

第一章 绪 论

第一节 微生物及其特点

一、微生物的概念

微生物是一些形体微小、结构简单的低等生物。由于来源不一，因此实际上包含了许多类群。通常，我们把病毒、衣原体、支原体、立克次氏体、细菌、放线菌、酵母菌、霉菌、单细胞藻类、原生动物等都作为微生物来研究。在这些繁杂的类群中，有些微生物，例如细菌和酵母菌，是由单个细胞构成一个个体的。有些微生物尽管是由多细胞组成的，但由于细胞间的分工还很不完全，所以在结构上仍然是十分简单，例如有些霉菌。还有些不具备完整细胞结构的病毒，形式上更是简单，仅仅由核酸芯子和蛋白质外壳所组成。总之，微生物都是些简单的、原始的生命形式，包括了很多不同种类的低等生物。

尽管微生物的种类复杂、形态各异，但是它们有许多相近的生物学特性。同时，由于对它们的研究技术和培养方法也比较相似，所以习惯上把它们作为一群生物在微生物学中加以研究。

在发酵工业中，应用得比较多的微生物有细菌、放线菌、酵母菌和霉菌。因此，这几类微生物是工业微生物学研究的主要对象。另外，噬菌体是一类以微生物细胞为寄主的病毒。通常会危害细菌和放线菌的生长繁殖。而在新发展起来的基因工程中，噬菌体却又是运送核酸的有效载体。由于这一些原因，噬菌体也是工业微生物学研究的重要对象。

二、微生物的特点

微生物所具有的区别于其他生物的共同特点可以归纳为如下

几点:

1. 分布广

在自然界中,微生物的分布范围之广是任何其他生物所不能比拟的。可以说,凡是在有其他生物存在的环境中,就必定有微生物的踪迹。反之,在许多不利于或者没有其他生物生长的环境,却仍有微生物存在。沙漠、冰川、热泉、深海和沉积岩心等条件恶劣的环境都有微生物生存。

微生物的广泛存在,为人们利用微生物发展生产,提供了极其丰富的资源。

2. 种类多

微生物的种类繁多,目前已发现的微生物约有十万种以上。不同种类的微生物常常具有不同的代谢方式,它们几乎可以分解自然界中的各种有机物质,利用其他生物所不能利用的物质作为自己的营养,形成上千种代谢产物。发酵工业中,就利用具有各种不同代谢途径的微生物来生产各种产品,如酒精、酒类、丙酮、丁醇、抗生素、酶制剂、有机酸、维生素和氨基酸等。

3. 繁殖快

微生物具有惊人的繁殖速度。条件适宜时,细菌能在20~30min(分钟)内繁殖一代。生产味精的谷氨酸短杆菌从三角烧瓶培养扩大到50t(吨)的发酵罐,52h(小时)内细胞数目可以增加32亿倍。

4. 代谢能力强

由于微生物的表面积与容积的比值很大,便于与外界环境迅速地交换营养物质和废物,因此微生物具有快速处理的代谢能力。例如,一种乳酸杆菌,在一小时内产生的乳酸是它本身体重的1000~10000倍。在工业上,人们可以利用微生物的这一特点,在短时间内将原料转化成有用的产品。

5. 容易培养

微生物的生存能力很强,它们容易适应环境的变化。大多数

微生物利用简单的营养物质，即能在常温常压下生长。因此在人工控制的条件下培养微生物是比较容易的。此外，培养过程中所需的设备也比较简单。与其他生物相比，培养微生物不受地理、季节、气候等自然条件的严格限制，易于进行工业规模的管理。

6. 较易变异

微生物的结构主要为单细胞体制，或者是多细胞而细胞组织极少有分化的体制，比较简单。大多数微生物又具有单倍体*的生长阶段，遗传物质单一而不复杂。这样，一方面，微生物细胞内的遗传物质较容易受到环境因素的刺激，并在环境因素的影响下发生改变；另一方面，体制单纯的微生物细胞较容易在自然选择和人工选择的压力下，把这种改变传递给子代。由于微生物的繁殖速度较快，因此这些遗传物质的变化最后可能在短时间内导致遗传特性的改变，即产生出现变异的后代。微生物的这一特点使我们能够不断地提高生产用菌种的生产能力和适应能力。

微生物的这一系列显著的特点，决定了微生物在工业上的经济价值和应用潜力。

三、微生物在生物界中的地位

在早期的研究中，人们把居住在地球上的生物分为两大类：动物界和植物界。区别这两大类生物，主要是根据主动运动和进行光合作用的能力。但是，随着对微生物各个类群特征的认识的加深，仅仅把生物分成两界的见解就显得不能令人满意了。有一些鞭毛体既能运动，又能进行光合作用。也就是说，它们既有类似动物的特性，又有类似植物的特性。于是有人把它们归纳到动物界中，而另一些人则把它们归纳到植物界中。它们的地位成了分类学中的尖锐问题。

* 关于单倍体细胞，请参见本书酵母菌的细胞核部分。

在此以后，又产生了把生物分成三界和四界的学说以及把生物分成原核生物和真核生物两大类的学说。1969年，**华特柯 (Whittaker)** 提出了五界分类系统。他把形形色色的细胞生物分成：原核原生生物界、真核原生生物界、植物界、真菌界和动物界。见图1-1

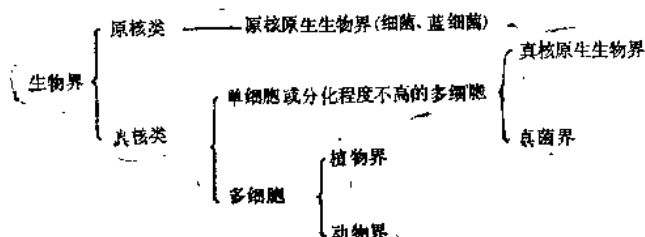


图 1-1 五界系统示意图

在五界分类系统中，细菌、放线菌、蓝细菌等原核生物属于原核原生生物。原生动物、粘菌和藻类都是真核生物，属于真核原生生物。酵母菌和霉菌属于真菌界。真菌界生物的营养方式既不同于能进行光合作用的植物，也不同于具有吞噬能力的动物，它们借助渗透作用从体外吸收营养。正是根据获取营养的方式不同这一点，华特柯另辟了一个真菌界，把真菌的分类地位从门提升为界。五界分类系统把微生物归纳在与动物、植物界相并列的原核界、原生界和真菌界中，这一点也可以从生物进化途径得到证明，见图1-2。地球上的生物是由非细胞的生命形式从低级到高级进化而来的，微生物在生命进化的阶梯上处于较低级的地位。就目前的资料来看，微生物中的原核原生生物、真核原生生物和真菌各有其不同的分支，并各自循不同的路线进化，它们是独立发展的生物群。

五界系统的生物都是细胞生物。然而还有一些无完整细胞结构的生命实体。例如病毒、类病毒等。1979年又有人在五界分类系统的基础上，将非细胞的生命实体列为病毒界，提出了六界系

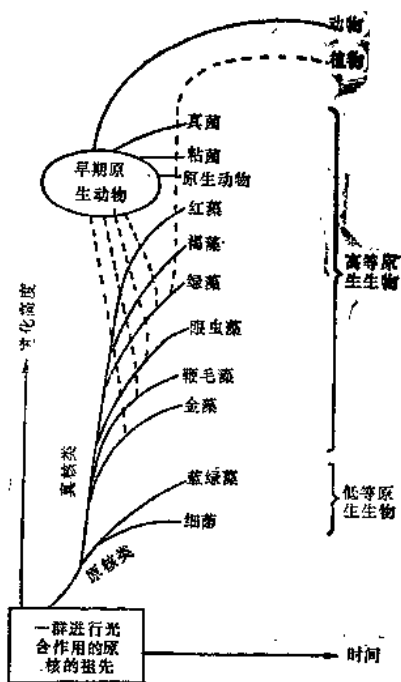


图 1-2 主要微生物类群的进化关系

统。五界系统和六界系统重新认识了微生物在生物界的地位，是目前较有影响的分类系统。

四、自然界中的微生物

(一) 微生物在自然界中的存在

地球表面存在的空气、水和土壤为生物有机体提供了维持生命的基本条件。微生物则广泛地分布在这个生存空间之中。土壤由于含有微生物生长所需要的水分和营养，又具有微生物生长所适宜的微环境，因此是微生物生长繁殖的天然基地。在1g(克)肥沃的表土中所含有的微生物的数目就可能高达数亿。任意一把土就是一个小的微生物世界，其中繁育着许多不同种类的微生物。

物。在各种水域中，也活跃着种类繁多的微生物，有能进行光合作用的单细胞藻类和光合细菌，有以有机物为营养的微生物，也有以无机物为营养的微生物。分布在上层水面的微生物大都在生长时需要氧气，而生活在水底的微生物则大都是厌氧的。在大气中的细菌、藻、酵母、真菌孢子和病毒都是外来的。微生物本身，或粘着在微小的尘土粒子上，能飞达几千米的高空。由于大气中不含可以直接被利用的物质和足够的水分，以维持微生物的生长和繁殖，所以大气并不是微生物的理想栖所。但是空气的流动和水在自然中的运动使得微生物得以广为散播，在地球的每个角落留下微生物的踪迹。

从更深一层的意义来说，广布在自然界中的微生物还是生物大家庭中的极其重要的成员。在漫长的生命进化的历史中，它们已经与地球上的其他生物结下了不解之缘。从宏观上看，组成生命物质的所有元素在自然界中的转化，构成了物质循环。可以这样认为，生物体内含有的重要元素都处于由非生命环境转入生物物质的组成，然后再回到非生命环境这样一个不断的循环之中。这个物质循环中的一些环节是由微生物来完成的。微生物的参与使它们的作用成为其他生物赖以生存的重要条件。例如，单细胞藻类、光合细菌利用太阳能把无机物质转化为有机物质，成为建造活细胞的材料。然后，这些光合生物可以被原生动动物或食草动物所利用，而食草动物又被食肉动物所捕食。当这些生物衰老死亡之后，它们的尸体又重新被细菌和真菌分解成无机物，归还到环境之中去。在这一系列的物质循环中，我们可以看到，微生物起着生物媒介物的作用，它们把地球上一切非生命组分与所有生物联系了起来。设想一下，如果缺少微生物的存在，那末地球上的氮、磷等重要元素都将被耗尽而无法再加利用，地球表面的动植物尸体就会堆积如山，生命则再也无法继续维持下去了。

(二) 微生物群落及群落中的关系

自然界中的微生物是杂处群居的。共同生活在同一个环境条

件下的许多种微生物组成了微生物群落。群落中的各种微生物的兴衰则随着环境条件的变化而演变。高度多样性的微生物通过一系列十分复杂的相互作用来维持群落的活力和平衡，使群落适应周围环境的变迁。其中，有一些微生物共存一处，互利互惠；有一些微生物相互竞争，相互对抗。我们把这一些关系归纳为互生、共生、寄生和拮抗（抗生）四大类。

1. 互生

这是广泛存在于两种微生物之间的相互关系。处于互生关系的两种微生物可以单独生活，但当它们共同生活在一起时，可以相互受益，共同生长。或者于一方有利，而对另一方无害。

例如，土壤中的固氮菌需要不含氮的有机物作为碳源和能源，但是不能直接利用土壤中大量存在的纤维素。而分解纤维素的微生物虽能分解纤维素，但分解后却有大量有机酸积累，对生长不利。当两者共同生活时，固氮菌可以利用有机酸作为自己的碳源和能源而大量生长，并进行固氮。有机酸被消耗后，分解纤维素的微生物的生长也就不会受到自己累积的代谢产物的抑制了。再如，纤维单胞菌属的细菌能把纤维素分解成葡萄糖，葡萄糖又可以作为酵母菌的营养基质。

2. 共生

互生关系发展到相互依赖、相互创造有利的营养和生活条件，甚至在生理上形成一定分工，相互依存，不易单独生活的程度，这时的相互关系被称为共生。

地衣是藻类和真菌的共生群体，生长在有机物含量稀少的岩石、墙壁和树干等地方。其中的藻类通过光合作用捕获太阳能制造有机物质。真菌则吸收水分和矿物营养。藻类和真菌相互交换营养，共同维持生长，在生理上是相互依存的。除此之外，在地衣中，真菌和藻类盘根错节，在形态上也形成了特殊的整体。

3. 寄生

一种微生物生长在另一种微生物体内，从中摄取营养，进行

生长繁殖，而相对一方在联合中得不到利益，或可能遭受损害，这样的关系被称为寄生。

噬菌体和细菌、放线菌的关系是典型的寄生关系。这里，噬菌体被称为寄生物，细菌和放线菌被称为寄主。脱离寄主后不能生存的寄生物称为专性寄生物。噬菌体侵入寄主细胞以后，利用寄主细胞的细胞机构和营养物来进行生命活动。

4. 拮抗

一种微生物在其生命活动过程中抑制其他微生物的生长繁殖，甚至杀死其他微生物的现象，称为拮抗。

拮抗作用可以通过以下几个途径来维持，

(1) 营养竞争和空间竞争。

(2) 以代谢产物改变生活环境，抑制不能适应环境的微生物。如乳酸细菌在旺盛繁殖时产生大量乳酸，降低环境 pH，从而抑制腐败细菌的生长。

(3) 分泌抗生素或其他毒素，杀死别的微生物。

微生物间的相互关系虽然大致归为这样四类，但这样的划分是有条件的，是通过一些具体的种类表现出来的，并不是每种微生物都与其他微生物有这四个方面的关系。

此外，微生物和其他生物之间的相互关系也可以归纳为上述四类。

第二节 微生物学与生物工程学

微生物学是研究微生物及其生命活动规律的学科。研究的内容涉及微生物的形态结构、分类鉴定、生理生化、生长繁殖、遗传变异、生态环境，以及微生物在工业、农业、医疗卫生、环境保护等各个领域中的应用。

人类对微生物的利用已有悠久的历史，在漫长的人类文明的发展过程中，不断地积累了应用微生物的丰富经验。公元前6000

年，古代巴比伦人已能用酵母酿造啤酒。公元前4000年，古埃及人利用酵母发酵面包。我国是一个文明古国，利用微生物进行谷物酿酒的历史，至少可以追溯到距今四千多年前的龙山文化时期。这是人类利用微生物的开端。当然，这时人类还没有认识大千世界中存在着的这些微小的生命。

16世纪，荷兰人列文虎克用自制的显微镜观察雨水、牙垢和腐败的有机物时，发现了其中的微小生物。这是人类第一次观察到微生物这种生命形式，是认识微生物的开始。这一发现为以后的微生物研究创造了条件。19世纪末，法国微生物学家巴斯德证明了发酵是由于微生物的作用，从而揭示了几千年来传统发酵的奥秘。巴斯德在解决酿酒生产等问题的同时，奠定了微生物生理学的基础。在此同时，德国微生物学家科赫等人创立了一套分离、培养、观察自然界中微生物的方法，改进了微生物的纯种培养技术。随着人类对微生物的认识逐渐深入，微生物学作为一门独立的学科，本身不断地成熟起来。理论的发展更进一步促进了生产实践的发展，这一时期的生物技术已经从凭借经验手段提高为凭借较为精确的物理、化学和遗传学的分析。但由于受到当时科技水平和生产力的限制，发酵工业还是以厌氧发酵和依赖生态优势的混合发酵为主的，生产设备相当简陋。

20世纪40年代后，随着深层通气培养、大罐无菌操作、无菌空气制备、中间无菌取样、产品分离纯化等技术的开发，抗生素发酵工业蓬勃兴起。到60年代，通过对微生物代谢的深入研究，人类开始利用代谢调控技术，来改变微生物的代谢方式，使微生物的代谢产物按照需要的方向过量积累。这导致了有机酸、氨基酸和酶制剂发酵工业的发展。至此，从微生物学实验室中获得的研究成果所形成的产业系统终于跻身于工业之林。

70年代初，以DNA重组技术为突破口，一举叩开了基因工程的大门。细胞融合技术也进入了实用阶段。各种生物反应器相继研究成功。传统的生物工艺在注入这些新技术后，以新的面貌

唤起了人们对近代生物工程学的关注。

生物工程学是应用生物科学和工程原理来加工生物材料，以提供我们所需产品或提供社会服务的一门综合性科学技术。也就是生物化学、生物学、微生物学和化学工程在工业加工、产品生产及环境方面的应用。近代生物工程学包括基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程等几个分支。基因工程和细胞工程都是按照预定设计，有计划地改变细胞遗传物质组成的手段。细胞工程还包括了细胞的组织培养。酶工程是把酶或细胞直接应用于化学工业的技术。基因工程和细胞工程的最后的目标的实现，以及酶工程系统的建立，往往要依靠发酵工程。而从目前来看，发酵工程又大都是以微生物为基本模式的。这说明了一个问题，古往今来，微生物在生物工程中的地位是举足轻重的。见图1-3。

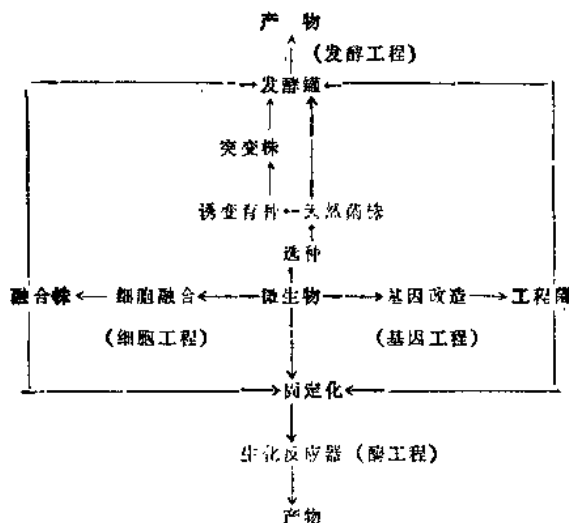


图 1-3 微生物与生物工程学的关系

微生物学是在人类长期的实践活动中形成并发展起来的。微生物学的发展反过来对生产实践又起着巨大的指导作用，推动了生物工程学的发展。那末，对于一个从事工业发酵生产的技术人

员来说,掌握微生物学的基本理论,详细地了解微生物的动态,其重要性是不言而喻的。在实际工作中,改变微生物细胞的遗传组成,获得新的生产菌种;研究细胞的生活环境,从而实现精确调节环境条件,达到工艺操作程序的最佳化,这些都是充分利用和发掘生物体系潜力,提高生产效率,扩大生产的可靠途径。

现在,生物工程已经发展成为一个新兴的工业部门。在医药工业方面,利用基因工程菌生产的人胰岛素、生长激素释放抑制素、幼畜腹泻疫苗、乙型肝炎疫苗已成功投产,可用于抗癌的干扰素和其他基因工程新药也将陆续问世。工业方面,正在研究利用生物催化来生产主要的商品和特殊的化学试剂,利用生物转化加工石油化学品。在食品工业方面,应用遗传工程已能生产18种氨基酸和大量的单细胞食用蛋白,利用微生物酶来加工食品的研究也正受到重视。在能源工业方面,目前正在研究利用再生资源作为能源,例如,利用纤维素和半纤维素生产乙醇,利用发酵工厂废弃物生产沼气等等。总之,生物工程的发展将在解决能源、防止污染、增产粮食、提供新产品、新食品、新药品和新技术等一系列问题中显示出强大的生命力,在国民经济中发挥巨大的作用。

生物工程为我们指出了令人振奋的前景,作为生物工程学的基础的微生物学也将获得蓬勃的发展。

第三节 观察微生物的基本方法

微生物的形体微小,必须借助显微镜和其他一些技术手段才能加以仔细观察,深入研究。

一、普通光学显微镜

普通光学显微镜是一种直接探索微观世界的工具,在微生物学的研究工作中被广为采用。

光学显微镜有两组透镜。位于被观察物一端的透镜叫物镜。靠近眼睛的透镜叫目镜。物镜把被观察的物体放大一次，所成的象投射到目镜上，在那里被第二次放大。见图1-4。由于显微镜的光学系统将物体作了两次放大，所以光学显微镜的总放大率是它的物镜和目镜的放大率的乘积。例如，使用放大率为 $40\times$ 的物镜和放大率为 $16\times$ 的目镜，则总放大率为640倍。

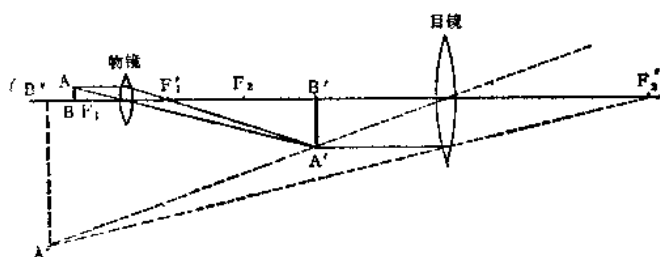


图 1-4 普通光学显微镜的光学原理示意图

显微镜的性能良好与否，不仅决定于放大率，还与物象观察时的明晰程度有关。明晰程度包括显微镜的清晰力和分辨力。

显微镜的清晰力，是指透镜显示物体的能力。使用单一透镜放大的物象常不能完全显示出物体原有的形状和颜色。由于凸形透镜的中心和边缘厚薄不一，光线透过时，因折射率不同而不能集合在一个焦点上，所以会产生形状失真的现象，称为球面象差。另外，白光通过透镜时，会被分解成不同的颜色，在视野的物象周围产生彩色的环纹，造成颜色的失真，称为色差。为了提高象的质量，通常用几种不同球面的、光学特性不同的玻璃制成透镜，并由这些透镜组合成透镜组。采用透镜组作为显微镜的物镜或目镜，就可以部分消除象差和色差，提高显微镜的清晰力。

显微镜的分辨力是指显微镜对所观察的物体上很接近的两点的区分能力。很显然，使用高分辨力的显微镜对于观察细微结构是特别有利的。

分辨力用能够辨析的两点之间的最小距离(R)来表示。距

离越小，显微镜的分辨力越高。

分辨距离 (R) 由下式决定。

$$R = \frac{0.61\lambda}{n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}} \quad (1-1)$$

式中的 λ 是照射光源的波长。

α 为物镜光轴上物点发出的光线投射到物镜前透镜边缘的最大夹角，称为镜口角。见图 1-5。

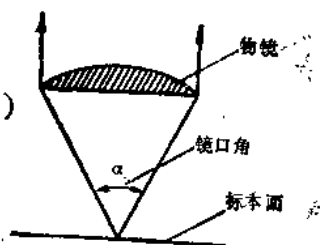


图 1-5 光线射入物镜的镜口角

n 为介质的折射率。 $n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}$ 通常也称作数值孔径 (NA)，它表明物镜的性能。在一定限度内，NA 值越大，分辨距离越小，显微镜的分辨力越高。分辨力的单位与波长的单位相同。

由式 1-1，我们还可以推断，使用波长比可见光较短的紫外线作为显微镜的光源，能够提高分辨力。使用油浸系透镜时，物镜浸没在折射率比空气较高的镜油中，也可以获得比干燥系透镜较大的分辨力。

但是，光学显微镜受到所使用的光源波长及物镜的限制，分辨力的增加是有限的。根据计算，光学显微镜的最大分辨力约为 $0.2\mu\text{m}$ 。在分辨力不提高的情况下，单纯地增加放大率，只能增加物象的大小，而不能提高其精微程度，叫做空虚放大。在一般情况下，有效的放大率应在物镜数值孔径的 500 倍至 1000 倍之间。

二、其他显微镜简介

1. 暗视野显微镜和相差显微镜

在光学显微镜下观察一个生活的微生物细胞，其观察效果的好坏要决定于生活细胞与周围环境之间的反差。反差是光线在亮度上的差别。细胞与环境的反差是光线在透过溶液环境介质和细胞时，由于溶液和细胞对光线的吸收、折射情况不同所造成的。

但由于生活细胞与周围介质之间的反差很小，所以较难使用普通光学显微镜直接观察。经过改进，暗视野显微镜和相差显微镜都可以用来强化反差，便于直接观察生活细胞。

在普通的光学显微镜上装配上一个中间遮暗的聚光器，就成了暗视野显微镜。由于聚光器中间遮暗，光线不是直接通过聚光镜上升，所以观察到的视野是暗的。光线从聚光镜的边缘成斜角反射，集中于标本上，使菌体发出亮光，并反射到物镜内，其他的光线则并不射入物镜。因此，在暗视野的衬托下，菌体会显得格外清晰。见图1-6。

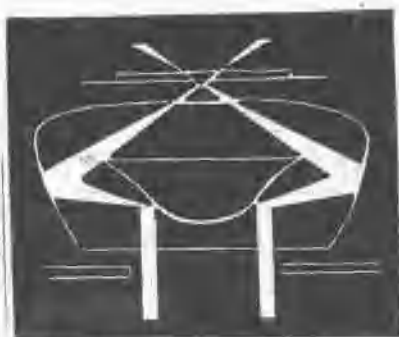


图 1-6 暗视野显微镜光路图

相差显微镜具有特殊的聚光镜和相差物镜。相差物镜使光波通过物体后所产生的微小的、人眼所不能感知的波的滞后转变为光强度的差别，从而利用细胞与周围介质之间的微小差别来造成具有高度反差的影象。因此相差显微镜也可用来观察生活的、未经染色的微生物细胞。

2. 电子显微镜

电子显微镜利用电子束作为显微镜放大的媒体。这样，电子束即相当于光学显微镜中的可见光。由于电子束波长极短，只有可见光波的十万分之一，因此，电子显微镜就具有比普通光学显微镜高得多的分辨力。同时，因而也可以具有高得多的有效放大

率。

电磁场对于电子束的作用和透镜对于光束在某些方面是很相象的。电子经过电子显微镜时要穿过一系列电磁镜，使标本最终在屏幕上形成放大的物象。电磁镜有许多级，电子显微镜的总放大率是多级电磁镜放大倍数的乘积。高度放大的电子显微镜，其放大倍数可达百万倍以上。

电子显微镜可以用来观察病毒颗粒、蛋白质颗粒和细胞的微小构造。但它不能观察活的微生物。有时，还必须把标本制成极薄的切片（100nm以下）。

三、制片技术

在显微镜下观察微生物，必须以适当的方法制成标本，标本一般制作在载玻片上。

1. 涂片法

在干净的载玻片中央加一滴蒸馏水，用灭菌的接种环在固体培养物表面取少许菌体，放在载玻片上，与水混合涂成直径约1 cm的均匀薄层，即成涂片。

如果待观察的微生物被培养在液体培养基中，则只须将一滴适当稀释的含菌悬液直接加在载玻片中央即可。

涂片经自然干燥或加温干燥后，进行固定。如采用加温固定，即让涂片在酒精灯火焰上快速通过数次。固定后，可根据需要进行染色和镜检。

2. 压滴法

在载玻片中央滴加含菌悬液，或加一滴蒸馏水后用灭菌接种针加入少量欲观察的菌体，使菌体均匀分布在



图 1-7 加盖玻片的方法

蒸馏水中（不要涂开）。取一洁净盖玻片，先把盖玻片的一端放在载玻片上液滴的边缘，再慢慢往下压盖。压盖时，勿使液滴外

溢，同时要避免气泡产生。盖玻片紧贴在载玻片上后，就可以进行镜检。见图1-7。

有时为了便于检查，可用染色剂来代替蒸馏水。

3. 悬滴法

把要观察的含菌悬液滴在盖玻片上，然后将盖玻片翻转过来，放置在凹孔载玻片上，使液滴悬挂在凹孔室内，即可观察。

见图1-8。

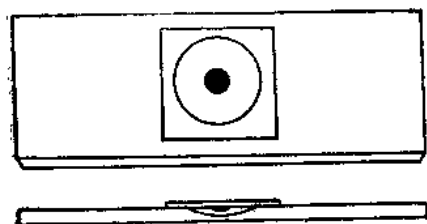


图 1-8 悬滴法

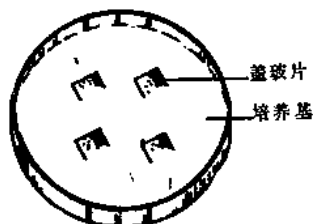


图 1-9 插片法

4. 转移法

这是一类利用特殊手段直接将被观察的材料转移到载玻片上去的制片方法。常采用的有插片法、压片法和透明薄膜培养法等。

(1) 插片法 将制备好的培养基倒入培养皿中。待凝固后，用无菌镊子取盖玻片以 45° 角斜插入培养基，插片深度以插入培养基厚度 $1/2$ 为宜。见图1-9。把欲观察的材料接种于盖玻片和培养基的交界处。将培养皿置恒温箱培养。观察时用镊子取出盖玻片，背面用洁净棉花擦净，即可镜检。还可以将盖玻片放在滴有染色液的载玻片上观察。

(2) 压片法 用接种铲挖取斜面或平皿培养物（带一小块培养基），将培养物对准干净的载玻片轻轻一压，不要移动。将载玻片上的印痕固定后，就可以进行染色和观察了。

也可以用洁净盖玻片放在平皿培养物表面轻轻一压，然后将带有印痕的盖玻片压盖在滴有染色液的载玻片上观察。

(3) 透明薄膜培养法 将小块经灭菌的玻璃纸平铺在固体培养基表面。在玻璃纸上点种欲观察的微生物，保温培养。由于可溶性的营养物质能够透过玻璃纸，因此微生物能在玻璃纸上生长。观察时，取出玻璃纸，贴在洁净的载玻片上即可。

四、染色技术

染色是强化细胞或细胞组分与周围环境之间的反差，便于利用普通光学显微镜来观察微生物细胞的简捷方法。

(一) 染色的基本原理

染色时使用染色剂。染色剂通过渗透、吸附、吸收和毛细作用等方式渗入细胞。当细胞物质所带电荷与染色剂所带电荷相反时，染色剂就与该类细胞物质结合，使其着色。染色剂与细胞或细胞组分的选择性结合，在细胞与环境介质之间，或在细胞各组分之间造成了明显的差别，从而显示了细胞的内部构造与化学性质。

由于染色过程包含了物理作用和化学作用，因此染色要受到细胞通透性、环境温度、pH等因素的影响。

(二) 染色剂的种类

微生物学中使用的染色剂大多是苯的衍生物，为了使它们易于电离，带有一定的电荷，而可与相应物质结合，通常把它们制成盐类。

按照染色剂电离后，其主要助色部分所带电荷的性质，我们把染色剂分成酸性、碱性和中性等三类。

1. 酸性染色剂

这类染色剂电离后，其主要助色部分为阴离子，能和带正电荷的细胞成分，如多种蛋白质等结合。常用的酸性染色剂有酸性复红、伊红、刚果红和苦味酸等。

2. 碱性染色剂

电离后，其主要助色部分是阳离子的染色剂为碱性染色剂。