

医学微生物学 基础实验技术

主 编 刘先洲 饶邦忠 应惠芳



武汉大学出版社

前 言

医学微生物学基础实验技术,是研究病原微生物的基本生物学特性及致病性的基础实验技术,可为诊断和防治由病原微生物感染所致疾病奠定必要的实验基础。本书根据医药院校本专科生医学微生物学的教学要求,遵循实用性、科学性和先进性的原则,结合编者多年的教学 and 实践经验,从实验目的、材料、方法及结果分析入手,分 30 个实验,较系统和较全面地介绍了医学微生物的基本实验技术。其中包括各类病原微生物的形态与结构检查方法,常见病原微生物的分离、培养与鉴定,细菌代谢产物和致病性的检测,消毒与灭菌,变异现象等。为适应分子生物学技术在微生物学领域的应用需要,我们也介绍了噬菌体、质粒、核酸分子杂交、PCR 等技术的一些基本方法。为了方便读者,在本书附录中,我们给出了常见培养基、试剂、染色液和缓冲液的配制,以及菌种保藏法等。

本书可作为医药院校本专科生的微生物学实验教材,也可作为医院、卫生防疫部门及其他从事微生物实验工作的技术人员的参考书。

本书由湖北医科大学和咸宁医学院两所高校微生物学教研室的部分老师合作编写。张绍金教授主审全书。在编写过程中,得到了两校各级领导的关心与帮助,也得到了武汉大学出版社的领

导及有关同志的大力支持，在此一并致谢。

限于编者的学识水平，书中不当之处，诚望读者批评指正。

刘先洲 饶邦忠 应惠芳

一九九八年元月

目 录

微生物学实验室规则.....	1
实验一 显微镜的结构与使用.....	2
实验二 观察细菌的基本形态与特殊结构.....	6
实验三 细菌不染色标本检查法.....	8
实验四 细菌染色标本检查法	11
实验五 细菌基础培养基的制备	16
实验六 细菌的培养法	21
实验七 观察细菌的生长现象	28
实验八 鉴定细菌常用的生化反应实验	30
实验九 物理因素对细菌的影响	36
实验十 化学因素对细菌的影响	42
实验十一 细菌对抗生素的药物敏感试验	45
实验十二 噬菌体	49
实验十三 细菌的遗传变异	52
实验十四 细菌的分布试验	58
实验十五 动物的实验感染法	61
实验十六 细菌的毒力试验	65
实验十七 病原微生物的核酸检测技术	69
实验十八 病原性球菌	74
实验十九 肠道杆菌	85
实验二十 弧菌	91
实验二十一 厌氧性细菌	94

实验二十二	白喉杆菌	99
实验二十三	结核杆菌	103
实验二十四	支原体、衣原体、立克次氏体	106
实验二十五	病原性螺旋体	111
实验二十六	病原性真菌	118
实验二十七	病毒的形态学检查	123
实验二十八	病毒的培养技术	127
实验二十九	病毒的滴定、空斑技术及血凝试验	132
实验三十	病毒的血清学试验	136
附录	一、一般染色液的配制	141
	二、特殊染色法	142
	三、常用培养基配方	147
	四、常用试剂、清洁液及缓冲液的配制	150
	五、常用菌种保藏法	155

微生物学实验室规则

在进行微生物学实验时，一定要记住我们实验的对象大多是病原微生物，有传染的危险性。因此进入实验室必须提高警惕性，严格遵守下列规则。

- 一、非必需物品尽量不要带入实验室。
- 二、进实验室必须穿好工作服，离室时脱下。
- 三、禁止在实验室内抽烟与饮食，不准随地吐痰。
- 四、要严格遵守无菌操作规则。实验时保持安静，勿高声谈笑或随便走动，以免影响他人实验。
- 五、实验过程中如发生意外，应进行紧急处理。
 1. 皮肤破伤。先除尽异物，用蒸馏水或生理盐水洗净后，涂以2%碘酒。
 2. 灼伤。涂以凡士林油、5%鞣酸。
 3. 吸入病菌菌液。应立即吐出，以大量清水漱口，必要时，根据菌类不同服用相关药物进行预防。
 4. 菌液流洒桌面。立即以抹布浸沾2%~3%来苏或5%石炭酸液后，泡在污染部位经半小时方可抹去。若手上沾有活菌，亦应浸泡于上述消毒液10~20分钟后，再以肥皂水洗。
- 六、吸过菌液的吸管、毛细吸管，要投入含有2%~3%来苏或5%石炭酸液的玻璃筒中，不得放在桌上，亦不可冲洗于水槽内。用过的玻片也应放于含消毒液的器皿内。
- 七、爱护公物，节约使用实验材料。实验完毕后，整理桌面，需培养的物品要放入培养箱，做好实验室清洁；关好水电等，洗手后离室。

实验一 显微镜的结构与使用

显微镜是一种放大仪器。由于微生物的体积微小，因此，显微镜是微生物学实验中的重要工具之一。根据不同的研究目的和要求，可分别选用普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜和电子显微镜等。其中以普通光学显微镜（通常称显微镜）最为常用，尤其是油浸镜（简称油镜）。

实验目的

- 一、学习并掌握油镜的使用技术。
- 二、了解油镜的基本原理。

实验项目

一、普通光学显微镜的构造

显微镜的构造大致如下：

1. 光学部分：接物镜（包括高倍镜、低倍镜和油镜）、接目镜、集光器、反光镜等。
2. 机械部分：镜筒、镜臂、镜座、回转板、倾斜关节、调节器（包括粗调节器和细调节器）、载物台、光圈、次台等。

二、显微镜的使用方法

材料

普通光学显微镜、香柏油、擦镜纸、细菌染色标本片等。

方法

1. 油镜的识别 显微镜油镜头上常有下列几种标记：

- (1) 放大倍数是 $90\times$ 或 $100\times$ 。
- (2) 镜头前端常有一黑圈。
- (3) 油镜前面的透镜最小。
- (4) 刻有“油”或外文“HI” (homogene immersions) “oil oel” 等字样。

2. 油镜的使用程序

(1) 对光：显微镜直立在桌上，将集光器升起与载物台孔平行，并将虹彩光圈轻轻开至最大，再转动反光镜，使光线集中于集光器。光强时用平面，光弱时用其凹面。

(2) 放置标本片：将标本片放置在载物台上，用弹簧夹或标本推进器固定，将待检部分移置接物镜下。

(3) 观察：先用低倍镜找到标本所在处，再换油镜观察。使用油镜时，须在载玻片上先滴加香柏油一滴，并置台孔中央，眼睛从镜筒侧面观察，并顺时针方向扭动粗螺旋，使镜筒徐徐下降，让油镜头浸入油内接近标本表面，并轻轻接触玻片，然后将眼睛移至目镜，边观察边向上（逆时针方向）徐徐扭动粗螺旋，至视野中看到模糊物像时，再换用细螺旋调至物像清晰为止。调节时千万不可使用强力将物镜任意下降，以免压碎标本片，甚至将贵重油镜头损坏，检查完毕，向上扭动粗螺旋将镜筒提起，取下标本片，用擦镜纸将油镜头上的油擦净。

三、显微镜的保养

1. 显微镜是贵重的精密光学仪器，使用时应爱惜，避免碰撞，更勿随意拆散玩弄。拿显微镜时，必须用双手，一手持镜臂，一手托镜座。

2. 每次实验前用纱布擦去显微镜外面的灰尘，接物镜、接目镜须用软绸或擦镜纸拭擦，切不可用粗布、粗纸，以免损害透镜。不要随意抽出接目镜，以免灰尘落入镜筒，影响清晰度。

3. 用油镜时，不可使镜臂弯曲，致使载物台倾斜，香柏油外溢。非油镜头不可与香柏油接触。

4. 显微镜的光学部分，如镜头、反光镜等，应避免日光照射；强酸、强碱、氯仿、酒精、乙醚等都能去漆或损坏机件，不可使用。油镜每次用毕，须立即以擦镜纸或软绸布擦净油渍。如香柏油已干或镜头模糊不清，可用擦镜纸沾少许二甲苯擦净，并随即用干擦镜纸擦干。因二甲苯能溶解粘固透镜的胶质，日久致使镜片移位或脱落，故尽量少用。

5. 显微镜用毕，将接物镜转成“八”字形，集光器稍下降，然后转动粗调节器，使镜筒下移，以避免接物镜与集光器相碰受损，然后送入镜箱。

附：油镜的原理

使用油镜要加香柏油的原理：因为油镜的透镜很小，从载玻片透过的光线通过空气 ($n=1.0$)，因介质密度不同，发生折射现象，使射入镜筒的光线很少，物像不清。若在油镜与载玻片中间加入和玻片折射率 ($n=1.52$) 相近的香柏油 ($n=1.515$)，则使通过的光线不致产生折射而损失，因此能清楚地看到物像，如图 1-1 所示。

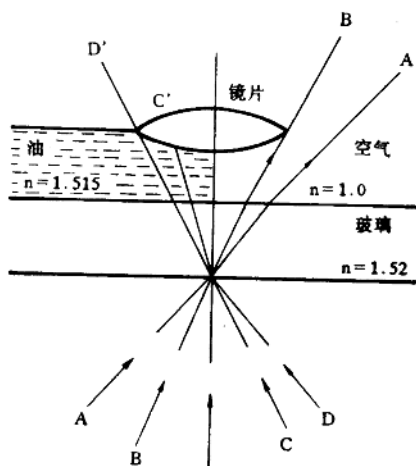


图 1-1 显微镜油镜的原理

注意事项

1. 油镜头的识别。
2. 显微镜的使用方法步骤及保养。

思考题

1. 在使用油镜时，能否用其他种类的油剂或水来代替香柏油，为什么？
2. 在使用高倍镜或低倍镜观察标本时，能否像油镜那样使用香柏油，为什么？

(饶邦忠)

实验二 观察细菌的基本形态 与特殊结构

细菌是一类种类繁多、分布广泛的单细胞原核生物，在适宜的环境下，保持着一定的形态。细菌的基本形态可分为球菌、杆菌、螺形菌（或弧菌）三大类。球菌按其分裂方向与分裂后排列情况又分为葡萄球菌、链球菌、双球菌等；杆菌也有球杆菌、分枝杆菌、棒状杆菌之分；螺形菌中有弧菌和螺菌。

细菌具有细胞壁、细胞膜、细胞浆、核质等基本结构。某些细菌还有荚膜、芽胞、鞭毛、菌毛等特殊结构。运用相应的特殊染色法予以染色，将有助于某些特殊结构的检视和菌种的鉴别。

实验目的

- 一、认识细菌的基本形态和特殊结构。
- 二、细菌的特殊结构与医学实践的关系。

实验项目

一、观察细菌的三种基本形态

材料

葡萄球菌、肠道杆菌、霍乱弧菌或水弧菌形态染色片。

方法

1. 球菌：葡萄球菌，革兰氏阳性（紫色），呈葡萄状排列。

2. 杆菌：如大肠杆菌，革兰氏阴性（红色），两端钝圆，排列无一定规律。

3. 弧菌：如水弧菌为革兰氏阴性（红色），菌体弯曲成弧形或逗点状，排列无一定规律。

二、观察细菌的特殊结构

材料

变形杆菌、肺炎球菌、破伤风杆菌形态染色片。

方法

1. 鞭毛：如变形杆菌，用鞭毛染色法，可见菌体呈深红色，周身鞭毛呈红色。

2. 荚膜：如肺炎球菌，用革兰氏染色，可见菌体染成紫色（革兰氏阳性），常成双排列，菌体周围有一未着色之空圈即荚膜所在处。

3. 芽胞：如破伤风杆菌，用革兰氏染色，菌体染成紫色（革兰氏阳性），菌体顶端有一个圆形未着色的芽胞，使整个菌体呈鼓锤状。

注意事项

球杆菌（如大肠杆菌）与弧菌的区别。

思考题

1. 细菌的基本形态是否永恒不变？在哪些情况下可以发生改变？

2. 细菌的特殊结构与医疗实践各有何关系？

（饶邦忠）

实验三 细菌不染色标本检查法

一般认为鞭毛是细菌的运动器官。有鞭毛的细菌，具有真正的运动，能定向地由一个地方较快速地泳动到另一个地方。没有鞭毛的细菌，由于体重微小，而受所处环境中液体分子的冲击，呈左右前后位置变更不大的颤动，不具有真正运动的能力。能否运动是某些细菌的特征之一，可以帮助鉴别菌种。许多杆菌和螺形菌有鞭毛，能运动；一般球菌无鞭毛，不能运动。

检查细菌有无运动的方法颇多，有悬滴法、压滴法、暗视野显微镜和相差显微镜检查法、半固体琼脂培养基法，其中以半固体琼脂培养基法（见实验七）和压滴法较为常用。

实验目的

- 一、了解悬滴法和压滴法观察细菌运动的基本技术。
- 二、学会在显微镜下识别细菌的运动性和非运动性。

实验项目

一、悬滴法

材料

1. 菌种：绿脓杆菌和葡萄球菌 8~12 小时肉汤培养物。

2. 其他：凹玻片、盖玻片、凡士林、眼科镊等。

方法

1. 取两张凹玻片，用火柴棒于凹窝周围涂凡士林少许。

2. 取两张盖玻片，用无菌接种环分别挑取绿脓杆菌及葡萄球菌肉汤培养物2~3环，分别放在两块盖玻片中央（若为固体培养物，则须先加生理盐水2~3接种环于盖玻片上，然后用接种环取菌苔少许放于盐水中，磨散呈云雾状）。

3. 分别将两块凹玻片反转，覆盖于盖玻片上，使盖玻片的菌液正居凹窝中央，然后轻按凹玻片使其与盖玻片粘合紧密。

4. 两手持凹玻片两端，迅速翻转过来，使菌液垂悬于凹窝中心，置显微镜载物台上。

5. 将显微镜光圈缩小或降低集光器，先用低倍镜找到悬滴边缘，并移至视野中央，然后用高倍镜检查（因凹玻片较厚，油镜焦距很短，故一般不能用油镜进行检查）。

二、压滴法

材料

1. 菌种：同悬滴法

2. 其他：载玻片、盖玻片、眼科镊等。

方法

1. 用无菌接种环分别挑取绿脓杆菌及葡萄球菌肉汤培养物2~3环，分别置于两载玻片中央。

2. 用眼科镊取载玻片，分别压盖于两菌液上，即成压滴（先使盖玻片的一边接触菌液，慢慢放下，以免气泡产生）。

3. 置载物台上，同悬滴法在高倍镜下观察细菌的形态及运动。

注意事项

1. 在悬滴法中，菌液悬滴不能与凹玻片接触。
2. 在压滴法中，进行压滴操作时，要防止气泡发生。

思考题

1. 细菌不染色标本检查法有何优缺点？
2. 在显微镜下，绿脓杆菌和葡萄球菌的运动有何不同？为什么？
3. 常用于观察细菌运动的实验有哪几种？各有何优缺点？

(饶邦忠)

实验四 细菌染色标本检查法

细菌个体微小，无色透明，未经染色时，在显微镜下仅能粗略地看到其大小和形态，欲观察清楚，必须经过染色。染色后，尚能识别细菌的各种不同结构，并可协助鉴别细菌。

染色法分为单染色法和复染色法。单染色法是采用单一染料（如石炭酸、复红、结晶紫、美兰等）对细菌涂片进行染色，此法操作简便，适用于菌体一般形态的观察，但不能鉴别细菌。复染色法是用两种或两种以上染料进行染色，有助于鉴别细菌。复染色法种类很多，主要有革兰氏染色法和抗酸染色法，尤以前者应用最广。此外，尚有对细菌的芽胞、鞭毛、荚膜、核质、细胞壁、荧光色素等特殊染色法。

实验目的

一、学习并初步掌握革兰氏染色法的操作技术，并通过以后的实验达到熟练操作。

二、初步掌握细菌涂片制作过程，熟悉单染色法（美兰染色法）和抗酸染色法的基本步骤。

实验项目

一、革兰氏染色法

革兰氏 (Gram) 染色法是丹麦细菌学家 Christian Gram 于 1884 年创立, 是细菌学中使用最为广泛的一种染色法。利用此法, 可将所有的细菌区分为两大类, 革兰氏阳性菌 (细菌染成紫色) 和革兰氏阴性菌 (细菌染成红色)。

材料

1. 菌种

葡萄球菌、大肠杆菌琼脂斜面 18~24 小时培养物。

2. 染色液: 结晶紫染液、卢戈 (lugol) 碘液、95% 酒精、稀释石炭酸复红染液。

3. 其他: 生理盐水、载玻片等。

方法

1. 细菌涂片标本的制作

(1) 涂片

1) 取一张洁净无油的载玻片, 以红蜡笔中线分开成两等份。用接种环按无菌操作法取灭菌生理盐水置载玻片两边 (每边一接种环)。

2) 用灭菌接种环在葡萄球菌琼脂斜面上挑取菌苔少许, 与载玻片一边的生理盐水混匀, 涂布成直径约 1 厘米大小的均匀薄膜涂片 (若采用液体培养物, 不用生理盐水, 直接用接种环取 1~2 环菌液涂片即可)。再以同样方法在玻片另一边制作大肠杆菌涂片。烧灼接种环灭菌后插入试管架上。

(2) 干燥

涂片标本最好在室温中待其自然干燥。如需快干, 可将玻片