

医学微生物学 实验指导

湖南医科大学微生物学教研室

一九九九年四月

实验室规则

- 一、进入实验室应穿实习衣，离室时脱下，反折放回原处。
不必要的物品不带入实验室。
- 二、实验室内禁止吸烟、吃食物，不得高声谈笑或随便走动。
- 三、如有传染性材料污染桌面、地面等时，应立即用3%~5%来苏液等处理半小时以上，然后洗净。
- 四、用过的有菌器材切不可^{及痰板}随处乱扔或冲入水池，应放在指定的地点。须送温箱培养的物品，应标记清楚后送到指定地点。
(真) 白念 (痰、分泌物) 棉签染色 日常菌种/白念感染
- 五、实验完毕，应物归原处将桌面整理清洁，实验室打扫干净。
新陈(肠管液) 果汁染色 白染 芽胞 随肠
离开实验室前，需用肥皂洗手，如做病原微生物实验时，应将手浸在2%来苏液中5min左右，再用肥皂及自来水洗净。

目 录

第一部分 微生物学基本技术.....	1
实验一 常用仪器及无菌室简介.....	1
实验二 实验室常用器材的处理与消毒灭菌.....	8
实验三 细菌的染色技术(常用).....	10
一、细菌涂片的制作.....	10
二、美蓝染色法.....	11
三、革兰染色法.....	11
四、抗酸染色法.....	11
实验四 细菌形态与结构的观察.....	13
一、细菌基本形态的观察.....	14
二、细菌基本结构的染色和观察.....	14
三、细菌特殊结构的观察.....	15
实验五 细菌的人工培养法.....	15
一、常用培养基的制备.....	15
二、细菌接种技术.....	18
三、细菌的培养技术.....	20
四、细菌的生长情况观察.....	21
五、倾注培养和活菌计数.....	22
实验六 细菌生化鉴定法.....	23
一、单糖发酵试验.....	23
二、IMViC试验.....	24
三、硫化氢试验.....	25
四、脲酶试验.....	26
五、数字编码测定法.....	26
实验七 细菌血清学鉴定法.....	30
一、凝集试验.....	30
二、沉淀试验(毛细管法).....	34
三、荚膜肿胀试验.....	35
实验八 理化及生物因素对细菌的影响.....	36
一、紫外线对空气中微生物的杀灭作用.....	36
二、煮沸对微生物的影响.....	37
三、2.5%碘酒和75%酒精对皮肤的消毒作用.....	37
四、高压蒸汽灭菌法的灭菌效果检查.....	38

五、常用消毒剂的种类、用法和用途.....	38
六、噬菌体的特异性试验.....	39
七、细菌对抗菌药物的敏感性试验.....	40
实验九 细菌的遗传与变异.....	44
一、细菌变异现象的观察.....	44
二、R因子传递试验.....	46
三、质粒DNA转化试验.....	47
实验十 实验动物感染及细菌的致病性试验.....	49
一、实验动物的管理与选择.....	49
二、动物接种与采血技术.....	50
三、免疫血清的制备.....	52
四、细菌毒素的检测.....	54
实验十一 其它实验.....	55
一、饮用水的卫生细菌学检测.....	56
二、食品卫生细菌学检测.....	64
三、空气的卫生细菌学检验.....	70
第二部分 临床常见病原菌的培养与鉴定.....	72
实验十二 球菌.....	72
一、病原性球菌的形态及染色性观察.....	72
二、病原性球菌的培养特性观察.....	72
三、血标本的细菌学检查.....	73
实验十三 肠道杆菌.....	79
一、肠道杆菌的形态及染色性.....	79
二、肠道杆菌的培养特性.....	79
三、粪标本的细菌学检查.....	80
四、尿标本的定量培养法.....	86
实验十四 厌氧性细菌.....	87
一、厌氧性细菌的形态及染色性观察.....	87
二、厌氧性细菌的培养特性观察.....	88
三、产气荚膜杆菌的动物试验.....	89
实验十五 棒状杆菌属.....	89
一、棒状杆菌属的形态及染色性观察.....	89
二、白喉杆菌的毒力试验.....	90
三、疑似白喉患者的咽拭子细菌学检查.....	91
实验十六 分枝杆菌属及需氧性放线菌.....	94
一、分枝杆菌属的形态及染色性观察.....	94
二、结核杆菌的培养特性观察及与非结核分枝杆菌的区别.....	95
三、结核病人痰标本直接镜检.....	96
四、诺卡菌属的特性.....	97

实验十七 需氧芽胞杆菌.....	99
一、炭疽杆菌与枯草杆菌的形态及染色性观察.....	100
二、炭疽杆菌与枯草杆菌的培养特性观察.....	100
三、炭疽杆菌串珠试验.....	100
四、蜡样杆菌食物中毒的细菌学检查.....	101
实验十八 霍乱弧菌、副溶血弧菌.....	103
一、霍乱弧菌的鉴定.....	103
二、副溶血弧菌的鉴定.....	105
实验十九 弯曲菌属、幽门螺杆菌、军团菌属.....	107
一、空肠弯曲菌的鉴定.....	107
二、幽门螺杆菌的鉴定.....	108
三、军团菌的鉴定.....	109
实验二十 螺旋体.....	111
一、病原性螺旋体的形态及染色性观察.....	112
二、钩体的培养特性观察.....	112
三、钩体的动力检查——压滴法.....	113
四、钩体的显微镜凝集试验.....	113
五、梅毒螺旋体血清学试验.....	114
六、伯氏螺旋体的血清学试验.....	116
实验二十一 支原体.....	118
一、肺炎支原体形态及菌落观察.....	119
二、肺炎支原体冷凝集试验.....	119
三、溶脲脲原体脲酶试验.....	120
实验二十二 衣原体.....	121
一、姬姆萨染色检查沙眼衣原体包涵体.....	121
二、荧光抗体法检测沙眼衣原体.....	122
三、ELISA法检测衣原体.....	123
四、细胞培养分离衣原体.....	125
实验二十三 立克次体.....	126
一、恙虫病立克次体的形态观察.....	126
二、外斐反应.....	127
实验二十四 真菌.....	128
一、真菌的基本形态及结构观察.....	128
二、真菌的培养特性观察.....	130
三、真菌的药敏试验.....	131
四、常见浅部真菌的鉴定.....	132
五、常见深部真菌的鉴定.....	133
第三部分 病毒学实验.....	139
实验二十五 病毒形态结构观察.....	139

一、病毒包涵体观察.....	139
二、电子显微镜技术.....	139
实验二十六 病毒的分离培养技术.....	143
一、病毒的动物接种法.....	143
二、病毒的鸡胚接种法.....	143
三、病毒的组织培养法.....	146
实验二十七 病毒数量与感染性的测定.....	151
一、蚀斑试验.....	151
二、TCID ₅₀ 测定.....	152
实验二十八 呼吸道病毒.....	153
一、流感病毒的分离与鉴定.....	153
二、ELISA夹心法检测呼吸道合胞病毒(RSV)抗原.....	157
实验二十九 肠道病毒.....	158
一、肠道病毒的分离鉴定.....	158
二、轮状病毒的检测.....	159
实验三十 甲型和戊型肝炎病毒.....	162
一、ELISA法检测甲型肝炎病毒IgM抗体.....	163
二、ELISA法检测HEV-IgG抗体.....	164
实验三十一 乙型、丙型和庚型肝炎病毒.....	164
一、ELISA法测HBsAg.....	165
二、反向间接血凝法(RPHA)检测HBsAg.....	166
三、PCR法检测HBV-DNA.....	166
四、斑点杂交法检测HBV-DNA.....	168
五、ELISA法检测HCV-IgM抗体.....	169
六、PCR法检测HCV-RNA.....	170
七、ELISA法检测HGV-IgG抗体.....	172
实验三十二 人类免疫缺陷病毒.....	173
一、ELISA法检测HIV抗体筛选试验.....	173
二、WB法检测HIV抗体确认试验.....	174
实验三十三 出血热病毒.....	176
一、免疫荧光法检测抗汉坦病毒IgM.....	177
二、ELISA法检测汉坦病毒特异性IgM.....	178
实验三十四 疱疹病毒.....	178

第一部分 微生物学基本技术

实验一 常用仪器及无菌室简介

微生物学是一门实验性学科。微生物学实验必需一些基本实验条件。本部分简要介绍微生物学实验的一些常用仪器和其它基本实验条件。

一、灭菌器

(一)高压蒸汽灭菌器

1.构造及原理：此种灭菌器为一个双层的金属圆筒，两层之间盛水。外层坚厚，其上有金属厚盖，盖旁附有螺旋，借以扣紧厚盖，使蒸汽不能外溢。随着锅内蒸汽压力的升高，温度亦相应增高。它们之间的关系如表1

表1 不同蒸汽压力所能达到的温度

蒸 汽 压 力		温度 (°C)
磅/平方	公斤/平方厘米	
5	0.35	108.8
8	0.57	113.0
10	0.70	115.6
15	1.0	121.3
20	1.46	126.2
25	1.77	130.4
30	2.10	134.6

高压蒸汽灭菌器上装有排气阀、安全阀，以调节器内蒸汽。有温度计及压力表，以示内部的温度和压力。器内装有带孔的金属搁板，用以放置待灭菌物品。

2.使用方法(以手提式灭菌器为例)：

(1) 在外层锅内加适量的水，将需要灭菌的物品放入内层锅。把排气管插入孔道内，关好锅盖并对称地扭紧螺旋。

(2) 加热使锅内产生蒸汽，当压力表指针达到0.35公斤 / 平方厘米时，打开排气阀，将冷空气排出，此时压力表指针下降，当指针下降至零时，即将排气阀关好。

(3) 继续加热，锅内蒸汽增加，压力表指针又上升，当压力增加到所需压力时，将火力减小，使蒸汽压力维持所需压力水平一定时间，然后将灭菌器离开炉火或断电，慢慢打开排气阀。

3.注意事项：

(1) 待灭菌的物品放置不宜过紧。

(2) 必须将冷空气充分排除，否则影响灭菌效果。

(3) 灭菌完毕后，不可放气太急，否则瓶中液体会剧烈沸腾，冲掉瓶塞而外溢。须

使器内压力降至与大气压相等后才开盖。

(4) 装培养基的试管或瓶子的棉塞上，应包油纸或牛皮纸，以防冷凝水入内。

(5) 为了确保灭菌效果，应定期检查灭菌效能，常用的方法是将硫磺粉末(熔点为 115°C)或安息香酸(熔点为 120°C)置于试管内，然后进行灭菌试验。如上述物质熔化，即说明加压蒸汽灭菌器内温度已达要求，灭菌的效果是可靠的。

4.应用：为最常用的灭菌方法。一般以1公斤/平方厘米灭菌15~20min。凡耐高温和潮湿的物件，如培养基、生理盐水、衣服、纱布、玻璃器材等都可用本法灭菌。

(二)电热干燥灭菌器(烤箱)

1.构造及原理：此种灭菌器为一种双层壁的金属箱。箱底处装有电炉，作为热源，箱外包以石棉板，以防散热，箱顶装有温度计。

2.使用方法：将欲灭菌的器材置烤箱内，闭门通电，待温度升至 $160\sim 180^{\circ}\text{C}$ 后，保持2小时。

3.注意事项：

(1) 待灭菌的玻璃器材必须充分干燥，否则耗电过多，灭菌时间长，且玻璃器材有破裂的危险。

(2) 灭菌温度不要超过 180°C ，否则棉花及纸将被烧焦。

(3) 灭菌后待箱内温度下降至与外界温度相差不多时，方可开门，否则冷空气突然进入，玻璃器材极易破裂，且有引起纸和棉花起火的危险。

4.应用：凡能耐高温而且需要干燥的物品如玻璃器材，金属器械等(手术器械及针头例外)，可用此法灭菌。

二、滤菌器

1.构造及种类：滤菌器由孔径极小且能阻挡细菌通过的陶瓷、硅藻土，石棉或玻璃屑等制成。种类多，但常用的有下列几种：

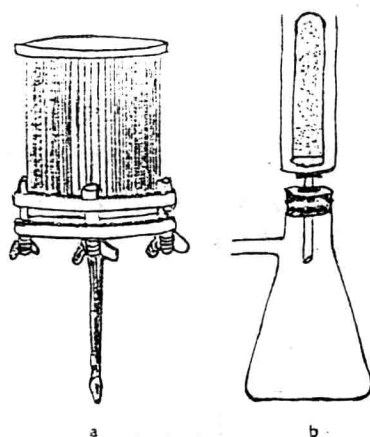


图1-1 a. 赛氏滤菌器；b. 贝克菲尔滤菌器

(1) 赛氏(Seitz)滤菌器(图1~1a): 由三部分组成。上部的金属圆筒, 用以盛装将要滤过的液体; 下部的金属托盘及漏斗, 用以接受滤出的液体; 上下两部分中间放石棉制的滤板, 滤板按孔径大小可分三种: K滤孔最大, 供澄清液体之用; EK滤孔较小, 供滤过除菌; EK~S滤孔更小, 可阻止一部分较大的病毒通过。滤板依靠侧面附带的紧固螺旋拧紧固定。

(2) 贝克菲尔滤菌器(图1~1b): 用硅藻土加压制成的空心圆柱体, 底部连接金属托盘, 托盘中央有金属导管, 金属导管插入橡胶塞, 以便装在抽气瓶上, 在圆柱体外, 有玻璃套筒, 用以盛放被滤液体。按滤孔大小分为三型: V型, 只除去大部分细菌; N型, 能除去所有细菌, 但病毒能通过; W型, 能除去一部分较大病毒; 一般除菌使用N型。

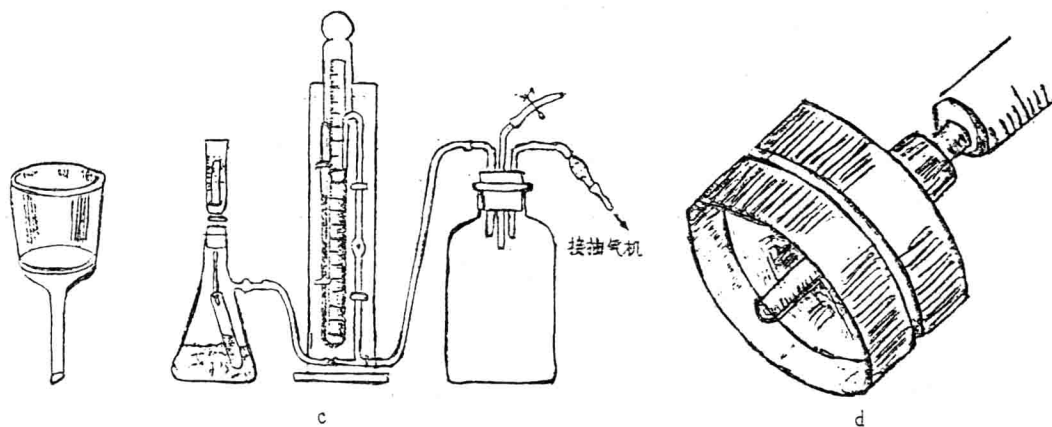


图1~1 c. 玻璃滤菌器与滤器使用时的滤过装置: d. 薄膜滤菌器

(3) 玻璃滤菌器(图1-1c): 由玻璃制成。滤板采用细玻璃砂在一定高温下加压制成。孔径由 $0.15\sim 250\mu\text{m}$ 不等, 分为 G_1 , G_2 , G_3 , G_4 , G_5 , G_6 六种规格, 后两种规格均能阻挡细菌通过。

(4) 薄膜滤菌器(图1-1d): 由塑料制成。滤菌器薄膜采用优质纤维滤纸, 用一定工艺加压制成。孔径 200nm 。能阻挡细菌通过。

2. 用法: 将清洁的滤菌器(赛氏滤菌器、薄膜滤菌器须先将石棉板、或滤菌薄膜放好, 螺旋拧紧)、滤瓶分别用纸或布包装好, 加高压蒸汽灭菌。再以无菌操作把滤菌器与滤瓶装好, 并使滤瓶的侧管与缓冲瓶相连, 再使缓冲液与抽气机相连。将待滤液体倒入滤菌器内, 开动抽气机使滤瓶中压力减低, 滤液则徐徐流入滤瓶中(量少时可事先

在滤瓶中放试管接收滤液)。滤毕, 迅速按无菌操作将滤瓶中的滤液放到无菌容器内保存。滤器经加压蒸汽灭菌后, 洗净备用。

3.用途: 用于除去混杂在血清、腹水、糖溶液、某些药物等不耐热液体中的细菌。

三、恒温箱(温箱)

1.构造及原理: 结构因种类不同而异, 有的是以热空气加温, 也有以热水加温的。其温度是依靠温度调节器来维持的, 温度调节器有各种类型: 如定温膨胀器、双合金式和水银式温度调节器。其原理是当恒温箱内温度超过所需温度时, 温度调节器就使电路中断, 加热自动停止; 当温度低于所需温度时, 电路又恢复, 温度即上升。在大实验室中可设恒温室。

2.应用: 常用于人工培养细菌。一般病原微生物以 $36\sim 37^{\circ}\text{C}$ 为最适宜。

四、冰箱

根据冰箱温度的高低, 分普通冰箱(家用冰箱)及低温冰箱。前者维持温度一般在 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 之间, 其冷藏室内可达零下 20°C ; 后者的温度可达零下 $50\sim 90^{\circ}\text{C}$ 。

冰箱主要用于保藏菌种、血清、培养基及其他生物制品。

五、液氮罐

即储存液氮的容器。液氮罐具有良好的隔热性能, 可避免液氮在短时间内气化, 较长时间地保持低温状态(-196°C)。

主要用于组织细胞、菌种、病毒及生物活性物质的长期保藏。

六、恒温水浴箱(水浴箱)

一般为金属制的长方形箱, 箱内盛有温水, 用电热维持温度, 通常可自 37°C 调节至 56°C 。箱盖呈斜面, 以便水蒸汽所凝成的水滴沿斜面流下, 避免水滴落下箱内的试管中。

此仪器系作血清学反应时加温用。

七、厌氧培养箱

(一)构造及原理

厌氧培养箱主要是利用密封、抽气、换气及化学除氧方法造成厌氧状态, 有利于厌氧菌的生长繁殖。厌氧培养箱装有真空表、真空泵气阀、温度控制器、总电源指示灯、六个培养罐气阀。箱内装有远红外加热器、需氧培养槽以及六个培养罐体。

1.气体纯度与气体分配:

(1)纯度要求: 厌氧菌培养所用气体纯度需达99.99%以上。

(2)气体分配:

	N_2	H_2	CO_2
厌氧菌气体分配率(%)	80	10	10
微需氧菌气体分配率(%)	80	15	5
需 CO_2 菌气体分配率(%)	10	普通大气	90

2.干燥剂与脱氧剂:

(1) 高效干燥剂分子筛3A。

(2) 102型脱氧催化剂(钯粒)。

3. 指示剂:

(1) 厌氧环境指示剂: 美蓝溶液。

(2) CO₂环境指示剂: 溴麝香草酚兰。

(二) 操作方法

1. 首先将所有气阀全部关闭。开启真空泵阀, 再开启A罐体阀, 将A罐体门敞开。

2. 迅速将已接种细菌的培养基放入罐内, 同时将105型脱氧催化剂约50克与高效干燥剂分子筛3A约15克混合后放入2只不加盖玻璃皿内, 而后放入A罐内。

3. 将预先备好的厌氧环境指示剂放入罐门真空玻璃前(以利于观察颜色变化), 迅速关闭罐门、扭紧。

4. 开动真空泵, 当真空度达到700mmHg时, 将泵阀门关闭后, 再关停真空泵电源。

5. 开启输气总阀(即输N₂、H₂、CO₂阀), 开启气体盘铜阀(N₂阀)用N₂冲洗罐床及管路, 轻轻开启N₂瓶阀及减压器阀。

6. 当真空表针由700mmHg回复0位时, 关闭N₂铜阀, 再开启真空泵阀, 按上述重复一次, 以冲洗残余杂质——氧。

7. 再按“4、5”操作, 按需要比例通入N₂、H₂、CO₂。

8. 真空表指针回复到0位时, 即将铜瓶阀门关闭, 再次检查, 所有气阀需一律关闭。

9. 在已放置接种之培养基的罐门, 挂一标牌, 注明放物日期, 并在化验单上也注明罐体号。

八、二氧化碳孵箱

由二氧化碳气源和培养箱两部分组成。该孵箱可自动调节二氧化碳的含量和温度, 保持箱内二氧化碳的恒定浓度(通常设置为5%)。箱内有盛水容器, 可保持箱内湿度。

主要用于组织细胞培养以及奈瑟氏菌、布鲁氏菌等的初次分离培养。

九、离心机

1. 构造及原理: 主要由底座和容器室组成。底座内有电动机和转速调节器, 后者可通过旋钮或手柄调节电阻值而控制电动机转速; 容器室内有旋转盘, 它是固定在电动机上用于放置离心套管的装置, 一般吊有4~6个金属环, 离心时, 可甩成水平(俗称水平离心机)。

2. 使用方法:

(1) 将离心机置于平稳台面上。平稳离心的对称重量(包括离心管及其套管)后, 放入离心机旋转盘内, 并盖紧离心机容器室盖。

(2) 离心前检查电源开关是否拨向“关”位置，调速手柄(或旋钮)是否置于最低速度位置。

(3) 接通电源后，将开关拨向“开”位置，再平稳移动调速手柄(或旋钮)，视转速表指示，调到所需转速位置。1~2min后转速稳定则开始计时。

(4) 用毕将调速器手柄(或旋钮)退回原位，再将开关拨向“关”位置。

3.应用：用于混合溶液的快速分离和沉淀。

十、普通光学显微镜(显微镜)

1.油镜的原理：油镜的透镜很小，从玻璃片透过的光线通过空气时，因介质密度不同，发生散射现象，使射入镜筒的光线很少，物象不清。若在油镜与玻璃片间加入与玻璃折射率相近的香柏油(图1)，则使通过的光线不至因折射而减弱，因此能清楚地看到物象。

2.使用方法：

(1) 对光：于自然光线下观察时，应用平面反光镜；在人工光源或减弱光处则应用凹面反光镜。检查不染色标本宜用弱光，即将聚光器降低或缩小光圈；检查染色标本时光线宜强，应将光圈完全打开并升高聚光器。

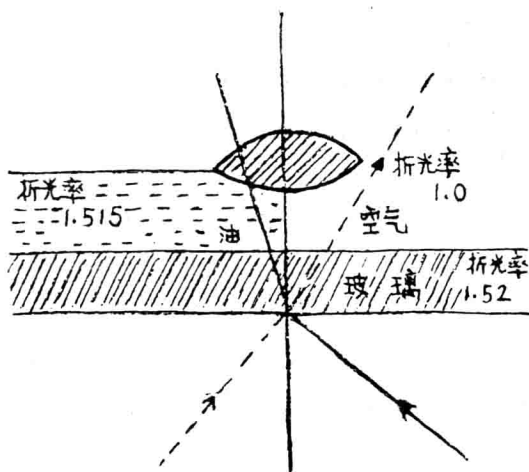


图1 油镜的原理

(2) 观察：将载玻片放在载物台上，用夹片器固定，先用低倍镜找到标本所在处，再换油镜观察。使用油镜时，须在载玻片的标本部位滴香柏油一滴，从旁观察并扭动粗螺旋使载物台上升，将油镜头浸入油内接近标本表面，但不要碰到玻片，再转动粗螺旋使载物台徐徐下降，至视野中看到标本轮廓，然后转动细螺旋至清晰。细螺旋是显微镜最精细而脆弱的部分，只能做往复的回转，不要向同一方向转动数周以上。

3.保护方法：

(1) 物镜及目镜须经常保持清洁，特别是油镜，使用完毕后，应立即用擦镜纸滴加少许二甲苯后将镜头的油擦掉，再用干的擦镜纸擦干。

(2) 显微镜使用完毕应将物镜转成“八”字形，使之不正对光线，降下聚光器，然后送入镜箱。

十一、暗视野显微镜

1. 构造与原理：在显微镜上安装一个特制的聚光器——暗视野聚光器。此聚光器中央为一黑板所遮，光线不能直接通向镜筒，使视野背景黑暗。这样，从聚光器周边斜射到载玻片上细菌等微粒上的光线，就因散射作用而发出亮光，反射到镜筒内。故在强光照射下，可在黑色的背景中看到发亮的菌体。正如我们在暗室内，能看到从隙缝漏入的阳光内有无数颗尘埃微粒跳跃飞舞一样。

2. 使用方法：

(1) 将显微镜聚光器卸下，装上暗视野聚光器，置暗室，使用人工光源。

(2) 先用低倍物镜观察，调节光环置中央后，在暗视野聚光器表面滴上香柏油(或水)，再将标本夹在移动尺上。

(3) 调节暗视野聚光器，使之油滴(或水滴)与镜台上的载玻片底面接触。

(4) 其余操作同显微镜。

十二、荧光显微镜

1. 构造及原理：

(1) 荧光显微镜光源：能发射丰富的紫外光和紫蓝光，常用150~200瓦高压汞灯。

(2) 滤光片：① 激发滤光片装于光源与聚光器之间，可选择性使紫外光及紫蓝光通过，而激发荧光素发出荧光；② 吸收滤光片装于物镜与目镜之间，可吸收紫外光及紫蓝光，仅让荧光通过，以便观察标本和保护眼睛。

2. 使用方法：

(1) 将荧光显微镜置暗室，开启光源，待光源稳定并达到一定亮度(约5~10min)后，对准光轴。

(2) 装好配对的激光滤光片和吸收滤光片后再作观察，操作同显微镜。

3. 注意事项：

(1) 如用高压汞灯作光源，使用时一经开启不宜中断。断电后需待汞灯冷却后(约15min)方能再启用。

(2) 观察标本时间不宜太长，因标本在高压汞灯下照射超过3min，即有荧光减弱现象。

十三、医用净化工作台(超净工作台)

医用净化工作台是改变局部环境空气洁净度及无菌度的重要设备，常用来进行无菌操作。

其构造主要有电器部分、送风机、三级过滤器(初、中、高)及紫外线杀菌灯等。

使用前50min打开紫外线杀菌灯，处理净化工作区空气及表面积累的微生物。30min后关闭杀菌灯，并启动送风机，清除尘粒，10~20min后即可于操作区进行操作。工作完毕方停止送风机运行，并放下防尘帘。

十四、无菌室

无菌室是一间光照度良好，无直接空气对流，并与外界隔离的小室。其外有一缓冲过道，在内室门中开一小活动窗，以便室内外物品的传递。室内有紫外线灯(其多少取决于无菌室空间的大小)。

无菌室应经常保持清洁，工作前应将室内抹净，地上用洗把拖湿，然后将需用的器材放入室内，关好门后，开启紫外线灯照射1小时。工作者进入时应穿戴无菌衣、帽及口罩，并换清洁的胶底鞋(无菌室专用)。进入前将紫外线灯关灭，在工作未完成前，不应随便开门出入。工作后，将室内打扫干净方可离开。

实验二 实验室常用器材的处理与消毒灭菌

一、常用玻璃器材的处理法

(一)玻璃器材清洁的重要性

玻璃器材若不清洁，常可影响实验结果，如影响培养基的pH值，甚至由于某些化学物质的存在可抑制微生物的生长；试管不清洁也可影响血清学反应的结果，如在pH<3时可发生酸凝集。

(二)玻璃器材的处理法(图2-1)



图2-1 玻璃器材处理

二、橡皮类物品的处理法(图2-2)

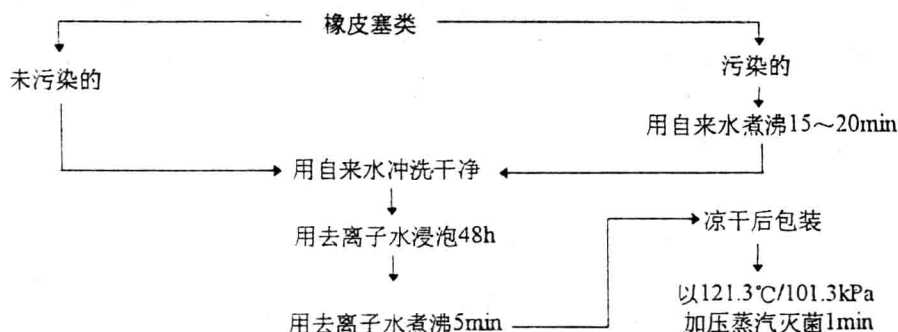


图2-2 橡皮类物品处理

【附】

清洁液的配制:

重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$) 100克

水 1000ml

浓硫酸(粗) 250ml

先将重铬酸钾与水置塑料桶中搅拌溶化,置桶于冷水中,慢慢加入浓硫酸,并不断搅拌。此液可使用多次,至颜色变暗绿时,即失去清洁能力,不能再使用。

三、金属器械的处理法

1.用过的无传染性刀、剪和镊子等用自来水冲洗干净,立即擦干,防止生锈。若急用,可于使用前浸泡于95%酒精内,用时取出并经过火焰,待器械上的酒精自行燃烧完毕后即可使用。一般用加压蒸汽灭菌或煮沸消毒。

2.污染的金属器械可先煮沸15min,然后按上述处理。器械上如带有动物组织碎屑,先在5%石炭酸中洗去碎屑,然后加压蒸汽或煮沸灭菌。临时急用,也可酒精烧灼灭菌。

注意金属器械(包括注射用针头)最好不要干烤灭菌,更不能在火焰上直接烧灼,否则易引起金属钝化,影响使用。

四、塑料及有机玻璃器械的处理法

这类物品在使用后直接浸泡在2%~3%盐酸溶液中过夜,取出后用棉签蘸去污剂逐孔擦洗,然后用自来水彻底冲洗,蒸馏水洗2~3次,晾干。如果是多孔培养板,则必须用2层塑料袋包装并密封好,用 ^{60}Co 射线辐照(120万拉得)灭菌备用。玻璃皿不宜用辐照灭菌,因为辐射会使玻璃变成茶色。

五、无菌室及其他污染物品的处理法

1.无菌室的消毒 平时在操作前后,均应用紫外线照射0.5~1小时。若出现霉菌或顽固性细菌污染时,要用福尔马林熏蒸消毒,每立方米容积使用福尔马林10~15ml,加高锰酸钾5~7.5g,密闭门窗,熏蒸4小时以上或过夜。由于福尔马林有刺激性,因而现在已多用1%~2%的过氧乙酸熏蒸。

2.其他污染物品的消毒 有时因某些意外造成物体、桌面或地面的污染,常用5%石炭酸处理2min,若因操作不慎致使皮肤被病原性细菌污染,需用2.5%来苏或0.1%新洁尔灭浸泡洗涤至少20min。若实验中可能接触肝炎病毒,所有的玻璃器皿均需用0.2%过氧乙酸浸泡,并常用0.2%过氧乙酸擦拭实验室。

六、常用无菌器材的包装

(一)包装

1.平皿:用纸包好,或盛入金属盒内。

2.试管和锥形瓶:空的或盛有培养基的均可用棉塞塞好,并用不透水的厚纸包于棉塞外。若是盛有液体培养基的试管,应直立并扎成捆,以免灭菌时倾倒。

3.吸管:于吸口端先垫入少许棉花(不可太松或太紧),然后每支分别用纸包好,或以数支放入金属筒内。

4.注射器:最好将内芯取出,与外套一起用纸或纱布包好;针头最好装入小试管内(管底垫有少量棉花),管口塞上棉塞。

(二)灭菌

上述玻璃器材可用加压蒸汽灭菌法,也可用干烤法进行灭菌。如用干烤法应注意控制温度和时间在160℃ 2~3小时内,以免烧焦棉塞及外包的纸张等。

注意:任何已灭菌的器材,在使用前不能随意打开,一经打开则不再认为是无菌的。

实验三 细菌的染色技术(常用)

【内容】

一、涂片的制作

二、美蓝染色法

三、革兰染色法

四、抗酸染色法

一、细菌涂片的制作

【材料】

1.菌液。

2.载玻片、接种环、酒精灯。

【方法】

1.涂片:取清洁无油载玻片一块,置火焰上通过数次,用烧灼灭菌的接种环取菌液

1~2环，均匀涂布于载玻片中央(直径约1.5厘米)。若取菌落涂片，则需用接种环取生理盐水1~2环置载玻片上，再用烧灼且已冷却的接种环取菌落少许放在生理盐水中研匀，涂成直径约1.5厘米的菌膜。接种环经火焰灭菌后方可放回原处。

2.干燥：涂片放室温自然干燥；也可将标本向上，在离火焰约15厘米高处微微加热烘干，但切勿靠近火焰；或用电吹风吹干。

3.固定：常用加热固定法，其主要目的是使菌体与载玻片粘附较牢固，在染色时不至被染液和水冲掉。方法是手执载玻片一端，标本面向上，在火焰上迅速来回通过3次，注意温度不宜太高，以玻片反面触及皮肤热而不烫为宜。

二、美蓝染色法

【材料】

- 1.白喉杆菌吕氏血清斜面培养物。
- 2.美蓝染色液、载玻片。

【方法】

- 1.自吕氏血清斜面上取白喉杆菌菌苔作涂片、干燥、固定。
- 2.在制好的涂片上滴加美蓝染色液1~2滴，染色2~3min后，倾斜载玻片，用自来水轻轻冲洗，待干即成。

三、革兰染色法

【材料】

- 1.葡萄球菌、大肠杆菌混合菌液。
- 2.革兰染液、载玻片。

【方法】

- 1.用葡萄球菌和大肠杆菌混合菌液制作标本涂片，干燥后经火焰固定。
- 2.在制好的涂片上，加结晶紫液1~2滴，染色1min后倾斜载玻片，用自来水轻轻冲洗，再将玻片上积水甩干。
- 3.加碘液(卢戈氏液)1~2滴，染色1min后水洗，甩干。
- 4.加95%酒精2~3滴，将涂片轻轻晃动，使其脱色，通常需30秒左右(脱色时间之长短须依所作涂片之厚薄而定)，水洗，甩干。
- 5.加石炭酸复红稀释液1~2滴复染1min，水洗，甩干即成。

四、抗酸染色法

【材料】

- 1.肺结核病人痰标本。