

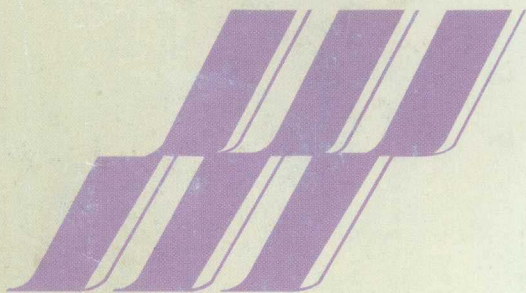
卫生部规划教材

全国中等卫生学校配套教材

供医学检验、卫生检验专业用

微生物学及检验技术实验指导

主编 董 奇



广东科技出版社

微生物学及检验技术实验指导

主 编 董 奇
编 者 (以姓氏笔画为序)
张加敏 罗燕华 董 奇
主 审 李振林

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学及检验技术实验指导/董奇主编. —广州:
广东科技出版社, 2000. 1
ISBN 7-5359-2311-9

I. 微…

II. 董…

III. 微生物学-医学检验-专业学校-教材

IV. R446.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 23861 号

出版发行: 广东科技出版社

(广州市环市东路水荫路 11 号 邮码: 510075)

E-mail: gdkjzbb@21cn.com

出版人: 黄达全

经 销: 广东省新华书店

排 版: 广东科电有限公司

印 刷: 广东省肇庆新华印刷有限公司

(广东省肇庆市狮岗 邮码: 526060)

规 格: 787mm×1092mm 1/16 印张 13 字数 260 千

版 次: 2000 年 1 月第 1 版

2001 年 2 月第 2 次印刷

印 数: 5 201 ~ 10 200 册

定 价: 15.00 元

如发现因印装质量问题影响阅读, 请与承印厂联系调换。

编写说明

本书是根据卫生部颁发的教学大纲和教学计划，由全国中等卫生学校《微生物学及检验技术》第三版教材编写组董奇、罗燕华、张加敏老师编写的三版教材配套教材。供医学检验专业、卫生检验专业实验教学使用。由于两个专业教学大纲要求有所不同，各校在使用时可按自己学校的具体情况选用。

本书包括课时目标、实验材料、实验内容与方法、实验报告、思考题及附录等内容，共分 52 次实验。各校可根据专业及实验设施等情况，安排实验顺序与内容。

本指导在编写过程中，得到了《微生物学及检验技术》第三版教材主编、广西卫生学校李振林老师的大力支持和热情指导。在此我们表示衷心地感谢！

由于我们水平有限，加之时间仓促，肯定有不少缺点和错误，恳请广大师生在使用过程中批评指正。

董 奇

1999 年 4 月

目 录

《微生物学及检验技术》实验的目的和要求	(1)
微生物学实验室规则	(2)
实验一 显微镜油镜的使用及细菌形态与结构的观察	(3)
实验二 革兰染色法	(7)
实验三 抗酸染色法和不染色标本检查法	(10)
实验四 常用玻璃器皿的准备	(14)
实验五 肉膏汤培养基制备与 pH 值的测定	(17)
实验六 常用培养基的制备	(21)
实验七 细菌的分离与接种法	(25)
实验八 细菌生长现象的观察与细菌的培养方法	(29)
实验九 细菌的生化反应试验	(32)
实验十 细菌的分布	(37)
实验十一 外界因素对细菌的影响	(39)
实验十二 细菌对药物的敏感试验	(43)
实验十三 细菌的致病性	(48)
实验十四 动物实验	(52)
实验十五 病原性球菌常用培养基制备	(57)
实验十六 葡萄球菌属检验	(58)
实验十七 链球菌属检验	(62)
实验十八 奈瑟菌属与卡他布兰汉菌检验	(66)
实验十九 脓液标本检验 (一)	(68)
实验二十 脓液标本检验 (二)	(69)
实验二十一 脓液标本检验 (三)	(70)
实验二十二 肠杆菌科细菌常用培养基制备	(71)
实验二十三 大肠埃希菌生物学性状观察	(73)
实验二十四 大肠埃希菌的鉴定	(75)
实验二十五 沙门菌属生物学性状观察	(77)
实验二十六 沙门菌属的鉴定	(78)
实验二十七 肥达 (Widal) 试验	(80)
实验二十八 志贺菌属生物学性状观察	(83)
实验二十九 志贺菌属的鉴定	(84)
实验三十 其他肠道杆菌检验	(87)
实验三十一 弧菌属与弯曲菌检验	(89)
实验三十二 非发酵菌检验	(94)

实验三十三	厌氧菌检验	(100)
实验三十四	需氧芽胞杆菌检验	(103)
实验三十五	棒状杆菌属检验	(106)
实验三十六	分枝杆菌属检验	(108)
实验三十七	病毒的培养与包涵体的观察	(111)
实验三十八	病毒的血凝试验、血凝抑制试验与乙型肝炎病毒抗原检测	(115)
实验三十九	衣原体与支原体检验	(118)
实验四十	立克次体检验	(121)
实验四十一	病原性螺旋体检验	(124)
实验四十二	病原性真菌检验	(128)
实验四十三	血液标本的细菌学检验	(133)
实验四十四	脓液标本的细菌学检验	(135)
实验四十五	尿液标本的细菌学检验	(137)
实验四十六	粪便标本的细菌学检验	(139)
实验四十七	水与食品卫生细菌学检验常用培养基制备	(141)
实验四十八	水的卫生细菌学检验	(144)
实验四十九	食品的微生物学检验	(148)
实验五十	细菌性食物中毒的检验	(152)
实验五十一	空气中的微生物学检验	(154)
实验五十二	化妆品的微生物学检验	(156)
附录一	常用染色液的配制及染色方法	(159)
一、	革兰染色法	(159)
二、	抗酸染色法	(159)
三、	美蓝染色法	(159)
四、	鞭毛染色法(改良 Ryu 法)	(159)
五、	异染颗粒染色法	(159)
六、	荚膜染色法	(160)
七、	芽胞染色法	(160)
八、	布鲁菌柯兹罗夫斯基染色法	(161)
九、	结核分枝杆菌荧光染色法	(161)
十、	墨汁负染色法	(161)
附录二	常用培养基的配制及用途	(163)
一、	肉浸液(肉汤)及肉浸液琼脂	(163)
二、	肉膏汤	(163)
三、	肝浸液及肝浸液琼脂	(164)
四、	营养琼脂(或称普通琼脂)	(164)
五、	半固体琼脂	(164)
六、	血液琼脂	(165)
七、	葡萄糖肉汤	(166)

八、硫酸镁肉汤	(166)
九、革兰阴性杆菌 (GN) 增菌液	(167)
十、亚硒酸盐 (S.F) 增菌液	(167)
十一、四硫磺酸盐 (TT) 增菌液	(168)
十二、碱性蛋白胨水	(168)
十三、高盐胨水及高盐琼脂	(168)
十四、H ₇ 抗血清-山梨醇半固体培养基	(169)
十五、麦康凯 (Mac Conkey) 琼脂	(169)
十六、中国蓝琼脂	(169)
十七、伊红美蓝 (EMB) 琼脂	(170)
十八、SS 琼脂	(170)
十九、碱性琼脂平板	(172)
二十、碱性胆盐琼脂	(172)
二十一、庆大霉素碱性胆盐琼脂	(172)
二十二、碱性胆盐琼脂平板 (TCBS)	(173)
二十三、卵黄双抗琼脂 (EPV)	(173)
二十四、血清斜面培养基 (吕氏血清斜面)	(174)
二十五、亚硝酸钾琼脂	(174)
二十六、改良罗氏培养基	(175)
二十七、包-金 (Bordet-Gengou) 琼脂	(175)
二十八、疱肉培养基	(176)
二十九、动力-吲哚-尿素酶 (MIU) 培养基	(176)
三十、醋酸铅培养基	(176)
三十一、糖氧化发酵 (O/F·HL) 培养基	(177)
三十二、脱氧核糖核酸酶 (DNase) 试验琼脂	(177)
三十三、氰化钾培养基	(178)
三十四、氨基酸脱羧酶培养基	(178)
三十五、硝酸盐培养基	(179)
三十六、紫牛乳培养基	(179)
三十七、Hayflick 固体及液体培养基	(179)
三十八、A7B 鉴别琼脂	(180)
三十九、改良 Kagan 培养基 (L 型平板)	(180)
四十、马铃薯葡萄糖琼脂培养基	(180)
四十一、Thornley 精氨酸培养基	(181)
四十二、cBAP-thio 培养基 (改良 Campy-BAP 弯曲菌选择培养基)	(181)
四十三、干燥培养基简介	(181)
附录三 常用细菌的生化反应试验	(182)
一、糖 (醇) 类代谢试验	(182)
(一) 糖 (醇) 类发酵试验	(182)

(二) 糖氧化发酵 (O-F) 试验	(183)
(三) 甲基红 (Methyl red) 试验 (MR 试验)	(183)
(四) 伏普 (Voges-proskauer) 试验 (VP 试验)	(184)
(五) β -半乳糖苷酶 (ONPG) 试验	(185)
(六) 七叶苷水解试验	(185)
二、有机酸盐及铵盐利用试验	(186)
(一) 枸橼酸盐利用试验	(186)
(二) 丙二酸钠利用试验	(186)
三、蛋白质和氨基酸代谢试验	(186)
(一) 靛基质 (吲哚) 试验	(186)
(二) 霍乱红试验	(187)
(三) 硫化氢试验	(188)
(四) 尿素酶试验	(188)
(五) 明胶液化试验	(189)
(六) 苯丙氨酸脱氨酶试验	(189)
(七) 氨基酸脱羧酶试验	(190)
(八) 精氨酸双水解酶试验	(190)
四、呼吸酶类试验	(191)
(一) 氧化酶试验	(191)
(二) 触酶试验	(192)
(三) 氰化钾试验	(192)
(四) 硝酸盐还原试验	(193)
(五) 氯化三苯四氮唑 (TTC) 试验	(193)
五、毒性酶类试验	(194)
(一) 溶血试验	(194)
(二) 凝固酶试验	(194)
(三) DNA 酶试验	(194)
(四) 卵磷脂酶试验	(195)
六、其他试验	(195)
(一) 胆汁溶菌试验	(195)
(二) 嗜盐性试验	(195)
(三) Optochin 敏感试验	(196)
(四) 杆菌肽敏感试验	(196)
(五) CAMP 试验	(196)
(六) 美蓝还原试验	(196)
(七) O/129 抑菌试验	(196)
(八) 葡萄糖酸氧化试验	(197)
(九) 氢氧化钾拉丝试验	(197)

《微生物学及检验技术》

实验的目的和要求

《微生物学及检验技术》实验课，是《微生物学及检验技术》课程的重要组成部分。学习本实验课的目的在于：

1. 在系统学习微生物学理论知识的基础上，加深理解并验证和巩固理论知识。

2. 学习正确使用微生物学检验的常用仪器，正确配制各种常用染色液、培养基、试剂及消毒剂；学会常用的消毒和灭菌方法；学会病原微生物的形态、培养、生化反应及动物试验的基本技术和检验方法。

3. 通过正确地观察和分析实验结果，培养学生科学的思维方法和实事求是的科学态度，提高分析问题和解决问题以及独立学习与独立工作的能力。

为了达到上述目的，提高实验课效果，特提出以下要求：

1. 每次实验课前必须做好预习，明确实验目的、原理、方法，以免发生错误，并可提高实验效果。

2. 实验过程中必须持严肃认真的态度，具有一丝不苟的工作作风，树立牢固的无菌观念，认真地按实验指导的操作步骤及方法进行实验。

3. 对实验结果必须仔细地观察和真实地记录，然后进行分析，得出恰当结论。若实验结果与理论不符合时，要加以分析讨论，找出原因。

4. 独立认真地完成实验报告。书写实验报告要字迹清楚，语言简练，表格清晰，画图力求反映实物标本的原状。

5. 切实遵守实验室规则。

微生物学实验室规则

医学微生物学实验的对象主要为病原微生物，具有传染性，如疏忽大意，易发生实验室感染，必须提高警惕，并严格遵守下列规则：

1. 非必要物品不准带入实验室，必要的实验指导、笔记本和文具等带入后要远离操作处。

2. 进入实验室应穿好隔离衣，离室时脱下反叠并放在指定处。隔离衣应经常消毒洗涤。

3. 实验室内应保持肃静和良好秩序，不得高声谈笑，或随便走动。

4. 实验室内不准饮食和吸烟，不得用嘴湿润标签或铅笔等，尽量不要用手触摸头面部及身体暴露部位，以免传染。

5. 如发生意外情况，应立即报告指导教师，并按下述方法进行处理：①吸入菌液：应立即用0.1%高锰酸钾或3%双氧水漱口，并根据吸入的不同细菌服用相应的抗生素以预防感染。②污染手部：应立即将手浸于3%来苏水中5~10分钟，然后用肥皂及自来水冲洗干净。③有菌材料污染桌面或衣物等，应立即用抹布浸沾3%来苏或0.1%新洁尔灭等，浸泡污染部位半小时后抹去。

6. 凡用过的吸管、玻片应放在指定的消毒缸内，其他物品也应放在指定地点，不得乱放。

7. 爱护公物，节约实验材料，损坏实验器材时，应报告教师，进行登记，酌情处理。

8. 实验完毕后，整理桌面、地面、用具等。需培养的培养物要放入温箱内培养，观察结果后的培养物等放入污物筒，统一消毒处理。桌面用浸有消毒液的抹布擦拭干净。

9. 离开实验室前，用消毒液浸泡双手，然后用自来水洗净。每组轮流值日，负责实验室的卫生，关好水、电及门窗后，方能离开实验室。

实验一 显微镜油镜的使用及细菌形态与结构的观察

【课时目标】

1. 明确微生物学实验室规则。
2. 学会显微镜油镜的使用和保护。
3. 辨认细菌的基本形态和特殊结构。

【实验材料】

1. 显微镜、香柏油、二甲苯、擦镜纸。
2. 球菌标本片：葡萄球菌、链球菌、脑膜炎奈瑟菌。
3. 杆菌标本片：大肠埃希菌、结核分枝杆菌、白喉棒状杆菌，炭疽芽胞杆菌。
4. 螺形菌标本片：霍乱弧菌。
5. 特殊结构标本片：肺炎链球菌（荚膜）、破伤风梭菌（芽胞）、伤寒沙门菌（鞭毛）。

【实验内容与方法】

（一）介绍微生物学实验室规则

（二）显微镜油镜的使用和保护

1. 油镜的原理：从聚光器出来的光线通过标本玻片经空气进入物镜时，由于玻片与空气的折光率不同而发生折射，使一部分光失掉，进入物镜的光线减少，结果视野暗淡，物像不清。如果使用折光率与玻片（ $n=1.52$ ）相近似的香柏油（ $n=1.515$ ）即可减少折射，增加视野光亮度，提高分辨率，获得清晰的物像（图1）。

2. 油镜的辨认：油镜头上标有 $90\times$ 或 $100\times$ ；镜头前端有黑色的圆圈；刻有“油”、“Oil”或“HI”等；透镜直径最小。

3. 油镜的使用和保护

（1）将显微镜平稳地放在实验台上。使用油镜时，必须端坐，不要将载物台倾斜，以免菌液或镜油流出，污染载物台。

（2）先将低倍镜对准中央聚光器，以自然光线为光源时，使用反光镜的平面；以灯光为光源时，使用反光镜的凹面。

（3）将玻片标本放在载物台上，用固定夹固定。先用低倍镜对好光线，然后转换油镜观察，将聚光器上升与载物台相平，把光圈完全打开。

（4）先在标本上滴加1滴香柏油，为了避免损伤镜头或玻片，用眼睛从侧面看着油镜，慢慢扭动粗螺旋，将油镜头浸入镜油内，并几乎与玻片接触为止，但勿使两者相碰（其工作距离仅有 0.18mm ）。然后从目镜上观察，扭动粗螺旋使镜筒慢慢上移，看到模糊物像时，换用细螺旋调节至物像清晰为止。如果油镜头已离开油面，可重复上述操作。

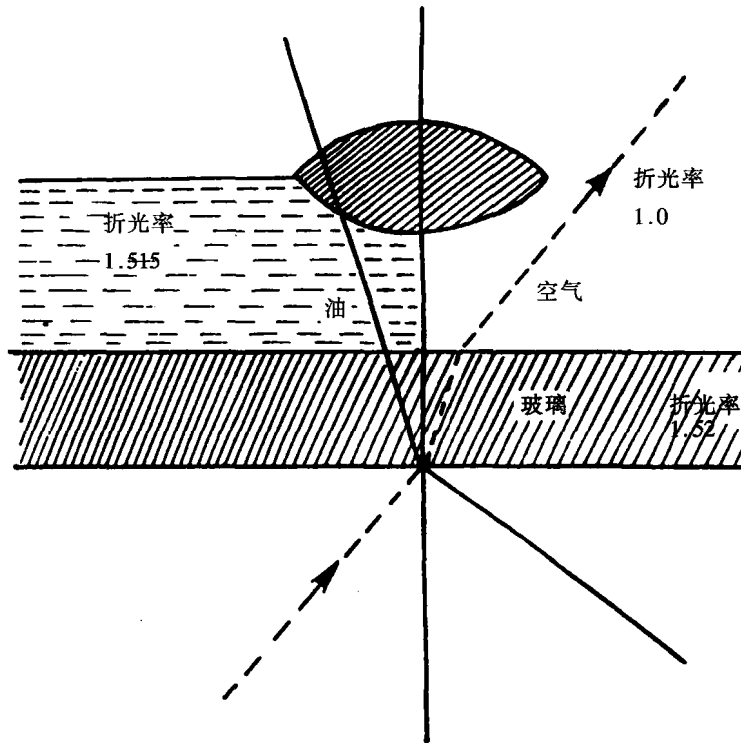


图1 油镜的原理

观察标本时用左眼，并应练习两眼睁开，既便于绘图或记录，又可避免眼睛疲劳。

(5) 观察完毕，用粗螺旋将镜筒提升，立即用擦镜纸擦净镜头上的镜油。如油已干，可在擦镜纸上滴少许二甲苯擦拭，并随即用干擦镜纸擦去残留的二甲苯。然后将物镜转成“八字形”，下降镜筒和聚光器，双手托持显微镜，放入镜箱中。

(三) 细菌的基本形态观察 (操作)

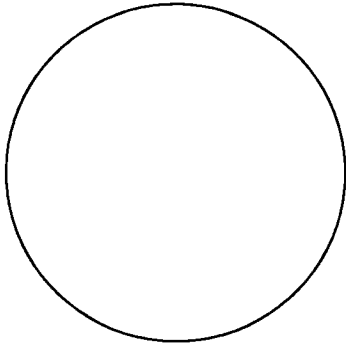
使用显微镜油镜，观察各种球菌、杆菌和螺形菌的革兰染色标本片，以认识细菌的基本形态。观察前要明确标本片的涂片材料、染色方法；观察时应注意细菌的形态、大小、排列和染色反应，同时绘图（或记录）。

(四) 细菌的特殊结构观察 (示教)

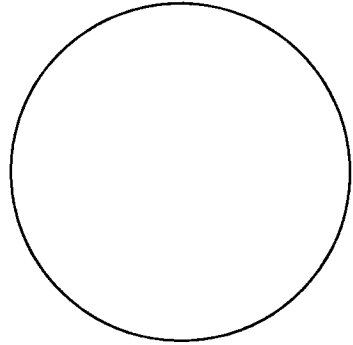
观察示教镜下肺炎链球菌的荚膜、破伤风梭菌的芽胞、伤寒沙门菌的鞭毛。注意细菌菌体与特殊结构的形状、染色、大小、位置等形态特点，并绘图。

【实验报告】

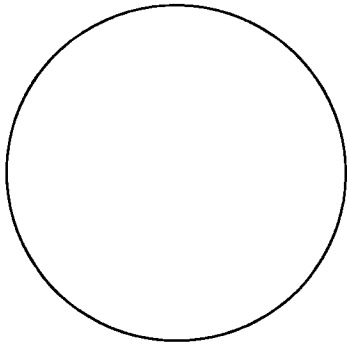
1. 用红蓝铅笔绘出显微镜下细菌的基本形态图。



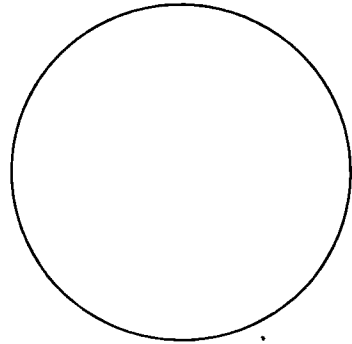
葡萄球菌



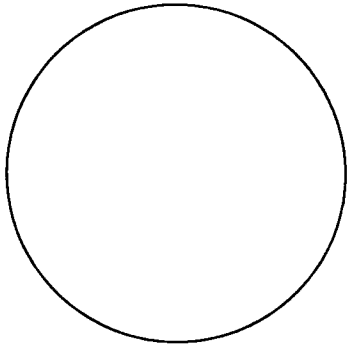
链球菌



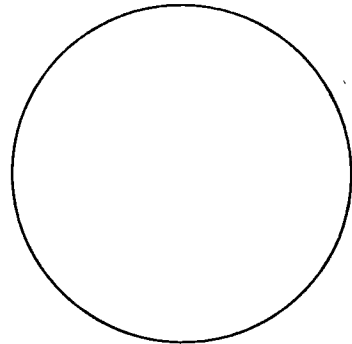
脑膜炎奈瑟菌



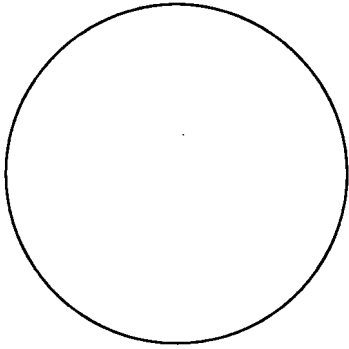
大肠埃希菌



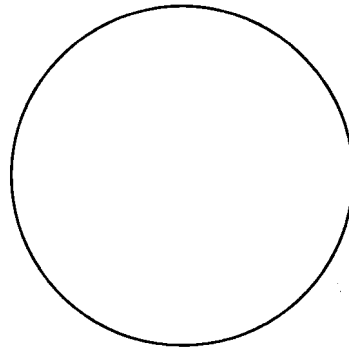
结核分枝杆菌



白喉棒状杆菌

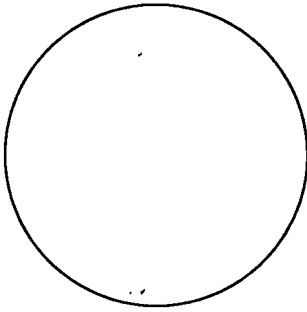


炭疽芽胞杆菌

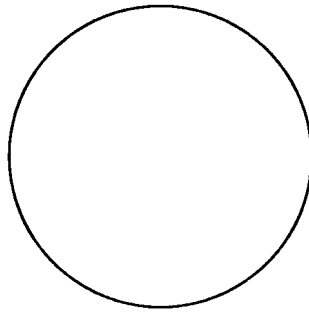


霍乱弧菌

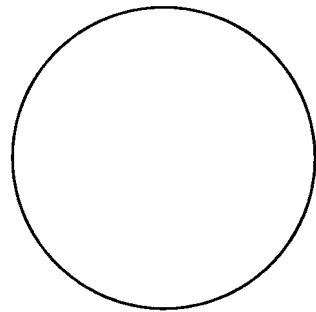
2. 绘出显微镜下细菌的特殊结构图。



荚膜



芽胞



鞭毛

菌名_____ 菌名_____ 菌名_____

【思考题】

1. 油镜有哪些标志？如何使用油镜？
2. 镜下检查细菌染色标本时，应注意观察哪些方面？

实验二 革兰染色法

【课时目标】

1. 配制革兰染液和抗酸染液。
2. 学会制作细菌染色标本。
3. 进行革兰染色法的操作，判断革兰染色法的结果。

【实验材料】

1. 菌种：大肠埃希菌及葡萄球菌 18~24 小时培养物。
2. 器材：载玻片、生理盐水，接种环、接种针、酒精灯、显微镜、革兰染液、香柏油等。
3. 配制革兰染液和抗酸染液的染料及器具等。

【实验内容与方法】

（一）革兰染液与萘-纳抗酸染液的配制（示教）

1. 革兰染液

（1）结晶紫染液：称取结晶紫 10g，溶于 95% 酒精 100mL 中，配成结晶紫酒精饱和液。取此饱和液 20mL 与 1% 草酸铵水溶液 80mL 混合即成。

（2）卢戈碘液：先将碘化钾 2g 溶于 10mL 蒸馏水中，再加碘 1g，待碘全部溶解后，加蒸馏水 200mL 即成。

（3）95% 酒精。

（4）稀释石炭酸复红液：取石炭酸复红液 10mL 加入蒸馏水 90mL 即成。

2. 萘-纳抗酸染液

（1）石炭酸复红液：称取碱性复红 4g，溶于 95% 酒精 100mL 中，配成碱性复红酒精饱和液。取此饱和液 10mL 与 5% 石炭酸水溶液 90mL 混匀即成。

（2）3% 盐酸酒精：取浓盐酸 3mL，95% 酒精 97mL 混合。

（3）吕弗勒碱性美蓝液：称取美蓝 2g，溶于 95% 酒精 100mL 中，配成酒精饱和液。取此饱和液 30mL，再加入蒸馏水 100mL 及 10% 氢氧化钾水溶液 0.1mL 即成。

（二）接种环（针）使用和制作方法（示教）

接种环和接种针是微生物学检验中用以取菌、接种和分离细菌的简单器具。接种环用来划线分离培养、纯菌移种、挑取菌落以及涂片制备等。接种针主要用来挑取单个菌落、进行穿刺接种和斜面接种等。

接种针用白金丝或镍合金丝制成。接种环系接种针的游离端弯成环状，直径约 2~4mm，另一端固定于金属棒上（图 2、图 3 所示）。使用时右手持接种环（针）柄将环（针）部放于酒精灯的火焰上烧灼，将环（针）上的细菌全部杀灭，再平持接种环转动着

通过火焰 3 次，冷却后即可取菌。用毕后，接种环（针）在酒精灯火焰上灭菌。

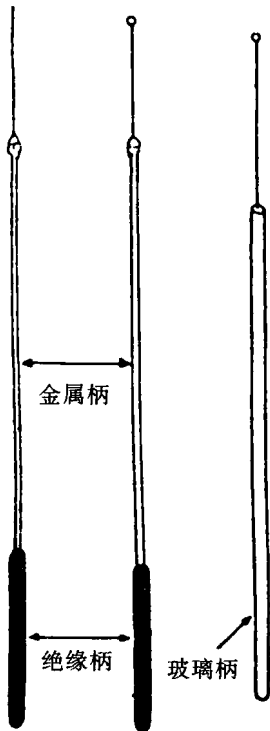


图 2 接种针与接种环

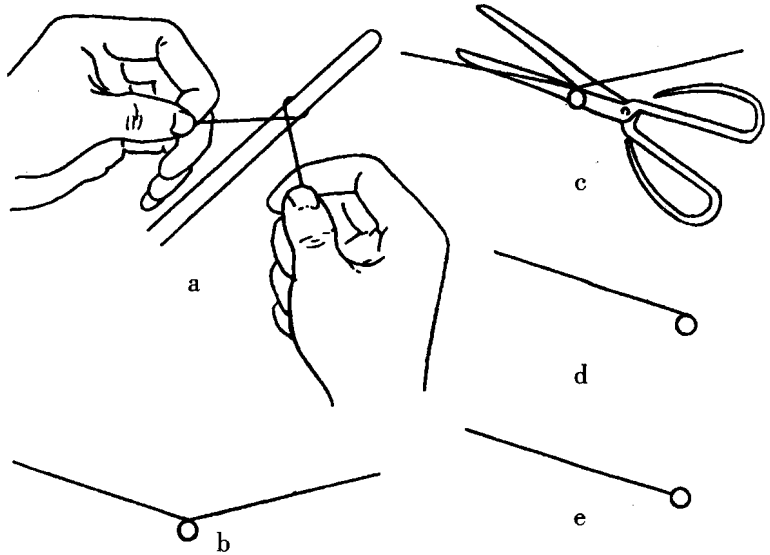


图 3 接种环的制备

(三) 细菌染色标本的制作 (操作)

细菌染色标本制作的基本步骤为：涂片→干燥→固定→染色。

1. 涂片：取洁净载玻片 1 张，用接种环各加 1 环生理盐水于载玻片两端（如系液体标本，可不加盐水）。用接种环挑取大肠埃希菌和葡萄球菌菌落少许，分别涂布于盐水中。

2. 干燥：在空气中自然干燥。必要时，可将标本面向上，在火焰上方烘干，切勿紧靠火焰，以免标本烤焦。

3. 固定：固定的目的是杀死细菌，使细菌粘附在玻片上，改变细菌对染料的通透性，便于染料着色。将已干燥的玻片来回通过火焰 3 次，以热而不烫为宜。

4. 染色：根据检验目的的不同，而选用不同的染色方法进行染色。滴加染液，以覆盖标本为度，不宜过多。

(四) 革兰染色法 (操作)

1. 方法

(1) 初染：将结晶紫染液滴加在已固定的涂片标本上，染 1 分钟，水洗。

(2) 媒染：加卢戈碘液媒染 1 分钟，水洗。

(3) 脱色：滴加 95% 酒精脱色，轻轻摇动玻片至无紫色染液脱下为止（约 30 秒 ~ 1 分钟），水洗。

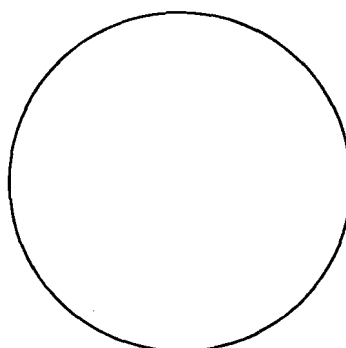
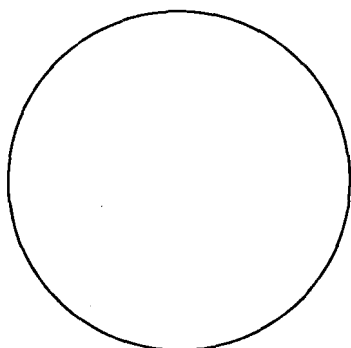
(4) 复染：用稀释石炭酸复红液复染 30 秒，水洗，干后镜检。

2. 结果：染成紫色为革兰阳性菌 (G^+)；染成红色为革兰阴性菌 (G^-)。

【实验报告】

1. 写出革兰染色法的原理、步骤和结果。

2. 绘出革兰染色法结果图。



【思考题】

1. 制作细菌染色标本的步骤有哪些？
2. 固定标本时应注意什么？
3. 革兰染色法的关键步骤是什么？
4. 影响革兰染色法的因素有哪些？