

畜牧兽医省级高水平专业群建设成果



广东茂名农林科技职业学院

Guangdong Maoming Agriculture & Forestry Technical College

畜牧兽医专业群核心课程技能考核方案

课程名称：水产微生物学

制订部门：动物科学教研室

制订时间：2022年2月

广东茂名农林科技职业学院动物科学系

《水产微生物学》实训项目技能考核方案

项目一 显微镜的构造、使用和保养方法

一、技能目标

掌握显微镜的构造，初步学会使用方法。

二、教学资源准备

(一) 材料与工具

显微镜 组织切片

(二) 教学场所

校内教学基地

(三) 师资配置

实训时 1 名教师指导 20 名学生，技能考核时 1 名教师指导 10 名学生。

三、原理与知识

(一) 显微镜的构造

生物显微镜的种类很多，但其构造均分以下两大部分。

1. 机械部分

- (1) 镜座——直接与实验台接触。
- (2) 镜体——又称镜柱，在斜型显微镜的镜体内有细调节器的齿轮，叫齿轮箱。
- (3) 镜臂——中部稍弯，握持移动显微镜用。
- (4) 镜筒——为接目镜与转换器之间的金属筒，可聚光。镜筒上端装有目镜。
- (5) 抽筒——有些显微镜在镜筒内装有抽筒，上有刻度，上提抽筒时，可扩大倍数。
- (6) 活动关节——可使镜臂倾斜。
- (7) 粗调节器——旋转它，可使物镜与标本间距离迅速拉开或接近。
- (8) 细调节器——旋转一周，可使镜筒升降 0.1mm。
- (9) 载物台——为放组织标本的平台，分圆形和长方形两种，载物台中央都有一个圆形的通光孔。
- (10) 推动器——可前后、左右移动标本。
- (11) 压夹——可固定组织标本。
- (12) 转换器——位于镜筒下部，上装放大各种倍数的物镜，可转换物镜用。
- (13) 集光器升降螺旋——可使集光器升降以调节光线之强弱。

2. 光学部分

- (1) 接目镜（简称目镜）。安装在镜筒的上端，目镜上的数字是表示放大的倍数的，有 5×、8×、10×、15×、16×及 25×等。
- (2) 接物镜（简称物镜）。是显微镜最贵重的光学部分。物镜安装在转换器上，可分为低倍、高倍和油镜三种。

低倍镜——有 8、10、20~25 倍。

高倍镜——有 40、45 倍。

油镜——在镜头上一般有一红色、黄色或黑色横线作标志，一般为 100 倍。

显微镜提放大倍数等于目镜的放大倍数乘以物镜的放大倍数。例如目镜是 10 倍，物镜是 45 倍，显微镜的放大倍数为 $10 \times 45 = 450$ 倍。

(3) 反光镜。镜有两面，一面为平面，一面为凹面。有的无反光镜，直接安有灯泡作为光源。

(4) 集光器。位于载物台下，内装有虹彩（光圈），虹彩是由许多重叠的铜片组成，旁边有一条扁柄，左右移动可以使虹彩的开孔扩大或缩小，以调节光线的强弱。

(二) 显微镜的使用方法

1. 搬动显微镜时，必须用右手握镜臂，左手托镜座。
2. 将镜轻放于实验台上，并避免阳光直射。
3. 先用低倍镜对光，直至获得清晰明亮、均匀一致的视野为止。

反光镜的使用方法平行光线（如阳光）原则上用平面镜，但若因此映入外界景物（如窗格、树叶）妨碍观察时，可改用凹面镜。

(1) 点状光线（如灯光）。原则上用凹面镜，因其可聚集光线，增加亮度。

(2) 除日光灯外，一般电灯光下看镜时，应在集光器下插入蓝玻璃滤光片，以吸收黄色光线部分。

4. 置标本于载物台上，将欲观察的组织细胞对准圆孔正中央，用推进器或压夹固定，注意标本若有盖玻片者，一定使盖玻一面朝上。

5. 转动粗调节器，使镜筒徐徐向下，此时应将头偏向一侧注视接物镜下降程度，以防物镜与标本互相碰撞，特别当转换高倍镜或油镜观察时更要当心。原则上使物镜与标本片之间的距离缩到最小。

6. 观察切片时，先用低倍镜，身体坐端正，胸部挺直，用左眼自目镜观察（右眼同时睁开），同时转动粗调节器，使镜筒上升至一定程度时，就会出现物象，再微微转动细调节器，调整焦点，直到物象达到最清晰程度为止。

如果需要观察细胞的微细结构时，再转换高倍镜接物镜至镜筒下面，并转动细调节器，以期获得清晰的物象。但有些显微镜在转换高倍镜前，必须先转动粗调节器，使镜筒向上，然后再转动粗调节器，使物镜下降至接近标本片时，进行观察。

组织学标本多半在高倍镜下即可辨认。如须采用油镜观察时，应先用高倍镜检查，把欲观察处，置于视野中央，然后移开高倍镜，把香柏油（或檀香油）滴于标本上，转换油镜，使油镜头与标本上油液处相接触，轻轻转动细调节器，直至获得最清晰的物象为止。

7. 调节光线时，可扩大或缩小虹彩（光圈）的开孔，也可使集光器上升或下降。有的还可直接调节灯光的强弱。

(三) 显微镜的保养方法

1. 显微镜使用后，取下组织标本，将转换器稍微旋转，使物镜叉开（呈八字形），并转动粗调节器，使镜筒稍微下移，然后用绸布包好，装入显微镜箱内。
2. 不论目镜或物镜，若有灰尘，严禁用口吹或用手抹。应用擦镜纸擦净。
3. 勿用暴力转动粗、细调节器，并保持该部齿轮之清洁。
4. 显微镜勿置于日光下或靠近热源处。
5. 活动关节，不要任意弯曲，以防机件由于磨损而失灵。
6. 显微镜的部件，不应随意拆下，箱内所装之附件，也不应随便取出，以免损坏或丢失。

7. 在使用过程中，切勿将酒精或其他药品污染显微镜。显微镜一定要保存在干燥的地方，不能使其受潮，否则会使透镜发霉或机械部分生锈，特别在多雨地区和多雨季节更应注意。最好用精制的显微镜专用柜子保存。

8. 应用油镜后，应即以擦镜纸蘸少量二甲苯（半滴已够）将镜头上及标本上的油擦去，再用干擦镜纸擦净之。对于无盖玻片的标本，可采用“拉纸法”，即把小张擦镜纸盖在玻片上的香柏油处，加数滴二甲苯，趁湿向外拉擦镜纸，拉出后丢掉，如此连续3~4次即可将标本上的油去净。

四、操作方法及考核标准

（一）操作方法与步骤

1. 介绍显微镜的构造 学生认识显微镜的构造。
2. 示范显微镜的使用方法 学生练习显微镜的使用方法。
3. 示范显微镜的保养方法 学生练习显微镜的保养方法。

（二）技能考核标准

考核内容及分数分配	操作环节与要求	评分标准		考核方法	熟练程度	时限
		分值	扣分依据			
显微镜的构造、使用 and 保养方法(100分)	1. 说出显微镜各部分名称	30	任意三个部位名称，每错一个扣10分	单人操作考核	熟练掌握	45min
	2. 陈述显微镜的使用方法	50	正确使用显微镜，每错一项扣10分			
	3. 陈述显微镜的保养方法	20	说出任意两项操作，每错一项扣10分			

项目二 常用玻璃器皿及仪器的使用

一、技能目标

能识别、使用水产动物微生物检验中主要的玻璃器皿及设备

二、教学资源准备

（一）材料与工具

主要玻璃器皿：载玻片、凹玻片、盖玻片、试管、平皿、吸管、微型凝集反应板等。

主要仪器：电热恒温培养箱、电热干燥箱、高压蒸汽灭菌器、电动离心机等。

（二）教学场所

动物微生物及检验实验室

（三）师资配置

实训时 1 名教师指导 20 名学生，技能考核时 1 名教师指导 10 名学生。

三、原理与知识

（一）玻璃器皿

玻璃器皿的准备：用过的玻璃器皿依次经过消毒或灭菌、洗涤、干燥、包装、灭菌处理；新购入玻璃器皿的处理是在用前用 1%-2% 盐酸浸泡 1 天，然后再用洗衣粉水洗涤，最后用清水冲洗干净。

(二) 仪器

1. 电热恒温箱:

用途: 培养细菌、孵化小鸡

温度范围: 37-39℃

使用方法:

(1) 加水

(2) 接上电源插头, 开启电源开关 (绿灯亮, 表示电源已接通)。

(3) 调节温度至所需要的温度: 37℃ (红灯亮, 表示电热丝已在发热, 箱内温度升温)。

(4) 待温度稳定 (红绿灯交替出现), 再将待高压物品放入。

(5) 培养结束, 取出物品, 并切断电源。

(6) 若长期不使用, 将箱内水放出来。

2. 电热干燥箱

用途: 用于玻璃器皿、金属制品等干燥灭菌。

温度范围: 180-250℃

使用方法:

(1) 接通电源。

(2) 调节好温度, 先升温至 60℃, 打开排气孔, 放出箱内冷空气, 当温度升至 180℃, 维持 2 小时。

(3) 消毒结束, 待温度降至 60℃时, 再打开箱门, 取出物品。

(4) 切断电源。

3. 蒸汽消毒器

类型: 立式、卧式、手提式

结构:

(1) 由内外两个金属桶构成, 外桶放水, 水位至内脚, 内桶放待消毒物品。

(2) 盖子: 上面有安全阀、排气阀、压力表, 边缘有六个螺旋, 螺旋要求对称旋紧。

使用方法:

(1) 加适量的水至外桶中, 水面略低于内脚。

(2) 放入内桶, 将被消毒物品放入内桶中。

(3) 盖上盖子, 并拧好盖上的 6 个螺旋, 要求对称旋紧, 并关闭排气阀。

(4) 加热, 温度升至 108℃时, 徐徐打开排气阀, 放出冷空气, 关闭排气阀, 待温度升至 121.3℃时, 高压 30min。

(5) 灭菌结束, 停止加热, 待压力降至 0 时打开排气孔, 打开盖子, 取出灭菌物品。

4. 电热水浴锅

用途: 水域加热, 例如: 细菌液体。

5. 电动离心机

用途: 用于沉淀细菌、红细胞、寄生虫卵。

使用方法:

(1) 接通电源。

(2) 放入离心管, 要求对称放入离心管且离心管重量相等。

(3) 盖上盖子。

(4) 打开开关, 开始加速, 由低至高; 离心结束时, 转速由高至低。

(5) 取出离心管。

四、技能考核的内容

1. 玻璃器皿、仪器的认识
2. 玻璃器皿、仪器的使用

五、操作方法及考核标准

(一) 操作方法与步骤

1. 展示动物微生物及检验实验室常用器皿及仪器让学生识别。
2. 边展示边讲授。
3. 使用

(二) 技能考核标准

考核内容及分数分配	操作环节与要求	评分标准		考核方法	熟练程度	时限
		分值	扣分依据			
1. 动物微生物及检验实验室常用玻璃器皿及仪器的认识 2. 玻璃器皿、仪器的使用	1. 玻璃器皿、仪器的认识	40	任意四个设备识别，每错一个扣5分	单人操作考核	熟练掌握	40min
	2. 常用玻璃器皿及仪器的使用	60	任意两个玻璃器皿及任意四个仪器使用，每错一个扣10分			

项目三 常用培养基的制备

一、技能目标

能掌握培养基制备的基本程序、培养基 pH 的测定及矫正方法，能熟练制备常用培养基。

二、教学资源准备

(一) 材料与工具

电炉、天平、量筒、漏斗、试管、平皿、烧杯、三角瓶、精密 pH 试纸、纱布、牛肉膏、蛋白胨、琼脂粉、氯化钠、磷酸氢二钾、氢氧化钠等。

(二) 教学场所

动物微生物及检验实验室

(三) 师资配置

实训时 1 名教师指导 20 名学生，技能考核时 1 名教师指导 10 名学生。

三、原理与知识

培养基制备的基本程序：

配料—溶解—测定及矫正 pH—过滤—分装—灭菌—无菌检验—保存备用

(一) 营养肉汤培养基

1. 成分：牛肉膏 3-5g，蛋白胨 10g，氯化钠 5g，磷酸氢二钾 1g，蒸馏水 1000mL。
2. 制法：于蒸馏水中加入已称量好的牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、磷酸氢二钾，加热溶解。矫正 pH 至 7.4-7.6，过滤分装。置高压蒸汽灭菌器内，121.3℃ 经 20min 灭菌即成。

3. 用途：可供一般细菌生长，同时也是制作一般培养基的基础原料。

(二) 营养琼脂培养基

1. 成分：肉膏汤 1000mL，琼脂粉 18-20g。

2. 制法：将琼脂粉加入未过滤、分装及灭菌的肉膏汤内，煮沸使其完全溶解，矫正 pH 至 7.4-7.6，过滤分装于试管或三角瓶中，以 121.3℃ 灭菌 20min。可制成试管斜面、高层培养基或琼脂平板。

3. 用途：可供一般细菌生的分离培养、纯培养，观察菌落特征及保存菌种等，也可作特殊培养基的基础培养基。

四、技能考核的内容

营养肉汤培养基、营养琼脂培养基的制备

五、操作方法及考核标准

(一) 操作方法与步骤

1. 展示培养基制备常用器皿及化学试剂让学生识别。
2. 边展示边讲授。
3. 培养基制备

(二) 技能考核标准

考核内容及分数分配	操作环节与要求	评分标准		考核方法	熟练程度	时限
		分值	扣分依据			
1. 营养肉汤培养基的制备 2. 营养琼脂培养基的制备	1. 营养肉汤培养基的制备	50	化学试剂的选择、称量、蒸馏水取得、pH 值测定及矫正、分装、高压等，每错一个扣 7 分	单人操作考核	熟练掌握	45min
	2. 营养琼脂培养基的制备	50	化学试剂的选择、称量、蒸馏水取得、pH 值测定及矫正、分装、高压等，每错一个扣 7 分			

项目四 细菌的分离培养、移植及培养性状的观察

一、技能目标

能熟练掌握病料采集的方法和利用不同被检材料进行细菌分离培养的方法；能掌握细菌的移植、培养的方法；能熟悉细菌的培养特性。

二、教学资源准备

(一) 材料与工具

病料、实验用菌种、营养琼脂培养基、肉汤培养基、接种环、酒精灯等。

(二) 教学场所

动物微生物及检验实验室

(三) 师资配置

实训时 1 名教师指导 20 名学生，技能考核时 1 名教师指导 10 名学生。

三、原理与知识

(一) 细菌的分离培养

细菌的分离培养是细菌学诊断的重要环节。

平板划线分离法：其目的是将被检查的材料作适当的稀释，在琼脂平板上划线分离，以便得到单个菌落。其操作方法如下：

(1) 右手持接种环于酒精灯上烧灼灭菌，待冷。

(2) 无菌操作取病料，若为液体病料，可直接用灭菌的接种环取病料一环；若为固体病料，首先将烙刀在酒精灯上灭菌，并立即用其将病料表面烧烙灭菌；然后用灭菌接种环从烧烙部位伸到组织中取内部病料。

(3) 左手持平皿，用拇指、食指及中指将皿盖打开一侧(角度大小以能顺利划线为宜，但以角度小为佳，以免空气中细菌污染培养基)，将已取被检材料的接种环伸入平皿，并涂于培养基一侧，然后自涂抹处以腕力在平板表面轻轻地分区划线，可间断划线也可连续划线，第一组作 1-3 次划线，环上的多余细菌材料烧掉后，从第一组划线引出第二组划线，接种环灭菌，再从第二组划线引出第三组划线，如此反复 3—4 组划线后，即可把整个平板表面划满。一组划线的起点只能与邻近的上一组划线重叠，这样就可可在最后的 1-2 组划线上出现多量的单个菌落，以便进行纯培养。

(4) 划线完毕，烧灼接种环，将平皿盖好，用玻璃铅笔在平皿底部注明被检材料及日期，将平皿倒置于 37℃ 温箱中，培养 18-24 小时观察结果。

(二) 细菌移植

斜面移植法：

(1) 左手斜持菌种管和被接种琼脂斜面管，使管口互相并齐，管底部放在拇指和食指(食指)之间，松动两管棉塞，以便接种时容易拔出。

(2) 右手持接种棒，在火焰上灭菌后，用右手小指和无名指并齐同时拔出两管棉塞。

(3) 将管口进行火焰灭菌，使其靠近火焰，将接种环伸入菌种管内，先在无菌生长的琼脂上接触使冷却，再挑取少许细菌后退出接种环立即伸入另一管斜面培养基上，勿碰及斜面和管壁，直达斜面底部，从斜面底部开始划曲线，向上至斜面顶端为止，管口通过火焰灭菌，将棉塞塞好。

(4) 接种完毕，接种环通过火焰灭菌后放下接种棒。最后在斜面管壁上注明菌名、日期，置 37℃ 温箱中培养。

(三) 细菌在培养基中生长特性的观察

1. 琼脂平板培养基 主要观察细菌在培养基上形成的菌落的特征

(1) 大小。以直径(mm)表示，小菌落如针尖大，大菌落为 5—6mm，甚至更大。

(2) 形状。有圆形、不整形、针尖状、露滴状、同心圆形及根足形等。

(3) 边缘。有整齐、波浪状、锯齿状及卷发状等。

J:

(4) 表面形状。有光滑、粗糙、同心圆、放射状、皱状及颗粒状结构等。

(5) 湿润度。有的菌落湿润、而有的菌落干燥。

(6) 隆起度和隆起形状。隆起度有隆起、轻度隆起及中央隆起等，隆起形状有脐状、扣状及扁平状等。

(7) 色泽和透明度。色泽有无色、白、黄、橙及红等；透明度有透明、半透明及不透明等。

(8) 质地。分坚硬、柔软或黏稠。

2. 内汤培养基

(1) 混浊度。有高度混浊、轻微混浊或仍保持透明者。

(2) 沉淀。管底有无沉淀，沉淀物是颗粒状或、棉絮状等。

(3) 表面。液面有无菌膜，管壁有无菌环。

(4) 色泽。液体是否变色，如绿色、红色等。

四、技能考核的内容

1. 病料采集

2. 细菌分离培养

3. 细菌移植
4. 琼脂平板培养基中细菌生长特性的观察
5. 肉汤培养基中细菌生长特性的观察

五、操作方法及考核标准

(一) 操作方法与步骤

1. 展示病料、各种培养基、待移植细菌等。
2. 边操作边讲授。
3. 操作

(二) 技能考核标准

考核内容及 分数分配	操作环节与 要求	评分标准		考核 方法	熟练 程度	时限
		分值	扣分依据			
1. 病料采集 2. 细菌分离 培养 3. 细菌移植 4. 琼脂平板 培养基中细 菌生长特性 的观察 5. 肉汤培养 基中细菌生 长特性的观 察	1. 病料采集	10	病料采取部位、无菌操作、 手法，每错一个扣3分	单人 操作 考核	熟练 掌握	40min
	2. 细菌分离 培养	20	手持培养皿姿势，接种环 消毒、酒精灯使用，细菌 分离操作，每错一个扣5 分			
	3. 细菌移植	20	手持试管姿势，接种环消 毒、酒精灯使用，细菌移 植操作，每错一个扣5分			
	4. 琼脂平板 培养基中细 菌生长特性 的观察	25	大小、形状、边缘、 表面形状、湿润度、隆起 度和隆起形状、色泽和透 明度、质地等，任意5个， 每错一个扣5分			
	5. 肉汤培养 基中细菌生 长特性的观 察	25	混浊度、管底有无沉淀， 液面有无菌膜，管壁有无 菌环、色泽等，任意5个， 每错一个扣5分			

项目五 细菌标本片的制备及染色

一、技能目标

能制备细菌抹片；能进行革兰氏染色；能识别革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的染色特征。

二、教学资源准备

(一) 材料与工具

酒精灯、接种环、载玻片、革兰氏染色液、显微镜等。

(二) 教学场所

动物微生物及检验实验室

(三) 师资配置

实训时 1 名教师指导 20 名学生, 技能考核时 1 名教师指导 10 名学生。

三、原理与知识

1. 载玻片的准备: 取清洁载玻片, 用纱布或吸水纸擦干净, 如有油迹或污垢, 用少量酒精擦拭干净。根据所检材料多少, 可在玻片背面用记号笔画出方格或圆圈作为记号。

2. 抹片、触片的制备:

(1) 接种棒的使用。点燃酒精灯, 右手持接种棒(握钢笔方式), 先将接种棒直立, 使接种环在酒精灯火焰上烧红后, 再横向持棒移动烧金属柄部分, 通过火焰 3~4 次, 即火焰灭菌, 每次使用前均需火焰灭菌。

(2) 固体培养物(平板, 斜面)或脓汁、粪便等抹片的制备。用接种环取生理盐水 1 滴, 置于载玻片上, 再用灭菌接种环取培养物少许混合于水滴中, 混匀涂成薄膜, 使其呈极轻微的乳浊为度, 多余材料在火焰上灭菌。

(3) 液体培养物或血液、尿液、渗出液及乳汁等抹片的制备。直接用灭菌接种环取山环或数环待检材料, 置于玻片上制成涂片。

(4) 组织、脏器材料触片的制备。取病料组织一小块, 以其切面在玻片表面轻轻接触几次, 注意不宜触重、过厚, 自然干燥, 即成组织触片(或称印片)。也可用其切面轻轻接触玻片表面并移动组织块制成抹片, 自然干燥。

3. 干燥固定: 抹片(触片)于室温自然干燥后, 将涂抹面朝上, 以其背面在酒精灯火焰上通过数次, 略作加热(但不能太热, 以不烫手背为度)进行固定。血液、组织及脏器抹片(尤其作姬姆萨染色)常用甲醇固定, 可将已于干燥的抹片浸入含有甲醇的染色缸内, 取出晾干或在抹片上滴加数滴甲醇使其作用 3-5 分钟后, 自然干燥。

固定目的: 杀死细菌; 使菌体蛋白凝固附着在玻片上, 以防被水冲洗掉; 改变细菌对染料的通透性, 因活细菌一般不允许染料进入细菌体内。

4. 染色: 固定好的涂片或抹片即可进行染色。常规染色法有革兰氏染色法、美蓝染色法、瑞氏染色法等。染色片应贴标签, 注明菌名、材料、染色法和日期等/封存。

革兰氏染色。基本过程: 染色—媒染—脱色—复染—干燥—镜检。

染色: 在已于干燥固定好的抹片上滴加草酸亚铁结晶紫溶液于涂、抹面上, 染色 2-3 分钟, 水洗。

媒染: 滴加革兰氏碘液作用 2-3 分钟, 水洗。

脱色: 滴加 95% 酒精于抹片上, 脱色时间应根据涂抹面酌厚度灵活掌握, 多在 20-60 秒之间, 水洗。

干燥: 用吸水纸吸干或自然干燥。

镜检: 革兰氏阳性菌呈蓝紫色, 革兰氏阴性菌呈红色。

四、技能考核的内容

1. 细菌抹片的制备

2. 革兰氏染色及结果判定

五、操作方法及考核标准

(一) 操作方法与步骤

1. 展示细菌抹片制备的材料、革兰氏染色试剂。

2. 边操作边讲授。

3. 操作。

(二) 技能考核标准

考核内容及 分数分配	操作环节与 要求	评分标准		考核 方法	熟练 程度	时限
		分值	扣分依据			

1. 细菌抹片的制备	1. 细菌抹片的制备	40	载玻片清洗、酒精灯使用、抹片等，每错一个扣 10 分	单人操作考核	熟练掌握	30min
2. 革兰氏染色及结果判定	2. 革兰氏染色及结果判定	60	颜色判定阳性菌、阴性菌判定，每错一个扣 10 分			

项目六 显微镜油镜的使用及细菌形态的观察

一、技能目标

能使用油镜并能通过油镜观察细菌的基本形态。

二、教学资源准备

(一) 材料与工具

显微镜、细菌标本、香柏油、二甲苯、蜡笔、擦镜纸等。

(二) 教学场所

动物微生物及检验实验室

(三) 师资配置

实训时 1 名教师指导 20 名学生，技能考核时 1 名教师指导 10 名学生。

三、原理与知识

(一) 油镜的使用方法

1. 油镜头的认识

(1) 有 100× 标记

(2) 镜头最长：接物镜的放大倍数越大，长度就越长，油镜的放大倍数最大，故油镜最长。

(3) 有的生产显微镜厂家，在物镜上有白色圆圈等作为油镜的标记

2 油镜使用原理：

油镜是接物镜的一种，使用时需在物镜和载玻片之间添加香柏油，因此称为油镜。使用油镜时加香柏油的原因如下：

(1) 油镜头晶体小：进入镜中的光线比低倍镜、高倍镜少的多，视野不明亮。

(2) 玻璃和空气折光率不同（空气为 1，玻璃的为 1.52-1.59）：光线不能通过空气射进物镜晶体，香柏油折光率是 1.52，它和玻璃的折光率相似，因此加香柏油后，光线可通过香柏油射进物镜晶体，视野变得明亮。

3 使用方法

(1) 接通电源。

(2) 用 10×10 对光，然后转到 100 倍的物镜即油镜镜头。

(3) 被检玻片滴一滴香柏油（不要涂抹，否则菌片被刮花，看不清楚）。

(4) 调粗螺旋，缓慢升高载物台至镜头浸在油中（从一侧看，油镜头浸在油中即可，不要使劲压玻片，以免压碎玻片，损坏油镜头）。

(5) 左眼看目镜，边观察边降低载物台（此时转动的是粗螺旋），待得到模糊物象时，再调细螺旋，直至物象清晰为止。

(二) 细菌基本形态：球状、杆状、螺旋状

根据基本形态将细菌分为：球菌、杆菌、螺旋菌

四、技能考核的内容

1. 油镜的使用
2. 细菌形态的观察及识别

五、操作方法及考核标准

(一) 操作方法与步骤

1. 展示显微镜。
2. 边使用边讲授。
3. 使用。

(二) 技能考核标准

考核内容及分数分配	操作环节与要求	评分标准		考核方法	熟练程度	时限
		分值	扣分依据			
1. 油镜的正确使用 2. 细菌形态的观察及识别	1. 油镜的正确使用	40	镜头选择、载玻片放置、香柏油的添加、用油镜调出细菌，每错一个扣10分	单人操作考核	熟练掌握	30min
	2. 细菌形态的观察及识别	60	球菌、杆菌、螺旋菌、革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、细菌颜色，每错一个扣10分			

项目七 细菌的药物敏感试验

一、技能目标

能掌握细菌的药物敏感性试验的操作及结果判定。

二、教学资源准备

(一) 材料与工具

大肠杆菌和金色葡萄球菌肉汤培养物各1管，灭菌棉签1包，含抗生素的纸片10张，直径90mm普通营养琼脂平板1个等。

(二) 教学场所

动物微生物及检验实验室

(三) 师资配置

实训时1名教师指导20名学生，技能考核时1名教师指导10名学生。

三、原理与知识

1. 纸片扩散试验

- (1) 每组将每种菌培养物稀释到盐水中，使其混浊度相当于所给比浊管。
- (2) 混匀稀释管，插入一个棉签沿管壁滚动，挤去多余液体。
- (3) 用含菌棉签从平板中央开始涂抹，然后再转90°涂布，使整个平板表面涂布上菌。
- (4) 再用灭菌镊子将含抗生素纸片放入平板内并压实，每个平板上可放4个纸片(2个含青霉素纸片，2个含庆大霉素纸片)。4℃作用2小时。
- (5) 将平板倒置放入培养箱中培养。

2. 最低抑菌浓度试验

(1) 从 2 mL 含抗生素肉汤管取出 1 mL 加到第 1 管 1 mL 肉汤管中混匀, 再取 1 mL 到第 2 管, 如此连续稀释至第 7 管, 最后弃去 1 mL 含抗生素肉汤。共有 8 支 1 mL 含抗生素肉汤管(抗生素浓度从 32Hg/n]L 稀释至 0.25 件 g/mL) 和不含抗生素肉汤管 1 支。

(2) 吸取 0.1 mL 含菌量相当于麦氏比浊管第 1 管 1/2 的金色葡萄球菌悬液 U 力亿菌/mL) 到每个含抗生素管以及不含抗生素的对照管。

(3) 若有两种或两种以上抗生素和被检细菌也按上述过程进行。

3. 实验结果判定

(1) 纸片扩散试验测定抑菌环的直径, 记录每种菌对某一抗生素的敏感性。

敏感 抑菌环直径《对照菌株抑菌环直径。

有抗力 没有抑菌环或抑菌环直径《2mm。

中度抗力 抑菌环直径》3mm, 但《对照菌株抑菌环直径。

药敏试验常用金色葡萄球菌作为革兰氏阳性菌的对照菌株; 用大肠杆菌作为革兰氏阴性菌的对照菌株。

(2) 最低抑菌浓度试验记录最低抑菌浓度结果。无细菌生长的最大抗生素稀释倍数管内抗生素浓度即为最低抑菌浓度。

四、技能考核的内容

纸片扩散试验操作及结果判定

五、操作方法及考核标准

(一) 操作方法与步骤

1. 展示药敏片。
2. 边展示边讲授。
3. 操作

(二) 技能考核标准

考核内容及分数分配	操作环节与要求	评分标准		考核方法	熟练程度	时限
		分值	扣分依据			
1. 纸片扩散试验操作 2. 结果判定	1. 纸片扩散试验操作	60	纸片制备、药敏片涂抹、手持培养皿姿势、无菌操作等, 每错一个扣 10 分	单人操作考核	熟练掌握	40min
	2. 结果判定	40	敏感、有抗力、中度抗力, 每错一个扣 10 分			

项目八 抗菌药物对大肠杆菌的体外抑菌试验和联合药敏试验

一、技能目标

1. 测定 6 种药物对大肠杆菌的最小抑菌浓度;
2. 测定氨苄西林和链霉素以及氟苯尼考和多黏菌素体外联合药敏的 FIC 值, 为临床联合用药提供理论依据。

二、教学资源准备

（一）材料与工具

1. 药品：氨苄西林、氟苯尼考、多黏菌素、链霉素、恩诺沙星、多西环素
2. 培养基：MH 肉汤培养基(培养细菌使用)，LB 营养琼脂（细菌活菌计数使用）。
3. 供试菌种：大肠杆菌 ATCC25922。

（二）教学场所

校内专业实训室或校内外教学基地

（三）师资配置

实训时 1 名教师指导 20 名学生，技能考核时 1 名教师指导 10 名学生。

三、方法和步骤

1. 细菌含量的测定

- (1) 用生理盐水将上述菌液作 10 倍梯度稀释（0.5mL 菌液+4.5mL 生理盐水）；
- (2) 取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 三个滴度的菌液各 0.1mL 滴在琼脂平板中央，轻轻拍打，使其均匀摊开，不要接触平皿边缘，每个梯度做 2 个平板，放入 37℃ 温箱培养 16-24h；
- (3) 计算菌落数，挑选平板上生长 30-300 个菌落的计数，数两个平板取其平均值为细菌浓度，要求生长浊度达 9×10^8 /mL。计算示例： 10^{-6} 两个平板上生长菌落数分别为 68、70 个，平均 69 个/0.1mL，则 1mL 含活菌数 690×10^6 /mL，即 6.9×10^8 /mL。
- (4) 将供试菌液（3 步制得）用肉汤作 1：1000 稀释（最终的浊度为 10^5 ）。

2. 最小抑菌浓度测定——微量肉汤二倍稀释法

- (1) 在 96 孔板的前三排即 A/B/C 三排每孔中各加入空白肉汤 100 μ L；
- (2) 在 A/B/C 三排的第 1 孔加配好的药液(浓度为 512 单位/mL 或 μ g/mL)100 μ l，然后对药物进行二倍稀释。此时每孔药物浓度从左到右依次为(单位：IU/mL 或 μ g/mL)；
- (3) 再在每一孔中加入稀释好的菌液 100 μ l，这样就形成测定一个药物 MIC 值的三次重复(A/B/C 三排样品)。此时每孔药物浓度即最终药物浓度从左到右依次为(浓度：单位/mL 或 μ g/mL)；
- (4) 另外在同一块板上做一排阴性对照（仅加空白肉汤不加菌液）和一排阳性对照（加菌液肉汤不加药液）；
- (5) 将 96 孔板放入 37℃ 恒温培养箱培养 16~20 小时后，观察结果。

2. 联合药敏试验

- (1) 将 A B 两种药物分别稀释到各自 MIC 值的 32 倍；
- (2) 96 孔板照紫外 3h；
- (3) 以 2 倍稀释法制备 A 药与 B 药的菌药液；
- (4) 分别把 A 与 B 药菌药液 100 μ l 按顺序加入 96 孔细胞培养板的横排与竖列的各孔中并分别设置阴阳性对照；
- (5) 再做同样的 1 块板，置于 37℃ 恒温培养箱培养 14—18 小时。

4. 结果记录

(1) 细菌计数结果

稀释滴度	活菌数		总计
	A 平板	B 平板	

--	--	--	--

(2) MIC 测定结果

6 种药物对大肠杆菌的 MIC 值

单位：(μ g/mL 或 IU/mL)

药物	大肠杆菌	药物	大肠杆菌
	MIC 值		MIC 值
氨苄西林		氟苯尼考	
多黏菌素		链霉素	
恩诺沙星		多西环素	

(1) 联合药敏实验结果

氟苯尼考和多黏菌素对大肠杆菌的体外联合药效：FIC 指数 = ，结果判定用图表表示。

氟苯尼考和多黏菌素对大肠杆菌联合药敏结果

药物 (μ g/mL)		A 药						B 单药对照	空白对照	阳性对照	
		8M	4M	2M	M	1/2M	1/4M				1/8M
B 药	8M	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	4M	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	2M	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
	M	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
	1/2M	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
	1/4M	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	1/8M	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A 单药对照		-	-	+	+	+	+	+	细菌对照	-	+

$$FIC \text{ 指数} = \frac{\text{甲药联用时的MIC}}{\text{甲药单用时的MIC}} + \frac{\text{乙药联用时的MIC}}{\text{乙药单用时的MIC}}, FIC \text{ 指数} = 8/4 + 4/4 = 3$$

因为 FIC > 2，所以氟苯尼考和多黏菌素对大肠杆菌的体外联合药效为拮抗作用。

青霉素和链霉素对大肠杆菌的体外联合药效：FIC 指数 = 17/32，结果判定用图表表示。

青霉素和链霉素对大肠杆菌联合药敏结果

药物 (μ g/mL)		A 药						B 单药对照	空白对照	阳性对照
		8M	4M	2M	M	1/2M	1/4M			
B 药	8M	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	4M	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	2M	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	M	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	1/2M	-	-	-	-	-	-	+	+	+

	1/4M	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
	1/8M	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
A 单药对照		-	+	+	+	+	+	+	细菌对照	-	+

$$FIC\text{指数} = \frac{\text{甲药联用时的MIC}}{\text{甲药单用时的MIC}} + \frac{\text{乙药联用时的MIC}}{\text{乙药单用时的MIC}}, FIC\text{指数} = 1/4/8 + 1/2 = 17/32$$

因为 $0.5 < FIC \leq 1$ ，所以青霉素和链霉素对大肠杆菌的体外联合药效为相加（累加）作用。

四、实验报告

填写实验报告。

实验报告的写作要求：

1. 实验项目的总标题要醒目，分标题要清晰。（10分）
2. 注明班级、姓名、实习报告完成的时间。（10分）
3. 要求写出实验的目的、所用仪器。（10分）
4. 操作过程熟练。（30分）
5. MIC 试验对临床选药的意义以及它的局限性。结合以上内容、分析联合的效果和依据，及其对指导临床用药的意义。（40分）