食品微生物学实验守则

为了使实验顺利进行，根据微生物学的特点，提出以下要求：

1. 进入实验室，应保持肃静，不可随便吃东西，禁止吸烟、用嘴湿润标签或铅笔等物。

2. 每次实验前认真预习实验指导及课堂讲授的内容，明确实验的目的、原理和方法步骤及操作中的注意事项。

3. 实验中严格遵守实验要求及操作规程，认真操作，培养从事科学研究工作的严谨态度。

4. 按时观察实验结果，以科学的态度认真填写实验报告，力求简明准确、字迹清楚、绘图真实。

5. 保持实验室的整洁，勿将用过的培养物、废纸、废液等随便乱扔，要放在指定地点。如有菌液污染桌面或地面时，应该用 75%酒精或 5%石炭酸或 3%来苏尔溶液覆盖 0.5h后才能擦去。如果不慎吸入菌液或划破皮肤应立即向教师报告，不得擅自处理。

6. 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%来苏尔溶液或 5%石炭酸溶液覆盖 0.5h后再行洗刷。如系芽孢杆菌或有孢子的霉菌，则应延长浸泡或覆盖时间。

7. 在使用仪器、设备及玻璃器皿时，要认真小心，轻拿轻放，如有损坏，须做好登记。

8. 实验完毕，应将仪器用具等放回原处，擦净桌面，收拾整齐，然后用肥皂洗手，离开实验室前注意关好门、窗、灯、火、水、煤气等。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

第一章
显微镜的使用

微生物的个体微小，必须借助显微镜才能看到。因此，学会使用显微镜对学习微生物学和从事微生物学的科研和生产都是十分重要的。

显微镜可分为普通光学显微镜、相差显微镜、暗视野显微镜、紫外光显微镜、偏光显微镜、荧光显微镜和电子显微镜等不同类型。

本章着重介绍普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜和荧光显微镜的结构原理和使用方法。

实验 1.1　普通光学显微镜的使用

一、目的

了解显微镜的结构及油浸镜的工作原理，学会正确地使用显微镜，并用油浸镜观察细菌形态。

二、材料

普通光学显微镜、香柏油、二甲苯、擦镜纸、金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌的染色涂片。

三、普通光学显微镜的构造

显微镜是一种高度放大的光学仪器，它的种类很多，根据实验目的不同，可分别选用普通光学显微镜、相差显微镜、暗视野显微镜、偏光显微镜、荧光显微镜及电子显微镜。在微生物一般形态的观察中，普通光学显微镜最为常用，它的主要构造包括机械和光学两部分。普通光学显微镜的构造如图 1-1 所示。

(一)机械部分

包括镜座、镜臂、载物台、镜筒、物镜转换器、粗调螺旋和细调螺旋、推进器、聚光器升降螺旋等部件。

1. 镜座　显微镜的基座，用以支撑整个显微镜。

2. 镜臂　携带或移动显微镜的把手，上连镜筒、下连镜座，用以支撑镜筒，与镜座连接处为一关节，可使镜身倾斜。

3. 镜筒　由金属制成的中空圆筒，上端放置目镜，下端连接转换器，形成目镜与物

镜间的暗室。

4. 物镜转换器　由两个金属圆盘叠合而成，上有 3～4 个安装物镜的螺旋口，可依物镜放大倍数高低，顺序安装 3～4 个物镜。根据需要，可转动转换器将其中的某一物镜和镜筒接通，与镜筒上方的接目镜配合，构成一个放大系统。转换器的两个金属圆盘中，上面那个圆盘的正后方装有一个弹簧舌片，下面那个圆盘侧面与每个物镜相应的位置各有一个小凹缝。转换物镜时，必须使弹簧舌片嵌入此凹缝中，才是达到了正确的位置。

5. 载物台　位于镜筒下方，呈方形，中间有孔可透过光线。台上装有推进器，用以固定或移动标本的位置，使镜检标本恰好位于视野中，有些显微镜无推进器而有一对弹簧夹为固定标本用。

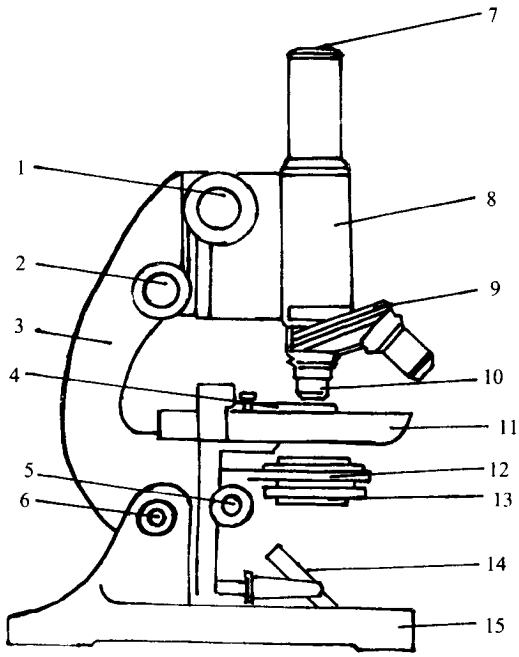


图 1-1　普通光学显微镜的构造

1. 粗调螺旋　2. 细调螺旋　3. 镜臂　4. 推进器　5. 聚光器升降螺旋　6. 倾斜关节　7. 接目镜　8. 镜筒　9. 物镜转换器　10. 接物镜　11. 载物台　12. 聚光器　13. 虹彩光圈　14. 反光镜　15. 镜座

6. 粗调螺旋和细调螺旋　位于镜筒的两旁，粗调螺旋位于细调螺旋的上方。它们可使镜筒升降，目的是使被观察物与物镜的距离恰好等于物镜的工作距离。要使镜筒作较大幅度升降，可用粗调螺旋，要使之作甚微的升降，则用细调螺旋。

细调螺旋每转一圈，镜筒升降 100μm，很多显微镜的细调螺旋上附有刻度，每转动一小格相当于升降 2μm，当细调螺旋旋转到极限时，则不应继续用力旋转，而应重新调节粗调螺旋，使物镜与标本距离稍微拉开一些，然后反拧细调螺旋便可将物镜调至最适高度。

7. 聚光器升降螺旋　装在载物台下面的一个可使聚光器升降的部件，用它可以调节反光镜反射出来的光线。

(二)光学部分

光学部分又可分为照明和放大两个系统，前者包括反光镜、聚光器和虹彩光圈，有的还有特殊的光源部件；后者包括物镜和接目镜。

1. 反光镜　位于显微镜的最下方，有平凹两面，可以自由转动方向，其作用是将投射到它上面的光线反射到聚光器透镜的中央，穿过透镜，照明标本。当外源光线较强时应使用平面反光镜，光线较弱时应使用凹面镜。

2. 聚光器　位于反光镜上方，由一组透镜组成。其作用是将反光镜反射来的光线聚为一束强的光锥于载玻片标本上，聚光器可根据需要上下移动调节，一般用低倍镜时应降低聚光器，用油浸镜时，聚光器应升至最高。

3. 虹彩光圈　位于聚光镜下方，由十几张金属薄片组成，中心部分形成圆孔，推动光圈把手，可开大或关小，用以调节射入聚光镜光线的多少，使照明恰到最适程度。

4. 接物镜　通常称为镜头，是显微镜的重要部件，它不仅可以放大标本，而且具有辨晰性能。因此，它决定着显微镜的性能。一台显微镜通常有三个接物镜，一个是低倍镜（8～10×），一个是高倍镜（40～60×），这两个都是干燥系接物镜（干燥系是指接物镜与被检物之间的介质是空气），第三个接物镜为油浸系接物镜（90～100×），简称油浸镜或油镜（油浸系指接物镜与被检物之间的介质是某种油类物质）。三个接物镜按放大倍数顺序安装在转换器上，便于依次转换使用。

接物镜的放大率可以直接通过镜头侧面刻有的放大倍数来辨认，也可由其外形来辨认，一般低倍物镜较短，高倍物镜较长，油浸镜也较长，接物镜上面带有一圈不同颜色的线作为标记，使用时一定要识别清楚。

放大倍数越高的接物镜，它的焦距越小，工作距离也越小，也就是说，在观察时它与被观察物的距离越小。因此，在使用油浸镜观察时其镜头和玻片极为接近。

5. 接目镜　通常称为目镜，位于镜筒的上端，由两块透镜组成，它只能将接物镜所造成的实像进一步放大形成虚像映入眼部，不具有辨晰性能。接目镜上刻有表示放大倍数的标志，如5×、10×、16×。通常每台显微镜都备有几种不同放大倍数的接目镜，可根据需要选择其中一种使用。有的接目镜为便于指示物像起见，镜头中装有黑色细丝一条作为指针。

四、显微镜的性能

显微镜的总放大倍数等于物镜放大率和目镜放大率的乘积。但显微镜性能的优劣不只是视其放大倍数的高低，而更主要的是视其辨晰细微结构的能力，即性能良好的显微镜必须使被观察的物体放大倍数高，而且清晰。

显微镜辨晰细微结构的能力可用分辨率表示，其能够辨晰的细微结构越小，则分辨率越高。分辨率的高低，首先取决于物镜的性能，若设物镜分辨出的物体两点间的最短距离为 D，则：

$$D=\frac{\lambda}{2NA}$$

式中，λ 为可见光的波长，平均为 $0.55\mu m$；NA 为物镜镜口率或称开口率、数值口径。镜口率 NA 是物镜和被检标本间介质的折射率 n 与镜口角（即入射角 α）的半数正弦的乘积，常以下式表示：

$$\text{镜口率 } NA=n\sin\frac{\alpha}{2}$$

所以，D 也可表示为 $D=\dfrac{\lambda}{2n\sin(\alpha/2)}$

由上可见，显微镜的分辨率与波长、介质折射率和镜口角（入射角）有关。λ 越大，D 值越大，分辨率越低；n 和 α 越大，D 值越小，分辨率越高。因此，可以通过缩短光线波长，增大介质折射率和加大镜口角（入射角）来提高分辨率。紫外光显微镜和电子显微镜就是利用短波光和电子波来提高分辨率的。但普通光学显微镜用的是可见

光，波长一定，平均为 0.55μm，而镜口角是指物镜光轴上的物点发出的光线与物镜前透镜有效直径的边缘所张的角度，理论上最大为 180°，故 sin（α/2）理论最大值为 1（实际上镜口角度最大只能为 140°），因此试图通过缩短波长或提高镜口角来提高光学显微镜的分辨率是有限度的。只有通过提高介质的折射率来提高镜口率，从而提高其分辨率。在使用低倍镜和高倍镜时，镜头与玻片标本间的介质是空气，其折射率是 1，sin（α/2）= sin70° = 0.94 ，故其镜口率 $NA = 1 \times 0.94$。使用油镜时，镜头与玻片标本间的介质是香柏油，香柏油的折射率为 1.515，则其 $NA = 1.515 \times 0.94$ ，故油镜的镜口率总是大于低倍或高倍镜的镜口率，其镜口率最大可达到 1.4，所以油镜的分辨率比低倍镜或高倍镜要高的多。例如，在可见光照射下，用镜口率 1.25 的油镜（一般油镜的镜口角半数的正弦为 0.81），能分辨出物体两点间的最短距离 $D = 0.55/(2 \times 1.25) = 0.22\mu m$。而且镜口率为 0.65 的高倍镜，能分辨出的最短距离 $D = 0.55/(2 \times 0.65) = 0.42\mu m$。即两点间的最小距离如果小于 0.4μm ，在高倍镜下即混为一点，不可辨晰，而在油镜下则清晰可见。

使用某一物镜时，应配合一定镜口率的聚光镜。一般以聚光镜的镜口率大于或等于物镜的镜口率为宜，否则影响物镜的性能。

由此可见，显微镜的性能不只是决定于总放大率。一般来说，显微镜的总放大率应以物镜镜口率的 500～1000 倍为宜，这个范围内的放大率叫有效放大率。

例如，用 NA1.25（100× ）的物镜，其有效放大率为 1250 ，超过此数叫无效放大率，虽用 15×的目镜可放大 1500倍，但对分辨率是没有任何帮助的。

五、显微镜的使用方法

显微镜是光学精密仪器，使用前要了解显微镜的结构及性能，然后按下列步骤仔细操作。

1. 取镜　拿取显微镜必须一只手拿着镜臂，一只手托着镜座，保持镜座平直，以防止反光镜及接目镜滑落，置显微镜于平稳的实验台上。

2. 姿势　镜检者姿势要端正，一般用左眼观察，右眼进行绘图和记录，两眼应同时睁开，以减少疲劳。

3. 对光　正确的照明是获得良好检查效果的前提条件。晴天对着窗户的散射阳光是很好的光源，但应避免强烈的直射光，以防止损坏显微镜的光学系统，在光线不足时，可用日光灯或特制的显微镜灯作光源。普通灯泡因有黄色光影响观察，需在聚光器下加放一块蓝色滤光片。对光的步骤是：

（1）将低倍镜旋转于镜筒正下方，调节粗调螺旋，使镜头和载物台距离约 1cm 左右。

（2）升聚光器，使其与载物台表面距离 1mm 左右。

（3）双眼张开用左眼看目镜调节反光镜镜面角度，调节光圈，直至视野内得到最均匀最适宜的照明为止。

一般染色片油镜检查时，光度宜强，可将光圈开大，聚光器上升到最高，反光镜调至最强。未染色标本，用低倍镜或高倍镜观察时，应适当地缩小光圈，下降聚光器，使光度减弱，否则光线过强不易观察。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

4. 观察　初学者应先用低倍镜观察，这是因为低倍镜视野的实际范围最大，易于发现目的物，将标本玻片放在载物台上（注意标本朝上），并使标本位于物镜的正下方，转动粗调螺旋，同时从侧面观察，待物镜下降到距标本约 0.5cm 时，开始由目镜观察，同时用粗调螺旋升起镜筒，直到出现物象后，改用细调螺旋，上下微微转动，仔细调节焦距，直至最后获得清晰的物象为止。如此时视野调螺旋，倍

(0.19mm

5.

(1)

(2)

(3)

(4)

(5)

(6)

实验 1.2　暗视野显微镜的使用

检物体并进入物镜，而是使光线只能从周缘进入并会聚在被检物体的表面，利用被检物体表面的反射光线来观察物体的轮廓。暗视野显微镜适合于观察在明视野中不易观察的折射率很强的物体，以及普通明视野显微镜看不到的微小颗粒（0.2～0.04μm），如细菌的运动或鞭毛等。

暗视野显微镜有两种主要类型：一种是折射型，即在普通聚光镜放置滤光片的地方放上一个中心有光挡的小铁环就成为一个暗视野聚光镜。另一种是反射型，有不同形式的产品。

三、材料

1. 菌种　枯草芽孢杆菌或大肠杆菌

2. 仪器及其他　普通光学显微镜、暗视野聚光器、显微镜灯、盖玻片（厚度 1.0～1.2mm）盖玻片（厚度＜0.17mm）、香柏油、二甲苯、擦镜纸等。

四、方法与步骤

1. 安装暗视野聚光器　取下普通聚光器，换上暗视野聚光器，上升聚光器使其透镜顶端与镜台平齐。

2. 调节光源　光源宜强，将光源的光圈开到最大，聚光器光圈调至 1.4。如显微镜本身不带光源，可用显微镜灯，调整好光源和反光镜，使强光束正好落在反光镜中央并反射入聚光器。

3. 制片　取载玻片一块，加一滴幼龄菌液，盖上盖玻片。注意不要有气泡，载玻片和盖玻片应非常清洁，无油脂、无划痕，以免反射光线。

4. 置片　加香柏油于聚光器透镜的顶部，下降聚光器，然后把制片放置在载物台上，并把标本移至物镜下，升高聚光器，使镜油与载玻片背面相接触，避免产生气泡。

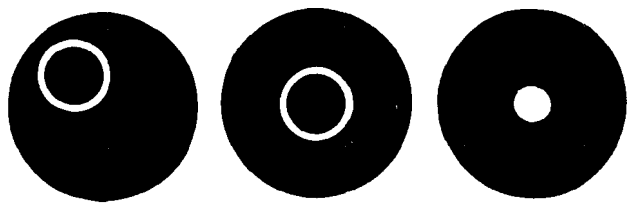


图 1-2　暗视野聚光器的中心调节及调焦
1. 集光器光轴与显微镜光轴不一致
2. 光轴一致，但聚光器焦点与被检物不一致
3. 焦点与被检物一致

5. 调焦和调中　用低镜进行，调节聚光器的高低，最初可出现一个中间有一黑点的光环，再调至成为一个光点，光点愈小愈好。然后用聚光器的调中螺丝进行调节，使光点位于视野的中心，如图 1-2。

6. 用油镜观察　操作方法见实验 1.1 可进一步微调聚光器和反光镜使暗视野照明处于最佳状态，并仔细调节粗、细调节螺旋，使菌体更清晰。

五、记录结果

描述所观察菌体的运动情况。

实验 1.3　相差显微镜的使用

一、目的

了解相差显微镜的构造和原理，掌握其使用方法。

二、原理

用暗视野显微镜可以看到活菌体的轮廓及运动情况，但看不清细胞的内部结构。用普通光学显微镜观察活细胞时，由于活细胞多是无色透明，光线通过时，光的波长和振幅不发生变化，所以整个视野的亮度均匀，不能分辨细胞内的细微结构，而相差显微镜可以较好地解决这一问题。

相差显微镜的外形和成像原理与普通显微镜相似，不同的是相差显微镜有相差聚光器（内有环状光阑）和相差物镜（内装相板）及调节环状光阑和相板合轴的调整望远镜。

相差聚光器装有一个转盘，内有大小不同的环状光阑，在边上刻有 0、10、20、40、100 等字样，“0”表示没有环状光阑，其他数字表示环状光阑的不同大小，应和相应（10×、20×、40×、100×）相差物镜配合使用。环状光阑是一透明的亮环，光线通过环状光阑形成一个圆筒的光柱。

相差物镜有“ph”或一个红圈，或两者兼有作为标志。相差物镜的内焦平面上装有一个相板，相板上有一层金属物质及一个暗环，不同放大倍数的相差物镜其暗环的大小不同。

相差显微镜利用环状光阑和相板，使通过反差很小的活细胞的光形成直射光和衍射光，直射光波相对地提前或延后 1/4 波长，并发生干涉，使通过活细胞的光波由相位差变为振幅（亮度）差，活细胞的不同构造就表现出明暗差异，使人们能观察到活细胞的细微结构。

相差显微镜可分为正反差（标本比背景暗）和负反差（标本比背景明亮）两类。正反差特别适用于活细胞内部细微结构的观察。

三、材料

1. 菌种　酿酒酵母

2. 仪器及其他　相差显微镜、载玻片（厚约 1mm）、盖玻片（厚度 0.17～0.18mm）、镜油、擦镜纸等。

四、方法与步骤

1. 安装相差装置　取下普通光学显微镜的聚光器和物镜，分别装上相差聚光器和相差物镜。

2. 制片　在洁净的载玻片中央加一滴无菌水，从斜面上取一环酵母置水滴中轻轻混合，盖上盖玻片；若是液体培养物，则可先将其摇匀，然后用滴管吸取后加一滴于载玻片

中央，盖上盖玻片，勿产生气泡。将此水浸片放在载物台上。

3. 放置滤色镜　在光源前放置蓝色或黄绿色滤色镜。

4. 视场光阑的调中

（1）将相差聚光器转盘转到“0”位，用10×相差物镜观察，将视场光阑关至最小。

（2）转动旋钮上下移动聚光器，使观察到清晰的视场光阑的多边影像。

（3）转动调中旋钮使视场光阑影像调中。

（4）将视场光阑开大，进一步调中使视场光阑多角形与视场圆内接，再稍开大视场光阑至各边与视场圈外切。

5. 环状光阑与相板合轴调节

（1）取下目镜，换上合轴调整望远镜。将相差聚光镜转盘转至“10”位（与10×物镜相配）。

（2）调整望远镜的焦距至清晰地观察到聚光器的环状光阑（亮环）和相差物镜的相板（暗环）的像。

（3）调节聚光器的环状光阑的合轴调整旋钮，使亮环完全进入暗环并与暗环同轴。

6. 相差观察

（1）取下合轴调整望远镜，装上目镜即可进行观察。若改用不同放大倍数的相差物镜，如20×、40×时，应重新进行合轴调整。若用100×相差物镜时标本和物镜间应加入镜油，然后进行合轴调整。

（2）用40×、100×相差物镜对酿酒酵母细胞结构进行观察，绘制酿酒酵母细胞的结构，特别是核结构。

第二章
原核微生物的形态结构观察

微生物的形态特征包括个体形态结构和群体特征，进行微生物形态特征的观察是认识微生物的重要内容。细菌和放线菌同属原核微生物，细菌的种类多、个体小、结构较为简单，以二次分裂繁殖为主；放线菌呈分枝菌丝状，主要以无性孢子繁殖。

实验 2.1　细菌简单染色

一、目的

学习并掌握简单染色法。

二、原理

细菌个体微小，且较为透明。因此，需借染料使其着色，以便于在显微镜下观察。细菌简单染色是用一种染液一次着染菌体的方法。其原理是细菌在中性环境中一般带负电荷，所以当采用碱性染料如美蓝、碱性复红、结晶紫、孔雀绿、蕃红等进行染色时，这类染料解离后，染料离子带正电荷，故使细菌着色。

三、材料

1. 菌种　巨大芽孢杆菌。

2. 仪器及其他　接种环、酒精灯及火柴、载玻片、碱性复红或结晶紫染色液，洗瓶及废液缸、吸水纸、显微镜。

四、方法与步骤

1. 准备玻片　载玻片应清洁透明，无油渍。如有残余油渍，可按下列方法处理：

(1) 滴上 95%酒精 2～3滴，用洁净纱布反复擦净，然后在酒精灯火焰上轻轻拖过几次。

(2) 如果玻片事先已浸泡在 75%酒精中，那么就可用镊子将其取出直接在酒精灯火焰上拖过几次。

2. 涂片　根据材料的不同，涂片方法也有区别。

(1) 液体材料　液体培养物、组织汁液或牛乳等直接用接种环以无菌操作法取一环材料，置于玻片中央均匀地涂抹成适当大小的薄层（直径约 1cm）。

(2) 固体材料　如固体培养物、牛乳凝块或奶酪等则先用滴管在载玻片中央加一滴无菌水，然后同样以无菌操作法用接种环从固体材料上挑取一环，在液滴中混合均匀，涂抹成适当大小的薄层。

3. 干燥　将涂好的玻片放在玻片架上自然干燥。有时为了使它干得快些，可以将涂片小心地在酒精灯的火焰上微微挥动使其干燥（注意载玻片的温度以不超过手背的耐受力为限）。

4. 固定　将已干燥的涂片（涂菌面向上）慢慢地从酒精灯的火焰上通过 2～3 次，目的是将活菌杀死，使菌体粘附在玻片上，染色时不致脱落，同时改变菌体对染液的通透性，增加染色效果。

5. 染色滴 1～2 滴碱性复红（或其他染液，如结晶紫、美蓝、沙黄等）于涂片的部位，染色 1～2min （染色液不同，染色时间长短也不完全一样）。

6. 水洗　用一只手的拇指和食指拿住玻片一端的两侧，菌面向上并使玻片向下倾斜，另一只手拿洗瓶或直接用水龙头从玻片上端轻轻地冲洗掉多余染液（不可直接冲洗染色部位，以免将菌体冲掉），直至冲洗水滴无色或浅色为止。

7. 干燥　用吸水纸吸去载玻片上多余的水分让其自然干燥或在酒精灯火焰上方微热烘干。

8. 油镜检查　用油镜对标本片进行镜检，观察菌体形态及大小，同时绘出图来。

实验 2.2　细菌革兰氏染色

一、目的

了解细菌革兰氏染色原理，并掌握其方法。

二、原理

革兰氏染色法是一种重要的鉴别细菌的方法，根据各种细菌对这种染色法的反应不同，可把细菌分为革兰氏阳性和革兰氏阴性两大类。因此，该方法对于细菌的分类、鉴定及生产应用都有重要意义。其染色原理是利用细菌的细胞壁组成成分和结构的不同，革兰氏阳性菌的细胞壁肽聚糖层厚，交联而成的肽聚糖网状结构致密，经乙醇脱色处理发生脱水作用，使孔径缩小，通透性能降低，结晶紫与碘形成的大分子复合物保留在细胞内而不被脱色，结果使细胞呈现紫色；而革兰氏阴性菌肽聚糖层薄，网状结构交联少，脂类含量较高，经乙醇处理后，脂类被溶解，细胞壁孔径变大，通透性增加，结晶紫与碘的复合物被溶出细胞壁，使细胞脱色。此时，再经复红或沙黄等红色染料复染后细胞呈红色。

在革兰氏染色中，有两个值得注意的问题。一是酒精脱色的时间要掌握恰当，随涂片厚薄不同，脱色的时间也不完全一样，一般以不溶出色素为止。若脱色过度则阳性菌被误染为阴性菌，而脱色不够时阴性菌则被误染为阳性菌。二是培养物的老幼对染色结果也有影响，革兰氏染色检查的菌，必须是新培养物。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

三、材料

1. 菌种　培养 10～12h 的枯草杆菌（*Bacillus subtilis*）及大肠杆菌（*Escherichia coli*）。

2. 仪器及其他　显微镜、接种环、酒精灯、载玻片、玻片架、 75%酒精消毒缸、镊子、无菌水、草酸铵结晶紫、 Lugol 氏碘液、95%酒精、蕃红染液、吸水纸、特种蜡笔。

四、方法与步骤

1. 涂片　涂片、干燥、固定同简单染色法。
2. 初染　滴加草酸铵结晶紫于涂片部位，染色时间为 1min。
3. 水洗　用水轻轻冲洗，洗去多余的染料。
4. 滴加 Lugol　氏碘液 1～2min，紫色部分变黑为止。
5. 水洗　倾去 Lugol 氏液，水洗。
6. 脱色　滴加 95%以上的酒精，约 30～60s（色素不溶出为止）。
7. 水 洗　同 5 水洗。
8. 复染　滴加蕃红或沙黄染 1～2min。
9. 水 洗　同 5 水洗。
10. 干燥　自然干燥或用吸水纸吸干。
11. 镜检　用油镜观察，记录结果。

实验 2.3　细菌芽孢染色

一、目的

学习并掌握细菌芽孢染色的原理及方法。

二、原理

细菌的芽孢具有一层结构致密的芽孢壁，通透性差、着色较难，用普通染色法染色菌体着色而芽孢呈现不染色的轮廓，但经特殊处理（加热染色或腐蚀性药物处理）色素即可透过芽孢壁而使芽孢着色，且芽孢一经着色便不易褪色，脱色时只能脱掉菌体的颜色而保留芽孢的颜色。因此，如再换另一种颜色的染液复染菌体，便会使菌体和芽孢呈不同颜色的鲜明对照。

三、材料

1. 菌种　枯草芽胞杆菌。

2. 仪器及其他　显微镜、接种环、酒精灯、载玻片、 7.6%的孔雀绿染色液，0.5%的蕃红、石炭酸复红、美蓝、吸水纸、枯草芽孢杆菌、水浴锅或小烧杯与三角架。

四、方法与步骤

1. 孔雀绿藕红芽孢染色法

(1) 涂片经火焰固定，滴定孔雀绿染液于涂片上，加热至产生蒸汽达 3～5min（加热时要慢慢来回移动，添加染液勿使涂片干燥）。

(2) 水洗后，再用藕红染液复染 1～2min。

(3) 水洗、干燥、镜检、绘图。芽孢被染上绿色，营养体呈红色。

2. 石炭酸复红染色法

(1) 试管一支，加蒸馏水 3～4 滴，取 1～2 环芽孢杆菌于水中，并充分摇荡制成均匀的悬浮液。

(2) 滴加等量 3～4 滴石炭酸复红液摇匀，水浴煮沸 10min 以上。

(3) 取上述加热后的染色菌悬液 2～3 环于载玻片上制成涂片，然后经过干燥、火焰固定、水洗。

(4) 美蓝复染 3～4min，经水洗、干燥后，镜检，绘图。

实验 2.4　细菌荚膜染色

一、目的

学习并掌握细菌荚膜染色的原理及方法。

二、原理

细菌的荚膜不易着色，但通透性较好，染料可通过荚膜使菌体着色，所以，染色后在有颜色的菌体周围，有一浅色或无色的透明圈，即为荚膜。为了更清楚地观察荚膜常用负染色法，即用有色的背景来衬托出没有染上颜色的荚膜。

三、材料

1. 菌种　在阿须贝（Ashby）无氮培养基上培养 2～3d 的圆褐固氮菌（*Azotobacter chroococcum*）或硅酸盐细菌。

2. 仪器及其他　显微镜、酒精灯、载玻片、石炭酸复红染液、 1%黑素或绘图墨水、95%酒精、在阿须贝（Ashby）无氮培养基上培养 2～3d 的圆褐固氮菌或硅酸盐细菌。

四、方法与步骤

(1) 在干净的载玻片中央，滴加无菌水少许。

(2) 挑取培养 2～3d 的硅酸盐细菌斜面菌体制成涂片，晾干（不可用火焰烘干）。

(3) 加 95%酒精 1 滴固定（不可加热），待酒精蒸发掉为止。

(4) 石炭酸复红染色液染色 3～4min，然后水洗，晾干。

(5) 用接种环取少许黑素于载玻片一端，另取一块边缘光滑的载玻片与黑素接触，并

向玻片两侧稍滑动几下使黑素散开，再以均匀速度向涂片部位推动，通过涂片部位使之成一均匀而且厚薄适中的薄层，自然干燥。也可用绘图墨水 1 滴，滴于涂片部位附近，再用另一玻片的一端接触墨滴，使之向旁边散开，然后拉过涂片部位，注意墨滴不可太大。

（6）镜检、绘图。

操作中应注意的问题：由于荚膜中含有大量的水分和多糖或多肽类物质，因而受热时容易失水收缩使菌体变形，所以染色时不要加热固定。

实验 2.5　细菌鞭毛染色及运动性的检查

一、目的

学习并掌握细菌鞭毛染色及运动性检查的原理及方法。

二、原理

细菌鞭毛的着生部位是细菌分类的重要特征之一，但它们非常纤细，直径 0.01～0.02μm 在普通光学显微镜下不能看到，必须经特殊的染色方法，使染料堆积在鞭毛上，将鞭毛加粗，才能在普通光学显微镜下观察到细菌鞭毛的着生部位和形状。

另外，也可以通过细菌运动性的检查，来判断细菌是否具有鞭毛，但不能测定鞭毛的数量。当然，细菌依赖鞭毛的运动方式，与鞭毛的排列形式和数目有关，但根据细菌的运动方式，对鞭毛的数目和排列形式只能作大致判断。单毛菌和丛毛菌多做直线运动，周毛菌多做翻转运动。依赖鞭毛的运动称为真性运动。无鞭毛细菌做左右颤动而不改变其位置，这种运动称为非真性运动。

三、材料

. 菌种　枯草杆菌（培养 24h 以内）。

2. 仪器及其他　显微镜、接种环、酒精灯、无菌蒸馏水、载玻片、盖玻片、鞭毛染色液。

四、方法与步骤

1. 鞭毛染色法

（1）涂片　在载玻片的一端滴一滴无菌蒸馏水，用接种环挑取菌苔，在载玻片水滴中轻轻沾几下，将玻片倾斜，使菌液随水滴缓缓流到玻片另一端，然后平放在空气中干燥（或放入 37℃保温箱中干燥），不宜用火焰加热固定。

（2）染色　滴加鞭毛染色液，染 10～15min，染色时间长短随室温高低而不同，在冬季可置 37℃温箱中染色。

（3）水洗　水洗 1～2min，在室温或温箱中干燥后再作镜检、绘图，菌体和鞭毛均呈红色。

2. 细菌运动性的检查（压滴法）

在载玻片上滴加一滴蒸馏水（水滴不要太小），挑取菌苔少许混合于水滴中，加盖玻片后即可进行镜检，此时光线宜弱，可通过下降聚光器，缩小虹彩光圈和用平面镜反光来调节。

实验 2.6　细菌细胞中异染粒的染色观察

一、目的

了解细菌细胞中异染粒的染色原理，掌握其操作方法。

二、原理

当异染粒被美蓝染色时，它呈现出与细胞质其他部分颜色不同的红色或紫红色，因而被称为异染粒。除细菌外，其他的微生物如真菌、藻类和原生动物均含有异染粒。异染粒的主要化学组分是大分子的聚偏磷酸盐。

当细胞中缺少营养物质特别是缺硫时，可导致生成大量的多聚磷酸盐。若再供给硫，则多聚磷酸盐将消失，并参与核酸合成。可见，异染粒的重要功能是当核酸合成受阻时，它作为磷酸盐保存形式存在于细胞内。

三、材料

1. 菌种　枯草芽孢杆菌
2. 试剂　奈瑟氏（Neisser）甲液、奈瑟氏乙液。

四、方法与步骤

1. 制片　按前述常规方法进行。
2. 染色　用奈瑟氏甲液染标本 30～60s，水洗，再用奈瑟氏乙液染色 30s，水洗。
3. 镜检　晾干后镜检菌体呈黄褐色，异染粒呈深紫色。

实验 2.7　细菌培养特征的观察

一、目的

培养特征是指微生物在培养基上所表现的群体形态和生长情况。菌落是指个体微生物在固体培养基上繁殖成的肉眼可见的群体。培养特征包括菌落特征、斜面培养特征及液体培养时的生长特征，它是认识微生物和微生物分类的重要依据。通过实验掌握观察细菌培养特征的方法。

二、材料

培养皿、试管、酒精灯、接种环、藤黄八叠球菌、大肠杆菌、荧光极毛杆菌、枯草芽

孢杆菌、蕈状芽孢杆菌（*Bacillus mycoides*）、肉膏蛋白胨琼脂培养基、无菌水。

三、方法与步骤

（一）表面菌落特征的观察

1. **接种方法** 有划线法即用接种环直接挑取菌苔在培养皿内培养基表面划线培养，该方法简便，但不易掌握，常常由于挑取菌苔过多，因而得不到单个菌落。另一种方法是稀释倾注法即用接种环取菌苔于无菌水试管中，制成菌悬液，以 10 倍稀释法配成 10^{-1}～10^{-5}稀释度的稀释液，取后两个稀释度的稀释液各 0.5ml 加入无菌培养皿中，倒入融化好的培养基（45℃左右），混合均匀，于 37℃培养。也可采用稀释涂布法，即先倒制平板，然后取适当稀释度的菌悬液 0.2ml 于平板上，再用涂布器涂布，而后进行培养。

2. **观察记载** 一般细菌在肉膏蛋白胨琼脂培养基上培养 3～7d，再进行观察和记载。培养时间过短，不易观察到应有的特征。

观察和记载时可参照图 2-1 和图 2-2 其项目为：

（1）大小 以菌落的直径为多少毫米表示。

（2）形状 斑点状（直径在 1mm 以下）、圆形、不规则状、放射状、卷发状、根状等。

（3）表面 光滑、皱、颗粒状、同心环状、辐射状、龟裂状等。

（4）边缘 光滑整齐，锯齿状、波状、裂叶片、有缘毛、多枝等。

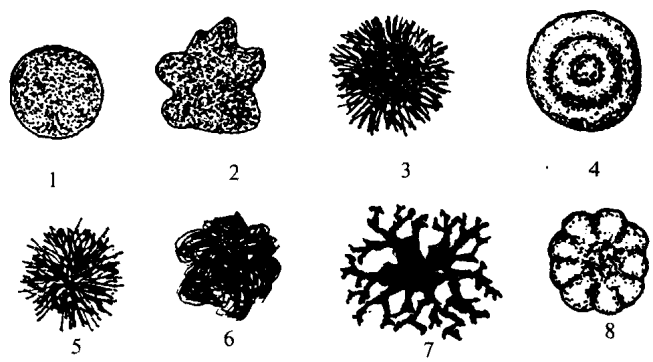


图 2-1 细菌菌落的形状

1. 圆形 2. 不规则状 3. 缘毛状 4. 同心环状 5. 丝状 6. 卷发状 7. 根状 8. 规则放射叶状

（5）隆起形状 扩展、凸起、中凹台状、突脐形、台状等。

（6）透明程度 透明、半透明、不透明。

（7）颜色 黄色、乳白、乳黄等。

将本实验结果填入表 2-1。

表 2-1 平板菌落特征观察记录

温度_____℃ 时间_____d

菌种	大小	形状	表面	边缘	隆起形状	透明程度	颜色	绘图

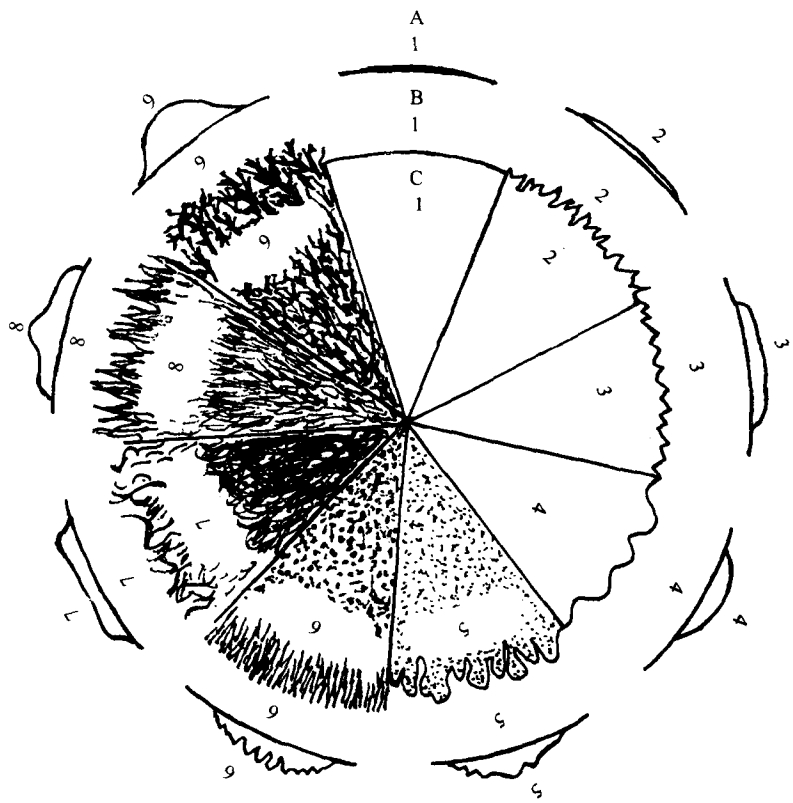


图 2-2　细菌菌落的隆起、边缘和表面状况

A－隆起：1.扩展　2.稍凸起　3.隆起　4.凸起　5.乳头状　6.皱纹状凸起
7.中凹台状　8.突脐形　9.高凸起

B－边缘：1.光滑　2.缺刻　3.锯齿　4.波状　5.裂叶状
6.有缘毛　7.镶边　8.深裂　9.多枝

C－表面：1.透明　2.半透明　3.不透明　4.平滑　5.细颗粒
6.粗颗粒　7.混杂波纹　8.丝状　9.树状

(二)斜面培养特征的观察

1.接种方式　以无菌操作，用接种环挑取少量菌苔，在已制备好的试管斜面培养基中央自管底向上直线划过斜面（切勿划破斜面表面），置37℃下培养。

2.观察和记载　一般细菌斜面培养经过3～5d后，就可按下列项目观察和记载：

(1) 生长　不生长、微弱生长、中等生长、旺盛生长。

(2) 形状　丝状、有小突起、有小刺、念珠状、扩展状、假根状、树状，如图2-3。

(3) 表面　光滑、不平、皱褶、瘤状突起。

(4) 颜色　菌苔颜色（即非水溶性色素）、培养基颜色（即水溶性色素）。

(5) 透明程度　透明、不透明、半透明。

需要全本请访问 www.ertongbook.com