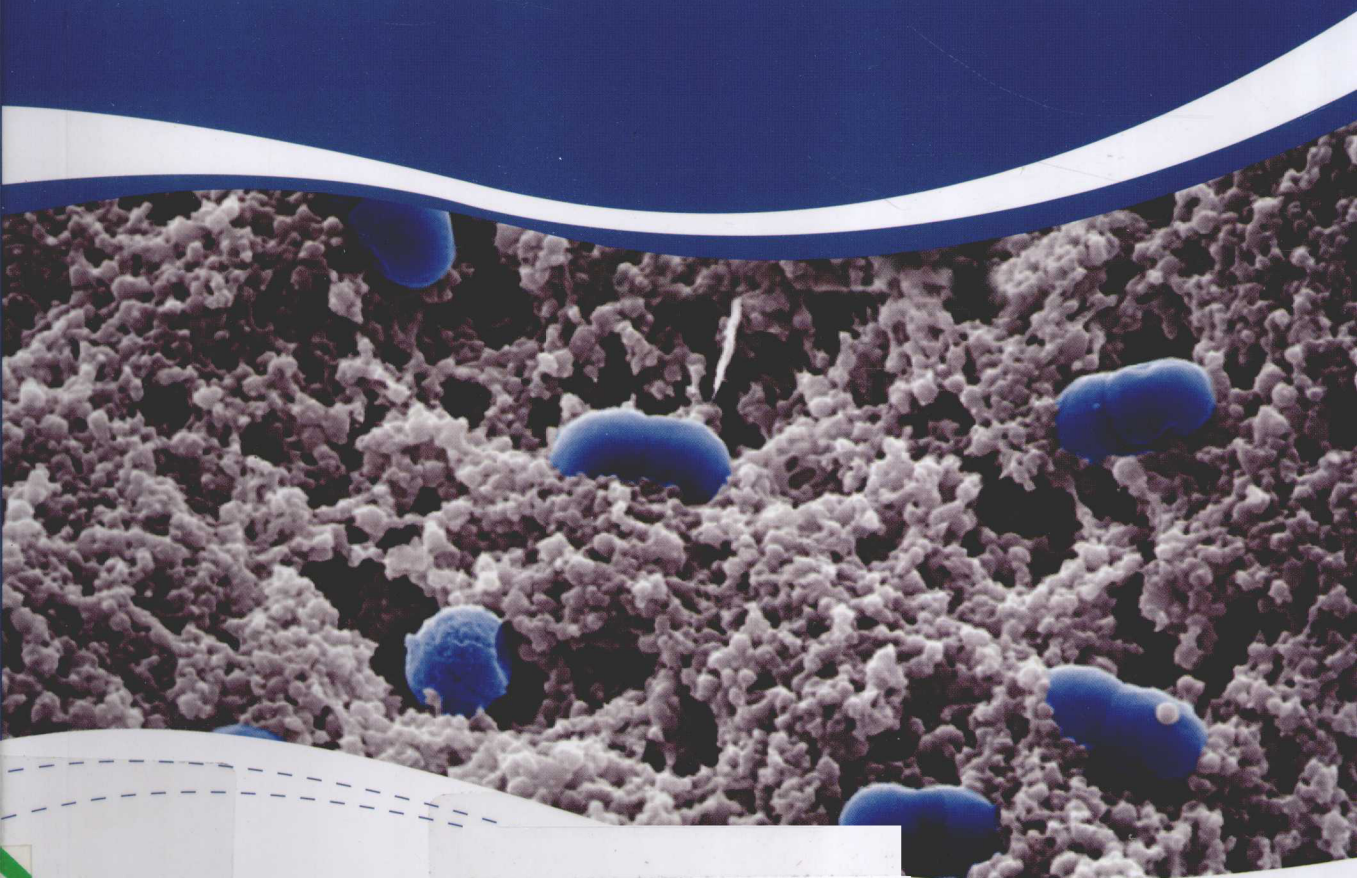


高等农林院校基础生物学系列实验教材

微生物学 实验教程

主编 咸洪泉 郭立忠

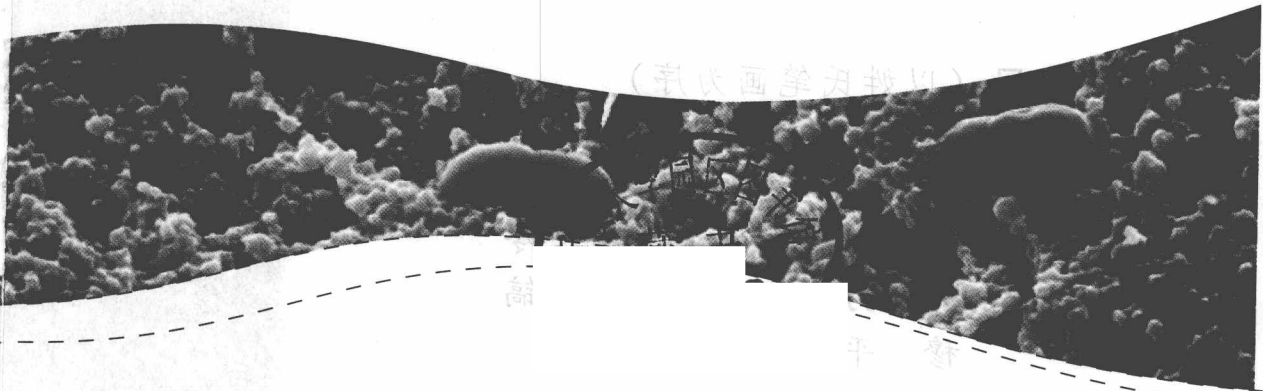


 高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

高等农林院校基础生物学系列实验教材

微生物学实验教程

Weishengwuxue Shiyan Jiaocheng



主 编 咸洪泉 郭立忠
副主编 李树文 袁洪水

编 者 (以姓氏笔画为序)

冯建英	李树文	吴韶菊	张丽青
赵培宝	咸洪泉	洪永聪	袁洪水
徐茁茁	郭立忠	燕淑海	



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

■ 内容提要

本书编写的中心思想是以基础实验为前提,进一步提高学生的综合素质,从而发挥学生的创造性、自主性。全书内容全面、系统,图文并茂,兼顾理论性、科学性、系统性和实用性,其内容涉及微生物在工业、农业、环保、医疗和食品等领域的应用。全书共分为三部分:第一部分,基础性实验的内容包括:微生物的形态、结构、营养、生长、选育保藏、生理生化以及免疫学试验等,主要使学生掌握基本的实验理论知识和操作技能;第二部分,综合性实验的内容包括:遗传物质的提取鉴定、水质检测、发酵的工艺流程以及免疫分析试验等,主要培养学生综合运用知识的能力;第三部分,研究性实验的内容包括:菌株选育和鉴定、基因表达以及发酵条件的优化等,着重培养学生在掌握基本理论和操作技能的基础上的创新能力。书后附有附录和参考文献,供读者查阅和参考。

本书适合高等院校生物科学与工程类、农学类、环境科学与工程类、食品科学与工程类以及药学类各专业学生学习使用,也可供相关专业人员查阅和参考。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验教程 / 咸洪泉, 郭立忠主编. —北京:
高等教育出版社, 2010.9

ISBN 978 - 7 - 04 - 030818 - 1

I. 微… II. ①咸… ②郭… III. 微生物学—实验
—高等学校—教材 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 170836 号

策划编辑 吴雪梅 李光跃

封面设计 张志奇

责任编辑 高新景

责任印制 陈伟光

出版发行 高等教育出版社

社 址 北京市西城区德外大街 4 号

邮政编码 100120

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司

印 刷 北京天来印务有限公司

开 本 787 × 1092 1/16

印 张 12.5

字 数 300 000

购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>

<http://www.hep.com.cn>

网上订购 <http://www.landaco.com>

<http://www.landaco.com.cn>

畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2010 年 9 月第 1 版

印 次 2010 年 9 月第 1 次印刷

定 价 22.80 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 30818-00

► 前 言

《微生物学实验教程》是在吸取各兄弟院校实验教材编写和教学经验基础上,结合近年来微生物学实验技术的发展前沿,由7所高校从事教学多年的教师撰写而成。针对当前实验教学需求,反映教学改革发展的方向,本书旨在加强学生动手能力、自主分析问题和解决问题的能力,在实验内容的更新、实验体系的系统性与与理论课教学的同步性等方面进行了精心编排。本书从培养学生的创造性、自主性出发,以学生为主体,以提高学生发现问题、分析问题和解决问题的能力为指导思想,将实验框架分为基础性实验、综合性实验和研究性实验3个部分,形成基础—综合—创新的梯级实验体系,内容涉及微生物的形态和结构、营养和培养基、代谢和发酵、生长和控制、遗传变异和基因表达、传染和免疫、生态和分类以及鉴定和应用等,共43个实验项目,各相关专业师生可根据自身教学任务和条件酌情选做。

本书的编著者均为多年教授微生物实验课程的优秀教师,编写具体分工是实验1、2、3由德州学院冯建英执笔,实验4、6、8、9、36、37、38由青岛农业大学李树文执笔,实验5、11、16、17、18、31、32由泰山医学院张丽青、徐英萍执笔,实验7、23、29、35由河北农业大学袁洪水执笔,实验10、15、20、22由青岛农业大学洪永聪执笔,实验12、24、26、33由临沂师范学院吴韶菊执笔,实验13、39由青岛农业大学郭立忠执笔,实验14、25、27、28、30由潍坊教育学院燕淑海执笔,实验19、40、41由青岛农业大学咸洪泉执笔,实验21、34、42、43由聊城大学赵培宝执笔。青岛农业大学李树文对全书的文字进行校订和修改。本书在编写过程中得到青岛农业大学和各兄弟院校领导和教师的大力支持和帮助,在此一并表示感谢。

本书附有附录和参考文献,供读者查阅和参考。本书适合高等院校生物科学与工程类、农学类、环境科学与工程类、食品科学与工程类以及药学类各专业学生学习使用,也可供相关专业人员查阅和参考。

由于编者水平有限,难免有错误和不足之处,恳请读者批评指正。

编 者

2010年8月

目 录

第一篇 基础性实验

实验 1	培养基的配制与灭菌	2
实验 2	微生物的分离、纯化与微生物的培养特征	7
实验 3	细菌的染色方法	11
实验 4	放线菌、酵母菌、霉菌形态观察	20
实验 5	微生物细胞大小的测定和显微镜直接计数	26
实验 6	稀释培养测数法(MPN)	31
实验 7	细菌生长曲线的测定	36
实验 8	细菌的生理生化试验(IMViC 与硫化氢试验)	39
实验 9	糖发酵与淀粉水解试验	42
实验 10	物理、化学因素对微生物的影响	45
实验 11	生长谱法测定微生物的营养需求	48
实验 12	微生物的物理、化学诱变	50
实验 13	微生物菌种保藏方法	53
实验 14	厌氧菌的分离和培养	60
实验 15	噬菌体的检查及其效价测定	64
实验 16	免疫血清的制备	67
实验 17	凝集反应	70
实验 18	琼脂双向扩散沉淀反应	73
实验 19	机械搅拌通风发酵罐的结构和基本操作技术	75

第二篇 综合性实验

实验 20	大肠杆菌质粒 DNA 的提取和电泳检测	86
实验 21	酵母 RNA 的提取及组分鉴定	89
实验 22	大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	91



实验 23	抗药性突变株的分离	94
实验 24	水中大肠菌群的测定	97
实验 25	水中生化需氧量(BOD)的测定	101
实验 26	酸乳的制作和乳酸生产菌的分离	107
实验 27	甜酒酿的制作	109
实验 28	葡萄酒的制作	112
实验 29	快速、简易的微生物检测技术	115
实验 30	酵母细胞的固定化与乙醇发酵	119
实验 31	对流免疫电泳试验	122
实验 32	酶联免疫吸附分析法(ELISA)	124

第三篇 研究性实验

实验 33	从土壤中分离、纯化、筛选产酶菌株	128
实验 34	酵母菌原生质体融合	131
实验 35	产氨基酸抗反馈调节突变株的筛选	133
实验 36	糖化酶的固体发酵和提取	136
实验 37	发酵培养基的正交试验设计	139
实验 38	发酵条件的响应面优化	146
实验 39	药用真菌多糖的提取	157
实验 40	细菌 16S rRNA 基因的扩增与克隆	160
实验 41	真菌的分子生物学鉴定	163
实验 42	外源基因的原核表达	169
实验 43	外源基因的真核表达	171
附录		175
I	染色液的配制	175
II	常用培养基的配制	178
III	常用试剂和溶液的配制	186
IV	微生物基因克隆表达常用试剂与培养基的配制	188
V	酵母原生质体融合实验用培养基及溶液的配制	190
参考文献		192

附录 常用培养基的配制

第一篇

基础性实验

期 間 錄

[illegible][illegible]

Blank lined paper for writing.

实验 I

培养基的配制与灭菌

一、目的要求

1. 掌握培养基的配制原理及几种常用培养基的配制方法。
2. 掌握高压蒸汽灭菌原理及普通培养基的灭菌方法。

二、实验原理

培养基是人工配制的,适合微生物生长繁殖或产生代谢产物的营养基质。由于微生物具有不同的营养类型,对营养物质的要求也各不相同,加之实验和研究的目的不同,所以培养基的种类很多,使用的原料也各有差异,但从营养角度分析,培养基中一般含有微生物生长所必需的碳源、能源、氮源、无机盐、生长因子及水分等。

牛肉膏蛋白胨培养基是一种应用广泛的细菌基础培养基。高氏 I 号培养基是分离和培养放线菌的合成培养基。马铃薯葡萄糖琼脂培养基,简称 PDA,主要用于真菌的培养,有时也用于植物病原细菌的培养。马丁氏培养基是用来分离真菌的选择性培养基。察氏培养基则主要用于培养霉菌进行形态观察。

在配制固体培养基时需要加入琼脂。琼脂是从石花菜等海藻中提取的胶体物质,是应用最广的凝固剂。琼脂的熔点为 $96\text{ }^{\circ}\text{C}$,凝固点为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

任何一种培养基一经制成就应及时彻底灭菌,以备使用。一般培养基的灭菌采用高压蒸汽灭菌。高压蒸汽灭菌基于水的沸点随着蒸汽压力的升高而升高的原理设计,是将待灭菌的物品放在一个密闭的加压灭菌锅内,通过加热,使灭菌锅的水沸腾而产生蒸汽,得到高于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度,导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。

三、器材与试剂

1. 材料与试剂

牛肉膏,蛋白胨,可溶性淀粉,马铃薯,葡萄糖,蔗糖,琼脂,NaOH, HCl, KNO_3 , NaCl, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaNO_3 , KCl, 孟加拉红,链霉素等。

2. 仪器

高压蒸汽灭菌锅,天平,电炉,试管,锥形瓶,烧杯,量筒,漏斗分装架,牛角匙,精密 pH 试纸,玻璃棒,纱布,棉花,线绳,牛皮纸或报纸等。

四、实验步骤

1. 常用培养基的配制

(1) 牛肉膏蛋白胨培养基

配方:牛肉浸膏 3 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,琼脂 15~20 g,水 1 000 mL,pH 7.0~7.2。

配制方法:将称好的牛肉浸膏和蛋白胨溶于水中,加入琼脂后加热至熔化,测定 pH,用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 调 pH 至 7.0~7.2,补充水分至所需总体积。

注意:操作过程中称量药品用的牛角匙不要混用,称完药品应及时盖紧瓶盖,特别是蛋白胨极易吸水,称量时动作要快;配制培养基使用的水,一般情况下可以选用自来水;熔化琼脂时,一般在下面垫以石棉网煮沸熔化,并以玻璃棒不断搅拌,以免琼脂粘锅、烧焦;调 pH 时要小心缓慢操作,尽量避免回调而带入过多的无机离子。

(2) 高氏 I 号培养基

配方:可溶性淀粉 20 g,NaCl 0.5 g,KNO₃ 1 g,K₂HPO₄·3H₂O 0.5 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,FeSO₄·7H₂O 0.01 g,琼脂 15~20 g,水 1 000 mL,pH 7.4~7.6。

配制方法:称取可溶性淀粉,放入小烧杯,用少量冷水调成糊状,再加入少于所需水量的沸水中,使其完全溶化。然后称取其他各成分依次逐一溶化。待所有药品完全溶解后,加入琼脂加热至溶化,调节 pH,补充水分至所需总体积。为防止沉淀生成,应用蒸馏水配制。

对于微量成分 FeSO₄·7H₂O,可先配成高浓度的贮备液后再加入,方法是先在 100 mL 水中加入 1 g 的 FeSO₄·7H₂O 配成 0.01 g/mL,再在 1 000 mL 培养基中加入 1 mL 的 0.01 g/mL 的贮备液即可。

(3) 马铃薯葡萄糖琼脂培养基

配方:马铃薯 200 g,葡萄糖(或蔗糖) 10~20 g,琼脂 15~20 g,水 1 000 mL,pH 自然。

配制方法:将马铃薯洗净、去皮,切成 1 cm³ 大小,天平称取后,放入约与总体积相等的水中煮沸 30 min,用 4 层纱布过滤,取汁液,加入琼脂加热至熔化,加葡萄糖搅溶,补充水分至所需总体积。

(4) 马丁氏培养基

配方:葡萄糖 10 g,蛋白胨 5 g,KH₂PO₄ 1 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,1% 孟加拉红水溶液 3.3 mL,琼脂 15~20 g,水 1 000 mL,pH 自然,1% 链霉素 3 mL。

配制方法:称取各成分,依次溶于水中。然后加入孟加拉红,混匀后,加入琼脂加热至熔化,补足水分到所需体积,灭菌后备用。使用之前将培养基熔化冷却至 45~50℃ 时加入链霉素,使每毫升培养基中含链霉素 30 μg。

孟加拉红和链霉素是细菌和放线菌的抑制剂,对真菌无抑制作用,从而达到分离真菌的目的。

注意:由于链霉素受热容易分解,所以需要在培养基灭菌之后添加,且添加时培养基的温度不得太高。

(5) 察氏琼脂培养基

配方:蔗糖 30 g, NaNO_3 2 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 g, KCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 琼脂 15~20 g, 水 1 000 mL, pH 自然。

配制方法:称取各成分,依次溶于水中。加入琼脂加热至熔化,补足水分至所需总体积。

2. 培养基的分装

根据不同需要,可将制好的培养基趁热分装入试管或锥形瓶中。分装试管时,取玻璃漏斗一个,装在铁架上,玻璃漏斗下连接一根乳胶管,乳胶管的另一端连接一细玻璃管,乳胶管上加一弹簧夹。操作时,用左手拿住空试管中部,并将漏斗下的玻璃管插入试管内,以右手拇指与食指开放弹簧夹,中指和无名指夹住玻璃管,使培养液直接流入试管内(图 1-1)。

固体培养基的分装量为管高度的 1/5;用锥形瓶分装培养基时,容量不宜超过容积的 1/2。装量过多,则培养基在灭菌时会因沸腾而污损棉塞。

注意:分装时不要将培养基沾到管口或瓶口上,以免沾湿棉塞而引起杂菌污染。

3. 加塞、捆扎

分装完毕后,需要用棉塞堵住管口或瓶口。加棉塞的主要目的是过滤空气,避免污染,并保证有良好的通气性能。

棉塞应采用普通新鲜、干燥的棉花制作,不要用脱脂棉,以免因脱脂棉吸水使棉塞无法使用。棉塞制作时根据管口或瓶口大小取适量棉花铺成近正方形,将一角往里折,使其略成五边形,然后从一侧往另一侧卷紧(图 1-2)。

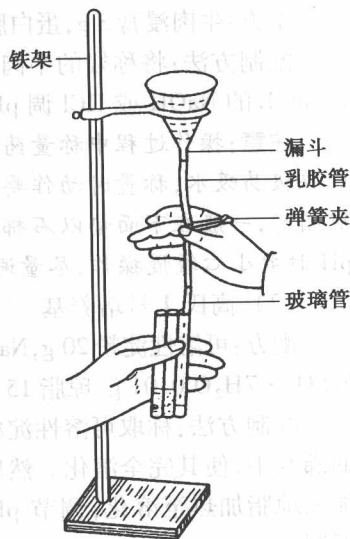


图 1-1 培养基的分装

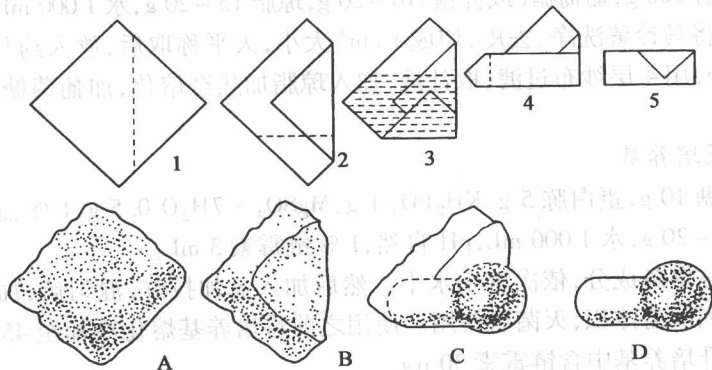


图 1-2 棉塞制作过程

制成的棉塞不要过紧或过松,塞好后,以手提起棉塞,以管、瓶不下落为合适。棉塞的 2/3 应在管内或瓶内,上端露出少许棉花便于拔取。

塞好棉塞的试管 7 支扎成一捆,由于棉塞外面容易附着灰尘及杂菌,且灭菌时容易凝结水汽,因此在灭菌前应用牛皮纸或报纸将试管口、锥形瓶口包起来;再贴上标签,注明培

培养基名称、日期、组别,准备灭菌。

4. 灭菌

灭菌锅结构如图 1-3。

(1) 加水:打开灭菌锅盖,向锅内加水,使水面与三角搁架相平为宜。

(2) 装料、加盖:装入待灭菌物品,加盖,将盖上的排气软管插入内层灭菌桶的排气槽内。采用对角式均匀拧紧锅盖上的螺栓,使蒸汽锅密闭,勿使漏气。

(3) 排气:通电加热,并同时打开排气阀,当有大量蒸汽排出时,维持 5 min 左右,使锅内冷空气完全排净。

注意:若排空气不彻底,会因灭菌锅内温度达不到预期温度而影响灭菌效果。

(4) 升压:待冷空气完全排尽后,关上排气阀,让锅内的温度随蒸汽压力增加而逐渐上升。

(5) 保压:当锅内蒸汽压力达到 0.103 MPa 时,蒸汽的温度升高到 121 ℃,维持 15 ~ 30 min。

(6) 降压:灭菌所需时间到后,切断电源,让灭菌锅内温度自然下降,当压力表的压力降至“0”时,打开排气阀,旋松螺栓,打开盖子,取出灭菌物品。

注意:如果过早打开排气阀,就会因锅内压力突然下降,使容器内的培养基由于内外压力不平衡而冲出试管口或锥形瓶,造成棉塞沾染培养基而发生污染。

5. 灭菌后的处理

试管培养基灭菌后,待冷却到 50 ~ 60 ℃,将试管棉塞端抬高一定高度,摆斜面,使培养基斜面长度为试管长度的 2/5 ~ 3/5 (图 1-4)。

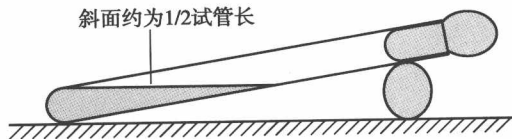


图 1-4 摆斜面

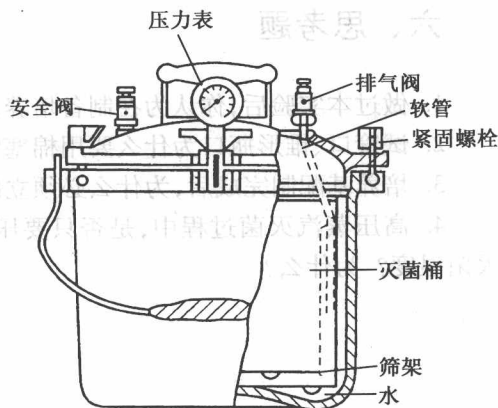


图 1-3 手提式灭菌锅结构

注意:摆斜面时若培养基温度过高,斜面上会呈现过多的冷凝水;冷凝过程中切勿移动试管。

锥形瓶中的培养基放置于冰箱,保存备用。

五、实验报告

1. 记录本实验所配制培养基的名称、配制过程,总结制备培养基的一般程序。

2. 试述高压蒸汽灭菌的过程及注意事项。

六、思考题

1. 做过本实验后,你认为在制备培养基时要注意些什么问题?
2. 试管口、锥形瓶口为什么要用棉塞?能否用木塞或橡皮塞代替?
3. 培养基配制完成后,为什么必须立即灭菌?已灭菌的培养基如何进行无菌检查?
4. 高压蒸汽灭菌过程中,是否只要压力表上的指针指到所需的压力时就能达到所需灭菌温度?为什么?

木塞

图 8-1 高压蒸汽灭菌锅结构示意图

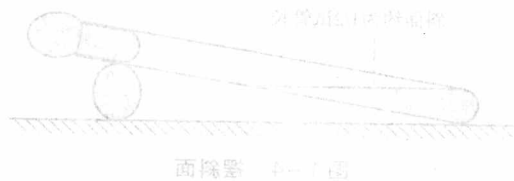


图 8-2 试管口棉塞示意图

实验 2

微生物的分离、纯化与微生物的培养特征

一、目的要求

1. 掌握倒平板的方法和几种常用的分离纯化微生物的基本操作技术。
2. 掌握常见微生物的培养方法,了解各大类微生物的菌落形态特征。
3. 建立无菌操作的概念,掌握无菌操作的基本环节。

二、实验原理

自然界中,不同种类的微生物绝大多数都是混杂生活在一起,当我们希望获得某一种微生物时,就必须从混杂的微生物类群中分离它。从混杂的微生物群体中获得只含有某一种或某一株微生物的过程称为微生物的分离与纯化。土壤是微生物生活的大本营,土壤微生物无论是数量还是种类都是极其丰富的。因此,土壤是发掘微生物资源的重要基地,可以从分离、纯化得到许多有价值的菌株。

本实验将采用不同的培养基,利用平板分离法从土壤中分离不同类型的微生物,其基本原理包括两个方面:

1. 选择适合于待分离微生物的生长条件,如营养成分、酸碱度、温度和氧等或加入某种抑制剂,从而淘汰一些不需要的微生物。
2. 通过稀释涂布平板法、平板划线法或稀释混合平板法等技术,经微生物培养后,挑取在固体培养基上生长形成的单个菌落而获得纯培养。

微生物的培养特征是指微生物在固体培养基上生长后所表现出的群体形态特征。不同的微生物有其固有的培养特征。细菌、放线菌和霉菌等每一类微生物在一定培养条件下形成的菌落各具有某些相对的特征。利用微生物的培养特征,可以作为其种类初步鉴定和识别纯培养是否被污染的参考。

三、器材与试剂

1. 材料与试剂

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,高氏 I 号琼脂培养基,马丁氏琼脂培养基,土样,10 % 酚水溶液,链霉素等。

2. 仪器

培养皿, 试管, 酒精灯, 玻璃涂棒, 移液管, 接种工具, 记号笔等。

四、实验步骤

(一) 微生物的分离、纯化

1. 稀释涂布平板法

(1) 制备土壤稀释液: 称取土样 10 g, 放入盛 90 mL 无菌水并带有玻璃珠的三角烧瓶中, 振摇约 20 min, 使土样与水充分混合, 将菌分散。用一支 1 mL 无菌移液管从中吸取 1 mL 土壤悬液注入盛有 9 mL 无菌水的试管中, 吹吸三次, 使充分混匀。然后再用一支 1 mL 无菌移液管从此试管中吸取 1 mL 注入另一盛有 9 mL 无菌水的试管中, 以此类推制成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 各种稀释度的土壤溶液 (图 1-5)。操作时注意每一个稀释度应更换一支新的灭菌移液管。

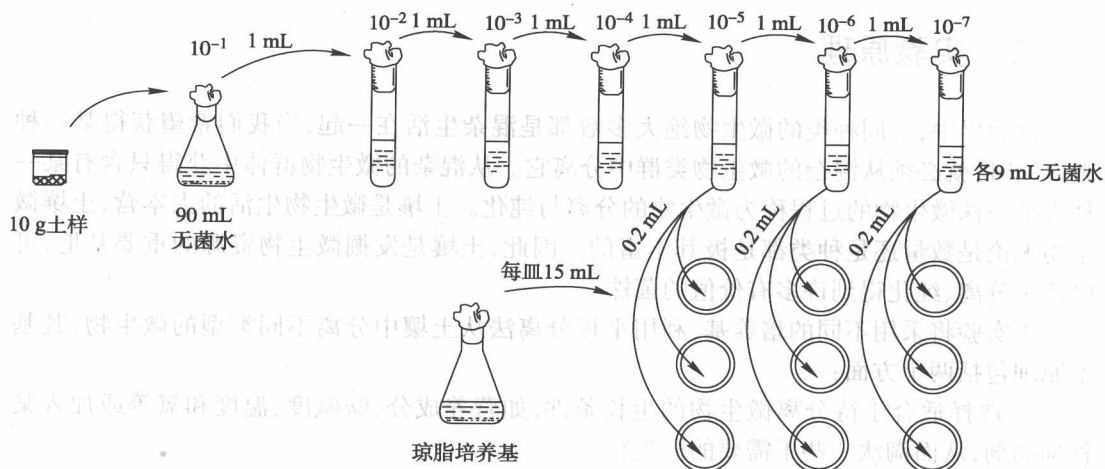


图 1-5 样品 10 倍系列稀释及平板分离

(2) 制备空白平板: 将已灭菌的牛肉膏蛋白胨培养基、高氏 I 号培养基、马丁氏培养基加热融化待冷至 $55 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 时, 高氏 I 号琼脂培养基中加入 10% 酚水溶液数滴, 马丁氏培养基中加入链霉素溶液 (终质量浓度为 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$), 混合均匀后分别倒平板, 每种培养基倒三皿, 并用记号笔标明培养基名称、土样编号和实验日期。

倒平板的方法: 左手拿培养皿置酒精灯火焰旁边, 右手拿锥形瓶底部, 用左手小指和手掌将锥形瓶口的棉塞拔下, 并握在手中, 灼烧瓶口片刻, 在酒精火焰附近将培养皿打开一小缝, 迅速倾入培养基约 15 mL, 平置、凝固即成。

(3) 涂布: 将上述每种培养基的三个平板底面分别用记号笔写上 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 三种稀释度, 然后用无菌移液管分别由相应浓度土壤稀释液中各吸取 0.1 或 0.2 mL, 小心地滴加在对应平板培养基表面中央位置。用无菌玻璃涂棒将菌悬液沿同心圆方向轻轻地向外扩展, 使之分布均匀, 见图 1-6。室温下静置 5 ~ 10 min, 使菌液浸入培养基。

(4) 培养:将琼脂平板翻转,使皿底朝上,倒置于培养箱培养。牛肉膏蛋白胨培养基平板在 37°C 下培养 2~3 d,高氏 I 号培养基平板和马丁氏培养基平板在 28°C 下培养 3~5 d,即可获得微生物的单菌落。

注意:培养皿要求倒置培养,目的是防止皿盖上的冷凝水打湿生长的菌落。

(5) 挑取菌落:分别挑取稀疏、孤立菌落中的少许细胞对应接种到上述三种培养基斜面上,分别置 28°C 或 37°C 培养。若发现有杂菌,需再一次进行分离、纯化,直到获得纯培养。

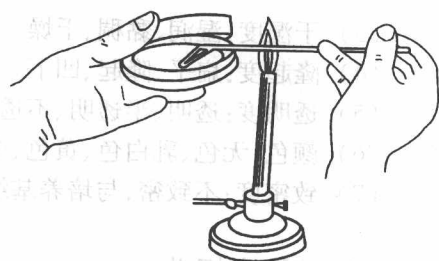


图 1-6 涂布平板示意图

2. 平板划线法

(1) 制备土壤稀释液:方法同稀释涂布平板法。

(2) 制备空白平板:方法同稀释涂布平板法。

(3) 划线:在近酒精灯火焰处,左手拿皿底,右手拿接种环,挑取上述 10^{-1} 浓度的土壤菌悬液一环在平板上划线。划线的方法很多,但无论采用哪种方法,其目的都是通过划线将样品在平板上进行稀释,最终能形成单个菌落。常用的划线方法有下列两种:一是平行划线法。即用接种环以无菌操作挑取土壤菌悬液一环,接种环与平板成 $30^{\circ}\sim 40^{\circ}$ 角,在平板培养基的一侧划 3~4 条平行线,然后转动培养皿约 70° 角,并将接种环上剩余物烧掉,待冷却后通过前一区再划 3~4 条平行线。之后再转动培养皿,以同样的方法重复划线(图 1-7A)。二是“之”字划线法。即在平板培养基上作“之”字形连续划线(图 1-7B)。

(4) 培养:方法同稀释涂布平板法。

(5) 挑取菌落:方法同稀释涂布平板法,一直到分离的微生物确认为纯培养为止。

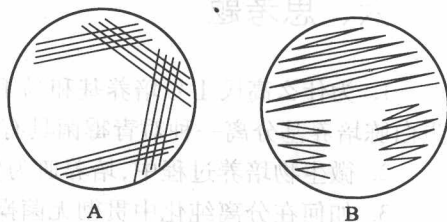


图 1-7 划线分离图

3. 稀释混合平板法

(1) 制备土壤稀释液:方法同稀释涂布平板法。

(2) 制备混合平板:用移液管取某一浓度土壤稀释液 1 mL,加入培养皿中,再倒入已灭菌并冷却至 50°C 左右的培养基 15 mL,在桌面上作顺时针或逆时针方向滑动,使充分混匀。待琼脂凝固后,制成含菌的混合平板。

注意:培养基的温度不得太高,否则会杀死土壤稀释液中的微生物。

(3) 培养:方法同稀释涂布平板法。

(4) 挑取菌落:方法同稀释涂布平板法。

(二) 微生物的培养特征

培养后,在不同的培养基上选择具有代表性的分离得很开的单菌落来观察。根据菌落的大小、形状、干湿情况、颜色、致密度等特征辨别不同的菌落类型。

菌落特征描述方法如下:

(1) 大小:大、中、小、针尖状。

(2) 形状:圆形、不规则等。

- (3) 干湿度:湿润、黏稠、干燥。
- (4) 隆起度:扁平、隆起、凹下。
- (5) 透明度:透明、半透明、不透明。
- (6) 颜色:无色、乳白色、黄色、金黄色、红色、粉红色、黑色、绿色、褐色等。
- (7) 致密度:不致密,与培养基结合不紧密;致密,与培养基结合紧密。

五、实验报告

1. 所做稀释涂布平板法和平板划线法是否较好地得到了单菌落?如果不是,请分析其原因并重做。

2. 在三种不同的培养基平板上分离得到哪些主要类群的微生物?分别观察细菌、放线菌和霉菌的生长情况和培养特征,并将所观察到的菌落特征记录于下表:

微生物种类	特征描述						
	大小	形状	干湿度	隆起度	透明度	颜色	致密度
细菌							
放线菌							
霉菌							

六、思考题

- 为什么高氏 I 号培养基和马丁氏培养基中要分别加入酚和链霉素?如果用牛肉膏蛋白胨培养基分离一种对青霉菌具有抗性的细菌,你认为应如何做?
- 微生物培养过程中,培养皿为什么要倒置?
- 如何在分离纯化中贯彻无菌操作的原则?
- 试设计一个实验,从土壤中分离酵母菌。

(冯建英)

实验 3

细菌的染色方法

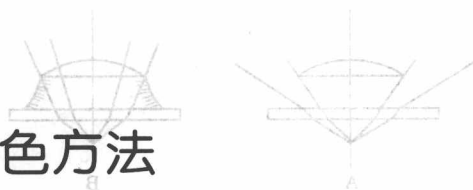


图 1-8 空气与香柏油界面处光的折射 (A) 空气与香柏油界面处光的折射 (B) 香柏油与香柏油界面处光的折射

一、细菌的简单染色及显微镜油镜的使用

(一) 目的要求

1. 掌握微生物制片和细菌简单染色的基本方法。
2. 掌握显微镜油镜的使用方法。
3. 观察细菌的基本形态, 巩固无菌操作技术。

(二) 实验原理

细菌的细胞小而透明, 在普通的光学显微镜下不易识别, 必须对它们进行染色, 经染色后的菌体与背景形成明显的色差, 便于更清楚地观察其形态和结构。

简单染色法是利用单一染料对细菌进行染色。常用碱性染料进行简单染色, 这是因为: 细菌蛋白质等电点较低, 当它生长于中性、碱性或弱酸性的溶液中时常带负电荷, 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而使细菌着色。常用作简单染色的染料有美蓝(亚甲蓝)、结晶紫、碱性复红等。此法操作简便, 适用于菌体一般形状和细菌排列的观察。

普通光学显微镜是一种精密的光学仪器。当前使用的显微镜都是由一套透镜组成的。其分辨率(可辨出两点间最小距离)公式如下:

$$D = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}}$$

式中, λ 为所用光源波长; α 为物镜镜口角; n 为玻片与物镜间介质的折射率。

根据上式, 可通过: ① 减低波长; ② 增大介质的折射率; ③ 加大镜口角来提高分辨率。紫外线作光源的显微镜和电子显微镜就是利用短光波来提高分辨率以检视较小的物体的。

当物镜与装片之间的介质为空气时, 由于空气($n=1.0$)与玻璃的折射率不同, 光线会发生折射, 不仅使进入物镜的光线减少, 降低了视野的照明度, 而且会减少镜口角(图 1-8A)。当以香柏油($n=1.52$)为介质时, 由于它的折射率与玻璃相近, 光线经过载玻片后可直接通过香柏油进入物镜而不发生折射(图 1-8B), 不仅增加了视野的照明度, 更重要的是通过增加镜口角达到提高分辨率的目的。