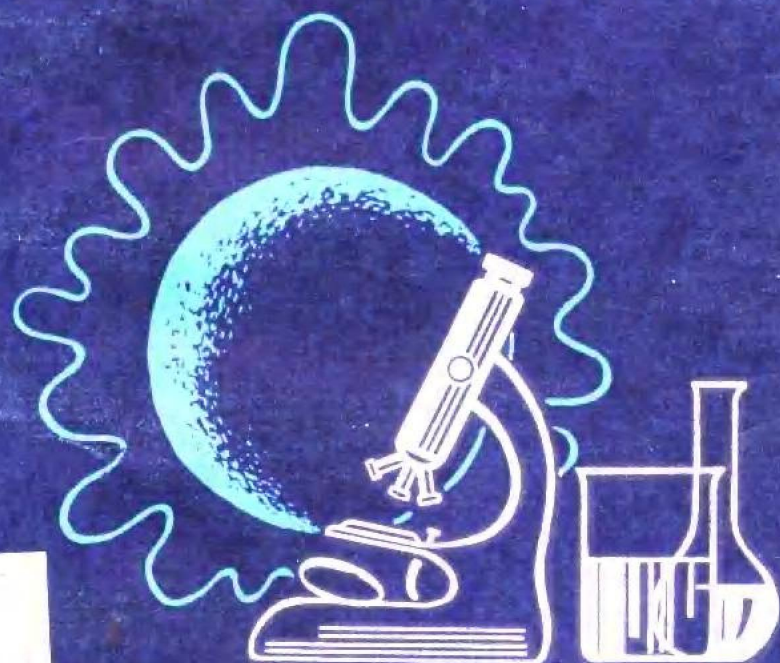


怎样观察与培养微生物



北京师范大学出版社

怎样观察与培养微生物

北京师范大学生物系

微生物教研组 编

*

北京师范大学出版社出版

新华书店北京发行所发行

西安新华印刷厂印刷

*

开本：787×1092 1/32 印张：5.25 字数：106千

1982年9月第1版 1982年9月第1次印刷

印数：1—20,000

统一书号：13243·19 定价：0.47元

前 言

近几十年来，微生物学在生产实践中的应用日益广泛，在生物科学研究中的地位也日趋重要。可以说，在生活或生产实践中，随时随地都能接触到许多与微生物学有关的问题。因此，在中学生物学教学中，如何创造条件增强学生对微生物世界的感性认识；如何利用微生物分布广、繁殖快、代谢类型多样化等有利条件，开展课外小组活动，增强学生对微生物的重要作用的理解；广大的基层科技干部及生物爱好者如何因地制宜，利用丰富的微生物资源为四化做贡献，这些都是十分重要而有意义的问题。本书编者的意图，就是希望在推广和普及微生物学基础知识及实验方法的过程中，做一些力所能及的工作。

本书的主要内容包括：各类微生物的形态特征及观察方法；微生物在物质转化中的作用及观察方法；进行微生物纯种培养的操作技术等。书中介绍的实验方法，只要具有一般的实验设备条件，加上主观努力即可实现。对于微生物学实验中一些特殊的操作，例如分离纯化与接种的方法及其无菌操作技术，则用图解和较详细的文字说明相结合，力求对于缺乏系统学习和训练的同志有所帮助。另一方面，考虑到许多学校现有的条件，对于各类微生物的形态及其作用的观察，我们也尽力介绍一些简单易行的实验方法。

本书的主要阅读对象是中中学生物学教师，有关的基层科

技干部以及有志于自学的青年读者，也可供师范院校生物系的学生作课外参考读物。

本书由我组杨江城、黄秀梨、王秀云、吕宪芝负责编写。由于我们的经验和水平有限，书中的内容必然存在不少问题，欢迎广大读者批评指正。

编者

1981. 9.

目 录

I. 微生物的形态及观察方法	(1)
< I > 细菌	(1)
一、细菌的形态特征	(2)
二、细菌形态的观察方法	(8)
(一) 单染色法	(8)
(二) 复染色法	(9)
(三) 负染色法 (背景染色)	(11)
(四) 细菌运动的观察	(12)
(五) 特殊染色	(14)
1. 芽孢染色法	
2. 荚膜染色法	
3. 鞭毛染色法	
(六) 常用染色液的配制	(16)
(七) 显微镜油镜头的原理及使用方法	(19)
三、自然基质中细菌的观察和分离培养	(21)
(一) 细菌的生活环境	(21)
(二) 自然基质中的细菌观察	(23)
1. 牙垢细菌	
2. 污水、土壤中的细菌	
3. 腐败食物中的细菌	
4. 枯草杆菌	
(三) 细菌的分离培养	(26)
< II > 放线菌	(26)
一、放线菌的形态特征及重要代表	(27)

二、放线菌的形态观察方法.....	(30)
(一) 玻璃纸培养和观察方法.....	(30)
(二) 印片法.....	(32)
(三) 盖片培养法.....	(33)
(四) 琼脂条培养法.....	(34)
三、放线菌的分离培养.....	(35)
(一) 放线菌的生活环境.....	(35)
(二) 从土壤中分离放线菌的方法.....	(36)
(三) 从高温堆肥中分离高温放线菌.....	(37)
<Ⅲ> 酵母菌.....	(37)
一、酵母菌的形态特征及重要代表.....	(38)
二、酵母菌形态的观察方法.....	(42)
(一) 一般观察.....	(42)
(二) 酵母菌死活细胞的区别.....	(42)
(三) 假菌丝的观察.....	(43)
(四) 酵母菌子囊孢子的观察.....	(43)
三、酵母菌的分离培养.....	(44)
(一) 酵母菌的生活环境.....	(44)
(二) 酵母菌的分离培养.....	(45)
<Ⅳ> 霉菌.....	(46)
一、霉菌的形态特征及重要代表.....	(47)
二、常见霉菌的分离培养.....	(52)
(一) 霉菌的生活环境.....	(52)
(二) 常见霉菌的分离培养.....	(53)
三、霉菌形态的观察方法.....	(54)
(一) 直接取培养物观察.....	(54)

(二) 压片法观察.....	(55)
(三) 载片培养法.....	(55)
(四) 玻璃纸培养法.....	(57)
Ⅱ. 微生物在物质转化中的作用及观察方法.....	(57)
一、淀粉水解.....	(58)
(一) 需氧菌对淀粉的水解.....	(59)
(二) 厌氧菌对淀粉的水解.....	(61)
二、果胶质的分解.....	(61)
三、纤维素的分解.....	(63)
四、乳酸发酵.....	(66)
五、醋酸发酵.....	(68)
六、酒精发酵.....	(70)
七、沼气发酵.....	(72)
八、蛋白质的分解.....	(76)
九、固氮作用.....	(78)
(一) 自生固氮菌的培养和观察.....	(79)
(二) 根瘤菌的培养和观察.....	(80)
十、反硝化作用.....	(81)
十一、硝化作用.....	(84)
Ⅲ. 微生物的纯培养技术.....	(86)
一、微生物的分离纯化.....	(86)
(一) 稀释法分离土壤微生物.....	(86)
(二) 平板划线法.....	(93)
二、微生物的接种技术.....	(96)

(一) 固体斜面接种法.....	(96)
(二) 液体接种方法.....	(98)
(三) 穿刺接种.....	(99)
(四) 接种工具.....	(100)
三、灭菌和消毒.....	(101)
(一) 干热灭菌.....	(102)
1. 火焰灭菌 2. 热空气灭菌	
(二) 湿热灭菌.....	(102)
1. 高压蒸气灭菌法 2. 常压间歇灭菌法	
3. 煮沸消毒 4. 巴斯德消毒法	
(三) 过滤除菌.....	(107)
(四) 常用杀菌剂及使用方法.....	(109)
1. 有机化合物 2. 无机化合物 3. 染料	
4. 化学药剂对微生物生长的影响	
(五) 接种室及接种箱的消毒方法.....	(114)
(六) 玻璃器皿的洗涤及灭菌.....	(117)
四、菌种保藏方法.....	(121)
(一) 斜面及柱状培养基保藏方法.....	(122)
(二) 麸皮保藏法.....	(123)
(三) 砂土管保藏法.....	(124)
IV. 培养基的配制.....	(125)
(一) 培养基的类型.....	(125)
(二) 选择培养基的依据.....	(126)
(三) 配制培养基的注意事项.....	(129)
(四) 配制培养基的步骤.....	(130)

(五) 常用培养基及配制方法.....	(134)
附 I、几种担子菌的培养.....	(139)
一、平菇的栽培.....	(139)
二、灵芝的栽培.....	(144)
三、木耳的栽培.....	(147)
四、银耳的栽培.....	(150)
附 II、红茶菌简介.....	(153)
一、红茶菌饮料的来源.....	(153)
二、红茶菌中的微生物及其作用.....	(154)
三、红茶菌饮料的酿制.....	(156)

I. 微生物的形态及观察方法

< I > 细 菌

细菌是一群个体微小、种类繁多的单细胞原核生物。按照现代的生物分类系统，整个生物界可分为病毒界，原核生物界，真核原生生物界、真菌界、植物界和动物界。细菌属于原核生物界细菌门。细菌门中种类最多、了解较清楚的就是通常所说的球状、杆状、螺旋状的细菌，在分类上称这些微生物为真细菌。除真细菌外，细菌门还包括一些个体更小的单细胞生物如立克次氏体(Rickettsia)、衣原体(Chlamydia)等寄生于人或动物细胞内的致病菌和其它类群。

细菌与人类关系极为密切。细菌能引起疾病，危害身体健康，这是人们对于细菌最早的认识。但是现在已发现的2000多种细菌中，能引起人和家畜传染病以及农作物病害的，只是少数种类，大多数细菌的生命活动，对于人类和动物、植物都是有益的；有的细菌终生在人或动物、植物体内生存，成为对人体或动物、植物有益而不可少的菌群，例如人体的终生伴侣大肠杆菌，反刍动物瘤胃中的瘤胃细菌群，与豆科植物共生的根瘤菌等等。

细菌在自然界的物质循环中起着重要作用。许多细菌能分解复杂的有机质，或在自然界氮素循环、硫和磷的转化中起重要作用，为植物提供了可利用的营养物质。

许多细菌已被直接应用于工农业生产中。例如用枯草杆菌生产的淀粉酶、蛋白酶，用于棉纱脱浆，皮革脱毛；利用谷氨酸棒状杆菌生产谷氨酸，制成味精；利用丙酮丁醇梭菌生产重要的有机溶剂丙酮、丁醇等等，早已投入大型工业生产；利用苏云金杆菌类的细菌制做的细菌农药，在许多国家早已普遍使用；利用细菌浸矿，可以从贫矿、尾矿中提取铜、锰等贵重金属以及铀等稀有金属，在国内外均已推广。

以上仅是细菌在工农业生产中应用的少数实例。目前，在工业、农业和医学的各个领域中，对于细菌的研究和应用，早已超出了以上范围，有了更大的发展。

一、细菌的形态特征

细菌是单细胞的微生物，基本形态为球状、杆状、螺旋状。球状的细菌称为球菌，依其排列方式不同又可分为不同种类（图 I—1）；杆状的细菌称为杆菌，可成链状排列或单个分散存在（图 I—2）；细胞略呈弯曲或弓形的称为弧菌，弯曲在一圈以上的称为螺菌（图 I—3）。另有一类螺旋状细菌，其螺旋多而密，菌体呈细长螺旋状，细胞壁柔韧，菌体能屈伸，不同于上述螺菌，叫做螺旋体（Spirochaete），如常见于齿垢中的口腔螺旋体等；还有一类丝状细菌，其杆状菌体连成长链，外面围有共同的粘质衣鞘，形成丝状或毛发体，例如球衣细菌（Sphaerotilus），这类细菌常见于下水道或其它有机质丰富的水中。

细菌的个体极小，其大小以微米计量（1微米=1/1000毫米），一般细菌的宽度（或直径）为0.5—1微米，长度

1—3 微米，有的也可长达数微米或更长。

细菌为原核生物，具有原核生物细胞的共同特点，在细

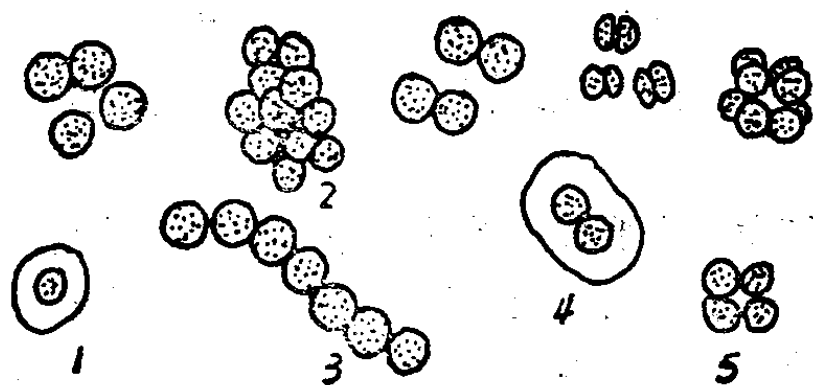


图 I—1 球菌的各种形态

1. 细球菌 2. 葡萄球菌 3. 链球菌 4. 双球菌 5. 四联球菌及八
迭球菌

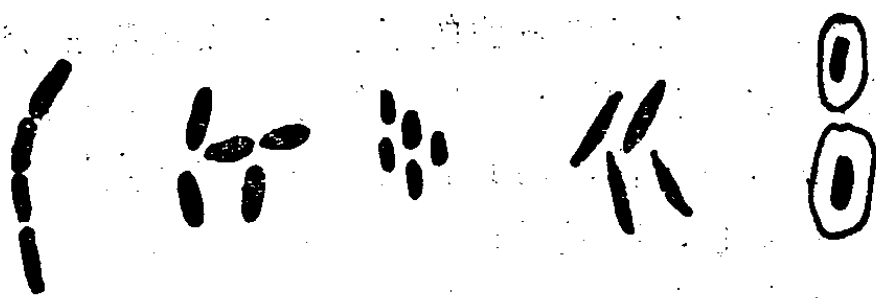


图 I—2 各种杆菌形态

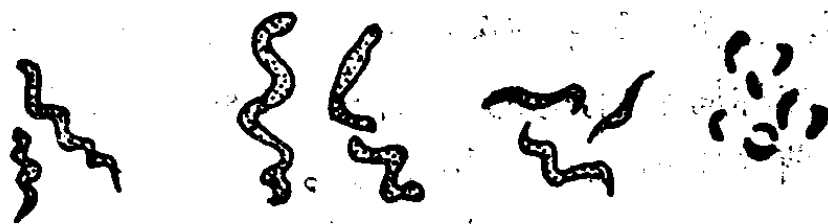


图 I—3 螺菌和弧菌形态

胞壁与核的结构组成上，与真核生物细胞有较大区别。

细菌的核不具核膜、核仁等结构，只有环状 DNA 折叠构成的核物质，故称原核或拟核，又称染色质体或细菌染色体。用特殊方法染色，可在光学显微镜中看到细菌的核，一般位于菌体中央，呈球状，棒状或哑铃状，数目为 1—2 个。

细菌细胞壁的主要成份是肽聚糖。肽聚糖是由 N—乙酰葡萄糖胺和 N—乙酰胞壁酸以及短肽联结形成的多层网状结构的大分子化合物。革兰氏阳性菌的细胞壁含有较多的肽聚糖，革兰氏阴性菌的细胞壁含肽聚糖较少，而含有较多的脂类，结构也较阳性菌的复杂。

有些细菌除具有一般结构外，还具有特殊结构：鞭毛、荚膜、芽孢。

(1) 鞭毛：

鞭毛是某些细菌细胞表面的细长而呈波状弯曲的丝状物，着生在细胞质内的基粒上，穿过细胞膜伸到外部。鞭毛的长度可超过菌体若干倍，而其直径却不及细胞直径的 1/20，因此不经特殊染色，在光学显微镜下不能看到。

鞭毛着生的位置和数目，是细菌种属鉴定的依据之一。可分为单生，丛生，周生三种类型（图 I—4）。鞭毛单生的可称为单毛菌，如霍乱弧菌 (*Vibrio comma*)；鞭毛丛生的称丛毛菌，如荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluoresceus*)；鞭毛周生的称周毛菌，如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

鞭毛的化学组成主要是蛋白质，只含少量多糖。

鞭毛是细菌的运动器，由于鞭毛的旋转，可使细菌迅速

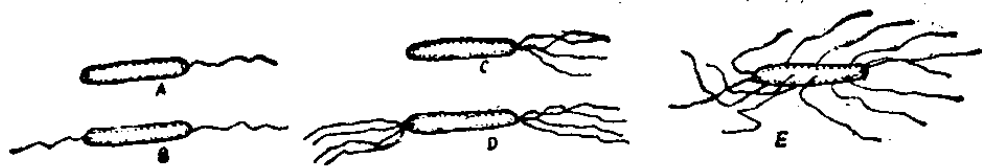


图 I—4 细菌鞭毛着生位置

A、偏端单毛菌；B、两端单毛菌；C、偏端丛毛菌；D、两端丛毛菌；E、周生鞭毛菌。

运动。一般有鞭毛菌，主要在幼龄期可以活跃运动，衰老的细菌，鞭毛常易脱落，因而失去运动能力。

通常球菌没有鞭毛；杆菌中有的有鞭毛，有的没有鞭毛，有的在生长的某一阶段有鞭毛；弧菌和螺菌都有鞭毛。有的细菌不借助于鞭毛运动，如螺旋体就是借助于细胞中有弹性的轴丝伸缩而使菌体运动的。

(2) 荚膜：

有些细菌如圆褐固氮菌 (*Azotobacter* sp.)、肺炎球菌 (*Diplococcus pneumoniae*)，可向细胞壁外分泌一层透明的粘液性物质，具有一定形状，叫做荚膜。荚膜的成份因细菌而异，大多数是多糖或多肽。

细菌荚膜的形成与环境条件有关。如肺炎球菌等致病菌，只在被感染的动物体内形成荚膜，如有的生荚膜菌，只在含糖量高、含氮量低的培养基中产生大量荚膜。

有荚膜的细菌较抗干燥。对于致病菌，荚膜可保护细菌抵抗白血球吞噬，从而增强致病力。

用简单染色及特殊染色方法，均可在光学显微镜下看到荚膜(图 I—8)。

(3) 芽孢：

某些细菌在其生长的一定阶段，于营养细胞内形成一个

圆形或卵圆形的内生孢子，称为芽孢，带有芽孢的菌体叫芽孢囊或孢囊。生芽孢的细菌主要是一部份革兰氏阳性杆菌。

芽孢是细菌的休眠体。一个细菌只形成一个芽孢，芽孢成熟后菌体其余部份自溶消失，游离的芽孢在适宜条件下萌发，形成一个新的营养体。

芽孢的形状、大小、芽孢形成的位置，都是芽孢杆菌分类的重要依据。大多数厌氧芽孢杆菌的芽孢直径大于菌体的宽度，芽孢形成后，芽孢囊膨大成梭形、鼓槌形，因此又称梭状芽孢杆菌（Clostridium），如破伤风芽孢杆菌、丙酮丁醇梭菌、蚀果胶梭菌等（图 I—6）。枯草杆菌、巨大芽孢杆菌等需氧菌，形成的芽孢直径接近于菌体的宽度，芽孢囊不膨大（图 I—5）。

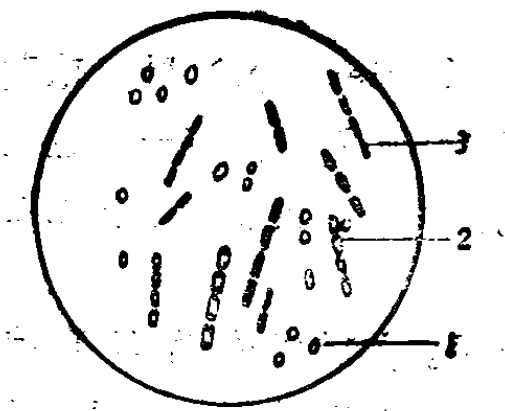


图 I—5 芽孢杆菌
(芽孢囊不膨大)
1. 芽孢 2. 孢囊 3. 菌体

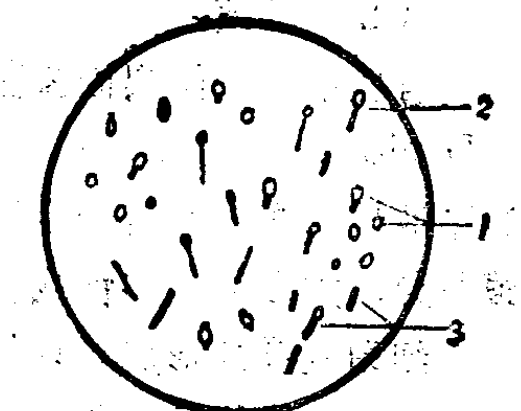


图 I—6 芽孢杆菌
(芽孢囊膨大)
1. 芽孢 2. 孢囊 3. 菌体

芽孢含水量低，壁厚而致密，对热、干燥、化学药剂的抵抗力很强，芽孢中还含有一种特殊的化学物质——吡啶二羧酸钙，更增加了芽孢对热的抵抗力，因此，高温灭菌的对象主要是细菌的芽孢。

芽孢壁厚，透性低，不易着色，必须用特殊染色法才能

使芽孢染上颜色；用普通染色法染色时，只有芽孢壁稍微着色，在光学显微镜下，芽孢只是一个未着色的空圈（见图 I—5、I—6）。

苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringiensis*）类的细菌（包括青虫菌、杀螟杆菌等），在形成芽孢的同时，在菌体的另一端形成一个晶体内含物，称为伴孢晶体，是一种蛋白质毒素，可以毒死鳞翅目昆虫，因此这类细菌被广泛用作杀虫剂。

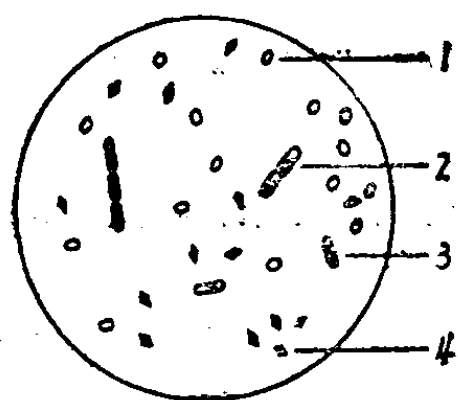


图 I—7 苏云金杆菌的芽孢和伴孢晶体

1. 芽孢 2. 孢囊 3. 菌体
4. 伴孢晶体

细菌以无性二均分裂方式进行繁殖，即一个细胞生长到一定阶段，可分裂成二个同样大小的子细胞。细菌的繁殖速度一般说来相当快，如大肠杆菌在条件适宜时，17分钟即可繁殖一代。

单个细菌的菌体或芽孢在固体培养基上繁殖，形成肉眼可见的群体即为菌落。各种细菌在一定的培养条件下，所形成的菌落具有一定的特征。

菌落特征对于菌种的识别、鉴定有一定意义。

与霉菌和放线菌比较，细菌的菌落比较湿润、粘稠，表面光滑，有的有皱折、有颜色等，一般不深入培养基，容易被挑起。

细菌在液体培养基中繁殖时，单个细胞均匀分散在培养基中，常使培养基呈现混浊。某些好气性细菌常在培养液表面生长繁殖并连成一片，即形成菌膜。

二、细菌形态的观察方法

由于细菌个体极小，菌体透明，在光学显微镜下不易观察其个体形态，必需借助于染色的方法使菌体着色，增加与背景的明暗对比，才能在光学显微镜下观察其个体形态和部份结构。至于细菌细胞的详细构造，则必需用电镜才能观察。

生物学染料一般分为酸性和碱性两大类。酸性染料易与细胞的碱性部分结合，碱性染料易与细胞的酸性部分结合。由于细菌细胞质内布满了酸性的核物质和异染粒，所以细菌染色一般用碱性染料。

按照所用染料种类的多少不同，可将染色法分为两大类，一类是单染色法，一类是复染色法。

（一）单染色法

单染色法又称普通染色法，是只用一种染料染色，适用于菌体一般形态的观察，但通常不能显示细胞构造，也不能鉴别细菌。

操作步骤如下：

1. 制备涂片

（1）取清洁无油的载玻片一块（先滴水检查，如有油迹，用纱布擦净。如玻片有油，则影响染色效果），在玻片中央滴一滴水（如用菌液，则不必加水），取少量牙垢或其它细菌培养物，与水充分混匀，制成混浊液，然后涂布成小片。

注意取菌要少，混匀后稍显混浊即可，否则影响观察。

取菌用的牙签、玻棒或接种环，用毕应立即在火焰上灼