

# 医学微生物学实验指导

湖南医学院微生物学教研组

一九八四年一月

# 目 录

|              |   |
|--------------|---|
| 微生物学实验室规则    | 1 |
| 微生物学实验课要求    | 1 |
| 显微镜的使用和保护    | 1 |
| 常用玻璃器材的洗涤和准备 | 2 |

## 细 菌 学 总 论

|       |                             |    |
|-------|-----------------------------|----|
| 实 验 一 | 细菌涂片的制备及革兰氏染色法              | 4  |
| ✓     | 涂片的制备                       | 4  |
| ✓     | 革兰氏染色法                      | 4  |
| 实 验 二 | 细菌的基本形态、基本结构及特殊结构           | 6  |
| ✓     | 细菌的基本形态                     | 7  |
| ✓     | 细菌的基本结构                     | 7  |
| ✓     | 细菌的特殊结构                     | 7  |
| 实 验 三 | 常用培养基的制备                    | 8  |
| 一、    | 肉汤培养基的制备                    | 8  |
| 二、    | 普通琼脂培养基的制备                  | 9  |
| •三、   | 半固体培养基的制备                   | 10 |
| 四、    | 血液琼脂培养基的制备                  | 10 |
| 实 验 四 | 细菌的接种法                      | 11 |
| ✓     | 平皿接种法                       | 11 |
| 二、    | 斜面培养基接种法                    | 11 |
| 三、    | 液体培养基接种法                    | 12 |
| ✓     | 四、半固体培养基接种法                 | 13 |
| 实 验 五 | 细菌培养物的观察                    | 14 |
| 一、    | 细菌培养性状的观察                   | 14 |
| ✓     | 二、细菌代谢产物的检查                 | 14 |
| 实 验 六 | 微生物的分布                      | 18 |
| 一、    | 空气中微生物的检查                   | 18 |
| 二、    | 水中微生物的检查                    | 18 |
| 三、    | 手指皮肤消毒前后的微生物检查              | 19 |
| 实 验 七 | 外界因素对微生物的影响                 | 19 |
| 一、    | 微生物学实验室常用仪器及无菌室简介           | 20 |
| •二、   | 紫外线的杀菌作用                    | 23 |
| ✓     | 三、抗菌药物对细菌的作用（细菌对抗菌药物的敏感性试验） | 23 |

|                          |    |
|--------------------------|----|
| ✓四、噬菌体的基本特性及效价测定         | 24 |
| 实验八 细菌的变异                | 26 |
| ✓一、光滑型 (S) 与粗糙型 (R) 菌落变异 | 26 |
| ✓二、毒力变异                  | 26 |
| ✓三、耐药性变异                 | 27 |
| ✓四、R 因子试验                | 28 |
| 实验九 细菌的致病性               | 29 |
| ✓一、血浆凝固酶试验               | 29 |
| 二、破伤风外毒素的毒性作用            | 30 |
| 三、伤寒杆菌内毒素的毒性作用           | 30 |
| ✓四、内毒素的测定——鲎试验           | 31 |

## 免 疫 学 基 础

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 实验十 非特异性免疫                            | 32 |
| ✓一、溶菌酶的溶菌作用                           | 32 |
| ✓二、吞噬细胞的吞噬作用                          | 33 |
| ✓三、补体在溶血反应中的作用                        | 34 |
| ✓四、50%溶血试验 (简称 $CH_{50}$ ) 测定血清中总补体活性 | 35 |
| 实验十一 凝集反应                             | 36 |
| ✓一、玻片凝集                               | 36 |
| ✓二、试管凝集                               | 37 |
| ✓三、反向间接血凝试验                           | 39 |
| 实验十二 沉淀反应                             | 42 |
| 一、环状沉淀试验                              | 42 |
| ✓二、琼脂扩散试验                             | 43 |
| ✓三、琼脂免疫电泳                             | 45 |
| 四、对流免疫电泳                              | 46 |
| 实验十三 补体结合反应                           | 48 |
| 实验十四 常用的细胞免疫体外检测法                     | 51 |
| ✓一、绵羊红细胞花环形成试验 (E-花环试验)               | 52 |
| ✓二、淋巴细胞转化试验                           | 53 |
| 实验十五 B 淋巴细胞表面膜免疫球蛋白 (SmIg) 的荧光检测      | 54 |
| 实验十六 豚鼠过敏反应                           | 56 |

## 细 菌 学 各 论

|                 |    |
|-----------------|----|
| ✓实验十七 病原性球菌     | 57 |
| ✓实验十八 血标本的细菌学检查 | 58 |

|       |                            |    |
|-------|----------------------------|----|
| 实验十九  | 肠道杆菌                       | 59 |
| ✓     | 肠道杆菌的形态、培养及生化反应            | 59 |
| ✓     | 肥达氏反应                      | 60 |
| 实验二十  | 荧光菌球试验                     | 62 |
| 实验二十一 | 需氧芽胞杆菌属                    | 63 |
| 实验二十二 | 厌氧芽胞杆菌属                    | 64 |
| ✓     | 破伤风杆菌、产气荚膜杆菌、肉毒杆菌的形态特点及染色性 | 65 |
| ✓     | 产气荚膜杆菌在培养基中的发酵现象           | 65 |
| ✓     | 产气荚膜杆菌的动物实验                | 65 |
| 实验二十三 | 棒状杆菌属                      | 66 |
| ✓     | 白喉杆菌与类白喉杆菌的形态染色性           | 67 |
| ✓     | 白喉杆菌的毒力试验                  | 67 |
| ✓     | 疑似白喉患者咽拭子的细菌学检查            | 68 |
| 实验二十四 | 分枝杆菌属                      | 69 |
| ✓     | 结核杆菌和麻风杆菌的形态染色性            | 70 |
| ✓     | 结核杆菌的培养特性                  | 70 |
| ✓     | 肺结核病人痰标本直接镜检               | 70 |

## 螺旋体、真菌、病毒、立克次氏体等

|       |                       |    |
|-------|-----------------------|----|
| 实验二十五 | 病原性螺旋体                | 73 |
| ✓     | 病原性螺旋体的形态染色性          | 73 |
| ✓     | 钩体动力观察                | 73 |
| ✓     | 钩体凝集溶解（简称凝溶）试验        | 74 |
| 实验二十六 | 病原性真菌                 | 76 |
| ✓     | 真菌的基本形态               | 77 |
| ✓     | 真菌的培养特征               | 77 |
| ✓     | 浅部真菌病病理标本的检查          | 78 |
| 实验二十七 | 病毒的形态学                | 79 |
| ✓     | 一、观察牛痘病毒原生小体          | 79 |
| ✓     | 二、观察狂犬病毒包涵体           | 80 |
| 实验二十八 | 病毒的培养法                | 80 |
| ✓     | 一、病毒鸡胚培养法             | 81 |
| ✓     | 二、病毒组织培养法             | 83 |
| 实验二十九 | 流感病毒的分离和鉴定            | 86 |
| ✓     | 一、流感病毒的分离——鸡胚羊水囊及尿囊接种 | 86 |
| ✓     | 二、血球凝集试验              | 87 |
| ✓     | 三、血球凝集抑制试验            | 88 |

|       |                    |    |
|-------|--------------------|----|
| 实验三十  | 病毒免疫荧光检查法          | 89 |
| 实验三十一 | 酶标记免疫试验            | 90 |
| 一     | 酶联免疫吸附试验检测HBsAg    | 90 |
| 二     | 玻片法检测血清中EB病毒的VCA抗体 | 91 |
| 实验三十二 | 沙眼衣原体包涵体           | 92 |
| 实验三十三 | 立克次氏体的形态           | 92 |
| 实验三十四 | 肺炎支原体的集落           | 93 |

## 微生物学实验室规则

一、进入实验室应穿实习衣，离室时脱下，反折放回原处。不必要的物品不带入实验室。

二、实验室内不许吸烟、吃食物；不得高声谈笑或随便走动，以免影响无菌环境及他人实验。

三、如有传染性材料破损、污染桌面、地面、书籍、衣物等时，应立即用消毒药水（2%来苏或5%石炭酸）处理半小时以上，再洗净。

四、凡做过微生物实验的器材（吸管、玻片、平皿及其他容器或培养物等）切不可随处乱扔或放入水池，应放在指定的地点，如消毒缸、消毒筒中。须送温箱培养的物品，应标记清楚然后送到指定地点。

五、爱护仪器，节约实验材料，器材如有破损，应报告教师并进行登记、处理。实验材料不得携带出实验室。

六、实验完毕，桌面应整理清洁，不可将火柴棍、擦镜纸投入水槽内，用过的物品（如接种环、染色液、擦镜纸、香柏油、火柴等）归还原处，将实验室打扫干净，关好水、电和门窗。

## 微生物学实验课要求

一、每次实验课前必须做好预习：明确实验的目的；了确实验的原理；了解实验操作方法的大概情况以便事先计划。

二、实验过程中必须按操作步骤，认真进行独立操作以达到掌握本学科必要的基本操作技术；并力求正规、准确。树立三严（严肃性、严格性、严密性）的科学作风。

三、实验结果的观察：必须按照要求，按时认真观察，如实的记录实验结果，独立分析实验结果并做出实验报告。以培养自己具有分析问题和解决问题的能力。

## 显微镜的使用和保护

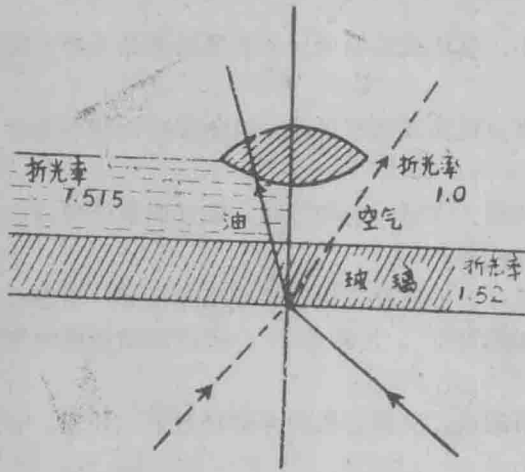
由于微生物学实验经常使用油镜，学生必须熟练地掌握油镜的使用及保护法。

### 一、油镜的使用法：

1. 对光：于天然光线下观察时，应用平面反光镜；在人工灯光或弱光处则应用凹面反光镜。检查不染色标本宜用弱光，可将集光器降低或缩小光圈；检查染色标本时光线宜强，应将虹彩打开并升高集光器。

2. 观察：将载玻片放在载物台上，用固定器固定，先用低倍镜找到标本所在处，再换油镜观察。使用油镜时，须在载玻片上先滴柏油一滴，从旁观察并扭动粗螺旋使载物台上升，将油镜头浸入油内接近标本表面，但不要碰到玻片，再转动粗螺旋使载物台徐徐向下，至视野中看到标本轮廓，然后转动细螺旋至清晰。细螺旋是显微镜最精细而脆弱的部分，只能做往复的回转，不要向同一方向转动数周以上。

使用油镜要加柏油的原理是：因为油镜的透镜很小，从玻片透过的光线通过空气，因介质密度不同，发生散射现象，使射入镜筒的光线很少，物象不清，若在油镜与载玻片中间加入和玻璃折射率（ $n=1.52$ ）相近的柏油（ $n=1.515$ ），则使通过的光线不至产生散射而损失，因此能清楚地看到物象。



图，油镜的原理

## 二、保护方法：

显微镜是结构比较复杂的贵重仪器之一，因此使用时要小心保护。

1. 物镜及目镜须经常保持清洁，特别是油镜，使用完毕后，应立即用二甲苯将镜头上的油擦掉，再用擦镜纸擦干。

2. 显微镜使用完毕应将物镜转成“八”字形，使之不正对光线，集光器下降，然后送入镜箱。

## 常用玻璃器材的洗涤及准备

### 一、常用玻璃器材的洗涤

#### （一）、玻璃器材清洁的重要性：

玻璃器材若不清洁，常可影响实验结果，如影响培养基的PH，甚至由于某些化学物质的存在可以抑制微生物的生长，试管不清洁也可影响血清学反应的结果。

#### 二、玻璃器材的洗涤方法：

1. 新的玻璃仪器：先用自来水冲洗多次，然后浸于2%的盐酸内数小时，将游离的硷质除去，再用清水冲洗后，干燥备用。

#### 2. 用过的玻璃器材：

（1）凡含有培养基或传染性物质的玻璃器材（包括平皿、试管、锥形瓶等），均应先使用高压蒸汽灭菌法灭菌半小时（若培养物中没有含芽胞的微生物可煮沸半小时以上进行消毒），然后将培养基倾出，用清水冲洗，再用5%肥皂水刷洗（或用5%苏打溶液煮沸后再刷洗），倒置架上，晾干备用。

（2）作血清学反应的试管若不含传染性物质时，可用5%的热肥皂水刷洗，再用清水冲洗，若不够清洁，可用清洁液（配制法见附）浸泡，然后用清水冲洗7次以上，再用少量蒸馏水冲洗7次以上，晾干备用。

（3）吸管：吸过传染性材料者，应放入盛有消毒液（为5%石炭酸或2%来苏）的玻璃筒中（筒底应垫纱布、棉花，以免碰破吸管尖），使消毒液盖过吸管口，浸泡24小时，以杀死吸管上所沾附的微生物，然后用肥皂水洗涤一次，再以清水冲洗，待干备用。若吸过血清又无传染物质污染的吸管，则可用清水浸泡或用自来水直接冲洗后，用清洁液浸泡，再用清水及蒸馏水各冲洗7次以上，待干备用。



(4) 载玻片及盖玻片：用过应分开浸入2%的来苏水或清洁液中，浸泡过夜后，取出，用5%肥皂水煮沸10分钟，然后用自来水冲洗，再浸入2%盐酸酒精内约1小时，取出用水洗净，用软布擦干。如有油或树脂时，最好先用二甲苯拭净，然后置酒精中，最后移置于汽油中，取出擦干。

(5) 注射器：用过后立即进行煮沸消毒(若含有芽胞者，则应用高压蒸汽灭菌)，但在煮沸及高压灭菌之前均应先将清水抽入针头及注射器内反复洗涤几次，然后连同洗出水一起煮沸消毒或高压灭菌，以免加热时有蛋白质凝固，阻塞针头或使注射器凝住。若用普通方法不能洗净，可置清洁液中浸泡24小时(针头不能用清洁液泡)，用水冲洗，再用5%甘油水煮后擦干。

#### 〔附〕清洁液的配制

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| 重铬酸钾 ( $K_2Cr_2O_7$ ) | 100克   |
| 水                     | 1000毫升 |
| 浓硫酸(粗)                | 250毫升  |

先将重铬酸钾与水放置大烧杯中加热溶化，待凉，置烧杯于冷水中，慢慢加入浓硫酸，并不断搅拌。此液可使用多次，至颜色变绿时，即不能再使用。

#### 二、常用无菌玻璃器材的准备：

平皿应用纸包好或盛入金属盒内进行高压灭菌，试管、锥形瓶等(空的或盛有培养基)可用棉花纱布作塞子塞好，并用不透水的厚纸包于棉花塞外面，再进行高压蒸汽灭菌；吸管应于吸口端先塞入少许棉花(塞入的棉花不可太松，也不可太紧)，然后每支用纸包好，或以数支放入金属筒内，进行高压灭菌。以上这些玻璃器材经高压蒸汽灭菌后，应烤干然后才能使用。

上述器材也可用干烤法进行灭菌，但温度及时间应注意掌握( $160^{\circ}C$  2—3小时)，以免烧焦棉塞及外包的纸张等。

注射器最好将内轴取出，与外套一起包好进行灭菌，针头最好装入管底含有少量棉花的小试管内，塞好棉塞进行灭菌(使用时，即可利用此试管保护无菌针头，且可于该试管底部棉花中排气)。

**注意：**任何已灭菌的器材，在使用前不能随意打开，一经打开过的器材则不能再认为是无菌的。



# 细菌学总论

## 实验一 细菌涂片的制备及革兰氏染色法

内容:

- 一、涂片的制备。
- 二、革兰氏染色法。

要求:

掌握涂片的制备法以及革兰氏染色法。

材料:

1. 混合菌液。
2. 革兰氏染色液一套。
3. 玻片、接种环、酒精灯。

### 一、涂片的制备

步骤: 涂片(用接种环或针), 干燥, 固定, 染色

方法:

1. 涂片: 取干净玻片一块, 置火焰上通过数次, 用烧灼灭菌的接种环取混合菌液 1——2 环置玻片上涂成直径约 1.5 厘米的涂片。(若取菌落涂片, 则需用烧灼的接种环取生理盐水 1——2 环置玻片上, 再用烧灼的且已冷却的接种环取菌落少许于盐水中混匀, 涂成直径约 1 厘米的涂片即可)。

2. 干燥: 涂片可在室温下自干或用电吹风吹干; 亦可将标本面向上, 放在离火焰较高处略烘使其干燥, 切不可在火焰上烧干。

3. 固定: 涂片干燥后, 标本面向上迅速通过火焰三次, 温度不宜太高, 以玻片的温度达到皮肤能耐受的温度为宜。固定后, 细菌被杀死并固定于玻片上, 染色过程中不易被水冲掉。

4. 固定之标本可以用不同方法染色。

### 二、革兰氏染色法

细菌的染色法可分为: 单染色法和复染色法两种。单染色法, 是用一种染料使细菌着色, 以利观察, 常用的有美兰染色法和石炭酸复红染色法。复染色法, 是用两种以上的染料于一涂片上染色, 利用各种细菌对各种染液呈现不同的反应, 来鉴别不同的细菌, 故又叫鉴别染色法, 常用的有革兰氏染色法和抗酸染色法。本次实验只做革兰氏染色法。

### 方法:

1. 在制好的涂片上, 加结晶紫染色液 1—2 滴染色, 1 分钟后, 用自来水轻轻冲洗, 再将涂片积水甩干。(紫色)
2. 加碘化钾溶液 (又名卢戈氏液), 1—2 滴媒染, 1 分钟后水洗, 甩干。(紫色)
3. 加95%酒精 2—3 滴, 将涂片轻轻晃动, 使其脱色, 通常需30秒左右 (脱色时间之长短须依所作涂片之厚薄而定), 水洗, 甩干。(紫色褪去)
4. 加石炭酸复红稀释液 1—2 滴复染 1 分钟, 水洗, 甩干。(复染, 紫色+红色)
5. 待涂片自干或用电吹风吹干后, 即可在显微镜下观察 (方法见油镜的使用法)。

### 结果观察:

注意标本中细菌的形态、大小、排列和染色性。

观察: 1. 涂片厚薄不均匀。

2. 脱色时间

3. 菌龄长短

4. 染色时间

5. 固定温度

### 思考题

1. 革兰氏染色法的原理及应用价值。

2. 革兰氏染色法成功因素有哪些?

〔附〕

### 一、细菌动力检查——悬滴法

1. 菌种: 变形杆菌、葡萄球菌幼龄 (8—12小时) 肉汤培养物。

2. 凹玻片、盖玻片、镊子、凡士林等。

### 方法:

1. 取凹玻片一张, 在凹窝四周涂凡士林 (或水) 少许。

2. 取一接种环的变形杆菌或葡萄球菌肉汤培养物, 放在盖玻片的中央。

3. 将凹玻片反转, 使凹窝对准盖玻片中心, 复于其上轻压之, 使凡士林 (或水) 粘住盖玻片后再翻转, 液滴即悬垂于凹窝中央。

4. 先用低倍镜找到悬滴的边缘, 再换用高倍镜检查。

5. 结果: 变形杆菌具有鞭毛, 能运动。葡萄球菌无鞭毛, 只有分子颤动 (即布朗氏运动)。

6. 检查完毕, 用镊子夹取盖玻片, 放入消毒缸内。

### 二、染色液的配制法

微生物学实验室所用的多为碱性苯胺染料 (如结晶紫、美兰、碱性复红等)。配制染液时, 一般先将染料溶解于酒精或水中, 配成饱和原液, 其中酒精原液较稳定, 便于保存, 应用时再以蒸馏水或适当溶液稀释之。

#### (一) 饱和液配制法:

配制饱和液时, 可按表 1 多取 20% 量的染料加于水或酒精中, 置棕色试剂瓶内盖紧, 充分振摇后, 静置 1—2 天, 如瓶底稍有沉淀, 表示此液已达饱和, 即可取上层液使用。

表 1 常用染料在100毫升水中或酒精内的溶解度 (克)

| 染 料  | 水    | 95%酒精 |
|------|------|-------|
| 美 兰  | 3.55 | 1.48  |
| 结晶紫  | 1.68 | 13.87 |
| 碱性复红 | 0.39 | 8.16  |

(二) 常用染色液配制法:

1. 革兰氏染色液:

(1) 结晶紫酒精饱和溶液:

(2克结晶紫溶于20毫升95%酒精内) 20毫升  
1%草酸铵水溶液 80毫升 } 混合即成

(2) 卢戈 (Lugol) 氏碘液:

碘片 1克  
碘化钾 2克 } 溶解即成。  
蒸馏水 300毫升

(3) 95%酒精。

(4) 石炭酸复红稀释液:

将石炭酸复红液用蒸馏水稀释10倍即成。

〔石炭酸复红液的配制〕

硷性复红酒精饱和液(95%酒精100毫升,加硷性复红5-10克) 10毫升  
5%石炭酸水溶液 90毫升 } 混合即成

2. 硷性美兰染色液:

美兰酒精饱和液(95%酒精100毫升中加美兰2克) 30毫升  
0.01%氢氧化钾水溶液 100毫升 } 混合即成

## 实验二 细菌的基本形态、基本结构及特殊结构

内容:

一、细菌的基本形态。

二、细菌的基本结构。

三、细菌的特殊结构。

要求:

认识细菌的基本形态、基本结构及特殊结构。

材料:

1. 球菌、杆菌、弧菌示教片。

2. 细菌的细胞壁、核质染色示教片。

3. 细菌的鞭毛、荚膜、芽胞示教片。

## 一、细菌的基本形态

革兰氏染色

1. 球菌：如葡萄球菌（革兰氏染色），革兰氏阳性（紫色），球形，常呈葡萄串状排列，因而得名。

2. 杆菌：如大肠杆菌（革兰氏染色），革兰氏阴性（红色），两端钝圆的短杆菌，散在排列。

3. 弧菌：如霍乱弧菌（革兰氏染色），革兰氏阴性（红色），菌体只有一个弯曲，呈逗点状，散在排列。

## 二、细菌的基本结构

### （一）细胞壁

材料：

1. 蜡样芽胞杆菌琼脂斜面培养物。
2. 5%鞣酸。
3. 0.5%结晶紫水溶液，0.5%刚果红。

方法：

1. 将蜡样芽胞杆菌培养物常规涂片，自干（不需固定）。
2. 用5%鞣酸染30分钟—60分钟，然后水洗，将涂片上的积水甩干。
3. 加0.5%结晶紫染2分钟，然后水洗甩干。
4. 用0.5%刚果红脱色，脱色时间为2—3分钟。
5. 将涂片印干，置显微镜（高倍或油镜）下观察，可见细胞壁为紫红色。

### （二）细菌的核质

材料：

1. 蜡样芽胞杆菌4小时培养物。
2. 甲醇、1N HCl 姬姆萨氏染色液。

方法：

1. 将蜡样芽胞杆菌培养物常规涂片，用甲醇固定。
2. 将涂片置60℃ 1N HCl中水解10分钟。
3. 取姬姆萨氏染色液2—3滴加入1毫升pH7.0的PB或新鲜的双蒸水中，用此液染30分钟。
4. 待涂片干后置油镜下观察，可见胞浆呈浅紫色，核质呈深紫色。

## 三、细菌的特殊结构

1. 鞭毛：如变形杆菌（鞭毛染色），可见变形杆菌菌体呈紫红色，周身鞭毛呈红

色。

2. 荚膜：如肺炎球菌（革兰氏染色），可见肺炎球菌为革兰氏阳性球菌，成双排列，菌体周围有一未着色的空圈，即为荚膜。

3. 芽胞：如破伤风杆菌（革兰氏染色），可见破伤风杆菌为革兰氏阳性杆菌，菌体顶端可见一个圆形未着色的空泡，即为芽胞。

鞭毛、荚膜、芽胞均为细菌的特殊结构，除可鉴别细菌外，细菌的鞭毛是细菌的运动器官；细菌的荚膜与细菌的致病力有密切关系；细菌的芽胞对于高温、干燥和化学消毒剂的抵抗力，远比繁殖体强，故细菌的芽胞，能在外界环境不良时，保存细菌的生命。

## 思考题

细菌有哪些特殊构造？它们各有何生理功能？在医学上有何意义？

## 实验三 常用培养基的制备

N源 碳源 水 无机源 赋溶剂

人工培养细菌时必须供给细菌需要的营养物质。培养基就是将细菌生长繁殖所需要的营养物人工配制而成的一种混合营养料。培养基的基本成份有蛋白胨、氨基酸、糖类、盐和水份。任何培养基除含有必需的营养物质外，还必须有一定的酸硷度（pH7.4—7.6），澄清并保证无菌。其物理性状：凝固

培养基的主要用途是：一、分离并繁殖细菌；二、保存菌种；三、鉴定细菌；四、生产菌苗、抗菌素以及细菌生理学的研究。

内容：

一、肉汤培养基的制备。

二、普通琼脂培养基的制备。

三、半固体培养基的制备。

四、血液琼脂培养基的制备。

五、蛋白胨水的制备。

要求：

掌握制备培养基的基本原则及了解制备的方法。

### 一、肉汤培养基的制备

成分：

|        |      |
|--------|------|
| 新鲜绞碎瘦肉 | 500克 |
| 蛋白胨    | 10克  |
| 氯化钠    | 5克   |

蒸馏水

1000毫升

**方法：**

1. 称取去筋膜无油脂的瘦牛肉500克，用绞肉机绞碎、加水1000毫升，搅匀浸于搪瓷锅内，置冻箱过夜，除去液面上的浮油。过夜的目的是使牛肉中的水溶性养料充分地渗透出来。

2. 次日取出，煮沸半小时（若不经冰箱过夜，可直接煮沸1小时）。用细布过滤，肉渣中液体应尽量挤尽。

3. 于1000毫升肉汁中加蛋白胨10克，氯化钠5克，搅拌加热使完全溶解。量滤出肉汁，用蒸馏水补足至原量。

4. 冷至40°—50°C时，用氢氧化钠校正pH至7.8，煮沸10分钟，然后补充失去水份，用脱脂棉过滤，滤液须澄清。

5. 分装于试管或三角烧瓶塞好棉塞，高压蒸汽15磅（121.3°C）20分钟灭菌。

**注：**如用牛肉膏制肉汤培养基，配方如下：

|     |       |
|-----|-------|
| 牛肉膏 | 0.5克  |
| 蛋白胨 | 1克    |
| 氯化钠 | 0.5克  |
| 蒸馏水 | 100毫升 |

以上各成分混合加热溶解后，即可校正pH，以下步骤同上。

## 二、普通琼脂培养基的制备

**成分：**

|       |       |
|-------|-------|
| 琼脂    | 2—3克  |
| 肉汤培养基 | 100毫升 |

**方法：**

1. 取已制备好的肉汤培养基100毫升，置于三角烧瓶中，加2—3克琼脂（琼脂是石花菜等海藻类中提取的一种物质，其化学成分主要是多糖。当温度达到98°C以上可溶解于水，45°C以下凝固，故用作赋形剂）加热溶化。

2. 趁热校正pH7.4—7.6。

3. 未凝前分装于试管中（可装于大、中不同号的试管，以备作琼脂斜面及平皿用），加棉塞，高压蒸汽灭菌。

4. 灭菌后将中号试管（约4—5毫升）斜置待凝后即成普通琼脂斜面。大试管中的培养基（约15毫升左右），在琼脂未凝前以无菌操作注入无菌平皿内，凝固后即成普通琼脂平皿。倾注平皿时必须严格无菌操作。此外，琼脂的温度不可过高，约在50°C左右为宜，如温度过高则平皿内凝固水过多，易引起污染，过低则琼脂凝固使培养基表面不平滑。

5. 置冰箱保存备用。

### 三、半固体培养基的制备

成分:

|       |       |
|-------|-------|
| 琼脂    | 0.5克  |
| 肉汤培养基 | 100毫升 |

方法:

1. 于100毫升肉汤中加入0.5克琼脂, 加热溶化, 校正pH7.4—7.6。
2. 分装于小试管中(每管约2毫升), 高压蒸汽灭菌。灭菌后将试管直立, 待冷凝后即成半固体培养基。
3. 置冰箱保存备用。

### 四、血液琼脂培养基的制备

成分:

|             |       |
|-------------|-------|
| 普通琼脂培养基     | 100毫升 |
| 无菌脱纤维兔(或羊)血 | 10毫升  |

方法:

1. 将已灭菌的普通琼脂培养基加热溶化, 并冷至50°C左右。
2. 以无菌操作加入脱纤维兔血或羊血于琼脂培养基内, 混匀(注意勿产生气泡), 然后分装于灭菌试管或平皿中, 制成血液琼脂斜面或平皿, 置4°C冰箱保存备用。

### 五、蛋白胨水的制备

成分:

|     |       |
|-----|-------|
| 蛋白胨 | 1克    |
| 氯化钠 | 0.5克  |
| 蒸馏水 | 100毫升 |

方法:

1. 取蛋白胨1克, 氯化钠0.5克, 溶于100毫升蒸馏水中。
2. 调整pH至7.6。
3. 分装于试管中或锥形瓶中, 塞好棉塞, 用油纸或牛皮纸包扎好, 高压蒸汽灭菌(15磅15分钟)。

## 思考题

制备培养基有什么原则要求? 要经过哪些步骤?



## 实验四 细菌的接种法

根据各细菌生物学特性不同，利用各种培养基分别研究它们的生物学特性，可以鉴别细菌的种类，有助于传染病的诊断，或进行其它实验。但是，一般的被检标本中（例如脓、尿、痰、粪）常混杂多种细菌，因此必须首先把它们各个分离开来，获得纯种，然后方能进一步鉴定。

内容：

- 一、平皿接种法。
- 二、斜面培养基接种法。
- 三、液体培养基接种法。
- 四、半固体培养基接种法。

要求：

掌握细菌分纯及接种方法和接种时的无菌技术。

### 一、平皿接种法

底朝上  
水蒸气

方法：

1. 右手拿接种环，烧灼冷却后，取待检标本少许。
2. 左手拿琼脂平皿培养基，略开盖，将标本涂于琼脂平皿表面之一侧边缘，作原划线。见图2（1）。
3. 烧灼接种环，冷却后自原划线末端沾取少许标本，使接种环与平皿成30—40度角，运用腕力用接种环在平皿上来回划线，见图2（2），划线要密但不能重叠，也不应划破琼脂表面，并要注意无菌技术，避免空气中细菌的污染。

每个菌落

也可用分区划线法，见图2（3）、（4）、（5），即从原划线末端沾取标本后只划平板的1/4—1/5，划毕再用火焰灭菌，冷后同样划线，共计4—5次。接种环烧灼灭菌后方可放下。

### 二、斜面培养基接种法

方法：

1. 右手拿接种针，烧灼冷却后，取待检材料少许，左手拿斜面培养管，用右手小拇指与手掌夹住培养管的棉塞，在火焰旁拔开（见图3），并将管口通过火焰数次。
2. 将接种针直刺培养基中心，然后从原刺入线退出，再在斜面上划线，划毕接种针火焰上灭菌。管口通过火焰，塞好棉塞（此法多用于双糖培养基的接种）。亦可用接种环取菌在斜面上自下而上划一直线，然后再从下至上来回划线（见图3）。

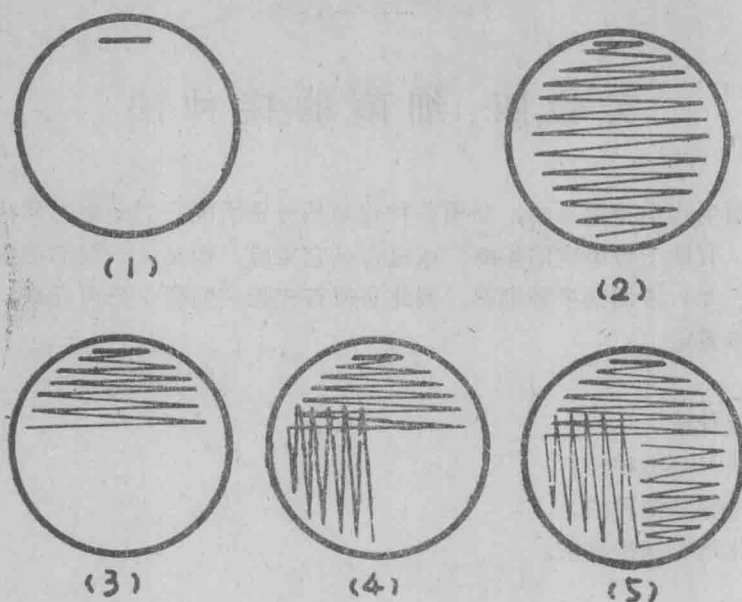


图2 平皿划线法

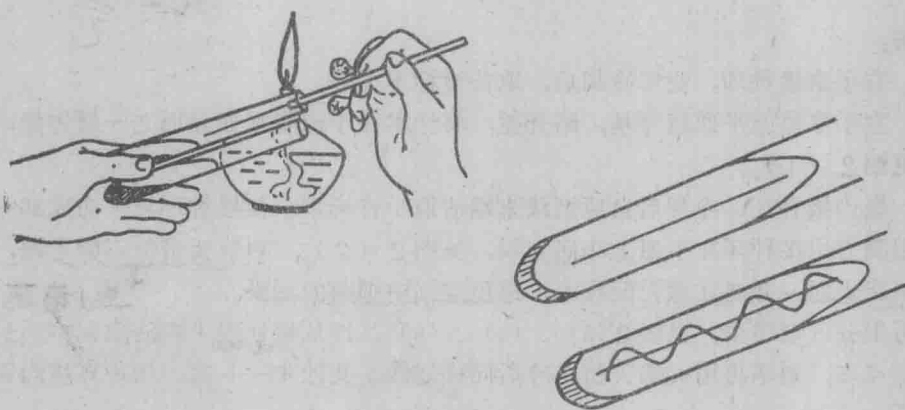


图3 斜面培养基接种法

### 三、液体培养基接种法

**方法：**左手握含菌之甲管与液体培养基之乙管下端，管口平齐，甲管在外，乙管在内，右手持接种环并以无名指与小指夹住甲管之棉塞，小指与手掌夹住乙管之棉塞，在火焰旁拔开，并将管口通过火焰数次。