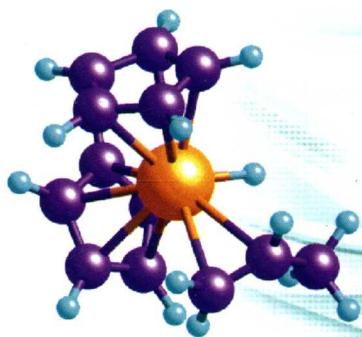




普通高等教育创新型人才培养规划教材



微生物学实验技术

WEISHENGWUXUE SHIYAN JISHU

主 编 石若夫
副主编 徐 阳 李大力 杨成丽



北京航空航天大学出版社
BEIHANG UNIVERSITY PRESS



普通高等教育创新型人才培养规划教材

微生物学实验技术

主 编 石 若 夫

副主编 徐 阳 李大力 杨成丽

北京航空航天大学出版社

内 容 简 介

本书涵盖了微生物学研究的各个层面,从基本技术到前沿应用,共有 100 多个实验,包括微生物的观察、分离、培养、生长、控制、代谢、免疫、检测、分类、鉴定和保藏等基本技术,以及微生物在食品、工业、农业、医学和环境中的主要应用技术。实验分别从目的、原理、材料、方法和统计等方面进行了介绍,并结合作者多年实验教学的积累,提出了实验的注意事项。

本书可供生命科学、生物工程、食品科学、环境科学、医学检验等专业的本科生和研究生学习使用,也可供科研工作者使用。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验技术 / 石若夫主编. -- 北京 : 北京
航空航天大学出版社, 2017. 8

ISBN 978 - 7 - 5124 - 2458 - 6

I. ①微… II. ①石… III. ①微生物学—实验—高等
学校—教材 IV. ①Q93 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 157219 号

版权所有,侵权必究。

微生物学实验技术

主 编 石若夫

副主编 徐 阳 李大力 杨成丽

责任编辑 杨 昕

*

北京航空航天大学出版社出版发行

北京市海淀区学院路 37 号(邮编 100191) <http://www.buaapress.com.cn>

发行部电话:(010)82317024 传真:(010)82328026

读者信箱: goodtextbook@126.com 邮购电话:(010)82316936

北京泽宇印刷有限公司印装 各地书店经销

*

开本:710×1 000 1/16 印张:18 字数:384 千字

2017 年 8 月第 1 版 2017 年 8 月第 1 次印刷 印数:1 000 册

ISBN 978 - 7 - 5124 - 2458 - 6 定价:45.00 元

若本书有倒页、脱页、缺页等印装质量问题,请与本社发行部联系调换。联系电话:(010)82317024

前 言

随着微生物学的发展,其理论和实践手段已经渗透到众多相关领域。全国高等院校都特别重视学生实践能力的培养,在此背景下,为了更好地帮助在校大学生、研究生以及从事相关领域研究的科研人员学习和掌握微生物学的实验技能,我们编写了这本实验教材,以适应生命科学、生物技术、生物工程、食品科学、环境科学、医学检验和农业微生物学等专业的教学需要。

本书内容取材于一些微生物学的经典实验,也加进了一些新的实验方法,第一章至第十章主要介绍了微生物学的基本技术,内容涉及微生物的观察、分离、培养、生长、控制、代谢、免疫、检测、分类、鉴定和保藏等;第十一章至第十五章主要介绍了微生物在食品、医学、农业、工业和环境中的主要应用技术,内容涉及食品微生物的检测,医学微生物的检测,食用菌的栽培,工业微生物的发酵、育种、基因改造和一些化合物的降解及毒性试验。附录主要介绍了常用微生物分离、鉴定用的试剂和培养基配方,以方便读者查阅和使用。全书共介绍了100多个实验,任课教师可以根据教学大纲和实验条件进行选择,不做实验也可以作为学习的参考。

本书共十五章,第一章至第九章由石若夫老师编写,第十章和第十一章由李大力老师编写,第十二章至第十五章由杨成丽老师编写。罗怀志、刘鑫、李桂瑶、阮玲玉和杨云霞负责文稿的录入,徐阳和刘鑫负责内容的审阅。

本书在编写过程中参考了大量的著作和文献资料,在此向有关作者及编者表示真诚的谢意。由于编者水平有限,书中错误之处在所难免,恳请广大读者批评指正。

编 者

2017年5月

目 录

第一章 微生物的观察.....	1
实验一 普通光学显微镜的使用.....	1
实验二 细菌的革兰氏染色法.....	4
实验三 细菌的细胞壁染色.....	6
实验四 细菌特殊结构的染色及细菌运动性观察.....	7
实验五 细菌培养特征的观察	10
实验六 螺旋体形态的观察	12
实验七 肺炎支原体形态及菌落的观察	15
实验八 沙眼衣原体包涵体形态的观察	16
实验九 立克次氏体的形态与染色	17
实验十 放线菌形态的观察	18
实验十一 酵母菌形态的观察及酵母菌死活细胞的鉴别	20
实验十二 霉菌形态及特殊结构的观察	22
实验十三 噬菌体培养与噬菌斑的观察	24
第二章 微生物的分离	26
实验一 土壤中淀粉酶产生菌的分离	26
实验二 死虫中苏云金芽孢杆菌的分离	27
实验三 担子菌的弹射分离	28
实验四 流感病毒的分离与鉴定	30
第三章 微生物培养技术	33
实验一 常用微生物接种法	33
实验二 苏云金芽孢杆菌的固体培养技术	34
实验三 苏云金芽孢杆菌的液体培养技术	37
实验四 丙酮丁醇梭状芽孢杆菌的厌氧培养	38
实验五 选择法获得酵母细胞的同步培养技术	40
实验六 乳酸杆菌与酵母菌的透析培养	42
实验七 酿酒酵母酒精发酵的原位分离培养技术	44
实验八 植酸酶固体发酵技术	46
实验九 乳酸乳球菌的膜过滤培养——高密度培养	47
实验十 病毒培养——动物接种技术	49



第四章 微生物的生长	52
实验一 细菌大小的测定	52
实验二 微生物的显微计数法	54
实验三 微生物的平板菌落计数法	56
实验四 微生物光电比浊计数法	58
实验五 光电比浊法测定大肠杆菌生长曲线	60
实验六 核酸检测法绘制生长曲线	61
第五章 微生物的控制	63
实验一 温度对微生物的影响	63
实验二 酸碱度对微生物的影响	63
实验三 化学药剂对微生物的影响	65
实验四 湿热灭菌法	65
实验五 干热灭菌法	67
实验六 控制微生物的化学方法	68
第六章 微生物的代谢、生理生化反应	70
实验一 糖类发酵试验	70
实验二 乙醇发酵试验	71
实验三 乳酸发酵试验	71
实验四 淀粉水解试验	73
实验五 石蕊牛奶试验	74
实验六 明胶水解试验	75
实验七 油脂水解试验	77
实验八 V-P 试验、甲基红试验、吲哚试验、硫化氢试验、三糖铁琼脂试验 ..	77
第七章 微生物的免疫	80
实验一 抗原的制备	80
实验二 免疫血清的制备及效价的测定	81
实验三 免疫血清(浆)的效价测定——溶血法	83
实验四 抗体纯化技术	84
第八章 微生物检测	87
实验一 细菌血清学鉴定基本技术	87
实验二 细菌的药物敏感试验	88
实验三 酵母菌 DNA 的提取及检测	92
实验四 丝状真菌总 RNA 的提取及检测	94
实验五 真菌的生化及血清鉴定技术	97



实验六	梅毒螺旋体的检测	101
实验七	病毒的血凝抑制试验	103
实验八	实时荧光定量 PCR 法检测病毒的核酸	105
实验九	酶联免疫技术(ELISA)检测 IL-2	107
实验十	乙型肝炎患者的血清学检测——乙肝两对半	108
第九章	微生物的分类	111
实验一	原核微生物 16S rRNA 基因的分离及序列分析	111
实验二	真核微生物 18S rRNA 基因的分离及序列分析	114
实验三	细菌 DNA 同源性测定	115
实验四	DNA 限制性片段长度多态性分析	118
实验五	细胞壁成分分析在分类中的应用	120
实验六	利用微生物快速测定仪对微生物进行分类	121
第十章	微生物的保藏	124
实验一	液体石蜡法	124
实验二	沙管保藏法	125
实验三	冷冻干燥保藏法	126
实验四	液氮冷冻法	128
第十一章	食品微生物应用技术	130
实验一	食品安全国家标准、食品微生物学检验、菌落总数的测定	130
实验二	食品安全国家标准、食品微生物学检验、大肠菌群计数	133
实验三	食品安全国家标准、食品微生物学检验、霉菌和酵母菌计数	138
实验四	食品安全国家标准、食品微生物学检验、致病菌检验	140
I	沙门菌检验	140
II	志贺菌检验	151
III	金黄色葡萄球菌检验	155
IV	蜡样芽孢杆菌检验	161
V	溶血性链球菌	164
实验五	酸奶制作	166
实验六	啤酒酿制	167
实验七	食醋酿制	169
第十二章	医学微生物应用技术	173
实验一	血液及骨髓标本的细菌学检验	173
实验二	肠道标本的细菌学检验	175
实验三	呼吸道标本的细菌学检验	178



第十三章	农业微生物应用技术	182
实验一	食用菌原种及栽培种的制作	182
实验二	香菇栽培技术	183
实验三	黑木耳栽培技术	188
实验四	灵芝栽培技术	190
实验五	豆科植物根瘤的固氮酶活性测定	193
实验六	生物有机肥的制备	195
实验七	微生物对纤维素的降解	196
实验八	苏云金芽孢杆菌杀虫剂的生物测定	198
第十四章	微生物的工业技术	202
实验一	短杆菌的谷氨酸发酵实验	202
实验二	枯草芽孢杆菌的 α -淀粉酶发酵实验	204
实验三	应用物理因素诱变选育抗药性的淀粉酶高产菌株	206
实验四	应用化学因素诱变选育腺嘌呤营养缺陷型菌株	209
实验五	酵母菌原生质体的融合育种	211
实验六	葡聚糖内切酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达	213
实验七	纳豆激酶基因的克隆及在酵母菌中的表达	218
第十五章	环境微生物应用技术	224
实验一	酚降解菌的分离筛选、降解能力的定量测定及菌种鉴定	224
实验二	木质素降解菌的分离纯化及木质素酶活性测定	228
实验三	木质纤维素废弃物制备燃料乙醇	231
实验四	石油污染土壤的微生物修复	232
实验五	微生物絮凝剂产生菌的筛选及絮凝剂成分分析	234
实验六	微藻生物的柴油制备	239
实验七	彗星法测定化学物质对细胞的 DNA 毒性	240
附 录		244
附录 A	染色液的配置	244
附录 B	常用培养基	247
附录 C	一般培养基和专用培养基	257
附录 D	生理生化试验培养基及试剂	267
参考文献		279

第一章 微生物的观察

实验一 普通光学显微镜的使用

一、实验目的

学习普通光学显微镜的构造、维护及保养方法；掌握普通光学显微镜的正确使用方法。

二、实验原理

(一) 显微镜的基本构造(见图 1.1)

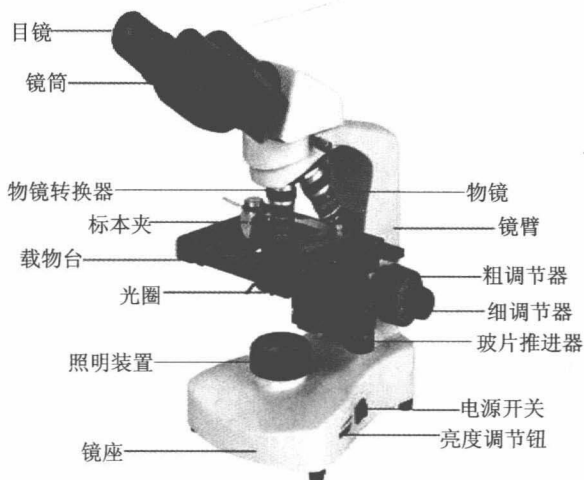


图 1.1 光学显微镜构造示意图

普通光学显微镜是利用目镜和物镜两组透镜系统来放大物像的，其构造主要由机械部分和光学部分组成。

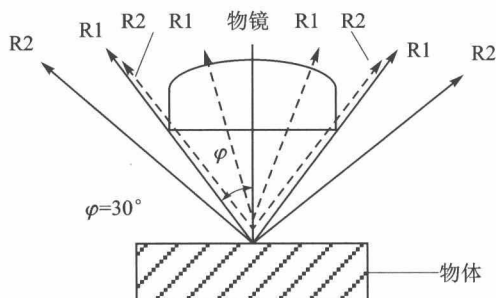
1. 光学部分：目镜、物镜、聚光镜、虹彩光圈、滤光片、电光源以及光强调节钮等。
2. 机械部分：镜座、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台、物镜转移器、调焦装置（粗调节器和细调节器）等。

(二) 油镜的工作原理

1. 增加照明强度。油镜，就是放大 100 倍的物镜，由于镜筒比较长，影响视野进



光,所以在使用时需在镜头和载玻片之间使用香柏油。当光线通过载玻片后,可以直接通过香柏油进入物镜,几乎不发生折射(见图 1.2),增加了视野的进光量,从而使物像更加清晰。



注:实线表示介质为空气($n=1.0$)的光线通路;虚线表示介质为香柏油($n=1.52$)的光线通路。

图 1.2 干燥系物镜与油浸系物镜光线通路对比图

2. 增加显微镜的分辨率。显微镜的放大倍数=物镜放大倍数 $\times$ 目镜放大倍数;显微镜的分辨率(D)为显微镜辨析两点之间距离的能力,可用公式表示为

$$D = \frac{\lambda}{2n \sin \mu}$$

式中: λ 为可见光的波长($0.4 \sim 0.77 \mu\text{m}$, 平均 $0.555 \mu\text{m}$); n 为物镜和被检标本间介质的折射率; α 为镜口角(即光线入射角,最大为 120°); μ 为镜口角的半数(见图 1.3), $NA = n \sin \mu$ 为物镜的数值孔径。

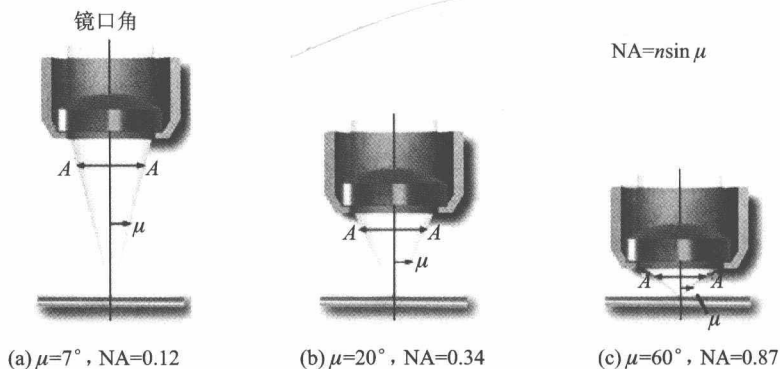


图 1.3 不同放大倍数物镜的光线入射角

由于香柏油的折射率(1.52)比空气和水的折射率(分别为 1.0 和 1.33)高,因此以香柏油作为镜头和载玻片之间介质的油镜所能达到的数值孔径值要高于干燥系物镜。若以可见光的平均波长 $0.55 \mu\text{m}$ 来计算,则数值孔径通常在 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,而油镜的分辨率可达到 $0.2 \mu\text{m}$ 。



显微镜的使用原则是：物镜的使用——先低倍，后高倍，再油镜。调焦的规律——由上而下。勿使物镜头碰触载玻片，以免损坏物镜（比较高级的显微镜，其所配物镜具有可伸缩头，能大大降低物镜损坏率）。使用油镜观察染色标本时，可将光圈调大，聚光器上升到最高，使光线调至最强。

三、实验材料

1. 菌种：大肠杆菌(*Escherichia coli*)，枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)，金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)，变形杆菌(*Proteus bacillus vulgaris*)，乳杆菌(*Lactobacillus*)，蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)等细菌染色片。

2. 试剂：香柏油，乙醇：乙醚($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{乙醚}}=7:3$)混合液。

3. 器材：普通光学显微镜，擦镜纸。

四、实验方法

(一) 观察前的准备

1. 显微镜的安置。拿显微镜时，应一手握镜臂，一手托镜座，置于平整的实验台上，镜座距实验台边缘 3~4 cm，使用前应先熟悉显微镜的结构和性能，检查各部分零件是否齐全，镜身有无尘土，镜头是否洁净。

2. 调节光源。打开电源，然后调节照明亮度。开闭光圈，调节光线强弱，直至视野内得到适宜的亮度为止。

3. 调节双筒显微镜的目镜。新的显微镜都采用人性化设计，目镜间距可以根据使用者的瞳间距进行适当调节。

4. 聚光器数值孔径值的调节。调节聚光器虹彩光圈值与物镜的数值孔径值相符或略低。工程师安装显微镜时，会对其进行调整和设定，无需自己调节。

(二) 显微观察

1. 低倍镜观察。将标本载玻片置于载物台上，推至合适位置，用标本夹夹住，移动载玻片推进器使观察对象处在物镜的正下方，将物镜转到光路上，先从侧面观察，用粗调螺旋将载物台升至最高，再用目镜观察，缓慢下降直至出现图像后再用细调螺旋调节图像至清晰。通过标本夹推进器慢慢移动载玻片，找到合适的目的物，仔细观察。

2. 高倍镜观察。在低倍镜下找到合适的观察目标并将其移至视野中心后，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进行适当调节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。

3. 油镜观察。将高倍镜下找到的观察目标移至视野中心，把高倍镜转离工作位置，在待观察的样品区域滴上一滴香柏油，将油镜转到工作位置，油镜镜头此时应正好浸泡在香柏油中。将聚光器升至最高位置并把光圈调到足够大，以保证其达到最



大效能。调节照明使视野的亮度合适,微调细调节器使物像清晰,利用推进器移动标本仔细观察。

(三) 显微观察后的处理

1. 降低载物台,取下载玻片。
2. 用擦镜纸擦去镜头上的香柏油,然后用擦镜纸蘸少许乙醇:乙醚($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{乙醚}}=7:3$)的混合溶液,擦去镜头上残留的香柏油,再用干净的擦镜纸擦去残留的清洗液。
3. 用擦镜纸清洁其他物镜和目镜,用绸布清洁显微镜的金属部件。
4. 将最低放大倍数的物镜转到工作位置,同时将载物台降低到最低位置,光源灯亮度调至最低后关闭电源。

(四) 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. 目镜和物镜头只能用擦镜纸擦拭,不能用手指或粗布去擦,以保证光洁度。
3. 搬动显微镜时,一手拿镜臂,一手托镜座,不可单手拿,更不可倾斜拿。
4. 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。

实验二 细菌的革兰氏染色法

一、实验目的

学习无菌操作和微生物涂片制备技术;掌握细菌的革兰氏染色的原理及操作步骤。

二、实验原理

细菌个体微小,在显微镜下比较透明,需借助染色剂使菌体着色才能观察其形态结构。用于生物样本的染料分为碱性染料、酸性染料和中性染料三大类。碱性染料的离子带正电荷,可与带负电荷的物质结合。当细菌生长于中性、碱性或弱酸性的溶液中时常带负电荷,所以通常使用碱性染料(如美蓝、结晶紫、碱性复红、番红或孔雀绿等)使其着色。酸性染料的离子带负电荷,可与带正电荷的物质结合。当细菌分解糖类产酸使培养基 pH 值下降时,细菌所带正电荷增加,因此易被伊红、酸性复红或刚果红等酸性染料着色。中性染料是前两者的结合物又称复合染料,如伊红美蓝、伊红天青等。

革兰氏染色法是细菌学中广泛使用的一种鉴别性染色方法,可将所有的细菌区分为革兰氏阳性菌(G^+)和革兰氏阴性菌(G^-)两大类。其机理是细菌细胞壁的化学组成、结构和通透性不同。主要染色过程是:细菌经结晶紫着染后,用媒染剂碘液处理,再用酒精脱色,最后用番红复染,置显微镜下观察。若菌体呈紫色,则称革兰氏阳



性菌;若菌体呈红色,则称革兰氏阴性菌。革兰氏阴性菌细胞壁中含有较多的类脂质,而肽聚糖的含量较少。当用乙醇或丙酮进行脱色时,类脂质被溶解,增加了细胞壁的通透性,使初染的结晶紫和碘的复合物易于渗出,颜色被脱掉,经复染后,就只留下复染剂番红的颜色了。而革兰氏阳性菌细胞壁中肽聚糖的含量多且交联度大,类脂质含量少,经乙醇或丙酮脱色后,肽聚糖的孔径变小,通透性变低,结晶紫和碘复合物仍留在肽聚糖网格里,复染的番红没有停留的空间,因此呈现初染剂结晶紫的颜色。

三、实验材料

1. 菌种:大肠杆菌(*Escherichia coli*),枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。
2. 试剂:草酸铵结晶紫染液,路氏碘液,95%乙醇,番红染液等。
3. 器材:显微镜,酒精灯,载玻片,接种环,擦镜纸,试管架,镊子,滤纸,滴管,无菌生理盐水,废液缸等。

四、实验方法

1. 涂片。取一干净的载玻片,滴一小滴生理盐水或蒸馏水于载玻片中央,用接种环以无菌操作法从培养 12~24 h 的被试菌体斜面取少量培养物,在载玻片上与水平混合后,用接种环涂成均匀的薄层。若是液体培养物,则可直接蘸取菌液作涂片。

2. 固定。自然晾干或加热干燥(标本面朝上,做如钟摆的动作,快速通过酒精灯外焰 2~3 次),此操作过程称为固定,其目的是使细胞质凝固,牢固附着在载玻片上,以固定细胞形态。

3. 染色。

(1) 初染。待载玻片冷却后加草酸铵结晶紫一滴,完全覆盖住菌膜,染色 1 min 后倾去染液,水洗。

(2) 媒染。加路氏碘液媒染 1 min,水洗。

(3) 脱色。手持载玻片一端,斜置,用 95% 的酒精,滴加于涂片的上部,直到流下的酒精不显紫色时(10~15 s),立即水洗。

(4) 复染。用番红染液染色 2 min,水洗,干燥。

4. 镜检。用低倍镜观察,待找到物像部位后,转换成油镜观察,革兰氏阳性菌呈紫色,革兰氏阴性菌呈红色。

5. 注意事项如下:

涂片上的菌液不能太浓,需涂抹均匀,否则影响脱色的均匀度及观察效果。酒精脱色时间的长短,可以直接影响实验结果,脱色时间过长,阳性菌误染成阴性菌;反之,阴性菌误染成阳性菌。因此必须严格掌握酒精脱色程度的准确性。此外样品中



的细菌有时因为不纯,在视野内可能同时看到阳性和阴性,更有甚者,即使是纯培养的细菌样品也会有个别细胞因为菌龄等因素而呈现出与众不同的细胞壁性质。

实验三 细菌的细胞壁染色

一、实验目的

掌握细菌的细胞壁染色法;学会在显微镜下观察和分辨细菌的细胞壁形态。

二、实验原理

革兰氏阳性细菌的细胞壁厚为 20~80 nm,革兰氏阴性细菌的细胞壁厚为 10~15 nm,其化学成分主要为肽聚糖,它与染料结合的能力差,不易着色。在细菌的染色过程中,染料一般情况都是通过细胞壁的渗透、扩散等作用而进入细胞,而细胞壁本身并未染色。因此,欲通过染色来观察细胞壁,必须使用专门的细胞壁媒染剂,常用的有磷钼酸和丹宁酸,它们使细胞壁形成可着色的复合物,而使细胞质不易被着色,再经结晶紫或甲基绿染色后,便可在普通光学显微镜下进行细胞壁观察。

三、实验材料

1. 菌种: 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 巨大芽孢杆菌(*Bacillus megatherium*)。
2. 试剂: 1%磷钼酸水溶液, 5%丹宁酸水溶液, 1%甲基绿水溶液, 0.2%结晶紫水溶液, 香柏油。
3. 器材: 显微镜, 擦镜纸, 载玻片, 废液缸, 滴管, 接种环等。

四、实验方法

(一) 磷钼酸法

1. 制片。取一片干净的载玻片,于中央滴加少许蒸馏水,在超净工作台内用接种环取培养 16~18 h 的枯草芽孢杆菌或巨大芽孢杆菌菌体少许放入蒸馏水中,混匀并制成均匀的涂片。
2. 磷钼酸染色。在涂片未干时,滴入 1%磷钼酸水溶液于涂片之上,完全覆盖,染色 3~5 min,蒸馏水水洗。
3. 甲基绿染色。取 1%甲基绿水溶液适量,滴于染色后涂片上,完全覆盖,染色 3~5 min 后,蒸馏水水洗。
4. 镜检。将干燥后的载玻片置于显微镜载物台上,用油镜观察,细胞壁呈绿色,细胞质呈无色。



(二) 丹宁酸法

1. 制片。取一片干净的载玻片,于中央滴加少许蒸馏水,在超净工作台内用接种环取培养 16~18 h 的枯草芽孢杆菌或巨大芽孢杆菌菌体少许放入蒸馏水中,混匀并涂成薄层,晾干。

2. 丹宁酸染色。取 5% 丹宁酸水溶液适量,滴于涂片上,完全覆盖,染色 5 min,蒸馏水水洗。

3. 结晶紫染色。取 0.2% 结晶紫水溶液适量,滴于染色后涂片上,完全覆盖,染色 3~5 min,蒸馏水水洗。

4. 镜检。将干燥后的载玻片置于显微镜载物台上,用油镜观察,细胞壁呈紫色,细胞质呈淡紫色。

实验四 细菌特殊结构的染色及细菌运动性观察

一、实验目的

掌握细菌特殊结构(荚膜、芽孢、伴孢晶体和鞭毛)的染色原理、染色方法,并观察其形态特征;学习用悬滴法和水浸片法观察细菌运动性的方法。

二、实验原理

1. 荚膜染色。由于荚膜是某些细菌细胞壁外存在的一层胶状黏液性物质,与染料间的亲和力弱,不易着色,因此通常采用负染色法染色,即设法使菌体和背景着色而荚膜不着色,从而使荚膜在菌体周围呈一透明圈。由于荚膜的含水量在 90% 以上,故染色时一般不加热固定,以免荚膜皱缩变形。

2. 芽孢染色。利用细菌的芽孢和菌体对染料的亲和力不同的原理,用不同染料进行着色,使芽孢和菌体呈现不同的颜色而加以区别。芽孢壁厚、透性低,着色、脱色均较困难,因此,先用弱碱性染料,如孔雀绿或碱性品红在加热条件下进行染色。此染料不仅可以进入菌体,而且也可以进入芽孢,进入菌体的染料可经水洗脱色,而进入芽孢的染料则难以透出。若再用复染液(如番红液)或衬托溶液(如黑色素溶液)处理,则很容易区分菌体和芽孢。

3. 伴孢晶体染色。伴孢晶体是少数芽孢杆菌类如苏云金芽孢杆菌在形成芽孢时,芽孢旁形成的一个菱形或双锥形的碱溶性蛋白质晶体,可被苯胺染料深着色。当芽孢成熟被释放时,它也同时被释放。伴孢晶体具有很强的毒性,对 200 多种昆虫尤其是鳞翅目的幼虫有毒杀作用,这也是苏云金芽孢杆菌类杀虫作用的主要原因,因而可将这类产伴孢晶体的细菌制成有利于环境保护的生物农药,即细菌杀虫剂。

4. 鞭毛染色。鞭毛极细,直径一般为 10~20 nm,只有用电子显微镜才能观察到。但是,如采用特殊的染色法,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处理,让它沉积在鞭毛上,使鞭毛直径加粗,然后再进行染色。常用的媒染剂由丹宁酸、氯化铁、钾明矾等配制而成。

5. 细菌运动性观察。有鞭毛的细菌都具有运动性。如果仅需了解某细菌是否具有鞭毛,则可采用悬滴法或水浸片法直接在光学显微镜下检查活细菌是否具有运动能力,以此能够快速、简便地来判断细菌是否有鞭毛。悬滴法就是将菌液滴加在洁净的盖玻片中央,在其周边涂上凡士林,然后将它倒盖在有凹槽的载玻片中央,即可放置在普通光学显微镜下观察。水浸片法是将菌液滴在普通的载玻片上,然后盖上盖玻片,置显微镜下观察。大多数球菌不生鞭毛,杆菌中有鞭毛或无鞭毛,弧菌和螺菌几乎都有鞭毛。有鞭毛的细菌在幼龄时具有较强的运动力,衰老的细胞鞭毛易脱落,故观察时宜选用幼龄菌体。

三、实验材料

1. 菌种: 巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*), 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*), 苏云金芽孢杆菌武汉变种(140)(*Bacillus thuringiensis* var. *wuhanensis* (140)) 或苏云金芽孢杆菌天门变种(*Bacillus thuringiensis* var. *tianmensis* (7216))。

2. 试剂。

(1) 荚膜染色液: 黑墨汁, 结晶紫。

(2) 芽孢染色液: 7.6%孔雀绿饱和水溶液, 齐氏石炭酸复红染液(1:10 稀释)。

(3) 伴孢晶体染色液: 溴酚蓝(MBB)染色液和番红染色液。

(4) 鞭毛染色液: 硝酸银染色液(A、B液)。

(5) 香柏油, 二甲苯, 无菌水或蒸馏水, 6%葡萄糖水溶液, 无水乙醇等。

3. 器材: 试管, 烧杯, 滴管, 载玻片, 盖玻片, 擦镜纸, 接种环, 凹载玻片, 酒精灯, 电炉, 显微镜等。

四、实验方法

(一) 荚膜染色法——负染色法

1. 制片。滴一滴6%葡萄糖水溶液于载玻片一端, 挑少量细菌与其充分混合, 再加一滴黑墨汁充分混匀。用推片法制片, 将菌液铺成薄层, 自然干燥。

2. 固定。加1~2滴无水乙醇覆盖涂片, 固定1 min, 自然干燥。

3. 染色。滴加结晶紫, 染色2 min, 水洗, 自然干燥。

4. 镜检。菌体呈紫色, 背景灰黑色, 荚膜不着色, 视野内为无色透明圈。

(二) 芽孢染色法——孔雀绿染色法

1. 制片、固定。取一干净载玻片按无菌操作取巨大芽孢杆菌菌体少许制成涂片, 风干, 固定。



2. 染色。在涂菌处滴加 7.6% 孔雀绿饱和水溶液, 间断加热染色 10 min, 用水冲洗。

3. 复染。用齐氏石炭酸复红染液染色 1 min, 水洗, 风干后镜检。

4. 镜检。芽孢被染成绿色, 营养体呈红色。观察细菌芽孢的形态。

(三) 伴孢晶体——溴酚蓝-番红染色法

1. 涂片。取干净载玻片一片, 于中央滴加少许蒸馏水, 在超净工作台内用接种环挑取“140”或“7216”菌体少许放入蒸馏水中混匀并涂成薄层, 自然干燥。

2. 初染。滴加溴酚蓝染色液 1 滴于涂面上, 待涂片出现灰白色结晶后, 再滴加溴酚蓝染色液, 如此反复持续 5~6 min 后, 用水轻轻冲洗, 即固定和染色同步完成。溴酚蓝染色液中含有乙醇及 HgCl_2 , 因此不能加热固定。

3. 复染。水洗后的涂片再滴加番红染色液 1 滴, 染色 30 s, 水洗, 干燥。

4. 镜检。在高倍镜或油镜下观察伴孢晶体的位置和形状。伴孢晶体呈深蓝色, 芽孢边缘红色而内部无色, 细菌细胞呈红色。(也可只用石炭酸复红液, 染色 1 min, 镜检, 伴孢晶体呈红色, 游离的芽孢外膜略显红色, 细胞质无色。)

(四) 鞭毛染色法——银盐染色法

1. 载玻片的清洗。选择光滑无划痕的载玻片, 将载玻片置洗液中煮沸 10~20 min, 取出用蒸馏水冲洗, 晾干, 或将水沥干后, 放入 95% 乙醇中脱水。取出载玻片, 在火焰上烧去酒精, 即可使用。

2. 菌液的制备及涂片。菌龄较老的细菌容易失落鞭毛, 所以在染色前应将待染枯草芽孢杆菌在新配制的营养琼脂培养基斜面上连续移接 3~5 代, 以增强细菌的运动性。最后一代菌种放在恒温箱中培养 12~16 h。然后, 用接种环挑取斜面与冷凝水交接处的菌液数环, 移至盛有 1~2 mL 无菌水的试管中, 使菌液呈轻度浑浊。将该试管放在 37 °C 恒温箱中静置 10 min (放置时间不宜过长, 否则鞭毛会脱落)。然后, 吸取少量菌液滴在载玻片的一端, 立即将载玻片倾斜, 使菌液缓慢地流向另一端, 可让幼龄菌的鞭毛松展开。用吸水纸吸去多余的菌液, 置空气中自然干燥。

3. 染色。滴加 A 液, 染 5~8 min, 用蒸馏水轻轻地冲洗 A 液。用 B 液冲去残水, 再加 B 液于载玻片上, 在微火上加热至冒蒸汽, 维持 0.5~1 min (加热时应随时补充蒸发掉的染料, 不可使载玻片出现干涸)。再用蒸馏水冲洗, 自然干燥。

4. 镜检。菌体呈深褐色, 鞭毛为褐色。观察鞭毛形态。

(五) 细菌运动性观察

1. 水浸片法。先在干净无痕迹的载玻片中央滴加少许无菌水, 然后用接种环取培养 15~18 h 的枯草杆菌于该无菌水中, 制成菌悬液, 切勿涂抹 (或直接从液体培养的新鲜菌种试管中, 用玻棒蘸取菌液于载玻片上)。加上盖玻片 (注意不要产生气泡)。用低倍镜确定部位后, 再改用高倍镜观察细菌的运动状况, 并注意区别真运动与布朗运动。观察时光线要调暗。