

《生物医学实验》讲义

实验一 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验

一、实验目的

1. 掌握小鼠骨髓嗜多染红细胞微核的制备方法。
2. 熟悉微核的形态特征。
3. 了解微核检测的实际意义和应用范围。

二、实验原理

染色单体或染色体的无着丝点断片，或因纺锤体受损而丢失的整个染色体，在细胞分裂后期，仍然遗留在细胞质中。末期之后，单独形成一个或几个规则的次核，被包含在子细胞的胞质内，因比主核小，故称为微核。大小应为主核的 1/20~1/5。微核的折光率及细胞化学反应性质和主核一样。微核率与用药的剂量或辐射累积效应呈正相关，所以可用简易的、快速、灵敏的微核计数来代替繁杂的畸变染色体计数。微核检测技术目前已广泛应用在辐射损伤以及化学诱变剂研究和新药、保健食品的毒理实验中。

嗜多染红细胞是分裂后期的红细胞由幼年发展为成熟红细胞的一个阶段，此时红细胞的主核已排出，因胞质内含有核糖体，姬姆萨 Giemsa 染色呈灰蓝色，成熟红细胞的核糖体已消失，被染成淡桔红色。骨髓中嗜多染红细胞数量充足，由于无核，极易观察到微核，因此，骨髓中嗜多染红细胞成为微核试验的首选细胞群。

三、实验材料

1. 主要器材 显微镜，低速离心机，电子天平，解剖器械（搪瓷解剖盘、探针、剪刀、镊子），干净纱布，注射器、试管、试管架、磨口试剂瓶、滴管、染色缸、吸耳球、量筒、清洁载玻片。
2. 主要试剂 0.9%生理盐水、灭活的小牛血清、环磷酰胺、甲醇、磷酸盐缓冲液 PBS (pH6.8)、Giemsa 染液、瑞氏染液。
3. 实验动物 成年昆明小鼠。

四、实验方法

1. 环磷酰胺处理 取骨髓前 24 h 先给小鼠腹腔注入环磷酰胺，注射剂量为 100 mg / kg 动物体重。
2. 取骨髓 用损伤脊髓法处死小鼠，然后用剪刀剪开大腿上的皮肤和肌肉，取出大腿

骨，用一小块纱布来回搓干净附在骨上的肌肉碎渣。剪掉股骨两端膨大的关节头，然后用注射器吸取 5 ml 生理盐水，插入股骨一端，将骨髓细胞冲洗至 10 ml 的离心管中。可重复冲洗多次，直至骨髓腔呈白色为止。

3. 离心处理 将所获得的细胞悬浮液以 1000 rpm 离心 10 min，吸去上清液，在沉淀物中加入 2 滴灭活的小牛血清，制成细胞悬液。

4. 涂片 滴一滴悬液于载玻片一端，按常规方法涂片，在空气中晾干。

5. 固定 将晾干的载玻片放入甲醇固定液中 10 min，取出晾干。

6. 染色 将制片平放在玻璃板上，用 Giemsa:PBS:瑞氏染液 (1:9:10)，染色 15 min，流水冲洗后晾干即可镜检。

7. 观察 先以低倍镜、高倍镜粗检，选择细胞分布均匀、疏密适度、形态完整、染色良好的区域，再在油镜下按一定顺序进行嗜多染红细胞和微核计数。嗜多染红细胞为幼稚红细胞，呈灰蓝色，略大于红细胞（红色），微核多呈圆形和椭圆形，呈蓝紫色或紫红色。嗜多染红细胞中微核多为一个，也可有两个或以上微核，此时仍按有微核的嗜多染红细胞计算。

8. 结果分析 在显微镜下，每只小鼠骨髓涂片标本计数 1000~2000 个嗜多染红细胞，包括其中出现微核的细胞数，计算微核细胞率。计算公式如下：

$$\text{微核细胞率} = \frac{\text{含微核的细胞数}}{\text{观察的细胞总数}} \times 100\%$$

五、结果意义

按 100 mg/kg 体重剂量给小鼠腹腔注射环磷酰胺，其嗜多染红细胞微核率为千分之 48.9±3.6。正常小鼠嗜多染红细胞微核率为千分之五以下，超过千分之五为异常。

六、注意事项

1. 防止小牛血清污染。
2. 大腿骨须擦拭干净，以免影响结果。
3. 涂片不要过厚或过薄。
4. 选择分布均匀、疏密适度、形态完整、染色好的区域镜检。由低倍镜到高倍镜，并按一定顺序镜检。
5. 注意微核与其他颗粒异物的区分。

实验二 小鼠骨髓细胞染色体畸变实验

一、实验目的

1. 掌握动物骨髓细胞标本制作技术
2. 了解染色体畸变实验剂量设计原则和体内染毒过程
3. 掌握染色体畸变的类型

二、实验原理

哺乳动物细胞核中均具有一定的数目和特定形态结构的染色体。当外源化学物质作用于动物机体后，其母体化学物或代谢产物可能作用于染色体或与染色体分裂有关的过程，引起染色体断裂和错误重接结构，或者引起染色体分离过程的改变，从而导致染色体结构畸变或数目畸变。

动物骨髓细胞具有数目多和分裂旺盛的特点，可以直接用于染色体标本的制备而无需体外培养。为了清楚地观察染色体畸变，必须选择处于细胞分裂中期相的细胞。因此在细胞收获前给予动物一定剂量的秋水仙碱处理，通过阻止纺锤体对染色体向细胞两极的牵拉作用使细胞分裂间期和分裂前期的细胞产生同步化，并停留在中期相。细胞收获后，还必须通过低渗处理使细胞体积增大，并使染色体均匀分散在细胞质中。

小鼠骨髓细胞染色体畸变实验检测的遗传学终点是染色体结构的改变和染色体分离的改变，用于检测环境中的染色体断裂剂和有丝分裂毒物。

三、实验材料

1. 器材：小剪刀、镊子、滴管、离心管、载玻片、注射器、水浴箱，离心机，生物显微镜。
2. 试剂：全部试剂除注明外均为分析纯，实验用水为蒸馏水。
 - 1) 500mg/L 秋水仙素，置于棕色瓶中，冰箱保存。
 - 2) 2.2%柠檬酸钠
 - 3) PH7.4 磷酸盐缓冲液：1/15mol/L 磷酸氢二钠溶液：磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 9.47g 溶于 1000mL 蒸馏水中。1/15mol/L 磷酸二氢钾溶液：磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 49.07g 溶于 1000mL 蒸馏水中。将磷酸氢二钠溶液 80mL 与磷酸二氢钾溶液 20mL 混合，用 PH 记调节 PH 至 7.4。
 - 4) 0.075mol/L 的氯化钾溶液。
 - 5) 甲醇：冰乙酸以 3: 1 混合，临用时现配。
 - 6) Giemsa 储备液：Giemsa 染料 3.8 克，加少量甲醇研磨，逐渐加甲醇 375mL，溶解后再加 125mL 纯甘油，于 37℃ 温箱保温 48 小时，在此期间摇动数次，放置 1~2 周备用。Giemsa 应用液：取 1mL 储备液加入 9mL，PH7.4 的磷酸盐缓冲液。

3. 实验动物

常用健康成年小鼠，每组 6~10 只，雌雄各半。动物购买后适应环境至少 3 天。

四、实验方法

1. 剂量及分组

受试物应设三个剂量组，最高剂量组原则上为动物出现严重中毒表现和/或个别动物出现死亡的剂量，一般可取 30%~80%LD₅₀，低剂量组应不表现出毒性，可取 1/8 LD₅₀ 作为低剂量组。当急性毒性试验给予受试物最大剂量（最大使用浓度和最大灌胃容量），动物仍无死亡而求不出 LD₅₀ 时，高剂量组则按以下步骤确定：1) 10g/kg 体重；2) 人的可能摄入量的 100 倍；3) 一次最大灌胃剂量进行设计，再下设中、低剂量组。同时设溶剂对照组和阳性对照组，阳性物可用丝裂霉素 C 或环磷酰胺经口或腹腔注射给予。

2. 受试物配制：一般用蒸馏水作溶剂，一般蒸馏水不溶于水，可用食用油，医用淀粉，羧甲基纤维素，配成乳浊液或悬浊液。受试物应于灌胃前新鲜配制。

3. 实验动物的处理：受试物经口给予实验动物 2~4 次，每次间隔 24 小时，在末次给受试物后间隔 24 小时取材。必要时可先用一个剂量的 3 只动物，于给受试物后 6、24、48 小时分别处死动物取材，以选择处死动物的最适时间。在一次给受试物时也可每个剂量组用 15 只动物，于 6、24、48 小时后分别各处死 5 只动物取材。处死动物前 2~4 小时，按 4 mg/kg 体重注入秋水仙素。小鼠颈椎脱臼处死。

4. 标本制备

1) 取材，取股骨，去附着的肌肉，剪去两端骨骺，用带针头的注射器吸取 2~4 mL 2.2% 柠檬酸钠溶液，将骨髓洗入 10mL 离心管中，反复冲洗数次，然后以 1000r~1500r/min 离心，弃去上清液。

2) 制片：离心后的沉淀物加入 4mL 0.075mol/L 氯化钾溶液，混匀后于在 37℃ 低渗水浴箱中，放置 15~20 分钟，再以 1000~1500r/min 离心，弃去上清液。将新配制的甲醇~冰乙酸固定液 4mL 沿管壁加入受试物中，10~15 分钟后，用吸管将细胞团块打碎继续固定 10~15 分钟，以 1000~1500r/min 离心，弃去上清液。再加固定液 4mL 静置 20 分钟后离心，弃去上清液，用吸管混匀细胞悬液。先将洗净的载玻片保存于冰水中备用。自冰水中取出载玻片，倾斜 30 度放置，立即吸取细胞悬液在玻片的 1/3 处滴 3 滴，轻吹细胞悬液扩散平铺于玻片上。每个标本制 2~3 张玻片，空气中自然干燥。临用时取 Giemsa 储备液 1mL，磷酸盐缓冲液 9mL，置染色缸中，将涂片浸于染液中染色 15 分钟左右，取出玻片用水冲洗，空气中自然干燥。

5. 阅片

1) 阅片要求：在低倍镜下检查制片质量，制片应为全部染色体较集中，而各个染色体分散、互不重叠、长短收缩适中、两条单体分开、清楚地显示着丝粒点位置，染色体呈红紫色。用油镜进行细胞中期染色体分析。每只动物分析 100 个中期相细胞，每个剂量组不少于 1000 个中期相细胞。

2) 观察项目：

染色体数目的改变：①非整倍体：亚二倍体或超二倍体；②多倍体：染色体成倍增加；③内复制：包膜内的特殊形式的多倍化现象。

染色体结构的改变：①断裂：损伤长度大于染色体的宽度；②微小体，较断片小而呈圆形；③有着丝点环：带着丝点部分，两端形成环状结构，并伴有一双无着丝粒点断片；④无着丝粒点环：成环状结构；⑤单体互换，行成三辐体、四辐体或多种形状的图像；⑥双微小体：成对的染色质小体；⑦裂隙：损伤的长度小于染色体的宽度；⑧非特异性变化：如粉碎化，着丝点细长化、粘着等。

五、结果意义

1. 结果判定

试剂组与对照组相比，试验结果染色体畸变率有明显的剂量反应关系并有统计学意义时，即可确认为阳性结果，若统计学上差异有显著性，但无剂量反应关系时，则应进行重复试验。结果能重复者确定为阳性。

2. 数据处理

统计处理用 X^2 检验。

六、注意事项

1. 控制好低渗时间，可使染色体标本分散良好，便于观察。
2. 固定的次数和时间对制片的质量也有影响。
3. 本实验不适用于有证据表明受试物或反应代谢产物不能达到靶组织—骨髓的情况。

实验三 小鼠精子致畸实验

一、实验目的

1. 了解小鼠精子畸形实验是一种检测环境理化因素对雄性生殖细胞遗传损伤的遗传毒理学手段。
2. 熟悉小鼠精子畸形实验的操作步骤，学习精子悬液的制备，畸形精子形态的辨别及

正确的计数方法。

二、实验原理

小鼠精子形态直接或间接地受基因控制，具有高度遗传性。精子的畸形主要是指形态的异常，已知精子的畸形是决定精子形成的基因发生突变的结果。因此形态的改变提示有关基因及其蛋白质产物发生了变化。

该试验通过观察小鼠精子头部和尾部形态的改变，来研究外界化学物对人或动物精子细胞的毒性作用。

三、实验材料

1. 主要器材 细胞培养板，镊子，吸管，微量可调节加样器，清洁载玻片，染色缸，中性树脂，显微镜。

2. 主要试剂 环磷酰胺；0.9%生理盐水；1%伊红染液。

3. 实验动物 成年昆明小鼠。

四、实验方法

1. 染毒 将10只雄性小鼠分为两组，每组5只，染毒组以环磷酰胺按40 mg/kg腹腔注射；阴性对照组以0.9%生理盐水按0.1 ml / 10 g体重腹腔注射，每天1次，连续5天。

2. 精子悬液制备 两组小鼠均于首次给药后第35天用颈椎脱臼法处死，摘取双侧附睾分别置于盛有1 ml 0.9%生理盐水的细胞培养板中，用镊子轻轻撕开附睾包膜，徐徐摇动附睾组织后，静置5~10 min，然后用镊子将组织碎片尽量取出。

3. 制片 轻轻吹打精子悬液，按1 ml精子悬液加入1%伊红溶液0.1ml混匀染色15~20 min后，取1滴于清洁的玻片上，均匀推片，空气自然干燥后，用中性树脂封片，每个精液样本制片2张。

4. 镜检 在低倍镜下（绿色滤光片）找到背景清晰精子重叠较少的部位，用高倍镜顺序检查精子形态，计数。精子有头无尾（轮廓不清）或头部与其他精子或碎片重叠，或明显是人为剪碎者均不计算，每只动物检验1000个精子。精子畸形主要表现在头部，其次表现在尾部，畸形类型可分为无钩、香蕉形、胖头、无定形、尾折叠、双头、双尾等，最后统计其畸形百分率。

五、结果意义

经统计处理：对照组与40 mg / kg染毒组比较有显著意义， $P < 0.05$ 。表明环磷酰胺能够引起小鼠的精子畸形。

六、注意事项

1. 异常精子均应记录显微镜的坐标数，以备复查。
2. 分别记录异常类型，以便统计精子畸形率及精子畸形类型。

实验四 倾注平板法测定水中细菌菌落总数

一、实验目的

- (1) 了解水中菌落总数测定的意义和原理。
- (2) 熟悉水样的采集与保存。
- (3) 掌握倾注平板法测定水的菌落总数的技术方法，及正确进行结果的卫生评价。

二、实验原理

样品中的微生物细胞充分分散开，使其均匀分布于平板中的培养基内。经培养后，单个细胞及聚在一起的细胞可以生长繁殖，形成一个肉眼可见的菌落，统计菌落数目，即可用以评价样品中的微生物的数量。

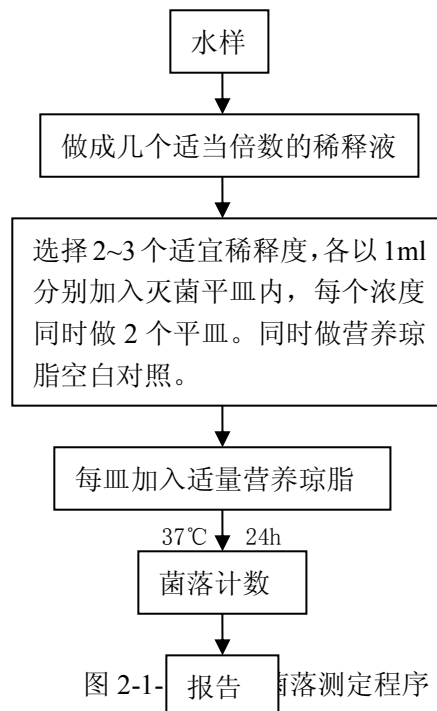
水中细菌菌落总数是指 1ml 水样在营养琼脂培养基中，37℃ 经 24h 培养后所生长的菌落数。用平板菌落计数测定水中细菌菌落总数，仅包括一群在营养琼脂上生长发育的嗜中温性需氧的和兼性厌氧的细菌菌落总数。

三、仪器与试剂

营养琼脂、高压蒸汽灭菌器、恒温培养箱、灭菌平皿、放大镜、灭菌采样瓶、灭菌刻度吸管、制备培养基用一般设备:量筒，三角烧瓶，pH 计或精密 pH 试纸等。

四、实验方法

检验程序，见下图所示：



操作步骤:

1. 检测细菌的水样采集与保存

1) 选择容量 500ml 的磨口带塞无色细口瓶, 在采样前必须洗净, 瓶口包扎后灭菌备用。

2) 按无菌操作采集水样, 采水量为瓶容量的 80% 左右, 以便检验时充分摇动, 使菌胶团分散。

3) 在采集加氯消毒水样时, 采样瓶应在消毒前, 按每 500ml 水样加入 1.5% 硫代硫酸钠溶液 2ml, 以中和水中的余氯, 终止氯的持续杀菌作用; 然后, 121℃ 高压灭菌 20min 备用。

4) 水样采集后, 应立即记录水样名称、时间、地点等项目, 从速检验, 一般不应超过 2h, 置冰箱保存时也不应超过 4h。

2. 水样的检测

1) 用力振摇水样 20~25 次, 以分散可能存在的菌胶团。

2) 以无菌操作法吸取 10ml 充分混匀的水样, 注入盛有 90ml 灭菌水的玻璃瓶中, 混匀成 1:10 稀释液。

3) 吸取 1:10 稀释液 1ml 注入盛有 9ml 灭菌水试管中, 混匀成 1:100 稀释液, 按同法依次稀释成 1:1000、1:10000 稀释液等备用。吸取不同浓度的稀释液时, 每次必须更换吸管。

4) 用 1ml 无菌吸管吸取 2~3 个适当浓度的稀释液 1ml, 分别注入无菌平皿中, 每个稀释度同时做 2 个平皿, 不同稀释度更换吸管。

5) 倾注约 15ml 已融化并冷却到 45℃ 左右的营养琼脂于上述平皿中, 并立即旋转平皿, 使水样与琼脂充分混匀。每次检验时另用一个平皿只倾注营养琼脂作空白对照。

6) 待平皿内琼脂冷却凝固后, 翻转平皿, 使底面向上, 置 37℃ 培养 24h。

3. 菌落计数

在记下各平板上的菌落数后, 应求出同一稀释度的平均菌落数, 供计算时使用。在求同一稀释度的平均数时, 若其中一个平板有较大片状菌落生长时, 则不宜计数, 应以没有片状菌落生长的平板计数平均菌落数。若片状菌落不到平板的一半, 而另一半中菌落分布均匀, 则可用计数一半平板上生长的菌落数乘 2, 代表整个平板上的菌落数。然后再求该稀释度的平均菌落数。

不同情况下的计算方法:

1) 首先选择平均菌落数在 30~300 之间者进行计算, 当只有一个稀释度的平均菌落数符合此范围时, 即以该平均菌落数乘以其稀释倍数报告。

2) 若有两个稀释度, 其平均菌落数均在 30~300 之间, 则应按两者菌落总数之比值来决定。若其比值小于 2, 应报告菌落的平均数; 若比值大于 2, 应报告其中较少的菌落。

3) 若所有稀释度的平均菌落数均大于 300, 则应该按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数报告。

4) 若所有稀释度的平均菌落数均小于 30, 则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告。

5) 若所有稀释度的平均菌落数均不在 30~300 之间, 则应以最接近 300 或 30 的平均菌落数乘以稀释倍数报告。

报告方式: 菌落数在 100 以内时, 按实有数报告; 大于 100 时, 采用两位有效数字乘以 10 的指数来表示。在两位有效数字后面的数值, 以四舍五入方法计算在报告菌落数为“无法计数”时, 应注明水样的稀释倍数。

表 2-1-1 检验结果记录:

稀释度	10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³	
	1	2	1	2	1	2
平板号						
菌落数						
平均菌落数						
菌落总数						

五、结果意义

细菌菌落总数用以说明水被有机物污染的程度。我国生活饮用水卫生标准中规定 1ml 生活饮用水中, 细菌菌落总数不得超过 100 个。

六、注意事项

1. 实验开始前, 应先将各稀释管、平皿做好标记, 包括: 稀释度、小组等。
2. 进行水样的稀释时, 吸管的更换: 每支吸管吹打混匀本稀释度的水样, 然后吸取 1ml 水样注入到下一支无菌水管后 (不要插入到无菌水中) 即弃去, 再用新的吸管在下一稀释度重复上述操作。
3. 倾注平板前注意琼脂的温度, 不要太烫和太凉, 否则使细菌烫伤和使琼脂凝固。预先融化的琼脂可放入 45℃ 水浴保温。
4. 37℃ 培养 24h 后, 做平板计数时, 可用肉眼观察, 必要时可用放大镜检查, 以防遗漏。

实验五 多管发酵法测定水中大肠菌群

一、实验目的

- 1、了解水中大肠菌群的检测意义。
- 2、熟悉水中大肠菌群的检测原理, 掌握多管发酵法检测大肠菌群的原理与技术方法。

二、实验原理

大肠菌群系指一群在 37℃ 培养 24h 能发酵乳糖、产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰阴性无芽孢杆菌。多管发酵法采用最大可能数 (most probable number, MPN) 的计数方法, 根据大肠菌群的定义, 将不同量的水样接种到含乳糖的培养基中, 经培养后根据阳性反应结果,

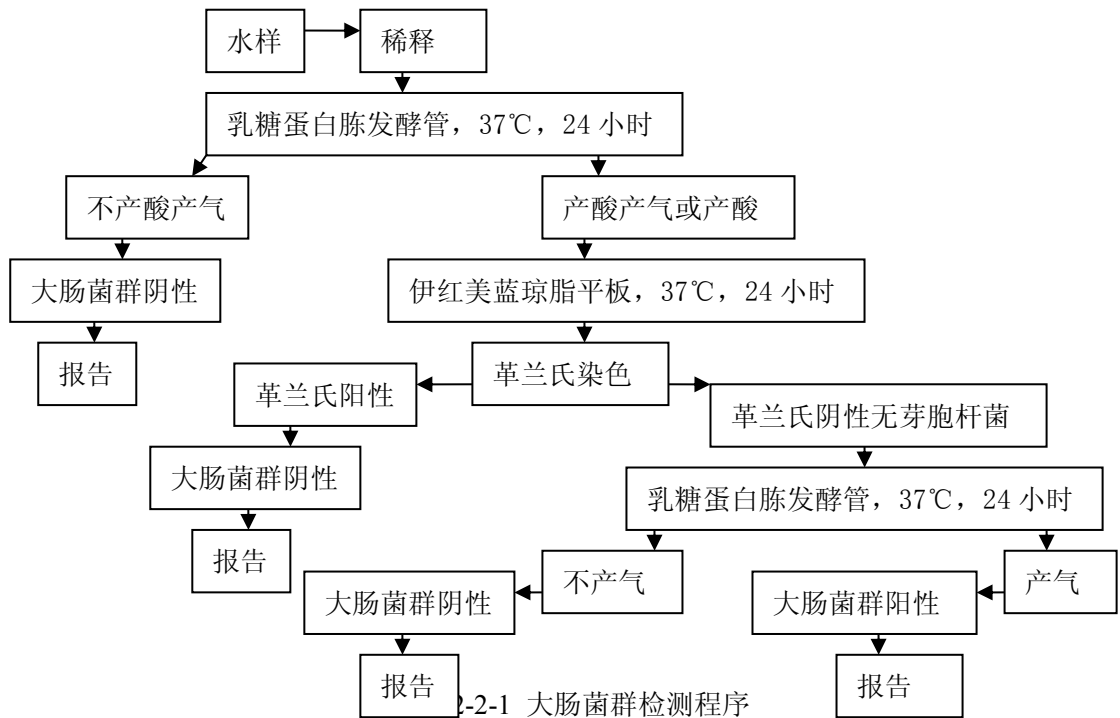
查相应的 MPN 表，可获得原水样中大肠菌群的数量。

三、实验材料

伊红美蓝平板、乳糖蛋白胨培养基、革兰染液、显微镜、无菌水、高压蒸汽灭菌器、恒温培养箱、灭菌采样瓶、灭菌刻度吸管、试管、小倒管、制备培养基用一般设备:量筒，三角烧瓶，pH 计或精密 pH 试纸等。

四、实验方法

1. 检验程序:



2. 操作步骤:

1) 将水样作 1: 10 及 1: 100 稀释。

2) 初步发酵试验: 分别吸取 1ml 1: 100 稀释水样, 1ml 1: 10 稀释水样及 1ml 原水样, 分别注入装有 10ml 乳糖蛋白胨培养液的试管中 (内有倒管), 每个浓度接种 5 份。混合后置于 37°C 恒温箱中培养 24 小时。

3) 平板分离: 经培养 24 小时后, 将初步发酵试验产酸产气及只产酸不产气的发酵管分别接种在伊红美蓝琼脂平板培养基上, 置 37°C 培养箱内培养 18~24h, 观察菌落形态, 挑选符合下述特征的可疑菌落涂片、革兰染色、镜检和进行复发酵试验: ① 深紫黑色, 具有金属光泽的菌落; ② 紫黑色, 不带或略带金属光泽的菌落; ③ 淡紫红色, 中心色较深的菌落;

4) 复发酵试验: 若挑取可疑菌落涂片镜检为革兰阴性无芽孢杆菌, 再接种于乳糖蛋白胨培养液 (内有倒管) 中, 每管可接种分离自同一初发酵管的最典型的菌落 1~3 个, 置 37°C 培养箱中培养 24h。有产酸产气 (不论倒管内气体的多少均为产气) 者, 即可证实有大肠菌群的存在。

查表报告结果：根据证实为大肠菌群阳性的管数，查 MPN 表 (见后页)，即可报告每 100 毫升水样中的总大肠菌群数。

五、结果意义

该菌群主要来源于人畜粪便，它基本包括了粪便内全部兼性需氧的革兰阴性杆菌，以埃希菌属为主，尚有柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、克雷伯菌属等。在成人每日粪便中，大肠菌群细菌数量极大，排菌数可达 $5\sim 10\times 10^{10}$ 个，是评价水体被粪便污染的指标菌，可用于评价饮用水的卫生质量。我国生活饮用水卫生标准为在 100ml 水中总大肠菌群不得检出。

六、注意事项

以下的大肠菌群 MPN 检索表，总接种量为 55.5 mL，其中 5 份 10 mL 水样，5 份 1mL 水样，5 份 0.1 mL 水样。如水样含菌量少，也可按 100，10，1mL 接种，那么实际 MPN 值应为表中的 MPN 值除以 10；反之如水样含菌量多，也可按 1，0.1，0.01mL 接种，那么实际 MPN 值应为表中的 MPN 值乘以 10。

表 2-2-1 菌群 MPN 检索表

接种量, mL				MPN/100m L	接种量, mL				MPN/100m L	接种量, mL				MPN/100m L
10	1	0.1			10	1	0.1			10	1	0.1		
0	0	0		0	1	0	0		2	2	0	0		5
0	0	1		2	1	0	1		4	2	0	1		7
0	0	2		4	1	0	2		6	2	0	2		9
0	0	3		5	1	0	3		8	2	0	3		12
0	0	4		7	1	0	4		10	2	0	4		14
0	0	5		9	1	0	5		12	2	0	5		16
0	1	0		2	1	1	0		4	2	1	0		7
0	1	1		4	1	1	1		6	2	1	1		9
0	1	2		6	1	1	2		8	2	1	2		12
0	1	3		7	1	1	3		10	2	1	3		14
0	1	4		9	1	1	4		12	2	1	4		17
0	1	5		11	1	1	5		14	2	1	5		19
0	2	0		4	1	2	0		6	2	2	0		9
0	2	1		6	1	2	1		8	2	2	1		12
0	2	2		7	1	2	2		10	2	2	2		14
0	2	3		9	1	2	3		12	2	2	3		17
0	2	4		11	1	2	4		15	2	2	4		19
0	2	5		13	1	2	5		17	2	2	5		22
0	3	0		6	1	3	0		8	2	3	0		12
0	3	1		7	1	3	1		10	2	3	1		14
0	3	2		9	1	3	2		12	2	3	2		17
0	3	3		11	1	3	3		15	2	3	3		20
0	3	4		13	1	3	4		17	2	3	4		22
0	3	5		15	1	3	5		19	2	3	5		25
0	4	0		8	1	4	0		11	2	4	0		15

0	4	1	9	1	4	1	13	2	4	1	17
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28
0	5	0	9	1	5	0	13	2	5	0	17
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32
接种量, mL MPN/100m				接种量, mL MPN/100m				接种量, mL MPN/100m			
10 1 0.1			L	10 1 0.1			L	10 1 0.1			L
3	0	0	8	4	0	0	13	5	0	0	23
3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	63
3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
3	1	4	23	4	1	4	36	5	1	4	110
3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	74
3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	94
3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
3	3	4	32	4	3	4	52	5	3	4	210
3	3	5	36	4	3	5	59	5	3	5	250
3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
3	4	1	24	4	4	1	44	5	4	1	170
3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430

3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	350
3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1600
3	5	5	45	4	5	5	81	5	5	5	> 1600

2. 应用 MPN 方法计数应注意：1) 菌液的稀释度要合适，原则是最低稀释度的所有重复都应有菌生长，而最高稀释度的所有重复无菌生长。2) 每个接种稀释度必须有重复，一般 3~5 个重复，重复越多，误差越小，不同重复数应查相应的 MPN 表计算结果。

3. 水样接种后需混匀

实验六 自然沉降法测定室内空气中细菌菌落总数

一、实验目的

- 1、了解空气中细菌菌落总数的测定意义与常用的方法，不同场所空气污染情况的测定。
- 2、熟悉自然沉降法测定空气中细菌菌落总数的原理。
- 3、掌握自然沉降法测定空气中细菌菌落总数的技术方法。

二、实验原理

自然沉降法是利用空气微生物粒子的重力作用，在一定时间内将微生物粒子收集到带有培养介质的平皿内，对在适宜温度下培养生长的菌落进行生物学观察和计数，能反映落下菌的数量，可用于大致了解环境空气微生物污染状况。

三、实验材料

高压蒸汽灭菌器、恒温培养箱、9cm 直径营养琼脂平板、制备培养基用一般设备：量筒，三角烧瓶，pH 计或精密 pH 试纸等。

四、实验方法

1. 根据现场的大小，选择有代表性的位置设采样点，离地高度为 1.2~1.5m。一般于室内四角及中央放平板各一块，于同一时间揭开皿盖，暴露放置 5min，盖上皿盖。
2. 平皿倒置，放 37℃ 培养 48h。
3. 计数 5 个平板菌落总数，结果以 cfu / 皿表示。

五、结果意义

自然沉降法能反映落下菌的数量，用落下菌推算悬浮菌量，在推理上有误差，偏少。可用于大致了解环境空气微生物污染状况。不适用于在有气流环境中使用；其采样效率普遍低于采样器法，但在脏环境采样效率较好，但难于测出空气中含菌量极少的菌类。

六、注意事项

1. 设置采样点时，应根据现场的大小，选择有代表性的位置作为空气细菌检测的采样

点。通常设置5个采样点，即室内墙角对角线交点为一采样点，该交点与四墙角连线的中点为另外4个采样点。室内面积小于10m³时，可设置3个采样点。采样高度为1.2 ~1.5m。采样点应远离墙壁1m以上，并避开空调、门窗等空气流通处。

2. 采样中打开平皿时，可将皿盖扣置于皿底之下，切忌皿盖向上暴露于空气中，影响采样结果。

3. 5人一组，一人一皿。不同组可选择采样地点：实验室、办公室、图书馆、食堂、医院门诊、寝室、教室、商店、理发店等，并对实验结果进行各采样点的比较。

实验七 粮食中霉菌的计数与鉴定

一、实验目的

- 1、了解粮食中霉菌存在的情况。
- 2、熟悉粮食中霉菌的分离、鉴定技术，掌握真菌的培养方法、常见产毒真菌的形态特点。

二、实验原理

粮粒的内部和外部均有大量霉菌存在，通过霉菌和酵母菌菌落总数的测定可反映粮食外部带菌情况，采用直接平板法可了解粮食内部霉菌侵染情况。

霉菌的鉴定主要依靠形态学特征，包括菌落的形态特征和菌丝、孢子的形态特征。霉菌的形态除菌种之间各有不同外，也常因发育的不同阶段、培养条件的不同而有较大差异。因此，对霉菌进行鉴定时，要选用标准培养基。一般鉴定青霉和曲霉用察氏琼脂培养基，镰刀菌和其他一些霉菌用马铃薯葡萄糖琼脂。

三、实验材料

小镊子，灭菌锥形瓶，灭菌试管，灭菌吸管，75%酒精，灭菌蒸馏水，高渗察培养基，灭菌刀以及灭菌平皿(直径9cm)，载玻片，盖玻片，接种钩针，分离针，察氏琼脂培养基，马铃薯葡萄糖琼脂，乳酸苯酚液等。

四、实验方法

1. 粮粒表面除菌：为了分离侵染粮粒内部的霉菌，在分离培养前，必须将附在粮粒表面的霉菌除去，粮粒表面除菌的方法是采用无菌水多次洗涤的方法。取粮食样品10~20g放入灭菌的150ml锥形瓶中，以无菌技术，加入无菌水超过粮粒1~2cm左右，塞好棉塞充分振荡1~2min。将水倒净，再换水振荡，如此反复洗涤10次，最后将水弃去。将粮粒倒在无菌平皿中备用。如为原粮(如玉米、小麦等)须事先用75%酒精浸泡1~2min，以脱粮粒表面的蜡质。倾去酒精后，再用无菌水洗涤粮粒。

2. 粮粒接种方法：

1)粮粒直接接种法：粮粒内部的霉菌分离主要应用此法。以无菌操作，用灭菌镊子将上述表面除菌的粮粒，胚部向下按等距离排列接种在高渗察琼脂平板上，接种时需将粮粒一部

分插入培养基中。每块平板大粒(玉米、大豆等)者接种 5 粒,小粒者接种 10 粒,每份样品共接种 50~100 粒。接种完毕后,立即置 28℃恒温箱中培养一周。

2)粮粒切开接种法:此法多用于大粒粮食如玉米、大豆、花生米等的直接接种。因为大粮粒在培养期间可能出现由于粮粒发芽顶开皿盖,而使培养物遭到污染。切开接种法即粮粒洗涤后先放在无菌容器内,用灭菌刀或剪将粮粒切成两半或只切取其胚部,再用灭菌镊子将半颗粮粒或其种胚接种在琼脂平板上,使粮粒的切面紧贴附于培养基,置 28℃恒温箱中培养一周。

3. 粮粒培养霉菌菌落的检查:在培养期间应随时观察并标记 50~100 粒粮粒中生长霉菌的粮粒和菌落,最后计算出受霉菌侵染的粒数即侵染率和菌落数。

4. 粮粒培养霉菌的鉴定:将从粮食中初步分离出来的霉菌菌落,点植于标准培养基平板上。每个平板接种一个或三个菌落(青霉、曲霉点种三点,镰刀菌点种一点)。方法是将平板翻转,倒置接种。置 25~28℃恒温箱中培养,每隔一定时间进行观察记录。

1)菌落观察内容包括:

生长速度:培养一定天数(5d、10d 和 14d),以菌落直径表示;描述时也可用“生长极慢”、“慢”、“中等”、“快”加以说明。

菌落颜色:表面(气生菌丝、子实体、菌核)和营养菌丝的颜色及变化以及菌落反面的颜色及变化。

菌落质地:绒状、絮状、绳状、粉粒状和束状。

菌落表面:疏松或紧密、扁平或隆起、边缘是否整齐、表面有无放射状沟纹或同心环。

气味:如“霉味”或“芬芳”以及其他特殊气味。

2)制片镜检:在载玻片中央加一滴乳酸苯酚液,用接种针钩取一小块霉菌培养物置液滴中,再用两支接种针小心地将培养物撕成小块,不要研磨,以防霉菌结构破坏,然后加上盖玻片。如有气泡,可将载玻片稍加热排除。制片时最好在无菌箱中操作,以防孢子飞扬。首先用低倍镜观察菌丝和孢子形态特征,然后换高倍镜。

3)根据菌落形态及镜检结果,参照霉菌鉴定检索表,鉴定到属或种。

五、结果意义

真菌在自然界分布极广,种类繁多,几乎无处不在,因此经常污染粮食、食品和饲料。全世界每年平均有 2%的谷物因发生霉变而不能食用,造成巨大的经济损失,而且有些产毒真菌可以产生真菌毒素,引起人畜中毒。有些毒素具有强烈的致癌性,可使实验动物产生癌症。经过霉菌和酵母菌数测定及粮食内部霉菌的分离,可初步判断粮食被霉菌和酵母菌污染的情况。通过鉴定粮食中污染霉菌的种类,了解是否有产毒霉菌的存在。粮食中常见的产毒霉菌有青霉、曲霉和镰刀菌。

六、注意事项

1. 霉菌培养应用专用培养箱,培养温度在 25~30℃之间对结果影响不大。为尽快得到

结果，我们以 27℃ 为培养温度。菌落计数应于培养后的 72 小时进行第一次观察。这时主要是观察那些密集生长的平皿，以免到第五天之后，菌落生长成片而难以计数。

2. 实验时手脚要快，动作宜轻。观察平板时，动作稍重，生长快速的霉菌孢子就会在培养基内扩散，导致二次污染，结果读数异常。特别是翻转平板进行培养，观察时再转过来，特别容易导致孢子飞散。一般以第五天的读数为最终计数，但观察应持续七天。

3. 由于霉菌和酵母菌落较大，光线正常时可以方便地计数。选择那些霉菌数为 10~100 个之间的平皿计数，而不是象细菌的 30~300 个。10~50 个菌落的平皿也可以。

4. 考虑到霉菌孢子容易飞散而造成污染，霉菌和酵母检验应在单独的实验室中进行。尽量保持实验室安静，减少空气流动。