《细菌学检验》实验讲义

实验一　试管稀释法测定抗菌药物最小抑菌浓度

一、实验目的

1、掌握试管稀释法，测定最小抑菌浓度的原理与方法。

2、熟悉抑菌试验的操作步骤、试验结果的判断以及试验的注意事项。

二、实验原理

肉汤稀释法是将药物按一定规律用 M-H 肉汤稀释成一系列浓度后，与一定量的细菌作用，经培养后定量测定其 MIC,反映细菌的药物敏感性。该法所获结果比较准确，常被用做校正其他方法的标准；适应范围广，不仅适合需氧菌、兼性厌氧菌的测定，也适合厌氧菌的测定。

三、实验材料

待测菌株和质控菌株 4～6h 肉汤培养物、MH 肉汤、MH 琼脂、抗菌药物、无菌生理盐水、0.5 麦氏标准比浊管、试管、吸头、微量加样器、接种环等。

四、实验方法

1. 抗菌药物原液的配制：根据所测药物的性质，选择适当的溶剂和稀释剂配制抗菌药物原液，原液浓度为1280μg/ml,滤过除菌后，小量分装，-20℃保存备用，并注意抗菌药物的保存期限。β-内酞胺类抗生素溶液最好在解融后一次用完，或每次新鲜配制。

2. 抗菌药物的稀释：取26支无菌试管排成两排，每排13支。以MH肉汤稀释待测药物原液至待测最高浓度（如128μg/ml)。除每排第1管外，每支试管内加入MH肉汤2m1。每排的第1、2管分别加人抗菌药物稀释液2m1,依次倍比稀释至第13管，使抗菌药物在每管的终浓度依次为128, 64, 32，16，8, 4, 2, 1，0.5，0.25，0.12，0.06, 0.03μg/ml。另设对照3支，分别为“肉汤对照”、“质控菌生长对照”和“待测菌生长对照”。

3. 待测菌和质控标准菌的准备：取已分纯的细菌菌落数个接种于MH液体培养基，35℃孵育4-6h。（链球菌或流感嗜血杆菌等则应接种于含血液的MH液体培养基，35℃孵育过夜。）以生理盐水校正菌液浓度至0.5麦氏比浊标准，再以MH肉汤作1：10稀释，使其含菌量达到10^5 cfu/ml。

4. 接种：第一排各试管中分别加入已校正浓度的待测菌液0. lml，第二排各试管中则加人相应的质控标准菌液。最终接种菌量约为5×10^5 cf u/ml。加样时应注意：①使用微量加样器依次由低浓度到高浓度加样;②加样器吸头必须插人管内液面下加菌且避免与管内壁接触；③避免晃动加完菌液后的试管。

5. 孵育：各试管置 35℃孵育 16～20h，观察结果。

五、结果意义

35℃孵育16～20h后，确定无细菌生长的药物最高稀释管，该管的浓度即为MIC（μg/ml)。

六、注意事项

1. 质量控制每批（次）实验时应根据测试菌的种类分别选用相应的标准菌株在同一试验条件下进行测试。

2. 稀释法的培养基、接种菌量、抗菌药物的配制、蛋白质结合率以及观察结果的时间等多种因素均可影响试验的结果，故应严格按照相应标准进行操作

实验二 消毒剂的定量杀菌试验- 悬液定量法

一、实验目的

1、掌握消毒剂的定量杀菌实验的原理。

2、熟悉消毒剂定量杀菌试验操作技术及结果计算方法。

二、实验原理

细菌定量杀菌试验系在实验室内测定消毒剂或消毒方法杀灭悬液中或载体上细菌繁殖体和细菌芽胞的剂量效应关系的一种试验。其原理是：将一定量的细菌悬液或菌片（载体），暴露于设计浓度的消毒液中，作用至规定时间后，取细菌与消毒液的混合物或取出载体，与中和剂反应，终止消毒剂的继续作用，并接种于营养琼脂平板，培养之后，计数菌落。以存活的菌落数与最初加人的菌数比较，计算出杀灭率，或杀灭效果(germicidal effect, GE)。此试验的结果为确定实用消毒剂量、指导消毒实践提供参考依据。

三、仪器与试剂

铜绿假单胞菌ATCC15442、有机干扰物、磷酸盐缓冲液、胰蛋白陈大豆琼脂培养基(TSA)、胰蛋白脉大豆肉汤培养基(TSB)、革兰染色液、恒温水浴箱、刻度吸管、平皿、酒精灯、接种针（环）、恒温培养箱等。

四、实验方法

1. 细菌繁殖体悬液的制备

(1)取菌种第3～14代的营养琼脂培养物斜面新鲜培养物（18～24h)，取3.0～5. 0ml稀释液加入斜面试管内，反复吹吸，洗下菌苔。将洗液移至另一无菌试管中，用电动混合器混合（振荡）20s，或在手掌上振敲80次，以使细菌悬浮均匀。

(2)初步制成的菌悬液，先用细菌浓度比浊测定法粗测其含菌浓度，然后以稀释液稀释至所需使用的浓度。

(3)细菌繁殖体悬液应保存在4℃冰箱内备用，应当天使用不得过夜。

2. 菌悬液定量杀菌试验操作程序

(1)按要求配制消毒液，配制浓度为待测浓度的1.25倍（如要评价的消毒液浓度为200mg/L,则应配制250mg/L)，置20±1℃水浴备用。

（2)按上述方法配制实验用菌悬液，浓度为1×108～5 × 108 cf u/ml。

(3)取消毒试验用无菌大试管，先加入0.5ml试验用菌悬液，再加人0. 5ml有机干扰物质，混匀，置20±1℃水浴中5min后，用无菌吸管吸取上述浓度消毒液4.0ml注入其中，迅速混匀并立即计时。

(4)待试验菌与消毒剂相互作用至各预定时间，分别吸取0. 5ml试验菌与消毒剂混合液加于4. 5ml经灭菌的中和剂中，混匀。

(5)各管试验菌与消毒剂混合液经加中和剂作用10min后，分别吸取1. 0ml样液，按活菌计数方法测定存活菌数，每管样液接种2个平板即可。如平板上生长的菌落数较多时，可进行系列10倍稀释后，再进行活菌培养计数。

(6)同时用稀释液代替消毒液，进行平行试验，作为阳性对照。

(7)所有试验样本均在37℃温箱中培养，对细菌繁殖体培养48h观察结果。

(8)试验重复3次，

五、结果意义

消毒剂的定量杀菌试验常用指标为杀灭率和杀灭对数值。报告在某条件下某消毒剂对某种细菌的杀灭率（保留小数点后3位）和杀灭对数值（保留小数点后2位）

杀灭对数值的计算：

杀灭对数值(KL)=对照组平均活菌浓度的对数值(N_0）-试验组活菌浓度对数值(N_x）

杀灭率的计算：

$$\text{杀灭率} = \frac{\text{对照组平均活菌数（cfu/ml）—试验组平均活菌数（cfu/ml）}}{\text{对照组平均活菌数（cfu/ml）}}$$

[illegible]

1. 注意菌液的均匀分散。

2. 稀释或取样时要准确，尽量减少吸管使用中产生的误差。

3. 每次吸取一个稀释度样液，必须更换一支吸管，以减少误差。

4. 样液接种于平皿后应尽快倾注营养琼脂培养基，避免样液干燥于平皿上，影响结果的准确性。

5. 倾注时琼脂培养基温度不得超过45℃，以防损伤细菌，倾注或摇动时，动作要尽量平稳，以利细菌分散均匀，便于计数菌落。勿使培养基外溢，以免影响结果的准确性和造成环境污染。

6. 为提高试验的成功率，最好先用浊度计对原菌液做出估计，尽可能在首次试验时所取的有限稀释范围内(2～3个稀释度）即有长菌在15～300cfu之间的平板。

7. 活菌计数应尽量准确，试验组与对照组应同一个人来进行操作。

实验二 消毒剂的定量杀菌试验- 悬液定量法

一、实验目的

1、掌握消毒剂的定量杀菌实验的原理。

2、熟悉消毒剂定量杀菌试验操作技术及结果计算方法。

二、实验原理

细菌定量杀菌试验系在实验室内测定消毒剂或消毒方法杀灭悬液中或载体上细菌繁殖体和细菌芽胞的剂量效应关系的一种试验。其原理是：将一定量的细菌悬液或菌片（载体），暴露于设计浓度的消毒液中，作用至规定时间后，取细菌与消毒液的混合物或取出载体，与中和剂反应，终止消毒剂的继续作用，并接种于营养琼脂平板，培养之后，计数菌落。以存活的菌落数与最初加人的菌数比较，计算出杀灭率，或杀灭效果(germicidal effect, GE)。此试验的结果为确定实用消毒剂量、指导消毒实践提供参考依据。

三、仪器与试剂

铜绿假单胞菌 ATCC15442、有机干扰物、磷酸盐缓冲液、胰蛋白陈大豆琼脂培养基(TSA)、胰蛋白脉大豆肉汤培养基(TSB)、革兰染色液、恒温水浴箱、刻度吸管、平皿、酒精灯、接种针（环）、恒温培养箱等。

四、实验方法

1. 细菌繁殖体悬液的制备

(1)取菌种第3～14代的营养琼脂培养物斜面新鲜培养物（18～24h)，取3.0～5. 0ml稀释液加入斜面试管内，反复吹吸，洗下菌苔。将洗液移至另一无菌试管中，用电动混合器混合（振荡）20s，或在手掌上振敲80次，以使细菌悬浮均匀。

(2)初步制成的菌悬液，先用细菌浓度比浊测定法粗测其含菌浓度，然后以稀释液稀释至所需使用的浓度。

(3)细菌繁殖体悬液应保存在4℃冰箱内备用，应当天使用不得过夜。

2. 菌悬液定量杀菌试验操作程序

(1)按要求配制消毒液，配制浓度为待测浓度的1.25倍（如要评价的消毒液浓度为200mg/L，则应配制250mg/L)，置20±1℃水浴备用。

（2)按上述方法配制实验用菌悬液，浓度为1×108～5 × 108 cf u/ml。

(3)取消毒试验用无菌大试管，先加入0.5ml试验用菌悬液，再加人0. 5ml有机干扰物质，混匀，置20±1℃水浴中5min后，用无菌吸管吸取上述浓度消毒液4.0ml注入其中，迅速混匀并立即计时。

(4)待试验菌与消毒剂相互作用至各预定时间，分别吸取0. 5ml试验菌与消毒剂混合液加于4. 5ml经灭菌的中和剂中，混匀。

(5)各管试验菌与消毒剂混合液经加中和剂作用10min后，分别吸取1. 0ml样液，按活菌计数方法测定存活菌数，每管样液接种2个平板即可。如平板上生长的菌落数较多时，可进行系列10倍稀释后，再进行活菌培养计数。

(6)同时用稀释液代替消毒液，进行平行试验，作为阳性对照。

(7)所有试验样本均在37℃温箱中培养，对细菌繁殖体培养48h观察结果。

(8)试验重复3次，

五、结果意义

消毒剂的定量杀菌试验常用指标为杀灭率和杀灭对数值。报告在某条件下某消毒剂对某种细菌的杀灭率（保留小数点后3位）和杀灭对数值（保留小数点后2位）

杀灭对数值的计算：

杀灭对数值(KL)=对照组平均活菌浓度的对数值(N_0）-试验组活菌浓度对数值(N_x）

杀灭率的计算：

$$\text{杀灭率} = \frac{\text{对照组平均活菌数（cfu/ml）—试验组平均活菌数（cfu/ml）}}{\text{对照组平均活菌数（cfu/ml）}}$$

六、注意事项

1. 注意菌液的均匀分散。

2. 稀释或取样时要准确，尽量减少吸管使用中产生的误差。

3. 每次吸取一个稀释度样液，必须更换一支吸管，以减少误差。

4. 样液接种于平皿后应尽快倾注营养琼脂培养基，避免样液干燥于平皿上，影响结果的准确性。

5. 倾注时琼脂培养基温度不得超过45℃，以防损伤细菌，倾注或摇动时，动作要尽量平稳，以利细菌分散均匀，便于计数菌落。勿使培养基外溢，以免影响结果的准确性和造成环境污染。

6. 为提高试验的成功率，最好先用浊度计对原菌液做出估计，尽可能在首次试验时所取的有限稀释范围内(2～3个稀释度）即有长菌在15～300cfu之间的平板。

7. 活菌计数应尽量准确，试验组与对照组应同一个人来进行操作。

实验三　食品中金黄色葡萄球菌的分离与鉴定

一、实验目的

1、了解检测食品中金葡菌的意义及检测，熟悉测食品中金葡菌的程序。

2、掌握食品前处理，掌握测食品中金葡菌的原理，食品中金葡菌的分离与鉴定技术。

二、实验原理

金黄色葡萄球菌能产生凝固酶，使血浆凝固，多数致病菌株能产生溶血毒素，使血琼脂平板菌落周围出现溶血环。根据本菌特有的形态及培养物质性，鉴定致病性金黄色葡萄球菌。

三、仪器与试剂

显微镜，37^{0}C 培养箱，研钵或均质器，灭菌吸管 lml、10ml，灭菌试管，灭菌平皿，载玻片，酒精灯，接种环。灭菌生理盐水，7.5％氯化钠肉汤，Baird—Parker 琼脂平板，兔血浆，革兰染色液。

三、实验方法

检验程序

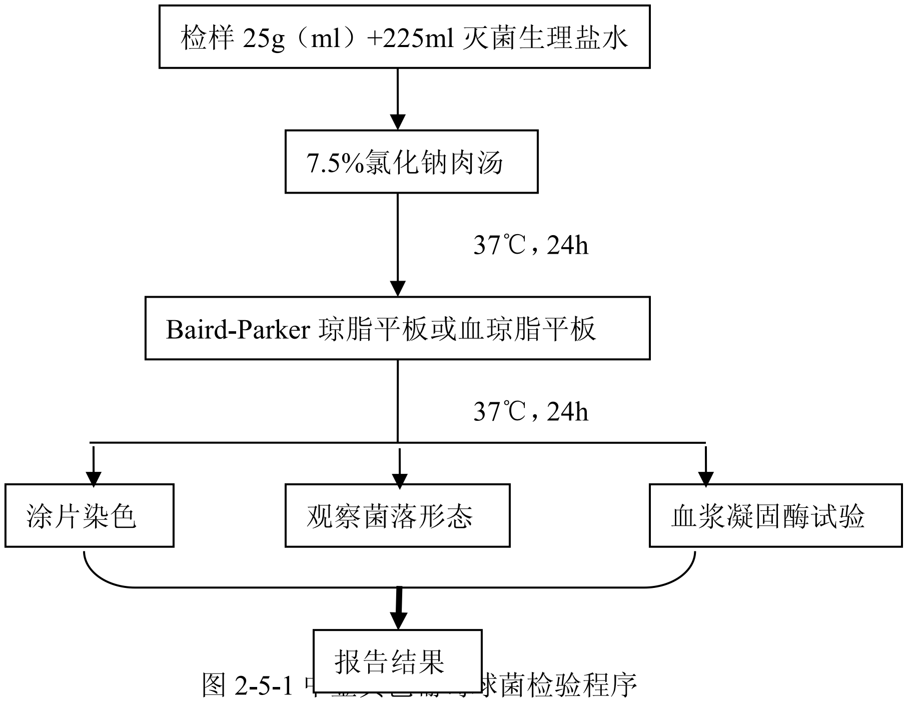


图 2-5-1 中[illegible]球菌检验程序

操作步骤

1．检样的处理：称取 25g 固体样品或吸取 25ml 液体样品，加入 225ml 灭菌生理盐水，研磨或置均质器中制成 1:10 的混悬液。

2．增菌及分离培养：吸取上述 1:10 混悬液 5ml，接种于盛有 5ml 7.5％氯化钠肉汤培养基的三角烧瓶内，置 37^{0}C 培养 24h，培养物转种于 Baird—Parker 琼脂平板，37℃培养 24h，挑取可疑菌落进行革兰染色镜检及血浆凝固酶试验。

3．血浆凝固酶试验

（1）玻片法：将玻片分为两格，一格加生理盐水一滴(对照)．另一格加 1：4 的兔血浆一滴．用接种环挑取被检细菌菌落，分别混悬于两格内，10～20s 内观察结果。若有大片凝块出现判为阳性，若无凝集判为阴性。玻片法主要用于检测结合的血浆凝固酶。

（2）试管法：取小试管四支，均加入 1：4 的新鲜兔血浆 0.5 ml，在其中一支小试管中加入培养 24h 的金黄色葡萄球菌肉浸液肉汤培养物 0.5 ml，其它三支小试管中分别加入已知阳和阴性葡萄球菌及肉汤 0.5 ml 作为对照，振荡摇匀，置 36±1℃培养箱或水浴内，每 30min 观察一次，观察 6h。如试验管呈现凝固，将试管倾斜或倒置呈现凝块者，为阳性结果。试管法主要是为了肯定玻片凝集试验的结果和对玻片凝集试验阴性者进行复查，试管法可检测游离血浆凝固酶。

1.金黄色葡萄球菌的判断：

（1）形态：本菌为革兰氏阳性球菌，排列是葡萄状，无芽孢，无荚膜，致病性葡萄球菌菌体较小，直径约为 0.5～1μm。革兰阳性球菌，排列呈葡萄球状，无芽孢、无荚膜。

（2）生长：在肉汤中呈混浊生长，血平板菌落呈金黄色，也有时呈白色，大而突起、圆形、不透明、表面光滑，周围有溶血圈。在 Baird-Parker 平板上为圆形、光滑凸起、湿润、直径 2～3mm，颜色呈灰色到黑色，边缘为淡色，周围为一混浊带，在其外层有一透明圈。用接种针接触菌落似有奶油树胶的硬度。偶然会遇到非脂肪溶解的类似菌落；但无混浊带及透明圈。长期保存的冷冻或干燥食品中所分离的菌落比典型菌落所产生的黑色较淡些，外观可能粗糙并干燥。

（3）血浆凝固酶试验：(+)。

五、结果和意义

葡萄球菌属中金黄色葡萄球菌中的某些菌株可产生肠毒素，引起葡萄球菌肠毒素中毒，此类中毒在我国较多见，易污染乳制品、肉制品和淀粉类食物。我国食品卫生标准规定金黄色葡萄球菌不得检出。凡在上述选择平板上有可疑菌落生长，经染色镜检，证明为革兰氏阳性葡萄球菌，并且血浆凝固酶试验阳性者，可报告被检样品检出金黄色葡萄球菌。

六、注意事项

1．葡萄球菌为耐盐菌，在 10%～15%盐浓度中仍可繁殖，在培养基中加入 7%～10%的氯化钠,可作为污染标本分离本菌用。自食品中分离金黄色葡萄球菌应考虑到腐生菌丛的抑制问题， Baird-Parker 培养基含氯化锂可抑制革兰阴性菌生长，所含亚碲酸钾与甘氨酸联合可抑制其它革兰阳性菌生长，因亚碲酸钾被葡萄球菌还原为金属碲，故菌落呈黑色。培养基所含卵黄中卵磷脂和脂肪被细菌分解，故出现混浊环及透明带。

2．如要观察食品被金黄色葡萄球菌污染程度（如食物中毒时），可用直接计数法。方法为：根据样品污染的情况，选择不同浓度的释液 lml，分别加入三块 Baird-Parker 琼脂平板，然后用灭菌 L 棒涂布整个平板。置 37℃培养箱中培养 24h。从三个平板上计数周围有混浊带的黑色菌落，并从其中任选 5 个典型菌落，分别接种血琼脂平板，37℃培养 24h 后，进行染色镜检、血浆凝固酶试验，计算三个平板中疑似金黄色葡萄球菌的菌落数，求出每克样品中金黄色葡萄球菌的数目。一般以 1g 标本细菌数 10^6 以上，有初步诊断的意义。结合现场调查和临床表现，可明确金黄色葡萄球菌食物中毒的诊断。

实验四 大肠杆菌的分离与鉴定

一、实验目的

2.掌握大肠埃希菌在各种培养基上的生长特点及主要生化反应和分离鉴定方法。

3.熟悉 EPEC、ETEC 的检测方法。

二、实验原理

大肠杆菌为肠杆菌科细菌，为革兰氏染色阴性无芽孢杆菌。根据其基本形态特征、培养特征与生化反应特性，以及血清型反应，进行鉴定。

三、仪器与试剂

麦康凯琼脂培养基、血平板、KIA, MIU培养基、系列生化反应培养基、增菌肉汤、革兰染液、显微镜、无菌水、高压蒸汽灭菌器、恒温培养箱、灭菌采样瓶、灭菌刻度吸管、试管、小倒管、制备培养基用一般设备:量筒，三角烧瓶，pH计或精密pH试纸等。

诊断血清

（1）EPEC诊断血清

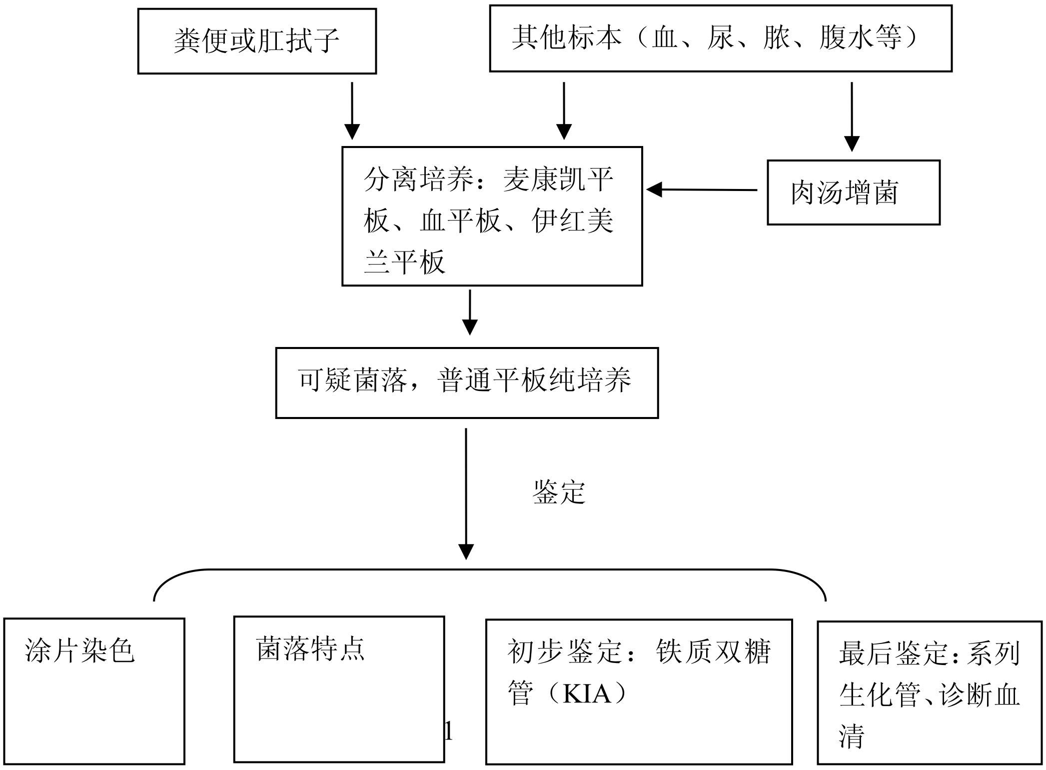
1)OK多价I：包括0_{26}: K_{60}（B_6）；0_{119}：K_{60}（B_{14}）；0_{44}：K_{74}（L）：0_{124}：K_{72}（B_{17}）OK多价II：包括0_{55}：K_{59}（B_5）；0_{125}：K_{70}（B_{15}）；0_{86}：K_{61}（B_7）；0_{126}：K_{71}（ B_{16}）

2)OK多价Ⅲ：包括0_{111}：K_{58}（B_4）；0_{127}：K_{63}（B_8）；0_{114}：K_{10}（B）；0_{128}：K_{67}（B_{12}）

3)LT(不耐热肠毒素）抗血清

四、实验方法

检验程序



1. 分离培养：以无菌接种环取标本接种于麦康凯平板和血平板做分离培养，或肉汤增菌后接种于麦康凯平板和血平板做分离培养。

2. 麦康凯平板和血平板上生长的大肠杆菌可疑菌落取 5～10 个分别接种普通平板作纯培养。麦康凯琼脂：红色菌落；血平板：一些致病性菌株常β溶血；伊红美蓝琼脂：黑色带金属闪光的菌落。

3. 对纯培养物进行鉴定

4. 涂片染色：革兰染色阴性无芽孢杆菌。

5. 菌落特点：生长良好，圆形凸起、光滑、湿润、半透明、灰白色菌落，直径约 2～3mm。

6. 铁质双糖管：大肠杆菌分解葡萄糖、乳糖产酸产气，糖管由红变黄，糖管中有气泡有动力，不产生 H_2S，故无黑色沉淀。

7. 系列生化反应：目前多采用系列生化编码管，根据反应结果编码做出最后鉴定，下面就 11 项生化反应组合来说明编码表的使用方法。

表 2-6-1 肠杆菌科细菌编码鉴定的数码组合表

组别代号	生化反应项目		代号（指数）	试验结果	各组阳性结果数码合计
1	葡糖糖	产酸	A	+	AG
		产气	G	+	
2	鸟氨酸脱羧酶		4	—	2
	赖氨酸脱羧酶		2	+	
	硫化氢		1	—	
3	靛基质		4	+	5
	乳糖		2	—	
	卫矛醇		1	+	
4	苯丙氨酸脱羧酶		4	—	0
	尿素酶		2	—	
	柠檬酸盐利用试验		1	—	

如果试验结果如上表（表 2-6-1），将每组出现阳性结果指数相加，得出数码累计，这时该菌的编码为 AG-250 然后从编码表中查得该菌为大肠埃希菌。如果阳性符合率不高，可根据编码表提供的补充试验，做进一步鉴定。

8. EPEC 的血清鉴定

(1)挑取 18～24h 培养的可疑性菌落，分别与 OK 多价 I、Ⅱ、Ⅲ作玻片凝集，同时做生理盐水对照。如果不出现凝集，即未检出 EPEC。

(2)确定 K 抗原：如细菌与上述任意一组多价血清发生凝集，则进一步与该组内的分型血清作玻片凝集。如出现阳性结果，则表明分离出 EPEC 的 K 抗原。

(3)确定 O 抗原：用生理盐水制备 10 亿/ml 的菌液，加热 100℃，1h 再与该型血清作玻片凝集，凝集者表示检出某型破坏 K 抗原后 EPEC 的 O 抗原，即可告检出致病大肠 O_{XX}：K_{xx}（B_{xx}）。

9. 肠毒素的检查方法-体外法（Elek 法）：用于检测 LT。

(1)将产 LT 的大肠埃希菌接种于麦康凯平板上，37℃培养 18～24h，经生化反应确定为大肠埃希菌.

(2)取平板上菌落移种于改良 Elek 平板，如图 2-5，涂成椭圆形，37℃培养 48h。

(3)将浸有多粘菌素 B 的滤纸贴于菌落上，37℃培养 5 ～6h 后在中心离菌苔 4～5mm 处开约 4mm 的小孔，滴人提纯并稀释的 LT 抗毒素 20～30ml。

(4)将平板置 37℃培养 18～24h，观察有无沉淀线。与 LT 间产生沉淀线的为 LT 阳性。

五、结果意义

由于大肠杆菌是人及各种动物肠道中的正常寄居菌，常随粪便从人及动物体排出，广泛散播于自然界，所以一旦检出大肠杆菌，即意味着直接或间接地被粪便污染，而在卫生学上被用于饮水，牛奶或食品等的粪源性污染卫生细菌学指标；致泻性大肠杆菌是引起人体以腹泻症状为主的全球性疾病，其中尤以 EPEC、ETEC 所占比例为大。致泻性大肠杆菌引起的腹泻病例始终位于第二位。

六、注意事项

接种生化管时，鸟氨酸、赖氨酸脱放酶试验管及氨基酸对照管均需无菌液体石蜡密封，葡萄糖管需倒置，以便观察产生气体情况。