


高等医药院校配套教材  
供检验、临床、口腔、护理等专业选用

# 医学微生物学和微生物检验

## 实验指导

主 编 张玉妥  
副主编 季建军

 人民卫生出版社

高等医药院校配套教材  
供检验、临床、口腔、护理等专业选用

# 医学微生物学和微生物检验 实验指导

主 编 张玉妥

副主编 季建军

编 者(以姓氏笔画为序)

王晨红(河北北方学院) 张玉妥(河北北方学院)  
乔海霞(河北北方学院) 张彦霞(河北北方学院)  
刘进军(河北北方学院) 张艳芳(深圳市职业病防治院)  
李小俊(河北北方学院) 季建军(河北北方学院)  
邱景富(河北北方学院) 韩小艳(河北北方学院)

人民卫生出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

医学微生物学和微生物检验实验指导/张玉妥主编.  
北京:人民卫生出版社,2009.9  
ISBN 978-7-117-11622-0

I. 医… II. 张… III. ①医药学:微生物学-实验-医学院校-教学参考资料②微生物-医学检验-医学院校-教学参考资料 IV. R37-33 R446.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 134911 号

|   |                        |
|---|------------------------|
| 门户网: <a href="http://www.pmph.com">www.pmph.com</a>       | 出版物查询、网上书店             |
| 卫人网: <a href="http://www.hrhexam.com">www.hrhexam.com</a> | 执业护士、执业医师、<br>卫生资格考试培训 |

## 医学微生物学和微生物检验实验指导

主 编: 张玉妥  
出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-67616688)  
地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼  
邮 编: 100078  
E - mail: [pmph@pmph.com](mailto:pmph@pmph.com)  
购书热线: 010-67605754 010-65264830  
印 刷: 北京市顺义兴华印刷厂  
经 销: 新华书店  
开 本: 787×1092 1/16 印张: 11 插页: 8  
字 数: 284 千字  
版 次: 2009 年 9 月第 1 版 2009 年 9 月第 1 版第 1 次印刷  
标准书号: ISBN 978-7-117-11622-0/R·11623  
定 价: 32.00 元  
版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394  
(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

---



# 前 言

---

为了更好地满足目前医学微生物学和临床微生物学教学工作的需要,根据学科发展对原实验教材进行了内容的调整、补充和修订,重新编写了这本《医学微生物学和微生物检验实验指导》教材。全书由实验和附录两大部分组成,实验内容分为六章,包括三十七节,每节包含多个教学内容,涉及微生物学实验的原理和基本方法、细菌、真菌和病毒等的系统检验、临床常见标本的细菌学检查及医院感染的监测等。附录由常用染色液及试剂的配制、常用培养基的制备、临床分离细菌药敏试验抗菌药物的选用和实验习题组成。为了提高实验教学效果,在书后附有九十多幅彩图。

本书作为理论内容的配套教材,编写中本着实验内容与教学大纲和理论教学紧密结合的原则,强调基本原理,侧重基本实验技术,着力于观察能力、动手操作能力、综合分析能力的培养。通过实验课不仅使学生加深和巩固对理论课内容的理解和体会,而且使学生掌握微生物学的基本操作技术和实验方法。对于检验专业的学生,通过系统的实验课学习,能够从临床标本中准确地分离出病原菌,并进行正确鉴定,为今后的临床实践及科学研究工作打下良好的基础。

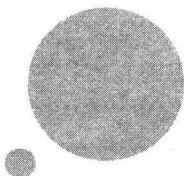
本实验教材为医学检验专业本、专科微生物学理论教材的配套教材,本、专科可根据教学大纲要求选择相应的实验项目。同时供临床、护理、口腔等专业本科实验教学使用,亦可作为研究生、教学人员、实验工作人员和进修教师的学习和参考之用。

本书的出版得到学院领导、教务处领导及教材科郭健老师的大力支持与帮助,在此表示衷心地感谢。

本书由编写人员通力合作完成。因水平所限及缺乏经验,难免出现错误和不妥之处,请师生在使用过程中多提宝贵意见,以便修订时加以完善。

编 者



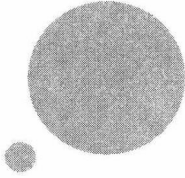


# 目 录

|                                |          |
|--------------------------------|----------|
| 微生物学实验室规则.....                 | 1        |
| <b>第一章 细菌学总论实验.....</b>        | <b>2</b> |
| 第一节 细菌形态学检查.....               | 2        |
| 第二节 细菌染色技术.....                | 4        |
| 第三节 培养基制备方法.....               | 7        |
| 第四节 细菌的分离与接种技术 .....           | 10       |
| 第五节 细菌的生化鉴定 .....              | 12       |
| 第六节 细菌的分布 .....                | 15       |
| 第七节 外界因素对细菌的影响 .....           | 16       |
| 一、物理因素 .....                   | 16       |
| 二、化学因素 .....                   | 18       |
| 三、生物因素 .....                   | 19       |
| 第八节 细菌的遗传与变异 .....             | 20       |
| 一、细菌的鞭毛变异和耐药性变异 .....          | 20       |
| 二、细菌 L 型的培养与鉴定 .....           | 21       |
| 第九节 动物感染及采血技术 .....            | 23       |
| 第十节 细菌的致病性 .....               | 25       |
| 一、细菌的内毒素 .....                 | 25       |
| 二、细菌的外毒素 .....                 | 26       |
| 第十一节 细菌的分子生物学鉴定 .....          | 27       |
| 第十二节 细菌的数字编码鉴定 .....           | 29       |
| 第十三节 抗菌药物敏感性试验 .....           | 32       |
| 一、纸片扩散法 .....                  | 32       |
| 二、稀释法 .....                    | 35       |
| 三、E 试验 .....                   | 38       |
| 四、联合药敏试验 .....                 | 39       |
| 五、细菌 $\beta$ -内酰胺酶的测定 .....    | 41       |
| 六、细菌超广谱 $\beta$ -内酰胺酶的测定 ..... | 42       |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 第二章 细菌学各论实验 .....         | 44 |
| 第一节 病原性球菌 .....           | 44 |
| 一、葡萄球菌属 .....             | 44 |
| 二、链球菌属 .....              | 47 |
| 三、肠球菌属 .....              | 49 |
| 四、奈瑟菌属 .....              | 50 |
| 第二节 肠道杆菌 .....            | 53 |
| 一、埃希菌属 .....              | 53 |
| 二、沙门菌属 .....              | 55 |
| 三、志贺菌属 .....              | 58 |
| 四、克雷伯菌属、肠杆菌属和沙雷菌属 .....   | 59 |
| 五、变形杆菌属和摩根菌属 .....        | 60 |
| 六、耶尔森菌属 .....             | 61 |
| 第三节 非发酵菌 .....            | 62 |
| 一、假单胞菌属 .....             | 62 |
| 二、不动杆菌属 .....             | 64 |
| 三、产碱杆菌属 .....             | 65 |
| 第四节 其他革兰阴性小杆菌 .....       | 66 |
| 第五节 弧菌属 .....             | 68 |
| 一、霍乱弧菌 .....              | 68 |
| 二、副溶血性弧菌 .....            | 70 |
| 第六节 需氧革兰阳性杆菌 .....        | 71 |
| 一、棒状杆菌属 .....             | 71 |
| 二、需氧芽胞杆菌属 .....           | 73 |
| 三、李斯特菌属 .....             | 74 |
| 四、加特纳菌属 .....             | 74 |
| 第七节 分枝杆菌属、放线菌属和诺卡菌属 ..... | 75 |
| 一、分枝杆菌属 .....             | 75 |
| 二、放线菌属和诺卡菌属 .....         | 78 |
| 第八节 弯曲菌属和螺杆菌属 .....       | 79 |
| 一、弯曲菌属 .....              | 79 |
| 二、螺杆菌属 .....              | 80 |
| 第九节 厌氧菌 .....             | 81 |
| 一、厌氧培养法 .....             | 81 |
| 二、厌氧芽胞梭菌 .....            | 83 |
| 三、无芽胞厌氧菌 .....            | 85 |
| 第十节 支原体 .....             | 86 |
| 第十一节 衣原体和立克次体 .....       | 88 |
| 一、衣原体 .....               | 88 |

|                                       |     |
|---------------------------------------|-----|
| 二、立克次体 .....                          | 90  |
| 第十二节 螺旋体 .....                        | 91  |
| <b>第三章 真菌学实验</b> .....                | 95  |
| 第一节 真菌检验基本技术 .....                    | 95  |
| 第二节 浅部感染真菌 .....                      | 96  |
| 第三节 深部感染真菌 .....                      | 97  |
| <b>第四章 病毒学实验</b> .....                | 99  |
| 第一节 病毒培养技术 .....                      | 99  |
| 一、动物接种法 .....                         | 99  |
| 二、鸡胚接种法 .....                         | 99  |
| 三、组织培养法 .....                         | 102 |
| 第二节 病毒检查常用方法 .....                    | 104 |
| 一、病毒的形态学检查 .....                      | 104 |
| 二、病毒的血清学检查 .....                      | 105 |
| 三、病毒的分子生物学检查 .....                    | 110 |
| <b>第五章 临床常见标本的细菌检验</b> .....          | 112 |
| 第一节 尿液标本的细菌检验 .....                   | 112 |
| 第二节 血液标本的细菌检验 .....                   | 114 |
| 第三节 粪便标本的细菌检验 .....                   | 116 |
| 第四节 呼吸道标本的细菌检验 .....                  | 118 |
| <b>第六章 医院感染监测</b> .....               | 121 |
| 第一节 医院环境中细菌污染的监测 .....                | 121 |
| 第二节 医院消毒药械效能监测 .....                  | 122 |
| 第三节 导管相关血流感染监测 .....                  | 124 |
| <b>附录 I 常用染色液及试剂的配制</b> .....         | 126 |
| <b>附录 II 常用培养基的制备</b> .....           | 132 |
| <b>附录 III 临床分离细菌药敏试验抗菌药物的选用</b> ..... | 143 |
| <b>附录 IV 实验习题</b> .....               | 146 |
| <b>附录 V 附图</b> .....                  | 169 |



# 微生物学实验室规则

医学微生物学实验的对象大多数为病原微生物,具有传染性。因此,进入实验室后必须严格遵守以下规则:

一、书包、衣物等与实验无关的物品不得带入实验室,必须带入的书籍和文具等放入实验桌抽屉内或置于非操作区,以免污染。

二、进入实验室应穿好白大衣、戴好帽子。

三、严禁在实验室内饮食、吸烟等,以免发生感染。

四、实验室内保持安静、有秩序,不得高声谈笑或随便走动,以免影响他人实验。

五、实验中发生吸入菌液或菌液流洒桌面、污染衣物、书本、手指及地面等意外事故时,应立即报告老师,及时处理。

吸入病菌菌液:立即吐出后,以大量 0.5g/L 高锰酸钾及清水漱口。必要时根据菌类的不同,服用有关药物以防感染。

菌液污染环境的处理:如污染桌面、地面,应立即在污染部位倒 2%~3% 来苏或 5% 苯酚,泡半小时后方可除去。如手上沾有活菌也应用上述消毒液浸泡 10~20 分钟后,再以肥皂清洗,自来水冲净。

六、认真进行各项实验,严格掌握无菌操作技术。各种实验室物品按指定地点存放,如吸过菌液的吸管、毛细滴管、试管、玻片等应放在指定的污物缸或盛有消毒液的玻璃缸内,绝对不可乱放于桌面上或在水槽中冲洗;铅笔屑以及用过的火柴、擦镜纸等放于实验桌上指定的容器内,不得随手丢弃。

七、要爱护实验室内仪器设备,按使用规则操作。不得随意拨动电器开关。要节约使用实验材料,如不慎损坏了器材等,应报告带教老师进行登记。

八、实验完毕应整理桌面,需培养的材料要标记组别、姓名等,置培养箱培养;显微镜用后要擦净,各功能部件复位;示教片用二甲苯擦洗干净,连同其他实验物品收回置固定位置。

九、整理完桌面后,脱下白大衣、帽子,按要求反折、叠好,按座号放入柜内。实验中如使用活的微生物,双手应在消毒液中浸泡 5 分钟消毒后,用自来水冲洗干净。值日生认真清扫实验室,关好水、电及门窗后方可离开实验室。



## 第一节 细菌形态学检查



### 目的要求

1. 掌握显微镜的正确使用和维护。
2. 掌握细菌的基本形态和特殊结构。
3. 掌握细菌不染色标本检查法。



### 实验材料

1. 示教片 细菌基本形态与特殊结构。
2. 菌种 变形杆菌 6~12 小时肉汤培养物。
3. 其他 显微镜、载玻片、凹玻片、盖玻片、凡士林、擦镜纸、香柏油、二甲苯等。



### 实验内容

#### 1. 显微镜油镜的使用

(1) 显微镜平放在实验台的适宜处,以自然光线为光源时,使用平面反光镜;以日光灯为光源时,使用凹面反光镜。

(2) 把集光器升到最高位置,把光圈完全打开。

(3) 先用低倍镜调节光线,使视野中光线最强。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,当油镜头接触到玻片时停止转动,从目镜观察视野,缓慢调节粗调节器,待看到模糊物像时,再调节细调节器,直至看到清晰物像。

使用油镜时必须滴加香柏油,因为: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( $n=1.515$ ),使进入油镜的光线增多,视野亮度增强,物像清晰。(图 1-1)

#### 2. 显微镜的维护

(1) 显微镜使用时应小心爱护,不得随意拆卸。

(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,油镜使用后应立即用擦镜纸擦去香柏油。

(4) 若油镜头上的油迹未擦干净,应先将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的二甲苯。

(5) 显微镜擦净后,下降聚光器,降低物镜并将其转成八字形,放显微镜柜中保存。

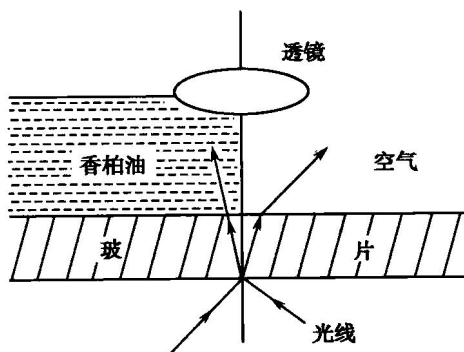


图 1-1 油镜原理示意图

### 3. 细菌的基本形态观察

(1) 球菌:革兰阳性球菌——葡萄球菌:菌体呈紫色球形,排列不规则,堆积成团如葡萄状。革兰阴性球菌——脑膜炎奈瑟菌:菌体呈红色球形,多成对排列。

(2) 杆菌:革兰阳性杆菌——炭疽芽胞杆菌:菌体呈紫色粗杆状,两端截平,排列成竹节状。革兰阴性杆菌——大肠埃希菌:菌体呈红色杆状,排列不规则。

(3) 弧菌:革兰阴性弧菌——霍乱弧菌:镜下菌体呈红色,只有一个弯曲,呈弧形或逗点状。

### 4. 细菌的特殊结构观察

(1) 荚膜:肺炎链球菌经荚膜染色后,菌体呈紫色,菌体周围淡紫色区域即为荚膜。

(2) 鞭毛:变形杆菌经鞭毛染色后,可见菌体周围有细长弯曲的数根丝状物,即为鞭毛。

(3) 芽胞:破伤风芽胞杆菌经芽胞染色后,菌体呈蓝色杆状,菌体顶端有一圆形红色结构即为芽胞,芽胞直径大于菌体宽度。

### 5. 细菌不染色标本检查

#### (1) 悬滴法

1) 取一张洁净的凹玻片,将凹窝四周涂少许凡士林。

2) 取一滴变形杆菌液体培养物于盖玻片中央。

3) 将凹玻片合于盖玻片上,使凹窝中央正对菌液。

4) 迅速翻转载玻片,用小镊子轻压,使盖玻片与凹窝边缘封闭。

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,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。注意与水分子的布朗运动相区别。

#### (2) 压滴法

1) 用接种环取 2~3 环菌液于洁净载玻片中央。

2) 用小镊子夹一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菌液边缘,然后缓慢放下,以免产生气泡。

3) 先用低倍镜观察,找到观察部位后再换高倍镜观察细菌的运动。

(季建军)



## 第二节 细菌染色技术



### 目的要求

1. 掌握细菌标本片的制作。
2. 掌握细菌检验常用染色技术。



### 实验材料

1. 菌种 根据不同染色方法选用不同菌种。
2. 试剂 染液。
3. 其他 显微镜、载玻片、擦镜纸、香柏油、二甲苯等。



### 实验内容

#### 1. 标本片的制作

(1) 涂片: 临床标本或液体培养物可直接涂于洁净的载玻片上, 固体培养物则先在载玻片上滴一滴生理盐水, 然后取少许菌在盐水中磨匀, 呈轻度混浊。涂好的菌膜大小以直径 1cm 的圆形为宜。

(2) 干燥: 涂片最好在室温下自然干燥, 或将标本面向上, 置于酒精灯火焰上方慢慢烘干, 切不可在火焰上烧干。

(3) 固定: 细菌的固定常用火焰加热法, 即将上述已干的涂片迅速通过酒精灯外焰 3~5 次。目的在于杀死细菌, 同时固定菌膜在载玻片上, 以免在染色中细菌被冲洗掉。标本片制备完成后可进行染色。

#### 2. 常用的染色方法

##### (1) 革兰染色法

1) 原理: 细菌被结晶紫着色后, 再经媒染剂处理, 染成紫色。如被乙醇脱去颜色, 经复红复染成红色, 称为革兰阴性菌; 如不被乙醇脱色, 则仍为紫色, 称为革兰阳性菌。

革兰染色的原理尚未完全明了, 主要有三种学说: ①等电点学说: 革兰阳性菌的等电点低(pI 2~3), 革兰阴性菌等电点较高(pI 4~5), 一般染色液 pH 为 7.0 左右, 故电离后革兰阳性菌所带负电荷比革兰阴性菌多, 因此, 摄取带正电荷的染料(如结晶紫)多且不易脱色。②通透性学说: 革兰阳性菌细胞壁的通透性比阴性菌小, 脱色剂较易通过革兰阴性菌的细胞壁, 将染料溶解脱出, 故易脱色; 阳性菌的细胞壁通透性低, 故不易脱色。③化学学说: 革兰阳性菌细胞内含有某种特殊化学物质, 一般认为是核糖核酸镁盐与多糖的复合物, 它能和染料-媒染剂牢固结合, 使已着色的细菌不易脱色; 革兰阴性菌细胞内含核糖核酸镁盐复合物较少, 易被脱色。

2) 染液: 结晶紫, 卢戈碘液, 95%乙醇, 稀释苯酚复红(配制方法见附录)。

3) 菌种: 大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌固体培养物。

4) 方法: ①初染: 将结晶紫染液 2~3 滴加于制好的标本片上, 染色 1 分钟, 水洗; ②媒染: 加卢戈碘液 2~3 滴染色 1 分钟, 水洗; ③脱色: 95%乙醇脱色 0.5 分钟左右, 至无紫色液

体流下为止,水洗;④复染:加稀释苯酚复红数滴,染色 1 分钟,水洗,干后镜检。

5) 结果:金黄色葡萄球菌呈紫色,为革兰阳性菌;大肠埃希菌呈红色,为革兰阴性菌。

6) 注意事项:①标本片不宜过厚,否则脱色受影响,使革兰阴性菌染成革兰阳性菌,造成错误鉴定。②涂片积水过多会改变染液浓度,影响染色效果,故每次水洗后应用去玻片上积水。③注意细菌的菌龄,一般以 18~24 小时左右培养物效果最好,菌龄过长影响细菌染色性。

(2) 萘-尼抗酸染色法(Ziehl-Neelsen):主要用于结核分枝杆菌和麻风分枝杆菌检查。

1) 原理:抗酸杆菌的细胞壁含有大量脂类物质,故常规染色法不易着色,但延长染色时间或提高染色温度可使菌体着色,且菌体着色后,能抵抗酸性乙醇的脱色,因此抗酸菌能保持复红的颜色。而非抗酸菌染色后容易被盐酸乙醇脱色,最后被复染成蓝色。

2) 染液:苯酚复红染液,3%盐酸乙醇,吕氏亚甲蓝染液(配制方法见附录)。

3) 标本:结核分枝杆菌和大肠埃希菌混合液。

4) 方法:①初染:在已制备好的标本片上滴加苯酚复红染液,徐徐加热至有蒸汽冒出,切不可沸腾,并随时添加染色液,染色 3~5 分钟,冷却后水洗。②脱色:滴加 3%盐酸乙醇脱色至无红色液体流下为止。③复染:水洗后用吕氏亚甲蓝复染 0.5~1 分钟,水洗,干后镜检。

5) 结果:呈红色的细菌为抗酸菌;呈蓝色的细菌为非抗酸菌。

6) 注意事项:①加热时火切勿过大,防止染液沸腾。②每张玻片只允许放一份标本,以免阴性阳性结果混淆。③用过的玻片要彻底洗干净,防止抗酸菌留在玻片上。④切勿使用染色缸,印干的滤纸只能一片一张,不得重复使用。⑤脱色时间宁长勿短,以免误诊。⑥为防止实验室内感染,临床标本需要高压灭菌后再制作标本片。

(3) 潘本汉抗酸染色法(panpenhein):主要用于尿及粪便中抗酸菌检查。当用萘-尼抗酸染色检出抗酸菌后,用该方法染色,结核分枝杆菌染成红色,耻垢分枝杆菌染成蓝色。

1) 染液:苯酚复红,复染液(配制方法见附录)。

2) 标本:结核分枝杆菌和耻垢分枝杆菌混合液。

3) 方法:①初染:于制好的标本片上滴加苯酚复红染液数滴加温染色 2 分钟。②复染:倾去染液勿水洗,滴加复染液,边滴边倾去,重复 4~5 次后,水洗,干后镜检。

4) 结果:染成红色的细菌为结核分枝杆菌,染成蓝色的细菌为耻垢分枝杆菌。

注:做潘本汉抗酸染色之前,先做萘-尼抗酸染色,进行对比。

(4) 鞭毛镀银染色法

1) 染液:甲液,乙液(配制方法见附录)。

2) 标本:形成迁徙生长现象的奇异变形杆菌软琼脂平板培养物。

3) 方法:①于一洁净玻片端部,滴加蒸馏水一滴,然后取上述迁徙生长边缘的细菌少许,轻轻点于蒸馏水中,待菌漂浮后,倾斜玻片,使菌随水流自然扩散,然后置玻片于室温,自然干燥,切勿火焰固定。②在制好的涂片上滴加甲液染 3~5 分钟,用蒸馏水冲洗。③用乙液冲去残留水后,加乙液,并在火焰上方稍加热 0.5~1 分钟,待有蒸汽冒出时用蒸馏水冲洗,干后镜检。

4) 结果:菌体染成深褐色,鞭毛染成浅褐色。

5) 注意事项:①为了形成较典型的迁徙生长现象,细菌一般要连续传代 2 次,但细菌传代培养次数因菌种不同可适当增加。②制标本片时菌量不宜过多,动作要轻,切勿研磨,以免鞭毛脱落。③加乙液后加热温度不要太高。

## (5) 魏曦鞭毛染色法

1) 染液:鞭毛染液(配制方法见附录)

2) 标本:形成迁徙生长现象的奇异变形杆菌软琼脂平板培养物。

3) 方法:制片同上。在制好的标本片上滴加鞭毛染液,0.5~1 分钟后水洗,干后镜检。

4) 结果:菌体与鞭毛均呈红色。

## (6) 芽胞染色法

1) 染液:苯酚复红染液,95%乙醇,吕氏亚甲蓝染液(配制方法见附录)。

2) 标本:炭疽芽胞杆菌斜面培养物。

3) 方法:①初染:于制好的标本片上滴加苯酚复红染液,加热染 3~5 分钟,勿使染液沸腾,水洗;②脱色:用 95%乙醇脱色约 1 分钟,至无红色染液流下为止,水洗;③复染:加吕氏亚甲蓝染液,染 1 分钟后水洗,干后镜检。

4) 结果:芽胞染成红色,菌体呈蓝色。

## (7) 黑斯(Hiss)荚膜染色法

1) 染液:结晶紫染液,20%  $\text{CuSO}_4$  水溶液(配制方法见附录)。

2) 标本:提前 1~2 天,于小白鼠腹腔注射肺炎链球菌菌液 0.2ml,小鼠死亡后解剖取腹腔液印片。印片在空气中自然干燥,无须加热固定。

3) 方法:①在标本片上滴加结晶紫染液,于火焰上加热,使有蒸汽冒出为止,勿水洗。②以 20%  $\text{CuSO}_4$  溶液冲洗染液,勿水洗,干后镜检。

4) 结果:菌体呈紫色,荚膜呈淡紫色。

## (8) 阿尔伯特(Albert)异染颗粒染色法

1) 染液:甲液,乙液(配制方法见附录)。

2) 标本:白喉棒状杆菌吕氏血清斜面培养物。

3) 方法:于已制好的标本片上加甲液染色 3~5 分钟,水洗,再加乙液染色 1 分钟,水洗,干后镜检。

4) 结果:菌体呈蓝绿色,异染颗粒呈蓝黑色。

## (9) 刚果红染色法:本方法为负染色法,即背景着色而菌体不着色的染色方法。

1) 染液:2%刚果红水溶液,1%盐酸乙醇溶液。

2) 标本:用牙签从牙缝中取牙垢。

3) 方法:于载玻片上滴加 2%刚果红溶液 1 滴,与所取标本混匀,涂成均匀厚片,待干后固定。以 1%盐酸乙醇溶液冲洗,菌膜由红变蓝后镜检。

4) 结果:背景呈蓝色,菌体无色。

## (10) 金胺“O”染色法

1) 染液:金胺“O”染液,0.5%盐酸乙醇,0.5%高锰酸钾溶液(配制方法见附录)。

2) 菌种:结核患者的痰标本。

3) 方法:①在已制好的标本片上加金胺“O”染液,染 15 分钟后水洗;②用 0.5%盐酸乙醇脱色 2 分钟,水洗;③加 0.5%高锰酸钾液作用 3 分钟,水洗。待干后用荧光显微镜观察。

4) 结果:抗酸菌呈亮黄色荧光。

(季建军)

### 第三节 培养基制备方法



#### 目的要求

1. 掌握培养基制备的基本步骤。
2. 熟悉常用培养基制备方法。



#### 实验材料

1. 试剂 新鲜牛肉、牛肉膏、氯化钠、蛋白胨、琼脂粉、脱纤维绵羊血、蒸馏水。
2. 器材 锥形瓶、量筒、吸管、精密 pH 试纸、高压蒸气灭菌器、无菌平皿、天平、试管、硅胶塞。



#### 实验内容

1. 培养基制备的基本过程 包括调配成分、溶解、校正 pH、过滤澄清、分装、灭菌，质量检查和保存。

(1) 调配成分:按培养基组成准确称取各成分用量,放入锥形瓶或烧瓶中,加入一定量蒸馏水,使其充分混合。注意染料、胆盐和指示剂应在矫正 pH 后加入。

(2) 溶解:将调配好的混合物在沸水浴中加热,使其完全溶解。

(3) 校正 pH:一般将培养基的 pH 调至 7.2~7.6 之间。经高压灭菌后其 pH 可发生 0.1~0.2 变动,若用 NaOH 校正,高压灭菌后, pH 下降 0.1~0.2;若用  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  校正,高压灭菌后 pH 升高 0.1~0.2。

(4) 滤过澄清:自配的培养基通常有一些混浊或沉淀,需滤过澄清后方可使用。液体培养基常用滤纸过滤,半固体、固体培养基在溶解后趁热以双层纱布夹薄层脱脂棉过滤。

#### (5) 分装

1) 液体培养基:一般分装于试管中,灭菌后备用。也可分装于锥形瓶,灭菌后可随时分装试管。

2) 琼脂斜面:通常在未凝固前分装试管,量约为试管高度的 1/4~1/3,加塞。灭菌后趁热摆成斜面,斜面长度约为试管长度 2/3,且直立层至少 1cm 高。

3) 半固体培养基:分装量为试管容量 1/4~1/3,加塞。灭菌后趁热直立凝固。

4) 琼脂平板:根据需要培养基分装,分装量不亦超过容器的 2/3,以免高压灭菌时外溢。灭菌后琼脂冷却至 50℃左右,以无菌操作倾注于无菌平皿内(直径 90mm 的平皿约 15ml),水平旋转平皿,待琼脂凝固后即成。

(6) 灭菌:由耐热物质配制成的培养基(如营养琼脂)常用高压蒸气灭菌,条件为 103.4kPa(121℃),15~20 分钟;含糖及蛋白质培养基以 68.95kPa(115℃)10~15 分钟为宜,以免破坏糖类和蛋白质。

(7) 质量检验:凡制成的培养基需经无菌试验和效果试验鉴定后方可使用。

1) 无菌试验:将灭菌后的培养基置 35℃培养箱培养 24 小时,无任何细菌生长为合格。

2) 效能试验:将已知的标准参考菌株接种于待检培养基中,检查细菌的生长繁殖状况和生化反应是否与预期的结果相符合。

(8) 保存:制备好的培养基应注明名称、制作日期,备用。注意琼脂平板倒置存放。

## 2. 常用培养基的制备

### (1) 液体培养基的制备

肉汤:

#### ① 成分

|              |         |
|--------------|---------|
| 新鲜牛肉(去除筋和脂肪) | 500g    |
| 氯化钠          | 5g      |
| 蛋白胨          | 10g     |
| 蒸馏水          | 1 000ml |

② 制备方法:将新鲜牛肉(去除筋和脂肪)绞碎加水,4℃过夜。然后 45~50℃加热 1 小时,并煮沸 30 分钟,用数层纱布或滤纸过滤,加水补充至 1 000ml。再加入蛋白胨和氯化钠,加热熔化,冷至 40~50℃,校正 pH 至 7.4~7.6,分装于锥形瓶或试管内,加塞后高压灭菌 121℃,20 分钟,冷后放阴暗处或 4℃备用。若用成品培养基,可直接称取所需成品量,加蒸馏水,溶解分装,经高压灭菌后备用。

③ 用途:可用于细菌的增菌培养。

### (2) 半固体培养基的制备

#### ① 成分

|    |         |
|----|---------|
| 肉汤 | 1 000ml |
| 琼脂 | 5g      |

② 制备方法:将上述成分加热溶解,分装小试管,每管 2ml 加塞,高压灭菌 103.4kPa 20 分钟,取出后直立待凝即成。

③ 用途:可于观察细菌动力和保存菌种用。

### (3) 固体培养基制备

#### 1) 营养琼脂培养基

##### ① 成分

|        |         |
|--------|---------|
| 肉汤或肉膏汤 | 1 000ml |
| 琼脂     | 20g     |

② 制备方法:将上述成分混合,加热溶解,调 pH 至 7.4~7.6,趁热分装试管或锥形瓶,加塞后高压灭菌,103.4kPa 20 分钟。试管取出摆成斜面,待凝固后即成琼脂斜面。锥形瓶中琼脂冷至 50℃左右倾注到无菌平皿中,凝固后即成营养琼脂平板。

③ 用途:供一般细菌培养用,可作无糖基础培养基。

2) 血液琼脂培养基和巧克力培养基:有些细菌营养要求较高,在营养琼脂培养基上生长不良,可用血液琼脂培养基或巧克力培养基进行培养。

##### ① 成分

|          |       |
|----------|-------|
| 血琼脂基础培养基 | 100ml |
| 脱纤维羊血    | 10ml  |

② 制备方法:将灭菌后的血琼脂基础培养基(pH 7.6),冷至 50℃左右,以无菌操作

加入无菌脱纤维羊血(临用前置 37℃水浴预温 30 分钟),轻轻摇匀(避免产生气泡),分装于无菌试管或平皿内,凝固后即成血液琼脂斜面或血液琼脂平板。若在琼脂温度 80℃时加入脱纤维羊血,并在 80~90℃水浴中维持 30 分钟,倾注平皿后即成巧克力琼脂平板。

③ 用途:血液琼脂培养基用于分离培养营养要求高的细菌;巧克力琼脂培养基主要用于分离培养奈瑟菌属,嗜血杆菌属,肺炎链球菌属等。

注意事项:倾注平板时,培养基温度应适宜,若温度过高,则制作的平板冷凝水过多,易致污染;若温度过低,部分琼脂凝固,倾注的平板表面高低不平。制备血液琼脂平板时,由于加血时易产生气泡,应使血液沿瓶壁流下。同时,倾注时应适时转动锥形瓶,使气泡附于瓶壁,减少血平板表面的气泡。

#### [附]常用玻璃器材的处理

1. 新玻璃器皿 因含少量游离碱,应先放入清洁液或者 2%盐酸内浸泡 2~6 小时后,再用自来水彻底冲洗干净。

#### 2. 接种过细菌的玻璃器皿

(1) 试管:先经高压灭菌,趁热倒出培养物,再用洗衣粉水洗刷,自来水冲洗干净。

(2) 培养皿:高压灭菌前先将底、盖分开,放入搪瓷桶或铁盒中(不可把平皿直接放入高压灭菌器内,以防琼脂融化后溢出,堵塞蒸汽孔),然后高压灭菌,灭菌后趁热倒出培养物,用 5%热肥皂水洗刷,自来水冲洗干净。

(3) 吸管:将染菌的吸管及时投入 3%煤酚皂消毒液中浸泡 4 小时后,用 5%肥皂水煮 30 分钟,自来水冲净。

(4) 玻片:用过的载玻片、盖玻片和凹玻片分别浸入 5%煤酚皂溶液内过夜。盖玻片取出后用流水冲净,再用软布擦干后备用。载玻片再放入肥皂水中煮沸 10 分钟后,洗刷,用清水冲净,最后放入 95%乙醇中浸泡片刻,取出后软布擦干后备用。

3. 含油质的玻璃器皿 凡沾有凡士林或石蜡的玻璃器皿,应单独高压灭菌后洗涤,以免玷污其他玻璃器皿。玻璃器皿经高压灭菌后,立即倒出污物,放入 50g/L 碳酸氢钠水中煮沸 1~2 小时,然后用热肥皂水或乙醇浸泡,最后用自来水冲净。玻片以同样的方法处理。

4. 沾有血液制品的玻璃器材 立即投入清水中浸泡过夜或用流水冲净(切勿加热煮沸,以防蛋白凝固在器皿上)。

5. 玻璃器材的包裹与灭菌 各种玻璃器材需正确包裹及捆扎后彻底灭菌。

(1) 吸管:在连接吸头的一端以少许棉花松紧适宜地塞上,以免使用时细菌吸入吸球内,然后用纸条卷好整个吸管(将两端也要包入其中),或将吸管装入金属筒内进行灭菌。

(2) 试管:管口塞入松紧适宜的胶塞或棉塞,塞子的 2/3 塞入管内,1/3 外露,然后用牛皮纸覆盖,用绳扎紧后灭菌。

(3) 培养皿:一般每 10 只同样大小的培养皿用纸包成一包,两端折叠封紧,或将培养皿装入特制的金属筒内灭菌。

(4) 三角烧瓶:瓶口加塞,松紧适宜,然后用牛皮纸覆盖瓶口,用绳将瓶口扎紧后灭菌。



玻璃器材一般采用干烤灭菌法,使温度升至 160℃,维持 2 小时,关闭电源。温度不可超过 160℃,以防纸和棉塞燃烧。待箱内温度自然下降至 40℃ 以下时,方可开启箱门取物。也可采用高压灭菌,但高压灭菌后玻璃器材较潮湿,故不可立即从高压灭菌器内取出,应利用灭菌器内余热将其烘干后取出。

(季建军)

## 第四节 细菌的分离与接种技术



### 目的要求

掌握细菌的各种接种方法。



### 实验材料

1. 菌种 金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌斜面培养物。
2. 培养基 肉汤培养基、半固体培养基、营养琼脂平板。
3. 其他 接种环、接种针、酒精灯等。



### 实验内容

1. 平板划线分离培养法 在被检材料中,常有一种以上的细菌,针对目的细菌进行检验,就必须从混杂有多种细菌的材料中将目的菌分离出来,进而达到纯培养的目的。常用平板划线法有以下几种:

(1) 连续划线法:主要用于杂菌不多的标本。

1) 将接种环用火焰灭菌,待冷后取标本少许。

2) 左手持平板,用中指、无名指、小指及手掌托起平板,示指抵住平板盖外侧,大拇指从平板内侧将盖掀起,盖与平板呈 45°角。

3) 斜持平板(与台面呈 45°角),在酒精灯旁边,右手持已取材的接种环,于平板 1/5 处密集涂布,然后来回作曲线连续划线,线与线间有一定距离,划满平板为止。

4) 划线完毕后,盖好平皿盖并做好标记(标本号及日期等),置 35℃ 培养箱中培养 18~24 小时(图 1-2)。

(2) 分区划线法:适用于杂菌量较多的标本。

1) 持平板的方法同连续划线法。

2) 先将标本涂布于平板 1 区内,约占平板 1/5 面积,接种环灭菌后与第一区接触

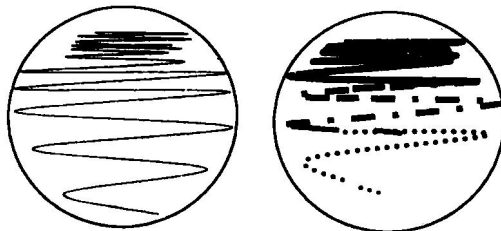


图 1-2 连续划线分离法(左)及培养后菌落分布示意图(右)