

全国中等农业学校试用教材

兽医微生物学 实验实习指导

吉林省农业学校主编

兽医专业用



农业出版社



全国中等农业学校试用教材

兽医微生物学实验实习指导

吉林省农业学校主编

兽医专业用

农业出版社

全国中等农业学校试用教材
兽医微生物学实验实习指导
吉林省农业学校主编

农业出版社出版 (北京朝内大街130号)
新华书店北京发行所发行 农业出版社印刷厂印刷

787×1092毫米 32开本 3.5印张 73千字
1981年12月第1版 1987年5月北京第6次印刷
印数 49,801—10,000册

统一书号 16144·2439 定价 0.57元

说 明

一、本实验实习指导，是根据中华人民共和国农业部，1980年5月制定的全国中等农业学校《兽医微生物学教学大纲》的规定编写的。

二、兽医微生物学实验实习，是本课程教学的重要组成部分。通过实验，验证课堂理论，加深对兽医微生物学基本理论知识的理解，学习和掌握微生物学的操作技术，为家畜传染病的诊断，以及有关学科的理论及实验打下基础。

三、实验实习指导，分总论及各论两部分。总论着重了解微生物的一般规律（形态、染色、分离培养、动物接种、鉴别原则及免疫方面的基本实验方法）。各论主要研究各种病原微生物的生物学特性以及诊断原则。并通过兽医临床、病料、标本检查，使学生掌握传染病的病原学及血清学诊断方法。

四、实验形式，分教师示教和学生操作两种。前者主要验证课堂理论，后者使学生掌握基本技能。

五、为了保证完成兽医微生物学教学大纲所规定的实验实习内容，各校要努力创造条件，配备必要的仪器设备。至于实验内容的合并与分次实习，以及实习时间的安排等，各校可根据具体情况灵活安排。

六、在实验实习时，对学生必须严格要求，加强安全教

育。在老师的指导下，发挥学生的主动性，认真观察，独立思考。微生物实验室，多使用贵重精密仪器，必须按使用规则精心操作和注意保养。

七、考虑到发挥教师的主导作用，各实验中的思考题和实验报告内容，可由任课教师自己确定。

目 录

兽医微生物学实验室规则.....	1
------------------	---

总 论

实验一 显微镜油镜的使用方法.....	2
实验二 微生物实验室的几种重要仪器的构造和使用 方法.....	4
实验三 细菌的基本形态和特殊构造的观察（附细菌 大小的测量法）.....	17
实验四 细菌涂片的制备和染色法.....	19
实验五 细菌运动检查法.....	24
实验六 常用玻璃器皿的准备和灭菌.....	26
实验七 常用培养基的制备.....	28
实验八 细菌的分离、移植及培养性状的观察.....	33
实验九 细菌的生物化学试验.....	39
实验十 环境中细菌的检验.....	42
实验十一 物理、化学因素对细菌影响的检查.....	45
实验十二 实验动物的接种与剖检.....	49
实验十三 凝集反应.....	52
实验十四 沉淀反应.....	61
实验十五 荧光抗体技术.....	66

各 论

实验十六	病原性球菌.....	70
实验十七	炭疽杆菌.....	72
实验十八	厌气性病原梭菌.....	75
实验十九	猪丹毒杆菌.....	79
实验二十	结核及副结核杆菌.....	81
实验二十一	多杀性巴氏杆菌.....	84
实验二十二	布氏杆菌.....	85
实验二十三	大肠杆菌及沙门氏杆菌.....	87
实验二十四	放线菌、真菌、螺旋体和支原体.....	90
实验二十五	病毒的鸡胚培养和细胞培养法（示教）.....	93
实验二十六	病毒红细胞的凝集试验和凝集抑制试验.....	99
（附）	兽医微生物学实验室的基本设备.....	103

兽医微生物学实验室规则

兽医微生物学实验的对象，主要是病原微生物，如不慎，则易引起感染，因此，必须严格遵守实验室规则，认真进行操作，防止发生意外事故。

一、实验前要认真预习，明确实验目的和内容。

二、进入实验室，必须穿工作服，只带实验实习指导及实习报告。严禁饮食、吸烟和随地吐痰。

三、在实验中，保持安静，认真操作，仔细观察，实验结果应作详细记录，并认真写出报告。

四、牢固树立无菌观念，进行无菌操作，用过的培养物、病料、实验动物及器材均须放入指定的消毒容器内灭菌，不准随意乱放，或用水冲洗。如遇污染，应速报告老师，采取措施。

五、注意安全，易燃品（如酒精、乙醚、二甲苯等）要远离火源，酒精灯用后立即熄灭，不可把酒精灯斜向另一点燃的酒精灯点火。未经老师许可，实验室内任何物品或材料一律不准带出。

六、爱护公物，节约水电和实验用品，显微镜用后擦净放入箱内。如有损坏公物主动报告、登记、酌情赔偿。

七、实验完毕，整理桌面，物归原处，洗手消毒，脱去工作服，值日小组巡视水电、门窗是否关闭，以确保安全。

总 论

实验一 显微镜油镜的使用方法

目的要求

正确掌握显微镜的油镜使用和保护。

仪器及材料

显微镜、香柏油、二甲苯、擦镜纸、细菌染色标本片。

方法与步骤

(一) 油镜的识别

油镜是接物镜的一种。因使用时需在物镜和载玻片之间添加香柏油，因此称为油镜。可从以下几点识别油镜。

1. 一般的说，接物镜的长度愈大，则放大倍数愈大，故油镜最长。

2. 油镜的放大倍数为 $100\times$ 或 $90\times$ ，使用时应查看油镜上标明的倍数（图1）。

3. 各类型或不同光学仪器厂生产的物镜，往往在接物镜的下端有一黑色线圈作为油镜的标记。故实习使用前，可先熟悉一下油镜上标志的黑线圈，以防用错物镜。

(二) 原理

主要避免部分光线折射的损失。因空气的折光率 ($n=1.0$) 与玻璃的折光率 ($n=1.52$) 不同，故有一部分光线被

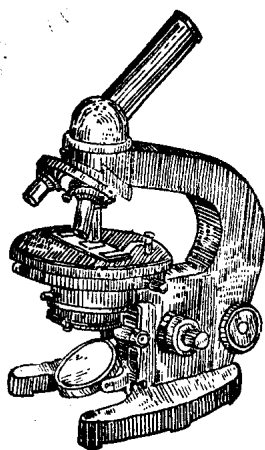


图1 显微镜

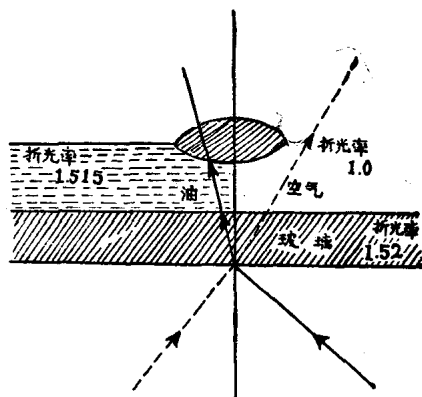


图2 油镜的原理

折射,不能射入镜头,加之油镜的开口较小,进入镜中的光线比低倍镜、高倍镜少得多,致使视野更暗。为了增强视野的亮度,使镜头和载玻片之间充填香柏油,这样绝大部分的光线射入镜头,使视野明亮,物像清晰,因香柏油的折光率($n=1.515$)和玻璃相近(见图2)。

(三) 使用方法

1. 尽量升高集光器,放大光圈,调节反光镜,使射入镜头的光线最强。

2. 于标本片的欲检部位,用香柏油壶(图3),滴加香柏油1滴,将标本片放在载物台上,用弹簧夹固定,使欲检部位移置于物镜下,先用低倍镜找到适宜的视野,然后转换油镜检查。



图3 香柏油壶

3. 眼睛从镜筒侧面注视油镜头，小心转动粗调节器，使镜筒下降，直至油镜头浸没油中，几乎与玻片相接触，但不要碰到玻片，因为油镜的工作距离只有 0.193 毫米左右，然后，一面从目镜观察，一面徐徐向上转动粗调节器，待获得模糊物像时，再换用细调节器，直至物像完全清晰为止。此时，切勿用粗调节器下降油镜，以免压碎油镜头。

4. 油镜用毕，应以擦镜纸（切勿用手、布或其它纸类）拭去香柏油。如油已干或透镜模糊不清，可滴少量二甲苯于擦镜纸上，拭净油镜头，并随即用干擦镜纸拭去二甲苯（以免二甲苯溶解粘固镜片的胶质使其脱胶，致使镜片移位或脱落），然后，把低倍镜转至中央，或将物镜转成“八”字形，将镜筒和集光器下降，用绸布盖好放入镜箱，存放于阴凉干燥处，以免受潮生锈。

实验二 微生物实验室的几种重要 仪器的构造和使用方法

目的要求

了解微生物实验室几种重要仪器的构造、作用原理、使用方法和保护。

仪器及材料

电热恒温培养箱、电热干燥箱、高压蒸气灭菌器、流通蒸气灭菌器、滤菌器、电冰箱、电动离心机、电动抽气机、水浴箱、电动振荡器。

方法与步骤

(一) 电热恒温培养箱

1. 构造及作用原理 电热恒温培养箱，是微生物实验室培养细菌的重要仪器。其构造主要由箱体、电热丝、温度调节器等组成。

(1) 箱体：是由双层金属板，中间夹有绝热材料（石棉或玻璃纤维）制成的长方形箱，内有放置试品的工作室，由网式隔板隔有数层。箱门有二道，一道为玻璃门，用以观察室内情况，另一道为有绝热层的金属隔热门。箱顶有排气孔，顶盖中央有一插入温度计的小孔（当采用接点温度计时，箱顶还设有一个供插入水银温度计的小孔）。箱底有进气孔，便于干燥空气进入，以促使工作室热空气流通。箱侧控制层内装有指示灯、温度调节器等零件。

(2) 电热丝：箱底夹层装有电热丝作为热源，电热恒温培养箱的电热丝，是由多组串连而成，固定于瓷盘上，使电热丝温度不超过 80°C ，利于箱内温度均匀。

(3) 温度调节器：箱上或侧面，装有特殊合金制成的自动温度调节器，对冷热极为敏感，冷则收缩，使电路接通，温度上升。热则膨胀，使电路截断，于是温度下降。冷至一定程度时，电路又接通，温度又上升。电路的接通和截断，可从左侧或下方的红绿指示灯亮、灭得知。红灯亮时，表示电路接通，逐渐升温，红灯熄灭绿灯亮时，表示电路截断，逐渐降温或保持恒温。

近年来温度调节改用接点温度计（又名导电表），将接点温度计插入顶盖中央小孔内，使用时把温度计内的金属丝调至所需温度上，当温度计内的水银柱上升与该金属丝接触

时，电路截断，温度下降，水银离开金属丝时，电路又接通。因此，温度的控制比其他温度调节器灵敏（图4）。

2. 使用方法

（1）安上电源插头，开启电源开关，绿色指示灯明亮，表示电源接通，然后扭转温度调节旋钮，顺时针扭转，红色指示灯亮，表示电热丝已在发热，箱内升温。

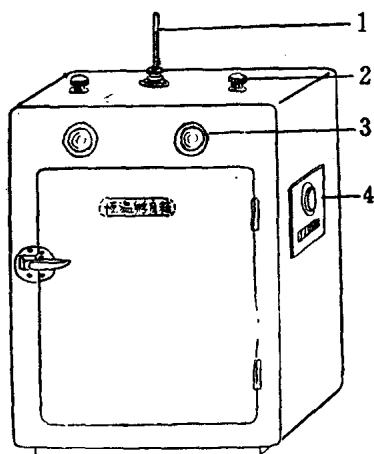


图4 电热恒温培养箱

1. 温度计 2. 排气孔 3. 指示灯 4. 调节器

（2）当温度升至所需温度时，把温度调节旋钮逆时针方向旋回至绿灯复亮，当红、绿灯交替明亮即为所需恒温（如若有增温，此乃余热影响，半小时左右即会处于稳定）。

3. 注意事项

（1）培养箱必须放置干燥及平稳处。

（2）使用时，随时注意温度计（或接点温度计）的指示温度是否与所需温度相同。

（3）除了取放培养物开启箱门外，尽量减少开启次数，以免影响恒温。

（4）工作室隔板放置试验材料不宜过重，底板为散热板，切勿放置其他物品。

（5）不用时，切断电源，并将旋钮转至零位，确保安全。

(二) 电热干燥箱 (干热灭菌箱) 电热干燥箱构造、原理与电热恒温培养箱相同 (图 5), 只是所用温度较高, 主要用于玻璃器皿和金属制品等的干热灭菌干烤用。箱内放置物品需要留空隙, 保持热空气流动, 以利彻底灭菌。常用灭菌温度为 160°C , 维持 1—2 小时。灭菌时, 关门加热应开启箱顶上的活塞通气孔, 使冷空气排出, 待升至 60°C 时, 将活塞关闭。为了避免玻璃器皿炸裂, 灭菌后降至 60°C , 才能开启箱门取出物品。灭菌温度不能超过 170°C , 以免棉塞或包扎纸被烤焦。若仅需达到干烤目的, 可一直开启活塞通气孔, 温度只需 60°C 左右即可。

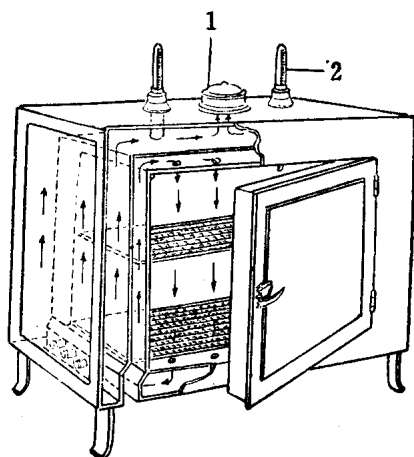


图 5 电热干燥箱
1. 排气孔 2. 温度计

近年来电热干燥箱内装有电动鼓风机, 促使箱内热空气机械对流, 温度均匀。

灭菌过程中如遇箱内冒烟, 温度突然升高, 应立即切断

电源，关闭排气小孔，箱门四周用湿毛巾堵塞，杜绝氧气进入，火则自熄。

(三) 高压蒸气灭菌器

1. 构造及作用原理 高压灭菌器是应用最广，效率最高的灭菌器。其种类有手提式、直立式及横卧式等，其构造和作用原理基本相同（图6）。

高压灭菌器为一锅炉状的双层金属圆筒，两层之间下面盛水，内筒有一活动金属隔板，隔板有许多小孔，使蒸气流通。灭菌器上方或前方有金属厚盖。盖上有压力表、温度计、安全活塞和排气活塞。盖旁附有螺旋，借以紧闭盖门，使蒸气不能外溢。

在标准大气压下，水的沸点是 100°C ，这个温度只能杀死一般细菌的繁殖体，不能杀死芽孢。为了提高温度，就需增加压力。压力增大，水沸点升高，压力减小，水沸点下降。

因高压蒸汽灭菌器是一个密闭的容器，因此，加热时蒸汽不能外溢，所以锅内压力不断增大，使水的沸点超过 100°C ，当压力达到15磅/英寸²（温度 121.30°C ）经30分钟即可杀灭细菌的芽孢。

蒸汽压力与灭菌器内温度的关系（见表1）。

2. 使用方法

(1) 加适量热水于灭菌器内，放入待灭菌物品。

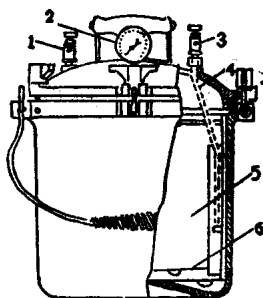


图6 手提式高压蒸气灭菌器

1. 安全活塞 2. 压力表 3. 排气活塞 4. 放气软管 5. 消毒桶 6. 隔板

表 1 蒸汽压力与蒸汽温度的对应关系

压 力			温 度 (°C)	压 力			温 度 (°C)
公斤/厘米 ²	磅/英寸 ²	气压		公斤/厘米 ²	磅/英寸 ²	气压	
	5		108.80	0.83	12		118.00
		1.4	109.68			1.9	118.90
0.40	6		110.30	0.89	13		119.10
0.48	7		110.70	0.96	14		120.20
		1.5	111.74	1.02	15	2.0	121.30
0.56	8		113.00	1.11	16		122.40
		1.6	113.60	1.17	17		123.30
0.64	9		114.30	1.25	18		124.30
0.71	10	1.7	115.54	1.40	20		126.20
0.77	11		116.80				
		1.8	117.30				

(2) 旋紧螺旋, 使盖紧闭后加热, 蒸汽由内壁小孔流入灭菌器内, 待灭菌器内压力升至 5 磅/英寸²时, 打开排气活塞, 排尽灭菌器内冷空气, 也可在加热时, 就打开排气活塞, 待均匀冒出水蒸汽流时, 表示锅内冷空气已排完。然后关闭排气活塞继续加热, 待灭菌器内压力升至 15 磅/英寸² (相当 1 公斤/厘米²), 温度 121°C 经 15—30 分钟, 即可达到灭菌的目的。

(3) 灭菌时间到达后, 停止加热, 待压力降至零时才能开盖取物。

(4) 手提式高压灭菌器灭菌完毕可放出器内之水, 并擦干净。

3. 注意事项

(1) 螺旋必须均匀上紧, 使盖紧闭, 以免漏气。

(2) 放入器内待灭菌物品, 不可堆压过紧, 以免妨碍蒸汽流通, 影响灭菌效果。

(3) 凡能耐高温和潮湿的物品(如培养基、生理盐水、敷料、病原微生物等)都可应用此法灭菌。

(4) 加热不久必须排尽灭菌器内冷空气, 否则影响灭菌效果(见表2)。

表2 冷空气排出量与温度的关系

压 力(磅/英寸 ²)	排 气 后 的 温 度 (°C)				
	全 排 出	排出 2/3	排出 1/2	排出 1/3	全未排出
5	109	100	94	90	72
10	115	109	105	100	90
15	121	115	112	109	100
20	126	121	118	115	109

(5) 为了达到彻底灭菌, 灭菌时间和压力必须准确可靠, 操作人员不能擅自离开。

(四) 流通蒸气灭菌器
主要利用常压蒸气灭菌。构造如一般蒸锅(图7), 底层盛水, 器中有1—2层带孔隔板用以放置待灭菌的物品。使用时, 器内加水后放入欲灭菌的物品, 加热至水沸腾产生蒸气。因在普通大气压力下, 蒸气温度只能达100°C, 一般维持30分钟, 只能杀死细菌的繁殖体, 芽孢不死亡。因此, 必须

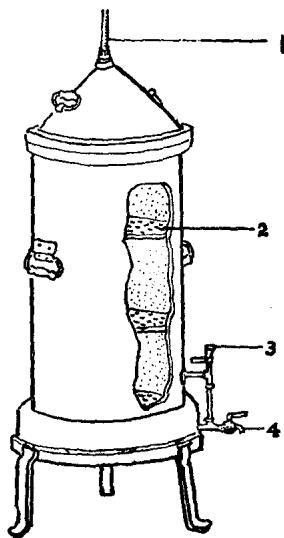


图7 流通蒸气灭菌器
1. 温度计 2. 隔板 3. 进水口
4. 排水孔