

微生物学实验法

-33

江西人民出版社

微生物学实验法

欧阳谅 编著

江西人民出版社出版

(南昌百花洲3号)

江西省新华书店发行 江西印刷公司印刷

开本 $787 \times 1092 \frac{1}{32}$ 印张6.25 字数27

1980年8月第1版 1980年8月江西第1次印刷

印数: 1—4,000

统一书号: 14110·31 定价: 0.51元

前 言

这是一本介绍微生物学实验方法的书，它包括微生物实验室最基本的实验内容。全书共分十一章，有显微镜的构造和使用；培养基的制备与灭菌；各类型微生物的形态观察；微生物的分离和纯化；微生物的各种计数方法；微生物的培养特征、生化特征鉴定法；各种酶的测定法；发酵液成分和菌体成分检验法；微生物的血清学鉴定法以及菌种的选育和保藏方法等，凡具备一般设备的微生物实验室都能够采用。书中较详细地介绍了各项实验的具体操作和基础理论，适应广大微生物工作者，特别是农业微生物工作者的需要，还可供高、中级专业学校微生物实验课作教材及中学生物课、农基课的参考书。

在编写过程中，江西共大农学系微生物教研组万淑婉、涂国全、陈新添、郑友康等同志曾协助搜集资料，陈新添同志并为全书绘制插图，在此一并表示谢意。由于作者水平有限，错误之处在所难免，请读者批评指正。

欧 阳 凉

于江西共大

目 录

第一章 显微镜

一、显微镜的构造	(1)
1. 显微镜的机械装置	(1)
2. 显微镜的光学系统	(3)
二、显微镜的放大倍数和分辨力	(5)
三、显微镜的使用方法	(7)
1. 选择良好的光源	(7)
2. 用低倍镜调好光照	(8)
3. 低倍接物镜观察	(8)
4. 高倍接物镜观察	(9)
5. 油浸接物镜观察	(9)

第二章 培养基的制备与灭菌

一、概述	(10)
二、培养基的制备	(13)
1. 培养基制备的一般过程	(13)
2. 几种常用培养基的制备	(14)
三、培养基的灭菌	(16)
1. 高压蒸汽灭菌法	(16)
2. 间歇蒸汽灭菌法	(18)
3. 滤过灭菌法	(20)

第三章 微生物形态观察

一、染色剂简述	(22)
---------	--------

二、细菌形态观察	(23)
1.细菌的简单染色法.....	(23)
2.细菌的芽孢染色法.....	(25)
3.细菌的荚膜染色法.....	(26)
4.细菌的革兰氏染色法.....	(27)
5.细菌的鞭毛染色法.....	(28)
6.细菌的抗酸性染色法.....	(30)
7.细菌细胞中异染颗粒染色法.....	(30)
8.细菌细胞中脂肪粒染色法.....	(31)
9.苏云金芽孢杆菌伴孢晶体染色法.....	(32)
10.细菌运动观察法.....	(32)
三、放线菌形态观察	(33)
1.印片观察法.....	(33)
2.直接显微镜观察.....	(34)
3.玻片培养法.....	(34)
4.赛璐玢培养及染色法.....	(36)
四、霉菌形态观察	(36)
1.霉菌菌丝水浸片观察.....	(36)
2.洗脱孢子观察担子梗形态法.....	(37)
3.悬滴培养法.....	(37)
4.玻片培养法.....	(38)
5.染色法鉴别死活孢子.....	(39)
五、微生物大小测量	(39)

第四章 微生物的分离和纯化

一、概述	(43)
二、微生物的稀释平板分离法	(43)
1.直接用融化的琼脂培养基稀释分离.....	(43)

2.用无菌水稀释分离·····	(45)
三、划线分离法 ·····	(45)
四、单细胞分离法 ·····	(47)
1.细菌的单细胞分离·····	(47)
2.真菌的单孢子分离·····	(47)
五、土壤微生物分离法 ·····	(48)
1.固氮菌的分离·····	(48)
2.根瘤菌的分离·····	(49)
3.磷细菌的分离·····	(51)
4.硅酸盐细菌的分离·····	(52)
5.硝化细菌的富集和分离·····	(53)
6.纤维分解微生物的分离·····	(55)
六、杀虫微生物分离法 ·····	(58)
1.杀虫细菌的分离·····	(58)
2.杀虫真菌的分离·····	(59)
〔附〕：昆虫病毒多角体的观察·····	(60)
七、植物病原菌分离法 ·····	(61)
1.植物病原细菌的分离·····	(61)
2.植物病原真菌的分离·····	(62)
八、抗生素放线菌分离法 ·····	(63)
九、菌株的纯化 ·····	(67)
1.细菌受细菌污染的纯化方法·····	(67)
2.细菌受真菌污染的纯化方法·····	(67)
3.真菌受细菌污染的纯化方法·····	(67)
4.真菌受真菌污染的纯化方法·····	(67)

第五章 微生物的计数法

一、直接显微镜计数法 ·····	(69)
-------------------------	--------

1. 利用血球计数板计算微生物·····	(69)
2. 利用目镜计数网计算微生物·····	(71)
3. 利用视野面积与涂片面积之比估算微生物·····	(71)
二、平板培养法计算活菌数·····	(72)
三、液体稀释法计数·····	(74)
四、利用标准比浊管测定菌数·····	(77)
五、利用光电比色计测算菌数·····	(78)
六、土壤中各类型微生物数量测定法·····	(81)
1. 土壤好气性细菌的测数·····	(81)
2. 土壤真菌测数·····	(81)
3. 土壤放线菌测数·····	(82)
4. 土壤中氨化作用细菌测数·····	(82)
5. 土壤中固氮细菌的测数·····	(82)
6. 土壤中无机磷细菌的测数·····	(83)
7. 土壤中有机磷细菌的测数·····	(83)
8. 土壤中硝化细菌的测数·····	(83)
9. 土壤中反硝化细菌的测数·····	(84)
10. 土壤中好气性纤维分解菌的测数·····	(85)
七、根瘤菌肥料含菌数测定·····	(85)

第六章 微生物培养特征的鉴定

一、平板培养特征的鉴定·····	(86)
二、斜面培养特征的鉴定·····	(90)
三、半固体穿刺培养特征的鉴定·····	(91)
四、液体培养特征的鉴定·····	(92)

第七章 细菌的生理生化常规鉴定法

一、微生物的碳源测定·····	(95)
-----------------	--------

二、微生物的氮源测定·····	(96)
三、糖类发酵试验·····	(96)
四、淀粉水解试验·····	(98)
五、乙酰甲基甲醇试验(V.P试验)·····	(98)
六、甲基红试验(M.R试验) ·····	(100)
七、明胶水解试验·····	(101)
1.穿刺法·····	(101)
2.平板培养法·····	(102)
八、硝酸盐还原试验·····	(102)
九、产氨试验·····	(105)
十、产硫化氢试验·····	(106)
十一、产吲哚试验·····	(107)
十二、石蕊牛乳试验·····	(108)
十三、七叶林水解试验·····	(109)

第八章 微生物发酵液和菌体主要成分检验法

一、发酵液中糖量的测定·····	(111)
1.斐林氏法测定还原糖含量·····	(111)
2.碘量法测定还原糖含量·····	(113)
3.蒽酮法测定含糖量·····	(116)
4.总糖的测定·····	(119)
二、蛋白质的测定·····	(119)
1.简易定氮法·····	(119)
2.微量凯氏定氮法·····	(121)
三、氨基氮的测定·····	(124)
四、脂肪的测定·····	(126)
1.发酵液中脂肪的测定·····	(126)

2. 菌体中脂肪的测定·····	(127)
五、总磷的测定·····	(128)
六、核酸和其他含磷化合物测定·····	(130)
1. 核酸和其他含磷化合物的提取·····	(130)
2. 核糖核酸的测定·····	(132)
3. 脱氧核糖核酸的测定·····	(133)
七、无机磷的测定·····	(133)
八、亚硝酸盐的测定·····	(134)
九、丙酮酸的测定·····	(135)
十、柠檬酸的测定·····	(136)

第九章 微生物酶的测定

一、氧化酶的测定·····	(138)
1. Kavacs 测定法·····	(138)
2. 细胞色素氧化酶测定·····	(139)
二、接触酶(过氧化氢酶)测定·····	(140)
三、尿素酶测定·····	(140)
四、酯酶测定·····	(141)
五、色氨酸酶测定(产吲哚测定)·····	(142)
六、氨基酸氧化酶的测定·····	(142)
七、糖苷水解酶的测定·····	(143)
八、脱氧核糖核酸酶的测定·····	(144)
九、酸性磷酸酯酶和碱性磷酸酯酶的测定·····	(144)
十、芳香基硫酸酯酶测定·····	(145)
十一、肽酶测定·····	(146)
十二、淀粉酶测定·····	(147)
十三、纤维素酶, 吉丁质酶测定·····	(147)

第十章 微生物的血清学鉴定法

一、抗血清的制备	(148)
1. 抗原制备	(148)
2. 免疫	(149)
3. 采血和制备抗血清	(150)
4. 抗体吸收	(150)
二、凝集反应	(151)
1. 试管凝集试验	(151)
2. 载玻片凝集试验	(153)
三、沉淀试验	(154)

第十一章 微生物的选种和菌种保藏

一、微生物的选种	(156)
1. 从自然界选种	(156)
2. 从已有菌株中选种	(156)
3. 人工诱变选种	(156)
3. 营养缺陷型的筛选方法	(166)
二、菌种保藏	(172)
1. 斜面保藏法	(172)
2. 矿油保藏法(即石蜡油保藏法)	(173)
3. 砂土管保藏法	(173)
4. 固体曲保藏法	(174)
5. 冰冻真空干燥保藏法	(174)
三、菌种的复壮	(176)
1. 原菌种管中分离	(176)
2. 通过寄主复壮	(177)
3. 改变培养条件	(177)

4.利用低温处理进行复壮.....	(178)
-------------------	-------

附录:

一几种主要染色剂的配制方法.....	(180)
二常见元素的原子量表.....	(184)
三常用酸碱溶液的浓度.....	(184)
四实验室常用溶液的配制.....	(185)
五几种缓冲液的配制.....	(185)
六pH指示剂的配制.....	(188)

第一章 显微镜

一、显微镜的构造

微生物的个体很小，无论是观察它的外部形态或细胞内部结构都必须使用显微镜，而要正确使用显微镜，首先应熟悉显微镜的构造。现代光学显微镜的构造，分机械装置和光学系统两部分。（图1—1）

1. 显微镜的机械装置

镜脚（或称镜座）是显微镜的座基，稳定显微镜之用。

镜臂 是显微镜的把手，直筒显微镜的镜臂和镜脚之间由一个倾斜关节联结，可藉以把镜筒斜仰至一定角度，更便于观察。

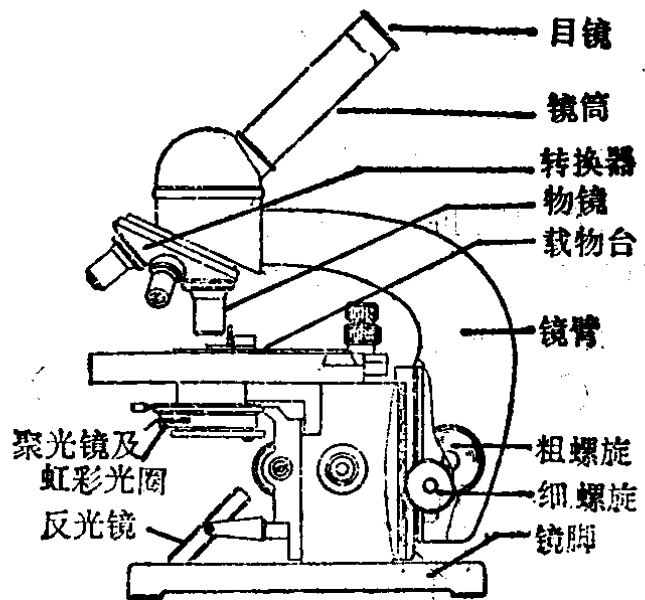


图 1—1 显微镜

镜筒 形成接目镜与接物镜间的暗室，自接目镜到接物镜螺口部为镜筒的全长，有些显微镜的镜筒带有套筒，可以调节长短。

物镜转换器（简称转换器） 物镜转换器一般都装在镜筒下方，是由两个金属圆盘叠合组成，上有 3—4 个园孔，可依物镜放大倍数高低，顺序安装 3—4 个接物镜。转动转换器，可以按需要将其中的某一个接物镜和镜筒接通，与镜筒上方的接目镜配合，构成一放大系统。

转换器的两个金属园盘中，上面那个园盘的正后方装有一

弹簧舌片，下面那个园盘（旋转盘）侧面与每个接物镜相应的位置各有一小凹缝。转换物镜时，必须使弹簧舌片嵌入此凹缝中，才是达到了正确的位置，这一点，初学的人必须特别注意。

旋转转换器，应该用手指捏住旋转盘使它转动，而不宜用手指捏住物镜来推动转换盘，否则长期使用后，会使光轴歪斜，破坏物镜与目镜的合轴。

载物台 位于镜筒的下方，中央有一孔，为光线通路，台上装有玻片推动器或一对弹夹，其作用是推动和固定标本的位置，使镜检标本恰好位于视野中心。

推动器 是移动标本的机械装置，由一横向和一纵向两个推进齿轴的金属架组成，两向配合移动，可以把标本上的任一点很方便的推进到视野中心，有的推动器的纵横架杆上还有刻度标尺，观察时记下坐标位置，便可对标本上的各部位进行重复观察。（图1—2）

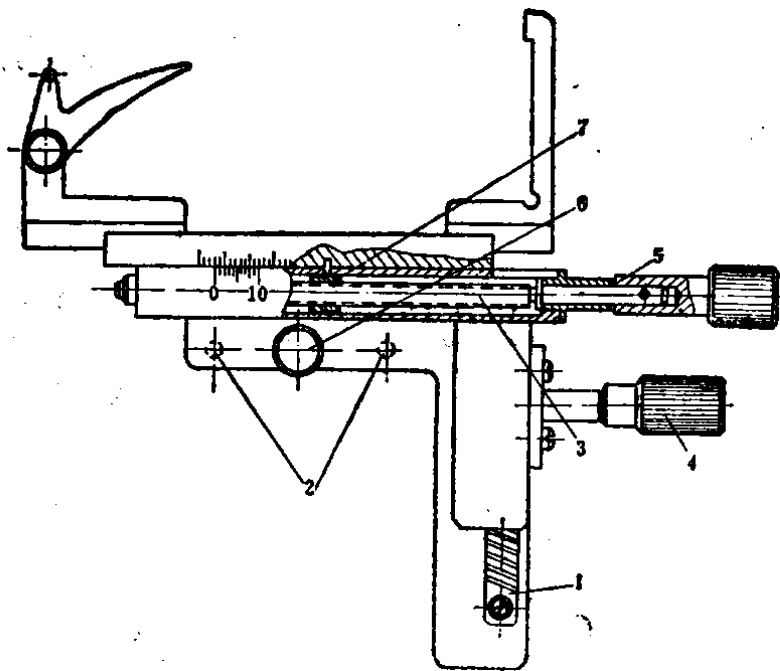


图 1—2 推动器

- 1—齿条 2—固定销 3—多头螺杆 4—纵向手轮
5—横向手轮 6—滚花螺钉 7—活灵

粗动螺旋和细动螺旋 一般安装在镜筒后方的两侧，有的则是装在镜座支柱的侧面。大的为粗动螺旋，小的为细动螺旋。它们可使镜筒升降，目的是使观察物与物镜的距离恰好等于物镜的工作距离。要使镜筒作较大幅度升降，可用粗动螺旋，要使之作甚微的升降，则用微动螺旋。

微动螺旋每转一圈，镜筒升降0.1毫米(100微米)。很多显微镜的微动螺旋轮上有刻度与指标，每一小格表示升降0.002毫米(即2微米)，利用这种刻度，可以了解镜筒升降了多少。

当微动螺旋已旋到极限时，则不应继续用力旋动，而应该重新小心地调节粗动螺旋，使物镜与标本距离稍微拉开一些，然后反拧细动螺旋便可将物镜旋至最适高度。

2. 显微镜的光学系统

反光镜 由一平面镜和一凹面镜组成，装在显微镜的下方，可以在水平与垂直两个方面任意转动。它的功用是把光源照射来的光线反射向上，使穿过聚光镜，照明标本。当外源光较强时宜使用平面镜，较弱时宜使用凹面镜。

聚光器及其升降螺旋 聚光器位于反光镜上方，由一组聚光透镜组成(图1—3)，它的功用是将反光镜反射来的光线聚集为一强光锥，直接送到玻片上。在镜座支柱侧面有一专司聚光器升降的螺旋，可调节聚光器的高低，从而调节光度。一般用低倍接物镜时应降低聚光器，用油浸镜观察时，聚光器应升至最高。

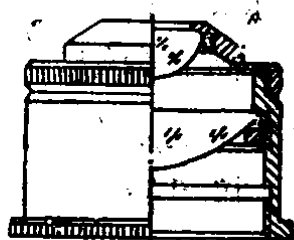


图 1—3 聚光镜

虹彩光圈 装在聚光器上，位于聚光透镜下方，由多数金属页片组合而成，有一小柄控制，推移小柄，可使光圈由全闭合到全张开达到任意大小，藉以调节入射光量，使照明恰到好处。虹彩光圈的金属页片很脆薄，在推动把手时不宜用力。

过猛，更不要用手指触摸页片，以免造成损坏。

接物镜 接物镜是显微镜的最重要部件，因为它决定着显微镜的性能，一台显微镜通常有三个接物镜，一个是低倍镜（放大 8—10 倍），一个是高倍镜（放大 40—60 倍），这两个都是干燥系统接物镜，另一个是油浸系接物镜，简称油镜（放大 90—100 倍）。三个接物镜按放大倍数顺序安装在转换器的三个螺口上，便于依次转换使用。

低倍、高倍和油浸接物镜的识别方法，当然可以直接读它上面刻的倍数，但简便的方法是：一般低倍接物镜较短，高倍接物镜较长，（图1—4）油镜虽也较长，但它上面常刻有 1—2 道黑圈作为标记。使用时一定要把各个接物镜识别清楚，不可认错，否则在转换接物镜时有碰压镜头，损坏物镜的危险。

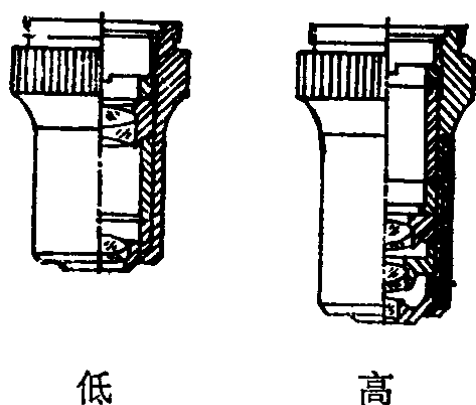


图 1—4 接物镜（剖视图）

放大倍数越高的接物镜，它的焦距越小，工作距离也越小，也就是说，在观察时它和所观察物体的距离越小，因此油镜观察时镜头和玻片极为接近，例如：国产的XSP—13型1250×生物显微镜，在使用100×油浸镜头时，工作距离只有0.198毫米，这是在使用操作中应该注意的。

接目镜 接目镜的功用，是把接物镜放大的物象进一步放大。它通常由两片透镜组成，上面的透镜叫做接目透镜，下面的叫会聚透镜，上下透镜之间装有一个光阑，这个光阑的大小决定了视野的大小，光阑的边缘也就是视野的边缘，所以这个光阑叫做视野光阑。因为标本正好在这个光阑面上成象，所以根据工作需要（例如：教学用时）可以在这个光阑上粘一小段细发做成指针。

每具显微镜通常备有 8 倍, 10 倍, 15 倍等几种接目镜, 使用时任选一只, 装于镜筒上端。

与接物镜相反, 接目镜越长, 它的放大倍数越小。反之, 接目镜越短, 它的放大倍数越大。

二、显微镜的放大倍数和分辨力

显微镜的成象原理如图 1—5 所示: 有很短的焦距的接物镜 L_1 给物体 PQ 造出放得很大的实像 $P'Q'$, 再由目镜 L_2 对这个实像作第二次放大, 得出虚像 $P''Q''$

用 n_1 表示接物镜的放大率, n_2 表示接目镜的放大率则:

$$n_1 = \frac{P'Q'}{PQ} \quad n_2 = \frac{P''Q''}{P'Q'}$$

两式相乘, 得:

$$n_1 n_2 = \frac{P'Q'}{PQ} \cdot \frac{P''Q''}{P'Q'} = \frac{P''Q''}{PQ}$$

可见显微镜的放大率 $\left(\frac{P''Q''}{PQ}\right)$, 等于接目镜放大率与接目镜放大率的积。

但实际放大倍数, 因镜筒长度而有所变化, 所以精确的计算方法, 应采用下面公式:

$$M = \frac{\Delta}{F_1} \times \frac{D}{F_2}$$

其中: M = 显微镜的放大倍数

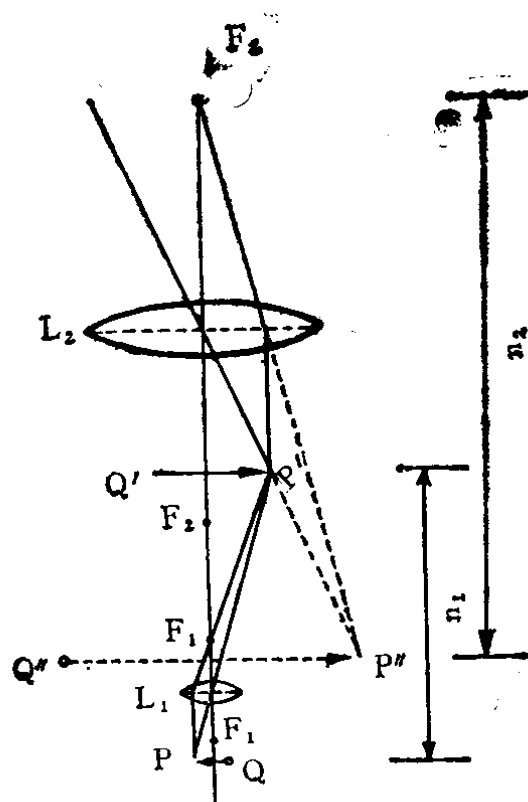


图 1—5 显微镜工作原理

F_1 = 接物镜的焦距 (毫米)

F_2 = 接目镜的焦距 (毫米)

Δ = 光学镜筒长度 (即从接物镜后焦点到接目镜前焦点的距离, 一般为140—160毫米)

D = 明视距离 (人眼睛的明视距离为250毫米)

举例说明: 设一显微镜的光学镜筒长度为 160 毫米, 接物镜焦距为 1.8 毫米, 接目镜焦距25毫米, 则此显微镜的放大倍数为:

$$M = \frac{160}{1.8} \times \frac{250}{25} = 888.9 \text{ 倍}$$

上面的公式表明, 显微镜的放大倍数, 随光学镜筒长度增大而增大。当然在使用显微镜时, 如抽长机械镜筒的长度, 也就会增大光学镜筒的长度, 从而提高放大倍数。

我们使用显微镜, 除了要达到高度的放大率外, 更重要的是要求有良好的分辨力。所谓分辨力是指能辨别物体上两个最小距离的点的本领。也就是说显微镜所能辨别的两点间的距离越小, 表明它的分辨率越大, 更能看清楚物体结构中的最细小部分。

显微镜的分辨能力, 完全由接物镜的质量决定的, 假如接物镜产生的像中没有分清这些细小部分, 它们就根本不可能在目镜放大的虚像中再显示出来。接物镜分辨力的大小则是由它的数值孔径 (又称开口率) 决定的, 所谓数值孔径 (numerical aperture 简写 N.A.) 是指从被观察物体射到物镜两边缘的两光线所形成的夹角 (称镜口角) 之半的正弦与物镜和玻片间介质折光率之积, 即:

$$N.A. = n \cdot \sin \theta$$

N.A. 为数值孔径, n 为介质折光率, θ 为镜口角之半 (见图1—6)。