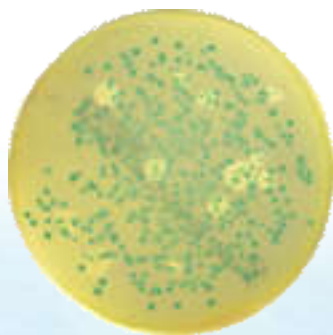




微生物学实验

毛露甜

惠州学院生命科学系

教材

沈萍主编，微生物学实验（第4版），高等教育出版社

参考书

刘荣臻主编，微生物学检验，高等教育出版社

黄秀梨主编，微生物学实验，高等教育出版社

汪福主编，微生物学检测验证技术，中国医药科技出版社

张英主编，食品理化与微生物检测实验，中国轻工业出版社

目录

实验一 实验室环境和人体表面微生物的检查

实验二 油镜的使用和细菌的简单染色

实验三 细菌的革兰氏染色和芽孢染色

实验四 微生物大小的测定和酵母菌死活细胞的鉴定

实验五 培养基的配制与消毒灭菌

实验六 土壤微生物的分离纯化与鉴定

实验七 食品微生物检验

(一)细菌总数测定

实验八 食品微生物检验

(二)大肠菌群数测定

实验九 大肠杆菌生长曲线的测定

实验十 IMViC与硫化氢试验

在微生物学实验室要注意的事项:

1. 注意无菌操作
2. 养成节约的习惯
3. 熟悉常用仪器的使用和维护:
 - ① 高压蒸汽灭菌锅
 - ② 超净工作台
 - ③ 生化培养箱
 - ④ 恒温摇床
 - ⑤ 干燥箱（烘箱）

常用工具

培养皿 (petri dish)



接种环 (inoculating loop)



接种钩 (inoculating hook)



接种针 (inoculating needle)

倾注平皿

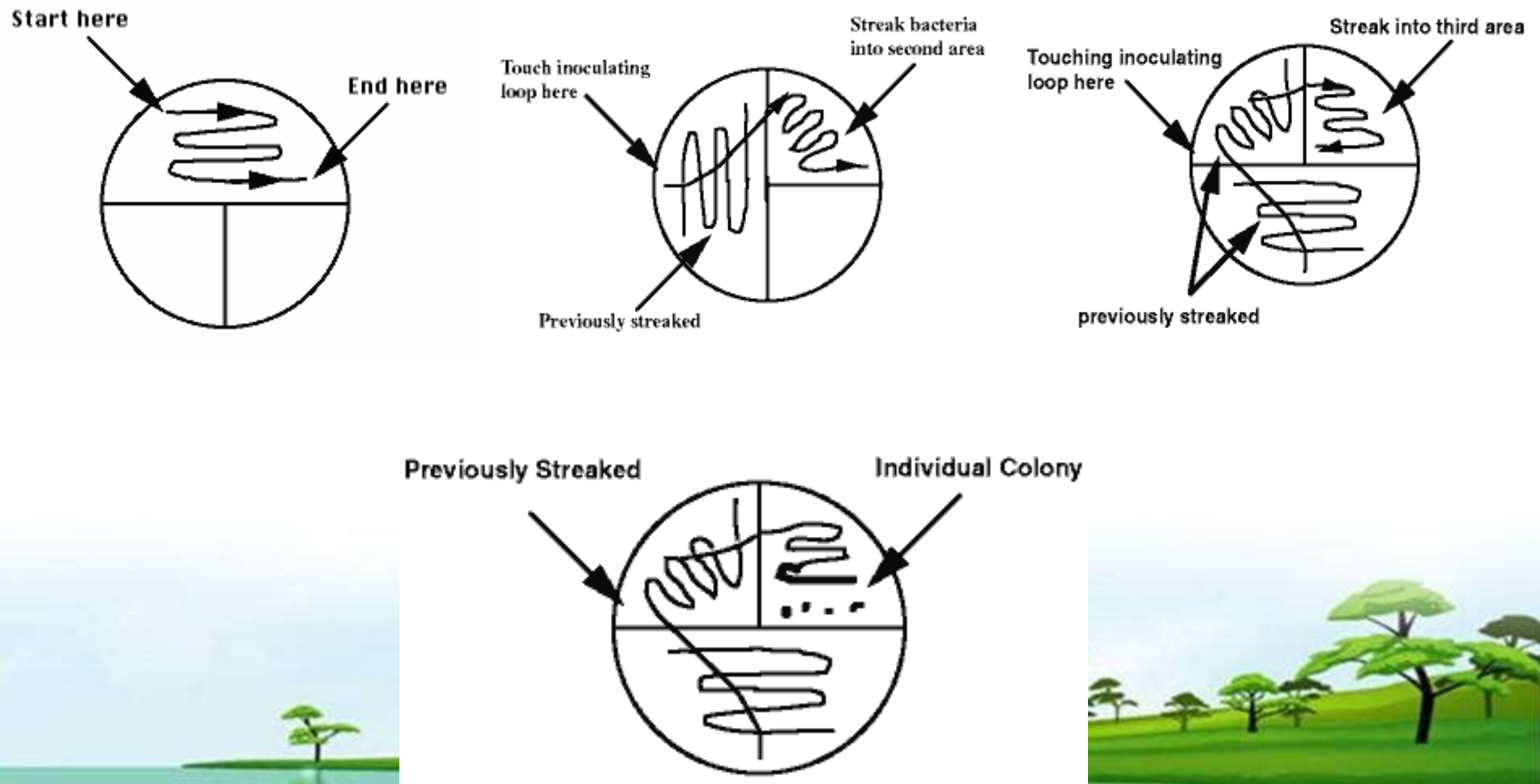
无菌操作
温度控制
水汽问题
陶瓷皿盖

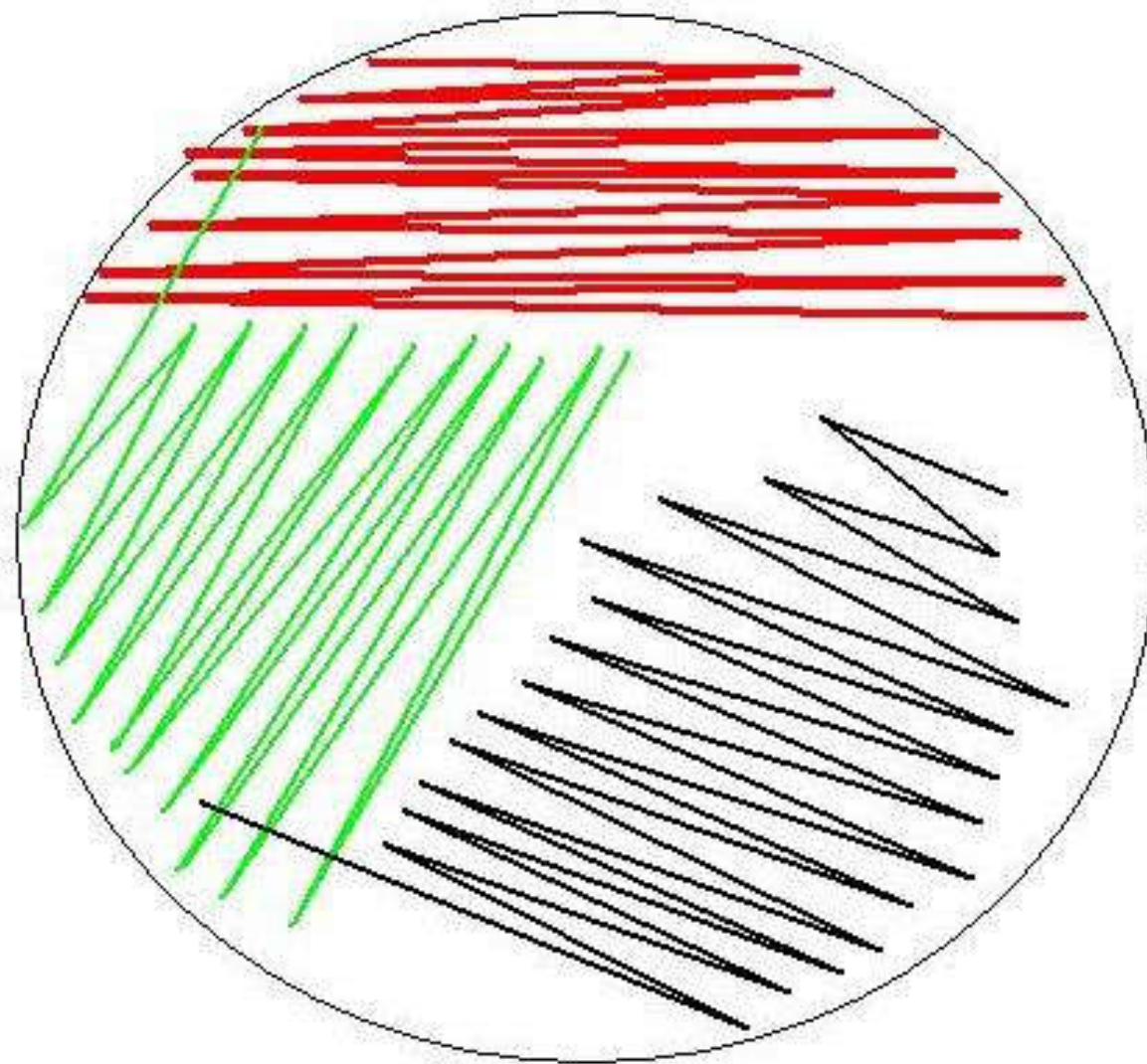


平板划线

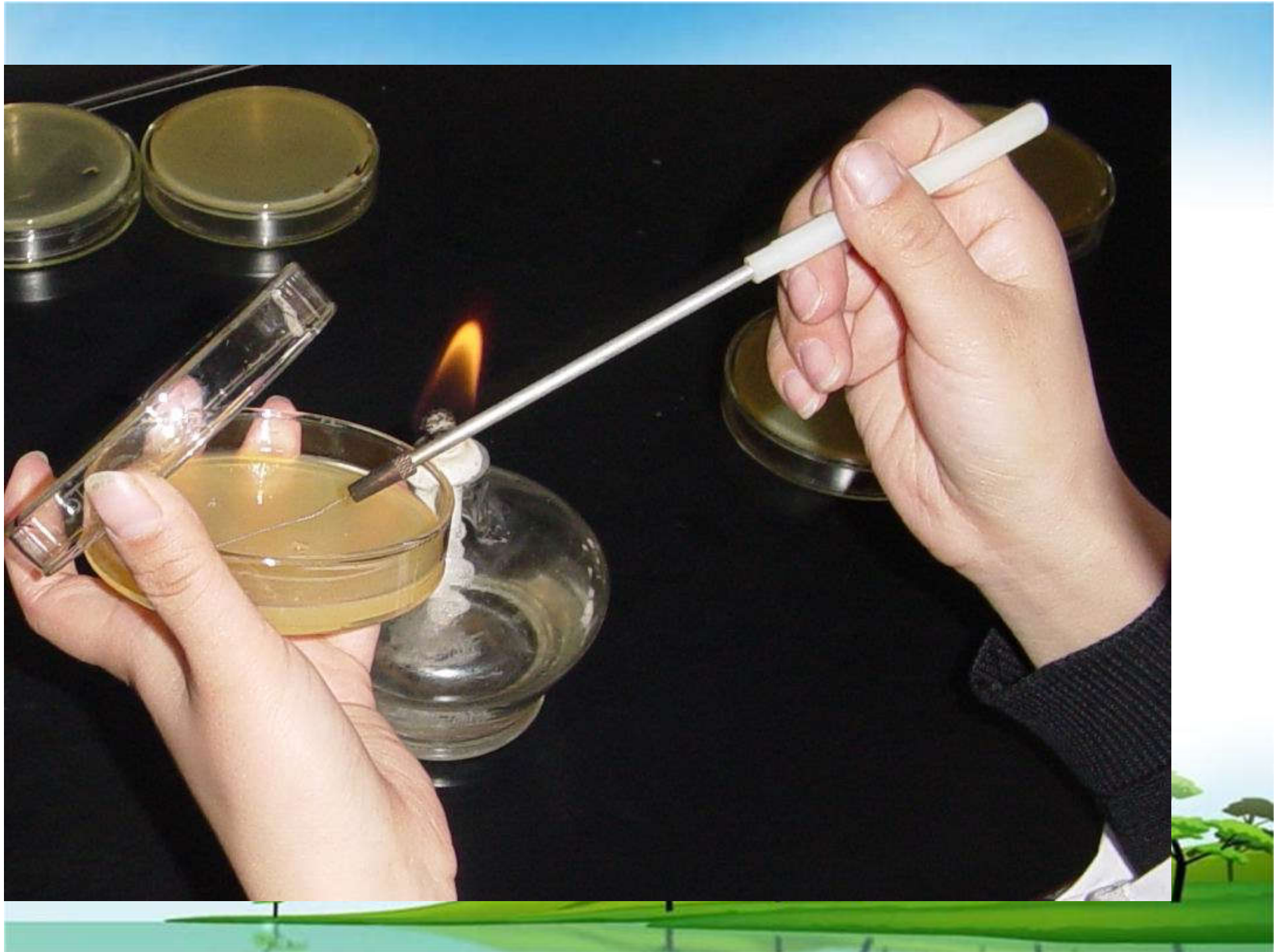
操作演示

分离纯化的过程









平板的制备

培养基倾注平皿时，温度越高，冷凝水越多。

水分蒸发→平皿盖→小水滴→大水滴



培养基吸收 ← 水滴扩散 ← 平板表面

如果平板表面有水滴，细菌可随水流扩散，
弥散生长，形成菌苔。

做细菌培养时，平板为什么要倒置？

①防止冷凝水滴于平板表面，影响单菌落形成。

②防止平板水分丢失。③防止杂菌污染。④…。

实验一、实验室环境和人体表微生物的检查

目的：



比较来自不同场所与不同条件下细菌的数量与类型；

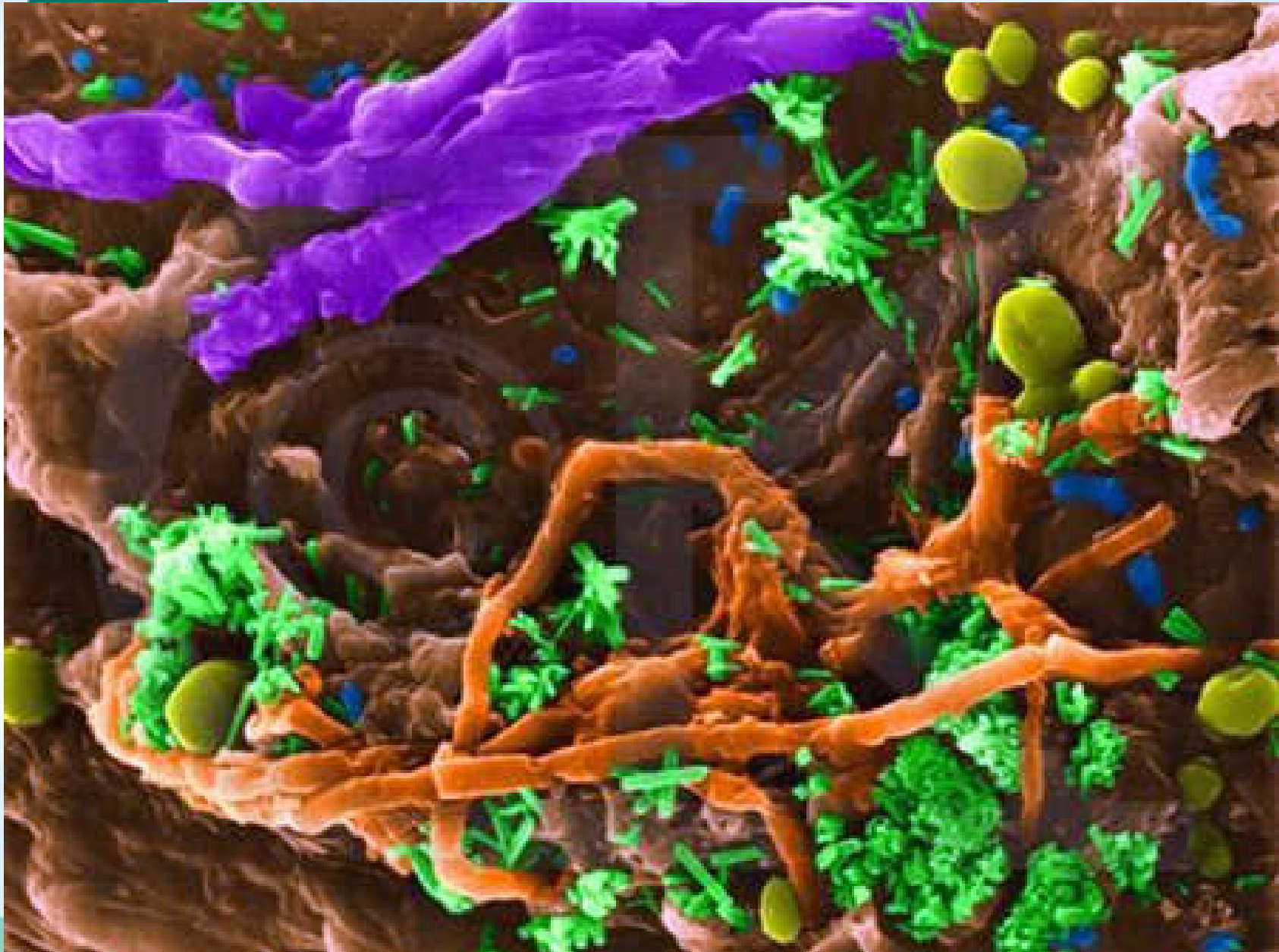


观察不同类型微生物的菌落形态特征；



体会无菌操作的重要性。

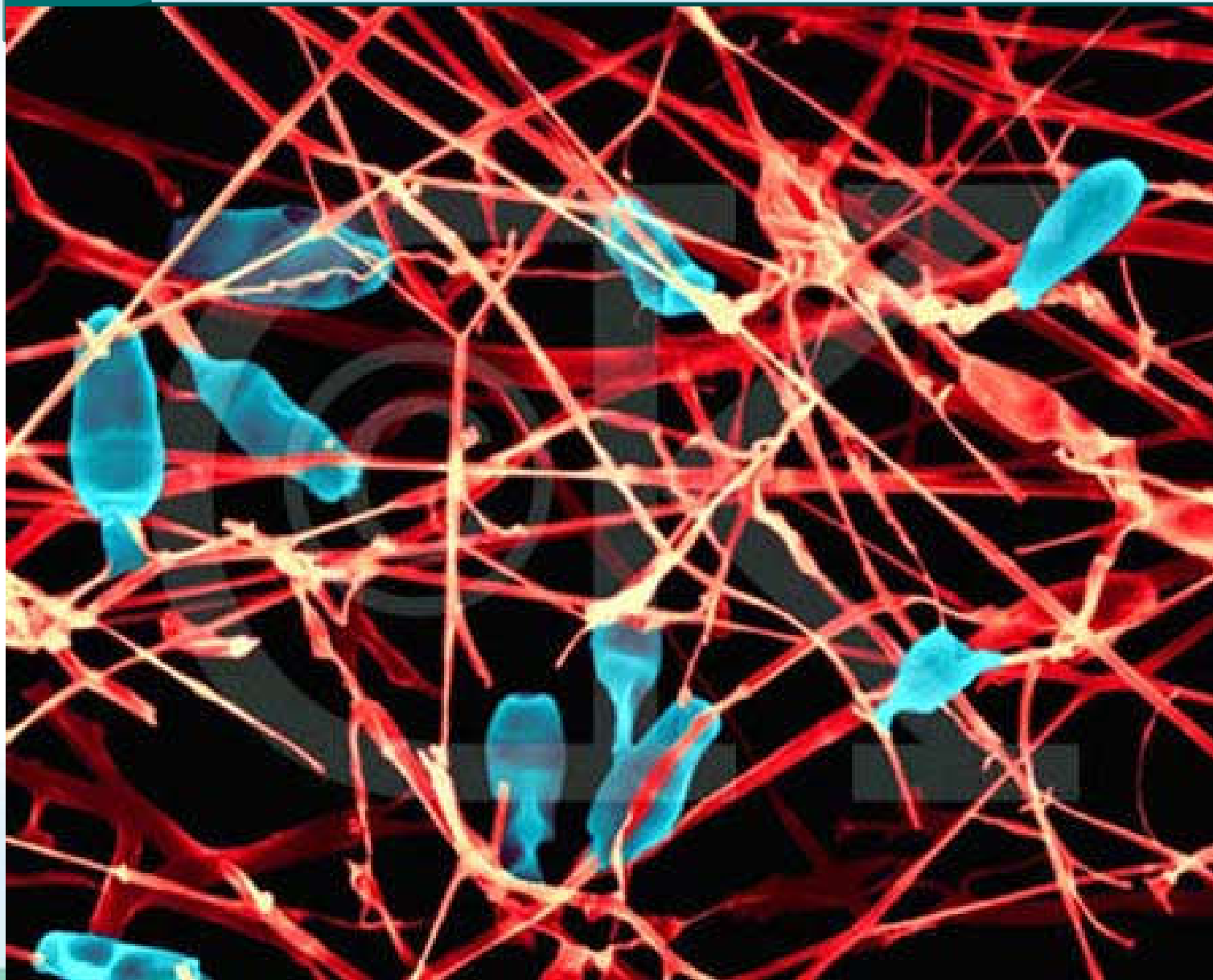
厨房抹布（含有细菌、真菌菌丝和酵母菌）



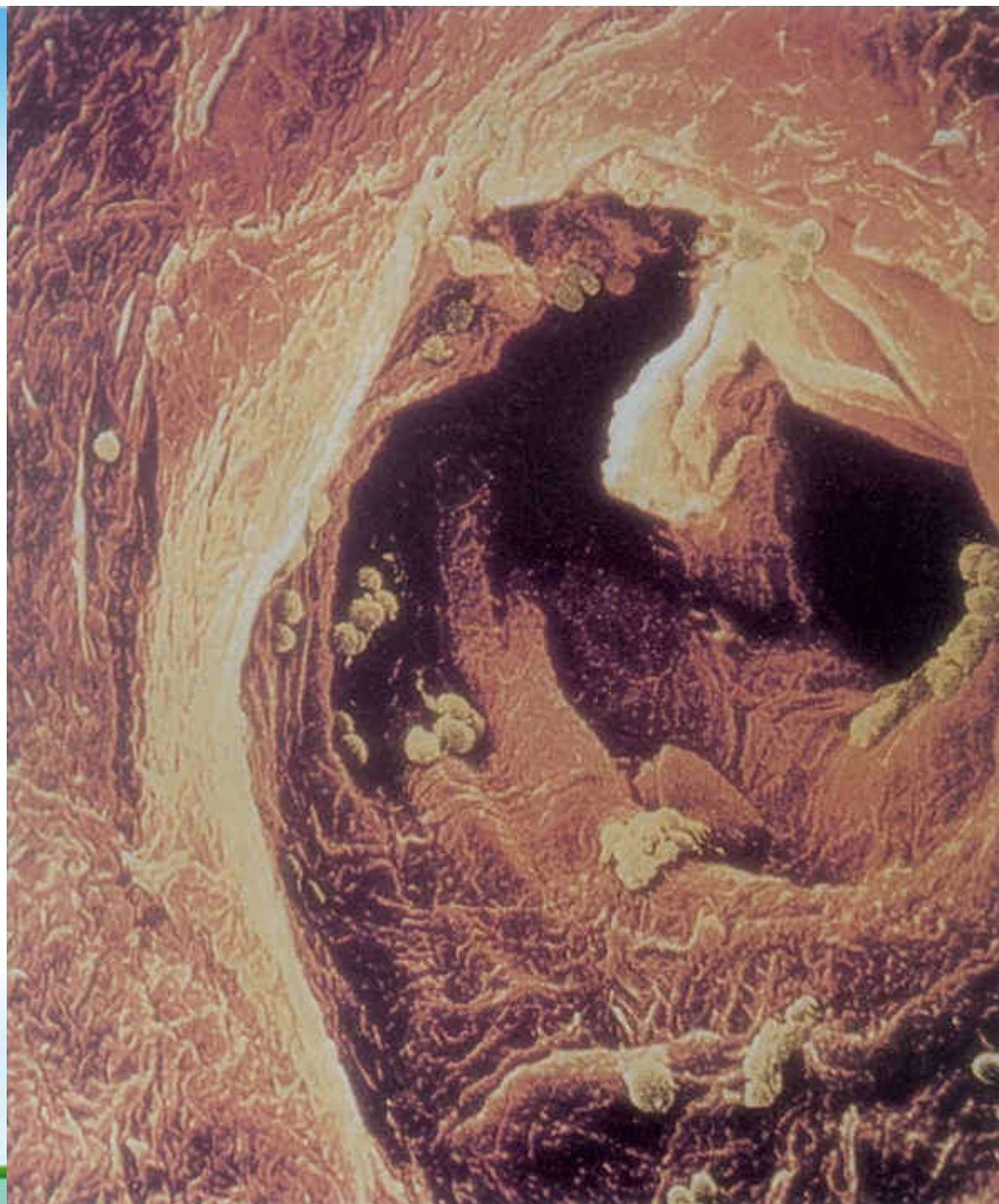
房间里的灰尘，难怪人家说“又脏又乱”



引起脚气的病菌



人的汗毛孔
的显微图像，
可以看到
里面布满了
细菌（一团
团偏绿的东
西）



实验一、实验室环境和人体表微生物的检查

- 器材：



培养基：营养琼脂平板（牛肉膏蛋白胨培养基）

- 器具：无菌水、灭菌棉签、接种环（针）、酒精灯等

实验一、实验室环境和人体表微生物的检查

- 步骤：



标记。组号/姓名、日期、样品来源。



接种。



倒置培养，**37℃ 24 h**



观察结果。

样品来源	菌	菌落 落数 类型	特征描写						
			大小	形态	干湿	扁/隆	透明度	颜色	边缘
本实验室 (流动空气 30 min)		I.							
接种室 (不流动空气 30 min)									
洗手前									
洗手后									
头发屑									
指甲垢									
实验台									
门把									

空气监测和表面样品

空气监测：**3点 5点 9点**

室内面积不超过**30m²**，在对角线上设里、中、外三点，里、外点位置距墙**1m**；室内面积超过**30m²**，设东、西、南、北、中**5点**，周围**4点**距墙**1m**。

采样时，将含营养琼脂的平皿（直径**9cm**）置采样点（约桌面高度），打开平皿盖，使平皿在空气中暴露**5min**。

$$\text{空气细菌菌落总数}(\text{cfu}/\text{m}^3) = \frac{\text{平板上平均细菌菌落数} \times 50\,000}{\text{平板面积}(\text{cm}^2) \times \text{暴露时间}(\text{min})} \dots\dots\dots (\text{D1})$$



菌落形态观察

- 1) **大小**: 以 **mm** 表示。菌落的大小随细菌种类、培养基及培养时间等条件而不同。同一种细菌在同一平板上, **在密集处的菌落比疏散处小**。因此, 表示菌落大小时, 应注明培养基名称。一般以培养 **18~24** 小时后, **选散在处的菌落大小**。 **1mm** 左右为小菌落; **2~3mm** 为中等大; **3mm** 以上为大菌落。
- 2) **形状及边缘**: 圆形、不规则、放射状、树根状、边缘整齐、波形、锯齿状、卷发状等。
- 3) **隆起**: 平的、突起的、凸面的、凸形的等。
- 4) **表面**: 光滑 (**S**型)、粗糙 (**R**型); 有无光泽等。

5) **构造**: 均匀、露滴状、颗粒状、发状、皱招状等。

6) **颜色**: 无色、白色、灰色、灰白色或乳白色、荧光绿、金黄色、柠檬色、红色等、

7) **透明度**: 透明、半透明、不透明、微透明等。

8) **硬度**: 硬、软、干燥、湿润，是否附着于培养基上或嵌入培养基内不易刮取。

9) **质地**: 脂状、粘液状、膜状等。

10) **乳化性**: 在盐水中研磨是否形成均匀乳剂或颗粒状。

11) **溶血性**: 在血平板上，菌落周围有无溶血环。



平板菌落观察

大小

形状

色泽

边缘

透明度

湿润度

溶血性



大肠杆菌在普通营养琼脂上生长表现**3**种菌落形态：

（1）光滑型：菌落边缘整齐，表面有光泽、湿润、光滑、呈灰色，在生理盐水中容易分散。

（2）粗糙型：菌落扁平、干涩、边缘不整齐，易在生理盐水中自凝。

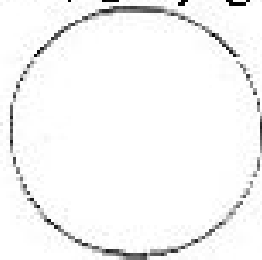
（3）粘液型：常为含有荚膜的菌株。



菌落形态学
Bacterial Colony Morphology

COLONIAL MORPHOLOGY

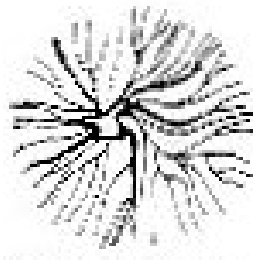
SHAPE OF COLONY



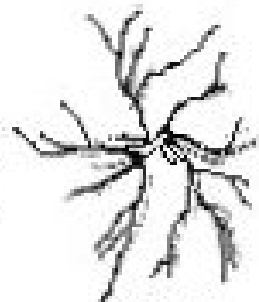
round



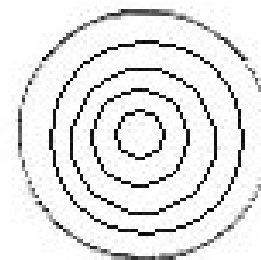
irregular



filamentous



rhizoid



curled

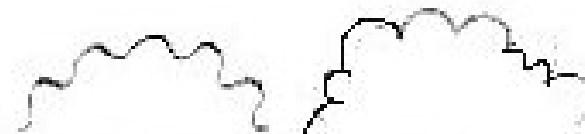
EDGE



entire



filamentous



undulate

lobate
irregular

ELEVATION



raised



flat



convex



umbonate



growth into
medium



丝状

- 有荚膜的细菌菌落较大并且表面光滑，而没有荚膜的则表面较粗糙；



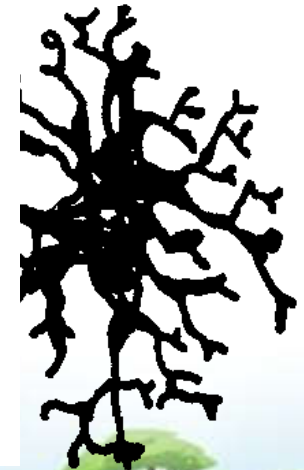
伏

- 具有芽孢的细菌菌落表面常有褶皱并且不透明。



圆形

- 没有鞭毛不运动的细菌，特别是球菌，常形成较小、较厚、边缘较整齐的菌落，



- 有鞭毛的细菌则较大而扁平，边缘波状、锯齿状等；

假根状

实验一、实验室环境和人体表微生物的检查

- 思考题：



人多的实验室与少人走动的实验室比较，平板上的菌落数和菌落类型有区别吗？试解释。



通过本实验，在防止培养物污染和防止细菌的扩散方面，你有何体会？

实验二 油镜的使用和细菌的简单染色

目的

-  1、学习和掌握油镜的原理和使用技术。
-  2、学习微生物涂片、染色的基本技术，掌握细菌的简单染色法。

实验二 油镜的使用和细菌的简单染色

- 原理：（细菌单染法）
- 在中性、碱性或弱酸性溶液中细菌细胞常带负电荷，而碱性染料在电离时其分子的染色部分带正电荷，很容易与细菌结合使细菌着色。常用的单染染料：美蓝、结晶紫、碱性复红。
- 如果细菌分解糖类产酸，pH降低，细菌带正电荷，则可与伊红、酸性复红或刚果红等酸性染料染色。

实验二 油镜的使用和细菌的简单染色

仪器、材料

菌种：枯草杆菌或苏云金芽孢杆菌（注意培养时间、温度的要求，避免出芽孢）

染料：草酸铵结晶紫、石炭酸复红、美蓝、番红

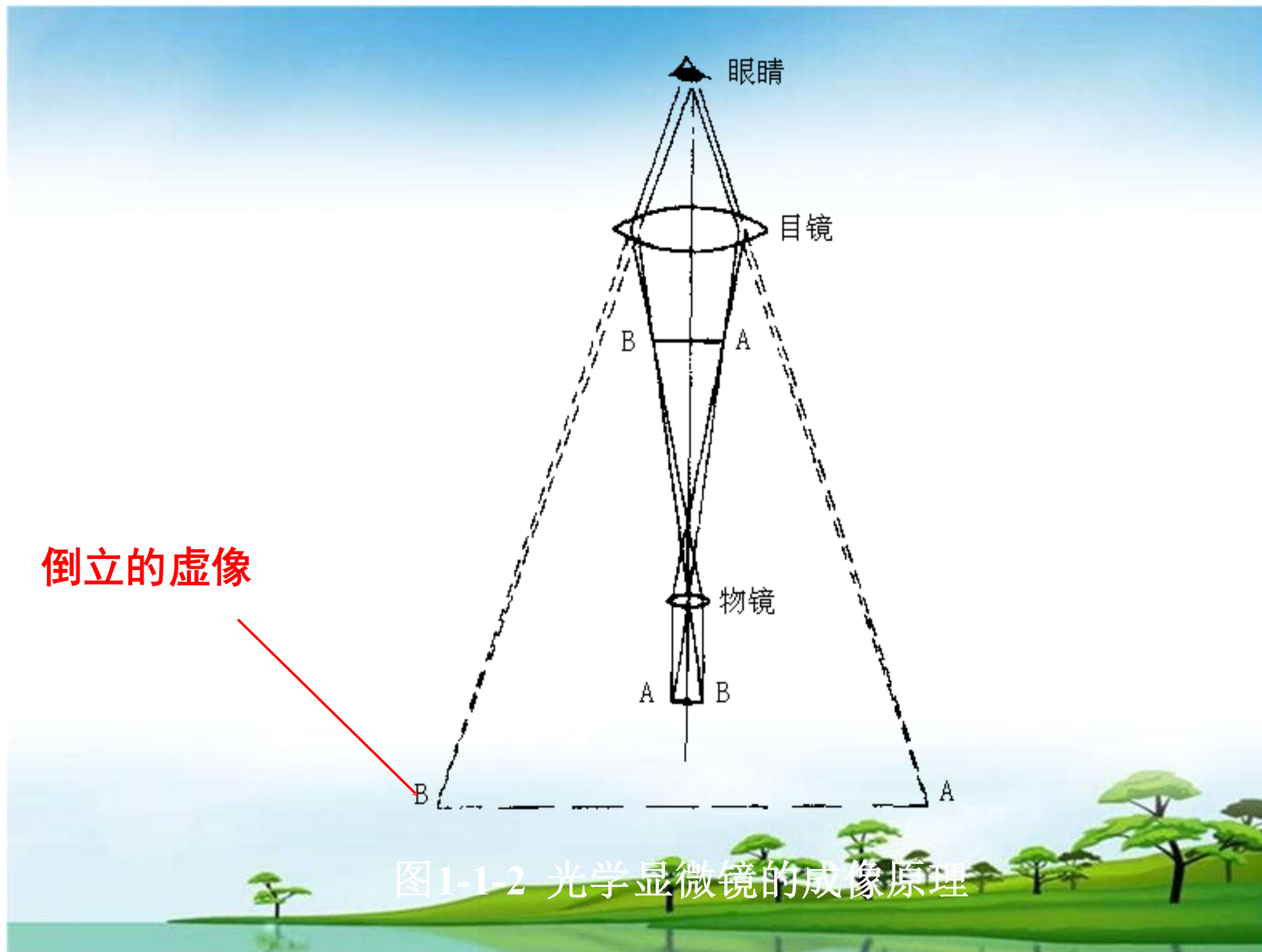
显微镜的使用

1、显微镜的基本结构和原理



倒立的虚像

图1-1-2 光学显微镜的成像原理



- 显微镜的放大倍数和分辨率

1. 放大倍数：物镜放大倍数×目镜放大倍数

2. 显微镜的分辨率：是表示显微镜辨析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 $0.55\mu\text{m}$ ）

n：物镜和被检标本间介质的折射率。

α ：镜口角（即入射角）。

D值越小，分辨率越高，看到的物象越清晰

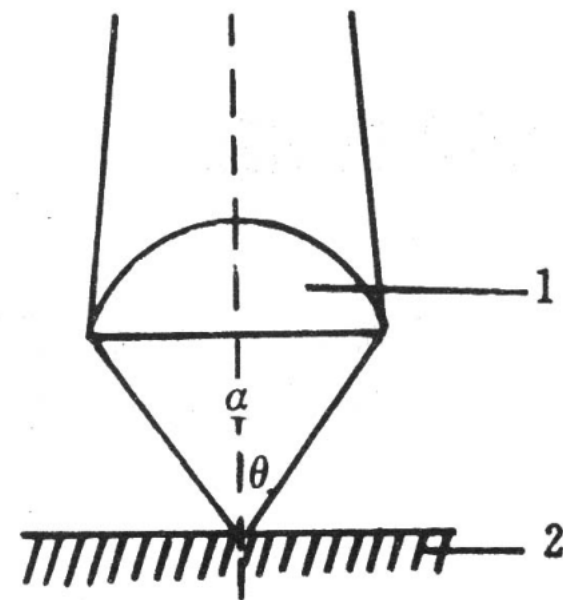


图 1—2 物镜的光线入射角

- 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。

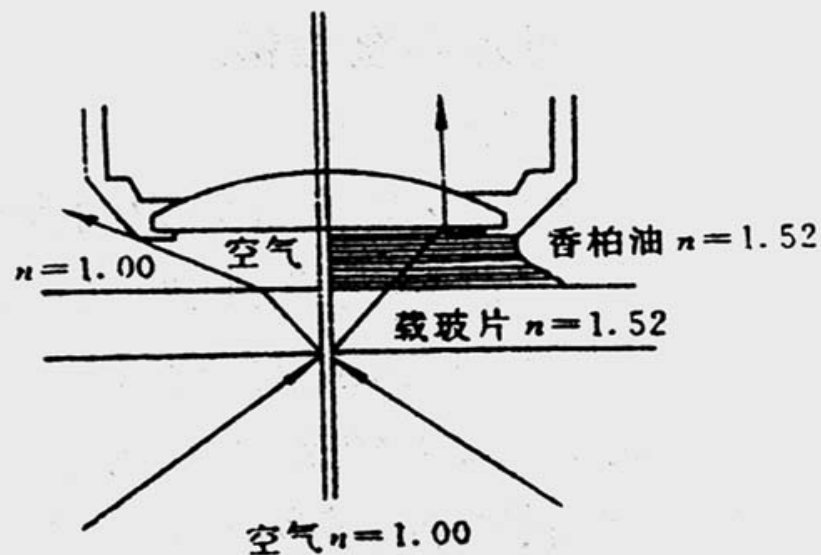


图 1—3 干燥物镜与油浸系统
镜光线通路

◆ 根据公式 $D = \lambda / 2n \cdot \sin(\alpha / 2)$ ，增大分母，使得D值减小，分辨率增大。

显微镜的使用步骤1

- 一手托住镜座
- 一手握住镜臂



显微镜的使用步骤2

- 物镜调至最低倍



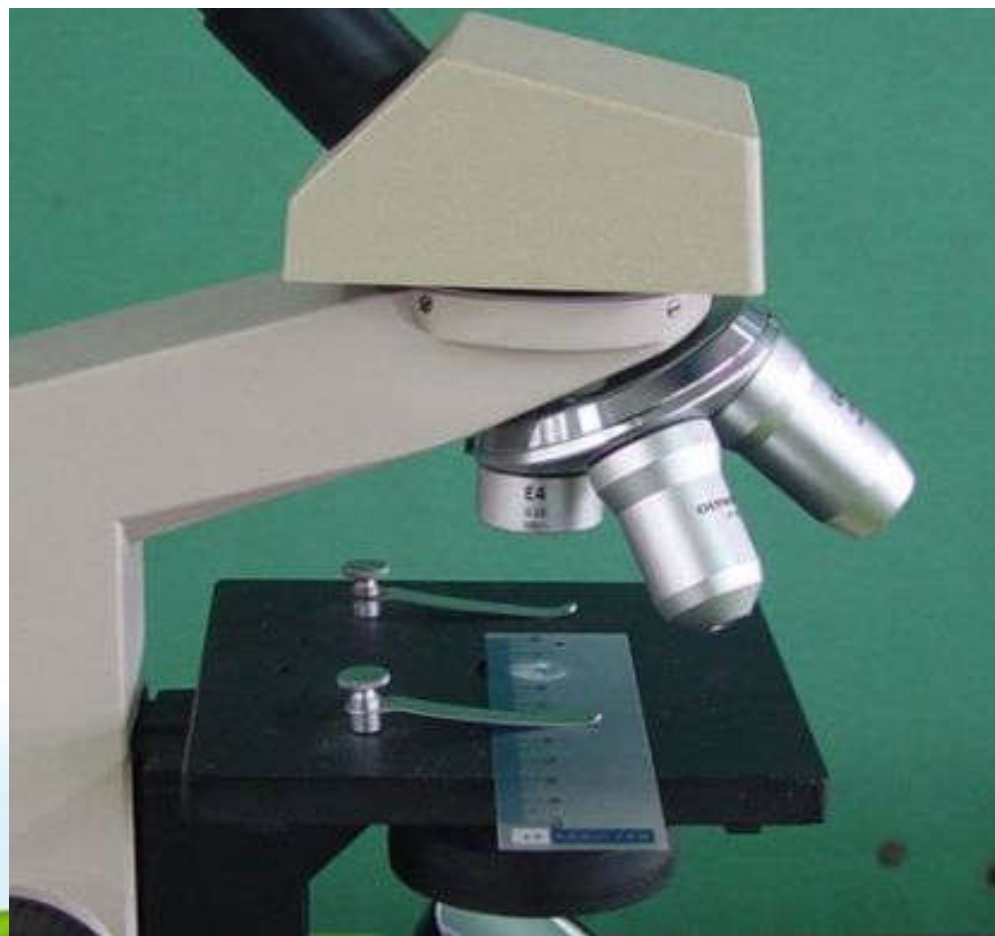
显微镜的使用步骤3

- 左眼对准目镜右眼看桌面
- 调整光圈



显微镜的使用步骤4

- 标本放在载物台上并用玻片夹固定

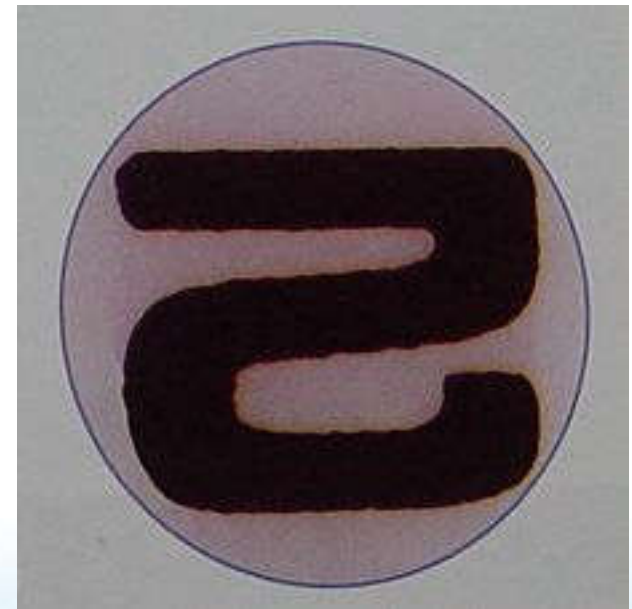
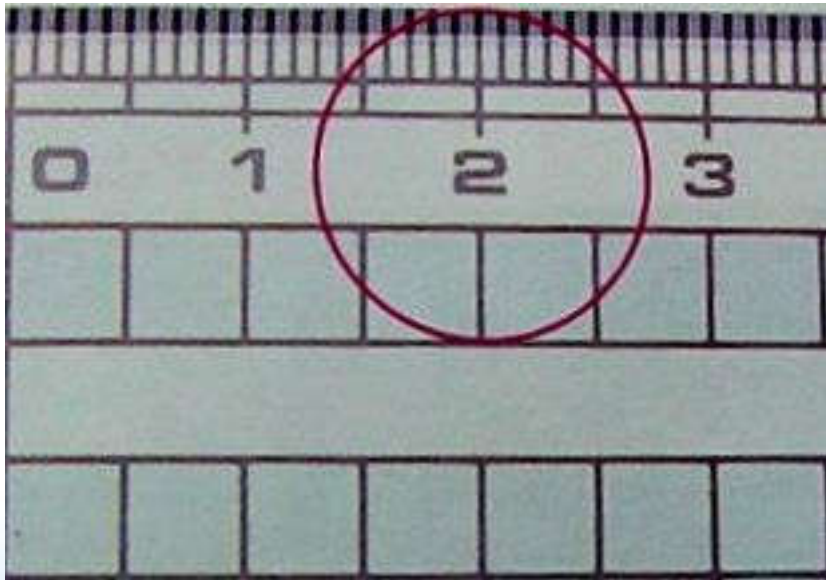


显微镜的使用步骤5

- 向外转动粗准焦螺旋使载物台下降至看到清晰的影像
- 转动细准焦螺旋使标本影像非常清晰



显微镜下的影像： 上下颠倒、左右相反



显微镜的放大倍数

- 目镜： **10x**、**16x**
- 物镜： **10x** 、 **40x** 、 **100x**
- 放大倍数：

目镜的倍数**x**物镜的倍数



显微镜保养和使用中的注意事项

1. 不准擅自拆卸或更换显微镜的镜头等部件, 以免损坏或不匹配。
2. 镜头只能用擦镜纸擦, 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. 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。
5. 油镜使用结束后, 物镜用擦镜纸擦三遍: 第一遍擦去多余的香柏油; 第二遍擦镜纸蘸上二甲苯再擦镜头; 第三遍再用干净的擦镜纸擦去多余的二甲苯。
6. 显微镜应存放在阴凉用擦镜纸擦干燥处, 以免镜片滋生霉菌而腐蚀镜片。

油镜用后的处理：

第一遍：用擦镜纸拭去镜头上的油；

第二遍：用擦镜纸蘸少许二甲苯（香柏油溶于二甲苯）擦去头上残留的油迹；

第三遍：再用干净的擦镜纸擦去残留的二甲苯。



本实验室使用显微镜的有关规定

- 本实验室按学号使用固定编号的显微镜，每次用完要登记！！
- 显微镜的保养由对应学号的同学负责。
- 实验过程中显微镜如果因操作不当而损坏的，由对应学号的同学承担责任。
- 一般的问题可由老师调试或更换。



显微镜的使用步骤8

- 收镜，套上塑胶套放到**104**的柜子里，一定要对号放，且要严关柜门以免受潮！
！
- 将玻片放到煮锅内统一煮沸后清洗。



实验二 油镜的使用和细菌的简单染色

步骤

(一) 油镜的使用方法。

- 1、先用低倍镜和高倍镜找到最适宜的观察目标。
- 2、滴加镜油。
- 3、从侧面注视，将镜筒慢慢下降，使油镜头浸在镜油中，直至油圈不再扩大为止；
- 4、从目镜观察，上升镜筒调焦直至视野出现清晰物像。
- 5、观察完毕，须将镜筒上升，取下玻片；
- 6、将镜头上的油用擦镜纸擦去，再用擦镜纸沾少许二甲苯擦去残留的香柏油，最后用干净的擦镜纸擦干残留的二甲苯。
- 7、收镜。

实验二 油镜的使用和细菌的简单染色

(二) 细菌的简单染色

- 涂片
- ↓
- 干燥（风干、可用点吹风的冷风）
- ↓
- 固定（热固定）
- ↓
- 染色
- ↓
- 水洗（不宜直接水冲菌涂面）
- ↓
- 干燥（风干、自然干、吸干）
- ↓
- 镜检

五、实验结果

绘出油镜下观察到的枯草芽孢杆菌的形态图



图 7-27 枯草芽孢杆菌纯培养的镜下形态（革兰染色）

实验二 油镜的使用和细菌的简单染色

思考题：

 用油镜观察时应注意哪些问题？用何镜油？起什么作用？

 物镜的**同焦现象**在显微镜观察中有何意义？

 涂片未经热固定会出现什么问题？若温度过高时间过长情况又怎么样？

实验三 革兰氏染色和芽孢染色

目的

-  1、初步掌握革兰氏染色法和芽孢染色法。
-  2、了解革兰氏染色法在细菌分类鉴定中的重要性。
-  3、巩固微生物无菌操作、涂片和染色的基本技术。

实验三 革兰氏染色和芽孢染色

仪器、材料

■ 镜油

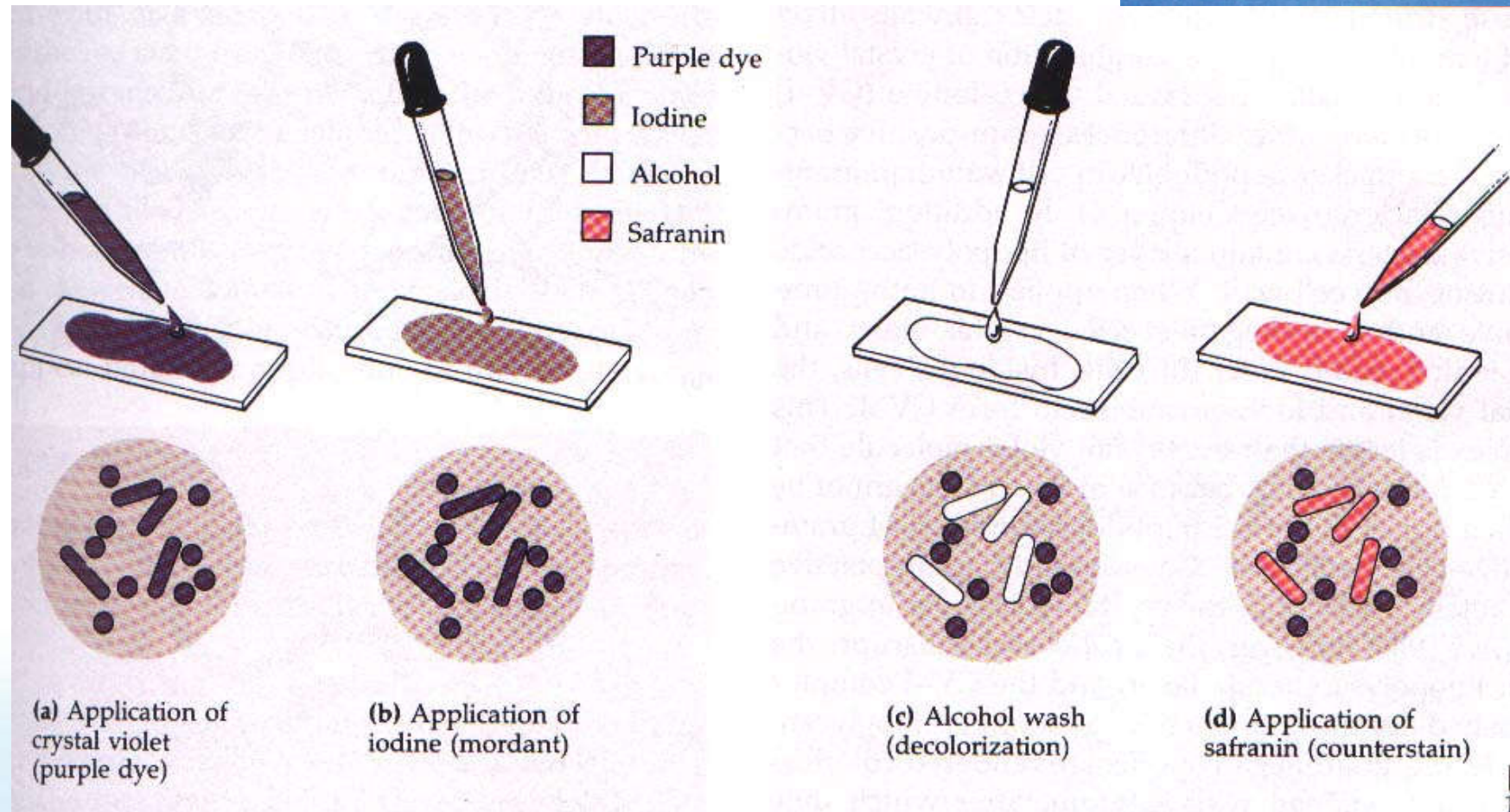
■ 菌种：大肠杆菌、苏云金杆菌、葡萄球菌、枯草杆菌等。

■ 染料：革兰氏染色液：结晶紫、碘液、**95%**乙醇、番红

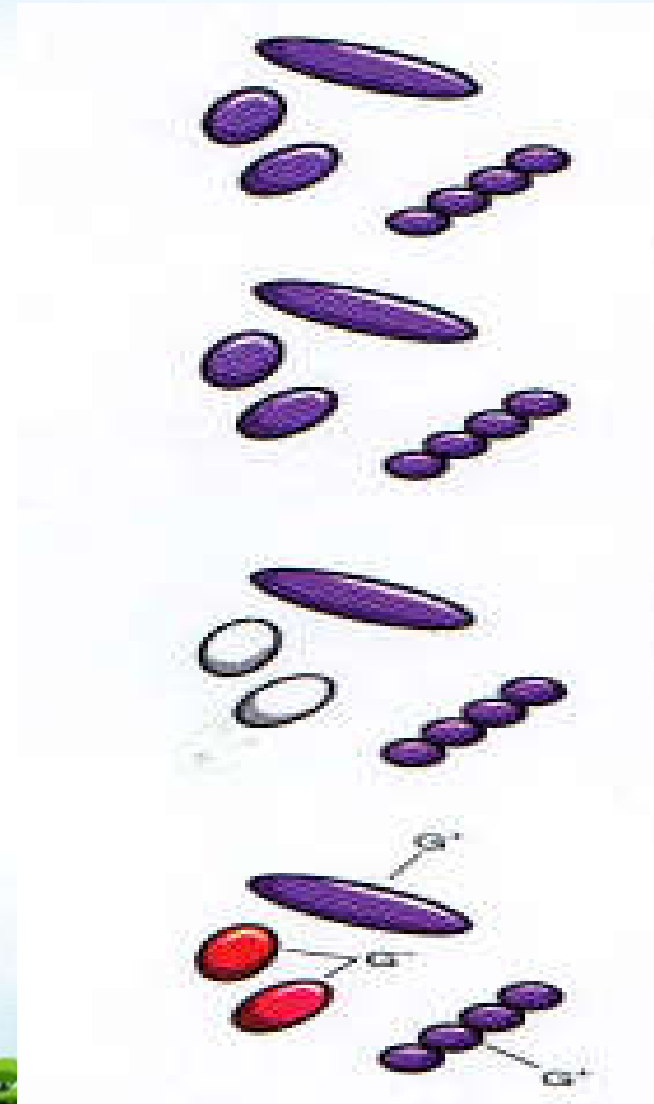
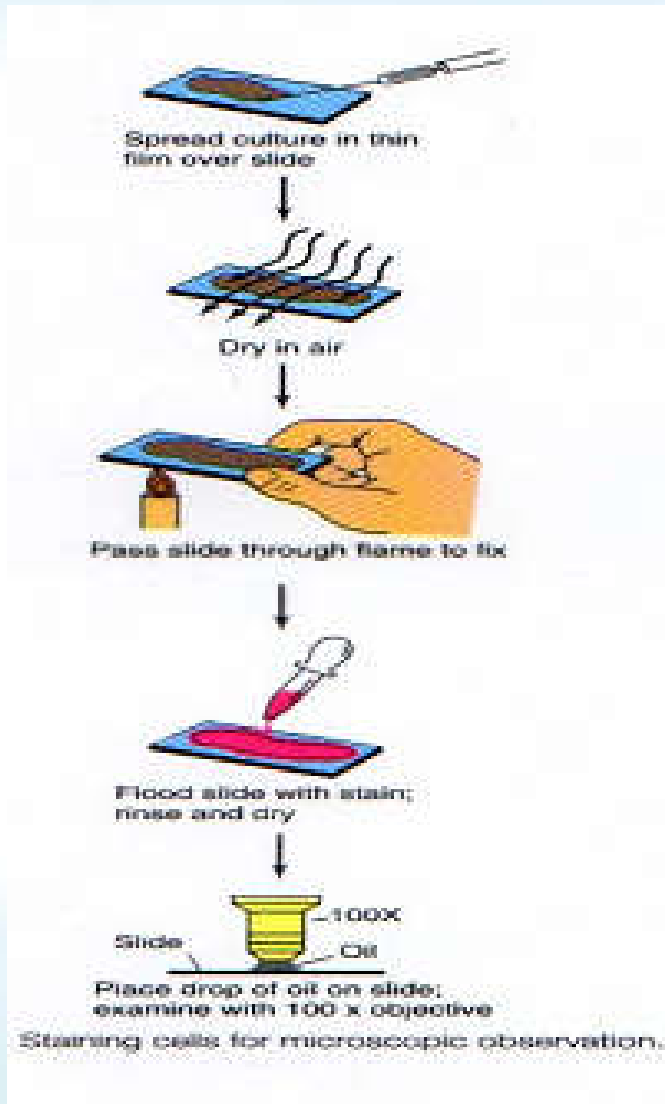
■ 芽孢染液：**7.6%**孔雀绿

■ 废报纸垫台

Procedures of Gram Staining



Gram positive or Gram negative?



实验三 革兰氏染色和芽孢染色

步骤

(一) 细菌的革兰氏染色法:

①草酸铵结晶紫**1—2**滴，初染**1**分钟、水洗。

②路哥氏碘液**1—2**滴、媒染**1**分钟，水洗。

③**95%**酒精脱色，约半分钟，水洗。

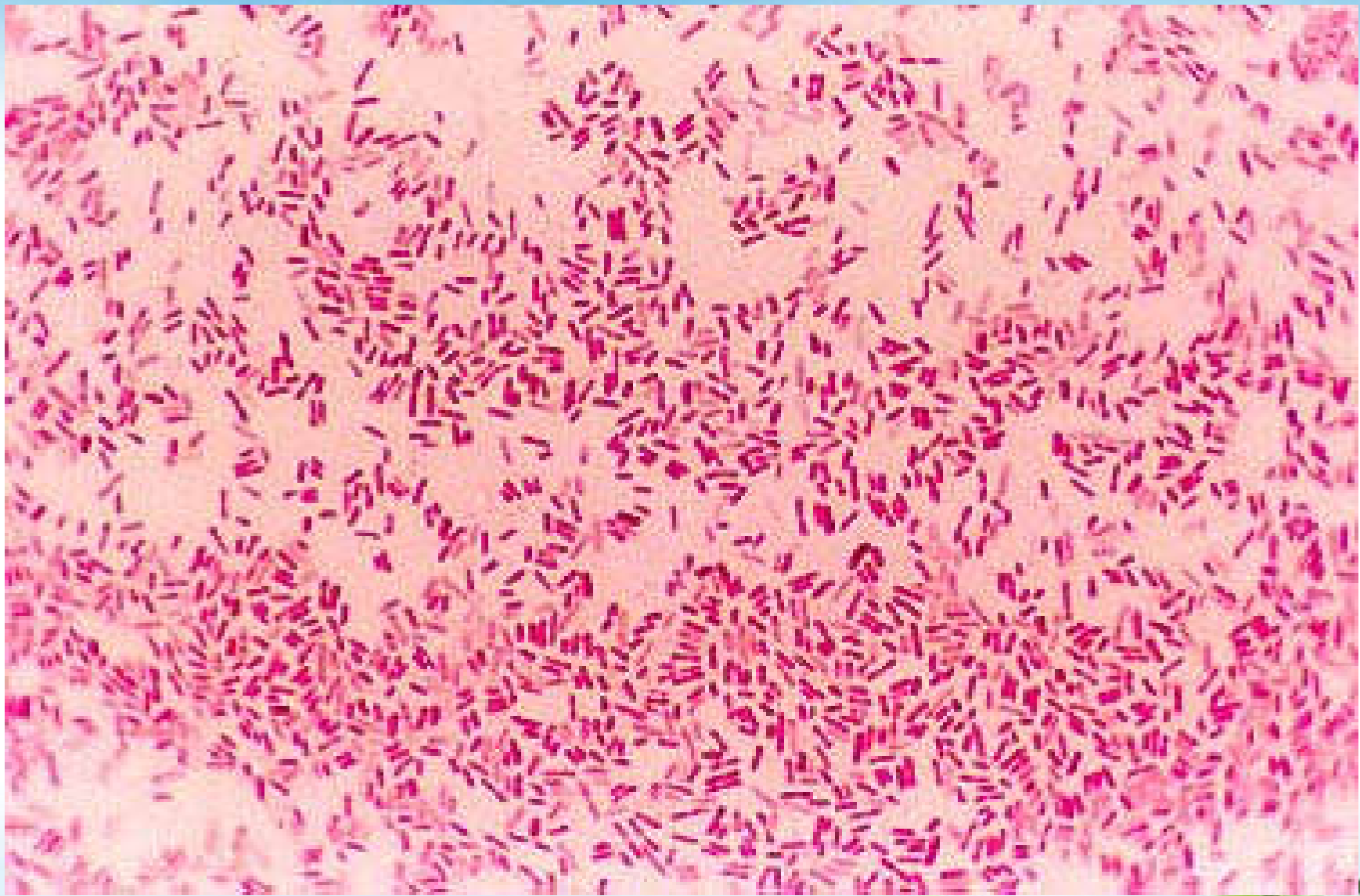
④番红染色液**1—2**滴，复染**1**分钟，水洗。

干燥后镜检。

实验三 革兰氏染色和芽孢染色

(二) 细菌的芽孢染色:

- 制片（涂片、干燥、热固定）
↓
- 染色（**7.6%**孔雀绿水溶液、加热至冒烟但不沸腾）
↓
- 番红复染
↓
- 镜检（油镜下芽孢绿色，菌体红色。）



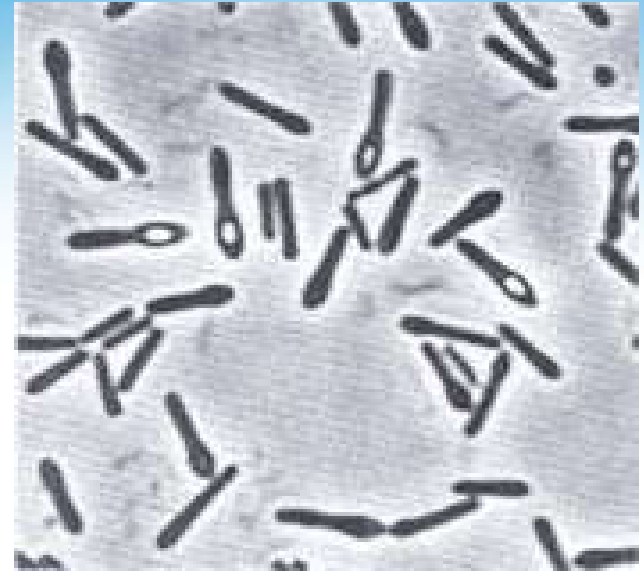
大肠杆菌的**Gram**染色（油镜下）**G-**

微生物学实验

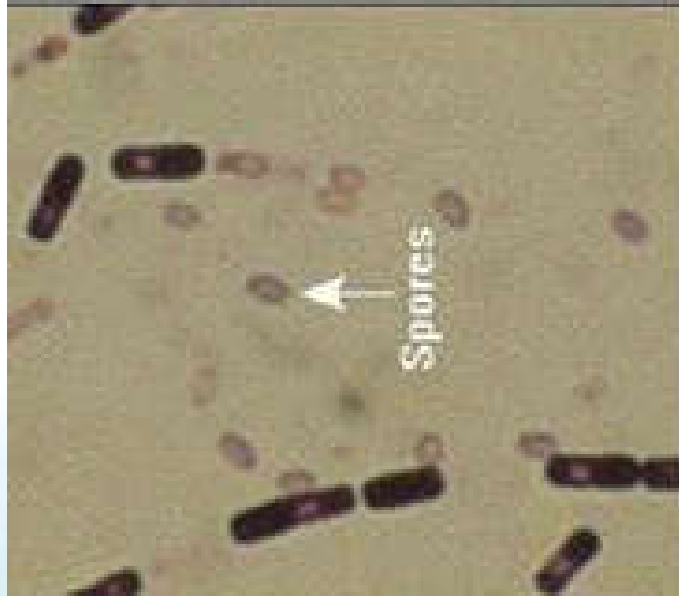
授课：毛露甜



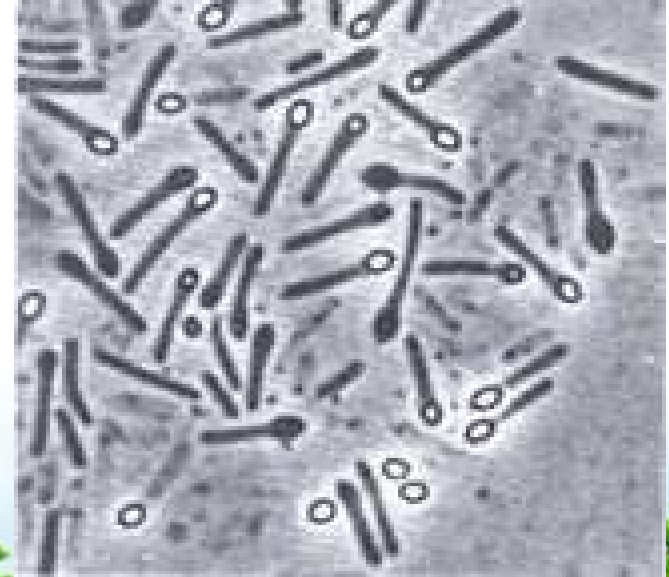
中央芽孢



偏端芽孢



游离芽孢



末端芽孢

实验三 革兰氏染色和芽孢染色

思考题：

- ① 革兰氏染色影响其成败的关键一步是哪一步？
- ② 为什么芽孢染色要加热？为什么芽孢及其营养体能染成不同颜色？

实验四 微生物大小的测定和酵母菌死活细胞鉴定

目的

-  1、学习并掌握用测微尺测定微生物大小的方法。
-  2、学习区分酵母的死活细胞的方法。

实验四 微生物大小的测定和酵母菌死活细胞鉴定

材料

 高活性干酵母（安琪牌）

 仪器：

目镜测微尺（目尺，定位用）

镜台测微尺（台尺，校准用）

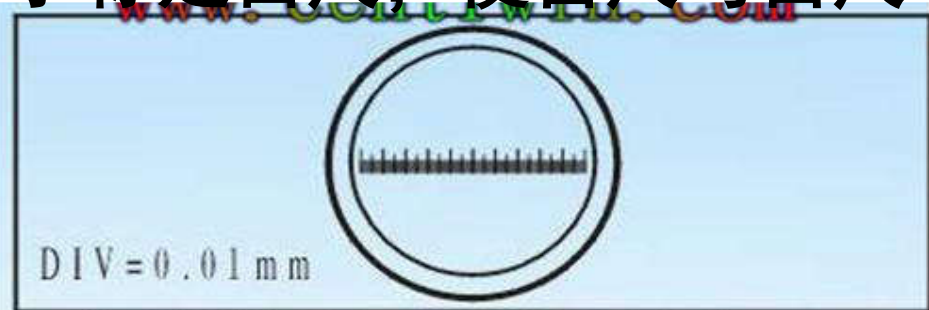


二、实验原理：

1 测微尺的使用

包括目镜测微尺和镜台测微尺。

- **镜台测微尺**是中央部分刻有精确等分线的载片。一般每格 $10\ \mu\text{m}$ 。台尺不直接测大小，只用于校正目尺每格的相对长度。（用于标定目尺，使台尺与目尺重合）

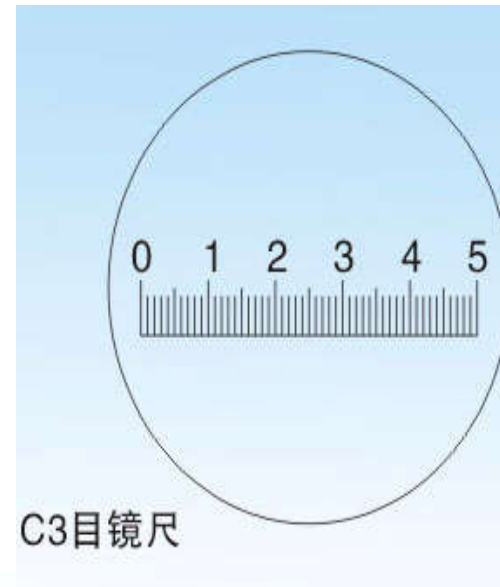
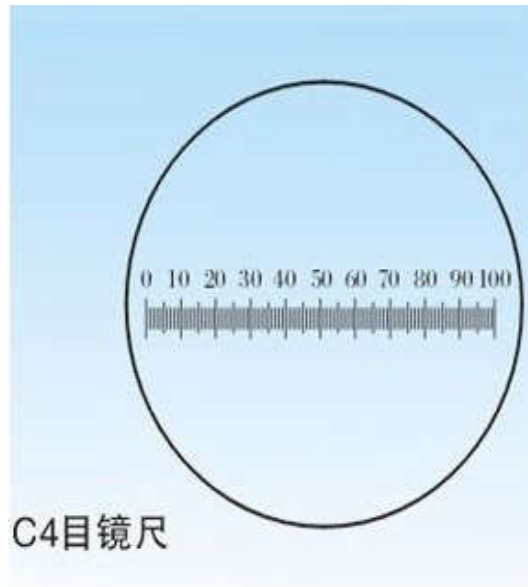


C1台式测微尺

刻线放大图



- **目镜测微尺**（目尺）是一块可放入接目镜内的圆形小玻璃片，其中央有精确的等分刻度。不同透镜组合放大倍数不同，目尺每小格代表的实际长度也不一样。



计算： $n_{\text{目尺}} \times \text{每小格目尺所代表的长度} = n_{\text{台尺}} \times 10 \mu\text{m}$

2. 酵母菌死活细胞的鉴定

- 酵母菌的形态多为圆形，少数为椭圆型及不规则型，本实验面包酵母近圆形。
- 美蓝作为无毒性染料，其氧化型呈蓝色，还原型呈无色。活的酵母细胞具有新陈代谢活性，能使美蓝由氧化型（蓝）变为还原型（无色），染约3 min，死的酵母或衰老的细胞代谢能力弱，菌体呈蓝色或浅蓝色。据此区分死活酵母。

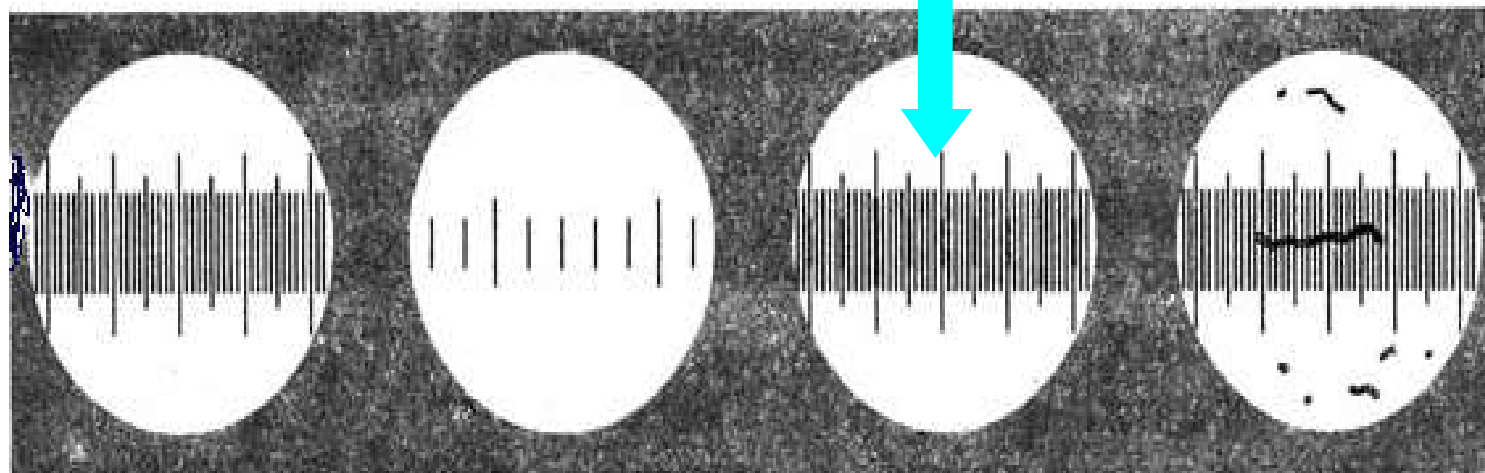
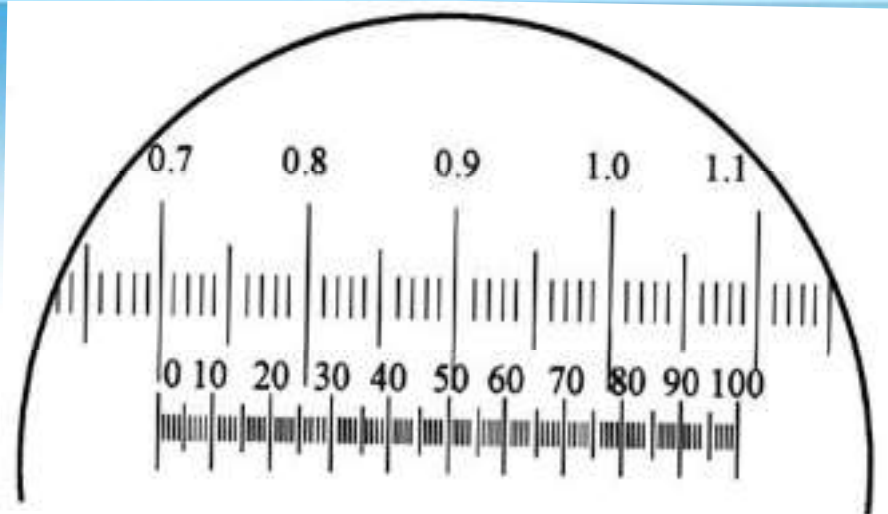


四、实验步骤

1. 安装目尺，校正目尺。

放台尺→调焦→低倍镜下，使目尺与台尺零点对齐，并在某一刻度上完全重合（准焦）→低倍、高倍、油镜下分别计算目尺每格所代表的长度。





目镜测微尺

镜台测微尺

利用目镜测微尺测定镜
台测微尺的每格绝对值

镜台测微尺
测定微生物大小

A

B

C

D

图 目镜测微尺(A)、镜台测微尺(B)及其校正(C)与测量(D)

2. 制作酵母菌的美蓝水浸片

在载片上加一滴美蓝染液，吸取酵母菌悬液一滴与之混匀。用镊子取盖片先一侧接触液滴再斜斜放下，以避免产生气泡。

3. 菌体大小测定

校正完毕，移走台尺，换上制好的面包酵母的水浸片，先低倍后高倍。面包酵母几乎圆形，测其直径占目尺多少格，将格数乘上目尺每格代表的长度，即为面包酵母的实际大小

4. 计算菌体大小

将目尺取出放入盒内保存



五 实验结果

1 目尺校正结果

接物镜	放大倍数	目尺格数	台尺格数	目尺每格代表的长度 (μm)
低倍镜				
高倍镜				

2 面包酵母的大小: $\phi = ? \mu\text{m}$

六 注意事项：

1. 使用镜台测微尺进行校正时，若一时无法直接找到测微尺，可先对刻尺外的圆圈线进行准焦后再通过移动标本推进器进行寻找。
2. 细菌的个体微小，在进行细胞大小测定时一般应选用油镜，以减小误差。
3. 进行显微镜计数时应先在低倍镜下寻找大方格的位置，找到计数室后将其移至视野中央，再换高倍镜观察和计数。
4. 酵母菌计数加样品前，一定将菌液摇匀。



实验四 微生物大小的测定和酵母菌死活细胞鉴定

思考题

- ① 更换不同放大倍数的目镜和物镜时，为什么必须用台尺重新校正目尺？
- ② 目镜和目尺不变，改用不同放大倍数的物镜来测同一细菌时，其测定结果是否相同？为什么？

实验五 培养基的配制与消毒灭菌

目的

- ① 学习并掌握配制培养基的一般方法和步骤。
- ② 学习并掌握高压灭菌锅的使用。

二、实验原理

高压蒸汽灭菌是利用高压使得水的沸点增高，得到高于 100°C 的高温，以及热蒸汽的穿透能力，导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。



三、实验仪器

- 天平：扭力托盘天平、电子天平
- 高压蒸气灭菌锅：台式、手提式



四、操作步骤

（一）培养基的配制

称药品——搅拌加热使溶化——调
pH——过滤——分装——加塞——包
扎——灭菌——摆斜面——无菌检查。



1. 无氮培养基的制备

土壤微生物的分离纯化培养用，用来培养固氮菌

- ❖ 葡萄糖 10 g
- ❖ KH_2PO_4 0.2 g
- ❖ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g
- ❖ NaCl 0.2 g
- ❖ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g
- ❖ CaCO_3 5 g
- ❖ 琼脂 15~20g
- ❖ 蒸馏水 1000 mL
- ❖ 调pH 7.0~7.2，分装（不能太满，不超过2/3体积）。

2. LB培养基的制备

大肠杆菌生长曲线测定用

- ❖ 蛋白胨 10 g
- ❖ 酵母膏 5 g
- ❖ NaCl 10 g
- ❖ 蒸馏水 1000 mL
- ❖ 调pH 7.0，每支试管准确分装5 ml。

3. 营养琼脂平板（细菌总数测定）：按说明配制。

4. 乳糖胆盐发酵培养基（大肠菌群的测定用）：先放小倒管。据说明配制双料管和单料管。按说明配制，试管准确分装为**10 ml/支**。

5. EMB平板：按说明配制。

6. 蛋白胨水培养基：按说明配制，试管分装为**10 ml/支**。



7. 葡萄糖蛋白胨水培养基按说明书配制。

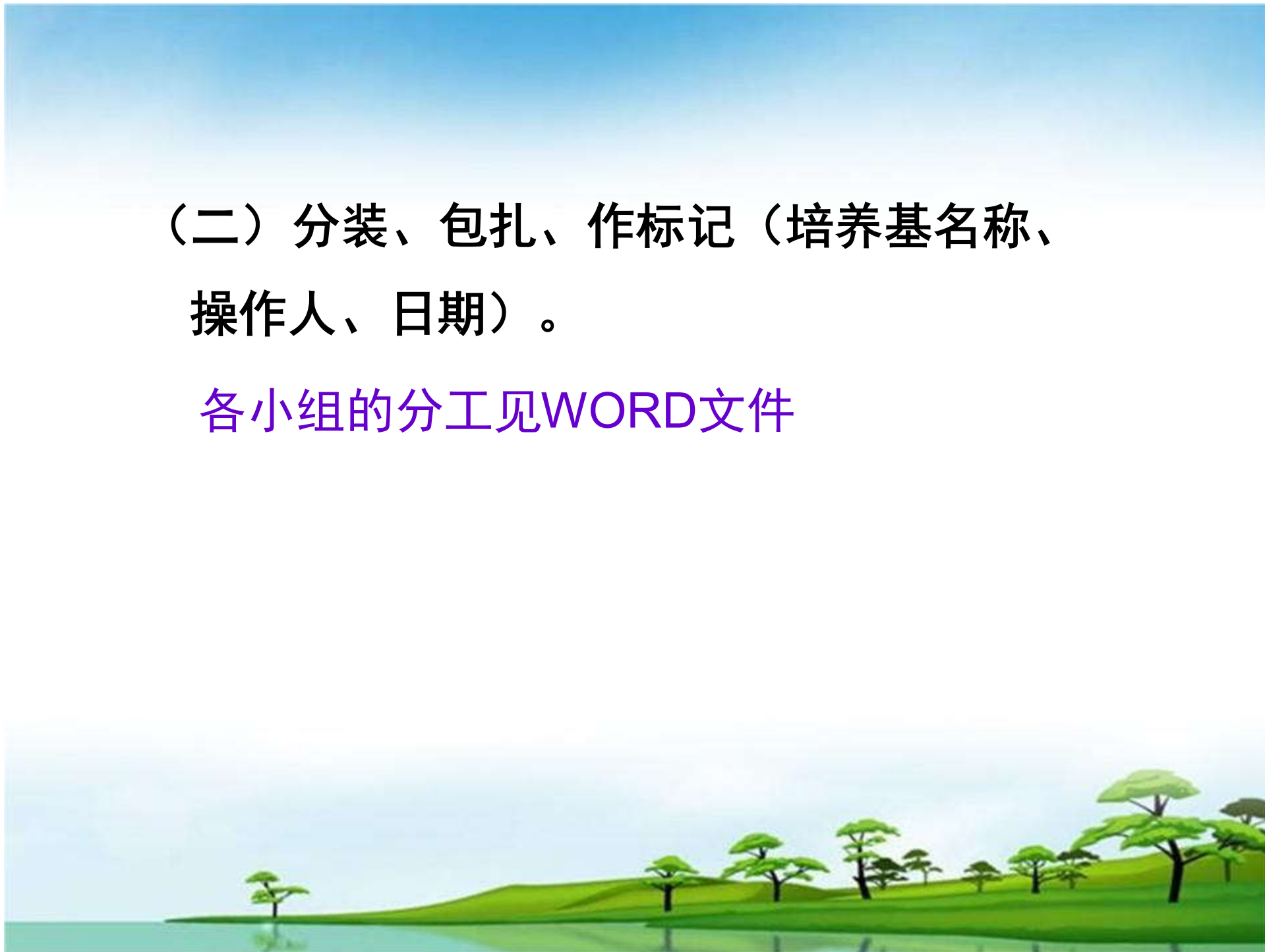
- ❖ 蛋白胨 5 g
- ❖ 葡萄糖 5 g
- ❖ K_2HPO_4 2 g
- ❖ 蒸馏水（加至）：1000 mL，调pH7.0~7.2，每支试管准确分装10 ml /支

8. 柠檬酸盐斜面培养基：注意斜面的摆放。



**（二）分装、包扎、作标记（培养基名称、
操作人、日期）。**

各小组的分工见WORD文件



(三) 高压蒸气灭菌

1. **加水：**往锅内加入适量的水，切勿加少了。
2. **装料：**把要灭菌的材料装入锅内。
3. **加盖：**关严灭菌锅盖和其它阀门，勿使漏气。
4. **加热：**编灭菌的程序
5. **排放冷空气：**当压力上升至0.05 MPa时，打开放气阀，将锅内的冷空气放走，待压力下降为“0”时，再关闭放气阀门。



6. 升压。

7. 保压：当压力上升至所需压力时，控制热源，维持压力至所需时间。

8. 降压：达到所需灭菌时间后，关闭热源，让压力自然下降到“0”后，打开放气阀，再开盖。

9. 无菌检查。



五、注意事项

1. 严格按照操作程序进行，灭菌时，操作者切勿擅自离开，以免发生事故。
2. 增压前必须充分排尽锅内的冷空气，否则压力虽然升高，而温度达不到要求，造成灭菌不彻底的结果。这是高蒸汽灭菌是否彻底的一个重要关键。
3. 灭菌完毕后，压力未降到0.05 MPa以下时，切勿打开放气阀，否则锅内突然减压，培养基和其它液体会从容器内喷出，或沾湿棉塞，则使用时容易污染杂菌甚至造成人身伤害。



实验五 培养基的配制与消毒灭菌

思考题：

- ① 试述高压蒸气灭菌的主要操作过程和注意事项。
- ② 培养基配好后为什么要立即灭菌？如何检验灭菌后的培养基是否无菌？

实验六 土壤微生物的分离纯化以及鉴定

目的

- ① 学习从土壤中分离纯化微生物的基本操作技术。
- ② 掌握样品稀释的方法和稀释倒平板等几种常用的分离纯化微生物的方法。
- ③ 掌握荚膜染色法，学习圆褐固氮菌的分离和鉴定。

二、实验原理

- 土壤中有大量混杂的微生物，以土壤作为菌源，通过稀释分离，使其分散成单个存在的菌体、芽孢或孢子，以便在固体平板上经过培养获得具有一定特征的菌落，经鉴定或进一步纯化，即为纯培养。
- 从无氮培养基分离出的圆褐固氮菌具荚膜，它是包在细菌细胞壁外的一层粘液性物质，与染料亲和力低，不易染色，用单染菌体着色荚膜透明以此区分，便于观察。



实验六 土壤微生物的分离纯化以及鉴定

步骤

(一) 稀释倒平板法分离圆褐固氮菌：

- ① 采土壤：取表层以下**5—10cm**处的菜园土。
- ② 制备土壤悬液：称土样**5g**→**45ml**无菌水（带玻璃珠）→振荡**5—10**分种，即成**10-1**的土壤悬液。
- ③ **10**倍稀释：**10-1**取**1ml**→放到**9ml**无菌水稀释管中，即成**10-2**的稀释液，**10-2**取**1ml**→放到**9ml**无菌水稀释管中，即成**10-3**的稀释液。
- ④ 稀释倒平板：取**10-2**、**10-3**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，每个平皿分别倒入约**15ml**已融化并冷至**50℃**左右的察氏培养基，轻轻摇匀，凝固后即成霉菌平板。
- ⑤ 培养：**28~30℃**，倒置培养**3—4**天。

实验六 土壤微生物的分离纯化以及鉴定

(二) 种土法分离圆褐固氮菌：

- 用灭菌镊子取火柴头大小（绿豆般大小）的土粒，接种于无氮培养基平板表面，**28~30℃**，倒置培养**3—4**天。

实验六 土壤微生物的分离纯化以及鉴定

（三）荚膜的染色：

- 挑取圆褐固氮菌的可疑菌落进行菌涂片，进行荚膜染色。
- 单染法：菌体紫色、荚膜浅色或无色。

实验六 土壤微生物的分离纯化以及鉴定

思考题：

- ① 稀释倒平板法分离微生物时应注意什么问题？吸取菌悬液时为什么要从低浓度到高浓度？
- ② 平板培养时，为什么要倒置培养？

绘图：

- 绘出圆褐固氮菌的形态图。

实验七 大肠杆菌生长曲线的测定

目的

- ① 了解细菌生长的规律和生长曲线的测定原理。
- ② 学习光电比浊法测定大肠杆菌的生长曲线。

测定微生物生长量

- 1) 直接法：显微镜直接计数
- 2) 间接法
 - ① 比浊法：721型分光光度计（本实验用）
 - ② 生理指标法：含氮量乘以6.25即为粗蛋白含量

测定微生物细胞数量的方法

- 1) 血球计数板直接计数法
- 2) 比浊法
- 3) 平板菌落计数法

无分支单细胞微生物群体生长的规律

适用于细菌和酵母菌。

- 细菌二分裂，每经一代时，群体数目增加一倍，故为“**指数增长**”，这也是其他无分支单微生物的生长特征。
- 公式： **$B_t = B_0 2^n$** B_0 起始时细胞数目。 B_t 为某一时刻t的细胞数目。 n 为世代数。

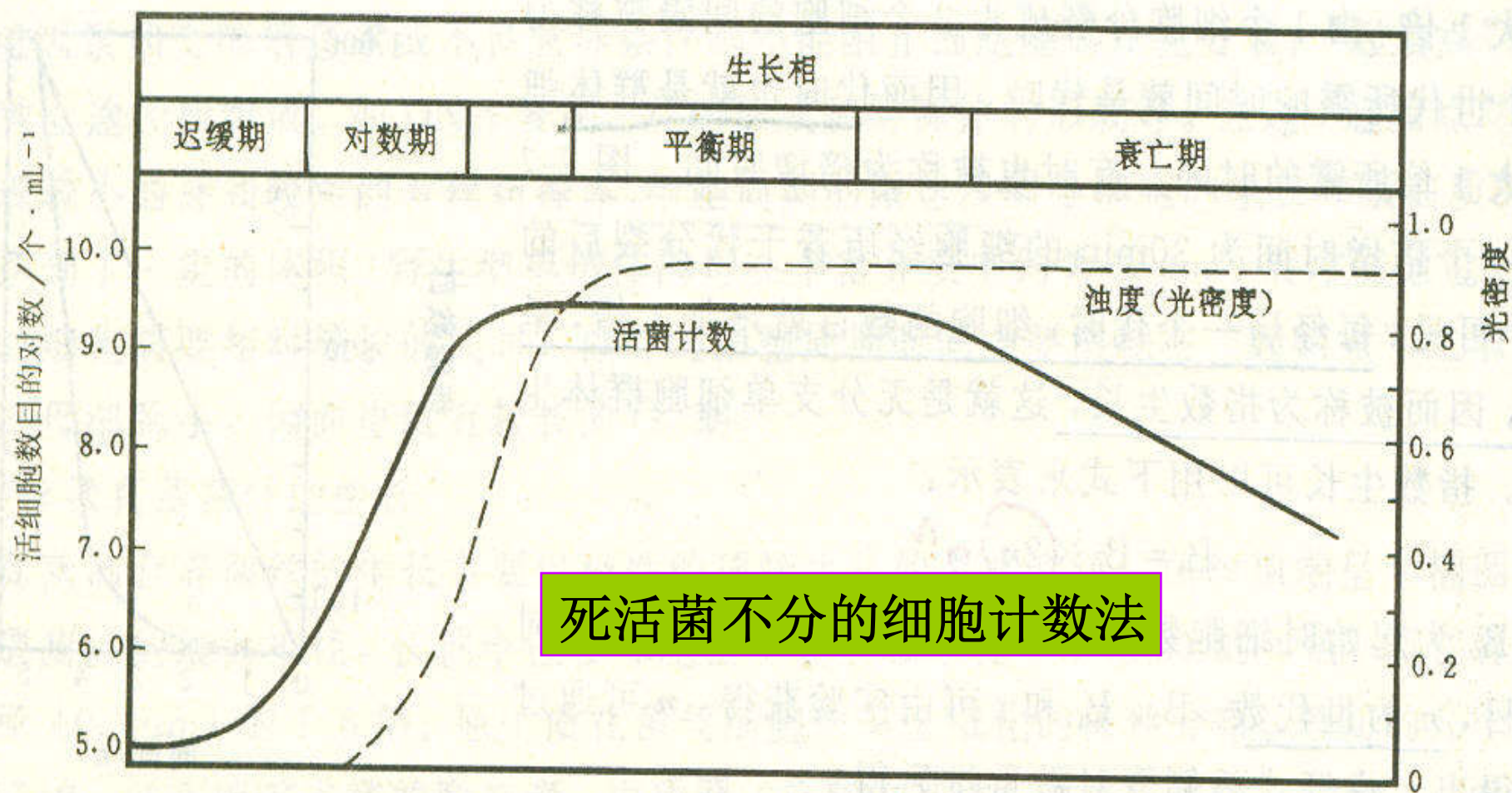


图 7-8 典型细胞生长曲线

实验七 大肠杆菌生长曲线的测定

材料

- 菌种：大肠杆菌
- 培养基：**LB**培养基
- 仪器：恒温振荡培养箱、**721**分光光度计

实验七 大肠杆菌生长曲线的测定

步骤

- ① 试管编号。共**11**支管。
- ② 接种。
- ③ 准确移取**0.3 ml**菌悬液接种到各试管中。
- ④ 培养：**37 °C**分别培养不同时间
- ⑤ 测**OD**值。
- ⑥ 在**530 nm**处有最大吸收值，本实验测**OD530**。

测OD值要注意几点

- 开机预热约**15-20**分钟；
- 调零、调满度，注意用新鲜**LB**肉汤培养基来调零，不能用蒸馏水来调零。
- 临测前才把菌液从冰箱拿出来，且要先摇匀试管的菌悬液才测定；
- 从**0**号管开始测**OD**值；
- 注意保持仪器的清洁，比色皿要用擦镜纸擦干净才可以放入比色槽中；
- 注意仪器的量程，如果超过仪器的测量范围则要用新鲜**LB**肉汤稀释一定倍数后才测量。

实验七 大肠杆菌生长曲线的测定

绘图

绘制大肠杆菌的生长曲线,注意要在**Excel**上绘图, 要求绘趋势线。

思考题

影响细菌生长曲线走向的因素有哪些?

实验八 食品微生物检验（一）菌落总数测定

小组设计实验方案并经审核才能做实验

注意参照食品微生物检验的国家标准，所选食品应有卫生国家标准，建议选标准中菌落总数大些的食品，少选焙烤类、高盐高渗食品，不选没有国家标准的食品，否则做出来也不知道合不合格。

思考题：

- ① 为什么采样要有代表性？如何做到采样的代表性？
- ② 你认为采样时要注意什么细节？菌落计数有哪些技巧？

实验九 食品微生物检验（二）大肠菌群测定

小组设计实验方案并经审核才能做实验

注意参照食品微生物检验的国家标准，学会MPN检索表的使用，理解加样量应该是1、0.0、0.0.或者0.1、0.01、0.001或者10,1、0.1.以匹配MPN检索表来工作。

思考题：

- ① 如何判断乳糖胆盐发酵管阳性？它与革兰氏染色阳性有何关系？
- ② 通过食品卫生的微生物检验，你有何体会？

实验十 微生物的生理生化试验

目的:

- ① 学习细菌的分类鉴定方法(鉴定大肠杆菌和产气肠杆菌).
- ② 通过不同细菌对碳源和氮源的利用情况,了解微生物代谢的多样性.
- ③ 了解**IMViC**与硫化氢反应的原理及其在肠道菌鉴定中的意义.

实验十 微生物的生理生化试验

培养基:

- 蛋白胨水培养基,葡萄糖蛋白胨水培养基,柠檬酸盐斜面培养基,

溶液与试剂:

- 甲基红指示剂,**40% KOH**,**5%α-萘酚**,乙醚,吲哚试剂等.
- 菌种:
- 将大肠杆菌和产气肠杆菌菌种设为盲管,标为**12号菌**和**14、16号菌**。

1.

接

实验十 微生物的生理生化试验

试验类型	培养基 (接种)	原理	鉴定反应	结果		
				12号	14号	16号
吡哌试验	蛋白胨水		加 5 滴乙醚，振摇，静置 3 分钟，沿管壁加 5 滴吡哌试剂			
甲基红试验	葡萄糖蛋白胨水（培养 2 天后振摇分开 2 管来鉴定）		加入甲基红试剂 2-3 滴，不能摇，看上层红或黄色	-	+	+
V-P试验			加 10 滴 40% KOH，加 10 滴 α -萘酚，用力振摇，放 37 度保温 15-30min ,若红色者为阳			
柠檬酸盐试验	柠檬酸盐斜面		斜面上有无细菌生长和是否变色			
	EMB平板					
	麦康凯平板					

观察结果

“+”表阳性反应，“-”表阴性反应

试验 菌号	吲哚试验	甲基红试验	V-P试验	柠檬酸盐试验板	EBB平板	麦康凯平
12号菌						
14号菌						
16号菌						
结论	判断：12、14、16号菌分别是_____菌					

实验十 微生物的生理生化试验

思考题

- ① 讨论**IMViC**试验在医学检验上的意义。
- ② 为什么大肠杆菌是甲基红试验反应阳性，而产气肠杆菌为阴性？



the END