

医学微生物学实验指导

湖南医学院微生物学教研组编

一九八〇年一月

前 言

医用微生物学的实验课是本课程学习过程中的主要环节之一。实验课的目的是使学生加强和巩固对课堂讲授的基本理论知识的理解和体会；学习和掌握微生物学的基本操作技术，为今后学习传染病和免疫性疾病的实验诊断和科研工作打下基础；培养科学作风特别是无菌操作的训练，为做好临床医疗和预防工作树立良好的无菌观念。

要 求

一、每次实验课前必须做好预习；明确实验的目的；了解实验的原理；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。

目 录

微生物学实验室规则	(1)
显微镜的使用和保护	(1)
常用玻璃器材的洗涤及准备	(2)

细菌学总论

实验一 细菌涂片标本的制作及革兰氏染色法	(4)
实验二 细菌的基本形态、基本构造及特殊构造	(6)
实验三 常用培养基的制备	(7)
实验四 细菌的培养法	(11)
实验五 细菌培养物的观测法	(13)
实验六 微生物的分布	(17)
实验七 外界因素对细菌的影响	(18)
一、微生物实验室常用仪器及无菌室简介	(18)
二、常用化学消毒剂简介	(21)
三、噬菌体的基本特性及效价测定	(22)
实验八 微生物的变异	(23)
✓一、光滑型与粗糙型菌落变异、毒力变异	(23)
✓二、细菌的药物敏感性试验及耐药性试验	(24)
✓三、R因子试验	(26)
实验九 细菌的致病性	(27)
一、破伤风外毒素的毒性作用	(27)
二、伤寒杆菌内毒素的毒性作用	(27)

免疫学基础

实验十 非特异性免疫	(29)
✓一、溶菌酶的溶菌作用	(29)
二、补体在溶血反应中的应用	(30)
三、小吞噬细胞的吞噬现象	(30)
四、巨噬细胞的吞噬现象及吞噬功能的测定	(31)

实验十一 常用的细胞免疫体外检测法	(31)
一、淋巴细胞花环试验	(32)
二、淋巴母细胞转化试验	(33)
实验十二 凝集反应	(35)
一、玻片凝集试验	(35)
二、试管凝集试验	(36)
三、反向间接血凝试验	(37)
实验十三 沉淀反应	(41)
一、环状沉淀试验	(41)
✓二、琼脂扩散试验	(41)
✓三、免疫电泳	(44)
✓实验十四 补体结合反应	(45)
实验十五 动物实验性过敏反应	(48)

细菌学各论

实验十六 病原性球菌	(49)
一、常见病原性球菌形态染色性	(49)
二、常见病原性球菌菌落特点	(50)
实验十七 血标本的细菌学检查	(50)
实验十八 肠道杆菌	(52)
一、大肠杆菌、伤寒杆菌、痢疾杆菌形态染色性	(52)
二、大肠杆菌、伤寒杆菌、痢疾杆菌菌落特征	(52)
三、大肠杆菌、伤寒杆菌、痢疾杆菌在双糖培养基中生长情况	(52)
四、肥达氏反应	(53)
实验十九 免疫荧光球	(55)
实验二十 需氧芽胞杆菌	(56)
一、炭疽杆菌与枯草杆菌的形态染色性	(56)
二、炭疽杆菌与枯草杆菌的培养特性	(56)
实验二十一 厌氧芽胞杆菌	(57)
一、破伤风杆菌、产气荚膜杆菌、肉毒杆菌的形态特点及染色性	(58)
二、产气荚膜杆菌在牛乳培养基中的“汹涌发酵”现象	(58)
三、产气荚膜杆菌动物实验	(58)
实验二十二 棒状杆菌	(59)
疑似白喉患者的细菌学检查	(60)
实验二十三 分枝杆菌	(62)
一、肺结核病人痰的直接镜检	(62)
二、麻风杆菌的形态染色	(63)
三、结核杆菌的培养特性	(63)

四、豚鼠结核菌素试验.....	(63)
-----------------	------

螺旋体、真菌、病毒、立克次氏体等

实验二十四 病原性螺旋体.....	(66)
一、病原性螺旋体的形态及染色性.....	(66)
二、钩端螺旋体动力观察.....	(66)
三、钩端螺旋体的凝集——溶解试验.....	(67)
实验二十五 放线菌.....	(69)
实验二十六 病原性真菌.....	(70)
一、真菌的基本形态.....	(70)
二、真菌的培养特征.....	(71)
三、浅部真菌病病理标本的检查.....	(71)
实验二十七 病毒的形态学.....	(73)
一、牛痘病毒原生小体.....	(73)
二、狂犬病病毒包涵体.....	(74)
实验二十八 病毒的培养法.....	(74)
一、鸡胚培养法.....	(75)
二、组织培养法.....	(77)
实验二十九 流感病毒的分离和鉴定.....	(79)
实验三十 乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 检测法之一——对流免疫电泳.....	(82)
实验三十一 病毒免疫荧光检查法.....	(83)
实验三十二 沙眼衣原体包涵体.....	(84)
实验三十三 立克次氏体的形态.....	(85)
实验三十四 肺炎支原体的集落.....	(86)

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、实验室内应保持安静和良好的秩序，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、如遇培养物或检验材料破损、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、用过的有菌器材（吸管、玻片、平皿、其它容器或培养物等。）切不可随处乱扔或冲入水池，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、应标记菌名、班别、组别，然后送到指定地点。

五、实验完毕，应将实验用具收入柜内，桌面整理清洁，离实验室前，用肥皂洗手，如做病原微生物实验时，应先用消毒液洗手，再用清水冲洗。

六、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。

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或石蜡油一滴，从旁观察并扭动粗螺旋使镜筒下降，使油镜头浸入油内接近标本表面，但不要碰到玻片，转动粗螺旋使镜筒徐徐向上，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。

使用油镜要加柏油或石蜡油的原理是：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折射而损失，因此能清楚地看到物象。*光线强弱*

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，应立即用擦镜纸擦去镜头上的油，若油已干，可用少许二甲苯擦净，再用擦镜纸擦干。

2. 显微镜用毕，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抑制微生物的生长，试管不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），均应先高压蒸气灭菌法灭菌半小时（若培养物中没有含芽胞的微生物也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（配制法见下）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：吸带传染性材料者，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。若系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七次以上，待干备用。

(4) 载玻片及盖玻片：用过后应分开浸入 2% 的来苏水中，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。如有油及树脂者，最好先用二甲苯拭净，然后置酒精中，最后移置于汽油中，擦干。

(5) 注射器：用过后应立即进行煮沸消毒（若含有芽胞菌者，则应用高压蒸汽灭菌），但在煮沸及高压蒸汽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，塞住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，再用不透水的厚纸包于棉塞外面，再进行高压灭菌；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中，进行高压灭菌。以上这些玻璃器材经高压灭菌后，应烤干然后才能使用。以上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，针头最好装入小试管，管底塞入少量棉花，套好、进行灭菌，（使用时，即可利用此试管保护无菌针头，且可于该试管底之棉花中排气）。

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 细菌涂片标本的制备及革兰氏染色法

要 求

掌握涂片的制备法以及革兰氏染色法。

内 容

- 一、涂片的制备。
- 二、革兰氏染色法。

一、涂片的制备

〔材料〕

1. 混合菌液一管。
2. 革兰氏染色液一套。
3. 玻片、生理盐水、接种环、牙签、酒精灯等。

〔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生理盐水置玻片一端，再用烧灼且已冷却的接种环取菌落少许置盐水中混匀，并在玻片上涂成直径约1厘米的涂片。同法将另一菌涂于玻片的另一端。（若取液体培养物作涂片，则不必先加生理盐水，直接取1~2环菌液涂片即可）。接种环必须灭菌后方可放在桌上。

2. 干燥：涂片最好在室温下自干，或将标本面向上，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，标本向上迅速通过火焰三次，温度不能太高，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，常用的有美兰及石炭酸复红染色法。复染色法，用两种以上的染料于一抹片上染色，利用各种细菌对各种染液呈现不同的反应，来鉴别不同细菌，故又称鉴别染色法。常用的有革兰氏染色法及抗酸染色法。本次实验只做革兰氏染色法。

〔方法〕

1. 按上述涂片制备的方法, 取混合菌液及自己的牙垢少许, 分别在一张玻片的两端做成涂片。

2. 在制好的涂片上, 加结晶紫染色液 1~2滴染色, 一分钟后, 用自来水轻轻冲洗, 再将涂片积水甩干。

3. 加碘化钾溶液 (又名卢戈氏液) 处理, 一分钟后水洗, 甩干。

4. 加95%酒精, 将抹片轻轻晃动, 助其脱色, 通常需30秒左右。(脱色之时间须依所作涂片之厚薄来掌握)。水洗, 甩干。

5. 加石炭酸复红稀释液复染一分钟, 水洗, 甩干。

6. 候抹片自干后或用吸水纸吸干后, 加一滴石蜡油置油镜下观察。

[结果观察]

注意标本中各种微生物的形态、大小、排列和染色性, 然后判定各种微生物的革兰氏染色性。并绘图。

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? 见实验

* [附] 一 细菌动力检查——悬滴法

[材料]

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, 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。

1. 饱和液配制法:

配制饱和液时, 可按下表多取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。

2. 常用染液配制法:

表一 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

(1) 革兰氏染色液:

革兰氏染液 (一) ——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 } 两液混合而成

革兰氏染液 (二) ——卢戈 (Lugol) 氏碘液:

碘片 1 克。 碘化钾 2 克。 蒸馏水 300 毫升。

革兰氏染液 (三) ——95% 酒精。

革兰氏染液 (四) ——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:

{ 取碱性复红酒精饱和液 10 毫升 (95% 酒精 100 毫升, 加碱性复红 5—10 克)
 { 再取 5% 石炭酸水溶液 90 毫升

(2) 碱性美兰染液:

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

√ 实验二 细菌的基本形态、基本构造及特殊构造

要 求

认识细菌的基本形态、基本构造及特殊构造。

内 容

- 一、细菌的基本形态。
- 二、细菌的基本构造。
- 三、细菌的特殊构造。

一、细菌的基本形态

1. 球菌: 葡萄球菌 (革兰氏染色), 革兰氏阳性 (紫色), 球形, 排列无一定规律, 常堆集成葡萄状, 因而得名。
2. 杆菌: 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，无一定的排列。

3. 弧菌：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，无一定的排列。

二、细菌的基本构造

1. 白喉杆菌（吕氏美兰染色）：白喉杆菌菌体呈浅兰色，异染颗粒呈深兰色。
2. 白喉杆菌（奈瑟氏染色）：白喉杆菌菌体呈黄褐色，异染颗粒呈深紫色。

三、细菌的特殊构造

1. 鞭毛：如变形杆菌，用鞭毛染色法，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，用革兰氏染色法，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之空圈即荚膜所在处。

3. 芽胞：如破伤风杆菌，用革兰氏染色法，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芽胞，形似火柴状。

鞭毛、荚膜、芽胞均为细菌的特殊构造，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，远比繁殖体为大，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？

实 验 三 常用培养基的制备

培养基是微生物的人工营养物，是根据微生物生长繁殖的要求（特别是营养条件、pH、渗透压等）用人工方法将下列诸物混合而成。如牛肉汤、蛋白胨、氨基酸、碳水化合物、水、无机盐等。培养基的用途是分离及培养微生物，制造生物制品，研究微生物的生物化学活动，测定微生物的不同营养要求，以助传染病的诊断，预防和治疗。

要 求

掌握制备培养基的基本原则及了解制备的方法。

内 容

- 一、肉汤培养基的制备。
- 二、肉汤琼脂固体、半固体培养基的制备。
- 三、血液琼脂培养基的制备。

四、蛋白胨水的制备。

一、肉汤培养基的制备

1. 取新鲜牛肉，去脂肪及筋膜等结缔组织后，用绞肉机绞碎，每 500 克加蒸馏水 1000 毫升置于容器中，在冰箱内浸一夜。

2. 次日取出煮沸半小时，待冷，用纱布或龙头细布过滤，去渣，计量滤液体积以水补足至原来容量。

3. 根据滤液量，每 100 毫升中加食盐 (NaCl) 0.5 克，蛋白胨 1 克，使其溶解。

4. 测定并调整 pH，使其为 7.8。（方法见附录）煮沸 10 分钟。

5. 将滤液分装于试管内或三角瓶中，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）。

6. 高压灭菌后，还要取一管复测 pH，若 pH 不对应重新调整，若 pH 适合，则可注明制作日期放冰箱保存待用。

肉汤培养基为基础培养基之一，可作为固体、营养、鉴别或选择培养基的基础。一般病原菌可在肉汤培养基内生长繁殖。

二、肉汤琼脂固体、半固体培养基的制备

在上述液体培养基中加入 2% 琼脂即成肉汤琼脂固体培养基。（若只加 0.25~0.5% 的琼脂则为半固体培养基）。

1. 取 100 毫升肉汤培养基，加 2 克或 0.5 克的琼脂，加热至琼脂溶化、调整 pH 为 7.6。

2. 将上液分装于试管内或三角瓶中，塞好棉塞，用油纸或牛皮纸扎好，高压蒸汽灭菌（15 磅 15 分钟）。

3. 趁热琼脂未凝固前，将试管斜置、冷凝后即成普通琼脂斜面培养基。或待肉汤琼脂冷至 50~60°C 时，以无菌技术倾入无菌的空培养皿中，冷凝后即成普通琼脂平板。

三、血液琼脂培养基的制备

将上述的肉汤琼脂，令其冷至 45°C 左右时，加入 5~10% 脱纤维羊血或兔血，则可制成血琼脂平板。

四、蛋白胨水的制备

此培养基中，不含糖类，可供作糖类鉴别培养基的基础。

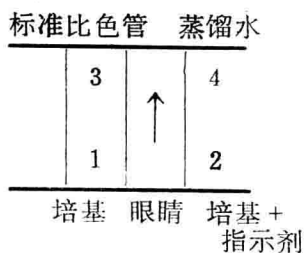
1. 取蛋白胨 1 克，NaCl 0.5 克，溶于 100 毫升蒸馏水中。

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）。

〔附〕 — pH调整法:

1. 取三支与标准比色管相同大小的试管，一管内盛蒸馏水 5 毫升（管 4），另二管各加欲测定的培养基 5 毫升，其中有一管加入 0.02% 的酚红指示剂 0.25 毫升（管 2），未加酚红者为管 1。



2. 将上述试管与标准比色管（管 3）分别插入比色箱中。（如图一）

3. 举起比色箱，对光观察两侧颜色是否相等，如不相等，则调换标准比色管至两侧颜色相等为止。此时标准比色管上所记录之 pH，即代表待测培养基之 pH。

4. 若待测培养基的 pH 低于 7.8，可用 N/20 NaOH 矫正之，即先将 pH 7.8 之标准比色管插入“3”中，再用 N/20 NaOH 徐徐滴入“2”中，边滴边振摇

试管，使混合均匀，直至两侧颜色相等，记录所用之 N/20 NaOH 的量。

5. 矫正全量培养基的 pH 时，可改用 1 N NaOH，计算法如下：

若 5 毫升培养基用去 N/20 NaOH 溶液 2 毫升，pH 为 7.8，则全量 1000 毫升需用 $(1000 \div 5) \times 2 = 400$ 毫升 N/20 NaOH，改用 1 N NaOH 则只需 $400 \div 20 = 20$ 毫升。

如培养基所需之 1 N NaOH 量 = X

矫正 5 毫升培养基所用 N/20 NaOH 之量 = W

$$\text{则: } X = \frac{\text{培养基量 (毫升)} \times W}{5 \text{ (毫升)}} \div 20$$

算出 X 值，按其量加 1 N 的 NaOH 液于全量培养基内。

二 标准比色管之配制

1. 指示剂的制备:

先称取干指示剂 0.1 克，置于研钵中磨成粉末，依下列所示，滴加 N/10 NaOH 溶液，再用蒸馏水加至规定浓度即可。例如称取酚红粉末 0.1 克，于研钵中研磨，滴加 N/10 氢氧化钠 2.82 毫升，然后加入蒸馏水至 500 毫升，即成 0.02% 的酚红原液。

表二 指示剂适合各种氢离子表

指示剂	色调改变 酸 → 硷	pH 感应界	水溶液 保存原液 (%)	稀释时 0.1 克 指示剂加 N/10 NaOH 量
溴酚兰 Bromphenol blue	黄 → 兰	3.0 ~ 4.6	0.04	1.49 毫升
甲基红 Methyl red	红 → 黄	4.4 ~ 6.0	0.02	

溴甲酚紫 Bromcresol purple	黄→红	5.2~6.8	0.04	1.85毫升
酚红 Phenol red	黄→红	6.8~8.4	0.02	2.82毫升
碱性麝香草酚兰 Thymol blue alkaline	黄→兰	8.0~9.6	0.04	2.15毫升
溴麝香草酚兰 Bromthymol blue	黄→兰	6.0~7.6	0.04	1.60毫升
中性红 Neutral red	红→黄	6.8~8.0		

2. 缓冲液的制备:

常用法之一——Soerensen氏法。用无水磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 和磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 配合而成, 先将两盐均配制成M/15溶液, 即无水磷酸氢二钠11.876克加水溶解成1000毫升, 磷酸二氢钾9.078克加水溶解至1000毫升, (水内应不含氨离子)。用吸管按下表加两液, 其量务必精确。标准比色管须每隔1个月换一次。每管加塞, 并以石蜡密封。

表三 无水磷酸氢二钠和磷酸二氢钾缓冲液配合表

pH	M/15 Na_2HPO_4 (毫升)	M/15 KH_2PO_4 (毫升)	0.02% 酚红指示剂 (毫升)
8.4	98.0	2.0	5
8.2	96.8	3.2	5
8.0	95.0	5.0	5
7.8	92.0	8.0	5
7.6	88.0	12.0	5
7.4	82.0	18.0	5
7.2	73.0	27.0	5
7.0	62.0	38.0	5
6.8	50.0	50.0	5
6.6	37.0	63.0	5
6.4	26.0	74.0	5
6.2	18.0	82.0	5
6.0	12.0	88.0	5

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 细菌的培养法

根据各细菌生物学特性的不同，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。

要 求

掌握细菌分纯及接种的方法，和接种时的无菌技术。

（把二种以上细菌分离开来的技术称为分离培养法，最常用的是琼脂平皿划线法。）

内 容

- 一、平板划线法。
- 二、斜面培养基接种法。
- 三、液体培养基接种法。
- 四、半固体穿刺接种法。

〔材料〕

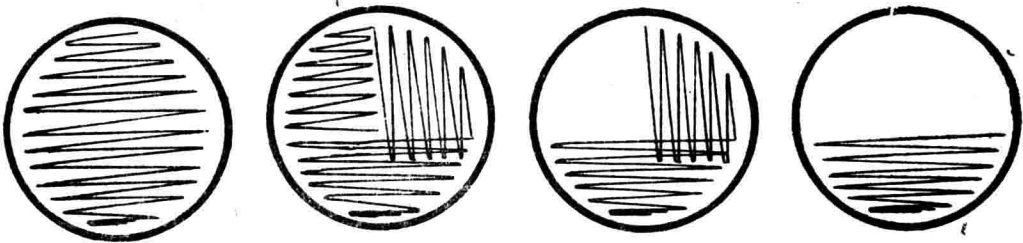
1. 菌种：葡萄球菌菌液，大肠杆菌菌液，产气杆菌菌液。
2. 培养基：普通琼脂平板，蛋白胨水培养基，枸橼酸盐培养基，尿素培养基。

〔方法〕

一、平板划线法

右手拿接种环，烧灼冷却后，取待检标本少许，左手拿琼脂平板培养基，略开盖，将标本涂于琼脂平板表面之一侧边缘，作原划线，然后再烧灼接种环，冷却后自原划线末端沾取少许标本，使接种环与平板成30~40度角，运用腕力用接种环在平板上来回划线。划线要密但不能重叠，也不应划破琼脂表面，并注意无菌技术，避免空气中细菌的污染。

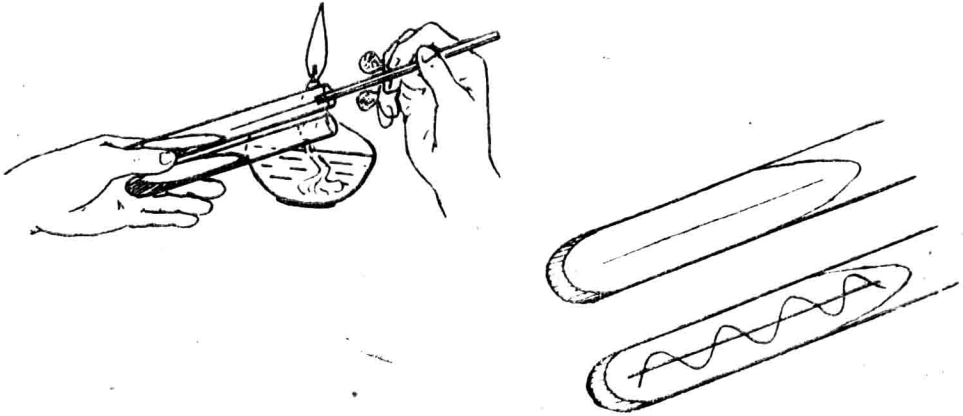
也可用分区划线法，即同上法原划线沾取标本后只划平板的 $\frac{1}{4}$ ~ $\frac{1}{5}$ ，划毕再用火焰灭菌，冷后同样划线，共计4~5次。接种环烧灼灭菌后方可放下。



图二 平板划线法

二、斜面培养基接种法

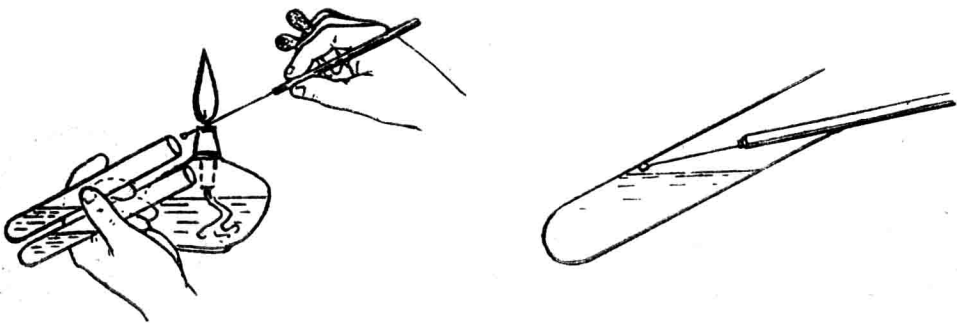
1. 右手拿接种针，烧灼冷却后，取待检材料少许，左手拿斜面培养基管，用右手小拇指与手掌夹住培养基管的棉塞，在火焰旁拨开，并将管口通过火焰数次。
2. 将接种针直刺培养基中心，然后从原刺入线退出，然后再在斜面上划线，划毕接种针火焰灭菌。管口通过火焰，塞好棉塞（此法多用于双糖培养基的接种）。亦可用接种环取菌在斜面上自下而上划一直线，然后再从下至上来回划线（见右图）。



图三 斜面培养基接种法

三、液体培养基接种法

1. 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，右手持接种环并以第四指与小指夹住甲管之棉塞，小指与手掌夹住乙管之棉塞，在火焰旁拨开，并将管口通过火焰数次。
2. 将烧灼过的接种环插入甲管，待冷后，取菌液一环，立即移入乙管并插入培养基中。



图四 液体培养基接种法

3. 管口通过火焰，塞上棉塞。接种环须烧灼灭菌后方可放下。