

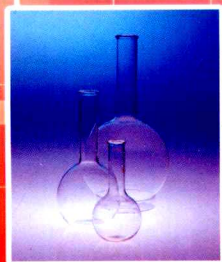
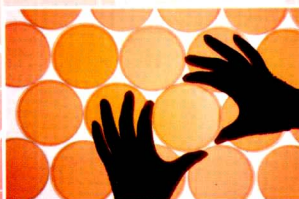
DNA

全国高等院校医学实验教学规划教材

微生物学实验教程

(案例版)

主 编 江 滢 王 和



科学出版社

全国高等院校医学实验教学计划教材

微生物学实验教程

(案例版)

主 编 江 滢 王 和

副主编 康颖倩 苑天红

编 者 (按姓氏笔画排序)

王 和 王 菲 王梅竹

江 滢 吴晓娟 余晓玲

苑天红 罗振华 赵 亮

贺 娟 康颖倩 綦廷娜

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本实验教程根据教育部教学大纲关于“三基”教学的要求,兼顾临床医学专业与药学专业,以专科、本科及硕士研究生为主要教学对象,共分为5篇,包括细菌学总论、常见病原性细菌及其感染的检查、其他原核细胞型微生物和真菌、病毒学、药学微生物学实验技术。其中共有67个独立实验,附录包括常用实验仪器和实验室生物安全、实验室器材的处理与消毒灭菌、常用培养基的制备与灭菌、常用溶液及染色试剂的配置。

本实验教程的特点是以微生物学基本实验技术为重点,通过实验或临床案例的引导,开展微生物学实验课教学。尝试以案例教学法进行实验课的教学改革新模式,使学生掌握基本实验操作技术的同时,注重培养学生独立观察和思考、独立分析问题和解决实际问题的能力以及建立团队协作的精神。使用者可根据不同层次、不同专业的培养目标以及实验教学条件,选择性地开设实验。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验教程:案例版 / 江滢,王和主编. —北京:科学出版社,2011
(全国高等院校医学实验教学规划教材)

ISBN 978-7-03-029770-9

I. 微… II. ①江… ②王… III. 微生物学-实验-医学院校-教材 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 247065 号

责任编辑:许贵强 朱 华 李国红 / 责任校对:宋玲玲

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

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>

明辉印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011年1月第一版 开本:787×1092 1/16

2011年1月第一次印刷 印张:13 1/2 插页:2

印数:1 5 000 字数:319 000

定价:25.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

案例教学法在国外医学院校是常用的教学模式之一,近年来在国内一些学科也有应用。案例教学法的基本做法是根据教学大纲要求,以典型案例为中心,在教师的主导下,启发学生独立思考,对案例所提供的材料与问题进行分析研究,根据实验目的与要求设计实验方案、分析与判断实验结果、提出应用的见解与决策,提高学生发现问题、分析问题和解决问题的能力。

医学微生物学是医学重要的基础课程与实验学科,与其他基础医学、临床医学及药学课程紧密联系。本实验教程以医学微生物学基本实验技术为重点,通过实验或临床案例的引导,为医学与药学以及基础与临床课程的学习与交流搭建联系的桥梁。

本实验教程根据教育部教学大纲关于“三基”教学的要求,兼顾临床医学专业与药学专业,以专科、本科及硕士研究生为主要教学对象。本书分为5篇,共67个实验,使用者可根据不同层次、不同专业的培养目标以及实验教学条件,选择性地开设实验。

本书的编者均为贵阳医学院微生物学教研室具有长期教学与科研工作经历的教师与实验技术人员,根据教学的具体需要广泛收集了国内外传统与现代技术方法。但由于学科的迅速发展以及编写时间紧迫,以致难免存在某些不尽如人意的缺陷甚至错误之处,敬请读者批评指正。

编 者

2010年6月

微生物学实验规则

微生物学实验是微生物学教学的重要组成部分,目的在于培养学生基础理论、基本知识、基本技能以及在此基础上的独立思考、观察、分析和解决问题的能力,使学生养成实事求是、严肃、认真的科学态度以及勤俭节约、爱护公物、团结协作的良好品德习惯。

为了保证微生物学实验课的顺利进行,达到相应的教学效果,参加实验者必须按照生物安全的基本原则严格遵守以下规则。

(1) 实验课前认真预习本次实验的内容,阅读案例,查看案例相关资料,对案例提出的问题认真思考,根据实验目的与要求提出实验的初步方案和预期结果。

(2) 进入实验室人员必须穿白大衣,必要时须穿戴实验室专用的口罩、帽与隔离衣,无关物品不得带入实验室,带入实验室的书籍和文具等应放在指定的清洁区。

(3) 在实验室内不得进行与实验活动无关的行为,不得高声谈话与随意走动,保持实验室肃静。

(4) 实验操作过程中需要注意

1) 按规定拿取、使用和放置实验设备与材料,爱惜和节约使用。

2) 实验设备与材料不得私自拆卸或带出实验室。若发生损坏或受实验材料污染,须及时报告指导教师并按有关规定进行处理,禁止隐瞒或自行处理。

3) 用过的实验材料与器械须按要求放到指定位置,禁止随意放置、丢弃或冲入水槽。

(5) 实验结束后做好实验室的清洁工作,关好水电开关、门窗,洗手或消毒后离开实验室。

目 录

前言

微生物学实验规则

第 1 篇 细菌学总论

实验 1	常用显微镜及其构造和使用方法	(1)
实验 2	细菌基本形态的观察	(5)
实验 3	细菌特殊结构的观察	(6)
实验 4	细菌动力的观察	(7)
实验 5	细菌涂片的制作	(9)
实验 6	细菌的染色方法	(10)
实验 7	培养基的制备和应用	(17)
实验 8	细菌的人工培养方法	(22)
实验 9	细菌生长现象的观察	(27)
实验 10	细菌分解代谢产物的检查	(31)
实验 11	细菌合成代谢产物的观察	(40)
实验 12	自然界环境中细菌的检查	(43)
实验 13	正常人体细菌的检查	(46)
实验 14	物理因素对细菌的影响	(49)
实验 15	化学因素对细菌的影响	(53)
实验 16	生物因素对细菌的影响	(55)
实验 17	菌种保藏及其常用方法	(61)
实验 18	细菌变异现象的观察	(65)
实验 19	细菌 L 型变异的诱导与观察	(69)
实验 20	细菌质粒的分离与提取	(71)
实验 21	细菌质粒转化	(72)
实验 22	细菌耐药基因检测与鉴定	(74)
实验 23	细菌侵袭性感染	(76)
实验 24	细菌外毒素感染	(77)
实验 25	细菌内毒素感染	(78)
实验 26	吞噬细胞的抗感染作用	(80)
实验 27	中和抗体的抗感染作用	(82)
实验 28	致敏淋巴细胞的抗感染作用	(83)

第 2 篇 常见病原性细菌及其感染的检查

实验 29	葡萄球菌属	(89)
实验 30	链球菌属	(91)
实验 31	奈瑟菌属	(93)
实验 32	病原性球菌感染的检查	(96)
实验 33	埃希菌属	(97)
实验 34	志贺菌属	(100)

实验 35	沙门菌属	(102)
实验 36	肠道杆菌感染的检查	(105)
实验 37	厌氧芽胞梭菌	(107)
实验 38	无芽胞厌氧菌	(109)
实验 39	弧菌属	(111)
实验 40	需氧芽胞杆菌	(114)
实验 41	棒状杆菌属	(117)
实验 42	分枝杆菌属	(120)

第 3 篇 其他原核细胞型微生物和真菌

实验 43	放线菌	(122)
实验 44	支原体	(124)
实验 45	立克次体	(127)
实验 46	衣原体	(129)
实验 47	螺旋体	(131)
实验 48	真菌的形态与培养	(135)
实验 49	浅部感染真菌的检查	(138)
实验 50	深部感染真菌的检查	(140)

第 4 篇 病 毒 学

实验 51	病毒的形态与结构的观察	(143)
实验 52	病毒分离培养技术	(144)
实验 53	病毒致病作用的观察	(149)
实验 54	病毒包涵体的观察	(152)
实验 55	病毒的血清学检查	(153)
实验 56	病毒感染的快速诊断方法	(156)

第 5 篇 药 学 微 生 物 学 实 验 技 术

实验 57	药物的体外抗菌试验	(163)
实验 58	抗生素效价的微生物学测定	(166)
实验 59	注射剂的无菌检验	(169)
实验 60	药品染菌量的检查	(170)
实验 61	药品中的金黄色葡萄球菌检测	(172)
实验 62	药品中的大肠埃希菌检测	(174)
实验 63	药品中的铜绿假单胞菌检测	(176)
实验 64	药品中的破伤风梭菌检测	(178)
实验 65	药品中的沙门菌检测	(179)
实验 66	注射剂细菌内毒素的检查	(181)
实验 67	药物体外抗菌试验中的细菌 L 型检查	(183)
参考文献		(186)

附录

一、常用实验仪器与生物安全实验室	(187)
二、实验室常用器材的处理与消毒灭菌	(195)
三、常用培养基的制备与灭菌	(197)
四、常用溶液及染色试剂的配制	(205)

第 1 篇 细菌学总论

实验 1 常用显微镜及其构造和使用方法

微生物的体积微小,因此微生物的形态和结构需要用显微镜放大适当倍数才能被肉眼所见。显微镜是微生物学实验观察微生物形态与结构常用的仪器,主要包括光学显微镜与电子显微镜。了解显微镜的构造及其原理和使用方法,有利于更好地利用显微镜观察微生物。

一、光学显微镜及其构造

光学显微镜的种类较多,常见包括普通光学显微镜、暗视野显微镜、相衬显微镜、荧光显微镜等,主要由机械系统和光学系统组成,通过两组汇聚透镜组成的光学折射成像系统对图像进行放大。

(一) 普通光学显微镜

1. 基本结构及其功能 普通光学显微镜(light microscope)是微生物学实验常用的一种光学显微镜,现简单介绍其基本构造(图 1-1)及功能。



图 1-1 普通光学显微镜

(1) 机械系统

镜筒:位于显微镜的前上方,上端连接目镜,下端连接物镜转换器。

镜臂:位于镜筒的后下方,是支持镜筒和移动显微镜时的握持部位。

镜柱:连接镜座和镜臂,起支持镜臂的功能。

镜座:位于显微镜的底部,用于固定整个镜体。

屈光度调节环:可通过调节屈光度来补偿左、右眼视力差。

物镜转换器:位于镜筒下端,上有 3~4 个圆孔,可装配不同放大率的物镜,旋转物镜转换器可选择使用不同放大率的物镜。

载物台:载物台为放置标本的平台,中央有一圆孔,为通光孔。载物台上有标本夹,用于标本的固定和前、后、左、右移动。

载物台移动手轮:旋转手轮可使载物台前、后、左、右移动。

调焦器:是调节焦距的装置,分粗调焦器和细调焦器,可来回旋转以上、下移动载物台或移动镜筒以调节焦距。粗调焦器转动时,镜筒升降距离大,用于粗略调焦;细调焦器转动时,镜筒升降距离小,用于精确调焦。用粗调焦器未找到物像前,不要使用细调焦器,以免磨损细调螺旋。

(2) 光学系统

目镜:是观察标本时眼睛接近的透镜,可有不同的放大倍数以备选用,常见如 5×、10×、15×,一般常用 10× 的目镜。

物镜:物镜为接近标本的透镜,是显微镜中决定成像质量和分辨能力的重要部件,其作用是将标本放大。一台普通光学显微镜通常有 4 个物镜,各标有 4×、10×、40×、100× 的放大倍数,分别是放大镜头、低倍镜头、高倍镜头和油镜镜头。

聚光器(集光器):位于载物台下,由数个透镜组成。其作用为将入射光聚集于标本之上。聚光器可上下移动,根据需要调节亮度。

光圈:位于聚光器下方,拨动小柄可使光圈扩大或缩小,以调节进光量。

电光源:位于聚光器下方,打开电源开关后灯泡发光,提供光源。

(二) 暗视野显微镜

暗视野显微镜(dark field microscope)的结构特点是在普通光学显微镜上安装了一个特制的暗视野聚光器。暗视野聚光器中央有一块挡光板,光线不能直接射向镜筒,使视野背景黑暗。从聚光器周边斜射到标本上的光线,通过散射作用发出亮光再反射到镜筒内,因此可在黑色的背景中看到发亮的标本。利用暗视野显微镜可以观察到细菌等微生物的形态与某些外部结构(如荚膜等)以及运动现象,但不能辨认其内部结构。

(三) 相衬显微镜

相衬显微镜(phase contrast microscope)的结构特点是在普通光学显微镜上附加环状光阑和相板。环状光阑多与聚光镜装在一起组成转盘聚光镜,相板多装在物镜中组成相衬物镜。光线通过半透明的物体时波长和振幅不发生改变,只有相位发生改变,人眼只能分辨光波的波长(颜色)和亮度的差异,不能直接分辨光波相位的差异,因此一般显微镜很难分辨活体细胞内的细微结构。相衬显微镜利用衍射和干涉现象,把相位差转变为振幅差(即明暗变化),以致在观察细菌等半透明活体细胞或未染色组织切片标本时可产生反差的效果而分辨出标本中的某些细微结构。

(四) 荧光显微镜

荧光显微镜(fluorescence microscope)的结构特点是在普通光学显微镜上附加了激发

光源、激发滤板、双色束分离器和阻断滤片等部件。其工作原理是使用一定波长的光(如紫外光)作为激发光,激发标本内的荧光物质发射出各种不同颜色的荧光,再经过物镜和目镜的放大进行观察。目前多采用高压汞灯作为光源,它可发出各种波长的光。但每种荧光物质都有一个产生最强荧光的激发光波长,所以需加用激发滤片,以吸收和阻挡其他波长的激发光进入目镜并选择一定波长的激发光照射到标本上,从而激发出专一的荧光色彩。某些物质在短光波(波长为 250~400nm)照射下即可发出荧光,如组织内大部分脂质和蛋白质经紫外线照射后发出淡蓝色荧光;而细胞内的叶绿素、维生素 A 经紫外线照射后发出红色荧光,称为自发性荧光。但大部分标本需要用荧光染料(如吖啶橙、甲基绿、异硫氰酸荧光素、酸性品红等)染色后,在短光波照射下才能发出荧光。由于荧光很易褪色减弱,因此标本染色后应立即观察且观察时间不宜过长,并及时记录结果。如果将标本置于聚乙烯塑料袋中 4℃ 保存,可延缓荧光减弱时间。荧光显微镜技术具有灵敏度高、简便快速等特点,主要用于细胞结构、功能相关化学成分等的研究。

二、电子显微镜及其构造

电子显微镜(electron microscope)是一种大型精密仪器,可用于观察病毒、细菌等微生物的超微结构。电子显微镜是用高速电子束代替光束,以磁场代替透镜,以致电子显微镜的分辨率最高可达 0.1nm,能够将标本放大近百万倍观察。常用的电子显微镜有透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)和扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)两类。

透射电子显微镜简称为透射电镜,通过收集透过样品的电子束而成像。透射电镜通常由电子光学系统、电源系统、真空系统、循环冷却系统和控制系统组成。由于电子射线的穿透能力比较低,因此所观察的组织标本需制作为 0.03~0.05 μm 厚度的超薄切片,以获得高分辨率的超微结构图像。超薄切片制作的基本过程包括取材、固定、脱水、渗透、包埋、聚合、切片和染色等几个环节。对病毒等颗粒状的生物材料可采用负染色技术观察,其基本原理是通过重金属盐加强样品外周的电子密度,以致背景黑暗而样品透亮,衬托出样品的形态和大小。负染色技术具有比超薄切片技术更加简便快速、分辨率高、反差好等优点。

扫描电子显微镜简称为扫描电镜,是使用电子探针在样品表面作逐行扫描并激发出多种电子信号并将其转换为电压信号发送至显像管成像。扫描电镜由电子光学系统、扫描系统、信号检测放大系统、图像显示和记录系统、真空系统和电源及控制系统组成。扫描电镜适用于观察样品的表面形态及表面结构特征,扫描出的图像具有立体感。扫描电镜样品制备过程中应尽可能使样品不变形、不污染、保存好原有的表面结构、样品干燥并且具有良好的导电性能。

三、光学显微镜油镜的使用和保护

细菌个体微小,用肉眼不能看到,需借助于普通光学显微镜的油镜将其放大千倍左右,才能看清。使用油镜时要滴加香柏油,因为从玻片标本透过的光线经空气到油镜前端透镜时,由于介质密度不同,光线发生折射现象,以至进入镜头的光线很少,视野很暗,物像不清晰。如在标本玻片上滴加与玻片折光率($n=1.52$)相近的香柏油,光线通过玻片到香柏油,

再进入油镜,其间不发生折射,从而增强了视野的亮度,可获得清晰的物像。

案例 1-1

在使用普通光学显微镜观察革兰染色的痰标本时,产生了图像模糊不清、微生物体积过小以致分辨困难、光线暗淡等现象。请分析可能的原因,并提供解决方法。

【实验目的】

- (1) 掌握显微镜油镜的正确使用方法。
- (2) 熟悉显微镜油镜的维护方法。

【实验材料】

- (1) 普通光学显微镜。
- (2) 香柏油、二甲苯、擦镜纸。
- (3) 细菌标本涂片(大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌的革兰染色片)。

【实验内容】

1. 方法

(1) 拿取显微镜:右手握持镜臂,左手托起镜座。取出显微镜后平稳地轻放在实验台上,置于自己身体左前方,使镜臂朝向操作者,镜筒朝向前方,以镜座后端为准距桌边缘约4~6cm为宜,勿将镜臂倾斜,以免香柏油流散。

(2) 油镜的识别:常用的油镜头外壁上有标记。

(3) 对光:先旋转粗调节器,将镜筒升高至一定位置后,旋转物镜转换盘,使低倍镜和镜筒在同一水平或正对载物台中央通光孔。将聚光器上升至最高位置,光圈适度开大以增加光线进入的强度。左眼对准目镜进行反光镜的调节,如果以自然光线为光源,使用平面反光镜;以灯光为光源使用凹面反光镜。

(4) 放置玻片:将载玻片的标本面朝上固定于载物台上,标本正对通光孔中央。

(5) 油镜的使用:首先分别依次用低倍镜、高倍镜寻找和确定标本的位置,然后在玻片的标本上加香柏油1滴,转换油镜对准标本。眼睛于侧方注视油镜,转动粗调焦器,使镜筒缓慢下降,将油镜头浸入油中至即将接触玻片,注意切勿使两者相碰,以免损伤镜头或压碎玻片。眼睛移至目镜观察,以相反方向轻微旋转粗调焦器至可见物像,再转动细调焦器至物像清晰。

(6) 油镜的维护:油镜使用完毕后,转动粗调焦器使镜头远离载玻片。取下标本,立即用擦镜纸直接拭擦或沾少许二甲苯拭擦镜头的油,再用干净擦镜纸擦拭残余油剂。将物镜转换器上的镜头转成“八”字形,聚光器稍下降。右手握镜臂,左手托座,对号放入镜箱中。

2. 注意事项

(1) 显微镜是贵重的精密仪器,除要正确使用外,不得随意拆散和碰撞,注意经常保养和维修。

(2) 严禁强酸、强碱、乙醚、三氯甲烷、酒精等化学药品接触显微镜光学部分。

(3) 亮度调节钮调至最小时方能打开或关闭电源开关。

(4) 机械部分的清洁用无绒毛布擦拭,绝不可用二甲苯或其他有机溶剂与硬物,以防损伤显微镜的漆层。

案例 1-1 提示

需要考虑是否正确地选择和使用显微镜的镜头、光圈、香柏油,载玻片的放置是否正确以及标本的厚度、干燥情况等。

(慕廷娜 吴晓娟)

实验2 细菌基本形态的观察

细菌的基本形态为球形、杆形和螺形(螺菌、弧菌或螺杆菌),细菌分裂繁殖后可形成不同的排列方式。观察细菌的形态学特征,有助于细菌的识别与初步鉴定。

案例 2-1

某临床实验室对一具有慢性尿道炎症状的男性病人采集生殖道分泌物,涂片后革兰染色镜检。发现在大量中性粒细胞中含数个革兰阴性双球菌,报告为“发现革兰阴性双球菌(细胞内)”。医生根据病人的临床表现及其检验结果初步诊断病人为“淋病”,给予头孢曲松与氧氟沙星治疗2周无明显效果。请问:①诊断该病人为“淋病”的依据是什么?②对该病人应当做哪些检查可帮助诊断与鉴别诊断?

【实验目的】

- (1) 掌握细菌的基本形态、排列方式及染色性。
- (2) 熟悉细菌形态检查的意义及其常见影响因素。
- (3) 了解细菌的大小。

【实验材料】

- (1) 标本:金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌及水弧菌的革兰染色片。
- (2) 仪器:普通光学显微镜。

【实验内容】

- 1. 方法 利用光学显微镜油镜观察金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和水弧菌的革兰染色标本。
- 2. 结果 观察细菌的形态、排列方式及其染色性(图 2-1),结果记录于表 2-1。

表 2-1 细菌基本形态观察结果

细菌	形态	排列方式	染色性
金黄色葡萄球菌			
大肠埃希菌			
水弧菌			

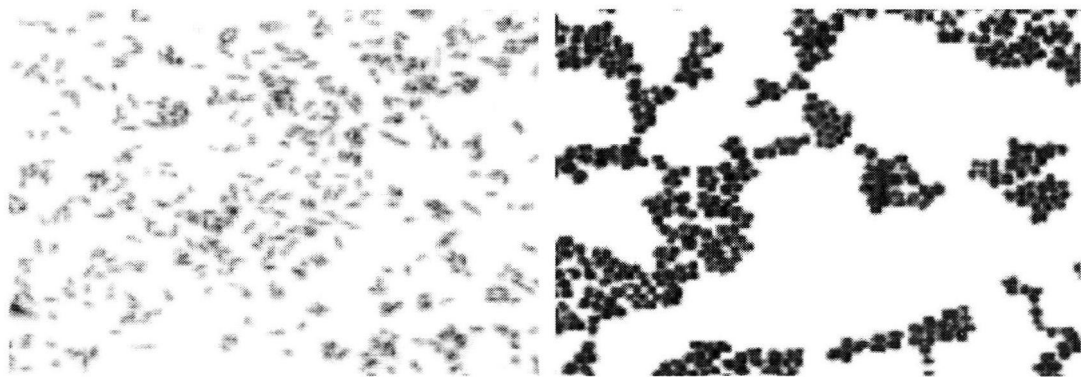


图 2-1 不同染色性和形态的细菌观察

案例 2-1 提示

①诊断该病人为“淋病”的依据是慢性尿道炎与尿道分泌物染色镜检结果。②对该病人应当做分离培养与病原菌鉴定可帮助诊断与鉴别诊断。

(王 菲)

实验 3 细菌特殊结构的观察

细菌的特殊结构是指某些细菌具有的结构,主要包括荚膜、鞭毛、菌毛和芽胞。其中的荚膜、鞭毛和芽胞经过特殊染色法染色后,可在普通光学显微镜下观察到。检查细菌的特殊结构及其形态与抗原性等,有助于细菌的鉴定。

案例 3-1

临床实验室通过对标本涂片与染色镜检观察细菌的形态与结构,可进行菌种的早期初步鉴定。在涂片中可分别发现肺炎链球菌、破伤风梭菌、普通变形杆菌的细胞上具有某些特殊结构或能够运动,怎样鉴别细菌的这些结构同菌细胞的关系?检测这些特殊结构对于细菌的鉴定有何意义?

【实验目的】

- (1) 掌握细菌荚膜、鞭毛和芽胞的形态与结构及其意义。
- (2) 了解细菌特殊结构的检查方法。

【实验材料】

- (1) 标本:肺炎链球菌荚膜染色片、普通变形杆菌鞭毛染色片、破伤风梭菌芽胞染色片。
- (2) 仪器:普通光学显微镜。

【实验内容】

- 1. 方法 利用光学显微镜油镜观察肺炎链球菌荚膜染色片、普通变形杆菌鞭毛染色片及破伤风梭菌芽胞染色片。
- 2. 结果 观察荚膜、鞭毛和芽胞的形态、数量、染色性及其与菌体的位置关系(图 3-1),描述并绘图,结果记录于表 3-1。

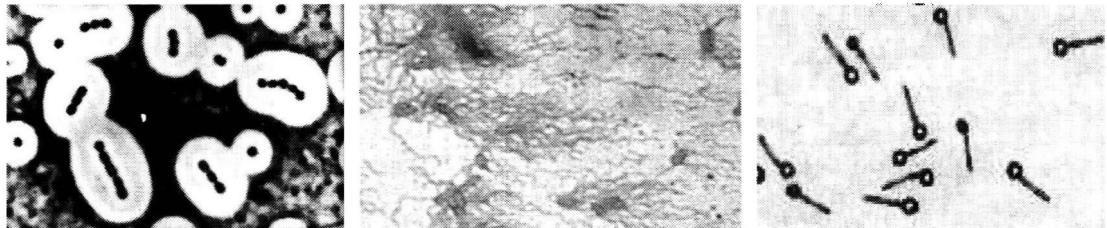


图 3-1 荚膜、鞭毛、芽胞的镜下形态

表 3-1 细菌特殊结构的观察

细菌	特殊结构	描述	绘图
肺炎链球菌	荚膜		
普通变形杆菌	鞭毛		
破伤风梭菌	芽胞		

3. 注意事项 细菌的某些特殊结构在特殊染色方法染色后,可在普通光学显微镜下观察。但染色操作过程中容易造成细菌特殊结构损伤或破坏以致丢失,从而影响观察效果。

案例 3-1 提示

细菌的特殊结构中,鞭毛和荚膜位于菌细胞表面,而芽胞在菌体内可以位于菌体的中央、次末端或末端;特殊结构的存在可分别增强细菌的致病能力、运动能力及对外界不良环境的抵抗力。

(王 菲)

实验 4 细菌动力的观察

鞭毛(flagellum) 是细菌的运动器官,有鞭毛的细菌具有真运动,使细菌定向地由一个

位置泳动到另一位置。鞭毛的数量及其存在位置是细菌的重要形态特征,有助于细菌的鉴别。细菌动力的检查方法常用悬滴法、压滴法、半固体琼脂培养基穿刺接种法及暗视野显微镜观察法等。

案例 4-1

在临床腹泻门诊的实验室,常常采用直接湿片镜检法(压滴法或悬滴法)观察病人粪便标本内病原菌的形态与运动现象,进行霍乱等肠道细菌或真菌感染的早期初步诊断。在涂片中可见不同细菌分别表现为振动或游动现象,细菌不同的“动象”分别属于什么类型的运动?怎样根据细菌的鞭毛运动现象进行细菌的早期初步鉴别?

【实验目的】

掌握细菌动力的检查方法。

【实验材料】

- (1) 菌种:普通变形杆菌 8~12h 营养肉汤培养物、普通变形杆菌及金黄色葡萄球菌的 18~24h 营养琼脂斜面培养物。
- (2) 材料:凹玻片、盖玻片、蒸馏水、接种环、接种针、酒精灯及普通光学显微镜。
- (3) 培养基:半固体营养琼脂。

【实验内容】

1. 方法

(1) 悬滴法

- 1) 取一块洁净的凹玻片,用接种环取少许蒸馏水放置于凹窝边缘 4 个点,作为黏合剂。
- 2) 用接种环取一环普通变形杆菌肉汤培养物,置于盖玻片中央。
- 3) 翻转凹玻片,使凹窝中央正对盖玻片上的菌液,粘住盖玻片后再次翻转,注意菌液不能与凹窝接触(图 4-1)。

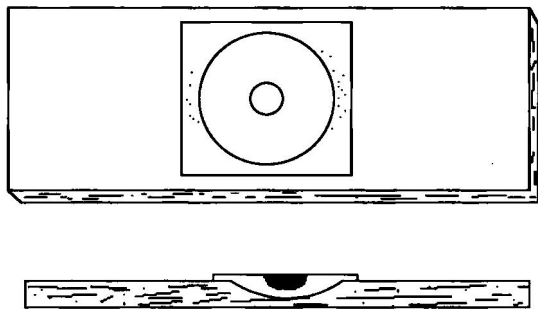


图 4-1 悬滴法

4) 显微镜观察:将制备好的标本固定于载物台上。先用低倍镜对光,通过光圈减少射入光线使视野稍暗,找到菌液边缘,并调至视野中央。转换高倍镜,旋转细调焦器使视野清晰。

(2) 压滴法:用接种环取 2~3 环菌液于清洁的载玻片中央。取一块洁净的盖玻片,使其一边先接触菌液,然后将整个盖玻片慢慢放下,注意不要产生气泡。先用低倍镜找到标本,再用高倍镜观察。

(3) 接种半固体培养基:用接种针分别取普通变形杆菌及金黄色葡萄球菌的 18~24h

营养琼脂斜面培养物,用穿刺接种的方法分别接种于 2 支半固体培养基中,置于培养箱内 37℃ 培养 18~24h 后,肉眼观察结果。

2. 结果 观察细菌的运动现象,结果记录于表 4-1。

表 4-1 细菌动力的观察

方法	细菌	描述
压滴法	普通变形杆菌	
悬滴法	普通变形杆菌	
半固体培养基	普通变形杆菌	
培养法	金黄色葡萄球菌	

3. 注意事项

- (1) 观察悬滴标本时,先用低倍镜找物像,再改换高倍镜观察。由于凹玻片较厚,油镜焦距很短,所以一般不用油镜检查。
- (2) 观察标本时,应下降聚光器和缩小光圈,减少视野光线。视野亮度太强,不易观察。
- (3) 旋转调焦螺旋时应缓慢,勿压碎盖玻片。

案例 4-1 提示

细菌可由于水分子撞击产生布朗运动,鞭毛摆动产生具有位移的真运动。真运动的细菌有鞭毛,霍乱弧菌的运动速度极快。铜绿假单胞菌、普通变形杆菌、大肠埃希菌等也具有较强的快速运动能力,有助于早期初步鉴别这些细菌。

(王 菲)

实验 5 细菌涂片的制作

制作细菌涂片是细菌形态学检查的首要步骤,是将细菌培养物或含菌标本涂于玻片等载体上,从而有助于在显微镜下观察和研究。常用涂片法包括干片法与湿片法。干片法是将细菌标本固定于载体上,经过染色后观察细菌的形态、大小、结构等。湿片法是将菌液置于载体上或将含菌标本在载体上制成悬液,染色或不染色,可直接观察活菌的形态、大小、结构、动力及分裂等。本实验着重介绍细菌干片的制作方法,湿片的制作参见实验 4。

案例 5-1

某实验员在制作细菌标本涂片过程中,标本固定后测试固定效果时造成其手背皮肤明显灼伤。请问:该标本还具有进行染色镜检的价值吗?为什么?

【实验目的】

掌握细菌涂片制作的方法。

【实验材料】

- (1) 菌种:大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌的菌液或营养琼脂培养基 18~24h 培养物。
- (2) 材料:载玻片、接种环、酒精灯、无菌生理盐水等。

【实验内容】

1. 方法

(1) 涂片:取洁净载玻片一张,无菌操作法用接种环取菌液 1~2 环,均匀涂布于载玻片中央。如取细菌的固体培养物涂片时,先用接种环取无菌生理盐水 1~2 环置于载玻片上,再用接种环取少许细菌的固体培养物放于生理盐水中研磨均匀,涂成直径约 0.5~1.5cm 的涂面,接种环经火焰烧灼灭菌后放回原处。

(2) 干燥:涂片放在室温下自然干燥或用电风吹干,也可将标本放在酒精灯火焰上方约 10~15cm 处烘干,以助水分蒸发。

(3) 固定:手持载玻片一端,涂菌面朝上将涂片在酒精灯火焰的外焰处缓慢往返通过 3 次,以玻片触及手背皮肤感觉灼热但不烫伤为宜。

2. 结果 干片经染色后,可在显微镜下观察细菌的形态、大小、排列与染色性。

3. 注意事项

- (1) 涂片所用载玻片需洁净明亮、无油渍或划痕。
- (2) 如用酒精灯加热干燥时,应注意涂片与火焰距离不宜过近、温度不宜过高。
- (3) 应取对数生长期的细菌涂片,以便于观察细菌的典型形态和染色性。
- (4) 加热固定的目的在于杀死细菌和使菌体较牢固黏附于载玻片上,同时凝固细菌细胞质和其他细胞结构,改变对染料的透过性而有利于菌细胞染色。

案例 5-1 提示

该标本不具有进行染色镜检的价值了,因为造成皮肤明显灼伤的温度一般达到 60℃ 以上,在此温度条件下,细菌的荚膜、鞭毛等结构可被破坏。

(余晓玲)

实验 6 细菌的染色方法

细菌细胞是无色、半透明的,只有染色后才能较清楚地显示其形态与结构。本实验主要介绍几种常用的细菌染色方法。

案例 6-1

某实验员制作的细菌纯培养物标本革兰染色涂片,在显微镜下观察,发现是形态相似的球菌,但标本的边缘部分有散在的革兰阳性球菌、中心部分是成堆的革兰阴性球菌。请问:①该标本内含有几种细菌?②分析造成这种图像结果的可能原因。