

第一篇



第一章 细菌检验的基本技术

第一节 细菌形态学检查

实验 1 显微镜的使用

[目的与要求]

1. 掌握显微镜油镜的使用方法。
2. 熟悉显微镜结构及各部分的功能。
3. 学会显微镜的保护。

[材料和试剂]

显微镜 香柏油 擦镜纸 二甲苯等。

[步骤和方法]

一、普通显微镜的构造

普通显微镜分光学和机械两大部分。

(一) 光学部分

物镜 目镜 聚光器 光圈 反光镜。

1. 目镜

因与观察者眼睛接近，故又称接目镜。目镜上标有 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 等放大倍数，一般采用 $10\times$ 目镜。

2. 物镜

因为镜头接近观察的标本，又称为接物镜。物镜能起到将标本放大的作用。可分为低倍镜、高倍镜和油镜 3 种。一般将放大倍数为 10 倍以下的物镜称为低倍镜，放大倍数为 40 倍左右的称为高倍镜。油镜放大倍数一般在 100 倍左右。因为微生物一般体积微小，故多用油镜观察。若目镜用 $10\times$ ，物镜用油镜时，则显微镜的放大倍数为 1 000 倍。油镜一般有以下标志：① 油镜头的下缘有 1 圈黑线或 2 圈红线。② 有放大倍数 $100\times$ 的标记。③ 有“oil”等字样。④ 油镜头要长于低倍镜或高倍镜。⑤ 油镜直径最小。

3. 聚光器和光圈

聚光器位于载物台下方，有聚集光线的作用。上下调节可调整视野的亮度。上升时亮度增

强，下降时则减弱。聚光器的下方有可调节光束的光圈，通过放大或缩小光圈也可控制视野的亮度。使用油镜观察标本时，通常是将光圈开到最大，聚光器上升到最高。

4. 反光镜

一面是平面镜，另一面是凹面镜。反光镜的作用是采聚光线并传送到聚光器下。采用天然光源时用平面镜，采用人工光源时用凹面镜。注意，应用天然光源时要用间接天然光源，否则，直接照射会对镜头造成损害。

(二) 机械部分

镜筒 镜臂 调节器 载物台 镜座 倾斜关节。

1. 镜筒

镜筒是一个空心圆筒，上端与目镜相连，下端与物镜相连。

2. 镜臂

镜臂呈弓形，位于镜筒后面，为显微镜的握持部。

3. 镜座

镜座呈马蹄形，位于显微镜的底部，用以支撑全镜。

4. 载物台

载物台多呈方形，在镜筒的下方，用以放置被检标本。

5. 调节器

调节器有粗细两种，粗调节器用于镜筒较大距离的升降，细调节器用于小距离的升降。一般用粗调节器调至看到模糊的物像时，再用细调节器调节，直至物像清晰为止。

二、显微镜油镜的使用方法

1. 将显微镜平稳放于实验台的适宜处。注意用油镜时勿使镜臂和载物台倾斜，以免镜油流出，影响观察。

2. 将光圈开到最大，聚光器升到最高位置。

3. 在标本上滴 1 滴香柏油，并将标本固定于载物台上。先用低倍镜对好光线，然后换油镜。

4. 眼睛从侧面观察物镜，慢慢转动粗调节器，使物镜镜头浸入镜油内，但不要与标本接触。然后眼睛移到目镜，缓慢转动粗调节器，当看到模糊物像时，再轻轻转动细调节器直到物像清晰为止。若未看到物像，可重复进行上述操作过程。

三、显微镜的保护

1. 显微镜属精密光学仪器，使用时要注意精心爱护，不得随意拆卸碰撞各部分结构。

2. 取送显微镜时要轻拿轻放，右手持镜臂，左手托镜座，平端于胸前。

3. 显微镜油镜头使用完毕，应立即用擦镜纸拭去镜头上的镜油，擦不净时可滴加少许二甲苯或乙醚擦拭。

4. 显微镜用完后，应下调聚光器，将物镜转成“八”字形，使其不正对聚光器，并降低物镜头。擦拭各部位后，套上镜套，放回原位。

[实验报告]

1. 列出显微镜的基本构造。

2. 说出显微镜油镜的使用方法。

实验 2 不染色标本检查法

不染色标本检查法有悬滴法和压滴法 2 种，主要用于观察细菌的形态与动力。

[目的与要求]

1. 熟悉不染色标本检查法的操作步骤。
2. 了解不染色标本检查法的临床意义。

[材料和试剂]

1. 菌种
金黄色葡萄球菌及变形杆菌 8~12 h 的肉汤培养物。
2. 其他
载玻片，盖玻片，凹玻片，生理盐水等。

[步骤和方法]

一、压滴法

1. 用接种环分别取金黄色葡萄球菌、变形杆菌肉汤培养物 2~3 环，置于载玻片中央。
2. 用镊子夹取盖玻片，覆盖于菌液上。放置时，应先使盖玻片一侧接触菌液，缓缓放下，避免产生气泡。
3. 先用低倍镜找好位置，再换高倍镜观察细菌的运动情况。

二、悬滴法

1. 取 1 张洁净的凹玻片，在凹窝四周涂抹少许凡士林。
2. 于盖玻片中央放 1 环金黄色葡萄球菌或变形杆菌菌液。
3. 将凹玻片倒置于盖玻片上，使凹窝对准盖玻片中央菌液，反转盖玻片，用镊子轻压盖玻片，使盖玻片与凹窝边缘黏紧。
4. 先用低倍镜找到菌悬液，下调聚光器，缩小光圈，再换高倍镜观察。金黄色葡萄球菌无鞭毛，只能做分子布朗运动，位置移动不明显；变形杆菌有鞭毛，运动活泼，可向不同方向运动，位置

移动明显。

[实验报告]

1. 叙述悬滴法的操作过程。
2. 描述金黄色葡萄球菌、变形杆菌的镜下运动情况。

实验 3 细菌的染色标本检查法（革兰染色法）

细菌的染色标本检查法有单染色法和复染色法 2 种。单染色法只用 1 种染料染色，用于观察细菌的形态和排列，不能显示细菌的结构及染色特性。复染色法是用 2 种以上的染料进行染色，可用于观察细菌的结构及染色特性。其中主要是革兰染色法。

[目的与要求]

1. 熟悉细菌涂片的制备。
2. 掌握革兰染色操作方法。

[材料和试剂]

1. 菌种
葡萄球菌、大肠埃希菌的琼脂斜面培养物。
2. 试剂
革兰染色液，结晶紫染液，卢戈氏碘液，95%乙醇，稀释石炭酸复红染液。
3. 其他
生理盐水 载玻片等。

[步骤和方法]

1. 标本片的制备

(1) 涂片 取洁净载玻片 1 张，用蜡笔在玻片中间划线，将玻片二等分，用接种环在两部分各加 1~2 环生理盐水。接种环于酒精灯火焰上灭菌后，再分别取葡萄球菌和大肠埃希菌少许，加

于各自生理盐水中研磨均匀，涂抹成 1 cm×1 cm 大小面积的菌膜为宜。接种环用后注意灭菌。

(2) 干燥：涂片最好自然干燥，为加快干燥速度可在手心上轻轻摩擦，也可在酒精灯火焰高处慢慢烘干（切勿在火焰上烧干，以防菌膜受损变性）。

(3) 固定：将已干燥的涂片在酒精灯火焰上以钟摆样速度往返 3 次。

2. 革兰染色过程

(1) 初染：在已固定好的涂片标本上，滴加结晶紫染液（注意染液要覆盖整个菌膜）染色 1 min，用小水流冲洗。

(2) 媒染：加卢戈氏碘液染 1 min，小水流冲洗。

(3) 脱色：滴加 95% 乙醇，轻轻摇动玻片，使脱色均匀，然后斜持玻片使染液下流；再次滴加乙醇脱色，直至流下的乙醇无色为止（约 0.5 min）小水流冲洗。

(4) 复染：滴加稀释石炭酸复红染液，染 0.5~1 min，水洗，用吸水纸吸干。滴加镜油，于油镜下观察。

3. 革兰染色结果

葡萄球菌染成紫色，为革兰阳性菌（G⁺）；大肠埃希菌染成红色，为革兰阴性菌（G⁻）。

4. 注意事项

(1) 涂片时菌膜厚度要适宜，不要太厚或太薄。

(2) 脱色时间要掌握好，至无紫色下流为止。

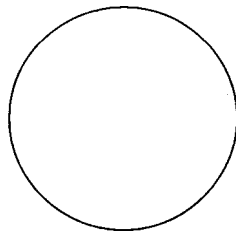
(3) 防止染液因蒸发而改变浓度，最好是现用现配。卢戈氏碘液放置过久或光照后容易失去媒染作用，应特别注意。

(4) 细菌的染色结果因菌龄不同而有差异，一般用 18~24 h 的细菌培养物作为染色标本。

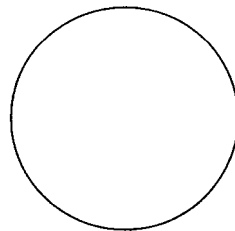
[实验报告]

1. 叙述革兰染色的操作过程。

2. 画出细菌革兰染色镜下形态。



葡萄球菌



大肠埃希菌

实验 4 细菌的特殊结构染色法

[目的与要求]

1. 掌握细菌鞭毛、荚膜、芽孢等特殊结构的镜下形态观察。
2. 了解鞭毛染色、荚膜染色和芽孢染色的操作方法。

[材料和试剂]

1. 菌种

变形杆菌，肺炎链球菌，破伤风芽孢梭菌。

2. 试剂

鞭毛染色液等。

3. 培养基

1.4% 的软琼脂平板，普通琼脂斜面培养基。

4. 其他

载玻片，玻片夹，蒸馏水，生理盐水，小白鼠等。

[步骤和方法]

一、鞭毛染色法（魏曦）

1. 制片

(1) 变形杆菌在 1.4% 的软琼脂平板上传代 2 次，使其形成迁徙生长现象。

(2) 取 1 张清洁的载玻片，并于玻片一侧滴加 1 滴生理盐水；再取少量迁徙生长的细菌，加于蒸馏水中，慢慢倾斜玻片，使细菌沿水流扩散，37℃ 恒温箱内自然干燥玻片。

2. 染色过程

于涂好的标本片上滴加鞭毛染色液，染色 0.5~1 min，用小水流冲洗掉染液，吸水纸吸干后镜检。

3. 染色结果

菌体和鞭毛都被染成红色。

二、芽孢染色法

1. 制片

取 1 张洁净载玻片，于玻片中央滴 1 滴生理盐水；再用接种环挑取破伤风芽孢梭菌斜面培养物涂于生理盐水中，自然干燥后，在酒精灯火焰上固定。

2. 染色过程

于制好的标本片上滴加石炭酸复红染液，并用小火加热，使染液有蒸汽冒出，但不要煮沸；并随时添加染液，不要让标本片干燥，持续 5 min，待玻片冷却后水流冲洗。然后用 95% 乙醇脱色 1 min，水流冲洗，美蓝复染，吸水纸吸干后镜检。

3. 结果

菌体呈蓝色，而芽孢被染成红色。

三、荚膜染色法 (Hiss)

1. 制片

抽取提前进行过肺炎链球菌注射的小白鼠腹腔液，制作印片，自然干燥后备用。

2. 染色过程

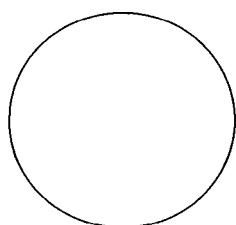
于印片上滴加结晶紫染液，并在酒精灯火焰上加热，有蒸汽冒出为止。用 20% 的 CuSO_4 溶液冲洗染液，不要水洗，吸水纸吸干后镜检。

3. 结果

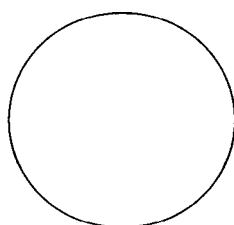
菌体被染成紫色，荚膜呈淡紫色。

[实验报告]

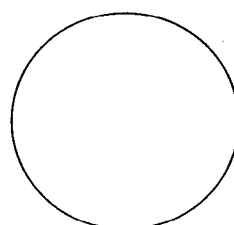
绘出镜下细菌特殊结构的示意图。



荚膜



鞭毛



芽孢

(刘翠青)

第二节 细菌的人工培养与分离技术

实验 5 常用玻璃器材的准备

[目的与要求]

1. 掌握常用玻璃器材的包装方法。
2. 熟悉常用玻璃器材的清洗方法。

[材料和试剂]

1. 材料

培养皿 试管 定量刻度吸管 毛细吸管 三角烧瓶 量筒 量杯 棉花 纱布 牛皮纸或棉布 软毛刷等。

2. 试剂

清洗液 (配制方法见附录 2), 5% 稀盐酸和洗涤剂 (高级洗衣粉或洗洁精) 等。

[步骤和方法]

玻璃器材的准备分为清洗、干燥、包装和灭菌 4 步。

一、清洗

玻璃器皿的清洗包括浸泡、刷洗、浸酸和冲洗 4 个步骤。清洁玻璃仪器的标准是：用蒸馏水洗涤后，其内壁明亮光洁，无水迹附着。

对于新购置的玻璃器材，应先用自来水初步冲洗后，再用 5% 盐酸溶液浸泡过夜，然后用自来水或蒸馏水清洗。对于使用后无细菌污染的玻璃器材，清水浸泡后用毛刷蘸洗涤剂刷洗污垢。对于被细菌污染的玻璃器材，一般先经过消毒灭菌处理，再用洗涤剂洗刷。刷洗不掉的极微量杂质用 5% 稀盐酸浸泡过夜可除去。刷洗和浸酸后都必须用清水充分冲洗：用清水灌满、倒掉，重复 10 次以上，再用蒸馏水漂洗 2~3 次。

注：稀酸浸泡的方法主要用于新购置的第一次使用的玻璃器皿。以后反复使用时，无需每次都 5% 稀盐酸浸泡。

二、干燥

可晾干，也可在干烤箱中烘干。

三、包装

玻璃器材在清洗干燥后，必须经正确包装或加塞才能进行灭菌处理，以保证玻璃器材灭菌后不被污染。

不同玻璃器材包装方式不同。

1. 培养皿

一般以 10 个培养皿为单位，用牛皮纸或报纸包好，装入金属桶内。

2. 试管、离心管、三角烧瓶

用透气的棉花纱布塞或橡皮塞塞好，管塞的 2/3 塞入管内，1/3 外露。管口或瓶口用牛皮纸包好，用纱绳打结或扎紧，试管和离心管集中捆扎，每包 10~20 支。

3. 刻度吸管、毛细吸管

先于吸口端用拉直的回形针塞入少许棉花，然后再集中装入金属吸管筒内或用纸条分支包裹后再集中包扎，并注明包装和灭菌日期。

四、灭菌

利用干烤箱加热 160~170 °C 干热灭菌 2 h；或高压蒸汽灭菌法 103.43 kPa 灭菌 20 min。

[实验报告]

在清洗玻璃器材过程中应注意哪些问题？

2. 灭菌前为何要对玻璃器材进行包装？

实验 6 基础培养基的制备

[目的与要求]

1. 掌握培养基制备的基本程序。
2. 熟悉常用培养基的制备过程、种类及用途。
3. 了解培养基的主要成分及其作用。

[材料和试剂]

1. 材料

比色管, 吸管, 橡皮乳头, 滤纸, 量筒, 天平, 中试管, 锥形瓶, 精密 pH 试纸, 脱脂棉, 漏斗和无菌平皿等。

2. 试剂

牛肉膏, 蛋白胨, NaCl, 蒸馏水, NaOH 溶液 (1 mol/L 及 0.1 mol/L), 0.02% 酚红试剂等。

[步骤和方法]

制备培养基应掌握 3 个原则: 充足而适当的营养, 适当的细菌生长 pH, 使用前保证无菌。一般步骤如下: 调配成分 溶解 校正 pH 过滤 分装 灭菌 质量检验 保存。

一、液体培养基 (肉膏汤)

1. 成分

牛肉膏 0.3~0.5 g, 蛋白胨 1 g, NaCl 0.5 g, 蒸馏水 100 mL。

2. 制法

(1) 调配成分: 将上述营养物质准确称量, 加入装有 100 mL 蒸馏水的 250 mL 三角烧瓶中。

(2) 溶解: 将上述混合物在沸水浴中加热使之完全溶解。

(3) 校正 pH: 冷至 40~45 °C 时, 以 0.1 mol/L NaOH 溶液矫正酸碱度至 pH 7.6, 方法如下: ① 取 3 支和标准比色管规格相同的空白比色管, 于 1、3 支管中各加入待测 pH 的肉膏汤 5 mL, 并于第 1 管中加入 0.2 g/L 酚红 0.25 mL 混匀, 作为测定管; 于第 2 管中加入蒸馏水 5 mL; 第 4 管为 pH 7.6 标准比色管, 分别按图 1-1-1 插入比色架内, 然后对光比较。pH 的矫正: 若 1、3 管与 2、4 管颜色相同时, 表示待测肉膏汤的 pH 为 7.6; 若管 3 的色调不同于标准比色管, 偏黄过酸则徐徐加入 0.1 mol/L NaOH 溶液 (偏红过碱则加入 HCl) 摇匀, 直至色调与标准比色管相同为止, 记录用去 NaOH 或 HCl 溶液量。③ 计算: 假设 5 mL 的待测培养基需要

0.1 mol/L NaOH溶液 0.25 mL 配制至 pH 7.6 则剩余 90 mL 培养基需用 0.1 mol/L NaOH 溶液 4.5 mL 计算式：

$$5 : 0.25 = 90 : X$$

则 $X = \frac{0.25 \times 90}{5} \text{ mL} = 4.5 \text{ mL} (0.1 \text{ mol/L NaOH 溶液})$

若实验中使用 1 mol/L NaOH 溶液进行配制，按以上计算方法 则需使用 1 mol/L NaOH 溶液 0.45 mL。

(4) 过滤：pH 矫正后 再煮沸 10 min(稳定酸碱度并使沉淀物下沉)，滤纸过滤澄清，补足水分，重新测校 pH 一次。若变更很大应重新校测。

(5) 分装：根据需要分装于试管或三角烧瓶中。分装的数量不宜超过容器的 2/3，以免灭菌时外溢。

(6) 灭菌：将分装好的试管或三角烧瓶用塞子塞好，包扎后高压灭菌 103.43 kPa, 20 min(不耐高压的培养基可用流通蒸汽灭菌法或间歇灭菌法，对含有糖类的培养基可采用 68.95 kPa 灭菌 15 min)。

(7) 质量检查：将已灭菌的培养基，置 35 °C 培养箱中培养 24 h，如无细菌生长，表明质量合格。

(8) 保存：制备好的培养基应注明名称、制作日期、有效期等，置 4 °C 冰箱冷藏。

二、琼脂固体培养基

1. 成分

pH 7.8 液体培养基或肉汤，琼脂。

2. 制法

(1) 加 3 g 琼脂至 100 mL pH 7.8 的液体培养基中。

(2) 加热溶化后，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 103.43 kPa 灭菌 15 min 后，趁热将试管斜置，冷凝后即成为琼脂斜面培养基。或待琼脂培养基冷至 50~60 °C 时，以无菌操作倾入灭菌的无菌平皿中(直径 9 cm 的平皿倾注培养基 15~20 mL)，冷凝后即成为琼脂平板。

3. 注意事项

(1) 倾注培养基时，切勿将皿盖全部开启，以免空气中微生物污染。

(2) 新制成的琼脂平板，表面水分较多，不利于细菌的分离，通常应将平皿倒扣搁置于 37 °C 培养箱内约 30 min，待平板表面干燥后使用。

三、半固体琼脂培养基

若在以上肉汤培养基中加入 0.3%~0.5% 琼脂，则制成半固体琼脂培养基。

注：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。

四、常用培养基的配方及配制

依据卫生部检验中心推荐，细菌实验室应有如下培养基：

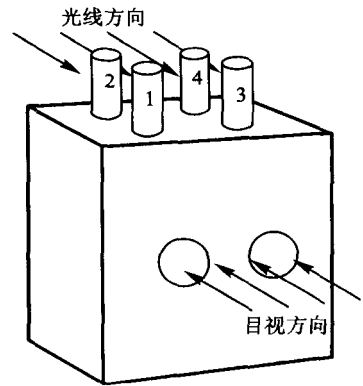


图 1-1-1 目视比色法

1. 血琼脂平板

(1) 成分 肉浸液琼脂 100 mL 脱纤维羊血(兔或马血)5~10 mL。

(2) 制法 将灭菌的肉浸液琼脂加热溶化 待冷至 45~50℃ 加入脱纤维血液 轻轻混匀, 不要产生气泡, 倾注灭菌平皿, 凝固后经无菌试验, 4℃ 冷藏备用。

(3) 用途: 用于分离培养一般致病菌。

2. 巧克力血琼脂平板

(1) 成分 pH 7.4 肉浸液琼脂 100 mL 脱纤维羊血 10 mL。

(2) 制法 加热溶化琼脂 在 90℃ 时加入无菌血液, 混匀培养基呈巧克力色, 可制成斜面和平板。

(3) 用途: 用于脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌的分离培养。

3. 伊红美蓝平板(EMB) 或中国蓝平板)

(1) 成分 2% 无糖琼脂 100 mL, 2% 伊红水溶液 2 mL, 0.65% 美蓝水溶液 1 mL 乳糖 1 g。

(2) 制法: 在无糖琼脂内加入乳糖, 加热溶化, 冷至 50℃, 加入经高压灭菌的伊红及美蓝水溶液, 摇匀后倾注平板。

(3) 用途: 用于肠道杆菌的分离鉴定。

4. 麦康凯培养基

(1) 成分 蛋白胨 20 g 胆盐 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, 1% 中性红水溶液 5 mL 氯化钠 5 g 琼脂 20 g 乳糖 10 g。

(2) 制法: 上述成分除乳糖和中性红外, 均溶解于水, 调整 pH 至 7.4, 过滤分装每瓶 100 mL, 高压灭菌 103.43 kPa 15 min 备用。临用时每瓶加乳糖 1 g 加热溶化琼脂 冷至 50℃ 加入 1% 中性红水溶液 0.5 mL 摇匀, 倾注平板。

(3) 用途: 用于肠道杆菌的分离鉴定。

5. SS 琼脂培养基

(1) 成分 牛肉膏 5 g, 枸橼酸铁 1 g 蛋白胨 5 g, 0.1% 煌绿 0.33 mg 乳糖 10 g, 1% 中性红 0.25 g 胆盐 8.5 g 琼脂 15 g 枸橼酸钠 10 g, 蒸馏水 1 000 mL 硫代硫酸钠 8.5 g。

(2) 制法: ① 加热溶解琼脂、牛肉膏于蒸馏水中。② 除中性红、煌绿外, 其余成分加入已过滤的琼脂内, 摇匀溶解, 稍微加热。③ 调整 pH 至 7.4, 加入中性红、煌绿溶液摇匀, 再煮沸一次(无需灭菌) ④ 待冷至 55℃ 倾注平皿。

(3) 用途: 用于志贺菌和沙门菌的分离培养。

6. 碱性胆盐琼脂平板(或碱性琼脂)

(1) 成分 蛋白胨 10 g 酵母膏粉 5 g 牛胆盐 8 g, 枸橼酸钠 10 g 枸橼酸铁 10 g 硫代硫酸钠 10 g 蔗糖 20 g, 麝香草酚蓝 0.04 g 琼脂 14 g, 溴香草酚蓝 0.04 g, 蒸馏水 1 000 mL。

(2) 制法: 除指示剂及琼脂外, 将各成分加热溶解于蒸馏水中, 调整 pH 至 8.6 然后加入指示剂及琼脂, 煮沸使完全溶解, 不需灭菌, 倾注平板。

(3) 用途: 用于霍乱弧菌及副溶血性弧菌的分离培养。

7. 血液增菌培养基(葡萄糖肉汤)

(1) 成分 酵母浸膏 3 g, K_2HPO_4 2 g, 247 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20 mL 葡萄糖 3 g 牛肉汤 1 000 mL, 枸橼酸钠 3 g, 0.5% 对氨基苯甲酸 5 mL。

(2) 制法：① 除葡萄糖及硫酸镁外，其他成分混合，加热溶解，校正 pH 至 7.6 过滤并分装于 100 mL 三角烧瓶中，每瓶 50 mL，包扎瓶口，高压灭菌 (68.95 kPa) 20 min。② 将葡萄糖配成 10% 水溶液，硫酸镁配成 247 g/L 硫酸镁溶液，高压灭菌 (55.16 kPa) 15 min。③ 每 50 mL 无菌肉汤内加入无菌葡萄糖水溶液 1.5 mL，硫酸镁水溶液 1 mL 混匀，冷藏备用。

(3) 用途：为血液、骨髓增菌用培养基，用于从血液、骨髓中分离病原菌。

8. 营养肉汤

(1) 成分：新鲜牛肉 500 g，蛋白胨 10 g，氯化钠 5 g，蒸馏水 1 000 mL。

(2) 制法：首先将牛肉去筋膜、脂肪并绞碎，加水，放冰箱过夜，然后加热 45~50 °C 1 h 并煮沸 30 min，用纱布过滤，用水补足体积至 1 000 mL。再于滤液中加入蛋白胨和氯化钠，加热使之完全溶化。冷至 40~50 °C，调 pH 至 7.4~7.6，分装于烧瓶或试管内，加塞包扎后高压蒸汽灭菌 103.43 kPa 20 min。

(3) 用途：用于各类细菌的增菌培养。

[实验报告]

1. 根据用途不同可将培养基分为哪几类？

2. 在配制培养基时，应注意的事项有哪些？

实验 7 细菌的分离培养及接种技术

[目的与要求]

1. 掌握液体培养基、斜面培养基和半固体培养基的接种方法。
2. 熟悉接种细菌用具、接种细菌的环境要求及无菌操作要领。

[材料和试剂]

1. 菌种

大肠埃希菌，金黄色葡萄球菌，枯草芽孢杆菌， β 溶血链球菌等。

2. 培养基

液体培养基，半固体培养基，固体培养基（营养琼脂平板和斜面）等。

3. 其他

接种环 接种针 培养箱 培养基 无菌室超净台 酒精灯等。

[步骤和方法]

一、接种环和接种针的使用方法

接种环(针)由环(针)、金属杆和绝热柄3部分组成。环(针)采用铂丝制作最佳。其硬度适宜,易于传热,火焰灭菌后冷却快,经久耐用。但价格昂贵,多用电热(镍)丝或一次性塑料接种环代替。环的直径为2~4 mm,长5~8 cm(图1-1-2),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测标本。用毕后立即将染菌的镍丝部分先于还原焰中烧灼,再移至氧化焰中烧红(防止细菌四溅);随后将金属杆部分在火焰中通过3次灭菌,置于架上,切勿随手放置,以免烧灼台面或其他物品。也可使用电热式接种环灭菌器。接种环用于划线分离和纯菌移种及细菌涂片制备,接种针主要用于挑取菌落和穿刺接种。

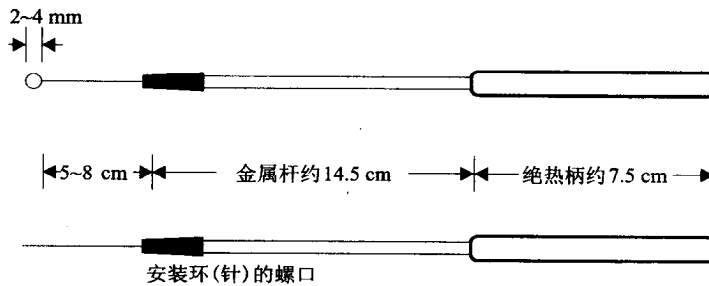


图 1-1-2 接种环和接种针结构

二、接种方法

1. 液体培养基接种

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。

(1) 用灭菌接种环挑取菌落。

(2) 在试管内壁与液面交界处轻轻研磨,使细菌均匀分布于液体培养基中(图1-1-3)。

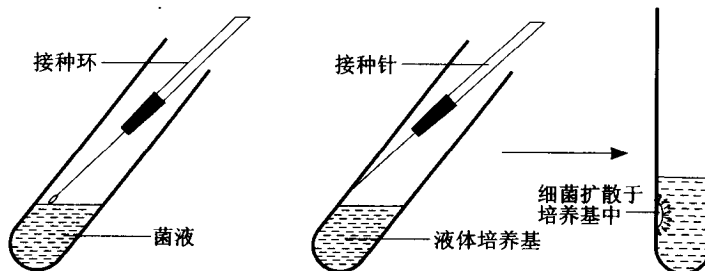


图 1-1-3 液体培养基接种法

- (3) 接种完毕，将管口和棉塞迅速在火焰上灭菌，塞好棉塞，接种环重新灭菌后放回架上。
- (4) 在试管上注明菌名和接种日期，置 35℃ 培养箱培养。

2. 斜面培养基接种

此法主要用于细菌纯培养，以进一步鉴定或保存菌种

(图 1-1-4)。

(1) 在左手食指、中指、环指之间放菌种管和斜面培养管，一并用拇指压住试管底部上方，使菌种管靠近火焰一侧，斜面培养管位于外侧，斜面均向上。

(2) 右手拇指和示指分别松动两管棉塞，灭菌接种环。

(3) 用右手小指与手掌、小指与环指分别拔出两管的棉塞，将管口通过火焰灭菌。

(4) 用灭菌接种环伸入菌种管内挑取移种之菌落。退出菌种管，迅速伸入待接种的培养管，在斜面上先从底部向顶端拉 1 条接种线，再自下而上轻轻蜿蜒划线；或直接自下而上蜿蜒划线。

(5) 将接种针沿培养基中央，穿刺至培养基的底部，然后沿原穿刺线退出接种针，将接种针灭菌后放回原处。

(6) 接种完毕，管口经火焰灭菌，塞上棉塞，做好标记，置 35℃ 培养箱培养 (图 1-1-5)。

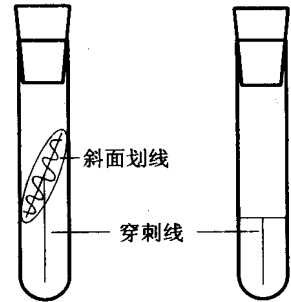


图 1-1-4 斜面接种穿刺培养法

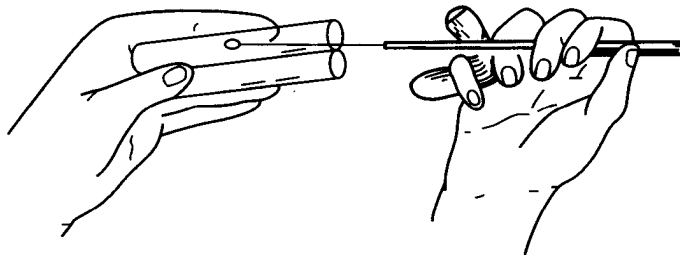


图 1-1-5 双管移种法

3. 半固体培养基的穿刺接种

此法用于保存菌种、观察动力及某些生化反应。

(1) 以接种针挑取细菌培养物，插入半固体培养基的中央，穿刺至培养基底部，然后沿穿刺线退出接种针。

(2) 其他操作与斜面接种相似。

4. 平板划线分离

平板划线分离的目的是使标本中混杂的多种细菌在培养基表面分散生长，形成单个菌落。根据菌落特征，挑取单个菌落进行培养。根据划线方式可分为连续划线法、分区划线法、棋盘格划线法等。常用平板分区划线法。

(1) 连续划线法：一般用于接种材料中菌量较少的标本或培养物。

右手持接种环，通过火焰灭菌，冷却后，挑取菌液。② 左手持培养基平板，将标本或培养

基涂于琼脂平板的一角，然后用接种环自涂布部位开始，向左向右并逐渐向下移动，连续划成若干条分散的平行线。③ 划线完毕，取出接种环，在火焰上灭菌，将平板加盖并倒置，在平皿底部标记，置 35℃ 培养箱培养（图 1-1-6）。

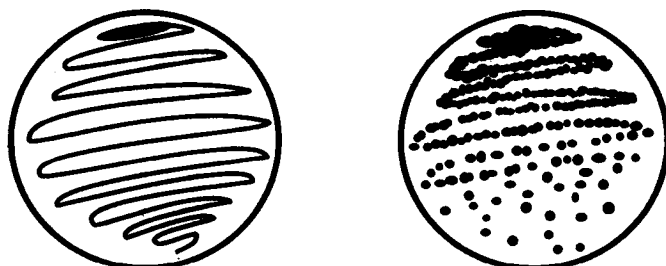


图 1-1-6 连续划线法及培养后菌落分布示意图

(2) 分区划线法：此法常用于粪便等含菌量较多的标本。

灭菌接种环，取 1 环混合菌液。② 左手持平板，五指固定平皿盖边缘，向外反转手掌，使平皿盖向上，平板落于掌内，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，并稍提起，做好备用状态。③ 左手斜持平板，右手持已取材的接种环，两肘固定于试验台边缘，使双手等高，平板在酒精灯火焰上方 5~6 cm 距离，以右手持接种环在平板上侧的原始部位以 30°~40°角反复划线 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，在区“1”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。每一区域的划线应接触上一区域的接种线 2~3 次，划线既密又不重叠，使菌量逐渐减少，以形成单个菌落，4 个区占据整个平板为宜。

划线完毕，将平板放入平板盖内，并在平板底上用记号笔做好标记；将平板倒置放入 35℃ 培养箱。⑤ 经 18~24 h 培养后取出，观察平板表面生长的菌落特征（图 1-1-7）。

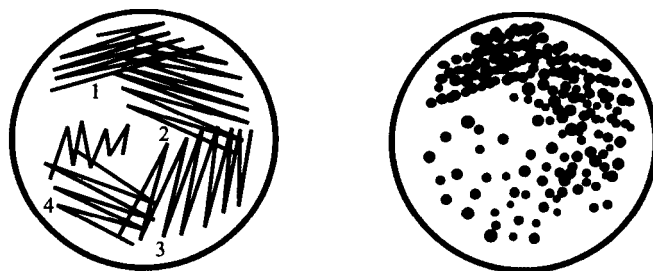


图 1-1-7 分区划线法及培养后菌落分布示意图

(3) 棋盘格划线法：常用于含菌量较多的临床标本，如痰、粪便等标本的初代分离培养。其优点是整个平板的棋盘格范围内均为有效分离区。

金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌混合菌液涂布于平板上部约 1/5 处，接种环烧灼灭菌后，