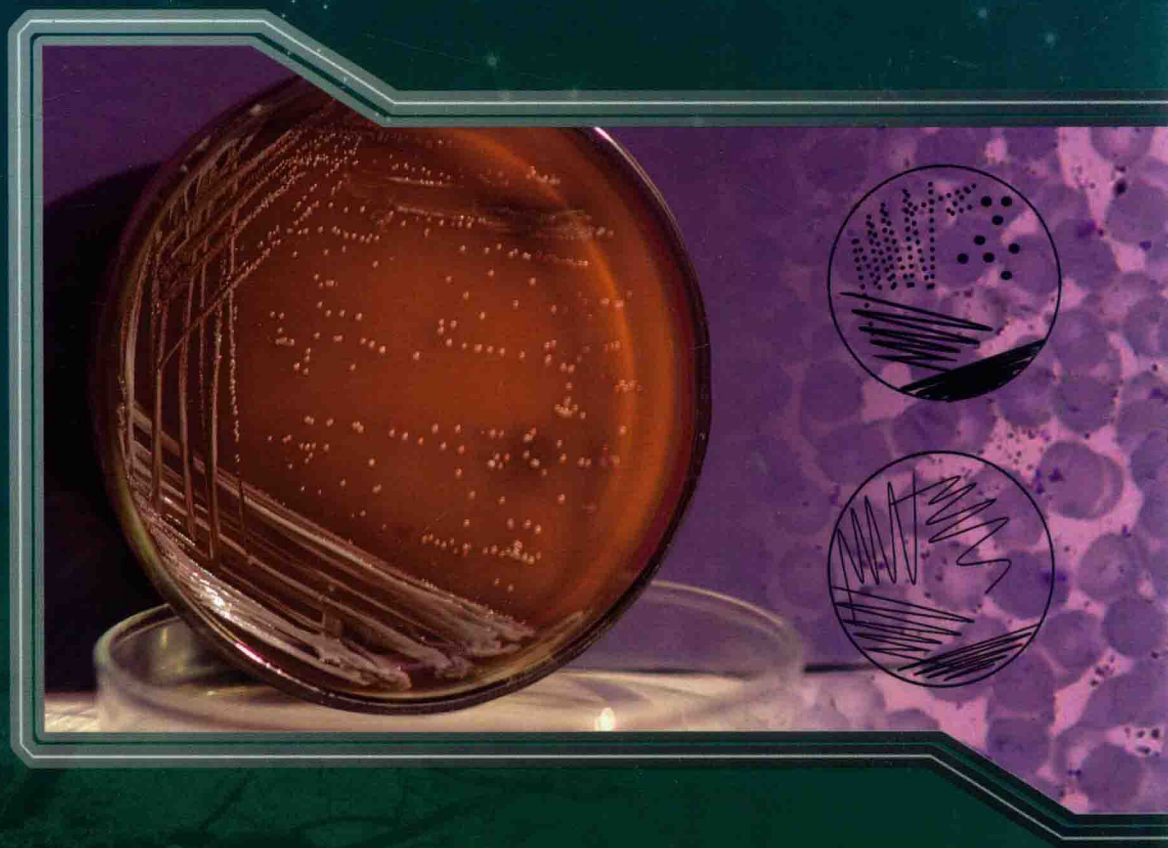


高等医学院校实验系列规划教材

医学微生物学实验指导

YIXUE WEISHENGWUXUE SHIYAN ZHIDAO

主编 管俊昌 刘 勇



中国科学技术大学出版社

高等医学院校实验系列规划教材

医学微生物学实验指导

YIXUE WEISHENGWUXUE SHIYAN ZHIDAO

主 编 管俊昌 刘 勇

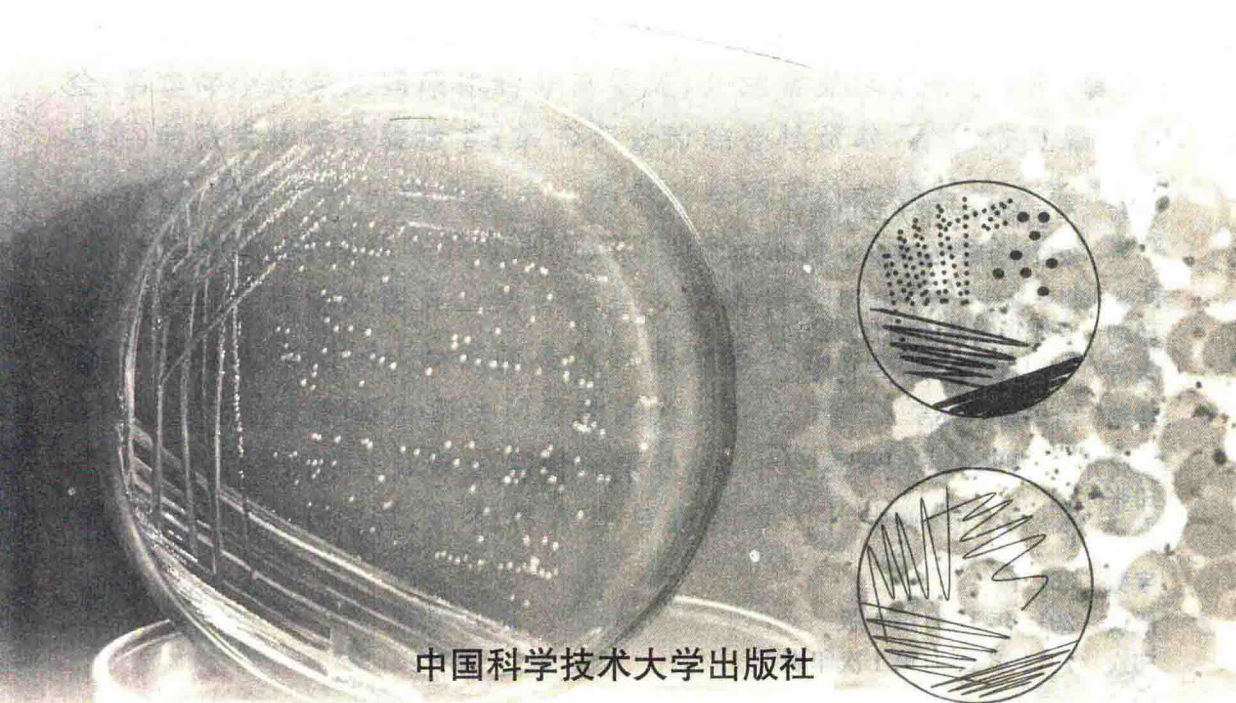
副主编 陈艺林 张 涛

编 委 (以姓氏笔画为序)

马丽娜 韦 莉 吕 杰

刘 勇 张 涛 陈艺林

郑庆委 赵芳芳 管俊昌



中国科学技术大学出版社

内 容 简 介

为适应学科发展、满足教学需要,培养学生理论联系实际、独立思考、独立操作的能力,结合实际情况,组织编写了本实验指导书。

本实验指导共分三大部分,第一部分为微生物学基本技术及实验,共设 12 个实验;第二部分为常见病原体的分离鉴定,共设 13 个实验;第三部分为综合性试验,共设 4 个实验。

每个实验的编写力求实用、简明、条理清晰,并附有图表。为进一步增强学生对知识的理解和掌握及提高学生分析问题和解决问题的能力,特别增设了“注意事项”、“习题及作业”和“知识拓展”,供学生复习和迎考。

图书在版编目(CIP)数据

医学微生物学实验指导/管俊昌,刘勇主编. —合肥:中国科学技术大学出版社,2014. 12
ISBN 978-7-312-03601-9

I. 医… II. ①管… ②刘… III. 医学微生物学—实验 IV. R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 247726 号

出版 中国科学技术大学出版社
安徽省合肥市金寨路 96 号,230026
<http://press.ustc.edu.cn>
印刷 合肥市宏基印刷有限公司
发行 中国科学技术大学出版社
经销 全国新华书店
开本 787 mm×1092 mm 1/16
印张 13
插页 6
字数 361 千
版次 2014 年 12 月第 1 版
印次 2014 年 12 月第 1 次印刷
定价 29.00 元

前 言

医学微生物学是基础医学中的一门重要学科,学习医学微生物学为学习临床各科的感染性疾病、传染病、超敏反应性疾病和肿瘤疾病等奠定重要的理论基础。医学微生物学实验的基本操作技术对医学微生物学的创建和飞速发展起到了巨大作用。为适应医学微生物学的快速发展和培养实用型人才的需要,我们在学院有关部门的组织和支持下,经过教研室多名资深教师的共同努力,完成了这本医学微生物学实验指导的编写,希望能借此提高实验教学质量,增强学生对基本理论、基本知识和基本技能的掌握。

为适应学科发展、满足教学需要,培养学生理论联系实际、独立思考、独立操作的能力,结合实际情况,我们对实验内容进行了认真选择,并与编写体系有机整合起来。本实验指导共分三大部分:第一部分为微生物学基本技术及实验,介绍微生物学的基本实验技术及基础性实验;第二部分为常见病原体的分离鉴定,介绍常见病原体(细菌、真菌、病毒)的微生物学实验检查;第三部分为综合性试验,介绍常见临床标本的微生物学检查原则及方法。编者对每项实验的编写力求实用、简明、条理清晰,对每项实验分别介绍了目的、材料、原理、方法及结果观察等,并附有必要的图表。结合编者多年的教学经验,增设了“注意事项”、“习题及作业”和“知识拓展”,以期增强学生对知识的理解和掌握及提高学生分析问题和解决问题的能力。

限于编者的水平以及编写时间紧迫,书中缺点和不足在所难免,恳请广大师生给予指正,我们将在今后的教学工作中不断加以补充和完善。

编 者

2014年7月

目 录

前言	(i)
绪论	(1)

第一篇 微生物学基本技术及实验

实验一 显微镜的使用和维护	(5)
实验二 微生物学实验室常用仪器的使用	(9)
实验三 微生物学实验中常用物品的准备	(13)
实验四 微生物学实验动物和动物实验技术	(18)
一 抓取和固定实验动物的方法	(18)
二 常用实验动物感染技术	(20)
实验五 临床常见感染标本的采集	(24)
一 脓液标本的采集	(25)
二 痰液标本的采集	(25)
三 粪便标本的采集	(27)
四 尿液标本的采集	(27)
五 血液及骨髓液标本的采集	(29)
六 脑脊液标本的采集	(30)
七 生殖道标本的采集	(31)
实验六 常用培养基的制备	(32)
实验七 常用的细菌接种和培养方法及生长现象观察	(35)
一 细菌的接种方法	(35)
二 细菌的培养方法	(38)
三 细菌的生长现象	(41)
实验八 细菌形态结构及运动观察	(44)
一 细菌涂片标本的制备	(44)
二 细菌基本形态的观察	(46)
三 细菌特殊结构的观察	(49)

四 细菌动力观察	(51)
实验九 细菌分布的测定	(54)
一 空气中细菌的分布	(54)
二 水中细菌总数的测定	(56)
三 细菌在口腔中的分布及数量的测定	(59)
实验十 消毒与灭菌	(62)
一 物理因素对细菌的影响	(62)
二 化学因素对细菌的影响	(65)
三 生物因素对细菌的影响——抗菌药物敏感试验	(66)
四 生物因素对细菌的影响——噬菌体对细菌的裂解作用	(69)
实验十一 细菌变异的观察	(71)
一 细菌的鞭毛变异现象	(71)
二 细菌的 L 型变异	(73)
实验十二 细菌致病性作用的观察	(76)
一 荚膜的致病作用	(76)
二 透明质酸酶试验	(77)
三 细菌外毒素毒性作用及抗毒素的保护作用	(78)
四 细菌内毒素的致病作用	(79)

第二篇 病原体的分离鉴定

实验十三 病原性球菌	(81)
一 葡萄球菌属的生物学性状观察	(81)
二 链球菌属的生物学性状观察	(85)
三 奈瑟菌属的生物学性状观察	(89)
实验十四 肠道杆菌	(94)
实验十五 霍乱弧菌	(102)
一 霍乱弧菌的形态学观察和动力观察	(102)
二 霍乱弧菌的分离鉴定程序	(103)
实验十六 厌氧性细菌	(108)
一 厌氧性细菌的生物学性状观察	(108)
二 厌氧芽孢梭菌	(111)
实验十七 分枝杆菌	(118)
实验十八 白喉棒状杆菌	(124)

实验十九 其他细菌/动物源性细菌	(128)
一 炭疽芽孢杆菌	(128)
二 蜡样芽孢杆菌	(131)
实验二十 支原体、衣原体、立克次体、螺旋体	(133)
一 支原体	(133)
二 衣原体	(136)
三 立克次体	(138)
四 螺旋体	(140)
实验二十一 病原性真菌	(148)
一 真菌的形态观察	(148)
二 真菌的培养与菌落观察	(152)
三 病原性真菌的临床标本检查法	(154)
实验二十二 病毒学的基本实验	(157)
一 病毒的形态观察	(157)
二 病毒的培养方法	(158)
三 病毒致细胞病变作用	(163)
四 病毒的中和试验	(166)
五 病毒的分子生物学诊断	(170)
实验二十三 流行性感冒病毒的分离与鉴定	(174)
实验二十四 乙型肝炎病毒抗原抗体的检测	(177)
实验二十五 HIV 的检测	(179)
一 ELISA 法检测 HIV 抗体	(179)
二 免疫印迹法检测 HIV 抗体	(180)

第三篇 综合性实验(临床常见标本的细菌学检验)

实验二十六 血液及骨髓液标本的细菌学检验	(183)
实验二十七 呼吸道标本的细菌学检验	(188)
实验二十八 脑脊液标本的细菌学检验	(193)
实验二十九 组织标本的细菌学检验	(197)
附录 示教彩图	(201)

绪 论

一、医学微生物学实验的目的与要求

【目的】

医学微生物学实验的目的是加强和巩固学生对所学理论知识的理解和体会,是理论课的重要补充。在系统学习理论知识的基础上,使学生掌握微生物学实验的基本操作、基本技术,为今后的临床实践及科研工作打下坚实的基础。

【要求】

为达到实验目的,要求学生应做到以下方面:

- (1) 实验课前应做好预习,明确本次实验的目的、内容、理论依据及操作中注意事项,尽量避免或减少错误发生。
- (2) 认真听取指导老师的课中讲解、示教,观摩实验课中的影像、多媒体等电化教材。
- (3) 在实验过程中,应持严肃认真的科学态度,合理分配时间,爱护实验器材。
- (4) 整个微生物学实验过程中,应建立“无菌”概念,培养“无菌操作”习惯。
- (5) 实验课中应独立思考、独立操作,培养分析及解决问题的能力。
- (6) 实验结果应真实记录并写出实验报告(根据需要用彩笔绘图),如实验结果与理论不符,应探讨和分析其产生原因。

二、医学微生物学实验室学生安全规则

医学微生物学实验室涉及病原微生物,任何疏忽或者不规范操作均可能导致严重的后果。因此,为了防止医学微生物学实验过程中自身感染及环境污染,根据中华人民共和国国务院令(第424号)《病原微生物安全管理条例》,参照《实验室生物安全通用要求》,结合学生实验实际情况,制定《医学微生物学实验室学生安全规则》如下:

- (1) 学生进入实验室应穿白大衣,离室时脱下并反折放回原处。不必要的物品不得带入实验室,必须带入的书籍和文具等应放在指定的非操作区,以免受到污染。无菌操作时必须戴口罩,并不得开电风扇。
- (2) 进入实验室进行实验前应先洗手,避免手上的分泌物、食物油、护肤用品和沾染的微生物等对实验造成污染。
- (3) 禁止在实验室工作区域进食、饮水、吸烟、化妆和处理隐形眼镜;不得高声谈笑,应保持实验室内的安静、整洁、有序。
- (4) 各种实验物品应按指定地点存放,小心处理传染性材料、培养物和污染物,用过的器材

必须及时放入盛有消毒液的容器内,不得放在桌上,也不能在水槽内冲洗。

(5) 严禁用口吸移液管或将实验材料置于口内,严禁用口舔标签。

(6) 实验过程中必须送温箱培养的物品,应做好标记后送到指定地点。

(7) 实验过程中发生差错或意外事故时,禁止隐瞒或自作主张不按规定处理,应立即报告老师进行正确的处理。如有传染性的材料污染桌面、地面等,应立即用 0.2%~0.5% 的 84 消毒液浸泡污染部位,持续 5~10 min 后方可抹去。如手被活菌污染也应使用上述消毒液浸泡 5~10 min 后,再以自来水反复冲洗干净。

(8) 爱护仪器设备,严格按操作规则使用。节约使用实验材料,如不慎损坏了器材等物品应主动报告指导老师进行处理。

(9) 在实验课结束前应清点、整理好实验物品,清点菌种管,应物归原处并将桌面整理清洁。若有缺失,应立即报告指导教师,查清后方能离开实验室。

(10) 实验完毕后,以肥皂洗手,必要时用 84 消毒液泡手后方可离开实验室。值日生打扫室内卫生,关好水电、煤气、门窗,洗手后离室。

三、医学微生物实验室废弃物处理标准规程

(1) 实验室工作人员做好个人防护。穿好工作服,戴好手套、口罩和帽子等。

(2) 实验人员用防渗专用包装容器(袋)或者防锐器穿透密闭容器收集实验室废弃物。在包装上贴警示标识和中英文警示标签,标签上填写废弃物名称、数量、产生日期、处理人名字、废弃物来源、是否回收、处理注意事项等,然后存放规定位置。实验准备人员及时进行无害化处理,并做好实验室废弃物处理记录。

(3) 废弃物分类处理规程如下:

① 感染性废弃物处理:培养基、标本和菌(毒)种保存液、血液、血清、临床标本等感染性废弃物首选进行高压蒸汽灭菌。用过的一次性手套、口罩、帽子,用过的试管、吸管、移液器吸头,用过的一次性实验用品及实验器械等感染性废弃物可选进行高压蒸汽灭菌或消毒液浸泡 24 h。

② 损失性废弃物处理:针头、缝合针、解剖刀、手术刀、备皮刀、手术锯、试验玻片、玻璃试管、玻璃安瓿等能够刺伤或割伤人体的废弃的实验利(锐)器等损伤性废弃物需放入符合要求的利器盒里,容器装满 3/4 后封盖,进行高压蒸汽灭菌处理,按要求贴上警示标志和标签。

③ 重复使用检验器材处理:重复使用的器材,清洗后灭菌、烘干、备用;若染菌则先灭菌,再清洗,再灭菌、烘干、备用。

四、医学微生物实验室意外事故处理

为降低意外事故对生物安全产生的不利影响,保障实验人员安全和实验室生物安全,实验人员必须严格遵守操作程序,一旦有意外事故发生,实验人员应立即停止工作,及时通知实验室主任,并采取应急措施和检修,具体如下:

(1) 实验人员被实验动物咬伤时,应立即停止工作,用 3% 双氧水或碘酒擦拭受伤部位,用创可贴或消毒纱布包住受伤部位,然后按照退出程序退出实验室,如需要再进行必要的医学处理,要同时通知实验室主任。

(2) 当实验动物逃逸时,将实验动物抓获后,要立即对动物逃逸时的途经路线及实验区域严格消毒并作备案。

(3) 皮肤破损: 应先除去异物, 用生理盐水或蒸馏水清洗双手和受伤部位, 使用适当的皮肤消毒剂, 必要时进行医学处理。要记录受伤原因和相关的微生物, 并应保留完整准确的医疗记录。

(4) 烧伤: 局部涂凡士林、5% 鞣酸或 2% 苦味酸。

(5) 化学药品腐蚀伤的处理: 强酸: 先用大量清水冲洗, 再用苯酚氢钠溶液洗涤中和; 强碱: 先用大量清水冲洗, 再用 5% 硼酸溶液洗涤中和。如受伤处为眼部, 经上述步骤处理后, 再用 1~2 滴橄榄油或液状石蜡滴眼。

(6) 食入潜在感染性物质, 应立即将含菌液体吐入消毒容器内, 并用 3% 双氧水漱口; 根据菌种不同, 服用抗菌药物预防感染及做相应的医学处理。要报告食入材料的鉴定情况和事故发生的细节, 并保留完整准确的医疗记录。

(7) 当含有感染性物质的容器破碎或有感染性物质溢出时, 实验人员应立即用蘸有消毒液的抹布覆盖溢出感染物及含有感染物的容器碎片, 10 min 后将抹布及破碎物品清理掉(注意: 用镊子清理玻璃碎片), 然后再用消毒剂擦拭被污染区域。用于清理的抹布等物品装入耐高温高压灭菌袋, 封口后用高压蒸汽灭菌法进行消毒处理。

(8) 当离心机内盛有潜在危害物质的离心管破损时, 如果怀疑发生破损时机器正在运行, 应立即关闭机器电源, 让机器密闭静置 30 min; 如果机器停止后发现破损, 应立即盖上盖子, 让机器密闭 30 min。将所有破碎的离心管、离心机内盖和转头在 0.2% 新洁尔灭(苯扎氯铵)消毒剂内浸泡、擦拭。未破损的离心管作表面消毒处理。

(9) 潜在危害性气溶胶的释放。所有人员必须立即撤离相关区域, 任何暴露人员都应接受医学咨询。立即通知实验室负责人。为了使气溶胶排出和使较大的粒子沉降, 在 1 h 内严禁人员入内。24 h 禁止进入实验室, 张贴“禁止进入”的标志。过了相应时间后, 在生物安全专业人员的指导下清除污染。应穿戴适当的防护服和呼吸保护装备。

(10) 火灾和自然灾害。发生自然灾害时, 应向当地或国家紧急救助人员提出警告。感染性物质应收集在防漏的盒子内或结实的一次性袋子中, 由生物安全人员依据当地的规定决定继续利用或是最终丢弃。发生火灾时须沉着、冷静, 切勿惊慌, 应立即关闭电闸和煤气阀门, 如为酒精、乙醚、汽油等有机溶液起火, 切忌用水扑救, 可用沙土等扑灭, 必要时拨打火警电话求助。

五、医学微生物学实验室菌种、样本的保藏、使用和销毁

规范病原微生物菌种、样本的保藏、使用和销毁工作, 防止病原微生物的感染与扩散。

1. 病原微生物菌种、样本的使用

(1) 使用病原微生物菌种、样本时应在相应生物安全级别的实验室中进行。

(2) 在使用病原微生物菌种、样本时应按上岗证的项目范围进行实验活动, 使用高致病性和可疑高致病性病原微生物菌种、样本按其特殊规定进行。

(3) 使用病原微生物菌种、样本时, 如发生意外事件或生物安全事故, 应按“实验室感染应急预案”的相关规定进行处理。

(4) 实验结束后, 剩余的病原微生物菌种、样本需要归还的, 应按要求归还, 并由使用者和保藏者双方签名; 不需归还的, 应视为感染性废弃物, 按“实验废弃物管理规定和处置要求”进行处置。

2. 病原微生物菌种、样本的销毁

(1) 菌种、样本在销毁前应经科室负责人批准, 并在保藏记录上注销, 写明销毁原因, 填写

销毁记录,记录内容应包括时间、方法、销毁人、批准人等。

(2) 销毁菌种、样本应按“实验废弃物管理规定和处置要求”中感染性废弃物的处理方法进行处理,必要时应在质量管理办公室监督下进行销毁。

(3) 销毁高致病性病原微生物菌种、样本时应按照特殊要求进行。

3. 病原微生物菌种保藏

(1) 实验室应指定专人负责菌种的保藏,双人双锁,并建立所保藏的菌种名录清单,确保菌种安全。

(2) 保管人员变动时,必须严格办理交接手续。

(3) 菌种应有严格的登记,包括购进日期,使用、销毁情况,销毁经手人、销毁方法、销毁数量等。

(4) 各菌种应按规定时间接种,一般接种不超过五代,同时注意菌种有无污染及变异,如发现污染或变异,应及时更换。

(5) 菌种保存范围及向外单位转移,应按国家卫生部规定执行。

(6) 所有存在的菌种应备有清单。

(7) 使用菌种工作时,如发生严重污染环境或实验室人身感染事故,应及时处理,并向当地卫生局报告。

第一篇 微生物学基本技术及实验

实验一 显微镜的使用和维护

【目的】

- ① 熟悉显微镜的结构、功能和使用方法。
- ② 掌握油镜的使用方法和维护。

【内容】

绝大部分的病原微生物,如细菌、病毒和单细胞真菌等,必须借助显微镜(光学显微镜或电子显微镜)才能被观察到,其中使用最广泛的是普通光学显微镜(本书中简称为显微镜),所以,正确地使用和维护显微镜是进行微生物学实验研究所必须掌握的基本技能之一。

(一) 普通光学显微镜的基本构造

普通光学显微镜的基本构造分为机械系统和光学系统两大部分,下面以目前较为常用的电光源光学显微镜为例进行介绍(图 1-1)。机械系统部分包括镜座、镜臂、载物台及台上的标本推进器、镜筒、物镜转换盘、升降调节器等,其主要作用是支撑、固定镜头、调节物像焦距、搁置和移动标本。光学系统部分包括反光镜(或电光源)、光圈、聚光器、物镜、目镜等,作用是收集光源并聚集于标本上,然后通过透镜放大成像,使人眼可以分辨在裸眼时不能看见的细节。物镜一般有 $4\times$ 、 $10\times$ 、 $40\times$ 、 $100\times$ (或 $90\times$)等几种。 $100\times$ 的物镜是油镜,是微生物学实验最常用的物镜。因为目镜多为 $10\times$,所以使用油镜观察标本时,放大倍数为 $1000\times$,可以将实际大小为 $1\mu\text{m}$ 左右的细菌放大至人眼能分辨的 1mm 左右。

1. 机械系统

(1) 镜筒

上端装接目镜,下端与物镜转换器相连。

(2) 物镜转换器

又称旋转盘,是安装在镜筒下方的一圆盘结构,可以按顺时针或逆时针方向旋转,其上平均分布有 3~4 个圆孔,用以装载不同放大倍数的物镜。

(3) 镜臂

是支持镜筒和镜台的弯曲状结构,是取用显微镜时的握持部位。

(4) 镜台

也称载物台,是放置被检测标本片的平台。镜台上有标本移动器(推进尺),可使标本片前后左右移动。镜台的中央有圆形的通光孔,来自下方的光线经此孔照射到标本上。

(5) 调焦器

也称调焦螺旋,用于调节物镜与被检物体之间的焦距,一般设有粗调螺旋和细调螺旋,前者作概略调焦,后者作精密调焦。

(6) 镜柱

是连接镜臂与镜座的短柱。

(7) 镜座

位于最底部,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。

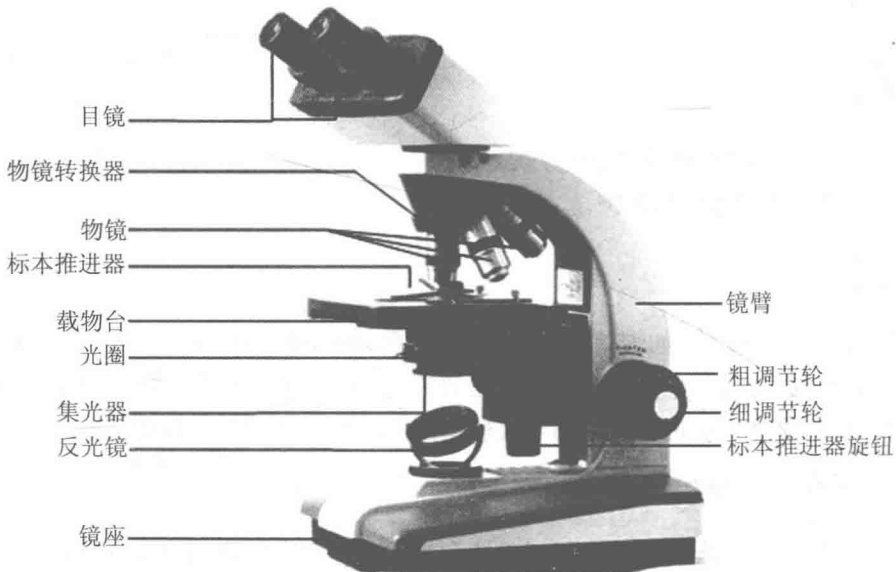


图 1-1 普通光学显微镜结构示意图

2. 光学系统

光学系统包括目镜、接物镜、聚光器、反光镜等。

(1) 目镜

也称接目镜,安装在镜筒的上端。每个目镜一般由两个透镜组成。其上刻有放大倍数,如 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 等。镜中常装有一条黑色细丝作为指针,以便指示物像供人观察。

(2) 物镜

也称接物镜。每个物镜由数片凸透镜组合而成,其下端接近被检标本。接物镜一般有低倍镜、高倍镜和油镜三种。它们被安装在物镜转换器上,各有一些标志,如低倍镜: 10×0.25 ($10/0.25$), 10 表示放大倍数,0.25 表示数值孔(口)径(NA);高倍镜 40×0.65 ($40/0.65$);油镜: 100×1.25 ($100/1.25$)。

(3) 聚光器

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。聚光器由 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,反之使光线变弱。光圈也

称彩虹光阑或孔径光阑,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。

(二) 显微镜的使用

1. 低倍镜的使用

(1) 准备

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“咔哒”声。

(2) 调光

打开光圈,上升聚光器,双眼向目镜内观察,同时调节反光镜的角度,使视野内的光线均匀、亮度适中。

(3) 放片

把所需要观察的标本片放到载物台上,并用移动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),直到低倍镜头距载玻片标本约 5 mm 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。

2. 高倍镜的使用

① 依照上述操作步骤,先用低倍镜找到物像。

② 将待观察物像移至视野中央,同时转动细调螺旋,使被观察的物像清晰。

③ 眼睛从侧面注意物镜,转动物镜转换器,使高倍镜头对准通光孔。

④ 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。

有时,在低倍镜准焦情况下,直接换高倍时会发生高倍镜与标本片碰撞的情况,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。

3. 油镜的使用

① 用低倍镜或高倍镜找到所需观察的标本物像,并将要进一步放大的部位移至视野中央。

② 转动物镜转换器,移开低倍镜或高倍镜,在标本片的中央滴一滴香柏油,眼睛从侧面注视镜头,轻轻转换油镜,使镜面浸在油滴中。在一般情况下,转过油镜即可看到物像,如不清楚,用细调螺旋调节至物像清晰。

③ 油镜观察完毕后取下标本片,并下降载物台约 10 mm,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擦净,并用另一张擦镜纸拭去二甲苯,以防二甲苯使镜头脱胶落下。

④ 封加盖片的标本片擦拭方法同油镜。无盖片的标本片,可用拉纸法擦油,即用一小块擦镜纸覆盖在标本片油滴上,再滴一滴二甲苯,平拉擦镜纸,反复几次即可擦净,也可直接在二甲

苯中把标本片上的油洗去。

使用油镜时添加香柏油的原理:因油镜的放大倍数高和透镜较小,而且载玻片和空气的折射率不同,从标本片透过的光线经折射后部分光线不能进入油镜,使视野亮度不够,且物像不清晰。若在油镜和标本片之间滴加香柏油,因其折射率 $n=1.515$,与载玻片的折射率($n=1.520$)相仿,故可使进入油镜头的光线增加,物像清晰(图 1-2)。

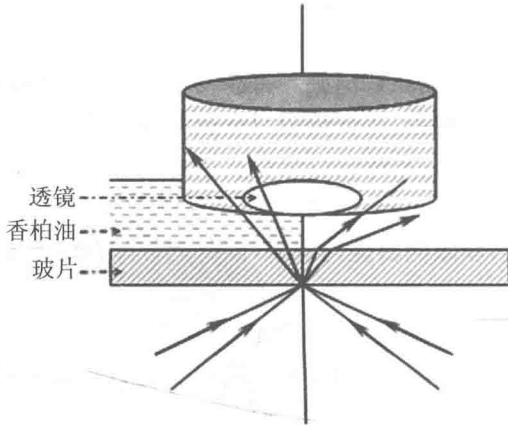


图 1-2 油镜原理示意图

(三) 显微镜使用的注意事项和维护

- ① 使用显微镜时应小心爱护,不得随意拆卸。
- ② 取显微镜时应一手紧握镜臂,一手托住镜座,切忌一手斜提,前后摆动,双手取镜可避免零部件滑落。
- ③ 显微镜应置于离实验台边缘约 6 cm 处,以免显微镜翻倒落地。课间离开座位时,应将倾斜关节复原,镜头转离通光孔位置。
- ④ 要熟悉粗、细调螺旋转动方向,并能配合使用,调节焦距时,眼睛必须注视物镜头,以免压坏标本和损坏镜头。
- ⑤ 观察带有液体的临时标本时要加盖片,应将显微镜充分放平,以免液体污染镜头和显微镜。
- ⑥ 显微镜不得与强酸、强碱、乙醚、氯仿和酒精等化学药品接触,如不慎污染时,应立即擦拭干净。
- ⑦ 要经常保持显微镜的清洁,显微镜的光学部分只能用擦镜纸轻轻擦拭,不可用纱布、手帕、普通纸张或手指擦拭,以避免磨损镜面。
- ⑧ 显微镜使用完毕,将三个接物镜转成“八”字形,将聚光器下降,放入显微镜箱内。切不可把显微镜放在直射光线下曝晒。

实验二 微生物学实验室常用仪器的使用

【目的】

掌握微生物实验室常用仪器的使用方法和注意事项。

【仪器】

恒温培养箱、水浴箱、离心机、电热干烤箱、高压灭菌器等。

【内容】

（一）恒温培养箱

恒温培养箱简称温箱，是微生物学实验中不可缺少的设备，主要用于细菌培养及一些恒温试验。

1. 使用方法

- ① 当试验物品放入培养箱后，将玻璃门与外门关上，并将箱顶上方风顶活门适当旋开。
- ② 在通电加热前，必须先加水，使浮标指示至“止水”为止。为节约用电和减少加热时间，可加入比要求温度低 4°C 的温水。
- ③ 接通电源，开启电源开关。
- ④ 旋转设定旋钮，设定所需温度值。

2. 注意事项

- ① 使用前必须注意所用电源电压是否与所规定的电压相符，并将电源插座接地或按规定进行有效接地。
- ② 在通电使用时，切忌用手触及箱左侧空间的电器部分或用湿布揩抹及用水冲洗。
- ③ 试验物放置在箱内不宜过挤，使空气流动畅通，保持箱内受热均匀，在试验时，应将风顶活门适当旋开，以利调节箱内温度。
- ④ 每次使用完毕后，须将电源切断，经常保持箱内外清洁和水箱内水的清洁。
- ⑤ 应经常注意水箱内水的水位，浮标指示牌下降至“起水”位置时即应加水，切勿断水。

（二）离心机

微生物实验中常用的离心机有普通离心机、低温高速离心机和超速离心机，它们用于沉淀细菌、分离血清和其他比重不同的材料。这里仅介绍普通离心机。

1. 使用方法

- ① 将盛有离心物品的离心管放入离心机金属套管内，在天平上配平。

- ② 将离心管及其套管按对称位置放入离心机转盘中,将离心机盖子盖好。
- ③ 打开开关,缓慢调至所需转速,维持一定时间。
- ④ 到达一定时间后缓慢使速度下降,然后关闭开关。
- ⑤ 离心机转盘静止后,方可开盖拿取离心管。

2. 注意事项

- ① 物品离心前一定要配平,为防止离心管在离心过程中破裂,可在离心管与套管间垫上棉花。
- ② 离心过程中如发现离心机震动、有杂音或有金属音,应立即关闭开关,并仔细检查原因。
- ③ 启动和关闭离心机时,速度变化不宜过快,应慢慢转动速度调节器。转动盘完全停止前,禁止打开离心机。
- ④ 如带菌物品离心时破裂,应立即消毒方可再次使用。

(三) 高压灭菌器

1. 构造

高压蒸汽灭菌器是一个双层的金属圆筒,两层之间盛水。外层坚厚,其上方有金属厚盖,锅沿旁有螺栓,以之将锅盖紧闭,使锅内气体不能外溢,因而蒸汽压升高,从而使水蒸气的温度相应地升高超过 100℃,它们之间的关系见表 2-1。

表 2-1 不同蒸汽压力下所达到的温度

蒸汽压力			温度(℃)
(MPa)	(kg/cm ²)	(lb/in ²)	
0.034	0.35	5	108.8
0.055	0.56	8	113.0
0.069	0.70	10	115.6
0.103	1.05	15	121.3
0.137	1.40	20	126.2
0.172	1.75	25	130.4
0.207	2.11	30	134.6

注:Pa 为帕斯卡;MPa 为百万帕斯卡;1 Pa=9.8 达因/m²;1 lb/in²=47.89 Pa。

高压蒸汽灭菌器上装有排气阀、安全活塞以调节灭菌器内蒸汽。有压力表和温度计,以显示内部的蒸汽压力和温度。

2. 使用方法

向灭菌器内加水至规定量,放入要消毒的物品,关上灭菌器盖,用螺栓将其与锅体紧密固定,使之密闭。加热灭菌器,在压力表指针达 5 lb/in² 时,打开排气阀,将灭菌器内的空气排出,使灭菌器内的压力均由水蒸气产生。否则,压力表所示的压力并非全部由水蒸气产生,则温度也将不正确,影响灭菌的效果。灭菌器内的温度与空气排出量的关系见表 2-2。

灭菌器排气阀先排出空气,继而排出水蒸气,待有大量的蒸汽排出时(呈白色雾状气流),即可认为灭菌器内的空气已经全部排出。此时,关闭排气阀。此后,灭菌器内压力逐渐升高,直至压力表显示压力达到所需的压力(如 0.10 Mpa),调节安全阀,使灭菌器内的压力维持在该值上