

# 《农业与环境微生物学》

## 实验指导书

北京农学院食品科学系

刘 慧编著

二〇〇六年七月

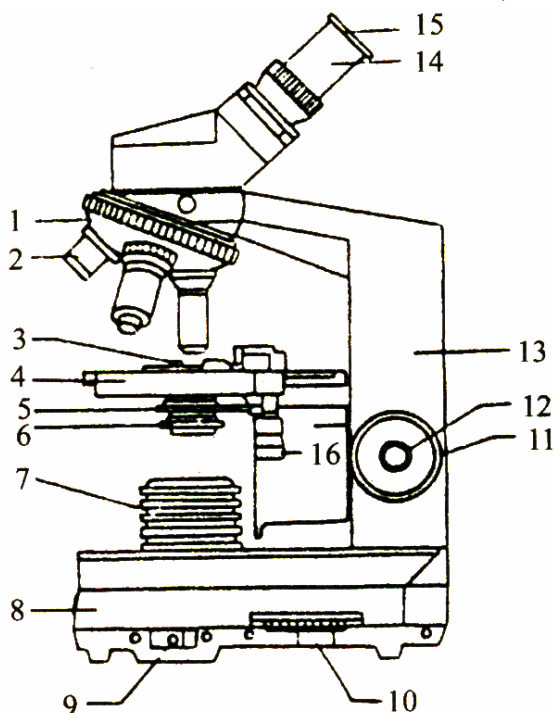
# 实验一 显微镜的使用及细菌形态的观察

## 1 目的要求

- (1) 了解普通光学显微镜的构造，各部分的功能和使用方法。
- (2) 学习并掌握油镜的原理和使用方法，熟悉几种常见微生物的基本形态。

## 2 普通光学显微镜的构造与油镜的工作原理

**2.1 普通光学显微镜的构造** 显微镜的构造可分为机械装置和光学系统两大部分。机械装置包括镜座、镜筒、镜臂、物镜转换器、载物台、推进器、粗调螺旋、微调螺旋、光圈等部件；光学系统由接目镜、接物镜、聚光器、反光镜等组成(图 1-1)。



(1) 镜座 镜座是显微镜底座，用以支撑全镜，呈长方形。其上装有电源开关、照明光源、保险丝、光源滑动变阻器等。

(2) 镜筒 镜筒上连接目镜、下连接转换器，光线从筒中通过。安装目镜的镜筒分为可调式的单筒和固定式的双筒两种。从镜筒上缘到物镜转换器螺旋口之间的距离称为筒长。国际上将显微镜的标准筒长定为 160mm，此数字标在物镜的外壳上。

(3) 镜臂 连接镜筒和镜座。有的镜臂是固定的，有的可向后倾斜，其作用是支撑镜筒、载物台、聚光器和调焦装置等。

(4) 物镜转换器 转换器上可安装 3~5 个物镜，一般是 3 个物镜(低倍镜、高倍镜、油镜)。转动转换器时，可以按需要调换各种物镜，将之推到使用位置上。

图 1-1 光学显微镜构造示意图

1. 物镜转换器；2. 物镜；3. 游标卡尺；4. 载物台；
5. 聚光器；6. 虹彩光圈；7. 光源；8. 镜座；9. 电源开关；10. 光源滑动变阻器；11. 粗调螺旋；12. 微调螺旋；13. 镜臂；14. 镜筒；15. 目镜；16. 标本移动螺旋

(5) 载物台 载物台呈长方形，中央有一孔，为光线通路。在台上装有弹簧标本夹和推进器。

(6) 推进器 推进器由一横一纵两个推进齿轴和齿条构成，转动其上螺旋，可使标本片向前、后、左、右移动。研究型显微镜的纵横架杆上刻有刻度标尺，构成精密的平面坐标系。如需要重复观察已检查标本的某一物像时，可在第一次检查时记下纵横标尺的数值，下次按数值移动推进器，就可以找到原来标本的位置。

(7) 粗调螺旋 粗调螺旋用于粗放调节物镜和标本的距离。老式单目镜显微镜的粗调螺旋向前转动，镜头下降接近标本。新式双目镜显微镜(如 Motic 显微镜)镜检时，双手向后扭动使载物台上升，让标本接近物镜，反之则下降，标本远离物镜。使用显微镜观察标本时，主要使用粗调螺旋调节。

(8) 微调螺旋 用粗调螺旋只能粗放地调节焦距，难于观察到清晰的物像，因而需要用微调螺旋做进一步调节。其每转一周，镜筒移动 0.1 mm。新式研究型显微镜粗、微螺旋为共轴式。原则上，微调螺旋每次旋转不超过一周。

(9) 光圈 在聚光器下方，可任意开闭，用来调节射入聚光器光线强弱。

(10) 接目镜 目镜作用是将物镜放大的实像进行第二次放大，形成虚像并映入眼帘。不同的目镜上刻有 5×、10×、15× 等字样，以表示该目镜的放大倍数。普通光学显微镜常用的目镜主要

是惠更斯目镜。研究型显微镜配有性能更好的目镜，如补偿目镜(K)、平场目镜(P)和广视场目镜(WF)等。照相时选用照相目镜(NFK)。

(11)接物镜 物镜安装于转换器上，入射光线通过物镜时使被检物像形成第一次放大的实像。普通显微镜装有低倍镜(10×)、高倍镜(40×)和油镜(100×)三种消色差物镜，外壳上标有“Ach”字样，通常与惠更斯目镜配合使用。使用低倍镜和高倍镜时，物镜与标本间的介质是空气，称之为干燥系物镜。；而使用油镜时，物镜与标本间的介质是香柏油，称之为油浸系物镜。油镜标有HI或Oil字样及镜头下缘刻有白环或红环。检查细菌标本要用油镜。研究型显微镜配有性能更好的物镜，如复消色差物镜(Apo)、平场物镜(Plan)、平场消色差物镜(Plan Ach)、平场复消色差物镜(Plan Apo)等。

(12)聚光器 由聚光透镜、升降螺旋和能调节开孔大小的虹彩光圈组成，装在载物台下面，可通过升降螺旋而起落。其作用是将光线聚光于标本之上，增强照明度。普通光学显微镜配置的都是明视场聚光器，分为阿贝聚光器、齐明聚光器和摇出聚光器三种。研究型显微镜(如 Motic BA400 显微镜)配有性能更好的消色差摇出式聚光器，能将聚光器上透镜从光路中摇出，满足低倍物镜(4×)大视场照明的需要。齐明聚光器虽质量最好，但不适于4倍以下的物镜。

(13)反光镜 早期普通光学显微镜常用自然光检视标本，在镜座上装有反光镜，由平凹两面镜子组成。光线较强时用平面镜，光弱时用凹面镜，可自由旋转方向，以将最佳光线反射入聚光器。新式研究型显微镜镜座上装有光源，并由电流调节螺旋来调节光照强度。

**2.2 油镜使用的工作原理** 在显微镜的光学系统中，物镜的性能直接影响显微镜的分辨率。与其他物镜相比，油镜的放大倍数最大，使用也比较特殊，需在载玻片与镜头之间滴加香柏油，这主要有如下二方面的原因：

(1)增加照明亮度 油镜的放大倍数虽然可达100×，但因焦距很短，镜头直径很小，进入镜头中的光线亦较少，故所需要的光照强度最大(图 1-2)。当油镜头和标本玻片之间的介质为空气时，因空气折射率( $n=1.00$ )与玻璃的折射率( $n=1.55$ )不同，会有一部分光线被折射而不能进入镜头内，使视野更暗，物像显现不清。若在镜头与标本玻片之间滴上与玻璃的折射率相仿的油类，如香柏油( $n=1.52$ )等，则光线不发生折射，从而增加了视野的照明亮度(图 1-3)。

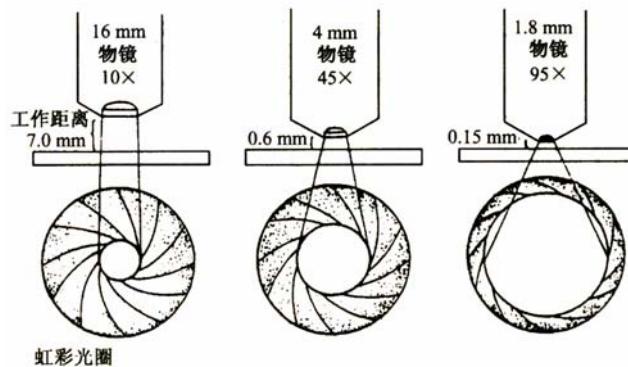


图 1-2 物镜的焦距、工作距离和虹彩光圈的关系

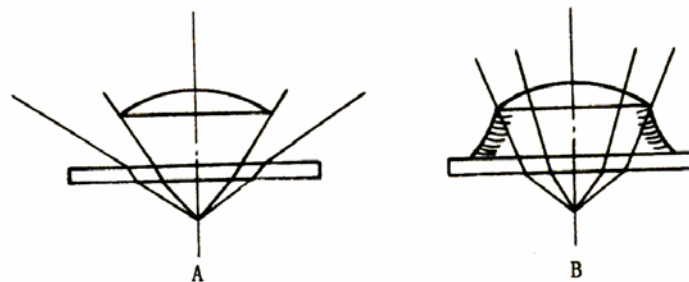


图 1-3 干燥系物镜 A 与油浸系物镜 B 的光线通路

(2) 增加显微镜的分辨力 显微镜的分辨力或分辨率是指显微镜能够辨别两点之间最小距离的能力。它与物镜的数值口径成正比, 与光波长度成反比。因此, 当光波波长一定时, 物镜的数值口径愈大, 则显微镜的分辨力愈大, 被检物体的细微结构也愈清晰地区别出来。分辨力可由下列公式表示:

$$\text{分辨力(最大可分辨距离)}=\lambda/2NA$$

式中  $\lambda$  为光波波长(0.4~0.7  $\mu\text{m}$ ); NA 为物镜的数值口径值。它是光线投射到物镜上的最大角度(称为镜口角)的一半正弦, 与介质的折射率之乘积, 即  $NA=n \cdot \sin\alpha$ 。式中  $\alpha$  为光线最大入射角的半数, 它取决于物镜的直径和焦距。在实际应用中光线入射角最大只能达到  $120^\circ$ , 其半数的正弦为  $\sin 60^\circ=0.87$ 。以空气为介质时,  $NA=1 \times 0.87=0.87$ ; 而以香柏油为介质时,  $NA=1.52 \times 0.87=1.32$ , 故以香柏油为介质的油镜要比用空气为介质的高倍镜分辨力高, 因而细菌用油镜才可观察到。

然而, 显微镜的放大倍数越高, 并不等于其分辨力越高。假如采用放大率为  $40\times$  的高倍镜( $NA=0.65$ )和放大率为  $24\times$  的目镜, 虽然总放大率为  $960\times$ , 但其分辨力只有  $0.42\mu\text{m}$ ; 若采用放大率为  $90\times$  的油镜( $NA=1.25$ )和放大率为  $9\times$  的目镜, 虽然总放大率为  $810\times$ , 但却能分辨出  $0.22\mu\text{m}$  之间的距离, 因而显微镜的总放大倍数越高并不是其分辨力越高。

### 3 实验材料

3.1 菌种 细菌三型、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)等染色玻片标本。

3.2 溶液或试剂 香柏油、二甲苯。

3.3 仪器与其他用具 显微镜、擦镜纸等。

### 4 普通光学显微镜的使用流程

安置→调光源→调目镜→调聚光器→镜检(低倍镜→高倍镜→油镜)→擦物镜头→复原

### 5 操作步骤

#### 5.1 观察前的准备

5.1.1 显微镜的安置 置显微镜于平整的实验台上, 镜座距实验台边缘约  $10\text{cm}$ 。镜检时姿势要端正。一般用左眼观察, 右眼绘图或记录, 两眼同时睁开, 以减少眼睛疲劳。

5.1.2 光源调节 安装在镜座内的光源灯可通过调节电压以获得适当的照明亮度。反光镜采集自然光或灯光作为照明光源时, 较强的自然光源用平面镜, 较弱的照明光源用凹面镜, 并调节其角度, 使视野内的亮度适宜、均匀。凡检查染色标本时, 光线应强; 检查未染色标本时, 光线不宜太强, 可通过光圈、聚光器、反光镜调节适宜的光线。

5.1.3 双筒显微镜的目镜调节 根据使用者的个人情况, 双筒显微镜的目镜间距可以适当调节, 而左目镜上一般还配有屈光度调节环, 可以适应眼距不同或两眼视力有差异的不同观察者。

5.1.4 聚光器数值孔径值的调节 正确使用聚光镜才能提高镜检效果。聚光镜的主要参数是数值孔径, 它有一定的可变范围, 一般聚光镜边框上的数字是代表它的最大数值孔径, 通过调节聚光镜下面可变光阑的开放程度, 可以得到各种不同的数值孔径, 以适应不同物镜的需要。

5.2 显微镜观察 一般情况下, 特别是初学者, 进行显微镜观察时, 应遵守从低倍镜到高倍镜, 再到油镜的观察程序。因为低倍数物镜视野相对较大, 易发现目标和确定检查的位置。

5.2.1 低倍镜观察 将标本片置于载物台上, 用弹簧夹固定, 移动推进器, 使观察对象处于物镜正下方。旋动粗调螺旋, 使物镜与标本片距离约  $1\text{cm}$ (单筒显微镜)或  $0.5\text{cm}$ (双筒显微镜), 再以粗螺旋调节, 使镜头缓慢升起(单筒), 或使载物台缓慢下降(双筒), 直到物像出现后再用微螺旋调节使物像清晰。然后移动标本玻片, 将观察目标移至视野中心后, 仔细观察与绘图。

5.2.2 高倍镜观察 由低倍镜直接转换成高倍镜至正下方。转换时, 需用眼睛于侧面观察, 避免镜头与玻片相撞。调节聚光器和光圈使视野亮度适宜, 而后微调细螺旋使物像清晰。利用推进器移动标本找到需要观察的部位, 并移至视野中心仔细观察或准备用油镜观察。

5.2.3 油镜观察 先将光圈开至最大, 集光器升至最高位, 调节好光源, 使照明亮度最强。在高倍

镜或低倍镜下找到要观察的样品区域后，用粗调节螺旋将镜筒远离载物台，然后在标本上滴加香柏油(切勿过多，否则视野模糊)，转换油镜头，从侧面注视，小心将之浸入油滴中，使其几乎与标本片相接触为度(注意：切不可将油镜头压到标本，否则不仅压碎玻片，还会损坏镜头)。用粗螺旋缓慢升起镜筒(单镜筒)或下降载物台(双镜筒)，至物像出现后，再以细螺旋调至物像清晰。如果油镜已离开油面而仍未见物像，可再将镜头浸入油中，重复以上操作至物像清晰为止。

**5.3 显微镜用后的处理** 观察完毕，台起镜头，立即用擦镜纸擦去镜头上的油，再用擦镜纸蘸取少许二甲苯(香柏油溶于二甲苯)或乙醚乙醇混合液擦去镜头上的残留油迹，最后再用擦镜纸擦去残留的二甲苯。严禁用手或其他纸擦镜头，以免损坏镜头。用绸布清洁显微镜的金属部件。

将各部分还原，将物镜转成“八”字形，再将载物台下降至最低，降下聚光器，以免与物镜相撞，反光镜垂直于镜座。套上镜套，放回柜内或镜箱中。

## 6 实验结果与报告

(1) 分别绘出用油镜观察到的细菌的形态图。注意观察它们的个体形态、大小、排列方式。有芽孢的细菌，观察其菌体两端情况及芽孢着生位置。

## 7 思考题

(1) 观察细菌时为何使用油镜？它与干燥系物镜使用方法有何不同？使用时注意哪些问题？

(2) 普通光学显微镜的目镜与物镜的常用放大倍数有几种？显微镜的放大倍数越高，分辨力越高吗？为什么？举例说明。

(3) 试列表比较低倍镜、高倍镜及油镜各方面的差异。为什么在使用高倍镜及油镜时应特别注意避免粗调节螺旋的误操作？

(4) 根据实验体会，谈谈应如何根据所观察微生物的大小，选择不同的物镜进行有效的观察。

# 实验二 细菌的革兰氏染色及其形态观察

## 1 目的要求

(1) 了解革兰氏染色法的原理及其在细菌分类鉴定中的重要性。

(2) 学习掌握革兰氏染色技术，进一步熟练光学显微镜油镜的使用技术。

## 2 基本原理

革兰氏染色法是细菌学中最重要鉴别染色法。根据细菌细胞壁的结构和化学组成的不同，经革兰氏染色后，呈现不同的染色反应，可将所有细菌区分为两大类，即革兰氏阳性菌(用 $G^+$ 表示)和革兰氏阴性菌(用 $G^-$ 表示)。当细菌用结晶紫初染后，像简单染色法一样，所有细菌都被染成初染剂的蓝紫色。碘作为媒染剂，它能与结晶紫结合成结晶紫—碘的复合物，从而增强了染料与细菌的结合力。染色关键在于脱色剂的脱色作用。当用乙醇(或丙酮)处理时，两类细菌的脱色效果是不同的。 $G^+$ 细菌的细胞壁主要由肽聚糖形成的网状结构组成，壁厚、类脂质含量较低，用乙醇(或丙酮)脱色时细胞壁脱水、使肽聚糖层的网状结构孔径缩小，透性降低，从而使结晶紫—碘的复合物不易被洗脱而保留在细胞内，经脱色和复染后仍保留初染剂的蓝紫色。 $G^-$ 细菌则不同，由于其细胞壁肽聚糖层较薄、类脂含量较高，所以当脱色处理时，类脂质被乙醇(或丙酮)溶解，细胞壁通透性增大，使结晶紫—碘的复合物比较容易被洗脱出来，用复染剂复染后，细胞被染上复染剂的红色。

## 3 实验材料

**3.1 菌种** 大肠杆菌(*Escherichia coli*)约24h营养琼脂斜面培养物，枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)约18~20h营养琼脂斜面培养物。

**3.2 染色剂** 草酸铵结晶紫染色液、鲁格尔氏碘液、95%乙醇、0.5%番红(沙黄)染色液。

**3.3 仪器与其他用具** 显微镜、酒精灯、载玻片、接种环、双层瓶(内装香柏油和二甲苯，因二甲苯有毒及容易损坏镜头，可用乙醚乙醇混合液替代二甲苯)、生理盐水、擦镜头纸、吸水滤纸、纱布、火柴、玻璃铅笔、玻片夹或镊子等。

## 4 实验流程

涂片→干燥→固定→草酸铵结晶紫初染(1min)→水洗→碘液媒染(1min)→水洗→95%乙醇脱色(30s)→水洗→沙黄复染(1min)→水洗→滤纸吸干→镜检

## 5 操作步骤

**5.1 制片** 取菌种培养物按简单染色法中的常规涂片、干燥、固定进行制片。注意要用活跃生长期的幼龄培养物做革兰氏染色。

**5.2 初染** 在涂片菌膜处滴加草酸铵结晶紫适量(以刚好将菌膜覆盖为宜),染色 1~2min,倾去染色液,细水冲洗至洗出液为无色。

**5.3 媒染** 滴加碘液于涂片上,作用 1min,水洗。

**5.4 脱色** 用滤纸吸去玻片上的残水,滴加 95%酒精于涂片上,轻轻摆动玻片,直至乙醇脱色刚好不出现紫色为止,一般 30s(如牛乳培养物用 60s)后立即水洗,终止脱色。

**5.5 复染** 沙黄复染 1~2min,水洗。

**5.6 镜检** 用滤纸吸干或自然干燥,油镜检查。 $G^+$ 菌呈蓝紫色, $G^-$ 菌呈红色。

**革兰氏染色的注意事项:** ①涂片不宜过厚,勿使细菌密集重叠,影响脱色效果,否则脱色不完全造成假阳性。镜检时应以视野内分散细胞的染色反应为标准。②火焰固定不宜过热,以玻片不烫手为宜,否则菌体细胞变形。③滴加染色液与酒精时一定要覆盖整个菌膜,否则部分菌膜未受处理,亦可造成假象。④乙醇脱色是革兰氏染色操作的关键环节。如脱色过度,则 $G^+$ 菌被误染成 $G^-$ 菌;而脱色不足, $G^-$ 菌被误染成 $G^+$ 菌。在染色方法正确无误前提下,如菌龄过长,死亡或细胞壁受损伤的 $G^+$ 菌也会呈阴性反应,故革兰氏染色要用活跃生长期的幼龄培养物。

## 6 示范

在示范镜下观察大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、钩端螺旋菌、副溶血性弧菌的形态及排列方式。

**7 实验结果与报告** 根据观察结果,按比例大小绘出革兰氏染色制片中细菌的形态图,并说明各菌的形状、颜色和革兰氏染色反应。

## 8 思考题

- (1) 详叙革兰氏染色的原理及操作方法,染色时应注意哪些问题?
- (2) 哪些环节会影响革兰氏染色结果的正确性?其中最关键的环节是什么?
- (3) 不经过复染这一步,能否区别 $G^+$ 菌和 $G^-$ 菌?
- (4) 为什么要求制片完全干燥后才能用油镜观察?
- (5) 当你对未知菌进行革兰氏染色时,怎样保证操作正确,结果可靠?

# 实验三 霉菌形态及菌落特征的观察

## 1 目的和要求

- (1) 学习并掌握观察四类常见霉菌形态特征的基本方法。
- (2) 掌握青霉、曲霉的小室载片培养法,以便更好地观察其个体形态。
- (3) 观察霉菌的平板菌落特征,了解霉菌的菌落特征在丝状真菌形态学鉴定上的重要性。

## 2 基本原理

霉菌是由复杂的菌丝体组成。它分为基内菌丝或营养菌丝、气生菌丝或繁殖菌丝,由繁殖菌丝产生孢子。霉菌的繁殖菌丝及孢子的形态特征是识别不同种类霉菌的重要依据。观察霉菌的形态常用的有下列三种方法:①乳酸石炭酸棉蓝浸片法:是将培养物置于乳酸石炭酸棉蓝染色液中,制成霉菌制片。由于霉菌菌丝较粗大(约为 3~10 $\mu\text{m}$ ),置于水中观察时,菌丝容易收缩变形,故常用乳酸石炭酸棉蓝染色液制片使细胞不会变形,染液的蓝色能增强反差,并具有防腐、防干燥、防止孢子飞散作用,能保持较长时间,必要时还可用光学树脂封固,制成永久标本长期保存。但用接种针(或

小镊子)挑取菌丝体时,菌体各部分结构在制片时易被破坏,不利于观察其完整形态。②小室载玻片培养法:用无菌操作将培养基琼脂薄层置于载玻片上,接种后盖上盖玻片培养,霉菌即在载玻片和盖玻片之间的有限空间内沿盖玻片横向生长。培养一定时间后,将载玻片上的培养物置显微镜下观察。这种方法可以保持霉菌自然生长状态,便于观察到霉菌完整的营养和气生菌丝体的特化形态,例如曲霉的足细胞、顶囊,青霉的分生孢子梗、根霉的匍匐枝、假根等。此外,也便于观察不同生长时期的培养物。③玻璃纸培养法:其操作方法与放线菌的玻璃纸培养观察方法相似。此种方法用于观察不同生长阶段霉菌的形态,亦可获得良好效果。

霉菌在固体培养基上生长呈棉絮状(毛霉)、蜘蛛网状(根霉)、绒毛状(曲霉)和地毯状(青霉)的菌落。其繁殖方式多为无性繁殖和少为有性繁殖。霉菌的菌丝体及其菌落形态特征是霉菌分类、鉴定的重要依据。

### 3 实验材料

**3.1 菌种** 黑曲霉、产黄青霉、黑根霉和总状毛霉 28~30℃培养 3~5d 的 PDA(或麦芽汁)斜面和平板培养物(点植接种)、培养根霉假根的 PDA 平板培养物、培养霉菌的小室载玻片培养物。

**3.2 培养基** 马铃薯葡萄糖(PDA)琼脂培养基、麦芽汁琼脂培养基。

**3.3 试剂与染色剂** 乳酸石炭酸棉蓝染色液、50%乙醇、20%甘油保湿剂、无菌生理盐水。

**3.4 仪器与其他用具** 接种环、接种钩、解剖针、解剖刀、镊子、酒精灯、载玻片、盖玻片、透明胶带、圆形滤纸片、U形玻璃棒、无菌平皿、无菌细口滴管、格尺、普通光学显微镜、体视显微镜、恒温培养箱等。

### 4 操作步骤

#### 4.1 霉菌的形态观察

**4.1.1 乳酸石炭酸棉蓝浸片法** 在载玻片上滴一滴乳酸石炭酸棉蓝染色液,用解剖针(或小镊子)从霉菌菌落边缘处挑取少量已产孢子的霉菌菌丝,先置于 50%乙醇中浸一下以洗去脱落的孢子,再置于载玻片上的染液中,用解剖针小心地将菌丝分散开。盖上盖玻片(注意勿压入气泡和移动盖玻片,以免影响观察),置于低倍镜和高倍镜下观察四类霉菌内容如下:

**根霉:**用低倍镜观察孢子囊梗,囊轴等,用高倍镜观察孢子囊孢子的形状,大小。将根霉斜面培养物置于显微镜载物台上,用低倍镜观察根霉的孢子囊柄、孢子囊、假根和匍匐枝。

**毛霉:**用低倍镜观察孢子囊梗,囊轴等,用高倍镜观察孢子囊孢子的形状,大小。将毛霉斜面培养物置于显微镜载物台上,用低倍镜观察毛霉的孢子囊梗粗细、孢子囊大小、形状、色泽等。

**曲霉:**在高倍镜下观察菌丝有无隔膜,分生孢子着生位置,辨认分生孢子梗、顶囊、小梗和分生孢子。

**青霉:**在高倍镜下观察菌丝有无隔膜,分生孢子梗、副枝、小梗和分生孢子的形状等。

**4.1.2 粘片法** 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。

#### 4.1.3 小室载玻片培养法

**(1)培养小室的灭菌** 将略小于平皿底部的圆形滤纸片 1 张、U 形玻璃棒、载玻片和两块盖玻片等按图 7-5 放入平皿内,盖上平皿盖,包扎后于 121℃ 湿热灭菌 30min,置 60℃ 烘箱中烘干备用。

**(2)琼脂块的制作** 取已灭菌的 PDA 琼脂培养基 6~7ml 注入另一灭菌平皿中,使之凝固成薄层。用解剖刀切成 0.5~1.0cm<sup>2</sup> 的琼脂块,并将其移至上述培养

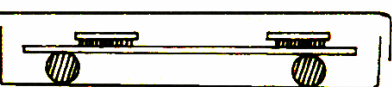
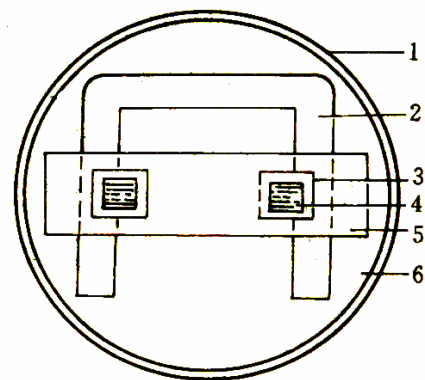


图 3-1 小室载玻片培养法示意图  
上:正面观;下:侧面观

1. 平皿; 2. U 形玻璃棒; 3. 盖玻片; 4. 培养物; 5. 载玻片; 6. 保湿用滤纸

室中的载玻片上(每片放两块)(图 3-1)。制作过程应注意无菌操作。

**(3) 接种和培养** 用接种环或接种钩挑取很少量的青霉(曲霉、根霉、毛霉)的孢子接种于培养基四周,用无菌镊子将盖玻片覆盖在琼脂块上,并轻压使之与载玻片间留有极小缝隙,但不能紧贴载玻片,否则不透气。**注意:接种量要少,尽可能将孢子分散接种在琼脂块边缘上,否则培养后菌丝过于稠密,影响观察。**先在平皿的滤纸上加 3~5ml 灭菌的 20% 甘油(用于保持平皿内的湿度),盖上皿盖,皿盖上注明菌名、组别和接种日期,置 28~30℃ 培养 3~5d。

**(4) 镜检** 培养至 1~2d 后,可以逐日连续观察到孢子的萌发、菌丝体的生长分化和子实体的形成过程。将小室内的载玻片取出,直接用低倍镜和高倍镜观察上述四类霉菌的形态,重点观察曲霉分生孢子头和青霉的帚状枝形态,根霉和毛霉的孢子囊和孢子囊孢子,菌丝有无隔膜等情况。

**4.1.4 根霉的假根观察方法** 将溶化并冷却至 50℃ 的 PDA 培养基倒入无菌平皿,其量约为平皿高度的 1/2。冷凝后,用接种环蘸取根霉孢子划线接种于平板表面。倒置平皿,在皿盖内放一无菌载玻片,于 28℃ 培养 2~3d 后,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,置低倍显微镜下观察假根及从根节上分化出的孢子囊梗、孢子囊、孢囊孢子和两个假根间的匍匐菌丝等结构(图 3-2)。

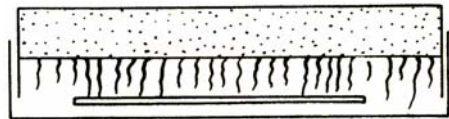


图 3-2 根霉假根的培养

#### 4.2 霉菌的菌落特征观察

在一定培养条件下(包括培养基的性状、培养温度和时间等),不同种属的霉菌在菌落形态上显出一定的特征,用肉眼或放大镜(低倍镜)即可观察。霉菌的菌落特征内容不同于细菌和酵母菌,可根据下列要求对各种霉菌的菌落特征进行观察,并加以记录。

**4.2.1 菌落大小** 分局限生长和蔓延生长,用格尺测量菌落的直径和高度。

**4.2.2 菌落的颜色** 表面和反面的颜色,基质的颜色变化(有无分泌水溶性色素)。

**4.2.3 菌落的组织形状** 分棉絮状、蜘蛛网状、绒毛状、地毯状等。

**4.2.4 菌落的表面形状** 分同心轮纹、放射状、疏松或紧密的菌丝,有无水滴等。

#### 5 示范

(1)在示范光学显微镜下观察黑曲霉、黄曲霉、杂色曲霉橘青霉、少根根霉、蓝色犁头霉在 PDA 琼脂培养基上纯培养的形态特征。注意观察霉菌的菌丝内有无隔膜,营养菌丝有无假根,无性孢子的种类(孢子囊孢子或分生孢子),孢子着生位置,形状、颜色。

(2)在体视显微镜下观察黑曲霉、黄曲霉、杂色曲霉、橘青霉、黑根霉、总状毛霉在 PDA 琼脂平板上的菌落特征。注意观察菌落的大小、颜色、组织形状、表面形状等。

#### 6 实验结果与报告

(1)根据观察结果,按比例大小绘图说明根霉、毛霉、曲霉(低倍镜下)、青霉(高倍镜下)的形态特征,并标明结构名称。

(2)按照霉菌的菌落特征内容列表描述你所观察到的曲霉、青霉、根霉、毛霉的菌落特征,并识别和区别它们之间的不同之处。

(3)观察采用小室载玻片培养法培养青霉和黑曲霉的形态特征。

#### 7 思考题

(1)你主要根据哪些形态特征来区分根霉和毛霉,青霉和曲霉?列表比较它们在形态结构上的异同。

(2)根据小室载玻片培养方法的基本原理,你认为上述操作过程中的哪些步骤可以根据具体情况作一些改进或可用其他方法替代?



# 实验四 土壤中微生物的分离

## 1 目的和要求

- (1)了解微生物分离与纯化的原理。
- (2)掌握微生物的各种平板分离与纯化方法，
- (3)重点掌握常用的平板划线分离技术和斜面试种技术。

## 2 基本原理

纯种分离技术是食品微生物学中重要的基本技术之一。为了生产和科研的需要，人们往往需从自然界混杂的微生物群体中分离出具有特殊功能的纯种微生物；或重新分离被其他微生物污染或因自发突变而丧失原有优良性状的菌株；或通过诱变及遗传改造后选出优良性状的突变株及重组菌株。

从混杂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。平板分离法普遍用于微生物的分离与纯化。其基本原理是选择适合于待分离微生物的最适培养基和培养条件，如培养基的营养成分、酸碱度、温度和氧等要求，或加入某种抑制剂创造一个只利于目的菌生长而抑制其他微生物生长的环境，从而可选择性地分离目的菌。

细菌或放线菌皆喜中性或微碱性环境，但细菌比放线菌生长快。分离放线菌时，一般在样品稀释液或高氏1号培养基中添加数滴10%的酚液。酵母菌和霉菌都喜酸性环境。在分离酵母菌和霉菌时只要选择好适宜的培养基和pH值，即可抑制细菌的生长。一般在培养基临用前需添加灭菌的乳酸，以降低培养基的pH值至3.5，或添加链霉素抑制细菌的生长。有时分离霉菌时，为了抑制菌丝蔓延生长，在马丁氏培养基中还加入去氧胆酸钠。微生物四大菌类的分离培养基、培养温度、培养时间见表4-1所示。

表 4-1 微生物四大菌类的分离和培养

| 样品来源        | 分离对象 | 分离方法     | 选择稀释度                             | 培养基名称        | 培养温度/℃ | 培养时间/d |
|-------------|------|----------|-----------------------------------|--------------|--------|--------|
| 土样          | 细菌   | 倾注、涂布、划线 | $10^{-5}$ , $10^{-6}$ , $10^{-7}$ | 牛肉膏蛋白胨       | 37     | 1~2    |
| 土样          | 放线菌  | 倾注、涂布、划线 | $10^{-3}$ , $10^{-4}$ , $10^{-5}$ | 高氏1号         | 28     | 5~7    |
| 土样          | 霉菌   | 倾注、涂布、划线 | $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$ | 马丁氏<br>马铃薯蔗糖 | 28~30  | 3~5    |
| 果园土样<br>或面肥 | 酵母菌  | 倾注、涂布、划线 | $10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ | 马铃薯蔗糖<br>马丁氏 | 28~30  | 2~3    |

微生物在固体培养基上生长形成的单个菌落，通常是由一个细胞繁殖而成的集合体。因此可通过挑取单菌落而获得一种纯培养。纯种(纯培养)是指一株菌种或一个培养物中所有的细胞或孢子都是由一个细胞分裂、繁殖而产生的后代。获取单个菌落的方法可通过稀释倾注平板、稀释涂布平板或平板划线等技术完成。值得指出的是，从微生物群体中经分离生长在平板上的单个菌落并不一定保证是纯培养。因此，纯培养的确除观察其菌落特征外，还要结合显微镜检测个体形态特征后才能确定，有些微生物的纯培养要经过一系列分离与纯化过程和多种特征鉴定才能得到。

土壤是微生物生活的大本营，它所含微生物无论是数量还是种类都是极其丰富的。因此土壤是微生物多样性的重要场所，是发掘微生物资源的重要基地，可以从中分离、纯化得到许多有价值的菌株。本实验将采用不同的培养基从土壤中分离不同类型的微生物。

## 3 实验材料

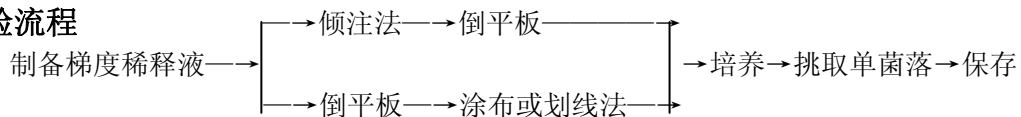
**3.1 菌源** 选定采土地点后，铲去表层土2~5cm，取5~10cm处的土样，放入灭菌的牛皮纸袋中备用。土样采集后应及时分离，否则应放在4℃冰箱中暂存。

**3.2 培养基** 牛肉膏蛋白胨、高氏1号、PDA或马丁氏琼脂培养基，制备平板和斜面试管。

**3.3 溶液或试剂** 10%酚液、无菌生理盐水(9ml/试管，99ml/150ml三角瓶，带适量玻璃珠)、链霉素、80%乳酸、75%酒精棉球。

**3.4 仪器及其他用品** 1ml无菌吸管、无菌培养皿、三角形无菌玻璃涂棒、接种环、显微镜、天平、无菌称量纸、药勺、试管架、记号笔等。

## 4 实验流程



## 5 操作步骤

**5.1 制备土壤稀释液** 称取土样 1g，放入盛 99ml 无菌生理盐水并带有玻璃珠的三角瓶中，振摇约 20min，使土样与水充分混合，将细胞分散，即成为  $10^{-2}$  的土壤悬液。用一支 1ml 无菌吸管从三角瓶中吸取 1ml 土壤悬液加入盛有 9ml 无菌生理盐水的大试管中(图 4-1①)，另换一支 1ml 吸管插入  $10^{-3}$  试管中反复吹吸 10 余次，进一步分散菌体(图 4-1③)。注意吹吸菌液时不要过猛太快，吸时将吸管伸入管底，吹时将吸管提到接近液面以下，避免将吸管中的过滤棉花浸湿或试管内液体外溢。或者右手持稀释液试管，用左手掌敲打试管 20~30 次，充分振荡混匀，即成为  $10^{-3}$  的稀释液。然后用此无菌吸管从  $10^{-3}$  试管中吸取 1ml 加入另一盛有 9ml 无菌生理盐水的试管中，另换一支 1ml 吸管插入  $10^{-4}$  试管中反复吹吸 10 余次，混合均匀。如此重复，连续稀释可依次制成  $10^{-3}$ ~ $10^{-7}$  不同稀释度的土壤稀释液，整个稀释过程如图 4-2 所示。注意：用吸管释放稀释液时，管尖不能接触液面，并且每一个梯度的稀释液换一支吸管。

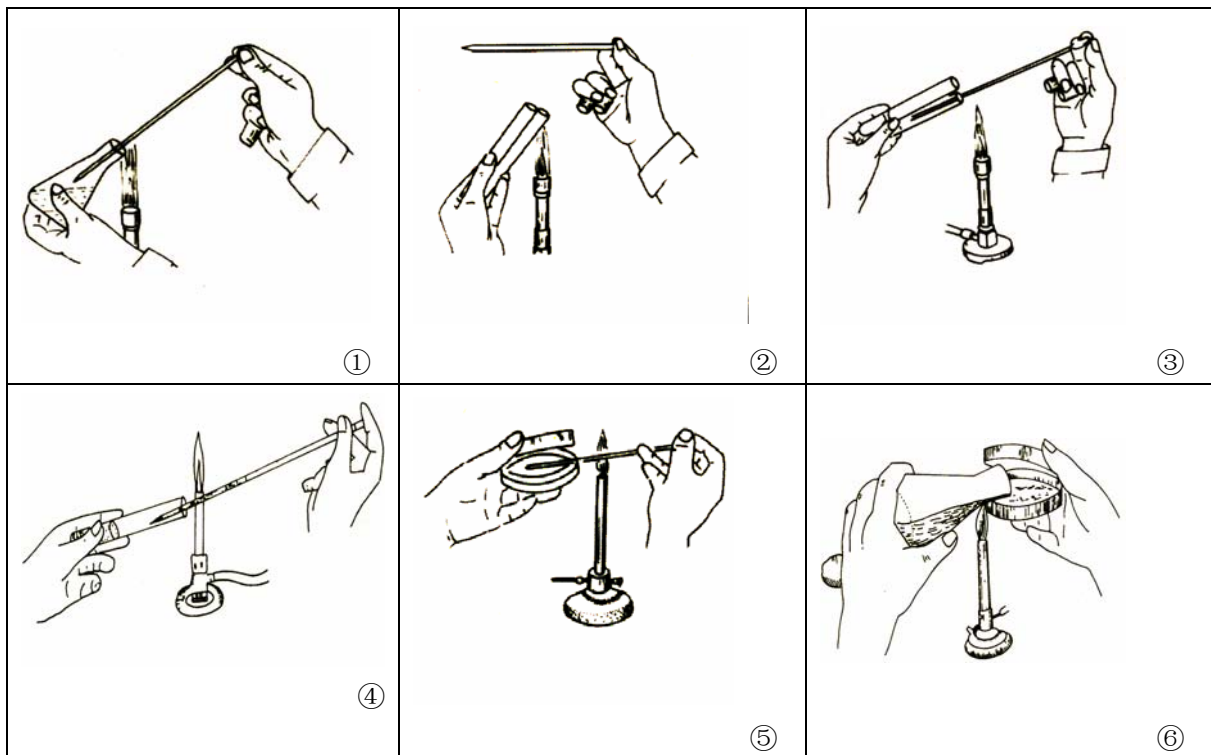


图 4-1 稀释分离无菌操作示意图

①火焰旁从三角瓶中取出土壤悬浮液； ②拔棉塞，灼烧试管口； ③火焰旁对试管中土壤悬浮液进行稀释混匀； ④用吸管取稀释菌液； ⑤将稀释菌液加入无菌培养皿中； ⑥将溶化冷却至 45~50℃ 培养基倒入培养皿内。

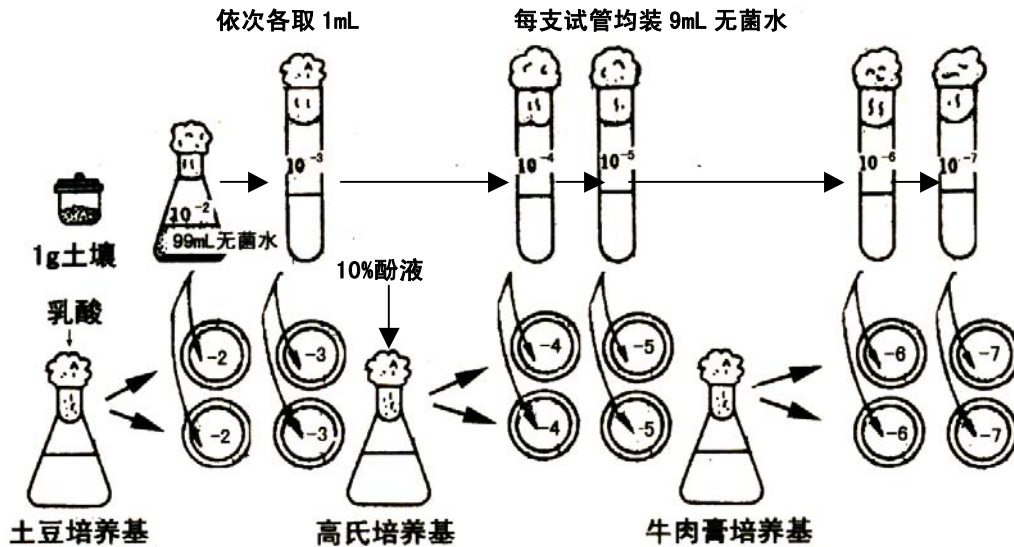


图 4-2 稀释倾注(涂布)平板法中样品的稀释和稀释液的取样培养

## 5.2 平板接种培养

平板分离培养法有稀释倾注平板法、稀释涂布平板法和平板划线分离法三种方法。

### 5.2.1 稀释倾注平板法

(1) **倾注平板** 取无菌平皿 12 套，分别用记号笔标明  $10^{-2}$ ~ $10^{-7}$  稀释度各 2 套。用 1ml 无菌吸管分别吸取  $10^{-2}$ ~ $10^{-7}$  的土壤稀释液各 1ml(图 4-1④)，倾注相应标号的无菌平皿中(无菌操作见图 4-1⑤)，每个稀释度接种两个平板。

(2) **倒平板** 取溶化后冷却至  $45\sim 50^{\circ}\text{C}$  (不烫手)的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、高氏 1 号琼脂培养基(加入 10%酚数滴)和马铃薯蔗糖琼脂培养基(每 100ml 加入灭菌乳酸 1ml)，按图 4-2 所示，分别倒入相应标号的无菌平皿约 15ml(倒量已铺满皿底为限)，置水平位置迅速轻轻旋动平皿，使培养基与稀释菌液充分混匀，而又不使培养基荡出平皿或溅到平皿盖上。每个稀释度倒两个平皿。倒平板操作如图 4-1⑥所示。

(3) **培养** 待培养基凝固后，将牛肉膏蛋白胨平板倒置于温箱中(以免培养过程皿盖冷凝水滴下，冲散已分离的菌落)， $37^{\circ}\text{C}$  培养 1~2d，高氏 1 号和马铃薯蔗糖平板倒置于  $28^{\circ}\text{C}$  温箱中培养 3~5d。

### 5.2.2 稀释涂布平板法

(1) **倒平板** 取无菌平皿 12 套，分别用记号笔标明  $10^{-2}$ ~ $10^{-7}$  稀释度各 2 套。将牛肉膏蛋白胨、高氏 1 号、马铃薯蔗糖琼脂培养基分别加热溶化待冷至  $55\sim 60^{\circ}\text{C}$  时，高氏 1 号培养基中加入 10%酚数滴，马铃薯蔗糖培养基中每 100ml 加入灭菌的乳酸 1ml，混合均匀后，按图 4-2 所示分别倒平板，平放桌上待凝固后备用。每种培养基倒 4 个平皿。

(2) **涂布平板** 用 1ml 无菌吸管分别由  $10^{-2}$ ~ $10^{-7}$  土壤稀释液中各吸取 0.1 或 0.2 ml，按图 4-2 所示，依次滴加于相应标号平板培养基表面中央位置。按图 4-3 所示，在火焰旁左手拿培养皿，并用拇指将皿盖打开一缝，右手持无菌玻璃涂棒(用酒精棉球擦拭并灼烧灭菌)于平板培养基表面上，将菌悬液自平板中央以同心圆方向轻轻向外涂布扩散，使之均匀分布。室温下静置 5~10min，使菌液浸入培养基。**注意：每个稀释度用一个灭菌玻璃涂棒，在由低向高浓度涂布时，亦可不用更换玻璃涂棒。**

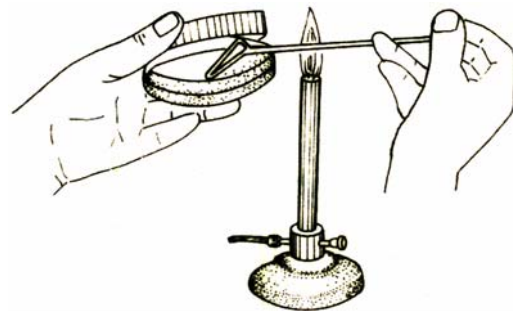


图 4-3 平板涂布操作图

(3) **培养** 将牛肉膏蛋白胨平板倒置于  $37^{\circ}\text{C}$  温箱中培养 1~2d，高氏 1 号和马铃薯蔗糖平板倒置

于 28℃温箱中培养 3~5d。

### 5.2.3 平板划线分离法

(1)倒平板 按稀释涂布平板法倒平板，并用记号笔标明培养基名称、土样编号和日期。

(2)平板划线 在近火焰处，左手拿皿底，右手拿接种环，挑取上述  $10^{-2}$  的土壤悬液一环在上述 3 种培养基平板上划线(图 4-4)，划线完毕，将牛肉膏蛋白胨平板倒置于 37℃温箱中培养 1~2d(分离细菌)，高氏 1 号和马铃薯蔗糖平板倒置于 28℃温箱中培养 3~5d(分离放线菌、酵母菌和霉菌)。培养后在划线平板上观察沿划线处长出的菌落形态特征，经涂片、染色和镜检为纯种后再接种斜面。平板划线方式很多，但无论采用哪种方式，其目的都是通过划线将样品在平板上进行适当稀释，使之形成单个菌落(既由一个菌体细胞繁殖而形成的孤立群落)。常用的划线分离方式有以下两种。

**连续划线法：**用接种环以无菌操作挑取  $10^{-2}$  土壤悬液一环，先在平板培养基的边缘一处反复划线涂布，然后取出接种环，烧死多余菌体。待接种环在培养基空白边缘处接触一下冷却后，而后从涂菌部位在平板上自左向右轻轻划线。当划至平皿的一半时，旋转平皿 180° 角，再于平皿的另一半培养基的边缘继续划线。划线时接种环面与培养基表面成 30~40° 角，用手腕力量在平板表面轻快地作“之”字形滑动(图 4-5a)。注意接种环勿划破或嵌入培养基，前后两条划线不宜重叠，要疏密适中，以免长成菌苔，并能充分利用平板表面积。划线完毕，盖上皿盖，倒置于温箱培养。

**分区划线法：**用接种环以无菌操作挑取  $10^{-2}$  土壤悬液一环，先在平板培养基的一边作第一次平行划线 3 或 4 条，再转动培养皿约 70° 角，并将接种环上剩余菌烧掉，待冷却后通过第一次划线部分作第二次平行划线，再用同样的方法通过第二次划线部分作第三次划线和通过第三次平行划线部分作第四次平行划线(图 4-5 c)。划线完毕后，盖上培养皿盖，倒置于温箱培养。

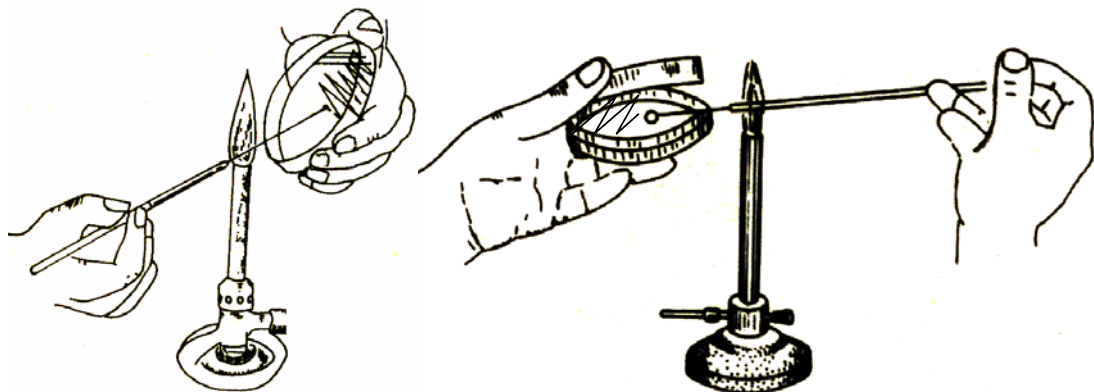


图 4-4 两种平板划线操作图

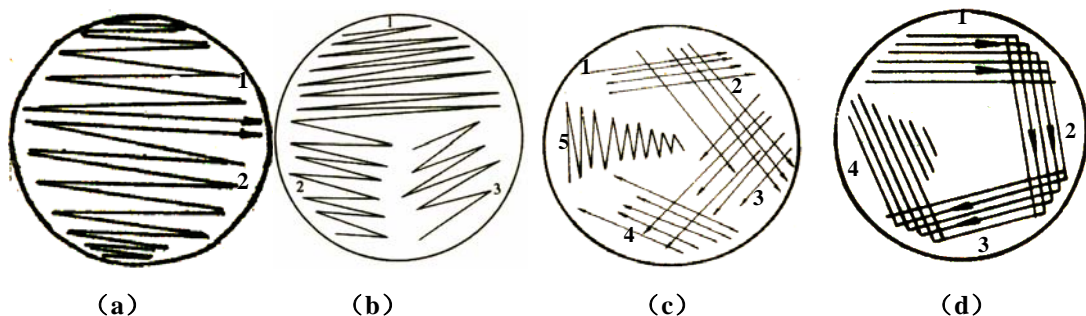


图 4-5 平行划线方式示意图

a 和 b 用于稀释液中，可连续划线；

c 和 d 用于较浓的菌样，分数次划线，每次划线后要烧接种环，然后在划下一区。

### 5.3 纯化培养(挑取单菌落)

5.3.1 菌落特征观察与选择 采用平板分离培养法长出的肉眼可见菌落，不同菌株的菌落形态特征各异，据此可在一定程度上鉴别微生物。从分离平板中选择目的菌株的菌落，进行纯化培养。

观察菌落特征主要有：大小、表面形状、隆起度、边缘性状、菌落形状、表面光泽、菌落质地、颜色、透明度等等，有时还要结合气味观察。观察菌落特征具体内容参见实验七。

**5.3.2 斜面纯化培养** 此法是将平板分离培养得到的单菌落在无菌操作之下，分别接种到各支斜面培养基上，以便作进一步扩大培养或鉴定、保存之用。

接种前，可根据目的菌的菌落特征，选择好平板上的单菌落，并做好标记(用记号笔圈上或编号)。对所选单菌落用接种环挑取一半进行革兰氏染色，如果镜检发现没有杂菌(纯一)，则挑取另一半菌落接种于上述3种相应培养基斜面上，分别置于28℃和37℃温箱中培养1~5d，既长出菌苔。对斜面菌苔进行革兰氏染色镜检，若发现有杂菌(不纯)，则应重新选择纯一的目的菌落，重新纯化培养，或由检样开始再一次进行分离、纯化，直到获得纯培养物。

**具体接种方法：**左手持平板，右手拿接种环。在火焰旁用拇指、食指和中指将皿盖揭开一缝，将烧过的接种环先在空白培养基处冷却，然后挑取菌落，取出带菌的接种环在火焰无菌区(10cm之内)稍等片刻，此时左手将平板放下，拿起一支斜面培养基试管，以小拇指和手掌拔出棉塞，迅速将带菌接种环伸入试管，于斜面上自下而上地曲折划线接种。注意接种过程要迅速，否则易污染空气中的杂菌，接种时勿将菌烫死和勿用力划破培养基。

## 6 示范

- (1) 演示制备土壤稀释液无菌操作过程。
- (1) 演示稀释倾注平板法、稀释涂布平板法和连续平板划线法的无菌操作过程。
- (3) 演示从平板菌落接种于斜面的纯化培养操作。

## 7 实验结果与报告

- (1) 所做倾注平板法、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3种不同的平板上你分离得到哪些类群的微生物?描述它们的菌落特征。
- (3) 将你所分离样品中单菌落菌株的菌落特征描述出来，并绘出镜检形态图。

## 8 思考题

- (1) 如何确定平板上某单个菌落是否为纯培养?请写出实验的主要步骤。
- (2) 详述平板划线分离操作过程和斜面接种方法。如果接种后经培养未长出菌落或菌苔，是何原因?