



普通高等教育“十二五”规划教材
微生物学实验教程系列

微生物生物学实验教程

王颖 主编 赵良启 主审

BIOLOGY OF
MICROORGANISMS
EXPERIMENTATION



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材
微生物学实验教程系列

微生物生物学实验教程

王 颖 主 编
赵良启 主 审

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书涵盖了 34 个微生物学基础实验,包括常用的显微镜使用技术,多种代表性微生物细胞的形态描述及结构染色技术,实验室常用培养基的配制及灭菌技术,微生物生长及群体生长的测定方法,微生物的生理、生化反应,噬菌体效价测定,微生物遗传育种技术,微生物的分离、纯化和检测方法,菌种保藏措施等内容。本书涉及的微生物种类各异,设计的培养技术和接种方法多样,提供的检测手段简明而规范,书后还附有常用培养基及染色剂等的配制方法,并附彩图展示部分重要的实验结果。

本书可作为高等院校微生物生物学基础实验教材,同时也可作为微生物学及相关领域研究人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

微生物生物学实验教程 / 王颖主编. —北京:科学出版社, 2014.8
普通高等教育“十二五”规划教材 微生物学实验教程系列

ISBN 978-7-03-041734-3

I. ①微… II. ①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(2014)第 193391 号

责任编辑:刘 畅 / 责任校对:钟 洋
责任印制:霍 兵 / 封面设计:迷底书装

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

三河市骏杰印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014 年 8 月第 一 版 开本:720 × 1000 1/16

2014 年 8 月第一次印刷 印张:10 彩插:4 页

字数:201 000

定价:25.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)



微生物学实验教程系列编委会

主 委	任 员	李季伦	中国农业大学
		李季伦	中国农业大学
		陈文新	中国农业大学
		邢来君	南开大学
		陈冠军	山东大学
		赵良启	山西大学
		顾桂芬	中国农业大学
		楼慧强	中国农业大学
		何 群	中国农业大学
		李 颖	中国农业大学
		李大伟	中国农业大学
		王贺祥	中国农业大学
		封文海	中国农业大学
		宋 渊	中国农业大学
		袁红莉	中国农业大学
		文 莹	中国农业大学

《微生物生物学实验教程》编委会名单

主 编 王 颖

主 审 赵良启

编委会成员（按姓氏笔画排序）

王 颖 （中国农业大学）

王凤琴 （河南农业大学）

李 颖 （中国农业大学）

辛明秀 （北京师范大学）

张 婵 （太原科技大学）

陈文峰 （中国农业大学）

黄晓波 （太原理工大学）

同努力的结果。

衷心感谢南开大学邢来君教授、山东大学陈冠军教授、山西大学赵良启教授欣然接受我们的邀请，不仅为本套教材的审稿付出辛勤劳动，同时作为本套实验教程编委会成员，为保证教材的质量献计献策。感谢中国农业大学生物学院领导的支持和“教育部高等学校专业综合改革试点”项目的资助，感谢来自兄弟院校全体参编教师们的认真合作。感谢科学出版社为编辑和出版本套教材所付出的努力。希望这套实验教程的出版，为本学科和相关学科读者的学习和工作带来有益的参考，也希望广大读者提出批评和建议，以便我们今后做出修改。

A stylized handwritten signature in black ink, consisting of three characters: '李', '训', and '伦'.

2014年1月

前 言

中国农业大学微生物专业开设的“普通微生物学”课程源于1958年，它像一把开启微生物世界的钥匙，引领着学生进入了充满奇趣的“微生物世界”，培养了学生浓厚的学习兴趣。目前的“微生物生物学”课程是在原课程基础上随着教学改革的进程而更名和建设的，其教学宗旨并没有改变。多年来，一代又一代的教师不断努力，为本课程的建设打下了坚实的基础。教师们不断探索教学规律，始终注重将理论与实践相结合，坚持基础知识与前沿技术并重的教学理念。实验教材内容的更新和充实，也一直贯穿于不断的教学改革中。

《微生物生物学实验教程》的基本特点是：①内容全面，全书共分为5章，包括了显微技术、微生物的形态观察、微生物的纯培养技术、营养因素与环境条件对微生物生长的影响及应用微生物技术，目的是使学生循序渐进地掌握微生物学基本的操作理念和实验技能；②每个实验都尽可能详细地阐述理论依据、技术难点和注意事项，希望能有效地帮助学生提高对实验原理和关键技术的理解；③每个实验都配有相应的思考题和参考文献，便于提高学生思考和分析的能力；④在实验内容的安排上，包括了验证性实验和综合性实验等不同的设计，希望能有效地逐步提高初学者的实验能力，为后续相关课程的深入学习奠定基础。

参加编写的人员都是活跃在教学一线的中青年教师，他们在实践中不断探索本课程的教学规律，客观地把握了本书的写作内容。本书的编写以中国农业大学生物学科基地的“微生物生物学实验指导”为基础，并汇集了多所兄弟院校教师的经验和智慧。实验一至实验四由陈文峰编写，实验五、实验二十四、实验二十九及实验三十三由李颖编写，实验六至实验十一及实验二十五由王颖编写，实验十二至实验十五由辛明秀编写，实验十六、实验十七、实验二十六至实验二十八由黄晓波编写，实验十八、实验二十二、实验二十三、实验三十二及实验三十四由王凤琴编写，实验十九至实验二十一、实验三十及实验三十一由张婵编写，全书由王颖统稿，赵良启教授主审。

衷心感谢科学出版社的帮助和中国农业大学“教育部高等学校专业综合改革试点”项目的资助。由于我们的水平有限，难免存在不足之处，恳切希望广大读者提出批评和建议，以便我们今后改进。

编 者

2014年7月

实验规则

(1) 按时上课，不迟到早退。如有疾病不能上课，应向任课教师提供医院证明。

(2) 实验前请预习相关实验内容，明确实验目的、实验原理、实验操作方法，以保证实验顺利进行。

(3) 做实验时严格遵守实验纪律及操作规程，培养严肃认真的科学态度。不随意涂改、编造实验数据，要对实验结果进行认真分析。

(4) 在实验台上除实验用具和《微生物生物学实验教程》外，不乱放其他物品。勿将菌液、染液、药品等洒在桌面或地面，如有菌液污染桌面或地面，不随便涂抹，应使用 75%乙醇或 5%苯酚溶液消毒。

(5) 实验过程中保持实验室肃静，不随便走动，不高声谈笑。

(6) 接种时必须严格遵守无菌操作规程，不准讲话。接种用的接种环、接种针及其他接种用具，在使用前后必须经过火焰灭菌或放在指定的消毒器皿内，不准随便放置。

(7) 实验完毕时，整理实验台，擦净桌面，打扫地面后方可离开。

(8) 爱护仪器、用具，节约药品，并按指定方法使用，不准擅自乱用。如有损坏或故障及时报告指导教师，并登记在物品损坏登记簿上。

(9) 按时观察实验结果，以实事求是的科学态度完成实验报告，力求简明准确。实验报告需包括实验目的、实验原理、实验方法、实验结果及回答问题（讨论）五部分内容。字迹要清楚，绘图要真实。

目 录

总序

前言

实验规则

第一章 显微技术	1
实验一 亮视野显微镜的使用	1
实验二 暗视野显微镜的使用	6
实验三 相差显微镜的使用	9
实验四 荧光显微镜的使用	13
实验五 趋磁细菌细胞及其磁小体形态的透射电镜观察	15
第二章 微生物的形态观察	21
实验六 细菌的简单染色	21
实验七 细菌的革兰氏染色	24
实验八 细菌的芽胞染色	27
实验九 细菌荚膜染色	30
实验十 细菌的鞭毛染色及其运动性观察	32
实验十一 细菌的抗酸性染色	35
实验十二 放线菌的形态观察	39
实验十三 酵母菌形态及子囊孢子的观察	44
实验十四 毛霉与根霉的形态观察	48
实验十五 青霉、曲霉及镰刀菌的形态观察	53
第三章 微生物的纯培养技术	57
实验十六 几种常见培养基的制备	57
实验十七 高压蒸汽灭菌和干热灭菌	64
实验十八 厌氧细菌的培养技术	67
第四章 营养因素与环境条件对微生物生长的影响	75
实验十九 营养元素对微生物生长的影响	75
实验二十 温度对微生物生长的影响	77
实验二十一 pH 对微生物生长的影响	79
实验二十二 紫外线对微生物生长的影响	81
实验二十三 化学药剂对微生物生长的影响	84

第五章 应用微生物技术	87
实验二十四 噬菌体效价的测定	87
实验二十五 微生物对大分子物质的水解	91
实验二十六 微生物对糖的利用	94
实验二十七 显微镜下微生物细胞的直接计数	96
实验二十八 显微镜下微生物细胞大小的测量	98
实验二十九 大肠杆菌生长曲线及其代时测定	101
实验三十 环境中微生物的检测	104
实验三十一 稀释法分离土壤微生物	107
实验三十二 环境中大肠菌群的测定	110
实验三十三 自然乳酸发酵及其菌株和产物的检测	117
实验三十四 微生物菌种保藏技术	124
附录 I 常用培养基及试剂	130
附录 II 常用染液	139
附录 III MPN 检索表	143
实验部分照片举例	

第一章 显微技术

实验一 亮视野显微镜的使用

一、实验目的

1. 熟悉普通亮视野显微镜的构造及各部分的功能。
2. 学习并掌握油镜的工作原理及正确的使用方法。

二、实验原理

(一) 显微镜的基本构造

普通亮视野显微镜是一种精密的光学仪器，通常能将物体放大 1500~2000 倍。它的构造可分为两大部分：一为机械装置，二为光学系统（图 1-1），只有这两部分很好地配合使用，才能发挥显微镜的作用。

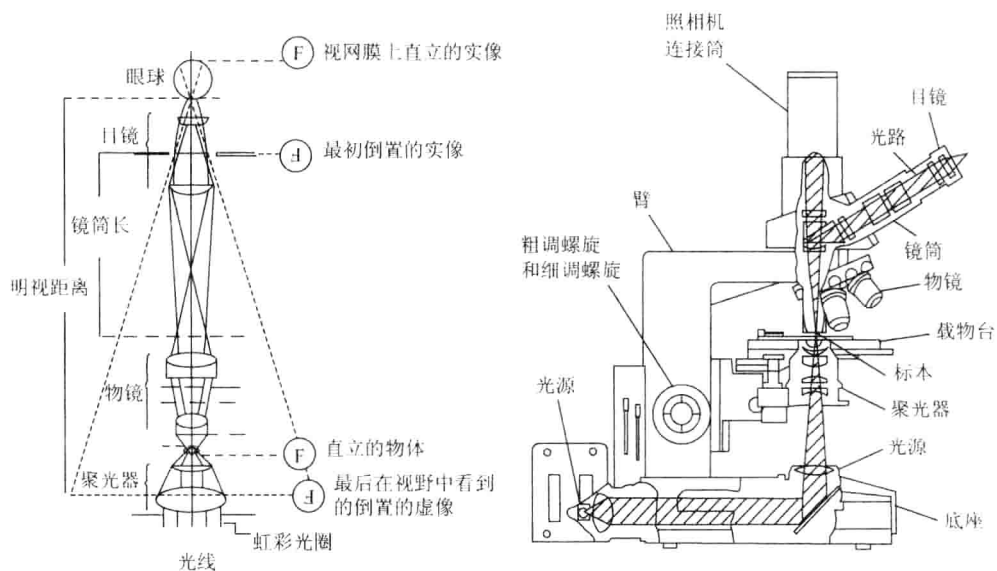


图 1-1 普通亮视野显微镜的成像原理示意图

1. 机械装置

普通亮视野显微镜的机械装置部分包括：镜座、镜筒、物镜转换器、载物台、推动器、粗调螺旋、细调螺旋。

2. 光学系统

普通亮视野显微镜的光学系统包括：光源、物镜、聚光器、目镜。

显微镜的物镜使被检物体第一次成像，物镜成像的质量对显微镜的分辨率有着决定性的作用。物镜的性能取决于物镜的数值孔径（numerical aperture, NA），每个物镜的数值孔径都标在物镜的外壳上，数值孔径越大，物镜的性能越好。根据物镜放大率的高低，可分为①低倍物镜：指 $1\times\sim 6\times$ ，NA 值为 $0.04\sim 0.15$ 。②中倍物镜：指 $6\times\sim 25\times$ ，NA 值为 $0.15\sim 0.40$ 。③高倍物镜：指 $25\times\sim 63\times$ ，NA 值为 $0.35\sim 0.95$ 。④油镜：指 $90\times\sim 100\times$ ，NA 值为 $1.25\sim 1.40$ 。

聚光器安装在载物台下，其作用是将光源经反光镜反射来的光线聚焦于样品上，以得到最强的照明，使物像获得明亮清晰的效果。聚光器的高低可以调节，使焦点落在被检物体上，以得到最大亮度。

目镜的作用是把物镜放大的物像再放大一次，并把物像映入观察者的眼中。目镜的结构较物镜简单，普通光学显微镜的目镜通常由两块透镜组成，上端的透镜称“接目镜”，下端的透镜称“场镜”。

（二）光学显微镜的成像原理

显微镜的放大功能是通过透镜来完成的，单透镜成像具有像差，影响像质。由单透镜组合而成的透镜组相当于一个凸透镜，放大作用更好。图 1-1 是显微镜的成像原理模式。

（三）显微镜的性能

显微镜分辨能力的高低决定于光学系统的各种条件。被观察的物体必须放大率高，而且清晰。物体放大后，能否呈现清晰的细微结构，首先取决于物镜的性能，其次为目镜和聚光器的性能。

1. 数值孔径

数值孔径也称镜口率（或开口率），简写为 NA，在物镜和聚光器上都标有数值孔径。数值孔径是物镜和聚光器的主要参数，也是判断它们性能的最重要指标。数值孔径和显微镜的各种性能有密切关系，它与显微镜的分辨率成正比；与焦深成反比；与镜像亮度的平方根成正比。

数值孔径（NA）可用下式表示：

$$NA = n \cdot \sin \alpha$$

式中， n ——物镜与标本之间的介质折射率；

α ——最大入射角的半数，即物镜的镜口角的半数。

所谓镜口角是指从物镜光轴上的物点发出的光线与物镜前透镜有效直径的边缘所张的角度，见图 1-2。

镜口角总是小于 180° 。因为空气的折射率为 1，所以

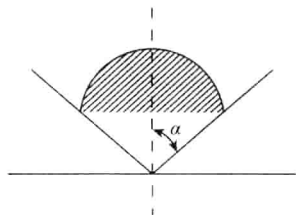


图 1-2 物镜的光线入射角

干燥物镜的数值孔径总是小于 1，一般为 0.05~0.95；油镜如用香柏油（折射率为 1.515）浸没，则数值孔径最大可接近 1.5。虽然理论上数值孔径的极限等于所用浸没介质的折射率，但实际上从透镜的制造技术看，是不可能达到这一极限的。通常在实用范围内，高级油镜的最大数值孔径是 1.4。

几种物质的介质的折射率如下：空气为 1.0，水为 1.33，玻璃为 1.5，甘油为 1.47，香柏油为 1.52。

介质折射率对物镜光线通路的影响见图 1-3。

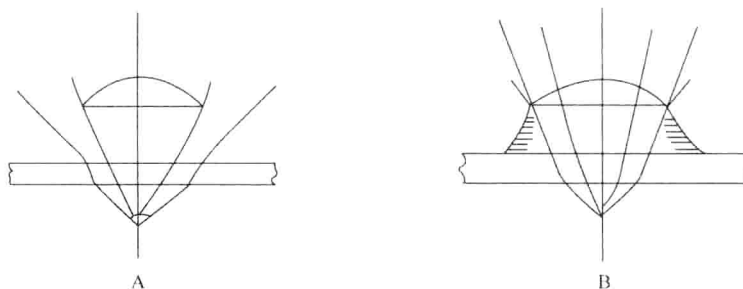


图 1-3 物镜干燥系 (A) 与油浸系 (B) 的光线通路

2. 分辨率 (D)

分辨率 D 可用下式表示： $D = \lambda / (2NA)$

可见光的波长 (λ) 为 0.4~0.7 μm ，平均波长为 0.55 μm 。这也是肉眼所能感受的光波的平均长度。若用数值孔径为 0.65 的物镜，则 $D = 0.55 / (2 \times 0.65) = 0.42\mu\text{m}$ 。这表示被检物体长度在 0.42 μm 以上时可见，若小于 0.42 μm 就不可见。如果使用数值孔径为 1.25 的油镜时，则 $D = 0.55 / (2 \times 1.25) = 0.22\mu\text{m}$ ，凡被检物体长度大于这个数值，均可见。由此可见， D 值越小，分辨率越高，物像越清晰。根据上式，可通过：①减低波长；②增大折射率；③加大镜口角来提高分辨率。紫外线作光源的显微镜和电子显微镜就是利用短光波来提高分辨率以检视较小物体的。物镜分辨率的高低与造像是否清楚有密切关系；目镜没有物镜所具有的这种性能，目镜只放大物镜所造的像。

3. 放大率

显微镜放大物体，首先经过物镜第一次放大造像，目镜在明视距离造成第二次放大像。放大率就是最后的像和原物体两者体积大小之比。因此，显微镜的放大率 (V) 等于物镜放大率 (V_1) 和目镜放大率 (V_2) 的乘积，即 $V = V_1 \times V_2$ 。

4. 焦深

在显微镜下观察一个标本时，焦点对在某一像面时，物像最清晰，这像面为目的面。在视野内除目的面外，还能在目的面的上面和下面看见模糊的物像，这两个面之间的距离称为焦深。物镜的焦深和数值孔径及放大率成反比，即数值孔径和放大率越大，焦深越小。因此调节油镜比调节低倍镜要更加仔细，否则容易使物像滑

过而找不到。

三、实验材料

光学显微镜、擦镜纸、吸水纸、无水乙醚：无水乙醇（3：1）混合液或二甲苯置于双层瓶中。

四、实验步骤

显微镜结构精密，使用时必须细心，要按下述操作步骤进行。

1. 观察前的准备

（1）显微镜从显微镜柜或镜箱内拿出时，要用右手紧握镜臂，左手托住镜座，平稳地将显微镜搬运到实验桌上。

（2）将显微镜放在自己身体的左前方，距离桌子边缘约 10cm，右侧可放记录本或绘图纸。

（3）将 10×物镜转入光路，将聚光器上的虹彩光圈打开到最大位置。打开电源，用双眼观察目镜中视野的亮度，通过调节电流旋钮来调节光照强弱，使视野的光照达到最明亮最均匀为止。

（4）调节光轴中心，在使用显微镜进行观察时，其光学系统中的光源、聚光器、物镜和目镜的光轴及光阑的中心必须跟显微镜的光轴同在一条直线上。

2. 低倍镜观察

镜检任何标本都要养成必须先用低倍镜观察的习惯。因为低倍镜视野较大，易于发现目标和确定检查的位置。

将标本片放置在载物台上，用标本夹夹住，移动推动器，使被观察的标本处在物镜正下方，转动粗调螺旋，使物镜调至接近标本处，用目镜观察并同时用粗调螺旋慢慢升起镜筒（或下降载物台），直至物像出现，再用细调螺旋使物像清晰。用推动器移动标本片，找到合适的目的像并将它移到视野中央进行观察。

3. 高倍镜观察

在低倍物镜观察的基础上转换高倍物镜。较好的显微镜，低倍、高倍镜头是同焦的，在正常情况下，高倍物镜的转换不应碰到载玻片或其上的盖玻片。若使用不同型号的物镜，在转换物镜时要从侧面观察，避免镜头与玻片相撞。然后从目镜观察，调节光照，使亮度适中，缓慢调节粗调螺旋，使载物台上升（或镜筒下降），直至物像出现，再用细调螺旋调至物像清晰，找到需观察的部位，并移至视野中央进行观察。

4. 油镜观察

油镜的工作距离（指物镜前透镜的表面到被检物体之间的距离）很短，一般在 0.2mm 以内，再加上一般光学显微镜的油镜没有“弹簧装置”，因此使用油镜时要特别细心，避免由于“调焦”不慎而压碎标本片并使物镜受损。

5. 油镜的使用

(1) 先用粗调螺旋将镜筒提升(或将载物台下降)约 2cm, 并将高倍镜转出。

(2) 在玻片标本的镜检部位滴上 1 滴香柏油。

(3) 从侧面注视, 用粗调螺旋将载物台缓缓地上升(或镜筒下降), 使油镜浸入香柏油中, 直至镜头几乎与标本接触。

(4) 从接目镜内观察, 放大视场光阑及聚光镜上的虹彩光圈(带视场光阑油镜开大视场光阑), 上调聚光器, 使光线充分照明。用粗调螺旋将载物台徐徐下降(或镜筒上升), 当出现物像一闪后改用细调螺旋调至最清晰。如油镜已离开油面而仍未见到物像, 必须再从侧面观察, 重复上述操作。

(5) 观察完毕, 下降载物台, 将油镜头转出, 先用擦镜纸擦去镜头上的油, 再用擦镜纸蘸少许无水乙醚: 无水乙醇(3:1)混合液或二甲苯, 擦去镜头上残留油迹, 最后再用擦镜纸擦拭 2~3 下即可(注意: 要向一个方向擦拭, 同时不要过量使用二甲苯, 以免其残留在镜头上影响观察)。

(6) 将各部分还原, 转动物镜转换器, 使物镜头不与载物台通光孔相对, 而是成“八”字形位置, 再将镜筒下降至最低, 降下聚光器, 反光镜与聚光器垂直, 用一个干净手帕将接目镜罩好, 以免目镜头沾污灰尘。最后用柔软纱布清洁载物台等机械部分, 然后将显微镜放回柜内或镜箱中。

五、实验结果

学会光学显微镜的使用, 并学会对不同微生物示范片(如细菌、真菌)进行观察。

六、思考题

1. 请说出双层瓶中液体的成分和用途, 用光学显微镜观察细菌制片时吸水纸和擦镜纸各有什么用途?

2. 为什么在观察细菌制片时多使用油镜? 使用油镜时应注意些什么? 如何清理?

3. 如何确定光学显微镜中图像的放大倍数? 什么是显微镜的分辨率? 光学显微镜最大的分辨率一般是多少?

4. 你在实验过程中使用过何种显微镜? 通常有几种型号的物镜? 如何区分? 它们的放大倍数一般是多少? 请说出在观察下列微生物形态时, 应使用多大放大倍数的物镜头?

A. 大肠杆菌 B. 酵母菌 C. 蓝细菌 D. 曲霉 E. 黑化链霉菌

七、参考文献

刘国生. 2007. 微生物学实验技术. 北京: 科学出版社

Madigan M T, Martinko J M, Stahl D A, et al. 2012. *Brock Biology of Microorganism*. 13th ed. Boston: Benjamin Cummings

实验二 暗视野显微镜的使用

一、实验目的

1. 学习暗视野显微镜的工作原理及使用方法，了解其应用范围。
2. 掌握使用暗视野显微镜观察微生物样品形态及细菌运动性的基本技术。

二、实验原理

暗视野显微镜工作的基本原理是丁达尔效应：当一束光线透过黑暗的房间，从垂直于入射光的方向可以观察到空气里出现一条光亮的灰尘“通路”。暗视野显微镜是在普通亮视野显微镜的结构基础上改造而成的，它使用专用的聚光镜，其中央有挡光片，使照明光线不能由下而上地通过直射进入物镜，从而使光改变路径，只有被标本反射和衍射的光线从周边进入物镜（图 2-1），因而视野的背景是黑的，物体的边缘是亮的（图 2-2）。

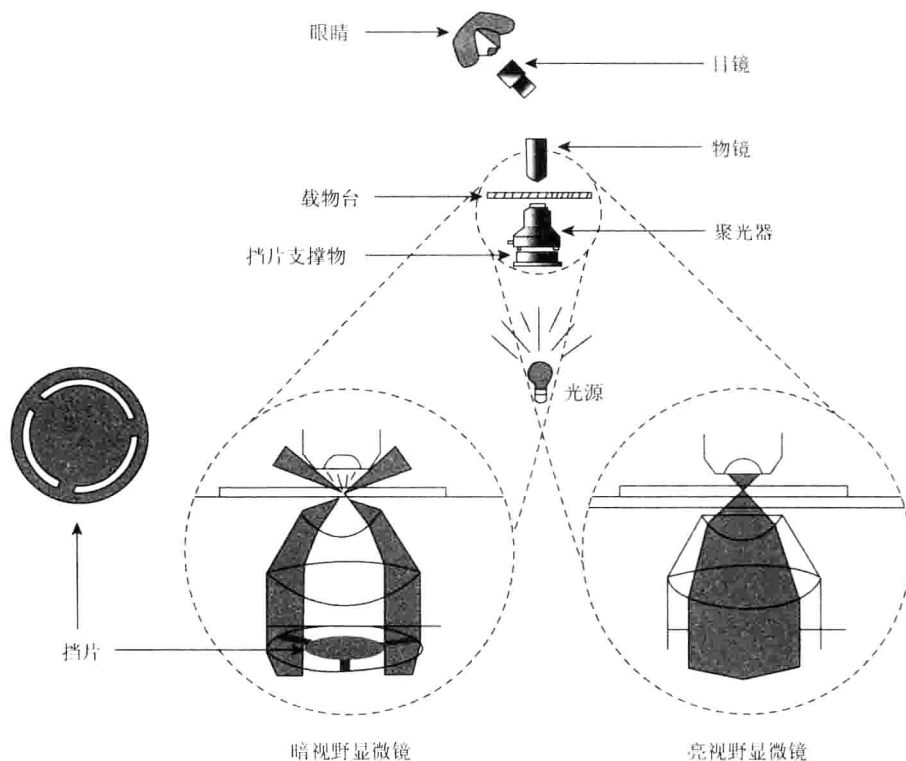


图 2-1 暗视野显微镜与亮视野显微镜工作原理对比及挡片的形态示意图（引自：Omoto et al., 1999）

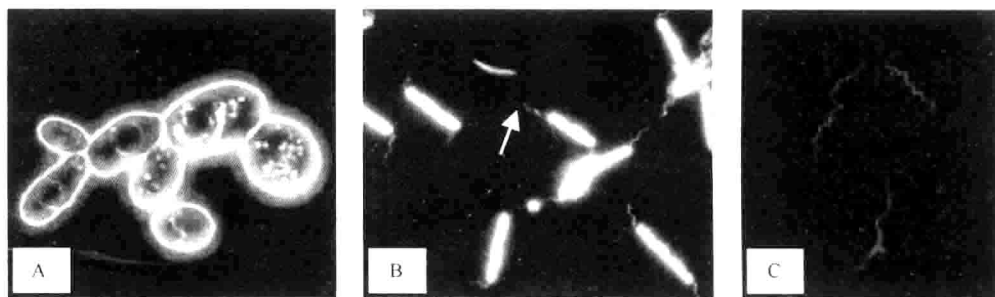


图 2-2 暗视野显微镜下观察到的不同细胞的形态

A. 细胞平均宽度为 $8\sim 10\mu\text{m}$ ，一端有一束鞭毛的杆状细菌的细胞；B. 细胞宽约 $2\mu\text{m}$ （引自：Madigan et al., 2012），箭头指示端生的一束鞭毛；C. 螺旋状的梅毒螺旋体（*Treponema pallidum*）（引自：Hook et al., 1985）

临床上，暗视野显微镜常用于检查菌体娇弱纤细呈长螺旋状的梅毒螺旋体（*Treponema pallidum*，图 2-2C），该项检查对梅毒的早期诊断有十分重要的意义（Hook et al., 1985）。利用这种显微镜能见到小至 $4\sim 200\text{nm}$ 的微粒子，分辨率可比普通亮视野显微镜高 50 倍，也比相差显微镜的分辨率要高。暗视野显微镜是用来进行悬滴法观察微小的活菌体（如细菌和一些原生动物）运动状态的一种绝好方式，由此也能够很好地看到一端长有一束鞭毛的细菌（图 2-2B）（Macnab, 1976）。暗视野显微镜也用于观察酵母菌细胞（图 2-2A）、区别细胞的死活（活细胞外表明亮），以及观察上皮细胞、叶绿体、线粒体，甚至血细胞等。

暗视野显微镜可清楚地看到样本的轮廓，但这种显微镜也有一些不足的地方，如被观察样本的涂片不均匀时，会使图像扭曲、变形。样本制备不好，载玻片不洁净或有划痕，会影响观察对象的真实结构。悬滴法观察微生物运动时，还应注意不要使液体中产生气泡。使用暗视野，需要光照强度增加，以增加对比度，这会造成刺眼现象和样本图像的变形。最后，就是暗视野显微镜使用和调整起来较为麻烦，需要对显微镜的聚光器、光照强度、挡片、光圈等进行精细调节。因此，暗视野显微镜除在观察未经染色处理的细菌运动及观察样本大小和轮廓中常用外，很少用于其他方面。

三、实验材料

1. 菌种：酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*），枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis*）。
2. 培养基：PDA 培养基、牛肉膏蛋白胨培养基。
3. 其他：普通光学显微镜、暗视野显微镜专用聚光器、厚黑纸片、凹玻片、剪刀、盖玻片、擦镜纸、香柏油、无水乙醚：无水乙醇（3：1）混合液、凡士林等。