



普通高等教育“十五”国家级规划教材



面向 21 世纪 课程 教材

Textbook Series for 21st Century

食品微生物学 实验原理与技术

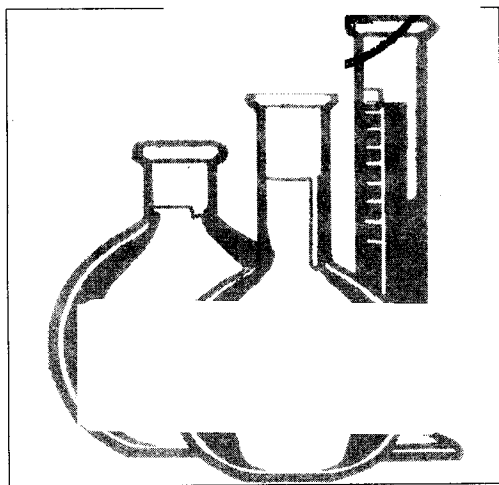
李平兰 贺稚非 主编

 中国农业出版社

普通高等教育“十五”国家级规划教材
面向 21 世纪课程教材

食品微生物学实验 原理与技术

李平兰 贺稚非 主编



中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

食品微生物学实验原理与技术/李平兰, 贺稚非主编.
北京: 中国农业出版社, 2005. 8
全国高等农业院校教材
ISBN 7-109-09913-X

I. 食... II. ①李...②贺... III. 食品微生物-微生物学-实验-高等学校-教材 IV. TS201.3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 086958 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 傅玉祥

责任编辑 叶 岚

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2005 年 8 月第 1 版 2005 年 8 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×960mm 1/16 印张: 19

字数: 335 千字

定价: 23.40 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

前 言

微生物学是生命科学研究中最活跃的学科领域，而微生物学实验原理与技术是微生物学建立和发展的基础，曾为整个生命科学技术的发展做出过积极而重要的贡献，同时也是生物工程技术的核心和主体。随着分子生物学的诞生，各学科相互交叉渗透，极大地丰富了微生物学实验原理与技术的内容，并将其推向一个新的发展阶段。而微生物学实验也广泛地渗透到了现代生命科学的各个分支领域，不断发挥着它的独特作用。因此，微生物学实验是一门十分重要的基础实验。

全国农业院校的食品学科大多建立于20世纪80年代改革开放的初期，经过20年的发展，现已成为我国食品科学人才培养的最为重要的人才基地。在学科发展的起步阶段，食品微生物学课程一直沿用过去轻工院校编写的教材。然而，经过20年的发展，这些教材已远远不能适应今天的教学需要。当然，在此期间也陆续出版过几本优秀的食品微生物学教材，为全国农业院校食品微生物学课程的开设起到了积极有效的作用。但一直没有一本与其配套的食品微生物学实验原理与技术的教材。

为了适应21世纪科学技术更为迅猛发展的需要，迎接微生物学迅速向分子生物学水平和微生物产业化发展的机遇和挑战，为社会培养微生物领域的高素质科技人才，国家教育部在面向21世纪课程教材的基础上，评选出了一批优秀的教材作为国家“十五”重点规划教材来进一步完善和提高，《食品微生物学》就是其中的一本，而《食品微生物学实验原理与技术》作为《食品微生物学》的配套教材由全国十几所院校教学第一线的教师共同编写。

本教材针对食品微生物学是多学科组成的特点，分析总结了以往开课内容及效果，去除了重复的实验内容，适当删除了某些已经淘汰、过时或不太重要的实验内容；集中或改变某些原来分别在普通微生物学、微生物生理学、微生物遗传学、食品微生物学、发酵微生物学、卫生微生物学和发酵食品学中单独开设的小实验，编写成系统、连贯、实践性强、教学效果较好的实验系列；同时增加了一些近年来新出现的与食品加工、保鲜及安全关系较为密切的相关微



生物的检测以及具有某种功能特性微生物菌株选育的内容。此外,还适当增加了一些现代分子微生物学的实验方法与新技术,力求做到既避免与理论教材脱节又能启发学生的主动思考能力和创新思维能力。我们希望通过微生物学实验让学生验证理论,巩固和加深理解所学过的专业知识,熟悉和掌握微生物基本实验操作技能,培养学生理论联系实际,独立分析问题和解决问题的能力,进一步启发和提高学生的创新意识和创新能力。

全书共分三部分。第一部分为基础微生物学实验技术;第二部分为食品微生物学实验技术;第三部分为与其相关的其他食品微生物学实验技术;书后还有附录和参考文献。以上内容共66个实验,每个实验相对独立,因而各个院校可根据具体情况酌情选做。

本书由李平兰、贺稚非任主编,参加编写的还有刘慧、田洪涛、许喜林、李理、时向东、张晓东、王成涛、尹源明、郭爱玲、杜小兵、陈晓蔚、江晓、梁志宏等。实验1、2、22由时向东编写;实验3、4、9、10、11、12、14由刘慧编写;实验5、6、7、8、15、16、17、44、57由贺稚非和杜小兵编写;实验19、20、21由张晓东编写;实验25、26、27、66由王成涛编写;实验28、29、43由江晓编写;实验30、31由陈晓蔚编写;实验32、33、34由尹源明编写;实验35、36、37、38由郭爱玲编写;实验13、45、46、47由梁志宏编写;实验48、49、58由许喜林编写;实验50、51、54、55、56由田洪涛编写;实验59、60、61、62由李理编写;实验18、23、24、39、40、41、42、52、53、63、64、65由李平兰编写。附录部分由李平兰、王成涛、梁志宏等编写与整理。李平兰负责全书的统编定稿。南京农业大学江汉湖教授担任主审,中国农业大学牛天贵教授担任副主审。

本书在编写过程中,得到了各编委所在单位和领导的支持。中国农业大学食品科学与营养工程学院食品微生物学科研究生吕燕妮、沈清武、江志杰、欧阳清波等在实验试做及编写过程中提供了帮助,研究生周伟、刘子宇、孙成虎、梁锋、傅鹏、靳志强、王玉文等对本书的编排和校阅做了大量具体的工作。在本书出版之际谨向他(她)们表示诚挚的谢意!

编者

2005年5月

食品微生物学实验室守则

微生物学实验课的目的是训练学生掌握最基本的操作技能；了解微生物学的基本知识；加深对微生物学基本概念、基本理论及原理的理解。通过实验，培养学生观察、思考、分析问题和解决问题的能力；树立实事求是、严肃认真的科学态度和良好的合作精神，养成勤俭节约、爱护公物的优良品德。

为了上好食品微生物学实验课，并保证安全，实验时须注意如下事项：

1. 每次实验前需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。

2. 实验室内要保持安静和整洁，勿高声喧哗，尽量避免随便走动以免染菌。

3. 实验操作应严格按操作规程进行，万一遇有带菌物品洒漏、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。

4. 实验操作需认真谨慎，要细心观察并及时做好实验记录，对于当时不能得到结果而需要连续观察的实验，则需在指定时间内观察，并记录每次观察的现象和结果，以便日后分析。

5. 使用仪器、设备时，要认真小心，如有损坏，须做好登记。对耗材和药品的使用要杜绝浪费，用完后放回原处。

6. 实验过程中，切勿使乙醚、丙酮、酒精等易燃药品接近火源，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。

7. 每次实验需要培养的材料，应标明自己的组别及处理方法，放于指定地点进行培养。实验室的菌种和物品等，未经教师许可，不得擅自带出实验室。

8. 每次实验结果，应以实事求是的科学态度填入报告表格中，力求简明准确，并连同思考题一起及时交给指导教师批阅。

9. 凡实验用过的菌种以及带有活菌的各种器皿，应先经高压灭菌后才能洗涤。制片上的活菌标本应先浸泡于3%来苏儿溶液或5%石炭酸溶液中，半小时以后再行洗刷。如系芽孢杆菌或有孢子的菌，则应适当延长浸泡时间。

10. 实验完毕，须把所用仪器擦拭干净后放回原处，并将实验室收拾整齐干净。离开实验室前，一定要用肥皂将手洗净。同时要关闭门窗以及水、电、煤气等开关。

目 录

前言

食品微生物学实验室守则

第一部分 基础微生物学实验技术

实验 1	普通光学显微镜的使用	3
实验 2	电子显微镜样品的制备及使用	6
实验 3	细菌的简单染色和革兰氏染色	10
实验 4	细菌特殊结构的染色	16
实验 5	微生物细胞大小的测量	23
实验 6	微生物细胞数量的直接计数法	27
实验 7	培养基的制备及灭菌方法	30
实验 8	微生物的分离、纯化与接种技术	34
实验 9	细菌的菌落特征观察及计数方法	39
实验 10	放线菌的形态及菌落特征的观察	50
实验 11	酵母菌形态、菌落特征的观察及死活细胞的鉴别	55
实验 12	霉菌形态、菌落特征的观察及郝氏霉菌计数法	61
实验 13	实验室环境中的微生物检测	67
实验 14	微生物鉴定用生理生化试验	69
实验 15	环境因素对微生物生命活动的影响	80
实验 16	微生物的菌种保藏技术	83
实验 17	微生物的人工诱变育种技术	87
实验 18	丝状真菌原生质体制备、融合及再生技术	90
实验 19	细菌的凝集实验	93
实验 20	琼脂免疫扩散实验	95
实验 21	荧光抗体技术	98
实验 22	酶联免疫吸附实验 (ELISA)	100



实验 23	质粒转化大肠杆菌及其检测	103
实验 24	细菌 DNA G+Cmol%含量的测定	107
实验 25	聚合酶链反应 (PCR) 技术体外扩增 DNA	111
实验 26	16S rRNA 序列分析及其同源性分析	116
实验 27	脉冲电场凝胶电泳分离大分子 DNA	122

第二部分 食品微生物学实验技术

实验 28	食品中细菌菌落总数的测定	129
实验 29	食品中大肠菌群的测定	133
实验 30	食品中金黄色葡萄球菌的检测	137
实验 31	食品中溶血性链球菌的检测	140
实验 32	食品中沙门氏菌属的检验	143
实验 33	食品中志贺氏菌属的检验	150
实验 34	食品中蜡样芽孢杆菌的检验	154
实验 35	食品中副溶血性弧菌的检验	157
实验 36	食品中空肠弯曲杆菌的检验	160
实验 37	食品中肉毒梭状芽孢杆菌及肉毒毒素的检验	165
实验 38	食品中单核细胞增生李斯特氏菌的检验	169
实验 39	食品中大肠杆菌 O157: H7 的检验	175
实验 40	冷却肉中假单胞菌的检测	177
实验 41	真空包装肉及肉制品中热杀索丝菌的检测	180
实验 42	奶粉中阪崎肠杆菌的检测	182
实验 43	噬菌体的检测	185
实验 44	食品中霉菌的计数及生物量的测定	188
实验 45	苹果汁中棒曲霉毒素的检测	191
实验 46	食品中黄曲霉毒素的检测	194
实验 47	化学诱变剂的微生物检测实验——Ames 法	197
实验 48	微生物的微量诊断系统	200
实验 49	食品加工过程中微生物的快速检测	204

第三部分 其他相关的食品微生物学实验技术

实验 50	食品微生物菌种的复壮技术	213
-------	--------------------	-----



实验 51	食品用微生物发酵剂菌种的低温冷冻干燥技术	215
实验 52	酸乳及泡菜中乳酸杆菌的分离与初步鉴定	217
实验 53	发酵香肠中葡萄球菌和微球菌的分离计数与初步鉴定	219
实验 54	鲜牛乳中自然发酵过程中微生物菌相变化测定	221
实验 55	酸乳中乳酸菌活力的测定	223
实验 56	双歧杆菌等厌氧菌的分离、培养及活菌计数方法	225
实验 57	酵母菌等单细胞微生物生长曲线的测定	228
实验 58	啤酒酵母的固定化与啤酒发酵实验	231
实验 59	糖化曲的制备及其酶活力的测定	234
实验 60	酱油种曲中米曲霉孢子数及发芽率的测定	237
实验 61	酒酿中根霉的分离与甜酒酿的制作	240
实验 62	毛霉的分离和豆腐乳的制作	242
实验 63	细菌素产生菌的筛选及效价测定方法	245
实验 64	产胞外多糖 (EPS) 乳酸菌菌株的分离、筛选	248
实验 65	耐消化道逆环境乳酸菌菌株的分离与筛选	251
实验 66	降解胆固醇微生物菌株的分离与筛选	254

附 录

附录 I	微生物常用玻璃器皿清洁法	259
附录 II	常用检索表	260
附录 III	常用培养基配方	263
附录 IV	常用染色液的配制	282
附录 V	常用缓冲液的配制	284
附录 VI	常用试剂和指示剂的配制	285
附录 VII	常用消毒剂和杀菌剂	288
主要参考文献	289

第一部分

基础微生物学实验技术





实验 1 普通光学显微镜的使用

1 目的要求

- (1) 学习并掌握油镜的原理及使用方法。
- (2) 复习普通台式显微镜的结构、各部分的功能和正确的使用方法。

2 基本原理

现代普通光学显微镜利用目镜和物镜两组透镜系统来放大成像，故也常称为复式显微镜。它们由机械装置和光学系统两大部分组成(图 1-1)。在显微镜的光学系统中，物镜的性能最为关键，它直接影响着显微镜的分辨率。而在普通光学显微镜通常配制的几种物镜中，油镜的放大倍数最大，对微生物学研究最为重要。与其他物镜相比，油镜的使用比较特殊，需要在载玻片与油镜之间滴加香柏油，其主要目的是增加照明亮度和提高显微镜的分辨率。

2.1 增加照明亮度 油镜的放大倍数可达 $100\times$ ，放大倍数这样大的镜头焦距很短，孔径很小，但所需要的光照强度却最大。从承载标本的玻片透过来的光线，因介质密度不同(从玻片进入空气，再进入镜头)，有些光线会因折射或全反射，不能进入镜头，致使在使用油镜时会因射入的光线较少，物像显现不

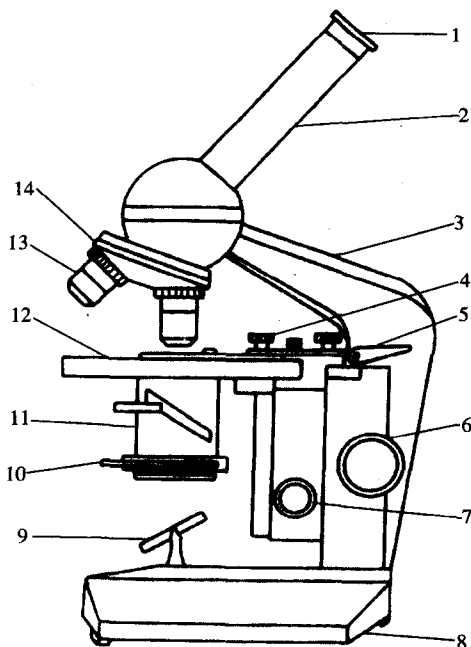


图 1-1 显微镜的结构

1. 目镜 2. 镜筒 3. 镜臂 4. 标本移动器
5. 粗动限位器 6. 粗调节器 7. 细调节器
8. 底座 9. 反光镜 10. 聚光孔光圈
11. 聚光器 12. 镜台(载物台)
13. 物镜 14. 物镜转换器



清。所以为了不使通过的光线有损失，在使用油镜时必须在油镜与载玻片之间加入与玻璃的折射率 ($n=1.55$) 相仿的香柏油 ($n=1.52$)。

2.2 提高显微镜的分辨率 显微镜的分辨率或分辨力是指显微镜能辨别两点之间的最小距离的能力。从物理学角度看，光学显微镜的分辨率受光的干涉现象及所用物镜性能的限制，可表示为：

$$\text{分辨率 (最大可分辨距离)} = \lambda/2NA$$

式中 λ ——光波波长；

NA ——物镜的数值孔径值。

光学显微镜的光源不可能超出可见光的波长范围 ($0.4\sim 0.7\ \mu\text{m}$)，而数值孔径则取决于物镜的镜口角和玻片与镜头间介质的折射率，可表示为： $NA=n \cdot \sin\alpha$ 。

式中 α 为光线最大入射角的半数，它取决于物镜的直径和焦距。一般来说，在实际应用中最大只能达到 120° ，而 n 为介质折射率。由于香柏油的折射率 (1.52) 比空气及水的折射率 (分别为 1.0 和 1.33) 要高，因此，以香柏油作为镜头与载片之间介质的香柏油所能达到的数值孔径 (NA 一般在 $1.2\sim 1.4$) 要高于低倍镜、高倍镜等干镜 (NA 都低于 1.0)。若以可见光的平均波长 $0.55\ \mu\text{m}$ 来计算，数值孔径通常在 0.65 左右的高倍镜只能分辨出距离不小于 $0.4\ \mu\text{m}$ 的物体，而油镜的分辨率却可达到 $0.2\ \mu\text{m}$ 左右。

3 实验材料

3.1 菌种 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、乳脂链球菌 (*Streptococcus cremoris*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、纹膜醋酸杆菌 (*Acetobacter aceti*)、啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)、脆壁酵母菌 (*Saccharomyces fragilis*)、鲁氏毛霉 (*Mucor rouxii*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)。

3.2 溶液和试剂 香柏油、二甲苯 (或乙醚：乙醇=7：3 的混合液)。

3.3 仪器或其他用具 显微镜、擦镜纸。

4 实验方法与步骤

4.1 观察前的准备

(1) 显微镜的安置。置显微镜于平整的实验台上，镜座距实验台边缘 $3\sim 4\ \text{cm}$ 。镜检时姿势要端正。

(2) 光源调节。安装在镜座内的光源灯可通过调节电压以获得适当的照明



亮度，而使用反光镜采集自然光或灯光作为照明光源时，应根据光源的强度及所用物镜的放大倍数选用凹面或平面反光镜并调节其角度，使视野内的光线均匀，亮度适宜。

(3) 根据使用者的个人情况，调节双筒显微镜的目镜。双筒显微镜的目镜间距可以适当调节，而左目镜上一般还配有屈光度调节环，可以适应瞳距不同或两眼视力有差异的不同观察者。

(4) 聚光器数值孔径的调节。调节聚光器虹彩光圈值与物镜的数值孔径相符或略低。有些显微镜的聚光器只标有最大数值孔径值，而没有具体的光圈数刻度。使用这种显微镜时可在样品聚焦后取下一目镜，从镜筒中一边看着视野，一边缩放光圈，调整光圈的边缘与物镜边缘黑圈相切或略小于其边缘。因为各物镜的数值孔径值不同，所以每转换一次物镜都应进行这种调节。

4.2 显微观察 在目镜保持不变的情况下，使用不同放大倍数的物镜所能达到的分辨率及放大率都是不同的。一般情况下，特别是初学者进行显微镜观察时，应遵守从低倍镜到高倍镜再到油镜的观察程序，因为低倍数物镜视野相对较大，容易发现目标及确定检查的位置。

(1) 低倍镜观察。将金黄色葡萄球菌等染色标本玻片置于载物台上，用标本夹夹住，移动推进器使观察对象处在物镜的正下方。下降 $10\times$ 物镜，使其接近标本，用粗调节器慢慢升起镜筒，使标本在视野中初步聚焦，再使用细调节器调节图像清晰。通过玻片夹推进器慢慢移动玻片，认真观察标本各部位，找到合适的目的物，仔细观察并记录所观察到的结果。

(2) 高倍镜观察。在低倍镜下找到合适的观察目标并将其移到视野中心后，轻轻转动物镜转换器将高倍镜移至工作位置。对聚光器光圈及视野亮度进行适当调整后微调细调节器使物像清晰，利用推进器移动标本仔细观察并记录所观察到的结果。

(3) 油镜观察。在高倍镜或低倍镜下找到要观察的样品区域后，用粗调节器将镜筒升高，然后将油镜转到工作位置。在待观察的样品区域加滴香柏油，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并与标本相连。将聚光器升至最高位置并开足光圈，若使用聚光器的数值孔径值超过了1.0，还应在聚光镜与载玻片之间也滴加香柏油，保证其达到最大的效能。调节照明使视野的亮度合适，用粗调节器将镜筒徐徐上升，直至视野中出现物像并用细调节器使其清晰聚焦为止。

4.3 显微镜用毕后的处理

(1) 上升镜筒，取下载物片。

(2) 用擦镜纸拭去镜头上的香柏油，然后用擦镜纸蘸少许二甲苯（乙醚：



乙醇=7:3的混合液)擦去镜头上残留的油迹,最后再用干净的擦镜纸擦去残留的二甲苯。

(3) 用擦镜纸清洁其他物镜及目镜;用绸布清洁显微镜的金属部件。

(4) 将各部分还原,反光镜垂直于镜座,将物镜转成“八”字形,再向下旋。同时把聚光镜降下,以免接物镜与聚光镜发生碰撞危险。

5 实验报告

绘制出你在低倍镜、高倍镜和油镜下观察到的各细菌、酵母菌和霉菌的形态图。并注明物镜放大倍数和总的放大倍数。

6 注意事项

(1) 调焦时,应先用粗调节器使镜台下降(或镜筒上升),等看到物像后再用细调节器使物像清晰。

(2) 切忌不要在调焦时误将粗调节器向反方向转动,这样很容易损坏镜头和载玻片。

(3) 保持镜头干净,不要用手和其他纸擦拭镜头,以免使镜头沾上污渍或产生划痕而影响观察。

7 思考题

(1) 用油镜观察时应注意哪些问题?在载玻片和镜头之间滴加什么油?起何作用?

(2) 影响显微镜分辨率的因素有哪些?

(3) 油镜用毕后,为什么必须把镜油擦掉?用过多的二甲苯擦镜头有什么危害?

实验2 电子显微镜样品的制备及使用

1 目的要求

(1) 熟悉制备微生物电镜样品的基本方法。

(2) 了解电子显微镜结构的基本原理,在透射电镜和扫描电镜下观察大肠



杆菌的形态。

2 基本原理

电子显微镜是观察微生物极其重要的仪器。由于受光学显微镜分辨力的限制(受检物直径须在 $0.2\ \mu\text{m}$ 以上),若要观察比细菌更小的微生物如病毒,或观察微生物细胞的超微结构时必须使用电子显微镜。电子显微镜是以电子波代替光学显微镜使用的光波,电子场的功能类似光学显微镜的透镜,整个操作系统在真空条件下进行。由于用来放大标本的电子束波长极短,当通过电场的电压为 $100\ \text{kV}$ 时,波长仅为 $0.04\ \text{nm}$,大约比可见光波短 $10\ 000$ 倍,所以电子显微镜分辨力较光学显微镜大得多,因而有非常大的放大率。所以,通过它可观察到更微细的物质和结构。在生命科学研究中,电子显微镜已成为观察和描述细胞、组织、细菌和病毒等超微结构必不可少的工具。

根据电子束作用于样品的方式的不同及成像原理的差异,现代电子显微镜已发展形成了许多类型,目前最常用的是透射电子显微镜(transmission electron microscope)和扫描电子显微镜(scanning electron microscope)两大类。前者总放大倍数可在 $1\ 000\sim 1\ 000\ 000$ 倍范围内变化,后者总放大倍数可在 $20\sim 3\ 000\ 000$ 倍之间变化。

3 实验材料

3.1 菌种 大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)。

3.2 溶液或试剂 醋酸戊酯、浓硫酸、无水乙醇、无菌水、2%磷酸钠($\text{pH}6.5\sim 8.0$)水溶液、1%~2%戊二醛磷酸缓冲液($\text{pH}7.2$ 左右)。

3.3 仪器及用具 普通光学显微镜、真空镀膜机、临界点干燥仪、细菌计数板、烧杯、培养皿、载玻片、瓷漏斗、铜网、大头针、滤纸、无菌滴管、无菌镊子等。

4 实验方法与步骤

4.1 透射电镜样品的制备及观察

(1) 金属网的处理。在透射电镜中,由于电子不能穿透玻璃,所以只能采用网状材料即载网作为载体。载网有不同的规格,通常采用 $15\sim 200$ 目的铜网。铜网在使用前要先进行处理,以除去其上的污物,否则会影响支持膜的质量及标本照片的清晰度。通常是先用醋酸戊酯浸泡 $2\ \text{h}$,然后用蒸馏水冲洗数次,再将铜网浸泡在无水乙醇中进行脱水。若上述方法处理后铜网仍不干净,可用稀释的浓硫酸浸 $1\sim 2\ \text{min}$ 。



(2) 支持膜的制备。在进行样品的观察时，在载网上还应覆盖一层无结构的、均匀的薄膜，否则细小的样品会从载网的孔中漏出去，这层薄膜通常称其为支持膜或载膜。支持膜可用塑料膜，也可以用碳膜或金属膜。常规工作条件下塑料膜就可以达到要求，所以大多数情况下采用塑料膜中的火棉网。

(3) 转移支持膜到载网上。转移支持膜到载网上，可以有多种方法，常用的有两种：

一是将洗净的网放入瓷漏斗中，漏斗下面套上乳胶管，用止水夹控制水流，缓缓向漏斗内加入无菌水，其量约高 1 cm；用无菌镊子尖轻轻排除铜网上的气泡，并将其均匀地摆在漏斗中心区域；按 (2) 所述方法在水面上制备支持膜，然后松开水夹，使膜缓缓下沉，紧紧贴在铜网上；将一清洁的滤纸覆盖在漏斗上防尘，自然干燥或红外线灯下烤干。干燥后的膜，用大头针尖在铜网周围划一下，用无菌镊子小心将铜网膜移到载玻片上，置光学显微镜下用低倍镜挑选完整无缺、厚薄均匀的铜网膜备用。

二是按 (2) 所述方法在平皿或烧杯里制备支持膜，成膜后将几片铜网放在膜上，再在上面放一张滤纸，浸透后用镊子将滤纸反转提出水面。将有膜及铜网的一面朝上放在干净平皿中，置 40℃ 烘箱使其干燥。

(4) 制片。透射电镜样品的制备方法比较多，有超薄切片法、冰冻蚀刻法、复型法及滴液法等。其中滴液法或在此基础上发展起来的直接帖印法和喷雾法等主要是用于观察病毒颗粒、细菌形态及生物大分子物质的。由于生物样品主要是由碳、氢、氧、氮等元素组成，散射电子的能力很低，在电镜下反差较小，所以在进行电镜的生物样品制备时通常还须采用重金属盐染色或金属电镀等方法来增加样品的反差，从而提高观察效果。负染色法由于操作简单，目前在透射电镜生物样品制片时比较常用。本实验采用的是滴液法结合负染色技术来观察大肠杆菌的形态。

首先将无菌水加入生长良好的细菌斜面，轻轻用吸管拨动制成菌悬液。用无菌滤纸过滤，并调整滤液中的细胞浓度为 10^8 个/ml。而后取菌悬液与等量的 2% 磷钨酸钠 (pH 0.6~8.0) 水溶液混合，用无菌毛细管吸取混合悬液滴在铜网上，经 3~5 min 后，用滤纸吸去多余的水分，待样品干燥后，置低倍光学显微镜下检查，挑选膜完整、菌体分布均匀的铜网。

(5) 观察。将载有样品的铜网置于透射电镜中进行观察。

4.2 扫描电镜微生物样品的制备及观察 扫描电镜观察时要求样品必须干燥，并且表面能够导电。因此，在进行扫描电镜生物样品制备时一般都需采用固定、脱水、干燥及表面镀金等处理步骤。

(1) 固定及脱水。生物的精微结构极易遭受破坏，因此在进行制样处理和