

# 微生物学实验指导

微生物学实验指导编写组

淮阴师范学院  
生物学实验教学中心  
淮安 2004

## 目 录

微生物学实验课程简介	1
------------	---

### 第一部分 基础实验

实验 1 培养基的配制	3
实验 2 消毒和灭菌	7
实验 3 土壤的稀释分离、纯化及无菌操作技术	10
实验 4 微生物菌落的观察	14
实验 5 显微镜油浸系物镜的使用	17
实验 6 细菌形态的观察	21
实验 7 细菌单染色法及口腔微生物的观察	24
实验 8 细菌的革兰氏染色	27
实验 9 细菌鞭毛染色及其运动的观察	29
实验 10 细菌芽孢、荚膜的染色及观察	32
实验 11 支原体、衣原体的形态观察	34
实验 12 放线菌的形态观察	36
实验 13 酵母菌的形态观察	39
实验 14 霉菌的形态观察	42
实验 15 细菌大小的测定	45
实验 16 细菌数目的测定	48
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)	52

### 第二部分 应用性实验部分

实验 18 酒精发酵及糯米甜酒的酿制	56
实验 19 抗生素抗菌谱及抗生素的抗药性测定	58
实验 20 微生物菌种保藏	61

### 第三部分 综合性实验和研究性实验

实验 21 食用菌的抑菌实验·····	66
实验 22 酸乳的制作和酸乳生产菌的分离实验·····	68
实验 23 泡菜的制作以及乳酸菌的分离·····	69
实验 24 表面活性剂的降解菌的筛选·····	72
实验 25 蛋白酶生产菌的筛选与鉴定·····	74
实验 26 活性污泥中微生物的纯系分离·····	76
实验 27 PDA 培养基的微波灭菌研究·····	78
实验 28 蛋白酶生产菌的产酶条件研究·····	80
实验 29 松菇母种培养基的研究·····	82

### 第四部分 微生物实验技能的测评

基本实验技能的检测·····	84
实验设计及实施能力的测评·····	86
后记·····	88

## 《微生物学实验》课程简介

适用专业 生物技术、生物科学

学 时 46

学 分 2.5

课程性质 必修

预修课程 生物化学、化学、  
植物学、动物学

### 一、课程性质、地位和作用

微生物学实验是生物科学和生物技术专业的一门专业基础课程，是一门独立的实验课程，同时也是为了配合微生物学的教学而开设的。实验内容分为基础实验部分、应用性实验部分、综合性实验部分和研究性实验部分。实验过程中要求学生首先要掌握微生物学科实验的基本技术和技能，实验手册中基础实验部分是学生必须掌握的内容，在学生掌握了学科的基本实验技能后，综合性实验是必选的实验部分，该项实验内容旨在培养学生的综合性实验能力，要求学生以实验小组为单位，可参阅实验手册或相关资料，自己选定或自行设计出两个综合性实验方案，并完成其实验设计。研究性实验部分为选做，这是为部分学有余力的学生提供的。我们希望通过本实验的教学，培养学生主动性和探究性学习的能力。

### 二、实验内容选编原则与要求

微生物学实验教学内容选编原则与要求是，根据生物科学和生物技术专业人才的培养目标所需要的基本理论和基本技能的要求，根据本课程的教学性质、条件和教学实践而制定的。既要涵盖微生物学的基本实验技术，也要体现现代微生物学发展的新方法、新技术。全书所选实验项目分为四个部分，第一、二部分为基础性实验和应用性实验，包括显微技术、微生物的观察、纯培养技术、微生物的分离和纯化技术、细菌纯培养的常规生理生化实验和应用微生物实验等内容，要求学生能够掌握基本的实验操作技能。第三部分为综合性实验，提供了六个供选的参考实验，采用开放实验室的方法，为学生提供一个实验平台。第四部分是研究性实验，采用了实验教学与科研课题相结合的新模式，选编了3个实验，要求学生根据所掌握的理论基础和实验技能，能够独立设计实验。

### 三、教学安排与时数

本实验课程在二年级下学期开设,学生可从基础性实验项目(每一实验为3学时)中任选10项(学时=30),从综合性实验项目中任选2项(学时 $\geq$ 16),总计 $\geq$ 46学时,2.5学分。

#### 四. 考核方法与要求

##### (一) 基础性实验部分

1. 平时成绩: 包括出勤、实验操作, 实验效果、讨论情况等, 占 30%
2. 报告成绩: 实验报告等, 占 30%
3. 考试成绩: 占 40%
4. 综合考核成绩: 平时成绩+设计成绩+报告成绩+考试成绩

##### (二) 综合性实验部分

1. 平时成绩: 包括出勤、实验操作, 实验效果、讨论情况等, 占 30%
2. 设计成绩: 提交实验设计报告等, 占 30%
3. 报告成绩: 实验报告和实验产物等, 占 40%
4. 综合考核成绩: 平时成绩+设计成绩+报告成绩+考试成绩

##### (三) 研究性实验部分

1. 选做该类实验的同学可不选综合性实验项目, 成绩评定参照综合性实验部分。
2. 实验报告要求以论文形式撰写。

**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、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

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 1000mL, 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，此步可省略。

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面造成污染。

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内一半为宜。半固体培养基以试管高度的  $1/4$  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, 棉塞制作方法则图 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透气的作用。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透气, 则可用 8 层纱布制成通气塞。有时也可用试管帽或塑料盖代替棉塞。

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  $121.3^{\circ}\text{C}$  湿热灭菌 20min。如因特殊情况没能及时灭菌, 则应放入冰箱内暂时保存。

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, 使斜面长度不超过试管总长的一半。

10 无菌检查 将灭菌的培养基放入  $37^{\circ}\text{C}$  温箱中培养 24-48h, 无菌生长时可以使用, 或放置在冰箱或清洁的橱内, 备用。

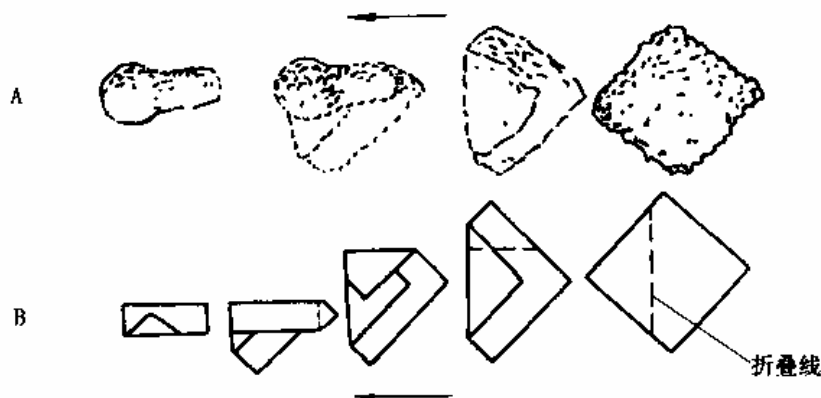


图 1-1 试管棉塞的制作

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,  $\text{KNO}_3$  1g,  $\text{NaCl}$  0.5g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{k}_2\text{S}_0_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1g, 琼脂 15—20g, 水 1000ml, pH 7.4—7.6.

1. 称量和溶解 经计算后称量, 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 1000ml 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:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g, 蛋白胨 5g, 葡萄糖 10g, 琼脂 15—20g, 水 1000ml, 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 1000ml 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 1000mL 培养基中加 1% 链霉素 0.3mL, 使每毫升培养基中含链霉素 30ug。

## 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。

#### (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，以免冷凝水沾湿棉塞。
3. 加压 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。

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，表示已停止加温。
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 0.1 $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.3 $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$  等)，过滤细菌常用 0.45  $\mu\text{m}$  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)蔡氏过滤器：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—5  $\mu\text{m}$ )和 6 号(孔径小于 2  $\mu\text{m}$ )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% $\text{KNO}_3$  的浓硫酸中 24h，再用蒸馏水抽洗数次。在抽洗液中加入数滴 $\text{BaCl}_2$  液，至不出现 $\text{BaSO}_4$  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。

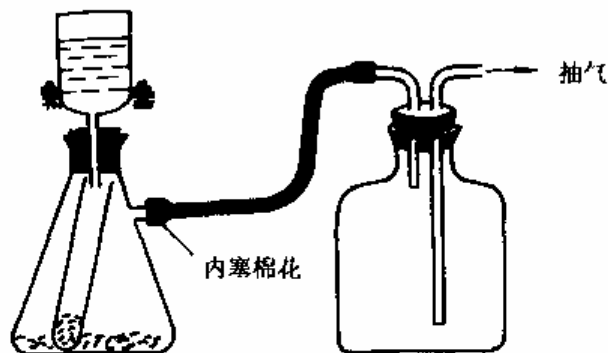


图 2-1 过滤装置

(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，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)。
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落?并要在放净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(*Protues 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, 495mL 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 的无菌移液管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1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 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 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  $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$  两管稀释液各 1mL，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  $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$  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。在溶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。

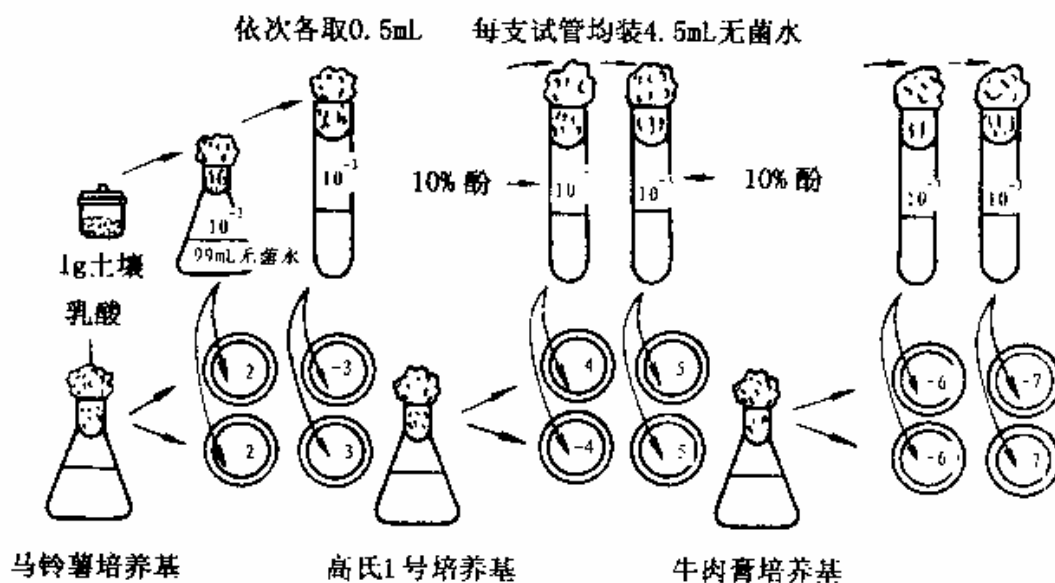


图 3-1 稀释法分离土壤微生物操作过程图解

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  $28^{\circ}\text{C}$ — $30^{\circ}\text{C}$  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，用于进一步分离纯化或直接转接斜面。

## (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  $50^{\circ}\text{C}$ )，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。

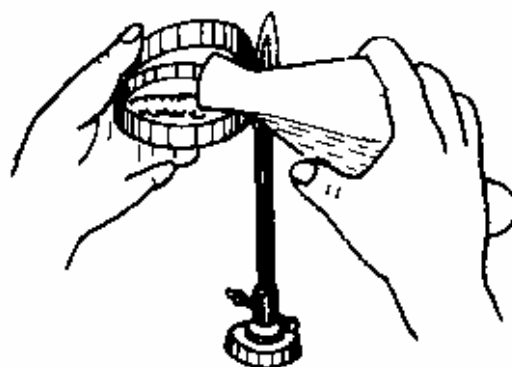


图 3-2 倒平板的方法

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，把待接菌种接入以上新鲜培养基斜面中。

(2) 接种的方法是，用接种针沾取少量待接菌种，然后在新鲜培养基面上“之”字划线，方向是从下部开始，一直到上部。

(3) 接种后 30℃ 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。

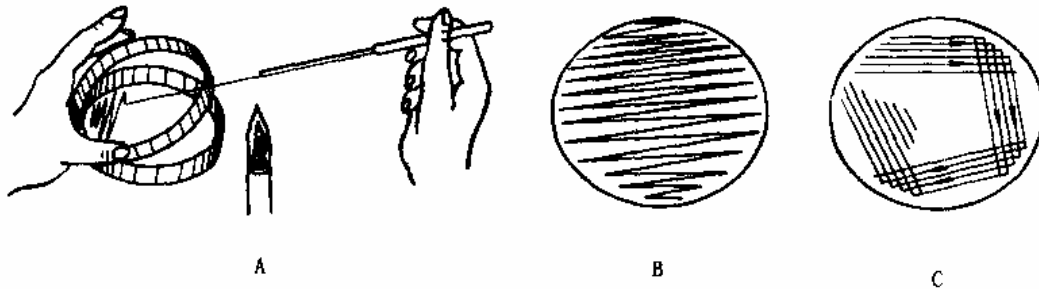


图 3-3 平板划线方法示意图

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。

#### 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菌种，然后从柱状培养基的中心穿入其底



图 3-4 斜面接种(A)及穿刺接种(B)示意图

部(但不要穿透)、然席沿原刺人路线抽出接种针。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。

#### 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，故从土壤个分离细菌时，要取较高的稀释度，否则菌落达成一片不能计数。
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：

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

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。
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(*Cantropicalis 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*) 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，使含一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。



七、问题和思考

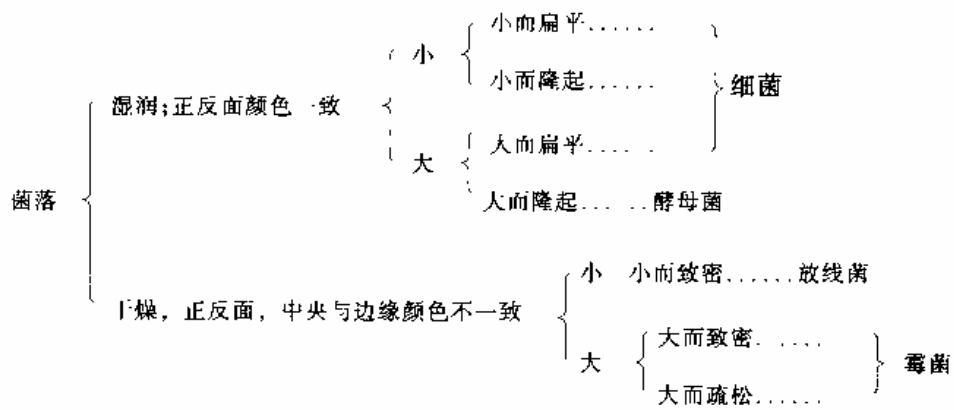
1. 试比较细菌、放线菌、酵母菌和霉菌菌落形态的差异?
2. 设计一个实验, 按测实验室空气环境中的微生物类别?

参考书目

1. 范秀容, 李广武, 沈萨. 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

注:

四大类微生物菌落的识别要点如下:



对于一些难区别的菌落还应借助显微镜来观察其细胞形态以进一步作出正确的判断。

## 实验5 显微镜油浸系物镜的使用

### 一、实验目的和内容

目的：复习显微镜低倍镜和高倍镜的使用技术，了解油浸系物镜的基本原理，掌握油浸的使用方法。

内容：

1. 学习油浸系物镜的使用方法。
2. 用油镜观察枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌染色装片。

### 二、实验材料和用具

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的染色装片。

香柏油、二甲苯、显微镜、擦镜纸。

### 三、操作步骤

#### (一) 观察前的准备

1. 将显微镜置于平稳的实验台上，镜座距实验台边沿约为4cm。坐正，练习用左眼观察。
2. 调节光源：将低倍物镜转到工作位置，把光圈完全打开，聚光器升至与载物台相距约1mm左右。转动反光镜采集光源，光线较强的天然光源宜用平面镜，光线较弱的天然光源或人工光源宜用凹面镜，对光至视野内均匀明亮为止。观察染色装片时，光线宜强；观察未染色装片时，光线不宜太强。

#### (二) 低倍镜观察染色装片

首先上升镜筒，将枯草芽孢杆菌染色装片置于载物台上，用标本夹夹住，将观察位置移至物镜正下方，物镜降至距装片0.5cm处，适当缩小光圈，然后两眼从目镜观察，转动粗调节器使物镜逐渐上升(或使镜台下降)至发现物像时，改用细调节器调节到物像清楚为止。移动装片，把合适的观察部分移至视野中心。

#### (三) 高倍镜观察

眼睛离开目镜从侧面观察，旋转转换器，将高倍镜转至正下方，注意避免镜头与玻片相撞。再用目镜观察，仔细调节光圈，使光线的明亮度适宜。用细调节器校正焦距使物镜清晰为止。将最适宜观察部分移至视野中心，绘图。不要移动装片位置，准备用油镜观察。

#### (四) 油镜观察

1. 提起镜筒约2cm，将油镜转至正下方。在玻片标本的镜检部位(镜头的正下方)滴香柏油。
2. 从侧面注视，小心慢慢降下镜筒，使油镜浸在油中至油圈不扩大为止，镜头几乎与装片接触，但不可压及装片，以免压碎玻片，损坏镜头。
3. 将光线调亮，左眼从目镜观察，用粗调节器将镜筒徐徐上升(切忌反方向旋转)，直至视野中有物

像出现时，再用细调节器校正焦距。如因镜头下降未到位或镜头上升太快未找到物像，必须再从侧面观察，将油镜降下，重复操作直至物像看清为止。仔细观察并绘图。

4. 再次观察，提起镜筒，换上金黄色葡萄球菌染色装片，依次用低倍镜、高倍镜和油镜观察。绘图。重复观察时可比第一次少加香柏油。

#### (五)镜检完毕后的工作

1. 移开物镜镜头。
2. 取出装片。
3. 清洁油镜 油镜使用完毕后，须用擦镜纸擦去镜头上的香柏油，再用擦镜纸沾少许二甲苯，擦掉残留的香柏油，最后再用干净的擦镜纸擦干残留的二甲苯。
4. 擦净显微镜，将各部分还原；将接物镜呈“八”字形降下，不可使其正对聚光器，同时降下聚光器，转动反光镜使其镜面垂直于镜座。最后套上镜罩，对号放入镜箱中，阴凉干燥处存放

#### 四、注意事项

1. 使用油镜必须先用低倍镜和高倍镜观察，再用油镜观察的程序操作；
2. 下降镜头时，一定要从侧面注视，切忌用眼睛对着目镜，边观察边下降镜头的错误操作，以免压碎玻片而损坏镜头。
3. 使用二甲苯擦镜头时，注意：二甲苯不能过多，以防溶解固定透镜的树脂。
4. 注意保持显微镜的洁净，对金属部分要用软布擦拭，擦镜头必须用擦镜纸，切勿用手或用普通布、纸等，以免损坏镜头。

#### 五、演示

如何使用油镜观察染色装片的要点，如滴油、下降镜头、调焦、擦拭镜头等。

#### 六、实验报告

分别绘出在高倍镜和油镜下观察到的枯草芽孢杆菌及金黄色葡萄球菌的形态，注明物镜放大倍数和总放大率。

#### 七、问题和思考

1. 用油镜便于观察细菌的依据是什么？
2. 使用油镜应特别注意哪些问题？
3. 当物镜从低倍镜转到高倍镜和油镜时，对照明度有何要求？

#### 参考书目

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

注：油镜的基本原理

### (一) 油镜头的辨认

油镜头上常刻有 OI(Oil ,Immersion)或 HI(Homogeneous immersion)字样，有的还到有一圈红线或黑线标记。

在低倍物镜、高倍物镜和油镜 3 种物镜中，油镜的放大倍数和数值孔径(numeral aperture)最大，而工作距离最短(图 5—1)。

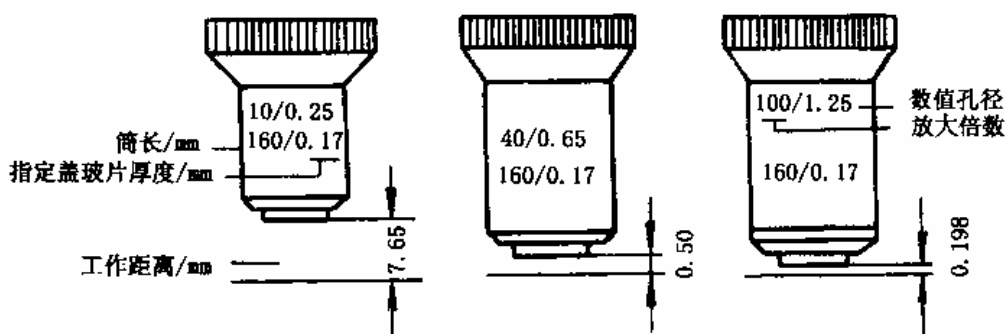


图 5-1 显微镜物镜参数示意图

### (二) 显微镜的分辨率

显微镜性能的优劣不单是看它的总放大倍数，更重要的是看它分辨率的大小。分辨率是指显微镜能分辨出物体两点间最小距离(D)的能力。D 值愈小表明分辨率愈高。D 值与光线的波长(A)成正比，与物镜的数值孔径(NA)成反比。

$$D = \frac{\lambda}{2NA}$$

从上式可看出，缩短光波长和增大数值孔径都可提高分辨率。

数值孔径指光线投射到物镜上的最大角度(称镜口角， $\alpha$ )的一半正弦与介质折射率(n)的乘积：

影响数值孔径大小的因数，一是镜口角，二是介质的折射率。

$$NA = n \times \sin \frac{\alpha}{2}$$

当镜与装片之间的介质为空气时，由于空气(n=0.1)与玻璃(n=1.52)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 5—2A)。当以香柏油(n

=1.515)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 5—2B),不仅增加了视野的照明度,更重要的是通过增加数值孔径达到提高分辨率的目的。

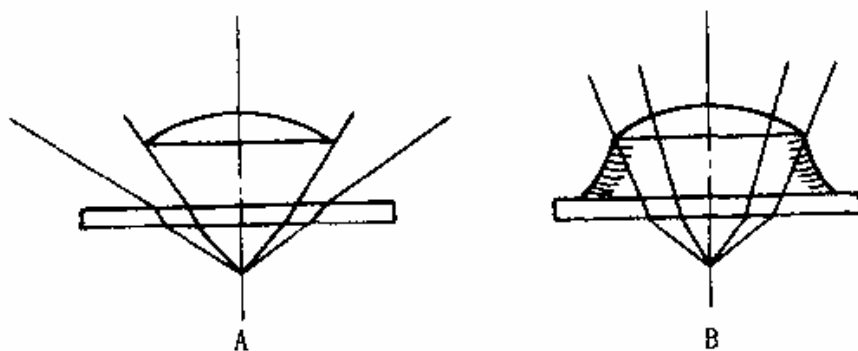


图 5—2 介质为空气(A)与介质为香柏油(B)时光线通过的比较

可见光的波长平均为  $0.55\mu\text{m}$ ,当使用数值孔径为 0.65 的高倍物镜时,它能辨别两点之间的距离为  $0.42\mu\text{m}$ ;而使用数值孔径为 1.25 的油镜时,能辨别两点之间的距离则为  $0.22\mu\text{m}$ 。

## 实验6 细菌形态的观察

### 一、实验目的和内容

目的：巩固油镜的使用；掌握细菌形态观察的基本方法

内容：

1. 观察细菌的基本形态染色装片
2. 观察枯草芽孢杆菌活菌
3. 观察细菌细胞结构的染色装片。

### 二、实验材料和用具

溶血链球菌(*Streptococcus haemolyticus*)、棒杆菌(*Corynebacterium*)、螺菌(*Spirillum sp.*)、浮游球衣菌(*Sphaerotilus natans*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、普通变形菌(*Proteus vulgaris*)、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、褐球固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)等细菌的染色装片，枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的斜面菌种。

香柏油、二甲苯、无菌水、显微镜、擦镜纸、接种环、酒精灯、载玻片

### 三、操作步骤

#### (一) 观察细菌的基本形态

用低倍镜、高倍镜和油镜观察溶血链球菌、棒杆菌、螺菌、浮游球衣菌的染色装片，并分别在油镜下绘图。

#### (二) 观察细菌的细胞结构

用低倍镜、高倍镜和油镜观察巨大芽孢杆菌(示细胞壁)、巨大芽孢杆菌(示异染粒)、苏云金芽孢杆菌(示伴胞晶体)、普通变形菌(示鞭毛)、丙酮丁醇梭菌(示芽孢)、褐球固氮菌(示荚膜)等细菌的染色装片，并分别在油镜下绘图

#### (三) 观察枯草芽孢杆菌活菌

常用压滴法(图6—1)

1. 将洁净无油腻的载片放于自己右边前方，在中央放一小滴无菌水。
2. 将酒精灯放于自己正前方，点燃。
3. 用无菌操作方法从枯草芽孢杆菌斜面中沾取少量菌体，与载片上的水滴充分混匀，把接种环上残留的菌体杀灭后，放回试管架。
4. 用镊子夹一洁净的盖玻片，使其一边先接触菌液，然后将整个盖玻片慢慢放下，注意不要产生



气泡。如菌液过多，可用吸水纸适当吸去一部分。

5. 先用低倍镜然后转用高倍镜观，观察时光线要适当调暗些。

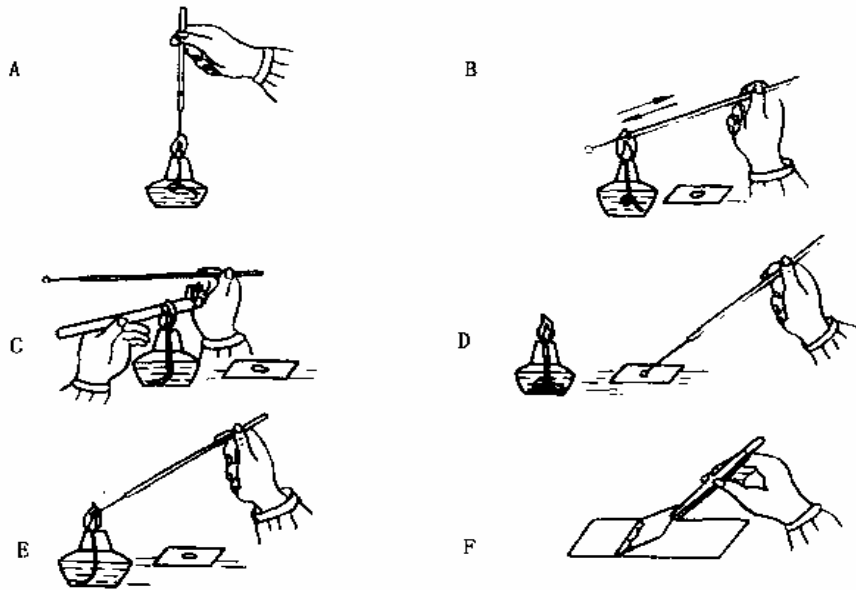


图 6-1 压滴法制片示意图

#### 四、注意事项

1. 注意擦镜头时，只能用擦镜纸。
2. 观察完毕，必须将镜筒上升，才能取下装片。放入另一装片后，要按使用油镜要求，重新操作。不能在油镜下直接取下和替换装片，切记。
3. 无菌操作过程中，接种环灭菌后不能触及其他物品，挑菌不能过多。

#### 五、演示

1. 细菌细胞结构装片示范镜。
2. 无菌操作过程。
3. 怎样盖盖玻片才不产生气泡。

#### 六、实验报告

##### (一)绘图

给出你所观察到的几种细菌的个体形态视野图。

绘出你所观察到的细菌细胞结构视野图，并注明各部分。

##### (二)试指出在制备活菌装片时，应注意什么问题？

#### 七、问题和思考

1. 用明视野显微镜观察细菌的形态时,你认为用染色装片好还是用非染色装片好?观察活体装片与染色装片,光线调节各有什么不同?
2. 无菌操作过程中,可否将棉塞放在桌面上?为什么?
3. 试设一个准备该实验的工作方案。

### **参考书目**

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

## 实验7 细菌单染色法及口腔微生物的观察

### 一、实验的目的和内容

目的：巩固无菌操作技术；掌握细菌的涂片和单染色技术，了解口腔中的微生物及其观察方法。

内容：

1. 学习细菌单染色操作技术。
2. 用单染色法或负染色法观察口腔中的微生物。

### 二、实验材料和用具

大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的斜面菌种。

吕氏美蓝染色液、石炭酸复红染色液、黑色素液或碳素墨水、香柏油、

显微镜、擦镜纸、接种环、酒精灯、载玻片、吸水纸、无菌牙签。

### 三、操作步骤

#### (一) 单染色法

1. 涂片 在洁净无脂的载玻片中央滴一小滴无菌水，用无菌操作方法从菌种斜面挑取少量菌体与水滴充分混匀，涂成薄膜，涂布面积约  $1-1.5\text{cm}^2$ (图 7-1A、B)

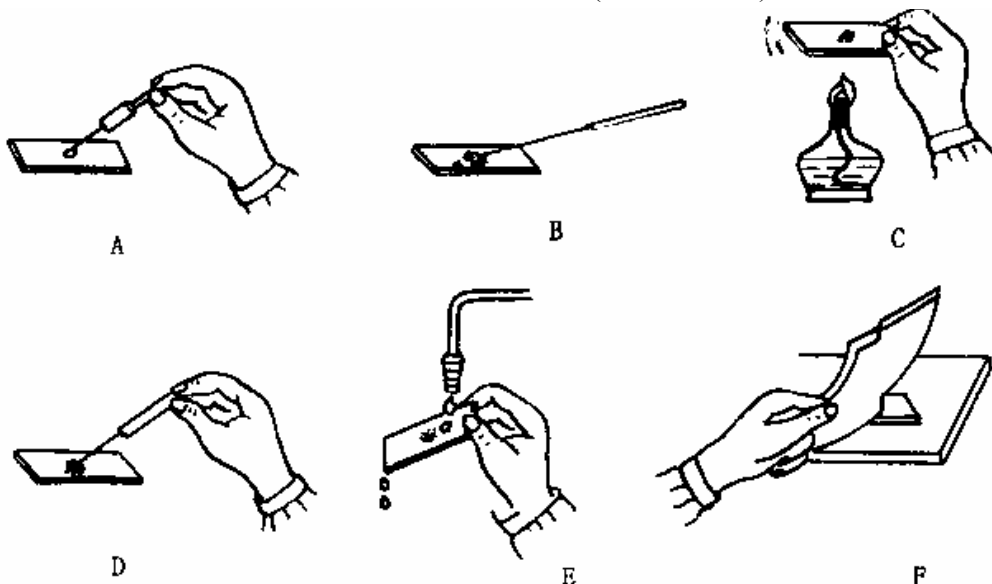


图 7-1 负染色的推片方法

2. 干燥 将涂片于室温中自然干燥。
3. 固定 手执载片一端，使涂菌的一面向上，将载片通过微火 2—3 次。在火上固定时，用手摸涂

片反面，以不烫手为宜。不能将载片在火上烤，否则细菌形态毁坏(图 7—1c)。

4. 染色 将涂片置于水平位置，滴加染色液覆盖于涂菌处，染色约 2min(图 7—1D)。

5. 水洗 倾去染色液，斜置载片，用自来水的细水流由载片上端流下，不得直接冲在涂菌处。直洗至从载片上流下的水中无染色液的颜色为止(图 7—1E)。

6. 干燥 自然晾干或用吸水纸轻轻地吸干，注意不要擦掉菌体(图 7—1F)。

7. 待标本完全干燥后，先用低倍镜和高倍镜观察，将典型部位移至视野中央，再用油镜观察。

## (二)口腔微生物的观察

### 1. 单染色法

(1) 在洁净无油腻的载片中央滴一小滴无菌水，用牙签挑取少许与水滴充分混匀，涂成薄膜。

(2) 将涂片于室温中自然干燥后，按上面单染色法的步骤，进行固定、染色、水洗，干燥后镜检。

### 2. 负染色法

(1) 在洁净无油腻的载片的一端滴一小滴无菌水，用牙签取牙垢少许与水滴充分混匀，然后加少许黑色素溶液，充分混匀。

(2) 另取一载片将其边缘放在含菌载片的一端，然后推向另一端，则含菌载片上的混合菌被推成薄膜。

(3) 于室温中自然干燥。

(4) 镜检：将光线响亮，先用低倍镜观察，再用高倍镜观察。

## 四、注意事项

载玻片要洁净无脂，否则菌液涂不开。涂片时，滴水不要过多，挑菌量宜少，菌膜宜薄。

## 五、演示

1. 单染色的主要步骤。

2. 负染色的推片方法。

## 六、实验报告

### (一) 绘图

1. 单染色后观察到的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的形态图。

2. 你所观察到的口腔微生物的形态图，并注明使用的染色方法。

### (二) 单染色法和负染色法操作要点。

## 七、问题和思考

1. 涂片在染色前为什么要先进行固定?固定时应注意什么问题?

2. 制备染色装片时应注意哪些事项，为什么?制片为什么要完全干燥后才能用油镜观察?

3. 你知道口腔中通常存在哪些微生物吗?如何进行区分?

### 参考书目

1. 钱存柔等 微生物学实验. 北京: 北京大学出版社, 1985
2. wistreich G A *et al.* Labrotary Exericise in Microbiology 5.th ed. New York: Macmillan, 1984

## 实验 8 细菌的革兰氏染色

### 一、实验目的和内容

目的：初步掌握细菌涂片方法及革兰氏染色的步骤

内容

1. 制作细菌染色装片。
2. 进行革兰氏染色法操作。

### 二、实验材料和用具

大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)菌液，待测菌面液 1—2 种。

革兰氏染色液(结晶紫染液、卢戈氏碘液、95%乙醇、石炭酸复红液等)、香柏油、二甲苯。

显微镜、擦镜纸、接种环、载玻片、吸水纸、试管、小滴管、酒精灯。

### 三、操作步骤

#### (一) 制片

1. 涂菌 用无菌操作方法从试管中沾取菌液一环，用接种环在洁净无脂的载玻片上做一薄而匀、直径约 1cm 的菌膜。涂菌后将接种环火焰灭菌。
2. 干燥 于空气中自然干燥。亦可把玻片置于火焰上部略加温加速干燥(温度不宜过高)。
3. 固定 目的是杀死细菌并使细菌粘附在玻片上，便于染料着色，常用加热法。即将细菌涂片向上，通过火焰 3 次，以热而不烫为宜，防止菌体烧焦、变形。此制片可用于染色。

#### (二) 染色

1. 初染 于制片上滴加结晶紫染液，染 1min 后，用水洗去剩余染料。
2. 媒染 滴加卢戈氏碘液，1min 后水洗。
3. 脱色 滴加 95%乙醇脱色，摇动玻片至紫色不再为乙醇脱退为止(根据涂片之厚薄需时 30s 至 1min 水洗)。
4. 复染 滴加石炭酸复红液复染 1min，水洗
5. 用滤纸吸干,油镜镜检。

#### (三) 结果

革兰氏阳性菌染成蓝紫色，革兰氏阴性菌染成淡红色。

#### (四) 检测未知菌

用以上方法对未知菌进行革兰氏染色，并绘图、记录染色结果。

### 四、注意事项

1. 涂片务求均匀。切忌过厚。
2. 在染色过程中，不可使染液干涸。
3. 脱色时间十分重要，过长，则脱色过度，会使阳性菌被染成阴性菌。
4. 老龄菌因体内核酸减少，会使阳性菌被染成阴性菌，故不能选用。

## 五、演示

制片方法及染色过程。

## 六、实验报告

### (一) 绘图

大肠杆菌革兰氏染色视野图。

金黄色葡萄球菌革兰氏染色视野图。

(二) 记录革兰氏染色法步骤，并进行结果分析。

(三) 未知菌的检测结果。

## 七、问题和思考

1. 涂片后为什么要进行固定，固定时应注意什么？
2. 什么是革兰氏染色法？染色过程应注意什么？
3. 试分析革兰氏染色法在细菌分类中的意义。

## 参考书目

1. 李振林. 微生物学检验技术 第二版 广州：广东科技出版社
2. 陆德源. 医学微生物学 第四版 北京：人民卫生出版社, 1998
3. 朱忠勇. 实用医学检验 北京：人民华医出版社, 1992

## 实验9 细菌鞭毛染色及其运动的观察

### 一、实验目的和内容

目的：了解细菌鞭毛染色的原理，掌握鞭毛染色法；学习观察细菌运动的方法。

内容：

1. 细菌的鞭毛染色法。
2. 用压滴法观察细菌的运动。
3. 用悬滴法观察细菌的运动。

### 二、实验材料和用具

普通变形菌(*Proteus vulgaris*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。

牛肉膏蛋白胨培养基斜面、鞭毛染色液、0.01%美蓝水溶液、香柏油二甲苯、无菌水、凡士林。

显微镜、擦镜纸、接种环、酒精灯、载玻片、凹载玻片、盖玻片、镊子、细玻棒、吸水纸。

### 三、操作步骤

#### (一)细菌鞭毛染色

1. 活化菌种 将保存的变形菌在新制备的普通牛肉膏蛋白胨斜面培养基上连续移种 2—3 次，每次于 30℃ 培养 10—15h。活化后菌种备用。
2. 制片 在干净载玻片的一端滴一滴蒸馏水，用无菌操作法，以接种环从活化菌种中取少许菌苔(注意不要带培养基)，在载玻片的水滴中轻沾几下。将载玻片稍倾斜，使菌液随水滴缓缓流到另一端，然后平放，于空气中干燥。
3. 染色
  - (1) 滴加鞭毛染色液 A 液，染 3—5min。
  - (2) 用蒸馏水充分洗净 A 液，使背景清洁。
  - (3) 将残水沥干或用 B 液冲去残水。
  - (4) 滴加 B 液，在微火上加热使微冒蒸汽，并随时补充染料使不干涸，染 30—60s。
  - (5) 待冷却后，用蒸馏水轻轻冲洗干净，自然干燥或滤纸吸干。
4. 镜检 先用低倍镜和高倍镜找到典型区域，然后用油镜观察。菌体为深褐色，鞭毛为褐色。

注意观察鞭毛着生位置(镜检时应多找几个视野，有时只在部分涂片上染出鞭毛)。

#### (二)细菌运动的观察

1. 压滴法



- (1) 制备菌液：从幼龄菌斜面上，挑数环菌放入装有 1-2ml 的无菌水中，制成轻度浑浊的菌悬液。
- (2) 取 2—3 环稀释菌液于洁净载玻片中央，再加入一环 0.01% 的美蓝水溶液，混匀。
- (3) 用镊子夹一洁净的盖玻片，先使其一边接触菌液，然后慢慢地放下盖玻片，这样可防止产气泡。
- (4) 镜检：将光线适当调暗，先用低倍镜找到观察部位，再用高倍镜观察。要区分细菌鞭毛运动和布朗运动，后者只是在原处左右摆动，细菌细胞间有明显位移者，才能判定为有运动性。

## 2. 悬滴法(图 9—1)

- (1) 取洁净盖玻片，在四周涂少许凡士林。
- (2) 在盖玻片小央滴一小滴菌液(图 9—1A)。

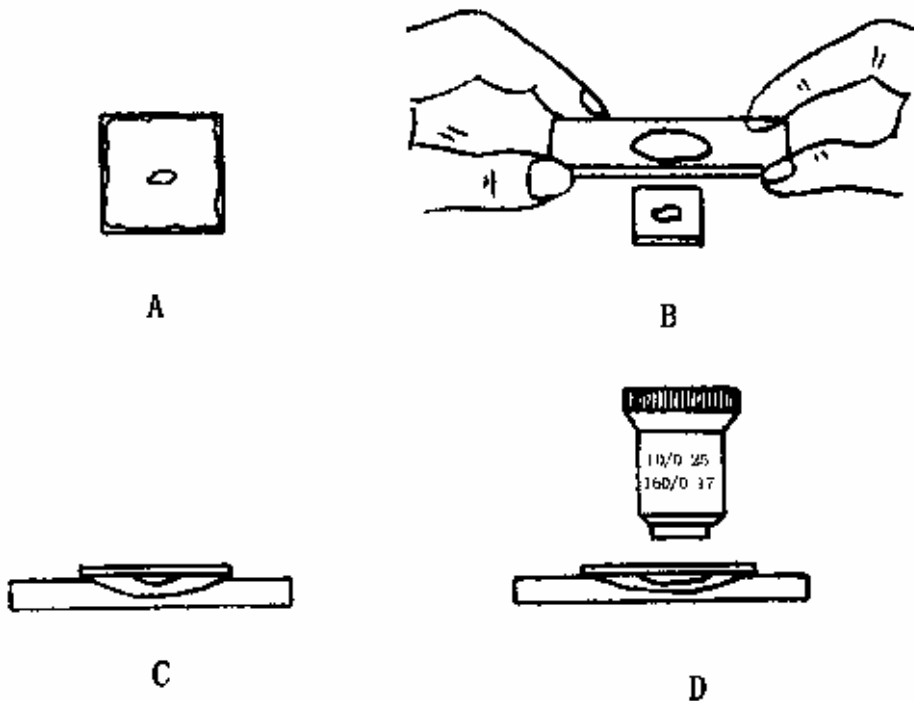


图 9-1 悬滴标本的制备

- (3) 将凹玻片的凹窝向下，使凹窝中心对准盖玻片中央的菌液(图 9—1B)，轻轻地盖在盖玻片上，使凹玻片与盖玻片粘在一起(注意液滴不得与凹玻片接触)。
- (4) 小心将玻片翻转过来，使菌液正好悬在窝的中央。再用火柴棒轻压盖玻片四周使封闭，以防菌液干燥(图 9—1C)。
- (5) 镜检：将光线适当调暗，先用低倍镜找到悬滴的边缘后(图 9—1D)，再将菌液移至视野中央，换用高倍镜观察，注意细菌是如何运动的，它与分子布朗运动的不同。

#### 四、注意事项

1. 鞭毛染色液最好当日配置，次日使用则鞭毛染色浅，观察效果差。染色时 A 液后再加 B 液，否则背景不清晰。
2. 观察细菌的运动，载玻片和盖玻片都要洁净无油，否则会影响细菌的运动。有些细菌,温度太低时不能运动。

#### 五、演示

1. 鞭毛染色涂片的制备和染色
2. 悬滴标本的制备。

#### 六、实验报告

1. 绘出你所观察到的细菌的形态及鞭毛着生情况。
2. 试描述你所观察的细菌有无运动性，是如何运动的

#### 七、问题和思考

1. 鞭毛染色的菌种为什么要先连续传几代，并且要采用幼龄菌种?
2. 根据你的实验体会，哪些因素影响鞭毛染色的效果?如何控制?
3. 试设计一实验，如何鉴别某种细菌是否能运动，是否有鞭毛，其鞭毛的着生位置

#### 参考书目

1. 中国科学院微生物研究所 细菌分类组一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社
2. Adas R M *et al* , Basic Experimental Microbiology 5.th ed New York: Macmillan, 1986

## 实验 10 细菌芽孢、荚膜的染色及观察

### 一、实验目的和内容

目的：掌握细菌的芽孢及荚膜染色方法

内容：

1. 细菌的芽孢染色。
2. 细菌的荚膜染色。

### 二、实验材料和用具

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、褐球固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)的斜面菌种。

二甲苯、香柏油、蒸馏水、5%孔雀绿水溶液、0.5%沙黄水溶液(或0.05%碱性复红)、绘图墨水(用滤纸过滤后备用)、95%乙醇、石炭酸复红染液。

显微镜、接种环、酒精灯、载玻片、盖玻片、小试管(1x 6.5cm)、烧杯(300mL)、滴管、试管夹、擦镜纸、吸水纸。

### 三、操作步骤

#### (一)芽孢染色法

##### 1. 方法 1

- (1) 取 37℃ 培养 18—24h 的枯草芽孢杆菌作涂片，并干燥，固定(参见“细胞单染色法”)。
- (2) 于载片上滴入 3—5 滴 5% 孔雀绿水溶液。
- (3) 用试管夹夹住载玻片在火焰上用微火加热，自载玻片上出现蒸汽时开始计算时间约 4—5min。加热过程中切勿使染料蒸干，必要时可添加少许染料。
- (4) 倾去染液，待玻片冷却后，用自来水冲洗至孔雀绿不再褪色为止。
- (5) 用 0.5% 沙黄水溶液(或 0.05% 碱性复红)复染 1min，水洗。
- (6) 制片干燥后用油镜观察。芽孢呈绿色，菌体红色。

##### 2. 方法 2

- (1) 加 1—2 滴自来水于小试管中，用接种环从斜面上挑取 2—3 环培养 18—24h 的枯草芽孢杆菌菌苔于试管中，并充分期匀打散，制成浓稠的菌液。
- (2) 加 5% 孔雀绿水溶液 2—3 滴于小试管中。用接种环搅拌使染料与菌液充分混合。
- (3) 将此试管浸于沸水浴(烧杯)中，加热 15—20min。
- (4) 用接种环从试管底部挑数环菌于洁净的载玻片上，并涂成薄膜，将涂片通过微火 3 次固定。
- (5) 水洗，至流出的水中无孔雀绿颜色为比。
- (6) 加沙黄水溶液，染 2—3min 后，倾去染液，不用水洗。

(7) 干燥后用油镜观察。芽孢绿色，菌体红色。

## (二) 荚膜染色法

### 1. 石炭酸复红染色

(1) 取培养 72h 的褐球团氮菌制成涂片，自然干燥(不可用火焰烘干)。

(2) 滴入 1—2 滴 95%乙醇固定(不可加热固定)。

(3) 加石炭酸复红染液染色 1—2min，水洗，自然干燥。

(4) 在载玻片一端加一滴墨汁，另取一块边缘光滑的载玻片与墨汁接触，再以匀速推向另一端，涂成均匀的薄层。自然干燥。

(5) 干燥后用油镜观察。菌体红色，荚膜无色，背景黑色。

### 2. 背景染色

(1) 先加 1 滴墨水于洁净的玻片上，并挑少量褐球固氮菌与之充分混合均匀。

(2) 放一清洁盖玻片于混合液上，然后在盖玻片上放一张滤纸，向下轻压，吸收多余的菌液。

(3) 干燥后用油镜观察。背景灰色，菌体较暗。在其周围呈现一明亮的透明圈即荚膜。

## 四、注意事项

1. 荚膜染色涂片不要用加热固定，以免荚膜皱缩变形。

2. 供芽孢染色用的菌种应控制菌龄，使大部分芽孢仍保留在菌体上为宜。

## 五、演示

1. 无菌操作取菌、涂片及涂片的固定。

2. 染荚膜的墨汁背景染色法。

## 六、实验报告

### (一) 绘图

1. 枯草芽孢杆菌及巨大芽孢杆菌的菌体及芽孢形态，芽孢的着生位置。

2. 褐球固氮菌菌体及荚膜的形态。

(二) 试制片。但不进行染色，观察是否能看到芽孢和荚膜?

## 七、问题和思考

1. 为什么芽孢染色要加热?为什么芽孢及营养体能染成不同的颜色?

2. 组成荚膜的成分是什么?涂片一般用什么固定方法，为什么?

3. 试设计实验如何鉴定某一产芽孢菌株的芽孢形态、着生位置及所属分类地位。

## 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. 周学韬 微生物学,北京:北京师范大学出版社 1991

## 实验 11 支原体、衣原体的形态观察

### 一、实验目的和内容

目的：学习观察沙眼衣原体包含体形态及肺炎支原体形态的方法。

内容：

1. 观察沙眼衣原体包含体染色片。
2. 肺炎支原体形态反面菌落特征观察。

### 二、实验材料和用具

沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)的姬姆萨染色装片 肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)的 Hayflick 培养基上的培养物。

生理盐水(0.85%NaCl、甲醛、姬姆萨(Giemsa)染色液。

接种环、载玻片、酒精灯、试管、吸管、显微镜。

### 三、操作步骤

#### (一)沙眼衣原体包含体形态观察

用显微镜观察沙眼衣原体姬姆萨染色装片。注意观察包含体的颜色、位置、形状。沙眼衣原体在眼结膜上皮细胞内可形成 4 种不同类型的包含体：

1. 散在型包含体 由始体组成，圆形成卵圆形，散在于胞浆内，一个上皮细胞内可含 1-3 个或更多。
2. 帽型包含体 多个小始体连接排列而成，形如帽沿。大小不等，紧贴在细胞核上：
3. 桑椹型包含体 由始体或原体堆积而成圆形或椭圆形，形如桑椹。
4. 堵塞型包含体 绝大部分由原体堆积而成，常待整个胞浆堵塞充满，而将细胞核压挤变成梭形或其他形状。

#### (二)肺炎支原体姬姆萨氏染色及形态观察

用接种环挑取肺炎支原体在 Hayflick 培养基上的菌落少许于载玻片上，涂片，自然干燥后用甲醛固定 5min，干燥后加稀释的姬姆萨染液染色 0.5h。最后用蒸馏水冲洗标本全红色为止。吸干后置油镜下观察，可见支原体呈高度多形性，常有球形、杆状、丝状、分支状、颗粒状等，被染成蓝紫色。

#### (三)支原体菌落特征观察

取培养物平板，用放大镜或低倍镜观察肺炎支原体在 Hayflick 培养基上的生长特征，可见菌落细小、圆形、边缘整齐，分中央与边缘两部分，中央部分深入培养基中，呈现“油煎蛋状”。

### 四、注意事项

培养肺炎支原体的 Hayflick 培养基上中加有醋酸铊，这是具有强毒性的物质,故在实验中注意强毒性。

## 五、演示

沙眼衣原体不向包含体形状的讲解以及观察示范镜。

## 六、实验报告

1. 绘制沙眼衣原体包含体及肺炎支原体在油镜下的形态图。
2. 记录肺炎支原体在 Hayflick 培养基上的菌落特征。

## 七、问题和思考

1. 支原体为什么呈多形性?
2. 如何检查肺炎支原体的存在?

## 参考书目

1. 李振林, 微生物学及检验技术 广州: 广东科技出版社
2. 朱忠勇, 实用医学检验学 北京: 人民军医出版社, 1992
3. 陆德源, 医学微生物学北京: 人民卫生出版社. 1998

## 实验 12 放线菌的形态观察

### 一、实验目的和内容

目的：辨认放线菌的营养菌丝、气生菌丝、孢子丝、孢子的形态；学习放线菌的观察方法。

内容：用水封片法、玻璃纸法、印片法观察放线菌的形态特征。

### 二、实验材料和用具

细黄链霉菌(*Streptomyces micuoflavus*)又称 5406 的培养皿，棘孢小单孢菌(*Micromonospora echinospora*)的玻璃纸培养皿。

0.1%美蓝染色液、石炭酸复红染色液。

盖玻片、载玻片、镊子、接种环、显微镜、涂布器、玻璃纸、打孔器。

### 三、操作步骤

#### (一) 观察自然生长状态的放线菌

用镊子小心取出用插片法培养的 5406 菌培养皿中的一张盖玻片，将其背面附着的菌丝体擦净，然后将长有菌的一面向上放在洁净的载玻片上，用低倍镜、高倍镜观察，找出 3 类菌丝及其分生孢子。

并绘图。注意放线菌的基内菌丝、气生菌丝的粗细和色泽差异。

#### (二) 水封片观察

取一滴美蓝染色液置于载玻片中央，将用搭片法培养棘孢小单孢菌培养皿中的盖玻片取出，并将有菌面朝下，放在载玻片上，染在染色液中，制成水封片，用高倍镜观察其单个分生孢子及其基内菌丝，并绘图：

#### (一) 玻璃纸法的镜检观察

##### 1. 直接玻璃纸的观察

分别用 5406 和棘孢小单孢菌的玻璃纸制片观察。制片时，于载玻片上放一小滴蒸馏水，将含菌纸片剪下一小块，移至玻片上，并使有菌面向上。在玻璃纸与载玻片间不能有气泡，以免影响观察。将制片于显微镜下观察，先用低倍镜观察菌的立体生长状况、再用高倍镜仔细观察。注意区分 5406 菌的基内菌丝、气生菌丝和弯曲状或螺旋状的孢子丝。观察棘孢小单孢菌时注意把视野调暗，其基内菌丝纤细发亮，其单个分生孢子发暗，直接生长在基内菌丝长出的小梗上。绘图。

##### 2. 印片染色法观察

用镊子取洁净载玻片并微微加热，然后用这微热载玻片盖在长有 5406 或棘孢小单孢菌的平皿上

轻轻压一下，注意将载玻片垂直放下和取出，以防载玻片水平移动而破坏放线菌的自然形态，反转有印痕的载玻片微微加热固定，用石炭酸复红染色 1min，水洗，晾干。用油镜观察。绘图。注意比较两种菌的形态特征有何不同。

#### 四、注意事项

1. 培养放线菌中要注意，放线菌的生长速度较慢，培养期较长，在操作中成特别注意无菌操作，严防杂菌污染。
2. 玻璃纸法培养接种时注意玻璃纸与平板琼脂培养基间不宜有气泡，以免影响其表面放线菌的生长。
3. 不同观察方法中严格按照要求进行，注意菌体的上下位置。

#### 五、演示

1. 几种不同的培养方法。
2. 几种观察方法的要点和注意事项。
3. 5406 菌及棘孢小单孢菌形态的示范镜。

#### 六、实验报告

1. 绘图 玻璃纸法、水封片法、印片法及自然生长状态下观察的形态
2. 试比较 5406 菌与棘孢小单孢菌特征的异同。

#### 七、问题和思考

1. 在高倍镜或油镜下如何区分放线菌的基内菌丝和气生菌丝。
2. 用插片法和搭片法如何制备放线菌标本，其主要优点是什么？可否用此法观察其他微生物？为什么？
3. 以玻璃纸覆盖法培养和观察放线菌有何优点？试用此法设计一个观察青霉菌形态的实验。

#### 参考书目

1. 李阜棣，何绍汀等 农业微生物学实验技术 北京：中国农业出版社，1996
2. 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，1999
3. 陈声明，刘丽丽等 微生物学研究法 北京：中国农业科技出版社，1996

#### 注：

##### (一) 插片法和搭片法培养放线菌

##### 1. 插片法(图 12—1A)

(1) 制平板、接种：用冷却至约 50℃的高氏 2 号琼脂培养基倒平板(每皿约 20ml)。可用两种方法接菌：①先接种后插片：冷凝后用接种环挑取少量斜面上的 5406 菌孢子，用平板培养基的一半面积作



来回划线接种(接种量可适当扩大)。②先插片后接种;用平板培养基的另一半面积进行。

(2) 插片及培养:用无菌镊子取无菌盖玻片,在已经接种平板以  $45^{\circ}\text{C}$  角斜插入培养基内,插入深度约占盖玻片  $1/2$  的长度(图 12--1A) 同时,在另一半未经接种的部位以同样方式插入数块盖玻片,然后接种少量 5406 菌孢子至盖玻片一侧的基部,且仅接种于其中央位置约占盖玻片长度的一半左右,以免菌丝蔓延至盖玻片的另一侧,将插片平板倒置于  $28^{\circ}\text{C}$ 。培养 3—7d。

## 2. 搭片法(图 12—1D)

(1) 开槽及接种:用无菌打孔器在凝固后的平板培养基上打洞数个,并将棘孢小单孢菌孢子划线接种至洞内边缘。

(2) 搭片及培养:在接种后的洞面上放一无菌盖玻片,平板倒置于  $28^{\circ}\text{C}$ 。培养 3—7d。

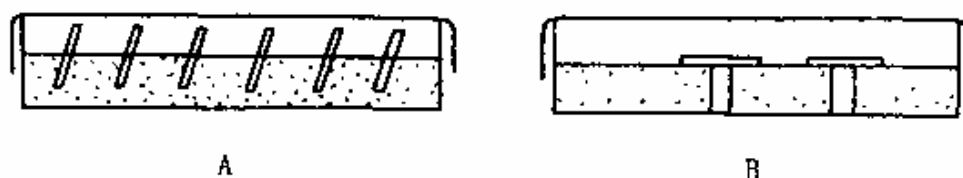


图 12-1 放线菌的插片与搭片培养示意图

A. 插片法; B. 搭片法

## (二) 玻璃纸法固体培养 5406 菌和棘孢小单孢菌

1. 玻璃纸灭菌 将玻璃纸剪成比培养皿直径略小的片状,将滤纸剪成培养皿大小的圆形纸片并稍润湿,然后把湿滤纸和玻璃纸交互重叠地放在培养皿中,借滤纸将玻璃纸隔开,然后进行湿热灭菌,备用。

2. 制平板及铺玻璃纸 取冷凝后的高氏 1 号琼脂培养基,用无菌镊子将预先灭菌的块状玻璃纸平铺至平板培养基表面,铺玻璃纸时可用无菌涂布器将玻璃纸与培养基之间的气泡除去。

3. 涂布菌液及培养 取  $0.1\text{mL}$  的孢子悬液涂布在铺有玻璃纸的平板培养基表面。接种平板,倒置于  $28^{\circ}\text{C}$ 。培养 5—7d。

## 实验 13 酵母菌的形态观察

### 一、实验目的和内容

目的：了解自然存在的酵母菌及其形态结构。了解酵母菌产生子囊孢子的条件及其形态。

内容：

1. 观察酵母菌个体形态。
2. 观察酵母菌的假菌丝和繁殖过程。
3. 观察自然状态的酵母菌。

### 二、实验材料和用具

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、热带假丝酵母(〔*Candida tropicalis*〕斜面菌种。

PAD 培养基、麦氏(McCLaryW)培养基(醋酸钠培养基)、0.05%美蓝染色液(以 pH 6.0 的 0.02mol/L 磷酸缓冲液配制)、碘液、0.04%的中性红染色液、5%孔雀绿, 0.5%沙黄液、95%乙醇。

显微镜、载玻片、擦镜纸、盖玻片、接种环、v 形玻璃棒、放置一个三角形玻璃棒支架的培养皿；

### 三、操作步骤

#### (一)酵母菌形态观察

##### 1. 酵母菌的活体染色观察及死亡率的测定

- (1) 以无菌水洗下 PDA 斜面培养的酿酒酵母菌苔，制成菌悬液。
- (2) 取 0.05%美蓝染色液 1 滴，置载玻片中央，并用接种环取酵母菌悬液与染色液混匀 3min，加盖玻片，在高倍镜下观察酵母的个体形态，区分其母细胞与芽体，区分死细胞(蓝色)与活细胞(不着色)。
- (3) 在一个视野里计数死细胞和活细胞，共计数 5—6 个视野。

酵母菌死亡率一般用百分数来表示，以下式来计算：

$$\text{死亡率} = \frac{\text{死细胞总数}}{\text{死活细胞总数}} \times 100\%$$

2. 酵母菌液泡系的活体观察 于洁净载玻片中央加一滴中性红染色液，取少许上述酵母液悬液与之混合，染色 5min，加盖玻片在显微镜下观察。细胞无色，液泡呈红色。
3. 酵母菌细胞中肝糖粒的观察 将 1 滴碘液置于载破片中央，接入上述酵母菌悬液,混匀,盖上盖玻片，显微镜观察，细胞内的贮藏物质肝糖颗粒呈深红色。
4. 酵母菌子囊孢子的观察

- (1) 活化酿酒酵母：将酿酒酵母接种至新鲜的麦芽糖培养基上，置 28℃ 培养 2-3d，然后再移接 2-3 次。
- (2) 移接产孢培养基：将活化的酿酒酵母移接至醋酸钠培养基上，置 30℃ 恒温培养 14d。
- (3) 观察：挑取少许产孢菌苔于载玻片的水滴中，经涂片、热固定后，加数滴孔雀绿，1min 后水洗，加 95% 乙醇 30s，水洗，最后用 0.5% 沙黄液复染 30s，水洗去染色液，最后用吸水纸吸干。制片干燥后，镜检，于孢子呈绿色，于囊为粉红色。注意观察子孢子的数目、形状，子囊的形成率。
- (4) 计算子囊形成的百分率：计数时随机取 3 个视野，分别计数产子孢子的子囊数和不产孢子的细胞，然后放下列公式计算：

$$\text{子囊形成率(\%)} = \frac{\text{3个视野中形成子囊的总数}}{\text{3个视野中(形成子囊的总数 + 不产孢子细胞总数)}} \times 100\%$$

5. 酵母的假菌丝的观察 取一无菌载玻片浸于溶化的 PDA 培养基中，取出放在湿室培养的支架上，待培养基凝固后，进行酵母菌划线接种，然后将无菌盖玻片盖在接菌线上(图 13—1)，28℃ 培养 2—3d 后，取出载玻片，擦去载玻片下面的培养基，在显微镜下直接观察。可见到芽殖酵母形成的藕节状假菌丝，裂殖酵母则形成竹节状假菌丝(图的(13—2))。

6. 自然状态下的酵母菌观察 取一滴天蓝染色液于载玻片中央，春夏秋季取酱油或腌菜上的白膜，冬季取腌菜上的白膜，将其置于载玻片染色液中，盖上盖玻片，显微镜下仔细观察酵母菌形态，出芽生殖，假菌丝等。

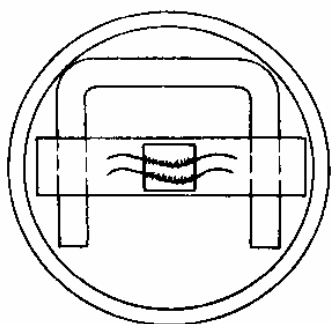


图 13-1 酵母菌假菌丝的培养

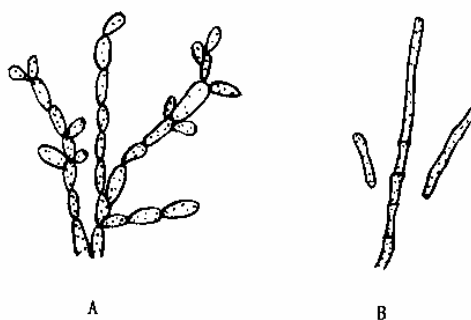


图 13-2 酵母菌的假菌丝形态  
A. 藕节状假菌丝； B. 竹节状假菌丝

#### 四、注意事项

1. 用于活化酵母面的麦芽汁培养基要新鲜、表面湿润
2. 在产孢培养基加大移种量，可提高于囊形成率。

3. 通过微加热增加酵母的死亡率，易于观察死亡细胞

## 五、演示

1. 酵母菌子囊及于子囊孢子，酵母菌假菌丝的示范镜。
2. 假菌丝培养的操作过程。

## 六、实验报告

### (1) 绘图

数个酵母菌细胞，示观察到的结构。

数个子囊及子囊孢子形态图。

- ### (2) 记录并计数酵母菌的死亡率及子囊形成率(原始记录及计算结果)

## 七、问题和思考

1. 酵母菌的假菌丝是怎样形成的?与霉菌的真菌丝有何区别?
2. 如何区别营养细胞和释放出的子囊孢子。
3. 试设计一个从子囊中分离子囊孢子的试验方案。

## 参考书目

1. 杜连祥 工业微生物学实验技术 天津：天津科学技术出版社，1992
2. 周宗旭 观察酵母菌假菌丝及出芽繁殖的好材料 生物学通报. 1998, 33(2)37
3. D R 贝里 酵母菌生物学 楼纯菊，徐士菊译 上海：复旦大学出版社，1986

## 实验 14 霉菌的形态观察

### 一、实验目的和内容

目的：了解霉菌形态，掌握微生物载玻片湿室培养方法。

内容：

1. 霉菌载玻片湿室培养。
2. 曲霉、青霉、根霉、毛霉形态观察。
3. 根霉假根的观察。

### 二、实验材料和用具

产黄青霉(*penicillium chrysogenum*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、黑根霉(*Rhizopus nigricans*)、总状毛霉(*Mucor racemosus*)等斜面菌种\*

半固体 PDA 培养基、乳酸苯酚固定液、棉蓝染色液、20%甘油。

透明胶带、剪刀、培养皿、载玻片、门形玻棒搁架、盖玻片、圆形滤纸片、细口滴管、镊子、显微镜、接种环。

#### (一)霉菌的载玻片湿室培养

可 4 人合作，每人制作一霉菌的载玻片。

1. 准备湿室 在培养皿底铺一张圆形滤纸片，其上放一“门”形载玻片搁架，在搁架上放一块载玻片和两块盖玻片，盖上皿盖，外用纸包扎。经 121℃ 湿热灭菌 30min，置 60℃ 烘箱中烘干，备用。
2. 取菌接种 用接种环挑取少量待观察的霉菌孢子至湿室内的载玻片上，每张载玻片可接同一菌种的孢子两处。接种时只要将带菌的接种环在载玻片上轻轻碰几下即可(务必记住接种的位置)。
3. 加培养基 用无菌细口滴管吸取少量融化约 60℃ 的培养基，滴加到载玻片的接种处。培养适应滴得圆而薄，其直径约为 0.5cm(滴加量一般以 1/2 小滴为宜)。
4. 加盖玻片 在培养基未彻底凝固之前，用无菌镊子将皿内盖玻片盖在琼脂块薄层上，用镊子轻压，使盖玻片和载玻片间的距离相当接近，但不能压扁。否则不透气。
5. 倒保湿剂 每皿倒人约 3mL 20% 的无菌甘油，使皿内的滤纸完全润滑，以保持皿内湿度。

皿盖上注明菌名、组别和接种日期；此为制成的载玻片湿室，置 28℃ 恒温培养 3-5d。

#### (一)黑根霉假根的培养

将融化的 PDA 培养基，冷却至 50℃ 倒入无菌平皿，其量约为平皿高度的 1/2、冷凝后，用接

种环沾取根霉孢子,在平板表面划线接种,然后将平皿倒置,在皿盖内放一无菌载玻片,于28℃培养2—3d后,可见根霉的气生菌丝倒挂成胡须状,有许多菌丝与载玻片接触,并在载玻片上分化出假

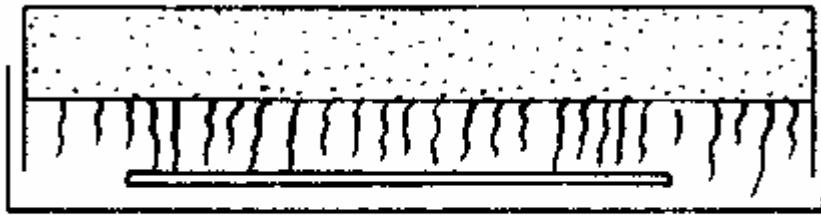


图 14-1 根霉假根的培养

根和匍匐菌丝等结构(图 14—1)。

## (二) 镜检观察

1. 湿室培养霉菌镜检载玻片 从培养 16—20h 开始,通过连续观察,可了解孢子的萌发、菌丝体的生长分化和利于实体的形成过程。将湿室内的载玻片取出,直接置于低倍镜和高倍镜下观察曲霉、青霉、毛霉、根霉等霉菌的形态,重点观察菌丝是否分隔,曲霉和青霉的分生孢子形成特点,曲霉的足细胞,根霉和毛霉的孢子囊和孢囊孢子,绘图。
2. 粘片观察 取一滴棉蓝染色液置于载玻片中央,取一段透明胶带,打开霉菌平板培养物,粘取菌体,粘面朝下,放在染液上。镜检。
3. 假根观察 将培养根霉假根的平皿打开,取出皿盖内的载玻片标本,在附着菌丝体的一面盖上盖玻片,置显微镜下观察。只要用低倍镜就能观察到假根及从根节广分化出的孢子囊梗、孢子囊、孢囊孢子和两个假根间的匍匐菌丝,观察时注意调节焦距以看清各种构造:
4. 制成永久装片 把观察到霉菌形态较清晰,完整的片子,制成标本作较长期保有:制备方法是,轻轻揭去盖玻片,如果载玻片上有琼脂,仔细挑去,然后滴加少量乳酸苯酚固定液,盖上清洁盖玻片,在盖玻片四周滴加树胶封固。

## 四、注意事项

载玻片湿室培养时,盖玻片不能紧贴载玻片,要彼此有极小缝隙。一是为了通气,二是使各部分结构平行排列,易于观察。

## 五、演示

1. 4 种霉菌制片的示范。
2. 载玻片湿室培养方法。

## 六、实验报告

## (一)绘制镜检形态图

1. 毛霉和根霉形态图，示各部。
2. 青霉和曲霉形态图，示各部。

## (二)载玻片观察记录

各菌种的载玻片标本观察结果：

菌种	菌丝体 (气生菌丝、营养菌丝的粗细、 色泽,菌丝有隔或无隔等)	无性孢子特征 (孢子梗的分化特征、孢子着 生特征等)	其他特征结构 (有无假根、足细胞、匍匐菌 丝、囊轴等)

## 七、问题和思考

1. 什么叫载玻片湿室培养? 它适用于观察怎样的微小物, 有何优点?
2. 湿室培养时为何用 20% 甘油作保湿剂?
3. 本实验中观察假根的设计原理是什么? 此设计还适合于培养哪类菌

## 参考书目

1. 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
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 15 细菌大小的测定

### 一、实验目的和内容

目的：学会测微尺的使用和计算方法及对球菌和杆菌的测量

内容：

1. 认识测微尺，学习目镜测微尺的标定。
2. 测定金黄色葡萄球菌和大肠杆菌菌体的大小。

### 二、实验材料和用具

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*E. coli.*)的玻片标本。

香柏油、二甲苯。

显微镜、目镜测微尺、镜台测微尺、擦镜纸。

### 三、操作步骤

1. 测微尺的构造 显微镜测微尺是由目镜测微尺和镜台接物测微尺组成，目镜测微尺是一块圆形玻璃片，其中有精确的等分刻度，在 5mm 刻尺上分 50 份(图 15—1B)。目镜测微尺每格实际代表的长度随使用接目镜和接物镜

的放大倍数而改变，因此在使用前必须用镜台测微尺进行标定。镜台测微尺为一专用中央有精确等分线的载玻片(图 15—1A)，一般将长为 1mm 的直线等分 100 个小格，每格长 0.01mm，即 10 $\mu$ m，是专用于校正目镜测微尺每格长度的。

2. 目镜测微尺的标定 把目镜的上透镜旋开，将目镜测微尺轻轻放入目镜的隔板上，使有刻度的一面朝下。将镜台测微尺放在显微镜的载物台上，使有刻度的一面朝上。先用低倍镜观察，调焦距，待看清镜台测微尺的刻度后，转动目镜，使目镜测微尺的刻度与镜台测微尺的刻度相平行，并使两尺左边的一条线重合，向右另外一条两尺相重合的直线(图 15—1B)、

3. 计算方法

$$\text{标定公式: 目镜测微尺每格长度}/\mu\text{m} = \frac{\text{两条重合线间镜台测微尺的格数} \times 10}{\text{两条重合线间目镜测微尺的格数}}$$

例如，目镜测微尺 20 个小格等于镜台测微尺 3 个小格，已知镜台测微尺每格为 10 $\mu$ m，则 3 小格的长度为 3 $\times$  10=30 $\mu$ m，那么相应地在目镜测微尺上每小格长度为 3 $\times$ 10 $\div$ 20=1.5( $\mu$ m)。用以上计算方法分别校正低倍镜、高倍镜及油镜下目镜测微尺每格实际长度。



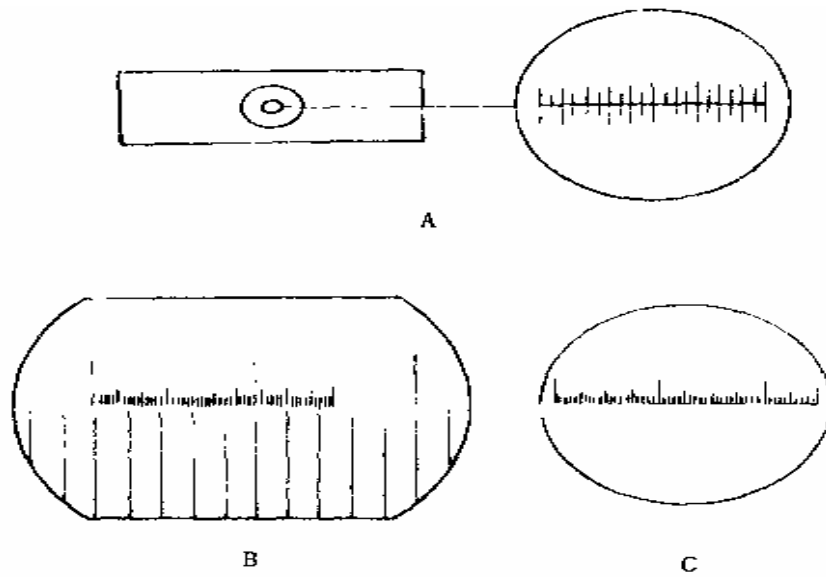


图 15-1 镜台测微尺(A)与目镜测微尺(C)及其校正方法(B)

4. 菌体大小的测定 将镜台测微尺取下, 分别换上大肠杆菌及金黄色葡萄球菌玻片标本, 先在低倍镜和高倍镜下找到目的物, 然后在油镜下用目镜测微尺测量菌体的大小。先量出菌体的长和宽占目镜测微尺的格数, 再以目镜测微尺每格的长度计算出菌体的长和宽。并详细记录于表 15-1 中。

例如, 目镜测微尺在这架显微镜下, 每格相当于  $1.5\mu\text{m}$ , 测量的结果, 若菌体的平均长度相当于目镜测微尺的 2 格, 则菌体长应为  $2 \times 1.5\mu\text{m} = 3.0\mu\text{m}$ 。

一般测量菌体的大小, 应测定 10—20 个菌体, 求出平均值, 才能代表该菌的大小。

#### 四、注意事项

1. 镜台测微尺的玻璃很薄, 在标定油镜头时, 要格外注意, 以免压碎镜台测微尺或损坏镜头。
2. 标定目镜测微尺时要注意准确对正目镜测微尺与镜台测微尺的重合线。

#### 五、演示

1. 目镜测微尺、镜台测微尺的显微镜下示教
2. 标定及测量方法示范。

#### 六、实验报告

1. 目镜测微尺标定结果:

低倍镜下\_\_\_\_\_倍目镜测微尺每格长度是\_\_\_\_\_

高倍镜下\_\_\_\_\_倍目镜测微尺每格长度为\_\_\_\_\_

油镜下\_\_\_\_\_倍目镜测微尺每格长度是\_\_\_\_\_

2. 菌体大小测定结果:

菌号	大肠杆菌测定结果				金黄色葡萄球菌的直径大小测定结果	
	目镜测微尺格数		实际长度		目镜测微尺格数	实际直径/ $\mu\text{m}$
	宽	长	宽	长		
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
均值						

试与已知的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的大小作一比较是否一致，为何？

### 七、问题和思考

1. 为什么更换不同放大倍数的目镜和物镜时必须重新用镜台测微尺对目镜测微尺进行标定？
2. 若目镜不变，目镜测微尺也不变，只改变物镜，那么目镜测微尺每格所测量的镜台上的菌体细胞的实际长度(或宽度)是否相同？为什么？

### 参考书目

陈声明、刘丽丽等. 微生物学研究法北京：中国农业科技出版社，1996

## 实验 16 细菌数目的测定

### 一、实验目的和内容

目的 掌握细菌数量的测定方法。

内容

1. 计数板直接镜检计数。
2. 载玻片直接镜检计数。
3. 平板菌落计数。

### 二、实验材料和用具

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)斜面培养物(约培养 10h)、培养 5—7d 的大肠杆菌(*E.coli*)菌液。

牛肉膏蛋白胨培养基、美蓝染色液、; 结晶紫染色液、香柏油、二甲苯、无菌水。

显微镜、血细胞计数板、手动计数器、酒精灯、无菌吸管、滤纸条、载玻片、盖玻片、无菌微量移液管、接种环、擦镜纸、无菌试管、涂布器、无菌培养皿。

### 三、操作步骤

#### (一)计数板直接镜检计数

##### 1. 血细胞计数板的构造

血细胞计数板由四条平行槽构成 3 个平台，中间的平台较窄，其中间又被一短槽隔成两半，每边平台面各有一个含 9 个大格的方格网，中间大格为计数室。计数室的长和宽各为 1mm，中间平台下陷 0.01mm，故盖上盖玻片后计数室的总容积为 0.1mm<sup>3</sup>。血细胞计数板的构造见图 16。

常见血细胞计数板的计数室有两种规格。一种是 16x 25 型，称为麦氏血细胞计数板，共有 16 个小格，每个小格分为 25 个小格。另一种是 25x16 型，称为希里格式血细胞计数板，共有 25 个中格，每个中格又分成 16 个小格。但是不管哪种规格的血细胞计数板其计数室的小格均由 400 个小方格组成。应用血细胞计数板在显微镜下直接计算微生物细胞的数量，方法是先测定若干个方格中的微生物细胞，再换算成每 mL 菌液(或每 g 样品)中微生物细胞数量。

##### 2. 细菌数量的测定

(1) 稀释加样：取枯草芽孢杆菌斜面少量菌体至 100mL 无菌水中，稀释混匀后待用(浓度约为 10<sup>4</sup>—10<sup>5</sup> / mL)。先将盖玻片放在计数室上，用吸管吸取以上稀释液滴于盖玻片的边缘，让菌液自行渗入，多余菌液用滤纸吸去，稍待片刻，待细菌细胞全部沉降到计数室底部，将计数板放于载物台的中央，按下列步骤寻找计数室并计数。

(2) 找计数室：先在低倍镜下寻找计数板大方格网的位置，转换高倍镜后，调节光亮度至菌体和计数室线条清晰为止，再将计数室一角的小格移至视野中。顺着大方格线移动计数板，使计数室位于视野中间。

(3) 计数：计数时，如用 16x 25 则计数板则按对角线方位，取左上、右上、左下、右下 4 个大格(共 4 个大格，100 个小格)内的细胞逐一进行计数；如使用规格为 25x16 型的计数板，则除取左上、右上、左下、右下 4 个大格外，还需加中央的一个大格(共 5 个大格，80 个小格)内的细胞。计数时当遇到大格线上的细菌时，一般只计此大格的上方及右方线上的细胞(或只计下方及左方线上的细胞)，将计得的细胞数填入结果表中。对每个样品重复计数 3 次，取具平均值，按下列公式计算每 mL 菌液中所含的细菌细胞数。

16×25 型血细胞计数板的计算公式：

$$\text{菌细胞数/mL} = \frac{100 \text{ 小格内细菌细胞数}}{100} \times 400 \times 1000 \times \text{稀释倍数}$$

25×16 型血细胞计数板的计算公式：

$$\text{细菌细胞数/mL} = \frac{80 \text{ 小格内细菌细胞数}}{80} \times 400 \times 10 \times \text{稀释倍数}$$

## (二)载玻片直接镜检计数

1. 摇动菌液使其混合均匀，用无菌微量移液管取菌液 0.01mL 于载玻片上，并用无菌接种环均匀地涂布 1cm<sup>2</sup>的面积上。风干，固定，结晶紫染色 1min，冲洗，干燥备用。
2. 用物镜测微尺，测量显微镜油镜观察时的视野直径，并以 S= r<sup>2</sup> 公式，计算出视野面积。
3. 将涂片置于载物台，滴香柏油，以油镜观察，不断变化视野，共观察 N 个视野，计数每一视野中细菌个数。以下列公式计算每毫升菌液中的含菌数量：

$$\text{原菌液菌数/个} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{1\text{cm}^2}{1 \text{ 个视野的面积}} \times \text{视野中的平均菌数} \times 100 \times \text{稀释倍数}$$

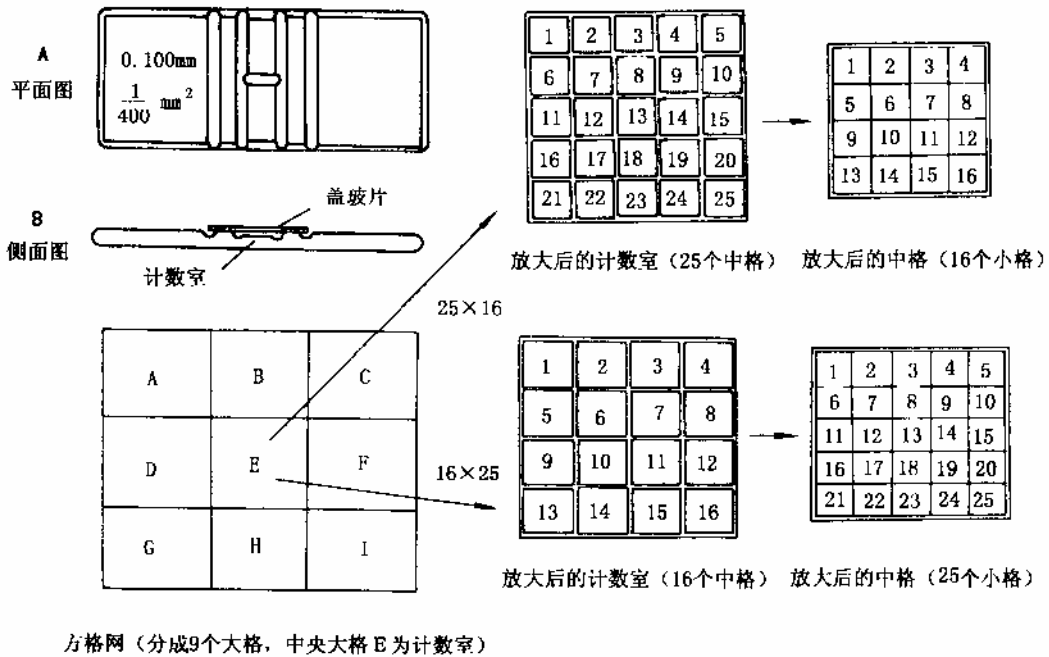


图 16-1 血细胞计数板

### (三) 平板菌落计数

另取灭菌移液管吸取上述枯草芽孢杆菌稀释液 1mL, 放入已灭菌的培养皿中, 再倒入融化而冷却到 50℃左右的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基, 同时制作 3 个平板。皿中铺成一薄层, 并使平皿作前后和左右滑动, 使样品和培养基混匀。待其凝固后倒置, 37℃培养 24h 后计算菌落数, 并计算其每 mL 的含菌量。

### 四、注意事项

直接镜检计数完毕, 用蒸馏水冲洗计数板。绝不能用硬物洗刷。洗后待自行晾干, 或用滤纸沾干。最后用擦镜纸擦干净。若计数是病原微生物, 则需先浸泡在 5% 的石炭酸溶液中进行消毒, 然后再进行清洗。

### 五、演示

1. 显微镜下显示计数板计数室。
2. 平板菌落计数操作过程。

### 六、实验报告

#### (一) 记录实验结果

1. 计数板直接镜检计数结果:

计算次数	各大格中细胞数					大格中细胞总数	稀释倍数	总菌数/个·mL <sup>-1</sup> 或个·g <sup>-1</sup>
	左上	右上	右下	左下	中间			
第一次								
第二次								
第三次								
平均值								

## 2. 涂片直接镜检计数结果:

视野	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均视野	待测样品/mL·g <sup>-1</sup>
菌数												

## 3. 平板菌落计数结果

$$\text{总菌数/个}\cdot\text{mL}^{-1}\text{或}\cdot\text{g}^{-1} = \text{每皿平均菌落数} \times \text{稀释倍数}$$

(二) 比较以上3种不同计数方法所得的结果并进行分析。

## 七、问题和思考

1. 根据你的体会, 血细胞计数板计算的误差主要来自哪些方面? 应如何减少误差?
2. 比较各种计数法的优点和缺点。
3. 设计一个方案, 如何计数市售酸奶或三株口服液或菌肥制品的单位含菌数。

## 参考书目

1. 白毓谦, 方善康等微生物学实验技术山东: 山东大学出版社, 1987
2. 微生物研究法讨论会编 程光用等译 微生物学实验法 北京: 科学出版社, 1981

## 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)

### 一、实验目的和内容

目的: 了解细菌鉴定中常用的主要生理生化反应试验法及其原理。

内容:

1. 比较 4 种菌的 V. P 反应(Voges—Prokauer 反应或称乙酰甲基甲醇试验)结果。
2. 比较 4 种菌的甲基红反应结果。
3. 比较 4 种菌的吲哚反应结果 “
4. 如何使用杜氏小管进行醇试验

### 二、实验材料和工具

大肠杆菌(*E. coli*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、普通变形菌(*Protues vulgaris*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的斜面菌种

葡萄糖蛋白胨水培养基、蛋白胨水培养基、糖发酵培养基(葡萄糖、乳糖或蔗糖)、40%NaOH 溶液、肌酸、甲基红试剂、吲哚试剂、乙醚、1.6%溴甲酚紫指示剂。

超净工作台、恒温培养箱、高压蒸汽灭菌锅、试管、移液管, 杜氏小套管。

### 三、操作步骤

#### (一) V. P 反应

1. 试管标记 以 5 支装有葡萄糖蛋白胨水培养基的试管, 分别标记大肠杆菌、产气肠杆菌普通变形菌, 枯草芽孢杆菌和空白对照。
2. 接种培养 以无菌操作分别接种少量菌苔至以上相应试管中。培养 24—48h。
3. 观察记录 取出以上试管, 振荡 2min。另取 5 支交试管相府标记菌名, 分别加入 3—5mL 以上对应管中的培养液。再加入 40%NaOH 溶液 10—20 滴, 并用牙签挑入约 0.5—1mg 微量肌酸, 振荡试管, 以使空气中的氧溶入, 放在 37℃恒温箱中保温 15—30min 后, 若培养液呈红色, 记录为 V. P 试验阳性反应(用“+”表示); 若不呈红色, 则记录为 V. P 试验阴性反应(用“-”表示)。

注意: 原试管中留下的培养液供作甲基红试验用。

#### (二) 甲基红试验(M. R. 试验)

用 V. P 试验留下的培养液中, 各加入 2—3 滴甲基红指示剂, 注意沿管壁加入, 仔细观察培养液上层, 若培养液上层变成红色, 即为阳性反应, 若仍为黄色, 则为阴性反应, 分别用“+”或“-”表示:

### (三) 吡啶试验

1. 试管标记 取装有蛋白胨水培养基的试管 5 支, 分别标记大肠杆菌、产气肠杆菌、普通变形菌、枯草芽孢杆菌和空白对照。
2. 接种培养 以无菌操作分别接种少量菌苔到以上相应试管中, 第 5 管作空白对照不接种, 置 37℃, 恒温箱中培养 24—48h。
3. 观察记录 在培养基加入乙醚 1-2mL, 经充分振荡使吡啶萃取至乙醚中, 静至片刻后乙醚层浮出培养液的上面, 此时沿壁缓慢加入 5—10 滴吡啶试剂(加入吡啶试剂后切勿振动试管, 以防破坏乙醚层影响结果观察), 如有吡啶存在, 乙醚层呈现玫瑰红色, 此为吡啶试验阳性反应。否则为阴性反应。阳性用“+”, 阴性用“-”表示。

### (四) 糖发酵试验

可根据细菌分解利用糖能力的差异表现出是否产酸产气作为鉴定菌种的依据。是否产酸, 可在糖发酵培养基中加入指示剂酚甲酚紫(即 B.C.P 指示剂, 其 pH 在 5.2 以下呈黄色, pH 在 6.8 以上呈紫色), 经培养后根据指示剂的颜色变化来判断; 是否产气, 可在发酵培养基中放入倒置杜氏小管观察,

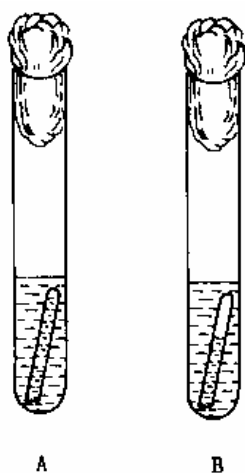




图 17-1 细菌对糖发酵  
试验的产气观察  
A. 不产气; B. 产气

1. 试管标记 取分别装有葡萄糖、蔗糖和乳糖发酵培养液试管各 4 支, 每种糖发酵试管中均分别标记大肠杆菌、产气肠杆菌、普通变形菌和空白对照。
2. 接种培养 以无菌操作分别接种少量菌苔至以上相应试管中, 每种糖发酵培养液的空白对照均不接种。将装有培养液的杜氏小管倒置放入试管中(图 17—1), 于 37℃恒温箱中培养, 分别在培养 24,48h



和 72h 观察结果。

3. 观察记录 与对照管比较, 若接种培养液保持原有颜色, 其反应结果为阴性, 表明该菌不能利用该种糖, 记录用“-”表示; 如培养液呈黄色, 反应结果为阳性, 表明该菌能分解该种糖产酸。记录用“+”表示。培养液中的杜氏小管内有气泡为阳性反应, 表明该菌分解糖能产酸并产气。记录用“”表示; 如杜氏小管内没产气泡为阴性反应, 记录用“”表示。

#### 四、注意事项

1. V. P. 反应中加入 NaOH 溶液和肌酸后要反复振荡试管, 使空气中氧溶入培养液中。
2. 甲基红试验中, 不要过多滴加甲基红指示剂, 以免出现假阳性反应。
3. 吲哚试验中宜选用色氨酸含量高的蛋白胨(用胰蛋白酶水解酪素, 得到的蛋白胨中色氨酸含量较高)配制蛋白胨水培养基, 否则将影响产吲哚的阳性率; 在加入吲哚试剂后切勿振动试管, 以免破坏乙醚层而影响结果。
4. 在糖发酵试验的培养管中装入倒置杜氏小管时, 注意防止小管内有残留气泡。灭菌时适当延长煮沸时间去除去管内气泡。

#### 五、演示

1. 杜氏小管倒置装入培养液管中不残留气泡的操作过程。
2. 分别显示 V. P 反应、甲基红试验、吲哚试验和糖发酵试验培养液阳性反应和阴性反应结果的颜色变化情况。

#### 六、实验报告

1. 细菌生理生化反应试验测定结果

试验项目	V. P. 反应	甲基红试验	吲哚试验	糖发酵试验		
				葡萄糖	乳糖	蔗糖
大肠杆菌						
产气肠杆菌						
普通变形菌						
枯草芽孢杆菌						
空白对照						

2. 在 v. P 反应中加入 NaOH 溶液和肌酸, 在吲哚试验中加入乙醚, 它们各有什么作用?

#### 七、问题和思考

1. 以上生理生化反应能用来鉴别细菌, 其原理是什么?

2. 细菌生理生化反应试验中为什么要设有空白对照?
3. 现分离到一株肠道细菌, 试结合本实验学到的知识设计一个试验方案进行鉴别。

**参考书目:**

1. 周德庆 微生物学教程 北京: 高等教育出版社, 1993
2. 黄秀梨等 微生物学 北京: 高等教育出版社, 1998
3. 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

## 第二部分 应用性实验部分

### 实验 18 酒精发酵及糯米甜酒的酿制

#### 一、实验目的和内容

目的：学习和掌握酵母菌发酵糖产生酒精和酒曲发酵糯米酿制糯米甜酒的方法。

内容：

1. 酵母菌的酒精发酵。
2. 糯米甜酒的酿制。

#### 二、实验材料和用具

培养 24h 的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)斜面菌种。

酒精发酵培养基、甜酒曲、蒸馏水、无菌水、糯米。

铝锅、电炉、三角瓶、牛皮纸、棉绳、蒸馏装置、水浴锅、振荡器、酒精比重计。

#### 三、操作步骤

##### (一)酵母菌的酒精发酵

1. 培养基 配制好的发酵培养基分装入 300mL 三角瓶中,每瓶 100mL, 121℃湿热灭菌 20-30min。
2. 接种和培养 于培养 24h 的酿酒酵母斜面中加入无菌水 5mL, 制成菌悬液。并吸取 1mL 接种于装有 100mL 培养基的三角瓶中, 一共接 2 瓶, 其中 1 瓶于 30℃恒温静止培养, 另 1 瓶置 30℃恒温振荡培养。
3. 酵母菌数目的计数 每隔 24h 取样, 经 10 倍稀释后进行细胞计数(方法参阅“细菌数量测定”)。
4. 酒精蒸馏及酒精度的测定 取 60mL 已发酵培养 3d 的发酵液加至蒸馏装置的圆底烧瓶中, 在水浴锅中 85—95℃下蒸馏。当开始流出液体时, 准确收集 40mL 于量筒中, 用酒精比重计测量酒精度。
5. 品尝 取少量一定浓度(30—40 度)的酒品尝, 体会口感。

##### (二)糯米甜酒的酿制

1. 甜酒培养基制作 称取一定量优质糯米(糙糯米更好)。用水淘洗干净后, 加水量为米水比 1: 1, 加热煮熟成饭。或者糯米洗净后, 用水浸透, 沥干水后, 加热蒸熟成饭, 即为甜酒培养基。
- 2 接种 糯米冷却至 35℃以下, 加入适量的甜酒曲(用量按产品说明书)并喷洒一些清水拌匀, 然后装入到干净的三角瓶中或装入聚丙烯袋中。装饭量为容器的 1/3—2/3, 中央挖洞, 饭面上再撒一些酒曲, 塞上棉塞或扎好袋口, 置 25—30℃下培养发酵。
3. 培养发酵 发酵 2d 便可闻到酒香味, 开始渗出清液, 3—4d 渗出液越来越多, 此时, 把洞填平,

让其继续发酵。

4. 产品处理 培养发酵至第7天取出，把酒糟滤去，汁液即为糯米甜酒原液，加入一定量的水加热煮沸便是糯米甜酒，即可品尝。

#### 四、注意事项

酿制糯米甜酒时糯米饭一定要煮熟煮透，不能太硬或夹生；米饭一定要凉适至 35℃拌酒曲，否则会影响正常发酵。

#### 五、演示

酒精蒸馏过程

#### 六、实验报告

1. 记录酵母酒精发酵过程，比较两种培养方法结果的不同，并解释其原因。
2. 记录糯米酿制糯米甜酒的发酵过程，以及糯米甜润的外观、色、香、味和口感。

#### 七、问题和思考

- 1、为什么糯米饭温度必须降到 35℃下拌酒曲，发酵才能正常进行？糯米饭一开始发酵时要挖个洞，后来又填平,为什么？
- 2、酒精发酵培养基配方中如去掉 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 矾，同样接入酒精酵母菌进行发酵，将出现何种结果?为什么？

#### 参考书目

钱存柔，童碧虹. 微生物学基础知识与实验指导 北京；科学出版社，1979

## 实验 19 抗生素抗菌谱及抗生素的抗药性测定

### 一、实验目的和内容

目的：学习抗生素抗菌谱的测定方法，了解常见抗生素的抗菌谱。

内容：

1. 供试菌的培养与制备。

2. 抗生素抗菌谱的测定。

### 二、实验材料和用具

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)斜面菌种(野生株及不同抗药程度的抗链霉素菌株 3 株)。

牛肉膏蛋白胨培养基斜面。

供试抗生素：氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素、链霉素和四环素。

恒温培养箱、镊子、圆滤纸片(直径为 8.5mm)或牛津杯、培养皿(直径 12cm)。

### 三、操作步骤

#### (一) 供试菌的培养基制备

金黄色葡萄球菌(代表革兰氏阳性菌)和大肠杆菌(代表革兰氏阴性菌)接种在牛肉膏蛋白胨琼脂斜面上，置 37℃ 下培养 18—24h，取出后用 5mL 无菌水洗下，使成菌悬液备用。

#### (二) 配制所需浓度的抗生素

各抗生素分别配制成以下浓度：氨苄青霉素 100ug / mL(溶于水)，氯霉素 200 ug / mL (溶于乙醇)，卡那霉素 100 ug / mL (溶于水)，链霉素 100 卡那霉素 ug / mL (溶于水)，四环素 100 卡那霉素(溶于乙醇)，配制好的溶液经 0.45um 的滤膜无菌过滤后备用。

#### (三) 抗生素抗菌谱的测定

采用液体扩散法，分别吸取供试菌悬液 0.5 mL 加在牛肉膏、蛋白胨琼脂平板上，用无菌涂布器涂布均匀(每个学生两只平板，一只涂布大肠杆菌，另一只涂布金黄色葡萄球菌)，待平板表面液体渗干后，在皿底用蜡笔分成 6 等份，每一等份标明一种抗生素(图 26—1)，设一无菌水作对照，用滤纸片法或杯碟法测定。具体方法是：用无菌镊子将滤纸片浸入上述抗生素溶液中，取出，并在瓶内壁除去多余的药液，以无菌操作将纸片对号转放到接好供试菌的平板的小区内，或将牛津杯置于供试菌的平板上，加入一定量的抗生素溶液。置 37℃ 培养 18—24h，测定抑菌圈的直径，用抑菌圈的大小来表示抗生素的抗菌谱。

## (四) 抗生素的抗药性测定

1. 制备链霉素药物平板 取4套无菌培养皿, 皿底标记编号, 从链霉素溶液(100 ug / mL)中, 分别吸出 0.2、0.4、0.6 和 0.8mL. 加至以上培养皿中, 倒入冷却至 50℃的融化牛肉育蛋白胨培养基中, 迅速混匀, 制成药物平板, 待凝后在每个平皿的皿底划分成4份, 并注明1—4号, 备用。

2. 抗药性测定 在以上1—3号空格上分别接上不同抗药程度的抗链霉素菌株3株, 在4号接入野生型菌株作对照, 37℃培养24h后观察菌生长情况, 并记录。以“+”表示生长, 以“-”表示不生长。

## 四、注意事项

1. 供试菌液涂布于平板后, 待菌液稍干再加入滤纸片或牛津杯。

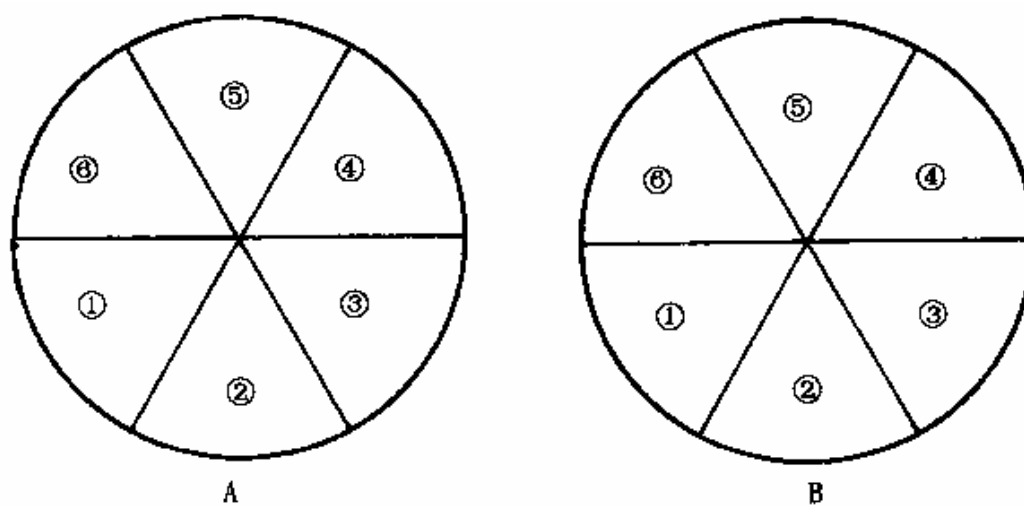


图 26-1 抗生素抗菌谱的测定示意图

A. 大肠杆菌; B. 金黄色葡萄球菌

①氨苄青霉素; ②氯霉素; ③卡那霉素; ④链霉素; ⑤四环素; ⑥无菌水

2. 制备药物平板时, 注意把药物与培养基充分混匀。

## 五 实验报告

1. 将抗生素的抗菌结果填入下表:

抗生素名称	抗菌谱(抑菌圈直径/mm)		作用机制
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	
氨苄青霉素			
链霉素			
卡那霉素			
氯霉素			
四环素			
对照(无菌水)			

2. 根据以上结果说明供试抗生素的抗菌谱。
3. 记录不同大肠杆菌的抗药性测定结果。

## 六、问题和思考

1. 抗生素对微生物的作用机制有几种?举例说明之。
2. 如供试菌为酵母菌、放线菌或霉菌, 应如何测定抗生素的抗菌谱?

## 参考书目

1. 天宜磊 简明微生物学及实验技术 新疆: 新疆科技卫生出版社, 1994
2. 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
3. 徐积思, 朱明珍 抗生素 北京: 科学出版社, 1982

## 实验 20 微生物菌种保藏

### 一、实验目的和内容

目的:了解并掌握菌种保藏的常用方法及其优缺点

内容

1. 学习斜面传代保藏方法。
2. 学习液体石蜡保藏方法。
3. 学习沙上管保藏方法。
4. 学习冷冻干燥保藏方法。

### 二、实验材料和用具

细菌、酵母菌、放线菌和霉菌斜面菌种。

牛肉膏蛋白胨培养基斜面(培养细菌), 麦芽汁培养基斜面(培养酵母菌), 高氏一号培养基(培养放线菌), 马铃薯蔗糖培养基斜面(培养丝状真菌)。

无菌水、液体石蜡、 $P_2O_5$ 、脱脂奶粉、10% HCl、干冰、95%乙醇、食盐、河沙、瘦黄土(有机物含量少的黄土)、无菌试管、无菌吸管(1mL及 5mL)、无菌滴管、接种环、40 目及 100 目筛子、干燥器、冰箱、冷冻真空干燥装置、酒精喷灯、三角烧瓶(250 mL)。

### 三、操作步骤

下列各方法可根据实验室具体条件与需要选做。

#### (一) 斜面传代保藏法

1. 贴标签 取各种无菌斜面试管数支, 将注有菌株名称和接种日期的标签贴上, 贴在试管斜面的正上方, 距试管口 2—3cm 处。
2. 斜面试种 将待保藏的菌种用接种环以无菌操作法移接至相应的试管斜面上, 细菌与酵母菌宜采用对数生长期的细胞, 而放线菌和丝状真菌宜采用成熟的孢子。
3. 培养 细菌 37℃ 恒温培养 18—24h, 酵母菌于 28—30℃ 培养 36-60h, 放线菌和丝状真菌置于 28℃ 培养 4—7d。
4. 保藏 斜面长好后, 可直接放入 4℃ 冰箱保藏。为防止棉塞受潮长杂菌, 管口棉花应用个皮纸包扎, 或换上无菌胶塞, 亦可用熔化的固体石蜡熔封棉塞或胶塞。

保藏时间依微生物种类而不同, 酵母的、霉菌、放线菌及有芽孢的细菌可保存 2—6 个月, 移种一次, 而不产芽孢的细菌最好每月移种一次。此法的缺点是容易变异, 污染杂菌的机会较多。



## (二)液体石蜡保藏法

1. 液体石蜡灭菌 在 250mL 三角烧瓶中装入 100mL 液体石蜡, 塞上棉塞, 并用牛皮纸包扎, 121℃ 湿热灭菌 30min, 然后于 40℃ 温箱中放置 14d(或置于 105—110℃ 烘箱中 1h), 以除去石蜡中的水分, 备用。

2. 接种培养 同面传代保藏法:

3. 加液体石蜡 用无菌滴管吸取液体石蜡以无菌操作加到已长好的菌种斜面上, 加入量以高出斜面顶端约 1cm 为宜。

4. 保藏 棉塞外包牛皮纸, 将试管直立放置于 4℃ 冰箱内保存

利用这种保藏方法, 霉菌、放线菌、有芽孢细菌可保藏 2 年左右, 一般无芽孢细菌也可保藏 1 年左右。

5. 恢复培养 用接种环从液体石蜡下挑取少量菌种, 在试管壁上轻靠几下, 尽量使油滴滴净, 再接种于新鲜培养基中培养。由于菌体表面粘有液体石蜡, 生长较慢且有粘性, 故一般须转接 2-3 次才能获得良好菌种。

## (二)沙土管保藏法

1. 沙土处理

(1) 沙处理: 取河沙经 40 目过筛, 去除大颗粒, 加 10% HCl 浸泡(用量以浸没沙面为宜)2-4h(或煮沸 30min), 以除去有机杂质, 然后倒去盐酸。用清水冲洗至中性, 烘干或晒干, 备用。

(2) 土处理: 取非耕作层瘦黄土(不含有机质), 加自来水浸泡洗涤数次。直至中性, 然后烘干粉碎, 用 100 目过筛, 去除粗颗粒后备用。

2. 装沙土管 将沙与土按 2:1, 3: 1 或 4: 1(W / W)比例混合均匀装入试管中(10mmx100mm), 装置约 7cm 高。加棉塞, 并外包牛皮纸, 121℃ 湿热灭菌 30min、然后烘干。

3. 无菌试验 每 10 支沙土管任抽一支, 取少许沙土放入牛肉膏蛋白胨或麦芽汁培养液中, 在最适的温度下培养 2—4d, 确定无菌中长时才可使用。若发现有杂菌, 经重新灭菌后, 再作无菌试验, 直到合格。

4. 制备菌液 用 5mL 无菌吸管分别吸取 3mL 无菌水至待保藏的菌种斜面上, 用接种环轻轻搅动, 制成悬液。

5. 加样 用 1mL 吸管吸取上述菌悬液 0.1—0.5mL 加入沙土管内。用接种环拌匀。加入菌液量以湿润沙土达 2 / 3 高度为宜。

6. 干燥 待含菌的沙土管放入干燥器中, 干燥器内用培养皿盛  $P_2O_5$  作为干燥剂, 可再用真空泵连续抽气 3—4h。加速干燥。将沙土管轻轻——拍, 沙土呈分散状即达到充分干燥。

7. 保藏 沙土管可选择下列方法之一来保藏:

- (1) 保存于干燥器中;
- (2) 用石蜡封住棉花塞后放入冰箱保存;
- (3) 将沙土管取出, 管口用火焰熔封后放入冰箱保存;
- (4) 将沙土管装入含有 $\text{CaCl}_2$ 等干燥剂的大试管中, 塞上橡皮塞或木塞, 再用石蜡封口, 放入冰箱中或室温下保存。

8. 恢复培养 使用时挑少量混有孢子的沙土, 接种于斜面培养基上, 或液体培养基内培养即可, 原沙土管仍可继续保藏。

此法适用于保藏能产芽孢的细菌及形成孢子的霉菌和放线菌, 可保存 2 年左右。但不能用于保藏营养细胞。

#### (四) 冷冻干燥保藏法

1. 准备安瓿管, 选用外径 6—8mL, 壁厚 0.6—1.2cm, 长 10.5cm 的硬质玻璃试管, 用 10% 的 HCl 浸泡 8—10h 后用自来水冲洗多次, 最后用去离子水洗 1—2 次, 烘干。将印有菌名和接种日期的标签放入安瓿管内, 有字的一面朝向管壁。管口加棉塞, 121℃ 灭菌 30min。

2. 制备脱脂牛奶 将脱脂奶粉配成 20% 乳液, 然后分装。121℃ 灭菌 30min, 并作无菌试验。

3. 准备菌种 选用无污染的纯菌种, 培养时间, 一般细菌为 24—48h。酵母菌为 3d, 放线菌与丝状真菌 7—10d。

4. 制备菌液及分装 吸取 3mL 无菌牛奶直接加入斜面菌种管中, 用接种环轻轻搅动菌落, 再用手摇动试管, 制成均匀的细胞或孢子悬液。用无菌长滴管将菌液分装于安瓿管底部, 每管装 0.2mL。

5. 预冻 将安瓿管外的棉花剪去并将棉塞向里推至离管口约 15mm 处(图 33—2A), 再通过乳胶管把安瓿管连接于总管的侧管上, 总管则通过厚壁橡皮管及三通短管与真空表及干燥瓶、真空泵相连接(图 33—1), 并将所有安瓿管浸入装有干冰和 95% 乙醇的预冷槽中, (此时槽内温度可达 -40℃—-50℃)。只需冷冻 1h 左右, 即可使悬液冰结成固体。

6. 真空干燥 完成预冻后, 升高总管使安瓿管仅底部与冰面接触, (此处温度约 -10℃), 以保持安瓿管内的悬液仍呈固体状态。开启真空泵后, 应在 5—15min 内使真空度达 66.7Pa 以下, 使被冻结的悬液开始升华, 当真空度达到 26.7—13.3Pa 时, 冻结样品逐渐被干燥成白色片状, 此时使安瓿管脱离冰浴, 在室温下(25—30℃)继续干燥(管内温度不超过 30℃), 升温可加速样品小残余水分的蒸发。总干燥时间应根据安瓿管的数量, 悬浮液装置及保护剂性质来定, 一般 3—4h 即可。

7. 封口 样品干燥后继续抽真空达 1.33Pa 时, 在安瓿管棉塞的稍下部位用酒精喷灯火焰灼烧, 拉成细颈并熔封(图 33—2B、C), 然后置 4℃ 冰箱内保藏。

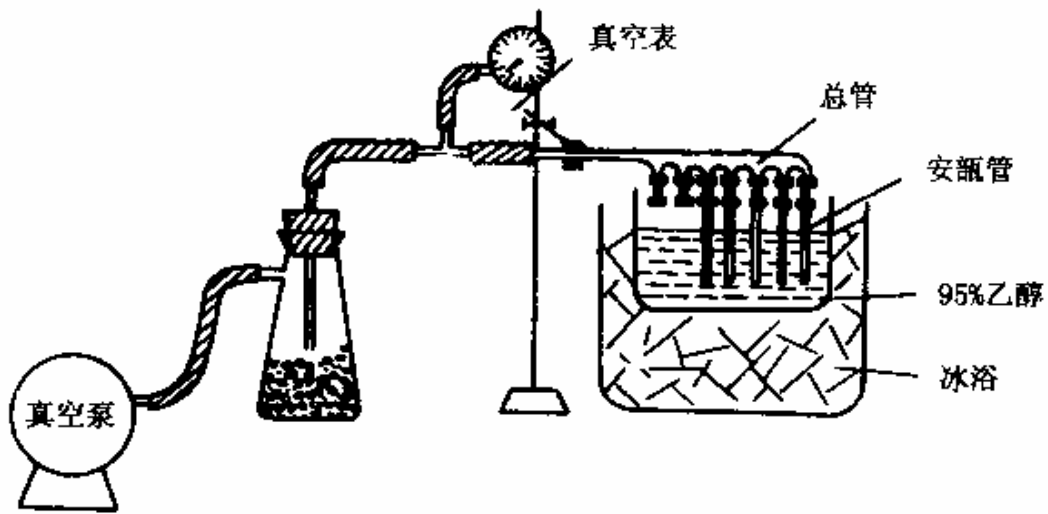


图 33-1 真空冷冻干燥装置

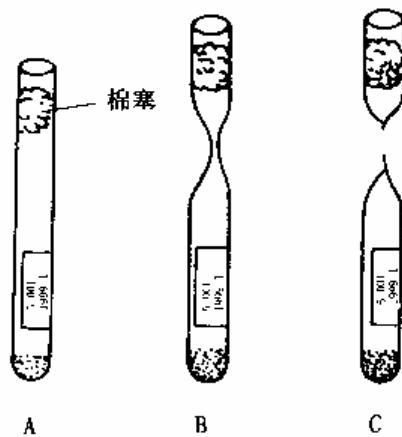


图 33-2 安瓿管的处理

A. 棉塞推向管内的位置; B. 拉细颈; C. 熔封

8. 恢复培养 用 75%乙醇消毒安瓿管外壁后, 在火焰上烧热安瓿管上部, 然后将无菌水滴在烧热处, 使管壁出现裂缝, 放置片刻, 让空气从裂缝中缓慢进入管内后, 将裂口端敲断, 这样可防止空气因突然开口而进入管内致使菌粉飞扬; 将合适的培养液加入冻干样品中, 使干菌粉充分溶解, 再用无菌的长颈滴管吸取菌液置合适培养基中, 放置在最适温度下培养。

冷冻干燥保藏法综合利用了各种有利与菌种保藏的因素(低温、干燥和缺氧等), 是目前最有效的菌种保藏方法之一。保存时间可长达 10 年以上。

#### 四、注意事项

1. 从液体石蜡封藏的菌种管中挑菌后，接种环上带有油和菌，故接种环在火焰上灭菌时要先在火焰边烤干再立接灼烧，以免菌液四溅，引起污染。
2. 在真空干燥过程中安瓿管内样品应保持冻结状态，以防止抽真空时样品产生泡沫而外溢。
3. 熔封安瓿管时注意火焰大小要适中，封口处灼烧要均匀，若火焰过大，封口处易弯斜，冷却后易出现裂缝而造成漏气。

## 第三部分 综合性实验和探究性实验

### 综合性实验指导

#### 实验 21、食用菌的抑菌实验

##### 一、实验性质和项目来源

**实验性质：**综合性实验

**项目来源：**本系 2002 级学生年度论文转化

##### 二、实验目的与要求

使学生学会提取技术，较熟练应用微生物学抑菌实验的基本原理和常规的基本实验技术，独立完成培养基配制、灭菌、接种、到平板、涂布、稀释、记数等实验项目。

学会设计综合性实验和综合性实验报告规范的书写格式。

##### 三、实验内容

1. 实验材料中抑菌物质的提取；
2. 适宜浓度供试菌液的制备（比浊法）；
3. 抑菌试验（滤纸片法）

##### 四、实验安排

**时间安排：**本实验共 6 学时；1 学时准备实验；2 学时抑菌物质的提取；2 学时菌种培养、供试菌液的制备；1 学时观察、描述、记载。

**分组安排：**每 5 人一组；每组分别选择一种食用菌作为研究对象(自由选择)。

**程序安排：**预习建议的参考书（学生实验报告样本由实验指导老师提供）→预习所选择的食用菌生理特点→分组写出实验流程设计书→指导教师确认实验设计的可行性→实验准备→预实验→修改实验方案→进行实验

选择合适的培养基种类→计算培养基需要量→配置培养基→灭菌待用。

实验材料中抑菌物质的提取→适宜浓度供试菌液的制备（比浊法）→抑菌试验（滤纸片法）

##### 五、操作

本实验需要的基本操作训练已经在前面的一些实验中学习过，在这里不再一一列出每一操作步骤。为了帮助预习，将有关操作名称列出，这些操作在建议参考书中都可以找到。

1. 培养基配置和灭菌
2. 无菌操作
3. 显微镜使用和细菌记数

4. 分光光度计使用和标准曲线绘制
5. 系列稀释方法
6. 抑菌试验（滤纸片法）

## 六、试验报告记载内容

1. 姓名、班级、学号、小组编号、试验开始日期/时间
2. 材料和方法
  2. 1 材料 仪器和药品、所选的食用菌种类、供试菌种、培养基组成等
  2. 2 方法 培养基配置和灭菌、系列稀释、倾倒平板、抑菌物质的提取、适宜浓度供试菌液的制备（比浊法）、抑菌试验（滤纸片法）
3. 结果  
抑菌圈记录
4. 讨论

## 七、组间交流(学时数不占实验学时数，将在理论课学时数中安排)

每组自由选定 1 人向全班做报告。

## 建议参考书

1. 叶竹秋,林跃鑫.巴西蘑菇抑菌作用的初步研究[J].食品科学,2001,Vol.22(4):82~84
2. 陈颖,石洪娟.平菇及富硒平菇抑菌作用的初步研究.淮阴师范学院生物系级学生实验报告
3. 张伟,崔同,檀建新等.蜂胶对食品致病菌抑菌作用研究[J].食品科学,1998,Vol.19(3):40~41
4. 宫霞,姚淑敏,卢元芳.银杏叶提取物抑菌作用的研究[J].食品科学,1999:54~56
5. 谭敬军,胡亚平,吴晗晗.竹荪抑菌作用研究[J].食品科学,2000,Vol.21(10):54~56
6. 谭敬军.竹荪抑菌特性研究[J].食品科学,2001,Vol.22(9):73~75
7. 乔军,孟庆龄,贾桂珍.运用 OD 值法进行细菌计数的研究[J].中国家禽,1996(4):26
8. 黄秀梨.微生物学实验指导[M].高等教育出版社,1999

(王新风供稿)

## 实验 22、酸乳的制作和酸乳生产菌的分离实验

### 一、实验性质和项目来源

**实验性质：**综合性实验

**项目来源：**本系 2002 级学生年度论文转化

### 二、实验目的与要求

通过该实验，同学们不仅丰富了视野，同时，学会了无菌条件下平板划线分离与斜面试种技术，微生物培养技术，油镜的观察与使用，革兰氏染色，细菌的单染以及细菌发酵技术，基本覆盖了微生物实验学科要求掌握的主要内容，从而极大的锻炼了学生的动手能力。

学会设计综合性实验和综合性实验报告规范的书写格式。

### 三、实验内容

1. 平板划线分离与斜面试种技术
2. 油镜的观察与使用
3. 革兰氏染色与细菌的单染
4. 发酵

### 四、实验安排

**时间安排：**本实验共 9 学时；2 学时准备实验；2 学时乳酸菌的分离与纯化；2 学时菌种初步鉴定观察；2 学时发酵制备乳酸；1.观察、描述、记载并讨论分析。

**分组安排：**每 5 人一组；每组分别选择一种不同乳酸产品作为起始分离乳酸菌的原材料(自由选择)。

**程序安排：**教师提供选择实验课题→学生自主上网数据库检索酸菌分离以及制备相关文献→分组写出实验流程设计书自主小组讨论实验方案→指导教师确认实验设计的可行性→实验准备→预实验→修改实验方案→进行实验

购买乳酸产品

选择合适的培养基种类→计算培养基需要量→配置培养基→灭菌待用。

### 五、操作

本实验需要的基本操作训练已经在前面的一些实验中学习过，在这里不再一一列出每一操作步骤。为了帮助预习，将有关操作名称列出，这些操作在建议参考书中都可以找到。

1. 培养基配置和灭菌
2. 无菌操作

3. 梯度稀释分离
4. 油镜的使用和细菌记数
5. 细菌染色观察
6. 乳酸发酵制备酸乳

## 六、试验报告记载内容

1. 姓名、班级、学号、小组编号、试验开始日期/时间
2. 材料和方法
  2. 1 材料 仪器和试剂、所购市场乳酸产品、培养基组成等
  2. 2 方法 培养基配置和灭菌, 无菌条件下梯度稀释分离纯化乳酸菌株,初步鉴定(革兰氏染色), 乳酸发酵制备酸乳
3. 结果  
品尝自制酸乳
4. 讨论

## 七、组间交流(学时数不占实验学时数, 将在理论课学时数中安排)

每组自由选定 1 人向全班做报告。

## 建议参考书

1. 顾珊红,黄鹏飞. 酸奶制品中乳酸菌的分离纯化及酸乳的制作 淮阴师范学院生物系学生实验报告
2. 黄秀梨.微生物学实验指导[M].高等教育出版社,1999
3. 金世琳等编.奶食品制作.呼和浩特:内蒙人民出版社.1987.87~110
4. 崔景泰等编.乳品加工技术.北京:农业出版社,1990.16~38
5. 李里特.大有发展前途的发酵乳.农畜产品加工.1990,(2) 35~46
6. 韩刚等.提高天然型酸奶质量的研究.农畜产品加工.1989.(1):3~5
7. 阮银岭等.酸奶饮料的研制.郑州畜牧专科学报.1990.10(2):1~3
8. R.E 希坎南.伯杰氏细菌鉴定手册[M].第九册.北京:科学出版社,1989.1-200
9. 杨洁冰.乳酸菌生物学基础及应用[M].北京:中国轻工业人出版社.1996.1-150
10. 周德庆.微生物学实验手册[M].上海:上海科技出版社.1993.20-70
11. 王海源.现代食品发酵技术[M].北京:中国轻工业出版社.1996.1-30

(于爱茸供稿)



## 实验 23、泡菜的制作以及乳酸菌的分离

### 一、实验性质和项目来源

**实验性质：**综合性实验

**项目来源：**本系 2002 级学生年度论文转化

### 二、实验目的与要求

通过该实验,同学们不仅丰富了视野,同时,学会了无菌条件下平板划线分离与斜面接种技术,微生物培养技术,油镜的观察与使用,革兰氏染色,细菌的单染以及细菌发酵技术,基本覆盖了微生物实验学科要求掌握的主要内容,从而极大的锻炼了学生的动手能力.

学会设计综合性实验和综合性实验报告规范的书写格式。

### 三、实验内容

1. 泡菜的制作
2. 平板划线分离与斜面接种技术
3. 油镜的观察与使用
4. 革兰氏染色与细菌的单染

### 四、实验安排

**时间安排：**本实验共 9 学时；2 学时准备实验（查阅文献资料，购买实验材料），提出实验设计方案；2 学时发酵制备泡菜（做好后不断观察）2 学时乳酸菌的分离与纯化；2 学时菌种初步鉴定观察；2 学时发酵制备乳酸；1 学时讨论分析并整理成实验报告。

**分组安排：**每 5 人一组；

**程序安排：**教师提供选择实验课题→学生自主上网数据库检索乳酸菌分离以及泡菜制备相关文献→分组写出实验流程设计书自主小组讨论实验方案→指导教师确认实验设计的可行性→实验准备→预实验→修改实验方案→进行实验

购买制备泡菜的原材料以及容器

选择合适的培养基种类→计算培养基需要量→配置培养基→灭菌待用。

### 五、操作

本实验需要的基本操作训练已经在前面的一些实验中学习过，在这里不再一一列出每一操作步骤。为了帮助预习，将有关操作名称列出，这些操作在建议参考书中都可以找到。

1. 泡菜的制备
2. 培养基配置和灭菌

3. 无菌操作
4. 梯度稀释分离
5. 油镜的使用和细菌记数
6. 细菌染色观察

## 六、试验报告记载内容

1. 姓名、班级、学号、小组编号、试验开始日期/时间
2. 材料和方法
  2. 1 材料 制备泡菜的蔬菜 容器 分离乳酸菌的培养基成分等
  2. 2 方法 泡菜制备（利用乳酸发酵） 培养基配置和灭菌, 无菌条件下梯度稀释分离纯化乳酸菌株, 初步鉴定(革兰氏染色等),
3. 结果  
品尝自制泡菜并与同学分享
4. 讨论

## 七、组间交流(学时数不占实验学时数, 将在理论课学时数中安排)

每组自由选定 1 人向全班做报告。

## 参考文献

- 周康恒 主编, 四川泡菜的制作方法, 中国酿造, 1995 年 03 期  
泡菜的制作, 农业知识, 1998 年 08 期  
四川泡菜制作全攻略, 新华论坛, 2004 年 09 月 27 日  
泡菜制作的基本知识, 食品伙伴网, 2005 年 04 月 11 日

(于爱茸 供稿)

## 实验 24 表面活性剂的降解菌的筛选

### 一、实验性质和项目来源

**实验性质：**综合性实验

**项目来源：**本系 2002 级学生年度论文转化

### 二、实验目的与要求

使学生学会萃取技术，较熟练掌握微生物的分离和纯化技术，独立完成培养基配制、灭菌、接种、到平板、涂布、稀释、观察、描述、鉴定、分类等实验项目。

学会设计综合性实验和综合性实验报告规范的书写格式。

### 三、实验内容

1. LAS（烷基苯磺硝酸盐）的提取与测定；
2. 从环境中分离表面活性剂的降解菌；
3. 表面活性剂的降解菌的活力测定

### 四、实验安排

**时间安排：**本实验共 8 学时；1 学时准备实验；2 学时 LAS 的提取与测定；2 学时表面活性剂降解菌的分离；2 学时表面活性剂降解菌的活力测定；1 学时观察、描述、记载。

**分组安排：**每 5 人一组。

**程序安排：**预习建议的参考书→了解常用的表面活性剂种类及其检测方法→分组写出实验流程设计书→指导教师确认实验设计的可行性→实验准备→预实验→修改实验方案→进行实验

选择合适的培养基种类→计算培养基需要量→配置培养基→灭菌待用。

LAS 的标准曲线绘制→表面活性剂的降解的分离和纯化→表面活性剂的降解菌的活力测定。

### 五、操作

本实验需要的基本操作训练已经在前面的一些实验中学习过，在这里不再一一列出每一操作步骤。为了帮助预习，将有关操作名称列出，这些操作在建议参考书中都可以找到。

1. 培养基配置和灭菌
2. 无菌操作
3. 显微镜使用
4. 分光光度计使用和标准曲线绘制
5. 纯培养技术
6. 萃取技术

## 六、试验报告记载内容

1. 姓名、班级、学号、小组编号、试验开始日期/时间
2. 材料和方法
  2. 1 材料 仪器和药品、培养基组成等
  2. 2 方法 培养基配置和灭菌、LAS 标准曲线的绘制、倾倒平板、降解菌的分离和纯化、活力测定
3. 结果  
LAS 降解力
4. 讨论

## 七、组间交流(学时数不占实验学时数，将在理论课学时数中安排)

每组自由选定 1 人向全班做报告。

## 建议参考书

1. 李阜棣,喻子牛,何绍江.农业微生物学实验技术[M].中国农业出版社,北京,1996:143-145
2. 赵斌,何绍江.微生物学实验[M].科学出版社,北京,2002:
3. 黄秀梨.微生物学实验指导[M].高等教育出版社,1999

(王新风供稿)

## 实验 25、蛋白酶生产菌的筛选与鉴定

### 一、实验性质和项目来源

**实验性质：**综合性实验

**项目来源：**本系教师科研课题转化

### 二、实验目的与要求

学会从土壤中分离有益微生物的方法，学会无菌条件下平板划线分离与斜面接种技术,微生物培养技术，油镜的观察与使用,革兰氏染色,细菌的单染以及细菌生理、生化鉴定技术。

学会设计综合性实验和综合性实验报告规范的书写格式。

### 三、实验内容

1. 土壤梯度稀释分离与筛选及斜面保藏技术
2. 油镜的观察与使用
3. 革兰氏染色与细菌的单染
4. 细菌生理、生化鉴定

### 四、实验安排

**时间安排：**本实验共 8 学时；1 学时，准备实验；3 学时，蛋白酶生产菌的分离与纯化；3 学时，菌种初步鉴定观察；1 学时，观察、描述、记载并讨论分析。

**分组安排：**每 5 人一组；

**程序安排：**教师提供选择实验课题→学生自主上数据库检索网查蛋白酶生产菌分离与鉴定相关文献→分组写出实验流程设计书自主小组讨论实验方案→指导教师确认实验设计的可行性→实验准备→预实验→修改实验方案→进行实验

选择合适的培养基种类→计算培养基需要量→配置培养基→灭菌待用。

### 五、操作

本实验需要的基本操作训练已经在前面的一些实验中学习过，在这里不再一一列出每一操作步骤。为了帮助预习，将有关操作名称列出，这些操作在建议参考书中都可以找到。

1. 培养基配置和灭菌
2. 无菌操作
3. 梯度稀释分离
4. 油镜的使用和细菌记数
5. 细菌染色观察

## 6. 细菌生理、生化鉴定

### 六、试验报告记载内容

1. 姓名、班级、学号、小组编号、试验开始日期/时间
2. 材料和方法
  2. 1 材料 仪器和试剂、土壤来源、培养基组成等
  2. 2 方法 培养基配置和灭菌, 无菌条件下梯度稀释分离纯化蛋白酶生产菌,初步鉴定方法(细菌大小、革兰氏染色、生理、生化指标),
3. 结果
  3. 1 蛋白酶生产菌的酶活大小
  3. 2 蛋白酶生产菌的初步鉴定结果
4. 讨论

### 七、组间交流(学时数不占实验学时数, 将在理论课学时数中安排)

每组自由选定 1 人向全班做报告。

### 建议参考书

1. 黄秀梨.微生物学实验指导[M].高等教育出版社,1999
2. R.E 希坎南.伯杰氏细菌鉴定手册[M].第九册.北京: 科学出版社, 1989.1-200
3. 周德庆.微生物学实验手册[M].上海: 上海科技出版社. 1993.20-70
4. 乔军,孟庆龄,贾桂珍.运用 OD 值法进行细菌计数的研究[J].中国家禽,1996(4):26
5. 唐兵,周林峰,陈向东,戴玄,彭珍荣.嗜热脂肪芽孢杆菌高温蛋白酶的产生条件及酶学性质[J].微生物学报,1999, 40: 188~193.
6. 林影,卢荣德.极端酶及其工业应用[J]. 工业微生物, 2000, 30 (2): 51~53.
7. Coolbear T, Whittaker JM, Danol RM. The effect of metal ions on the activity and thermostability of the extracellular proteinase from altherm-ophilic Bacillus, strain EA.1[J]. Biochem. J., 1992, 287: 3.
8. Fujiwara N, Masui A, Imanaka T. Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from and alkaliphilic an thermophilic Bacillus sp[J]. J. Biotechnol., 1993, 30(2): 245~246.
9. 金城,杨寿钧,刘宏迪,张树政. 耐热中性蛋白酶产生条件及酶的亲和层析纯化[J]. 微生物学报, 1994, 34(4): 285~292.

(张云峰供稿)

## 实验 26、活性污泥中微生物的纯系分离

### 一、实验性质和项目来源

**实验性质：**综合性实验

**项目来源：**兄弟高校实验项目

### 二、实验目的与要求

使学生综合应用微生物学基本原理和基本实验技术，独立完成不同类型微生物的分离、纯化、观察、描述、鉴定、分类。

### 三、实验内容

1. 从活性污泥(或其它环境样品)中分离下列不同生理类群的微生物

A.光合细菌 B.(自生)固氮菌 C.纤维分解菌 D.霉菌

2. 从活性污泥(或其它环境样品)中分离下列不同营养型微生物

A.自养型细菌 B.异养型细菌

3. 从活性污泥(或其它环境样品)中分离下列不同呼吸型微生物

A.好氧菌 B.兼厌氧菌

### 四、实验安排

**时间安排：**本实验共 6 学时；1 学时准备实验；1 学时培养、分离、纯化微生物；2 学时观察、描述、记载；2 学时进行分类学指标测定。

**分组安排：**每 5 人一组；每组分别选择一个类群的微生物作为研究对象(自由选择)。

**程序安排：**预习建议的参考书→预习所选择的微生物类群的生理特点(教材)→分组写出实验流程设计书→指导教师确认实验设计的可行性→实验准备→预实验→修改实验方案→进行实验

从建议的参考书中选择合适的培养基种类→计算培养基需要量→配置培养基→灭菌待用。

系列稀释活性污泥的稀释度选择→稀释活性污泥达到要求的稀释度→倾倒平板→培养(根据不同类群细菌的基本特征选择培养条件如光照、厌气等)→挑取单菌落 2~3 个(根据已经掌握的菌落特征选择)→划线法纯化(染色、显微镜观察等以确定纯度)→记载菌落特征以及细菌形态→转接斜面待用。

预习贝氏细菌鉴定手册→选择鉴定指标→测定、记载鉴定指标→确定细菌学名(尽可能鉴定到种)。

熟悉 BIOLOG 系统鉴定细菌的方法原理及操作程序。

### 五、操作

本实验需要的基本操作训练已经在前面的一些实验中学习过，在这里不再一一列出每一操作步骤。为了帮助预习，将有关操作名称列出，这些操作在建议参考书中都可以找到。

1. 培养基配置和灭菌
2. 无菌操作
3. 细菌染色和显微镜使用
4. 菌落特征观察和描述
5. 系列稀释方法
6. 细菌鉴定指标测定

## 六、试验报告记载内容

1. 姓名、班级、学号、小组编号、试验开始日期/时间、所选的微生物类群
2. 所用的培养基名称、组成；所使用的环境样品名称、来源
3. 培养基配置和灭菌操作步骤
4. 系列稀释、倾倒平板操作步骤；平板标记
5. 培养条件记载（温度、厌气/好气）
6. 菌落特征记载(注意：微生物之间的拮抗现象常常能够观察到；将具有拮抗现象的平板留下；进一步将可能有拮抗关系的 2 个菌落分离、纯化、保存，备下一个综合性实验使用)
7. 划线分离、纯化操作步骤记载
8. 微生物形态观察记载、纯菌株确认
9. 菌株鉴定指标结果记载、分类结果(学名)，用 BIOLOG 系统确认菌株学名。

## 七、组间交流(学时数不占实验学时数，将在理论课学时数中安排)

每组自由选定 1 人向全班做报告。

## 八、主要仪器设备及试剂

1. 生物培养箱
2. 细菌鉴定试剂
3. BIOLOG 分析系统

## 建议参考书

1. 《土壤微生物实验法》
2. 贝氏细菌鉴定手册(9 版)
3. 微生物学实验指导



## 研究性实验指导

### 实验 27、PDA 培养基的微波灭菌研究

#### 一、实验性质和项目来源

**实验性质：**探究性实验

**项目来源：**本系 2001 级学生年度论文转化

#### 二、实验目的与要求

使学生学会培养基的配制技术，较熟练应用高压蒸汽灭菌锅、家用微波炉和酸度计等，独立完成培养基配制、灭菌、接种、倒平板等实验项目。

学会设计实验，培养学生根据实验过程和结果探究出导致其结果的原因。

#### 三、实验内容

1. 培养基的配制；
2. 不同微波强度和灭菌时间对培养基灭菌效果的影响；
3. 微波灭菌对培养基温度、失水量、pH 等的影响；
4. 食用菌生长影响试验

#### 四、实验安排

**时间安排：**本实验共 12 学时；1 学时准备实验；3 学时微波强度和灭菌时间对培养基灭菌效果的实验；4 学时微波灭菌对培养基温度、失水量、pH 等的实验；3 学时微波灭菌培养基对食用菌生长影响试验；1 学时观察、描述、记载。

**分组安排：**每 5 人一组。

**程序安排：**预习建议的参考书→预习微波灭菌的原理→分组写出实验流程设计书→指导教师确认实验设计的可行性→实验准备→预实验→修改实验方案→进行实验

计算培养基需要量→配置培养基

确定最适微波强度和灭菌时间和载物量间的关系；探究微波灭菌对培养基温度、失水量、pH 等的影响；微波灭菌培养基对食用菌生长影响试验

#### 五、操作

本实验需要的基本操作训练已经在前面的一些实验中学习过，在这里不再一一列出每一操作步骤。为了帮助预习，将有关操作名称列出，这些操作在建议参考书中都可以找到。

1. 培养基配置和灭菌
2. 无菌操作

3. 显微镜使用和细菌记数

4. 酸度计使用

## 六、实验报告记载内容

1. 姓名、班级、学号、小组编号、实验开始日期/时间

2. 材料和方法

2. 1 材料 仪器和药品、培养基组成等

2. 2 方法 培养基配置和灭菌、

3. 结果

3. 1 微波强度和作用时间对培养基灭菌效果的影响

3. 2 微波强度和作用时间对培养基温度的影响

3. 3 微波强度和作用时间对培养基 PH 值的影响

3. 4 微波强度和作用时间对培养基失水率的影响

3. 5 微波灭菌的培养基与对照组的生长试验

4. 讨论

## 七、组间交流(学时数不占实验学时数, 将在理论课学时数中安排)

每组自由选定 1 人向全班做报告。

## 建议参考书

1. 董洪梅,王新风.PDA 培养基的微波灭菌研究[J].北方园艺.2005(1): 71-72

2. 谢昌华,李凤英,孔祥华等. 微波炉用于培养基灭菌研究[J] . 滨州医学院学报,1998,Vol,21(4): 330

3. 姚开, 武丽荣, 谭敏、微波加热条件下的细菌死亡特性值研究、食品科学、1999、(4): 20-23

4. 金钦汉.微波化学[M]北京、科学出版社、1999、320-321

5. 陈永勤、M S 培养基凝固效果和高温灭菌后 p H 值变化的研究、湖北大学学报(自然科学版)、2001、Vol23(3):280-283

6. Ball E、Hydrolysis of sucros by autoclving media-a neglected aspect in the technique of culture of plant tissues [J].Bell Torrey Bot Club,1953,80:409-411

7. 王鲁嘉. 微波灭菌试验及分析、云南大学学报(自然科学版)、1998、Vol 20(1):34~36

3. 黄秀梨.微生物学实验指导[M].高等教育出版社,1999

(王新风供稿)

## 实验 28、蛋白酶生产菌的产酶条件研究

### 一、实验性质和项目来源

**实验性质：**探究性实验

**项目来源：**本系教师科研课题转化

### 二、实验目的与要求

使学生学会产酶条件的研究方法及培养基的设计技术，较熟练应用高压蒸汽灭菌锅、摇床、酸度计、分光光度计等，独立完成培养基设计、配制、灭菌、接种、酶活的测定等实验项目。

学会设计实验，培养学生根据实验过程和结果探究出导致其结果的原因。

### 三、实验内容

1. 培养基的设计与配制；
2. 不同碳源、氮源、碳氮比、初始pH、Ca<sup>2+</sup>的浓度等对蛋白酶生产菌产酶的影响；
3. 培养温度、通气量、接种量等对蛋白酶生产菌产酶的影响；

### 四、实验安排

**时间安排：**本实验共 12 学时；1 学时，准备实验；2 学时，培养基的设计与配制；4 学时，不同碳源、氮源、碳氮比、初始pH、Ca<sup>2+</sup>的浓度等对蛋白酶生产菌产酶的影响；4 学时，培养温度、通气量、接种量等对蛋白酶生产菌产酶的影响；1 学时，观察、描述、记载。

**分组安排：**每 5 人一组。

**程序安排：**预习建议的参考书→培养基的设计原理及酶活的测定方法→分组写出实验流程设计书→指导教师确认实验设计的可行性→实验准备→预实验→修改实验方案→进行实验。

确定产酶的最适碳源、氮源、碳氮比、初始pH、Ca<sup>2+</sup>的浓度；探究培养温度、通气量、接种量等对蛋白酶生产菌产酶的影响。

### 五、操作

本实验需要的基本操作训练已经在前面的一些实验中学习过，在这里不再一一列出每一操作步骤。为了帮助预习，将有关操作名称列出，这些操作在建议参考书中都可以找到。

1. 培养基配置和灭菌
2. 无菌操作
3. 酶活的测定
4. 酸度计、摇床、分光光度计的使用

### 六、实验报告记载内容

1. 姓名、班级、学号、小组编号、实验开始日期/时间
2. 材料和方法
  2. 1 材料 仪器和药品、培养基组成等
  2. 2 方法 培养基配置和灭菌、酶活的测定方法
3. 结果
  3. 1 碳源对蛋白酶生产菌产酶的影响
  3. 2 氮源对蛋白酶生产菌产酶的影响
  3. 3 初始 pH 对蛋白酶生产菌产酶的影响
  3. 4  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度等对蛋白酶生产菌产酶的影响
  3. 5 培养温度对蛋白酶生产菌产酶的影响
  3. 6 通气量对蛋白酶生产菌产酶的影响
  3. 7 接种量等对蛋白酶生产菌产酶的影响
4. 讨论

**七、组间交流**(学时数不占实验学时数, 将在理论课学时数中安排)

每组自由选定 1 人向全班做报告。

**建议参考书**

- [1] 唐兵,周林峰,陈向东,戴玄,彭珍荣. 嗜热脂肪芽孢杆菌高温蛋白酶的产生条件及酶学性质[J]. 微生物学报,1999, 40: 188~193.
- [2] 林影,卢荣德.极端酶及其工业应用[J]. 工业微生物, 2000, 30 (2): 51~53.
- [3] Coolbear T, Whittaker JM, Danol RM. The effect of metal ions on the activity and thermostability of the extracellular proteinase from altherm-ophilic Bacillus, strain EA.1[J]. Biochem. J., 1992, 287: 3.
- [4] Fujiwara N, Masui A, Imanaka T. Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from and alkaliphilic an thermophilic Bacillus sp[J]. J. Biotechnol., 1993, 30(2): 245~246.
- [5]金城,杨寿钧,刘宏迪,张树政. 耐热中性蛋白酶产生条件及酶的亲和层析纯化[J]. 微生物学报, 1994, 34(4): 285~292.
- [6]黄秀梨.微生物学实验指导[M].高等教育出版社,1999

(张云峰供稿)

## 实验 29、松菇母种培养基的研究

### 一、实验性质和项目来源

实验性质：研究性实验

项目来源：食用菌研究小组研究课题和论文

### 二、实验目的和要求

使学生学会母种培养基配方的设计，不同配方培养基的批量制备，熟练掌握高压灭菌、无菌操作和母种培养技术，以及数据处理、分析研究和论文撰写方法，以上均在食用菌研究小组同学的指导下分组完成。

### 三、实验内容

1. 母种培养基配方设计：不同氮源及不同水平；不同碳源及不同水平；不同微量元素及不同水平；不同激素及不同水平；不同 pH 值，以上可任选 1—2 项。
2. 不同配方培养基批量制备的合理安排和操作。
3. 配制好的培养基分装试管，塞棉塞，扎把，用薄膜或牛皮纸包棉塞。
4. 高压蒸汽灭菌，摆斜面。
5. 无菌操作接入松菇菌种或其它食用菌菌种。
6. 培养观察，测量记录。
7. 数据整理，寻找规律和新发现。

### 四、实验安排

- 1、时间：本实验共需 12 学时：1 学时准备，1 学时设计，3 学时制备，1.5 学时灭菌，1.5 学时接种，（培养观察记录需延续 10 日以上，利用课外时间进行，不计入实验时间），2 学时数据整理，2 学时组间交流。
- 2、分组：每 4 人一组。

### 五、实验报告

实验报告按科研论文要求撰写，依次为：

标题

研究小组成员（含班级）

摘要

关键词

前言（研究背景）

材料和方法

结果和分析

小结或讨论

参考文献

## 六、组间交流

根据实际情况，如在论文撰写前进行，以讨论形式为主；如在论文撰写后进行，则以报告形式为主。

## 建议参考文献

- 1、翁梁，温鲁，孔庆环，等. 松菇母种培养基研究[J]. 北方园艺. 2005.
- 2、喻涟淮，温鲁，季红，等. 松菇原种和栽培种培养基研究[J]. 江苏农业科学. 2005.
- 3、王帅，温鲁，朱寿荣，等. 松菇菌种培养基添加木屑和增氧剂研究[J]. 林业实用技术. 2005.
- 4、张以俭，温鲁，葛宜和. 蚕蛹虫草母种培养基研究[J]. 中国蚕业. 2005.
- 5、暴增海，张功，温鲁，等. 食用菌栽培学[M]. 吉林科技出版社. 2002.
- 6、温鲁. 食用菌制种技术[M]. 江苏科技出版社. 1987.
- 7、汪昭月. 食用菌制种技术[M]. 金盾出版社. 2000.
- 8、黄秀梨. 微生物学实验指导[M]. 高等教育出版社. 1999.

(温鲁供稿)

## 第四部分 微生物实验技能的测评

微生物学实验是微生物教学的重要组成部分,对学生实验基本技能的培养,在教学中占有重要的位置。为了检验学生在经过微生物实验课学习后,对微生物实验基本技术和知识的掌握程度并对学生学习效果进行评定。测评内容包括对微生物学实验基本知识和技能的掌握,应用所学识进行实验设计及系统地完成实验的实际工作能力。下面是为此而设计的两种测方式,可选择其中的一种进行检测。

### 基本实验技能的检测

#### 一、实验目的和内容

目的:掌握微生物学的基本实验技能并进行测试。

内容:

1. 复习全部基本实验操作。
2. 教师对基本实验技能进行全面辅导,并接受学生的提问。
3. 开放实验室(固定开放时间,学生可自由进入实验室)。

#### 二、实验材料和用具

细菌、放线菌、酵母菌、霉菌菌种,细菌形态装片、培养基(液体、斜面、平板)、染色液。

载玻片、盖玻片、接种针、接种环、酒精灯、移液管、试管、培养皿、包装纸、线绳、高压蒸汽

灭菌锅、显微镜。

#### 三、基本步骤

(一)复习的主要内容

1. 实验的基本操作方法
  - (1) 培养基的配制。
  - (2) 试管、培养皿、移液管等的包扎。
  - (3) 物品的高压蒸汽灭菌和干热灭菌。
  - (4) 细菌制片、单染色、革兰氏染色及染色原理。
  - (5) 铺平板、制斜面。
  - (6) 从试管斜面菌种划线接种至平板。
  - (7) 从试管斜面菌种转接到试管斜面。

(8) 从试管斜面菌种转接至液体培养基。

## 2. 微生物的分离纯化

(1) 四大类群微生物的常用培养基及其 pH 范围。

(2) 涂布法和混菌法的平板接种方法。

(3) 穿刺接种。

(4) 菌悬液的梯度稀释。

(5) 划线分离纯化微生物。



## 实验设计及实施能力的测评

### 一、实验目的和内容

目的：了解学生对实验的知识内容的灵活应用能力。

内容：

1. 分析实验设计。
2. 学生自行设计实验。
3. 学生独立完成自行设计的实验，并基本达到预期结果。

### 二、学会进行实验设计

#### (一)实验设计的基本要求

1. 写出实验目的和基本原理。
2. 写出实验的基本要求。
3. 详细写出实验的每一个步骤和注意问题。

#### (二)考试前的准备

指导学生选定实验题目，或由老师指定题目，提供参考书目。

#### (三)考试方式

学生在规定时间内递交实验设计。

#### (四)评分标准

1. 具有科学性和可行性，有一定创新。(优)
2. 无科学性错误，设计不够细致，基本可行。(良)
3. 无明显科学性错误，设计有部分不够合理。(中)
4. 无明显科学性错误，设计不够合理。(及格)
5. 有明显科学性错误，设计不合理。(不及格)

### 三、自行设计实验独立完成的考核

#### (一)考前准备

1. 教师帮助学生修改和完善实验设计。
2. 为学生提供必要的仪器药品。

#### (二)考试方式

在一定时间里，实验室开放，学生在规定时间内，将实验设计完成，并提交

### (三)评分标准

1. 顺利完成实验，得到合理结果，实验中操作正确，熟练。(优)
2. 完成实验，得到较合理结果，实验中操作正确。(良)
3. 完成实验，得到较合理结果，实验操作基本正确。(中)
4. 完成实验，未得到合理结果，实验操作基本正确。(及格)
5. 未得到合理结果，未完成实验，实验中操作不熟练，不正确。(不及格)

### (四)注意事项

1. 注意实验室安全，老师要现场监督和检查。
2. 如果条件不充许单个学生完成考试实验，可分组进行。

## 后 记

在长期的教学实践中我们发现，虽然在微生物课程开设前，学生已有了一年多的高校学习经历，对高校的教学模式有了比较深的了解，其自主学习的能力也有了一定程度上的提高，同时还经历了植物学、化学和动物学等课程的学习，但我们还是发现有一些学生的学习是被动的学习过程，体现在实验过程中，主要有：只满足于会按照实验指导手册去做，而不去探究为什么；只忠实地记录每一步实验结果，而不去分析为什么；只追求实验结果是不是正确，对实验中的一些异常现象不去思考为什么等方面。这种被动的、从属的学习行为，不利于培养学生的主动性、创造性，也与当前基础教育课程改革相悖，为了提高学生的创新能力和实践能力，我们认为建构一种新型的开放性实验教学模式已势在必行。为了适应现代教学实验改革的需要，我们结合近年来的教学实践，特别是在综合性实验教学改革方面的尝试，选择了一些优秀的学生实验报告，和教师的研究课题中可操作的部分，以及与其他高校交流的实验项目，进行了科学规范的修正，编写了这一本实验手册，希望为实验教师和学生提供一定的帮助。

《微生物学实验指导》是淮阴师范学院生物实验中心实施实验教学综合改革试验中组织编写的系列实验指导书之一。参加本册编写的有王新风、温鲁、于爱茸和张云峰等老师。在编写中系列实验指导书主编淮阴师范学院生物系罗玉明主任审定了全书。

本书编写过程中参考了黄秀梨主编的《微生物学实验指导》。

《微生物学实验指导》编写组

2004年12月