



面向 21 世纪 课 程 教 材
Textbook Series for 21st Century

微生物学实验指导

李顺鹏 主编

3-33
27

中 国 农 业 出 版 社

面向 21 世纪课程教材
Textbook Series for 21st Century

微生物学实验指导

李顺鹏 主编

中国农业出版社

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验指导/李顺鹏主编. —北京: 中国农业出版社, 2003.3

面向 21 世纪课程教材

ISBN 7-109-08265-2

I. 微... II. 李... III. 微生物学—实验—高等学校—教学参考资料 IV. Q93—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 013513 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 傅玉祥

责任编辑 毛志强 杨国栋

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2003 年 3 月第 1 版 2003 年 3 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×960mm 1/16 印张: 8

字数: 140 千字

定价: 12.10 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

主 编	李 顺 鹏	南 京 农 业 大 学
副 主 编	李 玉 祥	南 京 农 业 大 学
	唐 欣 韵	安 徽 农 业 大 学
参 编	孙 军 德	沈 阳 农 业 大 学
	高 勇 生	江 西 农 业 大 学
	崔 中 利	南 京 农 业 大 学
	盛 下 放	南 京 农 业 大 学
	何 健 航	南 京 农 业 大 学
主 审	闵 航	浙 江 大 学

前 言

微生物学是一门实验性很强的学科，微生物学实验是微生物学的重要组成部分，微生物学实验的理论和方法已经广泛地渗透到现代生命科学的各个领域，发挥着重要作用，微生物学实验已经成为一门十分重要的生物科学基础课实验。

《微生物学实验指导》是与《微生物学》第五版的理论课教学配套的微生物学实验教学指导书。本实验指导的使用对象主要是把微生物学作为专业基础课的农学、园艺学、农业化学、植物营养、环境保护等生物学类和大农学类的学生，也可作为一般涉及微生物研究的工作人员进行一般微生物学实验的参考指导。

为适应现代理论教学与实验教学自成体系的特点，我们在实验指导前面编入微生物学实验的基本理论部分，以帮助使用者对有关理论问题进行回顾和深入，加深实验课的教学质量。本实验指导围绕微生物学实验四大技术，主要收纳最基本的有关微生物学研究实验，希望为初学习者建立一个良好的实验微生物学知识平台。通过学习掌握基本的微生物学实验技能，了解微生物学实验室一般仪器设备的原理与使用方法，了解微生物学实验的设计与实验实施，为学生以后的工作奠定良好的基础。

为了引导学生的创新和开拓精神，本书在每一个实验后列出了思考题内容，以帮助学生复习总结，并在实验操作中列出注意事项，以确保实验的成功。本实验指导共安排了20个实验，可供各校根据具体条件酌情选做。书后附有详细的附录和参考书，供读者查阅和参考。

本实验指导的编写除上述编委会八位同志外，还有南京农业大学于汉寿、赵明文、钟增涛、杨兴明等同志参加编写。由于水平和

时间有限，本书不足之处在所难免，请读者和同行专家提出宝贵意见。

本书承浙江大学生命学院闵航教授主审，对全书进行了仔细的审阅和修改，谨表示衷心的感谢。

作 者

2003年3月

目 录

前言

第一部分 微生物学实验基本技术	1
一、微生物显微与染色技术	1
二、微生物分离纯化技术	13
三、灭菌和消毒技术	16
四、微生物接种技术	25
第二部分 微生物学实验	31
实验一 普通光学显微镜的使用与细菌形态观察	31
实验二 细菌的简单染色与革兰氏染色	33
实验三 细菌特殊结构的染色（附运动性观察）	36
实验四 放线菌形态的观察	42
实验五 水浸片观察酵母菌、霉菌的菌体形态	45
实验六 真菌繁殖体（孢子）的培养与观察	48
实验七 大肠杆菌噬菌斑的观察	51
实验八 昆虫病毒多角体的染色观察	53
实验九 微生物细胞大小的测定	55
实验十 培养基的配制	58
实验十一 细菌纯种的分离	68
实验十二 用选择性培养基分离自生固氮菌	70
实验十三 微生物菌落形态特征及其在分类鉴定中的应用	71
实验十四 微生物的计数与土壤微生物的分离	74
实验十五 环境条件对微生物生长的影响	80
实验十六 微生物代谢特性及其在分类鉴定中的应用	83
实验十七 微生物间的拮抗作用和抗生素的效价测定	87
实验十八 微生物诱变育种——紫外线诱变	94

实验十九 食品中细菌总数和大肠菌群数的检测	101
实验二十 Ames 试验	103
附录	108
一、染色液的配制	108
二、微生物实验室常用试剂与缓冲液	111
三、实验室常用培养基配方	112
四、MPN 法计数统计表	116
五、微生物实验室常用玻璃器皿清洗法	117
六、教学常用微生物菌种	120

第一部分 微生物学实验基本技术

一、微生物显微与染色技术

(一) 微生物显微技术

微生物个体微小，大小通常用微米表示，肉眼难于看见，必须利用显微镜放大后才能看见，所以说显微镜是微生物工作者必不可少的工具。因此，深入了解显微镜的结构和工作原理、熟练操作显微镜是每一个微生物工作者必备的素质之一。

从工作原理和结构上显微镜可分为光学显微镜和电子显微镜。其中光学显微镜有普通光学显微镜、相差显微镜、暗视野显微镜、荧光显微镜、激光共聚焦显微镜等。电子显微镜有透射电子显微镜和扫描电子显微镜等。

本章重点介绍几种常用显微镜的结构和工作原理。

(二) 普通光学显微镜 (light microscopy)

光学显微镜是由一组光学放大系统和机械支持及调节系统组成 (图 1-1-1)。

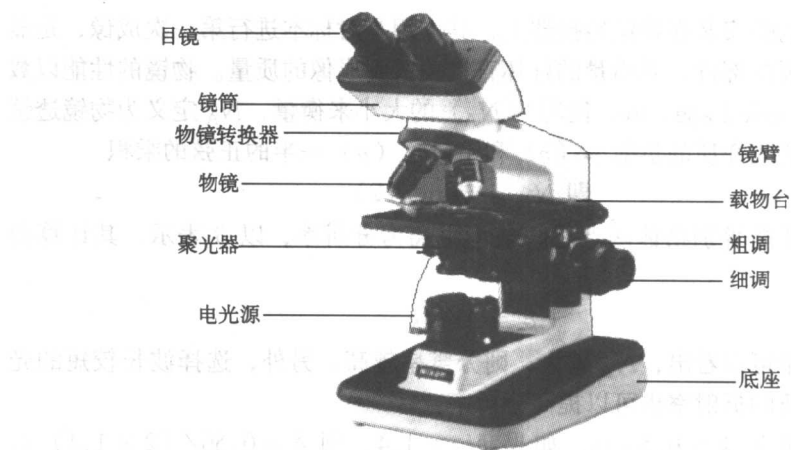


图 1-1-1 光学显微镜构造

1. 机械支持及调节系统 机械支持及调节系统是整个显微镜的骨架，对

光学系统起支撑和调节作用，部件包括镜座、镜臂、镜台、物镜转换器、镜筒和粗、细调节旋钮等。

镜座：镜座是显微镜的基座，可使显微镜平稳地放置在桌面上。

镜臂：镜臂用于支撑镜筒、镜台和调节系统。

镜台：镜台又叫载物台，是放置标本的地方，多为方形。镜台上有标本固定和位置移动系统，用于固定标本和在平面上移动。标本固定和位置移动系统上附带有游标尺，可用于标本定位。

镜筒：镜筒是连接物镜和目镜的金属筒，其上端插入目镜，下端和物镜转换器相连接。

物镜转换器：物镜转换器安装在镜筒下端，用于装配物镜，装配有 4~6 个不同放大倍数的物镜，转动物镜转换器可以选择到合适的物镜。

粗细调节旋钮：粗细调节旋钮位于镜臂基部，可使镜臂上下移动，用于调节焦距。

2. 光学系统 光学系统架构于机械系统上，包括目镜、物镜、聚光器和光源。

目镜：目镜的作用是使物镜放大的实像再放大一次，且物像由此进入观察者眼中，一般由两块透镜组成，上面一块称为接目透镜，下面一块称为场镜，在两块透镜之间或在两块透镜下方有一个由金属制成的环状光栅，又叫视场光栅，物镜放大后的中间像就落在视场光栅处，目镜测微尺应安装在视场光栅处。

物镜：物镜安装在物镜转换器上，其作用是对标本进行第一次成像，是显微镜中很重要的部件，其质量的好坏直接关系到成像的质量。物镜的性能以数值孔径 (numerical aperture, 简称为 N_A) 的大小来衡量， N_A 定义为物镜透镜与被检物体之间介质的折射率 (η) 和镜口角 (μ) 一半的正弦的乘积。

$$\text{即 } N_A = \eta \sin(\mu/2)$$

显微镜所能辨别物体两点之间最小距离为分辨率，以 δ 表示，其计算公式如下：

$$\delta = \lambda / N_A$$

从公式中可以看出， N_A 越大，则分辨率越高。另外，选择波长较短的光源及增大介质的折射率也可以提高分辨率。

日光的波长 $\lambda = 0.56\mu\text{m}$ ，如果 $N_A = 1.4$ ，则 $\delta = 0.56 / (2 \times 1.4) = 0.20\mu\text{m}$ ；

如使用波长 λ 为 $0.27\mu\text{m}$ 的紫外光，则

$$\delta = 0.27 / (2 \times 1.4) = 0.10\mu\text{m}$$

分辨率提高了1倍。

增大物镜与标本之间介质的折射率也是行之有效的方法，在使用油浸物镜观察细菌的形态时，在物镜与标本之间滴加香柏油就是为了增加分辨率，并减少因折射而造成光线散失。

物镜下表面与标本之间或与盖玻片之间的距离称为物镜的工作距离，物镜的放大倍数越大，则其工作距离越短，油镜的工作距离最短，只有约0.2mm。

根据物镜的放大倍数，可将其分为低倍镜、高倍镜和油镜。低倍镜有4×、10×、20×等，高倍镜有40×、60×等，油镜有90×、100×等。

根据物镜和标本之间介质不同，可分为干燥系和油浸系（图1-1-2）。干燥系以空气为介质，其数值孔径小于1，油浸系以香柏油为介质，其数值孔径大于1。

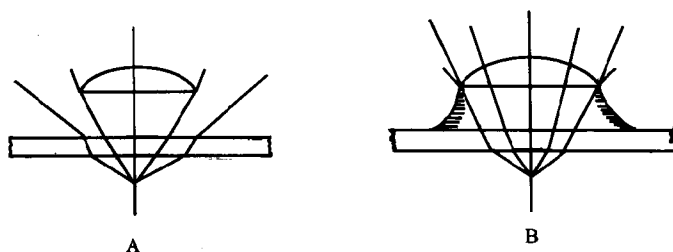


图1-1-2 接物镜干燥系(A)和油浸系(B)的光线图

显微镜的总放大倍数为物镜放大倍数乘以目镜的放大倍数。如在观察某标本时，物镜的放大倍数为100倍，目镜的放大倍数为10倍，则总的放大倍数为 $100 \times 10 = 1\,000$ 倍。

聚光器：聚光器安装于载物台下，其作用是将从光源来的平行光线聚焦于标本上，以增强照明度，得到清晰明亮的效果，可以通过调节旋钮调节聚光器上下移动以适应不同厚度的载玻片（0.9~1.3mm）。聚光器上附有孔径光栅，通过调节孔径光栅孔径的大小可以调节进入物镜光线的强弱。

光源：光源有自然光源（反光镜）和电光源两种。老式显微镜一般采用自然光源，其取光设备是反光镜。反光镜有两个面，一面是平面镜，另一面是凹面镜。反光镜可自由转动，以调节位置，使光线能射向聚光器和标本。有聚光镜的显微镜，无论是使用高倍还是使用低倍镜，均使用平面镜，只有在光线不足时才使用凹面镜。无聚光器的显微镜，在使用低倍镜时用平面镜，在使用高倍镜时用凹面镜。新式显微镜设置有内源性电光源，使用方便，不受环境光源的影响。

3. 显微镜的成像原理（图1-1-3） 由光源射入的光线经聚光镜聚焦于被

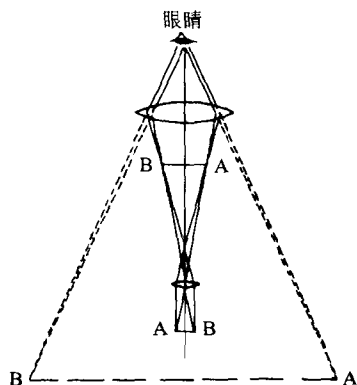


图 1-1-3 光学显微镜成像原理图

检标本上，使标本得到足够的照明，由标本反射或折射出的光线经物镜放大，在目镜的视场光栅处形成放大的实像。此实像再经接目透镜放大成虚像。

(三) 相差显微镜 (phase-contrast microscope)

活的生物细胞内部结构一般无色透明，光线通过细胞时，光的波长（颜色）和振幅（亮度）的变化不大。因此，用普通光学显微镜看不清活细胞内部的细微结构。

相差显微镜又叫相衬显微镜，是一种能将光线通过透明标本时所产生的眼睛不能分辨的光程差（相位差）转化为人眼能够分辨的光强差（振幅差）的显微镜，从而使细胞内部的细微结构能在相差显微镜下清晰可见。

1. 相差显微镜的结构 相差显微镜的结构和普通的显微镜相似。所不同的是它有特殊的结构：环状光栅、相板、合轴调节望远镜和绿色滤光片。

环状光栅：其上有一环形开孔，照明光线只能从环形的透明区形成一圆柱形光柱进入聚光镜再斜射到标本上。大小不同的环状光栅分别和不同放大倍数的物镜相匹配，位于聚光器的前焦点平面上，与聚光器一起组成转盘聚光器。在转盘的前端有一标示孔，表示当前的光栅种类，0 表示没有环状光栅相当于普通聚光镜，10、20、40、100 分别表示要和 $10\times$ 、 $20\times$ 、 $40\times$ 、 $100\times$ 。

相差物镜：相差物镜的后焦平面上装有相板，这是相差显微镜很重要的结构。相板上有环状光栅相对应的环状共轭面和补偿面，相板上镀有两种金属膜，即吸收膜和相位膜。吸收膜上镀有铬、银等金属。吸收膜能吸收通过光线的 60%~90% 以上，相位膜上则镀有氟化镁，能把通过的光线相位推迟 $1/4$ 个波长。

金属膜的镀法有两种：一种是两种金属膜都镀在共轭面上，这种情况下，通过物体的直射光振幅减弱相位推迟 $1/4$ 个波长后和照射物体的绕射光在同一个相位上，合成光振幅相加，使有直射光和绕射光物体要比只有直射光的背景要明亮，产生暗背景中有明亮物体的效果，这种物镜又叫负相衬物镜。另一种镀法是吸收膜镀在共轭面上，相位膜镀在补偿面上，直射光仅振幅减弱而相位不被推迟，绕射光相位被推迟 $1/2$ 个波长，合成光振幅相减，使有直射光和绕射光物体要比只有直射光的背景要暗，产生亮背景中有暗物体的效果，这种物

镜又叫正相衬物镜。

合轴调节望远镜的环状光栅的光环和相差物镜中的相位环很小，使用合轴调节望远镜可以调节两环的环孔相互吻合，光轴完全一致。

滤光片：一般显微镜使用的光源为复色光，常引起相位的变化，为获得良好稳定的相差效果。相差显微镜要求使用波长范围比较窄的单色光，通常采用绿色滤光片来过滤光线。这是因为绿色滤光片滤光效果好，且由于能吸收产热的红光和蓝光，有利于观察活体细胞。

2. 相差显微镜的成像原理 (图1-1-4) 相差显微镜的光路图如图1-1-4所示。从光源发出的光线通过环状光栅形成光柱，光柱经聚光器聚成光束照射在被检物体上，有细胞结构的地方光线即发生直射又发生绕射，背景处光线只发生直射。光线到达相板后，直射光通过共轭面，而绕射光通过补偿面，由于相板上共轭面和补偿面上的金属膜不同，会使这两部分光线产生一定程度的相位差和强度的减弱。当这两部分光线通过透镜会聚进入同一光路后，会产生光的干涉现象，将人眼不可觉察的相位差变成人眼可觉察的振幅差即光强度。

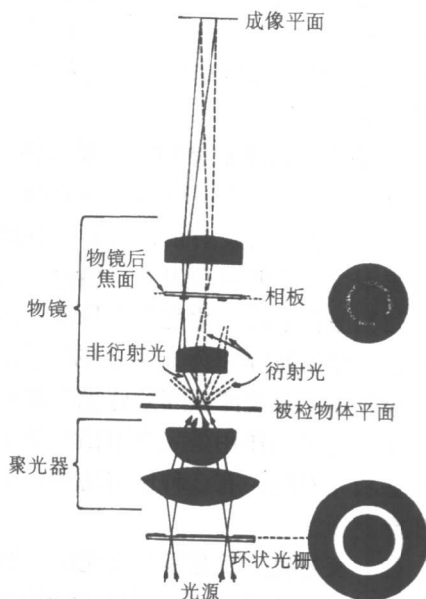


图 1-1-4 相差显微镜成像原理图

(四) 暗视野显微镜 (darkfield microscope) (图1-1-5)

暗视野显微镜又称暗场显微镜，其工作的原理是用侧光照射样品，使样品产生散射光来分辨标本的细节。

暗视野显微镜的结构和普通光学显微镜基本相同。暗视野显微镜特殊的地方是采用了暗场聚光器。暗场聚光器的结构使光线不能由下而上垂直通过被检物体，而是使光线改变方向，使其斜向射向标本。只有从标本上反射或衍射的光线才能进入物镜和目镜，而照明光线则不能进入物镜

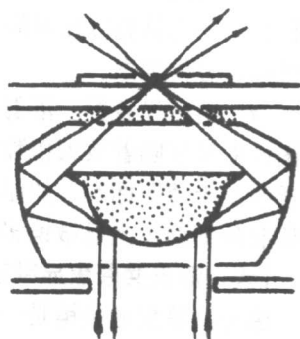


图 1-1-5 暗视野显微镜的暗场聚光器

和目镜,这样就能在黑暗的背景中看到标本受光侧面清晰明亮的轮廓。暗视野显微镜能观察到 $0.004\sim 0.2\mu\text{m}$ 大小的细节。

(五) 荧光显微镜 (fluorescence microscopy)

荧光显微镜是研究免疫荧光细胞化学的基本工具。它是由光源、滤板系统和光学系统等主要部件组成。是利用一定波长的光激发标本发射荧光,通过物镜和目镜系统放大以观察标本的荧光图像。荧光显微镜激发光照射的方式,有透射和落射两种。

1. 荧光显微镜的结构和主要部件

(1) 光源。荧光显微镜一般采用 200W 的超高压汞灯作光源,由石英玻璃制作。超高压汞灯发射很强的紫外和蓝紫光,足以激发各类荧光物质。另外,超高压汞灯工作时散发出大量热能。因此,灯室必须有良好的散热条件。

(2) 滤色系统。滤色系统是荧光显微镜的重要部件,由激发滤板和压制滤板组成。根据光源和荧光色素的特点,激发滤板分为三类,即紫外光激发滤板、紫外蓝光激发滤板和紫蓝光激发滤板,分别可以提供一定波长范围的激发光。压制滤板的作用是完全阻挡激发光通过,提供相应小波长范围的荧光,与激发滤板相对应。有 3 种压制滤板:紫外光压制滤板、紫蓝光压制滤板和紫外光压制滤板。

(3) 反光镜。反光镜的反光层一般是镀铝的。因为铝对紫外光和可见光的蓝紫区吸收少,反射达 90% 以上(而银的反射只有 70%;一般使用平面反光镜)。

(4) 聚光镜。专为荧光显微镜设计制作的聚光器是用石英玻璃或其他透紫外光的玻璃制成。分明视野聚光器的暗视野聚光器两种。

(5) 物镜。各种物镜均可应用,但最好用消色差的物镜,因其自体荧光极微,且透光性能(波长范围)适合于荧光。

(6) 目镜。在荧光显微镜中多用低倍目镜,如 $5\times$ 和 $6.3\times$ 。过去多用单筒目镜。因为其亮度比双筒目镜高一倍以上。但目前研究型荧光显微镜多用双筒目镜,方便观察。

(7) 落射光装置。落射荧光显微镜还具有落射光装置。落射光装置可使荧光图像的亮度随着放大倍数增大而提高,在高放大时比透射光源强,更适用于不透明及半透明标本,如厚片、滤膜、菌落、组织培养标本等的直接观察。近年研制的新型荧光显微镜多采用落射光装置。

(六) 激光共聚焦显微镜 (confocal scanning laser microscope CSLM)

激光共聚焦显微镜是一种新的三维成像设备,可获得普通光学显微镜无法达到的分辨率。同时,具有深度识别能力及纵向分辨率,可对 $200\sim 400\mu\text{m}$ 的切片进行扫描,因而能看到较厚生物标本中的细节。它还以一个微动步进马达

控制载物台的升降(最小步距可达 $0.1\mu\text{m}$)装置,可以逐层获得高反差、高分辨率、高灵敏度的二维光学横断面图像,从而对较厚的样本进行无损伤的系列光学切片,得到其各层面的信息。这种功能被称为显微CT。

共聚焦显微系统主要由激光源、共聚焦显微镜(包括物镜前和探测器前针孔和光学显微镜、探测器计算机以及图像输出设备(显示器、彩色打印机和照片幻灯制作设备)组成(图1-1-6)。

(七) 电子显微镜 (electron microscope)

由于传统的光学显微镜采用的光源是可见光或紫外光,受其波长的限制,其最大的分辨率只能达到 $0.2\mu\text{m}$ (采用可见光)或 $0.1\mu\text{m}$ (采用紫外光),而在要观察小于 $0.1\mu\text{m}$ 的物体如病毒、亚细胞结构时,传统的光学显微镜就显得无能为力,只能使用电子显微镜。

电子显微镜以电子束代替了光波,以电磁场代替光学透镜。它的成像光学原理与光学显微镜完全相同。电子具有波粒二相性,其波长可以用公式表示:

$$\lambda = h/mv$$

其中 h 为普朗克常数, m 为电子的质量, v 为电子的速度, v 与外加电压 V 有关。电压越高,速度越快,相应的波长 λ 越短,其可达到的最大分辨率也就越高。当外加电场为 100kV 时,波长为 0.04nm ,比可见光短 $10\,000$ 倍,分辨率可达到 $0.2\sim 0.3\text{nm}$,放大倍数可达到 80 万倍。

根据电子显微镜有两类即透射电子显微镜 (transmission electron microscope) 和扫描电子显微镜 (scanning Electron Microscope, sem)。下面介绍这两种电子显微镜的结构和特点。

1. 透射电子显微镜的结构 透射电镜(图1-1-7)由电子透镜系统,真空系统和电源系统组成。

(1) 电子透镜系统。电子透镜系统是电镜的主体,由照明装置、样品室、成像放大装置和观察记录装置组成。起着照明、成像和观察记录作用。

照明装置由电子枪和聚光器组成。电子枪即电镜的电子发射源,相当于光

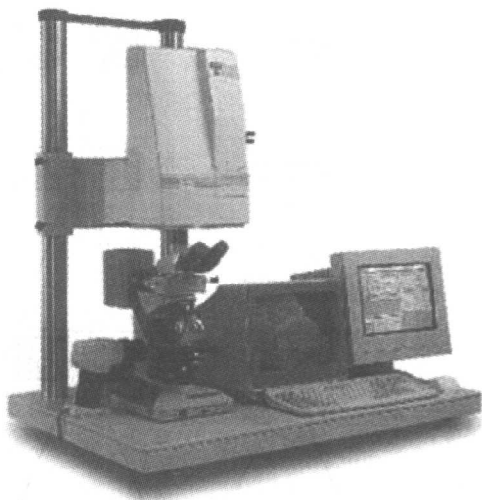


图1-1-6 聚光共聚焦显微镜

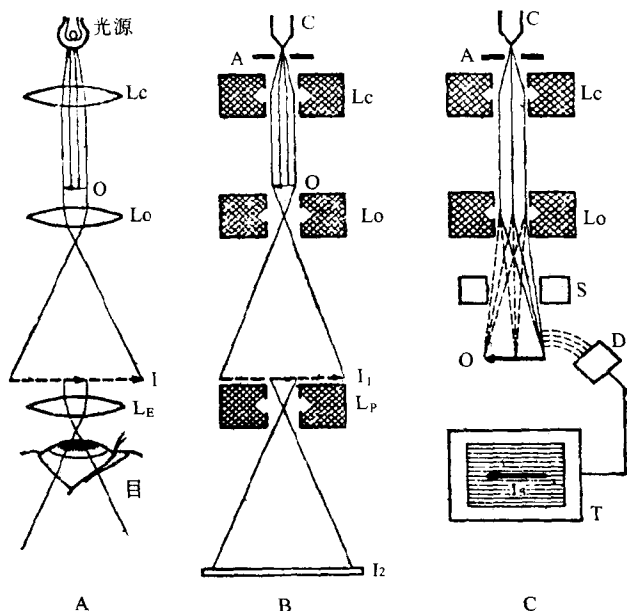


图 1-1-7 普通光学显微镜 (A)、透射电镜 (B) 和扫描电镜 (C) 的成像图比较

学显微镜的照明光源，位于镜筒的顶部。聚光器一般由两个电磁透镜组成。其作用是将来自电子枪的电子束会聚在标本上，通过对聚光器的调节，可以控制照明电子斑的大小、电流密度和孔径角。

成像装置由样品室、物镜、中间镜及投影镜等组成。样品室位于聚光镜之下，用于放置和移动样品。物镜、中间镜和投影镜对样品进行放大成像。电子束穿过标本后经物镜作一次放大，再经中间镜和投影镜作二级和三级放大，成像于荧光屏或感光胶片上。

(2) 观察记录装置。观察系统装置位于镜筒底部，包括观察室和照相室。

(3) 真空系统。为避免电子与空气中分子发生碰撞产生电离放电而导致电子轨迹的改变。真空系统由旋转式机械泵、油扩散泵、阀门、真空管道和真空检测装置组成。

2. 扫描电子显微镜的结构和原理 扫描电子显微镜，是 20 世纪 50 年代发展起来的一种电子显微镜，具有图像景深大，富有立体感，对样品适应性强的优点。

在构造上扫描电镜由电子光学系统、信号检测及显示系统、真空系统和电力供应系统等组成。这些系统在装配时分成两部分：一是主机部分，装有镜

筒、样品室、真空装置等；二是控制部分，装有荧光屏、控制和调节装置。

扫描电子显微镜的工作原理：电子枪发射的电子束经聚光镜聚焦后在偏转线圈作用下，对样品表面进行“光栅状扫描”，由于样品表面形态、结构特征上的差异，反射的二次电子数量有所不同，从而被检测器接受并转换为视频信号，经放大和处理后显示在显示屏上。

(八) 微生物染色技术

微生物细胞个体微小、透明且含有大量水分（一般为 80%~90%），当微生物细胞悬浮于水溶液中时，对光线的吸收和反射与水溶液的差别不大，与周围背景无明显的明暗差，难于看清其形态，更谈不上识别其细微结构。所以，微生物细胞需要经过染色后，借助染料的反衬才能把菌体和背景区分开，从而能在显微镜下进行观察。但是，任何一项技术都不是完美无缺的。微生物学发展到现在，已发展和完善了很多的染色技术，这些技术除能对菌体染色，还能对细胞内部或外部的细微结构进行染色，染色技术已成为微生物学实验中的最基本技术之一。

染色技术的缺点是染色后的微生物标本是死的（活菌染色除外），不能区分活菌和死菌，在染色过程中微生物的形态与结构均会发生一些变化，不能完全代表其生活细胞的真实情况。

1. 染色的基本原理 微生物染色的基本原理，是根据微生物菌体和染料的特性，通过物理因素和化学因素的相互作用来实现的。物理因素如细胞和细胞物质对染料的毛细管现象、渗透作用和吸附作用等。化学因素则是根据细胞物质和染料的不同化学性质而发生各种各样的化学反应。酸性物质对于碱性染料吸附力较强，吸附作用稳固；同理，碱性物质吸附酸性染料能力强。如酸性物质细胞核对于碱性染料就易于吸附。如果要使酸性物质染上酸性材料，必须改变它们的物理状态，比如细胞的 pH，才利于吸附作用。反之，碱性物质（如细胞质）通常仅能染上酸性染料，若把它们变为适宜的物理形式，也同样能与碱性染料发生吸附作用。

细菌的等电点较低，pH 在 2~5 之间，而目前常用的培养基一般为中性、碱性或弱酸性。微生物在这些培养基中生长后菌体蛋白质电离后带负电荷；而碱性染料电离时染料离子带正电荷。带负电荷的细菌常和带正电荷的碱性染料结合。因此，在细菌学上常用碱性染料对菌体进行染色。

影响染色效果的因素很多。菌体细胞的构造和其外膜的通透性，如细胞膜的通透性、膜孔的大小和细胞结构完整与否，在染色上都起一定影响作用。此外，培养基的组成、菌龄、染色液中的电介质含量和 pH、温度、药物的作用等，也都能影响细菌的染色效果。