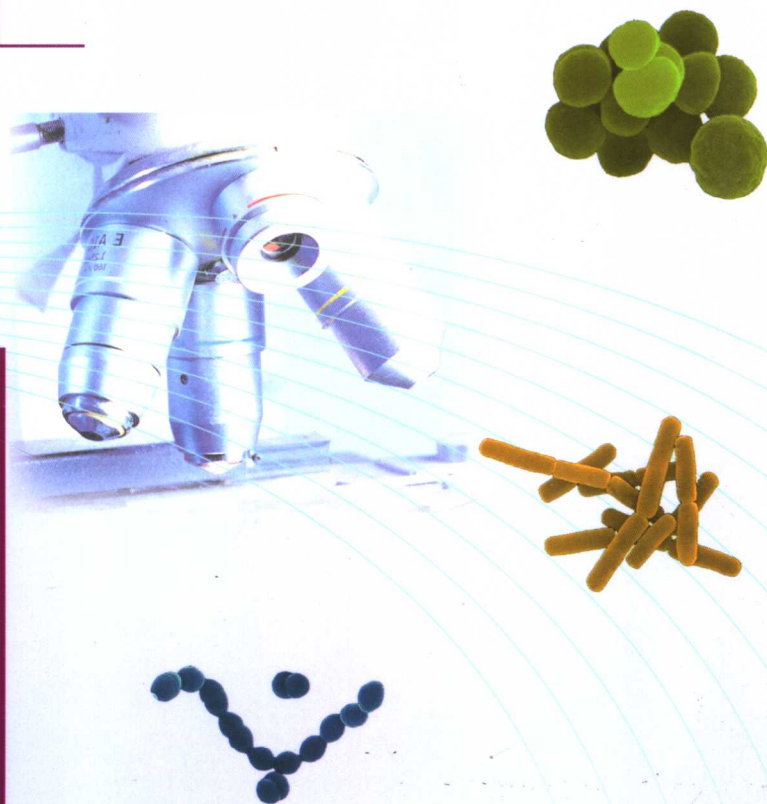


高等院校生命科学与技术实验教材

微生物学 实验指导

WEISHENGWUXUE
SHIYAN ZHIDAO

陈金春 陈国强 主编



清华大学出版社

高等院校生命科学与技术实验教材

微生物学实验指导

主 编	陈金春	陈国强		
编 者	陈金春	雷明光	林 琳	
	蒋五玲	孙智杰	陈国强	

清华大学出版社
北 京

版权所有,翻印必究。举报电话:010-62782989 13501256678 13801310933

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验指导/陈金春,陈国强主编. —北京:清华大学出版社,2005.8

(高等院校生命科学与技术实验教材)

ISBN 7-302-11182-0

I. 微… II. ①陈… ②陈… III. 微生物学—实验—高等学校—教学参考资料 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 061288 号

出版者:清华大学出版社 地址:北京清华大学学研大厦
<http://www.tup.com.cn> 邮编:100084
社总机:010-62770175 客户服务:010-62776969
责任编辑:罗健
印刷者:北京市通州大中印刷厂
装订者:北京国马印刷厂
发行者:新华书店总店北京发行所
开本:185×260 印张:7.25 字数:171千字
版次:2005年8月第1版 2005年8月第1次印刷
书号:ISBN 7-302-11182-0/Q·49
印数:1~4000
定价:15.00元

微生物学实验是综合性大学和师范院校生物系开设的一门非常重要的基础实验,掌握微生物学的一些实验方法和技术,在大脑中形成无菌概念是学生进行分子生物学和细胞生物学实验和研究的基础。在目前高校扩招、学时紧张的情况下,如何在有限学时内系统地完成微生物学实验的教学,是摆在全国高校微生物学实验老师面前的一大难题。我们在清华大学十几年微生物学实验教学经验的基础上,参考国内兄弟院校和国外有关教材编写了本实验教材。我们不求面面俱到,但是力图在各个实验里安排尽量多的微生物实验基本操作和微生物学知识点。本书主要内容包括微生物个体和菌落形态观察,染色方法,计数,大小测量,培养基制备和灭菌,无菌操作,微生物检测和分离,生理生化反应,影响微生物生长的因素和细菌生长曲线测定,诱变育种和实验室发酵制备啤酒和酸奶,发酵罐使用等内容。整个实验课中贯穿了显微镜使用,无菌操作,菌种筛选、鉴定、选育和发酵应用这一主线。微生物学需掌握的基本操作在实验中得到反复训练,同时加深了同学们对所学微生物学基本概念的理解和掌握程度。实验设计贴近生活,大大提高了同学们学习生物学的兴趣。

本书把微生物学实验分为四个部分,第一部分为 8 个实验(45 个学时),我们认为比较全面地安排了微生物基础实验所要求的内容,较有代表性,掌握了这些基础操作,其他的内容查查书,同学就可以独立操作了。加上第三部分实验十三的考试测验(3 学时),目前清华大学生物系和医学院的普通微生物学实验教学内容约需 48 学时。如果学时允许,第二部分安排的实验九—十二为选做实验(25 学时),第四部分发酵工程综合实验需 32 学时。具体学时安排如下:

- 实验一 微生物形态观察(5 学时)
- 实验二 微生物的大小测定与显微计数(5 学时)
- 实验三 细菌的简单染色和革兰染色(5 学时)
- 实验四 环境中微生物的检测和分离纯化(5 学时)
- 实验五 细菌鉴定中常用的生理生化反应(5 学时)
- 实验六 测定细菌生长曲线(10 学时)
- 实验七 固定化酵母细胞发酵啤酒实验与酸奶制作(5 学时)
- 实验八 环境因素对微生物的影响和紫外诱变效应(5 学时)

实验九 用生长谱法测定微生物的营养要求(5 学时)

实验十 化学诱变剂的诱变效应(5 学时)

实验十一 水中细菌总数及大肠菌群的测定(5 学时)

实验十二 微生物常用的染色技术(10 学时)

实验十三 微生物学实验技能综合测试实验(3 学时)

实验十四 种子培养液的配制及发酵罐的准备

实验十五 重组大肠杆菌的高密度发酵与目的产物的大量表达

实验十六 发酵数据处理及分析

我们把一些教学方法方面改革和实践在这里提出来,供同行参考。微生物实验的准备工作一直是一个工作量巨大的事情,以往往往是老师把准备工作包括培养基的配制和其他实验器材灭菌,同学上课来接种菌,再来观察培养结果。结果是老师累得要死,而同学还觉得微生物实验太简单了,没意思。现在,我们在上一个实验间隙安排同学自己准备下一个实验的用具和培养基的灭菌,让同学自己在上课前一天来实验室倒培养基制作平板,结果同学普遍觉得收获很大,受到了各方面的锻炼,而且也理解了带实验老师平常的艰辛劳动,明白了以后做科学研究中做试验的流程,同学们普遍反映学完后收获很大。另一个教学改革是改变实践教学的评价方式。以前一般是做完实验,同学们写一份实验报告,老师再根据报告给一个分数,期末再平均一下,给出总成绩,就“OK”了,这样往往会造成大家只注意写实验报告,轻实际操作能力的锻炼。现在我们的做法是,实验报告占 60%,实验考试占 35%,平常成绩占 5%(主要是严格考勤和平常对实验室公益事情的关注),同学反映实验要考试还真新鲜,是第一次遇到。平常做实验也更认真了,有意识地多练习基本操作。实验考试时,我们利用清华大学配备助教多的特点,考试时每个老师看 3 个同学,老师之间统一标准,逐项对同学的表现打分,对实验结果逐一打分,考完后老师之间互相交流,也允许同学看结果,尽量做到公平。这种考核方式改变了以前一些同学只重视实验报告,轻实际动手能力的培养,受到了同学们的欢迎。

本书在编写过程中参考了国内外一些教材和网络资料,在此一并表示感谢。我们对生物系老师对微生物实验教学的一贯支持和关心表示感谢,对陈晶瑜、郑重、曲向华、王亚武、刘倩等助教对微生物实验的热情投入和参与部分章节的编写表示感谢。对曾经在本教学实验室教过课的刘祖同老师和李艺老师等表示感谢。

由于时间仓促以及我们水平有限,教材之中难免有不妥之处,希望各位同仁给予批评指导,我们将不胜感激。

陈金春

2005 年 4 月于清华园

微生物学实验绪论·····	1
微生物显微技术介绍·····	4

第一部分 微生物学必做基础实验

实验一 微生物形态观察·····	11
实验二 微生物的大小测定与显微计数·····	18
I 酵母菌大小测定·····	18
II 微生物数量的测定——显微镜直接计数法·····	21
实验三 细菌的简单染色和革兰染色·····	24
实验四 环境中微生物的检测和分离纯化·····	27
实验五 细菌鉴定中常用的生理生化反应·····	31
实验六 测定细菌生长曲线·····	36
实验七 固定化酵母细胞发酵啤酒实验与酸奶制作·····	39
实验八 环境因素对微生物的影响和紫外诱变效应·····	42

第二部分 微生物学选做实验

实验九 用生长谱法测定微生物的营养要求·····	49
实验十 化学诱变剂的诱变效应·····	51
实验十一 水中细菌总数及大肠菌群的测定·····	53
实验十二 微生物常用的染色技术·····	58
方法一 革兰鉴别染色法·····	60
方法二 活体染色法·····	63
方法三 单染色法·····	63
方法四 假丝酵母负染色法·····	64
方法五 枯草芽孢杆菌的抗酸性染色·····	64
方法六 真菌的荧光染色与观察·····	65

第三部分 微生物学实验技能综合测试实验

实验十三 微生物学实验技能综合测试实验	69
---------------------------	----

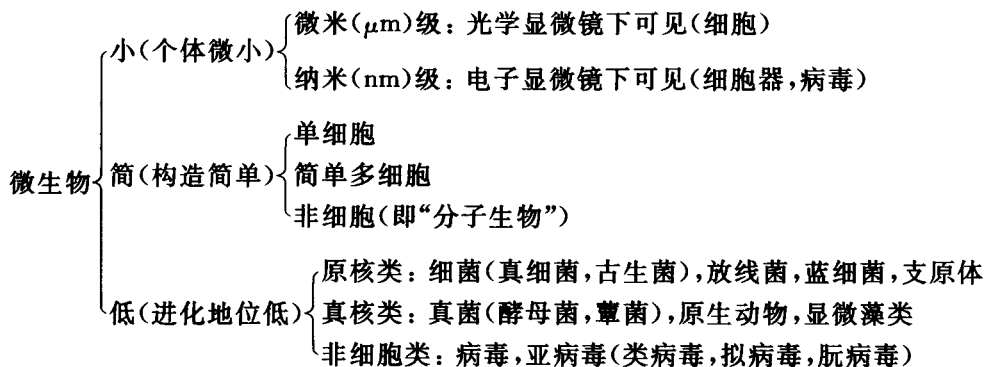
第四部分 发酵工程综合实验

实验十四 种子培养液的配制及发酵罐的准备	80
实验十五 重组大肠杆菌的高密度发酵与目的产物的大量表达	83
实验十六 发酵数据处理及分析	85
附录 I 常用培养基的配制	87
附录 II 染色液的配制	94
附录 III 微生物实验室常用仪器介绍	96
附录 IV 微生物学实验室规则和要求	108
参考文献	109

微生物学实验绪论

一、微生物分类

微生物(microorganism, microbe)是一切肉眼看不见或看不清的微小生物总称。它们都是一些个体微小(一般 $<0.1\text{mm}$)、构造简单的低等生物,包括属于原核类的细菌(真细菌和古生菌)、放线菌、蓝细菌(旧称“蓝绿藻”或“蓝藻”)、支原体、立克次体和衣原体;属于真核类的真菌(酵母菌、真菌和蕈菌)、原生动物和显微藻类;以及属于非细胞类的病毒和亚病毒(类病毒、拟病毒和朊病毒)。



二、微生物学简史

(一) 神奇的微生物世界

人类对动、植物的认识,可以追溯到人类的出现。可是,对数量无比庞大、分布极其广泛并始终包围在人体内外微生物却长期缺乏认识,其主要原因就是它们的个体过于微小、群体外貌不显、种间杂居混生以及形态与其作用的后果之间很难被认识等。例如,称作“世纪瘟疫”的获得性免疫缺陷综合征,从感染病毒至发病一般要经过 12~13 年的潜伏期,若没有现代微生物学知识,谁会知道病人的死因就是由极其微小的人类免疫缺陷病毒(HIV)在作祟?又如,在发霉的花生、玉米等胚的附近,常易生长黄曲霉(*Aspergillus flavus*),一类会产生剧毒真菌素——黄曲霉素(aflatoxin)的真菌,若经常食用这类霉变食物,就会诱发肝癌等疾病,倘若没有微生物学知识,人们无论如何也不会相信自己竟是被这类极不显眼的区区微生物所害。

由于上述认识微生物的 4 个障碍迟迟未能解决,因此人类在其长期的历史发展中,尽管也有自发地利用酵母菌等若干有益微生物的活动,但更多地还是被各种病原微生物所害,例如鼠疫(“黑死病”,历史上 3 次大流行曾杀死过 2 亿人)、天花、疟疾、麻风、梅毒、肺

结核(“白疫”)和流感的大流行等。直至今日,在全球范围内,不但传染病仍是死亡的首因(1997 年全球达 5220 万人),而且还面临着旧病卷土重来、新病不断出现(近 20 年来又出现 30 余种)的严峻形势。

(二) 微生物学发展史

整个微生物学发展史是一部逐步克服上述认识微生物的 4 个障碍(如显微镜的发明,灭菌技术的运用,纯种分离和培养技术的建立等),不断探究它们的生命活动规律,并开发利用有益微生物和控制、消灭有害微生物的历史。现扼要地将它分为 5 个时期(表 1)。

表 1 微生物学史简表

分期	史前期	初创期	奠基期	发展期	成熟期
时间	约 8000 年前—1676 年	1676—1861 年	1861—1897 年	1897—1953 年	1953 年至今
实质	朦胧阶段	形态描述阶段	生理水平研究阶段	生化水平研究阶段	分子生物学水平研究阶段
开创者	各国劳动人民。其中尤以我国的制曲、酿酒技术著称	列文虎克——微生物学的先驱者	①巴斯德——微生物学奠基人;②科赫——细菌学奠基人	E. Buchner——生物化学奠基人	J. Watson 和 F. Crick——分子生物学奠基人
特点	①未见细菌等微生物的个体;②凭实践经验利用微生物的有益活动(进行酿酒、发面、制酱、酿醋、沤肥、轮作、治病等)	①自制单式显微镜,观察到细菌等微生物的个体;②出于个人爱好对一些微生物进行形态描述	①微生物学开始建立;②创立了一整套独特的微生物学基本研究方法;③开始运用“实践—理论—实践”的思想方法开展研究;④建立了许多应用性分支学科;⑤进入寻找人类和动物病原菌的黄金时期	①对无细胞酵母菌“酒化酶”进行生化研究;②发现微生物的代谢统一性;③普通微生物学开始形成;④开展广泛寻找微生物的有益代谢产物;⑤青霉素的发现推动了微生物工业化培养技术的进步	①广泛运用分子生物学理论和现代研究方法,深刻揭示微生物的各种生命活动规律;②以基因工程为主导,把传统的工业发酵提高发酵工程新水平;③大量理论性、交叉性、应用性和实验性分支学科飞速发展;④微生物学的基础理论和独特实验技术推动了生命科学各领域飞速发展;⑤微生物基因组的研究促进了生物信息学时代的到来

三、微生物学实验室规则和要求

1. 每次实验前必须对实验内容进行充分预习,以了解实验目的、原理和方法,做到心中有数,思路清楚;操作时,才能够做到胆大心细,不容易出现意外。

2. 实验室内应保持整洁,勿高声谈话和随便走动,保持室内安静,关好门窗,以免空气扰动,造成污染。上课前应洗干净手。最好戴上医用口罩。

3. 认真及时做好实验记录。对于当前不能得到结果而需要连续观察的实验,则需记下每次观察的现象和结果,以便分析。

4. 实验时先看懂操作原理,再小心、严格按操作规程进行,实验中万一发生意外,如划破皮肤以及细菌污染实验台或地面等处时,应立即报告教师及时处理。切勿隐瞒。

5. 实验过程中,切勿使乙醇、乙醚、丙酮等易燃品接近火焰,如遇火险,应先立即用湿布掩盖灭火,必要时用灭火器。

6. 如打破实验器材时,应向指导教师报告,进行登记;未经许可,不得任意将实验室内任何物品携出室外。

7. 使用显微镜或其他贵重仪器时,要求细心操作,特别爱护。对消耗材料和药品等要力求节约,用毕后仍放原处。

8. 进行高压蒸气灭菌时,严格遵守操作规程,负责灭菌的同学在灭菌过程中不准离开实验室,并经常观察灭菌锅工作情况,以免发生意外。

9. 每次实验需进行培养的材料,应标明自己的组别和姓名的首字母缩写以及实验时间和菌名,放于教师指定的地点进行培养。

10. 每次实验完毕后,必须把所有仪器洗净放妥,将实验室收拾整齐,整理桌面,不要随便乱扔乱放,养成良好的实验习惯。凡带菌之工具(如吸管等)在洗涤前须浸泡在消毒液中进行消毒,再清洗干净。

11. 离开实验室前应将手洗净,注意关闭门窗、灯、火、电源等。

12. 微生物实验一般都要经过一段时间的培养,才能观察到结果,所有同学都要求在指定时间观察结果,写好实验报告,才能得到该实验的成绩。

13. 实验报告,应以实事求是的态度写,对实验现象作出合理的解释,实验报告不要长篇大论,一般2~6页即可,不要写一些与实验无太大关系或在网络上拷贝大篇的基础知识,下次实验时交给指导教师批阅,禁止同学之间互相拷贝电子版实验报告。

微生物显微技术介绍

显微技术是微生物检验和研究中最常用的技术之一。显微镜的种类很多,在实验室中常用的有:普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜和电子显微镜等。而在微生物检验和研究中最常用的还是普通光学显微镜。下面将重点介绍普通光学显微镜的结构以及显微镜油镜的基本原理。

一、普通光学显微镜的结构和基本原理

(一) 基本结构

光学显微镜(图 1)是由光学放大系统和机械装置两部分组成。光学系统一般包括目镜、物镜、聚光器、光源等;机械系统一般包括镜筒、物镜转换器、载物台、镜臂和底座等。

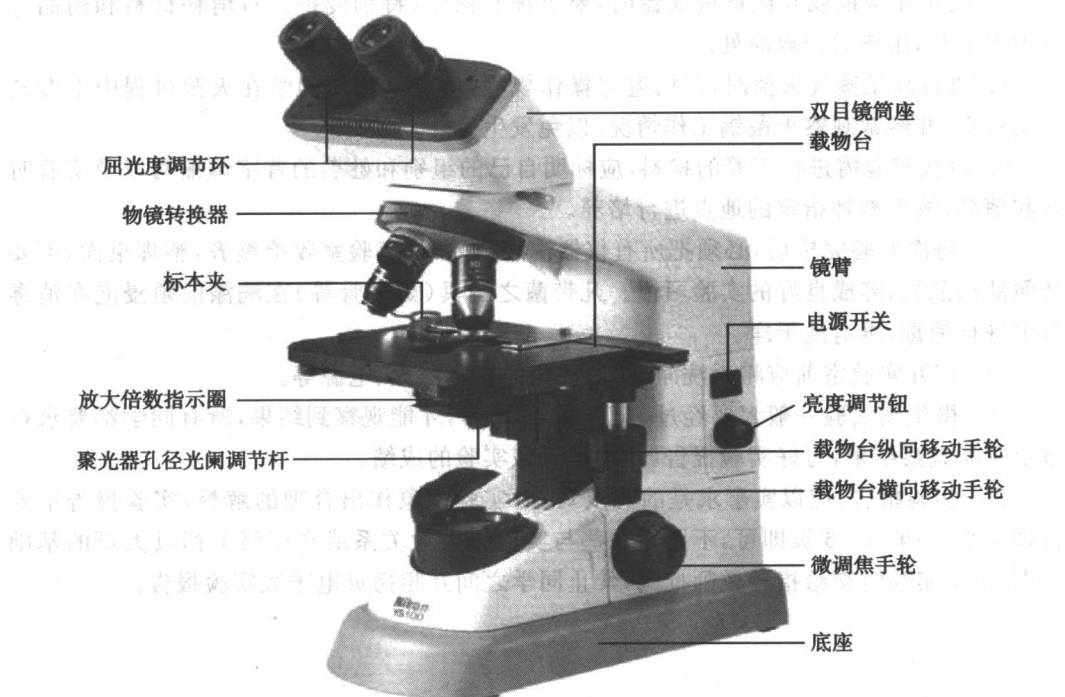


图 1 光学显微镜

标本的放大主要由物镜完成。物镜放大倍数越大,它的焦距就越短,物镜的透镜和玻片间距离(工作距离)也就越小。油镜的工作距离很小,使用时需格外注意。目镜只起放大作用,不能提高分辨率,标准目镜的放大倍数是 10 倍。聚光镜能使光线照射标本后进

入物镜,形成一个大角度的锥形光柱,因而对提高物镜分辨率是很重要的。聚光镜可以上下移动,以调节光的明暗,调节光阑可以调节入射光束的大小。

显微镜用光源,自然光和灯光都可以,以灯光较好,因光色和强度都容易控制。一般的显微镜可用普通的灯光,质量高的显微镜要用显微镜灯,才能充分发挥其性能。有些需要很强照明,如暗视野照明、摄影等,常常使用卤素灯作为光源。

(二) 显微镜油镜原理

在显微镜的光学系统中,物镜的性能最为关键,直接影响显微镜的分辨能力。物镜的一个重要参数是数值孔径(N. A.)。

$$N. A. = n \cdot \sin\theta, \theta = \alpha/2$$

式中,N. A. 为数值孔径; n 为介质折射率; α 为开口角,即物镜前面的发光点进入物镜的角度。

显微镜性能的优劣不仅是它的放大倍数,更重要的是它的分辨率大小。分辨率是指显微镜分辨出两个物点最小距离的能力,分辨距离越小其分辨率就越高。分辨率是由所用光的波长和物镜数值孔径决定的。

$$d = 0.61 \times (\lambda / N. A.)$$

式中, d 为分辨距离; λ 为所使用光线的波长。

减小使用的光波长或增加数值口径可以提高分辨率,可见光的光波幅度比较窄,紫外光波长短可以提高分辨率,但不能用肉眼直接观察。所以利用减小光波长来提高光学显微镜分辨率是有限的,提高数值孔径是提高分辨率的理想措施。要增加数值口径,可以提高介质折射率,当空气为介质时折射率为 1,而香柏油的折射率为 1.51,与载片玻璃的折射率(1.52)相近,这样光线可以不发生折射而直接通过载片、香柏油进入物镜,从而提高分辨率。另外,镜油避免了光线的折射和全反射,使进入镜头的光线增加,从而增加了照明亮度。

二、普通显微镜的使用方法

(一) 低倍镜观察

观察任何标本都必须先用低倍镜观察,因为低倍镜视野范围大,容易发现观察目标,确定观察部位。操作步骤如下。

1. 用 10×物镜对焦:调粗调焦手轮降低载物台,旋转物镜转换器,将 10×物镜移入光路,对准载物台孔(当旋转到位时,物镜会自动卡位)(图 2)。

2. 光亮度调节:打开电源开关(将开关拨至“Ⅰ”侧),旋转亮度调节钮来调节视场亮度。同时调节聚光镜的位置等,直到整个视野中得到均匀、明亮的光度为止。

在以上光度调节中,要体会调节不同结构对光亮度的作用。

3. 标本的安放:将制成的玻片标本置于载物台上,用推进器夹紧,调节推进器使标本对准台孔(图 3)。

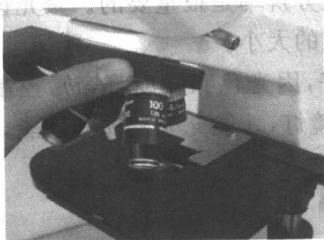


图2 旋转物镜转换器

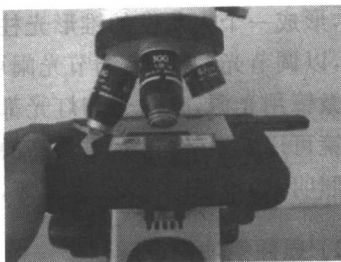


图3 标本的安放

4. 焦距的调节：转动粗调焦手轮，从侧面观察将载物台上玻片标本调至物镜下约 5mm 处，然后从目镜观察，左手调粗调焦手轮使载物台缓慢下降，右手调节推进器寻找观察标本的物像，找到物像后调微调手轮，直到看清物像为止。如一次找不到的话，重复以上步骤。

5. 瞳距的调节：通过向内或向外滑动镜筒盖板，使左、右目镜中的图像合并成一。利用这一功能可以测一下你的瞳距(图 4)。

6. 视度的调节：①旋转视度圈(屈光度调节环)，使其下端与刻线(沟槽)对齐，此时是零视度位置；②将物镜转换器旋至 40× 物镜，调节微调焦旋钮，对标本准确调焦；③转换至 4× 和 10× 物镜，不动调焦旋钮，分别旋转左右目镜的视度圈，使每个目镜中的图像分别调节清楚。重复上述步骤两次，正确调节视度(图 5)。

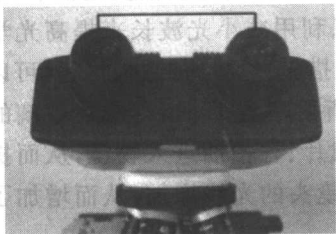
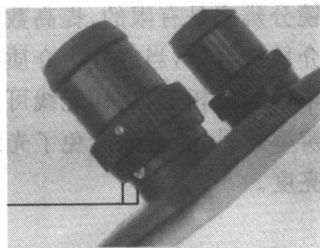


图4 瞳距的调节



对准目镜筒上的刻度线

图5 视度的调节

(二) 高倍镜的使用方法

1. 用低倍镜找到标本并调节清晰后，将欲放大的观察部位用推进器调到视野中央。
2. 转动物镜转换器，将高倍镜转到载物台中央对准载物台孔，用微调焦手轮慢慢调节焦距，直到物像清晰为止。此时可用限位手轮固定此位置。
3. 从低倍镜换到高倍镜观察时，视野变小、变暗，此时可调节扩大光亮度。

(三) 油镜观察

油镜的工作距离很小，所以要防止载玻片和物镜上的透镜损坏。使用时，一般是经低倍、高倍到油镜。

1. 用低倍镜及高倍镜找好观察部位并将此部位调到视野中心后,用粗调焦手轮将载物台向下调离物镜,在观察部位的标本玻片上滴加一小滴镜油。
2. 转动物镜转换器,使油镜对准载物台孔。
3. 从侧面观察,将载物台向上调节至载物台上标本玻片的油滴与油镜头刚刚接触为止。
4. 从目镜中观察,用微调焦手轮(一般1~2圈即可)缓缓向上调节镜台至物像清晰为止,如果观察不到标本,要注意是否调过了焦距,可以重复步骤3、4。使用油镜观察时一般也要适当扩大光亮度。
5. 用油镜观察结束后,先用小片镜头纸将镜头上的油擦去,再以蘸有擦镜液(乙醚:乙醇=7:3,浓度可以根据空气干燥程度调整为6:4)的擦镜纸反复将镜头上的油擦干净,最后用干镜头纸擦拭。

三、普通显微镜的保养

显微镜是精密贵重的仪器,必须很好地保养。显微镜用完后要套上防尘罩,放回原来的镜箱或镜柜中,同时要注意下列事项:

1. 显微镜是精密仪器,因此搬运时要小心,须右手握镜臂,左手托镜座,严禁单手提镜,勿使镜体倾斜,防止目镜从镜筒中滑出或碰撞显微镜。
2. 将载物台向上调节时,须从侧面观察,以防压碎标本玻片或损坏物镜镜头。
3. 一般情况下观察标本均要加盖盖玻片,切忌水、乙醇或其他药品浸损镜头或载物台。
4. 观察标本时,必须按低倍镜→高倍镜→油镜的顺序进行。
5. 在更换标本,转换高倍镜、低倍镜或油镜时,须将载物台略向下调,以免损坏标本或镜头。不可在高倍镜下取换制片,否则容易损坏镜头,也可能碰坏制片。转换物镜镜头时,应转动物镜转换器,切忌直接扳动镜头。
6. 显微镜各部要保持清洁,光学部分必须用镜头纸擦拭,绝对禁止用其他物品擦拭。用过油镜的,应先用擦镜纸将镜头上的油擦去,再用擦镜纸蘸擦镜液擦拭2~3次,最后再用擦镜纸将擦镜液擦去。其他部分可用纱布轻轻擦拭。
7. 使用显微镜时一定严格按规程操作,遇到问题,如机件不灵,千万不可用力转动,切忌任意拆修,应立即报告指导教师。
8. 使用完毕要将显微镜擦拭干净,恢复原状,转动物镜转换器,将4×物镜转到光路上,并将载物台调至最低。
9. 观察结束后逆时针旋转亮度调节钮,将光线调暗。关闭电源开关待显微镜冷却后罩上显微镜防尘罩。

第一部分

微生物学必做基础实验

