



普通高等教育“十一五”国家级规划教材



卫生部“十一五”规划教材

供基础、临床、预防、护理等专业用

病原生物学 实验教程

主 编 訾自强 杨秀珍

副主编 刘佩梅 钟启平



人民卫生出版社



主编：王 强、张 强、李 强、李强等主编

病原生物学 实验教程

主 编：王 强、张 强、李 强、李强等主编
副主编：王 强、张 强、李 强、李强等主编

人民卫生出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

卫生部“十一五”规划教材

供基础、临床、预防、护理等专业用

病原生物学实验教程

主 编 訾自强 杨秀珍

副主编 刘佩梅 钟启平

编 者 (以姓氏汉语拼音为序)

安桂珍 (天津医科大学)	石立莹 (天津医科大学)
董小青 (武警医学院)	吴增强 (天津医科大学)
胡晓蕙 (天津中医药大学)	闫玉文 (武警医学院)
李晓霞 (天津医科大学)	杨秀珍 (天津医科大学)
李咏梅 (天津医科大学)	詹曦菁 (武警医学院)
刘俊燕 (天津医科大学)	钟启平 (天津医科大学)
刘丽英 (武警医学院)	朱云娟 (天津医科大学)
刘佩梅 (天津医科大学)	訾自强 (天津医科大学)

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

病原生物学实验教程/瞿自强等主编. —北京: 人民卫生出版社, 2009. 4

ISBN 978-7-117-11295-6

I. 病… II. 瞿… III. 病原微生物-实验-医学院校-教材 IV. R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 022151 号

本书本印次封底贴有防伪标。请注意识别。

病原生物学实验教程

主 编: 瞿自强 杨秀珍

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 北京人卫印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 17.5

字 数: 414 千字

版 次: 2009 年 4 月第 1 版 2009 年 4 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-11295-6/R · 11296

定 价: 30.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

前言

病原生物学包括医学微生物学和人体寄生虫学,均为医学专业主干课程。其中的实验教学是两门课程学习过程中的重要环节。多年来各大专院校均使用自编教材,缺乏对实验教学的统一要求和标准。为培养创新型、复合型人才,我们在获得天津市教委资助进行实验课程体系改革的实践中,探索并尝试打破学科界限,改变传统微生物学与寄生虫学单科独立的实验教学模式,力求给学生一个病原生物学的整体概念,让学生有机会把不同的病原生物放在同一环境中进行思考和比较,自主掌握不同病原生物间的差别。从而,产生了课程内及课程间的综合性实验,收到了较好的教学效果。

为与同行共享,特邀天津市兄弟院校共同编写了本教材,希望通过新编教材的公开使用,把我们对这两门课程多年的教学积淀和近年教学改革的体会介绍给同行。更希望得到同行的意见、建议和参与,促进病原生物学实验教材的建设。

本教材的编排结构既能满足病原生物学实验作为一个整体教学用书的院校使用,又可供两门课程不能统一教学的院校使用。全书共分三篇和附录,第一篇为医学微生物学实验教程,采用基础与临床相结合,以基础教学为主的编排方式,即在微生物学实验技术的学习中增加了临床应用,而在应用中涉及了许多基本技术,互为补充。第二篇为人体寄生虫学实验教程,除了传统的寄生虫标本的观察外,增加了综合性实验病例、设计性实验方案及简单易行的基本操作技术。两篇同时引进两个学科较为成熟的新实验和新技术,满足创新教育的基本要求。第三篇为临床标本的病原学诊断,是打破课程界限教学的示范。教材中给出适合的病例及提示,在教师的指导下,学生通过对病例的分析自主设计实验方案,再通过连续性试验,独立完成对模拟临床标本的检查。或师生讨论,对病例进行模拟检查,也能使学生得到对病原学诊断的锻炼机会。在两门实验课程学习具有一定基础时,开展一次此类病例的模拟实验室诊断,将会把实验教学引向一个高潮。示范病例各院校可选择使用或另行编纂。附录中为组织教学提供了有益的参考。教材编写在努力使文字精练的同时,仍不失系统和完整,适合于教师授课、学生自学和实验准备工作。

本教材是各位编者辛勤工作的结晶,凝聚了编者所在教研室历届同仁多年实验教学的宝贵经验,同时编写过程中得到了多方支持和帮助,在此一并致以衷心感谢。本书的完成,希望能为病原生物实验教学的规范和创新迈出第一步。但医学教育发展迅速,我们的学术水平和编写能力有限,书中定有欠缺,衷心希望得到师生和读者的批评指正。

訾自强 杨秀珍

2009年2月

目 录

第一篇 医学微生物学实验教程

第一章 微生物学实验基本技术	1
实验一 细菌形态学检查方法	1
实验二 细菌的培养技术	9
实验三 细菌的生化鉴定方法	15
实验四 细菌变异的诱导与观察	20
实验五 细菌的血清学试验	24
实验六 细菌的分布与环境因素对细菌的影响	30
第二章 常见病原菌的分离与鉴定	40
实验一 化脓性细菌的分离与鉴定	40
实验二 肠道感染细菌的分离与鉴定	47
实验三 厌氧性细菌的分离与鉴定	53
实验四 呼吸道感染细菌的分离与鉴定	57
实验五 需氧芽胞杆菌的分离与鉴定	64
第三章 病毒和其他微生物的检测方法	67
实验一 螺旋体的形态观察、分离培养与血清学试验	67
实验二 支原体的分离培养与血清学试验	74
实验三 立克次体的形态观察与外斐试验	78
实验四 沙眼衣原体的分离培养与包涵体观察	79
实验五 真菌的形态观察、培养特性与鉴定方法	80
实验六 病毒形态的观察	85
实验七 病毒的分离培养技术	86
实验八 病毒数量和感染性的测定	93
实验九 病毒感染的血清学试验	95
实验十 病毒感染的快速诊断	106
第四章 临床标本中的细菌学检查	111
实验一 脓汁或渗出液标本	111
实验二 咽拭子标本	113
实验三 痰及支气管分泌物标本	115
实验四 血液及骨髓标本	118
实验五 脑脊液标本	121

实验六	尿液标本	123
实验七	粪便标本	128
实验八	胆汁标本	131
实验九	生殖道分泌物标本	134
第二篇 人体寄生虫学实验教程		
第五章 寄生虫形态学观察		139
实验一	消化道线虫	139
实验二	血液和组织内线虫	144
实验三	消化道吸虫	145
实验四	血液和组织内吸虫	147
实验五	绦虫	149
实验六	消化道及生殖道原虫	152
实验七	血液和组织内原虫	156
实验八	医学节肢动物(昆虫纲)	160
实验九	医学节肢动物(蛛形纲)	168
第六章 寄生虫学实验技术		172
实验一	粪便检查技术	172
实验二	肛门周围虫卵检查方法	182
实验三	血液检查	183
实验四	排泄物与分泌物的检查	186
实验五	器官组织内寄生虫采集与检查	188
实验六	寄生虫学特殊及常用的免疫学检查技术	191
第七章 寄生虫的体外培养及动物模型		194
实验一	阴道毛滴虫培养	194
实验二	齿龈内阿米巴培养	195
实验三	利什曼原虫动物模型	195
实验四	刚地弓形虫动物模型	196
实验五	鼠疟原虫动物模型	197
实验六	日本血吸虫动物模型	197
实验七	旋毛虫动物模型	199
第八章 寄生虫学综合性及设计性实验		200
实验一	蠕虫综合实验病例	200
实验二	原虫综合实验病例	211
实验三	节肢动物综合实验病例	219
实验四	人体寄生虫学设计性实验方案	222

第三篇 临床标本的病原学诊断

一、要求学生思考和完成的问题与工作·····	225
二、教学安排示范·····	225
三、示范病例·····	227

附 录

一、病原生物学实验室规则·····	231
二、常用仪器的使用与维护·····	232
三、常用培养基的制备与应用·····	235
四、常用染色液、试剂及溶液·····	249
五、细胞培养常用试剂及培养液·····	251
六、菌种的保存及保管·····	254
七、实验报告参考模式·····	260
八、医学微生物学重要英文词汇·····	266
九、人体寄生虫学重要英文词汇·····	270

第一篇 医学微生物学实验教程

医学微生物学实验课,是病原生物学课程学习过程中的重要环节之一。医学微生物学实验的目的,在于使学生加深、巩固和拓展对讲课内容的理解和体会;同时学习和掌握微生物学的基本操作技术。在全部实验过程中,严格贯彻“无菌概念”的培养和训练,为今后对感染性疾病的诊断、治疗和科学研究工作奠定基础。

第一章 微生物学实验基本技术

医学微生物学实验是根据病原微生物的生物学性状、致病性与免疫性设计出的多种实验。本章以细菌学实验为代表概括了微生物学实验的基本技术,包括细菌的分离培养技术、形态学、生物化学及血清学等实验技术和原理。为第二章、第四章中对病原菌系统分离鉴定的学习打基础,同时也是第三章中病毒及其他微生物检测方法学习的参考。另外,本章还对细菌在自然界的分布及环境因素对细菌的影响和细菌的遗传变异进行了实验证实。

实验一 细菌形态学检查方法

各种细菌在一定的环境条件下,有相对恒定的形态与结构。了解细菌的形态与结构是鉴别细菌的重要方法之一。此外,对分析细菌的致病性和免疫的发生机制等方面,也有一定的意义。

【目的要求】

1. 观察细菌的基本形态和一些细菌的特殊结构。
2. 学习检查细菌有无动力的方法,观察细菌运动现象。
3. 学习细菌单染色法、复染色法和负染色法,观察各种细菌染色标本。

【实验内容】

(一) 细菌的基本形态与特殊结构的观察

1. 基本形态(示教) 细菌在适宜的生长条件下所显示的正常形态主要分为三大类:球菌、杆菌和螺形菌。不同的细菌又可表现出不同的排列方式,在细菌的鉴别上有一定的参考价值。

材料

- (1) 球菌示教片:葡萄球菌、链球菌和脑膜炎奈瑟菌。
- (2) 杆菌示教片:大肠埃希菌和炭疽芽胞杆菌。

(3) 螺形菌示教片:霍乱弧菌。

方法

(1) 使用显微镜的油镜观察球菌、杆菌和螺形菌的示教片。

(2) 注意各菌的形状、大小、排列方式等特点。

结果记录

项目	葡萄球菌	链球菌	脑膜炎奈瑟菌	大肠埃希菌	炭疽芽胞杆菌	霍乱弧菌
细菌形态						
细菌排列方式						

2. 特殊结构(示教) 某些细菌具有特殊结构,其特殊结构的形成受到一定条件的限制。虽然特殊结构不是细菌生存所必需的,但它们的存在将赋予细菌一定的功能,在致病性、免疫性以及细菌的鉴别上都有一定的意义。

材料

(1) 芽胞示教片(破伤风梭菌)。

(2) 荚膜示教片(肺炎链球菌)。

(3) 鞭毛示教片(变形杆菌)。

(4) 菌毛电镜下照片(伤寒沙门菌)。

方法

(1) 使用显微镜的油镜,观察细菌的芽胞、荚膜和鞭毛的示教片。

(2) 观察菌毛电镜照片。

(3) 注意芽胞在菌体上的位置和大小;荚膜的薄厚及其与菌体的关系;注意鞭毛和菌毛的形态、数量及其位置。将所观察到的细菌特殊结构的形态特点记录于下表中。

结果记录

项目	破伤风梭菌	肺炎链球菌	变形杆菌	伤寒沙门菌
特殊结构				

(二) 细菌不染色标本检查法

鞭毛是细菌的运动器官。有鞭毛的细菌,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,因受到所处环境中液体分子的冲击而呈现摇摆颤动的现象。检查细菌有无动力的方法很多,有悬滴法、压滴法、暗视野显微镜法、相差显微镜法、半固体琼脂培养基法等,其中以悬滴法、压滴法及半固体琼脂培养基法较常用。许多杆菌和螺形菌具有鞭毛,有动力;一般球菌无鞭毛,没有动力。

1. 悬滴法

材料

(1) 菌种:变形杆菌、葡萄球菌肉汤培养物。

(2) 凹玻片、盖玻片、凡士林。

方法

(1) 取一接种环的变形杆菌或葡萄球菌肉汤培养物,置于盖玻片中央。在盖玻片四

角点上少许凡士林。

(2) 取凹玻片一张,将凹玻片反转,使凹窝对准盖玻片中心,覆于其上,轻轻按压,粘住盖玻片后再反转。以接种环柄轻压盖玻片周边,使其与凹窝边缘粘紧。

(3) 先以低倍镜找到悬滴的边缘后,再换用高倍镜观察(因凹玻片较厚、油镜焦距很短,故一般不能用油镜来检查)。

结果

变形杆菌有鞭毛可向不同方向迅速运动,葡萄球菌无鞭毛,不能自主运动,但因液体中水分子的撞击而呈布朗运动。

2. 压滴法

材料

(1) 菌种:变形杆菌、葡萄球菌肉汤培养物。

(2) 盖玻片、载玻片、镊子。

方法

(1) 以接种环取变形杆菌或葡萄球菌菌液 2~3 环,置于载玻片中央。

(2) 用镊子夹住盖玻片,覆盖于菌液上。放置时,先使盖玻片一边接触菌液,缓缓放下,以不产生气泡为佳。

(3) 用高倍镜或油镜观察结果。

结果

基本同于悬滴法的观察,油镜下结果更为清晰。

3. 半固体琼脂培养法 具有鞭毛的细菌,在半固体琼脂培养基中能冲破低浓度琼脂的阻力,而自原接种处向四周移动扩散生长,使整个培养基呈现混浊状态;无鞭毛、不具运动力的细菌则被阻,仅在接种部位生长繁殖,不向四周移动扩散生长。

材料

(1) 菌种:变形杆菌、葡萄球菌肉汤培养物。

(2) 培养基:半固体琼脂培养基。

方法

(1) 用接种针蘸取菌液后,以穿刺法接种至半固体琼脂培养基的中央。

(2) 37℃ 孵育 18~24h 后,分别观察两种细菌在半固体琼脂培养基内的生长情况,以判断有无动力。

结果

变形杆菌有鞭毛,可运动,在培养基中扩散生长,至培养基呈混浊状;葡萄球菌无鞭毛,不能运动,只沿穿刺接种线生长。

(三) 细菌染色标本检查法

活的细菌为无色半透明状,在普通光学显微镜下不易观察清晰。若用染色的方法使菌体着色与背景形成鲜明对比,可在显微镜下清晰地观察其形态。

一般染色法分为单染色法和复染色法。前者只用一种染料使细菌着色,可观察细菌的大小与形态。复染色法又称鉴别染色法,是用两种或两种以上染料,有协助鉴别细菌的作用。常用复染色法有革兰染色法和抗酸染色法。此外,尚有负染色法以及对细菌芽胞、鞭毛、荚膜等特殊结构的染色方法。

1. 单染色法 使用一种染料进行细菌染色,主要用于观察细菌形态、大小与排列方式。

材料

- (1) 菌种:大肠埃希菌、葡萄球菌琼脂斜面培养物。
- (2) 染液:碱性亚甲蓝染液或苯酚复红染液。

方法与结果

(1) 涂片

- 1) 取洁净载玻片 1 张,做好标记后置于实验台上。
- 2) 点燃酒精灯,右手以持笔式握持接种环并放置火焰中烧灼灭菌。用灭菌的接种环取无菌生理盐水 1~2 环,置于载玻片的一端。将接种环再次放在火焰上灭菌,以灭菌接种环自菌种管中挑取少许变形杆菌或葡萄球菌培养物与盐水混匀,涂布成面积约 $1.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$ 的菌膜(若用液体培养物,直接采取 1~2 环菌液作涂片即可),即为涂片,应薄而均匀。接种环采菌后,要再通过火焰灭菌,才能放下。

- 3) 干燥:涂片在室温中自然干燥。

- 4) 固定:手执载玻片的一端(即涂有标本的远端),标本面向上,在火焰外层快速地来回通过 3~4 次,共约 2~3s,以载玻片反面触及皮肤,不觉过烫为度。放置待冷后,进行染色。

- (2) 滴加碱性亚甲蓝或苯酚复红染液 1~2 滴,使染液盖满菌膜。1~2min 后,用细小水流,轻轻洗去多余染液。

- (3) 涂片用吸水纸轻轻吸干后,滴加香柏油一滴,油镜观察,菌体呈蓝色或红色。

2. 复染色法 用两种以上染料染色,将不同细菌染成不同的颜色。

革兰染色

革兰染色法是细菌学中使用最广泛的一种染色方法,是由丹麦医生 Hans Christian Gram 于 1884 年创建的。利用此法可将细菌分为革兰阳性细菌和革兰阴性细菌两大类。革兰阳性细菌因细胞壁中含有大量的肽聚糖和磷壁酸,可保留结晶紫与碘的复合物,而不被酒精脱色故显示为蓝紫色。革兰阴性细菌因其细胞壁中肽聚糖含量少,脂类物质含量高而被酒精脱色,经沙黄复染呈红色。

材料

- (1) 菌种:葡萄球菌、大肠埃希菌琼脂斜面培养物。
- (2) 革兰染色剂:结晶紫染液、卢戈(Lugol)碘液、95%乙醇和沙黄染液。
- (3) 载玻片、接种环、酒精灯、无菌生理盐水等。

方法

(1) 涂片

- 1) 取洁净载玻片 1 张,做好标记后置于实验台上。
- 2) 点燃酒精灯,右手以持笔式握持接种环并放置火焰中烧灼灭菌。用灭菌的接种环取无菌生理盐水 1~2 环,分别置于载玻片左右两处。
- 3) 左手持培养物琼脂平板,右手仍以持笔式握持接种环,并再次放在火焰上灭菌,待接种环冷却后,挑取单一葡萄球菌菌落。
- 4) 将挑取的细菌混合于其中一处的盐水中,涂抹均匀使成一层薄膜(若检材是液体,则不必加生理盐水),薄膜涂抹的面积约 $1.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$ 。

- 5) 按上法在载玻片的另一处制备大肠埃希菌涂片。
- (2) 于室温中自然干燥。
- (3) 固定:细菌涂片在酒精灯火焰上快速通过 3~4 次以固定细菌,使其不易从载玻片上脱落。注意不要将涂片直接放在火焰上烤,以免破坏细菌的结构。
- (4) 染色
 - 1) 初染:在涂膜上滴加结晶紫染液 1~2 滴,染 1min,用水冲洗,并轻轻倾去载玻片上的积水。
 - 2) 媒染:加卢戈碘液 1~2 滴,染 1min,用水冲洗。将表面积水甩干。
 - 3) 脱色:滴 95%乙醇数滴于载玻片上,频频摇晃以脱色,约 30s,立即用水冲洗(若涂膜较厚,可延长脱色时间,必须随时观察,以免脱色过度)。
 - 4) 复染:滴加沙黄染液 1~2 滴,复染 1min 后用水冲洗。最后用吸水纸吸干。
- (5) 用显微镜的油镜观察染色结果,将实验结果记录于下表中。

结果记录

细菌	染色性	形态	排列方式
葡萄球菌			
大肠埃希菌			

抗酸染色

结核分枝杆菌是引起结核病的病原体,菌体细长略弯曲,有分枝生长趋势。因其细胞壁含有大量脂质,一般不易着色,若经加温或延长染色时间或提高染液浓度而着色后能抵抗盐酸乙醇的脱色,故又称抗酸杆菌。

材料

- (1) 肺结核患者痰标本涂片(或卡介苗涂片)和枯草芽胞杆菌涂片(阴性对照)。
- (2) 抗酸染色剂:苯酚复红染液、3%盐酸乙醇、碱性亚甲蓝染液。

方法

- (1) 染色
 - 1) 初染:在已固定的细菌涂片上滴加苯酚复红染液数滴,染色 8~10min,用水冲洗。
 - 2) 脱色:滴加 3%盐酸乙醇,频频摇晃以脱色,至苯酚复红的颜色不再继续脱下为止,时间为 0.5~1min,用水冲洗。
 - 3) 复染:滴加碱性亚甲蓝染液 2~3 滴,1min 后用水冲洗。
 - 4) 用吸水纸把载玻片吸干,油镜观察。
- (2) 抗酸染色标本镜检:结核分枝杆菌为抗酸染色阳性,在蓝色背景下可见染成红色的细长或略带弯曲的杆菌,有分枝生长趋势,有时菌体内可含浓染颗粒,呈念珠状。枯草芽胞杆菌为抗酸染色阴性,菌体被染成蓝色。

结果记录

细菌	染色性	形态
枯草芽胞杆菌		
结核分枝杆菌		

3. 特殊染色法 细菌的某些结构如鞭毛、荚膜、芽胞、细胞壁等,需用特殊染色法才能着色,或使其染上与菌体不同的颜色,利于观察和鉴别。

鞭毛染色

材料

- (1) 菌种:变形杆菌琼脂斜面培养物。
- (2) 培养基:普通琼脂平板。
- (3) 染液:鞭毛染色液(配方见附录“四、常用染色液、试剂及溶液”)。
- (4) 载玻片、接种环、酒精灯、无菌蒸馏水等。

方法与结果

- (1) 细菌培养:变形杆菌点种于普通琼脂平板,37℃培养 18~24h。
- (2) 涂片制备:在洁净的载玻片中央用滴管滴加 1~2 滴蒸馏水,用灭菌后的接种环选取迁徙最远处的变形杆菌菌苔,轻点于载玻片中央的蒸馏水中,令其自由分散。将载玻片置于 37℃温箱中干燥,制备成涂片。

(3) 染色:用滴管取 1~2 滴染液置于制备好的涂片上,计时 5~10min。以蒸馏水冲洗载玻片,用吸水纸将载玻片拭干,油镜检查,菌体和鞭毛呈红色。

注意:在鞭毛染色中,较关键的问题在于载玻片的清洁度,要求使用新玻片,并用肥皂水煮沸 2~3min,冲洗干净后置蒸馏水中,用前捞出擦净。

荚膜染色

材料

- (1) 菌种:经肺炎链球菌感染死亡的小白鼠。
- (2) 染液:结晶紫饱和乙醇溶液、20%硫酸铜水溶液。
- (3) 载玻片、接种环、酒精灯等。

方法(Hiss 法)与结果

制作肺炎链球菌感染小白鼠腹腔液细菌涂片,自然干燥后,经火焰固定,滴加结晶紫染液,在弱火上略加热,使染液冒蒸气为止。用 20%硫酸铜液将涂片上的染液洗去,此时切勿再用水洗。以吸水纸吸干后镜检,菌体及背景均呈紫色,菌体周围有一圈淡紫色或无色的荚膜。

芽胞染色

材料

- (1) 菌种:枯草芽胞杆菌琼脂斜面培养物。
- (2) 染液:苯酚复红染液、碱性亚甲蓝染液、95%乙醇。
- (3) 载玻片、接种环、酒精灯、无菌生理盐水等。

方法与结果

制作枯草芽胞杆菌涂片,自然干燥后经火焰固定。滴加苯酚复红染液于涂片上,并弱火加热,使染液冒蒸气约 5min。冷后水洗,并用 95%乙醇脱色 2min。水洗,碱性亚甲蓝液复染 30s。水洗,干后镜检,芽胞呈红色,菌体为蓝色。

细菌细胞壁染色

材料

- (1) 菌种:葡萄球菌肉汤培养物。

(2) 染液:0.5%结晶紫水溶液、0.5%刚果红水溶液、5%鞣酸溶液。

(3) 载玻片、接种环、酒精灯、无菌生理盐水等。

方法与结果

(1) 制作葡萄球菌涂片,空气干燥后,置于5%鞣酸溶液中0.5~1h,水洗。

(2) 以0.5%结晶紫水溶液染1.5~2min,水洗。

(3) 再以0.5%刚果红水溶液脱色2~3min,水洗。

(4) 油镜观察,细胞壁呈蓝紫色。

细菌核质染色

细菌的核处于细胞质内,细胞质中含大量RNA,容易和碱性染料结合,影响核质的着色。故先将细胞质中的RNA经强酸处理使之水解,再染色方可使细菌的核清晰呈现。

材料

(1) 菌种:蜡样芽胞杆菌琼脂斜面幼龄培养物。

(2) 试剂:甲醇、HCl(1mmol/L)、姬姆萨染液、新鲜双蒸馏水(pH7.0)。

方法与结果

(1) 将蜡样芽胞杆菌制成均匀涂片,自然干燥,甲醇固定。

(2) 将涂片置60℃ HCl(1mmol/L)中水解,10min,取出,水洗。

(3) 姬姆萨染液20~30滴加入10ml pH7.0的新鲜双蒸馏水中,将涂片置于此染液中30min,取出。

(4) 油镜观察:胞质染成浅紫红色,核质为深紫色。

细菌异染颗粒染色(Albert法)

某些细菌,如白喉棒状杆菌细胞内有异染颗粒存在,用特殊染色法,使之染出与菌体不同的颜色,可用于细菌鉴别。

材料

(1) 菌种:白喉棒状杆菌培养物。

(2) 染液:甲液:甲苯胺蓝0.15g、孔雀绿0.2g,溶解于2ml的95%乙醇中,加入蒸馏水100ml及冰醋酸1ml,置室温24h后,滤纸过滤待用。乙液:将碘化钾3g溶于10ml蒸馏水中,再加碘2g,待溶解后,加蒸馏水300ml。

方法与结果

涂片,自然干燥,火焰固定。用甲液染5min,水洗。再用乙液染色1min,水洗。油镜观察。菌体呈蓝绿色,异染颗粒为蓝黑色。

镀银染色

材料

(1) 固定液:冰醋酸0.1ml、甲醛0.2ml,加蒸馏水至100ml。

(2) 媒染液:鞣酸0.5g、苯酚0.1g,加蒸馏水至100ml。

(3) 银溶液:硝酸银5g,加蒸馏水至100ml。

使用前取银溶液20ml,逐滴加入10%氨液,至所产生的棕色沉淀物轻摇溶解为止。如溶液很澄清,可再加入硝酸银溶液数滴,直至溶液轻摇显示轻度混浊为止。

(4) 载玻片、盖玻片、接种环、酒精灯等。

方法与结果

- (1) 取下疖、梅毒疹渗出物或淋巴结抽出物涂片,自然干燥。或采用组织切片。
- (2) 用固定液固定 1~2min。
- (3) 无水乙醇洗涤。
- (4) 滴加媒染液 2~3 滴,加热至产生蒸气,染 30s 后水洗。
- (5) 滴加经氨液处理的银溶液,并加热产生蒸气,染 30s 后,水洗,待干。
- (6) 加盖玻片后用加拿大树胶封片,油镜观察,梅毒螺旋体呈明显的棕褐色,有紧密的螺旋 8~14 个,背景呈棕黄色。

4. 负染色法

墨汁染色

材料

- (1) 经新生隐球菌感染死亡的小鼠腹腔渗出液、墨汁、生理盐水。
- (2) 载玻片、盖玻片。

方法与结果

- (1) 取生理盐水 1 滴置于洁净的载玻片上,再加新生隐球菌感染死亡小鼠腹腔渗出液一接种环,然后滴加墨汁 1 滴混合并加盖玻片,镜检。
- (2) 高倍镜下可见菌体呈球形、壁厚、大小不等,有芽生孢子,孢子内有一个较大的反光颗粒(蜡质颗粒)和许多小颗粒,菌体周围有宽厚透明的荚膜,厚度可与菌体相等,或大于菌体。

注意:及时镜检,勿干燥。

刚果红染色

可观察到奋森疏螺旋体及梭杆菌。

材料

- (1) 牙垢。
- (2) 染液:2%刚果红水溶液、浓盐酸。
- (3) 无菌生理盐水、无菌牙签、载玻片等。

方法

- (1) 用接种环取无菌生理盐水 1 环,置于洁净载玻片一端。
- (2) 同学间或自己用无菌牙签,挑取恒磨牙牙垢,加到载玻片的盐水中,混匀。
- (3) 于载玻片的另一端滴 1 滴 2%刚果红水溶液。
- (4) 用接种环将待检标本与刚果红溶液混匀后制成薄膜,自然干燥。
- (5) 置于浓盐酸蒸气上熏至蓝色。
- (6) 油镜观察。

结果

在蓝色背景中,可见未着色的螺旋体,有 3~8 个稀疏而不规则的螺旋,同时还可见梭杆菌等。

(钟启平)

实验二 细菌的培养技术

一般细菌均可用人工方法进行培养,使其生长繁殖,以便进一步观察和研究。为了获得良好的细菌培养物,在分离培养细菌时,除采用适宜的培养基并考虑到其他的培养条件(如温度、湿度、酸碱度、气体等)之外,掌握各种分离培养和接种的基本技术,也是重要环节。

培养细菌需选用适宜的培养基。能满足一般细菌生长繁殖的培养基常称为基础培养基,包括营养肉汤、营养琼脂、蛋白胨水等。按物理状态可将细菌培养基分为固体、液体和半固体3种。在液体培养基中(如营养肉汤)加入1.5%~2%的琼脂,即凝固成固体培养基也称营养琼脂(平板、斜面);琼脂含量在0.2%~0.5%时,即成为半固体培养基。琼脂在培养基中起赋形剂作用,不具营养意义。固体培养基用于细菌的分离和纯化;液体培养基用于大量繁殖细菌,但必须种入纯种;半固体培养基则用于观察细菌的动力和短期保存菌种。

细菌在自然界分布广、种类多,各种被检材料,如粪便、痰液、脓汁、水及食物等常混杂有多种细菌。如欲研究其中一种细菌,或检查患者标本中是否存在某种病原菌时,常需先将各种细菌分离,以获得纯培养,然后进一步观察其形态结构、研究其生物学特性。

培养细菌常用4种接种方法。一种是平板划线法,主要是借助划线将混杂的细菌在琼脂平板表面分散开,使单个细菌能固定在某一点,生长繁殖后形成单个的细菌集团(即菌落),以达到分离纯种的目的。另外3种接种方法即是斜面培养基接种法、液体培养基接种法和穿刺接种法,常用于纯种细菌的大量繁殖,保存菌种,或观察细菌某些生化反应、动力等特性。

【目的要求】

1. 学习细菌基础培养基的制备。
2. 学习和掌握无菌操作技术。
3. 学习和掌握细菌分离和培养的基本技术。

【实验内容】

(一) 基础培养基的制备

1. 普通肉汤培养基(见附录“三、常用培养基的制备与应用”)。
2. 普通琼脂培养基(见附录“三、常用培养基的制备与应用”)。
普通琼脂平板培养基
普通琼脂斜面培养基
3. 半固体培养基(见附录“三、常用培养基的制备与应用”)。
4. 1%蛋白胨水培养基(见附录“三、常用培养基的制备与应用”)。

(二) 细菌的人工培养

1. 细菌的接种方法