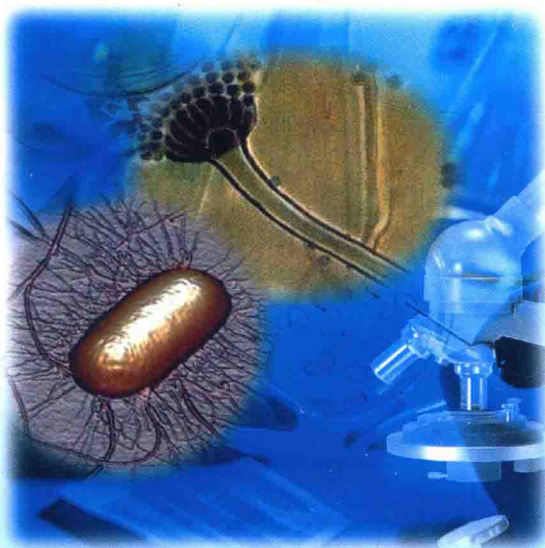




医学本科院校精品规划实验教材

微生物学实验教程

◎ 主编 王 平



第四军医大学出版社

医学本科院校精品规划实验教材

微生物学实验教程

主 编 王 平

副主编 韩 洁 梁建东

编 者 (按姓氏笔画排序)

王 平 王 巍 王文佳

王乾宇 田维毅 孙东风

何光志 范万阳 俞 琦

梁建东 韩 洁 蔡 琨

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学实验教程/王平主编. —西安:第四军医大学出版社, 2013.8

ISBN 978-7-5662-0381-6

I. ①微… II. ①王… III. ①微生物学-实验-高等学校-教材
IV. ①Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 197681 号

weishengwuxue shiyanjiaochen

微生物学实验教程

出版人: 富 明

责任编辑: 曹江涛 崔宝莹

责任校对: 杜亚男

出版发行: 第四军医大学出版社

地址: 西安市长乐西路 17 号 邮编: 710032

电话: 029-84776765

传真: 029-84776764

网址: <http://press.fmmu.edu.cn>

制版: 绝色设计

印刷: 西安力顺彩印有限责任公司

版次: 2013 年 8 月第 1 版 2013 年 8 月第 1 次印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 4.75 字数: 110 千字

书号: ISBN 978-7-5662-0381-6/Q·55

定价: 12.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书, 凡有缺、倒、脱页者, 本社负责调换

前 言

微生物学是研究生命基础理论的学科,同时也是一门应用性很强的学科,是医药院校药学类各专业学生的一门重要基础课程。微生物学实验教学是保证整体教学水平、提高教学质量的重要方面,良好的教材是提高实验课教学质量的先决条件之一。所以在总结我校长期开设微生物学实验课和科学研究中的部分工作经验,并参考和学习兄弟院校大量实验教材和实验经验的基础上我们编写了这本实验教材。

本书力求突出药学专业特点,注重理论联系实际,加强应用性,使学生通过学习能掌握必要的微生物学实验基本技能,为今后学习其他课程和从事药学工作奠定基础。

全书涵盖基本技能实验、应用性实验、综合设计性实验三章,具体包括显微镜的使用、无菌操作、菌种筛选、鉴定、选育和发酵等 19 个实验。基本技能实验包括微生物学实验的基本操作和技能训练,通过学习使学生掌握相应学科的基本知识与基本技能,为应用性实验奠定基础。应用性实验主要介绍药学专业常用的、与微生物学相关的实验技术,体现教学内容的针对性和实用性。综合设计性实验由多种实验手段和多层次的实验内容所组成,主要训练学生对所学知识和实验技术的综合运用能力,培养学生创造性、自主性,提高学生发现问题、分析问题和解决问题的能力。

本教材适用于医药院校药学类各专业本科生的微生物学实验教学,也可供药学专业教师及科研人员参考。

书中编者均为具有微生物学实验教学经验的中青年教师和实验技术人员,限于编者水平,书中难免存在不妥之处,敬请读者批评指正。

王 平

2013 年 7 月

目 录

第一章 基本技能实验	(1)
实验一 微生物的人工培养	(1)
实验二 微生物的形态学观察	(9)
实验三 微生物鉴定中常用的生理生化试验(示教)	(15)
实验四 微生物的分布	(17)
实验五 微生物的控制	(19)
实验六 微生物的遗传变异	(23)
实验七 免疫学实验	(27)
实验八 病原性球菌	(31)
实验九 肠道杆菌	(32)
实验十 表皮丝状真菌检查	(35)
第二章 应用性实验	(37)
实验十一 微生物药物敏感实验	(37)
实验十二 中药抗真菌实验	(40)
实验十三 注射药物的无菌检查	(41)
实验十四 口服药品中霉菌总数测定	(43)
实验十五 药品中大肠埃希菌的检测	(44)
实验十六 药品中金黄色葡萄球菌的检测	(45)
第三章 综合设计性实验	(47)
实验十七 乳酸发酵及乳酸菌饮料的制作	(47)
实验十八 制药用微生物的选育	(49)
实验十九 药品中霉菌的检测及霉菌优势菌群的鉴定	(52)
附录 1 实验室规则	(57)
附录 2 常用玻璃器皿及玻片洗涤方法	(58)
附录 3 常用培养基的配制	(60)
附录 4 常用染色液及试剂的配制	(64)
参考文献	(70)

第一章 基本技能实验

实验一 微生物的人工培养

实验目的

1. 掌握微生物的常用接种方法和在不同培养基上的生长现象。
2. 熟悉常用微生物培养基的种类和制备方法。
3. 了解真菌(丝状菌)不同发育阶段及完整的基本结构。

实验内容

一、培养基的制备

【实验原理】 培养基是用人工方法将适合微生物生长繁殖的各种营养物配制而成的营养基质,以供微生物培养使用。一般培养基的主要成分为蛋白质、糖类、盐类、水分等。另外还有一些营养要求较高的细菌,还必须加入血液或血清、鸡蛋、维生素等其他营养物质。有时为了鉴别或抑制某些细菌,则可加入各种专用基质(如某种糖类、氨基酸等)、指示剂、染料等。由于对培养基的使用目的不同,故在培养基的选择上有所不同。按其物理性质可分为液体培养基、固体培养基、半固体培养基。按其成分和用途可分为普通培养基、鉴别培养基、选择培养基和专用培养基等。培养基需加入小试管、中试管、三角瓶、平皿等内使用。培养基的制备程序为:配料→溶化→测定及矫正 pH 值→过滤→分装→灭菌备用。

【材料与方法】

1. 肉膏汤培养基

(1) 成分:牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、蒸馏水。

(2) 方法:

①用天平分别称取牛肉膏 0.3g,蛋白胨 1g,氯化钠 0.5g,加入蒸馏水 100ml。

②上述用品混合加热溶化,调整 pH 值为 7.6。

③用滤纸过滤后分装于试管或烧瓶,塞上瓶塞,高压蒸汽灭菌(压力 103.42kPa,温度 121.3℃,维持 15~20 分钟)取出冷却后冰箱贮存备用。

用途:肉膏汤培养基可供一般细菌生长。

2. 普通琼脂培养基

(1) 成分:肉膏汤培养基、琼脂。

(2)方法:

①普通肉汤培养基 100ml,加入琼脂 2~3g。

②上述用品混合加热溶化,调整 pH 值为 7.6。

③高压蒸汽灭菌(压力 103.42kPa,温度 121.3℃,维持 15~20 分钟),取出在酒精灯下按无菌手续分装于无菌试管中,每管约 5ml,斜放使其凝成斜面培养基(亦称斜面);分装于无菌平皿中,厚度 3~4mm。凝固后即反转过来,底向上,以免在平皿盖上积存凝结水,即为普通琼脂培养基(亦称平板),冷却后置冰箱保存备用。

用途:普通琼脂培养基用于一般细菌的分离培养,纯种接种或短期保存菌种。

3. 血液琼脂培养基

(1)成分:普通琼脂培养基、脱纤维绵羊血或兔血。

(2)方法:

①普通琼脂培养基经高压灭菌后冷却至 45℃~50℃。

②无菌手法操作加入 5%~10% 血液,轻轻摇匀。

③在无菌条件下,倾注于无菌平皿中,冷凝后即成血琼脂平板培养基。凝固后即反转过来,底向上,置冰箱保存备用。

用途:血液琼脂培养基可用来培养对营养要求较高的细菌,如链球菌、肺炎球菌等。

4. 半固体培养基

(1)成分:肉膏汤培养基、琼脂。

(2)方法:

①将 0.5~1g 琼脂加到 100ml 肉膏汤中,加热溶化,调整 pH 值至 7.6。

②分装于小试管中,每管 2~3ml,加棉塞。

③高压蒸汽灭菌,冷却后冰箱保存备用。

(3)用途:半固体培养基用于保存菌种或观察细菌的动力。

5. 沙保弱培养基

(1)成分:蛋白胨、葡萄糖、琼脂、蒸馏水。

(2)方法:

①在蒸馏水中分别加入 1% 蛋白胨、4% 葡萄糖、2% 琼脂,加热溶化。

②pH 值调至 5.5。分装于试管或平皿,高压蒸汽灭菌 20 分钟。

③冷却后凝固成斜面或平板,冰箱保存备用。

(3)用途:培养真菌。

二、细菌接种技术及生长现象

由于细菌感染而致病的各种标本及带菌者所需检查的各种标本,往往并非单一的细菌,而混有其他非致病菌(人体正常菌群)。因此当对此标本作出细菌鉴定时,就必须从标本中分离出致病菌,称为细菌分离培养技术。另外,对已得到可疑病菌进行

细菌鉴定及菌种保存等培养,称为纯培养接种技术。

(一)细菌的接种技术

平板划线接种法

平板分离划线的方法较多,其中以分区划线法与曲线划线法较为常用。其目的都要使细菌呈现单个菌落生长,便于同杂菌菌落鉴别。现只介绍分区划线法。

【实验材料】

1. 细菌 大肠杆菌、葡萄球菌 18~24 小时普通琼脂斜面培养物。

2. 培养基 普通琼脂平板培养基。

3. 工具 酒精灯、接种环、恒温培养箱等。

【实验方法】

1. 右手持接种环,经火焰灭菌,待凉后,挑取大肠杆菌(或葡萄球菌)培养物少许。

2. 左手斜持琼脂平板,皿盖留在桌上,于火焰近处将菌涂于琼脂平板上端,来回划线,涂成薄膜(约占平板总表面积的 $1/10$),划线时接种环与平板表面成 $30^\circ \sim 40^\circ$ 角,轻轻接触,以腕力在平板表面行轻快地滑移动作,接种环不应划破培养基表面。

3. 烧灼接种环,杀灭环上残留细菌,待冷(是否冷却,可先在培养基边缘处试触,若琼脂溶化,表示未凉,稍等再试),从薄膜处取菌作连续平行划线,占平板表面 $1/5$ 左右,再次烧灼接种环,等三次平行划线……以同样方法作第四次,第五次划线,将平板表面划完。

4. 划线完毕,盖上平皿盖,底面向上,用标签或蜡笔注明菌名检验号码,接种者班级、姓名、组别等,置 37°C 孵育培养 24 小时后观察结果(图 1-1)。

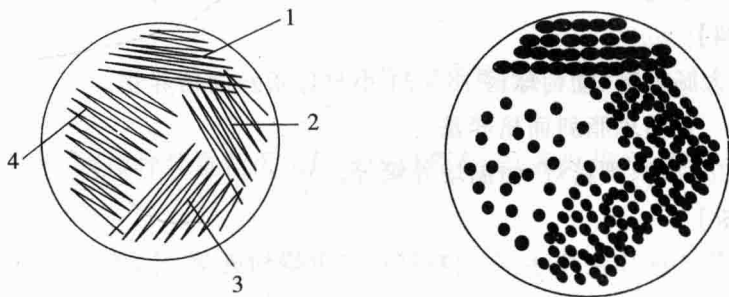


图 1-1 平板培养基划线接种法

斜面培养基接种法

【实验材料】

1. 细菌 大肠杆菌、葡萄球菌 18~24 小时琼脂斜面培养物。

2. 培养基 普通琼脂斜面培养基。

3. 工具 接种环、酒精灯、恒温培养箱等。

【实验方法】

1. 取一支斜面培养基及一支纯菌种管,并排倾斜放在左手四指中拇指压住并以

手掌支住两试管底部。右手将白金环于火焰上灭菌、冷却。并拔起两试管的棉塞(勿放置桌上,如棉塞太紧时应预先松动)。

2. 试管口部于火焰上往返通过 2~3 次灭菌,将灭菌白金环伸入有菌试管中,取少量细菌,小心移至准备接种的试管中。

3. 接种方法是自管底向上连续平划线,若以保存菌为目的时可自管底上划一粗直线即可。

4. 取出接种环,将试管上部再经火焰灭菌,塞好棉塞,接种环灭菌后放回原处。

5. 若自平皿培养物中取菌时,只应沾取一个单个菌落。

6. 接种菌应作好标记,标明菌种名称,日期等,置 37℃ 温箱中培养,次日观察结果(图 1-2)。

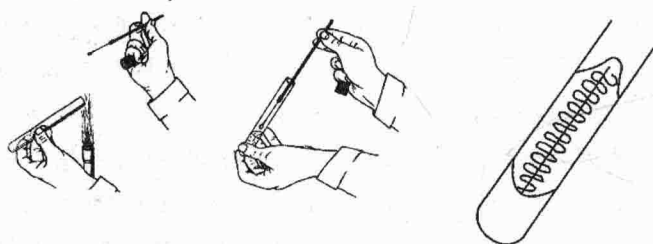


图 1-2 斜面培养基接种法

液体培养基接种法

用于增菌及鉴定细菌生长特点,如表面生长,沉淀生长,均匀混浊生长等。

【实验材料】

1. 细菌 大肠杆菌、葡萄球菌 18~24 小时琼脂斜面培养物。

2. 培养基 普通琼脂斜面培养基。

3. 工具 接种环、酒精灯、恒温培养箱等。

【实验方法】

1. 右手握笔式握住接种环,在酒精灯火焰上烧灼灭菌,冷却后用接种环挑取细菌培养物少许。

2. 左手拇指、示指、中指托住液体培养基之下端,右手小指和环指(或手掌)拔取试管塞,将试管口移至火焰上旋转烧灼。

3. 将沾有细菌的接种环移入液体培养基,在液体偏少侧接近液面的管壁上轻轻研磨,沾取少许液体与之调和,使菌液混合于培养基中,如图 1-3 所示。

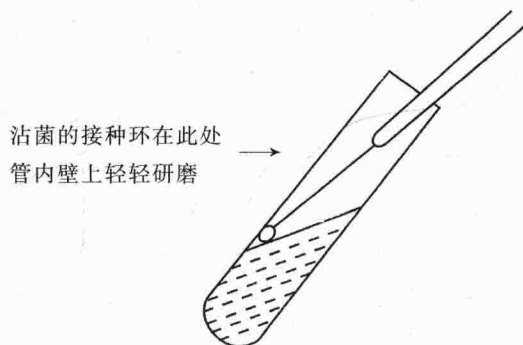


图 1-3 液体培养基接种法

4. 培养基管口通过火焰烧灼灭菌后,塞好试管塞。再将接种环烧灼灭菌冷却后,插入试管架中。接种菌应作好标记,标明菌种名称,日期等,置 37℃ 温箱中培养,次日观察结果。

半固体培养基穿刺培养法

【实验材料】

1. 菌种 大肠杆菌和葡萄球菌琼脂斜面 18~24 小时培养物。
2. 培养基 半固体琼脂培养基。
3. 工具 接种针、酒精灯、试管架等。

【实验方法】

1. 做好标记。
2. 左手握持菌种管和待接种的半固体培养基。
3. 右手持接种针,灭菌冷却后,以针挑取菌落,垂直刺入半固体琼脂培养基的中心,可刺达接近管底 3~5mm,但不必刺至管底,然后循原路退出,注意刺入及退出时不可晃动接种针(图 1-4)。

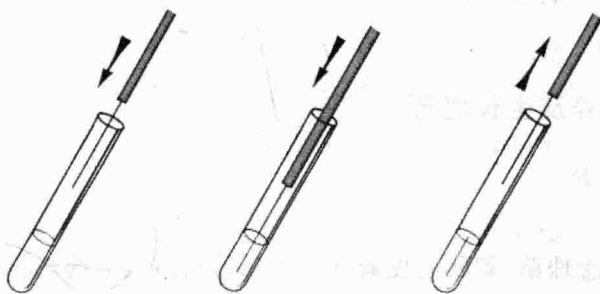


图 1-4 半固体培养基接种法

4. 接种完毕,将接种针重新灭菌后放于试管架上,塞好棉塞,37℃ 孵育 18~24 小时后取出观察结果。

(二) 细菌在培养基上的生长现象(示教)

观察:白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、枯草杆菌平板培养物;白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌血平板培养物;大肠杆菌、葡萄球菌斜面培养物;枯草杆菌、大肠杆菌、链球菌肉汤培养物;大肠杆菌、白色葡萄球菌半固体培养物。

1. 平板培养基中的生长状态观察

(1) 菌苔:细菌在培养基表面形成一层苔状物,见于最开始划线的区域。

(2) 菌落:细菌在普通平板与血平板上单个菌落特征,注意下列 7 点。

① 直径大小:小于 2mm 者为小菌落;2~4mm 者为中等菌落;4mm 以上者为大菌落。

② 形状:圆形或不规则。

- ③透明度:要对光观察,分为透明、半透明或不透明。
 - ④表面:光滑、粗糙、湿润、有光泽、干燥、凸起、凹下、平坦等。
 - ⑤边缘:整齐、不整齐(波浪状、锯齿状、毛发状)。
 - ⑥颜色:有无特殊颜色,无特殊颜色者一般呈灰色或无色。
 - ⑦溶血性:有无溶血环,是完全溶血还是不完全溶血。
2. 斜面培养基上生长状态观察 可见有均匀一致的菌苔,如有不同的菌落出现,则表明污染了杂菌。

3. 液体培养基中的生长状态观察

- (1)混浊生长:液体均匀混浊,或有少量沉淀。大多细菌如此。
- (2)沉淀生长:液体清晰,细菌主要集中在管底形成沉淀。链球菌如此。
- (3)表面生长:液体清晰,细菌主要生长在液面形成菌膜。枯草杆菌如此。

4. 半固体培养基中的生长状态观察

- (1)线性生长(原位生长):无鞭毛的细菌由于不能运动,仅沿穿刺线生长,穿刺线周围界限清楚。
- (2)扩散生长(毛刷状生长):有鞭毛的细菌能够运动,沿穿刺线弥散生长,穿刺线周围界限模糊。

四、真菌的培养及生长现象

(一)真菌的培养

【实验材料】

- 1. 真菌 白色念珠菌、絮状表皮癣菌在沙氏琼脂斜面上的培养物。
- 2. 培养基 沙保弱培养基。
- 3. 工具 接种钩、酒精灯、小刀、灭菌载玻片、盖玻片、培养箱。

【实验方法】

- 1. 斜面培养 用接种钩挑取真菌菌种培养物,接种于斜面培养基的中部,并将其稍微插入培养基内。接种真菌后的培养基置 25°C ~ 28°C 培养,每 2 ~ 3 天观察 1 次。
- 2. 真菌小培养 用灭菌小刀取大约 5mm^2 的琼脂块置于灭菌载玻片上。将真菌培养物取少许接种于琼脂块的周缘。将灭菌盖玻片覆盖于已接种真菌的琼脂块上。将载玻片置于灭菌空平皿中,并在此平皿中放置一浸有大量无菌水的棉球,使平皿内的空气保持充分的湿度。将此平皿置于温箱 25°C 培养,待真菌生长后,即可将小培养真菌自平皿中取出置显微镜下直接观察,观察后仍可放回平皿内继续培养,以便观察其生长的全过程。

3. 真菌大培养

- (1)将沙保弱培养基加热溶化,冷却至 45°C 时倾入大试管内使成斜面。凝固后置 37°C 温箱培养 24 小时,无细菌生长即可使用。
- (2)将毛发或皮屑等检材先用 75% 酒精浸泡数分钟,再以无菌盐水冲洗数遍,置

培养基上,并适当向培养基内压入。将接种好的培养基置室温或 37℃ 培养,每 2~3 天观察一次,经 1~3 周可生长出典型菌落。若 3 周无真菌生长,可报告结果阴性。

(二)真菌菌落观察(示教)

观察新生隐球菌斜面培养物、白色念珠菌斜面培养物、红色毛癣菌斜面培养物。

1. 酵母型菌落(新生隐球菌斜面培养物) 菌落总体特征类似于细菌菌落,较大,圆形或卵圆形,白色,柔软细密,透明发亮,表面光滑凸起,湿润,边缘整齐,无菌丝长入培养基内,菌落黏稠易流动。

2. 类酵母型菌落(白色念珠菌斜面培养物) 新鲜菌落与酵母菌落类似,菌落表面光滑、湿润,乳白色,但有营养菌丝伸入培养基中,对光观察可见菌落周围呈羽毛状。陈旧培养物的颜色变深变硬,表面有皱褶,或有放射状浅沟。

3. 丝状菌落(红色毛癣菌斜面培养物) 菌落表面有大量气生菌丝,呈绒毛状、粉末、棉花样等,中央有皱褶,外周有放射状沟,培养基常裂开,菌落正面和背面可显示不同颜色,有红色、白色、棕色、黑色、黄色等,在不同的培养时间段也不同。

五、病毒鸡胚培养法

鸡胚培养法为常用的病毒培养方法之一,因鸡胚价格低廉,来源充足,培养操作简便,容易培养病毒。主要用于痘类病毒、黏病毒和疱疹病毒的分离鉴定,疫苗及诊断抗原的制备和病毒性质的研究等。接种途径有 4 种:卵黄囊接种、羊膜腔接种、尿囊腔接种和绒毛尿囊膜接种。

【实验原理】 鸡胚组织分化程度低,有可供选择的多种囊腔及囊膜。多种病毒可在其囊膜中增殖,收集囊膜及囊液可得到大量病毒。

【实验材料】

1. 9~10 日龄鸡胚、 10^{-3} 稀释的流感病毒液、单纯疱疹病毒液、流行性乙型脑炎病毒液等。

2. 培养箱、检卵灯、卵架、注射器、针头、小镊子、无菌生理盐水、消毒剂、毛细吸管、酒精灯、试管架、试管等。

【操作方法】

1. 鸡胚的孵育 选新鲜、大而壳薄色浅的鸡蛋,用酒精棉球轻轻拭去壳外的污物,置温度为 38℃~39℃、湿度为 40%~70% 的培养箱中孵育。每天翻蛋 1~2 次,以免粘壳。4~5 日后用检卵灯检查鸡胚,若胚影活动、血管清晰、绒毛尿囊膜界限明显,则可判断为活胚。

2. 尿囊腔接种法

(1) 标记:选 9~10 日龄活鸡胚,在检卵灯上用铅笔标明气室、鸡胚及大血管位置,在胚胎旁避开大血管处标记好注射点。

(2) 接种:将胚蛋立于卵架上,使标记的注射点向上。用碘酒消毒注射点及周围后,用无菌刀尖打一小孔,再用镊子将小孔扩大至直径 1cm。直视下将注射器针头从

壳孔处以与蛋壳成 30° 角的方向斜向刺入尿囊膜约 1cm, 缓慢注入流感病毒液 0.2ml (图 1-5)。注射完毕后, 针头应稍留片刻, 以防回流。接种完毕后以透明胶带封闭注射孔。

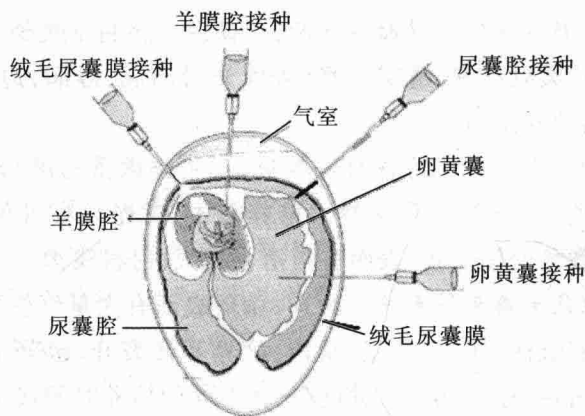


图 1-5 病毒鸡胚培养法

(3) 孵育: 胚蛋置 $35^\circ\text{C} \sim 37^\circ\text{C}$ 培养, 每日照检鸡胚 1 次。2~3 日后将胚蛋移入 4°C 冰箱过夜, 以冻死鸡胚避免收获时出血。若接种后鸡胚 24 小时内死亡, 应视为非特异性死亡, 可即弃之。

(4) 收获病毒: 取出预冷后的胚蛋, 立于架上, 用 2.5% 碘酒消毒气室部蛋壳。用镊柄击破卵壳后, 沿气室边缘剪去卵壳, 用镊子撕去卵膜及绒毛尿囊膜, 然后用无菌吸管进入尿囊腔, 吸取尿囊液, 置无菌试管内。每个鸡胚可收取 4~5ml。在测定病毒的血凝效价后小瓶分装, 低温保存。

3. 绒毛尿囊膜接种法

(1) 标记: 选取 12 日龄、发育良好的活鸡胚, 标出气室界线及鸡胚位置。

(2) 接种: 将胚蛋立置于卵架上, 用碘酒消毒气室部位的卵壳后, 用齿锯或砂轮在气室端近鸡胚侧开出 1 个直径约 2cm 的窗口。用镊子小心撕去气室下的白色卵膜, 使布满血管的绒毛尿囊膜暴露。用注射器滴加 0.2~0.5ml 单纯疱疹病毒液于绒毛尿囊膜上 (图 1-5), 轻轻旋转胚蛋, 使病毒液均匀分布。用无菌玻璃纸封闭卵壳窗口。

(3) 孵育: 将胚蛋窗口朝上, 置 37°C 培养 4~5 天后取出, 移入 4°C 冰箱过夜。弃去接种后 24 小时内死亡的胚蛋。

(4) 收获病毒: 取出预冷后的胚蛋, 立于架上, 消毒窗口区, 撕去玻璃纸, 扩大窗口。用无菌剪刀沿窗口剪下绒毛尿囊膜置无菌平皿内, 用无菌生理盐水洗涤数次, 置低温保存备用。

4. 羊膜腔接种法

(1) 取 9~10 日龄鸡胚, 标出气室与胚位。在接种前 1 天, 将鸡胚气室向上, 直立于卵架上培养, 使胚胎浮于气室下, 易于接种。

(2) 消毒气室端卵壳。在气室近胚胎侧开出 1 个边长约 1cm 的方形窗口, 用无菌吸管滴 1~2 滴无菌液体石蜡于气室端的卵膜上使卵膜透明。检卵灯照射下, 鸡胚清晰可见。

(3) 将注射针头对准鸡胚, 避开大血管刺入, 穿过绒毛尿囊膜和羊膜进入羊膜腔, 注入流感病毒液 0.2~0.5ml。然后用无菌玻璃纸封闭气室的窗口, 纸缘用熔化的石蜡密封(图 1-5)。注射前, 用针头轻击鸡胚小鸡嘴部, 小鸡立即动弹, 表示针头已进入羊膜腔。

(4) 将胚蛋气室向上直立, 置 35℃~37℃ 培养 3~4 天后取出, 置 4℃ 过夜。弃去 24 小时内死亡的胚蛋。

(5) 取出预冷后的胚蛋, 立于架上, 消毒窗口区, 撕去玻璃纸, 扩大窗口。用无菌小镊子轻轻撕去卵膜和绒毛尿囊膜, 用无菌毛细吸管除去尿囊液。再以左手持镊子提起羊膜, 右手以无菌毛细吸管插入羊膜腔吸取羊水置无菌试管内。平均每胚可收获羊水 0.5~1.0ml。最后用红细胞凝集试验测定流感病毒滴度, 小瓶分装, 低温保存备用。

5. 卵黄囊接种

(1) 取 6~8 日龄鸡胚, 照检后标出气室与胚位。将鸡胚气室向上, 直立于卵架上, 消毒气室端卵壳后在气室中央开出小孔。

(2) 注射器针头从气室小孔沿蛋纵轴垂直刺入 2~3cm, 注入流行性乙型脑炎病毒液 0.2~0.5ml(图 1-5)。刺入时注意避开鸡胚。

(3) 以石蜡封闭气室小孔, 置 37℃ 孵育。弃去接种后 24 小时内死亡的胚蛋。

(4) 取出孵育 24 小时以上濒死的胚蛋, 将其气室向上直立于卵架上。消毒气室端卵壳, 无菌操作去除卵壳。用镊子夹住卵黄蒂, 挤去卵黄液。用无菌生理盐水轻轻洗去卵黄囊上的卵黄液后, 将卵黄囊置于无菌平皿内, 低温保存备用。

(王文佳 王 平)

实验二 微生物的形态学观察

实验目的

1. 掌握细菌的基本形态和特殊结构、掌握革兰氏染色法的原理、方法和意义; 常见单细胞真菌、多细胞真菌的形态特征。

2. 熟悉常见致病病毒的形态特征; 生物显微镜的使用, 特别是油镜的使用和

保护。

3. 了解单细胞真菌的形态结构及生殖方式,了解墨汁负染法的操作方法。

实验内容

一、油镜的使用

【实验原理】 微生物学实验中最常使用的是普通光学显微镜的油镜。油镜镜头透镜很小,进入镜筒的光线很少,使用时为了增加亮度,必须在标本玻片与油镜头之间,滴加香柏油,因为香柏油的折光率($n = 1.512$)与载玻片的折光率($n = 1.52$)相近,这样就可使通过聚光器进入载玻片的光线不会因折射而散失,几乎全部进入镜筒内,使视野明亮,物象清楚(图 1-6)。

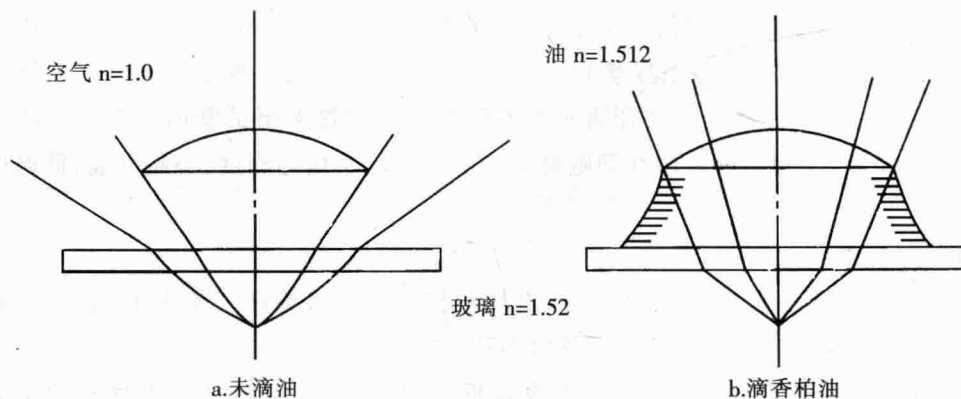


图 1-6 油镜的光线透过原理

【操作方法】

1. 调试 打开电源,先采用低倍镜,使视野达到清晰光亮。
2. 加油 双手向上转动粗螺旋,使镜筒上升,将标本片固定于载物台上,使染色面对准集光器中央,加镜油于标本面,调换油镜头对准标本面。
3. 调焦点 用左手向下轻转粗螺旋,使镜筒下降,同时眼睛从右侧观察下降程度,待镜头入油后接触上玻片,用眼观目镜,反转粗螺旋,使镜筒慢慢上升,待看到模糊物象时,改用细螺旋上下调节,使物像达到完全清晰为宜(一般转动细调节前后半圈)。
4. 观察 观察时只使用细调。需改换视野时,右手操纵推进器,左手转动细螺旋,做到配合自如。并养成左眼用于观察,右眼用于绘图的习惯。
5. 油镜头的保护 油镜头使用完后,必须用擦镜纸滴加少量二甲苯将油擦洗干净(二甲苯用量宜少,以免镜片间粘胶溶解)。下降集光器,半接物镜转成“八”字,再下降镜筒,轻触镜台表面,双手平持显微放入镜箱,避免直射日光,置于干燥处,以

防受潮。

【注意事项】

1. 使用直筒显微镜观察标本时,必须两眼同时睁开,训练使用左眼用于观察,右眼用于绘图。如用油镜头观察,勿将镜身歪斜,避免镜油流出片面。
2. 观察染色标本时,光线宜强,可上升集光器,开大光圈。观察不染色标本时,光源宜弱,可下降集光器,缩小光圈。
3. 使用完毕,一定擦去镜油。

二、细菌染色法(技术操作)

【实验原理】 革兰阳性菌细胞壁结构致密,肽聚糖层厚,且脂质含量少,乙醇不易渗入脱色。革兰阴性菌细胞壁结构疏松,肽聚糖层薄,且脂质含量多,乙醇溶解脂质后易渗入细胞而脱色;革兰阳性菌菌体含有大量核糖核酸镁盐,可与碘、结晶紫牢固结合,使已着色的细菌不被乙醇脱色;革兰阴性菌菌体内核糖核酸镁盐含量小,易被乙醇脱色;革兰阳性菌等电点比革兰阴性菌低,在同一 pH 值条件下革兰阳性菌比革兰阴性菌所带负电荷多,故与带正电荷的碱性染料(结晶紫)结合牢固,不易被乙醇脱色。

【实验材料】

1. 白色葡萄球菌、大肠杆菌 18~24 小时普通琼脂斜面培养物。
2. 革兰染色液(结晶紫、卢戈碘液、95% 乙醇、稀释复红染液)。
3. 生理盐水、载物玻片、接种环、酒精灯、显微镜、香柏油、擦镜纸、二甲苯。

【实验方法】

1. 细菌涂片的制作

(1) 涂片:取清洁无油污载物玻片一张,接种环沾取生理盐水 1~2 环置于玻片中央,再将接种环火焰灭菌待冷后,沾取葡萄球菌或大肠杆菌菌苔少许,混于生理盐水中,轻轻涂成均匀薄膜。

(2) 干燥:室温自然干燥,也可将涂面向上,远离火焰上方微加温干燥(切勿加热过度,以防将标本烧枯)。

(3) 固定:标本干燥后,通过酒精灯火焰三次(2~3 秒),以杀死细菌并使之固定于玻片上。

(4) 染色:可根据不同的染色要求,用相应染色液进行染色。

2. 革兰染色法

(1) 初染:于涂抹面上滴加结晶紫染液数滴,覆盖整个涂面,室温作用 1 分钟。用自来水轻轻冲洗,甩干水分。

(2) 媒染:滴加卢戈碘液,室温作用 1 分钟。自来水冲洗,甩干水分。

(3) 脱色:将载物玻片浸于 95% 酒精缸中,上下提取,边提边看,见涂面无色素下流为止(约 30 秒)。自来水冲洗,甩干水分。

4. 复染 加稀释复红染液染 30 秒,自来水冲洗,吸水纸吸干玻片水分。

染色完毕,用吸水纸将标本片吸干,玻片上滴加香柏油,油镜观察。呈紫色的为革兰阳性菌,呈红色的为革兰阴性菌。

结果观察:白色葡萄球菌被染成紫色,为革兰阳性菌,单个细菌呈球形,葡萄串状排列;大肠杆菌被染成红色,为革兰阴性菌,单个细菌呈杆状,散在排列。

【注意事项】 脱色是革兰染色成功与否的关键,脱色不够造成假阳性,脱色过度造成假阴性。涂片不宜过厚,以免脱色不完全造成假阳性。宜选用对数生长期细菌染色,老龄的革兰阳性细菌会被染成红色而造成假阴性。

三、细菌基本形态和特殊结构观察(示教)

(一)基本形态

1. 球形 葡萄球菌革兰染色标本片——菌体正圆形,染成紫色,呈现葡萄串状排列。

2. 杆形 大肠杆菌革兰染色标本片——菌体短杆状,染成红色,呈分散排列。

3. 螺旋形 霍乱弧菌革兰染色标本片——菌体弧形,染成红色,呈分散排列。

(二)特殊结构

1. 鞭毛 伤寒杆菌鞭毛染色片——菌体较粗大杆状,染成蓝灰色,单个或成堆存在,周围可见到波浪状弯曲,较长,呈蓝灰色的鞭毛。

2. 荚膜 肺炎双球菌荚膜染色片——视野背景为红色,其中可见到染色呈深红色,矛头状菌体,纵向成双排列,菌体周围有未染上颜色的空白区,即荚膜。

3. 芽胞 破伤风梭菌芽胞染色片——菌体为细长杆状,顶端有染成红色,并大于菌体的球状物即芽胞,呈“鼓槌状”,其他散乱分布的红色球体,为菌体脱落的成熟芽胞。

四、真菌的染色及形态观察

(一)单细胞真菌染色及观察

【实验原理】 真菌的基本形态有单细胞和多细胞两种。单细胞真菌的结构较为简单,大多为圆形或卵圆形,以出芽的方式进行繁殖,故在某些标本中可观察到芽生孢子。真菌比细菌大数倍至数十倍,用普通光学显微镜放大数十倍或数百倍即可观察。单细胞真菌一般呈半透明状态,可通过染色或不染色进行观察,在普通显微镜下,染色后更易于观察。

如果要区分培养物中酵母的生命状态可以采用美蓝染色来观察,对酵母菌的死、活细胞进行鉴别。美蓝是一种无毒性的染料,它的氧化型呈蓝色,还原型呈无色。对酵母进行染色时,由于细胞中新陈代谢的作用,使细胞内具有较强的还原能力,能使美蓝从蓝色的氧化型变为无色的还原型,所以酵母的活细胞无色,而对于死细胞或代