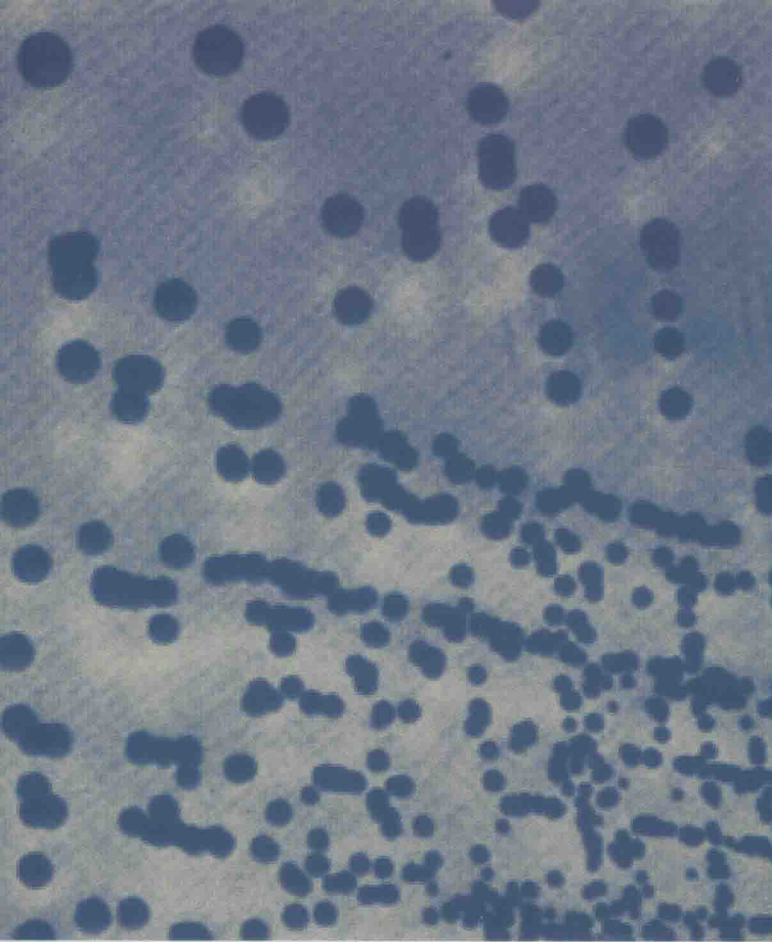


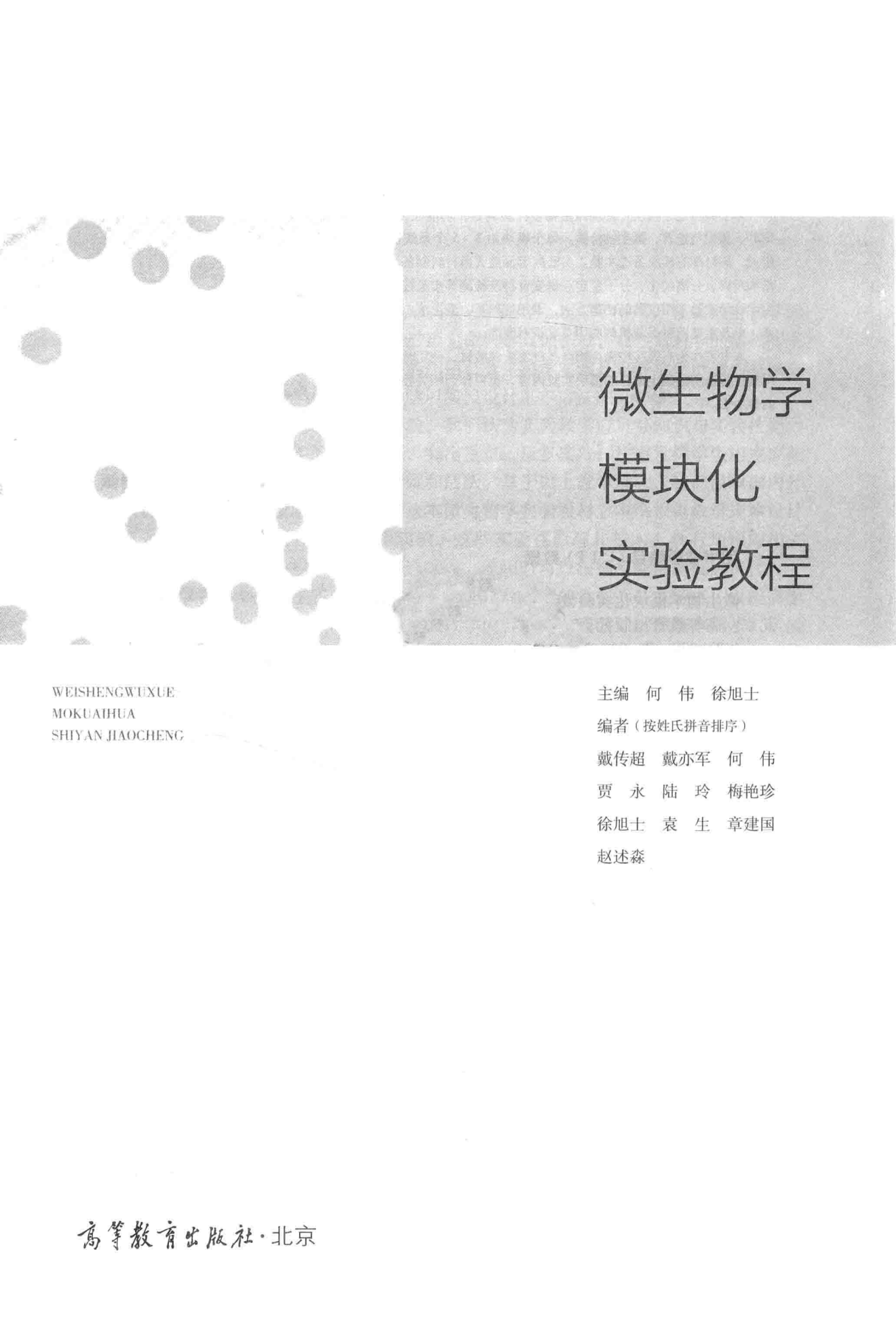


微生物学 模块化 实验教程

主编 何 伟 徐旭士



高等教育出版社



微生物学 模块化 实验教程

WEISHENGWUXUE
MOKUAIHUA
SHIYAN JIAOCHENG

主编 何 伟 徐旭士

编者（按姓氏拼音排序）

戴传超 戴亦军 何 伟

贾 永 陆 玲 梅艳珍

徐旭士 袁 生 章建国

赵述森

高等教育出版社·北京

内容提要

本书尝试将普通微生物学实验设计成模拟研究实验模块,并适当增加与当前科研、生产及工程应用相关的新技术。

本书共分三个模块:环境微生物多样性调查,功能性微生物的筛选、培养、鉴定与选育,微生物检验。每个模块由3~5个系统性较强的实验组成,同时配有模块备选实验。实验内容涵盖灭菌材料制备,微生物形态结构观察、分离纯化、分子鉴定、诱变育种及检测等实验技术。书后附有微生物学实验常用仪器的使用方法,常用培养基、染色液、试剂的配制方法,以及主要菌种保藏机构和中英名词对照等。

本书可作为高等院校微生物学基础实验课教材,使用时可根据具体情况结合备选实验确定适合的模块实验内容,也可作为相关教师、科研人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学模块化实验教程 / 何伟, 徐旭士主编. --
北京: 高等教育出版社, 2014. 4.
ISBN 978-7-04-034240-6
I. ①微… II. ①何…②徐… III. ①微生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q93-33
中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 056303 号

策划编辑 潘 超 责任编辑 高新景 封面设计 张志奇
责任校对 刁丽丽 责任印制 韩 刚

出版发行	高等教育出版社	咨询电话	400-810-0598
社 址	北京市西城区德外大街 4 号	网 址	http://www.hep.edu.cn
邮政编码	100120		http://www.hep.com.cn
印 刷	保定市中国美凯印刷有限公司	网上订购	http://www.landraco.com
开 本	787mm×1092mm 1/16		http://www.landraco.com.cn
印 张	7.75	版 次	2014 年 4 月第 1 版
字 数	180 千字	印 次	2014 年 4 月第 1 次印刷
购书热线	010-58581118	定 价	17.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物 料 号 34240-00

前 言

微生物学是一门应用性很强的生命科学基础学科。近 30 年来,有关微生物学的实验技术与方法有了飞跃发展,并渗透至生命科学其他领域,在生命科学的基础研究与应用开发等方面发挥着越来越重要的作用。微生物学实验是培养学生严谨的科学思维、熟练掌握基础实验操作与技能、学习实验设计基本方法的必修课。

结合数年微生物学实验教学经验,我们认为实验教学应贯穿知识与实验技能的连续性与一体化,注重实验技能训练,突出重点,反复实践;注重发挥学生的主观能动性和创造性,让学生的思维更加开阔和活跃。基于以上教学理念,我们汲取国内外一些优秀实验教材建设经验,编写了这本微生物学实验教材。本书根据教学规律设计了三大模块,每个模块含有 3~5 个实验,这些实验在原理和技术上具有知识的相关性与连续性。同时,各模块内还有备选实验,使用时可以根据实际情况挑选替代。

本书以强调学生自主实验与强化学生实验操作技能的掌握为基本特点,以提高学生对微生物学实验的兴趣。同时,模块式教学内容与理论课教学过程基本同步,实验操作技术的连续性得到较好体现。本书将整个微生物学基础实验分为三个模块:环境微生物多样性调查,功能性微生物的筛选、培养、鉴定与选育和微生物检验。第一模块包含环境微生物样品的采集、分离与观察,细菌的形态特征观察与鉴定,放线菌与真菌的形态观察与鉴定,环境中的噬菌体分离与纯化;第二模块包含培养基的配制与灭菌,土壤中功能性微生物的筛选及其分离纯化,环境条件对功能性微生物生长代谢的影响,功能性微生物的形态观察及 16S rRNA 基因分子鉴定,功能性微生物的诱变育种;第三模块包含水体样品的采集及菌落总数测定,大肠菌群检测与生理生化测定,大肠杆菌的血清学检测,以及食品中的微生物检测。

本书的编写得到国家自然科学基金委国家基础科学人才培养基金项目“南京师范大学生物学基地人才培养支撑条件建设项目”(J1210025)的资助,以及江苏省高等教育教改研究课题“综合性、研究型的微生物学实验教学体系的构建”(2009-70)与“本科模块化微生物实验教学改革与实践”(2013JSJG205)和南京师范大学高等教育教学改革重点课题“综合性、研究型微生物学实验教学中提升学生科研能力的研究与实践”的支持。同时,本书也得到了南京师范大学及校外专家老师的大力协助,在此一并表示感谢。

希望本书的编写和出版为我们和国内同行进行交流建立一个平台,期盼广大学生和教师提出批评与建议。

编 者

2014 年 1 月于南京师范大学

目 录

微生物学实验概述	1
微生物学实验的目的、要求和注意事项	1
微生物学实验的组织	2
微生物学实验的准备工作	2
第一模块 环境微生物多样性调查	4
模块实验 微生物的分离筛选与观察	4
实验一 环境微生物样品的采集、分离与观察	4
实验二 微生物菌落特征与细菌细胞形态多样性观察	11
实验三 放线菌与真菌的多样性观察	19
实验四 污水中大肠杆菌噬菌体的分离、纯化与观察	24
模块备选实验	29
实验 I 细菌鞭毛及芽孢的染色与观察	29
实验 II 酵母芽殖和伞菌担孢子的形成与观察	31
第二模块 功能性微生物的筛选、培养、鉴定与选育	33
模块实验 土壤中蛋白酶产生菌的筛选及其分离纯化	39
实验一 培养基的配制与灭菌	39
实验二 土壤中蛋白酶产生菌的筛选及分离纯化	45
实验三 不同培养条件对产蛋白酶细菌生长及酶活力的影响	48
实验四 产蛋白酶细菌的形态特征与 16S rRNA 基因分子鉴定	51
实验五 产蛋白酶细菌的紫外诱变育种	55
模块备选实验	57
实验 I 产胞外淀粉酶细菌的分离筛选	57
实验 II 颞颥菌的分离筛选及其抗菌谱的测定	59
实验 III 酵母的鉴定	62
第三模块 微生物检验	65
模块实验 水体质量的微生物检验	65
实验一 水体样品的采集与菌落总数的测定	65
实验二 水体的大肠菌群检测与生理生化测定	69
实验三 水体大肠杆菌的血清学检测	75

模块备选实验	79
实验 I 食品中沙门氏菌的检验	79
实验 II Ames test 检测化学诱变剂	83
实验 III 牛乳卫生质量的检测	85
 附 录	 89
附录一 微生物学实验常用器材及其使用方法	89
附录二 普通光学显微镜的使用	92
附录三 常用灭菌条件与方法	96
附录四 DNA 琼脂糖凝胶电泳技术	101
附录五 微生物学实验常用培养基的配制	104
附录六 酸碱指示剂的配制	108
附录七 微生物学实验常用染色液及试剂的配制	109
附录八 微生物学实验常用消毒剂	112
附录九 玻璃制品洗涤法	113
附录十 主要菌种保藏机构	114
附录十一 微生物学实验常用中英名词对照	115

微生物学实验概述



微生物学实验的目的、要求和注意事项

(一) 实验目的

1. 掌握微生物学基本的操作技能，加深理解课堂讲授的相应理论知识。
2. 了解微生物学的基本知识；对比不同样品中微生物的差异，了解环境因素对微生物种群及数量分布的影响，增强环境保护意识。
3. 通过实验培养学生观察、思考、分析问题和解决问题的能力；培养学生微生物样品的野外采集、分离和纯化能力，以及微生物功能分析和微生物检测能力，为将来从事各种与微生物学相关的工作奠定扎实的基础。
4. 培养学生实事求是、严肃认真的科学态度，以及勤俭节约、爱护公物的良好作风。

(二) 实验要求

通过微生物学实验，要求掌握以下几方面内容：

1. 初步掌握土壤、水体、空气中微生物的种类、数量和分布差异；了解微生物几大类群（细菌、放线菌、真菌和噬菌体）的多样性，能辨识三大类菌群菌落的基本形态特征和差别；了解和掌握土壤、水体、空气和植物体微生物采集的常用方法，熟悉开展微生物实验用到的基本工具及其使用方法。
2. 初步掌握如何从各种环境中采集、分离、筛选和纯化功能性微生物，同时对其功能进行分析和初步了解；掌握功能性微生物的菌种保藏和分类鉴定方法。
3. 掌握基本的微生物学检验方法，测试不同环境样品中特定微生物的种类和数量差异，评估人类活动对环境的影响，并了解微生物在实践工作中的意义。

(三) 实验注意事项

1. 实验前进行预习，了解当次实验的实验目的、原理与方法内容等。
2. 进入实验室后及离开实验室前均需用清水洗手，以防杂菌污染。
3. 保持实验室的安静、有序和整洁，维持实验室器皿的统一摆放，不要将自己的书包放在实验台上。
4. 实验室禁止吸烟，食品与饮用水不要带入实验室。
5. 严格按照实验指导和指导教师的规范要求进行实验，并尽量做到独立完成实验操作。
6. 实验操作过程中尽量避免人员走动，以防止不必要的操作污染。
7. 爱护实验室的器具与器皿，如有损坏，应及时向指导教师报告。
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，应立即报告指导教师，及时处

理,切勿隐瞒。

9. 按照指导教师的要求完成实验报告和课程论文。

10. 实验完毕后,将实验使用过的器物全部归位,清理自己的实验台面,将废弃物放入垃圾桶,经指导教师检查后方可离开实验室。严禁将固体培养基或其他固体物倒入水池内。

11. 所有同学完成实验后,由班级指派的值日生负责实验室的清洁卫生,包括擦拭实验台、扫地拖地、清洗水池、关门窗水电等。

微生物学实验的组织

本书根据微生物学基础知识的教学规律,按照模块设计安排,每个模块中含有若干实验,包括环境样品的采集、分离、培养和观察分析,功能微生物的筛选、鉴定、诱变、保藏、功能产物的分析,以及微生物检验等模块。这些模块彼此具有知识的相关与连续性,并且具有良好的操作性。同时,每个模块内容中有备选实验,可以根据实际情况挑选替代,以尽可能满足不同学校、不同专业对微生物学实验的需要。各校在组织微生物学实验时,可根据自身的实验目的要求、实验时间、实验指导教师组成和数量、实验装备等具体情况,制订切实可行的实验计划。

(一) 实验组织

有计划的准备和组织,才能顺利地完成任务。实验前,要制订详细的实验计划,包括老师、学生的分组安排,领队老师、指导老师的分配,实验所需设备和工具的准备,培养基、培养皿的准备;实验基地的联系,以及实验前的动员组织等。

实验课每班学生人数以 20~32 人为宜,每 2 人为一实验小组,这样既保证学生有充分的动手机会,又有助于团队精神的培养。本书中未特别说明的情况下,均以小组为单位编号配发和准备实验物品。

(二) 实验时间

建议微生物学实验安排在每学年的春季学期,此时环境气温适宜微生物生长,微生物的数量和种类相对较多。尽量避开冬季。

(三) 实验方式

微生物学实验可以采用两种方式进行。一种方式是集中式,每次实验集中安排独立的 1~2 天完成;另一种方式是分班次,将微生物学实验安排与动、植物学实验穿插进行,不同实验班分别由动物学、植物学或微生物学教师分别进行不同的实验内容,半天或 1 天进行轮换,这对于每门实验课程指导教师不多的学校尤其实用。

微生物学实验的准备工作

根据具体的实验所需,实验教师应在实验开始前做好以下物品的准备和分发工作。

以 2 人一小组为单位:

革兰氏滴瓶染液一套:卢戈氏碘液 1 瓶、草酸铵结晶紫染液 1 瓶、沙黄染液 1 瓶、95% 乙醇 1 瓶、蒸馏水洗瓶 1 个。



试管架 1 个	载玻片、盖玻片各 1 盒
酒精灯 2 盏	装有二甲苯和香柏油的双层瓶 1 只
接种环 2 支	1 mL 移液器 1 支
玻璃涂棒 2 支	1 mL 吸头 1 盒
记号笔 1 支	擦镜纸、称量纸若干
70% 酒精棉球 1 瓶	托盘天平 1 台
镊子 1 把	1.5 mL 离心管
250 mL 三角瓶若干	16 cm 玻璃试管若干
9 cm 玻璃培养皿若干	置于物品柜备用
以实验班为单位，每个实验室配备一套仪器设备：	
微波炉 2 台	振荡摇床 3 台
电磁炉 2 台	烘箱 1 台
显微镜 20 ~ 30 台	10 L 灭菌锅 1 台
冰箱 1 台	照相机 1 台
培养箱 2 台	

每位参加实验的同学应做好以下基本准备工作：

切实抓紧时间，做好课前的预习和课后的复习、练习。在进入实验室之前，须先了解实验室各项规章制度和注意事项，同时准备实验用具一套，包括：白大褂 1 件、解剖剪 1 把、解剖针 1 支、解剖刀 1 把。

【参考文献】

- [1] 周德庆. 微生物学实验教程. 2 版. 北京：高等教育出版社，2006.
- [2] 袁生. 微生物学. 北京：高等教育出版社，2009.

(何 伟)

第一模块 环境微生物多样性调查



微生物在自然界广泛分布，无所不在，无论在万米高空，还是在深海，或是地壳、高原冻土，抑或极地冰芯、火山喷发地区、盐湖、热泉等都能寻找到它们的踪迹。可以这么说，微生物的生存环境涵盖了地球上的所有生境。因此，了解环境条件与微生物的关系对于理解微生物世界的多样性尤其重要。

“环境微生物多样性调查”实验模块设置的目的是，就是将单纯的微生物形态结构观察的验证性实验变为引导学生调查身边微生物多样性的研究型实验，在认识自然界存在的不同微生物类群的同时，建立“微生物无所不在”的基本意识，从而认识到无菌概念的重要性和环境卫生的必要性；将微生物的分离、筛选、培养、纯化、染色、观察、计数、大小测定等传统的单个实验内容与技术整合在一个有目的的研究型实验中，不但要求学生通过实验掌握相关的实验技术和方法，而且还要求学生知道如何利用这些技术和方法去解决实际问题。

本模块共 12 学时，由 4 次实验课组成：①环境微生物样品的采集、分离与观察；②不同微生物类群菌落的比较及细菌多样性观察与鉴定；③放线菌与真菌多样性的观察与鉴定；④自然界中噬菌体的分离与纯化。4 项实验内容相互关联、前后衔接，共同组成一个系统性的模块实验。

模块实验 微生物的分离筛选与观察

实验一 环境微生物样品的采集、分离与观察

【实验目的】

1. 了解环境与微生物的关系及其微生物多样性，初步认识细菌的形态特征。
2. 通过实验掌握环境微生物（来自土壤、水体、空气、人体等）采样的基本方法。
3. 树立严格的无菌意识和掌握正确的无菌操作方法。
4. 掌握细菌的简单染色法。
5. 了解光学显微镜显微观察的基本操作和油镜的使用方法。

【实验原理】

自然环境中的微生物都是以混居形式存在的，并且不同的环境下具有不同的微生物类群和区系，不同的微生物具有不同的营养需求和生长条件，通过不同的培养基和适当的分离方法可以将各种微生物分开并得到它们的纯菌株，从而了解不同环境中的微生物类群和数量。

分析微生物的数量和种类,首要的一步就是样品采集。采集微生物样品时,一般应当场做好采样记录,并用照相机拍摄采样点周围环境。采样记录项目应包括采样地点(包括地理位置、海拔、向阳程度、降水量、年平均温度和温差等)、日期、人员、样品编号、样品类型、采样深度、环境条件等。采好的样品应及时处理,暂不能处理的也应储存于4℃下,但储存时间不宜过长。因为一旦采样结束,样品中的微生物群体就脱离了原来的生态环境,其内部生态环境就会发生变化,微生物群体之间就会出现消长。

简单的空气微生物样品采集可不使用专门的采样器具,而是采用自然沉降采样法,亦称平板沉降法。该方法是德国细菌学家 Koch 早在 1881 年建立。该法简单、经济,故至今仍适合于某些场合的空气监测。它的原理是利用空气中微生物粒子的重力作用使空气中的微生物随气溶胶自然沉降,测定在一定时间内自然沉降于带有培养基平皿上的微生物形成的菌落数,以空气微生物粒子沉降量近似地判断空气被微生物污染的状况。该法可用于大致了解空气微生物的污染状况。该法采样效率低于采样器法,对空气中含量极少的微生物难以测出。另外还存在采样条件难以控制、稳定性差、准确度不够等缺点,但方法简便,成本低廉。

通常采用稀释平板法来分离和培养样品中的微生物,以便进行观察和鉴定。即制备不同梯度稀释的样品悬液,将其在营养平板上分离并确保获得某种微生物的单菌落的方法。各类样品的稀释度因样品来源、采集样品时的季节、气温等条件而异。分离培养时还应考虑各类微生物的不同特性,避免样品中各类微生物的相互干扰。细菌或放线菌皆喜中性或微碱性环境,但细菌比放线菌生长快,分离放线菌时,一般在制备土壤稀释液时添加 50 mg/L 的重铬酸钾或在分离培养基中加相应的抗生素以抑制细菌和霉菌(加链霉素 25~50 U/mL 以抑制细菌;添加制霉菌素 5 U/mL 或多菌灵 30 U/mL 以抑制霉菌)。酵母和霉菌都喜酸性环境,酵母一般只能以糖为碳源,不能直接利用淀粉;酵母在 pH 5 时生长极快,而细菌生长适宜的酸碱度为 pH 7,所以分离酵母时只要选择好适宜的培养基和 pH,可降低细菌增殖率。霉菌生长慢,也不干扰酵母分离。若分离霉菌,需降低细菌增殖率,一般培养基临用前需添加灭过菌的乳酸或链霉素。

由于不同微生物类群需要不同的营养和培养条件,一般分离细菌需用牛肉膏蛋白胨培养基,30~37℃培养 1~2 天;放线菌用高氏一号培养基,28℃培养 5~7 天;霉菌和酵母用马丁或马铃薯葡萄糖琼脂培养基,28~30℃培养 3~5 天。

微生物形态微小,一般肉眼难以观察,需要借助显微镜进行观察。由于细菌细胞小而透明,在普通的光学显微镜下不易识别,必须对它们进行染色。利用单一染料对细菌进行染色,使经染色后的菌体与背景形成明显的色差,从而能更清楚地观察到其形态和结构。常用碱性染料进行简单染色,这是因为在中性、碱性或弱酸性溶液中,细菌细胞通常带负电荷,而碱性染料在电离时,其分子的染色部分带正电荷,因此碱性染料的染色部分很容易与细菌结合,使细菌着色。经染色后的细菌细胞与背景形成鲜明的对比,在显微镜下易于识别。常用作简单染色的染料有美蓝、结晶紫、碱性复红等。染色前必须固定细菌,其目的有二:一是杀死细菌并使菌体黏附于玻片上;二是增加其对染料的亲和力。常用的有加热和化学固定两种方法。固定时尽量维持细胞原有的形态。

显微观察所使用的油镜是普通光学显微镜放大倍数最高的镜头,镜头与样品之间

的介质为香柏油，由于它的工作距离仅有 0.17 mm，所以使用时需要特别谨慎。其工作原理可参见附录二。

【实验材料】

实验教师为每小组提前准备如下仪器和灭菌物品：

带有玻璃珠的装 18 mL 无菌水的三角瓶 1 瓶

不带玻璃珠的装有无菌水的三角瓶 1 瓶

灭菌的 250 mL 空三角瓶 1 只

小包装 1.5 mL 离心管（不少于 5 支）

灭菌土壤采样器 1 套

水样采样器 1 套（使用前需用 70% 乙醇消毒，后经紫外线照射 10 h 杀菌）

灭菌铲 1 把

干净聚乙烯保鲜袋或牛皮纸袋若干

牛肉膏蛋白胨平板培养基 7 块

马铃薯平板培养基 7 块（添加链霉素至终浓度 10 U/mL）

高氏一号平板培养基 7 块（添加制霉菌素至终浓度 5 U/mL）

灭菌 1 mL 和 200 μ L 吸头各 1 盒

灭菌牙签或棉签 1 包

擦镜纸若干

1 mL 移液器 1 支

玻璃涂棒 1 支

卷尺、绳子、样品标签和采样记录表等

【实验步骤】

1. 土壤、水体、空气微生物样品的采集

（1）土壤微生物样品的采集 在选好适当地点后，用灭菌小铲除去表土和地面植被及枯枝落叶，然后用土壤采样器（图 1-1-1 A）采取离地表以下 5 ~ 15 cm 处的土约 10 g，剔除石砾并混合均匀后盛入清洁的牛皮纸袋或保鲜袋中，扎好，标记，记录采样时间、地点、环境条件等，以备查考。采样点可按照图 1-1-1 B 所示，通常采取对角 5 点取样或蛇形取样的方法，或根据地形等情况确定。

样品应尽快用于分离实验，或者放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存不超过 24 h。

（2）水体微生物样品的采集 采样使用 ETC 桶式深水采样器（图 1-1-1 C）。该采样器由有机玻璃制成，无色透明，仪器下部活动翻盖在进水时于水流冲击下自动打开，出水时在静水压力作用下自动密封，实现对水体不同深处的水样进行自由采集，使用方便。仪器内部设有温度计，直接可以报告所采水样的温度。使用时用采样器专配的尼龙绳连接上采样器，手执绳末端，将采样器投入选定水体中，采集表面下约 100 cm 处的水样，然后将采样器拎出水体。打开通出水口让水流出一些，冲洗出水口及其管道，然后用灭菌三角瓶或试剂瓶接取适量水样，盖好塞子或瓶盖，写好标签，带回处理。采样

器中剩余水样倒回水体。如需保存,可将水样保持于4℃冰箱内,但不得超过24 h。

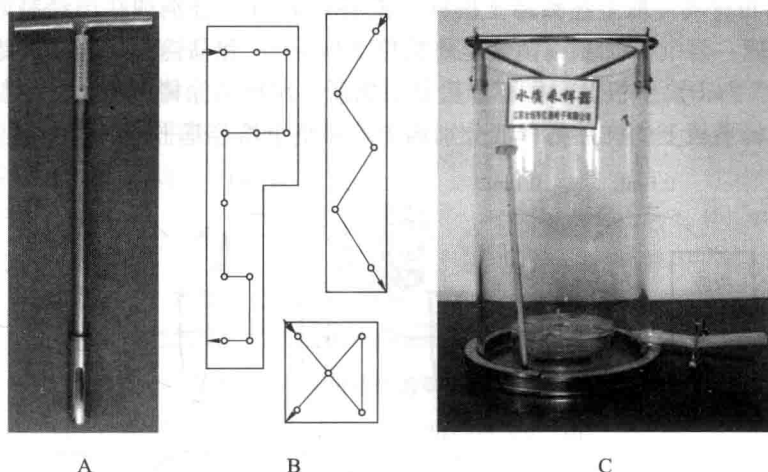


图 1-1-1 采样器及采样方法示意

(引自李振高等, 土壤与环境微生物研究法, 2008)

A. 土壤采样器, B. 土壤采样点图示, C. 深水采样器

(3) 空气微生物样品的采集 采用自然沉降法采集空气微生物样品, 每班用牛肉膏蛋白胨平板培养基(培养细菌)、马铃薯平板培养基(培养真菌)和高氏一号平板培养基(培养放线菌), 在约定的时间和地点(室外环境和室内空间各设置平行实验三套)依次打开平皿盖在空气中暴露5 min, 然后合上平皿盖并做好标记。

通过一个比较方便的关系换算成空气微生物粒子含量, 即“5 min 在 100 cm² 面积上降落的细菌粒子总数, 约等于 10 L 空气中所含的菌数”。为方便换算, 通常把 10 L 空气换成以 m³ (1 000 L) 为单位的空气中微生物的含量表示, 公式为:

$$C = 50\,000\, N/AT$$

式中, C 为每立方米空气中细菌、真菌、放线菌菌落形成单位总数 (cfu/m³); N 为培养后平皿上菌落形成单位数 (3 皿平均值, cfu/皿); A 为所用平皿的面积 (cm²); T 为打开皿盖暴露的时间 (min); 50 000 为校正值。

根据公式算出空气中细菌、真菌、放线菌总数, 以空气细菌、真菌、放线菌总数之和代表空气微生物含量。

将室外环境和实验室环境空气微生物种类和数量进行对比, 分析空气微生物分布, 评价空气污染程度。

2. 土壤微生物的分离

(1) 样品稀释 称取 2 g 土壤样品, 放入盛有 18 mL 无菌水并带玻璃珠的三角瓶中 (玻璃珠的主要作用是打散土壤样品), 振摇 15 min, 使得土壤与水充分混合, 将微生物细胞均匀分散。

静置 5 min 后, 用移液器戴上无菌吸头从中吸取 0.1 mL 土壤悬浮液, 加入事先盛有 0.9 mL 无菌水的离心管中并吹吸混匀。然后换一支无菌吸头, 从此离心管中再吸取 0.1 mL 加入下一支 0.9 mL 无菌水的离心管中混匀。按此法类推, 制作 10⁻¹,

10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 等不同稀释度的土壤溶液（图 1-1-2）。

（2）涂布分离 取上述稀释土壤样品液各 0.1 mL，分别加在已经制好的牛肉膏蛋白胨、高氏一号（添加制霉菌素至终浓度 5 U/mL）和马铃薯培养基（添加链霉素至终浓度 10 U/mL）平板上，做 3 个重复。然后，用玻璃涂棒蘸取乙醇灼烧灭菌并稍许冷却后，将平板上的样品稀释液分别均匀涂布整个培养基平板表面。

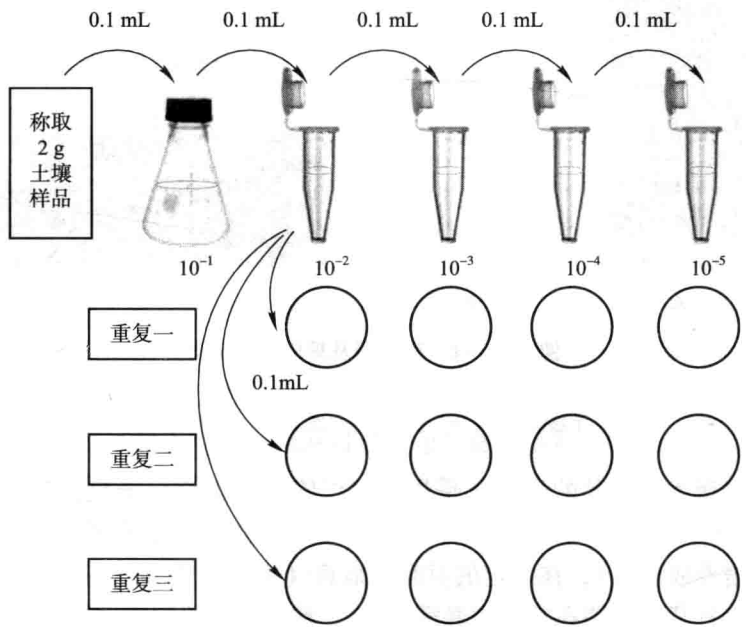


图 1-1-2 稀释涂板法示意

（3）培养 将以上所有接种环境样品的培养基平板按照表 1-1-1 稀释度操作涂布后，倒置放在合适的温度下进行培养，留待下次实验使用。由于每次实验间隔约为一周，当菌体长出来后，由任课老师将所有平板置于 4℃ 冷藏柜保存。

表 1-1-1 土壤和水体微生物的分离培养条件

微生物类群	平板培养基	土壤样品稀释液	水样稀释液	培养温度	培养时间
细菌	牛肉膏蛋白胨	10^{-4} , 10^{-5}	10^{-2} , 10^{-3}	30℃	1~2 天
放线菌	高氏一号	10^{-3} , 10^{-4}	10^{-1} , 10^{-2}	28℃	5~7 天
真菌	马铃薯	10^{-3} , 10^{-4}	10^{-1} , 10^{-2}	28℃	3~5 天

（4）水体微生物运动性观察（选做）

① 取一片干净的盖玻片，在其周围涂抹少许凡士林。

② 在盖玻片中央滴一小滴未经稀释的污水样品（天气炎热时于严重污染处取样，或将污染水样在室内加入适量培养基于 30℃ 培养 24 h），再加一小滴 0.1 g/L 美蓝水溶液，用接种环混匀并将液滴置于盖玻片中央。

③ 取一块凹玻片，将其反转，使凹窝中心对准盖玻片上的菌液滴，液滴不得与

凹玻片接触，以接种环柄轻压使盖玻片与凹玻片粘在一起。由于涂抹了凡士林，液滴处于封闭的小室中，这样可以防止液滴干燥和气流对液滴的扰动和影响。

④ 小心将凹玻片翻转过来，使菌滴仍悬挂在盖玻片下和凹窝中心（图 1-1-3）。

⑤ 用普通光学显微镜进行观察，低倍镜找到悬滴边缘，再用高倍镜观察。

细菌的运动有一定的前进方向，并可转弯，极生单鞭毛菌类多为直线运动，周生鞭毛菌类多作波浪式运动。

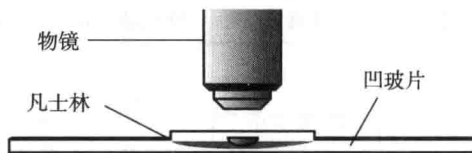


图 1-1-3 悬滴片的制备和观察方法

(5) 口腔微生物采集与简单染色观察

① 先取干净的载玻片一张，在载玻片中央滴上一小滴蒸馏水。

② 用无菌牙签在口腔内牙缝中反复擦拭几遍，刮下少许牙垢，然后将其在水滴中打散并涂布于载玻片上。

③ 自然干燥后通过酒精灯火焰 2~3 次加热固定。

④ 将沙黄染液滴在玻片中央的干燥涂面上，静置染色 3~5 min，用水将多余的染液洗掉并用吸水纸把残余的水分吸干，待充分干燥。

⑤ 在显微镜下按照从低倍到高倍，再到油镜的顺序进行观察。

⑥ 在油镜下可以清晰地看到口腔上皮细胞的结构和口腔微生物（图 1-1-4）。

普通光学显微镜的使用方法见附录二。

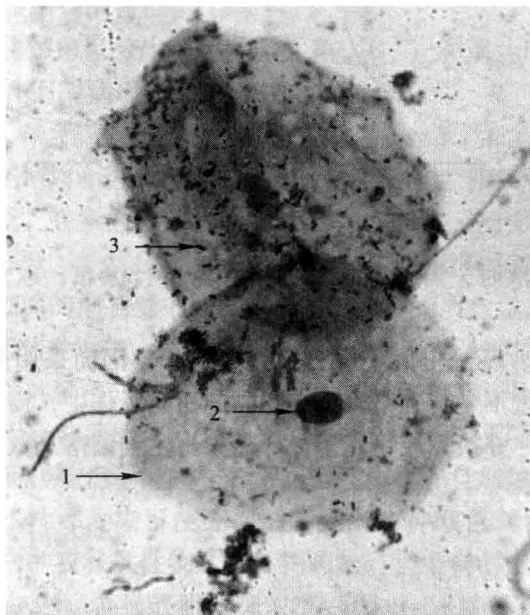


图 1-1-4 口腔微生物显微照片（放大倍数 1 000 ×）

1. 口腔上皮细胞, 2. 口腔上皮细胞细胞核 3. 口腔细菌

【实验结果】

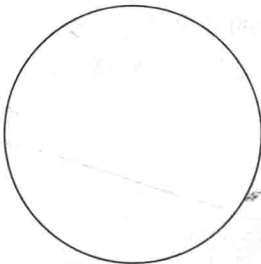
1. 填写土壤微生物样品的采集、分离与培养表格，按照公式计算每克土壤样品中微生物活菌总数：

每克土壤样品中微生物菌落数 = 平均菌落数 × 稀释倍数 × 10 ÷ 土壤样品克数

样品编号	样品来源	稀释度	样品液/mL	菌落数/（平均 cfu/皿）
牛肉膏蛋白胨 平板培养基			0.1	
高氏一号 平板培养基			0.1	
马铃薯平板 培养基			0.1	

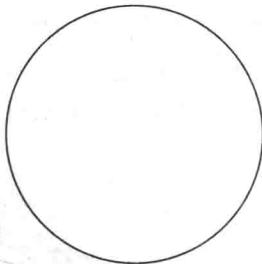
2. 描述你所观察到的污水微生物的运动情况视野图。
3. 观察并记录口腔微生物经简单染色后在 100 倍物镜下的大小和形态等特征。

污水微生物的运动情况



放大倍数：_____ ×

口腔微生物经简单染色



放大倍数：_____ ×

【注意事项】

1. 涂布样品稀释液时，需待玻璃涂棒冷却后再行涂布，以免将样品中的微生物高温烫死。
2. 需要指出的是，不同土壤中水分含量不一样，因而采用原始土壤样品所测定的土壤中的微生物含量不是特别精确。在实际的研究工作中，需要参照有关文献，同时测定土壤中含水量，并换算成每克干土样品中微生物菌落总数，以便对不同土壤样品进行分析比较。

【参考文献】

[1] 李素玉. 环境微生物分类与检测技术. 北京：化学工业出版社，2005.

[2] 闵航. 微生物学. 杭州：浙江大学出版社，2005.

[3] 安德荣，慕小倩，等. 土壤放线菌分离中抑制剂的应用研究. 西北农业学报, 2002, 11

(1): 106 ~ 108.

(何 伟 徐旭士)

实验二 微生物菌落特征与细菌细胞形态多样性观察

【实验目的】

1. 通过比较和观察不同环境微生物样品的数量及类群的不同,了解微生物的多样性,掌握不同微生物类群的菌落特征和细菌形态特征。
2. 通过实验掌握细菌革兰氏染色、荚膜染色和芽孢染色方法,巩固和熟悉油镜的使用方法;初步掌握平板菌落转接平板和固体斜面的方法,熟悉无菌操作技术。

【实验原理】

微生物多样性的表现之一就是其形态结构的多样性。微生物的形态结构特征包括个体形态结构与群体形态结构,个体形态结构主要通过显微镜及染色技术辨别其形态构造;而群体形态则是通过单个微生物细胞在固体培养基上经生长繁殖后所形成的菌落(子细胞集合)来认识。肉眼观察在固体和液体培养基中培养的细菌菌落和菌苔的大小、形状、光泽、颜色、硬度、色素、生长速度、透明度及生长状况等特征。采用显微镜观察细菌细胞的形态、大小和特殊的结构(如芽孢、颗粒内含物、荚膜),测定革兰氏染色反应、抗酸反应结果。利用扫描和透射电子显微镜观察细胞壁、鞭毛、纤毛和菌毛等细微结构的特征。

革兰氏染色法可将细菌区分为革兰氏阳性菌(G^+)和革兰氏阴性菌(G^-)两大类,该方法是1884年由丹麦病理学家 Christain Gram 创立的。革兰氏染色法是细菌学中最重要鉴别染色法。革兰氏染色法之所以能将细菌分为革兰氏阳性和革兰氏阴性,是由这两类细菌细胞壁的结构和组成不同决定的。革兰氏阳性细菌的细胞壁主要是由肽聚糖形成的网状结构组成,在染色过程中,当用乙醇处理时,由于脱水而引起网状结构中的孔径变小,通透性降低,使结晶紫-碘复合物被保留在细胞内而不易脱色,因此呈现蓝紫色;革兰氏阴性细菌的细胞壁中肽聚糖含量低,而脂质含量高,当用乙醇处理时,脂质溶解,细胞壁的通透性增加,使结晶紫-碘复合物易被乙醇抽出而脱色,然后又被染上了复染液(番红)的颜色,因此呈现红色(图1-2-1 A、B)。

芽孢、荚膜和鞭毛是细菌菌种鉴定的重要指标,在菌落形态上也有其相关特征。芽孢壁很厚且结构致密,着色不易,一般采用碱性染料并且加热和延长染色时间可以使得芽孢着色,通过水洗和复染可使芽孢细菌染成两种颜色(图1-2-1 C)。荚膜是一种含有多糖和蛋白的胶状黏性物质,结构疏松,与染料的亲和力低,采用负染的方法可将菌体与背景着色而荚膜透明以利观察(图1-2-1 D)。细菌鞭毛的粗细已经超过了光学显微镜的最大分辨率,因此鞭毛染色的原理主要是在媒染剂的作用下促使染料分子吸附沉着于鞭毛上达到加粗的效果,从而便于鞭毛的观察。由于时间关系