

微生物学基础实验

共七次课：

前四次课需要用到显微镜，在A224上课；

后三次课为综合性实验，在A105上课；

虚拟仿真实验用自己的电脑在课余时间完成。

实验课成绩组成

实验成绩（占整个课程成绩的**30%**）：

- ❑ 实验报告（**40%**）：主要考查画图能力及结果分析能力；
- ❑ 平时操作（**40%**）：考查听课是否认真，实验操作是否规范，结果是否可靠等；
- ❑ 考勤及卫生（**10%**）：上课是否迟到、早退等，课后是否按要求打扫卫生；
- ❑ 虚拟仿真实验（**10%**）：是否按时、按要求完成实验。

虚拟仿真实验（约4学时）

实验内容：

- 1、耐镉细菌的筛选
- 2、基于16S rRNA基因序列分析的细菌鉴定
- 3、金属有机骨架包被增强细菌的镉吸附能力



<https://shijian.hzau.edu.cn/portal/#/home/virtualsimulationexperiment/experimentdetails?id=54>, **耐镉细菌的筛选、鉴定与功能优化虚拟仿真实验**, 右上角点击“登录”，通过“统一身份认证”进行登录（账号：学号；密码：学号后6位），点击“进入实验”。

注意：需要用校园网才能登录，若是仍登录不上，请换个浏览器再试。每一个小实验均会对应一个成绩，请大家及时截图保存，以应对成绩上传失败的情况发生。

完成时间：

- 1、理论课上学完**原核微生物的分离（第二章内容）** 后**2周内** 利用课余时间完成（**约4小时**）；
- 2、分为练习模式和考核模式，**选其一**做就可以。

实验课注意事项

课堂纪律

- 不得迟到，不得早退，不得缺课，
- 如果确实有紧急的事情，可以调课，但仅限当周调课。
- 不允许在实验室吃东西，打闹，女生长发需扎起来。
- 穿工作服进实验室。

清洁和卫生

所有人员：实验结束后所有用到仪器，试剂和材料都要处理好，并放到指定的位置；台面清洁干净。

值日生：要作好值日工作，公共台面，扫地，拖地，关好水、电。在实验老师记录本登记后方可离开实验室。

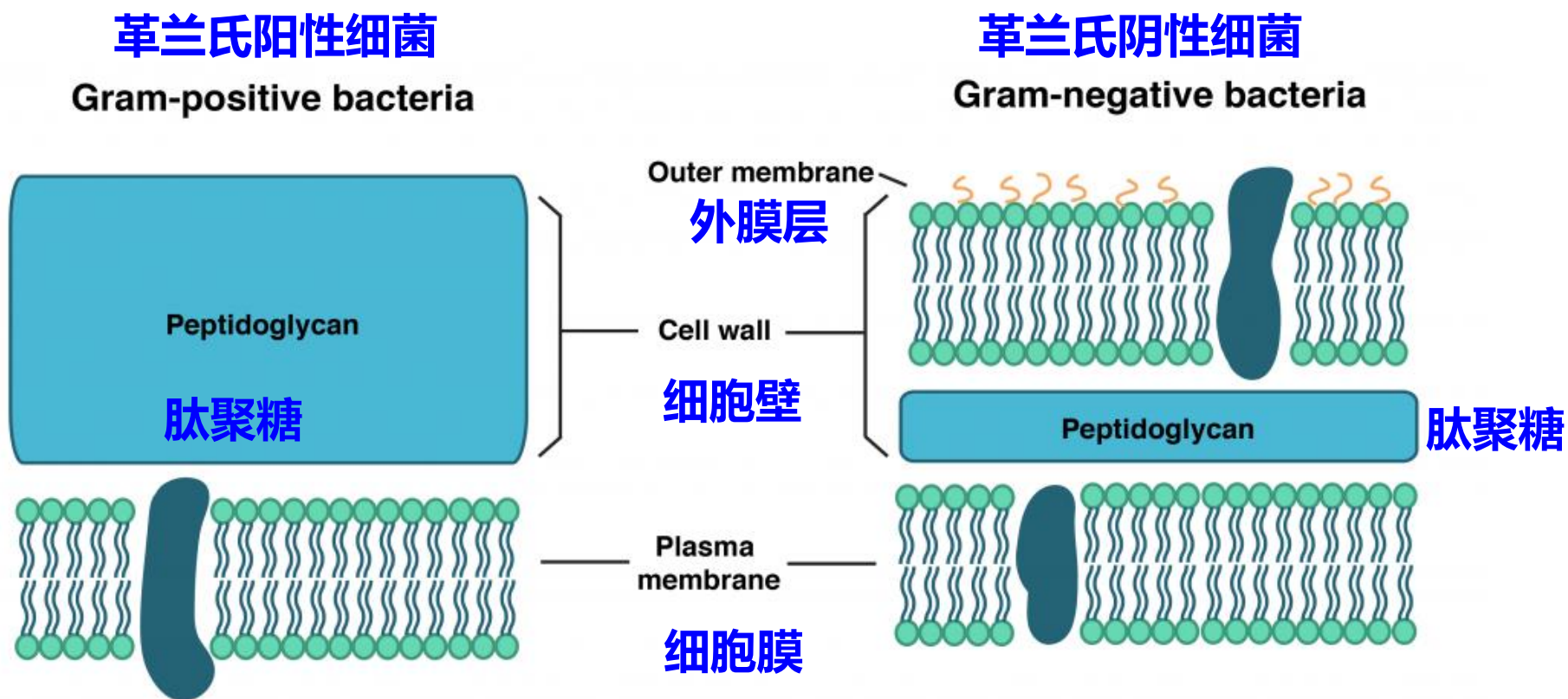
实验一 细菌的革兰氏染色

一、实验目的：

- 1、学习普通光学显微镜的使用
- 2、学习革兰氏染色法

二、实验原理：

革兰氏染色法之所以能将细菌分为**革兰氏阳性菌**（ G^+ ）与**革兰氏阴性菌**（ G^- ），是由于这两种细菌的**细胞壁结构和组成**不同决定的。



Steps:

GRAM-POSITIVE



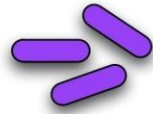
Fixation



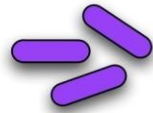
Crystal Violet



Iodine Treatment



Decolorisation



Counter stain with
Safranin

紫色

GRAM-NEGATIVE



固定



结晶紫初染



碘液媒染



乙醇脱色 (关键)



番红复染

红色

革兰氏阳性菌 (G⁺)

细胞壁中肽聚糖层厚且交联度高，
类脂质含量低

↓ 乙醇脱色

肽聚糖层的网状结构孔径缩小，
通透性降低



初染和媒染形成的**结晶紫-碘复合物**不易洗脱而保留在细胞内

↓ 番红复染

仍为紫色

革兰氏阴性菌 (G⁻)

细胞壁中肽聚糖层较薄且交联度低；
含有较多易被乙醇溶解的类脂质

↓ 乙醇脱色

溶解了类脂质，增加了细胞壁的通透性



初染的结晶紫-碘复合物易于渗出，
细菌脱为**无色**

↓ 番红复染

染为红色

三、实验菌种：

金黄色葡萄球菌 （*Staphylococcus aureus*）

大肠杆菌 （*Escherichia coli*）

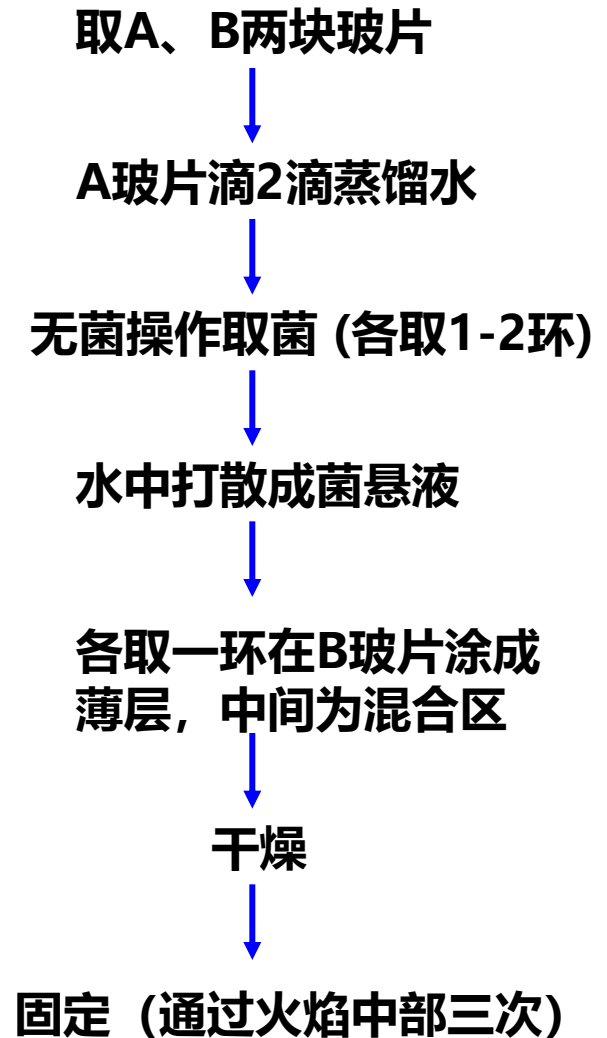
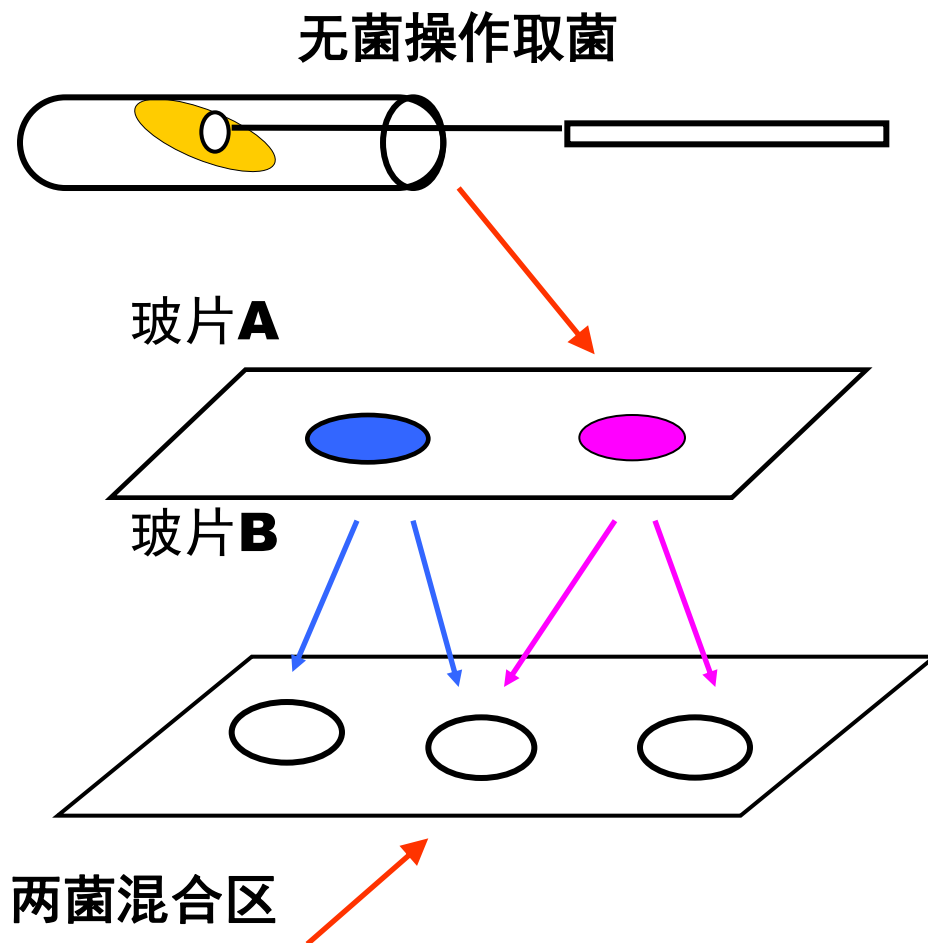
四、试剂及染料：

{ 结晶紫、卢哥氏碘液
95% 乙醇
番红

香柏油、二甲苯、擦镜纸

五、实验步骤：

(一) 制涂片



(二) 染色

- 1、**初染**：滴结晶紫，染 1 分钟，水洗。
- 2、**媒染**：滴碘液染 1 分钟，水洗。
- 3、**脱色**：用 95% 乙醇连续冲洗玻片 20 秒，立即水洗。
- 4、**复染**：番红染色 2-3 分钟，水洗。吸水纸吸去多余水分。

显微镜使用

原理：

$$N.A = n \cdot \sin(\alpha/2)$$

N.A（数值孔径）与显微镜的分辨力成正比， n 为介质折射率， α 为物镜的镜口角，总是小于 180° 。

空气的介质折射率为**1.0**，水为**1.33**，玻璃为**1.5**，香柏油为**1.52**



(三) 镜检：

- 1、玻片放显微镜载物台上，固定好，打开电源，起始光源强度为弱，载物台调至最高；
- 2、粗调，10x物镜下找到视野，微调至最清晰，再将物镜调至40x，光圈调大，光强调亮，微调看清物像后，将40x镜头旋开，使待观察区域处于40x和100x之间；
- 3、在玻片上待观察的区域滴加一滴香柏油（**双层瓶的上层液体**），镜头浸入油滴中，再调焦观察。

(四) 镜头清理：

100x物镜用后，将二甲苯（双层瓶的下层液体）滴在擦镜纸上，擦去镜头的香柏油。其他镜头的污垢也可用二甲苯。

注意：“三次三张”要用擦镜纸，不能使用卫生纸！

注意事项:

- 1、先低倍、后高倍、最后是油镜，光的亮度先暗后亮；
- 2、高倍及油镜下使用微调螺旋，不能使用粗调，以免镜头压碎载玻片；
- 3、100x才滴油，其它镜头不能滴油；
- 4、油镜镜头需清理干净（**三次三张，需使用擦镜纸**）。

香柏油在双层瓶上层，二甲苯在下层，不可滴错！！！！

六、作业：

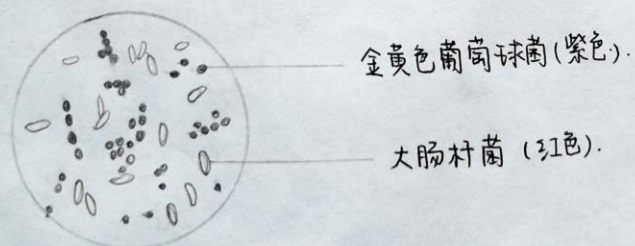
绘出100x油镜下*S. aureus*和*E. coli*的菌体形态图，革兰氏染色请标明革兰氏反应结果。（真实，美观，图例详细）

实验报告统一格式

1. 实验目的
2. 实验原理
3. 实验材料
4. 实验方法和步骤
5. 实验结果和分析

优秀实验报告范例

五、实验结果和分析:



大肠杆菌经革兰氏染色后呈红色,为革兰氏阴性菌
金黄色葡萄球菌经革兰氏染色后呈紫色,为革兰氏阳性菌,但也有小部分
老龄的G⁺会被染红造成假阴性,这是由于细胞壁老化,不能在乙醇
处理时让结晶紫留在细胞壁造成的。

3. 100×物镜用后,将二甲苯滴在擦镜纸上,擦去镜头的香柏油。

五、实验结果及分析

