

微生物大小的测定和显微直接计数

孔召玉

kongzhaoyu@hotmail.com

南昌大学生命学院

一、实验目的

- 1、学习并掌握测微尺和血球计数板的使用方法。
- 2、掌握对不同形态细菌细胞大小的分类学基本要求，增强对微生物细胞大小的感性认识。

二、实验材料

- 1、显微镜、镜台测微尺（物镜测微尺）、目镜测微尺、血球计数板、载玻片等。
- 2、麦芽汁培养基、细菌三型片、酵母菌。
- 3、吸管、吸水纸等。

三、实验原理

(一) 微生物大小的测定原理

微生物大小的测定，借助于特助的测量工具——显微测微尺，包括目镜测微尺和镜台测微尺。

测微尺的构造和使用方法

(1) 目镜测微尺的构造 目镜测微尺是一块圆形玻片，其中央刻有精确的刻度，通常是将5mm划分为50格，实际每格等于 $100\ \mu\text{m}$ 。测量时需将其放在接目镜中的隔板上。刻度的大小是随使用的目镜和物镜的放大倍数而改变，用前必须用物镜测微尺来标定，[如图](#)。

(2) 镜台测微尺的构造 镜台测微尺为一块特制的载玻片，其中央有一小圆圈。圆圈内刻有分度，将长1mm的直线等分为100小格，每小格等于 $10\ \mu\text{m}$ ，[如图](#)。镜台测微尺并不直接测量细胞的大小，而是用于校正目镜测微尺每格的相对长度。

- 所有微生物的大小需要用刻有一定刻度的测微尺来测量，先用绝对长度的镜台测微尺来校正不表示绝对长度的目镜测微尺，计算后者每格所代表的实际长度。
- 然后放上待测的标本，用目镜测微尺测定标本上微生物细胞占目镜测微尺的格数，就可计算该微生物的大小。

(二) 显微镜直接计数原理

微生物常用的计数方法有两种，即直接计数法和间接计数法。前者利用血球计数板在显微镜下直接计数，能立即得到数值，但死活细胞都计数在内。后者是在平板上长成菌落后再计数，反应较真实，但费时太长。

本实验是利用血球计数板进行直接计数。计数前需对样品做适当稀释，按照规定方法及计算公式运算后，即可得出实际数值。

四、操作方法

1. 目镜测微尺的标定

(1)取下接目镜，旋下目镜上的目透镜，将目镜测微尺放入接目镜的中隔板上，使有刻度的一面朝下，再旋上目透镜，并装入镜筒内。

(2)将镜台测微尺置于显微镜的载物台上，使有刻度的一面朝上，同观察标本一样，使具有刻度的小圆圈位于视野中央。

(3)先用低倍镜观察，对准焦距，待看清镜台测微尺的刻度后，转动目镜，使目镜测微尺的刻度与镜台测微尺的刻度相平行，并使两尺的左边第一条线相重合，再向右寻找两尺的另外一条重合线。[如图](#)

(4)记录二条重合线间的目镜测微尺的格数和镜台测微尺的格数。

2. 计算方式

由于已知镜台测微尺每格长 $10\ \mu\text{m}$ ，根据下列公式即可分别计算出在不同放大倍数下，目镜测微尺每格所代表的长度

$$\text{目镜测微尺每格长度} (\mu\text{m}) = \frac{\text{两重合线间镜台测微尺格数} \times 10}{\text{两重合线间目镜测微尺格数}}$$

如此测定后的目镜测微尺的尺度，仅适用于测定时所用的显微镜的目镜和物镜的放大倍数。若更换物镜、目镜的放大倍数时，必须再进行校正标定。

3. 细菌大小的测定

- (1)取下镜台测微尺，换上细菌三型片。
- (2)测量菌体的长度和宽度各占目镜测微尺几格，然后换算出菌体的实际长度。
- (3)在同一标本上测定5-10个菌体，求其平均值。

(二) 显微镜直接测定酵母细胞数的操作方法

1. 血球计数板的构造

血球计数板是由一块比普通载玻片厚的特制玻片制成的。玻片中有四条下凹的槽，构成三个平台。中间的平台较宽，其中间又被一短横槽隔为两半，每半边上面刻有一个方格网。方格网上刻有9个大方格，其中只有中间的一个大方格为计数室，供微生物计数用。这一大方格为边长为1mm正方形，深度为0.1mm，其体积为 0.1mm^3 。

计数室通常有两种规格。一种是大方格内分为16中格，每一中格又分为25小格；另一种是大方格内分为25中格，每一中格又分为16小格。但是不管计数室是哪一种构造；它们都有一个共同的特点，即每一大方格都是由 $16 \times 25 = 25 \times 16 = 400$ 个小方格组成。[如图](#)

2. 血球计数板的使用

- (1)用血球计数板计数酵母菌悬液的酵母菌个数。
- (2)样品稀释的目的是便于酵母菌悬液的计数，以每小方格内含有4-5个酵母细胞为宜，一般稀释10倍即可。

(3) 将血球计数板用擦镜纸擦净，在中央的计数室上加盖专用的盖玻片。

(4) 将稀释后的酵母菌悬液，用吸管吸取一滴置于盖玻片的边缘，使菌液缓缓渗入，多余的菌液用吸水纸吸取，稍待片刻，使酵母菌全部沉降到血球计数室内。

(5) 计数时，如果使用16格×25格规格的计数室，要按对角线位，取左上、右上、左下、右下4个中格（即100个小格）的酵母菌数。如果规格为25格×16格的计数板，除了取其4个对角方位外，还需再数中央的一个中格(即80个小方格)的酵母菌数。

(6) 当遇到位于大格线上的酵母菌，一般只计数大方格的上方和右方线上的酵母细胞(或只计数下方和左方线上的酵母细胞)。

(7) 如遇到酵母出芽，芽体大小达到母细胞的一半时，即作为两个菌体计数。

(8) 计数一个样品要从两个计数室中计得平均值，按下列公式计算每1 ml菌液中所含的酵母菌个数。

3. 计算公式

(1) **25小格 × 16中格**的血球计数板计算公式:

$$\text{酵母细胞数} / \text{ml} = 100 \text{小格内酵母细胞个数} / 100 \times 400 \times 10^4 \times \text{稀释倍数}$$

(2) **16小格 × 25中格**的血球计数板计算公式:

$$\text{酵母细胞数} / \text{ml} = 80 \text{小格内酵母细胞个数} / 80 \times 400 \times 10^4 \times \text{稀释倍数}$$

4. 血球计数板的清洁

血球计数板使用后，用自来水冲洗，切勿用硬物洗刷，洗后自行晾干或用吹风机吹干，或用95%的乙醇、无水乙醇、丙酮等有机溶剂脱水使其干燥。通过镜检观察每小格内是否残留菌体或其他沉淀物。若不干净，则必须重复清洗直到干净为止。

杆菌和螺旋菌大小测定记录

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
宽度											
长度											

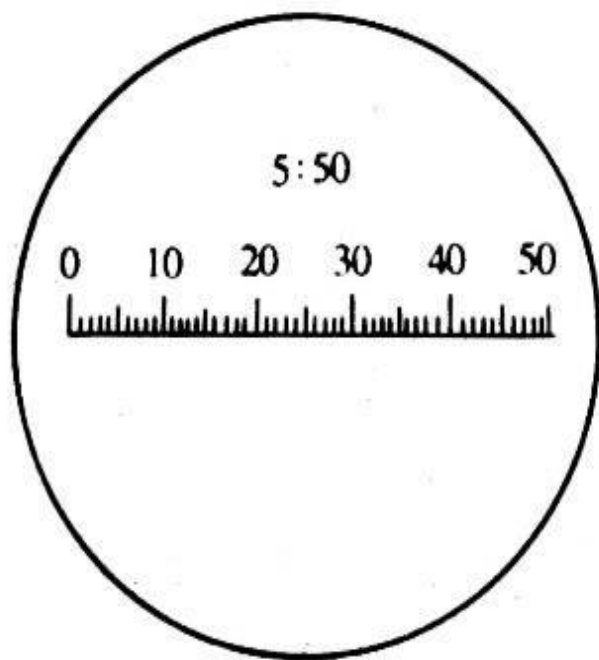
各菌测定结果

微生物名称	目镜测微尺每格代表的长度/ μm	宽		长		菌体大小范围/ μm
		目镜测微尺格数	宽度/ μm	目镜测微尺格数	长度/ μm	
球菌						
杆菌						
螺旋菌						

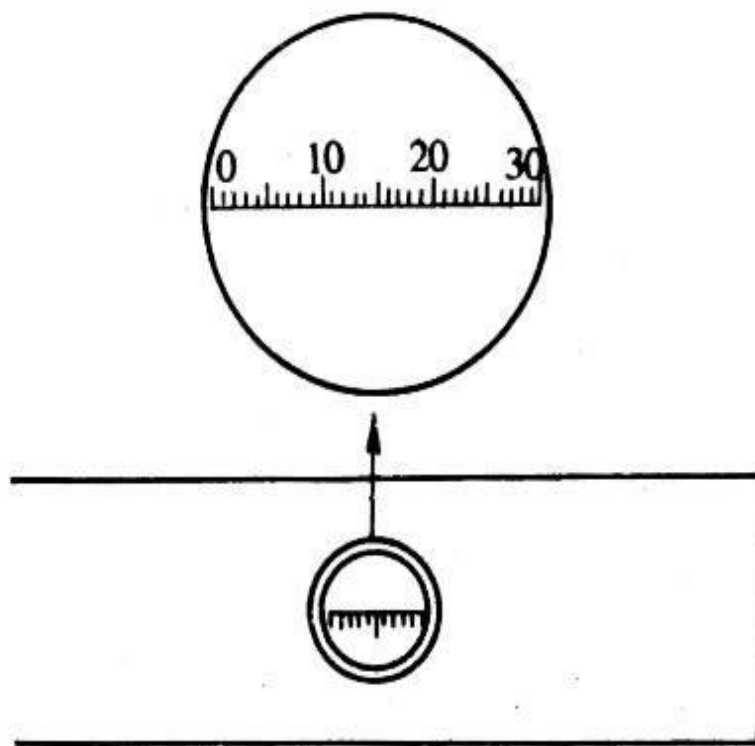
2、显微镜直接计数结果

将结果记录于下表中，A表示五个中方格中的总菌数；B表示菌液稀释倍数。

	各中格中菌数					A	B	二室平 均值	菌数/ml
	1	2	3	4	5				
第一室									
第二室									

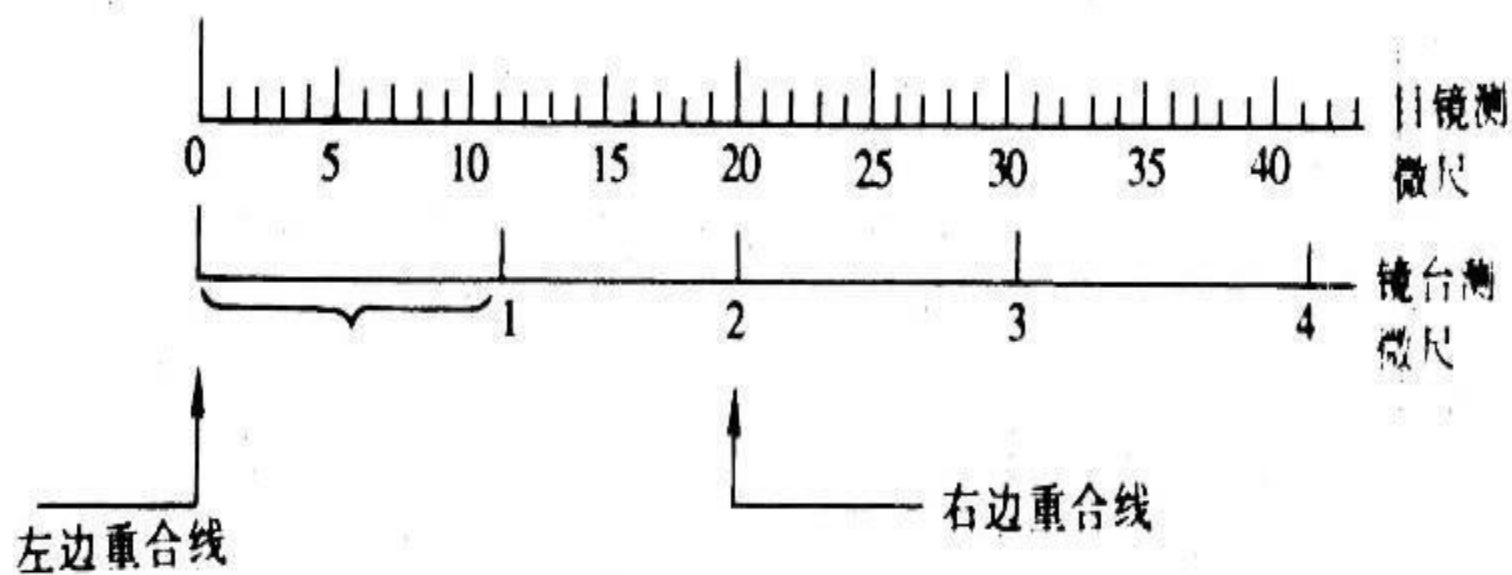


目镜测微尺



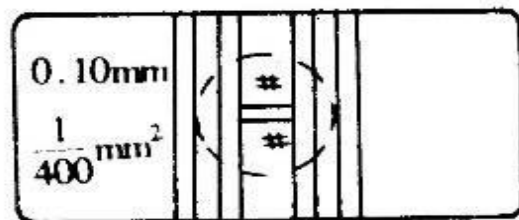
镜台测微尺



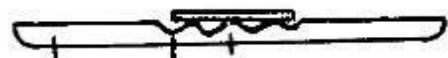


目镜测微尺与镜台测微尺校准

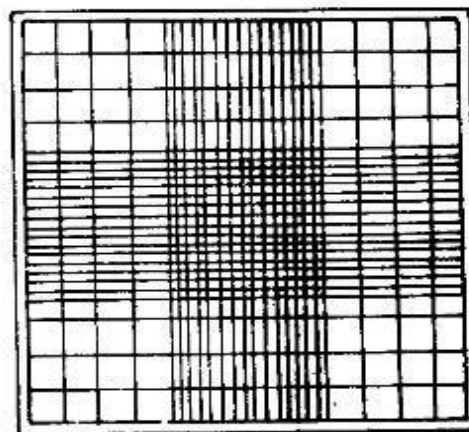




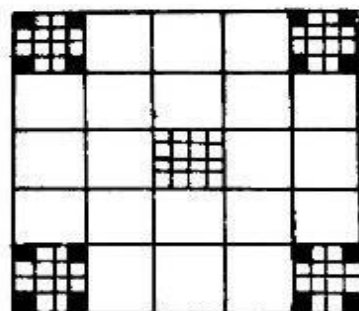
(a) 正面体



(b) 纵切面图

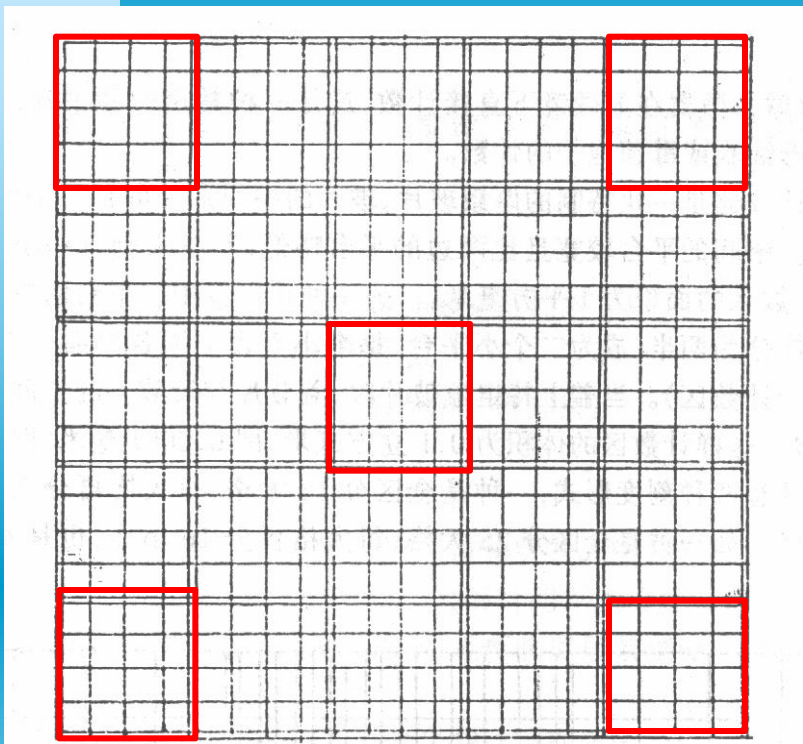


(c) 放大后的方格网计数室

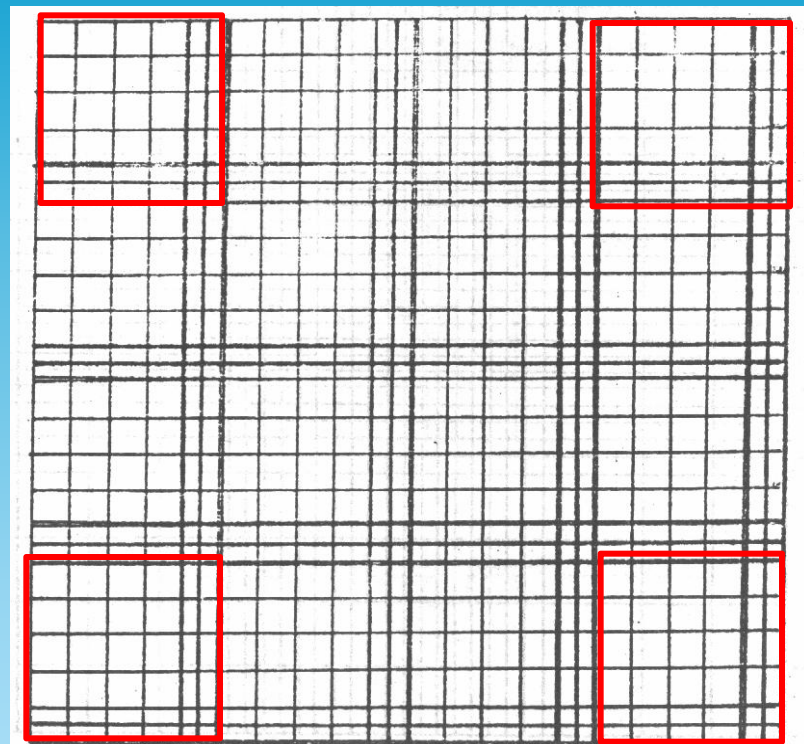


(d) 放大后的计数室
血球计数板的构造





16小格 × 25中格计数室



25小格 × 16中格计数室

计数室的两种刻度形式

