

高等医药学校基础课实验系列教材

医学微生物学 实验教程

© 孙剑刚 邓毛子 主编

YIXUEWEISHENGWUXUE
SHIYANJIAOCHENG



科学出版社

高等医药学校基础课实验系列教材

医学微生物学实验教程

孙剑刚 邓毛子 主编

科学出版社

北 京

版权所有,侵权必究

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303

内 容 简 介

本书是高等医药学校基础课实验教材系列之一,内容主要涉及医学微生物学的基本理论、基本实验操作技能以及一些与创新性、应用性相关的综合设计性实验项目。全书共分6篇:第一篇为实验概述,第二篇为细菌学实验的基本技术,第三篇为细菌学各论实验,第四篇为真菌学实验,第五篇为病毒学实验,第六篇为综合性实验。每一实验内容基本上都依照实验目的、实验原理、实验器材、实验方法、实验结果、注意事项与思考题的顺序编写。书末并附有附录、主要参考书目,供读者查阅和参考。

本书的主要使用对象是高等医药院校本专科学生,教学中可根据不同专业要求和具体的学时数选择适当教学内容。

图书在版编目(CIP)数据

医学微生物学实验教程/孙剑刚,邓毛子主编. —北京:科学出版社,2011.9

高等医药学校基础课实验系列教材

ISBN 978-7-03-032216-6

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

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 175929 号

责任编辑:张颖兵 程 欣/责任校对:闫 陶

责任印制:彭 超/封面设计:苏 波

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>

武汉市新华印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011年8月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2011年8月第一次印刷 印张:10 1/4 插页:4

印数:1—3 000

字数:240 000

定价:20.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

为适应新世纪对高等医药人才的要求,迎合高等医药院校实验教学改革的主流,适应本学科的发展及教学需要,并突出学生的能力培养,结合我校的实际情况,我们特编写此实验教程。

本书凝聚了我们在实验教学过程中的经验积累,并借鉴了其他医药院校相关实验教材内容,坚持基本理论、基本知识与基本技能相结合,同时又注意创新性与应用性的培养。本书在突出基本实验技术的同时,适当编入一些综合设计性实验项目,以引导学生在掌握基本技能的基础上,用所学的知识去分析、解决实际问题,真正做到学以致用,为培养高级应用型医学人才创造条件。本实验教程分6篇,33次实验,共127个具体实验项目,书后列有相关附录,便于查阅。另外在每次实验内容之后附有思考题,以便引导学生思索、理解问题和掌握相关知识。在对每个具体实验的编写过程中,力求实验目的明确、原理透彻、实验器材具体、实验方法可行、实验结果准确。

本书以“基础性、实用性、系统性、科学性、创新性”为编写原则。各个实验相对独立,在教学中可根据实际情况灵活选择实验内容进行教学。本书主要供高等医药院校的基础、临床、预防、口腔、影像、护理、检验、药学等专业的本专科生使用,亦可作为从事微生物相关工作的教学、科研、临床工作者的参考书。

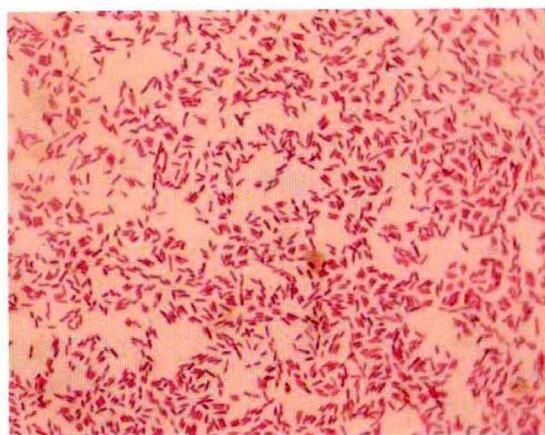
由于编者学识水平和经验有限,以及编写时间紧迫,书中难免存在不足和疏漏,恳请广大同仁及读者予以批评指正。

编者

2011年6月



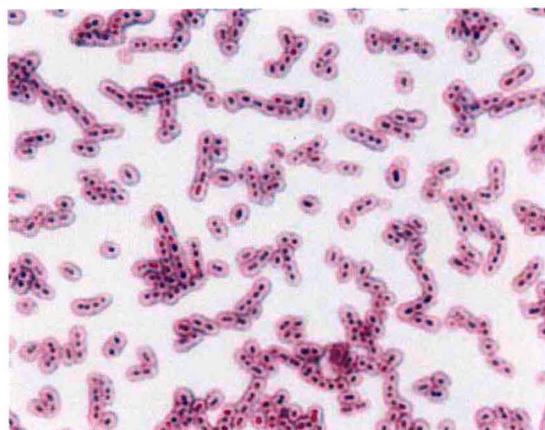
1. 葡萄球菌



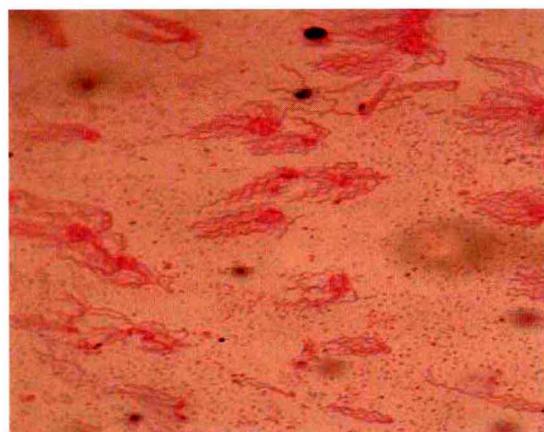
2. 大肠杆菌



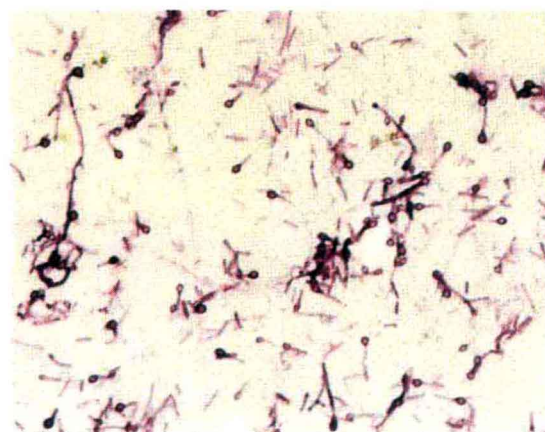
3. 水弧菌



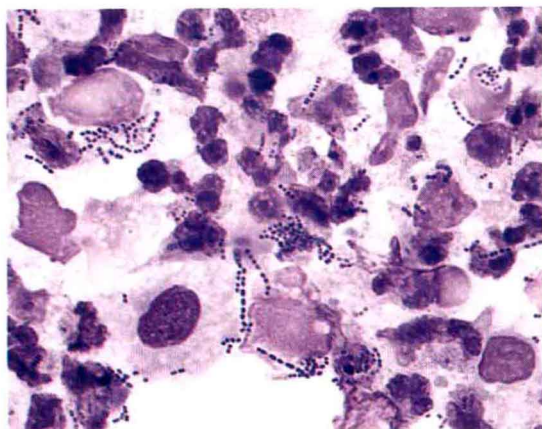
4. 肺炎双球菌荚膜



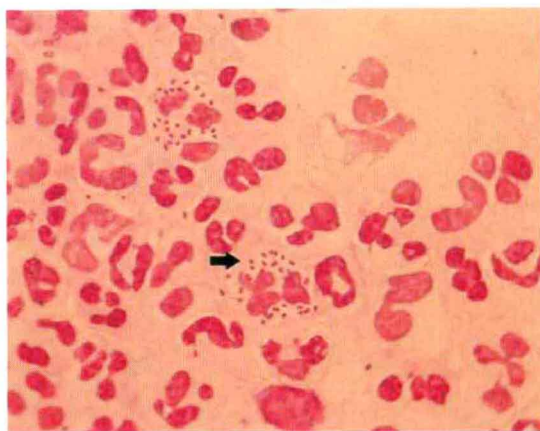
5. 变形杆菌鞭毛



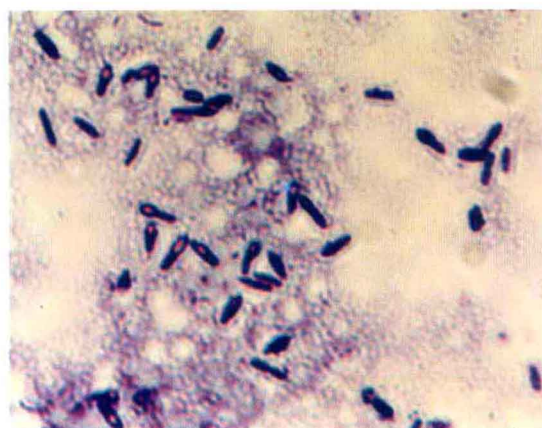
6. 破伤风梭菌芽孢



7. 链球菌



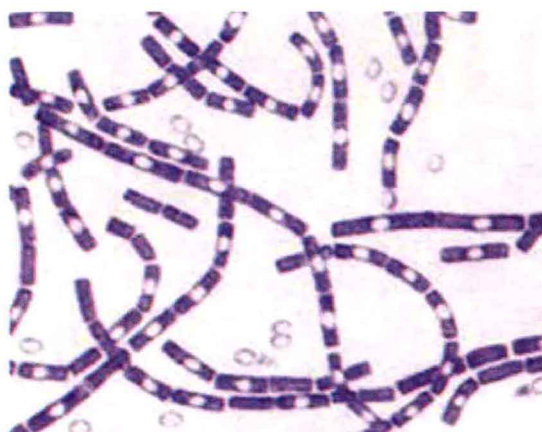
8. 淋病耐瑟菌



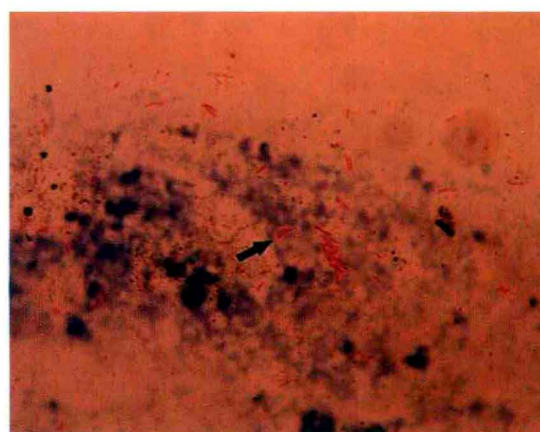
9. 肉毒梭菌



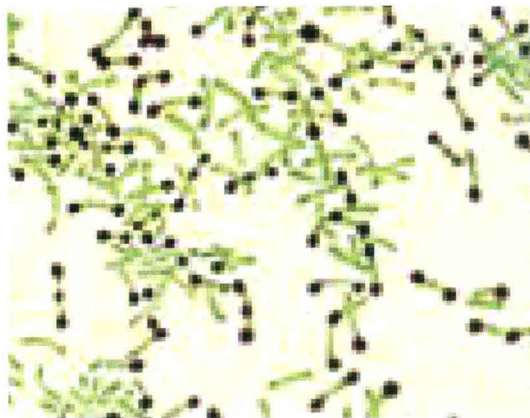
10. 产气荚膜梭菌



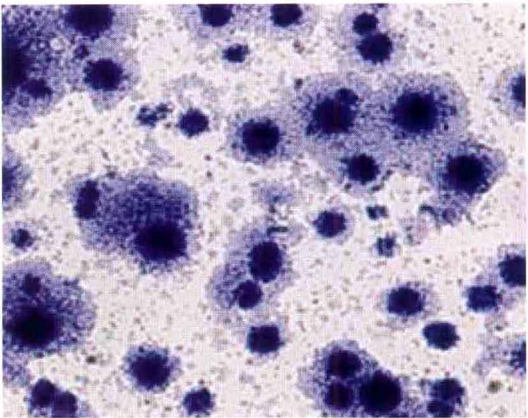
11. 炭疽杆菌



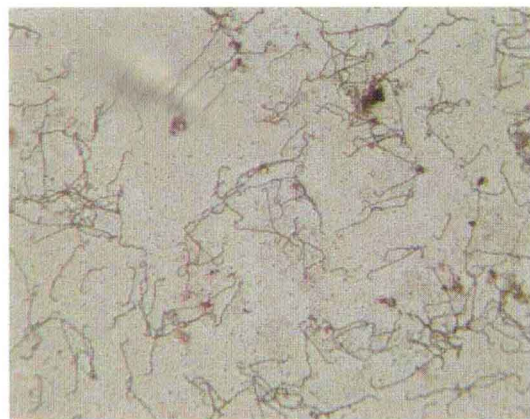
12. 结核杆菌



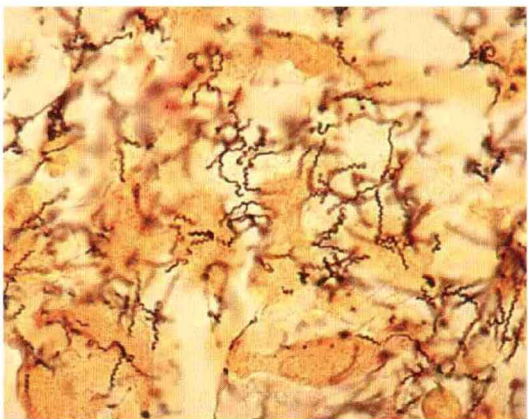
13. 白喉棒状杆菌



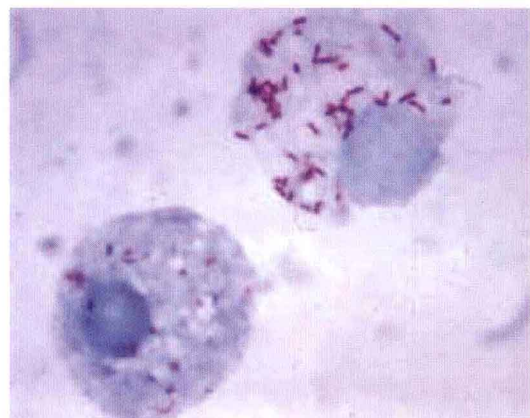
14. 肺炎支原体“荷包蛋”样菌落



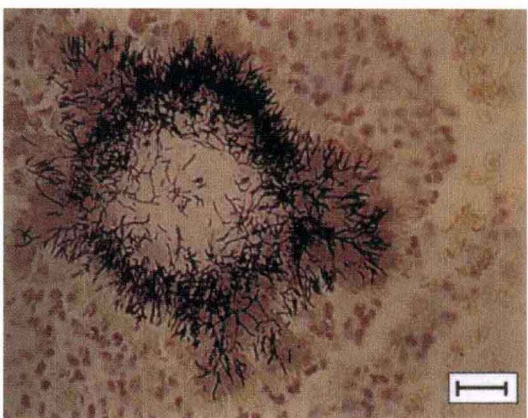
15. 钩端螺旋体



16. 梅毒螺旋体



17. 立克次体



18. 放线菌硫磺样颗粒



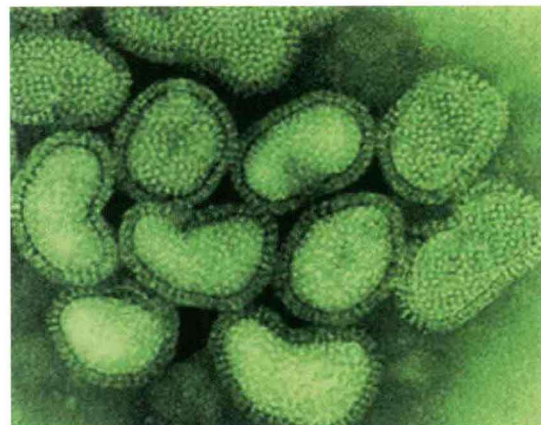
19. 白色念珠菌



20. 真菌大分生孢子



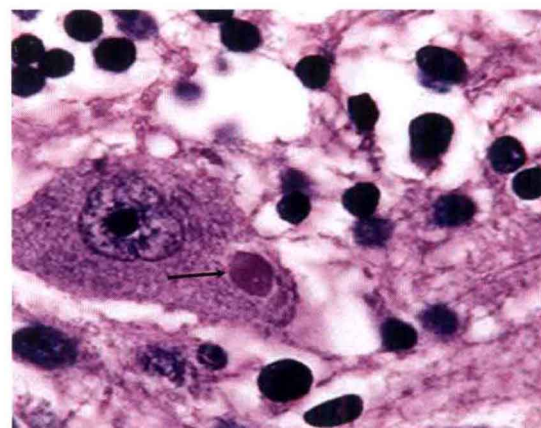
21. 曲霉



22. 流感病毒



23. 麻疹病毒多核巨细胞



24. 狂犬病毒内基小体

目 录

第一篇 实验概述	(1)
医学微生物学实验室规则.....	(3)
实验意外事故的紧急处理.....	(4)
常用实验器皿的处理.....	(5)
油镜的使用与保护.....	(9)
病原微生物实验室生物安全	(11)
第二篇 细菌学实验基本技术	(17)
实验一 细菌的基本形态和特殊结构观察	(19)
实验二 细菌标本不染色检查	(21)
实验三 细菌标本染色检查	(23)
实验四 细菌基础培养基的制备	(30)
实验五 细菌的分离接种技术	(32)
实验六 微生物菌种保藏	(36)
实验七 细菌的生化鉴定	(39)
实验八 正常人体及环境中细菌的检查	(43)
实验九 物理、化学及生物因素对细菌的影响.....	(45)
实验十 细菌的遗传变异	(50)
实验十一 细菌的致病性实验	(53)
第三篇 细菌学各论实验	(57)
实验十二 病原性球菌	(59)
实验十三 肠杆菌科	(67)
实验十四 霍乱弧菌	(74)
实验十五 幽门螺杆菌	(79)
实验十六 厌氧性细菌	(81)
实验十七 分枝杆菌属	(86)
实验十八 棒状杆菌属	(89)
实验十九 其他革兰阴性杆菌	(91)
实验二十 需氧芽孢杆菌	(93)
实验二十一 支原体、衣原体、立克次氏体	(97)
实验二十二 病原性螺旋体.....	(101)
实验二十三 放线菌.....	(106)
第四篇 真菌学实验	(107)
实验二十四 常见病原性真菌的形态特征观察.....	(109)

实验二十五 真菌的培养方法及其菌落特征观察·····	(110)
实验二十六 临床标本中常见真菌的检查·····	(112)
第五篇 病毒学实验 ·····	(115)
实验二十七 病毒的形态学检查·····	(117)
实验二十八 病毒的分离培养技术·····	(119)
实验二十九 病毒的血清学实验·····	(122)
实验三十 病毒的核酸检测·····	(131)
第六篇 综合性实验 ·····	(133)
实验三十一 临床脓汁标本的细菌学检查·····	(135)
实验三十二 药品中金黄色葡萄球菌的检查·····	(138)
实验三十三 水中细菌总数和大肠菌群指数的测定·····	(140)
附录 ·····	(145)
参考文献 ·····	(155)

第一篇

实 验 概 述

YI XUE WEI SHENG WU XUE
SHI YAN
JIAO CHENG

► 医学微生物学实验室规则 ◀

在进行医学微生物实验时,实验人员要有自我安全防范意识,要认识到微生物实验的对象大多是病原微生物,存在着被感染与传染的危险,为保证实验人员的安全和避免病原微生物对实验室的污染,进入实验室的实验人员必须遵守以下规则。

(1) 学生在每次实验课前,必须预习实验内容、明确实验目的、了解实验原理和实验操作过程,若有疑问应课前请教指导教师。

(2) 进入实验室必须先穿好工作服,离室时脱下反叠好带走。不必要的物品如书包、衣物等请勿带入实验室内,必要的书本、文具应放在指定的位置以防污染。

(3) 实验室内应保持安静,不得高声谈笑和随意走动。严禁在实验室内吸烟、进食、饮水和用嘴吸取移液及湿润标签等,也不要以手抚摸头面部及身体其他暴露部位。

(4) 实验操作要小心仔细,严格按操作规程进行。实验过程中若出现问题,如不慎打破菌种管或使有菌材料污染操作台桌面、衣物和皮肤等情况,应立即报告指导教师,切勿隐瞒或擅自处理。

(5) 需培养的实验材料应标明实验者的组别、时间及实验名称,放于教师指定的地方进行培养。培养后的实验材料应放置于教师所指定的地方,实验室中的菌种和实验物品未经教师许可,不准带出实验室。

(6) 实验完毕整理桌面,清理实验用品并归回原处。实验废弃物应放入或倒入指定的容器内,吸过菌液的吸管、毛细吸管、玻片等有菌物品应放入消毒缸内,杜绝乱放乱扔在实验桌面上。

(7) 实验完毕离开实验室前,用肥皂将手洗干净,必要时用消毒液浸泡双手然后用清水洗净。离开实验室时必须关好实验室的水、电、窗、门后方可立刻离开。

► 实验意外事故的紧急处理 ◀

微生物实验时,应严格按照实验操作规程和指导老师的要求进行操作,实验中若不慎发生意外事故,应立即报告指导老师并立刻进行紧急处理。

(1) 皮肤创伤:应先除尽异物,用无菌盐水洗净再涂以活力碘。

(2) 烧灼伤:可涂以无菌液体石蜡、5%鞣酸或2%苦味酸。

(3) 化学腐蚀伤:若遇强酸腐蚀时,则先用大量的清水冲洗,再用5%的碳酸氢钠溶液洗涤中和;若遇强碱腐蚀时,先用大量的清水冲洗,再用5%的醋酸溶液洗涤中和;若眼部受伤,经上述步骤处理后,再滴入1~2滴无菌液状石蜡以滋润眼部。

(4) 吸入菌液:应立即吐入盛有消毒液的容器内,以大量清水或3%双氧水嗽口,并根据所吸入细菌的种类服用相应的抗生素,预防感染。

(5) 菌液溅洒桌面或地面:应立即用抹布浸入0.2%~0.5%84消毒液,覆盖被污染的桌面或地面约30 min后再抹去,若污染菌为芽胞杆菌则应延长消毒时间。若菌液污染手部,应立即将手浸泡于消毒液内10~20 min后用肥皂刷洗和自来水反复冲洗干净。

► 常用实验器皿的处理 ◀

微生物实验经常要用到大量的玻璃、橡胶、塑料和金属等消耗性实验器材,并要求这些器材洁净无菌、pH 值中性,否则实验器材因灭菌不合格、pH 值过高、低或因含有某种化学物质,影响培养基的 pH 值、抑制细菌生长进而影响实验结果。

一、玻璃器皿的处理

1. 主要程序

玻璃器皿的处理流程如图 1-1 所示。

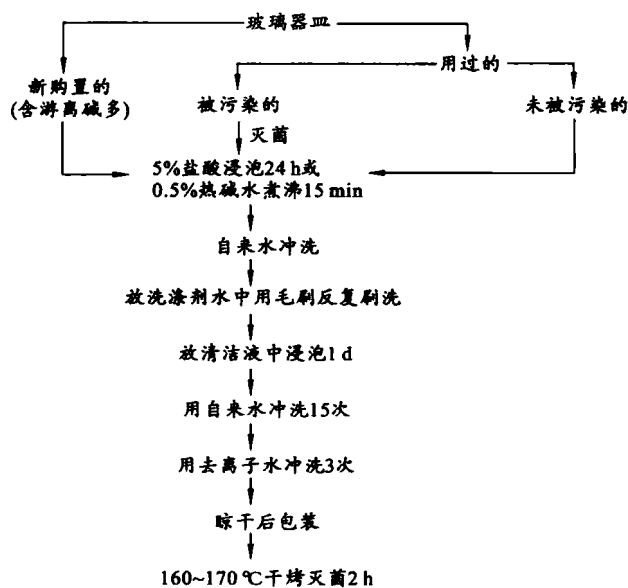


图 1-1 玻璃器皿的处理流程

2. 载玻片与盖玻片

用过的载玻片与盖玻片如滴有香柏油,可用擦镜纸蘸取 30%酒精乙醚,擦去香柏油或浸在 30%酒精乙醚溶液中摇晃使香柏油溶解,或用 5%碱性溶液煮沸 10 min,冷却后用自来水冲洗。然后在稀洗涤液中浸泡 2 h,自来水冲洗并用蒸馏水换洗数次,自然干燥后浸入 95%酒精溶液中备用。使用时将玻片上的酒精沥干,残余的酒精在酒精灯火焰上缓慢烧掉。

检查过活菌的载玻片或盖玻片应在 0.25%新洁尔灭消毒液中浸泡 24 h 后取出,然后按上述处理步骤清洗。

3. 玻璃吸管与玻璃刻度吸管

吸过血液、血清、糖溶液或染料的玻璃吸管或玻璃刻度吸管,用后立即投入底部垫有脱脂棉花、盛有自来水的量筒或标本瓶内(玻璃刻度吸管顶部塞有棉花则应将棉花取出),然后按上述处理步骤清洗。

4. 含油脂的试管

凡沾有凡士林或石蜡的试管,应单独高压灭菌洗涤,避免油脂沾污其他玻璃器皿。高压灭菌后立即取出棉塞并趁热倒去污物,然后将试管倒置铁丝篓内烤干,烤干后用碱性溶液浸泡试管煮沸2次,再用试管刷洗刷,最后用自来水冲洗干净。

5. 培养细菌用的玻璃平皿

培养细菌后的玻璃平皿高压灭菌时,应将平皿放在搪瓷容器中,不要将平皿直接置于高压灭菌器内,避免因高温琼脂融化流出而阻塞排气孔。高压灭菌后应趁热倒出培养物,在进行洗涤晾干、底盖相配,包装备用。

6. 玻璃染色瓶

将沾有染料的染色瓶浸入清洁液中浸泡24 h后用自来水冲洗,晾干后备用。

7. 玻璃器皿清洁程度的判断和清洁液的配制(见表1-1)

玻璃器皿经洗涤后若器皿内壁的水均匀分布成薄层,表示器皿油垢洗去较为洁净。若内壁挂有水珠表明清洗不彻底,还需用清洁液浸泡数小时或数天后,再用自来水冲洗干净。

表 1-1 清洁液的配方

成 份	强酸清洁液	次强酸清洁液	弱酸清洁液
重铬酸钾(g)	63	120	100
H ₂ SO ₄ (ml)	1 000	200	100
蒸馏水(ml)	200	200	1 000

注意 配制清洁液时,操作者要小心认真,戴耐酸手套和防护眼镜,严格按下列步骤操作:

- (1) 按配方称量好重铬酸钾和蒸馏水,然后将重铬酸钾完全溶于蒸馏水中。
- (2) 再按配方把工业用浓硫酸缓慢(以产热很少为宜)加入(1)液中,边加边缓慢搅拌。
- (3) 自然冷却后备用。

新配制的清洁液呈棕红色。当使用过久,清洁液的颜色变暗、发绿或浑浊时,应弃去(深埋地下)重新配制新。配制盛装清洁液的容器应耐酸、耐热、有较大的开口,一般用瓶、缸等玻璃或陶瓷制品。

二、橡胶类制品的处理

(1) 新购置的橡胶类制品(胶塞、胶管、橡皮头)→自来水冲洗→蒸馏水浸泡48 h→蒸馏水煮5 min→晾干或50℃烤干→高压灭菌。

(2) 用过的或被污染的橡胶类制品→自来水煮沸 20 min→自来水冲洗→同上后续步骤。

三、塑料制品的处理

塑料制品具有质地柔软、易出现划痕、不耐热、耐腐蚀能力强等特点。一般处理过程为:用后直接浸泡在 2%~3% 盐酸溶液中过夜→用纱布或棉签蘸去污剂→流水冲洗→晾干。

四、金属器械的处理

(1) 用过的(无污染的)剪刀、镊子等器械→流水冲洗→擦干→包装→高压蒸汽灭菌。若临时急用,可在使用前浸泡于 95% 酒精内,用时取出并经过火焰,待器械上的酒精自行燃烧完毕后即可使用。

(2) 被病原体污染的器械→煮沸 15 min→流水冲洗→同上述步骤。

五、滤菌器的处理

1. 玻璃滤器的清洁

(1) 新购置的滤器:置玻璃滤器洗液(470 ml 蒸馏水+10 g 硝酸钠+28.6 ml 浓硫酸混匀)中浸泡 24 h→流水缓慢冲洗至 pH5.5 左右→用 4 倍体积的蒸馏水缓慢冲洗→再次用蒸馏水缓慢冲洗→烤干→包装→灭菌备用。

(2) 用过的滤器:立即浸泡于水中过夜→流水冲洗 24 h→滤面基本疏通→50℃ 烤干→置清洁液浸泡 24 h→流水冲洗→蒸馏水冲洗→烤干→包装→灭菌备用。

2. 不锈钢滤器的清洁

用清洗剂刷洗新的或用后的滤器→流水冲洗 15 min→去离子水浸泡 24 h→三蒸水浸泡 24 h→干燥→灭菌备用。

六、常用器皿的包装和灭菌

微生物的分离与培养所用器皿在灭菌前应进行包装便于灭菌和储存,常用的包装材料有旧报纸、牛皮纸、硫酸纸、棉布、铝饭盒、金属筒、特制玻璃消毒筒等。

1. 培养皿

玻璃培养皿常用旧报纸或牛皮纸密封包紧,一般以 5~8 套培养皿为一包进行高压蒸汽灭菌,灭菌后置烤箱内烤干备用。

2. 吸管与毛细吸管

干燥的玻璃刻度吸管在其顶端管口约 0.5 cm 处,塞一小段约 1.5 cm 长松紧适中的