

环境微生物学实验

丁林贤 盛贻林 陈建荣 主编



科学出版社

环境微生物学实验

丁林贤 盛贻林 陈建荣 主编



科学出版社

北京

内 容 简 介

本书是以微生物学实验方法为基础的环境微生物学的实验教学参考书, 涵盖了一般环境微生物的分离筛选、培养保存与鉴定方法, 环境因子的影响以及环境监测等方面的内容, 共编写了25个独立的实验。根据近年对多种生态环境中微生物群集解析的实验研究要求, 特别编著了对环境样品中占绝大多数的未培养和活的但非可培养(VBNC)状态微生物(细菌)优势菌种的检出, 提高分离丰度的方法, 力求体现环境微生物学前沿性和创新性的特点。

本书可作为普通高校生命科学、环境科学专业的实验教学教材, 也可作为环境工程、给排水等相关学科以及相关科技人员学习微生物实验的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

环境微生物学实验 / 丁林贤, 盛贻林, 陈建荣主编. —北京: 科学出版社, 2016.9

ISBN 978-7-03-049964-6

I. ①环… II. ①丁… ②盛… ③陈… III. ①环境微生物学-实验
IV. ①X172-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 225569 号

责任编辑: 赵晓霞 宁倩/责任校对: 何艳萍

责任印制: 赵博/封面设计: 陈敬

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>

三河市骏志印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 9 月第 一 版 开本: 720×1000 1/16

2016 年 9 月第一次印刷 印张: 8

字数: 150 000

定价: 28.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

环境微生物学以微生物学为基础,利用微生物在环境污染治理、环境生态修复中的特殊地位与作用,已经成为当代环境科学发展、涉及多学科和跨学科的现代生命科学的前沿学科之一。在过去的几十年中,由于环境生态污染加剧,人们对环境中微生物群体结构以及多样性特征的认识不断深化,因此对实验方法和技术手段也需不断更新与完善。

根据一般环境微生物学实验的教学要求,本书编写了环境微生物的分离筛选、培养保存、形态观察和一般鉴定方法,环境因子对微生物生长的影响以及在环境监测中的微生物学实验手段等基础实验。近年,人们对环境微生物认知逐渐加深,迫切需要创新科学实验手段的支持,为此,在微生物学实验的基础上增加了分子生物学等实验,编写有土壤以及活性污泥中微生物总DNA的抽提,16S rRNA基因的PCR扩增与系统树构建,DGGE法对微生物群集组成的解析。基于环境微生物总量的90%以上处于未培养与活的但非可培养(VBNC)状态的认识,设计了利用Rpf信号蛋白分子对VBNC细菌优势菌种的复苏与促进生长、提高分离丰度的探索性实验方法,力求体现环境微生物学实验前沿性和创新性的特点。

本书由浙江师范大学地理与环境科学学院多年从事教学、科研及实验指导的教师陈建荣、丁林贤和盛贻林编写。由盛贻林、丁林贤负责内容整理与编排等工作,陈建荣教授对全书进行了统稿、审核和定稿。

由于编者水平有限和时间仓促,书中不妥之处在所难免,热忱希望读者谅解并批评指正。

编 者

2016年3月

目 录

前言

第一部分 环境微生物实验基本操作及注意事项.....	1
第二部分 环境微生物实验.....	4
实验一 普通光学显微镜的使用.....	4
实验二 培养基的制备及灭菌.....	11
实验三 细菌的革兰氏染色与形态结构观察.....	19
实验四 细菌的芽孢、鞭毛、荚膜染色法.....	22
实验五 真菌的形态结构观察.....	25
实验六 放线菌的形态结构观察.....	29
实验七 微生物细胞大小和数量测定.....	33
实验八 无菌操作及接种技术.....	37
实验九 土壤中微生物的分离与纯化培养.....	43
实验十 环境样品中优势菌种的分离与计数.....	48
实验十一 环境样品中未培养 VBNC 资源细菌的分离.....	51
实验十二 厌氧细菌的一般分离与培养.....	54
实验十三 酵母菌的加富培养与分离.....	56
实验十四 微生物菌种的一般保藏与恢复培养.....	59
实验十五 土壤中微生物总 DNA 的提取.....	67
实验十六 活性污泥中微生物总 DNA 的提取.....	69
实验十七 细菌 DNA 琼脂糖凝胶电泳实验.....	72
实验十八 细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增技术.....	74
实验十九 DGGE 法解析环境样本中微生物的多样性.....	78
实验二十 环境因子对微生物生长的影响.....	82
实验二十一 微生物对有机物的降解与转化.....	86
实验二十二 微生物对含氮化合物的转化.....	89
实验二十三 水中细菌总数与大肠菌群的检测.....	92
实验二十四 活性污泥及其生物相的观察.....	96
实验二十五 样品致突变毒性检测 Ames 实验.....	102
第三部分 附录.....	106

附录一	常用培养基及其配制法.....	106
附录二	常用染色液的配法.....	111
附录三	常用染色方法.....	114
附录四	MPN 表.....	118
参考文献	120

第一部分 环境微生物实验基本操作及注意事项

一、基本操作

1. 药品的使用

(1) 使用药品或试液,应严格遵守实验讲义上所列的用量或教师规定的用量,不可多取。如果有剩余,不要随意丢弃,也不要倒回原容器中,必须按照教师的指导作妥善处理。

(2) 取用任何药品时,都要及时把盖子盖好,绝不能把塞子盖错,药品取后放回原处。

(3) 称量试剂或药品时,应非常仔细,不要泼洒在实验台上或其他容器上。

(4) 不能用手直接抓拿固体药品,应该用干净的镊子、骨匙或镍匙取用。

2. 高压灭菌锅的使用

(1) 开盖:开盖前必须确认压力表指针归零,灭菌器内无压力,按照手轮上的标示“ON”逆时针转动手轮直至转动到顶,使灭菌器盖充分提起,拉起左立柱上的保险销,向右推开横梁,移开灭菌器盖。

(2) 通电:将控制面板的电源开关按至“ON”处,控制面板上的低水位灯亮,灭菌器内处断水状态,压力表指针指向零。

(3) 加水:在灭菌器开盖状态下,将约 8L 纯化水直接注入灭菌器内,同时观察控制面板上的水位灯,当加水至低水位灯灭,应继续加水至高水位灯亮停止加水。

(4) 物品堆放:将包扎后的灭菌物品(体积为 $200 \times 200 \times 100$,各包之间留有间隙),依次堆放在灭菌框,有利于蒸气穿透,提高灭菌效果。堆放灭菌包应注意留出安全阀孔空隙,否则将因安全阀气孔堵塞未能泄压而造成锅体爆裂事故。

(5) 合盖:把横梁推向左立柱,拉起左立柱上的保险销,使横梁全部嵌入立柱槽内,保险销下落锁住横梁,按照手轮上的标示“OFF”顺时针转动手轮直至灭菌盖与下阀栏压紧,加力使之充分密合。

(6) 设定工作温度(最高可设定为 105°C 、 115°C 、 121°C 、 126°C 四挡, 134°C 不可用),当显示温度超过设定温度 2°C 以上时,设备启动超温报警停止加热,该

设备控温范围为 50~126℃, 当超过 126℃ 时因安全阀起跳泄压, 设备控制退出。

(7) 设定定时时间: 定时功能为倒计时运行(最高可设定到 60min), 当灭菌器内达到所设定的温度, 定时器开始计时(当安全阀起跳泄压, 计时器失去计时功能), 按照国家规定, 灭菌温度对应时间必须匹配, 且时间只能增加不能减少。例如, 105℃ 时间不小于 40min、115℃ 时间不小于 30min、121℃ 时间不小于 20min、126℃ 时间不小于 15min(134℃ 不可用)。

(8) 灭菌: 当温度、时间设定完毕, 控制面板上的加热灯亮, 灭菌器正常加热升温、升压, 当灭菌室内到达设定温度时, 加热指示灯闪烁, 进入灭菌倒计时, 并在控制面板上的设定窗内显示剩余灭菌时间, 在升温过程中应观察温度压力表与数字显示是否一致。

对灭菌室温度均匀性要求高的灭菌物品, 在灭菌过程中须将灭菌器左下方排气排水总阀向排气(向左)开启少许, 让少量蒸气不断排出为宜, 使灭菌室上、中、下温度均匀。

灭菌完成, 自动关闭加热系统(手动控制除外), 保温时间结束自动切换成“END”显示并发出蜂鸣声, 关闭电源。

开启安全阀或排气排水总阀, 放净灭菌室内余气, 待压力表指针回落零为止。

(9) 启盖: 开盖前必须将灭菌器内蒸气排出(液体、器皿除外), 待压力表归零, 并切断电源。

按照手轮上的标示“ON”逆时针转动手轮直至到顶, 将灭菌器盖提起, 拉起左立柱上的保险销, 向右推开横梁, 移开灭菌器盖。

注意: 不同型号的高压灭菌锅有不同的使用要求, 实际操作时以说明书为准。

3. 烘箱的使用

(1) 烘箱供烘干仪器之用, 使用时不得任意调节控温器, 烘箱门要轻启轻关。

(2) 木塞、橡皮塞、纸以及涂有石蜡的仪器不得放入烘箱内。

(3) 放入烘箱前的仪器要先淋干水, 磨口活塞应从仪器上取下单独放置。

(4) 烘箱用完后, 要立即把电源切断。

4. 超净工作台的使用与维护

(1) 使用前打开紫外灯照射 40~60min。

(2) 开启超净工作台工作电源, 关闭紫外灯, 风速保持在 0.32~0.48m/s, 并用 75% 的酒精或 0.5% 的过氧乙酸喷洒并擦拭工作台面进行消毒。

(3) 若有机玻璃罩在使用中受到污染, 严禁用酒精棉球擦拭, 请用含水棉布擦拭。

- (4) 请保持超净台整洁、干燥，不要堆积杂物。
- (5) 使用完毕后，关闭煤气开关或酒精灯。
- (6) 使用完毕后，用消毒液擦拭工作台面，关闭工作电源，重新开启紫外灯照射 15min，或连续照射至下次实验开启使用之前，保障无菌操作时的灭菌效果。
- (7) 定期做无菌实验，以测定净化台是否符合无菌要求。

二、实验注意事项

- (1) 进入环境微生物实验室必须严格遵守实验室的各项规章制度，确保安全。
- (2) 非实验必需物品，不准带进实验室；进入实验室必须穿白大褂，禁止穿拖鞋，留长发者须束发或戴帽，防止被实验用火烧伤；不得高声谈笑及乱动物品，禁止吸烟和进食。
- (3) 认真预习实验教材，听从老师讲解指导，明确实验目的、要求、原理和方法，对实验过程做到心中有数，有条不紊。
- (4) 珍惜与把握实验机会，重视各项实验技能，认真观察实验现象，冷静分析实验结果，如实做好实验记录。
- (5) 实验中用过的染菌器材如吸管、试管和玻片等，应及时放入盛有消毒液的容器内，或放于实验指导教师指定的地方集中处理，不得随意放在桌上、遗弃地上或在水槽内冲洗。
- (6) 爱护公物，节约使用实验材料，注意安全使用水、电、煤气；因违反操作而损坏仪器设备的，须按学校有关规定赔偿。
- (7) 实验完毕后，将仪器洗净、放好，并清理实验台。按要求整理仪器、试剂药品，记录实验耗材使用情况，并消毒洗手后离开实验室；值日生负责打扫实验室，清理水槽和药品台、地面，切断所有水、电、关好门窗。
- (8) 倡导科学严谨的实验作风，认真整理、分析实验结果，认真完成实验报告，上交实验指导教师批阅。

第二部分 环境微生物实验

实验一 普通光学显微镜的使用

一、实验目的

学习并掌握普通光学显微镜的一般使用方法和注意事项。

二、实验原理

光学显微镜是利用光学原理，把人眼所不能分辨的微小物体放大成像，以供人们提取微细结构信息的一种精密的光学仪器。简单的显微镜仅由几块透镜组成，一般使用的显微镜由一套透镜组成。普通光学显微镜通常能将物体放大 1500~2000 倍。普通光学显微镜由机械系统和光学系统两部分组成(图 1-1)。

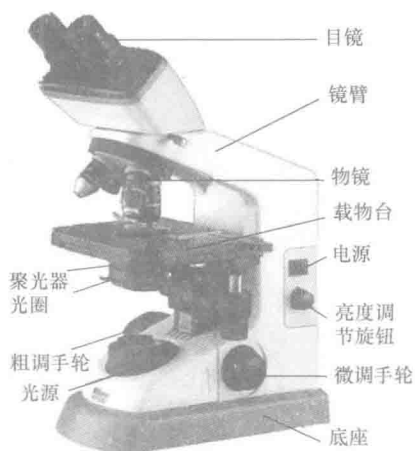


图 1-1 普通光学显微镜结构

1. 显微镜的构造

普通光学显微镜的构造可分为两大部分：一为机械装置，二为光学系统，这两部分很好地配合，才能发挥显微镜的作用。

1) 显微镜的机械装置

显微镜的机械装置包括镜座、镜筒、物镜转换器、载物台、推动器、粗动螺旋、微动螺旋等部件。

镜座：镜座是显微镜的基本支架，它由底座和镜臂两部分组成。在它上面连接有载物台和镜筒，它是用来安装光学放大系统部件的基础。

镜筒：镜筒上接目镜，下接转换器，形成接目镜与接物镜(装在转换器下)间的暗室。从物镜的后缘到镜筒尾端的距离称为机械筒长。因为物镜的放大率是对一定的镜筒长度而言的，随着镜筒长度的变化，不仅放大倍率变化，而且成像质量也受到影响。因此，使用显微镜时，不能任意改变镜筒长度。国际上将显微镜的标准筒长定为 160mm，此数字标在物镜的外壳上。

物镜转换器：物镜转换器上可安装 3~4 个接物镜，一般是 3 个接物镜(低倍、高倍、油镜)。Nikon 显微镜装有 4 个物镜。转动转换器，可以按需要将其中的任何一个接物镜和镜筒接通，与镜筒上面的接目镜构成一个放大系统。

载物台：载物台中央有一孔，为光线通路。在台上装有弹簧标本夹和推动器，其作用为固定或移动标本的位置，使得镜检对象恰好位于视野中心。

推动器：是移动标本的机械装置，由一横一纵两个推进齿轴的金属架构成，好的显微镜在纵横架杆上刻有刻度标尺，构成很精密的平面坐标系。如果需重复观察已检查标本的某一部分，则在第一次检查时，可记下纵横标尺的数值，以后按数值移动推动器，就可以找到原来标本的位置。

粗动螺旋：粗动螺旋是移动镜筒调节接物镜和标本间距离的机件，老式显微镜粗动螺旋向前扭，镜头下降接近标本。新近出产的显微镜(如 Nikon 显微镜)在镜检时，右手向前扭使载物台上升，让标本接近物镜，反之则下降，标本脱离物镜。

微动螺旋：用粗动螺旋只可以粗放地调节焦距，要得到最清晰的物像，需要用微动螺旋做进一步调节。微动螺旋每转一圈镜筒移动 0.1mm(100 μ m)。新近出产的较高档次的显微镜的粗动螺旋和微动螺旋是共轴的。

2) 显微镜的光学系统

显微镜的光学系统由反光镜、聚光器、接物镜、接目镜等组成，光学系统使物体放大，形成物体放大像。

反光镜：较早的普通光学显微镜是用自然光检视物体，在镜座上装有反光镜。反光镜是由一平面和一凹面的镜子组成，可以将投射在它上面的光线反射到聚光器透镜的中央，照明标本。不用聚光器时用凹面镜，凹面镜能起会聚光线的作用；用聚光器时，一般都用平面镜。新近出产的较高档次的显微镜镜座

上装有光源,并有电流调节螺旋,可通过调节电流大小调节光照强度。

聚光器:聚光器在载物台下面,它是由聚光透镜、虹彩光圈和升降螺旋组成。聚光器可分为明视场聚光器和暗视场聚光器。普通光学显微镜配置的都是明视场聚光器,明视场聚光器有阿贝聚光器、齐明聚光器和摇出聚光器。阿贝聚光器在物镜数值孔径高于 0.6 时会显示出色差和球差。齐明聚光器对色差、球差和慧差的校正程度很高,是明视场镜检中质量最好的聚光器,但它不适于 4 倍以下的物镜。摇出聚光器能将聚光器上透镜从光路中摇出,满足低倍物镜($4\times$)大视场照明的需要。聚光器安装在载物台下,其作用是将光源经反光镜反射来的光线聚焦于样品上,以得到最强的照明,使物像获得明亮清晰的效果。聚光器的高低可以调节,使焦点落在被检物体上,以得到最大亮度。一般聚光器的焦点在其上方 1.25mm 处,而其上升限度为载物台平面下方 0.1mm。因此,要求使用的载玻片厚度应为 0.8~1.2mm,否则被检样品不在焦点上,影响镜检效果。聚光器透镜组前面还装有虹彩光圈,它可以开大和缩小,影响成像的分辨力和反差,若将虹彩光圈开放过大,超过物镜的数值孔径时,便产生光斑;若收缩虹彩光圈过小,分辨力下降,反差增大。因此,在观察时,通过调节虹彩光圈再把视场光阑(带有视场光阑的显微镜)开启到视场周缘的外切处,使不在视场内的物体得不到任何光线的照明,以避免散射光的干扰。

目镜:目镜的作用是把物镜放大的实像再放大一次,并把物像映入观察者的眼中。目镜的结构较物镜简单,普通光学显微镜的目镜通常由两块透镜组成,上端的透镜称“接目镜”,下端的透镜称“场镜”。上下透镜之间或在两个透镜的下方,装有由金属制的环状光阑或称“视场光阑”,物镜放大后的中间像就落在视场光阑平面处,所以其上可安置目镜测微尺。

物镜:安装在镜筒前端转换器上的接物透镜利用光线使被检物体第一次造像,物镜成像的质量对分辨力有着决定性的影响。物镜的性能取决于物镜的数值孔径(numerical aperture, NA),每个物镜的数值孔径都标在物镜的外壳上,数值孔径越大,物镜的性能越好。

物镜的种类很多,主要有:①燥系物镜,以空气为介质,如常用的 $40\times$ 以下的物镜,数值孔径均小于 1;②油浸系物镜,常以香柏油为介质,称油镜头,其放大率为 $90\times\sim 100\times$,数值孔径大于 1。

根据物镜放大率的高低,可分为低倍物镜($1\times\sim 6\times$),中倍物镜($6\times\sim 25\times$),高倍物镜($25\times\sim 63\times$),油浸物镜($90\times\sim 100\times$)。物镜上通常标有放大倍数、数值孔径、工作距离及盖玻片厚度等参数(图 1-2)。

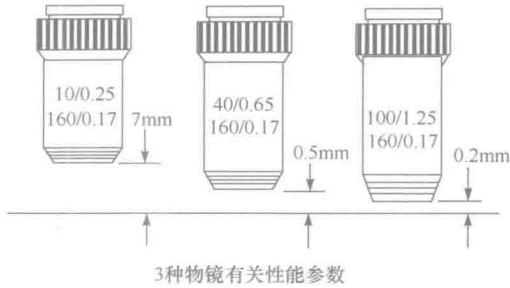


图 1-2 XSP-16 型显微镜的主要参数

2. 光学显微镜的成像原理

普通光学显微镜是根据凸透镜的成像原理制成的,要经过凸透镜的两次成像。第一次先经过物镜(凸透镜 1)成像,这时候的物体应该在物镜(凸透镜 1)的一倍焦距和两倍焦距之间,根据物理学的原理,形成的应该是放大的倒立的实像。而后以第一次成的物像作为“物体”,经过目镜(凸透镜 2)的第二次成像。由于我们观察的时候是在目镜的另外一侧,根据光学原理,第二次成的像应该是一个虚像,这样像和物才在同一侧。因此第一次成的像应该在目镜的一倍焦距以内,这样经过第二次成像后,目镜看到的这个像是一个由第一次放大的倒立的实像再经目镜放大后倒立的虚像,其工作原理如图 1-3 所示。

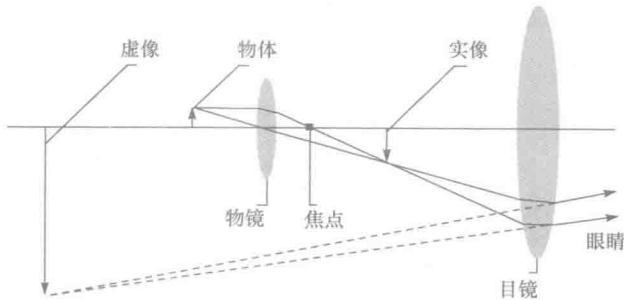


图 1-3 显微镜的工作原理

3. 显微镜的性能

显微镜分辨能力的高低取决于光学系统的各种条件。被观察的物体必须放大率高,而且清晰,物体放大后,能否呈现清晰的细微结构,首先取决于物镜的性能,其次为目镜和聚光镜的性能。

1) 数值孔径

也称为镜口率(或开口率),简称为 NA,是指介质折射率与镜口角 1/2 正弦的

乘积，可用式(1-1)表示：

$$NA = n \sin(\theta/2) \tag{1-1}$$

式中， n 为物镜与标本之间介质的折射率； θ 为镜口角(通过标本的光线延伸到物镜边缘所形成的夹角，图 1-4)。

在物镜和聚光器上都标有它们的数值孔径，数值孔径是物镜和聚光器的主要参数，也是判断它们性能的最重要指标。数值孔径和显微镜的各种性能有密切的关系，因为镜口角总是小于 180° ，所以 $\sin(\theta/2)$ 的最大值不可能超过 1。又因为空气的折射率为 1，所以以空气为介质的数值孔径不可能大于 1，一般为 $0.05 \sim 0.95$ 。根据式(1-1)，要提高数值孔径，一个有效途径就是提高物镜与标本间介质的折射率(图 1-5)。使用香柏油(折射率为 1.515)浸没物镜(即油镜)理论上可将数值孔径提高到 1.5 左右，实际数值孔径也可达 $1.2 \sim 1.4$ 。

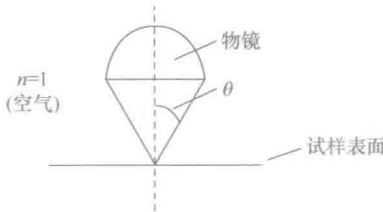


图 1-4 物镜的镜口角

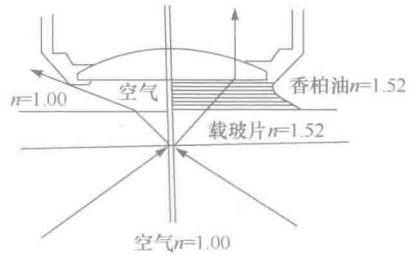


图 1-5 介质折射率对光线通路的影响

2) 分辨力

分辨力以 D 表示：

$$D = \lambda / (2NA)$$

D 值越小，分辨力越高，物像越清楚。物镜分辨力的高低与造像是否清楚有密切的关系。目镜没有这种性能，目镜只放大物镜所造的像。

3) 放大率

显微镜的放大率(V)等于物镜放大率(V_1)和目镜放大率(V_2)的乘积，即

$$V = V_1 \times V_2$$

4) 焦深

在显微镜下观察一个标本时，焦点对在某一像面时，物像最清晰，该像面为目的面。在视野内除目的面外，还能在目的面的上面和下面看见模糊的物像，这两个面之间的距离称为焦深。物镜的焦深和数值孔径及放大率成反比，即数值孔径和放大率越大，焦深越小。因此调节油镜比调节低倍镜要更加仔细，否则容易使物像滑过而找不到。

三、实验仪器与材料

- (1) 实验菌种:培养 12~18h 的枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)斜面培养物 3~4 支。
- (2) 标本片:细菌三种基本形态的染色标本,特殊形态细菌染色标本。
- (3) 仪器及相关用品:显微镜,香柏油,二甲苯,无水酒精,无菌蒸馏水,擦镜纸。
- (4) 其他用品:盖玻片,凹玻片,吸水纸,酒精灯,接种环,牙签,凡士林。

四、实验步骤

1. 取镜和安放

按实验指导教师安排领取显微镜,右手握住镜臂,左手托住镜座。把显微镜放在实验台上,略偏左(显微镜放在距实验台边缘 7cm 左右处)。安装好目镜和物镜。

2. 对光

接上电源,转动转换器,使低倍物镜对准通光孔(物镜的前端与载物台要保持 2cm 的距离)。把一个较大的光圈对准通光孔,左眼注视目镜内(右眼睁开,便于以后同时画图)。转动反光镜,使光线通过通光孔反射到镜筒内。通过目镜,可以看到白亮的视野。

3. 观察

把所要观察的玻片标本(也可以用印有“6”字的薄纸片制成)放在载物台上,用压片夹压住,标本要正对通光孔的中心。转动粗准焦螺旋,使镜筒缓缓下降,直到物镜接近玻片标本为止(眼睛看着物镜,以免物镜碰到玻片标本)。左眼向目镜内看,同时反方向转动粗准焦螺旋,使镜筒缓缓上升,直到看清物像为止。再略微转动细准焦螺旋,使看到的物像更加清晰。

高倍物镜的使用:使用高倍物镜之前,必须先用低倍物镜找到观察的物象,并调到视野的正中央,然后转动转换器再换高倍镜。换用高倍镜后,视野内亮度变暗,因此一般选用较大的光圈并使用反光镜的凹面,然后调节细准焦螺旋。观看的物体数目变少,但是体积变大。

4. 整理

实验完毕,把显微镜的外表擦拭干净,用过油镜的则用二甲苯擦拭镜头。转动转换器,把两个物镜偏到两旁,并将镜筒缓缓下降到最低处,反光镜竖直放置。最后把显微镜放进镜箱里,送回原处。

五、注意事项

(1) 严禁单手提取显微镜。

(2) 若须移动显微镜, 务必将显微镜提起再放至适当位置, 严禁推动显微镜(推动时造成的震动可能会导致显微镜内部零件的松动, 切记!), 使用显微镜时请务必小心轻放。

(3) 使用显微镜时坐椅的高度应适当, 观察时更应习惯两眼同时观察, 且光圈及光源亮度皆应适当, 否则长时间观察时极易感觉疲劳。

(4) 转动旋转盘时务必将载物台降至最低点, 以免因操作不当而刮伤接目镜的镜头。

(5) 标本染色或其他任何操作皆应将玻片取下, 操作完成后再放回载物台观察, 切勿在载物台上操作, 以免染剂或其他液体流入显微镜内部或伤及镜头。

(6) 观察完一种材料, 欲更换另一种材料时, 务必将载物台下降至最低点, 换好玻片后再依标准程序重新对焦, 切勿直接抽换标本, 以免刮伤镜头或玻片标本。

(7) 用毕显微镜应将载物台下降至最低点, 并将低倍镜对准载物台中央圆孔处, 将电源线卷好, 盖上防尘罩, 并收入存放柜中。

六、结果记录

做好实验观察结果的记录。

七、思考题

(1) 使用显微镜的油镜时, 为什么必须使用浸润镜头的香柏油?

(2) 镜检标本时, 为什么先用低倍镜观察, 而不直接用高倍镜或油镜观察?

实验二 培养基的制备及灭菌

一、实验目的

- (1) 掌握培养基的制备原理与方法。
- (2) 掌握玻璃器皿的包扎与灭菌方法。
- (3) 掌握高压蒸气灭菌、干热灭菌的原理与方法。

二、实验仪器与材料

- (1) 三角烧瓶(250mL)2 个, 烧杯(500mL)1 个, 培养皿(直径 90mm)10 套, 试管(15mm × 150mm)5 支, 试管(18mm × 180mm)5 支, 移液管(10mL)1 支, 移液管(1mL)2 支, 天平, 牛角匙, 玻璃棒。
- (2) 棉塞(或硅胶塞), 纱布, 牛皮纸。
- (3) 精密 pH 试纸, 10% HCl, 10% NaOH, 记号笔等。
- (4) 牛肉膏, 蛋白胨, 氯化钠, 琼脂, 蒸馏水。
- (5) 高压蒸气灭菌锅, 烘箱, 冰箱, 电炉。

三、实验内容

1. 玻璃器皿的洗涤和包扎

1) 洗涤

玻璃器皿在使用前必须洗涤干净, 培养皿、试管、锥形瓶等可用洗衣粉或去污粉洗刷并用自来水冲干净。移液管先用洗液浸泡, 再用水冲洗干净。洗刷干净的玻璃器皿自然晾干或放入烘箱中烘干备用。

2) 包扎

(1) 移液管的包扎。在移液管的上端塞入一小段棉花(勿用脱脂棉), 它的作用是避免外界及口中杂菌进入管内, 并防止菌液等吸入口中。塞入此小段棉花应距管口 0.5cm 左右, 棉花自身长度 1~1.5cm。塞棉花时, 可用一外围拉直的曲别针将少许棉花塞入管口内。棉花要塞得松紧适宜, 吹时以能通气而又不使棉花滑下为宜。

先将报纸裁成宽 5cm 左右的长纸条, 然后将已塞好棉花的移液管尖端放在长条报纸的一端, 约成 45°角, 折叠纸条包住尖端, 用左手握住移液管身, 右手将