

微生物学实验

钱存柔 等编

北京大学出版社

微生物学实验

钱存柔 等编

责任编辑：李蕙兰

•

北京大学出版社出版

(北京大学校内)

河北省固安县印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

•

787×1092毫米 32开本 7.5印张 130千字

1985年10月第1版 1985年10月第1次印刷

印数：00001—11,000册

统一书号：13209·126 定价：1.35元

前 言

微生物学已经成为分子生物学和生物工程学不可分割的内容。由于微生物本身特殊有利的条件，如：个体小、繁殖快、代谢类型多样化、易于变异、易于培养等特性，并且代表了生命活动最简单的模型，因而使微生物学能够深入到生命科学基本理论的领域，并且目前比过去要更为广泛、更为活跃地应用在工、农、医的各个范畴，为人类创造了巨大的物质财富，这些都是和微生物学实验技术的独特性分不开的。微生物学既然是一门实践性极强的科学，所以掌握微生物学实验最基本的操作技术对学好这门科学是极其重要的。

本书所列的实验除采用了我们在1964年所编的“微生物学实验指导”一书内的部分实验外，还有是参考国内外有关的实验后改编而成，此外还根据需要自行设计了部分的实验，总共有下列数方面的内容：

1. 有关课程内容的的基本理论和基本知识 使学生通过实验加深对课程内容的理解，如对：各类微生物的形态特征，微生物生命活动所需的营养和生长繁殖的条件，微生物代谢的多样性及其代谢产物的印证，加深认识环境因素对微生物生命活动和遗传变异的影响，了解微生物在自然界的分布以及机体对微生物侵袭时产生的免疫特性等。

2. 微生物学的基本操作技能 这方面的内容要求同学严格正确地掌握方法，能够熟练操作，因此注意在不同实验中

能有多次重复练习的机会，如：实验仪器的准备，消毒灭菌技术，培养基的配制，各种接种方法，不同类型微生物的培养条件和方法，不同种类微生物形态观察法，纯种分离技术，微生物计数和测量微生物大小的方法等。

3. 生产实践中常用的一些方法 如：菌种的诱变和保藏，土壤中微生物纯种的分离，根瘤菌的分离和鉴定，水质的细菌学检查，牛奶中微生物的检查，抗生素发酵和管碟法测抗生素效价，噬菌体效价的测定，固体发酵法制备蛋白酶和酶活性测定，免疫试验等。

为了便于同学总结实验中出现的问题并启发独立思考的能力，在每个实验后附有思考题。附录包括微生物接种技术、教学常用培养基的配制方法、消毒灭菌及玻璃器皿的洗涤、实验中染液的配制、常用指示剂的性能及配制、常用试剂及溶液的配制、教学用菌种的学名和实验有关汉英微生物学词汇等以便读者查阅。

本书主要由钱存柔、黄仪秀、林稚兰等同志负责编著，教研室其他同志也分别提供了实验方法并编了部分实验。罗妙芳同志在编写过程中提供了不少宝贵经验和建议，特此表示感谢。

由于我们水平有限，敬希广大读者在使用后给我们提出宝贵意见。

编 者

一九八四年于北京大学

微生物学实验室守则

一、为了保证实验室的整洁和实验顺利进行，非必要的物品和书包，请勿带入室内。

二、每次实验前要充分预习实验指导，明确本次实验的目的要求、原理和方法，做到心中有数。

三、实验进行时，应尽量避免在实验室内走动，防止尘土飞扬，以免染菌。同时请勿高声谈话，保持室内安静。

四、实验操作要细心谨慎，认真进行观察，及时做好实验记录。

五、凡实验用过的菌种以及带有活菌的各种器皿，应先经高压灭菌后才能洗涤。制片上的活菌标本应先浸泡于3%来苏尔溶液或5%石炭酸溶液中半小时后再行洗刷。如系芽孢杆菌或有孢子的菌，则应适当延长浸泡时间。

六、实验过程中，如不慎将菌液洒到桌面或地面，应以5%石炭酸溶液或3%来苏尔溶液覆盖半小时后才能擦去。如将菌液吸入口中或皮肤破伤处或烫伤，应立即报告指导教师，及时处理，切勿隐瞒。

七、进行高压蒸汽灭菌时，严格遵守操作规程。负责灭菌的人在灭菌过程中不准离开灭菌室。

八、实验需进行培养的材料，应注明组别、名称及处理方法，放于教师指定的地点进行培养。

九、爱护国家财产。使用显微镜及其他贵重仪器时要按要求操作。注意节约药品、水、电。

十、实验完毕，应将仪器放回原处，擦净桌面，收拾整齐。离开实验室前注意关闭门、窗、灯、火、煤气等。并用

肥皂洗手。

十一、每次实验结果，应以实事求是态度填写实验报告，及时交给指导教师批阅。

目 录

前 言	I
微生物学实验室守则	1
实验一 显微镜的使用	1
实验二 细菌的形态观察 (简单染色法、革兰氏染色法)	12
实验三 细菌的形态观察 (芽孢染色、荚膜染色、鞭毛染色)	20
实验四 放线菌的形态观察	24
实验五 酵母菌的形态观察	26
实验六 霉菌的形态观察	29
实验七 微生物血球计数板直接计数法及测微技术	32
实验八 培养基的配制	38
实验九 高压蒸汽灭菌法与消毒方法	49
实验十 土壤微生物的分离和纯化	54
实验十一 根瘤菌的分离和鉴定	63
实验十二 微生物菌种保藏	67
实验十三 厌氧微生物的培养	72
实验十四 噬菌体的培养及效价测定	76
实验十五 动物病毒的鸡胚培养	79
实验十六 微生物的生理生化反应 (微生物对含碳化合物的分解和利用)	83

实验十七	微生物的生理生化反应 (微生物对含氮化合物的分解和利用)	91
实验十八	环境因素对微生物生长发育的影响	100
实验十九	酵母菌酒精发酵及其影响因素	109
实验二十	细菌生长曲线的测定	116
实验二十一	硫酸二乙酯对枯草杆菌的诱变效应	120
实验二十二	紫外线照射对粘质赛氏杆菌的诱变效应	125
实验二十三	抗生素发酵和管碟法测定抗生素效价	129
实验二十四	水质的细菌学检查	135
实验二十五	牛奶中微生物的检查	145
实验二十六	蛋白酶的固体发酵及酶的活性测定	150
实验二十七	免疫血清的制备	155
实验二十八	凝集反应	159
实验二十九	沉淀反应——琼脂扩散法	163
实验三十	琼脂凝胶对流免疫电泳	166
附录一	微生物接种技术	169
附录二	教学常用培养基配制法	176
附录三	消毒、灭菌及玻璃器皿的洗涤	192
附录四	实验用染液配制法	205
附录五	常用指示剂的性能及配制	208
附录六	常用试剂及溶液的配制	211
附录七	教学用菌种学名	216
附录八	汉英微生物学词汇	219
主要参考书目		231

实验一 显微镜的使用

一、目的要求

- (一) 了解显微镜各部分的构造和性能。
- (二) 学习显微镜的正确使用方法，特别是油镜的使用方法。
- (三) 了解油镜、暗视野显微术和相差显微术的原理。

二、显微镜的结构和基本原理

(一) 光学显微镜的结构

光学显微镜是生物科学研究中的常用工具，是由一组光学放大系统和支持及调节它的机械系统组成，有的还附加光源部分。显微镜的结构见图1-1。其光学系统见图1-2。

光学显微镜的机械系统包括底座、镜臂、镜台、物镜转换器、镜筒和调节器等。

镜台又名载物台，是放置标本的地方，有方形或圆形。镜台上有压片夹用以固定标本，较好的显微镜则是用标本移动器（或称推进尺），转动螺旋可使标本前、后、左、右移动。有的标本移动器带有标尺，可指明标本所在位置。

粗调节器和细调节器能使镜筒或镜台升降，调节物镜与标本的距离，使可最清晰地观察标本。较好显微镜的粗细调节器是共轴式。在细调节器的外侧刻有分度，用以测定被检物的厚度，所以细调节器又名测微螺旋。

光学显微镜的光学系统包括反光镜、聚光器、物镜和目

镜等。

目镜插在镜筒的上端，基本上是一个放大镜，它可将物镜所形成的实像进一步放大，形成虚像，并映入眼部。不同的目镜上刻有 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 等字样以表示该目镜的放大

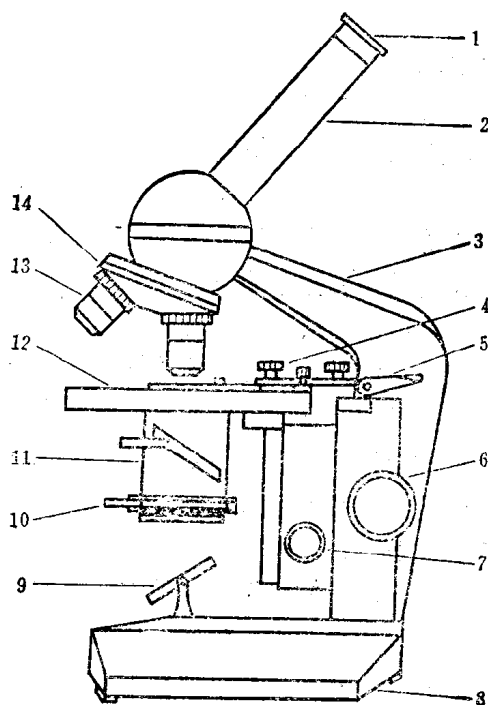


图1-1 显微镜的结构

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. 聚光器孔径光栏（光
阑）；11. 聚光器；12. 镜台（载物台）；13. 物
镜；14. 物镜转换器。

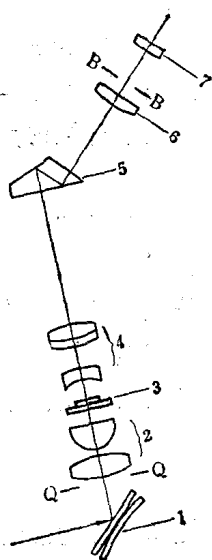


图1-2 显微镜的光学系统

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

倍数。使用时可根据需要选用适当的目镜。

物镜是显微镜中最重要光学部件，安装在物镜转换器上。普通装有低倍镜、高倍镜和油镜三种。使用低倍镜或高倍镜时，物镜与标本间的介质是空气；使用油镜时，标本与物镜间的介质是香柏油或液体石蜡。在物镜侧面刻有一些符号（各厂家的符号不尽相同），现举例说明其含义如下：

10×0.30 ——表示放大10倍， $NA=0.30$ ， NA 表示数值口径，详见（二）。

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

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

$H1 \ 90 \ 1.25$ ——表示放大90倍， $NA=1.25$ ，复消色差油镜。

$\text{Plan } 16/0.35 \ 160/-$ ——表示放大16倍， $NA=0.35$ ，平场消色差物镜，镜筒长度160毫米，斜线右下方为一短横划，无数字，表示对盖片厚度要求不严格。如果刻度是

160/0.17,表示镜筒长160毫米,要求盖片厚度为0.17毫米。

观察时可根据需要转动物镜转换器,选择合适的物镜。

聚光器装在镜台下,其作用是将光线聚焦于标本之上增强照明度。聚光器内部有孔径光栏可以调节开孔的大小。聚光器可以升降。

反光镜是普通显微镜的取光设备,一面是凹镜,一面是平镜,镜体可在弧弓上自由翻转以调整位置,使光线射向聚光器。在有聚光器的情况下,无论低倍或高倍物镜均应使用平面镜,但光量不足时不得已可使用凹面镜。没有聚光器的显微镜,低倍物镜用平面镜,高倍物镜用凹面镜。较好的显微镜自身带有照明光源。

(二) 油镜的基本原理

由于在其它课程已经学过低倍物镜和高倍物镜的原理及使用方法,这里只介绍微生物学实验中常用的油镜原理。

油镜与普通物镜不同,载片和物镜之间的介质不是空气,而是一层油质,一般常用香柏油,其折射率为1.515,与玻璃的折射率(1.52)相近。光线通过载片后,可直接通过香柏油进入物镜而不发生折射。如果载片与物镜之间的介质为空气(干燥系),空气折射率为1,因此光线通过载片后折射而发生散射现象,结果进入物镜的光线必然减少,这就降低了视野的照明度(图1-3)。

被观察物体的放大倍数是目镜放大倍数和物镜放大倍数的乘积。

显微镜的放大效能是由其数值口径(又称开口率,简写为NA)决定的。所谓数值口径就是光线投射到物镜上的最大角度一半的正弦,乘上载片与物镜间介质的折射率的乘积。

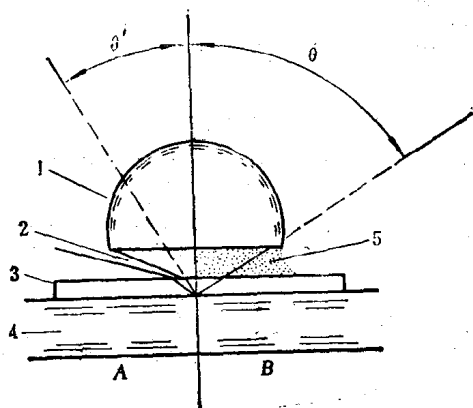


图1-3 物镜干燥系(A)与油浸系(B)的光线通路

1. 物镜前透镜; 2. 空气; 3. 盖片; 4. 载片;
5. 镜油。

$$NA = n \cdot \sin \theta$$

NA代表数值口径, n 为介质折射率, θ 为最大入射角的半数。介质为空气时, $n=1$, θ 最大只能到 90° , $\sin 90^\circ = 1$ 但实际上不可能达到 90° , 所以干燥系物镜的数值口径小于1。而油镜不仅能增加照亮度, 更主要的是增大数值口径。一般地说干燥系物镜的 $NA=0.05-0.95$, 油镜的 $NA=0.85-1.40$ 。

一台显微镜质量的好坏, 主要不是看它的总放大倍数, 而是以分辨率(又称解像力)来确定的。分辨率是指显微镜能够辨别两点或两根细线之间最小距离的能力。它与物镜的数值口径成反比, 与光线的波长成正比:

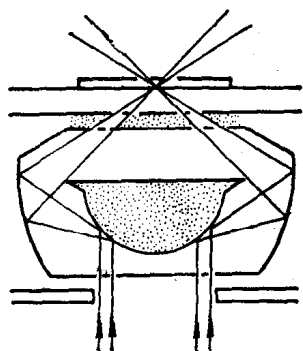
$$\delta = \lambda / 2NA$$

δ 为分辨率, λ 为光线波长。可见光波长范围是 $400-750$ 纳

米，平均为550纳米，这是对人眼睛最亮的黄绿光。假如我们用 $NA=1.25$ 的油镜，则分辨率 $\delta=0.55/2 \times 1.25=0.22$ 微米。

(三) 暗视野显微术的原理

暗视野（或称暗场）显微镜名称的由来是在于它使用一



种特殊的暗视野聚光器。在此聚光器透镜中央有一光挡，使光线仅由周缘进入并会聚于载片上，斜照物体，使物体表面的反射光进入物镜（图1-4）。所以，我们在黑暗的背景中看到的只是物体受光的侧面，是它边缘发亮的轮廓。

图1-4 暗视野聚光器的光路

使用暗视野显微镜时，只需将光学显微镜上的聚光器取下，换上暗视野聚光器即可。暗视野显微术适于观察在明视野中由于反差过小不易观察而折射率很强的物体，以及

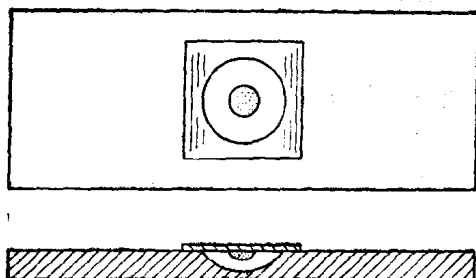


图1-5 悬滴法制片

观察一些小于显微镜分辨极限的微小颗粒或鞭毛等，故常用暗视野显微术来观察活菌的运动或鞭毛。

示范：悬滴法制片（图1-5），观察细菌的运动。

1. 将普通显微镜上的聚光器取下，换上暗视野聚光器。
2. 取洁净的凹玻片及盖片一套，用接种环取培养24小时之内的枯草杆菌或普通变形菌菌液一环，放在盖片中央。
3. 将盖片反扣在载片上，使菌滴置于凹窝处。
4. 调节光源及焦距（图1-6），进行观察。

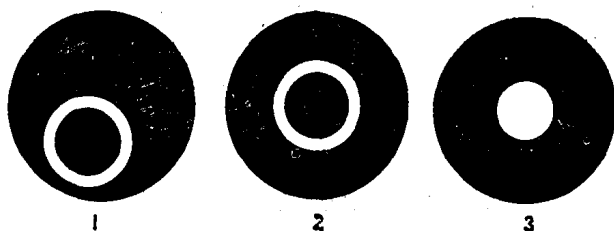


图1-6 暗视野聚光器的中心调节及调焦

1. 聚光器光轴与显微镜光轴不一致时的情况；
2. 光轴一致，但聚光器焦点与被检物不一致时的情况；
3. 聚光器焦点与被检物一致时的情况。

（四）相差（相衬）显微术的原理

相差显微镜（或叫相衬显微镜）有专用的相差聚光器（内有环状光栏）和相差物镜（内装相板），利用合轴调整望远镜调节环状光栏和相板合轴（图1-7），使通过标本的各组光波间的相差产生干涉，这就能观察到无色透明的活标本。

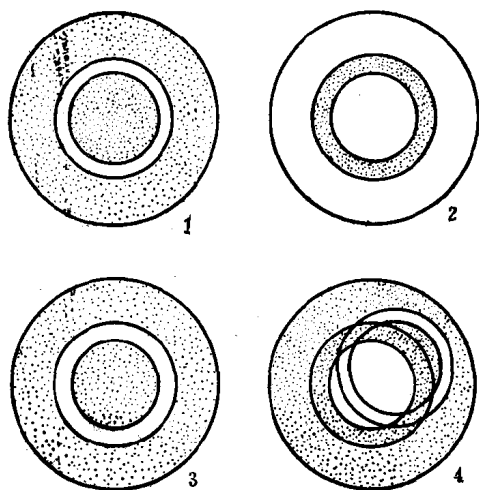


图1-7 环状光栏和相板的合轴调整

1. 相差聚光器中的环状光栏；
2. 相差物镜中的相板；
3. 环状光栏和相板调节合轴；
4. 环状光栏和相板不合轴。

相差显微术适用于观察活的或虽经固定但未曾染色的生物标本。有时经染色的标本，用本法观察或照相效果也较理想。

示范：用相差显微术观察啤酒酵母

1. 调节好相差显微镜的光源，使环状光栏和相板合轴。
2. 用水浸片法制备啤酒酵母的标本：取洁净的载片及盖片一套，在载片中央放蒸馏水一小滴，用接种环取培养好的啤酒酵母菌少许在水中和匀，用镊子夹住盖片一角，轻轻盖在标本上，注意不要出气泡。

3.用吸水纸吸去边缘多余的水，在相差显微镜下进行观察。

三、实验材料和仪器

(一)光学显微镜及其附件：暗视野聚光器、相差聚光器、相差物镜、合轴调整望远镜。

(二)液体石蜡或香柏油、二甲苯、擦镜纸。

(三)枯草杆菌的染色标本，枯草杆菌或普通变形菌24小时内的培养液，啤酒酵母新鲜培养的活标本。

四、显微镜的使用方法

(一)显微镜的放置：显微镜应直立放置在桌上，勿将直筒显微镜倾斜。

(二)光源：显微镜不能采用直射阳光，因光线太强，反而不易看清，且有损光学装置。一般白昼晴天可用窗外的散射阳光作为光源，也可采用日光灯作为光源，但最好的光源是专为显微镜照明用的聚丝电灯光。

调节照明的步骤：

1.将低倍物镜旋转至镜筒下方，旋转粗调节器，使物镜和镜台的距离约为3毫米左右。

2.旋转聚光器螺旋，使聚光器与镜台表面相距约1毫米左右。

3.调节反光镜（在自然光线下观察，以平面反光镜为宜），开闭聚光器上的孔径光栏，调节光线强弱程度，直至照明效果最佳时为止。

(三)低倍镜观察：

1.置已染色的枯草杆菌载片标本于镜台上，并用压片夹固定。