

# 基础微生物学实验

## 每组实验材料清单

试剂或耗材	数量	试剂或耗材	数量
结晶紫	1	酒精灯	1
95%乙醇	1	接种环	2
碘液	1	血球计数板	2
番红	1	擦镜纸	1
无水乙醇	1	试管架	1
香柏油	1	光学显微镜	1

## 实验内容

实验一 光学显微镜的使用与细菌形态观察

实验二 细菌的简单染色和革兰氏染色

实验三 霉菌和放线菌形态特征观察

实验四 培养基的制作与灭菌技术

实验五 微生物的纯系分离、纯化、培养技术

实验六 微生物计数法（平板法、血球板法）

## 实验一 光学显微镜的使用与细菌形态观察

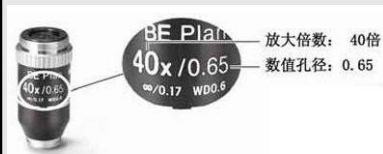
### 实验目的

- 1、掌握显微镜的结构，学习显微镜的操作和保养方法
- 2、油镜的使用原理及维护的基本知识
- 3、观察细菌的形态并绘图

## 实验一 光学显微镜的使用与细菌形态观察

### 实验原理

#### 1) 显微镜的结构



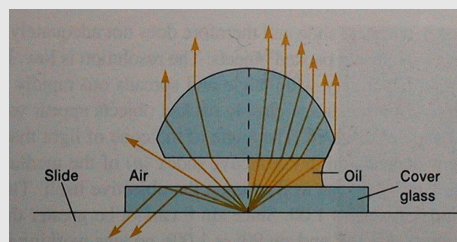
## 实验一 光学显微镜的使用与细菌形态观察

#### 2) 油镜使用的原理

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。

空气折射率=1，香柏油折射率=1.515，玻片折射率=1.52。

很多原来由于在透镜及载片表面的反射和折射而损失的光线可以进入物镜，使照明亮度提高，改善观察效果。



## 实验一 光学显微镜的使用与细菌形态观察

### 实验器材

菌种：大肠杆菌、枯草芽孢杆菌

仪器及相关用品：光学显微镜、擦镜纸、香柏油、无水乙醇、  
吸水纸、酒精灯、接种环等

## 实验一 光学显微镜的使用与细菌形态观察

### 实验步骤

#### ►低倍镜的使用

- ① 取镜和安放：右手握镜臂，左手托镜座；镜筒朝前、镜臂朝后，置于观察者座位前的桌子上。
- ② 对光：转动粗准焦螺旋，使载物台徐徐下降，然后转动物镜转换器，使低倍物镜对准通光孔；用手转动光阑调节杆，使最大光圈对准通光孔；眼睛向目镜内注视，同时转动光度控制旋钮，使视野内亮度均匀合适。
- ③ 观察：放置标本片，使观察物位于圆孔正中央；转动粗准焦螺旋，使载物台徐徐上升，同时眼睛从侧面注视物镜镜头，当镜头距玻片相距2-3mm时，眼睛向目镜内注视，并转动粗准焦螺旋，使载物台徐徐上升，直到看到物象，换用细准焦螺旋进行调节，使物像更加清晰。此过程，同时转动载物台移动旋钮，寻找最佳观察位置。

## 实验一 光学显微镜的使用与细菌形态观察

### ➤高倍物镜的使用

- ① 先用低倍镜找到目的物并移至中央。
- ② 转动粗准焦螺旋，使载物台徐徐下降，旋转物镜转换器换高倍镜。
- ③ 观察。

### ➤油镜的使用

- ① 先按低倍镜到高倍镜的操作步骤找到目的物，并将目的物移至视野正中。
- ② 将高倍镜移开，在标本上滴一滴香柏油，换油镜镜头转至正中，**使镜面浸在油滴中**，然后通过细准焦螺旋进行调节，直至看清目的物。

## 实验一 光学显微镜的使用与细菌形态观察

### ➤油镜的使用

- ③ 观察完毕后，应先通过粗准焦螺旋下降载物台，旋转物镜转换器将油镜头扭向一侧，再取下标本片。油镜头使用后，立即用擦镜纸擦拭镜头。  
**镜头的擦拭：**用专门的擦镜纸；擦镜头时，先将擦镜纸折叠几次，然后朝一个方向擦，不可来回擦或转动擦；如果镜头被油污污染，则可在擦镜纸上滴几滴无水乙醇，然后按上述方法擦拭。
- ④ 镜头擦拭完毕后，将其机械部分用白纱布擦拭干净；转动物镜转换器，让两个物镜偏于两旁；转动粗准焦螺旋，使载物台下降至最低点，蒙上罩子，然后将显微镜放入实验桌下柜。

## 实验一 光学显微镜的使用与细菌形态观察

### ➤ 显微镜的保养

- ① 避免直接在阳光下曝晒。
- ② 避免和挥发性药品或腐蚀性酸类一起存放。
- ③ 油透镜要用擦镜纸擦拭或蘸无水乙醇擦拭。
- ④ 不能随意拆卸显微镜，尤其是物镜、目镜不能随意拆卸。
- ⑤ 避免用手指沾抹镜面。
- ⑥ 显微镜放在干燥处。

## 实验一 光学显微镜的使用与细菌形态观察

### 实验内容

使用显微镜观察大肠杆菌、枯草芽孢杆菌的个体形态，并绘出镜检图。  
(本实验的细菌观察与实验二的染色观察合并)

### 问题与思考

- 1、使用油镜时，为什么先要用低倍镜观察？
- 2、使用油镜时，为什么用香柏油？

## 实验二 细菌的简单染色和革兰氏染色

### 实验目的

- 1、掌握细菌涂片及染色的基本方法和步骤
- 2、熟练掌握显微镜油镜的使用技术

## 实验二 细菌的简单染色和革兰氏染色

### 实验（染色）原理

**染色目的：**增加菌体与背景的反差，便于观察

**染色方法：**简单染色、复合染色（革兰氏染色）

**革兰氏染色原理：**该染色法所以能将细菌分为G-菌和G+菌，是由这两类菌的**细胞壁结构和成分的不同**所决定的。G-菌的细胞壁中含有较多易被乙醇溶解的类脂质，而且肽聚糖层较薄、交联度低，故用乙醇或丙酮脱色时溶解了类脂质，增加了细胞壁的通透性，使初染的结晶紫和碘的复合物易于渗出，结果细菌就被脱色，再经番红复染后就成了红色。G+菌细胞壁中肽聚糖层厚且交联度高，类脂质含量少，经脱色剂处理后反而使肽聚糖层脱水而孔径缩小，通透性降低，因此细菌仍保留初染时的颜色。

## 实验二 细菌的简单染色和革兰氏染色

### 实验器材

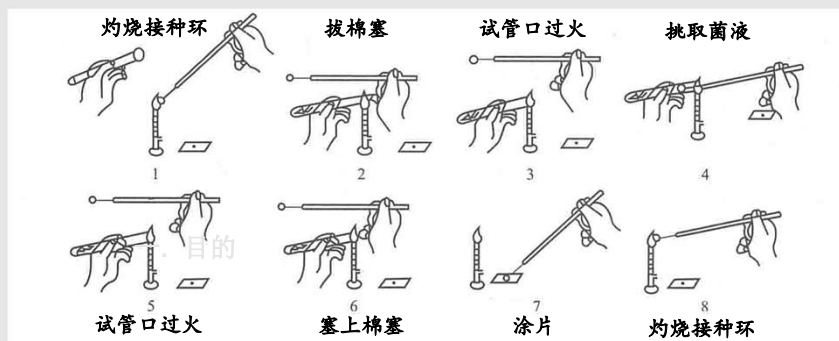
- 1、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌
- 2、结晶紫染液、碘液、95%乙醇、番红染色液
- 3、显微镜、香柏油、无水乙醇、擦镜纸、接种环、载玻片、吸水纸、酒精灯

## 实验二 细菌的简单染色和革兰氏染色

### 实验（染色）步骤

#### ➤ 简单染色法

- ① 涂片 在洁净的载玻片中央滴一滴蒸馏水，用接种环挑取少许菌体与载玻片上的水滴混合均匀，并涂成薄的菌膜。





## 实验二 细菌的简单染色和革兰氏染色

### 染色步骤

#### ➤ 简单染色法

- ② 固定 将涂片放在离火焰较远处，以微热烘干，烘干后再在火焰上方快速通过3~4次，使菌体完全固定在载玻片上。
- ③ 染色 滴加结晶紫染色液，染1~2 min，染色液量以盖满菌膜为宜。
- ④ 冲洗 倾去染色液，斜置载玻片，用水冲去多余染色液，直至流出的水呈无色为止。
- ⑤ 干燥 自然晾干或者在火焰上方微热烘干。
- ⑥ 镜检 按显微镜的操作步骤观察菌体形态，并及时记录，包括形态图的绘制。

## 实验二 细菌的简单染色和革兰氏染色

### 染色步骤

#### ➤ 革兰氏染色法

- ① 涂片、固定 同简单染色法
- ② 初染 滴加结晶紫染色液，染1~2 min，水洗。
- ③ 媒染 滴加碘液，1min后水洗，染色液量以盖满菌膜为宜。
- ④ 脱色 滴加95%乙醇，摇动玻片几下即倾去乙醇，重复2~3次至紫色不再后即水洗(根据涂片之厚薄需时30s至1min)。
- ⑤ 复染 滴加番红染色液复染1min，水洗。
- ⑥ 镜检 同简单染色法，并根据呈现的颜色判断该菌属G-细菌还是G+细菌。

## 实验二 细菌的简单染色和革兰氏染色

### 结果对比

革兰氏阳性菌染成蓝紫色，革兰氏阴性菌染成淡红色。



革兰氏阴性菌



革兰氏阳性菌

## 实验二 细菌的简单染色和革兰氏染色

### 注意事项

- ① 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，切忌过厚。
- ② 在染色过程中，不可使染液干涸。
- ③ 在革兰氏染色过程中脱色时间十分重要，过长，则脱色过度，会使阳性菌被染成阴性菌，另外，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。

## 实验二 细菌的简单染色和革兰氏染色

### 实验内容

绘制大肠杆菌、枯草芽孢杆菌革兰氏染色视野图，并进行结果分析。

### 问题与思考

- 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 制片为什么要完全干燥后才能用油镜观察?
- ③ 试分析革兰氏染色法在细菌分类中的意义。

## 实验三 放线菌和霉菌的形态特征观察

### 实验目的

- 1、学习并掌握放线菌、霉菌形态结构的观察方法。
- 2、认识并理解放线菌、霉菌的形态特征

### 实验材料

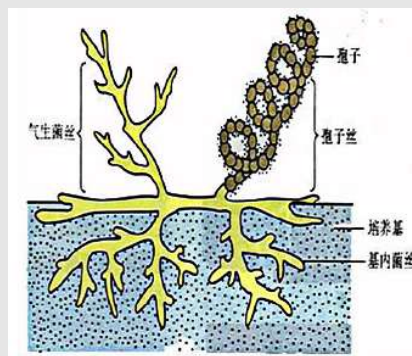
- 1、链霉菌培养物，黄曲霉、青霉、黑根霉玻璃纸培养物
- 2、显微镜、无水乙醇、擦镜纸、载玻片、盖玻片、吸水纸、酒精灯等

## 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察

### 实验原理-放线菌

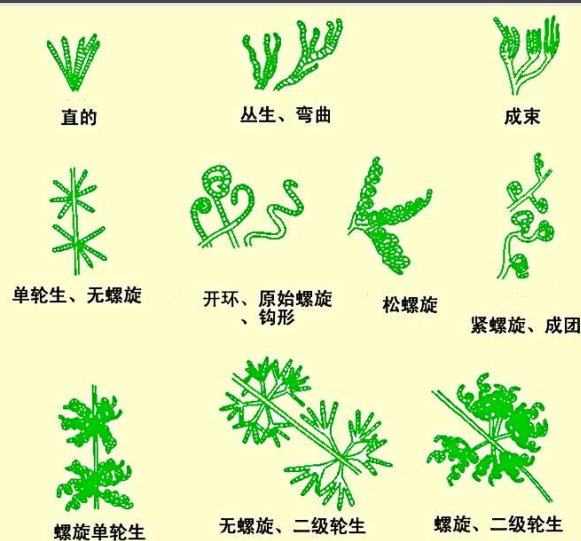
**放线菌**：是一类主要呈（分枝状）菌丝状生长和以孢子繁殖的原核生物。

紧贴培养基表面或深入培养基内生长的**基内菌丝**（也称：**营养菌丝**）；基内菌丝生长到一定阶段向空气中延伸生长出**气生菌丝**，并进一步分化产生**孢子丝**及孢子。



## 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察

### 放线菌孢子丝类型



## 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察

### 实验程序-放线菌

#### ►插片法

- ① 倒平板：将融化后冷却至50℃的高氏一号培养基平板，平板宜厚些（4~5 mm，约20 ml），冷凝待用。
- ② 插片：用无菌镊子将无菌盖玻片以45°倾角插入培养基内，深度约为盖玻片的一半。



- ③ 接种：用接种环挑取少量菌种，在盖玻片与培养基的交界面处接种，且接种于其中央约盖玻片宽度的一半，以免菌丝蔓延到盖玻片的另一面。

## 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察

#### ►插片法

- ④ 将平板倒置于28℃的恒温培养箱中，培养3~7天。
- ⑤ 镜检：用镊子小心拔出盖玻片，擦去背面培养基，将有菌的一面朝上放在载玻片上，直接镜检。

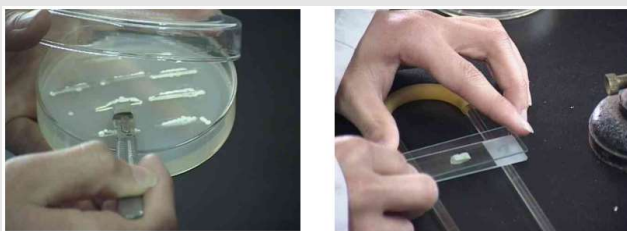


## 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察

### ▶印片法

- ① 倒平板、接种、培养：同插片法。
- ② 印片：切取放线菌培养体，放在干净的载玻片上（菌面朝上），用另一块载玻片对菌块的气生菌丝轻轻按压，使孢子丝和孢子印在另一载玻片上，然后将载玻片垂直拿起。

**注意：**不要使培养体在载玻片上滑动，防治打乱孢子的自然形态。



## 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察

### ▶印片法

- ④ 固定：将放线菌涂面朝上，通过酒精火焰2~3次加热固定。
- ⑤ 染色：用石碳酸复红染液染色1min，水洗后晾干。
- ⑥ 镜检：按低倍镜、高倍镜、油镜依次观察孢子丝、孢子的形态及排列情况。

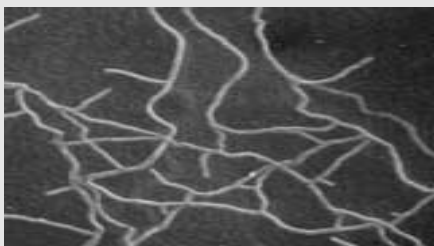
### 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察

#### ➤直接观察法（本实验选用该法）

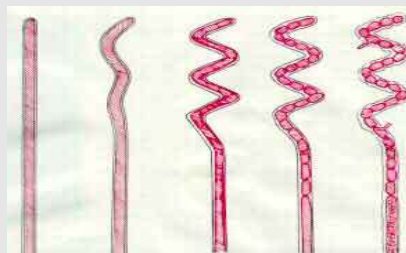
在放线菌平板培养物中，用解剖刀切下一小块长有菌丝的培养基，放在洁净的载玻片上，选择菌苔边缘部位，在显微镜下依次用低倍镜、中倍镜、高倍镜直接观察，观察时需不断调节微调，仔细观察气生菌丝、基内菌丝和孢子丝的形状。

可观察放线菌菌丝和孢子丝的自然生长状况。

### 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察



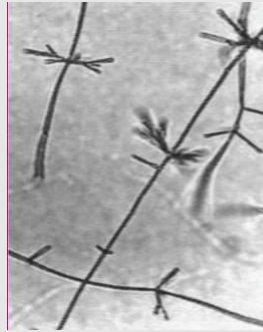
链霉菌形态观察



放线菌的孢子丝描绘图

### 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察

放线菌孢子丝的显微图片：



单轮生

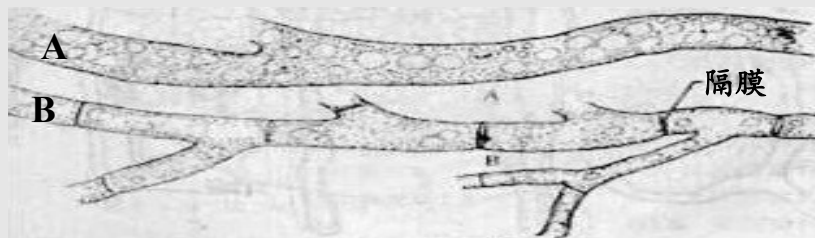


螺旋状

### 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察

#### 实验原理-霉菌

霉菌：由粗大、有隔或无隔分支状菌丝构成。菌丝分为**基内菌丝**、**气生菌丝**。气生菌丝特化结构上产生孢子，孢子着生部位、排列方式以及孢子形态可作为真菌鉴定的重要依据。

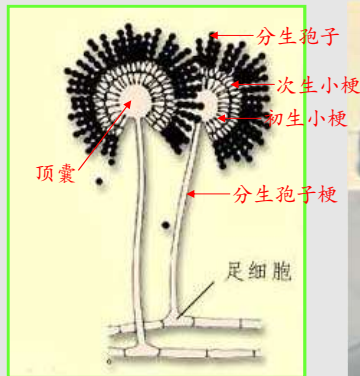


霉菌菌丝 A:无隔菌丝, B: 有隔菌丝

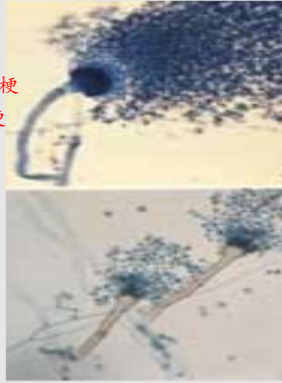


## 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察

### 霉菌形态观察



曲霉



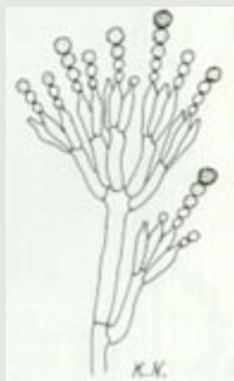
曲霉的分生孢子梗和顶囊上的分生孢子



曲霉的分生孢子彩图

## 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察

### 霉菌形态观察



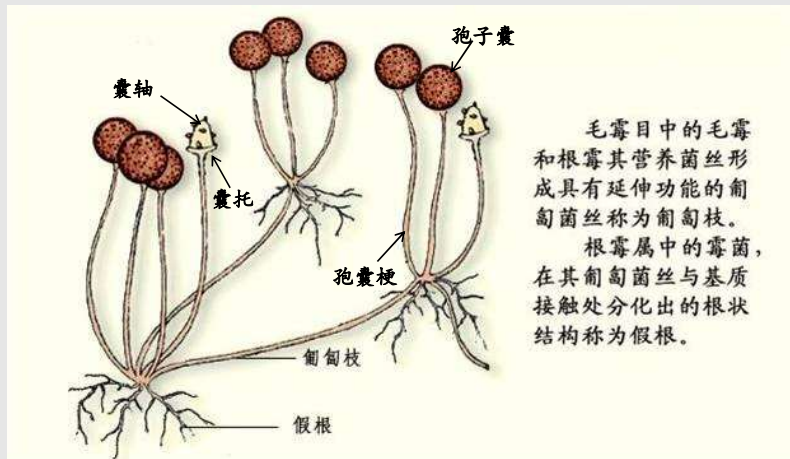
青霉的帚状分生孢子梗和分生孢子



青霉的形态观察

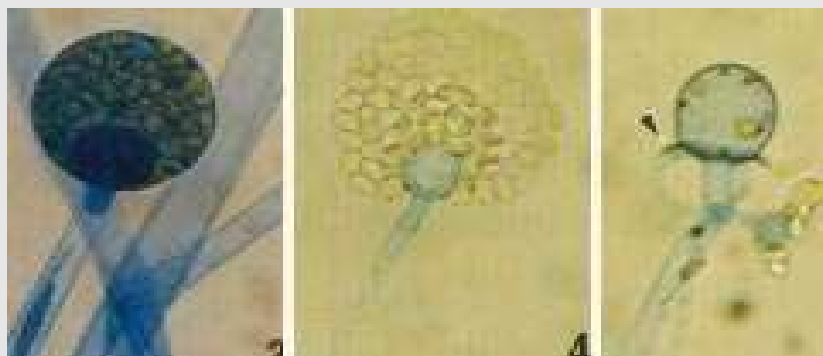
### 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察

#### 霉菌形态观察



### 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察

#### 霉菌形态观察



毛霉的静孢子 左：毛霉的孢子囊；中：孢子囊壁破裂，露出静孢子；右：囊轴

## 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察

### 实验步骤-霉菌

在干净的载玻片上加一滴无菌水，将真菌玻璃纸培养物轻放在无菌水上，注意不要产生气泡。在显微镜下依次用低倍镜、中倍镜、高倍镜直接观察。

黑根霉的孢子的形状、颜色、大小、孢子囊、中轴体的形状，有无假根和葡萄菌丝。

黄曲霉的分生孢子的形状、颜色、大小、顶囊的形状、小梗排列隔膜。

青霉的分生孢子的形状、颜色、大小、小梗的排列方式，菌丝的隔膜。

## 实验三 放线菌、霉菌的形态特征观察

### 试验报告

通过直接观察法观察放线菌形态，并绘图。

绘制黑根霉、青霉、黄曲霉的镜检图，并标注其中的特征性结构。

## 实验四 培养基的制作与灭菌技术

### 实验目的

- 1、了解微生物培养基的种类及配制原则
- 2、掌握微生物培养基的配制程序
- 3、掌握灭菌原理及方法

## 实验四 培养基的制作与灭菌技术

### 实验原理

培养基是用人工的办法将多种营养物质按微生物生长代谢的需要配制成的一种营养基质。培养基中除应含有满足微生物生长发育且比例合适的水分、碳源、氮源、无机盐、生长因素以及某些特需的微量元素外还应具有适宜的酸碱度、缓冲能力、氧化还原电位和渗透压。

**培养细菌最常用的培养基是牛肉膏蛋白胨培养基、培养放线菌最常用的培养基是高氏一号培养基、培养真菌最常用的马丁氏培养基。**

## 实验四 培养基的制作与灭菌技术

### 实验器材

药品：牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、氢氧化钠、硝酸钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、硫酸亚铁、磷酸二氢钾、葡萄糖、琼脂等

仪器：天平、高温蒸汽灭菌锅、烘箱

玻璃器皿：培养皿、试管、移液管、锥形瓶、烧杯、量筒、玻璃棒等

其他物品：角匙、称量纸、pH试纸等

## 实验四 培养基的制作与灭菌技术

### 培养基配方

牛肉膏蛋白胨培养基 (pH7.2-7.4)

牛肉膏	3.0 克
蛋白胨	10.0 克
氯化钠	5.0 克
蒸馏水（自来水）	1000毫升
琼脂	18克

## 实验四 培养基的制作与灭菌技术

高氏一号培养基 (pH自然)

可溶性淀粉	20.0克
KNO <sub>3</sub>	1.0克
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5克
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5克
NaCl	0.5克
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	溶液2滴(10%，0.01克)
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0.075克
蒸馏水（自来水）	1000毫升
琼脂	18克

可溶性淀粉需先单独煮至澄清透明，再与其他营养盐混合

## 实验四 培养基的制作与灭菌技术

马丁氏培养基 (pH自然)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1克
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5克
蛋白胨	5克
葡萄糖	10克
琼脂	18克
蒸馏水（自来水）	1000毫升

此培养液1000 mL加1%孟加拉红水溶液3.3 mL。临用时每100 mL培养基中加1%链霉素液0.3mL。

## 实验四 培养基的制作与灭菌技术

### 实验步骤

- 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。称药品的角匙不可混用。
- ② 加热溶解 在烧杯中加入少于所需要的水量，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培养基中（可先将培养基分装至三角瓶，后根据分装量称量对应质量的琼脂，直接加入至三角瓶）。

## 实验四 培养基的制作与灭菌技术

- ③ 调pH 检测培养基的pH，若pH偏酸，可滴加10%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10%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 分装 根据实验要求，可将配制的培养基分装入试管或三角瓶内，然后用塞子塞住。分装时可用漏斗以免使培养基沾在管口或瓶口上面造成污染。
- ⑤ 培养基的灭菌时间和温度，需按照各种培养基的规定进行，以保证灭菌效果和不损培养基的必要成份。培养基经灭菌后，必须放37℃温室培养24 h，无菌生长者方可使用。

## 实验四 培养基的制作与灭菌技术

### 灭菌

实验室最常用的灭菌方法是利用高温处理达到杀菌效果。高温主要是使微生物的蛋白质和核酸等重要生物大分子发生变性。高温灭菌分为干热灭菌和湿热灭菌两大类。湿热灭菌的效果优于干热灭菌。湿热下热量易于传递，更容易破坏保持蛋白质稳定性的氢键等结构，加速其变性。此外，过滤除菌、射线灭菌和消毒、化学药物灭菌等也是微生物学操作中不可缺少的常用方法。

## 实验四 培养基的制作与灭菌技术

### 高压蒸汽灭菌法

高压蒸汽灭菌法适用于培养基、无菌水等物品的灭菌。

- 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至。
- 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，以防冷凝水沾湿棉塞。
- ③ 加盖 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；



## 实验四 培养基的制作与灭菌技术

- ④ 排气 加热。待水煮沸后，水蒸汽和空气一起从排气孔排出。一般认为，当水沸后约5 min，表明锅内空气已排净。
- ⑤ 升压 当锅内空气排净时，即可关闭排气阀，压力开始上升。
- ⑥ 保压 当压力表指针达到所需压力刻度时，控制热源。开始计时并维持压力至所需时间。本实验用121℃，20 min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24 h，无杂菌生长，即可待用。

## 实验四 培养基的制作与灭菌技术

### 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。



## 实验四 培养基的制作与灭菌技术

### 注意事项

- 1、称药品用的牛角匙不要混用；
- 2、称完药品应及时盖紧瓶盖；
- 3、调pH时要小心操作，避免回调；
- 4、不同培养基各有配制特点，要注意具体操作；
- 5、使用灭菌锅应严格按照操作程序进行，避免发生事故；
- 6、灭菌时，操作者切勿擅自离开，务必待压力下降到零后，才可打开锅盖；
- 7、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，以免包装纸烤焦起火。

## 实验四 培养基的制作与灭菌技术

### 问题和思考

- 1、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？
- 2、已灭菌的培养基如何进行无菌检查？
- 3、牛肉膏蛋白胨培养基属何种培养基？

## 实验五 微生物的纯种分离、纯化、培养技术

### 实验目的

- 1、了解平板划线法分离菌种的基本原理及操作
- 2、了解涂布平板法分离微生物纯种的原理及操作

## 实验五 微生物的纯种分离、纯化、培养技术

### 实验原理

自然界中，绝大多数微生物都是混杂生活在一起的；必须从混杂的微生物类群中分离以得到只含有这一种微生物的纯培养物，这种获得纯培养物的方法称为微生物的分离与纯化。

一般根据该微生物营养、培养特点、对某种抑制剂的耐受性不同及对某种环境条件要求不同，制作或设置一些选择性培养基及选择性培养条件，再用平板划线法、稀释涂布平板法等，纯化该微生物，直至得到该纯种菌株。

## 实验五 微生物的纯种分离、纯化、培养技术

### 实验材料

供试样品：土壤

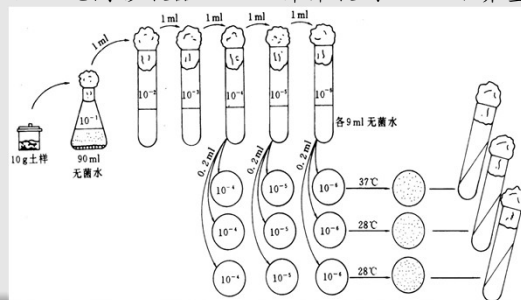
培养基：牛肉膏蛋白胨培养基、马丁氏培养基、高氏一号培养基

其他：盛9 mL无菌水的试管、盛90 mL无菌水的三角瓶、涂布器、移液枪（无菌枪头）、接种环、无菌培养皿。

## 实验五 微生物的纯种分离、纯化、培养技术

### 实验步骤

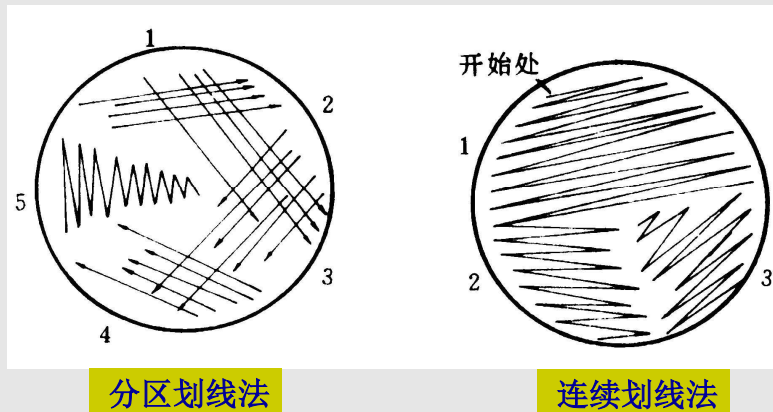
- ① 土壤菌悬液的制备及梯度稀释
- ② 培养基的融化和平板的制备
- ③ 涂布平板：以无菌移液器加入100  $\mu\text{L}$  稀释液，用涂布器涂布均匀。
- ④ 倾注法：以无菌移液器加 1 mL 稀释液到15 mL培养基中，倒平板



## 实验五 微生物的纯种分离、纯化、培养技术

### 实验步骤

平板划线：以无菌接种环取一环稀释液，在平板上划线。



## 实验五 微生物的纯种分离、纯化、培养技术

### 实验步骤

④ 恒温培养 划线或涂布完毕后，将平板倒置于28-30℃恒温箱中培养。细菌培养时间1-2天，真菌和放线菌培养时间5-6天。

⑤ 转接纯化：挑取单菌落，接种到新鲜平板上，培养观察，直至纯化。

(本实验不做转接纯化)



稀释平板法

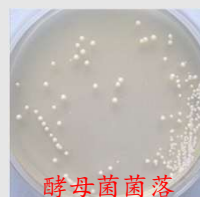
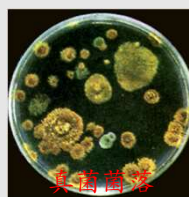
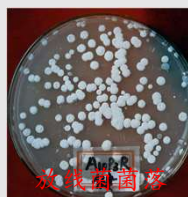
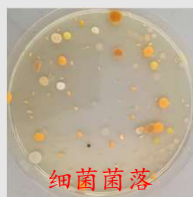


平板划线法

## 实验五 微生物的纯种分离、纯化、培养技术

### 四类微生物菌落的识别与比较

菌落表面特征	细菌	放线菌	真菌	
			酵母菌	霉菌
	圆形或不规则；边缘光滑或不整齐；大小不一，表面光滑或皱褶；颜色多样；湿润粘稠。	与细菌比较，主要区别为表面干燥，呈细致的粉末状或茸毛状。	颇似细菌，一般圆形，表面光滑，但不及细菌湿润粘稠；多显乳白色。	与细菌比较，差异显著。与放线菌比较，表面呈绒毛状或棉絮状；不如放线菌致密。



## 实验五 微生物的纯种分离、纯化、培养技术

### 注意事项

用于划线的接种环，环柄宜长些（约10cm），环口应十分圆滑，划线时环口与平板间的夹角应小些，动作要轻巧，以防划破平板。

用于平板划线的培养基，琼脂含量宜高些（2%左右），否则会因平板太软而被划破。

平板不能倒得太薄，最好在使用前一天倒好。为防平板表面产生冷凝水，倒平板前培养基温度不能太高。

## 实验五 微生物的纯种分离、纯化、培养技术

### 思考

- 1、在你所实验的三种培养基平板上长出的菌落属于哪个类群？简述它们的菌落形态特征。
- 2、稀释分离时，为什么要将融化的琼脂培养基冷却到45~50℃左右才能倾入装有菌液的培养皿内？
- 3、划线分离时，为什么每次都要将接种环上多余的菌体烧掉？划线为何不能重叠？
- 4、培养时为什么要将培养皿倒置培养？

## 实验六 微生物计数法（平板法、血球计数板法）

### 实验目的

- 1、了解显微镜计数的原理
- 2、学习并掌握使用血球计数板进行微生物直接计数的方法
- 3、学习并掌握使用平板法进行微生物计数的方法



## 实验六 微生物计数法（平板法、血球计数板法）

### 实验原理

利用血球计数板在显微镜下直接计数，是微生物实验中一种十分重要的常用微生物计数方法。此法的优点是直观、快速，不论微生物的生理状况如何，都可以在显微镜下一一计数。由于此法得到的是活菌和死菌的总和，故又称为总计数法。这种方法主要用于酵母菌和霉菌孢子的计数。

## 实验六 微生物计数法（平板法、血球计数板法）

血球计数板是一块特制的载玻片，其上四条纵槽构成了三个平台，中间的平台又被一短横槽隔成两半，每一边的平台上各刻有一个方格网，每个方格网共分成9个大方格，中央的大方格为计数室。计数室边长1 mm，共有400个小方格，加盖玻片于突起部分上时，即形成一个体积为0.1 mm<sup>3</sup>的计数室。

计数室的规格有两种：一种是25个中方格×16个小格，另一种是16个中方格×25个小格，所以小方格的总数是相同的，都为400个。

## 实验六 微生物计数法（平板法、血球计数板法）

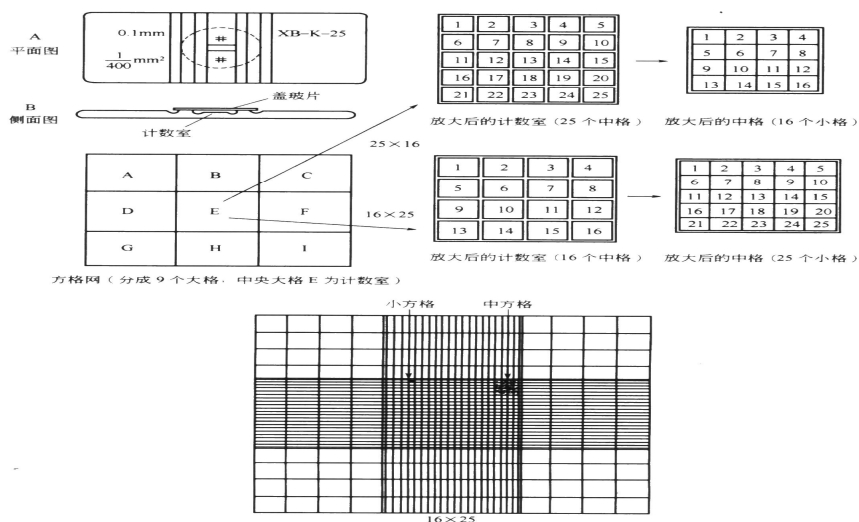


图 2-13 血细胞计数板正面、侧面观与正面方格放大示意图

## 实验六 微生物计数法（平板法、血球计数板法）

### 实验器材

1. 酿酒酵母培养物
2. 血球计数板、盖玻片、酒精灯、显微镜、擦镜纸等

## 实验六 微生物计数法（平板法、血球计数板法）

### 实验步骤

- ① 稀释 将样品稀释至合适的浓度，一般将样品稀释至每一中格约有15~20个细胞数为宜。
- ② 加样 取干净的血球计数板，将盖玻片盖住中央的计数室，用细口滴管吸取少量充分摇匀的菌液滴于盖玻片的边缘，菌液自行渗入计数室，静置5~10 min，待菌体自然沉降并稳定。
- ③ 计数 先用低倍镜寻找大方格网的位置（视野可调暗些），找到计数室后将其转移至视野中央，再换高倍镜观察计数。为减少误差，所选中格位置应布点均匀，如规格为25个中格的计数室，通常取4个角及中央1个中格进行计数；每个样品重复计数2-3次。

## 实验六 微生物计数法（平板法、血球计数板法）

- ④ 计算 先求得每中格菌数的平均数，乘以中格数（16或25），即为一大格（ $0.1\text{mm}^3$ ）中的总菌数，再乘以 $10^4$ ，则为每毫升稀释液的总菌数，如换算成原液的总菌数，再乘以稀释倍数即可。

	每个中格中的菌数					稀释 倍数	总菌数 个/毫升
	1	2	3	4	5		
第一室							
第二室							

## 实验六 微生物计数法（平板法、血球计数板法）

### 注意事项

加样时先摇匀菌液，计数室中不可有气泡产生；

计数时，格线上的菌体只数上方和右边线上的；

如遇酵母出芽，芽体大小达到母细胞一半时，认作两个菌体；

清洗计数板时切勿用手或硬物刷洗。

## 实验六 微生物计数法（平板法、血球计数板法）

### 以实验五中所做的平板来进行平板法计数

#### 活菌数计算说明

- ① 同一稀释度各重复的菌落数不应相差很大，否则表明实验不准确。实际实验中同一稀释度重复不能少于三个，这样全部数据统计，可减少误差。
- ② 由不同稀释度计算出的菌落形成单位也不应相差太大。
- ③ 有两个稀释度的菌落数均符合计数范围时（即细菌、放线菌、酵母菌每皿30-300个菌落，霉菌每皿10-100个菌落），按两者菌落总数比值决定：若比值小于2，取平均值，若比值大于2，取较少的菌落总数。
- ④ 所有稀释度的菌落数均大于300（或霉菌大于100）时，则应以稀释度最高的平板菌落数计算。
- ⑤ 所有稀释度的菌落数均小于30（或霉菌小于10）时，则应以稀释度最低的平板菌落数计算。

## 实验六 微生物计数法（平板法、血球计数板法）

计算公式

菌数 (CFU/g) = 同一稀释度几次重复的菌落平均数  $\times 10$  (涂布法)  $\times$  稀释倍数

微生物种类	稀释度	各稀释度菌落数		各稀释度平均菌落数	两稀释度菌落数之比	菌落总数 (CFU/g)
细菌						
放线菌						
霉菌						