



普通高等教育“十二五”规划教材
食品科学与工程系列教材

食品微生物学实验

主 编 樊明涛 赵春燕 朱丽霞
副主编 魏新元 焦玲霞 秦翠丽 朱传合 贺 江



 科学出版社

食品微生物学实验

主 编 樊明涛 赵春燕 朱丽霞
副主编 魏新元 焦凌霞 秦翠丽
朱传合 贺 江

北 京

内 容 简 介

本书以微生物学的基础知识为出发点,以微生物学和食品加工过程中所涉及的微生物为核心,汇编了研究和生产中经常涉及的实验技术,具有内容广泛、选材结合实际、方法先进的特点。本书主要包括6个方面的内容:第1篇,微生物学基础实验技术;第2篇,微生物生理生化实验技术;第3篇,发酵食品微生物学技术;第4篇,食品安全微生物学技术;第5篇,微生物育种与分子生物学技术;第6篇,食用与药用真菌实验技术。书后还附录了微生物学实验中常用培养基配方、常用试剂配方等,便于读者使用。

本书适于普通高等院校食品科学与工程、食品质量与安全、生物技术、生物工程、发酵工程、应用微生物学等专业的大专院校学生作为教材使用,也可供从事食品加工、食品发酵、酒类酿造、食品检测及相关管理人员在实际工作中作为参考。

图书在版编目(CIP)数据

食品微生物学实验/樊明涛,赵春燕,朱丽霞主编. —北京:科学出版社, 2015.2

食品科学与工程系列教材

ISBN 978-7-03-043317-6

I. ①食… II. ①樊… ②赵… ③朱… III. ①食品微生物-微生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①TS201.3-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第026602号

责任编辑:杨 岭 刘 琳/责任校对:韩雨舟

责任印制:余少力/封面设计:墨创文化

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

http://www.sciencep.com

成都创新包装印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015年2月第一版 开本:787×1092 1/16

2015年2月第一次印刷 印张:17.25

字数:400 000

定价:34.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《食品微生物学实验》编委名单

主 编 樊明涛（西北农林科技大学）

赵春燕（沈阳工学院/沈阳农业大学）

朱丽霞（塔里木大学）

副主编 魏新元（西北农林科技大学）

焦凌霞（河南科技学院）

秦翠丽（河南科技大学）

朱传合（山东农业大学）

贺 江（湖南文理学院）

编 者 （按姓氏拼音排序）

包秋华（内蒙古农业大学）

傅虹飞（西北农林科技大学）

郭东起（塔里木大学）

侯小歌（周口师范学院）

胡炜东（内蒙古农业大学）

李 彬（商洛学院）

李 霞（南阳理工学院）

刘变芳（西北农林科技大学）

罗勤贵（西北农林科技大学）

秦 义（西北农林科技大学）

任晓璞（塔里木大学）

王 雅（兰州理工大学）

王树林（青海大学）

王文华（塔里木大学）

王永刚（兰州理工大学）

杨 薇（安康学院）

杨保伟（西北农林科技大学）

张 强（西北农林科技大学）

张宝善（陕西师范大学）

张国强（西藏大学农牧学院）

张佳琪（四川大学）

赵旭博（西北农林科技大学）

前 言

食品微生物学是基础微生物学一个非常重要的分支，是高等院校食品科学与工程、食品质量与安全及相近专业的主要基础课之一，属于应用微生物学的范畴。食品微生物学也是实践性很强的课程，不仅要求学生掌握微生物学的完整理论体系，更要求学生掌握微生物学在食品科学中具体应用的实验操作技能，因此，各高等院校相关专业在开设这门课程时，不仅重视理论教学，还要安排大量的学时进行实验操作，以训练学生对微生物学具体应用的能力。尽管国内有关食品微生物学实验方面的教材已经较多，且各版本各有千秋，但内容取舍上存在较大差异，难以找到一本能统揽全国各层次院校的教材，加之经济的发展及日益增加的对外交流，各院校教学科研条件都有了很大改观，特别是一些分子生物学的技术手段已经应用到食品微生物学的领域。在此大背景下，国内 18 所院校长期从事食品微生物学教学和科研工作的老师，联合编写本书，在编写过程中，作者始终贯彻以下指导思想。

(1) 内容力求新。各个实验内容力求吸收微生物学发展的最新成果和理念，去掉或纠正一些过时的说法，补充一些分子生物学方面的实验，特别是在现代仪器的介绍上，选用和选编应用普遍的高端仪器，让学生掌握这些仪器的原理及应用，便于随后的就业。

(2) 理论与实践力求紧密结合。食品微生物学内容包括微生物的基础知识和应用两部分，既要体现微生物学的基础实验，又要训练学生对微生物学的应用能力。在本书的应用部分，既安排了有益微生物在食品工业中的应用，也安排了有害微生物的防控技术、食品腐败变质、食品安全、食品标准中对微生物检验的要求等方面的内容。

(3) 内容取舍与编排力求突出重点。本书参编人员队伍强大，每个人只编写自己在微生物学教学、科研工作中比较熟悉的内容，内容编写经典、简洁、实用，去掉了在实际中不太常用的内容。

(4) 每个实验目的要求明确。每个实验提出了明确的要求，后边附有思考题，便于学生复习、思考和自学，从而更深层次地掌握所学实验内容。

本书共分为 6 篇，涉及 90 多个实验，由 30 位老师参加编写（各位老师的编写内容直接附于实验后，在此不再赘述），最后主要由主编、副主编共同协商统稿、定稿。在本书编写过程中，得到了各有关院校教务部门、各学院及科学出版社的大力支持，编者特表示衷心感谢。有些经典实验引用了原作者的实验程序和原话，编者还邀请了西北农林科技大学生命科学院食用菌专家杜双田教授审阅并修改了第 6 篇内容，特向这些作者学者致以谢意。

虽然参加编写的老师均为国内多年从事食品微生物学教学、科研的高校科技工作者，具有较丰富的经验，在编写过程中力求做到重点突出、言简意赅、科学系统、深入浅出、理论联系实际，有些内容就是老师科研的部分结果。但由于编者的学识和水

平有限，加之微生物学技术的发展突飞猛进，书中难免存在不足之处，恳请读者在使用过程中及时发现，并不吝赐教，提出宝贵意见，以便今后在教学实践及再版时得以改正。

编 者

2015 年 1 月

目 录

第 1 篇 微生物学基础实验技术	1
实验 1-1 培养基的制备与灭菌	1
实验 1-2 环境中的微生物检测及菌落特征观察	4
实验 1-3 普通光学显微镜的构造与使用	7
实验 1-4 相差显微镜的构造和使用	16
实验 1-5 暗视野显微镜的构造和使用	24
实验 1-6 细菌运动性的观察	26
实验 1-7 细菌的简单染色法	27
实验 1-8 细菌的革兰氏染色法	28
实验 1-9 细菌的荚膜染色法	31
实验 1-10 细菌的芽孢染色法	33
实验 1-11 细菌的鞭毛染色法	35
实验 1-12 细菌的伴孢晶体染色法	37
实验 1-13 细菌的细胞壁染色法	38
实验 1-14 放线菌形态及菌落特征观察	39
实验 1-15 酵母菌形态、假菌丝形态及其菌落特征观察	43
实验 1-16 霉菌形态及菌落特征观察	45
实验 1-17 噬菌斑的观察及噬菌体效价测定	47
实验 1-18 微生物细胞大小测定	49
实验 1-19 显微镜下直接测数法——细胞计数板法	51
实验 1-20 微生物接种技术	54
实验 1-21 细菌培养特征观察	59
实验 1-22 食品中细菌的分离与测数	62
实验 1-23 微生物菌种保藏	64
第 2 篇 微生物生理生化实验技术	70
实验 2-1 细菌生长曲线测定	70
实验 2-2 营养元素对微生物生长的影响	71
实验 2-3 温度对微生物生长的影响	73
实验 2-4 氧气对微生物生长的影响	74
实验 2-5 pH 对微生物生长的影响	75
实验 2-6 渗透压对微生物生长的影响	77
实验 2-7 抗生素对微生物生长的影响	78
实验 2-8 微生物间的拮抗作用	80

实验 2-9 紫外线对微生物致死作用的影响	82
实验 2-10 化学药剂对微生物生长的影响	83
实验 2-11 糖类发酵试验	85
实验 2-12 乙醇发酵试验	86
实验 2-13 乳酸发酵试验	87
实验 2-14 淀粉水解试验	89
实验 2-15 石蕊牛奶试验	90
实验 2-16 明胶水解试验	92
实验 2-17 甲基红试验和乙酰甲基甲醇试验	94
第 3 篇 发酵食品微生物学技术	96
实验 3-1 微生物热致死时间与 D 值的测定	96
实验 3-2 微生物水分活性试验	97
实验 3-3 微生物的耐盐性	98
实验 3-4 微生物的耐糖性	100
实验 3-5 酸奶中乳酸菌的分离	101
实验 3-6 泡菜中乳酸菌的分离	103
实验 3-7 酒曲中根霉菌的分离	104
实验 3-8 酒曲中酵母菌的分离	106
实验 3-9 枯草芽孢杆菌的分离	107
实验 3-10 醋酸细菌的分离	109
实验 3-11 柠檬酸生产菌的分离筛选	111
实验 3-12 酵母菌发酵力的测定	112
实验 3-13 酵母菌乙醇耐受能力测定	114
实验 3-14 淀粉酶、果胶酶及纤维素酶产生菌的分离筛选	115
实验 3-15 乳酸发酵及乳酸测定	117
实验 3-16 乳酸菌饮料	120
实验 3-17 酸奶制作	122
实验 3-18 果酒酿制——以干红葡萄酒酿制为例	123
实验 3-19 啤酒酿制	125
实验 3-20 醪糟制作	127
实验 3-21 食醋酿制	129
实验 3-22 豆腐乳制作	132
实验 3-23 酱油酿制	134
实验 3-24 酿酒酵母的固定化及连续发酵	137
实验 3-25 食品加工废水中化学需氧量的测定	140
实验 3-26 食品加工废水中生物需氧量的测定	143
第 4 篇 食品安全微生物学技术	151
实验 4-1 食品中细菌菌落总数的检验	151

实验 4-2 食品及水中大肠埃希氏菌检测	154
实验 4-3 食品中霉菌和酵母菌总数的测定	160
实验 4-4 食品中沙门氏菌的检验	163
实验 4-5 志贺氏菌的检验	170
实验 4-6 病原性大肠杆菌的检验	173
实验 4-7 金黄色葡萄球菌的检验	177
实验 4-8 食品中副溶血性弧菌的检验	181
实验 4-9 溶血性链球菌的检验	187
第 5 篇 微生物育种与分子生物学技术	190
实验 5-1 微生物的紫外线诱变技术	190
实验 5-2 微生物的化学诱变剂诱变技术	192
实验 5-3 枯草芽孢杆菌抗药性标记 (抗利福平突变型) 的筛选	194
实验 5-4 大肠杆菌营养缺陷型筛选	197
实验 5-5 酵母菌营养缺陷型筛选	199
实验 5-6 细菌总 DNA 提取技术	201
实验 5-7 琼脂糖凝胶电泳	206
实验 5-8 细菌 16S rDNA 的 PCR	209
实验 5-9 大肠杆菌质粒 DNA 提取技术	212
实验 5-10 大肠杆菌感受态细胞的制备	214
实验 5-11 大肠杆菌转化技术	218
实验 5-12 原生质体融合	220
第 6 篇 食用与药用真菌实验技术	223
实验 6-1 食用菌子实体的形态观察	223
实验 6-2 食用菌的显微特征观察	224
实验 6-3 黑木耳纯种分离与菌种制备	226
实验 6-4 平菇的袋料栽培	228
实验 6-5 香菇的袋料栽培	230
实验 6-6 灵芝的袋料栽培	233
实验 6-7 金针菇的瓶栽	235
主要参考文献	238
附录	240

第 1 篇 微生物学基础实验技术

实验 1-1 培养基的制备与灭菌

一、目的要求

了解并学习培养基的配制、分装方法，掌握各种实验室灭菌方法及技术。

二、实验原理

培养基是供微生物生长、繁殖、代谢的混合养料。由于微生物具有不同的营养类型，对营养物质的要求也各不相同，加之实验和研究的目的不同，因此培养基的种类很多，使用的原料也各有差异，但从营养角度分析，培养基中一般含有微生物所必需的碳源、氮源、无机盐、生长因子及水分等。另外，培养基还应具有适宜的 pH、一定的缓冲能力、一定的氧化还原电位及合适的渗透压。

琼脂是从石花菜等海藻中提取的胶体物质，是实验室应用最广的凝固剂。加琼脂制成的培养基在 98~100℃ 条件下熔化，于 45℃ 以下凝固。但若多次反复熔化，其凝固性将会降低。

任何一种培养基一经制成就应及时彻底灭菌，以备纯培养用。一般培养基的灭菌采用高压蒸汽灭菌，达到无菌状态。

三、实验材料

(1) 器皿及材料：天平，称量纸，牛角匙，精密 pH 试纸，量筒，刻度搪瓷杯，试管，三角瓶，漏斗，分装架，移液管及移液管筒，培养皿及金属培养皿筒，玻璃棒，烧杯，试管架，铁丝筐，剪刀，酒精灯，棉花，线绳，牛皮纸或报纸，纱布，乳胶管，电炉，灭菌锅，干燥箱等。

(2) 药品试剂：蛋白胨，牛肉膏，NaCl，K₂HPO₄，琼脂，NaNO₃，KCl，MgSO₄，FeSO₄，蔗糖，麦芽糖，木糖，葡萄糖，半乳糖，乳糖，土豆汁，豆芽汁，磷酸铵，5% NaOH 溶液，5% HCl 溶液。

四、实验步骤

1. 培养基的制备

(1) 称量药品：根据培养基配方依次准确称取各种药品，放入适当大小的烧杯中，

琼脂先不要加入。蛋白胨极易吸潮，故称量时要迅速。

(2) 溶解：用量筒取一定量（约占总量的 1/2）的蒸馏水倒入烧杯中，在放有石棉网的电炉上小火加热，并用玻璃棒搅拌，以防液体溢出。待各种药品完全溶解后，停止加热，补足水分。如果配方中有淀粉，则先将淀粉用少量冷水调成糊状，并在火上加热搅拌，然后加其他原料，待完全溶化后，补足水分。

(3) 调节 pH：根据培养基对 pH 的要求，用 5% NaOH 溶液或 5% HCl 溶液调至所需 pH。

(4) 溶化琼脂：固体或半固体培养基需加入一定量琼脂。琼脂加入后，置电炉上一边搅拌一边加热，直至琼脂完全溶化后才能停止搅拌，并补足水分（水需预热）。注意控制火力不要使培养基溢出或烧焦。

(5) 过滤分装：分装时注意不要使培养基沾染在管口或瓶口，以免浸湿棉塞，引起污染。液体分装高度以试管高度的 1/4 左右为宜，固体分装量为试管高度的 1/5 为宜，半固体分装量一般以试管高度的 1/3 为宜。分装三角瓶，其装量以不超过三角瓶容积的一半为宜。

(6) 包扎标记：培养基分装后加好棉塞或试管帽，再包上一层牛皮纸或报纸，用线绳系好。在包装纸上标明培养基名称、制备组别、制备者姓名和制备日期等。

(7) 灭菌：所配培养基应按培养基配方中规定的条件及时进行灭菌。普通培养基为 121℃ 20min，以保证灭菌效果和不损伤培养基的有效成分。培养基经灭菌后，如需要做斜面固体培养基，则灭菌后立即摆放成斜面，斜面长度一般以不超过试管长度的 1/2 为宜；半固体培养基灭菌后，垂直冷凝成半固体深层琼脂培养基。

(8) 倒平板：将需倒平板的培养基，于水浴锅中冷却至 45~50℃，立刻倒平板。倒平板时，从培养皿的一边倒入，使培养基流向对面，一般标准皿需培养基约 20mL。

2. 灭菌方法

灭菌是指杀死或消灭一定环境中的所有微生物，灭菌的方法分为物理灭菌法和化学灭菌法两大类。本实验主要介绍物理灭菌法的一种，即加热灭菌。

加热灭菌包括湿热灭菌和干热灭菌两种。通过加热使菌体内蛋白质凝固变性，从而达到杀菌目的。蛋白质的凝固变性与其自身含水量有关，含水量越高，其凝固所需要的温度越低。在同一温度下，湿热灭菌的杀菌效力比干热灭菌大。因为在湿热情况下，菌体吸收水分，使蛋白质易于凝固；同时湿热灭菌的穿透力强，可增加灭菌效力。

1) 湿热灭菌

实验室一般采用高压蒸汽灭菌锅（图 1-1）进行高压蒸汽灭菌。高压蒸汽灭菌用途广，效率高，是微生物学实验中最常用的灭菌方法。这种灭菌方法是基于水的沸点随着蒸汽压力的升高而升高的原理设计的。当蒸汽压力达 1.05kg/cm² 时，水蒸气的温度升高到 121℃，经 15~30min，可杀死锅内物品上的全部微生物和它们的孢子或芽孢。一般培养基、玻璃器皿和工作服等都可应用此法灭菌。

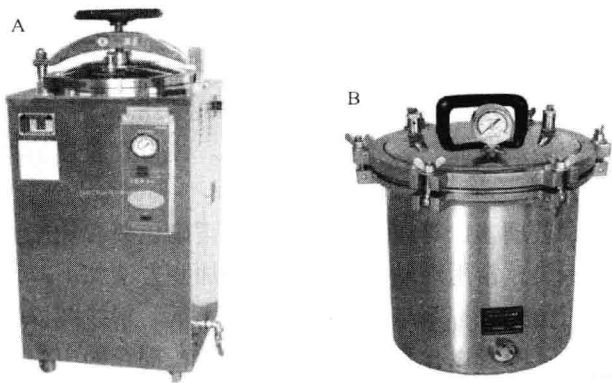


图 1-1 高压蒸汽灭菌锅

A. 立式高压蒸汽灭菌锅；B. 手提式高压蒸汽灭菌锅

操作方法和注意事项如下。

(1) 加水：打开灭菌锅盖，向锅内加水到水位线。立式高压蒸汽灭菌锅最好用已煮开过的水，以便减少在锅内积存水垢。注意水要加够，防止灭菌过程中干锅。

(2) 装料、加盖：灭菌材料放好后，关闭灭菌器盖，采用对角式均匀拧紧锅盖上的螺栓，使蒸汽锅密闭，以免漏气。

(3) 排气：打开排气口（也称放气阀）。用电炉加热，待水煮沸后，水蒸气和空气一起从排气孔排出，当有大量蒸汽排出时，维持 5min，使锅内冷空气完全排净。在使用高压蒸汽灭菌锅灭菌时，完全排除灭菌锅内冷空气极为重要。因为空气膨胀压大于水蒸气的膨胀压，所以，当水蒸气中含有空气时，在同一压力下，含空气蒸汽的温度低于饱和蒸汽的温度。灭菌锅内留有不同分量空气时压力与温度的关系见表 1-1。

表 1-1 灭菌锅内留有不同分量空气时压力与温度的关系

压力/(kg/cm ²)	压力/(lb/in ²)	全部空气排出时的温度/℃	2/3 空气排出时的温度/℃	1/2 空气排出时的温度/℃	1/3 空气排出时的温度/℃	空气全不排出时的温度/℃
0.35	5	108.8	100	94	90	72
0.70	10	115.6	109	105	100	90
1.05	15	121.3	115	112	109	100
1.40	20	126.2	121	118	115	109
1.75	25	130.0	126	124	121	115
2.10	30	134.6	130	128	126	121

注：1kg/cm²≈9.8×10⁴Pa；1lb/in²≈6.89×10³Pa

(4) 升压、保压和降压：当锅内冷空气排净时，即可关闭排气口，压力开始上升。当压力上升至所需压力时，控制电压以维持恒温，并开始计算灭菌时间，待时间达到要求（一般培养基和器皿灭菌控制在 121℃ 20min）后，停止加热，待压力降至接近 0 时，打开排气口。注意不能过早过急地排气，否则会由于瓶内压力下降的速度比锅内慢而造成瓶内液体冲出容器。

(5) 灭菌后的培养基空白培养：灭菌后的培养基放于 37℃培养箱中培养，经 24h 培养无菌生长，可保存备用；斜面培养基取出后，立即摆成斜面后空白培养；半固体的培养基垂直放置凝成半固体深层琼脂培养基后，空白培养。

2) 干热灭菌

通过使用干热空气杀灭微生物的方法称干热灭菌。一般是把待灭菌的物品包装就绪后,放入电烘箱中烘烤,即加热至 $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ 并维持 $1\sim 2\text{h}$ 。

干热灭菌法常用于空玻璃器皿、金属器具的灭菌。凡带有胶皮的物品、液体及固体培养基等都不能用此法灭菌。

(1) 灭菌前的准备。玻璃器皿等在灭菌前必须经正确包裹和加塞,以保证玻璃器皿于灭菌后不被外界杂菌污染。常用玻璃器皿的包扎和加塞方法如下:培养皿用纸包扎或装在金属培养皿筒内;三角瓶在棉塞与瓶口外再包以厚纸,用线绳以活结扎紧,以防灭菌后瓶口被外部杂菌污染;吸管以拉直的曲别针一端放在棉花的中心,轻轻插入管口,松紧必须适中,管口外露的棉花纤维统一通过火焰烧去,灭菌时将吸管装入金属管筒内进行灭菌,也可用纸条斜着从吸管尖端包起,逐步向上卷,头端的纸卷捏扁并拧几下,再将包好的吸管集中灭菌。

(2) 干燥箱灭菌。将包扎好的物品放入干燥箱内,注意不要摆放太密,以免妨碍空气流通;不得使器皿与烘箱的内层底板直接接触。将干燥箱的温度升至 $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ 并恒温 $1\sim 2\text{h}$,注意勿使温度过高,超过 170°C ,器皿外包裹的纸张、棉花就会被烤焦燃烧。如果是为了烤干玻璃器皿,温度为 120°C 持续 30min 即可。温度降至 $60\sim 70^{\circ}\text{C}$ 时才可打开箱门,取出物品,否则玻璃器皿会因骤冷而爆裂。

用此法灭菌时,绝不能用油纸、蜡纸包扎物品。

五、实验报告

1. 记录各种物品所用的灭菌方法及灭菌条件(温度、压力等)。
2. 试述高压蒸汽灭菌的过程及注意事项。

六、思考题

1. 制备培养基的一般程序是什么?
2. 做过本实验后,你认为在制备培养基时要注意些什么问题?
3. 灭菌在微生物学实验操作中有何重要意义?
4. 试述高压蒸汽灭菌的操作方法和原理。
5. 高压蒸汽灭菌时应注意哪些事项?

(安康学院 杨薇)

实验 1-2 环境中的微生物检测及菌落特征观察

一、目的要求

了解环境中各类微生物的存在,并比较不同环境中微生物的数量和种类;理解微生

物实验无菌操作技术的重要性；初步认识各类微生物的菌落特征。

二、实验原理

微生物在环境中广泛存在，但由于其个体微小，绝大部分用肉眼无法观察到。人工制备的培养基中含有微生物生长所需要的各种营养成分，将取自不同来源的样品接种于培养基上，并在适宜的温度条件下培养，则微生物细胞能够通过繁殖而形成肉眼可见的群体，即菌落。不同微生物对营养物质有不同的要求，实验室一般用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基（简称营养琼脂培养基）进行细菌的培养，而马铃薯蔗糖琼脂培养基（PDA）一般用于真菌的培养。不同微生物形成的菌落也有其各自的特征，如菌落的大小、表面干燥或湿润、隆起或扁平、粗糙或光滑，边缘整齐或不整齐，菌落透明或半透明或不透明、颜色及质地疏松或紧密等。因此，可通过选用营养琼脂平板和 PDA 平板来分别检测环境中的细菌和真菌等微生物的数量和种类。

三、实验材料

（1）培养基：营养琼脂平板，马铃薯蔗糖琼脂平板。

（2）仪器及其他用品：高压蒸汽灭菌锅，培养箱，棉签（装在试管或小玻璃瓶中灭菌后备用），试管架，记号笔，酒精灯，无菌水（装在试管中备用），废物缸等。

四、实验步骤

取营养琼脂平板和 PDA 平板各 5 副，其中各一副作为对照不做任何处理，其余各 4 副分别按如下方法处理。

1. 空气中微生物的检测

取营养琼脂平板和 PDA 平板各一副；打开培养皿盖，在空气中暴露约 10min 后盖上；用记号笔在培养皿的底部做好标记，将培养皿倒置于 25℃ 培养箱中培养 3~4d。

2. 实验台面上微生物的检测

（1）取棉签：左手拿装有棉签的试管，在火焰旁用右手的手掌边缘和小指夹持并拔出棉塞（或试管帽）；将试管口在酒精灯（或煤气灯）火焰上稍作烧灼；倾斜试管，用右手拇指和食指小心地取出一根棉签；烧灼管口，塞回棉塞（或试管帽），将试管放回试管架。

（2）弄湿棉签：左手取无菌水试管，同上方法拔出棉塞（或试管帽）并烧灼试管口；将棉签插入水中，再提出水面并在管壁上挤压一下以除去过多的水分；小心取出棉签，烧灼管口，塞回棉塞（或试管帽），并将试管放回试管架。

（3）取样：将湿棉签在实验台面上约 2cm² 的范围内来回擦拭数次（图 1-2A），以吸附台面上的微生物。

(4) 接种：取营养琼脂平板一副，在火焰旁用左手拇指和食指使培养皿开启一条缝；将棉签伸入并在培养基表面来回擦拭接种（图 1-2B），注意不要将培养基擦破；立即闭合皿盖，将用过的棉签丢弃至废物缸中；在培养皿底部用记号笔做好标记。

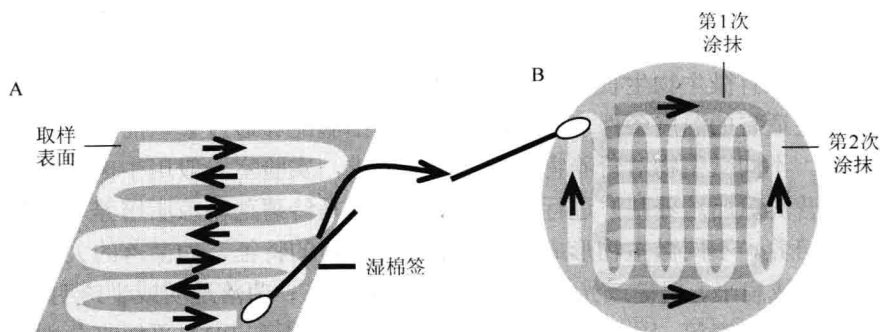


图 1-2 实验台面或皮肤表面微生物的取样与接种方法

A. 用湿棉签在实验台面或皮肤表面来回擦拭，以粘取微生物；B. 将湿棉签在平板培养基的表面来回涂抹，使粘取的微生物转移到培养基上

(5) 培养：将培养皿倒置于 25℃ 培养箱中培养 3~4d。

采用同样的方法取样并接种 PDA 平板，做好标记后将培养皿倒置于 25℃ 培养箱中培养 3~4d。

3. 人体皮肤表面微生物的检测

采用上述方法，另取无菌棉签并弄湿，然后将湿棉签在自己手臂或耳根等处的皮肤表面约 2cm² 的范围内来回擦拭数次，并接种营养琼脂平板和 PDA 平板。做好标记后将培养皿倒置于 37℃ 培养箱中培养 3~4d。

4. 自来水中微生物的检测

采用上述方法，另取无菌棉签，但无需用无菌水弄湿，而是直接蘸取少量自来水；然后将蘸有自来水的湿棉签在营养琼脂平板和 PDA 平板的表面来回擦拭接种。做好标记后将培养皿倒置于 25℃ 培养箱中培养 3~4d。

五、实验报告

培养 3~4d 后，用相机拍摄各个平板的照片，并填写表 1-2。

表 1-2 不同来源的微生物在营养琼脂平板和 PDA 平板上生长状况

微生物来源	平板种类	菌落数	大小	颜色	形状	边缘	透明程度	表面光泽	质地
空气	营养琼脂平板								
	PDA 平板								
实验台面	营养琼脂平板								
	PDA 平板								

续表

微生物来源	平板种类	菌落数	大小	颜色	形状	边缘	透明程度	表面光泽	质地
自来水	营养琼脂平板								
	PDA 平板								
人体皮肤表面	营养琼脂平板								
	PDA 平板								

六、思考题

1. 哪一类环境中的微生物种类和数量最多？为什么？
2. 为何取自皮肤表面和其他环境中的微生物要分别在不同温度条件下培养？
3. 在你操作的平板上是否出现了“抑菌现象”？若有，请说明原因。

(湖南文理学院 贺江)

实验 1-3 普通光学生物显微镜的构造与使用

一、目的要求

学习和掌握普通光学生物显微镜的结构和放大原理，练习显微镜的正确使用方法。

二、光学显微镜的结构与放大原理

(一) 光学显微镜的放大原理

光学显微镜简称光镜，是利用光线照明使微小物体形成放大影像的仪器。显微镜的主要构成要件是物镜和目镜，虽然它们的结构复杂，但其作用都是相当于一个凸透镜。由于被检标本是放在物镜下方的 1~2 倍焦距之间，上方形成一倒立的放大实像，该实像正好位于目镜的下焦点（焦平面）之内，目镜进一步将它放大成一个虚像，通过调焦可使虚像落在眼睛的明视距离处，在视网膜上形成一个正立的实像。显微镜中被放大的倒立虚像与视网膜上正立的实像是相吻合，这样就将真实物体放大。

与放大倍数有关的主要参数包括：放大倍数、分辨率、数值孔径和工作距离。

(1) 放大倍数：是指眼睛看到像的大小与对应标本大小的比值。它指的是长度的比值而不是面积的比值。例如，放大倍数为 100，指的是长度为 $1\mu\text{m}$ 的标本，放大后像的长度是 $100\mu\text{m}$ ，要是以面积计算，则放大了 10 000 倍。显微镜的总放大倍数等于物镜和目镜放大倍数的乘积。

(2) 分辨率：也称分辨力或分辨本领。分辨率的大小用分辨距离（所能分辨开的两个物点间的最小距离）的数值来表示。在明视距离（25cm）之处，正常人眼所能看清两

个物点的最小相距是 0.073mm, 0.073mm 即正常人眼的分辨率(距离)。显微镜的分辨距离越小, 表示它的分辨率越高, 也就表示它的性能越好。

显微镜分辨率的大小是由物镜的分辨率来决定, 而物镜的分辨率又是由它的数值孔径和照明光线的波长决定。

当用普通的中央照明法(使光线均匀地透过标本的明视照明法)时, 显微镜的分辨距离为

$$d=0.61\lambda/NA$$

式中, d 为物镜的分辨距离, nm; λ 为照明光线波长, nm; NA 为物镜的数值孔径。

例如, 油浸物镜的数值孔径为 1.25, 可见光波长为 400~700nm, 取其平均波长 550nm, 将上述几个值带入公式中, 则 $d=268\text{nm}$, 约等于照明光线波长的一半。一般地, 用可见光照明的显微镜分辨率的极限是 $0.2\mu\text{m}$ 。

(3) 数值孔径: 也称镜口率(numerical aperture, NA 或 A), 是物镜和聚光镜的主要参数, 与显微镜的分辨率有密切关系。干燥物镜的数值孔径为 0.05~0.95, 油浸物镜(香柏油)的数值孔径为 1.25。

数值孔径计算公式为

$$NA = \eta \cdot \sin \frac{\alpha}{2}$$

式中, η 为物镜与标本间的介质折射率; α 为物镜的镜口角。

镜口角指光波从标本片的中心位置投射到物镜前透镜边缘的最大夹角(图 1-3), 镜口角越大, 进入透镜的光线越多, 显微镜的分辨率越高。物镜镜口角的理论限度为 180° , $\sin\alpha/2=1$, 这时物镜的数值孔径达到极限值, 也就是物镜与标本间的介质折射率。但实际上, 镜口角只能达 $120^\circ\sim 140^\circ$, 因此油镜选用折光率与玻璃相近的介质(通常用香柏油)来提高数值孔径, 达到增大分辨率的目的(图 1-4)。一些物质的折射率为: 玻璃 1.52、香柏油 1.515、液体石蜡 1.481、甘油 1.475、水 1.33、空气 1.0003。

因此分辨率 d 也可用下式表示。

$$d = \frac{0.61\lambda}{\eta \cdot \sin \frac{\alpha}{2}}$$

从这个公式中可以看出, 分辨率与光波长、介质的折射率、镜口角之间的关系。

要选用折光率与玻璃相近的介质, 是因为当介质的折光率和玻璃差距大时, 一部分光线会因折射或全反射, 不能进入镜头, 致使在使用油镜时会因为射入的光线较少, 物像不清; 而当介质的折射率和玻璃接近时, 光线发生折射或反射的概率很低, 基本都能进入镜头, 因此物像显得清晰(图 1-5)。

(4) 工作距离: 是指当所观察的标本最清楚时物镜的透镜最前端到标本的盖玻片上面的距离。物镜的工作距离与物镜的焦距有关, 物镜的焦距越长, 放大倍数越低, 其工作距离越长。例如, 10 倍物镜上标有 10/0.25 和 160/0.17, 其中 10 为物镜的放大倍数; 0.25 为数值孔径; 160 为镜筒长度(mm); 0.17 为盖玻片的标准厚度(mm)。10 倍物镜有效工作距离为 6.5mm, 40 倍物镜有效工作距离为 0.48mm。物镜放大倍数越大, 则工作距离越近。