**四川省职业院校检验检疫技术技能竞赛**

**微生物学检验-革兰染色及细菌分区（四区）划线试卷（高职组）**

**一、竞赛说明**

1.主要考核医学检验技术专业、卫生检验与检疫技术专业学生对革兰染色、分区划线的熟练程度，在规定时间内完成革兰染色和细菌分区（四区）划线的操作。

2.本题满分100分，完成时间22分钟，其中细菌分区划线6分钟，革兰染色16分钟。

3.独立完成，不得相互询问或讨论。

4.考核成绩为操作过程评分、操作结果和考核时间评分、职业素养之和。

5.全部操作过程时间和操作后处理时间计入时间限额，超过规定时间将终止操作。

**二、实验原理**

1.细菌分区（四区）划线

是将微生物样品在固体培养基表面多次作“由点到线”稀释而达到分离的目的。

2.革兰染色

G＋菌：细胞壁结构较致密，肽聚糖层厚，脂质少，乙醇脱色时不易渗入菌体，并能使细胞壁脱水，间隙缩小，通透性下降，阻止结晶紫-碘复合物从胞内渗出，保留紫色。

G－菌：细胞壁结构较疏松，肽聚糖层薄，脂质多，易被乙醇溶解，使细胞壁通透性增高，菌体内的结晶紫-碘复合物易被乙醇溶解逸出而脱掉紫色，经沙黄或稀释石碳酸复红复染后呈红色。

**三、实验器材和试剂**

1.分区（四区）划线法

标本（7cm血平板培养物）、9cm血平板、记号笔、不干胶标签（约2×3厘米方形）、生物安全柜、接种环、试管架、计时器、恒温培养箱等。

2.革兰染色

载玻片、试管架、红蓝铅笔、接种环、记号笔、酒精灯、打火机、生理盐水、吸水纸、冲洗瓶、计时器、纱布（可用于拭擦玻片）、显微镜、香柏油、擦镜纸、擦镜液、染色盘、染色架、消毒洗手液、洗面盆、抹布、锐器盒、普通污物缸、废液缸、标本盒等。

3.实验试剂

革兰氏染液（杭州滨和微生物试剂有限公司）：结晶紫染液、碘液、脱色液（95%乙醇）、复染液。(连包装盒一起存放在上述托盘里，由选手取出使用，操作完毕后放回原位。)

**四、实验标本**

7cm血平板细菌培养物

**五、操作步骤**

1.细菌分区（四区）划线法

（1）标记 在9cm平板底部粘贴上不干胶标签，并用签字笔在标签上正确标记。

（2）取菌 右手持接种环（执笔式）伸入红外线灭菌器腔内6～8秒，外移接种环，离开红外线灭菌器内腔，待冷却后挑取少许标本。

（3）划线 左手持琼脂平板适当倾斜，用拇指打开皿盖，使其与皿底间分开2～3cm宽的缝隙，右手持取标本的接种环深入皿内，先将细菌标本在培养基一角涂成直径约一厘米薄膜，并以此为起点，使接种环与接种平板面呈30°～40°角，以腕力在平板表面进行，连续不重叠划线，作为第一区，其范围不能超过平板的 1/4；灭菌接种环，待冷却后，转动平皿至适合操作的位置（各区的交角应为120°左右，即平板转动一定角度约60°，以便充分利用整个平板的面积），将接种环通过第一区 3～4 次，连续不重叠划线，作为第二区。同法依次划完第三、四区，第四区切勿重新接触第一、二区。注意每区的划线须有数条线与上区交叉接触，每区线间需保持一定距离，线条要密而不重复；划第三至第四区间可不灭菌接种环。

（4）培养 划线完毕，盖好皿盖，倒置放入37℃恒温培养箱中培养18～24h。（5）观察结果 培养18～24h后，从恒温培养箱中取出，观察菌落生长情况并计数单个菌落数量。

2.革兰染色

（1）标记 选择玻片并正确编号。

（2）涂片 用灭菌接种环挑取菌落与载玻片上预先滴加的生理盐水涂布成1cm2或蚕豆大小的均匀半透明菌膜。

（3）干燥 涂片制成后，在空气中使其迅速干燥，以免菌体皱缩变形（若需加快干燥速度，将涂布面朝上，置于火焰上方，不烫手的位置，慢慢烘干，切勿紧贴火焰）。

（4）固定 玻片干燥后用火焰加热法固定，即玻片（菌膜面向上）以中速（钟摆速度）来回通过火焰外焰3次进行固定，以玻片反面接触手背皮肤，热而不烫为宜。

（5）初染 加结晶紫染液，染60秒，细流水冲洗，并倒去玻片上积水。

（6）媒染 加碘液，染60秒，细流水冲洗，倒去玻片上积水。

（7）脱色 加脱色液，脱色 10～30秒，不时摇动至无紫色逸出为止，细流水冲洗，倒去玻片上积水。

（8）复染 加复染液，染30～60秒，细流水冲洗，倒去玻片上积水。

（9）镜检 待已染色的细菌标本片自然干燥或用吸水纸吸干后，再用显微镜进行观察。

**四川省职业院校检验检疫技术技能竞赛**

**微生物学检验-革兰染色和细菌（四区）分区划线答题卷（高职组）**

**一、革兰染色结果**

1.绘出镜下形态

2．镜下结果描述

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 参赛选手填写 | 复核裁判填写 |
| 菌体颜色 |  |  |
| 菌体形态 |  |  |
| 染色性 |  |  |
| 染色色彩是否清晰 | 选手不填 |  |

3.初步报告

（如：找到革兰阳性球（杆）菌或找到革兰阴性杆菌）

|  |  |
| --- | --- |
| 得 分 |  |
| 裁判签名 |  |

**二、分区（四区）划线结果**

|  |  |
| --- | --- |
| 得 分 |  |
| 裁判签名 |  |