

农业微生物技术 实训教程

主编 张 燕 陈 波



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

农业微生物技术实训教程

主 编 张 燕 陈 波
副主编 郑晓慧 王向东



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

图书在版编目(CIP) 数据

农业微生物技术实训教程/张燕,陈波主编. —武汉:武汉大学出版社,2016.5
ISBN 978-7-307-17784-0

I. 农… II. ①张… ②陈… III. 农业—应用微生物学—高等学校—教材
IV. S182

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 085528 号

责任编辑:余 梦 薛文杰

责任校对:杜筱娜

装帧设计:张希玉

出版发行:武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)

(电子邮件:whu_publish@163.com 网址:www.stmpress.cn)

印刷:虎彩印艺股份有限公司

开本:787×1092 1/16 印张:13 字数:304 千字

版次:2016 年 5 月第 1 版 2016 年 5 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-307-17784-0 定价:34.00 元

版权所有,不得翻印;凡购买我社的图书,如有质量问题,请与当地图书销售部门联系调换。

前 言

微生物是所有形体微小、构造简单的低等生物的总称。微生物学是研究微生物生命活动规律及其应用的一门学科,是生物学的分支学科之一,是高等院校生物类专业的重要基础课或专业基础课。微生物在工业、农业、医药、食品等领域应用广泛、作用重大。其中,农业微生物在维系与提高土壤肥力、改善农产品品质、降低病虫害危害程度、保护农田生态环境及夯实国家粮食安全等方面都发挥着重要作用。微生物在新型农业中的广泛应用包括微生物饲料、微生物肥料、微生物农药、微生物食品、微生物能源和微生物环保制剂等。农业微生物学是微生物学的分支学科,是研究与农业有关的微生物的特性、生命活动规律及其作用过程的调控,从而促进农业生产发展的学科。

本书为农业微生物学实践性教材,以促进学生知识、能力、素质协调发展为原则,着力体现教材的实用性和实践性,着重培养学生的动手能力;以掌握概念和强化应用为重点,以满足岗位能力需要为度,以为社会培养更多面向生产一线的高素质技能型人才为目的。

本书主要内容为微生物的基本操作技术及其在农业各领域的研发和应用技术。本书共8个模块,57个实训,每个实训由实训目标、相关理论、材料和用具、实训内容和方法、实训报告及注意事项6个部分组成。具体包括:微生物学基本操作技术、微生物肥料研发技术、植物病原微生物研究技术、微生物农药研发技术、传统发酵食品制作技术、食用菌栽培技术、微生物饲料生产技术及微生物与农业环境保护,可供农林类本、专科院校及高等职业技术学院种植类、植保类、生物技术类专业及相关学科学生使用,也可供农业技术推广和农业生产的管理人员、微生物学授课教师、微生物学技术人员和其他生物科技人员查阅、使用和参考。

本书由西昌学院张燕和陈波担任主编,西昌学院郑晓慧和王向东担任副主编,西昌学院潘步昌、四川省中医药科学院杨玉霞担任参编。具体编写分工为:模块一由张燕编写,模块二由陈波、张燕编写,模块三、六由张燕、郑晓慧编写,模块四由陈波、王向东编写,模块五由张燕、潘步昌编写,模块七、八及附录由陈波、杨玉霞编写,全书由张燕和陈波统稿。

本书引用了大量文献资料,在此向相关文献资料的各位作者表示衷心的感谢。

由于编者水平有限,书中疏漏和不妥之处在所难免,敬请广大读者批评指正。

编 者

2016年1月

目 录

实训须知	1
模块一 微生物学基本操作技术	2
实训一 普通光学显微镜的使用与维护	2
实训二 培养基的制作、灭菌及微生物接种	6
实训三 细菌的简单染色和革兰氏染色	10
实训四 放线菌、酵母菌和霉菌的培养性状及显微形态观察	12
实训五 微生物细胞大小与数量测定	17
实训六 理化因素对微生物生长的影响	23
实训七 细菌生长曲线测定	28
实训八 菌种保藏	30
模块二 微生物肥料研发技术	35
实训一 微生物肥料市场调查	36
实训二 微生物肥料外观及菌种特征观察	37
实训三 微生物肥料菌种的分离鉴定	39
实训四 根瘤菌对大豆和花生的接种与结瘤培养	42
实训五 微生物肥料的生产	47
实训六 微生物肥料的理化指标测定	49
实训七 微生物肥料中有效活菌数和杂菌含量的测定	51
实训八 微生物肥料的田间肥效测定	55
模块三 植物病原微生物研究技术	58
实训一 植物病害症状识别与描述	58
实训二 植物真菌性病害的诊断	62
实训三 植物细菌性病害的诊断	67
实训四 植物病毒性病害的诊断	70
实训五 植物线虫性病害的诊断	73
实训六 植物病害标本的采集与制作	77
实训七 植物病原菌的分离与纯化	82
实训八 植物抗病性鉴定	85
实训九 植物病原物生理小种鉴定	89
实训十 植物病原真菌的分子鉴定	93

实训十一 杀菌剂的室内毒力及田间药效测定	96
模块四 微生物农药研发技术	100
实训一 微生物农药主要品种识别	100
实训二 抗病微生物的分离、筛选与鉴定	103
实训三 杀虫微生物的分离与鉴定	106
实训四 苏云金芽孢杆菌制剂的生产	108
实训五 白僵菌制剂的生产	111
实训六 木霉制剂的生产	114
实训七 微生物杀虫剂杀虫效果测定	116
实训八 微生物杀菌剂防病效果测定	119
实训九 微生物杀线虫剂的防治效果测定	122
实训十 微生物除草剂的除草效果测定	125
模块五 传统发酵食品制作技术	128
实训一 酸奶制作	128
实训二 馒头制作	130
实训三 泡菜制作	131
实训四 葡萄酒制作	133
实训五 米酒制作	135
实训六 腐乳制作	137
实训七 果醋制作	139
实训八 黄豆酱制作	141
模块六 食用菌栽培技术	144
实训一 常见食用菌形态结构观察	144
实训二 食用菌菌种制作	147
实训三 平菇发酵料袋栽	150
实训四 双孢蘑菇粪草畦栽	155
实训五 香菇熟料袋栽	161
实训六 野生菌资源调查、鉴定与标本制作	164
模块七 微生物饲料生产技术	168
实训一 青贮饲料生产	168
实训二 单细胞蛋白饲料生产	171
模块八 微生物与农业环境保护	174
实训一 环境微生物检测	174
实训二 堆肥制作	178
实训三 农村难降解生活垃圾填埋处理	181

实训四 沼气发酵及综合利用.....	183
附录.....	186
附录一 培养基配方及配制方法.....	186
附录二 染色液配制方法.....	192
附录三 植物病害标本浸渍液的配制.....	193
附录四 食用菌子实体浸渍液的配制.....	195
参考文献.....	196

实训须知

微生物实训的目的是加深和巩固学生对微生物理论教学内容的理解,使学生在掌握微生物学基本操作的基础上具有一定的综合设计、实训实施、调查分析和推理总结的能力。

实训应注意:

(1) 实训前认真预习实训指导内容,明确实训目的、要求、方法和步骤,了解主要操作环节。

(2) 实训前准备好实训用具,如 3H~4H 绘图铅笔、橡皮、直尺或三角板、绘图纸、报告纸、记录本。

(3) 在实训前应仔细清点实训用具和材料,填写仪器使用卡片,如有不符或损坏,应及时报告指导教师。

(4) 实训时严格遵守操作规程,服从教师指导,认真完成规定的操作和观察项目,培养严肃认真、一丝不苟的科学态度和工作作风。

(5) 在实训场所必须保持安静,爱护仪器、珍惜标本、节约药物,实训用品、材料等用后要及时整理,放归原处,不得乱拿、乱用或随意丢弃,如有损坏按规定处理。

(6) 注意安全,严防着火、触电和药物中毒。

(7) 每次实训结束后,应做好清洁,由指导人员检查后,方可离开现场。

(8) 翔实地记录实训结果,通过分析得出合理结论,写好实训报告(用统一规定的实训报告纸)。由实训指导人员考核和评定成绩。实训缺席者需申请补做。

模块一 微生物学基本操作技术

本模块包括普通光学显微镜的使用与维护,培养基的制作、灭菌及微生物接种,细菌的简单染色和革兰氏染色,放线菌、酵母菌和霉菌的培养性状及显微形态观察,微生物细胞大小与数量测定,理化因素对微生物生长的影响,细菌生长曲线测定,菌种保藏共 8 个实训项目。通过本模块的实训,要求认识微生物实验室的常用设备和仪器,掌握其作用、使用方法及使用注意事项,理解微生物学实验中常用的专业术语,熟练掌握微生物学的基本操作技术。

实训一 普通光学显微镜的使用与维护

一、实训目标

- (1)了解普通光学显微镜的构造和原理。
- (2)掌握普通光学显微镜(包括油镜)的使用方法。
- (3)掌握普通光学显微镜的简单维护方法。

二、相关理论

(一)普通光学显微镜的结构

普通光学显微镜的结构如图 1-1 所示。

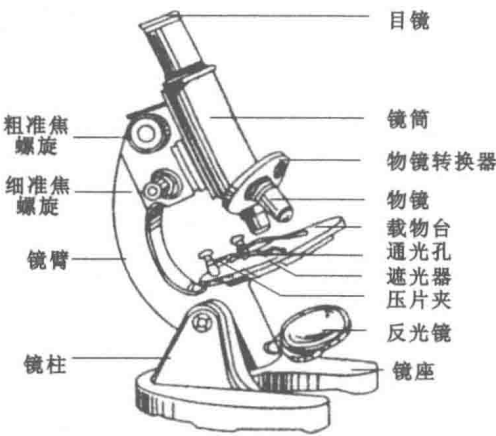


图 1-1 光学显微镜的构造

1. 机械部分

镜筒:安装在光学显微镜最上方或镜臂前方的圆筒状结构,起安放目镜镜头的作用。

物镜转换器:又称物镜转换盘,是安装在镜筒下方的圆盘状构件,可以按顺时针或逆时针方向自由旋转,其上均匀分布 3~4 个圆孔,起安放和转换物镜镜头的作用,用以装载不同放大倍数的物镜。

镜臂:支持镜筒和载物台的弯曲状构件,是取放显微镜时的手握部位。

调焦器:也称调焦螺旋,是调节焦距的装置,位于镜臂的下端(镜筒倾斜式光学显微镜),分粗准焦螺旋(大螺旋)和细准焦螺旋(小螺旋)两种。粗准焦螺旋可使镜筒或载物台以较快速度或较大幅度升降,能迅速调节好焦距使物像呈现在视野中,适用于低倍镜观察时的调焦。细准焦螺旋只能使镜筒或载物台缓慢或较大幅度升降(升或降的距离不易被肉眼观察到),适用于高倍镜和油镜的聚焦或观察标本的不同层次。一般在粗准焦螺旋调焦的基础上再使用细准焦螺旋精细调节焦距。

载物台:也称镜台,是位于物镜转换器下方的方形平台,作用是放置被观察的玻片标本。平台中央有一圆孔,称为通光孔,来自下方的光线经此孔照射到标本上。

镜柱:连接镜臂与镜座的短柱,起支持作用。

镜座:位于显微镜最底部的构件,是整个显微镜的基座,用于支持和稳定镜体。有的显微镜在镜座内装有照明光源等构件。

2. 光学系统部分

光学显微镜的光学系统主要包括目镜、物镜和照明装置(反光镜、聚光器和光圈等)。

目镜:又称接目镜,安装在镜筒的上端,起放大物像的作用。每台显微镜通常配置 2~3 个不同放大倍率的目镜,常见的有 5×、10×和 15×(“×”表示放大倍数)的目镜,可根据不同需要选择使用,最常使用的是 10×目镜。

物镜:也称接物镜,安装在物镜转换器上,起放大物像的作用。每台光学显微镜一般有 3~4 个不同放大倍率的物镜,每个物镜由数片凸透镜和凹透镜组合而成,是显微镜最主要的光学部件,决定着光学显微镜分辨率的高低。常用物镜的放大倍数有 4×、10×、40×和 100×几种。一般将 4×或 10×的物镜称为低倍镜(4×以下的叫作放大镜),将 40×或 45×的物镜称为高倍镜,将 90×或 100×的物镜称为油镜(油镜镜头在使用时需浸在镜油中)。不同物镜有不同的工作距离(指焦距调好、物像清晰时物镜最下端与盖玻片上表面之间的距离),物镜的放大倍数与其工作距离成反比。当低倍镜被调节到工作距离后,可直接转换高倍镜或油镜,只需用细准焦螺旋稍加调节焦距便可见到清晰的物像,这种情况称为同高调焦。

聚光器:位于载物台的通光孔下方,由聚光镜和光圈构成,其主要功能是将光线集中到所要观察的标本上。聚光镜由 2~3 个透镜组合而成,其作用相当于一个凸透镜,可将光线汇集成束。在聚光器的左下方有一调节螺旋可使其上升或下降,从而调节光线的强弱,升高聚光器可使光线增强,反之则使光线变弱。光圈也称为彩虹阑或孔径光阑,位于聚光器的下端,是一种能控制进入聚光器的光束大小的可变光阑,它由十几张金属薄片组合排列而成,其外侧有一小柄,可使光圈的孔径开大或缩小以调节光线的强弱。在光圈的下方常装有滤

光片框,可放置不同颜色的滤光片。

反光镜:位于聚光镜的下方,可向各个方向转动,能将来自不同方向的光线反射到聚光器中。反光镜有两个面,一面为平面镜,另一面为凹面镜,凹面镜有聚光作用,适于较弱光和散射光下使用,光线较强时则选用平面镜。

内光源:显微镜自带的照明装置,安装在镜座内部,由强光灯泡发出光线通过安装在镜座上的集光器射入聚光器。

(二)普通光学显微镜(包括油镜)的光学原理

1. 成像原理

显微镜是利用凸透镜的放大成像原理,将人眼不能分辨的微小物体放大到人眼能分辨的尺寸,主要是增大近处微小物体对眼睛的张角(视角大的物体在视网膜上成像大),用角放大率 M 表示它们的放大倍率。因同一物体对眼睛的张角与物体离眼睛的距离有关,所以一般规定像离眼睛距离为 250 mm(明视距离)处的放大率为仪器的放大率。显微镜观察物体时通常视角甚小,因此视角之比可用其正切之比代替。

光学显微镜的成像原理如图 1-2 所示。物体 AB 经物镜后成放大倒立的实像 A_1B_1 , A_1B_1 位于目镜的物方焦距的内侧,经目镜后,于明视距离处成再放大的虚像 A_2B_2 。

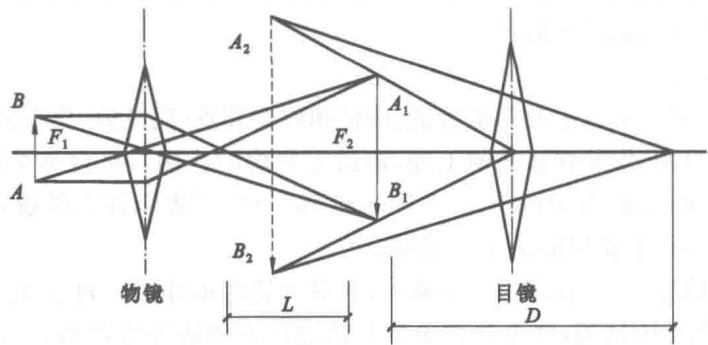


图 1-2 光学显微镜的成像原理

AB —物体; A_1B_1 —物镜放大图像; A_2B_2 —目镜放大图像; F_1 —物镜的焦距; F_2 —目镜的焦距;

L —镜筒长度(即物镜后焦点与目镜前焦点之间的距离); D —明视距离(人眼的正常明视距离为 250 mm)

2. 放大倍数

显微镜总的放大倍数是目镜放大倍数和物镜放大倍数的乘积。

3. 分辨率

分辨率是指显微镜能够辨别两个质点间最小距离的能力。普通光学显微镜的分辨率约为 $0.3\ \mu\text{m}$ 。若使用油镜,光线通过载玻片后直接透过香柏油进入物镜,分辨率可达 $0.2\ \mu\text{m}$ 。

4. 工作距离

工作距离是指观察标本最清晰时物镜透镜的下表面与标本之间(无盖玻片)或与盖玻片之间的距离。物镜的放大倍数越大,其工作距离越短,油镜的工作距离约为 $0.2\ \text{mm}$ 。

三、材料和用具

1. 材料

根霉玻片标本、枯草芽孢杆菌玻片标本。

2. 用具

普通光学显微镜、香柏油、二甲苯、擦镜纸、镊子等。

四、实训内容和方法

(一)显微镜构造的认识

逐一寻找、观察光学显微镜机械部分和光学部分各构件,记住其名称和位置。

(二)根霉玻片标本镜检

1. 显微镜放置

显微镜放在座前桌面偏左的位置,镜座距桌沿 6~7 cm。

2. 打开光源

打开光源后调节光强到中等大小。

3. 调节聚光镜和光阑

转动物镜转换器,使低倍镜镜头正对镜台上的通光孔。

4. 低倍镜和高倍镜的使用

放上待观察的玻片标本,移动载物台,使玻片中央处于物镜正下方。用左手转动粗准焦螺旋上升镜筒,同时注意从目镜观察到视野中逐渐出现物像时改用细准焦螺旋调至物像清晰。移动玻片,寻找观察目标。

然后眼睛离开目镜,从侧面观察,旋转物镜转换器,将高倍物镜镜头转至正下方。再从目镜观察,同时调节光圈和细准焦螺旋使物像清晰明亮,并将观察目标缓慢移至视野中心。边观察边绘图。观察完毕降下载物台,取出玻片。

(三)枯草芽孢杆菌玻片标本镜检

(1) 按照观察根霉的方法,用低倍镜和高倍镜观察目标。

(2) 将载物台下降(物镜镜头距玻片 5 cm 左右),向玻片上垂直滴加一滴香柏油,转动 100×油镜镜头至正下方,从侧面观察,调节粗准焦螺旋上升载物台,使油镜镜头刚好浸入油中。然后从目镜观察,缓慢调节粗准焦螺旋,至视野中出现物像时改用细准焦螺旋,调至出现清晰物像为止。边观察边绘图。观察完毕降下载物台,取出玻片。

(四)显微镜清洁

1. 低倍镜和高倍镜清洁

将光强调至最低,关闭电源。将载物台降至最低处,旋转物镜转换器,用擦镜纸擦拭低倍镜和高倍镜镜头。

2. 油镜清洁

先用擦镜纸擦拭镜头上残留的香柏油,然后另取一张擦镜纸蘸取二甲苯擦拭残留的香

柏油,最后取一张擦镜纸擦拭残留的二甲苯。

3. 其他部件擦拭

首先用擦镜纸或吸水纸擦掉载物台上的水渍或污物,然后用无尘丝绸布擦拭显微镜其他部件上的灰尘,最后罩上防尘罩。

五、实训报告

- (1) 叙述油镜使用完毕的清洁方法。
- (2) 叙述普通光学显微镜的使用及简单维护方法。
- (3) 绘制标本观察结果。

六、注意事项

(1) 显微镜应放置在干燥、无尘、不受阳光直接照射的地方。不使用时用防尘罩将显微镜罩起来,也可罩上防尘罩后将其放入显微镜箱或显微镜柜内,在箱柜内放干燥剂。

(2) 取送显微镜时要轻拿轻放。取送显微镜时一定要一手握住镜臂,另一手托住底座。显微镜不能倾斜,以免目镜从镜筒上端滑出。

(3) 必须熟练掌握并严格执行显微镜使用规程,按照严格的流程和说明书来操作显微镜。

(4) 严禁将表面有水的载玻片放在显微镜上。观察时不能随便移动显微镜的位置。忌频繁开关电源,暂时不用时只需将光源亮度调至最低。

(5) 显微镜的光学部分只能用特殊的擦镜纸擦拭,或用脱脂棉球蘸无水乙醚和无水乙醇混合液(7:3)擦拭,然后用擦镜纸擦干。不能乱用其他物件擦拭,更不能用手指触摸透镜,以免汗液污染透镜。

(6) 转换物镜镜头时,不要搬动物镜镜头,只能转动物镜转换器。

(7) 切勿随意转动调焦螺旋。使用细准焦螺旋时,用力要轻,转动要慢,转不动时不要硬转。

(8) 不得任意拆卸显微镜上的零件,严禁随意拆卸物镜镜头,以免损伤转换器螺口或螺口松动使低倍物镜和高倍物镜转换时不齐焦。

(9) 使用高倍物镜时,勿用粗准焦螺旋调节焦距,以免移动距离过大损坏物镜和玻片。

(10) 用毕,先将电源调至最暗处后再关闭电源,把载物台降至最低处。然后检查物镜镜头上是否沾有水或其他试剂,如有则要擦拭干净,并把载物台擦拭干净。最后,将显微镜罩上防尘罩。

实训二 培养基的制作、灭菌及微生物接种

一、实训目标

(1) 学习常用的马铃薯蔗糖琼脂培养基(PDA 培养基)和牛肉膏蛋白胨培养基(NA 培养基)的制作过程。

(2) 掌握培养皿包扎、棉塞制作、试管捆扎等基本操作技术。

(3) 掌握高压蒸汽灭菌的原理与操作过程。

(4) 掌握简单的无菌接种技术。

二、相关理论

微生物在自然环境条件下呈混合杂居状态。要研究、利用微生物,必须将目标微生物从杂居状态中分离培养出来。要分离培养微生物,首先要制备相应的培养基。培养基是由人工配制的适合微生物生长繁殖或积累代谢产物的营养基质。培养基须含有微生物所需的六大类营养要素:碳源、氮源、能源、生长因子、无机盐和水。

(一)培养基的种类

培养基种类很多,迄今为止,已有数千种培养基。

按照营养物质的来源可将培养基分为天然培养基、合成培养基和半合成培养基。

按照培养基配制完成后的物理状态可将培养基分为固体培养基、液体培养基和半固体培养基。固体培养基一般是在液体培养基中加入 1.5%~2.0% 的琼脂作为凝固剂制作而成的。半固体培养基是在液体培养基中加入 0.5%~0.8% 的琼脂作为凝固剂制作而成的。

按照使用目的可将培养基分为选择性培养基和鉴别性培养基。

(二)培养基的配制

配制培养基的原则是目的明确、营养协调、理化适宜、经济节约。

由于微生物的营养类型不同,应选择不同的培养基培养相应的微生物。实验室常用 PDA 培养基培养真菌,用 NA 培养基培养细菌,用高氏 1 号培养基培养放线菌,用麦芽汁培养基培养酵母菌。培养基配制的一般流程为称量、溶解、过滤、定容、调节 pH 值、分装、灭菌。

(三)培养基灭菌

培养基灭菌的目的是杀死其中的一切微生物。培养基灭菌的方法有高压蒸汽灭菌、干热灭菌、过滤除菌等。其中,高压蒸汽灭菌是最常用的灭菌方法,其原理是利用高压蒸汽的持续穿透杀菌而消灭培养基内的所有微生物。

(四)微生物的接种

微生物的接种是指在无菌操作条件下将微生物菌种转接于无菌培养基上。接种通常需要在超净工作台上或专用接种箱内进行。接种方法可能因微生物不同而不同,也可能因实验目的不同而不同。真菌接种一般采用菌丝块接种和孢子涂抹接种方法,细菌接种有涂抹接种、划线接种和穿刺接种等方法。接种的用具具有接种针、接种铲、接种环、镊子、涂布棒等。

三、材料和用具

1. 材料

菌种:真菌和细菌活化菌种各 3 支或 3 皿。

试剂:琼脂、马铃薯、蔗糖、牛肉膏、蛋白胨、食盐、NaOH、HCl、75% 乙醇溶液等。

2. 用具

电子天平、菜刀、药匙、量筒、玻璃棒、滴管、烧杯、电磁炉、汤锅、三角瓶、试管、培养皿、纱布、铁架台、漏斗、止水夹、乳胶管、高压灭菌锅、牛皮纸、棉花、棉线、橡皮筋、系带、标签纸、剪刀、镊子、pH 试纸、记号笔、超净工作台、接种针、接种环、酒精灯、恒温培养箱等。

四、实训内容和方法

1. 称量

按照 PDA 培养基和 NA 培养基的配方[见附录一(一)、(二)], 计算各成分的需要量, 将称取的药品放于烧杯中。

称取 4 g NaOH 溶解于 100 mL 蒸馏水中配制成 1N(N 为当量浓度)NaOH 溶液, 量取 5 mL HCl, 用蒸馏水稀释定容至 60 mL 制成 1N HCl 溶液, 以备调节 NA 培养基的 pH 值。

2. 溶解

在锅中加入一定体积的自来水, 马铃薯去皮称量后切成大小均匀的条状放入锅中熬煮至熟而不烂, 倒取熬煮的汤汁, 加入琼脂粉不断搅拌溶解, 最后加入蔗糖搅拌溶解。

3. 过滤

用单层纱布过滤取滤液。

4. 定容

非精确性实验直接用 1000 mL 大烧杯定容即可。

5. 调节 pH 值

取事先配制好的 1N NaOH 溶液和 1N HCl 溶液调节 NA 培养基的 pH 值为 7.2~7.4。

6. 分装

趁热分装。取约 1/3 的培养基分装入试管。培养基的分装量应为试管长度的 1/5~1/4, 操作时应尽量防止培养基黏附在试管口或外壁上, 若已黏上应立即用纱布或脱脂棉擦净。装好培养基的试管应及时塞上棉塞, 棉塞 2/3 留在试管内, 1/3 露在试管外。然后把塞好棉塞的试管每 10 支(或 3、5、7 支)捆扎成一把, 用橡皮筋捆扎底端, 用牛皮纸或双层报纸包扎管口端, 再用棉线捆好, 竖直放入高压锅内。剩余培养基装入 250 mL 三角瓶内, 装入量为三角瓶容量的 1/3~2/3。

7. 灭菌

给高压灭菌锅补水淹没铁圈, 加热升温, 待压力升至 0.05 MPa 时, 打开放气阀排冷气至压力为 0, 关闭阀门继续升温放冷气, 反复 3 次。排掉冷气后关闭排气阀继续升温, 压力升至 0.15 MPa 时开始计时, 维持 20~30 min, 关闭电源。

8. 摆斜面、倒平板

灭菌完毕, 高压灭菌锅压力自然降至 0 后立即取出试管培养基, 在清洁的台面或桌面上倾斜摆放, 冷却成斜面, 一般斜面长度以达试管全长的 1/3~1/2 为宜。将三角瓶培养基移至事先消过毒的超净工作台内, 待瓶壁冷却至不烫手时迅速将培养基倒入培养皿, 每个培养皿内约倒入 10 mL, 培养皿厚度可根据实验目的进行调整。

9. 接种

把冷却的斜面培养基移入超净工作台内,打开紫外光灯,待培养皿中的培养基冷却凝固后关闭紫外光灯,打开风机 5~10 min 后在超净工作台上用接种针挑取菌丝块接种真菌,用接种环蘸取菌苔,以划线法接种细菌。以不接种培养皿为空白对照。每次接种后用记号笔在培养皿底靠边的位置简单注明接种物、接种人和接种日期。

10. 培养

将空白对照和接种物分别分成两半,斜面朝下,培养皿倒置,一半放在 25℃ 恒温培养箱中培养,另一半放在 37℃ 恒温培养箱中培养。培养过程中每日观察接种物生长情况及有无污染,对照有无菌落生长等,如实记录。

$$\text{污染率} = \frac{\text{污染管数(或皿数)}}{\text{总接种管数(或皿数)}} \times 100\%$$

五、实训报告

- (1) 叙述培养基配制过程和结果。
- (2) 叙述微生物接种与培养结果,计算污染率,分析污染原因。

六、注意事项

- (1) 实验前日将所需器皿清洗后烘干备用。
- (2) 因为实训历时较长,为了节约时间,实训时分 2 组分别配制 PDA 培养基和 NA 培养基,组内同学注意分工协作。
- (3) 在称量至分装阶段可以同时包扎培养皿单独灭菌。培养皿可用干热灭菌或湿热灭菌,若为湿热灭菌,取出后应立即放入烘箱烘烤备用。
- (4) 马铃薯需要去皮后再称量。牛肉膏可以在小烧杯中称量,用温水溶解后倒入锅中,或用称量纸称量后连同称量纸放入热水中,待牛肉膏与纸自动分离,取出称量纸。蛋白胨极易吸潮,称量时应迅速。
- (5) 熬煮时加水量略小于最终所需体积以便后续定容,熬煮过程中注意搅拌以免粘锅。
- (6) 培养基配好后应尽快灭菌。灭菌前务必检查高压灭菌锅内的水位,及时补水。全自动高压灭菌锅在升温过程中注意排掉冷气。当压力升至 0.15 MPa 时注意计时(最好使用定时器)。灭菌时全程守候,灭菌计时结束后关闭电源,待压力降为 0 时打开放气阀彻底排气后方可开盖取物。取物时最好戴上棉手套以防烫伤。
- (7) 接种操作时尽量少说话、少走动,双手不能超出超净工作台边缘,头部不能探入超净工作台内。在酒精灯无菌区内接种,每接完一支菌后接种工具都要灼烧,灼烧后要充分冷却再刮取菌种。
- (8) 超净工作台使用前用 75% 的酒精擦拭或喷雾,然后打开紫外光灯照射杀菌,避免紫外光照射皮肤和眼睛,紫外光照射后打开风机吹掉臭氧后再行操作。接种前用 75% 的酒精擦拭双手,用火焰灭菌法为接种工具灭菌。接种后及时将超净工作台台面清理干净,关闭电源。

实训三 细菌的简单染色和革兰氏染色

一、实训目标

- (1) 学习微生物涂片染色的操作技术。
- (2) 掌握细菌革兰氏染色的原理和方法。
- (3) 熟悉油镜的使用和清洁方法。

二、相关理论

(一) 染色的目的

细菌小而透明,一般用临时玻片制作方法镜检时菌体和背景没有明显差异,不易观察其形态,更难识别其结构。因此,细菌研究中需要对细菌菌体进行染色,染色后的菌体与背景反差明显,可以十分清楚地观察细菌的形态、基本结构及附属物。

(二) 常用染料

用于生物染色的染料有碱性染料、酸性染料和中性染料三大类。碱性染料的离子带正电荷,能和带负电荷的物质结合。因为细菌蛋白质等电点较低,当它生长于中性、碱性或弱酸性的溶液中时常带负电荷,所以通常采用碱性染料(如美蓝、结晶紫、碱性复红或孔雀绿等)使其着色。酸性染料的离子带负电荷,能与带正电荷的物质结合。当细菌分解糖类产酸使培养基 pH 值下降时,细菌所带正电荷则会增加,因此易被伊红、酸性复红或刚果红等酸性染料染色。中性染料又称复合染料,是前两者的结合物,如伊红美蓝、伊红天青等。

(三) 染色的类型

根据染色过程中使用染料种类不同将染色分为单染(仅使用一种染料)和复染(使用两种或两种以上的染料),根据染色对象是菌体还是背景将染色分为正染(菌体着色)和负染(背景着色)。细菌简单染色法属于单染/正染,适用于菌体一般形态和细胞排列方式的观察,不能辨别细菌的构造。革兰氏染色属于复染/正染,可以将细菌分为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌,还可观察到芽孢等结构。

(四) 革兰氏染色的原理

革兰氏染色法是丹麦病理学家 Hans Christian Gram 于 1884 年发明的。革兰氏染色法是微生物学中最重要染色方法,其机制直至该法发明 100 年后(1983 年)才得到确切的证明。

革兰氏染色的机制:菌体通过结晶紫初染和碘液媒染后,在细菌的细胞膜内可形成不溶于水的结晶紫与碘的复合物。 G^+ 细菌由于其细胞壁较厚、肽聚糖网层次多而交联致密,故遇乙醇脱色处理时,细胞失水而使网孔缩小,再加上其细胞壁不含类脂,故乙醇处理不会溶出缝隙,脱色后结晶紫碘复合物牢牢锁在壁内,使其保持紫色,再用番红染色时染料无法进入细胞,因此菌体为紫色。 G^- 细菌因其细胞壁薄、外膜层类脂含量高、肽聚糖层薄、肽聚糖网交联度差,乙醇脱色后以类脂为主的外膜迅速溶解,这时薄而松散的肽聚糖网不能阻挡结