

高等学校教材

微生物学实验指导

黄秀梨 主编



CHEP
高等教育出版社



Springer
施普林格出版社

(京)112 号

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验指导/黄秀梨主编;夏立秋等编著. - 北京:高等教育出版社;德国:施普林格出版社,1999.6

ISBN 7-04-006956-3

I. 微… II. ①黄… ②夏… III. 微生物学-实验-高等学校-教学参考资料 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 17636 号

微生物学实验指导

黄秀梨 主编

出版发行 高等教育出版社 施普林格出版社

社 址 北京市东城区沙滩后街 55 号

邮政编码 100009

电 话 010-64054588

传 真 010-64014048

网 址 <http://www.hep.edu.cn>

经 销 新华书店北京发行所

印 刷 北京外文印刷厂

开 本 787×1092 1/16

版 次 1999 年 6 月第 1 版

印 张 8.5

印 次 1999 年 6 月第 1 次印刷

字 数 210 000

定 价 11.50 元

©China Higher Education Press Beijing and Springer - Verlag Berlin Heidelberg 1999

版权所有 侵权必究

前 言

微生物学实验课是对学生进行独立工作能力培养的重要环节,实验教材是指导学生上好实验课的重要工具。师范院校的微生物实验课时少、后续课程缺乏,具有与综合性大学不同的要求和具体目标。为适应师范院校教学的特点,我们在学习兄弟院校大量实验教材和实验经验的基础上编写了本《微生物学实验指导》。本实验指导是《微生物学》(黄秀梨主编,高等教育出版社,1998)的配套实验教材。全书约20万字,共有45个实验,分五部分,包括基础实验、实际应用实验、分子微生物学基础实验、专题实验及微生物实验技能测评等。在基础实验中,突出了微生物实验的特点,首先学会制作培养基和消毒灭菌,然后逐渐掌握培养、分离、纯化、观察和检测微生物的系列基本技能,如各类微生物的形态观察,微生物大小的测定、计数、生理生化测定和鉴定,基本的免疫化学方法等。在实际应用及专题实验中,尽量结合工农业生产及医学工作实际,如病毒、螺旋体检测,食用菌栽培、苏云金芽孢杆菌的发酵生产、 α 淀粉酶的固定化、从虫体中分离杀虫微生物,检测水体中的大肠菌群,微生物的诱变育种、营养缺陷型筛选、原生质体融合等。在分子微生物学基础实验中概括了几个常用的操作技术,如DNA的小量制备、DNA重组、感受态细胞制备、转化、PCR技术等,为进一步从事分子生物学工作打下基础。在实验中设计了,注意事项、演示、问题和思考等项目,以提示学生要特别注意的操作步骤和注意思考的问题,每个实验均给学生提出一个自己独立设计和完成的实验题目,并设有与本实验有关的参考书目,为年青教师和学生提供进一步的参考指南。

参加本书编写的有,北京师范大学、湖南师范大学、华中师范大学、华南师范大学、陕西师范大学、河北师范大学、天津师范大学、山东淄博大学、河北科技大学、河南许昌卫生学校等单位长期从事微生物学教学和科研工作的教授、副教授、讲师等,他们根据本单位的教学特点进行撰稿,全书由黄秀梨统编。本书得到代忠新、王冬梅等同志的协助,在此一并表示感谢!

为提高学生对实验课的重视程度,并逐步做到实验技术规范,本书从考试和实验设计两方面提出了测评学生微生物实验技能的做法,供同行参考。

书后设置附录的出发点,是为同行们在指导实验中能方便查找到所需的参考资料,如实验室的意外处理、实验中常见英文缩写名称对照表及常用中英名词对照表等,在实验用培养基、染色液、试剂的配制中,为了方便读者查找而设计了按笔画顺序排列的查阅一览表,具有一目了然的作用。

本书具有简明扼要、实用性强的特点,并注意突出对学生独立工作能力的训练和培养。

本教材特别适用于师范院校的本科生和专科生的微生物学实验教学,亦可作为农林等其他有关专业或教师的参考用书。

限于编者的水平,书中存在不当之处,请批评指正。

编著者名录

黄秀梨	北京师范大学
夏立秋	湖南师范大学
辛明秀	北京师范大学
黄文芳	华南师范大学
陶树兴	陕西师范大学
胡 巍	山东淄博大学
赵宝华	河北师范大学
洪 洞	北京师范大学
刘丽丽	天津师范大学
王 旭	华中师范大学
黄国锦	华中师范大学
王 磊	北京师范大学
李利红	北京师范大学
李越丹	北京师范大学
李 宏	河北科技大学
谢 君	许昌卫生学校

目 录

第一部分 基础实验

实验 1	培养基的配制	1
实验 2	消毒和灭菌	3
实验 3	土壤的稀释分离、纯化及无菌操作技术	6
实验 4	微生物菌落的观察	9
实验 5	显微镜油浸系物镜的使用	12
实验 6	细菌形态的观察	15
实验 7	细菌单染色法及口腔微生物的观察	17
实验 8	细菌的革兰氏染色	19
实验 9	细菌鞭毛染色及其运动的观察	21
实验 10	细菌芽孢、荚膜的染色及观察	23
实验 11	支原体、衣原体的形态观察	25
实验 12	放线菌的形态观察	26
实验 13	酵母菌的形态观察	28
实验 14	霉菌的形态观察	31
实验 15	细菌大小的测定	33
实验 16	细菌数量的测定	35
实验 17	细菌的生理生化反应(V.P. 反应、甲基红试验、吲哚试验、糖发酵试验)	39
实验 18	微生物与氧关系的检测	41
实验 19	厌氧微生物的培养	43
实验 20	免疫血清的制备	49
实验 21	凝集反应	51
实验 22	沉淀反应	53
实验 23	巨噬细胞体外吞噬实验	55

第二部分 实际应用实验

实验 24	乳酸发酵与乳酸菌饮料	58
实验 25	酒精发酵及糯米甜酒的酿制	60
实验 26	抗生素抗菌谱及抗生素的抗药性测定	62
实验 27	固定化枯草芽孢杆菌连续生产 α 淀粉酶	64
实验 28	食用菌的培养	67
实验 29	苏云金芽孢杆菌的发酵生产	69
实验 30	病毒的血清学反应	72
实验 31	螺旋体的检测	76
实验 32	从虫体中分离杀虫微生物	79

实验 33 微生物菌种保藏	81
---------------------	----

第三部分 分子微生物学基础实验

实验 34 质粒 DNA 的小量制备	86
实验 35 感受态细胞的制备及转化	87
实验 36 DNA 重组	91
实验 37 PCR 技术	93

第四部分 专题实验

实验 38 水中大肠菌群的检测	95
实验 39 噬菌体的提取及效价测定	98
实验 40 细菌转导的测定	100
实验 41 微生物的诱变育种	102
实验 42 营养缺陷型的筛选和鉴定	104
实验 43 微生物的原生质体融合	106

第五部分 微生物实验技能的测评

实验 44 基本实验技能的检测	110
实验 45 实验设计及实施能力的测评	112

附 录

附录 1 实验室意外事故的处理	113
附录 2 实验用培养基配制	114
附录 3 酸碱指示剂的配制	117
附录 4 实验用染色液及试剂的配制	117
附录 5 微生物学实验中一些常用数据表	121
附录 6 玻璃器皿及玻片洗涤法	122
附录 7 琼脂的制造和检查方法	123
附录 8 各国主要菌种保藏机构	124
附录 9 实验用缩写名称对照表	124
附录 10 实验常用中英名词对照表	125

第一部分 基础实验

实验1 培养基的配制

一、实验目的和内容

目的：学习和掌握配制培养基的一般方法和步骤。

内容：1. 牛肉膏蛋白胨培养基的配制。

2. 高氏1号培养基的配制。

3. 马丁氏培养基的配制。

二、实验材料和用具

牛肉膏、蛋白胨、琼脂、可溶性淀粉、葡萄糖、孟加拉红、链霉素、1mol/L NaOH、1mol/L HCl、KNO₃、NaCl、K₂HPO₄·3H₂O、MgSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O。

试管、三角瓶、烧杯、量筒、玻璃棒、天平、牛角匙、pH试纸、棉花、牛皮纸、记号笔、线绳、纱布。

三、操作步骤

(一) 牛肉膏蛋白胨培养基的配制

牛肉膏蛋白胨培养基是一种应用最广泛和最普通的细菌基础培养基。其配方如下：

牛肉膏 3g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 琼脂 15~20g, 水 1 000mL, pH 7.4~7.6。

1. 称药品 按实际用量计算后,按配方称取各种药品放入大烧杯中。牛肉膏可放在小烧杯或表面皿中称量,用热水溶解后倒入大烧杯;也可放在称量纸上称量,随后放入热水中,牛肉膏便与称量纸分离,立即取出纸片。蛋白胨极易吸潮,故称量时要迅速。

2. 加热溶解 在烧杯中加入少于所需要的水量,然后放在石棉网上,小火加热,并用玻棒搅拌,待药品完全溶解后再补充水分至所需量。若配制固体培养基,则将称好的琼脂放入已溶解的药品中,再加热融化,此过程中,需不断搅拌,以防琼脂糊底或溢出,最后补足所失的水分。

3. 调pH 检测培养基的pH,若pH偏酸,可滴加1mol/L NaOH,边加边搅拌,并随时用pH试纸检测,直至达到所需pH范围。若偏碱,则用1mol/L HCl进行调节。pH的调节通常放在加琼脂之前。应注意pH值不要调过头,以免回调而影响培养基内各离子的浓度。

4. 过滤 液体培养基可用滤纸过滤,固体培养基可用4层纱布趁热过滤,以利结果的观察。但是供一般使用的培养基,这步可省略。

5. 分装 按实验要求,可将配制的培养基分装入试管或三角瓶内。分装时可用三角漏斗以免使培养基沾在管口或瓶口上而造成污染。

分装量: 固体培养基约为试管高度的1/5,灭菌后制成斜面。分装入三角瓶内以不超过其容积的一半为宜。半固体培养基以试管高度的1/3为宜,灭菌后垂直待凝。

6. 加棉塞 试管口和三角瓶口塞上用普通棉花(非脱脂棉)制作的棉塞,棉塞制作方法如图1-1。棉塞的形状、大小和松紧度要合适,四周紧贴管壁,不留缝隙,才能起到防止杂菌侵入和有利通气的作用。要使棉塞总长约3/5塞入试管口或瓶口内,以防棉塞脱落。有些微生物需要更好的通气,则可用8层纱布制成通气塞。有时也可用试管帽或塑料塞代替棉塞。

7. 包扎 加塞后,将三角瓶的棉塞外包一层牛皮纸或双层报纸,以防灭菌时冷凝水沾湿棉塞。

若培养基分装于试管中,则应先把试管扎成捆后,再于棉塞外包一层牛皮纸。然后用记号笔注明培养基名称、组别、日期。

8. 灭菌 将上述培养基于 121.3°C 湿热灭菌 20min。如因特殊情况不能及时灭菌,则应放入冰箱内暂存。

9. 摆斜面 灭菌后,如制斜面,则需趁热将试管口端搁在一根长木条上,并调整斜度,使斜面的长度不超过试管总长的 $1/2$ 。

10. 无菌检查 将灭菌的培养基放入 37°C 温箱中培养 24~48h,无菌生长即可使用。或贮存于冰箱或清洁的橱内,备用。

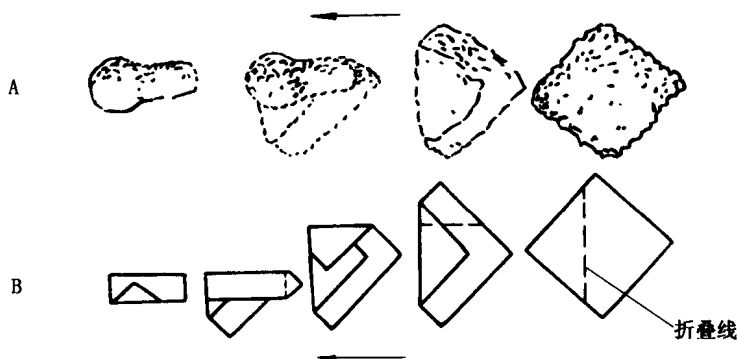


图 1-1 试管棉塞的制作

A. 制作过程; B. 制作图解

(二) 高氏 1 号培养基的配制

高氏 1 号培养基是用于分离和培养放线菌的合成培养基。其配方如下:

可溶性淀粉 20g, KNO_3 1g, NaCl 0.5g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, 琼脂 15~20g, 水 1 000mL, pH 7.4~7.6。

1. 称量和溶解 先计算后称量,按用量先称取可溶性淀粉,放入小烧杯中,并用少量冷水将其调成糊状,再加至少于所需水量的沸水中,继续加热,边加热边搅拌,至其完全溶解。再加入其他成分依次溶解。对微量成分 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 可先配成高浓度的贮备液后再加入,方法是先在 100mL 水中加入 1g 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,配成浓度为 0.01g/mL 的贮备液,再在 1 000mL 培养基中加入以上贮备液 1mL 即可。待所有药品完全溶解后,补充水分到所需的总体积。如要配制固体培养基,其琼脂溶解过程同牛肉膏蛋白胨培养基配制。

2. pH 调节、分装、包扎、灭菌及无菌检查同牛肉膏蛋白胨培养基配制。

(三) 马丁氏培养基的配制

马丁氏培养基是用于分离真菌的选择培养基。其配方如下:

K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 蛋白胨 5g, 葡萄糖 10g, 琼脂 15~20g, 水 1 000mL, 自然 pH。

1. 称量和溶解 先计算后称量,按用量称取各成分,并将其溶解在少于所需量的水中。待各成分完全溶解后,补充水分到所需体积。再将孟加拉红配成 1% 的水溶液,在 1 000mL 培养液中加入以上孟加拉红溶液 3.3mL,混匀后,加入琼脂加热融化,方法同牛肉膏蛋白胨培养基配制。

2. 分装、包扎、灭菌及无菌检查同牛肉膏蛋白胨培养基配制。

3. 链霉素的加入 链霉素受热容易分解,所以临用时,将培养基融化后待温度降至45℃左右时才能加入。可先将链霉素配成1%的溶液(配好的链霉素溶液保存于-20℃),在100mL培养基中加1%链霉素0.3mL,使每毫升培养基中含链霉素30μg。

四、注意事项

称药品用的牛角匙不要混用;称完药品应及时盖紧瓶盖。调pH时要小心操作,避免回调。不同培养基各有配制特点,要注意具体操作。

五、演示

1. 培养基的分装方法。
2. 试管斜面的搁置方法。

六、实验报告

记录本实验配制培养基的名称、数量,并图解说明其配制过程,指明要点。

七、问题和思考

1. 配制培养基有哪几个步骤? 在操作过程中应注意些什么问题? 为什么?
2. 培养基配制完成后,为什么必须立即灭菌? 若不能及时灭菌应如何处理? 已灭菌的培养基如何进行无菌检查?
3. 试设计实验对饮料进行无菌检查。

参考书目

- 1 范秀容,李广武,沈萍. 微生物学实验. 第二版. 北京:高等教育出版社. 1989
- 2 祖若夫,胡宝龙,周德庆. 微生物学实验教程. 上海:复旦大学出版社. 1993
- 3 武汉大学,复旦大学合编. 微生物学. 第二版. 北京:高等教育出版社. 1989

实验2 消毒和灭菌

一、实验目的和内容

目的:了解消毒和灭菌的原理,并掌握各种灭菌方法的操作步骤。

内容:1. 高压蒸汽灭菌法。

2. 干热灭菌法。

3. 过滤除菌法。

二、实验材料和用具

待灭菌的培养基和链霉素溶液。

手提式高压蒸汽灭菌锅、电热烘箱、过滤除菌器、培养皿、试管。

三、操作步骤

(一)高压蒸汽灭菌法

高压蒸汽灭菌法适用于培养基、无菌水、工作服等物品的灭菌。

1. 加水 将内层灭菌桶取出,再向外层锅内加入适量的水,以水面与三角架相平为宜。
2. 装料 将装料桶放回锅内,装入待灭菌的物品。装有培养基的容器放置时要防止液体溢出,瓶塞不要紧贴桶壁,以防冷凝水沾湿棉塞。
3. 加盖 将盖上与排气孔相连接的排气软管插入内层灭菌桶的排气槽内,摆正锅盖,对齐螺口,然后以同时旋紧相对的两个螺栓的方式拧紧所有螺栓,并打开排气阀。
4. 排气 用电炉或煤气加热,待水煮沸后,水蒸汽和空气一起从排气孔排出。一般认为,当排出的气流很强并有嘘声时,表明锅内空气已排净(沸后约 5min)。
5. 升压 当锅内空气排净时,即可关闭排气阀,压力开始上升。
6. 保压 当压力表指针达到所需压力刻度时,控制热源,开始计时并维持压力至所需时间。本实验用 121℃, 20min 灭菌。

7. 降压 达到所需灭菌时间后,关闭热源,让压力自然下降到零后,打开排气阀。放净余下的蒸汽后,再打开锅盖,取出灭菌物品,倒掉锅内剩水。

8. 无菌检查 将已灭菌培养基于 37℃ 培养 24h,无杂菌生长,即可待用。

(二)干热灭菌法

干热灭菌法适用于玻璃器皿,如试管、培养皿、三角瓶、移液管等的灭菌。

1. 装入待灭菌物品 预先将各种器皿用纸包好或装入金属制的培养皿筒、移液管筒内,然后放入电热烘箱中。
2. 升温 关好电烘箱门,打开电源开关,旋动恒温调节器至所需温度刻度(本实验所需为 160~170℃),此时烘箱红灯亮,表明烘箱已开始加热,当温度上升至所设定温度后,则烘箱绿灯亮,表示已停止加热。
3. 恒温 当温度升到所需温度后,维持此温度 2h。
4. 降温 切断电源,自然降温。
5. 取出灭菌物品 待电烘箱内温度降到 70℃ 以下后,才能打开箱门,取出灭菌物品。

(三)过滤除菌法

有些物质,如抗生素、血清、维生素等易受热分解,因而要采用过滤除菌法。

1. 过滤器的种类

(1) 滤膜过滤器:由醋酸纤维素、硝酸纤维素等制成,有孔径大小不同的多种规格(如 0.1μm、0.22μm、0.3μm、0.45μm 等),过滤细菌常用 0.45μm 孔径。其优点是吸附性小,即溶液中的物质损耗少,滤速快,每张滤膜只使用 1 次,不用清洗。

(2) 蔡氏滤器:是一种金属制成的过滤漏斗,其过滤部分是一种用石棉纤维和其他填充物压制成的片状结构。溶液中的细菌通过石棉纤维的吸附和过滤而被去除,但对溶液中其他物质的吸附性也大。每张纤维板只能使用 1 次。

(3) 玻璃滤器:是一种由玻璃制成的过滤漏斗,其过滤部分是由细玻璃粉烧结成的板状构造。玻璃滤器规格很多,5 号(孔径 2~5μm)和 6 号(孔径小于 2μm)适用于过滤细菌。其优点是吸附量少,但每次使用后要洗净再用。清洗方法是:用水充分冲洗,然后浸于含 1% KNO₃ 的浓硫酸中 24h,再用蒸馏水抽洗数次。在抽洗液中加入数滴 BaCl₂,至不出现 BaSO₄ 沉淀时,即表示已洗净。

2. 过滤装置

(1) 按图 2-1 进行安装,为阻止空气中细菌进入滤瓶而在接管处塞入棉花,外用纸包好进行 121℃ 湿热灭菌 20min。

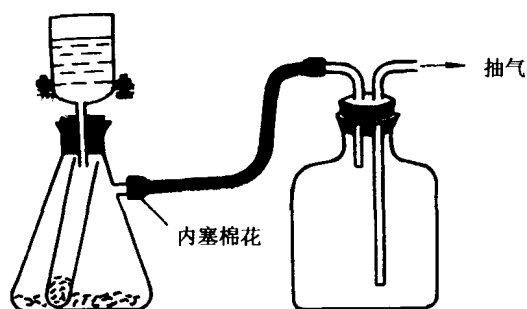


图 2-1 过滤装置

(2) 为加快过滤速度,一般用负压抽气过滤,即在自来水龙头上装一抽气装置,利用自来水流动造成负压。若接真空泵进行抽滤则速度更快。

四、注意事项

1. 使用灭菌锅应严格按照操作程序进行,避免发生事故;灭菌时,操作者切勿擅自离开;务必待压力下降到零后,才可打开锅盖。
2. 干热灭菌时电烘箱中物品不要摆得太拥挤,以免阻碍空气流通而影响灭菌效果;灭菌物品不要与电烘箱内壁的铁板接触,以防包装纸烤焦起火。
3. 过滤除菌时应注意检查过滤装置各连接处是否漏气,以防污染。

五、演示

1. 高压蒸汽灭菌锅的结构及使用方法。
2. 过滤除菌装置的安装。

六、实验报告

1. 记录各种不同物品所用的灭菌方法及灭菌条件(温度、压力等)。
2. 试述高压蒸汽灭菌的操作过程及注意事项。

七、问题和思考

1. 比较各种灭菌方法的原理及适用范围。
2. 高压蒸汽灭菌中为什么要把冷空气排净,为什么在灭菌后不能骤然快速降压?并要在放尽锅内蒸汽才能打开锅盖。
3. 在检测某水体是否存在病毒的实验中,如何排除细胞型生物的干扰?试设计一实验。

参考书目

- 1 范秀容,李广武,沈萍.微生物学实验.第二版.北京:高等教育出版社.1989
- 2 祖若夫,胡宝龙,周德庆.微生物学实验教程.上海:复旦大学出版社.1993

实验3 土壤的稀释分离、纯化及无菌操作技术

一、实验目的和内容

目的:学习从土壤中分离微生物的方法,学习无菌操作技术。

内容:1. 用稀释法分离细菌、放线菌和霉菌。

2. 用平板划线方法分离微生物。

3. 学习斜面接种及穿刺接种等无菌操作技术。

二、实验材料和用具

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和普通变形菌(*Proteus vulgaris*)斜面菌种。

已灭菌的牛肉膏、高氏1号、土豆蔗糖固体培养基各1瓶,49.5mL无菌水(带玻璃珠)1瓶、4.5mL无菌水6管、80%乳酸、10%酚液、95%乙醇。

无菌培养皿12套、1mL无菌移液管10支、土壤样品、天平、称量纸、药勺、试管架、玻璃铅笔、橡皮头(用75%乙醇浸泡)、涂布器。

三、操作步骤

(一) 土壤稀释分离

1. 取土壤 取表层以下5~10cm处的土样,放入灭菌的袋中备用,或放在4℃冰箱中暂存。

2. 制备稀释液(要无菌操作)

(1) 制备土壤悬液:称土样0.5g,迅速倒入带玻璃珠的无菌水瓶中(玻璃珠用量以充满瓶底为最好),振荡5~10min,使土样充分打散,即成为 10^{-2} 的土壤悬液。

(2) 稀释:用无菌移液管吸 10^{-2} 的土壤悬液0.5mL,放入4.5mL无菌水中即为 10^{-3} 稀释液,如此重复,可依次制成 10^{-3} ~ 10^{-8} 的稀释液(图3-1)。注意:操作时管尖不能接触液面,每一个稀释度换用一支移液管,每次吸入土液后,要将移液管插入液面,吹吸3次,每次吸上的液面要高于前一次,以减少稀释中的误差。

3. 混菌法测定菌落数的方法

(1) 细菌:取 10^{-7} 、 10^{-6} 两管稀释液各1mL,分别接入相应标号的平皿中,每个稀释度接两个平皿。然后取冷却至50℃的牛肉膏琼脂培养基,分别倒入以上培养皿中(装量以铺满皿底的2/3为宜),迅速轻轻摇动平皿,使菌液与培养基充分混匀,但不沾湿皿的边缘,待琼脂凝固即成细菌平板。倒平板时要注意无菌操作,见图3-2。

(2) 放线菌:取 10^{-5} 、 10^{-4} 两管稀释液,在每管中加入10%酚液5~6滴,摇匀,静置片刻,然后

分别从两管中吸出 1mL 加入相应标号的平皿中,选用高氏 1 号培养基,用与细菌相同的方法倒入平皿中,便可制成放线菌平板。

(3) 霉菌:取 10^{-2} 、 10^{-3} 两管稀释液各 1mL,分别接入相应标号的平皿中,每个稀释度接两个平皿。在熔好的土豆蔗糖培养基中,每 100mL 加入灭菌的乳酸 1mL,轻轻摇匀,然后用与细菌相同的方法倒入平皿中,便可制成霉菌的平板。

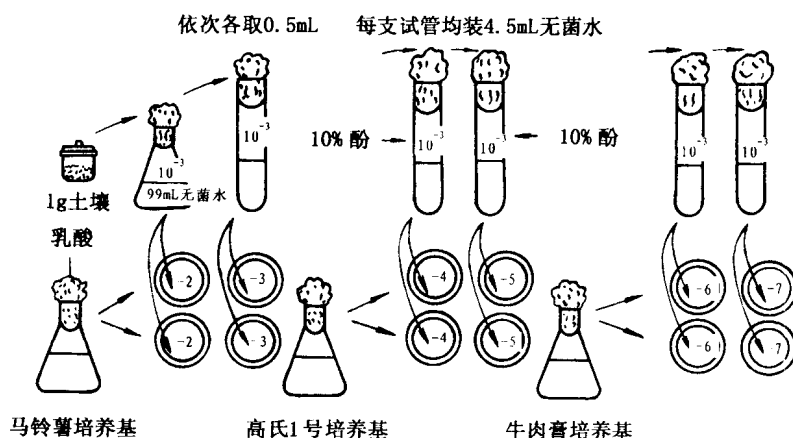


图 3-1 稀释法分离土壤微生物操作过程图解

4. 培养 将接种好的细菌、放线菌、霉菌平板倒置,即皿盖朝下放置,于 $28\sim 30^{\circ}\text{C}$ 中恒温培养,细菌培养 1~2d,放线菌培养 5~7d,霉菌培养 3~5d。可用于观察菌落,用于进一步纯化分离或直接转接斜面。

(二) 平板划线分离微生物

1. 倒平板 按无菌操作要求,在火焰旁操作(图 3-2),取融化并冷却至不烫手的固体培养基(约 50°C),倒入无菌培养皿中,倒量以铺满皿底为限,平放桌上待其充分凝固,备用。

2. 划线分离 使用接种环,从待纯化的菌落或待分离的斜面菌种中沾取少量菌样,在相应培养基平板中划线分离,划线的方法多样,目的是获得单个菌落,主要方法参见图 3-3。

3. 培养 方法同“土壤稀释分离”。

(三) 斜面接种和穿刺接种

1. 斜面接种

(1) 取新鲜固体斜面培养基,分别做好标记(写上菌名、接种日期、接种人等),然后用无菌操作方法,把待接种菌接入以上新鲜培养基斜面中。

(2) 接种的方法是,用接种环沾取少量待接菌种,然后在新鲜斜面上“之”字形划线,方向是从下部开始,一直划至上部(图 3-4A)。注意划线要轻,不可把培养基划破。

(3) 接种后 30°C 恒温培养,细菌培养 48h,放线菌、霉菌培养至孢子成熟方可取出保存。

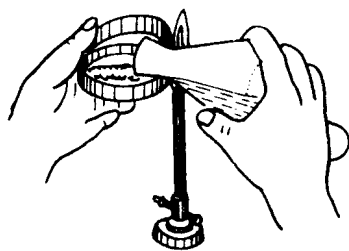


图 3-2 倒平板的方法

2. 穿刺接种

(1) 取两支新鲜半固体牛肉膏蛋白胨柱状培养基,做好标记(写上菌名、接种日期、接种人等)。分别接入金黄色葡萄球菌和普通变形菌。

(2) 接种的方法是,用接种针沾取少量待接种菌种,然后从柱状培养基的中心穿入其底部(但不要穿透),然后沿原刺入路线抽出接种针,注意接种针不要移动(图3-4B)。

(3) 接种后 30℃ 恒温培养,24h 后观察,比较两种菌的生长结果。

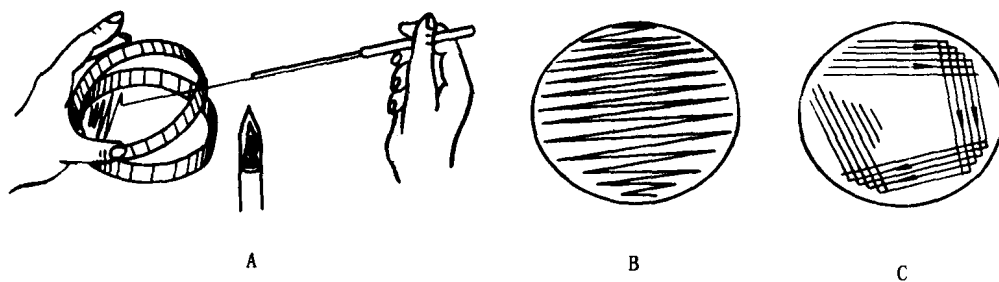


图 3-3 平板划线方法示意图

A. 划线分离操作; B. 用于稀释液中,可连续划线;
C. 用于较浓的菌样,分数次划线,每次划线后要烧接种环,然后再划下一区。

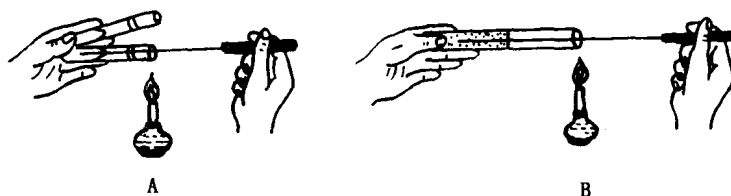


图 3-4 斜面接种(A)及穿刺接种(B)示意图

四、注意事项

1. 一般土壤中,细菌最多,放线菌及霉菌次之,而酵母菌主要见于果园及菜园土壤中,故从土壤中分离细菌时,要取较高的稀释度,否则菌落连成一片不能计数。
2. 在土壤稀释分离操作中,每稀释 10 倍,最好更换一次移液管,使计数准确。
3. 放线菌的培养时间较长,故制平板的培养基用量可适当增多。

五、演示

1. 土壤稀释分离法操作。

2. 平板制作及划线分离方法。
3. 斜面试种。
4. 穿刺接种。

六、实验报告

1. 记录土壤稀释分离结果,并计算出每克土壤中的细菌、放线菌和霉菌的数量。

计算方法:选择长出菌落数 30~300 之间的培养皿进行计数,按以下公式:

$$\text{总菌数/g} = \text{同一稀释度几次重复的菌落平均数} \times \text{稀释倍数}$$

2. 分别记录平板划线、斜面试种的结果,并自我评价。
3. 比较两种细菌穿刺接种的结果,并进行分析。

七、问题和思考

1. 在测定土壤微生物含量中,除混菌法外还可用什么方法?
2. 试设计实验,从土壤中分离出酵母菌,并进行计数。

参考书目

- 1 祖若夫,胡宝龙,周德庆.微生物学实验教程.上海:复旦大学出版社,1993
- 2 许光挥,郑洪元.土壤微生物分析方法手册.北京:农业出版社,1986

实验 4 微生物菌落的观察

一、实验目的和内容

目的:识别细菌、酵母菌、放线菌和霉菌四大类微生物的菌落特征。

内容:1. 观察已知菌的菌落的形态、大小、色泽、透明度、致密度和边缘等特征。

2. 根据菌落的形态特征判断未知菌的类别。

二、实验材料和用具

大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粘红酵母(*Rhodotorula gracilis*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、细黄链霉菌(*Streptomyces microflavus*, 又称“5406”抗生素)、灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)、球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)等细菌的斜面菌种。

牛肉膏蛋白胨培养基、马铃薯培养基、高氏 1 号培养基、无菌水。

接种环、接种针、酒精灯、无菌培养皿多套、电热恒温箱。

三、操作步骤

(一)制备已知菌的单菌落

1. 制备平板 将已融化的无菌培养基待冷却至 50℃ 左右,倒入平皿中,分别制备牛肉膏蛋白胨培养基平板、马铃薯蔗糖培养基平板和高氏 1 号培养基平板各一皿。

2. 制备菌悬液或孢子悬液 在培养好的斜面菌种管内加入 5mL 无菌水,制成菌悬液后备用。

3. 制备单菌落 通过平板划线法获得细菌、酵母菌和放线菌的单菌落。用三点接种法获得霉菌的单菌落。细菌于 37℃ 恒温培养 24~48h,酵母菌于 28℃ 培养 2~3d,霉菌和放线菌置 28℃ 培养 5~7d,待长成菌落后,仔细观察四大类微生物菌落的形态特征,并将观察结果记录于表 4-1 中。

(二)制备未知菌落

1. 倒平板

2. 接种 可用弹土法接种,其要点为:采集校园土壤,待风干磨碎后,可将细土撒在无菌的硬板纸表面,先弹去纸面浮土,然后打开皿盖,使含土的纸面对着平板培养基的表面,用手指在硬板纸背面轻轻一弹即可接种上各种微生物。

3. 培养 将牛肉膏蛋白胨培养基平板倒置于 37℃ 培养箱中恒温培养 2~3d,将马铃薯蔗糖培养基倒置于 28℃ 培养箱中恒温培养 3~5d,即可获得未知菌的单菌落。

4. 编号 从培养好的未知平板中,挑选 8 个不同的单菌落,逐个编号,根据菌落识别要点区分未知菌落类群,并将判断结果填入表 4-2 中。

(三)直接观察菌落

直接用实验 3 中的“土壤稀释分离”获得的单菌落进行观察识别,并将结果填入表 4-2 中。

四、注意事项

观察菌落特点时,要选择分离得很开的单个较大菌落;已知菌落和未知菌落要编好号,请勿随意移动开盖,以免搞混菌号。

五、演示

弹土法制备未知菌落。

六、实验报告

1. 已知菌落的形态特征记录于表 4-1 中。
2. 将未知菌落的辨别结果记录于表 4-2 中。

七、问题和思考

1. 试比较细菌、放线菌、酵母菌和霉菌菌落形态的差异?
2. 设计一个实验,检测实验室空气环境中的微生物类别?

表4-1 已知菌菌落的形态

微生物群	菌名	辨别要点				菌落描述						
		湿		干		表面	边缘	隆起形状	颜色			透明度
		厚薄	大小	松密	大小				正面	反面	水溶性色素	
细菌	大肠杆菌											
	金黄色葡萄球菌											
	枯草杆菌											
酵母菌	酿酒酵母											
	粘红酵母											
	热带假丝酵母											
放线菌	细黄链霉菌											
	灰色链霉菌											
霉菌	产黄青霉											
	黑曲霉											
	球孢白僵菌											

表4-2 未知菌菌落的形态

菌落号	湿		干		菌落描述							判断结果	
	厚薄	大小	松密	大小	表面	边缘	隆起形状	颜色			透明度		
								正面	反面	水溶性色素			
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													

参考书目

- 1 范秀容,李广武,沈萍.微生物学实验.北京:高等教育出版社,1989
- 2 祖若夫,胡宝龙,周德庆.微生物学实验教程.上海:复旦大学出版社,1993
- 3 陈声明,刘丽丽.微生物学研究法.北京:中国农业出版社,1996