



普通高等教育“十一五”国家级规划教材



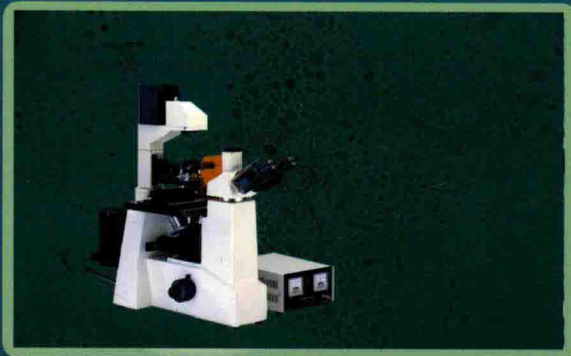
普通高等教育“十二五”规划建设教材

第2版

兽医微生物学实验教程

(动物医学专业用)

胡桂学 陈金顶 彭远义 主 编
唐丽杰 陈培富 邬向东 潘树德 副主编



Shouyi Weishengwuxue
Shiyan Jiaocheng



中国农业大学出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS

普通高等教育“十一五”国家级规划教材
普通高等教育“十二五”规划建设教材

兽医微生物学实验教程

第2版

(动物医学专业用)

胡桂学 陈金顶 彭远义 主 编
唐丽杰 陈培富 邬向东 潘树德 副主编

中国农业大学出版社

· 北京 ·

内 容 简 介

本书共分两部分、7章、36个实验。第一部分是微生物学基础实验,包括微生物学常用实验器材的准备、培养基的制备、细菌的培养与鉴定、病毒的培养与鉴定以及真菌的培养与鉴定等5章22个实验。安排这些实验旨在使学生掌握微生物学最基本的实验操作技能。第二部分是重要动物病原的微生物学检查,设计了兽医临床上多发、常见和重要传染病病原的检查实验,共14个实验。其中,第六章是重要动物病原菌的微生物学检查,包括大肠杆菌、沙门菌、炭疽芽胞杆菌、结核分枝杆菌等12种重要动物病原菌的微生物学检查;第七章是重要动物病毒的微生物学检查,包括猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征、新城疫、犬瘟热等8种重要动物病毒的微生物学检查。每个实验都精心设计了基本原理、器材准备、实验步骤、注意事项和实验报告等内容,以使本书具有更强的实用性和可操作性。本书既可作为动物医学专业和其他相关专业的动物微生物学配套的实验教材,也可作为病原微生物相关研究生和教师的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

兽医微生物学实验教程/胡桂学,陈金顶,彭远义主编.—2版.—北京:中国农业大学出版社,2014.12

ISBN 978-7-5655-1119-6

I. ①兽… II. ①胡…②陈…③彭… III. ①兽医学-微生物学-实验-教材
IV. ①S852.6-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第285319号

书 名 兽医微生物学实验教程
作 者 胡桂学 陈金顶 彭远义 主编

策划编辑	潘晓丽	责任编辑	潘晓丽
封面设计	郑川	责任校对	王晓凤
出版发行	中国农业大学出版社	邮政编码	100193
社 址	北京市海淀区圆明园西路2号	读者服务部	010-62732336
电 话	发行部 010-62818525, 8625 编辑部 010-62732617, 2618	出 版 部	010-62733440
网 址	http://www.cau.edu.cn/caup	e-mail	cbsszs@cau.edu.cn
经 销	新华书店		
印 厂	涿州市星河印刷有限公司		
版 次	2015年1月第2版	2015年1月第1次印刷	
规 格	787×1092	16开本	16.25印张
印 数	1~3000		406千字
定 价	35.00元		

图书如有质量问题本社发行部负责调换。

第2版编写人员

主 编 胡桂学 陈金顶 彭远义

副主编 唐丽杰 陈培福 邬向东 潘树德

编写人员 (按姓氏笔画排序)

- 韦良孟 (山东农业大学)
- 刘 芳 (河南农业大学)
- 刘文华 (莱阳农学院)
- 邬向东 (江西农业大学)
- 闫 芳 (山西农业大学)
- 陈金顶 (华南农业大学)
- 陈培富 (云南农业大学)
- 胡桂学 (吉林农业大学)
- 倪宏波 (黑龙江八一农垦大学)
- 唐丽杰 (东北农业大学)
- 徐凤宇 (吉林农业大学)
- 徐志文 (四川农业大学)
- 格日勒图 (内蒙古农业大学)
- 彭远义 (西南大学)
- 潘树德 (沈阳农业大学)

第 1 版编写人员

主 编 胡桂学

副 主 编 廖 明 彭远义 陈金顶

编写人员 (按姓氏笔画排序)

闫 芳 (山西农业大学)

刘文华 (莱阳农学院)

邬向东 (江西农业大学)

陈金顶 (华南农业大学)

苏敬良 (中国农业大学)

胡桂学 (吉林农业大学)

袁少华 (华南农业大学)

彭远义 (西南大学)

廖 明 (华南农业大学)

霍乃蕊 (山西农业大学)

第 2 版前言

《兽医微生物学实验教程》自 2006 年问世至今已有 8 年时间，得到了同行的大力支持与关照，被许多农林高等院校作为实验教材使用，受到了好评，也收到了各方宝贵的意见和建议。随着微生物学新理论和新技术的不断出现，针对我国动物传染病发生的新形势，在中国农业大学出版社的积极倡导下，我们开展了本书的修订工作。在修订过程中，我们注重保持第 1 版简明扼要、重点突出、实用性强的特点，同时也对书中内容进行了较大的调整和补充。

本书的实验内容分微生物学基础实验和重要动物病原的微生物学检查两大部分。第一部分相当于兽医微生物学实验的总论部分，分 5 章 22 个实验，安排了细菌培养基的制备以及细菌、病毒和真菌的培养与鉴定等微生物学基本实验技术；第二部分相当于兽医微生物学实验的各论部分，分 2 章 14 个实验，突出了严重危害动物养殖业的猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征、新城疫、犬瘟热等重要动物病毒的检查内容。与第 1 版相比，本书在实验内容上做了很多的补充和删减，增加了动物病原菌和病毒的致病性、生长曲线的绘制、分子生物学鉴定和耐药基因的检测，以及病毒的荧光定量 PCR 鉴定等实验内容，突出体现了现代生物技术 在兽医微生物学中的应用；删除了附录中常用培养基制备内容，把不同细菌特殊需要培养基安排在不同病原菌的检查内容中，使本书具有更强的实用性。考虑到各学校本科实验室生物安全的实际，口蹄疫、狂犬病等危害严重的传染病病原的微生物学检查未列入本书，而像布氏杆菌、炭疽芽孢杆菌等重要人兽共患病原的微生物学检查，则以疫苗株设计了实验内容。

为使本书能体现我国不同高等农业院校在兽医微生物学实验教学中的特点和优势，本书作者由第 1 版的 10 位增加至 15 位，作者单位也由第 1 版的 7 个增加到 14 个，从而具有更广泛的代表性。本书作者都是从事兽医微生物学教学的一线教师，经验丰富，编写认真，审稿者也付出了很多宝贵的个人休息时间，在此表示衷心的感谢。此外，本书从谋划、编写大纲的修订到出版一直得到中国农业大学出版社的大力支持，在此也一并表示诚挚的感谢。

由于本书编写时间较紧，加之学术水平有限，缺点和欠妥之处在所难免，恳请同行和师生批评指正，不吝赐教。

胡桂学

2014 年 9 月

第 1 版前言

随着高等农业院校动物医学专业课程体系的不断深入,为适应人才培养的新模式,以及适应近年来我国动物传染病发生的新形势,很多院校分别开设了兽医微生物学和兽医免疫学两门课程,将免疫学从微生物学中分离出来,实验教学也进行了相应的调整。在中国农业大学出版社的组织下,由国内部分农业院校从事兽医微生物学教学的一线教师共同编写了这本只含有兽医微生物学部分的实验教程。全书分为细菌形态学检查法、细菌培养法、病原菌的微生物学检查和病毒的培养与鉴定技术四个部分,共计 23 个实验。

本书重视兽医微生物学基本实验方法和技能的培养,紧密结合当前我国动物传染病流行的形势。同时,更加重视对学生归纳总结,提出、分析和解决问题能力的培养,主要表现在对实验报告撰写的要求上。实验报告不要求学生照抄实验教程,而是要求学生写出实验结果,通过思考题,使学生分析出现这些实验结果的实际原因,总结实验体会,以巩固学生对实验过程的了解和与理论知识的结合。

本书在编写过程中,申报了教育部普通高等教育“十一五”国家级规划教材,并获得批准。各位编者受到很大鼓舞,更加努力工作,精心编写。该书的出版得到了中国农业大学出版社和参编院校的大力支持,在此一并表示诚挚的谢意。此外,本书的编写大纲是在中国农业大学苏敬良老师提交的大纲基础上进行修改后制定的。由于苏老师出国,由本人继续组织编写。在本书完稿之际,也向苏老师表示感谢。

限于编者的水平,本书的不足之处,敬请同行及师生指正,以便修订再版。

胡桂学

2006 年 7 月

目 录

微生物实验室生物安全与规则	1
第一部分 微生物学基础实验	3
第一章 微生物学实验室常用仪器的使用及器材准备 (Employment of Common Instruments in Microbiological Laboratory and Preparation of Equipments)	3
实验 1 微生物学实验室常用仪器的使用 (Employment of Common Instruments in Microbiological Laboratory)	3
实验 2 常用器材的准备 (Preparation of Equipments in Common Use)	10
第二章 培养基的制备 (Preparation of Medium)	13
实验 3 原核微生物培养基的制备 (Preparation of Medium for Prokaryotic Microbes)	13
实验 4 动物细胞培养基的制备 (Preparation of Medium for Animal Cell)	18
实验 5 真菌培养基的制备 (Preparation of Medium for Fungi)	21
第三章 细菌的培养与鉴定 (Cultivation and Identification of Bacteria)	23
实验 6 细菌的分离培养、计数及其生长曲线的绘制 (Isolation, Cultivation, Counting and Growth Curve of Bacteria)	23
实验 7 细菌的染色与形态结构观察 (Coloration and Observation of Morphology and Structures of Bacteria)	34
实验 8 细菌的致病性实验 (Pathogenicity Test of Bacteria)	40
实验 9 细菌的生理生化特性鉴定 (Physiological and Biochemical Characteristics Identification of Bacteria)	49
实验 10 细菌的血清学鉴定 (Serological Identification of Bacteria)	63

实验 11	细菌的分子生物学鉴定 (Biological Identification of Bacteria)	76
实验 12	细菌的药物敏感试验及其耐药基因的分析 (Drug Sensitive Test and Resistance Gene Analysis of Bacteria)	81
实验 13	支原体和螺旋体的培养与鉴定 (Cultivation and Identification of <i>Mycoplasma</i> and <i>Spirochaete</i>)	88
第四章	病毒的培养与鉴定 (Cultivation and Identification of Virus)	96
实验 14	病毒的接种与培养 (Inoculation and Cultivation of Virus)	96
实验 15	病毒滴度的测定与一步生长曲线的绘制 (Measurement of Virus Titre and Drawing of One-step Growth Curve)	111
实验 16	病毒的致病性实验 (Viral Pathogenicity Test)	117
实验 17	病毒形态结构观察 (Morphologic Observation of Virus)	120
实验 18	病毒的理化学和生物学特性鉴定 (Physical, Chemical and Biological Characteristics Identification of Virus)	130
实验 19	病毒的血清学鉴定 (Serological Identification of Virus)	134
实验 20	病毒的分子生物学鉴定 (Molecular Biology Identification of Virus)	138
第五章	真菌的培养与鉴定 (Culture and Identification of Fungi)	152
实验 21	真菌的培养方法与培养性状观察 (Culture Technique of Fungi and Examination of Morphology)	152
实验 22	真菌及其毒素的检测与鉴定 (Detection and Identification of Fungi and Mycotoxins)	157
第二部分	重要动物病原的微生物学检查	162
第六章	重要动物病原菌的微生物学检查 (Microbiological Examination of Important Pathogenic Bacteria)	162
实验 23	葡萄球菌和链球菌的微生物学检查 (Microbiological Examination of <i>Staphylococcus</i> and <i>Streptococcus</i>)	162
实验 24	大肠杆菌和沙门菌的微生物学检查 (Microbiological Examination of <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella</i>)	167
实验 25	多杀性巴氏杆菌和副猪嗜血杆菌的微生物学检查 (Microbiological Examination of <i>P. multocida</i> and <i>H. parasuis</i>)	174
实验 26	布氏杆菌的微生物学检查 (Microbiological Examination of <i>Brucella</i>)	178

实验 27	猪丹毒杆菌和李氏杆菌的微生物学检查 (Microbiological Examination of <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> and <i>Listeria monocytogenes</i>)	183
实验 28	炭疽芽孢杆菌和产气荚膜梭菌的微生物学检查 (Microbiological Examination of <i>Bacillus anthracis</i> and <i>Clostridium per-</i> <i>fringens</i>)	189
实验 29	牛结核杆菌和副结核杆菌的微生物学检查 (Microbiological Examination of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> and <i>Mycobac-</i> <i>terium paratuberculosis</i>)	195
第七章	重要动物病毒的微生物学检查 (Microbiological Examination of Important Animal Virus)	203
实验 30	痘病毒的微生物学检查 (Microbiological Examination of <i>Poxvirus</i>)	203
实验 31	猪瘟病毒的微生物学检查 (Microbiological Examination of <i>Classical Swine Fever Virus</i>)	208
实验 32	猪繁殖与呼吸综合征病毒的微生物学检查 (Microbiological Examination of <i>Porcine Reproductive and Respiratory</i> <i>Syndrome Virus</i>)	213
实验 33	猪流行性腹泻病毒与传染性胃肠炎病毒的微生物学检查 (Microbiological Examination of <i>Epidemic Diarrhea Virus</i> and <i>Transmi-</i> <i>ssible Gastroenteritis Virus</i> of Porcine)	218
实验 34	新城疫病毒的微生物学检查 (Microbiological Examination of <i>Newcastle Disease Virus</i>)	222
实验 35	禽传染性支气管炎病毒的微生物学检查 (Microbiological Examination of <i>Avian Infectious Bronchitis Virus</i>)	228
实验 36	犬瘟热病毒的微生物学检查 (Microbiological Examination of <i>Canine Distemper Virus</i>)	232
附录	235
附录一	常用染色液的配制 (Confection of Liquid Dyestuff in Common Use)	235
附录二	细菌、病毒种的保存 (Conservation of Bacterium and Virus Seed)	240
附录三	常见动物病原菌鉴定检索表 (Retrieval Table for Identification of Common Pathogenic Bacteria from Animals)	245
附录四	实验报告格式 (Format of Test Report)	249
参考文献	250

微生物实验室生物安全与规则

微生物学实验教学的目的在于使学生掌握基本的微生物学操作技能及其应用意义,深刻理解微生物学的基本理论;同时,培养学生以下几方面的素质:一是观察、分析、解决问题的能力;二是实事求是、严肃认真的科学态度;三是独立思考、勇于创新的开拓精神;四是认真负责、团结协作、勤俭节约、爱护公物的良好习惯。

在实验中可能接触病原微生物及其提取物或气溶胶,学生既要树立良好的安全和无菌操作意识,工作要严谨、细心,严防病原微生物的污染、散布,杜绝事故,确保安全,又要求严格训练。具体应注意下列事项:

(1)每次实验课前必须充分预习实验内容,并根据内容选择适当生物安全级别的实验室;明确实验的目的、意义、原理和步骤。

(2)对于可能接触到人兽共患传染病病原的工作人员,必须提前接种相关疫苗。

(3)需要用到实验动物的内容,需事先经过有关部门的检疫,掌握动物的处理方法,操作要谨慎镇静,避免伤害人或动物。

(4)进入实验室,需着工作衣帽,固定座位;保持实验室整洁,非实验必需物品勿带入实验室;尽量避免走动,切勿高声说话。

(5)严格无菌操作,防止病原微生物污染或散布。

①实验过程中,一旦实验衣帽污染可传染的材料,应脱下并浸于消毒液中(如5%石炭酸或含5.25%氯的消毒剂等)过夜,或高压灭菌后洗涤。

②沾有病原微生物的器皿及废弃培养物,应置于指定地点,消毒后再洗涤;检查用过或余下的病料,应严格消毒、掩埋。

③接种环、接种针使用前、使用后须烧灼灭菌。

④含有液体的试管须立于试管架中,避免液体流出。

⑤实验室中禁止饮食、吸烟、化妆、装隐形眼镜等,勿用嘴吸加液体。

⑥操作危险材料时,勿谈话或思考其他问题,以免分散注意力而发生意外。

⑦实验中万一发生意外,如吸入细菌、划破皮肤、病料污染桌面或地面等时,应及时报告教师并立即处理,必要时就医。病原微生物污染的地点,应以布蘸浓消毒液(5%石炭酸等)覆盖过夜。

⑧菌种或毒种不得带出实验室。若要索取,应严格按照规章制度办理。

⑨实验完毕后应先用消毒液洗手,然后用清水冲洗。

(6)一切易燃品应远离火源。不可将酒精灯倾向另一个酒精灯引火。酒精灯中的酒精要及时添加,使酒精量既不少于酒精灯容积的1/4,也不超过酒精灯容积的2/3。电炉、电热板等用完后立即关闭。实验室内要有充足的灭火器,并学会使用。

(7)养成节约习惯,合理使用实验器材。

①使用药品、试剂、拭镜纸、吸水纸等应节约。

②使用仪器要严格按规程操作、维护,避免损坏和意外,贵重仪器使用结束后应做好登记。不是当次实验使用的仪器不要动。

③平皿一般应倒置,即皿底在上,避免污染。

④金属器皿用完消毒后,应立即擦干,防止生锈。

(8)所用试剂、染色剂、培养物、培养基、动物和病料等,均需标记明确。需进行湿热灭菌的器皿标签,应用记号笔写清。

(9)认真操作,仔细观察,及时如实做好记录,必要时以照片形式留存。

(10)实验结束后,及时清理实验台。各种器材放回原处或指定地点,摆放整齐。清扫实验室,关好门、窗,检查水、电和煤气等是否关好。

(11)每次实验结束后,必须按教师要求撰写实验报告,内容力求简明、准确、实事求是,分析力求合理、透彻,并及时交给教师评阅。

第一部分

微生物学基础实验

第一章 微生物学实验室常用仪器的使用及器材准备

(Employment of Common Instruments in Microbiological Laboratory and Preparation of Equipments)

实验 1 微生物学实验室常用仪器的使用

(Employment of Common Instruments in Microbiological Laboratory)

【目的要求】

- (1)了解微生物学实验室常用仪器原理、使用方法和维护要点。
- (2)熟练掌握油镜的使用方法。

【基本原理】

(一)显微镜

显微镜是微生物学工作者必不可少的工具,因微生物个体微小,大小通常用微米表示,肉眼难于看见,故必须利用显微镜放大后才能看见。从工作原理和结构上显微镜可分为光学显微镜和电子显微镜。其中,光学显微镜有普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜和激光共聚焦显微镜等;电子显微镜有透射电子显微镜和扫描电子显微镜等。观察细菌的形态与结构,最常用的是油镜镜头。

1. 普通光学显微镜

普通光学显微镜由一组机械支持及调节系统和光学放大系统组成(图 1-1),这两部分很好地配合,才能发挥作用。

(1)机械支持及调节系统:机械支持及调节系

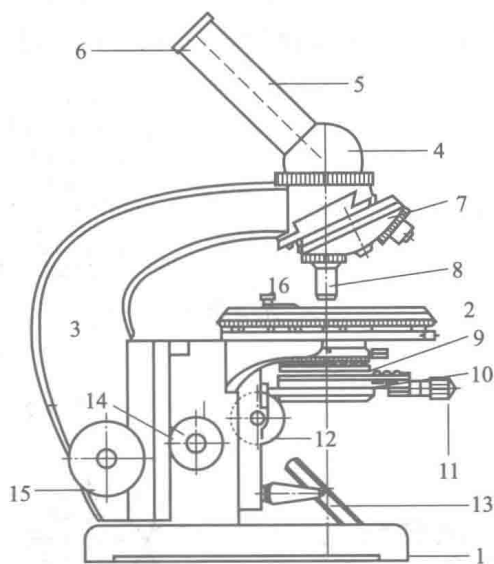


图 1-1 普通光学显微镜的模式图

1. 镜座
2. 载物台
3. 镜臂
4. 棱镜套
5. 镜筒
6. 目镜
7. 物镜转换器
8. 物镜
9. 聚光器
10. 虹彩光圈
11. 光圈固定器
12. 聚光器升降螺旋
13. 反光镜
14. 细调焦旋钮
15. 粗调焦旋钮
16. 标本夹

统是整个显微镜的骨架,对光学放大系统起支撑和调节作用,部件包括镜座、镜臂、镜台、镜筒、物镜转换器和调焦旋钮等。

◆ 镜座:镜座是显微镜的基座,可使显微镜平稳地放置在桌面上。

◆ 镜臂:镜臂用于支撑镜筒、镜台和调节系统。

◆ 镜台:镜台又称载物台,是放置标本的地方,多为方形。镜台上有标本固定和位置移动系统,用于固定标本和在平面上移动。标本固定和位置移动系统上附带有游标卡尺,可用于标本定位。

◆ 镜筒:镜筒是联结物镜转换器和目镜的金属筒,其上端插入目镜,下端和物镜转换器相连接。

◆ 物镜转换器:物镜转换器安装在镜筒下端,用于装配物镜,一般装配4~6个不同放大倍数的物镜,转动物镜转换器可以选择合适的物镜。

◆ 调焦旋钮:粗、细调焦旋钮位于镜臂基部,可使镜臂上下移动,用于调节焦距。

(2)光学放大系统:光学放大系统架构于机械系统上,包括光源、聚光器、目镜和物镜。光学系统使标本物像放大,形成倒立的放大物像。

◆ 光源:光源有自然光源和电光源两种。老式显微镜一般采用自然光源,其取光设备是反光镜。反光镜有两个面,一面是平面镜,另一面是凹面镜。新式显微镜设置有内源性电光源,使用方便,不受环境光源的影响。

◆ 聚光器:聚光器在载物台下面,一般由聚光透镜、虹彩光圈和升降螺旋组成。聚光器可分为明视场聚光器和暗视场聚光器。普通光学显微镜配置的都是明视场聚光器,明视场聚光器又有阿贝聚光器、齐明聚光器和摇出聚光器之分。

◆ 物镜:物镜安装在物镜转换器上,其作用是对标本进行第一次成像。物镜的性能取决于物镜的数值孔径(NA)。数值孔径越大,物镜的性能越好(图1-2)。

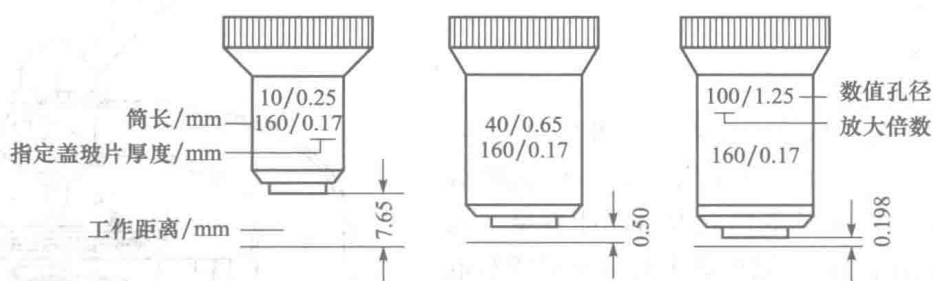


图 1-2 显微镜物镜参数示意图

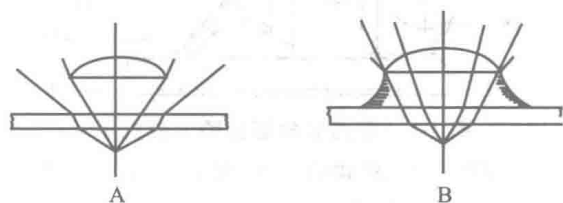


图 1-3 接物镜干燥系(A)和油浸系(B)的光线图

增大物镜与标本之间介质的折射率也是行之有效的办法。在使用油浸物镜观察细菌的形态时,在物镜与标本之间滴加香柏油就是为了增加分辨率,并减少因折射而造成的光线散失(图1-3)。

物镜下表面与标本之间或与盖玻片之间的距离称为物镜的工作距离。物镜的放大倍数越大,则其工作距离越短。油镜的工作距离最短,只有约0.2mm。

物镜的种类很多,可从不同角度来分类。

根据物镜前透镜与被检物体之间的介质不同,物镜可分为干燥系物镜和油浸系物镜。

①干燥系物镜:以空气为介质,如常用的 $40\times$ 以下的物镜,数值孔径均小于1;②油浸系物镜:常以香柏油为介质,此物镜又叫油镜头,其放大率为 $90\times\sim 100\times$,数值孔径大于1。检查细菌标本,多用油镜进行。油镜是一种放大倍数较高的物镜,一般都刻有放大倍数和特别的标记,以便于认识。国产镜多用油字表示,国外产品则常用“oil”或“HI”做记号。油镜上也常漆有黑环或红环,而且油镜的镜身较高倍镜和低倍镜的长,镜片最小,这也是识别的另一个标志。

根据物镜放大率的高低,物镜又可分为:①低倍物镜;②高倍物镜;③中倍物镜。

◆目镜:目镜的作用是把物镜放大的实像进行二次放大,并把物像映入观察者的眼中。

(3)显微镜的成像原理:由光源射入的光线经聚光镜聚焦于被检标本上,使标本得到足够的照明;由标本反射或折射出的光线经物镜放大,在目镜的视场光阑处形成放大的实像;此实像再经接目透镜放大成虚像。

油镜头的晶片细小,进入镜中的光量亦较少,其视野较高倍镜为暗。当油镜头与载玻片之间为空气所隔时,因为空气的折光指数与玻璃不同,故有一部分光线被折射而不能进入镜头之内,使视野更暗;若在镜头与载玻片之间放上与玻璃的折光指数相近的油类,如柏木油等,则光线不会因折射而损失太多,从而使观察者的视野充分照明,能清楚地进行检查。

2. 暗视野显微镜

暗视野显微镜(dark-field microscope)又称暗场显微镜,是在普通光学显微镜中去除明视野集光器,换上一个暗视野集光器,通过观察样品受侧向光照射时所产生的散射光来分辨样品的细节。

暗视野显微镜使用特殊的暗视野聚光镜或暗视野聚光器。此聚光镜中央有一光挡,使光线不能由中央直线向上进入镜头,只能从周缘进入并会聚在被检物体的表面;同时,在有些物镜镜头中还装有光圈,以阻挡从边缘漏入的直射光线。由于光线不能直接进入物镜,因此,视野背景是黑暗的,如果在标本中有颗粒物体存在,并被斜射光照着,则能引起光线散射,一部分光线就会进入物镜。暗视野显微镜适于观察在明视野中由于反差过小而不易观察的折射率很强的物体,以及一些小于光学显微镜分辨极限的微小颗粒。在微生物学研究工作中,常用暗视野显微镜来观察活菌、螺旋体的运动或鞭毛等。

暗视野显微镜和一般的明视野显微镜区别只在于二者的聚光器不同,暗视野聚光器可阻止光线直接照射标本,使光线斜射在标本上。

3. 相差显微镜

相差显微镜(phase contrast microscope)适合于观察透明的活微生物或其他细胞的内部结构。用普通光学显微镜观察一些活的微生物或其他细胞等透明物体时,常不易分清其内部的细微结构。但光线通过厚度不同的透明物体时,其相位却会发生改变,形成相差。相差不表现为明暗和颜色的差异。利用光学的原理,可以把相差改变为振幅差,这样就能使透明的不同结构表现明暗的不同,从而能够较清楚地予以区别。

4. 荧光显微镜

荧光显微镜(fluorescence microscope)用来观察荧光性物质,特别是供免疫荧光技术应用的专门显微镜。荧光性物质含有荧光色素,当其受到一定波长的短波光(通常是紫外线部分)照射时,能够激发出较长波长的可见荧光。利用这一现象,把荧光色素与抗体结合起来,进行

免疫反应,就可以在荧光显微镜中观察荧光影像,以作各种判定。荧光显微镜激发光照射的方式,有透射和落射两种。

5. 电子显微镜

用可见光作为光源的各种光学显微镜,进入光学放大系统中的可见光,其波长是恒定的,而显微镜的分辨能力与波长相关,故欲提高分辨力则需缩短波长,但这是无法实现的,因此,光波波长是限制显微镜增大分辨力不可逾越的障碍。电子显微镜有透射电子显微镜(transmission electron microscope)和扫描电子显微镜(scanning electron microscope)两种。目前的电子显微镜分辨能力已达 0.3 nm 甚至 0.14 nm 的水平(可以直接看到原子),放大倍数亦可达 250 000 倍以上,再利用显微摄影技术放大 10 倍,就能得到 2 500 000 倍放大的图像。

(二) 恒温箱

恒温箱是培养微生物的必备仪器。目前市场上有两种恒温箱:一种是普通电热恒温箱,不能制冷,在南方天气炎热时,培养真菌有一定困难;另一种是生化培养箱,可制冷,调温范围在 5~50℃,比较方便调温,目前应用较广。

两种恒温箱操作步骤基本相似,具体如下:

1. 操作前准备

对箱体内进行清洁和消毒。

2. 操作过程

(1)接通电源,开启电源开关。

(2)调节调节器按钮至调节温度挡,并调节至所需温度,点击“确认”按钮,加热指示灯亮,培养箱进入升温状态。

(3)箱内温度应按照温度表指示为准。

3. 维修保养及注意事项

(1)恒温箱必须连接地线,以保证使用安全。

(2)在通电使用时,箱左侧空间内的电器部分忌用手触及或用湿布揩抹及用水冲洗。

(3)电源线不可缠绕在金属物上或放置在潮湿的地方。必须防止橡皮老化以及漏电。

(4)实验物放置在箱内不宜过挤,使空气流动畅通,保持箱内平均受热。在实验时,应将顶部适当旋开,使湿空气外逸以利于调节箱内温度。

(5)箱内外应保持清洁,每次使用完毕应当进行清洁。

(6)若长时间停用,应将电源切断。

(三) 高压蒸汽灭菌器

高压蒸汽灭菌器是根据沸点与压力成正比的原理设计,其灭菌效果较好。通常在 15 磅压力下灭菌 15~20 min,可将一般细菌完全杀灭。目前,高压蒸汽灭菌器有手提式与全自动两种,具体操作步骤如下。

1. 手提式高压蒸汽灭菌器

(1)将内层灭菌桶取出,再向外层锅内加入适量的去离子水或蒸馏水,使水面与三角搁架相平为宜。

(2)放回灭菌桶,并装入待灭菌物品。注意不要装得太挤,以免妨碍蒸汽流通而影响灭菌效果。三角烧瓶与试管口端均不要与桶壁接触,以免冷凝水淋湿包口的纸而透入棉塞。

(3)加盖,并将盖上的排气软管插入内层灭菌桶的排气槽内。再以两两对称的方式同时旋紧相对的两个螺栓,使螺栓松紧一致,勿使漏气。

(4)加热,并同时打开排气阀,使水沸腾以排除锅内的冷空气。待冷空气完全排尽后,关上排气阀,让锅内的温度随蒸汽压力增加而逐渐上升。当锅内压力升到所需压力时,控制热源,维持压力至所需时间(一般为 121°C , 0.1 MPa)。

(5)灭菌时间到后,切断电源,让灭菌锅内温度自然下降。当压力表的指示数降至零时,打开排气阀,旋松螺栓,打开盖子,取出灭菌物品。

2. 全自动高压蒸汽灭菌器

(1)在设备使用中,应对安全阀加以维护和检查。当设备闲置较长时间重新使用时,应扳动安全阀上小扳手,检查阀芯是否灵活,防止因弹簧锈蚀而影响安全阀起跳。

(2)设备工作时,当压力表指示超过 0.165 MPa 时,安全阀不开启,应立即关闭电源,打开放气阀旋钮;当压力表指针回零时,稍等 $1\sim 2\text{ min}$,再打开容器盖并及时更换安全阀。

(3)堆放灭菌物品时,严禁堵塞安全阀的出气孔,必须留出空间保证其畅通放气。

(4)每次使用设备前必须检查外桶内水量是否保持在灭菌桶搁脚处。

(5)当灭菌器需要连续工作,在进行新的灭菌作业前,应留有 5 min ,并打开上盖使设备有时间冷却。

(6)灭菌液体时,应将液体罐装在硬质的耐热玻璃瓶中,以不超过 $3/4$ 体积为好,瓶口选用棉花纱塞,切勿使用未开孔的橡胶或软木塞(注意:在灭菌液体结束时不准立即释放蒸汽,必须待压力表指针回复到零位后方可排放余汽)。

(7)对不同类型、不同灭菌要求的物品,如敷料和液体等,切勿放在一起灭菌,以免顾此失彼,造成损失。

(8)取放物品时,注意不要被蒸汽烫伤,可戴上线手套。

(四)超净工作台

超净工作台是微生物学实验室最常用的设备之一,是细菌、病毒等微生物的分离、培养、鉴定等操作的重要平台。

1. 使用方法

(1)使用超净工作台时,应提前 50 min 开机,同时开启紫外杀菌灯,处理操作区内表面积累的微生物, 30 min 后关闭杀菌灯(此时日光灯即开启),启动风机。

(2)新安装的或长期未使用的超净工作台,使用前必须对工作台和周围环境先用超净真空吸尘器或用不产生纤维的工具进行清洁,再采用药物灭菌法或紫外线灭菌法进行灭菌处理。

(3)操作区内不允许存放不必要的物品,保持工作区的洁净气流流型不受干扰。

(4)操作区内尽量避免做明显扰乱气流流型的动作。

(5)操作区的使用温度不要超过 60°C 。

2. 维护规程及注意事项

(1)根据环境的洁净程度,可定期(一般 $2\sim 3$ 个月)将粗滤布(涤纶无纺布)拆下清洗或给予更换。