



普通高等专科教育药学类规划教材

(供药学专业用)

微生物学 实验

WEISHENGWUXUE SHIYAN

主编 毛季琨 主审 唐珊熙

中国医药科技出版社

普通高等专科学校教育药学类规划教材

微生物学实验

(供药学专业用)

主 编 毛季琨 (湖南医学高等专科学校)

主 审 唐珊熙 (海军医学高等专科学校)

参编人员 李文汉 (海军医学高等专科学校)

阎浩林 (沈阳药科大学)

江苏工业学院图书馆
藏书章

中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书是根据全国普通高等专科学校教育药学类规划教材建设委员会的要求而组织编写,供全日制药学专业大专层次的学生使用,与理论教材《微生物学》(唐珊熙主编,牟家琬主审)相配套的实验教材。

全书包括微生物学实验(含免疫学实验)的基本技能训练和控制药品质量的微生物学检验方法两部分,共二十一个实验。每个实验后附有思考题。本书针对药学专业的特点,理论联系实际,实用性强,适合大专层次培养应用型人才的需要。

本书亦可作为医药院校药学专业大专层次成人教育的教材或供其他医药人员及微生物学实验技术人员作参考资料。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验/毛季琨主编. —北京:中国医药科技出版社, 1998.7
普通高等专科学校教育药学类规划教材

ISBN 7-5067-1787-5

I. 微… II. 毛… III. 微生物学-实验-高等教育-教材
IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 13209 号

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲 22 号

邮编 100088

电话 010-62244206

网址 www.mpsky.com.cn www.cspyp.cn

规格 787×1092mm $\frac{1}{16}$

印张 6

字数 134 千字

印数 33001—37000

版次 1998 年 7 月第 1 版

印次 2006 年 7 月第 8 次印刷

印刷 北京兴华印刷厂

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 7-5067-1787-5/G·0149

定价 8.00 元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

普通高等专科学校教育药学类
规划教材建设委员会

名誉主任委员：郑筱萸

主任委员：姚文兵

副主任委员：尹 舫 宋丽丽

委 员：(按姓氏笔画为序)

丁 红 毛季琨 王树春

王桂生 刘志华 朱家勇

宋智敏 陈天平 林 宁

罗向红

秘 书：浩云涛 高鹏来

序 言

我国药学高等专科学校教育历史悠久,建国后有了较大发展。但几十年来一直未能进行全国性的教材建设,在一定程度上影响了专科教育的质量和·发展。改革开放以来,专科教育面临更大的发展,对教材的需要也更为迫切。

国家医药管理局科技教育司根据国家教委(1991)25号文的要求负责组织、规划高等药学专科教材的编审出版工作。在国家教委的指导下,在对全国高等药学专科教育情况调查的基础上,普通高等专科学校教育药学类教材建设委员会于1993年底正式成立,并立即制订了“八五”教材编审出版规划。在全国20多所医药院校的支持下,成立了各门教材的编审专家组(共51人)和编写组(共86人),随即投入了紧张的编审、出版工作。经100多位专家组、编写组教师和中国医药科技出版社的团结协作、共同努力,建国以来第一套普通高等专科学校教育药学类规划教材终于面世了。

该套规划教材是国家教委“八五”教材建设的一个组成部分,编写原则是既要保证教材质量,又要反映专科的特色。同时,由于我们组织了全国设有药学专科教育的大多数院校和大批教师参加编审工作,既强调专家审稿把关的作用,也注意发挥中、青年教师的积极性,使该套规划教材能在较短时间内以较高质量出版,适应了当前高等药学专科教育发展的需求。在编写过程中,也充分注意目前高等专科教育中有全日制教育、函授教育、自学高考等多种办学形式,力求使该套规划教材具有通用性,以适应不同办学形式的教学要求。

高等药学专科教育的主要任务是为医药行业生产、流通、服务、管理第一线培养应用型技术人才。为此,在第一套普通高等专科学校教育药学类规划教材面世之后,我们又立即组织编审、出版了这套配套教材(实验指导、习题集),以加强对学生的实验教学,培养实际操作能力。从现实国情考虑,我们统筹规划、全面组织教材建设活动,是为了优化教材编审队伍,确保教材质量,规范教材规格。同时,为了照顾各地办学条件和实际需求的不同,在保证基本规格的前提下,提供了若干可供灵活选择的材料。今后,规划教材的使用情况将作为教学质量评估的基本依据之一。

配套教材出齐之后,我们将大力推动以上两套教材的使用,并组织修订及评优工作,竭诚欢迎广大读者对这两套教材的不足之处提出宝贵意见。

普通高等专科学校教育药学类
规划教材建设委员会

1998年3月

前 言

本书是根据全国普通高等专科教育药学类规划教材建设委员会的要求而组织编写，供全日制药学专业大专层次的学生使用，与理论教材《微生物学》（唐珊熙主编，牟家琬主审）相配套的实验教材。

全书包括微生物学实验（含免疫学实验）的基本技能训练和控制药品质量的微生物学检验方法两大部分，共二十一个实验。本书力求突出药学专业及专科层次的特点，注重理论联系实际，加强应用性，使学生通过实验教学，掌握必要的微生物学实验的基本技能，为今后学习其他专业课和从事药学工作奠定必要的基础。本书亦可作为医药院校药学专业大专层次成人教育的教材或供其他医药人员及微生物学实验技术人员作参考资料。

本书由毛季琨（主编）、李文汉、阎浩林等同志共同编写。唐珊熙教授担任主审，具体指导了本书的编写。本书插图由湖南医学高等专科学校王文同志绘制。本书在编写过程中，得到国家医药管理局科技教育司和各编写人员所在单位的领导及有关同志的热情支持、指导和帮助，在此致以衷心的感谢。

由于编者的水平有限，编写药学类专科实验教材尚缺乏经验，书中缺点和错误在所难免，我们恳切希望广大师生在使用过程中批评指正。

编 者

1998年1月

普通高等专科学校教育药学类规划教材配套教材目录

《高等数学解题指导》	杨继泰主编	张德舜主审
《无机化学实验》	彭夷安主编	侯新初主审
《有机化学实验》	伍焜贤主编	马祥志主审
《人体解剖生理学实验》	付建华主编	张尚俭主审
《微生物学实验》	毛季琨主编	唐珊熙主审
《分析化学实验》	马长清主编	张其河主审
《生物化学实验》	薛丽珠主编	赖炳森主审
《物理化学实验》	周传佩主编	侯新朴主审
《药理学实验》	王玉祥主编	张大禄主审
《药剂学实验》	林 宁主编	高鸿慈主审
《药物化学实验》	刘芳妹主编	孙常晟主审
《药物分析实验》	苏薇薇主编	蔡美芳主审
《天然药物化学实验》	李嘉蓉主编	杨其萱主审
《药用植物学实验》	汪乐原主编	许文渊主审
《生药学实验》	赵奎君主编	罗集鹏主审
《物理学实验》	贺德麟主编	潘百年主审

目 录

微生物学实验的目的与要求	(1)
微生物学实验室规则	(2)
实验一 显微镜的使用与细菌形态结构的观察	(3)
实验二 细菌染色法	(8)
实验三 基础培养基的制备	(11)
实验四 细菌的接种与培养	(14)
实验五 细菌的生化反应	(21)
实验六 放线菌 真菌	(25)
实验七 病毒 螺旋体	(29)
实验八 微生物的分布	(32)
实验九 消毒灭菌	(36)
实验十 细菌的变异	(41)
实验十一 血清学反应 (一) ——凝集反应	(44)
实验十二 血清学反应 (二) ——沉淀反应	(47)
实验十三 动物血清过敏反应	(51)
实验十四 常用生物制品	(53)
实验十五 药物的体外抗菌试验	(59)
实验十六 抗生素效价的微生物学测定	(64)
实验十七 灭菌制剂的无菌检验	(68)
实验十八 口服药物的微生物学检验	(70)
实验十九 药品中大肠杆菌的检验	(73)
实验二十 药品中金黄色葡萄球菌的检验	(76)
实验二十一 药品中绿脓杆菌的检验	(79)
附 录	(82)

微生物学实验的目的与要求

微生物学实验是微生物学课程的重要组成部分，其目的在于通过实验，使学生巩固和加深所学的理论知识，掌握必要的微生物学基本技术，培养独立观察、思考和分析、解决问题的能力，为今后进行药物制剂及药物的微生物学检查打下一定的基础。

微生物学实验的形式可分为教师示教（亦可播放电视教学录相片）和学生操作两种。为提高实验课的效果，特提出以下几点要求：

一、严格遵守微生物学实验室规则，树立“无菌观念”，正确掌握无菌操作技术。

二、每次实验课前应作好预习，明确实验目的与要求，了解实验内容及原理，作好实验前的必要准备工作，避免在实验中发生差错及事故。

三、在实验过程中应严肃认真，对示教性实验，应注意仔细观察，及时记录结果；对自己操作的实验，要按实验要求与步骤进行；对一些较复杂的实验，应与其他同学作好分工协作，注意合理分配和运用时间。

四、对每次实验结果应仔细、客观、详细地记录或绘图说明，若实验结果与理论不符，应认真分析，找出原因，必要时应重复实验。

五、注意安全，严防发生各类事故。实验完毕，应整理好实验桌面，搞好实验室清洁卫生。

微生物学实验室规则

一、进入实验室后，必须先穿好实验工作服，以防被细菌等微生物污染；离开实验室时，应脱下实验工作服，反拆挂回原处；实验工作服应经常洗涤、消毒，保持干净。

二、除必要的书籍、实验报告及文具外，其他个人物品（如书包、餐具等），一律不得带入实验室；未经教师允许，不得将实验室内物品带出。

三、实验室应保持安静、有序，严禁食用任何食品或吸烟，不得高声谈笑和随意走动，以免影响他人实验。

四、严格遵守实验操作规程和无菌操作技术，各类微生物及其培养物应轻拿轻放，以免容器破损，造成污染。

五、实验中用过的器材必须放在指定的地点或按特殊要求处理，切不可乱丢乱放。

六、实验过程中万一发生有菌材料污染桌面、用具物品，应立即报告教师，及时进行处理：

若桌面、地面被细菌等微生物污染，可将3%来苏尔或0.1%新洁尔灭等消毒液倒在污染处，30min后擦去。

若手上沾有活菌，应浸泡在上述消毒液中10~20min后，再用肥皂及水洗净。

若吸入细菌菌液等，应立即吐出，并用0.1%高锰酸钾溶液或3%双氧水漱口，必要时可口服抗菌类药物。

七、爱护公物，节约使用实验器材，如损坏器材，应主动报告教师，听候处理。

八、实验完毕，将需培养的物品作好标记，放入恒温箱；清理好实验桌面，物归原处；脱下实验工作服，洗手后方可离开实验室。

九、值日生应将实验室打扫干净，并用消毒液擦拭桌面，在确认水、电、煤气、窗等已经关好后，方可离开实验室。

实验一 显微镜的使用与细菌形态结构的观察

【目的要求】

1. 熟悉普通光学显微镜的主要构造和一般维护方法。
2. 了解油浸镜的使用原理，掌握显微镜油浸镜的正确使用方法。
3. 熟悉细菌基本形态和特殊结构的观察技术。

【实验原理】

细菌个体微小，需借助显微镜放大数百倍、上千倍才能看到。显微镜的种类很多，根据不同的目的要求，可选用普通光学显微镜、暗视野显微镜、荧光显微镜、电子显微镜等。在微生物学实验中，以普通光学显微镜（简称显微镜）最为常用。显微镜的物镜有低倍镜、高倍镜及油浸镜三种，而在细菌形态学检查中，最常用的为油浸镜（简称油镜）。

使用油镜与使用其他物镜不同之处是玻片与物镜之间不是以空气为介质，而是以镜油为介质，使物镜浸在油内，故称油镜。镜油常为香柏油。当玻片和油镜之间不加香柏油时，光线自玻片透过进入空气后，再进入油镜内，因空气与玻璃介质密度不同（空气折光率 $n=1$ ），光线发生折射现象，由于油镜的透镜很小，因此进入物镜中的光线很少，所见的视野很暗，物像不清晰。在玻片与油镜之间加上香柏油后，因香柏油的折光率（ $n=1.515$ ）与玻璃的折光率（ $n=1.52$ ）相近，光线透过玻片通过香柏油进入油镜内而较少发生折射，使更多的光线进入油镜，使视野亮度增加，从而提高了显微镜的分辨力，故观察物像更清晰（图 1-1）。

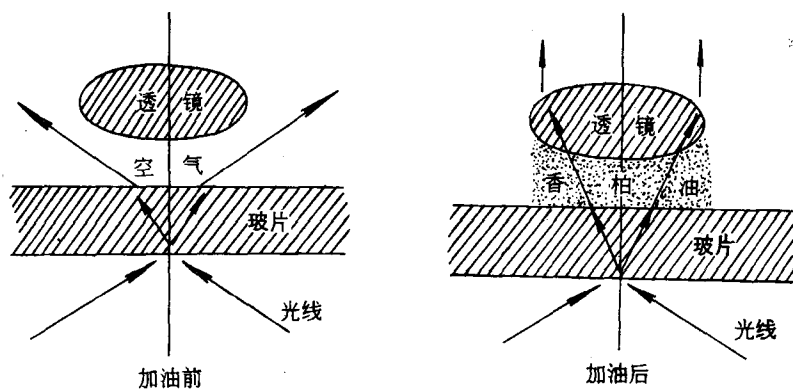


图 1-1 油镜使用的原理

细菌按基本形态可分为球菌、杆菌和螺形菌三类,某些细菌还具有鞭毛、荚膜、芽胞、菌毛等特殊结构。细菌的基本形态和特殊结构是鉴别细菌的重要依据,要清楚地观察细菌的形态与结构须用显微镜放大以及经合适的染色。

【实验内容】

一、显微镜油镜的使用与维护

(一) 材料

1. 标本: 已制备细菌染色标本的载玻片。
2. 试剂: 香柏油、二甲苯。
3. 其他: 显微镜、擦镜纸等。

(二) 方法

1. 光学显微镜的构造

普通光学显微镜是微生物学实验室最常用的仪器,它的结构分为机械部分和光学部分(图 1-2)。

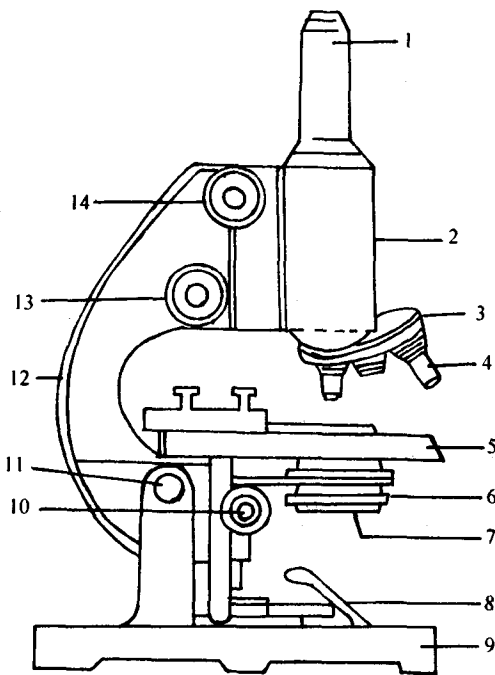


图 1-2 光学显微镜的构造

1. 目镜; 2. 镜筒; 3. 镜头转换器; 4. 物镜;
5. 载物台; 6. 聚光器; 7. 光圈; 8. 反光镜;
9. 镜座; 10. 聚光器调节器; 11. 关节;
12. 镜臂; 13. 细调节器; 14. 粗调节器

(1) 机械部分

镜筒: 位于显微镜的前上方,上端连接目镜,下端连接物镜,有单筒、双筒两种。倾斜双筒镜上端有两个目镜,使用时眼睛不易疲劳。

镜臂: 位于镜筒的后面,为弓形金属柱,为支持镜身和搬移显微镜时握持部位。

镜座: 位于显微镜的底部,是支持全镜的底座。

镜头转换器: 位于镜筒下端,上有 3~4 个圆孔,可装配不同放大率的物镜,此转换器可转动以转换物镜。

调节器: 是调节焦距的装置,分粗调节器和细调节器两种,均可来回转动用以上下移动镜筒(有的显微镜是通过上下移动载物台)调节焦距。粗调节器转动时,镜筒升降距离大,用于粗略调焦;细调节器转动时,镜筒升降距离小,用于精确调焦。在用粗调节器未找到物像前,不要使用细调节器,以免磨损细调螺旋。

载物台: 是镜筒下的平台,用以载放被检标本。台中央有孔,可使光线通过。载物台上装有片夹以固定标本,有的装有推进器,不但可固定标本,还可将标本前后左右移动。

(2) 光学部分

目镜：又称接目镜，安放于镜筒上端。目镜有放大 5 倍、10 倍、15 倍三种，分别刻有“5×”、“10×”、“15×”标记。为便于指示物像，目镜中常装有指针。使用时一般采用“10×”的目镜。

物镜：又称接物镜，装在转换器的圆孔内，一般有 3-4 个物镜，分别刻有放大倍数标记：“10×”、“45×”、“100×”。习惯上把放大 10 倍以下的物镜称为低倍镜，放大 40 倍左右的物镜称为高倍镜，放大 90~100 倍的物镜称为油镜。物镜可由其外形加以辨认，放大倍数小者，镜头较短，镜片口径大；放大倍数大者，镜头较长，镜片口径小。油镜常有以下几种标记：放大倍数“90×”、“100×”；镜头上常标有黑色、白色或红色的圆圈；镜头刻有“油”或英文“HI”、“Oil”等字样。

聚光器：又称集光器，位于载物台下，由数个透镜组成，能调节和集聚由反光镜反射来的光线，使光线集中在载玻片上。聚光器可上下移动，随意调节到所需要的亮度。在聚光器下方装有虹彩光圈，以通过光束直径的变化调节光照强度和聚光器的镜口率。

反光镜：位于聚光器的下方，可使光线反射至聚光器。反光镜的一面为平面镜，另一面为凹面镜，根据需要可自由转换。一般采集自然光时用平面镜，使用人工光源时用凹面镜。

2. 显微镜油镜的使用

(1) 使用显微镜时，应将显微镜平稳安放在实验台上，不应将镜臂弯曲造成载物台倾斜，致使标本片上镜油或菌液流淌外溢，影响观察或造成污染。

将标本载玻片置于载物台上，用推进器的片夹固定，转动推进器螺旋，将载玻片上标本部分移至物镜镜头下。

(2) 调节光源，对好光线。将低倍镜旋至镜筒下方，根据光源，选择平面镜或凹面镜。从目镜观察，并转动反光镜，使光线集中于聚光器。升降聚光器以调节光线强弱（上升光线增强，下降光线减弱）。开闭光圈成适当大小，以调节光线的多寡（开大光线增强，闭小光线减弱）。一般细菌染色标本用油镜观察时，光亮度要求较强，因此聚光器要尽量上升，光圈要全部打开；而不染色标本用低倍镜或高倍镜观察时，光亮度宜较弱。

(3) 调节焦距。用低倍镜或高倍镜时，顺时针方向转动粗调节器，同时从显微镜侧面观察，使物镜接近标本片（约 0.5cm），再从目镜观察，并逆时针方向缓缓转动粗调节器（此时物镜上升或载物台下降），直至标本中的物像基本清晰为止，再转动细调节器调至物像清晰。

使用油镜观察时，应将油镜头转换至镜筒下。在载玻片待检标本部位滴加一小滴香柏油，油勿过多，不要将油涂开。将载玻片置载物台上，将待检部位移至油镜头下。从显微镜侧面观察，顺时针方向转动粗调节器，缓缓地使油镜头浸入油滴内，使其镜面几乎与标本片接触，但两者切不可相碰！因用力过猛，不仅易压碎标本片，还会损坏镜头。然后用目镜观察，逆时针方向缓慢转动粗调节器，获得模糊物像时，再转动细调节器，至视野内物像清晰为止。如转动粗调节器未获得物像，镜头已离开油面，则需重新开始操作。

(4) 观察标本时，坐姿应端正，通过调节推进器的螺旋，前后左右观察标本的各个部分。若用单筒显微镜，左眼观察，右眼应睁开，以减轻疲劳。

(5) 观察完毕, 向上转动粗调节器使镜筒上升, 取下标本片, 用擦镜纸擦去油镜头上镜油。如油已干, 可用擦镜纸沾取少许二甲苯, 擦拭镜头上的油迹, 随即用一块干净擦镜纸擦去镜头上残存的二甲苯, 以防镜片脱落。最后将两个物镜转换成“八”字形, 以防物镜与聚光器碰撞受损。

3. 显微镜的维护

显微镜是贵重精密的光学仪器, 使用时要精心爱护。取送显微镜时, 应右手持镜臂, 左手托镜座, 以免反光镜松脱受损; 不准碰撞或随意拆卸显微镜部件; 避免日光直接照射显微镜光学部分, 如镜头等; 避免触及强酸、强碱、有机溶剂等化学药品, 以免损坏机件; 各个光学部分的镜面切忌用手触摸, 以免油迹、汗污损坏镜面; 显微镜必须保持清洁, 放置于干燥处, 以防透镜长霉。

二、细菌基本形态的观察

(一) 材料

1. 标本: 球菌革兰染色示教片: 葡萄球菌、链球菌、脑膜炎双球菌。杆菌革兰染色示教片: 大肠杆菌、白喉杆菌、破伤风杆菌、痢疾杆菌。螺杆菌革兰染色示教片: 霍乱弧菌。
2. 试剂: 香柏油、二甲苯。
3. 其他: 显微镜、擦镜纸等。

(二) 方法

用显微镜油镜观察细菌革兰染色示教片, 注意细菌的形态、大小、排列方式与染色性。

(三) 结果

将观察结果绘图说明。

三、细菌特殊结构的观察

(一) 材料

1. 标本: 变形杆菌鞭毛染色示教片、肺炎双球菌荚膜染色示教片、破伤风杆菌芽胞染色示教片。
2. 试剂: 香柏油、二甲苯。
3. 其他: 显微镜、擦镜纸等。

(二) 方法

用显微镜油镜观察上述细菌特殊结构示教片。注意鞭毛和菌体的颜色, 鞭毛的数量、位置; 荚膜与菌体的位置、颜色, 荚膜的宽度; 芽胞的形态、大小及位置。

(三) 结果

将观察结果绘图说明。

细菌菌毛也是细菌的特殊结构, 但必须用电子显微镜才能看到。可通过观看细菌菌毛的电镜照片, 了解其形状、数量、长度, 并比较普通菌毛与性菌毛的区别。

【思考题】

1. 如何识别普通光学显微镜的油镜头? 怎样正确使用油镜?

2. 为什么要选用香柏油作为油镜的镜油？油镜的原理是什么？
3. 能否仅根据细菌的形态来鉴别细菌？
4. 细菌的特殊结构有哪些？它们在医学上各有何实际意义？

(毛季琨)

实验二 细菌染色法

【目的要求】

1. 掌握细菌染色标本的制备。
2. 了解细菌染色方法的一般原则，掌握单染色法和革兰染色法及其结果判断。
3. 熟悉革兰染色法在鉴定细菌上的重要意义。

【实验原理】

细菌染色法是细菌形态学检查的一项基本技术。由于细菌个体微小，无色半透明，在普通光学显微镜下不易观察清晰，一般需经染色来增加反差，从而有利于对细菌标本的观察。染料有带阴离子着色基团的酸性染料和带阳离子着色基团的碱性染料。在一般生理条件下（pH7.4左右），细菌菌体都带负电荷，故用于细菌染色的染料多为带阳离子着色基团的苯胺染料，如美蓝、结晶紫、碱性复红等，它们较容易与细菌菌体结合。

细菌染色法可分单染色法和复染色法两大类。单染色法只用一种染料，所染的细菌均被染成一种颜色，可用来观察细菌的形态和排列方式，一般无鉴别细菌的作用。复染色法通常是用两种以上染料进行染色，由于不同种类细菌或同种细菌的不同结构对染料有不同的反应性，而被染成不同的颜色，从而有鉴别细菌的作用，故又称鉴别染色法。

革兰（Gram）染色法是最常用的一种鉴别染色法。用本法不仅可以观察细菌的形态和排列，还可根据染色结果将所有细菌分成革兰阳性菌与革兰阴性菌两大类：不被酒精脱色仍保留紫色者为革兰阳性菌（G⁺菌），被酒精脱色后复染成红色者为革兰阴性菌（G⁻菌）。革兰染色法不仅有助于细菌的鉴别，同时还为分析细菌的致病性和选用抗菌药物提供了依据。

在细菌标本染色前，必须将细菌固定在载玻片上，常用的固定方法为加热法，其目的是杀死细菌，且保持原有形态，并使细菌粘附在载玻片上，不致染色时脱落。

【实验内容】

一、细菌涂片标本的制作

（一）材料

1. 菌种：大肠杆菌 18~24h 琼脂斜面培养物、葡萄球菌 18~24h 琼脂斜面培养物、大肠杆菌和葡萄球菌的混合菌液。
2. 其他：载玻片、生理盐水、接种环、酒精灯等。

（二）方法

1. 涂片

取洁净的载玻片一张，滴一小滴生理盐水于载玻片中央。将接种环在酒精灯火焰上烧灼灭菌冷却后，从琼脂斜面上沾取少许菌苔混入载玻片上的生理盐水中，磨匀并涂抹成直径1.5cm左右的均匀薄层菌膜。将接种环灭菌后放回原处。如用菌液制作涂片，则不加生理盐水，直接用接种环取菌液涂抹于载玻片上。亦可在同一载玻片上，用特制蜡笔划为二格，每格涂抹一种细菌。

2. 干燥

将上述涂片置于桌面上，任其自然干燥；或将涂有细菌的一面朝上，在酒精灯火焰上方烘干，但切勿紧靠火焰，防止细菌烤焦。

3. 固定

手持载玻片一端，涂有细菌标本的一面朝上，将载玻片在酒精灯火焰外层（最热部分）来回快速通过3次，使涂抹的细菌固定于载玻片上。固定时，温度不能太高，以手背皮肤触及载玻片时不感觉过烫为宜，千万不得将载玻片停留于火焰上灼烤。

（三）结果

按上述方法制备的细菌涂片可见在涂抹部位有一层薄而均匀的菌膜。

二、单染色法

（一）材料

1. 涂片：已制备的细菌涂片。
2. 试剂：吕氏美蓝染液或复红染液、香柏油、二甲苯。
3. 其他：显微镜、擦镜纸、吸水纸等。

（二）方法

1. 将制备的细菌涂片平置于桌面，滴加吕氏美蓝染液（或复红染液）于载玻片的细菌涂抹处，染液以覆盖涂抹的标本为度，染色时间1~2min。
2. 倾去染色液，用细水流自载玻片一端冲洗去多余的染液。
3. 洗毕，甩净载玻片上的积水，并用吸水纸吸干。
4. 待涂片自然干燥后，于涂抹处滴加香柏油，置油镜下观察染色结果。

（三）结果

经美蓝染液单染色后，所有细菌均染成蓝色；若用复红染液单染色，则所有细菌均染成红色。

三、革兰染色法

（一）材料

1. 涂片：用葡萄球菌和大肠杆菌混合菌液制备的细菌涂片。
2. 试剂：革兰染色液（结晶紫染液、95%酒精、卢戈碘液、稀释复红染液）、香柏油、二甲苯。
3. 其他：显微镜、擦镜纸、吸水纸等。

（二）方法