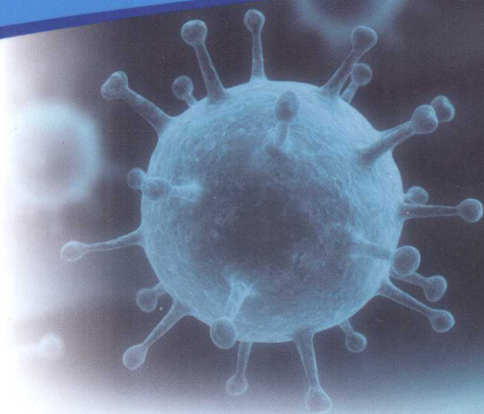


高等院校实验教程系列



微生物学

实验教程

WEISHENGWUXUE SHIYAN JIAOCHENG

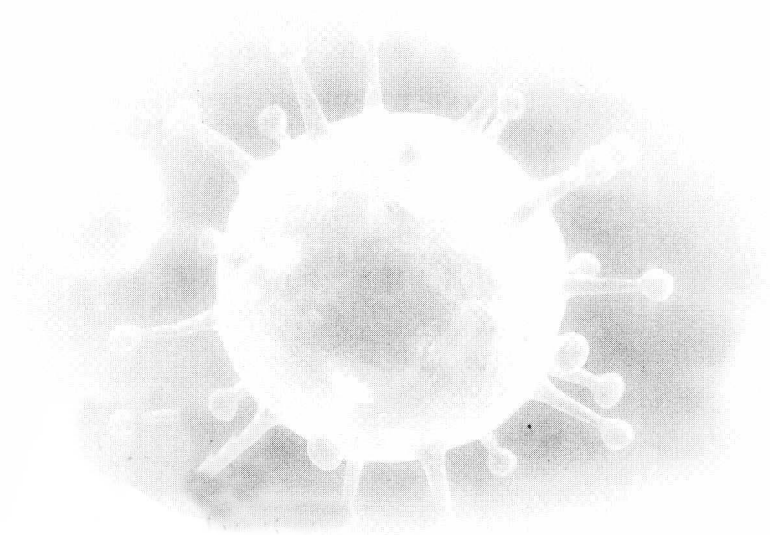
○ 张尔亮 李 维 王汉臣 主编 ○

国家一级出版社 全国百佳图书出版单位



西南师范大学出版社

新世纪高等院校实验教程系列



微生物学实验教程

WEISHENGWUXUE SHIYAN JIAOCHENG

○ 张尔亮 李 维 王汉臣 主编 ○

国家一级出版社 全国百佳图书出版单位



西南师范大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验教程/张尔亮,李维,王汉臣主编. —
重庆:西南师范大学出版社,2012.5
ISBN 978-7-5621-5734-2

I. ①微… II. ①张… ②李… ③王… 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(2012)第 072359 号

微生物学实验教程

张尔亮 李维 王汉臣 主编

责任编辑:杜珍辉

封面设计:戴永曦

照 排:李 燕

出版发行:西南师范大学出版社

重庆·北碚 邮编:400715

网址:www.xscbs.com

印 刷 者:重庆川外印务有限公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:10.75

字 数:240 千字

版 次:2012 年 6 月 第 1 版

印 次:2012 年 6 月 第 1 次印刷

书 号:ISBN 978-7-5621-5734-2

定 价:20.00 元

编委会 / BIAN WEI HUI

主 编：张尔亮 李 维 王汉臣

副主编：刘 刚 李林辉 龚明福

黎 勇 何 颖 王 丹

参 委（按姓氏笔画为序）：

王 丹（成都医学院）

王汉臣（重庆师范大学）

王 燕（乐山师范学院）

刘 刚（四川师范大学）

李林辉（西华师范大学）

李 维（四川师范大学）

张尔亮（四川师范大学）

陈希文（绵阳师范学院）

张晓渝（四川师范大学）

何 颖（四川师范大学）

殷建华（成都医学院）

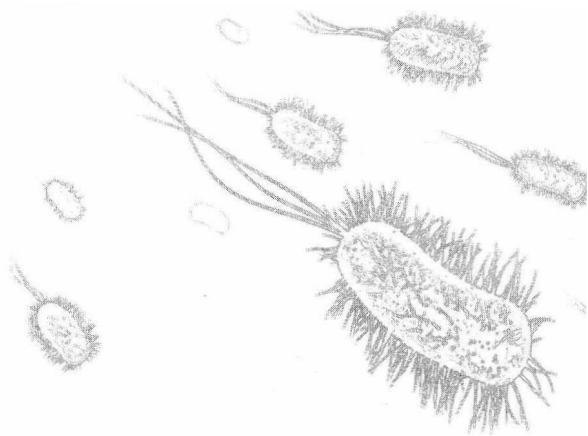
龚明福（乐山师范学院）

黄春萍（四川师范大学）

葛芳兰（四川师范大学）

黎 勇（内江师范学院）





前言 / QIAN YAN

随着素质教育的提出,实践能力和创新意识的培养已成为现代高等教育质量工程的核心内容。微生物学实验是生命科学相关专业的重要基础课程,许多新兴学科和产业,如分子生物学、分子遗传学、生物信息学和生物工程学,以及农业、食品、环境和医学等都需要微生物学实验技术的相关训练。所以开设微生物学实验课程不仅能作为微生物学理论课程的配套,更是培养学生动手能力、实践能力和创新能力的重要手段。

《微生物学实验教程》按照实验教学的需要,既符合实验的系统性,又能满足理论课教学的同步性,并尽可能反映本学科教学改革的发展方向,旨在加强学生各方面能力的锻炼,从培养学生的独立性和创造性出发,以提高学生的科学素养和实际工作能力以及发现问题、分析问题和解决问题的能力。

本书按照学生认知过程的发展规律和本学科所涉及的知识点以及创新性人才培养的要求,将实验项目分为基础性、综合性、研究性三个层次,并对其进行了整合和精选,既要以基础实验为前提,又要反映出实验教材的先进性、启发性和创新性,加强综合性、研究性实验,适当增加部分新技术,尽可能体现出基础性、应用性、拓展性和先进性,以便学生能够验证和强化微生物学的基础知识,受到微生物学基本技能和技术的训练,培养其自主性学习和研究性学习的能力。

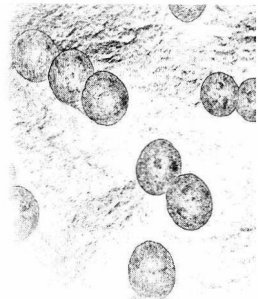
本书设三篇,共包括二十四个大实验,有的实验还含若干小实验。通过对本实验教程的学习,学生能掌握相关微生物学基础和拓展实验方面的知识和

技能,能受到相关微生物学实验系统、科学的训练,有利于学生综合素质的提高和科学思维方法的形成及创新能力的培养,为后续相关课程的学习打下良好的基础。本书适合作为高等院校生物科学与工程类、食品科学与工程类、环境科学与工程类以及农学类和医学类等本科学生的微生物学实验教材,也可供研究生、科研人员和教学人员参考。

本书由西南大学、四川师范大学、西华师范大学、重庆师范大学、乐山师范学院、内江师范学院、绵阳师范学院和成都医学院等多所院校长期从事微生物学教学和科研的教师编著。虽然所有参编人员都作了很大的努力,但由于水平有限,疏漏、错误和不足之处在所难免,恳请读者批评指正。

编者

2012年5月于四川师范大学



目 录

CONTENTS

实验的基本要求

微生物学实验须知 003

显微技术 004

实验前的准备工作 018

第一篇 基础性实验

实验 1 培养基的配制 025

实验 2 微生物的分离、纯化与培养特征 028

实验 3 细菌染色与形态观察 037

实验 4 放线菌、酵母菌和霉菌的形态观察 043

实验 5 微生物生长实验 050

实验 6 微生物的生理生化试验 057

实验 7 环境因素对微生物生长的影响 063

实验 8 常用菌种保藏方法 073

第二篇 综合性实验

实验 9 水中细菌总数和大肠菌群的测定 081

实验 10 酸乳的制作与乳酸菌的分离 087

实验 11 抗药性突变株的分离 091

实验 12 高产蛋白酶菌种的诱变选育 093

实验 13 大肠杆菌质粒 DNA 的提取和电泳检测 098

- 实验 14 酵母 RNA 的提取及组分鉴定 100
- 实验 15 大肠杆菌感受态细胞的制备与转化 102
- 实验 16 酵母菌的固定化及其乙醇发酵 104

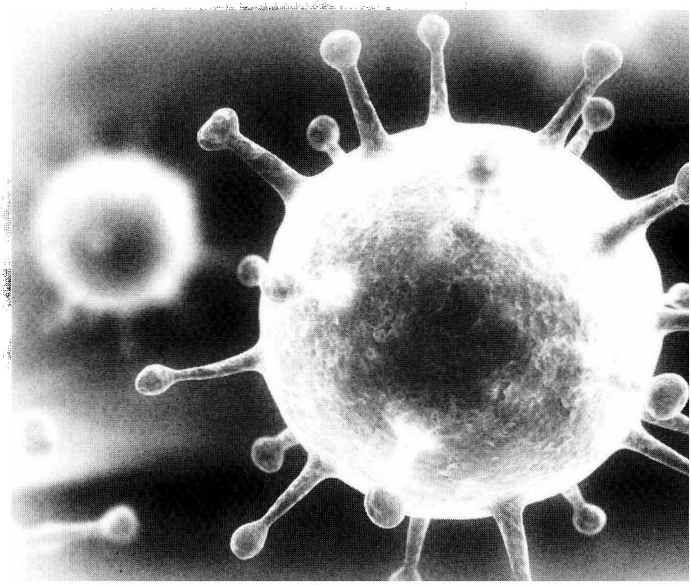
第三篇 研究性实验

- 实验 17 环境中目的微生物的分离、纯化及初步鉴定 109
- 实验 18 土壤中微生物总 DNA 的提取 119
- 实验 19 营养缺陷型菌株的筛选及鉴定 121
- 实验 20 细菌原生质体的融合 124
- 实验 21 香菇子实体多糖的提取 128
- 实验 22 细菌 16S rRNA 基因的扩增与克隆 132
- 实验 23 外源基因在大肠杆菌中的表达及其检测 136
- 实验 24 微生物培养条件的优化 139

附录

- 附录 1 教学常用菌种 145
- 附录 2 常用培养基的配制 146
- 附录 3 常用染色液的配制 156
- 附录 4 常用试剂和溶液的配制 160
- 附录 5 乳酸含量的检测和乳酸菌的镜检 163

实验的基本要求



微生物学实验须知

普通微生物学实验课的主要目的是通过实验使学生熟练掌握微生物学研究的基本方法和操作技能;加深学生对微生物学基本理论和基本知识的理解;提高学生观察、思考、分析和解决问题的能力,形成良好的实验习惯;培养学生实事求是的科学态度和严谨的工作作风。

为了保证微生物学实验课的教学质量和安全,达到上述实验教学目的,特提出如下注意事项。

(1)每次实验前须认真预习实验内容,弄清楚实验目的和实验原理以及实验的操作步骤和注意事项。

(2)在实验过程中,经常会接触到一些致病性的和非致病性的微生物,应穿戴工作衣帽;接种环、接种针等器械,用前用后必须置火焰中灼烧,以防止污染和感染。

(3)每次实验均要自己动手,认真完成每一个步骤,仔细观察实验中出现的各种现象,以科学的态度,运用理论知识认真思考和分析,及时做好实验记录。若有疑问,主动向指导教师提出,并共同分析原因。

(4)实验中需进行培养的材料,应标明自己的组别、日期等,放于指定的地点进行培养。实验室中所有菌种和物品不得随意带出实验室,若必须带出时,应严格按照规章制度操作。

(5)严格遵守实验室管理规定,勿高声谈话和随便走动,保持室内整洁、安静。

(6)酒精、丙酮等易燃药品要严格按照实验安全的要求小心使用,远离火源,电炉用完后应立即断电。

(7)对发酵罐、显微镜、天平、计数器等各种仪器设备要特别爱护,须熟悉操作规程,细心操作、保持整洁。各种仪器使用完毕后要放回原处,填好使用记录。若有损坏,应立即报告指导教师,如实反映原因,填写仪器损坏登记表。

(8)实验操作完毕后,及时清理现场和实验用具,对染菌物品进行消毒灭菌处理。

(9)实验课结束后,须以实事求是的科学态度整理实验数据,认真撰写实验报告,文字力求简明准确,并及时交指导教师批阅。

(10)离开实验室前要注意将手洗净,并关闭门窗、灯、火和气等。

(四川师范大学 李维 葛芳兰)



显微技术

显微技术(microscopy)是利用光学系统或电子光学系统设备,观察肉眼所不能分辨的微小物体形态结构及其特性的技术。

原始的光学显微镜是一个高倍率的放大镜。据记载,在 1610 年前意大利物理学家伽利略已制作过一种具有目镜、物镜和镜筒等装置的复式显微镜,用于观察昆虫的复眼。荷兰人 A. van. 列文虎克制作了不少于 247 架显微镜,观察了许多细菌、原生动物和动植物组织,他是第一个用显微镜做科学观察的人。到 18 世纪显微镜已有许多改进,应用比较普遍。

1872~1873 年,德国物理学家和数学家 E. 阿贝提出了光学显微镜的完善理论,从此,镜头的制作可按预先的科学计算进行。德国化学家 O. 肖特成功地研制出供制作透镜的优质光学玻璃。他们和德国显微镜制作家卡尔·蔡司合作,建立了蔡司光学仪器厂,于 1886 年生产出具复消色差的油镜,达到了现代光学显微镜的分辨限度。

从 19 世纪后期至 20 世纪 60 年代发展了许多类型的光学显微镜,如:偏光显微镜、暗视场显微镜、相差显微镜、干涉差显微镜、荧光显微镜。此外,还有许多特殊装置的显微镜,例如在细胞培养中特别有用的倒置显微镜。20 世纪 80 年代后期又发展了一种同焦扫描激光显微镜,结合图像处理,可以直接观察活细胞的立体图,是光学显微镜的一大进展。

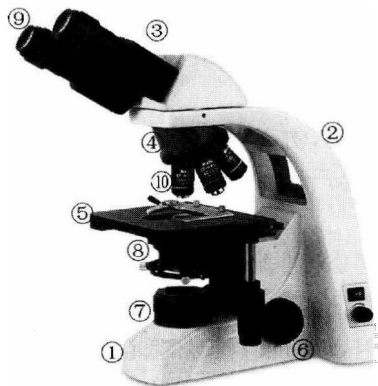


图 0-1 普通光学显微镜的构造

- ①镜座,②镜臂,③镜筒,④物镜转换器,⑤载物台,⑥调焦旋钮,⑦下聚光器,
⑧上聚光器,⑨目镜,⑩物镜

一、普通光学显微镜技术

(一) 普通光学显微镜的结构

1. 机械系统

普通光学显微镜的机械系统主要由镜座、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台、标本移动螺旋、粗调螺旋和微调螺旋等部件组成,见图 0-1。

(1)镜座:是显微镜的底座,用以支撑整个显微镜。镜座内安装有光源系统,其一端和镜臂相连。

(2)镜臂:是支撑和固定镜筒、物镜转换器、载物台及调焦螺旋的弯曲状结构,也是移动显微镜时右手握持的位置。

(3)镜筒:是显微镜最上方的圆筒状结构,其上端装入目镜,而下端则连接物镜转换器。显微镜分为单筒和双筒两种。当使用双筒显微镜观察时,可以通过调节调距装置改变镜筒之间的距离,从而适应瞳距不同的观察者。从镜筒上缘到物镜转换器螺旋口之间的距离称为机械筒长。普通光学显微镜的标准筒长被定为 160 mm,并标注于物镜上。

(4)物镜转换器:是连接于镜筒下端的圆盘状结构,可顺序安装 3~5 个物镜(低倍、高倍、油镜)。使用时可以根据需要转动转换器,将其中合适的物镜旋入光路中,从而使物镜和目镜构成放大系统。当物镜入位时,可以听到“咔”的一声清脆响声。

(5)载物台:固定于镜臂上的方形平台(圆形的平台往往更贵,其常可以同轴旋转),并位于物镜转换器下方。载物台中央开孔,来自下方的光线可以通过此孔照射到标本上。载物台台面上安装有玻片标本夹,用于固定玻片标本。载物台侧下面安装有两个标本夹移动旋钮,分别控制标本夹的前后和左右移动,便于观察标本上的任意位置。标本夹滑动的横向和纵向齿条上刻有刻度,以此构成精密的平面坐标系。观察时可以通过该游标尺记录下观察对象的坐标位置,从而可以实现重复观察。

(6)调焦旋钮:安装于镜臂两侧下端,左右对称各一套,用于调节物镜和标本的距离,使清晰的物像呈现于视野之中。调焦旋钮分为粗调旋钮和微调旋钮两种。旋转粗调螺旋会使载物台以较大幅度和较快速度升降。调到焦点附近时微调旋钮,微调旋钮每旋转一圈镜筒只会移动 0.1 mm,便于调节出清晰的物像。通常先用粗调旋钮调焦找到模糊的物像,然后再用微调旋钮使物像清晰。

2. 光学系统

普通光学显微镜的光学系统主要由光源、聚光器、光圈、物镜、目镜等部件组成(图 0-2)。

(1) 光源

在显微镜的镜座中央安装有灯泡,提供观察所需的光。在镜座周侧有电源开关和控



制灯泡亮度的旋钮。

(2) 聚光器

聚光器位于载物台下方,能将光源射来的光线会聚起来,集中于标本上,增强对标本的照明,也增强了视野的亮度。在聚光器的旁边,有一调节螺旋,旋动它可以使聚光器上下移动,用于调节光线的强弱。向上移动聚光器可使光亮度增强,反之则减弱。

(3) 光圈

光圈也称虹彩光阑或孔径光阑,由十几张金属薄片组成,通过推动其外侧伸出的小柄来调节孔径的大小,从而控制进入聚光器的光束大小。有些显微镜的光圈下方还安装有放置滤光片的支架,可以根据需要放入不同颜色的滤光玻片。

(4) 目镜

放置在镜筒的上端,又称为接目镜。每个目镜由两块透镜组成,上面一块称为接目透镜,下面一块称为会聚透镜。在上下透镜之间,或在会聚透镜的下端安装有金属制成的环状光阑,称为视场光阑。物镜所放大的实像便落在视场光阑的面上。在这个视场光阑的面上还可以安装目镜测微尺。目镜的放大倍数一般为“ $5\times$ ”、“ $10\times$ ”和“ $15\times$ ”,最常用的是“ $10\times$ ”目镜。显微镜的总放大倍数是目镜的放大倍数和物镜的放大倍数的乘积。

(5) 物镜

安装在镜筒下端的物镜转换器上,又称为接物镜。每台普通光学显微镜一般配置有3~4个不同放大倍数的物镜。根据物镜与标本之间的介质不同,物镜分为干燥系物镜和油浸系物镜。介质为空气(折光率 $n=1$)的物镜,即为干燥系物镜,包括低倍镜和高倍镜。介质为香柏油(折光率 $n=1.51$)的物镜,即为油浸系物镜,也称为油镜。香柏油的折光率和玻璃的折光率($n=1.52$)近似。油镜的镜头上标有“oil”,下端边缘刻有黑圈,以区别于干燥系物镜。油镜在使用时需要将镜头顶端浸入滴加在覆盖标本的盖玻片上的香柏油中,方能得到清晰物像。物镜的性能参数被标注在镜头侧面,主要有放大倍数和数值孔径(NA),例如 $10/0.25$ 、 $40/0.65$ 、 $100/1.25$ 等等。常用的低倍镜放大倍数有“ $10\times$ ”、“ $20\times$ ”,高倍镜放大倍数有“ $40\times$ ”、“ $45\times$ ”,油镜放大倍数有“ $90\times$ ”、“ $100\times$ ”。数值孔径是物镜与标本介质折射率和物镜镜口角 α 的一半的正弦的乘积($NA = n \cdot \sin(\alpha/2)$)。数值孔径的数值越大,镜头分辨率越高。

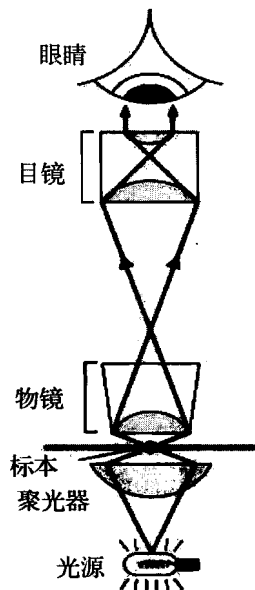


图 0-2 普通光学显微镜的光学系统

(二)普通光学显微镜的成像原理

普通光学显微镜通过目镜和物镜两组透镜系统来放大成像,因此又称为复式显微镜。标本(O)通过物镜(L_1)形成放大倒立的实像(I_1);目镜(L_2)对实像(I_1)再次放大,在明视距离(虚像 I_2 和眼睛的距离为显微镜的明视距离)处形成一个与标本像相反的放大虚像(I_2)。人眼通过显微镜看到的像就是由标本 O 放大的虚像 I_2 ,见图 0-3。

(三)显微镜的性能

1. 放大倍数

标本通过显微镜的放大倍数(V)是物镜放大倍数(V_1)和目镜放大倍数(V_2)的乘积,即: $V = V_1 \cdot V_2$ 。例如,物镜放大 40 倍,目镜放大 10 倍,则总放大倍数为 400 倍。

2. 数值孔径

数值孔径又称镜口率,是物镜与标本介质折射率和物镜镜口角 α 的一半的正弦的乘积,简称 NA 。

计算公式: $NA = n \cdot \sin(\alpha/2)$, NA 为数值孔径值, n 为物镜和标本间的介质折射率, α 为物镜镜口角。

3. 分辨率

显微镜的分辨率是指显微镜能辨别两点之间的最小距离的能力,可表示为:

$$R = \lambda / 2NA = \lambda / 2n \sin(\alpha/2)$$

式中: R 为分辨率, λ 为光波波长, NA 为物镜的数值孔径值, n 为介质折射率, α 为物镜镜口角。

日光的波长 $\lambda = 0.5607 \mu\text{m} \approx 0.6 \mu\text{m}$, 若物镜的 $NA = 1.4$, 则 $R = 0.6/2 \times 1.4 = 0.22 \mu\text{m}$ 。

4. 工作距离

工作距离指观察标本最清晰时,物镜的透镜下表面与盖玻片上表面之间的最短距离。物镜的放大倍数越大,其工作距离越短。油镜的工作距离约为 0.2 mm 。

5. 焦点深度

焦点深度简称焦深,指通过显微镜观察标本时有一个最清晰的物像,这个物像处于被称为目的面的像面上。在目的面上下一定距离内,还可以看见模糊的物像,这个距离被称为焦点深度。物镜的焦点深度和数值孔径以及放大倍数成反比。

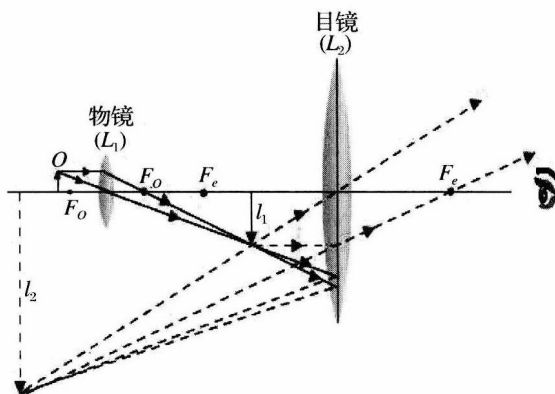


图 0-3 普通光学显微镜的成像原理



(四) 油镜的工作原理

当使用高倍镜不能观察到微生物的清晰物像时,就需要使用油镜。与低倍镜和高倍镜相比,油镜在使用时必须要在盖玻片和镜头之间滴加镜头油,例如香柏油。

油镜的工作原理(见图 0-4),主要有以下两点。

1. 增加光照强度

空气的折射率为 1,玻璃的折射率为 1.52。当盖玻片与油镜镜头之间的介质为空气时,因为空气和玻璃的介质密度差异较大,所以透过盖玻片进入空气的光线会发生折射,从而导致进入镜头的光线较少。视野的光照强度不够,物像也就不清晰了。为了使透过盖玻片的光线在进入镜头前尽量减少损失,就需要在盖玻片和油镜镜头之间滴加和玻璃折射率相近的介质。通常使用香柏油(折射率为 1.51)、液体石蜡(折射率为 1.48),与玻璃的折射率相似。

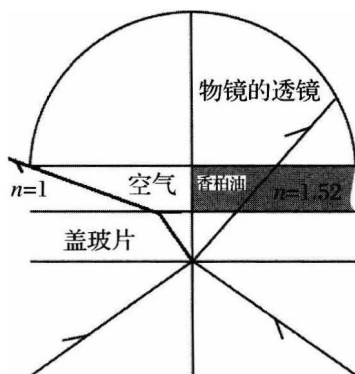


图 0-4 油镜的工作原理

2. 增加显微镜的分辨率

显微镜的分辨率是指显微镜能辨别两点之间的最小距离的能力,可表示为:

$$\text{分辨率} = \lambda / 2NA, NA = n \cdot \sin(\alpha/2)$$

式中: λ 为光波波长,NA 为物镜的数值孔径值, n 为介质折射率, α 为物镜镜口角。

光波波长和物镜镜口角不变,但标本和镜头之间的介质可以发生改变。香柏油的折射率比空气大,从而使油镜的数值孔径值高于低倍镜与高倍镜,其分辨率也相应提高,可以达到 $0.2 \mu\text{m}$ 。

(五) 普通光学显微镜的操作

1. 观察前准备

(1) 显微镜放置

将显微镜从存放柜中拿出,右手紧握镜臂,左手托着镜座,将显微镜竖立着搬移到实验台上。显微镜通常被放置于观察者的左前方,离实验台边缘大约 10 cm。观察者右前方放实验记录册,便于记录观察结果。

(2) 选择物镜

电源线插头接上插座后,打开显微镜的电源开关,旋转物镜转换器,将低倍镜($10\times$)转入光路之中。

(3)光源调节

将虹彩光圈开到最大位置,同时上升聚光器。一边用左眼观察目镜中视野的亮度,一边调节控制光源灯泡亮度的旋钮,直到视野中光亮强度适宜为止。

(4)目镜间距调节

由于观察者双眼间距不同,所以在观察前需要调节目镜间距,以使双眼看到的两个视野重叠为一个,从而防止观察疲劳。调节时,一边用双手移动目镜镜筒,一边观察左右视野是否重叠为一个。

(5)聚光器调节

调节聚光器,使虹彩光圈值与物镜的数值孔径值相一致。在标本聚焦后,将目镜取下,关闭虹彩光圈,然后慢慢打开,使光圈的边缘和物镜边缘黑圈正好相切,以便充分发挥物镜的分辨力。放大倍数不同的物镜,其数值孔径值也不同,因此每转换一次物镜都需要进行类似调节,从而更好地观察标本。

2. 标本观察

(1)放置标本

旋转粗调螺旋,下降载物台。将玻片标本的盖玻片一面朝上,放入载物台上的标本夹中夹住。然后旋转标本夹移动螺旋,可以控制标本的前后左右移动,从而将观察区域移入光路中,处于物镜的正下方,以便后续观察。

(2)低倍镜观察

观察标本时,先用低倍镜,再用高倍镜,最后才使用油镜。使用低倍镜,可以看到较大的视野,容易发现观察对象所处位置。

将头偏向右侧,双眼观察载物台和物镜的距离,避免载物台上升过快过猛而造成镜头压碎标本片。用手旋转粗调螺旋,使载物台上升,直至物镜和玻片标本距离约为10 mm处。然后双眼观察目镜,缓慢转动粗调螺旋,使载物台继续上升,直到视野中出现模糊的物像。最后转动微调螺旋,使物像清晰。旋动标本夹移动螺旋,寻找比较典型的观察对象。

(3)高倍镜观察

转动物镜转换器,将高倍镜置入光路中。操作时,将头偏向右侧,双眼观察载物台和物镜的距离,以防止高倍镜头与玻片碰撞。观察目镜,通常会看到一个模糊的物像,此时调节微调螺旋,便可得到清晰的物像。如果视野光照强度不够,可调节光源旋钮。更换玻片标本则需先降下载物台后方可操作。

(4)油镜观察

旋转粗调螺旋,降下载物台。转动物镜转换器,使高倍镜离开光路。在需要观察的盖玻片上滴加一滴香柏油,然后将油镜转入光路中。头偏向右侧,一边观察载物台和物镜的距离,一边旋动粗调螺旋上升载物台,使油镜镜头浸入香柏油中,几乎接触到玻片标本。观察目镜,缓慢旋转粗调螺旋,使载物台下降,当物像出现后改用微调螺旋调节,直至物像清晰。