

微生物学实验

安徽医学院三年級甲班編

高等教育出版社

微生物学实验

安徽医学院三年級甲班編

高等教育出版社

本书为安徽医学院三年級甲班学生編写的,于1958年在教育与生产劳动相结合展覽会上展出,經該院推荐我社出版。

本书共分为八章,内容包括:微生物学实验的常用器械、染色及染色剂的配制、微生物学实验的基本操作、清洁消毒与灭菌、生物制品的简单介绍等,并有九个实验指导。

本书可供綜合大学、师范学院生物系和医学院学生参考。

微生物学实验

安徽医学院三年級甲班編

高等教育出版社出版 北京宣武門內承恩寺7号

(北京市书刊出版业营业登记证出字第054号)

人民教育印刷厂印装 新华书店发行

統一书号 13010·047 开本 787×1092 $\frac{1}{32}$ 印張 2 $\frac{18}{16}$

字数 57,000 印数 0001—2,500 定价 (7) 洋 0.26

1959年8月第1版 1959年8月第1次印刷

目 录

第一章 緒言	1
一、微生物学实验的重要性	1
二、微生物学实验的目的	1
三、微生物学实验的主要方法	1
四、微生物学实验的注意事项	1
第二章 医学微生物学实验室常用器械介绍	2
一、显微镜	3
二、白金耳(鉋耳)	7
三、白金針(鉋針)	7
四、酒精灯	8
五、載玻片	8
六、吸管	8
七、平碟	9
八、L型玻棒	9
九、糖发酵管	9
十、染色用品	10
第三章 染色及染色剂的配制	10
一、染色操作	11
二、实验室常用的染色法	12
三、常用染色剂的配制	14
第四章 培养基的一般介绍	15
一、培养基的一般要求	15
二、培养基的分类	16
三、培养基的制备过程	17
四、几种培养基的成份及制作方法介绍	19

五、培养基表解	23
第五章 微生物学实验基本操作	26
一、细菌的显微镜检查	27
二、细菌的接种培养	28
三、动物试验	34
第六章 清洁消毒与灭菌	36
一、玻璃器皿的清洁消毒	37
二、灭菌	38
三、常用化学灭菌剂、消毒剂	40
第七章 生物制品的简单介绍	40
一、产生人工自动免疫的生物制品	40
二、产生人工被动免疫的生物制品	42
三、生物制品分类举例	44
第八章 临床微生物学检查法	44
一、临床检验材料收集的注意点	45
二、检验材料和其中可能含有的细菌的关系	46
三、检验材料的收集与微生物学检查法简单介绍	47
四、临床微生物学检查的一般过程	51
实验指导	52
实验一	52
实验二	54
实验三	57
实验四	60
实验五	64
实验六	68
实验七	72
实验八	77
实验九	82

第一章 緒言

微生物學實驗的重要性 微生物學是一門獨立的生物學，也是一門實驗性的科學。學習微生物學是為了將來在實際工作中能加以應用。因此，學習微生物學的時候不能光學理論而脫離實踐，一定要使學到的理論和實踐結合起來。也只有這樣，學到的理論才是鞏固的和有用的。所以，實驗在微生物學的學習過程中是一個非常重要的環節。

二、微生物學實驗的目的 通過微生物學實驗不僅可以幫助我們了解、熟悉微生物的性狀，還可以在實驗中學到許多實際的操作技術，對我們今后的應用有很大的幫助。

三、微生物學實驗的主要方法 在我們實驗室中，常用的實驗方法有：形態觀察（微生物形態、菌落形態）、培養、生物化學反應、血清學反應、動物試驗等。在整個實驗過程中我們必須基本掌握以上各種方法。

四、微生物學實驗的注意點 由於醫學微生物學實驗的對象是致病的微生物，對我們是有害的。因此，在實驗的時候，我們必須嚴格地注意操作過程的正確與安全，並須加強無菌觀點。這樣，一方面可以避免致病微生物作用於自己或別人，另一方面也可以使實驗正確而順利地完成。因此，在實驗時必須遵守以下規則：

1. 實驗時必須穿著白色工作衣，如條件許可，在實驗後應加以消毒；

2. 細菌培养物或檢驗材料若不慎污染桌面、衣服及地面时，应立即用2%来苏儿溶液或5%石炭酸溶液处理半小时后，方可洗净；

3. 实验过程中凡沾有細菌的廢物如吸过菌液的吸管及沾有細菌的涂片等不可随便乱丢，必須立即投入装有5%石炭酸的消毒缸内；

4. 实验过程中如发生玻璃割伤皮肤、口中吸入菌液等情况时，应立即报告实验室指导老师，求得即时处理，以免发生危险；

5. 实验室中应保持安静，不得高声談笑；

6. 实验完毕后，应将桌面整理清洁，用过的物品放回原处。需要孵育的及需要灭菌的东西放到指定的地点，以便由实验室工作人员统一送去孵育及灭菌；

7. 实验完毕后离开实验室前，脱下白色工作衣，双手在2%来苏儿溶液中浸泡2—3分钟，再用清水洗净。然后，可以离开实验室；

8. 为了使实验顺利地进行，提高实验效果，在实验前应该做好预习工作，以掌握本次实验的理论内容及具体的操作步骤；

9. 为了保证安全起见：书本、笔记、讲义一律不得放在实验桌上。复杂的实验步骤不易记忆时，可将主要内容写在小卡片上，以便实验时查阅；

10. 对实验仪器材料应尽量爱护，损坏时必须向指导老师报告，并在损物簿上登记。

第二章 医学微生物学实验室 常用器械介绍

我们在实验室中经常要接触和应用到许多东西。最常用到的有显微镜、白金耳、白金针、酒精灯、载玻片、刻度吸管、试管、糖发酵管、L型玻棒、染色用品、菌种和检查材料等等。此外，还有些仪器（如冰箱、温箱、水箱）虽然实际操作中应用不

到或很少用到，但是这些仪器对整个实验过程的进行是有很大作用的。在此，仅对我们在实验操作时最常用到的一些东西，作一个简单的介绍。

一、显微镜 在微生物学实验时，我们经常要观察微生物的形态。但是微生物很小，最大的细菌其长度不过十微米左右，肉眼根本看不到。因此，必须借助于显微镜的放大作用，

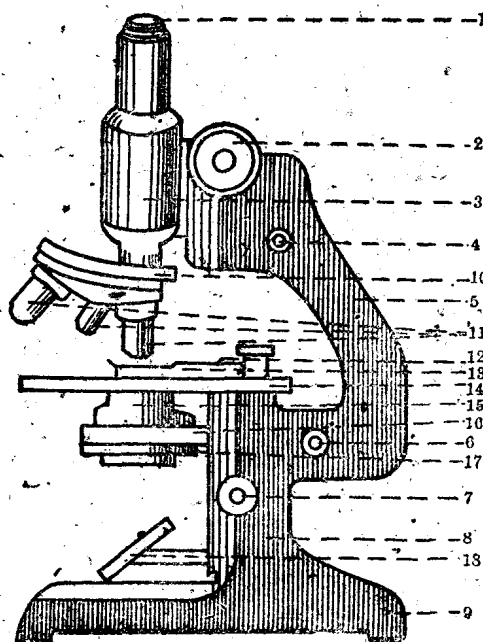


图 1. 普通显微镜构造:

1. 接目镜; 2. 粗调节器; 3. 镜筒; 4. 细调节器; 5. 镜臂;
6. 倾斜关节; 7. 次台调节器; 8. 支柱; 9. 镜座; 10. 逆转板;
11. 接物镜; 12. 弹簧夹; 13. 标本片; 14. 载物台; 15. 集光
- 器; 16. 次台装置; 17. 光圈; 18. 反光镜。

4

才能对微生物的形态进行观察。显微镜的种类很多,有普通显微镜、暗视野显微镜、位相差显微镜、荧光显微镜、电子显微镜等等。它们各有各的用途。在我们实验操作时所用到的仅是普通显微镜:

1. 普通显微镜 在以前几个学期的实验中,我们已经熟悉了显微镜的用法。但是,由于用到油镜的机会很少,对油镜的使用方法还不够熟练,而微生物学实验中又经常要用到油镜,因此,在介绍显微镜的使用方法时将着重地介绍一下油镜的用法。拿到显微镜后,应从以下几方面来着手操作:

(1) 清洁 在使用显微镜前,应先用布将镜身擦拭一遍,同时用绸巾擦拭镜头。倘若发现镜头上沾有已干的香柏油时,应用二甲苯将它擦去,否则妨碍观察。

(2) 调节光线 为了使视野中的光线适宜,更便于观察起见,因此,使用显微镜的第一步就应该先调节好光线(尤其是应用油镜观察时,视野较暗,若光线不能调节适当的话,观察起来很困难)。调节光线可在低倍镜下进行,并从以下二方面来着手:

i. 反光镜的调节 在天然光线下列用平面反光镜即可。但若天然光线不足或使用人工光源时,应用凹面反光镜;

ii. 集光器的调节 主要调节集光器的高度及光圈的大小。集光器越靠近载物台则光线越强;光圈放得越大光线也越强。

(3) 观察 当光线调节好以后,即可将制好的标本片放到载物台上进行观察。观察时应先使用低倍镜,将所需要观察

的範圍調節至視野中。然後換用油鏡頭來進行仔細的觀察。油鏡頭的直徑很小，視野往往很暗，為了让更多的光線進入油鏡頭，防止因散光而引起光線的損失，因此，在標本片上應加一滴香柏油（香柏油的折光系數與玻璃的折光系數相近），使標本片與鏡頭之間有一層香柏油存在，這樣，可以減少光線的損失而增加視野的亮度。香柏油可在標本片未放上載物台前先滴好。使用油鏡頭時，由於鏡頭與標本片非常靠近，因此，在放下鏡筒時必須從旁觀察，以防止鏡筒放下時將標本片壓碎。一般可先將鏡筒放下使它與標本片接觸，然後一面觀察，一面用細調節器再行調節至視野清晰為止。

香柏油價格較貴，實際應用時也可以液狀石蠟來代替，效果也很好。

(4) 注意點

i. 顯微鏡是貴重儀器，使用時必須小心愛護，不可重放。在拿取過程中應避免振蕩；

ii. 顯微鏡使用完畢時，應先用布將鏡身擦拭一遍，然後放進木箱內。切不可放在日光中曝曬；

iii. 顯微鏡中最重要的一个另件是鏡頭。因此，在使用時對鏡頭應特別注意保護。應該防止鏡頭放下時壓碎標本片而同時造成鏡頭的損壞。油鏡頭用過後，應立即用擦鏡紙將油擦去。在擦鏡時最好不用二甲苯，因為二甲苯固然能溶解香柏油使香柏油容易擦去；但二甲苯也能溶解固定鏡片的膠質，常用二甲苯後可使膠質溶解，而使鏡片容易脫落，故二甲苯以少用為宜。

2. 電子顯微鏡 電子顯微鏡在一般實驗時用不到。由於其放大倍數特別高，因此，對研究工作有很大幫助。在此僅將其構造用圖簡單介紹一下。

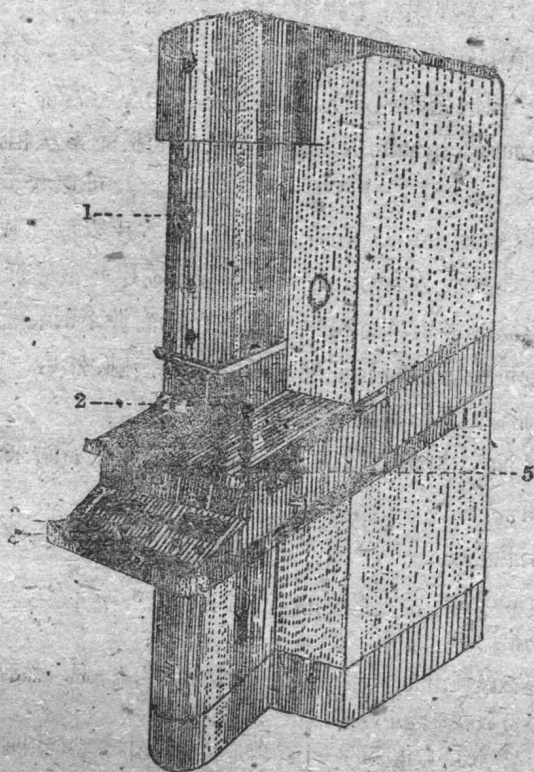


图2. 电子显微镜构造:

1. 放标本处; 2. 物象观察处; 3. 放大率调节钮; 4. 标本移动, 焦点调节钮; 5. 照片摄影处。

虽然, 电子显微镜在研究工作上有很大价值, 但是, 电子显微镜只能观察死的微生物, 不能观察活的微生物, 因为, 活的微生物会被电子枪所放射的电子波所杀死, 又由于电子显微镜构造复杂、价格昂贵, 目前还不能普遍地应用, 因此, 电子显微镜的使用就受到了一定的限制。

二、白金耳(鉑耳)

在微生物学实验中经常要挑取细菌来做涂片标本或接种至培养基上。常用的挑取细菌的器械就是白金耳。它是由粗0.5毫米、长5—10厘米的白金丝或镀铬合金丝(电炉丝之一)所做成。白金丝的一端弯成圈状,另一端固定于金属的柄上,柄外包有电木,可以防止传热。白金耳的具体用途可有以下几个方面:

1. 挑取菌落菌苔或沾取菌液以制作涂片标本;

2. 挑取细菌,接种于固体或液的培养基;

3. 沾取少量的盐水或血清以供制作涂片标本或进行玻片凝集反应。

三、白金针(鉑针) 白金针也是挑取细菌用的。它与白金耳的区别在于它的末端不弯成圈状而是直的。当接种细菌

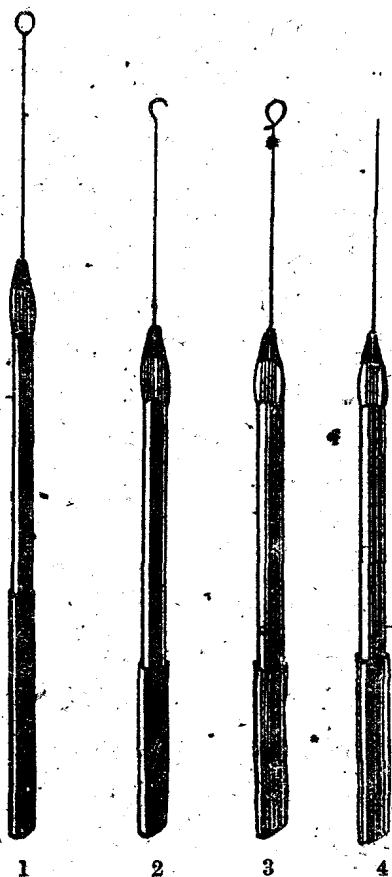


图3. 白金耳与白金针:

1. 标本的白金耳; 2. 3. 做得不正确的白金耳; 4. 白金针。

于半固培养基及双醣培养基时，常用到白金針。

白金針与白金耳經常用来进行細菌接种。为了不使培养基被杂菌污染而妨碍培养的结果，因此，在使用白金針与白金耳之前必須进行燒灼灭菌。燒灼灭菌的方法是：手持白金針或白金耳的柄，将它們倒置过来，让火焰燒灼白金絲，至燒紅为止。燒紅后亦可再将金属柄通过火焰数次，稍待冷却后即可沾取細菌。当使用完毕后，应立即放在火焰上燒灼灭菌。切不可将沒有灭菌的白金針或白金耳放在实验桌上，因为这样很容易引起細菌的传播。这一点很重要！虽然看起来很容易做到但在具体操作时有时会被忽略，应加以注意。

四、酒精灯 与一般实验中应用的酒精灯相同。在点火时千万不可将已燃点的酒精灯的灯头直接去点燃另一个酒精灯，以防止发生危险。使用酒精灯时应本着节约的原则，不用时立即熄灭。

五、載玻片 即一般常用的載玻片。微生物学实验中进行玻片凝集反应及制作涂片标本时經常要使用載玻片。在使用前应先布擦去上面的油污（或先在火焰上通过一下再用布擦，更为方便）。玻片用好后应立即投入消毒缸内。

六、吸管 与一般化学实验中所应用的刻度吸管相同。但在使用前須先行消毒灭菌。为了防止在吸取过程中标本和吸取者口中的微生物互相污染，因此，在吸管上端的管腔中塞有棉花。吸管常用来吸取菌液、血清及盐水（如果吸管所吸取的材料不作培养的话，那么吸管可以不必灭菌消毒）。已經吸过材料的吸管在未清洗消毒前不能再次应用，但是吸取盐水者則例外。吸管的大小有好几种，常用者有容积 1 毫升、2 毫

升、5毫升、10毫升等數种。根据吸取材料的需要,选用适当大小的吸管。

使用方法:用~~用~~吸液体至刻度以上,然后用食指末端按住吸取端的管口,用其他四指握住管子,轻轻松开食指液体即可滴出。

七、平碟 平碟由一个圓型的玻璃皿及比皿略大的皿盖所合成。

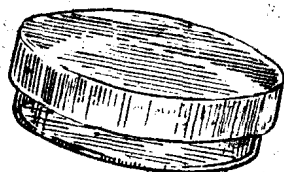


图4. 平碟。

培养基分装于平碟中即成平板,可

供細菌培养用。

八、L型玻璃棒 普通玻璃直棒燒热后弯成L型即成(如图5)。平板用涂布法进行細菌接种时,常要应用到L型玻璃棒。

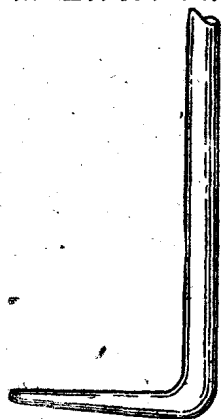


图5. L型玻璃棒。

普通的小試管,在这个小試管中含有一个倒置的小管。在小試管内可装入液体培养基、指示剂及被試驗的糖(培养基加入后,不能完全充盈在倒立的小管中,經高压灭菌后,小管中即可充滿培养基,因此,不会妨碍結果的觀察)。常用的指示剂为溴甲酚紫。如果种入的細菌能分解該种糖而产酸产气的話,那么,产生的气体就会充积在倒立的小管中,同时产生的酸也会使溴甲酚紫由紫色变为黄色;如果种入的細菌能分解該种醣类只产酸不产气的話,那么,只有培

九、糖发酵管 为了試驗細菌分解某种醣类的能力,在实验中常用到醣发酵管。我們在实验室中經常接触到的一种就是所謂杜亨氏管。杜亨氏管是一个



倒置的小管

图 6. 杜亨氏发酵管。色代表麦芽糖、白色代表甘露醇、黑色

代表蔗糖。

培养基颜色由紫变黄而倒立的小管中并无气体的积留；如果种入的细菌根本不能分解该种糖的话，那么二种变化都不会产生。这样就很容易判断出结果来。为了记录的方便，常用⊕来代表细菌能分解该种糖而产酸产气；用+来代表细菌能分解该种糖只产酸不产气；用-来代表细菌不能分解该种糖。

在实验中常要观察某种细菌对数种糖的分解能力，因此要用几个糖发酵管来进行试验。为了区别起见，可在杜亨氏管的管壁上贴上有色的小纸条以某种颜色代表某种糖，习惯上常用红色代表葡萄糖、黄色代表乳糖、蓝

十、染色用品 染色用品包括染色盘、染色架、冲洗水壶等。在制备染色标本时经常要用到。染色盘专供放置盛染色剂的染色瓶、染色架用来放置正在进行染色的标本片。染色架、染色盘应放在清水冲洗处的附近，以便于使用。染色剂的瓶取用后，应该立即放回原处，不可乱放，以免需要时找不到。

第三章 染色及染色剂的配制

细菌是一种由原生质构成的单细胞生物，体积很小。用

普通显微镜观察时,虽然可以看到它的形态、大小,但是无法推测它的种类。因此,在观察细菌时,常常观察已经染色的染色标本,这样观察起来既清楚又方便,而且还可以从它们染色的特性不同来帮助我们推测它是属于那一类的菌种。个别的细菌仅仅以染色标本即可作出判断或初步的诊判断。各种细菌对各种染料的亲和力各不相同,因此也就显示了不同的染色性。

细菌的原生质部分呈酸性,因此易与硷性染料相结合,所以经常应用的染料多为碱性的。在微生物学实验中,应用到酸性染料的机会很少。

一、染色操作

1. 标本的制作 以无菌操作术用白金耳取检查材料(如为菌液就滴在玻片上;如为菌苔还需先取1—2白金耳的生理盐水稀释。)于载玻片上涂布均匀。

2. 标本干燥及固定 标本涂好,即可放在室温中干燥。为了缩短干燥时间,也可利用火焰温度(切勿放在火焰上)烘干,将干燥了的标本,在火焰中迅速通过2—3次。

固定有三个作用:(1)杀死细菌;(2)使菌体原生质凝固于玻片上,这样,染色时即不易被染料和水冲洗掉;(3)易染色。

标本固定后,即滴加染料进行染色。染色后要水洗干净(如作复合染色,在换用复染剂以及酒精脱色的前后,都须水洗)。几乎每一步都穿插着水洗操作。水洗即用清水冲去玻片上的染料或脱色剂。

标本着色后,用吸水纸(可用许多张订成一本)吸干或微热烘干(多用前一种)。

二、實驗室常用的染色法

1. 单一染色法

(1) 染料 单染色为一种染料进行着色, 最常用者为吕氏美藍。

(2) 操作步骤 (i) 在固定好的标本上滴加吕氏美藍染料, 染色一分鐘, 以清水冲洗干淨; (ii) 以吸水紙吸干, 即可鏡杆。

2. 复合染色(鉴别染色法) 同一种細菌对于某些染料的結合力或易染程度是不同的, 有的細菌不被某种染料着色而被另一种染料着色, 因此, 复合染色就根据这个道理, 在染色过程中利用了两种染料。一种染料未被染上則被脫色剂脫去, 再用第二种染料复染就能染上顏色。

3. 革兰氏染色法

(1) 染料 初染剂——草酸鉍結晶紫溶液。

媒染剂——革兰氏碘液;

脫色剂——95%酒精;

复染剂——稀釋复紅溶液。

(2) 操作步骤 于制好的标本片上滴加草酸鉍結晶紫
 染色一分鐘 → 水洗 → 革兰氏碘液 → 一分鐘 → 水洗 → 95%酒精 → 脫色 30 秒鐘 → 水洗 → 稀釋复紅
 染色 30 秒鐘 → 水洗 → 吸干。

4. 抗酸染色 常用于結核杆菌、麻风杆菌染色。因为这类細菌不易被普通染色剂着色, 必須加媒染剂和加温才能染上顏色。着色后又不易被酸(盐酸、硫酸、硝酸、醋酸)、硷、酒