

普通高等教育“十二五”规划教材

# 水处理微生物实验技术

丁文川 叶姜瑜 何冰 编



化学工业出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

# 水处理微生物实验技术

丁文川 叶姜瑜 何冰 编



化学工业出版社

· 北京 ·

# 前言

水是维系人类生存、保障经济建设和社会发展最重要的自然资源之一。随着工业化、城市化的加快和人们生活水平的提高,当今世界面临着水资源短缺、水环境污染严重的挑战。水处理工程的任务就是提供合乎标准、满足人们生活和生产需要的用水,以及对排放的污(废)水进行净化,消除其对环境的污染,并加以再生利用。

水处理微生物学与水处理工程有密切的关系。一方面需要去除水源水中存在的病原微生物和藻类等,获得理化性质达标、符合卫生标准的生产、生活用水;另一方面,也可以利用微生物降解和转化水中的污染物质,净化水体。因此,了解和掌握水处理微生物的形态、生理特性和控制方法,对理解微生物在水处理中的作用机理和规律十分必要,而这都需要熟练运用相关的微生物实验技术。近年来,随着水处理技术的不断发展,微生物在水污染控制、水体水质净化以及水生生态修复工程中的应用越来越受到关注。“水处理生物学”(即原“水处理微生物学”)课程已被列为高等学校给水排水工程专业指导委员会提出的新课程体系中10门主干课程之一,是给水排水专业的必修课。同时,现代水处理技术研究以及现代生物技术的新发展,对水处理微生物实验技术提出了更高的要求。

本书的编写主要是基于为工科类高等院校给排水专业“水处理微生物学”课程实验教学提供配套教材,同时总结了我校给排水专业本专科教学和对外培训以及从事水处理科学研究中积累的实践经验,并参考了国内外有关实验教材和文献资料,增加了部分新技术和现代仪器使用和操作等方面的内容,以使该书能同时为水处理行业相关技术人员的工作提供指导。

全书分为5章,共涉及40个实验。除第1章主要介绍实验室组建和管理的相关内容外,其余各章均由不同的实验组成,并根据实验内容归集为微生物基础实验技术(第2章)、水处理微生物常规实验技术(第3章)、水处理微生物应用实验技术(第4章)、水处理微生物现代实验技术(第5章)四大部分。章节后的附录部分列出微生物实验中常用的染色液、缓冲溶液和培养基配制方法,以方便读者查阅。

本书主要由重庆大学环境工程系丁文川、叶姜瑜和重庆大学市政与环境工程实验研究中心何冰三位老师编写完成。各章节具体编写分工如下:丁文川编写第1章、第4章和附录,参与编写第3章部分实验内容,并负责全书编写的组织协调工作;叶姜瑜编写第5章,参与编写第4章部分实验内容;何冰编写第2章和第3章。感谢李桥、刘任露、王永芳、陈宇、陈士兵和李文娟等为本书的编写所做的收集资料工作,此外还要感谢重庆大学市政与环境工程实验研究中心蒋少阶和邓晓莉等老师在实验试做及编写过程中提供的热情帮助。

由于编者水平和时间有限,疏漏之处在所难免,望广大读者给予批评指正。

编者

2011年4月



# 目 录

|              |                                 |    |
|--------------|---------------------------------|----|
| <b>第 1 章</b> | <b>微生物实验前的准备</b> .....          | 1  |
|              | 一、微生物实验室的设置.....                | 1  |
|              | 二、微生物实验常用设备及器皿.....             | 2  |
|              | 三、微生物实验室管理规程.....               | 6  |
| <b>第 2 章</b> | <b>微生物的基础实验技术</b> .....         | 8  |
|              | 实验 1 普通光学显微镜的结构和使用 .....        | 8  |
|              | 实验 2 显微镜测微技术 .....              | 12 |
|              | 实验 3 微生物细胞的染色 .....             | 14 |
|              | 实验 4 微生物的形态观察 .....             | 17 |
|              | 实验 5 培养基的配制与灭菌 .....            | 19 |
|              | 实验 6 微生物的接种与培养 .....            | 23 |
|              | 实验 7 微生物数量测定 .....              | 25 |
|              | 实验 8 菌种的简易保藏 .....              | 28 |
| <b>第 3 章</b> | <b>水处理微生物常规实验技术</b> .....       | 31 |
|              | 实验 9 活性污泥菌胶团及生物相观察 .....        | 31 |
|              | 实验 10 藻类及微型动物的观察 .....          | 33 |
|              | 实验 11 水的细菌学检查 .....             | 34 |
|              | 实验 12 水中大肠菌群的测定 .....           | 37 |
|              | 实验 13 活性污泥耗氧速率的测定 .....         | 40 |
|              | 实验 14 活性污泥微生物分离与培养 .....        | 42 |
|              | 实验 15 厌氧菌的分离和培养 .....           | 45 |
|              | 实验 16 藻类叶绿素 a 的测定 .....         | 48 |
|              | 实验 17 紫外线消毒及效果测定 .....          | 50 |
| <b>第 4 章</b> | <b>水处理微生物应用实验技术</b> .....       | 52 |
|              | 实验 18 暗视野显微镜的使用 .....           | 52 |
|              | 实验 19 相差显微镜的使用 .....            | 53 |
|              | 实验 20 荧光显微镜的使用 .....            | 55 |
|              | 实验 21 水体中碱性磷酸酶活性的测定 .....       | 56 |
|              | 实验 22 活性污泥脱氢酶活性的检测 .....        | 57 |
|              | 实验 23 荧光素-荧光酶法测定细菌 ATP 浓度 ..... | 59 |
|              | 实验 24 苯酚降解菌的分离和筛选 .....         | 60 |
|              | 实验 25 固定化微生物处理含酚废水 .....        | 62 |
|              | 实验 26 硝化细菌及亚硝化细菌的检测 .....       | 64 |
|              | 实验 27 反硝化细菌的分离与培养 .....         | 65 |

|              |                                |            |
|--------------|--------------------------------|------------|
| 实验 28        | 藻类的培养和数量测定 .....               | 67         |
| 实验 29        | PFU 微型生物群落监测法 .....            | 69         |
| 实验 30        | 利用藻类评价水中重金属的毒性 .....           | 72         |
| 实验 31        | AOC 法评价饮用水的生物稳定性 .....         | 74         |
| 实验 32        | 发光细菌评价污染物急性生物毒性 .....          | 77         |
| 实验 33        | Ames 实验评价水体有毒污染物的致突变性 .....    | 79         |
| <b>第 5 章</b> | <b>水处理微生物现代实验技术 .....</b>      | <b>82</b>  |
| 实验 34        | 活性污泥中微生物 DNA 的提取 .....         | 82         |
| 实验 35        | 琼脂糖凝胶电泳 .....                  | 83         |
| 实验 36        | 16S rDNA 的 PCR 扩增 .....        | 84         |
| 实验 37        | 利用 TGGE 分析活性污泥中微生物种群的多样性 ..... | 85         |
| 实验 38        | 应用 PCR 方法快速监测污染水体中的大肠杆菌 .....  | 87         |
| 实验 39        | 全自动微生物分析仪菌落计数 .....            | 89         |
| 实验 40        | Biolog 微生物自动分析系统鉴定微生物 .....    | 90         |
| <b>附录</b>    | <b>.....</b>                   | <b>95</b>  |
| 附录 1         | 玻璃器皿的洗涤和洗液的配制 .....            | 95         |
| 附录 2         | 常用染色液的配制及染色法 .....             | 97         |
| 附录 3         | 常用培养基配方及配制 .....               | 100        |
| 附录 4         | 常用缓冲溶液的配制 .....                | 105        |
| <b>参考文献</b>  | <b>.....</b>                   | <b>109</b> |

# 第 1 章 微生物实验前的准备

## 一、微生物实验室的设置

### （一）实验室布局的要求

微生物实验室是以教学、科学研究和产品质量控制为主要目的，从事微生物培养、检测和分析等活动的场所。良好的实验室布局与设计是顺利开展微生物实验、提高工作效率和获取可靠信息的重要保证。同时，实验室布局应充分满足微生物实验操作规范和实验室安全的要求，也需符合建筑设计和施工规范。

实验室布局设计的基本原则是：人流、物流、气流要畅通；清洁区、缓冲区、污染区要分离；要最大可能地防止微生物的污染以及检验过程对环境和人员造成危害。

实验室一般应具备照明、通风、电源、给水、排水和通信等基础设施，另外根据实验操作的要求设置工作台、试剂架、通风橱、特殊气体管道系统等。表 1-1 是实验室工作台设计参考标准。

表 1-1 实验室工作台参考标准

| 类 别        | 推 荐 标 准  |
|------------|----------|
| 工作间通道宽度    | 1.5~1.8m |
| 工作台距墙壁空间宽度 | 1.2~1.5m |
| 工作台宽度      | 0.76m    |
| 工作台离地高度    | 0.80m    |
| 工作台面材料     | 耐高热、耐酸碱  |

### （二）微生物实验室的功能组成

微生物实验室根据使用功能不同可分为准备区（室）、洗涤区（室）、灭菌区（室）、无菌区（室）、恒温培养区（室）和实验操作区（室）六大部分，其具体设置目的和要求如下。

#### 1. 准备区（室）

准备区（室）主要用于配制培养基和样品处理等，设有试剂柜、存放器具或材料的专柜、工作台、电炉、冰箱和上下水道、电源等。

#### 2. 洗涤区（室）

洗涤区（室）主要用于洗刷器皿等。备有加热器、蒸锅，洗刷器皿用的盆、桶等，还应有各种瓶刷、去污粉、肥皂和洗液等。

#### 3. 灭菌区（室）

灭菌区（室）主要用于培养基和各种器具的灭菌。备有高压蒸汽灭菌器、烘箱等设备。

#### 4. 无菌区（室）

无菌区（室）也称接种室，是系统接种、纯化菌种等无菌操作的专用区域。常分隔为

内、外两间，内间是无菌室，外间是缓冲室。房间容积不宜过大，以便于空气灭菌。内间面积约  $5\text{m}^2$ ，外间面积约  $2\text{m}^2$ ，高以  $2.5\text{m}$  以下为宜，都应有天花板。应备有工作台、紫外灯（多为  $30\text{W}$ ）、酒精灯、常用接种工具、消毒药剂、记录本、文具、标签纸、废物筐等。

#### 5. 恒温培养区（室）

培养区（室）主要用于提供满足微生物生长和繁殖所需的温度、湿度和光照等需要。一般分为内室和外室，内室是培养室，外室是缓冲室。房间容积不宜大，以利于空气灭菌，内室面积在  $15\text{m}^2$  左右，外室面积在  $6\text{m}^2$  左右，高以  $2.5\text{m}$  左右为宜，都应有天花板。应有紫外线灯、培养架、摇瓶机（摇床）、灭菌和消毒药剂。

#### 6. 实验操作区（室）

实验操作区（室）又称普通实验室，是进行微生物实验教学、微生物观察和生理生化测定工作的场所。区域内的布置因工作侧重点不同而有很大的差异。一般均配备实验工作台、显微镜、柜子及凳子，为满足教学需要，有时需配置黑板或投影仪。

## 二、微生物实验常用设备及器皿

### （一）常用设备

#### 1. 显微镜

显微镜是微生物学各项研究中不可缺少的工具，用于微生物个体形态和细胞结构的观察。

显微镜的种类很多，根据其结构，可以分为光学显微镜和非光学显微镜两大类。在微生物学的研究中，以普通光学显微镜（明视野显微镜）最为常用。此外，还有暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜、偏光显微镜、紫外光显微镜和倒置显微镜等。非光学显微镜包括电子显微镜和超声波显微镜，前者又分为投射电子显微镜和扫描电子显微镜。

#### 2. 高压蒸汽灭菌锅

高压蒸汽灭菌锅是一个密闭的、可以耐受一定压力的双层金属锅。锅底或夹层内盛水，当水在锅内沸腾时由于蒸汽不能逸出，使锅内压力逐渐升高，水的沸点和温度可随之升高，从而达到高温灭菌的目的。一般在  $0.11\text{MPa}$  的压力下， $121^\circ\text{C}$  灭菌  $20\sim 30\text{min}$ ，包括芽孢在内的所有微生物均可被杀死。如果灭菌物品体积较大，蒸汽穿透困难，可以适当提高蒸汽压力或延长灭菌时间。

高压灭菌锅有卧式、立式、手提式等多种类型，在微生物学实验室，最为常用的是手提式和立式高压蒸汽灭菌锅。和常压灭菌锅相比，高压灭菌锅的优点是灭菌所需的时间短、节约燃料、灭菌彻底等，缺点是价格昂贵、灭菌容量较小。

#### 3. 恒温培养箱

培养箱是培养微生物的专用设备。随着科学水平的发展，培养箱设备的完善程度和价格有很大差别。有各种结构合理、功能齐全的培养箱。

（1）普通培养箱 常称为恒温培养箱，一般的温度控制范围为  $5\sim 65^\circ\text{C}$ ，又分为电热恒温培养箱和隔水式恒温培养箱。

（2）生化培养箱 一般的温度控制范围为  $5\sim 50^\circ\text{C}$ ，广泛应用于细菌、霉菌、微生物、组织细胞的培养保存以及水质分析与 BOD 测试。

（3）恒温恒湿箱 一般的温度控制范围为低温  $-70\sim 0^\circ\text{C}$ ，高温  $150^\circ\text{C}$ ，最高可达

200℃。控制的湿度范围为 20%~98%。可作为霉菌培养箱。

(4) 厌氧培养箱 又称 CO<sub>2</sub> 培养箱，一般的温度控制范围为 5~50℃，CO<sub>2</sub> 浓度调节范围 0.1%~20.0%，适用于厌氧培养、微好氧培养、细胞培养以及用户自定义环境条件微生物的培养及操作。

(5) 多用培养箱 集加热、制冷和振荡于一体的微生物液体发酵装置，选定后经温控仪自动控制，保持工作室恒温，同时设有可控硅调速系统，振荡机转速在一定范围内调控。

#### 4. 冰箱

微生物实验室的冰箱主要有两种：普通冰箱和低温冷冻冰箱。普通冰箱一般都具有两个柜子，即鲜藏柜和冷藏柜，温度分别为 4℃ 和 -20℃；低温冷冻冰箱温度一般控制在 -80~-40℃。它们都可以用于微生物菌种保藏。

#### 5. 干燥箱

干燥箱是用于除去潮湿物料内及器皿内外水分或其它挥发性溶液的设备，也可用于吸管、平皿类玻璃器皿的干热、灭菌和烘烤。微生物学实验室多用箱式干燥箱，大小规格不一。工作室配有可活动的铁丝网板，便于放置被干燥的物品。制热升温式干燥箱也是由电炉丝和温度控制仪组成，可调节温度从室温至 300℃ 任意选择。此外，还有真空干燥箱（配有真空泵和气压表），可在常压或减压下操作。

#### 6. 摇床

摇床又称摇瓶机，它是培养好气性微生物的小型试验设备或作为种子扩大培养之用，常用的摇床有往复式和旋转式两种。往复式摇床的往复频率可达每分钟 0~300 次 (r/min)，但如频率过快或瓶内液体装量过多，在摇动时液体会溅到包扎瓶口的纱布或棉塞上，导致杂菌污染，特别是启动时更容易发生这种情况。旋转式摇床的回旋频率为 30~300r/min。近年来，市场上出现的多功能智能摇床具有温控和振荡控制功能，同时通过微电脑编程控制操作。

放在摇床上的培养瓶（一般为三角瓶）中的发酵液所需要的氧是由空气经瓶口包扎的纱布（一般 8 层）或棉塞通入的，所以氧的传递与瓶口的大小、瓶口的几何形状、棉塞或纱布的厚度和密度有关。在通常情况下，摇瓶的氧吸收系数取决于摇床的特性和三角瓶的装样量。往复式摇床的频率和偏心距的大小对氧的吸收有明显的影响。旋转式摇床氧的传递较好，功率消耗小，培养基不会溅到瓶口的纱布上，但这种摇床结构复杂、造价高。

#### 7. 净化工作台

净化工作台是一种局部层流装置，能在局部形成高洁度的工作环境。它由工作台、过滤器、风机、静压箱和支撑体等组成，采用过滤空气使工作台操作区达到净化除菌的目的。室内空气经预过滤器和高效过滤除尘后以垂直或水平层流状态通过工作台的操作区，由于空气没有涡流，所以，任何一点灰尘或附着在灰尘上的杂菌都能被排除，不易向别处扩散和转移。因此，可使操作区保持无菌状态。

与无菌室和接种箱比较，使用净化工作台具有工作条件好、操作方便、无菌效果可靠、无消毒药剂对人体危害、占用面积小且可移动等优点。如果放在无菌室内使用，无菌效果更好。其缺点是价格昂贵，预过滤器和高效过滤器还需要定期清洗和更换。

#### 8. 天平

天平是一种常见衡器，在微生物实验室常用于药品称量和试剂配制，分为机械天平和



电子天平两大类。对于一般药剂称量，如配制培养基，选择托盘式机械天平足以胜任，其最小精度为 0.1g。电子天平是最新一代的天平，是根据电磁力平衡原理，直接称量，全量程不需砝码。电子天平具有重量自动显示、称量速度快、精度高、使用寿命长、性能稳定、操作简便和灵敏度高的特点。此外，电子天平还具有自动校正、自动去皮、超载指示、故障报警等功能。由于电子天平具有机械天平无法比拟的优点，尽管其价格较贵，但呈现逐步取代机械天平趋势。电子天平具备称量精度从 0.1g 到 0.01mg 不等，有时也称为分析天平。

#### 9. 其它常用设备

水浴箱：以水为介质进行加热的恒温装置，用于微生物培养、恒温生化反应、样品浓缩及其它常规实验。

酸度计：又称 pH 计，测量液体介质的酸碱度值，若配上相应的离子选择电极也可以测量离子电极电位 mV 值，在微生物实验中用于溶液配制的酸碱控制或生化反应液相产物的测定。

蒸馏水器：一般为不锈钢材质，用电加热自来水工作，以蒸馏方法制取纯水，用于试剂、培养基配制或器皿清洗。

小型离心机：根据物质的沉降系数、质量、密度等的不同，应用离心力分离液相非均一体系的设备，微生物实验中用于反应产物的分离，一般的小型离心机为台式，离心管容量 0.5~10mL，最大转速 15000r/min 以下。

可见光分光光度计：是基于不同物质对某一波长单色光有选择性吸收的特性建立的分析方法，一般波长 330~1000nm，微生物实验中可用于反应产物的鉴定和细菌计数等。

细菌过滤器：过滤器中的无菌滤膜孔径 ( $0.22\mu\text{m}$ ) 小于细菌直径，当液体或者气体通过的时候，细菌被滞留于滤膜上，从而获得无菌滤液，过滤一般采用真空抽滤，它适用于无菌试验、培养基除菌过滤、菌落检查及液体中微粒的测定。

电炉：用于液体加热，如固体培养基制备时加热熔解化学药品和琼脂等，一般微生物实验室宜配有普通电炉，功率 300~1000W 可调。

### (二) 常用器皿

#### 1. 试管

微生物学实验所用玻璃试管，其管壁比化学实验室用的厚，这主要是防止塞棉花塞时，管口太薄容易破损。现在逐渐用铝制或塑料制的试管帽代替棉塞。试管的大小可根据用途的不同，准备下列三种型号。

① 大试管 (约 18mm×180mm) 可盛倒培养皿用的培养基，亦可作制备琼脂斜面用 (需要大量菌体时用)。

② 中试管 [(13~15)mm×(100~150)mm] 盛液体培养基或作琼脂斜面用，亦可用于菌液稀释和血清学试验。

③ 小试管 [(10~12)mm×100mm] 一般用于糖发酵试验或血清学试验。

#### 2. 德汉氏试管

观察细菌在糖发酵培养基内的产气情况时，一般在小试管内再套一倒置的小套管 (约 6mm×36mm)，此小套管即为德汉氏试管，又称发酵小套管。

#### 3. 吸管 (又称移液管)

① 玻璃吸管用于吸取少量液体，微生物学实验室一般要准备 1mL、5mL、10mL 的

刻度玻璃吸管。与化学实验室所用的不同，其刻度指示的容量往往包括管尖的液体体积，亦即使用时要注意将所吸液体吹尽，故有时称为“吹出”吸管。市售细菌学用吸管有的在吸管上端刻有“吹”字。

② 移液器（又名微量加样器、移液枪等）是连续可调的、计量和转移液体的专用仪器，其装有直接读数容量计。移液之前，调节移液器上旋钮至设定体积，再套上与移液器配套的专用吸头。吸取液体时，先将移液器按钮按至第一挡，然后将吸头竖直插入液面下2~3mm；缓慢松开控制按钮至其完全复位；打出液体时呈一定角度贴壁，先按到第一挡，稍停顿1s左右，待剩余液体聚集于吸头尖部后，再按到第二挡将剩余液体全部压出。使用完毕，可以将其竖直挂在移液器架上。移液器操作方便（可单手操作），定量精确，随着价格降低，已逐渐成为微生物实验室常规的移液工具。

#### 4. 培养皿

由一个直径与高度相差悬殊的直口杯状底和相同形状略大的盖组成。普通微生物实验常用培养皿皿底直径有70mm、90mm、100mm和150mm，高度15~20mm。培养皿一般为玻璃或PE塑料制成，在培养皿内倒入适量固体培养基制成平板，用于分离、纯化、鉴定菌种、微生物计数以及测定抗生素、噬菌体的效价等。

#### 5. 三角烧瓶与试剂瓶

三角烧瓶常用的规格有100mL、250mL、500mL、1000mL等不同的大小，多用于盛无菌水、培养基和摇瓶发酵等。试剂瓶常用的规格有50~1000mL，有玻璃和塑料两种材质，多用于溶液、固体、粉末的分装和存储，有时根据试剂对光的反应特性，应分别用白色和棕色存放。

#### 6. 烧杯

常用的烧杯规格有50mL、100mL、250mL、500mL、1000mL等，可用来配制培养基与药品，并根据需要可在电炉上加热或煮沸。烧杯不能作为量取溶液的玻璃器皿。

#### 7. 量筒

用于量取液体体积，微生物实验常用规格为10mL、25mL、50mL、100mL、250mL、1000mL，作为计量玻璃仪器，不能用于配制溶液，也不能直接加热或量取高温溶液。量筒只适用于精度要求不高时测量液体体积，通常量筒的精确度为0.1mL。

#### 8. 载玻片与盖玻片

普通载玻片大小为75mm×25mm，厚度1~1.2mm（太厚会影响聚光器效能，太薄则容易破裂），盖玻片为18mm×18mm，厚度 $(0.17 \pm 0.02)$ mm（太厚影响成像质量），一般用于微生物涂片、染色、做形态观察等。

#### 9. 滴瓶

用来装各种染料、生理盐水等，有白色和棕色，一般与滴管配合使用。

#### 10. 酒精灯

酒精灯是微生物实验常用的局部加热工具，由灯体、灯芯管和灯帽组成，酒精灯的加热温度400~500℃。在接种培养物前，将接种环或接种针在酒精灯外焰（温度最高）处烧灼或将烧瓶口或者试管口在火焰上方停留数秒，以达到局部灭菌的目的；当转移培养物时，应在稍离酒精灯火焰侧上方处进行操作，可防止携带有污染性质细菌的尘埃落入培养容器中。

#### 11. 接种工具

接种工具有接种环、接种针、接种钩、接种铲、涂布器等，一般采用金属铂或镍制

成。用涂布法在琼脂平板上分离单个菌落时需玻璃涂布器，是将玻棒弯曲或将玻棒一端烧红后压扁而成。

### 三、微生物实验室管理规程

#### (一) 微生物实验室基本规范

##### 1. 实验人员

从事水处理微生物实验工作的人员应具备微生物学或相近专业知识的教育背景。

实验人员应依据所在岗位和职责接受相应的培训，应保证所有人员在上岗前接受胜任工作所必需的设备操作、微生物检验技术和实验室生物安全等方面的培训。

##### 2. 仪器设备及操作

实验室应建立完整的仪器设备操作、维护和保养的标准操作规程，使用要有记录。

应定期对微生物实验室所用的主要仪器进行校准、维护和期间核查，以保证处于良好工作状态，重要的仪器设备应由专人负责，并有记录。

对于一些容易污染微生物的仪器设备应定期进行清洁和消毒。对试验需用的无菌器具应实施正确的清洗、灭菌措施，并形成相应的标准操作规程，无菌器具应有明确标识。

##### 3. 实验记录和质量控制

实验记录应包含所有关键的实验细节，以便确认数据的完整性。实验室原始记录至少应包括以下内容：实验日期、实验材料、实验人员姓名、标准操作规程编号或方法、实验结果、实验参数、主管/复核人签名。

实验室应制订针对不同实验内容的标准操作规程，标准操作规程应指出如何进行正确的试验操作并严格执行。

##### 4. 实验室安全管理

实验室负责人应制订生物安全管理计划、安全操作手册和意外事故应急方案，实验人员须接受常规的实验室安全培训，了解我国现行关于实验室安全的规范、条例、通则和要求等。

实验室人员在工作时应穿戴必要的防护设备（如工作服、手套、护目镜、面罩等），禁止在实验室工作区域进食、饮水、吸烟、化妆和处理隐形眼镜，禁止在实验室工作区域储存食品和饮料。

严禁随意丢弃和放置废弃培养物，应根据其污染性质进行必要的消毒和灭菌处理，对于使用后的有毒和致癌性化学药剂应存放于专用容器之中，贴上相应标签，并送至专业机构处置。

加强对实验室水、电设施的管理，杜绝“跑、冒、滴、漏”现象，建立仪器设备定期检查制度，配置必要的安全防护器材（如消防器材、防毒面具、消毒液等）。

#### (二) 微生物实验室守则

1. 未经同意，非实验人员不得随意进入实验室以及使用 and 出借实验室物品。

2. 每次实验前必须对实验内容进行充分预习，以了解实验的目的、原理和方法，实验指导人员必须熟悉仪器、设备性能和使用方法，按规定要求进行操作。

3. 进入实验室应先穿实验服，离开实验室时要脱下实验服，反折放回原处。实验前应先洗手，避免手上的分泌物、食物油、护肤用品和沾染的微生物等对实验带来污染。

4. 各种实验物品应按指定地点存放，用过的器材必须经必要处理，禁止随意放于桌

上或冲入水槽。培养和存放的各种样品、试剂均应做好标记，如使用者姓名、物品名或主要成分、浓度和配制日期等。

5. 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。

6. 认真及时做好实验记录，对于当时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；每次实验的结果，应以实事求是的科学态度填入报告表格中，力求简明准确。

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

8. 实验时小心仔细，全部操作应严格按操作规程进行，万一遇有盛菌试管或瓶不慎打破、皮肤破伤或菌液吸入口中等意外情况发生时，应立即报告相关人员及时处理，切勿隐瞒。

9. 每次实验完毕后，必须把所用仪器抹净放妥，将实验台清理整洁，药品和试剂放回原处。如有致病菌液污染桌面或其它地方时，可用 3% 来苏尔液或 5% 石炭酸液覆盖其上半小时后擦去，如系芽孢杆菌，应适当延长消毒时间。凡带菌之工具（如吸管、玻璃刮棒等）在洗涤前须浸泡在 3% 来苏尔液中进行消毒。

10. 严格遵守安全用电规程。不使用绝缘损坏或接地不良的电器设备，不准擅自拆修电器。

11. 实验结束后将实验室打扫干净，实验人员应以肥皂洗手。离开实验室前要注意检查门窗、灯、火源、煤气等是否关闭，确保安全。

# 第2章 微生物的基础实验技术

## 实验1 普通光学显微镜的结构和使用

### 一、实验目的

1. 熟悉普通光学显微镜的构造及各部分的功能。
2. 学习显微镜的正确使用方法
3. 学习并掌握油镜的原理和使用方法。

### 二、实验材料

#### 1. 菌体材料

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 染色涂片标本、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 染色涂片标本。

#### 2. 培养基/试剂

香柏油、二甲苯。

#### 3. 仪器、器皿及其它

普通光学显微镜、滴管、擦镜纸。

### 三、实验原理

#### (一) 普通光学显微镜的基本构造

由于微生物个体细小，人们必须借助显微镜才能“看到”它们。熟悉和掌握显微镜的原理与操作是微生物研究重要的基本技能。现代显微镜一般可分为光学显微镜和非光学显微镜两大类，前者使用较普遍。光学显微镜由机械装置和光学系统两大部分组成（图2-1）。

#### 1. 机械装置

(1) 镜座和镜臂 它们是显微镜的基本骨架，起稳固和支持显微镜的作用，镜臂支持镜筒。

(2) 镜筒 它是一个金属制的圆筒，其上端安放目镜，下端安装转换器，镜筒的长度是固定的，通常是160mm。目前常见的是倾斜式的双筒，即镜筒向观察者一侧倾斜

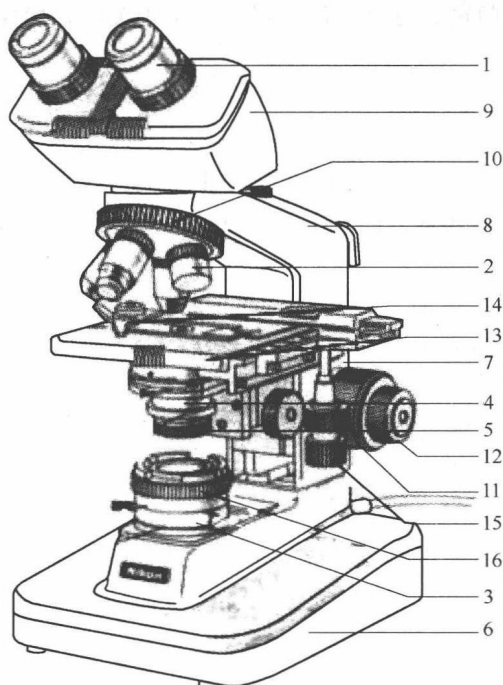


图2-1 普通光学显微镜的结构

- 1—目镜；2—物镜；3—光源；4—聚光器；5—虹彩光圈；6—镜座；7—镜柱；8—镜臂；9—镜筒；10—转换器；11—粗准焦螺旋；12—细准焦螺旋；13—载物台；14—标本夹；15—推动器；16—滤光器

45°。双筒中的一个目镜有屈光度调节装置，以备在两眼视力不同的情况下调节使用。

(3) 转换器 它是一个用于安装物镜的圆盘，其上可装 3~4 个物镜。为使用方便物镜应按低倍到高倍的顺序安装。转换物镜时，必须用手按住圆盘旋转，勿用手指直接推动物镜，以免使物镜与转换器间的螺旋松脱而损坏显微镜。

(4) 载物台又称镜台 用于安放载玻片。镜台上装有玻片夹或玻片移动器，调节移动器上的螺旋可使标本前、后、左、右移动，有些移动器上还装有标尺，可标定标本的位置，便于重复观察。

(5) 调焦装置 调焦装置即安装在镜筒后方两侧的粗螺旋即粗调节器和细螺旋即细调节器，用于调节物镜和标本间的距离，使物像清晰。

2. 光学系统

(1) 目镜 又称接目镜，装于镜筒上端，由两块透镜组成，上面一块为接目透镜，下面一块为聚透镜，两片透镜之间有一光阑。光阑的大小决定了视野的大小，光阑的边缘就是视野的边缘，故又称视野光阑。由于标本正好在光阑上成像，因此在光阑上粘一小段黑丝作为指针，可用来指示标本的具体部位。光阑上还可放置测量微生物大小的目镜测微尺。目镜把物镜造成的像再次放大，不增加分辨力，上面一般标有 5×、10×、16× 等放大倍数，可根据需要选用。

(2) 物镜 物镜安装在镜筒下端的转换器上，因接近被观察的物体，故又称接物镜。其作用是将物体第一次放大，是决定成像质量和分辨能力的重要部件。物镜有低倍（10× 或 4×）、中倍（20×）、高倍（40×~60×）和油镜（100×）等不同的放大倍数。油镜镜筒上刻有“OI”（oil immersion）或 HI（homogeneous immersion）字样，也有刻一圈红线或黑线为标记的，借以区别于其它物镜。物镜上标有放大倍数、数值孔径（numerical aperture, NA）、工作距离（物镜下端至盖玻片间的距离，mm）及盖玻片的厚度，主要参数见图 2-2。

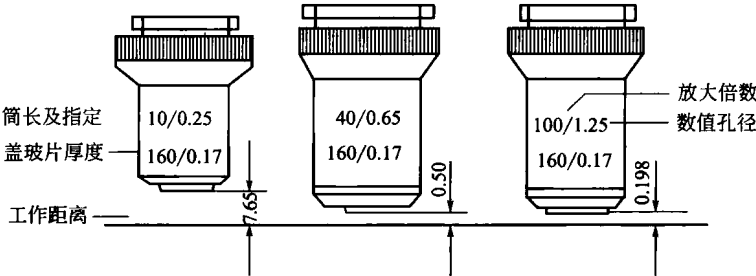


图 2-2 XSP-16 型显微物镜的主要参数 (mm)

物镜的放大倍数除了可以通过镜筒上标记的数字辨认，也可以由其外形辨认。一般倍数较低的物镜镜筒较短，反之则较长。放大倍数越高的物镜，焦距越小，工作距离也越小，因此观察时它与被观察物距离越小。比如在使用油镜时其镜头与玻片极为接近，操作时需特别小心，以免镜头接触玻片挤压而被破坏。

(3) 聚光器 聚光器起会聚光线的作用，可上下移动，在其边框上刻有数值孔径值。当用低倍物镜时聚光器应下降，而当用油镜时则聚光器应升到最高位置。聚光器包括聚光镜和虹彩光圈聚光镜，由透镜组成，虹彩光圈由薄金属片组成，中心形成圆孔，推动把手可随意调整透进光的强弱。调节聚光镜的高度和虹彩光圈的大小，可得到适当的光照和清



晰的图像。在观察较透明的标本时，光圈宜缩小一些，这时分辨力虽降低，但反差增强，从而使透明的标本看得更清楚。但不宜将光圈关得太小，以免由于光干涉现象而导致成像模糊。

(4) 光源 较新式的显微镜光源通常是安装在显微镜的镜座内，通过按钮开关来控制。老式的显微镜大多是采用附着在镜臂上的反光镜，反光镜是一个两面的镜子，一面是平面，另一面是凹面。在使用低倍和高倍镜观察时，用平面反光镜；使用油镜或光线弱时可用凹面反光镜。

(5) 滤光片 可见光是由各种颜色的光组成的，不同颜色的光线波长不同。如只需某一波长的光线时，就要用滤光片。选用适当的滤光片，可以提高分辨力，增加影像的反差和清晰度。滤光片有紫、青、蓝、绿、黄、橙、红等各种颜色的，分别透过不同波长的可见光，可根据标本本身的颜色，在聚光器下加相应的滤光片。

(二) 光学显微镜的性能

显微镜的总放大倍数是指物镜放大倍数和目镜放大倍数的乘积，但并不能以此评判显微镜性能的优劣。性能良好的显微镜不仅使被观察物体放大倍数高，同时能清晰地显示出被观察物的细微结构，即拥有较高的分辨力。显微镜的分辨力是指显微镜工作时能分辨出物体两点间最小距离（ $D$ ）的能力，其主要取决于物镜分辨率的大小。它与物镜的数值孔径（ $NA$ ）成正比，与光波长度（ $\lambda$ ）成反比， $D$  值愈小表明分辨力愈高。 $D$  值可以下列公式表示：

$$D=\frac{\lambda}{2NA}$$

数值孔径（ $NA$ ）即光线投射到物镜上的最大角度（称为镜口角）的  $1/2$  的正弦，乘上玻片与物镜间介质的折射率所得乘积，可用下列公式表示：

$$NA=n\sin \frac{\alpha}{2}$$

式中， $n$  为物镜与标本间的折射率； $\alpha$  为镜口角（通过标本的光线延伸到物镜前透镜边缘所形成的夹角，见图 2-3）。

由上可见，要提高物镜的分辨率有两条途径。

① 缩短光的波长。普通光学显微镜的缺点是所用的照明光源不可能超过可见光的波长范围（ $400\sim770\mu\text{m}$ ）。而紫外光显微镜和电子显微镜就是利用短波长光束和电子波来提高分辨率。

② 增大物镜的数值孔径。影响因素之一是镜口角  $\alpha$ ，理论上最大为  $180^\circ$ ，此时  $\sin(\alpha/2)=1.0$ ，就是说进入透镜的光线与光轴成  $90^\circ$ ，这是不可能的，所以以空气为介质时（ $n=1.0$ ）的数值孔径最大值总是小于 1。此时为增大数值孔径，常常是在载玻片与物镜之间采用油质介质（这种结构称为油浸系或油镜，若对应介质为空气，则称为干燥系）。因香柏油的折射率  $n=1.52$ ，与玻璃相同，一般油质介质常选用香柏油。这样当光线通过载玻片后，可直接通过香柏油进入物镜而不发生折射（图 2-4）。采用香柏油为介质时，实际镜口角最大为  $140^\circ$ ， $\sin(\alpha/2)=\sin70^\circ=0.94$ ，则数值孔径  $NA=1.52\times0.94=1.42$ 。而以空气为介质的数值孔径为 0.94。因此香柏油作介质时，就可使数值孔径值增大到 1.2~1.4，故油镜的分辨率比低倍镜或高倍镜要高得多。例如，我们

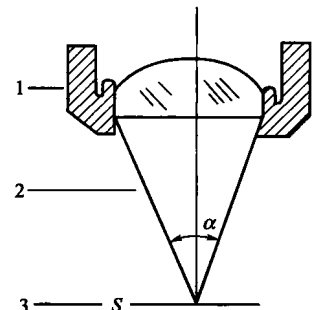


图 2-3 物镜的镜口角  
1—物镜；2—镜口角；3—标本面

肉眼所能感受的光波平均长度为  $0.55\mu\text{m}$ ，假如数值孔径为 0.65 的高倍物镜，它能辨别两点之间的距离  $D = 0.55 / (2 \times 0.65) = 0.42\mu\text{m}$ 。当用数值孔径为 1.25 的油镜来观察标本时，可计算出  $D = 0.55 / (2 \times 1.25) = 0.22\mu\text{m}$ 。而大多数细菌的直径在  $0.5\mu\text{m}$  左右，故在油镜下能看清其细胞形态及某些构造。

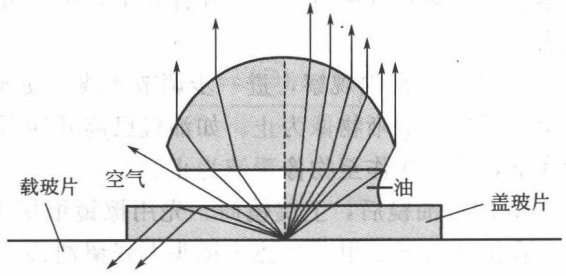


图 2-4 一般物镜与油镜的光线路路

由于物镜和目镜搭配的不同，其分辨力也不同。例如，在总放大倍数一样的情况下，采用数值孔径大的 40 倍物镜和 10 倍目镜相搭配，其分辨力就比数值孔径小的 20 倍物镜和 20 倍目镜相搭配时要高些，效果也比较好。另外，一般总放大倍数以物镜数值孔径的 500~700 倍，最大也不能超过 1000 倍为宜，这个范围的放大率叫有效放大率。例如 NA1.25 (100×) 的物镜，其有效放大率为 1250，即使用 15× 的目镜可放大 1500 倍，但对分辨率不起任何帮助。

## 四、操作步骤

### (一) 低倍镜观察

1. 置显微镜于固定平稳的实验台上，镜座距实验台边沿 3~4cm。拨动回转板，把低倍镜移到镜筒正下方，和镜筒连接而对直。
2. 拨动反光镜向着光线的来源处，同时用眼对准目镜仔细观察使视野完全成为白色，这表明光线已通到镜里。由于现代光学显微镜多采用内光源，因此观察前应确保光源开关打开，调节聚光器获得最佳视野亮度。
3. 把金黄色葡萄球菌染色标本置于镜台上，用标本夹夹住，移动推动器，使观察对象处在物镜正下方，开始时置于载物台上圆孔的正中央。
4. 调节粗调节器，使物镜降至距标本约 0.5cm 处，从目镜观察。用粗调节器慢慢升起镜筒，直至从目镜中显出标本物像后再用细调节器调节到物像清晰时为止，然后移动标本，认真观察标本各部位，找到合适的目的物，并将其移至视野中心，准备用高倍镜观察。
5. 在观察时，最好两眼都睁开，一般用左眼观察，右眼便于绘图或记录，两眼必须同时睁开，以减少疲劳，亦可练习左右眼均能观察。

### (二) 高倍镜使用方法

1. 将高倍镜转至正下方，在转换物镜时，需用眼睛在侧面观察，避免镜头与玻片相撞。
2. 由目镜观察，并仔细调节光圈，使光线的明亮度适宜，同时用粗调节器慢慢升起镜筒至物像出现后，再用细调节器调节至物像清晰为止。
3. 找到最适宜观察的部位后，将此部位移至视野中心，准备用油镜观察。

### (三) 油镜的使用方法

1. 用粗调节器将镜筒提起约 2cm，将油镜转至正下方，将枯草芽孢杆菌染色标本置于镜台上，用标本夹夹住。在玻片标本的镜检部位滴上一滴香柏油。
2. 从侧面注视，用粗调节器将镜筒小心地降下，使油镜浸在香柏油中至镜头几乎与

标本相接，应特别注意不能压在标本上，更不可用力过猛，否则不仅压碎玻片，也会损坏镜头。

3. 从接目镜内观察，进一步调节光线，使光线明亮，再用细调节器将镜筒徐徐上升，直至视野出现清晰物像为止。如油镜已离开油面而仍未见物像，必须再从侧面观察，将油镜降下，重复操作至物像看清为止。

4. 用过油镜后，上旋镜筒。先用擦镜纸拭去镜头上的油，然后用擦镜纸蘸少许二甲苯（香柏油溶于二甲苯）擦去镜头上残留油迹，最后再用干净擦镜纸擦去残留的二甲苯。切忌用手或其它纸擦镜头，以免损坏镜头。

5. 将各部分还原，反光镜垂直于镜座，将接物镜转成八字形，再向下旋。同时把聚光镜降下，以免接物镜与聚光镜发生碰撞。

## 实验 2 显微镜测微技术

### 一、实验目的

1. 了解目镜测微计和镜台测微计的构造、校正方法。
2. 掌握用显微测微计测量微生物细胞大小的方法。

### 二、实验材料

1. 菌体材料

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌种斜面、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 染色标本片。

2. 培养基/试剂

香柏油、二甲苯、无菌水。

3. 仪器、器皿及其它

光学显微镜、目镜测微尺、镜台测微尺、盖玻片、载玻片、无菌试管、接种环、酒精灯和擦镜纸等。

### 三、实验原理

各种微生物细胞的大小是微生物的形态特征之一，也是分类鉴定的依据之一。由于微生物细胞很小，只能在显微镜下测量，一般采用显微测微计来测量。显微测微计有镜台测微计和接目测微计两个部件（图 2-5）。

目镜测微尺 [图 2-5(a)] 是一块可放在接目镜内的圆形小玻片，在玻片中央把 5mm 长度刻成 50 等分，或把 10mm 长度刻成 100 等分。测量时，将其放在接目镜中的隔板上（此处正好与物镜放大的中间像重叠）来测量经显微镜放大后的细胞物像。由于不同目镜、物镜组合的放大倍数不相同，目镜测微尺每格实际表示的长度也不一样，因此目镜测微尺测量微生物大小时须先用置于镜台上的镜台测微尺校正，以计算出在一定放大倍数下，目镜测微尺每小格所代表的相对长度。

镜台测微尺 [图 2-5(b) 和图 2-5(c)] 是中央部分刻有精确等分线的载玻片，一般将 1mm 等分为 100 格（或 2mm 等分为 200 格），每格长  $10\mu\text{m}$ （即 0.01mm），是专门用来