

高等学校配套教材

供基础、临床、预防、口腔医学等专业用

病原生物学实验

主 编 谷鸿喜 副主编 张唯哲 钟照华

人民卫生出版社

People's Medical Publishing House

高等学校配套教材

供基础、临床、预防、口腔医学等专业用

病原生物学实验

主 编 谷鸿喜

副主编 张唯哲 钟照华

主 审 张凤民 李 光

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 燕	付英梅	刘 平	李 迪	刘爱芹
庄 敏	张凤民	张文莉	张唯哲	谷鸿喜
钟照华	凌 虹	姬 红	商庆龙	魏兰兰

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

病原生物学实验/谷鸿喜主编. —北京:
人民卫生出版社, 2005. 10

ISBN 7-117-07113-3

I. 病... II. 谷... III. 病原微生物—实验—医学
院校—教材 IV. R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 116493 号

病原生物学实验

主 编: 谷 鸿 喜

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址: (100078)北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

邮购电话: 010-67605754

印 刷: 北京人卫印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 5.5 插页: 6

字 数: 146 千字

版 次: 2005 年 11 月第 1 版 2005 年 11 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-07113-3/R·7114

定 价: 18.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

序

为培养综合素质高，创新能力强的新世纪高级医学人才和提高实验室管理运行水平，我校 2000 年承担了国家教委新世纪教改工程《实验教学改革研究与实践》项目，对医学实验教学进行了有益的探索和研究。整合微生物学、寄生虫学实验教学资源，成立了病原学实验中心；对实验内容进行了调整，增加了综合性、设计性实验，为提高学生病原学实验基本技能、科学素养和创新能力创建了实验教学平台。

该书根据病原学实验特殊要求，在注重基本技能和方法训练的同时，更加强调学生科学思维能力的培养，培养学生自主学习能力、实验设计能力、动手能力和分析问题能力，注重基础与临床的结合，适合医学本科和七年制教学使用，同时也是青年科技工作者病原学实验的手册。

该《病原学实验》是在医学实验教学改革背景下由哈尔滨医科大学基础医学学院组织专家编写完成的，真心欢迎教育同仁提出您的宝贵意见和建议，在今后的教学实践中，我们将继续深入地探讨医学实验教学的规律，以进一步完善病原学实验教学，提高医学实验教学质量。

李 光

哈尔滨医科大学

2005 年 7 月

前 言

为了适应高等医学教育的教学改革和学生实验教学的需要,我们编写了《病原生物学实验》一书,其内容以病原生物学的基本实验为基础,包括医学微生物学和寄生虫学相关的常用实验技术和操作技能,同时增加了一些病原体诊断常用的分子生物学和免疫学技术的实验。

本教材指导学生在掌握医学微生物学和寄生虫学基本理论的基础上,进行实验设计和实验操作,不仅能巩固所学理论知识,掌握病原体的实验室诊断原则,同时还能提高学生的实验设计、实验操作和分析问题的能力,为促进理论与实验教学结合,为提高学生综合素质,培养全面发展的新型医学人才打基础。

本书主要针对医学院校各专业本科的病原生物学实验教学,全书包括 24 个实验,归纳为 4 个单元,有基础性实验,也有综合性实验以及病例讨论。每个实验相对独立,但与其他实验也有一定连续性,使用时需要前后联系。其他不同学制学生也可根据教学大纲适当选用其中部分实验。

感谢在编写过程中给予大力支持的领导和同仁。由于编写时间仓促,本书缺点和不足之处在所难免,恳请广大师生给予指正,以便今后再版完善。

谷 鸿 喜

2005 年 9 月 22 日

目 录

第一单元 基础性实验	1
实验 1 病原生物学实验室常用仪器设备及使用	1
实验 2 细菌培养基的制备	2
实验 3 消毒、灭菌及无菌操作	5
实验 4 细菌的培养法	9
实验 5 细菌的药物敏感性试验	12
实验 6 细菌的生化反应实验	14
实验 7 细菌的染色法	16
实验 8 显微镜油浸镜的使用及细菌的形态观察	21
实验 9 常见蠕虫的形态观察	24
实验 10 常见原虫的形态观察	29
实验 11 血清学诊断与血清学鉴定	32
第二单元 综合性和设计性实验	35
实验 12 临床标本中化脓性球菌的分离鉴定	35
实验 13 致病性肠道杆菌感染的实验室诊断	38
实验 14 肝吸虫抗体的检测	43
实验 15 流感病毒的微生物学诊断	44
实验 16 人乳头瘤病毒快速诊断	48
实验 17 病例讨论	50
第三单元 其他相关实验技术	52
实验 18 病毒的培养法	52
实验 19 病毒的定量法	57
实验 20 病毒的血清学诊断	60
实验 21 病毒性感染的快速诊断	61
实验 22 寄生虫感染常用免疫学诊断方法	70
实验 23 寄生虫病常见的病原学检查方法	71
实验 24 临床标本的采集与处理方法	74
附录 病原生物学实验课程教学大纲	78
附图 1 细菌的基本形态与特殊结构	81
附图 2 有鉴别意义的细菌形态与结构	83
附图 3 其他种类病原微生物的形态	85

附图 4 常见病毒的形态	88
附图 5 人体主要寄生虫卵的形态及相对大小	91
附图 6 四种疟原虫红细胞内各期形态（姬氏液染色）	92

第一单元 基础性实验

实验 1 病原生物学实验室常用仪器设备及使用

实验目的 主要了解病原生物学实验室常用的仪器和设备。

(一) 火焰灯 火焰灯是接种工具灭菌及试管等物品无菌化处理的必备器材。

酒精灯、煤气灯是较理想的接种环灭菌器材，火焰的大小可根据需要自行调节。火焰柱可分为两层：外焰和内焰。外焰由于接触氧气丰富，热度很高，所以烧灼接种环或物品时应使用外焰。

近年来，市场上有电热接种环灭菌器，使用比较安全，特别适于结核分枝杆菌实验操作。

(二) 接种工具 可以分为接种环和接种针两类。接种环用来挑取标本、菌液及划菌落涂平板等，直径一般为 2~4 mm，也可依需要自定。接种针则用来挑取单个菌落，穿刺高层琼脂等。为了适应不同的需要，接种器可以做成各种形状（图 1-1）。

(三) 显微镜 显微镜用于观察某些病原微生物和人体寄生虫的形态（包括病毒、包涵体形态）。

一般的光学显微镜就可满足常规要求，其目镜常用 5×、8×、10×，物镜常有 10×、40×和 100×（油镜），细菌和某些寄生虫虫卵等检验常用油镜，应注意保护油镜头。有条件的实验室还可装备暗视野显微镜、倒置显微镜、荧光显微镜、甚至能观察病毒等形态的电子显微镜。

(四) 温箱 温箱是进行细菌培养的基本设备，可调控温度范围一般在 20~60℃，其容积可根据实际要求进行选择，温箱有隔水式和非隔水式两种类型。

培养一般的细菌时，温箱的温度应定在 37℃。温箱应由控温仪进行温度控制，以避免由于温箱偶然升温使细菌死亡或发育受影响。另外，温箱也可依需要设定其他温度，如 26℃、43℃等。

(五) CO₂ 培养设备 用于分离和培养需要 CO₂ 气体才能生长的病原微生物。

市售专用的 CO₂ 培养箱对于常规实验室来说成本太高，一般用蜡烛罐亦可满足要求，以真空干燥罐、标本缸、甚至厌氧培养罐作为蜡烛罐，将接种的平板和试管放在罐内，然后放入点燃的蜡烛，再将罐盖盖好并用凡士林密闭，待蜡烛耗尽罐内的氧气，自行熄灭，即达到了所需的 5%~10% 的 CO₂ 浓度。将蜡烛罐放入普通温箱孵育便可。也

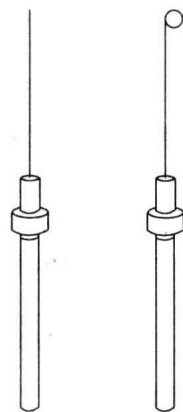


图 1-1 细菌接种工具
(有环者为接种环或称白金耳，无环者为接种针或称白金针)

可用化学试剂产气法，如每升体积需枸橼酸 9.3 g、 Na_2HCO_3 0.37 g，两试剂混合置一小烧杯中然后置于罐内。向烧杯中加入 10 ml 蒸馏水，立即将罐封闭，如此产生的 CO_2 环境也比较理想。

(六) 高压灭菌设备 高压灭菌器是微生物学实验室必备的设备，用于培养基及其他物品的灭菌。

高压灭菌器有立式、卧式之分。也有比较小型的手提式高压灭菌器，适用于小型实验室，由于热源不同，又可分为蒸气式和电热式，不同的实验室可根据具体情况选用。

(七) 冰箱 冰箱是微生物学实验室用于储存制备好的培养基、菌种、试剂等的必需设备。

冰箱的种类很多，家用和医用的均可。用于储存培养基，可选用 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 范围的冰箱；放置抗原、抗体等试剂最好选用 -20°C ，菌种保存放于 -70°C 冰箱最好。

(八) DNA 扩增仪 也称 PCR (polymerase chain reaction) 仪。PCR 技术是以目的基因为模板，在人工合成特异引物和耐热 DNA 聚合酶作用下进行的体外 DNA 扩增的方法。实验过程有高温变性、低温退火和适宜温度延伸等反应步骤组成一个循环，经过多个循环，特异性 DNA 片段就会大量被扩增。然后再用琼脂糖凝胶电泳等手段检测被扩增的 DNA。

PCR 仪根据用途分许多类型，由普通 PCR 已发展到原位 PCR、定量 PCR 仪等。

(钟照华)

实验 2 细菌培养基的制备

实验目的 了解常用培养基，如基础培养基、营养培养基，选择培养基和鉴别培养基的制备方法及应用。

制备培养基的基本流程：按配方称取原料、加水溶解、校正 pH、分装并灭菌。现在大多数实验室都使用半成品培养基，称量后加蒸馏水溶解、分装、灭菌即可。

一、蛋白胨水培养基

[材料]

蛋白胨 1.5 g

蒸馏水 100.0 ml

[方法] 将材料混合、加热搅拌溶解，分装小试管，每管约 2~3 ml，15 磅高压灭菌 15 min 备用。

[用途] 可供一般生化反应及制备糖发酵管用。

二、营养琼脂培养基

[材料]

合成营养琼脂 4.8 g

蒸馏水 100.0 ml

[方法] 称量后混合、加热搅拌溶解，分装于中试管内，每管约 5 ml，剩余部分装于三角烧瓶内，一并高压灭菌（15 min）。

灭菌后，将试管倾斜放置，使斜面长度约为试管长度的 1/2。冷却凝固后即成斜面培养基。三角烧瓶内的培养基待冷却至 50~55℃ 时，按无菌操作方法将培养基倒入无菌培养皿内，每平皿 15~20 ml，冷却后即成琼脂平板。

[用途] 琼脂平板用于分离细菌等，琼脂斜面用于细菌纯培养及短期菌种保存等。

三、半固体培养基

[材料]

合成半固体琼脂 1.0 g

蒸馏水 100.0 ml

[方法] 混合，加热溶解，分装于小试管中，每管约 3 ml，高压灭菌 15 min 后，使试管直立冷却凝成高层。

[用途] 供测定细菌动力和保存菌种用。

四、血液琼脂培养基

[材料]

营养琼脂培养基 100 ml

脱纤维新鲜羊血或兔血 5~10 ml

说明：脱纤维血液的制备：无菌采血，放入盛有小玻璃珠的无菌容器内，振摇 5~10 次，使纤维蛋白固定于玻璃珠表面，即得脱纤维血液。

[方法] 待灭菌后的营养琼脂冷却至约 50℃ 左右时，按无菌操作将羊血或兔血加入，混匀，分别倒入无菌的试管或培养皿内，制成血琼脂斜面或血琼脂平板。

[用途] 用于培养营养要求较高的细菌。

附 1 S.S 琼脂培养基 (S.S agar medium)

[原理] S.S 琼脂培养基为强选择培养基，其中肉膏、蛋白胨为主要营养物质，煌绿、胆盐、硫代硫酸钠、枸橼酸钠等可抑制非病原菌生长，而胆盐可促进某些病原菌生长。大肠杆菌分解乳糖产酸，使中性红变红色，且酸与胆盐结合成胆酸，因而大肠杆菌菌落为中心混浊的深红色菌落；病原菌不分解乳糖，故菌落透明，略带微黄色，枸橼酸铁能指示硫化氢的产生，故产生硫化氢的细菌菌落中心呈黑色。硫代硫酸钠有缓和胆盐对志贺菌及沙门菌的有害作用，并能中和煌绿、中性红的毒性，故可作为分离肠道病原菌的选择培养基。

[成分]

牛肉膏 5.0 g

蛋白胨 5.0 g

乳糖 10.0 g

胆盐 8.5 g

枸橼酸钠	8.5 g
硫代硫酸钠	8.5 g
琼脂	20.0 g
枸橼酸铁	1.0 g
0.1%煌绿溶液	0.33 ml
1%中性红溶液	2.5 ml
蒸馏水	加至 1 000.0 ml

[制法]

1. 将以上各成分，除琼脂、中性红和煌绿外，加热溶解于蒸馏水中，校正 pH 为 7.6。
2. 加入琼脂，煮沸溶化，滤过，再加入煌绿和中性红溶液，分装于三角烧瓶中，置于流通蒸气灭菌器内，100℃30 min 灭菌。
3. 取出摇匀，倾注平皿备用。

附 2 双糖铁培养基

[原理] 该培养基内含 1%乳糖，0.1%葡萄糖，若细菌能分解该两种糖，产酸量较多可使酚红指示剂变色，故培养基由红变黄，若只分解葡萄糖不分解乳糖，产酸量甚少，则仅培养基底部变黄，上部斜面仍为红色。此外，底部可看到细菌分解糖后产气情况，同时还可观察某些细菌分解含硫氨基酸产生硫化氢与培养基中铁盐生成的黑色沉淀。可用于肠道致病菌的鉴定。

[成分]

牛肉膏	0.5 g
氯化钠	0.5 g
硫酸亚铁胺	0.5 g
葡萄糖	0.1 g
酚红	0.025 g
蛋白胨	1.0 g
硫代硫酸钠	0.05 g
琼脂	1.0 g
乳糖	1.0 g
蒸馏水	加至 200.0 ml

[制法] 将上述成分（琼脂和酚红除外）混合，加热溶解，矫正 pH 至 7.6，加入琼脂，溶化，再加入酚红，分装试管，每管约 8 ml。经 10 磅高压灭菌 15 min 后，摆成高层斜面，冷凝后即成。

（商庆龙）

思 考 题

1. 什么是培养基？如何进行分类？
2. 配制培养基的原则是什么？

实验3 消毒、灭菌及无菌操作

实验目的 熟悉和掌握对各种消毒灭菌法的原理及应用；建立无菌操作观念，掌握无菌操作原则和方法。

一、热力灭菌法

利用热能去变性蛋白质或核酸、破坏细胞膜来实现杀灭微生物，分干热灭菌和湿热灭菌法。常用的仪器有以下两种：

(一) 干热灭菌器（烤箱）

干烤箱是两层金属板制成的方形或长方形密闭箱，外壁内层装有隔热的石棉板，箱底置有电炉，并附有温度计和自动温度调节器。主要用于平皿、吸管、试管等玻璃瓷、金属等器材的灭菌。灭菌时，打开通气口，加热到 80°C 或 100°C ，再关闭通气口，待温度达到 $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ ，维持 2 h。最高温度不得超过 180°C ，超过 180°C 时棉塞和包装纸会被烤焦。灭菌后，待温度下降到 80°C 以下时，再开箱取物，否则，冷空气突然进入，会使玻璃器材炸裂。

(二) 高压蒸气灭菌器

高压蒸气灭菌器是一个双层的耐高压的金属圆筒，附有贮水、排水、加热、排气阀门、安全阀门和压力计等装置。一般实验室常用小型的手提式高压蒸气灭菌器。使用时密闭，所产生的蒸气不能外溢而压力增加，则容器内温度亦相应增高。通常用 103.4 kPa (1.05 kg/cm^2)，温度即可达 121°C ，维持 $15\sim 30\text{ min}$ ，就可杀死一切微生物（包括细菌芽胞）。凡是耐高温、不怕潮湿的物品，如手术器械、敷料、手术衣、橡皮手套、生理盐水、基础培养基和废弃培养物等均可用此法灭菌。

二、紫外线灭菌

波长 $200\sim 300\text{ nm}$ 的紫外线具有杀菌作用，其中以 $265\sim 266\text{ nm}$ 杀菌作用最强，因其与 DNA 吸收光谱相一致。其杀菌机制是使病原微生物 DNA 相邻的胸腺嘧啶形成二聚体，从而破坏 DNA 构型，干扰其正常复制，导致其死亡或变异。紫外线杀菌力强，但穿透力弱，所以仅用于实验室、病房、手术室的空气或物体表面的消毒灭菌。

[材料]

1. 大肠杆菌及葡萄球菌的 12 h 培养物。
2. 普通琼脂平板。
3. 紫外线消毒箱、接种环等。

[方法]

1. 接种环火焰灭菌，分别取大肠杆菌、葡萄球菌培养物均匀地接种于两个平板上。
2. 半启平板盖，置紫外灯下适当位置，接受照射 30 min。
3. 盖上平板盖，置 37°C ，培养 16~18 h，观察结果。

[结果] 暴露于紫外灯下的平皿琼脂表面无菌或仅有少量菌生长，而盖遮着的平皿琼脂表面则有细菌生长。

三、常用消毒剂的消毒作用

化学消毒剂种类很多，其杀菌机制可有以下几类：①使菌体蛋白变性或沉淀，如酚类（高浓度）、醇类、重金属盐类、酸碱类、醛类；②妨碍代谢中某些环节，如氯化剂的氯化作用、低浓度重金属盐类与-SH基结合、Co及CN拮抗作用；③损害菌细胞，如酚类（低浓度）、表面活性剂（肥皂、去污剂、胆盐类）；④影响细菌代谢，如染料。本实验仅检测碘酒、75%酒精、3%~5%甲酚等几种消毒剂的灭菌效果。

【材料】 2.5%碘酒、75%乙醇、3%甲酚、普通琼脂平板等。

【方法】

1. 用玻璃笔在琼脂平板底面划十字线，将其分成A1、A2、A3、A4四区。
2. 掀开平板盖，将手指末端掌侧面在琼脂A1区表面轻轻压一下，盖好，作为对照。
3. 选用下述方法分别消毒其余各手指末端掌侧面。
 - (1) 用75%酒精棉球擦拭1 min，待干，在A2区轻轻压一下。
 - (2) 用2.5%碘酒消毒后，再用75%酒精棉球擦去碘酒，待干在A3区轻轻压一下。
 - (3) 3%来苏儿消毒5 min，待干在A4区轻轻压一下。
4. 将平皿置37℃，培养18~24 h，观察结果。

【结果】 观察琼脂表面各区菌落，判断消毒剂的效果及生长情况。

四、微生物实验室无菌操作技术

在病原生物学实验室进行实验操作，首先要建立无菌操作观念，严格遵循无菌操作原则，并熟练掌握无菌操作方法，贯彻到整个实验过程，从而保护操作对象免受污染，保证实验结果的准确和科学性。

1. 普通微生物实验室内无菌操作 在普通微生物实验室内操作时，无菌环境通常由酒精灯、煤气灯的火焰来实现。因此，操作时应靠近火焰，火焰灭菌应使用外焰。适用于处理感染性不强的病原生物。

2. 在生物洁净（超净）工作台内进行无菌操作 超净工作台能够保证操作野达到要求的洁净度，避免操作对象被污染。是医疗卫生、生物工程、科学实验等领域用于动植物细胞组织培养的必需设备。（图3-1）。

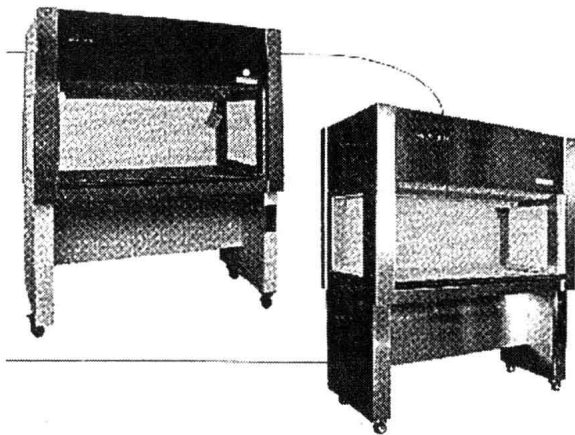


图 3-1 生物洁净台

在超净工作台内进行操作的过程如下：

- (1) 打开无菌工作台的紫外灯，消毒 30 min 以上。
- (2) 开始操作前先关闭紫外灯，打开超净台风机，等待 15 min。穿好工作衣，戴好口罩、帽子。
- (3) 用 70%酒精消毒手，晾干。
- (4) 点燃酒精灯，进行组织培养等操作。操作完毕后熄灭酒精灯，将培养物放入培养箱。
- (5) 恢复工作台面，用 70%酒精消毒工作野，关闭超净台风机，洗手。

[注意事项]

- (1) 超净台内应避免放入过多的物品，避免遮挡排风口；使用的吸管、滴管、试管及培养瓶等均事先灭菌。
- (2) 打开各类瓶盖前先过火焰，以固定灰尘；打开的瓶口、试管口过火焰，镊子使用前应经火焰烧灼。
- (3) 水平式风机的超净台，应使瓶口斜置，应尽量避免瓶口敞开直立。
- (4) 漏在培养瓶上或台上的液体，立即用酒精棉球擦净。

五、病原微生物实验室生物安全原则

1. 生物安全：即避免生物危险因子对包括实验室工作者在内的生物体的伤害和对环境的污染及扩散的措施。

2. 实验室感染可能来源：使用试管吸液时不慎将传染物吸入进口；在接种时不小心将传染物注入体内；被感染动物咬伤；注射器喷溅；离心机事故；微生物气溶胶，约 80% 起因不明的实验室事故原因主要是在操作中产生了微生物气溶胶。能够产生微生物气溶胶的活动包括：接种环操作；吸管操作；针头和注射器操作；培养和划线培养；混合微生物悬液；吸管操作液体溢出在固体表面；排除注射器中的空气；从塞子中拔出针头；接种动物；针头从注射器上脱落喷出毒液；离心；使用搅拌机、超声波仪和混合用的仪器；打开培养容器；感染性材料的溢出；在真空中冻干和过滤；接种鸡胚和培养物的收取等。

3. 实验室和微生物的分级：每类生物安全防护实验室根据所处理的微生物及其毒素的危害程度各分为四级。各级实验室的生物安全防护要求依次为：一级最低，四级最高。用于教学的普通微生物实验室一般为一级生物安全防护实验室，实验室结构和设施、安全操作规程、安全设备适用于已知不能导致健康成年人 and 动物致病的细菌、真菌、病毒和寄生虫等生物（危险度 I 级）。如果对象为能引起人或动物发病，但一般情况下对健康工作者、群体、家畜或环境不会引起严重的危害的病原体，实验室暴露很少引起严重疾病，有有效治疗和预防措施，并且传播危险有限的病原生物时（危险度 II，中等个体危险，有限群体危险），则在二级生物安全防护实验室内进行（表 3-1）。

表 3-1 生物安全实验室的分级

实验室分级	处理对象的危害程度
一级	对人体、动植物或环境危害较低，不具有对健康成人、动植物致病的致病因子
二级	对人体、动植物或环境具有中等危害或具有潜在危险的致病因子，对健康成人、动植物和环境不会造成严重危害。有有效的预防和治疗措施

实验室分级	处理对象的危害程度
三级	对人体、动植物或环境具有高度危险性，主要通过气溶胶使人传染上严重的甚至是致命疾病，或对动植物和环境具有高度危害的致病因子。通常有预防治疗措施
四级	对人体、动植物或环境具有高度危险性，通过气溶胶途径传播或传播途径不明，或未知的、危险的致病因子。没有预防治疗措施

4. 生物安全防护三原则：实验室生物安全防护的内容包括：安全设备、个体防护装置和措施（一级防护），实验室的特殊设计和建设要求（二级防护），严格的管理制度和标准化的操作程序和规程等方面采取综合措施，确保实验室工作人员不受实验对象感染，确保周围环境不受其污染。

5. 在微生物实验室内遵循生物安全原则

(1) 一级生物安全防护实验室安全设备和个体防护：一般无须使用生物安全柜等专用安全设备。工作人员在实验时应穿工作服，戴防护眼镜。工作人员手上有皮肤破损或皮疹时应戴手套。

(2) 二级生物安全防护实验室安全设备和个体防护：使用个体防护设备（口罩、眼镜，防护衣、帽、裤、鞋、袜、手套等）。实验室应配备生物安全柜（biosafety cabinet, BSC）（以Ⅱ级生物安全柜为宜）。可能产生致病微生物气溶胶的操作均应在生物安全柜中进行。当微生物的操作不可能在生物安全柜内进行，而必须采取外部操作时，必须使用面部保护装置（护目镜、面罩、个体呼吸保护用品或其他防溅出保护设备）。离开实验室时，防护服必须脱下并留在实验室内。不得穿着外出，更不能携带回家。用过的工作服应先在实验室中消毒，然后统一洗涤或丢弃。当手可能接触感染材料、污染的表面或设备时应戴手套。如可能发生感染性材料的溢出或溅出，宜戴两副手套。不得戴着手套离开实验室。工作完全结束后方可除去手套。一次性手套不得清洗和再次使用。

附 Ⅱ级生物安全柜

生物安全柜是病原微生物实验室必需设备，特别是那些对操作者需要采取保护措施の場合，如医疗卫生、制药、科研等进行细菌、病毒或其他病原微生物培养时提供无菌无尘工作环境。气幕式隔离设计，防止内外交叉感染。移门限位器可时刻提醒操作者。排风处设有专用过滤器，保证排放的空气符合国家卫生要求。（图 3-2）

使用注意事项

- (1) 只有鼓风机开着和气流指示在安全的位置时，才能使用 BSC。
- (2) 如果 BSC 有一扇可开的玻璃面板，当工作时它必须限制在固定的位置和高度。
- (3) BSC 中使用的装置和物品应保持在最小量，并且放置应不阻挡空气流动。
- (4) 工作结束之后，所有装置和容器在移出 BSC 之前应对其表面消毒。在进行这一操作的过程中 BSC 鼓风机应保持运转。
- (5) 煤气不能用于 BSC。
- (6) BSC 中工作结束之后至少应在 5 min 内保持 BSC 鼓风机运转。
- (7) 工作告一段落后，应彻底消毒工作台表面。

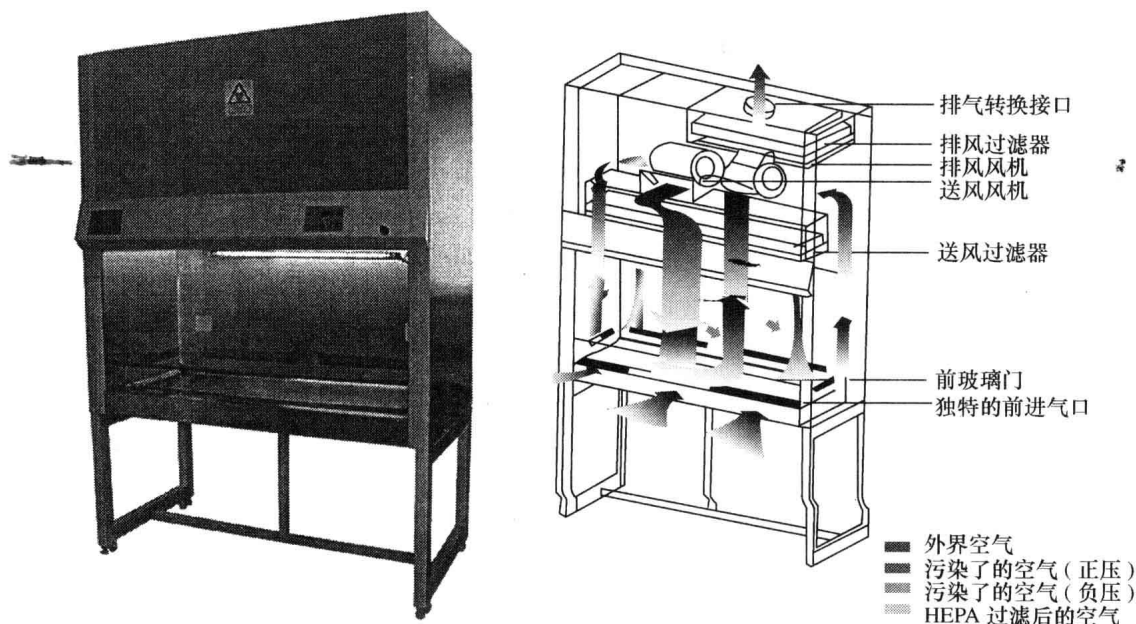


图 3-2 II 级生物安全柜及排风原理

思考题

1. 对可疑有芽胞的污染物，选择什么方法灭菌？

2. 下列各物应选择什么方法消毒灭菌？

体温计、注射器、牛奶、平皿、试管、普通琼脂培养基

(凌虹庄敏)

实验 4 细菌的培养法

实验目的 掌握细菌培养法。

一、分离培养法和菌落观察

细菌在自然界分布广、种类多；临床检验标本，如粪便、痰、脓汁中也常混有多种细菌。若欲从标本中查出某种病原菌时，必须先进行细菌分离，以获得纯培养物，再做进一步鉴定。分离培养方法有多种，但常用平板划线法。有些菌必要时尚可用动物接种分离法，如肺炎链球菌。划线方式很多，要求借划线而将混杂的细菌在琼脂表面分散开来，使单个菌能固定在一点上生长繁殖形成菌落，从而达到获得纯种的目的。

[材料]

1. 大肠杆菌与金黄色葡萄球菌混合培养物。
2. 普通琼脂平板。

[方法]

1. 右手持灭菌的接种环（冷却 3~5 s），取一接种环混合菌液。
2. 平板培养基放置时一般是平皿底在上，平皿盖在下放置。在划线时，左手抓握平板

(平皿盖则自然留在实验台上)，尽量使之直立，并靠近酒精灯周围，以免空气中杂菌落入。

3. 将接种环上菌液涂于平板面的原始区，并且来回划线，涂成一薄膜。划线时使接种环面与平板表面成 $30^{\circ}\sim 40^{\circ}$ 角，且轻轻接触，以腕力在平板表面滑移。

4. 接种环反复火焰灭菌，待冷，按图 4-1 于 I、II、III 区划线，但在划每区之前，接种环都要火焰灭菌 1 次。

5. 划线结束后，将平板培养基放回平皿盖内，灭菌接种环后放回接种环架上，用玻璃笔在皿底作标记。

6. 放 37°C 恒温箱倒置培养 $18\sim 24\text{ h}$ ，观察平板表面生长的菌落状态。

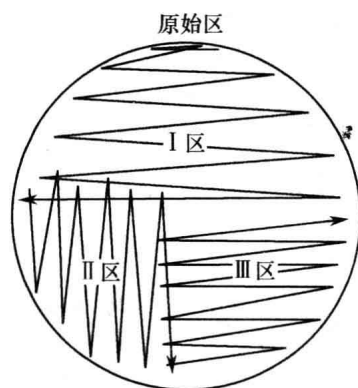


图 4-1 分离培养接种法

[结果] 单个细菌在平板培养基上繁殖成一个肉眼可见的细菌集团，称为菌落 (colony)。由于细菌种类以及培养基的成分不同，菌落特点也不尽相同，这有助于鉴别细菌。因此，应当对菌落进行认真观察，选出目的菌菌落进一步检查，观察要点如下：

1. 大小 以直径 (mm) 表示。 1 mm 左右为小菌落， $2\sim 3\text{ mm}$ 为中等菌落， 3 mm 以上为大菌落。
2. 形状 圆形、卵圆形及不规则形。
3. 边缘 整齐或不整齐、锯齿状、毛发状等。
4. 表面 光滑、湿润、皱纹、干燥等。
5. 隆起度 扁平、凸起、中心凹陷等。
6. 透明度 透明、不透明、半透明。
7. 颜色 无色、白色、黄色、绿色等。
8. 溶血性 产生溶血毒素的细菌，可以使血平板培养基中的红细胞破坏溶解。分为完全溶血、草绿色溶血及不溶血。
9. 气味 有些气味对鉴别细菌有意义。
10. 黏稠度 黏稠、稀薄等。

二、纯种细菌培养法

平板分离培养获得目的菌纯种后，常需接种至各有关培养基，以进一步测试菌的其他生物学特性。根据培养基的物理性状，纯种细菌培养法有斜面培养基接种法、液体培养基接种法和穿刺接种法三类。

[材料]

1. 琼脂斜面培养基。
2. 半固体培养基。
3. 蛋白胨水或肉汤培养基。
4. 大肠杆菌培养物。

[方法]

1. 斜面培养基接种法 琼脂斜面、尿素、枸橼酸盐等凡具有斜面外形的固体培养