

实验四 微生物细胞大小和数量的测定

- 目的要求
- 实验材料
- 实验程序
- 思考题

目的要求

- 学习使用目镜测微尺和镜台测微尺在显微镜下测定微生物大小的方法。
- 学习使用血球记数板测定微生物数量的方法。

实验材料

显微镜、目镜测微尺、镜台测微尺、细菌染色片、血球记数板、酵母菌悬液、盖玻片、无菌滴管、西水纸、擦镜纸、香柏油、二甲苯。

实验程序

- 测定微生物的大小
- 测定微生物数量

实验程序：测定微生物的大小

测定的工具：目镜测微尺 镜台测微尺

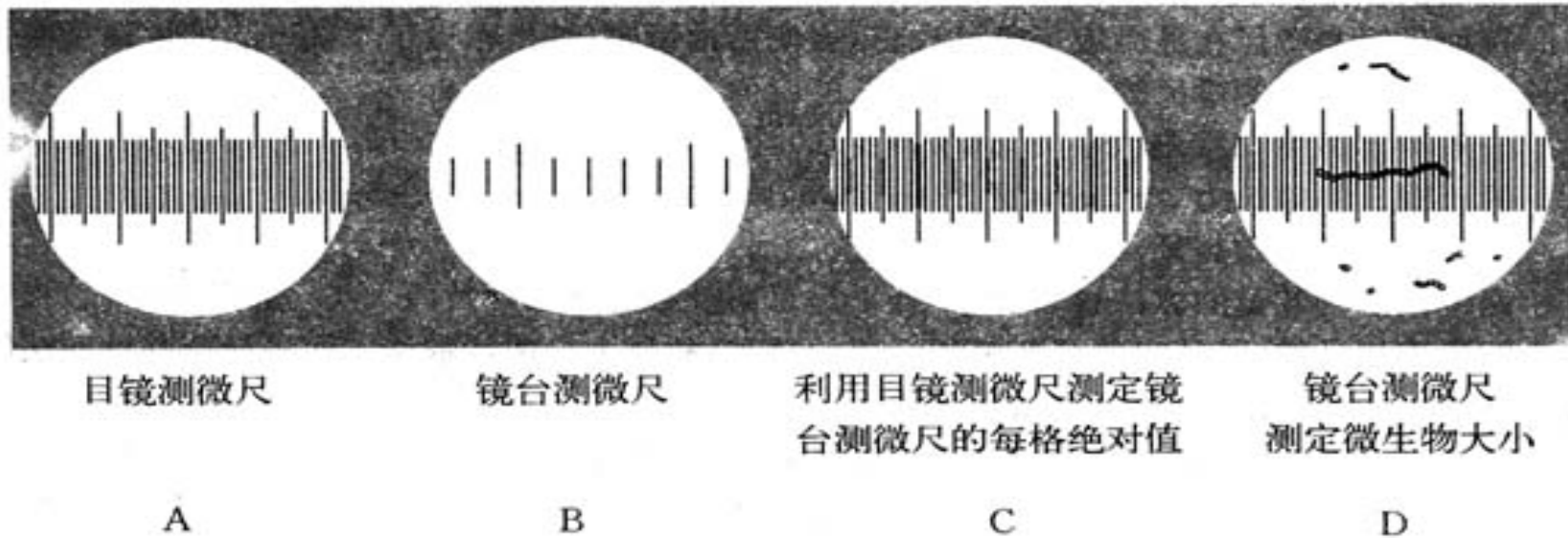


图 5—1 目镜测微尺(A)、镜台测微尺(B)及其校正(C)与测量(D)

实验程序：测定微生物的大小

- **目镜测微尺的校正：**在高倍镜下，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，移动推动器，使目镜测微尺的0点与镜台测微尺的某一刻度重合，然后，仔细寻找两尺第二个完全重合的刻度。计算两刻度间目镜测微尺的格数和镜台测微尺的格数。由于镜台测微尺的刻度每格长 $10\mu\text{m}$ ，所以可得：
目镜测微尺每格长度（ μm ）=（镜台测微尺格数 $\times 10$ ）/目镜测微尺格数
注意：校正目镜测微尺必须针对特定的显微镜和附件（特定的接物镜、接目镜、镜筒长度等）进行，而且只能在这特定的情况下才可重复使用。
- **菌体大小的测定：**取下镜台测微尺，将细菌染色标本置于载物台上，然后在油镜下用目镜测微尺测量菌体的长和宽。

实验程序：测定微生物数量

- 方法：活菌计数法——平板菌落计数法；总菌计数法——血球计数板或霍瑟（Peroff Hausser）细菌计数板（二者原理和部件相同，只是厚薄不同而已）。

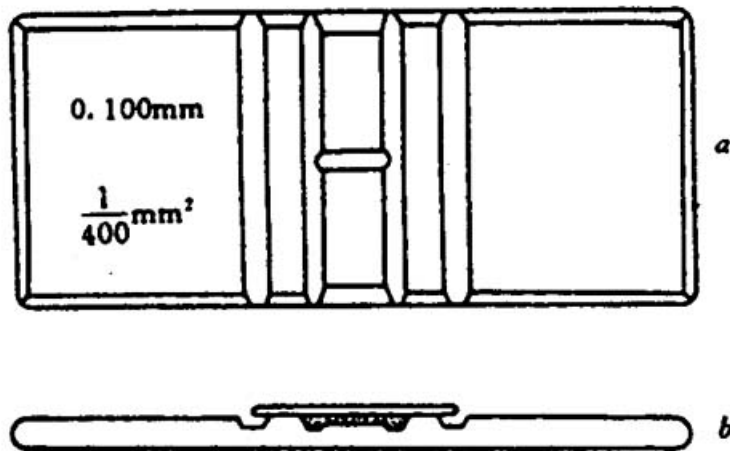


图 5—2 血球计数板构造

上：俯视图（中间平台分为两半，各刻有一个方格网）

下：侧面图（中间平台与盖玻片之间有高度为 0.1mm 的间隙）

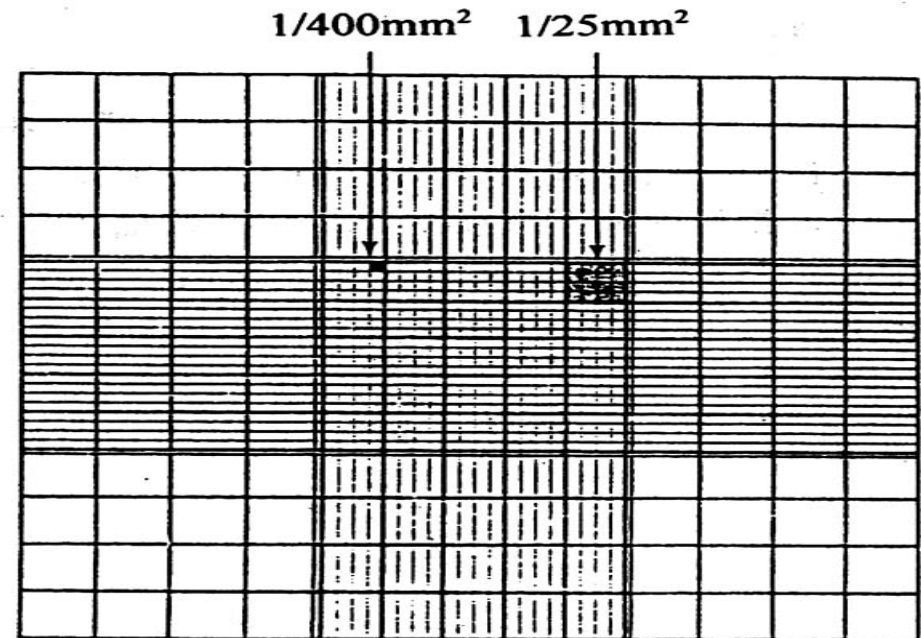


图 5—3 计数网的分区和分格

实验程序:测定微生物数量

- 本实验用血球计数板计数酵母菌的数量
 1. 取清洁无油的血球计数板，在计数室上面加盖玻片。
 2. 取酵母菌液，摇匀，用滴管由盖玻片边缘滴一小滴，使菌液自行渗入，计数室内不得有气泡。
 3. 静止5min后，用低倍镜观察并将计数室移至视野中央。
 4. 在高倍镜下计数：随机计数五个中格的平均值，然后求得每个中格的平均值。乘上**16**（或**25**）就得出一大格中的总菌数，最后再换算到每mL菌液中的含菌数。

实验程序

5. 计算方法:

$$\text{酵母菌细胞数/mL} = \frac{(X1+X2+X3+X4+X5)}{5} \times 25 \text{ (或16)} \times 10 \times 1000 \times \text{稀释倍数}$$

6. 注意事项: 压在方格线上的菌体, 以压在底线和右侧线上的菌体计入本格内; 遇到有芽体的酵母时, 若芽体和母体同等大, 就按单个酵母计数。

7. 计数完毕后, 血球计数板要立即清洗干净, 并用吸水纸吸干, 最后用擦镜纸擦干净, 并放回盒内。

思考题

- 为什么目镜测微尺必须用镜台测微尺来校正？
- 在显微镜下直接测定微生物数量有什么优缺点？