

土壤微生物学实验指导

华南农学院植保系植物生理教研组编

1961.9

目 录

项 目	页 次
实验须知	1
实验一 显微镜油镜的使用及微生物形态的观察	1
实验二 真菌和藻类形态的观察	7
实验三 微生物大小的测定及菌落形态的观察	10
实验四 细菌肥料的制备 I. 培养基的制造	15
II. 培养基和器皿的灭菌法	18
实验五 细菌肥料的制备 III. 固氮菌的分离及其形态观察 (简单染色法及革兰氏染色法)	23
实验六 细菌肥料的制备 IV. 固氮菌之落形态及大量繁殖固氮菌	29
实验七 细菌肥料的制备 V. 固氮菌之剂的制造和菌剂质量的检查	32
实验八 根瘤菌的分离和形态观察	36
实验九 磷细菌的制造和影响菌肥繁殖的环境条件	38
实验十 固氮蓝藻小球藻食用酵母和赤霉菌的培养与应用	42
实验十一~十三 土壤微生物区系的分析	44
实验十四~十六 细菌的鉴定方法	61
实验十七 土壤微生物合成和分解腐殖质能力的测定	75
附录一 常用染色液的配法	77
附录二 常用培养基的成分	78
附录三 常用试剂的配法	81

實 駝 湏 知

更前能可学行我进这”
能于我们中同进，的，歇
们在我作一地会性的昼
我仅伎工每划机的做芦
俊不，际求计的目样葫
贴的，贴实要有力的怎依
贴的实在贴的能贴，“
实目过右实目作实么忌
过的通今此有工次什切
通贴是为因到立一些，
分的，实的，做独每做向
部识奎技条程教明实的
安知要本备过思要次贴
奎物，基准贴立前每实
学生论的凸实独贴平而。
物微物理学方：人实了贴贴
生痕的物术备个在，实实
微土过生技进一，与为行
痕关讲微学分每堂培止进
土有上壤物充钵同贴而地
是据室土生好铁个。子
贴掌课握微做是一可因脑
实地证掌的前贴海以死动
本定贴地到贴实式先的不
牢牢正能在，并且样式

相二我运且一，弟，道下，系而此虑了，联，因此消耗了，后好。因故影响了前做救静的而，是有补冷间反，都设能，时，贴而才作，果，实心力操，费效，次小努心浪定，每不的细的预，贴，为大能物的，贴固很中药贴，实果花程成突，的如委过做到，性节是贴会达，续环或实意有，连个，在大设，个一去学心，一中下同粗口，是其缘个为似，贴，继一因奎，实的鞋每是贵贴，本响很求。坏实，影就要仅损的，互步们不会次

也看果。黏题点黏玻药离气盖
果能结实向新实的的。煤並
結定黏对关重。用用黏查，
黏一实和有须黏使共实粘牢
实不黏的和。臭再，行，干
，就观自容黏行不上进齐找
性了来的内容进的白学并操
间过内黏的次能过粘全和己
的时间实黏这才用己他法否
的时一次实加，己自其清是
定，定一次参考自或响的头
一来指每当能意是置影上镜
有云在对向不同允位致置油
是现能学提就过，来以位镜
动表学同省的查牢底，黏微
活地同解准云致清回来实显
的确求瞻前不师的放己己，
物正妥地黏答老己否格自前
生能以好实回导地拿己持关
微才所要，都指和干自保无
于内，了度题待己洗到委有
由向果为程向，格应舒，头
次定的外推三内保，值室水。
其一点此的像黏求由得黏和子
在实，容连实要似不实关累
是到内，卷还属物开开上

实验一 显微镜油镜的使用及微生物形态的观察

目的要求：1. 熟练在高倍镜下观察活的细菌。

2. 熟练使用油镜观察细菌及放线菌的形态及内部构造。

说明：

显微镜是微生物室经常使用的仪器，实验成功与否是与显微镜熟练使用有极大关系，因此必须了解显微镜各部分的性能和用法。

微生物学所使用的显微镜与植物学实验的显微镜相同，只是增加了三个光学部分，即油镜、集光口及光圈。

油镜接物镜放大倍数，一般介于90~100倍之间，因而一般油镜头上刻有90X，或95X，或100X字样，这样可以与低倍接物镜及高倍接物镜区别。（此外在油镜上刻有黑线或“oil”或“oil”或N.A.1.25或1.3等字样来标记油镜的）。

显微镜的构造包括两个主要部分，即机械部分和光学部分。

机械部分：

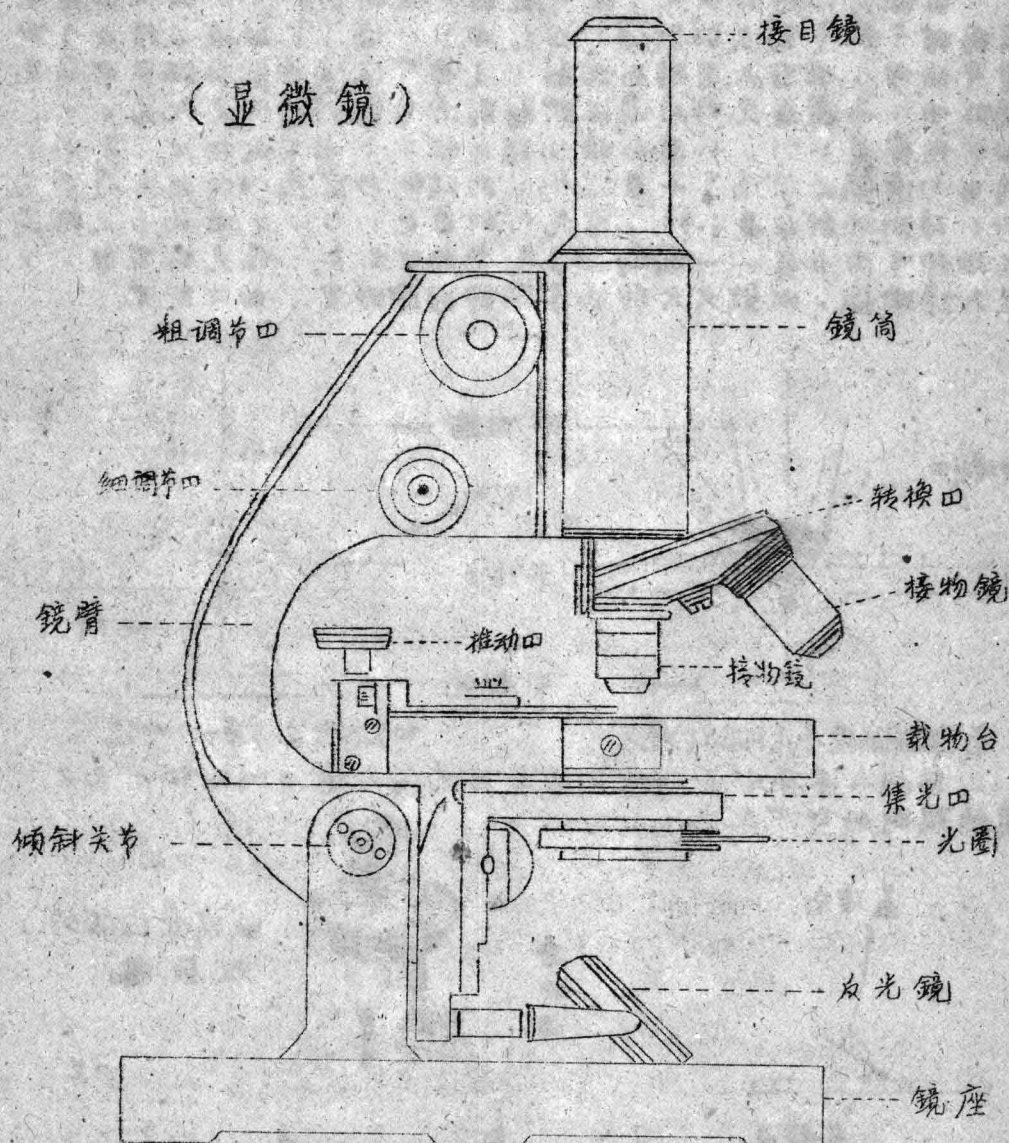
1. 镜座：——为马蹄形金属物，使显微镜稳立于桌上。
2. 镜臂：——呈弓形，上连镜筒，下连镜座，为支持镜筒之用，又为移动显微镜之把手，其下有一关节与镜座相连接，可使镜身倾斜。
3. 镜筒及转换器：——镜筒为圆形中空之长筒，上口安装接目镜，下口安装接物镜，同时有数个接物镜者则有转换器，一般镜筒长160毫米（亦有170毫米者），又有些镜筒具双层套筒可以自由拉长或缩短。
4. 载物台：——为圆形或方形之盘，放置载玻片之用，台中央有一圆孔，可以透光。
5. 推动口：——为附加于载物台上之机械装置，可推动玻片便于观察。有些显微镜无推动口而有弹簧铁，为固定标本用。
6. 粗调节点及细调节点：——在镜筒两旁为移动镜筒调节接物镜之焦距距离之用，粗调节点调节距离较大，细调节点的位于粗调节点下，为精确调节用，每转一周可以升降100微米，亦有在其上附有刻度的，每刻度相当于2微米。

光学部分：

1. 接目镜：——装于镜筒上端，其放大倍数均刻于镜之上部如5X，10X，15X等。
2. 接物镜：——为显微镜最重要部分，分低倍、高倍油镜

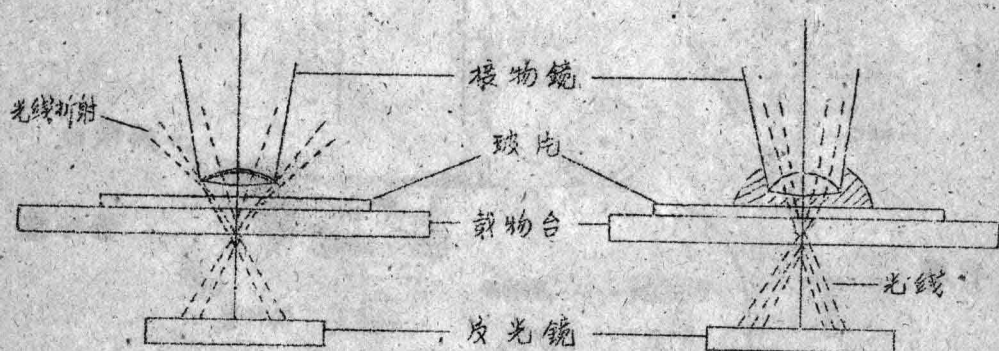
物种，低倍者焦距较大（约16毫米），高倍者次之（约4毫米），油镜最小（约1.8毫米），其放大倍数亦刻于镜上，如10X，44X，90X等。也可从外形来辨识：镜头长度愈大，镜头口径愈小时，放大倍数愈大；反之，放大倍数愈小。而其中油镜使用时必须在玻片上加香柏油（或甘油）使镜头浸入油中，油镜制造精细价值高昂，用时需特别小心。

（显微镜）



3. 集光凹——在载物台下，为聚光之用，可以上下移动。
4. 光圈——在集光凹之下，可以放大或缩小，为调节光线进入镜头之用。
5. 反光镜——在集光凹之下，可使光线反射经集光凹射入镜头，其一为平凸镜，一为凹凸镜，通常使用平凸镜，光线较弱时用凹凸镜。

在微生物的粘查中，油镜是经常使用到的。所谓油镜是在使用时于标本片上加柏油（洋杉油）一滴，然后使油镜头下降浸入油内，但防止与玻片接触，这样可使接物镜与标本之间充满柏油，而避免光线在通过玻片到达透镜时之折光现象。（柏油折光率是1.51）如果在接物镜与标本之间不放柏油，那么在玻片与透镜之间隔了一层空气，而玻璃与空气的折光率是不同的（玻璃折光率是1.51，空气折光率是1.0），因而当光线通过两种不同介质——玻璃与空气会发生折射，使光线不能全部进入接物镜，以致大大降低了视野的清晰度，如图可示：



无柏油的油镜，光线折射在物镜外。

加柏油后，光线集中在物镜内。

因此在采用镜头油时，只要油的折光率与玻璃相同而又不会腐蚀玻璃的即可应用。



实验步骤:

I. 高倍镜下观察活细菌:

1. 取发酵液一小滴于载玻片中央, 加上盖玻片(防止盖玻片下有气泡产生)(方法是将盖玻片一端先与发酵液接触, 然后轻轻下放)。(如上图)
2. 以低倍镜确定位置, 调节视野内的光线, 由于活细菌的折光率与水相近, 所以光线不宜过强, 可适当下旋集光口或缩小光圈。
3. 再在高倍镜观察水滴中的微生物, 注意各种细菌的形态, 大小及运动情况。

II. 观察细菌染色片学习使用油镜

1. 取制好的细菌染色片一片。
2. 于玻片染色处上加柏油一小滴(不可过多)(柏油载于双层并内如图)。
3. 找油浸镜, 徐徐转动粗螺旋, 下降镜筒, 使油浸镜头浸入油内, 再仔细地转动镜筒, 使油镜几乎与玻片相接触为止。(注意不要用力过猛, 把玻片压破而损坏了镜头)同时把聚光口升高, 光圈放大, 使进入较多的光线于油镜头中, 便于观察。
4. 用左眼视接目镜内视野, 轻轻向上转动粗螺旋调节口(要求十分缓慢转动, 否则找不到), 当发现视野有被视物时, 改用细螺旋调节口, 向上或向下转动, 直到被视物明晰为止(此时决不能用粗螺旋向下移动!!)。如镜头已露出油面, 仍不见物像, 则需按上述步骤重作, 操作时务须细心循序进行, 不要急躁从事, 以免损坏镜头。
5. 观察完一个标本片后, 如要另看一片, 则必须先先将镜筒旋上, 再按上列步骤进行。
6. 全部标本片观察完毕后, 必须用擦镜纸蘸二甲苯擦去镜头上的柏油, 然后用干的擦镜纸擦去二甲苯。如继续使用油镜, 则镜头上的油可不必擦掉, 以免擦磨次数过多, 损耗镜头上之镜片。
7. 加过油的玻片标本, 如上盖有胶条的, 可用纸擦去柏油即可。无胶条封固的玻片, 必须浸于二甲苯并内洗去柏油, 10~25分钟后取出晾干。
8. 使用油镜观察下列标本片, 并按比例绘图:
 - ①. 螺旋状菌
 - ②. 细菌的荚膜

- | | |
|---------------|-----------|
| ③ 无芽孢杆菌 | ⑦ 链球菌或链杆菌 |
| ④ 有芽孢杆菌 | ⑧ 双球菌 |
| ⑤ 细菌的鞭毛 (示范镜) | ⑨ 放线菌 |
| ⑥ 葡萄球菌 | |

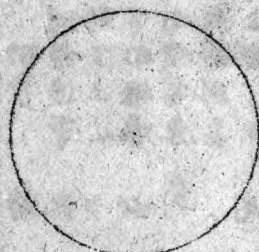
实验注意：

1. 观察活细菌时，注意高倍镜头不得接触发酵液。
2. 使用油镜时油镜与油接触后，如发现视野中有粘附物时，不能再粗螺旋向下转动，以免压破玻片，损坏油镜头。
3. 用擦镜纸擦镜头时，只能单方向抹擦。
4. 不可将显微镜各部分任意拆除，以免损坏。

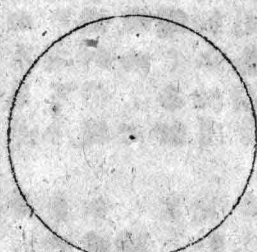
问题：

1. 镜检时，如何才能找到活细菌清晰的形象？
2. 何谓油镜？加油作用如何？
3. 显微镜使用应注意什么？
4. 活细菌的运动器官是什么？细菌的运动与布朗运动有何不同？

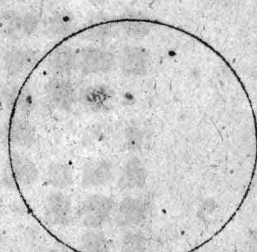
实验报告：



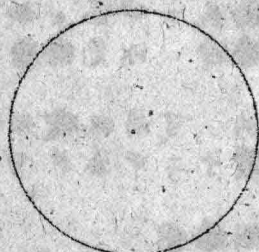
活细菌



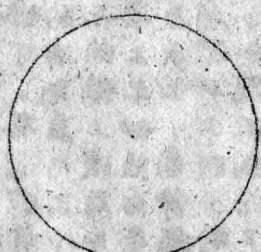
双球菌



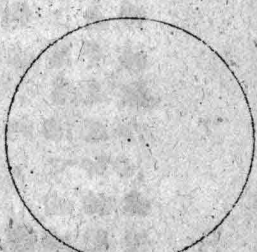
链杆菌



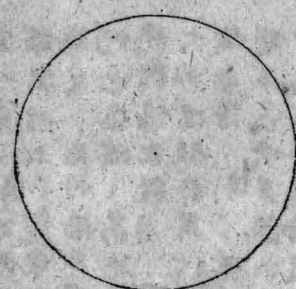
葡萄球菌



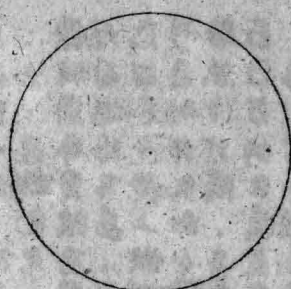
无芽孢杆菌



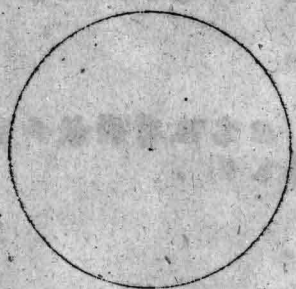
有芽孢杆菌



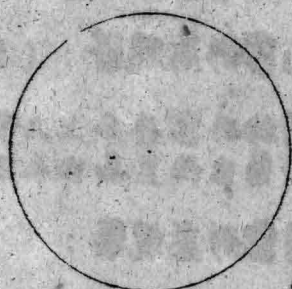
鞭毛



螺旋状苔



荚膜



放射状苔

实验二 真苔和藻类的形态观察

目的要求：

1. 学习观察真苔的方法。
2. 熟练在显微镜下观察真苔和藻类的形态。

说明：

大多数真苔为多细胞微生物，形体较大，苔体多为丝状，称为苔丝。苔丝多分枝，低等的种类，其苔丝中无隔膜，高等的种类，其苔丝中有隔膜。苔丝中有明显的细胞核，无性繁殖与有性繁殖，种类很多，本实验只观察在土壤中常见的一些类型。

藻类为有叶绿素，能行光合作用的单细胞或多细胞、低等植物，无根茎叶的分化。

实验步骤：

一、根霉形态观察：

1. 菌落形态观察：用肉眼或手提放大镜观察霉菌菌落形态，注意其菌丝及菌落生长情况。孢子中的颜色及生长情况。将带有假根及孢子束的菌体连培养基一起挖一小块，放在玻片上，再于其上加1~2滴乳酸石炭酸混合液，用解剖针轻轻将菌体分开，注意其菌丝是否分枝，有无隔膜，假根的形状，孢子束的形状及颜色，孢子中着生位置，菌落生长情况，将观察结果按比例绘图。

二、霉菌形态观察：（示范镜）

霉菌的形态基本上与根霉相同，但它没有假根和匍匐枝，孢子束的着生位置和生长情况与根霉不同。

三、青霉形态观察：

1. 菌落形态观察：取平皿培养的青霉，观察其菌落形状，表凸气生菌丝和分生孢子的颜色，背凸基内菌丝的颜色。
2. 菌体形态观察：如观察根霉一样，制成标本片，观察其菌丝有无隔膜，分生孢子着生的情况，按比例绘图。

四、赭霉形态观察：（示范镜）

1. 菌落形态与青霉的比较。
2. 菌体形态：观察其菌丝有无隔膜，分生孢子着生情况。

五、酵母菌形态观察：

1. 菌落形态观察：注意其颜色、形状、表凸情况。
2. 菌体形态观察：取酵母菌液一滴于玻片上，加上盖玻片，先用低倍镜，再用高倍镜观察，注意其菌体形状，及示芽生殖情况。按比例绘图。
将玻片取下，于盖玻片边缘滴加0.1%美兰液一滴，再在显微镜下观察酵母菌细胞的死活情况；死的酵母菌，无还原美兰的能力，被美兰染上兰色；活的酵母菌，能还原美兰为无色，因而细胞不被染上色。

六、镰刀霉形态观察：

1. 菌落形态观察：取平皿培养的菌落，观察其菌落形状。

颜色及其它特征。

2. 菌体形态观察：如根霉一样做成标本片，先在低倍镜，再在高倍镜，观察其菌丝有无隔膜，分生孢子的形状、颜色，着生情况，按比例绘图。

七、固氮蓝藻形态观察：

用接种环取固氮蓝藻藻膜一小块，放在玻片上，用针剖开将其分开，加上盖玻片，在高倍镜下观察其细胞形状，按比例绘图。

八、小球藻形态观察：（示范镜）

注意其形状、大小、内部结构。

实验注意：

1. 挑取菌落时，要连培养基一起挑一小块，小心地拨开，免致分生孢子掉下或孢子束散碎。
2. 制片时要薄，且不要有气泡。

问题：

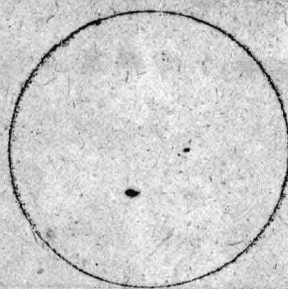
1. 所观察的几种真菌，它们的个体形态和菌落形态上有何异同？
2. 细菌、霉菌、放线菌及酵母菌在细胞个体形态上有何异同？

实验记录

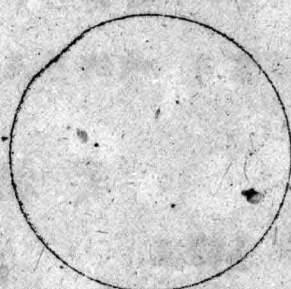
真菌的形态特征：

	菌落形态说明	菌体形态绘图
根霉		

青 霉		
麴 霉		
酵母菌		
镰刀菌		



腐腐兰藻



小球藻

实验三 微生物大小的测定及菌落形态的观察

目的要求：

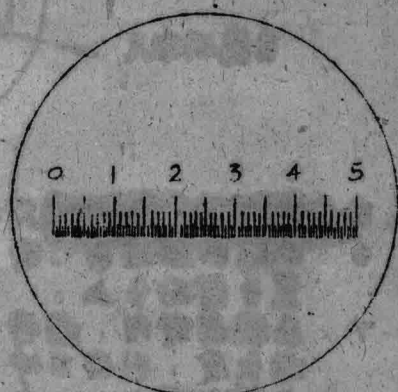
掌握测定微生物大小的方法，及区别细菌、真菌、放线菌的菌落。

说明：

测量微生物的大小，是用具有精密刻度的显微镜测微尺来测量的。装于目镜内的为目镜测微尺，装于镜台上的为物镜测微尺。

目镜测微尺为一圆形玻璃片，中间有长5毫米，并分为50格的尺子，而每格的长度是随不同放大倍数的物镜而改变。

物镜测微尺为一载玻片上放有一层玻片，其中有长1毫米，并等分为100格的尺子，每一格即为0.01毫米，此长度固定不变，因此可用物镜测微尺的已知长度来计算出目镜测微尺每格的大小。



目镜测微尺

实验步骤：

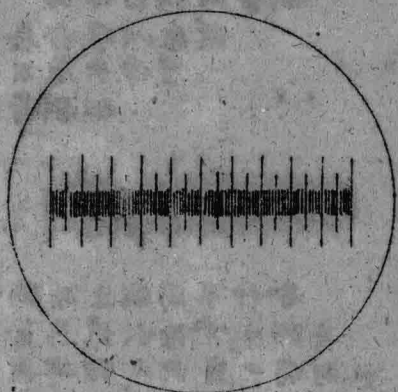
I. 微生物大小的测定：

1. 取下接物镜，旋开接目镜上凸的透镜，将目镜测微尺小心装入接目镜内（有刻度凸朝下），然后旋好放回镜筒中。将物镜测微尺置于载物台上。

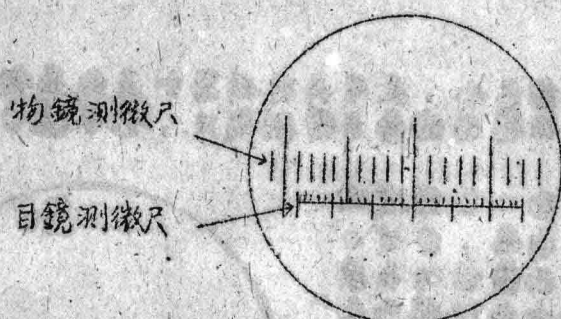
2. 先用低倍镜找到物镜测微尺的视野。

3. 改用高倍镜，但要小心调节粗螺旋，避免物镜与物镜测微尺相接触造成损失。

4. 转动接目镜，使目镜测微尺与物镜测微尺重叠，并找出两个测微尺的中部某一格互相吻合，然后自此格再找物镜测微尺的第几格与目镜测微尺相吻合。例如：假定目镜测微尺33格 = 物镜测微尺3格（每格为0.01毫米），则目镜测微尺每格长度 = $\frac{3 \times 0.01}{33} = 0.0091$ （微米）。



物镜测微尺(放大图)



5. 确定了目镜测微尺每格长度后，移去物镜测微尺。
 6. 取酵母液或其它微生物悬液少许，加盖玻片，然后置于载物台上。
 7. 在镜视野内，选择一个单独的微生物细胞，测定菌体的长度，则使菌体与目镜测微尺的刻度相垂直（转动目镜即可）；测定菌体的宽度，则应使菌体与刻度相平行。
- 测量时使菌体的一端与目镜测微尺上的一个刻度相重合，然后以重合点起计算菌体所占目镜测微尺上的格数。若菌体长度不到一格，则应估计它佔多少，如左图所示。如测芽孢，则仅测量其直径即可。记载

II. 微生物菌落形态之观察：

各种不同微生物所形成之菌落，其外表形态不同，故于实际中掌握认识菌落之能力可作一初步诊断，对微生物鉴别有一定的参考价值，注意各种不同微生物的菌落特点，来区分细菌、真菌及放线菌的菌落。

1. 细菌菌落形态：

观察细菌之菌落时，应注意其外表是干燥或润湿、光滑或粗糙、透明或不透明、扁平或隆起、表面有无皱褶、边缘是否整齐、是否呈粘液状、有无色素等情况，观察时可用肉眼，或藉放大镜放大后观察。（关于细菌菌落的形态图可参攷实验十四）

2. 真菌菌落形态：

注意观察真苔、落与细苔、放线苔、落之区别。

3. 放线苜蓿落形态：

注意观察放线菌与细菌及真菌菌落的区别。

实践注意点：

2. 观察微生物古菌形态时, 注意不要损坏标本。

問題：

1. 细苔、真苔、放射线苔及酵母苔在细胞个体形态上有什么异同?
2. 如何区别细苔、放射线苔及真苔的苔落?

細荷：

放线苗:

真首：

实验记录：

微生物大小测定：

目镜放大倍数：

物镜放大倍数：

物镜测微尺____格等于目镜测微尺____格。

目镜测微尺每格长度=

微生物长	____格即	=	微米	平均长	微米
长	____格即	=	微米		
宽	____格即	=	微米	平均宽	微米
宽	____格即	=	微米		

实验四 细菌肥料制备

总目的要求：

1. 掌握有关微生物的基本操作技术。
2. 掌握从土壤中分离培养微生物的方法。
3. 熟悉细菌肥料的生产过程。

说明：

将微生物应用到农业生产中去，将是农业生产上的重要方向。所谓细菌肥料是将一些有益的微生物，通过人工的培植，施用到土壤中，使它们在土壤中大量生长繁殖，进行旺盛的生命活动，通过它们的活动来增加或改善土壤中的植物营养，或抑制植物病危害，刺激植物生长等，因而使作物产量增加，土壤肥力提高，或保能植物。

细菌肥料的制备，一般是通过从土壤或植物中分离出有益的微生物后，从形态和生理上检查鉴定它的效果，以后进行大群的繁殖。繁殖后与一定的吸附剂或填充剂混和在一起可成。

各种细菌肥料的制造过程是相似的。掌握了其中主要的制造方法和过程，就能了解其它细菌肥料的制造方法。本实验是通过固氮菌肥料和磷细菌肥料的制造来掌握细菌肥料的基本制

作方法。

I. 培养基的制造

目的要求：了解配制培养基的原则，并掌握配制方法。

说明：在分离或保存微生物，或研究微生物的形态与生理状态时，都要应用培养基。所谓培养基是培养微生物用的。人工培养基，培养基不仅要满足微生物所需要的各种营养物质（其中含有可被微生物利用的碳源、氮源、无机盐类及水等），同时还应具有适合于微生物正常生长发育要求的其它条件，其中尤应注意培养基的pH值、渗透压和盐浓度，因此在配制培养基时，调其pH值是重要步骤。

培养基的种类很多，或以自然产物制成（牛肉汁、蛋白胨、乳牛汁等）或以化学药品配制成（如阿希比无氮培养基）。若培养基成分中，某种营养物质最适合于一种或一类微生物利用，而对于其它微生物不适合的则称为选择性培养基。

培养基有液体及固体之分，液体培养基常用于扩大菌液，固体培养基是在液体培养基中加上凝固剂而制成的。分离微生物，大多用固体培养基。常用的凝固剂有琼脂（又名琼脂或冻粉，是由海藻类提取的多酚类物质）、明胶、石花菜等。

实验步骤：

一、阿希比 (Ashby) 无氮培养基 (分离培养固氮菌用)

1. 成分：	蔗糖或甘露醇	10克	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1克
	KH_2PO_4	0.2克	CaCO_3	5克
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2克	水	1000毫升
	NaCl	0.2克	琼脂	15~20克

（本实验每组配剂量较少，因而把药品配成浓缩液。因学们可按下列数量配制少量阿希比无氮培养基）

2. 于250 ml 烧杯内按量加入下列溶液，以合成无氮培养基。