



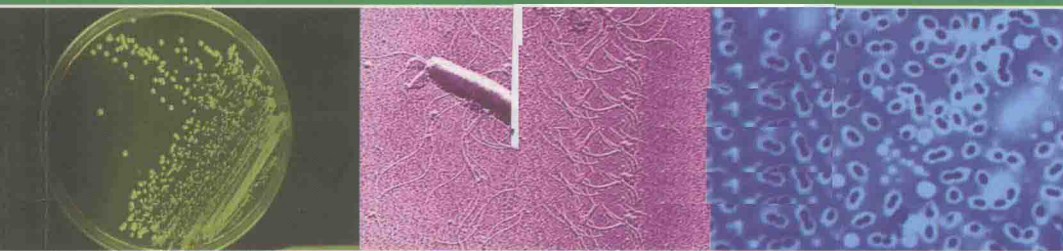
21世纪高等教育规划教材
生物学系列

微生物学实验

(第二版)

WEISHENGWUXUE SHIYAN

■ 主编 熊元林 姚小飞 赵 为
■ 主审 吴柏春



教育部直属师范大学
华中师范大学出版社

WEISHENGWUXUE

微生物学实验

(第二版)

主 编：熊元林 姚小飞 赵 为

副主编：周志娟

编 者：(以姓氏笔画为序)

王志勇 方 浩 石 慧

李 萌 别运清 沈维铎

范 萌 周志娟 赵 为

姚小飞 曹晓玲 熊元林

主 审：吴柏春

华中师范大学出版社

内 容 提 要

本教材与华中师范大学出版社出版的《微生物学》配套,内容分为6个部分,包括微生物的形态观察、微生物的培养与测定、微生物的生理生化、微生物的控制与保藏、微生物综合应用实验和附录,共计47个实验和6个附录,详尽阐述微生物学实验中的基本操作和基本技能,力求在培养学生动手能力的同时,培养学生独立思考和微生物学知识的运用能力,提高学生的综合素质。

本教材可供生物工程、生物技术、生物制药技术、食品生物技术、微生物应用技术等生物类专业的本、专科学生作为教材使用,也可作为从事微生物相关工作人员的参考。

新出图证(鄂)字 10 号

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验(第二版)/熊元林 姚小飞 赵为 主编. —武汉:华中师范大学出版社,2014.1
(21世纪高等教育规划教材·生物学系列)

ISBN 978-7-5622-6464-4

I. ①微… II. ①熊… ②姚… ③赵… 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(2013)第 305845 号

微生物学实验

(第二版)

主 编:熊元林 姚小飞 赵 为◎

选题策划:华中师范大学出版社第二编辑室

出版发行:华中师范大学出版社

地 址:武汉市珞喻路 152 号

销售电话:027-67863426 67863040

邮购电话:027-67861321

网 址:<http://www.ccupress.com>

责任编辑:张晶晶

封面设计:罗明波

印 刷 者:武汉理工大印刷厂

开本/规格:787mm×1092mm 1/16

版次/印次:2014 年 1 月第 2 版第 1 次印刷

定 价:16.00 元

电 话:027-67867362

邮 编:430079

传 真:027-67863291

电子信箱:hscbs@public.wh.hb.cn

责任校对:易 雯

封面制作:胡 灿

督 印:章光琼

印 张:8 字 数:180 千字

印 数:14201—17200

欢迎上网查询、购书

敬告读者:欢迎举报盗版,请打举报电话 027-67861321。

本书如有印装质量问题,可向承印厂调换。



第二版前言

《微生物学实验》是由华中师范大学出版社出版的“普通高等教育‘十一五’国家级规划教材”《微生物学》的配套实验教材,第一版自2008年出版至今,有多所高校选用,不少读者在使用过程中给我们提出了宝贵建议,推动我们在这几年的实验教学与科研工作中逐渐对其进行更新与完善,也促成第二版的付梓。

修订的第二版《微生物学实验》主要包括了6个部分:微生物的形态观察、微生物的培养与测定、微生物的生理生化、微生物的控制与保藏、微生物综合应用实验和附录,共有实验47个和附录6个。本次修订对第一版的内容进行了更新整合,并补充了一些应用性较强的实验内容,使该教材更具有适用性。

此次修订主要由武汉生物工程学院基础生物学教研室微生物教研组的几位教师共同完成,其中沈维铎完成了“第四部分 微生物的控制与保藏”的整合与更新工作,范萌完成了“第五部分 微生物综合应用实验”的整合与更新工作,曹晓玲完成了“第六部分 附录”的修订工作,全书最后由熊元林统稿。

本书在编写过程中得到了武汉生物工程学院生物科技系的大力支持,并得到兄弟院校各位同仁的帮助,成书过程中华中师范大学出版社第二编辑室主任王文琴和责任编辑张晶晶做了大量的工作,在此一并表示衷心感谢!

由于编者水平所限,遗漏与错误之处在所难免,恳请广大读者批评指正。

编 者

2013年10月



第一版前言

微生物学实验技术和方法是微生物学建立和发展的基础,也为整个生物学的发展作出了积极的贡献,并已渗透到现代生命科学的各个领域,成为一门十分重要的基础实验课。微生物学实验的教学在培养生物学人才的过程中显得尤为重要。

《微生物学实验》一书是《微生物学》的配套教材,《微生物学》(第二版)于2007年8月由华中师范大学出版社出版,并被评为“普通高等教育‘十一五’国家级规划教材”。为实现该教材的完整性,我们组织有丰富实践教学经验的教师,编写了《微生物学实验》教材。

本书分为微生物的形态观察、微生物的培养与测定、微生物的生理生化、微生物的控制、微生物的分离与纯化、菌种的保藏、微生物综合应用实验和附录共8个部分,共有43个实验和6个附录,内容比较充足,包括与《微生物学》相配合的验证理论的实验以及进行微生物学实验和研究所需的基本操作和技能的训练。生物学本科生及专科生的微生物学实验教学中可酌情选做某些实验。

本书在编写过程中主要突出了以下特点:(1)精选大量实验内容,力求涵盖微生物学的诸多方面,既充实又精练;(2)注重基本操作和技能的训练,微生物学实验必需的无菌操作、染色观察、培养测数、分离纯化、检测鉴定和菌种保藏等技能训练都得到了加强;(3)设置了综合应用实验,培养学生应用微生物技术的能力和分析解决问题的能力;(4)实验器材尽量简单易得,操作过程切实可行,具有很强的可操作性。

本书由武汉生物工程学院的教师主持编写,其中第一部分由方浩编写,第二部分和第三部分由姚小飞编写,第四部分和第五部分由赵为编写,第六部分由石慧编写,第七部分和第八部分由熊元林编写。另外,湖北生物科技职业学院周志娟、咸宁职业技术学院王志勇、襄樊职业技术学院别运清、荆楚理工学院李萌参加了本书的编写及书稿整理工作。全书最后由熊元林和周志娟统稿。

本书在编写过程中得到了武汉生物工程学院生物工程系的大力支持,特别是由吴柏春教授主持审定了全书内容,并得到了兄弟院校各位同仁的帮助,成书过程中华中师范大学出版社第二编辑室刘敏主任和责任编辑肖颖做了大量的工作,在此一并表示衷心感谢!

由于编者水平所限,遗漏与错误之处在所难免,恳请广大读者批评指正。

编 者

2008年3月



目 录	
实验须知	1
第一部分 微生物的形态观察	2
实验一 显微镜油镜的使用及微生物形态观察	2
实验二 细菌的单染色法	5
实验三 革兰氏染色法	7
实验四 细菌芽孢染色法	10
实验五 细菌荚膜染色法	11
实验六 细菌鞭毛染色法及活细菌运动性的观察	12
实验七 放线菌的形态观察	15
实验八 霉菌的形态观察	16
实验九 真菌有性孢子的观察	17
实验十 四大类微生物菌落形态的对比观察	18
第二部分 微生物的培养与测定	22
实验十一 微生物大小的测定	22
实验十二 微生物的显微镜直接计数法	24
实验十三 牛肉膏蛋白胨培养基的制备	27
实验十四 微生物的平板菌落计数法	29
实验十五 光电比浊计数法	32
实验十六 稀释培养计数法(MPN)	33
实验十七 大肠杆菌生长曲线的测定	37
第三部分 微生物的生理生化	39
实验十八 温度对微生物的影响	39
实验十九 pH对微生物的影响	40
实验二十 渗透压对微生物的影响	41
实验二十一 氧对微生物的影响	42
实验二十二 用生长谱法测定微生物的营养要求	43
实验二十三 大分子物质的水解试验	44
实验二十四 糖发酵试验	47
实验二十五 IMViC与硫化氢试验	48



第四部分 微生物的控制及保藏	52
实验二十六 物理因素对微生物生长的影响	52
实验二十七 化学因素对微生物的影响	59
实验二十八 生物因素对微生物的影响	62
实验二十九 传代培养保藏法	63
实验三十 载体保藏法	65
实验三十一 冷冻保藏法	66
实验三十二 冷冻干燥保藏法	67
第五部分 微生物综合应用实验	69
实验三十三 实验室环境和人体表面微生物的检查	69
实验三十四 从土壤中分离纯化微生物	72
实验三十五 从自然环境中分离与纯化噬菌体	76
实验三十六 噬菌体效价的测定	78
实验三十七 抗药性突变株的分离	80
实验三十八 牛乳中细菌的检查	82
实验三十九 乳酸菌的检测	84
实验四十 水中细菌总数的测定	85
实验四十一 大肠菌群的检测	88
实验四十二 微生物的诱变育种	93
实验四十三 大肠杆菌营养缺陷型菌株的筛选	95
实验四十四 固定化酵母细胞发酵啤酒	98
实验四十五 酸乳的制作	100
实验四十六 泡菜的制作	101
实验四十七 甜酒酿的制作	102
第六部分 附录	104
附录一 实验室意外事故的处理	104
附录二 玻片及玻璃器皿洗涤法	105
附录三 实验用培养基的配制	106
附录四 酸碱指示剂的配制(按笔画顺序排列)	112
附录五 实验用染色液及试剂的配制	113
附录六 微生物学实验中一些常用数据表	117
主要参考文献	119



实验须知

普通微生物学实验课的目的是训练学生掌握微生物学最基本的操作技能,了解微生物学的基本知识,加深理解课堂讲授的微生物学基本理论,同时通过实验,培养学生观察、思考、分析和解决问题的能力,实事求是、严肃认真的科学态度,以及勤俭节约、爱护公物的良好作风。

为了上好微生物学实验课,并保证安全,特提出如下注意事项:

1. 每次实验前必须对实验内容进行充分预习,以了解实验的目的、原理和方法,做到心中有数,思路清楚。
2. 认真及时做好实验记录,对于当时不能得到结果而需要连续观察的实验,则需记下每次观察的现象和结果,以便分析。
3. 实验室内应保持整洁,勿高声谈话和随便走动,保持室内安静。
4. 实验时小心仔细,全部操作应严格按操作规程进行,万一有不慎打破盛菌试管或瓶、皮肤破伤或菌液吸入口中等意外情况发生时,应立即报告指导教师,及时处理,切勿隐瞒。
5. 实验过程中,切勿使酒精、乙醚、丙酮等易燃药品接近火焰。如遇火险,应先关掉火源,再用湿布或沙土掩盖灭火。必要时用灭火器。
6. 使用显微镜或其他贵重仪器时,要细心操作,特别爱护。对消耗材料和药品等要力求节约,用毕仍放回原处。
7. 每次实验完毕后,必须把所用仪器抹净放妥,将实验室收拾整齐,擦净桌面。如有菌液污染桌面或其他地方时,可用3%来苏尔液或5%石炭酸液覆盖其上半小时后擦去,如系芽孢杆菌,应适当延长消毒时间。凡带菌之工具(如吸管、玻璃涂棒等)洗涤前须浸泡在3%来苏尔液中进行消毒。
8. 每次实验需进行培养的材料,应标明自己的组别及处理方法,放于教师指定的地点进行培养。实验室中的菌种和物品等,未经教师许可,不得携至室外。
9. 每次实验的结果,应以实事求是的科学态度填入报告表格中,力求简明准确,回答思考题,及时汇交教师批阅。
10. 离开实验室前应将手洗净,注意关闭火、煤气、门窗、灯等。



第一部分 微生物的形态观察

实验一 显微镜油镜的使用及微生物形态观察

一、目的要求

1. 学习并掌握油镜的原理和使用方法。
2. 观察微生物的基本形态。

二、基本原理

微生物学研究用的显微镜的物镜通常有低倍物镜、高倍物镜和油镜三种。油镜通常标有白圈,也有的以“OI”(oil immersion)或“油”等字样表示,它是三者中放大倍数最大的。使用不同放大倍数的目镜,可使被检物体放大1 000~2 000多倍。由下表可看出,油镜的焦距和工作距离(标本在焦点上看得最清晰时,物镜与样品之间的距离)最短,光圈则开得最大,因此在使用油镜观察时,镜头离标本十分近,要特别小心。

物镜焦距,放大倍数	16 mm, 10×	4 mm, (40~45)×	1.8 mm, (95~100)×
工作距离	7.0 mm	0.6 mm	0.15 mm

使用时,油镜与其他物镜的不同是载玻片与物镜之间不是隔一层空气,而是隔一层油质,称为油浸系。常选用香柏油,因香柏油的折射率 $n=1.52$,与玻璃的折射率相仿。光线透过滤载玻片后,可直接透过香柏油到达物镜而不发生折射(如图1-1)。如果载玻片与物镜之间的介质为空气,则称为干燥系。光线透过滤载玻片后,发生折射及散射,到达物镜的光线显然减少,这样就降低了视野的照明度。

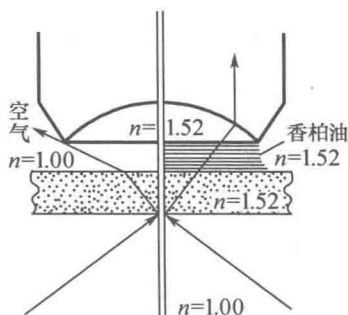


图1-1 进入物镜的光路

利用油镜不但能增加照明度,更主要的是能增加数值孔径,而显微镜的放大效能是由其数值孔径决定的。

所谓数值孔径,即光线投射到物镜上的最大角度(称为镜口角)的一半正弦,乘上载玻片与物镜间介质的折射率所得的乘积,可用下列公式表示:

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

式中: NA = 数值孔径; n = 介质折射率; $\frac{\alpha}{2}$ = 最大入射角的半数,即镜口角的半数。



因此,光线投射到物镜的角度越大,显微镜的效能就越大,该角度的大小决定于物镜的直径和焦距。同时, $\frac{\alpha}{2}$ 的理论限度为 90° , $\sin 90^\circ=1$,故以空气($n=1$)为介质时,数值孔径不能超过1。如以香柏油为介质时,则 n 增大,其数值孔径也随之增大。如光线入射角为 120° 时,其半数的正弦值为 $\sin 60^\circ=0.87$,则:

以空气为介质时 $NA=1 \times 0.87=0.87$

以水为介质时 $NA=1.33 \times 0.87=1.15$

以香柏油为介质时 $NA=1.52 \times 0.87=1.32$

显微镜的分辨力是指显微镜能够辨别两点之间最小距离的能力。它与物镜的数值孔径成正比,与光波波长成反比。因此,物镜的数值孔径越大,光波波长越短,则显微镜的分辨力越大,被检物体的细微结构也越能明晰地区别出来。因此,一个高的分辨力意味着一个小的可分辨距离,这两个因素是成反比关系的,通常有人把分辨力说成是多少微米或纳米,这实际上是把分辨力和最小分辨距离混淆了。显微镜的分辨力是用可分辨的最小距离来表示的:

$$\text{能辨别两点之间的最小距离} = \frac{\lambda}{2NA}$$

式中: λ =光波波长。

我们肉眼所能感受的光波平均波长为 $0.55\mu\text{m}$,假如高倍物镜的数值孔径为0.65,它能辨别两点之间的最小距离为 $0.42\mu\text{m}$,而在 $0.42\mu\text{m}$ 以下的两点之间的距离就分辨不出,即使用倍数更大的目镜,使显微镜的总放大率增加,也仍然分辨不出。只有改用数值孔径更大的物镜,增加其分辨力才行。例如用数值孔径为1.25的油镜时,能辨别两点之间的最小距离 $=\frac{0.55}{2 \times 1.25}=0.22\mu\text{m}$ 。

因此,我们可以看出,假如采用放大率为40倍的高倍物镜($NA=0.65$)和放大率为24倍的目镜,虽然总放大率为960倍,但其最小分辨距离只有 $0.42\mu\text{m}$ 。假如采用放大率为90倍的油镜($NA=1.25$)和放大率为9倍的目镜,虽然总的放大率仅为810倍,却能分辨出 $0.22\mu\text{m}$ 的最小距离。

三、材料与用品

1. 材料 酵母菌、黑根霉、曲霉和青霉染色玻片标本。
2. 用品 光学显微镜、香柏油、二甲苯。

四、操作步骤

1. 观察前的准备

置显微镜于平稳的实验台上,镜座距实验台边沿约 $3\text{cm} \sim 4\text{cm}$ 。镜检者姿势要端正,一般用左眼观察,右眼便于绘图或记录,两眼必须同时睁开,以减少疲劳,亦可练习左右眼均能观察。

调节光源,先将光圈完全开放,升高聚光器至与载物台同样高,否则使用油镜时光线较暗,然后转下低倍镜观察光源强弱。凡观察染色标本时,光线应较强;观察未染色标本



时,光线不宜太强。可通过扩大或缩小光圈、升降聚光器、调节内置光源等方法调节光线。

2. 低倍镜观察

检查的标本须先用低倍镜观察,因为低倍镜视野较大,易发现目标和确定观察的位置。

将酵母菌染色标本置镜台上,用标本夹夹住,移动推动器,使观察对象处在物镜正下方。转动粗调节器,使载物台升到最高,或使镜筒下降,由目镜观察,此时可适当地缩小光圈,否则视野中只见光亮一片,难见到目的物。调节虹彩光圈,与显微镜的数值孔径一致。用粗调节器慢慢降下载物台,直至物像出现后再用细调节器调节到物像清楚时为止。然后移动标本,认真观察标本各部位,找到合适的目的物,并将其移至视野中心,准备用高倍镜观察。

3. 高倍镜观察

一般不移动载物台,直接将高倍镜转至正下方,然后由目镜观察,并仔细调节光圈,使光线的明亮度适宜,此时应能看到目的物的模糊影像。用细调节器慢慢调节至物像清晰为止,找到最适宜观察的部位后,将此部位移至视野中心,准备用油镜观察。

4. 油镜观察

不移动载物台,直接将高倍镜与油镜转换为“八”字形。不取下玻片,直接在玻片标本的镜检部位滴上一滴香柏油。从侧面注视,直接将物镜转换到油镜,此时油镜浸在香柏油中,其镜头几乎与标本相接,应特别注意不能压在标本上,更不可用力过猛,否则不仅会压碎玻片,也会损坏镜头。从目镜观察,进一步调节光线,使光线明亮,用细调节器调节直至看到清晰的物像。

用同样的方法观察其他几种微生物的染色装片。

5. 显微镜用毕后的处理

观察完毕,降下载物台,取下玻片。先用擦镜纸拭去镜头上的油,然后用擦镜纸蘸少许二甲苯擦去镜头上残留的油迹(香柏油溶于二甲苯),最后再用干净的擦镜纸擦去残留的二甲苯。切忌用手或其他纸擦镜头,以免损坏镜头。用擦镜纸清洁其他物镜及目镜。用绸布擦净显微镜的金属部件。

将各部分还原,关闭电源开关,将接物镜转成“八”字形,同时把聚光镜降下,以免接物镜与聚光镜发生碰撞危险。

五、实验报告

1. 结果

分别绘出你在低倍镜、高倍镜和油镜下观察到的微生物的形态,包括在三种情况下视野中的变化,同时注明物镜放大倍数和总放大率。

2. 思考题

(1) 用油镜观察时,为什么要在载玻片上滴加香柏油?

(2) 在明视野显微镜下观察微生物形态时,你认为用染色标本好,还是用未染色的活标本好,为什么?



实验二 细菌的单染色法

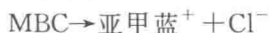
一、目的要求

1. 掌握无菌操作技术、微生物涂片及染色的基本技术。
2. 巩固显微镜的使用方法。
3. 观察细菌的形态。

二、基本原理

单染色法是利用单一染料对细菌进行染色的一种方法。此法操作简便,适用于菌体一般形态的观察。

在中性、碱性或弱酸性溶液中,细菌细胞通常带负电荷,所以常用碱性染料进行染色。碱性染料并不是碱,和其他染料一样是一种盐,电离时染料离子带正电,易与带负电荷的细菌结合而使细菌着色。例如,美蓝(亚甲蓝)实际上是氯化亚甲蓝盐(methylenebluechloride, MBC),电离生成正、负离子:



带正电荷的染料离子可使细菌细胞染成蓝色。常用的碱性染料除美蓝外,还有结晶紫(crystal violet)、碱性复红(basic fuchsin)、番红(safranin, 又称沙黄)等。

细菌体积小,较透明,如未经染色常不易识别,而经染色后,与背景形成鲜明的对比,易于在显微镜下进行观察。

三、材料与用品

1. 材料 金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌营养琼脂斜面培养物。
2. 用品 光学显微镜、酒精灯、载玻片、接种环、香柏油、二甲苯、擦镜纸、生理盐水、滴管、吕氏碱性美蓝染色液、石炭酸复红染色液。

四、操作步骤

1. 涂片

取两块干净的载玻片,各滴一小滴生理盐水于载玻片中央,用接种环以无菌操作(如图 2-1)分别从金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌斜面上挑取少量菌苔于两块载玻片的水滴中,混匀并涂成薄膜。若用菌悬液(或液体培养物)涂片,可用接种环挑取 2~3 环直接涂于载玻片上(如图 2-2)。

注意滴生理盐水时不宜过多,涂片必须均匀。

2. 干燥

室温自然干燥。

3. 固定

涂片面向上,快速通过酒精灯外焰 2~3 次,使细胞质凝固,以固定细菌的形态,并使

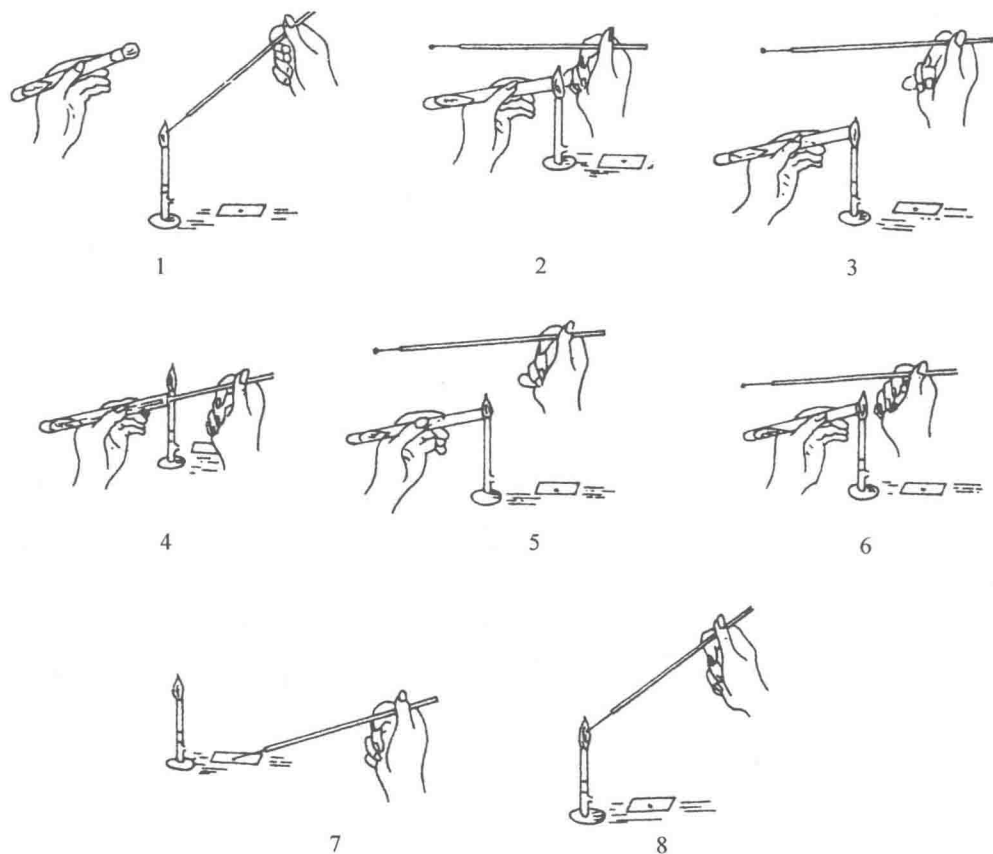


图 2-1 无菌操作过程

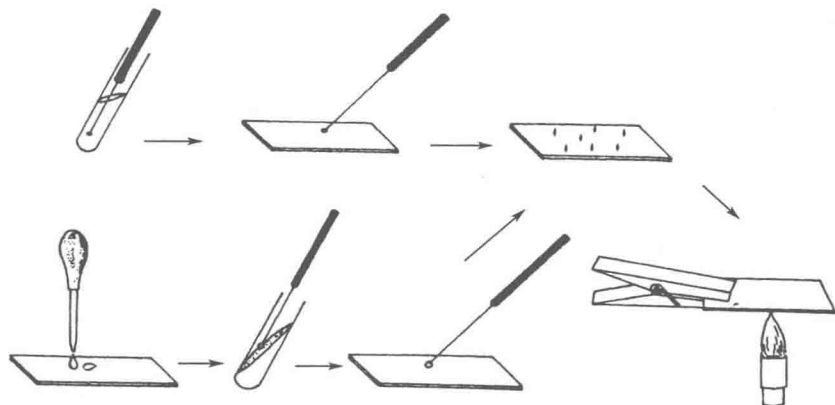


图 2-2 涂片、干燥和热固定

其不易脱落。但不能在火焰上烤,否则细菌形态将毁坏。

4. 染色

放标本于水平位置,滴加染色液于涂片薄膜上,染色时间长短随不同染色液而定。吕氏碱性美蓝染色液染 2 min~3 min,石炭酸复红染色液染 1 min~2 min。



5. 水洗和干燥

染色时间到后,倒去染液,用自来水冲洗,直至冲下的水无色时为止。注意冲洗水流不宜过急、过大,水由玻片上端流下,避免直接冲在涂片处。冲洗后,将标本晾干或用吹风机吹干,待完全干燥后才可置油镜下观察。

6. 镜检

按实验一操作程序进行显微镜观察。

五、实验报告

1. 结果

绘出你所观察到的经单染色的两种细菌的形态图。

2. 思考题

- (1) 根据实验体会,你认为制备染色标本时,应注意哪些事项?
- (2) 为什么制片要完全干燥后才能用油镜观察?

附:涂片无菌操作要点

1. 无菌操作的试管或三角瓶在开塞后及回塞之前,其口部应通过火焰 2~3 次,以烧去可能附着于管口的微生物。开塞后的管口及瓶口应尽量靠近火焰,尽量平放,切忌口部向上及长时间暴露于空气中,以防污染。

2. 接种环(针)每次使用前后均应在火焰上彻底灼烧灭菌。挑菌前必须待接种环(针)冷却后才能使用。

实验三 革兰氏染色法

一、目的要求

了解革兰氏染色的原理,学习并掌握革兰氏染色的方法。

二、基本原理

革兰氏染色法(Gram stain)是细菌分类和鉴定的重要方法。它是 1884 年由丹麦医师 Gram 创立的。用革兰氏染色法不仅能观察到细菌的形态,而且可将所有细菌区分为两大类:染色后呈蓝紫色的称为革兰氏阳性细菌,用 G^+ 表示;染色后呈红色(复染颜色)的称为革兰氏阴性细菌,用 G^- 表示。细菌对于革兰氏染色的不同反应,是由于它们细胞壁的成分和结构不同而造成的。革兰氏阳性细菌的细胞壁主要是由肽聚糖形成的网状结构组成的,在染色过程中,当用乙醇处理时,由于脱水而引起网状结构中的孔径变小,通透性降低,使结晶紫—碘复合物被保留在细胞内而不易脱色,因此呈现蓝紫色;革兰氏阴性细菌的细胞壁中肽聚糖含量低,而脂类物质含量高,当用乙醇处理时,脂类物质溶解,细胞壁的通透性增加,使结晶紫—碘复合物易被乙醇洗脱出来,用复染剂复染后,细胞被染上复染剂的红色。



革兰氏染色需用4种不同的溶液:碱性染料(basic dye)初染液、媒染剂(mordant)、脱色剂(decolorizing agent)和复染液(counterstain)。碱性染料初染液的作用如在细菌的单染色法基本原理中所述,用于革兰氏染色的初染液一般是结晶紫(crystal violet)。媒染剂的作用是增加染料和细胞之间的亲和性或附着力,即以某种方式帮助染料固定在细胞上,使其不易脱落,碘(iodine)是常用的媒染剂。脱色剂是将被染色的细胞进行脱色,不同类型的细胞脱色反应不同,有的能被脱色,有的则不能,脱色剂常用95%的酒精(ethanol)。复染液也是一种碱性染料,其颜色不同于初染液,复染的目的是使被脱色的细胞染上不同于初染液的颜色,而未被脱色的细胞仍然保持初染液的颜色,常用的复染液是番红。

三、材料与用品

1. 材料 大肠杆菌、枯草芽孢杆菌。
2. 用品 革兰氏染色液、载玻片、显微镜、酒精灯、接种环、滴管等。

四、操作步骤

1. 涂片

将培养14h~16h的枯草芽孢杆菌和培养24h的大肠杆菌分别制作涂片(注意涂片切不可过于浓厚),干燥,固定。固定时通过火焰1~2次即可,不可过热,以载玻片不烫手为宜。

2. 初染

加草酸铵结晶紫1滴,约1min,水洗。

3. 媒染

滴加碘液冲去残水,并覆盖约1min,水洗。

4. 脱色

用滤纸吸去玻片上的残水,并衬以白色背景,用95%酒精滴洗至流出的酒精刚刚不出现紫色时为止,约20s~30s,立即用水冲净酒精。

5. 复染

用番红液复染约2min,水洗。

6. 镜检

干燥后,用油镜观察。革兰氏阴性菌呈红色,革兰氏阳性菌呈紫色。以分散开的细菌的革兰氏染色反应为准,过于密集的细菌常常呈假阳性。

7. 混合涂片染色

用同法在同一载玻片上以大肠杆菌与枯草芽孢杆菌混合制片,作革兰氏染色对比。

革兰氏染色的关键在于严格掌握酒精脱色程度。如脱色过度,则阳性菌可被误染为阴性菌;脱色不够时,阴性菌可被误染为阳性菌。此外,菌龄也影响染色结果,如阳性菌培养时间过长,已死亡或部分菌自行溶解了,都常呈阴性反应。

革兰氏染色操作过程如图3-1。

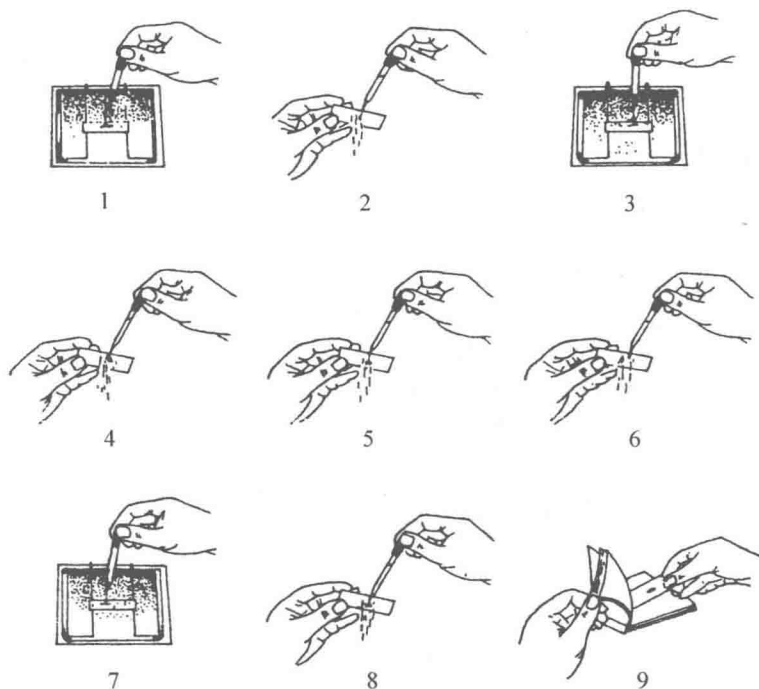


图 3-1 革兰氏染色操作过程

1. 加草酸铵结晶紫染 1min; 2. 水洗; 3. 加碘液媒染 1min; 4. 水洗;
5. 乙醇脱色约 20s~30s; 6. 水洗; 7. 番红液复染约 2min; 8. 水洗; 9. 用吸水纸吸干

五、实验报告

1. 结果

在你所做的革兰氏染色制片中,大肠杆菌和枯草芽孢杆菌各染成何色? 它们是革兰氏阴性菌还是革兰氏阳性菌? 绘图表示它们的形态。

2. 思考题

- (1) 制作革兰氏染色涂片为什么不能过于浓厚? 其染色成败的关键一步是什么?
- (2) 当你一株未知菌进行革兰氏染色时,怎样能确保你的染色技术操作正确,结果可靠?



实验四 细菌芽孢染色法

一、目的要求

学习并掌握细菌芽孢染色法。

二、基本原理

芽孢染色法是利用细菌的芽孢和菌体对染料的亲和力不同的原理,用不同染料进行着色,使芽孢和菌体呈不同的颜色而便于区别。芽孢壁厚、透性低,着色、脱色均较困难,因此当先用一弱碱性染料,如孔雀绿(malachite green)或碱性品红(basic fuchsin)在加热条件下进行染色时,此染料不仅可以进入菌体,也可以进入芽孢,进入菌体的染料可经水洗脱色,而进入芽孢的染料则难以透出,若再用复染液(如番红液)或衬托溶液(如黑色素溶液)处理,此时菌体即被染成红色,而芽孢难着色,仍呈绿色,则菌体和芽孢易于区分。

三、材料与用品

1. 材料 枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌。
2. 用品 孔雀绿染液、番红水溶液等。

四、操作步骤

1. 制片

将培养 24 h 左右的枯草芽孢杆菌或其他芽孢杆菌制作涂片、干燥、固定。

2. 染色

滴加 3~5 滴孔雀绿染液于已固定的涂片上。用木夹夹住载玻片在火焰上加热,使染液冒蒸汽但勿沸腾,切忌使染液蒸干,必要时可添加少许染液。加热时间从染液冒蒸汽时开始计算约 4 min~5 min。这一步也可不加热,改用饱和的孔雀绿水溶液(约 7.6%)染 10 min。

3. 脱色

倾去染液,待玻片冷却后水洗至流出的水无绿色为止。

4. 复染

用番红水溶液复染 1 min,倾去染液并用滤纸吸干残液。

5. 镜检

待干燥后,置油镜下观察。芽孢呈绿色,菌体呈红色。

五、实验报告

1. 结果

绘图表示你观察到的两种芽孢杆菌的芽孢在形状、大小、着生位置上有什么不同。

2. 思考题

为什么在孔雀绿染液加热染色中,要待玻片冷却后才能用水冲洗?