

药学类专业实验教学丛书

微生物学实验与指导

程永宝 主编 方静娴

主审 ● 中国医药科技出版社



33

药学类专业实验教学丛书

微生物学实验与指导

主 编 程永宝
副主编 查永喜
主 审 方静娴

中国医药科技出版社

登记证号:(京)075号

内 容 提 要

本书是配合高等医药院校教学的实验教材。主要内容包括微生物学基本操作, 抗生素效价测定, 针剂、口服制剂和一些外用制剂的质检方法, 实验室常用仪器的使用保养以及培养基、试剂的配制等。实用为主, 方法具体, 不仅包括了较全面、系统的实验内容, 而且其中的预习要求、操作注意点、实验报告格式、思考题等均有普遍的指导意义。本书还可供从事微生物学研究及质检的有关人员参考。

微生物学实验与指导

程永宝 主编

中国医药科技出版社 出版
(北京西直门外北礼士路甲38号)
(邮政编码: 100810)

河北昌黎县印刷厂 印刷
全国各地新华书店 经销

开本787×1092mm¹/₃₂ 印张7¹/₄

字数 156千字 印数1--5500

1994年2月第1版 1994年2月第1次印刷

ISBN 7-5067-0985-6/R·0874

定价: 5.60元

中 国 药 科 大 学
药 学 类 专 业 实 验 教 学 丛 书
编 写 委 员 会

主任委员：郑梁元

编 委：（以姓氏笔划为序）

王 强	王秋娟	王莉华	方醉敏
刘文英	刘成基	刘静涵	宋学华
陆振达	钱之玉	徐秀兰	高金生
盛以虞	屠树滋	程永宝	蓝琪田

序 言

实验教学是培养药学人才的一个重要方面，在整个教学计划中占有很大的比重，也是当前教学中亟需加强的一环。长期以来，我校在抓好理论教学的同时，积累了较为丰富的指导实验的经验，并形成了比较成熟的、完整的实验教材体系。针对目前实验教学资料较少，迫切需要高质量实验教学用书的情况，我校专门组织了一批长期从事教学、实验工作的教师，根据国家教委颁发的《药学专业课程基本要求》的精神，对16门课程的实验教材进行了修订补充，按课程独立成册，每册基本内容包括实验、实验技术和实验指导三部分。

1. 实验部分 根据科学性、先进性和效益性的原则，收录了比较成熟的，基本技能训练效果比较好，又切合课程基本要求的实验若干个，供各校根据自己的特点和条件选用。每一实验都包括目的要求、实验原理、实验步骤、结果处理等内容。

2. 实验技术部分 介绍了与实验有关的技术，包括仪器的基本原理和构造、正确的使用方法、操作要点等，突出强调操作的规范性。

3. 实验指导部分 概述了每一实验的技能训练重点、实验的关键操作、实验注意事项等。为了进一步开拓学生的思路，对实验前的预习工作和实验后应思考的问题，也都有具体要求。

这套实验教学丛书可作为高等医药院校有关课程的本、专科教学参考用书，也可作为本科药学类专业的实验教材。

由于编写出版整套药学教学实验丛书尚属首次，缺乏经验，在内容选择及编写方法上的不妥之处，在所难免。欢迎从事药学教育的同行们批评赐教。

郑梁元

于南京

前 言

“微生物学”是一门实践性很强的生物科学，与“微生物学实验”一道在药学院校的教学起着重要的作用。前者已有统编教材问世，后者目前尚缺少适合于药学专业使用的教材。为此，我们以本校微生物学教研室编写的实验讲义为基础，在内容上进行了必要的精选和充实，编成本书。参加编写的有钱海伦、刘长云、肖灿鹏、倪孟祥等同志。

全书共有28个实验，分为对有关理论的验证、加强对实验技能的基本训练和控制药品质量的检测方法等三方面的内容。每个实验分为目的要求、实验原理、实验内容及实验教学指导四个部分。实验中涉及的其它部分如染色液的配法，培养基的制备和用途，免疫血清的制作原则以及微生物实验室中常用仪器的使用和保养等，均列于有关实验的附录中。

本书特点是微生物学内容与药学专业内容结合得十分密切，既有微生物学的基本操作实验，又有药学专业的应用实验，对实验原理还进行了简单讲述，并详细而具体的介绍操作方法。根据许多同志丰富的教学经验、科研实践经验还增编了“实验教学指导”主要有学习内容与要求，操作注意事项，实验报告的格式，进一步理解和巩固理论思考题。

本书除可供医药院校师生及从事微生物学研究的科技工作者使用与参考外，对进行药物生产、药品质量控制的有关人员亦具有重要的指导作用。

本书的编写得益于我校陈知本、陈小英、方静娴等同志的丰富实践经验，有的实验还得到冯瑞山同志的指导，在此

谨表深切的谢意。

由于编者水平有限，错误和不妥之处恳请批评指正。

编者

1994年3月

目 录

微生物学实验规则.....	1
微生物学实验基本技能项目.....	3
实验一 显微镜的使用和细菌形态的观察.....	4
实验二 细菌形态学检查方法.....	15
实验三 基础培养基的制备.....	28
实验四 各种接种技术.....	33
实验五 细菌生长状况的观察.....	46
实验六 细菌的生化反应试验.....	51
实验七 放线菌 真菌.....	64
实验八 病毒 噬菌体.....	74
实验九 螺旋体.....	85
实验十 微生物在外界的分布.....	89
实验十一 消毒灭菌.....	92
实验十二 细菌的遗传与变异.....	103
实验十三 菌种保藏法.....	112
实验十四 机体的非特异性免疫功能试验.....	118
实验十五 细胞免疫体外试验.....	124
实验十六 体外抗原-抗体反应.....	129
实验十七 常用生物制品示教.....	139
实验十八 药物体外抗菌试验.....	142
实验十九 抗生素效价测定法(管碟法).....	150
实验二十 注射剂的无菌检查法.....	163
实验二十一 口服药品中细菌总数的测定.....	168

实验二十二	药品中霉菌(酵母)总数的测定·····	174
实验二十三	药品中大肠杆菌检查法·····	178
实验二十四	药品中金黄色葡萄球菌的检查法·····	185
实验二十五	药品中绿脓杆菌的检查法·····	191
实验二十六	药品中沙门氏菌的检查法·····	199
实验二十七	药品中破伤风杆菌的检查法·····	210
实验二十八	化学消毒剂杀菌效力的测定·····	216

微生物学实验规则

一、一律穿工作衣入实验室，以防衣服被菌污染或被染液弄脏，离室时脱下，并应经常洗干净。

二、非实验所需物品不得置于实验台上。

三、未经教师许可，不得将实验室内物品带出。

四、实验前应做好预习，实验时必须严格遵守操作规程。

五、实验室中应保持安静，不得高声谈笑，无事不得到处走动。

六、各种细菌培养物均需轻取轻放，以免容器破损，造成污染。

七、若细菌污染桌面、地面、用具、衣服或皮肤，应立即报告指导老师，然后进行以下处理：

1. 若桌面、地面被污染，将 3% 来苏水或 5% 酚倒在污染处，半小时后方可擦去。

2. 手被污染时可浸泡于 3% 来苏水或 0.1% 的新洁尔灭中 10~20 分钟，然后用肥皂洗净。

3. 衣服被污染时，须经煮沸或高压蒸汽灭菌后再进行洗涤。

八、如吸入菌液，应立即吐入水槽内，先用自来水再用消毒液漱口，必要时可服用抗菌药物。

九、实验室内不得食用任何饮食。

十、留长发者应戴帽或将长发束扎于脑后，以免着火或被污染。

十一、爱护公物，节约实验材料。器材如有损坏应主动

报告，并填写报损单。

十二、实验完毕，应将桌面整理清洁，物归原处，将需培养的物品放入培养箱中，洗手后方能离室。

十三、值日生离室前必须将实验室打扫干净，用消毒液擦抹桌面，并检查水、电、窗是否关好。

微生物学实验基本技能项目

- 一、显微镜的维护及使用，尤其是油镜的使用。
- 二、细菌染色标本的制备（涂片制备及革兰氏染色法）。
- 三、无菌操作法（各种接种法及无菌吸管的使用）。
- 四、普通肉汤及琼脂培养基的制备。
- 五、无菌器皿的包扎及常用消毒灭菌法。
- 六、实验结果的判断：

1. 认识细菌的基本形态与特殊构造。
2. 识别细菌、放线菌、真菌的菌落。
3. 普通培养基中生长状况及生化反应结果的判断。

要求掌握基本技能后，能独立进行以下几项有关的实

验：

1. 无菌药物制剂的无菌检查法。
2. 药物效价的微生物学测定法（管碟法）。
3. 药物体外抗菌活性测定法（琼脂渗透法、浓度系列稀释法）。
4. 口服及外用药物的微生物学检验。

实验一 显微镜的使用和细菌形态的观察

一、目的要求

1. 熟悉普通光学显微镜的构造、油镜使用的原理和显微镜保护法。
2. 学会正确使用油镜观察细菌的基本形态和特殊构造。
3. 了解各种显微镜的主要特征。

二、实验原理

(一) 光学显微镜的构造

细菌的形体非常小，必须用显微镜放大才能看到。微生物实验室中最常用的是普通光学显微镜，它的构造可分为机械部分和光学部分（图 1-1）。

1. 机械部分

镜筒：在显微镜的上方，为一空心直立圆筒。上端连接目镜，下端连接物镜。

镜臂：为弓形金属柱，在镜筒后，是拿取显微镜时手握之处。

镜头回转器：装于镜筒下端，为装置物镜和转换物镜之用。

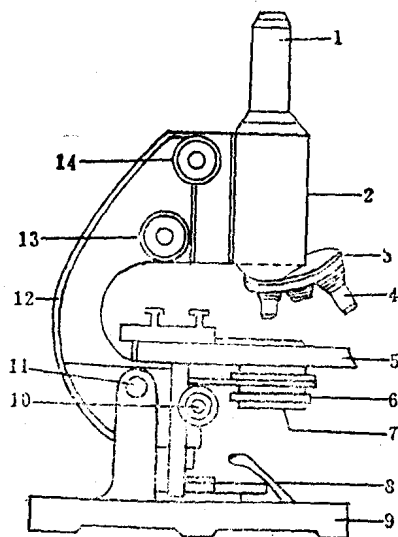


图 1-1 显微镜构造图

1. 目镜；2. 镜筒；3. 镜头回转器；4. 物镜；5. 载物台；
6. 光圈；7. 聚光器；8. 反光镜；9. 镜座；10. 聚光器调
节器；11. 关节；12. 镜臂；13. 细调节器；14. 粗调节器。

调节器：是调节焦距的装置，有粗调节器和细调节器两种。有的显微镜还有专司聚光器升降的调节器。

载物台：镜筒下之平台，用以载放被检标本。中央有孔，可使光源通过。载物台上装有推动器，可移动标本片，或用片夹固定标本片。

镜座：支持全镜的底座。

2. 光学部分

目镜：又称接目镜，由数片透镜组成。上面刻有 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 等，各代表其放大倍数。

物镜：又称接物镜，也由数片透镜组成。其作用是将标本放大。根据使用条件的不同分为干燥物镜和浸油物镜。习

惯上把放大 10 倍以下的物镜叫低倍镜，放大 40 倍左右的叫高倍镜，二者皆为干燥物镜。通常油镜的放大倍数为 90~100 倍。

物镜上一般都标有表示物镜光学性能和使用条件的一些数字和符号。当油镜上标有 100 (或 100×)，*N.A* 1.25 时，100 表示放大倍数，*N.A* 是数值口径 (numerical aperture) 的缩写，用来表示从聚光镜发出的锥形光柱照射在观察标本上被物镜所聚集的量。物镜的数值口径愈大，分辨物体的能力愈强。物镜上有的还标有透镜焦距等数字。

聚光器：位于载物台下，其位置之升降可影响视野的明亮度：上升则视野明亮，下降则光线减弱。

光圈：在聚光器上装有可调节光束的光圈，其放大或缩光也可控制视野的明亮程度。

反光镜：装于镜之下方，作用是采集外来光线并送入聚光器中。有平面及凹面之分，一般在采集自然光时用平面，采集人工光源时用凹面。

(二) 放大倍数

标本首先经物镜放大，在目镜的焦距平面上形成一个实

表 1-1 显微镜的放大倍数

	放 大 倍 数		总的放大倍数
	物 镜	目 镜	
低倍镜	10×	10×	100×
高倍镜	45×	10×	450×
油镜	100×	10×	1000×

像，再经过目镜放大成最终的虚像。总的放大倍数是物镜放大倍数与目镜放大倍数的乘积。显微镜的放大倍数见表 1-1。

物镜的放大倍数愈大，其工作距离（物镜镜头到标本片之间的距离）愈短，这时光圈就要打开得愈大。

(三) 分辨距离与分辨力

显微镜的性能受物镜的分辨距离或分辨力所限制。分辨距离即透镜所能分辨的两个物点之间的最小距离，分辨距离愈小，透镜的分辨力愈高，物像也就愈清晰。因此常以分辨距离来衡量显微镜的分辨力。

$$R = \frac{0.61\lambda}{N.A} \quad (1-1)$$

式中 R ——分辨力；

λ ——作用光的波长；

$N.A$ ——数值口径。

由式 (1-1) 可见，物镜的数值口径愈大，分辨距离就愈小，分辨力也就愈高。物镜的数值口径又可用式 (1-2) 表示：

$$N.A = n \cdot \sin \frac{\theta}{2} \quad (1-2)$$

式中 n ——物镜和标本片之间所用介质的折射率；

θ ——物镜的镜口角（图 1-2）。

由上述二公式可以看出，物镜的分辨力与物镜的数值口径、所用光波的波长以及物镜与标本片之间所用介质的折射率有关，一些介质的折射率见表 1-2。要提高分辨力，一是所用的光波波长要短，二是增大数值口径。由于可见光的波长范围狭窄（平均波长约为 $0.5\mu\text{m}$ ），再短就进入肉眼所不能感觉的紫外线范围了，因此只有增大数值口径一种途径。