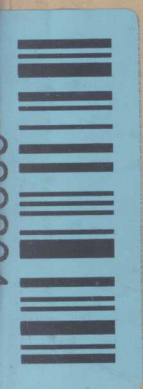


工业微生物实验法

广东化工学院工业微生物教研组编



毛主席语录

真理的标准只能是社会的实践。实践的观点是辩证唯物论之第一的和基本的观点。

理性认识依赖于感性认识，感性认识有待于发展到理性认识，这就是辩证唯物论的认识论。

知识的问题是一个科学的问题，来不得半点的虚伪和骄傲，决定地需要的倒是其反面——诚实和谦逊的态度。



90056963

目 录

实验一	显微镜及其使用方法	-----
实验二	微生物的制片技术及形态观察	-----
实验三	培养基的制备及灭菌	-----
实验四	细菌的鉴定	-----
实验五	酵母菌的特性试验	-----
实验六	霉菌和放线菌的实验	-----
实验七	微生物的纯种分离和筛选	-----
实验八	黑曲霉紫外线诱变育种	-----
实验九	短杆菌腺嘌呤缺陷型的选育	-----
实验十	菌种保藏	-----
附 录		-----

实验一 显微镜及其使用方法

微生物个体极其微小，必需借助于显微镜将它们放大，才能看清楚其形态结构。因此显微镜是微生物工业生产及科研的必要的常用的仪器，我们必须了解其构造及掌握使用方法。

显微镜种类很多，如光学显微镜、荧光显微镜、暗视野显微镜、电子显微镜等等，下面介绍普通光学显微镜的构造、性能和使用方法。

一. 显微镜的构造

普通光学显微镜的构造可分为机械装置及光学系统两大部分

(一) 机械装置：

1. 镜座

镜座是显微镜的基座，为稳定整个显微镜用，具有一定的形状大小和重量，通常有蹄形、椭圆形或三角形等。

2. 镜臂

镜臂直立于镜座后侧，用以支持镜筒、镜台和照明装置用。镜臂下端通常装有能活动的倾斜关节，以调节倾斜度，便于观察。

3. 镜台

镜台是放置镜检物体的平台。有圆形和方形的，表面平滑，中央有镜台孔，使光线通过，镜台有固定式和移动式两种，在镜台上装有固定标本用的弹簧夹和标本移动器，在标本移动器和镜台上附有游标尺。

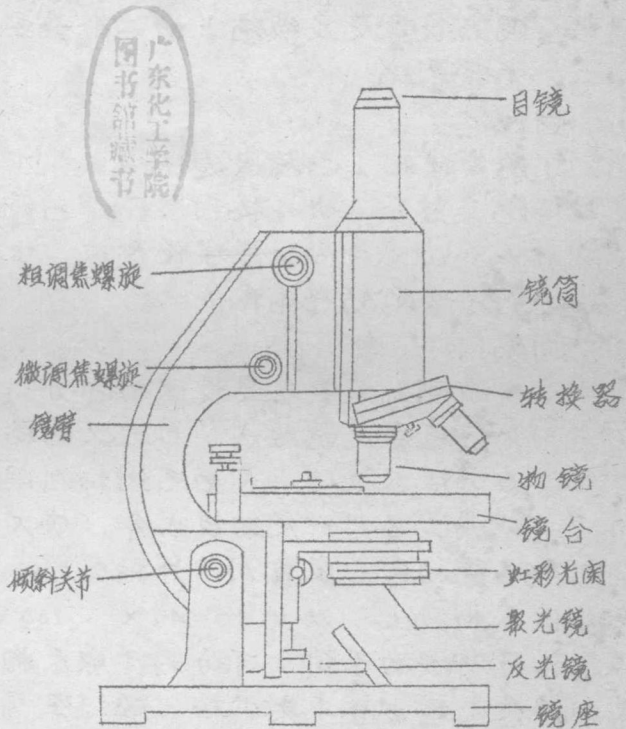


图1 显微镜的结构

4. 镜筒及附件

镜筒是连接目镜和物镜的圆筒，由被检物体入射的光线在镜筒内造成物象，镜筒上下口径的大小都按国际标准而定，镜筒长度也是固定的，有的镜筒带抽筒可以调节筒长。镜筒下端连接物镜转换器，转换器上可装上三到四个不同倍数的物镜，可以转换使用。

5. 调焦装置

为了获得清晰的物象，必须调节物镜与标本间的距离，这叫调焦。粗调焦螺旋和微调焦螺旋是通过镜筒（或镜台）的升降来调焦。调焦装置是显微镜上的一个重要部分。

〈二〉光学系统

1. 目镜

它位于镜筒顶端，由两块透镜组成，下面一块是起放大作用的会聚透镜，上面一块叫接目透镜。目镜的放大倍数标在目镜上，以 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 等字样表示。上下透镜之间有一个光阑，光阑的边缘即视野境界。

2. 物镜

物镜是显微镜上最重要最贵重的部分，它装在镜筒的转换器上，它由几组特殊透镜组成，每组又包括几块透镜。物镜的功用是聚集来自标本任何一点的光线和利用入射光线对被检物体作第一次造像，它有一定的放大率，放大率与透镜焦距成反比，也就是透镜的弯曲度愈大，焦距愈短，放大率就愈高，其放大倍数标在物镜上，以 $10\times$ 、 $45\times$ 、 $100\times$ 等字样表示。

根据物镜用法的不同，可分为干燥系物镜和油浸系物镜。干燥系物镜是光线由标本射出后，经过空气发生折射，然后进入物镜。油浸系物镜是在标本片与物镜间加入一种与玻璃折射率相近的介质如香柏油（折射率为1.51）以避免光线由一种介质进入另一介质（由盖玻片进入到空气中，然后进入物镜中）时所发生的散光现象。在检验时，物镜就浸在这个介质中，故称油浸系物镜。干燥系物镜不能作油浸系物镜使用。

3. 反光镜

反光镜是一个双面镜子，一面为平面，一面为凹面，它位于显微镜的下方，起着接受外来光线并将其反射到聚光镜的作用。反光镜可向任意方向转动以对准光线，通常都使用平面镜。在照明较弱时使用凹面镜。

4. 聚光镜

它由几块透镜组成，它聚集由反光镜射来的光线，并可矫正色差。聚光镜安装在镜台下方的聚光镜支架上，靠螺旋装置可使它上下移动，以调节光的明暗。在聚光镜下装有虹彩光圈，可以调节入射光束的大小。

二. 显微镜的性能

被观察的物体放大率愈高，物象愈清晰，分辨力愈高，显微镜的性能就愈好，显微镜性能的好坏，决定于光学系统的各种条件，首先取决于物镜的性能，其次是目镜和聚光镜的性能。

1. 数值口径

物镜和聚光镜都有一定的数值口径（又称镜口径），数值口径的大小和显微镜的分辨能力有关。通常以下式表示：

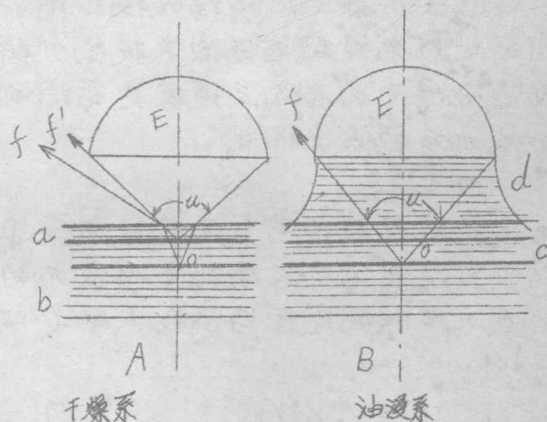
$$N.A. = n \sin \frac{\mu}{2}$$

式中：N.A.—数值口径。

n ——标本与物镜之间介质的折射率

μ ——镜口径，即投入物镜中的光线所成之最大角度。

从式中可见，介质的折射率 n 越大，数值口径就越大，显微镜的分辨能力就越强。例如用干燥系物镜时，空气的折射率为 1，而用油浸系物镜时，香柏油折射率为 1.51，因而后者的数值口径比前者大。 $\sin \frac{\mu}{2}$ 的值常小于 1，当 μ 为 180° 时， $\sin \frac{\mu}{2}$ 值达最大即等于 1，但镜口径 μ 为 180° 时知物镜与标本片完



- | | | |
|---------|--------------|-------------|
| a. 盖玻片 | d. 香柏油 | o. 被检物 |
| b. 载玻片 | E. 透镜 | μ . 镜口径 |
| c. 加身大板 | f. f' . 光束 | |

图2 干燥系及油浸系入射光线折射示意图

全接触，实际已不能观察了，所以一般油浸镜的数值孔径为 0.85~1.4，干燥系物镜的数值孔径为 0.05~0.75。使用某一物镜时，应配合一定数值孔径的聚光镜，一般聚光镜的数值孔径大于或等于物镜的数值孔径为合适，否则物镜的性能受到影响。

2. 分辨力

分辨力是指分辨物体微细结构的能力。分辨力与能分辨出物体两点间的最短距离 (D) 有关。 D 与光波的波长 (λ) 及物镜的 $N.A.$ 有关，可用下式表示：

$$D = \lambda / N.A.$$

因为光波只能对比其波长为长的物体造象，若某物体小于波长，光线可绕过此物体而不能造象。可见光的波长为 0.4~0.8 微米，平均 0.55 微米。若用数值孔径为 0.65 的物镜，则 $D = 0.55 \text{ 微米} / 0.65 = 0.86 \text{ 微米}$ ，即被检物或物体上某结构在 0.86 微米以上才能被观察到，否则就观察不出来。若改用数值孔径为 1.25 的物镜观察，则 $D = 0.44 \text{ 微米}$ ，即大小为 0.44 微米以上的被检物均可观察出来。由此可见， D 值越小，分辨力就愈高，物象愈清晰，根据公式，提高分辨力可通过：①降低波长；②增大折射率；③增大镜口角。紫外光显微镜及电子显微镜就是用短光波和电子波来提高分辨力的。

物镜分辨力的高低与造象是否清晰有密切关系。目镜只起放大物镜所造的像的作用。

3. 放大率

显微镜的放大作用首先经过物镜第一次造象，再被目镜作第二次放大造象。放大率就是所放大的虚象与标本物体两者大小的比值，实际就等于目镜放大率 (V_1) 与物镜放大率 (V_2) 的相乘积。

$$\begin{aligned} \text{即：} \quad V &= V_1 \times V_2 \\ V_1 &= \frac{T}{f_1} \\ V_2 &= \frac{250 \text{ 毫米}}{f_2} \end{aligned}$$

T —— 光学筒长。
 f_1 —— 目镜焦距。
 f_2 —— 物镜焦距。
 250 毫米为眼睛明视距离。

用显微镜观察物体时，要得到清楚的放大象，首先是依靠

物镜的分辨力，并非物象愈放得大，就愈清楚。

4. 焦距

在显微镜下观察一个标本时，对焦在某一面时物象最清晰，此表面叫目的面，在此视野内除目的面以外还能在其上面及下面看见物象，这两个面的距离称为“焦距”。物镜的焦距与数值口径及放大率成反比，即数值口径和放大率愈大，焦距就愈小，所以在调节高倍物镜时要比调节低倍物镜时更要仔细，否则容易使物象滑过而找不到。

三、显微镜的使用方法

1. 显微镜的放置：

显微镜放置在桌面上要求平稳，勿近热源或潮湿处。要便于采光。

2. 调节光照：

光照可利用散射的阳光（勿用直射阳光）作光源，或用日光灯或专用显微镜照明灯作光源。

调节光照步骤是：

(1) 先放入目镜后装上物镜，用粗调焦螺旋下降镜筒，使物镜镜头与镜台的距离约为1—2厘米处。

(2) 旋转聚光镜螺旋，使聚光镜与镜台表面相距约1—2厘米。

(3) 调节反光镜，开闭光闸，用左眼看接目镜，调节光线强弱，直至视野内照明效果最佳为止。

(4) 将标本片放镜台上，用弹簧夹子固定。

3. 干燥系观察

甲、低倍观察

(1) 转动粗调焦螺旋，使物镜下降至距标本约0.5厘米的地方。

(2) 用左眼看目镜，慢慢往上旋粗调焦螺旋，直至发现视野中有被观察的东西后，改用微调焦螺旋，向上或向下转动直到能清楚地看到标本为止。

(3) 旋转标本移动器，使标本移动，将所要观察的部位放在视野中心，进行观察。

乙、高倍观察

用低倍镜找到目的后，转换高倍镜。用微调焦螺旋校正焦

距，再校正观察部位，并调节光阑至清楚看到标本为止。如仍不清楚，可换用油浸系观察。

4. 油浸系观察

(1) 转动粗调螺旋使镜头上升，要在观察的标本部位加入镜油（香柏油或液体石蜡）一滴，然后慢慢下降镜头，从侧面观察，直至镜头浸入油滴，并几乎与标本接触为止。（注意切不可将镜头压到标本上，以免损坏镜头！）

(2) 左眼看接目镜，向上微微转动粗调螺旋（此时只准向上，不能向下转动），当视野中出现模糊的标本形象时，改用微调螺旋，调至物象清晰时为止。当视野不够明亮，可调节光阑或聚光镜。

(3) 向上调已使油镜头离开油滴而尚未发现标本时，或物象已滑过时，则应重新按上述步骤操作。

四、注意事项

1. 强烈的阳光、热、酸、碱、潮湿等对显微镜都有损害，所以显微镜的使用地方及存放地点应避免靠近热源。强烈阳光及有腐蚀性地方，并要保持干燥、清洁。

2. 光学部分不能用手触摸或用粗布揩抹，如需揩抹，则应用显微镜专门使用的擦镜纸。

3. 每次使用油镜后，须用擦镜纸擦去镜头上的油，然后再用镜纸沾少许二甲苯揩抹镜头，最后用擦镜纸将镜头擦净，（如用液体石蜡则不必加二甲苯）。

4. 观察完毕，必须把机械装置部分调回原位，然后放入箱内。物镜、目镜放入干燥器中保存。

五、实验内容

1. 了解显微镜的结构性能。

2. 练习显微镜的使用方法：

① 用低倍镜观察霉菌标本片。② 用高倍镜观察酵母菌标本片。③ 用油浸系观察细胞标本片。

把观察所得结果记录并绘图说明。

思考与讨论：

1. 使用显微镜要掌握那些要领？

2. 使用显微镜要注意那些事项？油镜和普通物镜在使用方法上有何不同？

实验二 微生物的制片技术及形态观察

一. 目的

1. 掌握对细菌、酵母菌和霉菌的基本制片技术和染色方法。

2. 掌握用显微镜观察各类微生物的个体形态，从而对各类微生物在个体形态上加以识别。

二. 原理

为了清楚地观察到微生物的形态和构造，必须制成各种标本片，用显微镜来观察。不同类型的菌类和不同的目的要求所使用的制片方法有所不同。一般地说，霉菌、酵母菌等细胞较粗大，可不须染色，制成活片，直接在低倍或高倍显微镜下就可观察到其形态，但细菌及放线菌的细胞极薄且透明，透光率小，需要染上颜色，使菌体和背景色差显著，在高倍显微镜下方能观察清楚它的形态和构造。微生物的染色法有普通染色和特殊染色两种。普通染色法是利用不同性质的染料（主要是碱性染料）与细胞有亲和力能着色的原理。此法仅能显示其形态不能显示各部分构造，适用于对微生物一般形态的观察。特殊染色法如革兰氏染色，芽孢染色，荚膜染色，鞭毛染色等等是利用微生物细胞各部分构造与各种染料的亲和力的不同，使各部分染上不同的颜色，使易于观察鉴别。

三. 材料

1. 各种染色液（见附录三）
2. 已培养好的各类微生物菌种。

四. 实验内容

〈一〉活体的观察：

一般用于酵母、霉菌等较大微生物的形态观察，不需固定和染色。

1. 酵母形态的观察——米曲汁培养一天的酵母菌

〈1〉取干净的载玻片和盖玻片（图4）各一块，在酒精灯火焰上方微微加热烤干，待冷后，滴一滴蒸馏水（或生理盐水）于载片中央；

〈2〉取酵母菌培养液试管轻轻摇匀，按图3所示的涂片操作过程，用无菌操作挑取1~2环菌液置于载片水滴中，和匀；

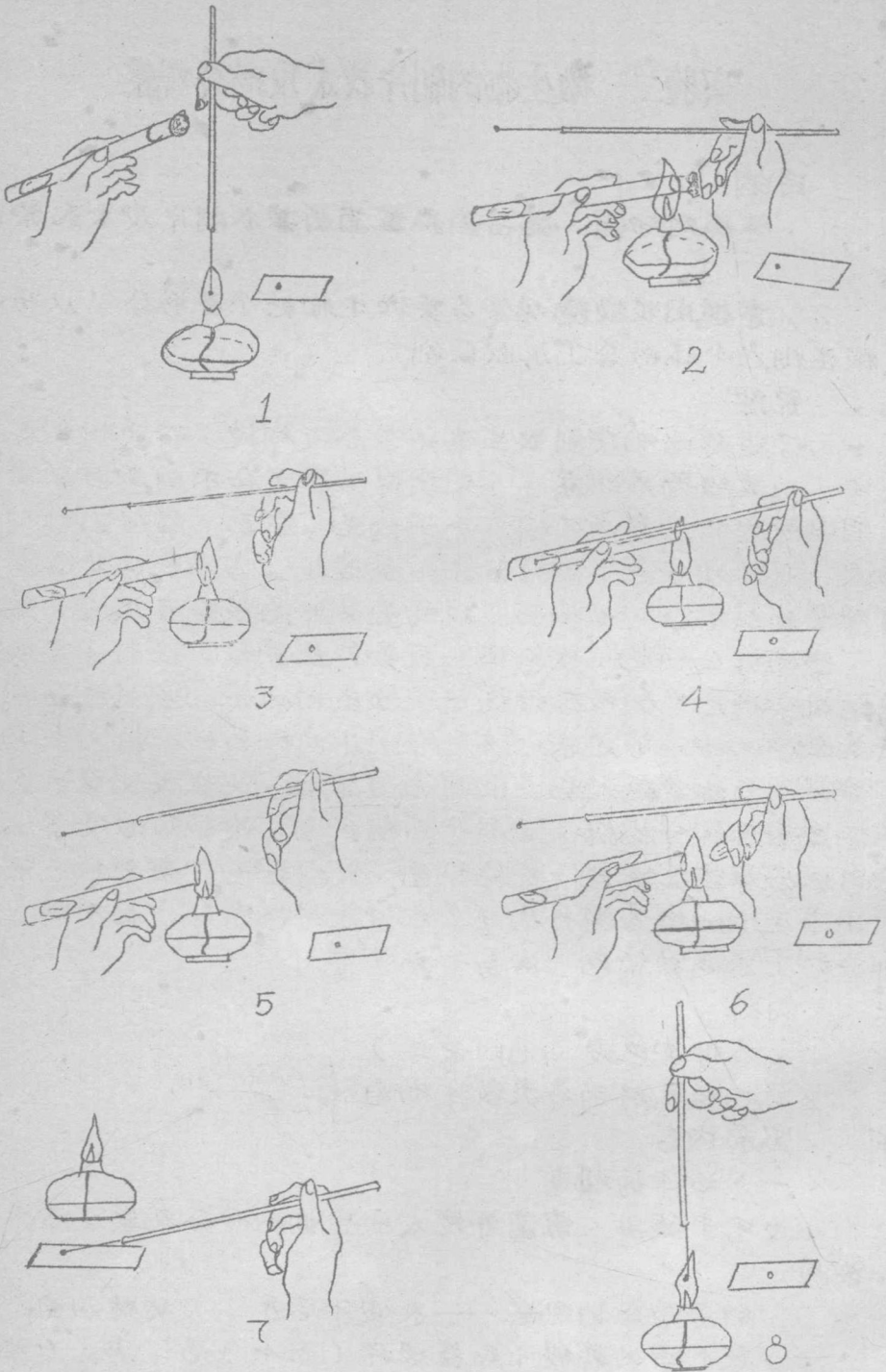


图3 细菌染色标本涂片操作的过程

1. 灼烧接种环
2. 拨去棉塞
3. 烘烤试管口
4. 挑取少量菌体
5. 再烘烤试管口
6. 将棉塞塞好
7. 做涂片
8. 烧去残留的菌体

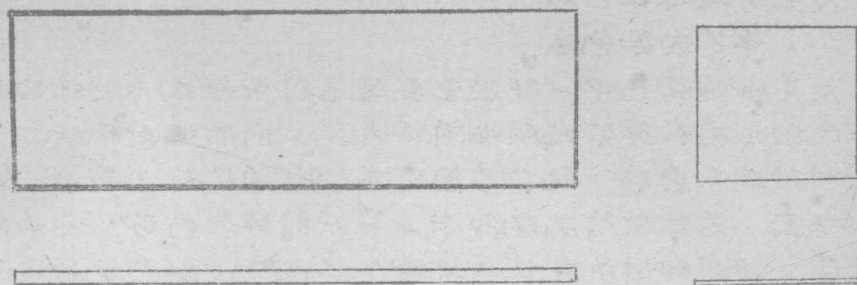


图4 载玻片

盖玻片

(3) 轻轻加上盖玻片，勿使生成气泡，用滤纸片吸去盖玻片周围多余的液体，镜检并记下酵母菌的形态。

2. 霉菌形态的观察——出汁平板培养三天的几种霉菌

(1) 如上法取载玻片和盖玻片，于载玻片中央滴一滴乳酸石炭酸液（如用蒸馏水，细胞容易收缩变形）

(2) 取已培养好的霉菌平板，用无菌操作轻轻挑取菌体少许移于载玻片液滴中，小心不要破坏菌丝体的完整性，盖上玻片用低倍显微镜镜检，观察菌丝及孢子的形态。

(二) 普通染色制片法：一般细菌或放线菌的形态观察

检样：液体培养1~2天的枯草杆菌

1. 涂片：取干燥载片及盖片各一块，微热烘干，滴一滴蒸馏水于载片中央，用无菌操作取少许菌体于载片水滴中，和匀，使成薄层。

2. 固定：持载片（涂面向上），在酒精灯火焰上通过几次，使涂片的菌体贴紧于载片上不易被洗脱。固定时加热温度不宜过高，否则会使细胞变形。

3. 染色：载片放于水平位置，加石炭酸复红染色液1~2滴，使全涂面上都盖染液，静置1~2分钟。

4. 水洗：染色时间一到，在自来水龙头下用细水冲洗（涂面向下）使涂片上的染液洗去。

5. 吸干：用滤纸片吸去载玻片上的水分（注意不要将细菌抹去）

6. 镜检：置于显微镜下，用油浸系物镜观察菌体形态。

〈三〉特殊染色法

1. 革兰氏染色法

这是细菌染色中一种很重要的鉴别染色法，能把细菌分为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌两大类，用碱性染料结晶紫及媒染剂碘液染色后，细胞着色，不为酒精所洗脱者，称革兰氏阳性菌；为酒精所洗脱而染上复染剂的颜色者，称为革兰氏阴性菌。这与细菌所具有的特殊化学成分、细胞膜的通透性、等电点高低等有关。培养基的成分、染色技术（脱色时间、脱色剂浓度、染片的厚度等）也有影响。细胞的老幼，对革兰氏染色也有影响，须加注意。

菌种：大肠杆菌、枯草杆菌的培养液

操作：

- (1) 用一般染色法相同的方法，对大肠杆菌、枯草杆菌分别涂片、固定。
- (2) 革兰氏A液（结晶紫）染色一分钟，水洗（涂面向下）
- (3) 革兰氏B液（碘液）媒染一分钟，水洗。
- (4) 用95%酒精脱色：斜将载玻片，滴加酒精冲洗至流出液刚刚不显紫色为止，（约半分钟）即行水洗。
- (5) 加一品红复染约半分钟，水洗。
- (6) 用滤纸片吸去多余液体，油浸系观察，记录大肠杆菌及枯草杆菌的形态及革兰氏反应。阳性菌紫色，阴性菌红色。

2. 芽孢染色法

芽孢染色法不少，其原理一样。细菌芽孢壁比营养细胞壁透性低，着色困难，它常不吸着冷水溶液内的染料，要加热并较长时间才能着色，着色后又较难脱色，现介绍三种常用的芽孢染色法。

菌种：培养三天以上的枯草杆菌斜面

操作：

(1) 法——将枯草杆菌涂片加热固定后，用冲淡结晶紫液染色5~10分钟，水洗、吸干、镜检，可见营养细胞上色芽孢无色。

(2) 法——将枯草杆菌涂片、固定后，加石碳酸复红液数滴于涂面上，火焰上加热至生水汽，但不要沸腾，维持生气温度5分钟，不要使染色液干涸，可继续添加之。冷却、水洗。用1% H_2SO_4 液脱色约10秒钟，水洗，加碱性美兰液2滴，染

色2分钟，水洗。吸干，镜检，芽孢呈红色，营养细胞为兰色。

(3)法——把枯草杆菌涂片，固定后，加孔雀绿液于涂面上，加热至产生水汽，维持3分钟，（不要使染色液干涸，不断添加孔雀绿液）冷却后水洗。加番红花红染色液2滴，染色30秒钟，水洗，吸干。镜检，芽孢呈绿色，营养细胞为红色。

3. 荚膜染色法（示范）

菌种：麦芽汁加碳酸钠划线培养五天的醋酸菌

操作：

加无菌水一滴于载片中央，移一环菌液，和匀，涂成薄层，风干。（不加热固定），用结晶紫染色2分钟，用20%硫酸铜液冲洗，吸干，镜检。细胞为紫色，荚膜为淡兰色。

4. 鞭毛染色法（示范）

鞭毛染色不太容易，须培养幼细胞，极薄涂的载片，且要谨慎按操作进行，方能得到较满意的结果。

(1)菌种的准备——接种大肠杆菌于肉汤斜面中，于35℃培养24小时，每天移接一次，连续2~3次，最后一次培养12~16小时，备用。

(2)玻片的处理——把载片浸于重铬酸钾硫酸洗液中，15分钟以上。取出，水洗后，又浸于酒精-氢氧化铵液中15分钟，然后用擦镜纸抹干净玻片表面，在火焰上烧成金黄色，冷却后备用。

(3)制片——把无菌水滴于载片上三个小滴成直行，用接种环取菌体少许放入右边的水滴中，轻轻移动数次（但不要研磨），使之分散于液滴中。再用接种环从右边的菌液移接1~2环于中间水滴中，移动使均匀；同法移中间菌液于左边水滴中。室温风干。

(4)染色——用滤纸折迭成漏斗，滤过费氏—康氏染色A液，滤液分别滴于三个涂面，不用加热，静置15分钟，倾去染色液，放入蒸馏水中上下移动洗涤，取出，涂面向上置于架上，用同法加入B液，静置10分钟，如法洗涤。再加石炭酸复红液复染2分钟，如法洗涤，风干。镜检，菌体及鞭毛都是红色。

五. 实验纪录

染色方法	菌名	形态绘图	摘 要	备 注

思考与讨论：

1. 细菌、酵母、霉菌及放线菌的形态及大小有何异同？你能从显微镜观察中把这四大类微生物区别开来吗？
2. 革兰氏染色法有何意义？如何选用制片的方法？
3. 制片时应注意那些事项？

实验三 培养基的制备与灭菌

一、目的：

1. 掌握常用培养基的制备方法。
2. 掌握培养基和玻璃器皿的灭菌操作方法及灭菌前的准备工作。

二、原理：

能够作为微生物生长、繁殖和发酵所需要的各种营养物质称为培养基。培养基可由各种化学药品人工配制而成，也可利用天然的营养丰富的物质，制成液体或固体等不同形式。由于不同微生物对营养要求差异很大，我们在进行人工培养、利用、控制微生物时，必须根据生产实际的具体情况各类微生物营养的特点来设计培养基的配方。但是无论是何种培养基，都必须包括碳源、氮源、无机盐类、生长因素和水分这五大类营养物质。此外，不同微生物还要求一定的酸碱度和渗透压。

生产和科研中，为将微生物进行纯种培养，所用的培养基和一切玻璃器皿都必须根据不同对象采用不同的方法进行灭菌，以杀死其它不需要的微生物。

三、材料：

(1) 配制培养基所需的各种药品、试剂（详见本实验的培养基配方）

(2) 各种玻璃器皿、仪器及其它有关材料。

四、实验内容：

(一) 无菌玻璃器皿的准备：

(1) 玻璃器皿的清洗：

将实验所需的各种玻璃器皿用去污粉、洗衣粉或洗涤剂清洗干净。采用去污粉或洗衣粉时，先将器皿润湿，用刷子沾粉 scrub，再用水冲洗干净；洗涤剂为重铬酸钾的硫酸溶液，是一种强氧化剂，去污能力及腐蚀性很强，使用时应尽量避免稀释及直接洗涤带有大量有机质的器皿，否则会使洗液很快失效。用洗涤剂洗过的器皿，应立即用水冲洗。若不慎衣服或皮肤沾有洗涤剂，应立即用水洗，然后用苏打水（ Na_2CO_3 ）或氨水洗。

玻璃器皿如若粘煤膏、煤油等一类物质，可用浓硫酸或 40% NaOH 液洗，有时洗涤油脂物质及其它不溶于水也不溶于

酸碱的物质，可用特定的有机溶剂如汽油、丙酮、酒精、二甲苯或松节油等洗。

新购置的玻璃器皿含有游离碱，应用2%的HCl液浸泡数小时，再用水冲洗干净。装有琼脂培养基的器皿，应先将培养基刮去，若培养基已干固，可放在水中煮沸，使琼脂融化后趁热倒出，再用水洗净。洗净的器皿应放入烘箱中烘干后，才能包装灭菌。

(2) 玻璃器皿的包装

1. 做棉花塞：需要装培养基及无菌水的试管或三角瓶，在灭菌前都应当加上棉塞，目的是过滤空气，避免污染。

制成的棉塞应紧贴管壁不留缝隙，以防空气中杂菌沿缝隙侵入容器。棉塞松紧要合适，过松起不到过滤微生物的作用，且易于脱落；过紧难以透气。棉塞长度不短于试管口径的2倍，其 $\frac{2}{3}$ 的长度应在试管内部，上部露出少许棉花，便于拔放。要求拔出后棉塞仍基本保持原形，便于重塞（图5）棉塞旋入试管时一律以向右旋转为准。

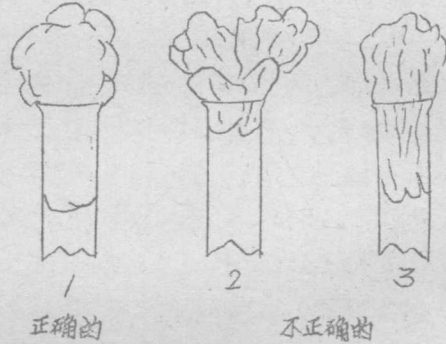


图5 棉花塞

做棉塞用普通棉花即可，脱脂棉易吸水，不可用。如棉花纤维过短，可在棉塞外加二层纱布包扎，可延长使用时间。棉塞做好后，试管用绳捆紮好，进行干热灭菌。

2. 吸管应在其吸口端塞上一小块棉花（松紧要适宜），以防止细菌吸入口中或避免将口中细菌吹入吸管内，每支吸管需用长纸条从吸管尖端开始以螺旋式包扎起来，上端剩余部分折迭打结。培养皿由一底一盖组成一套，可将几套已烘干的培养皿在一起用纸包装。三角瓶瓶口可用8~10层纱布包扎。包装完毕，开始干热灭菌。

(3) 干热灭菌法

此法多用于玻璃器皿（糊状、液体之物不能用此法）。一般使用电烘箱进行。由于蛋白质在干燥情况下不易凝固变性，所以干热灭菌须有较高的温度和较长的时间。具体操作如下：