

医学微生物学实习指导

北京医学院微生物教研组

1979.8.

目 录

实验室的规则.....	1
显微镜的使用.....	1
总论.....	
实验 一 细菌的形态及其检查法.....	3
一、细菌的基本形态.....	3
二、细菌的染色检查法.....	3
实验 二 细菌细胞的基本构造及特殊构造的观察.....	5
一、细菌细胞的基本构造.....	5
二、细菌的特殊构造.....	5
实验 三 培养基的制备.....	6
一、液体培养基.....	6
二、固体培养基.....	6
三、半固体培养基.....	7
四、血琼脂平皿.....	7
实验 四 细菌的分离培养与纯培养接种技术.....	8
一、细菌的分离培养.....	8
二、纯培养接种.....	9
三、病原菌的菌落特点观察.....	10
四、正常人体细菌的分离培养.....	10
实验 五 细菌的生化反应.....	10
一、细菌对碳水化合物的分解反应.....	10
二、细菌对含氮化合物的分解反应.....	11
三、细菌色素的产生.....	12
实验 六 理化因素对细菌的影响.....	12
一、物理因素对细菌的作用.....	12
二、化学消毒剂对细菌的作用.....	13
三、无菌玻璃器材的准备.....	13
实验 七 噬菌体.....	15
一、固体培养物上的溶菌现象.....	15
二、液体培养物中的溶菌现象.....	16
实验 八 细菌对抗菌素的敏感性测定.....	16
一、试管稀释法.....	16
二、纸片法.....	18
实验 九 细菌的变异.....	20
一、细菌形态的变异.....	20

二、细菌鞭毛的变异 (H→O 变异)	20
三、细菌光滑型至粗糙型的变异 (S→R 变异)	20
实验十 病原菌的毒力与机体的抵抗力	21
一、透明质酸酶试验	21
二、细菌外毒素的致病作用及抗毒素的保护作用	21
三、细菌内毒素的致病作用	22
四、肺炎双球菌对小白鼠的感染试验	22
五、细胞吞噬作用	22
实验十一 血清学反应——凝沉反应	23
一、环状沉淀试验	23
二、琼脂凝胶扩散试验	24
三、对流免疫电泳	24
四、琼脂免疫电泳	25
实验十二 血清学反应——凝集反应	25
一、玻片凝集试验	26
二、试管凝集试验	26
实验十三 血清学反应——补体结合反应	27
一、补体滴定	27
二、补体结合反应	28
实验十四 酶标记抗体与荧光抗体检查	29
一、酶标记抗体检查	29
二、荧光抗体检查	29
实验十五 细胞免疫检查	30
一、E 玫瑰花试验	30
二、PHA 刺激淋巴细胞转化试验	31
三、白细胞移动抑制试验	31
实验十六 变态反应 (超敏感性)	32
一、豚鼠的过敏性休克现象	32
二、结核菌素试验	32
实验十七 生物制品	33
一、预防接种制品	33
二、治疗制品	33
三、诊断用品类	33
各论	34
实验十八 病原性球菌	34
一、葡萄球菌	34
二、链球菌与肺炎双球菌	35
三、奈瑟氏菌属	36
四、病原性球菌未知标本检查法	36
实验十九 肠道杆菌	37

一、大肠杆菌、付大肠杆菌、变形杆菌及肺炎杆菌	37
二、沙门氏菌属	37
三、志贺氏菌属	38
四、伤寒、付伤寒与痢疾的细菌学检查法	39
五、霍乱弧菌	41
实验二十 棒状杆菌属	41
一、白喉杆菌与类白喉杆菌的形态观察	42
二、白喉杆菌与类白喉杆菌的菌落观察	42
三、白喉杆菌与类白喉杆菌的生化反应试验	42
四、白喉杆菌的毒力试验	42
实验二十一 分枝杆菌属	42
一、结核杆菌的形态观察	43
二、结核杆菌的菌落观察	43
三、结核病患者痰标本的常规检查法	43
四、麻风杆菌形态观察	43
实验二十二 嗜血杆菌属	43
一、流行性感胃杆菌	43
二、百日咳杆菌	43
实验二十三 布氏杆菌属, 巴氏杆菌属——鼠疫杆菌	44
一、布氏杆菌	44
二、鼠疫杆菌	44
实验二十四 需氧芽胞杆菌属——炭疽杆菌	44
一、炭疽杆菌的形态观察	45
二、炭疽杆菌的菌落观察	45
实验二十五 厌氧芽胞杆菌属	45
一、厌氧培养方法	45
二、破伤风杆菌、产气荚膜杆菌、肉毒杆菌的形态观察	46
三、三种厌氧菌的菌落观察	46
四、观察三种厌氧菌在庖肉培养基中生长情况	46
五、观察三种厌氧菌在牛乳培养基中生长的情况	46
六、动物试验	46
七、产气荚膜杆菌的卵磷脂酶试验	46
实验二十六 病原性真菌与放线菌	46
一、真菌的培养方法	47
二、常见真菌的基本构造与菌落特点的观察	47
三、致病性真菌的临床标本检查法	47
实验二十七 病原性螺旋体	47
常见病原性螺旋体的形态及检查方法	47
病毒	48
实验二十八 病毒形态学	48

一、病毒原生小体的形态·····	48
二、病毒包涵体的形态·····	48
实验二十九 病毒的培养方法·····	48
一、组织培养技术·····	49
二、鸡胚培养法·····	50
三、动物培养法·····	51
实验三十 病毒致细胞病变作用·····	51
一、病毒致细胞病变作用·····	51
二、血球吸附试验·····	51
实验三十一 流行性感冒病毒的分离和鉴定·····	52
一、流行性感冒患者标本的采集与处理·····	52
二、流行性感冒病毒的培养·····	52
三、流行性感冒病毒的初步鉴定·····	53
实验三十二 乙型肝炎实验诊断·····	55
一、对流电泳法·····	55
二、被动血凝试验·····	55
三、反向间接血凝试验·····	56
实验三十三 立克次氏体·····	56
一、立克次氏体的形态·····	56
二、外——裴二氏反应·····	56
附录·····	58
附录 I 实验室设备·····	58
附录 II 染液·····	59
附录 III 培养基·····	62
附录 IV 试剂·····	67
附录 V 实验动物的管理、接种、采血与解剖法·····	68
附录 VI 伤寒抗原与伤寒免疫血清的制备·····	70
附录 VII 组织培养所用的各种液体的配法·····	72
附录 VIII 鸡胚接种法·····	73

实验室规则 (Laboratory rules)

在微生物学实验室内经常接触具有传染性的材料，因之，必须严格遵守下述规则以保安全。

1. 进实验室时，先穿好实验服，不必要的物品（如衣服、书籍等）不得携入室内。
2. 进入实验室后，应立即清洁实验台面，洒湿地面，并保持实验室内安静。
3. 在实验过程中，有感染性的材料污染桌面、地面、实验服或不慎吸入口内时，应立即进行处理。倘污染桌面、地面时，用 3% 来苏水消毒半小时，污染手部时应浸入 1% 来苏儿中浸洗，若误吸入口中，应立即用大量自来水及 0.1% 过锰酸钾液漱口，如已咽下则应速到保健室作适当处理。
4. 实验时对带有传染性的器材如吸管、尖吸管、截玻片等用后立刻作消毒处理。吸管、尖吸管放入 3% 来苏水消毒筒中，截玻片放入消毒缸中。
5. 爱护公物，节约水电等一切实验器材，如损坏玻璃器材时，应填表登记并酌情赔偿，使用易燃品时，应远离火源，万一失火，立即用湿布或沙土掩盖。
6. 实验毕将桌面整理好，物归原处，已接种的培养物放入 37℃ 温箱；需要消毒灭菌的物品，送到指定地方。不用的菌种，登记后交回。
7. 实验毕，还应清洁并整理实验室。用肥皂水或消毒液洗手，脱去实验服，关好灯、水电、煤气、门窗，再离开实验室。

显微镜的使用方法 (The use of microscope)

1. 普通显微镜的构造、使用和保护 (care and use of microscope)
 - (1) 显微镜的构造：分为光学和机械两大部分。
 - ① 光学部分：
 - a. 接物镜（简称物镜）(objectives)
 - 低倍镜 [10×] (Lowpower)
 - 高倍镜 (40×) (Highpower)
 - 油头镜 (oil immersion lens) 下缘一般刻有一圈黑线或有 100× 的标志（分辨率在 0.2 微米以上）。
 - b. 接目镜 (Eyepiece)（简称目镜）：5×、10×、15×、三种。
 - c. 集光器 (Condenser)
 - d. 反光镜 (Reflex mirror)
 - ② 机械部分：
 - a. 镜筒。b. 镜臂。c. 镜坐。d. 回转板。e. 倾斜关节。f. 调节器。g. 载物台。h. 光圈。i. 次台。

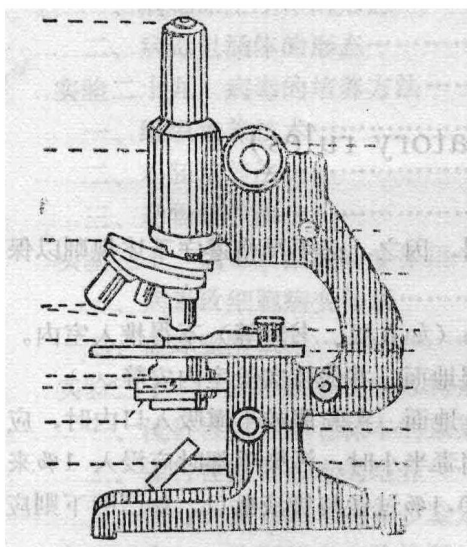


图 1 显微镜的结构

(2) 用法:

- ① 使用显微镜时，必须端坐，勿将镜台斜立，以免镜油流出。
- ② 以天然光为光源时应用平面反光镜，灯光为光源时应用凹面反光镜。
- ③ 将标本放在载物台上，用弹簧夹或标本移动器固定，先用低倍镜对好光线，然后使用高倍镜或油镜观察，同时调节集光器和光圈，以取得最合适光度，检查染色标本时光线宜强，应开大光圈，升高集光器。检查未染色标本时，光线宜弱，可缩小光圈，降低集光器。
- ④ 用油镜检查时，先在标本上加一滴液体石蜡，用眼睛从侧面看油镜镜头，转动粗调节器，使镜筒逐渐下降至油镜浸没在油内，几乎和标本接触。但两者切勿相碰。然后从接目镜中边看边转动粗调节器（只能向上）看到模糊物象后，再转动细调节器，直至物象完全清晰为止。滴油的目的在于减少光线通过玻片与物镜之间的空气引起的散光现象。如射入镜筒的光线过少，物体观察不清晰，若在玻片与物镜之间滴加和玻片折光率相近似的物质，如液体石蜡，就不至使通过的光线有所损失，而物体就可以看清楚。（参看图 2）。

- ⑤ 观察标本时，两眼同时睁开，以减少眼睛的疲劳。最好左眼观察，右眼协助绘图。
- ⑥ 显微镜用毕，应以擦镜头纸（不能用布类或其他纸）拭去镜头上的油。

(3) 显微镜的保护:

- ① 使用时：依照使用方法正确地并缓缓地转动或搬移，各部分结构如无特殊需要，切勿自行拆卸，以免损坏。强酸、强碱、氯仿、乙醚和酒精等，均能去漆或损坏机件，应避免与显微镜接触。
- ② 使用毕：应以擦镜头纸（不能用布类或其他纸）从镜头圆的直径直擦，避免顺着圆周擦，因为直线条纹对光线的通过较圆形环纹影响较少。

- ③ 保存：不用时，将接物镜转成八字并降下集光器。妥放箱内或罩内，避免直射日光，并防受潮。

2. 暗视野显微镜 (Dark-ground Microscope)

暗视野显微镜的分辨率比普通光学显微镜大，可观察到相当于可见光波长 1% 大小的微粒的存在。直径大于 0.3 微米 (μ) 的颗粒，在暗视野显微镜中可以观察其大小和形态；对于更小的颗粒，根据发亮点可知其存在与位置，但无法判断其形态及大小。

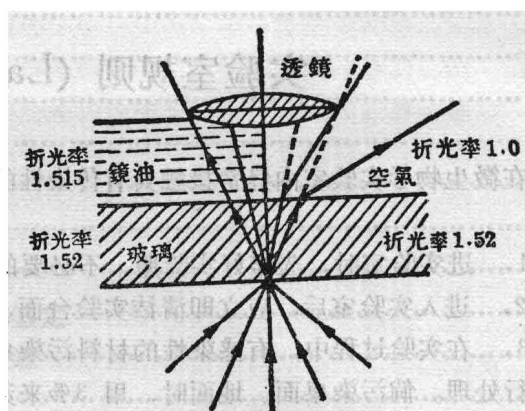


图 2 光线在油镜中的进行方向

在微生物学中，暗视野检查法常用于观察未染色的活体细菌、螺旋体等的形态和动力。

(1) 暗视野映光法的原理：暗视野显微镜是在普通光学显微镜上安装一个特别的集光器——暗视野集光器，其中央遮以黑板，光线不能直接通向镜筒，仅可从其四周边缘斜射到玻片的标本上。因光线不能向上直射，所以视野背景是暗的。从集光器斜射到被检物上的光线，由于光线散射作用而发出亮光反射到物镜内。故可以在黑暗视野中看到发亮的被检物。此即光学上的丁道尔氏现象。

暗视野集光器有两种类型，即抛物面型和心型。

(2) 用法：

- ① 将显微镜聚光器卸下，换装暗视野聚光器，并使其顶面与镜台相平。
 - ② 将油镜卸下于其后部旋入一漏斗形集光器，或换用带有虹彩的油浸接物镜。
 - ③ 于玻片上放被检物一滴，加盖片。
 - ④ 于聚光器上加镜油一滴，然后将次台向下移。
 - ⑤ 将标本置于载物台上，使聚光器表面与玻片接触，勿使发生气泡。转动反光镜使光源射来的光线完全射在聚光器的镜面上。用低倍镜观察，视野中有一光环时，应转动聚光器上的附件，将光环移置视野中心。
 - ⑥ 另加镜油一滴于盖片上，用油镜检查。
- 结果：黑暗背景中可见发亮、运动活泼的微生物。

实验一 细菌的形态及其检查法

目的：

1. 认识细菌的基本形态。
2. 掌握革兰氏染色法，耐酸染色法。

一、细菌的基本形态

材料：

球菌 Cocci(葡萄球菌 *Staphylococcus*、脑膜炎双球菌 *Meningococcus*) 杆菌 *Bacilli* (大肠杆菌 *Escherichia. Coli* 枯草杆菌 *B.Subtilis*)。弧菌 *Vibrio* (霍乱弧菌 *V.c-holerae*)

方法：

用油镜观察上述标本片，以认识细菌的三种基本形态，观察时注意其形状，大小比例、排列及染色反应。

二、细菌的染色检查法

材料：

葡萄球菌及大肠杆菌的培养物（液体培养物或斜面培养物）。

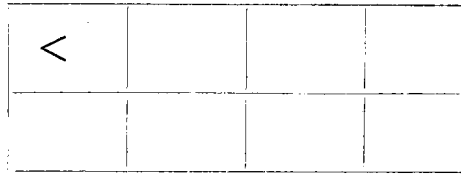
无毒结核杆菌培养物。

载玻片。

方法：

1. 涂片的制备。

(1) 于清洁无油的载玻片上,用蜡笔在玻片反面中央划分为两格,如为多种细菌可划为数格,并于左端划一“<”号,以标明次序:如图所示:



(2) 用灭菌白金耳 Sterile inoculating loop 取一小滴生理盐水放于玻片上,白金耳灭菌后,再取少许细菌放于水滴旁,轻轻涂抹,使细菌与盐水混匀并涂成面积不超过一平方厘米的薄膜(如用液体培养物制备涂片,则无需先放盐水,取培养物直接涂布于玻片上即可)。

2. 涂片的固定:待涂片在空气中自然干燥后,在火焰上往返通过三次,使细菌死亡并固着于玻片上,避免染色时脱落。

3. 染色:

(1) 革兰氏染色法 (Gram's staining method (附录 II—1 见 59 页))

- ① 分别取大肠杆菌及葡萄球菌作成涂片,火焰固定。冷后即可进行染色。
- ② 将龙胆紫溶液滴加在已固定的涂片上,染 1 分钟后,用水缓缓冲洗。
- ③ 滴加碘液作用一分钟,水洗。
- ④ 滴加 95% 酒精脱色,轻轻摇动玻片,使均匀脱色,至无紫色脱下为止(约需 $\frac{1}{2}$ —1 分钟),立即用水冲去酒精。
- ⑤ 滴加稀释石炭酸复红染液染色 $\frac{1}{2}$ 分钟,水洗后,用吸水纸印干玻片,用油镜检查。
- ⑥ 结果:革兰氏阳性菌呈紫色。

革兰氏阴性菌呈红色。

(2) 耐酸染色法:常用—萋尼二氏法 (Ziehl Neelsen's staining method) (附录 II—2 见 59 页)。

- ① 分别取大肠杆菌及无毒结核杆菌作成涂片,火焰固定。
- ② 在已固定的涂片上,滴加石炭酸复红溶液,将玻片置于铜板上,用微火加温至染液冒汽为止,注意温度不易过高,在此过程中,尚可添加染液,以免干涸,加热约 5 分钟。
- ③ 冷却后,用水冲洗。
- ④ 以 3% 盐酸酒精脱色至无红色脱下为止(约 $\frac{1}{2}$ —1 分钟),水洗。
- ⑤ 以吕氏美兰复染一分钟,水洗,印干,镜检。
- ⑥ 结果:标本中耐酸菌呈红色,非耐酸菌呈兰色。

要求:

1. 绘图说明细菌的基本形态。
2. 染料渣与细菌如何区别。
3. 掌握鉴别革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌,耐酸菌与非耐酸菌的不同颜色反应。

实验二 细菌细胞的基本构造及特殊构造的观察

目的:

了解细菌细胞的基本构造、特殊构造及其染色法。

一、细菌细胞的基本构造

1. 细胞壁 (cell wall)

材料:

大肠杆菌的细胞壁示教标本片。染色法 (附录 II—3 见 59 页)。

方法:

用油镜观察细胞壁示教片, 绘图记录。

2. 异染颗粒 (Metachromatic granules)。

材料:

白喉杆菌示教标本片, 阿伯尔 (Albert) 氏染色法 (附录 II—4 见 60 页)。

方法:

用油镜观察白喉杆菌示教片, 注意颗粒与菌体的颜色, 颗粒的数目与分布。

3. 细胞核 (Nucleus of cell)。

材料:

大肠杆菌细胞核示教标本片, 染色法 (附录 II—5 见 60 页)。

方法:

用油镜观察细胞核示教片, 绘图记录。

二、细菌的特殊构造

1. 鞭毛 (Flagella)。

材料:

伤寒杆菌鞭毛示教标本片, 染色法 (附录 II—6 见 60 页)。

方法:

用油镜观察鞭毛的形态、长短、颜色、及与菌体的关系。

2. 荚膜 (Capsule)。

材料:

肺炎双球菌荚膜示教标本片, 希 (Hiss) 氏染色法 (附录 II—7 见 61 页)。

方法:

用油镜观察菌体与荚膜的颜色及二者的形态特点。

3. 芽胞 (Spore)。

材料:

破伤风杆菌芽胞示教标本片, 耐酸染色法 (附录 II—2 见 59 页)。

方法:

用油镜观察菌体与芽胞的颜色, 芽胞的位置, 及二者的比例。

要求:

绘图说明细菌的基本构造及特殊构造。

实验三 培养基的制备

目的:

了解基础培养基的制备原则、成分及应用。

一、液体培养基: 肉汤基础培养基 (Broth basic media)。

材料:

牛肉浸液	100 毫升
蛋白胨	1 克
氯化钠	0.5 克

方法:

1. 将已除去油脂和肌腱, 并绞碎的牛肉浸入为其重量二倍的蒸馏水中, 置冰箱浸泡一夜。
2. 次日由冰箱取出, 量其体积并记录之, 煮沸半小时, 用玻棒随时搅拌。
3. 量其体积并用蒸馏水补足。
4. 用纱布过滤, 将肉渣中液体尽量挤出。
5. 用滤纸过滤。
6. 滤液中加 1% 蛋白胨及 0.5% 氯化钠, 使溶。
7. 测定 pH 值, 用 1% 氢氧化钠矫正 pH, 使 pH 成 7.4—7.8。
8. 煮沸过滤。
9. 分装, 灭菌。

用途:

此基础培养基可作固体、鉴别、营养及选择培养基的原料, 除某些特殊致病菌外, 一般细菌均能在此培养基中生长。

二、固体培养基 (Solid media): 普通琼脂平皿及琼脂斜面 (Meat infusion agar plate and slant)。

材料:

pH7.8 牛肉汤	100 毫升
琼脂 (agar)	2 克

方法:

1. 将以上材料混合加热使溶。
2. 趁热用热水浸湿的棉花过滤, 然后分装于试管中, 或分装于三角烧瓶中。
3. 用高压 15 磅 20 分钟灭菌。
4. 趁琼脂尚未凝固前斜置试管即成琼脂斜面培养基。
5. 已灭菌溶化的肉汤琼脂冷至 50—60℃, 取出棉塞将瓶口在火焰上灭菌后, 将琼脂 (15 毫升) 倒入无菌平皿内并轻轻摇动平皿, 使琼脂均匀分布于全平皿底部, 凝固后即成

琼脂平皿培养基。

用途：

用于细菌的分离可获得纯培养。增菌、保存菌种。

三、半固体培养基 (Semi-solid medium)。

材料：

pH7.8 牛肉汤 100 毫升

琼脂 0.25—0.5 %

方法：

1. 与固体培养基制法相同。

2. 分装试管中，试管直立，凝固后即成。

用途：保存菌种，检查细菌动力。

四、血琼脂平皿 (Blood agar medium)。

材料：

2% 琼脂培养基 100 毫升

脱纤维之无菌羊血 5—10 毫升

方法：

1. 将 2% 琼脂培养基溶化，待其稍冷至约 45℃—50℃ 时，加入 5—10% 脱纤维羊血，然后将血液与琼脂混匀。

2. 混匀后用无菌手续倾入无菌平皿，或分装于无菌试管中，使成斜面。

用途：

增菌及供营养要求较高的细菌分离培养用。

“附”：培养基 pH 之比色测定法

材料：

1. pH 值比色用具：pH 标准比色管一套，(pH6.4—8.4 酚红指示剂)；比色架一个，为长方形盒，其上刻有六个垂直园孔，以备插置试管。

2. 试剂：0.02% 酚红指示剂，1% 及 10% 氢氧化钠溶液。

3. 待测之培养基。

方法：

1. 取同样试管 2 支，分别装入待测之培养基 5 毫升，其中一管加酚红指示剂 0.25 毫

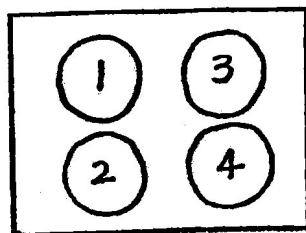
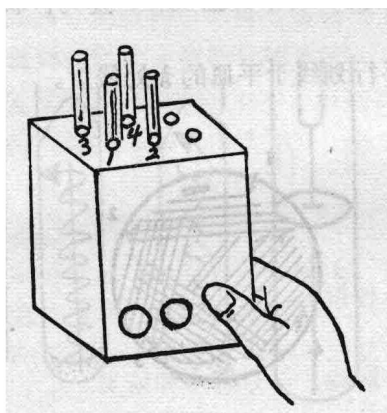


图 3 pH 比色计

升。

2. 将以上各管插入比色架（参看图3）。

3. 对光观察，如培养基呈酸性，用 1% 氢氧化钠矫正之，并记下所用 1% 氢氧化钠的量。

4. 计算出全部培养基所需加入氢氧化钠的量。

例如：5 毫升培养基加入 1% 氢氧化钠 0.2 毫升即成 pH7.6，则 1000 毫升培养基中

$$\text{需加入 1\% 氢氧化钠毫升数} = \frac{0.2 \times 1000}{5} = 40 \text{ 毫升。}$$

取 10% 的氢氧化钠加 4 毫升，即成 pH7.6。

实验四 细菌的分离培养与纯培养接种技术

目的：

1. 掌握细菌分离培养及纯培养接种技术。

2. 观察细菌在培养基中的生长现象。

一、细菌的分离培养 (The isolation of pure cultures)

应用于由混杂多种细菌的材料中分离纯种细菌，有下列三种方法较为多用：

1. 平行划线法：如图所示。

(1) 用灭菌白金耳沾取标本涂于培养基之一角。

(2) 将白金耳通过火焰灭菌，冷后再自涂布材料处沾取细菌，连续密集平行线于整个培养基上。但如细菌过少可不经灭菌而直接自涂材料处向下平行划线。有时为节省培养基，一个平皿可用以分离两个以上标本。接种时应注意无菌操作，白金耳要斜划，勿划破琼脂，打开平皿时应在火焰附近操作，以减少污染机会。

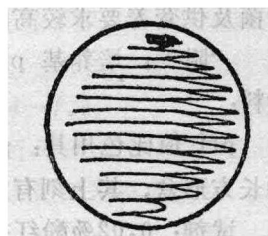


图 4① 平行划线法

(3) 接种后平皿底上应注明接种标本之名称，接种日期，接种者之组别姓名。

(4) 然后将平皿（底向上）放于 37℃ 温箱中培养。

2. 分区划线法：如图所示。

(1) 用无菌手续以白金耳沾取标本，连续平行划线于平皿的 $\frac{1}{4}$ 处线 1。

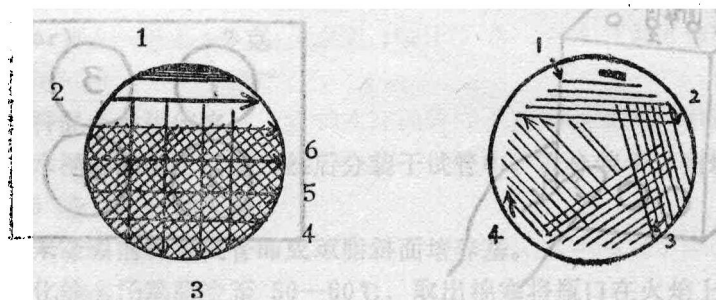


图 4② 井字划线法

图 4③ 分区划线法

(2) 将白金耳灭菌，冷后通过线1部分连续平行划线，占平皿之 $\frac{1}{4}$ 面积线2。

(3) 白金耳再灭菌，冷后按同法划线3。

(4) 同法：划线4。划满整个平皿。其他注意事项同平行划线法。

3. 井字划线法：如图所示。

(1) 将标本涂于平皿上部“1”处，白金耳灭菌，冷却。

(2) 用白金耳沾取“1”处细菌在其下部“2”划一条粗线。白金耳灭菌。冷却。

(3) 用白金耳自“2”处垂直划4，5条直线，即“3”处，白金耳灭菌，冷却。

(4) 用白金耳与“3”线垂直再划4，5条横线，即“5”处，白金耳灭菌，冷却。

(5) 在4，5条，互相垂直的粗线间，再用白金耳划相互交叉的“5”“6”处线。

(6) 白金耳用后灭菌。其他注意事项同前。

二、纯培养 (Pure culture) 接种

1. 斜面培养基接种技术：用于增菌或保存菌种。

(1) 取一支斜面培养基及一支纯菌种管，并列放在左手指和中指上，手掌支住两试管底，并以大拇指压住。右手将白金耳灭菌，再用右手无名指和小指拔起棉塞。（勿放置桌上，如棉塞太紧时应予先松动）。

(2) 管口经火焰灭菌数次后，将灭菌白金耳伸入有菌试管中，待冷，取少量细菌（从斜面培养基之底部有凝固水处取）接种于斜面培养基上，接种法是自管底向上轻轻连续曲折划线。如图5(2)、(3)所示，以保存菌种为目的时亦可按图5(1)之所示划线。然后取出白金耳，将管口再经火焰灭菌，塞好棉塞，白金耳灭菌后放回原处。

(3) 若自平皿培养物中取菌时，只钩取一个单个菌落。

(4) 接种前应作好标记、标明菌种名称、日期、接种人、组别，然后放置 37℃ 温箱中培养，次日观察结果。

2. 液体培养基接种技术：用于增菌及鉴定细菌生长特点（表面生长、沉淀生长、均匀混浊生长）。

操作技术与上法相同，唯移种时将沾菌之白金耳沿接近液体表面之管内壁轻轻摩擦（勿用力振荡），使细菌混入培养基内，置 37℃ 温箱中培养，次日观察结果。

3. 半固体培养基接种技术：用于保存菌种及间接观察细菌之动力。（无动力之细菌沿穿刺线生长，有动力者使培养基混浊，甚至看不出穿刺线）。

用无菌操作技术，取白金耳沾取细菌后，向半固体培养基中央自上穿刺到管底，再沿原穿刺线抽出即可。置 37℃ 温箱培养，次日观察结果。

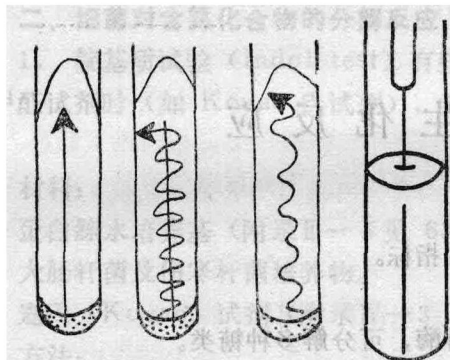


图 5①斜面培养基接种法

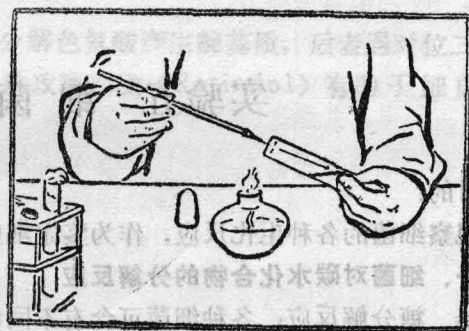


图 5②半固体培养基接种法

三、病原菌的菌落特点观察

材料:

金黄色葡萄球菌血琼脂平皿培养物

枯草杆菌普通琼脂平皿培养物

肺炎杆菌普通琼脂平皿培养物

方法:

肉眼或用放大镜观察所发平皿培养物的菌落形态特点。

1. 观察细菌菌落形态时应注意以下几点:

- (1) 形状: 圆形、不规则、放射状;
- (2) 大小: 通常以小、中、大表示。
- (3) 表面: 扁平、凸起、凹陷、湿润或干燥。
- (4) 边缘: 整齐、皱折状、捲发状。
- (5) 其他: 色素有无、光泽、透明度、溶血性等。

2. 通常根据菌落性状分为三个类型:

(1) 光滑型菌落 (Smooth colony): 表面光滑, 边缘整齐, 其凸起, 扁平或凹陷, 色素, 透明度, 溶血性等可因菌种而异。

(2) 粗糙型菌落 (Rough colony): 表面粗糙, 边缘不整齐。

(3) 粘液型菌落 (mucoid coloy): 呈粘液状, 表面光滑, 湿润。

四、正常人体细菌的分离培养

材料: 无菌棉拭子, 粪便标本, 血琼脂平皿, 远藤氏琼脂平皿 (附录Ⅲ—1 见 62 页)

方法:

1. 用无菌棉拭子, 取正常人咽喉部标本涂抹于血琼脂平皿上端, 再用白金耳作平行划线, 培养 24 小时后观察结果。

2. 用白金耳取少许粪便, 涂抹于远藤氏琼脂平皿或中国兰琼脂平皿上端, 再用白金耳按井字法划线接种, 次日观察培果。

要求:

1. 分离培养应划出单个菌落。
2. 纯种接种不能污染。
3. 了解纯培养的获得方法。
4. 掌握观察细菌菌落的方法。

实验五 细菌的生化反应

目的:

观察细菌的各种生化反应, 作为鉴定细菌的一种指标。

一、细菌对碳水化合物的分解反应

1. 糖分解反应: 各种细菌可含有不同糖的分解酶, 可分解多种糖类。

材料:

乳糖管（附录Ⅲ—2 见 62 页）。

大肠杆菌，伤寒杆菌培养物。

方法：

将上述细菌分别接种到乳糖培养基中，置温箱培养，次日观察结果。

记录结果时，以下述符号标明分解情况，产酸记以“+”，产酸气记以“⊕”不分解记以“-”。

“附”：培养基中所加指示剂是溴甲酚紫（Brom cresol purple）碱性时呈紫色，酸性时呈黄色。

2. V—P 反应（Voges Prauskaue reaction）及甲基红反应（Methyl red reaction）。

材料：

葡萄糖磷酸盐胨水（附录Ⅲ—3 见 63 页）。

Barnitt 试剂（V—P 试剂）：（附录Ⅳ—1 见 67 页）。

5% α -萘酚酒精溶液

40% KOH 溶液

0.02% 甲基红酒精溶液，1 毫升吸管。

方法：

（1）将大肠杆菌及产气杆菌分别接种于葡萄糖胨水中各二管，置温箱，培养 24—48 小时。

（2）V—P 反应，将两种菌液（各一管）分别加入 α -萘酚溶液 0.6 毫升，KOH 溶液 0.2 毫升，用力摇匀；观察结果。

（3）甲基红反应：将剩下之两种菌液，加入甲基红试剂（附录Ⅳ—2 见 67 页）数滴，观察结果。

3. 枸橼酸盐利用试验：某些细菌可利用枸橼酸盐（Sodium citrate），使培养基 pH 增高，培养基中指示剂由绿色变成兰色。

材料：

枸橼酸盐琼脂培养基（附录Ⅲ—4 见 6 页）。

大肠杆菌及产气杆菌培养物。

方法：

将上述细菌分别接种于枸橼酸盐斜面上，置 37℃ 温箱，培养 24 小时，观察结果。

二、细菌对含氮化合物的分解反应

1. 靛基质试验（Indol test）有些细菌能分解色氨酸产生靛基质，后者遇对位二甲苯甲醛试剂时（如 Kovac 氏试剂），形成红色的玫瑰吲哚（Rosindol）有助于细菌之鉴定。

材料：

蛋白胨水培养基（附录Ⅲ—5 见 63 页）。

大肠杆菌及伤寒杆菌培养物。

寇氏（Kovac）试剂（附录Ⅳ—3 见 67 页）。

方法：

将上述细菌分别接种于蛋白胨水培养基中，置 37℃ 温箱。次日取出，加入寇氏试剂数

滴，静置片刻，在两液界面形成红色环者称靛基质反应阳性，无红色环者为阴性。

2. 硫化氢产生试验，某些细菌能分解培养基中之含硫氨基酸产生硫化氢，遇醋酸铅，则产生硫化铅，显黑色，有助于细菌之鉴别。

材料：

醋酸铅琼脂培养基（附录Ⅲ—6 见 63 页）。

大肠杆菌及变形杆菌培养物。

方法：

将上述细菌分别用白金针刺入醋酸铅培养基内，37℃ 培养 24 小时，观察结果。

3. 尿素分解反应，某些细菌能分解尿素产生氨，而使培养基的 pH 增高，使指示剂变色。

材料：

尿素培养基（附录Ⅲ—7 见 63 页）。

伤寒杆菌及变形杆菌培养物。

方法：

将上述细菌分别接种于尿素培养基内，37℃ 温箱培养 24 小时，观察结果。

三、细菌色素的产生

材料：

普通琼脂平皿。

金黄色葡萄球菌及绿脓杆菌培养物。

方法：

将上述细菌接种于普通琼脂平皿上，置 37℃ 温箱培养 24 小时，观察结果。

要求：

1. 掌握各种生化反应的结果观察方法。并理解它的原理。
2. 了解利用这些反应对鉴定细菌的意义。

实验六 理化因素对细菌的影响

目的：

1. 了解各种理化因素对细菌的作用。
2. 学习消毒灭菌方法。

一、物理因素对细菌的作用

1. 热力杀菌作用。

材料：

大肠杆菌及枯草杆菌 24 小时液体培养物。肉膏汤管（附录Ⅲ—8 见 64 页）。

60℃，100℃ 水浴。

方法：

（1）在肉膏汤培养基管上，用蜡笔或纸签分别标明菌种名称、时间、温度及组别。

（2）于 5 支培养基管内各种入一白金耳大肠杆菌菌液，于另 5 支培养基管内各种入一白金耳枯草杆菌菌液。各留一支不加热作对照。其余 8 管作实验。