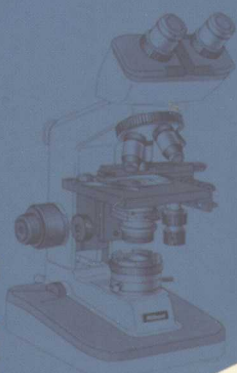
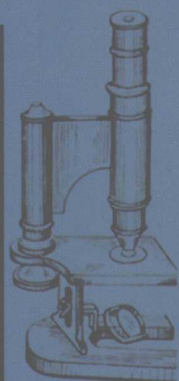
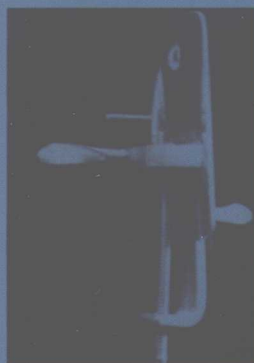




普通高等教育“十一五”国家级规划教材

微生物学实验

何绍江 陈雯莉 主编



 中国农业出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

微生物学实验

何绍江 陈雯莉 主编

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学实验 / 何绍江, 陈雯莉主编. — 北京: 中国农业出版社, 2007. 7

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

ISBN 978-7-109-11638-2

I. 微… II. ①何…②陈… III. 微生物学-实验-高等学校-教材 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 065747 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

责任编辑 李国忠

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2007 年 7 月第 1 版 2007 年 7 月北京第 1 次印刷

开本: 720mm×960mm 1/16 印张: 12

字数: 209 千字

定价: 18.50 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

内 容 提 要

本教材分 3 部分，第一部分介绍微生物学实验室的基本设置。第二部分介绍微生物学实验技术，包括：微生物的个体形态观察、微生物的纯培养、微生物的生长和生长量的测定、微生物的纯种分离与鉴定、细菌多样性研究的分子生物学技术和应用微生物实验，共 47 个实验。第三部分为微生物学实验常用数据和材料。

本教材可作为高等农业院校微生物学实验教材，可供高等学校植物科学和生产类、生物类各专业及科研、生产单位相关人员参考。

主 编 何绍江(华中农业大学)

陈雯莉(华中农业大学)

编 者 (按姓氏笔画排序)

何绍江(华中农业大学)

陈雯莉(华中农业大学)

袁红莉(中国农业大学)

莫美华(华南农业大学)

唐 明(西北农林科技大学)

戴经元(华中农业大学)

主 审 李阜棣(华中农业大学)

前 言

本教材是与李阜棣教授和胡正嘉教授主编的《微生物学》(第六版)配套的实验教材,其编写宗旨是为植物科学和生产类、生物类等各专业提供一本简明、扼要的微生物学实验教材。因此,本教材的篇幅不宜大,而内容既要包含微生物学的基本实验技术(如微生物的形态观察、微生物的大小测定及数量测计、微生物学的纯培养技术等),又要包括微生物的现代分子生物学技术(如DNA的抽提、质粒的快检、PCR技术等)。为此,编者参考了众多的微生物实验技术书籍,总结自己的教学经验,精选出47个实验编成了此书,希望它既能满足植物科学和生产类各专业开设微生物学实验课的需要,又能作为农业微生物领域研究生的参考书。

本教材是在李阜棣教授的指导下完成的,从编写大纲的制定到全书的审定,李阜棣教授都提出了许多宝贵的意见。参加本教材编写的成员均是长期工作在微生物学教学第一线的教师,本教材应该说是他们多年教学工作经验的总结。本教材的第一部分、第三部分和第二部分中的微生物的个体形态观察、微生物的纯培养、细菌的常规生理生化鉴定由华中农业大学何绍江教授编写;微生物的生长和生长量的测定由西北农林科技大学唐明教授编写;微生物的纯种分离由中国农业大学袁红莉博士编写;细菌的血清学鉴定由华中农业大学戴经元教授编写;细菌多样性研究的分子生物学技术由华中农业大学陈雯莉教授编写;应用微生物实验由华南农业大学莫美华博士编写。全书由何绍江教授、陈雯莉教授负责统稿。

由于编者水平有限,错误在所难免,恳请各位读者批评指正。

主 编

2007年4月于武昌狮子山

目 录

前言

第一部分 微生物学实验室的基本设置

一、实验室基本条件	1
二、显微镜	2
三、消毒和灭菌设备	10
四、净化工作台和接种工具	14
五、微生物实验常用玻璃器皿	16
六、微生物培养设施	17
七、实验室的安全与清洁	19

第二部分 微生物学实验技术

I 微生物的个体形态观察	22
实验一 细菌的简单染色和革兰氏染色	22
实验二 细菌的荚膜染色	25
实验三 细菌的芽孢染色	28
实验四 细菌的鞭毛染色 (附细菌的运动性观察)	30
实验五 放线菌的形态观察	34
实验六 放线菌的印片染色法	36
实验七 霉菌水浸标本片的制备与观察	37
实验八 霉菌接合孢子的培养与观察	38
实验九 酵母菌子囊孢子的培养与观察	39
实验十 伞菌担子和担孢子的观察	40
实验十一 昆虫病毒多角体的染色与观察	42
实验十二 噬菌斑的培养观察	44
II 微生物的纯培养	45
一、培养基	45
实验十三 牛肉膏蛋白胨培养基的配制	48

实验十四	高泽氏一号合成培养基的配制	49
实验十五	马铃薯蔗糖培养基的配制	50
实验十六	麦芽汁培养基和米曲汁培养基的配制	51
二、	培养基的灭菌与消毒	53
三、	微生物接种技术	60
Ⅲ	微生物的生长和生长量的测定	66
实验十七	比浊法测定大肠杆菌的生长曲线	66
实验十八	微生物细胞大小的测定	68
实验十九	微生物的显微直接计数法	72
实验二十	稀释平板计数法	74
实验二十一	稀释培养计数法	77
实验二十二	薄膜过滤培养法测定空气微生物数量	81
Ⅳ	微生物的纯种分离与鉴定	83
一、	微生物的纯种分离	83
实验二十三	土壤中细菌的分离与计数	84
实验二十四	土壤中真菌的分离与计数	87
实验二十五	从酒曲中分离酵母菌	88
实验二十六	担子菌的弹射分离法	89
实验二十七	从豆科植物根瘤中分离根瘤菌	91
实验二十八	从死虫中分离苏云金芽孢杆菌	92
二、	细菌的常规生理生化鉴定	94
实验二十九	惟一碳源试验	94
实验三十	惟一氮源试验	95
实验三十一	微生物对含碳化合物的分解利用	96
实验三十二	微生物对含氮化合物的分解利用	102
三、	细菌的血清学鉴定	108
实验三十三	抗血清制备	108
实验三十四	直接凝集反应	112
实验三十五	免疫电泳	115
实验三十六	双向免疫扩散	117
V	细菌多样性研究的分子生物学方法	118
实验三十七	土壤中总 DNA 的提取	119
实验三十八	根瘤菌的质粒快速检测	121
实验三十九	PCR 技术	123

实验四十 PCR 扩增产物的 DGGE 检测	125
VI 应用微生物实验.....	129
实验四十一 根瘤菌结瘤试验.....	129
实验四十二 泡囊丛枝状菌根的染色	131
实验四十三 苏云金芽孢杆菌制剂的毒力测定	133
实验四十四 抗生素的效价测定 (管碟法)	137
实验四十五 棉铃虫核型多角体病毒的室内培养及效价测定	140
实验四十六 酒精发酵 (附巴斯德效应)	143
实验四十七 乳酸发酵	148

第三部分 微生物实验常用数据和材料

一、教学常用菌种	152
二、常用培养基配方.....	155
三、常用染色液的配制	163
四、常用缓冲液的配制	166
五、常用试剂和指示剂的配制	171
六、几种计量单位的名称与换算	174
七、最大或然数表	176
八、微生物实验常用玻璃器皿的清洁法	178
主要参考文献	181

第一部分 微生物学实验室的基本设置

现代微生物学实验室是一个复杂的工作系统，除具备显微镜等微生物研究专用设备外，还应有相关生化分析精密仪器。这里仅介绍公共微生物学课程所必需的实验条件，包括教学实验室和教师准备室以及相关设施。

一、实验室基本条件

进行微生物学工作的实验室必须具有采光好、通风好、电力保障好、有自来水、煤气管道等基本条件。实验室最好是南北向，既便于空气对流，又便于采光。进行微生物学实验离不开电，使用显微镜、配制培养基、消毒灭菌、培养微生物都需要电，电力供应不好将给工作带来很大损失。例如，灭菌中途停电将会使所做的培养基染菌报废。实验室的自来水供给是必不可少的，染色、制备培养基、灭菌都需要水。在微生物无菌操作接种过程中，必须用火焰对试管进行封口，因此，煤气灯是必备的。没有煤气供应的地方，可用酒精灯代替。

一套完整的微生物学教学实验室必须具备：①预备室，供教师和实验技术人员准备实验材料用。预备室应具有染色、显微观察、配制培养基、无菌操作接种等功能，因此，显微镜、净化工作台是预备室必备设备。②灭菌室，是专门用来对微生物实验器材和培养基进行灭菌的房间，应配备卧式灭菌锅、手提灭菌锅、干热灭菌箱等设备。灭菌室还可兼做洗涤室。③培养室，是用来培养微生物的房间，应常年保持恒温，一般控制温度在 30℃ 左右，需要特殊培养的微生物可放在培养箱内培养。培养室内应放若干放置培养物的搁架。④教学实验室，是供学生实验的场所。一个适合学生实验的微生物教学实验室要求宽敞、明亮、通风性好，并有遮光窗帘。实验台上设置电源插座，便于学生使用显微镜；实验台旁装有水槽，便于学生洗涤玻璃器皿。实验室四周应安装高功率的电源插座，便于学生使用电炉配制培养基。一个容纳 32 人的微生物教学实验室，面积应在 120m² 左右，摆 150cm×75cm×85cm（长×宽×高）的实验台 16 个，每个实验台坐 2 名学生。实验台面应是耐高温耐酸碱的黑色面板（如威盛亚面板）。学生座椅应配备可升降的气垫椅，便于不同身高的学生在使用显微镜观察时调整高度。实验室应安装空调，便于工作时根据气候升温

或降温。实验室还应配备多媒体教学设备,便于播放录像资料。

二、显微镜

微生物个体微小,必须借助显微镜才能观察到它的个体形态和细胞构造。显微镜是微生物实验室最基本的设备,是主要仪器之一。

大约 400 年前,眼镜片工匠们开始了放大镜的制作,当时放大镜的放大倍数只有 3~5 倍,出于航海和认识微观世界的需要,聪明的工匠们将单片透镜组装起来创造出了望远镜和显微镜。荷兰布商吕文虎克 (Leeuwenhoek) 擅长磨制透镜,他一生中用自己磨制的短焦距透镜装配了几十架单式显微镜。虽然这些显微镜的放大倍数只有 50~300 倍,但吕文虎克用它看到了雨水、井水、海水和牙垢中的细菌。复式显微镜最早是 16 世纪末由德国制造的,但放大倍数太低,不能看到细菌。17 世纪胡克 (Hooke) 等人制造出了放大 300~500 倍的复式显微镜,但这种高倍显微镜产生色像差,在物体周围出现光环,不能用它来观察微小的细菌。大约在 1821 年,麦地那 (Medina) 大学的阿米西教授制造出了第一架有效消色差的显微镜,并由法国人薛瓦利埃 (Chevalier) 和英国人李斯特 (Lister) 做了进一步的改进。17 世纪末到 18 世纪初荷兰物理学家惠更斯 (Huygens) 为显微镜的发展做出了杰出贡献。19 世纪末德国学者 E. 阿贝 (Abbe) 奠定了光学显微镜的成像原理,从而推动了显微镜制造业的发展,并使光学显微镜的分辨率达到了最高极限(图 1-1)。

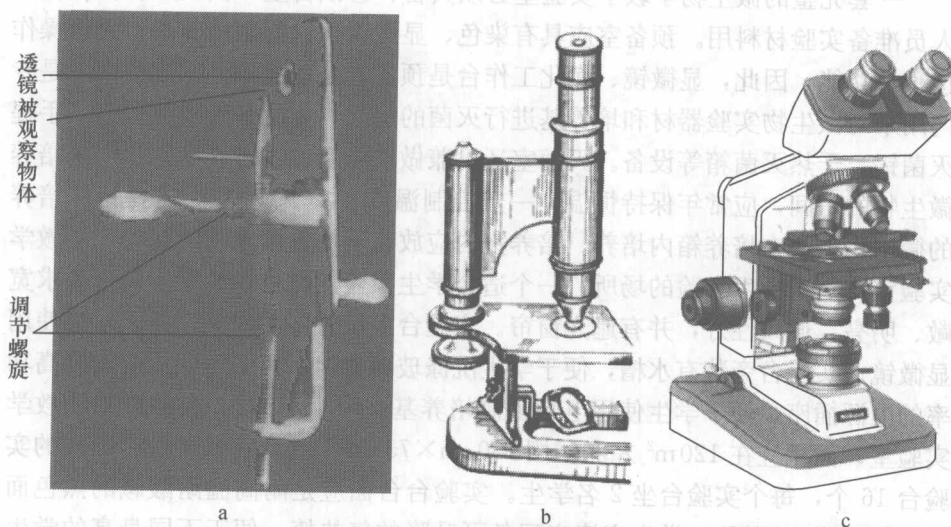


图 1-1 几种显微镜

a. 吕文虎克 (Leeuwenhoek) 制作的显微镜 b. 18 世纪用来观察细胞的显微镜 c. 现代光学显微镜

1940 年荷兰学者 F. Zeinik 应用光的衍射和干涉原理提高标本细节的折光率的差异,创造了相差显微镜。1904 年 A. Koehler 创造了用紫外光作光源激发出荧光以观察组织、细胞的结构,并在 1908 年试制成功了第一台紫外荧光显微镜,但由于光源强度不足,不能对微细结构进行系统研究。直到 1938 年采用了超高压汞灯作光源,解决了光源强度问题,才使得荧光显微镜在组织学、细胞学、微生物学中广泛应用。这些显微镜的不足之处是看到的只是二维平面图像,研究用干涉显微镜、原子力显微镜和供焦扫描激光显微镜可以观察三维立体图像,扫描电子显微镜看到的也是立体图像。不过最常用的仍然是普通光学显微镜,是本书阐述的重点,本书也简要介绍暗视野显微镜、相差显微镜和荧光显微镜。

(一) 普通光学显微镜

普通光学显微镜是以日光或电灯灯光作光源的一种显微镜,被观察的物体通过物镜和目镜的两次放大可将物体放大 1 500~2 000 倍。

1. 普通光学显微镜的构造 普通光学显微镜的构造可分为两大部分,一为机械装置,另一为光学系统,这两部分很好地配合,才能发挥显微镜的作用。

(1) 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、粗调焦手轮、微调焦手轮等部件(图 1-2)。

(2) 光学系统 显微镜的光学系统由反光镜、聚光器、物镜、目镜等组成(图 1-2),现在比较好的显微镜没有反光镜,镜座下装有电光源,通常为 15 W 的卤钨灯。光学系统使物体放大,形成物体放大像。

2. 光学显微镜的成像原理 显微镜的放大是通过透镜来完成的,单透镜成像具有像差,影响像质。由单透镜组合而成的透镜组相当于一个凸透镜,放大作用更好。图 1-3 是显微镜的成像原理模式。 AB 为标本, L_1 为物镜, L_2 为目镜。 $A''B''$ 和眼点的距离为显微镜的明视距离。它的成像原理是:标本 AB 的像经过 L_1 (物镜) 后到 $A'B'$ 处成为一个放大倒立的实像(中间像), F 为 L_2 的后焦点。当光线传到 L_2 (目镜) 时,在 $A'B'$ 处 $A'B'$ 被放大成一个正立的虚像,然后传递到视网膜上,标本 AB 就被放大了,人眼看到的 AB 被放大后的虚像 $A''B''$ 与原样品像的方向是相反的(图 1-3)。

3. 光学显微镜的性能 显微镜分辨能力的高低决定于光学系统的各种条件。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 数值孔径也叫做镜口率(或开口率),简写为 $N.A.$,在物

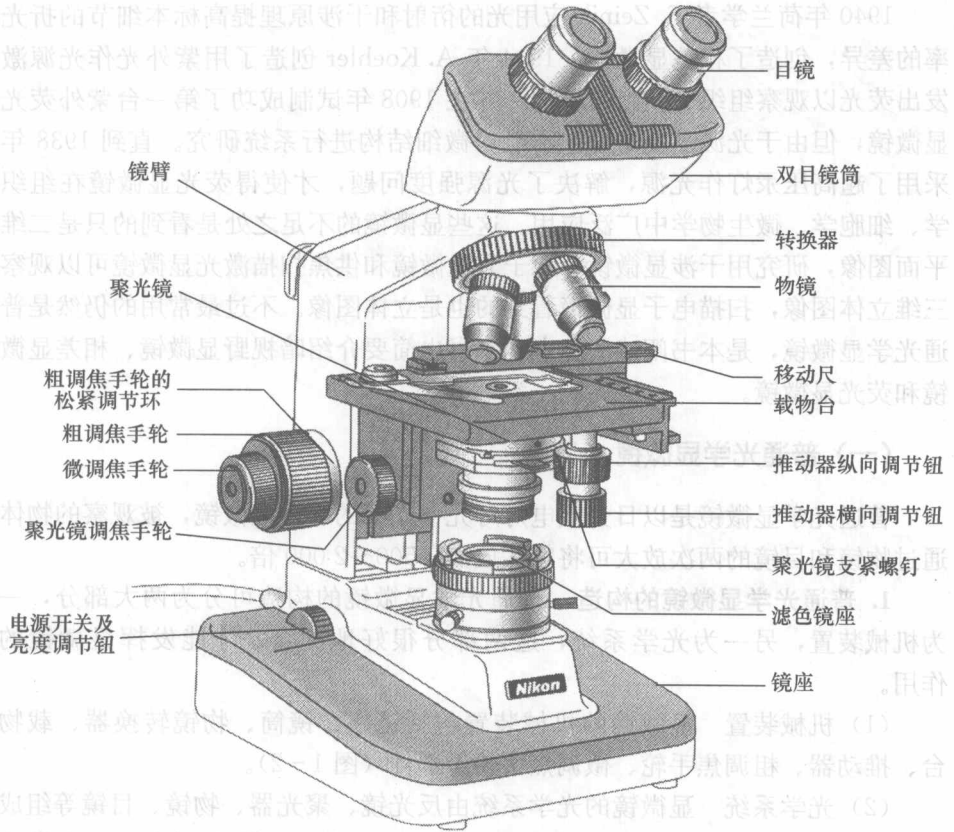


图 1-2 普通光学显微镜的构造

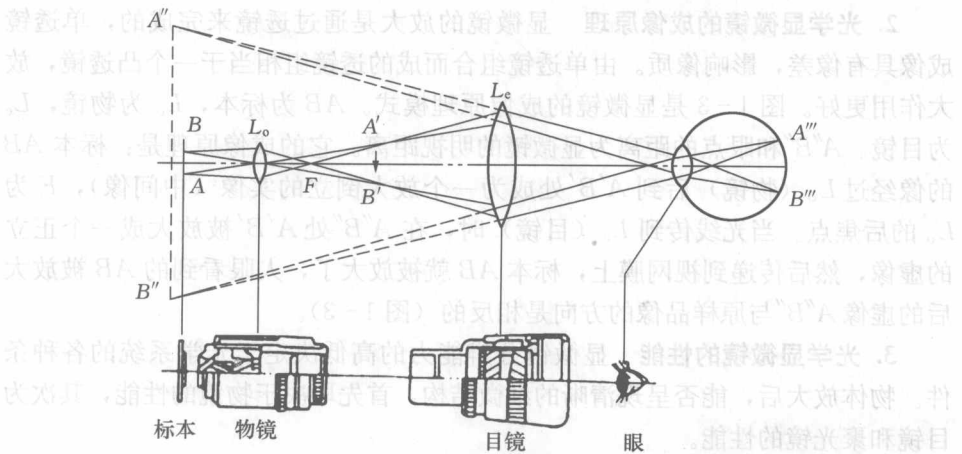


图 1-3 显微镜的成像原理图

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，它与显微镜的分辨力成正比，与焦深成反比，与镜像亮度的平方根成正比。数值孔径 (N.A) 可用下式表示

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

式中 n ——物镜与标本之间的介质折射率；

α ——物镜的镜口角。

所谓镜口角，是指从物镜主光轴上的物点发出的光线与物镜前透镜有效直径的边缘所张的角度 (图 1-4)。

镜口角 α 总是小于 180° ，所以 $\sin \alpha/2$ 的最大值小于 1。因为空气的折射率为 1，所以干燥物镜的数值孔径总是小于 1，一般为 $0.05 \sim 0.95$ 。油浸物镜如用香柏油 (折射率为 1.52) 浸没，则数值孔径最大可接近 1.5 (图 1-5)。虽然理论上数值孔径的极限等于所用浸没介质的折射率，但实际上从透镜的制造技术看，是不可能达到这一极限的。通常在实用范围内，高级油浸物镜的最大数值孔径是 1.4。

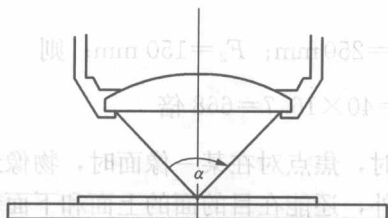


图 1-4 物镜的镜口角

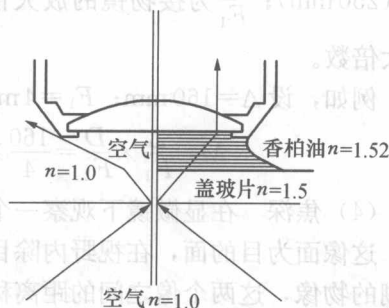


图 1-5 介质折射率对光线通路的影响

几种物质的介质的折射率如下：空气为 1.0，水为 1.33，玻璃为 1.5，甘油为 1.47，香柏油为 1.52。

(2) 分辨力 分辨力是指分辨物体细微结构的能力。分辨力与能够分辨出的物体两点间的最短距离 (D) 有关。而 D 又和 $1/2$ 波长 (λ) 及物镜的数值孔径有关。因为光波只能对比其波长较长的物体造像，若某个物体小于 $1/2$ 波长，光线可绕过该物体，不能造像。 D 可用下式表示

$$D = \lambda / (2N.A)$$

可见光的波长为 $0.4 \sim 0.7 \mu\text{m}$ ，平均波长为 $0.55 \mu\text{m}$ 。若用数值孔为 0.65

的物镜, 则 $D=0.55\mu\text{m}/2\times 0.65=0.42\mu\text{m}$ 。这表示被检物体在 $0.42\mu\text{m}$ 以上时可被观察到, 若小于 $0.42\mu\text{m}$ 就不能视见。如果使用数值孔径为 1.25 的物镜, 则 $D=2.20\mu\text{m}$ 。凡被检物体长度大于这个数值, 均能视见。由此可见, D 值愈小, 分辨力愈高, 物像愈清楚。根据上式, 提高显微镜的分辨力的方式有: ①缩短波长; ②增大折射率; ③加大镜口角。紫外线作光源的显微镜和电子显微镜就是利用短光波来提高分辨力以检视较小的物体的。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 显微镜放大物体, 首先经过物镜第一次放大造像, 目镜在明视距离造成第二次放大像。放大率就是最后的像和原物体两者体积大小之比例。因此, 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

$$V = V_1 \times V_2$$

比较精确的计算方法, 可从下列公式求得

$$M = \frac{\Delta}{F_1} \times \frac{D}{F_2}$$

式中, F_1 为接物镜焦距; F_2 为接目镜焦距; Δ 为光学筒长; D 为明视距离 (250mm); $\frac{\Delta}{F_1}$ 为接物镜的放大倍数; $\frac{D}{F_2}$ 为接目镜放大倍数; M 为显微镜放大倍数。

例如, 设 $\Delta=160\text{mm}$; $F_1=4\text{mm}$; $D=250\text{mm}$; $F_2=15\text{mm}$; 则

$$M = \frac{\Delta}{F_1} \times \frac{D}{F_2} = \frac{160}{4} \times \frac{250}{15} = 40 \times 16.7 = 668 \text{ 倍}$$

(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, 这像面为目的面, 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, 这两个像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愈大, 焦深愈小。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。

(二) 暗视野显微镜

暗视野显微镜又叫暗场显微镜, 是一种通过观察样品受侧向光照射时所产生的散射光来分辨样品细节的特殊显微镜。

根据光学上的丁道尔 (tyndall) 现象, 微尘细粒在强光直射通过的情况下, 不能为人所见, 这是因为光线过强及绕射现象等因素, 因而看不到微尘的形象。若把光线斜射它们, 则由于光的反射或衍射的结果, 微尘细粒似乎增大了体积, 而为人眼可见。暗视野显微镜便是利用这一原理而设计出来的。

透射照明的照明光线从标本下方经过聚光器会聚后透过标本，进入物镜，它适用于观察对光可透的标本。若利用斜射光照射物体，使光线不能直接进入物镜，只有物体经斜射照明后，发出的反射光可进入物镜，这样在显微镜中可见到黑暗视野中明亮的物像。利用暗视野显微镜可以观察到某些细微的部分，如细菌鞭毛的运动。

暗视野显微镜和一般的明视野显微镜只在于二者的聚光镜不同，暗视野聚光镜可阻止光线直接照射标本，使光线斜射在标本上（图 1-6）。

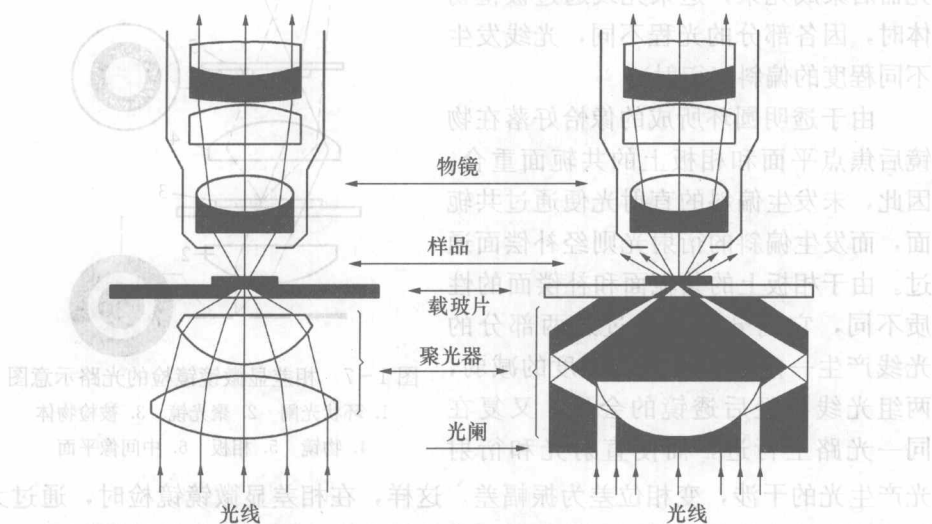


图 1-6 明视野光线通路（左）和暗视野光线通路（右）

在使用暗视野显微镜时，须要调节聚光镜的焦点与被检物体在同一平面上，并且需要选用较薄的载玻片，否则不易看见被检物。

（三）相差显微镜

1. 相差显微镜的特点 相差显微镜是一种将光线通过透明标本细节时所产生的光程差（即相位差）转化为光强差的特种显微镜。光线通过比较透明的标本时，光的波长（颜色）和振幅（亮度）都没有明显的变化。因此，用普通光学显微镜观察未经染色的标本（如活的细胞）时，其形态和内部结构往往难以分辨。然而，由于细胞各部分的折射率和厚度的不同，光线通过这种标本时，直射光和衍射光的光程就会有差别。随着光程的增加或减少，加快或落后的光波的相位会发生改变（产生相位差）。光的相位差不能被人的肉眼感觉到，但相差显微镜能通过其特殊装置——环状光阑和相板，利用光的干涉现象，将

光的相位差转变为人眼可以察觉的振幅差（明暗差），从而使原来透明的物体表现出明显的明暗差异，对比度增强，使我们能比较清楚地观察到普通光学显微镜和暗视野显微镜下都看不到或看不清的活细胞及细胞内的某些细微结构。

2. 相差显微镜的成像原理 图 1-7 所示为相差显微镜的成像原理。镜检时光源只能通过环状光阑的透明环，经聚光器后聚成光束，这束光线通过被检物体时，因各部分的光程不同，光线发生不同程度的偏斜（衍射）。

由于透明圆环所成的像恰好落在物镜后焦点平面和相板上的共轭面重合。因此，未发生偏斜的直射光便通过共轭面，而发生偏斜的衍射光则经补偿面通过。由于相板上的共轭面和补偿面的性质不同，它们分别将通过这两部分的光线产生一定的相位差和强度的减弱，两组光线再经后透镜的会聚，又复在同一光路上行进，而使直射光和衍射光产生光的干涉，变相位差为振幅差。这样，在相差显微镜镜检时，通过无色透明体的光线使人眼不可分辨的相位差转化为人眼可以分辨的振幅差（明暗差）。

3. 相差显微镜的结构和装置 相差显微镜与普通光学显微镜的基本结构是相同的，所不同的是它具有 4 部分特殊结构：环状光阑、相板、合轴调节望远镜及绿色滤光片（图 1-8）。

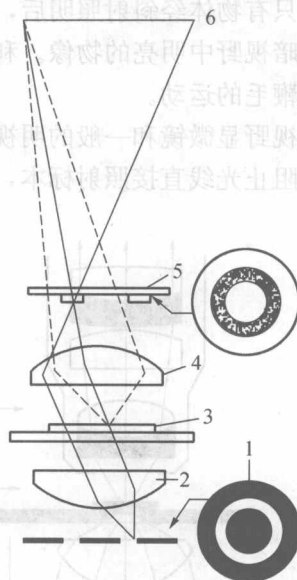


图 1-7 相差显微镜镜检的光路示意图

1. 环状光阑 2. 聚光镜 3. 被检物体
4. 物镜 5. 相板 6. 中间像平面



图 1-8 相差显微镜的环状光阑（a）和合轴调节望远镜（b）