

《食品微生物学》实验指导书

编者：刘变芳

西北农林科技大学食品科学与工程学院

二〇〇九年五月

实验一 环境中微生物的检测

一、目的要求

了解环境中微生物的生存，初步建立从事微生物工作者必须具有的“无菌”概念，并认识微生物细胞的群体结构—菌落

二、基本原理

微生物个体微小，种类繁多且无处不有，但肉眼不可见。若用营养琼脂平板法进行检测，即可看到细胞繁殖后的群体结构，即菌落。不同的微生物形成的菌落性状不同，它是认识和鉴别各种微生物的依据之一。

一般细菌在肉汁营养琼脂上的菌落形态，可从形状、大小、色泽、光泽、隆起度、透明度、表面光滑或粗糙、边缘整齐或不规则等特征加以区别。

三、实验材料

牛肉膏蛋白胨琼脂平板培养基 5 副（供 4 人用）。

四、实验步骤

1. 编号 每人取牛肉膏蛋白胨琼脂平板培养基 1 副，用特种铅笔在皿盖上注明班、组号及操作处理号（同桌 4 人分别记以 1、2、3、4），另一副平板培养基皿盖上注以“CK”字样（对照），但不许打开皿盖。

2. 处理操作 打开皿盖按下列方法各自进行操作：

- (1) 在桌面上，使平板培养基于空气中暴露 5~10min，盖上皿盖。
- (2) 用手指在平板培养基表面轻压 3~5 点，盖上皿盖。
- (3) 口对平板培养基咳嗽几下，盖上皿盖。
- (4) 取头发 1 根，在平板培养基表面任一方向划线 3~5 条，盖上皿盖。

3. 培养 操作完毕，将 5 副培养皿重叠，倒置于 28℃ 温度下培养 2~3d。

4. 检查 取出培养皿，仔细观察各皿中的菌落形态，并统计出每皿菌落数。

五、实验报告

将实验结果填入表 1—1 中。

表 1—1 环境中微生物检测结果

皿号	菌落各数 (个/皿)	优势类群菌落特征 (选典型代表描述)							
		形状	大小 (mm)	色泽	光泽	高度	透明度	边缘状况	表面状况
1									
2									
3									
4									
CK									

*注：菌落特征描述

1. 形状：园状、丝状、不远见则状、假根状。
2. 大小：以直径 (mm) 表示。
3. 光泽：玻璃状、蜡质状、油脂状。
4. 高度：扁平、隆起、凸形、乳头形。
5. 透明度：透明、半透明、不透明。
6. 边缘状况：光滑、湿润、干燥、皱褶。

六、思考题

1. 各处理皿的菌落性状有何异同？
2. 环境中微生物检测结果说明什么问题？对你有何启示？

实验二 细菌运动性的观察

一、目的要求

学习水浸片和悬滴标本片的制作方法，观察细菌的运动。

二、基本原理

具鞭毛的细菌在液体中借助鞭毛的旋转，使菌体能定向的泳动。幼龄菌活泼，老龄菌运动性差或失去鞭毛不能运动，观察细菌的运动常采用水浸片或悬滴标本片。在显微镜下观察时，应减弱光照强度，并注意区分是细菌的真运动，还是因液体流动引起细菌随水流而动，或呈现无规则、原位颤动的布朗运动。

三、实验材料

1. 菌种 培养 24~36h 的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌悬液或枯草水 (枯草加水煮沸，加水许蛋白胨，适温培养)，或陈尿液。

2. 器材 凹室载玻片，载玻片，盖玻片，滴管，蒸馏水，吸水纸，擦镜纸，显微镜，双层瓶。

四、实验步骤

(一) 水浸片法

1. 制片 用滴管取菌悬液 (枯草水或陈尿液) 一小滴，置于干净的载玻片中央，以倾斜法加上盖玻片 (勿使产生气泡)。

2. 镜检 将载玻片置显微镜下，用低倍镜、高倍镜观察细菌运动的情况。

(二) 悬滴法

1. 制片 取凹室载玻片一张，于凹室周围涂一圈水膜；取干净的盖玻片一张，于中央滴一小滴菌悬液，小心而迅速的翻转盖玻片，使菌液保留园形水珠状。将盖玻片轻放于凹室的上面，使液滴空悬于室内，稍压，使盖玻片边缘与水膜密接，以减少菌液蒸发 (图 1—15)。

2. 镜检 标本片置于显微镜下，用低倍镜、高倍镜观察。

五、实验报告

绘出你观察的细菌运动位移轨迹示意图。

六、思考题

1. 显微镜下观察细菌运动时，为何应减弱光线？

2. 细菌的运动布朗运动有何区别？

实验三 显微镜的使用和细菌形态的观察

一、目的要求

学习并掌握显微镜油镜的使用技术及维护的基本知识。使用油镜观察细菌的几种基本形态。用悬滴法在高倍镜或油镜下观察细菌的运动。显微镜油镜使用的原理。

普通光学显微镜的构造

1. 光学部分：接目镜、接物镜、照明装置(聚光镜、虹彩光圈、反光镜等)。它使检视物放大,造成物象。

2. 机械部分:镜座、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台、载物台转移器、粗调节器、细调节器等部件.它起着支持 调节 固定等作用。

普通光学显微镜的放大倍数和分辨率

1. 放大倍数=接物镜放大倍数×接目镜放大倍数

2. 显微镜的分辨率 是表示显微镜辨析物体(两端)两点之间距离的能力,可用公式表示为:

$$D = \lambda / 2n \cdot \sin(\alpha / 2)$$

式中 D: 物镜分辨出物体两点间的最短距离。λ: 可见光的波长(平均 0.55 μm)n: 物镜和被检标本间介质的折射率。α: 镜口角(即入射角)。

普通光学显微镜油镜使用的原理:油镜,即油浸接物镜。当光线由反光镜通过玻片与镜头之间的空气时,由于空气与玻片的密度不同,使光线受到曲折,发生散射,降低了视野的照明度。若中间的介质是一层油(其折射率与玻片的相近),则几乎不发生折射,增加了视野的进光量,从而使物象更加清晰。

二、实验材料

显微镜(显微镜灯)、香柏油、二甲苯、擦镜纸、吸水纸等。细菌三种形态的染色标本。

三、实验程序

显微镜的使用

1. 用前检查: 零件是否齐全, 镜头是否清洁。
2. 调节光亮度
3. 低倍镜观察: 粗调、细调
4. 依次再进行中倍、高倍观察
5. 油镜观察: 高倍镜下找到清晰的物象后, 提升聚光镜, 在标本中央滴一滴香柏油, 使油镜镜头浸入香柏油中, 细调至看清物象为止。
6. 换片: 另换新片, 必须从第三条开始操作。

7. 用后复原：观察完毕，上悬镜筒，先用擦镜纸擦去镜头上的油，然后再用擦镜纸沾取少量二甲苯擦去残留的油，最后用擦镜纸擦去残留的二甲苯，后将镜体全部复原。

显微镜保养和使用中的注意事项：

1. 不准擅自拆卸显微镜的任何部件，以免损坏。
2. 镜面只能用擦镜纸擦，不能用手指或粗布，以保证光洁度
3. 观察标本时，必须依次用低、中、高倍镜，最后用油镜。当目视接目镜时，特别在使用油镜时，切不可使用粗调节器，以免压碎玻片或损伤镜面。
4. 观察时，两眼睁开，养成两眼能够轮换观察的习惯，以免眼睛疲劳，并且能够在左眼观察时，右眼注视绘图。
5. 拿显微镜时，一定要右手拿镜臂，左手托镜座，不可单手拿，更不可倾斜拿。
6. 显微镜应存放在阴凉干燥处，以免镜片滋生霉菌而腐蚀镜片。

思考题

- 1、油镜与普通物镜在使用方法上有何不同？应特别注意些什么？
- 2、使用油镜时，为什么必须用镜头油？镜检标本时，为什么先用低倍镜观察，而不是直接用高倍镜或油镜观察？

实验四 细菌的简单染色法

一、目的要求

学习细菌的简单染色法，观察细菌的形态特征。

二、基本原理

细菌个体小而透明，活细胞与水及玻璃的折光率相差无几，在普通光学显微镜下难以看清。若经染料染色后，增强了细胞折光性，借助颜色的反衬作用，就能看清它们有形状、大小和排列方式。

细菌细胞含核酸较多，故一般染色多用碱性染料，如碱性复红 (Basic fuchsin)、美蓝 (ethylene blue)、结晶紫 (Crystal violet)、孔雀绿 (Malachite green)、番红 (Safranin O) 等，染料需预先配成染液供使用。

简单染色法是用一种染料进行染色。此法仅能显示其形态，而不能辨别其构造。

三、实验材料

1. 菌种 培养 18~24h 的枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌 (*Bac. megathrium*)、或培养 48h 的四联微球菌 (*Micrococcus tetragenus*)、金色微球菌 (*Micrococcus aureus*)。

2. 器材 石炭酸复红液或美蓝染色液，或结晶紫染色液，或番红染色液，蒸馏水 (滴瓶装)，载玻片，接种环，酒精灯，火柴，洗瓶，染色盆，染色架，废物缸，吸水纸，擦镜纸，显微镜，双层瓶。

四、实验步骤

制作细菌标本的步骤：涂片→干燥→加热固定→冷却→染色→水洗→干燥→镜检。

1. 涂片 取干净载玻片一张放于染色架上。于载玻片两处分别滴加蒸馏水一小滴，以无菌操作法用接种环取斜面菌种菌体少许，放于载玻片一处的水滴中混匀，并涂成均匀的薄层；另一滴水同法放入第二种菌体涂匀 (图 1—7)。

2. 干燥 使涂片在空气中自然风干或在酒精灯焰高处 (距火焰 8~10cm) 微热烘干。

3. 加热固定 将干燥后的涂片用手拿住一端 (涂面向上)，以钟摆摆动速度通过酒精灯焰 2~3 次，使加热固定。目的是杀死细菌以增强细胞着色力，并使细胞粘着于载玻片上。

4. 染色 将载玻片放回染色架上，待冷却。任取染色剂一种，滴 1~2 滴于二处的涂面上进行染色。一般碱性复红染色 30s~1min，(或用美蓝染色 2~3min，或结晶紫染色 1min，或番红染色 2~3min)。

5. 水洗 染色完毕，手持染色架略呈倾斜状，用洗瓶从载玻片一端缓慢冲洗染液，让废液流入染色盆中。再用吸水纸吸去载玻片上的残留水滴，自然干燥。

6. 镜检 先用低倍镜寻找标本的最好部位，再换高倍镜、油镜观察，绘图。

图 1—15 细菌染色标本涂片制作过程

1. 接种环灭菌 2. 拔棉塞 3. 管口灭菌 4. 取菌

5. 管口灭菌 6. 加棉塞 7. 涂片 8. 接种环灭菌

五、实验报告

绘出你镜检的细菌细胞形态图 2~3 个，注明细菌名称及放大倍数。

六、思考题

1. 简单染色法的原理与步骤是什么？

2. 涂片的要点是什么？加热固定的目的何在？

实验五 细菌的革兰氏染色法

一、目的要求

了解革兰氏染色的原理，掌握革兰氏染色的方法以鉴别细菌。

二、基本原理

革兰氏染色法是细菌学中一种重要的鉴别染色法。其方法是，细菌涂片先经结晶紫初染，加媒染剂碘液处理，再以脱色剂酒精脱色，最后用复染剂番红复染。若细菌不被脱色而保留紫红色者，称为革兰氏阳性菌或正反应（用G⁺表示）；若被脱色而染上复染剂的粉红色者，称为革兰氏阴性菌或负反应（用G⁻表示）。革兰氏染色常受菌龄、培养基的pH的染色技术等的影响，一般采用幼龄菌为宜。

革兰氏染色机理虽然至今还不完全清楚，但显然与两类细菌的细胞壁成份和结构有密切关系。革兰氏阴性菌的细胞壁中含较多的类脂质，而肽聚糖含量较少。当用酒精脱色时，类脂质被溶解，从而增加了细胞壁的通透性，使初染后的结晶紫与碘的复合物易于渗出，结果细胞被脱色，经复染后则呈现复染剂的颜色。而革兰氏阳性菌细胞壁中肽聚糖含量多且交联度大，类脂质含量少，经酒精脱色后，肽聚糖层的孔径变小，通透性降低，因而细胞仍保留初染时的颜色。

三、实验材料

1. 菌种 培养 24h 的大肠杆菌 (*E. coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。
2. 器材 结晶紫染色液，路哥 (Lugol) 氏碘液，95%酒精，番红或石炭酸复红染色液，载玻片，接种环，酒精灯及其它染色、镜检用物。

四、实验步骤

革兰氏染色的程序为：

涂片→干燥→加热固定→冷却→^{水洗}结晶紫初染→^{水洗}碘液媒染→^{水洗}酒精脱色→番红复染
水洗
→干燥→镜检。

1. 涂片、固定 取干净载玻片一张放在染色架上，分别在载玻片的两处各滴一小滴蒸馏水，按无菌操作法用接种环分别取大肠杆菌与葡萄球菌少许，各涂于一处的水滴内（作好标记），涂匀、干燥、加热固定。

2. 染色 待涂片冷却后染色。先滴加结晶紫染色 1min，用水冲去染液，控净水，再滴加碘液媒染 1min，倾去碘液，水洗，以 95%酒精脱色 20~30s（严格掌握时间），水洗，最后滴加番红

复染 2~3min (或用石炭酸复红复染 30s), 水洗, 干燥。

3. 镜检 先用低倍镜寻找标本清晰部位, 再换油镜观察细胞形态及染色结果。

五、实验报告

绘出油镜下的细胞形态图, 注明细胞颜色, 说明染色反应。

六、思考题

1. 革兰氏染色法哪一步最关键? 为什么?
2. 革兰氏染色法为何要求用幼龄细胞进行染色?

实验六 细菌的荚膜染色法

一、目的要求

学习荚膜染色技术，观察细菌的荚膜形态。

二、基本原理

荚膜(Capsule)是某些细菌分泌于细胞壁外的一层粘性物质，具一定形状，其主要成分为多糖，它与染料亲合力很弱，不易着色；但荚膜通透性较好，某些染料可透过荚膜使菌体着色。因此，染色后要菌体周围有一浅色或无色的透明圈，即荚膜。

荚膜染色常采用负染色法，也称衬托染色法。此法使菌体和背景显色，来衬托出无色的荚膜。

荚膜易溶于水，故染色中尽量少用水。荚膜受热失水易引起皱缩变形，故不必加热固定。也可用酒精或甲醇进行固定。

三、实验材料

1. 菌种 在阿须贝(Ashby)无氮培养基上培养3~4d的褐球固氮菌(*Az. chroococcum*)、培养2d胶质芽孢杆菌(*B. mucilaginosus*)。

2. 器材 石炭酸复红液、黑色素液(或碳素墨水)，95%酒精，载玻片，接种环及其它染色、镜检用物。

四、实验步骤

方法一

1. 涂片 取干净载玻片一张，于中央滴加蒸馏水少许，用接种环以无菌操作法取菌体少许放入蒸馏水中混匀并涂成薄层，晾干。

2. 固定 滴加95%酒精一滴固定1min，倾去，晾干。

3. 染色 加石炭酸复红液染色1min，水洗，晾干。

4. 涂背景 于涂片一端滴少许(半滴)黑色素液，另取一张边缘光滑的载玻片，将其一端放于黑色素液滴中，以30°C角顺势向涂片另一端滑动(图1—16)，使涂片成一均匀薄层，自然干燥。

5. 镜检 在高倍镜或油镜下观察。细胞呈红色，背景淡灰色，中间显示无色的透明圈，即荚膜。

方法二

1. 涂片、染色 于载玻片中央一小滴石炭酸复红液，用接种环取菌体少许，放于石炭酸复红液液滴中，混匀并涂成薄层，自然干燥后，同上法涂抹黑色素液，晾干。

2. 镜检，方法同上。

方法三

1. 涂片 取干净载玻片一张，于中央滴加 1 小滴黑色素液，用接种环以无菌操作法取菌体少许放入黑色素液滴中充分混匀。

2. 加盖片 取洁净盖玻片一张，以倾斜式轻轻复盖于混合液上，然后在盖玻片上放一小片吸水纸（或滤纸），轻轻按压，以便吸收盖玻片周边多余的混合液。

3. 镜检 用低倍镜、高倍镜观察。背景黑色，细胞较暗，其周围呈现出明亮的透明圈，即荚膜。

五、实验报告

绘出细菌荚膜镜检图。

六、思考题

1. 荚膜染色法的原理是什么？

2. 荚膜染色中应注意的事项是什么？

实验七 细菌的芽孢染色法

一、目的要求

学习芽孢染色法，观察细胞芽孢的形态特征及着生位置。

二、基本原理

细菌的芽孢具有厚而致密的壁，通透性差，不易着色。普通染色法只能使细胞着色，而芽孢显示不着色的透明体，因而需用特殊的芽孢染色法。该法是采用着色力强或高浓度的染料，进行加温处理并延长染色时间，使菌体与芽孢均染上颜色，芽孢一旦着色就难以脱色。再通过脱色剂脱去菌体颜色而保留芽孢的颜色，然后再用复染剂复染菌体，使菌体与芽孢呈现不同的颜色，便于观察。

三、实验材料

1. 菌种 培养 24~30h 的枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌或 状芽孢杆菌 (*Bac. mycoides*)。
2. 器材 5%孔雀绿液，石炭酸复红液，酒精丙酮液，试管，木夹，载玻片及接种、染色、镜检用物。

四、实验步骤

方法一

1. 涂片 取干净载玻片一张，于中央滴蒸馏水少许，按无菌操作法取菌，涂片，风干，加热固定，冷却。
2. 初染 将涂片放在染色架上，于涂面处滴加孔雀绿染色液数滴。手持染色架，于灯焰高处徐徐加热至有蒸气冒出，随时补加染液覆盖涂面，防止沸腾或蒸干。维持 8~10min，水洗脱色，至无绿色出现为度。
3. 复染 用石炭酸复红液复染 30s~1min，水洗晾干。
4. 镜检 在低倍镜、油镜下观察。芽孢呈绿色，菌体呈红色。

方法二

1. 初染 取试管 1 支，加蒸馏水 7~8 滴，按无菌操作法用接种环挑取菌种 1 满环，混于蒸馏水中制成浓菌悬液。再于管中滴加等量的石炭酸复红液，用木夹夹好，于灯焰上加热近沸，维持 3~4min（加热近沸时应离开灯焰，管口向外，以防喷出）。
2. 涂片 用接种环取加热后的菌悬液 2~3 环，制成涂片、风干、加热固定、冷却。
3. 脱色 于涂片上滴加酒精丙酮液 1~2 滴，进行脱色 30s。

4. 复染 用 5%孔雀绿液复染 2~5min, 水洗, 晾干。

5. 镜检 油镜下观察。芽孢呈红色, 菌体呈绿色。

五、实验报告

图示镜检芽孢杆菌的芽孢形状及着生位置, 并注明染色结果。

六、思考题

芽孢杆菌属与梭状芽孢杆菌属的芽孢形状与着生位置有何异同?

实验八 放线菌形态及菌落特征的观察

一、目的要求

学习入线菌的制片方法，观察放线菌的细胞形态和菌落特征。

二、基本原理

放线菌是由菌丝组成的分枝丝状体，以链霉菌属 (*Streptomyces*) 的菌丝体最发达。菌丝可分为基内菌丝 (较细)、气生菌丝 (较粗)、孢子丝三种。放线菌发育到一定阶段，孢子丝即形成孢子。孢子丝有直形、波曲形、螺旋形 (左旋、右旋、密螺、疏螺之分)、轮生、单搓分枝等；孢子有球形、椭圆形、柱状或瓜子形、刺型、疣突型、毛发型等常成串排列或单个存在。这些特征是鉴定菌种的重要依据之一。

放线菌菌落特征：园形、较小、干燥、质地致密，表面粉粒状或茸毛状，有的呈同心环或辐射状。基内菌丝与培养基结合紧密，用针难以挑取。菌丝体与孢子常具有不同色素，故菌落正面与背成可显示相应颜色。有的种类散发有特殊气味。

三、实验材料

1. 菌种 细黄链霉菌 (5~6) (*Str. microflavus*)，灰色链霉菌 (*Str. griseus*)，天蓝色链霉菌 (*Str. coelicolor*) 的插片培养物或划线法培养的菌落。

2. 器材 石炭酸复红液或美兰染色液，载玻片，解剖针，镊子，无菌水管及接种、染色、镜检用物。

四、实验步骤

(一) 放线菌细胞形态的观察

方法一 插片法

1. 插片制作 用接种环取放线菌斜面培养管的菌体少许，放入无菌水管中制成孢子悬液，用无菌吸管取孢子悬液一滴，放入高氏 1 号平板培养基上，用无菌刮铲涂抹均匀后，将已消毒好的盖玻片，以 45°C 角插入培养基中 (如图 1—17) 置 28~30°C 下培养 4~5d。

还可采取先插盖玻片，再以接种环取孢子悬液接种于盖玻片与培养基相接的沿线处。

2. 制片 用镊子取插片一张，用吸水纸擦去生长较差一面的菌丝体，然后用镊子夹住盖玻片，使有菌面朝上，通过灯焰 2~3 次进行加热固定、冷却。

3. 染色 在盖玻片上滴加一滴石炭酸复红液染色 1min，水洗，干燥。

4. 镜检 取干净载玻片一张，将盖玻片染色面向下，放在载玻片中央，在低倍镜、高倍镜、

油镜下观察，辨认放线菌的菌丝体、孢子丝及孢子的形态及排列方式。

方法二 搭片法

1. 制片 用无菌接种小铲（竹制或金属制）在高氏一平板培养基上开挖两条宽约 **0.5cm** 左右平行槽，用接种环从放线菌斜面培养管上取面熟孢子接种于槽内边缘一侧，然后用无菌镊子夹取无菌盖玻片，轻轻搭放在接种后的槽面上轻压，每条槽可盖 **3~4** 片，于 **28℃** 下培养 **5~7d**（如图 1—18）。

2. 镜检 用镊子小心地取下盖玻片，放置于干净载玻片上，有菌的一面朝上，在低倍镜或高倍镜下观察丝自然生长形态及孢子丝等结构。

方法三 印片法

1. 菌落培养 采用平板划线法或涂抹法分离出孤立菌落。

2. 制片 取一张干净的载玻片，在灯焰上微热后放在染色架上；用解剖针切割一个完整的菌落（连同培养基一起），并以解剖针穿入培养基中小心的取出菌块，将菌落面紧贴在微热过的载玻片中央，轻轻按压，切忌不可滑动移位，然后再小心挑去菌块。

2. 加热固定 将载玻片通过灯焰 **2~3** 次，冷却。

3. 染色 滴加石炭酸复红液染色 **1min** 或美蓝液染色 **2~3min**，水洗，干燥。

4. 镜检 在低倍镜、高倍镜、油镜下观察。

（二）放线菌菌落特征的观察

观察放线菌的菌落，注意其大小、形状、色泽（正面与背面）、表面状况、干燥或湿润、气味有无等，描述其特征。

五、实验报告

1. 图示你观察的放线菌细胞形态，区分气生菌丝、孢子丝及孢子排列方式。

2. 记述几种放线菌的菌落的特征。

六、思考题

放线菌制片法与细菌制片法有何不同？

实验九 酵母菌形态及菌落特征的观察

一、目的意义

学习酵母菌的制片方法，观察酵母菌的形态及生殖方式，认识酵母菌的菌落特征。

二、基本原理

酵母菌是单细胞的真菌，细胞圆形、卵圆形或圆柱状，较细菌细胞大，具明显的细胞核和肝糖粒、脂肪粒等内含物。无性繁殖为主，有的种可形成芽簇或细胞互联呈假菌丝。此外尚有裂殖酵母进行裂殖。这些都是鉴定酵母菌菌种的重要依据。

观察酵母菌细胞时，常用路哥氏（Logol）碘液制成水浸片，以观察细胞形态并鉴别肝糖粒之存在；若区别死、活细胞时，可以美蓝液染色。由于活细胞的还原力强，美蓝着色后又被还原为无色，而死细胞则为蓝色。

酵母菌菌落特征：与细菌菌落相似。一般圆形，表面光滑、湿润、粘稠，用针易挑取，具油脂光泽，多数种为乳白色，少数种呈红色。

三、实验材料

1. 菌种 啤酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、红酵母（*Rhodotorula glutinis*）、裂殖酵母（*Schizo saccharomyces sp*）的斜面培养管和平板上的单菌落。

2. 器材 路哥氏碘液，载玻片，接种环及染色、镜检用物。

四、实验步骤

1. 制片 取干净载玻片一张，于中央滴加路哥氏碘液一滴，用接种环以无菌操作法取啤酒酵母菌体少许，放入碘液中混匀，然后在液滴上以倾斜式加盖玻片一张（勿使产生气泡），待用。

同法，分别制作红酵母与裂殖酵母的标本片，待用。

2. 镜检 用低倍镜、高倍镜观察三种酵母菌的细胞形态及生殖方式，绘图。

3. 菌落观察 仔细观察平板培养基上的单菌落，记述三种酵母菌的菌落特征。

五、实验报告

1. 图示镜检的酵母菌细胞形态及生殖方式。

2. 列表记述酵母菌的菌落特征。

六、思考题

你能准确地识别酵母菌与细菌的菌落吗？

实验十 霉菌形态及菌落特征的观察

一、目的要求

学习霉菌的制片方法，观察常见霉菌的细胞形态、构造和菌落特征。

二、基本原理

霉菌是丝状真菌的俗称。个体大且构造较复杂，菌丝一般无色透明，宽度在 3~10 μ m，有隔或无隔，在低倍镜或高倍镜下即可看清。菌体分为基内菌丝与气生菌丝，气生菌丝间生孢子。孢子形状、颜色、及着生部位及排列方式等是认识霉菌种类的依据。制片时，常用乳酸石炭酸棉蓝液，做成水浸片进行观察。这是霉菌制片中常用的固定液，它可使菌丝体分散，细胞不易变形，并具染色、杀菌作用。也可用插片法，搭片法等进行培养，均可取得满意效果。

菌落特征：一般较大，有固定形状，也有无定形的；菌丝体结构疏松可略致密，有呈绒毛状，有呈蛛网状或棉絮状；表面粉粒或粗粒状；不同种类因孢子颜色而菌落也呈相应的颜色；有的霉菌能分泌色素。

三、实验材料

1. 菌种 2^o波林 (Balling) 麦芽琼脂平板上培养 2~3d 的根霉 (*Rhizopus sp.*)、毛霉 (*Mucor sp.*)，在酸化的马铃薯蔗糖琼脂平板上培养 3~5d 的青霉 (*pemicillium sp.*)、曲霉 (*Aspergillus sp.*)。

2. 器材 乳酸石炭酸棉蓝液，解剖针、镊子及接种、染色、镜检用物。

四、实验步骤

(一) 霉菌细胞形态的观察

方法一 搭片法

1. 制片 用灭菌接种小铲 (竹制或金属制) 在马铃薯蔗糖琼脂平板上挖两条宽 0.5cm 的平行槽，将青霉等待观察的霉菌菌丝或孢子接种于槽缘一侧，用无菌镊子将灭菌盖玻片轻轻搭盖于平皿内的槽面上，每条槽可盖 3~4 片，每皿即 6~8 片，于 28 $^{\circ}$ C 下培养 2~3d。

2. 镜检 用镊子小心地将皿内的盖玻片取出，有菌的一面向上，放置于干净载玻片上，在低倍镜或高倍镜下观察，可见到菌体的自然发育情况及各部构造。

方法二 水浸片法

1. 制片 取干净载玻片一张，于中央滴加乳酸石炭酸棉蓝液一滴，用解剖针从菌落边缘

划取菌丝体一小块，放入乳酸石炭酸棉蓝液滴中，小心地加盖玻片一张，并轻压盖玻片（勿使产生气泡）。

2. 镜检 在低倍镜或高倍镜下观察。观察时注意菌丝有无隔膜，假根，足细胞等特殊构造，孢子形状，大小和着生方式。

方法三 载片培养法

1. 制片 在装有U形玻棒的无菌皿中，倒入3~4ml 无菌水，按无菌操作将灭过菌的载玻片放在U形玻棒上，用无菌吸管吸取融化并冷却至50℃左右的马铃薯蔗糖琼脂(含琼脂1%)培养基于载玻片放在培养基上，并轻压几下，置皿于28~30℃温度下培养。

2. 镜检 根据需要分别于培养不同天数，观察霉菌发育的全过程。可用低倍镜通培养皿盖观察其发育情况。

若要封片保存，先将载玻片取出放温箱中使蒸发去一部分水分，擦净熏片周边（勿使移动）再加一圈合成树脂，风干后即可长期保存。

（二）霉菌菌落特征的观察

认真观察根霉、毛霉、青霉、曲霉的菌落，记述其特征（形状、大小、表面状况、颜色及产色素与否等）。

五、实验报告

1. 绘出镜检的几种霉菌细胞形态构造图，注明各部构造名称。

2. 列表记述青霉、曲霉、根霉、毛霉的菌落特征。

六、思考题

霉菌制片中为何用乳酸石炭酸棉蓝液而不宜用水？

实验十一 微生物细胞大小的测定

一、目的要求

了解目镜测微尺和镜台测微尺的构造和使用原理；掌握微生物细胞大小的测定方法。

二、基本原理

微生物细胞的大小是微生物重要的形态特征之一。由于菌体很小，只能在显微镜下来测量。用来测量细胞大小的工具有目镜测微尺（简称目尺）和镜台测微尺（简称台尺）。

目镜测微尺是一块圆形玻片，在玻片中央把 5mm 长度刻成 50 等分（图 1—20）或把 10mm 长度刻成 100 等分。测量时，将其放在接目镜中的隔板上来测量经显微镜放大后的细胞物象，由于在显微镜不同的接目镜和接物镜系统下，放大倍数不同，目镜测微尺每格所示长度随显微镜放大倍数而变人化。所以在使用前，须用镜台测微尺来校正，求出在显微镜某一接目镜和接物镜系统下，目镜测微尺一格的长度。

镜台测微尺（图 1—21）形如载玻片，在中央的圆形盖片下，有一条长为 1mm 的刻度，精确等分为 100 格，每格长 10 μ m。故用已知长度的台尺校正目尺，即可求出目尺一格的长度。

三、实验材料

1. 菌种 巨大芽孢杆菌或杀螟杆菌染色片；酵母菌水浸片。
2. 器材 目镜测微尺，镜台测微尺，显微镜，双层瓶，擦镜纸。

四、实验步骤

（一）目尺校正

1. 将目镜测微尺小心地装入接目镜的隔板上，使刻度向下，把镜台测微尺置于载物台上，使刻度向上，用弹簧夹夹稳。

2. 先用低倍镜观察，调节工作距离，从视野中看清镜台测微尺的刻度后，移动推动器并转动目镜，使目镜测微尺的刻度和镜台测微尺的刻度平行。

3. 用推动器定位，使两尺重叠，先使两尺一端“0”刻度完全重合，再寻找两尺另一端的重合刻度，以两端的重合刻度线相距愈远愈好。

4. 数出两重合刻度间目镜测微尺的格数（N）和镜台测微尺的格数（N'）。已知台尺每格长度是 10 μ m，故目尺每格之长度 X 即可求得：

$$X = N' \times 10 = \frac{\text{两重合线间台尺格数} \times 10}{N}$$

两重合线间目尺格数

5. 先在低倍镜下校正后, 随即用推动器把台尺的刻度移到视野正中央, 然后更换高倍镜。
6. 同法校正正在高倍镜和油镜下目镜测微尺每格代表的长度。
7. 校正完毕, 取下镜台测微尺, 用一张擦镜纸蘸酒精乙醚液少许, 擦去油污, 再以另一张干净的擦镜纸轻轻擦去残留的酒精乙醚液, 然后装入盒内, 妥为保存。

(二) 细胞大小的测定

1. 将细菌染色片或酵母菌水浸片, 置于载物台上, 用低倍镜和高倍镜找到目的物, 把菌体分散均匀的部位移到视野中心。
2. 在高倍镜下, 测量酵母菌细胞的大小。在油镜下, 测量细菌细胞的大小。先量出菌体长和宽或直径占有目镜测微尺的格数, 再用校正的目镜测微尺每格长度, 计算出菌体长度和宽度, 计量单位以微米 (μm) 表示。同一涂片上, 任意测定 10~20 个菌细胞, 求其平均值, 即可代表该菌的大小。

五、实验报告

将实验结果记录于表 1—4, 表 1—5 中

表 1—4 台尺校正目尺结果

物镜	目尺格数	台尺格数	目尺校正值 ($\mu\text{m}/\text{格}$)
10×			
40×			
100×			

表 1—5 细菌大小测定记录 菌名_____

细胞数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Σ	平均
长																	
宽																	

结果计算 长 $\mu\text{m} = \text{长平均格数} \times \text{校正值}$

宽 $\mu\text{m} = \text{宽平均格数} \times \text{校正值}$

大小表示 宽 $\mu\text{m} \times$ 长 μm

六、思考题

1. 为什么目镜测微尺必须用镜台测微尺校正?

2. 在目镜放大倍数固定情况下，改变接物镜，由低倍、高倍到油镜，为什么测出目尺每格之长度愈来愈小。

实验十二 显微镜下直接测数法—血球计数板法

一、目的要求

了解血球计数板的构造、原理和计数方法，掌握显微镜下直接计数的技能。

二、基本原理

血球计数板测数，一般适用于含菌体较大的单细胞的悬浮液，如酵母菌、霉菌孢子等，若有杂菌或杂质，则较难辨认。对个体小的细菌也不易辨清，必要时，可采用彼德罗夫—霍瑟（Petroff-Hausser）细菌计数板，即可在油镜下计数。

血球计数板的构造和使用原理：（图 1—22）。

血球计数板为一特制的厚型载玻片，在其中部有三条玻璃台（a, b, a'），b 台上刻有一对每边长 1mm 的大方格，大方格各边分为 20 等分，因此 1mm² 的大方可知，等分为 400 个小方格（图 1—23）。a, a' 台比 b 台高出 0.1mm，所以加盖玻片后，从盖玻片到 b 台台面之高度（即液层深度）也是 0.1mm，由以上数据可得出：

$$\text{大方格面积} = 1\text{mm} \times 1\text{mm} = 1\text{mm}^2$$

$$\text{大方格体积} = 1\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm} = 0.1\text{mm}^3$$

$$\text{一个小方格体积} = \frac{0.1}{400} \text{mm}^3 = \frac{1}{4000} \text{mm}^3$$

$$\text{已知：1ml 体积} = 10\text{mm} \times 10\text{mm} \times 10\text{mm} = 1000\text{mm}^3$$

$$\text{所以，1ml 体积中应含有小方格数} = \frac{1000\text{mm}^3}{\frac{1}{4000}\text{mm}^3}$$

$$= 1000 \times 4000$$

$$= 4 \times 10^6 \text{ 个小方格}$$

$$\text{即系数 } K = 4 \times 10^6$$

$$\text{因此，每 ml 菌悬液中含有细胞数} = K \times d \times \bar{N}$$

$$K: 4 \times 10^6$$

D: 菌液稀释倍数

\bar{N} : 一个小方格中细胞平均数。

由上可知，用血球计数板在显微镜下直接测数时，首先数出一个小方格（ $\frac{1}{4000} \text{mm}^3$ ）

均质菌液中的细胞数，然后根据公式求得 1ml 菌液中的细胞数。

三、实验材料

1. 测试样品 酵母菌液或细菌悬液。

2. 器材 血球计数板，盖玻片（22mm×22mm），无菌滴管，吸水纸，擦镜纸，显微镜等。

四、实验步骤

1. 准备工作

（1）取血球计数板一个，用无菌滴管吸取摇匀的菌悬液少许，滴在 b 玻璃台网格上，不要使 a, a' 玻璃台沾上菌液，以免加盖玻片后，造成 b 台上液层深度的误差。

（2）取干净的盖玻片一张，盖在 a, a' 玻璃台上，勿使产生气泡，使多余的菌液流入 a, b 和 a, a' 玻璃台间之液槽内，静置数分钟，使菌细胞沉积于平面上。

2. 镜检测数

（1）将血球计数板置载物台上夹稳，先用低倍镜找到方格位置，再用高倍镜测数，由于生活细胞的折光率和水的折光率相近，观察时应减弱光的高度。

（2）在高倍镜下，观察五个视野，每个视野任意计数五个小方格内之细胞数。位于小方格四边的压线细胞，只计两边，另两边不计；对于出芽的酵母，以芽体与细胞接近大小时，按二个菌体计数。然后求出一个小方格的细胞平均数（ \bar{N} ）。在观察时，应充分运用微动螺旋，以便观察到处于不同液层的细胞，以减少误差。

（3）测数完毕，取下盖玻片，用清水把血球计数板冲洗干净，用吸水纸轻轻吸去吸去台上附着的水分，再用擦镜纸小心地吸干计数板，注意勿使网格受到磨损，然后放入盒内保存。

3. 计算

将 \bar{N} 值代入公式，求出每 ml (g) 菌液中的细胞数。

五、实验报告

计算并报告所测样品每 ml (g) 的含菌数。

六、思考题

1. 系数 K 值是如何求得的？

2. 血球计数板的显微镜直接测数法有何优缺点？

实验十三 营养元素对微生物生长发育的影响

一、目的要求

了解微生物生长发育和营养元素的关系。

二、基本原理

微生物生长发育要求一定的营养条件，影响微生物生长发育的元素主要有碳、氮、磷、钾、硫、镁及微量元素。有的微生物还需从环境中获得维生素类物质。本实验通过几种含有不同成分的合成培养基，测试碳、磷、钾对微生物生长发育的影响。

三、实验材料

1. 菌种 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)。

2. 器材 蔗糖、100g/L 的 NH_4NO_3 、 KH_2PO_4 、 NaH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KCl 、1g/L 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 ZnCl_2 、蒸馏水，pH 试纸，10% HCl ，培养管，无菌水管，量筒、烧杯，1ml 吸管，托盘天平，接种环，酒精灯。

四、实验步骤

1. 制备培养基 试验设计培养基五种。其组分见表 2—2。

表 2—2 测试营养元素的培养基组成

序号	培养基	蔗糖 (g)	NH_4NO_3 (g)	KH_2PO_4 (g)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g)	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	ZnCl_2	蒸馏水 (ml)
1	完全	7.5	0.3	0.1	0.1	微量	微量	100
2	缺碳	—	0.3	0.1	.01	微量	微量	100
3	缺氮	7.5	—	0.1	0.1	微量	微量	100
4	缺磷	7.5	0.3	0.1g KCl	0.1	微量	微量	100
5	缺钾	7.5	0.3	0.1g NaH_2PO_4	0.1	微量	微量	100

2. 按表 2~3 的组分，配制总量 25ml 的上述五种培养基。并以 10% HCl 调 pH 为 5.0 左右

3. 分装灭菌 配好后，将各号培养基分装入培养管中，每号 3 管，每管 8ml，做好标记。

在 0.1Mpa 下灭菌 20~30min，备用。

4. 孢子悬液制备 取无菌水管 1 支，用接种环从黑曲霉斜面菌种管中挑取菌体二环，放入水中，充分混匀，备用。

5. 接种 接无菌操作法用接种环取黑曲霉孢子悬液，接种于上述的各号培养基中，每管接入二环。

6. 培养 接种后，置培养管于 28℃ 温度下培养 5~7d。

表 2-3 一定体积的培养基中各药剂的组成量

体积 (ml)	蔗糖 (g)	含 100g/L 浓度的各成分需要量 (ml)				含 1g/L 各成分需要量 (ml)		蒸馏水 (ml)
		NH ₄ NO ₃	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	KCl	ZnCl ₂	FeSO ₄	
25	2	0.75	0.25	0.25	0.25	1 小滴	1 滴	24
50	4	1.5	0.5	0.5	0.5	1 小滴	2 滴	47
100	8	3	1	1	1	2 小滴	4 滴	94

7. 结果检查 培养好后，观察各号培养基中黑曲霉菌丝及孢子生长状况，并做好记录。

五、实验报告

将实验结果填入表 2-4 中。

表 2-4 营养元素对黑曲霉生长发育的影响

培养基	菌丝生长情况			孢子生长情况	
	有无沉淀	菌膜厚薄	菌膜色泽	生长状况	孢子疏密
完全					
缺碳					
缺氮					
缺磷					
缺钾					

记载符合：优+ + + +, 良+ + +, 中+ +, 劣+, 不发育-。

六、思考题

1. 培养基的 pH 值为何要加酸调至 5 左右？
2. 在缺碳培养基中黑曲霉生长有何特点？原因何在？

实验十四 氧对微生物生长的影响

一、目的要求

了解微生物生长与氧的关系，学习其测定方法。

二、基本原理

根据微生物与氧的关系，将微生物分为好气性微生物（包括微需气性微生物）、厌气性微生物和兼性厌气性微生物三大类。需氧性测定是细菌分类鉴定中的项目之一。实验室中常用深层琼脂培养法测定氧气对细菌生长的影响。

三、实验材料

1、菌种 根瘤菌(*Rhizobium* sp.)、大肠杆菌斜面菌种，巴氏芽孢梭菌(*Clostridium pasteurianum*)。

2、器材 葡萄糖牛肉膏蛋白胨琼脂培养基（含琼脂 10g/L，每管 12ml），无菌水管、吸管。

四、实验步骤

1、菌悬液制备 用接种环按无菌操作法取根瘤菌、巴氏芽孢梭菌、大肠杆菌 1~2 环分别放入三支无菌水管中制成菌悬液。

2、接种 取已融化并保温在 50℃左右的培养基 6 支，用无菌吸管分别吸取菌悬液 0.1ml 接种于培养管中，每种试验菌接种 2 个重复。接种后立即用手搓法（见实验二十七图 1-28）混匀，待冷凝。

3、培养 置培养管于 28℃下培养 3d。

4、结果检查 取出培养管，观察并记录氧气对几种细菌生长的影响。

五、实验报告

观察并记录几种细菌在培养基中的生长部位，将实验结果填入表 2-6 中。

表 2-6 几种微生物与氧的关系测定结果

菌名	根瘤菌	大肠杆菌	巴氏芽孢梭菌
生长状况			
呼吸类型			

注：专性好气性：只生长在培养基表面。专性厌气性：只生长在培养基底部。

兼性厌气性：生长在表面及整个培养基中。微需气性：在表面约 4mm 处生长最好。

六、思考题

分析以上三种细菌与氧的关系。

实验十五 渗透压对微生物生长发育的影响

一、目的要求

了解渗透压对微生物生长发育的影响，学习测定渗透压的方法。

二、基本原理

微生物生长受其基质渗透压的影响，一般细胞的渗透压约为 3~6 个大气压，除嗜盐微生物外，一般细菌在高渗透压溶液中易发生质壁分离，在低渗透压溶液内又易吸水过量而胀破。故适宜的渗透压是微生物正常生长发育的必要条件。微生物耐渗透压的能力随菌种而不同。在细菌鉴定中，常以耐盐性试验做为其特征之一。

三、实验材料

1、菌种 葡萄球菌、大肠杆菌、枯草杆菌、灵杆菌、黑曲霉、黄曲霉、根霉菌、酵母菌等的斜面菌种。

2、器材 无盐的牛肉膏蛋白胨溶液，豆芽汁溶液；9ml 无菌水管，1ml、10ml 无菌吸管，灭菌试管，小铝锅。

四、实验步骤

1、培养基配制（4 人一组）。

(1) 每组配制含 NaCl 5g/L、50g/L、100g/L、200g/L 的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基各 80ml，分装于 16 支试管中，每管 5ml，加棉塞，包扎，灭菌，并摆成斜面备用。

(2) 每组配制含蔗糖 3g/L、30g/L、300g/L、600g/L 的豆芽汁蔗糖琼脂培养基各 80ml，分装于 16 支试管中，每管 5ml，加棉塞，包扎，灭菌，并摆成斜面备用。

2、菌悬液制备 将供试菌分别编号，四种细菌编号为 B₁、B₂、B₃、B₄；四种真菌编号为 F₁、F₂、F₃、F₄。取无菌水管 8 支，编写相应号。按无菌操作法从供试菌斜面上取菌体或孢子少许，接入编号相同的无菌水管中制成菌悬液待用。

3、接种、培养 取含不同 NaCl 浓度的牛肉膏蛋白胨琼脂斜面，以划线法于斜面上接种各细菌悬液，重复 2 管；取含不同蔗糖浓度的豆芽汁斜面，以划线法于斜面上接种霉菌孢子悬液或酵母菌悬液，重复 2 管；做好标记，置 28℃ 培养。细菌于 2~3d 后检查，真菌于 4~5d 检查。

五、实验报告

将观察结果分别记入表 2-9、2-10 中。

表 2-9 NaCl 对细菌生长发育的影响

NaCl 浓度	5g/L	50g/L	100g/L	200g/L
---------	------	-------	--------	--------

B₁

B₂

B₃

B₄

表 2-10 蔗糖对真菌生长发育的影响

蔗糖浓度	3g/L	30g/L	300g/L	600g/L
F ₁				
F ₂				
F ₃				
F ₄				

注：记载符合-：不生长，+：生长，++：生长较好，+++：生长最好。

六、思考题

- 1、渗透压影响微生物生长发育的机理是什么？
- 2、通过实验你认为加工盐腌食品和蜜饯果品应选用的腌制溶液，其盐或糖的最低浓度应是多少？为什么？

实验十六 微生物间的拮抗作用

一、目的要求

学习拮抗作用的试验方法，观察微生物间的拮抗现象及抗生素的抗菌作用。

二、基本原理

拮抗作用是土壤微生物之间普遍存在的一种相互关系。它是某些微生物生命活动中产生的一种特异性代谢产物—抗生素，具有抑制或杀死另一些微生物的作用。能产生抗性素的微生物称为抗生素菌。衡量抗生素菌或抗生素抗菌作用的强弱，常以其对某些微生物产生拮抗作用所形成的抑菌圈的大小来表示。

三、实验材料

1、菌种 2° 波林麦芽汁琼脂平板上培养 3d 的青霉素、马铃薯葡萄糖琼脂平板上培养 3d 的 5406 放线菌、棉立枯病菌 (*Rhizoctoniasolani kuehn*)、葡萄球菌、大肠杆菌、萤光杆菌、变形杆菌 (*Proteus*) 等斜面菌种。

2、器材 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(每支 15ml)，马铃薯葡萄糖琼脂培养基(每支 15ml)，青霉素，链霉素，无菌培养皿，无菌水管，无菌吸管，无菌打孔器，镊子、解剖针，接种环，接种针，0.6cm 的园形滤纸片。

四、实验步骤

(一) 微生物间的拮抗试验

1、菌块法

(1) 5406 放线菌对棉立枯病菌的拮抗试验 取融化并保温在 50℃ 左右的马铃薯葡萄糖琼脂培养基管，倾入无菌培养皿中，使冷凝成平板。按无菌操作法用接种环挑取立枯病菌菌丝接种于平板中心；再取 5406 放线菌菌块 3~4 块(用解剖针划取)，均匀分放在平板的 3~4 处，然后将皿正放或倒置于 28℃ 下培养 4d。观察结果，并测量抑菌圈的大小(图 2-2)。

(2) 青霉菌对葡萄球菌的抑菌效应 取融化并保温在 50℃ 左右的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基一管，按无菌操作法接入 2~3 环葡萄球菌于培养基中，轻轻摇动(以手搓法搓摇)后，倾入无菌皿中。在未凝固前，迅速取经灭菌打孔器制备的青霉菌块 2~3 块(用无菌打孔器在青霉菌平板上打孔制成)，小心放入培养基中(分 2~3 点放置)，使菌块与培养基凝固在一起。将皿置低温 10℃ 以下保持 12~14h，使菌块中的抗菌素扩散后，然后将皿倒置于 28℃ 下培养 3~4d，观察青霉菌对葡萄球菌的拮抗现象，并测定抑菌圈的直径。

2、平板划线法

(1) 细菌悬液的准备 用接种环按无菌操作法分别制备葡萄球菌、大肠杆菌、荧光杆菌、变形杆菌的菌悬液备用。

(2) 制平板 取融化并保温在 50℃左右的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基 1 管，倒入无菌培养皿中。在未凝固前，用镊子迅速取制好的条状青霉菌块一条（用灭菌刀片或用解剖针划制）放于皿的一侧，使其与培养基一起凝固。

(3) 接种 用接种环分别取已制好的细菌悬液，于平板上划一条直线，划线方向与青霉菌菌苔垂直，各线条之间保持一定距离，于皿底做好各菌的标记。将皿置于低温（10℃以下）下保持 12~14h，然后倒置移入 28℃下培养 3~4d。观察青霉菌对几种测试菌的拮抗作用（图 2-3）。

(二) 抗生素药剂的抑菌试验（滤纸片法）

1、抗生素标准液的配制 精确称取青霉素（P）、链霉素（S）已知含量的标准品，以磷酸缓冲液配制成 10、50、100、1000 单位的溶液放入 6cm 培养皿中，将灭过菌的圆形滤纸片数张分别浸入各浓度的药剂中。

2、制含菌平板 取融化并保温在 48℃左右的牛肉膏蛋白胨琼脂高层培养基 2 支，分别接入葡萄球菌和大肠杆菌 2 环，轻轻摇匀，迅速倒入无菌培养皿中，待冷凝成平板，做好标记。

3、加药剂 用无菌镊子由低浓度顺序分别夹取浸药滤纸片（控净药液并稍晾干），放在含菌平板的不同位置上，做好标记。

4、培养 将培养皿倒置于 28℃下培养 24~48h 后，观察结果。

5、结果检查 取出培养皿观察药剂对试验菌的抑菌作用，并测量抑菌圈大小（直径）。

五、实验报告

记录试验结果，分析微生物之间和抗生素对微生物的拮抗关系。

六、思考题

1、何谓拮抗作用？举例说明微生物间的拮抗关系。

2、拮抗作用在生产实践中有何意义？

实验十七 紫外线对微生物致死作用的试验

一、目的要求

了解紫外线的杀菌作用原理，学习其试验方法。

二、基本原理

紫外线对微生物有强烈的致死作用。波长 260nm 左右的紫外线杀菌力最强。其杀菌机制是短波的紫外线引起细胞蛋白质和核酸的光化学反应。但微生物对紫外线的吸收与剂量有关。剂量高低是由紫外灯的功率，照射距离与照射时间而定。高剂量使微生物致死，低剂量引起细胞发生变异，因此紫外线在微生物的诱变育种和消毒灭菌中有重要意义。

紫外线穿透力很弱，普通玻璃、薄纸、水层等均能防止其透过。故紫外线只限于进行物体表面或接种室的空气灭菌。经紫外线照射后的受损细胞，遇光则有光复活现象，故处理后的接种物应避光培养。

三、实验材料

1、菌种 培养 24~48h 的金黄色葡萄球菌、灵杆菌。

2、器材 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基，无菌水管，无菌培养皿，无菌吸管（1ml），无菌刮铲，灭菌图案纸（牛皮纸或黑纸），紫外灯。

四、实验步骤

1、制平板 取无菌培养皿 2 副，将已融化并冷却至 50℃左右的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基按无菌操作法倒入培养皿中，使冷凝成平板。

2、菌悬液制备 取无菌水管 2 支，以无菌操作法分别取葡萄球菌和灵杆菌各 1 环，接入无菌水管中充分摇匀，制成菌悬液。

3、接种 用无菌吸管吸取已制好的菌悬液各 0.1ml，分别接种于二个平板上，用无菌刮铲涂匀，随即用无菌镊子来取无菌图案纸一张，小心放于接种好的培养皿中央（图 4-2）。

4、紫外线处理 紫外灯箱先开灯预热 2~3min。再将上述培养皿置于紫外灯下，打开皿盖。在 30cm 距离处照射 5~8min，小心地取下图案纸，盖上皿盖。用黑布或厚纸遮盖，送入培养箱。

5、培养 将培养皿于 28~30℃温度下培养 48h。

6、结果检查 取出培养皿观察并分析平板上细菌生长的状况。

五、实验报告

记述并图示平板上细菌生长的状况。

六、思考题

- 1、紫外线菌的原理是什么？
- 2、紫外线照射时，为何要打开皿盖？

实验十八 化学药剂对微生物的影响

一、目的要求

了解化学药剂的杀菌和消毒作用，并掌握常用消毒剂的浓度和使用方法。

二、基本原理

一些化学药剂对微生物的生长有抑制或杀死作用。因此，在实验室和生产上常利用某些化学药剂进行杀菌或消毒。不同的药剂或同一药剂对不同微生物的杀菌能力不同。此外，药剂浓度、作用时间及环境条件不同，其效果也不同。应用前需进行试验，灵活选择。

三、实验材料

1、菌种 培养 24~38h 的大肠杆菌、葡萄球菌、枯草杆菌斜面菌种。

2、器材 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基，无菌培养皿无菌水管，无菌吸管（1ml），无菌刮铲，无菌镊子，直径 0.6cm 的无菌圆形滤纸片，1g/L HgCl₂，5g/L AgNO₃，5g/L CuSO₄，50g/L 石炭酸。

四、实验步骤

1、制平板 取无菌皿 3 副，将已融化并冷却至 50℃ 左右的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基按无菌操作法倒入培养皿中，使冷凝成平板。

2、制备菌悬液 取无菌水管 3 支，用接种环分别取大肠杆菌、葡萄球菌、枯草杆菌各 1~2 环接入无菌水管中，充分混匀，制成菌悬液。

3、接种 用无菌吸管分别吸取已制好的菌悬液 0.1ml 接于平板上，用无菌刮铲涂匀。注意做好标记。

4、加药剂 用无菌镊子夹取滤纸片，分别浸蘸 1g/L HgCl₂、5g/L AgNO₃、5g/L CuSO₄ 和 5g/L 石炭酸溶液，稍风干，分别平铺于同一含菌平板上，注意药剂之间勿互相沾染。于培养皿背面做好标记。（图 2-5）。

5、培养 将培养皿置于 28℃ 下培养 48~72h。

6、结果检查 取出培养皿观察滤纸片周围有无抑菌圈产生，并测量抑菌圈之大小。

五、实验报告

将测量结果填于表 2-11 中，并分析比较各药剂的杀菌效能。

表 2-11 化学药剂对细菌的抑菌效果（抑菌圈直径 cm）

消毒剂	HgCl ₂ (1g/L)	AgNO ₃ (5g/L)	CuSO ₄ (5g/L)	石炭酸(50g/L)
大肠杆菌				

葡萄球菌				
枯草杆菌				

六、思考题

- 1、指出以上各化学药剂的抑菌机遇。
- 2、分析比较各药剂对试验菌的药效结果。

实验十九 淀粉水解试验

一、目的要求

了解淀粉水解的原理，学习淀粉水解试验方法，检测细菌是否具水解淀粉的能力。

二、基本原理

许多细菌产生淀粉酶，能水解培养基中的淀粉为无色糊精、麦芽糖、葡萄糖。淀粉水解后，遇碘不再变蓝，故可用以鉴定某菌是否具水解淀粉的能力。

三、实验材料

1、菌种 培养 24~48h 的大肠杆菌及枯草杆菌的斜面菌种。

2、器材 含淀粉的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基（每管 15ml）（附录一，36），路哥氏碘液、无菌培养皿。

四、实验步骤

1、制平板 取已融化并保温在 50℃ 的含淀粉牛肉膏蛋白胨琼脂培养基 2 支，分别倒入 2 副无菌培养皿中，静置，待冷凝成平板后，将皿倒置，使表面水分蒸发片刻。

2、接种 按无菌操作法用接种针挑取大肠杆菌和枯草杆菌菌体少许，等距排布点接于同一平板上，重复两皿（一般每皿可点种 3~5 个菌株）做好标记，28℃ 下培养 2~4d。

3、检查 形成菌落后，于平板上滴加碘液数滴，轻轻旋转培养皿，使碘液铺满全皿为度。若菌落周围出现无色透明圈，说明淀粉被水解；透明圈的大小，说明该菌水解淀粉能力的大小；反之，则示该菌不产淀粉酶，无水解淀粉的能力。（图 2—10）

五、实验报告

列表记录实验结果报告之。

六、思考题

淀粉水解的原理是什么？本方法是否适用于所有的微生物？

实验二十 石蕊牛奶试验

一、目的要求

了解石蕊牛奶产生变化的原理，学习细菌鉴定的方法。

二、基本原理

牛奶中主要含有乳糖和酪蛋白等，不仅是细菌生长发育的良好培养基，而且可用以测定细菌的生化特性。不同细菌对牛奶各成分的分解利用是不同的，常用石蕊作为酸碱指示剂和氧化还原指示剂。石蕊在中性时呈淡紫色，酸性时呈红色，碱性时呈蓝色，还原时自下而上地褪色变色。以此特征来鉴定细菌。

细菌对牛奶的作用有六种情况

1. 产酸—细菌发酵乳糖产酸，使石蕊变红
2. 产碱—细菌分解酪蛋白产生氨等碱性物质，使石蕊变蓝。
3. 胨化—细菌产生蛋白酶，使酪蛋白分解，故牛奶变得比较澄清而略为透明。
4. 酸凝固—细菌发酵乳糖产酸，使石蕊变红，当酸度很高时，可使牛奶凝固。
5. 凝乳酶凝固—有些细菌能产生凝乳酶，使牛奶中的酪蛋白凝固，此时牛奶常呈蓝色或不变色。
6. 还原—细菌生长旺盛，使培养基氧化还原电位降低，因而石蕊还原褪色。

以上所述 1—5 种反应情况中，石蕊均可还原。

三、实验材料

1. 菌种 培养 24h 的大肠杆菌，枯草杆菌斜面菌种。
2. 器材 石蕊牛奶培养基（附录一，37），接种环。

四、实验步骤

1. 接种培养 取石蕊牛乳培养基 6 管，除二管不接种作对照外，其余 4 管用接种环分别接入大肠和枯草杆菌，每菌重复 2 管。接种完毕，置 30℃ 下保温培养。
2. 结果检查 于 3d、5d、7d、14d 分别观察一次，记录结果。

五、实验报告

将观察结果填入表 2-14。

表 2-14 细菌对牛奶的作用结果

菌种	观察时间 (d)	颜色反应	凝乳	胨化	酸凝固	氧化还原	产气
----	-------------	------	----	----	-----	------	----

大 肠 杆 菌	1						
	3						
	5						
	7						
	14						
枯 草 杆 菌	1						
	3						
	5						
	7						
	14						

注：记载符号：有反应+，无反应-。颜色反应，氧化还原等用文字记录。

六、思考题

- 1、怎样区分细菌对牛奶作用的六种反应情况？
- 2、石蕊牛奶试验有何实践意义？

实验二十一 明胶水解试验

一、目的要求

了解明胶水解的原理，学习穿刺接种的方法。

二、基本原理

明胶是一种动物性蛋白，其水解（液化）是由于某些细菌能分泌蛋白酶使蛋白质降解之故。水解后其分子变小，虽然在低于 20℃ 的温度下，亦不再凝固。根据液化的程度，以判断细菌产酶能力的大小与液化特征，此实验是鉴定细菌的生理生化特征之一。

明胶培养基本身具有低于 20℃ 凝固为固体、高于 24℃ 则自行液化的特性，所以必须注意培养和观察的温度，如高于 24℃ 时，则需经低温处理。

三、实验材料

1、菌种 培养 24h 的大肠杆菌、枯草杆菌、灵杆菌斜面菌种。

2、器材 明胶柱状培养基（4.5ml），明胶琼脂高层培养基（每管装 15ml）附录一，27），无菌培养皿，酸性升汞液（附录七，1），接种针。

四、实验步骤

（一）穿刺法

1、接种培养 取明胶柱状培养基 8 管，除二管不接种作为对照外，其余 6 管用接种直针在柱状培养基中央，分别接入大肠杆菌，枯草杆菌，灵杆菌，每种菌重复二管。于 20℃ 温度下培养 2d、7d、15d 观察。若有的菌不能在 20℃ 生长，可于 30℃ 下培养后，放入冰箱或冰浴中，待对照管凝固后，才能观察液化程度。

2、结果检查 培养好后，轻轻拿出培养物（勿摇动），在 20℃ 以下的室温或经低温处理后，观察菌的生长与液化明胶的程度。若菌已生长，明胶表面无凹陷且为稳定的凝块，则为明胶水解阴性；如明胶凝块部分或全部在 20℃ 以下变为可流动的液体，则为明胶水解阳性；如菌已生长，明胶未液化，但明胶柱状表面菌苔下出现凹陷小窝（须与对照管比较，因培养时间过久水分失散，也会有凹陷）为轻度水解、按阳性记录。其液化类型记载见实验二十八图 1-35。

（二）明胶平板法

1、制平板 取已融化冷却至 50℃ 左右的明胶琼脂高层培养基 4 管，倒入 4 副无菌培养皿内，使冷凝成平板。

2、接种、培养 用接种针挑取待测菌，在平板上作等距离点接（每个平板可接 3~5

种菌，重复二皿)；另二皿不接种作对照。接种完毕，置 28℃下培养 2~3d。

3、结果检查 待菌落生长丰厚后取出平板，于皿中滴加 8~10ml 酸性升汞液，轻轻旋转培养皿使复盖均匀，放置 10~15min 进行观察。若菌落周围出现透明圈者记为阳性，说明该菌具有蛋白酶，能液化明胶。透明圈的大小表明酶活力的大小。未水解的明胶与汞盐作用形成白色沉淀，即示阴性。

注意事项：

①这种培养基适用于中温菌类蛋白酶活的测定。

②升汞试剂剧毒，用时应特别小心。

五、实验报告

将实验结果填于表 2-15。

表 2-15 细菌对明胶液化结果

菌种	明胶液化			
	2d	7d	15d	平板法
大肠杆菌				
枯草杆菌				
灵杆菌				
对 照				

六、思考题

明胶水解的原理是什么？试试验有何实践意义？

实验二十二 食品中微生物的检验

一、目的要求

学习并掌握食品中细菌总数和大肠菌群测定的基本方法，了解一些主要食品的卫生指标。

二、基本原理

食品中细菌污染的程度，反映了食品的一般卫生质量，以及食品在产、储、运、销过程中的卫生措施及管理情况。

细菌总数是指 1g 或 1ml 被检食品中，在一定的培养条件下所得的菌落总数。

大肠菌群指一群在 37℃，24h 能发酵乳糖，产酸、产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。菌群主要来源于人畜粪便，故以此作为被粪便污染指标，来评价食品的卫生质量，具有广泛的卫生学意义。

食品中大肠菌群数系以 100ml (g) 检样内大肠菌群最近似数 (MPN) 来表示，其含义是指 100ml (g) 食品内含有大肠菌群数的实际数值 (表 7-3)。

三、实验材料

1、待检样品 表列食品之一。

2、器材 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基，乳糖胆盐发酵液管 (内倒置小管)，伊红美蓝琼脂平板，乳糖发酵液管 (内倒置小管) (附录一，58, 60~62)，灭菌生理盐水 (9ml、90ml、225ml 的 0.85%NaCl 溶液)，革兰氏染色液，均质器或研钵，无菌皿、无菌吸管 (1ml, 10ml)，显微镜，灭菌采样瓶 (管) 等。

主要食品卫生指标见表 7-3。

表 7-3 一些主要食品卫生指标 (微生物)

食品种类	细菌数个/ml (g)	大肠杆菌群最近似数	致病菌
酱类、醋类	<5000	<30, 醋不得检出	不得检出
腐乳类、豆豉、酱菜类		<30	不得检出
豆腐干、豆腐、豆腐片	<5000	<70	不得检出
凉粉	<500	<30	不得检出
消毒牛乳、甜炼乳	<3000	<40	不得检出
全脂奶粉	<5000	<40	不得检出
瓶装汽水、果汁饮料	<100	<5	不得检出
全啤酒	<1000	<50	不得检出
发酵酒 (熟啤酒、黄酒、黄酒、葡萄酒)	<50	<3	不得检出

罐头制品、微生物指标规定无致病菌及微生物引起的腐败现象。

四、实验步骤

1、细菌总数的测定

(1) 样品采集 不同的待检样其取样方法随样品而定。总原则是取样应有代表性，均匀性，典型性。应多点采样，且无菌操作。

(2) 样品稀释 取 10ml 无菌吸管以无菌操作法吸取液体样品 10ml 或以无菌称样纸称取固体样品 10g，加入盛 90ml 无菌生理盐水的三角瓶中，充分振荡 15min，再以 10 倍稀释法依次稀释为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} ... (稀释度以待检样污染程度而定)。

(3) 接种、培养 取 1ml 无菌吸管 3 支，分别吸取不同浓度的稀释液各 1ml，放入与稀释度编号相同的培养皿中，每个稀释度重复二皿，立即倒入已融化并保温以 50°C 左右的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基约 15ml，轻轻转动平皿使之混匀，静置冷凝成平板后，倒置于 37°C 培养 24h，取出计数。平皿内细菌菌落数乘以计数皿的稀释倍数，即得每毫升(克)样品所含细菌的总和。

菌落计烽的方法与原则见实验九十六。

2、大肠菌群的测定

(1) 检样的稀释 以无菌操作法取待检样 25ml(或 25g)，放于含有 225ml 灭菌生理盐水或其它稀释液的灭菌玻璃瓶内(瓶内预置适当数量的玻璃珠)或灭菌研钵内，经充分振荡或研磨制成 10^{-1} 的稀释液。固体检样最好用均质器，以 $8000\sim 10000\text{r}/\text{min}$ 的速度处理 1min，再做成 10^{-1} 稀释液。根据食品卫生标准要求或对待检样污染情况的估计，再依次稀释成 10^{-2} 10^{-5} 或更高。

(2) 乳糖发酵试验 将待检样品接种于乳糖胆盐发酵管内，接种量为 10ml 者，用双倍乳糖发酵管；1ml 以下者，用单倍乳糖发酵管。每一稀释度接种 3 管，置 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 温度下，培养 $24\pm 2\text{h}$ 。如所有乳糖胆盐发酵管都不产气，则可报告为大肠菌群阴性；如有产气者，则按下列程序进行。

(3) 分离培养 将产气的发酵管分别以划线法转接在伊红美蓝琼脂平板上，置 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 温度下，培养 $18\sim 24\text{h}$ ，取出观察菌落形态，并作革兰氏染色和证实试验。

(4) 证实试验(即复发酵试验)在上述平板上，挑取可疑大肠菌群落 1~2 个进行革兰氏染色，同时接种乳糖发酵管，置 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 温度下，培养 $24\pm 2\text{h}$ ，观察产物情况。凡乳糖管产气，革兰氏染色为阴性的无芽孢杆菌，即可报告为大肠菌群阳性；如乳糖管不产气或革兰氏染色阳性，则报告为大肠菌群阴性。

大肠菌群检验程序见图 7-2。

五、实验报告

1、根据证实为大肠菌群的阳性管数，按表 7-4 报告你所作的食品检样 100ml (g) 中的大肠菌群最近似数。

2、所测食品的细菌总数和大肠菌群最近似数是否符合卫生指标？

六、思考题

为什么食品中大肠菌群的检验要经过复发酵试验才能证实

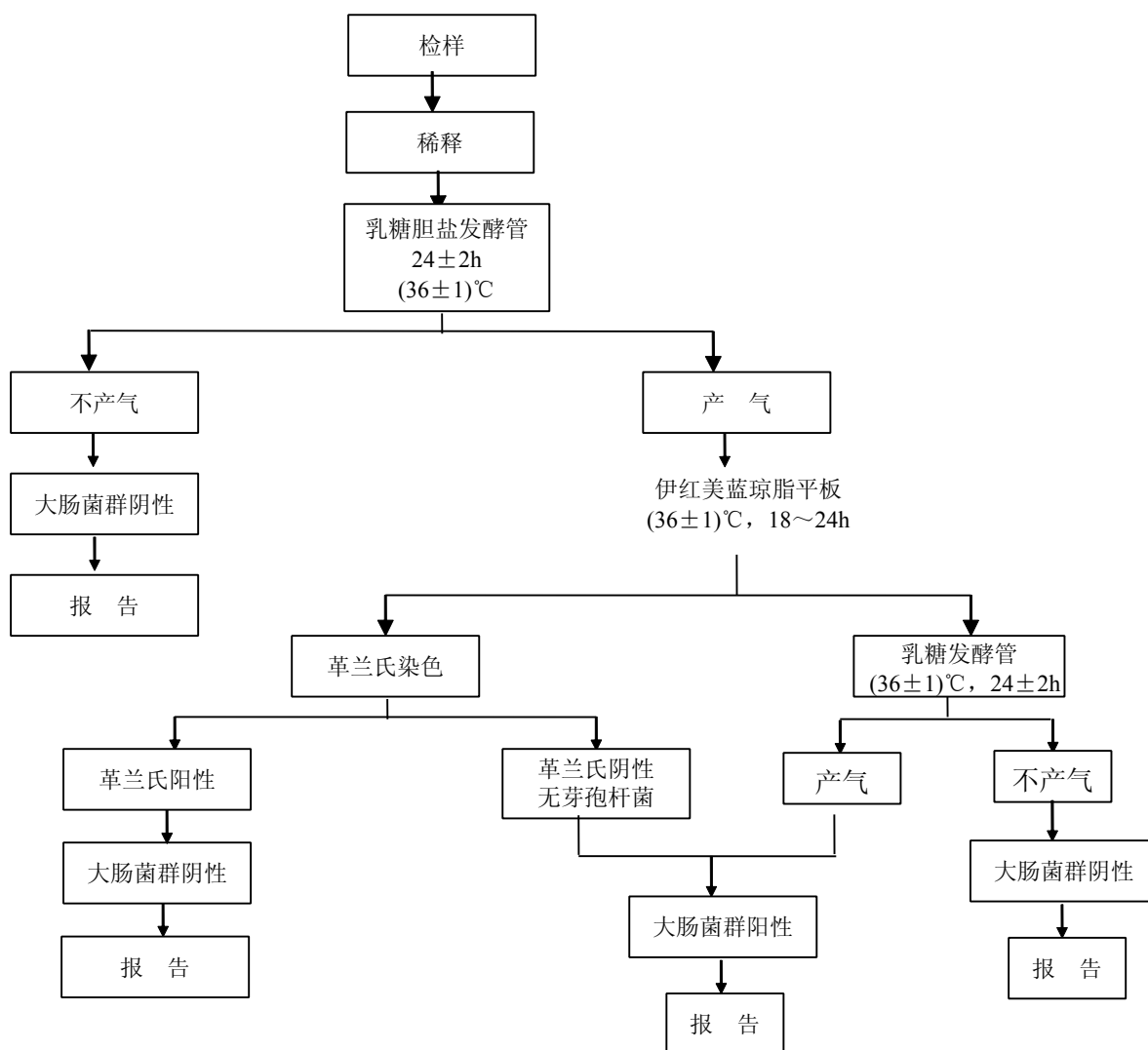


图 7-2 大肠菌群检验程序

表 7-4 大肠菌群最近似数 (M. P. N) 检索表

阳性管数	MPN	95%可信限
------	-----	--------

1ml (g) × 3	0. 1ml (g) × 3	0. 01ml (g) × 3	100ml (g)	上限	下限
0	0	0	<30		
0	0	1	30		
0	0	2	60	<5	90
0	0	3	90		
0	1	0	30	<5	130
0	1	1	60		
0	1	2	90		
0	1	3	120		
0	2	0	60		
0	2	1	90		
0	2	2	120		
0	2	3	160		
0	3	0	90		
0	3	1	130		
0	3	2	160		
0	3	3	190		

阳 性 管 数			MPN	95%可信限	
1ml (g) × 3	0. 11ml (g) × 3	0. 01ml (g) × 3	100ml (g)	上限	下限
	3	3			
1	0	0	40	<5	200
1	0	1	70	10	210
1	0	2	110		
1	0	3	150		
1	1	0	70	10	230
1	1	1	110	30	360
1	1	2	150		
1	1	3	190		
1	2	0	110	30	360
1	2	1	150		
1	2	2	200		
1	2	3	240		919
1	3	0	160		
1	3	1	200		
1	3	2	240		
1	3	3	290		

2	0	0	90	10	360
2	0	1	140	30	370
2	0	2	200		
2	0	3	260		
2	1	0	150	30	440
2	1	1	200	70	890
2	1	2	270		
2	1	3	340		
2	2	0	210	40	470
2	2	1	280	100	1500
2	2	2	350		
2	2	3	420		
2	3	0	290		
2	3	1	360		
2	3	2	440		
2	3	3	530		
3	0	0	230	40	1200
3	0	1	390	70	1300
3	0	2	640	150	3800
3	0	3	950		
3	1	0	430	70	2100
3	1	1	750	140	2300
3	1	2	1200	300	3800
3	1	3	1600		
3	2	0	930	150	3800
3	2	1	1500	300	4400
3	2	2	2100	350	4700
3	2	3	2900		
3	3	0	2400	360	13000
3	3	1	4600	710	24000
3	3	2	11000	1500	48000
3	3	3	>24000		

注：1、本表采用 3 个稀释度 1ml (g) 0.1ml (g) 0.01ml (g) 每稀释度 3 管。

1、表内所列检样量如改用 10ml (g), 1ml (g) 和 0.1ml (g) 时, 表内数字相应降低 10 倍, 如改用 0.1ml (g), 0.01ml (g) 和 0.001ml (g) 时, 则表内数字应增加 10 倍, 其余可类推。