

细菌的分离培养技术

一、常用培养基的制备

(一) 肉膏汤培养基 (broth medium)

1、成分 牛肉浸膏 3~5g 蛋白胨 10g 氯化钠 5g 蒸馏水 1000ml

2、制法

(1) 于 1000ml 蒸馏水中加入上述成份，混合加热溶解。

(2) 调整 pH 为 7.4~7.6，煮沸 3~5min，用滤纸过滤。

(3) 分装于适当容器内，高压灭菌 103.43Kpa 20min，置阴暗处或冰箱中贮存备用。

3、用途 供一般细菌培养之用，亦可制备糖发酵管及琼脂培养基用。

(二) 肉浸汤培养基(infusion medium)

1、成分

(1)新鲜牛肉(去脂绞碎)500g 蛋白胨 10g

(2)氯化钠 5g 蒸馏水 1000ml

2、制法

(1) 取新鲜牛肉(兔肉)除去肌腱、肌膜及脂肪，切成小块后用绞肉机绞碎或用手剁碎，置于搪瓷或铝制锅中，每 500g 碎肉加水 1000ml 混合后置冰箱中过夜。

(2) 次日取出肉浸液，搅拌均匀，煮沸 30min 并常搅拌以免沉淀烧焦。如蛋白质已凝固，即停止加温，补足失去水分。

(3) 用纱布或绒布挤压过滤，使所有肉汁尽量挤出，再用脱脂棉滤入大三角烧瓶内。

(4) 在滤液中加入蛋白胨(10g/L)、氯化钠(5g/L)，再加热使其全部溶解。

(5) 调整 pH 至 7.6~7.8，煮沸 10min，以滤纸过滤。

(6) 分装三角烧瓶，塞好棉塞，再用厚纸将瓶口扎好，高压灭菌 103.43KPa 20min，冷却后置阴暗或冰箱中保存备用。

3、用途

供作基础培养基用，营养较肉膏汤好。一般营养要求不高的细菌均能生长。

(三) 普通琼脂培养基(agar medium)

1、成分

牛肉浸膏 3~5g 蛋白胨 10g 氯化钠 5g 琼脂 20~25g

蒸馏水 1000ml

2、制法

(1)将上述成分置于三角烧瓶中，煮沸使其溶解(须防止外溢)，并补足由于蒸发失去的水分。

(2)趁热调整 pH 至 7.6，以绒布过滤，分装试管或烧瓶内，高压灭菌 103.43KPa 15min。

(3)琼脂斜面培养基制法：高压灭菌后，趁琼脂尚未凝固前，将其分装在已灭菌的试管内，斜放在台面上，待凝固后即成琼脂斜面培养基。

琼脂平板培养基制法：经高压灭菌后的培养基冷却至 50~55℃时，打开瓶口棉塞，将琼脂倒入已灭菌的平皿内(直径 9cm 的平皿约需培养基 20ml)，待凝固后即成琼脂平板培养基。平板培养基制成后，通常都是倒置的，这种放置既便于取放，又有利于避免水分蒸发，以及保持无菌状态。普通琼脂培养基亦可用市售的营养琼脂粉制备。取 4.5g 营养琼脂粉加蒸馏水 100ml，高压蒸汽灭菌后倾注平皿即成。

3、用途 供一般细菌培养用，并可作无糖培养基。

(四) 半固体琼脂培养基(soft agar medium)

1、成分

(1)牛肉浸液(或牛肉膏汤)100ml

(2)琼脂 0.25~0.5g

2、制法

(1)将琼脂加于肉 浸液中，加热溶化。

(2)以绒布过滤并分装试管，每管约 1~1.5ml。

(3)高压灭菌 103.43KPa 20min 后，直立放置，待凝固后即成高层培养基，保存备用。

3、用途 保存一般菌种用，并可观察细菌的动力。

(五) 血液琼脂培养基(blood agar medium)

1、配方一：

(1)成分：

①普通琼脂培养基 100ml

②脱纤维羊血(兔血)8~10ml

(2)制法

①将高压灭菌后的普通琼脂培养基(pH7.6)加热融化。

②冷至 50℃左右，以无菌操作加入无菌脱纤维羊血(临用前置 37℃水箱中预温 30min)8~10ml，轻轻摇匀(防止产生气泡)，倾注于灭菌平皿内或分装试管内，制成血琼脂平板或血琼脂斜面培养基。

③待凝固后，抽样于 37℃培养 18~24h 行无菌试验，若培养基上无细菌生长即可使用或保存于 4℃冰箱内备用。

(3)用途 供分离营养要求较高的病原菌用。

2、配方二：

(1)成分

牛肉膏(pH7.8)800ml

硫酸镁(493g/L)8ml

脱纤维羊血 80ml

琼脂 21~23g

5g/L 对氨基苯甲酸 8ml

(2)制法

①将肉膏汤置于三角烧瓶内，加入硫酸镁、对氨基苯甲酸及琼脂，混合并使液体浸湿琼脂。

②加热溶解，或置于 103.43kPa 高压灭菌器内 30min(可达融化与灭菌的目的)。

③取出后冷至 50℃左右，以无菌操作加入无菌脱纤维羊血或兔血，轻轻摇匀，倾注平板，凝固后，抽样经 37℃培养 18~24h，如无细菌生长，冷藏备用。

(3)用途：供已使用过抗生素及磺胺药的病人标本分离培养。

(六) SS 琼脂培养基(Salmonella-Shigella medium)

1、成分

这是一种选择性培养基，SS 琼脂培养基配方较多，其基本原理一致。

2、制法

(1)将牛肉膏、蛋白胨和琼脂加入水中，加热溶解。

(2)加入胆盐、乳糖、柠檬酸钠及柠檬酸铁，微微加热，使之全部溶解。

(3)调整 pH 至 7.2 后，用绒布或脱脂棉过滤。

(4)加入煌绿和中性红水溶液，再煮沸一次(无需高压灭菌)，待冷至 55℃左右倾注平板，凝固后将平板置 37℃温箱中干燥 30min 后应用或冰箱保存备用。

3、用途 供分离培养肠道致病菌用。

(七) 吕氏血清斜面培养基(Loeffler medium)

1、成分

(1)10g/L 葡萄糖肉浸液 100ml

(2)动物血清(马、牛、羊等)300ml

2、制法

(1)用 pH7.4 肉浸液 100ml, 加入 1g 葡萄糖, 溶解后与动物血清混合, 分装于中试管内, 每管 4~5ml。

(2)放于血清凝固器内制成斜面, 加热至 80℃并维持 30min, 待血清充分凝固, 但加热不能过高过快, 否则其表面易产生气泡。于第二 d 和第三 d 继用 85℃灭菌 1h。

(3)制成后进行无菌试验。

3、用途 供分离培养白喉杆菌用。

二、细菌培养技术

(一) 平板划线分离培养法

1、原理与应用

通过划线, 将混杂的细菌在平板表面逐一分散, 经培养后, 各自形成菌落(colony)。根据菌落形态、特征挑选单个菌落, 移种培养后, 即得到纯种细菌。

2、材料

琼脂平板培养基(简称普通平板)。

含菌标本(如脓汁、粪便与分泌物等)。

3、方法

操作前先在盛培养基的平皿底上注明检查标本的名称(或编号)、接种日期及检查者的组别与代号。

平板划线法有几种, 可根据不同情况选用其中一种。

(1)平行划线法。(见图 20-1) 此法适用于含菌不多的液体标本, 如脑脊液(CSF)、腹水、分泌物、脓汁以及稀薄的菌液等。

①左手斜持平板底, 右手持接种环。接种环在火焰上灭菌, 冷却后, 沾取一接种环标本, 先在平板的一端涂开, 并从此处开始向下划密集的平行线, 约占平板面积的一半。

②将平板转 180°角, 从平板另一端开始也划密集的平行线, 直到划满平板的剩余部分。

将平板底放入盖内, 接种环火焰灭菌后放下, 将平板倒置, 37℃培养。

(2)分区划线法。(见图 20-2)此法适用于含菌多的检测标本，如粪便，咯痰、细菌固体培养物等。

①划线前的操作同平行划线法。先在平板的一端将标本涂开并在平板的 1/5~1/4 面积上划密集的平行线，接种环火焰灭菌。

②将平板转约 70°角，待接种环冷却后，使接种环通过已划线的 1 区 5~7 次，以后即不与 1 区接触作连续密集划线，约占平板面积的 1/4，接种环再通过火焰灭菌。

③再转平板约 70°，如上法在第 3 区划线，此后接种环不再灭菌。

④重复上述操作在第 4 区划线，划满余下的培养基表面。将平板底放入盖内，接种环灭菌后放下，置 37℃培养。

4、结果

(1)培养后在第 1、2 区可观察到密集的细菌菌苔。

(2)在第 3、4 区可见单个细菌菌落(在划线上)。

(二) 纯种细菌移种技术

1、斜面培养基移种技术

(1)材料

琼脂斜面培养基

经分离培养的平板培养物。

(2)方法

①在琼脂斜面培养基试管上部标明移种的菌名(或编号)、接种日期、接种者的组别及代号。

②左手持长有细菌的平板底，右手持接种环。接种环在火焰上灭菌冷却后，沾取平板划线上发育良好的孤立菌落。把平板放回原处，立即用此手取斜面培养基斜持，用右手小指与手掌夹持棉塞，轻轻转动后拨出棉塞，管口通过火焰灭菌。

③将已沾菌的接种环伸入斜面培养基的管底部的凝固水，沿斜面培养基的表面从底向上划一直线，然后再从底部向上划连续曲折线；也可不划直线只划曲折线。取出接种环，管口通过火焰灭菌，塞好棉塞，放试管架上，接种环火焰灭菌后放下。

向斜面培养基上移种的细菌如果是生长在斜面培养基上的，或是生长在液体培养基中的，则用左手同时斜持菌种管和斜面培养基两个管，右手无名指、小指手掌同时拨起夹持二个棉塞。管口及接种环先经火焰灭菌后，从菌种管取菌立即移种到斜面上，塞好棉塞，接种环火焰灭菌后放下(见图 20-4)。然后将斜面培养基放 37℃恒温箱中培养 24h。3、结果斜面表面形成菌苔

2、液体培养基移种技术

用于纯种细菌的增菌及观察细菌在液体环境中的生长特征(混浊生长, 表面生长或沉淀生长)

(1)材料

肉汤培养基

斜面培养物(大肠埃希菌、化脓性链球菌、枯草芽胞杆菌)

(2)方法

①取接种环在火焰上灼烧灭菌、冷却。

②以“双管移植法”左手持细菌斜面培养物和肉汤培养基两支试管, 右手持接种环, 按无菌操作法取少量细菌, 将沾菌的接种环按图 20-5 在斜倾的接近液面的管壁上轻轻涂抹研匀, 试管直立使沾附在管壁上的细菌没入液体中, 接种后放 37℃ 恒温箱中培养。

(3)结果

①浑浊生长大肠埃希菌菌液呈均匀混浊, 管底有少量沉淀。

②沉淀生长化脓性链球菌菌液管底有沉淀, 菌液无明显浑浊。

③菌膜生长枯草芽胞杆菌菌液表面形成膜状物。

3、半固体培养基移种技术(高层穿刺培养法)用于保存菌种及间接检查细菌有无动力。

(1)材料

半固体培养基。

细菌斜面培养物。

(2)方法

①将接种针经火焰灭菌冷却后, 从斜面培养物表面沾取细菌。

②用无菌法穿刺接种, 将接种针刺入半固体培养基正中央, 深度达距管底 0.5cm 处停止, 然后循原路退出。注意在刺入及拔出时要保持接种针不向穿刺线外摆动。

③试管口通过火焰灭菌, 塞上棉塞。接种针经火焰灭菌。培养物放 37℃ 恒温箱中培养。

(3)结果: 有动力的细菌呈扩散生长, 无动力的细菌沿穿刺线生长。