



“十三五”普通高等教育本科规划教材

环境工程微生物 实验技术

徐爱玲 主 编

宋志文 副主编



中国电力出版社
CHINA ELECTRIC POWER PRESS



“十三五”普通高等教育本科规划教材

环境工程微生物 实验技术

主 编 徐爱玲
副主编 宋志文
编 写 夏文香 孙好芬 谢经良



中国电力出版社
CHINA ELECTRIC POWER PRESS

内 容 提 要

本书为“十三五”普通高等教育本科规划教材，包括基础微生物学实验技术、现代微生物学实验技术、环境微生物检测与评价技术、污染物微生物处理与资源化综合实验技术四方面的内容。书中配有大量实际操作图例，具有可读性和实用性。

本书力图实现让学生在了解、掌握常用环境微生物实验原理和基本操作技能的基础上，通过相关综合设计实验来达到提高实验实际操作和设计的能力。

本书主要作为高等院校环境工程、环境科学、环境监测、生物和给排水等专业的教材，也可供相关专业的科学技术人员参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

环境工程微生物实验技术/徐爱玲主编. —北京: 中国电力出版社, 2017. 3

“十三五”普通高等教育本科规划教材

ISBN 978 - 7 - 5198 - 0253 - 0

I. ①环… II. ①徐… III. ①环境微生物学—实验—高等学校—教材 IV. ①X172 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 314061 号

出版发行: 中国电力出版社

地 址: 北京市东城区北京站西街 19 号 (邮政编码 100005)

网 址: <http://www.cepp.sgcc.com.cn>

责任编辑: 熊荣华 (010-63412543)

责任校对: 马 宁

装帧设计: 张俊霞 赵姗杉

责任印制: 吴 迪

印 刷: 北京天宇星印刷厂

版 次: 2017 年 3 月第一版

印 次: 2017 年 3 月北京第一次印刷

开 本: 787 毫米×1092 毫米 16 开本

印 张: 9.5

字 数: 230 千字

定 价: 30.00 元

版 权 专 有 侵 权 必 究

本书如有印装质量问题, 我社发行部负责退换

前 言

环境工程微生物学重点研究污染环境中的微生物学，是环境科学中的一个重要分支。它主要以微生物学科的理论与技术为基础，研究自然环境中的微生物群落、结构、功能与动态；研究微生物对不同环境中的物质转化及能量变迁的作用与机理，进而考察其对环境质量的影响；研究微生物与污染环境的相互关系，特别是如何利用微生物有效降解日趋严重的多种多样的环境污染物，为解决全世界环境污染问题提出一些有效、可持续发展的方法和技术及理论基础。环境工程微生物实验技术是环境工程、环境科学、环境监测等专业本科生的专业基础实验课。掌握必要的环境工程微生物实验技术对于认识和理解环境工程微生物学的相关理论，以及从事环境和相关专业的研究工作具有重要意义。

目前环境工程微生物学实验教材较少，而微生物技术在环境领域的地位又日益突出，因此编者在环境工程微生物本科实验教学及总结前人的经验基础上完成了本教材的编写。全书共分为四章，其中第一章介绍基础微生物学实验技术，包括十个实验；第二章介绍现代微生物学实验技术，包括十个实验；第三章介绍环境微生物检测与评价实验技术，包括十个实验；第四章介绍污染物微生物处理与资源化综合实验技术，包括六个实验。

限于编者水平，加上时间仓促，书中难免存在疏漏和不妥之处，敬请读者批评指正。

编 者

2016年10月于青岛理工大学

目 录

前言

第一章 基础微生物学实验技术	1
实验一 微生物形态和结构观察.....	1
实验二 细菌的革兰氏染色.....	4
实验三 显微镜测微技术和微生物显微镜直接计数.....	7
实验四 培养基的制备及消毒.....	11
实验五 微生物的稀释涂布及平板计数.....	15
实验六 细菌纯化分离、培养和接种技术.....	18
实验七 细菌生长曲线的测定.....	21
实验八 菌种的紫外诱变.....	25
实验九 菌种保藏.....	29
实验十 微生物生理性质检测.....	34
第二章 现代微生物学实验技术	39
实验十一 细菌总基因组 DNA 的提取纯化及检测.....	39
实验十二 环境微生物基因的 PCR 扩增.....	41
实验十三 实时荧光定量 PCR 技术.....	45
实验十四 凝胶的制备及电泳技术.....	48
实验十五 RNA 的提取及逆转录.....	52
实验十六 蛋白质的提取纯化.....	55
实验十七 质粒的分离纯化和鉴定.....	56
实验十八 感受态细菌的制备及细菌的转化.....	61
实验十九 重组质粒的定向克隆及蓝白筛选.....	63
实验二十 酶活性检测.....	67
第三章 环境微生物检测与评价技术	71
实验二十一 水中细菌学检测.....	71
实验二十二 废水生化需氧量的测定.....	76
实验二十三 富营养化湖水中藻类的测定(叶绿素 α 法).....	79
实验二十四 空气中微生物数量的检测.....	82
实验二十五 变性梯度凝胶电泳技术分析污水处理系统中微生物的多样性.....	85
实验二十六 限制性片段长度多态性技术分析污水处理系统中微生物的多样性.....	87
实验二十七 环境水体中典型致病菌的定量 PCR 检测.....	93

实验二十八	物理和化学因素对微生物生长发育的影响	96
实验二十九	Biolog 分析废水微生物代谢特性	101
实验三十	活性污泥脱氢酶活性的测定	104
第四章	污染物微生物处理与资源化	107
实验三十一	活性污泥的培养及曝气生物滤池对污水的生物处理	107
I	活性污泥的培养	107
II	曝气生物滤池对污水的生物处理	109
实验三十二	废水厌氧消化	112
实验三十三	石油高效降解菌株的分离鉴定及性质研究	117
实验三十四	固体废物处理与资源化方法	125
I	碱溶性金属废物碱浸—电解资源化（含锌废物碱浸—电解回收 金属锌粉工艺简介）	125
II	固体废物破碎与筛选	130
III	固体废物热值、含水率测定	133
IV	固体废物浸出毒性实验	134
V	农作物秸秆制备活性炭	136
实验三十五	微生物堆肥技术	137
实验三十六	室内甲醛的微生物去除	142
参考文献	146

第一章 基础微生物学实验技术

实验一 微生物形态和结构观察

一、实验目的

1. 了解普通光学显微镜的构造、基本原理、维护及保养方法；
2. 学习并掌握普通光学显微镜的正确使用方法；
3. 掌握使用油镜观察细菌形态的基本技术。

二、实验原理

1. 显微镜的基本结构

普通光学显微镜是利用目镜和物镜两组透镜系统来放大物像的，由一组光学系统和支持及调节光学系统的机械系统组成（见图 1-1）。

(1) 光学系统：包括目镜、物镜、聚光器、反光镜、滤光片、虹彩光圈等，较好的显微镜有内光源。

(2) 机械系统：包括镜筒、物镜转换器、载物台、镜臂、镜座及调节器（粗准焦螺旋、细准焦螺旋）等。

2. 显微镜的光学原理

成像原理（光路）：光源→虹彩光圈→聚光器→通光孔→标本→物镜→镜筒→目镜→人眼

3. 油镜工作原理

(1) 增加照明强度。油镜与其他物镜的不同之处在于载玻片与接物镜之间的介质不是空气，而是与玻璃折射率（ $n=1.55$ ）相仿的镜油（通常选用香柏油，其折射率 $n=1.52$ ）。当光线通过载玻片后，可以直接通过香柏油进入物镜，几乎不发生折射（见图 1-2），增加了视野的进光量，从而使物像更加清晰。

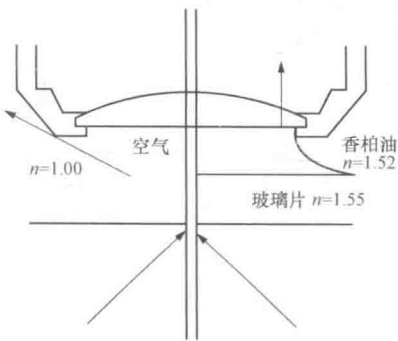


图 1-2 干燥系物镜与油浸系物镜光线通路

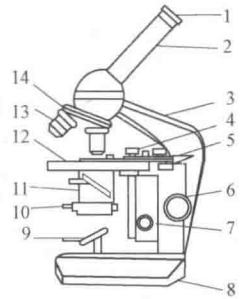


图 1-1 显微镜的结构

- 1—目镜；2—镜筒；3—镜臂；
- 4—标本移动器；5—粗动限位器；
- 6—粗调节器；7—细调节器；
- 8—底座；9—反光镜；
- 10—聚光器孔径光圈；11—聚光器；
- 12—镜台（载物台）；13—物镜；
- 14—物镜转换器

(2) 增加显微镜的分辨率。显微镜的放大倍数=接物镜放大倍数×接目镜放大倍数。

显微镜的分辨率：表示显微镜辨析两点之间距离的能力。可用公式表示为

$$D = \lambda / 2n \cdot \sin(\alpha/2)$$

式中 D ——物镜分辨出物体两点间的最短距离， D 值越小，分辨率越高，看到的物像越清晰；

λ ——可见光的波长（ $0.4 \sim 0.77 \mu\text{m}$ ，平均 $0.555 \mu\text{m}$ ）；

n ——物镜和被检标本间介质的折射率；

α ——镜口角（即光线入射角，最大为 120° ，见图 1-3）。

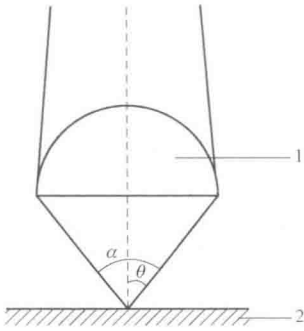


图 1-3 物镜的光线入射角

1—物镜前透镜；2—载玻片；
 α —镜口角； θ —镜口角的半数

油镜的透镜很小，光线通过玻片与油镜头之间的空气时，因从一个介质（玻璃）进入到另一折射率不同的介质即空气（折射率为 1.0）而引起折射或全反射使射入透镜的光线减少，造成亮度不够而观察不清。若在油镜与载玻片之间加入和玻璃的折射率（1.55）相近似的香柏油（折射率 1.52），则使进入透镜的光线增多，视野亮度增强，使物像明亮清晰。由于细菌体积微小，故在细菌的形态学研究中，经常需要借助显微镜油镜，才能比较清楚地进行观察。因此，必须熟练地掌握油镜的使用及保护方法。

三、实验材料

1. 菌种

大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、乳杆菌 (*Lactobacillus*)、变形杆菌 (*Proteus bacillus vulgaris*) 等细菌染色片。

2. 溶液或试剂

香柏油、乙醇—乙醚 (V : V = 3 : 7) 混合液。

3. 仪器或其他用具

普通光学显微镜、擦镜纸等。

四、实验步骤

普通光学显微镜的使用流程：

取镜→安置→调光源→调目镜→调聚光器→镜检（低倍镜→高倍镜→油镜）→清洁物镜镜头→复原。

1. 观察前的准备

(1) 显微镜的安置。拿显微镜时，应一手握镜臂，一手托镜座，置于平整的实验台上，镜座距实验台边缘 3~4cm，使用前先熟悉显微镜的结构和性能。检查各部分零件是否齐全，镜身有无尘土，镜头是否洁净。镜检时姿势要端正。

(2) 调节光源。安装在镜座内的光源灯可通过调试电压以获得适当的照明亮度。开闭光圈，调节光线强弱，直至视野内得到最均匀最适宜的亮度为止。

(3) 调节双筒显微镜的目镜。双筒显微镜的目镜间距可以根据使用者的个人情况适当调节。

(4) 聚光器数值孔径值的调节。调节聚光器虹彩光圈值与物镜的数值孔径值相符或略低。

2. 显微镜观察

物镜的使用：先低倍、后高倍、再油镜。

调焦的规律：由上而下，勿使物镜镜头碰触玻片，以免损坏物镜。

(1) 低倍镜观察。将标本玻片置于载物台上，用标本夹夹住，移动推进器使观察对象处在物镜的正下方，下降 10×物镜，使其接近标本，先用粗调节器（粗准焦螺旋）将载物台升至最高，再缓慢下降直至出现图像后再用细调节器（细准焦螺旋）调节图像至清晰。通过标本夹推进器慢慢移动玻片，认真观察标本各部位，找到合适目的物，仔细观察。

(2) 高倍镜观察。在低倍镜下找到合适的观察目标并将其移至视野中心后转动物镜转换器将高倍镜移至工作位置,对聚光器光圈及视野进行适当调节后微调细调节器使物像清晰,利用推进器移动标本仔细观察并记录。

(3) 油镜观察。在高倍镜下找到合适的观察目标将其移至视野中心,将高倍镜转离工作位置,在待观察的样品区域滴上一滴香柏油,将油镜转到工作位置,油镜头头此时应正好浸泡在镜油中。将聚光器升至最高位置并开足光圈,保证其达到最大的效能。调节照明使视野的亮度合适,微调细调节器使物像清晰,利用推进器移动标本仔细观察并记录所观察到的结果。

使用油镜观察染色标本时,光线宜强,可将光圈开大,聚光器上升到最高,光线调至最强。

注意: 转换物镜时,不可使高倍镜经过滴有镜油的区域。

3. 显微镜用毕后的处理

(1) 上升镜筒,取下玻片。

(2) 用擦镜纸擦去镜头上的香柏油,然后用擦镜纸蘸少许乙醇—乙醚(V:V=3:7)混合溶液擦去镜头上残留的油迹,然后再用干净的擦镜纸擦去残留的清洗液。

(3) 用擦镜纸清洁其他物镜和目镜,用绸布清洁显微镜的金属部件。

(4) 将各部分还原,将光源灯亮度调至最低后关闭,将最低放大倍数的物镜转到工作位置;同时将载物台降低到最低位置,并降下聚光灯。

4. 显微镜保养和使用中的注意事项

(1) 不准擅自拆卸显微镜的任何部件,以免损坏。

(2) 目镜和物镜镜面只能用擦镜纸擦,而不能用手指或粗布去擦,以保证其光洁度。

(3) 观察标本时,必须依次用低、中、高倍镜,最后用油镜。若已使用过油镜,则不要再用高倍镜,以免镜油污染镜头难以清洁。当目视接目镜时,特别在使用油镜时,切不可使用粗调节器,以免压碎玻片损伤镜面。

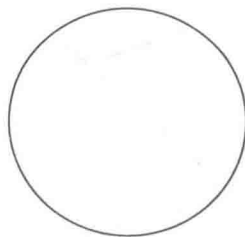
(4) 拿显微镜时,一定要右手拿镜臂、左手托镜座,不可单手拿,更不可倾斜拿。

(5) 显微镜应存放在阴凉干燥处,以免镜片滋生霉菌而腐蚀镜片。

五、实验记录

绘出所观察微生物的形态图,描述所观察微生物的特征,标明菌名(中文及拉丁文名称)、放大倍数、菌体形状、颜色、有无芽孢、排列方式等。

结果记录:



菌名(拉丁文): _____

观察物镜: _____ 放大倍数: _____

菌体形状: _____ 排列方式: _____

颜色：_____ 有无芽孢：_____

六、思考题

1. 用油镜观察时应该注意哪些问题？在载玻片和镜头之间滴加香柏油有什么作用？
2. 什么是物镜同焦现象？它在显微镜观察中有什么意义？
3. 影响显微镜分辨率的因素有哪些？

实验二 细菌的革兰氏染色

一、实验目的

1. 学习微生物涂片、染色的基本技术，掌握细菌的革兰氏染色法；
2. 了解革兰氏染色的原理及其在细菌分类学上的意义；
3. 了解芽孢、荚膜和鞭毛染色的原理和技术；
4. 初步认识细菌的形态特征。

二、实验原理

单染色法：只用一种染色剂进行染色，只能观察微生物的大小、形状和细胞排列状况，不能鉴别微生物及它的特殊构造等。由于菌体极小，折射率低，在显微镜下不容易看清，将其染色使菌体和背景之间反差增大，折射率增强，就容易看清。

复染色法：用两种或两种以上染色剂进行染色，有协助鉴别微生物的作用，故也称鉴别染色法。

1. 革兰氏染色法

革兰氏染色法是一种鉴别性的染色方法，基本步骤为：先用初染剂结晶紫进行初染，再用碘液媒染，然后用乙醇（或丙酮）脱色，最后用复染剂番红复染。结果细胞保留初染剂蓝紫色的细菌，则为革兰氏阳性菌；细胞为复染剂红色的细菌，则为革兰氏阴性菌。其机理是由于细菌细胞壁的化学组成及结构和通透性不同的缘故。

G^- 菌肽聚糖层较薄，交联度低，含较多脂质，故用乙醇等有机溶剂脱色时类脂质溶解，增加了细胞的通透性，使初染的结晶紫—碘的复合物易于渗出，经番红或沙黄复染呈红色。

G^+ 菌细胞壁结构致密，用脱色剂处理后，肽聚糖层孔径缩小，通透性降低，故细菌仍保留初染时的紫色。

细菌的革兰氏染色受菌龄、培养基 pH 值和染色技术等因素的影响，并非固定不变。

2. 芽孢、荚膜、鞭毛染色技术

芽孢具有厚而致密的壁，通透性差，含水量低，折光性强，不易着色。在加热条件下加入着色力强的染色剂，让芽孢、菌体与染色剂作用较长时间，使芽孢染上颜色，再使菌体的颜色脱去；然后再用另一种与前者颜色不同的对比度强的染色剂对菌体进行复染，使芽孢和菌体分别呈现出不同的颜色，因而能更明显地衬托出芽孢，以便观察。

荚膜是一层覆盖在某些细菌细胞壁表面的黏性物质，主要成分是多糖类。荚膜与染色剂的亲和力较差，不易着色。荚膜的通透性好，某些染色剂可透过荚膜而使菌体着色。因此，常采用复染色法将菌体和背景着色而荚膜不着色，因而荚膜在菌体周围呈一透明无色圈。

细菌鞭毛非常纤细，直径 10~20nm，只能在电子显微镜下才能观察到。但采用特殊的染色法在光学显微镜下也能见到。其原理是：在染色前先用媒染剂处理，使媒染剂沉积在鞭毛上，将鞭毛加粗，然后再进行染色，便能在油镜下看见鞭毛的形状和着生方式。

三、实验材料

1. 菌种

酵母菌 (Yeast)、放线菌 (Actinomycete) 18~24h 营养琼脂斜面培养基。

2. 染色液和试剂

结晶紫染色液：A 液结晶紫 2.0g，95%乙醇 20mL；B 液草酸铵 0.8g，蒸馏水 80mL。将 A 和 B 充分溶解后混合静置 24h 过滤使用。

革氏碘液：碘 1g，碘化钾 2g，蒸馏水 300mL。

番红染液：2.5%番红的乙醇溶液 10mL，蒸馏水 100mL，混合过滤。

脱色液：95%乙醇。

乙醇—乙醚 (V : V = 3 : 7) 混合液、香柏油、生理盐水等。

3. 仪器和其他用具

普通光学显微镜、载玻片、盖玻片、接种针 (环)、擦镜纸、酒精灯、吸水滤纸、火柴、玻璃铅笔、玻片夹或镊子等。

四、实验步骤

1. 涂片

(1) 取一片洁净的载玻片，将其在火焰上微微加热，除去上面的油脂，冷却，在中央部位滴加一小滴无菌水，用接种环在火焰旁从培养 24h 的斜面上挑取少量菌体与水混合；烧去环上多余的菌体后，再用接种环将菌体涂成直径约 1cm 的均匀薄层。制片是染色的关键，载玻片要洗净，不得沾污油脂，菌体才能涂布均匀。

注意：初次涂片，取菌量不应过大，以免造成菌体重叠。

(2) 三区混合涂片法：在玻片的左右端各加一滴水，用无菌接种环挑少量金黄色葡萄球菌或枯草芽孢杆菌 (A 菌) 与左边水滴充分混合成仅有金黄色葡萄球菌的区域，并将少量的菌液延伸至玻片的中央；再用无菌的接种环挑少量大肠杆菌 (B 菌) 与右边水滴充分混合成仅有大肠杆菌的区域，并将少量大肠杆菌菌液延伸至玻片中央，在中央区域形成含有两种细菌的混合菌区，如图 2-1 所示。

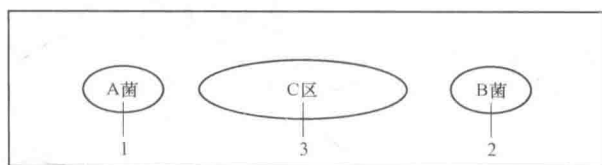


图 2-1 三区涂片法示意图

1—金黄色葡萄球菌或其他革兰氏阳性菌；2—大肠杆菌；3—AB 两菌混合区

2. 干燥

涂布后，待其自然干燥。

3. 固定

将已干燥的涂片标本面向上，在微火上通过 3~4 次进行固定。固定的作用是为杀死细

菌，使蛋白质凝固，菌体牢固黏附于载玻片上，染色时不易被染液或水冲掉，增加菌体对染色剂的结合力，使涂片易着色。

4. 染色

在涂片处滴加结晶紫染色液 1~2 滴，使其布满涂菌部分，染色 1min。斜置载玻片，倾去染色液后用水轻轻冲去染色液至流水变清。注意水流不得直接冲在涂菌处，以免将菌体冲掉。

5. 媒染

滴加革氏碘液冲去残水，并用碘液覆盖 1min，用水冲去碘液。

6. 乙醇脱色

斜置载玻片于一烧杯上，滴加 95% 乙醇，轻轻摇动载玻片，至乙醇液不呈现紫色时停止（约 0.5min）；立即用水冲净乙醇并用滤纸轻轻吸干。脱色是革兰氏染色的关键，必须严格掌握乙醇的脱色程度。若脱色过度则阳性菌被误染为阴性菌，而脱色不够时阴性菌被误染为阳性菌。

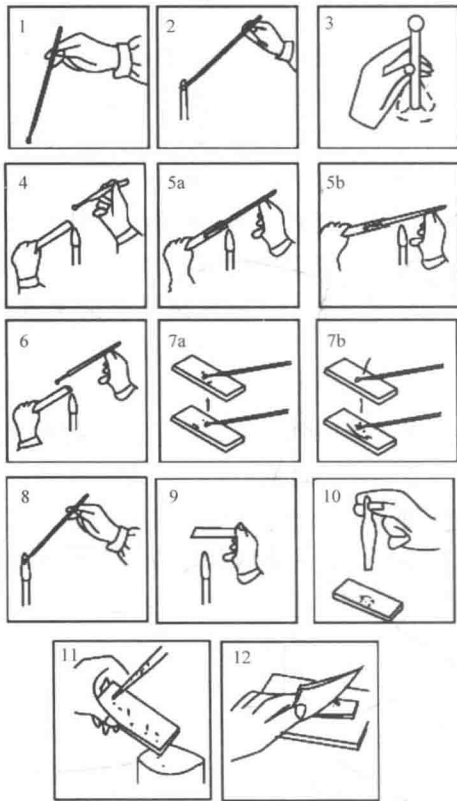


图 2-2 细菌染色标本制作及染色过程

1—取接种环；2—灼烧接种环；3—摇匀菌液；4—灼烧管口；5a—从菌液中取菌（或 5b 从斜面菌种中取菌）；6—取菌毕，再灼烧管口，加塞；7a—将菌液直接涂片（或 7b 从斜面菌种中取菌与玻片上水滴混匀涂片）；8—烧去接种环的残菌；9—固定；10—染色；11—水洗；12—吸干

7. 复染

番红染色液复染 1min 后水洗。

8. 吸干并镜检

用滤纸轻轻吸干载玻片上的水分，干燥后镜检。

G^+ 菌呈蓝紫色， G^- 菌呈红色。在研究工作中要确证未知菌的革兰氏反应时，则需要同时用已知菌进行染色作为对照。

图 2-2 为细菌染色标本制作及染色过程示意图。

简单染色法步骤：涂片→干燥→固定→染色→水洗→吸干→镜检。

革兰氏染色法步骤：涂片→干燥→固定→结晶紫初染→水洗→碘液媒染→水洗→95% 乙醇脱色→水洗→番红复染→水洗→吸干→镜检。

9. 注意事项

(1) 涂片不宜过厚，勿使细菌密集重叠影响脱色效果，否则脱色不完全会造成假阳性。镜检时应以视野内均匀分散细胞的染色反应为标准。

(2) 火焰固定不宜过热，以玻片不烫手为宜，否则菌体细胞易变形。

(3) 滴加染色液与酒精时一定要覆盖整个菌膜，否则部分菌膜未受处理，亦可造成假象。

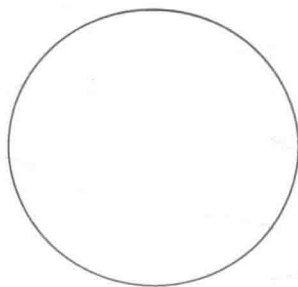
(4) 乙醇脱色是革兰氏染色操作的关键环节。如脱色过度，则 G^+ 菌被误染成 G^- 菌；如脱色不足， G^- 菌被误染成 G^+ 菌。在染色方法正确无误前提下，如菌龄过长，死亡或细胞壁受损伤的 G^+ 菌也会呈阴性反应，故革兰氏染色要用活跃生长期的幼龄培

养菌。

五、实验记录

1. 记录所观察到的 3 种细菌革兰氏染色结果。
2. 按比例大小绘出显微镜下 3 种细菌的形态。

结果记录：



菌名（含拉丁文名称）：_____

观察物镜：_____ 放大倍数：_____

菌体形状：_____ 颜色：_____

革兰氏阴性/阳性：_____

六、思考题

1. 要得到正确的革兰氏染色结果必须注意哪些操作？关键是哪一步？为什么？
2. 现有一株未知杆菌，个体明显大于大肠杆菌，请你鉴定该菌是革兰氏阳性还是革兰氏阴性，如何确定你的染色结果的正确性？
3. 为什么要选用培养 18~24h 菌龄的细菌？

实验三 显微镜测微技术和微生物显微镜直接计数

一、实验目的

1. 学习掌握目镜测微尺的标定及显微镜下测量微生物细胞大小的方法；
2. 了解血球计数板的构造，明确其计数原理；
3. 学习掌握使用血球计数板进行微生物细胞或孢子计数的方法。

二、实验原理

1. 测微技术

微生物细胞的大小，是微生物重要的形态特征之一，也是分类鉴定的依据之一。由于菌体很小，只能在显微镜下来测量。用于测量微生物细胞大小的工具有目镜测微尺和镜台测微尺。目镜测微尺是一块圆形玻片，其中央刻有精确等分的刻度，有刻成为 50 等分的，有刻成 100 等分的。

显微镜下的细胞物像是经过了物镜、目镜两次放大成像后才进入视野的。即目镜测微尺

上刻度的放大比例与显微镜下细胞的放大比例不同，只是代表相对长度，所以使用前须用置于镜台上的镜台测微尺校正，以求得在一定放大倍数下实际测量时的每格长度。镜台测微尺是中央刻有精确等分线的一块载玻片，一般将 1mm 等分为 100 格，每格长 0.01mm（即 $10\mu\text{m}$ ），如图 3-1 所示。

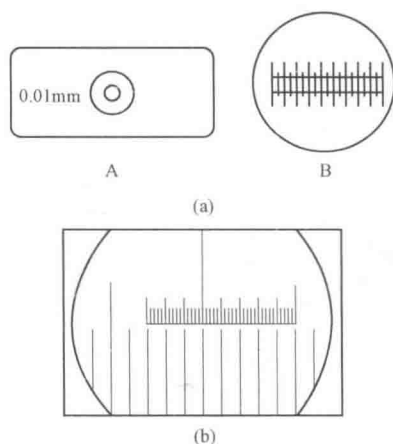


图 3-1 用镜台测微尺校正目镜测微尺
(a) 镜台测微尺 A 及其中央部分的放大 B；
(b) 镜台测微尺校正目镜测微尺时的情况

2. 直接计数

测量微生物数量的方法有很多，通常采用的有显微镜直接计数法、平板计数法、细胞和原生质体总量计测法等。将少量待测样品的悬液置于一种特别的具有确定面积和容积的载玻片上，这种载玻片又称血球计数板（见图 3-2），其是在显微镜下直接计数的一种简便、快速、直观的方法。

血球计数板上刻有一长宽各为 1mm 的方形大格，其体积为 0.1mm^3 。计数板有两种刻度，一种是每大格分为 16 个中格，而每中格又分 25 个小格，每大格为 $400=16\times 25$ 小格；而另一种，则是每大格分为 25 个中格，而每中格又分为 16 个小格，则每大格为 $400=25\times 16$ 小格（计数板上的标识为 XB·K25），如图 3-3 所示。使用血球计数板直接计数时，要先测定每个小方格中微生物的数量，再换算成每毫升菌液（或每克样品）

中微生物细胞的数量。

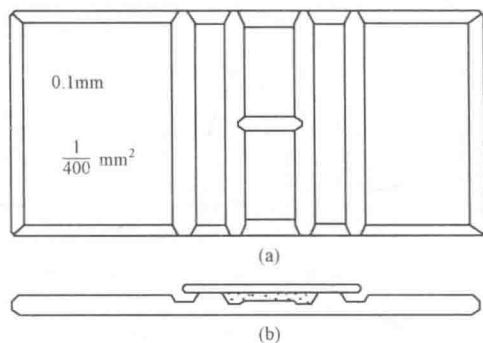


图 3-2 血球计数板的构造

- (a) 平面图（中间平台分为两半，各刻有一个方格网）；
(b) 侧面图（中间平台与盖玻片之间有高度为 0.1mm 的间隙）

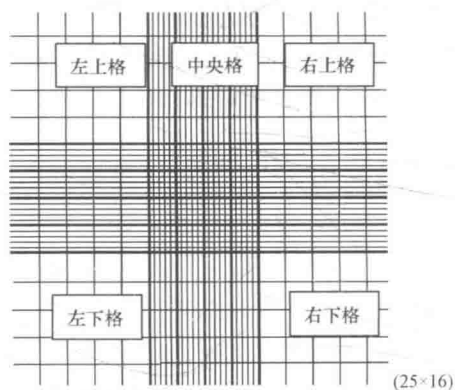


图 3-3 血球计数板计数网的分格

三、实验材料

1. 菌种

酵母菌 (Yeast)，枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

2. 溶液或试剂

酵母菌悬液、香柏油、擦镜液。

3. 仪器或其他用具

光学显微镜、擦镜纸、血球计数板、载玻片、盖玻片、目镜测微尺、镜台测微尺、无菌毛细滴管。

四、实验步骤

1. 微生物细胞大小的测定

(1) 目镜测微尺的安装。把目镜的上透镜旋开，将目镜测微尺轻轻放在目镜的隔板上，使有刻度的一面朝下。旋上目镜透镜，再将目镜插入镜筒内（见图 3-4）。

(2) 校正目镜测微尺。将镜台测微尺放在显微镜的载物台上，使有刻度的一面朝上。先用低倍镜观察，调焦距，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，利用推进器移动镜台测微尺，使两尺在某一区域内两线完全重合，然后分别数出两重合线之间镜台测微尺和目镜测微尺所占的格数（见图 3-1）。用同样的方法换成高倍镜和油镜进行校正，分别测出在高倍镜和油镜下两重合线之间两尺分别所占的格数。

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。

$$\text{目测微尺每小格长度 } (\mu\text{m}) = \frac{\text{两重合线间物镜测微尺所占的格数}}{\text{两重合线间目镜测微尺所占的格数}} \times 10$$

(3) 菌体大小的测定。换上菌体标本片，先在低倍镜下找到目的物，然后在高倍镜、油镜下转动目镜测微尺，测出菌体的长、宽各占几格（不足一格的部分估读一位小数），测出的格数乘以目镜测微尺每格的长度，即等于该菌的大小，一般测量菌的大小要在同一涂片上测定至少 10 个以上菌体，求出平均值，才能代表该菌的大小，而且一般是用对数生长期的菌体进行测定。

2. 微生物的直接计数

(1) 无菌生理盐水适当稀释制备酵母菌悬液。

(2) 镜检血球计数板。

(3) 加样品。血球计数板盖上盖玻片，将酵母菌悬液摇匀，用无菌滴管吸取少许，从计数板平台两侧的沟槽内沿盖玻片的下边缘滴入一滴，利用表面张力沟槽中流出多余的菌悬液。加样后静置 5min，使细胞或孢子自然沉降。

(4) 将加有样品的血球计数板置于显微镜载物台上，先用低倍镜找到计数室所在位置，然后换成高倍镜进行计数。若发现菌液太浓或太稀，需重新调节稀释度后再计数。一般样品稀释度要求每小格内有 5~10 个菌体为宜。每个计数室选 5 个中格（可选四个角和中央的一个中格）中的菌体进行计数。若有菌体位于格线上，则计数原则为计上不计下，计左不计右。如遇酵母出芽，芽体大小达到母细胞的一半时，即作为两个菌体计数。计数一个样品要从两个计数室中计得的平均数值来计算样品的含菌量。

$$\text{细胞数} = A/5 \times 25 \times 1/0.0001 \times B$$

式中 A——5 个格中的菌数；

B——菌液本身的稀释度。



图 3-4 目镜测微尺及镜台测微尺的装置方法

要特别注意的是,加酵母菌液时,量不应过多,不能产生气泡。由于酵母菌菌体无色透明,计数观察时应仔细调节光线,用吕氏碱性美蓝染色液处理酵母菌液。美蓝是一种弱的氧化剂,还原后变成无色,酵母细胞死活的鉴别就是利用美蓝的这一特性。活的酵母细胞由于新陈代谢的不断进行,能将美蓝还原,而死的酵母细胞则不能,染色需严格控制时间。

(5) 清洗。使用完毕后,对血球计数板及盖玻片进行清洗、干燥,放回盒中,以备下次使用。

3. 注意事项

(1) 镜台测微尺的玻片很薄,在标定油镜镜头时,要格外注意,以免压碎镜台测微尺或损坏镜头。

(2) 一般用对数生长期的菌体进行测量,此时菌体的生长情况较为一致。

(3) 计数板使用完毕后,用自来水冲洗,切勿用硬物洗刷;洗后风干,镜检计数室内无残留菌体或其他沉淀物即可,否则须重新洗干净。

(4) 计数室内不可有气泡,如有气泡应重做,因为有气泡后会使计数体积有较大的误差,影响计数结果的准确性。

(5) 为了减少误差,应避免重复或遗漏,凡在方格线上的菌体,只数底线及一侧线上的菌体。

五、实验记录

记录相关数据,填写表 3-1~表 3-3。

表 3-1 目镜测微尺校正结果表

物镜	物镜倍数	目镜测微尺格数	镜台测微尺格数	目镜测微尺每格代表长度 (μm)
低倍镜	$\times 10$			
高倍镜	$\times 40$			
油镜	$\times 100$			

表 3-2 各菌测定结果表

名称	目镜测微尺每格代表的长度 (μm)	宽		长		菌体大小 ($\mu\text{m} \times \mu\text{m}$)
		目镜测微尺平均格数	宽度 (μm)	目镜测微尺平均格数	长度 (μm)	
枯草芽孢杆菌						
酵母菌						

表 3-3 酵母菌显微计数结果表 (A 表示 5 个中格中总菌数, B 表示菌液稀释倍数)

菌种	各中格菌数					A	B	菌数/mL
	1	2	3	4	5			
酵母菌								

六、思考题

1. 为什么更换不同放大倍数的目镜或物镜时,必须用镜台测微尺重新对目镜测微尺进行校正?

2. 在不改变目镜和目镜测微尺, 而改用不同放大倍数的物镜来测定同一细菌的大小时, 其测定结果是否相同? 为什么?
3. 哪些因素会造成血球计数板的计数误差? 应如何避免?

实验四 培养基的制备及消毒

一、实验目的

1. 学习掌握配制培养基的原理;
2. 通过对几种培养基的配制, 掌握配制培养基的一般方法和步骤;
3. 了解干热灭菌、高压蒸汽灭菌、紫外线灭菌和微孔滤膜过滤除菌的原理和应用范围;
4. 学习干热灭菌、高压蒸汽灭菌、紫外线灭菌和微孔滤膜过滤除菌的操作技术。

二、实验原理

培养基是人工配制的适合微生物生长繁殖或积累代谢产物的营养基质, 用以培养、分离、鉴定、保存各种微生物或积累代谢产物。在自然界中微生物种类繁多, 营养类型多样, 加之实验和研究的目的不同, 所以培养基的种类很多。但是, 不同种类的培养基中, 一般都应含有水分、碳源、氮源、无机盐和生长因子等。不同微生物对 pH 要求不一样, 霉菌和酵母菌培养基的 pH 值一般是偏酸性的, 细菌和放线菌培养基的 pH 值一般为中性或微碱性(嗜碱细菌和嗜酸细菌例外)。所以配制培养基时, 要根据不同微生物的要求将培养基 pH 调到合适的范围。

本实验通过配制适用一般细菌、放线菌和真菌的 3 种培养基来了解和掌握配制培养基的基本原理和方法。培养细菌一般用牛肉膏蛋白胨培养基, 这是一种应用十分广泛的天然培养基, 其中的牛肉膏为微生物提供碳源、磷酸盐和维生素, 蛋白胨主要提供氮源和维生素, 而 NaCl 提供无机盐。高氏 I 号培养基是用来培养和观察放线菌形态特征的合成培养基, 如果加入适量的抗菌药物(如各种抗生素、酚等), 则可用于分离各种放线菌。此合成培养基的主要特点是含有多种化学成分已知的无机盐, 这些无机盐可能相互作用而产生沉淀。如高氏 I 号培养基中磷酸盐和镁盐相互混合时易产生沉淀。因此, 在混合培养基成分时, 一般是按配方的顺序依次溶解各成分, 甚至有时还需将两种或多种成分分别灭菌, 使用时再按比例混合。此外, 合成培养基有的还要补加微量元素, 如高氏 I 号培养基中的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的用量只有 0.001%, 因此在配制培养基时需预先配成高浓度的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 储备液, 然后再按需加一定的量到培养基中。马丁氏培养基是一种用来分离真菌的选择性培养基。此培养基是由葡萄糖、蛋白胨、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、孟加拉红(玫瑰红, Rose Bengal)和链霉素等组成, 其中葡萄糖主要作为碳源, 蛋白胨主要作为氮源, KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 作为无机盐, 为微生物提供钾、磷、镁离子。培养基中加入的孟加拉红和链霉素能有效抑制细菌和放线菌的生长, 而对真菌无抑制作用, 因此真菌在这种培养基上可以得到优势生长, 从而达到分离真菌的目的。培养基配好后, 用稀酸或稀碱将其 pH 调至所需酸碱度或自然 pH。在配制固体培养基时还要加入一定量琼脂做凝固剂。

此外, 在微生物实验中, 需要进行纯培养, 不能有任何杂菌污染, 因此对所用器材、培