

卫生部规划教材

高等医药院校 配套教材
全国医学专科学校

(供医学检验专业用)

微生物学和 微生物学检验 实验指导

倪语星 主编

人民卫生出版社

高等医药院校
全国医学专科学校配套教材
(供医学检验专业用)

微生物学和微生物学 检验实验指导

倪语星 主编

编者 (以姓氏笔画为序)

王立霞(吉林医学院)	李文汉(海军医学高等专科学校)
余平(湖南医科大学)	张文兰(蚌埠医学院)
张卓然(大连医科大学)	项明洁(上海第二医科大学)
洪秀华(上海第二医科大学)	柴顺根(镇江医学院)
倪语星(上海第二医科大学)	黄锡全(镇江医学院)

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

微生物学和微生物学检验实验指导/倪语星主编. —北京:人民卫生出版社,1999

ISBN 7-117-03264-2

I. 微… II. 倪… III. 微生物学-医学检验-实验-医学院校-教材
IV. R446.5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 07181 号

微生物学和微生物学检验实验指导

倪语星 主编

人民卫生出版社出版发行

(100078 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼)

北京人卫印刷厂印刷

新华书店经销

787 × 1092 16 开本 11 印张 249 千字

1999 年 7 月第 1 版 1999 年 7 月第 1 版第 1 次印刷

印数: 00 001—3 000

ISBN 7-117-03264-2/R · 3265 定价: 12.50 元

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

著作权所有,请勿擅自用本书制作各类出版物,违者必究。

序 言

根据高等医药院校和全国医学专科学校医学检验专业“微生物学和微生物学检验”专业课教学的需要,在卫生部教材办公室的组织和指导下,我们编写了这本《微生物学和微生物学检验实验指导》,作为实验课教材,供医学检验专业师生在教学时与理论课教材配套使用。本教材分微生物学检验基本技术、常见病原微生物的培养和鉴定和各种临床标本的微生物学检查三个章,共 27 个节。在教学中以“节”为一个相对独立的教学单位(三学时),每节中包含数个教学内容,每个内容中又包含几项具体的实验。每个节后设附录,附录中列出该节的实验中所用主要试剂和培养基的配方或以表格的形式列出各种临床标本中常见的病原微生物的种类等。

编写本教材的目的是要求学生在学习微生物学和微生物学检验专业课的过程中,通过实验课的学习而验证理论,从而使学到的知识更为巩固;通过学生亲自动手操作,得到比较全面的微生物学基本操作技术的训练;树立无菌观念,掌握无菌操作技术;并熟悉常见病原微生物的生物学性状、分离培养和鉴定的方法以及各种临床标本的微生物学检查的基本程序。在本实验教材的编写中将力求体现上述要求。

本实验教材作为医学检验专业《微生物学和微生物学检验》规划教材的配套教材,既可供高等医药院校和全国医学专科学校医学检验专业师生作为教学用书和教学参考书,又可供医院检验科的工作人员和进修、实习生在临床微生物学检验的实际工作中参考。

本实验教材是卫生部教材办公室组织编写的全套医学检验实验教材中的一本。在编写的过程中得到全国高等医药院校医学检验专业“临床微生物学校际协作组”和各参编单位的大力支持,湖南医科大学的张国英同志为本教材绘制了插图,在此一并表示感谢。同时,由于本人的水平所限,难免会出现一些错误或不妥之处,敬请各单位在使用本教材的过程中多提宝贵的意见,以便修订时加以完善。

倪语星

1998 年 7 月

目 录

微生物学和微生物学检验实验的目的要求	(1)
微生物学实验室规则及注意事项	(1)
一、微生物学实验室规则	(1)
二、实验室意外的紧急处理办法	(2)
三、实验时的注意事项	(2)
第一章 微生物学检验基本技术	(3)
第一节 微生物形态学检查	(3)
一、显微镜的构造和应用	(3)
二、细菌不染色标本检查	(5)
三、细菌涂片的制备和革兰染色	(5)
四、细菌的基本形态和特殊结构	(6)
五、病毒和其他微生物的形态结构(示教)	(7)
第二节 消毒与灭菌	(8)
一、物理法	(8)
二、化学法	(9)
三、消毒与灭菌效果的评价	(10)
第三节 微生物的遗传变异	(13)
一、细菌形态与结构变异	(13)
二、细菌耐药株的筛选	(14)
三、细菌耐药质粒的提取与转化	(15)
第四节 细菌培养技术	(17)
一、培养基制备技术	(17)
二、细菌培养方法	(20)
三、分离培养和接种技术	(22)
四、倾注培养和活菌计数	(25)
五、细菌生长现象的观察	(27)
第五节 细菌鉴定技术	(28)
一、生物化学鉴定	(28)
二、数字编码鉴定技术	(32)
三、血清学鉴定	(35)
第六节 抗生素敏感试验	(38)
一、纸片扩散法	(38)
二、稀释法	(40)
三、E 试验	(43)
第七节 动物实验与细菌毒素检测技术	(45)
一、小白鼠腹腔接种	(45)

二、动物采血	(46)
三、内毒素的致病作用	(47)
四、细菌内毒素的检测	(48)
五、破伤风外毒素的毒性作用及抗毒素的保护作用	(48)
第二章 常见病原微生物的培养和鉴定	(52)
第一节 球菌	(52)
一、葡萄球菌属	(52)
二、链球菌属和肠球菌属	(54)
三、奈瑟菌属	(58)
第二节 肠杆菌科(I)	(61)
一、大肠埃希菌	(61)
二、沙门菌属和志贺菌属	(63)
三、肥达试验	(65)
四、小肠结肠炎耶尔森菌	(66)
第三节 肠杆菌科(II)	(68)
一、枸橼酸杆菌属	(68)
二、克雷伯菌属、肠杆菌属、沙雷菌属	(69)
三、变形杆菌属和摩根菌属	(72)
第四节 弧菌属、弯曲菌属和螺杆菌属	(73)
一、弧菌属	(73)
二、空肠弯曲菌	(75)
三、幽门螺杆菌	(76)
第五节 厌氧菌	(80)
一、破伤风梭菌、产气荚膜梭菌和肉毒梭菌	(80)
二、艰难梭菌	(83)
三、脆弱类杆菌和产黑色素类杆菌	(85)
第六节 革兰阳性杆菌	(91)
一、棒状杆菌属	(91)
二、需氧芽胞杆菌属	(95)
三、产单核李斯特菌	(98)
第七节 分枝杆菌属	(99)
一、结核分枝杆菌	(99)
二、麻风分枝杆菌	(102)
第八节 非发酵菌和其他革兰阴性杆菌	(104)
一、假单胞菌属和嗜麦芽窄食单胞菌	(104)
二、不动杆菌属和产碱杆菌属	(106)
三、嗜血杆菌属	(107)
第九节 螺旋体	(108)
一、形态染色	(108)
二、钩端螺旋体培养技术	(109)
三、钩端螺旋体显微镜凝集试验	(109)
四、梅毒血清学诊断	(110)

第十节 支原体、衣原体、立克次体	(112)
一、支原体	(112)
二、衣原体	(113)
三、立克次体	(114)
第十一节 真菌	(116)
一、真菌形态结构的观察	(116)
二、真菌培养方法	(117)
三、白色念珠菌芽管和厚膜孢子形成试验	(118)
四、新型隐球菌墨汁负染色法	(119)
五、组织胞浆菌	(120)
第十二节 病毒培养和检测技术	(121)
一、鸡胚接种	(121)
二、组织细胞培养	(123)
三、病毒血清学诊断技术	(126)
四、分子生物学诊断技术	(126)
第十三节 常见病毒的检测	(128)
一、流行性感冒病毒的检测	(128)
二、乙型肝炎病毒的检测	(130)
第三章 各种临床标本的微生物学检查	(135)
第一节 血液标本	(135)
第二节 粪便标本	(140)
第三节 尿液标本	(145)
第四节 泌尿生殖道标本	(149)
第五节 痰液和呼吸道标本	(154)
第六节 脓液和创面标本	(157)
第七节 无菌体液(脑脊液、穿刺液)标本	(161)
第八节 组织标本	(164)

微生物学和微生物学检验实验的目的要求

1. 通过实验来验证理论,使课堂效果更为生动,学到的知识更为巩固。
2. 通过学生亲自动手操作,得到比较全面的微生物学基本操作技术的训练。
3. 在微生物学实验课的过程中,帮助学生建立无菌观念,掌握无菌操作技术。
4. 帮助学生熟悉和掌握常见病原微生物的生物学性状、分离培养和鉴定的方法以及各种临床标本的微生物学检查的基本程序。
5. 在实验过程中培养学生独立操作、独立思考、分析问题和解决问题的能力。

微生物学实验室规则及注意事项

一、微生物学实验室规则

在进行微生物学实验时,须时刻牢记实验的对象是病原微生物,任何疏忽都可能导致严重的后果,不仅自身有可能招致感染,且有可能将病原微生物传给他人。因此决不能有丝毫侥幸心理,冒任何不必要的危险。进入实验室时必须遵守下列规则。

1. 进实验室时必须穿白大衣,离室时脱下反折,白大衣要经常清洗消毒。
2. 每次实验后均要用肥皂洗手,必要时用消毒药水泡手。
3. 书包、衣物等勿带入实验室,必要的文具、实验指导、笔记等带入后,放在指定的地方。
4. 每次实验后均用消毒药水擦洗工作台面,并用紫外线灯照射过夜。
5. 在实验室内不准吃东西、喝饮料和吸烟,不可把任何东西放入嘴中,也不要用手抚摸头面等部位。
6. 进入实验室后要保持安静,禁止高声谈话,不准打闹嘻笑。
7. 必须按照老师指定的方法,小心地处理传染性材料、培养物和污染的物质,要正确地使用存放污染器材的各种消毒容器。
8. 接种环使用前后必须进行烧灼灭菌。
9. 必须小心地避免任何有菌材料的溅出,若不慎污染了工作台、手、眼、衣服和地面等处,应立即报告老师,以便及时作适当处理。
10. 培养物和传染性材料须放在工作台的安全部位,尽可能保持台面的清洁整齐。
11. 爱护公物,合理使用实验材料和器材,如不慎损坏了某些器具,应及时报告老师,听候处理。
12. 实验完毕后清理台面,将需培养的标本及时放入培养箱。关闭水、电、煤气和门窗后离开实验室。

二、实验室意外的紧急处理办法

1. 皮肤破损 先除去异物,用蒸馏水或生理盐水洗净后,涂 2% 红汞或 2% 碘酒。
2. 烧伤 局部涂凡士林、5% 鞣酸或 2% 苦味酸。
3. 化学药品腐蚀伤 若为强酸,先用大量清水冲洗,再以 5% 碳酸氢钠溶液洗涤中和;强碱腐蚀伤时先以大量清水冲洗后,再用 5% 醋酸或 5% 硼酸溶液洗涤中和。若受伤处是眼部,经过上述步骤处理后,再滴入橄榄油或液体石蜡 1~2 滴。
4. 菌液误入口中 应立即吐入消毒容器内,并用 1:1000 高锰酸钾溶液或 3% 双氧水漱口;并根据菌种不同,服用抗菌药物预防感染。
5. 菌液流洒桌面 将适量 2%~3% 来苏尔或 0.1% 新洁儿灭倒于污染面,浸泡半小时后抹去。若手上有活菌,亦应浸泡于上述消毒液 3 分钟后,再用肥皂和水清洗。
6. 火警 如发生火警疫情时须沉着处理,切勿慌张,应立即关闭电闸和煤气阀门。如酒精、乙醚、汽油等有机溶液起火,切忌用水扑救,可用沙土等扑灭火苗。

三、实验时的注意事项

(一)严格遵循实验指导

1. 在开始做实验以前,须仔细阅读实验指导,进行独立思考,并根据实际情况,作出实验的具体安排和打算。

2. 合理安排时间和实验材料,尽量避免出错,力求取得理想的结果。

(二)认真完成实验操作

1. 认真听取指导老师实验前的讲解。

2. 细心操作,若发现问题,在独立思考分析原因的基础上找老师帮助。

3. 在自己的实验材料上作好标记,包括班级、姓名、菌名、日期等。

4. 认真观察自己的实验结果,将其记录在实验报告中(根据需要用彩色笔绘图记录),并回答实验报告中所有的问题。

5. 遇到实验结果与理论不符的情况,应仔细分析原因,培养自己独立思考、分析问题和解决问题的能力。

(三)充分利用参考资料

1. 在教科书和参考书中核对有关的数据和资料。

2. 认真观摩示教和影相、多媒体等电化教材。

(倪语星)

第一章 微生物学检验基本技术

第一节 微生物形态学检查

一、显微镜的构造和应用

目的要求

1. 掌握油镜的使用和保护。
2. 熟悉显微镜的结构、功能和使用方法。

器材和方法

1. 显微镜的构造 显微镜的种类很多,应根据其目的和要求不同,选用普通光学显微镜、暗视野映光显微镜、相差显微镜、偏光显微镜、荧光显微镜及电子显微镜等。在细菌形态学检查时,最常用普通光学显微镜(以下简称显微镜)。显微镜的构造分光学和机械两大部分(图 1-1-1)。

(1)光学系统:最重要的部件是接物镜和接目镜,它们构成放大与造象。另有照明装置。

1)接物镜:由多块透镜组成,其下端接近被检标本。接物镜一般有低倍镜、高倍镜和油镜三种。它们安装在物镜转换器(回转板)上,各有一些标志,如低倍镜:10×0.25(10/0.25),10 表示放大倍数,0.25 表示数值孔(口)径(NA);高倍镜:40×0.65(40/0.65);油镜:100×1.25(100/1.25)。

2)接目镜:装在镜筒的上端,由两块透镜组成,其上刻有放大倍数,如 5×、10×、15×等。为了便于指示物像,镜中常装有一条黑色细丝作为指针。

3)照明装置:由反光镜、光圈和集光器三部分组成。反光镜在显微镜的最下方,有平、凹两面,可以自由转动方向,使光源射出的光线至集光器。光圈和集光器用以调整光量和光线的性质,以增加成像的清晰度。在集光器下有滤光片环,可用以更换各种滤光片,常用的为蓝色滤光片。

(2)机械系统:用于支持镜体和调焦,它包括以下几部分:

- 1)镜座:支持和稳定镜体的底座。
- 2)镜臂:支持镜筒和镜台(载物台)。
- 3)镜台:放置被检测标本片的平台。镜台上有标本移动器(推进尺),可使标本片前后左右移动。
- 4)镜筒:上装接目镜,下装物镜转换器。

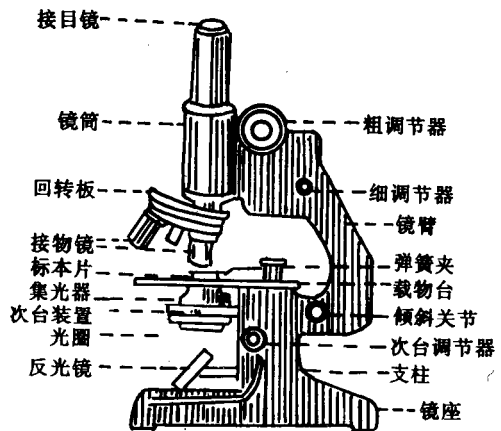


图 1-1-1 显微镜结构

5)物镜转换器:位于镜筒下端的旋转盘,盘上一般设有3~5个物镜孔。

6)调焦装置:用于调节物镜与被检物体之间的焦距,一般设有粗调节器和细调节器,前者作概略调焦,后者作精密调焦。

2. 显微镜的使用

(1)低、高倍镜使用:①使用显微镜时必须端坐,座位高低要适当调节;②先将低倍镜转到工作位置,上升聚光器,打开光圈,然后转动反光镜对光。光源不能采用直射日光,因直射日光的强度太大而刺激眼睛,故多采用间接日光的自然光源,也可采用人工光源(用凹面反光镜);③在使用时,应根据实际需要,选择合适的亮度。未染色标本检查,应适当缩小光圈和下降集光器,使亮度减弱,有利于用高倍镜观察细菌运动。染色标本检查时,应将光圈完全打开,集光器上升至载物台相平,使光亮度很强,用油镜观察细菌形态时,清晰易见;④将标本片放在载物台上,用标本移动器或压片夹固定,将欲检部位移低至低倍镜下,缓慢转动粗调节器,待看到物像模糊影迹时,再转换成高倍镜,缓慢转动细调节器使物像清晰;⑤观察标本时应两眼同时睁开,以减少眼睛疲劳,用左眼窥镜,右眼管书绘;⑥显微镜放大率计算法为显微镜的放大率为接物镜倍数与接目镜倍数之乘积(当显微镜的镜筒长度为160mm时)。

(2)油镜的使用:先用低倍镜对光,在标本片欲检部位滴一滴香柏油,然后转换成油镜,从侧面观察,缓慢转动粗调节器,使油镜头浸没在油滴内,当油镜头几乎接触玻片时停

止转动,用肉眼观察接目镜,缓慢向上调节粗调节器,待看到模糊物像时,再调节细调节器,直至清晰看到细菌等微生物形态。

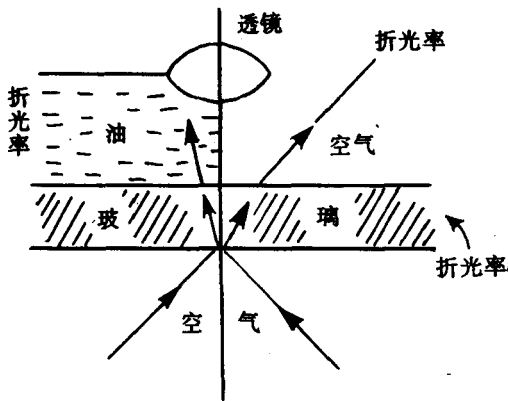


图 1-1-2 油镜原理示意图

使用油镜时滴加香柏油的原理:油镜放大倍数高而透镜很小。自标本片透过的光线,因玻片和空气介质密度不同而折光率不同,因此,有些光线经载玻片和空气折射后而不能进入接物镜,或射入光线较少,使物像不清晰。在油镜和标本片之间滴加和玻璃折射率($n=1.52$)相仿的香柏油($n=1.515$),则使进入油镜的光线增多,视野光亮度增强,物像清晰(图 1-1-2)。

注意事项

1. 显微镜使用时应小心爱护,不得随意拆开。
2. 搬动显微镜时,用右手持镜臂,左手托镜座,平端在胸前。
3. 镜头必须保持清洁,特别在油镜使用后,应立即用擦镜纸擦去香柏油。若油镜头上的油迹未擦干净,应先用二甲苯滴在擦镜纸上擦拭镜头,再用干净擦镜纸擦净镜头上沾有的二甲苯。擦拭其他镜头也可用软绸布,但不能用硬布(纸)擦拭。
4. 显微镜擦净后,下降聚光器,降低物镜并将其转成八字形,送至显微镜室。
5. 显微镜不得与强酸、强碱、乙醚、氯仿和酒精等化学药品接触,以免造成显微镜的损害。

二、细菌不染色标本检查

目的要求

熟悉细菌不染色检查法。

器材和试剂

1. 菌种 葡萄球菌、变形杆菌。
2. 培养基 肉汤培养基。
3. 其他 载玻片、凹玻片、盖玻片、凡士林。

步骤和方法

1. 悬滴法

(1)取一张洁净凹玻片,将凹窝四周涂少许凡士林。

(2)取一接种环葡萄球菌或变形杆菌液体培养物于盖玻片中央。

(3)将凹玻片侧合于盖玻片上,使凹窝中央正对菌液(见图 1-1-3)。

(4)迅速翻转载玻片,用小镊子轻压,使盖玻片与凹窝边缘粘紧封闭,以防水分蒸发。

(5)先用低倍镜找到悬滴,再换高倍镜。观

察时应下降聚光器、缩小光圈,以减少光亮,使背景较暗而易于观察。变形杆菌有鞭毛,运动活泼,可向不同方向迅速运动。葡萄球菌无鞭毛,不能作真正运动,只能在一定范围内作位移不大的颤动,这是受水分子撞击而呈分子运动(布朗运动)。

2. 压滴法

(1)用接种环取 2~3 环菌液于洁净载玻片中央。

(2)用小镊子挟一块盖玻片轻轻覆盖在载玻片的菌液上,放置盖玻片时,应先将盖玻片的一端接触载玻片,然后缓慢放下,以免菌液中产生气泡。

(3)然后用低倍镜对光找到细菌所在部位,用高倍镜观察细菌运动。

观察不染色标本中细菌等微生物运动,可用普通光学显微镜,也可用暗视野显微镜。暗视野显微镜上装有一个中央遮暗的聚光器,并配以强光源,使光线不能通过聚光器中央往上射,而只能从聚光器四周边缘未遮暗的部位斜射到载玻片的标本上。因光线是斜射的,不能直接进入物镜,故观察的视野是暗的,而聚光器斜射到菌体上的光线,因光散射作用而使菌体发亮光,反射到物镜内。

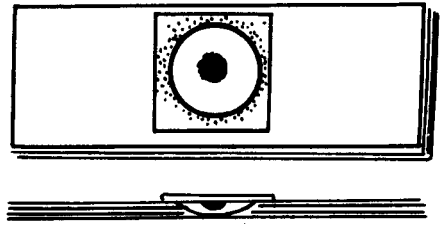


图 1-1-3 悬滴标本

三、细菌涂片的制备和革兰染色

目的要求

掌握革兰染色法和熟悉细菌涂片的制备。

器材和试剂

1. 菌种 葡萄球菌、变形杆菌。
2. 试剂 革兰染色液。

3. 其他 载玻片。

步骤和方法

1. 涂片制备

(1)涂片:取一张洁净载玻片,将变形杆菌液体培养物直接涂布于载玻片,或先在载玻片上放置一接种环生理盐水,再取固体培养基上少许葡萄球菌与生理盐水磨匀,涂成 $1\text{cm}\times 1\text{cm}$ 大小的区域,取菌量不可太多,使盐水磨成灰白色为宜。

(2)干燥:涂片最好在室温下自然干燥,或将标本片接种面向上,置酒精灯火焰高处慢慢烘干,切不可放在火焰上烧干。

(3)固定:干燥后的标本片迅速通过火焰3次,这样既可杀菌,又能将细菌固定在玻片上,以免玻片上的细菌在染色过程中被水冲洗掉。

2. 革兰染色

(1)原理:

1)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;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。

2)革兰阳性菌等电点($\text{pI}2\sim 3$)比革兰阴性菌($\text{pI}4\sim 5$)低,在相同pH条件下,革兰阳性菌所带负电荷比革兰阴性菌多,故与带正电荷的结晶紫染料结合较牢固,不易脱色。

3)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;革兰阴性菌体含核糖核酸镁盐很少,故易被脱色。

(2)方法:

1)初染:滴加结晶紫2~3滴于涂布细菌处,染色1min后用细流水冲洗,甩干。

2)媒染:滴加卢戈(Lugol)碘液数滴,染色1min后用细流水冲洗,甩干。

3)脱色:滴加95%乙醇数滴,轻轻晃动玻片,使玻片上流下的乙醇液无紫色为止,大约30秒左右(灵活掌握时间),用流水冲洗,甩干。

4)复染:滴加稀释石炭酸复红液数滴,染色1min,用流水冲洗,甩干。

待标本片自然干燥或用吸水纸吸干后,在涂菌处滴加一滴香柏油,然后用油镜观察。

染色结果:葡萄球菌染成紫色,为革兰阳性菌,呈葡萄状排列的球菌;变形杆菌染成红色,为革兰阴性菌,单个散在分布的杆菌。

影响因素:一是操作因素,涂片太厚或太薄,菌体分散不均匀,可影响染色结果。固定时应避免菌体过分受热。二是染液因素,所有染液应防止水分蒸发而影响浓度,特别是卢戈碘液久存或受光作用后易失去媒染作用。脱色用的乙醇以95%浓度为宜,若瓶密封不良或涂片上积水过多,可使乙醇浓度降低而增强脱色能力。三是细菌因素,不同时间的细菌培养物,染色结果有差异,如葡萄球菌幼龄菌染成紫色,而老龄菌染成红色。细菌染色一般用18~24h的细菌培养物。

四、细菌的基本形态和特殊结构

目的要求

掌握细菌的基本形态和特殊结构。

器材和试剂

细菌的基本形态示教片、细菌特殊结构示教片。

步骤和方法

1. 细菌的基本形态(示教)

(1)球形:革兰阳性球菌,如葡萄球菌、链球菌;革兰阴性球菌,如脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌。

(2)杆形:革兰阳性杆菌,如炭疽芽胞杆菌;革兰阴性杆菌,如大肠埃希菌。

(3)弧形:革兰阴性弧菌,如霍乱弧菌。

2. 细菌的特殊结构(示教)

(1)荚膜:肺炎链球菌经革兰染色后,菌体染成紫色,呈矛头状成双排列的球菌,菌体四周有不着色的透明圈(即荚膜);用黑斯(Hiss)荚膜染色后,菌体呈紫色,菌体四周有一淡紫色的荚膜圈。

(2)鞭毛:变形杆菌经鞭毛染色后,菌体和周身鞭毛均呈红色。

(3)芽胞:破伤风芽胞梭菌经革兰染色后,菌体呈紫色杆状,菌体顶端有一圆形不着色的芽胞。用芽胞特殊染色后,菌体呈紫色,芽胞为红色。

五、病毒和其他微生物的形态结构(示教)

目的要求

熟悉病毒和其他微生物的形态结构。

器材和试剂

病毒、立克次体、支原体、螺旋体、衣原体和真菌形态示教片。

步骤和方法

1. 病毒的形态(示教) 腺病毒、轮状病毒等电镜照片。

2. 其他微生物形态

(1)立克次体:经吉姆萨(Giemsa)染色后呈紫色或蓝色的球杆状。

(2)支原体:经革兰染色后呈革兰阴性球形或短杆状。

(3)螺旋体:钩端螺旋体经冯泰纳(Fontana)镀银染色后,钩端螺旋体被染成棕褐色、螺旋状、一端或两端弯曲成钩状。

(4)衣原体:沙眼衣原体经吉姆萨染色呈紫红色或深蓝色的圆形或椭圆形颗粒。

(5)真菌:白色念珠菌经革兰染色后,呈革兰阳性、着色不均匀的圆形或卵圆形。

附录

1. 革兰染色液配制

(1)结晶紫染液:称取结晶紫 4~8g,溶于 100ml 95%乙醇中制成饱和液。取 20ml 饱和液与 80ml 10g/L 草酸铵溶液混合即成,过滤后备用。

(2)卢戈(Lugol)碘液:先将 2g 碘化钾溶于 10ml 蒸馏水中,再加 1g 碘,待碘全部溶解后再加 300ml 蒸馏水即成。

(3)95%乙醇或丙酮乙醇溶液(70ml 95%乙醇加 30ml 丙酮)。

(4)稀释石炭酸复红液:称取 4g 碱性复红溶解于 100ml 95%乙醇内,即成碱性复红饱和酒精溶液,吸取 10ml 饱和液和 90ml 50g/L 石炭酸水溶液混匀即成石炭酸复红液。量取 10ml 石炭酸复红液加 90ml 蒸馏水混匀即成。

2. 黑斯染色(荚膜染色)

(1)染液配制:5ml 结晶紫饱和乙醇加 95ml 蒸馏水混合液、200g/L 硫酸铜水溶液。

(2)染色方法:将荚膜菌涂片,在空气自然干燥,无需加热固定,滴加结晶紫染液,在火焰微微加热,使玻片上染液冒蒸汽为止,不要水洗,再用硫酸铜水溶液冲洗后,用吸水纸吸干后油镜检查,菌体呈紫色,荚膜呈淡紫色。

3. 魏氏染色(鞭毛染色)

(1)染液配制:2ml 饱和钾明矾液、5ml 50g/L 石炭酸液和 2ml 200g/L 鞣酸液混合。临用时加 1ml 碱性复红乙醇饱和液混合后过夜,次日过滤后使用,3 天内使用效果最好。

(2)染色方法:先将鞭毛菌在肉汤培养基中传代 6~7 次。取琼脂斜面培养基吸出凝渗水,加入 2ml 无菌蒸馏水,然后将肉汤中传代的细菌接种于斜面琼脂与液体交界处,再从该交界处向上划一直线,放入温箱中培养 16h。用接种环从交界处取一环菌液,轻轻放入盛有 3~4ml 蒸馏水的小碟液体表面,使细菌自由分散,浮在液体表面,静置于孵箱内 4~5min 后,用接种环取一环液面混合液放于高度洁净的载玻片上,切勿研磨和摇动,置 35℃ 或室温下让其自然干燥,切勿火焰固定,加数滴染液染色 0.5~1min,水洗,干后镜检,可见菌体和鞭毛均呈红色。

4. 芽胞染色

(1)染液:石炭酸复红染液、碱性美蓝染液、95%乙醇。

(2)方法:用芽胞菌制成涂片,干燥后加热固定,加数滴石炭酸复红液,微加热染 5min,冷却后用流水冲洗,用 95%乙醇脱色 2min,水洗,再加数滴碱性美蓝 30 秒,水洗,吸干后镜检。其结果是,菌体呈蓝色,芽胞呈红色。

(柴顺根)

第二节 消毒与灭菌

一、物理法

目的要求

1. 掌握常用的物理灭菌法如热力灭菌、滤过除菌、紫外线灭菌。
2. 熟悉影响物理灭菌法效果的几种因素。

器材和试剂

1. 菌种 枯草芽胞杆菌、大肠埃希菌。
2. 培养基 普通肉汤培养基、普通琼脂平板。
3. 其他 高压蒸气灭菌器、水浴锅、滤器、水浴箱、无菌生理盐水、紫外灯等。

步骤和方法

1. 热力对细菌的作用

(1)取肉汤管 10 支,其中 5 支接种枯草芽胞杆菌培养物,另 5 支接种大肠埃希菌培养物。每支接种量为一环。

(2)取接种不同细菌的肉汤管各一支,置 65℃ 水浴 5min,取出肉汤管,自来水冲凉。

(3)同 2),热力作用时间改为 65℃ 30min。

(4)同 2),热力作用时间改为 100℃ 5min。

(5)同 2),热力作用时间改为 103.43kPa 灭菌 30min。

(6)将上述处理 8 支肉汤管连同未经任何热力作用的 2 支肉汤管置 37℃ 孵育 18~24h, 观察各管细菌生长情况。

2. 滤过除菌

(1)演示蔡氏滤器或其他类型滤器的部件及装配。

(2)无菌操作装配微孔滤膜滤器(直径 2.5cm, 滤膜孔径 0.22 μ m)。

(3)将大肠埃希菌肉汤培养物通过滤器。

(4)各取过滤前的细菌肉汤培养物及过滤的滤液 0.1ml, 分别接种 2 支肉汤管, 37℃ 孵育 24h。

(5)观察细菌生长情况, 比较过滤前细菌稀释液和过滤后滤液的培养结果。

3. 紫外线杀菌作用

(1)用无菌接种环取数环大肠埃希菌肉汤培养物, 密布涂布于琼脂平板上。

(2)打开一半皿盖, 置于紫外灯管垂直 1m 处, 直接照射紫外线 30min。

(3)盖上皿盖, 37℃ 孵育 24h, 观察细菌生长情况。

注意事项

滤过除菌时滤过速度和除菌效果有关, 要调整滤过速度, 速度太快则影响除菌效果。

二、化学法

目的要求

1. 掌握化学消毒剂的抑菌作用。

2. 了解和比较不同化学消毒剂对细菌作用的效果。

器材和试剂

1. 菌种 枯草芽胞杆菌、大肠埃希菌。

2. 培养基 普通琼脂培养基、肉汤培养基。

3. 试剂 5% 石炭酸溶液、2% 碘伏溶液、1% 戊二醛溶液、70% 乙醇溶液。

4. 其他 接种针、环、棉签。

步骤和方法

1. 化学消毒剂对皮肤细菌的抑制作用

(1)用无菌棉签沾取生理盐水后擦拭手指皮肤数次, 再在普通琼脂平板上密布涂布。

(2)用碘酒、酒精消毒手指皮肤后, 再用沾取生理盐水的棉签擦拭手指皮肤数次, 用棉签在另一个普通琼脂平板上密布涂布。

(3)将上述两个平板置 35℃ 孵育 18~24h, 观察平板上细菌生长菌落数的多少。

2. 化学消毒剂对细菌的作用

(1)将 5% 石炭酸溶液、2% 碘伏溶液、1% 戊二醛、70% 乙醇溶液分装于试管中, 每支各为 5ml。

(2)在每支消毒剂中加入 0.5ml 细菌悬液(分别为枯草芽胞杆菌和大肠埃希菌)。

(3)轻轻用手指弹击管底, 使管内均匀混合, 迅速置入 20℃ 水浴并计时。

(4)每间隔 5、10、20min 从每一个消毒剂试管中取 1 接种环悬液接种于肉汤管, 37℃ 孵育 48h。

(5)观察不同细菌在不同时间和不同消毒剂中的生长情况。

注意事项

1. 在试验 2 操作中,加入消毒剂的细菌悬液必须直接滴入消毒剂,不能接触管壁,否则影响试验结果。
2. 每一肉汤管均应作好所用消毒剂和作用时间的标记。

三、消毒与灭菌效果的评价

目的要求

1. 熟悉压力蒸气灭菌效果的评价方法与标准。
2. 熟悉紫外线表面消毒效果评价方法与标准。
3. 熟悉消毒剂定量消毒试验。

器材和试剂

1. 指示剂 嗜热脂肪芽胞杆菌(ATCC 7953)菌片、大肠埃希菌(ATCC 25922)、枯草芽胞杆菌黑色变种(ATCC 9732)。
2. 培养基 普通营养琼脂培养基、普通肉汤培养基、溴甲酚紫蛋白胨水。
3. 试剂 1%蛋白胨 0.03mol/L PBS、洗脱液。
4. 其他 菌落计数器、微量加样器、0.5cm×1.0cm 玻片(载体)、试管、吸管等。

步骤和方法

1. 压力蒸气灭菌效果评价的生物学检测方法

(1)将两片嗜热脂肪芽胞杆菌菌片分别装在灭菌的试管中,管口用牛皮纸包封,然后置于通气储物盒内。

(2)将通气储物盒平放于手提压力蒸气灭菌器底部。

(3)103.43kPa 灭菌 20~30min 后,无菌取出指示菌片,接种在溴甲酚紫蛋白胨水,56℃培养 48h,观察培养基颜色变化。

(4)每片指示菌片接种的溴甲酚紫蛋白胨水不变色,判定灭菌合格;如有一片指示菌接种的溴甲酚紫蛋白胨水培养基颜色变黄,则判定灭菌不合格。

2. 紫外线表面消毒效果评价的生物学检测方法

(1)将市售大肠埃希菌 ATCC 25922 染菌的载片放于紫外线管垂直 1m 处照射一定时间后投入盛有 5ml 洗脱液试管中振摇 80 次。

(2)经适当稀释后,取 0.5ml 洗脱液作倾注平板,37℃孵育 48h,作菌落计数。

(3)同法,不作照射处理的染菌载体作阳性对照。

(4)计算杀菌率:

$$\text{杀菌率} = \frac{\text{阳性对照菌落数} - \text{试验组菌落数}}{\text{阳性对照菌落数}} \times 100\%$$

(5)指示菌杀灭率≥99.9%判为消毒合格。

3. 消毒剂定量消毒试验

(1)将枯草芽胞杆菌黑色变种稀释成含菌量 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ CFU/ml 细菌悬液。

(2)将消毒剂稀释成三个不同浓度,各吸取 4.5ml 分别装于 3 个试管内,放 20℃水浴中。

(3)在三个试管中分别加入 0.5ml 细菌悬液,混匀并开始计时。