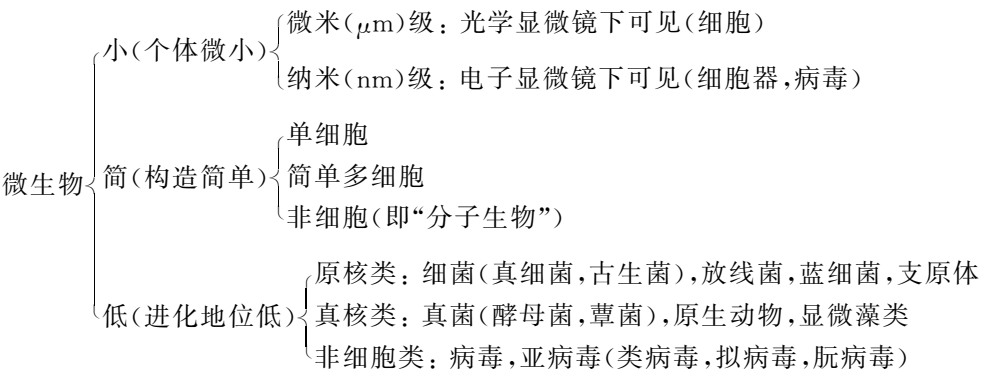


微生物学实验绪论

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的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到发酵工程新水平;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. 实验时先弄懂操作原理,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 $10\times$ 物镜对焦: 调粗调焦手轮降低载物台, 旋转物镜转换器, 将 $10\times$ 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 $40\times$ 物镜, 调节微调焦旋钮, 对标本准确调焦; ③转换至 $4\times$ 和 $10\times$ 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)。

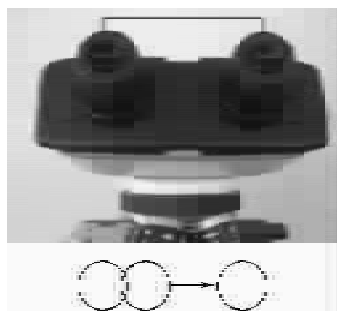


图4 瞳距的调节

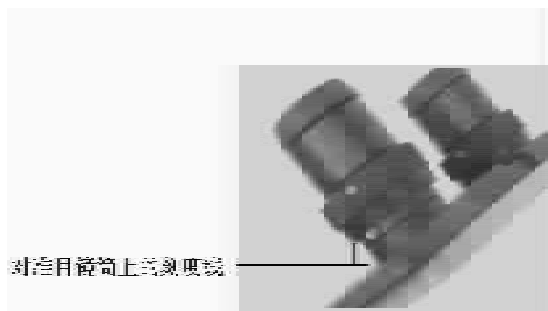


图5 视度的调节

(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. 使用显微镜时一定要严格按规程操作,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