



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

22



全国高等医药院校药学类实验双语教材

(第3版)

微生物学 实验与指导

Experiment and
Guide for Microbiology

◎ 主编 周长林

中国医药科技出版社



普通高等教育“十一五”国家级规划教材



全国高等医药院校药理学类实验双语教材

微生物学

Experiment and Guide for Microbiology

实验与指导 (第3版)

主 编 周长林
副主编 陈向东 徐旭东 徐 威
编 者 (以姓氏笔画为序)
马晓楠 (沈阳药科大学)
张文军 (广东药学院)
陈向东 (中国药科大学)
周长林 (中国药科大学)
徐旭东 (东南大学)
徐 威 (沈阳药科大学)
窦 洁 (中国药科大学)

中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书是全国高等医药院校药学类实验双语教材之一。全书共分九个部分,内容主要包括微生物学实验基本原理、基本方法,细菌、放线菌、真菌、病毒等的形态结构和培养特征,微生物遗传学、免疫学、药学微生物学实验技术、综合性实验和设计性实验。本书可供高等医药院校药学类专业微生物学实验教学使用,同时可供药品质量检验人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验与指导:汉英对照/周长林主编.—3版.—北京:中国医药科技出版社,2015.9

全国高等医药院校药学类实验双语教材

ISBN 978-7-5067-7753-7

I. ①微… II. ①周… III. ①微生物学-实验-双语教学-医学院校-教材
IV. ①Q93-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第198792号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话 发行:010-62227427 邮购:010-62236938

网址 [www: cmstp. com](http://www.cmstp.com)

规格 787×1092mm $\frac{1}{16}$

印张 18 $\frac{1}{2}$

字数 381千字

初版 2004年2月第1版

版次 2015年9月第3版

印次 2015年9月第1次印刷

印刷 廊坊市广阳区九洲印刷厂

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5067-7753-7

定价 39.00元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

序

教学是学校人才培养的中心环节,实验教学是这一环节的重要组成部分。《教育部、财政部关于“十二五”期间实施“高等学校本科教学质量与教学改革工程”的意见》要求进一步推进高等学校实验教学改革与创新,促进创新人才成长。《全国高等医药院校药学类实验双语教材》是中国药科大学自2005年以来坚持药学实践教学改革,突出提高学生动手能力、创新思维,通过承担教育部“世行贷款——21世纪初高等教育教学改革项目”等多项教改课题,逐步建设完善的一套与药学各专业学科理论课程紧密结合的高水平双语实验教材,也是普通高等教育“十一五”国家级规划教材。

本轮修订,适逢《全国高等医药院校药学类第四轮规划教材》及2015年版《中国药典》出版,整套教材的修订强调了与新版理论教材知识的结合,与2015年版《中国药典》、新版《药品质量管理规范》(GMP)等新颁布法典法规结合,为更好的服务于新时期高等院校药学教育与人才培养的需要,在上一版的基础上,进一步体现了各门实验课程自身独立性、系统性和科学性,又充分考虑到各门实验课程之间的联系与衔接,主要突出了以下特点。

1. 适应医药行业对人才的要求,体现行业特色 契合新时期药学人才需求的变化,使修订后的教材符合2015年版《中国药典》及新版GMP、新版GSP等国家标准、法规和规范以及新版国家执业药师资格考试大纲等行业最新要求。

2. 更新完善内容,打造教材精品 在上一轮教材基础上进一步优化、精炼和充实内容。紧密结合《全国高等医药院校药学类第四轮规划教材》,强调与实际需求相结合,进一步提高教材质量。

3. 坚持双语体系,强调素质培养 教材以实践教学为突破口,采用双语体系编写,有利于加快药学教育国际接轨,提高学生的科技英语水平,进一步提升学生整体素质。

《全国高等医药院校药学类实验双语教材》历经十年三轮建设,在各个时期广大编写教师的努力下,在广大使用教材师生的支持下日臻完善。本轮教材的出版,必将对推动新时期我国高等药学教育的发展产生积极而深远的影响。希望广大师生在教学实践中对本套教材提出宝贵意见,以便今后进一步修订完善,共同打造精品教材。

吴晓明

全国高等医药院校药学类规划教材常务编委会主任委员

二〇一五年八月

前 言

本书是全国高等医药院校药学类实验双语教材之一，供药学类院校微生物学实验教学使用。全书分九个部分，内容主要包括微生物学实验基本原理、基本方法，细菌、放线菌、真菌、病毒等的形态结构和培养特征，微生物遗传学、免疫学、药学微生物学实验技术、综合性实验和设计性实验。其中第一部分的实验一、实验二和第二部分由马晓楠编写，第一部分的实验三至实验十三和第九部分的实验五十七由周长林编写，第三部分、第八部分的实验四十九和第九部分的实验五十五由徐旭东编写，第四部分由张文军编写，第五部分、第八部分的实验五十一和第九部分的实验五十四、实验五十六、实验五十八由陈向东编写，第六部分和第九部分的实验六十、实验六十一、实验六十二由窦洁编写，第七部分、第八部分的实验四十八、实验五十、实验五十二和第九部分的实验五十三、实验五十九由徐威和马晓楠编写。本书英文部分由中国药科大学外语系陈菁老师校稿。

实验编排一般包括实验目的、实验原理、实验材料、实验方法、结果与讨论五个部分，力求使学生在实验中有明确的实验思路。结果和讨论部分旨在培养学生分析问题和全面总结实验结果的能力，培养独立思考的习惯，以期进一步消化和巩固所学的理论知识。实验所需的染料、培养基配方、试剂及缓冲液配制和微生物学实验的英文词汇列于附录中。

本书是微生物学教学同仁多年教学实践的结晶，具有药学微生物学实验教学的显著特色，实验内容可根据教学需要适当选做，期望在药学生的素质教育方面能尽微薄之力，同时可供药物质检人员参考。由于编者水平有限，在实验内容编排和中英文表述方面定有欠妥之处，恳请指正。

编 者
2015 年 5 月

目 录

Content

第一部分 显微技术和微生物形态学	(1)
PART ONE Microscopic Techniques and Microbial Morphology	(1)
实验一 明视野光学显微镜	(4)
EXPERIMENT 1 Bright - Field Light Microscope	(5)
实验二 暗视野光学显微镜	(9)
EXPERIMENT 2 Dark - Field Light Microscope	(10)
实验三 单染色法	(11)
EXPERIMENT 3 Simple Stain	(13)
实验四 革兰染色法	(16)
EXPERIMENT 4 Gram' s Stain	(18)
实验五 芽孢染色法	(21)
EXPERIMENT 5 Spore Stain	(23)
实验六 荚膜染色法	(25)
EXPERIMENT 6 Capsule Stain	(26)
实验七 鞭毛染色法	(27)
EXPERIMENT 7 Flagella Stain	(28)
实验八 螺旋体的染色和形态观察	(29)
EXPERIMENT 8 Spirochetes Morphology	(30)
实验九 悬滴法观察细菌的动力	(31)
EXPERIMENT 9 Observation of Bacterial Motion with Hanging Drop	(32)
实验十 酵母菌的形态观察	(33)
EXPERIMENT 10 Yeast Morphology	(34)
实验十一 微生物大小的测定	(35)
EXPERIMENT 11 Determination of the Size of Microorganisms	(38)
实验十二 放线菌、霉菌的菌丝和孢子形态观察	(40)
EXPERIMENT 12 Morphology of Mycelia and Spore for Actinomycetes and Molds ...	(41)
实验十三 细菌、放线菌、酵母菌和霉菌的菌落特征观察	(43)
EXPERIMENT 13 Colony Characteristics of Bacteria, Actinomycetes, Yeasts and Molds	(44)

第二部分 基本实验操作与培养技术	(46)
PART TWO Basic Laboratory and Culture Techniques	(46)
实验十四 培养基的配制与灭菌	(48)
EXPERIMENT 14 Culture Media Preparation and Sterilization	(48)
实验十五 接种技术与微生物的分离纯化	(50)
EXPERIMENT 15 Culture Transfer Techniques and Isolation of Pure Cultures ...	(54)
实验十六 常用的消毒灭菌方法	(58)
EXPERIMENT 16 Commonly Used Sterilization and Disinfection Methods	(59)
实验十七 菌种保藏	(61)
EXPERIMENT 17 Preservation of Pure Cultures	(64)
实验十八 微生物计数法	(67)
EXPERIMENT 18 Counting of Microorganisms	(71)
实验十九 细菌的生长曲线测定	(74)
EXPERIMENT 19 Bacteria Growth Curve	(76)
第三部分 细菌的生理生化反应	(78)
PART THREE Biochemical Activities of Bacteria	(78)
实验二十 淀粉水解和明胶液化试验	(79)
EXPERIMENT 20 Hydrolysis of Starch and Protein	(79)
实验二十一 糖发酵试验	(81)
EXPERIMENT 21 Utilization of Carbohydrates	(82)
实验二十二 IMViC 试验	(83)
EXPERIMENT 22 IMViC Series	(85)
实验二十三 硫化氢产生试验和触酶试验	(88)
EXPERIMENT 23 Hydrogen sulfide Production and Catalase Test	(89)
第四部分 病毒学实验	(91)
PART FOUR Experiments for Virology	(91)
实验二十四 流感病毒的培养与检测	(93)
Experiment 24 Culture and Detection of Influenza Virus	(96)
实验二十五 噬菌体分离和效价测定	(98)
Experiment 25 Isolation and Titer Detection of Bacteriophage	(98)
实验二十六 噬菌体一步生长曲线的测定	(101)
Experiment 26 One - Step Growth Curve of Bacteriophage	(102)
第五部分 微生物遗传学实验	(104)
PART FIVE Experiments for Microbial Genetics	(104)
实验二十七 微生物的遗传与变异现象	(106)
EXPERIMENT 27 Heredity and Variation of Microorganism	(106)
实验二十八 微生物抗药性变异	(109)
EXPERIMENT 28 Drug Resistant Variation	(111)
实验二十九 组氨酸营养缺陷型菌株的诱变和筛选	(114)

EXPREIMENT 29	Mutagenesis and Isolation of <i>his⁻</i> Auxotroph	(117)
实验三十	鼠伤寒沙门菌/微粒系统检测化学诱变剂	(120)
EXPERIMENT 30	Ames Test: A Bacterial Test System for Detecting Mutagens and Carcinogens	(123)
实验三十一	抗药质粒接合传递实验	(127)
EXPERIMENT 31	Bacterial Conjugation: The Transfer of Antibiotic - Resistant Plasmids	(128)
实验三十二	抗药质粒 DNA 的分离检测和转化	(129)
EXPERIMENT 32	Isolation and Characterization of Plasmid DNA and Transformation	(132)
实验三十三	细菌转导	(135)
EXPERIMENT 33	Bacterial Transduction	(138)
实验三十四	枯草杆菌原生质体的制备和再生	(140)
EXPERIMENT 34	Formation and regeneration of <i>Bacillus subtilis</i> protoplast	(142)
实验三十五	利用 16s rRNA 基因序列进行细菌分类鉴定	(144)
EXPERIMENT 35	Bacterial Identification with 16SrRNA Gene	(146)
第六部分	免疫学实验	(149)
PART SIX	Experiments of Immunology	(149)
实验三十六	抗原与免疫血清的制备	(151)
EXPERIMENT 36	Preparations of Antigen and Antiserum	(151)
实验三十七	吞噬细胞功能的测定	(153)
EXPERIMENT 37	Assay of the Function of Phagocytes	(155)
实验三十八	体液因子的免疫功能测定	(157)
EXPERIMENT 38	Assay of Immune Functions of Humoral Factors	(158)
实验三十九	体液免疫功能检测 (1)	(160)
EXPERIMENT 39	Immune Functions by Antibody (1)	(164)
实验四十	体液免疫功能检测 (2)	(168)
EXPERIMENT 40	Immune Functions of Antibodies (2)	(170)
实验四十一	细胞免疫功能检测 (1) ——体外实验	(172)
EXPERIMENT 41	Immune Function by Cellular Immunity (1) ——in Vitro ..	(173)
实验四十二	细胞免疫功能检测 (2) ——细胞因子的检测	(176)
EXPERIMENT 42	Immune Function by Cellular Immunity (2) ——Detection of Cytokines Levels	(177)
实验四十三	细胞免疫功能检测 (3) ——体内实验	(178)
EXPERIMENT 43	Immune Function by Cellular Immunity (3) ——in Vivo	(179)
第七部分	药学微生物学实验	(182)
PART SEVEN	General Microbial Experiments in Pharmaceutics	(182)
实验四十四	药物的体外抗菌试验	(185)
EXPERIMENT 44	Determination of Antimicrobial Activity in Vitro	(185)

实验四十五 抗生素效价测定	(189)
Experiment 45 Assay of Antibiotic Potency	(192)
实验四十六 药物的无菌检查法	(195)
EXPERIMENT 46 Sterility Test of Drugs	(200)
实验四十七 药物的微生物限度检查法	(206)
EXPERIMENT 47 Microbial Quality and Microbial limit Tests of Pharmaceutical Preparations	(210)
第八部分 综合性实验	(214)
PART EIGHT Integrated Experiments	(214)
实验四十八 土壤中抗生素产生菌的分离、鉴定和抗菌活性测定	(217)
EXPERIMENT 48 Isolation and Identification of Antibiotic - Producing Actinomycetes from Soil, and the Determination of its Antimicrobial activity	(217)
实验四十九 重组人干扰素- α 工程菌的构建、培养和诱导表达	(220)
EXPERIMENT 49 Construction, Expression and Cultivation of Recombinant <i>E. coli</i> Expressing INF - α	(222)
实验五十 产淀粉酶枯草杆菌的选育	(225)
EXPERIMENT 50 Screening of <i>Bacillus subtilis</i> with High Productivity of Amylase	(227)
实验五十一 产 β -内酰胺酶抗药细菌的分离和鉴定	(230)
EXPERIMENT 51 Isolation and Identification of β - lactamase producing <i>Staphylococcus aureus</i>	(231)
实验五十二 污水中大肠埃希菌噬菌体的分离、培养和效价测定	(232)
EXPERIMENT 52 Isolation, Cultivation and Titration of <i>Escherichia coli</i> phage from Sewage	(236)
第九部分 设计性实验	(240)
PART NINE Designed Experiments	(240)
实验五十三 药品的微生物学质量标准的建立	(241)
EXPERIMENT 53 Microbial Quality Control of Pharmaceuticals	(241)
实验五十四 营养缺陷型菌株的筛选和鉴定	(241)
EXPERIMENT 54 Isolation and Identification of Auxotroph	(242)
实验五十五 葡萄中酵母菌的分离、培养和鉴定	(243)
EXPERIMENT 55 Isolation, Culture and Identification of Yeast in Grapes	(243)
实验五十六 菌种的复壮	(244)
EXPERIMENT 56 Strain Rejuvenation	(245)
实验五十七 基因工程菌种子库的构建	(245)
EXPERIMENT 57 Establishment of Seed Bank of Genetic Engineered Bacteria	(246)
实验五十八 环境中微生物的检测	(247)
EXPERIMENT 58 Detection of Environmental Microorganisms	(247)

实验五十九 利用 BIOLOG 自动分析系统分离鉴定人体正常菌群	(248)
EXPERIMENT 59 Isolation and Identification of Normal Flora in Human Body Using BIOLOG Automatic Analysis System	(249)
实验六十 药物对流感病毒的抑制作用	(250)
EXPERIMENT 60 <i>In Vitro</i> Inhibition of Influenza Virus by Antiviral drugs	(251)
实验六十一 实验药物对机体的免疫调节作用	(252)
EXPERIMENT 61 Regulatory Effects of Pharmaceuticals on Immunity	(252)
实验六十二 抗原抗体反应在伤寒疫苗制备中的应用	(253)
EXPERIMENT 62 Application of Antigen - Antibody Reaction in Preparation of Typhoid Vaccine	(253)
附录	(254)
I. 常用无菌玻璃仪器的准备和废品处理	(254)
II. 教学用菌种	(254)
III. 常用培养基	(255)
IV. 染色液的配制	(261)
V. 试剂及缓冲液配制	(262)
APPENDIX	(263)
I. Sterilization of Glass Apparatus and Treatment of Waste	(263)
II. Microorganisms	(263)
III. Culture Media	(264)
IV. Staining Solutions	(270)
V. Solutions and Buffers	(271)
专业名词表	(273)
Words and Vocabulary	(273)
参考文献 (References)	(285)

第一部分

显微技术和微生物形态学

微生物学的研究对象是肉眼无法直接分辨的微小生物，正是由于微生物的这个特性，使得显微镜成为这个学科中最为重要的工具之一。因此，显微镜的使用方法和如何制备标本也是必须掌握的实验技能。本部分共包括两部分：显微技术——从最常用的明视野光学显微镜入手，讲述了光学显微镜的构造和原理，及其使用方法，并对暗视野光学显微镜的使用也进行了介绍；微生物形态学——描述了如何利用显微镜对不同微生物（包括特殊结构）的形态、大小和运动性进行观察与测量的方法。本部分最后以常见微生物的菌落形态观察结尾。

实验一 明视野光学显微镜

【实验目的】

- (1) 熟悉明视野光学显微镜的使用方法、尤其是油镜的使用。
- (2) 掌握明视野光学显微镜的结构和工作原理。
- (3) 观察微生物染色标本。

【实验原理】

明视野光学显微镜（以下简称“明视野显微镜”）是最常用的光学显微镜。之所以叫它“明视野”，是因为它就像你现在所看到的本页书上的文字一样，能够在较亮的背景下形成一个比较暗的图像。

1. 明视野显微镜的结构

明视野显微镜的基本结构如图 1-1 所示，分光学系统和机械系统两部分。

(1) 光学系统：主要包括物镜、目镜、聚光器和光源等。

① 显微镜有两种放大镜头，一种是目镜，一种是物镜。每一部分都对载物台上的标本起放大作用。显微镜的放大倍数由物镜和目镜的乘积决定。用转换器可以将物镜进行转换，因而也就改变了显微镜的放大倍数。转换器上共有四个物镜，分别是 4 倍的扫描物镜（红色）、10 倍的低倍镜（黄色）、40 倍的高倍镜（蓝色）和 100 倍的油镜（白色）。需要注意的是这些物镜之所以用颜色进行标记是为了更容易进行辨认。在必要情况下镜头只能用擦镜纸进行清洁。

② 光圈和聚光器位于载物台下方。聚光器将穿过标本的光线进行汇聚，而光圈则

用于调节穿过标本的光线强弱。

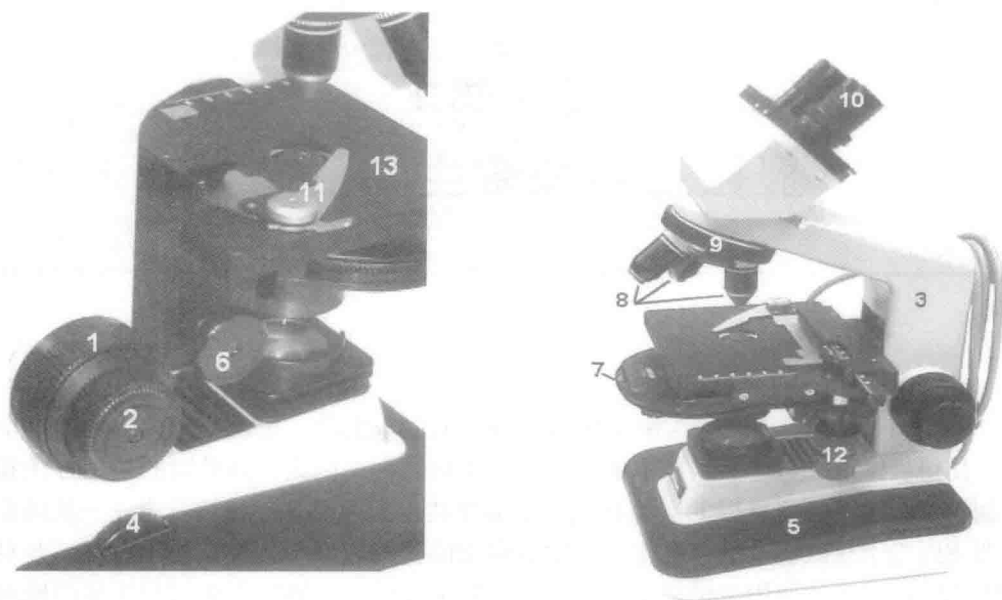


图 1-1 明视野显微镜

1. 粗调节旋钮； 2. 细调节旋钮； 3. 镜臂； 4. 电源开关（亮度调节旋钮）； 5. 镜座； 6. 聚光器调节旋钮；
7. 光圈； 8. 物镜； 9. 物镜转换器； 10. 目镜； 11. 玻片夹； 12. 标本推动旋钮； 13. 载物台

③ 光源位于显微镜的基座上，由开关控制并对其亮度进行调节。显微镜不使用的情况下应将光源关掉。

(2) 机械系统：主要包括镜座、镜臂、载物台、物镜转换器和调节旋钮等。

① 镜座是显微镜的底座，是支撑显微镜全部重量的部件。

② 镜臂用以支撑载物台和光学镜筒。需要注意的是在搬运显微镜时，需要一手握住镜臂，一手支撑底座。

③ 载物台用以放置被检标本，在载物台的中央有一小孔，可以使光线穿过。载物台上装有一对玻片夹，镜检时用来固定标本。

④ 物镜转换器位于光学头的下半部，是一个带有物镜的可旋转圆盘。

⑤ 较大的粗调节旋钮位于镜臂两侧，用于快速升降载物台，进行粗略调焦，使用时应记住升高或降低载物台的旋钮旋转方向。较小的细调结旋钮用于载物台高度的细微调节，位于粗调节旋钮的中间。

2. 显微镜的分辨率和油镜的使用

显微镜所观察到的应是放大且清晰的图像。其清晰度由分辨率来决定。分辨率 (R) 是指能够将非常靠近的两点进行区分的能力。分辨率越小，其分辨能力越高。下面的方程式显示了决定分辨率的主要参数：

$$R = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$

其中， λ 是所用的光线波长， NA 叫做数值孔径。由方程可见，所用波长越小，成像越清晰，电子显微镜所具有的高分辨率就与此有关。分辨率的另一个决定因素是数值孔

径。数值孔径是用来描述镜头改变光线方向的相对有效性的数学常数。数值孔径的大小如下面方程显示：

$$NA = n \sin\theta$$

其中， n 代表物镜与样本间介质的折射率， θ 则定义为穿过样本进入镜头的光锥角度的 $1/2$ ，即镜口角（图 1-2）。

由于数值孔径越大，分辨率效果越好。所以要提高数值孔径，可以通过提高 n 和 $\sin\theta$ 来达到。空气的折射率是 1，并且由于 $\sin\theta$ 不会大于 1，所以任何透镜在空气中的数值孔径都不会大于 1。要使数值孔径大于 1 的唯一可行方法就是通过使用香柏油是一种无色液体，来提高折射率，香柏油与载玻片具有相同的折射率。当用香柏油代替空气时，入射光线就不会发生反射和折射。因此，就能够得到较大的数值孔径和更好的分辨效果（图 1-3）。

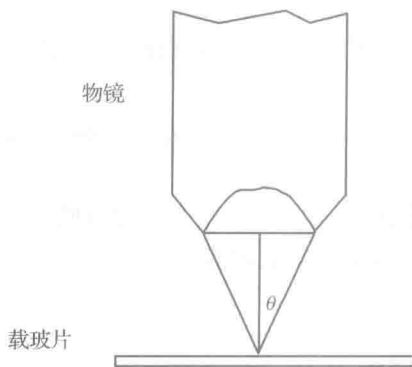


图 1-2 数值孔径

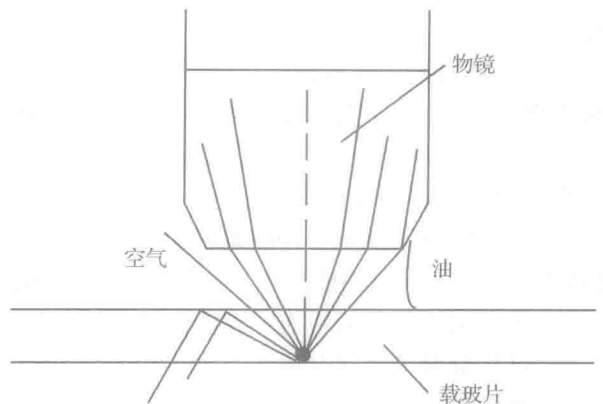


图 1-3 油镜

【实验材料】

1. 载玻片标本

(1) 细菌基本形态标本：金黄色葡萄球菌、唾液链球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、霍乱弧菌。

(2) 细菌特殊结构标本：芽孢（枯草芽孢杆菌、破伤风梭菌）、鞭毛（伤寒沙门菌）、荚膜（肺炎链球菌）。

(3) 真菌基本形态标本：酿酒酵母。

2. 仪器与试剂 明视野显微镜、二重瓶（内装香柏油和二甲苯）、擦镜纸、吸水纸。

3. 其他 擦镜纸、吸水纸。

【实验方法】

(1) 一手握住镜臂，一手托住镜座，取出显微镜置于实验台上，镜座距实验台边缘约 3~4cm。为减少疲劳，镜检者应姿势端正，两眼睁开。一般用左眼观察，右眼便于绘图或记录。

(2) 将标本用玻片夹固定在载物台上，通过调节标本推动旋钮将涂有标本的位置置于载物台光源通过孔的正上方。

(3) 适当调节光圈、聚光器和光亮度，使视野得到均匀照明。

(4) 先用低倍镜（即 10 倍物镜）进行观察，将载物台上升至载玻片与物镜下方距离大约为 5mm 处，然后用粗调节旋钮缓慢下降载物台，同时从目镜中观察，直至视野中出现图像。这样做可以防止在观察过程中物镜与载玻片接触而损坏物镜。当视野中出现图像时，改用细调节螺旋将图像调至清晰。注意：细调节旋钮不可沿同一方向过度调节。

(5) 转至高倍镜（即 40 倍物镜），此时标本仍应在视野中，只不过比原来大了 4 倍。用细调节旋钮将物像调至清晰。少数显微镜在从低倍镜转至高倍镜时，仍需要按步骤（4）再次进行调节。真菌标本用高倍镜即可观察清楚。

(6) 用油镜观察细菌的染色标本：降低载物台，在载玻片上光源透过的位置加一滴香柏油，然后将 100 倍物镜（即油镜）转入光路，用粗调节旋钮升高载物台，并从侧面观察，使镜头浸入油中并几乎与载玻片接触。注意：不可用力过猛，以免压碎玻片，损坏镜头。

(7) 从目镜中进行观察，同时将光亮度升至最大。用粗调节旋钮缓缓下降载物台至出现物象时，改用细调节旋钮调整至物像清晰。

(8) 当使用油镜时，一旦镜头接触香柏油，就不要再将高倍镜转入。否则高倍镜头会因为沾到油而需要彻底清洗。

(9) 当观察结束时，用擦镜纸擦除油镜上残留的香柏油，也可用二甲苯来进行此步骤，但最后也要用擦镜纸将残留的二甲苯擦掉。显微镜镜头只能在必要时用擦镜纸清洁。

(10) 将 4 倍物镜转入，载物台降至最低。

(11) 显微镜送回存放处。

【结果与讨论】

(1) 分别绘出明视野显微镜下观察到的微生物标本的典型形态结构。

(2) 使用油镜时应注意哪些问题？

(3) 用明视野显微镜能否观察病毒？为什么？

PART ONE Microscopic Techniques and Microbial Morphology

Microbiology is the study of organisms invisible to the naked eye. Because of this characteristic of microbes, microscope is an essential tool in this discipline. Thus, to understand how microscope works and the way to prepare the specimens are of great importance. This part begins with the most commonly used microscope – bright – field light microscope, including its structure, principle and use. Dark – field microscope is also introduced. The second section is about how to use light microscope to observe the morphology and motility of different microbes. This part closes with microbial colony observation.

EXPERIMENT 1 Bright – Field Light Microscope

Purpose

- (1) Grasp how to correctly use a microscope, especially the oil immersion lens.
- (2) Be familiar with the structure and principle of bright – field light microscope.
- (3) Observe several stained microorganism specimens.

Principles

Bright – field light microscope (or “bright – field microscope”) is the most commonly used type of light microscope. It is so named “bright – field” because it forms a dark image against a brighter background just like the words on a printed page.

1. The structure of bright – field microscope

As illustrated in figure 1 – 1, the fundamental structure of a bright – field microscope includes optical system and mechanical system.

(1) Optical system; mainly includes objective lens, ocular, condenser and light source.

① There are two magnifying lenses in the microscope. One magnifying lens is in the ocular and one is in the objective. Each contributes to the magnification of the object on the stage. The total magnification of any set of lenses is determined by multiplying the magnification of the objective by the magnification of the ocular. When rotating the nosepiece, there is change in the objective and consequently in magnification. On the nosepiece, a $4\times$ objective or lens (red), a $10\times$ low power objective (yellow), a $40\times$ high power objective (blue), and a $100\times$ oil immersion lens (white) can be found. Note that these lenses are color – coded for easy identification. Only lens paper is allowed to clean the lens when necessary.

② The iris diaphragm and condenser are located under the stage. The condenser focuses the light passing through the specimen and the iris diaphragm is used to regulate the amount of light passing through the specimen.

③ An electric light source is mounted on the base of the microscope, and is controlled by an on – off switch which can also adjust the brightness. Please turn off the light when the microscope is not in use.

(2) Mechanical system; mainly includes base, arm, stage, nosepiece and adjustment knobs.

① The base is the main support for the microscope.

② The arm supports the stage and the optical head. Note that the proper way to carry a microscope is to grasp the arm with one hand and support the base with the other hand.

③ The stage is a flat area upon which the specimen is placed. It has a hole in the center through which light may pass. Mounted on the stage is a pair of stage clips. This is designed to immobilize the slide during observation.

④ The nosepiece is a revolving plate on the lower side of the optical head which holds

the objective lenses.

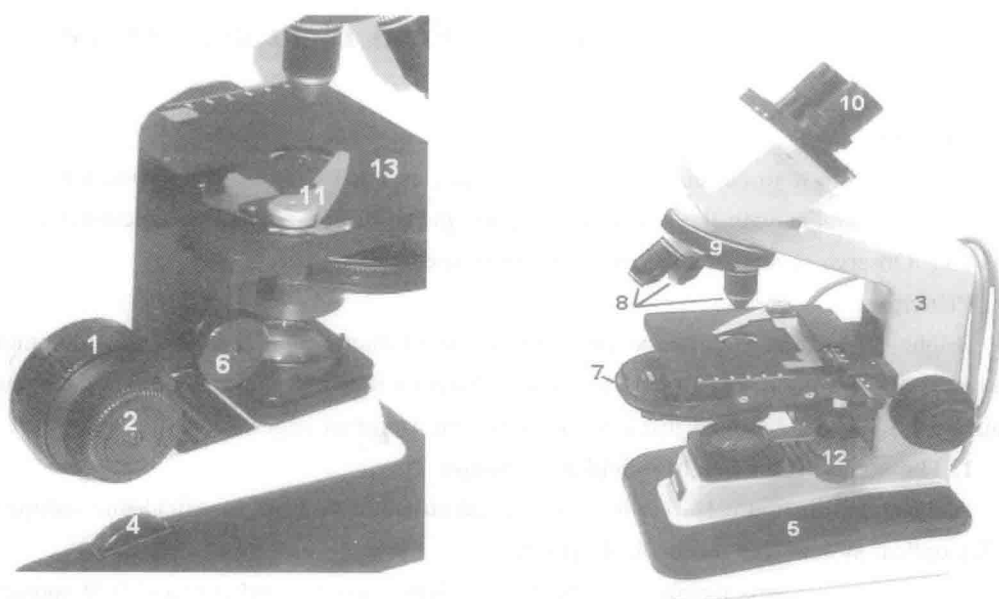


Fig. 1 - 1 Bright - field microscope

1. Coarse adjustment knob; 2. Fine adjustment knob; 3. Arm; 4. Power switch/
brightness control 5. Base; 6. Condenser knob; 7. Iris diaphragm; 8. Objective lens;
9. Revolving nosepiece; 10. Ocular eyepiece lens; 11. Stage clips;
12. Stage motion knobs; 13. Stage

⑤A pair of large knobs located on both sides of the arm are coarse adjustment knobs that permit rapid raising or lowering of the stage. Please memorize the direction of rotation to lower or raise the stage. A pair of smaller knobs located “inside of” the coarse adjustment knobs are fine adjustment knobs that permit minor adjustments in the stage height.

2. Microscope resolution (resolving power) and the oil immersion objective

Microscope is used to provide a magnified and clear image. Resolution (R) is essential for this. Resolution is the capacity of an optical system to distinguish or separate two adjacent objects or points from one another. The smaller the resolution, the better the resolving ability. The following equation expresses the main determining factors in resolution:

$$R = \frac{0.61\lambda}{NA}$$

In the equation, λ is the wavelength of light used to illuminate the specimen and NA is the numerical aperture. From the equation, it indicates that a major determinant of resolution is the wavelength of the light used. The shorter the wavelength is, the clearer the image will be. This will help to understand the high resolution of the electron microscope introduced in later parts. Another determinant of resolution is NA. NA is a mathematical constant that describes the relative efficiency of a lens in bending light rays. It could be expressed as:

$$NA = n \sin\theta$$

In the equation, n represents the refractive index of the medium between the objective and the specimen. θ is defined as $1/2$ the angle of the cone of light that enters a lens from a specimen (Figure 1-2).

Remember that a higher NA can provide a better resolution. An increase in either n or $\sin\theta$ or both can result in a higher NA. The refractive index for air is 1.00. Since $\sin\theta$ cannot be greater than 1.00, no lens working in air can have a NA higher than 1.00. The only practical way to make NA above 1.00 is to increase the refractive index with immersion oil, a colorless liquid with the same refractive index as the slide. When air is replaced with immersion oil, reflection and refraction of the light from the condenser to the objective will be avoided effectively. Thus, an increase in numerical aperture and resolution is achieved (Figure 1-3).

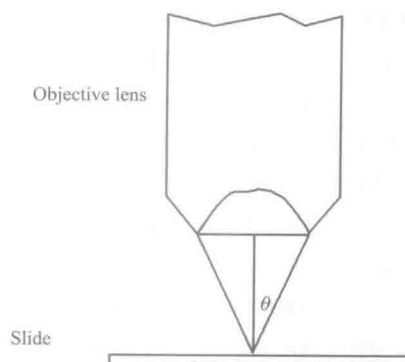


Fig. 1-2 Numerical aperture

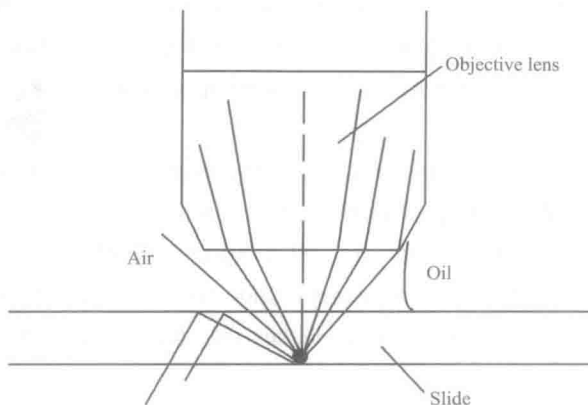


Fig. 1-3 The oil immersion objective lens

Materials and Apparatus

1. Specimens on glass slides

(1) The basic morphology of bacteria—*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Vibrio cholerae*.

(2) The special structures of bacteria—endospore (*Bacillus subtilis*, *Clostridium tetani*), flagella (*Salmonella typhosa*) and capsule (*Streptococcus pneumoniae*).

(3) The basic morphology of fungi—*Saccharomyces cerevisiae*

2. Apparatus and reagents bright-field microscope, dual-bottle (with immersion oil and xylene).

3. Others lens paper, water-adsorption paper.

Procedures

(1) Always carry the arm of the microscope with one hand and support the base with the other hand. Place it on the desk 3 to 4 cm away from the desk edge. In order to reduce