

生物工程
生物技术
系 列

LABORATORY EXPERIMENTS IN MICROBIOLOGY

普通高等教育规划教材

微生物学实验

袁丽红 主编



化学工业出版社

LABORATORY EXPERIMENTS IN MICROBIOLOGY

普通高等教育规划教材

微生物学实验

袁丽红 主编
陆利霞 李 霜 参编



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验/袁丽红主编. —北京: 化学工业出版社,
2010.1
普通高等教育规划教材
ISBN 978-7-122-07403-4

I. 微… II. 袁… III. 微生物学-实验-高等学校-
教材 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 235486 号

责任编辑: 赵玉清 袁俊红
责任校对: 顾淑云

文字编辑: 刘 畅
装帧设计: 张 辉

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张 14 彩插 4 字数 374 千字 2010 年 2 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888(传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 25.00 元

版权所有 违者必究

编者的话

微生物学是生物学中具有一套特有的实验技术、实验性很强的一门学科，同时也是一门应用范围很广的一门学科，已广泛应用于工业、医药、环境、食品等多个领域。目前，微生物学不仅仅是微生物学专业开设的一门重要基础课，它也成为与生命科学相关的专业（如生物工程、生物技术、制药工程、环境工程、食品科学与工程等）所开设的一门重要的专业基础课，并且这些专业的规模日趋增大。但一直没有一本合适的微生物学实验教材供非微生物专业学生、教师使用和参考。为此，我们根据多年微生物实验教学积累的经验，以凸显微生物学和微生物实验技术在工业、医药、环境、食品等各专业领域的应用为出发点，编写了《微生物学实验》一书。

本书在编写内容的组织形式上分成上篇和下篇两部分。上篇为基本技能部分，安排了39个典型的微生物基本操作技能实验，内容包括光学显微镜和显微技术、细菌染色技术、培养基制备技术、灭菌除菌技术、接种与分离培养技术、生长繁殖测定技术、微生物形态特征观察和描述、噬菌体检测技术、菌种保藏技术和分类鉴定技术。目的是强化学生对基本实验技能的掌握。在这部分实验中不仅包括微生物学的经典实验技术，而且也包括现代技术在微生物实验中的应用，尽量体现实验内容和实验手段的先进性；下篇为专业技能实验部分，该部分的主要目的是使学生熟悉微生物学课程与其所学专业的密切关系，了解学习微生物学的重要性。为此，我们根据微生物学和微生物学实验技术在工业、医药、环保和食品等领域中的应用，编写了工业微生物实验、制药微生物实验、环境微生物实验和食品微生物实验四个实验模块，共35个应用微生物学实验，以满足不同专业方向学生选择专业实验的需要。实验内容更加突出专业特色和实用性。虽然按照微生物应用领域编写了不同专业方向微生物实验内容，但有些实验内容对其他专业方向也具有指导作用。

本书中每个实验编写格式与以往教材不同，删去实验原理，而以概述形式对实验背景、原理做了必要的介绍，但并不一定是完整的介绍。因此，要求学生实验前进行预习，以充分了解所要进行实验的背景知识、原理和目的，在实验报告中用自己的语言撰写在前言部分，改变学生以往写实验报告照抄实验讲义的做法。此外，在很多实验的实验结果部分设计了大量表格，突出加强培养学生对实验结果观察、记录和整理的能力。在思考题上设计大量的分析思考问题，目的是加强培养学生分析问题的能力。为了增加直观性，改变了以往教材采用手绘图片形式，书中基本上采用拍摄的真实图片，以增加直观教学效果。

总体上，本书具有实验内容安排组织系统和科学，选编的实验实用性、指导性强、可操作性更强的特点，尤其适合作为非微生物专业微生物学实验教材。本书中各个实验相对独立，因而根据具体情况可酌情选做。

本书在编写过程中得到我院各位领导的关心和支持，得到微生物学课程组老师的帮助和支持，还得到化学工业出版社赵玉清、袁俊红等的大力支持和具体指导，另外，本书出版也得到学校教材建设费的资助，在此，谨对他们表示衷心感谢。

本书涉及的内容范围广，同时本书的编写在许多方面都是新的尝试，限于编者的学识、水平和能力，书中的疏漏和错误之处恐仍难免，诚请广大学生、同行和读者批评指正，以待日后再版时改进。

编者

2009年10月于南京工业大学
生物与制药工程学院

目 录

微生物实验室安全	1
----------------	---

上篇 基本技能部分

第 1 章 微生物实验介绍	4
实验 1 微生物实验介绍	4
第 2 章 光学显微镜和显微技术	8
实验 2 普通光学显微镜的结构、使用与维护	8
实验 3 相差显微镜的结构与使用	12
实验 4 微生物测微技术	15
实验 5 数码显微摄影技术	17
第 3 章 细菌染色技术	20
实验 6 细菌的简单染色和细菌菌体形态的观察	20
实验 7 细菌的革兰染色	22
实验 8 细菌的芽孢染色	24
实验 9 细菌的荚膜染色	25
实验 10 细菌的鞭毛染色	27
第 4 章 培养基的制备	30
实验 11 通用培养基的配制	30
实验 12 选择培养基和鉴别培养基的配制和应用	33
第 5 章 灭菌和除菌技术	38
实验 13 高压蒸汽灭菌和灭菌验证	38
实验 14 干热灭菌	42
实验 15 过滤除菌技术	44
第 6 章 微生物接种技术	46
实验 16 微生物斜面接种技术	46
实验 17 微生物平板接种技术	49
实验 18 微生物液体接种技术和穿刺接种技术	52
第 7 章 微生物培养技术	56
实验 19 微生物的纯种分离技术	56
实验 20 厌氧微生物的培养技术	59
第 8 章 微生物生长繁殖测定技术	63
实验 21 微生物显微镜直接计数法——血球计数板计数法	63
实验 22 微生物间接计数法——平板菌落计数法	65
实验 23 细菌生长曲线的测定——比浊法	67
实验 24 霉菌生长曲线的测定——干重法	69
第 9 章 微生物形态特征观察和描述	72
实验 25 细菌的菌体特征和培养特征	72

实验 26	放线菌的菌体特征和培养特征	77
实验 27	酵母菌的菌体特征和培养特征	79
实验 28	霉菌的菌体特征和培养特征	83
实验 29	藻类形态的观察	86
实验 30	原生动物和微型后生动物的观察	87
第 10 章	噬菌体检测技术	89
实验 31	大肠埃希菌噬菌体的分离和纯化	89
实验 32	大肠埃希菌 T2 噬菌体效价的测定	91
第 11 章	微生物菌种保藏技术	94
实验 33	斜面传代低温保藏法	94
实验 34	液体石蜡保藏法	96
实验 35	冷冻干燥保藏法	98
实验 36	液氮超低温保藏法	100
第 12 章	微生物分类鉴定技术	103
实验 37	细菌的生理生化反应——糖发酵实验和 IMViC 实验	103
实验 38	利用 Biolog 自动微生物分析系统进行微生物鉴定	107
实验 39	利用 16S rRNA 基因序列分析技术进行微生物分类鉴定	112

下篇 专业技能部分

第 13 章	工业微生物实验	122
实验 40	营养物质对微生物生长的影响——碳源物质的影响	122
实验 41	环境因素对微生物生长的影响——pH 的影响	124
实验 42	碱性蛋白酶产生菌的分离筛选	126
实验 43	大肠埃希菌 β -半乳糖苷酶合成诱导与调控	128
实验 44	紫外线诱变技术	131
实验 45	抗反馈调节突变株的选育	134
实验 46	氨基酸营养缺陷型突变株的筛选	136
实验 47	酵母菌原生质体融合育种	140
实验 48	固定化大肠埃希菌生产 L-天冬氨酸	143
第 14 章	制药微生物实验	147
实验 49	环境中微生物监测	147
实验 50	水质微生物学分析——利用多管发酵法检测水中大肠菌群数量	150
实验 51	水质微生物学分析——利用膜滤技术检测水中粪便肠球菌数量	154
实验 52	微生物对数递减时间 (D 值) 测定	155
实验 53	药品微生物限度检查——细菌、霉菌与酵母菌计数	158
实验 54	微生物限度检查方法的验证——菌落计数方法的验证	161
实验 55	药品的无菌检查——全密封无菌检验系统的使用	163
实验 56	药品中细菌内毒素检查——鲎试剂 (LAL) 法	166
实验 57	消毒剂效力测定——石炭酸系数实验	168
实验 58	微生物制剂检验——乳酸菌制剂检查法	170
实验 59	抗生素产生菌分离筛选和抗菌谱测定	173
第 15 章	环境微生物实验	177
实验 60	活性污泥生物相的观察	177
实验 61	活性污泥脱氢酶活性的测定	178

实验 62	利用发光细菌检测水体生物毒性	181
实验 63	富营养化水体中藻类检测——叶绿素 a 法	184
实验 64	苯酚降解菌的分离筛选	186
实验 65	利用微生物吸附法去除水体中重金属	188
第 16 章	食品微生物实验	191
实验 66	食品中菌落总数的检测	191
实验 67	食品中致病菌的检测	193
实验 68	食品中大肠菌群的计数	197
实验 69	食品中霉菌毒素的检测	200
实验 70	污染食品微生物来源的分析与判断	202
实验 71	纯种发酵泡菜的制作	204
实验 72	酸奶的制作	205
实验 73	酒酿的制作	208
实验 74	食药真菌的组织分离及原种制作	209
附录		211
附录 1	实验用菌种及其学名	211
附录 2	实验用培养基	211
附录 3	染色液和试剂的配制	217
参考文献		218

微生物实验室安全

在实验室中实验和工作安全是极其重要的部分。在微生物学实验中，由于使用具有潜在致病性、甚至致病性的微生物作为实验材料，因此，除了遵守实验室常规的安全规定外，还有一些安全规定需要掌握、熟悉和遵守。为了保证实验者和实验室的安全，以下微生物学实验的安全须知和注意事项请学生们在进入实验室之前务必认真阅读并熟知。

一、微生物学实验基本要求

(1) 准时 每次实验必须准时进入实验室。在每个实验开始操作前实验指导教师都要针对该实验操作要点、注意事项和安全须知进行讲解或示范，如果你没有准时进入实验时，你就会错过这些重要内容。

(2) 预习 每次实验前必须充分预习实验教材，了解实验目的、原理和主要操作方法，对要做的实验做到先后有序、有条不紊和心中有数，避免发生差错。

(3) 负责 在每次实验中谁对我们的安全负责？答案就是我们自己。因此，实验中切记不要做危害自己和实验室中他人以及实验室公物的事情。实验中和实验结束后做到及时清理，保证自己的实验台和实验操作区整洁、干净、物品摆放有序。严格按照实验规定或实验指导教师要求认真操作。实验中使用的或接触微生物的材料，要严格按照无菌操作技术的要求进行，防止菌种的污染和实验环境的污染。实验中出现任何意外或事故应及时向实验指导教师或实验室技术人员报告。每次实验必须带实验教材、干净的白色工作服、防护眼镜、一次性手套、打火机、记号笔、笔、实验记录本和药匙。

二、微生物学实验安全须知和注意事项

(1) 不许将与实验无关的物品（包括书包、帽子、围巾等）带入实验室，进入实验室前将这些物品放在指定地方。

(2) 实验前、实验结束以及实验过程中接触了微生物培养物或接触了污染物品后要用抗菌洗手液或抗菌皂将手洗净。

(3) 在微生物实验室内请勿将任何物品如标签、笔、手指、移液管等放入口中或口的附近。

(4) 实验室内不准吃、喝任何食物，包括咀嚼口胶糖。不准在实验室内擦拭化妆品。实验室内严禁吸烟。

(5) 使用移液管时绝不能用嘴吸取。

(6) 进行微生物操作时要严格按照无菌操作技术进行无菌操作。接种微生物时不许走动和讲话。

(7) 每次实验开始前和实验结束后用消毒剂擦净实验台面。

(8) 切记永远把实验中用到的微生物菌种看作为潜在的致病菌。避免微生物培养物溢出或洒到实验台面或地上。如果溢出或洒出，应立即用消毒剂覆盖污染区域，并告知他人注意。

- (9) 所有的培养物要注明菌名、接种日期、培养基名称和操作者。
 - (10) 未经允许，实验室内微生物菌种和物品不许带离实验室。
 - (11) 实验过程中必须穿上工作服，并扣好衣扣。不许在实验室之外的场所如洗手间、餐厅穿实验室工作服。
 - (12) 在配制或使用挥发性或腐蚀性药品和试剂时必须戴防护眼镜。
 - (13) 制片使用染色剂时必须戴一次性手套。
 - (14) 实验中出现任何意外或事故应及时向实验指导教师或实验室技术人员报告。
 - (15) 必须熟悉实验室中灭火器、紧急出口、急救箱等所在的地方。
 - (16) 留长发的学生实验时必须将头发束于脑后以免使用酒精灯时烧着头发。
 - (17) 酒精灯不用时立即将其熄灭，不要让它一直燃烧。
 - (18) 除非意外情况下，实验过程中不许无故离开实验室。
 - (19) 绝对不准许穿戴不齐，如穿拖鞋、背心等进入实验室，否则取消本次实验资格。
 - (20) 如果接触实验的手或身体某处皮肤受伤，进入实验室前务必做好防护，以免实验过程中被感染。
 - (21) 刚灭过菌的培养基和玻璃器皿等物品很热，请勿直接用手拿，以免烫伤，必须戴隔热手套。
 - (22) 各种仪器严格按照要求操作，用后按原样放置并清理整洁。
 - (23) 实验完毕后将桌面整理清洁，用过的物品放回原处。需要培养和灭菌的物品放在指定地方，以便由实验室技术人员统一处理。
 - (24) 实验完毕离开实验室之前必须进行安全检查，包括水、电、门窗等。
- ### 三、用过和废弃物品处理
- (1) 含有培养物和培养基等用过的器皿等必须先煮沸杀菌后再清洗，切记勿将培养物等直接倒入水池或垃圾桶中。清洗时必须戴橡胶手套。
 - (2) 用过的带菌移液管、滴管、涂布棒等先放入消毒液中浸泡 20min，然后再清洗。
 - (3) 用过的染色剂和有机试剂等勿直接倒入水池中，要倒入指定的容器中。
 - (4) 未污染的常规废弃物入棉球、纸巾等可直接放入垃圾桶中。
 - (5) 本次实验结束必须将所有垃圾从实验室清理干净。

切记：必须保证并保持实验者自身工作环境干净、整洁和井然有序。养成良好的卫生习惯是确保我们自身安全、他人安全和实验室安全的重要部分。

最后，如果对实验室或实验过程中有何疑问，请直接请教实验指导教师或实验室技术人员。

如果进入实验室之前你已经认真阅读并熟知微生物实验室安全须知和注意事项，请签字。

签名：_____ 日期：_____

上篇 基本技能部分

- 第 1 章 微生物实验介绍
- 第 2 章 光学显微镜和显微技术
- 第 3 章 细菌染色技术
- 第 4 章 培养基的制备
- 第 5 章 灭菌和除菌技术
- 第 6 章 微生物接种技术
- 第 7 章 微生物培养技术

- 第 8 章 微生物生长繁殖测定技术
- 第 9 章 微生物形态特征观察和描述
- 第 10 章 噬菌体检测技术
- 第 11 章 微生物菌种保藏技术
- 第 12 章 微生物分类鉴定技术

第1章 微生物实验介绍

微生物实验室与一般实验室如化学实验室等不同，因为微生物实验室主要进行微生物的操作、培养等工作。微生物个体微小，肉眼看不见，常常被人忽略它们的存在，同时实验中使用接触的微生物或未经妥善处理的微生物对人体存在潜在的危害，因此，遵守微生物实验室的管理和各项规章制度尤为重要。进入实验室进行实验前，要确保在无菌或整洁环境下操作，实验操作者要保持良好的卫生习惯。实验完毕后，及时将要处置的微生物高温灭菌，降低与微生物接触的机会，对双手和环境进行清洁，防止微生物对人体带来危害。

实验1 微生物实验介绍

【目的要求】

1. 认识实验室各种仪器设备、器皿、药品及试剂。
2. 了解仪器设备操作方法和药品的保管方法。
3. 熟悉实验室的管理制度和实验室的各项规章制度。

【实验材料】

(1) 材料 酒精喷雾器、隔热手套、乳胶手套、滴管、移液管、试管、试管架、培养皿、三角瓶、量筒、烧杯、载玻片、盖玻片、洗瓶、玻棒、接种环、接种针、接种钩、涂布棒、药勺、酒精灯、擦镜纸、称量纸、试管塞、瓶塞、香柏油。

(2) 仪器设备 显微镜、电子天平、高压蒸汽灭菌锅、干燥箱、恒温培养箱、摇床、超净工作台、具加热磁力搅拌器、离心机、水浴锅、酸度计、冷藏箱、微波炉。

【实验方法】

(一) 常用材料器具介绍

(1) 酒精喷雾器 内装 70% 酒精，用于实验室、手、超净工作台台面、实验台台面消毒。

(2) 隔热手套 拿取经高温灭菌的器皿、培养基等时使用，以免手被烫伤。

(3) 乳胶手套 实验操作、配制染色剂、溶液或洗涤物品时使用，以免菌液、染色剂、污物等污染手部。

(4) 滴管 吸取少量且不需很准确的液体时使用。

(5) 移液管 需要准确吸取一定体积的液体时使用。常用的规格有：1mL、5mL、10mL。

(6) 试管 分装液体或固体培养基（斜面、直立柱）和稀释菌液等时使用。

(7) 试管架 摆放试管用。

(8) 培养皿 常用的规格为直径 9cm。用于培养微生物，使用前要灭菌。15~20mL 融化的培养基倒入其中，铺平，凝固后制成平板。

(9) 三角瓶 分装培养基(固体、液体)或其他液体等;分装液体培养基时用于微生物液体培养。

(10) 量筒 测量液体体积。

(11) 烧杯 盛装液体或配制试剂、培养基等时使用。

(12) 载玻片/盖玻片 显微观察微生物时,作为制片的载体。

(13) 洗瓶 内装蒸馏水或消毒液。

(14) 玻棒 配制试剂、培养基等时搅拌用。

(15) 接种环 接种工具的一种,用于细菌、酵母菌、产生较多孢子的放线菌和霉菌接种。

(16) 接种针 接种工具的一种,用于半固体或明胶直立柱培养基的穿刺接种。

(17) 接种钩 接种工具的一种,用于霉菌和放线菌的接种。

(18) 涂布棒 接种工具的一种,用于涂布接种。

(19) 药勺 称取药品、试剂时使用。使用前确保清洁,避免药品间交互污染。

(20) 酒精灯 用于接种工具、瓶口、试管口的火焰灭菌。

(21) 擦镜纸 用于擦拭显微镜目镜、物镜、聚光镜,避免镜头被刮伤。

(22) 称量纸 称取药品用。将称取的药品直接放在称量纸上。

(23) 试管塞/棉塞 用试管分装培养基时,用试管塞/棉塞封口,以免灭菌后培养基被污染。

(24) 瓶塞/棉塞 用三角瓶分装培养基时,用瓶塞/棉塞封口,以免灭菌后培养基等被污染。

(25) 香柏油 显微镜镜检时,使用油镜观察时所用的介质,直接滴加在载玻片上,然后将油镜镜头浸入香柏油中,以提高分辨率。

(26) 二甲苯 油镜使用完毕,用蘸取少量二甲苯的擦镜纸擦去沾在油镜上的香柏油。

(二) 常用仪器设备介绍

(1) 显微镜 常用的是普通光学显微镜,主要用于观察微生物形态结构、染色结果和用于计数。

(2) 电子天平 配制培养基、试剂、溶液等时用于精确称取药品。

(3) 高压蒸汽灭菌锅 高压蒸汽灭菌设备,用于培养基、水和其他可高温高压灭菌的溶液或物品的灭菌。灭菌条件一般为 121°C 、15min。

(4) 干燥箱 干热灭菌设备,用于培养皿等玻璃器皿和金属器具等物品灭菌。灭菌条件一般为 $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ 、1~2h。也可用于洗净器皿的干燥。

(5) 恒温培养箱 培养微生物的培养箱。根据微生物生长所需温度不同设定不同的培养温度。一般实验室常用的培养温度为 $25\sim 30^{\circ}\text{C}$ 和 37°C 。

(6) 摇床 用于微生物振荡培养,根据微生物培养所需转速不同而设定不同的转速。

(7) 超净工作台 进行微生物接种等操作时需无菌环境下进行,超净工作台能提供无菌环境。使用前要在台面上喷洒酒精并擦拭台面。

(8) 具加热磁力搅拌器 配制培养基时,用于加热使培养基成分溶解和混匀其中成分。

(9) 离心机 使培养的菌体与培养基等液体分离开来的设备。

(10) 水浴锅 控制水温,用于融化后培养基保温或其他需保温的液体等保温用。

(11) 酸度计 用于调节培养基或其他溶液和试剂的 pH 值。使用前要进行校正。

(12) 冷藏箱 用于保藏微生物菌种和需低温保藏的试剂、溶液和物品等。温度保持 4°C 以下为宜。

(13) 微波炉 用于培养基加热溶解。

(三) 实验室安全守则

(1) 实验前必须预习, 准确了解所要做实验的背景知识、实验原理、目的, 熟悉实验步骤、操作方法, 避免在实验过程中产生慌乱。

(2) 实验开始前, 如有不清楚的地方应随时提出; 进行实验时, 应按照实验指导教师的指示操作, 切勿自己行动。

(3) 实验前应做到了解实验中可能会出现的问题或意外, 并知道解决的办法, 以免发生意外时, 延误妥善处理时间。

(4) 进入实验室应穿实验工作服, 不可穿拖鞋, 长发者应将头发束起来, 这些要求都是意外发生时第一道保护措施。

(5) 实验过程中, 实验室门窗应紧闭, 以免外界环境的污染。

(6) 实验室内严禁吸烟、饮食、嬉戏或追逐等行为, 避免危险发生。

(7) 实验前、后彻底清洗双手, 以 70% 酒精或其他消毒液擦拭双手和实验室操作台面。实验室必须保持整洁。

(8) 实验器材应避免不当操作, 尤其是酒精灯的操作应格外小心, 酒精灯在不使用时应立即熄灭。可燃性物质必须远离火源。

(9) 若有菌液倾出、起火燃烧、烫伤等任何意外发生, 应立即通知实验指导教师和实验室技术人员, 以得到及时妥善处理。

(10) 取用试剂和药品时, 应先确认、查明标签及浓度, 以免误用。

(11) 接种微生物后的试管应随时插在试管架上, 不可平放在操作台面上; 培养基在接种前或接种后应及时详细标明菌名、日期、接种者。

(12) 凡接触过微生物的废弃物, 如培养基、玻璃器皿、载玻片等, 均应置于指定的容器, 并经过灭菌处理后方可清洗或处理掉。

(13) 实验室内的物品、菌种未经允许不可带出实验室; 实验工作服、手套不可穿出实验室, 以免微生物散播。

(14) 仪器设备用后需清洁后放回原处; 离开实验室前, 需确认实验器材是否收妥、不用的电源、水、门窗等完全关闭。

(15) 实验后, 依规定记录实验结果, 按时交实验报告。

(四) 实验室管理制度

(1) 实验分组。同学自行寻找最佳伙伴, 每组选定一名同学当组长。组长职责是负责本组实验工作协调、组织和清洁卫生安排工作。实验结束后由各组指派一名学生留下做值日生。

(2) 每次实验课前, 学生必须提前到实验室, 清洁自己实验工作台台面、器材和周围环境; 也可协组实验室技术人员分发当日实验所需的实验材料等。

(3) 实验结束后, 各组同学自行清理自己台面的物品并做好保洁工作, 请实验室技术人员检查合格后方可离开。

(4) 实验结束后, 各组指派的值日生留下, 负责实验室最后的清理、打扫和处理当日实验室垃圾、清点当日分发的仪器等工作, 并协助实验室技术人员完成离开实验室之前的各项检查工作。

(5) 需隔天观察的实验结果, 每位学生必须亲自到场, 仔细观察记录实验结果, 并将所用的器皿处理、清洗干净。

(6) 完成实验结果观察记录后, 及时完成实验报告, 并在指定时间交给实验指导教师批阅。

(7) 实验记录和报告书写格式要按照实验指导教师规定的格式进行科学、规范书写。实

验背景和实验目的必须用自己组织的语言写作，避免抄袭、剽窃！

【实验内容】

进入实验室，由实验指导教师介绍微生物实验室各种仪器设备、器皿、药品及试剂、实验室的管理制度和实验室的各项规章制度以及认识实验室技术人员。

【实验结果】

1. 写出你在微生物实验室看到的仪器设备、器皿、药品及试剂等并说明其主要功能和药品、试剂的保管方法。

2. 写出了解过微生物实验室之后的感想。

【思考题】

1. 如果你在实验室中发生意外该如何处理？

2. 试述称取药品和试剂时要注意哪些？

3. 使用超净工作台要注意什么？

(袁丽红)

第2章 光学显微镜和显微技术

微生物个体极其微小，而我们人类肉眼的分辨率只有 0.2mm ，很难直接用肉眼去观察，需要借助显微镜观察微生物的个体形态特征和菌体细胞内的结构特征。因此，显微镜是观察微生物必不可少的工具。显微技术是微生物学的基本技术之一。

随着科学技术的进步，显微镜的种类愈来愈多。根据结构和原理不同，可将显微镜分为光学显微镜、电子显微镜和扫描隧道显微镜等。在微生物学实验中最常用的是光学显微镜。光学显微镜以可见光或紫外线为光源，主要有明视野显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜、激光共聚焦扫描显微镜等不同类型的。实际工作中根据实验的目的与要求不同选用不同类型的光学显微镜。

实验2 普通光学显微镜的结构、使用与维护

【目的要求】

1. 熟悉普通光学显微镜的构造和原理。
2. 学会普通光学显微镜的正确使用和维护、保养方法。

【概述】

在微生物一般形态的观察中，普通光学显微镜最为常用。

1. 普通光学显微镜的构造

普通光学显微镜的构造如（彩）图 2-1 所示。主要包括光学放大系统、照明系统和机械系统三部分。

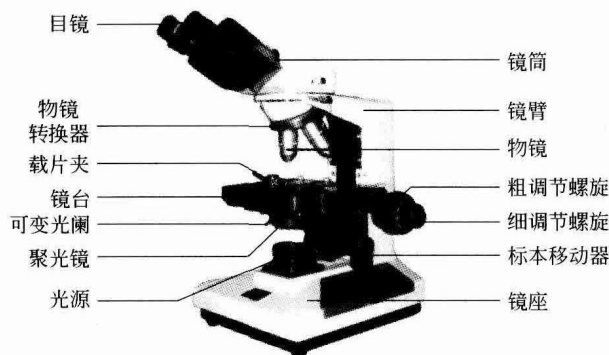


图 2-1 普通光学显微镜的构造

光学放大系统包括目镜和物镜，利用目镜和物镜两组透镜系统放大成像，故又常称为复式显微镜。目镜一般由两块透镜组成，上面的称接目透镜，下面的称场镜。在两块透镜中间或场镜的下方有一视场光阑。在进行显微测量时，目镜测微尺放在视场光阑上。不同的目镜上标有 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $16\times$ 或 $20\times$ 等字符，表示该目镜的放大倍数。物镜由多块透镜组成。各种物镜上都标有放大倍数、数值孔径 (NA) 及所要求盖玻片厚度等主要参

数（图 2-2）。根据物镜的放大倍数和使用方法的不同，分为低倍物镜、高倍物镜和油镜三种。低倍物镜有 $4\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$ ，高倍物镜 $40\times$ ，油镜 $100\times$ 。数值孔径是表示物镜性能

的指标。例如图 2-2 中, $10\times/0.25$ 表示放大 10 倍, NA 为 0.25, 为消色差物镜; $PL40\times/0.65$ 表示放大 40 倍, NA 为 0.65, 为平场消色差物镜; $100\times/1.25Oil$ 表示放大 100 倍, NA 为 1.25, 为消色差油镜。160/0 表示镜筒长度为 160mm, 0 表示对盖玻片厚度要求不严格; 160/0.17 表示镜筒长度为 160mm, 盖玻片的厚度应为 0.17mm 或小于 0.17mm。

照明系统包括光源和聚光镜, 有时另加各种滤光片以控制光的波长范围。聚光镜 (又称聚光器) 安装在镜台下, 是由多块透镜构成, 其作用是把平行的光线聚焦于标本上, 增强照明度。聚光镜的焦点必须在正中, 通过聚光镜调节螺旋

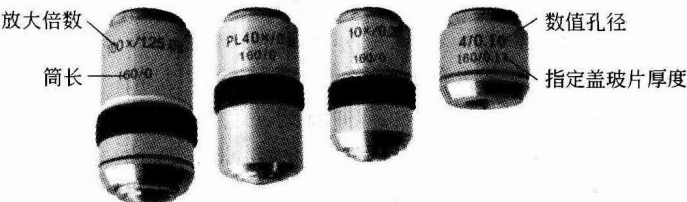


图 2-2 显微物镜及其主要参数

调节聚光镜的上下, 以适应使用不同厚度的载玻片, 也能保证焦点落在被检标本上。由于聚光镜的焦距短, 载玻片不能太厚, 一般以 $0.9\sim1.3\text{mm}$ 之间为宜。聚光镜上附有可变光阑 (孔径光阑, 俗称光圈), 通过调整光阑孔径的大小, 可以调节进入物镜光线的强弱。

机械系统保证光学系统的准确配置和灵活调控, 包括镜座、镜臂、镜台、物镜转换器、镜筒和调节螺旋等。镜座是显微镜的基座, 使显微镜干稳放置于桌面上。镜台又称载物台, 是放置标本的地方。镜台上有载片夹用于固定被检标本, 并可通过转动标本移动器使标本前后、左右移动。有的标本移动器带有游标尺, 指示标本所在位置。镜臂用以支持镜筒, 也是移动显微镜时手握的部位。镜筒是连接目镜和物镜的金属筒。镜筒上端插入目镜, 下端与物镜转换器相接。物镜转换器上装有 $3\sim5$ 个不同放大倍数的物镜, 可以通过转动物镜转换器随意选用合适的物镜。调节螺旋安装在镜臂基部, 是调节物镜与被检标本距离的装置, 通过转动粗、细调节螺旋便可清晰地观察到标本。

2. 普通光学显微镜的光学原理

(1) 光学显微镜的成像原理 由光源发射的光线经聚光镜会聚在被检标本上, 使标本得到足够的照明, 由标本 (AB) 反射或折射出的光线经物镜 (L_1) 进入使光轴与水平面倾斜 45° 角的棱镜, 在目镜 (L_2) 的焦平面上, 即在目镜的视场光阑处 (F_2) 成一个放大倒立的实像 $A'B'$, 该实像再经目镜的接目透镜放大成一个正立虚像 $A''B''$ 于无穷远或明视距离, 以供人眼观察。所以人们看到的是虚像 (图 2-3)。

(2) 显微镜的放大倍数 被检物体经显微镜的物镜和目镜放大后, 总的放大倍数是物镜的放大倍数和目镜放大倍数的乘积。例如使用 $40\times$ 物镜和 $10\times$ 目镜观察, 总的放大倍数是 400 倍。

(3) 分辨率 评价一台显微镜质量的优劣不仅要看其放大倍数, 更重要的是看其分辨率。分辨率 (D) 是指显微镜能够辨别两个质点间最小距离的能力。

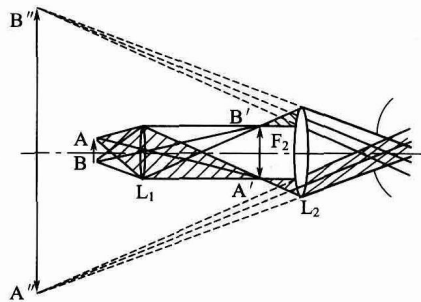


图 2-3 光学显微镜的成像原理

$$\text{分辨率 } D = \frac{0.61\lambda}{N \cdot \sin(\alpha/2)}$$

式中, N 表示标本和物镜之间介质折射率; α 表示镜口角 (标本在光轴的一点对物镜镜口的张角, 图 2-4)。 $N \cdot \sin(\alpha/2)$ 即为数值孔径 NA 。

介质为空气时, $N=1$, α 最大值可达 140° , 最短的可见波长 $\lambda=450\text{nm}$, 此时分辨率 $D=292\text{nm}$, 约 $0.3\mu\text{m}$ 。使用油镜时, 物镜与标本间的介质为香

柏油 ($N=1.515$) 或液体石蜡 ($N=1.52$), 不仅增加了透明度, 而且提高了分辨率, 分辨率可达 $0.2\mu\text{m}$ 。所以普通光学显微镜的最大分辨率是 $0.2\mu\text{m}$ 。

(4) 工作距离 工作距离是指观察标本最清晰时物镜透镜的下表面与标本之间 (无盖玻片时) 或与盖玻片之间的距离。物镜的放大倍数越大, 其工作距离越短, 油镜的工作距离最短, 约为 0.2mm , 所以使用油镜时要求盖玻片的厚度为 0.17mm 。虽然不同放大倍数的物镜工作距离不同, 但生产厂家已进行校正, 使不同放大倍数物镜转换时都能观察到标本, 只需进行细调焦便可使物像清晰。

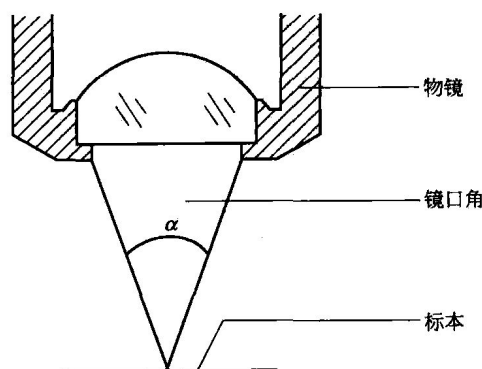


图 2-4 物镜的镜口角

(5) 目镜的放大倍数 根据计算, 显微镜的有效放大倍数是 $E \times O = 1000 \times NA$, 式中 E 为目镜放大倍数, O 为物镜放大倍数。因此, 目镜的有效放大倍数是 $E = 1000 \times NA / O$

根据上式可知, 在与物镜的组合中, 目镜有效放大倍数是有限的, 过大的目镜放大倍数并不能提高显微镜的分辨率。如用 $90\times/1.4$ 的物镜, 目镜有效的最大倍数是 $15\times$ 。

【实验材料】

- (1) 菌种 青霉菌 (染色标本)、枯草芽孢杆菌 (染色标本)。
- (2) 仪器 普通光学显微镜。
- (3) 其他 香柏油 (或液体石蜡)、二甲苯、擦镜纸等。

【实验方法】

(一) 普通光学显微镜的使用方法

1. 显微镜放置

实验时显微镜直立放在座前桌面稍偏左的位置, 镜座距桌沿 $6\sim7\text{cm}$ 左右。

2. 打开光源开关, 调节光强到合适大小。

3. 调节聚光镜和孔径光阑

(1) 转动物镜转换器, 使低倍镜头正对镜台上的通光孔。

(2) 先把镜头调节至距镜台 $1\sim2\text{cm}$ 左右处, 取下目镜, 直接向镜筒内观察, 调节聚光镜上的孔径光阑, 使其孔径与视野恰好一样大或略小于视野, 目的是使入射光展开的角度与物镜的数值口径相一致, 既可充分发挥该物镜的分辨力, 又能把超过该物镜可能接受的多余光挡住, 否则会产生干扰, 影响清晰度。原则上使用不同的物镜时应相应调节孔径光阑。

(3) 放回目镜, 通过调节聚光镜的高度或调节照明度控制钮, 选择最佳的照明效果。

4. 低倍镜和高倍镜的使用——观察青霉菌标本

(1) 标本放置 下降镜台或升高镜筒, 把青霉菌染色标本置于镜台上, 用载片夹夹牢。调节标本移动器使玻片被观察的部位位于通光孔的正中央。

(2) 先用低倍镜 (物镜 $4\times$ 、 $10\times$) 观察 观察之前, 先转动粗调节螺旋升高镜台 (或下降镜筒), 使物镜的前端接近载片 (距离最近)。然后, 眼睛注视目镜内并转动粗调节螺旋, 使镜台下降 (或镜筒上升) 至看到物像, 再转动细调节螺旋, 使物像清晰。进行显微镜观察时要注意养成睁开双眼的习惯。

(3) 如果在视野内看到的物像不符合实验要求或要改变观察的视野, 可慢慢调节标本移动器。调节时应注意玻片移动的方向与视野中看到的物像的移动方向正好相反。如果物像不很清晰, 调节细调节螺旋, 直到物像清晰。