

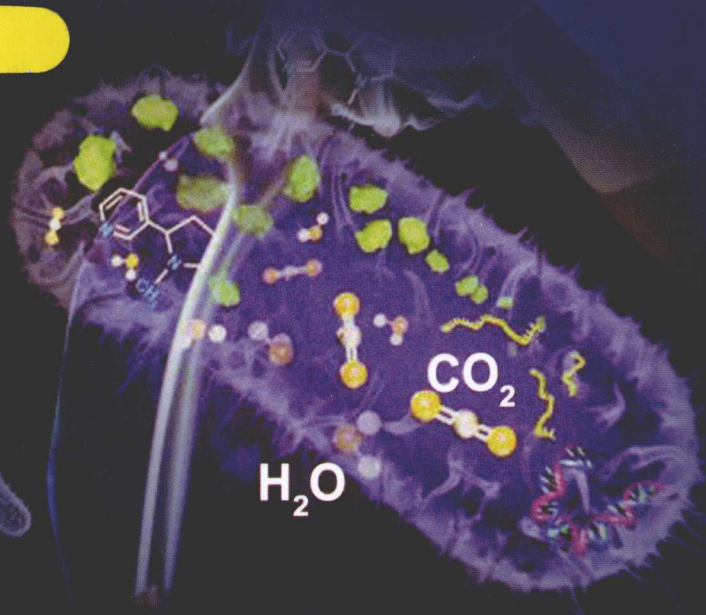


普通高等教育“十二五”规划教材

微生物学实验

(第二版)

主编 赵斌 林会 何绍江



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

微生物学实验

(第二版)

赵斌 林会 何绍江 主编

—

—

—

—

—

—

—

主编：赵斌、林会、何绍江

副主编：王德成、王德成、王德成

编委：王德成、王德成、王德成

王德成、王德成、王德成

王德成、王德成、王德成

王德成、王德成、王德成

王德成、王德成、王德成

科学出版社

北京

内 容 简 介

微生物学是实践性很强的学科,微生物学实验技术是该学科的重要内容。本书由长期从事微生物教学、科研工作的教师编写,总结了编者多年的实验教学经验和科研成果。本书包括 93 个实验,共分六大部分:①微生物的形态学研究方法,介绍微生物的制片、染色及形态观察;②微生物的纯培养技术,介绍几种常用培养基的配制、灭菌及微生物接种技术;③微生物的营养及环境条件,介绍微生物的培养及生长条件;④微生物的分离与纯化,介绍微生物的分离、纯化、形态鉴定、生理生化鉴定和分子鉴定操作技术;⑤微生物育种技术与菌种保藏,介绍微生物的遗传、育种、菌种保藏实验操作方法;⑥应用微生物实验,包括不同环境中(土壤、水体、食品)微生物的检测、微生物细胞的荧光标记、酶活性检测等研究技术,培养学生的综合实践能力。

本书可作为高等院校生命科学、微生物学、生物技术、生物工程、资源环境及植物病理学等专业的教学用书,也可作为研究生和相关研究人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验/赵斌,林会,何江江主编. —2版. —北京:科学出版社,2014

普通高等教育 规划教材

ISBN 978-7-03-040239-4

I. ①微… II. ①赵… ②林… ③何… III. ①微生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 048950 号

责任编辑:吴美丽 / 责任校对:宣 慧
责任印制:阎 磊 / 封面设计:迷底书装

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

http://www.sciencep.com

化学工业出版社印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2002 年 8 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2014 年 5 月第 二 版 印张:15 1/2

2014 年 5 月第一次印刷 字数:406 000

定价:30.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

第二版前言

第一版《微生物学实验》自2002年出版以来,经过多次印刷,印数已经达数万册。本书在微生物学的教学、实验指导和研究生参阅等方面起了重要作用并产生了积极影响。但是近年来,微生物学的实验技术和方法有了许多新的进展,为了适应学科的发展和教学改革的要求,不断提升学生动手能力、自主分析问题与解决问题的能力,我们对本书的结构和内容进行了适当的调整和修订。

第一,使一些领域的内容更全面。例如,在“微生物的分离与纯化”部分增加了“厌氧细菌的分离培养”、“土壤中纤维素分解菌的分离培养”、“土壤中有机磷农药降解菌的分离”和“土壤中丛枝菌根真菌的筛选分离”;在“微生物的营养与环境条件”部分增加了“微生物的拮抗实验”;在“微生物的分离与纯化”部分增加了“微生物分子鉴定”内容,在“应用微生物学实验”部分增加了“食品中沙门氏菌的检测”等实验内容。

第二,使实验内容的结构更完善,条理更清晰。在“微生物的分离与纯化”部分增加了形态鉴定和分子鉴定等内容,并将该部分技术按照细菌、放线菌、真菌、藻类、原生动物的顺序做了梳理调整。将微生物的生理鉴定原有的19个实验整合为3个部分,即“微生物对含碳化合物的分解和利用”、“微生物对含氮化合物的分解和利用”、“微生物的产酶实验”。在分子鉴定方面,将原来微生物遗传学实验中的DNA提取、琼脂糖凝胶电泳、DNA回收、感受态细胞的制备与转化等内容进行了调整融合,使本教材内容更为紧凑,编排更为合理,条理更加清楚。

第三,注重与实际应用结合和与其他学科交叉。对第一版中用得较少或已有新方法替代的传统实验内容进行删除,增加了新技术的介绍。例如,在微生物鉴定部分引入了“利用BIOLLOG系统进行微生物的分类鉴定”,“应用微生物实验”部分增加了“环境微生物细胞的固定化技术”、“产蛋白酶和淀粉酶芽孢杆菌的分离和酶活力检测”、“利用PCR-DGGE方法对土壤微生物群落多样性的检测”等内容,菌种保藏技术也增添了新的操作方法。

第四,注重学生综合能力的提升。在实验内容安排上,既注重训练学生基本技能的基础性实验,也重视培养学生分析问题、解决问题和实际动手能力的综合性实验。这些实验内容涵盖了微生物在农业、工业、食品、环境及医学等方面的应用技术,有利于学生的自主学习、综合训练和课余科研。

参加本书编写的成员均是长期从事微生物实验教学的教师,都具有丰富的教学经验。本书的主编是赵斌、林会和何绍江。参加编写的有郑世学、陈大松。在本书第二版即将问世之际,我们向曾在本书第一版中作出重要贡献的老师致以衷心的感谢和敬意!

由于编者水平有限,书中的不足在所难免,敬请各位同仁和读者提出宝贵意见。

编者

2014年1月

第一版前言

在当代生命科学研究中,微生物学实验技术既是生命科学中的独立技术,又是分子生物学、动植物育种学的基础。微生物的纯培养技术已广泛用于组织培养、细胞培养。随着分子生物学的发展,各学科间的交叉和渗透,又大大地丰富了微生物学实验技术的内容,在当今生命科学中,微生物的实验技术和方法正在生命科学各个领域发挥着它独特的作用。

华中农业大学微生物学科在陈华癸院士的带领下,经过几代人的努力,已成为全国独树一帜的微生物学国家重点学科。1962年,陈华癸教授主编出版了《微生物学实验》(中国农业出版社),1996年陈华癸的学生李卓棣、喻子牛、何绍江又主编出版了《农业微生物学实验技术》(中国农业出版社),这两本书对推动我国微生物学的发展作出了积极的贡献。两书除了介绍微生物学的基本实验技能——显微镜的使用、微生物制片染色和微生物的纯培养技术外,内容侧重于农业应用微生物实验技术,包括土壤微生物研究法、杀虫微生物技术、农用抗生素技术、食品微生物技术、食用菌栽培技术及植病研究法等。

随着教学改革的深入发展,农科院校的微生物学实验教学已不再局限于农业微生物领域,在全国专业目录调整后,为了适应生命科学、生物技术、生物工程专业教学需要,在科学出版社的支持下,我们编写了此书。

本书的内容重点注重微生物学的基本实验技术,包括显微镜的使用技术、微生物形态观察的制片染色技术、微生物细胞大小测定与计数技术和微生物的纯培养技术、微生物的分离鉴定技术。本书内容介绍了微生物的最新研究技术,包括细菌的转化、转导、原生质体融合、质粒快速检测、DNA的PCR扩增、发光酶基因标记技术等。本书内容兼顾了微生物的应用技术,包括酸乳制作、细胞固定化、食用菌栽培、根瘤菌和菌根应用等。

编写本书的宗旨是,本书既是本科生的实验教科书,又是研究生的参考书。本着每个实验都有可操作性的原则,我们邀请了部分高校长期从事教学、科研工作的教授、博士参与了本书的编写。何绍江编写第一部分的显微镜技术、微生物的形态观察和附录;赵斌编写第二部分纯培养技术;唐明编写第三部分微生物的营养实验和第一部分中的微生物细胞的大小测定与计数;谭周进编写第四部分中微生物纯培养的分离与纯化;李玉祥编写第四部分中细菌纯培养鉴定实验;戴经元编写细菌的血清学鉴定。微生物的遗传学实验由胡福荣、马向东、吴坤、陈大松编写;应用微生物实验由刘四新、陈大松、郑世学、戴经元编写。全书由何绍江统稿,赵斌审阅定稿。非常感谢周俊初教授审阅全书并做了仔细的修改。

由于编者水平有限,错误在所难免,敬请读者谅解并提出宝贵意见。

编者

2002年7月15日

目 录

第一部分 微生物的形态学研究方法

I 微生物的形态观察	1
一、细菌的形态观察	1
实验一 普通光学显微镜的使用及活细菌观察	1
实验二 细菌的简单染色和革兰氏染色	5
实验三 细菌的荚膜染色	8
实验四 细菌的芽孢染色	10
实验五 细菌的鞭毛染色(附细菌的运动性观察)	11
实验六 蓝细菌的培养与观察	15
二、放线菌形态观察	16
实验七 用玻璃纸琼脂平板透析培养法观察放线菌形态	16
实验八 用插片培养法观察放线菌的形态	16
实验九 放线菌的印片染色法	17
三、真菌的形态观察	18
实验十 霉菌形态及无性孢子的观察	18
实验十一 霉菌封闭标本的制备	19
实验十二 霉菌接合孢子的培养与观察	20
实验十三 酵母菌子囊孢子的培养与观察	21
实验十四 伞菌担子和担孢子的压片观察	22
实验十五 镰刀菌分生孢子的培养与观察	22
四、病毒的形态观察	23
实验十六 昆虫病毒多角体的染色与观察	23
实验十七 噬菌斑的培养与观察	24
五、藻类和原生动物的形态观察	25
实验十八 衣藻和水绵的形态观察	25
实验十九 草履虫和眼虫的培养与观察	27
实验二十 变形虫的培养与观察	28
II 微生物的大小与数量测定	30
实验二十一 微生物细胞大小的测定	30
实验二十二 微生物细胞的显微直接计数法	32
实验二十三 稀释平板测数法	34
实验二十四 稀释培养计数	36
实验二十五 比浊法测定大肠杆菌的生长曲线	39

第二部分 微生物的纯培养技术

I 培养基的制备	41
一、培养基的配制方法	41
二、几种常用培养基的配制	43
实验二十六 牛肉膏蛋白胨培养基的制备	43
实验二十七 高氏一号合成培养基的制备	44
实验二十八 马丁-孟加拉红培养基的制备	45
实验二十九 马铃薯蔗糖琼脂培养基的制备	46
实验三十 土壤浸出液培养基的制备	47
实验三十一 麦芽汁培养基和米曲汁培养基的制备	48
实验三十二 明胶培养基的制备	49
实验三十三 石蕊牛乳培养基的制备	49
II 灭菌和消毒	51
一、干热灭菌法	51
二、湿热灭菌法	52
三、过滤除菌	57
四、紫外线杀菌	58
五、化学药剂消毒杀菌	58
III 微生物接种技术	60
一、接种前的准备工作	60
二、几种常用的接种技术	62

第三部分 微生物的营养与环境条件

实验三十四 营养元素对微生物生长的影响	65
实验三十五 氧气对微生物生长的影响	66
实验三十六 温度对微生物生长的影响	66
实验三十七 pH 对微生物生长的影响	67
实验三十八 紫外线杀菌实验	68
实验三十九 化学药剂对微生物的作用	70
实验四十 微生物的拮抗实验	71
实验四十一 微生物的耐盐性实验	71

第四部分 微生物的分离与纯化

I 微生物纯培养分离纯化的一般方法	73
实验四十二 土壤中好气性细菌的分离与计数（附划线分离法）	73
实验四十三 厌氧细菌的分离培养	75
实验四十四 土壤中纤维素分解菌的分离培养	76
实验四十五 土壤中的固氮菌的分离培养	78
实验四十六 豆科植物根瘤中根瘤菌的分离	79
实验四十七 死虫中苏云金芽孢杆菌的分离	80
实验四十八 土壤中有机磷农药降解菌的分离	81

实验四十九	土壤中放线菌的分离与计数	82
实验五十	土壤中真菌的分离与计数	83
实验五十一	酒曲中酵母菌的分离	84
实验五十二	担子菌的弹射分离	84
实验五十三	土壤中丛枝菌根真菌的筛选分离	85
实验五十四	自然环境中噬菌体的分离	86
实验五十五	土壤中藻类的分离	87
实验五十六	土壤中原生动物的分离	89
II	微生物的形态鉴定方法	91
实验五十七	各类微生物菌落的识别	91
III	微生物的生理鉴定常规实验	93
实验五十八	微生物对含碳化合物的分解和利用	93
	唯一碳源实验	93
	糖、醇、糖苷类碳源的分解实验	93
	淀粉水解实验	94
	纤维素分解实验	95
	果胶分解实验	96
	油脂水解实验	96
	甲基红 (M. R.) 实验	97
	乙酰甲基甲醇 (V. P.) 实验	97
	柠檬酸盐实验	98
实验五十九	微生物对含氮化合物的分解和利用	99
	唯一氮源实验 (无机氮)	99
	明胶液化实验	100
	石蕊牛乳实验	100
	产氨实验	101
	产硫化氢实验	102
	硝酸盐还原实验	103
	吲哚实验	104
实验六十	微生物的产酶实验	105
	过氧化氢酶实验	105
	苯丙氨酸脱氨酶实验	106
	卵磷脂酶实验	106
实验六十一	利用 BIOLOG 系统进行微生物的分类鉴定	107
IV	微生物的血清学鉴定	110
实验六十二	抗血清制备	110
实验六十三	直接凝集反应	112
实验六十四	免疫电泳	115
实验六十五	双向免疫扩散	116
V	微生物的分子鉴定	118
实验六十六	细菌总 DNA 的提取	118
实验六十七	PCR 扩增细菌 16S rRNA 序列	119

实验六十八	细菌 16S rRNA 序列的克隆	121
-------	-------------------	-----

第五部分 微生物育种技术和菌种保藏

实验六十九	三亲本杂交	124
实验七十	细菌的专性转导	125
实验七十一	细菌的转座突变	129
实验七十二	细菌的互补测验	130
实验七十三	大肠杆菌的中断杂交实验	131
实验七十四	紫外线诱变技术及营养缺陷型突变株的筛选	134
实验七十五	亚硝酸诱变技术及乳糖发酵突变株的筛选	137
实验七十六	原生质体融合	139
实验七十七	脉孢菌的分离和交换	141
实验七十八	微生物菌种保藏	143

第六部分 应用微生物实验

实验七十九	豆科植物根瘤的固氮酶活性测定	150
实验八十	根瘤菌的荧光标记及检测	152
实验八十一	泡囊丛枝状菌根的染色	154
实验八十二	苏云金芽孢杆菌杀虫剂的生物测定	155
实验八十三	抗生素的效价测定(管碟法)	158
实验八十四	棉铃虫核多角体病毒的室内培养及效价测定	160
实验八十五	乙醇发酵(附巴斯德效应)	162
实验八十六	乳酸发酵	165
实验八十七	酸奶制作	166
实验八十八	水中细菌总数和大肠菌群的检测	168
实验八十九	食品中菌落总数和大肠菌群的检测	175
实验九十	食品中沙门氏菌的检测	179
实验九十一	环境微生物细胞的固定化技术	184
实验九十二	产蛋白酶和淀粉酶芽孢杆菌的分离和酶活力检测	185
实验九十三	利用 PCR-DGGE 方法对土壤微生物群落多样性的检测	188

主要参考文献	194
--------	-----

附录一	微生物实验课常用玻璃器皿的清洁法	195
附录二	教学常用菌种	198
附录三	常用培养基配方	200
附录四	常用染色液的配制	222
附录五	缓冲液的配制	227
附录六	常用试剂和指示剂的配制	232
附录七	微生物混浊度计数法麦兰云度计的配制与菌数对照表	235
附录八	几种法定单位的名称与换算	236
附录九	最大或然数统计表	238

微生物的形态学研究方法

I 微生物的形态观察

一、细菌的形态观察

实验一 普通光学显微镜的使用及活细菌观察

(一) 实验目的

- (1) 学习普通光学显微镜的结构、各部分的功能和使用方法。
- (2) 学习并掌握活细菌形态的观察方法。

(二) 实验原理

1. 显微镜的构造及原理

普通光学显微镜是以日光或电灯灯光作为光源的一种显微镜,被观察的物体通过物镜和目镜的两次放大可将物体放大 1500~2000 倍。

1) 普通光学显微镜的构造

普通光学显微镜的构造可分为两大部分:一为机械装置,一为光学系统,这两部分很好地配合,才能发挥显微镜的作用。

普通光学显微镜的机械装置包括镜座、镜筒、物镜转换器、载物台、推动器、粗调焦手轮、微调焦手轮等部件(图 1-1-1)。

普通光学显微镜的光学系统由反光镜、聚光器、物镜、目镜等组成(图 1-1-1),现在比较好的显微镜没有反光镜,镜座下装有电光源,通常为 15W 的卤钨灯。光学系统使物体放大,形成物体放大像。

2) 光学显微镜的成像原理

显微镜的放大是通过透镜来完成的,单透镜成像具有像差,影响像质。由单透镜组合而成的透镜组相当于一个凸透镜,放大作用更好。图 1-1-2 是显微镜的成像原理模式图。 $A''B''$ 和眼睛的距离为显微镜的明视距离。它的成像原理是:标本 AB 的像经过 L_o (物镜) 后到 $A'B'$ 处成为一个放大倒立的实像(中间像), F 为 L_o 的后焦点。当光线传到 L_e (目镜) 时,在 $A''B''$ 处 $A'B'$ 被放大成一个正立的虚像,然后传递到视网膜上,标本 AB 就被放大了,人眼看到的是 AB 被放大后的虚像,与原样品像的方向是相反的。



图 1-1-1 普通光学显微镜的构造

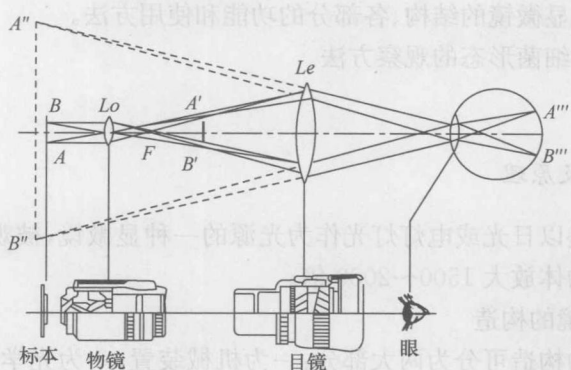


图 1-1-2 显微镜的成像原理图

3) 光学显微镜的性能

显微镜分辨能力的高低决定于光学系统的各种条件。被观察的物体必须放大率高,而且清晰。物体放大后,能否呈现清晰的细微结构,首先取决于物镜的性能,其次取决于目镜和聚光镜的性能。

A. 数值孔径

也称为镜口率(或开口率),简称为 NA,在物镜和聚光器上都标有它们的数值孔径,数值孔径是物镜和聚光器的主要参数,也是判断它们性能的最重要指标。数值孔径和显微镜的各种性能有密切的关系,它与显微镜的分辨力成正比,与焦深成反比,与镜像亮度的平方根成正比。

数值孔径可用下式表示:

$$NA = n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}$$

式中, n ——物镜与标本之间的介质折射率;

α ——物镜的镜口角。

所谓镜口角是指从物镜主光轴上的物点发出的光线与物镜前透镜有效直径的边缘所张的角度(图 1-1-3)。

镜口角 α 总是小于 180° , 所以 $\sin\alpha/2$ 的最大值小于 1。因为空气的折射率为 1, 所以干燥物镜的数值孔径总是小于 1, 一般为 $0.05 \sim 0.95$; 油浸物镜如用香柏油(折射率为 1.515)浸没, 则数值孔径最大可接近 1.5(图 1-1-4)。虽然理论上数值孔径的极限等于所用浸没介质的折射率, 但实际上从透镜的制造技术看, 是不可能达到这一极限的。通常在实用范围内, 高级油浸物镜的最大数值孔径是 1.4。

几种物质的介质折射率如下: 空气为 1.0, 水为 1.33, 玻璃为 1.5, 甘油为 1.47, 香柏油为 1.52。

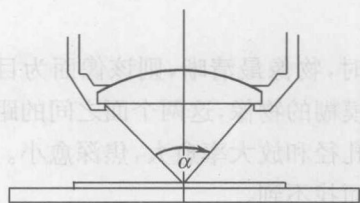


图 1-1-3 物镜的镜口角

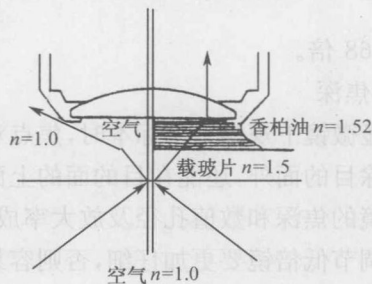


图 1-1-4 介质折射率对光线通路的影响

B. 分辨力

分辨力是指分辨物体细微结构的能力。分辨力与能够分辨出的物体两点间的最短距离 (D) 有关。而 D 又和 $1/2$ 波长 (λ) 及物镜的数值孔径有关。因为光波只能对比其波长较长的物体造像, 所以若某个物体小于 $1/2$ 波长, 光线可绕过该物体, 不能造像。

D 可用下式表示:

$$D = \frac{\lambda}{2} \cdot NA$$

可见光的波长为 $0.4 \sim 0.7 \mu\text{m}$, 平均波长为 $0.55 \mu\text{m}$ 。若用数值孔径为 0.65 的物镜, 则 $D = 0.55 \mu\text{m} / (2 \times 0.65) = 0.42 \mu\text{m}$, 这表示被检物体在 $0.42 \mu\text{m}$ 以上时可被观察到, 若小于 $0.42 \mu\text{m}$ 就不能视见。如果使用数值孔径为 1.25 的物镜, 则 $D = 0.22 \mu\text{m}$ 。凡被检物体长度大于这个数值, 均能视见。由此可见, D 值愈小, 分辨力愈高, 物像愈清楚。根据上式, 可通过以下方法来提高显微镜的分辨力: ①减小波长; ②增大折射率; ③加大镜口角。紫外线作光源的显微镜和电子显微镜就是利用短光波来提高分辨力以检视较小的物体的。物镜分辨力的高低与造像是否清楚有密切的关系, 目镜没有这种性能, 目镜只放大物镜所造的像。

C. 放大率

显微镜放大物体, 首先经过物镜第一次放大物像, 目镜在明视距离造成第二次放大像。放大率就是放大物像和原物体两者大小之比例。因此, 显微镜的放大率 (V) 等于物镜放大率 (V_1) 和目镜放大率 (V_2) 的乘积, 即

$$V = V_1 \times V_2$$

比较精确的计算方法, 可从下列公式求得

$$M = \frac{\Delta}{F_1} \times \frac{S}{F_2}$$

式中, F_1 ——物镜焦距;

F_2 ——目镜焦距；

Δ ——光学筒长；

S ——明视距离(=250mm)；

$\frac{\Delta}{F_1}$ ——物镜的放大倍数；

$\frac{S}{F_2}$ ——目镜放大倍数；

M ——显微镜放大倍数。

设 $\Delta=160\text{mm}$, $F_1=4\text{mm}$, $S=250\text{mm}$, $F_2=15\text{mm}$; 则 $M=\frac{\Delta}{F_1} \times \frac{S}{F_2} = \frac{160}{4} \times \frac{250}{15} = 40 \times$

$16.7=668$ 倍。

D. 焦深

在显微镜下观察一个标本时,焦点对在某一像面时,物像最清晰,则该像面为目的面。在视野内除目的面外,还能在目的面的上面和下面看见模糊的物像,这两个面之间的距离称为焦深。物镜的焦深和数值孔径及放大率成反比,即数值孔径和放大率愈大,焦深愈小。因此调节油镜比调节低倍镜要更加仔细,否则容易使物像滑过而找不到。

2. 活细菌的观察

芽孢杆菌在自然界中分布广泛,具有耐高温的特性。利用高温加热的方法,可以将稻草中的枯草芽孢杆菌分离出来。

微生物的细胞在显微镜下是透明的,不易观察。因此在观察时应减弱光照、增加反差,才能获得较好的效果,如果光照很强,细菌和周围的液体的差别就难以辨识。

(三) 实验材料

(1) 材料:稻草、无菌水。

(2) 试剂:香柏油、二甲苯。

(3) 器材:三角瓶、显微镜、废液缸、洗瓶、凹载玻片、接种杯、酒精灯、擦镜纸。

(四) 实验方法

1. 制备菌液

(1) 称取 10g 稻草,将其剪碎,加入已装有 200mL 无菌水的三角瓶中,浸泡 2h。

(2) 将其煮沸 30min 后,37℃ 培养 24h。

(3) 取 1mL 液体于 9mL 无菌水中,制成菌悬液。

2. 涂凡士林

取洁净无油的盖玻片一块,在其四周涂少量的凡士林。

3. 滴加菌液

加 1 滴菌液于盖玻片中央,并用记号笔在菌液的边缘做一记号,以便显微镜观察时,易于寻找菌液的位置。

4. 盖凹玻片

将凹玻片的凹槽对准盖玻片中央的菌液,并轻轻地盖在盖玻片上,使两者粘在一起,然后翻转凹玻片,使菌液正好悬在凹槽的中央,再用铅笔或火柴棒轻压盖玻片,使玻片四周边缘闭合,以防菌液干燥(图 1-1-5)。



图 1-1-5 细菌悬滴制片法

若制水封片,在载玻片上滴加 1 滴菌液,盖上盖玻片后即可置显微镜下观察。

5. 显微镜观察

(1) 低倍镜观察:将制好的涂片置于载物台上,用玻片夹夹住,移动推动器,使观察对象处于通光孔中央。旋转粗调焦手轮,使 $10\times$ 物镜下降,直至接近玻片。双眼通过目镜观察,旋转粗调焦手轮,使 $10\times$ 物镜缓缓上升,标本在视野中初步聚焦。再调节微调焦手轮至物像清晰。通过调节推动器,慢慢移动玻片,找到合适的观察目标。

(2) 高倍镜的观察:在低倍镜下找到合适的观察目标并将其移至视野中心后,轻轻转动物镜转换器,将高倍镜转换至对准通光孔。对聚光器光圈及视野亮度进行适当调节,使视野内光线均匀,亮度适宜。调节微调焦手轮,使物像清晰。

(五) 实验作业

(1) 仔细观察所看到的活细菌的形态,并绘出其形态图。

(2) 利用显微镜观察活细菌时,应注意哪些问题?

实验二 细菌的简单染色和革兰氏染色

(一) 实验目的

学习细菌的简单染色和革兰氏染色法。

(二) 实验原理

用于生物染色的染料主要有碱性染料、酸性染料和中性染料三大类。碱性染料的离子带正电荷,能和带负电荷的物质结合。因为细菌蛋白质等电点较低,当它生长于中性、碱性或弱酸性的溶液中时常带负电荷,所以通常采用碱性染料(如美蓝、结晶紫、碱性复红或孔雀绿等)使其着色。酸性染料的离子带负电荷,能与带正电荷的物质结合。当细菌分解糖类产酸使培养基 pH 下降时,细菌所带正电荷增加,因此易被伊红、酸性复红或刚果红等酸性染料着色。中性染料是碱性染料和酸性染料的结合物,又称复合染料,如伊红美蓝、伊红天青等。

简单染色法是只用一种染料使细菌着色以显示其形态,简单染色不能辨别细菌细胞的构造。

革兰氏染色法是 1884 年由丹麦病理学家 C. Gram 所创立的。革兰氏染色法可将所有的细菌区分为革兰氏阳性(G^+)菌和革兰氏阴性(G^-)菌两大类,是细菌学上最常用的鉴别染色法。

该染色法之所以能将细菌分为 G^+ 菌和 G^- 菌,是由这两类菌的细胞壁结构和成分的不同

所决定的。 G^- 菌的细胞壁中含有较多易被乙醇溶解的类脂质,而且肽聚糖层较薄、交联度低,故用乙醇或丙酮脱色时溶解了类脂质,增加了细胞壁的通透性,使初染的结晶紫和碘的复合物易于渗出,结果细菌就被脱色,再经番红复染后就成了红色。 G^+ 菌细胞壁中肽聚糖层厚且交联度高,类脂质含量少,经脱色剂处理后反而使肽聚糖层的孔径缩小,通透性降低,因此细菌仍保留初染时的紫色。

(三) 实验材料

(1) 活材料:培养 12~16h 的苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、培养 24h 的大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

(2) 染色液和试剂:结晶紫(附录四中 3)、卢哥氏碘液(附录四中 4)、95%乙醇、番红(附录四中 5)、复红(附录四中 2)、二甲苯、香柏油。

(3) 器材:废液缸、洗瓶、载玻片、接种杯、酒精灯、擦镜纸、显微镜。

(四) 实验方法

1. 简单染色

(1) 涂片:取干净载玻片一块,在载玻片的左、右各加 1 滴蒸馏水,按无菌操作法取菌涂片,左边涂苏云金杆菌,右边涂大肠杆菌,做成浓菌液。再取干净载玻片一块将刚制成的苏云金杆菌浓菌液挑 2~3 环涂在左边制成薄的涂面,将大肠杆菌的浓菌液取 2~3 环涂在右边制成薄的涂面。也可直接在载玻片上制薄涂面,注意取菌不要太多。

(2) 晾干:让涂片自然晾干或者在酒精灯火焰上方文火烘干。

(3) 固定:手执玻片一端,让菌膜朝上,通过火焰 2~3 次固定(以不烫手为宜)。

(4) 染色:将固定过的涂片放在废液缸上的搁架上,加复红染色 1~2min。

(5) 水洗:用水洗去涂片上的染色液。

(6) 干燥:将洗过的涂片放在空气中晾干或用吸水纸吸干。

(7) 镜检:先低倍观察,再高倍观察,并找出适当的视野后,将高倍镜转出,在涂片上加香柏油 1 滴,将油镜头浸入油滴中仔细调焦观察细菌的形态。

2. 革兰氏染色

革兰氏染色的操作程序为:涂片→干燥→固定→结晶紫染色 1min→水洗→碘液媒染 1min→水洗→95%乙醇脱色 20~25s→立即水洗→番红复染 5min→水洗→晾干或吸水纸吸干(图 1-1-6)。

(1) 涂片:取干净载玻片一块,在载玻片的左、右各加 1 滴蒸馏水,按无菌操作法取菌涂片,左边涂苏云金杆菌,右边涂大肠杆菌,做成浓菌悬液。再取干净载玻片一块,将刚制成的苏云金杆菌浓菌液挑 2~3 环涂在左边制成薄的涂面,将大肠杆菌的浓菌液取 2~3 环涂在右边制成薄的涂面。也可直接在载玻片上加水制薄涂面,但取菌不要太多。

(2) 晾干:让涂片自然晾干或者在酒精灯火焰上方文火烘干。

(3) 固定:手执玻片一端,让菌膜朝上,通过火焰 2~3 次固定(以不烫手为宜)。

(4) 结晶紫染色:将玻片置于废液缸玻片搁架上,加适量(以盖满细菌涂面为度)的结晶紫染色液染色 1min。

(5) 水洗:倾去染色液,用水小心地冲洗。

(6) 媒染:滴加卢哥氏碘液,媒染 1min。

(7) 水洗:用水洗去碘液。

(8) 脱色:将玻片倾斜,连续滴加 95%乙醇脱色 20~25s 至流出液无色,立即水洗。

(9) 复染:滴加番红染色液复染 5min。

(10) 水洗:用水洗去涂片上的番红染色液。

(11) 晾干:将染好的涂片放在空气中晾干或者用吸水纸吸干。

(12) 镜检:镜检时先用低倍,再用高倍,最后用油镜观察。使用油镜观察时注意:在高倍镜下找到合适的观察目标并将其移到视野中心后,将高倍镜旋转至一侧,在待观测的样品区域滴上 1 滴香柏油,将油镜旋转至对准通光孔,油镜镜头此时应刚好浸没在油滴中。将聚光器升至最高位置,打开光圈,调节光线至亮度合适。调节微调焦手轮,使物像清晰。仔细观察并记录观察到的结果。

(13) 实验完毕后的处理:使用油镜观察完后,油镜上的香柏油应及时擦拭清理。用镜头纸拭去镜头上的香柏油,然后用镜头纸蘸取少量二甲苯,擦去镜头上残留的油剂,最后用干净的镜头纸擦去残留的二甲苯。注意擦镜头时向一个方向擦拭。

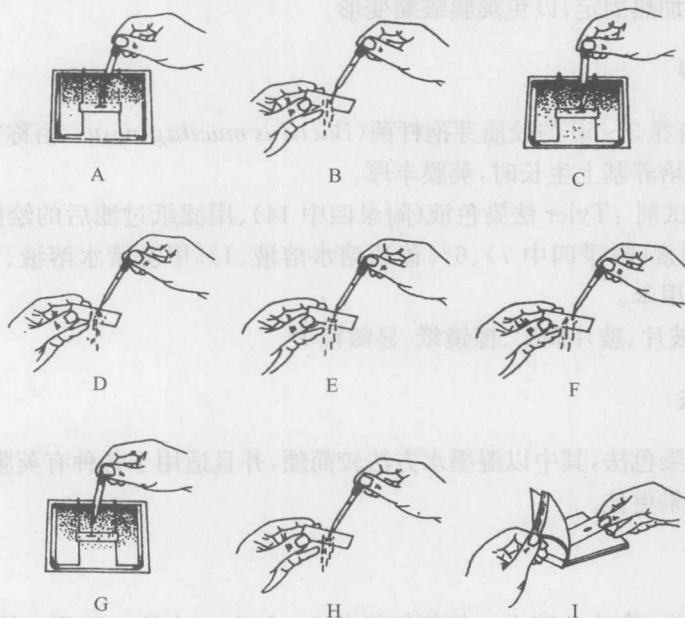


图 1-1-6 细菌的革兰氏染色程序

A. 结晶紫初染;B. 水洗;C. 碘液媒染;D. 水洗;E. 95%乙醇脱色;F. 水洗;G. 番红复染;H. 水洗;I. 染色片吸干

(五) 实验作业

(1) 绘出苏云金杆菌和大肠杆菌的形态图,并注明两菌染色后的颜色和它们的革兰氏染色反应性。

(2) 为什么细菌经革兰氏染色后会出现不同的颜色?

(六) 注意事项

(1) 革兰氏染色成败的关键是乙醇脱色。如脱色过度,革兰氏阳性菌也可被脱色而染成阴性菌;如脱色时间过短,革兰氏阴性菌也会被染成革兰氏阳性菌。脱色时间的长短还受涂片厚薄及乙醇用量多少等因素的影响,难以严格规定。

(2) 染色过程中勿使染色液干涸。用水冲洗后,应吸去玻片上的残水,以免染色液被稀释而影响染色效果。

(3) 选用幼龄的细菌。 G^+ 菌培养 12~16h,*E. coli* 培养 24h。若菌龄太老,由于菌体死亡或自溶常使革兰氏阳性菌转呈阴性反应。

实验三 细菌的荚膜染色

(一) 实验目的

学习细菌的荚膜染色法。

(二) 实验原理

由于荚膜与染料间的亲和力弱,不易着色,通常采用负染色法染荚膜,即设法使菌体和背景着色而荚膜不着色,从而使荚膜在菌体周围呈一透明圈。由于荚膜的含水量在 90%以上,因此染色时一般不加热固定,以免荚膜皱缩变形。

(三) 实验材料

(1) 活材料:培养 3~5d 的胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*, 俗称“钾细菌”)。该菌在甘露醇作碳源的培养基上生长时,荚膜丰厚。

(2) 染色液和试剂:Tyler 法染色液(附录四中 14)、用滤纸过滤后的绘图墨水、复红染色液(附录四中 2)、黑素(附录四中 7)、6%葡萄糖水溶液、1%甲基紫水溶液、甲醇、20% CuSO_4 水溶液、香柏油、二甲苯。

(3) 器材:载玻片、玻片搁架、擦镜纸、显微镜等。

(四) 实验方法

推荐以下 4 种染色法,其中以湿墨水方法较简便,并且适用于各种有荚膜的细菌。如用相差显微镜检查则效果更佳。

1. 负染色法

负染色的程序为:涂片→晾干→加复红染色 2~3min→水洗→晾干→涂黑素为一薄层→迅速风干。

(1) 制片:取洁净的载玻片一块,加蒸馏水 1 滴,取少量菌体放入水滴中混匀并涂布。

(2) 干燥:将涂片放在空气中晾干或用电吹风冷风吹干。

(3) 染色:在涂面上加复红染色液染色 2~3min。

(4) 水洗:用水洗去复红染色液。

(5) 干燥:将染色片放空气中晾干或用电吹风冷风吹干。

(6) 涂黑素:在染色涂面右边加 1 小滴黑素,用一边缘光滑的载玻片轻轻接触黑素,使黑素沿玻片边缘散开,然后向左一推,使黑素在染色涂面上成为一薄层,并迅速风干(图 1-1-7)。

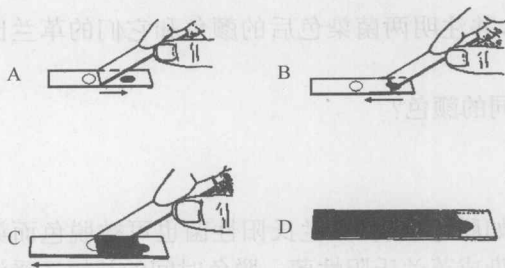


图 1-1-7 荚膜染色涂黑素的方法