

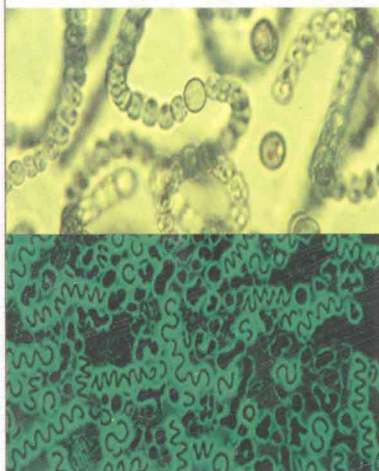


中国地质大学(武汉)实验教学系列教材

# 环境工程微生物实验

HUANJING GONGCHENG WEISHENGWU SHIYAN

罗泽娇 冯亮 ◎主 编



中国地质大学 出版社有限责任公司  
ZHONGGUO DIZHI DAXUE CHUBANSHE YOUXIAN ZEREN GONGSI

# 环境工程微生物实验

HUANJING GONGCHENG WEISHENGWU SHIYAN

罗泽娇 冯亮 主编



中国地质大学出版社有限责任公司  
ZHONGGUO DIZHI DAXUE CHUBANSHE YOUXIAN ZEREN GONGSI

## 图书在版编目(CIP)数据

环境工程微生物实验/罗泽娇,冯亮主编. —武汉:中国地质大学出版社有限责任公司, 2013. 1

ISBN 978-7-5625-3117-3

I. 环…

II. ①罗…②马…

III. 环境微生物学-实验-高等学校-教材

IV. X172-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 121040 号

**环境工程微生物实验**

**罗泽娇 冯亮 主编**

责任编辑:王凤林

责任校对:张咏梅

出版发行:中国地质大学出版社有限责任公司(武汉市洪山区鲁磨路388号) 邮编:430074

电 话:(027) 67883511 传 真:(027) 67883580 E-mail: cbb@cug.edu.cn

经 销:全国新华书店

Http://www.cugp.cug.edu.cn

开本:787毫米×1092毫米 1/16

字数:150千字 印张:5.75

版次:2013年1月第1版

印次:2013年1月第1次印刷

印刷:武汉路南印务有限责任公司

印数:1—1000册

ISBN 978-7-5625-3117-3

定价:12.00元

如有印装质量问题请与印刷厂联系调换

# 环境工程微生物实验注意事项

开展环境工程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实验操作技能；帮助掌握微生物学的基本知识与概念；使课堂讲授的微生物学理论与实践相结合，加深学生对理论的理解。在实验过程中，培养学生的观察、思考能力；通过实验数据的分析与实验报告的撰写，培养学生分析问题和解决问题的能力，培养学生的创新性思维，培养学生实事求是、严肃认真的科学态度。

因此，环境工程微生物学的实验内容，除对微生物学基本操作技能如显微观察技术、染色技术、无菌操作技术、接种与培养技术的训练外，更多地强调与环境、工程过程有关的微生物学的基本知识与理论，围绕这些理论开展实验。

为了上好环境工程微生物学实验课，保障学生的实验安全，特提出如下注意事项。

1. 上课第一天请先阅读本注意事项，熟悉实验室环境，查看紧急冲洗站、洗眼站、灭火器、急救箱及安全通道、梯等的位置，牢记“安全”是进行任何实验最重要的准则。

2. 每次实验前必须充分预习实验内容，以了解实验的目的、原理和方法，做到心中有数，思路清楚。

3. 认真及时地做好实验记录，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。

4. 实验前后及任何时候只要手接触到污染物，要注意洗手。实验前后对试验台要进行消毒。

5. 实验时要小心仔细，全部操作应严格按操作规程进行，万一遇有盛菌试管或瓶不慎打破、皮肤破伤或菌液吸入口中或泼洒等意外情况发生时，应立即报告指导教师，及时处理，切勿隐瞒。

6. 保持实验室内试验台和地面整洁，勿高声谈话和随便走动，保持室内安静。

7. 进行如下个人安全保护措施，包括：①将长头发束于脑后；②穿实验服，按需要戴实验手套；③穿封闭的鞋子，即不露脚趾、脚背、后跟等；④实验室内禁止饮食；⑤在实验室里禁止使用化妆品或佩戴隐形眼镜；⑥不将任何物品放进嘴里，如铅笔等；⑦不穿、戴实验服和手套离开实验室，离开实验室之前

必须放置于规定的地方。

8. 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，应保持镇定，沉着处理。酒精或乙醚等着火时，应使用泡沫灭火剂或湿毛巾或沙土覆盖，勿使用水冲洗。

9. 使用显微镜或其他贵重仪器时，要求细心操作，特别爱护。如使用离心机，一定要使离心管两两以圆心对称、重量平衡；使用振荡器时，也要注意对称放置，并用夹具夹紧，避免振荡物品摇晃摔出台面。对消耗材料和药品等要力求节约，用毕后仍放回原处。

10. 每次实验完毕后，必须把所有仪器抹净放妥。凡带菌之工具（如吸管、玻璃刮棒等）在洗涤前必须浸泡在3%来苏尔液中进行消毒。

11. 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，不得携出室外。

12. 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，并连同思考题及时汇交教师批阅。

13. 离开实验室时，要检查仪器电源是否关闭；注意关闭门窗、灯火煤气等。

14. 遇到如下紧急情况，配合老师与同学采取如下急救措施：

(1) 急性呼吸系统中毒：使中毒者迅速离开现场，移到通风良好的地方，呼吸新鲜空气；立即报告医院或拨打112；如有休克、虚脱或心肺功能不全，必须先作抗休克处理，如人工呼吸、给予氧气、喝兴奋剂（如浓茶、咖啡）等。

(2) 经由口服而中毒：需立即用3%~5%小苏打溶液或1:5 000高锰酸钾溶液洗胃，洗胃时要大量地喝，边喝边使之呕吐，最简单的催吐办法是用手指或筷子压舌根或给中毒者喝少量（15~25ml）1%硫酸铜或硫酸锌溶液（催吐剂），使之迅速将毒物吐出。洗胃要反复进行多次，直至吐出物中基本无毒物为止。再服解毒剂，一般解毒剂有鸡蛋清、牛奶、淀粉糊、橘子汁等。另外有些特殊专一性解毒剂针对特定毒性物质使用，如磷中毒时用硫酸铜、钡中毒时用硫酸钠、氰化物中毒时用硫代硫酸钠等。

(3) 皮肤、眼、鼻、咽喉受毒物侵害时，应立即用大量自来水冲洗，然后送医院请各专科医生处理。

(4) 一度烧伤：只损伤表皮，皮肤呈红斑，微痛，微肿，无水泡。如被化学药品烧伤，应立即用大量水冲洗，除去残留在创面上的化学物质，并用冷水浸沐伤处，可减轻疼痛，最后需要消毒，保护创面不受感染。

(5) 二度烧伤：损伤表皮及真皮层，皮肤起水泡，疼痛，水肿明显。创面如污染严重，先用清水或生理盐水冲洗，再以1:1 000新洁尔灭消毒，不要挑

破水泡，用消毒纱布轻轻包扎好，请医生治疗。

(6) 三度烧伤：损伤皮肤全层，包括皮下组织、肌肉、骨骼，创面呈灰白色或焦黄色，无水泡，不痛，感觉消失。在送医院前，主要防止感染和休克，可用消毒纱布轻轻包扎好，给伤者保暖和供氧，必要时注射吗啡止痛。

(7) 炸伤：其急救措施基本同烧伤处理。但炸伤后伤口往往大量出血，应立即将伤口上部扎紧，防止流血过多，如发生昏迷、休克等，应进行人工呼吸，给氧，并送医院治疗。

(8) 电击伤：急救时首先使触电者脱离电源，为此可拉下电闸或用木棍将触电者从电源上拨开。当心勿将触电者摔伤。断开电源后，检查伤员呼吸和心跳情况，若呼吸停止，立即进行人工呼吸。对心跳亦停止者同时进行心肺复苏术。电击伤比较轻微者，很快能恢复健康，重者必须请医生治疗。应该注意，触电者在进行急救时，一般不要注射强心针或饮用兴奋剂。

# 目 录

实验一 光学显微镜的操作及细菌个体形态的观察 .....	(1)
一、目的 .....	(1)
二、显微镜的结构和光学原理及其操作方法 .....	(1)
三、显微镜的保护注意事项 .....	(5)
四、细菌的个体形态观察 .....	(5)
实验二 微生物的染色 .....	(7)
一、目的 .....	(7)
二、染色原理 .....	(7)
三、染色方法分类 .....	(7)
四、仪器和材料 .....	(9)
五、实验内容和步骤 .....	(9)
实验三 富集培养观察——Winogradsky 柱 .....	(12)
一、目的 .....	(12)
二、富集培养原理 .....	(12)
三、Winogradsky 柱 .....	(12)
四、实验材料 .....	(13)
五、实验内容和步骤 .....	(13)
实验四 酵母菌的加富培养与分离 .....	(14)
一、器材与用品 .....	(14)
二、方法与步骤 .....	(14)
实验五 营养与环境因子对微生物生长的影响 .....	(16)
一、实验目的 .....	(16)
二、实验材料 .....	(16)
三、实验步骤 .....	(16)
实验六 微生物细胞数的计数 .....	(20)
一、目的 .....	(20)
二、仪器与材料 .....	(20)
三、血球计数板的结构和计算方法 .....	(20)
四、操作步骤 .....	(20)

<b>实验七 培养基的制备和灭菌</b> .....	(23)
一、目的 .....	(23)
二、仪器和材料 .....	(23)
三、实验内容 .....	(24)
<b>实验八 细菌纯种分离、培养和接种技术</b> .....	(32)
一、微生物的接种 .....	(32)
二、微生物的培养 .....	(33)
三、附注 .....	(35)
四、目的 .....	(36)
五、仪器和材料 .....	(36)
六、细菌纯种分离的操作方法 .....	(36)
七、接种 .....	(38)
<b>实验九 粪大肠菌群的测定——多管发酵法(HJ/T 347 - 2007)</b> .....	(42)
一、目的 .....	(42)
二、原理 .....	(42)
三、材料 .....	(42)
四、步骤 .....	(43)
五、测定方法与步骤 .....	(44)
<b>实验十 环境中微生物生物量的测定</b> .....	(47)
一、细菌活菌数的测定 .....	(47)
二、细菌总数的测定 .....	(50)
三、测总氮量计算微生物量 .....	(53)
四、DNA 含量的测定 .....	(53)
<b>实验十一 微生物细胞的固定化技术</b> .....	(56)
一、微生物细胞的一般固定方法 .....	(56)
二、活性污泥固定化 .....	(57)
三、微生物酶与细胞共固定化 .....	(58)
<b>实验十二 过氧化氢酶活化性的测定</b> .....	(60)
一、气量法(演示实验) .....	(60)
二、滴定法 .....	(60)
三、比色法 .....	(61)
<b>实验十三 生化需氧量测试</b> .....	(62)
一、实验目的 .....	(62)
二、试剂 .....	(63)
三、仪器 .....	(64)
四、样品的储存 .....	(64)
五、操作步骤 .....	(64)



六、结果的表示·····	(66)
<b>实验十四 富营养化水体中藻类的测定(叶绿素 a 法)</b> ·····	(67)
一、目的要求·····	(67)
二、基本原理·····	(67)
三、器材·····	(67)
四、操作步骤·····	(67)
<b>实验十五 噬菌体效价的测定(双层琼脂培养法)</b> ·····	(69)
一、目的要求·····	(69)
二、基本原理·····	(69)
三、器材·····	(69)
四、操作步骤·····	(69)
<b>实验十六 藻类观察、计数和鉴定</b> ·····	(71)
一、目的要求·····	(71)
二、基本原理·····	(71)
三、器材·····	(71)
四、操作步骤·····	(71)
<b>附录一 苯酚降解实验</b> ·····	(73)
一、原理·····	(73)
二、材料·····	(73)
三、方法·····	(74)
<b>附录二 稀释法测数统计表</b> ·····	(75)
<b>附录三 常用染色液的配制</b> ·····	(78)
<b>参考文献</b> ·····	(80)

# 实验一 光学显微镜的操作及细菌个体形态的观察

显微镜的种类很多，一般可分为光学显微镜与非光学显微镜两大类。光学显微镜按其性能的不同可分为明视野显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、紫外光显微镜、偏光显微镜和荧光显微镜等。非光学显微镜为电子显微镜。本实验的学习目的是训练学生学习使用明视野显微镜观察和描述模式微生物。重点介绍油镜物镜的基本原理与操作步骤。

## 一、目的

1. 掌握光学显微镜的结构、原理，学习显微镜的操作方法和保养。
2. 观察细菌的个体形态及绘制细胞形态。

## 二、显微镜的结构和光学原理及其操作方法

### (一) 显微镜的结构 (图 1-1) 和光学原理

显微镜分机械装置和光学系统两部分。

#### 1. 机械装置

(1) 镜筒。镜筒上端装目镜，下端接转换器。镜筒为双筒，双筒全倾斜，其中一个筒有屈光度调节装置，以备两眼视力不同者调节使用。两筒之间可调距离，以适应两眼宽度不同者调节使用。

(2) 转换器。转换器装在镜筒的下方，其上有 4 个孔，不同规格的物镜分别安装在各孔上。

(3) 载物台。载物台为方形，中央有一光孔，孔的两侧装有夹片，载物台上还有移动器，位于载物台的底部，移动器的作用是夹住和移动标本片，可横向 (X 螺旋) 和纵向 (Y 螺旋) 移动。

(4) 镜臂。镜臂支撑镜筒、载物台、聚光器和调节器。

(5) 镜座。支撑整台显微镜，其上有光源开关、光亮控制钮、指示灯、集光器。

(6) 调节器。本仪器调节的是载物台的位置，有的仪器调节的是镜筒的位置。它包括镜架两侧大、小螺旋调节器 (调焦距) 各一，前转上升，后转下降。可调节物镜和所需观察的物体之间的距离。

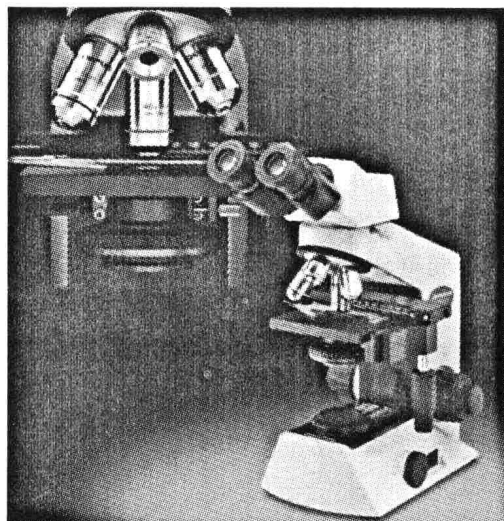
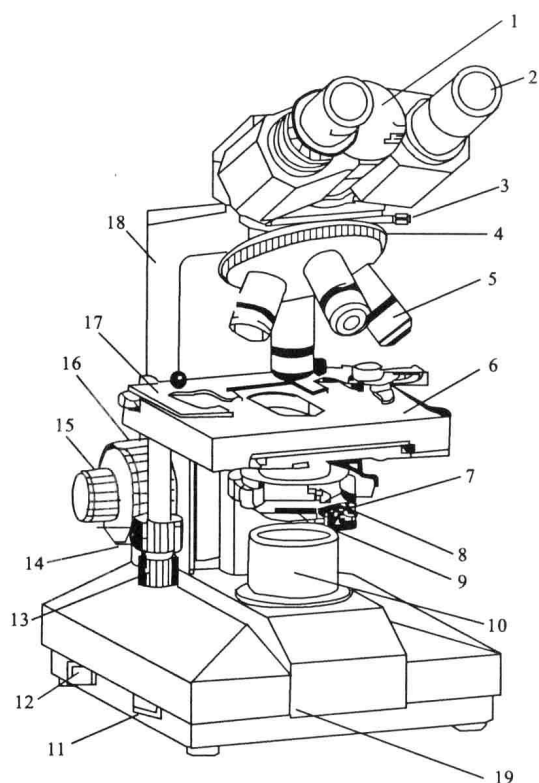


图 1-1 显微镜的结构

1. 目头; 2. 目镜; 3. 观察镜固紧螺钉; 4. 转换器; 5. 物镜; 6. 载物台; 7. 聚光镜升降手轮; 8. 聚光镜固紧螺钉; 9. 聚光镜 (带孔径光阑); 10. 下聚光镜; 11. 光亮控制钮; 12. 光源开关; 13. 横向移动手轮; 14. 纵向移动手轮; 15. 微调调焦旋钮; 16. 粗调调焦旋钮; 17. 标本片夹持器; 18. 镜臂; 19. 镜座

## 2. 光学系统及其光学原理

(1) 目镜。装于镜筒上端, 由两块透镜组成。目镜把物镜造成的像再次放大, 不增加分辨力, 各台显微镜备有 3 个不同规格的目镜, 分别是 7 倍 ( $7\times$ )、10 倍 ( $10\times$ ) 和 16 倍 ( $16\times$ ), 可根据需要选用。一般可按与物镜放大倍数的乘积为物镜数值孔径的  $500\sim 700$  倍, 最大也不能超过 1 000 倍的选择。目镜的放大倍数过大, 反而会影响观察效果。

(2) 物镜。物镜装在转换器的孔上, 物镜有低倍 ( $4\times$ 、 $10\times$ )、高倍 ( $40\times$ ) 及油镜 ( $100\times$ )。物镜上标有: N A. 1.25、 $100\times$ 、“OI”、 $160/0.17$ 、0.16 等字样, 其中 N A. 1.25 为数值孔径;  $100\times$  为放大倍数; “OI” 表示油镜, 即 oil immersion; “ $160/0.17$ ” 中 160 表示镜筒长, 0.17 表示要求载玻片的厚度; 0.16 为工作距离。

油镜与其他物镜不同, 其载玻片与油镜之间不是隔一层空气, 而是隔一层油质, 称为油浸系。常选用香柏油作为油浸介质, 因香柏油的折射率  $n=1.52$ , 与玻璃相同。当光线通过载玻片后, 可直接通过香柏油进入物镜而不发生折射。如果玻片与物镜之间的介质为空气, 则称为干燥系, 当光线通过玻片后, 受到折射发生散射现象, 进入物镜的光线显然减少, 这样就减低了视野的照明度 (图 1-2)。

利用油镜不但能增加照明度, 更主要的是能增加数值孔径 (numerical aperture, N A)。

显微镜的放大效能由其数值孔径决定。数值孔径  $= n \times \sin(\alpha/2)$ ，其意为玻片和物镜之间的折射率乘上光线投射到物镜上的最大夹角（即镜口角）（图 1-3）的一半的正弦。光线投射到物镜的角度越大，则显微镜的效能越大，该角度的大小决定于物镜的直径和焦距， $n$  是影响数值孔径的因素，空气的折射率  $n=1$ ，水的折射率  $n=1.33$ ，香柏油的折射率  $n=1.52$ ，用油镜时光线入射  $\alpha/2$  为  $60^\circ$ ，则  $\sin 60^\circ = 0.87$ ；

以空气为介质时： $NA = 1 \times 0.87 = 0.87$

以水为介质时： $NA = 1.33 \times 0.87 = 1.16$

以香柏油为介质时： $NA = 1.52 \times 0.87 = 1.32$

显微镜的性能还依赖于物镜的分辨力，分辨力即能分辨两点之间的最小距离的能力。它与数值孔径成正比，与波长成反比。即数值孔径愈大，光波波长越短，则分辨力愈大，被检物体的细微结构也愈能明晰地区别出来。因此，一个高的分辨力意味着一个小的可分辨距离，这两个因素呈反比关系。通常有人把分辨力说成是多少微米或纳米，实际上是把分辨力和最小分辨距离混淆了。通过增大数值孔径、缩短波长均可提高显微镜的分辨力，使目的物的细微结构更清晰可见。但事实上可见光的波长（ $0.38 \sim 0.7 \mu\text{m}$ ）是不可能缩短的，只有靠增大数值孔径来提高分辨力。

显微镜的分辨力用可分辨的最小距离表示：

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

式中， $\lambda$ ——光波波长。

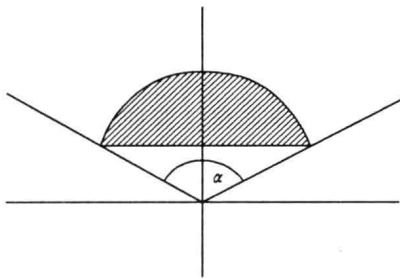


图 1-3 物镜的光线入射角

我们肉眼所能感受的光波平均长度为  $0.55 \mu\text{m}$ ，假如数值孔径为  $0.65$  的高倍物镜，它能辨别两点之间的距离为  $0.42 \mu\text{m}$ 。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

$$\text{最小距离} = \frac{0.55}{2 \times 1.25} = 0.22 \mu\text{m}$$

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，但其分辨的最小距离只有  $0.42 \mu\text{m}$ 。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，虽然总的放大率为  $810$  倍，但却能分辨出  $0.22 \mu\text{m}$  间的距离。

显微镜的总放大倍数为物镜放大倍数和目镜放大倍数的乘积。

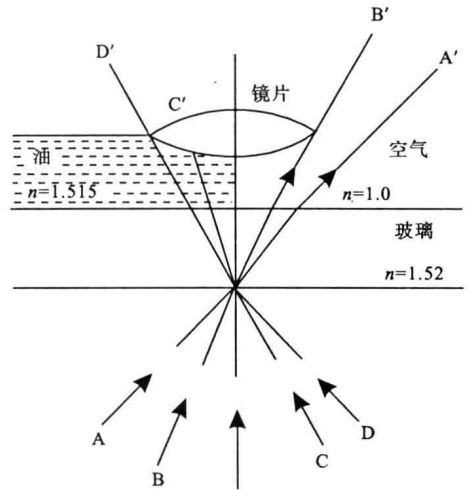


图 1-2 油浸工作原理

(3) 聚光器。聚光器安装在载物台的下面，光线通过聚光器被聚集成光锥照射到标本上，可增强照明度和造成适宜的光锥角度，提高物镜的分辨力。当使用油镜工作时，光圈开得最大。

(4) 照明：6V20W 卤素灯，亮度可调。

(5) 内藏式光源：220V、50Hz 或 110V、60Hz。

## (二) 显微镜的操作方法

### 1. 竖起显微镜

(1) 从镜头盒中取出物镜，并拧入转换器的孔中。

(2) 把观察头装在显微镜弯臂上，并拧紧锁定螺丝以固定观察头。

(3) 把目镜插入目镜筒。

(4) 用孔径光栏的手柄将聚光镜定位，使其便于操作。

### 2. 操作

(1) 把显微镜的电源线插到适当接地的电源插座中。

(2) 把照明器开关移到“ON(开)”的位置，滑动光控制变阻器，以获得适宜的照明亮度，当照明器处于工作状态时，电平指示器和指示灯都应亮着(初调时，亮度应较小；用油镜观察时，亮度应调大)。

(3) 安放样品：把需要观察的样品放在显微镜的平台上，由平台夹爪将其稳固地夹紧，再旋转平台的 X-Y 方向的移动旋钮，把要观察的样品移动到平台上透光孔的中心。

(4) 设定瞳孔眼距：握住观察头的表面平板向内、外移动目镜筒，直到双眼可以同时看清完整的视场为止，看一下此时的眼距(可以从观察头面板的刻度尺上读出)，然后把两目镜筒的视度圈的相应数值调到对准镜筒刻度为止。

(5) 显微镜的调焦：先用一只 10×目镜和 10×物镜进行初步观察。旋转粗调手轮提升平台直到样品的图像可以粗略地看到，然后再旋转微调手轮可以获得清晰的图像。在必要时，可松开自动调焦止动旋钮，使平台运动自如。这时应防止物镜接触样品，一旦结束调焦，就应当收紧自动调焦止动旋钮，这样就限制了平台移过定位点。再用另一只目镜观察图像，调节视度圈获得清晰图像，在需要时，旋转转换器，按需求改变物镜的放大倍率。

(6) 如果必要，如下述调节显微镜以获得清晰的图像和舒适地观察，根据各种样品的密度和物镜的放大倍数，亮度亦应相应调节。如果光线明显偏黄，应在聚光镜的滤光镜座中放入蓝色滤色片。

(7) 油镜的操作，如果用高倍镜未能看清目的物，可用油镜。先用低倍镜和高倍镜检查标本片，将目的物移到视野正中；用粗调节器将镜筒提起 1.5~2cm，将油镜头转至镜筒下方，在载玻片上滴 1 滴香柏油。然后从侧面注视，用粗调节器缓缓降下镜筒，直至油镜头浸没于香柏油内，至几乎与载玻片相接触，但注意不能相碰，以免压破载玻片并损伤油镜头。然后从目镜中观察，首先调节光亮度，适当加大，用粗调节器极其缓慢地提升镜筒至出现物像为止。再用细调节器微调至物像清晰。油镜观察完毕，用擦镜纸将镜头上的油擦净，另用擦镜纸蘸少许二甲苯擦拭镜头，再用擦镜纸擦干。注意：二甲苯用量不宜过多，擦拭时间应短。

(8) 注意：用完之后一定要将物镜旋转到最低倍数的那一个对准透光孔！

### 三、显微镜的保护注意事项

(1) 避免直接在阳光下曝晒,因为透镜与透镜之间、透镜与金属之间都是用树脂和亚麻仁油黏合的。金属与透镜的膨胀系数不同,受高热因膨胀不均,透镜可能脱落或破裂,树脂受高热溶化,透镜也会脱落。

(2) 避免和挥发性药品或腐蚀性酸类一起存放,碘片、酒精、醋酸、盐酸和硫酸等对显微镜金属质机械装置和光学系统都是有害的。

(3) 透镜要用擦镜纸擦拭,若仅用擦镜纸擦不净,可用擦镜纸蘸少许二甲苯擦拭,但用量不宜过多,擦拭时间也不宜过长,以免黏合透镜的树脂被溶化,而使透镜脱落。

(4) 不能随意拆卸显微镜,尤其是物镜、目镜、镜筒不能随意拆卸,因拆卸后空气中的灰尘落入里面会引起生霉。机械装置经常加润滑油,以减少因摩擦而受损。

(5) 避免用手指沾抹镜面,否则会影响观察,沾有有机物的镜头,时间长了会生霉,因此,每使用一次,所有的目镜和物镜都得用擦镜纸擦净。

(6) 显微镜放在干燥处,镜箱内要放硅胶吸收潮气。目镜、物镜放在盒内并贮存于干燥器中,以免受潮生霉。

(7) 学生使用显微镜固定镜号、位置,填写使用卡,本学期一直使用本台显微镜。

(8) 观察标本时,必须依次用低、高倍镜,最后用油镜。当目视接目镜时,特别在使用油镜时,切不可使用粗调节器,以免压碎玻片或损伤镜面。

(9) 观察时,两眼睁开,养成两眼能够轮换观察的习惯,以免眼睛疲劳,并且能够在左眼观察时,右眼注视绘图。

(10) 拿显微镜时,一定要右手拿镜臂,左手托镜座,不可单手拿,更不可倾斜拿。

### 四、细菌的个体形态观察

#### 1. 仪器和材料

(1) 显微镜、擦镜纸、香柏油、二甲苯或乙醇-乙醚(2:1)混合液、吸水纸等。

(2) 示范片:各种细胞形态的典型示范片。

#### 2. 实验内容和操作方法

严格按光学显微镜的操作方法,依低倍、高倍及油镜的次序逐个观察杆状、球状细菌示范片,用铅笔绘出各种细菌的形态图。

### 思考题

1. 油镜与普通物镜在使用方法上有何不同?应特别注意些什么?
2. 如何正确使用油镜?油镜观察的原理及注意事项有哪些?
3. 使用油镜时,为什么必须用香柏油?
4. 镜检玻片标本时,为什么要先用低倍物镜观察,而不直接用高倍物镜或

油镜进行观察？

5. 根据实验室提供的微生物玻片，你在显微镜下看到了几种微生物，它们分别是什么形态？将它们描绘下来，并判断它们属于原核细胞还是真核细胞。对于原核细胞微生物，试着判断如果进行革兰氏染色，其革兰氏染色的结果。

6. 思考除显微镜观察认识微生物外，还有哪些其他的方法？

7. 通过示范玻片的观察，谈谈你对微生物多样性的理解。

## 实验二 微生物的染色

### 一、目的

学习染色原理和方法，掌握微生物涂片、革兰氏染色、无菌操作技术；巩固显微镜的使用。

### 二、染色原理

微生物（尤其是细菌）个体微小，其机体是无色透明的，在显微镜下，微生物体与其背景反差小，不易看清微生物的形态和结构，若增加其反差，微生物的形态就可看得清楚，通常用染料将菌体染上颜色以增加反差，便于观察。

微生物细胞由蛋白质、核酸等两性电解质及其他化合物组成，所以，微生物细胞表现出两性电解质的性质。两性电解质兼有碱性基和酸性基，在酸性溶液中离解出碱性基呈碱性带正电。在碱性溶液中离解出酸性基呈酸性带负电。经测定，细菌等电点在  $\text{pH}=2\sim 5$  之间，故细菌在中性 ( $\text{pH}=7$ )、碱性 ( $\text{pH}>7$ ) 或偏酸性 ( $\text{pH}=6\sim 7$ ) 的溶液中，细菌的等电点均低于上述溶液的  $\text{pH}$  值，所以细菌带负电荷，容易与带正电的碱性染料结合，故用碱性染料染色的为多。碱性染料有美蓝、甲基紫、结晶紫、龙胆紫、碱性品红、中性红、孔雀绿和蕃红等。

微生物体内各结构与染料的结合力不同，故可用各种染料分别染微生物的各结构以便观察。

### 三、染色方法分类

#### 1. 简单染色法

简单染色法又叫普通染色法，只用一种染料使细菌染上颜色，如果仅为了在显微镜下看清细菌的形态，用简单染色即可。即利用细菌与各种不同性质的染料如石碳酸复红、结晶紫、美蓝等具有亲和力而被着色的原理，采用一种单色染料对细菌进行染色，其具体步骤见本实验第五部分。

#### 2. 复染色法

用两种或多种染料染细菌，目的是为了鉴别不同性质的细菌，所以又叫鉴别染色法。主要的复染色法有革兰氏染色法和抗酸性染色法。抗酸性染色法多在医学上采用。此处介绍革兰氏染色法。

革兰氏染色法是细菌学中很重要的一种鉴别染色法。它可将细菌区别为革兰氏阳性菌和



革兰氏阴性菌两大类。其染色步骤如下：先用草酸铵结晶紫染色，经碘-碘化钾（媒染剂）处理用乙醇脱色，最后用蕃红液复染。如果细菌能保持草酸铵结晶紫与碘的复合物而不被乙醇脱色，呈紫色者叫革兰氏阳性菌。被乙醇脱色用蕃红液复染后呈红色者为革兰氏阴性菌。染色成败的关键在于严格掌握酒精脱色程度和应使用新鲜幼龄的菌体进行涂片。其具体步骤见本实验第五部分。

### 3. 芽孢染色法

用普通染色法制成的标本片，在显微镜下观察时，菌体着色而芽孢不着色。由于细菌芽袍着色较难，脱色也不易，因此芽孢染色的基本方法是采用着色力强的染料，如孔雀绿、石碳酸复红等加热染色，使菌体和芽孢都着色，再通过脱色剂使菌体脱色而芽孢不脱色。然后用其他染料使菌体再着色，这样菌体与芽孢形成不同颜色的鲜明对照。其操作步骤如下：

(1) 制片：涂片、风干、固定。

(2) 初染：滴 3~5 滴孔雀绿染色液于涂片上。用木夹夹住载玻片在酒精灯火焰上加热，使染液冒气但不沸腾，注意勿使染液蒸干，必要时可添加孔雀绿染色液。从冒气开始计算 6~8 分钟，倾去染液，待载玻片冷却后水洗至不再褪绿色为止。

(3) 复染：用蕃红染色液染 2~3 分钟，水洗，风干。

(4) 镜检：芽孢呈绿色，团体呈红色。

### 4. 荚膜染色法

荚膜为多糖类物质，不易着色，故常用衬托染色法，即将菌体及背景着色以衬托出不着色的荚膜。操作步骤如下：

(1) 制片：在干净载玻片的一端滴 1 滴蒸馏水或生理盐水，用接种环以无菌操作取少许菌落，制成细菌悬液，加 1 滴黑色素水溶液或绘图黑墨水与菌液混合。另取一块边沿平整的载玻片，将上述混合液顺载玻片表面刮过，使之成为一匀薄菌层并很快风干。

(2) 固定：用纯甲醇固定 1 分钟。

(3) 染色：用蕃红染色液冲去残留甲醇，染色 0.5~1 分钟，以细水流冲洗，再用滤纸小心地吸去余水。

(4) 镜检：油镜下观察，背景呈黑色，细胞呈红色，衬托出不着色的荚膜。

### 5. 鞭毛染色法

细菌鞭毛直径在 10~20nm，超过了普通光学显微镜的分辨范围。鞭毛染色是使染料在鞭毛上沉淀堆积，加粗其直径便于在普通光学显微镜下观察。一般而言，以幼壮培养体产生鞭毛情况最好，故鞭毛制片常以短期内经多次移植的新鲜幼龄培养体为佳。鞭毛染色必须采用新配制的染色液以及高度清洁的载玻片，才能保证染色质量。

(1) 初检：制水浸标本片检查细菌的运动性。方法是用接种环以无菌操作挑取少许菌落置于载玻片上已滴好的蒸馏水中，用镊子小心地从菌液一侧向另一侧盖上盖玻片，注意勿产生气泡。将水浸标本片置于高倍物镜下观察活菌是否运动，此时视野背景光线宜稍弱。如运动性很强，则可制片进行鞭毛染色。

(2) 制片：在清洁载玻片的一端加蒸馏水 1 滴，用接种环挑取少许菌落，在载玻片水滴中轻沾使成菌悬液。倾斜载玻片使菌悬液下流，形成薄菌膜，然后平置载玻片使其自然干燥。

(3) 染色：滴加鞭毛染色液 A 液染色 3~5 分钟，用蒸馏水轻轻冲洗。再用鞭毛染色液