

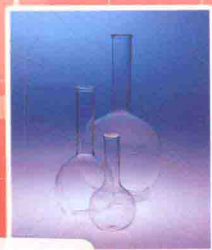


DNA

国家级实验教学示范中心
全国高等院校医学实验教学规划教材

医学微生物学实验教程

主 编 孙玉萍 陈 锋



科学出版社

国家级实验教学示范中心
全国高等院校医学实验教学规划教材

医学微生物学实验教程

主 编 孙玉萍 陈 锋

副主编 王红英 马海梅

编 委 (按姓氏汉语拼音排序)

阿孜尔古丽·阿布都克日木

迪丽达尔·库德热提

刘雪莉

倪 萍

王红英

张春桃

陈 锋

刘素辉

马海梅

孙玉萍

张 蓓

孜来古丽·米吉提

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

《医学微生物学实验教程》包括两章：第一章总论主要介绍微生物学实验目的和要求、实验室规则、微生物学实验室意外的紧急处理办法、微生物学实验室的常用设备及其使用方法以及常用培养基的配制方法。目的是让学生在使用本书之前对微生物学实验课中涉及到的生物安全知识有一定的了解，减少在实验过程中的失误。第二章实验部分介绍了教学涉及的十个实验，每个实验按实验原理、材料和方法、实验步骤、观察方法及注意事项和附件逐项进行编写。便于学生在学习过程中查阅，同时精选了大量色彩清晰的图片（95%来源于本学科实际教学过程中的示教片和培养物图片）附于书后，供学生实验时参考。实验教学大纲、实验教学课件均可参考病原生物学精品课程和微生物学网络课程网站（网址 <http://kczx.xjmu.edu.cn/G2S/ShowSystem/Index.aspx>）。适用临床、检验、预防各相关专业。

图书在版编目(CIP)数据

医学微生物学实验教程 / 孙玉萍, 陈锋主编. —北京: 科学出版社, 2016.3

国家级实验教学示范中心·全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-047736-1

I. ①医… II. ①孙… ②陈… III. ①医学微生物学—实验—医学院校—教材 IV. ①R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 0500560 号

责任编辑: 李 植 / 责任校对: 胡小洁

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 陈 敬

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京市文林印务有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

2016 年 3 月第 一 版 开本: B5(720×1000)

2016 年 3 月第一次印刷 印张: 8 1/2 彩插: 4

字数: 164 000

定价: 29.80 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

医学微生物学是高等医学院校各专业必开的一门重要基础课或专业基础课,主要研究与人类疾病有关的病原微生物的生物学性状、致病机制、机体的抗感染免疫,以及特异性诊断、防治措施,以控制和消灭感染性疾病和与之相关的免疫损伤,提高人类健康水平。而微生物学实验是教学中的主要部分,是临床、检验等相关专业学生获得病原微生物导致的感染性疾病的诊断知识的基础课程,为学生在将来的医疗和疾病控制实践中利用微生物学知识解决感染性疾病治疗和预防等问题奠定学科基础。

本书的编写主要针对当地各民族学生的实际需求,并本着对教学和学生负责的态度,对新编内容进行仔细推敲,精益求精,目的是提高实验教学课堂效果,对使用者有所帮助,同时提高实验教学质量。适用范围包括临床、口腔、麻醉、影像、预防等专业,特点是按照实验课教学内容编排,内容涉及医学微生物的染色、分离培养、鉴定等内容。同时本书为便于学生查阅,提供了医学微生物学实验的常用相关参考资料并强化综合性试验,可以极大的提高学生的自主学习和创新能力。本书编写人员都是一线长期从事医学微生物学教学与科研工作的教师,具有丰富的实验教学经验,编写的实验内容具有很强的实用性、科学性与先进性。在编写过程中,对每个实验的编写力求实用、简明,条理清晰,实验之后的思考题利于学生复习和思考,提高学生分析问题、解决问题的能力。同时精选了大量色彩清晰,95%来源于本学科实际教学过程中的示教片和培养物附于书后,供学生实验时参考。

由于编者水平有限,以及编写时间紧迫,书中难免存在缺点和不足,恳请广大师生给予指正,我们将在今后的教学工作中不断加以补充和完善。

孙玉萍

2016年1月1日

目 录

第一章 总论	1
第一节 医学微生物学实验目的和要求	1
第二节 微生物学实验室规则	2
第三节 微生物学实验室意外的紧急处理办法	2
第四节 微生物学实验室的常用设备及其使用方法	3
第五节 培养基的制备及要求	10
第二章 实验	12
实验一 细菌的基本形态和特殊结构的观察及革兰染色 Observation of basic morphology, structure and gram stain	12
实验二 细菌的人工培养与生化反应 Artificial culture and biochemical reaction of bacterial	23
实验三 细菌的分布、消毒灭菌与抗生素药敏试验 Microbial distribution, disinfection, sterilization and antibiotic sensitivity test	36
实验四 细菌的变异现象观察和致病物质检测 Absolve bacterial variation and pathogenicity substance test	44
实验五 脓汁标本的病原学检查(一) Identification of pathogenic coccus I	51
实验六 脓汁标本的病原学检查(二) Identification of pathogenic coccus II	59
实验七 粪便标本的病原学检查(一) Identification of enteric bacteria I	66
实验八 粪便标本的病原学检查(二)及厌氧性细菌和动物源性细菌生物学特性观察 Identification of enteric bacteria II and observe the festure of anaerobic bacteria and zoonotic bacteria	75
实验九 粪便标本的病原学检查(三)抗酸染色及其微生物形态学观察 Identification of pathogenic coccus III and Acid-fast stain	86
实验十 病毒与真菌的培养特性及真菌孢子染色 Cultivation of Virus and fungus and Spore staining of fungi	98

彩插

第一章 总 论

第一节 医学微生物学实验目的和要求

医学微生物学实验是医学微生物学的重要组成部分,是医学微生物学课程学习过程中不可缺少的实验技能培训环节之一,是理论与实验研究的技术基础,也是将来医学生进入临床工作进行疾病诊疗的重要知识与技能基础。因此实验课是每个医学生完成医学微生物学课程的必经之路。因此为了帮助学生上好实验课,编写符合当地各民族学生的实际需求的《医学微生物学实验教程》十分必要,目的是提高实验教学课堂效果,对使用者有所帮助,同时提高实验教学质量。

本次编写主要依据我校医学微生物学实验教学大纲的要求,结合实验教学经验和现存的实际情况,参考兄弟院校的部分资料以及原校内《医学微生物学实验指导》的基础上编写。每个实验力求实用、简明,条理清晰,提出的思考题便于学生复习和思考,提高学生分析问题、解决问题的能力。在医学微生物学整个实验过程中,始终贯穿“无菌操作”和“生物安全”理念,要求学生做到:实验前预习,达到明确实验的内容、目的、理论依据、操作方法及注意事项,以避免或减少错误的发生;实验过程中坚持严格按照无菌操作要求和方法遵照实验教程所列步骤和仔细观察教师示教依次进行操作;实验结束要如实记录实验结果,并对实验结果积极地思考并进行结果分析,如结果与理论不符,应探讨分析可能的原因以培养训练科研思维能力;实验结束后,根据要求撰写实验报告。

本实验教程内容编排上主要分教师示教和学生操作两部分。示教主要引证理论,使学生对有关理论能有感性认识和更深入的理解;操作可从不同角度进行基本技术训练和反复练习,使学生能熟练地掌握普通光学显微镜检查、涂片染色、分离培养等基本操作技术。

最终的目的是通过实验课程的学习,加深和巩固对医学微生物学理论知识的理解与记忆;掌握本学科相关的基本实验操作技术,树立无菌和生物安全理念;培养学生的动手操作能力及实事求是的科学态度和独立分析问题与解决问题的创新能力,提高学生的学习兴趣。为学生在将来的医疗和疾病控制实践中利用微生物学知识解决感染性疾病治疗和预防等问题奠定学科基础。

第二节 微生物学实验室规则

微生物学实验中所用材料,多具有感染性,因此进入微生物学实验室以后,必须按照实验操作规范,以保证结果准确,防止实验室及环境污染。必须遵守以下各项:

1. 进入实验室应穿白大衣,离室时脱下,反折放回原处,不必要的物品不得带入实验室,必须带入的书籍和文具等应放在指定的非操作区,以免受到污染。无菌操作时必须在超净台里操作,但注意操作过程中不得开紫外灯。

2. 实验室内严禁饮食、吸烟及用嘴舔湿铅笔及瓶签等,也不要以手抚摸头、面等部位。

3. 保持实验室安静,不得高声谈笑或随便走动,实验进行时不准随意进出。

4. 如发生感染或污染等意外时,禁止隐瞒或自作主张不按规定处理,应立即报告指导老师,进行紧急处理。

5. 各种实验物品应按指定地点存放,接触过菌液的吸管、毛细管及玻片等,用后应立即放入消毒缸内,禁止随意放于桌上及冲入水槽内。接种环用后应立即在酒精灯火焰上烧灼灭菌。待消毒或废弃物品必须放在指定地点。同时实验室中物品未经许可不准带出室外。

6. 须送温箱培养的物品,应做好标记后送到指定地点。

7. 实验完毕,整理桌面,需培养的物品要放入孵育箱。打扫干净实验室,关好门窗水电,洗手后离去。

8. 爱护实验室内仪器设备,严格按操作规则使用。节约使用实验材料,不慎损坏了器材等,应主动报告老师进行处理。

第三节 微生物学实验室意外的紧急处理办法

1. 菌液误入口中,应立即吐入消毒容器中,并用 1:1000 高锰酸钾溶液或 3% 双氧水漱口,必要时根据菌种的不同服用适当的抗菌药物预防感染。

2. 菌液污染桌面或地面,取适量 2%~3% 来苏或 0.1% 新洁尔灭于污染面上,30min 后抹去。手上污染活菌,在上述消毒液中浸泡 10~20min 后,再用肥皂水刷洗。衣服污染时,用上述消毒液浸泡 30min 或高压灭菌后清洗。

3. 若皮肤破损应先除去异物,用生理盐水或蒸馏水洗净后,涂 75% 酒精或 2% 碘酊。若发生烧伤,局部涂凡士林、5% 鞣酸或 2% 苦味酸。若发生化学药品腐蚀伤,强酸先用大量清水冲洗,再用碳酸氢钠溶液洗涤中和;强碱则先用大量清

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 滴滴眼以滋润。

4. 若发生火警,须沉着、冷静,切勿惊慌,应立即关闭电闸。如为酒精、乙醚等有机溶液起火,切忌用水扑救,可用沙土等扑灭。

第四节 微生物学实验室的常用设备及其使用方法

一、超净工作台(clean bench)

(一)工作原理

超净工作台是一种局部层流装置,能在局部形成高洁度的工作环境(图 1-4-1)。它由工作台、过滤器、风机、静压箱和支撑体等组成,其原理为在特定的空间内,超净工作台通过风机将室内空气吸入预过滤器,由小型离心风机压入静压箱,再由静压箱进入高效过滤器过滤进行二级过滤。过滤后的空气以垂直或水平气流的状态送出,过滤器出风面吹出的洁净气流具有一定的和均匀的断面风速,将尘埃颗粒和生物颗粒带走,使操作区域达到百级洁净度,形成无菌的高洁净的工作环境,从而满足对空气洁净度的需求。

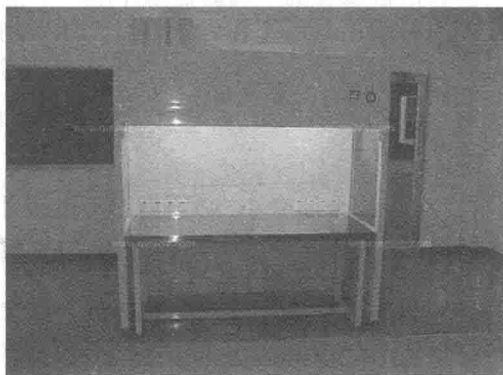


图 1-4-1 超净工作台

(二)优点

使用净化工作台具有工作条件好、操作方便、无菌效果可靠、无消毒药剂对人体危害、占用面积小且可移动等优点。

(三)超净工作台的操作规范

1. 使用前的检查

(1)接通超净工作台的电源。

(2)旋开风机开关,使风机开始正常运转,这时应检查高效过滤器出风面是否

有风送出。

(3) 检查照明及紫外设备能否正常运行, 如不能正常运行则通知实验教师。

(4) 净化工作区内严禁存放不必要的物品, 以保持洁净气流流动不受干扰。

2. 清洗和紫外消毒

(1) 工作台消毒: 实验教师实验前对工作台先经过清洁液浸泡的纱布擦拭台面, 然后用消毒剂擦拭消毒。

(2) 紫外线灭菌: 接通电源, 提前 30min 打开紫外灯照射消毒, 30min 后, 关闭紫外灯, 开启送风机。

3. 使用方法

(1) 接通超净工作台的电源。打开照明开关。**注意: 操作时紫外灯处于关闭状态。**

(2) 旋开风机开关, 使风机开始正常运转;

(3) 实验操作结束后, 清理工作台面, 收集各废弃物, 关闭风机及照明开关, 用清洁剂及消毒剂擦拭消毒;

(4) 最后开启工作台紫外灯, 照射消毒 30min 后, 关闭紫外灯, 切断电源。

二、显微镜(microscope)

微生物个体微小, 必须借助显微镜才能观察清楚它们的个体形态和细胞结构。因此, 在微生物学的各项研究中, 显微镜就成为不可缺少的工具。

(一) 显微镜的种类

根据结构, 显微镜可以分为光学显微镜和非光学显微镜两大类。光学显微镜又可分为单式显微镜和复式显微镜。在微生物学研究中, 主要使用复式显微镜。其中以普通光学显微镜(明视野显微镜)最为常用。此外, 还有暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜、偏光显微镜、紫外光显微镜和倒置显微镜等。

(二) 显微镜的构造

普通光学显微镜的基本结构主要由两大部分组成(见图 1-4-2), 即光学系统和机械部分。光学系统包括物镜、目镜、反光镜(或电光源)、光圈、聚光器等。通常物镜有低倍镜 4 倍、10 倍、高倍镜 40 倍和油镜 100 倍, 其中油镜是微生物实验最常用的物镜。目镜多为 10 倍, 因此使用油镜观察标本时, 放大倍数为 10×100 倍, 可以将 $1\mu\text{m}$ 的细菌放大至肉眼可分辨的 1mm 的物象。

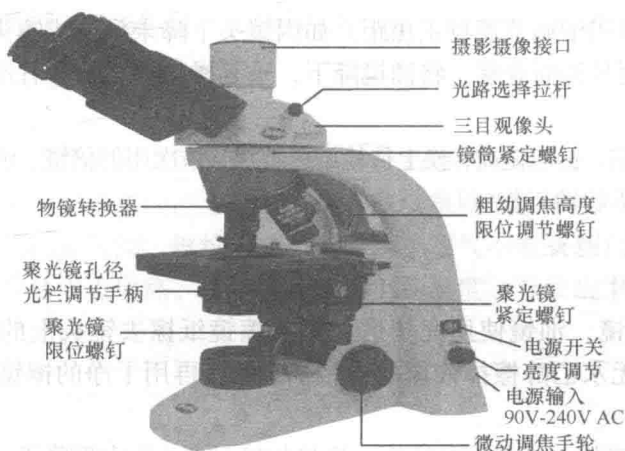


图 1-4-2 光学显微镜的基本结构

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、调节物象焦距、搁置和移动标本。

(三) 显微镜的使用(以光学显微镜油镜为例)

1. 观察前的准备

(1) 将显微镜置于平稳的实验台上，镜座距实验台边沿约为 4cm。坐正，练习用左眼观察。

(2) 调节光源：将低倍物镜转到工作位置，把光圈完全打开，聚光器升至与载物台相距约 1mm 左右。转动反光镜采集光源，光线较强的天然光源宜用平面镜，光线较弱的天然光源或人工光源宜用凹面镜，对光至视野内均匀明亮为止。观察染色装片时，光线宜强；观察未染色装片时，光线不宜太强。

2. 低倍镜观察染色装片

首先上升镜筒，将待检染色装片置于载物台上，用标本夹夹住，将观察位置移至物镜正下方，物镜降至距装片 0.5cm 处，适当缩小光圈然后两眼从目镜观察，转动粗调节器使物镜逐渐上升(或使镜台下降)至发现物像时，改用细调节器调节到物像清楚为止。移动装片，把合适的观察部位移至视野中心。

3. 油镜观察

(1) 提起镜筒约 2cm，将油镜转至正下方。在玻片标本的镜检部位(镜头的正下方)滴一滴香柏油。

(2) 从侧面注视，小心慢慢降下镜筒，使油镜浸在油中至油圈不扩大为止，镜头几乎与装片接触，但不可压及装片，以免压碎玻片，损坏镜头。

(3) 从目镜观察，用粗调节器将镜筒徐徐上升(切忌反方向旋转)，当视野中有

物像出现时,再用细调节器校正焦距。如因镜头下降未到位或镜头上升太快未找到物像,必须再从侧面观察,将油镜降下,重复操作直至物像看清为止。仔细观察并绘图。

(4)再次观察:提起镜筒,换上待检染色装片,依次用低倍镜、油镜观察,绘图。

4. 镜检完毕后的工作

(1)移开物镜镜头。

(2)取出装片。

(3)清洁油镜,油镜使用完毕后,须用擦镜纸擦去镜头上的香柏油,再用擦镜纸沾少许无水乙醇擦掉残留的香柏油,最后再用干净的擦镜纸擦干残留的无水乙醇。

(4)擦净显微镜,将各部分还原。将接物镜呈“八”字形降下,不可使其正对聚光器,同时降下聚光器,转动反光镜使其镜面垂直于镜座。最后套上镜罩,对号放入镜箱中,置阴凉干燥处存放。

(四)使用显微镜的注意事项

1. 使用油镜必须按先用低倍镜观察,再用油镜观察。

2. 下降镜头时,一定要从侧面注视,切忌用眼睛对着目镜,边观察边下降镜头的错误操作,以免压碎玻片而损坏镜头。

3. 擦拭显微镜时要沿直径擦。

4. 使用无水乙醇擦镜头时,注意无水乙醇不能过多,以防溶解固定透镜的树脂。

5. 注意保持显微镜的洁净,对金属部分要用软布擦拭,擦镜头必须用擦镜纸,切勿用手或用普通布、纸等,以免损坏镜头。

三、高压蒸汽灭菌锅(high-pressure steam sterilization pot)

(一)简介

高压蒸汽灭菌锅是一个密闭的、可以耐受一定压力的双层金属锅。锅底或夹层内盛水,当水在锅内沸腾时由于蒸汽不能逸出,使锅内压力逐渐升高,水的沸点和温度可随之升高,从而达到高温灭菌的目的。一般在 0.11MPa 的压力下,121℃ 灭菌 20~30min,包括芽胞在内的所有微生物均可被杀死。如果灭菌物品体积较大,蒸汽穿透困难,可以适当提高蒸汽压力或延长灭菌时间。

高压灭菌锅有卧式、立式、手提式等多种类型,在微生物学实验室,最为常用的是手提式和立式高压蒸汽灭菌锅。和常压灭菌锅相比,高压灭菌锅的优点是

灭菌所需的时间短、节约燃料、灭菌彻底等。其缺点是价格昂贵，灭菌容量较小。

(二) 基本原理

高压蒸气灭菌是将待灭菌的物品放在一个密闭的加压灭菌锅内，通过加热，使灭菌锅隔套间的水沸腾而产生蒸气。待水蒸气急剧地将锅内的冷空气从排气阀中驱尽，然后关闭排气阀，继续加热，此时由于蒸气不能溢出，而增加了灭菌锅内的压力，从而使沸点增高，得到高于 100°C 的温度。导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。

(三) 种类

目前实验中常用的自控高压蒸气灭菌锅 (autoclave)，见图 1-4-3。

(四) 使用方法

1. 首先锅内加入适量的水。切勿忘记加水，同时水量不可过少，以防灭菌锅烧干而引起炸裂事故。

2. 装入待灭菌物品。注意不要装得太挤，以免妨碍蒸气流通而影响灭菌效果。三角烧瓶与试管口端均不要与锅壁接触，以免冷凝水淋湿包口的纸而透入棉塞。

3. 加盖，将锅盖拧紧。

4. 打开电源，并同时打开排气阀，使水沸腾以排除锅内的冷空气。待冷空气完全排尽后，关上排气阀，让锅内的温度随蒸气压力增加到逐渐上升。当锅内压力升到所需压力时，控制热源，维持压力至所需时间。常用 0.1MPa ， 121.5°C ， 20min 灭菌。

灭菌的主要因素是温度而不是压力。因此锅内冷空气必须完全排尽后，才能关上排气阀，维持所需压力。

5. 灭菌所需时间到后，切断电源，让灭菌锅内温度自然下降，当压力表的压力降至“0”时，打开排气阀，打开盖子，取出灭菌物品。

压力一定要降到“0”时，才能打开排气阀，开盖取物。否则就会因锅内压力突然下降，使容器内的培养基由于内外压力不平衡而冲出烧瓶口或试管口，造成棉塞沾染培养基而发生污染，甚至灼伤操作者。



图 1-4-3 自控高压蒸气灭菌锅

(五) 注意事项

1. 待灭菌的物品放置不宜过紧。
2. 必须将冷空气充分排除, 否则锅内温度达不到规定温度, 影响灭菌效果。
3. 灭菌完毕后, 不可放气减压, 否则瓶内液体会剧烈沸腾, 冲掉瓶塞而外溢甚至导致容器爆裂。须待灭菌器内压力降至与大气压相等后才可开盖。
4. 装培养基的试管或瓶子的棉塞上, 应包油纸或牛皮纸, 以防冷凝水入内。
5. 为了确保灭菌效果, 应定期检查灭菌效果, 常用的方法是将硫磺粉末(熔点为 115°C) 或安息香酸(熔点为 120°C) 置于试管内, 然后进行灭菌试验。如上述物质熔化, 则说明高压蒸气灭菌器内的温度已达要求, 灭菌的效果是可靠的。也可将检测灭菌器效果的胶纸(其上有温度敏感指示剂)贴于待灭菌的物品外包装上, 如胶纸上指示剂变色, 亦说明灭菌效果是可靠的。

四、恒温细菌培养箱(culture box)

培养箱是培养微生物的专用设备。制热式培养箱是由电炉丝和温度控制仪合成的固定体积的恒温培养装置, 大小规格不一。微生物实验室常用的培养箱工作容积有 $450\text{mm} \times 450\text{mm} \times 350\text{mm}$ 或 $650\text{mm} \times 500\text{mm} \times 500\text{mm}$, 适用于室温至 60°C 之间的各类微生物培养。目前, 随着科学水平的发展, 培养箱设备的完善程度和价格有很大差别。有各种结构合理、功能齐全的培养箱, 如恒温培养箱(图 1-4-4)、恒温恒湿培养箱、低温培养箱、微生物多用培养箱和二氧化碳培养箱等。有的用计算机控制, 可选择多条时间线变换温差, 从而克服了环境温度的影响, 一年四季均能达到培养要求的温度。

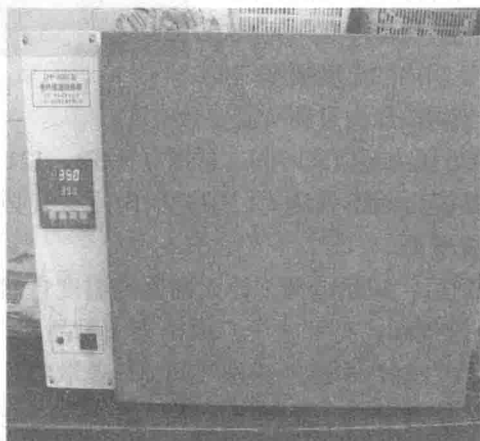


图 1-4-4 恒温培养箱

微生物多用培养箱是集加热、制冷和振荡于一体的微生物液体发酵装置。工作室的温度在 $15\sim 50^{\circ}\text{C}$ 范围内任意选定, 选定后经温控仪自动控制, 保持工作室恒温。同时设有可控硅调速系统, 振荡机转速可在 $1\sim 220\text{rpm}$ 范围内任意调控。

五、恒温干燥箱(drying box)

(一) 简介

干燥箱是用于除去潮湿物料内及器皿内外水分或其他挥发性溶液的设备。类型很多, 有箱式、滚筒式、套间式、回转式等。微生物学实验室多用箱式干燥箱, 大小规格不一。工作室配有可活动的铁丝网板, 便于放置被干燥的物品。制热升温式干燥箱也是有电炉丝和温度控制仪组成, 可调节温度从室温至 300°C 任意选择。有的干燥箱采用导电温度计为敏感元件, 配合晶体管和继电器组成自动控制系统, 克服了金属管型热膨胀控制的缺点。此外, 还有真空干燥箱(配有真空泵和气压表), 可在常压或减压下操作。

(二) 适用范围

此法只适宜玻璃器皿, 金属用具等的灭菌, 含有水份的物质, 不能用这种方法。把待灭菌的物件均匀地放入恒温干燥箱, 加热至 $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ 维持 2h 即可达目的。

(三) 使用方法

1. 将包扎好的待灭物品放于箱内, 注意不要摆得太挤, 以免妨碍气流流通。
2. 关门, 插上电源插头, 拨动开关, 旋动恒温调节器, 至红灯亮。
3. 待温度上升 $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ 时, 借恒温调节器的自动控制, 保持此温度 2h。
4. 两小时后中断电源, 待温度降至 70°C 以下之后, 方可开箱取物, 在这之前切勿自行打开箱门。

六、冰 箱

微生物实验室的冰箱主要有两种: 普通冰箱和低温冷冻冰箱。普通冰箱一般都具有两个柜子, 即鲜藏柜和冷藏柜, 温度分别为 4°C 和 -20°C ; 低温冷冻冰箱温度一般控制在 $-40\sim -80^{\circ}\text{C}$ 。它们都可以用于微生物菌种保藏。鲜藏柜常用于保存

斜面菌种, 保藏时间在 3 个月左右。超过 3 个月, 斜面就会变干, 因此需要转接菌种。如果要长时间保存菌种, 则需要经过处理后, 贮藏于普通冰箱的冷藏柜或低温冷冻冰箱中, 它们的保存时间较长, 一般都在 1 年以上。

第五节 培养基的制备及要求

培养基是按照微生物生长繁殖所需要的各种营养物质, 用人工方法配制而成的营养基质, 其中含有碳源、氮源、无机盐及水分等。一般培养基的主要成份为蛋白质、糖类、盐类、水分等。另外还有一些营养要求较高的细菌, 还须加入血液或血清、鸡蛋、维生素等其他营养物质。有时为了鉴别或抑制某些细菌, 则可加入各种专用基质(如某种糖类、氨基酸等)、指示剂和染料等。

(一) 器材用具

各种琼脂培养基、天平或台秤、高压蒸汽灭菌锅、移液管、试管、烧杯、量筒、锥形瓶、培养皿、玻璃漏斗等。药匙、称量纸、pH 试纸、记号笔、棉花、纱布、线绳、塑料试管盖、牛皮纸报纸等。

(二) 方法步骤

1. 玻璃器皿的洗涤和包装: 清洗、控水分别用报纸包好并放入烘箱中等待灭菌。
2. 培养基的配制方法和步骤:

原料称量: 按照配方正确称取各种原料放于玻璃三角烧瓶中;



溶化: 在三角烧瓶中加入所需水量, 玻棒搅匀, 加热溶解;



调 pH: 用 1N NaOH 或 1N HCl 调 pH, 用 pH 试纸对照;



加琼脂溶化: 加热过程中要不断搅拌, 可适当补水;



塞棉塞和包扎: 注意不要污染棉塞;



高压蒸汽灭菌;



分装: 挂上标签, 注明何种培养基, 备用。

(三) 培养基制备原则

1. 足够和适当的营养成分。籍以满足细菌生长繁殖的要求, 获得典型细菌培养物, 达到研究细菌的形态, 生化反应, 抗原结构及致病力等方面的目的。

2. 合适的酸碱度。培养基的酸碱度直接影响细菌的生长繁殖。一般细菌最合适 pH 为 7.2~7.6。

3. 绝对无菌。培养基务必进行除菌处理, 由于培养基所含成分不同, 除菌的方法也不同。如普通培养基常用高压蒸气灭菌法。

(四) 培养基的主要用途

1. 分离和繁殖细菌。

2. 保存菌种。

3. 鉴定细菌。

4. 生产菌苗、抗生素。

5. 细菌生理学的研究。

(五) 注意事项

1. 称量蛋白胨时要迅速, 防止吸潮。

2. 培养基融化时要不断搅拌以防烧焦。

3. 针对不同的培养基要调节合适的 pH。

4. 培养基灭菌时应按高压蒸汽灭菌锅的操作过程进行, 以免危险发生。

5. 灭菌后培养基要及时处理, 防止凝固或污染。

6. 培养基灭菌后必须在 37℃ 下恒温培养 24h, 确定无菌生长, 方可使用。

7. 制作后, 其贮藏时间有一定限制, 一般室温条件下不超过三周。

第二章 实 验

实验一 细菌的基本形态和特殊结构的观察及革兰染色

Observation of basic morphology, structure and gram stain

【实验类型】

验证型。

【实验目的】

观察细菌的基本形态及特殊结构特点,掌握细菌染色标本的制备、革兰染色法及其结果判断,熟悉革兰染色法意义。了解细菌动力。

【实验内容】

1. 显微镜油镜的原理及使用和维护(示教)。
2. 观察细菌的基本形态及特殊结构(示教)。
3. 观察细菌的动力(示教)。
4. 革兰染色法(操作)。

一、显微镜油镜的原理、使用及维护

【油镜的原理】

油镜头的透镜很小,部分光线由空气进入载玻片折射后分散,不能进入油镜,导致视野亮度不够,物象不清晰,而香柏油的折射率($n=1.515$)与玻璃的折射率($n=1.52$)相近,在玻片和镜头之间滴加香柏油后,可减少光线的分散,使进入油镜头的光线增多,视野亮度增强,从而得到清晰图像(图 2-1-1)。

【油镜的使用方法】

1. 对光 打开光源(若使用人工光源或弱光处用凹面镜,自然光源用平面镜),染色标本观察时光线应强,光圈完全打开至最亮并升高集光器。