

“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8年制及7年制（“5+3”一体化）临床医学等专业用

医学微生物学 实验指导

主 编 徐志凯
副主编 江丽芳 黄 敏

MEDICAL
ELITE EDUCATION

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8年制及7年制(“5+3”一体化)临床医学等专业用

医学微生物学 实验指导

主 编 徐志凯

副主编 江丽芳 黄 敏

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 丽(吉林大学白求恩医学部)

王明丽(安徽医科大学)

龙北国(南方医科大学)

叶嗣颖(华中科技大学同济医学院)

刘 力(北京协和医学院)

江丽芳(中山大学中山医学院)

汤 华(天津医科大学)

李 凡(吉林大学白求恩医学部)

李明远(四川大学华西医学中心)

李婉宜(四川大学华西医学中心)

严 杰(浙江大学医学院)

杨 春(重庆医科大学)

吴兴安(第四军医大学)

张力平(首都医科大学)

陈利玉(中南大学湘雅医学院)

林 旭(福建医科大学)

罗恩杰(中国医科大学)

钟照华(哈尔滨医科大学)

胡福泉(第三军医大学)

郭晓奎(上海交通大学医学院)

郭德银(武汉大学医学院)

贾继辉(山东大学医学院)

徐纪茹(西安交通大学医学部)

徐志凯(第四军医大学)

黄 敏(大连医科大学)

彭宜红(北京大学医学部)

瞿 涤(复旦大学上海医学院)

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学微生物学实验指导 / 徐志凯主编. —北京:
人民卫生出版社, 2016

ISBN 978-7-117-22067-5

I. ①医… II. ①徐… III. ①医学微生物学 -
实验 - 医学院校 - 教学参考资料 IV. ①R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 025935 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	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!

医学微生物学实验指导

主 编: 徐志凯

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

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

印 刷: 北京机工印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 8 插页: 2

字 数: 205 千字

版 次: 2016 年 3 月第 1 版 2016 年 3 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-22067-5/R · 22068

定 价: 28.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: 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

《医学微生物学实验指导》是全国高等学校八年制临床医学专业规划教材《医学微生物学》(第3版)的配套教材,由全国24所重点高等院校的38位教师参加编写。

医学微生物学是一门实践性很强的学科,实验课教学是医学微生物学教学内容和教学过程的重要组成部分。本教材在内容上体现了理论知识与基本技术的有机结合。通过实验,可验证相关基础理论,巩固学到的理论知识;还可培养学生严谨的科学态度、动手操作的能力,相互配合的精神以及分析问题和解决问题的能力。

本教材编写过程中参考了国内多所院校编写的医学微生物学实验教材,并结合编者自己多年的教学经验,既保留了大多数传统、经典的实验内容,又根据微生物学的新进展,增加了一些新的实验内容。全书分为三篇,包括了细菌学、病毒学及其他病原微生物的53项实验内容;实验方法介绍具体,具有良好的可操作性。书后的附录列出了医学微生物学实验常用试剂配制和培养基制备的方法、微生物菌种的常用保藏方法及实验动物管理的相关内容,便于广大师生查阅参考。

本教材主要供临床医学专业八年制及基础医学、临床医学、口腔医学、预防医学、药学等医药专业的本科生使用,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。

本教材的编写出版,得到了人民卫生出版社的大力支持和帮助,参加编写的各位老师贡献了智慧,分享了经验,并付出了辛勤的劳动,在此一并表示衷心的感谢!

限于我们的水平和各院校实际开设实验课的差异,本教材中难免有错误和疏漏之处,诚恳希望读者和同道们批评指正。

徐志凯
2015年6月

目 录

医学微生物学实验的目的与要求	1
----------------	---

医学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 细菌涂片标本的制备及简单染色法	4
---------------------	---

实验三 细菌的革兰染色法	6
--------------	---

实验四 细菌特殊结构的染色法	7
----------------	---

实验五 活菌运动观察	9
------------	---

第二章 细菌的培养及其生化代谢产物的检查	11
----------------------	----

实验六 细菌的分离、培养与性状观察	11
-------------------	----

实验七 糖发酵试验	14
-----------	----

实验八 蛋白质代谢试验	16
-------------	----

实验九 其他代谢试验	17
------------	----

第三章 动物实验	19
----------	----

实验十 小白鼠腹腔接种方法	19
---------------	----

实验十一 小白鼠尸体解剖与细菌学检查	20
--------------------	----

第四章 细菌的遗传与变异及耐药性实验	22
--------------------	----

实验十二 噬菌体裂解细菌试验	22
----------------	----

实验十三 细菌的形态变异试验	23
----------------	----

实验十四 细菌的药物敏感性试验	25
-----------------	----

实验十五 细菌耐药性质粒转化试验	32
------------------	----

第五章 环境、体表细菌的检查及消毒与灭菌实验	34
------------------------	----

实验十六 环境中及人体表面细菌的检测	34
--------------------	----

实验十七 消毒与灭菌试验	37
--------------	----

第六章 病原性球菌的实验	43
实验十八 脓汁标本的检验	43
实验十九 血浆凝固酶试验	44
实验二十 抗链球菌溶血素“O”(ASO)试验——胶乳凝集法	45
实验二十一 病原性球菌相关鉴定试验	46
第七章 肠道杆菌的分离及鉴定实验	49
实验二十二 粪便标本的检验	49
实验二十三 肥达试验	52
第八章 霍乱弧菌、幽门螺杆菌实验	54
实验二十四 霍乱弧菌的检验	54
实验二十五 幽门螺杆菌的检验——快速尿素酶试验	55
第九章 呼吸道感染细菌的检验	57
实验二十六 结核分枝杆菌的检验	57
实验二十七 白喉棒状杆菌的检验	60
第十章 动物源性细菌的检验	63
实验二十八 炭疽芽胞杆菌的检验	63
实验二十九 布鲁菌的检验——平板凝集试验	64
实验三十 鼠疫耶尔森菌的形态观察	64

第二篇 病毒学实验

第十一章 病毒的形态学观察	66
实验三十一 电子显微镜观察负染病毒	66
实验三十二 病毒包涵体的检查	68
第十二章 病毒的分离培养实验	70
实验三十三 病毒的细胞培养方法	70
实验三十四 病毒的鸡胚培养方法	73
实验三十五 病毒的动物接种方法	74
第十三章 病毒的感染性测定实验	76
实验三十六 病毒的TCID ₅₀ 测定	76
实验三十七 病毒的空斑形成试验	77
第十四章 病毒抗原的检测	79
实验三十八 直接免疫荧光试验	79

实验三十九 酶联免疫吸附试验——双抗体夹心法·····	80
实验四十 Western blot·····	81
第十五章 病毒抗体的检测 ·····	84
实验四十一 血凝与血凝抑制试验·····	84
实验四十二 补体结合试验·····	86
实验四十三 酶联免疫吸附试验·····	90
实验四十四 微量细胞培养中和试验·····	92
实验四十五 空(蚀)斑减少中和试验·····	93
第十六章 病毒核酸的检测 ·····	95
实验四十六 多聚酶链反应定性检测病毒核酸·····	95
实验四十七 荧光定量PCR检测病毒核酸·····	96
实验四十八 原位杂交法检测病毒核酸·····	98
第三篇 其他病原微生物实验	
实验四十九 支原体感染的实验室检验·····	100
实验五十 衣原体的检验·····	104
实验五十一 钩端螺旋体的实验室检验·····	106
实验五十二 立克次体的检验·····	111
实验五十三 病原性真菌的检验·····	113
附录 ·····	115
一、医学微生物学实验常用试剂·····	115
(一)常用染色液的配制·····	115
(二)常用培养基的制备·····	116
(三)常用试剂和溶液的配制·····	117
二、菌种保藏与保管·····	119
(一)菌种的保藏·····	119
(二)菌种的保管·····	120
三、实验动物管理·····	121
(一)实验动物的选择·····	121
(二)实验动物的管理·····	121
参考文献 ·····	122

医学微生物学实验的目的与要求

《医学微生物学》是为医学类专业本科生开设的一门必修专业基础课程,而医学微生物学实验则是医学微生物学教学过程中的重要环节和内容之一。

一、医学微生物学实验的目的

1. 通过实验,验证医学微生物学的基本理论,进一步巩固和加深对基本理论知识的理解。
2. 通过实验课,学习和掌握医学微生物学实验的基本技术和方法。
3. 通过实验操作和实验报告的撰写,养成严谨的科学态度,实事求是的工作作风和团结协作的精神。
4. 培养创新思维能力和动手能力,为今后临床实践和科学研究奠定有益基础。

二、医学微生物学实验课要求

1. 实验前应做好预习,明确实验的目的要求及基本原理,熟悉实验操作的全过程。
2. 应仔细观察教师的示教,并联系相关理论知识,认真思考和记忆,加深理解。
3. 严格按照操作规范,认真进行实验,既重视独立操作,也注意分工合作。
4. 应客观地观察、记录、分析和判断实验结果,并结合相关理论知识进行归纳总结。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。
5. 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。
6. 必须严格遵守实验室规则,实验全过程均应严格按照规程进行操作,特别注意无菌操作,避免发生可能的事故。

医学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。

1. 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。
2. 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。
3. 凡具有传染性的培养物、带菌材料、动物、器具(如吸管、试管、载玻片)等,均须按规定处理,不得随便乱放及用水冲洗,带菌液体不得倾倒入水槽。
4. 实验中一旦发生意外,如吸入菌液、划破皮肤、菌液溅入眼内以及细菌污染实验台或地面等处时,应立即报告指导教师,进行相应处理。
5. 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。
6. 如打破实验器材时,须向指导教师报告,进行登记。
7. 未经许可,不得将实验室内的任何物品(特别是菌种)带出室外。
8. 实验操作中注意节约水、电、煤气、染色液以及其他材料。
9. 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,方可离开实验室。

第一篇 细菌学实验

第一章 细菌的染色与形态、结构观察

实验一 油浸显微镜的使用和保护

显微镜是一种精密的放大仪器。由于微生物的体积微小,因此必须在显微镜下才能观察到。根据不同的观察目的和要求,可分别选用普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜、激光共聚焦显微镜和电子显微镜等。其中以普通光学显微镜最为常用,而普通光学显微镜的使用中又以油浸显微镜(油镜)为主。

普通光学显微镜的大致构造如图1-1所示。

1. 光学部分 物镜(包括高倍镜、低倍镜和油镜),目镜,集光器,反光镜等。

2. 机械部分 镜筒,镜臂,镜座,回转板,倾斜关节,调节器(包括粗准焦螺旋和细准焦螺旋),载物台(通光孔、压片夹),通光孔,反光镜(平面镜、凹面镜)等。

【实验材料】

1. 普通光学显微镜。
2. 细菌染色标本。
3. 香柏油、二甲苯、擦镜纸等。

【实验方法与步骤】

1. 显微镜的使用

(1) 油镜的识别: 显微镜油镜头上常有下列几种标记。

- 1) 放大倍数是 $90\times$ 或 $100\times$ 。
- 2) 数值孔径为NA 1.25。
- 3) 刻有“油”或“oil”等字样。

(2) 油镜的使用程序

1) 对光: 显微镜直立在桌上,将集光器升起与载物台孔平行,并将光圈轻轻开至最大,再转动反光镜,使光线集中于集光器。光强时用平面,光弱时用凹面。

2) 放置标本片: 将标本片放置在载物台上,用弹簧夹或标本推进器固定,将待检部分移置

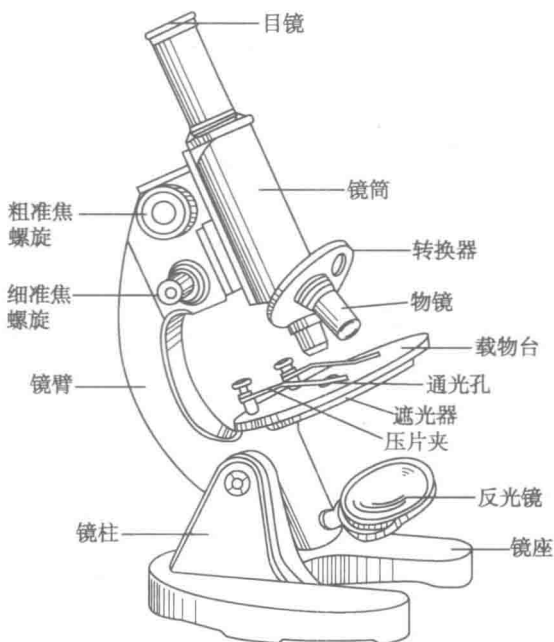


图1-1 显微镜的构造示意图

接物镜下。

3) 观察: 先用低倍镜找到标本所在处, 再换油镜观察。使用油镜时, 须在载玻片上滴加香柏油一滴, 置于载物台通光孔中央。眼睛从镜筒侧面观察, 顺时针方向扭动粗螺旋, 使镜筒徐徐下降, 直到油镜头浸入香柏油内接近标本表面, 并轻轻接触载玻片。眼睛移至目镜, 一边观察一边向上(逆时针方向)徐徐转动粗准焦螺旋, 至视野中看到模糊物像时, 再换用细准焦螺旋缓缓下降, 直到物像清晰为止。注意转动时动作要缓慢, 以免压碎标本片, 甚至将油镜头压坏。观察完毕, 向上扭动粗螺旋, 将镜筒提起, 取下标本片, 用擦镜纸将油镜头擦拭干净。

使用油镜要加香柏油的原理如下:

因为油镜的透镜很小, 从载玻片透过的光线通过空气($n=1.0$)时, 因介质密度不同, 发生折射现象, 使射入镜筒的光线很少, 物像不清。若在油镜与载玻片中间加入和玻片折射率($n=1.52$)相近的香柏油($n=1.515$), 则使通过的光线不致产生折射而损失, 因此能清楚地看到物像(图1-2)。

2. 显微镜的保养

(1) 显微镜是一种精密而贵重的光学仪器, 使用时要注意爱护, 避免碰撞, 更不能随意拆散玩弄。拿显微镜时, 必须用双手, 一手持镜臂, 一手托镜座。

(2) 每次实验前用纱布擦去显微镜外面的灰尘, 接物镜、接目镜须用软绸或擦镜纸拭擦, 切不可用粗布、粗纸, 以免损坏透镜。不要随意抽出接目镜, 以免灰尘落入镜头, 影响清晰度。

(3) 用油镜时, 不可使镜臂弯曲, 致使载物台倾斜, 香柏油外溢。非油镜头不可与香柏油接触。

(4) 显微镜的光学部分, 如镜头、反光镜等, 应避免日光照射。强酸、强碱、氯仿、乙醇、乙醚等都能去漆或损坏机件, 不可使用。每次用毕油镜, 须立即以擦镜纸或软绸布擦净油渍。如香柏油已干或镜头模糊不清, 可用擦镜纸沾少许二甲苯擦净, 并随即用干擦镜纸擦干。因二甲苯能溶解粘固透镜的胶质, 日久会使镜片移位或脱落, 故尽量少用。

(5) 显微镜用毕, 将接物镜转成“八”字形, 集光器稍下降, 然后转动粗准焦螺旋, 使镜头下移, 以避免接物镜与集光器相碰受损, 然后送入镜筒。

(张俊琪 瞿 涤)

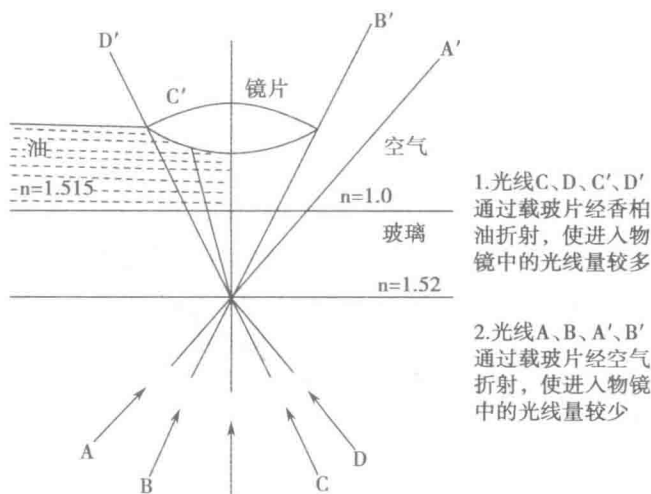


图1-2 油镜的使用原理示意图

实验二 细菌涂片标本的制备及简单染色法

【实验原理】

细菌形体微小、无色半透明, 经染色后方能在普通光学显微镜下清楚观察。对细菌染色分为单染色法和复染色法。

单染法使用一种染料使细菌着色, 用以观察细菌的大小、形态和排列。细菌通常带负电荷,

所以常采用带正电荷的碱性染料(如美蓝、甲紫、碱性复红或孔雀绿等)使细菌着色。当细菌分解糖类物质产酸时,细菌所带的正电荷增加,易被带负电荷的酸性染料(如伊红、酸性复红或刚果红)着色。经染色后的细菌与背景形成鲜明的对比,可清楚地观察细菌的形态和结构。

复染法用2种或2种以上的染料,有助于鉴别细菌,故又称鉴别染色法,常用的复染法有革兰染色法和抗酸染色法;此外,尚有对细菌的芽胞、荚膜、鞭毛、细胞核、细胞壁、荧光色素等特殊染色法。

细菌染色时首先需作涂片。细菌涂片的制作分涂片、干燥和固定3个步骤。

【实验材料】

1. 菌种 葡萄球菌和大肠埃希菌8~12h斜面培养物。
2. 染色液 吕氏碱性美蓝染液。
3. 其他材料 接种环,载玻片,生理盐水,酒精灯,吸水纸,记号笔等。

【实验方法与步骤】

1. 涂片 取一张清洁无油的载玻片,以记号笔画线分开成两等份。用烧灼灭菌的接种环分别取1~2环灭菌生理盐水置载玻片两边(或两边各滴加1小滴生理盐水);用灭菌接种环挑取葡萄球菌斜面培养物少许(接种环灭菌操作和细菌培养物的挑取如文末彩图2-1所示),与载玻片一边的生理盐水混匀,涂布成直径约1cm大小的均匀薄膜涂片(若采用液体培养物,不用生理盐水,直接用接种环取1~2环菌液涂片即可)。再以同样方法在玻片另一边制作大肠埃希菌涂片。烧灼接种环灭菌后插入试管架上。

用接种环在试管中取材的方法如下(文末彩图2-1)。

1)左手拇、食、中三指持试管底,右手拇、食、中三指握笔式持接种环,并直立于火焰上烧灼至发红为止,移至火焰旁待冷;

2)在火焰附近用右小指夹取试管上的试管帽,移动后轻轻夹出,并持于小指与手掌之间,不得将试管帽放置于桌上或触及任何物品;

3)将试管口移至火焰上旋转烧灼,灭菌后移至火焰附近,用冷却后的接种环插入试管内直至液体中,沾取一环液体后退出(接种环不可与试管壁接触,以免环上液体碰落),立即将试管口在火焰上转动灭菌后盖上试管帽。将接种环上的液体轻触玻片表面,使其自然留在玻片上,然后将接种环烧灼灭菌后插入试管架上。

2. 干燥 涂片标本最好在室温中待其自然干燥。若需快干,可将载玻片的标本面朝上,断断续续在微火高处借热烘干(标本片置火焰上的高度以手感觉温热为宜),切忌紧靠火焰,以免标本烤焦,损害菌体结构,影响检查。

3. 固定 手持载玻片一端(即涂有薄菌膜片的远端),标本面向上,在火焰外层较快的来回通过三次,温度不能太高,以玻片的温度达到皮肤所能耐受的温度为宜,放置待冷后进行染色。固定的目的在于杀死细菌,使菌体较牢固地附着于玻片上,改变细菌对染料的通透性。

4. 染色 将玻片平放于玻片搁架上,滴加染液1~2滴于涂片上(染液刚好覆盖涂片薄膜为宜),染色1~2min。

5. 水洗 倾去染液,用自来水从载玻片一端轻轻冲洗,直至从涂片上流下的水无色为止。水洗时,勿用水流直接冲洗涂面。水流不宜过急、过大,以免涂片薄膜脱落。

6. 干燥 甩去玻片上的水珠,自然干燥、电风吹干或用吸水纸吸干均可(注意勿擦去菌体)。

7. 镜检 待涂片完全干燥后用油镜观察。

【实验结果观察】

在油镜下观察葡萄球菌和大肠埃希菌的形态,并绘制细菌形态图。

【注意事项】

1. 细菌培养管在拨开试管帽后和塞上试管帽前均需烧灼灭菌试管口。
2. 接种环每次使用前后均需烧灼灭菌。

(张俊琪 瞿 涤)

实验三 细菌的革兰染色法

革兰染色法(Gram stain)是丹麦细菌学家Christlan Gram于1884年创立的,是细菌学中使用最为广泛的一种染色法。利用此法,可将大部分细菌区分为两大类,革兰阳性菌(G^+ ,细菌染成紫色)和革兰阴性菌(G^- ,细菌染成红色)。

【实验原理】

革兰阳性细菌的细胞壁较厚,主要成分为肽聚糖。革兰阴性细菌的细胞壁较薄,肽聚糖的含量较少,类脂质成分较多。肽聚糖不溶于乙醇或丙酮等有机溶剂,但脂多糖可溶于这些有机溶剂。

由于细菌细胞壁结构的不同,革兰染色后呈现不同结果。革兰染色法采用四种试剂:结晶紫、碘液、95%乙醇和苯酚复红。结晶紫为初染剂,它能将任何细菌染成紫色。碘液是常用的媒染剂,其作用是和结晶紫形成复合物从而增加染料与细胞之间的亲和性或附着力,帮助染料固定在细胞上,使其不易脱落。此时,所有细菌细胞的颜色相同。脱色剂(95%乙醇)对革兰阳性细菌富含肽聚糖的细胞壁没有影响,而能溶解革兰阴性细菌细胞壁的一类脂质成分,使细胞壁的通透性增加,造成初染的结晶紫和碘的复合物易于渗出,结果细胞被脱色;经苯酚复红(复染剂)复染后,细胞即被染成红色。因此,保持初染颜色,呈现蓝色或紫色的称为革兰阳性细菌;经复染剂将细菌染成红色或粉色的称为革兰阴性细菌。

【实验材料】

1. 菌种 葡萄球菌、大肠埃希菌琼脂斜面18~24h培养物。
2. 染色液 结晶紫,卢戈(Lu901)碘液,95%乙醇,稀释苯酚复红。
3. 其他材料 接种环,生理盐水,载玻片,酒精灯,吸水纸,擦镜纸,镜油,记号笔等。

【实验方法与步骤】**1. 细菌涂片标本的制作**

按常规进行细菌涂片、干燥和固定(见实验二)。

2. 染色(见图3-1)

- (1)初染:加结晶紫染液盖满标本处,染1min后水洗,并将玻片上的积水轻轻甩净。
- (2)媒染:加碘液(媒染剂)盖满标本处,1min后水洗,甩净玻片上的积水。
- (3)脱色:加95%乙醇(脱色剂)盖满标本,轻轻摇动玻片,约30sec后水洗、甩干。
- (4)复染:加稀释苯酚复红液1~2滴盖满标本,染30sec后水洗,待标本片自干或用吸水纸吸干。

【实验结果观察】

待涂片干燥后用油镜观察,并绘制单染色后观察到的葡萄球菌和大肠埃希菌的形态。染成紫色者为革兰阳性菌(G^+ 菌);染成红色者为革兰阴性菌(G^- 菌)。

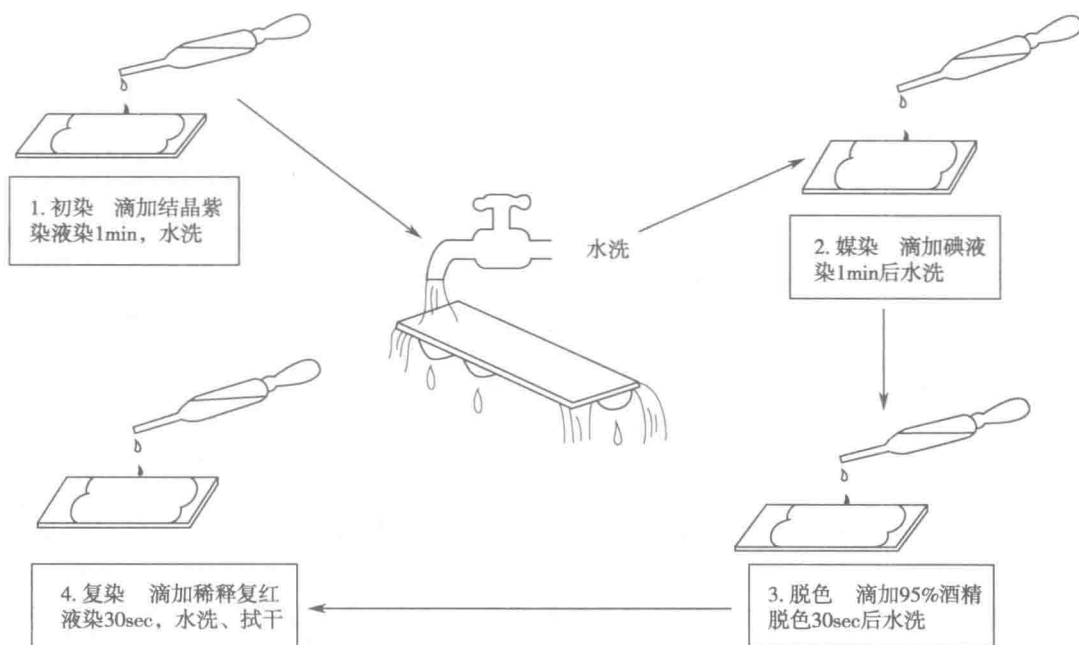


图3-1 革兰染色步骤示意图

【注意事项】

1. 取斜面中部的细菌进行涂片和染色操作,以保证所用细菌生物学状态最为典型。
2. 涂片必须制作得薄而均匀;菌量过大、菌膜过厚或薄厚不均都会影响染色及观察效果。
3. 注意掌握恰当的脱色时间。脱色不够,革兰阴性菌可能染成阳性菌;脱色过度,革兰阳性菌会被染成阴性菌。

(张俊琪 瞿 涂)

实验四 细菌特殊结构的染色法

细菌的特殊结构有荚膜、鞭毛、芽胞和菌毛。菌毛在光学显微镜下观察不到,其余三种特殊结构经染色后能够在光学显微镜下看到。

一、细菌芽胞染色法

【实验原理】

芽胞是某些细菌在动物体外对细菌不利条件下形成的休眠体,呈圆形或椭圆形。细菌芽胞含多层膜壳,结构致密,故不易染色。利用细菌的芽胞和菌体对染料的亲和力不同,用不同染料进行着色,使芽胞和菌体呈不同的颜色而便于区别。由于芽胞壁厚、透性低,故着色、脱色均较困难,因此,当先用弱碱性染料,如孔雀绿在加热条件下进行染色时,此染料不仅可以进入菌体,而且也可以进入芽胞,进入菌体的染料可经水洗脱色,而进入芽胞的染料则难以透出,若再用复染液(如番红液)处理,菌体染上复染剂颜色,而芽胞仍保持原来颜色,则菌体和芽胞易于区分。

【实验材料】

1. 菌种 枯草芽胞杆菌培养物。

2. 染色液 孔雀绿染液, 番红水溶液等。

3. 其他材料 接种环, 载玻片, 生理盐水, 酒精灯, 吸水纸, 擦镜纸, 镜油等。

【实验方法与步骤】

1. 细菌涂片标本的制作: 取培养24h左右的枯草芽胞杆菌, 参照实验二和实验三作涂片、干燥、固定。

2. 染色 滴加3~5滴孔雀绿染液于已固定的涂片上, 用木夹夹住载玻片在火焰上方加热, 使染液冒蒸汽持续约5min, 待玻片冷却后, 用缓慢水流冲洗除去染液, 甩去余水。

3. 复染 滴加番红染色复染1~2min。用缓慢水流冲洗去染液, 甩去余水。将标本片夹在吸水纸本中吸干残水, 或待自然干燥后镜检。

【实验结果观察】

在油镜下观察, 细菌芽胞呈绿色, 繁殖体呈红色。

【注意事项】

1. 加热染色时应维持染液冒蒸汽的状态, 但切忌使染液沸腾、蒸干, 必要时可添加少许染液。

2. 必须等待玻片冷却后进行脱色, 以免玻片破裂。

二、荚膜染色法

【实验原理】

荚膜是某些细菌生长到一定阶段, 在一定条件下产生并包围在细菌细胞壁外的一层黏液性物质, 主要成分为多糖类物质。由于荚膜与一般碱性染料间的亲和力弱, 故不易着色。本染色法以结晶紫为初染剂, 经初染后菌体和荚膜均呈紫色, 由于荚膜为非离子物质, 经初染后颜色仅附着其上而不吸收, 且荚膜是水溶性的, 可因水洗而流失, 故以硫酸铜冲洗并作为脱色剂脱去荚膜上附着的结晶紫, 使菌体和背景着色而荚膜不着色, 从而使荚膜在菌体周围呈一透明圈。

【实验材料】

1. 菌种 有荚膜的肺炎链球菌液体培养物。

2. 染色液 结晶紫染液, 20%硫酸铜溶液等。

3. 其他材料 接种环, 载玻片, 吸水纸, 酒精灯, 擦镜纸, 镜油等。

【实验方法与步骤】

1. 制备细菌涂片 取洁净的载玻片一块, 用接种环取菌液2~3环涂于载玻片上, 制成薄层菌膜。

2. 干燥 将涂片放在空气中晾干或用电吹风冷风吹干。

3. 染色 用结晶紫染液覆盖菌膜, 在火焰上微微加热, 使玻片上染液冒蒸汽为止。

4. 用硫酸铜水溶液冲洗染液, 切勿用流水冲洗。用吸水纸吸干后待镜检。

【实验结果观察】

在油镜下观察, 菌体呈紫色, 荚膜呈淡紫色或无色。

【注意事项】

1. 荚膜为可溶性物质, 很薄且易变形, 可因剧烈的冲洗而丢失或脱离, 故荚膜染色时冲洗的动作要轻柔。

2. 由于荚膜的含水量在90%以上, 故制备细菌涂片时一般不加热固定, 以免荚膜皱缩变形。

三、鞭毛染色法

【实验原理】

细菌的鞭毛极细,直径一般为12~30nm,需用电子显微镜观察,或经特殊染色法使鞭毛增粗后才能在普通光学显微镜下看到。鞭毛染色的基本原理是在染色前先用媒染剂处理,使它沉积在鞭毛上,使鞭毛直径加粗,同时使鞭毛着色(文末彩图4-1)。

【实验材料】

1. 菌种 变形杆菌固体培养物。
2. 染色液 硝酸银鞭毛染液A液、B液。
3. 其他材料 接种环,载玻片,无菌蒸馏水,酒精灯,吸水纸,擦镜纸,镜油等。

【实验方法与步骤】

1. 制备细菌涂片 用灭菌后的接种环选取少量迁徙最远处的细菌菌苔,轻轻地移入盛有1ml与菌种同温的无菌水试管中,不要振动,让有活动能力的细菌游入水中,呈轻度混浊。制备的菌液在37℃温度下保温10min,让老龄菌体下沉,而幼龄菌体在无菌水中可展开鞭毛。用接种环从试管上端取数环菌液,置于洁净玻片的一端,稍稍倾斜玻片,使菌液缓慢地流向另一端,用吸水纸吸去多余的菌液。

2. 干燥 将涂片放在空气中自然干燥。

3. 染色

(1)滴加A液,染4~6min后,用蒸馏水轻柔冲洗,去除A液。

(2)用B液冲去残水后,再加B液覆盖菌膜,在微火上加热至冒蒸汽,约维持0.5~1min(加热时应随时补充染料,勿使玻片出现干涸)。

(3)用蒸馏水轻柔冲洗玻片,干燥后待镜检。

【实验结果观察】

在油镜下观察,变形杆菌菌体呈深褐色,鞭毛呈浅褐色。

【注意事项】

1. 载玻片的前期处理很重要,要使玻片光滑洁净,无油污。具体处理方法如下:将载玻片用洗衣粉煮沸10min,水洗,再用清洁液浸泡,加温10min,水洗,放入95%乙醇脱脂后取出晾干。

2. 因鞭毛中的鞭毛素为蛋白质,故勿对细菌涂片进行热固定,以免破坏鞭毛的结构。

3. 染色过程要仔细小心,防止鞭毛脱落。

(李 琴 张力平)

实验五 活菌运动观察

【实验原理】

鞭毛是细菌的运动器官。有鞭毛的细菌具有真正的运动能力,能定向的由一个地方快速游动到另一个地方。没有鞭毛的细菌,不具有真正运动的能力。但由于其体重微小,易受所处环境中其他分子的冲击,呈左右前后位置变更不大的颤动(布朗运动)。能否运动是某些细菌的特征之一,可以帮助鉴别菌种。许多杆菌和螺形菌有鞭毛,能运动,一般球菌无鞭毛,不能运动。观察活菌运动的常用方法是采用压滴法或悬滴法制片,以普通光学显微镜观察。如用暗

视野显微镜或相差显微镜观察则效果更好。

一、悬滴法

【实验材料】

1. 菌种 变形杆菌(或水弧菌)8~12h肉汤培养物。
2. 其他材料 接种环,凹玻片,盖玻片,酒精灯,凡士林,眼科镊等。

【实验方法与步骤】

1. 取一张洁净无油的凹玻片,在玻片凹陷区周围涂凡士林少许。

2. 用眼科镊取一张盖玻片,再用无菌接种环挑取细菌肉汤培养物2~3环,涂布在载玻片中央(若为固体培养物,则须先用接种环取生理盐水2~3环涂于盖玻片上,然后用接种环取菌苔少许放于盐水中,涂布均匀)。

3. 将凹玻片反转,覆盖于盖玻片上,使盖玻片的菌液正居于凹陷区中央,然后轻按凹玻片使其与载玻片粘合紧密。

4. 两手持凹玻片两端,迅速翻转过来,置显微镜载物台上(图5-1)。

5. 将显微镜光圈缩小或降低聚光器,先用低倍镜找到悬滴边缘,并移至视野中央,然后用高倍镜检查(因凹玻片较厚,油镜焦距很短,故一般不能用油镜进行检查)。

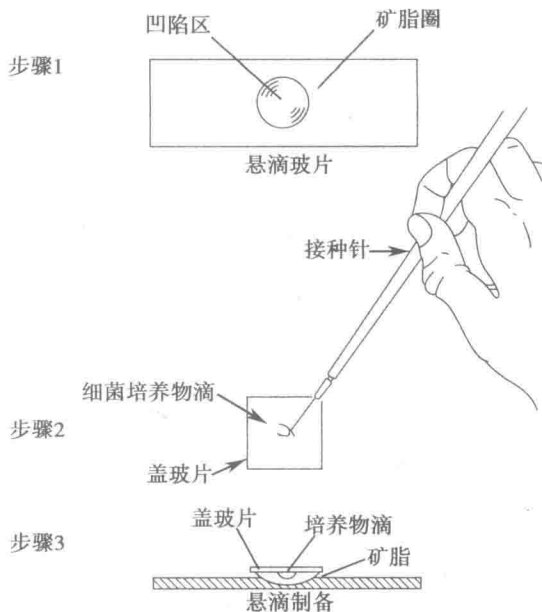


图5-1 细菌悬滴制备方法示意图

二、压滴法

【实验材料】

1. 菌种 同悬滴法。
2. 其他材料 载玻片,盖玻片,眼科镊等。

【实验方法与步骤】

1. 用无菌接种环挑取细菌肉汤培养物2~3环,置于洁净无油的载玻片中央。

2. 用眼科镊取盖玻片,压盖菌液上,即成压滴(先使盖玻片的一边接触菌液,慢慢放下,以免气泡产生)。

3. 将载玻片置载物台上,在高倍镜下观察细菌的形态及运动。

【注意事项】

1. 观察不染色标本应降低聚光器,缩小光圈以降低背景亮度,便于观察。
2. 标本制备好应尽快观察,以防水分蒸发。

(李 琴 张力平)