

高等农业院校試用教材

微生物学实验

陈华癸主編

农学类各专业及土壤农化专业用

农业出版社

高等农业院校試用教材

微生物学实验

陈华癸主编

农学类各专业及土壤农化专业用

农业出版社

主 編 陈华癸

参加編写者 李阜棣、周启、赵学慧、曹燕珍、胡正嘉等

高等农业院校试用教材
微 生 物 学 实 驗
陈华癸主编

农 业 出 版 社 出 版
北京东便门一号

(北京市书刊出版业营业许可证出字第106号)

新华书店上海发行所发行 各地新华书店经售

大东集成联合印刷厂印刷装订

统一书号K13144.137

1962年8月北京制型

1962年10月初版

1962年10月上海第一次印刷

印数 0001—4000册

开本 787×1092 毫米
十六分之一

字数 202 千字

印张 十

定价 (9) 九角六分

序

本书既是一本实验课的教材,又是一本土壤微生物学工作手册。这本书的服务对象是:(1)农学院农学系统各专业的微生物学实验课;(2)土壤农化专业土壤微生物学实验课、教学实习和学生的科学研究活动;(3)微生物学和土壤微生物学教师和研究生的备课活动和科学研究活动。

为了满足上述多种要求,本书在内容的选择和编写体制上有下列特点:(1)内容项目比较多,常用的工作项目不因迁就篇幅而割舍;(2)一个项目中可以互相代替的工作方法多数只选写一种;(3)章节单元比较细小,力求可以分小单元选读;(4)采取实验课指导书的形式,做实验课教材用只要根据特定的教学计划选择,无需重制。

本书包括我国近几年来常用的土壤微生物学研究方法。书中所写出的方法基本上都是编者实地做过的。然而,由于微生物、土壤和其它条件的变异性,不一定不加变化就可以在各地应用。

书中所采取的方法,显然有些是比较陈旧的。这一方面是由于我们学习得不够,另一方面也是因为在处理直接经验和间接知识之间,做为一本工作方法的书,我们倾向于落在直接经验上。并且就我国现在的工作条件而论,有些在技术上比较新颖的工作方法也不尽相宜。

由于落在直接经验上,有些比较重要的土壤微生物学研究方法,因为我们没有做过,也割舍了。例如洛海德(Lochhead)等的土壤微生物营养群研究法;李斯(Lecs)的硝化细菌环流培养法等等。我们力求多学多做,待有一定经验,在以后的版本中充实。

由于本书是教研组的同志在进行经常的教学工作中挤出时间编写的,错漏之处在所难免。希望读者们随时发现,不吝指教,以便再版时修正。

参加本书编写工作的有陈华癸、李阜棣、周启、赵学慧、曹燕珍、胡正嘉等。

陈华癸

于华中农学院 1962年4月

写給实验課的指导教师

做为微生物学实验課的教材，建議：(1)由指导教师根据特定的实验課的教学內容，預先选择一定节目做为指定的学习文件；(2)在每次实验課开始时，由指导教师将具体要求、工作程序，必要的修改和注释写在黑板上，并簡明扼要地做一些說明(或在每学期初編出詳細的教学計劃)。这样做，既可以較充分地利用这本书，不用另发成套的講义或实验指导书，并可以結合当时当地的实验課的具体条件。

例(1) 特定实验課的实验 X，题目为：“細菌荚膜的衬托染色法”。

閱讀本书实验六“細菌荚膜衬托染色法”；复习实验四“細菌的簡單染色法”。

实验工作程序：

1. 制涂片，簡單染色。
2. 做黑素处理。
3. 鏡检。
4. 书面作业：繪图并說明；提問解答。

說明：

1. 本次实验用固氮菌进行。
2. 本实验用 1/5 石碳酸复紅染色液染色。

例(2) 特定实验課的实验 Y，题目为：“用嫌气培养法培养巴斯德梭菌”。

閱讀本书实验三十八“用焦性沒食子酸吸收氧气培养嫌气性細菌”；实验十一“酵母菌水浸片的制备”；实验十二“酵母菌細胞中肝糖粒染色法”。

实验工作程序：

1. 接种。
2. 实习用焦性沒食子酸吸收氧气法。
3. 保溫培养 3—5 天。
4. 制水浸片，加碘液处理；鏡检。
5. 书面作业：繪图并报告实验結果。

說明：本班实验集体采用标本瓶代替大試管。1,000毫升标本瓶，用10克焦性沒食子酸和50毫升 20% NaOH。瓶口用真空封閉油膏封閉。

华中农学院微生物学教研組

1962年4月

目 录

序

写给实验课的指导教师

第一部分 微生物学实验室的设置

I. 实验室的设置和主要设备	1
II. 微生物学实验常用的玻璃器材及其清洁方法	5
III. 学生实验台上常备器材	9

第二部分 微生物形态学的研究

光学显微镜的构造和性能	12
实验一 显微镜的使用方法	18
实验二 活细菌的观察	20
实验三 细菌大小的测定	22
实验四 细菌的简单染色法	24
实验五 细菌的革兰氏染色法	25
实验六 细菌荚膜衬托染色法	26
实验七 细菌芽孢染色法	26
实验八 细菌鞭毛染色法	27
实验九 细菌细胞中异染粒染色法	28
实验十 放线菌形态观察	28
实验十一 酵母菌水浸片的制备	29
实验十二 酵母菌细胞中肝糖粒染色法	30
实验十三 酵母菌细胞中脂肪粒染色法	30
实验十四 发酵液中酵母菌数的显微镜直接测数法	31
实验十五 霉菌水浸片的制备	32
实验十六 霉菌封闭标本的制备	33

第三部分 培养基与灭菌法

I. 培养基	34
--------------	----

实验十七	牛肉膏蛋白胨洋葱培养基的制备	36
实验十八	豆芽汁蔗糖洋葱培养基的制备	37
实验十九	淀粉-酪蛋白培养基的制备	37
实验二十	马丁 (Martin) 孟加拉红-链霉素洋葱培养基的制备	38
实验二十一	阿须贝 (Ashby) 无氮洋葱培养基的制备	39
实验二十二	察贝克 (Czapek) 洋葱培养基的制备	40
实验二十三	明胶培养基的制备	40
实验二十四	石蕊牛乳培养基的制备	42
实验二十五	马铃薯块培养基的制备	42
实验二十六	甘露醇酵母汁洋葱培养基的制备	43
实验二十七	土壤汁洋葱培养基的制备	44
实验二十八	硅胶胶平板的制备	45
实验二十九	培养基pH值的测定和校正	46
I. 灭菌法		47
实验三十	干热灭菌法	50
实验三十一	加压蒸汽灭菌法	51

第四部分 微生物的营养与环境条件

实验三十二	营养元素对黑曲霉生长发育的影响	53
实验三十三	不同碳源对固氮菌及白地霉生长发育的影响	54
实验三十四	不同氮源对根瘤菌生长发育的影响	55
实验三十五	氧气对细菌生长发育的影响	57
实验三十六	用深层培养液培养丁酸细菌	57
实验三十七	用嫌气培养罐培养嫌气性细菌	58
实验三十八	用焦性没食子酸吸收氧气培养嫌气性细菌	60
实验三十九	用燕麦发芽吸收氧气来培养乳酸菌, 并考察其氮素营养特性	61
实验四十	温度对微生物生长发育的影响	62
实验四十一	紫外线对微生物生长发育的影响	63
实验四十二	溶质的浓度对微生物生长发育的影响	63
实验四十三	氢离子浓度对微生物生长发育的影响	64
实验四十四	化学药剂对细菌生长发育的影响	65
实验四十五	微生物间的对抗作用	66

第五部分 细菌的分离、纯化和鉴定(附酵母菌和霉菌的分离)

I. 細菌純培養的分离和純化的一般方法.....	67
實驗四十六 用选择培养基分离土壤中的解磷芽孢杆菌	68

实验四十七	从根瘤中分离根瘤菌	69
实验四十八	用稀释平面分离法进一步纯化根瘤菌培养体	70
实验四十九	固氮菌的加富培养及其分离	71
实验五十	乳酸细菌的分离	72
实验五十一	从土壤中分离放线菌	72
实验五十二	酵母菌的加富培养及其分离	74
实验五十三	从土壤中分离霉菌	74
I. 细菌纯培养鉴定的常规实验		75
实验五十四	细菌菌落形态和培养体特征的检验	77
实验五十五	细菌的发酵实验	79
实验五十六	明胶水解实验(平面法)	80
实验五十七	石蕊牛乳鉴定	80
实验五十八	乙酰甲基甲醇反应(或称V. P. 反应)	81
实验五十九	细菌产生明胶的检验	82
实验六十	细菌分解蛋白质产氨、产硫化氢的常规鉴定	82
实验六十一	细菌还原硝酸盐的检验	83
实验六十二	细菌水解淀粉的检验	85

第六部分 微生物引起的物质转化过程的观察

实验六十三	好气性分解纤维素细菌及其作用现象的观察	86
实验六十四	嫌气性分解纤维素细菌及其作用现象的观察	87
实验六十五	分解果胶类物质的微生物	88
实验六十六	酒精发酵作用	88
实验六十七	乳酸发酵作用	89
实验六十八	丁酸发酵作用	90
实验六十九	土壤微生物分解蛋白质的作用	91
实验七十	硝化作用(第一阶段)及亚硝酸细菌的观察	92
实验七十一	硝化作用(第二阶段)及硝酸细菌的观察	92
实验七十二	反硝化细菌及其作用过程的观察	93
实验七十三	硫化细菌及其作用过程的观察	94
实验七十四	反硫化细菌及其作用过程的观察	95
实验七十五	无机磷细菌及其作用	95
实验七十六	硅酸盐细菌的选择培养及其形态观察	96
实验七十七	硅酸盐细菌吸收利用海州磷矿石能力的测定	97
实验七十八	硅酸盐细菌吸收利用钾长石能力的测定	98
实验七十九	铁细菌加富培养及其形态观察	98

第七部分 土壤微生物区系的分析

实验八十	土样的采取和含水量的测定	100
实验八十一	制土壤悬液和稀释液	101
实验八十二	平面培养测数法的工作和计算方法	102
实验八十三	稀释培养测数法的工作和计算方法	103
实验八十四	好气性细菌平面培养测数法	104
实验八十五	嫌气性细菌平面培养测数法	104
实验八十六	放线菌平面培养测数法	105
实验八十七	真菌平面培养测数法	106
实验八十八	氨化细菌数量的测定	106
实验八十九	硝化细菌数量的测定	107
实验九十	反硝化细菌数量的测定	107
实验九十一	固氮菌 (<i>Azotobacter chroococcum</i>) 数量的测定	108
实验九十二	好气性分解纤维素细菌数量的测定	108
实验九十三	嫌气性分解纤维素细菌数量的测定	109
实验九十四	硫化细菌数量的测定	109
实验九十五	反硫化细菌数量的测定	109
实验九十六	根际微生物研究方法	110
实验九十七	根表微生物研究方法	110
实验九十八	用埋片法观察土壤微生物	111
实验九十九	土壤细菌的显微镜直接测数法	111

第八部分 菌肥研究法和实验室制备法

实验一〇〇	根瘤菌的固体表面繁殖法	113
实验一〇一	根瘤菌的液体浅层繁殖法	114
实验一〇二	固氮菌的振荡繁殖法	114
实验一〇三	根瘤菌的深层通气繁殖法	115
实验一〇四	固氮菌泥面繁殖法	116
实验一〇五	草炭根瘤菌肥的配制	117
实验一〇六	泥土根瘤菌肥的配制	118
实验一〇七	根瘤菌的盆栽结瘤试验	119
实验一〇八	固氮菌固氮强度的测定	122
实验一〇九	根瘤菌(或固氮菌)肥料的質量检查	126

附 录

附录一	教学用菌种一览表	128
-----	----------------	-----

附录二	教学用药品.....	128
附录三	教学用培养基的配方	130
附录四	教学用染色液的配制	138
附录五	教学用溶液的配制	140
附录六	指示剂及试剂的配制	143
附录七	其他	145
附录八	相差显微镜的使用法	148

第一部分 微生物学实验室的设置

进行微生物学教学和研究工作，一般包括下面几个主要的方面：培养基的制备，培养基及各种器皿的灭菌；进行分离和培养，显微镜检查（包括染色制片等）；在工作之前和工作之后，必须进行各种器皿的清洁工作。为了使工作方便，在条件许可的情况下，每一类工作最好有专门的房间，在不同的房间中陈列经常使用的各项设备和各种用品。关于实验室的设备我们主要是从教学工作（学生实验和教学人员的准备工作）的需要来考虑的，也照顾到一般性科学研究工作的需要。

I. 实验室的设置和主要设备

微生物学实验室通常包括实验室、实验预备室、灭菌室、无菌操作室（简称无菌室）、培养室（保温室）、洗涤室。这样划分实验室不是绝对的，可根据具体条件加以合并，或者是分得更细致，但这几方面的工作是不可缺少的。对各室的共同要求是高度的清洁卫生，也就是要尽可能地创造无菌条件。为了达到这个目的，房屋的墙壁和地板，使用的各种家具都要便于清洗；对于不同房屋的具体要求是不同的。

一、实验室

实验室是为学生进行实验课之用。实验室的大小根据人数来决定，一般是15—20人的小班实验约需要48平方米的面积。

实验室中的家具主要有讲台、实验台、凳子、柜子和架子。实验台最好有抽屉和小柜子，便于存放各种器材。家具都要涂中国漆。如果可能，在台面上要铺玻璃或漆布。

实验室中的家具应够用而不要过多，以便于进行操作。

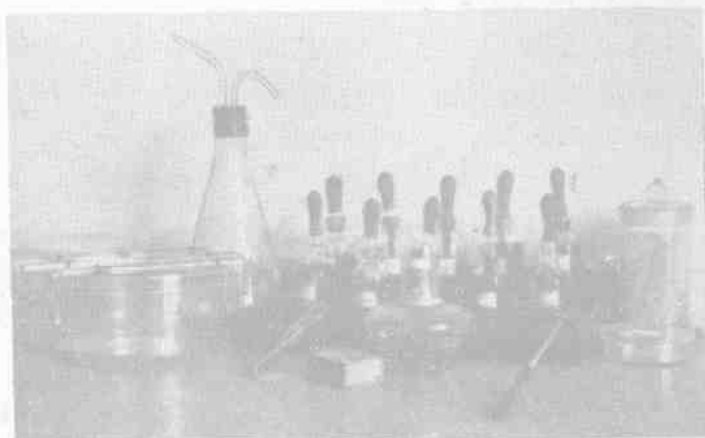


图1 染色用基本器材

作和清洁工作。家具在室内的布置应根据具体条件来决定,主要的原则是充分利用空间,避免学生相互干扰,并便于教师指导。

实验室的主要设备有显微镜、显微镜灯、制片和染色的设备〔包括灯火、接种环、全套染色液等,盛染料和试剂的小滴瓶应用架子或盘子(图1)存放〕,制作培养基的全套用具(包括天平、量筒、各种玻璃容器,以及蒸馏水瓶、pH 比色计、水浴锅等)。制备一般的培养基不需要精度很高的天平,如有一架1%的扭力天平(图2)是很方便的。

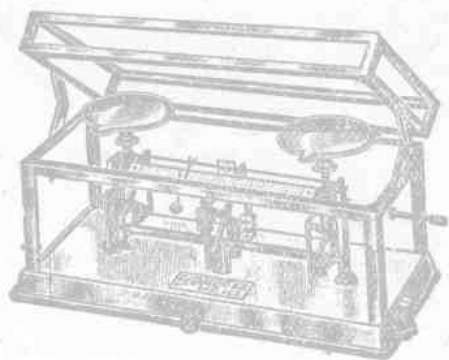


图2 扭力天平

实验室必不可缺少的另外二项设备是水源和电源。水龙头可以装在讲台或实验台的两头,并有水槽便于洗涤。电插座装在实验台上或两旁,要求每一组学生(或每个学生)有一电插座使用。室内的照明电灯不必多,因为学生在使用显微镜时都有显微镜灯。如果没有特别的显微镜灯,可以自己装置小型日光灯(图3)。一般电灯呈黄色,不是理想的光源。除了电以外,大城市的实验室多装有煤气。

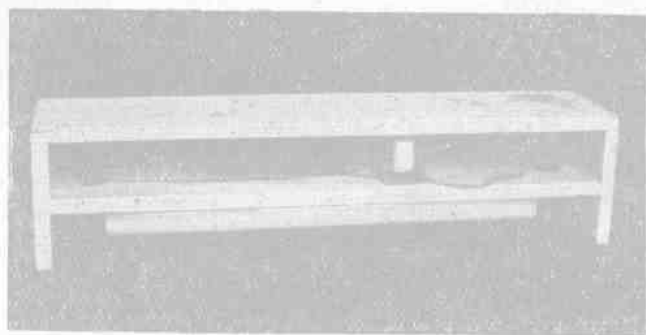


图3 显微镜检照明用日光灯

工作完毕,必须进行整理和清洗工作。显微镜装入镜箱并放入实验台的小柜(或专用的显微镜柜)中。其他仪器和玻璃器皿分别放在木架上或实验桌的抽屉中。培养基放在木柜中。废弃物不应丢在地上,要用盘子收集或倒在废物筐中。进行清洁工作,应尽量避免扬起灰尘,多用水洗涤,少用或不用扫帚。在实验过程中不要清扫,并减少走动,保持安静。

二、实验预备室

为了提高学生实验室的利用率和使用效果,应设立预备室(或称准备室)。学生实验课所需用的大量器材可以存放在预备室。染色液和试剂的配制,不同专业和班次所需要器材的准备等都在这里进行。

预备室的设置应与实验室相联,但各有单独的出入口,以免在上课时妨碍学生进行实验。

在预备室应该有药品柜,有隔板的立式架子,存放玻璃器皿和其他材料的箱子或柜子,

还应有实验台,以便教师 and 教学辅助人员进行工作。

三、灭菌室

培养基以及分离培养微生物所用的各种器皿,都需要经过灭菌。灭菌的方法虽然很多,但灭菌室中的主要工作是进行培养基的加压蒸汽灭菌(简称加压灭菌)、蒸汽灭菌和各种器皿的干热灭菌。因此灭菌室中的主要设备是加压灭菌器、阿诺氏灭菌器和干热灭菌器。

根据各种灭菌器的特点,在灭菌室中尚需装置电插座或煤气嘴、炉子等加热设备。

如果灭菌器是用煤气、电热或煤油炉来加热,则把灭菌器装在坚固的支架上;如果是用煤或木柴加热,则将灭菌器固定在砖砌的炉子上,炉子要有烟囱通出室外。

四、无菌操作室(简称无菌室)

无菌操作室(图4)是进行无菌操作的房间,在工作时要求里面没有杂菌。因此为了便于进行清洁工作,房子不要太高,天花板、地板和墙壁不应有积累灰尘的缝隙。天花板和墙壁要刷上油漆,如果在墙壁表面铺磁砖则更好。地板要很光滑,室内应具有二重窗,以免在工作时流入污染空气。室外应有一无菌过道,不应和走廊与其他工作室直接相通。

室内的主要设备是一个紫外线灯和一个工作台。紫外线灯上的反光罩要使全室都能照射到。工作台的表面要光滑,以便洗涤。此外还必须有一套接种等用的器具,在墙上还要有一个电插座,以备恒温水槽及其他用电设备时使用。

无菌过道中最好也装上紫外线灯。要有一小台子放杂用物品,如喷雾器、酒精瓶、消毒药剂瓶等。工作服和鞋子都放在过道中。

每次工作之前可用5%的石炭酸溶液(或其他消毒药剂)擦洗桌面和喷射全室,必须用紫外线灯照射。照射时间依紫外线灯强度的大小、离桌面的距离而定,如30瓦的紫外线灯,离桌面一米,照射15分钟就可灭菌。紫外线灯不可对人目或皮肤照射,以免伤害。进入室中必须换工作衣、帽和鞋子,并进行手指的表面消毒,要用的物品应一次准备好,避免



图4 无菌操作室

在中途进出。工作完毕后立即进行清洁, 拿走非室内存放的各种物品, 桌面用石炭酸溶液洗擦。

此外还要定期进行无菌室的大清理, 对室内各处进行消毒, 工作服和鞋子也应经常消毒。

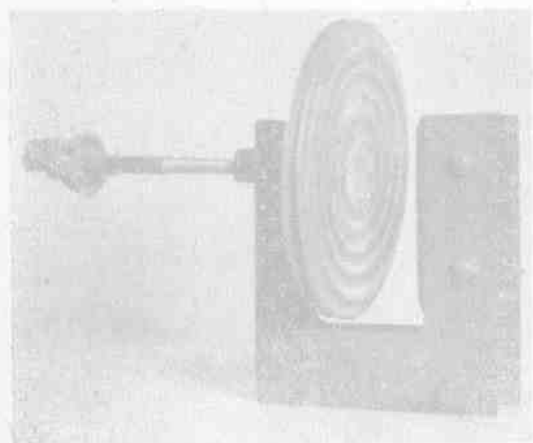
五、保温室(或称保温培养室)

保温室(图5)是进行微生物定温培养的房间。为了便于保温, 在四周用双层夹壁, 在夹壁之间放一些填充物(如锯木屑等)。在保温室墙壁的上部要有一个能关闭的小通风窗。

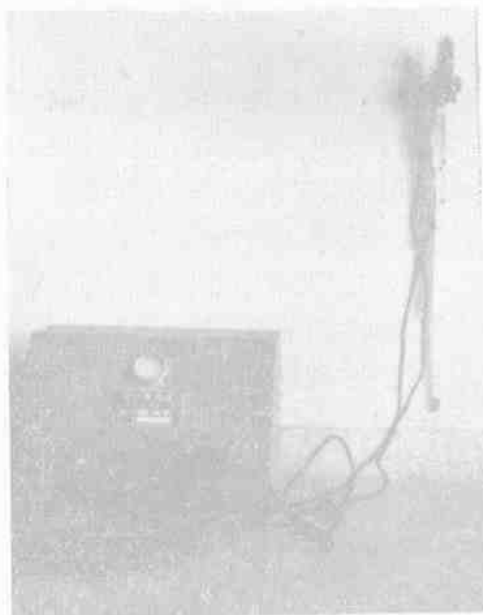
室内的主要设备有加温用电炉、温度控制器(图6)和放置物品的架子。温度控制器的种类很多, 现在国产的电子管式是一种很合用的控制器(图6B)。培养一般中温性微生



图5 保温室



A



B

图6 温度控制器

A. 胀缩瓶式 B. 电子管继电器式

物, 温度可调节在28—30°C之间。

培养室要定期进行清扫, 培养好的材料必须及时拿走。

在没有培养室时, 可用保温箱来培养微生物。

六、洗涤室

器皿的清洁是保证工作质量的重要条件, 在有可能时应尽量设置单独的洗涤室。

洗涤室的主要设置是要有一较大的洗槽和一放置器皿的木架, 木架应是空心格子的(图7), 以便于滤水。

洗涤室须有电炉或其他炉子, 以便于加热、烧水之用。

洗涤室中应具备各种毛刷、肥皂、去污粉、洗涤液等。

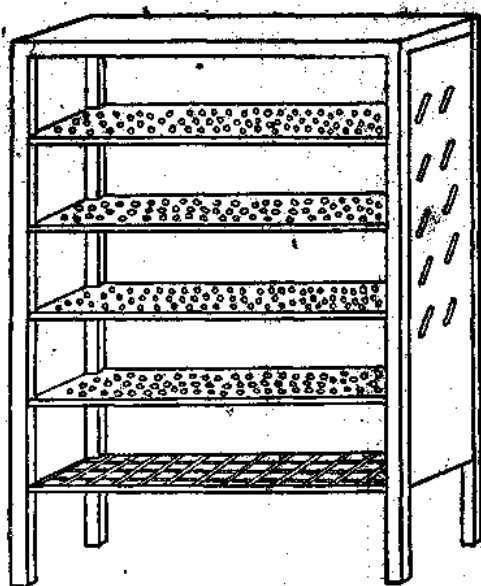


图7 玻璃器皿干燥架

I. 微生物学实验常用的玻璃器材及其清洁方法

微生物学实验中常用的玻璃器皿是试管、三角瓶、烧杯、吸管、培养皿、鲁氏瓶、发酵管、载玻片和盖玻片等等。

玻璃器皿最好是硬质的, 要经受灼烧而不破损。玻璃的游离碱含量要少, 否则可能影响培养基的酸碱度。

一、常用玻璃器材的种类

1. 试管: 管口不要翻口。常用的试管大小有三种:

(1) 1.8×18厘米, 多用于盛倒平面用的培养基和稀释用的无菌水。

(2) 1.5×15厘米, 做斜面培养基用。

(3) 1.0×10厘米, 用小试管可节省材料, 一般用于做各种生理鉴定。

不同规格试管的用途, 没有严格的划分, 以便于工作, 节省材料为原则。

2. 吸管: 1毫升、5毫升、10毫升的刻度吸管及1毫升单标记吸管。特别是1毫升单标记吸管(图8A)和1毫升刻度吸管(图8B)用得最多, 应大量准备。

3. 培养皿: 一般使用较多的是底面直径为9厘米的培养皿(图9), 直径6厘米的培养皿也需要。



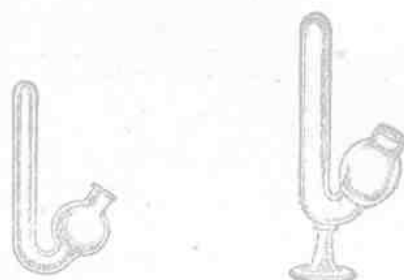
A B

图8 吸管

A, 1毫升单标记 B, 1毫升刻度



图9 培养皿



A B

图10 发酵管

A, 无脚 B, 有脚

4. 三角瓶: 100毫升及250毫升三角瓶用得最多。500毫升, 1,000毫升, 2,000毫升的三角瓶也需要。

5. 发酵管: 一般常用的发酵管为斯氏 (Smith, 图10) 与杜汉氏 (Dunham) 两种发酵管。杜汉氏发酵管就是在一中号试管中倒置入另一小试管, 为细菌发酵试验之用。

6. 烧杯: 常用的有50毫升、100毫升、250毫升、500毫升及1,000毫升玻璃质的烧杯。备有容量刻度的搪瓷质烧杯(图11)是很



图11 刻度搪瓷烧杯

方便的，特别是在配制培养基等工作中。

7. 鲁氏瓶和血清瓶：在制菌肥时，常用 800—1,000 毫升鲁氏瓶(Roux, 图12) 作固体培养或液体浅层培养，用10,000毫升血清瓶作液体深层通气培养。

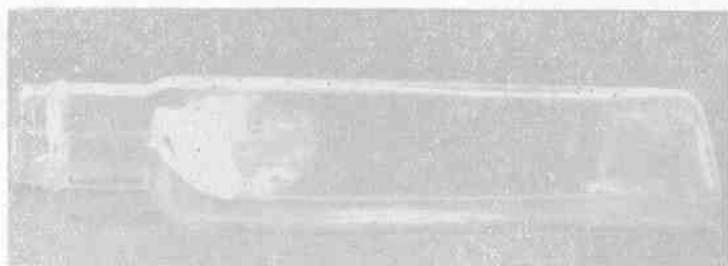


图12. 鲁氏(Roux)瓶

8. 载玻片与盖玻片：常用载玻片大小 7.5×2.5 厘米，厚度 0.10—0.13 厘米。常用的盖玻片为 18×18 毫米。

除了普通的载玻片外，还有作微室培养和悬滴观察用的凹玻片(图13)，即在玻片上有一个或两个圆形的凹窝。



图13. 凹玻片

二、玻璃器皿的清洁方法

清洁的玻璃器皿是得到正确实验结果的重要条件之一。要求做到所使用器皿不能妨碍得到正确的结果，至少必须洗去灰尘、油垢、无机盐类等物质。器皿洗涤之后，必须晾干或烘干备用。

1. 洗涤工作注意事项

(1) 任何洗涤方法，都不应对玻璃器皿有所损伤。所以不能使用对玻璃有腐蚀作用的化学药剂，也不能使用较玻璃硬度大的物品来拭擦玻璃器皿。

(2) 用过的器皿应立即洗涤，有时放置太久会增加洗涤的困难，随时洗涤还可以提高器皿的使用率。

(3) 含有对人有传染性的或者是属于植物检疫范围内的微生物的试管、培养皿及其它容器，应先浸在 5% 石碳酸溶液内或蒸煮灭菌后再行洗涤。

(4) 盛过有毒物品的器皿，不要与其它器皿放在一起。

(5) 难洗涤的器皿不要与易洗涤的器皿放在一起，以免增加洗涤的麻烦。有油的器皿不要与无油的器皿混在一起，否则使本来无油的器皿沾上了油垢，浪费药剂和时间。

(6) 强酸强碱及其它氧化物和有挥发性的有毒物品，都不能倒在洗涤槽内，必须倒在废水缸中。

2. 洗涤剂的种类及应用

(1) 水：是最主要的洗涤剂，但只能洗去可溶解在水中的沾污物。不溶解于水中的沾污物，如油、蜡等，必须用其它方法处理以后，再用水洗。要求比较洁净的器皿，清水洗过以后，