理等医学类专业使用

# 医学微生物学实验教程

杨 靖 欧 琴 主 编

科学出版社

北京

## 内 容 简 介

本书是一本服务基础、紧密联系临床和科研实际的实验教材,编写的原则是在着重基本技能训练的基础上,主要突出了新颖性及注重综合能力和创新能力的培养,为学生提供了研究方向,也有利于学科研究水平的有序推进。教材内容按照基本型实验、经典型实验、综合型实验和创新型实验的顺序编写,体现了操作技术由基本到验证、由综合应用到创新的过程。综合型实验和创新型实验在实际教学中要有选择地取舍,主要培养学生的整体思维、逻辑思维和独立学习能力。通过医学病原微生物学病例分析典型病例,引导学生将理论与临床实际问题相联系。

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、专科的医学病原微生物学实验教学。同时,本教材也是指导本科生开展科研的参考书。

### 图书在版编目(CIP)数据

医学微生物学实验教程 / 杨靖, 欧琴主编. —北京:  
科学出版社, 2016. 11

全国普通高等教育基础医学类系列配套教材  
ISBN 978 - 7 - 03 - 050365 - 7

I. ①医… II. ①杨… ②欧… III. ①医学微生物学  
—实验—高等学校—教材 IV. ①R37 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 261499 号

责任编辑: 闵 捷 朱 灵  
责任印制: 谭宏宇 / 封面设计: 殷 靓

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>

南京展望文化发展有限公司排版

上海叶大印务发展有限公司印刷  
科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2017 年 1 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2017 年 1 月第一次印刷 印张: 8

字数: 171 000

**定价: 25.00 元**

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

# 《医学微生物学实验教程》

## 编辑委员会

主编  
杨 靖 欧 琴

副主编  
位秀丽 徐 祥 李 蓓 金志雄

编 者  
(以姓氏笔画为序)

王 娅(湖北医药学院基础医学院)  
付红霞(湖北医药学院附属太和医院)  
冯桂香(湖北医药学院基础医学院)  
朱明磊(湖北医药学院基础医学院)  
李 蓓(湖北医药学院基础医学院)  
李治军(湖北医药学院基础医学院)  
李晓花(东风医疗集团茅箭医院)  
余春芳(湖北医药学院基础医学院)  
杨 靖(湖北医药学院附属人民医院)  
杨飞翔(湖北医药学院附属东风医院)

邱 红(湖北医药学院附属东风医院)  
吴文琴(湖北医药学院附属太和医院)  
位秀丽(湖北医药学院基础医学院)  
周琳琳(四川大学华西基础医学与法医学院)  
金志雄(湖北医药学院基础医学院)  
欧 琴(湖北医药学院基础医学院)  
胡筱梅(湖北医药学院附属东风医院)  
郭 俊(湖北医药学院附属东风医院)  
徐 祥(湖北医药学院基础医学院)

## 前 言

病原生物学是基础医学中的一门重要学科,也是一门技术性很强的实验学科,其独树一帜的实验技术在学科发展中占据突出的地位。为适应学科的发展和实验改革的需要,培养实用性和具有创新精神的人才,我们在长期的医学病原微生物学教学经验积累和自编教材的基础上,为适应将来我校多层次的教学需要,根据新版教学大纲要求,参照国内外出版物及兄弟院校的经验,联合附属医院相关专业专家编写《医学微生物学实验教程》。本书是一本服务基础、紧密联系临床和科研实际的实验教材,编写的原则是在着重基本技能训练的基础上,主要突出新颖性及注重综合能力和创新能力的培养,为学生提供了研究方向,也有利于学科研究水平的有序推进。教材内容按照基本型实验、经典型实验、综合型实验和创新型实验的顺序编写,体现了操作技术由基本到验证,由综合应用到创新的过程。综合型实验和创新型实验在实际教学中要有选择的取舍,主要培养学生的整体思维,逻辑思维和独立学习能力。通过医学病原微生物学病例分析典型病例,引导学生将理论与临床实际问题相联系。

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、专科的医学病原微生物学实验教学。同时,本教材也是指导本科生开展科学的研究的参考书。

《医学微生物学实验教程》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。

# 前　　言

本教材编写过程中,广泛征求了《医学微生物学实验教程》教材主编和编委们的意见。但限于编者的水平和能力,在内容和编排上可能仍有缺漏之处,恳请广大同行和读者批评指正。谢谢!

## 主 编

2016年8月8日

# 目 录

## 前言

<b>绪论</b>	001
一、实验目的与要求	001
二、实验室规则	001
三、实验内容和方法	002
<b>第一章 基本型实验</b>	003
第一节 细菌形态结构的观察	003
一、光学显微镜油镜镜头的使用	003
二、细菌基本形态及特殊结构的观察	004
三、细菌不染色标本检查	004
四、革兰染色	006
五、细菌特殊结构染色	008
第二节 细菌的人工培养	009
一、常用培养基制备	009
二、细菌的分离培养与生长状态的观察	010
三、平板菌落计数	013
第三节 消毒灭菌技术	014
一、热力灭菌	014
二、过滤除菌	017
三、紫外线杀菌	018
四、化学消毒灭菌法	018
第四节 细菌的药物敏感性试验	019
一、纸片扩散法	019
二、稀释法	021

第五节 细菌的遗传与变异 .....	023
一、细菌变异现象的观察 .....	023
二、细菌耐药质粒的提取与转化 .....	025
三、R因子传递试验 .....	027
第六节 细菌代谢产物的检测 .....	027
一、单糖发酵试验 .....	027
二、IMViC 试验 .....	028
三、H <sub>2</sub> S 试验 .....	030
四、尿素酶试验 .....	030
五、内毒素的检测 .....	031
 第二章 经典型实验 .....	033
第一节 化脓性球菌检测 .....	033
一、常见化脓性球菌的形态观察 .....	033
二、常见化脓性球菌的培养特征 .....	034
三、血浆凝固酶试验 .....	034
四、触酶试验 .....	035
五、耐热核酸酶试验 .....	036
六、ASO 试验(ASO) .....	036
七、胆汁溶菌试验 .....	037
八、氧化酶试验 .....	038
第二节 肠道杆菌检测 .....	039
一、肠道杆菌的形态观察 .....	039
二、肠道杆菌的培养特征 .....	039
三、肠道杆菌的生化反应 .....	040
四、肥达(Widal)试验 .....	041
第三节 厌氧性细菌检测 .....	043
一、常见厌氧芽孢梭菌的形态观察 .....	043
二、常见厌氧芽孢梭菌的培养特征 .....	044
三、“汹涌发酵”试验 .....	045
四、脂酶试验 .....	046
五、产气荚膜梭菌动物试验 .....	046
第四节 呼吸道感染细菌检测 .....	047
一、常见呼吸道感染细菌形态观察 .....	047
二、结核分枝杆菌和白喉棒状杆菌培养特征 .....	048

三、分枝杆菌菌种鉴定 .....	048
四、抗酸染色 .....	049
五、结核菌素试验 .....	049
六、流感嗜血杆菌卫星试验 .....	050
第五节 其他微生物检测 .....	051
一、其他微生物的形态观察 .....	051
二、其他微生物的培养特征 .....	052
三、炭疽芽胞杆菌串珠实验 .....	052
四、放线菌属硫黄样颗粒检测 .....	053
五、梅毒螺旋体 RPR 试验 .....	054
六、解脲脲原体脲酶试验 .....	055
七、外斐(weil-felix)反应 .....	056
第六节 真菌学实验 .....	057
一、真菌形态结构观察 .....	057
二、真菌的培养特征 .....	059
三、常见浅部感染真菌检测 .....	060
四、常见深部感染真菌检测 .....	060
第七节 病毒 .....	062
一、病毒的鸡胚培养 .....	062
二、病毒的组织培养 .....	064
三、空(蚀)斑形成试验 .....	066
四、流感病毒的血凝试验 .....	066
五、血细胞凝集抑制试验 .....	068
六、胶体金标记抗体一步法检测 HBsAg .....	069
七、ELISA 检测 HIV 抗体 .....	070
第三章 综合型实验 .....	073
一、脓汁标本病原微生物的分离鉴定 .....	073
二、痰液标本病原微生物的分离鉴定 .....	075
三、尿液标本病原微生物的分离鉴定 .....	078
四、生殖道标本病原微生物的分离鉴定 .....	080
五、粪便标本病原微生物的分离鉴定 .....	082
六、血液标本病原微生物的分离鉴定 .....	084
七、脑脊液标本病原微生物的分离鉴定 .....	086
八、组织标本病原微生物的分离鉴定 .....	088

九、鲜奶中微生物的检测 .....	091
<b>第四章 创新型实验 .....</b>	<b>094</b>
一、药用植物内生菌的多样性分析 .....	094
二、幽门螺杆菌小鼠感染模型的建立及鉴定 .....	095
三、结核分枝杆菌临床分离株耐药性分析 .....	096
四、肺炎克雷伯菌 CRP 调控子对细菌毒力及生物膜形成的影响 .....	097
五、医院鲍曼不动杆菌的分布及耐药性研究 .....	098
<b>第五章 病例分析 .....</b>	<b>100</b>
病例一 .....	100
病例二 .....	100
病例三 .....	100
病例四 .....	101
病例五 .....	101
病例六 .....	101
病例七 .....	102
病例八 .....	102
病例九 .....	103
<b>附录 .....</b>	<b>104</b>
一、实验设计 .....	104
二、实验室常见意外事故的处理 .....	105
三、菌种保存 .....	106
四、常用试剂及培养基制备 .....	110
五、国家临床执业医师医学综合笔试大纲(医学微生物学部分,2016 年) .....	115

# 绪 论

医学病原微生物学实验教学是病原生物学教学的重要组成部分,是临床微生物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础。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微生物斗争的严峻挑战。

## 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、掌握医学病原微生物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与实验结果的分析,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) 每次实习前必须做好预习,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,并进行积极的思考,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,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在非操作区,以免污染。
- (2) 进入实验室应穿好隔离衣、戴好帽子和口罩。
- (3) 保持实验室肃静和秩序,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,经半小时后方可抹去。如手上沾有活病原微生物也应用上述消毒液浸泡 10 min 左右,再以肥皂及自来水反复洗净。

(7) 易燃物品(酒精、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,如不慎损坏了器材等,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,必要时用消毒液泡手,再用自来水冲洗干净。轮流值日,保持实验室的整洁,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知识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。微生物主要是一些细菌、真菌形态的观察。细菌一般用 1 000 倍的油镜观察,多数真菌可用 400 倍的高倍镜观察。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(图 0-1)。

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。

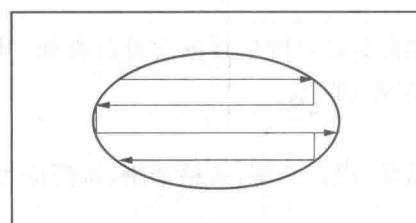


图 0-1 顺序观察标本示意图

## 第一章

# 基本型实验

## 第一节 细菌形态结构的观察

### 一、光学显微镜油镜镜头的使用

观察细菌最常用的仪器是光学显微镜,细菌的大小通常以微米( $\mu\text{m}$ )为单位,需借助油镜放大至1 000倍才能看清楚。

#### 【实验目的】

- (1) 了解显微镜的基本结构。
- (2) 掌握油镜的使用方法。

#### 【实验材料】

显微镜、待检细菌标本片、香柏油、镜头清洗液、擦镜纸。

#### 【实验方法】

1. 油镜的识别 油镜镜头上标有“100 $\times$ ”;镜头前端有白色或红色的圆圈;刻有“Ⅲ”或“Oil”等,其入光孔径较其他物镜小。

#### 2. 油镜的使用

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

(2) 固片:将标本(涂面向上)置于载物台上,保持水平状态,以免液体标本或香柏油流动。

(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,抬起镜头,在标本上滴加一滴香柏油,换用油镜镜头,从侧面观察,缓慢转动粗调节器,使载物台缓缓上升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,

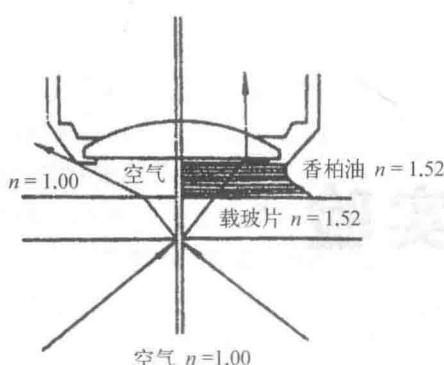


图 1-1 油镜加香柏油的原理

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、菌毛和芽胞。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: 大肠杆菌。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 芽胞: 破伤风杆菌芽胞。

### 【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, 而且革兰染色结果亦不同。
2. 杆菌 革兰阴性的短杆菌。
3. 弧菌 革兰阴性菌, 菌体略带弯曲, 呈弧形。
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。
  - (2) 芽胞: 经芽胞染色后, 可见菌体顶端或内部有一圆形直径大于菌体的结构。
  - (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。

## 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, 呈左右前后位置变化不大的颤动, 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】

- (1) 了解细菌动力的显微镜检查法。
  - (2) 观察有鞭毛菌与无鞭毛菌运动的特点。
- ### 【实验材料】
- (1) 载玻片、凹玻片、凡士林、盖玻片、接种环、酒精灯。
  - (2) 变形杆菌及葡萄球菌 8~12 h 肉汤培养物。

### 【实验方法】

#### 1. 悬滴法

(1) 取洁净凹玻片和盖玻片各一张, 步骤1  
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, 黏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。

#### 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, 先用盖玻片一边接触菌液(或先使中央与液滴接触)缓缓放下盖玻片, 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, 其量以盖片后无菌液溢出盖玻片为度。
- (3) 将载玻片置于镜台上, 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, 但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。

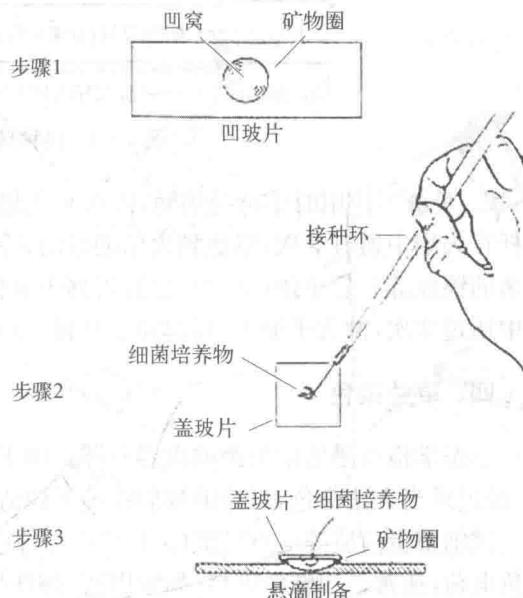


图 1-2 悬滴法

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,分别用于取液体和固体待检标本。

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3~4 mm,长40~50 mm,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,以达到灭菌的目的,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,在显微镜下不易观察,经过适当方法染色,可帮助我们在镜下较清晰地观察其形态特征,从而协助鉴别细菌。

因细菌蛋白质等电点较低(pH 2~5),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、酸性品红、甲紫等)使其着色。

染色方法有单染与复染之分。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】

- (1) 掌握细菌涂片制作、革兰染色的方法及意义。
- (2) 熟悉革兰染色法的原理。

##### 【实验材料】

- (1) 葡萄球菌和大肠杆菌混合液(18~24 h 培养物)、牙垢。
- (2) ① 结晶紫染液;② 碘液(媒染剂);③ 95%乙醇(脱色剂);④ 稀释苯酚复红液(复染剂)。
- (3) 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: 取洁净的载玻片一块,用蜡笔标记两区,用灭菌接种环取一环葡萄球菌和

大肠杆菌混合液,在一端涂抹成直径约1 cm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1 min后水洗,并将玻片上的积水轻轻甩掉。

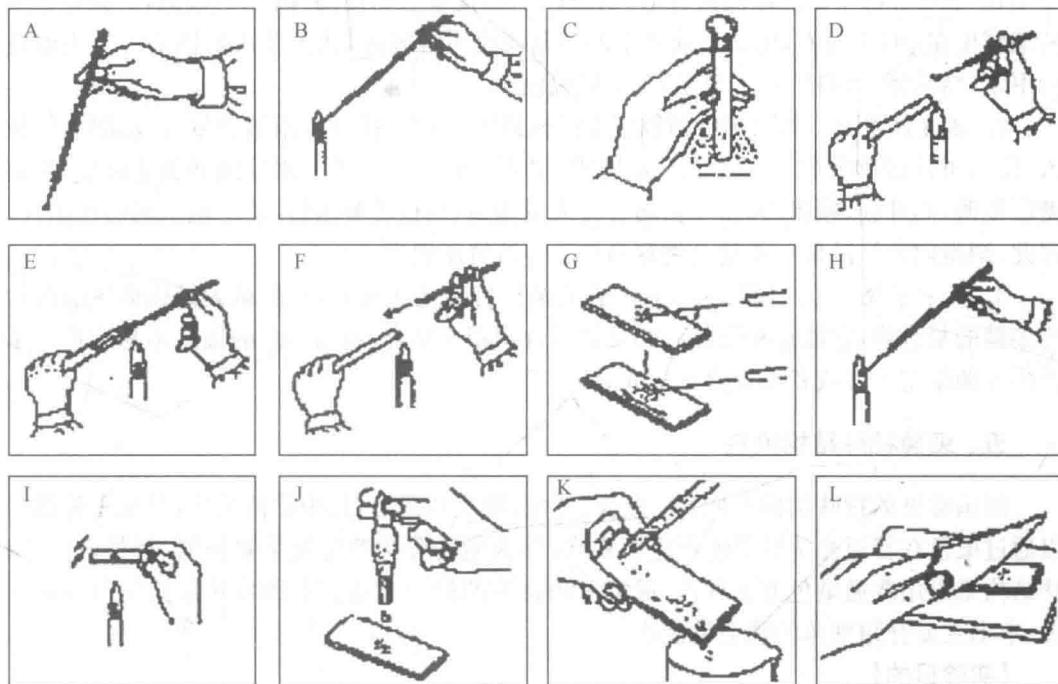


图1-4 细菌染色标本制作及染色过程

A. 取接种环;B. 烧灼接种环;C. 摆匀细菌;D. 烧灼管口;E. 取一环菌液;F. 取菌毕,烧灼管口,塞上塞子;G. 将菌液涂布在玻片上;H. 烧灼接种环;I. 固定;J. 染色;K. 水洗;L. 吸干

(2) 媒染:加碘液媒染1 min,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,直至流下乙醇无色或稍呈淡紫色为止(约30 s),水洗甩干。

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

## 【实验结果】

显微镜下可见两种细菌的形态及染色性,葡萄球菌被染后呈紫色,为革兰阳性菌(G<sup>+</sup>);大肠杆菌被染后呈红色,为革兰阴性菌(G<sup>-</sup>)。牙垢涂片可见大量细菌,从形态上