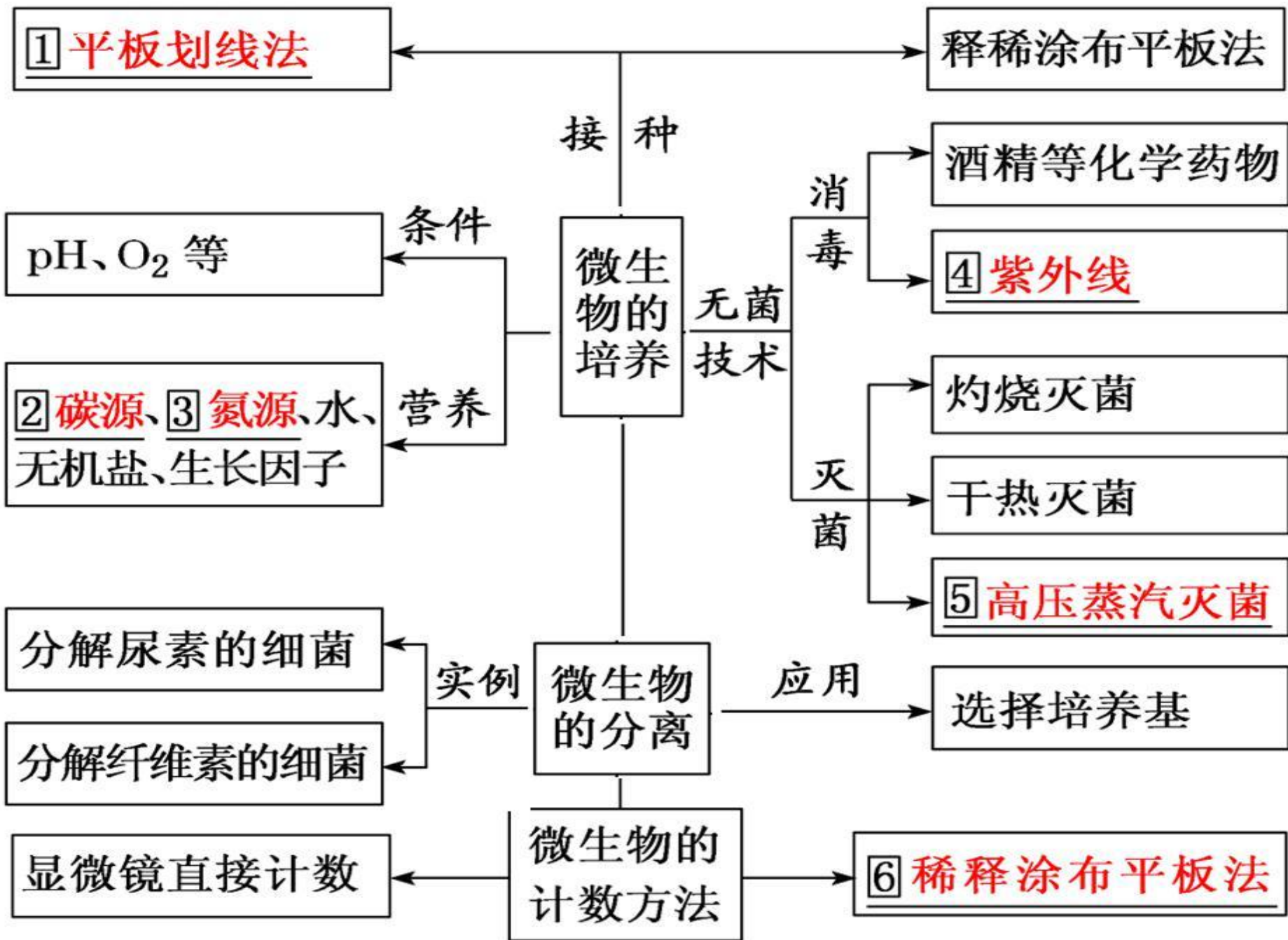


第三章 无菌操作技术实践

微生物的培养、分离和计数（二轮复习）



考点·

1. 培养基

标准	培养基类型	配制特点	主要应用
物理性质	固体培养基	加入琼脂较多	菌种分离, 鉴定, 计数
	半固体培养基	加入琼脂较少	菌种保存
	液体培养基	不加入琼脂	工业生产, 连续培养
化学组成	合成培养基	由已知成分配制而成, 培养基成分明确	菌种分类、鉴定
	天然培养基	由天然成分配制而成, 培养基成分不明确	工业生, 产降低成本
目的用途	鉴别培养基	添加某种指示剂或化学药剂	菌种的鉴别
	选择培养基	添加(或缺少)某种化学成分	菌种的分离

按化学成分来分，可分为**天然培养基**和**合成培养基**。

a. **天然培养基**：采用动植物组织或微生物细胞以及它们的提取物或粗消化物配置而成。（如**牛肉膏蛋白胨培养基**）

优点：取材便利、营养丰富、配制简便

缺点：成分复杂、实验结果的重复性较差

b. **合成培养基**：由准确称量的分析纯等级别的高纯度化学试剂加蒸馏水配制而成，（如**葡萄糖铵盐培养基**）

优点：化学成分及含量明确、实验可重复性好。

缺点：配制繁琐，成本较高。

按功能来分，可分为**选择培养基**和**鉴别培养基**。

a. 选择培养基：

加入青霉素的培养基：分离酵母菌、霉菌等真菌

加入高浓度食盐的培养基：分离金黄色葡萄球菌

不加氮源的无氮培养基：分离固氮菌

不加含碳有机物的无碳培养基：分离自养型微生物

b. 鉴别培养基（如伊红美蓝乳糖培养基）

当大肠杆菌分解乳糖产酸时细菌带正电荷被染成红色，再与美蓝结合形成紫黑色菌落，并带有绿色金属光泽。常用的伊红美蓝乳糖培养基，可用来鉴别饮用水和乳制品中是否存在大肠杆菌等细菌

2. 培养基的成分（导学单导思1.1）

（1）碳源

- ①无机碳源： CO_2 、 HCO_3^- 等，适于自养生物。
- ②有机碳源：葡萄糖、牛肉膏、蛋白胨等，适于异养生物。

（2）氮源

- ①无机氮源： N_2 、氨盐、硝酸盐等
- ②有机氮源：牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、尿素等

（3）水

- （4）无机盐： KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgSO_4 、 CaCl_2 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 NaCl 、 FeSO_4 等。

- （5）特殊营养物质（如维生素、生长因子、动物血清等）。

	概念	来源	功能
碳源	能够提供C元素的物质	有机C源：葡萄糖、牛肉膏、蛋白胨、脂肪酸、花生粉饼、石油等等。 无机C源： CO_2 、 CO_3^{2-} 、 HCO_3^-	构成生物体的细胞物质和一些代谢产物，有些是异养生物的能量物质
氮源	能够提供N元素的物质	有机氮源：牛肉膏、蛋白胨、尿素等 无机氮源： NH_4^+ 、 NO_3^- 、 N_2 、 NH_3	合成蛋白质、核酸以及含氮的代谢产物

注：含C、H、O、N的有机物是异养型微生物的碳源、氮源、能源

3. 培养基的配制（导学单导思2.1）

计算→称量→溶化→调节pH→分装→包扎→灭菌→倒平板（或搁置斜面）

关键步骤1

溶化：牛肉膏、称量纸、少量水加热溶解→蛋白胨、NaCl→琼脂、搅拌→补水定容

关键步骤2

调pH、分装、包扎：加棉塞、包牛皮纸、橡皮筋勒紧



关键步骤3

灭菌：培养基高压蒸汽灭菌，培养皿干热灭菌，接种环火焰灼烧灭菌

关键步骤4

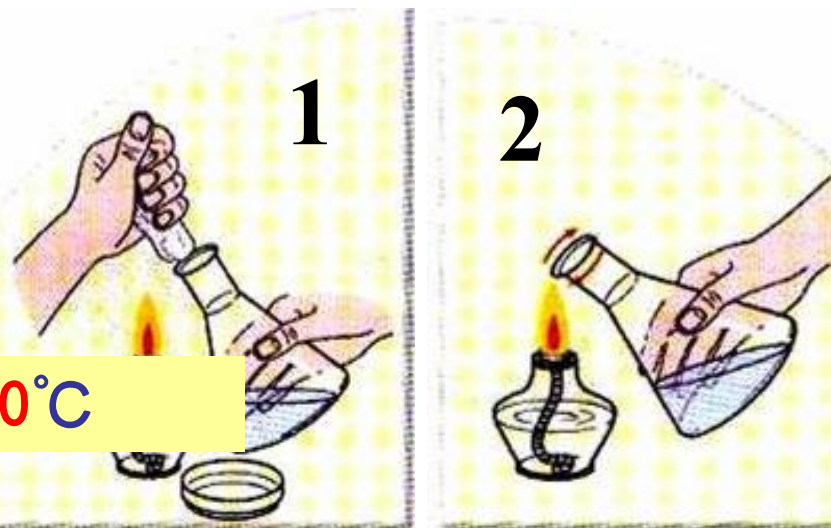
搁置斜面或倒平板

搁置斜面：待试管冷却至**50℃**左右，将试管口部枕在高约1cm的木条或其他合适高度的物体上，使其自然倾斜，**斜面长度不超过试管总长的1/2**，**固体斜面培养基可用于临时保存菌种。**

倒平板：（导学单导思2.2-2.3）

1.将培养皿放在**火焰旁**的桌面上，右手拿装有培养基的锥形瓶，左手拔出棉塞。

培养基灭菌后，需**冷却**到什么时候，才能用来倒平板？
约**50℃**



2.右手拿锥形瓶，使瓶口迅速**通过火焰**。

为什么这样操作？

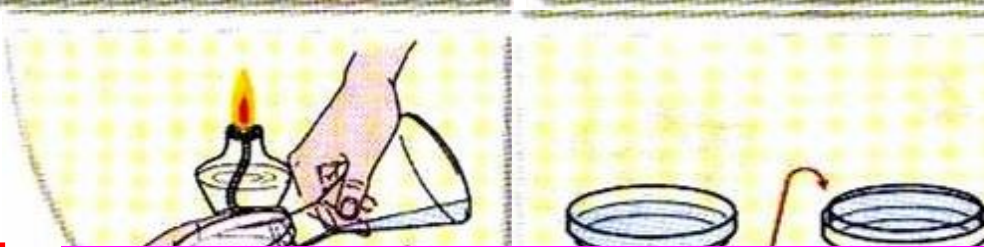
灼烧灭菌，防止瓶口的微生物污染培养基

4.等待平板**冷却凝固**（约需5~10min）。然后，将平板**倒过来**放置，使皿盖在下，皿底在上。

为什么**平板需倒置**？

防止皿盖上的水珠落入培养基，造成污染

3.用左手将培养皿打开一条稍大于瓶口的**缝隙**，右手将锥形瓶中的培养基(约10~20mL)倒入培养皿，左手**立即盖上皿盖**。



倒平板注意事项：

- ①**温度**：50℃左右
- ②**操作**：在酒精灯火焰附近
- ③**冷凝后平板倒置**

无菌检查：37℃的**恒温箱**中培养12h~24h，无杂菌污染才可用来接种。

例题1. 做“微生物的分离与培养”实验时, 下列叙述正确的是 **D**

A. 高压灭菌加热结束时, 打开放气阀使压力表指针回到零后, 开启锅盖

B. 倒平板时, 应将打开的皿盖放到一边, 以免培养基溅到皿盖上

C. 为了防止污染, 接种环经火焰灭菌后应趁热快速挑取菌落

D. 用记号笔标记培养皿中菌落时, 应标记在皿底上

考点二. 无菌技术(导学单导思1.3-1.4)

(1) 消毒和灭菌

消毒和灭菌的区别及方法

重点

项目	条件	结果	常用方法	应用范围
消毒	温和	杀死部分微生物	煮沸消毒法	日常用品
			巴氏消毒法	牛奶
			化学药剂消毒法	双手、水源
			紫外线消毒法	接种室
灭菌	强烈	杀死所有的微生物(包括芽孢和孢子)	灼烧灭菌法	接种工具
			干热灭菌法	培养皿、金属工具
			高压蒸汽灭菌法	培养基及容器

高压蒸汽灭菌锅的使用 结构：



使用步骤:

加水: 适量水

装锅: 不能过满; 对称方法旋紧固定螺栓

加热排气: 排出冷空气, 充分排出后关闭排气阀

保温保压: 100kPa, 121 °C, 20-30min

出锅: 压力表指针为0, 温度下降, 打开排气阀, 旋开固定螺栓, 开盖, 取出物品。

(注意: 压力表0以上, 温度100 °C以上开启, 会因压力骤然降低而造成培养基剧烈沸腾, 并冲出试管口或瓶口, 污染棉塞, 引起杂菌污染。)

2. 无菌操作--防止杂菌污染

- (1) 为避免周围微生物污染，实验操作应在酒精灯火焰附近进行；
- (2) 避免已灭菌处理的材料用具与周围物品相接触。
- (3) 出锅要等压力表指针为0，温度下降后，打开排气阀，旋开固定螺栓，开盖，取出物品。
- (4) 拔出棉塞后，再次塞上棉塞前，瓶口、试管口等要过火焰。
- (5) 倒平板时，培养皿打开一条稍大于瓶口的缝隙。
- (6) 平板冷却凝固后要倒置
- (7) 接种时接种环使用前后都要灼烧
- (8) 平板划线时不能划破培养基表面。
- (9) 微生物接种培养时要设置空白对照组。

例题2. 下列关于微生物实验操作的叙述，错误的是（ A ）

- A. 培养微生物的试剂和器具都要进行高压蒸汽灭菌
- B. 接种前后，接种环都要在酒精灯火焰上进行灼烧
- C. 接种后的培养皿要倒置，以防培养污染
- D. 菌种分离和菌落计数都可以使用固体培养基

考点三. 接种方法 (导学单导思2.3-2.4)

(1)接种针: 穿刺接种

(2)接种环: 斜面试种或平板划线接种

(3)玻璃涂布器: 涂布平板接种

一. 平板划线法

1. 概念:

平板划线法:通过接种环在琼脂**固体培养基**表面**连续画线**的操作,将聚集的菌种**逐步稀释**分散到培养基的表面.在数次画线后,可以分离到由**一个细胞**繁殖而来的肉眼可见的子细胞群体,这就是**菌落**。

2. 步骤:



将**接种环**放在火焰上**灼烧**，直到接种环烧红



在火焰旁**冷却**接种环，并打开棉塞



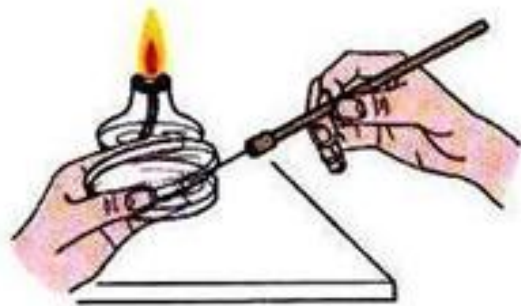
将试管口**通过**火焰



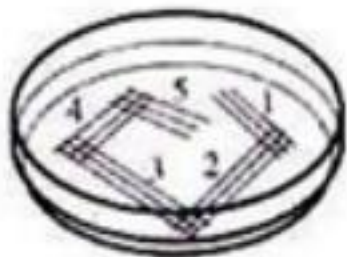
将已冷却的接种环伸入菌液中蘸取一环菌液



将试管**通过火焰**，并塞上棉塞



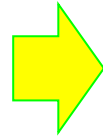
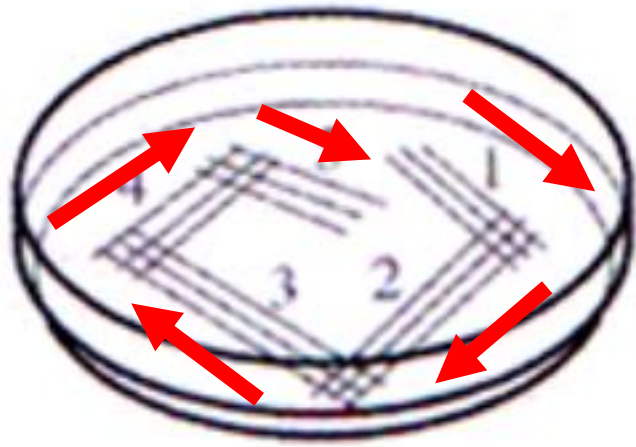
左手将皿盖**打开一条缝隙**，右手将沾有菌种的接种环迅速伸入平板内，划**三至五**条平行线，盖上皿盖。**注意不要划破培养基。**



灼烧接种环，待其**冷却后**，从第一区域划线的**末端**开始往第二区域内划线。重复以上操作，在三、四、五区域内划线。**注意不要将最后一区的划线与第一区相连，相邻两区要相连。**



将平板**倒置**放入培养箱中培养。



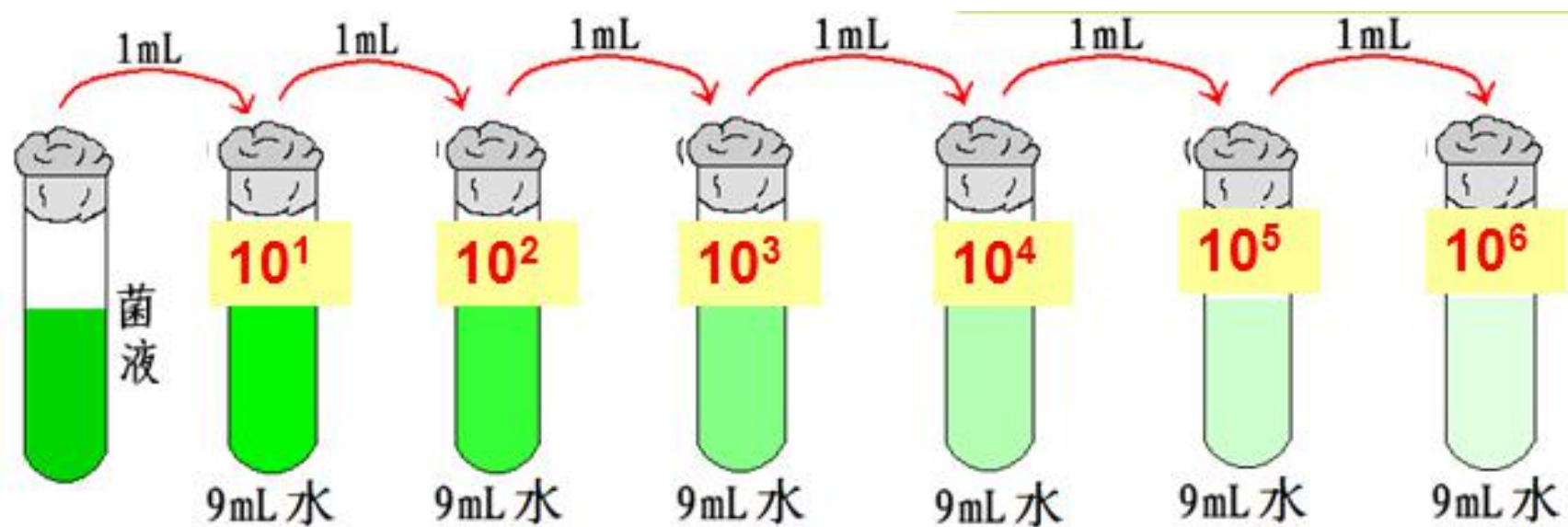
二. 稀释涂布平板法

(1) 概念与原理:

聚集的微生物 $\xrightarrow[\text{涂布平板}]{\text{菌液梯度稀释}}$ 单个细胞 $\xrightarrow{\text{生长繁殖}}$ 单个菌落

(2) 操作步骤: 系列稀释、涂布平板操作

①系列稀释操作:



②涂布平板操作：



1、将涂布器浸在盛有**酒精**的烧杯中



3、将沾有少量酒精的涂布器在火焰上引燃，待酒精燃尽后，**冷却8-10s。**



2、取**0.1ml**稀释液滴加到培养基表面



4、用涂布器将菌液均匀地涂布在培养基表面。涂布时可转动培养皿，使**涂布均匀**

如果过少，菌液不易涂布开；过多则在涂布完后或在培养时菌液仍会在平板表面流动，不易形成单菌落。

(3) 培养及结果

培养：各梯度分别涂布3个平板，1个不涂布作空白对照放入37℃恒温箱中培养12h~24h

结果：利用选择培养基筛选和分离某种微生物，然后利用稀释涂布平板等方法在固体培养基上培养一个个微生物形成的**单个菌落**。

注：菌落是指**单个**或少数细菌在固体培养基上大量繁殖时，会形成一个肉眼可见的，具有**一定形态结构**的子细胞群体。

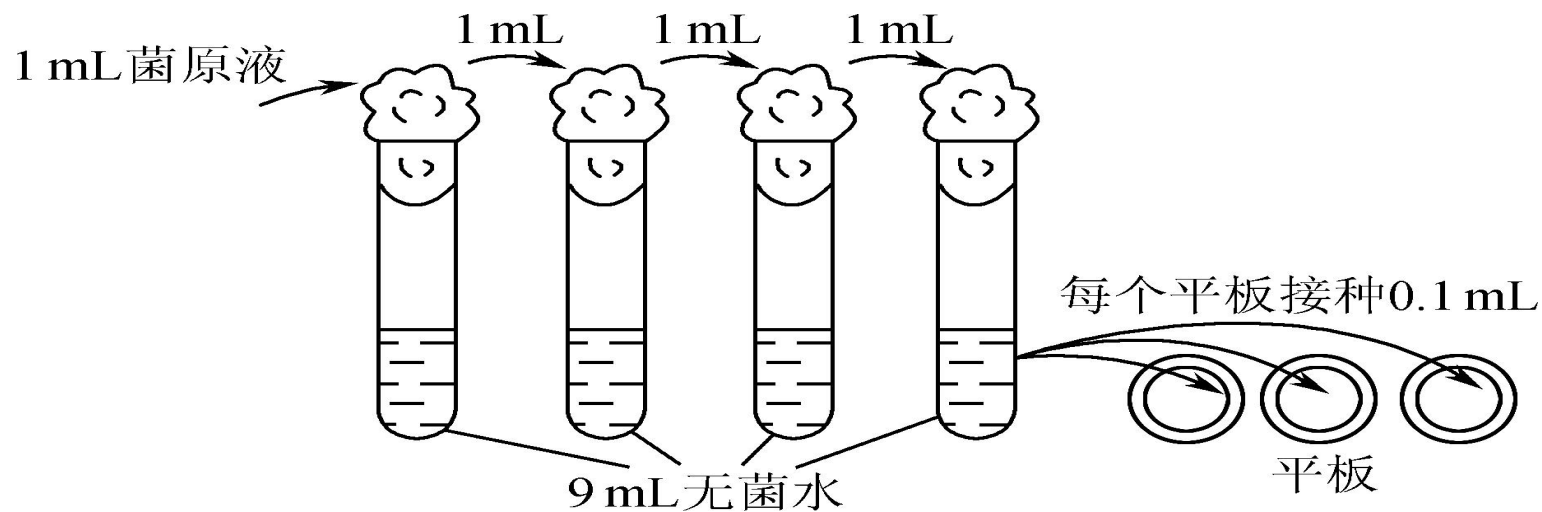


(4) 计数

- ①为了保证结果准确，一般选择菌落数在**30——300**的平板上进行计数。
- ②为使结果接近真实值可将同一稀释度加到三个或三个以上的平板中，经涂布，培养计算出菌落**平均数**。
- ③统计的菌落往往比活菌的实际数目**低**。

Q1: (四校联考) 若锥形瓶中大肠杆菌密度为 3×10^7 个/ml, 至少需将培养液中的菌液稀释 **10⁴** 倍才能接种。

Q2: 为确定合适的稀释倍数, 小组成员取1 mL菌原液进行如下图所示的操作, 在统计菌落时, 发现平板上的平均菌落数为40个, 则每毫升菌原液中的细菌数大约为 4×10^6 个。



平板划线法与稀释涂布平板法比较：

	平板划线法	稀释涂布平板法
相同点	分离纯化、观察菌落特征	
不同点	不可计数	可以计数

例3. 下图表示培养和纯化X细菌的部分操作步骤, 下列有关叙述正确的是(**B**)



- A. 步骤①操作时,倒好平板后应立即将其倒置,防止水蒸气落在培养基上造成污染
- B. 步骤②接种环和试管口应先在火焰上灼烧,接种环冷却后再放入试管中蘸取菌液
- C. 步骤③沿多个方向划线,使接种物逐渐稀释,培养后可根据出现的单个菌落计数
- D. 步骤④是将培养皿放在恒温培养箱中培养,一段时间后所得到的都是X细菌的菌落

例题4. (20年江苏卷) 为纯化菌种，在鉴别培养基上划线接种纤维素降解细菌，培养结果如图所示。下列叙述正确的是 **B**

- A. 倒平板后需间歇晃动，以保证表面平整
- B. 图中 I、II 区的细菌数量均太多，应从 III 区挑取单菌落
- C. 该实验结果因单菌落太多，不能达到菌种纯化的目的
- D. 菌落周围的纤维素被降解后，可被刚果红染成红色

