



高等医药院校基础医学实验教学系列规划教材

供本、专科医学类相关专业学生使用

微生物学实验与学习指导

◎ 主编 周 盛 马新博



第四军医大学出版社

高等医药院校基础医学实验教学系列规划教材

供本、专科医学类相关专业学生使用

微生物学实验与学习指导

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学实验与学习指导/周盛,马新博主编. —西安:第四军医大学出版社,2015.1
ISBN 978-7-5662-0705-0

I. ①微… II. ①周… ②马… III. ①微生物学-实验-高等职业教育-教学参考资料
IV. ①Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 032481 号

weishengwuxue shiyan yu xuexizhidao

微生物学实验与学习指导

出版人: 富 明 责任编辑: 朱德强 崔宝莹

出版发行: 第四军医大学出版社

地址: 西安市长乐西路 17 号 邮编: 710032

电话: 029-84776765 传真: 029-84776764

网址: <http://press.fmmu.edu.cn>

制版: 新纪元文化传播

印刷: 西安永惠印务有限公司

版次: 2015 年 2 月第 1 版 2015 年 2 月第 1 次印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 13.25 字数: 300 千字

书号: ISBN 978-7-5662-0705-0/Q·68

定价: 29.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书, 凡有缺、倒、脱页者, 本社负责调换

高等医药院校基础医学实验教学系列 规划教材建设指导委员会

主任委员 秦海洸

副主任委员 义家运 秦子平

委 员 (按姓氏笔画排序)

文玉萍 伍善广 刘珍莲

张安文 陆 春 陆桂喜

黄水群 廖春玲

前 言

微生物学是一门重要的医学基础课。当前微生物学实验技术被广泛应用于临床及科研工作中，成为推动临床及基础医学发展的有力工具。为了提高教学，反映出本学科实验内容的科学性、先进性和实用性，依据教学大纲的要求和课程设置，同时结合本校实验教学条件，在参阅中外相关文献，学习同类院校的教学经验和资料的基础上，我们编写完成了这本《微生物学实验与学习指导》。

全书共分六章，内容包括微生物学实验基本技术、原核微生物的培养和检验、真核微生物的培养和检验、免疫学实验、病毒的培养和鉴定等。参加编写的有广西科技大学医学院马新博、申海光、肖立兵、周盛、唐荣兰，广东药学院吴培成，玉林师范学院陈旭健，广西大学蒙娇荣。全书初审由各位副主编承担，终审由主编承担。主要作为本校院校医学与生命科学相关专业的实验指导书，同时适用于高职高专医学类各相关专业学生。

本书的编写得到了第四军医大学出版社和各参编院校领导的大力支持，在此表示诚挚的感谢。书中参考并引用了行业内知名专家和学者有关教材及专著的一些观点，在此，特向原作者致谢。

由于我们的专业知识和教学经验有限，加之时间仓促，疏漏错误之处在所难免，敬请专家同行和使用本教材的广大师生批评指正。

编 者

2014年12月

目 录

绪论	(1)
----------	-------

上篇 实 验

第一章 微生物学实验基本技术	(6)
实验一 细菌的形态结构观察及显微镜油镜的使用	(6)
实验二 细菌的单染色法	(9)
实验三 细菌的革兰染色法	(12)
实验四 基础培养基的制备与消毒灭菌	(14)
实验五 细菌的分离与生长现象的观察	(19)
实验六 药物的体外抗菌试验	(24)
实验七 细菌的生化反应	(28)
实验八 抗生素效价的微生物学测定	(32)
实验九 细菌的分布及消毒灭菌	(35)
实验十 灭菌制剂的无菌检验	(38)
实验十一 细菌的药敏试验及耐药性检测	(40)
实验十二 细菌的数字编码鉴定法和自动化检测技术	(48)
实验十三 口服药物的微生物学检验	(51)
实验十四 菌种保藏	(54)
实验十五 药品中大肠杆菌的检验	(59)
第二章 原核微生物的培养和检验	(61)
实验十六 葡萄球菌属检验	(61)
实验十七 药品中金黄色葡萄球菌的检验	(64)
实验十八 链球菌属检验	(66)
实验十九 大肠埃希菌检验	(70)
实验二十 药品中绿脓杆菌的检验	(73)
实验二十一 沙门菌属检验	(75)
实验二十二 志贺菌属检验	(79)
实验二十三 其他肠杆菌检验	(81)
实验二十四 弧菌属与弯曲菌属检验	(83)
实验二十五 棒状杆菌与需氧芽胞杆菌检验	(87)

实验二十六	分枝杆菌检验	(93)
实验二十七	厌氧菌检验	(97)
实验二十八	支原体、衣原体与立克次体检验	(101)
实验二十九	病原菌的分子生物学检测和其他检测技术	(104)
第三章	真核微生物的培养和检验	(106)
实验三十	病原性真菌检验	(106)
第四章	免疫学实验	(109)
实验三十一	凝集反应	(109)
实验三十二	环状沉淀反应	(111)
实验三十三	双向免疫扩散试验	(113)
第五章	病毒的培养和鉴定	(116)
实验三十四	病毒的培养和形态学检查	(116)
实验三十五	病毒的血凝试验与血凝抑制试验	(121)
实验三十六	病毒的免疫学检测和分子生物学检测技术	(124)

下篇 练习题

练习一	(130)
练习二	(130)
练习三	(132)
练习四	(139)
练习五	(141)
练习六	(144)
练习七	(148)
练习八	(149)
练习九	(149)
练习十	(150)
练习十一	(154)
参考答案	(157)
参考文献	(169)
附录	(170)
附录 1	实验室意外的紧急处理方法 (170)
附录 2	常见培养基的制备和用途 (170)
附录 3	常用染色液和试剂的配制 (190)
附录 4	药敏试验结果解释标准 (194)

绪 论

一、微生物实验课的目的和要求

微生物学实验是生物专业学生的实验类专业必修课,通过本课程的教学与学习可使学生完整、全面地了解 and 掌握微生物学的基本理论和研究方法,培养学生获得有关微生物实验基本技能,加深对微生物基础理论的理解,并力求达到系统地培养学生分析问题、解决问题的能力 and 实际动手能力,在实验中提高学生的科学素养。

微生物学实验教学的要求包括几个方面:要求学生掌握显微镜的使用、生物染色技术、形态学观察的方法、培养基的配置和灭菌方法、微生物分离、纯化等;在实验仪器方面要求学生了解对微生物实验室常用的仪器设备的基本原理、构造、使用方法及使用中的注意事项有基本了解;实验过程要求学生仔细观察实验现象,完整记录原始实验数据、结果,分析实验现象并认真填写实验报告,实验报告内容主要包括实验目的和原理、实验步骤、实验结果和分析与讨论等。

二、微生物学实验室规则

由于微生物学实验是以病原微生物为研究对象,在实验过程中任何疏忽大意都有可能引起实验人员的自身感染或实验室和周围环境的污染。因此,实验中应严格遵守实验规则,建立无菌观念,严格执行无菌操作,防止实验过程中出现意外情况,并确保实验结果的准确。

1. 试验前须预习实验内容,了解实验目的、方法和注意事项,做到心中有数,避免发生错误,提高实验效率。
2. 进入实验室必须穿工作服,必要时还须戴口罩、帽子和手套,并做好实验前的各项准备工作。
3. 非必需物品禁止带入实验室,带入实验室的物品应远离操作区,放在指定的区域。
4. 实验室内不准大声喧哗、嬉戏,应保持实验室的安静、整洁和有序。不准在实验室内吸烟、饮水和进食,尽量避免用手触摸头、面部,防止感染,尽量减少室内活动,以免引起风动。
5. 实验中注意节约试剂,爱护仪器,避免有菌材料的污染,如有传染性材料污染桌面、地面、手、衣服或发生其他意外情况,应立即报告老师及时做适当处理。
6. 用过的污染物品应放到指定的地点,经专人消毒灭菌之后再行清洗,切勿乱丢或冲入水池中。禁止将本实验室的物品带出实验室外。需送温箱培养的物品,应标记清楚后

送到指定地点。

7. 实验完毕后应将桌面整理清洁,试剂、仪器放回原处,并用浸有消毒液的抹布将操作台擦拭干净,打扫卫生,关好水、电、门窗。

8. 离室前脱下工作服,反折放在指定的地方;双手在 2% 来苏液中浸泡 5 分钟左右,再用肥皂、清水洗净,方可离开实验室。

三、生物安全防护知识

医学检验工作人员长期接触有潜在传染性的血液、粪便、体液等标本,这些标本往往是各种细菌、病毒等病原微生物的传播载体,无论是实验人员感染,还是造成实验室和周围环境的污染,都将导致严重的后果。因此,实验室工作人员在实验过程中必须高度重视实验室生物安全防护,强化生物安全意识,熟悉生物安全防护有关知识,严格执行无菌操作。

(一) 微生物的分类等级

根据世界卫生组织(WHO)出版的《实验室生物安全手册》,将微生物分为四个不同危险度等级:危险度 1 级是指不能引起人或动物致病的微生物,此类微生物无或仅具有极低的个体和群体危险;危险度 2 级的病原体具有中度个体危险,低度群体危险,能引起人或动物致病,但对实验室工作人员、社区、家畜或环境不易导致严重危害,所引起的感染具有有效的预防和治疗措施,并且疾病传播的危险有限;危险度 3 级的病原体具有高度个体危险,低度群体危险,通常能引起人或动物的严重疾病,但一般不会发生感染的播散,并且对感染具有有效的预防和治疗措施;危险度 4 级的病原体具有高度的个体危险和群体危险,通常能引起人或生物的严重疾病,并且很容易发生个体之间的直接或间接传播,对感染一般没有有效的预防和治疗措施。

基于以上划分标准,结合微生物的致病性、传播方式、目前所具有的预防和治疗措施等因素,我国卫生部于 2006 年制定了《人间传染的病原微生物名录》,对各种病原微生物的危害程度及其相关实验活动需要达到的生物安全实验室级别做了详细分类,各实验室进行有关实验均需参照此标准。

(二) 生物安全实验室分级与要求

由于各种病原微生物的危险度等级不同,因此,实验室必须达到相应的生物防护等级才能开展有关实验。根据 WHO《实验室生物安全手册》和我国卫生部 2002 年颁布的《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》,实验室从生物安全防护的角度共分为四级:一级生物安全防护实验室(BSL-1)为实验室结构设施、安全操作规程、安全设备适用于危险度 1 级的微生物,依据标准操作程序可进行开放性操作,如用于教学的普通微生物实验室即属此类。二级生物安全防护实验室(BSL-2)适用于对人或环境具有中等潜在危害的微生物,即危险度 2 级的病原体,该级别实验室应具备生物安全柜和密封的离心管,以免发生泄漏和产生气溶胶。三级生物安全防护实验室(BSL-3)适用于有明显危害、可以通过空气传播的病原微生物(如结核杆菌、伯氏立克次体等),通常已有预防传染的疫苗,该级别实验室除了有严格的一级和二级安全设施要求外,还需具备合适的空气净化系统。四级生物安全防护实

验室(BSL-4)适用于对人体具有高度的危险性,通过气溶胶途径传播或传播途径不明,目前尚无有效的疫苗或治疗方法的致病微生物及其毒素。BSL-4实验室必须与其他实验室隔离,并具备特殊的空气和废物处理系统,实验操作须在Ⅲ级生物安全柜内或全身穿戴特制的正压防护服。

根据以上定义,医院内的临床实验室因接触可能含有致病微生物的标本,通常应达到二级生物安全防护实验室要求。根据《实验室生物安全认可准则》,二级生物安全实验室结构设施需符合以下几点:①实验室需具有防止节肢动物和啮齿动物进入的设计,有可开启的窗户,有纱窗,实验室门有可视窗带锁并能自动关闭。②每个实验室均应设置洗手池,宜设置在靠近出口处。③实验室工作区域外有足够的存储空间及摆放个人衣物的设施。④实验室内墙壁、地面应平整、防滑、易于清洁,不适宜用地毯。⑤实验台面应能防水、耐腐蚀、耐热。⑥实验室内应保证工作照明,避免反光和强光。⑦在实验室内应穿戴隔离衣、帽、手套,必要时戴防护眼镜。实验室应备有生物安全柜。⑧有适当的消毒设施,如高压蒸汽灭菌器,并设置洗眼装置、应急喷淋装置、急救药箱、灭火器等。⑨有可靠的电力供应和应急照明。⑩在实验室出口处设有在黑暗中可明确辨认方向、通道的标识。⑪在实验室入口处和装有传染性物质的设备表面贴有生物危险标志。

(三) 实验室生物安全管理制度

实验室生物安全制度建设对于临床实验室而言是生物安全防护的核心,实验室生物安全管理制度应包括:实验室准入制度、生物安全培训制度、生物安全责任制和责任追究制度、生物防护与安全制度、安全检查制度、个人防护制度、实验室管理制度、清洁消毒制度、安全计划审核制度、废弃物处理制度、事故报告制度、生物安全防护应急预案、标准操作程序等。

建立健全了各项生物安全制度,还应成立生物安全管理领导小组,加强生物安全制度实施情况的监督管理,实验室入口处需粘贴生物安全标志,注明危险因素,生物安全级别,负责人姓名和电话,进入实验室的特殊要求及离开程序,禁止非工作人员进入实验室,如需参观实验室等特殊行为需经实验室负责人的批准后方可进入。

(四) 实验室常见生物危险

实验室生物污染的途径包括:空气传播(临床标本中的污染源在空气中传播、微生物气溶胶的吸入)、直接传播(工作中偶然刺伤、割伤,碎玻璃划伤直接感染)、皮肤黏膜接触(临床标本中的传染源通过破损皮肤黏膜接触造成的感染)、其他不明原因的实验室相关感染。

实验室伤害以及与工作有关的感染主要是由于人为失误、不良实验技术以及仪器使用不当造成的。因此,实验室人员必须提高生物安全意识,认真学习生物安全相关的各种法规和文件,定期进行生物安全防护知识培训,熟悉生物防护有关知识,加强基本技能的培养,严格执行操作规程。实验室管理者应对实验室的风险级别进行分析,尤其对风险级别较高的、接触高危标本几率较大的区域,如微生物和分子生物学实验室予以高度重视,保护实验室工作人员和环境的安全。

(五) 生物废弃材料的管理

实验室内所有用过的样本、培养物及其他生物性材料等废弃物,严禁未经处理就随意丢

弃,应置于贴有生物危害标志的专用废弃物处理容器内,注意容器的充满量不能超过其设计容量,利器(如针头、小刀、玻璃等)应置于耐扎锐器盒内,在去污染或最终处置前应存放在指定的安全地方,经过高压灭菌或其他无害化处理后再安全运出实验室;有害气体、气溶胶、污水、废液等均需经无害化处理后排放;动物尸体、组织的处置和焚化应符合国家相关要求。处理危险废弃物的人员需经过专业培训,并使用适当的防护设备。

(周 盛)

上 篇

实 验

第一章 微生物学实验基本技术

实验一 细菌的形态结构观察及显微镜油镜的使用

目的和要求

1. 掌握细菌基本形态和特殊结构的观察方法,光学显微镜油镜的使用和维护方法。
2. 熟悉微生物实验室规则并自觉遵守。

试剂与器材

1. 示教片 各种杆菌、弧菌、球菌、荚膜、鞭毛、芽胞的示教片。
2. 器材及其他 香柏油、脱油剂、光学显微镜、载玻片、擦镜纸等。

实验内容

一、细菌基本形态和特殊构造的观察

1. 细菌的基本形态(各种球菌、杆菌、弧菌等) 观察要点:注意细菌的染色性、相对大小、形状及排列方式。
2. 特殊结构的观察(荚膜、芽胞、鞭毛)

二、光学显微镜油镜的使用

1. 光学显微镜的构造 光学显微镜是观察细菌形态最常用的一种仪器,其构造分为机械部分和光学部分,机械部分包括:镜座、镜臂、载物台、镜筒、镜头转换器、调焦装置等;光学部分包括:接物镜、接目镜、反光镜、聚光器、光圈等(图1-1)。

显微镜的接物镜有低倍镜、高倍镜、油镜三种,放大倍数依次增高,其识别方法为:

- (1)低倍镜:镜头标志为 $10\times$ 或 $10/0.25$,镜头最短,其上常刻有黄色环圈。
- (2)高倍镜:镜头标志为 $40\times$ 或 $40/0.65$,镜头较长,其上常刻有蓝色环圈。
- (3)油镜:镜头标志为 $100\times$ 或 $100/1.30$,镜头最长,其上常刻有白色环圈,或“oil”字样。

接物镜(objective lens),常称为镜头,简称物镜,是显微镜中最重要的部分,由许多块透镜组成(图1-2)。其作用是将标本上的待检物进行放大,形成一个倒立的实像,一般显微镜有3~4个物镜,根据使用方法的差异可分为干燥系和油浸系两组。干燥系物镜包括低倍

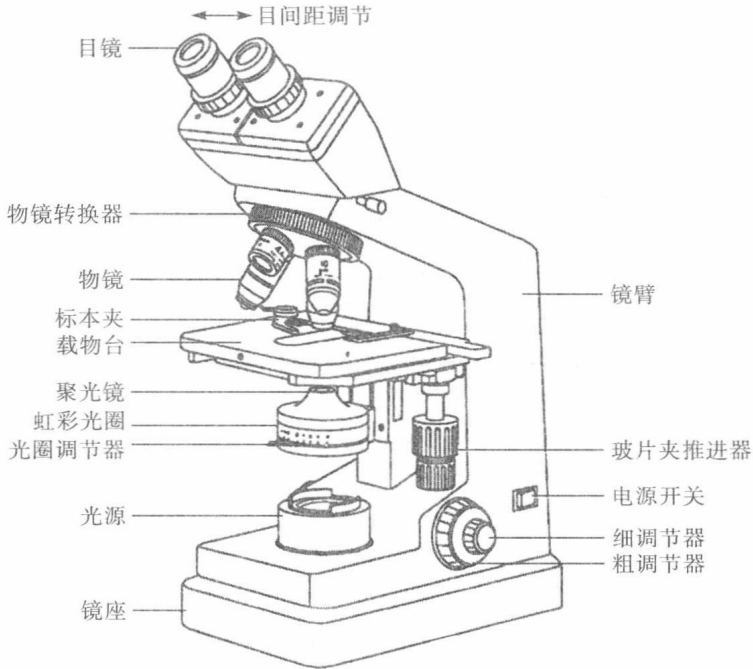


图 1-1 光学显微镜的构造

物镜(4 ~ 10 ×)和高倍物镜(40 ~ 45 ×),使用时物镜与标本之间的介质是空气;油浸系物镜(90 ~ 100 ×)在使用时,物镜与标本之间加有一种折射率与玻璃折射率几乎相等的油类物质(香柏油)作为介质。

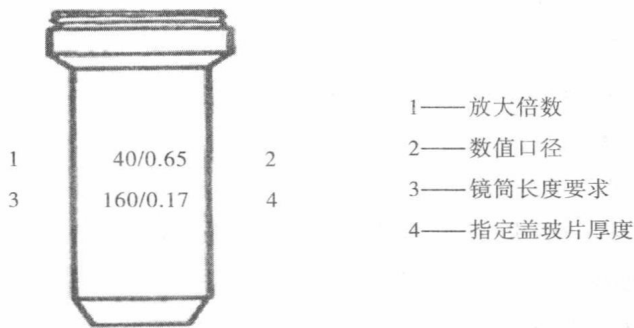


图 1-2 物镜的各种标记

2. 油镜的使用原理 油镜通常标有“OI”或“HI”字样,有时也有用刻一圈红线或黑线为标记的。用不同放大倍数的物镜可使被检物体放大 1000 ~ 2000 倍。使用时,油镜物镜与其他物镜不同的是载玻片和物镜之间不是隔一层空气,而是隔一层油质,称油浸系。常用的是香柏油,因其折射率为 1.515,与玻璃(1.52)相近。当光线通过载玻片后,可直接通过香柏油进入物镜而不发生折射。如果玻片与物镜之间的介质为空气,则称干燥系。这时光线通过玻片后会发生折射,从而使进入物镜的光线减少,降低了视野的照明度(图 1-3)。

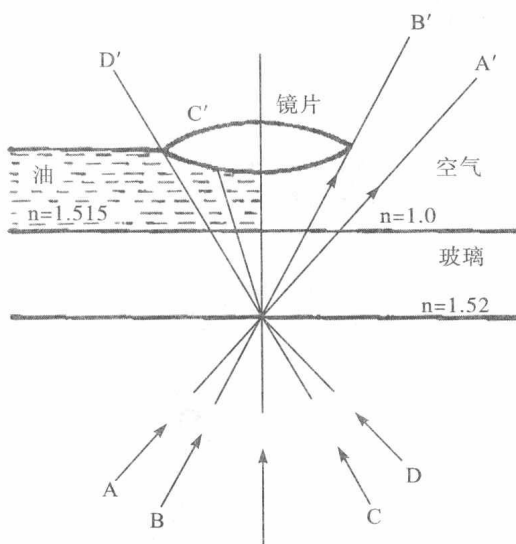


图 1-3 显微镜油镜的使用原理

3. 使用方法

(1) 采光: 使用显微镜时必须端坐, 将显微镜放在胸前适当位置。将低倍镜转到中央并对准下面的聚光器, 打开光圈, 转动反光镜, 使光线集中于聚光器 (以灯光为光源时, 使用凹面反光镜, 以自然光为光源时用平面反光镜)。根据所观察的标本, 通过升降聚光器和缩放光圈以获得最佳光度。当用低倍镜或高倍镜观察时, 应适当缩小光圈, 下降聚光器; 当用油镜观察时, 光线宜强, 应把光圈完全打开, 并将聚光器上升到最高位置。

(2) 低倍镜调焦: 将欲观察的标本置载物台上, 用弹簧夹和推进器固定, 将待检部位移至视野正中央, 上升载物台至不能升高为止。用左眼观察接目镜, 缓慢调节粗调节器, 使载物台下降, 待看到模糊的图像时, 再调节细调节器, 直至看到清晰的图像为止。

(3) 油镜的使用: 低倍镜找到物像并调至清晰之后, 转开物镜头, 在玻片的标本上滴加 1 滴香柏油, 将油镜头转换至中央, 缓慢调节粗调节器, 使镜头浸入油中, 当油镜头几乎接触玻片时停止转动 (从侧面观察), 边观察接目镜边轻轻转动粗调节器 (此时只能上升镜头, 不能下降, 防止压坏玻片及损坏物镜), 待看到模糊物像时改调细调节器, 直至找到清晰物像。

镜检时应将标本按一定方向呈“弓”形移动, 直至整个标本观察完毕, 以防漏检。观察时应将两只眼睛同时睁开, 左眼观察, 右眼用于绘图或记录。标本观察完毕后, 先将物镜头移开, 再转动粗调节器使载物台下降, 取下载玻片, 立即用擦镜纸将镜头上的香柏油擦净。

4. 注意事项

(1) 避免强酸、强碱、氯仿、乙醚、酒精等化学药品与显微镜接触, 避免日光直射, 显微镜须经常保持清洁, 勿使油污和灰尘附着。

(2) 镜头必须保持清洁, 油镜使用完后应立即用擦镜纸拭去香柏油。若油镜镜头上的油迹未擦干净, 应先将 1:1 醇醚混合液或二甲苯滴在擦镜纸上擦拭镜头, 再用干净擦镜纸将镜

头上残留的醇醚混合液或二甲苯擦净。

(3) 显微镜擦净后,取下标本片,下降聚光器,再将物镜转成“品”字形,送至显微镜室放入镜箱内。

结果记录

实验二 细菌的单染色法

目的和要求

1. 掌握细菌的单染色的方法、原理、结果观察及意义。
2. 熟悉细菌染色的常用染料和一般程序。
3. 学习细菌的特殊染色法。

试剂与器材

1. 菌种 大肠埃希菌、葡萄球菌。
2. 试剂 芽胞染色液、细胞壁染色液、鞭毛染色液、生理盐水等。
3. 其他 显微镜、香柏油、蜡笔、擦镜纸、载玻片、接种环、酒精灯、脱油剂等。

实验内容

一、实验原理

微生物(尤其是细菌)细胞小而透明,当把菌悬液浮于水滴内,用光学显微镜观察时,由于菌体和背景没有显著的明暗差,因而难以看清它们的形态,更不易识别其结构,所以,用不同光学显微镜观察细菌时,往往要先将细菌进行染色,借助于颜色的反衬作用,可以更清楚地观察到细菌的形状及某些细胞结构。因此,为了研究微生物的形态特征和鉴别不同类群的微生物,微生物的染色及形态结构的观察是微生物实验中十分重要的基本技术。

简单染色法是利用单一染料对细菌进行染色的一种方法。此法操作简便,适用于菌体一般形状和细菌排列的观察。

常用碱性染料进行简单染色,这是因为:在中性、碱性或弱酸性溶液中,细菌细胞通常带负电荷,而碱性染料在电离时,其分子的染色部分带正电荷(酸性染料电离时,其分子的染色

部分带负电荷),因此,碱性染料的染色部分很容易与细菌结合使细菌着色。经染色后的细菌细胞与背景形成鲜明的对比,在显微镜下更易于识别。常用作简单染色的染料有:美蓝、结晶紫、碱性复红等。当细菌分解糖类产酸使培养基 pH 下降时,细菌所带正电荷增加,此时可用伊红、酸性复红或刚果红等酸性染料染色。

二、细菌染色的一般程序

细菌染色法分单染法和复染法。单染法是用一种染料去染,所有细菌都染成一种颜色;复染法是用多种染料对细菌进行染色,不同细菌可染成不同的颜色。

大部分细菌染色的基本程序相同,即:涂片→干燥→固定→染色(图 1-4),根据实验目的选择不同的染色方法。

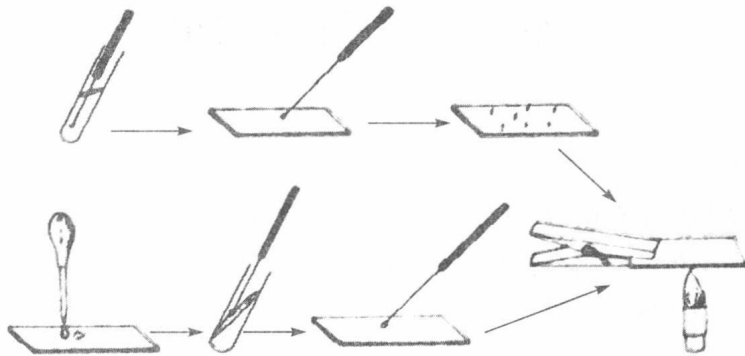


图 1-4 细菌染色的基本程序

三、特殊染色法

细菌的细胞壁、核质、胞浆颗粒和细菌的特殊结构如芽胞、荚膜、鞭毛等,必须用相应的特殊染色法才能染上颜色。

1. 细胞壁染色法

(1)涂片、干燥:同革兰染色法。

(2)固定:滴加 100g/L 鞣酸固定标本 15 分钟,水洗。

(3)滴加 5g/L 结晶紫染色 3~5 分钟,水洗,待干、镜检。

结果:有细胞壁的细菌仅菌体周边染成紫色,菌体内部无色;无细胞壁的细菌(如 L 型细菌)整个菌体都染成紫色。

2. 鞭毛染色法 鞭毛染色可从平板上直接挑取菌落,也可从斜面培养基上刮取菌苔涂片,必须注意动作尽量轻,以免鞭毛脱落。培养基应为营养较好的琼脂平板(如血平板、营养琼脂),不可用含抑制剂的选择培养基(如 SS、中国蓝、MAC 等)。

①玻片的处理:要求用新的载玻片,用前在 95% 乙醇中浸泡 24 小时以上,用时从酒精中取出,用干净的纱布擦干使用。若水滴向周围流散而不形成水珠表示玻片处理良好。