

# 实验一 微生物接种技术

## 一、 实验目的

学习使用常用的试验器具  
学习微生物接种的灭菌操作  
学习无菌操作

## 二、 实验仪器

接种针、接种环、接种钩、玻璃涂棒、接种圈、接种锄、小解剖刀

## 三、 实验操作

### 器具灭菌常用方法：

干热灭菌：160~170℃干燥环境下，灭菌1-2 h  
高压蒸气灭菌：121℃环境下，蒸气灭菌15-30min  
灼烧灭菌  
其它

### 无菌操作：

无菌操作在超净工作台中进行  
细菌在厌氧培养箱中进行无菌培养  
细菌的接种和分离都需要在无菌条件下进行

### 配制培养基：

培养基种类：  
细菌：LB  
真菌：PDA  
放线菌：高氏培养基  
培养基配制：  
称量——加入三角瓶等——溶解——灭菌  
倒平板：

待配制好的培养基冷却至50℃左右后，按无菌操作法倒平板（每皿约倒15ml），平置，待凝。操作方法：右手持盛培养基的三角瓶置火焰旁边，用右手手掌和小指将瓶塞轻轻地拨出，瓶口保持对着火焰；然后左手拿接养并将皿盖在火焰附近打开一条稍大于瓶口的缝隙，迅速倒培养基约15ml，加盖后轻轻摇动培养皿，使培养基均匀分布在培养皿底部，然后平置于桌面上，待凝后即成平板。

### 三点接种：

三点接种是为了获得单菌落所使用的方法之一，它是在培养皿上接种，即用接种针蘸取少量霉菌孢子，在浇有琼脂培养基的培养皿（俗称平板）上，以等边三角形的三点轻轻点一点，培养后即在此三点上长出菌落。其优点是：同种菌落有三个重复，同时在菌落彼此相接近的边缘常留有一条狭窄的空白地带，此处菌丝生长稀疏，较透明，还分化出典型子实体，因此可以直接把培养皿放在低倍镜下观察，便于根据形态特点进行菌种的鉴定。具体操作如下

步骤一，倒平板，将已灭菌的琼脂培养基放在水浴锅上加热融化，待冷却至45℃

(手握不觉太烫为宜)后,用无菌操作法倒平板。

步骤二,标明三点位置,待平板凝固后,在培养皿底部注明菌种、日期等,并以等边三角形的三个顶点标上记号。

步骤三,右手拿接种针,先在火焰上烧红灭菌并在平板培养基的边缘冷却且蘸湿。

步骤四,蘸取孢子,将灭过菌而且蘸湿的接种针伸入菌种管,用针尖蘸取少量霉菌孢子。

步骤五,点接,以垂直法或水平法把接种针上的孢子点到预先标记好的部位,注意切勿刺破培养基。

#### **划线接种:**

步骤一,标记,在培养皿底面,用记号笔注明接种的菌名、接种者姓名。日期等。

步骤二,灭菌接种环,点燃酒精灯,右手以持笔式握持接种环,并放置火焰中烧灼灭菌,先将接种环的接种丝部分置于火焰中,待金属丝烧红并蔓延至金属端,再直接烧灼金属环直至烧红,然后由金属环至金属杆方向快速通过火焰,随后再反方向通过火焰,如此2~3次。然后将接种环移开火焰,待其冷却。

步骤三,取菌种,左手持装有金黄色葡萄球菌或大肠杆菌菌液的试管,用持有接种环的右手手掌及小指拨取试管塞,将试管管口迅速通过火焰2~3次进行灭菌。将已灭菌且已冷却的接种环伸入菌种管中,取接种环的菌液,然后退出菌种管,将菌种管管口再次通过火焰2~3次灭菌,塞好试管塞,放至原来的位置。

步骤四,分离划线接种细菌(四区接种法),

①左手持琼脂平板培养基(将皿盖反放在桌上酒精灯附近),尽量使之直立以免空气中的细菌落入其中,并靠近火焰。右手持接种环在琼脂平板上端来回划线,涂成一细菌薄膜(约占平板的1/10),视为一区。划线时使接种环与接种平板面呈30~40度角,以腕力在平板表面行轻而快地来回滑动动作。

②旋转琼脂平板90度,烧灼接种环,以杀灭环上的残留细菌,将接种环触及培养基表面以使其冷却灭菌接种环通过薄膜处作连续平行划线(约占平板1/5),此视为二区。

③旋转琼脂平板90度,灼烧接种环灭菌并使之冷却。将灭菌接种环接三区连续平行划线(约占平板1/4),此为三区。

④旋转琼脂平板90度,接种环不必再灭菌,接三区连续平行划线,划满平板其余部分,此视为四区。

各区接种线间尽量互不交接,以达到细菌逐渐稀释的目的。

#### **注意事项:**

倒平板:

控制pH、灭菌时间、及时倒入培养基、注意标记。

划线接种:

菌的数量要少、划线要轻。