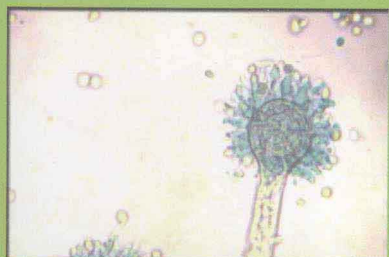


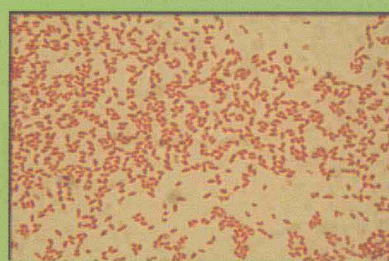
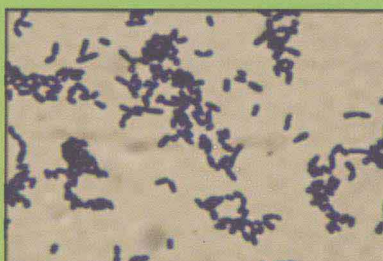
海洋生命科学实验教材



微生物与海洋微生物学 实验

WEISHENGWU YU HAIYANG WEISHENGWUXUE SHIYAN

王祥红 编著



中国海洋大学出版社

微生物与海洋微生物学实验

王祥红 编著

中国海洋大学出版社

· 青岛 ·

图书在版编目(CIP)数据

微生物与海洋微生物学实验/王祥红编著. —青岛:
中国海洋大学出版社, 2011. 9
ISBN 978-7-81125-851-6

I. ①微… II. ①王… III. ①微生物学—实验②海洋
微生物—实验 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 195983 号

出版发行	中国海洋大学出版社	
社 址	青岛市香港东路 23 号	邮政编码 266071
出版人	杨立敏	
网 址	http://www.ouc-press.com	
电子信箱	WJG60@126.com	
订购电话	0532—82032573(传真)	
责任编辑	魏建功	电 话 0532—85902121
印 制	日照报业印刷有限公司	
版 次	2011 年 10 月第 1 版	
印 次	2011 年 10 月第 1 次印刷	
成品尺寸	170 mm×230 mm	
印 张	14.75	
字 数	273 千字	
定 价	30.00 元	

前 言

在生命科学的教学中与研究,微生物学实验技术有着自己独立的操作技术,还是分子生物学、动植物育种学的基础。海洋环境有着自己的特殊性,进行海洋微生物学实验也有着自己的特点。编者总结多年的教学和科研工作经验,编写了《微生物与海洋微生物学实验》一书。

按照微生物学实验的技术的知识结构层次,考虑到学生进行实验的阶段性与渐进性,以便培养学生的动手能力与独立思考能力,本教材共安排三个部分实验内容:第一部分是基础性实验,包括显微镜的使用、微生物的染色与形态结构观察、微生物细胞大小测定与死活细胞鉴别、培养基的配制、灭菌与消毒技术、土壤细菌的分离与计数、微生物接种技术、微生物的培养特征观察、菌种保藏技术、微生物数量的测定、环境因素对微生物的影响、微生物的生理生化反应等实验内容。第二部分是综合性实验,这部分是学生在进行了验证性实验,已具备微生物学实验的基本操作技能的基础上,有选择地开设的具有一定难度的实验,包括微生物的诱变、细菌质粒的制备与转化、噬菌体的分离提取与转化、水中细菌总数与大肠菌群数的测定等实验内容。第三部分为研究性实验,这部分实验是在完成了基础性实验和综合性实验的基础上,以海洋微生物学的研究内容为主,突出海洋特色,使学生得到科学研究的初步训练,包括产酶的海洋细菌的分离与酶的检测、免疫荧光抗体技术、吖啶橙荧光显微镜直接计数、海洋细菌的活菌直接镜检计数、海洋发光细菌的分离培养、水产动物霍乱弧菌及副溶血弧菌的分离、海洋酵母菌的分离培养、产酶海洋酵母菌的分离与筛选、海洋酵母菌的鉴定、微生物的发酵技术等实验内容。

附录部分收录了微生物实验常用染色液和试剂的配制、培养基的配制、常用的消毒灭菌化学试剂、洗涤液的配制与使用等内容,可作为实验教学的参考资料。

本书目的在于使学生在学好微生物基本操作和基本技能的基础上,对海洋微生物的实验内容有一个直观的了解,为今后从事海洋微生物的教学和科研工作打下良好基础。为便于教学,实验内容一般按照实验目的、实验原理、实验器

材、实验方法、实验报告、思考题等部分编写。

本书既可作为生命科学本科生的教学用书,又可作为与生命科学相关的药学、生物工程、水产养殖、食品工程、环境工程等学科本科生的教学用书,也可作为相关专业研究生和研究人员的参考书。

由于编者水平所限,书中的缺点和错误在所难免,请读者批评指正。

编著者

2011年8月10日

目 次

实验守则	(1)
------------	-----

第一部分 基础性实验

实验一 显微镜油浸物镜的使用	(5)
实验二 细菌的简单染色和革兰氏染色	(9)
实验三 细菌的芽孢染色	(12)
实验四 细菌的鞭毛染色及运动性观察	(14)
实验五 细菌的荚膜染色	(18)
实验六 放线菌的形态观察	(20)
实验七 霉菌标本片的制备与观察	(23)
实验八 酵母菌的形态观察及细胞死活的鉴别,微生物细胞大小的测定	(25)
实验九 培养基的原理及配制	(29)
实验十 灭菌和消毒	(39)
实验十一 土壤细菌的分离与计数	(47)
实验十二 微生物接种技术	(50)
实验十三 微生物菌落的形态观察	(54)
实验十四 微生物的培养特征	(57)
实验十五 菌种保藏	(60)
实验十六 微生物细胞的显微镜直接计数法	(67)
实验十七 稀释平板计数法	(70)
实验十八 光电比浊计数法	(74)
实验十九 大肠杆菌生长曲线的测定	(76)
实验二十 紫外线杀菌实验	(78)
实验二十一 化学试剂对微生物的作用	(80)
实验二十二 氧对微生物生长的影响	(84)
实验二十三 温度对微生物的影响	(86)
实验二十四 微生物耐盐性的测定	(88)

实验二十五	氢离子浓度对微生物生长的影响	(90)
实验二十六	生物因素对微生物的影响	(92)
实验二十七	抗生素效价的测定	(95)
实验二十八	用最低抑制浓度法(MIC)测制菌效力	(99)
实验二十九	用生长谱法测定微生物的营养要求	(103)
实验三十	油脂水解实验	(105)
实验三十一	淀粉水解实验	(106)
实验三十二	明胶分解实验	(108)
实验三十三	糖发酵实验	(109)
实验三十四	吲哚实验	(111)
实验三十五	甲基红(M. R.)实验	(113)
实验三十六	乙酰甲基甲醇(V. P.)实验	(114)
实验三十七	柠檬酸盐实验	(116)
实验三十八	产硫化氢实验	(117)
实验三十九	硝酸盐还原实验	(119)
实验四十	过氧化氢酶实验	(121)
实验四十一	免疫荧光抗体染色技术	(122)
实验四十二	吖啶橙荧光显微镜直接计数	(124)
实验四十三	海洋细菌的活菌直接镜检计数	(127)

第二部分 综合性实验

实验四十四	微生物的诱发突变	(131)
实验四十五	细菌质粒 DNA 的小量制备	(136)
实验四十六	质粒 DNA 的转化	(140)
实验四十七	从自然环境中分离和纯化噬菌体	(143)
实验四十八	噬菌体的提取及效价测定	(146)
实验四十九	水中细菌总数的测定	(149)
实验五十	多管发酵法测定水中大肠菌群	(153)
实验五十一	滤膜法测定水中大肠菌群	(159)

第三部分 研究性实验

实验五十二	用选择培养基分离土壤中的固氮菌	(163)
-------	-----------------------	-------

目 次

实验五十三	根霉的分离和形态观察	(165)
实验五十四	产几丁质酶海洋细菌的分离及几丁质酶的检测	(167)
实验五十五	海洋细菌卵磷脂酶的检测	(169)
实验五十六	海洋细菌酪蛋白酶的检测	(170)
实验五十七	海洋细菌脲酶的检测	(172)
实验五十八	海洋细菌 β -半乳糖苷酶的检测	(174)
实验五十九	褐藻酸降解菌的分离	(176)
实验六十	海洋发光细菌的分离培养	(178)
实验六十一	从水产动物分离霍乱弧菌及副溶血弧菌	(180)
实验六十二	海洋产琼胶酶细菌的分离及降解琼脂现象观察	(182)
实验六十三	海洋拮抗细菌的分离筛选	(185)
实验六十四	海洋环境中酵母菌的分离培养	(187)
实验六十五	产嗜杀因子海洋酵母的分离及嗜杀能力测定	(189)
实验六十六	产淀粉酶海洋酵母菌的分离及筛选	(192)
实验六十七	产脂肪酶海洋酵母的分离与筛选	(194)
实验六十八	产丙酮酸海洋酵母的分离及筛选	(196)
实验六十九	产蛋白酶海洋酵母的分离和筛选	(198)
实验七十	海洋酵母菌的鉴定	(200)
实验七十一	香菇菌种的分离与栽培	(207)
实验七十二	微生物发酵技术	(210)
附录一	常用染色液和试剂的配制	(215)
附录二	实验用培养基的配制	(219)
附录三	实验室常用的消毒灭菌化学试剂	(222)
附录四	洗涤液的配制与使用	(224)
参考文献	(226)

实验守则

1. 实验前必须对实验内容进行充分预习,明确实验的目的、原理和方法。
2. 认真、及时做好实验记录。对于需要连续观察的实验,要记录每次观察的实验现象和结果,以便作出分析。
3. 实验室内应保持整洁,勿大声谈话和随便走动,保持室内安静,上课前应将手洗干净。
4. 实验时要小心仔细,严格按操作规程进行。万一遇到意外情况发生,如皮肤破损及细菌污染实验台面等,应立即报告指导教师,及时处理。
5. 使用显微镜或其他贵重仪器时,要细心操作,特别爱护。对消耗材料和药品等要尽量节约,用毕放回原处。
6. 每次实验完毕,必须把所用玻璃器皿洗净放好,将实验室收拾整齐,擦净桌面,不要将东西乱扔乱放。
7. 每次实验需进行培养的材料,应标明自己的组别和姓名及处理方法,放于教师指定的地点进行培养。实验室中的菌种和物品等,未经教师许可不得携出实验室。
8. 实验的结果,应以实事求是的科学态度填入实验报告表格中,力求简明准确,应回答思考题,并及时交教师批阅。
9. 在进行高压蒸汽灭菌时,负责灭菌的同学不能离开实验室,要随时观察灭菌锅的工作情况,以避免事故发生。
10. 离开实验室前将手洗净,并注意关闭水、火、煤气、门窗、灯等。



第一部分 基础性实验

实验一 显微镜油浸物镜的使用

一、实验目的

1. 复习显微镜低倍镜和高倍镜的使用技术,了解油浸物镜的基本原理,掌握油浸物镜的使用方法。
2. 学习油浸物镜的使用方法,用油镜观察枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌染色片。

二、实验原理

(一)油浸物镜的标志

油镜上常刻有 OI(oil immersion)或 HI(homogeneous immersion)字样,有的还刻有一圈红线或黑线标记。在低倍物镜、高倍物镜和油镜三种物镜中(图 1-1),油镜的放大倍数和数值孔径(numerical aperture)最大,而工作距离最短。

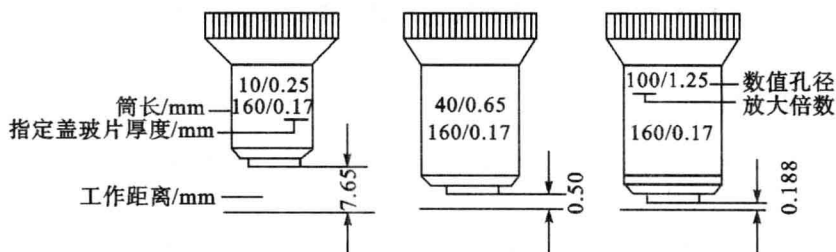


图 1-1 不同放大倍数物镜的工作距离

(二)显微镜的分辨率

显微镜性能的优劣不单是看它的总放大倍数,更重要的是看它的分辨率的大小。分辨率是指显微镜能分辨出物体两点间最小距离(D)的能力。 D 值越小表明分辨率越高。 D 值与光线的波长(λ)成正比,与物镜的数值孔径(NA)成反比:

$$D = \lambda / 2NA$$

从上式可看出,缩短光波长和增大数值孔径都可提高分辨率。

数值孔径又叫镜口率,是指光线投射到物镜上的最大角度(称镜口角, α)的一半的正弦与介质折射率(n)的乘积:

$$NA = n \times \sin(\alpha/2)$$

影响数值孔径大小的因素一是镜口角,二是介质的折射率。

当物镜与玻片之间的介质为空气时,由于空气($n=1.0$)与玻璃($n=1.52$)的折射率不同,光线会发生折射(图 1-2A),不仅使进入物镜的光线减少,降低了视野的照明度,而且会减少镜口角。当以香柏油($n=1.515$)为介质时,由于它的折射率与玻璃的相近,光线经过玻片后可直接通过香柏油进入物镜而不发生折射(图 1-2B),不仅增加了视野的照明度,更重要的是通过增加数值孔径达到提高分辨率的目的。可见光的波长平均为 $0.55 \mu\text{m}$ 。当使用数值孔径为 0.65 的高倍物镜时,它能辨别两点之间的距离为 $0.42 \mu\text{m}$;而使用数值孔径为 1.25 的油镜时,能辨别两点之间的距离则为 $0.22 \mu\text{m}$ 。

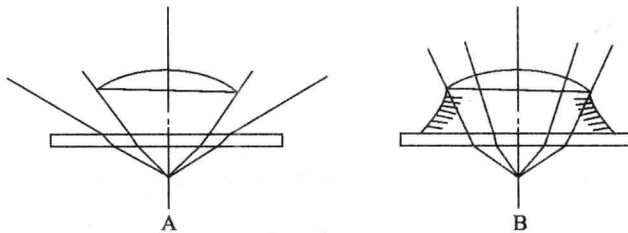


图 1-2 介质为空气(A)与介质为香柏油(B)时光线通过物镜的比较

三、实验器材

1. 细菌染色片:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的染色片。
2. 器材:显微镜,香柏油,双层瓶,镜头擦拭液(乙醚与乙醇比例为7:3的混合液),擦镜纸。

四、实验方法

(一)观察前的准备

1. 将显微镜置于平稳的实验台上,镜座距实验台边沿约为 4 cm 。
2. 调节光源:将低倍物镜转到工作位置,把光圈完全打开,聚光器升至距载物台 1 mm 左右。转动反光镜采集光源,光线较强的天然光源宜用平面镜,光线较弱的天然光源或人工光源宜用凹面镜。如果是电光源的显微镜,将电源打

开,旋转亮度调节旋钮将视场亮度调至合适。调光至视野内均匀明亮为止,观察染色玻片时,光线宜强;观察未染色玻片时,光线不宜太强。

(二)低倍镜观察染色玻片

首先上升镜筒,将枯草芽孢杆菌染色玻片置于载物台上,用标本夹夹住,将观察位置移至物镜正下方,物镜降至距玻片 0.5 cm 处,适当缩小光圈,然后两眼从目镜观察,转动粗调节器使物镜逐渐上升(或使镜台下降)至发现物像时,改用细调节器调节到物像清楚为止。移动玻片,把合适的观察部位移至视野中心。

(三)高倍镜观察

眼睛离开目镜从侧面观察,旋转物镜转换器将高倍镜转至正下方,注意避免镜头与玻片相碰。再由目镜观察,仔细调节光圈,使光线的明亮度适宜。用细调节器校正焦距使物镜清晰为止。将最适宜观察部位移至视野中心,绘图。不要移动玻片位置,准备用油镜观察。

(四)油镜观察

1. 将载物台下降约 2 cm,将油镜转至正下方,在玻片标本的镜检部位(镜头的正下方)滴一滴香柏油。

2. 从侧面注视,小心慢慢上升载物台,使油镜浸在油中至油圈不扩大为止,镜头几乎与玻片接触,但不可压及玻片,以免压碎玻片,损坏镜头。

3. 将光线调亮,从目镜观察,用粗调节器将载物台徐徐下降(切忌反方向旋转),当视野中有物像出现时,再用细调节器校正焦距。如因载物台上升未到位或载物台上升太快未找到物像,必须再从侧面观察,将载物台降下,重复操作直至物像看清为止。仔细观察并绘图。

(五)镜检完毕后的处理

1. 移开物镜镜头。

2. 取出玻片。

3. 清洁油镜:油镜使用完毕,须用擦镜纸擦去镜头上的香柏油,再用擦镜纸蘸少许镜头擦拭液擦掉残留的香柏油,最后再用干净的擦镜纸擦干残留的镜头擦拭液。

4. 擦净显微镜,将各部分还原。

五、注意事项

1. 使用油镜必须按先用低倍镜和高倍镜观察,再用油镜观察的程序操作。

2. 下降镜头时,一定要从侧面注视,切忌用眼睛对着目镜,边观察边上升载物台,以免压碎玻片损坏镜头。

3. 注意保持显微镜的洁净,对金属部分要用软布擦拭,擦镜头必须用擦镜纸,切勿用手或用普通布、纸等,以免损坏镜头。

六、实验报告

分别绘出在高倍镜和油镜下观察到的枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的形态。

七、思考题

1. 使用油浸物镜观察分辨率高的依据是什么?
2. 使用油浸物镜观察时应注意哪些问题?
3. 当物镜从低倍镜转到高倍镜和油镜时,对照明度有何要求? 应如何调节光线?
4. 用油镜观察时,玻片为什么要完全晾干?

实验二 细菌的简单染色和革兰氏染色

一、实验目的

学习细菌的简单染色法和革兰氏染色法的实验原理和实验操作。

二、实验原理

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 值下降时,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的方法,简单染色一般难于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。该染色法之所以能将细菌分为 G^+ 菌和 G^- 菌,是由这两类菌的细胞壁结构和成分的不同所决定的。 G^- 菌的细胞壁中含有较多易被乙醇溶解的类脂质,而且肽聚糖层较薄、交联度低,故用乙醇或丙酮等有机溶剂脱色时溶解了类脂质,增加了细胞壁的通透性,使初染的结晶紫和碘的复合物易于渗出,结果细菌就被脱色,再经番红复染后就成红色。 G^+ 菌细胞壁中肽聚糖层厚且交联度高,类脂质含量少,经脱色剂处理后反而使肽聚糖层的孔径缩小,通透性降低,草酸铵结晶紫与碘的复合物不易被脱掉,因此细菌仍保留初染时的紫色。

三、实验器材

1. 菌种:培养 12~16 h 的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)或枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),培养 24 h 的大肠杆菌(*Escherichia coli*)。