

全国高等学校“十二五”生命科学规划教材
高等师范院校生物学系列实验教材

微生物学 实验指导

主 编 陈 珊 刘东波 李 凡

全国高等学校“十二五”生命科学规划教材
高等师范院校生物学系列实验教材

微生物学 实验指导

Weishengwuxue Shiyao Zhidao

主 编 陈 珊 刘东波 李 凡

编 者 (按姓氏笔画排序)

王红蕾 王秀然 王金龙 王战勇 刘东波
刘玲绯 刘海音 李 凡 李晓玲 张 昕
张 虹 陈 珊 邸 瑶 郭 平 夏红梅



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验指导 / 陈珊, 刘东波, 李凡主编. —北京:

高等教育出版社, 2011.12

ISBN 978-7-04-033244-5

I. ①微… II. ①陈… ②刘… ③李… III. ①微生物学—实验—师范大学—教材 IV. ①Q93-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第266584号

策划编辑 吴雪梅

责任编辑 王 莉

封面设计 张雨微

责任印制 田 甜

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印 刷 北京铭传印刷有限公司
开 本 787×1 092 1/16
印 张 15
字 数 360 000
购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
版 次 2011年12月第1版
印 次 2011年12月第1次印刷
定 价 28.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题, 请到所购图书销售部门联系调换

版权所有 侵权必究

物 料 号 33244-00

高等师范院校生物学系列实验教材

编 委 会

主任委员 王 丽

副主任委员 魏 民 孙 晖

委 员 (按姓氏笔画排序)

王 丽 孙 晖 张丽萍

陈 珊 肖洪兴 胡 建

曾宪录 魏 民

序

东北师范大学生命科学学院的生物学实验课程经过多年的建设与实践,已经形成自己的特色。在实验课程建设方面,我们一直本着水平和特色两兼顾的原则。首先,实验课程是生物学教学过程中的一个必要而且重要的环节,应该保证其先进性。随着实验手段的进步和更新,实验课程的内容也不断扩展和完善。其次,实验课程设计应该有它的特色,这种特色主要体现在对实验内容的选择和教学方式的使用。这两个基本原则是我们编写这套实验教材的指导思想。

本套实验教材涵盖了生物学基础实验核心课程,其特色有三:①实用性。本套实验教材是在学院多年实验教学实践的基础上编写的,具有较好的实用性。②立体化。主要表现在教材内容分为两个部分,一部分呈现在纸质教材中,另一部分以网络版的数字课程形式展示给读者,这样大大丰富了教材的知识体系。③师范性。本套教材体现了本科实验教学对中生物生物学实验教学的直接指导和全面拓展。师范大学生物学教学与中生物生物学教学的脱节是长期存在的问题,在实验教学中也存在同样的现象。在本套教材中,我们尝试着将本科生物学教学与中生物生物学教学的知识相关联,为学生将来从事中生物生物学实验教学打下基础,起到一定的指导作用。与中生物生物学相关内容的衔接和指导主要是在数字课程中体现。这样,既保证了教材中实验知识体系的完整性,也可以利用立体化教材的特点,在互联网上以多种媒体形式体现,对中生物生物学教学进行指导。希望这些新的尝试能够促进生物学实验教学的改革。

“高等师范院校生物学系列实验教材”编委会

2011年8月

微生物学是研究微生物及其生命活动规律的科学,是生物学领域中一门重要的基础学科,该学科的特点是具有很强的实验性和应用性。随着现代生命科学尤其是分子生物学的迅猛发展,许多独特的微生物实验技术和方法已迅速渗透到生命科学的各分支领域,并成为研究生命科学的必要手段和现代生物技术的重要基础。微生物学实验是与微生物学理论课相配套的基础实验课,是微生物学教学中的重要组成部分,通过实验课教学,不仅可以验证和加深对基础理论的理解,同时也使学生掌握微生物学的基本实验技能,在培养学生的动手能力、综合分析能力、创新能力、正确的思维方法及严谨的工作作风等方面起着重要作用。

师范院校的微生物学实验具有与综合性大学不同的要求和目标。为提高实验课的教学效果,加强对学生微生物学综合素质的训练,培养既具备系统理论知识,又具备较强动手能力的高素质人才,以适应微生物学科的发展趋势和社会对人才的需求变化,编者根据多年来的实验课教学及科学研究中积累的经验,在学习兄弟院校实验教材和实践经验的基础上,编写了适合于师范院校教学特点的《微生物学实验指导》。本实验教材内容分为4篇,即基础性实验、综合性实验、研究性实验和中学相关生物学实验指导(微生物学篇)。

第1篇 “基础性实验”:本篇实验是针对微生物学教材的内容,选取了微生物学中的经典实验,是本课程中最代表学科特点的实验方法和技术。通过本部分的学习,使学生熟练掌握微生物学的基本操作和基本技能。

第2篇 “综合性实验”:本篇实验是在基础性实验的基础上,选取采用多种实验手段和方法的实验内容,对学生进行综合能力的训练。通过本部分的学习,提高学生对所学知识和实验技术的综合运用能力以及对实验结果的综合分析能力。

第3篇 “研究性实验”:本篇实验是在基础性实验和综合性实验的基础上,选取类似于科学研究的实验内容,引导学生查阅文献,制定实验技术路线,确定实验研究方法和手段,撰写课程研究论文。通过本部分的学习,培养学生学习的自主性、创造性和独立工作能力,使学生得到科学研究的初步训练。

第4篇 “中学相关生物学实验指导(微生物学篇)”:本篇总结了微生物学科在《全日制义务教育生物课程标准》和《普通高中生物课程标准》中的相关实验内

容,并就实验的设计、操作、改进等方面提出指导性的建议,以及对实验中常见的问题进行解析与指导。

本教材为立体化教材,包括纸质印刷本和数字课程两部分。数字课程主要包括多媒体教学课件、视频资料、实验结果的照片和参考资料等,这些数字化教学资源将采取动态开放、不断完善更新的建设模式。

本教材所安排的实验内容具有较强的实用性和可操作性,易于进行微生物学实验课的教学。参加教材编写的人员有东北师范大学的陈珊、刘东波、李凡、夏红梅、邸瑶、刘玲绯,吉林大学的郭平、张昕,长春师范学院的刘海音,大庆师范学院的张虹、王金龙,吉林农业大学的王秀然,辽宁石油化工大学的王战勇,长春工业大学的李晓玲、王红蕾,教材的插图均由东北师范大学华梅绘制。本教材在编写出版过程中,得到了东北师范大学生命科学学院和高等教育出版社领导的大力支持和帮助,在此一并表示诚挚的感谢。

本教材在编写过程中难免有疏漏和不足之处,欢迎同行及读者提出批评和改进意见。

编 者

2011 年 11 月

实验须知

微生物学实验课是一门对操作技能具有较强要求的课程。通过本实验课的学习,要求学生能够熟练地掌握微生物学实验的基本操作技术,并且树立严谨、求实的科学态度,提高观察、分析问题和解决问题的能力,培养开拓创新的精神和勤俭节约、互相协作的优良作风。

为了提高教学效果和实验质量,保证实验者和实验室的安全,我们根据微生物学实验特点提出以下注意事项:

1. 每次实验前必须对实验指导进行充分预习,了解实验目的、原理和操作方法,对整个实验做到统筹安排,先后有序,以便实验的顺利完成。
2. 每次实验必须准时进入实验室,以了解教师对实验操作要点、注意事项等讲解及示范。
3. 实验开始前和结束后,应对实验台进行清洁,必要时可使用消毒剂进行清理。同时也要对实验台上的器皿和药品等进行清点。
4. 在实验过程中要严格地进行无菌操作,防止杂菌污染。因此在操作过程中要预防空气对流,并且在接种过程中尽量不要走动和讲话。
5. 实验结束后,含有培养物和培养基等带菌的器皿需在 5% 苯酚或其他消毒液中浸泡 20 min 后,再进行清洗,切勿将其直接倒入水池或垃圾桶中,以免对环境造成污染。
6. 所有进行培养的材料,均应注明菌名、接种日期及操作者,并将其放在指定的培养箱中进行培养,按时观察并如实地记录实验结果,及时汇总并交实验指导教师批阅。
7. 爱护实验室的仪器和器材,在实验完毕后将桌面整理清洁,用过的物品和仪器按原样放回原处并清理整洁。
8. 实验中若出现任何意外或事故应及时向实验指导教师或实验技术人员报告。
9. 实验完毕离开实验室之前,将手洗干净。值日生负责实验室的安全检查,注意关闭门窗、水、煤气及不用的电源等。

实验须知

第 1 篇 基础性实验

实验 1	显微镜油镜的使用	3
实验 2	细菌的简单染色法及口腔微生物的观察	7
实验 3	革兰氏染色法	11
实验 4	细菌的芽孢染色法	14
实验 5	荚膜染色法	16
实验 6	细菌鞭毛染色法及其运动性的观察	19
实验 7	放线菌形态的观察	23
实验 8	酵母菌的形态观察及死、活细胞的鉴别	26
实验 9	酵母菌子囊孢子的观察	28
实验 10	霉菌的形态观察	29
实验 11	微生物菌落形态的观察	33
实验 12	牛肉膏蛋白胨培养基的制备	35
实验 13	马丁氏培养基的制备	39
实验 14	高氏 I 号培养基的制备	41
实验 15	高压蒸汽灭菌	43
实验 16	过滤除菌技术	47
实验 17	紫外线灭菌	50
实验 18	干热灭菌	53
实验 19	微生物的分离与纯化	55
实验 20	平板菌落计数法	61
实验 21	微生物大小的测定	64
实验 22	显微镜直接计数法	67
实验 23	大分子物质的水解试验	70
实验 24	糖发酵试验	73
实验 25	IMViC 与硫化氢试验	75
实验 26	厌氧微生物的培养	79
实验 27	从自然环境中分离和纯化噬菌体	83
实验 28	水中细菌总数的测定	86
实验 29	食品中细菌总数的检测	89
实验 30	空气中微生物的检测和数量测定	91

实验 31 微生物菌种保藏	94
---------------------	----

第 2 篇 综合性实验

实验 32 环境因素对微生物生长发育的影响	101
实验 33 紫外线对枯草芽孢杆菌产生淀粉酶的诱变效应	105
实验 34 细菌生长曲线的测定	108
实验 35 用生长谱法测定微生物的营养要求	111
实验 36 抗生素抗菌谱及抗生素的抗药性测定	113
实验 37 杯碟法测定抗生素的效价	116
实验 38 消毒剂和杀菌剂最低抑制浓度的测定	120
实验 39 水中大肠菌群的检测	124
实验 40 酸奶的制作与乳酸菌的分离纯化	129
实验 41 酸乳及其发酵剂的活菌计数与菌种活力的测定	132
实验 42 食用菌菌种的分离和制种技术	135
实验 43 食用菌的液体培养和固体栽培	138
实验 44 啤酒酵母细胞的固定化与酒精发酵	142
实验 45 毛霉的分离与腐乳的制作	144
实验 46 果酒及果醋的制作	147
实验 47 泡菜的制作及亚硝酸盐的检测	150
实验 48 分解尿素的微生物的分离与纯化	154
实验 49 分解纤维素的微生物的分离与纯化	156
实验 50 酚降解细菌的分离纯化	158
实验 51 甜酒的制作及酒药中根霉的分离	161
实验 52 基于 16S rDNA 序列测定的细菌菌种鉴定	164

第 3 篇 研究性实验

实验 53 产蛋白酶和淀粉酶芽孢杆菌的分离和酶活力检测	171
实验 54 营养缺陷型的筛选和鉴定	174
实验 55 产聚 β -羟基脂肪酸酯(PHA)的菌种的分离鉴定及 PHA 的制备	177
实验 56 双歧杆菌口服液的发酵制备	182
实验 57 发酵培养基的正交试验设计	185

第 4 篇 中学相关生物学实验指导(微生物学篇)

一、中学生物课程标准中的微生物学实验内容概述	191
二、中学微生物学实验指导与设计分析	192
三、中学生物学综合研究性实验立项及设计思路	194

参考文献	195
附录	196
I 培养基的配制	196
II 常用染色液的配制	204
III 试剂和溶液的配制	207
IV 缓冲液的配制	213
V 常用酸碱指示剂的配制	216
VI 化学杀菌剂和消毒液的配制	217
VII 常用微生物的学名	219
VIII 实验报告范文	221

基础性实验

本篇实验按照微生物学实验课程的授课顺序选取了微生物学中的经典实验,包括微生物及其特化结构的形态观察、无菌操作技术、微生物纯培养技术以及微生物生理生化特性的测定等,囊括了微生物学核心的实验技术和基本的实验方法。通过本部分实验,力求使学生掌握微生物学的基本实验技能,更好地理解微生物学的理论知识和概念,并养成良好的实验习惯,从而对微生物学科产生兴趣。

基础性实验部分强调基础性和可操作性,所需实验条件和仪器简单,在常规实验室均可进行操作。教学方式灵活多变,既可以按顺序进行传统方式的教学,也可以选择几个相关的基础性实验组合成综合性实验教学板块,进行研究性教学。

实验 1

显微镜油镜的使用

【背景与目的】

微生物的个体极其微小,必须借助显微镜才能对其进行观察和研究。了解显微镜的相关知识并掌握其使用方法对于微生物的研究工作十分必要。目前,显微镜已由最初的单式显微镜发展为光学显微镜、电子显微镜、相差显微镜等等,其中普通光学显微镜在微生物学的研究中是最常用的。

普通光学显微镜由机械装置和光学系统两部分组成。机械装置主要包括镜座、镜臂、镜筒、转换器、载物台和调焦装置。光学系统由光源、聚光器、物镜、目镜等组成。镜座和镜臂是显微镜的基本骨架,起稳固和支撑显微镜的作用。镜筒上端安装目镜,下端安装转换器。转换器用于装配物镜,可以通过转动转换器选择合适的物镜。载物台用于安放载玻片,其上装有载玻片夹及移动器。调焦装置包括粗调节螺旋和细调节螺旋,用于调节物镜与标本间的距离,使物像变清晰,粗调节螺旋旋转一周使镜筒移动约 10 mm,细调节螺旋旋转一周使镜筒升降约 0.1 mm 的距离。

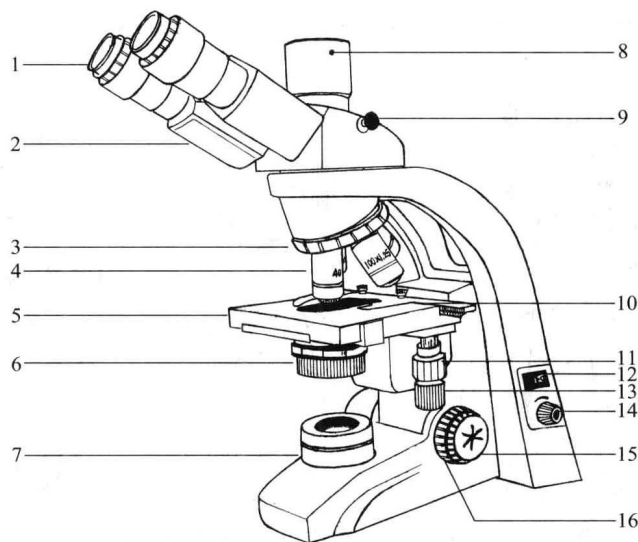


图 1-1 显微镜的基本构造示意图

1. 目镜; 2. 双目镜筒; 3. 物镜转换器; 4. 物镜; 5. 载物台; 6. 聚光器; 7. 光源;
8. 摄影摄像接口; 9. 光路选择拉杆; 10. 载玻片夹; 11. 载物台 Y 向调节手轮; 12. 电源开关;
13. 载物台 X 向调节手轮; 14. 亮度调节旋钮; 15. 细调节螺旋; 16. 粗调节螺旋

物镜是显微镜中最重要的部件,作用是对标本进行第一次成像。物镜分辨率的大小决定了显微镜的优劣,物镜根据放大率高低大致分为三类:低倍物镜($4\times\sim 20\times$)、高倍物镜($40\times\sim 60\times$)和油镜($90\times\sim 100\times$)。目镜的作用是对物镜放大的实像进行再次放大,不同的目镜上刻有 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 和 $20\times$ 等字符,表示该目镜的放大倍数,可根据需要选择合适的目镜。

本实验将着重介绍油镜的工作原理和基本操作技术,目的是使学生通过实验学习并掌握油镜的使用方法。

【实验原理】

在几种物镜当中,油镜的放大倍数最大,在微生物学的研究中也最为重要,与其他物镜相比,油镜的特殊之处在于使用时需要在载玻片与物镜之间滴加镜油(一般为香柏油)。这主要有两方面的原因:①增加视野亮度。油镜的放大倍数是100倍,这样的镜头焦距短,直径小,需要很大的光照度(图1-2)。如果载玻片与物镜之间的介质为空气,由于空气折射率为1,小于玻璃的折射率1.55,使光线受到折射发生散射现象,这就降低了视野的照明度;但如果在载玻片与物镜之间滴加了香柏油,由于香柏油折射率为1.52,与玻璃折射率1.55接近,光线通过载玻片后几乎不发生折射而直接经香柏油进入物镜,因此使视野的亮度增加(图1-3)。②增加显微镜的分辨率。显微镜的分辨率是指显微镜能够辨别的两点之间的最小距离,可表示为:

$$\text{分辨率} = \lambda / (2NA)$$

式中 λ 为光源光波波长, NA 为物镜的数值孔径(等于光线投射到物镜上的最大角度半数的正弦乘上玻片与物镜间介质的折射率所得的乘积)。在实际应用中,光学显微镜的光源不可能超出可见光的波长范围,而光线入射角最大只能达到 120° ,那么介质折射率越大,则分辨率越高。由于香柏油的折射率(1.52)比空气和水的折射率(分别为1.0和1.33)要高,因此使用油镜能分辨比其他物镜更小的距离。例如,我们肉眼所能感受的光波平均长度为 $0.55\mu\text{m}$,数值孔径为0.65的高倍物镜,它能辨别两点之间的距离为 $0.42\mu\text{m}$,而油镜的分辨率可以达到 $0.2\mu\text{m}$ 。

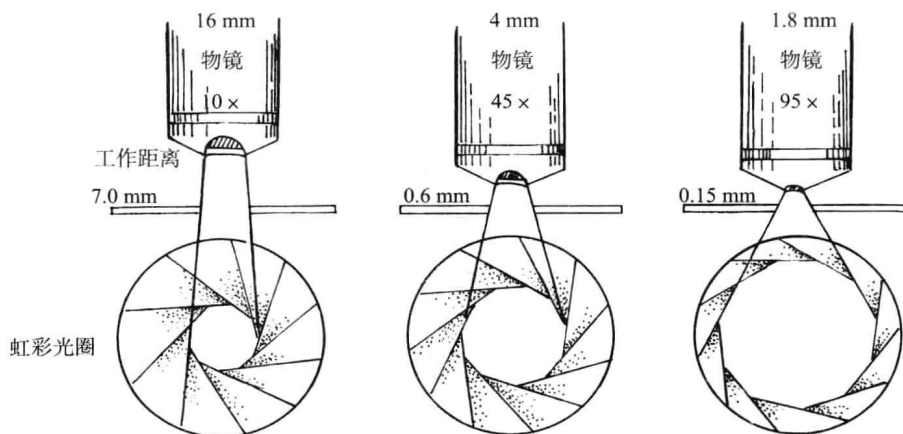


图1-2 物镜的焦距、工作距离和透射光线的关系

【仪器与试剂】

1. 材料:大肠杆菌(*Escherichia coli*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),枯草芽孢杆菌

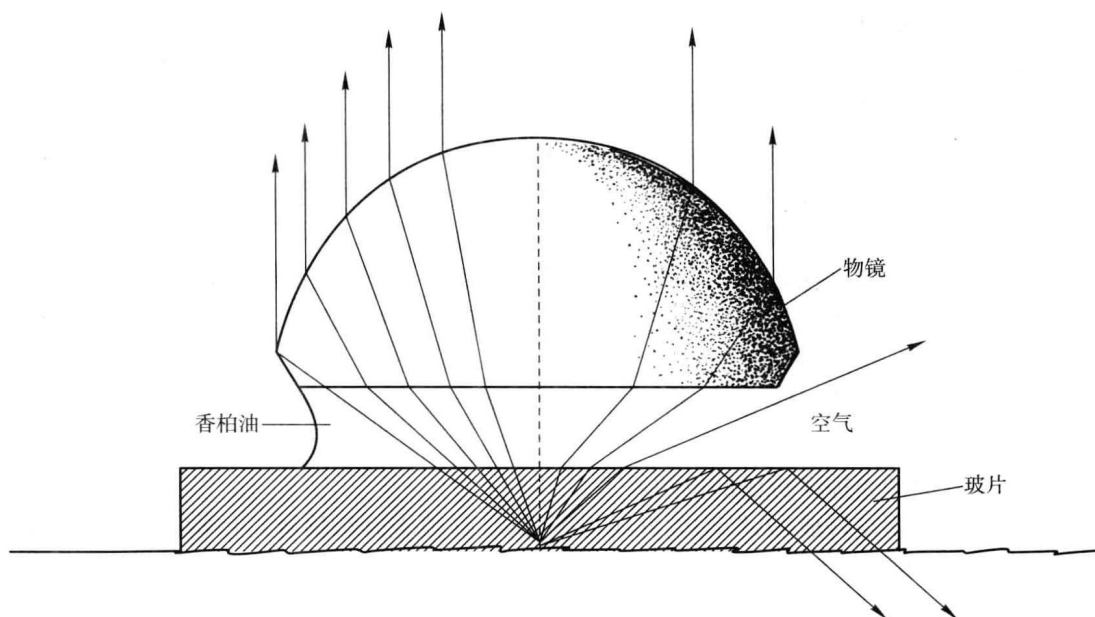


图1-3 介质折射率对物镜照明光路的影响

(*Bacillus subtilis*)等细菌的玻片标本。

2. 仪器和其他用具:显微镜,香柏油,二甲苯,擦镜纸等。

【实验操作】

1. 观察前的准备

(1) 显微镜的放置 一手握住镜臂,一手托住镜座,取出显微镜,将其平稳放置在实验台上,镜座距离实验台边缘5~10 cm,检查各部分零件是否完好。

(2) 显微镜的调整 首先调节显微镜的光源,对于使用自然光源的显微镜,不宜采用直射阳光做光源,可用散射光做光源。调节物镜与载物台间的距离约3 mm,聚光镜与载物台距离约1 mm,旋转反光镜,使光线充分进入聚光镜后,开启聚光镜上的孔径光阑调节光线程度至最佳。对于使用电光源的显微镜,在接通电源后,调节聚光镜上的孔径光阑,使其孔径与视野一致或略小于视野,并通过调节照明度控制钮选择最佳的照明效果。

然后调节双筒显微镜的目镜,根据观察者个人情况调节目镜间距,保证观察时两眼同时睁开,养成良好的观察习惯。

2. 显微观察

(1) 低倍镜观察 低倍镜视野较大,易发现目标和确定镜检的位置,因此一般情况下,特别是对于初学者,在进行观察时应遵循从低倍镜到油镜的观察过程。

将标本片放置在载物台上,用载玻片夹夹住,调节移动器,使被观察的标本处于物镜正下方,转动粗调节螺旋,使物镜调至接近标本处,用目镜观察并同时用粗调节螺旋慢慢上升镜筒(或下降载物台),直至物像出现,再用细调节螺旋调节物像至清晰。操作过程中,用移动器移动标本片,将合适的物像标本移动到视野中央进行观察。

(2) 高倍镜观察 由于一般的物镜都具有同焦性,所以在低倍物镜观察的基础上可直接转

换高倍镜观察。转换镜头后调节光线,使视野的明亮度适宜,再缓慢旋转细调节螺旋使物像清晰,进行观察。

(3) 油镜观察 先用粗调节螺旋将镜筒提升(或载物台下降)约2 cm,然后在载玻片的镜检部位滴一滴香柏油,从侧面注视,用粗调节螺旋将镜筒下降(或载物台上升),使油镜浸入香柏油中,并使镜头几乎与标本接触。从目镜内观察,适当调节亮度后,用粗调节螺旋将镜筒上升(或载物台下降),出现物像后改用细调节螺旋调至物像清晰为止。

油镜观察完毕后,升起镜筒(或下降载物台),将油镜旋出,先用擦镜纸擦去镜头上的香柏油,再用擦镜纸蘸取少量二甲苯,擦去镜头上残留的油迹,最后用擦镜纸擦掉二甲苯,注意朝一个方向擦拭。

3. 显微镜使用后的处理

(1) 转动粗调节螺旋,使镜筒上升(或载物台下降),取出载玻片标本。

(2) 用擦镜纸清洁目镜及物镜。

(3) 用柔软的绸布擦净机械部位的灰尘。

(4) 清洁后将物镜转成“八”字式,并缓慢下降镜筒(或上升载物台),使物镜置于载物台上。将聚光器降到最低位置,套上镜罩后放入显微镜柜中。

【注意事项】

1. 双手取放显微镜,保持显微镜直立、平稳,切忌单手提拎。

2. 观察时,双眼睁开以减少疲劳,也便于记录。

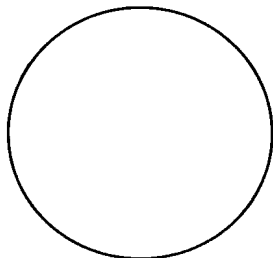
3. 在聚焦物像时,先从侧面注视,小心调节物镜靠近标本,然后用目镜观察,缓慢将物镜向离开标本的方向调节,以免物镜碰到载玻片而受到损伤或压碎载玻片。

4. 镜头只能用擦镜纸擦拭,切忌用手或其他纸、布,以免损伤镜头。油镜使用后必须用二甲苯擦去镜油,但用量不宜过多且要将残余的二甲苯擦净,以免溶解胶合树脂而使镜片脱落。

5. 显微镜使用完毕后,各部分归位,并将镜头转至“八”字式,于通风、干燥、少尘处存放。

【结果与分析】

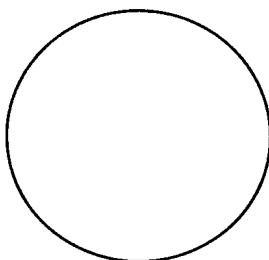
分别绘出低倍镜、高倍镜及油镜下观察到的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的形态图,并注明所使用物镜的放大倍数和总放大率。



菌种: _____

放大倍数: _____

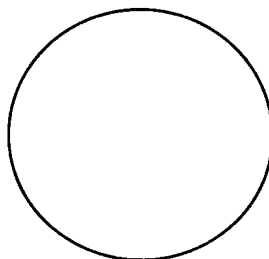
总放大率: _____



菌种: _____

放大倍数: _____

总放大率: _____



菌种: _____

放大倍数: _____

总放大率: _____