

牧医微生物学实验指导

广东农林学院牧医系

基础课教研组

1973年8月

兽医微生物学实验指导

目 录

	页 次
微生物实验时应注意的事项 - - - - -	1
实验一 显微镜油镜和暗视野显微镜的使用及微 生物形态观察 - - - - -	2
实验二 细菌抹片的制备及染色法 - - - - -	7
实验三 细菌培养的生长情况观察 - - - - -	14
实验四 常用培养基的制备及灭菌 - - - - -	17
实验五 细菌的接种及分离法 - - - - -	25
实验六 生化特性检查法 - - - - -	31
实验七 血清学反应 - - - - -	35
实验八 病剧中病原微生物的鉴定 - - - - -	39
实验九 饲料加工微生物的认定 - - - - -	44
实验十 鸡新城疫疫苗的制备 - - - - -	46
实验十一 鸡痘弱毒(六次系)疫苗制备 - - - - -	52
实验十二 鸭瘟弱毒(六次系)疫苗制备 - - - - -	56

I

微生物实验时应注意的事项

- 1、实验前须充分预习实验指导，以了解实验内容，避免实验时概念模糊和形成混乱现象。
- 2、“共产党员对任何事情都要问一个为什么，-----”。实验过程中要多加思考，培养独立工作能力；如有不懂的问题，应及时与组内同学或与教师讨论。要在学可上基本达到每个实验的目的要求。
- 3、勤俭节约。爱护公共财物，节约用品，特别注意显微镜使用及保护。
- 4、实验室内不得高声漫谈，不得饮食及吸烟，不要穿拖鞋打赤脚。除必要外，不得任意离开座位。
- 5、如有仪器损坏或其它意外情况，应立即报告教师进行处理。
- 6、实验完毕，桌面应清理整洁，用过的仪器药品，均须放回规定地方，不得乱放。
- 7、遵守指导教师作出的适当的临时规定。

实验一 显微镜油镜和暗视野显微镜的 使用及微生物形态观察

检验细菌标本多用油镜进行。所谓油镜，即是在标本与显微镜油镜头之间充以折光率与玻璃折光率大致相同的油滴，使透过之光线不致因空气的折射而有折损失，光量充足，则物象清晰。

暗视野显微镜，系用光线斜射通过标本的装置，使视野背景黑暗，而标本中的物体则反光发亮并增大其轮廓，有利于观察纤细的微生物和活体运动。

一、目的要求：学习正确地应用和保护显微镜的方法；掌握油镜和暗视野的使用技术；认识细菌的基本形态和构造。

二、显微镜检查法：

1、姿势：置显微镜于平稳的实验台上，镜检者的姿势要端正，一般用左眼观察，右眼便于绘图与记录，两眼亦必同时睁开，以减少疲劳，最好能练习到左右眼均能视物自如的程度。

2、光源：一般使用天然光源和人工光源，前者宜用北方散光，因其比较稳定。不能用直射日光作光源，以免损坏显微镜。人工光源常用着黄照明光线，效果亦甚佳。如使用普通电灯作光源时，为了避免红、黄光线影响物象颜色，应于集光凹下装入兰色滤光玻璃片以吸收之。

3、对光：先将光圈（虹彩）完全开放，升高集光凹使与载物台同高（否则使用油镜时光线较暗）。然后把检查标本置载台上，按下低倍镜观察光强减弱，用手转动反光镜以调节。反光镜有平凹两面，光线强时用平面（天然光源），弱时用凹面，

因凹面镜比平面镜容纳和反射光线较多。对光时使全视野内有均匀的明亮度。凡检查染色标本时，光线宜强，检查未染色的标本时，光线宜弱。要求光线强弱，可放大或缩小光圈，升降集光器，旋转反光镜等互相配合以调节之。

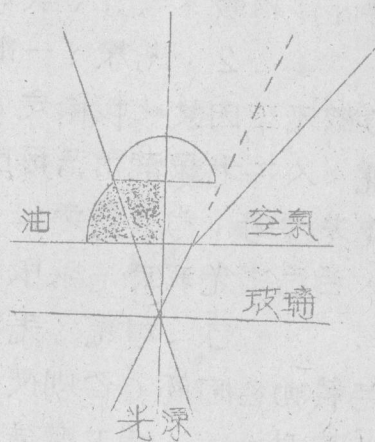
4、检查：初学者在先用低倍镜，找好所检查的部位（熟练时可省略），然后在标本上加柏油一滴，转换油镜头浸入油滴中，使镜头与标本面相接触为度。乃用左眼由目镜注视镜内，同时慢慢转动大螺旋、提起镜筒（此时严禁用大螺旋降下镜筒）至能模糊看到物象时，再转动微螺旋，直至物象清晰为止，随即开始进行检查观察。

三、显微镜油镜的原理：

油镜头的晶片极小，故进入镜中的光线较少，其视野较用高倍镜时为暗。当油镜镜头和载玻片之间为空气时，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入柏木油之类的油类，因柏木油与玻璃的折光指数相近，故光线不致因折射而丧失，可使视野充分照明，便于观察和检查。

实验室中几种常用物质的折光指数如下：

品名	折光指数
玻璃	1.52-1.59
檀香油	1.52
柏木油	1.51
加舒大树胶	1.52
二甲苯	1.49
液体石蜡油	1.48

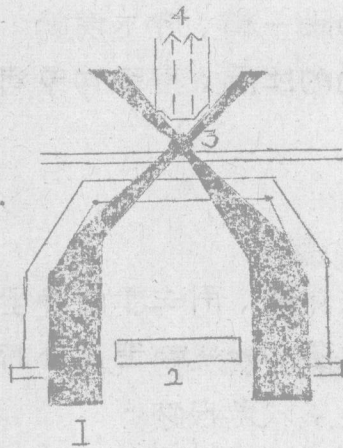


油镜的原理图

松节油	1:47
甘油	1:47
水	1:33

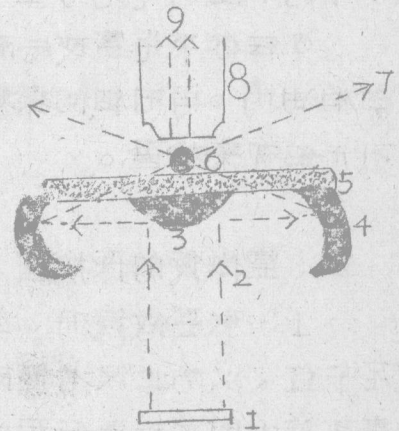
四、暗视野显微镜的原理和使用：

I、原理：暗视野显微镜是采用一个特殊的暗视野集光口，使光线不能直接通向镜筒，只能从四周边缘斜射到载玻片的物体上，由于物体和周围液体的折光率不同，引起散射，因此，所见的视野背景里暗，而其上的物体则反光发亮明显，犹如观看里夜天空中闪闪发亮的繁星，观察得比较清楚。暗视野显微镜可观察活体微生物运动，特别易于观察螺旋体的形状和运动。



抛物面型暗视野集光口

1、光束 2、聚光板
3、标本 4、射入镜筒的光线。



心形暗视野集光口

1、光源；2、光线；3、半圆形反光镜，
4、反光镜光线在此折射到标本上，
5、载物玻片，6、标本；下斜射出去的光线；8、接物镜；9、射入镜筒的光线。

2、暗视野显微镜的使用和注意事项：

①制作装片时所用的载玻片和盖玻片均必须清洗干净。
应使用薄玻片（载玻片厚度约1.0—1.1毫米，盖玻片约0.1毫米），否则会影响焦距的调节，使不能获得清晰的物象。标本不宜过厚。

②所用的光线宜强，光线暗则物象不清晰。

③调节光源，使光线集中在暗视野集光口中，先用低倍接物镜观察，移动暗视野集光口，使其中央的一个光圈处在视野的中央。如暗视野集光口已固定好，则可免去这一步骤。

④先在暗视野集光口上加柏油一滴，然后把标本放在载物台上，^把暗视野集光口向上转动，使其上的柏油和标本片表面相接触，中间不能有气泡存在。

⑤在标本片盖玻片面上再加柏油一滴，降下镜筒，使油镜浸在柏油内。再用粗调螺旋调节镜筒的高低，直至物象清楚为止。即可开始观察检查。

五、显微镜的保护法：

1、取显微镜时，应以右手持镜臂，用左手托镜座，保持镜座平直，以防止反光镜反接目镜滑落。如运输至远处时，应将镜身在箱内固定后关好箱门才能搬运，以免损坏。

2、显微镜的各个镜头均不得用手指拭抹，应用擦镜纸或绸布轻拭之。油镜用过后，应立即用擦镜纸拭净，如油质已干，则应用擦镜纸或绸布蘸二甲苯少许拭抹，然后再用擦镜纸或绸布轻拭干净，因二甲苯能溶解胶结镜头的粘着物，所以不能过久存留于镜头。镜体可用软布清拭，以保持清洁。

3、显微镜不得受直射日光照射，在清拭时不得随意把显微镜拆卸，显微镜的齿轮也不得任意添加润滑油。

4、显微镜用过后，须将各部位恢复原位，尤须注意不得将接物镜互对集光口，须将接物镜又开成八字形，然后将镜筒放下，使镜头承托于载物台上，同时又把集光口放下，以免发生撞环的危险。

5、保存中应注意防止灰塵、潮濕及高温影响。

六、观察各种微生物的形态及特殊构造：

1、细菌的各种基本外形（用油镜观察）：

①球菌：双球菌、链球菌、八叠球菌、葡萄球菌。

②杆菌：单杆菌、双杆菌、链杆菌。

③螺旋状菌：弧菌、螺菌。

2、细菌的特殊构造（用油镜观察）：

①荚膜。

②鞭毛：单毛菌、周毛菌。

③芽胞：中央芽胞、^本端芽胞、次末端芽胞。

3、立克次氏体、病毒已涵体的形态（用油镜观察）。

4、螺旋体的形态（用暗视野显微镜观察）。

所发的染色标本片，经看完后，应放入二甲苯缸中约1—2分钟以洗去油滴，洗后略干即可装回标本盒内。切忌用抹布将标本片揩拭，以免把标本抹掉。没有干燥固定的活体标本片，看完后要放在消毒瓶内；以防传染。

思考问题：

1、使用显微镜油镜及暗视野显微镜的原理及注意之要点如何？

2、对显微镜的保护应注意哪些地方？

3、细菌有哪些基本形态及特殊构造？

实训二 细菌抹片的制作及染色法

细菌细小，无色半透明，未经染色而用显微镜观察比较困难。经过制成抹片，并加以适当染色之后，不仅形态清楚可见，而且某些内部构造亦能显示出来，是鉴别细菌的一个重要方面。

I、目的要求：掌握细菌抹片制作方法及简单染色法、复染染色法（又称革兰氏染色法）、伊江美兰染色法（又称赖氏染色法）、抗酸染色法等几种常用的细菌染色法；识别固紫阳性、阴性反应和抗酸性反应的现象；通过抹片观察，进一步熟练使用显微镜油镜的方法。

2. 细菌抹片制作方法：

(1) 细菌培养物抹片制作法：

①、取洁净载玻片一块，在酒精灯火焰上通过数次，以除去其上面残余的油脂，然后平置于台上。

②将接种环在火焰上烧灼后，取无菌水或蒸馏水一滴置于玻片上（如培养物为液体，则可省去这步工作）。

③再烧灼接种环，冷却后从试管中取少许培养物混入玻片的水滴中，用接种环推布涂布均匀，使成抹片。再烧灼接种环后放好。

④抹片干燥后，在火焰上通过三、四次以进行固定，固定后即可染色。

固定的目的：①杀死微生物（但不是所有各种微生物都能被杀死！）；

②使涂抹物很好地附着于玻片上，防止水洗时冲掉；

③使全片易于染色，因为死的蛋白质比活的更

白质着色力强。

(2)、抹片制作时应注意的事项：

- ①制抹片取菌时，应注意无菌操作，以免把菌种污染。
- ②制抹片时，不要取菌太多，抹得太厚，以免透光不良，染色不好。
- ③抹片的位置应放在玻片中央部位，不要过份偏在两端。有时一块片可做两个或两个以上的抹片，以方便染色，镜检，对比，并节约时间。
- ④抹片后，应得固定。

3、实验室常用的染色法：

1)、简单染色法：

使用一种染料的染色法，称为简单染色法或单一染色法，标本更常只着染一种颜色。

常用稀稀石炭酸复红液、结晶紫液或美兰液进行染色，方法如下：

- ①、滴1—2滴染色液于已固定的抹片上。
- ②、染色1—2分钟后，用水轻轻冲洗。
- ③、干燥后，用显微镜油镜检查。

(2)、复合染色法：

不同的细菌对某些染料的结合力或染色程度是不同的，根据这个特性，应用两种以上的染料，经过一定方法进行染色，可以使不同性质的细菌染上不同的颜色，这就是复合染色法。这种染色方法，有着鉴别不同特性细菌的意义。其中最常用最重要的是固紫染色法。

①固紫染色方法（革兰氏染色法 Gram's stain）：

原理：固紫染色的本质是一种复杂的物理化学现象。一部分细

菌细胞的原生质内含有某些核柠檬酸类，这些物质和结晶紫或龙胆紫反应发生反应，即能形成固定的深紫色的复合物，不能被常用的脱色剂（95%酒精）所脱色，这种细菌称固紫阳性菌。另一部分细菌细胞的原生质内没有这些特别的核酸类，虽经结晶紫反应作用，不能形成固定的复合物，所着染的颜色能被酒精所脱，这类细菌称为固紫阴性菌。由于固紫阳性细菌于脱色后，又回复元色，不易观察，所以在脱色之后，必须用另一种不同颜色而浓度较低的染料，再次复染使阴性菌染上另一种颜色。阳性菌因已染成深紫色，一般不受第二种染料所影响，颜色改变很少，因此，染色结果固紫阳性菌为紫兰色，固紫阴性菌则为红色。

固紫染色方法的步骤如下：

- 1) 抹片固定后，用草酸铵（铀）结晶紫（第一液）染色1—2分钟。
- 2) 水洗并沥去多余水份后，加上碘液（第二液）作用1—2分钟。
- 3) 水洗后，用95%酒精（第三液）脱色约半分钟，至再无染料被溶解脱下即可。
- 4) 水洗后，加稀稀碳酸复红或沙黄液（第四液）复染约10秒钟。
- 5) 水洗，干燥后镜检。

染色结果：固紫阳性菌呈紫色，阴性菌呈红色。

固紫染色法的染色顺序不得颠倒或遗漏，脱色时间可以根据抹片厚薄，灵活掌握至色素不再溶出为止即可，不宜过长或过短。固紫染色所用的细菌宜用幼龄菌，过于衰老则染色反应会不准确。

②伊红美兰染色法（赖氏染色法、Wright's stain）：

此法常用于组织抹片及血片染色。染色后微生物与组

纤维细胞易于区别，使镜检时更加清楚分辨，一般的细菌被染成兰色，而其它的纤维细胞，则常呈红、橙等颜色。

染色方法如下：

①使抹片自然干燥，加染色液数滴于抹片上，染色2—3分钟。此时不但有染色作用，而且染色液中的甲醇能同时起脱水作用，将抹片固定。

②加伊红美蓝磷钨盐缓冲液或蒸馏水数滴于其上（约与伊红美蓝染色液等量），此时可见染色液浮现出一层金膜的光泽，让其作用2分钟。

③水洗（冲洗前不要将染料倒去，否则片上会有残渣）。

④干燥，镜检。

本染色还有另外一种方法：抹片干燥后，先在抹片上加一小块滤纸（比标本略大一些即可），再在滤纸上加上染料，从滤纸染料内的残渣而透过滤纸染色，也不需要再加缓冲液或蒸馏水，经2—3分钟后，水洗即成。此法效果较好，染色时间较久，又节省时间。

⑤抗酸染色法：

常用于结核杆菌等抗酸性细菌的染色，因为这类细菌不易被普通染色剂着色，必须加媒染剂和加温才能染上颜色，但一经着色后，则不易被酸性酒精所脱色。而其它非抗酸性细菌却易被脱色。结果抗酸性细菌保留原来所染颜色，非抗酸性细菌则须经其他染料复染，才呈现相宜的颜色。

其方法如下：

①抹片固定后，加少量^石炭酸复红染色液于其上，加热至蒸发表现为止（不要煮沸），约经3—5分钟即可。染色过程中可适当补充因蒸发所损失的染料，不使标本干燥。

②稍冷，用水冲洗后，用3%盐酸酒精脱色，至无色素脱

下为止；

3) 水洗后以美兰染色1分钟；

4) 干燥，镜检，抗酸菌呈红色，其他细菌或细胞呈兰色。

4. 几种常用染色液的配制方法：

(1)、美兰染色液的配制：

1% 美兰酒精溶液 30 毫升
1:10,000 氢氧化钾 (KOH) 水溶液 100 毫升
两者混合即成。

(2)、固紫染色液的配制 (又称革兰氏染色液)：

第一液：

溶液一：结晶紫 (含染料90%) 2.0 克
 95% 酒精 20.0 cc
溶液二：草酸铵 0.8 克
 蒸馏水 80.0 cc

将溶液一与溶液二混合即成。

第二液：

碘片 1 克
碘化钾 2 克
蒸馏水 300 cc

先将碘化钾置于干净的乳钵中，加入清水少许 (约5毫升)，待碘化钾完全溶解后，再将研碎的碘片加入，徐徐加水，充分混合，待碘片完全溶解后，再加蒸馏水至足量。切忌将碘片不加研磨即与碘化钾混于瓶中一次加水配制，若如此则碘片往往不能完全溶解而影响碘的浓度。

第三液 95% 酒精

第四液 (稀释龙胆紫红)

石碳酸复红	10cc (见抗酸染色液配制)
蒸馏水	90cc

第四组除了用石碳酸复红外，也有用次黄水溶液的（配制方法：取次黄3.41克溶于95%酒精100毫升中，配成酒精饱和溶液储存。应用时将储存的饱和酒精溶液用蒸馏水稀释10倍即成。此液保存期不超过四个月为宜）。

(3)、伊红美兰染色液的配制（又称赖氏染色液）：

伊红美兰染料粉（即赖氏染料粉）	0.1克
甲醇	60cc

置染料粉于玛瑙或玻璃乳钵中，徐徐加入甲醇，研磨以促其溶解，溶解后盛于有颜色的中性玻瓶中，置于暗处过夜，次日以滤纸滤过，保存于暗处备用。（若无甲醇，亦可免单独用花L糖代替，但染色时间须略加长）

磷酸盐缓冲液的配制：

溶液1： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ （磷酸盐=钠）	23.86克
蒸馏水	1000cc
溶液2： KH_2PO_4 （磷酸盐=钾）	9.078克
蒸馏水	1000cc

用时以溶液1四份与溶液2一份混合即成。

(4)、抗酸染色液的配制：

石碳酸复红液：5% 硷性复红酒精溶液	10cc
5% 石碳酸水溶液	90cc
二液混合即成。	

盐酸酒精液：

浓盐酸	3cc
95% 酒精	97cc
混合即成。	

思考问题：

- 1、细菌涂片染色时，为什么需要固定？
- 2、周染染色法的染色顺序如何？标注五个步骤完成后，其结果会怎样？
- 3、抗酸性染色的原理如何？

实验三 细菌培养的生长情况观察

同种细菌在不同的培养基上有不同的生长情况。虽然细菌的生长情况会随条件不同而有变化，但在相对稳定的环境条件下，这种特性还是比较稳定的。根据生长情况不同，对鉴别细菌有着重要意义。

1. 目的要求：

认识细菌在各种培养基上主要的生长情况及其在细菌鉴定上的意义。

2. 方法：

(1). 细菌培养生长情况的观察：

检查每一种细菌培养时，除了认真观察它的生长情况之外，还应挑取小许作涂片，阅染色，镜检。并将观察结果记录在表格中。

④ 肉汤中的细菌生长情况及菌体形态表：

观察时不要将试管倾斜或摇动，以免菌液流出或捣散菌膜与沉淀，看不到原来生长情况。

试管号	菌膜或菌环	混浊度	沉淀物	菌体形态	染色反应

② 琼脂斜面上的细菌生长情况反菌体形态表：

试管号	菌苔的生长情况	菌体形态	染色反应

③ 琼脂平板上的细菌生长情况反菌体形态表：

平皿号	菌落外形	大小	高度	内部构造	边缘	色素	透明度	粘稠度	湿度	菌体形态	染色反应

④ 细菌在鲜血琼脂平板上的生长情况：

平皿号	菌落外形	大小	表面构造	溶血情况