



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

(动物医学专业)

兽医微生物学 实验教程

胡桂学 主编



中国农业大学出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

兽医微生物学实验教程

(动物医学专业)

胡桂学 主编

中国农业大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

兽医微生物学实验教程/胡桂学主编. —北京:中国农业大学出版社,2006.9

(普通高等教育“十一五”国家级规划教材)

ISBN 7-81117-057-4

I. 兽… II. 胡… III. 兽医学:微生物学-实验-高等学校-教材 IV. S852.6-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 082725 号

书 名 兽医微生物学实验教程

作 者 胡桂学 主编

策划编辑 潘晓丽

责任编辑 冯雪梅

封面设计 郑 川

责任校对 王晓凤 陈 莹

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路2号

邮政编码 100094

电 话 发行部 010-62731190,2620

读者服务部 010-62732336

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 刷 北京鑫丰华彩印有限公司

版 次 2006年9月第1版 2006年9月第1次印刷

规 格 787×1092 16开本 11.75印张 293千字

印 数 1~3000

定 价 16.50元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

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)

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理论 and 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“十一五”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编写的。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

实验须知	(1)
------	-------

第一部分 细菌形态学检查法

实验一 显微镜的使用和维护	(5)
实验二 细菌基本形态及特殊结构的观察	(22)

第二部分 细菌培养法

实验三 培养基的制作	(31)
实验四 细菌的基本培养方法及生长现象观察	(36)
实验五 细菌的生化试验	(47)
实验六 药物敏感试验	(61)

第三部分 病原菌的微生物学检查

实验七 葡萄球菌和链球菌的微生物学检查	(71)
实验八 大肠杆菌和沙门氏菌的微生物学检查	(74)
实验九 布氏杆菌的微生物学检查	(78)
实验十 多杀性巴氏杆菌的微生物学检查	(83)
实验十一 炭疽芽孢杆菌的微生物学检查	(85)
实验十二 猪丹毒杆菌和李氏杆菌的微生物学检查	(89)
实验十三 结核杆菌和副结核杆菌的微生物学检查	(92)
实验十四 螺旋体的微生物学检查	(95)
实验十五 支原体的微生物学检查	(99)
实验十六 真菌的培养及形态观察	(103)

第四部分 病毒的培养与鉴定技术

实验十七 病毒的动物培养	(109)
实验十八 病毒的鸡胚培养	(117)
实验十九 病毒的细胞培养	(121)
实验二十 病毒滴度的测定	(126)
实验二十一 病毒形态学、理化学和生物学鉴定常用技术	(131)
实验二十二 病毒免疫学鉴定常用技术	(137)
实验二十三 病毒核酸检测常用技术	(145)

附录一 常用染色液的配制·····	(157)
附录二 常用培养基的配制·····	(162)
附录三 菌种的保存·····	(176)
附录四 实验报告格式·····	(180)
参考文献·····	(181)

实验须知

微生物学实验课的目的,是训练学生掌握微生物学基本操作技能,学习微生物学基本知识,加深理解微生物学基本理论。同时,通过实验培养学生观察、分析、解决问题的能力,实事求是、严肃认真的科学态度,独立思考、勇于创新的开拓精神以及认真负责、团结协作、勤俭节约、爱护公物的良好习惯。另外,在实验中,可能接触到病原微生物。既要求工作谨慎,严防实验室感染,防止事故,确保安全,又要求严格训练,以培养进行微生物学实验的良好素质。

为了上好兽医微生物学实验课,必须注意下列事项:

(1)每次实验课前必须充分预习实验教程,明确实验目的、原理和步骤,做到心中有数,思路清楚。课前教师可以安排简短的实验内容讨论和提问,督促学生做好预习。

(2)进入微生物学实验室,必须穿着工作衣帽。固定座位,不得随意更换。实验室内应保持整洁,非实验必需物品不要带入实验室。尽量避免在实验室内走动,切勿高声说话。

(3)严格无菌操作,防止病原微生物污染和散布。

①实验过程中,如果实验衣帽上不慎沾上可传染的材料,应脱下并浸于消毒液中(如5%石炭酸等),过夜或高压灭菌后再进行洗涤。

②沾有病原微生物的器皿及废弃的培养物,应置于指定的地点,消毒后再进行洗涤;检查用过的动物尸体、脏器、血液等,应严格消毒后深埋于指定地点或由卫生处理厂处理。

③接种环、接种针使用前后必须在火焰中烧灼灭菌。

④含有培养基的试管不可平放在桌面上,防止液体流出。

⑤实验室内禁止饮食、吸烟及用嘴湿润铅笔和标签等物,也不要用手指或其他物品与面部、眼睛接触。

⑥操作危险材料时,不要谈话或思考其他问题,以免分散注意力而发生意外。

⑦实验中若发生意外,如吸入细菌、划破皮肤、细菌或病料污染桌面或地面等时,应及时报告教师并立刻处理,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,如有特殊需要,应严格按照规章制度办理。

⑨工作完毕后应先用消毒药水洗手,后用清水洗手。

(4)一切易燃品应该远离火源。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,防止爆炸。电炉、电热板、煤气等用完后立即关闭,如有漏电、漏气等应立即维修。实验室内要有充足的灭火器,并教会学生使用。

(5)养成节约习惯,合理使用实验器材。

①使用药品、试剂、染色剂、镜油、拭镜纸、吸水纸等应该节约。

②使用仪器等要小心,严格按照操作规程工作、保养,避免损坏和意外,贵重仪器使用结束后应该做好登记。不是本次实验使用的仪器,不应乱动,以免混乱和影响正常实验。

③吸管插入试管时,要轻放到底才松手,以免戳破试管。

④平皿一般应倒放,即皿底在上,皿盖在下,以免拿时皿底掉下摔破。

⑤金属器皿用完消毒后,应立即擦干,防止生锈。

(6)所用各种试剂、染色剂、培养物、培养基、动物和病料等,均需标记明确。需进行高压灭菌或蒸汽消毒的标签,应该用黑色铅笔书写,不可用钢笔、圆珠笔书写,以免消毒后模糊不清。

(7)实验要认真操作,仔细观察,及时做好记录。

(8)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,对实验室进行清扫,关好门、窗、水、电和煤气等。

(9)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,并及时交给教师评阅。

第一部分

细菌形态学检查法

实验一 显微镜的使用和维护

(Employment and Maintenance of Microscope)

【目的要求】

- (1)了解各类显微镜和显微镜照相装置的简单构造原理、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】

微生物个体微小,大小通常用微米表示,肉眼难于看见,必须利用显微镜放大后才能看见。所以,显微镜是微生物学工作者必不可少的工具,正是显微镜的发明,使人类揭开了微生物世界的奥秘。随着科学技术的进步及微生物研究的需要,显微镜从使用可见光源的普通光学显微镜,发展到使用紫外线光源的荧光显微镜,进一步发展到用电子流代替照明光源的电子显微镜,使放大率和分辨率大大提高,为微生物学的发展提供了保障。因此,深入了解显微镜的结构、工作原理和熟练操作显微镜是每一个微生物学工作者必备的素质之一。

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、相差显微镜、暗视野显微镜、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时,最常用的是油镜。

下面重点介绍几种常用显微镜的结构和工作原理及维护。

一、普通光学显微镜

普通光学显微镜是由一组光学放大系统和机械支持及调节系统组成(图 1-1),这两部分很好地配合,才能发挥显微镜的作用。

1. 机械支持及调节系统 机械支持及调节系统是整个显微镜的骨架,对光学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。

(1)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。

(2)镜臂:镜臂用于支撑镜筒、镜台和调节系统。

(3)镜台:镜台又叫载物台,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。

(4)镜筒:镜筒是连接物镜和目镜的金属筒,其上端插入目镜,下端和物镜转换器相连接。

(5)物镜转换器:物镜转换器安装在镜筒下端,用于装配物镜,装配有 4~6 个不同放大倍数的物镜,转动物镜转换器可以选择到合适的物镜。

(6)调焦旋钮:粗、细调节旋钮位于镜臂基部,可使镜臂上下移动,用于调节焦距。

2. 光学系统 光学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。

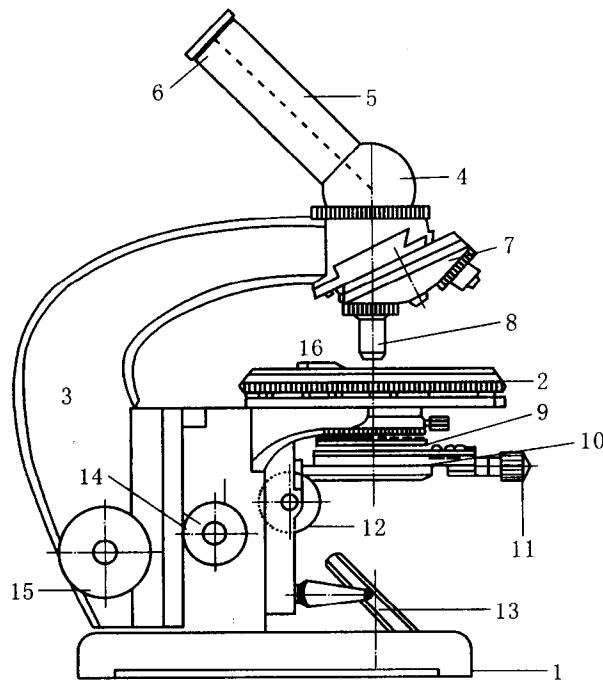


图 1-1 普通光学显微镜的模式图

1. 镜座 2. 载物台 3. 镜臂 4. 棱镜套 5. 镜筒 6. 接目镜 7. 转换器 8. 接物镜 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. 细调节器 15. 粗调节器 16. 标本夹

(1)光源:光源有自然光源(反光镜)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。反光镜可自由转动,以调节位置,使光线能射向聚光器和标本。有聚光镜的显微镜,无论是使用高倍镜还是使用低倍镜,均使用平面镜,只有在光线不足时才使用凹面镜。无聚光器的显微镜,在使用低倍镜时用平面镜,在使用高倍镜时用凹面镜。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。

(2)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,明视场聚光器有阿贝聚光器、齐明聚光器和摇出聚光器。阿贝聚光器在物镜数值孔径高于 0.6 时会显示出色差和球差。齐明聚光器对色差、球差和慧差的校正程度较高,是明视场镜检中质量最好的聚光器,但它不适于 4 倍以下的物镜。摇出聚光器,能将聚光器上的透镜从光路中摇出满足低倍物镜($4\times$)大视场照明的需要。

聚光器安装在载物台下,其作用是将从光源来的平行光线聚焦于标本上,以得到最强的照明,使物像获得明亮清晰的效果。聚光器在光学系统中的位置可以通过其上的两个调节螺杆将光圈调小后进行聚中调节。其高低也可以调节,使焦点落在被检物体上,以得到最大亮度。一般聚光器的焦点在其上方 1.25 mm 处,而其上升限度为载物台平面下方 0.1 mm。因此,要求使用的载玻片厚度应在 0.9~1.3 mm 之间,否则被检样品不在焦点上,影响镜检效果。聚

光器前透镜组前面还装有虹彩光圈,它可以开大和缩小,影响成像的分辨力和反差,若将虹彩光圈开放过大,超过物镜的数值孔径时,便产生光斑;若收缩虹彩光圈过小,虽反差增大,但分辨力下降。因此,在观察时一般应将虹彩光圈调节开启到视场周缘的外切处,使不在视场内的物体得不到任何光线的照明,以避免散射光的干扰。

(3)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,是显微镜中很重要的部件,其质量的好坏直接关系到成像的质量。物镜的性能取决于物镜的数值孔径(NA),每个物镜的数值孔径都标在物镜的外壳上,数值孔径越大,物镜的性能越好(图 1-2)。

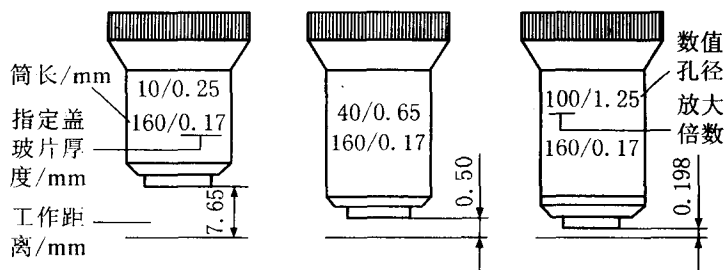


图 1-2 显微镜物镜参数示意图

数值孔径(NA)定义为物镜透镜与被检物体之间介质的折射率(η)和镜口角(μ)一半的正弦的乘积。即

$$NA = \eta \sin(\mu/2)$$

显微镜所能辨别物体两点之间最小距离为分辨率,以 δ 表示,其计算公式如下:

$$\delta = \lambda / NA$$

从公式中可以看出, NA 越大,则分辨率越高。另外,选择波长较短的光源及增大介质的折射率也可以提高分辨率。

日光的波长 $\lambda = 0.56 \mu\text{m}$,如果 $NA = 1.4$,则 $\delta = 0.56 / (2 \times 1.4) = 0.20 \mu\text{m}$;如使用波长 λ 为 $0.27 \mu\text{m}$ 的紫外光,则 $\delta = 0.27 / (2 \times 1.4) = 0.10 \mu\text{m}$,分辨率提高了 1 倍。

增大物镜与标本之间介质的折射率也是行之有效的方法,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光线散失。

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 0.2 mm 。

物镜的种类很多,可从不同角度来分类:

①根据物镜前透镜与被检物体之间的介质不同,可分为干燥系物镜和油浸系物镜(图 1-3)。

a. 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;

b. 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(图 1-3)。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(如 $95\times$, $100\times$ 等)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”(oil immersion)或“HI”(homogeneous immersion)做记号。油镜上也常漆有

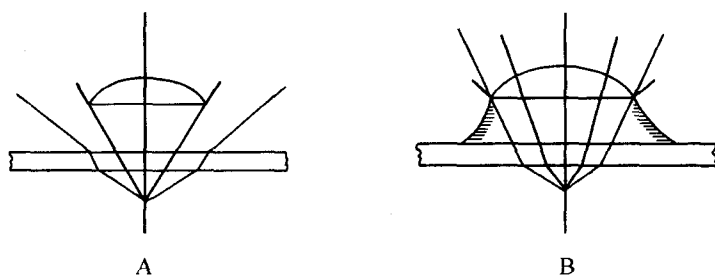


图 1-3 接物镜干燥系(A)和油浸系(B)的光线图

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。

②根据物镜放大率的高低,可分为:

- a. 低倍物镜:指 $1\times\sim 6\times$, NA 值为 $0.04\sim 0.15$;
- b. 中倍物镜:指 $6\times\sim 25\times$, NA 值为 $0.15\sim 0.40$;
- c. 高倍物镜:指 $25\times\sim 63\times$, NA 值为 $0.35\sim 0.95$;
- d. 油浸物镜:指 $90\times\sim 100\times$, NA 值为 $1.25\sim 1.40$ 。

③根据物镜对像差和色差校正的程度来分类,可分为:

a. 消色差物镜:是最常用的物镜,外壳上标有“Ach”字样,该物镜可消除红光和青光形成的色差。镜检时通常与惠更斯目镜配合使用;

b. 复消色差物镜:物镜外壳上标有“Apo”字样,除能校正红、蓝、绿三色光的色差外,还能校正黄色光造成的像差,通常与补偿目镜配合使用;

c. 特种物镜:在上述物镜基础上,为达到某些特定观察效果而制造的物镜。如带校正环物镜、带视场光阑的物镜、相差物镜、荧光物镜、无应变物镜、无罩物镜、长工作距离物镜等。目前研究显微镜常用的物镜还有:半复消色差物镜、平场物镜、平场复消色差物镜、超平场物镜、超平场复消色差物镜等。

显微镜的总放大倍数为物镜放大倍数乘以目镜的放大倍数。如在观察某标本时,物镜的放大倍数为 100 倍,目镜的放大倍数为 10 倍,则总的放大倍数为 $100\times 10=1\ 000$ 倍。

(4)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。目镜的结构较物镜简单,普通光学显微镜的目镜通常由两组透镜组成,上端的一组透镜又称为“接目镜”,下端的则称为“场镜”。上下透镜之间或在两组透镜的下方,装有由金属制的环状光阑或叫“视场光阑”,物镜放大后的中间像就落在视场光阑平面处,所以其上可安置目镜测微尺。

普通光学显微镜常用的目镜主要是惠更斯目镜,研究显微镜配有性能更好的目镜,如补偿目镜(K)、平场目镜(P)和广视场目镜(WF)等。照相时选用照相目镜(NFK)。

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,其视野较用高倍镜暗。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

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,如香柏油等,则光线不会因折射而损失太大,可使视野充分照明,能清楚地进行检查。

二、暗视野显微镜

暗视野显微镜(dark-field microscope)又叫暗场显微镜,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细节的特殊显微镜。

(一)原理、结构特点及其性能

暗视野(或称暗场)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(如镜头无光圈装置时,可在镜头内另加适当套管代用)。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(丁铎尔效应),一部分光线就会进入物镜。暗视野显微技术适于观察在明视野中,由于反差过小而不易观察折射率很强的物体,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,常用暗视野显微技术来观察活菌、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。常用的暗视野聚光器有以下几种:

1. 抛物面聚光器 抛物面聚光器透镜的上下两端平行,周边磨制成抛物面,在其下面中央有一块挡光薄膜可挡住光柱中部的光线,只允许周围的人射光线射达抛物面上反射并汇集到标本上(图 1-4)。

2. 心形聚光器 将光学透镜磨制成球面反射系统,并以中央膜阻挡直射光的聚光器(图 1-5)。

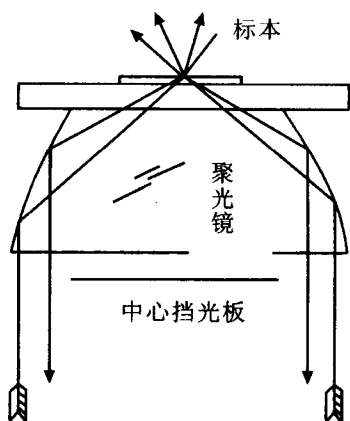


图 1-4 抛物面聚光器

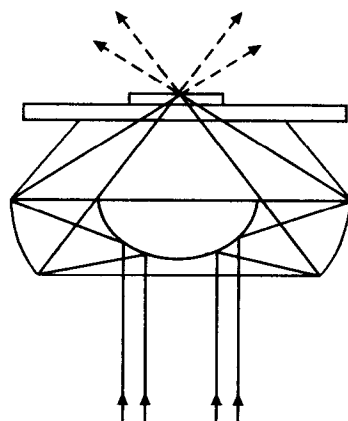


图 1-5 心形聚光器

3. 同心球面聚光器 利用 2 个球面的同一中心制造的聚光器。这种聚光器不涂中心挡光

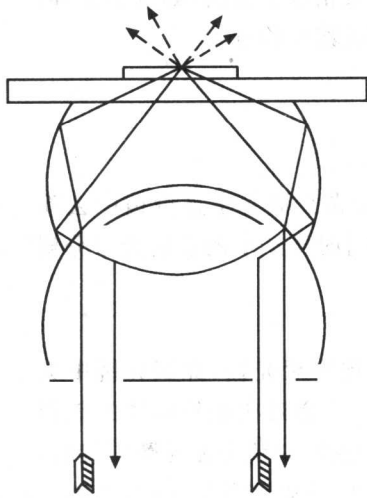


图 1-6 同心球面聚光器

金属薄膜,只以球面反射而阻挡中心直射光束(图 1-6)。

(二)暗视野显微镜的使用方法

基本上与普通光学显微镜相同,主要特点为:

(1)制作标本时所用的载玻片和盖玻片均应清洁干净,必须使用薄玻片(载玻片厚度 1.0~1.1 mm,盖玻片厚度约 0.1 mm),否则会影响暗视野集光器斜射光焦点的调节,如载玻片太厚,焦点只能落在载玻片内,就不能看到物像。标本也不能过厚。

(2)采用的光源宜强,一般均用强光灯照明,光线暗则物像不清晰。

(3)调节光源:使光线集中在暗视野集光器上。先用低倍镜观察,移动暗视野集光器,使其中央的一个圆圈恰好处在视野的中央(图 1-7)。如暗视野集光器已准确固定好,则可免去这一步骤。

(4)先在暗视野的集光器上加香柏油一滴,然后将标本

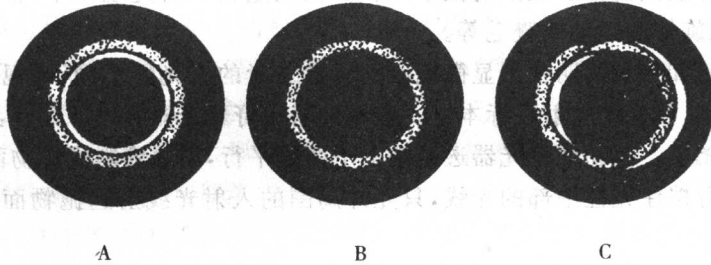


图 1-7 暗视野显微镜的调节

A. 调节亮环和暗环清晰度 B. 两环重合 C. 两环不重合

放在载物台上,把暗视野集光器向上移,使其上的香柏油与标本片的底面接触,中间不能有气泡存在。

(5)在标本盖玻片上再加香柏油一滴,降下镜筒,使油镜浸在香柏油内,再用粗、细螺旋调节物镜的焦距,有时还需稍微升降暗视野集光器以调节斜射光焦点,使其正好落在标本上,并且调节油镜头的光圈,相互配合,直到物像清楚为止,即可开始检查。也可用低倍或高倍物镜进行镜检,这就不必在盖玻片上加香柏油。

(三)注意事项

(1)暗视野观察所用物镜的数值孔径宜为 1.00~1.25,太高反而效果不佳,最好使用带视场光阑的物镜,转动物镜中部的调节钮,可随意改变数值孔径的大小。

(2)使用的载玻片和盖玻片,必须无划痕且无灰尘,物镜前透镜也必须清洁无尘。载玻片与盖玻片的厚度应符合要求。

(3)镜检时,要求室内要暗,不要在明亮的条件下观察,如果没有这样的条件,要尽可能使用遮光装置(如窗帘),以阻止目镜周围的光线射入。