

医学微生物学实验指导

(试用教材)

重 庆 医 学 院

一九七三年七月

实 验 目 录

实验一	细菌的染色标本观察.....	1—2
实验二	细菌的培养和生化反应.....	3—5
实验三	细菌分布.....	5—6
实验四	消毒灭菌.....	6—8
实验五	细菌对药物的敏感试验.....	8—9
实验六	血清学反应.....	12
实验七	变态反应.....	13
实验八	化脓球菌.....	14
实验九	肠道杆菌.....	17
实验十	白喉杆菌.....	18
实验十一	厌氧芽胞杆菌.....	19
实验十二	结核杆菌.....	20—21
实验十三	病 毒.....	21—24
实验十四	螺旋体及立克次压体的形态观察.....	24
实验十五	真 菌.....	25

附录:

临床标本的细菌学检查.....	23—31
-----------------	-------

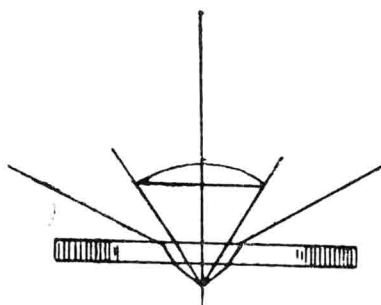
实验一 细菌的染色标本观察

一、显微镜油镜使用法：

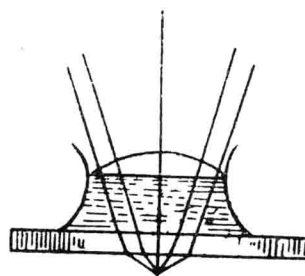
观察微生物必须使用显微镜，若要清晰地观察细菌的形态就必须使用油镜。油镜是观察细菌的基本方法之一，必须熟练掌握。

（一）油镜使用的原理：

油镜的放大倍数较高，但由于透镜的直径小，视野往往很暗。如在标本片与油镜头之间加一滴折光系数与玻璃相同的香柏油，就可以克服这一缺点。因为这样通过聚光器而来的光线将不再折射而全部进入镜筒，物象就清晰可见（见图）。



加香柏油之前



加香柏油之后

油镜加油前后光线折射比较

（二）油镜使用方法

用自己做的革兰氏染色涂片练习油镜的使用。使用油镜时要特别小心，因为油镜的焦距短，镜头必须接近被检查的物体面上，稍不小心即可压碎玻璃片，或使镜头损坏，给国家财产造成不必要的损失。使用时先在标本片上放一滴香柏油，用粗调节器慢慢放下镜筒，使油镜浸入油中，几乎与标本片相接触，然后用自己的眼睛在接目镜上观察，并慢慢用粗调节器使镜筒上升，直至看到模糊的物象，再用细调节器上下调节，直至物象清晰为止，禁止用粗调节器向下调节。

（三）使用时注意点

1. 先用低倍镜寻得最亮的光源（注意反光镜、聚光器、光圈的调节）。
2. 标本片必须全部干后，始可加油，一小滴即可。

3.用完后，立即用擦镜纸擦净镜头上之油，若油已干，可用少许二甲苯擦净，然后再用擦镜纸擦去二甲苯，否则固定镜片的胶质将被溶解、日久镜片脱落。

4.避免阳光直接照射镜头。

5.用完后，将低倍镜移至中央，以免损坏油镜。

二、革兰氏染色法（每人做）：

细菌微小，无色半透明，未经染色单用显微镜放大，仅能粗略地看到其形态大小，欲观察清楚，必须进行染色。革兰氏染色法是观察细菌形态使用最广泛的一种鉴别染色法。利用革兰氏染色法，可将所有的细菌区分为革兰氏阳性和革兰氏阴性两大类。

（一）涂片的制备：

取一张清洁玻片，用接种环取一环生理盐水置于玻片上，再用接种环按无菌操作法从葡萄球菌斜面培养物上取少量菌苔，然后与玻片上的盐水混匀。涂片要薄而均匀。制成的涂片置于空气中自然干燥或远离火焰烘干（切勿靠近火焰，以免标本烤焦），干后在火焰上迅速通过三次，使涂片固定。

同法作一张大肠杆菌斜面培养物的涂片。

如为液体培养物，就不必先加盐水，取一环菌液直接置玻片上即可。

（二）革兰氏染色法（快速法）

1.初染：百分之零点二五结晶紫溶液及百分之一点二五碳酸氢钠溶液各1~2滴滴于涂片上，轻摇玻片，约三秒钟后用水冲洗。

2.媒染：滴加碘液（碘2克加于1当量氢氧化钠溶液10毫升中研磨，溶解后加水90毫升）数滴，约3秒钟后，用水冲洗。

3.脱色：滴加丙酮酒精（百分之九十五的酒精75毫升加丙酮25毫升）数滴，轻摇玻片，约3秒钟后用水冲洗。

4.复染：用硷性复红水溶液（百分之八硷性复红酒精溶液10毫升，加水90毫升）复染3秒钟后用水冲洗。

染色完毕后凉干或远离火焰烘干均可，干后镜检，革兰氏阳性细菌为紫色，革兰氏阴性细菌为红色。

三、细菌的特殊构造（示教）：

细菌具有细胞壁、细胞核、细胞浆等基本构造。某些细菌尚有荚膜、芽膜、鞭毛等特殊构造。特殊构造用一般染色方法不易着色，必须用特殊的方法染色后才能察见。某些细菌的特殊构造，有助于细菌的鉴别。

用油镜观察鞭毛、荚膜、芽胞示教片。

实验二 细菌的培养和生化反应

一、认识常用的几种培养基及了解其用途（示教）：

一般细菌均可用人工的方法进行培养，培养细菌的营养材料称为培养基。制成培养基的材料一般多用牛肉浸液作为基础，加入一定量的蛋白胨和氯化钠，制成肉浸液（一般称为肉汤）。在肉浸液中，还可以加入一定量的琼脂制成肉浸液琼脂培养基（固体），在此基础上再加入某些必要的材料制成各种专用的或鉴别培养基。培养基的形式除液体、固体外，还有半固体。固体培养基中有平板、斜面、高层等。

认识肉汤、琼脂平板、琼脂斜面、半固体、琼脂高层等各种培养基。

各种培养基的用途：

肉汤：常用于培养普通细菌，并可作为制备其他营养要求更高的培养基的基础。

琼脂平板：分离单个菌落，获得纯培养细菌，并观察细菌菌落形态。

琼脂斜面：用于繁殖与保存细菌。

半固体培养基：用于检查细菌的动力及保存菌种。

二、各种培养基的接种法（每人做）：

根据培养细菌的目的不同，可将细菌接种于液体培养基或固体培养基中，接种时必须严格注意无菌操作技术，避免杂菌污染。

每组发葡萄球菌与大肠杆菌菌种各一管，每人任取一种，接种以下一套培养基，37℃孵育后下次观察：

（一）液体培养基接种法

用左手拇、食指与中指握住菌种管与肉汤管下端，菌种管在外侧。将两管棉塞转动一下，使略松，右手执接种环，烧灼灭菌后，以右手小指及掌心，和小指与无名指顺次拔去二管之棉塞，注意棉塞下端不可触及任何东西，管口在火焰上通过数次，然后用接种环沾取少许培养物，移种到肉浸液里面。将管口再在火焰上通过数次，塞好棉塞，然后烧灼接种环。置于37℃孵育24小时后观察。

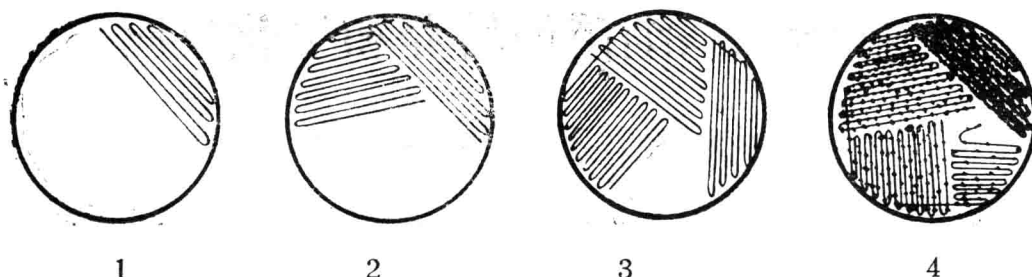
（二）固体平板接种法：

1. 将接种环按无菌操作法沾取少许培养物，在平板上作连续划线，约占平板面积的1/4。

2. 旋转平板约70—90°，将接种环在酒精灯火焰上烧灼，待冷，通过第一次划线区

2~3次再作连续划线，约占平板面积的另1/4。

3.重复上述操作2次即成（如下图）



分区划线接种法

4.置于37°C孵育24小时，观察菌落在各区分布的情况。

（三）斜面接种法：

将接种环按无菌操作法沾取少许培养物，从斜面培养基的底部向上方作蛇形划线即成。置37°C孵育24小时进行观察。

三、观察细菌的生长情况（每桌示教）：

（一）细菌在液体培养基中的生长情况的观察：

观察细菌在液体培养基中三种不同的生长情况：

- 1.液体均匀浑浊，或有少量沉淀。
- 2.液体澄清，细菌生长在管底，形成沉淀。
- 3.液体澄清，细菌生长在液面，形成菌膜。

（二）细菌在琼脂平板培养基上菌落的观察：

细菌在琼脂平板上经划线接种后，每个细菌可发育成为肉眼可见的集团，称为菌落。各种细菌的菌落形态可以有所不同，在一定程度上有助于细菌鉴别。观察菌落时，注意其大小、形状、表面是光滑还是粗糙、是湿润还是干燥、边缘是整齐还是不整齐、能否产生色素等。

观察金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、绿脓杆菌的菌落形态。

四、细菌的生化反应（每桌示教）：

各种细菌具有不同的代谢能力，它可以综合某种物质或分解某种物质而产生不同的代谢产物。这些不同的代谢产物常是鉴别细菌的重要依据之一。

（一）糖发酵试验：

- 1.原理：各种细菌对各种糖类的分解能力不同，有的细菌能分解某种糖类而产酸，

有的可进一步将糖分解为气体（大多为 H_2 以及 CO_2 ），有的细菌则完全不能分解。

2.培养基：以无糖培养基（百分之二蛋白胨水， $PH_{7.8}$ ）为基础，加入一种百分之一待试之糖类（如葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖等），以酚红作为指示剂（硷性时红色、酸性时黄色），并于试管中放倒置小玻管一支，以收集气体。

3.观察：接种细菌，经 $37^{\circ}C$ 孵育24小时后，可有以下三种不同的反应：

（1）培养基变黄，小倒管中有气泡，表示分解该糖产酸产气，以“⊗”表示之。

（2）培养基变黄，小倒管无气泡，表示分解该糖产酸不产气，以“+”表示之。

（3）培养基颜色不变，小倒管中无气泡，表示不产酸不产气，以“-”表示之。

观察以上三种不同的糖发酵反应。

（二）靛基质试验：

1.原理：细菌分解蛋白质的能力不同，有的能分解培养基中的色氨酸产生靛基质，当遇到柯氏试剂（含对二甲基氨基苯甲醛），则可使产生的靛基质变为玫瑰靛基质（红色）。

2.培养基：蛋白胨水培养基。

3.观察：接种细菌，经 $37^{\circ}C$ 孵育24小时后，可有以下不同反应：

（1）靛基质反应（+）：于蛋白胨水培养物中，加入柯氏试剂三滴，轻轻摇动，静置片刻等试剂浮集液面后观察。如试剂变为玫瑰红色，表示有靛基质形成，是为阳性。

（2）靛基质反应（-）：于蛋白胨水培养物中，加入柯氏试剂三滴，轻轻摇动，静置片刻，如试剂仍呈棕黄色，是为阴性。

发下靛基质阳性与阴性的蛋白胨水各一套，同学自行加入柯氏试剂后观察。

实验三 细菌的分布

细菌在自然界中的分布极广，土壤、水、空气、食品、用具、人与动物的体表以及一切与外界相通的腔道中，均有细菌存在，只是在不同环境中存在的细菌，在种类与数量上，有所不同而已。因此，我们在进行微生物实验及今后进行临床操作时，要树立无菌观念，注意无菌操作。

一、空气中细菌的检查（小组做）：

取琼脂平板一只，揭开其盖，置于实验室内人多之处，暴露于空气中，约十分钟后盖上盖，置于 $37^{\circ}C$ 孵育24小时后取出观察。

二、皮肤上细菌的检查（小组做）：

每小组发琼脂平板一只，将其一半用铅笔划成2—3小格，每人用手指在一小格琼脂表面轻轻涂抹数次，37℃孵育后观察有无细菌生长。

三、常用物品上细菌的检查（小组做）：

任取两种常用物品（钞票、衣服或其他），在琼脂平板之另一半面积上，轻轻涂抹数次，37℃孵育后观察有无细菌生长。

四、咽喉部细菌的检查（每人做）：

用无菌棉拭子，在扁桃体及咽后壁涂抹一下，作成涂片，固定后进行革兰氏染色，镜检。

同法用棉拭子在咽喉部取材，并直接用棉拭子涂在血平板上，然后用接种环作分区划线接种，置37℃培养24小时后观察结果，注意是否有各种不同的菌落，并作革兰氏染色镜检。

实验四 消毒灭菌

一、物理灭菌器之介绍：

（一）高压蒸气灭菌器：

使用方法及注意点：把待灭菌之物品放入灭菌器内筒中，由加水管加水入夹层中（所加之水应够一次灭菌用的），底部加热，水沸后蒸气沿夹层上升，由小洞入内筒。锅盖用螺旋固定，使不漏气。当蒸气开始进入内筒时，应把上下排气管打开，放出冷空气，以免温度不均，影响灭菌效果，必须等蒸气冲出五分钟后再关闭排气管。由于蒸气通入密闭之腔，压力就渐渐上升，可以从压力表上看出。蒸气还通安全活塞，以保证压力维持于一定限度，如超过即可自动放气，以防爆炸。当灭菌器内压力上升到所需高度时，调整火力，使维持于15磅20分钟，然后移去热源，使压力逐渐下降，等灭菌器内压力下降到压力表上在“0”时，方可打开锅盖，否则可以由于压力骤降，而使玻璃器内之液体冲出或发生爆炸等危险。

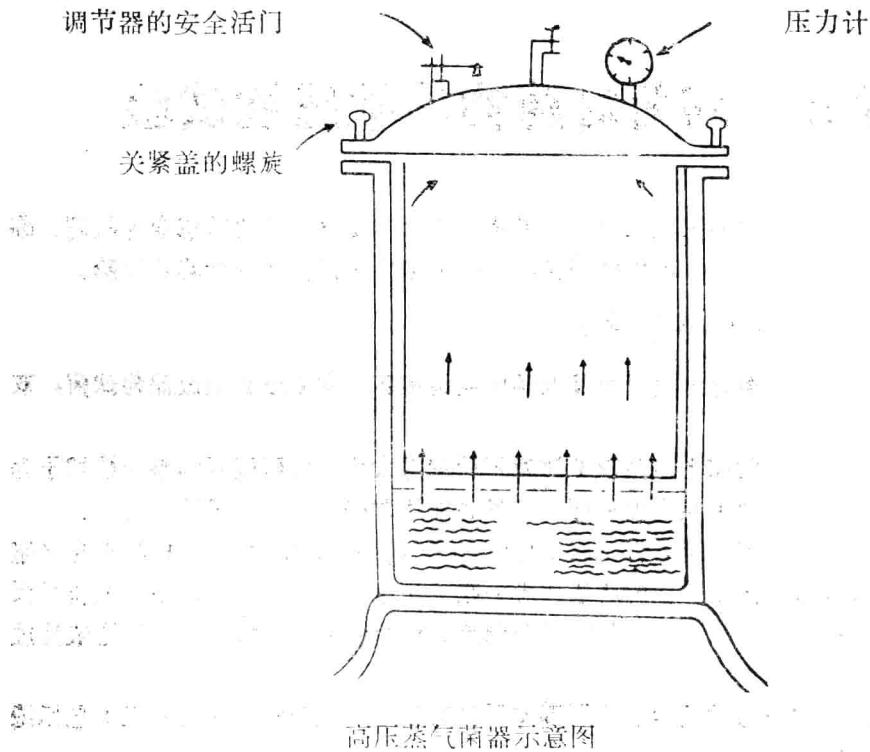
高压蒸汽灭菌及煮沸消毒比较：

材料：高压蒸汽灭菌器、搪磁杯，温度计、大肠杆菌，枯草杆菌菌液

方法：（每组做）将大肠杆菌与枯草杆菌菌液各一管，分别放入搪磁杯

（每组一个）及高压灭菌器（三班共用一个）进行消毒灭菌。搪磁杯煮沸后开始20分钟。高压灭菌15磅，维持20分钟。

然后每菌种管各取一环，分别接种于一支肉汤管中，置 37°C 、24小时培养后，观察比较



(二) 流动蒸气灭菌器：构造原理与家用蒸笼相同。底为双层，内贮少量水，加热煮沸，蒸气上升至锅内，利用蒸气进行灭菌，实验室内常利用流动蒸气灭菌器进行间隙灭菌。一些不耐热的含糖培养基、血清及牛乳培养基等，均用间隙灭菌法进行灭菌。必要时也可用家用蒸笼代替。

二、紫外线的杀菌作用（小组做）：

(一) 取琼脂平板一个，用接种环取一环大肠杆菌，划线于半个琼脂平板表面，划线需密集均匀，不可重迭。同法取枯草杆菌菌液划线接种于另一半琼脂平板之表面。

(二) 单数组去盖在紫外灯下照射20分钟，然后盖好盖；双数组不去盖照射，同时置 37°C 培养24小时，下次实验观察结果。

三、皮肤消毒试验（小组做）：

材料：消毒搪磁杯一只，内盛1:1000之新尔灭1000毫升，琼脂平板。

方法：（每组做）用右手食指在一琼脂平板上划线接种。然后将右手在自来水中洗净待干，干后将右手浸泡入搪磁杯内新洁尔灭中10分钟后立即取出右手，抬高，勿使水

下流，待手干后，用同一食指在另一琼脂平板上划线接种。

然后将此两平板置于37°C 24小时培养后，观察比较。

实验五 细菌对药物的敏感性试验

细菌经药物作用后，也能表现出对药物敏感性方面的变异，即由敏感变为抗药。临床上要知细菌对某种药物是否已产生抗药性，必须做细菌对该药物的敏感性试验。

一、纸片法（小组做）：

（一）每桌发金黄色葡萄球菌菌液及大肠杆菌菌液各一支（单数组做葡萄球菌，双数组做大肠杆菌）。

（二）以无菌棉拭子沾取上述菌液（注意不要取得太多，以刚刚浸湿整个棉拭子为度），轻轻划线涂抹于整个琼脂平板表面，划线必须均匀密布，不要重迭，待干。

（三）用无菌小镊子夹取浸有青霉素（100单位/毫升）、链霉素（1000微克/毫升）、氯霉素（1000微克/毫升）的滤纸片各一张（勿过分湿润，否则药液在琼脂平板表面易于流动，影响抑菌圈的观察，分别置于已涂满细菌的琼脂平板表面。三滤纸片放置的位置呈三角形。

（四）37°C 孵育24小时后观察纸片周围有无抑菌圈，并测量抑菌圈的直径（包括滤纸片本身的直径在内）。

（五）根据以下标准来判断细菌对三种抗菌素是否敏感。抑菌圈之直径：

＜10毫米以下者为不敏感菌株。

11—15毫米为中度敏感菌株。

＞15毫米者为敏感菌株。

二、试管法（小组做）：

（一）排列小试管10支。

（二）用无菌操作法，自第2管到10管，各加入肉浸液0.5毫升。

（三）将16单位/毫升之青霉素，分别加0.5毫升到第一管与第二管内，于第二管内反复吹匀，吸出0.5毫升，加入第三管。同样吹匀后再吸出0.5毫升加入第四管内。如此依次稀释，直到第九管，弃去0.5毫升。第七管不加青霉素作为对照。稀释时应严格遵守无菌操作技术。

（四）每管内加入培养18小时并用肉浸液稀释至 10^{-4} 的葡萄球菌菌液0.5毫升。

（五）37°C 孵育24小时。

（六）下次实验时观察生长情况。以最小浓度之青霉素尚能抑制细菌生长者为葡萄

球菌对青霉素之敏感度。如2单位/毫升以上浓度之青霉素尚不能抑制细菌生长者，则表示此菌株对青霉素有抗药性。

管 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
肉 浸 液 (毫 升)	—	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
青霉素16 单位/毫升	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
葡萄球菌 菌 液	每管0.5毫升									

置 于 37°C 孵 育 2 4 小 时

青霉素浓度 (单 位 / 毫 升)	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031	—
结 果										

注：纸片法所用浸有药物的滤纸片可用含有药物的干燥滤纸片代替。其制备法为：取直径0.6毫米的滤纸片，高压灭菌后烘干，用无菌蒸馏水将抗菌素配成1000微克/毫升（青霉素为100单位/毫升），每100张滤纸片加此种浓度的抗菌素1毫升，浸泡后，真空干燥，置冰箱保存备用。

实验六 血清学反应

一、凝集反应：

（一）玻片凝集试验（每人做）：

1、取洁净玻片一张，划为二格，一格内加伤寒免疫血清一小滴，另一格内加生理盐水一小滴。

2、用接种环沾取少许伤寒杆菌，分别加入伤寒杆菌免疫血清与生理盐水中，磨匀之，将玻片前后轻轻摇动数次，使之充分混和，数分钟内观察，有无凝集。

（二）试管凝集试验（每桌示教）：

1、取清洁小试管16支，分两排列于试管架上，依次用蜡笔注明号码。然后于每管

中分别加入生理盐水0.5毫升。

2、用1ml吸管吸取1:10的伤寒杆菌免疫血清0.5毫升加入第一排的第一管中，于管内连续吹吸三次，使血清与盐水充分混和，吸出0.5ml液入第2管，同法混和后，吸出0.5ml注入第3管，如此依次稀释直到第7管吸出0.5ml弃去，第八管不加血清作为对照。

3、同法吸取1:10伤寒杆菌免疫血清加入第二排的第一管中，并依次如上法稀释。

4、于第一排每管加入已被福尔马林固定，并用盐水稀释到适当浓度的伤寒杆菌“H”菌液0.5毫升。如此，则血清又被稀释了一倍。

5、于第二排每管中加入用加热或酒精处理的伤寒杆菌“O”菌液0.5毫升。

6、摇匀，放37°温箱24小时，次日观察结果。

观察结果时注意点：

1、勿摇动试管，以免凝块摇散。

2、先观察盐水对照管，对照管应为阴性，细菌均匀地存在管底，边缘呈整齐的园块。轻轻振摇，细菌分散后仍呈混浊现象。

3、试验管应从第一管看起，如有凝集，可见管底有凝集块，液体上部澄清。“H”菌液的凝集呈一大块棉絮状，轻摇即升起，容易摇碎。“O”菌液的凝集呈紧密颗粒状，不易摇碎，往往粘于管底。

4、判断凝集之程度乃根据细菌凝块之大小，与上层液体清晰与否而定。

试 管 号	1	2	3	4	5	6	7	8
盐 水 (毫 升)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
1:10伤寒杆菌免疫血清(毫升)	0.5							
盐水血清混合液		→ 0.5	→ 0.5	→ 0.5	→ 0.5	→ 0.5	→ 0.5	
血 清 稀 释 度	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	
菌 液 (毫 升)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清最后稀释度	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	
结 果								
伤寒“H”								
伤寒“O”								

上 层 液 体	管 底 凝 集	判 断
澄 清	大 块 凝 集	++++
微 混	中 等 凝 集	+++
混	较弱，但很明显可见。	++
混	似 有	+
混	细菌沉于管底成一园块	-

5、以血清最大稀释度尚能达到廿凝集者，为其效价。

二、沉淀试验：

（一）环状沉淀试验（小组做）：

1、取小玻管二只，每管内以细长的毛细吸管滴入白喉抗毒素数滴，（注意必须伸入管底加入），然后于一管内用毛细吸管再加入稀释之白喉毒素数滴，另一管则加入生理盐水数滴作为对照。加入时应注意，须沿管壁慢慢加入，不要有气泡产生，使之重叠在免疫血清之上，不要混和。静置10分钟，观察两液交界处有无白色环状沉淀出现。

（二）琼脂扩散试验（每桌示教）：

可溶性抗原与抗体在琼脂中二者相遇发生特异性结合，在比例适当时可形成白色的沉淀线。如待测物中含有一个以上的抗原抗体系统时，由于不同的抗原抗体在琼脂中扩散的速度不同，可形成几条沉淀线，沉淀线的数目即表示抗原的数目。

在琼脂平板上凿三个小孔，排列呈三角形，在Ⅰ孔内加入白喉类毒素数滴，Ⅱ孔内加生理盐水数滴，Ⅲ孔内加白喉抗毒素数滴，置室温中2~3天，观察Ⅰ与Ⅲ孔之间有无白色沉淀线出现。

三、补体结合试验（每桌示教）：

补体结合反应有两个系统参加，并分两个阶段进行：

（一）第一系统：抗原+抗体+补体——如果抗原抗体为相应时，则能结合补体，抗原抗体不相应时，则补体仍然游离。

（二）第二系统：羊血球与其相应抗体溶血素——其作用为检查第一系统的补体是否游离，起指示剂的作用。

假如第一系统能完好的结合，没有游离的补体存在，则第二系统由于缺乏补体而不发生溶血，是为阳性反应（若部分溶血，表示补体的一部分与第一系统结合，是为较弱的阳性反应）；若第一系统不能结合，则补体游离，第二系统由于补体参与而发生溶血，是为阴性反应。

本试验中各成分的量都是一定的，太多太少都能发生错误结果，因此，在试验前每种成分都须正确的测定其用量，才能得出正确结果。

试 管 号	1	2	3	4	5
抗 体	0.1	0.1	-	-	-
抗 原	0.1	-	0.1	-	-
盐 水	-	0.1	0.1	0.2	0.5
补 体	0.2	0.2	0.2	0.2	-

置37°C水箱30分钟

溶 血 素	0.1	0.1	0.1	0.1	-
1.25% 羊 血 球	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

置37°C水箱30分钟

结 果					
备 注		抗体对照	抗原对照	补体对照	血球对照

要求每人观察、记录并分析结果。

实验七 变 态 反 应

变态反应是指机体受某种抗原刺激后，机体对该种抗原就处于敏感性增高的状态。当再次接受同种抗原时，所表现出的一种异常反应。引起变态反应的物质有许多种，异种动物血清、鸡蛋白、细菌、药物、食物或花粉等。本次实验只观察豚鼠的过敏性休克反应（示教）：

一、豚鼠的过敏性休克的观察（示教）：

（一）取健康豚鼠二只，在两周前各以 0.1 毫升马血清腹腔注射。如此豚鼠即对血清处于敏感状态。

（二）实验时，用以下方法对致敏豚鼠注射：

1、取致敏豚鼠一只，心脏注射 1 毫升马血清。

2、取另一只致敏豚鼠，心脏注射1毫升鸡蛋白。

(三) 观察动物变化：

以马血清致敏，再以马血清注射的豚鼠，迅速出现不安、竖毛、打喷嚏、以前爪抓鼻等现象，继之发生抽搐、大小便失禁、呼吸困难而死亡（也有发生上述症状后逐渐恢复而不死亡的）。

2、以马血清致敏，再以鸡蛋白注射的豚鼠则不出现上述过敏性症状。

3、观察发生过敏性休克的豚鼠的肺脏：尸解，豚鼠两肺呈现高度气肿状态。

二、吞噬作用：

材料：以含抗凝剂的稀释液洗下之白色葡萄球菌菌液1管（稀释约10亿/毫升），血液，瑞氏染色液。

方法：取上述菌液0.5毫升于试管中，然后作穿刺取血，立即将0.5毫升血液与试管中菌液混合，置37℃半小时，取混合物一环于玻片上，制成推片，自然干燥后，瑞氏染色，用油镜观察，注意细胞外及细胞内细菌的分布。

实验八 化脓球菌

一、葡萄球菌：

(一) 形态与染色：（每人做）

取葡萄球菌斜面培养物作革兰氏染色镜检。

(二) 培养特性：（每桌示教）

观察金黄色、白色及柠檬色葡萄球菌在血平板上的菌落形态。（注意其菌落大小，颜色及溶血性。）

注：血平板

1、成份：肉浸液琼脂加热溶化后冷却至45℃—50℃，用无菌手续加入去纤维的兔或羊血液5—10ml，制成平板。

2、用途：大多数致病菌的发育需要营养丰富的培养基，血平板可以满足一般致病菌的要求，是细菌实验室中最常用的一种培养基。

3、观察血平板上的菌落时，除注意菌落大小及形状等特点外，尚须注意其溶血情况。

(1) 不溶血：菌落周围颜色不变，仍为原来之红色。

(2) 完全溶血：菌落周围培养基中的血球被细菌的产物完全溶解，形成一个无色透明之环，环之大小决定于细菌溶血能力的强弱。此种溶血亦称β型溶血。

(3) 不完全溶血：菌落周围培养基中的血球受到不完全溶血的作用，表现为一圈

绿色的不透明的溶血环。此种溶血亦称 α 型溶血。

(三) 血浆凝固酶试验——玻片法(小组做)

- 1、取洁净的玻片一张，划为二格，每格内加生理盐水一滴。
- 2、用接种环取金黄色葡萄球菌混于二格生理盐水中，注意尽量混匀。
- 3、于一格内加入血浆一滴，混匀。10—30秒钟后看结果。若细菌凝集成块者为阳性，另一格为盐水对照。
- 4、同法观察白色葡萄球菌的血浆凝固酶试验。

二、链球菌：

(一) 形态与染色：(每人做)

自肉汤管中分别取 α 、 β 、 γ ，三种链球菌液体培养物作革兰氏染色镜检。

(二) 培养特性：(每桌示教)

观察 α 、 β 、 γ ，三种链球菌在血平板上的菌落特点，注意其大小，形态和溶血情况。

三、肺炎双球菌：

(一) 形态染色：(示教)

观察肺炎双球菌革兰氏染色示教片和荚膜染色示教片。

(二) 培养特性：(每桌示教)

观察肺炎双球菌在血平板上的菌落特点。

四、脑膜炎双球菌：

观察脑膜炎双球菌革兰氏染色示教片。

实验九 肠道杆菌

一、肠道杆菌的主要鉴别培养基：(示教)

每人自看下述各种培养基，各种培养基均有未接种和已接种细菌的各种生长情况一张。

(一) 中国兰平板：

- 1、成份：2%蛋白胨水，琼脂(PH7.4)，乳糖，1%中国兰溶液，(此为指示剂，硷性时无色，酸性时兰色。) 1%蔷薇酸酒精溶液(抑制革兰氏阳性菌生长。)
- 2、用途：用于肠道致病菌的分离培养(如伤寒杆菌，痢疾杆菌)。肠道致病菌都

不发酵乳糖，菌落呈无色或培养基色，而大肠杆菌发酵乳糖产酸，故菌落呈兰色。

3、示教：中国兰平板一个，一半接种大肠杆菌，另一半接种伤寒杆菌，注意大肠杆菌菌落呈兰色（发酵乳糖），伤寒杆菌菌落呈无色或培养基色。

（二）双糖含铁培养基：

此为一种固体培养基，装在试管里面，可分上下两层，其成份如下：

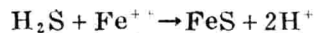
上层：

1、2%蛋白胨水琼脂，作为无糖之固体基础培养基。

2、乳糖

3、酚红，为指示剂，硷性时呈红色，酸性时为黄色。如细菌能发酵乳糖产酸，则培养基之颜色由红变黄。

4、硫酸亚铁胺：某种细菌分解培养基中之含硫氨基酸而生或硫化氢，后者遇到硫酸亚铁胺中之亚铁离子，即可结合而生成硫化铁之黑色沉淀。



下层：

1、2%蛋白胨水与0.5%琼脂，作为无糖之基础培养基，为半固体，可以观察动力。

2、葡萄糖

3、酚红

制作时先分装下层，待凝固后再加上层，将试管斜放，使之成为斜面。接种时用接种针挑取菌落，先由培养基之中央向下垂直穿刺直到管底，然后拔出再密集划线于斜面上，观察结果时注意：

上层：

1、如培养基变黄，表示分解乳糖产酸，但不能观察是否产气。

2、如培养基中央有一黑圈，表示产生硫化氢。

下层：

1、细菌可分解葡萄糖产酸，使培养基变黄，又可产气，使下层崩裂成蜂窝状。甚至可将上层向上推移。

2、在半固体中可观察有无动力。

有时因下层葡萄糖产生酸之影响，上层之下段亦变黄，但斜面上仍为红色，此时仍应视为阴性，并不表示乳糖发酵。

（三）糖发酵管：

常用者有四种：葡萄糖、乳糖、甘露醇、蔗糖（详见实验二“细菌的培养及生化反应”。）

（四）蛋白胨水培养基：

1、成份：2%蛋白胨水