

高职高专“十二五”规划教材

YAOWU WEISHENGWU YINGYONG JISHU

药物微生物 应用技术

傅文红 ● 主编

邓雪萍 ● 副主编

林丽英 赵鹏飞 ● 主审



化学工业出版社

医药生物技术(第2版)教材系列

药物微生物

应用技术

主编 王 强

副主编 王 强 王 强

编委 王 强 王 强 王 强

人民卫生出版社

高职高专“十二五”规划教材

药物微生物应用技术

傅文红 主 编

邓雪萍 副主编

林丽英 赵鹏飞 主审



化学工业出版社

·北京·

全书分为六个项目：认识并初步鉴别常见微生物、洁净室（区）的微生物控制与监测、微生物菌种的使用与管理、抗生素的微生物检定、非规定灭菌制剂的微生物限度检查、灭菌制剂的无菌检查，并补充了免疫学基础作为选学内容。每个项目均按学习目标、学习情境、项目实施、知识讲解、思考题等内容编写，并按典型工作任务安排若干个实训任务。

项目一中介绍了细菌革兰染色片的制作及显微镜油镜观察，真菌水浸标本片的制作及显微镜观察，细菌、放线菌、霉菌、酵母菌的形态结构特征，常见微生物等；项目二中介绍了操作人员及物体表面微生物的控制、人员和物料进出洁净室（区）的程序、洁净室（区）空气洁净度检查等；项目三中介绍了菌种的购买与接收，常用玻璃器皿的清洗、干燥与干热灭菌，培养基的配制与湿热灭菌，微生物营养，微生物的生长繁殖，微生物接种与培养技术，菌种复苏与菌种确认，菌种的传代与保藏等内容；项目四~项目六中介绍了抗生素的微生物检定，非规定灭菌制剂的微生物限度检查，规定灭菌制剂的无菌检查等，设计了几种有代表性的药物的微生物检验，内容基本涵盖了2010年版《中国药典》规定的微生物检验项目；免疫学基础知识为选学内容，介绍了抗原、抗体、免疫系统、免疫应答、超敏反应、免疫学诊断、免疫学应用等内容。

本书可供药学、生物制药技术、药物制剂技术、药品质量检测技术等专业使用，也可供制药企业的生产人员和检验人员及其他相关人员使用和参考。

图书在版编目（CIP）数据

药物微生物应用技术/傅文红主编. —北京：化学工业出版社，2012.8
高职高专“十二五”规划教材
ISBN 978-7-122-14698-4

I. ①药… II. ①傅… III. ①药理学-微生物学
IV. ①R915

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2012）第 142806 号

责任编辑：于 卉
责任校对：宋 夏

文字编辑：焦欣渝
装帧设计：关 飞

出版发行：化学工业出版社（北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011）
印 装：大厂聚鑫印刷有限责任公司
787mm×1092mm 1/16 印张 12 字数 309 千字 2012 年 10 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询：010-64518888（传真：010-64519686） 售后服务：010-64518899
网 址：<http://www.cip.com.cn>
凡购买本书，如有缺损质量问题，本社销售中心负责调换。

定 价：26.00 元

版权所有 违者必究

前 言

本书是以“实用、够用”为原则，依据在药品生产企业中的药品生产和药品质量控制岗位群对职业能力的要求编写而成的。教学内容与实际工作岗位密切相关，突出了实践技能的培养，将理论知识和操作技能有机地结合起来，教学内容贴近实际工作任务，学习过程贴近工作过程，体现了“工学结合”和“一体化”教学思路。全书分为六个项目：认识并初步鉴别常见微生物、洁净室（区）的微生物控制与监测、微生物菌种的使用与管理、抗生素的微生物检定、非规定灭菌制剂的微生物限度检查、灭菌制剂的无菌检查，还提供了免疫学基础作为选学内容。每个项目均按“学习目标”、“学习情境”、“项目实施”、“知识讲解”、“思考题”等内容编写，并均按典型工作任务安排若干个实训任务。

根据学生就业岗位的需要，充实了“环境微生物控制”内容，以增强学生的质量意识和无菌观念；增加了“菌种的购买与接收”，“菌种的复苏与确认”，“菌种的传代与保藏”等内容，使学生具备实验室菌种管理的初步能力；微生物检验部分是根据2010年版《中华人民共和国药典》的要求编写的，选择了几种代表性药品的检验作为教学任务，真实体验实际工作的全过程。

由于不同岗位群对职业能力需要的不同，对教学内容的要求也有差异，各学校和专业可根据本地区本专业学生的就业岗位不同，对教学内容进行合理的取舍，如教学时间不够，可引导学生以完成项目为目的自行学习有关内容。

本教材可供药学、生物制药技术、药物制剂技术、药品质量检测技术等专业使用，也可供制药企业的生产人员、检验人员及其他相关人员使用和参考。

本教材由清远职业技术学院傅文红任主编，清远职业技术学院邓雪萍为副主编，广东省食品药品检验所微生物检验室林丽英主任及清远职业技术学院赵鹏飞院长主审，项目一和项目三由傅文红、邓雪萍和清远职业技术学院陈清乐编写，项目二和项目四由邓雪萍编写，广东食药检验所湛文青老师参与了项目四的编写与审核，项目五、项目六和选学内容由傅文红编写。傅文红负责全书的统稿工作。清远职业技术学院陈春兰、郑正参与了部分内容的编写与校对。

本教材是在前两版校本教材的基础上不断修改完善而成的，在此对为前两版校本教材作出贡献的编委们表示深深的谢意，清远职业技术学院“药物微生物应用技术”精品课程建设团队的全体成员为本书的编写付出了辛勤的劳动，感谢他们的无私贡献。广东省食品药品检验所微生物检验室的技术人员对本书编写提供了很好的素材，在此一并表示感谢。

由于我们的学术水平、编写能力及对项目化教学改革的认识水平有限，加之时间仓促，书中难免存在不足，恳请广大师生给予批评指正。

编者

2012年5月

目 录

项目一 认识并初步鉴别常见微生物	1
学习目标.....	1
学习情境.....	1
项目实施.....	1
任务一 认识普通光学显微镜.....	1
任务二 酵母菌和霉菌的水浸标本片的制作与显微镜观察.....	3
任务三 细菌的革兰染色标本片的制作与显微镜油镜观察.....	5
任务四 链霉菌、诺卡菌、小单孢菌等放线菌标本片的观察.....	7
知识讲解.....	8
一、概述.....	8
二、细菌.....	12
三、放线菌.....	24
四、酵母菌.....	29
五、霉菌.....	32
六、病毒.....	37
思考题.....	45
项目二 洁净室（区）的微生物控制与监测	47
学习目标.....	47
学习情境.....	47
项目实施.....	47
任务一 微生物的分布及表面微生物的监测.....	47
任务二 人员进出无菌洁净室.....	48
任务三 物料进出无菌洁净室.....	50
任务四 空气洁净度的监测.....	50
一、洁净室沉降菌的检查.....	50
二、洁净室浮游菌的检查.....	53
三、洁净室悬浮粒子的检查.....	53
知识讲解.....	53
一、微生物的分布.....	53
二、洁净室（区）与空气洁净技术.....	55
三、药品生产过程中微生物污染的来源.....	59
四、药品生产过程中微生物污染的监测.....	61
思考题.....	62
项目三 微生物菌种的使用与管理	63
学习目标.....	63
学习情境.....	63
项目实施.....	63

任务一 微生物菌种的购买与接收	63
一、购买标准菌种	63
二、接收菌种	63
任务二 微生物接种前的准备	64
一、常用玻璃器皿的清洗、干燥与干热灭菌	64
二、培养基的配制与湿热灭菌	68
任务三 微生物菌种的复苏(示教)	73
任务四 微生物接种与确认	74
一、微生物的接种	75
二、菌种的初步确认(鉴别)	77
任务五 菌种的传代与保藏	79
知识讲解	80
一、消毒灭菌技术	80
二、微生物的营养	87
三、微生物的生长繁殖	90
四、微生物的培养方法	92
五、微生物在培养基中的生长现象	92
六、微生物的生理生化反应	96
七、菌种退化与菌种保藏	99
思考题	102
项目四 抗生素的微生物检定	104
学习目标	104
学习情境	104
项目实施	104
任务 硫酸妥布霉素注射液效价的微生物检定(二剂量管碟法)	104
知识讲解	108
一、药物的抗菌试验	108
二、抗生素	111
思考题	114
项目五 非规定灭菌制剂的微生物限度检查	115
学习目标	115
学习情境	115
项目实施	115
任务一 对乙酰氨基酚片的微生物限度检查	115
任务二 乌鸡白凤丸的微生物限度检查	121
任务三 克霉唑栓的微生物限度检查	128
知识讲解	135
一、非规定灭菌制剂微生物限度检查项目	135
二、非规定灭菌制剂微生物限度标准	135
三、微生物限度检查的环境要求	136
四、微生物限度检查样品采集和保存要求	136
五、微生物限度检查供试液的制备	137

六、微生物限度检查.....	138
思考题.....	138
项目六 灭菌制剂的无菌检查.....	140
学习目标.....	140
学习情境.....	140
项目实施.....	140
任务 硫酸妥布霉素注射液的无菌检查.....	140
知识讲解.....	144
一、概述.....	144
二、无菌检查方法.....	147
思考题.....	152
选学内容 免疫学基础.....	153
学习目标.....	153
一、免疫的基本概念与功能.....	153
二、免疫系统.....	153
三、抗原.....	158
四、免疫球蛋白与抗体.....	161
五、免疫应答.....	167
六、超敏反应.....	170
七、免疫学应用.....	177
思考题.....	183
参考文献.....	184

项目一 认识并初步鉴别常见微生物

学习目标

【能力目标】

1. 能根据微生物的形态特征,借助显微镜识别常见的细菌(如大肠埃希菌、葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等)、放线菌、酵母菌、霉菌,能正确描述常见微生物在显微镜下的形态特征。
2. 能正确制作细菌涂片,正确完成革兰染色操作。
3. 能正确使用显微镜,并能对显微镜进行简单保养与维护。

【知识目标】

1. 说出微生物的主要类群及各类群的主要形态结构特征。
2. 比较细菌、放线菌、酵母菌、霉菌等微生物的形态结构特点。
3. 了解各类微生物与制药工业的关系。

学习情境

微生物实验室以斜面低温的方法保藏了一批微生物菌种,包括金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌等细菌,黑曲霉菌、根霉菌等霉菌,白色念珠菌、酿酒酵母菌等酵母菌,链霉菌等放线菌。因实验管理人员的工作疏忽,贴在菌种管上的标签笔迹已经褪色而无法辨认。实验室人员现已对上述微生物进行了分离培养,请同学们借助显微镜,采用革兰染色等操作方法,对以上菌种进行初步鉴别,并重新贴上标签。

项目实施

任务一 认识普通光学显微镜

1. 材料

普通光学显微镜(物镜头:10×,40×,100×)。

2. 操作

请同学们按正确方法取出显微镜,两人一组,互相说出显微镜各部位的名称和用途。

普通光学显微镜是微生物学实验室最常用的仪器,它的结构分为机械部分和光学部分(图1-1)。

(1) 机械部分

① 镜筒 位于显微镜的前上方,上端连接目镜,下端连接物镜,有单筒、双筒两种。单筒镜筒上只有一个目镜,使用时一般为左眼观察,右眼睁开绘图;双筒镜筒上端有两个目镜,使用时双眼同时观察,眼睛不易疲劳。

② 镜臂 为弓形金属柱,一端连于镜柱,一端连于镜筒,是取放显微镜时的手握部位。

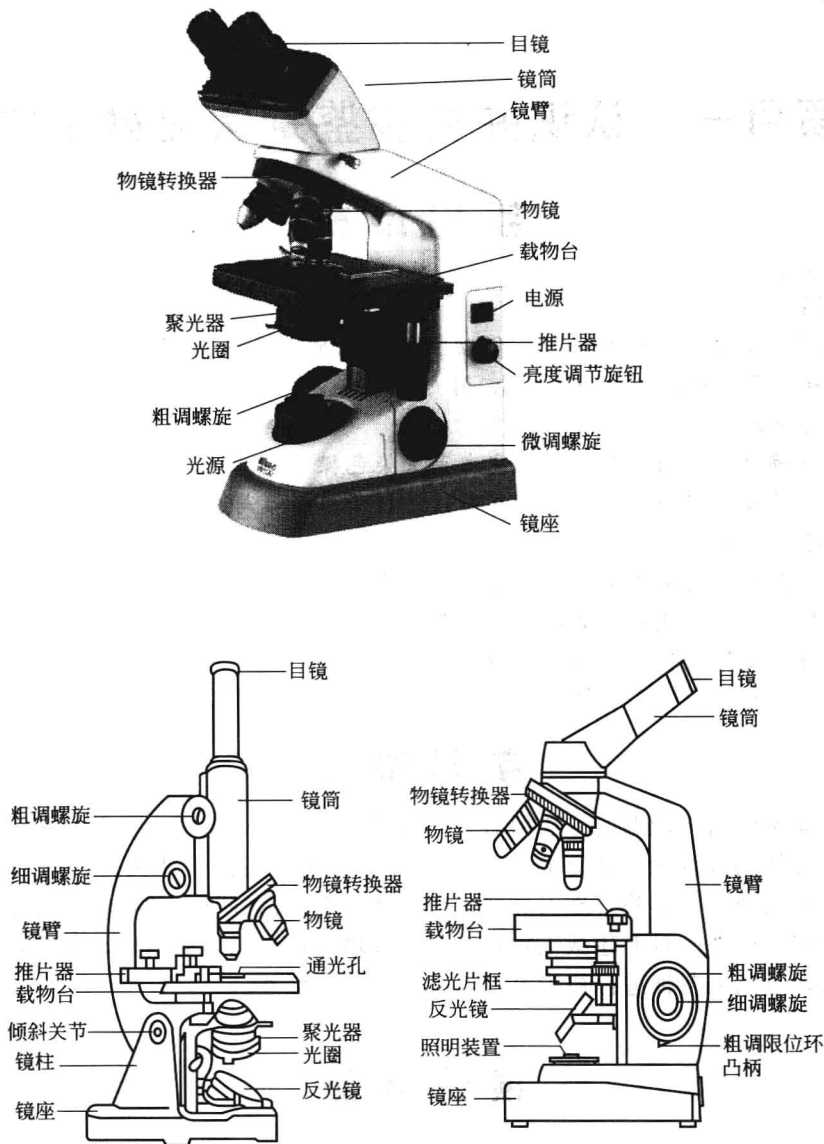


图 1-1 普通光学显微镜结构图

③ 镜柱 是连接镜臂与镜座的短柱。

④ 镜座 位于显微镜的最底部，是整台显微镜的基座，用于支撑和稳定镜体。有的显微镜在镜座内装有光源。

⑤ 物镜转换器 位于镜筒下端，上有 3~4 个圆孔，可装配不同放大率的物镜。此转换器可转动以转换物镜。

⑥ 调焦器 是调节焦距的装置，分粗调螺旋（或称粗调手轮）和细调螺旋（或称微调手轮）两种，均可来回转动用以调节焦距。粗调螺旋转动时，镜筒升降距离大，用于粗略调焦；细调螺旋转动时，镜筒升降距离小，用于精确调焦。在用粗调螺旋未找到物像前，不要使用细调螺旋，以免磨损细调螺旋。

⑦ 载物台 是镜筒下的平台，用以载放被检标本。台中央有通光孔，可使光线通过。载物台上装有片夹以固定标本，有的装有推片器，不但可固定标本，还可将标本前后左右

移动。

(2) 光学部分

① 目镜 又称接目镜，安放于镜筒的上端。目镜有放大 5 倍、10 倍、15 倍三种，分别刻有“5×”、“10×”、“15×”标记。为方便指示物像，目镜中常装有指针。使用时一般采用“10×”的目镜。

② 物镜 又称接物镜，装在转换器的圆孔内，一般有 3~4 个物镜，分别刻有放大倍数标记：“5×”、“10×”、“45×”、“100×”。习惯上把放大 10 倍及以下的物镜称为低倍镜，放大 40 倍左右的物镜称为高倍镜，放大 90~100 倍的物镜称为油镜。物镜可由其外形加以辨认，放大倍数小者，镜头较短，镜片口径大；放大倍数大者，镜头较长，镜片口径较小。油镜常有以下几种标记：放大倍数“90×”、“100×”；镜头上常标有黑色、白色或红色的圆圈；镜头刻有“油”或英文“Hi”、“oil”等字样。

③ 聚光器 又称集光器，位于载物台通光孔的下方，由聚光镜和光圈组成，其主要功能是将光线集中到要观察的标本上。

a. 聚光镜 由 2~3 个透镜组合而成，其作用相当于一个凸透镜，可将光线汇集成束。在聚光器的左下方，有一调节螺旋，可使其上升或下降，升高可使光线增强，反之光线变弱。

b. 光圈 也称虹彩光阑或孔径光阑，位于聚光器的下端，是控制进入聚光镜光束大小的可变光阑。它由十几张金属薄片组合排列而成，其外侧有一小柄，可使光圈的孔径开大或缩小，以调节光线的强弱。有的显微镜在光圈下方装有滤光片环，可放置不同颜色的滤光片。

④ 反光镜 位于聚光器的下方，可使光线反射至聚光器。反光镜的一面为平面镜，另一面为凹面镜。根据需要可自由转换，一般需较弱的光线时使用平面镜，需要较强的光线时用凹面镜。

带有光源的显微镜用灯泡代替反光镜，操作时先打开灯泡的电源开关，再根据需要调节灯泡亮度。

任务二 酵母菌和霉菌的水浸标本片的制作与显微镜观察

1. 材料

(1) 仪器 普通光学显微镜（物镜头：10×，40×）。

(2) 菌种 啤酒酵母菌、白色念珠菌：用沙氏葡萄糖琼脂培养基培养 2~5 天（只标号为 1、2，没有标示具体菌名）。

黑曲霉菌、青霉菌、毛霉菌、黑根霉菌：用马铃薯蔗糖琼脂培养基培养 2~5 天（只标号为 3、4、5、6，没有标示具体菌名）。

(3) 染色液 0.1%美蓝染色液、乳酸石炭酸棉蓝染色液。

(4) 其他 接种针、接种环、酒精灯、消毒棉球、载玻片、盖玻片、火柴等。

2. 操作方法

(1) 酵母菌水浸标本片的制作 取洁净的载玻片一张，滴一小滴 0.1%美蓝液（或无菌水）于载玻片中央；将接种环在酒精灯火焰上烧灼灭菌，冷却后，以无菌操作方法在培养基表面轻轻刮取少许待观察的啤酒酵母菌，与美蓝液混合均匀，染色 2~3min。用小镊子夹一片盖玻片，使其一侧与载玻片上的液滴边缘接触，然后慢慢将盖玻片放在液滴上，注意避免产生气泡。

将制好的水浸片用低倍镜（10×）观察到清晰的视野后，再用高倍镜（40×）观察，注

意酵母菌细胞的大小、形状及芽殖情况。

同法观察白色念珠菌的特征。

(2) 霉菌水浸标本片的制作 取洁净的载玻片一张，滴一小滴乳酸石炭酸棉蓝染色液（或无菌水）于载玻片中央；将接种针在酒精灯火焰上烧灼灭菌，冷却后，以无菌操作在培养基中挑取少量带有孢子的黑曲霉菌菌丝，用50%的乙醇浸润，再用蒸馏水将浸过的菌丝洗一下，然后放入载玻片上的液滴中，仔细地用接种针将菌丝分散开来。用小镊子夹一片盖玻片，使其一侧与载玻片上的液滴边缘接触，然后慢慢将盖玻片放在液滴上，注意避免产生气泡。

将制好的水浸片用低倍镜（10×）观察到清晰的视野后，再用高倍镜（40×）观察，注意观察霉菌菌丝有无隔膜、有无假根和足细胞、孢子菌丝的特征等。

同法观察青霉菌、毛霉菌、黑根霉菌的菌丝特征。

(3) 显微镜观察

① 准备 左手托镜座，右手持镜臂，保持显微镜为水平状态，将显微镜平稳地放在实验台上。

打开实验台上的工作灯，转动粗调螺旋，将载物台略下降（或镜筒略升高），使物镜和载物台距离稍拉开；再旋转物镜转换器，将低倍镜（一般为“10×”）对准载物台中央的通光孔，当镜头完全到位时，可听到轻微的“咔嗒”声。

② 采光与对光 打开光圈（顺时针旋转，光圈开大，光线增强；逆时针旋转，光圈闭小，光线减弱），上升聚光器至适当位置（聚光器上升时光线增强，下降时光线减弱），左眼向目镜内观察，同时调节反光镜的角度（或小心取出电源线，把电源线插头插入电源插座上，把电源开关按向“I”一边，接通电源，移动亮度调节器），使视野内的光线均匀、亮度适中。

光强的调节：一般情况下，染色标本光线宜强，无色或未染色标本光线宜弱。低倍镜观察光线宜弱；高倍镜观察光线宜强；油镜观察应将显微镜亮度调整至最亮，光圈完全打开。

③ 放片 把所需要观察的标本片放到载物台上，并用推片器上的弹簧夹固定好，然后把观察的标本部位移到通光孔的正中央。

④ 调焦 从显微镜侧面注视低倍镜，同时用粗调螺旋使载物台缓慢上升（或镜筒下降），直到低倍镜头距玻片标本约5mm时，再从目镜里观察视野，同时用左手慢慢转粗调螺旋，使载物台缓缓下降（或镜筒缓缓上升），直至视野中出现物像为止。如物像不清晰，可转动细调螺旋，直至视野中的物像清晰为止。

⑤ 观察 观察标本时，坐姿应端正，通过调节推片器的螺旋，按一定方向移动视野，前后左右观察标本，直至整个标本观察完毕，以便不漏检，不重复。若使用单筒显微镜，两眼自然张开，左眼观察标本，右眼记录及绘图，同时左手调节焦距，使物像清晰并移动标本视野，右手记录、绘图。

先用低倍镜（一般选择的物镜为“10×”）观察标本，找到所观察的目标，确定要观察的部位。低倍镜观察时光线不宜太强。

用低倍镜确定观察目标后，眼睛从侧面注意物镜，转动物镜转换器，使高倍镜头（一般选择的物镜头为“40×”）对准通光孔。

眼睛向目镜内观察，同时微微转动细调螺旋，直至视野内的物像清晰。从低倍镜转至高倍镜时，只需略微调动细调螺旋，即可使物像清晰。

使用高倍镜时切勿使用粗调螺旋，否则易压碎标本片并损伤镜头。

转动物镜转换器时，不可用手指直接推转物镜，这样容易使物镜的光轴发生偏斜，转换

器螺纹受力不均匀而破坏,导致转换器报废。

在低倍镜准焦情况下,直接换高倍镜时可能会发生高倍镜与标本片碰撞,有时标本转不过来,此时应将载物台下降或使镜筒升高,直接用高倍镜调焦。方法是从侧面注视物镜,调节粗调螺旋,使高倍镜头下降至与标本片最短距离,再观察目镜视野,慢慢调节细调螺旋,使镜头缓缓上升,直至物像清晰为止。

⑥ 收镜 观察完毕后,转动粗调螺旋使载物台下降(或镜筒上升),取下标本片放在标本盒中。

将两个物镜转换成“八”字形,或将“5×”物镜转至工作位置,但切勿将“10×”或以上倍数的镜头转至工作位置,以防物镜与聚光器碰撞受损。

关闭光圈,下降聚光器,移动反光镜使其竖立。若使用的是带有光源的显微镜,需要调节亮度旋钮将光亮度调至最暗,再关闭电源按钮,以防止下次开机时瞬间过强电流烧坏光源灯。套上镜套,将显微镜放置于规定位置。

⑦ 维护 显微镜是贵重精密的光学仪器,使用时要精心爱护。取送显微镜时,应右手持镜臂,左手托镜座,以免反光镜松脱受损;不准碰撞或随意拆卸显微镜部件;避免日光直射显微镜光学部分,如镜头等;避免触及强酸、强碱、有机溶剂等化学药品,以免损坏机件;各个光学部分的镜面切忌用手触摸,以免油迹、汗迹损坏镜面;显微镜必须保持清洁,放置于干燥处,以防透镜长霉。

3. 鉴别要点

酿酒酵母细胞多数为圆形、卵形或长卵形,一般不形成假菌丝或形成不发达的假菌丝。细胞大小约为细菌细胞的10倍。

白色念珠菌细胞呈圆形或卵圆形,直径 $3\sim 6\mu\text{m}$,比葡萄球菌大 $5\sim 6$ 倍,菌体细胞出芽生成假菌丝,假菌丝长短不一,不分枝,假菌丝顶端或中间、侧缘可形成厚垣孢子。

曲霉菌是一种典型的丝状菌,属多细胞,菌丝有分隔。营养菌丝大多匍匐生长,没有假根,产生分生孢子。分生孢子梗顶端膨大成为顶囊,顶囊表面长满一层或二层小梗,小梗顶端着生成串的分生孢子。

青霉菌属多细胞,菌丝有分隔。无性繁殖产生分生孢子,其分生孢子梗经过多次分枝,产生几轮对称或不对称的小梗,形如扫帚,称为帚状体。菌丝体成熟后长出青色有横隔的分生孢子梗,无足细胞,无顶囊。

毛霉菌的菌丝为无隔菌丝,多核,有分枝,以孢囊孢子和接合孢子繁殖,毛霉的孢子囊梗多呈丛生,分枝或不分枝。

根霉菌丝无隔,有分枝和假根,营养菌丝匍匐生长。在其假根处着生着丛生、直立、有分枝的孢子囊梗,顶端膨大形成圆形的孢子囊。

4. 作业

通过制作水浸片及镜检的方法,初步对编号为1、2的酵母菌及编号为3、4、5、6的霉菌进行鉴别,鉴别后写出菌种名称,制作菌种保藏管标签(含菌种名称、保藏条件、保管人、传代时间等),在保藏管上贴上相应的标签。

描述所观察的酵母菌和霉菌的形态特征,并绘图。

任务三 细菌的革兰染色标本片的制作与显微镜油镜观察

1. 材料

(1) 仪器 普通光学显微镜(物镜头:10×,100×)。

(2) 其他材料 革兰染色液一套(包括结晶紫、卢戈碘液、95%乙醇、稀释复红)、生

理盐水、吸水纸、载玻片、接种环、酒精灯、火柴等。

(3) 菌种 金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌的普通营养琼脂培养物（培养时间为8~16h）（只标号为I、II、III，没有标示菌名）。

2. 操作方法

(1) 细菌涂片标本的制作

① 涂片 取洁净的载玻片一张，滴一小滴生理盐水于载玻片中央（也可用接种环取一环生理盐水滴入载玻片中央）；将接种环在酒精灯火焰上烧灼灭菌，冷却后，无菌操作方法在培养基表面轻轻刮取少许待染色的细菌，混入载玻片上的生理盐水中，以画圈的形式由内向外均匀地涂抹成直径1.5cm左右的薄层涂片；将接种环灭菌后放回原处。

注：如用菌液制作涂片，则不加生理盐水，直接用接种环取菌液涂抹于载玻片上。

② 干燥 将上述涂片置于试管架上，任其自然干燥。也可以将涂面朝上，在酒精灯上稍微烘干，但切勿离火焰太近，因温度高会破坏菌体形态。

③ 固定 手持载玻片一端，涂有细菌标本的一面朝上，将载玻片在酒精灯火焰外焰来回通过3次，使涂抹的细菌固定于载玻片上。固定时，温度不能太高，千万不得将载玻片停留于火焰上灼烤。

(2) 细菌革兰染色标本片的制作

① 初染 将细菌涂片平置于试管架上，滴加结晶紫染液于细菌涂片处，使其布满菌膜，染色时间1min，用细水流徐徐冲洗去多余染液，甩去载玻片上过多的积水（以防影响下一种染液的浓度）。

② 媒染 滴加卢戈碘液于涂片位置，维持1min，用细水流冲洗，将载玻片上过多的积水甩去。

③ 脱色 加95%乙醇数滴于载玻片上，摇动载玻片让乙醇来回流动，使脱色均匀，倾去紫色酒精液；如涂片较厚可再滴加95%乙醇，继续摇动载玻片直至无紫色染料脱出为止。脱色时间约30~40s，脱色后，立即用水冲洗除去乙醇，甩去积水。

也可将玻片倾斜，连续滴加95%乙醇至涂片处进行脱色20~30s至流出的乙醇无色为止，立即用细水流冲洗。

乙醇的浓度、用量、涂片的厚度、染色时间都会影响脱色的效果。脱色是革兰染色中最关键的一步，脱色不足，革兰阴性菌仍保留紫色可造成假阳性；反之，脱色过度，革兰阳性菌也可被染成红色。

④ 复染 滴加稀释复红染液于涂片位置，染色1min，用水冲洗去染液，甩去载玻片上积水。让载玻片自然干燥或用吸水纸印干水分，切勿擦拭。

将染好的涂片标本用吸水纸印干后，加一滴香柏油，置显微镜油镜下观察染色结果。

(3) 显微镜油镜观察细菌染色标本片

① 准备 左手托镜座，右手持镜臂，保持显微镜为水平状态，将显微镜平稳地放在实验台上。

打开实验台上的工作灯，转动粗调螺旋。将载物台略下降（或镜筒略升高），使物镜和载物台距离稍拉开。再旋转物镜转换器，将低倍镜（一般为“10×”）对准载物台中央的通光孔，当镜头完全到位时，可听到轻微的“咔嚓”声。

② 采光与对光 打开光圈，上升聚光器至适当位置，小心取出电源线，把电源线插头插到电源插座上，把电源开关按向“I”一边，接通电源，左眼向目镜内观察，移动亮度调节器，使视野内的光线均匀、亮度适中。一般情况下，油镜观察应将显微镜亮度调整至很亮，光圈完全打开。

③ 滴加镜油、放片 将染好的细菌染色标本片用吸水纸印干，在镜检部位滴入一滴香柏油，保持香柏油呈油滴状，切勿涂散开。

将滴有香柏油的染色标本片放到载物台上，用移动器上的弹簧夹固定好，观察部位移到通光孔的正中央。

④ 调焦 用粗调螺旋将载物台下降（或将镜筒上升），转动物镜转换器，选择“100×”的油浸物镜（镜头上写有“100×”、“oil”或“Hi”字样，一般以白色线条为标志）对准通光孔。

眼睛从显微镜侧面注视物镜，转动粗调螺旋，缓缓上升载物台（或镜筒下降），使油浸物镜浸入香柏油中，使其镜面几乎与标本片接触，但两者切不可相碰！（需小心谨慎，如用力过猛，不仅易压碎标本片，还会损坏镜头。）

眼睛向目镜内观察，一边观察一边缓慢转动粗调螺旋，将载物台徐徐下降（或镜筒徐徐上升），注意此时切不可向相反的方向操作，否则易压碎标本片并损坏镜头。当出现物像一闪后，改用细调螺旋微微调节至物像最清晰为止。如转动粗调螺旋未获得清晰物像，但镜头已离开油面，眼睛必须重新从显微镜侧面注视物镜，重复上述操作。

⑤ 观察 观察标本时，通过调节推片器的螺旋，按一定方向移动视野，前后左右观察标本，直至整个标本观察完毕，以便不漏检，不重复。两眼自然张开，左眼观察标本，右眼记录及绘图，同时左手调节焦距，使物像清晰并移动标本视野，右手记录、绘图。

注意比较三种细菌在显微镜下的形态、大小、颜色、排列。

⑥ 收镜 油镜观察完毕后下降载物台，取下标本片，把物镜转到一边，立即用擦镜纸拭去镜头上的油，若油已干，可用擦镜纸蘸少许二甲苯（或用乙醇与乙醚混合制成镜头洗液）擦净，并用另一张擦镜纸拭去二甲苯。

将两个物镜转换成“八”字形，或将“5×”物镜转至工作位置，但切勿将“10×”或以上倍数的镜头转至工作位置，以防物镜与聚光器碰撞受损。

关闭光圈，下降聚光器，移动反光镜使其竖立。若使用的是带有光源的显微镜，需要调节亮度旋钮将光亮度调至最暗，再关闭电源按钮，以防止下次开机时瞬间过强电流烧坏光源灯。套上镜套，将显微镜放置于规定位置。

3. 鉴别要点

革兰阳性菌被结晶紫着色后不易被酒精脱色，故染成紫色；革兰阴性菌被结晶紫着色后易被酒精脱色，故被稀释复红复染成红色。

金黄色葡萄球菌为革兰阳性葡萄状排列的球菌，直径 $0.4\sim 1.2\mu\text{m}$ ，无鞭毛和芽孢。

大肠埃希菌为革兰阴性的短小杆菌，无芽孢，有鞭毛，大小为 $(1.1\sim 1.5)\mu\text{m}\times(2.0\sim 6.0)\mu\text{m}$ 。

枯草芽孢杆菌为革兰阳性链状排列的有芽孢的杆菌，大小为 $(1\sim 1.3)\mu\text{m}\times(3\sim 5)\mu\text{m}$ ，易形成芽孢，芽孢不突出菌体，菌体两端较平整。

4. 作业

通过革兰染色、镜检的方法，初步对编号为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ的细菌菌种进行鉴别，鉴别后写出细菌名称，制作菌种保藏管标签（含菌种名称、保藏条件、保管人、传代时间等），在保藏管上贴上相应的标签。

描述所观察的细菌的形态特征，并绘图。

任务四 链霉菌、诺卡菌、小单孢菌等放线菌标本片的观察

1. 材料

(1) 仪器 普通光学显微镜（物镜头： $10\times$ ， $100\times$ ）。

(2) 放线菌标本片 链霉菌、诺卡菌、小单孢菌标本片。

2. 操作方法

使用显微镜油镜观察链霉菌、诺卡菌、小单孢菌等放线菌的染色标本片，注意观察放线菌菌丝的大小、形态，基内菌丝、气生菌丝和孢子丝的着生部位及孢子的形态特征。

显微镜的使用与标本片的观察方法与任务三中的“(3)显微镜油镜观察细菌染色标本片”相同。

3. 鉴别要点

大部分放线菌由分枝菌丝组成，菌丝无隔膜，属于单细胞微生物。菌丝粗细与杆菌相近。

链霉菌的菌丝长短不一，多核，直径为 $0.4\sim 1.0\mu\text{m}$ 。菌丝体分为营养菌丝、气生菌丝和孢子丝，其营养菌丝不断裂，气生菌丝分化成直的、弯曲的或螺旋状的孢子丝，孢子丝发育到一定阶段可产生分生孢子。

诺卡菌菌丝体剧烈弯曲如树根或不弯曲，菌丝较长。菌丝体产生横隔膜，分枝的菌丝体断裂成长短相近的杆菌、球菌或带叉的杆状体。大多数没有气生菌丝，只有营养菌丝，孢子丝为直形，个别种呈钩状或螺旋，具横隔膜。

小单孢菌属的菌丝体纤细，直径为 $0.3\sim 0.6\mu\text{m}$ ，无横隔膜，不断裂，菌丝体浸入培养基内，不形成气生菌丝，只在营养菌丝上长出很多分枝小梗，顶端着生一个孢子。

4. 作业

列表比较细菌、放线菌、酵母菌、霉菌的形态特征。

知识讲解

一、概述

微生物是一类个体微小、构造简单，肉眼看不见，需借助显微镜才能看清的微小生物的总称。微生物的个体极其微小，必须借助显微镜放大几倍、几百倍、上千倍乃至数万倍才能看清。表示微生物大小的单位是微米(μm)($1\text{m}=10^6\mu\text{m}$)或纳米(nm)($1\text{m}=10^9\text{nm}$)。

1. 微生物的特点

(1) 个体小、比表面积大 以细菌中的杆菌为例可以形象地说明微生物个体的细小，杆菌的宽度是0.5微米，因此800个杆菌“肩并肩”地排列成横队，宽度也只相当于一根头发丝的直径。杆菌的长度约2微米，故1500个杆菌头尾衔接起来仅有一颗芝麻长，而3000个头尾衔接的杆菌的长度仅为一粒籼米的长度。

我们知道，把一定体积的物体分割得越小，它们的总表面积就越大，可以把物体的表面积和体积之比称为比表面积。如果把人的比表面积值定为1，则大肠埃希菌的比表面积值竟高达30万。这样一个大比表面积系统是微生物与一切大型生物在许多关键生理特征上的区别所在。

(2) 吸收多、转化快 由于微生物的比表面积大得惊人，所以与外界环境的接触面特别大，这非常有利于微生物通过体表吸收营养和排泄废物，因此它们的“胃口”很大。而且，微生物的食谱非常广泛，凡是动植物能利用的营养，微生物都能利用，大量的动植物不能利用的物质，甚至剧毒的物质，微生物照样可以作为“美味佳肴”。如大肠埃希菌在合适条件下，每小时可以消耗相当于自身重量2000倍的糖，而人要完成这样一个规模则需要40年之久。如果说一个体重50kg的人一天吃掉与体重等重的食物，恐怕无人会相信。

我们可以利用微生物这个特性，发挥“微生物工厂”的作用，使大量基质在短时间内转

化为大量有用的化工、医药产品或食品，为人类造福，使有害物质化为无害，将不能利用的物质变为植物的肥料。

(3) 生长旺、繁殖快 微生物以惊人的速度“生儿育女”。例如大肠埃希菌在合适的生长条件下，12.5~20min 便可繁殖一代，每小时可分裂3次，由1个变成8个，每昼夜可繁殖72代，由1个细菌变成 4.72×10^{21} 个（重约4722t）。

当然，由于种种条件的限制，这种疯狂的繁殖是不可能实现的。细菌数量的翻番只能维持几个小时，不可能无限地繁殖。在培养液中繁殖细菌，它们的数量一般仅能达到每毫升1亿~10亿个，最多达到100亿。尽管如此，它的繁殖速度仍比高等生物高出千万倍。

微生物的这一特性在发酵工业上具有重要意义，可以提高生产效率，缩短发酵周期。

(4) 易变异，适应性强 微生物个体一般都是单细胞，加之繁殖快、数量多及与外界环境直接接触等原因，即使变异的频率十分低（一般为 $10^{-5} \sim 10^{-10}$ ），也可在短时间内出现大量的变异后代。正是由于这个特性，人们才能够按照自己的要求不断改良在生产上应用的微生物，如青霉素生产菌的发酵水平原来每毫升20单位，经过改良选育后已上升到每毫升近10万单位，利用变异和育种得到如此大幅度的产量提高，在动植物育种工作中简直是不可思议的。在医疗实践中，常见致病菌对抗生素产生耐药性变异。例如，1943年青霉素刚刚问世时，它对金黄色葡萄球菌的作用浓度是 $0.02 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，20年后，有的菌株耐药性比原始菌株提高了1万倍（即 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）。20世纪40年代初刚刚使用青霉素时，即使严重感染的病人，只要每天分数次共注射10万单位青霉素即可，而现在，成人每天要100万单位左右，病情严重时，要用到数千万甚至上亿单位。

微生物的变异性使其具有极强的适应能力，诸如抗热性、抗寒性、抗盐性、抗干燥性、抗酸性、抗缺氧、抗高压、抗辐射及抗毒性等能力。这是微生物在漫长的进化历程中所经受各种复杂环境的影响和选择的结果。微生物对环境条件尤其是恶劣的“极端环境”具有惊人的适应力，这是高等生物所无法比拟的。例如，多数细菌能耐 $0 \sim -196^\circ\text{C}$ 的低温；在海洋深处分离到的某些硫细菌可在 $250 \sim 300^\circ\text{C}$ 的高温条件下正常生长；一些嗜盐细菌甚至能在饱和盐水中正常生活；产芽孢细菌和真菌孢子在干燥条件下能保藏几十年、几百年甚至上千年。

(5) 种类多、分布广 微生物种类繁多。迄今为止，人们所知道的微生物约有10万种。但由于微生物的发现和研究较动植物迟得多，有人估计目前已知的种类只占地球实际存在的微生物总数的1%，所以微生物很可能是地球上物种最多的一类生物。

虽然我们肉眼不能看到微生物，但它们却无处不在、无孔不入。85km的高空、11km深的海底、2000m深的地层、近 100°C 的温泉、 -125°C 等极端的环境下，均有微生物生存。在人类正常生活的地方，更是微生物生长的适宜场所，其中土壤是多种微生物的大本营，任意取一把土，就是一个微生物的世界，在1g肥沃的土壤中，微生物的数量可达到千百万乃至数亿。

除了自然环境，动植物和人体内也有微生物生存。如人的肠道中经常居住着100~400种不同的微生物，约100万个；把手放到显微镜下观察，一双普通的手上带有细菌4万~40万个，即使刚刚清洗过，上面也有300个细菌，当然这些绝大多数不是致病菌。因此，微生物领域是一个亟待开发和利用的宝地。

2. 微生物与人类的关系

(1) 微生物的有益作用

① 参与自然界的物质循环 微生物在自然界的物质循环中起着重要作用，整个生物圈显得生机勃勃，其主要能源依赖于太阳的光能，而组成机体的重要生命元素（如C、N、P、