



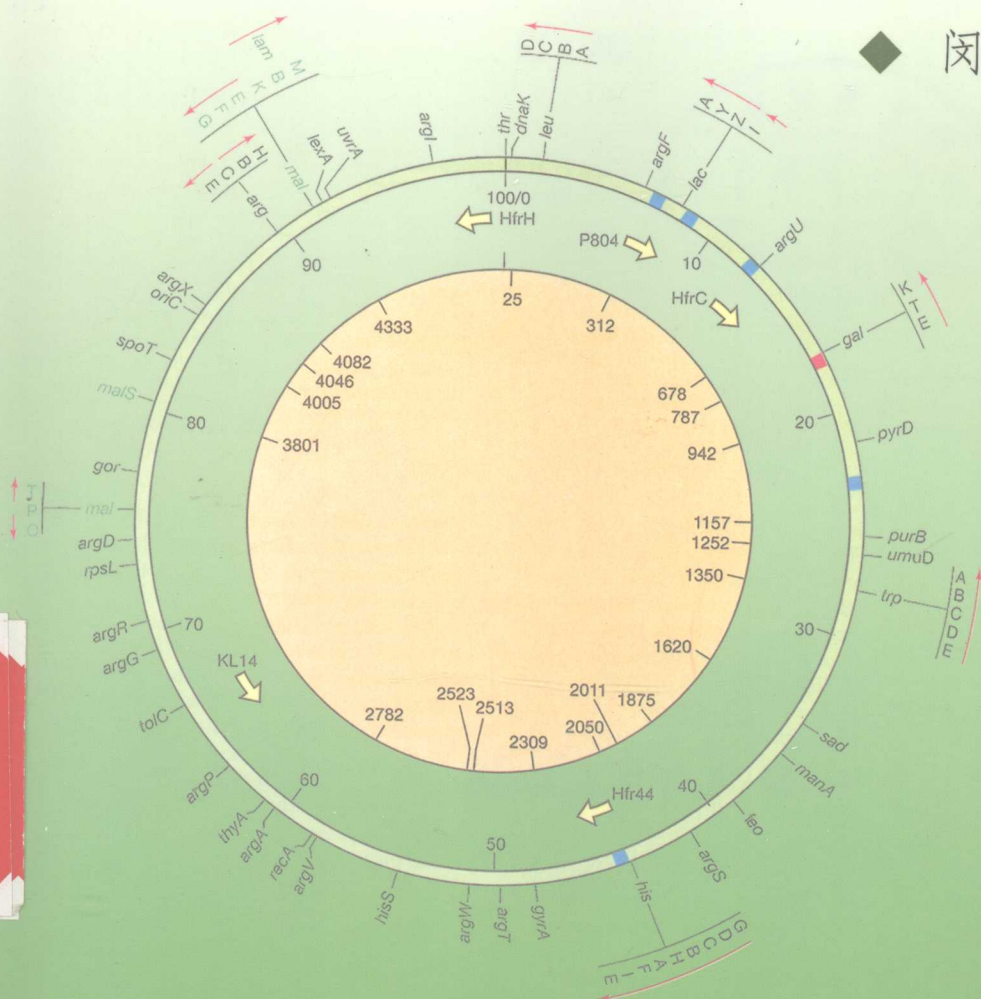
国家理科基地名牌课程系列教材
TEXTBOOK SERIES FOR BIOLOGICAL SCIENCE BASE

微生物学实验

EXPERIMENT OF MICROBIOLOGY

实验指导分册

◆ 闵 航 主编



浙江大學出版社

国家卫生和计划生育委员会规划教材
供临床医学、口腔医学、预防医学、护理学、药学、医学检验、医学影像、康复治疗学、生物医学工程、医学美容、医学美容技术、医学美容师、医学美容师(美容师)等专业的教材

供临床医学、口腔医学、预防医学、护理学、药学、医学检验、医学影像、康复治疗学、生物医学工程、医学美容、医学美容技术、医学美容师、医学美容师(美容师)等专业的教材

微生物学实验

EXPERIMENTAL MICROBIOLOGY

实验指导分册

李 明 编 著



清华大学出版社

微生物学实验

(实验指导分册)

主 编：闵 航

参 编：贾小明 陈美慈 马晓航

吴伟祥 陈中云 林小清

闵 航

浙江大學出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学实验 / 闵航主编. —杭州: 浙江大学出版社,
2005. 2
ISBN 7-308-04071-2

I. 微... II. 闵... III. 微生物学—实验
IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 001500 号

责任编辑 杜玲玲 唐桂礼
封面设计 刘依群
出版发行 浙江大学出版社
(杭州浙大路 38 号 邮政编码 310027)
(E-mail: zupress@mail. hz. zj. cn)
(网址: <http://www.zjupress.com>)
排 版 浙江大学出版社电脑排版中心
印 刷 杭新印务有限公司
开 本 787mm×1092mm 1/16
印 张 9.25
字 数 237 千
版 次 2005 年 2 月第 1 版 2005 年 2 月第 1 次印刷
印 数 0001—3000
书 号 ISBN 7-308-04071-2/Q·048
定 价 12.00 元

前 言

这本《微生物学实验指导》是在前三版(1983 年第一版,1988 年第二版,1999 年第三版)的基础上,为进一步适应微生物学学科的发展和本科教学的实际需要,进行修改扩充编写而成的。全书分“实验指导”与“实验报告”两分册。实验指导共设 29 个实验,系统包括了形态观察、操作技术和实际应用,内容涵盖了微生物学的形态、生理、生化、遗传育种、生态、环境、生物活性、系统发育、分子生态等不同方面;本书与由闵航主编的《微生物学》教材(浙江大学出版社,2005)的内容相配套,以适用于生物科学、生物技术、生物信息、应用生物学、农学类、环境微生物学等各个专业,使用时可根据不同专业的教学要求加以选择。

值本书正式出版之际,编者向为创建和编写本书中各个实验付出辛勤劳动的所有教师、实验管理人员,尤其是王献凤、陈浩军两位老师表示由衷的感谢。由于编者水平有限,不妥之处在所难免,请读者批评指正。

编 者

2004 年 8 月

微生物学实验须知

1. 进行微生物学实验前必须充分预习实验指导,明确实验目的、原理和方法,做到心中有数,以提高实验质量。
2. 实验室中不得高声说话、谈笑、喧闹,尽量少走动,以保持严肃、安静、清洁的环境。
3. 保持试验桌及地面的清洁,废纸、废棉花、培养物等应投入污物桶内,不得任意乱丢;严禁随意吐痰。
4. 注意安全,节约水电,爱护公物,尤其是显微镜等贵重仪器,要细心操作;如有损坏,应立即报告实验指导教师,并进行登记;凡属责任事故者,应按有关规定赔偿。
5. 严格遵守操作规程,显微镜使用后应按要求擦洗干净,放置于原放置的柜内位置;认真进行无菌操作,灭菌物品和菌种不得随意开启,以免污染。
6. 实验中需进行培养的材料,应注明班级、组别、名称及处理方法,放于教师指定地点进行培养。
7. 实验过程中如不慎将菌液或其他化学物溶液吸入口中,要及时用自来水反复漱口;皮肤割破或烫伤要及时处理。
8. 实验时要认真观察,用铅笔绘图,按时完成实验报告。
9. 实验完毕,必须整理好实验桌上各种器材,并按原来的位置放置整齐;已用过的各种器皿应洗涤干净,放于指定位置。值日人员应将实验桌和地面打扫干净,经实验指导教师同意后,方可离开。

目 录

微生物学实验须知	1
实验 1 显微镜油镜的使用和细菌形态的观察	1
实验 2 细菌的染色和细菌细胞构造的观察	10
实验 3 放线菌和真菌形态的观察	17
实验 4 微生物细胞大小和数量的测定	21
实验 5 微生物培养基的配制和灭菌	25
实验 6 微生物的分离、培养和菌种保藏	32
实验 7 食用菌——平菇的栽培	42
实验 8 甜酒酿的制作和酒药中糖化菌的分离	46
实验 9 微生物的生理生化反应	48
实验 10 细菌纯培养生长曲线的测定	52
实验 11 噬菌体的培养及效价测定	54
实验 12 根瘤菌质粒的快速检测	56
实验 13 细菌的紫外线诱变和营养缺陷型突变株的筛选	58
实验 14 土壤微生物区系的埋片观察法	63
实验 15 水质的细菌学检查以及空气中微生物的检测和计数	65
实验 16 活性污泥中微生物的显微镜观察	71
实验 17 活性污泥或水稻土中甲烷形成活性的测定	73
实验 18 豆科植物根瘤、根瘤细菌的形态观察及其分离	75
实验 19 根瘤或土壤固氮酶活性的测定	77
实验 20 环境条件对微生物生长的影响	79
实验 21 用 AMES 法测定化学物质的致突变作用	82
实验 22 微生物对不含氮有机物和含氮化合物的转化作用	84
实验 23 硝化作用强度的测定	88
实验 24 分解果胶类物质微生物的检测	90
实验 25 微生物乳酸发酵的观察	91
实验 26 液化型淀粉酶产生菌的分离与酶活性的测定	93
实验 27 蛋白酶产生菌的分离和蛋白酶活性的测定	95
实验 28 细菌分离菌株的分子生物学鉴定与系统发育分析	97
实验 29 土壤细菌群落多样性的 PCR-DGGE 凝胶电泳分析	99
附 录 微生物计数 MPN 法统计近似表	101
参考文献	103

实验 1 显微镜油镜的使用和细菌形态的观察

微生物的个体微小,肉眼难以见到,要研究它们,必须要用显微镜来观察。因此,显微镜是研究微生物的重要工具。显微镜是一种精密的光学仪器,使用时必须了解其基本原理和构造,才能充分发挥其性能。

一、目的要求

- (1) 学习并掌握显微镜油镜的使用技术及维护的基本知识。
- (2) 使用油镜观察细菌的几种基本形态。
- (3) 用悬滴法在高倍镜或油镜下观察细菌的运动。

二、生物显微镜、相差显微镜及其油镜的使用原理

(一) 显微镜的结构与油镜的使用原理

1. 显微镜的构造

图 1-1 为单目普通显微镜,现已较少使用。其结构可分为两大部分:光学部分和机械部分。光学部分通常由接目镜、接物镜和照明装置(聚光镜、虹彩光圈、反光镜等)组成。它使检视物放大,形成物像,是显微镜的重要组成部分。机械部分由镜座、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台、载物台移动器、粗调节器、细调节器等部件组成。它起着支撑、调节、固定等作用。

2. 显微镜的放大倍数和分辨率

(1) 显微镜的放大倍数

显微镜放大物体,首先经过物镜第一次放大成像,再经过目镜在明视距离内第二次放大成像。因此,显微镜的放大倍数等于接物镜的放大倍数和接目镜放大倍数的乘积,即:

显微镜放大倍数 = 接物镜放大倍数 × 接目镜放大倍数

(2) 显微镜的分辨率

显微镜的分辨率是表示显微镜分辨物体两端之间距离的能力,能够分辨物体两点间的距离

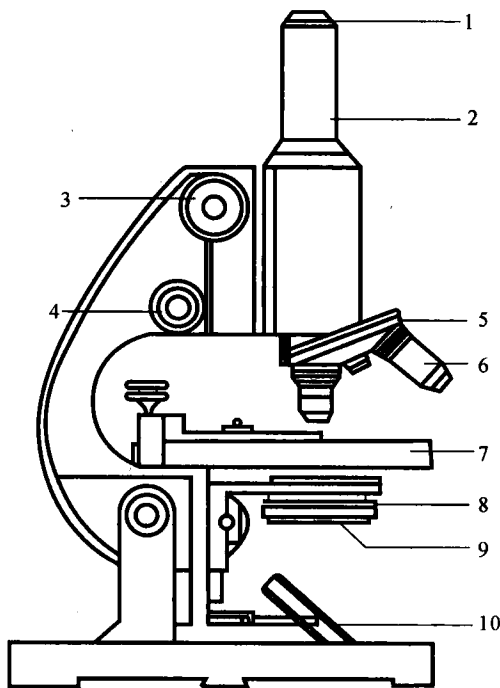


图 1-1 普通光学显微镜结构示意图

1. 接目镜; 2. 镜筒; 3. 粗调节器; 4. 细调节器
5. 转换器; 6. 接物镜; 7. 载物台; 8. 光圈
9. 聚光器; 10. 反光镜

愈小,则分辨率愈高。分辨率的高低,首先取决于物镜的镜口率所使用光线的波长,见图 1-2。

显微镜的分辨率可以用以下公式表示:

$$D = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}}$$

式中: D 为物镜分辨出物体两点间的最短距离;

λ 为可见光的波长(平均 $0.55\mu\text{m}$);

n 为物镜和被检标本间介质的折射率;

α 为镜口角(即入射角)。

λ 愈大, D 值愈大,分辨率愈低, n 和 α 愈大, D 值愈小,分辨率愈高。因此,可以通过降低光线波长,增大介质折射率和加大镜口角(入射角)来提高分辨率。

3. 油镜使用的原理

对于个体微小,用高倍镜仍观察不清的微生物,则必须使用油镜。使用时,需要在标本和物镜间加入一种镜头油,如香柏油,所以叫油浸接物镜,简称油镜。

一般在镜头上有一黑圈或红圈的,表示为油镜物镜,也有的以“IO”或“HI”字样来表示。由于油镜镜面很小,使用时检视物与镜面又非常靠近($0.14 \sim 0.19\text{mm}$),因而进入镜头的光线较少。当光线由反光镜通过玻片与镜头之间时,玻片与物镜之间的介质为空气(接物镜干燥系),空气折射率为 1,由于空气与玻片的密度不同,使光线受到折射,发生散射现象,结果进入物镜的光线必然减少,这样就降低了视野的照明度。若载玻片与物镜之间的介质不是空气,而是一层油质[一般常用香柏油,其折射率为 1.515,与玻璃的折射率(1.52)相近],光线通过载玻片可直接通过香柏油进入物镜而几乎不发生折射(接物镜油浸系),使视野增加进光量,这样就能使物像更加清晰,见图 1-3。

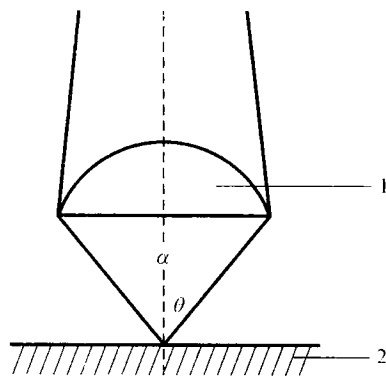


图 1-2 物镜的光线入射角

1. 镜头; 2. 载玻片

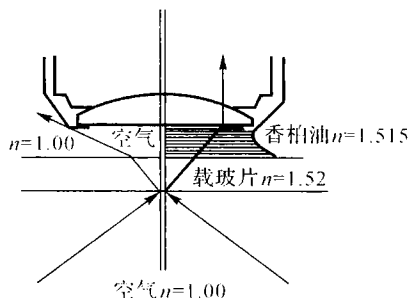


图 1-3 干燥物镜与油浸系统物镜光线通路

(二) 显微镜的一般使用方法(以油镜为例)

1. 用前检查

从显微镜箱中取出显微镜时,用右手拿镜臂,左手托镜座,直立移动,轻放在平稳的桌面上,然后检查各部零件是否齐全,镜头是否清洁,若有异常则即时报告老师。

2. 调节光照

正确的照明是获得良好检查效果的前提,用粗调节器提升镜筒,将低倍物镜旋到镜筒下方,使镜头和载物台距离为 5mm 左右,左眼看目镜,调节反光镜镜面角度(在天然的光线下观察,一般用平面反光镜;若以灯光为光源,则多用凹面反光镜)。调节光线强弱,然后调节聚光镜的位置(酌情升降),直至视野内得到最均匀最适宜的光度为止。

3. 低倍镜观察

低倍物镜视野面广,焦点深度较深,易于发现目标,确定观察位置,故应先用低倍镜观察为宜。

将载片标本(涂面朝上)置于载物台的标本夹上,并将标本部位处于物镜的正下方,转动粗调节器,使镜头下降至镜面距离检视物大约 10mm 处。然后以左眼看目镜,一边观察视野,一边扭动粗调节器使镜头缓慢地升高,至视野内出现物像后,改用细调节器上微微转动,仔细调节焦距和照明,直至视野内获得清晰的物像。选择适宜部位,移到视野中心,将物镜转至高倍镜观察。

4. 依次再进行中倍、高倍观察

在物镜依次由低倍至中倍、高倍的观察过程中,应逐次上升聚光镜以调节光线亮度,同样选择适宜的部位移至视野中央。

5. 油镜观察

将聚光镜提升至最高点,转动转换器,移开高倍镜,使高倍镜和油镜成“八”字形,在标本中央滴一小滴香柏油,使油镜镜头浸入香柏油中,微微转动细调节器至可见清晰物像;如果油镜上升已离开油面还未看清物像,则需要重新调节。此时可从侧面注视,用粗调节器将镜筒小心地降下,使油镜浸在香柏油中,其镜头几乎与标本相接。应特别注意不能压在标本上,更不能用力过猛,否则不仅压碎玻片,还会损坏镜头。用左手向上转动粗调节器,当视野中有模糊的标本物像时改用细调节器,直到看清物像为止。

6. 换片

另换新的标本片,必须从第 3 条开始操作。

7. 用后必须清洁、复原

观察完毕,上旋镜筒,先用擦镜纸擦去镜头上的油,然后再用擦镜纸沾取少许二甲苯(香柏油溶于二甲苯)擦去镜头上的残留油迹,最后再用擦镜纸擦去残留的二甲苯。机械部件用细软布擦去灰尘和冷凝水,下降镜筒,将接物镜转成八字形置于载物台上。下降聚光镜(切勿使接物镜与聚光镜相碰受损),反光镜垂直于镜座。放进显微镜箱中锁好,并放入指定的显微镜柜中。

8. 显微镜保养和使用中的注意事项

- ① 不准擅自拆卸显微镜的任何部件,以免损坏。
- ② 镜面只能用擦镜纸擦,不能用手指或粗布擦,以保证镜面的光洁度。
- ③ 观察标本时,必须依次用低倍镜、中倍镜、高倍镜,最后用油镜。当目视接目镜时,特别在使用油镜时,切不可用粗调节器向下旋,以免物镜碰到玻片损伤镜面或压碎玻片。
- ④ 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,并且学会在左眼观察时,右眼注视绘图。
- ⑤ 拿显微镜时,一定要右手拿镜臂,左手托镜座,不可单手拿,更不可倾斜挪动。
- ⑥ 显微镜应存放在阴凉干燥处,以免镜片滋生霉菌而腐蚀镜片。

(三)Nikon 显微镜的使用方法

1. Nikon 显微镜的结构

Nikon 显微镜 YS100 是目前实验室中微生物学实验所使用的双目显微镜,其结构示意图见图 1-4 和图 1-5。

2. Nikon 显微镜的使用方法

为了充分了解 Nikon 显微镜,更好地掌握这一精密仪器的性能及其使用方法,本实验对显微镜的结构及功能作较详细的介绍,指导教师作进一步的示范操作。因此,在使用时必须严格地按本实验的操作规程进行操作。具体的操作步骤如下:

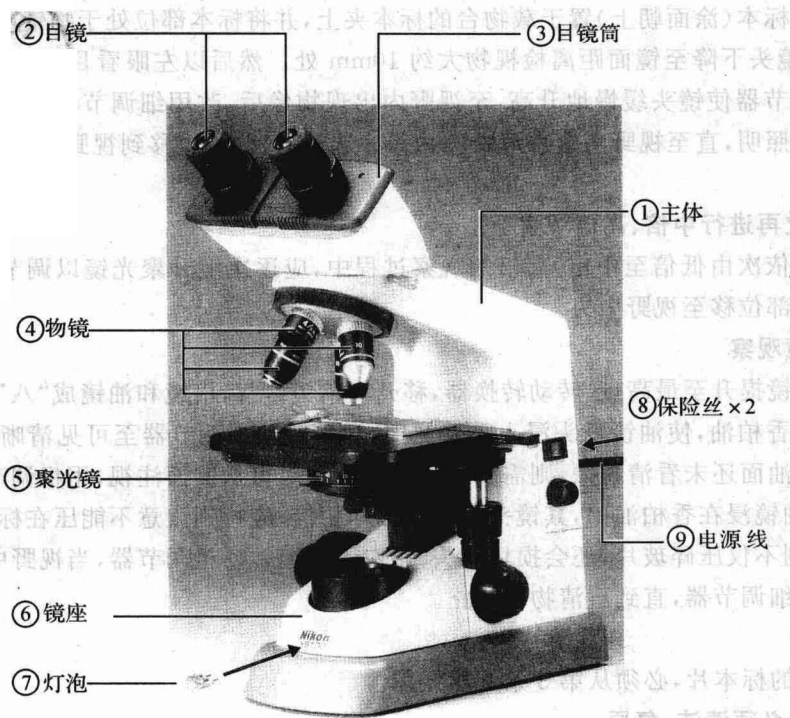


图 1-4 Nikon 显微镜的结构示意图 1

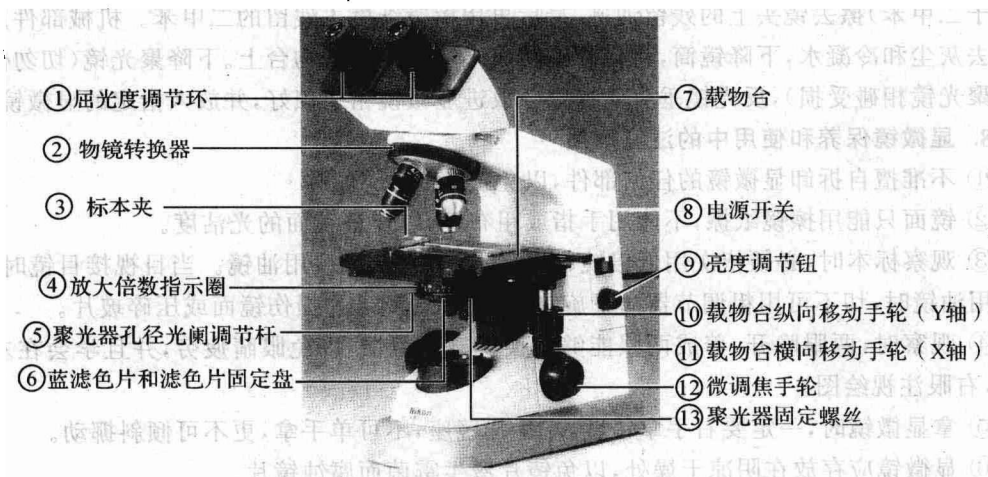


图 1-5 Nikon 显微镜的结构示意图 2

- ① 接通电源。
- ② 打开主开关。
- ③ 移动电压调整旋钮,使光亮度适中。
- ④ 把标本固定在载物台上。
- ⑤ 放松粗调锁挡。
- ⑥ 用低倍物镜,旋转粗调和微调控制钮来进行对焦。

⑦ 调节双目镜筒间距和视度差。调节左右双目镜筒间距调节座,使其与视场合而为一。旋转左右目镜套筒,使镜长补偿环刻度的数值与双目镜筒间距的刻度相一致。一边旋转粗调、微

调按钮,一边在标本上对焦。

⑧ 再适当调节照明亮度。

⑨ 使焦点正确地对准标本。

⑩ 锁紧粗调锁挡。

⑪ 调节孔径光栏,使视野亮度适宜。

⑫ 依次用低倍、中倍、高倍观察。

⑬ 油镜观察,移开高倍镜,在载玻片的标本中加一滴香柏油,旋转油镜至油液中,旋转微调控制钮,并将聚光镜调高与载片紧贴,即可见到清晰的物像。

⑭ 观察完毕,清洁、复原。

先将电压调整旋钮复原,关闭主开关,切断电源。放开粗调锁挡。

油镜的处理:先用擦镜纸擦去镜头上的油,再用蘸有二甲苯的擦镜纸擦镜头,最后用干净的擦镜纸将镜头擦干净。

⑮ 放入保存箱中。

(四)Olympus 生物显微镜

Olympus 生物显微镜是从日本进口的一种双目光学显微镜,它具有使用方便、分辨率高并且有立体感等优点,是研究微生物的良好工具。

1. 显微镜的结构与性能

(1)显微镜的结构 Olympus 生物显微镜的结构示意图见图 1-6 和图 1-7。主要由双筒目镜、物镜、镜筒、镜架、转换器、机械载物台、载物台、聚光镜、底盘等组成。

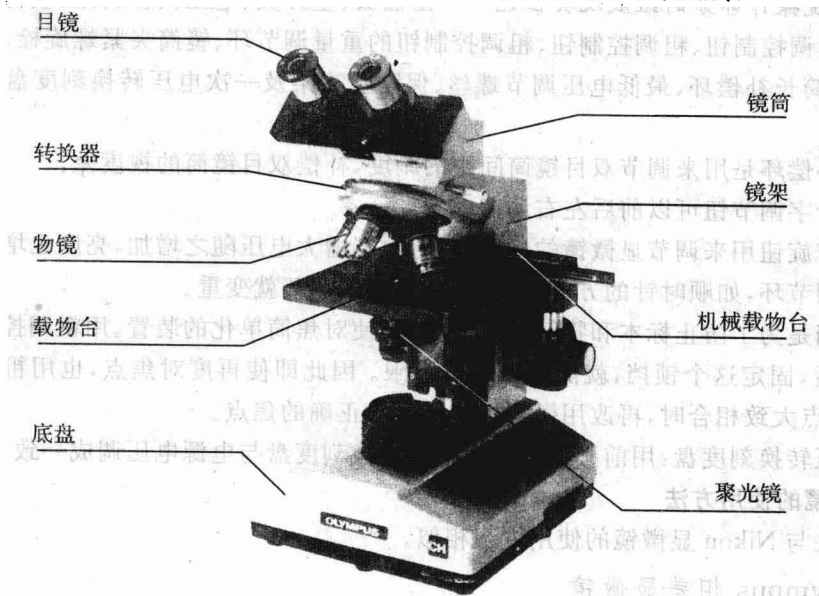


图 1-6 Olympus 显微镜的结构示意图 1

目镜放大倍数为 10× 15×

物镜放大倍数为 10×

20×

40×

100×

弹簧加重

弹簧加重



图 1-7 Olympus 显微镜的结构示意图 2

(2)显微镜操作部分的组成及其性能 由插头、主开关、电压调整旋钮、载物台十字调节钮、夹紧器、微调控制钮、粗调控制钮、粗调控制钮的重量调节环、镜筒夹紧螺旋栓、双目镜筒间距的刻度、镜筒长补偿环、最低电压调节螺丝、保险丝支架及一次电压转换刻度盘和粗调锁挡等组成。

镜筒长补偿环是用来调节双目镜筒间距的刻度,补偿双目镜筒的视度差。

载物台十字调节钮可以前后左右调节。

电压调节旋钮用来调节显微镜的光度,随着数字增大电压随之增加,亮度也增大。粗调控制钮为重量调节环,如顺时针的方向旋转,则这重量调节环就变重。

粗调锁挡是为了防止标本和物镜的碰撞,以及使对焦简单化的装置。用粗调控制或把焦点与标本对好后,固定这个锁挡,就能限制粗调下限。因此即使再度对焦点,也用粗调调至停止的位置,当焦点大致相合时,再改用微调控制钮调出正确的焦点。

一次电压转换刻度盘:用前必须把一次电压转换刻度盘与电源电压调成一致。

2. 显微镜的使用方法

使用方法与 Nikon 显微镜的使用方法相似。

(五)Olympus 相差显微镜

暗视野显微镜虽然可以看到活的微生物的轮廓,但是不能清楚地观察到内部结构,因为生物细胞的内部结构大部分都是透明的。相差显微镜则可以克服这方面的缺点。

1. 相差显微镜的工作原理

人的肉眼只能分辨光波的波长(颜色)和振幅(亮度)的差异,而不能分辨光波相应的差异。微生物细胞经过染色后,可以看得更清楚,这是由于改变了光波的波长(有的也同时改变了振幅)。透明的物体不能改变光波的波长和振幅,只能使光波的相位发生改变。因此,在普通显

显微镜下,活细胞内的显微结构是不易看到的。

相差显微镜具有一个特殊的由环状光圈与聚光镜组合而成的转盘聚光镜,通过这个特殊的装置,就可把光波的相位差异变为振幅的差异,从而使人们能观察到活细胞的细微结构,并有立体的感觉。

在微生物研究工作中,经常应用相差显微镜来观察微生物的活细胞结构、鞭毛的运动等。

2. 相差显微镜的装置

(1)环状光圈 环状光圈装在显微镜的聚光镜下,使光线只能从环状部分形成一个空心圆筒状的光柱,再通过聚光镜照在载玻片的标本上。

(2)相差物镜(具有环状相板) 相差物镜是相差显微镜的主要装置。在物镜的后焦平面上加一相板,相板上涂一层物质(多为氯化镁等喷涂而成),使光波相对地提前或阻滞 $1/4$ 波长。由于直射光的强度远远大于绕射光,即便是两者反向而发生干涉作用,其效果还是不够明显,所以要降低直射光的透光度,使相环呈暗色并使大约 25% 的直射光通过。环状相板上的暗环与环状光圈上的亮环,大小是配合的,通过透明标本的直射光,一定要准确地经过环状相板的暗环,以减弱视野亮度,增进观察效果。

相差物镜常刻有红色的 ph 样标记,ph 是 phase(相)的缩写。Olympus 相差物镜用红圈来代表相差物镜。

(3)定中心望远镜(也称辅助目镜) 这是一种工作距离长的低倍望远镜。使用时拔出目镜,安装在镜筒上端,调整环状光圈的中心使其与物镜的光轴完全在一直线上。

(4)辅助固定扳手。

(5)绿色滤光片 它的作用是使光源波长一致,增加干涉效果。

3. 相差显微镜的使用方法

(1)相差装置的安装 Olympus 相差显微镜是将普通的生物显微镜的聚光镜拆下,然后把转盘聚光镜安装在聚光镜支架上,方位记号要向前,聚光镜的上透镜平面要和镜台平面一致。将绿色滤光片放在滤色镜座上。

(2)相差物镜的安装 将相差物镜由低倍、中倍、高倍、油镜按顺时针方向安装在转换器上。

物镜的放大倍数为 $10\times$

$20\times$

$40\times$ 弹簧加重

$100\times$ 弹簧加重

(3)安放标本 将标本安放在载物台上,并用夹紧器夹紧。

(4)对光 先以相差物镜与普通目镜对光,旋转相差转盘至方位记号为“0”时停止,这时通光孔正位于聚光镜下面。使用低倍相差物镜,把标本移向视野中央,推动电压调整旋钮,调节光源亮度、高度和位置,以得到光亮均匀的视野。

(5)调焦 用粗调控制钮和微调控制钮调节焦点,至看清物像时为止。

(6)旋转相差转盘 使环光圈的直径和孔宽与所使用的相差物镜相适应。例如,使用 10 倍相差物镜时,要在方位记号表示 10 倍的位置停止旋转。

(7)中心调节 拔出普通目镜,插入定中心望远镜,一边看望远镜,一边旋转目镜镜筒使之升降,对准焦点就可看到清楚的亮环和暗环。再进行中心调节,如果两个圆环不能完全重合而有误差,则使用聚光器上左右侧的锁状螺旋——光环中心调节器,进行精密的调节,使两环完全重合。在调节过程中若亮环比暗环小而位于暗环内侧,此时可降低聚光镜;若亮环大于暗

环时,可升高聚光镜,升到最高限仍不能矫正,则是载玻片过厚的缘故,需要更换较薄的载玻片。载片的厚度以 0.8~1.2mm 为宜。

(8)相差观察 最后拔出定中心望远镜,插入普通目镜就可利用普通明视野的微检方法进行相差观察。每次更换标本或改变不同倍率的相差物镜时,都必须按上述方法重新调节中心,否则光轴不一致。

三、实验材料

- ① 显微镜(显微镜灯)、香柏油、二甲苯、擦镜纸、吸水纸等。
- ② 细菌三种形态的染色标本。
- ③ 培养 12~18 h 的枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)
- ④ 盖玻片、凹玻片、接种环、酒精灯。

四、实验程序

(一)细菌三种基本形态的观察

识别细菌首先要从形态特征入手,细胞形态观察包括菌落形态和个体形态,这里主要是指个体形态的观察。细菌个体形态包括活细菌观察和涂片染色观察。在一般实验室条件下,常常用染色观察来识别细菌的形态。

- ① 结合油镜的使用,观察三张细菌染色片(球状菌、杆状菌和螺旋状菌),边观察边绘图。
- ② 用示范镜观察双球菌、四联球菌,并绘图。

(二)细菌运动性的观察(示范)

有些细菌具有鞭毛,它是运动器官,在水中能自由快速地运动。观察细菌的运动一般采用水浸片法、悬滴法、半固体培养法,通常用水浸片法和悬滴法来观察细菌的运动性。

1. 水浸片法

用接种环取培养 12~18h 的枯草杆菌菌液一环,置于干净的载玻片中央,盖上盖玻片(注意不使产生气泡),用低倍镜确定部位后,再换用中倍至高倍或油镜观察。

2. 悬滴法

取一洁净的盖玻片。按无菌操作要求,用接种环从斜面低部取培养 12~18h 的枯草杆菌菌液一环,置盖玻片中央(要求菌液保持为圆形突起的水珠)。另取凹玻片一块,在凹窝周围涂一圈凡士林,再将带菌液的盖玻片翻转,使液滴悬于凹玻片之凹窝处上方并避免菌液触及凹窝的边和底,略按盖玻片,使凡士林密封边缘以减少

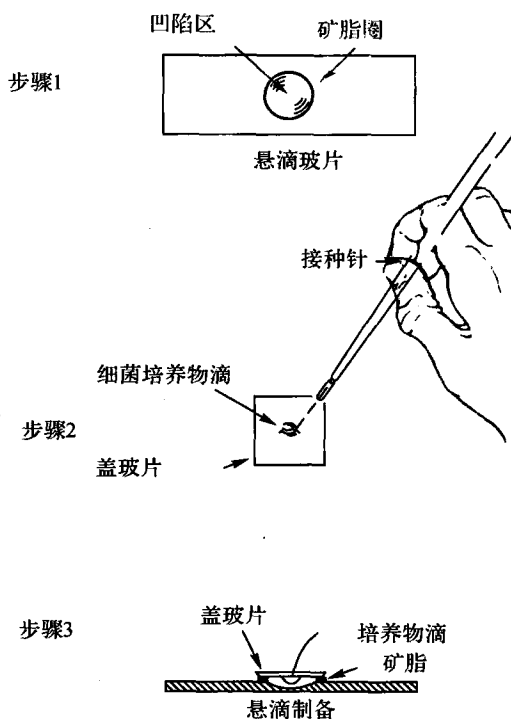


图 1-8 悬滴法观察细菌运动性

菌液蒸发,这样可以保持较长时间观察。见图 1-8。悬滴片制成后,先用低倍镜找到水滴,再换高倍镜观察。用此法可以区别细菌的运动性,也可用于观察细菌的繁殖方式、孢子发芽等。

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. 使用油镜时,为什么必须用镜头油?
3. 镜检标本时,为什么先用低倍镜观察,而不是直接用高倍镜或油镜观察?

实验 2 细菌的染色和细菌细胞构造的观察

染色是观察微生物的一种重要方法。由于微生物细胞含有大量水分,一般在 80%~90% 以上,对光线的吸收和反射与水溶液的差别不大,与周围背景没有明显的明暗差。所以,除了观察活体微生物细胞的运动性和直接计算菌数外,绝大多数情况下都必须经过染色后,才能在显微镜下进行观察。

一、目的要求

- ① 学习微生物涂片、染色的基本技术和无菌操作技术。
- ② 掌握细菌的一般染色法和革兰氏染色法。
- ③ 进一步掌握显微镜油镜的使用技术。
- ④ 观察和识别细菌细胞的特殊构造。

二、染色剂和染色的原理

微生物染色的基本原理,是借助物理因素和化学因素的作用而进行的。物理因素如细胞及细胞物质对染料的渗透、吸附作用等。

细菌的等电点较低($\text{pH}2\sim5$),故在中性、碱性或弱酸性溶液中,菌体蛋白质电离后带负电荷;而碱性染料电离时染料离子带正电荷。因此,带负电荷的细菌常和带正电荷的碱性染料进行结合,所以在细菌学实验室中常用碱性染料进行染色。

染色剂是一种供染色用的有机化合物,目前普遍采用的染色剂是含有苯环的有机化合物。染料分子都由苯环和连接在苯环上的染色基团(或称呈色基团,色基)和助色基团(或称作用基团)三部分组成。助色基团具有电离特性,电离后带有正或负电荷的染料离子便能与细胞进行较牢固的结合,使其呈现颜色。

染料可按其电离后染料离子所带电荷的性质分为酸性染料、碱性染料、中性(复合)染料和单纯染料四大类。

(1)酸性染料 这类染料电离后染料离子带负电荷,如酸性复红、刚果红、伊红、藻红、苯胺黑等,它们可与碱性物质结合成盐。

(2)碱性染料 这类染料电离后染料离子带正电荷,它可与酸性物质结合成盐。微生物实验室一般常用的碱性染料有碱性复红、中性红、孔雀绿、番红、结晶紫、美蓝、甲基紫等。在一般情况下,细菌易被碱性染料染色。

(3)中性(复合)染料 酸性染料与碱性的结合物叫做中性(复合)染料,如伊红、美蓝、瑞脱氏(Wright)染料和基姆萨氏(Gimasa)染料等,基姆萨氏染料常用于细胞核的染色。

(4)单纯染料 这类染料的化学亲和力低,不能和被染的物质生成盐,其染色能力视其是否溶于被染物而定。它们大多数属于偶氮化合物,不溶于水,但溶于脂肪溶剂,如苏丹类