

* 实验四

放线菌和酵母菌形态观察

孔召玉

kongzhaoyu@hotmail.com

生命学院生物技术系

* 一、实验目的

1. 学习并掌握观察放线菌形态的基本方法，初步了解放线菌的形态特征。
2. 观察酵母菌的形态及出芽生殖方式，学习区分酵母菌死活细胞的实验方法。
3. 掌握酵母菌的一般形态特征及其与细菌的区别。

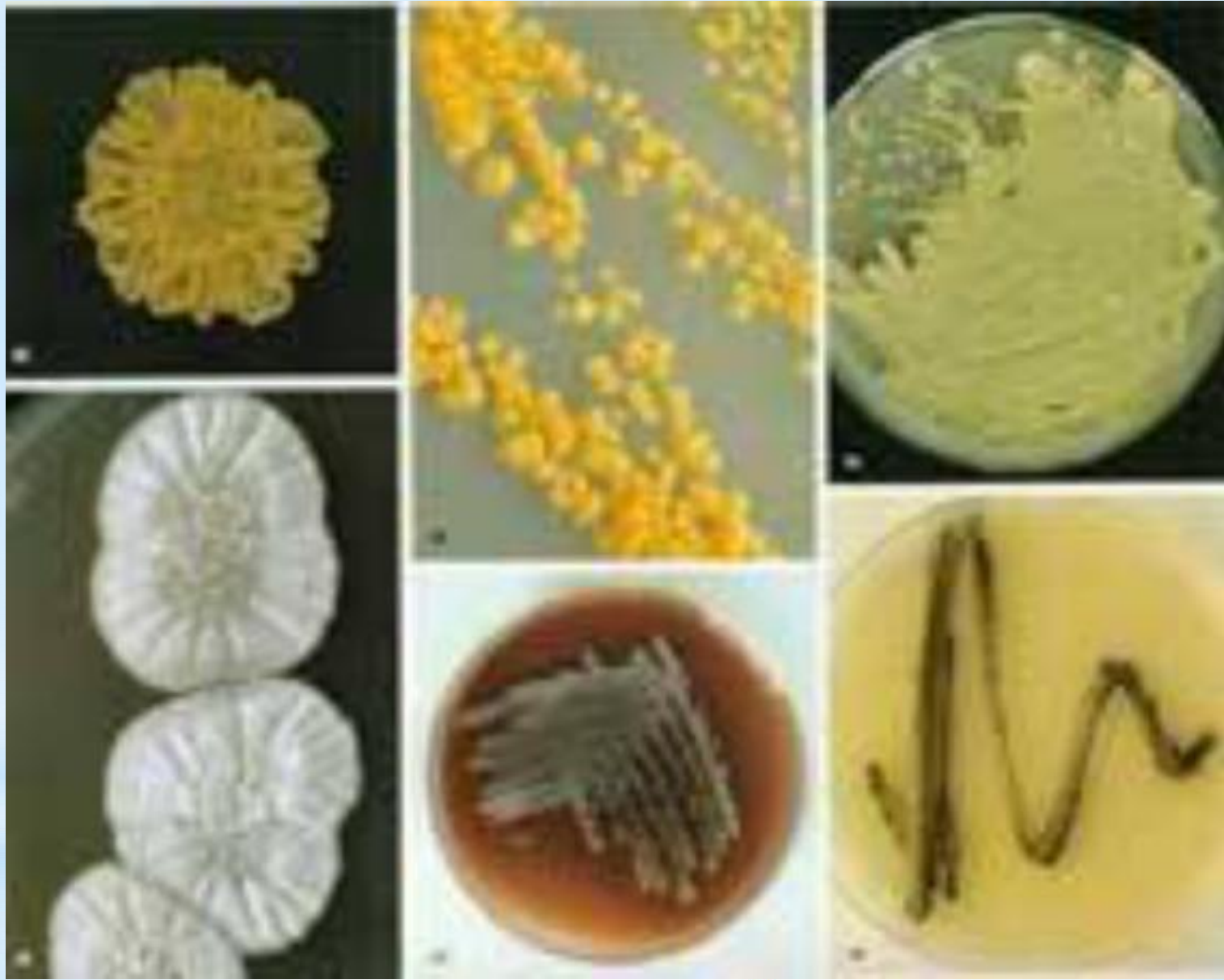
*二、实验原理

放线菌菌落在培养基上着生牢固，与基质结合紧密，难以用接种针挑取。

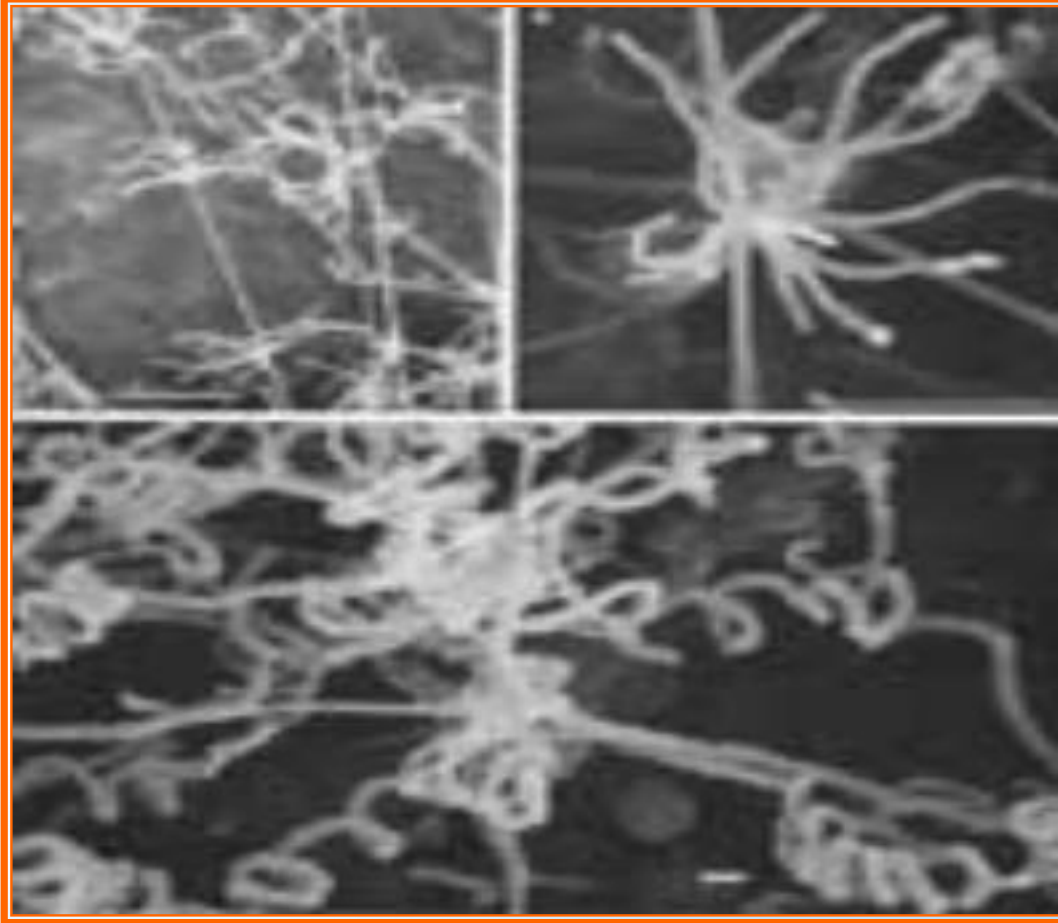
放线菌细胞一般呈分枝无隔的丝状，菌丝体分为在培养基内部的基内菌丝和伸出培养基表面的气生菌丝。

气生菌丝上部分化成孢子丝，呈螺旋状、波浪状或分枝状。菌丝呈各种颜色，有的能分泌水溶性色素到培养基内。孢子丝长出孢子，孢子形状各异。由于孢子的存在使菌落表面呈干粉状。

放线菌的孢子丝形状和孢子排列情况是放线菌分类的重要依据。

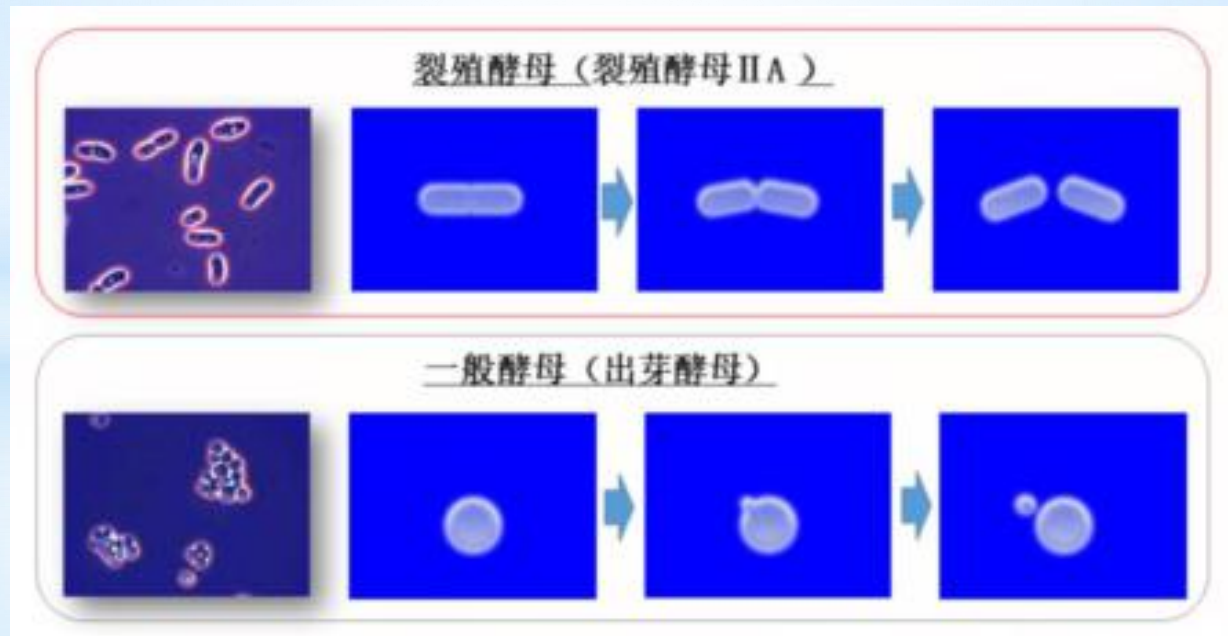


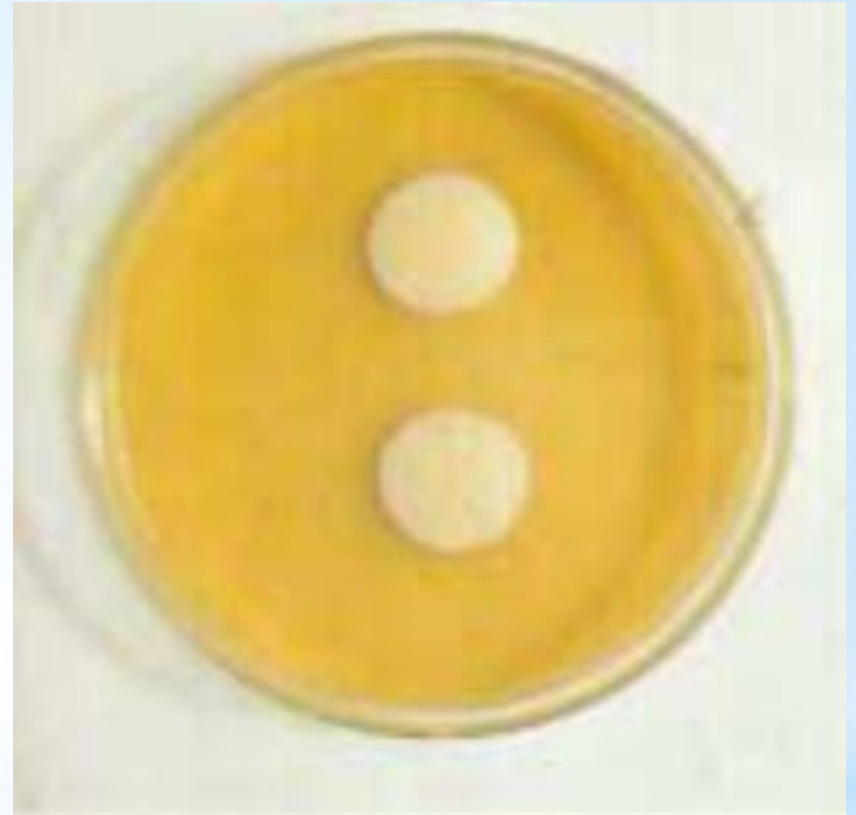
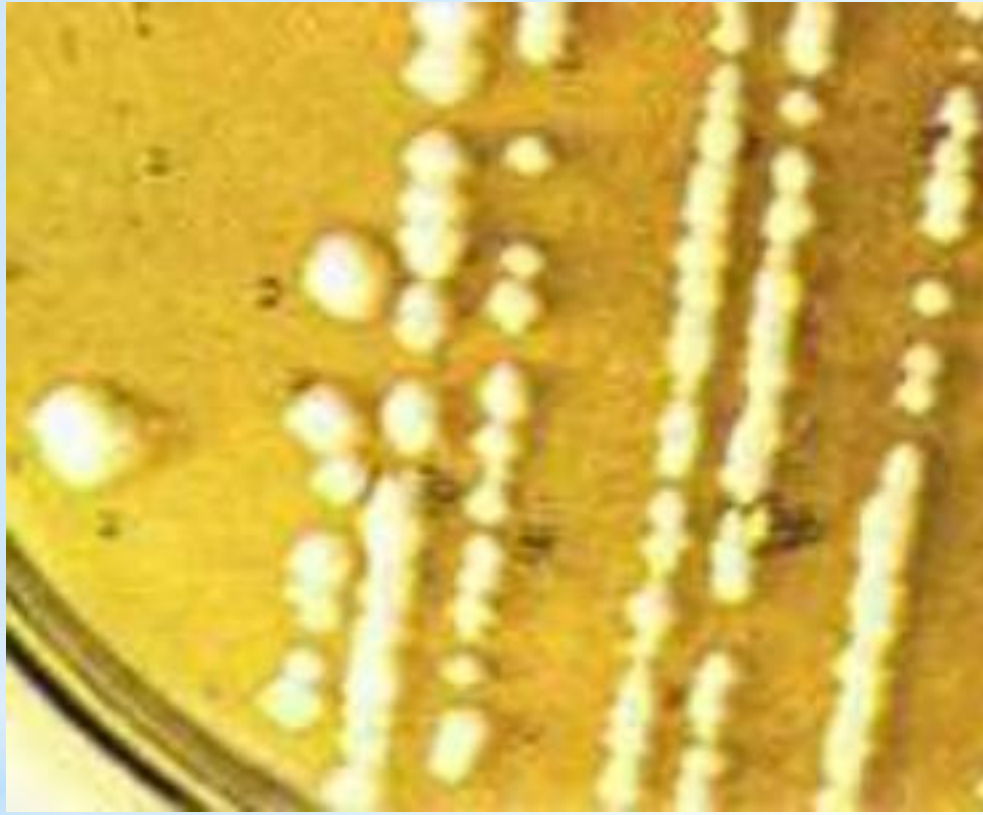
* 放线菌菌落形态



- *观察放线菌形态制片时**不采用涂片法**，以免破坏细胞及菌丝体形态。
- *通常采用插片法、玻璃纸法或印片法并结合菌丝体简单染色对放线菌进行观察。
- *在**插片法**中，首先将灭菌盖玻片插入接种有放线菌的平板，使放线菌沿盖玻片和培养基交接处生长而附着在盖玻片上，取出盖玻片可直接在显微镜下观察放线菌在自然生长状态下的形态特征，而且有利于对不同生长时期的放线菌形态进行观察。

* **酵母菌**是不运动的单细胞真核微生物，其大小通常比常见细菌大几倍甚至十几倍。大多数酵母以出芽方式进行无性繁殖，少数分裂繁殖；有性繁殖是通过接合产生子囊孢子。



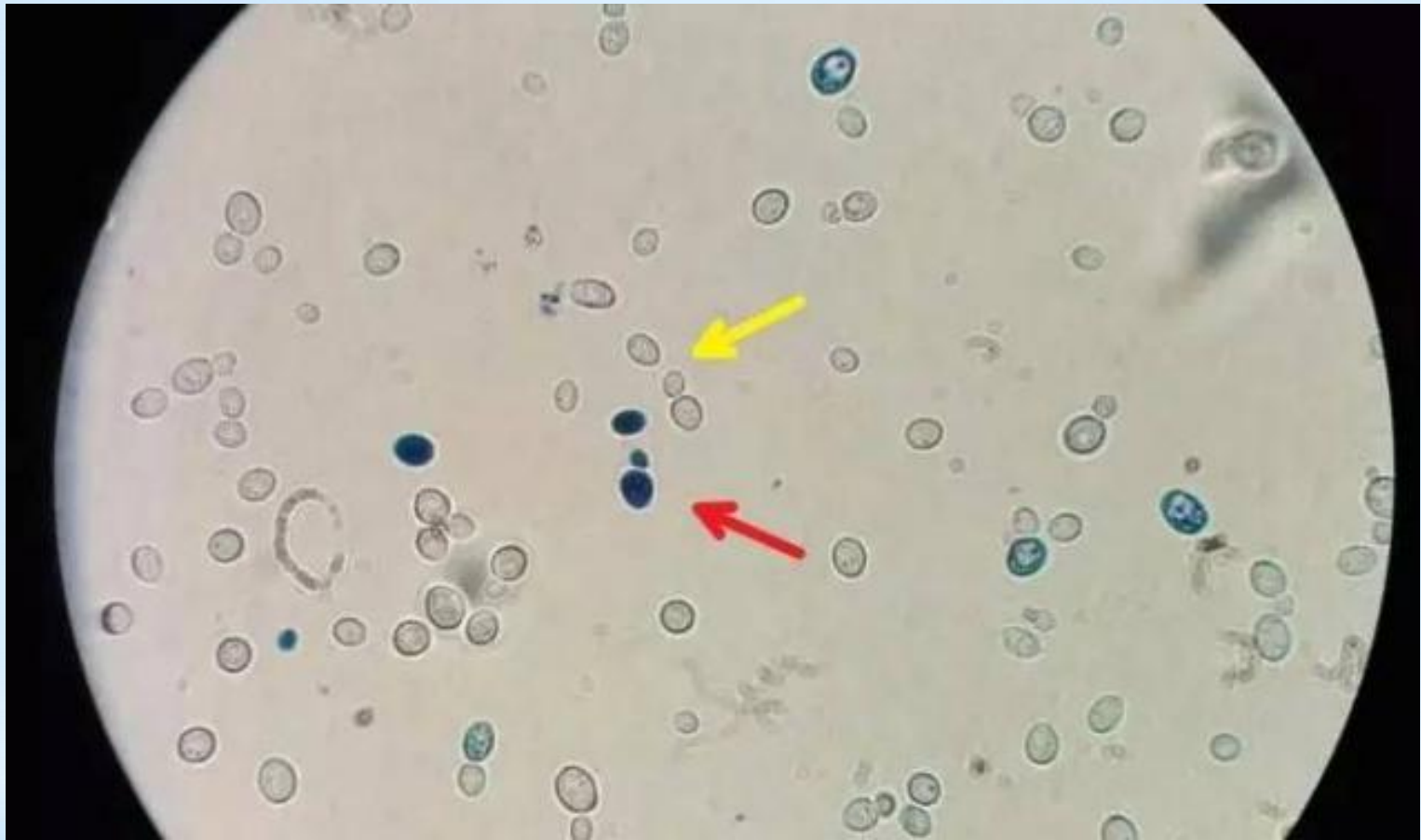


* 酵母菌菌落形态

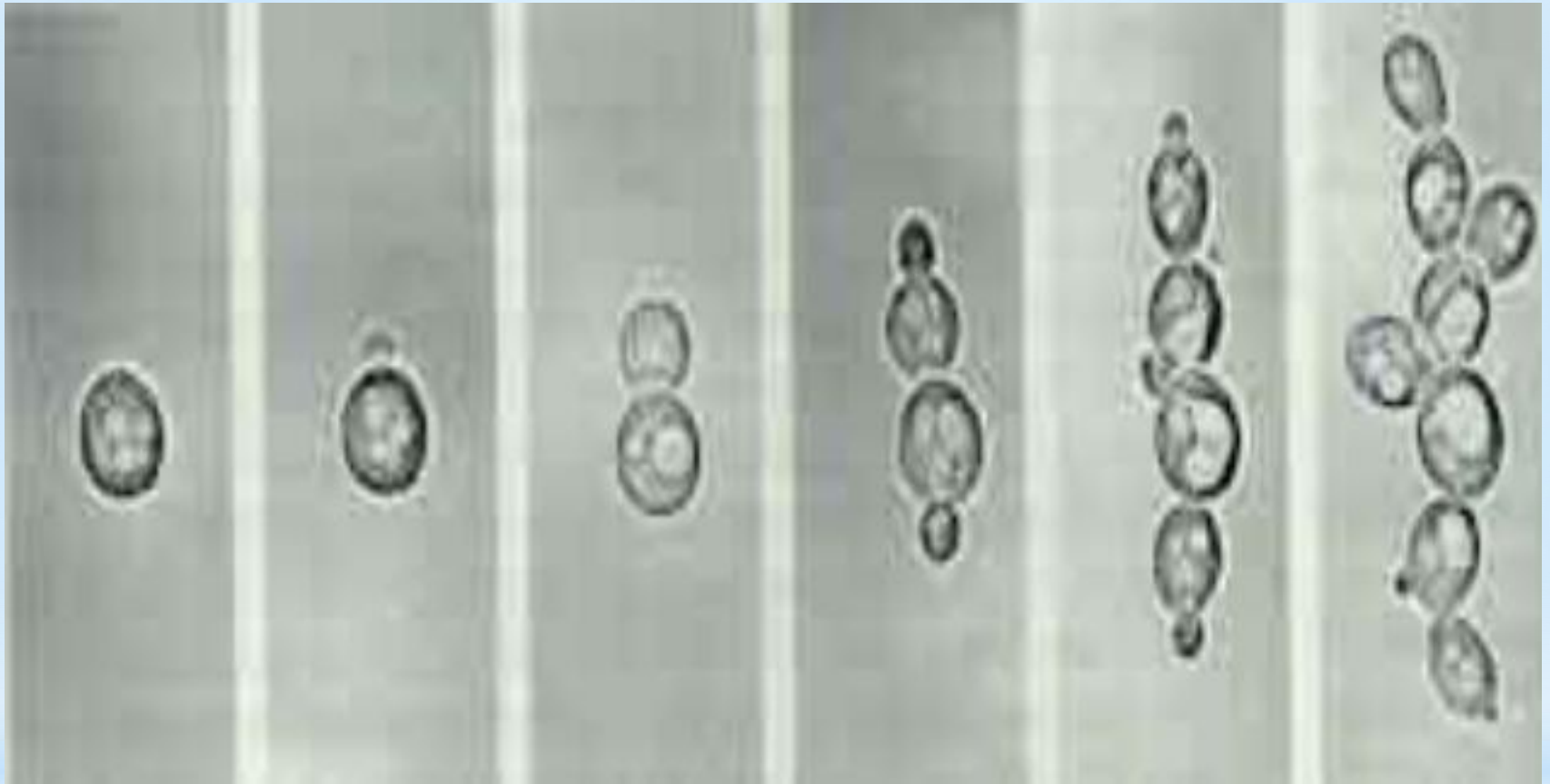


* 酵母菌形态

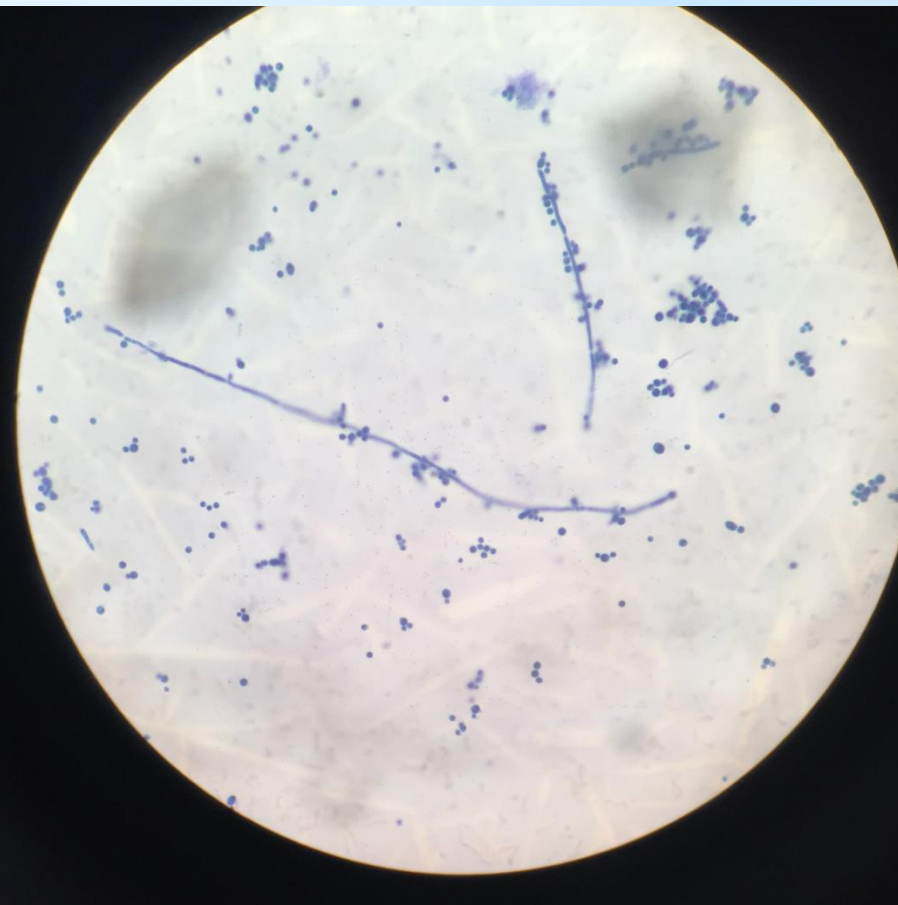
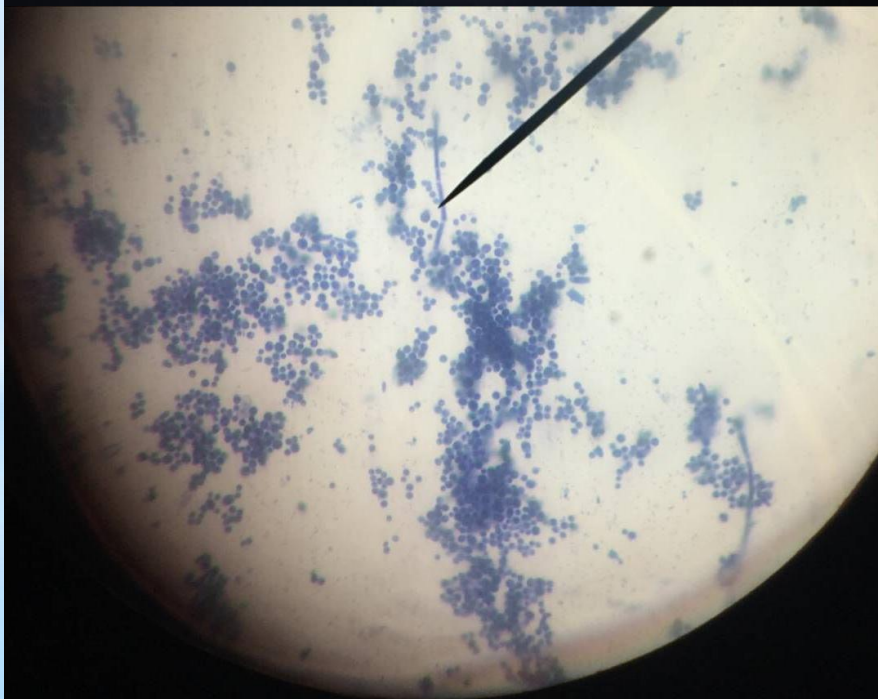
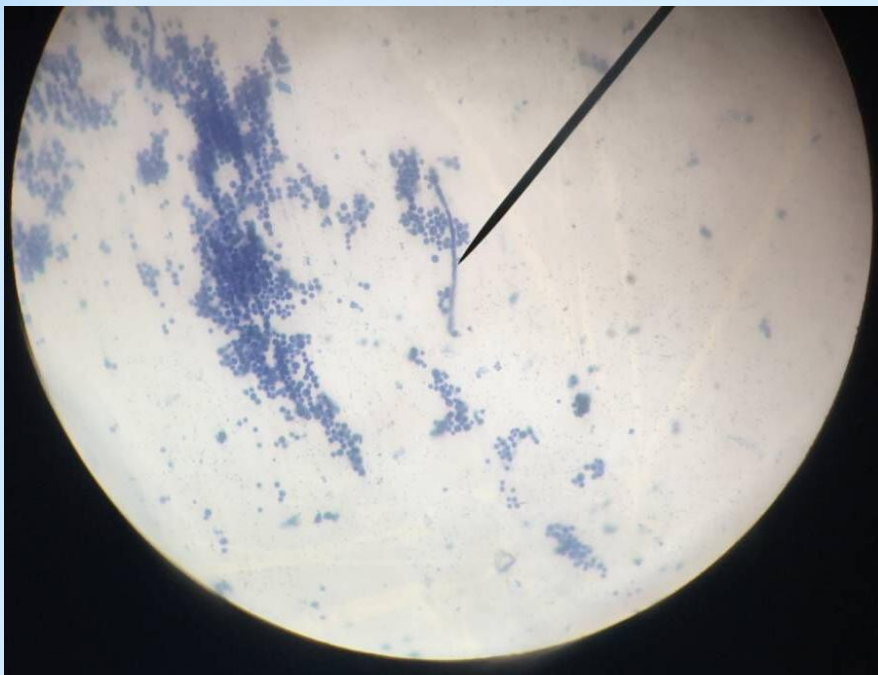
- 由于细胞个体大，采取涂片的方法制片有可能损伤细胞。一般通过**美蓝染液浸片**来观察酵母的形态和出芽生殖方式。
- 美蓝是对细胞无毒，它的氧化型呈蓝色，还原型无色。用美蓝对酵母的活细胞进行染色时，由于细胞的新陈代谢作用，活细胞内具有较强的还原能力，能使美蓝由蓝色的氧化型变为无色的还原型。因此，**具有还原能力的酵母活细胞是无色的，而死细胞或代谢作用微弱的衰老细胞则呈蓝色或淡蓝色**，借此即可对酵母菌的死细胞和活细胞进行鉴别。



*啤酒酵母显微镜观察



* 酵母菌的假菌丝形成过程



酵母菌的假菌丝

*三、实验器材

1. 菌种：放线菌插片培养物，啤酒酵母，裂殖酵母，假丝酵母
2. 染色液：0.1%吕氏碱性美蓝染色液
3. 器材：显微镜，载玻片，盖玻片等

* 四、实验步骤

(一) 插片法观察放线菌形态：

1. 接种：无菌操作挑取放线菌菌种斜面培养物在高氏1号培养基平板上密集划线接种。
2. 插片：无菌操作用镊子取灭菌盖玻片以约45°插入平板接种线上。
3. 培养：将平板倒置，于28℃培养3-5d。
4. 镜检：用镊子小心取一片放线菌插片，用纸擦去背面培养物，放在载玻片上（有菌的一面朝上），显微镜下观察（低倍→高倍）。

***注意事项:**

- *1. 注意在移到附着有菌体的盖玻片时**勿碰动菌丝体**，必须**菌面朝上**，以免破坏菌丝体形态。
- *2. 观察时，**宜用略暗光线**；先用低倍镜找到视野，再换高倍镜观察。

(二) 美蓝染液水浸片法观察酵母菌：

1. 在载玻片中央加一滴美蓝染色液，用接种环挑取少许酵母菌放入染液中，混合均匀。
2. 用镊子取一块盖玻片，将盖玻片一边与菌液接触，缓慢将盖玻片倾斜并覆盖在菌液上（勿使产生气泡）。
3. 将制片放置3 min后，显微镜下观察（低倍→高倍）酵母菌的形态和出芽情况，并根据细胞颜色区分死活细胞。
4. 染色30 min后再次观察，注意死活细胞的比例是否发生变化。

注意观察酵母菌的形态大小、芽殖、裂殖和假菌丝，区分死活细胞。

***注意事项:**

- *1. 用接种环将菌体与染液混合时**不要剧烈涂抹**，以免破坏细胞。
- *2. **滴加染液要适中**，否则用盖玻片覆盖时，染液过多会溢出盖玻片表明，影响观察；过少会产生大量气泡。
- *3. 盖玻片要缓慢倾斜覆盖，**以免产生气泡**。

* 五、实验结果

- * 绘图：放线菌（基内菌丝、气生菌丝及孢子丝）的形态和结构特征。
- * 酵母菌（芽殖、裂殖、假菌丝）的形态和结构特征，区分死活细胞。

六、作业

在显微镜下，酵母菌有哪些突出的特征区别于一般细菌？