

YIXUEWEISHENGWUXUESHIYANZHIDAO

医学微生物学 实验指导

yixueweishengwuxueshiyanzhidao

主编 朱万孚

北京大学医学出版社

医学微生物学实验指导

主编 朱万孚

编者(按编写章节次序排列)

朱万孚 曹 杰
阎 玲 刘桂荣

北京大学医学出版社

YIXUE WEISHENGWUXUE SHIYAN ZHIDAO

图书在版编目 (CIP) 数据

医学微生物学实验指导/朱万孚主编. —北京: 北京
大学医学出版社, 2003.3
ISBN 7-81071-148-2

I. 医… II. 朱… III. 医药学: 微生物学 - 实验
- 医学院校 - 教学参考资料 IV. R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 013006 号

北京大学医学出版社出版发行

(100083 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内 电话: 010-62092230)

责任编辑: 安 林

责任校对: 王怀玲

责任印制: 郭桂兰

北京东方圣雅印刷有限公司印刷 新华书店经销

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 7.5 字数: 189 千字

2003 年 3 月第 1 版 2003 年 3 月第 1 次印刷 印数: 1-5000 册

定价: 13.50 元

版权所有 不得翻印

内容提要

本《医学微生物学实验指导》为高等医药院校《医学微生物学》教科书的配套教材，主要供医学院校长学制（8 年或 7 年制）医学生使用，亦可供 5 年制医学生及医学微生物学检验专业人员选用。本书分为细菌学总论、细菌学各论、其他微生物、病毒学总论、病毒学各论和附录 6 个部分，共有 28 个实习内容，每个实习内容包括病原微生物检验方法的原理、材料与方法、操作步骤、实验结果与分析以及思考问题。本《实验指导》可供基础医学、临床医学、口腔医学、预防医学、医学检验、护理学、药学及卫生事业管理等专业的医学生实验课使用。全部实习内容大约需要 40 学时，针对不同专业的学生可进行适当调整与删减。

前 言

《医学微生物学》是基础医学中形态学研究与机能学研究相结合的一门主干学科，因此，在对医学生进行本学科的基本理论、基础知识和基本技能（“三基”）的培养过程中，应注重培养学生以实验结果来验证医学微生物学理论或假说的思维方法和在“三基”基础上的创新意识和实验操作技能。本《医学微生物学实验指导》主要供长学制（8年制及7年制）医学生教学用，亦可供5年制医学生及医学微生物学检验专业人员选择性使用。在实习内容编排上基本遵循传统的章节次序排列，即概论、细菌学总论、细菌学各论及其他微生物、病毒学总论和病毒学各论，但在具体编排实习课进度表时，可根据学时数删减部分内容并根据理论课进度调整实习内容和次序。在编写本《实验指导》过程中，除参照本校病原生物学系长期使用的实验课教材，结合多年来的教学改革的实践经验并参阅国内外多种相关教材外，还进行了多项教学改革的尝试。随着医学微生物学知识在不断更新，新的检验技术方法及设备不断出现，在细菌学、病毒学及血清学检验方面正趋向于微量化、快速化、系列化、半自动化甚至于自动化。本《实验指导》除尽量介绍这些新技术新方法外，仍旧保留了一些古老的经典实验内容，以便帮助医学生掌握微生物学基本理论，理解病原微生物的致病机制以及领会检验方法的基本原理等内容。为了培养医学生认真自学、独立思考和工作能力，本《实验指导》另附综合性实验内容，以便使医学生能够由浅入深、由表及里主动地去学习实验设计及操作，力图使其既学习到实验设计与操作方法，又培养其分析问题与解决问题的思路和能力。

参编本《实验指导》的作者包括2位微生物学副主任技师，他（她）们具有较丰富的实验课教学与科学研究的实践经验，因此本书突出实用性。在本书编写过程中曾得到许多兄弟医学院校同道们的帮助，例如中国医科大学、中南大学湘雅医学院、上海第二军医大学等，不吝馈赠自编的实验指导教材。本书的出版还得益于北京大学医学出版社的大力支持和帮助。在此一并致谢！对于本书中不足及错误之处，祈望使用本《实验指导》的老师们、同学们及同道们给予指正。

朱万孚

于北京大学基础医学院病原生物学系

2003年1月

目 录

微生物学实习课须知	(1)
一、医学微生物学实验目的和要求	(1)
二、微生物学实验室规则	(1)

细菌学总论

实习一 细菌的形态学	(2)
一、显微镜油镜头的使用	(2)
二、细菌的基本形态和特殊结构	(4)
三、细菌动力的直接观察	(5)
实习二 细菌的人工培养	(5)
一、人工培养基的种类及其应用	(6)
二、培养基制备的一般程序	(6)
三、细菌接种法	(7)
四、菌落特点观察	(13)
五、菌落计算板的使用	(14)
实习三 细菌染色法	(15)
一、细菌染色标本的制备	(15)
二、革兰染色法	(16)
实习四 细菌代谢产物检查	(17)
一、毒素检查	(17)
二、糖代谢物检查	(18)
实习五 消毒、灭菌、除菌	(18)
一、物理方法	(19)
二、化学方法	(24)
实习六 噬菌体试验	(25)
一、噬菌体分离	(25)
二、噬菌体蚀斑试验	(26)
实习七 细菌的遗传与变异	(26)
一、接合传递试验	(26)
二、转化试验	(27)
三、转导试验	(28)
四、细菌变异现象的观察	(29)

细菌学各论

实习八 病原性球菌	(32)
一、致病性球菌检验程序	(33)
二、致病性球菌形态与菌落	(33)

三、血浆凝固酶试验	(34)
四、抗链球菌溶血素“O”测定	(34)
五、透明质酸酶试验	(36)
六、胆盐溶菌试验	(37)
七、Optochin 敏感试验	(37)
八、细菌毒力试验	(38)
九、脑脊液直接涂片检查	(38)
十、荧光抗体法检查淋病奈瑟菌	(39)
实习九 肠道细菌	(40)
一、大肠埃希菌、沙门菌和志贺菌的鉴定程序	(40)
二、肠道杆菌的形态与典型菌落形态	(41)
三、双糖试验和尿素酶试验	(41)
四、肥达反应试验	(42)
五、茵姆维克试验	(44)
六、微量-编码测定法	(45)
七、血清学试验	(47)
八、抗生素敏感性试验	(47)
九、噬试验	(49)
十、霍乱弧菌的一般鉴定程序	(50)
十一、霍乱弧菌形态与典型菌落形态	(50)
十二、霍乱弧菌快速诊断	(50)
十三、副溶血性弧菌嗜盐试验	(51)
实习十 幽门螺杆菌、布氏杆菌、鼠疫杆菌、炭疽杆菌、结核分枝杆菌、厌氧芽胞梭菌、军团菌、百日咳杆菌和白喉棒状杆菌	(52)
一、形态与典型菌落观察	(52)
二、幽门螺杆菌尿素酶试验	(53)
三、布氏杆菌玻片凝集试验	(54)
四、鼠疫杆菌噬菌体裂解试验	(54)
五、炭疽杆菌串珠试验	(55)
六、结核杆菌耐酸染色	(55)
七、产气荚膜梭菌汹涌发酵试验	(56)
八、破伤风梭菌外毒素致病作用及抗毒素保护试验	(56)
九、肉毒毒素检查	(57)
十、军团菌免疫荧光检查法	(57)
十一、百日咳杆菌营养条件试验	(58)
十二、白喉棒状杆菌毒力测定	(58)
其他微生物	
实习十一 支原体	(60)
实习十二 衣原体	(60)
实习十三 立克次体	(61)

一、立克次体的培养与形态	(61)
二、外-斐反应	(61)
实习十四 螺旋体	(62)
一、观察主要病原性螺旋体的形态特征	(62)
二、暗视野法检查钩端螺旋体	(62)
三、快速血浆反应素试验	(63)
实习十五 病原性真菌	(64)
一、菌落特征观察(大培养示教)	(64)
二、形态特征观察(小培养示教)	(64)
三、浅部感染真菌的检查	(65)
四、深部感染真菌的检查	(65)
病毒学	
实习十六 病毒的形态学检查	(67)
一、病毒的5种基本形态	(67)
二、应用透射电子显微镜检查病毒颗粒	(67)
三、光学显微镜检查病毒包涵体	(68)
实习十七 病毒的动物接种	(68)
一、乳鼠的颅内接种	(68)
二、小白鼠鼻腔接种法	(69)
实习十八 病毒的鸡胚接种	(69)
一、卵黄囊接种	(70)
二、羊膜腔接种	(70)
三、尿囊腔接种	(70)
四、绒毛尿囊膜接种	(71)
实习十九 病毒的组织培养	(71)
一、原代细胞培养	(71)
二、传代细胞培养	(72)
实习二十 流行性感冒病毒的分离鉴定	(72)
一、流感病毒的分离培养-鸡胚尿囊腔接种	(72)
二、流感病毒的初步鉴定-血细胞凝集试验和血细胞凝集抑制试验	(73)
实习二十一 免疫荧光技术	(75)
一、直接免疫荧光(DIF)检测单纯疱疹病毒(HSV)抗原	(76)
二、间接免疫荧光(IIF)检测CMV IgM抗体	(76)
实习二十二 中和试验	(77)
实习二十三 空(蚀)斑形成试验	(78)
实习二十四 Southern印迹杂交	(79)
实习二十五 Northern印迹杂交	(80)
一、RNA的分离	(80)
二、变性RNA的膜上转移及固定	(81)
三、杂交	(82)

实习二十六	蛋白质印迹法 Western Blotting	(84)
实习二十七	聚合酶链式反应	(86)
实习二十八	DNA 序列测定	(87)

附录

附录 I	常用培养基制备	(89)
附录 II	微生物染色法	(97)
附录 III	常用指示剂、试剂、溶液和缓冲液	(101)
附录 IV	实验动物的管理、接种、采血及解剖法	(107)
附录 V	伤寒抗原与伤寒免疫血清的制备	(110)

微生物学实习课须知

一、医学微生物学实验目的和要求

微生物学试验课是完成本科生基础课教学不可缺少的重要内容。其目的在于加深和巩固基础理论知识，学习和掌握医学微生物学试验操作基本技能，培养学生观察、思考、分析及独立解决问题的能力，并建立无菌观念，严格执行无菌操作，为今后医学专业课程学习、临床实践及科学研究打下良好基础。

为达到上述目的要求同学做到以下几点：

1. 试验前做好预习，明确试验目的要求、实验原理和方法、操作步骤和注意事项，并做好必要准备工作，以避免和减少试验差错。
2. 要严格按试验步骤进行操作，对于较复杂的试验应分工协作，对于示教内容应仔细观察，并结合理论学习认真思考。
3. 合理分配和利用时间，客观真实地记录结果，并写出详细试验报告。
4. 确实遵守实验室规则，避免各种事故发生。

二、微生物学实验室规则

1. 必须先穿好白大衣或隔离衣，才能进入实验室。需要带入实验室内的实验指导及文具，应放到未污染的非操作区，其他个人物品严禁放在实验台上。
2. 保持室内安静，严禁在实验室内饮食、饮水及大声喧哗。
3. 在接触病原微生物时，应严格按照无菌操作技术要求小心操作。当不慎污染台面或地面时，应立即报告实验课教师，以便及时应用 0.2% ~ 0.5% “84” 消毒液，浸泡污染局部 5 ~ 10min。后再擦拭。
4. 实验用品均应定点存放，用过的器材，如吸管、载玻片、塑料吸头等应立即放入装有消毒液的专用容器内浸泡。当实验结束后，应将标本和材料按原样摆好并归还带实验课老师。
5. 未经教师允许，不得擅自移动示教标本和室内仪器设备。
6. 爱护实验设备，节约使用试验材料，注意易燃易爆物品如乙醇、氯仿等有机溶剂的安全使用，防止火灾事故。因不按操作规程，而引起损坏公物或标本者，视情节进行批评及赔偿处理。
7. 每次实验课后，应将显微镜按要求维护好，对号放入柜内，然后打扫实验室，关闭水、电、燃气阀门，脱去白大衣或隔离衣并反折叠好，用肥皂洗手后再离开实验室。

(朱万孚 编)

细菌学总论

【目的】

1. 熟悉细菌培养基的种类及制备方法，细菌标本的接种、分离培养及菌落形态观察，掌握细菌的革兰染色原理、方法及应用，熟悉细菌的特殊染色及应用。
2. 熟练使用显微镜和使用油镜头观察细菌的形态、一般结构及特殊结构。
3. 掌握细菌的主要代谢产物、检查方法及其在细菌鉴别中的应用。
4. 熟悉噬菌体试验及细菌遗传变异方式。
5. 熟悉消毒与灭菌的概念及在微生物实验室内的应用。

【学时安排】

共 6~9 学时（分 3 次进行，每次 2~3 学时，穿插进行实验操作与示教）

【试验内容】

1. 观察在培养基平板上的菌落形态，使用显微镜油镜头观看细菌的形态与结构（示教标本片）。
2. 接种脓性标本于培养基上，分离细菌并进行细菌的涂片和革兰染色，油镜下观察细菌的形态结构。
3. 噬菌体的分离及细菌遗传变异试验。

【示教内容】

制备培养基，细菌的厌氧培养法，消毒、灭菌与除菌，活菌动力观察及糖发酵试验。

实习一 细菌的形态学（Bacterial Morphology）

一、显微镜油镜头的使用（The use of oil immersions）

细菌个体微小，直径最大不超过几微米（ μm ）。多数球菌直径大约为 $0.5 \sim 2\mu\text{m}$ ，杆菌长为 $1 \sim 5\mu\text{m}$ ，宽 $0.3 \sim 1\mu\text{m}$ 。而人眼睛对物体的分辨力仅 0.25mm ，即 $250\mu\text{m}$ 。因此，选择分辨力至少为 $0.5\mu\text{m} \times (900 \sim 1000)$ 倍的显微镜油镜头才能观察到细菌。

【原理】

显微镜分辨物体的能力，即判别两个物体之间最短距离的能力称为分辨力，以 R 表示， R 值越小表示分辨力越高。

$$R = \frac{0.16\lambda}{NA} \quad NA = n \cdot \sin \frac{a}{2}$$

公式中 λ 为入射光波长， NA 为物镜数值孔径； n 为物镜与标本之间介质的折光率， a 为光线进入物镜的最大夹角（最大镜口角）。由于 λ 与 a 一般不会改变，因此 n 对显微镜分辨力影响很大。当光线由标本（玻片）经空气进入物镜头时，由于空气的折光率（ $n=1.0$ ）与玻片折光率（ $n=1.52$ ）不同，便发生散射现象，降低了显微镜的分辨力。为了提高分辨力，在物镜与标本片之间滴加镜油（ $n=1.51$ ），使之与玻片的折光率趋向一致，便减少了光的散

射，使物像明亮清晰可见（见图 1-1）。

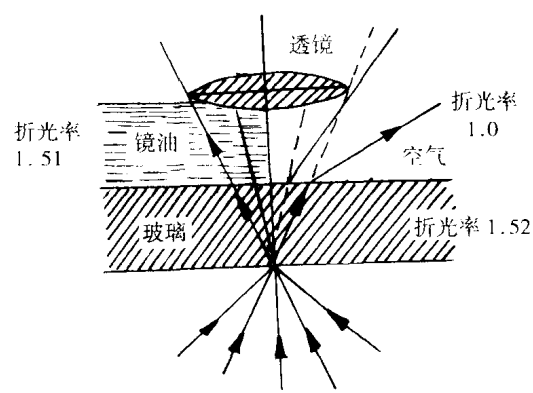


图 1-1 显微镜油镜放大的原理

【材料与方法】

1. 油镜头识别 普通光学显微镜构造见图 2。油镜头是普通光学显微镜放大倍数最高的物镜头。镜头上标有“90 ×”或“100 ×”；镜头前端有一白圈，白圈上缘刻有“HI”或“Oil”等标记，其孔径较其他物镜略小。

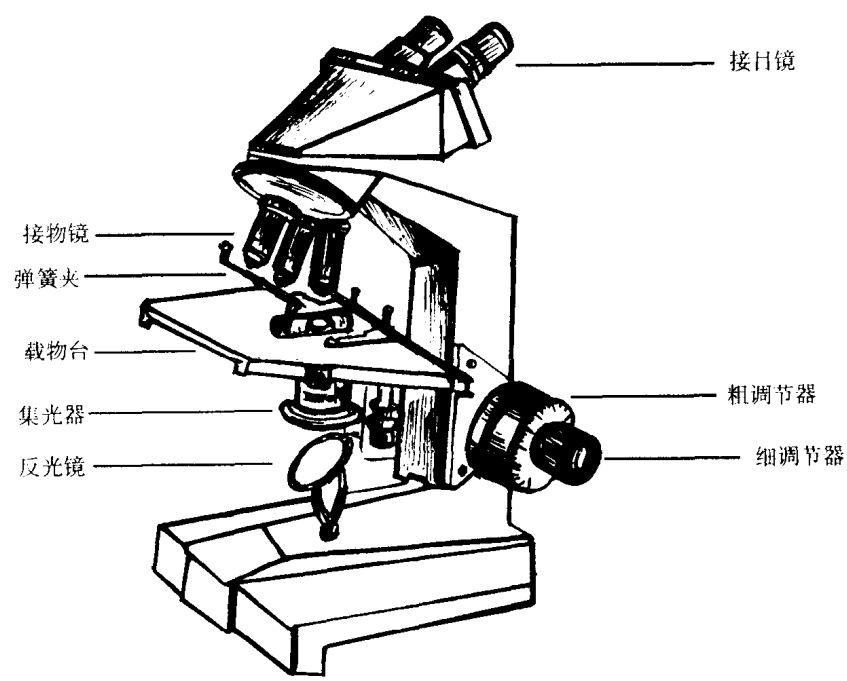


图 1-2 普通生物显微镜示意图

2. 油镜头使用方法 使用显微镜油镜头观察细菌标本，应按对光→滴油→调焦→选视野→用毕处理等步骤进行。

①对光：显微镜平放于试验台上，不能使载物台倾斜（避免镜油外流）。将集光器升至

最高，光圈全部打开，同时将反光镜的光对准集光器。

②滴油：升高物镜。将细菌标本片固定于载物台上，使菌膜处于集光器中央位置，滴加镜油于标本片上，并将镜头正对于油滴。

③调焦：眼睛从显微镜的侧面看油镜头，同时调节粗调节器移动镜头，使油镜头浸于油内，但勿使镜载玻片触碰，然后眼睛移到目镜处观察标本物像。此时应边观察边调节细调节器，直到物像清晰为准。如未能找到物像，应重复上述操作一次。

④选视野：进行标本观察时，双眼应睁开（便于边观察边绘图）。调换镜下视野要遵循由左向右，再由右向左，由上至下，再由下至上按顺序观察的原则，避免疏漏。

⑤用毕处理：显微镜使用完毕，应将目镜上移，用镜头纸沿镜头的垂直方向擦去镜油（不能转圈儿擦）。取下标本片，用卫生纸擦去标本片上镜油，将标本片归还原处。最后将物镜镜头转成“八”字形并降下物镜，用罩子套好，对号放入柜中。

2. 显微镜保护

①不得随意拆卸和碰撞显微镜零件。搬运时，应右手持镜臂，左手托镜座，平端于胸前。

②防止强酸、强碱、乙醚、氯仿、乙醇等有机物腐蚀镜头。

③显微镜长期不用时，应避免受潮和阳光直射。

二、细菌的基本形态和特殊结构 (The basic Morphology and Special Structure of Bacteria)

细菌有 3 种基本形态：球形、杆状和螺形，采用适当染色方法便可以观察到。细菌除了具有细胞壁、细胞膜、细胞质和核质等基本结构外，某些细菌还有芽胞、荚膜、鞭毛和菌毛等特殊结构。前 3 种特殊结构经用特殊染色法染色在普通光学显微镜下就能观察到，而菌毛需用电子显微镜才能观察到。

【材料与方法】

1. 细菌基本形态标本片

球菌 (Cocci)：葡萄球菌 (*Staphylococcus*)

杆菌 (Bacilli)：大肠埃希菌 (*E. coli*)

弧菌 (Vibrio)：霍乱弧菌 (*V. Cholerae*)

2. 细菌特殊结构标本片

鞭毛 (Flagella)：伤寒沙门菌鞭毛 (The Flagella of *S. typhi*)

荚膜 (Capsule)：肺炎链球菌荚膜 (The Capsule of *Strep. pneumoniae*)

芽胞 (Spore)：破伤风梭菌芽胞 (The Spore of *Clostridium tetani*)

3. 显微镜、镜油、镜头纸、卫生纸 (擦片纸)

4. 观察方法按显微镜油镜头使用程序进行。

【镜下观察内容】

1. 形态 观察细菌形态包括观察球菌、杆菌、螺菌及弧形菌形态区别、大小、排列方式、染色性及特殊结构。

2. 鞭毛 注意鞭毛形态、位置、长短、数量并辨别是否为周鞭毛、从鞭毛、两端鞭毛或单鞭毛。

3. 荚膜 观察荚膜标本应寻找组织染色较浅部位的单个细胞进行观察，并注意菌体形态及染色特点。

4. 芽胞 注意芽胞在菌体中的位置、形态、大小、着色情况及有无游离芽胞。
5. 作业 绘图说明所观察的内容。

三、细菌动力的直接观察 (Observation of The Bacterial Motility)

有鞭毛的细菌具有动力，在液体中其运动明显。用显微镜直接观察细菌动力是鉴别细菌方法之一，常采用不染色的压滴法和悬滴法。

【材料】

1. 大肠埃希菌、葡萄球菌肉汤 12h 培养物。
2. 载玻片、凹玻片、盖玻片、凡士林、接种环及乙醇灯等。

【方法】

1. 压滴法 用接种环分别取大肠埃希菌或葡萄球菌菌液置于玻片中央，在液体上请轻轻盖上盖玻片，静置片刻后于镜下观察。
2. 悬滴法 在凹玻片凹窝四周涂少许凡士林，用接种环取 1 环~2 环大肠埃希菌或葡萄球菌菌液，置盖玻片中央，将凹玻片凹窝对准盖玻片菌液处扣上轻压后迅速翻转，使菌液悬滴于盖玻片上 (见图 1-3)，静置后于镜下观察。

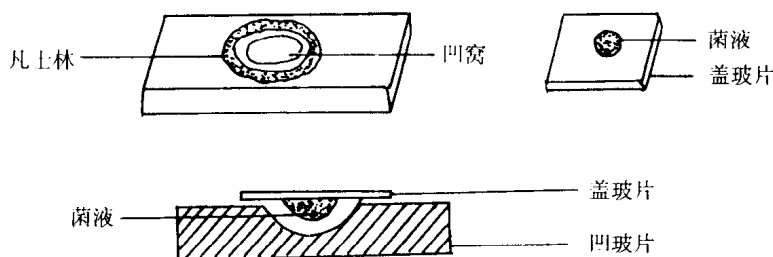


图 1-3 悬滴法标本的制备

【结果】

大肠埃希菌有明显的定向运动，而无鞭毛的葡萄球菌为布朗运动（即随着水分子的运动而在原位颤动）。

【注意事项】

1. 镜检时，如采用明视野集光器，应适当降低集光器和缩小光圈以减低亮度；如采用暗视野集光器，应适当增加电光源亮度。
3. 注意掌握定向运动与布朗运动区别。

【思考题】

1. 显微镜油镜头的使用原理及操作要领。
2. 细菌的基本形态和特殊结构及其在基础研究和临床中的应用。
3. 除应用压片法和悬滴法鉴别细菌动力外，还可应用何种检查方法？

实习二 细菌的人工培养 (The Artificial Culture of Bacteria)

细菌生长繁殖需要营养物质（如水、碳水化合物、氨基酸、无机盐及维生素等）、能量

(如光能)和适宜的生长环境(如温度、湿度及气体条件)等。采用人工的满足细菌生长繁殖条件的方法,称为细菌的人工培养。

一、人工培养基的种类及其应用 (The Varieties and Application of Artificial Medium)

培养基种类按其成分可分为天然培养基和人工培养基;按物理性状可分为液体、半固体(含 0.3~0.5g/dl 琼脂粉)和固体培养基(含 2g/dl 琼脂粉);根据培养基的用途一般可将其分为基础培养基、增菌培养基、选择培养基、鉴别培养基及厌氧培养基。

1. 基础培养基 (Basic Media)

用于满足一般细菌生长繁殖所需基本营养成分的培养基称基础培养基,它也是配制其它特殊用途培养基的基础。例如营养肉汤、营养琼脂、蛋白胨水等。

2. 增菌培养基 (Enrichment Media)

一方面指为增加标本中目的菌的增殖数量提高其检出率,于培养基加入某些抑制剂或药物制成的培养基。如蛋白胨水中加入高浓度碱(pH 值达 8.8 左右)有利于霍乱菌生长而不利於其它细菌生长。另一方面指某些细菌对营养要求较高,为了促进其生长,于基础培养基中加入血液、血清、酵母浸膏或生长因子等高营养物质制成的增菌培养基又称营养培养基。如在融化的 100ml 营养琼脂培养基中于 55℃ 左右加入 7ml~8ml 脱纤维羊血,制成血平板(blood agar plate),有利于甲、乙型溶血性链球菌、肺炎链球菌、白喉杆菌、鼠疫杆菌、布氏杆菌及百日咳杆菌等生长。

3. 选择培养基 (Selective Media)

在基础培养基中加入某些化学物质,使之抑制某一类细菌而利于另一类细菌生长的培养基称选择培养基。如分离肠道杆菌的 SS 培养基,其成分中的胆盐、煌绿和硫代硫酸钠可抑制肠道部分非致病菌生长,而胆盐等可促进致病的沙门菌和志贺菌生长。

4. 鉴别培养基 (Differential Media)

利用细菌对糖类及蛋白质类分解能力差异和代谢产物不同,在培养基中加入特定作用底物和指示剂,以细菌生长时的底物分解和指示剂变化来鉴别细菌,这种培养基称鉴别培养基。如单糖发酵管、双糖管、尿素管、蛋白胨水、葡一磷胨水、醋酸铅及枸橼酸盐培养基等。

5. 厌氧培养基 (Anaerobic Media)

针对厌氧菌繁殖设计的培养基为厌氧培养基。如庖肉培养基和硫乙醇酸盐培养基均属此类。

二、培养基制备的一般程序 (Preparation of Media)

培养基制备的一般程序是:成分混合→矫正 pH→过滤澄清→分装和标记→灭菌或除菌。

1. 成分混合:按培养基配方精确称取各种营养成分,放三角瓶中与蒸馏水混和,并置该瓶于 100℃ 水浴中煮溶。

2. 矫正 pH 值:当培养基成分充分煮溶后,用 10% 氢氧化钠(NaOH)碱液或 1N 盐酸(HCl)液矫正 pH 值。不同细菌对培养基 pH 值要求不同。培养基经高压灭菌会使 pH 值少许下降,故培养基在高压灭菌前应比实际要求的 pH 值高 0.1~0.2。

3. 过滤澄清:调整过 pH 值的液体培养基,应继续煮一段时间以使沉渣析出,然后用滤纸将沉渣滤除。滤过后的液体加入琼脂粉,便可制成固体或半固体培养基。

4. 分装和标记：将制好的培养基根据使用要求，分装于不同大小容器内。注意分装量一般为容器体积的 1/3 或 2/3，如果装的过满，高压灭菌时液体会溢出。另外，使用的瓶塞应透气，并在瓶塞上外裹牛皮纸，记上标记再行灭菌。

5. 灭菌或除菌：耐高压培养基可用高压蒸汽灭菌器进行常规灭菌。不耐高压的培养基如含有血清、尿素或某些糖类的培养基，可用灭菌滤器除菌。含牛奶和鸡蛋的培养基可用间歇灭菌法消毒。

常用培养基的具体制备方法详见附录。

三、细菌接种法 (The Method of Bacteria Inoculation)

细菌接种法是指将细菌在人工培养基上分离和接种的技术。其目的在于获得纯种细菌，并使其进一步增殖。它包括分离培养法和纯培养法。将分离培养的细菌或纯培养后的细菌，放于无氧或微氧环境中进行培养，称为厌氧培养。

(一) 接种工具及接种的无菌操作 (Inoculate Tools and Nonbacterial Operation)

培养细菌常用的接种工具有接种环、接种针、涂布棒、吸管、灭菌灯（乙醇灯、本生灯或煤气灯）。接种环（针）及涂布棒，见图 2-1。

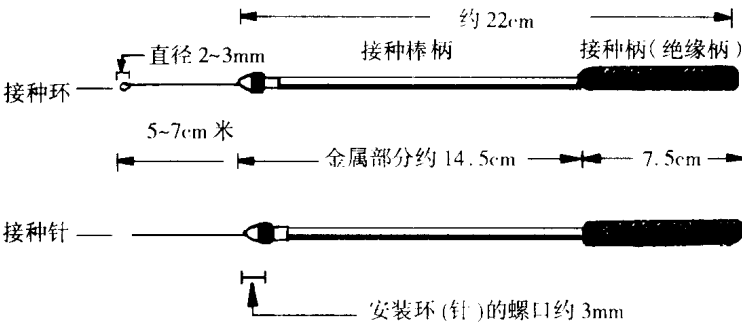


图 2-1 接种环（针）及接种棒

1. 接种工具：接种环（针）由白金丝或镍合金丝制成。接种环是在金属丝前端处卷成一直径 2~3mm 小环又称白金耳。用于细菌分离接种或纯培养接种。接种针多用于半固体培养基穿刺接种。涂布棒为前端呈三角形的玻璃小棒，用于细菌在固体培养基上进行大面积均匀涂布。吸管可用于大量菌液的接种或定量接种。

2. 接种的无菌操作：细菌接种要在无菌条件下进行无菌操作，除使用的物品如培养基、玻璃器皿、器械等进行灭菌外，空间应以紫外线消毒，操作者应穿隔离衣，必要时应戴口罩、帽子和医用手套。接种细菌时先将接种环（针）在火焰上烧红，再在火焰上移动接种杆消毒其余金属部分，然后离开火焰待其冷却后，以接种环（针）取细菌进行接种。接种操作应在火焰附近进行。已沾有细菌的接种环（针）不能碰触衣物、操作台等物品。接种结束后，应立即将蘸有细菌的接种环（针）用上述方法火焰灭菌，再将接种柄插于接种架上。应用涂布棒或吸管接种时，接种完毕的器具应放于消毒液中。所有无菌操作完毕，应将带有细菌物品分别妥善处理，并将其空间进行紫外线消毒。

(二) 分离培养法 (Isolative Culture Method)

细菌分离培养法也叫细菌分离接种技术，即应用接种环将细菌在固体培养基平板上划线接种，将多种细菌逐一分散成单个，经培养后各自形成单个菌落，将单个菌落移种增殖后可得到纯种细菌。通常划线分离接种细菌有4种方法，即小辨划线法（见图2-2①、②）、连续划线法（见图2-2③）、分区划线法（见图2-2④）和“井”字划线法（见图2-2⑤）。

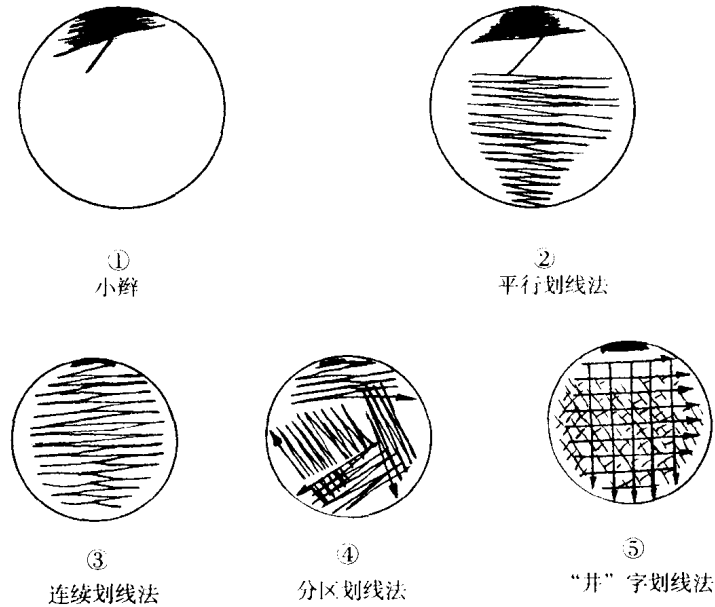


图2-2 培养基平板划线分离细菌法

上述方法的目的均为将细菌分散开，应注意每当划完一个区域都要将接种环灭菌后，再从细菌划线末端处，划到另外未划线处部分。

【操作方法】（以小辨划线法为例）

1. 左手执装有待分离标本的容器（管、瓶或平皿），右手执接种棒，将接种环用火焰灭菌后，以右手小指打开标本容器盖或塞，并用冷却后的接种环蘸取细菌，将标本容器口烧一下，盖上盖或塞，放标本于一边。

2. 左手将培养皿平托于手掌上，用手指将平皿盖呈15°角度打开，并靠近火焰无菌区（火焰半径5cm范围内），用蘸有细菌接种环于平皿一侧之上端，涂布一个0.5cm×1.5cm大小的区域，然后将接种环竖起，从涂布区中拉出一条0.5~1cm长的小辨（见图5①）。

3. 将接种环灭菌后于小辨尖部开始，平行密集连续向下之字形划线，划线的范围可根据待检标本和培养皿大小情况，划平板的一半或划满整个平板（见图5②）。

4. 接种完毕，将右手的接种环灭菌后插在专用架上，左手盖上平皿盖并翻转平皿使其底部朝上。在平皿底部注明标本名称、接种人、接种日期、班级和实验室号，然后统一放入指定温箱孵育。

【注意事项】

1. 为防止空气中杂菌污染琼脂平板，划线接种时动作要迅速准确，打开平皿盖的时间要尽量缩短。

2. 划线接种时，接种环与培养板表面呈15°~20°斜角，划线动作要轻，用力过大会划破琼脂面。