

---

东华理工大学放射性地质实验教学中心实践教学系列教材

---

# 环境微生物学实验教程

刘亚洁 李文娟 编著

中国原子能出版社

东华理工大学放射性地质实验教学中心实践教学系列教材

# 环境微生物学实验教程

刘亚洁 李文娟 编著

中国原子能出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

环境微生物学实验教程 / 刘亚洁, 李文娟编著. —北京: 中国原子能出版社, 2013. 5  
ISBN 978-7-5022-5824-5

I. ①环… II. ①刘… ②李… 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(2013)第 022858 号

## 内 容 提 要

该教程是《环境工程微生物学》、《水处理微生物学》等基础微生物学类课程的配套实验教程, 本书共分为九章, 主要内容包括: 微生物学实验仪器、微生物学基础实验、空气微生物检测实验、水污染微生物学实验、土壤微生物学实验、微生物的分离与纯化实验技术, 水质的细菌学检测技术, 环境中致突变物的监测等操作性实验, 以及酸性矿山微生物富集分离和环境样品中微生物检测等设计性、综合性试验。

本书可作为高等院校环境工程、给排水类专业学生的基础微生物学类课程配套实验教学用书, 也可供相关专业人员参考。

## 环境微生物学实验教程

---

出版发行 中国原子能出版社(北京市海淀区阜成路 43 号 100048)  
责任编辑 谭 俊  
责任校对 冯莲凤  
责任印制 潘玉玲  
印 刷 保定市中画美凯印刷有限公司  
经 销 全国新华书店  
开 本 787 mm×1092 mm · 1/16  
印 张 7 字 数 172 千字  
版 次 2013 年 5 月第 3 版 2013 年 5 月第 1 次印刷  
书 号 ISBN 978-7-5022-5824-5 定 价 20.00 元

---

网址: <http://www.aep.com.cn>

发行电话: 010-68452845

E-mail: [atomep123@126.com](mailto:atomep123@126.com)

版权所有 侵权必究

## 总 序

东华理工大学放射性地质实验教学中心是在东华理工大学前身太谷地质学校铀矿地质实验室的基础上发展而来。20世纪50年代中叶,为了响应党中央、国务院作出的发展原子能事业的伟大决策和“打破帝国主义核垄断”的号召,国家第二机械工业部于1956年6月创立了太谷地质学校,专门培养铀矿勘查技术人员。1959年学校迁至邻近某特大型铀矿区的江西省抚州市,校名改为抚州地质专科学校(本科),1978年改为抚州地质学院,1982年更名为华东地质学院,2002年更名为东华理工学院,2007年更名为东华理工大学。为全世界唯一的专门从事核燃料循环工程和放射性地学人才培养工作的高等学校,被联合国国际原子能机构(IAEA)指定为铀矿地质和同位素水文学高级培训中心。

放射性地质实验教学中心包括基础地质实验室、铀矿地质实验室、地质信息处理实验室、地球化学实验室、放射性地球物理勘探实验室、放射性水文地质与工程地质实验室等六个功能实验室,并建有杭州基础地质认识、江山区域地质调查、相山铀矿地质三个野外实习基地和地质博物馆,鹰潭龙虎山、抚州温泉、南昌梅岭、庐山等多个课间野外地质认识实习基地,以及鄂尔多斯、江西信江等多个产、学、研野外实习基地。2009年1月20日,该中心被教育部、财政部批准为2008年度国家级实验教学示范中心建设单位(教高函(2009)5号)。

为切实落实国家实验教学示范中心的建设目标,加强实验教学中心的内涵建设,中心做到以培养学生实践能力、创新能力和提高教学质量为宗旨,以实验教学改革为核心,以实验资源开放共享为基础,以高素质实验教学队伍和完备的实验条件为保障,创新管理机制,全面提高实验教学水平和实验室使用效益。建设过程中取得了一系列显著的实践教学效果,如在首届全国大学生地质技能大赛上,我校学子获得了包括地质技能综合应用一等奖(第1名)等多项佳绩,赢得了与会专家、兄弟院校的高度评价。

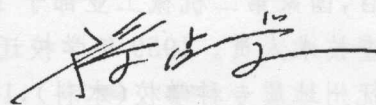
本系列实验、实习教材的出版是我校放射性地质实验教学中心进一步加强学生实践能力和创新精神培养、改进实验教学体系、内容和方法,凝练优秀教学成果,促进优质资源整合、共享的重要举措之一。系列实验、实习教材内容凝聚了我校相关专业教师多年的教学成果积累,是在原有自编特色、优势实践教学类讲义基础上重新编写或修订完成的。该系列教材适合资源勘查工程、地球化学、勘查技术与工程、地球物理学、水文与水资源工程、土木工程等本专科专业相关课程的室内实践教学实习和课间野外实践教学实习使用,同时也可供相关

专业人员参考。

本系列教材的出版得到了东华理工大学领导,地球科学学院、核工程技术学院、水资源与环境工程学院、建筑工程学院以及教务处等单位领导和老师的大力支持。

最后,衷心感谢参加这套教材编写的全体教师,正是由于他们的辛勤劳动,编写工作才得以顺利完成。同时真诚感谢中国原子能出版传媒有限公司(中国原子能出版社)的领导及有关同志,正是由于他们的最大支持和认真督促,这套教材才能够如期与读者见面。

东华理工大学副校长  
放射性地质实验教学中心主任



2011.6.30

# 前 言

本书是高等工科院校环境工程专业“环境工程微生物学”课程的配套教材。环境工程微生物实验是高等学校环境工程专业和给排水专业必修课程,是环境工程微生物学教学的重要组成部分。通过本教材内容的学习和操作,可加深学生对环境工程微生物学基础理论的理解,培养学生环境工程微生物学实验的基本操作技能,熟悉各种无菌操作技术及微生物学常用仪器设备的使用,同时,培养学生独立编写设计性和综合性实验方案、研究报告的能力。

本教程主要内容包括:微生物学实验仪器、微生物学基础实验、空气微生物检测实验、水污染微生物学实验、土壤微生物学实验、微生物的分离与纯化实验技术,水质的细菌学检测技术,环境中致突变物的监测等操作性实验,以及酸性矿山微生物富集分离和环境样品中微生物检测等设计性、综合性试验。本书最后还附有微生物常用培养基、染料、试剂等的配制方法。由于篇幅所限,本书省去了现代环境工程微生物学中分子操作部分的相关实验内容,如原核(真核)生物分子鉴定技术、分子克隆与杂交技术、测序技术等,同时省去了生物絮凝剂产生菌及其制备等实验。

该书是在刘亚洁所编的原东华理工学院《环境工程微生物学》内部实验讲义基础上补充完善而成。编写过程中,得到了环境工程系全体老师和各届学生的大力支持,其中环境工程系教师李小燕、王学刚,硕士研究生刘艳曾在编辑排版方面给予了极大帮助,在此表示衷心的感谢!教材的出版得到东华理工大学放射性地质实验教学中心(国家级实验教学示范中心)和东华理工大学地球科学学院国家级特色专业、国家管理专业、国防重点建设专业和江西省高校品牌专业等的鼎力支持。

本书亦可供从事普通微生物学、环境(工程)生物学研究领域的教师、研究生和其他研究者参考。由于时间仓促,加之编者水平有限,书中尚有许多不妥之处,敬请读者指正,并提出宝贵意见和建议。

编者

2012年5月

# 目 录

1	微生物学实验室常用的器皿	(1)
1.1	器皿的种类、要求与应用	(1)
1.2	玻璃器皿的洗涤	(4)
2	显微镜的构造、性能和使用方法	(7)
实验 2-1	普通光学显微镜的使用	(7)
实验 2-2	暗视野显微镜的使用	(13)
实验 2-3	相差显微镜的使用	(15)
实验 2-4	电子显微镜的使用	(17)
3	环境中微生物类群的观察	(22)
实验 3-1	细菌形态结构的观察	(22)
实验 3-2	放线菌的形态观察	(24)
实验 3-3	酵母菌的形态观察	(26)
实验 3-4	霉菌的形态观察	(29)
4	活性污泥或生物膜生物相的观察	(32)
实验 4-1	活性污泥微生物的显微镜观察及微型动物的计数	(32)
实验 4-2	活性污泥中丝状微生物的鉴别	(36)
5	培养基的配制及灭菌	(40)
实验 5-1	培养基的常规配制程序	(40)
实验 5-2	几种常用培养基的制备	(45)
实验 5-3	高压蒸汽灭菌	(47)
6	微生物的分离与纯化技术	(51)
实验 6-1	土壤中细菌、放线菌、酵母菌及霉菌的分离与纯化	(51)
实验 6-2	化能自养微生物的分离与纯化(硅胶平板分离纯化硝化细菌)	(59)
实验 6-3	含酚污水降解菌的分离、纯化与筛选	(62)
7	水质的细菌学检测	(67)
实验 7-1	饮用水中细菌总数及大肠菌群(Coliform group)的检测	(67)
实验 7-2	食品中细菌总数及大肠菌群数的检测	(70)
8	环境中致突变物的监测	(76)
实验 8-1	Ames 法检测环境中的致癌物质	(76)
9	环境工程微生物学综合设计性实验	(82)
实验 9-1	Thiobacillus 属细菌的富集及分离	(83)
实验 9-2	环境样品中微生物种类、数量及分布特性的检测	(87)

附录 .....	(89)
附录一 常用培养基的配方及配制方法 .....	(89)
附录二 常用染液的配制 .....	(95)
附录三 常用试剂及缓冲液的配制 .....	(98)
参考文献 .....	(102)

(1) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(2) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(3) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(4) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(5) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(6) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(7) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(8) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(9) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(10) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(11) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(12) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(13) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(14) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(15) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(16) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(17) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(18) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(19) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(20) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(21) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(22) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(23) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(24) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(25) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(26) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(27) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(28) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(29) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(30) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(31) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(32) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(33) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(34) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(35) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(36) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(37) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(38) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(39) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(40) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(41) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(42) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(43) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(44) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(45) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(46) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(47) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(48) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(49) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(50) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(51) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(52) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(53) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(54) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(55) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(56) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(57) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(58) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(59) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(60) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(61) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(62) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(63) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(64) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1

(65) ..... 细菌的分离与鉴定 ..... 1



# 1 微生物学实验室常用的器皿

微生物学实验室所用的玻璃器皿,大多要进行消毒、灭菌和用来培养微生物,因此对其质量、洗涤和包装方法均有一定的要求。一般,玻璃器皿要求使用硬质玻璃,才能承受高温和短暂烧灼而不致破损;器皿的游离碱含量要少,否则会影响培养基的酸碱度;洗涤方法不恰当也会影响实验结果。以下对此作详细介绍。

## 1.1 器皿的种类、要求与应用

### 1.1.1 试管(test tube)

微生物学实验室所用玻璃试管,其管壁必须比化学实验室用的厚些,这样在塞棉花时,管口才不会破损。试管的形状要求没有翻口(图 1-1,A),不然,微生物容易从棉塞与管口的缝隙间进入试管(图 1-1,B)而造成污染。此外,现在有不用棉塞而用铝制或塑料制的试管帽(图 1-1,C),若用翻口试管也不便于盖试管帽。有的实验要求尽量减低蒸发试管内的水分,则需使用螺口试管(图 1-1,D),盖以螺口胶木或塑料帽。

试管的大小可根据用途的不同,分为下列三种型号。

(1) 大试管(约  $18\text{ mm} \times 180\text{ mm}$ )可盛倒培养皿用的培养基;亦可作制备琼脂斜面用(需要大量菌体时用)。

(2) 中试管[约  $(13 \sim 15)\text{ mm} \times (100 \sim 150\text{ mm})$ ]盛液体培养基或做琼脂斜面用,亦可用于病毒等的稀释和血清学试验。

(3) 小试管[ $(10 \sim 12)\text{ mm} \times 100\text{ mm}$ ]一般用于糖发酵试验或血清学试验,和其他需要节省材料的试验。

(4) 德汉氏管(Durham tube)

观察细菌在糖发酵培养基内产气情况时,一般在小试管内再套一倒置的小套管(约  $6\text{ mm} \times 36\text{ mm}$ )(图 1-2),此小套管即为德汉氏试管,又称发酵小套管或杜氏小管。

(5) 吸管(又称移液管, pipette)

a 玻璃吸管(glass pipette) 微生物学实验室一般要准备  $1\text{ mL}$ 、 $5\text{ mL}$ 、 $10\text{ mL}$  的刻度玻璃吸管(图 1-3,A)。与化学实验室所用的不同,其刻度指示的容量往往包括管尖的液体体积,亦即使用时要注意将所吸液体吹尽,故有时称为“吹出”吸管。

除有刻度的吸管外,有时需用不计量的毛细吸管,又称滴管(图 1-3,B),来吸取动物体

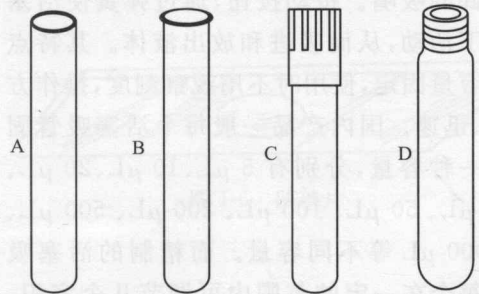


图 1-1 各式试管与试管帽

A. 无翻口试管; B. 翻口试管(不适用);  
C. 上有试管帽; D. 螺口试管

液和离心上清液以及滴加少量抗原、抗体等。

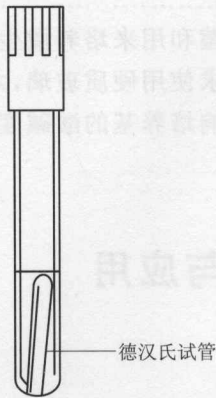


图 1-2 德汉氏试管

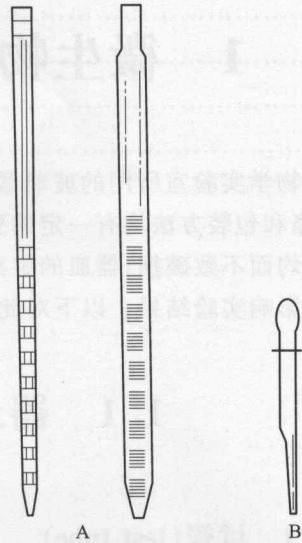


图 1-3 玻璃吸管

A. 刻度吸管; B. 毛细吸管

b 活塞吸管 (piston pipette) 主要用来吸取微量液体, 故又称微量吸液器或微量加样器。其外形和结构如图 1-4, 除塑料外壳外, 主要部件有按钮、弹簧、活塞和可装卸的吸嘴。按动按钮, 通过弹簧使活塞上下活动, 从而吸进和放出液体。其特点是容量固定, 使用时不用观察刻度, 操作方便、迅速。国内产品一般每个活塞吸管固定一种容量, 分别有  $5 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{L}$ 、 $20 \mu\text{L}$ 、 $25 \mu\text{L}$ 、 $50 \mu\text{L}$ 、 $100 \mu\text{L}$ 、 $200 \mu\text{L}$ 、 $500 \mu\text{L}$ 、 $1000 \mu\text{L}$  等不同容量。而精制的活塞吸管每个在一定的范围内可调节几个容积, 例如在  $5 \sim 25 \mu\text{L}$  的范围内, 可调节  $5 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{L}$ 、 $15 \mu\text{L}$ 、 $20 \mu\text{L}$ 、 $25 \mu\text{L}$  五个不同的量, 使用时按需要调节, 但当调节固定后, 每吸一次, 容量仍是固定的。用毕只需调换吸嘴或将吸嘴洗净, 消毒后再行使用。

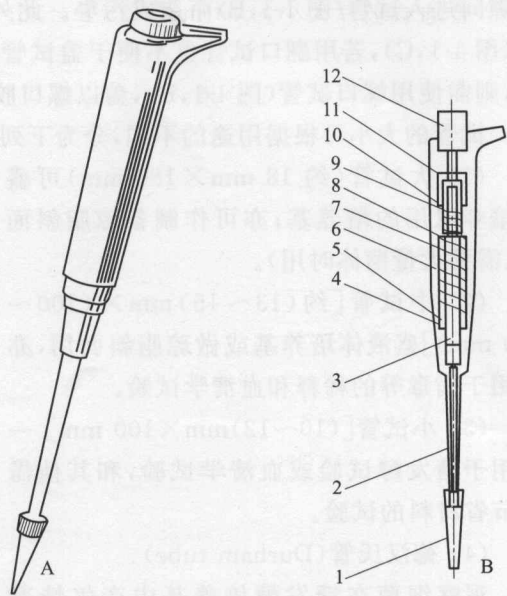


图 1-4 活塞吸管的外形与结构

A. 外形; B. 结构

- 1. 吸嘴; 2. 吸引管; 3. 活塞; 4. 活塞套;
- 5. 密封圈; 6. 外壳; 7. 压簧; 8. 活塞杆;
- 9. 上冲横压簧; 10. 冲程限位圈;
- 11. 螺母; 12. 按钮

### 1.1.2 培养皿 (petri dish)

常用的培养皿 (图 1-5), 皿底直径  $90 \text{ cm}$ , 高  $15 \text{ cm}$ 。培养皿一般均为玻璃皿

盖, 但有特殊需要时, 可使用陶器皿盖, 因其能吸收水分, 使培养基表面干燥, 例如测定抗生

素生物效价时,培养皿不能倒置培养,则用陶器皿盖为好。

在培养皿内倒入适量固体培养基制成平板,用于分离、纯化、鉴定菌种、微生物计数以及测定抗生素、噬菌体的效价等。

### 1.1.3 三角烧瓶(Erlenmeyer flask)与烧杯(beaker)

三角烧瓶有 100 mL、250 mL、500 mL、1 000 mL 等不同的大小,常用来盛无菌水、培养基和摇瓶发酵等。常用的烧杯有 50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1 000 mL 等,用来配制培养基与药品。

### 1.1.4 注射器(injector)

一般有 1 mL、2 mL、5 mL、10 mL、20 mL、50 mL 等不同容量的注射器。注射抗原于动物体内可根据需要使用 1 mL、2 mL 和 5 mL 的;抽取动物心脏血或绵羊静脉血可采用 10 mL、20 mL、50 mL 的。

微量注射器有 10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、50  $\mu$ L、100  $\mu$ L 等不同的大小。一般在免疫学或纸层析等实验中滴加微量样品时应用。

### 1.1.5 载玻片(slide)与盖玻片(cover slip)

普通载玻片大小为 75 mm $\times$ 25 mm,用于微生物涂片、染色,作形态观察等。盖玻片为 18 mm $\times$ 18 mm。

凹玻片是在一块厚玻片的当中有一圆形凹窝(图 1-6),作悬滴观察活细菌以及微生物培养用。



图 1-5 培养皿



图 1-6 凹玻片

### 1.1.6 双层瓶(double bottle)

由内外两个玻璃瓶组成(图 1-7),内层小锥形瓶盛放香柏油,供油镜头观察微生物时使用,外层瓶盛放二甲苯,用以擦净油镜头。

### 1.1.7 滴瓶(dropper bottle)

用来装各种染料、生理盐水等(图 1-8)。

### 1.1.8 接种工具

接种工具有接种环(inoculating loop)、接种针(inoculating needle)、接种钩(inoculating hook)、接种铲(inoculating shovel)、玻璃涂布器(glass spreader)等(图 1-9)。制造环、针、钩、铲的金属可用铂或镍,原则是软硬适度,能经受火焰反复烧灼,又易冷却。接种细菌和酵

母菌用接种环和接种针,其铂丝或镍丝的直径以 0.5 mm 为适当,环的内径 2 mm,环面应平整。接种某些不易和培养基分离的放线菌和真菌,有时用接种钩或接种铲,其丝的直径要求粗一些,约 1 mm。用涂布法在琼脂平板上分离单个菌落时需用玻璃涂布器,是将玻棒弯曲或将玻棒一端烧红后压扁而成。

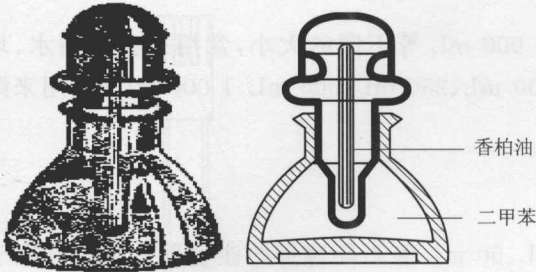


图 1-7 双层瓶



图 1-8 滴瓶

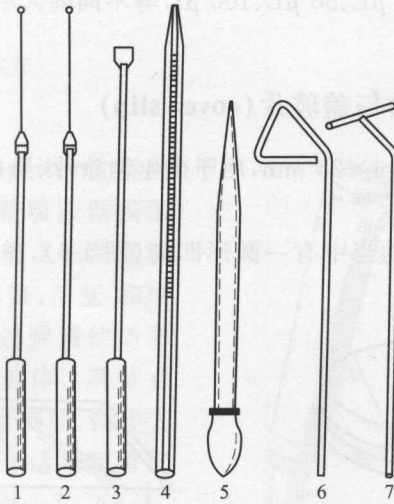


图 1-9 接种工具

1. 接种针;2. 接种环;3. 接种铲;4. 移液管;5. 滴管;6,7. 玻璃涂棒

## 1.2 玻璃器皿的洗涤

清洁的玻璃器皿是得到正确实验结果的重要条件之一。已用过的带有活菌沾染的玻璃器皿,更不能随意堆放,以防杂菌传播污染环境。由于实验目的的不同,对各种玻璃器皿的清洁程度要求也不一样。以下主要介绍新购置的玻璃器皿的处理,一般常用玻璃器皿的洗涤,带油污玻璃器皿和带菌玻璃器皿的处理、洗涤方法。

微生物学实验常用的玻璃器皿有试管、烧杯、锥形瓶、移液管、滴管、玻璃涂棒、培养皿、茄瓶或克氏瓶、盖片、载片等,在实验前均需洗涤清洁或经灭菌、晾干备用。

### 1.2.1 新购置的玻璃器皿的处理

新购置的玻璃器皿含有游离碱,一般应先在2%盐酸溶液浸泡数小时后再用清水洗净;也可在肥皂水或洗涤灵稀释液中煮30~60 min,取出用清水洗净。洗净后的试管倒置于试管筐内,锥形瓶倒置于洗涤架上,培养皿的皿盖和皿底分开,顺序压着皿边排列,倒扣在桌上或洗涤架上或铁丝筐内。上述玻璃器皿晾干或干燥箱中烘干备用。

新购置载玻片或盖玻片时,要挑选白色、厚薄均匀适中、无云雾状乳白色斑点的片子,先浸在2%盐酸酒精或洗涤灵稀释液或肥皂水中1 h,再用自来水冲洗,最后用蒸馏水冲洗,放在载片洗涤架上或斜立试管架旁,晾干备用。或以软布擦干后浸泡在装有含2%盐酸的95%酒精的玻璃缸中,用时取出在火焰上烧去酒精即可。

### 1.2.2 常用玻璃器皿的洗涤

常用的锥形瓶、培养皿、试管、烧杯、量筒、玻璃漏斗等器皿,洗涤时可用鬃刷沾上洗涤灵或肥皂粉或去污粉刷洗,然后用自来水冲洗干净,倒放在洗涤架上自然晾干或放70~80℃干燥箱中烘干备用。

移液管及滴管可用水冲洗后,插入2%盐酸溶液中浸泡数十分钟,取出后用自来水冲洗,再用蒸馏水冲洗2~3次(为使移液管、滴管冲洗洁净,可将一根直径6~7.5 mm的橡皮管或塑料管连接在自来水笼头上或连接在蒸馏水瓶上,橡皮管或塑料管的另一端直接套接在移液管或滴管的底端,即安装橡皮头的一端,然后放水冲洗即可)。洗净后的移液管或滴管使顶端(细口端)朝上倒转斜立于一铝制盒内,放入100℃干燥箱中烘干备用(烘烤温度太低移液管中水分不易蒸发)。

### 1.2.3 带油污玻璃器皿的处理

凡加过豆油、花生油、泡敌等消泡剂的锥形瓶或通气培养的大容量培养瓶,在未洗刷前,需尽量除去油腻,可将倒空油的瓶子用10%的氢氧化钠(粗制品)浸泡0.5 h或放在5%苏打液(碳酸氢钠溶液)内煮两次,去掉油污,再用洗涤灵和热水刷洗。吸取过油的滴管,先放在10%氢氧化钠溶液中浸泡0.5 h,去掉油污,再依上法清洗,烘干备用。

用矿物油封存过的斜面或用液体石蜡油加盖的厌氧菌培养管或石油发酵用的锥形瓶,洗刷前要先在水中煮沸或高压蒸汽灭菌,然后浸泡在汽油里使粘附于器壁上的矿物油溶解,汽油倒出后,放置片刻待汽油自然挥发,最后按新购置的玻璃器皿处理方法进行洗刷。凡带有凡士林的玻璃干燥器或瓦氏呼吸计侧压管玻璃塞、反应瓶口和玻璃磨口塞,洗刷前要用酒精或丙酮浸泡过的棉花擦去油污,现在也可用油污清洗剂喷洒于油污垢上,待2~5 min后,用百洁布或干布擦净,再依上法清洗干净。

### 1.2.4 带菌玻璃器皿的处理

#### (1) 带菌载片及盖片处理

已用过的带有活菌的载片或盖片,可先浸于5%的石炭酸(或2%来苏尔溶液或1:50(V/V)的新洁尔灭溶液)中1 h,然后用竹夹子将载片、盖片取出(不要用手取),依上法冲洗干净,再用软布擦干后放培养皿中备用。

### (2) 带菌移液管及滴管处理

吸过菌液的移液管或滴管,应立即投入盛有5%的石炭酸溶液(或2%来苏尔溶液或0.25%新洁尔灭溶液)的高筒玻璃标本缸内浸泡数小时或过夜(高筒玻璃标本缸底部应垫上玻璃棉,以防移液管及滴管顶端口损坏),再经100 kPa 高压蒸汽灭菌20 min,取出后用普通钢针或曲别针做成的小钩将移液管、滴管上端塞的隔离用棉花钩出,再依前法用自来水及蒸馏水冲洗洁净,晾干或烘干备用,若移液管用上述方法处理仍有污垢痕迹,可置2%盐酸溶液的高筒玻璃标本缸内浸泡1 h,再依上法清洗。

### (3) 其他带菌玻璃器皿的处理

培养过微生物的培养皿、试管、锥形瓶,因含有大量培养的微生物或污染有其他杂菌,应先经100 kPa 高压蒸汽灭菌20~30 min,灭菌后取出趁热倒出容器内的培养物,较大的废弃物应埋在土里,若非致病菌性微生物的液体废弃物可流入下水道,培养致病性微生物的废弃物和有琼脂的废弃物,切勿直接倒入下水道,以免污染水源和堵塞下水道。经过高压蒸汽灭菌的上述玻璃器皿,再用洗涤灵、热水刷洗干净,用自来水冲洗,以水在内壁均匀分布成一薄层而不出现水珠为油垢除尽的标准。

经过以上处理的玻璃器皿,可盛一般实验用的培养基和无菌水等。少数实验(如营养缺陷型菌株筛选、微生物遗传学实验等)对玻璃器皿清洁度要求较高,除用上述方法外,还应先在2%盐酸溶液中浸泡数十分钟,再用自来水冲洗、蒸馏水淋洗2~3次,有的尚需超纯水淋洗,然后烘干。

## 2 显微镜的构造、性能和使用方法

微生物的个体微小,肉眼难以看见,必须借助显微镜才能观察到。因此,显微镜就成为微生物学研究工作者不可缺少的基本工具,从事有关微生物学教学、科研和生产的人员,都应该了解显微镜的种类、功能和正确地掌握不同显微镜的使用方法。

显微镜可分为光学显微镜和非光学显微镜两大类。光学显微镜有普通光学显微镜、相差显微镜、微分干涉差显微镜、暗视野显微镜、紫外光显微镜、偏光显微镜和荧光显微镜等不同类型。非光学显微镜是指电子显微镜。

这一部分重点介绍普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜的结构原理和使用步骤,简要介绍电子显微镜原理及使用方法。

### 实验 2-1 普通光学显微镜的使用

#### 一、实验目的和内容

**目的:** 了解普通光学显微镜的结构、基本原理、使用、维护和保养方法。

**内容:** 1. 普通光学显微镜的结构、工作原理,如图 2-1 所示。

2. 普通光学显微镜的使用方法。

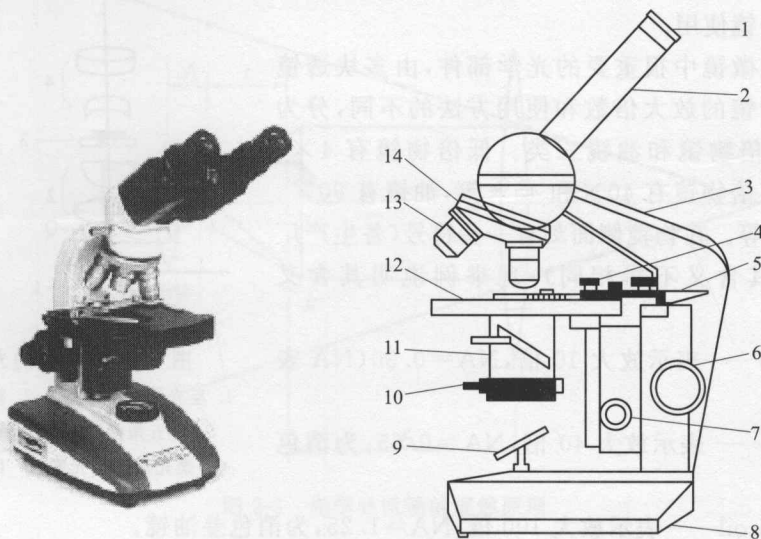


图 2-1 普通光学显微镜及其结构

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. 聚光器孔径光阑(光圈);11. 聚光器;12. 镜台;13. 物镜;14. 物镜转换器

## 二、基本原理

### (一) 普通光学显微镜的结构

普通光学显微镜(图 2-1)是由一组光学系统和支持及调节光学系统的机械系统组成。机械系统包括镜座、镜臂、镜台、物镜转换器、镜筒及调节器等。

镜座是显微镜的基座,使显微镜能平稳地放置在桌子上。

镜台又称载物台,是放置标本的地方,为方形或圆形。镜台上有压片夹,用来固定被检标本,较好的显微镜则有标本移动器,转动螺旋可使标本前后和左右移动。有的标本移动器带有游标尺,可指明标本所在位置。

镜臂用以支持镜筒,也是移动显微镜时手握的部位。

镜筒是连接目镜和物镜的金属筒。镜筒上端插入目镜,下端与物镜转换器相接。

物镜转换器安装在镜筒的上端,其上装有 3~5 个不同放大倍数的物镜,可以通过转动物镜转换器随意选用合适的物镜。

调节器安装在镜臂基部,是调节物镜与被检标本距离的装置,通过转动粗、细调节螺旋便可清晰地观察到标本。

普通光学显微镜的光学系统主要包括目镜、物镜、聚光镜和反光镜等(图 2-2)。

目镜一般由两块透镜组成。上面一块称接目透镜,下面一块称场镜。在两块透镜中间或场镜的下方有一视场光阑。在进行显微测量时,目镜测微尺便要放在视场光阑上。不同的目镜上刻有  $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$  或  $20\times$  等字符以表示该目镜的放大倍数。可根据需要选择适当的目镜使用。

物镜是显微镜中很重要的光学部件,由多块透镜组成。根据物镜的放大倍数和使用方法的不同,分为低倍物镜、高倍物镜和油镜三类。低倍物镜有  $4\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$ ,高倍物镜有  $40\times$  和  $45\times$  等,油镜有  $90\times$ 、 $95\times$  和  $100\times$  等。在物镜侧面刻有一些符号(各生产厂家的符号及其含义不尽相同),现举例说明其含义如下:

$10\times 0.30$ ——表示放大 10 倍,  $NA=0.30$  ( $NA$  表示数值口径)。

$40/0.65$ ——表示放大 40 倍,  $NA=0.65$ , 为消色差物镜。

$100/1.25\text{ oil}$ ——表示放大 100 倍,  $NA=1.25$ , 为消色差油镜。

$\text{Plan } 16/0.35$   $160/$ ——表示放大 16 倍,  $NA=0.35$ , 平场消色差物镜,镜筒长度 160 mm,斜线下方为一短横线,无数字,表示对盖玻片厚度要求不严格,如果是  $160/0.17$ ,则表示镜筒长度 160 mm,盖玻片的厚度应为 0.17 mm 或小于 0.17 mm。

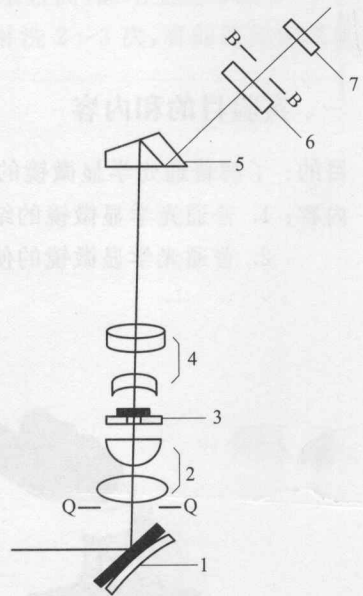


图 2-2 显微镜的光学系统

1. 反光镜;2. 聚光器;3. 标本;4. 物镜;  
5. 半五角棱镜;6. 场镜;7. 接目镜;  
Q. 聚光器孔径光阑;B. 目镜视场光阑



聚光镜(又称聚光器)安装在镜台下,是由多场面透镜构成,其作用是把平行的光线聚焦于标本上,增强照明度。聚光镜的焦点必须在正中,使用聚光镜上的调节器可以进行调中。通过转动手轮调节聚光镜的上下,以适应使用不同厚度的载玻片,也能保证焦点落在被检标本上。但因聚光镜的焦距短,载玻片也不能太厚,一般以 0.9~13 mm 之间为宜。聚光镜上附有虹彩光阑(俗称光圈),通过调整光阑孔径的大小,可以调节进入物镜光线的强弱。

反光镜是普通光学显微镜的取光设备,使光线射向聚光镜,它一面是凹面镜,另一面是平面镜,有聚光镜的显微镜,无论使用低倍或高倍物镜均应用平面镜,只在光量不足时才使用凹面镜,没有聚光镜的显微镜,低倍物镜时用平面镜,高倍物镜及油镜均用凹面镜。

内光源是较好的光学显微镜自身带有的照明装置,安装在镜座内部,由强光灯泡发出的光线通过安装在镜座上的集光镜射入聚光镜。集光镜上有一视场光阑,可改变照明视场的大小。集光镜上可放置不同颜色的滤光片,以改变进入聚光镜光线的波长。

## (二) 普通光学显微镜的光学原理

由单透镜构成的放大镜和由几块透镜组成的实体显微镜(解剖镜)称单式显微镜。目前微生物学教学及科研所用的光学显微镜一般是复式显微镜。

### 1. 光学显微镜成像的原理

由外界入射的光线经反光镜反射向上,或由内光源发射的光线经集光镜向上,再经聚光镜会聚在被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进入使光轴与水平面倾斜  $45^\circ$  角的棱镜,在目镜的焦平面上,即在目镜的视场光阑处,成放大的侧光实像,该实像再经目镜的接目透镜放大成虚像,所以人们看到的是虚像(图 2-3)。

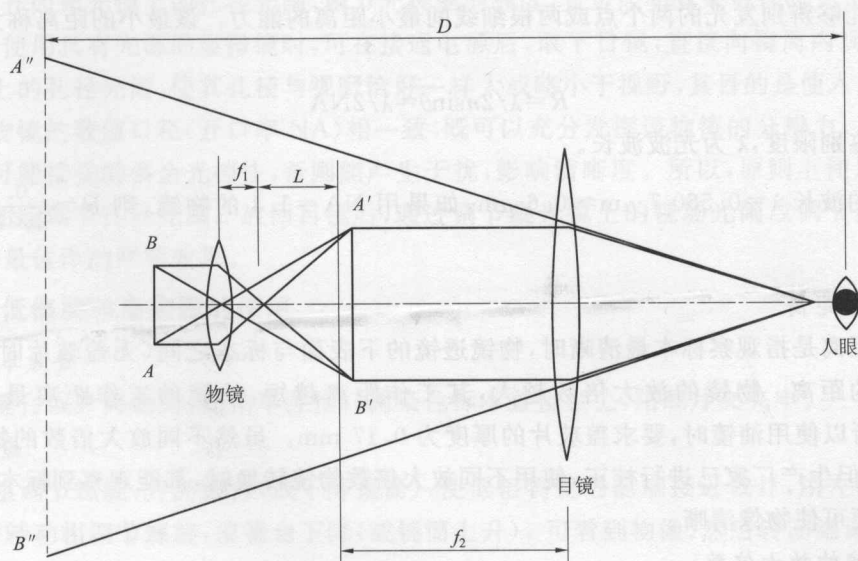


图 2-3 光学显微镜的成像原理

### 2. 显微镜的放大倍数

被检物体经显微镜的物镜和目镜放大后的总放大倍数是物镜的放大倍数和目镜放大倍数的乘积。如用放大 40 倍的物镜和放大 10 倍的目镜的总放大倍数是 400 倍。