

全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材

供医学检验、卫生检验、医学实验技术专业使用

临床微生物学检验 实验指导

主 编 费 樱

 科学出版社

全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材

供医学检验、卫生检验、医学实验技术等专业使用

临床微生物学检验实验指导

主 编 费 樱

副主编 谷俊莹 王豫萍 邹 阳

编 委 (按姓氏笔画排序)

王豫萍(贵阳医学院)

杨 旭(昆明医学院第二附属医院)

谷俊莹(贵阳医学院)

邹 阳(贵州省临床检验中心)

胡永林(遵义医学院)

查筑红(贵阳医学院附属医院)

费 樱(贵阳医学院附属医院)

袁 军(贵州省人民医院)

贾 伟(宁夏医科大学总医院)

夏乾峰(海南医学院)

郭 鹰(第三军医大学)

秘 书 王豫萍(贵阳医学院)

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书是全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材之一。全书分三篇,共二十五章。第一篇临床微生物检验基本技术,前四章主要介绍细菌形态学检查、细菌分离培养技术、细菌鉴定技术、抗菌药物敏感性试验及耐药监测,第五至十五章为临床常见病原微生物的培养、鉴定或检测方法,通过实验课的教学,加强学生对基础理论、基本知识和基本技能的掌握。第二篇综合性实验从标本送检要求、检验程序、结果解读等方面介绍临床各类标本的细菌学检测,有助于学生综合掌握和运用所学知识,为临床实习和工作打下基础。第三篇研究创新性实验重点在培养学生进行科学研究的兴趣和基本方法。

本书可作为高等院校医学检验专业、卫生检验专业学生实验用书,也可供临床检验工作者和从事医学研究的科研人员参考使用,并可用做临床医学、医学影像学、麻醉学、法医学、预防医学及药学等专业实验教学的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

临床微生物学检验实验指导 / 费樱主编. —北京:科学出版社,2012.6
全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材
ISBN 978-7-03-034693-3

I. 临… II. 费… III. 微生物学-医学检验-医学院校-教材 IV. R446.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 121701 号

责任编辑:李 植 李国红 / 责任校对:张怡君

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号
邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新科印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012年6月第一次印刷 印张:12 插页:1

字数:274 000

定价:32.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材》 编写指导委员会

顾 问	郑铁生			
主 任	杨国珍			
副主任	李永念			
委 员	(按姓氏笔画排序)			
	王正荣	王良宏	王豫萍	李 兴
	肖 芸	谷俊莹	张亚莉	罗昭逊
	费 樱	莫 非	夏曙华	黄 海
	黄韵祝	蒋红梅	曾小菁	潘 卫
秘 书	潘 卫	谷俊莹		

总 序

医学检验是临床医学与实验医学的有机结合,是运用物理学、化学、分子生物学、免疫学、病原生物学、生物信息学、细胞学等技术,为疾病预防保健、疾病诊断、治疗及科研等提供客观依据的一门学科。医学检验专业的培养目标是培养既具有基础医学、临床医学和检验医学理论知识,又具有实验室基本技能和一定创新能力的高级医学检验人才。

按照《教育部关于“十二五”普通高等教育本科教材建设的若干意见》(教高[2011]5号)“充分发挥高等学校在教材建设中的主体作用。……高等学校要根据学校特色,促进教材建设与人才培养相结合,与专业建设、课程建设、科研工作、教学方式方法改革和教学辅助资源建设相结合,形成良性互动,建设高质量教材”的精神,这套《全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材》由贵阳医学院牵头,联合第三军医大学、湖北医药学院、北京大学医学部、湖南师范大学、宁夏医科大学、遵义医学院、昆明医学院、海南医学院、徐州医学院、贵阳中医学院、贵阳护理职业学院等高等医药院校和贵州省临床检验中心、贵州省人口计生科研所、贵州省人民医院、贵州省血液中心、贵阳市妇幼保健儿童医院、广州军区总医院以及贵州省肿瘤医院的专家教授共同编写。这套教材包括了医学检验专业课程的七本实验教材,分别是《临床基础检验学实验指导》、《临床生物化学检验实验指导》、《临床微生物学检验实验指导》、《临床免疫学检验实验指导》、《临床血液学检验实验指导》、《分子诊断学实验指导》及《临床输血学检验实验指导》。本教材可供高等院校医学检验专业、卫生检验专业学生实验使用,也可供从事临床检验工作者和医学研究的技术人员参考使用。

本书的顺利出版,是各位编者辛勤劳动的结果,也得到各参编单位的大力支持,尤其得到教育部国家级教学团队、高等学校特色专业建设点、贵州省高等学校教学内容和课程体系改革重点项目、贵州省教育厅省级实验教学示范中心和贵州省卫生厅、贵阳医学院及贵阳医学院附属医院专项资金的资助,在此一并致谢。

敬请各位读者在使用中多提宝贵意见,以利修改再版。

《全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材》编写指导委员会

2012年1月

前 言

临床微生物学检验是医学检验专业重要分支学科,是医学检验专业本科生的必修课。《临床微生物学检验实验指导》由来自贵阳医学院、第三军医大学、遵义医学院、海南医学院、宁夏医科大学总医院、贵阳医学院附属医院、昆明医学院第二附属医院、贵州省人民医院和贵州省临床检验中心从事医学检验教学工作及临床微生物检验工作的专业人员共同编写完成,本教材力求兼顾实验教学与临床微生物检验工作的需求,较原有同类教材增加了医院感染监测、临床微生物学检验质量控制及研究创新性实验的内容,并在革兰阴性杆菌的培养和鉴定章节的编写上做了一些新的尝试,期望能使实验课的教学更贴近临床检验工作的实际需求,也有利于培养学生的创新思维。

本书主要作为医学检验、卫生检验等专业实验指导教材,同时可作为临床检验工作者、临床医学工作者的参考书籍。

本教材由所有编者尽心努力完成,但限于我们的水平和经验,书中疏漏甚至错误在所难免,恳请各位使用者多提宝贵意见。

费 樱
2012年4月

目 录

第一篇 临床微生物检验基本技术

第一章 细菌形态学检查	(1)
第一节 显微镜的使用	(1)
第二节 不染色标本检查	(3)
第三节 细菌的涂片和革兰染色	(3)
第四节 细菌的特殊染色技术和观察	(4)
第二章 细菌的分离培养技术	(7)
第一节 培养基制备技术	(7)
第二节 细菌的接种技术	(8)
第三节 细菌的培养方法	(10)
第四节 细菌生长现象观察	(11)
第三章 细菌鉴定技术	(13)
第一节 生物化学鉴定	(13)
第二节 血清学鉴定	(18)
第三节 动物实验与细菌毒素检测	(19)
第四章 抗菌药物敏感性试验与细菌耐药性检测	(23)
第一节 纸片扩散法	(23)
第二节 稀释法	(25)
第三节 E 试验	(28)
第四节 联合药敏试验	(29)
第五节 临床常用特殊耐药菌及耐药酶的表型检测	(30)
第五章 革兰阳性球菌的培养和鉴定	(36)
第一节 革兰阳性球菌各属间的鉴别	(36)
第二节 葡萄球菌属细菌鉴定	(37)
第三节 链球菌属和肠球菌属细菌鉴定	(38)
第六章 革兰阴性杆菌的培养和鉴定	(41)
第一节 革兰阴性杆菌各科或属之间的鉴别	(41)
第二节 肠杆菌科细菌的鉴定	(42)
第三节 非发酵革兰阴性杆菌的鉴定	(51)
第四节 苛氧菌的鉴定	(54)
第七章 革兰阴性球菌的培养和鉴定	(56)
第八章 弧菌属、弯曲菌属和螺杆菌属细菌的培养和鉴定	(58)
第一节 弧菌属	(58)

第二节	空肠弯曲菌	(60)
第三节	幽门螺杆菌	(61)
第九章	需氧革兰阳性杆菌细菌的培养和鉴定	(63)
第一节	棒状杆菌属	(63)
第二节	需氧芽孢杆菌属	(65)
第三节	产单核李斯特菌	(69)
第十章	分枝杆菌属、放线菌属和诺卡菌属细菌的培养和鉴定	(70)
第一节	结核分枝杆菌	(70)
第二节	放线菌属	(72)
第三节	诺卡菌属	(72)
第十一章	厌氧菌的培养和鉴定	(74)
第十二章	螺旋体、支原体和衣原体的实验室检测	(77)
第一节	梅毒螺旋体实验室检测	(77)
第二节	沙眼衣原体实验室检测	(81)
第三节	支原体实验室检测	(83)
第十三章	医院感染监测	(87)
第一节	手卫生监测	(87)
第二节	空气卫生学监测	(89)
第三节	物体表面致病菌监测	(90)
第十四章	真菌的培养和鉴定	(92)
第一节	真菌检验基本技术	(92)
第二节	临床常见浅部真菌培养和鉴定	(94)
第三节	常见深部真菌培养和鉴定	(96)
第十五章	病毒的培养和检测	(99)
第一节	病毒培养和检测技术	(99)
第二节	常见病毒的检测	(104)

第二篇 综合性实验

第十六章	血液及骨髓标本的细菌学检验	(108)
第一节	血液及骨髓标本的细菌学检验	(108)
第二节	中心静脉导管的细菌学检查(Maki 半定量法)	(115)
第十七章	尿液标本的细菌学检验	(117)
第十八章	呼吸系统标本的细菌学检验	(122)
第一节	上呼吸道标本的采集、运送及处理	(122)
第二节	下呼吸道标本的采集、运送及处理	(126)
第三节	呼吸机相关感染	(132)
第十九章	粪便标本的细菌学检验	(134)
第二十章	脑脊液标本的细菌学检验	(138)
第二十一章	生殖道标本的细菌学检验	(140)
第二十二章	穿刺液及脓标本的细菌学检验	(142)

第二十三章 临床微生物学检验室内质量控制	(144)
----------------------------	-------

第三篇 研究创新型实验

第二十四章 创新型实验实施原则和方法	(148)
--------------------------	-------

第二十五章 创新型实验	(152)
-------------------	-------

参考文献	(156)
------------	-------

附录	(157)
----------	-------

附录 1 临床微生物常用培养基	(157)
-----------------------	-------

附录 2 临床微生物常用生化试验培养基、试剂和染色法	(171)
----------------------------------	-------

彩图

第一篇 临床微生物检验

基本技术

第一章 细菌形态学检查

第一节 显微镜的使用

【实验目的】

1. 掌握光学显微镜的结构和原理。
2. 掌握光学显微镜使用方法。

【实验原理】

1. 显微镜的基本结构 普通光学显微镜的构造主要分为两部分:机械部分和光学部分。

(1) 机械系统

- 1) 镜座:是显微镜的底座,用以支持和稳定整个镜体。
- 2) 镜柱:是镜座上面直立的部分,用以连接镜座和镜臂。
- 3) 镜臂:一端连于镜柱,一端连于镜筒,是取放显微镜时手握部位。
- 4) 镜筒:连在镜臂的前上方,镜筒上端装有目镜,下端装有物镜转换器。
- 5) 物镜转换器:位于镜筒下端的旋转盘,可自由转动,盘上有3~4个物镜孔。
- 6) 载物台:在镜筒下方,用以放置标本,中央有一通光孔;装有玻片标本推进器,推进器左侧有弹簧夹,用以夹持玻片标本,镜台下有推进器调节轮,可调节标本位置。
- 7) 调焦装置:是装在镜柱上的大小两种螺旋,可调节物镜和标本之间的焦距。大螺旋称粗调节器,移动时可使载物台作较大幅度的升降,通常在使用低倍镜时,先用粗调节器迅速找到物像。小螺旋称细调节器,移动时可使镜台缓慢地升降,可作精密调焦,一般在高倍镜下使用,可得到清晰的物像。

(2) 光学系统

1) 目镜:装在镜筒的上端,其上刻有 $5\times$ 、 $10\times$ 或 $15\times$ 符号以表示其放大倍数,一般装的是 $10\times$ 的目镜,为便于指示图像,镜中装有一根黑丝作为指针。

2) 物镜:装在镜筒下端的旋转器上,一般有3~4个物镜,其中最短的刻有“ $10\times$ ”符号的为低倍镜,较长的刻有“ $40\times$ ”符号的为高倍镜,最长的刻有“ $100\times$ ”符号的为油镜,此外,在高倍镜和油镜上还常加有一圈不同颜色的线,以示区别。在物镜上,还有镜口率(N. A.) (也称为数值孔径)的标志,它表示该镜头分辨力的大小,其数字越大,表示分辨率越高。

3) 照明装置:装在镜台下方,包括光源和集光器。光源一般采用普通灯光,强度可以自由调节。集光器位于镜台下方的集光器架上,由聚光镜和光圈组成,其作用是把光线集中到所要观察的标本上。

2. 显微镜的放大成像原理 显微镜的分辨率是由所用光波长和物镜数值孔径决定,缩短使用的光波波长或增加数值孔径可以提高分辨率。减小光波波长来提高光学显微镜分辨率是有限的,提高物镜数值孔径是提高分辨率的理想措施。增加数值孔径,一般通过提高介质折射率,以空气为介质的折射率为 1,而香柏油的折射率为 1.51,和载玻片 1.52 的折射率相近,这样光线可以不发生折射而直接通过载玻片、香柏油进入物镜,从而提高分辨率。显微镜总的放大倍数是目镜和物镜放大倍数的乘积,而物镜的放大倍数越高,分辨率越高。

【实验器材】

普通光学显微镜、细菌革兰染色标本、香柏油、擦镜油、擦镜纸。

【实验方法】

1. 取镜和放置 从显微镜柜中取出显微镜,右手紧握镜臂,左手托住镜座,放在座前桌面上稍偏左的位置,镜座应距桌沿 6~7cm 左右,便于坐着操作。

2. 对光 打开光源开关,转动旋转器,使低倍镜对准镜台的通光孔,打开光圈,上升集光器,在目镜上观察,调节光源强度至视野内的光线均匀明亮。

3. 放置玻片标本 取一玻片标本放在镜台上,一定使有标本一面朝上,切不可放反,用推片器弹簧夹夹住,然后旋转推片器螺旋,使玻片中被观察的部分位于通光孔的正中央。

4. 低倍镜和高倍镜使用 先用低倍镜观察,先转动粗调焦手轮,使载物台上升至物镜距标本片约 5mm 处。并转动粗调节器,使载物台慢慢下降,直到视野中出现清晰的物像为止。如果物像不在视野中心,可调节推片器将其调到中心。转动转换器,调换为高倍镜头,在目镜上观察,此时一般能见到一个不太清楚的物像,可转动细调节器,直到获得清晰的物像。如果视野内的亮度不合适,可通过升降集光器的位置或开闭光圈的大小来调节。

5. 油镜的使用方法 在使用油镜之前,先经低、高倍镜观察,然后将需进一步放大的部分移到视野的中心。将集光器上升到最高位置,光圈开到最大。转动转换器,使高倍镜头离开通光孔,在需观察部位的玻片上滴加一滴香柏油,然后慢慢转动油镜,使镜头浸入油中,慢慢转动细调节器至物像清晰为止。油镜使用完毕,先用擦镜纸沾少许擦镜油将镜头上的香柏油擦去,再用干擦镜纸擦干净。

【实验结果】

在显微镜油镜下观察到细菌形态。

【注意事项】

1. 持镜时必须是右手握臂、左手托座的姿势,不可单手提取,以免零件脱落或碰撞到其他地方。

2. 轻拿轻放,不可把显微镜放置在实验台的边缘,以免碰翻落地。

3. 保持显微镜的清洁,镜头必须用专用擦镜纸擦拭,切忌口吹手抹或用布擦,机械部分用布擦拭。

4. 使用完毕后,取下标本片,转动旋转器使镜头离开通光孔,下降载物台和集光器,关闭光圈,盖上外罩,放回显微镜柜内。

第二节 不染色标本检查

【实验目的】

了解不染色标本的观察方法。

【实验原理】

有鞭毛的细菌在液体中可以运动,而无鞭毛的细菌只能发生分子颤动,以此可以观察细菌的运动能力。

【实验器材】

1. 菌种 变形杆菌、金黄色葡萄球菌 8~12 小时肉汤培养物。
2. 其他 载玻片、盖玻片、凹玻片、镊子、接种环、显微镜和凡士林等。

【实验方法】

1. 压滴法 用接种环取变形杆菌和金黄色葡萄球菌菌液各 2~3 环,分别置于两张载玻片中央,用镊子夹住盖玻片覆盖于菌液上。覆盖时,先将盖玻片一端接触菌液缓缓放下,使玻片之间不产生气泡,菌液不外溢为适。标本立即置显微镜下观察,先低倍镜找到标本,然后在高倍镜下观察。

2. 悬滴法 取变形杆菌或金黄色葡萄球菌肉汤培养物 1 环分别置盖玻片中央,在另一凹玻片凹窝的周围涂少许凡士林,将凹面向下,对准盖玻片中央,覆于其上,粘住盖玻片后迅速翻转,用小镊子轻压,使盖玻片与凹玻片粘紧,密封凹窝边缘,液滴即悬垂于凹窝中央。先在低倍镜下找到悬滴边缘,再换用高倍镜观察。

【实验结果】

无论是悬滴法还是压滴法,有鞭毛的变形杆菌可见发生位移的运动现象,而无鞭毛的金黄色葡萄球菌不发生位置变化。

【注意事项】

1. 不能使用陈旧的细菌培养物。
2. 压滴法的标本不能产生气泡,以免影响观察。

第三节 细菌的涂片和革兰染色

【实验目的】

1. 掌握细菌涂片的制作。
2. 掌握革兰染色方法、原理、结果观察和意义。

【实验原理】

革兰染色法的原理尚不完全清楚,主要有 3 种学说:

1. 通透性学说 革兰阳性菌细胞壁结构较致密,肽聚糖层厚,脂质含量少,乙醇不易透入,反而使细胞壁脱水后形成一道屏障,阻止染料外渗。革兰阴性菌细胞壁结构疏松,肽聚糖层薄,含大量脂质,乙醇易渗入,使细胞壁通透性增加,细胞内的染料容易被乙醇溶解脱出。

2. 等电点学说 革兰阳性菌等电点(pI 2~3)比革兰阴性菌(pI 4~5)低,一般染料酸碱度在 pH 7.0 左右,电离后革兰阳性菌所带的负电荷比革兰阴性菌多,故与带正电荷的碱性染料结晶紫结合牢固,不易脱色。

3. 化学学说 革兰阳性菌菌体含大量核糖核酸镁盐,可与碘、结晶紫牢固结合,使已着色的细菌不被乙醇脱色;革兰阴性菌菌体含核糖核酸镁盐很少,故易被脱色。

【实验器材】

1. 菌种 金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌 18~24 小时斜面培养物。
2. 其他 革兰染液、玻片、生理盐水、酒精灯、接种环、显微镜等。

【实验方法】

1. 细菌涂片标本的制作

(1) 涂片:取洁净玻片一张,用记号笔划分两格并标记金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌,用接种环按无菌操作取 1~2 环生理盐水在玻片上,刮取少许菌苔,在生理盐水中研磨成乳浊状,涂成直径约 1cm² 的均匀薄膜,然后立即将接种环烧灼灭菌。同法取大肠埃希菌液于另一格中涂片。

(2) 干燥:涂片一般在室温下自然干燥,若须迅速干燥,可将涂片膜面朝上,在火焰上方的热空气中加温干燥,但切勿紧靠火焰,以免将标本烤干。

(3) 固定:涂片干燥后,在酒精灯火焰上迅速来回通过三次,注意温度不能太高,以玻片反面触及皮肤,热而不烫为度。固定的目的—是杀死细菌,二是使菌体与玻片黏附牢固,染色时不被染液和水冲掉,三是可凝固细胞质,改变细菌胞壁对染料的通透性。

2. 革兰染色步骤

(1) 初染:将已固定的涂片置染色架上,滴加结晶紫 1~2 滴,1 分钟后用细水流轻轻冲洗。

(2) 酶染:滴加碘液 1~2 滴,1 分钟后用细水流轻轻冲洗。

(3) 脱色:95%乙醇溶液脱色,加乙醇后轻轻晃动玻片,约 30 秒后用细水流轻轻冲洗。

(4) 复染:滴加稀释石炭酸复红 1~2 滴,30 秒后用细水流轻轻冲洗。待标本自干或用吸水纸印干后,置油镜下观察。

【实验结果】

金黄色葡萄球菌是革兰阳性球菌,被染成紫色;大肠埃希菌是革兰阴性杆菌,被染成红色。

【注意事项】

1. 涂片厚薄要适宜,菌膜应该薄而均匀。
2. 水洗时,水流不宜过大,避免水流直接对准菌膜冲洗。
3. 菌种应选用对数生长期的菌种。

第四节 细菌的特殊染色技术和观察

【实验目的】

1. 掌握鞭毛染色法的基本原理和操作方法。
2. 掌握芽孢染色法的基本原理和操作方法。
3. 掌握荚膜染色法的基本原理和操作方法。

【实验原理】

1. 鞭毛染色法 在染色前先用媒染剂处理,让它沉积在鞭毛上,使鞭毛直径加粗,然后再进行染色。常用的媒染剂由丹宁酸和氯化高铁或钾明矾等配制而成。

2. 芽孢染色法 芽孢是利用细菌细胞不同部分与染料的亲和力不同,用特殊染色法使之显示出不同的颜色。芽孢染色法就是根据芽孢具有既难以染色而一旦染上色后又不易脱色的特点而设计的。除了用着色力强的染料外,还需加热以促进芽孢着色。孔雀绿染色法,此染料不仅可以进入菌体,而且也可以进入芽孢,进入菌体的染料可经水洗脱色,而进入芽孢的染料则难以透出,若再用沙黄进行复染,此时菌体即被染成红色,而芽孢难着色,仍呈绿色,进而更明显地衬托出芽孢,便于观察。

3. 荚膜染色法 由于荚膜与染料间的亲和力弱,不易着色,通常采用负染色法,即设法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。由于荚膜的含水量在90%以上,故染色时一般不加热固定,以免荚膜皱缩变形。

【实验器材】

1. 菌种 变形杆菌、枯草芽孢杆菌、肺炎链球菌。

2. 染色液 Leifson 染色液、芽孢染色液(5%孔雀绿水溶液、0.5%蕃红水溶液)、荚膜染色液。

3. 其他 载玻片、擦镜纸、吸水纸、记号笔、玻片搁架、镊子、接种环、显微镜。

【实验方法】**1. 鞭毛染色法**

(1) 清洗玻片:选择新的玻片,为了避免玻片相互重叠,应将玻片插在专用金属架上,然后将玻片置洗衣粉过滤液中(洗衣粉煮沸后用滤纸过滤,以除去粗颗粒),煮沸20分钟。取出稍冷后用自来水冲洗、晾干,再放入浓洗液中浸泡5~6天,使用前取出玻片,用自来水冲去残酸,再用蒸馏水洗。将水沥干后,放入95%乙醇溶液中脱水。

(2) 菌液的制备及制片:在染色前将待染细菌在新配制的牛肉膏蛋白胨培养基斜面上连续培养3~5代,以增强细菌的运动力。最后一代菌种培养12~16小时后,用接种环挑取斜面与冷凝水交接处的菌液数环,移至盛有1ml无菌盐水的试管中,使菌液呈轻度混浊,37℃恒温箱中静置10分钟。用记号笔在洁净的玻片上划分3个相等的区域,吸取少量菌液滴在玻片第一个小区的一端,立即倾斜玻片,使菌液缓慢地流向另一端,用吸水纸吸去多余的菌液,自然干燥。

(3) 染色:加染色液于第一区,使染料覆盖涂片。隔数分钟后再将染料加入第二区,依此类推,其目的是确定最合适的染色时间,而且节约材料。

(4) 水洗:在没有倾去染料的情况下,就用蒸馏水轻轻地冲去染料,否则会增加背景的沉淀。

(5) 干燥:自然干燥。

(6) 镜检:先低倍观察,再高倍观察,最后再用油镜观察。

2. 芽孢染色法

(1) 制备菌液:加1~2滴无菌盐水于小试管中,用接种环从斜面上挑取2~3环的枯草芽孢杆菌于试管中并充分混匀。

(2) 加染色液:加5%孔雀绿水溶液2~3滴于小试管中,用接种环搅拌使染料与菌液充分混合。

- (3) 加热:沸水浴 15~20 分钟。
- (4) 涂片:用接种环从试管底部挑 2 环菌液,涂片并晾干。
- (5) 固定:将涂片来回通过酒精灯火焰 3 次。
- (6) 脱色:用水洗直至流出的水中无孔雀绿颜色为止。
- (7) 复染:加蕃红水溶液染色 5 分钟后,倾去染色液,不用水洗,直接用吸水纸吸干后镜检。

3. 荚膜染色法

- (1) 涂片:按常规方法将肺炎链球菌制成一薄的涂片,自然干燥,加热固定。
- (2) 染色:滴加结晶紫染液 1 分钟。
- (3) 脱色:用 20% CuSO_4 溶液洗去结晶紫,勿水洗,直接用吸水纸吸干后镜检。

【实验结果】

变形杆菌菌体和鞭毛均染成红色结果;枯草芽孢杆菌芽孢呈绿色,芽孢囊和菌体为红色;在蓝紫色背景下,肺炎链球菌菌体呈紫色,荚膜无色或浅紫色。

【注意事项】

1. 细菌鞭毛极细,很容易脱落,操作时必须小心谨慎。
2. 供芽孢染色用的菌种应控制菌龄。
3. 因荚膜为可溶性物质,故染色冲洗时动作要轻柔,防止脱离。

【思考题】

1. 为什么用油镜要等标本完全干后才能滴加香柏油?
2. 如果显微镜视野光线太强或者太弱,应该怎么调节?
3. 细菌涂片过厚对革兰染色有什么影响?
4. 革兰染色后,如果金黄色葡萄球菌被染成红色,可能是什么原因造成?
5. 细菌不染色标本的检查有什么实际意义?
6. 细菌特殊染色标本的检查有什么实际意义?

(夏乾峰)

第二章 细菌的分离培养技术

第一节 培养基制备技术

【实验目的】

1. 掌握基础培养基的制备过程。
2. 熟悉常用培养基的原理、种类及其用途。

【实验原理】

微生物生长繁殖需要多种营养物质,培养基是人工地将多种物质按各种微生物生长的需要配置而成的一种混合营养基质,用以培养或分离各种微生物。培养基的基本成分包括碳源、氮源、无机盐和水等,有些还含必要的维生素和生长因子。另外,培养基还要调整适宜的酸碱度,并做到无菌。根据微生物的种类和实验目的不同,培养基也有不同的种类和配制方法。

【实验器材】

1. 试剂 牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、琼脂粉、1mol/L NaOH、1mol/L HCl、蒸馏水、pH试纸等。
2. 器材 试管、吸管、三角瓶、烧杯、量筒、玻棒、硅胶塞、无菌平皿、牛角匙、天平、高压蒸汽灭菌器、牛皮纸、脱脂棉、滤纸、棉线、纱布等。

【实验方法】

1. 培养基制备的基本步骤

(1) 调配成分:按培养基配方准确称取各种成分,倒入三角烧瓶中,加一定量蒸馏水,充分混合。

(2) 溶解:将调配好的混合物进行加热溶解,溶解过程中应随时搅动,以防焦化,待完全溶解后,补足水分到需要的总体积。

(3) 调节 pH:因培养基在加热消毒过程中,pH 会有所变化,培养基各成分完全溶解后,调节 pH 使用滴管逐滴加入 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 边滴边搅动;用 pH 试纸测其 pH,直到符合要求时为止。

(4) 过滤澄清:自配的培养基一般都有沉渣或混浊出现,需过滤成清晰透明后方可使用,一般液体或半固体培养基用滤纸过滤,琼脂培养基用清洁的白色薄绒布或纱布加脱脂棉趁热过滤。

(5) 分装:培养基的分装,应按使用的目的和要求分装于试管、烧瓶等适当容器内。分装的量不宜超过容器的 1/2,以免灭菌时培养基外溢。分装琼脂斜面培养基时,分装量一般为试管高度的 1/4~1/3,能形成 2/3 底层和 1/3 斜面。

(6) 灭菌:由耐热物质配制的培养基(如普通营养琼脂等)常用高压蒸汽灭菌法,条件为 103.43kPa,15~20 分钟。在各种培养基制备方法中,如无特殊规定,即可用此法灭菌。含

糖的培养基经 68.95kPa 灭菌 10~15 分钟为宜,以免糖类被破坏。其他含有不耐热或蛋白质丰富的培养基,应按其要求所需条件灭菌。

(7) 质量控制:每批培养基制成后须做无菌试验和效果试验。首先将培养基置 37℃ 温箱内孵育 24 小时后,无菌生长为合格,同时用已知标准菌株接种于培养基上,检查其生长繁殖及生化反应是否与预期结果符合。

(8) 保存:每批制备好的培养基应注明名称、制作日期等,放在 4℃ 冰箱内备用。放置时间不宜超过 1 周,倾注的平板培养基不宜超过 3 天。

2. 常用培养基的配制和用途

(1) 肉汤培养基:制备 100ml 肉汤培养基,准确称取去筋膜脂肪的牛肉 50g、蛋白胨 1g、氯化钠 0.5g、磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)0.1g,量取蒸馏水 100ml。制法如下:

1) 将去筋膜脂肪的鲜牛肉 50g 搅碎,加蒸馏水 100ml,放入 4℃ 冰箱中过夜。

2) 取出后倒入容器内煮沸 20 分钟,使肉渣全部凝固。

3) 用纱布和脱脂棉过滤,去除肉渣,于滤液中加入氯化钠 0.5g、蛋白胨 1g、磷酸氢二钾 0.1g,加热使之完全溶化,补足蒸发的水分。

4) 再度加热煮沸 10 分钟,过滤后,测定酸碱度并调整至 pH 7.6。

5) 分装于试管或烧瓶内,加塞,121.3℃ 20 分钟灭菌。

6) 置 37℃ 温箱孵育 24 小时,无菌生长,即可应用。

(2) 普通琼脂培养基:制法如下:

1) 在上述肉汤中加入 2%~3% 的琼脂,熔化后调 pH 为 7.6,必要时应过滤。

2) 于琼脂凝固前,分装于试管或小烧瓶内,加棉塞。

3) 置高压蒸汽灭菌器内,经 121.3℃ 20 分钟灭菌。

4) 取出后趁热将试管倾斜一定角度,待琼脂凝固后即成普通琼脂斜面。将烧瓶内琼脂培养基冷至 50~60℃ 时,以无菌操作注入无菌平皿内,凝固后即成普通琼脂平板。

(3) 半固体培养基:在上述肉汤中加入 0.3% 的琼脂,熔化后,脱脂棉过滤,补足水分,调节 pH 为 7.6,分装于小试管中(每管约 2ml),然后放入高压蒸汽灭菌器内,经 121.3℃ 20 分钟灭菌,取出直立,待凝固后即成半固体培养基。

(4) 血液和巧克力琼脂培养基:将制好的普通琼脂培养基加热熔化,待冷至 50℃ 左右时,以无菌操作加入 5%~10% 脱纤维兔血或羊血,轻轻摇匀(注意勿使产生泡沫),分装于灭菌试管或平皿中,制成血液琼脂斜面或血液琼脂平板。若在琼脂温度 80℃ 时加入血液,80℃ 水浴摇匀,倾注平板后即成巧克力平板。

【注意事项】

1. 盛放培养基不可用铁、铜等材质的器皿,防止铁、铜离子进入培养基中抑制细菌的生长或细菌毒素的产生。

2. 在进行调配溶解培养基各成分时,应先向瓶中加少量蒸馏水,再加入各种固体成分,以免加热时瓶底烧结。

第二节 细菌的接种技术

【实验目的】

1. 掌握细菌的分离方法和无菌操作技术。