



GAODENG XUEXIAO ZHUANYE JIAOCAI

• 高等学校专业教材 •

微生物学 实验技术

杜连祥 路福平 主编



中国轻工业出版社

ZHONGGUO QINGGONGYE CHUBANSHE

高等学校专业教材

微生物学实验技术

杜连祥 路福平 主编

参加编写人员（按姓氏笔画排列）

王素英 王海宽 王敏 杜冰 杜连祥
吴琼 肖静 张鹭 俞海清 顾晓波
戚薇 童应凯 路福平 黎明

 中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学实验技术/杜连祥, 路福平主编. —北京:
中国轻工业出版社, 2006. 9

高等学校专业教材

ISBN 7-5019-5007-5

I. 微... II. ①杜...②路... 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 (2005) 第 078328 号

责任编辑: 白 洁 李海燕

策划编辑: 白 洁 责任终审: 劳国强 封面设计: 刘 鹏

版式设计: 马金路 责任校对: 燕 杰 责任监印: 胡 兵

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印 刷: 利森达印务有限公司

经 销: 各地新华书店

版 次: 2006 年 9 月第 1 版第 2 次印刷

开 本: 787×1092 1/16 印张: 24.75

字 数: 565 千字

书 号: ISBN 7-5019-5007-5/Q·025 定价: 28.00 元

读者服务部邮购热线电话: 010—65241695 85111729 传真: 85111730

发行电话: 010—85119817 65128898 传真: 85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社读者服务部联系调换

60844J4C102ZBW

前 言

随着工业生物技术的迅猛发展,作为专业基础知识的微生物学理论和实验手段也在不断改进、加深和拓宽,正在快速渗透到生物学的各个领域。为了更好地掌握生物技术知识,从事相关领域的基础和应用研究,微生物学实验技术是必不可少的敲门砖。

本书取材来源于大量微生物学实验的经典资料,内容不仅涉及到传统的微生物形态、生理生化、菌种分离、生长代谢以及诱变育种等手段,而且将微生物学近年来的许多新技能应用到实验中,包括现代免疫检测技术、细胞及分子水平的微生物育种等。

考虑到本书作为教材,为了便于学生学习和掌握最基本的微生物学实验技术,同时能了解本领域的相关知识,拓宽学生知识面,全书分成两部分,第一部分是针对微生物学教材内容,帮助学生了解微生物知识,列举了经典的微生物学实验内容,包括四大类微生物的接种、培养和形态观察、噬菌体的分离、细菌生理生化、自然界中菌种的筛选、传统诱变技术、有性杂交,以及微生物学研究中最基本的遗传标记营养缺陷型的制作,分子生物学中最常用的 DNA 提取和微生物转化、转导等技术,可作为大学本科生微生物实验课的内容。第一部分共设 26 个实验,任课教师可根据学校具体情况从中选择部分开设实验。第二部分是内容面较宽的微生物实验原理和技术,包括 15 章,190 个实验,可以作为大学生、研究生以及从事微生物研究工作的人员参考。

本书第一部分由天津科技大学的杜连祥、路福平教授和仲恺农业技术学院的杜冰老师编写。第二部分各章节编写人员及单位如下:

天津农学院:童应凯(第一、三、九章)

天津商学院:王素英(第十三章)

山东轻工业学院:吴琼(第四章、附录)

齐齐哈尔大学:张鹭(第六、七章)、肖静(第二、十五章)

天津科技大学:王敏(第八章)、戚薇(第十四章)、黎明(第十一、十二章)、

王海宽(第十章)、顾晓波(第五章)

南开大学:俞海清(第五章)

本书由天津科技大学生物工程学院杜连祥教授和路福平教授负责统稿和审校。

天津师范大学的孙建华博士、天津科技大学的张燕博士对教材的部分内容进行了审阅,并提出许多宝贵意见。天津科技大学应用微生物研究室的各位老师和研究生在教材资料收集和整理方面也给予了大力支持,在此一并表示衷心的感谢。

虽然参加编写的各位老师都是多年从事微生物学及实验教学和科研的工作人员,但是由于微生物学实验技术的发展迅速,自身知识的提高有限,书中错误难免,敬请读者批评指正。

编 者

目 录

第一部分 基础微生物学实验技术

实验一 普通光学显微镜的结构与使用	(1)
实验二 培养基的配制与灭菌	(4)
实验三 微生物接种技术与细菌的接种和培养	(7)
实验四 细菌染色与形态观察	(12)
实验五 细菌的芽孢染色与观察	(15)
实验六 放线菌的接种与形态观察	(15)
实验七 酵母菌培养、水浸片制备与形态观察	(16)
实验八 酵母菌活体染色观察及死亡率的测定	(18)
实验九 酵母菌细胞大小及体积的测定	(18)
实验十 酵母菌细胞计数和出芽率的测定	(20)
实验十一 酵母菌子囊孢子的形成与观察	(22)
实验十二 霉菌培养与形态观察	(23)
实验十三 细菌的生理生化实验	(25)
实验十四 细菌菌落总数的测定	(31)
实验十五 大肠菌群的测定	(33)
实验十六 物理因素对微生物生长的影响	(36)
实验十七 化学因素对微生物生长的影响	(37)
实验十八 产蛋白酶的枯草芽孢杆菌的分离	(38)
实验十九 溶源性菌株的检查及噬菌斑的观察	(39)
实验二十 大肠杆菌半乳糖基因高频转导	(40)
实验二十一 紫外线诱变育种——绘制细胞存活率和突变率曲线	(42)
实验二十二 枯草杆菌营养缺陷型突变遗传标记的制作	(44)
实验二十三 大肠杆菌质粒 DNA 的快速提取及琼脂糖凝胶电泳	(46)
实验二十四 大肠杆菌的遗传转化	(48)
实验二十五 异宗接合型酵母菌的杂交实验	(49)
实验二十六 微生物菌种保藏实验	(50)

第二部分 应用微生物学实验技术

第一章 显微技术	(51)
第一节 暗视野显微镜的使用	(51)
实验 1.1 暗视野显微镜使用举例——细菌运动的观察	(52)
第二节 相差显微镜的使用	(52)
实验 1.2 相差显微镜使用举例——酿酒酵母细胞内部结构的观察	(53)
第三节 荧光显微镜的使用	(54)
实验 1.3 荧光显微镜使用举例——抗酸细菌的观察	(55)
第四节 电子显微镜的使用	(55)
一、透射电子显微镜 (Transmission Electron Microscope, TEM)	(56)
二、扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM)	(56)
三、扫描透射电镜 (Scanning Transmission Electron Microscope, STEM)	(57)
四、扫描隧道显微镜 (Scanning Tunneling Microscope, STM)	(58)
实验 1.4 电子显微镜的使用举例——电子显微镜样品的制备与观察	(58)
第五节 其它显微镜介绍	(61)
一、偏光显微镜	(61)

二、紫外光显微镜	(61)
三、激光扫描共聚焦显微镜	(61)
四、微分干涉差显微镜	(62)
五、多光子荧光显微镜	(62)
六、电镜 X 射线微区分析技术	(62)
第二章 消毒、灭菌及除菌技术	(62)
第一节 物理因素除菌的种类及方法	(63)
一、加热除菌	(63)
二、过滤除菌	(67)
三、辐射除菌	(70)
四、超声除菌	(71)
五、微波除菌	(71)
六、低温等离子除菌	(72)
第二节 化学药物的消毒与灭菌	(72)
一、优良消毒剂和防腐剂的特点	(72)
二、化学药物的灭菌原理	(72)
三、化学消毒剂的种类和应用形式	(73)
四、常用消毒剂的使用和灭菌原理	(73)
五、影响消毒剂作用的因素	(77)
六、消毒剂的使用原则	(78)
第三节 各类培养基常采用的灭菌方法及注意事项	(78)
一、各类培养基采用的灭菌方法	(78)
二、培养基灭菌的注意事项	(78)
第四节 无菌室和曲室的消毒与灭菌	(79)
一、福尔马林加热熏蒸	(79)
二、氧化熏蒸	(79)
三、硫熏蒸	(79)
第三章 微生物接种与培养技术	(80)
第一节 微生物的培养技术	(80)
一、好氧性微生物培养方法	(80)
二、厌氧微生物培养方法	(81)
实验 3.1 丙酮丁醇梭状芽孢杆菌的厌氧培养	(84)
第二节 连续培养技术	(86)
第三节 同步培养技术	(87)
实验 3.2 选择法获得同步生长酵母细胞的实验技术	(88)
实验 3.3 诱导法获得霉菌分生孢子同步生长的实验技术	(89)
第四节 透析培养技术	(89)
实验 3.4 乳酸杆菌与酵母菌的透析培养	(91)
第五节 高密度培养技术	(91)
实验 3.5 产乳球菌素的乳酸乳球菌的膜过滤培养	(92)
第六节 原位分离培养技术	(93)
实验 3.6 酿酒酵母酒精发酵的原位分离培养技术	(94)
第七节 补料分批培养技术	(94)
实验 3.7 产杆菌肽地衣芽孢杆菌的补料分批培养	(95)
第八节 固体发酵技术	(96)
实验 3.8 植酸酶的固体发酵	(97)

实验 3.9 霉菌的栽培技术举例——白灵菇的栽培	(97)
第四章 染色技术及微生物细胞结构观察	(99)
第一节 染色技术	(99)
一、染色的基本原理	(99)
二、染料种类及选择	(99)
三、制片与染色	(101)
四、活体染色	(101)
实验 4.1 酵母的负染色法	(102)
实验 4.2 真菌的荧光染色与观察	(103)
实验 4.3 细菌的抗酸性染色法	(103)
第二节 微生物细胞结构的观察	(104)
实验 4.4 细菌细胞壁染色观察	(104)
实验 4.5 细菌荚膜的染色与观察	(105)
实验 4.6 细菌鞭毛的染色与观察	(105)
实验 4.7 微生物细胞核的染色与观察	(106)
实验 4.8 微生物细胞中异染粒的染色与观察	(107)
实验 4.9 酵母细胞内脂肪粒的染色与观察	(107)
实验 4.10 酵母细胞内肝糖粒的染色与观察	(108)
实验 4.11 酵母细胞中液泡的活体染色与观察	(108)
实验 4.12 酵母细胞线粒体的活体染色与观察	(108)
实验 4.13 毛霉菌的琼脂槽培养法染色与观察	(109)
第五章 微生物生长控制	(109)
第一节 生物量测定	(109)
一、测生长量	(109)
二、计繁殖数	(110)
第二节 生长曲线测定	(111)
实验 5.1 OD 值法测定大肠杆菌肉汤培养基中的生长曲线	(111)
实验 5.2 平板计数法测定酿酒酵母的生长曲线	(112)
实验 5.3 菌丝重量法测定丝状真菌的生长曲线	(114)
实验 5.4 核酸测定法绘制生长曲线	(115)
第三节 微生物生长代谢影响因素的测定	(116)
实验 5.5 营养因素对微生物生长的影响	(116)
实验 5.6 接种量对微生物生长的影响	(117)
实验 5.7 种龄对微生物生长的影响	(117)
实验 5.8 温度对微生物生长和代谢的影响	(118)
实验 5.9 pH 对微生物生长的影响	(119)
实验 5.10 溶解氧对微生物生长的影响	(120)
实验 5.11 表面活性剂对微生物生长和代谢的影响	(121)
第六章 微生物纯种分离技术	(122)
第一节 选择培养技术	(122)
一、分离样品的来源	(122)
二、培养条件的控制	(122)
第二节 纯种分离技术	(123)
一、简单平板分离法	(123)
二、稀释倾注分离法	(123)
三、毛细管分离法	(124)

四、小滴分离法	(124)
五、显微操纵单细胞分离技术	(124)
第三节 菌种分离纯化的步骤	(125)
一、新种分离与筛选的方法步骤	(125)
二、纯种的鉴定	(126)
第四节 细菌的分离	(127)
实验 6.1 乳酸菌的分离	(127)
实验 6.2 酸乳制品中乳酸菌的分离	(128)
实验 6.3 分解脂肪的细菌的分离	(128)
实验 6.4 水解淀粉的细菌的分离	(129)
实验 6.5 醋酸菌的分离	(130)
实验 6.6 己酸菌的分离	(130)
实验 6.7 固氮菌的分离	(131)
实验 6.8 嗜盐菌的分离	(132)
实验 6.9 硝化细菌的分离测定	(134)
实验 6.10 反硝化细菌的分离	(135)
实验 6.11 谷氨酸产生菌的分离	(136)
实验 6.12 甲烷代谢菌的分离	(137)
实验 6.13 双歧杆菌的分离	(140)
第五节 放线菌的分离	(144)
实验 6.14 弹土分离法分离金色链霉菌	(144)
实验 6.15 诺卡氏菌的分离	(145)
实验 6.16 稀有放线菌的分离	(146)
第六节 酵母的分离	(147)
实验 6.17 酒曲中酵母菌的分离	(147)
实验 6.18 耐双乙酰啤酒酵母的分离	(147)
实验 6.19 耐二氧化硫葡萄酒酵母的分离	(148)
实验 6.20 果汁中水解柠檬酸的酵母菌的分离	(149)
第七节 霉菌的分离	(149)
实验 6.21 水解蛋白的毛霉的分离	(149)
实验 6.22 根霉菌的分离	(150)
实验 6.23 产糖化酶的黑曲霉的分离	(150)
实验 6.24 产柠檬酸黑曲霉的分离	(151)
第八节 噬菌体的分离	(152)
实验 6.25 烈性噬菌体的分离	(152)
实验 6.26 高效价噬菌体裂解液的制备	(152)
实验 6.27 枯草芽孢杆菌溶源性菌的检查	(154)
第七章 微生物生理生化试验	(154)
第一节 细菌的生理生化实验	(155)
实验 7.1 β -半乳糖苷酶试验	(155)
实验 7.2 含碳化合物的利用试验	(155)
实验 7.3 丙二酸盐试验	(155)
实验 7.4 葡萄糖铵试验	(156)
实验 7.5 氰化钾试验	(156)
实验 7.6 动力试验	(157)
实验 7.7 血清学玻片凝集试验	(157)

实验 7.8	溶血性试验	(158)
实验 7.9	耐盐性试验	(158)
实验 7.10	酪蛋白分解试验	(159)
实验 7.11	氨基酸脱羧酶试验	(159)
实验 7.12	尿素酶试验	(160)
实验 7.13	氧化酶试验	(160)
实验 7.14	细胞色素氧化酶试验	(161)
实验 7.15	过氧化氢酶试验	(161)
实验 7.16	TTC 试验	(161)
实验 7.17	卵磷脂酶试验	(162)
实验 7.18	苯丙氨酸脱氨酶试验	(162)
实验 7.19	链激酶试验	(162)
实验 7.20	马尿酸钠水解试验	(163)
实验 7.21	杆菌肽敏感试验	(163)
实验 7.22	淀粉水解试验	(164)
实验 7.23	精氨酸双水解酶的测定试验	(164)
第二节	放线菌的生理生化实验	(165)
实验 7.24	放线菌的生理生化实验	(165)
第三节	酵母的生理生化实验	(165)
实验 7.25	糖类发酵试验	(165)
实验 7.26	碳源同化试验	(166)
实验 7.27	氮源同化试验	(167)
实验 7.28	分解杨梅苷的测定	(167)
实验 7.29	类淀粉化合物形成的测定	(167)
实验 7.30	产酯试验	(168)
实验 7.31	分解脂肪试验	(168)
实验 7.32	产酸测定	(168)
实验 7.33	石蕊牛乳反应	(169)
实验 7.34	明胶液化试验	(169)
实验 7.35	尿素分解试验	(169)
实验 7.36	啤酒酵母发酵力的测定	(170)
实验 7.37	酵母菌热死温度的测定	(171)
实验 7.38	酵母菌凝集力的测定	(172)
实验 7.39	酵母菌耐酒精能力的测定	(172)
实验 7.40	酵母生孢子能力的测定	(172)
实验 7.41	霉菌产酸试验	(173)
第八章	微生物诱变育种实验	(173)
第一节	诱变育种中的几个问题	(174)
一、	出发菌株的选择	(174)
二、	细胞悬浮液的制备	(174)
三、	诱变剂的选择及处理方法的选择	(175)
四、	中间培养	(178)
五、	突变型菌株的分离	(178)
第二节	突变型菌株的分离	(183)
实验 8.1	抗反馈调节突变株赖氨酸高产菌株的筛选	(183)
实验 8.2	抗生素效价的生物测定(管碟法)	(184)

实验 8.3 耐高浓度自身代谢产物的抗反馈抑制突变型卡那霉素高产菌株的选育	(186)
实验 8.4 大肠杆菌链霉素抗性标记的制作	(187)
实验 8.5 酿酒酵母呼吸缺失突变株的选育	(188)
实验 8.6 酱油曲霉温度敏感型突变株的选育	(189)
第九章 微生物细胞水平基因重组育种	(190)
第一节 细菌的转化	(190)
实验 9.1 枯草杆菌质粒 DNA 的提取	(192)
实验 9.2 地衣芽孢杆菌染色体 DNA 的提取	(193)
实验 9.3 枯草杆菌染色体 DNA 的转化	(194)
实验 9.4 枯草杆菌原生质体的转化	(195)
第二节 细菌的转导	(196)
实验 9.5 枯草杆菌噬菌体的普遍转导	(197)
第三节 细菌的接合	(198)
实验 9.6 大肠杆菌 Hfr 品系的建立	(199)
实验 9.7 大肠杆菌的接合	(200)
第四节 酵母菌的杂交育种	(202)
一、酵母的生活史	(202)
二、酵母有性杂交技术	(203)
实验 9.8 糖化酵母单倍体细胞分离与遗传标记制作	(204)
实验 9.9 同宗接合型酵母株的杂交	(206)
实验 9.10 应用多次回交法选育嗜杀清酒酵母株	(207)
第五节 霉菌的杂交育种	(208)
一、霉菌的准性生殖过程	(208)
二、霉菌的杂交育种	(209)
第六节 微生物细胞融合技术	(210)
实验 9.11 细菌原生质体细胞融合	(214)
实验 9.12 酵母菌原生质体细胞融合	(215)
实验 9.13 利用核融合缺陷细胞融合法选育嗜杀葡萄酒酵母菌株	(216)
实验 9.14 应用原生质体细胞融合技术选育酱油曲霉	(220)
实验 9.15 电诱导酵母菌与短梗霉属属间融合	(221)
第十章 基因工程育种	(222)
第一节 概述	(222)
一、重组 DNA 中常用的工具酶	(222)
二、载体-宿主系统	(223)
第二节 基因工程基本操作步骤	(223)
一、目的基因的获取	(223)
二、DNA 分子的体外连接	(223)
三、重组 DNA 导入宿主菌	(224)
四、重组克隆的筛选与鉴定	(224)
第三节 生物信息数据库与查询	(225)
一、概述	(225)
二、生物信息数据库与查询	(225)
实验 10.1 酵母菌 DNA 的提取及检测	(227)
实验 10.2 丝状真菌总 RNA 的提取及检测	(229)
实验 10.3 PCR 方法获得微生物的目的基因	(230)
实验 10.4 RT-PCR 获得真核生物的目的基因	(232)

实验 10.5 利用标记的探针获得目的基因	(234)
实验 10.6 体外基因重组及在大肠杆菌中的克隆	(235)
实验 10.7 原核表达载体构建及在宿主中表达	(238)
实验 10.8 真核表达载体构建及在宿主中表达	(239)
实验 10.9 mRNA 差别显示技术	(241)
实验 10.10 微生物 cDNA 文库构建技术	(244)
实验 10.11 PCR 定点突变技术改造微生物菌种	(247)
实验 10.12 丝状真菌的转化技术	(248)
第十一章 分子杂交技术	(249)
第一节 核酸探针的种类与标记方法	(249)
一、核酸探针的种类	(249)
二、核酸探针的标记和检测	(250)
实验 11.1 用切口平移法标记双链 DNA 探针	(252)
实验 11.2 随机引物延伸法进行纯化 DNA 片段的放射性标记	(253)
实验 11.3 利用聚合酶链反应制备放射性标记的 DNA 探针	(255)
实验 11.4 从 RNA 合成单链 cDNA 探针	(256)
第二节 核酸分子杂交类型	(257)
一、固相核酸分子杂交类型	(257)
二、液相核酸分子杂交类型	(260)
第三节 分子杂交基本操作步骤和杂交实验因素的优化	(261)
一、固相膜核酸分子杂交方法	(261)
二、核酸分子杂交实验因素的优化	(261)
实验 11.5 Southern 杂交实验	(263)
实验 11.6 Northern 杂交实验	(265)
第十二章 微生物免疫及现代检测技术	(269)
第一节 抗体的制备	(269)
实验 12.1 乳化抗原的制备	(270)
实验 12.2 抗血清的制备	(271)
实验 12.3 杂交瘤与单克隆抗体的制备	(273)
第二节 抗体的纯化	(277)
实验 12.4 抗血清中 IgG 的分离与纯化	(277)
第三节 凝集反应试验方法	(278)
实验 12.5 玻片凝集反应试验	(278)
第四节 沉淀反应检测方法	(279)
实验 12.6 单向琼脂扩散试验	(279)
第五节 酶联免疫吸附技术	(280)
实验 12.7 夹心 ELISA 测定乙型肝炎表面抗原的实验	(281)
第六节 免疫胶体金技术	(283)
实验 12.8 免疫金银染色法	(283)
第七节 免疫印迹	(285)
实验 12.9 免疫印迹	(285)
第十三章 微生物分类技术	(288)
实验 13.1 热变性温度法测定 GC 含量	(288)
实验 13.2 原核微生物 16S rRNA 基因的分离及序列分析	(289)
实验 13.3 真核微生物 18S rRNA 基因的分离及序列分析	(291)
实验 13.4 DNA 杂合法在分类中的应用	(292)

实验 13.5 细胞壁成分分析在分类中的应用	(293)
实验 13.6 红外吸收光谱法在微生物分类中的应用	(294)
实验 13.7 利用微生物快速测定仪对微生物进行分类	(295)
第十四章 食品卫生微生物学检测	(296)
第一节 总则	(296)
一、采样用具	(296)
二、样品的采集	(296)
三、送检	(299)
四、检验	(299)
第二节 各类微生物检验法	(299)
实验 14.1 沙门氏菌属 (<i>Salmonella</i>) 的检验	(300)
实验 14.2 志贺氏菌属 (<i>Shigella</i>) 的检验	(309)
实验 14.3 致泻大肠埃希氏菌 (<i>Diarrheogenic Escherichia coli</i>) 的检验	(312)
实验 14.4 副溶血性弧菌 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>) 的检验	(315)
实验 14.5 小肠结肠炎耶尔森氏菌 (<i>Yersinia enterocolitica</i>) 的检验	(318)
实验 14.6 金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) 的检验	(320)
实验 14.7 溶血性链球菌 (<i>Streptococcus hemolyticus</i>) 的检验	(321)
实验 14.8 肉毒梭菌 (<i>Clostridium botulinum</i>) 及肉毒毒素的检验	(323)
实验 14.9 蜡样芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>) 的检验	(325)
实验 14.10 霉菌和酵母的计数	(328)
第三节 食品加工和发酵生产环境的卫生学检验	(330)
实验 14.11 水的细菌学检验	(330)
实验 14.11 (1) 水中细菌总数的测定	(330)
实验 14.11 (2) 多管发酵法测定水中大肠菌群	(331)
实验 14.11 (3) 滤膜法测定水中大肠菌群	(335)
实验 14.12 空气中的微生物检测	(336)
第十五章 微生物菌种保藏	(338)
第一节 普通菌种保藏方法	(338)
一、定期移植保藏法	(338)
二、沙管保藏法	(339)
三、液体石蜡保藏法	(340)
四、液氮保藏法	(341)
五、冷冻真空干燥保藏法	(342)
六、悬液保藏法	(344)
七、木粒麸皮保藏法	(344)
八、孢子滤纸保藏法	(344)
第二节 特殊菌种保藏方法	(344)
一、噬菌体的保藏法	(344)
二、厌氧性细菌的保藏法	(345)
附录	(348)
I. 染色液及其配制	(348)
II. 培养基	(349)
III. 生理生化实验培养基及试剂	(355)
IV. 食品卫生微生物学检测用培养基、试剂及染色液	(359)
主要参考书目	(365)

第一部分 基础微生物学实验技术

实验一 普通光学显微镜的结构与使用

一、实验目的

- (1) 了解普通光学显微镜的构造、原理、维护及保养方法。
- (2) 学会使用普通光学显微镜观察生物标本片。

二、原理

显微镜的种类很多，其中普通光学显微镜是最常用的一种，是微生物学研究者不可缺少的工具之一。其成像原理如图 1 所示。

将被检物体置于集光器与物镜之间，平行的光线自反射镜折入集光器，光线经过集光器穿过透明的物体进入物镜后，即在目镜的焦点平面（光阑部位或附近）形成一个初生倒置的实像。从初生实像射过来的光线，经过目镜的接目透镜而到达眼球。这时的光线已变成平行或接近平行光，再透过眼球的水晶体时，便在视网膜后形成一个直立的实像。

光学显微镜的构造如图 2 所示，分光学系统和机械系统两部分。

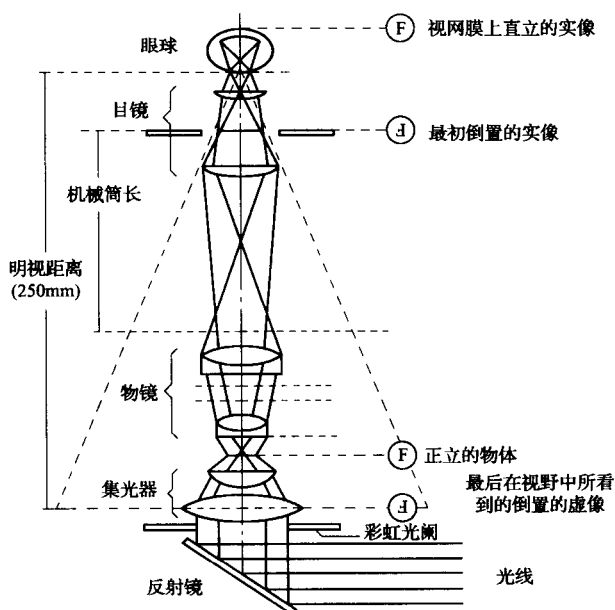


图 1 复式光学显微镜成像原理图

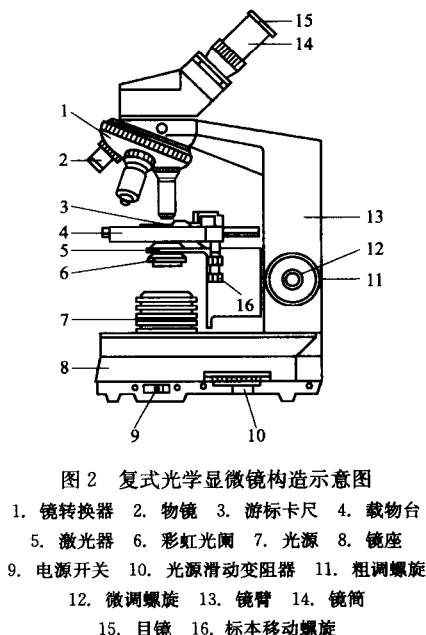


图 2 复式光学显微镜构造示意图

1. 镜转换器 2. 物镜 3. 游标卡尺 4. 载物台
5. 集光器 6. 彩虹光阑 7. 光源 8. 镜座
9. 电源开关 10. 光源滑动变阻器 11. 粗调螺旋
12. 微调螺旋 13. 镜臂 14. 镜筒
15. 目镜 16. 标本移动螺旋

1. 光学系统

显微镜的光学系统主要包括物镜、目镜、集光器、彩虹光阑、反光镜和光源等。

(1) 物镜 物镜统称为镜头，是在金属圆筒内装有许多块透镜用特殊的胶粘在一起而形成的。根据物镜和标本之间的介质的性质不同，物镜可分为干燥系物镜和油浸系物镜。干燥系物镜指物镜和标本之间的介质是空气（折光率 $n=1$ ），包括低倍镜和高倍镜两种。油浸系物镜指物镜和标本之间的介质是一种和玻璃折光率（ $n=1.52$ ）相近的香柏油（ $n=1.515$ ），这种物镜也称为油镜。油镜的镜头上一般标有“HI”或“OI”字样，镜头下缘刻有一黑圈。使用油镜时需将镜头浸在香柏油中，这是为了消除光由一种介质进入另一种介质时发生散射。

① 放大倍数：物镜的放大倍数可由外形来辨别，镜头长度越短，口径越大，放大倍数越低。物镜的放大倍数都标在镜头上，常用的低倍镜为 $10\times$ 、 $20\times$ ；高倍镜为 $40\times$ 、 $45\times$ ；油镜为 $90\times$ 、 $100\times$ 。

物镜的放大倍数=光学筒长÷物镜的焦距

光学筒长是指物镜上焦平面到目镜下焦平面间的距离，一般为 160mm。例如当物镜的焦距为 16mm，光学筒长为 160mm 时，它的放大倍数是 $160/16=10$ 。

② 工作距离：是指观察标本最清晰时的物镜下面透镜的表面与盖片上表面之间的最短距离。物镜的放大倍数越大，工作距离越短。一般油镜的工作距离最短，约为 0.2mm（表 1）。因此，要求盖玻片的厚度为 0.17~0.18mm，若盖玻片太厚，就不可能将被检物体聚焦，且易引起物镜的意外损伤。

表 1 标准物镜的主要性质

焦距/mm	光学筒长/mm	放大倍数	镜口率	工作距离/mm
16	160	10×	0.28	6.5
8	160	20×	0.50	2.0
4	160	40×	0.65	0.60
2	180	90×	1.25	0.20

③ 焦距：是指平行光线经过单一透镜后集中于一点，由这一点到透镜中心的距离。一般，物镜的放大倍数越大，焦距越短。

④ 焦点深度：在视野中垂直范围内所能清晰观察到的物体界限，称为焦点深度。物镜放大倍数越大，焦点深度越浅。通常，焦点深度与显微照相有密切关系。

⑤ 镜口率：是物镜与标本介质折射率（ n ）和光的最大入射角 α 正弦的乘积，也称为数值口径，简称 N. A. 其计算公式为： $N. A. = n \cdot \sin(\alpha/2)$ ，其中 n 是物镜与标本间介质的折射率，干燥系物镜 $n=1$ ，油浸系物镜 $n=1.515$ 。 α 是光线进入物镜的最大夹角，也称镜口角。油浸系物镜的镜口角为 120° ，因此镜口率最大也不超过 1.31，只能分辨直径为 $0.2\mu\text{m}$ 的物体。镜口率均标明在物镜的镜头上。

⑥ 分辨力：是指显微镜分辨被检物体细微结构的能力，也就是判别两个物体点之间最短距离的本领，分辨力以 R 表示，若两个物体之间距离大于 R ，可被这个物镜分辨；若距离小于 R 时，就分辨不清了。所以， R 越小，物镜的分辨力越高。

分辨力的计算公式为： $R = \lambda / (2N. A.) = \lambda / [2n \cdot \sin(\alpha/2)]$

由上式可知，镜口率越大，物镜放大倍数越大，分辨力越强。如果射入的光线为单色绿光，其波长为 $0.55\mu\text{m}$ ，代入公式后，则 10×、40×、90×物镜的分辨力分别为 $1\mu\text{m}$ 、 $0.42\mu\text{m}$ 和 $0.22\mu\text{m}$ 。因此，无论总的放大倍数多大，用普通光学显微镜是无法观察到小于 $0.2\mu\text{m}$ 的物体的。当用光学显微镜观察标本时，其波长不可能短于可见光的波长，因此必须依靠增大物镜的镜口率来提高显微镜的分辨力。

（2）目镜

① 目镜的组成：目镜也称接目镜，是由两块透镜组成的。上面的一块与眼接触，称为接目透镜；下面的一块靠近视野的称为会聚透镜。在两块透镜中间，或在视野透镜的下端装有一个用金属制成的光阑，物镜与会聚透镜就在这个光阑的面上成像，在这个光阑的面上还可以安装目镜测微尺。

② 目镜的放大倍数：实验室中常用的目镜的放大倍数为 5×、10×、15×、20×。若 10×的目镜与 40×的物镜配合使用，显微镜的总放大倍数为 400 倍，一般用 40×10 来表示，即显微镜的物镜和目镜放大倍数的乘积。但这是有条件的，只有在能分辨的情况下，上述乘积才有效。

（3）集光器 在较高级的显微镜的载物台下的次台上均装有集光器。集光器一般由 2~3 块透镜组成，其作用是会聚从光源射来的光线，集成光束，以增强照明光度，然后经过标本射入物镜中去。利用升降调节螺旋可以调节光线的强弱。

（4）彩虹光阑 在集光器下方装有彩虹光阑。彩虹光阑能连续而迅速改变口径，光阑越大，通过的光束越粗，光量也越多。在用高倍物镜观察时，应开大光阑，使视野明亮；若观察活体标本或未染色标本时，应缩小光阑，以增加物体明暗对比度，便于观察。

有些显微镜的彩虹光阑下方装有滤光片支持架，可以内外移动，以便安放滤光玻片。

（5）反光镜和光源 在显微镜最下方、镜座中央的底座内，装有灯泡，为显微镜的光源，目前显微镜都自身携带光源。而一些老式的显微镜需要采集外界光源，因此在镜座的中央装有反光镜。反光镜由凹、平两面圆形镜子组成，可以自由转动方向，将从外界光源来的光线送至集光器。在利用集光器

时，通常用平面镜，因为集光器的构造最适于利用平行光，只有在照明条件较差或用油镜时，才用凹面镜。

2. 机械系统

显微镜的机械系统主要由镜座、镜臂、载物台、镜筒、物镜转换器和调节装置等组成。

(1) 镜座 是显微镜的基座，位于显微镜最底部，多呈马蹄形、三角形、圆形或丁字形。

(2) 镜臂 是显微镜的脊梁，用以支持镜筒、载物台和照明装置。对于镜筒能升降的显微镜，镜臂是活动的；对于镜台活动的显微镜，镜臂和镜座是固定的。

(3) 镜筒 是连接目镜和物镜的金属空心圆筒，圆筒的上端可插入目镜，下端与物镜转换器相连。镜筒长度一般为 160mm。有的镜筒有分枝呈双筒，可同时装两个目镜。

(4) 物镜转换器 在镜筒下端与螺纹口相接，是一个可以旋转的圆盘，其上装有 3~4 个不同放大倍数的物镜，可以随时转换物镜与相应的目镜构成一组光学系统。由于物镜长度的配合，镜头转换后仅需稍微调焦即可观察到清晰的物像。

(5) 载物台 是放置被检标本的平台，呈方形或圆形，中心部位有孔可透过光线。一般方形载物台上装有标本移动器装置，转动螺旋可使标本前后、左右移动。有的在移动器上装有游标尺，构成精密的平面直角坐标系，以便固定标本位置重复观察。

(6) 调焦装置 在镜臂两侧装有使载物台或镜筒上下移动的调焦装置——粗、细（微调）螺旋。一般粗螺旋只做粗调焦距，使用低倍物镜时，仅用粗调便可获得清晰的物像；当使用高倍镜和油镜时，用粗调找到物像，再用微调调节焦距，才能获得清晰的物像。微调螺旋每转一圈，载物台上升或下降 0.1mm。因此，微调只在用粗调螺旋找到物像后，使其获得清晰物像时使用。

三、实验材料

普通光学显微镜，擦镜纸，标本片（可以用做好的酵母水浸片）等。

四、方法与步骤

(1) 显微镜放置位置 显微镜应放在身体的正前方，镜臂靠近身体一侧，镜身向前，镜与桌边相距 10cm 左右。

(2) 选择物镜 转动物镜转换器，将低倍镜（10×）转动到和光路对准的位置。

(3) 调节光源 打开光源，通过底座上的光强度滑动开关来调节光的强度。如果光源太亮，而且发射的光谱中有较多刺眼的红光，可根据情况选用绿色、黄绿或蓝绿等滤光片，以减弱光的强度。

(4) 调节集光器和物镜数值口径相一致 取下目镜，直接向镜筒内观察，先将可变光阑缩到最小，再慢慢打开，使集光器的孔径与视野恰好一样大。其目的是使入射光所展开的角度正好与物镜的镜口角相一致，以充分发挥物镜的分辨力，并把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。在实际操作中，观察者往往只根据视野亮度和标本明暗对比度来调节可变光阑的大小，而不考虑集光器与所用物镜的数值口径的一致。只要能达到较好的效果，这种调节方法也是可取的，但对使用显微镜的工作者来说，必须了解这一操作的原理，只有这样，当需要采用这一正规操作时，才能运用自如。

(5) 放置标本 降低载物台，将标本片放在镜台上，用玻片夹夹牢，然后提升载物台，使其物镜下端接近标本片。

(6) 调焦 双眼移向目镜，提升粗调节螺旋，当发现模糊的物像时，可以调节细螺旋（微调），使物像清晰为止。如发现视野太亮，切勿随意变动可变光阑，但可调节光的强度，或上下调节集光器。

(7) 观察 左眼观察显微镜，右眼睁开同时绘图。用圆规在记录本上画直径为 4cm 的圆，再在圆内用铅笔绘出所观察到的物像，并在圆的下面标注放大倍数，一般以“物镜的放大倍数×目镜的放大倍数”表示。

低倍镜观察后，转动物镜转换器，换用高倍镜观察，这时只用轻轻调节微调就可观察到清晰的物像。进行观察和绘图。

转换油镜观察时，首先加一滴香柏油于细菌染色片上，下降镜筒，将油镜浸入香柏油中（操作时应从侧面仔细观察，避免镜头撞击载片），其调焦与观察同上。

(8) 用毕后的处理 下降载物台，取下标本；用擦镜纸擦目镜和物镜，并用柔软的绸布擦拭机械部分；油镜使用完毕后，先用擦镜纸揩去香柏油，再用另一张蘸有少许二甲苯的擦镜纸去除残留的香柏油之后，用干净的擦镜纸揩干；最后将物镜转成“八”字形，再将载物台提升到最高处。

五、注意事项

(1) 显微镜应放在通风干燥的地方，避免阳光直射或曝晒，通常用玻璃罩或红、黑两层布罩罩起来，放入箱内。为避免受潮，在箱内放有用小袋装的干燥剂，如氯化钙或硅胶，以便吸收水分。要经常更换干燥剂。

(2) 显微镜要避免与酸、碱和易挥发的、具腐蚀性的化学试剂等放在一起。

(3) 接目镜和接物镜必须保持清洁，如有灰尘应该用擦镜纸揩去，不得用布或其它物品擦拭。

(4) 用油镜观察后，应先用擦镜纸将镜头上的油擦去，再用蘸有少许二甲苯的擦镜纸擦 2~3 次，最后用干净的擦镜纸将二甲苯擦去，二甲苯用量不能太多，这是因为物镜的几块透镜是用树胶粘合在一起的，一旦树胶溶解，透镜将脱落。

(5) 显微镜应防止震动和暴力，否则会造成光学系统光轴的偏差而影响精度，从箱内取出或放入显微镜时，应一手提镜臂，另一只手托镜座，防止目镜从镜筒中滑出。

(6) 粗、细调节螺旋和标本推进器等机械系统要灵活，如不灵活可在滑动部分滴加少许润滑油。

(7) 显微镜用毕，需将物镜转成“八”字形，勿使物镜镜头与集光器相对放置，同时将物镜降至载物台或将载物台提升以缩短物镜和载物台之间的距离，避免因镜筒脱落或操作不小心，损坏物镜和集光器。

(8) 显微镜观察时以左眼为宜，但两眼务必同时睁开，否则易产生疲劳。一般是左眼观察，右眼睁开，同时绘图。

(9) 镜检时，首先提升载物台或降低物镜，使载片标本和物镜接近，之后将眼睛移至目镜观察，此时只允许降低载物台或提升物镜，以免物镜与载片相撞。为了快速找到物像，先用低倍镜观察，因为低倍镜视野大，易发现目的物和找到物像，再转换为高倍镜或油镜，由于安装在物镜转换器上的多个物镜被设计成共焦点，因此物镜转换只要使用微调就能获得清晰图像。但此时需将集光器上升或开大光圈，以获得合适亮度。

实验二 培养基的配制与灭菌

一、器皿的准备

在配制培养基的过程中，首先要使用一些玻璃器皿，如三角瓶、试管、培养皿、烧杯、吸管等，这些器皿在使用前都要根据不同的情况，经过一定的处理，洗刷干净，进行包装、灭菌后，才能使用。

1. 玻璃器皿的清洗

(1) 新玻璃器皿 新玻璃器皿含有游离碱，一般先将其浸于 2% 的盐酸溶液中数小时，然后用自来水清洗干净。也可将器皿先用热水浸泡，再用去污粉或肥皂粉刷洗，最后经过热水洗刷、自来水清洗，待干燥后，灭菌备用。

(2) 用过的玻璃器皿

① 试管或三角瓶的洗刷：盛有废弃物的试管或三角瓶，因其内含大量微生物，洗刷前应先进高压蒸汽灭菌。对只带有细菌标本或培养物的试管等玻璃器皿，用过后立即将其浸于 2% 的来苏尔消毒水中，经 24h 后，才可以取出洗刷。

用蜡封口的试管或石油发酵用瓶，清洗前先将置于高压蒸汽灭菌器中消毒，然后取出，趁热拔去沾有蜡或油的棉花塞，立即倒去培养污物，再将试管投入温水中，稍加洗刷后浸于 5% 的肥皂水内，煮沸 5min，以去除试管上的油污。也可将倒空的瓶子用汽油浸泡，待油溶解后再刷洗。

加过消泡剂的发酵瓶或做过通气培养的大三角瓶，一般先将倒空的瓶子用碱粉或用 10% 的火碱水去掉油污后，再行洗刷。

管壁或瓶壁上留有培养物的痕迹，用试管刷难以去除，此时可用一根粗铁丝把顶端弯曲，捆几层纱布，浸湿，沾一点去污粉，或再沾少许细沙，擦磨管壁或瓶壁，就可把器壁的痕迹擦掉。

② 培养皿的清洗：用过的器皿中往往有废弃的培养基，需先经高压蒸汽灭菌或沸水煮沸 30min 后，倒

掉污物，方可清洗。如果灭菌条件不便，可将皿中培养基刮出来，倒在一起，以便统一处理。洗刷时，先用热水洗一遍，再用洗衣粉或去污粉擦洗，然后用自来水冲洗干净，将平皿全部向下，一个压着一个，扣于洗涤架上或桌子上。

③ 吸管的清洗：吸过菌液的吸管，用完后应放入装有 5% 石炭酸溶液的高玻璃筒内消毒；未吸过菌液的吸管，用后放入清水中，防止干燥；吸过带油液体的吸管，应先在 10% 的氢氧化钠溶液中浸泡半小时，去掉油污，方可清洗。如果吸管经以上处理仍留有污垢，可再置于洗液中浸泡 1h，再进行清洗。

吸管上端的隔离棉花，可用普通钢针制成的小钩钩出，清洗时，将直径为 6~7.5mm 的橡皮管一端连在自来水龙头上，另一端套在吸管的底端，放水冲洗即可。洗净的试管顶端向下，下面垫一块干净的厚布或几层纱布，使吸管的水分能迅速被吸干。

附：洗液配制方法

- ① 浓洗液配方：重铬酸钾 40g，浓硫酸 800mL，水 160mL。
- ② 稀洗液配方：重铬酸钾 50g，浓硫酸 100mL，水 850mL。
- ③ 配制方法：将重铬酸钾溶于水中，冷却后，边搅拌边将浓硫酸缓缓加入溶液中。

2. 器皿的包扎

(1) 试管和三角瓶 灭菌之前，试管口和瓶口均需先塞好棉花塞，棉花不可塞得过紧，亦不得过松，和管壁和瓶壁紧贴的曲面不可出现裂纹，具体做法见图 3。待棉塞做好之后，在塞棉塞的瓶口外面包一层牛皮纸，用线绳扎好；试管应 10 个一捆，也用牛皮纸和线绳扎好，置于烘箱中灭菌备用。

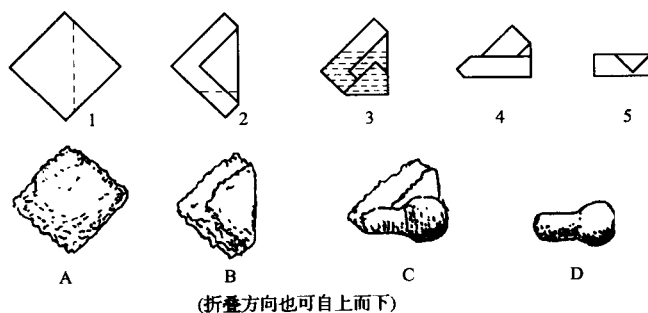


图 3 试管、三角瓶棉塞制作方法

(2) 培养皿 洗净的平皿通常用报纸包装，每包 10~12 套，或将平皿每 10 套放入一个待制的铁皮圆形平皿筒中，加盖，置烘箱中，灭菌备用。

(3) 吸管 包扎前吸管的粗头应先塞少许普通棉花，以避免应用时因不慎而将菌液吸入口中，或将口内物吹入培养液中。塞入的棉花应与吸管口保持 5mm 左右的距离，若距离太近，容易被唾液浸湿，造成通气不良。一般这段棉花全长不得短于 10mm。塞好棉花的吸管要进行包装。将报纸裁为宽为 5~8cm 的长纸条，先把试管的尖端放在纸条的一端，呈 45°角折叠纸条，包住尖端，一手捏住管身，一手将试管压紧在桌面上，向前滚动，以螺旋式包扎，最后将剩余的纸条打结，灭菌备用。

二、培养基的制备

培养基的制备过程可简单描述为：配料—溶解—校正 pH—加凝固剂—融化—过滤—分装—加棉塞、包扎—灭菌—无菌检查。

(1) 溶解配料 制备培养基时，先在烧杯中放入所需水量的一半，按培养基配方称取各项材料，依次加入水中，逐个溶解，最后加足水量。在加料过程中，各种成分溶解的次序应该是先加缓冲化合物，然后是主要元素、微量元素，最后加维生素等。

(2) 调 pH 配料溶解完后，并冷却到室温时，用精密 pH 试纸或酸度计测试溶液的 pH，然后根据要求的 pH 确定需加酸或加碱。当加入酸或碱液时，要缓慢、少量、多加搅拌，防止局部过碱或过酸而破坏营养成分。常用 10% NaOH 或 6mol/L HCl 调整 pH。

(3) 加凝固剂 配制固体培养基时，需加入凝固剂（如琼脂、明胶等），若以琼脂为凝固剂时，一般先