

牧医微生物学实验指导

广东农林学院牧医系

一九七六年八月

牧医微生物学实验指导

目 录

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	1
实验二、 细菌抹片的制作及染色法	6
实验三、 细菌培养的生长观察	11
实验四、 常用培养基的制造及灭菌	13
实验五 细菌的接种及分离法	20
实验六 生化特性检查法	25
实验七 血清学反应	28
实验八 病例中病原微生物的鉴定	32
实验九 饲料加工微生物的认识	37
实验十 鸡新	39
实验十一 鸡瘟	44
实验十二 鸭瘟	48
实验十三 乳霉	51
附： 口蹄疫	53

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, 应提出与组内的同学或与教师讨论。要在学习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. 如有仪器损坏或其他意外情况, 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, 均须放回规定地点, 才得离开。
7. 遵守指导教师作出的适当的临时规定。

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，两眼务必同时睁开，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。人工光源常用普通照明光管，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，须于集光器下装入蓝色滤光玻璃片以吸收之。

3. 对光：先将光圈（彩虹）完全开放，升高集光器，使与载物台同高（否则使用油镜时，光线较暗）。然后，把检查标本置载物台上，旋下低倍镜观察光源强弱，用手转动反光镜以调节。反光镜有平凹两面，光线强的用平凸（天然光源），弱时用凹面，因凹面镜比平凸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：初学者应先用低倍镜，找好所检查的部位（点线时可省略），然后在标本上加柏油一滴，转换油镜头浸入油滴中，使几乎与标本面相接触为度，乃用左眼由接目镜注视镜内，同时，慢之转动大螺旋，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。

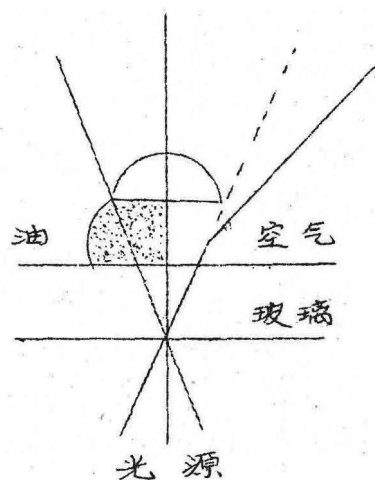
三、显微镜油镜的原理

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。当油镜头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:

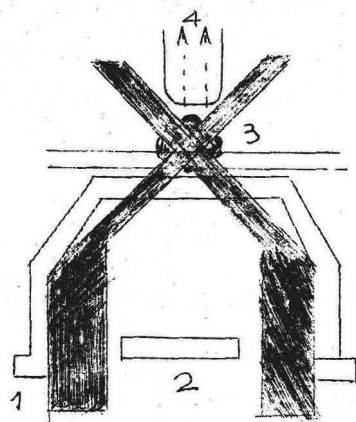
品 名	折 光 指 数
玻 璃	1.52 ~ 1.59
松 香 油	1.52
柏 木 油	1.51
加拿大树脂	1.52
二 甲 苯	1.49
液体石蜡油	1.48
松 节 油	1.47
甘 油	1.47
水	1.33



油镜的原理

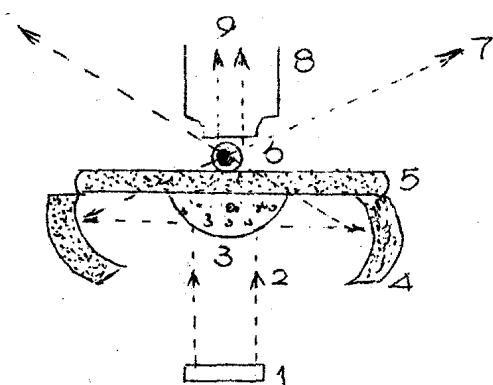
四、暗视野显微镜的原理和使用

1. 原理: 暗视野显微镜是采用一个特殊的暗视野集光器,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,所见的视野背景黑暗,而域上的物体则发光发亮明显,犹如观看黑夜天空中闪闪发亮的繁星,观察得比较清楚。暗视野显微镜可以观察活体微生物运动,特别适于观察螺旋体的形状和运动。



- 1——光 束
- 2——透 光
- 3——标 本
- 4——射入镜筒的光线

抛物面型暗视野集光器



- 1 — 光源
2 — 光线
3 — 半圆形反光镜
4 — 反光镜(光线
经此折射到标本上)
5 — 载物玻片
6 — 标本
7 — 斜射出去的光线
8 — 接物镜
9 — 射入镜筒的光线

心形视野聚光器

2. 暗视野显微镜的使用和注意事项

① 制作涂片时所用的载玻片和盖玻片均应认真清洗干净。使用盖玻片(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, 使不可能放得清晰的物象。标本不宜过厚。

②, 采用的光线宜强, 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器上, 先用低倍接物镜观察, 移动暗视野集光器使其中央的一个圆圈适处在视野的中央。如暗视野集光器已固定好, 则可免去这一步骤。

④, 先在暗视野集光器上加柏油一滴, 然后将标本放在载物台上, 把暗视野集光器向上移动, 使其上的柏油和标本片背面相接触, 中间不能有气泡存在。

⑤, 在标本盖玻片面上再加柏油一滴, 降下镜筒, 使油镜浸在柏油内。再用粗细螺旋调节镜筒的距离, 直至物象清楚为止。即可开始观察。

五. 显微镜的保护方法

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, 以防止反光镜及接目镜滑落。如运至远处时, 须将镜臂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, 均不得用手指揩抹, 应用擦镜纸或

绸布轻拭之。油镜用过后，应立即用镜纸拭净，如油渍已干，则须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片的粘着物，所以，不能过久留存于镜头。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，不得随意把显微镜折开，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，尤其注意不得将接物镜直对集光器，须将接物镜叉开成八字形，然后将镜筒旋下，使镜头承载于载物台上，同时又把集光器旋下，以免发生撞坏的危险。

5. 保存中应注意防止灰尘、潮湿及高温影响。

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、螺旋杆菌：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、末端芽胞、次末端芽胞。

①、荚膜。

3. 细菌有哪些基本形态及特殊构造?

实验二、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。

一、目的要求：

掌握细菌抹片制作方法及简单染色法，固紫染色法（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。

二、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，则可省去这项工作）。
- 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，用接种环推抹涂布均匀，作成抹片。再烧灼接种环后放好。
- ④，将抹片干燥后，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, 使涂片易于染色, 因为死的蛋白质比活的蛋白质着色力强。

(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, 抹得过厚, 以免透光不良染色不好。
- ③, 抹片的位置应放在玻片的中央部位, 不要过分偏在两端。有时一块片可做两个或两个以上的抹片, 以方便染色、镜检、对照、并节约时间。
- ④, 抹片后, 记得固定。

三、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。标本通常只着染一种颜色。

常用稀释的碳酸复红液和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易染程度是不同的, 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, 有着鉴别不同特征细菌的意义。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杄核酸盐类, 这些盐类和结晶紫或龙胆紫及碘发生反应, 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。另一部份细菌细胞的原生质内没有这些特别的核酸盐类, 虽

经结晶紫及碘作用，不能形成的复合物，所着染的颜色能被酒精所脱，这类细菌，称为固紫阴性菌。由于固紫阴性细菌于脱色后，只回復无色，不易观察，所以在脱色之后，还用另一种不同颜色而浓度较低的染料，再次复染使阴性细菌染上另一种颜色。阳性菌因已染成深紫色，一般不易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，用草酸铈（铈）结晶紫（第一液）染色1—2分钟。
- 2) 水洗，并拭去多余水分后，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，加稀释石炭酸复红或沙黄液（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，至色素不再溶出来时即可，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的染色。染色后，微生物与组织细胞易于区别，使镜检时更加清楚分辨，一般的细菌被染成浅兰色，而其他的组织细胞则常呈红、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) 加伊红美兰磷酸盐缓冲液或蒸馏水数滴于其上（约与伊红美兰染色液等量），此时可见染色液将现出一层金属的光泽，

让其作用2分钟。

3) 水洗(冲洗而不要将染料倒去, 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, 也不须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, 染色沉淀较少, 又节省时间。

③、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, 必须加媒染剂和加热才能染上颜色, 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它染料复染, 才呈现相应的颜色。

其方法如下:

1) 抹片固定后, 加适量石炭酸复红染色液于其上, 加热至蒸汽出现为止(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) 水洗后以美兰液复染1分钟。

4) 干燥、镜检, 抗酸菌呈红色, 其他细菌或经脱色或呈蓝色。

2) 稍冷, 用水冲洗后, 用1%盐酸酒精脱色, 至无色素脱下为止。

溶液二：草酸铋	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，再将磨碎的碘片加入，徐徐加水，充分混匀，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：（稀释石碳酸复红）

石碳酸复红	10 CC（见抗酸染色的配制）
蒸馏水	90 CC

第四液除了用石碳酸复红外，也有用沙黄水溶液的（配制方法：取沙黄 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期为宜）。

(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	60 CC

置染料粉于玛瑙或玻璃乳钵中，徐徐加入甲醇，研磨，以促进其溶解，溶解后盛于有颜色的中性玻瓶中，置于暗处过夜，次日以滤纸滤过后，保存于暗处备用（如无甲醇，亦可勉强用乙醇代替，但染色时间须略加长）。

磷酸盐缓冲液的配制：

溶液一： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ （磷酸氢二钠）	23.864 克
蒸馏水	1000 CC
溶液二： KH_2PO_4 （磷酸二氢钾）	9.078 克
蒸馏水	1000 CC

用时以溶液一，四份与溶液二，一份混合即成。

(4) 抗酸染色液的配制：

石炭酸复红液：	3%碱性复红酒精溶液	10 CC
	5%石炭酸水溶液	90 CC

二液混合即成。

盐酸酒精液：	浓盐酸	3 CC
	95% 酒精	97 CC

二液混合即成。

思考问题：

1. 细菌抹片染色时，为什么需要固定？
2. 固紫染色法的染色顺序如何？分析每个步骤完成后，其结果会怎样？
3. 抗酸性染色法的原理如何？

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着条件的不同而有变化，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。

一、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。

二、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，还应挑取少许作涂片、固紫染色、镜检。并将观察结果记录

在各表格之中。

①、肉汤中的细菌生长情况及菌体形态表。

观察时，不要将试管平拿或摇动，以免菌液流出或摇散菌膜与沉淀，看不到原来生长的情况。

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及菌体形态表。

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及菌体形态表

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	干湿性	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

⑤、细菌在明胶穿刺培养中的生长情况：

试管号	液化明胶情况	穿刺线的生长形态

⑥、细菌在半固体琼脂穿刺培养中的生长情况：

试管号	沿穿刺线生长情况	穿刺线外扩散生长情况

思考问题

1. 认识细菌在各种培养基上的生长特性有什么实际意义？
2. 不同细菌的生长特性是否都不相同？

实验四 常用培养基的制造及灭菌

培养基是用人工的方法，将多种物质按照各种微生物生长发育的需要，配制成一种混合营养料和适宜的生长环境，用于培养、分离、鉴定和研究细菌等方面。

一、目的要求

认识常用液体培养基、固体培养基及一些鉴别培养基的制造程序及掌握其制造方法；认识高压蒸汽灭菌器的制造及其使用方法。

二、培养基的种类

培养基按其物理状态可以分为：

(1) 液体培养基——将各种有关物品溶解在水中而成。如肉汤、蛋白胨水等。

(2) 固体培养基——在液体培养基的基础上，加上适量的能凝固的物质，如琼脂、明胶等，使培养基冷却后成为固体状态，如普通琼脂、明胶培养基等，又根据用途不同，常把固体培养基分装成斜面、高层、平板等。

(3) 半固体培养基——在液体培养基的基础上，加入少量凝固物质，使冷却后既不呈液体，也不完全凝固，如半固体琼脂或半固体明胶培养基等。

三、制造的一般程序

虽然各种培养基的制造具体上有所不同，但一般均按下列配制程序进行。

(1) 配料及溶化：

把需要用的原料按量称好，置于容器（不可用铜或者铁器，因为铜、铁离子的抑菌性强）加热溶化，并经常搅拌，蒸发去的水分要用蒸馏水补足。

(2) PH值的测定：

培养基溶化后，要校正其PH值，使适于细菌生长。

(3) 过滤及分装：

用棉花、纱布或滤纸过滤，使滤液澄清，便于观察。分装时，不能超过容器的 $\frac{2}{3}$ 容量，以免灭菌时溢出。分装后塞上棉花塞，然后包装好。

(4) 灭菌：

培养基常用高压蒸汽灭菌法。一般培养基用15磅压力/平方吋灭菌20~30分钟。某些不耐热的培养基，如芽孢、明胶等则用8磅压力15分钟或应用间歇消毒法灭菌。

(5) 无菌检验：

把制好的培养基置37°C温箱内，培养24~48小时无菌生长才可应用。

(b) 保存:

为了避免培养基干燥、氧化、PH 改变及污染杂菌, 故须保存在冷暗处, 但时间不可过长。

四、液体培养基的制造

(1) 普通肉汤

①, 取牛肉除去脂肪、肌膜和结缔组织, 切成小块, 在磨肉机中磨碎, 或用菜刀剁碎。

②, 称其重量, 每 50 克加蒸馏水 100 CC, 混合后浸 1 ~ 2 小时, 或放在冰箱中过夜则更佳。

③, 用缓火煮沸 40 ~ 60 分钟, 加入蒸馏水补足其失去水分, 用纱布棉花过滤并挤出碎肉中所含的液体。

④, 每 100 CC 肉汤中加蛋白胨 1 克, 氯化钠 0.5 克, 并加热溶解。

⑤, 矫正酸碱度至 PH 7.6, 再用缓火煮沸 30 分钟。

⑥, 用棉花纱布或滤纸过滤。

⑦, 分装入试管 (每管约装 3 ~ 5 CC), 加棉塞, 用高压蒸汽灭菌器以 15 磅 30 分钟灭菌。

如果没有鲜牛肉, 则可用已制好成品的牛肉膏代替而制成牛肉膏汤培养基。其制法如下:

牛肉膏	0.3 克
蛋白胨	1 克
氯化钠	0.5 克
蒸馏水	100 CC

将上述各物混合后, 用缓火加热, 使其充分溶解, 并用蒸馏水补足其蒸发所失之水分, 然后矫正其酸碱度至 PH 7.4 ~ 7.6, 又煮沸 10 分钟, 待冷却至 25°C 时, 仍须补进所失去之水分, 最后用纱布棉花过滤分装、高压灭菌。

(2) 厌气肉汤 (培养厌气性细菌用)

取干净试管先置已煮热的肉屑少许于其中, 加入已制好的普通肉汤约 3 ~ 5 CC, 再在管上加入石蜡油或凡士林, 加固体石蜡的已溶化的液体约 1 CC, 置高压蒸汽 15 磅 20 ~ 30