

医学微生物学 实验技术

主 编 饶邦忠



全国优秀出版社
武汉大学出版社

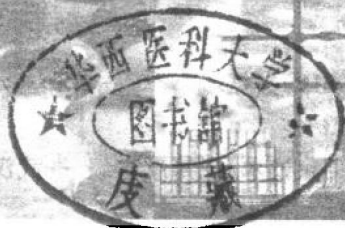
276237

R37-33

R151

2002

C.1



医学微生物学 实验技术

主 编 饶邦忠

编 委 邓兆群 刘斌波 闵 磊
刘先洲



00120591

武 汉 大 学 出 版 社
全 国 优 秀 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

医学微生物学实验技术/饶邦忠主编. —武汉: 武汉大学出版社, 2002. 2

ISBN 7-307-03465-4

I. 医… II. 饶… III. 医药学: 微生物学—实验
IV. R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 007517 号

责任编辑: 黄汉平 责任校对: 程小宜 版式设计: 支 笛

出版发行: 武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)

(电子邮件: wdp4@whu.edu.cn 网址: www.wdp.whu.edu.cn)

印刷: 湖北省国营人民大垸农场印刷厂

开本: 787×1092 1/32 印张: 5.75 字数: 131 千字

版次: 2002 年 2 月第 1 版 2003 年 1 月第 2 次印刷

ISBN 7-307-03465-4/R·66 定价: 8.00 元

版权所有, 不得翻印; 凡购买我社的图书, 如有缺页、倒页、脱页等质量问题者, 请与当地图书销售部门联系调换。

前 言

医学微生物学是一门基础医学课程,《医学微生物学实验技术》是与之配套的书籍,旨在突出病原微生物的生物学性状及致病性的基础实验技术,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,遵循适用性、科学性、先进性和启发性的原则,从实验目的、材料、方法、结果分析及思考题等方面入手,较为系统和较为全面地介绍了医学微生物学的基本实验技术,主要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。随着分子生物学技术在微生物学领域的广泛应用,本书也介绍了噬菌体、质粒、核酸分子杂交、PCR 等技术。为了方便读者,本书在附录中列举了常见培养基、试剂、染色液和缓冲液的配制,以及菌种保藏方法等,在每个实验的最后列出了思考题,其目的是增强读者的思维想象能力。

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。

本书在编写出版过程中,得到了武汉大学教务部、医学院各级领导的关心和帮助,也得到了武汉大学出版社的大力

支持，在此一并表示衷心的感谢。

限于编者的学识水平，书中不当之处，诚望读者批评指正。

饶邦忠
2002年1月

微生物学实验室规则

微生物学是一门实验性很强的学科，在做实验时，经常用到病原微生物，因此，在进入实验室期间，必须严格遵守下列规则。

一、进实验室必须穿好工作服，离室时脱下。非必需物品不要带入实验室。

二、禁止在实验室内抽烟与饮食，不准随地吐痰，注意保持室内整洁。

三、要严格遵守操作规程。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。

四、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。

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冲洗后，涂以 2% 碘酒。

2. 灼伤：涂以凡士林油、5% 鞣酸。

3. 菌液进入口腔：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，盖在污染部位半小时方可抹去。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、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。

目 录

微生物学实验室规则	1
实验一 显微镜的构造与使用	1
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	9
实验四 细菌染色标本检查法	12
实验五 细菌的分布试验	18
实验六 细菌基础培养基的制备	21
实验七 细菌的分离培养法	26
实验八 观察细菌的生长现象	33
实验九 鉴定细菌常用的生化反应实验	36
实验十 物理因素对细菌的影响	42
实验十一 化学因素对细菌的影响	49
实验十二 细菌对抗生素的药物敏感试验	53
实验十三 噬菌体	57
实验十四 细菌的遗传与变异	60
实验十五 动物的实验感染法	67
实验十六 细菌的毒力试验	71
实验十七 病原微生物的核酸检测技术	76
实验十八 病原性球菌	82
实验十九 肠道杆菌	96

实验二十	弧菌·····	102
实验二十一	厌氧性细菌·····	105
实验二十二	白喉杆菌·····	111
实验二十三	结核杆菌·····	115
实验二十四	支原体、衣原体、立克次氏体·····	118
实验二十五	病原性螺旋体·····	123
实验二十六	病原性真菌·····	131
实验二十七	病毒的形态学检查·····	136
实验二十八	病毒的培养技术·····	140
实验二十九	病毒的滴定、空斑技术及血凝试验·····	146
实验三十	病毒的血清学试验·····	151
附 录	·····	156
一、	一般染色液的配制·····	156
二、	特殊染色法·····	157
三、	常用培养基配方·····	163
四、	常用试剂、洗液及缓冲液的配制·····	167
五、	常用菌种保藏法·····	173

实验一 显微镜的构造与使用

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、熟悉显微镜的保养技术。
- 三、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” (homogeneous immersions)、“oil oil”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，更不能随意拆散玩弄。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。因二甲苯能溶解凝固透镜的胶质，日久会使镜片移位或脱落，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，然后送入镜筒。

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。

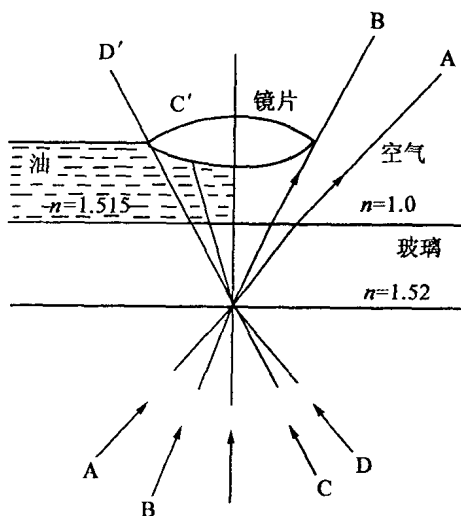


图 1-1 显微镜油镜的原理

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形、杆形、螺形（或弧形）三大类，分别称为球菌、杆菌、螺形菌（或弧菌），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，将有助于细菌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、思考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，革兰阳性（紫色），呈葡萄状排列。
2. 杆菌：大肠杆菌，革兰阴性（红色），两端钝圆，排列无一定规律。
3. 弧菌：如水弧菌，革兰阴性（红色），菌体弯曲呈弧形或逗点状，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，用革兰染色，可见菌体染成紫色（革兰阳性），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，用革兰染色，菌体染成紫色（革兰阳性），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有何关系？

（饶邦忠）