

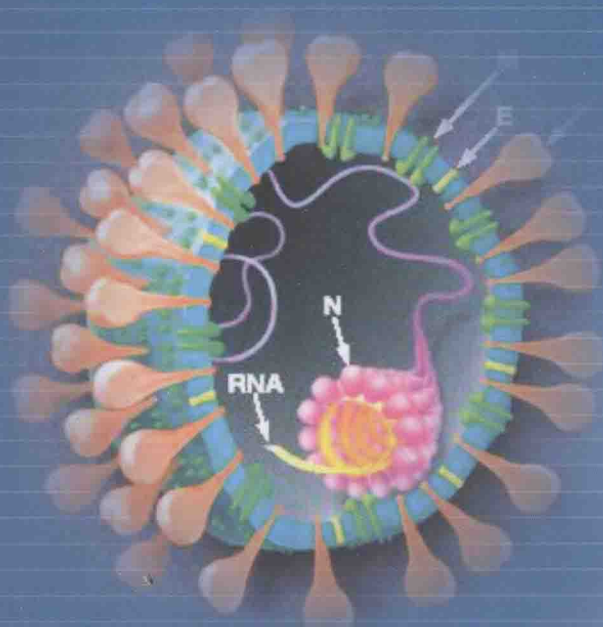
“十二五”规划教材

全国高等医药院校教材

供临床、预防、口腔、护理、药学等专业用

医学微生物学实验指导

主 编：何玉林 黄大林



甘肃科学技术出版社

“十二五”规划教材

全国高等医药院校教材

供临床、预防、口腔、护理、药学等专业用

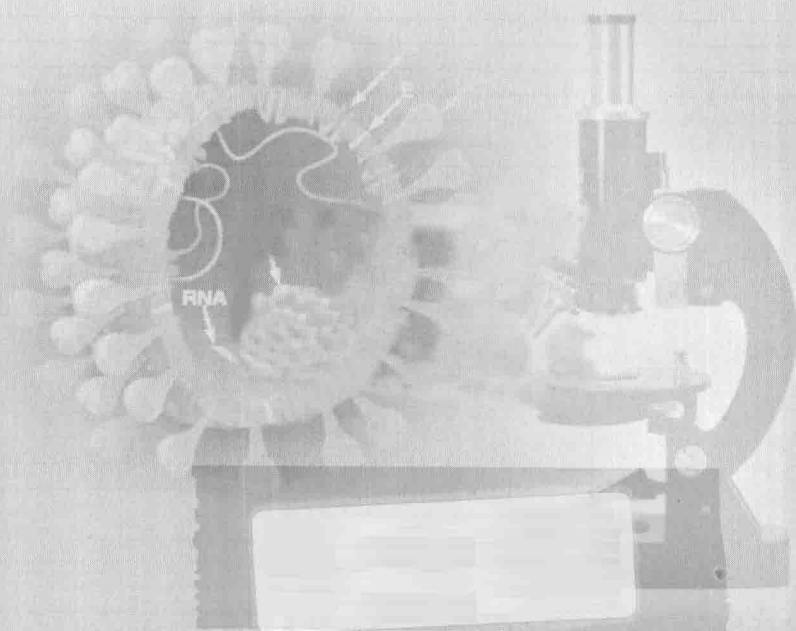
医学微生物学 实验指导

主 编：何玉林 黄大林

副主编：韦晗宁 陈建宏 乔永超

编 委：(按姓氏笔画排序)

陈建宏 黄大林 何玉林 乔永超 韦晗宁



甘肃科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学微生物学实验指导 / 何玉林, 黄大林主编. -- 兰州 :
甘肃科学技术出版社, 2012.12
ISBN 978-7-5424-1737-4

I. ①医… II. ①何… ②黄… III. ①医学微生物学
—实验—医学院校—教学参考资料 IV. ①R37-33

中国版本图书馆CIP数据核字 (2012) 第 313393号

责任编辑 陈 檠 (0931-8773230)

封面设计 刘小梅

出版发行 甘肃科学技术出版社(兰州市读者大道 568 号 0931-8773237)

印 刷 甘肃北辰印务有限公司

开 本 787mm × 1092mm 1/16

印 张 11.25

字 数 356 千

插 页 1

版 次 2013 年 2 月第 1 版 2013 年 2 月第 1 次印刷

印 数 1~2000

书 号 ISBN 978-7-5424-1737-4

定 价 24.00 元

前 言

医学微生物学隶属边缘生物学范畴,其实验课是本课时的重要组成部分。为适应教学改革,满足教学需要,我们根据新的教学大纲的要求编写了这本《医学微生物学实验指导》。

在编写过程中,我们以形态观察,病原学检测方法为重点,突出本学科实验课的特点,使理论与实践紧密结合,基础与临床密切联系。重在培养学生独立思考能力、创新能力和实践能力。

本实验指导涵盖基本实验技术、染色技术、细菌培养技术和病原微生物检测分离技术;适用于临床医学、预防医学、口腔医学、护理学、药学等专业使用。各专业层次可根据不同的学时数选择有关的内容进行实验。

为了使学生巩固和掌握所学的理论知识,帮助学生强化概念,提高应试能力,了解考试形式特点方法,领悟命题规律和技巧,根据新教学大纲的要求,我们也编写了相应的学习题,并附有参考答案。

由于时间仓促,水平有限,难免有不当之处,敬请批评指正。

编 者

2012年10月

微生物学实验室规则

微生物学实验的对象大多是病原微生物,因此必须严格贯彻“无菌观念”,防止实验中自身感染和环境污染是微生物学实验室的最重要原则。

一、尽量不带个人生活、学习用品入实验室,必要的用具带入后,应放在远离操作的位置。

二、进入实验室后穿上工作衣,离室时脱下反叠带走。在实验室内应保持安静、整洁、有秩序,不得高声谈笑,随便走动或拆卸仪器、搬弄标本。

三、实验室内严禁吸烟、进食、饮水,严禁用嘴吸移液及润湿标签,尽量不要用手触摸头面部及身体其他暴露部位。

四、如遇不慎而打破菌种管或使有菌材料污染皮肤、衣物、桌面等情况,应立即报告指导教师,切勿隐瞒或自行处理。

五、被污染过且需要回收的吸管、滴管、试管、玻片等物应用完后立即投入已准备的消毒液中,不得放在桌面上或水槽内。

六、爱护公物,节约试剂材料,不得将实验室任何物品私自带走。如遇仪器、用品损坏,应报告指导教师并按规定予以赔偿。

七、实验完毕,整理桌面,值日生打扫室内卫生,最后离开的同学应注意关好水电、门窗,洗手后离室。

目 录

第一篇 医学微生物学基本实验技术部分	(1)
实验一 显微镜的油镜的使用和保护	(1)
实验二 细菌基本形态的观察	(2)
实验三 细菌特殊结构的观察	(3)
实验四 不染色标本的观察	(3)
实验五 细菌的染色法	(4)
实验六 基础培养基的制备	(7)
实验七 细菌的人工培养法	(9)
实验八 自然界与人体的微生物检查	(14)
实验九 细菌代谢产物的检查	(16)
实验十 理化及生物因素对细菌的影响	(20)
实验十一 细菌的遗传与变异	(25)
第二篇 综合实验部分	(27)
实验一 病原性球菌的分离培养与鉴定	(27)
实验二 肠道杆菌	(28)
实验三 水样中的微生物检查	(34)
实验四 空气中的微生物学检测	(38)
实验五 化妆品中的微生物检测	(40)
实验六 药物中的微生物学检测	(51)
第三篇 医院感染的微生物学检测	(56)
实验一 物体表面的监测	(56)
实验二 医护人员手细菌学监测	(57)

实验三 空气的细菌学监测	(58)
实验四 消毒液细菌学监测	(59)
实验五 无菌器材、一次性注射用品细菌学监测	(59)
第四篇 药学专业部分实验	(61)
实验一 药物的体外抗菌试验	(61)
实验二 药物的微生物学检验	(64)
实验三 抗生素效价的微生物学测定	(68)
第五篇 医学微生物学习题	(72)

将高倍镜(或油浸镜)头扭向一侧,再取下玻片。

4.显微镜用毕后,以擦镜纸擦拭油镜头,不可用粗布硬纸擦拭;向下调节聚光镜,反光镜直放,物镜头成八字形摆放;套好镜罩,按指定地方放好。

5.显微镜的保护要点:

(1)显微镜是精密仪器,注意爱护,取送搬移时,要一手握紧镜臂,一手托住镜座,轻拿轻放,以免碰撞,严格按规程操作。

(2)物镜和目镜只能用擦镜纸擦,不能用手、手绢、纸擦,每次使用完油镜,立即用擦镜纸将油镜上的油擦干净,如油已干或镜头模糊不清,可用擦镜纸蘸少许二甲苯擦,并用另一张擦镜纸擦净残留的二甲苯。

(3)不能用错物镜,切片观察时不能放反,使用高倍镜时应先用低倍镜观察后再转换高倍镜观察。

(4)细调节器是显微镜最精细而脆弱的部分,只能做轻微地来回转动。各部位应保持清洁,避免日光直接照射和强酸、强碱等化学物质的接触,以免损坏。

(5)显微镜不用时,必须将物镜转成“品”字形,降下聚光器,罩上防尘套,置于干燥处,以防受潮。

【思考题】

- 1.如何识别普通光学显微镜的油镜头?怎样正确使用油镜?
- 2.油镜的原理是什么?为什么要选用香柏油作为镜油?

实验二 细菌基本形态的观察

【目的】

掌握细菌的三种基本形态。

【材料】

金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、霍乱弧菌的革兰染色示教片。

【方法】

将各示教片置油镜下观察,注意观察其形态、排列及染色性并将观察结果描绘在记录本上。

【结果】

- 1.金黄色葡萄球菌:革兰染色阳性,球形,常呈葡萄串状排列,如图 2(A)。
- 2.大肠埃希菌:革兰染色阴性,为两端钝圆的短杆菌,散在排列,如图 2(B)。
- 3.霍乱弧菌:革兰染色阴性,菌体只有一个弯曲,呈逗点状,散在排列,如图 2(C)。

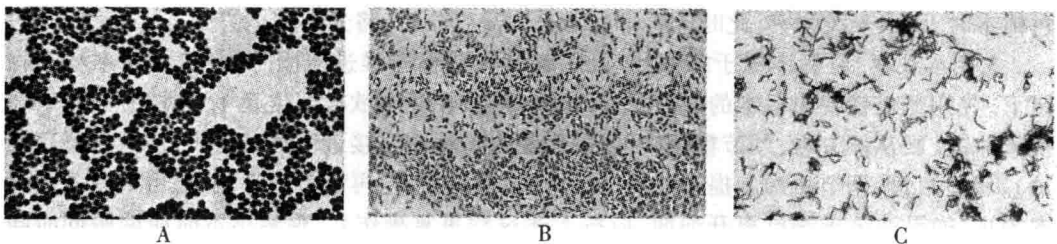


图 2 细菌基本形态示意图

【思考题】

- 1.细菌的基本形态有哪些?
- 2.能否根据细菌的形态来鉴别细菌?

实验三 细菌特殊结构的观察

【目的】

掌握细菌的四种特殊结构。

【材料】

伤寒沙门菌鞭毛染色、肺炎链球菌荚膜染色、破伤风梭菌芽孢芽胞染色示教片。

【方法】

将各示教片置于油镜下观察并记录观察结果。

【结果】

1. 伤寒沙门菌鞭毛染色:可见伤寒沙门菌菌体呈紫红色,周身鞭毛呈红色,如图3(A)。
- 2.肺炎链球菌荚膜染色:可见肺炎链球菌菌体被染成紫色,成双排列,菌体周围有一圈未着色的环状带,即为荚膜,如图3(B)。
- 3.破伤风梭菌芽孢染色:可见破伤风梭菌菌体被染成紫色,菌体顶端可见一个比菌体大的正圆形芽孢,整个菌体呈鼓槌状,如图3(C)。

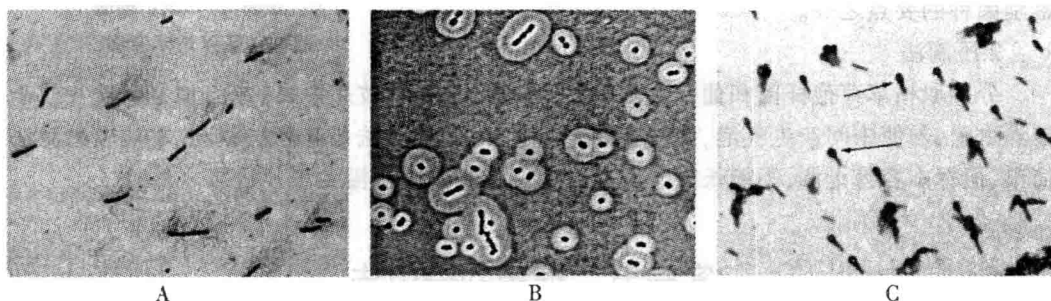


图3 细菌特殊结构示意图

【思考题】

- 1.细菌特殊结构中,哪一种在光学显微镜下观察不到?
- 2.细菌有哪些特殊结构?各有什么功能?

实验四 不染色标本的观察

细菌鞭毛与其动力有关,有无鞭毛,细菌的运动方式不同,依其运动特点可间接有判定细菌有无鞭毛,也是鉴定细菌方法之一。应用不染色标本可直接观察活细菌的形态和运

动,且能避免由于某些染色操作而引起细菌变形,常用的不染色标本的制备方法有悬滴法和压滴法。

证明细菌有无鞭毛,除显微镜直接观察其运动特点外,还可以通过鞭毛染色法直接观察有无鞭毛及其特点,也可以通过半固体穿刺培养法间接证明。

【材料】

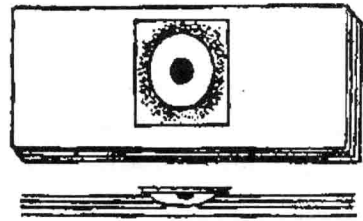
枯草芽孢杆菌 6~12h 肉汤培养物、葡萄球菌 6~12h 肉汤培养物、凡士林、载玻片、凹玻片、盖玻片、接种环、酒精灯。

【方法】

1. 悬滴法

取清洁的凹玻片和盖玻片各一张,涂少许凡士林于凹玻片窝的周围;取一接种环枯草芽孢杆菌肉汤培养物滴于盖玻片之中央,将盖玻片迅速翻转,覆盖于凹玻片窝上(图4)。轻压盖玻片,使其固定并密封,防止菌液变干,便于长时间观察。同法再以葡萄球菌肉汤培养物做一悬滴片。

镜检方法:将集光器稍降下,使视野内光线变暗。用低倍镜找出悬滴的边缘,然后换用高倍镜或油镜观察滴内细菌的形态和运动。枯草芽孢杆菌有鞭毛能运动。它们可向不同方向运动,速度较快,相互间的位移很大。葡萄球菌没有鞭毛不能运动,但由于受水分子的撞击而呈分子运动(布朗运动),只在一定范围内作往复颤动,相互间位移不大。按细菌运动性的不同,可以推知细菌有无鞭毛,这是鉴别菌种的要点之一。



上: 正面 下: 侧面

图4 悬滴法示意图

2. 压滴法

分别取枯草芽孢杆菌和葡萄球菌肉汤培养物,放于载玻片中央。小心地把盖玻片放于液滴之上,勿使中间产生气泡,中间液层越薄越好。镜检方法与悬滴法相同。本法较悬滴法简单,但标本容易干涸,不能长时间观察(注意:勿将菌液压溢到玻片边缘之外)。

实验五 细菌的染色法

形态学检查是鉴定细菌一个重要的环节。细菌个体小,无色半透明,不染色在镜下不易观察清晰,使菌体着色后,即可在镜下清晰地观察其形态特征,有助于菌种的鉴定。

进行细菌染色时因其等电点低($pH2\sim5$),细菌在中性、碱性以及弱酸性环境中都带有负电荷,易与带阳电荷的碱性染料结合,常用美兰、复红、结晶紫等碱性染料,碱性染料电离后带色离子带阳电荷,易与带阴电荷的被染物结合,使细菌着色。染色方法有单染色与复染色之分,只用一种染料使细菌着色的方法称单染色法,用两种以上染料染色的方法叫复染色法,主要有革兰染色法、抗酸染色法,此外还有多种特殊染色法。

(一) 细菌涂片的制作

【目的】

1.了解细菌常用的一些染色方法。

2.掌握细菌涂片制作的步骤。

【材料】

菌液或固体平板上生长的菌落、载玻片、接种环、酒精灯。

【方法】

1.涂片:按无菌操作取材法进行,具体步骤如下:

(1)用肉汤培养物涂片

①右手拿接种环的黑色塑料柄部分,左手托持试管。

②将接种环按 15° 角放在酒精灯的外焰中烧灼灭菌,直到把金属丝烧红,然后将铝制的银色柄部也通过火焰略加烧灼(如图 5-1)。对于接种环的使用,必须牢记一句话:使用前和使用后均要烧灼。

③用右手小指和手掌的前内缘拔掉左手所持试管的棉塞,并立即将试管口用火焰烧灼灭菌。

④用灭菌后已冷却的接种环伸入试管中取出材料(如图 5-2),此时注意勿使沾有材料的接种环触碰试管壁及试管口。

⑤将试管口再次灭菌,棉塞也要在火焰上略加烧灼(时间要短以免点燃棉塞),塞好棉塞,放回原处。

⑥将接种环上材料涂于载玻片上,随后立即将接种环用火焰烧灼灭菌。为防止细菌溅散污染环境,接种环灭菌前,须先将接种环靠近火焰或放内焰中烤干,然后再在外焰中烧红灭菌,杀死残留的细菌。

(2)用斜面培养物涂片

用细菌斜面培养物涂片,需预先取一接种环生理盐水放在载玻片上,然后再按无菌操作取材法从斜面培养物上取少量菌苔,在水滴内轻轻研磨将细菌制成菌悬液,再涂成一薄膜,大小约 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 。无菌操作取材步骤同前。

2.干燥:放空气中自然干燥。如欲加速,也可把涂片置于火焰上部的热气层中烘烤,

但切勿将涂膜烤焦。

3.固定:用木夹子夹住涂片,在火焰的最热部分连续通过三次,以固定之。此时杀死细菌,并使标本固定于玻片上,以免在染色或水洗过程中被冲掉。

(二)革兰染色法

【目的】

1.掌握革兰染色法的步骤。

2.熟悉革兰染色法的原理。

【原理】

该染色法于 1884 年由丹麦细菌学家 Gram 创建,为最常用的染色法之一。经此法染色后,可将细菌分为两大类,即革兰阳性菌和革兰阴性菌,有助于细菌的鉴别。另外,根据



图 5-1 接种环灭菌示意图

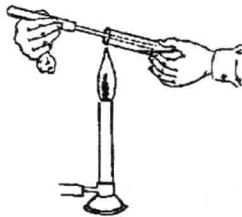


图 5-2 细菌培养物取材示意图

初步染色结果,可以协助临床选择抗菌药物,并对了解细菌的致病性有一定的帮助。该染色法的机理:①细胞壁结构学说:基于革兰阳性菌与革兰阴性菌细胞壁的差异。细菌经结晶紫初染成紫色。革兰染色阳性菌(G^+)细胞壁肽聚糖层数多,且肽聚糖为空间网状结构,再经乙醇脱水,网状结构更为致密,染料复合物不易从细胞壁内漏出,仍为紫色。而革兰染色阴性菌(G^-)细胞壁脂类含量多,肽聚糖层数少,且肽聚糖为平面片层结构,易被乙醇溶解,使细胞壁通透性增高,结合的染料复合物容易泄漏,细菌被脱色为无色,再经稀释复红染色液复染成红色。②等电点学说: G^+ 菌的等电点(pH2~3)比 G^- 菌的等电点(pH4~5)低,在同一 pH 条件下, G^+ 菌比 G^- 菌所带负电荷要多,与带正电荷的碱性染料结合力牢固,不易脱色。③化学学说: G^+ 菌含有大量核糖核酸镁盐,与进入胞浆内的结晶紫和碘牢固结合成大分子复合物,不易被 95%乙醇脱色;而 G^- 菌含此种物质量少,故易被乙醇脱色。

【材料】

细菌涂片、结晶紫染色液、卢戈碘液、95%乙醇、稀释复红染色液。

【方法】

- 1.将结晶紫染色液加于涂片上,染色(初染)1min。
- 2.水洗后加卢戈氏碘液处理(媒染)1min。
- 3.水洗后用 95%酒精脱色,脱色时频频摇动玻片,直至流下的液体无色为止(约需 0.5min)。
- 4.水洗后加稀释复红染色液染色(复染)0.5min。
- 5.水洗,用滤纸轻轻吸干,待标本充分干燥后进行镜检。

染色过程中,水洗要用自来水的细流徐徐冲洗涂片的表面,勿使强水流直接冲到涂片上。

【结果】

革兰阳性(G^+)菌染成紫色,革兰阴性(G^-)菌染成红色。

【思考题】

- 1.细菌染色前,为什么必须进行固定?
- 2.在革兰染色过程中,哪个步骤对染色结果影响最显著?
- 3.试述革兰染色法的主要步骤、结果及实际意义。

(三)抗酸染色法

【目的】

- 1.了解抗酸染色法的原理及意义。
- 2.学会抗酸染色法的基本过程,并且通过光学显微镜观察细菌的形态结构,能够对抗酸杆菌进行鉴别。

【原理】

分枝杆菌属最显著的特性为其胞壁中含有大量类脂,可达菌体干重的 40%左右,故生长形成粗糙性菌落,而且也难以用一般染料染色,然而若设法用石炭酸复红染料使之着色后,又不易被 3%HCl 的酒精脱色,而非抗酸性细菌胞内的石炭酸复红染料易离开菌体,可被 3%HCl 的酒精脱色,不被着色,抗酸性取决于胞壁内所含分枝菌酸残基和胞壁固有层的完整性有关。结核杆菌一般常用齐~尼氏抗酸性染色法染色,结核杆菌染成红色,其他非抗酸性细菌及细胞浆等呈蓝色。

【材料】

- 1.菌种:结核病人痰标本或 BCG 菌液。
- 2.染液:石炭酸复红,3%盐酸酒精,碱性美兰染液。
- 3.器材:玻片,显微镜,酒精灯,接种环等

【方法】

- 1.取结核病人痰标本或 BCG 菌液涂片,干燥固定。
- 2.石炭酸复红初染:将标本片放在三角架上的铁片上,滴加石炭酸复红,铁板下用酒精灯徐徐加热 3~5min,使溶液冒气但不沸腾,溶液即干时要添加。
- 3.3%盐酸酒精脱色:涂片冷却后水洗,用 3%盐酸酒精脱色,使流出的液体几乎无色为止。
- 4.碱性美兰复染:碱性美兰复染 30s(不加热),水洗,吸干水后油镜检查。

【结果】

抗酸菌呈红色,非抗酸菌为蓝色。

实验六 基础培养基的制备

培养基是根据细菌生长繁殖的需要人工配制的营养基质,培养基的基本成分有蛋白胨、氨基酸、糖类、盐和水分。除含有营养成分外,还要调节到适当的酸碱度(pH7.4~pH7.6),经灭菌后使用。常用的培养基有基础培养基、营养培养基、鉴别培养基、选择培养基和厌氧培养基等。能使多数病原菌生长繁殖的培养基称为基础培养基。培养基按物理性状的不同又可分为液体、半固体和固体三种。

培养基的主要作用是:1.分离和繁殖细菌;2.保存菌种;3.鉴定细菌;4.生产菌苗、抗生素;5.细菌生理学的研究。

(一)肉汤培养基的制备

肉汤培养基是常用的液体培养基,也是制备常用的细菌分离培养基及其他某些培养基的基础。

【材料】

鲜牛肉(去脂肪和肌腱)、蛋白胨、氯化钠、pH 试纸、10%碳酸氢钠、试管、三角烧瓶、蒸馏水等。

【方法】

- 1.将新鲜牛肉 500g 切碎或搅碎,加水 1000mL,放 4℃冰箱或冷处浸泡过夜,然后煮沸 30min,放凉,使残余的脂肪凝固,再用绒布或滤纸过滤,将滤液补足为原量。此溶液称为肉水或肉浸液。
- 2.1000mL 肉水中加入蛋白胨 10g、氯化钠 5g,加热溶解,放凉。
- 3.用精密 pH 试纸测酸碱度,用 10%碳酸氢钠校正 pH 为 7.2 左右。过碱时,可用 10%醋酸校正之。
- 4.酸碱度调整后,煮沸 3~5min,补足因蒸发失去的水量,待冷后用滤纸过滤,使之澄清透明。并重新测定酸碱度一次,若变动较大,应再次矫正。

5.分装于试管中或三角烧瓶中,103.4kPa(121℃)高压蒸气灭菌 20~30min。

如用市售的牛肉膏代替新鲜肉水时,可将牛肉膏溶成 0.3%~0.5%的水溶液,再如上法制成培养基。

(二)普通琼脂培养基的制备

普通琼脂培养基是常用的固体培养基,包括普通琼脂平板和普通琼脂斜面两种,前者用于分离纯种细菌,后者用于增殖纯种细菌或保存菌种。

【材料】

肉汤 200mL、蛋白胨 2g、氯化钠 1g、琼脂 5g、无菌平皿、灭菌试管、三角烧瓶等。

【方法】

1.按上述数量把肉汤、蛋白胨、氯化钠和琼脂放到三角烧瓶中,加热溶化。

2.趁热用 pH 试纸测酸碱度,用 10%碳酸氢钠校正 pH 为 7.2 左右。

3.103.4kPa 高压蒸气灭菌 20~30min。

4.趁热将溶化的培养基倒入灭菌平皿内,每个平皿倒入约 15mL,凝固后即成普通琼脂平板培养基;如趁热将培养基倒入灭菌试管内,再将试管斜放试验台上,凝固后即成普通琼脂斜面培养基。如图 6 所示。

琼脂是由海藻中提取的一种多糖,俗称洋粉,具有 100℃溶化,40℃凝固的特性。细菌不能分解琼脂,故无营养作用,仅是固体培养基的赋形剂。



图 6 琼脂斜面培养基斜置示意图

普通琼脂培养基也可用市售的营养琼脂粉(含有普通琼脂培养基的各种成分并已调好 pH)制备,用法见产品说明书。

(三)血液琼脂培养基的制备

有些细菌其营养要求较高,在普通琼脂培养基上生长不良,可用血液琼脂培养基进行培养。

【材料】

普通琼脂培养基 200mL,血液(脱纤维羊血或兔血)10~20mL

【方法】

1.加热溶化普通琼脂培养基。

2.待冷至 50℃左右时,加入无菌的脱纤维血液,混匀(注意勿使产生泡沫)。

3.分别注入灭菌试管或平皿中制成血斜面 and 血平板培养基。

(四)半固体培养基的制备

于肉膏汤或肉汤中加入 0.3%~0.5%琼脂,加热溶化后,分装于试管中,经 103.4kPa 20min 高压灭菌后,直立放置,冷却后即成半固体培养基。置 37℃温箱培养 24h 无菌生长,即可使用。常用于观察细菌动力和保存菌种。

【思考题】

1.制备培养基的一般程序是什么?

2.肉汤培养基、肉汤固体培养基和肉汤半固体培养基的配方成分有何区别?这三种培养基各有何用途?

实验七 细菌的人工培养法

(一)细菌接种技术

不同的细菌具有不同的生物学特性,利用各种培养基分别研究它们的生物学特性,鉴别细菌的种类,有助于细菌感染性疾病的诊断或进行其他实验。但是,由于正常菌群的存在,一般的被检标本(例如脓、尿、痰、大便)中常含有多种细菌,因此首先必须把它们各自分离开来,获得纯种,然后才能作进一步鉴定。

接种器具

接种环和接种针是最常用的接种细菌的工具,它们的使用方法是微生物学实验的最基本技能之一。

1.结构:接种针和接种环均由三部分组成,其环及针部分多用易于传热又不易生锈且经久耐用的白金或镍制成,环的直径一般为3~4mm,环和针的长度一般为40~50mm,其一端固定于铝制的金属杆上,金属杆的另一端为手持的绝缘柄(图7a、b)。

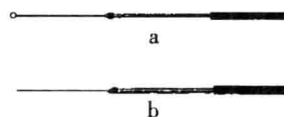


图7 接种环(a)和
接种针(b)

2.使用方法:手持绝缘柄,先将接种环或接种针的金属丝部分垂直置于酒精灯外焰中烧红,然后斜持接种环或接种针,使其金属杆部分通过火焰外焰三次,待冷却后即可取标本,用毕,斜持接种环或接种针,先将金属丝污菌部位稍上部分置于酒精灯外焰中,使染菌部位的水分蒸发后,再将接种环或接种针垂直置于酒精灯外焰中烧红,然后使金属杆部分通过外焰三次,灭菌后搁于架上,切勿随手乱放,以免灼焦实验台面或其它物品。

3.用途:接种环主要用于划线分离、纯种移种及涂片制备等,接种针主要用于穿刺接种及菌落的挑选。

(二)分离培养法——平板划线法

临床的痰、粪、脓汁等标本,常混杂有多种细菌,要从中找出病原菌,就必须通过平板划线法,使其中的细菌在琼脂平板表面逐步稀释,充分地分散开来,使单个活的细菌能固定在一点上生长繁殖,形成单个菌落,根据菌落的特征,可以发现病原菌。挑取单个可疑为病原菌的菌落扩大培养,便可达到分离纯种细菌的目的。有了纯种的细菌,就可以进一步鉴定或作其他用途。划线的方法有多种,现以平板分区划线法为例。

【目的】

掌握平板分区划线接种方法。

【材料】

金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌混合菌液,普通琼脂平板。

【方法】

1.取琼脂平板一个,用标签纸做好标记(包括接种物、日期、班组、接种者)贴在琼脂平板底的玻璃上。

2.右手持接种环在酒精灯火焰上烧灼灭菌,待冷(5s左右),以无菌操作取混合菌液一环。

3.左手持琼脂平板(让皿盖留在桌上),使有培养基的一面向酒精灯火焰,尽量垂直,以减少空气中杂菌地落入。(如图8所示)右手握持沾有混合菌液的接种环,将细菌涂布于琼脂平板之边缘上,约占平板总面积的1/10为1区。划线时,使接种环与平板表面成 $30^{\circ}\sim 40^{\circ}$,轻轻接触,以腕力或指力在平板培养基的表面作轻快的滑动,不可用力太大,以免划破琼脂培养基。划线要连续、密集、平行,要充分利用平板的表面。

4.划完1区后,烧灼接种环,以杀灭环上多余的细菌,待冷(环是否冷却,可先在平板边缘处轻触表面,若接触处琼脂熔化,表示尚未冷却,稍后再复试之),将接种环通过1区作连续划线,约占平板面积的1/5为2区,再依次划3区、4区或5区。划完2区后,在划3区、4区或5区前是否烧灼接种环和划线时每区要交叉多少条线,应根据估计接种材料中所含细菌数量的多少而定。

5.划线接种完毕,应立即将有培养基的皿底倒置于皿盖内(即皿底朝上,皿盖在下,这样可避免培养过程中凝结水自皿盖滴下,冲散菌落)。同时,将接种环灭菌后放回原处。将平板放入 37°C 温箱内培养。

6. 37°C 培养18~24h后取出,观察平板表面生长的不同菌落。如图9所示。注意其大小、形状、边缘、表面、透明度和颜色等性状。由于不同细菌其菌落的特征有所不同,可用于初步鉴别细菌。从平板上挑取可疑的单个细菌菌落接种于琼脂斜面上,经 37°C 温箱培养18~24h后,即可获得某一种细菌的纯种。不在划线上的菌落多是从空气中落入的杂菌。试比较金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的菌落特征。

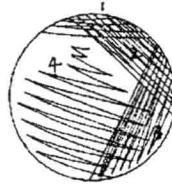


图8 平板分区
划线法示意图

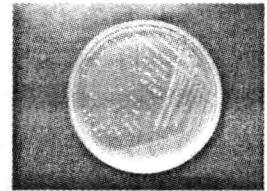


图9 平板分区划线结果

【结果】

菌落形态观察:首先一般先观察整个平板培养基上的菌落形态及种类,然后再选有代表性的各种孤立菌落做如下的详细观察。如图10所示。

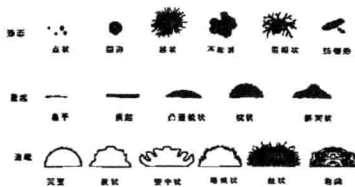


图10 细菌菌落的形态图

1.大小:一般可描述为针尖大、粟粒大等,也可按实测mm数表示之。大菌落(直径在5mm以上),中等大菌落(直径在3mm左右),小菌落(直径在1mm左右)。

2.形状:点状、圆形、卵圆形、叶状等。

3.边缘:整齐、锯齿状、毛发状等。

4.表面:光滑、皱纹、湿润、干燥等。

5.隆起度:凸起、扁平、中心凹陷等。

6.结构:均质性、颗粒状等。

7.色素:无色、白色、黄色、褐色等。

8.透明度:透明、半透明、不透明等。

观察菌落时,不要将空气中落入培养基而生长的杂菌误认为目的细菌。杂菌一般生长于划线痕迹外,或为个别的形状异常的孤立菌落。另外观察时,也要注意保护好平板,勿使再落入杂菌。

(三)斜面培养基接种的纯培养法

【目的】

了解斜面培养基的用途及接种方法。

【材料】

大肠埃希菌、斜面培养基。

【方法】

斜面培养基不易污染,常用于培养纯种细菌。斜面培养基通常也采用划线接种法。接种时,右手持接种环,先将接种环灭菌,待冷后挑取平板上孤立菌落的细菌。将平板放回原处后,用左手取斜面培养基,用右手小指和手掌拔去试管棉塞,将试管口通过火焰略微加热灭菌,再将接种环插入试管(勿触碰管壁),由斜面底部向上划一直线,然后再从斜面底部向上连续蛇行划线(如图 11 所示)。划线完毕,再将试管口通过一下火焰,棉塞灭菌后,塞好棉塞,最后将接种环上的残留细菌用火焰灭菌。接种好的斜面培养基放 37℃ 温箱培养 18~24h,所接种的细菌则生长为均质的菌苔。此培养物来自孤立菌落,为纯种,可用于该菌的各种生物学性状检查。

【结果】

细菌在斜面培养基上经培养后呈菌苔生长。

(四)液体培养基接种法

【目的】

了解液体培养基的用途及接种方法。

【材料】

大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌和链球菌培养物、肉汤或肉膏汤培养基、血清肉汤培养基。

【方法】

可采用“双管移植法”(如图 12-1 所示),将琼脂斜面上生长的细菌移植于肉汤培养基中,即左手持细菌培养物和肉汤培养基两支试管,右手持接种环,按无菌操作法取少量细菌,在肉汤表面稍上的管壁上轻轻研磨(如图 12-2),使细菌混入培养基内。接种后放 37℃ 温箱培养 18~24h,肉眼观察,如培养基出现混浊或形成菌膜、沉淀等,则表示有细菌增殖,观察其增殖状态,有助于鉴别细菌。

【结果】



图 12-1 双管移植法
示意图



图 12-2 液体培养基接种
示意图

大肠埃希菌为均匀混浊生长,枯草芽孢杆菌为表面生长形成菌膜,链球菌为沉淀生长。

(五)半固体培养基接种法

【目的】

掌握半固体培养基的用途和接种方法。

【材料】

材料:大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌斜面培养物、半固体培养基。

【方法】

细菌实验室为保存菌种或测定细菌有无动力,常制成固体或半固体的高层培养基,某

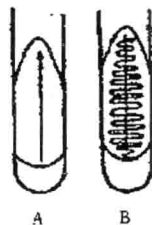


图 11 斜面接种法示意图