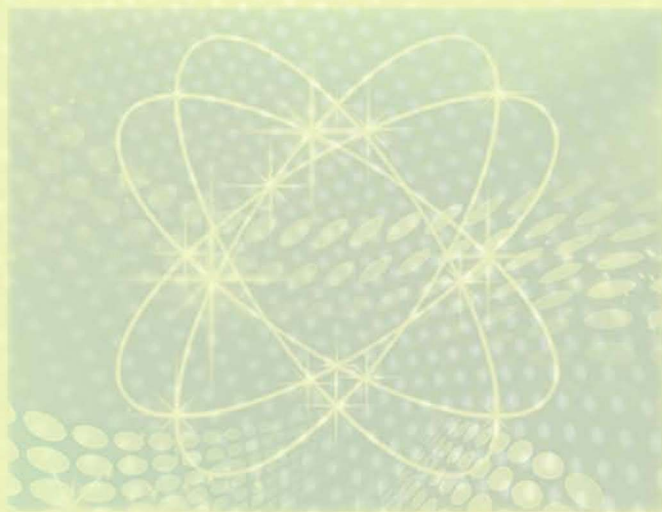


# 微生物学检验实验实训指导

陈静 主编



江西科学技术出版社

# 微生物学检验 实验实训指导

主 编: 陈 静

副主编: 陈 娇 漆 坚

编 者: (按姓氏笔画排序)

李剑平 (江西护理职业技术学院)

陈 娇 (江西护理职业技术学院)

陈 静 (江西护理职业技术学院)

胡雪飞 (南昌大学第一附属医院)

漆 坚 (南昌大学第四附属医院)

## 图书在版编目(CIP)数据

微生物学检验实验实训指导/陈静主编. —南昌:江西科学技术出版社,2012.  
10

ISBN 978-7-5390-4621-1

I. ①微… II. ①陈… III. ①微生物学—医学检验—实验—医学院校—  
教学参考资料 IV. ①R446.5-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第253816号

国际互联网(Internet)地址:

<http://www.jxkjcs.com>

选题序号:ZK2012086

图书代码:X12011-101

微生物学检验实验实训指导

陈静主编

---

出版	江西科学技术出版社
发行	南昌市蓼洲街2号附1号
社址	邮编:330009 电话:(0791)86623341 86610326(传真)
印刷	江西千叶彩印有限公司
经销	各地新华书店
开本	787mm×1092mm 1/16
字数	150千字
印张	7.5
版次	2012年11月第1版 2012年11月第1次印刷
书号	ISBN 978-7-5390-4621-1
定价	15.00元

---

赣版权登字-03-2012-116

版权所有,侵权必究

(赣科版图书凡属印装错误,可向承印厂调换)

## 实训室规则

由于微生物检验实训材料大多是病原微生物,如操作不慎发生意外,可能造成自身感染或环境污染,因此,必须严格遵守以下规则:

1. 非实训用品不准带入实训室,必需的教材和文具带入后要远离操作区。
2. 进入实训室要穿工作服,离开实训室前要脱下并反叠放于指定处,且工作服应经常消毒、清洗。
3. 实训室内绝对禁止饮食、吸烟、化妆,不得用嘴湿润标签、铅笔等,不要用手抚摸头面部,长发必须束起。
4. 实训室内要保持肃静,禁止高声说话和乱动物品。
5. 凡实训用过的污染物品及器械,如接触菌液、培养物的吸管、试管、玻片等,应放入指定容器内,不得直接放在桌面上。
6. 爱护公物,节约使用实训材料,如损坏实训器材,应向老师报告,酌情处理。
7. 操作时严格按照无菌操作进行,实训中一旦发生意外,如划破皮肤、细菌污染桌面、地面、手及衣物时,应立即报告老师并按下述方法进行处理。
  - (1)如吸入菌液,立即将菌液吐入消毒容器中,再用 0.1%高锰酸钾或 3%过氧化氢漱口,并根据吸入的不同细菌服用相应的抗生素以预防感染。
  - (2)如污染手部,则应立即将手浸于 3%来苏水中 5~15min,然后用肥皂和自来水冲洗干净。
  - (3)如有菌材料污染桌面或衣物,应立即用抹布浸沾 3%来苏水或 0.1%新洁尔灭等,浸泡污染部位 30min 后抹去。
  - (4)发生皮肤破损或刺伤,应先用肥皂和水冲洗伤口,尽量挤出损伤处的血液,并用 70%乙醇或其他皮肤消毒剂进行消毒,再立即进行医疗处理。
8. 实训完毕,按要求整理实训物品和桌面,需培养的培养物应放入温箱内,观察结果后的培养物等应放入污物桶,送消毒室处理。
9. 实训完毕后每组轮流值日,打扫卫生,检查水电和门窗是否关好。离开实训室前,用肥皂洗手(必要时用消毒液泡手),然后离开实训室。

# 前 言

为创新、实践“校企合作、工学结合”的人才培养模式,构建满足临床医学检验岗位需求的系统化、职业化课程体系,推进医药卫生院校医学检验技术专业课程建设与改革,在各护理专业学院领导的重视和大力支持下,与南昌大学第一附属医院、南昌大学第四附属医院等医学检验界专家共同编写了医学检验技术专业核心课程系列教材之一——《微生物学检验实验实训指导》。本教材可供医学检验技术专业教师和学生使用。

微生物学检验是医学检验技术专业学生必须具备的一项专业技能,在推行工学结合的教学改革过程中,我们与医院检验科专家共同开发了“实施项目为导向、任务驱动为主”的《微生物学检验实验实训指导》省级精品课程。本教材作为精品课程的配套教材,在编写过程中坚持工学结合的理念,以培养实用型微生物检验技能型人才为目标,根据临床微生物检验岗位工作职责,遵循必须、够用的原则选择教材编写内容,力求课程内容与临床实践对接,使教材内容充分体现临床微生物学检验岗位的技能需要,促进学生实践操作能力培养。

全书基于临床微生物检验岗位工作内容,设计了细菌检验基本技术、真菌检验基本技术、常见临床标本的采集与前处理、常见细菌鉴定、常见病源性真菌鉴定、临床标本细菌学检验、临床微生物检验报告单发送 7 个学习情境共 26 个学习项目。每个情境分为若干个项目,每个学习项目设计了背景知识、训练目的、原理、材料准备、训练步骤、注意事项、达标测试 7 个模块,既体现了教学内容,又便于评价学生的学习效果。

本教材在编写过程中得到了南昌大学第一附属医院检验科胡雪飞和南昌大学第四附属医院检验科漆坚两位专家的大力支持和帮助,在此致以衷心的感谢。由于本人的学术水平和编写能力有限,尽管做了最大的努力,但缺点和错误仍在所难免,恳请广大师生和同仁不吝指正。

陈 静

2012 年 7 月



# 目 录

## 学习情境一

### 细菌检验基本技术

1

- 项目一 细菌形态学检查 /1
- 项目二 常用培养基的制备 /7
- 项目三 细菌的分离培养技术 /12
- 项目四 细菌的生化反应 /18
- 项目五 细菌对抗菌药物敏感性试验 /27

## 学习情境二

### 真菌检验基本技术

33

- 项目六 真菌形态学检验技术 /33
- 项目七 真菌的分离培养与鉴定 /35

## 学习情境三

### 常见临床标本的采集与前处理

40

- 项目八 血液标本的采集与处理 /40
- 项目九 脓液、痰液标本的采集与处理 /42
- 项目十 尿液及粪便标本的采集与处理 /45

## 学习情境四

### 常见细菌鉴定

49

- 项目十一 病原性球菌鉴定 /49
- 项目十二 肠杆菌科细菌鉴定 /55
- 项目十三 非发酵菌鉴定 /60
- 项目十四 弧菌属鉴定 /64

项目十五 厌氧菌鉴定 /67

项目十六 分枝杆菌属鉴定 /72

## 学习情境五

常见病原性真菌鉴定

77

项目十七 常见深部感染真菌鉴定 /77

项目十八 常见浅部感染真菌鉴定 /80

## 学习情境六

临床标本的细菌学检验

84

项目十九 血液标本的细菌学检验 /84

项目二十 痰液标本的细菌学检验 /88

项目二十一 尿液标本的细菌学检验 /92

项目二十二 粪便标本的细菌学检验 /95

项目二十三 脓液标本的细菌学检验 /99

项目二十四 脑脊液标本的细菌学检验 /102

## 学习情境七

临床微生物检验报告单发送

107

项目二十五 微生物检验分级报告制度 /107

项目二十六 微生物检验报告方式 /107

## 参考书目

110

## 项目一 细菌形态学检查

### 一、背景知识

细菌形态学检查法是利用显微镜,对细菌的形态、结构、动力和染色性等特点进行观察分析的方法。镜检不仅可以迅速了解标本中有无细菌及大致的菌量,而且根据细菌形态、结构和染色性可对病原菌进行初步识别和分类,为进一步做生化反应、血清学鉴定提供依据。对某些细菌,如痰中的抗酸杆菌和脑脊液中的脑膜炎奈瑟菌等,通过形态学检查可得到初步诊断,对临床早期诊断和治疗疾病有一定的参考意义。

细菌的形态学检查是细菌检验中极为重要的基本方法之一,包括不染色标本检查法和染色标本检查法。

#### (一)不染色标本检查

细菌不经染色直接镜检,主要用于检查生活状态下细菌的动力及运动状况。常用的方法有压滴法和悬滴法,以普通光学显微镜观察。也可用暗视野显微镜或相差显微镜观察,效果更好。在临床上,有时通过不染色标本的动力检查可对某些病原菌作出初步鉴定。

#### (二)染色标本的检查

细菌标本经染色后,除能清楚看到细菌的形态、大小、排列方式外,还可根据染色反应将细菌进行分类,因此染色标本的检查在细菌的鉴定中应用最广,具有非常重要的作用。微生物学检验中常用的有革兰染色法和抗酸染色法。

### 二、训练目的

1. 熟悉微生物实验室规则并自觉遵守。
2. 掌握细菌基本形态和特殊结构的观察方法。
3. 掌握染色标本的检查方法。
4. 掌握不染色标本的检查方法。

### 三、原理

用两种或两种以上不同染料可将细菌染成不同的颜色,除可观察细菌的大小、形态与排列外,还反映出细菌染色特性,具有鉴别细菌种类的价值。

革兰染色法的原理:①等电点学说: $G^+$ 菌的等电点比 $G^-$ 菌的等电点低,在同一pH条



件下,阳性菌比阴性菌所带负电荷要多,与带正电荷的碱性染料结合力牢固,不易脱色;②化学学说: $G^+$ 菌含有大量核糖核酸镁盐,与进入胞浆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 $G^-$ 菌含此物质量少,故易被95%乙醇脱色;③细胞壁结构学说: $G^+$ 菌细胞壁结构较致密,肽聚糖层厚并且具有三维空间结构,脂类含量低,乙醇不易透入,而且95%乙醇可使细胞壁脱水,细胞壁间隙缩小,通透性降低,阻碍结晶紫与碘的复合物渗出;而 $G^-$ 菌的细胞壁结构疏松,肽聚糖层薄且无三维空间结构,含脂量多,易被乙醇溶解,致使细胞壁通透性增高,细胞内的结晶紫和碘复合物被溶出而脱色。

不染色标本的检查原理:有鞭毛的细菌其运动方式为有方向、位移的运动;无鞭毛的细菌呈布朗运动,原地颤动。

## 四、材料准备

1. 示教片:各种球菌、杆菌、弧菌、荚膜、鞭毛、芽孢的示教片。
2. 菌种:金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌。
3. 试剂:革兰染色液、抗酸染色液、无菌生理盐水、卡介苗。
4. 其他:载玻片、盖玻片、接种环、酒精灯、显微镜、香柏油、蜡笔、擦镜纸、擦镜液等。

## 五、训练步骤

### (一)细菌基本形态与特殊结构的观察

#### 1. 练习使用显微镜:

(1)采光:使用显微镜时必须端坐,将显微镜放在胸前适当位置。将低倍镜转到中央并对准下面的聚光器,打开光圈,转动反光镜,使光线集中于聚光器(以灯光为光源时,使用凹面反光镜,以自然光为光源时用平面反光镜)。

(2)低倍镜调焦:将欲观察的标本置载物台上,用弹簧夹和推进器固定,将待检部位移至视野正中央,上升载物台至不能升高为止。用双眼观察接目镜,缓慢调节粗调节器,使载物台下降,待看到模糊的图像时,再调节细调节器,直至看到清晰的图像为止。

(3)油镜的使用:低倍镜找到物象并调至清晰之后,转开物镜头,在玻片的标本上滴加1滴香柏油,将油镜头转换至中央,缓慢调节粗调节器,使镜头浸入油中,当油镜头几乎接触玻片时停止转动(从侧面观察),边观察接目镜边轻轻转动粗调节器(此时只能上升镜头,不能下降,防止压坏玻片及损坏物镜),待看到模糊物象时改调细调节器,直至找到清晰物象。

标本观察完毕后,应先将物镜头移开,再转动粗调节器使载物台下降,取下载玻片,立即用擦镜纸沾擦镜液将镜头上的香柏油擦净。

#### 2. 观察细菌基本形态:

使用显微镜油镜观察细菌的形态、菌体大小、排列方式及染色性。

#### 3. 观察细菌特殊结构:

注意这些特殊结构的大小、形状及其在菌体中的位置,均有助于细菌的鉴定。

(1)荚膜:应寻找染色较浅部位的单个菌体进行观察,并注意菌体形态及染色特点。

(2)芽孢:观察时应注意芽孢在菌体中的位置、形态、大小、着色情况。

(3)鞭毛:应注意观察其形态、位置、长短和数量等。

## (二)染色标本的检查

染色标本检查的基本程序是涂片、干燥、固定、染色和镜检。

1. 涂片:用灭菌接种环取1~2环无菌生理盐水于玻片上,再用灭菌接种环挑取菌落或菌苔少许,与载玻片上的生理盐水研匀,制成细菌悬液,再涂布成1cm<sup>2</sup>或蚕豆大小的半透明菌膜。抗酸染色将1ml无菌生理盐水与卡介苗混匀后涂片。

2. 干燥:标本涂片最好自然干燥,若需加快干燥速度,则可将涂片接种面朝上,置于火焰上方慢慢烘干,切勿紧贴火焰。

3. 固定:玻片干燥后迅速通过火焰3次进行固定,以玻片反面接触手背部皮肤,以热而不烫手为宜。固定是使细菌的蛋白质凝固,杀死细菌,有利于菌细胞着色,并使菌体与玻片黏附牢固。

4. 染色:按检验方法和目的要求,选用不同的染料对标本涂片进行着色的过程。

(1)革兰染色:①初染:细菌涂片经火焰固定,加结晶紫染液染1min,清水冲去染液,甩干;②媒染:加碘液媒染1min,水洗,甩干;③脱色:用95%乙醇脱色,轻轻摇动约30s,至无明显紫色洗落为止,水洗,甩干;④复染:加稀释石炭酸复红或沙黄染液数滴进行复染,约30s,水洗。

(2)抗酸染色:①初染:细菌涂片经火焰固定,加石炭酸复红溶液,徐徐加热至有蒸气出现,切不可沸腾。染液因蒸发减少时,应随时补充,防止染液蒸干。持续染5min,水洗,甩干;②脱色:滴加3%盐酸乙醇脱色,不时摇动玻片至无红色脱落为止,水洗,甩干;③加吕氏美蓝复染液数滴复染1min,水洗。

5. 镜检:染色后用吸水纸吸干玻片上的水分,显微镜下油镜观察结果。①革兰染色:革兰阳性菌染成紫色,革兰阴性菌为红色;②抗酸染色:抗酸菌染成红色,非抗酸菌为蓝色。

## (三)不染色标本的检查

### 1. 压滴法:

用接种环分别取灭菌生理盐水2~3滴环置于洁净载玻片中央,再取细菌培养物与生理盐水混匀(如果标本为细菌液体培养物,则直接取菌液于玻片上)。用小镊子夹一盖玻片,先使盖玻片一边接触菌液,然后缓缓放下,覆盖于菌液上,避免菌液中产生气泡。先用低倍镜找到观察部位,再换高倍镜观察细菌的运动。

### 2. 悬滴法:

在洁净凹玻片的凹孔四周涂凡士林,用接种环取一环菌悬液放在盖玻片中央,再将凹玻片的凹孔对准盖玻片中央的液滴并盖上,然后迅速翻转,轻压盖玻片,使其与凹孔边缘的凡士林粘紧封闭后置高倍镜下(或暗视野)观察。

## 六、注意事项

### (一)染色标本的检查

#### 1. 革兰染色:

(1)操作因素:涂片太厚或太薄,菌体分散不均匀,可影响染色结果。固定时应避免菌体过分受热。脱色时间要根据涂片厚薄灵活掌握。脱色时间长短要适宜,如果涂片较厚应相应地延长脱色时间,如涂片较薄则相应地缩短脱色时间。脱色时应不断旋转玻片摇匀,使其

充分脱色,通常脱到无明显紫色流下即可。水洗时,水流不能过大,防止水流直接对准菌膜冲洗。

(2)染液因素:所有染液应防止水分蒸发而影响浓度,特别是卢戈碘液久存或受光作用后易失去媒染作用。脱色酒精以95%的浓度为宜,若瓶密封不良或涂片上积水过多,可使酒精浓度下降而影响其脱色能力。

(3)细菌因素:不同时间培养物,革兰染色结果有差异,如葡萄球菌幼龄菌染成紫色,而老龄菌可被染成红色。细菌染色时一般用18~24h的细菌培养物为宜。

## 2. 抗酸染色:

(1)抗酸染色初染加热时,勿使染液煮沸或煮干,应随时补充染液以防干涸。

(2)染色完毕,可用吸水纸吸干载玻片上的水分,但用过的吸水纸上可能沾有染色的结核分枝杆菌,故不宜再用于吸干第二份标本,以免发生错误诊断。

## (二)不染色标本的检查

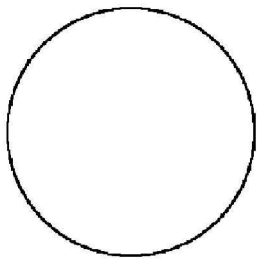
1. 细菌因素:制片时滴加的菌液量应适当,以加盖玻片后菌液不外溢为度,并避免气泡。气候寒冷时,应注意保温,避免影响细菌动力。

2. 玻片因素:在使用暗视野显微镜和相差显微镜时,载玻片的厚度以1.0~1.1mm为宜。盖玻片的厚度不得超过0.15mm,否则影响调焦。玻片均应清洁无油渍。

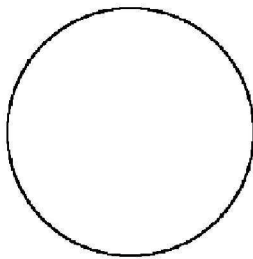
3. 光线亮度:镜下观察时光线不宜过亮。可通过调节光圈大小和聚光器上下位置来控制光线亮度,以达到最佳效果。

## 七、达标测试

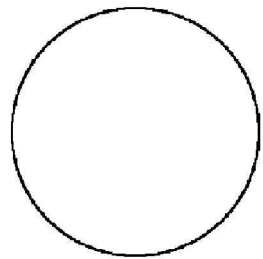
### (一)细菌基本形态观察 (绘图)



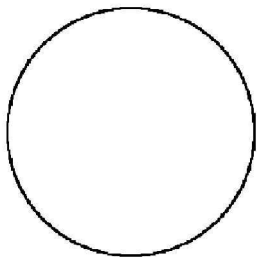
金黄色葡萄球菌



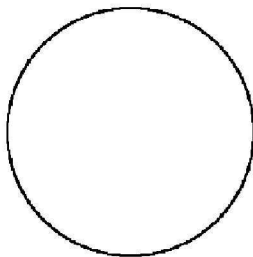
肺炎链球菌



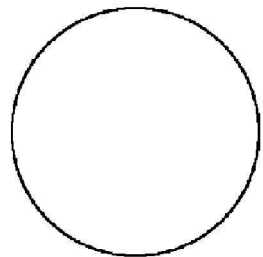
脑膜炎奈瑟菌



大肠埃希菌

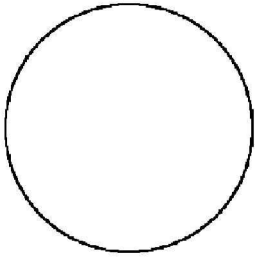


霍乱弧菌

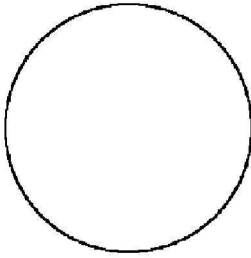


炭疽芽孢杆菌

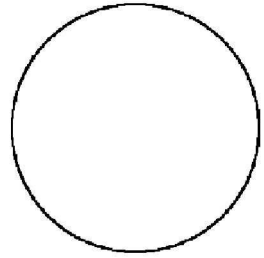
(二)细菌特殊结构的观察 (绘图)



鞭毛

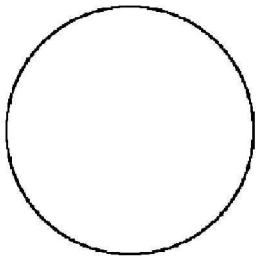


芽孢

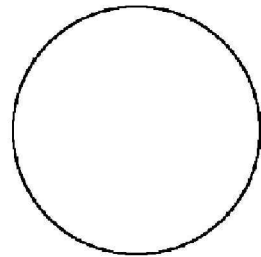


荚膜

(三)革兰染色结果报告 (并绘图)



金黄色葡萄球菌



大肠埃希菌

金黄色葡萄球菌染色结果为革兰( )性( )菌,呈( )排列;大肠埃希菌染色结果为革兰( )性( )菌,呈( )排列。

(四)单项选择题

1. 革兰染色所用染液的顺序是( )  
A. 稀释复红—碘液—酒精—结晶紫  
B. 结晶紫—酒精—碘液—稀释复红  
C. 稀释复红—结晶紫—碘液—酒精  
D. 结晶紫—碘液—酒精—稀释复红  
E. 稀释复红—酒精—结晶紫—碘液
2. 细菌染色多采用的染料是( )  
A. 酸性染料  
B. 中性染料  
C. 碱性染料  
D. 复合染料  
E. 单纯染料
3. 不属于细菌形态学观察的是( )  
A. 平板分区划线观察单个菌落  
B. 革兰染色观察细菌染色性  
C. 鞭毛染色观察细菌的动力  
D. 光镜观察细菌形态  
E. 暗视野显微镜观察细菌动力
4. 细菌染色过程中固定的作用主要是( )  
A. 使其易与染料结合  
B. 使其失去抗原性  
C. 杀死细菌  
D. 利于保存  
E. 破坏细菌结构
5. 下列哪些方法动力与检测细菌动力无关( )

- A. 压滴法  
B. 鞭毛染色  
C. 细菌半固体培养基接种  
D. 细菌革兰染色  
E. 暗视野显微镜观察活菌
6. 用于观察细菌内部结构的最好仪器是( )  
A. 相差显微镜  
B. 荧光显微镜  
C. 暗视野显微镜  
D. 电子显微镜  
E. 光学显微镜
7. 下列不属于革兰染液成分的是( )  
A. 稀释复红  
B. 95%酒精  
C. 结晶紫  
D. 卢戈碘液  
E. 5%石炭酸复红
8. 结核分枝杆菌常用的染色法为( )  
A. 吉姆萨染色法  
B. 革兰染色法  
C. 抗酸染色法  
D. 瑞氏染色法  
E. 金胺 O 染色法
9. 细菌的革兰染色性不同主要是由于( )  
A. 细胞核结构的不同  
B. 细胞壁结构的不同  
C. 细胞膜结构的不同  
D. 中介体的有无  
E. 胞质核颗粒的有无或不同
10. 细菌的革兰染色性不同是由于( )  
A. 化学组成不同  
B. 形态特点不同  
C. 生理特点不同  
D. 营养要求不同  
E. 生长阶段不同
11. 抗酸染色所用染液的顺序是( )  
A. 吕氏美蓝—盐酸酒精—5%石炭酸复红液  
B. 吕氏美蓝—5%石炭酸复红液—盐酸酒精  
C. 5%石炭酸复红液—吕氏美蓝—盐酸酒精  
D. 5%石炭酸复红液—吕氏美蓝—盐酸酒精  
E. 5%石炭酸复红液—盐酸酒精—吕氏美蓝
12. 细菌染色的基本程序是( )  
A. 涂片—染色—镜检  
B. 涂片—固定—干燥—镜检  
C. 涂片—干燥—固定—染色—镜检  
D. 涂片—干燥—染色—镜检  
E. 涂片—固定—染色—镜检
13. 属于抗酸染色的是( )  
A. 萋纳染色  
B. 异染颗粒染色  
C. 荚膜染色  
D. 芽孢染色  
E. 革兰氏染色
14. 需用电子显微镜才能观察到的结构是( )  
A. 荚膜  
B. 异染颗粒

C. 菌毛

D. 鞭毛

E. 芽孢

### (五) 填空题

1. 有鞭毛细菌的运动方式为( ), 无鞭毛细菌的运动方式为( )。
2. 染色标本检查的基本程序是( )、( )、( )、( )、( )。
3. 革兰染色法的操作步骤是先用( )初染, 然后以( )媒染, 再用( )脱色, 最后以( )复染。革兰染色阳性菌呈( )色, 革兰染色阴性菌呈( )色。
4. 革兰阳性菌等电点为( ), 革兰阴性菌等电点为( )。革兰阳性菌带( )电荷比阴性菌多, 故与( )性染料结合牢固。
5. 细菌形态学检查包括( )和( )。
6. 痰结核分枝杆菌涂片常用染色方法为( ), 抗酸性细菌呈( )色, 非抗酸性细菌呈( )色。
7. 可观察细菌动力的方法有( )、( )、( )、( )等。
8. 根据细菌的基本形态, 可将细菌分为( )、( )和( )三大类。

### (六) 简答题

1. 试述细菌革兰染色法的原理。
2. 简述细菌革兰染色法的操作方法及注意事项。
3. 试述细菌抗酸染色法的操作方法。

(陈静)

## 项目二 常用培养基的制备

### 一、背景知识

培养基是人工配制的适合细菌生长繁殖的综合营养基质。广泛用于繁殖和分离纯种微生物, 传代或保存微生物, 鉴别微生物, 研究微生物的生理、生化特性; 制造菌苗、疫苗或其他微生物制剂等, 因此, 培养基是细菌培养检验的重要物质基础。掌握培养基成分的作用和制备技术, 是保证培养基质量, 准确可靠地进行微生物学检验的基本条件。

培养基的成分因种类不同而异, 其中基础培养基含有一般细菌生长所需要的基本营养成分, 如蛋白胨、肉浸液(或牛肉膏)、氯化钠和水, 这些营养物质能为细菌提供生命所需的碳源、氮源、无机盐、水分, 并能调节菌体内外的渗透压, 为细菌提供能量。其他培养基大多是在基础培养基中加入某些特殊成分(如营养物质、抑菌剂、检测基质、指示剂等)配制而成。培养基按照物理性状分为液体、半固体和固体培养基三类, 其区别主要是凝固剂的有无和多少; 按用途分为基础、营养、选择、鉴别、增菌、特殊培养基等。

各种培养基的制备程序基本相似, 一般可分为调配、溶化、调整 pH、过滤、澄清、分装、灭菌、检定及保存等步骤。

### 二、训练目的

1. 掌握常用培养基的制备程序、方法和注意事项。



2. 熟悉培养基的种类、主要成分及用途。

### 三、材料准备

1. 试剂:琼脂粉、营养琼脂培养基干粉、麦康凯琼脂培养基干粉、克氏双糖铁琼脂粉、葡萄糖蛋白胨水干粉、哥伦比亚琼脂粉、脱纤维羊血、1mol/L NaOH、1mol/L HCl 等。

2. 器材及其他:试管、一次性无菌培养皿、锥形瓶、量筒、吸管、pH 比色计、天平、称量纸、滤纸、试管塞、高压蒸汽灭菌器、牛皮纸等。

### 四、训练步骤

#### (一)葡萄糖蛋白胨水培养基的制备

1. 调配:先在锥形瓶或烧杯中加入少量蒸馏水(事先量好),按照培养基的配方准确称取葡萄糖蛋白胨水干粉加入瓶中混匀,再将剩余的水冲洗瓶壁。

2. 溶化:通过加热等方式将各种成分混匀溶解于水中。

3. 矫正 pH:用 pH 比色计矫正 pH 至 7.4~7.6。

4. 过滤澄清:将培养基过滤澄清使其清晰透明方可使用。

5. 分装:将上述培养基分装于试管内,分装量为试管长度的 1/3,加试管塞塞紧,10 支为一扎,上端用牛皮纸包住并用橡皮筋扎紧。

6. 灭菌:采用高压蒸汽灭菌法灭菌,121.3℃维持 15min。灭菌完成待压力表归零后即可取出。

7. 检定:①无菌试验:将制备好的葡萄糖蛋白胨水培养基置 35℃温箱培养 24h,证明其无菌生长;②生长试验:接种大肠埃希菌于该培养基中,35℃温箱培养 24h 后观察其生长繁殖情况。大肠埃希菌:培养基变混浊。

8. 保存:制备好并检验合格的培养基应注明名称、配制的日期等,存放于冰箱或冷暗处,一般不超过两周。

#### (二)半固体培养基的制备

1. 调配:先在锥形瓶或烧杯中加入少量蒸馏水(事先量好),按照培养基的配方准确称取葡萄糖蛋白胨水干粉加入瓶中混匀,按比例加入 0.2%~0.5%的琼脂粉混匀,再将剩余的水冲洗瓶壁。

2. 溶化:通过加热等方式将各种成分混匀溶解于水中。

3. 矫正 pH:用 pH 比色计矫正 pH 至 7.4~7.6。

4. 过滤澄清:将培养基过滤澄清使其清晰透明方可使用。

5. 分装:将上述培养基分装于试管内,分装量为试管长度的 1/3,加试管塞塞紧,十支为一扎,上端用牛皮纸包住并用橡皮筋扎紧。

6. 灭菌:采用高压蒸汽灭菌法灭菌,121.3℃维持 15min。灭菌完成待压力表归零后即可取出,竖直放置至凝固。

7. 检定:①无菌试验:将制备好的半固体培养基置 35℃温箱培养 24h,证明其无菌生长;②生长试验:穿刺接种大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌于该培养基中,35℃温箱培养 24h 后观察其生长现象。大肠埃希菌:培养基中穿刺线变模糊;金黄色葡萄球菌:穿刺线清晰。

8. 保存:制备好并检验合格的培养基应注明名称、配制的日期等,存放于冰箱或冷暗处,一般不超过两周。

### (三)营养琼脂培养基、麦康凯琼脂培养基的制备

1. 调配:先在锥形瓶中加入少量蒸馏水(事先量好),按照培养基的配方准确称取营养琼脂培养基干粉或麦康凯琼脂培养基干粉加入瓶中混匀,再将剩余的水冲洗瓶壁。

2. 溶化:通过加热等方式将各种成分混匀溶解于水中。

3. 矫正 pH:用 pH 比色计矫正 pH 至 7.4~7.6。

4. 过滤澄清:将培养基过滤澄清使其清晰透明方可使用。

5. 灭菌:采用高压蒸汽灭菌法灭菌,121.3℃维持 15min。灭菌完成待压力表归零后即可取出。

6. 分装:待培养基冷却至 50~55℃,将上述培养基无菌分装于无菌培养皿中,每个培养皿中约分装 10ml。

7. 检定:①无菌试验:将制备好的半固体培养基置 35℃温箱培养 24h,证明其无菌生长;②生长试验:分别接种大肠埃希菌于该培养基中,35℃温箱培养 24h 后观察其生长现象。大肠埃希菌:生长良好。

8. 保存:制备好并检验合格的培养基应注明名称、配制的日期等,存放于冰箱或冷暗处,一般不超过两周。

### (四)克氏双糖铁琼脂

1. 调配:先在锥形瓶或烧杯中加入少量蒸馏水(事先量好),按照培养基的配方准确称取克氏双糖铁琼脂干粉加入瓶中混匀,再将剩余的水冲洗瓶壁。

2. 溶化:通过加热等方式将各种成分混匀溶解于水中。

3. 矫正 pH:用 pH 比色计矫正 pH 至 7.4~7.6。

4. 过滤澄清:将培养基过滤澄清使其清晰透明方可使用。

5. 分装:将上述培养基分装于试管内,分装量为试管长度的 1/3,加试管塞塞紧,十支为一扎,上端用牛皮纸包住并用橡皮筋扎紧。

6. 灭菌:采用高压蒸汽灭菌法灭菌,121.3℃维持 15min。灭菌完成待压力表归零后即可取出,试管口垫毛巾或玻棒,使试管中的培养基形成斜面及底层,底层至少有 1cm 的直立段。

7. 检定:待培养基冷却凝固后检定。①无菌试验:将制备好的培养基置 35℃温箱培养 24h,证明其无菌生长;②生长试验:分别接种大肠埃希菌和普通变形杆菌于培养基中,35℃温箱培养 24h 后观察其生长现象。大肠埃希菌:底层和斜面均变黄色;普通变形杆菌:底层黄色+黑色(产生硫化氢),斜面为红色。

8. 保存:制备好并检验合格的培养基应注明名称、配制的日期等,存放于冰箱或冷暗处,一般不超过两周。

### (五)血琼脂培养基

1. 调配:先在锥形瓶中加入少量蒸馏水(事先量好),按照培养基的配方准确称取哥伦比亚琼脂干粉加入瓶中混匀,再将剩余的水冲洗瓶壁。

2. 溶化:通过加热等方式将各种成分混匀溶解于水中。

3. 矫正 pH:用 pH 比色计矫正 pH 至 7.6。
4. 过滤澄清:将培养基过滤澄清使其清晰透明方可使用。
5. 灭菌:采用高压蒸汽灭菌法灭菌, 121.3℃ 维持 15min。灭菌完成待压力表归零后即可取出。
6. 分装:培养基冷却至 50℃ 左右加入 5% 无菌脱纤维羊血, 边加边轻微地振荡, 混匀后无菌分装于无菌培养皿中, 每个培养皿约分装 10ml。
7. 检定:① 无菌试验:将制备好的半固体培养基置 35℃ 温箱培养 24h, 证明其无菌生长; ② 生长试验:分别接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌于该培养基中, 35℃ 温箱培养 24h 后观察其生长现象。大肠埃希菌:生长良好;金黄色葡萄球菌:β-溶血;肺炎链球菌:α-溶血。
8. 保存:制备好并检验合格的培养基应注明名称、配制的日期等, 存放于冰箱或冷暗处, 一般不超过两周。

## 五、注意事项

1. 在进行调配时应在瓶中先加入少量水, 再加入各种固体成分, 以免固体成分黏附在瓶壁上。装培养基的容器不能用铁、铜等材质的容器, 最好使用玻璃、搪瓷或不锈钢的容器。某些特殊成分(如染料、胆盐、指示剂等)应在矫正 pH 后加入。
2. 配制培养基所用的化学物品或药品, 均需化学纯以上纯度, 且各种成分的称取一定要准确。
3. 灭菌后的培养基在进行分装时应注意无菌操作, 倾注平板时培养基的温度不能过高, 否则冷凝水多, 影响细菌的分离并易造成污染; 也不能温度过低, 否则琼脂过早凝固, 使平板表面高低不平。
4. 在加热溶化时注意溶液不能溢出瓶外, 否则会影响培养基的营养成分, 若水分蒸发, 应补足失去的水分。
5. 制备血琼脂培养基加入 5% 无菌脱纤维羊血时, 琼脂温度不宜过高或过低, 一般以 50℃ 左右为宜, 并且边加边轻微地振荡。温度过高会造成溶血, 温度过低则琼脂会凝固。

## 六、达标测试

### (一) 单项选择题

1. 属于营养培养基的是( )
  - A. 巧克力琼脂培养基
  - B. SS 琼脂培养基
  - C. 麦康凯琼脂培养基
  - D. 碱性蛋白胨水
  - E. 伊红-美蓝琼脂培养基
2. 下列培养基与其分类的组合中不正确的是( )
  - A. 蛋白胨水——基础培养基
  - B. 克氏双糖铁琼脂——鉴别培养基
  - C. 胆盐肉汤管——营养培养基
  - D. SS 琼脂培养基——选择培养基
  - E. 高渗培养基——特殊培养基
3. 从有正常菌群存在的部位所采取的标本应接种在何种培养基中分离培养病原体( )
  - A. 基础培养基
  - B. 营养培养基
  - C. 增菌培养基
  - D. 选择鉴别培养基
  - E. 特殊培养基