

上海第二医学院教材

医用微生物学

实验指导

1982. 1.

微生物学实验的目的与要求

实验课是医学微生物学教学过程中的重要环节。

医学微生物学实验的目的，在于使学生加深和巩固对讲课内容的理解和体会；并在掌握系统理论知识的基础上，使学生学习及掌握医学微生物学的基本操作技术，为今后有关的传染病诊断与科学研究工作上必要的检查方法和技能打下良好基础。

本实验指导分为细菌学总论、免疫学基础、细菌学各论、病毒与其他微生物四部分。在细菌学总论实验中，着重介绍细菌形态学观察方法，细菌的分离培养方法，各种外界因素对细菌的影响以及动物的实验感染方法等。免疫学基础实验中，除了介绍几种传统的经典的血清学反应以外，着重介绍近年来新发展的一些体液免疫和细胞免疫的检测方法。细菌学各论实验中，主要有系统的介绍一些危害人类健康较为严重的传染病病原菌生物学性状的实验，并通过数种临床标本的检查，使学生了解传染病的病原及血清学诊断方法的程序。在病毒与其他微生物实验中，着重介绍了各种病原微生物的常用形态学检查和血清学检查，以及病毒、衣原体、立克次氏体的三种基本分离培养鉴定方法等。

实验形式基本上分为教师示教及学生自己操作两种。前者多数印证理论，使学生对系统理论能有更深入的理解。后者则通过对各项实验的具体操作，从不同角度进行反复学习、训练，引导学生较熟练地掌握涂片染色、分离接种、稀释方法等基本操作技能。在微生物学的整个实验过程中，应严格贯彻“无菌概念”的培养和训练。

为了提高实验课的效果，要求学生们在实验前后做到下列数点。

1. 每次实验前务必作好预习，明确实验的目的、内容、操作中注意点及其理论依据等，避免或减少错误的发生。
2. 在实验过程中，要坚持严肃性、严格性与严密性。对操作的实验，应遵照实验指导所列步骤，依次进行，边操作边进行积极的思考；对示教的实验也要仔细观察，并联系有关理论。实验中亦须注意科学地分配和运用时间。
3. 实验结果必须真实地记录下来，然后进行分析，得出结论。遇有和理论不符的结果时，应尽量探讨其原因，训练自己的科学思维能力。实验完成后，要写出实验报告。

目 录

微生物学实验的目的与要求	1
微生物学实验室规则	2
第一篇 细菌学总论	3
细菌的形态学	3
实验一 显微镜的使用与细菌正常形态的观察	3
实验二 细菌动力检查法	11
实验三 细菌染色标本检查法	14
细菌的生理学	21
实验四 基础培养基的制备	21
实验五 细菌的培养法	26
实验六 细菌的新陈代谢	33
微生物在自然界和正常机体的分布	40
实验七 正常人体与环境中细菌的检查	40
外界因素对微生物的影响	42
实验八 物理因素对细菌的影响	43
实验九 化学因素对细菌的影响	50
实验十 磺胺药和抗菌素对细菌的影响	53
实验十一 噬菌体	58
实验十二 细菌素	61
微生物的变异性	62
实验十三 细菌的变异性	63
动物实验方法	67
实验十四 动物的实验感染法	67
实验十五 感染动物的尸体解剖及细菌学检查	71
细菌的致病性	72
实验十六 细菌的侵袭力	72
实验十七 细菌毒素的作用	74
第二篇 免疫学基础	77
实验十八 机体天然免疫机制	77
实验十九 吞噬作用	79
实验二十 抗原与免疫血清的制备	82
实验二十一 实验动物的采血	85
实验二十二 凝集反应	87
实验二十三 血型鉴定及交互配血试验	93
实验二十四 沉淀反应	96
实验二十五 溶血反应与补体结合反应	104

实验二十六	补体的测定方法	109
实验二十七	免疫复合物检测方法	110
实验二十八	淋巴细胞功能检查	112
实验二十九	T细胞和B细胞计数	121
实验三十	示踪方法	123
实验三十一	变态反应	133
实验三十二	生物制品	137
第三篇 细菌学各论		141
实验三十三	葡萄球菌	141
实验三十四	链球菌	143
实验三十五	肺炎球菌	146
实验三十六	奈瑟氏菌	148
实验三十七	病原性球菌未知标本的检查	150
实验三十八	大肠杆菌、产气杆菌	155
实验三十九	沙门氏菌	158
实验四十	痢疾杆菌属	160
实验四十一	变形杆菌	161
实验四十二	伤寒、付伤寒及痢疾标本的检查	162
实验四十三	霍乱与El-Tor弧菌	166
实验四十四	付溶血性弧菌	170
实验四十五	绿脓杆菌	172
实验四十六	嗜血杆菌属及包特氏菌属	172
实验四十七	鼠疫杆菌	175
实验四十八	布鲁氏菌属	177
实验四十九	需氧芽胞杆菌属	181
实验五十	厌氧芽胞杆菌属	183
实验五十一	无芽胞厌氧菌属	186
实验五十二	棒状杆菌属	189
实验五十三	分枝杆菌属	193
第四篇 病毒与其它微生物		200
实验五十四	病毒的形态学及生物学特性	200
实验五十五	病毒培养法	205
实验五十六	病毒血清学反应	215
实验五十七	病毒的分离与鉴定	223
实验五十八	衣原体	227
实验五十九	立克次氏体	228
实验六十	支原体	230
实验六十一	螺旋体	232
实验六十二	真菌与放线菌	239

微生物学实验室规则

在进行微生物学实验时，时时要记住，我们实验的对象大多是病原微生物。如果不慎发生意外，不仅自身可能招致感染，且有可能将病原微生物传给他人。因此，进实验室必须遵循下列规则。

一、书包、衣物等勿带入实验室，必要的文具、实验指导、笔记等带入后，亦要和操作部位远离。

二、进实验室穿上实习衣，离室时脱下，要反折。

三、实验室内要保持安静，有秩序，不得高声谈笑，或随便走动，以免影响他人实验。

四、实验室内禁止饮食、吸烟和用嘴湿润铅笔或标签等，也不要以手抚摸头面等部位。

五、若发生吸入菌液、割破手指等事故，应立即报告指导教师，进行预防处理。

1. 皮肤破伤：先除尽异物，用蒸馏水或生理盐水洗净后，涂以 2 % 红汞或 2 % 碘酒。

2. 烧伤：涂以凡士林油、5 % 鞣酸或 2 % 苦味酸。

3. 化学药品腐蚀伤：若为强酸，先用大量清水冲洗，再以 5 % 碳酸氢钠或 5 % 氢氧化铵溶液洗涤中和之；强碱腐蚀伤则先以大量清水冲洗后，再用 5 % 醋酸或 5 % 硼酸溶液洗涤中和之。若受伤处是眼部，经过上述步骤处理后，最后滴入橄榄油或液体石蜡一、二滴以滋润之。

4. 吸入病菌菌液：应立即吐入容器内消毒，并用 1 : 1,000 过锰酸钾溶液或 3 % 双氧水漱口；并根据菌种不同，服用抗菌药物等以资预防。

5. 菌液流洒桌面：倾倒适量 2-3 % 来苏或 0.1 % 新洁而灭等于污染面，让其浸泡半小时后抹去。若手上沾有活菌，亦应浸泡于上述消毒液 10-20 分钟后，再以肥皂及水洗刷之。

6. 严防火灾：如发生火灾苗子应沉着处理，切勿慌张，立即关闭电闸、煤气阀门；如系酒精、乙醚、汽油等火种，切忌用水，可撒泼大量沙土等扑灭火苗。

六、吸过菌液的吸管、毛细吸管，要投入含有 2-3 % 来苏或 0.1 % 新洁而灭液的玻璃筒中，不得放在桌上，亦不可冲洗于水槽内。用过的玻片也应放于含消毒液的容器内。

七、爱护公物，节约使用实验材料。器材如有损坏，应立即向指导教师报告，听候处理。

八、实验完毕，整理桌面；需培养的物品要放入孵育箱；水电等关好；洗手后离室。

第一篇 细菌学总论

细菌的形态学

细菌是微生物中种类繁多,分布广泛的一类单细胞原核生物。细菌细胞的结构除细胞核外基本上与高等植物细胞构造相似,具有细胞壁及原生质,原生质是由细胞浆、胞浆膜、核质所组成。有些细菌还具有鞭毛、荚膜、芽胞等特殊结构。在通常情况下细菌的形态可分为球菌、杆菌、螺菌(或弧菌)三大类。细菌的体积很微小,以微米(μ)作为测量单位。各类细菌菌体大小不一致,化脓性球菌的直径一般在 $0.8-1.2\mu$;肠道杆菌为 $2-3\mu \times 0.5-1\mu$;弧菌约为 $1-3\mu \times 0.3-0.6\mu$ 。当细菌所处的环境条件发生改变时,细菌的形态和大小等特点均可能发生变化。

由于细菌的体积微小,而且无色透明,因此,在细菌的形态学研究过程中,必须借助于显微镜以及适当的染色,才能比较清楚地进行观察。

实验一 显微镜的使用与细菌正常形态的观察

内 容

- 一、普通光学显微镜
- 二、细菌正常形态的观察(示教)
- 三、细菌大小的测定(示教)

一、普通光学显微镜

显微镜是研究微生物学的重要工具之一,根据不同的研究目的和要求,可分别选用普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜或电子显微镜等。在细菌形态学研究方面,以普通光学显微镜(简称显微镜)最为常用。

(一)显微镜的构造(图1)

显微镜的构造分为光学和机械两部分。

1. 光学部分:

(1) 接物镜:该镜头下端接近被检物体,为显微镜上的主要光学装置,由多块透镜组成。一般显微镜具有3-4个接物镜、分成干燥系和油镜两组;干燥系又按放大倍数分为低倍镜和高倍镜。各接物镜的放大率可由其外形辨认,镜头长度越大,镜片口径越小,放大倍数愈大;反之、放大倍数愈小。油镜头的下缘,一般刻有一圈黑线。此外,各接物镜上其它标志,如低倍镜:10X(放大倍数),N.A.(Numerical aperture,孔径数)0.2;高倍镜:40X, N.A. 0.69;油镜:100X, N.A. 1.25。

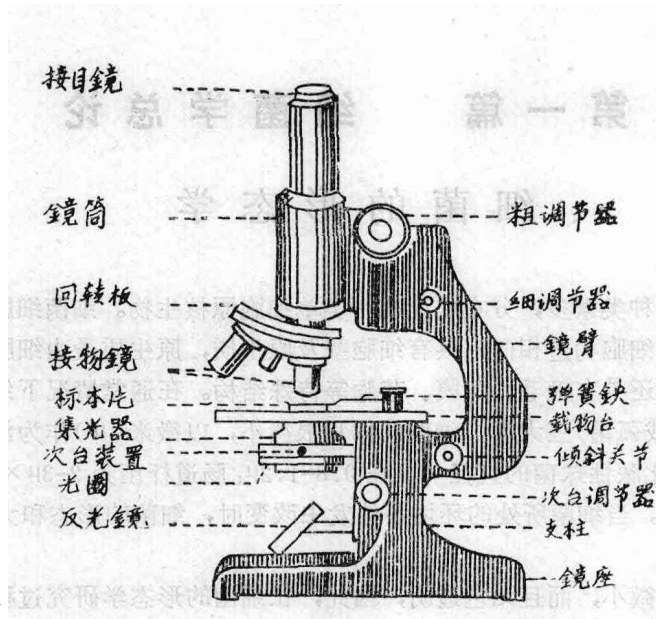


图 1 普通光学显微镜

(2) 接目鏡：重要的光学部分之一，按装在鏡筒上端，和鏡檢者的眼睛接近，接目鏡由二块透視鏡組成，其上刻有放大倍数，常用的为X 5 (5 倍)、X 10 (10 倍)、X 15 (15 倍)。为便于指示物象，常在鏡中装黑色細絲一条，作为指针。

(3) 集光器：位于載物台下方的次台上，由数个透視鏡組成。可以上下移动，调节并集聚由反光鏡反射来的光线，使集中于載物玻片上。

(4) 反光鏡：装在显微镜的最下方，有平凹两面，可自由转动方向，将光线反射至集光器。

2. 机械部分：

(1) 鏡筒：在显微镜前方，是一个金属制的空心圓筒，光线可以从此通过。

(2) 鏡臂：在鏡筒后面，呈圓弧形。使显微镜便于搬移，并为将鏡筒傾斜时的握持部。

(3) 鏡座：是显微镜的底部，呈馬蹄形，用以支持全鏡。

(4) 回轉板：装在鏡筒下端，有 3-4 个圓孔，为装备不同放大率的接物鏡之用。根据需要，回轉板可以转动，借以调换接物鏡。

(5) 傾斜關節：介于鏡臂和鏡座间，为鏡筒作前后变位时的支持点。

(6) 調節器：在鏡台后方两侧、分粗细两种。粗調節器在鏡筒与鏡臂之间，可使鏡筒较大距离地升降。細調節器位于粗調節器下方，可以精确地调节距离；每转一周，可使鏡筒升降 100μ ，有的在細調節器螺旋上附有刻度，每一小格刻度相当于 2μ 。

(7) 載物台：在鏡筒下方，呈方形或圓形，用以载放被檢物体。中央有孔，可以透光。台上装有一付彈簧夾，鏡檢時用以固定標本片。有的載物台上装有標本推進器，捻轉螺旋，能使標本前后左右移动。

(8) 光圈(虹彩)：在集光器下方，可以任意开闭，用以调节射入集光器光线的多寡。

(9) 次台：位于載物台下，装放集光器及光圈用。

(二)显微镜的使用法

1. 使用显微镜时,必须端坐,凳和桌的高低要配合适宜。显微镜应直立桌上,勿将镜臂弯曲。因为,在微生物学实验时,大多使用油镜或直接检查不染色的活菌悬液;若载物台倾斜,油滴或菌液将向外溢,影响观察或造成污染。

2. 显微镜不能采用直接阳光作光源,因其光线过强,反而不易看清;且反射热有损光学装置,以间接日光为佳。在光线灰暗的白昼或夜晚,可采用青色或蓝色灯光,应在集光器下加放一块蓝色玻璃片,或在灯光和显微镜间置一盛有蓝色硫酸铜溶液的球形烧瓶,滤去黄光。以天然光为光源时,用反光镜的平面;采用人工灯光时,宜用其凹面。

3. 转动反光镜,使光线集中于集光器。根据需要,上下移动集光器和缩放光圈,以获得最佳光度。一般染色标本,油镜检查时,光度宜强,可将光圈开足,聚光器上升至与载物台相平;未染色标本,低倍镜或高倍镜观察时,应适当地缩小光圈,下降集光器,使光度减弱;否则光线过强,反不易窥见。

4. 将标本放在载物台上,用弹簧夹或标本推进器固定,移置欲检部分于接物镜下。

5. 先用低倍镜找出标本的视野(隐约可见之标本),再换用高倍镜或油镜观察。

6. 使用油镜时,先加香柏油(Cedar oil)(或以松香、蓖麻油混合液替代)一滴于标本的待检部位。眼睛从镜筒侧面看着,将粗调节器作顺时针方向缓缓转动,使镜筒渐渐下降,直至油镜头浸没于油内(下降的程度是使油镜的透镜镜面几乎和标本片接触,但两者切勿相碰)。然后移目至接目镜,一面观察,一面再将粗调节器作逆时针方向缓慢地转动,获得模糊物象时,换用细调节器转动至物象清晰为止。调节时千万不可使用强力将镜头任意下压,以致压碎标本玻片,或甚至将油镜头损坏。

使用油镜时,须加香柏油的原理是由于油镜的透镜很小,自标本玻片透过的光线,因介质密度(从载物玻片至空气,再进入油镜)不同,有些光线因折射(如图2中之AA')或全反射,就不能进入透镜,致使射入的光线较少,物象显现不清。若在油镜与载物玻片中间加入和玻璃折射率($n=1.52$)相仿的香柏油($n=1.515$),则通过的光线不致有所损失,进入透镜的光量既多,视野的光亮度也相对增强了。此外,加用香柏油后,尚能增加孔径数,提高显微镜的分辨率。

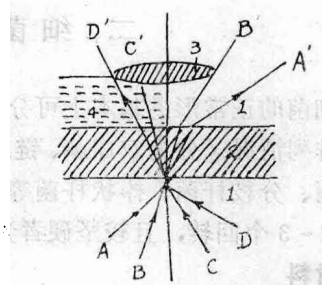


图 2 油镜加香柏油的原理

1. 空气 2. 玻璃片
3. 油镜透镜 4. 香柏油

7. 由低倍镜换用高倍镜观察时,可转动回转板,将高倍镜移至镜筒下,再略行调节即可,若直接使用高倍镜,亦须和使用油镜相同,先以眼睛从侧面看着镜筒下降至镜头将触及标本时,再移目至接目镜,以粗调节器调节之。

8. 观察时如发现有黑影或异物,可先转动接目镜,若该物随之亦转,则在接目镜中;如不随着转动,可移动标本片,若移动,则在片上;否则,即在接物镜上。

9. 显微镜放大率的计算法有数种。精确计算法是以M表示放大倍数,D表示明视距离,A表示镜筒长度, f_1 表示物镜的焦距, f_2 表示目镜的焦距,则得下列公式:

$$M = \frac{AD}{f_1 f_2}$$

设某显微镜的高倍镜焦距为4毫米,接目镜焦距为25毫米,镜筒长160毫米,则此显

显微镜的放大率为：

$$M = \frac{160}{4} \times \frac{250}{25} = 400 \text{ 倍}$$

若镜筒长度不变，显微镜的放大倍数即为接目镜的各单独放大率的乘积。如使用的接目镜为 10 倍，接物镜为 100 倍，则：

$$M = \text{接目镜放大率} \times \text{接物镜放大率} = 10 \times 100 = 1000 \text{ 倍}$$

普通光学显微镜一般能将物体放大 1000—2500 倍。

10. 观察标本时，应练习两眼同时睁开以左眼窥镜，右眼可写字、绘图，并可减少疲劳。开始不习惯时，可用一手掩目，但被遮盖的右眼也不要闭上，以后再逐渐将手移去。经数次的强化练习可渐成自然。

(三)显微镜的维护

1. 显微镜是很贵重的精密仪器，使用时要加以爱惜，切勿随意折散玩弄。
2. 接物镜和接目镜必须保持清洁。油镜用毕，应即以擦镜纸或软绸(不能用布类或普通纸张)拭去香柏油。如油已干，或透镜模糊不清，可沾少许二甲苯擦净，并随用干的擦镜纸或软绸拭去二甲苯，否则用以粘固透镜的胶质物易被二甲苯溶解，日久后镜片将移位或脱落。
3. 强酸、强碱、氯仿、酒精、乙醚等都能去漆或损坏机件，均需注意不使接触机件。
4. 显微镜用毕，擦净油镜后，将各物镜转成八字形；集光器稍下降，以免接物镜与集光器相碰受损。然后放入镜箱，或镜外加盖塑料防尘罩。
5. 显微镜放置的地方要干燥，以防止透镜发霉，但亦要避免阳光的直接照射。

二、细菌正常形态的观察(示教)

细菌的正常形态基本上可分为球菌、杆菌和螺菌(弧菌)三类。球菌按其分裂繁殖方向与分裂后排列情况又分为双球菌、链球菌、四联球菌、八叠球菌、葡萄球菌等；杆菌也有球杆菌、链杆菌、分枝杆菌、棒状杆菌等之分；螺菌中菌体仅有一个弯曲，呈逗点状者叫弧菌，菌体有 2—3 个回转，且较坚硬者为螺菌。

材料

1. 球菌示教片：双球菌、链球菌、四联球菌、八叠球菌、葡萄球菌。
2. 杆菌示教片：大肠杆菌、小杆菌、球杆菌、分枝杆菌、棒状杆菌。
3. 螺形菌示教片：弧菌、螺菌。

方法

1. 使用显微镜的油镜、观察各种球菌、杆菌和螺菌等示教片、比较各菌的形态、大小、排列等性状。
2. 绘图：将观察到的结果，画在报告纸上，并加以适当的描述。

三、细菌大小的测定(示教)

细菌及其它一些微生物的大小，通常用测微计来测量，测微计分接目测微计与镜台测微计二种，接目镜的刻度是相对的，在同一接目镜下，它是随着不同放大率的接物镜而改变

其相对比例，而镜台测微计上所刻的长度是绝对的用来校正接目测微计每格所代表的大小。

材料

光学显微镜、接目测微计、镜台测微计。

方法

1. 将接目测微计装入接目镜内的横隔上，刻度向下，置镜台测微计于镜台上，
 2. 在接目镜下寻得镜台测微计的刻度(这时光圈宜小，因光线暗才能使刻度更为清楚)。
- 需要用那一放大率的接物镜观察标本，则在校正接目测微计时就用那一个接物镜头。

3. 移动镜台测微计和转动接目测微计使二者刻度平行，并使二者的起始线相重叠，数出二条重叠线之间在两个测微计上的格数即可求出接目测微计每格的长度。

接目测微计与镜台测微计二个重叠点间的距离越长，则所得的数字越为精确。

4. 接目测微计每格长度的计算：

镜台测微计总长度为1毫米，其上刻有10大格，每大格划有10小格， $\therefore$ 每小格 $=1/100 = 10\mu$, ($\because 1\text{ mm} = 1000\mu$)

例：今测得高倍显微镜(油镜)的接目测微计50格相当于镜台测微计7格，则接目测微计每格长度为：

$$\frac{7 \times 10\mu}{50} = 1.4\mu/\text{格}$$

5. 校正后移去镜台测微计，将要测的细菌玻片标本置于镜台上，找到目的物后，移动接目测微计(或移动标本)，测定细菌长与宽各占几格，求得其大小。

细菌的大小=测得之格数 $\times$ 接目测微计每格长度。

6. 实验完毕后，取出接目测微计，其中如有油腻或手印，则用擦镜纸拭净。

附 录

一、自制显微镜油

取上等松香100克，以50毫升乙醚溶解之；用滤纸过滤，除去杂质；滤液于60℃左右水锅中蒸发，蒸至完全没有乙醚气味为止，否则，其中的乙醚将有损于油镜头。煮沸蓖麻油经20-30分钟，除去水滴，使之透明；煮沸时需用玻璃棒不断搅动，以防油中水滴因受热膨胀外溢。将已经处理过的松香油与蓖麻油按1:3~4比例混合，混合时要边加边搅动，且需在加热过程中进行；混合后，继续煮沸5-10分钟，以助溶解，直至透明为止，若不够清晰，可以用一、二层纱布过滤，再煮沸，即能获得满意的结果。

二、相差显微镜(示教)

相差显微镜是在普通显微镜的光学系统中加装一些装置，使透过光线中的一部分光束速度减慢，因而部分地或完全地抵消了其余光束的光度，使标本变为灰暗色，和背景的对比鲜明，易于检查。

相差显微镜有三个特殊装置。相差接物镜：有低倍、高倍和油镜，即在普通接物镜的后焦点处加装了一个相差板。相差板是一块玻璃板，表面涂有吸收膜，由银、铬等金属在真空中蒸发沉淀而成，可将强烈光线吸去50-95%，此外，尚有用氯化镁

等喷涂成圆环形的相差膜,使光线延迟或加快 $1/4\lambda$ 。相差集光器:在器下有一转盘,盘上装置直径不同的3—4个圆环形光阑,光阑孔一般很窄,上标明10 $\times$ 、20 $\times$ 、40 $\times$ 、100 $\times$ 等;另有未装光阑的孔,可供明视野检查用。辅助镜:或称对中心镜,系一种调正中心用的合轴望远镜。此外,尚有强光灯、滤光片、隔热玻片等附件。

相差显微镜可用在组织学、血液学、原虫学、微生物学等不染色的活体组织细胞的检查,以及一些非生物学方面的研究。在微生物学中,能用来观察细菌的动力,芽胞的形成与出芽、细菌的分裂繁殖、细胞中的病毒包涵体等。

材料

1. 菌种:变形杆菌、葡萄球菌的幼龄(8—12小时)肉汤培养物。
2. 相差显微镜、载玻片、盖玻片。

方法

1. 将相差集光器装好,并放妥滤光片及隔热玻片,对准光源。
2. 制作压滴片标本,将压滴片标本放在载物台上。
3. 若用低倍相差接物镜检查,则将低倍镜头移至镜筒下端;转动集光器上转盘,使光线通往明视野孔处,调节距离及光度,使象清晰;再转动转盘,使光线通经低倍镜专用的圆形光阑。拔出接目镜,换上辅助镜,并将其抽管上下抽动,至能同时看清接物镜中相差板上的暗圈(即相差膜)和光阑上的亮圈时,捻紧抽管旁螺旋,使之固定。操纵转盘两侧的调节柄,使暗、亮两圈相重叠。取去辅助镜,换回接目镜后,即可进行观察。

4. 若调用高倍镜或油镜观察,除调换相应的高倍镜或油镜的光阑外,均须用辅助镜按照上法重新予以校正。

三、电子显微镜(图3)

光学显微镜的有效放大率有其一定的限度。人类眼睛可见的光谱,其波长在4,000 $\text{\AA}$ (紫色)至7,700 $\text{\AA}$ (红色)之间。若物体颗

粒小于可见光谱波长的 $1/3$ 时,将会发生光的绕射现象,以致不能看到物象。因此,普通光学显微镜不能看到小于0.2 μ 的物体。电子显微镜以波长极短的电子射线来替代一般光线作光源,其波长仅为可见光波长的五万分之一,因而能看到2—3 μ 大小的微粒。目前电子显微镜的放

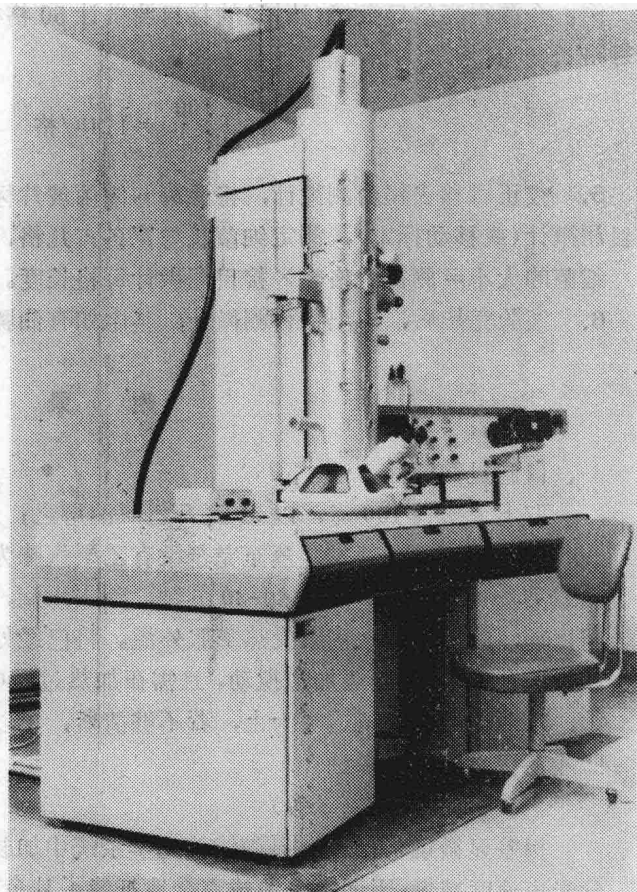


图3 电子显微镜(80万倍)

大率达 80 万倍，一般的放大率在 5—20 万倍。

电子显微镜顶端装有电子枪，应用 30,000—50,000 伏特的高压电，使之产生强烈的快速电子流。为使电子直线运动前进，不受空气气体分子所散射，整个电子显微镜的内部必须经常保持高度真空(约 10^{-5} 毫米汞柱)。在电子流的通道上放置欲观察的标本，由于电子穿透力弱，标本制作需用极薄(0.15—0.8 μ)的火棉胶，碳膜等。电子显微镜具有三组电磁圈，相当于光学显微镜的集光器，接物镜和接目镜。每组电磁圈均能产生极强的电磁场，它可以使电子集中或分散，改变电子的运动方向，造成放大的结果(图 4)电子不能目见，但投射在涂有硫化锌等物质的萤光屏上，发出明亮的兰绿色萤光，其亮度与电子的密度及速度成正比，故可借亮度的明暗而得出物象。这种物象可以用眼睛直接观察，也可用感光胶片摄影。若用金、铂、铈、钨、铬等重金属喷涂于被检物的表面，增加物体密度，则其折散电子的力量加大，观察更为清晰。

电子显微镜可用来研究生物体的微细结构，各种有机物的巨型分子，胶体微粒以及冶金学中金属表面的构造等。在微生物学中，则主要用以观察病毒的形态与大小，细菌的细胞壁、鞭毛、芽胞和细胞浆内的包含物等。电子显微镜不能检查生活微生物的动态，因当电子通过时，能使之死亡。

电子显微镜标本的制备——悬滴法标本制备

在应用电子显微镜研究微生物或一些细胞的细胞器时，常采用悬滴法制备标本，悬滴法就是将被检材料的悬液，直接放置的支持膜上做成标本，然后用适当的方法(染色投影)增加反差，在电镜下面进行整体观察。

悬滴法有些与光学显微镜的检查标本涂片相仿。

1. 悬液制备：

细菌、病毒、噬菌体和大分子的悬液，可用多种方法制备悬滴标本，如细菌、可以直接将从细菌菌落取下的细菌，放在生理盐水中制成悬液，也可将细菌肉汤培养液稀释而成。

病毒、噬菌体，可将初步分离的病毒或噬菌体，用离心机离心的方法加以纯化，制成悬液，也可将初步分离的病毒，噬菌体用赛氏或其它滤菌器过滤纯化。

悬液要求杂质尽可能少，一种悬液最好只含有一种被检查的样品。

2. 悬滴标本制备：

取上述悬液数滴放在凹玻片或白色反应凹面瓷板中，将带有支持膜的铜网(必须是喷有碳膜的，如火棉胶——碳膜)放在液面上(膜面朝下)，停留数分钟，使标本颗粒沉淀和吸附在膜上，然后，取下铜网，放于滤纸上进行固定，在空气中待其干燥后即是。可供电镜观察。

3. 悬液标本的固定：

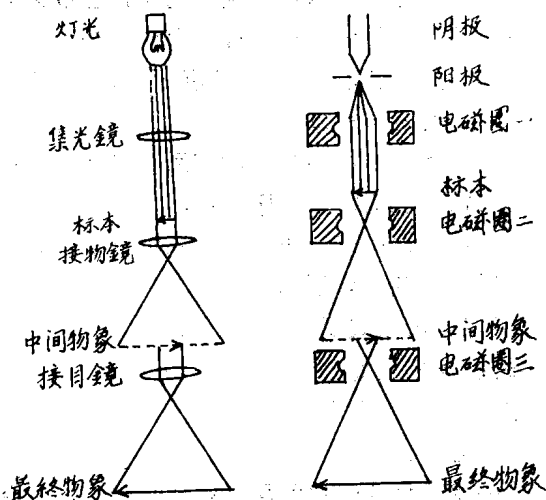


图 4 普通显微镜与电子显微镜放大系统的比较

有的检查标本需经特殊方法予以固定。

方法：将悬滴标本放在培养皿中，在液体未干燥前即进行固定，一般采用锇酸(O_8O_4)或甲醛蒸汽固定，于培养皿中放一塑料瓶塞，内放少许棉花，滴入几滴甲醛液(原液)或2%锇酸固定液，盖上培养皿盖，在室温下固定，一般15分钟左右。(病毒、噬菌体也可不经固定)，

4. 提高悬滴标本的反差

提高反差的方法很多：常利用金属盐类给检查标本以电子学的处理，提高反差。其中有：正染法、负染法、投影法等。

正染法：即一般电子染色，利用金属盐类与标本中一些物质相结合的原理。

常用的染色液有下列几种：

醋酸铀(与核酸反应)

锇酸(与脂类反应)

铝染液(与蛋白质反应)

染色方法：

滴一滴染色液于白色反应瓷板凹面中，将经固定(或未经固定的病毒、噬菌体……)的上述悬滴标本放在液面上，膜面朝下，染色数小时，然后，取出铜网，用蒸馏水洗去多余的染色剂，用滤纸吸去多余水分，干后即可镜检。

负染法：负染法是利用一些不与标本相结合的重金属盐类，将标本包围，散射电子增加而提高反差，在电镜下所见是黑色背景包围明亮的标本。常用于细菌、病毒、噬菌体等微生物标本的整体研究。

常用染液：

磷钨酸染液：磷钨酸(PTA) 4克 蒸馏水 加至 100毫升

用1N NaOH或1N KOH调节pH至7.2过滤备用。

醋酸铀染液：饱和醋酸铀水溶液或2%醋酸铀水溶液。

染色方法：

同正染色法，但从染液上取下铜网后不用水洗，而是用滤纸吸去多余的染液(不要吸得太干)在室温下凉干后镜检，细菌、病毒、噬菌体染30秒—60秒，即可上电镜观察。

投影法：在真空中，以一定方向向标本表面喷涂一层金属膜(薄膜)，使标本反差增加，这种方法称投影法。

在高真空中，将金属加热到适当温度，使金属受热蒸发，金属原子以直线方向喷射，将需投影的标本放在离蒸发金属一定距离的地方，蒸发的金属原子遇到表面温度较低的标本就会凝固成薄膜，在与金属喷射方向垂直的标本表面，形成金属层最厚，在标本背离喷射的地方，就形成“影子”，正象人在太阳光下有影子一样。这样经过投影，标本不同区域，金属密度不同，所以散射电子能力也不同而形成反差。

经投影的标本，在电镜下可见标本颗粒是黑暗的而其影子是明亮的，与人在太阳光下的影子相反。利用投影法不仅可以看到标本外形结构，而且可以计算标本高度。

上述电镜标本的制备方法，在微生物学的研究中以负染法最为常用。

问 题

1. 光学显微镜的接物镜、油镜的选择、使用要点是什么？

2. 能否仅根据细菌的形态鉴别菌类？

(吴万吉)

实验二 细菌动力检查法

内 容

一、悬滴法(示教)

二、压滴法

三、暗视野显微镜法(示教)

四、半固体琼脂培养法(示教)

有鞭毛的细菌,具有运动的能力,一般认为鞭毛是细菌的运动器官;能定向地由一个部位泳动到另一个部位。无鞭毛的细菌不具有真正运动的能力,而受到所处环境中液体分子的冲击呈左右前后,位置变更不大的颤动(纯属分子运动)。细菌的运动力是细菌特征之一,许多杆菌和螺菌或弧菌具有鞭毛,有动力;一般球菌和部分杆菌无鞭毛,没有动力,细菌的动力有助鉴别菌种。

检查细菌有无动力的方法很多,有悬滴法、压滴法、暗视野显微镜法、半固体琼脂培养基培养法等,其中以半固体琼脂培养基培养法及压滴法较为最常用。

一、悬滴法(示教)

材料

1. 菌种:变形杆菌、葡萄球菌的幼龄(8—12小时)肉汤培养物。
2. 凹玻片、凡士林。

方法

1. 取凹玻片一张,在凹窝周围涂抹凡士林少许。
2. 取一接种环的变形杆菌或葡萄球菌的幼龄培养物,放于盖玻片中央。
3. 将凹玻片反转,使凹窝对准盖玻片中心,复予其上,粘住盖玻片后再反转。以接种环柄轻压盖玻片,使与凹窝边缘粘紧(图5)。

4. 先以低倍镜找到悬滴的边缘后,再换用高倍镜观察(因凹玻片较厚、油镜焦距很短,故一般不能用油镜来检查)。

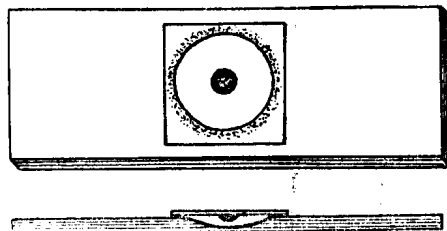


图5 悬滴法
上:正面 下:侧面

二、压滴法

材料

1. 菌种:变形杆菌、葡萄球菌的幼龄(8—12小时)肉汤培养。
2. 盖玻片、载玻片、镊子。

方法

1. 以接种环取变形杆菌或葡萄球菌菌液2—3环,放于载玻片中央。

2. 用镊子挟住盖玻片，复盖于菌液上。放置时，先使盖玻片一边接触菌液，以不发生气泡为佳。

3. 先以低倍镜找妥位置，再以高倍镜或油镜观察。

三、暗视野显微镜法(示教)

暗视野显微镜检查法，是在普通光学显微镜上安装一个特制的集光器——暗视野集光器，其中央为不透光的黑板所遮，光线不能直接通向镜筒，仅可从其边缘射到载玻片的标本上。因光线不能直接上升，所以视野背景是暗的。从集光器斜射到细菌等微粒上的光线，由于散射作用而发出亮光，反射到接物镜内，故在强光照下，可以在黑色的视野中看到发亮的菌体。犹如黝黑的夜间星空，闪烁着点点星光；又象在暗室内，能看见从隙缝漏入的阳光内，有千万颗尘埃微粒跳跃飞舞一样。

暗视野集光器有两种类型：抛物面型(见图6)和心型(见图7)。在微生物学大多使用抛物面型。

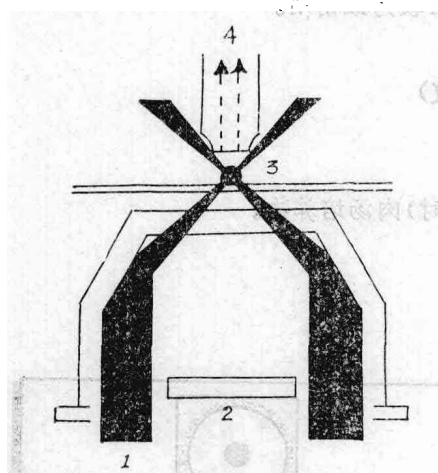


图6 抛物面型暗视野集光器

1. 光源 2. 遮光板
3. 标本 4. 射入镜筒的光线

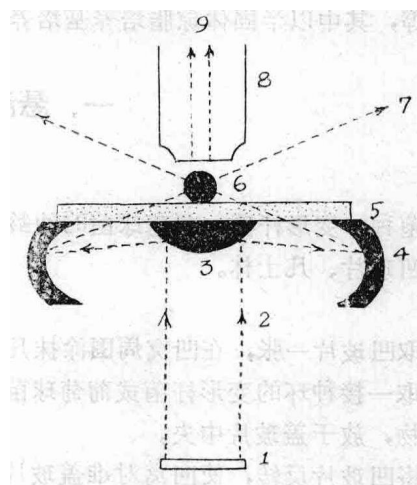


图7 心型暗视野集光器

1. 光源 2. 光束 3. 圆形反光镜
4. 反射光线(经此再反射到标本)
5. 载物玻片 6. 标本 7. 散射光线
8. 接物镜 9. 射入镜筒的光线

暗视野检查中，由于不让光源的光线直接进入物镜，因此，物镜的N.A.(孔径数)一般不应大于0.9；若用N.A.比0.9大的物镜，就必须在物镜中加装一个虹彩光阑，以减少N.A.，有的特制油镜头内附有可以缩放的光阑，使用更为方便。

暗视野显微镜的分辨率比普通光学显微镜要大，可以查见相当于可见光波长1%大小的微粒，在暗视野显微镜中可看出其形态和大小。

在微生物学中，暗视野检查法主要用于未染色的活体细菌，螺旋体等的形态和动力的观察，尤其是活螺旋体，在普通光学显微镜明视野检查时极难观察清楚。

材料

1. 菌种：变形杆菌、葡萄球菌幼龄(8-12小时)肉汤培养物。

2. 盖玻片(0.16 毫米以下)、薄载玻片(1.5 毫米以下)、暗视野集光器、虹彩光阑或特制油镜头、强光灯。

方法

1. 取下普通光学显微镜上原有的明视野集光器, 换装暗视野集光器, 并使其顶面与载物台相平。

2. 卸下油镜头, 添加一虹彩光阑或换以附有缩放光阑的特制油镜头。

3. 取 2—3 环菌液, 放于薄载玻片上, 加上盖玻片。

4. 在暗视野集光器上加香柏油一滴, 然后将次台略向下移。

5. 置标本片于载物台上, 上升集光器, 使其表面的镜油与载玻片相接触, 勿使发生气泡。

6. 转动反光镜, 使光线集中于暗视野集光器上, 用低倍镜观察。当视野中有一圆形光环出现时, 转动集光器上的调节器, 将光环移置于视野中心。

7. 另加香柏油一滴于盖玻片上, 以油镜检查。

四、半固体琼脂培养法(示教)

具有鞭毛的细菌, 能够运动, 在半固体琼脂培养基中自原接种部位向四周扩散生长, 使半固体琼脂培养基呈现混浊状态; 无鞭毛的细菌, 不具有运动的能力, 仅在接种部位生长繁殖, 半固体琼脂培养基不出现混浊。

材料

1. 菌种: 变形杆菌、葡萄球菌的幼龄(8—12 小时)肉汤培养物。

2. 培养基: 半固体琼脂培养基。

方法

1. 用接种针取菌液后, 以穿刺法接种到半固体琼脂培养基的中央(切勿刺到底)。

2. 放于 37℃ 孵育箱, 孵育 24 小时, 分别观察两菌在半固体琼脂培养基内的细菌生长繁殖的情况, 以判断有无动力。

附 录

1. 接种针、接种环(图8):

接种针(或称白金针)系用白金丝或电炉丝制成, 长 3—4 厘米。接种环(或称白金耳)系接种针的针端弯成直径约为 3—4 毫米小圆环而成。接种针或接种环均安装固定在下段带有铝质或铜质接种棒上。

接种针与接种环是微生物学中用以采取、接种、分离细菌的必备工具。在使用前后均应在火焰上烧红灭菌, 用毕插放架上, 不可随意乱放, 以免灼焦桌面或其它物件。

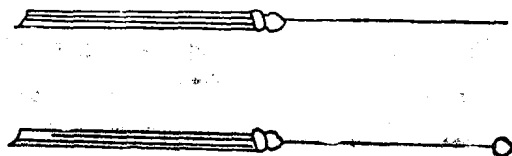


图 8 接种针(上)和接种环(下)