

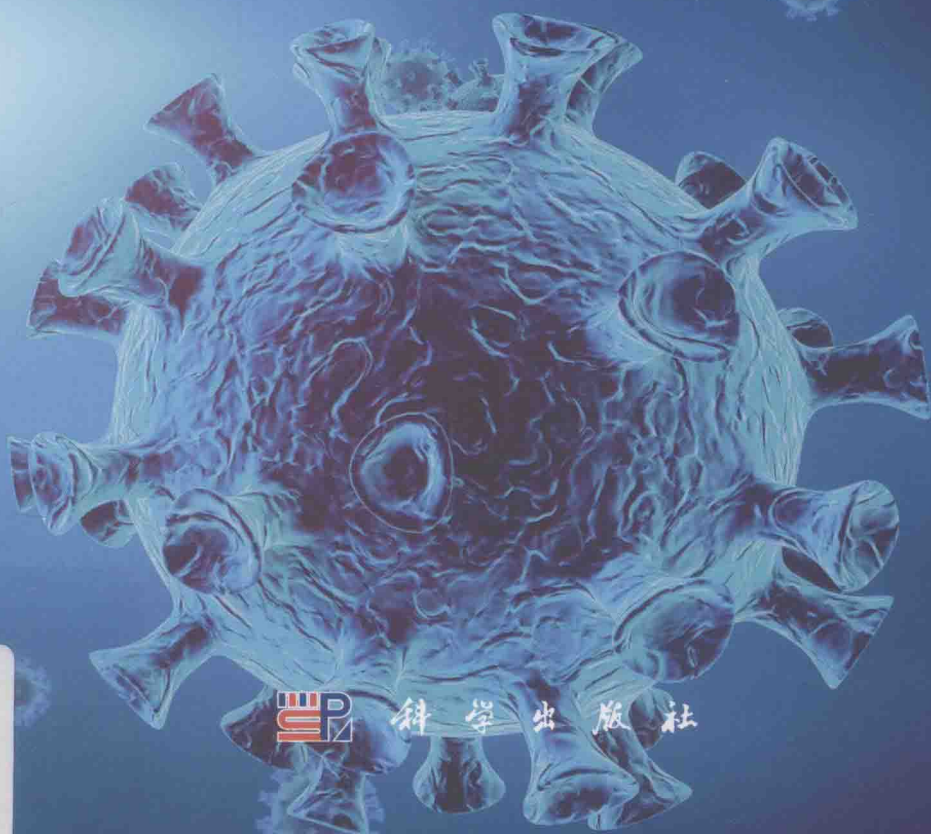


普通高等教育“十三五”规划教材

# 微生物学实验

(第四版)

蔡信之 黄君红 主编



科学出版社

普通高等教育“十三五”规划教材

# 微生物学实验

(第四版)

主 编 蔡信之 黄君红

副主编 陈 龙 魏淑珍 刘汉文 康贻军 苏 龙

编 委 (按姓氏汉语拼音排序)

蔡信之 陈 龙 陈旭健 黄君红 康贻军

刘汉文 卢冬梅 罗 青 苏 龙 魏淑珍

翟硕莉



科学出版社

北京

## 内 容 简 介

本书着重介绍微生物学实验的基本技术,适当增加了部分在生产、科研中常用的新技术。全书共94个常用实验,分为三部分:基础实验、综合实验和应用实验。基础实验突出微生物学实验的特点,系统介绍了微生物学实验的基本技术——无菌操作技术、显微技术、制片染色技术、纯培养技术、消毒灭菌技术、生长测定技术、生理生化实验技术、分子微生物学基础技术及免疫学技术等。综合实验介绍了常用的综合实验技术——抗生素效价及酶活力的测定、诱变育种、原生质体融合、细菌接合、应用微生物的分离与鉴定、噬菌体的分离纯化与效价测定及动物病毒的鸡胚培养等技术。应用实验结合生产和科研的实际,介绍了常用的应用实验技术——应用微生物的筛选、菌种保藏、食品及药品中微生物的检测、环境中微生物的检测、致癌剂的微生物法检测、固定化活细胞的制备及其发酵试验、高密度培养、发酵培养基配方试验、发酵条件的优选试验、台式自控发酵罐的发酵试验等。各单位可根据自己的教学要求和实际条件,选做相应的实验。书后附有相关染色液、试剂、溶液、消毒剂及培养基等的配制方法,还附有细菌鉴定及检索、常用菌种和病毒学名及饮用水、食品、药品等国家卫生标准等,方便使用。此外,授课教师通过书后教学课件索取方式可获赠教学课件一份。

本书不仅适合作为生物科学、生物技术和生物工程等专业本科生微生物学实验课程的教材,还可以作为相关专业研究生和科研、生产技术人员参考书。

### 图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验 / 蔡信之, 黄君红主编. —4版. —北京: 科学出版社, 2019.10

普通高等教育“十三五”规划教材

ISBN 978-7-03-061196-3

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

中国版本图书馆CIP数据核字(2019)第090105号

责任编辑: 席慧 张静秋 马程迪 / 责任校对: 严娜

责任印制: 师艳茹 / 封面设计: 铭轩堂

**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>

**北京市密东印刷有限公司** 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

1996年8月第 一 版 上海科学技术出版社  
2002年10月第 二 版 高等教育出版社  
2010年1月第 三 版 开本: 787×1092 1/16  
2019年10月第 四 版 印张: 19  
2019年10月第十三次印刷 字数: 490 000

定价: 55.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

## 前 言

微生物学是生命科学的重要组成部分，处于生命科学研究的前沿，许多重要的生命活动规律都是在研究微生物时发现的。微生物学是研究生命科学基础理论的主要学科，其独特的实验技术广泛应用于生命科学的各个领域和农业、工业、医药、环保等许多部门。

微生物学实验教学是培养学生独立工作能力的重要环节。各高校都加强了微生物学实验教学，纷纷增加课时、开放实验室，许多高校已单设微生物学实验课程；实验条件有了较大改善；微生物学实验技术发展迅速。为了适应迅速发展的形势，编者将已使用10年的《微生物学实验》（第三版）进行修订，按微生物学教学大纲，根据多年的微生物学教学和科研经验，参考了许多兄弟院校有关教材和国内外相关资料，适当增加了部分新技术，补充了许多新内容。内容较全面，重点更突出。全书共94个常用实验，分三部分：基础实验、综合实验和应用实验。基础实验突出微生物学实验的特点，系统介绍微生物学实验的基本技术——无菌操作、显微技术、制片染色、纯培养、消毒灭菌、生长测定、生理生化实验、分子微生物学基础技术及免疫学技术等。综合实验介绍常用的综合实验技术——抗生素效价及酶活力测定、育种、应用微生物的分离与鉴定、动物病毒的鸡胚培养等。应用实验结合生产和科研的实际，介绍常用的应用实验技术——菌种保藏、环境和食品及药品中微生物检测、固定化活细胞制备及其发酵试验、高密度培养、发酵培养基配方试验、发酵条件的优选试验、台式自控发酵罐的发酵试验等。各单位可根据自己的教学要求和实际条件，选做相应的实验。此外，授课教师通过书后教学课件索取方式可获赠教学课件一份。

本书修订时努力进一步体现以下特点。

1. 突出基础性和系统性，注重微生物学实验基本操作技术的系统训练。不仅使学生准确掌握微生物学实验的基本技术，而且帮助学生加深理解微生物学的理论知识。
2. 注重综合性和应用性。第二部分和第三部分分别安排了适量有代表性的综合实验和应用实验。可以提高学生综合应用微生物学实验技术、解决实际问题的能力。
3. 实验内容的选用特别注意先进性和可操作性。适当增加了应用较广的新技术和新方法，不仅在重点部分做了详细介绍，还增添了很多图表，以便于理解和操作。
4. 注重科学性和严肃性。我们在编写过程中邀请了多位长期在高校从事微生物学教学和科研工作的教师参加本书的修订工作；印发了修订大纲和讨论稿，深入讨论，反复修改；讨论稿于2017年下半年在部分院校试用，大多数实验都已在编者实验室实际操作过；根据讨论和试用结果反复修改、多方查证、仔细审核后定稿。

本书修订得到许多单位的大力支持，很多高校的微生物学教师对修订大纲和讨论稿提出了宝贵的修改意见，在此一并表示诚挚的谢意。感谢科学出版社编辑们的热情支持和辛勤劳动。限于编者的水平，不当之处在所难免，恳请微生物学同行和广大读者指正。

编 者

2019年3月

## 实验须知

微生物学实验课的目的是训练学生牢固建立无菌的观念；准确掌握微生物学实验基本的操作技能；深入学习微生物学的基础知识；加深理解微生物学的基本理论。同时，通过实验培养学生观察、分析、解决问题的能力，实事求是、严肃认真的科学态度，独立思考、勇于创新的开拓精神及认真负责、团结协作、勤俭节约、爱护公物的优良作风。

为了上好微生物学实验课，并确保安全，必须注意下列事项。

1. 每次实验前必须充分预习实验教材，明确实验的目的、原理和方法，做到心中有数，思路清楚，统筹安排。

2. 实验室内应保持整洁，非实验必需品请勿带入实验室；进入实验室要穿干净的白色实验服，留长发的须挽在背后；尽量避免在实验室内走动，防止尘土飞扬；切勿高声谈话，以免唾沫四溅，保持实验室内安静。实验室内严禁吸烟，不准吃东西，不准用嘴湿润铅笔、标签等物品，切勿用手指或其他物体接触面部，以防感染。每次实验前要用湿布擦净台面，洗净双手，地面洒水，减少杂菌污染。

3. 要认真操作实验，仔细观察，及时做好记录。要牢记无菌概念，严格无菌操作，防止杂菌污染。实验操作中要关闭门窗，防止空气对流。接种时尽量不要讲话和走动。

4. 要严格遵守操作规程，注意安全。严禁用嘴吸取菌液和试剂。如果有意外事故发生，应及时报告指导教师，妥善处理，切勿隐瞒。

5. 进行高压蒸汽灭菌的人员必须认真负责，中途不准离开。电炉、电热板、酒精灯、煤气灯等用后立即关灭。实验中，切勿使乙醇、乙醚或丙酮等易燃物品接近火源。如遇火险应先关火源，再用湿布或沙土掩盖灭火，必要时用灭火器。

6. 爱护国家财产。使用显微镜等贵重仪器时应细心操作，倍加爱护，切勿擅自拆卸；对药品及消耗材料要节约使用，用毕放回原处，严禁药匙交叉使用。

7. 每次实验结束后，必须把所有仪器擦净、放妥，将实验室收拾整齐，打扫干净。如有菌液污染桌面或其他地方，应立即用5%石炭酸（苯酚）液覆盖30 min后擦去。

凡带菌器具如吸管、涂布棒、试管、锥形瓶等洗涤前应在3%来苏尔液中浸泡20 min消毒，含培养物的器皿应先煮沸10 min灭菌后再清洗，以免污染环境。

工作衣、帽如沾有可传染的材料，应立即脱下浸于5%石炭酸等消毒液中过夜或高压蒸汽消毒后再清洗。

用过的染色液、有机试剂等切勿直接倒入水池中，必须倒进指定容器内。未染菌的棉球、纸片等直接放入垃圾桶中，切不可扔进水池内，以免堵塞下水道。

8. 用于实验培养的材料要贴好标签，放在指定地点培养。实验室中的菌种和物品未经教师许可，不得带出实验室。

9. 每次实验后必须如实编写实验报告，内容力求简明、准确，及时交给教师批阅。

10. 离开实验室前，应洗净双手，关闭门、窗、水、灯、火、煤气等。

# 目 录

前言

实验须知

## 第一部分 微生物学基础实验

|  |     |
|--|-----|
| <b>第一单元 无菌概念和无菌操作技术</b>                  |     |
| 实验 1-1 环境及人体表面微生物的检测                     | 1   |
| 实验 1-2 无菌操作技术                            | 2   |
| <b>第二单元 显微技术</b>                         |     |
| 实验 1-3 显微镜的使用及细菌形态的观察                    | 5   |
| <b>第三单元 微生物制片及染色技术</b>                   |     |
| 实验 1-4 细菌的单染色法                           | 29  |
| 实验 1-5 革兰氏染色法                            | 30  |
| 实验 1-6 细菌的抗酸性染色法                         | 32  |
| 实验 1-7 细菌芽孢染色法                           | 33  |
| 实验 1-8 鞭毛染色法及活细菌运动性的观察                   | 34  |
| 实验 1-9 荚膜染色法                             | 36  |
| 实验 1-10 微生物拟核的体内和体外染色观察                  | 37  |
| 实验 1-11 细菌细胞壁的染色和质壁分离的观察                 | 39  |
| 实验 1-12 放线菌形态的观察                         | 40  |
| 实验 1-13 酵母菌形态及其子囊孢子的观察                   | 42  |
| 实验 1-14 霉菌形态及其接合孢子的观察                    | 44  |
| 实验 1-15 伞菌担子及担孢子形态的观察                    | 47  |
| 实验 1-16 昆虫病毒多角体的观察                       | 48  |
| <b>第四单元 微生物纯培养技术</b>                     |     |
| 实验 1-17 培养基的制备                           | 50  |
| 实验 1-18 消毒与灭菌                            | 53  |
| 实验 1-19 微生物接种技术                          | 58  |
| 实验 1-20 微生物培养特征的观察与识别                    | 62  |
| 实验 1-21 厌氧微生物的培养                         | 66  |
| 实验 1-22 从土壤中分离与纯化微生物                     | 71  |
| 实验 1-23 显微操纵单细胞分离技术                      | 74  |
| <b>第五单元 微生物的生长</b>                       |     |
| 实验 1-24 微生物大小的测定                         | 77  |
| 实验 1-25 显微镜直接计数法                         | 79  |
| 实验 1-26 平板菌落计数法                          | 82  |
| 实验 1-27 光电比浊计数法                          | 84  |
| 实验 1-28 大肠埃希氏菌生长曲线的测定                    | 85  |
| 实验 1-29 霉菌生长曲线的测定(干重法)                   | 87  |
| 实验 1-30 物理因素对微生物生长的影响                    | 88  |
| 实验 1-31 化学因素对微生物生长的影响                    | 91  |
| 实验 1-32 生物因素对微生物生长的影响                    | 93  |
| <b>第六单元 细菌鉴定中常规生理生化反应</b>                |     |
| 实验 1-33 用生长谱法测定微生物的营养要求                  | 95  |
| 实验 1-34 唯一氮源(无机)试验                       | 96  |
| 实验 1-35 细菌鉴定中常用的生理生化反应                   | 97  |
| <b>第七单元 分子微生物学基础技术</b>                   |     |
| 实验 1-36 细菌质粒 DNA 的小量制备                   | 102 |
| 实验 1-37 质粒 DNA 的转化                       | 105 |
| 实验 1-38 细菌总 DNA 的制备                      | 107 |
| 实验 1-39 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定酿酒酵母菌胞外蛋白质相对分子质量 | 109 |
| 实验 1-40 微生物 DNA 的体外重组                    | 112 |
| 实验 1-41 聚合酶链反应(PCR)技术                    | 113 |

|                       |     |                        |     |
|-----------------------|-----|------------------------|-----|
| 实验 1-42 核酸分子杂交 .....  | 115 | 实验 1-44 凝集反应 .....     | 122 |
| <b>第八单元 免疫学技术</b>     |     |                        |     |
| 实验 1-43 免疫血清的制备 ..... | 118 | 实验 1-45 环状沉淀反应 .....   | 125 |
|                       |     | 实验 1-46 双向免疫扩散试验 ..... | 127 |

## 第二部分 微生物学综合实验

|                           |     |                                     |     |
|---------------------------|-----|-------------------------------------|-----|
| 实验 2-1 微生物抗药性突变株的分离 ..... | 129 | 实验 2-7 动物病毒的鸡胚培养 .....              | 144 |
| 实验 2-2 微生物的诱变育种 .....     | 131 | 实验 2-8 芽孢杆菌属 ( <i>Bacillus</i> ) 种的 |     |
| 实验 2-3 微生物的原生质体融合 .....   | 133 | 鉴定 .....                            | 146 |
| 实验 2-4 营养缺陷型突变株的诱变、       |     | 实验 2-9 利用 Biolog 系统鉴定微生物 .....      | 156 |
| 筛选与鉴定 .....               | 135 | 实验 2-10 微生物的快速、简易检测 .....           | 158 |
| 实验 2-5 细菌的接合作用 .....      | 138 | 实验 2-11 抗生素效价的测定 .....              | 160 |
| 实验 2-6 噬菌体的分离、纯化及其效价的     |     | 实验 2-12 产蛋白酶和淀粉酶芽孢杆菌的               |     |
| 测定 .....                  | 140 | 分离及酶活力检测 .....                      | 162 |

## 第三部分 微生物学应用实验

### 第一单元 微生物的分离、纯化、 筛选及保藏

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| 实验 3-1 从病死虫体内分离杀虫微生物 .....      | 165 |
| 实验 3-2 真菌的单孢子分离法 .....          | 167 |
| 实验 3-3 嗜盐细菌的分离与鉴定 .....         | 169 |
| 实验 3-4 极端嗜盐菌甘油二醚类衍生物的           |     |
| 测定 .....                        | 170 |
| 实验 3-5 食用菌菌种的分离与选育 .....        | 172 |
| 实验 3-6 细菌 DNA 中 (G + C) mol% 值的 |     |
| 测定 .....                        | 173 |
| 实验 3-7 菌种保藏 .....               | 177 |

### 第二单元 食品、药品、化妆品 微生物学检测

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| 实验 3-8 食品中菌落总数及大肠菌群的      |     |
| 检测 .....                  | 184 |
| 实验 3-9 肉毒梭菌及肉毒毒素的检测 ..... | 188 |
| 实验 3-10 沙门氏菌属的检测 .....    | 191 |
| 实验 3-11 志贺氏菌属的检测 .....    | 195 |
| 实验 3-12 金黄色葡萄球菌的检测 .....  | 198 |
| 实验 3-13 食品中霉菌和酵母的计数 ..... | 200 |
| 实验 3-14 食品中霉菌毒素的检测 .....  | 202 |
| 实验 3-15 罐头食品商业无菌检测 .....  | 205 |

### 第三单元 微生物发酵技术

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 实验 3-23 固定化活细胞的制备及其        |     |
| 发酵试验 .....                 | 228 |
| 实验 3-24 微生物发酵培养基配方的        |     |
| 正交试验 .....                 | 231 |
| 实验 3-25 微生物摇瓶发酵条件的优选 ..... | 237 |
| 实验 3-26 台式自控发酵罐的发酵试验 ..... | 241 |
| 实验 3-27 高密度培养——乳链球菌的       |     |
| 膜过滤培养 .....                | 245 |
| 实验 3-28 乳酸菌发酵制作酸奶及其分离      |     |
| 纯化 .....                   | 247 |

---

|  |     |
|--|-----|
| <b>第四单元 环境微生物学检测</b>                   |     |
| 实验 3-29 水的细菌学检查 .....                  | 250 |
| 实验 3-30 利用发光细菌检测水体生物毒性 .....           | 253 |
| 实验 3-31 富营养化水体中藻类检测<br>(叶绿素 a 法) ..... | 256 |
| 实验 3-32 利用微生物吸附法去除水体中<br>重金属 .....     | 258 |
| 实验 3-33 水中五日生化需氧量的测定 .....             | 260 |
| 实验 3-34 微生物传感器法测定 BOD 值 .....          | 262 |
| 实验 3-35 用埃姆斯试验检测诱变剂和<br>致癌剂 .....      | 264 |
| 实验 3-36 空气中微生物的检测 .....                | 270 |
| 主要参考文献 .....                           | 274 |
| 附录 .....                               | 275 |



# 第一部分

# 微生物学基础实验

## 第一单元 无菌概念和无菌操作技术

### 实验 1-1 环境及人体表面微生物的检测

#### 【目的要求】

1. 证实环境中普遍存在微生物；确立无菌概念，体会无菌操作技术的重要性。
2. 观察不同类群微生物的菌落特征。

#### 【基本原理】

微生物多种多样，无处不在。它们很小，肉眼看不见。将它们接种到适当的固体培养基上，在适宜温度培养，少量分散的菌体或孢子就可以在培养基上形成肉眼可见的细胞群体——菌落 (colony)。不同种的微生物可形成大小、形态、颜色等特征各异的菌落。因此，可以通过平板培养检查环境中微生物的类型和数量。

#### 【实验器材】

牛肉膏蛋白胨琼脂平板培养基（附录二），马铃薯葡萄糖琼脂平板培养基；无菌水，无菌棉签，试管架，酒精灯，记号笔，培养箱等。

#### 【操作步骤】

1. 标记 在一套牛肉膏蛋白胨琼脂平板培养基的底部划出 8 个等分的小区，并分别标注姓名、日期及代表不同样品的字母 (A~H)。在另外两套马铃薯葡萄糖琼脂平板培养基的底部分别标注空气 1、空气 2 及姓名、日期。

2. 检测 环境及人体表面的微生物多种多样，检测方法各不相同。

(1) 空气 将标有空气 1 的平板培养基打开皿盖，放于实验台上，使培养基表面完全暴露在空气中；将标有空气 2 的平板培养基打开皿盖，放于已灭菌的超净工作台上或接种箱（室）内，1 h 后盖上各皿盖。

(2) 人体表面及其他物体上的微生物

1) 手指：在酒精灯火焰旁，半开皿盖，用未洗的手指在平板培养基的 A 区内轻轻按一下，迅速盖上皿盖。然后用肥皂洗净双手，自然干燥后仍用同一手指在平板培养基的 B 区轻轻按一下，迅速盖上皿盖。

2) 头发：将 1 或 2 根头发轻轻放在平板培养基的 C 区，迅速盖上皿盖。

3) 鼻腔：按无菌操作，从试管中取无菌湿棉签在自己鼻腔内滚动数次，立即在平板培养基的 D 区轻轻划线接种，迅速盖上皿盖。将用过的棉签放入另一试管。

4) 桌面：按无菌操作，从试管中取无菌湿棉签擦抹实验台面约  $2\text{ cm}^2$ ，将棉签从皿盖开启处伸至培养基表面，在 E 区划线接种，立即盖上皿盖。放回棉签。

5) 水体：按无菌操作，从试管中取无菌干棉签，分别蘸取少量无菌水、自来水，将棉签从皿盖开启处伸至培养基表面，分别在 F 区和 G 区轻轻划线接种。

6) 地面: 按无菌操作, 从试管中取无菌湿棉签, 擦抹实验室地面约  $2\text{ cm}^2$ , 将棉签从皿盖开启处伸至培养基表面, 在 H 区轻轻划线接种。

3. 培养 将牛肉膏蛋白胨琼脂平板培养基倒置于  $37^\circ\text{C}$  培养箱中, 将马铃薯葡萄糖琼脂平板培养基倒置于  $28^\circ\text{C}$  培养箱中, 培养 3 d。

4. 观察 若有时间, 可从第 24 h 起连续观察数次, 仔细观察各培养基上不同类型菌落出现的顺序及菌落大小、外形、颜色、数量等的变化。

### 【实验报告】

1. 实验结果 将观察结果记录在表 1-1.1 中。

表 1-1.1 环境中微生物的检测记录表

| 样品   | 菌落数量 | 菌落类型 | 简要说明 |
|------|------|------|------|
| A    |      |      |      |
| B    |      |      |      |
| C    |      |      |      |
| D    |      |      |      |
| E    |      |      |      |
| F    |      |      |      |
| G    |      |      |      |
| H    |      |      |      |
| 空气 1 |      |      |      |
| 空气 2 |      |      |      |

注: 菌落数量可用“+”和“-”符号表示, 从多到少依次为++++, +++, ++, +, -

### 2. 思考题

- 1) 比较不同来源的样品, 哪种样品平板菌落数量和类型最多? 为什么?
- 2) 比较洗手前后及空气处理前后菌落的变化, 体会严格无菌操作的意义。

### 【注意事项】

1. 标记一定要记在皿底, 记在皿盖容易张冠李戴。各样品不能记错。
2. 接种要严格无菌操作, 在酒精灯火焰旁进行, 动作要迅速, 不能划破培养基。

(蔡信之)

## 实验 1-2 无菌操作技术

### 【目的要求】

准确掌握实验室微生物挑菌、接种的无菌操作技术; 认真体会无菌操作要领。

### 【基本原理】

微生物学实验中, 无菌操作技术是指为防止杂菌污染纯培养物而采取的一系列措施后的挑菌、接种操作。接种前应向地面洒水, 清理台面, 移走不必要的物品, 用湿布拭净灰尘, 消毒台面, 洗净双手。菌种管和待接种管都插在试管架上, 放在取放方便的位置。

置。接种应在酒精灯火焰旁严格按无菌操作规程(图1-2.1)进行。高温对微生物有致死效应。切忌边接种边聊天和随意走动,以防止杂菌污染。

### 【实验器材】

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*);牛肉膏蛋白胨斜面培养基;酒精灯,接种环,试管架,记号笔等。

### 【操作步骤】

1. 标记 用记号笔在斜面前方距管口2~3 cm处,分别标记3支装有牛肉膏蛋白胨斜面培养基的试管为A(接菌)、B(接无菌水)、C(非无菌操作接无菌水)。

2. 灭菌 左手持装有大肠埃希氏菌菌种和待接种的斜面培养基试管,右手持接种环,按图1-2.1的1及图1-2.2所示的方法将接种环在火焰的氧化焰彻底灼烧灭菌(烧红并持续一段时间),再在火焰旁打开装有斜面菌种和待接种斜面培养基试管的棉塞(图1-2.1的2)(棉塞不能放在桌上,应夹在右手指间并朝外),在火焰上灼烧管口。

3. 挑菌 在火焰旁将接种环插入菌种培养基上部空白处冷却5 s以上,挑取少许菌苔,将接种环退出菌种管。

4. 接种 将已挑菌的接种环迅速伸入A管斜面底部(环不要碰试管口和壁),从底部开始向上做蛇形密集划线接种(图1-2.1的3)。划线完毕后灼烧管口,塞上棉塞。将接种环彻底灼烧后放回原处(图1-2.1的4和5)。

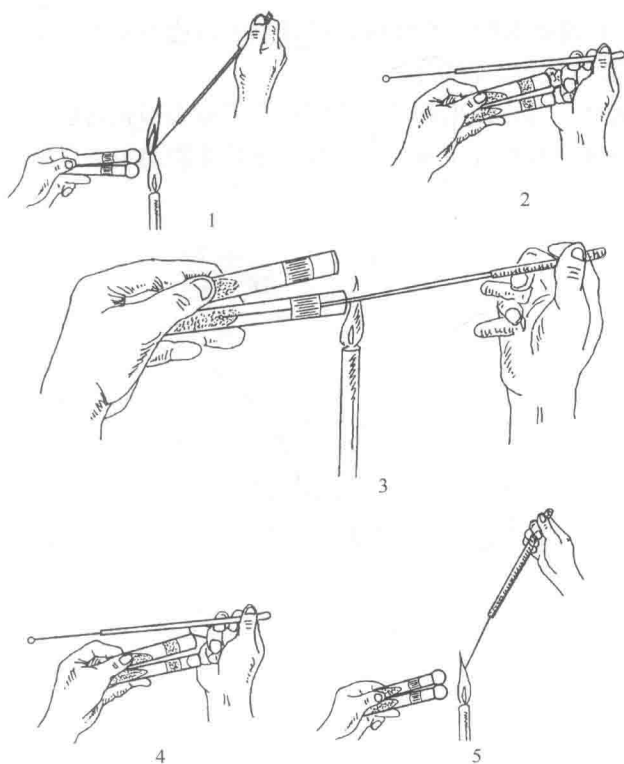


图1-2.1 无菌操作过程

1. 烧环; 2. 拔塞; 3. 接种; 4. 加塞; 5. 烧环

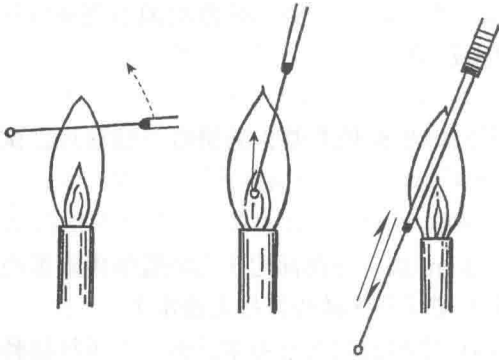


图 1-2.2 接种环（或针）灭菌

C 斜面培养基表面菌苔生长情况。

## 2. 思考题

- 1) 斜面试管 A、B、C 各起什么作用？你从中体会到什么？
- 2) 你的实验结果正确吗？试解释之。
- 3) 接种时开塞后试管口或锥形瓶口可否朝上？能否远离火焰？为什么？

## 【注意事项】

1. 无菌操作的试管或锥形瓶在开塞后及回塞前，其口部均应通过火焰 2 或 3 次，以烧去可能附着于口部的微生物。开塞后的管口及瓶口应尽量靠近火焰，平放，切忌口部向上及长时间暴露在空气中，以防止污染。
2. 接种环（或针）每次使用前后，均应在火焰外焰彻底灼烧灭菌。
3. 挑菌前，必须待接种环（或针）充分冷却后才能使用，以免烫死微生物。

5. 接水 同样接种无菌水于 B 管。

6. 对照 以非无菌操作为对照：在无酒精灯或煤气灯的条件下，用未经灭菌的接种环从另一盛有无菌水的试管中挑取一环无菌水划线接种到 C 管中。

7. 培养 将 A、B、C 3 支牛肉膏蛋白胨斜面培养基于 37℃ 直立培养 24 h。

8. 观察 仔细观察 A、B、C 斜面培养基表面有无纯培养的菌苔生长。

## 【实验报告】

1. 实验结果 分别描述试管 A、B、

(蔡信之)

## 第二单元 显微技术

### 实验 1-3 显微镜的使用及细菌形态的观察

熟悉显微镜并掌握其使用技术是研究微生物必不可少的重要手段。配合数码显微摄影技术的使用,对微生物的观察不仅快速、准确,而且便于编辑、储存。

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、暗视野显微镜、荧光显微镜、偏光显微镜、紫外光显微镜、微分干涉相差显微镜等不同类型的。非光学显微镜主要是电子显微镜。

#### 一、普通光学显微镜

##### 【目的要求】

1. 熟悉普通光学显微镜各部分的结构和性能。
2. 掌握油镜的基本原理和使用方法。
3. 观察细菌的基本形态。

##### 【基本原理】

1. 显微镜的结构 光学显微镜分机械装置和光学系统两大部分(图 1-3.1)。

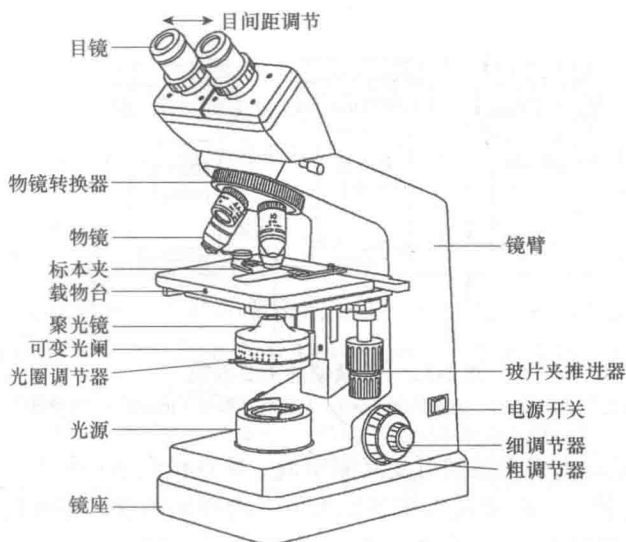


图 1-3.1 光学显微镜的结构

#### (1) 机械装置

1) 镜座和镜臂: 镜座位于显微镜底部, 马蹄形或方形, 是显微镜的基座, 由它支撑全镜。有的显微镜在镜座内装有照明光源等。

镜臂是显微镜的脊梁, 支撑镜筒。直筒显微镜镜臂与镜座间有一倾斜关节, 可使显

显微镜倾斜一定角度，便于观察。

2) 镜筒：是一金属圆筒，上接目镜，下接转换器，镜筒长通常是 160 mm，有些显微镜镜筒长度是可调的。根据镜筒数量，光学显微镜分单筒式和双筒式。

3) 物镜转换器：是一安装物镜的圆盘，其上可装 3 或 4 个物镜，可使每个物镜通过镜筒与目镜构成一个放大系统。转换物镜时必须用手按住圆盘旋转。

4) 载物台：又称镜台，用于安放玻片标本。中心有一个通光孔。载物台上装有一副金属的玻片夹推进器。调节移动器上的螺旋可使标本前后、左右移动。有些移动器上还有刻度，可确定标本的位置，便于重复观察。

5) 调焦装置：是调节物镜和标本间距离的机件，有粗调节器和细调节器，可使镜筒或镜台上下移动。当物体在物镜的焦点上时，可得到清晰的图像。

## (2) 光学系统

1) 目镜：目镜装于镜筒上端，作用是把物镜放大的物像再次放大，但不提高分辨率。它由两片透镜组成，在两块透镜中间或下方有一视野光阑。在进行显微测量时要把目镜测微尺放在视野光阑上。不同的目镜上面一般标有 5×、10×、16× 等放大倍数，不同放大倍数的目镜，其口径是统一的，可以互换使用。

2) 物镜：物镜是显微镜最重要的部件，由多块透镜组成。它决定成像质量和分辨能力。因靠近被观察的物体，又称为接物镜。作用是将物体进行第一次放大。

各物镜都刻有放大倍数（低倍镜为 10×；高倍镜为 40×~65×；油镜为 95×~100×）、数值孔径（numerical aperture, NA）、镜筒长度及所要求的盖玻片厚度等参数（图 1-3.2）。

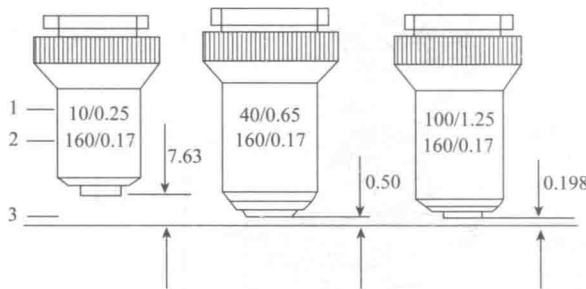


图 1-3.2 显微镜的主要参数

1. 放大倍数及数值孔径；2. 镜筒长度（mm）及盖玻片厚度（mm）；3. 工作距离（mm）

3) 聚光器：聚光器由聚光镜和可变光阑组成，装在镜台下，可上下升降。边框上刻有数值孔径。作用是将平行的光线聚集到标本上，增强照明度。用低倍镜时聚光器应下降，用油镜时则要升到最高位置。在聚光镜的下方装有可变光阑（光圈），由十几张金属薄片组成，可放大或缩小，以调节光强度和数值孔径的大小。

4) 反光镜：是一个有平凹两面的双面镜，装在聚光器下的镜座上，可在水平与垂直两个方向任意旋转。作用是采集光线并将其射向聚光器。光线较强或用低倍和高倍镜观察时用平面镜；光线较弱或用油镜观察时应用凹面镜。带电光源的显微镜通过调节电源

电压调节光线强弱。

2. 油镜的基本原理 油镜常标有“OI”或“HI”字样，有的用一圈红线或白线标记。用不同放大倍数的目镜可使被检物体放大 1000~2000 倍。使用时油镜与其他物镜不同的是盖玻片和物镜之间隔的不是一层空气而是一层油质，称为油浸系。常用香柏油，因其折射率为 1.515，与玻璃折射率（按成分不同折射率  $n$  为 1.5~1.9，一般为 1.52）相近，也可用液体石蜡（ $n=1.52$ ）。油镜的作用如下。

(1) 增强视野的照明度 光线通过盖玻片后可直接经香柏油进入物镜而不发生折射。若盖玻片与物镜间的介质为空气则称为干燥系，光线通过盖玻片后发生折射，进入物镜的光线减少，降低了视野的照明度（图 1-3.3）。

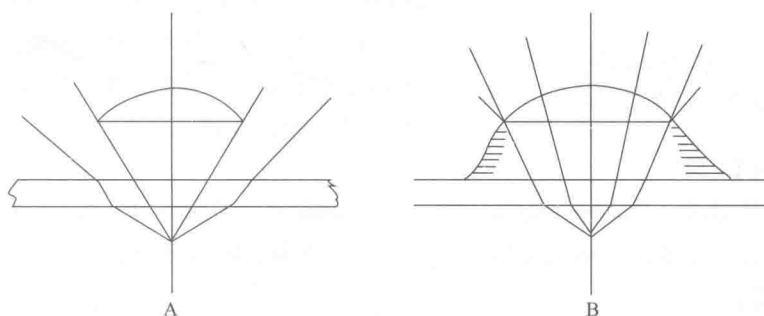


图 1-3.3 干燥系 (A) 与油浸系 (B) 的光线路路

(2) 提高显微镜的分辨率 利用油镜不但能增加照明度，更重要的是可以提高显微镜的分辨率（resolution）。

显微镜的优劣主要取决于分辨率的大小。所谓分辨率就是显微镜工作时能分辨出物体两点间最小距离（ $D$ ）的能力。如果显微镜只能放大，没有相应的高分辨率，则放大的物像也是模糊的。 $D$  值越小，表明分辨率越高，可用下列公式表示

$$D = \frac{\lambda}{2NA}$$

式中， $\lambda$  为光波波长；NA 为数值孔径。

由上式可见，要提高分辨率必须缩短光的波长和增大物镜的数值孔径。由于光学显微镜所用的照明光源是可见光（波长为 0.4~0.7  $\mu\text{m}$ ，平均为 0.55  $\mu\text{m}$ ），故必须靠增大物镜的数值孔径来提高显微镜的分辨率。

显微镜的放大效能由其数值孔径决定。数值孔径是介质的折射率与镜口角 1/2 正弦的乘积，可用公式  $NA = n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}$  表示。式中， $n$  为物镜与标本间介质的折射率； $\alpha$  为镜口角（物镜光轴上的物点发出的光线投射到物镜前透镜边缘所形成的最大夹角，图 1-3.4）。影响物镜数值孔径的因素，一是镜口角  $\alpha$ ，光投射到物镜的角度越大，显微镜的效能就越好，该角度取决于物镜的直径和焦距，是显微镜光学质量的关键。进入透镜的光线与光轴不可能成 90°角，所以  $\sin \frac{\alpha}{2}$  的最大值小于 1。实际上目前所用的油镜镜口角最大只能达到 140°，即  $\sin \frac{\alpha}{2} = \sin 70^\circ = 0.94$ 。影响数值孔径的另一个因素是介质的折射率。不同介质

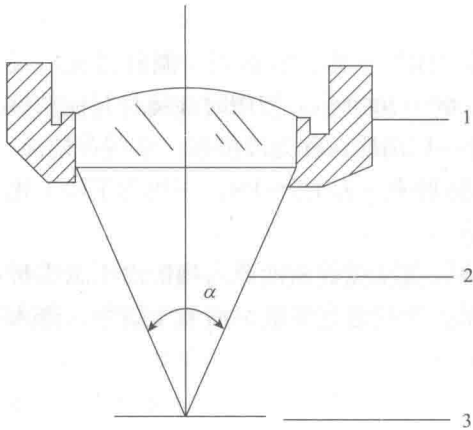


图 1-3.4 物镜的镜口角  
1. 物镜；2. 镜口角；3. 标本

的折射率不同：空气为 1.0，水为 1.33，香柏油为 1.515。因此，以空气为介质的数值孔径为 0.94，以香柏油作介质就可使数值孔径增大到 1.2~1.4。用数值孔径为 1.25 的油镜能分辨直径在 0.2  $\mu\text{m}$  以上的物体。大多数细菌直径在 0.5  $\mu\text{m}$  左右，在油镜下能看清细菌的形态及某些结构。

显微镜的总放大率是物镜放大率和目镜放大率的乘积。物镜和目镜搭配不同，其分辨率也不同，如用 40 倍的物镜 ( $\text{NA}=0.65$ ) 和 24 倍的目镜，总放大率虽有 960 倍，但其分辨率只有 0.42  $\mu\text{m}$ 。若用放大率为 90 倍的油镜 ( $\text{NA}=1.25$ ) 和 10 倍的目镜，虽然总放大率仅为 900 倍，却能分辨 0.22  $\mu\text{m}$  的物体。

### 【实验器材】

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 染色玻片标本；普通光学显微镜，显微镜灯，香柏油，二甲苯，擦镜纸等。

### 【操作步骤】

1. 调节光源 打开显微镜电源，通过底座上的光强度滑动开关调节光的强度。

调节光源时，先将光圈完全打开，上升聚光器至与载物台同高，否则使用油镜时光线较暗。然后转下低倍镜，观察光源强弱。对光时要使全视野内达到均匀的最明亮的程度。观察染色标本时光线应强；观察未染色标本时光线宜弱。可通过放大或缩小光圈、升降聚光器或旋转反光镜等调节光线。提高聚光器高度可增强视野的照明度，使用时一般都是将聚光器调到最高位置。

2. 调节聚光器数值孔径 取下一个目镜，从镜筒边观察视野，边缩放光圈，使光圈的边缘与物镜视野恰好一样大。目的是使入射光展开的角度正好符合镜口角的角度，以充分发挥物镜的分辨率，并将超过物镜所能接受的多余光挡掉，否则会发生干扰，影响清晰度。各物镜的数值孔径不同，每次转换物镜都应这样调节。

实际操作中也可根据视野亮度和标本明暗对比度调节光圈大小，不考虑聚光器数值孔径与物镜一致。只要能达到较好的效果，可根据情况灵活运用。

3. 低倍镜观察 低倍镜视野大，容易发现目标和确定检查位置，所以观察标本要先用低倍镜观察。

将金黄色葡萄球菌或枯草芽孢杆菌的染色玻片标本置于镜台上，用标本夹夹住，移动推进器使观察对象处于物镜正下方，然后从侧面注视，转动粗调节器降下低倍镜至距标本约 0.5 cm 处，由目镜观察，转动粗调节器使镜筒逐渐上升到看见物像，再转动细调节器使物像清晰。然后移动标本找到合适的目的物并将其移至视野中心，准备用高倍镜观察。

4. 高倍镜观察 一般物镜都是同焦的。轻轻转动转换器，将高倍镜转至正下方，由目镜观察，仔细调节光圈，使光线的明亮度适宜。再用细调节器调节至物像清晰，找



到适宜的观察部位并将其移至视野中心，准备用油镜观察。

#### 5. 油镜观察

- 1) 用粗调节器提高镜筒约 0.5 cm，轻轻转动转换器将高倍镜转离工作位置。
- 2) 在玻片标本的镜检部位加一滴香柏油。
- 3) 将油镜转至正下方，从侧面观察，转动粗调节器，徐徐下降镜筒，使油镜浸入香柏油中并接近玻片，切忌压及玻片，以防压碎玻片、损坏镜头。将聚光器升至最高并开足光圈。若所用聚光器的数值孔径超过 1.0，还应在聚光器与载玻片之间滴加香柏油，确保达到最大效能。

用目镜观察，进一步调节光线使视野的亮度合适，转动粗调节器缓慢地提升油镜或下降载物台至物像出现，再用细调节器调节至物像清晰。如果油镜已离开油面仍未找到物像，则有两种可能：一是油镜下降还未到位；二是油镜上升过快。必须再从侧面观察，将油镜降下，重复上述操作。应特别注意不要在下降镜头时用力过猛，或边在目镜观察，边转动粗调节器下降镜头，以免损坏玻片及镜头。

#### 6. 显微镜用毕后处理

- 1) 观察完毕，上升镜筒。先用擦镜纸擦去镜头上的香柏油，再用擦镜纸蘸少许二甲苯擦去镜头上残留的香柏油，最后用干净的擦镜纸擦去残留的二甲苯。用液体石蜡作镜油时，只用擦镜纸即可擦净。擦镜头时要顺着镜头直径向一个方向擦，不能来回或沿圆周方向擦。最后用绸布擦净显微镜的金属部件。
- 2) 清洁后将物镜转成“八”字，再向下旋到最低处。将聚光器降到最低位置。
- 3) 先轻轻擦去大部分染色玻片标本上的香柏油，再加一滴二甲苯使残留的香柏油溶解，用毛边纸轻轻压在涂片上，及时吸掉二甲苯和香柏油，以免损坏涂片。

#### 【实验报告】

1. 实验结果 绘出观察到的细菌形态，并注明物镜放大倍数和总放大倍数。
2. 思考题

- 1) 用油镜时为何要在盖片上加香柏油？加油时盖片上可否有水？为什么？
- 2) 使用油镜时应注意哪些问题？

#### 【注意事项】

1. 搬动显微镜时应右手握住镜臂。左手托住底座，使镜身保持直立，并靠近身体。切忌单手拎提、摆动，以防目镜脱落。
2. 各个镜面切忌用手或非擦镜纸涂抹，以免污染或损伤镜面。
3. 在更换标本或转换镜头时，必须将载物台略向下调低或将镜筒向上提升，以免损坏标本或镜头。转换物镜时应轻轻转动物镜转换器，切忌直接扳动镜头。
4. 用油镜应特别小心，切忌边在目镜观察边下降镜筒。
5. 用二甲苯擦镜头时量要少，且不宜久抹，以防粘合透镜的树脂溶解。显微镜金属油漆部件和塑料部件如有污垢应用软布蘸中性洗涤剂擦拭，勿用有机溶剂。

(黄君红)