

全国高等医药

院校实验教材



主编 夏佩莹 黄升海

医学微生物学

实验教程

YIXUE

WEISHENGWU XUE

SHIYAN JIAOCHENG

 安徽科学技术出版社

全国高等医药院校实验教材

医学微生物学实验教程

(供临床医学、基础医学、预防、检验、影像、护理、口腔、药学等专业使用)

主 编 夏佩莹 黄升海

副主编 李文汉 许礼发 刘 勇

编 委(以姓氏笔画为序)

李文汉 刘 勇 许礼发

朱玉霞 闵宏林 赵春霞

夏佩莹 黄升海 韩利刚

 安徽科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学微生物学实验教程/夏佩莹,黄升海主编. —合肥:安徽科学技术出版社,2004.2

全国高等医药院校实验教材

ISBN 7-5337-2887-4

I. 医… II. ①夏…②黄… III. 医药学:微生物学-实验-医学院校-教材 IV. R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 125542 号

*

安徽科学技术出版社出版

(合肥市跃进路 1 号新闻出版大厦)

邮政编码:230063

电话号码:(0551)2825419

新华书店经销 合肥中德印刷培训中心印刷厂印刷

*

开本:787×1092 1/16 印张:8 字数:120 千

2004 年 2 月第 1 版 2004 年 2 月第 1 次印刷

印数:10 000

定价:10.00 元

(本书如有倒装、缺页等问题,请向本社发行科调换)

前 言

医学微生物学实验课是微生物学教学中重要环节。作为《医学微生物学》的配套教材,本实验教程在编写过程中遵循教育部对医学院校实验教学的基本要求,由参编医学院校共同完成。

《医学微生物学实验教程》共分为四篇,即细菌学总论、细菌学各论、其他微生物、微生物学实验常用仪器及使用方法。

本实验教程在内容上力求体现基础理论与基本技术相结合,通过实验验证理论,达到巩固理论知识的目的。学生通过亲手操作,得到微生物学基本技能训练,掌握无菌操作技术,为临床工作打下良好的基础。为使学生通过实验过程及结果分析获取更深层次的知识,培养严谨的科学态度,书中每次实验后均附有相应的分析思考题。为适应分子生物学的发展,本书适当选择了部分微生物分子生物学实验内容,以拓宽学生的知识面。

本实验教程内容特点为简明实用,为方便学生学习,相关实验后的附录中加入了常用试剂、培养基的配方等内容,可作为学生今后临床和科研工作的参考。

本实验教程参编院校(以校名首字拼音为序):安徽医科大学、安徽理工大学医学院、蚌埠医学院、第二军医大学南京军医学院。由于时间仓促,加之各院校首次合作,可能有疏漏、不妥之处,敬请各使用院校提出宝贵意见,以便再版时修正完善。

编 者

2003 年 11 月

目 录

绪论

一、医学微生物学实验的目的与要求	1
二、微生物学实验室规则	1
三、微生物学实验室意外的紧急处理方法	2

第一篇 细菌学总论

实验一 显微镜的使用	4
实验二 细菌的基本形态及特殊结构	7
实验三 细菌的涂片标本制作及革兰染色法	9
实验四 微生物的分布	13
实验五 基础培养基的制备	14
实验六 细菌的接种方法	17
实验七 细菌的生化反应	23
实验八 物理灭菌法	28
实验九 化学消毒剂对细菌的作用	33
实验十 药物敏感试验	35
实验十一 噬菌体	39
实验十二 细菌的变异	41
一、细菌的鞭毛变异	41
二、细菌的 L 型变异	43
三、R 质粒接合传递试验	45
实验十三 细菌的致病性及免疫性	48

一、细菌外毒素毒性作用及抗毒素中和试验	48
二、内毒素测定——鲎变形细胞溶解物试验	49

第二篇 细菌学各论

实验十四 病原性球菌	51
一、病原性球菌的形态观察	51
二、病原性球菌在血平板上的菌落特点	52
三、病原性球菌分离鉴定步骤	53
四、葡萄球菌血浆凝固酶试验(玻片法)	55
五、抗链球菌溶血素“O”试验(ASO 试验)	56
实验十五 肠道杆菌	58
一、肠道未知标本分离鉴定步骤	59
二、主要肠道杆菌在中国蓝、SS 琼脂、麦康凯平板上的菌落特点	60
三、大肠埃希菌、伤寒沙门菌、志贺菌主要生化反应的观察	61
四、肥达反应	62
实验十六 霍乱弧菌	68
一、霍乱弧菌的形态观察	68
二、霍乱弧菌的一般检验程序	69
实验十七 厌氧性细菌	71
一、厌氧培养法	71
二、破伤风梭菌形态、染色性及培养性状	73
三、产气荚膜梭菌形态、染色性及培养性状	74
实验十八 白喉杆菌	75
一、白喉杆菌的形态观察	75
二、白喉杆菌的培养方法	76
实验十九 结核杆菌	78
一、结核杆菌的形态观察(抗酸染色法)	78

二、结核杆菌的培养方法(罗氏培养基)	79
--------------------------	----

第三篇 其他微生物

实验二十 支原体、衣原体、立克次体	82
一、支原体形态、培养方法及菌落特点	82
二、衣原体包涵体	83
三、立克次体形态观察	84
实验二十一 螺旋体	85
一、钩端螺旋体形态观察	85
二、显微镜凝集试验方法及意义	86
实验二十二 真菌	89
一、单细胞真菌的形态观察	89
二、多细胞真菌的形态观察	90
三、真菌菌落观察	91
四、皮肤癣标本中皮肤丝状菌检查	92
实验二十三 病毒学	94
一、病毒包涵体示教	94
二、病毒培养法	95
三、流感病毒血凝和血凝抑制试验	101
四、乙型肝炎病毒抗原抗体检测	105

第四篇 微生物学实验常用仪器及其使用方法

实验二十四 微生物学实验室常用仪器的使用	108
实验二十五 动物实验技术	111
实验二十六 玻璃器皿的准备	115

绪 论

一、医学微生物学实验的目的与要求

医学微生物学实验课的目的使学生加强、巩固对所学理论的理解和体会。在系统学习理论知识的基础上,使学生掌握微生物学实验的基本操作、基本技术,为今后的临床实践及科研工作打下坚实的基础。

为达到实验目的,要求学生应做到以下几点:

1. 实验课前应做好预习,明确本次实验的目的、内容、理论依据及操作中的注意事项,尽量避免或减少错误发生。

2. 认真听取指导老师的课前讲解、示教,观摩实验课中影像、多媒体等电化教材。

3. 在实验过程中,应持严肃认真的科学态度,合理分配时间,爱护实验器材。

4. 整个微生物学实验过程中,应建立“无菌概念”,培养“无菌操作”技能。

5. 实验课中应独立思考、独立操作,培养分析及解决问题的能力。实验结果应真实记录,并写出实验报告(根据需要用彩笔绘图),如实验结果与理论不符,应探讨其原因。

二、微生物学实验室规则

微生物学实验的对象大多是病原微生物,任何疏忽都可能导致严重后果。因此,防止实验过程中自身感染及环境污染、严格贯彻“无菌概念”是微生物学实验中最重要原则。

进入微生物学实验室必须遵守下列规则:

1. 进实验室之前必须穿好白大衣, 离开实验室时脱下反折, 白大衣要经常清洗消毒。
2. 书包、衣物等物品勿带入实验室。必要的文具、实验用书、笔记等物带入后, 应放在指定位置。
3. 实验室内严禁饮食、吸烟。
4. 实验室内应保持安静、整洁、有序, 不得高声谈笑、打闹, 以免影响他人实验。
5. 必须按照指导老师指定的方法, 小心处理传染性材料、培养物和污染物, 正确使用各种消毒容器。
6. 小心地避免任何有菌材料的溅出! 如不慎污染了工作台、手、眼、衣物、地面等, 应立即向指导教师报告, 及时做出处理。
7. 爱护公物, 节约使用实验材料, 如不慎损坏了某些器具, 应主动报告指导教师, 按照学院规定处理。
8. 每次实验后均应用肥皂洗手, 必要时用消毒液泡手; 如实验中使用了致病性较强的微生物, 则须用消毒液擦洗工作台面, 并用紫外线灯照射。
9. 实验完毕后, 清理台面, 将欲培养的标本放入培养箱。值日生打扫室内卫生, 关好水电、煤气、门窗, 洗手后离开实验室。

三、微生物学实验室意外的紧急处理办法

1. 皮肤破损: 先除去异物, 用生理盐水或蒸馏水洗净后, 涂 2% 红汞或 2% 碘酊。
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
强酸: 先用大量清水冲洗, 再用碳酸氢钠溶液洗涤中和。
强碱: 先用大量清水冲洗, 再用 5% 硼酸溶液洗涤中和。
如受伤处为眼部, 经上述步骤处理后, 用橄榄油或液体石蜡 1~2 滴滴眼。
4. 菌液误入口中: 立即将菌液吐入消毒容器内, 并用 1:1 000 高锰酸

钾液或 3% 双氧水漱口；根据菌种不同，服用抗菌药物预防感染。

5. 菌液污染桌面：将适量的 2%~3% 来苏儿或 0.1% 新洁尔灭倾倒在污染处，浸泡 30 分钟后抹去。如手上沾有活菌，亦应浸泡于上述消毒液 3 分钟后，再用肥皂和清水洗净。

6. 火警：如发生火警时须沉着、冷静，切勿惊慌，应立即关闭电闸和煤气阀门。如为乙醇、乙醚、汽油等有机溶液起火，切忌用水扑救，可用沙土等物扑灭。

(夏佩莹)

第一篇 细菌学总论

实验一 显微镜的使用

【目的和要求】

1. 熟悉显微镜的结构、功能和使用方法。
2. 掌握油镜的使用和保护方法。

【原理】

微生物是肉眼看不见的微小生物，必须借助光学显微镜或电子显微镜才能观察到。因此，显微镜是研究微生物最基本和最重要的工具之一。掌握显微镜的使用与维护是进行微生物实验研究的基本技能。

【普通光学显微镜的基本结构】

普通光学显微镜由两大部分组成（图 1-1），即机械部分和光学部分。机械部分包括镜座、镜臂、载物台及台上的标本推进器、镜筒、物镜转换盘、升降调节器等。其主要作用是支撑、固定镜头，调节物像焦距，搁置和移动标本。光学系统包括反光镜（或电光源）、光圈、聚光器、物镜、目镜等。其作用是收集光源并聚集于标本上，然后通过透镜放大成像，使人眼可以分辨在裸视时不能看见的细节。物镜的规格一般有 $4\times$ 、 $10\times$ 、 $40\times$ 、 $100\times$ （或 $90\times$ ）等几种。 $100\times$ 的是油镜，是微生物实验最常用的物镜。因为目镜多为 $10\times$ ，所以使用油镜观察标本时，放大倍数为 $1000\times$ ，可以将 $1\mu\text{m}$ 左右的细菌放大至 1mm 左右。

【方法】

低倍镜和高倍镜的使用方法在其他课程中已经被详细介绍，这里不再

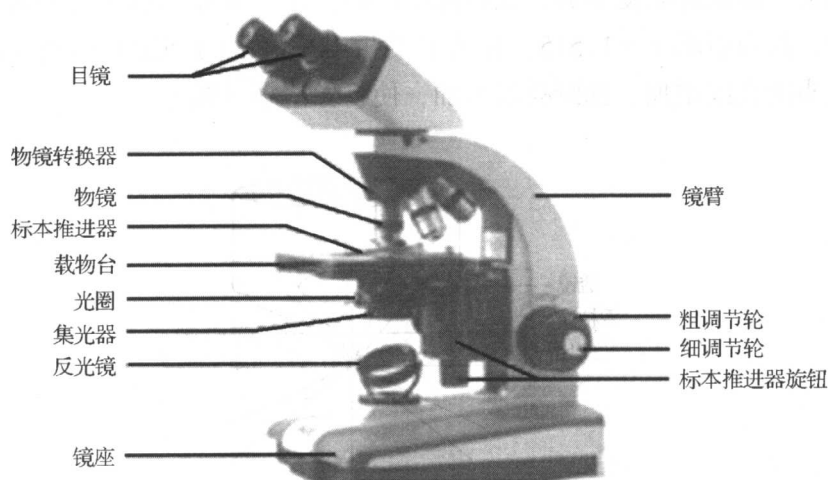


图 1-1 普通光学显微镜的结构

重复。下面重点介绍油镜的使用方法及注意事项。

(1) 打开光源，或先用低倍镜对光（若使用人工光源，宜用凹面反光镜），然后开大光圈至适当大小，升高集光器至相应高度。

(2) 将载物台放平，在标本片欲检部位加一滴香柏油，将油镜转换至镜筒下方。油镜的识别方法是：①镜头上标有放大倍数 $90\times$ 或 $100\times$ ；②镜头下缘常有一圈黑色线或白色线；③透镜孔径最小。

(3) 将标本片置于载物台上，欲检部位移至油镜正下方。

(4) 从侧面观察，将标本片与油镜头尽量接近，但不要接触，使油镜头浸没在香柏油中。然后从目镜中观察，并调节粗螺旋调节轮使标本缓慢离开油镜头，至看见有模糊影像时，用细螺旋调节轮调节至影像清晰。

(5) 观察完毕，取下标本片，立即以擦镜纸拭去镜头上的油，若油已干，可用擦镜纸蘸少许二甲苯擦净，并用另一张擦镜纸拭去二甲苯，以防二甲苯使镜头脱胶落下。

(6) 显微镜使用完毕，将三个接物镜转成“八”字形，将集光器下降，放入显微镜箱内。

使用油镜时滴加香柏油的原理：油镜的放大倍数高而透镜较小。从标本片透过的光线，因玻片和空气的折射率不同，部分光线经折射后不能进

入油镜，使视野亮度不够，且物像不清晰。在油镜和标本片之间滴加的香柏油，其折射率 $n=1.515$ ，和玻璃的折射率 ($n=1.520$) 相仿，使进入油镜头的光线增加、视野亮度增加，使物像清晰 (图 1-2)。

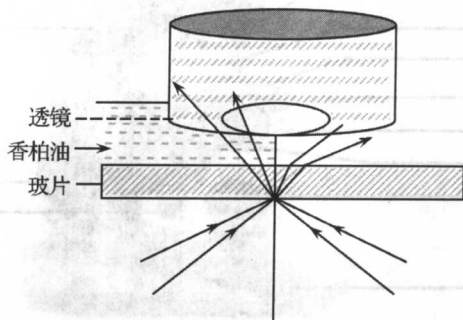


图 1-2 油镜原理示意图

【注意事项】

- (1) 使用显微镜时应小心爱护，不得随意拆卸。
- (2) 搬动显微镜时，用一手持镜臂、一手托镜座平端。
- (3) 载物台要放平，以防滴加的香柏油流出玻片。
- (4) 玻片干后才能加香柏油，滴加时要避免气泡形成，香柏油要适量，不宜过多或过少。
- (5) 调节粗调节轮时，动作要轻，侧面观察镜头和玻片的距离，注意使镜头与玻片不要相碰。
- (6) 用擦镜纸擦拭油镜头时，注意手法要轻柔，并向同一方向拖拭，防止旋转擦拭，以免损伤贵重的油镜光学系统。

【思考题】

- (1) 为什么使用油镜时要等玻片干后才能滴加香柏油？
- (2) 油镜的标志是什么？使用时应注意些什么？
- (3) 如果视野太亮或太暗，可以通过哪些方法来解决？

(刘 勇)



实验二 细菌的基本形态及特殊结构

【目的和要求】

熟悉油镜的使用，认识细菌的基本形态和特殊结构。

【材料】

细菌的基本形态示教片、特殊结构示教片。

【方法】

1. 细菌的三种基本形态（示教）

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

（2）杆形：革兰阴性杆菌，如大肠埃希菌；革兰阳性杆菌，如炭疽芽胞杆菌。

（3）弧形：革兰阴性弧菌，如霍乱弧菌（或水弧菌）。

2. 细菌三种特殊结构（示教）

（1）鞭毛：普通变形杆菌经鞭毛染色后，菌体和周身鞭毛均呈红色。

（2）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，菌体呈现紫色，菌体四周有一淡紫色的荚膜圈。

（3）芽胞：破伤风梭菌经革兰染色后，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，菌体呈蓝色，芽胞呈红色。

【结果】

- (1) 鞭毛：普通变形杆菌，菌体四周有周身鞭毛，细长呈波状弯曲。
- (2) 荚膜：肺炎链球菌菌体周围有一圈淡紫色区域（即荚膜）。
- (3) 芽胞：破伤风梭菌菌体顶端可见一正圆形芽胞，呈“鼓槌状”或“火柴棒状”。

绘图说明各菌的大小、形态、排列方式、特殊结构，并注明染色特性。

【思考题】

革兰阳性的细菌在染色后呈现红色有哪些原因？

【附录】

1. 鞭毛染色法（魏曦染色）

(1) 染液配制：将 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，再从该交界处向上画一直线，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，使细菌自由弥散，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。

2. 荚膜染色法

(1) 染液配制：将结晶紫乙醇饱和液 5ml 加蒸馏水 95ml，混匀；20% (200g/L) 硫酸铜水溶液。

(2) 染色方法：将经小白鼠传代培养的肺炎链球菌进行涂片，在空气中自然干燥，无需加热固定，先滴加结晶紫染液，在火焰上微微加热，使玻片上染液冒水蒸气为止。不要用水洗，用硫酸铜水溶液冲洗，用吸水纸吸干后用油镜观察，结果菌体及背景呈紫色，菌体周围有一圈淡紫色或无色的荚膜。

3. 芽胞染色法

(1) 染液：石炭酸复红染液、95%乙醇、碱性美蓝染液。

(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，微加热染色 5min，冷却后用流水冲洗，用 95%乙醇脱色 2min，水洗，再加数滴碱性美蓝染色 30s，水洗，用吸水纸吸干后镜检。其结果是菌体呈蓝色，芽胞呈红色。

(黄升海)

实验三 细菌的涂片标本制作及革兰染色法

【目的和要求】

1. 掌握细菌染色标本的制备。
2. 掌握革兰染色法及其结果判断。
3. 熟悉革兰染色法在鉴定细菌上的重要意义。

【实验原理】

细菌染色法是细菌形态学检查的一项基本技术。由于细菌个体微小，呈无色半透明，在普通光学显微镜下不易被清晰观察，一般需经染色来增加反差，从而有利于对细菌标本的观察。染料有带阴离子着色基团的酸性染料和带阳离子着色基团的碱性染料。在一般生理条件下 (pH 7.4 左

右), 细菌菌体都带负电荷, 故用于细菌染色的染料多为带阳离子着色基团的苯胺染料, 如美蓝、结晶紫、碱性复红等, 它们较易与细菌菌体结合。

革兰染色的原理目前存在三种假说。

(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; 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) 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, 在相同酸碱度条件下, 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。

革兰 (Gram) 染色法是细菌学中最常用的一种鉴别染色法。用本法不仅可以观察细菌的形态和排列方式, 还可根据染色结果将所有细菌分成革兰阳性菌与革兰阴性菌两大类; 不被乙醇脱色仍保留紫色者为革兰阳性菌 (G^+ 菌), 被乙醇脱色后复染成红色者为革兰阴性菌 (G^- 菌)。革兰染色法不仅有助于细菌的鉴别, 同时还为分析细菌的致病性和选用抗菌药物提供了依据。

在细菌标本染色前, 必须将细菌固定在载玻片上, 常用的固定方法为加热法, 其目的是杀死细菌, 且保持原有形态, 并使细菌黏附在载玻片上, 不致染色时脱落。

【材料】

(1) 菌种: 葡萄球菌、大肠杆菌的 18~24h 琼脂斜面培养物各 1 支。

(2) 试剂: 革兰染色液 1 套 (结晶紫、碘液、95% 乙醇、稀释石炭酸复红各 1 瓶)。

(3) 其他: 载玻片、生理盐水、接种环、酒精灯等。

【方法】