**实验一 显微镜的使用及微生物显微特征的观察**

--------------------------------------------------------------------------------

一、目的要求

1、了解显微镜的构造，掌握显微镜的使用方法；2、了解细菌的光学显微特征。

二、基本构造

普通光学显微镜构造主要分为三部分:机械部分照明部分光学部分。

1.机械部分

（1）镜座：是显微镜的底座，用以支持整个镜体。

（2）镜柱：是镜座上面直立的部分，用以连接镜座和镜臂。

（3）镜臂：一端连于镜柱,一端连于镜筒。

（4）镜筒：连在镜臂的前上方，镜筒上端装有目镜，下端装有物镜转换器。

（5）物镜转换器：接于棱镜壳的下方，可自由转动，盘上有3－4个圆孔，是安装物镜部位，转动转换器，可以调换不同倍数的物镜。

（6）载物台：在镜筒下方，形状有方、圆两种，用以放置玻片标本，中央有一通光孔，我们所用的显微镜其镜台上装有玻片标本推进器，推进器左侧有弹簧夹，用以夹持玻片标本，镜台下有推进器调节轮，可使玻片标本作左右、前后方向的移动。

（7）焦距调节轮：是装在镜柱上的大小两种螺旋，可使镜台作上下方向的移动以调节观察焦距。

2．照明部分

装在镜台下方，包括反光镜，集光器。

（1）反光镜：装在镜座上面，可向任意方向转动，它有平、凹两面，其作用是将光源光线反射到聚光器上，再经通光孔照明标本，凹面镜聚光作用强，适于光线较弱的时候使用，平面镜聚光作用弱，适于光线较强时使用。

（2）集光器位于镜台下方的集光器架上，由聚光镜和光圈组成，其作用是把光线集中到所要观察的标本上。

①聚光镜：由一片或数片透镜组成，起汇聚光线的作用，加强对标本的照明，并使光线射入物镜内，镜柱旁有一调节螺旋，转动它可升降聚光器，以调节视野中光亮度的强弱。

②光圈：在聚光镜下方，由十几张金属薄片组成，其外侧伸出一柄，推动它可调节其开孔的大小，以调节光量。

3.光学部分

（1）目镜：装在镜筒的上端，通常备有2－3个，上面刻有5×、10×或15×符号以表示其放大倍数，一般装的是10×的目镜。

（2）物镜：装在镜筒下端的旋转器上，一般有3－4个物镜，其中最短的刻有“10×”符号的为低倍镜，较长的刻有“40×”符号的为高倍镜，最长的刻有“100×”符号的为油镜，此外，在不同的镜头上加有一圈不同颜色的线，以区别不同的镜头。

在物镜上，还有镜口率(N.A.)的标志，它反应该镜头分辨力的大小，其数字越大，表示分辨率越高，各物镜的镜口率如下表：

物镜 镜口率(N.A.) 工作距离(mm)

10× 0.25 5.40

40× 0.65 0.39

100× 1.30 0.11

表中的工作距离是指显微镜处于工作状态(物象调节清楚)时物镜的下表面与盖玻片(盖玻片的厚度一般为0.17mm)上表面之间的距离，物镜的放大倍数愈大，它的工作距离愈小。

显微镜的放大倍数是物镜的放大倍数与目镜的放大倍数的乘积，如物镜为10×，目镜为10×，其放大倍数就为10×10=100

三、实验器材

枯草芽孢杆菌及大肠杆菌固定片、二甲苯、香柏油、擦镜纸、显微镜

四、方法与步骤

1．低倍镜的使用方法

（1）取镜和放置：显微镜平时存放在柜或箱中，用时从柜中取出，右手紧握镜臂，左一手托住镜座,将显微镜放在自己左肩前方的实验台上，镜座后端距桌边1－2寸为宜，便于坐着操作。

（2）对光：用拇指和中指移动旋转器，使低倍镜对准镜台的通光孔。打开光圈，上升集光器，并将反光镜转向光源，以左眼在目镜上观察(右眼睁开),同时调节反光镜方向，直到视野内的光线均匀明亮为止，有内置光源的只需通过调节位于镜座上的光调节纽以调节进光强度。

（3）放置玻片标本：取一玻片标本放在镜台上，一定使有盖玻片的一面朝上，切不可放反，用推片器弹簧夹夹住，然后旋转推片器螺旋，将所要观察的部位调到通光孔的正中

（4）调节焦距：以左手按逆时针方向转动粗调节器，使镜台缓慢地上升至物镜距标本片约5毫米处，应注意在上升镜台时，切勿在目镜上观察。一定要从右侧看着镜台上升，以免上升过多，造成镜头或标本片的损坏。然后，两眼同时睁开，用左眼在目镜上观察，左手顺时针方向缓慢转动粗调节器，使镜台缓慢下降，直到视野中出现清晰的物象为止。

如果物象不在视野中心，可调节推片器将其调到中心(注意移动玻片的方向与视野物象移动的方向是相反的)。如果视野内的亮度不合适，可通过升降集光器的位置或开闭光圈的大小来调节，如果在调节焦距时，镜台下降已超过工作距离(>5.40mm)而未见到物象，说明此次操作失败，则应重新操作，切不可心急而盲目地上升镜台。

2．高倍镜的使用方法

（1）选好目标：一定要先在低倍镜下把需进一步观察的部位调到中心，同时把物象调节到最清晰的程度，才能进行高倍镜的观察。

（2）转动转换器，调换上高倍镜头，转换高倍镜时转动速度要慢，并从侧面进行观察(防止高倍镜头碰撞玻片)，如高倍镜头碰到玻片，说明低倍镜的焦距没有调好，应重新操作。

（3）调节焦距：转换好高倍镜后，用左眼在目镜上观察，此时一般能见到一个不太清楚的物象，可将细调节器的螺旋逆时针移动约0.5－1圈，即可获得清晰的物象(切勿用粗调节器!)

如果视野的亮度不合适，可用集光器和光圈加以调节，如果需要更换玻片标本时，必须顺时针(切勿转错方向)转动粗调节器使镜台下降，方可取下玻片标本。

3. 油镜的使用方法

（1）先用粗调节旋钮将镜筒提升（或将载物台下降）约2cm，并将高倍镜转出；

（2）在玻片标本的镜检部位滴上一滴香柏油；

（3）从侧面注视，用粗调节旋钮将载物台缓缓地上升，（或镜筒下降），使油浸物镜浸入香柏油中，使镜头几乎与标本接触；

（4）从接目镜内观察，放大视场光阑及聚光镜上的虹彩光圈（带视场光阑油镜开大视场光阑），上调聚光器，使光线充分照明。用粗调节旋钮将载物台徐徐下降（或镜筒上升），当出现物像一闪后改用细调节旋钮调至最清晰为止。如油镜已离开油面而仍未见到物象，必须再从侧面观察，重复上述操作；

（5）观察完毕，下降载物台，将油镜头转出，先用擦镜纸擦去镜头上的油，再用擦镜纸蘸少许乙醚酒精混合液（乙醚2份，纯酒精3份）或二甲苯，擦去镜头上残留油迹，最后再用擦镜纸擦拭2—3下即可，（注意向一个方向擦拭）；

（6）将各部分还原，转动物镜转换器，使物镜头不与载物台通光孔相对，而是成八字形位置，再将镜筒下降至最低，降下聚光器，反光镜与聚光器垂直，用一个干净手帕将接目镜罩好，以免目镜头沾污灰尘。最后用柔软纱布清洁载物台等机械部分，然后将显微镜放回柜内或镜箱中。

五、注意事项

1．持镜时必须是右手握臂、左手托座的姿势，不可单手提取，以免零件脱落或碰撞到其它地方。

2．轻拿轻放，不可把显微镜放置在实验台的边缘，以免碰翻落地。

3．保持显微镜的清洁，光学和照明部分只能用擦镜纸擦拭，切忌口吹手抹或用布擦，机械部分用布擦拭。

4．水滴、酒精或其它药品切勿接触镜头和镜台，如果沾污应立即擦净。

5．放置玻片标本时要对准通光孔中央，且不能反放玻片，防止压坏玻片或碰坏物镜。

6．要养成两眼同时睁开的习惯，以左眼观察视野，右眼用以绘图。

7．不要随意取下目镜，以防止尘土落入物镜，也不要任意拆卸各种零件，以防损坏。

8．使用完毕后，必须复原才能放回镜箱内，其步骤是：取下标本片，转动旋转器使镜头离开通光孔，下降镜台，平放反光镜，下降集光器(但不要接触反光镜)、关闭光圈，推片器回位，盖上绸布和外罩，放回实验台柜内。最后填写使用登记表。

六、作业

1、绘制杆菌个体形态图，比较枯草芽孢杆菌与大肠杆菌个体形态上的差异。

**实验二 培养基的制备及灭菌及斜面接种技术**

--------------------------------------------------------------------------------

一 、实验目的

1、明确培养基配制的原理及方法，了解培养基中各成分的作用；2、掌握高压蒸汽灭菌的原理和方法；3、学会包扎吸管、培养皿，制作棉塞。

二、基本原理

（一）培养基的制备原理

培养基是按照微生物生长发育的需要，用不同组分的营养物质调制而成的营养基质。人工制备培养基的目的，在于给微生物创造一个良好的营养条件。把一定的培养基放入一定的器皿中，就提供了人工繁殖微生物的环境和场所。自然界中，微生物种类繁多，由于微生物具有不同的营养类型，对营养物质的要求也各不相同，实验和研究目的也不同，所以培养基在组成原料上也各有差异。但是，不同种类和不同组成的培养基中，均应含有满足微生物生长发育的水分、碳源、氮源、无机盐和生长素以及某些特需的微量元素等。此外，培养基还应具有适宜的酸碱度(pH值)和一定缓冲能力及一定的氧化还原电位和合适的渗透压。

根据制备培养基对所选用的营养物质的来源，可将培养基分为天然培养基、半合成培养基和合成培养基三类。按照培养基的形态可将培养基分为液体培养基和固体培养基。根据培养基使用目的，可将培养基分为选择培养基、加富培养基及鉴别培养基等。

培养基的类型和种类是多种多样的，必须根据不同的微生物和不同的目的进行选择配制，本实验分别配制常用培养细菌、放线菌和真菌的牛肉膏蛋白胨培养基、高氏一号合成培养基和马铃薯蔗糖培养基等固体培养基。

固体培养基是在液体培养基中添加凝固剂制成的，常用的凝固剂有琼脂、明胶和硅酸钠，其中以琼脂最为常用，其主要成份为多糖类物质，性质较稳定，一般微生物不能分解，故用凝固剂而不致引起化学成份变化。琼脂在95℃的热水中才开始融化，融化后的琼脂冷却到45℃才重新凝固。因此用琼脂制成的固体培养基在一般微生物的培养温度范围内(25℃-37℃)不会融化而保持固体状态。

（二）高压蒸气灭菌原理

高压蒸汽灭菌是将待灭菌的物品放在一个密闭的加压灭菌锅内，通过加热，使灭菌锅隔套间的水沸腾而产生蒸汽。待水蒸汽急剧地将锅内的冷空气从排气阀中驱尽，然后关闭排气阀，继续加热，此时由于蒸汽不能溢出，而增加了灭菌器内的压力，从而使沸点增高，得到高于100℃的温度。导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。

在同一温度下，湿热的杀菌效力比干热大，其原因有三：一是湿热中细菌菌体吸收水分，蛋白质较易凝固，因蛋白质含水量增加，所需凝固温度降低，二是湿热的穿透力比干热大；三是湿热的蒸汽有潜热存在，每1克水在100℃时，由气态变为液态时可放出2.26kJ(千焦)的热量。这种潜热，能迅速提高被灭菌物体的温度，从而增加灭菌效力。

在使用高压蒸汽灭菌锅灭菌时，灭菌锅内冷空气的排除是否完全极为重要，因为空气膨胀压大于水蒸汽的膨胀压，所以，当水蒸汽中含有空气时，在同一压力下，含空气蒸汽的温度低于饱和蒸汽的温度。一般培养基用0.1MPa，121.3℃ 15-30分钟可达到彻底灭菌的目的。灭菌的温度及维持的时间随灭菌物品的性质和容量等具体情况而有所改变。

三、实验器材

1、 药品

HCL、NaOH，牛肉膏、蛋白胨、琼脂、NaCl、蒸馏水；

2、 材料

250或300ml烧杯，电子天平，试管，量筒，玻璃棒，药匙，pH试纸，分装漏斗，试管架，纱布，棉花，报纸，麻绳，标签等。

3、 设备

高压蒸汽灭菌锅、烘箱、冰箱、电炉等。

四、实验方法及步骤

1、称取药品放在大烧杯中，加入蒸馏水用玻璃棒搅拌并加热溶化，等药品溶解后用pH试纸调节pH至7.4-7.6，如有沉淀应过滤后分装，每支试管约加入不宜超过试管高度的1/5，每组分装3支，加上棉塞，包上报纸，准备灭菌。在分装过程中，应注意勿使培养基沾污管口或瓶口、以免弄湿棉塞，造成污染。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 培养基体积/ml | 牛肉膏/g | 蛋白胨/g | 琼脂/g | NaCl/g | 蒸馏水/ml |
| 100.0 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 0.5 | 100.0 |
| 300.0 | 1.5 | 3.0 | 6.0 | 1.5 | 300.0 |
| 500.0 | 2.5 | 5.0 | 10.0 | 2.5 | 500.0 |

2、高压灭菌

高压蒸汽灭菌锅的使用操作步骤：

 （1）首先将内层灭菌桶取出，再向外层锅内加入适量的水，使水面与三角搁架相平为宜。

 （2）放回灭菌桶，并装入待灭菌物品。注意不要装得太挤，以免防碍蒸汽流通而影响灭菌效果。三角烧瓶与试管口端均不要与桶壁接触，以免冷凝水淋湿包口的纸而透入棉塞。

 （3）加盖，并将盖上的排气软管插入内层灭菌桶的排气槽内。再以两两对称的方式同时旋紧相对的两个螺栓，使螺栓松紧一致，勿使漏气。

 （4）打开灭菌锅电源，设置灭菌温度及时间，本实验用0.1MPa，121.3℃，20分钟灭菌。

 （5）灭菌所需时间到后，让灭菌锅内温度自然下降，当压力表的压力降至0时，打开排气阀，旋松螺栓，打开盖子，取出灭菌物品。如果压力未降到0时，打开排气阀，就会因锅内压力突然下降，使容器内的培养基由于内外压力不平衡而冲出烧瓶口或试管口，造成棉塞沾染培养基而发生污染。

 （6）将取出的灭菌培养基制成斜面或平板，放入37℃温箱培养24小时，经检查若无杂菌生长，即可待用。

**3. 斜面接种**

这是将长在斜面培养基（或平板培养基）上的微生物接到另一支斜面培养基上的方法。

（1）接种前将桌面擦净，将所需物品整齐有序地放在桌上。

（2）将试管贴上标签，注明菌名、接种日期、接种人等。

（3）点燃酒精灯。

（4）将一支斜面菌种和一支待接的斜面培养基放在左手上，拇指压住两支试管，中指位于两支试管之间，斜面向上，管口齐平。

（5）右手先将棉塞拧松动，以便接种时拔出。右手拿接种环，在火焰上将环烧红以达到灭菌目的（包括可能进入试管的接种棒的部分都应灼烧）。

（6）在火焰旁，用右手小指、无名指和手掌夹住棉塞将它拔出。试管口在火焰上略微灼烧一下，将管口上可能沾染的少量菌或带菌尘埃烧掉。将烧过的接种环伸入菌种管内，先触及没长菌的培养基使环冷却，然后轻轻挑取少许菌种，将接种环抽出管外迅速伸入另一试管底部，在斜面上有底部向上进行“Z”字形划线。抽出接种环，将试管塞上棉塞并放回试管架上，最后再次烧红接种环。

五 思考题

1、在配制培养基的过程中应该注意那些问题，为什么？

2、高压蒸汽灭菌开始之前，为什么要将锅内的冷空气排尽？灭菌结束之后，为什么要等压力降到“0”后才能打开放气阀？

**实验三 细菌的简单染色与革兰氏染色**

--------------------------------------------------------------------------------

一、目的要求

1、学习细菌染色的原理和方法；

2、掌握细菌的简单染色法和革兰氏染色法。

二、基本原理

 用于生物染色的染料主要有碱性染料、酸性染料和中性染料三大类。碱性染料的离子带正电荷，能和带负电荷的物质结合。因细菌蛋白质等电点较低，当它生长于中性、碱性或弱酸性的溶液中时常带负电荷，所以通常采用碱性染料（如美蓝、结晶紫、碱性复红或孔雀绿等）使其着色。酸性染料的离子带负电荷，能与带正电荷的物质结合。当细菌分解糖类产酸使培养基pH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。

 简单染色法是只用一种染料使细菌着色以显示其形态，简单染色不能辨别细菌细胞的构造。

 革兰氏染色法是1884年由丹麦病理学家C.Gram所创立的。革兰氏染色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，是细菌学上最常用的鉴别染色法。

 细菌经结晶紫初染染成蓝色。革兰氏染色阳性菌（G+）细胞壁肽聚糖层数多，且肽聚糖为空间网状结构，再经乙醇脱水，网状结构更为致密，染料复合物不易从细胞内漏出，仍为蓝色。而革兰氏染色阴性菌（G-）细胞壁脂类含量多，肽聚糖层数少，且肽聚糖为平面片层结构，易被乙醇溶解，使细胞壁通透性增高，结合的染料复合物容易泄漏，细菌被脱色为无色，再经石炭酸复红稀释液复染成红色。



三、实验器材

1、菌种

枯草杆菌（Bacillus subtilis）、大肠杆菌（Escherichia coli）

2、染色液和试剂

结晶紫、卢哥氏碘液、95%酒精、蕃红、复红、二甲苯、香柏油

3、器材

废液缸、洗瓶、载玻片、接种杯、酒精灯、擦镜纸、显微镜

四、实验方法及步骤

1、简单染色

（1）涂片 取干净载玻片一块，在载玻片的左、右各加一滴蒸馏水，按无菌操作法取菌涂片，左边涂苏云金杆菌，右边涂大肠杆菌，做成浓菌液。再取

干净载玻片一块将刚制成的苏云金杆菌浓菌液挑2-3环涂在左边制成薄的涂面，将大肠杆菌的浓菌液取2-3环涂在右边制成薄涂面。亦可直接在载玻片上制薄的涂面，注意取菌不要太多。

（2）晾干 让涂片自然晾干或者在酒精灯火焰上方文火烘干；

（3）固定 手执玻片一端，让菌膜朝上，通过火焰2-3次固定（以不烫手为宜）；

（4）染色 将固定过的涂片放在废液缸上的搁架上，加复红染色1-2min；

（5）水洗 用水洗去涂片上的染色液；

（6）干燥 将洗过的涂片放在空气中晾干或用吸水纸吸干；

（7）镜检 先低倍观察，再高倍观察，并找出适当的视野后，将高倍镜转出，在涂片上加香柏油一滴，将油镜头浸入油滴中仔细调焦观察细菌的形态。

2、革兰氏染色

（1）涂片 与简单染色涂片相同；

（2）晾干 与简单染色法相同；

（3）固定 与简单染色法相同；

（4）结晶紫色染色 将玻片置于废液缸玻片搁架上，加适量（以盖满细菌涂面）的结晶紫染色液染色1分钟；

（5）水洗 倾去染色液，用水小心地冲洗；

（6）媒染 滴加卢哥氏碘液，媒染1min；

（7）水洗 用水洗去碘液；

（8）脱色 将玻片倾斜，连续滴加95%乙醇脱色20—25s至流出液无色，立即水洗；

（9）复染 滴加蕃红复染5min；

（10）水洗 用水洗去涂片上的蕃红染色液；

（11）晾干 将染好的涂片放空气中晾干或者用吸水纸吸干；

（12）镜检 镜检时先用低倍，再用高倍，最后用油镜观察，并判断菌体的革兰氏染色反应性；

五 注意事项

1、革兰氏染色成败的关键是酒精脱色。如脱色过度，革兰氏阳性菌也可被脱色而染成阴性菌；如脱色时间过短，革兰氏阴性菌也会被染成革兰氏阳性菌。脱色时间的长短还受涂片厚薄及乙醇用量多少等因素的影响，难以严格规定，需要多加练习；

2、选用幼龄的细菌。G+菌培养12h-16h，E.coli培养24h。若菌龄太老，由于菌体死亡或自溶常使革兰氏阳性菌转呈阴性反应.

六 实验报告

1、结果

（1） 绘制简单染色的细菌个体形态图；

（2） 绘制大肠杆菌、枯草杆菌和葡萄球菌的形态图，并注明各自的革兰氏染色的反应性。

2、思考题

当对未知菌进行革兰氏染色时，如何保证操作正确及结果可靠？

**实验四 微生物细胞大小的测定**

--------------------------------------------------------------------------------

一、实验目的

1. 了解目镜测微尺和镜台测微尺的构造和基本原理

2. 学习并掌握使用测微尺测量菌体大小的方法

二、实验原理

微生物细胞大小是微生物重要的形态特征之一，也是分类鉴定的依据之一。由于菌体微小，只能在显微镜下测量。用于测量微生物细胞大小的工具有目镜测微尺和镜台测微尺。

1. 目镜测微尺

目镜测微尺是一块圆形玻片，在玻片中央将5mm长度刻成50等分，或将10mm长度刻成100等分。测量时，将其放在目镜中的隔板上（此处正好与物镜放大的中间物像重叠），用于测量经显微镜放大后的细胞物像。由于不同目镜、物镜组合的放大倍数不同，目镜测微尺每格实际表示的长度也不一样，因此目镜测微尺测量微生物大小时须用置于载物台上的镜台测微尺校正，以求出在一定放大倍数下，目镜测微尺每小格所代表的相对长度。

2. 镜台测微尺

镜台测微尺是中央部分刻有精确等分线的载玻片，一般将1mm等分为100格（或2mm等分为200格），每格长度等于0.01mm（即10μm），用于校正目镜测微尺每个长度。校正时，将镜台测微尺放在载物台上，由于镜台测微尺与细胞标本是处于同一位置，都要经过物镜和目镜的两次放大成像进入视野，即镜台测微尺随着显微镜总放大倍数的放大而放大。因此从镜台测微尺上得到的读数就是细胞的真实大小，所以用镜台测微尺的已知长度在一定放大倍数下校正目镜测微尺，即可求出目镜测微尺每格所代表的实际长度，然后移去镜台测微尺，换上待测标本片，用校正好的目镜测微尺在同样放大倍数下测量微生物细胞的大小。

三、实验材料

1. 菌种

枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌染色标本片。

2. 仪器

显微镜、目镜测微尺、镜台测微尺。

3. 其他

载玻片、滴管、擦镜纸

四、操作步骤

1. 目镜测微尺的校正

取出显微镜目镜，将目镜测微尺的刻度朝下轻轻装入目镜隔板上，把镜台测微尺置于载物台上，刻度朝上。先用低倍镜观察，对准焦距，视野中看清镜台测微尺的刻度后，转动目镜，使目镜测微尺与镜台测微尺的刻度平行，移动载物台位置，使目镜测微尺与镜台测微尺的“0”刻度完全重合，定位后，仔细寻找两尺第二个完全重合的刻度，然后计算两对重合线之间各自所占的格数。

根据计数得到的目镜测微尺和镜台测微尺重合线之间各自所占的格数，换算出目镜测微尺每小格所代表的实际长度。

例如，目镜测微尺20小格等于镜台测微尺3小格，已知镜台测微尺每格为10μm，则3小格的长度为3×10=30μm，那么相应地在目镜测微尺上每格长度为：3×10/20=1.5μm.。

用同样的方法分别校正在不同放大倍数的物镜下，目镜测微尺每格所代表的实际长度。

当更换不同显微镜目镜或物镜时，必须重新校正目镜测微尺每小格代表的实际长度。

2. 细胞大小的测定

移去镜台测微尺，换上细菌标本片，先在低倍镜下找到目的物，然后在油镜下用目镜测微尺来测量菌体的长宽各占几格（不足一格的部分估计到小数点后一位），一般测量菌体的大小要在同一标本片上测定10～20个菌体，求出平均值，才能代表该菌的大小

测量结束后将目镜测微尺和镜台测微尺分别用擦镜纸擦拭后，放回盒内保存。

五、实验报告

1. 将目镜测微尺校正结果填入下表内

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 镜头倍数（目镜×物镜） | 镜台测微尺格数 | 目镜测微尺格数 | 目镜测微尺每格长度/μm |
|  |  |  |  |

2. 将各菌测定结果填入下表中

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 项目 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 评价 |
| 枯草杆菌 | 长 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 宽 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 大肠杆菌 | 长 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 宽 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 葡萄球菌 | 直径 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

3. 结果计算

菌长（μm）= 平均格数×校正值

菌宽（μm）= 平均格数×校正值

菌直径（μm）= 平均格数×校正值

大小表示：杆菌= 长（μm）×宽（μm）

 球菌= π(直径/2)2

六、思考题

1. 为什么更换不同放大倍数的目镜或物镜时必须用镜台测微尺进行校正。

2. 若不改变目镜和目镜测微尺，改用不同放大倍数的物镜来测定同一细菌的大小时，其测定结果是否相同？为什么？

**实验五 细菌纯种分离技术及菌落总数(CFU)的测定**

一．细菌纯种分离技术

（一）、实验目的

掌握从环境（土壤、水体、活性污泥、垃圾、堆肥等）中分离培养细菌的方法，从而获得若干种细菌纯培养技能

（二）．仪器和材料

无菌培养皿；无菌移液管1ml、10ml；琼脂培养基；活性污泥或土壤或湖水一瓶；无菌水；接种环；酒精灯；恒温箱

（三）、细菌纯种分离的操作方法

细菌纯种分离的方法有两种：稀释平板法和平板划线法

**Ⅰ 稀释平板分离法**

1. 取样

用无菌锥形瓶到现场取一定量的活性污泥或土壤或湖水，迅速带回实验室。

2. 稀释水样

将1瓶90ml和5管9ml的无菌水排列好，按10-1、10-2、10-3、10-4、10-5及10-6依次编号。在无菌操作条件下，用10ml的无菌移液管吸取10ml水样（或其他样品10g）置于第一瓶90ml无菌水（内含玻璃珠）中，将移液管吹洗三次，用手摇10min将颗粒状样品打散。即为10-1浓度的菌液。用1ml无菌移液管吸取1ml10-1浓度的菌液于一管9ml无菌水中，将移液管吹洗三次，摇匀即为10-2浓度菌液。同样方法，依次稀释到10-6。

3. 平板的制作

取10套无菌培养皿编号，10-4、10-5、10-6各3个，另一个为空气对照。取1支1ml无菌移液管从浓度小的10-6菌液开始，以10-6、10-5、10-4为序分别吸取0.5ml菌液于相应编号的培养皿内（注：每次吸取前，用移液管在菌液中吹泡使菌液充分混匀）加热融化培养基，当培养基冷却至45℃左右时，右手拿装有培养基的锥形瓶，左手拿培养皿，以中指、无名指和小指托住皿底，拇指和食指夹住皿盖，靠近火焰，将皿盖掀开，倒入培养基后将培养皿平放在桌上，顺时针和反时针来回转动培养皿，使培养基和菌液充分混匀，冷凝后即成平板，倒置于30℃培养24～48h，然后观察结果。

**Ⅱ 平板划线分离法**

1. 平板的制作

将融化并冷却至约50℃的肉膏蛋白胨琼脂培养基倒入无菌培养皿内，使凝固成平板。

2. 操作

用接种环挑取一环活性污泥（或土壤悬液等），左手拿培养皿，中指、无名指和小指托住皿底，拇指和食指夹住皿盖，将培养基稍倾斜，左手拇指和食指将皿盖掀半开，右手将接种环伸入培养皿内，在平板上轻轻划线（切勿划破培养基），划线的方式可取下图中任何一种。划线完毕盖好皿盖，倒置，30℃培养24～48h后观察结果。

二．细菌菌落总数（CFU）的测定

（一） 细菌菌落总数

细菌菌落总数（CFU）是指1ml水样在营养琼脂培养基中，于37℃培养24h后所生长的腐生性细菌菌落总数。它是有机物污染程度的指标，也是卫生指标。在饮用水中所测得的细菌菌落总数除说明水被生活废弃物污染程度外，还指示该饮用水能否饮用。但水源水中的细菌菌落总数不能说明污染的来源。因此，结合大肠菌群数以判断水的污染源的安全程度就更全面。

我国现行生活饮用水卫生标准（BG5749-85）规定：细菌菌落总数在1ml自来水中不得超过100个。

（二）原理

细菌种类很多，有各自的生理特性，必须用适合它们生长的培养基才能将它们培养出来。然而，在实际工作中不易做到，通常用一种适合大多数细菌生长的培养基培养腐生性细菌，以它的菌落总数表明有机物污染程度

（三）仪器和材料

同上

（四）实验内容与操作方法

1. 生活饮用水

以无菌操作方法，用无菌移液管吸取1ml充分混匀的水样注入无菌培养皿中，倾注入约10ml已融化并冷却至45℃左右的营养琼脂培养基，平放于桌上迅速旋摇培养皿，使水样与培养基充分混匀，冷凝后成平板。每个水样倒三个平板。另取一个无菌培养皿倒入培养基冷凝成平板作空白对照。将以上所有平板倒置于37℃恒温箱内培养24h，计菌落数。算出三个平板上长的菌落总数的平均值即为1ml水样中的细菌总数。

2. 水源水

在无菌操作条件下，以10倍稀释法稀释水样，视水体污染程度定稀释倍数。取在平板上能长出30～300个菌落的该种水样的稀释倍数。

用无菌移液管吸取三个是以浓度的稀释液1ml（或0.5ml）加入无菌培养皿内，再倒培养基，冷凝后倒置37℃恒温箱中培养24h，之后取出计菌落数。

（五）菌落计数及报告方法

用肉眼观察，计平板上的细菌菌落数，也可用放大镜和菌落计数器计数。记下同一浓度的三个平板的菌落总数，计算平均值，再乘以稀释倍数即1ml水样中的细菌菌落总数。各种不同情况的计算方法如下：

①首先选择平均菌落数在30～300之间者进行计算，当只有一个稀释度的平均菌落符合此范围时，则以该平均菌落数乘其稀释倍数报告之。

②若有两个稀释度的平均菌落数均在30～300之间，则按两者之菌落总数之比值来决定，若其比值小于2应报告两者之平均数，若大于2则报告其中较小的菌落总数。

③若所有稀释度的平均菌落数均大于300，则应按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数报告之。

④若所有稀释度的平均菌落数均小于30，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告之。

⑤若所有稀释度的平均菌落数均不在30～300之间，则以最接近300或30的平均菌落数乘以稀释倍数报告之。

⑥在求同稀释度的平均数时，若其中一个平板上有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作物该稀释度的平均菌落数。若片状菌落约为平板的一半，二另一半平板上菌落数分布很均匀，则可按半平板上的菌落计数，然后乘以2作为整个平板的菌落数。

⑦菌落计数的报告，菌落数在100以内时按实有数报告，大于100时，采用二位有效数字，在二位有效数字后面的位数，以四舍五入方法计算。为了缩短数字后面的零数，可用10的指数来表示。在报告菌落数为“无法计数”时，应注明水样的稀释倍数。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 例次 | 不同稀释度的平均菌落数 | 两个稀释度菌落数之比 | 菌落总数/CFU·ml-1 | 报告方式/CFU·ml-1 |
| 10-1 | 10-2 | 10-3 |
| 1 | 1365 | 164 | 20 | — | 16400 | 16000或1.6×104 |
| 2 | 2760 | 295 | 46 | 1.6 | 37750 | 38000或3.8×104 |
| 3 | 2890 | 271 | 60 | 2.2 | 27100 | 27000或2.7×104 |
| 4 | 无法计算 | 4650 | 513 | — | 513000 | 510000或5.1×105 |
| 5 | 27 | 11 | 5 | — | 270 | 270或2.7×102 |
| 6 | 无法计算 | 305 | 12 | — | 30500 | 31000或3.1×104 |