

供临床、影像、药学、预防、检验、护理、口腔等专业使用

医学微生物学 实验教程



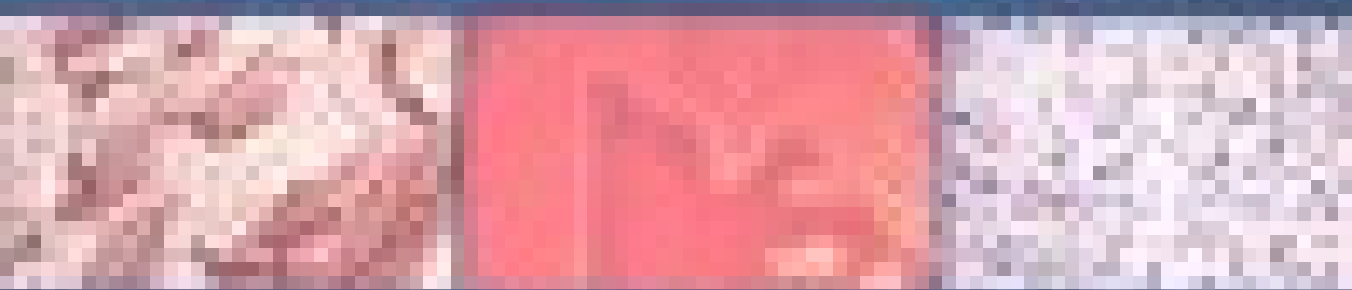
Laboratory Manual of Medical Microbiology

主编 李咏梅 陈 曦



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

醫學與生物學



100

Abstract

Laboratory Manual of Medical Microbiology

医学微生物学实验教程

Yixue Weishengwuxue Shiyān Jiāochéng

供临床、影像、药学、预防、检验、护理、口腔等专业使用

主 编 李咏梅 陈 曦

副主编 孙晓红 周丽琴 王立霞 宋文刚

编 委 (按姓氏笔画排序)

王大海 王立霞 母润红 朴太光 孙晓红

李 薇 李 霜 李咏梅 李洪涛 李富仁

宋文刚 陈 曦 周丽琴 顾世海 韩慧明



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

内容简介

本实验教程是基于当今“医学微生物学”先进的理论内容以及现代微生物学实验室技术,在总结以往医学微生物学实验课和科学研究中部分工作经验的基础上,适当增加了部分新技术,充实了新内容,其显著特色是将实验教材由知识技能型转变为能力培养型,坚持了“三基”。主要内容分为基础性、综合性和设计性实验三部分。

本书可供高等医学院校医学各相关专业本、专科学生使用,也可供从事微生物学实验室工作的人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

医学微生物学实验教程 / 李咏梅, 陈曦主编. — 北京: 高等教育出版社, 2012. 4

ISBN 978 - 7 - 04 - 035420 - 1

I. ①医… II. ①李… ②陈… 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 (2012) 第 058458 号

策划编辑 席 雁 责任编辑 瞿德斌 封面设计 张 楠 责任印制 朱学忠

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街 4 号
邮政编码 100120
印 刷 保定市中国画美凯印刷有限公司
开 本 787mm × 1092mm 1/16
印 张 8.75
字 数 190 千字
插 页 1
购书热线 010 - 58581118

咨询电话 400 - 810 - 0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landraco.com>
<http://www.landraco.com.cn>
版 次 2012 年 4 月第 1 版
印 次 2012 年 4 月第 1 次印刷
定 价 24.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物 料 号 35420 - 00

前 言

医学微生物学是医学类专业学生必修的专业基础课程，是一门实践性很强的学科，其实验技术和方法已广泛地渗透到现代生命科学的各分支领域，不断发挥着其独特的作用，而且随着分子生物学的诞生及其技术的应用，极大地丰富了微生物学实验技术的内容，并将其推向一个新的发展阶段。为了使學生广泛掌握医学微生物学基本实验技术，增强其了解和获取学科领域发展动态的能力，结合学校课程建设的要求，编写了本教材。

本教材是在总结以往医学微生物学实验课和科学研究中部分工作经验的基础上，参考了国内其他医学院校编写的有关教材以及国外的有关资料，适当增加了部分新技术，充实了新内容，其显著特色是将实验教材由知识技能型转变为能力培养型。

概括起来本实验教程内容分为基础性实验、综合性实验和设计性实验三部分。基础性实验包括了医学微生物学实验的基本操作和技能训练，使学生掌握微生物学科的基本知识与基本技能，为综合性实验奠定基础。综合性实验由多种实验手段与技术和多层次的实验内容所组成，要求学生独立完成预习报告、试剂配制、实验记录、数据处理和总结报告，训练其综合应用能力、综合分析能力等。设计性实验是在前两类实验的基础上，以医学微生物学临床检测为主结合其他学科的知识和技术，由学生设计、具体实施、撰写实验论文，使学生得到科学研究的初步训练，也为學生获得创新学分提供条件。

本实验教程适用于所有医学类专业的本科学生。由于时间仓促与水平有限，教材中难免存在错误与不足，希望使用和参考本教材的广大师生多提宝贵意见。

编 者

2012 年 2 月

目 录

绪论	1
一、医学微生物学实验目的与要求	1
二、微生物实验室生物安全与规则	1
实验一 细菌形态学	3
一、普通光学显微镜的构造与使用（油镜）	3
二、细菌基本形态和特殊结构的观察	6
三、细菌不染色标本检查法	6
四、细菌染色标本检查法	8
实验二 细菌生理	12
一、细菌培养基的制备	12
二、细菌分离培养技术	15
三、细菌的培养方法	18
四、细菌生长现象的观察	19
五、倾注培养和活菌计数	20
六、细菌生化反应鉴定	22
七、菌种的保藏	31
实验三 细菌分布及外界因素对细菌的影响	34
一、细菌分布的检测	34
二、物理因素对细菌的影响	35
三、化学消毒剂对细菌的作用	38
四、生物因素对细菌的作用	38
实验四 细菌的变异	47
一、形态的变异（L型细菌的检测）	47

• 目 录 •

二、鞭毛的变异	48
三、细菌耐药株的筛选	48
实验五 细菌的致病性及宿主的免疫性	50
一、细菌内毒素的致病作用	50
二、细菌内毒素的测定——鲎试验	51
三、细菌外毒素对机体的毒性作用及抗毒素的中和作用	52
实验六 病原微生物核酸检测技术	54
一、细菌核酸的分离与纯化	54
二、PCR 方法检测病原微生物	57
三、核酸杂交技术检测病毒	58
实验七 病原性球菌的检查与鉴定	60
一、葡萄球菌属	60
二、链球菌属	63
三、奈瑟菌属	68
实验八 病原性肠道杆菌的检查与鉴定	71
一、埃希菌属	71
二、沙门菌属	73
三、志贺菌属	76
四、克雷伯菌属	77
五、变形杆菌属	78
实验九 厌氧性细菌的检查与鉴定	80
一、厌氧芽胞梭菌和无芽胞厌氧菌形态观察	80
二、厌氧菌培养方法	82
三、特殊试验	84
实验十 结核分枝杆菌的检查与鉴定	86
一、形态染色性观察——抗酸染色	86
二、培养特性	88
实验十一 真菌和其他微生物的检查与鉴定	90
一、真菌的形态结构及主要病原性真菌的形态观察	90

二、真菌的培养物观察	93
三、真菌的分离培养	94
四、皮肤癣菌感染的临床标本检查	95
五、白假丝酵母感染的临床鉴定	95
六、新生隐球菌感染的临床鉴定	96
七、曲霉菌感染的临床鉴定	97
八、支原体、衣原体、立克次体、螺旋体的检查与鉴定	98
 实验十二 病毒的诊断和鉴定技术	 105
一、病毒形态学	105
二、病毒培养方法	106
三、病毒抗原检测	112
四、病毒血清学诊断	113
五、病毒的核酸检测技术	115
 实验十三 临床标本的病原学诊断	 116
 实验十四 实验室生物安全	 118
一、实验室生物安全水平分级	118
二、实验室设施和设备要求	118
三、病原微生物的分类	121
 附录	 123
一、玻璃器皿洗涤及各种洗液的配制	123
二、一般染色液的配制	124
三、常用培养基配方	125
四、常用试剂及缓冲液的配制	130
 主要参考文献	 131

绪 论

一、医学微生物学实验目的与要求

实验教学是课程教学过程的重要环节，尤其是针对实验技术需要掌握和实践的课程。医学微生物学的实验目的在于使学生加深和巩固对理论课内容的消化理解，并在掌握系统理论知识的基础上，学会及掌握医学微生物学实验的基本操作，为今后开展临床疾病的检查、实验室的病原学诊断以及相关学科的进一步学习和科学研究奠定良好的实验室工作基础。

本课程的实验内容紧密联系理论，根据内容采用的实验类型有示教、验证、综合、设计等形式，并辅以幻灯片、视频等现代化多媒体教学手段，实现教学单位实验室难以实践的重大传染病病原体的相关内容，通过实践使学生对相关理论增强感性认识。同时通过操作，培养和训练学生的动手意识与能力，给予应用知识分析问题、解决问题的机会和平台。

在整个实验过程中，结合国家相关部门颁发的有关生物实验室安全操作规程和相应文件精神，注重微生物实验室生物安全，并严格进行“无菌观念”和“无菌操作”的培养和训练，使学生养成尊重科学、规范操作的良好工作作风。

为了提高实验课的教学效果，要求学生在实验前后做到以下要求：

1. 课前预习，课后总结。根据实验内容，提前复习相关理论知识，或查阅相关资料，为实验的顺利进行做好充分的准备。课后认真总结，消化理论知识。
2. 严守规则，规范操作。实验过程中，严格按照实验操作规程操作，并根据实验进程积极主动思考，设计和完善实验内容，避免成为机械的操作者。
3. 求真务实，记录分析。真实记录实验结果，并进行科学总结和分析，对未达到预期目的的结果要运用理论和相关知识进行讨论和分析，力求找到原因，达到科学思维养成的训练目的。

二、微生物实验室生物安全与规则

生物安全是指人们对动物、植物、微生物，尤其是微生物等生物体给人类和自然环境可能造成的不安全的防范。其主要包括科学研究、开发生产和应用中，经遗传修饰的

生物体和危险的病原体等可能对人类的健康、生存环境造成的危害等。

（一）实验室生物安全的重要性

实验室生物安全问题已经受到普遍关注，随着科学技术的发展，越来越多的科研人员、实验教学人员从事接触病原微生物的工作，这些实验室的生物安全问题不容忽视。国家自 2004 年起先后颁布了《中华人民共和国传染病防治法》、《病原微生物实验室生物安全管理条例》（中华人民共和国国务院令——第 424 号）、《实验室生物安全通用要求》、《生物安全实验室建筑技术规范》、《人间传染的病原微生物名录》等有关法律法规，旨在加强和规范病原生物学实验室生物安全工作，保护人类建设和生存环境。因此，加强建设生物安全实验室具有相当重要的意义。

（二）微生物学实验室学生守则

医学微生物学实验课所用的标本多为病原微生物，其中有些微生物具有一定的感染性。因此，在实验中必须严格掌握无菌操作技术，防止实验中自身感染和污染环境。为此，提出下列规则：

1. 进入微生物实验室必须穿戴好白衣、白帽，口罩随身携带，操作时带好口罩。不必要的物品不得携带入室，保持室内整洁卫生。
2. 实验室内要保持肃静和良好的秩序，不得高声谈笑或随处走动。
3. 实验室内禁止饮食和吸烟，不得用嘴润湿铅笔或标签，也不得用手抚摸头面，以免发生感染。
4. 学生需按教师指定的项目程序做实验，如有其他要求，需经指导教师批准方可操作。
5. 室内常规器材、药品、试剂摆放需井然有序，各有其位，不得随意乱拿乱放。
6. 实验中如发生手指割破、菌液吸入或实验材料破损等事故时，应立即报告指导老师，进行紧急处理。
7. 用过的有菌器材或培养物等，应放于指定地点，不得随意抛掷，要严格执行无菌操作程序。
8. 严防火灾，如发生火灾苗子应沉着处理，切勿慌张，立即关闭电闸；如系乙醇、乙醚、汽油等火种，切忌用水，可撒泼大量沙土等扑灭火苗。
9. 爱护实验器材，节约水、电、试剂、药品和其他材料，如有损坏应立即报告指导教师，听候处理。
10. 实验完毕后，整理好器材、台面，物归原处，洗手后离开。
11. 室内轮流值日，认真负责打扫室内卫生，并检查好水、电、门、窗，严禁向下水槽内丢弃碎纸、琼脂、玻璃等杂物，防止发生安全事故。

实验一 细菌形态学

实验类型 验证

实验目的

1. 掌握显微镜油镜的原理、使用方法及细菌的革兰染色技术。
2. 熟悉细菌的基本形态和特殊结构。
3. 了解悬滴法和压滴法观察细菌运动的基本技术。

实验内容

一、普通光学显微镜的构造与使用（油镜）

显微镜是一种精密的光学仪器。由于微生物的体积微小，肉眼无法观察，必须借助显微镜方可观察微生物的形态和运动。因此，显微镜是微生物学实验中的重要工具之一。显微镜种类很多，根据实验目的和要求不同，可以选用普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、偏光显微镜、荧光显微镜及电子显微镜等，在微生物学实验中以普通光学显微镜尤其是油镜最为常用。

【实验材料】

1. 器材及其他 普通光学显微镜、香柏油、二甲苯、擦镜纸。
2. 材料 细菌染色标本片。

【实验方法】

（一）普通光学显微镜的构造

普通光学显微镜由机械装置和光学系统组成（图1-1）。

1. 机械装置

（1）镜座 支持和稳定镜体的底座，起稳定和支持整个机身的作用。

（2）镜臂 支持镜筒和镜台（载物台），也是移动显微镜时用手握住的部分。

（3）镜台 又称载物台，在镜筒下方，是放置被检测标本片的平台。镜台上有标本移动器（推进尺），可使标本片前后左右移动。

(4) 镜筒 是连接目镜和物镜的金属筒，镜筒上端插入目镜，下端与物镜转换器相连。根据镜筒的数目，光学显微镜可分为单筒式和双筒式两类。

(5) 物镜转换器 是位于镜筒下端的旋转盘，盘上一般设有 3~5 个不同放大倍数的物镜，可以通过转动物镜转换器选用合适的物镜。

(6) 调节器 安装在镜臂基部或镜柱两侧的粗、细调节螺旋上，可调节物镜与被检标本的距离，以便清晰地观察标本。一般设有粗调节器和细调节器。

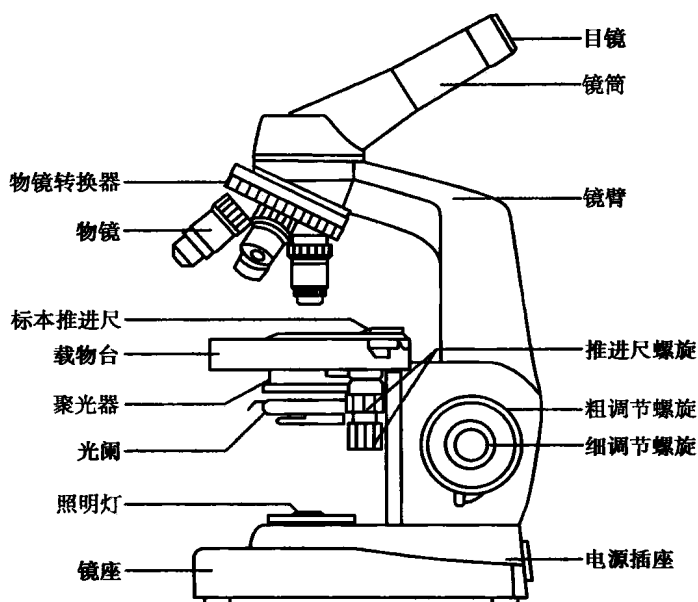


图 1-1 普通光学显微镜结构图

2. 光学系统 光学系统最重要的部件是物镜和目镜，这两个部件的作用是放大与成像。另外，还有照明装置。

(1) 物镜 物镜安装在物镜转换器上，是显微镜中很重要的光学部件，由多块透镜组成。根据放大倍数和使用方法的不同，物镜分为放大 $4\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$ 的低倍物镜，放大 $40\times$ 、 $45\times$ 的高倍物镜以及放大 $90\times$ 、 $95\times$ 、 $100\times$ 的油镜三类。油镜镜筒上刻有 OI、oil 或 HI 字样，也有刻一圈白线或黑线为标记的，借以区别于其他物镜。物镜上标有放大倍数、数值孔径 (γ_{NA})、工作距离 (物镜下端至盖玻片的距离)。

(2) 目镜 短圆筒状，装在物镜上端。目镜的功能是把物镜放大的物像再次放大。目镜由两块透镜组成，上面一块为接目透镜，下面一块为聚透镜，在两块透镜中间或聚透镜的下方有一视野光阑。在进行显微测量时，目镜测微尺要放在视野光阑上。不同的目镜上刻有 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 或 $20\times$ 等字符以表示该目镜的放大倍数，可根据需要选择适当的目镜。

(3) 照明装置 由反光镜、光阑和聚光器三部分组成。反光镜在显微镜的最下方，有平、凹两面，可自由转动方向，使光源射出的光线至聚光器。光阑和聚光镜用以调整

光量和光线的性质，以增加成像的清晰度。在聚光器下有滤光片环，可用以更换各种滤光片，常用的为蓝色滤光片。

（二）油镜的使用方法

1. 对光 显微镜直立在桌上，将聚光器升起与载物台孔平行，并将虹彩光圈轻轻开至最大，再转动反光镜，使光线集中于聚光器。光强时用平面，光弱时用其凹面。

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，须在载玻片上先滴加香柏油一滴，置台孔中央，眼睛从镜筒侧面观察，并顺时针方向扭动粗螺旋，使镜筒徐徐下降，让油镜头浸入油内接近标本表面，并轻轻接触玻片，然后将眼睛移至目镜，边观察边向上（逆时针方向）徐徐扭动粗螺旋，至视野中看到模糊物像时，再换用细螺旋调至物像清晰为止。调节时千万不可使用强力将物镜任意下降，以免压碎标本片，甚至将贵重油镜头损坏。检查完毕，向上扭动粗螺旋，将镜筒提起，取下标本片，用擦镜纸将油镜头上的油擦净。

（三）显微镜的保养

1. 显微镜是贵重的精密光学仪器，使用时应爱惜，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，物镜、目镜须用软绸或擦镜纸拭擦，切不可用粗布、粗纸，以免损害透镜。不要随意抽出目镜，以免灰尘落入镜筒，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。油镜每次用毕，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，将物镜转成“八”字形，聚光器稍下降，然后转动粗螺旋，使镜筒下移，以避免物镜与聚光器相碰受损，最后送入镜箱。

附：油镜的使用原理

使用油镜要加香柏油的原理：因为油镜的透镜很小，因介质密度不同，从载玻片透过光线通过玻片与油镜头之间的空气（ $n=1.0$ ）时，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，如图 1-2 所示。

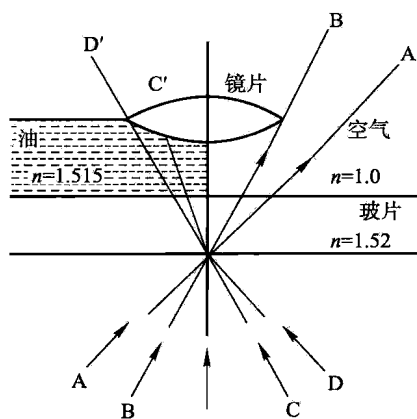


图 1-2 油镜的使用原理

二、细菌基本形态和特殊结构的观察

细菌是一类种类繁多、分布广泛的单细胞原核生物，在适宜的环境下，保持着一定的形态。细菌的基本形态可分为球形、杆形、螺形（或弧形）三大类，分别称为球菌、杆菌、螺形菌（或弧菌），球菌按其分裂方向与分裂后的排列情况又分为葡萄球菌、链球菌、双球菌等，杆菌也有球杆菌、分枝杆菌、棒状杆菌之分，螺形菌中有弧菌和螺菌。

细菌具有细胞壁、细胞膜、细胞质、核质等基本结构。某些细菌还有荚膜、芽胞、鞭毛、菌毛等特殊结构。运用相应的特殊染色法予以染色，将有助于细菌某些特殊结构的检视和菌种的鉴别。

【实验材料】

1. 基本形态材料 葡萄球菌、肠道杆菌、霍乱弧菌或水弧菌等形态染色片。
2. 特殊结构材料 变形杆菌、肺炎链球菌、破伤风芽胞梭菌等形态染色片。

【实验方法】

（一）基本形态

1. 球菌 葡萄球菌，革兰阳性（紫色），呈葡萄状排列。
2. 杆菌 大肠埃希菌，革兰阴性（红色），两端钝圆，排列无一定规律。
3. 弧菌 如霍乱弧菌，革兰阴性（红色），菌体弯曲呈弧形或逗点状，排列无一定规律。

（二）特殊结构

1. 鞭毛 如变形杆菌，用鞭毛染色法，可见菌体呈深红色，周身鞭毛呈红色。
2. 荚膜 如肺炎链球菌，用革兰染色，可见菌体染成紫色（革兰阳性），常成双排列，菌体周围有一未着色之空圈即荚膜所在处。
3. 芽胞 如破伤风芽胞梭菌，用革兰染色，菌体染成紫色（革兰阳性），菌体顶端有一个圆形未着色的芽胞，使整个菌体呈鼓锤状。

三、细菌不染色标本检查法

一般认为鞭毛是细菌的运动器官。有鞭毛的细菌，具有真正的运动，能定向地从一地方较快速地游动到另一个地方。没有鞭毛的细菌，由于体重微小，而受所处环境中液体分子的冲击，呈左右前后位置变更不大的颤动，不具有真正的运动能力。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。

检查细菌有无运动的方法颇多，有悬滴法、压滴法、视野显微镜和相差显微镜检查法、半固体琼脂培养基法，其中以半固体琼脂培养基法（详见实验二）和压滴法较为常用。

【实验材料】

1. 菌种 变形杆菌 6~12 h 肉汤培养物和葡萄球菌 6~12 h 肉汤培养物。

2. 器材及其他 普通玻片、凹玻片、盖玻片、吸管、酒精灯、接种环、眼科镊子、凡士林等。

【实验方法】

(一) 悬滴法

1. 取1张洁净凹玻片，在凹窝四周涂少许凡士林。
2. 用眼科镊取两张盖玻片，再用无菌接种环分别挑取变形杆菌及葡萄球菌肉汤培养物2~3环，放在两块盖玻片中央（若为固体培养物，则须先用生理盐水2~3接种环涂于盖玻片上，然后用接种环取菌苔少许放于盐水中，磨散呈云雾状）。
3. 分别将两块凹玻片反转，覆盖于盖玻片上，使盖玻片的菌液正居凹窝中央，然后轻按凹玻片使其与盖玻片黏合紧密（图1-3）。

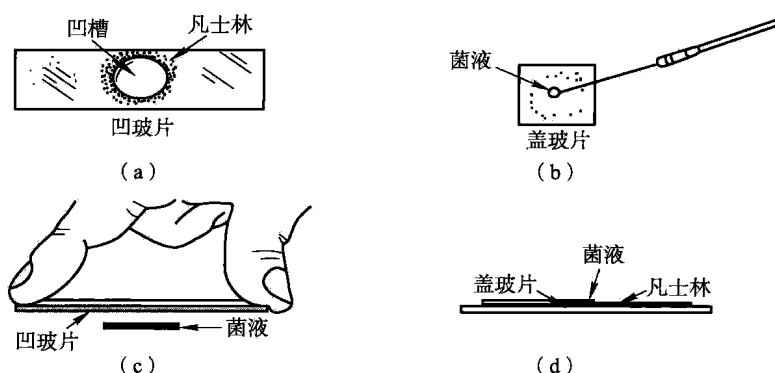


图1-3 悬滴法示意图

4. 迅速翻转载玻片，用小镊子轻压，使盖玻片与凹窝边缘粘紧封闭，以防水分蒸发。
5. 先用低倍镜找到悬滴边缘，再换高倍镜，观察时应下降聚光器，缩小光圈，减少光亮，使背景较暗易于观察。变形杆菌有鞭毛，运动活泼，可向不同方向迅速运动。葡萄球菌无鞭毛，不能做真正运动，只能在一定范围内做位移不大的颤动，这是受水分子撞击而呈分子运动（布朗运动）。

(二) 压滴法

1. 用无菌接种环分别挑取变形杆菌及葡萄球菌肉汤培养物2~3环，置于两载玻片中央。
2. 用小镊子夹1块盖玻片轻轻覆盖在菌液上，放置盖玻片时应注意，先将盖玻片的一端接触菌液，缓缓放下，以免产生气泡。
3. 先用低倍镜观察，找到细菌所在部位后再换高倍镜观察，看细菌能否运动。

(三) 暗视野显微镜检查法

暗视野显微镜与普通光学显微镜在结构上的不同之处，是装有一个中央遮暗的聚光器，并配以强光光源，使光线不能通过聚光器中央上升，而只能从聚光器四周及未遮暗的部位斜射到载玻片的标本上。因光线是斜射的，不能进入物镜，故观察的视野是暗的，

而聚光器斜射到菌体上的光线，因光散射作用而使菌体发出亮光，反射到物镜内。

用暗视野显微镜观察悬滴片或压滴片时，可见黑暗背景下发亮的变形杆菌做格外清晰的快速运动。暗视野显微镜主要用于检查未染色螺旋体的形态和运动。

四、细菌染色标本检查法

细菌个体微小，无色透明，未经染色时，在显微镜下仅能粗略地看到其大小和形态，用普通光学显微镜观察其形态时，较难看清个体的形状和结构，而其他显微镜也具有各自的局限性。所以，观察微生物的个体形态时，通常要借助染色的方法，使菌体着色，利用菌体与背景的颜色差别，在普通光学显微镜下清楚地观察其形状和结构，并可协助鉴别细菌。染色是微生物形态学观察的重要手段和微生物学实验十分重要的基本技术之一。

染色法分为单染色法和复染色法。单染色法是采用单一染料（如苯酚、复红、甲紫、亚甲蓝等）对细菌涂片进行染色，此法操作简便，适用于菌体一般形态的观察，但不能鉴别细菌。复染色法是用两种或两种以上染料进行染色，有助于鉴别细菌。复染色法种类很多，主要有革兰染色法和抗酸染色法，尤以前者应用最广。此外，尚有针对细菌的芽胞、鞭毛、荚膜、核质、细胞壁、荧光色素等的特殊染色法。

【实验材料】

1. 菌种 大肠埃希菌和葡萄球菌 6~12 h 肉汤混合培养物、肺炎链球菌、变形杆菌、破伤风芽胞梭菌。

2. 试剂及其他 甲紫溶液、卢戈碘液、95% 乙醇、稀释苯酚复红、炭黑墨水、甲醇、番红、鞭毛和芽胞染色液。二甲苯、香柏油、载玻片、酒精灯、接种环、吸管等。

（一）革兰染色法

〔实验方法〕

1. 革兰染色液的配制

（1）甲紫染液（初染剂） 称取甲紫 4~8 g，溶于 95% 乙醇 100 mL 中制成饱和液，再取饱和液 20 mL 与 10 g/L 的草酸铵溶液 80 mL 混合即成，过滤后备用。

（2）卢戈碘液（媒染剂） 先将 2 g 碘化钾溶于 10 mL 蒸馏水中，再加碘 1 g，待碘全部溶解后再加蒸馏水 300 mL 即成。

（3）95% 乙醇（脱色剂）

（4）稀释苯酚复红液（复染剂） 量取苯酚复红染液 10 mL 加蒸馏水 90 mL 混匀即成。

2. 细菌标本片制备

（1）涂片 取一张洁净载玻片，将变形杆菌液体培养物直接涂布于载玻片上，或先在载玻片上放置一接种环生理盐水，再取固体培养基上少许葡萄球菌与生理盐水磨匀，涂成直径 1 cm 大小的区域。取菌量不可太多，使盐水磨成灰白色为宜。

（2）干燥 涂片最好在室温下自然干燥，或将标本面向上，置于酒精灯火焰高处慢慢烘干，切不可放在火焰上烧干。

(3) 固定 干燥后的标本片迅速通过火焰3次,既可达到杀菌的目的,又能将细菌固定在玻片上,以免玻片上细菌在染色中被冲洗掉。

3. 革兰染色方法 在已固定的标本上滴加革兰染色液,其步骤如下(图1-4):

(1) 初染 滴加甲紫染液盖满标本处,染1 min后用细流水冲洗,并将玻片上的积水轻轻甩净。

(2) 媒染 滴加卢戈碘液(媒染剂)盖满标本处,作用1 min后流水冲洗,甩净玻片上的积水。

(3) 脱色 滴加95%乙醇(脱色剂)盖满标本,轻轻摇动玻片,使玻片上流下的乙醇液无紫色为止(时间灵活掌握,大约0.5 min),用流水冲洗,甩干。

(4) 复染 滴加稀释苯酚复红液1~2滴盖满标本,作用1 min后,用流水冲洗,甩干。最后用吸水纸印干标本片或自然干燥后,在玻片上滴加镜油,用显微镜油镜观察。

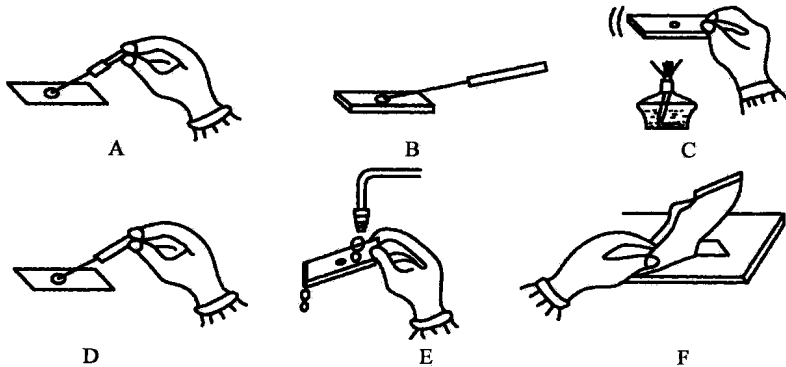


图1-4 革兰染色步骤

[实验结果]

染好的标本片用油镜观察结果,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)。

[注意事项]

1. 最好选用幼龄菌(处于活跃生长期的细菌)染色,细菌染色时一般用18~24 h的细菌培养物为宜。若菌龄过老,常可因菌体死亡或自溶发生 G^+ 菌转阴现象。
2. 脱色乙醇以95%的浓度为宜,脱色过度, G^+ 菌被误染成 G^- 菌,造成假阴性;脱色不完全, G^- 菌被误染成 G^+ 菌,造成假阳性。如果涂片过厚也会造成假阳性。
3. 初染试剂的着色能力较强,复染试剂的着色能力较弱。
4. 涂片务求均匀,切忌过厚。在染色过程中,不可使染液干涸。

(二) 特殊结构染色法

1. 细菌的荚膜染色法(荚膜负染色法) 荚膜的主要成分是多糖类物质,不易被着色,而且又能溶于水,因此,在实验室中常用炭黑墨水对荚膜细菌进行负染色(也叫背景染色或衬托染色)。荚膜的负染色法是指将菌体和背景着色,而荚膜不着色,用背景颜