



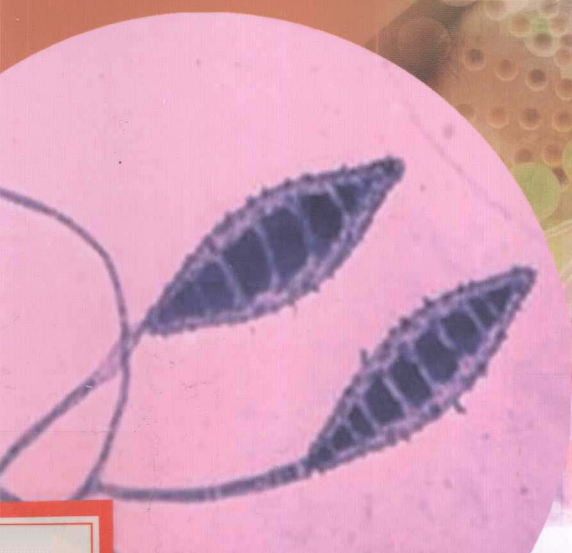
中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等医药院校规划教材

供临床、基础、检验、预防、口腔、护理、药学、影像、麻醉等专业使用

医学微生物实验学

第 4 版

黄 敏 主编



科学出版社

中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等医药院校规划教材

供临床、基础、检验、预防、口腔、护理、药学、影像、麻醉等专业使用

医学微生物实验学

第4版

黄 敏 主 编

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

全书包括微生物实验的基本技术,细菌学、真菌学及病毒学实验,临床标本的综合性实验及实验设计和微生物非培养法鉴定技术等6部分内容,分为44项共131个实验。内容涉及微生物学的实验原理和基础技术,各种微生物的系统检验,各种临床标本的检测方法,技术方法详实,图文并茂。其中非培养法鉴定技术是针对难培养或不能培养微生物的感染难以进行病原学检测的瓶颈而设计的。并针对目前仍以微生物的分离培养作为病原学诊断的“金标准”,提出要以非培养法鉴定技术替代微生物的分离培养,建立新的病原学诊断“金标准”。同时针对教育部倡导大学生创新能力和临床技能培养的教育理念,本书着重强化了临床标本的综合性实验及实验设计部分,以锻炼大学生在综合性实验中的综合分析能力和实践操作能力。要完成本教材全部实验内容约需100学时,各校可根据各自特点和专业要求选择适当的教学内容。

本书可供医药院校学生使用。另外,本书的技术和方法也可作为临床微生物检验的操作指南,也是广大微生物学工作者的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

医学微生物实验学 / 黄敏主编. —4版. —北京:科学出版社,2015.1
中国科学院教材建设专家委员会规划教材·全国高等医药院校规划教材
ISBN 978-7-03-043073-1

I. ①医… II. ①黄… III. ①医学微生物学-实验医学院-教材 IV. ①R37-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第013830号

责任编辑:胡治国 王 超 / 责任校对:朱光兰

责任印制:李 利 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

三河市骏立印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1998年4月第 二 版 开本:787×1092 1/16

2015年1月第 四 版 印张:14 插页:2

2015年1月第十六次印刷 字数:318 000

定价:39.80元

如有印装质量问题,我社负责调换

《医学微生物实验学》(第4版)编委名单

主 编	黄 敏				
主 审	张卓然				
副 主 编	马淑霞	王 岚	孙文长	张轶博	
	孙丽媛	范晓磊	张晓梅	韩晓伟	
编 委	(以姓氏笔画为序)				
	马淑霞(佳木斯大学)				
	王 岚(沈阳医学院)				
	方 芳(沈阳医学院)				
	付英梅(哈尔滨医科大学)				
	孙文长(大连医科大学)				
	孙丽媛(北华大学医学检验学院)				
	李明成(北华大学医学检验学院)				
	张轶博(辽宁医学院)				
	范晓磊(大连医科大学)				
	钟民涛(大连医科大学)				
	唐 立(大连医科大学)				
	黄 敏(大连医科大学)				
	曹 婧(大连医科大学)				
	韩晓伟(辽宁中医药大学)				
	褚云卓(中国医科大学)				
编写秘书	钟民涛(大连医科大学)				

《医学微生物实验学》

(第4版)编写人员

编 者 (以姓氏笔画为序)

马淑霞	王 岚	王立霞	王春敏
王晓丽	方 芳	邓国英	付英梅
任继秋	刘 欣	孙文长	孙丽媛
孙慎侠	杨淑凤	李明成	李星云
李新鸣	吴庆田	张 伟	张 昆
张小梅	张轶博	范晓磊	周慧敏
钟民涛	唐 立	黄 敏	曹 婧
韩晓伟	褚云卓		

前言

《医学微生物实验学》是与医学微生物学课程相配套的实验教材,其前身曾在西南和东北地区多所医学院校使用过,历经4次改版,凝聚了许多师生的汗水和努力,尤其是我校魏曦院士、陈立予教授等老一辈著名科学家给本书打下牢固基础。从第2版就吸收了几所兄弟院校的老师合作,经过十余年的教学实践,得到广大师生的肯定和欢迎,其技术曾被其他论著多次引用。第4次改版邀请了更多的院校参编,使本书的水平得到更大的提高,内容不断充实与完善。

本书在保持上一版风格的基础上,既保留原先微生物实验的基本技术,细菌学、真菌学及病毒学实验,临床标本的综合性实验及实验设计,微生物非培养法鉴定技术6部分内容,而且针对目前感染性疾病的病原学诊断仍以微生物的分离培养作为“金标准”的观点,提出要以非培养法鉴定技术替代微生物的分离培养,建立新的病原学诊断“金标准”。针对教育部倡导大学生创新能力和临床技能培养的教育理念,本版将原各种临床标本的微生物学检查改为临床标本的综合性实验及实验设计,以锻炼大学生在综合性实验中的综合分析能力和实践操作能力。

新版共44项实验,各校可按医学微生物学教学大纲要求,根据各专业教学的实际教学时数,教学习惯和设备条件等,选择恰当的实践教学内容。我们所选实验是坚持可操作性的原则,举一反三的收效,联系临床实际的指导思想。随着科学技术的进步,临床上出现了不少微生物商品化、自动化检测方法,但我们仍然坚持基本理论、基本知识和基本技能的原则,加强实验的基本原理,基本方法和基本技术的学习;主张循序渐进,提倡做综合性连续性实验,通过模拟临床标本的微生物学检查,设置实验设计平台,培养学生的兴趣和进行科学研究的积极性,提高学生的实验水平和解决实际问题的本领。为解决教学示教片不足的困难,本书增加了常见微生物的彩图以备师生参考,图文并茂也是本书的一大特点。另外,本书的技术和方法也可作为临床微生物检验的操作指南,也是广大微生物学工作者的参考用书。

本书再版得到多所兄弟院校领导和编者的支持与合作,同时也得到科学出版社的鼎力支持,在此一并表示衷心的感谢。由于我们的学术水平和编写能力有限,又是多所院校新的合作,内容和安排上难免会有不足之处,恳请同道斧正。

大连医科大学
黄 敏 张卓然
2014年8月29日

目 录

第一部分 微生物实验的基本技术

第一实验	细菌的人工培养法	(1)
实验 1	基础培养基的制备	(1)
实验 2	细菌的分离与接种法	(2)
第二实验	细菌形态学检查法	(6)
实验 3	显微镜的使用	(6)
实验 4	细菌不染色标本检查法(悬滴法)	(6)
实验 5	细菌涂片的制备及革兰染色法	(7)
实验 6	细菌的基本形态和特殊结构观察	(8)
第三实验	细菌生化鉴定法	(9)
实验 7	单糖发酵试验	(9)
实验 8	触酶试验	(9)
实验 9	氧化酶试验	(10)
实验 10	IMViC 试验	(10)
实验 11	硫化氢试验	(12)
实验 12	尿素酶试验	(12)
实验 13	数字编码测定法	(13)
第四实验	细菌血清学鉴定法	(15)
实验 14	凝集试验	(15)
实验 15	沉淀试验(毛细管法)	(18)
实验 16	荚膜肿胀试验	(18)
第五实验	消毒与灭菌	(20)
实验 17	常用消毒、灭菌法及除菌滤器的使用	(20)
实验 18	常用化学消毒剂对细菌的影响	(24)
实验 19	噬菌体的特异溶菌试验	(25)
第六实验	细菌抗生素敏感性测定	(27)
实验 20	纸片扩散法	(27)
实验 21	稀释法	(28)
实验 22	E 试验	(30)
第七实验	细菌的遗传与变异	(33)
实验 23	细菌变异现象的观察	(33)
实验 24	R 质粒的传递试验	(34)
实验 25	质粒 DNA 转化试验	(35)
实验 26	细菌 DNA 提取	(36)
第八实验	实验动物及细菌毒素检测	(37)

实验 27	实验动物的管理与选择	(37)
实验 28	动物接种与采血技术	(38)
实验 29	细菌毒素检测	(40)
第九实验	医院内感染监测与质量控制	(42)
实验 30	空气消毒效果的监测	(42)
实验 31	物体表面细菌污染监测	(42)
实验 32	医护人员手细菌污染监测	(43)
实验 33	使用中的消毒液与无菌器械保存液污染监测	(44)
实验 34	压力蒸汽灭菌器灭菌效果监测	(45)
实验 35	紫外线灯的消毒效果监测	(46)
实验 36	无菌试验	(47)

第二部分 细菌学实验

第十实验	球菌	(49)
实验 37	葡萄球菌属	(49)
实验 38	链球菌属	(52)
实验 39	抗链球菌溶血素“O”试验	(53)
实验 40	奈瑟菌属	(54)
第十一实验	肠杆菌科	(56)
实验 41	埃希菌属	(56)
实验 42	沙门菌属	(57)
实验 43	志贺菌属	(58)
实验 44	肥达(Widal)试验	(59)
实验 45	变形杆菌属	(60)
第十二实验	弧菌属	(61)
实验 46	霍乱弧菌	(61)
实验 47	副溶血弧菌	(62)
第十三实验	弯曲菌属和螺杆菌属	(65)
实验 48	弯曲菌属	(65)
实验 49	螺杆菌属	(67)
第十四实验	厌氧菌	(69)
实验 50	厌氧芽胞梭菌	(69)
实验 51	无芽胞厌氧菌	(71)
第十五实验	革兰阳性杆菌	(73)
实验 52	棒状杆菌属	(73)
实验 53	炭疽芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌	(74)
实验 54	李斯特菌属	(75)
第十六实验	分枝杆菌属及诺卡菌属	(76)
实验 55	结核分枝杆菌	(76)
实验 56	麻风分枝杆菌	(78)
实验 57	诺卡菌属	(79)

第十七实验 非发酵革兰阴性杆菌	(80)
实验 58 假单胞菌属	(80)
实验 59 不动杆菌属	(82)
第十八实验 其他细菌	(83)
实验 60 嗜血杆菌属	(83)
实验 61 军团菌属	(84)
第十九实验 API 鉴定系统在细菌学检验中的应用	(86)
实验 62 API 20 E 系统用于肠杆菌科的鉴定	(86)
实验 63 API 20NE 系统用于非发酵菌的鉴定	(89)
实验 64 API Rapid ID 32A 用于厌氧菌的鉴定	(91)
第二十实验 螺旋体	(95)
实验 65 螺旋体的形态观察	(95)
实验 66 钩端螺旋体	(95)
实验 67 梅毒螺旋体	(97)
实验 68 伯氏疏螺旋体	(99)
第二十一实验 支原体	(101)
实验 69 肺炎支原体形态及菌落观察	(101)
实验 70 肺炎支原体冷凝集试验	(101)
实验 71 ELISA 方法检测肺炎支原体 IgG/IgA/IgM 抗体	(102)
实验 72 溶脲脲原体脲酶试验	(104)
第二十二实验 衣原体	(105)
实验 73 沙眼衣原体包涵体的形态观察	(105)
实验 74 直接免疫荧光法检测沙眼衣原体	(105)
实验 75 ELISA 法检测衣原体	(107)
实验 76 细胞培养分离衣原体	(108)
第二十三实验 立克次体	(109)
实验 77 立克次体的形态与染色	(109)
实验 78 外斐反应	(110)

第三部分 真菌学实验

第二十四实验 真菌的基本性状	(112)
实验 79 真菌染色及形态结构的观察	(112)
实验 80 真菌的培养	(114)
实验 81 真菌的生化及鉴定试验	(115)
实验 82 真菌的药敏试验	(116)
第二十五实验 常见浅部真菌的鉴定	(117)
实验 83 毛癣菌属	(117)
实验 84 小孢子菌属	(117)
实验 85 表皮癣菌属	(118)
第二十六实验 常见深部真菌的鉴定	(119)
实验 86 假丝酵母菌属	(119)

实验 87 隐球菌属	(120)
实验 88 曲霉菌属	(121)

第四部分 病毒学实验

第二十七实验 病毒的分离培养技术	(122)
实验 89 病毒的动物接种法	(122)
实验 90 鸡胚培养法	(123)
实验 91 病毒组织培养法	(125)
实验 92 水泡性口炎病毒在细胞上的感染性测定	(127)
第二十八实验 呼吸道病毒	(129)
实验 93 流感病毒的分离与鉴定	(129)
第二十九实验 肠道病毒	(132)
实验 94 肠道病毒的分离鉴定	(132)
实验 95 轮状病毒的检测	(133)
第三十实验 肝炎病毒	(137)
实验 96 ELISA 法检测甲型肝炎病毒 IgM 抗体	(137)
实验 97 PCR 法检测 HBV DNA	(138)
实验 98 PCR 法检测 HCV RNA	(139)
第三十一实验 人类免疫缺陷病毒	(141)
实验 99 ELISA 法检测 HIV 抗体筛选试验	(141)
实验 100 蛋白印迹法检测 HIV 抗体	(142)
第三十二实验 疱疹病毒	(145)
实验 101 抗单纯疱疹病毒抗体检查	(145)
实验 102 PCR 法检测 HSV DNA	(146)
实验 103 生物素-链霉亲和素系统 ELISA 检测抗巨细胞病毒抗体	(147)
第三十三实验 虫媒病毒	(149)
实验 104 乙型脑炎病毒 IgM 抗体检测	(149)
实验 105 登革病毒	(150)

第五部分 临床标本的综合性实验及实验设计

第三十四实验 血液标本病原学鉴定	(151)
实验 106 血液标本的病原菌鉴定	(151)
第三十五实验 尿液及生殖道标本病原学鉴定	(154)
实验 107 尿液标本的病原菌鉴定	(154)
实验 108 生殖道标本的病原菌鉴定	(157)
第三十六实验 粪便标本病原学鉴定	(160)
实验 109 粪便标本的病原菌鉴定	(160)
第三十七实验 脓汁标本的病原学鉴定	(163)
实验 110 脓汁标本的病原菌鉴定	(163)
第三十八实验 痰液及呼吸道标本病原学鉴定	(166)
实验 111 痰及呼吸道标本病原菌鉴定	(166)

实验 112 免疫功能低下与机会性感染	(169)
第三十九实验 无菌体液标本	(171)
实验 113 脑脊液标本的病原菌鉴定	(171)
实验 114 穿刺液标本常见病原菌的鉴定	(173)
第四十实验 设计性实验	(176)
实验 115 临床检测方案的设计	(176)
实验 116 新方法、新技术的设计	(176)
实验 117 暴发流行的实验室工作	(179)

第六部分 微生物非培养法鉴定技术

第四十一实验 临床标本的直接显微镜检查	(181)
实验 118 微生物形态学检查	(181)
实验 119 荧光染色试验	(182)
实验 120 病毒的电子显微镜观察	(183)
第四十二实验 细菌特异性蛋白质及抗原的检测	(185)
实验 121 直接荧光抗体染色法	(185)
实验 122 胶体金法检测结核杆菌抗体	(186)
实验 123 ELISA 夹心法检测葡萄球菌肠毒素	(186)
第四十三实验 核酸检测技术	(188)
实验 124 细菌的培养和破壁	(188)
实验 125 DNA 的提取	(188)
实验 126 固相膜分子杂交	(191)
实验 127 原位杂交	(193)
实验 128 PCR 技术	(194)
实验 129 16S rRNA 的寡核苷酸序列分析	(195)
第四十四实验 气相与液相色谱技术	(196)
实验 130 气相色谱	(196)
实验 131 高效液相色谱	(197)
参考文献	(199)
附录	(200)
彩图	

第一部分 微生物实验的基本技术

随着科学技术的不断进步,标准化、自动化正在成为微生物学实验诊断的发展趋势。医学微生物实验学以病原微生物的表现型和基因型为研究对象,采用微生物学的经典技术(如革兰染色、琼脂培养、生化试验、药物敏感试验等),现代免疫学技术(血清学诊断等)以及分子生物学相关技术(核酸分子杂交、PCR、基因芯片等)对病原微生物的不同层面进行分析,为诊断和防治感染性疾病奠定实验基础。本书遵循科学性、先进性、启发性的原则,概括了微生物学实验的基本原理与方法,较为系统全面地对病原微生物的形态、生理生化特征、遗传变异、代谢产物以及致病性等进行深入研究,培养医学生的无菌操作能力,获得对病原微生物的正确认识。

第一实验 细菌的人工培养法

细菌在自然界和人体中广泛分布,且多为正常菌群。待检标本中的病原菌常与其他细菌混杂在一起,只有获得目的菌的纯培养,才能进一步研究其生物学特性,因此,感染性疾病的诊断关键在于病原菌的分离与鉴定。细菌的人工培养就是为细菌的生长提供必要的营养和条件,如温度、湿度、酸碱度、气体环境及适合的培养基。纯培养获得的细菌还可用于生物制品的制备。

实验1 基础培养基的制备

培养基是用人工方法将适合细菌生长繁殖的各种养分混合而成的营养基质。培养基种类很多,根据用途培养基可分为基础培养基、营养培养基、鉴别培养基、选择培养基以及厌氧培养基等;根据物理性状的不同又可分为固体培养基、半固体培养基和液体培养基。基础培养基中含有水分、碳源、氮源、无机盐等营养物质,可供大多数细菌生长繁殖。在基础培养基中增添某些特殊成分(如糖类、血液、抑制剂、指示剂等)则可制成有特殊用途的营养培养基、鉴别培养基和选择培养基。

培养基的制备原则:①充足的营养;②适合的酸碱度;③无菌。

制备培养基的基本流程为:a. 按配方称取原材料;b. 加水溶解;c. 调整酸碱度;d. 分装及灭菌。目前大多数实验室使用商品化的半成品培养基,只需加水溶解,分装灭菌即可使用。

一、液体培养基的制备

【材料】

- (1) 营养肉汤粉(含牛肉膏、蛋白胨及氯化钠)、蒸馏水、NaOH 溶液。
- (2) 玻璃棒、吸管、三角烧瓶、量筒、天平、试管等。

【方法】

称取营养肉汤粉 1.8g(含牛肉膏 0.3g,蛋白胨 1g、氯化钠 0.5g)加入 100ml 蒸馏水中,加热搅拌至溶解并调整 pH 为 7.2~7.6。试管分装及包装后置高压蒸汽灭菌器内,在 103.4kPa 压力下,维持 15~20min。冷却后贴好标签,放入 37℃ 温箱 24h,无细菌生长则置于 4℃ 冰箱贮存备用。制成后的液体培养基呈浅黄色,清晰透明。液体培养基常用于增菌培养,大规模工业生产及进行实验室微生物研究。

二、琼脂固体培养基的制备

琼脂是从海藻石花菜中提出的一种半乳糖胶,对细菌无营养作用,其熔点为 98℃,低于 45℃,则呈现凝胶状态,加入液体培养基中可使之固化形成固体培养基。

【材料】

- (1) 液体培养基、琼脂。
- (2) 试管、平皿。

【方法】

在液体培养基中加入 2% 琼脂即成。经高压灭菌后,趁热将试管斜置、冷凝(培养基约占试管长度的 2/3),即成普通琼脂斜面培养基;或待琼脂培养基冷至 50~60℃ 时,以无菌操作倾入灭菌的空培养皿,冷凝后即成普通琼脂平板(9cm 直径的平皿需培养基 15~20ml)。琼脂平板培养基用于细菌的分离培养;琼脂斜面培养基用于纯培养、保存菌种及观察细菌的某些生化特性。

半固体培养基是在上述液体培养基中加入 0.3%~0.5% 琼脂,加热溶化后,分装于小试管(10mm×100mm),每管约 3ml,经高压灭菌后取出直立冷凝即成。半固体培养基用于检查细菌的动力和细菌菌种的保存。

实验 2 细菌的分离与接种法

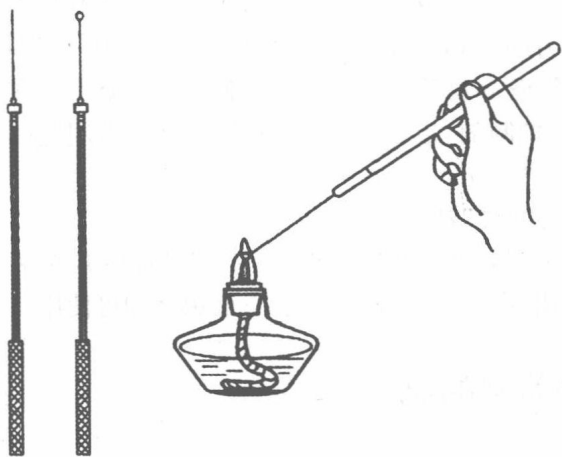


图 1-1-1 接种工具及灭菌方法

培养细菌时,根据研究目的和细菌生长条件的差异,需采用不同的接种技术和培养方法。细菌的分离培养方法有很多种,其中平板划线分离是用接种工具在平板培养基表面划线,将混杂在一起的细菌分散开来,使单个细菌能在某一点上繁殖并形成菌落。纯种的细菌可进一步接种相关的培养基如斜面、半固体、液体培养基以检验生物学性状及获得纯培养。接种工具末端为耐热金属丝,包括接种环和接种针,接种环用来挑取标本、涂划平板,而接种针用来挑取单个菌落、穿刺接种等。接种工具使用前必须通过火焰灼烧灭菌,如图 1-1-1。

一、平板划线分离培养法

四区划线是平板分离细菌中较为常用的技术,能有效稀释细菌获得单个菌落,为进一步鉴定细菌提供条件。

【材料】

- (1) 菌种:葡萄球菌和大肠埃希菌混合菌液。
- (2) 培养基:琼脂平板。
- (3) 接种环,酒精灯。

【方法】

(1) 烧灼灭菌接种环,待冷,以接种环取一环混合菌液。

(2) 左手立即斜持平板(45°角),靠近火焰周围,用手指打开平皿上盖,使之一端与平皿底形成3cm左右的缝隙,右手持已取材的接种环,在平板表面上侧接近玻璃边缘的原始部位以30°~40°角度迂回密集划线形成第1区,然后烧灼接种环,待冷后,逆时针转动平板90°,稍微通过原始部位从1区引出直线并密集划线作为第2区,重新烧灼接种环如此再重复两次,划出第3区及第4区。四个区以占据整个平板为宜,划线密集且不重叠(图1-1-2)。

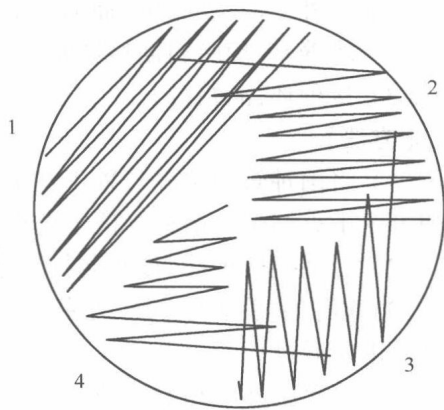


图 1-1-2 平板四区划线法

(3) 接种完毕,烧灼接种环完成灭菌,盖上培养皿,并在平板底玻璃上注明标本(菌种)名称及接种者信息,倒置平板(防止平皿干燥及冷凝水冲散菌落)并放于37℃孵箱培养。

(4) 结果观察:培养18~24h后取出,观察平板表面细菌生长情况及菌落特征,一般情况下,菌落是由分散出来的单个细菌经过18~24h培养形成的肉眼可见的细菌集团。在菌量多的部分,菌落常融合成片,形成菌苔,菌苔不能作为鉴定的依据。而菌落为鉴定细菌的重要指标之一,观察项目主要有以下几点:

- 1) 大小:菌落直径通常以mm表示。
(大菌落直径大于4mm;中等菌落直径2~4mm;小菌落直径小于2mm)
- 2) 形状:圆形、卵圆形、不规则形、放射状等。
- 3) 颜色:无色、白色、黄色、绿色等。

在某些鉴别和选择培养基上,细菌生长过程中会形成一定颜色,如伊红美蓝平板上大肠杆菌形成紫黑色有金属光泽的菌落,这是由于大肠杆菌发酵乳糖产酸,使伊红和美蓝结合成络合物而显色,与细菌本身产生色素不同。

- 4) 边缘:整齐、不整齐(可出现锯齿状、毛发状等)。
- 5) 隆起度:扁平、凸起、中心凹陷等。
- 6) 表面:光滑、粗糙、皱纹、颗粒状等;湿润(有光泽)、干燥(无光泽)等。
- 7) 透明度:透明、半透明、不透明等。

8) 溶血性:细菌在血琼脂培养基上生长可产生完全溶血(β 型溶血),不完全溶血(α 型溶血)和不溶血几种现象。

菌落可依据以上观察特点分为三个类型:①光滑型菌落(smooth type colony):又称 S 型菌落,特点为菌落表面光滑湿润、边缘整齐。②粗糙型菌落(rough type colony):又称 R 型菌落,特点为菌落表面粗糙干燥、边缘不整齐。③黏液型菌落(mucoid type colony):又称 M 型菌落,特点为菌落表面光滑湿润、呈黏液状,以接种环触之可拉出丝状物。

二、斜面培养基接种法

琼脂斜面培养基一般供细菌繁殖,主要用于细菌纯培养和传代,以便进一步鉴定和保存菌种,某些特殊斜面培养基可用作于观察生化反应等。

【材料】

- (1) 菌种:大肠埃希菌、葡萄球菌斜面培养物。
- (2) 培养基:琼脂斜面培养基。
- (3) 接种环,酒精灯。

【方法】

- (1) 将菌种管与培养管置于左手食指、中指和无名指之间,拇指压住试管底部上方,管口朝上置于火焰旁。菌种管位于近火焰一侧,接种管位于外侧。
- (2) 右手执接种环(姿势与握铅笔相似),火焰烧灼灭菌。
- (3) 以右手手掌与小指、小指与无名指分别拔取并夹持两管棉塞(先外后内),并将两管管口迅速通过火焰灭菌。
- (4) 将灭菌并冷却的接种环伸入菌种管,从斜面上取菌苔少许,退出菌种管,迅速伸入待接种的培养管,在斜面上先由底部向上拉一条线,再从斜面自下而上轻轻迂回连续划线,沾菌的接种环进出试管时,均不应触及试管内壁及管口(图 1-1-3)。
- (5) 取出接种环,在火焰上灭菌管口,塞上棉塞(先菌种管,后接种管),然后灭菌接种环,做好标记。置于 37℃ 温箱孵育 18~24h,观察结果。
- (6) 结果观察:细菌在培养管中的接种线上,生长出的大量细菌连成一片,形成了菌苔。不同种的细菌菌苔,其透明度、颜色等特征均不同。

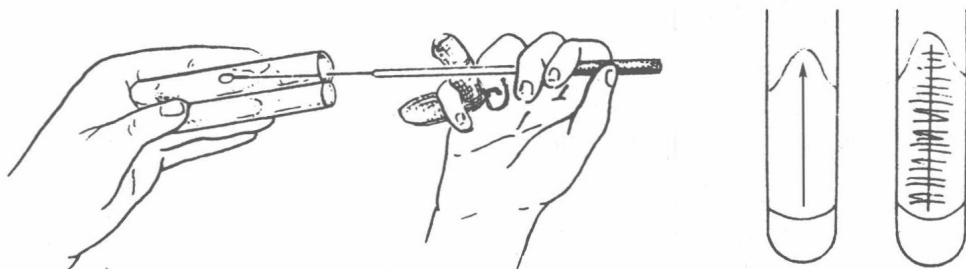


图 1-1-3 斜面培养基接种法

三、液体培养基接种法

肉汤、蛋白胨水、各种单糖发酵管等液体培养基都用本法接种细菌。普通液体培养基一般作增菌及观察细菌的生长状况使用。其他的液体培养基接种后,大多用以测定生化特性。

【材料】

- (1) 菌种:大肠埃希菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌斜面培养物。
- (2) 培养基:液体培养基。
- (3) 接种环,酒精灯。

【方法】

- (1) 与斜面培养基同法握持菌种管及接种管。
- (2) 接种环灭菌冷却,挑取少量菌苔,伸入待接种的培养基管内,在接近液面的管壁处轻轻研磨(图 1-1-4),然后将试管稍摇动,使菌种混匀于液体中即可。



图 1-1-4 液体培养基接种法

- (3) 接种完毕,标记试管及接种信息,将培养管置于 37℃ 温箱孵育 18~24h,观察结果。

(4) 结果观察:液体培养基在未接种细菌前是澄清的,接种细菌后可有以下三种生长现象:

- 1) 均匀混浊生长:一般情况下大多数细菌在液体中变混浊。
- 2) 沉淀生长:上层培养液澄清,管底有絮状或颗粒状沉淀物,一般见于死菌或密度大的细菌。
- 3) 形成菌膜:培养液相对澄清,表面形成一层菌膜,常见于专性需氧菌。

四、穿刺接种法

穿刺接种法主要用于半固体培养基、乙酸铅培养基和 KIA 培养基等的接种,以保存菌种,观察细菌动力及生化反应。

【材料】

- (1) 菌种:变形杆菌、葡萄球菌斜面培养物。
- (2) 培养基:半固体琼脂培养基和乙酸铅培养基。
- (3) 接种针,酒精灯。

【方法】

- (1) 如斜面培养基接种法握持菌种管及待接种管培养基。

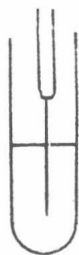


图 1-1-5 穿刺接种法

- (2) 右手持接种针,灭菌冷却后,以针挑取菌苔接种于半固体培养基时,垂直刺入培养基的中心接近底部 0.5cm 处,然后按原路退出(图 1-1-5)。

- (3) 接种完毕,管口通过火焰灭菌,塞上棉塞,接种针灭菌后放回。试管上注明菌名、接种者信息及日期,置于 37℃ 温箱,培养 18~24h 后观察生长情况。

(4) 结果观察:半固体培养基用于观察细菌有无动力,无鞭毛细菌沿接种线生长,接种线清晰无扩散,培养基澄清;有鞭毛细菌沿着接种线向外扩散,呈毛刷状生长。乙酸铅培养基观察有无黑色沉淀物形成。

(周慧敏)

第二实验 细菌形态学检查法

实验3 显微镜的使用

细菌个体微小,肉眼不能看到,必须借助普通显微镜之油镜,将其放大 1000 倍左右才能看清。因此,必须熟练掌握显微镜的使用和保护,尤其是油镜的使用和保护。

基本原理是光线从标本玻片经空气进入镜头时,由于介质密度不同而发生折射现象,因此,进入物镜中的光线很少,结果视野很暗,物像不清晰。如在玻片上加上折光率与玻片($n=1.52$)相近的香柏油($n=1.515$),就可避免光线的分散,加强视野的亮度,获得清晰的物像。

【材料】

显微镜、香柏油、二甲苯、擦镜纸。

【方法】

(1) 油镜的识别:油镜头上都有标记;标有 $90\times$ 或 $100\times$;镜头前端有黑、白或红色的圆圈;刻有“Ⅲ”或 Oil 等,其入光孔径也较其他物镜小。

(2) 油镜的使用(观察细菌的形态)

- 1) 显微镜平稳地安放在实验台适宜处。
- 2) 以天然光线为光源时,使用平面反光镜;以灯光为光源时,使用凹面反光镜。
- 3) 把集光器升到最高位置,光圈完全打开,增大射入光线的强度。
- 4) 将标本固定在载物台上,先把低倍镜调至视野最亮,并找到标本视野的适当位置,然后换用油镜。

5) 先在玻片上滴香柏油 1 滴,用眼从侧方看着物镜,缓慢转动粗调节器,使物镜头浸于油镜内,至与玻片几乎接触为止,但勿使两者相碰,防止损伤镜头或玻片。然后从目镜观察,仔细转动粗调节器,看到模糊物像时,再调动细调节器,使物像清晰。未能看到物像时,可重复上述操作。

6) 油镜头使用后应立即用擦镜纸滴少许二甲苯擦净镜头上的油,并随即用干的擦镜纸擦去二甲苯,以防止腐蚀镜片。注意:在擦镜纸擦拭时,要求顺一个方向旋转擦,不能两个方向来回擦。

(3) 显微镜的保护

- 1) 显微镜使用时要精心保护,不得随意拆散和碰撞。
- 2) 取送显微镜时,应右手持镜臂,左手托镜座,平端于胸前。
- 3) 不用时,将物镜转开呈“八”字,使其不正对集光器,集光器下降,罩上镜套。登记使用前后的情况,签名,对号归位。

实验4 细菌不染色标本检查法(悬滴法)

不染色标本中的细菌,内部均匀,折光性与周围环境相似,不能清楚见到形态特征与结构。一般主要用于观察细菌的动力及运动状况。