

医学微生物学 实验指导

(中西医专业使用)

福建中医学院
微生物学教研室

医学微生物学实验指导

(中西医专业使用)

福建中医学院微生物学教研室

实验的一般须知

一、微生物学实验的目的与要求：

医学微生物学实验的目的，在于使学生加深巩固对讲课内容的理解和体会，并在掌握系统理论知识的基础上，使学生学习及掌握医学微生物学的基本操作技术，加强无菌观念，为今后有关的传染病诊断与中医中药的科学研究工作打下良好的基础，为今后的临床医学和预防医学工作中树立良好的无菌观念。

为了提高实验课的效果，要求同学们在实验前后，应做到下列各点：

1. 每次实验课前务必做好预习，明确实验的目的、内容、方法和操作中的注意事项及其理论依据等，避免或减少错误的发生。
2. 在实验的过程中，要坚持严肃性、严格性和严密性，切实按照实验指导所列步骤和要求进行操作，对示教的实验也要联系理论仔细地进行观察。实验中也要注意科学地分配和运用时间。
3. 实验结果必须真实地记录下来，然后进行分析，得出结论。遇有和理论不符的结果时，应尽量探讨其原因，训练自己的科学思维。实验完成后，要写出实验报告，及时交老师批改。
4. 切实遵守实验室规则，防止发生各种事故。

二、实验室规则：

在进行微生物学实验时，一定要记住，我们的实验对象大多是病原微生物，如果不慎发生意外时，不仅自身可能招致感染，且有可能将病原微生物传给他人。因此，进入实验室必须遵循下列规则：

1. 非实验必备的物品，不准带入实验室。
2. 进入实验室，首先穿好工作衣，按规定就坐。
3. 实验室内要保持安静，不得高声谈笑，乱动物品。
4. 实验室内禁止吸烟和进食。
5. 实验时，听从老师指导，严格遵守无菌操作，若发生吸入菌液、割破手指等事故，应立即报告老师及时处理。
6. 吸过菌液的吸管，用过的玻片等污染器械，应及时放入含有消毒液的容器内，不得放在桌上，亦不可冲洗于水槽内。
7. 爱护公物，节约使用实验材料，器材等如有损坏，应立即向老师报告。
8. 注意水、电的安全使用，严防火灾。
9. 实验完毕，整理桌面，打扫卫生，要培养的物品要放入培养箱内，脱下工作衣，消毒洗手后，离开实验室。

实 验 一

内容：1. 显微镜油镜的使用。

2. 革兰氏 (Grams) 染色法。

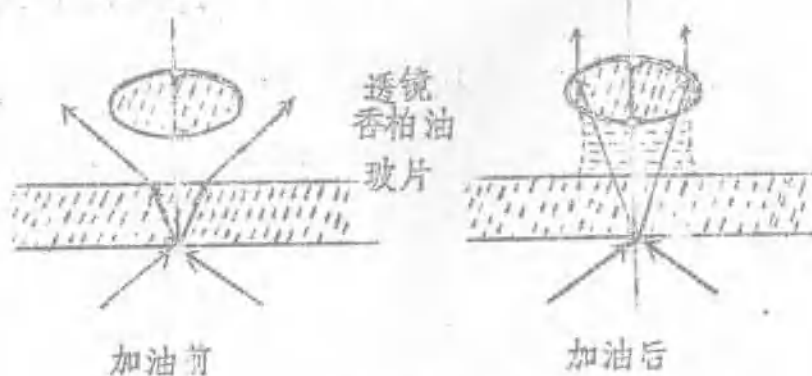
3. 观察细菌的基本形态和特殊构造。

4. 细菌的分布。

一、显微镜油镜的使用

显微镜是细菌实验常用的仪器。一般微生物实验中最常用的是光学显微镜的油镜。要求同学们熟练地掌握其使用和维护方法，防止发生损坏。

原理：油镜由于其透镜的直径小，自标本玻片透过的光线，因介质的密度不同（从载物玻片到空气，再进入油镜），有些光线因折射或全反射，不能全部进入透镜内，致使射入的光线较少，物象呈现不清楚。若在油镜和载物玻片中间加入和玻璃折射率相仿的香柏油，则通过的光线不致有所损失，进入透镜的光量就多，视野的光亮度也就增强。（图1—1）



= 3 =

图1—1：油镜头使用的原理

折光率：空气=1 玻璃=1.52 香柏油=1.515

材料：1、显微镜、香柏油、二甲苯、拭镜纸

2、葡萄球菌、大肠杆菌等标本片

使用方法：使用油镜时要特别小心，因油镜的焦距短，镜头需接近被检的物体面上，稍不小心就可压碎标本片，而更严重的是损坏油镜头。

1. 识别油镜头：油镜头上一般刻有“ $\times 100$ ”、“ $\times 90$ ”、“Oil”、“HI”等标记。使用时，显微镜直立放置，保持载物台呈水平位置，以免油滴或悬液标本流出。

2. 对光：用低倍镜对光，检查染色标本时光线宜强，要抬高集光器，放大光圈。

3. 滴加香柏油：将标本片放在载物台上固定好。滴加香柏油1滴，换油镜头检查。

4. 找焦点：将油镜头移至中央对准标本，从侧面注视镜头，缓慢向下转动粗螺旋，使镜筒下移，直至镜头浸于香柏油中并几乎接触到标本为止，然后将左眼移至目镜，一面观察一面向上徐徐转动粗螺旋，待看到模糊的物象时，即改用细螺旋。调节焦点以寻求清晰的物象。观察标本时应两眼同时张开，这样可以减少眼力疲劳并便于绘图。

5. 用毕处理：镜检完毕，将镜筒升起，取出标本片，用拭

纸将镜头的油揩净，若油已干，可用拭镜纸蘸少许二甲苯擦去油迹，随即用拭镜纸揩去二甲苯。然后，将聚光器降下，物镜转成八字形，放入镜箱内。

二、革兰氏染色法

革兰氏染色法是细菌学中使用最为广泛的一种鉴别染色法，1884年由 Gram 创立。

细菌先经碱性染料着染，并用媒染剂处理，再以脱色剂脱色，最后用另一碱性染料复染，若细菌仍保持脱色前的染料颜色，称为革兰氏阳性细菌；如被脱色，染上复染染料的颜色，则叫做革兰氏阴性细菌。利用革兰氏染色法，可将所有的细菌区分为两大类。所以，细菌对革兰氏染色的反应特性是一种重要的分类学依据，临床上这两类细菌对抗生素的敏感性也不同，有利于抗菌药物的选择和应用。

革兰氏染色法中的染料的配制以及染色过程，种类各异，兹介绍较常用的胡革(Hucker)氏改良法。用本法染色的细菌，呈紫色者为革兰氏阳性菌；呈红色者为革兰氏阴性菌。

材料：1、菌种：金黄色葡萄球菌、大肠杆菌悬液。

2、干净玻片。

3、革兰氏染色液一套（结晶紫染液、卢戈氏碘液、

95%酒精、碳酸复红稀释液)。

方法：1、涂片：取干净玻片一块，按无菌操作法以接种环自菌悬液中沾取少许细菌在玻片上涂成约 20×10 mm 大小的薄层，涂片应薄而均匀。接种环采菌后，必须通过火焰灭菌后，才能放回原处。待涂片自然干燥后，将标本面向上，在火焰外层较快地来回通过三次进行固定，时间约 2~3 秒，以玻片反面触及皮肤，不觉过分烫为度。固定的目的在于杀死细菌；使菌体与玻片的粘附较牢，以及改变对染料的通透性，因活的细胞一般不让许多染料进入细胞内。

2 初染：将已固定的标本冷却后，滴加结晶紫染液于涂片上，1 分钟后水洗。

3 媒染：滴加卢戈氏碘液，约 1 分钟后轻轻水洗。

4 脱色：加 95% 酒精数滴，频频摇动玻片 20~30 秒后，立即水洗。

5 复染：加碳酸复红稀释液复染 0.5~1 分钟后水洗。待标本片干后或用吸水纸吸干，用油镜镜检。

三、观察细菌的基本形态和特殊构造。

材料：1、球菌示教片（葡萄球菌）、杆菌示教片（大肠杆菌）、弧菌示教片（霍乱弧菌）。

2、特殊构造示教片：鞭毛（伤寒杆菌）、芽胞（破

伤风杆菌)、荚膜(肺炎球菌或炭疽杆菌)。

方法：使用显微镜的油镜，观察球菌、杆菌、弧菌及各特殊构造的示教片，观察各菌的形态、结构特点，并绘图说明。

观察鞭毛示教片时，注意鞭毛的颜色、形态及其位置与菌体的关系。

观察芽胞示教片时，注意芽胞及菌体的颜色，芽胞直径与菌体横径的比例，芽胞在菌体上的位置，有无游离芽胞。

观察荚膜示教片时，注意荚膜及菌体的颜色，荚膜的大小及其与菌体的关系。

四、细菌的分布

细菌种类繁多，繁殖迅速，分布广泛。不论空气、土壤、水、食物各种物体和器械的表面，以及动物和人体表面及与外界相通的腔道中都存在细菌，可通过细菌培养法检查其分布状况(种类、数量等)，了解细菌在自然界及正常人体中的分布，对于在医疗实践中树立无菌观念有着重要意义。检查空气中和水中的细菌分布状况，在卫生学上有实际意义；了解人体的正常菌群，在临床微生物诊断上有重要意义。

材料：1、普通琼脂培养基(平板高层)

2、无菌棉签、无菌生理盐水、无菌吸管等。

方法：

1. 空气中的细菌：取琼脂平板一只，置实验室的适宜处，揭开盖子，暴露于空气中15~20min，盖上盖子，置37℃温箱培养24小时后，观察平板上菌落生长的情况。

2. 水中的细菌（倾注法）：以无菌吸管吸取1ml待检水，置无菌空平皿内，然后倾入15ml溶化但已冷却至45℃左右的营养琼脂轻轻摇动，使水和琼脂均匀混和，待凝固后倒置37℃培养24小时后观察结果。

3. 皮肤上的细菌：用无菌棉签沾取无菌生理盐水少许，揩擦皮肤后直接于琼脂平板表面滚动接种，置37℃培养24小时，观察结果。亦可直接用手指在琼脂平板表面轻轻揩擦（注意不能搞破培养基），然后培养观察结果，再用碘酒，酒精对被检部位进行消毒后，再检查一次，观察消毒前后的两种结果，并进行对比。

同学们也可按3法检查其他物品表面的微生物。如：口、咽、鼻腔、指甲缝、书本、钱币、饭菜票、钢笔、桌面、试验台等等。

实 验 二

内容：1. 细菌的人工培养

2. 高压蒸汽灭菌

3. 紫外线杀菌试验

一、细菌的人工培养

掌握细菌的生长繁殖规律，根据细菌生长的需要，提供适宜环境条件，进行人工培养，用以观察和研究细菌各种特性，这对于传染病的诊断、流行病学调查、生物制品的制备或其他医药工作的生产，都具有实际意义。

(一) 常用培养基及其制备

1. 常用培养基：培养基就是将细菌生长繁殖所需要的营养物质按一定的配比人工配制而成的一种混合营养料，培养基的基本成分有蛋白胨、氨基酸、糖类、盐和水份。任何培养基除含有必需的营养物质外，还必须有一定的酸碱度（ $\text{PH } 7.2 \sim 7.6$ ）培养基本身必须无菌。

培养基的主要用途是：(1)分离并繁殖细菌；(2)保存细菌；(3)鉴定细菌；(4)生产细菌、抗生素以及细菌生理学研究。

培养基按其用途，可分为基础培养基、营养培养基、鉴别培养基、选择培养基、厌氧培养基等五大类。

培养基按其物理性状，可分为液体培养基、固体培养基及半

固体培养基三类。

常用培养基有：基础肉汤培养基、普通琼脂培养基、半固体培养基、血液琼脂培养基（血平板）等。

2 常用培养基的制备

(1)、基础肉汤培养基：

肉汤培养基是常用的液体培养基，并是制备某些其他培养基的基础。

成份：新鲜绞碎瘦牛肉	50 g
蛋白胨	1 g
氯化钠	0.5 g
蒸馏水	100ml

制备方法：

①、称取去筋膜无油脂的瘦牛肉50 g，用绞肉机绞碎加水100 ml，搅匀，置4℃冰箱内过夜，除去液面上的浮油。过夜的目的是使牛肉中的水溶性养料充分地渗透出来。

②、次日取出，煮沸半小时，加热过程中须不时地用玻棒搅拌，以免沉淀，也可不置冰箱过夜，直接煮沸1小时。用脱脂棉或纱布过滤，肉渣中的液体应尽量挤净，并补充水分至原加入蒸馏水的量，即为牛肉浸液。

③、100 ml牛肉浸液中加入蛋白胨、氯化钠搅拌加热，

使完全溶解。

④ 用 NaOH 校正 PH 至 7.6, 煮沸 10 分钟, 使肉汤中部分蛋白质及磷酸盐等因加热与再度加热的影响, 而重新凝固沉淀, 再次过滤补充失水, 分装、高压灭菌后备用。

注: 如用牛肉膏制备肉汤培养基, 配方如下:

牛肉膏	0.3g	蛋白胨	1g
氯化钠	0.5g	蒸馏水	100ml

以上各成分混合加热溶解后, 即可调节 PH 值, 以后步骤同上。

(2)、普通琼脂培养基

琼脂是石花菜等海藻类中提取的胶体物质, 其化学成分是多糖。当温度达到 98℃ 以上时可溶解于水, 45℃ 以下则凝固。琼脂对细菌一般无营养作用 (除自然界中极少数菌可利用琼脂外), 纯属凝固剂, 便于人们制做斜面、平板、高层等不同类型的固体培养基, 以供分离培养、繁殖细菌等用。

琼脂通常呈酸性, 加入凝体培养基后可使 PH 下降 0.2 左右。

成分: 肉汤培养基	100ml
琼脂	2~3g

制备方法:

①、取琼脂 2~3 g 加入 100 ml 的肉汤培养基中, 加热溶化。

②、趁热校正 PH 至 7.6, 以脱脂棉过滤, 除去杂质, 补充失水, 分装于烧瓶或试管中, 加棉塞, 高压蒸汽灭菌。

③、灭菌后, 趁热将试管斜置待冷却后, 即成琼脂斜面培养基, 或待肉汤琼脂冷却 50~60℃ 时, 以无菌操作倾入灭菌的空培养皿, 冷凝后即成琼脂平板, 方法是先拔去棉塞, 将瓶口或试管口迅速通过火焰 2~3 次 (勿烧过烫, 以免培养基流经时炸裂); 再微启皿盖, 恰好容管口或瓶口伸入, 将培养基迅速倾入后, 将皿盖盖上, 并将培养皿于桌面上轻轻地回转摇动, 使培养基平铺于皿底。制作琼脂斜面的 15×150 mm 试管内装琼脂培养基 5 ml 即足够; 制作琼脂平板时, 每一空皿 (直径 9 cm) 需装培养基 15~20 ml。

(3)、半固体培养基

成份: 肉汤培养基 100 ml

琼 脂 0.5 g

制备方法: 基本上与普通琼脂培养基的制法相同。

不同点: ①、琼脂含量 0.5 %

②、分装于小试管内, 高压灭菌后, 直立冷却即成。

半固体培养基可供检查细菌动力和保存菌种之用。

(4)、血液琼脂培养基(血平板)

有些细菌营养要求较高，在普通琼脂培养基上生长不良，需用血液琼脂培养基进行培养。

制备方法：将预先制好的普通固体培养基加热溶化，待冷却到50℃左右时，以无菌操作法按5~10%的比例加入脱纤维的兔血或羊血混匀(注意勿产生气泡)后，倒入灭菌平皿中，冷却后即成。

注：脱纤维兔血或羊血的制法：

无菌采集兔血或羊血于放有小玻璃珠的采血瓶中，强烈振摇5~10分钟，使纤维蛋白析出于玻璃珠表面，即可得脱纤维血液。

二、各种培养基的接种方法

1. 琼脂斜面培养基接种法

- (1)、左手握住菌种管和斜面培养基下端，斜面向上。
- (2)、右手握住接种环的柄，在火焰上将接种环烧灼灭菌。
- (3)、以右手小指和手掌以及无名指，顺次夹住并拔出两管的棉塞，注意瓶塞下端不可触及任何东西，将试管口在火焰上来回通过灭菌。
- (4)、用接种环(注意不能烫死细菌)从菌种管沾取少许细菌，

接种于斜面培养基表面，接种时自下而上沿斜面蜿蜒划线，注意勿划破培养基。然后再将试管口在火焰上灭菌，塞好棉塞，并将接种环烧灼灭菌后放在适当的地方。

(5) 置 37°C 培养 24 小时，后观察结果。

2. 液体培养基接种法：基本上和斜面培养基接种相同，但在沾取菌种后，接种环应在接近液体表面的管壁上轻轻研磨，然后将试管稍倾斜，使细菌混于液体中均可。

3. 平板划线接种法：目的是通过划线将混杂的细菌在平板表面分散开来，使个别细菌能分散生长繁殖，形成单个菌落而获得纯种。

(1)、以左手斜执平板略开盖，盖口应靠近火焰周围，或左手抓握琼脂平板（让皿盖留在桌上），使其尽量直立，以免空气中杂菌落入并靠近火焰周围，右手将接种环按无菌操作法沾取少许菌种培养物在平板表面一端开始（或上端）来回划线，先划平板面积 $1/10$ ，划线时使接种环轻轻接触平板表面，呈 $30\sim40^{\circ}$ 夹角，以腕力在平板表面作轻快的滑移动作。注意接种环不应划破培养基。

(2)、烧灼接种环，以杀灭环上存留的细菌。待冷（环是否冷却，可先在平板培养基的边缘空白处接触一下，若琼脂溶化表示尚未冷却，应再稍待复试之），将接种环通过第一次划线处作同

样连续划线（约占平板的 $1/5 \sim 1/6$ ），划毕再用火焰灭菌，冷后作同样的划线，如此顺序在平板上划线4~5次（图2-1）

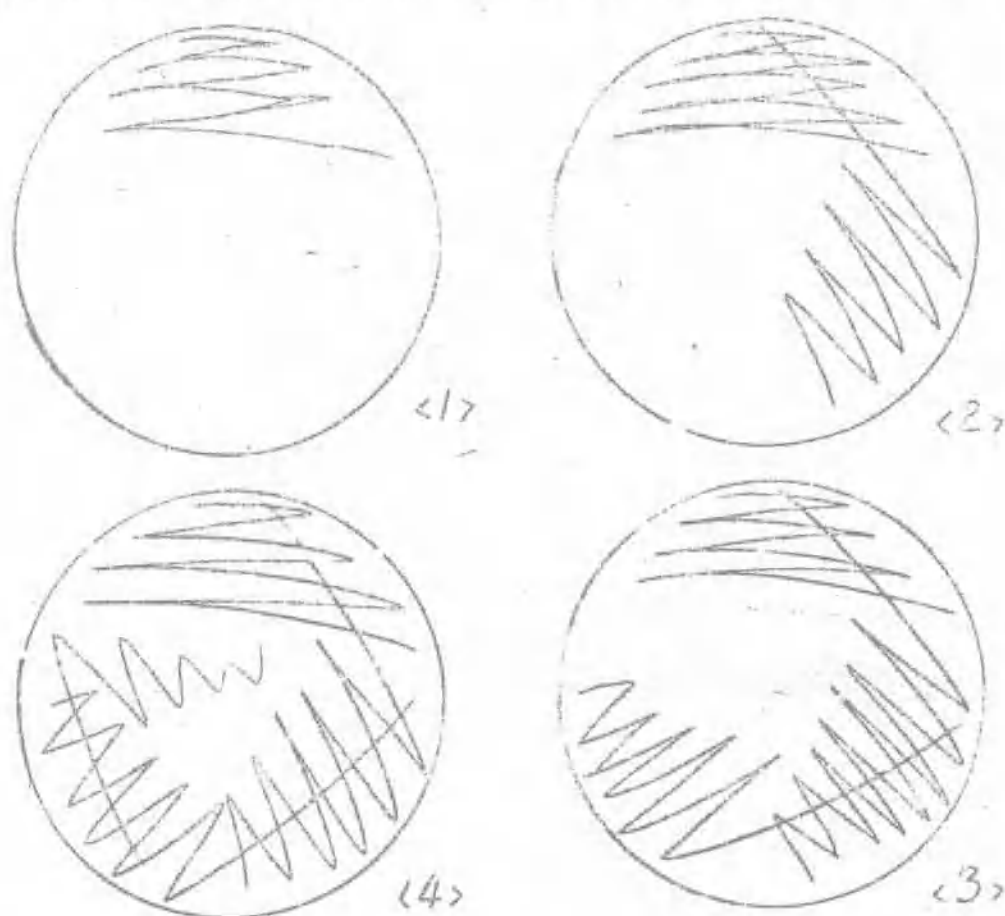


图2-1 平板划线接种法

(3)、划线完毕，盖好平皿，并在培养皿盖上用玻璃铅笔注明组别、接种者姓名、日期等，将培养皿倒置（这样可避免培养过程中凝结水自皿盖滴下，冲散菌落）。

(4)、置 37°C 培养24小时后观察结果。

4. 半固体培养基接种法（穿刺接种法）。

= 5 =