



扫描二维码  
免费课件下载

普通高等院校环境科学与工程类系列规划教材

# 环境微生物学实验基础

主 编 肖亦农 刘灵芝  
王 新  
副主编 钮旭光 高子晴  
佟德利 沈欣军  
主 审 徐 威



中国建材工业出版社

普通高等院校环境科学与工程类系列规划教材

# 环境微生物学实验基础

主 编 肖亦农 刘灵芝 王 新  
副主编 钮旭光 高子晴 佟德利 沈欣军  
主 审 徐 威

中国建材工业出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

环境微生物学实验基础/肖亦农, 刘灵芝, 王新主编. —北京: 中国建材工业出版社, 2018. 5  
普通高等院校环境科学与工程类系列规划教材  
ISBN 978-7-5160-2182-8

I. ①环… II. ①肖… ②刘… ③王… III. ①环境微生物学—实验—高等学校—教材 IV. ①X172-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 049224 号

### 内 容 简 介

本书针对环境微生物学专业较为系统地介绍了基础实验原理和环境微生物监测等领域的实验技术。全书共七章, 包括 29 个实验。主要内容为: 微生物形态观察与测定技术、培养基制备和灭菌消毒技术、微生物的分离与培养技术、环境因素对微生物生长的影响、环境微生物的丰度与多样性分析、微生物与环境监测和微生物菌种保藏技术。本书既设置了微生物分离、形态观察、生理生化特征、菌种保藏等基础性实验, 还设置了微生物分子生物学和微生物监测等综合实验内容。在每一个实验中, 通过介绍实验原理、试剂配制和详细的实验操作过程, 结合实验操作注意事项及思考题, 有助于学生更好地学习和掌握相关实验内容。

本书可作为高等院校环境科学和环境工程等专业的实验教学教材, 也可作为微生物学及相关专业的实验课用书, 还可作为相关科技人员的参考用书。

## 环境微生物学实验基础

主编 肖亦农 刘灵芝 王新

出版发行: 中国建材工业出版社

地 址: 北京市海淀区三里河路 1 号

邮 编: 100044

经 销: 全国各地新华书店

印 刷: 北京鑫正大印刷有限公司

开 本: 787mm × 1092mm 1/16

印 张: 6.5

字 数: 160 千字

版 次: 2018 年 5 月第 1 版

印 次: 2018 年 5 月第 1 次

定 价: 26.00 元

---

本社网址: [www.jcbs.com](http://www.jcbs.com) 微信公众号: [zgjcybs](https://www.weixin.com/zgjcybs)

本书如出现印装质量问题, 由我社市场营销部负责调换。联系电话: (010) 88386906

# 前 言

微生物学是一门实验性较强的科学，其基本理论和知识内容均源于实验，同时，微生物学实验技术和方法在整个生命科学技术的发展中占有重要地位。所以，观察和分析一些实验现象是学生真正理解和掌握微生物学知识内容的主要方式之一。而且，学习和掌握微生物学的基本实验技术和方法是培养学生实验技能及观察和分析问题能力的重要途径，有助于学生适应毕业后科研教学及相关工作的需要。

近年来，微生物学研究进入了分子生物学发展阶段，微生物学实验技术和方法也已广泛地渗透到环境科学领域的研究中，一个新的理论研究体系——环境微生物学逐渐形成并得到快速发展，这一体系作为一门跨越微生物学、环境科学和环境工程等学科的综合性学科，所包含的内容层次较多，无论在理论研究上还是在实际应用上，都要求有更新颖和实用的配套微生物学实验教材做基础。编者在传统微生物学实验教材的基础上，根据多年的教学和研究实践，参考国内外的相关教材，针对21世纪教学改革和学科发展的需要，对实验内容重新整合、精选，编写了这本《环境微生物学实验基础》教学指导教材。

本书的实验内容主要考虑到以下几方面：

1. 兼顾基础性和先进性的要求，尽可能涵盖微生物学的重要基础实验内容，如常见微生物种群形态结构的显微观察、培养基的配制和灭菌，微生物的纯培养技术、无菌操作技术等，并适当结合一些较新的研究技术，如16S rDNA序列的扩增和系统进化树的构建、DGGE（变性梯度凝胶电泳）和荧光定量PCR等。

2. 环境微生物学在环境类学科教学体系中具有的重要作用，所选的实验内容适当结合环境科学专业（学科）现有的研究项目特点，如水体、食品、空气等细菌学检查、环境因素对微生物的影响等。

3. 从锻炼学生的科学思维角度出发，书中每个实验后都设

置了一些思考题，这些思考题的选择既强调了对基本操作技术的掌握，又设置了与实验相关的具有启发性和探讨性的问题，使学生在知识学习的同时又能开拓思路、启发创新，正所谓“授人以鱼不如授人以渔”，使学生具备在生产实践中主动发现问题，并运用自己所学到的知识和技能独立分析和解决问题的能力。

我们希望本实验教材的出版不仅能够使学生掌握一些微生物学研究的主要技术和方法，还能够培养学生独立观察实验现象以及分析问题的能力，激发他们的科研兴趣，培养严肃认真与实事求是的科学态度。

本书是由多个院校的一线教师共同编写的，所写内容均为自己所熟悉的教学或科研领域。本书可作为高等院校环境科学和环境工程等专业的实验教学用书，也可作为微生物学及相关专业的实验课教材，还可作为相关科技人员的参考用书。由于水平和时间所限，编排过程中难免存在疏忽和失误，诚恳读者和同行专家提出宝贵意见。

编者

2018年4月

# 目 录

第一章 微生物形态观察与测定技术 .....	1
实验 1 光学显微镜的使用 .....	1
实验 2 细菌染色技术 .....	7
实验 3 放线菌形态观察 .....	10
实验 4 真菌形态观察 .....	12
实验 5 微生物细胞大小的测定 .....	15
实验 6 微生物细胞的显微镜直接计数 .....	17
实验 7 微生物细胞的稀释平板计数法 .....	19
实验 8 最大或然数 (MPN) 法测定微生物数目 .....	22
第二章 培养基制备和灭菌消毒技术 .....	25
实验 9 培养基制备 .....	25
实验 10 常用微生物消毒方法 .....	30
实验 11 微生物灭菌技术 .....	33
第三章 微生物的分离与培养技术 .....	38
实验 12 微生物的分离与纯化 .....	38
实验 13 好氧微生物的培养 .....	39
实验 14 厌氧微生物的培养 .....	41
实验 15 生长曲线的测定 .....	43
第四章 环境因素对微生物生长的影响 .....	45
实验 16 物理因素对微生物生长的影响 .....	45
实验 17 化学因素对微生物生长的影响 .....	48
第五章 环境微生物的丰度与多样性分析 .....	50
实验 18 土壤微生物总 DNA 的提取 .....	50
实验 19 16S rDNA 的 PCR 扩增 .....	51
实验 20 DGGE 法分析微生物多样性 .....	53
实验 21 16S rDNA 系统发育树的构建 .....	57
实验 22 荧光定量 PCR 检测微生物的丰度 .....	63
第六章 微生物与环境监测 .....	65
实验 23 水体中细菌总数和大肠菌群数的检测 .....	65
实验 24 空气中微生物的计数 .....	72
实验 25 发光细菌的毒性实验 .....	74
实验 26 土壤中各生理类群微生物的检测 .....	76

第七章 微生物菌种保藏技术 .....	84
实验 27 菌种的简易保藏 .....	84
实验 28 冷冻真空干燥保藏 .....	86
实验 29 液氮超低温冷冻保藏 .....	87
附录 .....	89
附录 1 培养基配方 .....	89
附录 2 最大或然数法测数统计表 .....	92
参考文献 .....	94

# 第一章 微生物形态观察与测定技术

## 实验 1 光学显微镜的使用

### 一、实验目的

1. 熟悉普通光学显微镜的主要构造及其性能。
2. 掌握低倍镜及高倍镜的使用方法。
3. 初步掌握油镜的使用方法。
4. 了解光学显微镜的维护方法。

### 二、实验原理

光学显微镜 (Light Microscope) 是生物科学和医学研究领域常用的仪器。在细胞生物学、组织学、病理学、微生物学及其他有关学科的教学研究工作中, 光学显微镜用途广泛, 是研究人体及其他生物机体组织和细胞结构强有力的工具。

光学显微镜简称光镜, 是利用光线照明使微小物体形成放大影像的仪器。目前使用的光镜种类繁多, 外形和结构差别较大, 有些类型的光镜有其特殊的用途, 如暗视野显微镜、荧光显微镜、相差显微镜、倒置显微镜等, 但它们基本的构造和工作原理是相似的。一台普通光镜主要由机械系统和光学系统两部分构成, 而光学系统则主要包括光源、反光镜、聚光器、物镜和目镜等部件。

光镜是如何使微小物体放大的呢? 物镜和目镜的结构虽然比较复杂, 但它们的作用都是相当于一个凸透镜, 由于被检标本是放在物镜下方的  $1\sim 2$  倍焦距之间的, 上方形成一个倒立的放大实像, 该实像正好位于目镜的下焦点 (焦平面) 之内, 目镜进一步将它放大成一个虚像, 通过调焦可使虚像落在眼睛的明视距离处, 在视网膜上形成一个直立的实像。显微镜中被放大的倒立虚像与视网膜上直立的实像是相吻合的, 该虚像看起来好像在离眼睛  $25\text{cm}$  处。

分辨力是光镜的主要性能之一。所谓分辨力 (Resolving Power) 也称为分辨率或分辨本领, 是指显微镜或人眼在  $25\text{cm}$  的明视距离处, 能清楚地分辨被检物体细微结构最小间隔的能力, 即分辨出标本上相互接近的两点间的最小距离的能力。据测定, 人眼的分辨力约为  $100\mu\text{m}$ 。显微镜的分辨力由物镜的分辨力决定, 物镜的分辨力就是显微镜的分辨力, 而目镜与显微镜的分辨力无关。光镜的分辨力 ( $R$ ) ( $R$  值越小, 分辨率越高) 可以下式计算:

$$R = \frac{0.61\lambda}{n\sin\theta}$$

式中,  $n$  为聚光镜与物镜之间介质的折射率 (空气为  $1$ , 油为  $1.5$ );  $\theta$  为标本对物镜镜



口张角的半角,  $\sin$  的最大值为 1;  $\lambda$  为照明光源的波长 (白光约为 0.5 $\mu\text{m}$ )。放大率或放大倍数是光镜性能的另一重要参数, 一台显微镜的总放大倍数等于目镜放大倍数与物镜放大倍数的乘积。

### 三、实验器材

#### 1. 溶液或试剂

香柏油或液体石蜡 (石蜡油)、清洁剂 (乙醚 7 份 + 无水乙醇 3 份)、二甲苯。

#### 2. 仪器或其他用具

普通光学显微镜、擦镜纸、羊毛交叉装片、英文字母或数字的装片。

### 四、实验操作

#### (一) 光学显微镜的基本构造及功能 (图 1-1)

##### 1. 机械部分

(1) 镜筒: 安装在光镜最上方或镜臂前方的圆筒状结构, 其上端装有目镜, 下端与物镜转换器相连。根据镜筒的数目, 光镜可分为单筒式光镜和双筒式光镜两类。单筒式光镜又分为直立式光镜和倾斜式光镜两种。而双筒式光镜的镜筒均为倾斜的。直立式光镜的目镜与物镜的中心线呈  $45^\circ$  角, 在其镜筒中装有能使光线折转  $45^\circ$  的棱镜。

(2) 物镜转换器: 又称物镜转换盘, 是安装在镜筒下方的一个圆盘状构造, 可以按顺时针或逆时针方向自由旋转。物镜转换盘中均匀分布 3~4 个圆孔, 用以装载不同放大倍数的物镜。转动物镜转换盘可使不同的物镜到达工作位置 (即与光路合轴)。使用时注意凭手感调整物镜的工作位置准确到位。

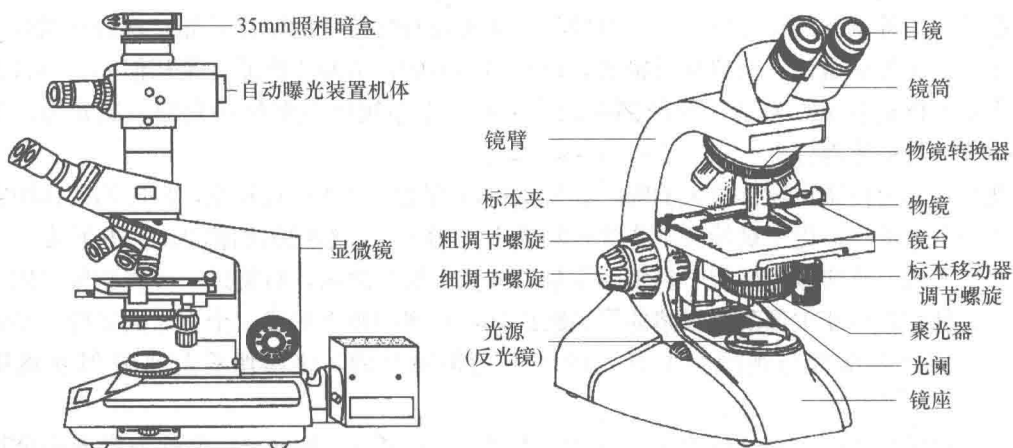


图 1-1 Olympus 显微镜 (BHS 型) 和光学显微镜的构造

(3) 镜臂: 支持镜筒和镜台的弯曲状构造, 是取用显微镜时握拿的部位。直立式光镜在镜臂与其下方的镜柱之间有一倾斜关节, 可使镜筒向后倾斜一定角度以方便观察, 但使用时倾斜角度不应超过  $45^\circ$ , 否则显微镜则由于重心偏移容易翻倒。在使用临时装片时, 千万不要倾斜镜臂, 以免液体或染液流出, 污染显微镜。

(4) 调焦器: 也称调焦螺旋, 为调节焦距的装置, 位于镜臂的上端 (直立式光镜) 或下

端（倾斜式光镜），分粗调节螺旋（大螺旋）和细调节螺旋（小螺旋）两种。粗调节螺旋可使镜筒或载物台以较快速度或较大幅度升降，能迅速调节好焦距使物像呈现在视野中，适于低倍镜观察时的调焦。而细调节螺旋只能使镜筒或载物台缓慢或较小幅度的升降（升或降的距离不易被肉眼观察到），适用于高倍镜和油镜的聚焦或观察标本的不同层次，一般在粗调节螺旋调焦的基础上再使用细调节螺旋，更能精细调节焦距。

有些类型的光镜，粗调节螺旋和细调节螺旋重合在一起，安装在镜柱的两侧。左右两侧粗调节螺旋的内侧有一窄环，称为粗调松紧调节轮，其功能是调节粗调节螺旋的松紧度（向外转偏松，向内转偏紧）。另外，在左侧粗调节螺旋的内侧有一个粗调限位环凸柄，当用粗调节螺旋调准焦距后向上推紧该柄，可使粗调节螺旋限位，此时镜台不能继续上升但细调节螺旋仍可调节。

（5）载物台：也称镜台，是位于物镜转换器下方的方形平台，是放置被观察的载玻片标本的地方。平台的中央有一圆孔，称为通光孔，来自下方光线经此孔照射到标本上。

在载物台上通常装有标本移动器（也称标本推进器），移动器上安装的弹簧夹可用于固定载玻片标本，另外，转动与移动器相连的两个螺旋可使载玻片标本前后、左右移动，这样寻找物像时较为方便。

在标本移动器上一般还附有纵横游标尺，可以计算标本移动的距离和确定标本的位置。游标尺一般由主标尺（A）和副标尺（B）组成（图 1-2）。副标尺的分度为主标尺的  $9/10$ 。使用时先看标尺的 0 点位置，再看主副标尺刻度线的重合点即可读出准确的数值。

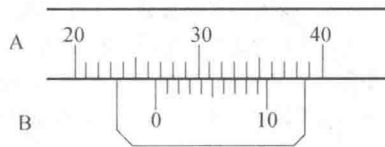


图 1-2 游标尺的使用方法示意图

（6）镜座：位于显微镜最底部的构造，为整个显微镜的基座，用于支持和稳定镜体。有的显微镜在镜座内装有照明光源等构造。

## 2. 光学系统部分

光镜的光学系统主要包括物镜、目镜和照明装置（反光镜、聚光器和光圈等）。

（1）目镜：又称接目镜，安装在镜筒的上端，具有将物镜所放大的物像进一步放大的作用。每个目镜一般由两个透镜组成，在上下两透镜（即接目透镜和会聚透镜）之间安装有能决定视野大小的金属光阑——视场光阑，此光阑的位置即是物镜所放大实像的位置，故可将一小段头发粘附在光阑上作为指针，用以指示视野中的某一部分供他人观察。另外，还可在光阑的上面安装目镜测微尺。每台显微镜通常配置 2~3 个不同放大倍率的目镜，常见的有  $5\times$ 、 $10\times$  和  $15\times$ （ $\times$  表示放大倍数）的目镜，可根据不同的需要选择使用，最常使用的是  $10\times$  目镜。

（2）物镜：也称接物镜，安装在物镜转换器上。每台光镜一般有 3~4 个不同放大倍率的物镜，每个物镜由数片凸透镜和凹透镜组合而成，是显微镜最主要的光学部件，决定着光镜分辨力的高低。常用物镜的放大倍数有  $10\times$ 、 $40\times$  和  $100\times$  等几种。一般将  $8\times$  或  $10\times$  的物镜称为低倍镜（而将  $5\times$  以下的叫做放大镜）；将  $40\times$  或  $45\times$  的称为高倍镜；将  $90\times$  或  $100\times$  的称为油镜（这种镜头在使用时需浸在镜油中）。

在每个物镜上通常都刻有能反映其主要性能的参数(图 1-3),主要有放大倍数和数值孔径(如 10/0.25、40/0.65 和 100/1.25)、该物镜所要求的镜筒长度和标本上的盖玻片厚度(160/0.17)等,另外,在油镜上还常标有“油”或 Oil 的字样。

油镜在使用时需要用香柏油或石蜡油作为介质,这是因为油镜的透镜和镜孔较小,而光线要通过载玻片和空气才能进入物镜中,玻璃与空气的折光率不同,使部分光线产生折射而损失掉,导致进入物镜的光线减少,而使视野暗淡、物像不清。在载玻片标本和油镜之间填充折射率与玻璃近似的香柏油或石蜡油时(玻璃、香柏油和石蜡油的折射率分别为 1.52、1.51、1.46,空气为 1),可减少光线的折射,增加视野亮度,提高分辨率。物镜分辨力的高低取决于物镜的数值孔径(Numerical Aperture, N. A.), N. A. 又称为镜口率,其数值越大,则表示分辨力越高。

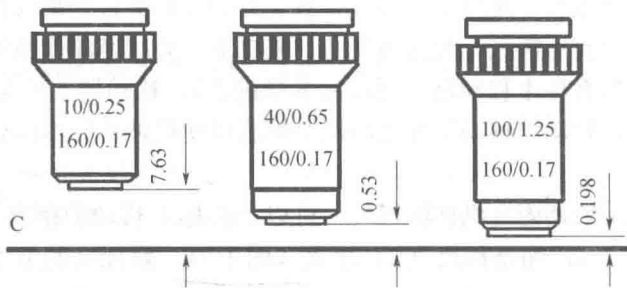


图 1-3 物镜的性能参数及工作距离

注: C 线为盖玻片的上表面, 10 $\times$ 物镜的工作距离为 7.63mm; 40 $\times$ 物镜的工作距离为 0.53mm; 100 $\times$ 物镜的工作距离为 0.198mm; 10/0.25、40/0.65、100/1.25 表示镜头的放大倍数和数字孔径; 160/0.17 表示显微镜的机械镜筒长度(标本至目镜的距离)和盖玻片的厚度,即镜筒长度为 160mm,盖玻片厚度为 0.17mm。

不同的物镜有不同的工作距离。所谓工作距离是指显微镜处于工作状态(焦距调好、物像清晰)时,物镜最下端与盖玻片上表面之间的距离。物镜的放大倍数与其工作距离成反比(表 1-1)。当低倍镜被调节到工作距离后,可直接转换高倍镜或油镜,只需要用细调节螺旋稍加调节焦距便可见到清晰的物像,这种情况称为同高调焦。

不同放大倍数的物镜也可从外形上加以区别,一般来说,物镜的长度与放大倍数成正比,低倍镜最短,油镜最长,而高倍镜的长度介于两者之间。

表 1-1 标准物镜的性质

放大倍数	数字孔径	工作距离 (mm)
10	0.25	6.5
20	0.50	2.0
40	0.65	0.6
100	1.25	0.2

(3) 聚光器: 位于载物台的通光孔的下方,由聚光镜和光圈构成,其主要功能是使光线集中到所要观察的标本上。聚光镜由 2~3 个透镜组合而成,其作用相当于一个凸透镜,可将光线汇集成束。在聚光器的左下方有一调节螺旋可使其上升或下降,从而调节光线的强

弱，升高聚光器可使光线增强，反之则使光线变弱。

光圈也称为彩虹阑或孔径光阑，位于聚光器的下端，是一种能控制进入聚光器光束大小的可变光阑。它由十几张金属薄片组合排列而成，其外侧有一小柄，可使光圈的孔径开大或缩小，以调节光线的强弱。在光圈的下方常装有滤光片框，可放置不同颜色的滤光片。

(4) 反光镜：位于聚光镜的下方，可向各方向转动，能将来自不同方向的光线反射到聚光器中。反光镜有两个面，一面为平面镜，另一面为凹面镜，凹面镜有聚光作用，在较弱光和散射光时使用，光线较强时则选用平面镜（现在有些新型的光学显微镜都有自带光源，而没有反光镜；有的光学显微镜二者都配备了）。

## (二) 光学显微镜的使用方法

### 1. 准备

将显微镜小心地从镜箱中取出（移动显微镜时应以右手握住镜壁，左手托住镜座），放置在实验台的偏左侧，以镜座的后端离实验台边缘的 6~10cm 为宜。首先检查显微镜的各个部件是否完整和正常。如果是直立式光镜，可使镜筒倾斜一定角度（一般不应超过 45°）以方便观察（观察临时装片时禁止倾斜镜臂）。

### 2. 低倍镜的使用方法

(1) 对光：打开实验台上的工作灯（如果是自带光源显微镜，这时应该打开显微镜上的电源开关），转动粗调节螺旋，使镜筒略升高（或使载物台下降），调节物镜转换器，使低倍镜转到工作状态（即对准通光孔），当镜头完全到位时，可听到轻微的扣碰声。

打开光圈并使聚光器上升到适当的位置（以聚光镜上端透镜平面稍低于载物台平面的高度为宜）。然后用左眼观察目镜（注意两眼应同时睁开），同时调节反光镜的方向（自带光源显微镜，调节亮度旋钮），使视野内的光线均匀、亮度适中。

(2) 放置玻片标本：将玻片标本放置到载物台上，用标本移动器上的弹簧夹固定好它（注意：有盖玻片或有标本的一面朝上），然后转动标本移动器的螺旋，使需要观察的标本部位对准通光孔的中央。

(3) 调节焦距：用眼睛从侧面注视低倍镜，同时调整粗调节螺旋使镜头下降（或使载物台上升），直至低倍镜头距载玻片标本的距离小于 0.6cm（注意：操作时必须从侧面注视镜头与载玻片的距离，以避免镜头压碎载玻片）。然后用左眼观察目镜，同时用左手慢慢转动粗调节螺旋使镜筒上升（或使载物台下降）直至视野中出现物像为止，再转动细调节螺旋，使视野中的物像最清晰。

如果需要观察的物像不在视野中央，甚至不在视野内，可用标本移动器前后、左右移动标本的位置，使物像进入视野并移至中央。在调焦时，如果镜头与载玻片标本的距离已超过了 1cm 还未见到物像时，应严格按上述步骤重新进行操作。

### 3. 高倍镜的使用方法

(1) 在使用高倍镜观察标本前，应先用低倍镜寻找到需观察的物像，并将其移至视野中央，同时调准焦距，使被观察的物像最清晰。

(2) 转动物镜转换器，直接使高倍镜转到工作状态（对准通光孔），此时，视野中一般可看到不太清晰的物像，只需调节细调节螺旋，一般都可使物像清晰。

**注意：**

(1) 在从低倍镜准焦的状态下直接转换到高倍镜时，有时会发生高倍物镜碰擦载玻片而不能转换到位的情况（这种情况，主要是因为高倍镜、低倍镜不配套，即不是同一型号的显微镜的镜头），此时不能硬转，应检查载玻片是否放反、低倍镜的焦距是否调好，以及物镜是否松动等情况后重新进行操作。如果调整后仍不能转换，则应将镜筒升高（或使载物台下降）后再转换，然后在眼睛的注视下使高倍镜贴近盖玻片，再一边观察目镜视野，一边调整粗调节螺旋使镜头极其缓慢地上升（或使载物台下降），看到物像后再用细调螺旋准焦。

(2) 由于制造工艺的原因，许多显微镜的低倍镜视野中心与高倍镜视野中心往往存在一定的偏差（即低倍镜与高倍镜的光轴不在一条直线上），因此，在从低倍镜转换为高倍镜观察标本时，常会给观察者快速寻找标本造成一定困难。为了避免这种情况的出现，帮助观察者在高倍镜下能较快找到所需放大部分的物像，可事先利用羊毛交叉装片本来测定所用光镜的偏心情况，并绘图记录制成偏心图。具体操作步骤如下：① 在高倍镜下找到羊毛交叉点并将其移至视野中心；② 换低倍镜观察羊毛交叉点是否还位于视野中央，如果偏离视野中央，其所在的位置就是偏心位置；③ 将前面两个步骤反复操作几次，以找出准确的偏心位置，并绘出偏心图。当光镜的偏心点找出之后，在使用该显微镜的高倍镜观察标本时，事先可在低倍镜下将需进一步放大的部位移至偏心位置处，再转换高倍镜观察时，所需的观察目标就正好在视野中央。

**4. 油镜的使用方法**

(1) 用高倍镜找到所需观察的标本物像，并将需要进一步放大的部分移至视野中央。

(2) 将聚光器升至最高位置并将光圈开至最大（因油镜所需光线较强）。

(3) 转动物镜转换盘，移开高倍镜，往载玻片标本上需观察的部位（载玻片的正面，相当于通光孔的位置）滴一滴香柏油（折光率 1.51）或石蜡油（折光率 1.47）作为介质，然后在眼睛的注视下，使油镜转至工作状态。此时油镜的下端镜面一般应正好浸在油滴中。

(4) 左眼观察目镜，同时小心而缓慢地转动细调节螺旋（注意：这时只能使用细调节螺旋，千万不要使用粗调节螺旋）使镜头微微上升（或使载物台下降），直至视野中出现清晰的物像。操作时不要反方向转动细调节螺旋，以免镜头下降压碎标本或损坏镜头。

(5) 油镜使用后，必须及时将镜头上的油擦拭干净。操作时，将油镜升高 1cm，并将其转离通光孔，先用干擦镜纸揩擦一次，把大部分的油去掉，再用沾有少许清洁剂或二甲苯的擦镜纸擦一次，最后再用干擦镜纸揩擦一次。至于载玻片标本上的油，如果是有盖玻片的永久制片，可直接用上述方法擦干净；如果是无盖玻片的标本，则盖玻片上的油可用拉纸法揩擦，即先把一小张擦镜纸盖在油滴上，再往纸上滴几滴清洁剂或二甲苯。趁湿将擦镜纸往外拉，如此反复几次即可干净。

**(三) 使用显微镜应注意的事项**

(1) 取用显微镜时，应一手紧握镜臂，一手托住镜座，不要用单手提拿，以避免目镜或其他零部件滑落。

(2) 在使用直立式显微镜时，镜筒倾斜的角度不能超过  $45^\circ$ ，以免重心后移使显微镜倾倒。在观察带有液体的临时装片时，不要使用倾斜关节，以避免由于载物台的倾斜而使液体流到显微镜上。

(3) 不可随意拆卸显微镜上的零部件，以免发生丢失损坏或使灰尘落入镜内。

(4) 显微镜的光学部件不可用纱布、手帕、普通纸张或手指揩擦，以免磨损镜面，需要时只能用擦镜纸轻轻擦拭。机械部分可用纱布等擦拭。

(5) 在任何时候,特别是使用高倍镜或油镜时,都不要一边在目镜中观察,一边下降镜筒(或上升载物台),以避免镜头与载玻片相撞,损坏镜头或载玻片标本。

(6) 显微镜使用后应及时复原。先升高镜筒(或下降载物台),取下载玻片标本,使物镜转离通光孔。如镜筒、载物台是倾斜的,应恢复直立或水平状态。然后下降镜筒(或上升载物台),使物镜与载物台相接近。垂直反光镜,下降聚光器,关小光圈,最后放回镜箱中锁好。

(7) 在利用显微镜观察标本时,要养成两眼同时睁开,双手并用(左手操纵调焦螺旋,右手操纵标本移动器)的习惯,必要时应一边观察,一边计数或绘图记录。

## 五、思考题

1. 使用显微镜观察标本时,为什么必须按从低倍镜到高倍镜,再到油镜的顺序进行?
2. 在调焦时为什么要先将低倍镜与标本表面的距离调节到 6mm 之内?
3. 如果标本片放反了,可用高倍镜或油镜找到标本吗?为什么?
4. 怎样才能准确而迅速地在高倍镜或油镜下找到目标?
5. 如果细调节螺旋已转至极限而物像仍不清晰时,应该怎么办?
6. 如何判断视野中所见到的污点是在目镜上?
7. 在对低倍镜进行对焦时,如果视野中出现了随标本片移动而移动的颗粒或斑纹,是否将标本移至物镜中央,就一定能找到标本的物像?为什么?

## 实验 2 细菌染色技术

### 一、实验目的

1. 掌握几种常用的细菌染色方法。
2. 初步认识细菌的形态和结构特征。

### 二、实验原理

细菌的个体形态主要分为球菌、杆菌和螺旋菌。有的细菌细胞除了细胞壁、细胞膜等基本结构以外,还具有芽孢、荚膜、鞭毛等特殊结构,是菌种分类鉴定的重要指标。由于细菌细胞既小又透明,直接在显微镜下观察时难以识别,故一般要经过染色才能做形态和结构的观察。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。在中性、碱性或弱酸性溶液中,细菌细胞通常带负电荷,而碱性染料在电离时带正电荷,所以很容易与细胞结合而使细菌着色,因此细菌染色多用碱性染料。常用的碱性染料有美蓝、结晶紫、番红、孔雀绿等。

细菌染色的方法很多,以下介绍几种常用的染色方法。

#### 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,用简单染色法即可。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。

## 2. 革兰氏染色法

革兰氏染色反应是细菌分类和鉴定的重要性状。它是 1884 年由丹麦医生 Gram 创立的。革兰氏染色法不仅能观察到细菌的形态特征而且还可将所有细菌区分为两大类：染色反应呈蓝紫色的称为革兰氏阳性细菌，用 G+ 表示；染色反应呈红色（复染颜色）的称为革兰氏染色阴性细菌，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着色，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—碘复合物易被乙醇抽出而脱色，然后又被染上了复染液（番红）的颜色，因此，呈现红色。

革兰氏染色需用四种不同的溶液：碱性染料初染液、媒染剂、脱色剂和复染液。碱性染料初染液的作用如在细菌的简单染色法基本原理中所述的一样，而用于革兰氏染色的初染液一般是结晶紫。媒染剂的作用是增加染料和细胞之间的亲和力或附着力，即以某种方式帮助染料固定在细胞上，使其不易脱落。不同类型的细胞脱色反应不同，有的细胞能被脱色，有的细胞则不能，脱色剂常用 95% 的酒精。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的颜色，从而将细胞区分成 G+ 和 G- 两大类群，常用的复染液是番红。

## 3. 芽孢染色法

芽孢是在某些细菌生长发育后期，细胞内形成的一个圆形或椭圆形的休眠构造。细菌的芽孢具有厚而致密的壁，透性低，不易着色。芽孢染色法就是根据芽孢既难以被染色而一旦染上色后又难以脱色这一特点而设计的。用碱性染料——孔雀绿在加热条件下染色，使染料不仅进入菌体，也可进入芽孢内。进入菌体的染料经水洗后被脱色，而芽孢一经着色后难以被水洗脱色，再用对比度大的复染剂染色后，芽孢仍保留初染剂的颜色，而菌体被染成复染剂的颜色，使芽孢和菌体易于区分。

## 4. 荚膜染色法

荚膜是包围在细菌细胞外的一层黏状物质，其成分为多糖、糖蛋白或多肽。由于荚膜与染料的亲和力弱、不易着色，所以通常用衬托染色法（负染色法）染色，即菌体和背景着色，而荚膜不着色，在菌体周围形成透明圈（即荚膜）。由于荚膜含水量高，制片时通常不用加热固定，以免荚膜变形，影响观察。

## 5. 鞭毛染色法

细菌的鞭毛极细，直径一般为 10~20nm，只有用电子显微镜才能观察到。但是，如采用特殊的鞭毛染色法，则在普通光学显微镜下也能看到它。鞭毛染色方法很多，但其基本原理相同，即在染色前先用媒染剂进行处理，当媒染剂沉积在鞭毛上时，鞭毛加粗，然后再进行染色。

# 三、实验器材

## 1. 菌种

金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌或自备菌种。

## 2. 溶液或试剂

草酸铵结晶紫、卢哥氏碘液、95%酒精、番红、5%孔雀绿水溶液、绘图墨水、硝酸银染色液、二甲苯、香柏油等。

## 3. 仪器或其他用具

废液缸、洗瓶、载玻片、接种环、酒精灯、擦镜纸、显微镜、小试管（75mm×10mm）、烧杯、滴管、玻片搁架、镊子、吸水纸、记号笔等。

# 四、实验操作

## 1. 简单染色法

(1) 涂片：在洁净无油腻的玻片中央滴一小滴水，按无菌操作的方法用接种环挑取少量金黄色葡萄球菌或大肠杆菌菌种与水滴充分混匀，涂成极薄菌膜。注意，取菌量要适当，且涂抹要均匀，避免因取菌太多而造成涂片细胞堆积难以看清细菌个体形态。

(2) 干燥：让涂片自然晾干或用电吹风吹干。

(3) 固定：手执玻片一端，有菌膜的玻片一面朝上，通过火焰2~3次（以玻片背面不烫手为宜）。注意，必须等涂片干燥后再加热固定，且避免固定时间过长而使细胞形态破坏。

(4) 染色：将涂片置于玻片搁架上，加适量（以盖满菌膜为宜）草酸铵结晶紫染色液染色1~2min。

(5) 水洗：倒掉多余染色液，用洗瓶小水流冲洗，直至涂片上流下的水无色为止。

(6) 干燥：用吸水纸吸去涂片上的水分，自然干燥或用电吹风吹干。

(7) 镜检：涂片完全干燥后进行镜检，从低倍镜到高倍镜，最后用油镜观察。

## 2. 革兰氏染色法

(1) 制片：金黄色葡萄球菌、大肠杆菌斜面培养物常规涂片、干燥、固定（步骤同1.）。注意，宜选用幼龄培养物，金黄色葡萄球菌和大肠杆菌培养约为24h。涂片宜薄，以免脱色不完全造成假阳性。

(2) 初染：涂片中滴加结晶紫（以刚好将菌膜覆盖为宜）染色1~2min，水洗（步骤同1.）。

(3) 媒染：用碘液冲去残水，并用碘液覆盖约1min，水洗（步骤同1.）。

(4) 脱色：将载玻片倾斜，在白色的背景下，用滴管流加95%乙醇脱色，直至流下的乙醇刚好无紫色时，立即水洗。注意，革兰氏染色成败的关键是乙醇脱色。如脱色过度，革兰氏阳性菌可能被染成假阴性；如脱色时间过短，革兰氏阴性菌也可能被染成假阳性。

(5) 复染：用番红液复染约2min，水洗（步骤同1.）。

(6) 镜检：涂片完全干燥后，用油镜观察。

## 3. 芽孢染色法

(1) 制片：按常规方法将巨大芽孢杆菌涂片、干燥、固定（步骤同1.）。

(2) 染色：加数滴5%孔雀绿染色液于涂片上，用木夹夹住载玻片一端，在酒精灯上方用微火加热，以染料冒蒸汽而不沸腾为宜，并开始计时，维持5min。注意，加热过程中切勿让染色液沸腾，并及时补加染色液，切勿让涂片干涸。

(3) 水洗：待涂片冷却后，用水轻轻地冲洗，直至流出的水中无染色液颜色为止。

(4) 复染：用番红液染色2min。



(5) 水洗：用水洗去染色液（步骤同 1.）。

(6) 镜检：涂片完全干燥后，用油镜观察。

#### 4. 荚膜染色法

(1) 制混合液：加 1 滴墨水于洁净的载玻片上，挑取少量胶质芽孢杆菌菌体与其充分混合均匀。

(2) 加盖玻片：放一个清洁盖玻片于混合液上，然后在盖玻片上放一张滤纸片，向下轻压，吸去多余的菌液。注意，勿产生气泡，以免影响观察。

(3) 镜检：先用低倍镜再用高倍镜观察涂片。

#### 5. 鞭毛染色法

(1) 菌种的准备：取经活化的幼龄苏云金杆菌菌种。

(2) 载玻片的准备：将载玻片在含适量洗衣粉的水中煮沸约 20min，取出用清水充分洗净，沥干水后浸于 95% 乙醇中。用时取出载玻片在火焰上烤，去除酒精及可能残留的油迹。

(3) 菌液的制备：取斜面菌种数环于装有 1~2mL 无菌水的试管中，制成菌悬液。

(4) 制片：取菌液 1 滴滴于载玻片的一端，将玻片倾斜，使菌液缓缓流向另一端，用吸水纸吸去玻片下端多余的菌液，室温下自然干燥。

(5) 染色：涂片干燥后，滴加硝酸银染色 A 液覆盖涂片上 3~5min，用蒸馏水充分洗去 A 液。用 B 液冲去残水后，再加 B 液覆盖涂片染色数秒至 1min，当涂片出现明显褐色时，立即用蒸馏水冲洗。若加 B 液后显色较慢，可用微火加热，直至显褐色时立即水洗。涂片进行自然干燥。

(6) 镜检：涂片完全干燥后用油镜观察，可从玻片的一端逐渐移至另一端观察。

## 五、思考题

1. 哪些环节会影响革兰氏染色结果的正确性？其中最关键的环节是什么？
2. 革兰氏染色时，初染前能加碘液吗？乙醇脱色后复染之前，革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌分别是什么颜色？
3. 革兰氏染色时，为什么特别强调菌龄不能太老，用老龄细菌染色会出现什么问题？
4. 观察芽孢、荚膜和鞭毛结构时，所用菌种菌龄有什么不同？

## 实验 3 放线菌形态观察

### 一、实验目的

1. 掌握放线菌形态的观察方法。
2. 了解放线菌的个体形态特征。

### 二、实验原理

放线菌具有发达的菌丝体。放线菌的菌丝一般无隔、分枝，菌丝直径与细菌的相似，可分为生长在培养基内的基内菌丝和生长在培养基表面及上方的气生菌丝，气生菌丝可部分分