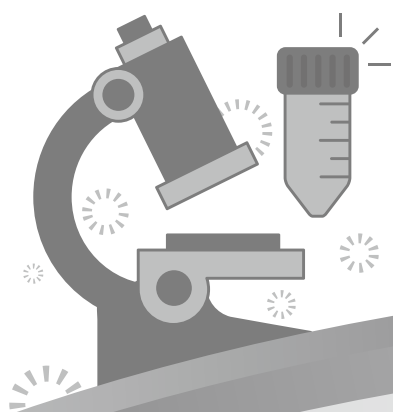




第一部分

细菌学实验



实验一 显微镜的使用

【目的要求】

掌握显微镜油镜的使用及防护。

【内容提要】

巩固显微镜的使用，尤其是油镜的使用。

【实验材料】

1. 试剂 镜油（香柏油）、镜头纸、擦镜液（乙醚：乙醇=7：3，浓度可以根据空气干燥程度调整为6：4）、擦镜纸。

2. 器械（仪器）普通光学显微镜。

3. 其他 微生物标本片。

【实验原理】

普通光学显微镜（light microscope）是由机械系统、照明系统和光学系统组成的（图 1-1-1）。



图 1-1-1 普通光学显微镜

机械系统的主要作用是稳定和支持整个镜身，由镜座、镜臂、镜筒、载物台、物镜转换器和调焦装置等组成。

照明系统是决定显微镜性能和功能的关键部分，由光源、反光镜、聚光器、光栏和滤光片等组成。其作用在于：一是改变入射光的性质，即决定吸收哪些光和透过哪些光；二是改变入射光的强度，即调节光束大小。

光学系统使所观察的样品在显微镜中成像，主要由物镜和目镜组成。

物镜（objective）位于被观察物体附近，是实现第一级放大的镜头。在物镜转换器上同时装着几个不同放大倍率的物镜，转动转换器就可让不同倍率的物镜进入工作光路。一般的显微镜配置有3~4个物镜，分别是4×低倍镜、20×镜、40×高倍镜和100×油镜。聚光镜发来的光束



应能保证充满物镜孔径角, 否则就不能充分利用物镜所能达到的最高分辨率。为此目的, 可以调节可变孔径光阑, 用来调节照明光束孔径, 以与物镜孔径角匹配。

目镜 (eyepiece) 是位于人眼附近实现第二级放大的镜头, 目镜放大倍率通常为 10 倍。

显微镜总放大倍数 = 物镜放大倍数 $\times$ 目镜放大倍数。

在微生物学实验室常用普通光学显微镜的油镜头观察细菌的形态, 因镜油的折光率为 1.52, 与玻璃的折光率相近, 当光线通过载玻片后, 可直接通过镜油进入物镜而不发生折射, 因此减少了光的散射, 提高了显微镜的分辨力, 可将物体放大 800~1000 倍。油镜头是普通光学显微镜上放大倍数最高的物镜头, 其孔径较其他物镜略小。镜头上标有 100 $\times$ 或 oil 字样, 镜头前端有白圈。

【实验内容】

用显微镜油镜头观察细菌标本

1. 对光 用 10 $\times$ 镜对焦, 找到标本并调节清晰后, 换高倍镜得到清晰的图像, 将要观察的部位移到视野中央。
2. 滴油 移开高倍镜, 换到 4 $\times$ 镜, 在标本玻片上滴一小滴油, 将油镜对准载物台孔。
3. 调焦 从侧面观察可看到油滴与油镜头刚刚接触, 缓缓向上调节镜台直至物像清晰为止, 注意不要调过了焦距, 使用油镜时需适当扩大光强。
4. 用毕处理 先用小片镜头纸将镜头上的油擦去, 再以蘸有擦镜液的擦镜纸反复将镜头上的油擦干净, 最后用干擦镜纸擦拭。关闭电源、罩上镜套。

【注意事项】

1. 显微镜是贵重精密仪器, 尽量避免移动或拆卸。
2. 避免损坏油镜头和标本片。如果发生损坏事故, 应及时向指导教师汇报。
3. 观察结束后, 记得清洁油镜头和标本片, 并将标本片按编号放回标本盒内。
4. 注意滴油和取放标本均在 4 $\times$ 镜下进行。滴油时避免气泡。



实验二 细菌的基本形态观察

【目的要求】

掌握细菌的基本形态。

【内容提要】

细菌的形态观察及绘图。

【实验材料】

1. 试剂 镜油、镜头纸、擦镜液、擦镜纸。
2. 器械（仪器） 普通光学显微镜。
3. 其他 微生物标本片。

【实验原理】

1. 微生物的大小 细菌很小，一般最大不超过几微米（ μm ），多数球菌直径为 $0.5\sim 2\ \mu\text{m}$ ，杆菌长为 $1\sim 5\ \mu\text{m}$ ，宽 $0.3\sim 1\ \mu\text{m}$ （图 1-2-1），而人肉眼分辨力约为 $0.25\ \text{mm}$ 。因此，需把细菌放大 1000 倍左右才能看到。

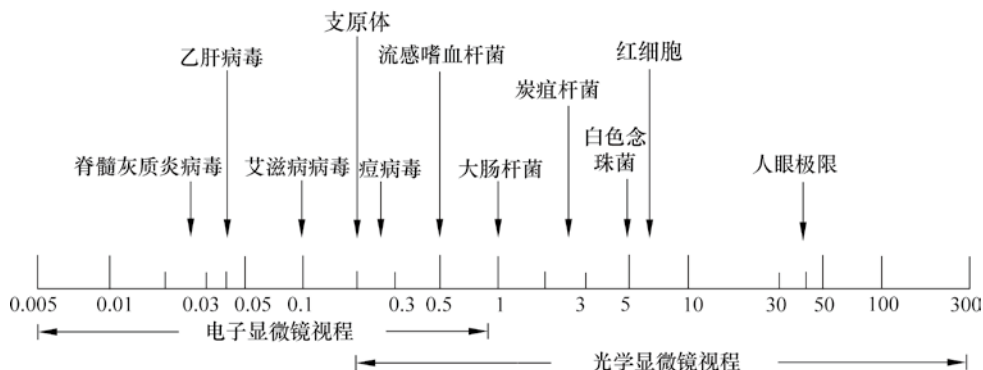


图 1-2-1 微生物的大小

2. 细菌的基本形态 单个细菌细胞有三种典型形态，即球菌（coccus）、杆菌（bacillus）及螺形菌（spiral-shaped bacterium），采用适当染色方法在油镜下可以观察到（图 1-2-2）。

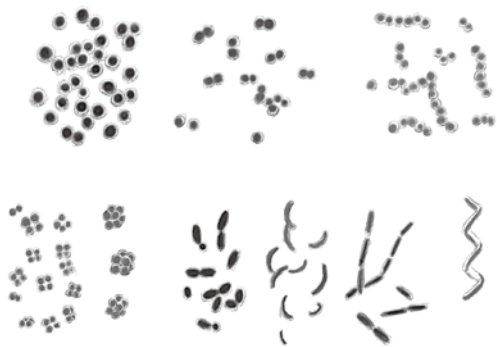


图 1-2-2 常见的细菌形态（彩图附后）



球菌：球菌一般可以链状或簇状排列。根据分裂繁殖方向与排列情况又可分为双球菌、四联球菌、链球菌、葡萄球菌等。

杆菌：杆菌的头端可以呈现不同的形状，例如方形或棒状。

螺形菌：螺形菌可以呈现不同的卷曲程度，例如紧的、松的、适中的。菌体仅有一个弯曲，呈逗点状的称为弧菌；菌体有 2、3 个回转且较坚硬者称为螺菌。

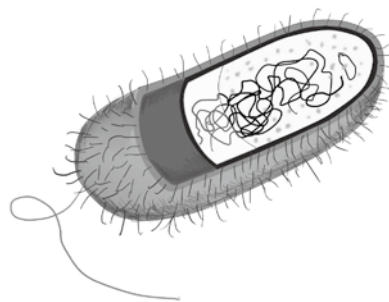


图 1-2-3 细菌的基本结构

3. 细菌的结构 细菌一般具有细胞壁、细胞膜、细胞质和核质等基本结构（图 1-2-3）。

【实验步骤】

1. 用显微镜油镜头观察细菌标本

（1）对光：用 10× 镜对焦，找到标本并调节清晰后，换高倍镜得到清晰的图像，将要观察的部位移到视野中央。

（2）滴油：移开高倍镜，换到 4× 镜，在标本玻片上滴一小滴油，将油镜对准载物台孔。

（3）调焦：从侧面观察可看到油滴与油镜头刚刚接触，缓缓向上调节镜台直至物像清晰为止，使用油镜时需适当扩大光强。

（4）用毕处理：先用小片镜头纸将镜头上的油擦去，再以蘸有擦镜液的擦镜纸反复将镜头上的油擦干净，最后用干擦镜纸擦拭。

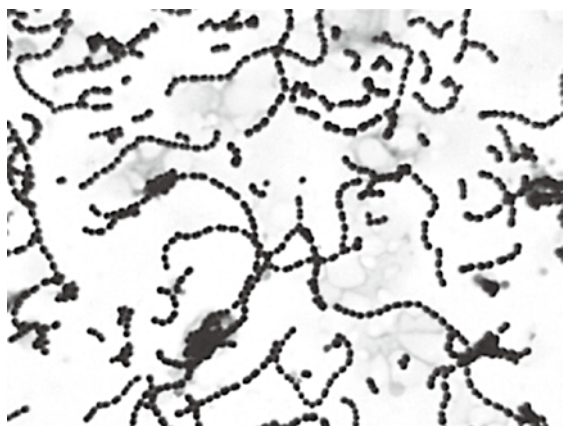
2. 微生物形态观察

（1）球菌：肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌

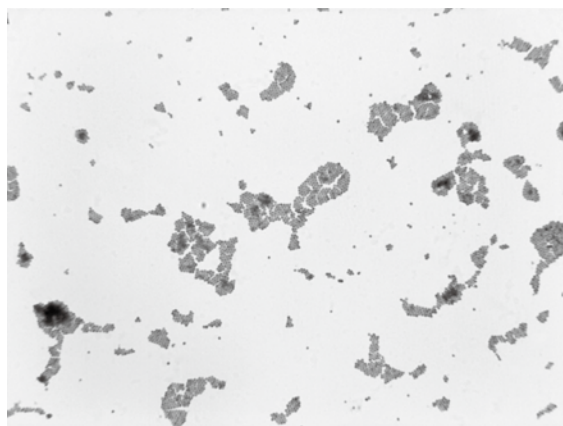
示教结果：

肺炎链球菌：革兰阳性球菌，在痰和脓汁中呈单个或链状，无鞭毛、无芽孢，可形成荚膜（图 1-2-4A）。

金黄色葡萄球菌：革兰阳性球菌，典型的排列呈葡萄串状，无鞭毛、无芽孢，有些可形成荚膜（图 1-2-4B）。



A



B

图 1-2-4 球菌示教片（彩图附后）

A. 肺炎链球菌；B. 金黄色葡萄球菌



(2) 杆菌：大肠杆菌、破伤风杆菌、产气荚膜杆菌、炭疽杆菌、痢疾杆菌

示教结果：

大肠杆菌：革兰阴性杆菌，无芽孢，多数有鞭毛，大多有菌毛，少数有荚膜；中等大小，两端钝圆（图 1-2-5A）。

破伤风杆菌：革兰阳性杆菌，芽孢呈圆形，位于菌体顶端，宽度较菌体大，形似鼓槌（图 1-2-5B）。

产气荚膜杆菌：革兰染色阴性杆菌，呈杆状（图 1-2-5C）。

炭疽杆菌：革兰阳性大杆菌，无鞭毛，有芽孢，排列成竹节状。芽孢多位于菌体中央，呈椭圆形（图 1-2-5D）。

痢疾杆菌：革兰染色阴性杆菌，菌体较长，呈杆状（图 1-2-5E）。

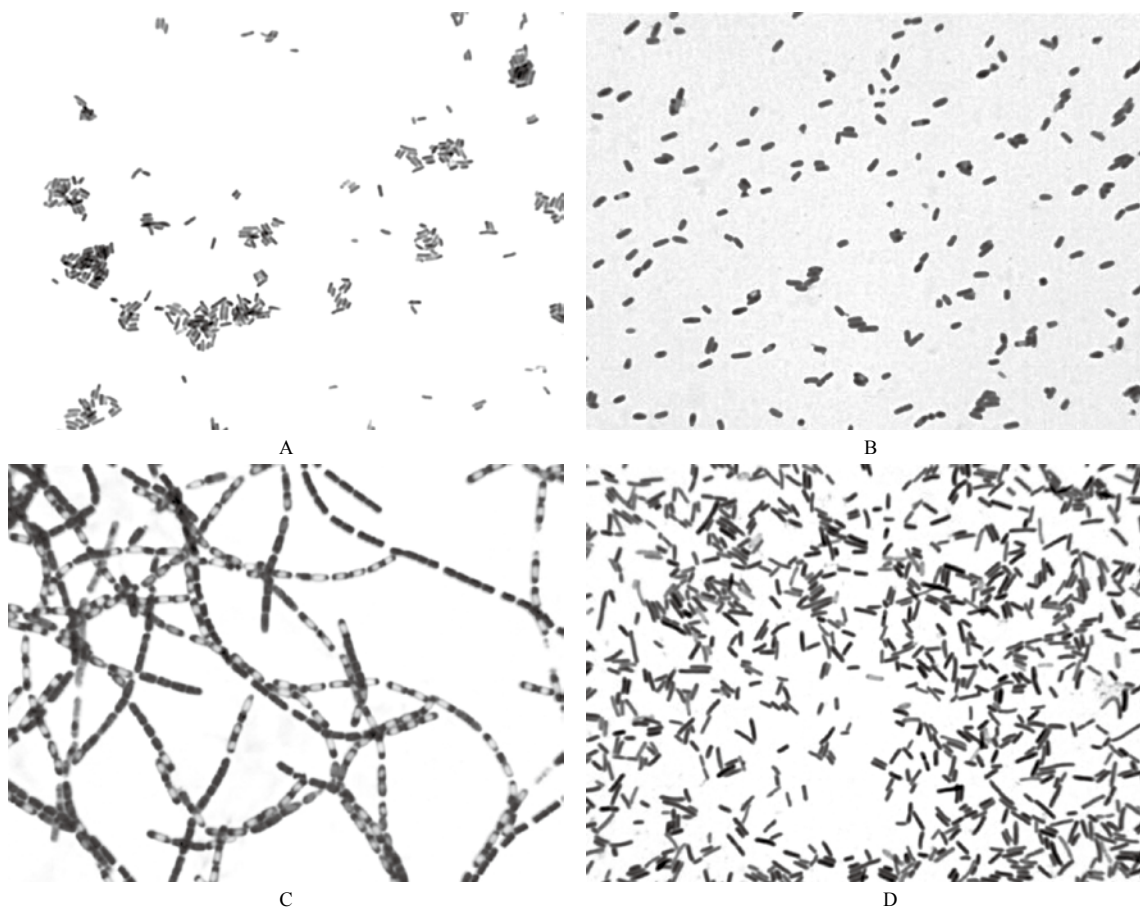
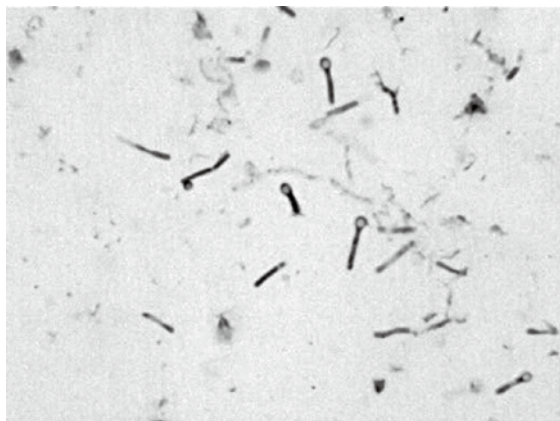


图 1-2-5 杆菌示教片（彩图附后）

A. 产气荚膜杆菌；B. 大肠杆菌；C. 炭疽杆菌；D. 痢疾杆菌；E. 破伤风杆菌



E

图 1-2-5 (续)

(3) 螺形菌：肉毒梭菌

示教结果：

肉毒梭菌：革兰阳性菌，芽孢呈卵圆形，宽带大于菌体，偏于一侧。像小拉锁（图 1-2-6）。

(4) 钩端螺旋体

示教结果：

钩端螺旋体：银染，菌体细长，呈褐色，可观察到锯齿状的纹理，代表其螺旋形态。菌体一端或两端弯曲呈钩状（图 1-2-7）。

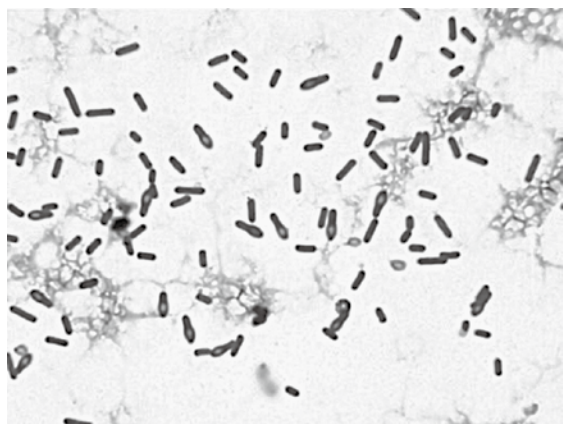


图 1-2-6 肉毒梭菌示教片（彩图附后）



图 1-2-7 钩端螺旋体示教片（彩图附后）

【结果与讨论】

1. 选取常见 5 种微生物，随堂拍摄图片。
2. 选取有代表性的微生物绘制 5 幅图片，不与拍摄的图片相重复。绘图时需注意大小、形状和排列，按照视野实际大小的 2~5 倍描画，每份报告统一放大倍数。颜色深的可以用点的密度来表示。



实验三 细菌的特殊结构观察

【目的要求】

掌握细菌的特殊结构。

【内容提要】

芽孢、荚膜、鞭毛、异染颗粒的形态观察及绘图。

【实验材料】

1. 试剂 镜油、镜头纸、擦镜液、擦镜纸。
2. 器械（仪器） 普通光学显微镜。
3. 其他 微生物标本片。

【实验原理】

细菌的特殊结构观察 细菌除了具有细胞壁、细胞膜、细胞质和核质等基本结构外，某些细菌还有芽孢、荚膜、鞭毛和菌毛等特殊结构（表 1-3-1）。

表 1-3-1 细菌非必需成分的组成和功能总结

非必需成分	化学组成	功 能
荚膜	多糖	抗吞噬作用
菌毛	糖蛋白	①普通菌毛介导细胞表面贴附；②性菌毛介导两种细菌的接合作用
鞭毛	蛋白	提供动力
芽孢	类角质外衣，吡啶二羧酸	抵抗脱水、热、化学作用
质粒	DNA	包括抗生素抗性和毒素基因
颗粒	糖原、脂质、磷酸盐	胞质中的营养部位
糖萼	多糖	介导表面的吸附作用

芽孢（spore）：某些细菌在其生长发育后期，在细胞内形成一个圆形或椭圆形的厚壁、含水量低、抗逆性强的休眠构造。芽孢生长的位置是种属特征，对于同一株菌通常不会有各种位置的芽孢。芽孢多在极端生存环境下出现，例如脱水、缺乏营养、高热、辐射等。

荚膜（capsule）：对于多数细菌来说荚膜由多糖组成，能够保护细菌抵抗环境压力，例如脱水、物理损伤和宿主细胞的杀伤作用。许多病原性细菌都具有荚膜。

鞭毛（flagellum）：是螺旋丝一样的结构，能够为细菌提供动力。某些细菌如大肠杆菌利用鞭毛趋利避害，实现化学趋向性。根据鞭毛位置的不同，细菌可分为单毛菌、双毛菌、丛毛菌和周毛菌（图 1-3-1）。

菌毛（pilus）：比鞭毛更细、更短而直硬的丝状物，称为菌毛或伞毛、纤毛。由结构蛋白亚单位菌毛蛋白（pilin）组成，具有抗原性，按照功能可分为普通菌毛和性菌毛两类。性菌毛是细菌传递游离基因的器官，作为细菌接合时遗传物质的通道。

前三种特殊结构经用特殊染色法染色在普通光学显微镜下就能观察到，而菌毛则要用电子显微镜进行观察。

此外，有些细菌具有独特的形态学特征，具有鉴别意义。其中代表性的包括白喉棒状杆菌的

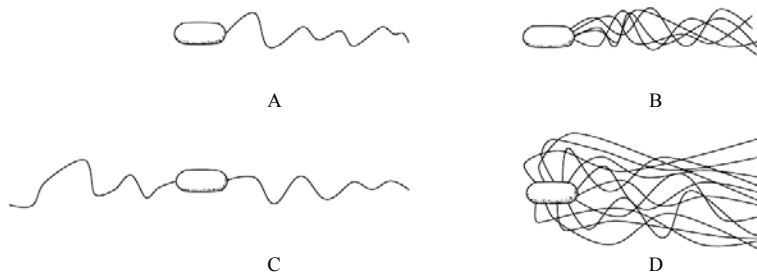


图 1-3-1 细菌鞭毛

A. 单鞭毛; B. 丛鞭毛; C. 双鞭毛; D. 周鞭毛

异染颗粒 (metachromatic granules), 以及炭疽芽孢杆菌的串珠试验 (string of pearls test)。

异染颗粒: 白喉棒状杆菌培养物用亚甲蓝或奈瑟染色 (Neisser's stain) 时, 在菌体一端或两端可见着色较深的异染颗粒, 其主要成分是嗜碱性多聚磷酸盐颗粒和核糖核酸, 是该菌的形态特征之一, 有鉴定意义 (图 1-3-2)。当培养基缺磷时, 异染颗粒可作为磷的补充来源。

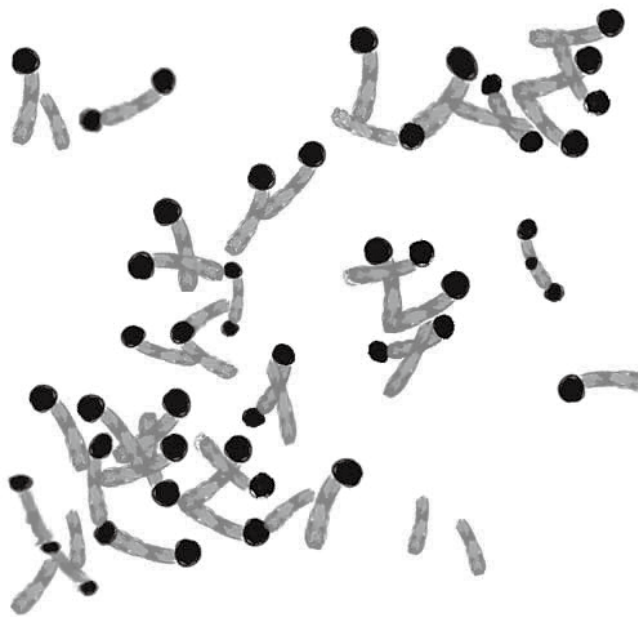


图 1-3-2 白喉棒状杆菌的异染颗粒 (彩图附后)

串珠试验: 炭疽芽孢杆菌在含有一定浓度青霉素 (0.05~0.5 U/mL) 的液体培养基中, 在 37℃ 下培养数小时后, 菌体可肿大形成圆珠, 呈链状排列似串珠状, 称为串珠试验, 在芽孢杆菌属中, 惟有炭疽芽孢杆菌呈阳性结果, 故有鉴别意义。其原理在于低浓度的青霉素使炭疽杆菌细胞壁黏肽的合成被抑制, 使菌体膨大, 形成大而均匀的圆球状, 链状排列的炭疽杆菌形成类似串珠的形态。

【实验步骤】

1. 用显微镜油镜头观察细菌标本

(1) 对光: 用 10× 镜对焦, 找到标本并调节清晰后, 换高倍镜得到清晰的图像, 将要观察的部位移到视野中央。

(2) 滴油: 移开高倍镜, 换到 4× 镜, 在标本玻片上滴一小滴油, 将油镜对准载物台孔。