



全国药、中药类专业实验实训『十三五』规划教材
总主编 张大方 朱俊义 张立祥 方成武 张震云 张彦文 马波



WEISHENGWUXUE SHIYAN CAOZUO JISHU

微生物学 实验操作技术

刘智 张栋◎主编

北京科学技术出版社



全国药学、中药学类专业实验实训“十三五”规划教材

总主编 张大方 朱俊义 张立祥 方成武 张震云 张彦文 马 波

WEISHENGWUXUE SHIYAN CAOZUO JISHU

微生物学 实验操作技术

刘 智 张 栋 主编

北京科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学实验操作技术 / 刘智, 张栋主编. —北京: 北京科学技术出版社, 2016.8

(全国药学、中药学类专业实验实训“十三五”规划教材)

ISBN 978-7-5304-8337-4

I . ①微… II . ①刘… ②张… III . ①微生物学—实验—院校—教材
IV . ① Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 081327 号

微生物学实验操作技术

主 编: 刘 智 张 栋

策划编辑: 王 微

责任编辑: 周 珊

责任校对: 贾 荣

责任印制: 李 茗

封面设计: 异一设计

版式设计: 天露霖文化

出 版 人: 曾庆宇

出版发行: 北京科学技术出版社

社 址: 北京西直门南大街 16 号

邮政编码: 100035

电话传真: 0086-10-66135495 (总编室)

0086-10-66113227 (发行部) 0086-10-66161952 (发行部传真)

电子信箱: hjkj@bjkjpress.com

网 址: www.bkydw.cn

经 销: 新华书店

印 刷: 三河市国新印装有限公司

开 本: 787mm × 1092mm 1/16

字 数: 200 千字

印 张: 10.25

版 次: 2016 年 8 月第 1 版

印 次: 2016 年 8 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-5304-8337-4 / R · 2095

定 价: 29.00 元



京科版图书, 版权所有, 侵权必究。

京科版图书, 印装差错, 负责退换。

全国药学、中药学类专业实验实训“十三五”规划教材

总主编

张大方

教育部高等学校中药学类专业教学指导委员会 副主任委员

朱俊义

通化师范学院 副院长

张立祥

山东中医药高等专科学校 校长

方成武

亳州职业技术学院 院长

张震云

山西药科职业学院 院长

张彦文

天津医学高等专科学校 校长

马 波

安徽中医药高等专科学校 副校长

《微生物学实验操作技术》

编者名单

主 编 刘 智 张 栋

副主编 陈 莉 康 曼 沈 鹏

编 者 （以姓氏笔画为序）

王迪涵（东北师范大学人文学院）

牛四坤（山西药科职业学院）

史文婷（长春中医药大学）

朴喜航（长春中医药大学）

刘 智（长春中医药大学）

杨修军（吉林省疾病预防控制中心）

沈 鹏（通化师范学院）

张 栋（东北师范大学人文学院）

张玉昆（黑龙江中医药大学）

陈 莉（山东中医药高等专科学校）

贾芙蓉（中国人民解放军第二〇八医院检验科）

黄 鑫（吉林省疾病预防控制中心）

康 曼（山西药科职业学院）

总前言

为贯彻李克强总理在高等教育改革创新座谈会上的讲话精神和教育部有关高校实验教学改革的要求,即“注重增强学生实践能力,培育工匠精神,践行知行合一,多为学生提供动手机会,提高解决实际问题的能力”,满足培养应用型人才的迫切需求,解决目前国内尚无统一的、成体系的、符合当前实验实训教学改革要求的相关教材的问题,我们组织全国 20 余所院校、企业和医院的优秀教师、行业专家联合编写了这套“全国药学、中药学类专业实验实训‘十三五’规划教材”,旨在打造一套紧跟国家教育教学改革发展方向,创新药学、中药学类专业实验实训教学方法的精品教材,从而为“十三五”期间落实国家以培养应用型人才为主的教育主导思想提供优秀的教育资源。

本套教材以基本技能与方法为主线,归纳每门课程的共性技术,以制定规范化操作为重点,将典型实验实训项目引入课程之中,这是本套教材改革创新点之一;将不同课程的重点内容纳入综合性实验与设计性实验,培养学生独立工作的能力与综合运用知识的能力,体现了“传承有特色,创新有基础,服务有能力”的人才培养要求,这是本套教材改革创新点之二;在专业课实验实训中设置了企业生产流程、在基础课中设置了科学研究案例,注重课堂教学与生产、科研相结合,提高人才培养质量,改变了以往学校学习与实际应用的脱节现象,这是本套教材改革创新点之三;注重培养学生综合素质,结合每门课程的特点,将实验实训中的应急处置纳入教材内容之中,提高学生的专业安全知识水平与应用能力,将实验实训后的清理工作与废弃物的处理列入章节,增强学生的责任意识与环保意识,这是本套教材改革创新点之四。

作为药学、中药学类专业实验实训的全国性规划教材,为了充分保证本套教材的创新性和权威性,我们遴选了国家示范院校及具有显著专业特色并处于国内领先水平的院校、企业、医院等单位的优秀教师和行业专家,组成了编写委员会。根据教学改革的需要,我们还将陆续组织相关单位联合编写具有创新价值的实验实训教材,以供全国药学、中药学、医学、护理等专业教育教学使用,同时也为相关企业和医院的从业人员提供参考用书。

北京科学技术出版社始终坚持“创新、精品”的教材出版理念，并将这种理念落实到严谨、高效的工作之中，感谢他们创新性、专业性的工作！各参编单位在本套教材的前期调研论证工作中给予了大力的支持，各位编者在教材的编写过程中做了大量开拓性的工作，在本套教材即将面世之际，特向他们表示衷心的感谢！

教学改革是一项长期的任务，尤其是实验实训教学，更需要在实践中不断探索。对本套教材编写中可能存在的缺点与不足，恳请各位读者在使用过程中提出宝贵意见和建议，以期不断完善。

张大方

2016年7月

前 言

《微生物学实验操作技术》依据国家生物安全管理条例、微生物限量检验标准，以及药学、中药学等专业教学计划与教学大纲编写而成，为“全国药学、中药学类专业实验实训‘十三五’规划教材”之分册。本教材以基本技能和基本方法为主线，突出规范化操作与实验中的注意事项。注重动手能力与科学思维的培养，适用于药学、中药学、制药工程类等专业的学生，并可作为中医药工作者研究和工作的参考书。

全书分为上、中、下三篇，上篇为基本技能及实验项目训练，包括微生物学实验操作安全与防护常识、微生物学实验基本技术、常见病原微生物学实验、药物微生物学检查、中药体外抗菌实验，共5章，各章内容紧紧围绕学生开展微生物学实验必备的基本知识、基本技能、基本方法，深入浅出地加以阐述，并注重培养学生对微生物性状特异性的学习和甄别，选取典型和具有代表性的实验内容，强调实验操作的规范性、指导性和实验内容的科学性。每章都有标准化、规范化操作方法介绍，以培养基本实验技能为目的，突出实际操作。

中篇为综合性及设计性实验，通过土壤中抗生素产生菌的分离实验，让学生学会通过多种方法进行菌落的分离培养；通过对粪便标本中肠道杆菌的分离鉴定方法的介绍，让学生学会设计分离细菌及进行细菌鉴定，从而培养学生综合分析和独立完成本课程实验设计的能力。

下篇为实践与研究，为生产与课堂、教学与科研的衔接点。本篇提供疾病预防控制中心微生物检验所进行食品（保健食品）中微生物含量及限量检测的方法及相关资料，学生可根据实际工作中的规定，模拟制定一种物质中微生物含量的检测方法，通过实验熟悉国家标准中微生物限量检验方法的基本内容。

附录部分收录了实验报告书写规范与原则、常用溶液的配制方法、常用培养基的配制方法、常用染色液的配制方法、常用菌种的保藏方法及部分国内外菌种保藏机构名称与缩写，供学生在学习和工作中参考。

本教材在编写过程中，得到了北京科学技术出版社及各参编院校的大力支持和帮助，借鉴了部分食品、药品检验机构及各参编院校的微生物学教学经验及成果，在此一并表示衷心的感谢。

由于编写时间仓促，业务水平有限，不足之处在所难免。希望广大师生在使用过程中提出宝贵意见，以便进一步修订和完善。

编者

2016 年 6 月

目 录

上篇 · 微生物学实验基本技术及实验项目训练

第一章 微生物学实验操作安全与防护常识

- 第一节 生物安全知识 / 2
- 第二节 实验室安全知识 / 5
- 第三节 实验安全防护常识 / 9
- 第四节 实验中突发事件的处理 / 11

第二章 微生物学实验基本技术

- 第一节 微生物学常用仪器及使用注意 / 13
- 第二节 微生物学实验基本技术训练 / 22
 - 实验一 细菌标本装片的观察 / 23
 - 实验二 细菌形态的观察 / 24
 - 实验三 细菌芽胞、荚膜的染色及观察 / 27
 - 实验四 细菌的鞭毛染色及观察 / 28
 - 实验五 细菌的革兰染色法 / 29
 - 实验六 常用培养基的配制和灭菌 / 32
 - 实验七 细菌的接种技术和培养特征 / 34
 - 实验八 细菌的平板菌落计数方法 / 36
 - 实验九 细菌的单糖发酵试验 / 39
 - 实验十 细菌的吲哚试验 / 41
 - 实验十一 甲基红试验 / 42
 - 实验十二 V-P (Voges-Proskauer) 试验 / 43

- 实验十三 枸橼酸盐 (Citrate) 利用试验 / 44

第三章 常见病原微生物学实验

- 实验十四 葡萄球菌属的培养与观察 / 46
- 实验十五 埃希菌属的培养与观察 / 49
- 实验十六 链球菌属的培养与观察 / 52
- 实验十七 结核分枝杆菌的培养与观察 / 57

第四章 药物微生物学检查

第一节 注射药品的无菌检查 / 60

- 实验十八 氯化钠注射液的无菌检查 / 61

第二节 口服药物微生物学检查 / 66

- 实验十九 葡萄糖酸锌口服液微生物总数检测 / 67

第三节 外用药品微生物学检查 / 72

- 实验二十 开塞露中金黄色葡萄球菌的检查 / 72

第四节 药品内毒素的检查 / 77

- 实验二十一 10% 葡萄糖注射液内毒素检查 / 78

第五章 中药体外抗菌实验

第一节 连续稀释法 / 83

- 实验二十二 肉汤连续稀释法 / 83
- 实验二十三 肉汤琼脂斜面连续稀释法 / 85
- 实验二十四 肉汤琼脂平板连续稀释法 / 85

第二节 扩散法 / 87

- 实验二十五 打孔法 (挖洞法) / 88
- 实验二十六 泡沫海绵栓子法 / 89
- 实验二十七 钢圈法 / 89
- 实验二十八 滤纸片法 / 90
- 实验二十九 挖沟法 / 91

第三节 熏蒸法 / 92

第四节 氯化三苯基四氮唑快速药物试验 / 94

第五节 中药抗结核分枝杆菌检测方法 / 95

中篇 · 综合性及设计性实验

第六章 综合性实验

第一节 环境中微生物的检查 / 98

- 实验三十 空气中微生物的检查 / 98
- 实验三十一 饮用水中微生物的检查 / 99

第二节 消毒与灭菌实验 / 100

- 实验三十二 煮沸消毒实验 / 100
- 实验三十三 紫外线杀菌实验 / 101
- 实验三十四 手指皮肤消毒实验 / 101

第七章 设计性实验

第一节 土壤中微生物的分离与纯化 / 103

第二节 食用菌菌种分离与菌丝形态观察 / 107

第三节 粪便标本中肠道杆菌的分离鉴定 / 109

下篇 · 实践与研究

第八章 食品中微生物检验实验与技术（疾控中心微生物检验所操作方法）

第一节 菌落总数测定 / 114

第二节 大肠菌群稀释培养测数法测定 / 117

- 第三节 真菌和酵母菌计数 / 121
- 第四节 沙门菌检验 / 123
- 第五节 金黄色葡萄球菌定性检验 / 128

- 附录一 实验报告书写规范与原则 / 134
- 附录二 常用溶液的配制 / 136
- 附录三 常用培养基的配制 / 139
- 附录四 常用染色液的配制 / 142
- 附录五 常用菌种的保藏方法 / 145
- 附录六 部分国内外菌种保藏机构名称与缩写 / 149

上 篇

微生物学实验基本技术及 实验项目训练

第一章 微生物学实验操作安全与防护常识

第一节 生物安全知识

在微生物学实验与研究工作中，处理病原微生物（如细菌、病毒、真菌等）及其代谢产物时，工作人员受到感染的情况时有发生。据统计，从事病原微生物研究的工作人员发生实验室感染的概率较普通人群高 5~7 倍。实验室感染事件不仅损害实验室工作人员的健康，也可能造成疾病的流行，危及群众的健康和生命安全，因此必须高度重视。

一、基本概念和术语

1. 生物危害 广义的生物危害是指各种生物因子（biological agents）对人、环境和社会造成的危害或潜在危害。狭义的生物危害是指实验室进行感染性致病因子的科学研究过程对实验室人员造成的危害和对环境的污染。

2. 生物安全 生物安全（bio-safety）是指避免危险生物因子造成实验室人员暴露，向实验室外扩散并导致危害的综合措施。生物安全是与生物危害相对应的一个概念，其与危险评价密切相关。生物安全贯穿于实验的整个过程，从取样开始到所有潜在危险材料被处理。生物安全面临的对象主要包括实验者本人、操作对象（如动物）、实验者周边的人和环境。

3. 实验室生物安全 实验室生物安全是指以实验室为研究场所时，避免危险生物因子造成实验室人员暴露、向实验室外扩散并导致危害的综合措施。

4. 危险废弃物 危险废弃物为列入国家危险废物名录或根据国家规定的危险废物鉴定标准和鉴定方法认定的具有危害特性的废物。危害特性是指腐蚀性、急性毒性、浸出毒性、反应性和污染性等。

5. 气溶胶 气溶胶是指悬浮于气体介质中、粒径一般为 0.001~100 μm 的固态或液态微小粒子形成的相对稳定的分散体系。其中的气体介质称为连续相，通常为空气；

微粒（particles）称为分散相，其成分复杂，大小不一，粒径一般为 $0.001\sim 10\mu\text{m}$ ，是气溶胶研究的对象。微粒为液体的称为液体气溶胶。

二、生物安全风险评估

生物安全工作的前提和核心是风险评估。微生物风险评估是指对实验微生物及其产物可能给人或环境带来的危害进行评估。在建设使用有传染性或有潜在传染性材料的实验室前，必须进行微生物危害评估。根据微生物危害评估结果，确定微生物应在相应级别的生物安全防护实验室中进行操作，并制定相应的操作规程、实验室管理制度和紧急事故处理办法，必须形成书面文件并严格遵守执行。要进行微生物的风险评估必须了解微生物的危险等级。根据微生物及其活性物质对个体和群体的危害程度，将其分为4类（国际分类），具体划分如下。

第一类，低个体危害，低群体危害。不太可能给人类、动植物带来疾病的微生物。

第二类，中等个体危害，有限群体危害。可能给人类、动植物带来疾病，但是对实验室工作人员与环境的危害不大。实验室暴露可能会带来感染，但是可以得到有效的处理和预防，传染的危险有限。

第三类，高个体危害，低群体危害。高危险的病原微生物，能给人类和动植物带来严重疾病，且会给实验室工作人员及环境带来较大危害，但是通常能够找到有效的预防措施和处理方法。

第四类，高个体危害，高群体危害。能给人类和动植物带来严重的疾病，且会给实验室工作人员及环境带来较大危害，不能找到有效的预防措施和处理方法。

所有微生物学实验室进行微生物学实验研究必须进行生物安全评估，具体评估办法应按照中华人民共和国国家标准《实验室生物安全通用要求》严格实行。生物安全风险评估可帮助操作者正确选择生物安全水平（设施、设备和操作），评估职业性疾病风险，制定相应的操作程序与管理规程，采取相应的安全防护措施，减少危险性事件的发生。

三、生物安全防护对策

微生物学实验室中接触的病原微生物种类日益繁多，其危险程度也不一致，如果对于危险性较大的微生物放松了警惕，就有可能造成严重的感染事故。

生物安全防护对策主要包括实验室物理防护、实验室操作技术以及实验室管理等方面的内容。

1. 物理防护对策 物理防护原则是避免操作人员和微生物直接接触。

(1) 将传染因子的操作置于一个密闭的、负压状态的工作环境中,在实际工作中可以使用各种级别的生物安全柜进行防护。

(2) 操作箱内的空气在排放前进行净化处理,其净化方法多种多样,如紫外线消毒、电加热灭菌、火烧、高效过滤器过滤等。

(3) 实验室内的污物、污水等在送出实验室之前进行彻底灭活消毒,可以采用物理方法和化学方法进行。

2. 实验室操作技术对策 研究发现,在测试的 276 种实验室操作中有 239 种操作可以产生微生物气溶胶,操作方法不当或器材使用不当都可以导致微生物气溶胶的产生。综合研究几种操作方法,比较结果如下。

(1) 用玻璃棒接种光滑的琼脂平面比用接种环接种粗糙的琼脂平面所产生的气溶胶少 99%。

(2) 用冷接种环蘸菌液比用热接种环蘸菌液所产生的气溶胶少 90%。

(3) 使菌液依靠重力由吸管中流出比用吹出所产生的气溶胶少 67%。

(4) 菌液滴落在浸有消毒液的毛巾上比滴落在硬桌面上所产生的气溶胶少 90%。

(5) 将针头从盖有橡皮塞的瓶中抽出时,用酒精棉球围住瓶口比不用酒精棉球围住瓶口时所产生的气溶胶少 99%。

由此可见,在实验中如能选用合适的器材及恰当的操作方法,并严格遵照微生物学标准操作规程进行操作,即可大大减少微生物气溶胶的产生,降低其危害性。

3. 实验室规范化管理 实验室规范化管理是落实国家安全管理法律法规的基本保证,而实验室的生物安全防护水平分级则是实现规范管理的前提条件。根据实验室所操作的生物因子的危害程度和实验室的设计特点、建筑结构和屏障设施等防护措施,将生物安全实验室划分为 4 级,一级和二级生物安全实验室又称为基础实验室,而三级和四级生物安全实验室分别称为屏障实验室和高级屏障实验室。每个级别的实验室都应该建立切实可行的实验室生物安全管理规章制度,具体原则如下。

(1) 建立实验室准入制度。二级及以上级别的生物安全防护实验室应张贴醒目的国际通用的生物危害标志,并标明实验室生物安全级别,出口处应有发光标志;严格控制非实验室人员进入实验室,非实验人员只有经过审批且在相关人员陪同下,方可进入实验室工作区域。

(2) 人员培训制度。明确并强化实验室主任和所有实验室工作人员的责任和能力,组织成立培训机构,承担实验室人员的生物安全培训工作,良好的专业训练和技术能力对保障实验室生物安全具有重要作用。