

高等医科院校教材

(供基础、临床、口腔、检验医学专业选用)

第二版

医学微生物实验学

张卓然 主编

科学出版社

高等医科院校教材(供基础、临床、口腔、检验医学专业选用)

医学微生物实验学

第 二 版

张卓然 主编

科学出版社

1998

R37-33
ZZR
=2

内 容 简 介

本书系高等医科院校教材,可供医科院校开设实验课选用,亦可供微生物学临床检验人员上岗培训参考。全书共分七部分,47项实验,142个试验。内容包括微生物学实验的原理和基本方法,细菌、真菌和病毒等的系统检验,各种临床标本的分离鉴定技术,新实验方法及质量控制等,适用于临床医学专业和检验专业师生。完成本教材全部实验约需120学时,远远超过规定的学时,因此各院校可根据自己的具体情况选用。

图书在版编目(CIP)数据

医学微生物实验学/张卓然主编. -2版. -北京:科学出版社,
1998.4

ISBN 7-03-006540-9

I. 医… II. 张… III. 医药学:微生物学-实验-医学院校-
教材 IV. R37-33

中国版本图书馆CIP数据核字(98)第02356号

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

新 世 纪 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1998年4月第 二 版	开本:787×1092 1/16
1998年4月第二次印刷	印张:15 1/4
印数:1—6 000	字数:360 000

定价:16.00元

《医学微生物实验学》
(第二版)

主 编 张卓然

副主编 范晓磊 王世仪 田延东

刘 敏 黄 敏

作 者 (以姓氏笔画为序)

王世仪 大连医科大学

田延东 大连大学医学院

江 芳 大连医科大学

刘 敏 大连医科大学附属二院

李 岩 大连医科大学

李冬梅 山东大学

张丽娟 大连大学医学院

张卓然 大连医科大学

范晓磊 大连医科大学

郑丛龙 大连医科大学

唐 立 大连医科大学

黄 敏 大连医科大学

再版前言

医学微生物学是一门实验性极强的学科,其实验教学应单独设课,可作为一门技术学对学生基本训练,对微生物学临检人员上岗前的技术培训等。为达此目的,医学微生物实验学就应运而生了。既然是实验学,就必须坚持让学生亲自动手,并重视智能和独立工作能力的培养。在整个实验教学中应严格贯彻“无菌观念”的教育。

本书分七部分,共47项实验。包括微生物学实验的原理和基本方法,细菌、真菌和病毒等的系统检验,各种临床标本的分离鉴定技术,新实验方法及质量控制等,适用于临床医学专业和检验专业等。按教学大纲要求,临床医学本科的实验课为32~40学时,大专为24~30学时;医学检验本科为74~82学时,专科为48~64学时。而要完成本教材的全部实验约需120学时,远远超过了上述规定的学时数。各学校可根据各层次的实际学时、要求及设备条件等,安排和确定实验内容。我们主张循序渐进,提倡做系统性连续实验,通过模拟临床标本的微生物学检查,提高学生的实验水平和解决实际问题的本领。另外,本书也可作为临床微生物检验工作的操作指南,是广大微生物学工作者的良好参考书。

本书凝聚着我室魏曦院士、陈立予教授等著名科学家的丰功业绩,也包含了历届教研室同仁的不懈努力。更可喜的是第二版已成为我校与大连大学医学院、山东大学等兄弟院校合作的结晶。本书的出版得到大连医科大学领导、教务处及教材科的大力支持与帮助,得到科学出版社的支持与合作,在此一并表示衷心地感谢。

本书的完成是向单独开设实验课的方向迈出了第一步。但由于我们的学术水平和编写能力有限,内容和安排上肯定有不少欠缺和错误,恳请同道们斧正。

大连医科大学 张卓然

1997. 11. 15

微生物学实验室规则

医学微生物学实验的对象大多为病原微生物,具有传染性,因此要求进入实验室后必须严格遵守以下规则:

一、书包、衣物等挂放于室外,切勿带入室内。必须带入的书籍和文具等也应放置于非操作区,以免污染。

二、进入实验室应穿好隔离衣、戴好帽子。无菌操作时必须带好口罩。

三、禁止在室内饮食、吸烟或用嘴去湿润标签、铅笔等。

四、认真进行各项实验,严格掌握无菌技术。各种实验物品按指定地点存放,如吸过菌液的吸管、毛细滴管投入来苏消毒缸内;用过的玻片、L形棒等放入装有消毒液的搪瓷缸内,绝对不要乱放在桌面上或冲洗于水槽中。

五、实验中发生差错或意外事故时,应立即报告教师及时处理。切勿隐瞒或自作主张不按规定处理。如万一发生有菌材料污染桌面、衣物等,应立即用抹布浸沾2%~3%来苏(或5%石炭酸液),泡在污染部位,经半小时后方可抹去。如手上沾有活菌也用上述消毒液浸泡10min左右,再以肥皂及自来水反复洗净。

六、要爱护室内仪器设备,按使用规则操作,不得随意拨动电器开关;显微镜用后要擦净,各功能部件复位,登记使用情况后放入显微镜柜内。要节约使用实验材料,如不慎损坏了器材等,应报告教师进行登记。

七、实验完毕应整理桌面,关好水、电及煤气开关。需培养的材料要标记组别、姓名等,送入孵箱培育。观察结果后的培养物等放污物筒,送消毒室处理、洗刷。

八、实验完毕,脱下隔离衣、帽子,按要求将隔离衣反折、叠好,按座号放入柜内。然后用消毒液及自来水洗手后再离开实验室。另应轮流值日,负责实验室的卫生,水电,煤气及门窗的安全。

目 录

再版前言

微生物学实验室规则

第一部分 微生物学原理及实验方法

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)
实验 3 倾注培养和活菌计数	(6)
第二实验 细菌形态学检查法	(7)
实验 4 显微镜的使用	(7)
实验 5 细菌不染色标本检查法(悬滴法)	(8)
实验 6 细菌涂片的制备及革兰氏染色法	(8)
实验 7 细菌的基本形态和特殊结构观察	(9)
实验 8 测微器的使用	(10)
第三实验 细菌生化鉴定法	(11)
实验 9 单糖发酵试验	(11)
实验 10 IMViC 试验	(12)
实验 11 硫化氢试验	(14)
实验 12 脲酶试验	(14)
实验 13 数字编码测定法	(14)
第四实验 细菌血清学鉴定法	(16)
实验 14 凝集试验	(16)
实验 15 沉淀试验(毛细管法)	(19)
实验 16 荚膜肿胀试验	(20)
第五实验 理化及生物因素对细菌的影响	(21)
实验 17 常用消毒、灭菌法及除菌滤器的使用	(21)
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	(26)
实验 20 纸片扩散法	(26)
实验 21 稀释法	(27)
实验 22 E 试验	(29)
第七实验 细菌的遗传与变异	(32)

实验 23	细菌变异现象的观察	(32)
实验 24	R 质粒的传递试验	(34)
实验 25	质粒 DNA 转化试验	(34)
第八实验	实验动物感染及细菌毒素检测	(35)
实验 26	实验动物的管理与选择	(35)
实验 27	动物接种与采血技术	(36)
实验 28	细菌毒素检测	(38)

第二部分 临床常见病原菌的培养与鉴定

第九实验	球菌	(41)
实验 29	葡萄球菌属	(41)
实验 30	链球菌属	(43)
实验 31	肺炎链球菌与甲型链球菌的鉴别	(46)
实验 32	抗链球菌溶血素“O”试验	(46)
实验 33	奈瑟菌属	(47)
第十实验	肠杆菌科 I	(49)
实验 34	大肠埃希菌属	(50)
实验 35	沙门菌属	(51)
实验 36	志贺菌属	(52)
实验 37	肥达(Widal)试验	(53)
第十一实验	肠杆菌科 II	(54)
实验 38	克雷伯菌属、肠杆菌属、沙雷菌属	(54)
实验 39	变形菌属与摩根菌属	(55)
实验 40	小肠结肠炎耶尔森菌	(56)
第十二实验	弧菌属、气单胞菌属、邻单胞菌属	(57)
实验 41	霍乱弧菌	(57)
实验 42	副溶血弧菌	(58)
实验 43	气单胞菌属和邻单胞菌属	(60)
第十三实验	弯曲菌属和幽门螺杆菌	(62)
实验 44	弯曲菌属	(62)
实验 45	幽门螺杆菌	(64)
第十四实验	厌氧菌	(65)
实验 46	厌氧芽孢梭菌	(65)
实验 47	无芽孢厌氧菌	(67)
第十五实验	革兰氏阳性杆菌	(69)
实验 48	棒状杆菌属	(69)
实验 49	炭疽芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌	(70)
实验 50	李斯特菌属	(72)
第十六实验	分枝杆菌属及需氧性放线菌	(73)

实验 51	结核分枝杆菌	(73)
实验 52	麻风分枝杆菌	(75)
实验 53	诺卡菌属	(76)
第十七实验	非发酵革兰氏阴性杆菌	(77)
实验 54	假单胞菌属	(77)
实验 55	黄杆菌属	(79)
实验 56	不动杆菌属	(79)
第十八实验	其他细菌	(80)
实验 57	嗜血杆菌属	(80)
实验 58	布鲁菌属	(82)
实验 59	军团菌属	(83)
实验 60	鲍特菌属、巴斯德菌属、弗朗西丝菌属	(85)
第十九实验	螺旋体	(86)
实验 61	螺旋体的形态观察	(87)
实验 62	钩端螺旋体	(87)
实验 63	梅毒螺旋体	(89)
实验 64	伯氏螺旋体	(91)
第二十实验	支原体	(92)
实验 65	肺炎支原体形态及菌落观察	(92)
实验 66	肺炎支原体冷凝集试验	(93)
实验 67	溶脲脲原体脲酶试验	(94)
第二十一实验	衣原体	(94)
实验 68	沙眼衣原体包涵体的形态观察	(94)
实验 69	荧光抗体法检测沙眼衣原体	(95)
实验 70	ELISA 法检测衣原体	(96)
第二十二实验	立克次体	(97)
实验 71	立克次体的形态与染色	(97)
实验 72	外斐反应	(98)

第三部分 真菌学实验

第二十三实验	真菌的基本性状	(100)
实验 73	真菌形态结构的观察	(100)
实验 74	真菌小培养	(100)
实验 75	真菌的生化试验	(102)
实验 76	真菌的药敏试验	(103)
第二十四实验	常见浅部真菌的鉴定	(103)
实验 77	真菌性皮屑的镜检	(104)
实验 78	毛发穿孔试验	(104)
第二十五实验	常见深部真菌的鉴定	(105)

实验 79	新生隐球菌墨汁负染色法	(105)
实验 80	白色假丝酵母菌芽管及厚膜孢子形成试验	(105)
实验 81	荚膜组织胞浆菌	(106)

第四部分 病毒学实验

第二十六实验	病毒的分离培养技术	(107)
实验 82	病毒的动物接种法	(107)
实验 83	鸡胚培养法	(108)
实验 84	病毒组织培养法	(110)
实验 85	水泡性口炎病毒在细胞上的感染性测定	(112)
第二十七实验	呼吸道病毒	(113)
实验 86	流感病毒的分离与鉴定	(113)
实验 87	ELISA 间接法检测副流感病毒(PFV)血清 IgM 抗体	(116)
实验 88	ELISA 夹心法检测呼吸道合胞病毒(RSV)抗原	(117)
第二十八实验	肠道病毒	(118)
实验 89	肠道病毒的分离鉴定	(118)
实验 90	轮状病毒的检测	(119)
第二十九实验	甲型和戊型肝炎病毒	(122)
实验 91	ELISA 法检测甲型肝炎病毒 IgM 抗体	(122)
实验 92	ELISA 法检测 HEV-IgG 抗体	(123)
第三十实验	乙型、丙型和庚型肝炎病毒	(124)
实验 93	乙型肝炎病毒 HBs Ag 检测	(124)
实验 94	PCR 法检测 HBV-DNA	(126)
实验 95	斑点杂交法检测 HBV-DNA	(127)
实验 96	ELISA 法检测 HCV-IgM 抗体	(128)
实验 97	PCR 法检测 HCV-RNA	(129)
实验 98	ELISA 法检测 HGV-IgG 抗体	(131)
第三十一实验	虫媒病毒	(131)
实验 99	乙型脑炎病毒 IgM 抗体检测	(132)
实验 100	登革病毒	(132)
第三十二实验	出血热病毒	(135)
实验 101	免疫荧光法检测抗汉坦病毒 IgM	(135)
实验 102	ELISA 法检测汉坦病毒特异性 IgM	(136)
第三十三实验	疱疹病毒	(137)
实验 103	抗单纯疱疹病毒抗体检查	(137)
实验 104	PCR 法检测 HSV-DNA	(138)
实验 105	生物素-链霉亲和素系统 ELISA 检测抗巨细胞病毒抗体	(139)
实验 106	免疫荧光法检测 EBV IgA 抗体	(140)
第三十四实验	人类免疫缺陷病毒	(141)

实验 107	ELISA 法检测 HIV 抗体筛选试验	(141)
实验 108	WB 法检测 HIV 抗体确认试验	(142)
第三十五实验	肿瘤病毒	(144)
实验 109	WB 法检测 HTLV 抗体试验	(144)
实验 110	PCR 法检测 HPV-DNA	(146)

第五部分 各种临床标本的微生物学检查

第三十六实验	血液标本	(148)
实验 111	血液标本常见病原微生物的分离鉴定	(149)
第三十七实验	粪便标本	(151)
实验 112	粪便标本常见病原微生物的分离鉴定	(151)
第三十八实验	尿液及生殖道标本	(154)
实验 113	尿标本常见病原微生物的分离鉴定	(154)
实验 114	生殖道标本常见病原微生物的分离鉴定	(157)
第三十九实验	痰液及呼吸道标本	(160)
实验 115	痰液及呼吸道标本常见病原微生物的分离鉴定	(160)
第四十实验	脓汁标本	(164)
实验 116	脓汁标本常见微生物的分离鉴定	(164)
第四十一实验	无菌体液标本	(166)
实验 117	脑脊液中常见病原微生物的分离鉴定	(166)
实验 118	穿刺液标本常见病原微生物的分离鉴定	(169)

第六部分 微生物学诊断新技术

第四十二实验	API 鉴定系统在微生物检验中的应用	(171)
实验 119	API 20E 系统用于肠杆菌科的鉴定	(171)
实验 120	API 20NE 系统用于非发酵菌的鉴定	(174)
实验 121	API 20C AUX 系统用于酵母样真菌的鉴定	(176)
实验 122	API Rapid ID32A 用于厌氧菌的鉴定	(177)
第四十三实验	气相与液相色谱技术	(180)
实验 123	气相色谱	(180)
实验 124	高效液相色谱	(181)
第四十四实验	发光分析技术	(182)
实验 125	化学发光技术	(182)
实验 126	生物发光技术	(183)
第四十五实验	核酸检测技术	(184)
实验 127	细菌的培养和破壁	(184)
实验 128	DNA 的提取	(185)
实验 129	细菌 DNA 中 G+C mol% 的测定	(189)
实验 130	固相膜分子杂交	(191)

实验 131	原位杂交	(193)
实验 132	PCR 技术	(194)

第七部分 质量控制和实验设计

第四十六实验	医院内感染监测与质量控制	(197)
实验 133	空气消毒效果的监测	(197)
实验 134	物体表面细菌污染监测	(198)
实验 135	医护人员手细菌污染监测	(199)
实验 136	使用中的消毒液与无菌器械保存液污染监测	(199)
实验 137	压力蒸气灭菌器灭菌效果监测	(201)
实验 138	紫外线灯的消毒效果监测	(201)
实验 139	无菌试验	(202)
第四十七实验	实验设计	(204)
实验 140	临床检测方案的设计	(204)
实验 141	新方法、新技术的设计	(205)
实验 142	暴发流行的实验室工作	(206)
附 录		(208)
I	实验室常用器材的处理与消毒灭菌	(208)
II	常用培养基	(209)
III	常用染色液	(217)
IV	常用试剂和溶液	(220)
V	药敏试验用液及材料制备	(222)
VI	细胞培养常用试剂及培养液	(224)
VII	菌种保存与保管	(225)

第一部分 微生物学原理及实验方法

医学微生物实验学是根据病原微生物的生物学性状、感染性与免疫性等设计出各种试验,以研究与确定感染性疾病的病原学特征及诊断方法。本部分概括了微生物学实验的基本原理与方法。包括对病原微生物的分离培养,生长特性的观察,形态学、生化学、血清学三大鉴定技术,以及对该微生物的药敏试验等。必要时尚须进行动物感染性试验,以协助临床的诊断与治疗。另外,还要对外界环境的影响、微生物本身的遗传性与变异性等,进行深入的研究,以利于人类最终能控制和消灭传染性疾病。

第一实验 细菌的人工培养法

感染性疾病的诊断关键在于病原菌的分离与鉴定,人工培养法为细菌提供必要的环境条件,使其在体外生长繁殖。本实验的目的是为了了解基础培养基的主要成分和制备工艺,掌握在各种培养基上接种细菌的方法;观察和描述细菌在各种培养基上的生长情况。

实验 1 基础培养基的制备

培养基为培养细菌的人工饲料,是由适合细菌生长繁殖的各种营养成分配制而成。基础培养基中所含的营养物质基本能满足一般病原菌生长繁殖时所需的氮源、碳源和无机盐等。在基础培养基的基础上增添某些特殊成分(如糖类、血液、抑制剂等)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等。

一、液体培养基

【材料】

1. 营养物:牛肉膏、蛋白胨、NaCl、 K_2HPO_4 、蒸馏水。
2. 比色管、水、NaOH 溶液(1mol/L 及 0.1mol/L)、0.02%酚红、吸管、橡皮乳头、滤纸、量筒、天平、中试管等。

【方法】

1. 将牛肉膏 0.3g、蛋白胨 1g、NaCl 0.5g、 K_2HPO_4 0.2g,加入装有 100ml 蒸馏水的 250ml 的三角烧瓶内,在沸水浴中加热使之完全溶解。

2. 冷至 40~45℃时,以 0.1mol/L NaOH 溶液矫正酸碱度至 pH7.6,方法如下:

1) 取 3 支和标准比色管规格相同的空白比色管,其中一管加蒸馏水 5ml,其余 2 管加待测 pH 的培养基各 5ml,其中的一管加入 0.02%酚红指示剂 0.25ml。

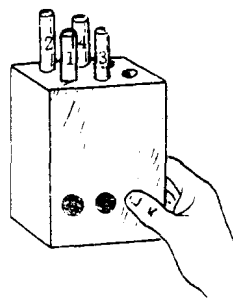


图 1-1 比色架

1. 培养基管;2. 标准比色管;
3. 加有指示剂的培养基管;
4. 蒸馏水管

2) 按图 1-1 所示次序,将各管插入比色架孔内,然后对光比较,若管 3 的色调不同于标准比色管,则徐徐加入 0.1mol/L NaOH 溶液(或 HCl 溶液)摇匀,直至色调与标准比色管相同为止,读记用去的 NaOH(或 HCl)溶液量。

3) 计算 0.1mol/L NaOH 溶液的需要量,并换算成 1mol/L NaOH 溶液量。假设 5ml 的待测培养基需加 0.1mol/L NaOH 溶液 0.25ml 始成 pH7.6,则 100ml 培养基需用 0.1mol/L NaOH 溶液 5ml,等于 1mol/L NaOH 溶液 0.5ml。

计算式 $5:0.25=100:x$

$$x = \frac{0.25 \times 100}{5} = 5\text{ml (0.1mol/L NaOH)} = 0.5\text{ml (1mol/L NaOH)}$$

3. pH 调整后,再煮沸 10min,使培养基中部分蛋白质及磷酸盐等因加碱与再度加热的影响而重新凝固沉淀,滤纸过滤澄清,补足失水。重新测校 pH 一次,若变更很大应重新校正。

4. 根据需要分装于试管或三角烧瓶中。

5. 将已分装好的试管,分捆扎好,并将扎好的每捆试管和三角烧瓶,分别用纸包好棉塞口,置高压灭菌器内 103.4kPa 蒸气压力下(121.3℃)灭菌 15~20min。(不耐高压的培养基则可采用流通蒸气灭菌或间歇灭菌,对含有糖类的培养基可采用 10 磅 15min 灭菌)。

6. 无菌试验:将已灭菌的培养基,置无菌试管内,放在 37℃ 孵箱中培养 24h,如无细菌生长,即可应用。

二、琼脂固体培养基

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,加入的目的是使培养基固态化,其熔点为 98℃,低于 45℃ 以下,则凝固成凝胶状态。琼脂通常呈酸性,加入液体培养基后可使 pH 下降 0.2 左右,故在制作固体培养基时,一般采用 pH 较高的液体培养基,当加入琼脂后,可以避免重新测校。

【材料】

1. 营养物:pH7.8 液体培养基或肉汤。
2. 试管、平皿、琼脂。

【方法】

1. 加 2.5g 琼脂至 100ml pH7.8 的液体培养基中。
2. 加热溶化,以双层纱布过滤,除去杂质,补足失水,分装三角烧瓶或试管内(培养基约占 1/5 试管容量)盖好棉塞。
3. 高压 103.4kPa 灭菌 15min 后,趁热将试管斜置(斜面长度约为试管长度的 2/3),冷凝后即为琼脂斜面培养基。或待琼脂培养基冷至 50~60℃ 时,以无菌操作倾入灭菌的无菌平皿中(直径 9cm 的平皿倾注培养基约 13~15ml),迅速摇匀,平皿使之成平板,冷凝后即为琼脂平板。

注:若在肉汤培养基加入 0.1%~0.5% 琼脂,则制成琼脂半固体培养基。

实验 2 细菌的分离与接种法

一、接种环(针)的用途

接种环(针)又称白金耳(针),是细菌学实验所不可缺少的最常用工具。它的使用是一

项重要的基本技术,必须熟练掌握。

1. 结构:接种环(针)由三部分组成,环(针)部分以用白金丝制成为佳,因易于传热、散热,不生锈而经久耐用。但因价昂,通常多用镍合金丝代替。常用的接种环直径约为3~4mm,长40~50mm,其一端固定于金属杆(多为铝制)上,金属杆的另一端为绝热柄(图1-2)。

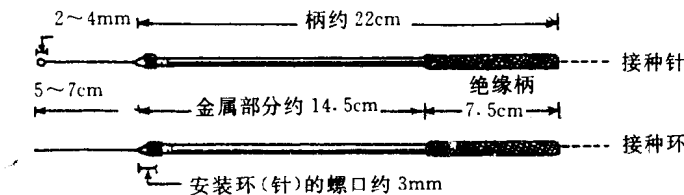


图 1-2 接种环(针)的结构

2. 用法:使用时手持绝热柄,先在氧化焰中烧红镍丝部分,再平持接种环(针)使金属杆在火焰中通过3次灭菌,冷却后即可取菌或待试标本。用毕后立即将染菌的镍丝部分先于还原焰中烧灼,再移于氧化焰中烧红,随后按上法将金属杆部分在火焰中通过3次,搁置于架上,切勿随手弃置,以免灼焦台面或其他物件。或使用电热式接种环灭菌器也可(图1-3)。

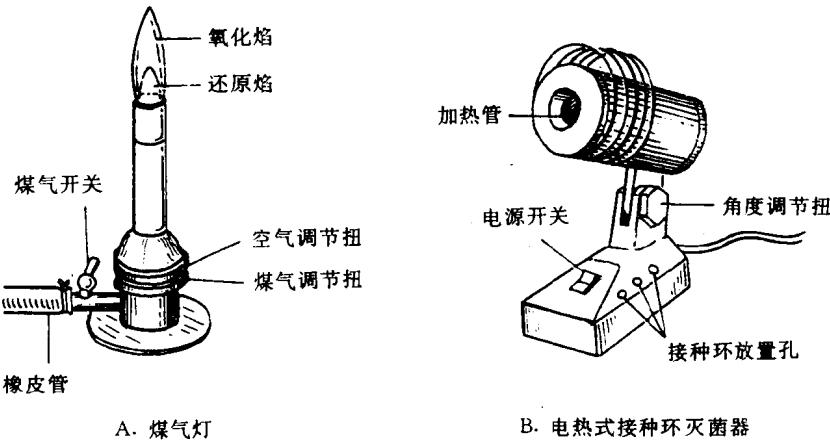


图 1-3 接种环(针)火焰灭菌用具

3. 用途:接种环用于划线分离和纯菌移种以及涂片制备等;接种针主要用于挑选菌落和穿刺接种等。

4. 实践:通过细菌的分离及各种培养基接种过程,初步学会正确用法,并在以后的各次实验中不断巩固熟练并正确掌握。

二、平板划线分离培养法

细菌在自然界中分布广、种类多,而被检材料又常含有一种以上的细菌,为了对特定

细菌进行研究或鉴定,必须从混杂的材料中分离出所需的细菌,以获得纯种。分离的方法有多种,常用平板分区划线法。

【材料】

1. 菌种:葡萄球菌和大肠杆菌混合菌液。
2. 培养基:琼脂平板。

【方法】

1. 烧灼灭菌接种环,待冷,以接种环取一环混合菌液。
2. 左手立即持起平板,五指固定平皿盖边缘,向外反转手掌使平皿盖向上,则平板落于手掌内,用拇指和中指固定平皿边缘,再向内反转手掌,使平皿盖向下放于桌面上,但此时手指仍持住平皿边缘,并稍微提起,作备用状态。
3. 左手斜持(45°角)平板,右手持已取材的接种环,两肘固定于实验台边缘使双手等高,平板在煤气灯或酒精灯火焰前上方 5~6cm 距离,以右手持接种环在平板上侧的原始部位以 30°~40°角度反复涂 4~5 次,然后烧灼接种环,待冷后,稍微通过原始部位向图示“1”区引出直线,如图示“1”区往返划线;旋转平板,重新烧灼接种环,待冷后,通过“1”区向“2”区引出一直线往返划线,如此重复 4 次。要求:划线每区之间只有一条线连接;划线既密又不重叠;四个区占据整个平板为宜(图 1-4)。

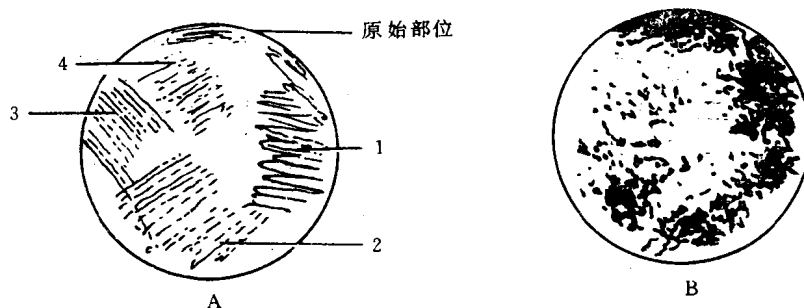


图 1-4 平板划线法

A. 平板划线法; B. 孵育后菌落的散布情况

4. 划线完毕,将平板放进平板盖内,并在平板底玻璃上用蜡笔标明标本(菌种)名称,班室座号,日期,将平板倒置(底在上)放于 37℃ 孵箱培养。

5. 经 18~24h 后取出,观察平板表面生长的各种菌落,注意其大小、形状、边缘、透明度、颜色等特征。

三、斜面培养基接种法

琼脂斜面培养基一般供细菌繁殖,用作纯培养;某些特殊斜面培养基可作观察生化反应等特殊用途。

【材料】

1. 菌种:大肠杆菌、葡萄球菌斜面培养物。
2. 培养基:琼脂斜面培养基。

【方法】

1. 取一菌种管与培养管置于左手食指、中指、无名指之间,拇指压住试管底部上方,使菌种管靠近火焰一侧,接种管位于外侧,斜面均向上。
2. 右手拇指和食指分别松动两管棉塞,火焰灭菌接种环。
3. 以右手小指与手掌,小指与无名指分别拔取两管棉塞(先外后内),将两管口迅速通过火焰灭菌。
4. 将灭菌的接种环插入菌种管,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,再从斜面底部向上轻轻曲折连续划线(图 1-5)。

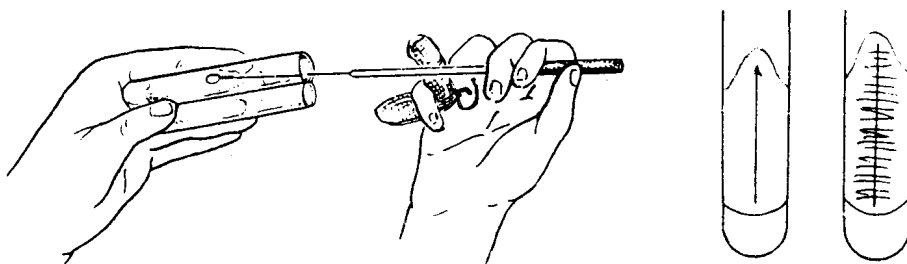


图 1-5 双管移种法和斜面接种法

5. 取出接种环,在火焰上灭菌管口,顺序塞上棉塞(先塞菌种管,后塞接种管),然后灭菌接种环;做好标记。 37°C 孵育 18~24h 后观察结果。细菌在培养管中的接种线上,生长出许多菌落连成一片,形成了菌苔。不同种的细菌菌苔,其透明度、颜色等特征不同。

四、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。接种肉汤经孵育后,可观察细菌不同生长情况。有的均匀混浊,有的沉淀生长,亦有表面形成菌膜。其他的液体培养基接种后,大多供作测定生化特性使用。普通液体培养基一般作增菌用。

【材料】

1. 菌种:大肠杆菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌斜面培养物。
2. 培养基:蛋白胨水及五糖发酵管培养基。

【方法】

如斜面培养基接种法握持菌种管,挑取少量菌苔,伸入待接种的培养基管内,在接近液面的管壁上轻轻研磨,并沾取少许培养液调和,使菌混合于其中(图 1-6)。

五、穿刺接种法

凡培养基制好后,其外形呈一圆柱直立于试管内者,均用穿刺法接种之。属于此类接种法的有半固体琼脂培养基、醋酸铅培养基、明胶培养基等。

【材料】

1. 菌种:变形杆菌、葡萄球菌斜面培养物。