

高等学校规划教材

# 微生物学实验指导

全桂静 雷晓燕 李辉 编



化学工业出版社

高等学校规划教材

# 微生物学实验指导

全桂静 雷晓燕 李辉 编



化学工业出版社

· 北京 ·

本书是以微生物学、环境工程微生物学、食品微生物学等理论知识为基础, 主要介绍微生物学相关的实验知识及实验技法。全书共设 45 个实验项目, 分为基础篇和应用篇两部分。其中, 基础篇的内容包含经典的微生物实验项目, 包括细菌形态观察、微生物染色、微生物的测微技术、大肠杆菌生长曲线的测定等, 主要在注重基础的同时, 通过思考题提高学生解决问题的能力。而应用篇则是在学生掌握微生物学基本实验技能的基础上, 将微生物学实验应用到食品工程、环境工程等方面, 以拓展学生的知识面。本书可作为高等院校的生物工程专业、环境工程专业及食品工程专业等的微生物学实验课程的教材, 亦可以作为一些专业实验的参考教材, 同时可供相关微生物学、环境科学与工程、食品科学与工程专业技术人员参考阅读。

### 图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学实验指导/全桂静, 雷晓燕, 李辉编. —北京:  
化学工业出版社, 2010.7  
高等学校规划教材  
ISBN 978-7-122-08606-8

I. 微… II. ①全…②雷…③李… III. 微生物学-  
实验-高等学校-教材 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 090829 号

---

责任编辑: 满悦芝  
责任校对: 宋 夏

装帧设计: 尹琳琳

---

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)  
印 装: 化学工业出版社印刷厂

720mm×1000mm 1/16 印张 9 字数 165 千字 2010 年 7 月北京第 1 版第 1 次印刷

---

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

---

定 价: 19.80 元

版权所有 违者必究

# 前 言

微生物学实验是微生物学、生物工程专业及相关本科专业的一门重要的基础实验课程。通过本门课程的学习和设定实验的完成,学生可以更好地掌握微生物学中的理论知识,为学习后续的专业课程打下坚实的基础,能够独立分析及解决实际中遇到的相关问题。

本书是编者多年的理论课程和实验课程教学经验的积累,同时也是编者阅读了大量微生物实验技术与方法等方面的材料,在校内多年使用的实验讲义基础上逐渐完善起来的。本书分为基础篇及应用篇两部分,基础篇主要包括微生物实验的基本实验操作、实验技能,通过实验操作及问题的解决更深刻地理解微生物学知识;应用篇则是通过设立的实验项目使学生认识微生物学在食品、环保等方面的应用价值,进一步提高解决实际问题的能力。

本实验指导共包括 45 个实验,基础篇的 24 个实验项目和应用篇的 21 个实验项目。其中,基础篇的实验项目包括微生物学实验中能用到的基本实验技能,如细菌制片、形态观察、细菌的染色、测微技术、培养基配制及消毒、实验器皿的消毒灭菌、接种、生长量测定等。而应用篇中则设立一些微生物应用到食品及环保方面的典型实验项目,如食品卫生指标的测定、艾姆氏试验、发酵食品用微生物的筛选、水体和空气微生物的检测等,使学生在熟悉微生物在其他领域中的应用情况的同时进一步提高分析、解决问题的能力。应用篇中还设有 3 个设计性实验项目,目的是让学生在掌握了基本实验技能的前提下独立完成实验,以拓展他们的实验思路。

由于时间和编者的水平有限,书中难免存在不当之处,请老师和同学们批评指正。

编者  
2010 年 5 月

# 目 录

|                |   |
|----------------|---|
| 第一章 实验须知 ..... | 1 |
|----------------|---|

## 基 础 篇

|                        |   |
|------------------------|---|
| 第二章 微生物形态观察及大小测定 ..... | 2 |
|------------------------|---|

|                         |    |
|-------------------------|----|
| 实验 1 细菌制片及形态观察 .....    | 2  |
| 实验 2 细菌的简单染色和革兰染色 ..... | 5  |
| 实验 3 细菌的特殊染色 .....      | 7  |
| 实验 4 真菌形态观察 .....       | 9  |
| 实验 5 放线菌形态观察 .....      | 11 |
| 实验 6 微生物的测微技术 .....     | 13 |

|                    |    |
|--------------------|----|
| 第三章 微生物的培养技术 ..... | 18 |
|--------------------|----|

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 实验 7 培养基的配制与灭菌 .....       | 18 |
| 实验 8 实验器皿的消毒、灭菌 .....      | 20 |
| 实验 9 细菌的穿刺培养 .....         | 22 |
| 实验 10 微生物的分离、纯化培养 .....    | 24 |
| 实验 11 细菌的保藏与活化 .....       | 27 |
| 实验 12 生长谱法测定微生物的营养要求 ..... | 29 |
| 实验 13 酵母菌营养缺陷型的筛选 .....    | 30 |
| 实验 14 细菌的抗药性突变株筛选 .....    | 32 |

|                     |    |
|---------------------|----|
| 第四章 微生物生长量的测定 ..... | 35 |
|---------------------|----|

|                         |    |
|-------------------------|----|
| 实验 15 大肠杆菌生长曲线的测定 ..... | 35 |
| 实验 16 丝状真菌生长曲线的测定 ..... | 36 |
| 实验 17 噬菌体的效价实验 .....    | 38 |

|                         |    |
|-------------------------|----|
| 第五章 微生物的生存因子和影响因素 ..... | 42 |
|-------------------------|----|

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 实验 18 环境因素对微生物生长繁殖的影响 .....  | 42 |
| 实验 19 微生物与氧关系的检测 .....       | 44 |
| 实验 20 青霉素效价的测定 .....         | 46 |
| 实验 21 细菌的生理生化反应 .....        | 50 |
| 实验 22 大肠杆菌半乳糖发酵基因的转导实验 ..... | 54 |

|                 |    |
|-----------------|----|
| 第六章 血清学反应 ..... | 57 |
|-----------------|----|

|                    |    |
|--------------------|----|
| 实验 23 抗原抗体反应 ..... | 57 |
|--------------------|----|

|                      |    |
|----------------------|----|
| 实验 24 酶联免疫吸附实验 ..... | 62 |
|----------------------|----|

## 应 用 篇

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 第七章 微生物学在食品工程方面的应用 ..... | 65 |
|--------------------------|----|

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 实验 25 固体样品中细菌菌落总数的测定 .....        | 65 |
| 实验 26 液体样品中大肠菌群数的测定 .....         | 67 |
| 实验 27 柠檬酸产生菌的选育 .....             | 71 |
| 实验 28 酸奶的制作和乳酸菌的分离 .....          | 73 |
| 实验 29 还原试验法对鲜乳中抗生素残留量的测定 .....    | 75 |
| 实验 30 食品中防腐剂抑菌效果的测定 .....         | 76 |
| 实验 31 艾姆 (Ames) 氏试验检测食品的安全性 ..... | 79 |
| 实验 32 酵母细胞的固定化与酒精发酵实验 .....       | 83 |
| 实验 33 甜酒曲中根霉的分离与甜酒的制作 .....       | 87 |
| 实验 34 毛霉的分离与腐乳的制作 .....           | 89 |

|                         |    |
|-------------------------|----|
| 第八章 微生物学在环境保护中的应用 ..... | 93 |
|-------------------------|----|

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| 实验 35 空气微生物的检测 .....      | 93  |
| 实验 36 水中细菌菌落总数测定 .....    | 94  |
| 实验 37 多管发酵法测定水中大肠菌群 ..... | 96  |
| 实验 38 水样生化需氧量的测定 .....    | 100 |
| 实验 39 滤膜法测定水中大肠菌群 .....   | 103 |
| 实验 40 水体富营养化程度的评价 .....   | 105 |
| 实验 41 发光细菌抑制实验 .....      | 109 |
| 实验 42 微生物吸附法去除重金属 .....   | 112 |

|                 |     |
|-----------------|-----|
| 第九章 设计性实验 ..... | 114 |
|-----------------|-----|

|                          |     |
|--------------------------|-----|
| 实验 43 产蛋白酶菌株的筛选 .....    | 114 |
| 实验 44 表面活性剂降解菌的分离 .....  | 116 |
| 实验 45 单细胞蛋白生产条件的优化 ..... | 118 |

|          |     |
|----------|-----|
| 附录 ..... | 121 |
|----------|-----|

|                        |     |
|------------------------|-----|
| 附录 1 常用培养基配方 .....     | 121 |
| 附录 2 常用染色剂 .....       | 123 |
| 附录 3 缓冲液的配制 .....      | 125 |
| 附录 4 常用菌种名称 .....      | 130 |
| 附录 5 菌种保藏机构名称及网址 ..... | 131 |

|            |     |
|------------|-----|
| 参考文献 ..... | 135 |
|------------|-----|

# 第一章 实验须知

微生物学实验课是一门对基本操作技能要求较强的课程。通过本课程学习，要求学生能够熟练掌握无菌操作技术和一系列微生物学实验基本技能；树立严谨、求实的科学态度，提高分析问题和解决问题的能力；树立勤俭节约、爱护公物、相互协作的优良作风。

为了提高教学效果，保证实验的顺利完成和实验室的安全，根据微生物实验工作的特点及多年的教学经验，提出以下几点注意事项。

1. 每次实验前必须对实验教材进行充分预习，以了解实验的目的、基本原理和方法。熟悉实验中的主要操作步骤和所用玻璃器皿和试剂等，使实验得以顺利完成。

2. 进入实验室后需要先对实验台面进行必要的清洁，清点摆放在实验台上的器皿和试剂、药品等。

3. 微生物学实验的核心是无菌操作，要求实验过程中保证基本操作是在无菌条件下完成，防止杂菌污染。为此，在实验过程中要求每个学生严格做到以下几点：

① 操作时要预防空气对流 在进行微生物实验操作时，要关闭门窗，以防止空气对流。

② 接种时不要走动和讲话 接种时尽量不要走动和讲话，以免造成杂菌污染。

③ 含菌器具要求充分消毒后再清洗 凡用过的带菌移液管、滴管或涂布棒等，在实验后应立即投入 5% 石炭酸或其他消毒液中浸泡 20min，然后再取出清洗，以免微生物污染环境。

④ 含有培养物的器皿要杀菌后清洗 在清洗带有培养物的培养皿、三角烧瓶或试管等器皿之前，应先煮沸 20min 以上或进行加压蒸汽灭菌。

4. 凡须进行培养的材料，都应注明菌种名称、接种日期及操作者姓名（或组别），放在设定好温度的恒温培养箱中进行培养，按时观察并如实地记录实验结果。

5. 爱护实验室内的设备和器材，仪器要按要求使用，用完后要将其恢复为原样；实验过程中要节约药品、水、电、煤气等。

6. 实验完毕，立即关闭水龙头、煤气及不用的电源，整理和擦净台面，离开实验室之前要用肥皂洗手。值日生负责清扫实验室及进行安全检查（门窗、水、电及煤气等）。

# 基 础 篇

## 第二章 微生物形态观察及大小测定

微生物的个体微小，需要借助生物显微镜或是电子显微镜方可观察。微生物主要包括真菌、显微藻类、原生动物等真核微生物和细菌、放线菌及蓝细菌等原核微生物，以及无细胞的病毒类。一般细菌的细胞直径为  $0.2\sim 1.5\mu\text{m}$ ，长度为  $1\sim 5\mu\text{m}$ 。

生物显微镜直接观察微生物细胞不易，利用染色剂对细胞进行染色后使其着色，形成色差后在显微镜下容易观察、分辨。

### 实验 1 细菌制片及形态观察

#### 一、目的

1. 认识细菌的基本形态；
2. 掌握细菌压滴片及悬滴片的制作方法；
3. 掌握油镜的使用方法。

#### 二、原理

##### 1. 压滴法

菌体形态的主要制片方法。将细菌悬液滴于载玻片中央，加上盖玻片，置于显微镜下观察。

##### 2. 悬滴法

菌体运动观察的制片方法。将细菌悬液滴于盖玻片中央，翻转，置于凹玻片的凹窝中央，由于细菌不受盖玻片的压力影响，所以此法常用于观察并区别细菌运动的性质，也可观察细菌的繁殖方式及孢子萌发等。

##### 3. 生物显微镜油镜的成像原理

现代普通光学显微镜利用目镜和物镜两组透镜系统来放大成像，故称复式显微镜，它们由机械装置和光学系统两大部分组成。在显微镜的光学系统中，物镜的性能最为关键，它直接影响着显微镜的分辨率，而在普通光学显微镜配置的几种物

镜中,油镜的放大倍数最大,对微生物学研究最为重要。与其他物镜相比,油镜的使用比较特殊,需在载玻片与镜头之间加滴香柏油,以增加照明亮度和分辨率。

显微镜的分辨率是指显微镜能识别两点之间的最小距离的能力。从物理学角度看,光学显微镜的分辨率受光的干涉现象及所用物镜性能的限制,可表示为:分辨率 $=(\lambda/2)NA$ ,式中 $\lambda$ =光波波长;NA=物镜的数值孔径值。光学显微镜的光源不可能超出可见光的波长范围(0.4~0.7 $\mu\text{m}$ ),而数值孔径值则取决于物镜的镜口角和玻片与镜头间介质的折射率,可表示为:NA= $n\sin\alpha$ 。 $\alpha$ 为光线最大入射角的半数,它取决于物镜的直径和焦距,一般来说在实际应用中最大只能达到120°,而 $n$ 为介质折射率。由于香柏油的折射率(1.52)比空气及水的折射率要高,因此以香柏油作为镜头与玻片之间介质的油镜所能达到的数值孔径值要高于低倍镜、高倍镜等干镜。若以可见光的平均波长0.55 $\mu\text{m}$ 来计算,数值孔径值通常在0.65左右的高倍镜只能分辨不小于0.4 $\mu\text{m}$ 的物体,而油镜的分辨率可达到0.2 $\mu\text{m}$ 左右。

### 三、材料与用具

#### 1. 材料

(1) 菌种 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。

(2) 其他材料 无菌水、凡士林油、香柏油、二甲苯等。

#### 2. 用具

生物显微镜、载玻片、凹玻片、盖玻片、接种环、镊子、特种铅笔、擦镜纸、酒精灯、火柴等。

### 四、方法

#### 1. 压滴标本的制作

(1) 取一清洁载玻片,用特种铅笔在载玻片的右侧注明所观察菌体的名称。

(2) 点燃酒精灯,在无菌操作(如图2.1所示)下取一滴清洁的无菌水放于玻片中央。

(3) 无菌条件下用接种环取出少许菌苔放于玻片水中,涂匀。

(4) 用镊子取一盖玻片,由一端与玻片的菌液接触,徐徐放下盖玻片,注意避免产生气泡。

(5) 将压滴片放于显微镜下观察。

#### 2. 悬滴标本的制作(如图2.2所示)

(1) 取一洁净的凹玻片和盖玻片。

(2) 用火柴杆取少许凡士林涂于凹玻片的凹窝周围。

(3) 在盖玻片中央滴一小滴无菌水,无菌操作用接种环取少许菌苔在水滴上

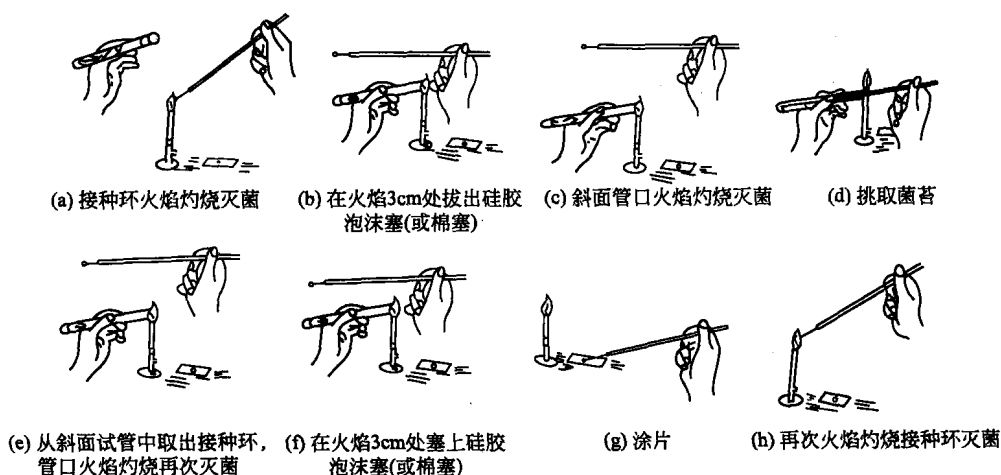


图 2.1 无菌操作示意图

轻沾一下, 不要弄破水滴。

(4) 将凹玻片翻转向下, 使凹窝中央对准玻片中央水滴, 然后轻压 (黏合紧密), 然后很快将凹玻片翻转, 使盖玻片向上。

(5) 将制好的悬滴片放于显微镜下观察。

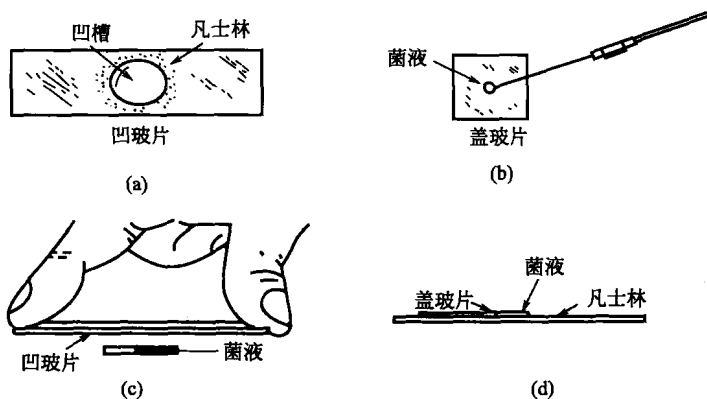


图 2.2 悬滴片的制作示意图

### 3. 显微镜的使用方法

#### (1) 观察前的准备

- ① 光源调节, 依个人习惯调节光源的亮度。
- ② 调节目镜 根据个人的瞳孔间距来调节目镜的间距。

#### (2) 观察

① 低倍镜观察 将标本玻片置于载物台上, 用标本夹夹住, 移动推进器使观察对象处于物镜的正下方。下降 10 倍物镜, 使其接近标本, 用粗调节器慢慢

降低载物台，使标本在视野中初步聚焦，再使用细调节器调节使图像清晰。

② 高倍镜观察 在低倍镜下找到合适的观察目标并将其移至视野中心，轻轻转动物镜转换器将高倍镜移至工作位置，再调节调节器以观察到清晰的物像。

③ 油镜观察 在高倍镜或低倍镜下找到要观察的样品区域后，用粗调节器将载物台降低，然后将油镜转到工作位置，在观察的样品区域滴加香柏油，用粗调节器将载物台升高，慢慢调节。

### (3) 显微镜用后的处理

- ① 下降载物台，取下载玻片。
- ② 用镜头纸沾取二甲苯擦拭镜头。
- ③ 将显微镜的各部分还原。

## 五、内容

1. 用无菌操作制金黄色葡萄球菌、荧光假单胞菌的压滴片，置油镜下观察。
2. 用无菌操作制大肠杆菌的悬滴片，置油镜下观察。

## 六、注意事项

1. 压滴片制作时注意不要产生气泡。
2. 悬滴片制作时，接种环与水滴接触时不要将水滴弄破。

## 七、思考题

怎样观察细菌形态？细菌未染色时，用油镜观察有何困难？

# 实验2 细菌的简单染色和革兰染色

## 一、目的

1. 学习微生物涂片及染色的操作技术；
2. 掌握微生物的简单染色和革兰染色的基本原理和方法。

## 二、原理

染色是微生物学实验中一项重要的实验技术。细菌细胞表面带有一定的负电荷，与各种染料具有一定的亲和力，从而使细胞着色。着色后的菌体折光性弱，与背景间的色差明显，在显微镜下容易观察。染色分为简单染色和复杂染色两种。其中，单染比较简单，用同一种染料使菌体着色，以显示微生物的形态；复合染色则是利用多种染料染多次，以显示细菌细胞的不同部位或其特殊性。

革兰染色是细菌鉴定中常用的一种染色方法，利用两种不同性质的染料，即草酸铵结晶紫和番红染液先后染色菌体。在利用草酸铵结晶紫进行染色后，再用乙醇脱色，如果细菌能保持草酸铵结晶紫与碘的复合物而不被脱色，即呈紫色的细菌为革兰阳性菌；如果草酸铵结晶紫与碘的复合物被洗脱掉，菌体呈现番红的

颜色（红色），则为革兰阴性菌。

### 三、材料与用具

#### 1. 菌种

大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*)。

#### 2. 染液

(1) 简单染液 齐氏石炭酸复红染液、吕氏美蓝染液。

(2) 革兰染液 草酸铵结晶紫染液、路哥氏碘液、95%乙醇溶液、番红（又名沙黄）酒精溶液。

#### 3. 其他材料

无菌水、香柏油、二甲苯等。

#### 4. 用具

显微镜、酒精灯、接种环、镊子、染色缸、载玻片、烧杯、滤纸、火柴等。

### 四、方法

#### 1. 制片

(1) 涂片 取保存在酒精溶液中的干净载玻片，用镊子夹取在酒精灯火焰上烧去残余酒精，冷却后，用特种铅笔在载玻片的右侧注明菌名、染色类型。在玻片中央滴加一小滴无菌水，以无菌操作用接种环取少许菌苔，在玻片的水滴中涂布均匀，成一薄层。

(2) 风干 在空气中自然干燥。

(3) 固定 将已干燥的涂片向上，在微火上迅速通过2~3次杀死细菌，凝固菌体蛋白，使得菌体与玻片结合牢固。

#### 2. 染色

(1) 简单染色 在已制好的涂片菌膜处，滴加吕氏美蓝染液染色3~5min，或滴加齐氏石炭酸复红染液染色1~2min，以流水冲洗涂片，至无色为止，后用滤纸吸干涂片的水滴，干后，镜检（如图2.3所示）。

#### (2) 革兰染色

① 在已制好的涂片菌膜处滴加草酸铵结晶紫染液染色1min，水洗。

② 滴加路哥氏碘液媒染1min，水洗，用滤纸吸干残存水滴。

③ 斜置玻片上端，滴加95%酒精脱色并轻轻摇动载玻片，滴至流出酒精刚刚不出现紫色时即停止。脱色完毕后，水洗，滤纸吸干。

④ 滴加番红染液复染1min，水洗，滤纸吸干后，备镜检。

### 五、内容

1. 用藤黄八叠球菌制简单染色片，在油镜下观察。

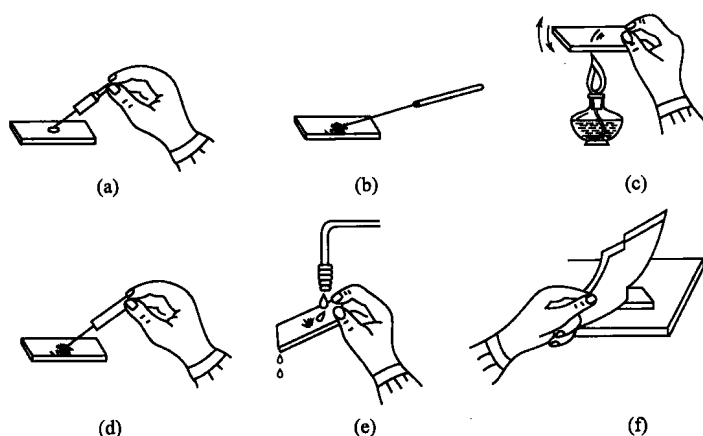


图 2.3 细菌的简单染色

2. 用金黄色葡萄球菌、大肠杆菌制革兰染色片，在油镜下观察，区别革兰阳性菌和阴性菌。

#### 六、注意事项

革兰染色中的脱色时间一定要掌握恰当，否则会影响染色结果。

#### 七、思考题

1. 影响菌体着色的因素有哪些？实验中应如何把握？
2. 革兰染色的关键步骤是什么？

## 实验 3 细菌的特殊染色

### 一、目的

1. 了解微生物学中最常用的几种特殊染色的原理；
2. 掌握芽孢、鞭毛染色等的特殊染色方法。

### 二、原理

芽孢为某些细菌细胞在环境条件不良时产生的休眠体，其染色主要是利用不同的染料进行染色，使芽孢和营养体呈不同的颜色。芽孢壁厚含疏水性角蛋白，对水及离子的透性低，使着色和脱色均较困难。因此，先用孔雀石绿在加热条件下进行染色，染料不仅进入菌体，而且可以进入芽孢。进入菌体的染料可经水洗脱色，而进入芽孢的染料则难以透出，若再用番红水溶液进行复染，此时菌体即被染成红色，而芽孢呈绿色。

鞭毛为某些细菌表面的长丝状蛋白结构，直径较小，很难在生物显微镜下分辨出。采用不稳定的胶体溶液做媒染剂，在鞭毛上生成沉淀，加大鞭毛的直径，

然后再进行染色。同时，培养时间过长的菌体，鞭毛易脱落，所以要使用新鲜的菌体（培养 12~16h 的菌体为佳）。

荚膜是包围在细菌细胞外面的一层黏液性物质，其主要成分是多糖类，不易被染色，故常用衬托染色法，即将菌体和背景染上颜色而把不着色的荚膜衬托出来。

### 三、材料与用具

#### 1. 菌种

大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*)。

#### 2. 染液

(1) 芽孢染液 5%孔雀绿水溶液、0.5%番红水溶液。

(2) 荚膜染液 石炭酸复红溶液、5%黑色素水溶液。

(3) 鞭毛染液 A 液、B 液（见附录 2）。

3. 其他材料 无菌水、香柏油、二甲苯等。

4. 用具 显微镜、酒精灯、接种环、镊子、染色缸、载玻片、烧杯、滤纸、火柴等。

### 四、方法

#### 1. 芽孢染色

(1) 在玻片涂有菌苔处，滴加孔雀绿染液，使之充满玻片。

(2) 将玻片于酒精灯火焰高处，徐徐加热，使染料在产生蒸汽的情况下维持 2min，此过程中随时滴加孔雀绿染料，保证染液不出现沸腾或干涸现象。

(3) 待玻片冷却后，水洗，吸干残水。

(4) 0.5%番红染液复染 1min，水洗，吸干，备镜检。

#### 2. 鞭毛染色

(1) 取新的载玻片，从已移接 3~5 代带有冷凝水的斜面菌种的冷凝水处，以无菌操作用接种环取一环菌液。将玻片倾斜，在带有菌液的菌环上滴下一滴无菌水，让水从玻片上端自然流向下端（切勿用接种环涂抹，以免损伤鞭毛），自然风干。

(2) 滴加 A 染液于菌膜处染 3~5min，用蒸馏水冲洗净 A 液。

(3) 用 B 液冲洗残水，使 B 液充满玻片，在火焰上轻轻加热至冒气后，维持 30~60s，然后用蒸馏水冲洗，滤纸吸干，备镜检。

#### 3. 荚膜染色

(1) 取少量菌苔与一滴无菌水，在玻片上混合、摊平，自然风干。

(2) 用石炭酸复红染色 2~3min，水洗（注意水不要直接冲洗涂菌处），用滤纸吸干。

(3) 在玻片一端加黑色素水溶液一滴，然后用另一玻片，将黑色素水溶液推

成一薄层，自然风干，备镜检。菌体红色，荚膜无色，背景黑色。

### 五、内容

1. 用枯草芽孢杆菌进行芽孢染色，置油镜下观察。
2. 用圆褐固氮菌进行荚膜染色，置油镜下观察。
3. 用荧光假单胞菌进行鞭毛染色，置油镜下观察。

### 六、注意事项

1. 芽孢染色中利用孔雀石绿进行初染时需要加热，注意一定要不断补加染色液保证不干涸、不沸腾。
2. 鞭毛染色时制片比较重要，不能涂抹菌液，以保证鞭毛不脱落。
3. 荚膜染色中，水洗时不能直接冲洗菌膜处，以免冲洗掉菌体。

### 七、思考题

1. 鞭毛染色最好使用新的载玻片，为什么？
2. 细菌的培养时间对芽孢染色有影响吗？

## 实验4 真菌形态观察

### 一、目的

1. 学会用小室培养法培养真菌；
2. 观察并记录真菌的形态特征。

### 二、原理

霉菌的菌丝体特别发达，以孢子形式进行繁殖。但是孢子及其菌丝极易受到外力的破坏而影响真菌形态的观察。而带有培养基的小空间（小室）可以形成真菌适宜的生长环境，这样培养的微生物可以保持菌体完整的形态和结构，便于观察和研究。在自然界和人体上存在着各种微生物，用适宜的培养基可以检测出它们的存在。该方法不但易于显微镜的观察和摄影，还可以通过固定、染色和封固，制成固定标本加以保存。

### 三、材料与用具

#### 1. 菌种

产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、毛霉 (*Mucor rouxianus*)、黑根霉 (*Rhizopus nigricans*)、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)。

#### 2. 培养基

- (1) 马铃薯琼脂培养基 马铃薯 200g，葡萄糖或蔗糖 20g，琼脂 20g，

蒸馏水 1000mL，pH 自然。

(2) 麦芽汁琼脂培养基 取大麦或小麦若干，用水洗净，浸水 6~12h，置 15℃ 阴暗处发芽，上盖纱布一块，每日早、晚淋水一次，麦根伸长至麦粒的两倍时，即停止发芽，摊开晒干或烘干，贮备用。将麦芽磨碎，一份麦芽加 4 份水，在 65℃ 水浴锅中糖化 3~4h，糖化程度可用碘滴定之。将糖化液用 4~6 层纱布过滤，滤液如浑浊不清，可用鸡蛋白澄清，具体方法是将一个鸡蛋白加水约 20mL，调匀至生泡时为止，然后倒在糖化液中搅拌煮沸后再过滤。将滤液稀释到 5~6 波美度，pH 约 6.4，加入 2% 琼脂即成麦芽汁培养基。

3. 试剂

20% 甘油水溶液。

4. 用具

培养皿、载玻片、盖玻片、圆形滤纸、镊子、“U”形玻璃管、无菌移液管、接种环、手术刀片、显微镜等。

四、方法

1. 霉菌的小室培养

在进行放线菌和各种霉菌的形态观察时，可以采用压滴法制片，但制片时，菌体的各部分结构往往被破坏，不易观察到完整典型的形态，采用小室培养可以清晰地观察到菌体的完整结构。

方法如下：

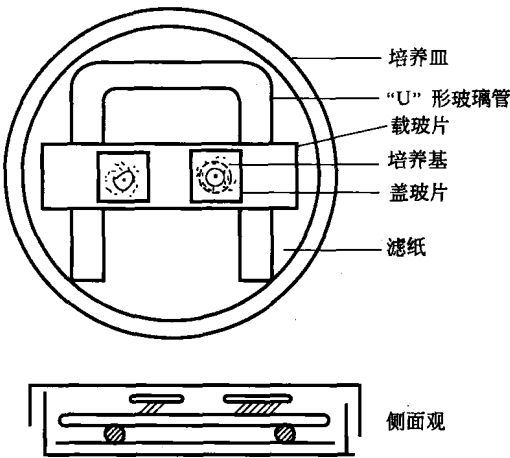


图 2.4 小室培养的示意图

① 在一套无菌培养皿内倒入已灭菌并融化的马铃薯琼脂培养基，形成厚约 3~4mm 的薄层，待冷凝后，用无菌手术刀片切成 10mm×10mm 的小块。

② 用无菌小刀取两小块上述切好的固体培养基薄片，置于载玻片上，用接种环在培养基四周接上霉菌孢子，盖上盖玻片，培养基在载玻片上的放置位置如图 2.4 所示。

③ 在另一个培养皿内放入圆形滤纸，滴加 20% 无菌甘油 3~4mL。

④ 在滤纸上放入“U”形管，将制好的玻片置于“U”形管架上，盖上培养皿盖，28℃ 恒温箱内培养。菌体长好后，取出玻片置于显微镜下观察。

2. 根霉的假根

根霉的气生菌丝遇到基质以外的障碍可分化为假根。在麦芽汁固体培养基平

板上点接黑根霉孢子，每皿可点接6~10处，在28℃恒温箱倒置培养2~7d，或者在皿盖上放一张无菌玻片，用“U”形管架高，制片时间可缩短。在低倍镜或高倍镜下，观察皿盖或玻片可见到假根、孢子囊、孢子梗等结构。

### 五、内容

1. 按教师指定的菌种制小室培养片，培养后观察。
2. 培养黑根霉的假根并观察。

### 六、注意事项

1. 在制作小室时，培养基要薄而且厚度均匀，接种量宜少，加盖盖玻片时不要产生气泡且不要压碎培养基。
2. 观察时应沿培养基边缘寻找合适的生长区以便获得较好的观察结果。

### 七、思考题

1. 20%甘油试剂的作用是什么？
2. 小室培养法适用于哪些微生物的形态观察？

## 实验5 放线菌形态观察

### 一、目的

1. 认识放线菌的菌丝分类及结构；
2. 学习放线菌形态的观察方法。

### 二、原理

放线菌是一类主要呈丝状生长和以孢子形式繁殖的革兰阳性细菌。固体培养基上培养时，培养基内生长着色淡、较细的菌丝称为营养菌丝，主要作用是吸收营养、排泄废物；营养菌丝生长过程中会向空气中分化生长为色深较粗的分枝菌丝，即气生菌丝；气生菌丝能进一步分化成孢子丝，其上生有大量的孢子。孢子丝形态多样，有直、波曲、钩状、螺旋状、轮生等多种形态，孢子也有球形、椭圆形、杆状和瓜子状等，它们的形态构造都是放线菌分类鉴定的重要依据。

放线菌为丝状，因此不能用简单的制片方法进行观察，一般采用插片法、搭片法等，能保持放线菌的菌丝和孢子自然特征。在接种过放线菌的琼脂平板上，插上盖玻片或在平板上开槽再搭上盖玻片，使放线菌菌丝沿着培养基与盖玻片的交界线上生长、蔓延，从而附着在盖玻片上。待培养物成熟后轻轻地取出盖玻片，就能获得放线菌在自然生长状态下的标本，将盖玻片置于载玻片上即可镜检，并能观察到放线菌整个个体形态。