

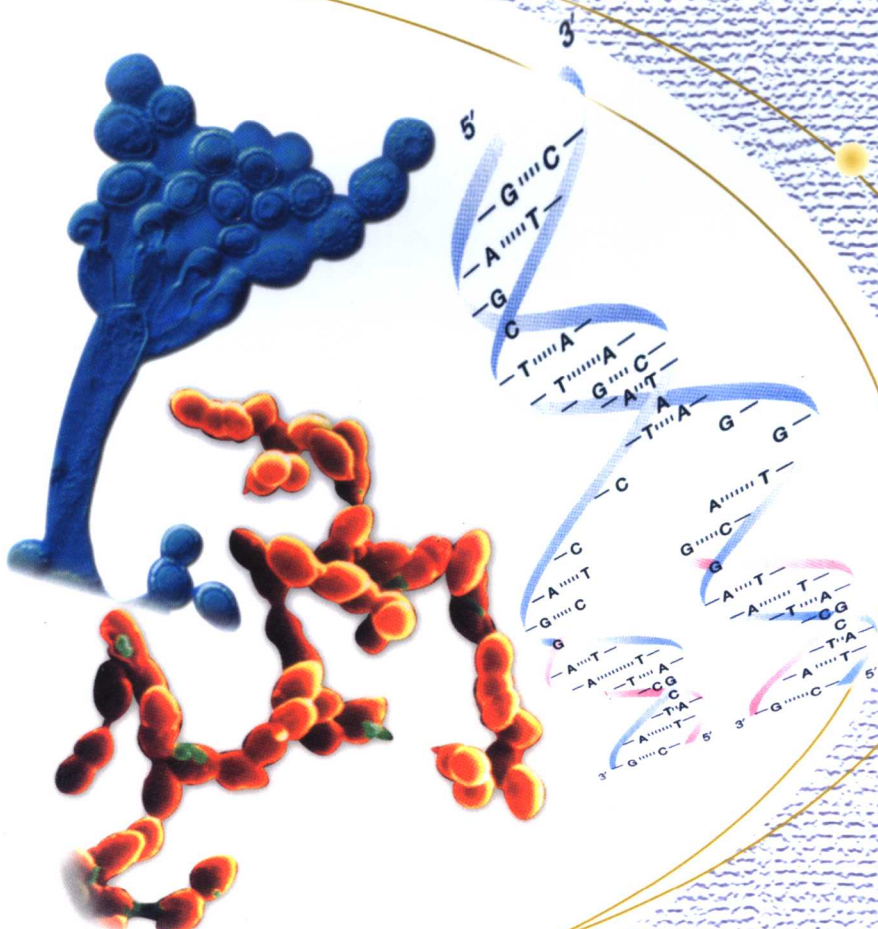
教育部世行贷款新世纪高等教育教学改革工程立项项目



高等学校教材

微生物学实验

杨文博 主编



化学工业出版社
教材出版中心

教育部世行贷款新世纪高等教育教学改革工程立项项目

高等学校教材

微生物学实验

杨文博 主编



化学工业出版社
教材出版中心

· 北京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验/杨文博主编. —北京: 化学工业出版社,
2004. 7
教育部世行贷款新世纪高等教育教学改革工程立项项目
高等学校教材
ISBN 7-5025-5976-0

I. 微… II. 杨… 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 (2004) 第 072209 号

教育部世行贷款新世纪高等教育教学改革工程立项项目
高等学校教材

微生物学实验

杨文博 主编

责任编辑: 何曙霓

责任校对: 郑捷

封面设计: 郑小红

*

化学工业出版社 出版发行
教材出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

[http:// www. cip. com. cn](http://www.cip.com.cn)

*

新华书店北京发行所经销

北京红光印刷厂印刷

北京红光印刷厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 15½ 字数 330 千字

2004 年 9 月第 1 版 2004 年 9 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-5976-0/G · 1600

定 价: 24.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

编者的话

微生物学是开设生命科学专业的普通高等院校、农、林、医科院校和高等职业专科学校一门重要的基础课。在人类进入以生命科学和信息科学为领先学科的 21 世纪,对于扮演生命科学研究中当红角色的微生物及其生命活动规律的微生物学的学习,尤为重要。

微生物学是实验性很强的一门学科。人类从 1676 年发现自然界中存在着微小生物开始,之后,着手对它们进行形态、结构的观察、生理生化代谢过程的探索、遗传变异和进化的解密,直至 21 世纪分子微生物学研究技术的涌现,都离不开由整体水平、细胞水平及分子水平微生物学实验的不断跨越。可以说,微生物学科这一生命科学研究领域中主车轮的加速转动,其动力是微生物学实验及其实验技术。

在教学中,微生物学实验是微生物学理论课的配套课程。微生物学实验课将最基础的微生物学实验技术、必需的专业微生物学实验技能以及基本的分子生物学技术传授给学习生命科学专业的学生,使他们掌握从事生命科学研究和产业开发所需要的微生物学实验技能,为人类社会的进步做出努力。

本书根据任课教师多年来的实验课教学经验编写而成。共计 77 个实验。其中适于本科生学习的基础微生物学实验 26 个、专业微生物学(涵盖微生物生理学、微生物遗传学、真菌学、病毒学、免疫学)实验 43 个、适合硕士研究生学习的实验 8 个。在本书中,编者对基础微生物学实验的安排,注重了实验的基础性、科学性、系统性和先进性,强调微生物学实验最基本、最核心的无菌概念和无菌操作;对专业微生物学实验的安排,注重培养学生的科学素养和实验技能;而分子微生物学实验部分仅是挂一漏万,只能起到入门的作用,为研究生的论文实验建立最基本的概念和基础。本书所安排的实验内容,其突出的特点是均具有可操作性,易于进行微生物学实验课的教学。

本书是学习生命科学的本科生都必须掌握的一门基础实验课程,是与生命科学相关的生物学、医学、生物化工、农、林科学、环境保护等相关学科学生必备的教学用书。可以满足生命科学各专业学生学习微生物学实验基本原理、技能的需要,可供综合性大学、师范院校、农林及医学院校、化工院校的有关专业选作本科生教材,也能给从事与微生物实践工作有关的专业人员提供参考和借鉴。

本书的出版受到“教育部世行贷款新世纪高等教育教学改革工程立项项目”经费的资助,在此表示衷心的感谢。

本书的编写人员为:杨文博、宋存江、严冰(实验须知、常用器皿、显微镜简介、第一篇、附录),白钢、邢来君、李明春、陈月华、牛淑敏、刁虎欣、王津红、刘春勇、杨建华(第二篇、第三篇)。

鉴于编者的水平有限,编写中的疏漏和错误之处,还望同行和读者批评指正。

编者

2004 年 6 月于南开大学生命科学学院

目 录

第一章 绪论	1
一、实验须知	1
二、微生物学实验室常用的器皿	2
三、显微镜简介及实验中常用的仪器和设备	6

第一篇 普通微生物学实验

第二章 微生物形态的观察技术	18
实验 1 实验室环境和人体体表微生物的检测	18
实验 2 细菌形态的观察	21
实验 3 细菌的简单染色和革兰氏染色	24
实验 4 细菌的芽孢、荚膜和鞭毛染色	27
实验 5 微生物细胞核的染色和细菌染色体 DNA 的提取	30
实验 6 细菌细胞壁的染色和质壁分离的观察	31
实验 7 大肠杆菌 λ 噬菌体形态的电镜观察	33
实验 8 放线菌和真菌形态的观察	34
实验 9 微生物测微技术和计数	37
第三章 微生物的培养技术	41
实验 10 培养基的制备与灭菌	41
实验 11 微生物的纯种分离培养	44
实验 12 生长谱法测定微生物的营养要求	49
实验 13 大肠杆菌生长曲线的测定	50
实验 14 大肠杆菌 λ 噬菌体效价测定和半乳糖发酵基因的转导	51
实验 15 环境因素对微生物生长发育的影响	53
实验 16 链霉素的效价测定	56
实验 17 血清学反应——凝集反应、沉淀反应、琼脂扩散实验	58
第四章 应用微生物学技术	62
实验 18 水的细菌学检查——细菌总数的测定	62
实验 19 多管发酵法测定水中大肠菌群	65
实验 20 微生物多糖——黄原胶的发酵和提取	70
实验 21 黄原胶溶液性能的测定	72
实验 22 产蛋白酶和淀粉酶芽孢杆菌的分离和酶活力检测	74
实验 23 杀虫微生物——苏云金芽孢杆菌的深层发酵	77
实验 24 细菌鉴定中常用的生理生化反应	79
实验 25 利用 BIOLOG 系统进行微生物的分类鉴定	84
实验 26 微生物发酵法制备生物降解材料——聚羟基脂肪酸酯 (PHA)	86

第二篇 专业微生物学实验

第五章 真菌学	89
实验 27 真菌形态及各类孢子的观察	89
实验 28 真菌孢子的萌发	92
实验 29 丝状真菌生长的测定	94
实验 30 不同碳源对真菌生长的影响	96
实验 31 矿物质营养对真菌生长的影响	97
实验 32 无机氮源对真菌生长的影响	98
实验 33 理化因素对真菌生长的影响	99
实验 34 酵母菌细胞形态及培养特征的观察	100
实验 35 丝状真菌米曲霉营养缺陷型的筛选与鉴定	102
实验 36 丝状真菌米曲霉原生质体的形成和再生	104
实验 37 丝状真菌米曲霉原生质体融合及融合子的筛选	106
实验 38 黄曲霉毒素的提取及测定	109
实验 39 真菌生物碱的测定	112
实验 40 真菌多糖的提取及测定	114
实验 41 丝状真菌总 DNA 的提取和测定	115
实验 42 丝状真菌深黄被孢霉总 RNA 的分离和检测	117
实验 43 RT-PCR 扩增深黄被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因	120
实验 44 深黄被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的克隆	123
实验 45 曲霉属 (<i>Aspergillus</i>) 群的分离和鉴定	126
实验 46 青霉属 (<i>Penicillium</i>) 系的鉴定	130
实验 47 镰刀菌属 (<i>Fusarium</i>) 组的分离和鉴定	134
第六章 微生物生理学	137
实验 48 正交试验法对黄原胶发酵最佳培养基和培养条件的选择与优化	137
实验 49 革兰氏阳性菌细胞壁的分离与纯化	143
实验 50 酵母菌质粒 DNA 的分离提取	144
实验 51 质粒 DNA 的纯度测定及定量分析	146
实验 52 琼脂糖凝胶电泳检测质粒 DNA	148
实验 53 用限制性内切酶消化 λ 噬菌体 DNA 片段的电泳检测和分析	150
实验 54 啤酒酵母非活性 RNA 的制备	152
实验 55 啤酒酵母非活性 RNA 含量的测定	153
实验 56 RNA 的酶促降解	154
实验 57 5'-单核苷酸的纸电泳鉴定	155
实验 58 酵母菌底物水平磷酸化合成 ATP	156
第七章 微生物遗传学	158
实验 59 苏云金芽孢杆菌 ICP 基因的检测	158
实验 60 T4 噬菌体基因组 rII 区域不同基因突变的互补	160
实验 61 大肠杆菌的高压电穿孔转化技术	163

实验 62 噬菌体 T4 一步生长实验和 Doermann 实验	165
第八章 病毒学	170
实验 63 病毒的细胞培养技术	170
实验 64 病毒的纯化	171
实验 65 病毒的毒力测定	173
第九章 免疫学	176
实验 66 血清中 IgG 的分离 (中性盐沉淀法)	176
实验 67 抗体的精制 (离子交换色谱法)	177
实验 68 抗血清效价的测定	179
实验 69 酶联免疫吸附试验	181

第三篇 分子微生物学实验

第十章 分子微生物学基础实验	184
实验 70 大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) 乳糖操纵子——酶的诱导及酶活性测定	184
实验 71 λ 噬菌体 DNA 的多种内切酶的物理图谱	188
实验 72 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定啤酒酵母菌胞外蛋白质分子量	192
实验 73 啤酒酵母的脉冲电泳核型分析	195
实验 74 大肠杆菌对紫外线辐射的修复机制	202
实验 75 苏云金芽孢杆菌新型 <i>vip</i> 基因的 RFLP 分析	204
实验 76 绿色荧光蛋白 (GFP) 的转化表达及免疫印迹检测	206
实验 77 干扰素 (IFN) 的转化表达及双抗体夹心法检测	211
附录	214
附录一 染色液的配制	214
附录二 培养基的制备	217
附录三 试剂和溶液的配制	227
附录四 实验中所用微生物学名	235
附录五 各国主要菌种保藏机构	237
参考书目	238

第一章 绪 论

一、实验须知

本实验教材包括：普通微生物学实验（本科生基础课）、综合微生物学实验（包括真菌学实验、微生物生理学实验、微生物遗传学实验、病毒学实验、免疫学实验等本科生专业课）和分子微生物学基础实验（硕士研究生课）三个层次的教学内容。

1. 实验课教学的目的

（1）使学生全面了解微生物学实验的科学内容和基本原理；熟知实验的操作方法和实验中所使用的仪器和药品。

（2）训练学生正确掌握进行微生物学实验的操作方法和技能，学会进行综合实验的设计、准备、操作和结果分析。

（3）培养学生对实验原理、方法和结果进行正确理解，仔细观察，认真思考的科学素养和分析问题，解决问题的科学能力。

2. 实验课教学注意事项

为了使微生物学实验课教学正常进行，学有收获，并保证实验室安全，特提出如下注意事项，希望共同遵守。

（1）每次实验前必须对实验内容进行充分的预习，以了解本次实验的内容、原理、方法。在实验课课堂上注意聆听任课教师对实验内容的讲解，注意观察教师的示范操作，以掌握实验操作的要领。

（2）微生物学实验的基本操作是多年来积累总结出的科学方法，一些关键性的操作与生活中的习惯动作完全相悖，实验时应仔细认真，严格按操作规程进行，注意改变生活中的习惯动作，以掌握微生物学实验的科学操作方法。

（3）使用显微镜和其他贵重仪器时，应事先熟知操作规程，遇到仪器故障时请任课教师帮助解决，切勿擅自拆卸，否则因此而损坏仪器，应予以赔偿。

（4）实验中如遇有盛菌器皿不慎破损、菌液外溢、皮肤划伤或菌液吸入口中等意外情况发生时，应立即报告任课教师及时进行处理，不得隐瞒，以免酿成后患。

（5）实验过程中，切勿使乙醇、乙醚、丙酮等易燃药品接近火焰。如遇火险，应关闭电源，用湿布阻燃灭火，必要时使用灭火器。

（6）实验时，实验室应保持安静，切勿高声喧哗和随意走动。

（7）每次实验完毕后，必须将所用玻璃器皿清洗干净，放回指定地点，所用仪器擦拭清洁、放妥。若桌面被菌液污染，可用3%来苏尔覆盖消毒后擦拭干净，带菌工具（如吸管、塑料吸嘴、玻璃刮棒、染色涂片等）在洗涤前浸泡在3%来苏尔液中进行消毒后再清洗。

（8）每次实验需进行培养的材料，在标明实验者姓名、组别、日期后，放于教师指定的培养箱中进行培养，未经教师同意，实验室中的任何菌种和物品不得携出室外。

（9）实验时应认真进行观察和操作，做好实验记录；有疑难问题向教师求教。对于需要连续观察的实验，则需记下每次观察的现象和结果，以便进行综合分析。每次实验后的结果，应以实事求是的科学态度认真书写实验报告，回答思考问题，交教师批阅。

(10) 离开实验室前注意关闭门窗、灯、煤气等。

二、微生物学实验室常用的器皿

微生物学实验室所使用的玻璃器皿主要用于微生物的培养（培养皿、锥形瓶）、微生物的保存（试管）、吸取菌液（吸管，亦称移液管）等，使用前需经洗涤、包装、灭菌（干热或湿热）后才能使用，因此，对其质量、洗涤和包装方法均有一定的要求。一般选用硬质玻璃方可耐受高温（121℃）、高压（0.1MPa）和短时火焰灼烧；另外，新购置的玻璃器皿中含有游离碱，长期使用后会在内壁析出，呈乳白色碱膜，器皿变得不透明，影响观察，同时也会影响培养基的酸碱度。不同玻璃器皿的洗涤方法、高温灭菌前的包装方式、灭菌彻底与否均会影响实验结果，以下介绍实验用玻璃器皿和接种工具的分类、洗涤方法、包装和灭菌方式。

1. 玻璃器皿的类别、规格和使用

(1) 试管 (test tube) 微生物学实验所用的试管为直口（勿使用翻口，以防止外界空气进入造成污染）；加盖棉塞，或塑料帽、铝帽、硅胶泡沫塑料塞（图 1-1）。试管根据用途分为三种型号。

① 大试管 ($\phi 18\text{mm} \times 180\text{mm}$)：可用于盛装制平板的固体培养基；可用于制备琼脂斜面；可用于盛装液体培养基进行微生物的振荡培养。

② 中试管 ($\phi 16\text{mm} \times 160\text{mm}$)：可用于制备琼脂斜面、盛液体培养基，或用于菌液、病毒悬液的稀释及血清学试验。

③ 小试管 [$(\phi 10 \sim 12\text{mm}) \times 100\text{mm}$]：一般用于细菌或酵母菌的糖发酵试验或血清学试验。

(2) 杜汉式小管 (Durham tube) 一种用于观察细菌在糖发酵培养基内产气情况的小套管 ($\phi 6\text{mm} \times 36\text{mm}$)，倒置于盛有液体培养基的试管或三角烧瓶内（图 1-2, A）。

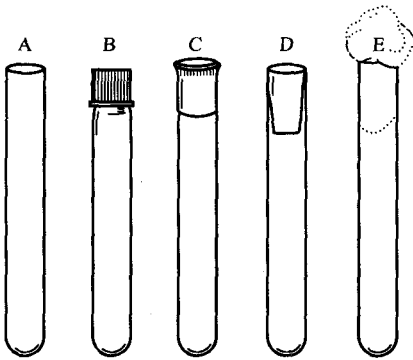


图 1-1 试管与试管帽（塞）

A. 细菌学试管；B. 螺帽；C. 塑料帽；
D. 硅胶泡沫塞；E. 棉塞

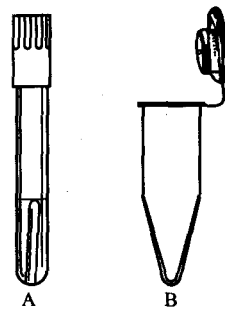


图 1-2 杜汉式小管 (A) 和
Eppendorf 管 (B)

(3) Eppendorf 管 亦即小塑料离心管（图 1-2, B）。分 1.5mL 和 0.5mL 两种型号。主要用于微生物分子生物学实验中小量菌体的离心、DNA、RNA 的提取等。

(4) 吸管 (pipette)

① 玻璃吸管 (glass pipette) 微生物学实验室常用的刻度玻璃吸管为：0.1mL、1mL、2mL、5mL 和 10mL，用于吸取溶液和菌悬液。此外，吸取不计量的液体，如染色液、离心上清液、无菌水、少量抗原、抗体、酸、碱溶液等可用具乳胶头的毛细吸管，即滴管（图 1-3）。

② 微量加样器 (micropipette) 微量加样器又称微量吸管, 用于吸取微量液体, 规格型号较多, 每种在一定范围内可调节几个体积, 并标有使用范围, 如: $1\sim 10\mu\text{L}$ 、 $2\sim 20\mu\text{L}$ 、 $20\sim 100\mu\text{L}$ 等。使用时: ①将合适的塑料吸嘴 (tip) 牢固地套在微量加样器的下端; ②旋动调节键 (图 1-4, A), 使数字显示器 (图 1-4, B) 显示出所需吸取的体积; ③用大拇指按下调节键并将吸嘴插入液体中 (图 1-4, C); ④缓慢放松调节键, 使液体进入吸嘴, 并将其移至接收试管中; ⑤按下调节键, 使液体进入接收管; ⑥按下排除键, 将吸嘴脱卸。

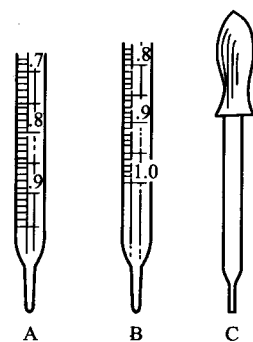


图 1-3 吸管和滴管
A. 血清学吸管; B. 测量吸管; C. 滴管

(5) 培养皿 (petri dish) 在微生物学实验中, 培养皿是进行微生物培养、分离纯化、菌落计数、菌落形态观察、遗传突变株筛选、噬菌斑形成、基因工程菌株筛选等最常用的玻璃器皿。一般常用的培养皿, 皿底直径 90mm, 高 15mm, 皿盖和皿底均为玻璃材质, 用于抗生素生物效价测定时, 培养皿不能倒置培养, 为防止培养时皿盖冷凝水滴下, 需选用陶器皿盖 (图 1-5)。

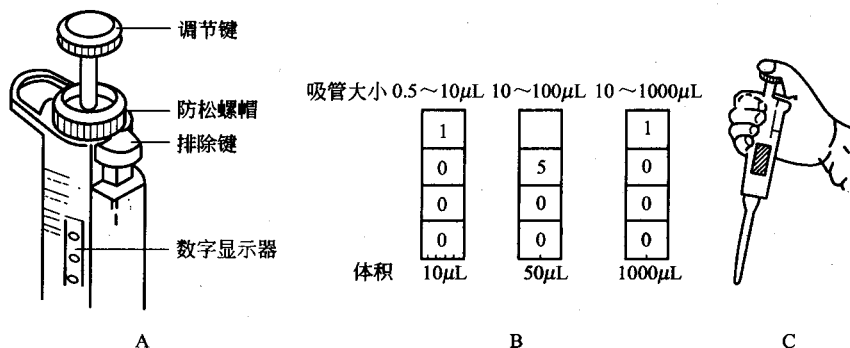


图 1-4 微量加样器

A. 结构; B. 数字显示器; C. 按调节键

(6) 三角烧瓶 (Erlenmeyer flask) 与烧杯 (beaker) 三角烧瓶的容积分别为 100、250、500 和 1000mL, 用于盛装无菌水, 琼脂固体培养基 (制平板) 和液体培养基 (振荡通气培养微生物)。常用的烧杯容积分别为 50、100、250、500 和 1000mL 等, 用于配制培养基和各种溶液。

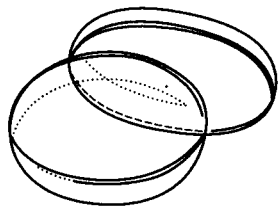


图 1-5 培养皿

(7) 注射器 (injector) 注射器的容量分别为 1、2、5、10、20、25mL, 向动物体内注射抗原可选用容量为 1、2 和 5mL 的; 抽取动物心脏血或绵羊静脉血可选用容量为 10、20、50mL 的, 微量注射器的容量分别为 10、20、50 和 $100\mu\text{L}$, 通常在免疫试验、薄层层析、电泳点样、色谱检测进样等需微量样品时使用。

(8) 载玻片 (slide) 与盖玻片 (cover slip) 普通载玻片 (图 1-6, A) 为长方形, 大小为 $75\text{mm}\times 25\text{mm}$, 常用于微生物涂片、染色进行形态观察及免疫学中的凝集反应。

凹玻片是在中央有一圆形凹窝的原载玻片 (图 1-6, B), 用于制作悬滴片进行细菌运动的观察或微室培养。

(9) 双层瓶 (double bottle) 由内外两个玻璃瓶组成 (图 1-7), 内层小锥形瓶内盛有香柏油, 可滴加在细菌经染色后的涂片上, 进行油镜观察。外层瓶盛有二甲苯, 用于擦拭油镜头。

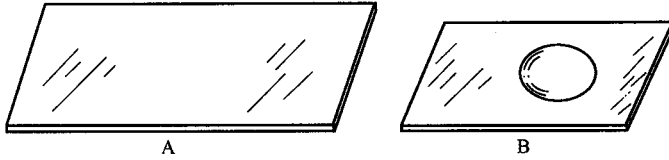


图 1-6 载玻片 (A) 和凹玻片 (B)

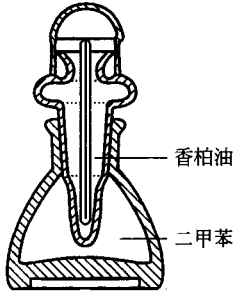


图 1-7 双层瓶



图 1-8 滴瓶

(10) 滴瓶 (dropper bottle) 用来盛装各种染液, 无菌水等 (图 1-8)。

(11) 接种工具 (inoculating tools) 微生物接种使用的工具有接种环 (inoculating loop, 用于细菌、酵母菌的斜面移接和液体培养接种)、接种针 (inoculating needle, 用于细菌的穿刺培养)、接种钩 (inoculating hook)、接种铲 (inoculating shovel) (后二种用于放线菌、霉菌的斜面移接和液体培养)。它们均用金属铂丝或镍丝制成, 也可用废电炉丝拉直后制成。金属丝的直径以 0.5mm, 接种环的内径以 2~4mm 为宜, 环面应平整。金属丝制成的接种工具使用前须用火焰灼烧灭菌, 选用的金属应软硬适度, 能经受火焰反复灼烧, 又易冷却。市售接种工具的金属丝通过带螺旋的箍扣与接种棒相连, 此处极易沾带培养基, 是杂菌可能孳生之处, 使用前应在此处蘸上乙醇, 再用火焰灼烧, 方能灭菌彻底 (图 1-9)。

玻璃涂布器 (glass spreader) 用玻棒灼烧后弯曲或压扁制成 (图 1-10), 用于在琼脂平板涂布菌液进行单菌落分离, 其形状有三角形 (也称三角玻璃刮刀) 和勺形 (图 1-10) 两种。

2. 玻璃器皿的清洗方法

玻璃器皿的清洗是实验前一项重要的准备工作, 其清洁与否同实验结果的正确有一定的

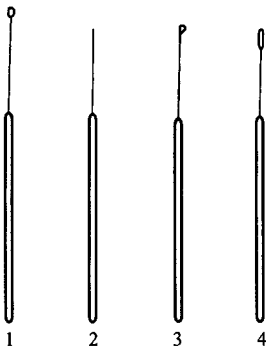


图 1-9 接种工具

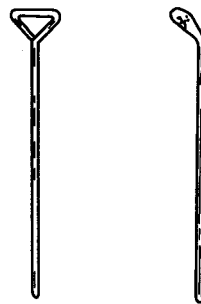


图 1-10 玻璃涂布器

1—接种环; 2—接种针; 3—接种钩; 4—接种铲

关系,故清洗方法因实验目的,器皿的种类,所盛的物品、洗涤剂的类别和沾染污物程度的不同而有所区别。现分述如下。

(1) 新玻璃器皿的洗涤方法 新购置的玻璃器皿含有游离碱,应先在酸溶液(2%盐液或洗液)内浸泡数小时,以中和游离碱,浸泡后用自来水冲洗干净。

(2) 已使用过的玻璃器皿的洗涤方法

① 试管、培养皿、三角烧瓶、烧杯 可用瓶刷或海绵沾上温热的洗洁精水刷洗,然后用自来水充分冲洗干净,再用蒸馏水冲洗一遍,倒置,室内晾干,或装入搪瓷盘内,于烘箱内烘干。

玻璃器皿经洗涤后,若内壁呈均匀的薄层水膜,则表示无油垢,视为洗涤干净;若仍挂有水珠,则需重新洗涤,直至油垢去除干净方可。当精确配制化学试剂时,所用玻璃器皿经上法洗涤后,必须用蒸馏水冲洗2~3遍,并且确保无油垢方可使用。经固体培养基培养后带菌的培养皿、斜面、盛过菌液的三角烧瓶、试管等应先在2%来苏尔(煤酚皂)溶液或0.25%新洁尔灭消毒液中浸泡24h后,或开水煮沸0.5h,再用上法洗涤,带病原菌的培养物应先行高压蒸汽灭菌20~30min,弃去培养物,再进行洗涤。

② 玻璃吸管 吸过糖溶液、染液、血液、血清、菌液(非致病菌)的玻璃吸管和毛细吸管,使用后应立即投入底部垫有脱脂棉或玻璃棉、盛有自来水的量筒或标本瓶内,以免干燥后难以冲洗干净,吸管顶部塞有棉花,应先用牙签拨出或用尖嘴自来水龙头的急速水流将棉花冲出(水龙头尖端与吸管尖端接触),再行洗涤,风干或烘干备用。

吸过菌液的玻璃吸管或塑料吸嘴上上述消毒液浸泡,或开水煮沸,或超声波清洗器,超声洗涤10~20min,特别是吸取过核酸,抗原,抗体的塑料吸嘴必须经超声波清洗方可使用,因上述残留物若不清洗干净,会严重影响下次实验。

玻璃吸管如有油污,应先经洗液浸泡数小时处理后,再行洗涤。

③ 载玻片与盖玻片 用过的载玻片与盖玻片,如滴有香柏油,先用卫生纸擦去油面,再用浸有二甲苯的脱脂棉擦拭,溶解油垢。在湿热的含洗洁精的水中用纱布或脱脂棉擦拭洗涤,自来水冲洗,沥干水分,于洗液中浸泡1~2h,自来水冲洗,蒸馏水冲洗后,经目测,玻片或盖玻片上无残留水珠,可视为洗涤干净,风干后于95%酒精中保存备用,使用时用镊子取出,烧去残留酒精即可。

涂有活菌和致病菌的载玻片或盖玻片应经上述消毒液处理24h后,方可进行洗涤,以避免致病菌可能对实验者造成的感染。

3. 玻璃器皿的包装和灭菌

(1) 培养皿的包装和灭菌

① 筒装 将洗涤干净并风干的培养皿按顺序放入金属(铜或不锈钢)圆筒内的带底框架中(图1-11),加盖,置烘箱内干热灭菌(130~140℃,4h,或150~170℃,1~2h),或高压蒸汽0.1MPa,20~30min灭菌,冷却后备用。

② 纸包装 用旧报纸将5套培养皿卷成一排,第1套和第5套的皿盖朝外,卷筒两端的报纸折叠后压紧,置于130~140℃烘箱内干热灭菌3~4h后,待温度自然冷却至40℃以下,方可取出。烘箱温度高于100℃时,切勿打开烘箱,以免冷空气进入烘箱内,引起培养皿爆裂,包装纸自燃。

(2) 吸管的包装和灭菌

① 筒装 灭菌用的金属筒有长方形和圆柱形两种(图1-12),筒底垫放干净的玻璃棉,

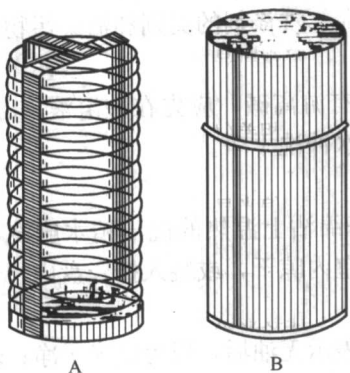


图 1-11 灭菌用金属圆筒

A. 内部框架; B. 带盖外筒



图 1-12 吸管灭菌用金属筒

避免吸管放筒内时,其尖端碰断。每支持灭菌的吸管在粗头端 0.5cm 处塞内一小段约 1.5cm 长的棉花,目的是避免在使用时将口腔中的杂菌吹入无菌的实验材料中造成人为污染,同时也防止不慎将实验用的菌液吸入口中。塞入的棉花小柱松紧要适当,过紧,吸取费力,过松,棉花会下滑,灭菌方式与培养皿的灭菌相同。

② 纸包装 将塞好棉花柱的玻璃吸管尖端斜放在旧报纸条的近左端 (a),以 45° 角为宜 (图 1-13),并将左端多余的一段纸覆折在吸管上 (b),左手按住吸管尖端的纸折 (c),右手转动吸管,使报纸条将吸管裹紧 (d),右端多余的报纸打一小结 (e)。多根包好的玻璃吸管再用一张大报纸包好,灭菌方式同上。

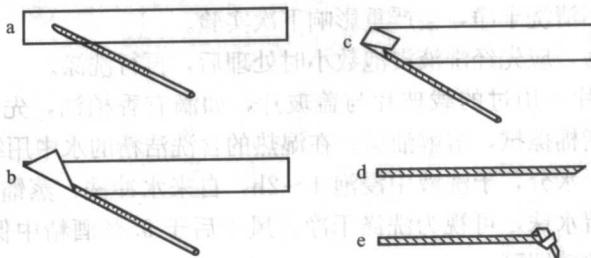


图 1-13 纸包装吸管

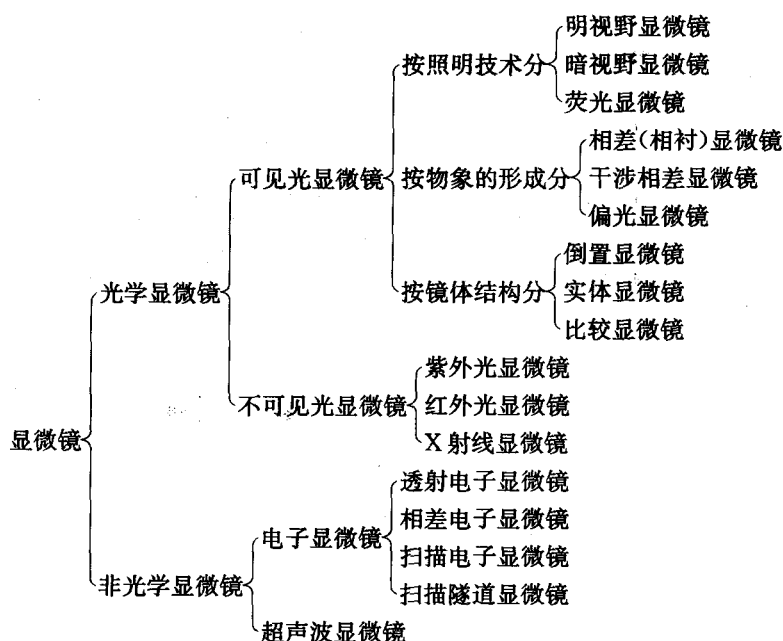
③ 塑料吸嘴 将洗净的塑料吸嘴放入带孔的塑料盒内或适宜的烧杯内,外加牛皮纸,用线绳扎好,高压蒸汽灭菌,但不能置于烘箱内进行干热灭菌!

(3) 试管和三角烧瓶的包装和灭菌 试管管口可用棉花塞、塑料帽、硅胶泡沫塞塞好,置于铁丝筐内,外加一层牛皮纸包好,棉线绳扎紧。三角烧瓶一般用纱布包裹的棉花塞,或 4~6 层纱布、包装布、铝箔封口,外加牛皮纸、棉线绳扎紧,高压蒸汽灭菌,条件同上。具塑料帽的试管不可用干热灭菌,棉花塞、纱布封口的试管、三角瓶干热灭菌时应选用 $130\sim 140^\circ\text{C}$, 3h 灭菌为宜。

三、显微镜简介及实验中常用的仪器和设备

1. 显微镜

微生物是形体微小、肉眼不可见的微小生物,观察和研究它们的形态和结构,必须借助于能将物像进行放大若干倍的显微镜才行。现代显微镜根据成像原理的不同分为两大类,一类是光学显微镜,另一类是非光学显微镜。根据显微镜的结构和不同的用途又分成以下各种类型。



在微生物学实验中最常用的是各种类型的光学显微镜和电子显微镜（透射、扫描电子显微镜）以进行各类微生物的形态观察和结构研究。为便于学生了解和掌握显微镜的构造、成像原理和使用方法，仅作如下简介。

（1）普通光学显微镜（general microscope）普通光学显微镜由机械装置和光学系统两部分组成（图 1-14），机械装置是显微镜的主体框架，包括镜筒、物镜转换器、镜台、镜座、镜臂粗、细调节螺旋等，用坚固的金属材料制成，其材质和加工精度影响显微镜的质量。不同厂家生产的显微镜在外观上风格各异，但其基本部件固定不变。光学系统是显微镜的核心，物镜的光学参数直接影响着显微镜的性能，匹配不同的聚光器可改变显微镜的功能，如明视野、暗视野、相差（相衬）等。

① 目镜 安装在显微镜镜筒上，供实验者用双眼进行标本观察。目镜的功能是把经过物镜放大的标本物像再次放大。目镜由两片透镜组成，上端（近目端）为接目透镜，下端为聚透镜，两片透镜之间有空心圆形光阑。光阑空心圆的面积大小决定视野大小，光阑的边缘即为视野的边缘，又称为视野光阑。标本在光阑上成像，在光阑的边缘上固定一小段细发丝作为指针，可用来指示所观测的微生物菌体的具体部位。另外，在光阑上放置目镜测微尺（目镜测微尺与镜台测微尺的校准，详见实验九内容）可进行微生物大小的测量。目镜上标有 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $12.5\times$ 、 $15\times$ 、 $20\times$ 等放大倍数，不同放大倍数的目镜，其口径统一，与镜筒的口径也一致，可互换使用。

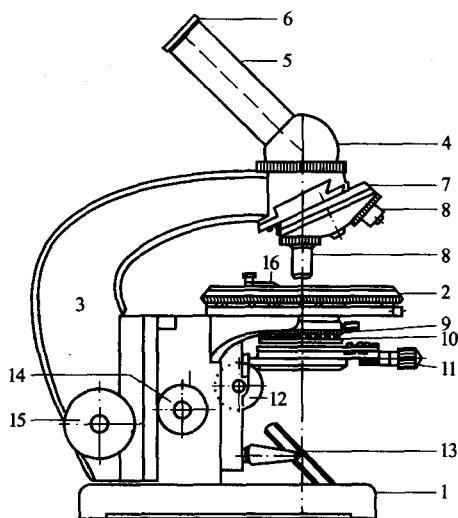


图 1-14 普通光学显微镜的模式图

1—镜座；2—载物台；3—镜臂；4—棱镜套；5—镜筒；6—接目镜；7—转换器；8—接物镜；9—聚光器；10—虹彩光圈；11—光圈固定器；12—聚光器升降螺旋；13—反光镜；14—细调节器；15—粗调节器；16—标本夹

② 物镜 在显微镜的光学系统中，物镜是最重要的部件，其性能直接影响显微镜的分辨率，物镜安装在能手动的物镜转换器上，供实验者观察标本时选用不同放大倍数的物镜，物镜的放大倍数有 $10\times$ (低倍)、 $20\times$ (中倍)、 $40\sim 65\times$ (高倍) 和 $100\times$ (油镜) 几种。在使用低倍、中倍、高倍物镜进行标本观察时，物镜与载玻片之间的折光介质为空气，这些物镜统称为干燥系物镜，而放大倍为 100 的油镜在使用时须在玻片上滴加香柏油，将油镜浸入到油滴中，使物镜与载玻片之间的折光介质为油，故油镜被称为油浸系物镜，油镜镜壁上刻有“OI” (oil immersion) 或“HI” (homogeneous immersion) 字样，或以红线或以黑线为标识，以区别于干燥系统镜。在所有物镜上均标有放大倍数，(如 10、40、100)、数值孔径 (numerical aperture, 简写为 NA, 又称镜口率如 0.35、0.65、1.25)、工作距离 (物镜下端至盖玻片的间距，即标本在焦点上看得最清晰时，物镜与样品之间的距离，如 7.65mm、0.5mm、0.198mm)，镜筒长度 (如 100mm、160mm)，以及盖玻片厚度 (通常为 0.17mm) 等参数 (图 1-15)。

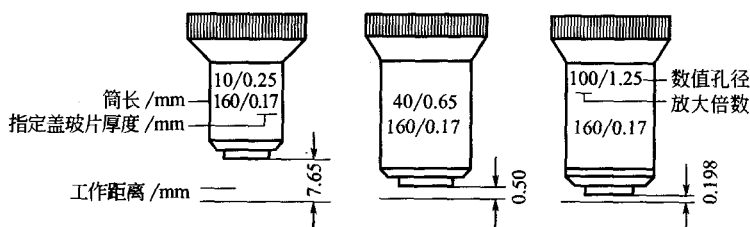


图 1-15 显微镜物镜参数示意

这些参数中，数值孔径 (NA)，最为重要，它决定着显微镜的物镜分辨率，而分辨率的大小是显微镜性能优劣的标志，所谓分辨率是显微镜工作时能分辨出的物体两点间最大距离 (D) 的能力， D 值愈小表明分辨率愈高，用公式 (1-1) 来表示 D 值：

$$D = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1-1)$$

式中 λ ——可见光的波长，可见光的波长范围约为 $400\sim 700\text{nm}$ ，平均为 $550\text{nm}(0.5\mu\text{m})$ ；
NA——数值孔径。

NA (数值孔径) 是指介质的折射率与镜口角 $1/2$ 正弦的乘积，用公式 (1-2) 表示：

$$NA = n \times \sin \frac{\alpha}{2} \quad (1-2)$$

式中 n ——物镜与标本间介质的折射率；

α ——镜口角 (通过标本的光线延伸到物镜前透镜边缘所形成的夹角，见图 1-16)。

有两条途径可提高物镜的分辨率：(a) 缩短光的波长。普通光学显微镜早期的产品利用镜座上凹凸两面的反光镜采撷自然光，现代产品改用内置照明，但这两种光源的波长均不可能小于可见光波长 $400\sim 700\text{nm}$ 的范围，无法缩短光的波长是提高光学显微镜分辨率不可逾越的障碍，而电子显微镜以波长仅 $0.01\sim 0.9\text{nm}$ 的高压电子束来替代照明光源，使分辨率得以大幅度提高，可达到 $0.15\sim 0.3\text{nm}$ 。(b) 增大物镜的数值孔径。由公式 (1-1) 可以看出，要使 D 值小，在 λ 为定值时，NA 值必须要大。

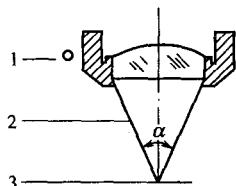


图 1-16 物镜的镜口角

1—物镜；2—镜口角；

3—标本面

而影响 NA 值的第一个因素是镜口角 α ，当 $\sin \alpha$ 增大为最大时， $\alpha = 180^\circ$ ，这意味着进入透镜的光线与光轴呈 90° 角，但这是不可能的，因为由于介质密度的不同 (光从载物台上的样品玻片进入空

气, 再进入镜头), 光线会由于折射或全反射, 不能成 90° 角进入镜头, 目前所用的油镜其 $\frac{\alpha}{2}$ 为 60° 左右, 所以 $\sin \frac{\alpha}{2}$ 的最大值总是小于 1。

影响 NA 的第二个因素是折射率 n , 不同介质的折射率有所不同, 如 $n_{\text{空气}} = 1.0$, $n_{\text{水}} = 1.33$, $n_{\text{玻璃}} = 1.52$, $n_{\text{香柏油}} = 1.515$, 显微镜中以空气、水、玻璃(水封片标本)作为折光介质的低倍物镜($10\times$)和高倍物镜($40\times$), 其 NA 值分别: $0.35(10\times, \text{低倍镜头})$ 和 $0.65(40\times, \text{高倍镜头})$, 而 D 值则分别为 $0.78\mu\text{m}(10\times, \text{低倍镜头})$ 和 $0.42\mu\text{m}(40\times, \text{高倍镜头})$, 也就是说在这两组物镜下其分辨率不小于 $0.42\sim 0.78\mu\text{m}$, 因此, 可用 $10\times$ 和 $40\times$ 的低倍、高倍物镜对微生物中个体较大的霉菌(菌丝直径 $2\sim 10\mu\text{m}$), 酵母菌 [$(1\sim 5)\times (5\sim 30)\mu\text{m}$] 进行观察。但对于大多数细菌来说, 其直径为 $0.5\sim 1\mu\text{m}$, 低倍和高倍镜的分辨率显然不能满足要求, 观察实验表明, 在低倍和高倍镜可以看到细菌, 但细节不清楚, 需要加大放大倍数并提高分辨率。显微镜物镜中的油镜, 其镜面很小, 标本与镜面间的距离仅为 $0.14\sim 0.19\text{mm}$ 左右, 进入镜头的光线较少, 视野的照明度低, 标本样品暗, 不易观察, 为克服由于空气与载玻片密度的不同致使光线受到折射, 发生散射现象(图 1-17A); 在镜头与载玻片之间滴加折射率为 1.515 与玻璃折射率 1.52 相近似的香柏油, 则光线通过载玻片后直接经过香柏油进入物镜而几乎不发生折射(图 1-17B), 其 D 值为 $0.22\mu\text{m}$, 这样, 在油镜下可以清晰地观察到细菌的形态及某些结构(如细胞壁、核质、鞭毛、芽孢、荚膜等)。

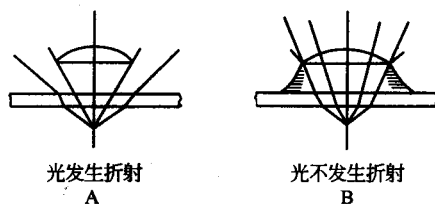


图 1-17 干燥系物镜(A)与油浸系物镜(B)光线通路

③ 聚光器 聚光器安装在显微镜载物台下, 起聚集光线的作用, 可上下移动, 边框上刻有数值孔径值。当用低倍镜时聚光器应下降, 用油镜时需上升到最高位置。聚光器下方装有可变光阑(虹彩光圈), 由若干金属薄片组成, 以放大或缩小光圈来调节光强度和数值孔径的大小。根据水封片和染色涂片的不同, 调节光圈, 以使物像清晰。

④ 光源 现代显微镜均以内置电光源, 替代采撷自然光的反光镜。镜座电源开关的上方, 均设有滑动螺钮, 可上下调节光强度, 选择观察时的最佳亮度。

(2) 暗视野显微镜(暗场显微镜)(dark-field microscope) 将不经染料染色的活细胞(水封片)在普通光学显微镜(明视野)下进行观察, 当光线通过透明的标本时, 由于细胞内物质的折光率与水相近, 明亮的视野背景与明亮的菌体不易分辨, 如果将背景变暗, 使标本与背景形成强烈的明暗反差, 则菌体在暗背景中会成为明亮的亮点。这正如在暗室中从一

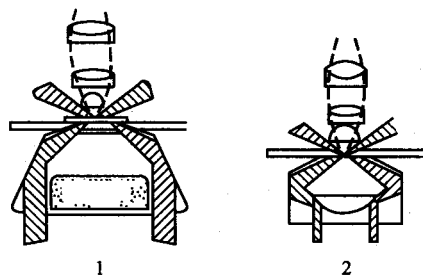


图 1-18 暗视野聚光器

1—抛物面型聚光器; 2—心型聚光器

狭缝射进一束强光, 可明显地看到空气中的尘埃一样。暗视野聚光器具有将视野背景变暗的功能。常用的暗视野聚光器分为抛物面型和心型两种(图 1-18)。抛物面型聚光器的顶部平滑, 心型聚光器的反射部分呈心脏形。两种聚光器底部的中央均有一块遮光板, 其作用是使进入反光镜的中央光柱不能直接射入物镜, 而仅允许光线从聚光器的边缘部位斜射到标本上, 这样只有经物体反射和衍射的光线才能进入物镜成像。因此, 视野背景黑暗, 需观察的菌体细胞呈明亮的亮点。

用暗视野显微镜观察微生物细胞由于背景与菌体的明暗反差大，其细胞轮廓清楚，但内部结构不明。主要用于观察细菌、螺旋体及其运动。

① 暗视野显微镜的使用方法

• 由于暗视野显微镜与明视野显微镜的机械部分和成像的光学系统是一致的，其区别仅由于聚光器的不同，在普通光学显微镜的底座上取下聚光器换上暗视野聚光器即可，观察前上升聚光器，使其透镜顶端与镜台平齐；

• 将聚光器的聚光镜光圈调至 1.4，光源的光圈孔调至最大；

• 在聚光镜顶端的平面上滴一滴香柏油，再将水封片标本放在镜台上，使载玻片的下表面与聚光镜上的油滴相接触，切勿产生气泡；

• 调节聚光器的高度，用低倍物镜进行配光对准物体，通过目镜可见到一个中间有黑点的光圈，仔细调节聚光器的高度（上升或下降），最后成为一光亮的光点（图 1-19），光点愈小愈好，由此点将聚光器上下移动时，均使光点增大；

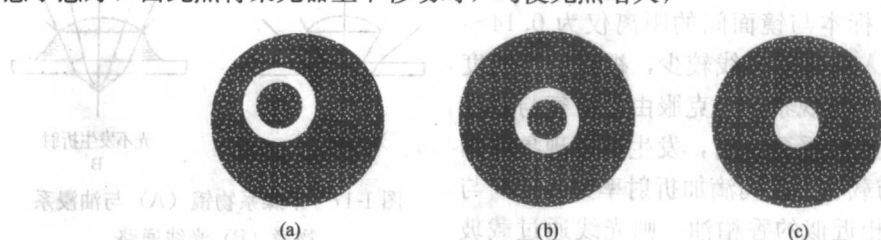


图 1-19 暗视野聚光镜的中心调节及调焦

(a) 聚光镜光轴与显微镜光轴不一致情况；(b) 虽然经过中心调节，但聚光镜焦点仍与被检物体不一致情况；(c) 聚光镜升降焦点与被检物体一致时的情况

• 转移高倍物镜，调整焦距至视野中心出现发光的菌体；

• 在标本水封片的盖玻片上滴加香柏油，进行油镜观察。

② 暗视野观察时注意事项：

• 在样品玻片和聚光镜之间的香柏油加量要大些，使之充满，不然，照明光将在聚光镜表面进行全面反射，光线达不到被检物体而不能形成暗视野照明；

• 进行聚光镜的中心调节和调焦，使焦点与被检物体一致，是进行暗视野观察的关键，否则被检物不能形成明亮的亮点；

• 用于暗视野聚光器的聚光镜，其数值孔径 (NA) 均为 1.2~1.4，焦点较浅，过厚的载玻片使被检物无法聚焦在聚光镜的焦点外，适宜的载玻片厚度为 1.0mm，盖玻片厚度为 0.16mm 以下。载玻片，盖玻片应十分干净，无油、无划痕，否则将会严重干扰显微镜形成的物像，与被检物的物像混淆。

(3) 相差显微镜 (phase microscope) 用暗视野显微镜可以进行微生物活细胞的形态及其运动性的观察，但不能清晰地观察到细胞内部结构的细节。这是因为当光线通过透明的活细胞后，由于微生物细胞内各类物质密度的差异（从光学角度看为折射率不同），直射光和衍射光的光程就会有差别，随着光程的增加或减少，加快或落后的光波的相位会发生变化，产生相位差。人的视觉只能分辨出可见光光谱内不同的波长（颜色）（在可见光光谱 399~800nm 范围内，其颜色依次为紫、蓝、青、绿、黄、橙、红）和振幅（明暗），而不能分辨出光波产生的相位差异。相差显微镜根据光波干涉原理，借助于环状光阑和相板两个特殊部件的作用，把相位转变为人眼睛可分辨的振幅差（明暗差），从而使原来透明的微生物细胞