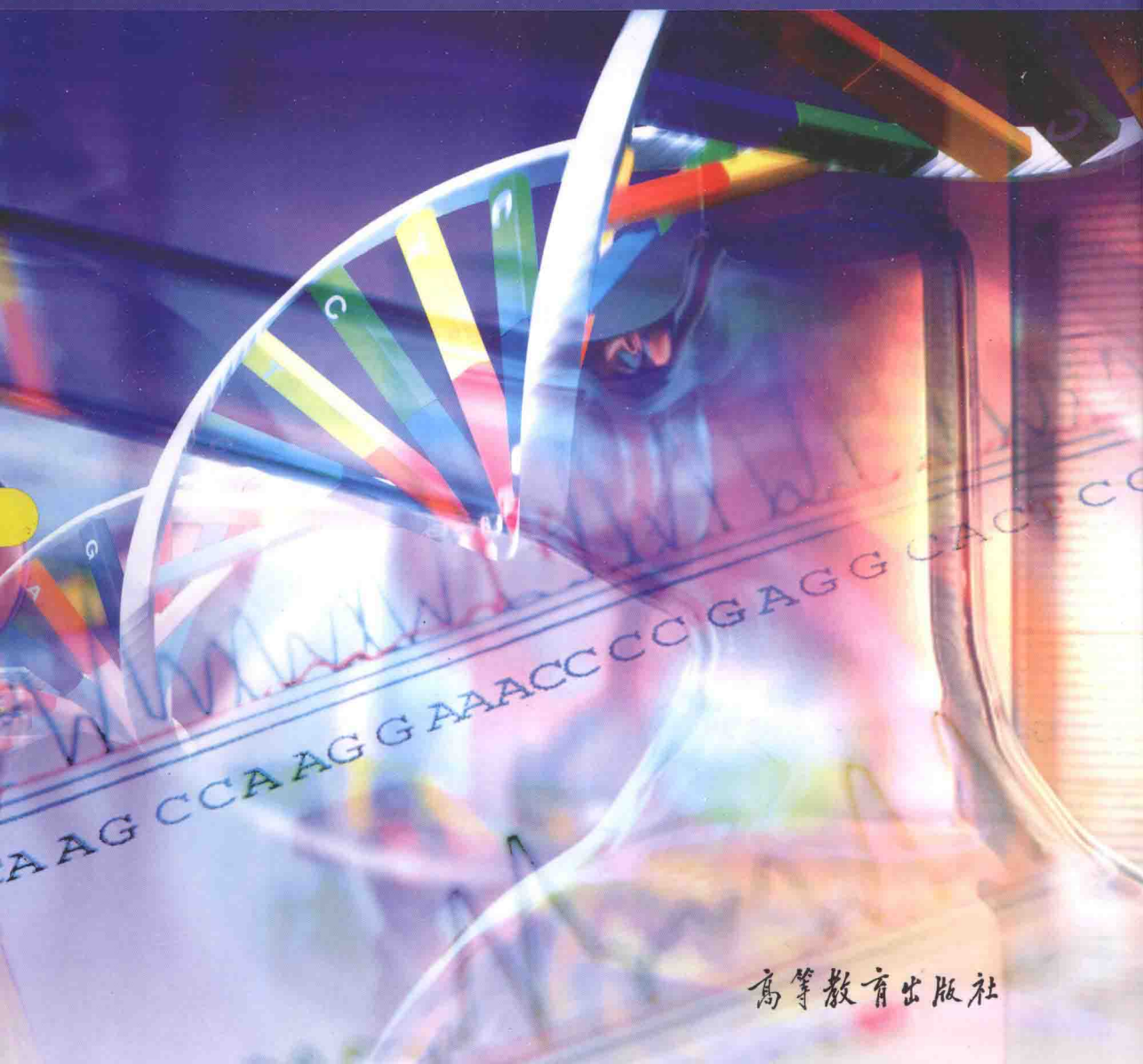


微生物学实验简明教程

Laboratory Manual for Microbiology

主编 高海春 吴根福



高等教育出版社

微生物学实验简明教程

Laboratory Manual for Microbiology

主编 高海春 吴根福

编者 (按姓氏笔画排序)

吕镇梅 吴科杰 吴根福 应盛华

陈中云 袁洁 高海春

内容提要

本书为高等院校微生物学实验教学用书,由基本技能训练和18个基础实验串联而成。所涉及的技能包括显微镜使用、制片与染色、细胞大小测定、各类无菌操作技术、培养基配制与灭菌、接种与培养、显微镜直接计数与平板活菌计数、菌种保藏等技术;实验内容涵盖微生物的形态与构造、生理与生长、遗传与变异、环境与生态、鉴定与分类等。配套的数字课程(abook.hep.com.cn/42913)除所有微视频外,还提供各实验的教学课件、实验报告(作业)范本等。

本书可作为高等学校生物类专业,以及生态、环境、医学等相关专业的微生物学实验课程教材,也可供相关科研、生产人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验简明教程 / 高海春, 吴根福主编. --
北京: 高等教育出版社, 2015.8

ISBN 978-7-04-042913-8

I. ①微… II. ①高… ②吴… III. ①微生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q93-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第138525号

策划编辑 高新景 责任编辑 高新景 封面设计 王洋 责任印制 韩刚

出版发行	高等教育出版社	咨询电话	400-810-0598
社 址	北京市西城区德外大街4号	网 址	http://www.hep.edu.cn
邮政编码	100120		http://www.hep.com.cn
印 刷	廊坊市文峰档案印务有限公司	网上订购	http://www.landaco.com
开 本	787mm×1092mm 1/16		http://www.landaco.com.cn
印 张	10.75	版 次	2015年8月第1版
字 数	250千字	印 次	2015年8月第1次印刷
购书热线	010-58581118	定 价	19.80元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换

版权所有 侵权必究

物 料 号 42913-00

数字课程 (基础版)

微生物学实验 简明教程

主编 高海春 吴根福

登录方法:

1. 访问<http://abook.hep.com.cn/42913>, 点击页面右侧的“注册”。已注册的用户直接输入用户名和密码, 点击“进入课程”。
2. 点击页面右上方“充值”, 正确输入教材封底的明码和密码, 进行课程充值。
3. 已充值的数字课程会显示在“我的课程”列表中, 选择本课程并点击“进入课程”即可进行学习。

自充值之日起一年内为本数字课程的有效期
使用本数字课程如有任何问题
请发邮件至: lifescience@pub.hep.cn



微生物学实验简明教程

主编 高海春 吴根福

用户名

密码

验证码

4260

进入课程

注册

内容介绍

纸质教材

版权信息

联系方式

“微生物学实验简明教程”数字课程与纸质教材一体化设计, 紧密配合。数字课程包括教材第一篇基本技能的操作微视频, 以及教学课件、实验报告等多种资源类型, 丰富知识呈现形式, 以此辅助学生拓展知识、规范操作、跟踪前沿, 引导学生自主学习, 掌握相关技能点和知识点。

相关教材



分子生物学实验指导(第3版)

魏群



基因工程实验指导(第3版)

朱旭芬



发酵工程实验指导(第2版)

吴根福

高等教育出版社

<http://abook.hep.com.cn/42913>

数字课程微视频目录

基本技能 1

显微镜介绍

油镜的使用技术

基本技能 2

涂片及染色技术

基本技能 3

革兰氏染色技术

基本技能 4

显微测微技术

基本技能 5

显微直接计数技术

基本技能 6

培养基配制技术

培养基分装技术

包平板技术

包移液管技术

斜面摆放技术

平板制备技术

基本技能 7

干热灭菌技术

高压蒸汽灭菌技术

基本技能 8

土壤稀释技术

微生物分离技术——涂布法

微生物分离技术——混菌法

微生物分离技术——划线法

基本技能 9

最大或然数测定技术

基本技能 10

超净台使用技术

斜面接种技术

斜面 - 平板接种技术

斜面 - 三角瓶接种技术

斜面 - 液体试管接种技术

穿刺接种技术

基本技能 11

斜面低温保藏技术

石蜡油封保藏技术

甘油管冷冻保藏技术

前言

微生物学是高等院校生物学相关专业的专业基础课,也是一门实验性很强的必修课程。在基础微生物学的教学实践中,老师们常常揪心于实验内容的设置与教学模式的改革。在设计型、探究型、开放型实验样式逐渐成为主流的今天,微生物学实验课程到底该怎么开,究竟该有多少学时,安排多少内容?各高等院校也是仁者见仁、智者见智。我们认为,作为一门生物学基础课程,微生物学实验应当注重传统模式的传承,并在传承的基础上有所创新。为此,课程的设计应注意以下四个问题。

1 优化课程体系,理顺学科脉络

微生物学课程主要包括微生物的形态与分类,营养与代谢,生长与遗传,生态与免疫等内容。传统上,微生物学实验多以形态与分类学的内容为主,即使一些生理生化实验牵涉到代谢方面的知识,其目的主要也是为了鉴定菌株。随着生命科学的发展,微生物学逐渐与遗传学、生态学,特别是与分子生物学相融合,发展出一系列新的实验技术,创建出一大批新的实验手段。即使像菌株鉴定这样的经典实验,也发展出了以 16S rDNA (真核生物为 18S rDNA) 序列为表征的分子鉴定手段。因此,微生物学实验内容也应与时俱进,进行必要的更新和补充。但是,对综合性大学来说,这些交叉学科的实验究竟放在哪个实验室中进行就成了管理者头疼的问题。从实验室的设备配置来看,分子鉴定实验应归到分子生物学实验室中进行,但从实验的内容和性质来看,应在微生物学实验室中进行。所以,相关课程负责人应协商一致,通过优化课程体系,理顺学科脉络,明确各课程的授业范围,使课程既反映时代特点,突出交叉融合之势,又避免内容的重复和设备的浪费。

我们将微生物学实验课程设计成基础性实验和综合创新性实验两大类型。基础性实验是相关专业的必修内容,要求用较少的学时完成最基本的技能训练任务,每一实验室按 40 人规模配备相关设备。我们把基础微生物学实验设定为 32 个学时,要求学生通过 11 周的训练掌握微生物的形态与测量、分离与接种、培养与保藏、分类与鉴定、消毒与灭菌等常规实验技能,而把感受态诱导与制备、质粒提取与转化、DNA 扩增与纯化、序列测定及分析等实验安排在分子生物学基础实验中。综合创新性实验是专业课,供微生物专业(专门化)的同学选修,让他们在学习了基础微生物实验和分子生物学实验后,进行相关交叉学科的探究,如进行微生物的分子鉴定、不依赖培养的微生物区系结构分析、致突变物及内毒素的检测等实验。综合创新实验室的设备较齐全,但设备数量只按小班(10 人)规模配置。

2 深化课程内容,融合实验模式

在实验内容安排上,我们建议在重视传统验证性实验的基础上,在配合课堂理论教学,循序

渐进的前提下,进行教学内容的深化,使验证性实验模式与探究性实验模式得到完美融合。

如细菌的形态观察是微生物实验中最基础的内容,传统实验模式是用标准菌株进行杆菌和球菌的形态观察,是一种典型的验证性实验模式;而我们要求学生在认识标准菌株形态的基础上,自己寻找实验材料,观察牙垢、指甲垢或头皮泥等样品中细菌的形态。这样,不但使同学们进一步认识了细菌的形态,还学会了区分微生物与颗粒性杂质的方法,即具有一定形态并被染上颜色的是细菌,无定型的或染不上颜色的是杂质。同样,在霉菌形态观察时,除了提供青霉和曲霉等标准菌株外,我们还提供一些发霉的橘子或馒头作为实验材料,让同学们观察这些自然环境中生长的霉菌,判断大致类别,以增强对霉菌的感性认识,体会生活中食品防霉的必要性和微生物接种时无菌操作的重要性。另外,在细菌运动性观察时,除了观察经典的枯草杆菌运动外,还可引导同学进行酸奶制品中乳酸杆菌和乳酸链球菌的运动性观察,让他们初步熟悉微生物生态制剂这一概念。

培养基配制、微生物分离纯化、菌种保藏和细菌生理生化实验是基础微生物学实验的重要内容。我们建议将这些实验整合在一起,开设为期五周的综合实验,目的就是探究环境样品中细菌、霉菌和放线菌的数量(活菌计数),并对其中的细菌分离株进行初步鉴定。在细菌鉴定过程中,建议以大组(10人)为单位,利用标准菌株的验证性实验作为阳性和阴性对照,要求同学们对各自从土壤中得到的细菌分离株进行形态观察和生理生化试验,尽可能将分离株归类到较小的分类单元。这样,既可对经典的验证性实验进行传承,又可对未知菌的形态和生理生化特性进行探究。由于细菌分离株是学生自己纯化的,不但减少了实验准备人员的工作量,也增加了学生对实验的兴趣。因为前一次实验结果会影响到后一次实验的顺利进行,同学们都格外认真细心。

3 改进教学方法,拓展教学手段

微生物学既是一门理论学科,更是一门实验性很强的应用学科。对微生物学实验的一些基本技能和技巧,不可能简单地从教材中的几幅图片得以理解和掌握,只能通过不断的实践来提高。传统上,这些技能主要靠教师的示范来传授,由于示范的时间和次数有限,学生的数量又比较多,教师不太可能一对一,手把手地对全部学生进行纠错,使教学效果受到一定影响。随着信息和网络技术的发展,通过规范的视频来实现在线教学已成为可能,同学们不但可通过视频进行预习,尽早熟悉基本操作,提升课堂教学质量,而且可及时改正操作错误,规范操作步骤,提高实验能力。

对于在线视频,我们并不倡导课程的全程录像,因为观看全程视频不仅花费时间,学生也会觉得乏味,不能自始至终集中注意力;我们也不推崇从头至尾录制整个实验过程,虽然这样确实能大幅提高实验效率,但也容易使学生过分倚重于视频,机械地重复操作过程,成为视频的奴隶,失去许多动脑的机会。我们主张把最基本的实验技能和技巧做成微视频,这样既可使教师根据临场状况合理发挥,又能使学生对相关技术活学活用。根据多年的微生物学教学和科研实践,我们认为基础微生物学中比较重要的技能主要包括以下10项(表1),一些大型实验实际上就是这些基本实验技能的综合和拓展。

表 1 微生物学实验中一些重要的基础技能

序号	技能名称	主要内容
1	显微镜使用技术	显微镜的使用,特别是油镜的使用
2	制片与染色技术	涂片制作,水浸片制作;单染色、革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色、鞭毛染色等
3	细胞大小测量技术	目镜测微尺的校正及细菌、酵母细胞的显微测微技术
4	显微计数技术	细菌和酵母悬液中细胞的显微镜直接计数
5	培养基制备与灭菌技术	培养基的配制与分装,无菌水制备,移液管及平板的包扎,干热灭菌,高压蒸汽灭菌,斜面的制作等
6	分离与纯化技术	菌悬液的制备与稀释,涂布法、混菌法、划线法分离纯化
7	活菌计数技术	微生物的培养及细菌、放线菌、霉菌和酵母的菌落形态识别,菌落形成单位计测
8	最大或然数测量技术	选择培养基的制备与最大或然数(MPN)测定
9	无菌操作技术	平板制备,无菌取样,各类接种技术(斜面-平板,斜面-斜面,斜面-液体试管,斜面-三角瓶,穿刺接种等)
10	菌种保藏技术	斜面低温法,隔绝空气法,超低温冻结法,冷冻干燥法、沙土管法等

4 创新教学设计,提高教学效率

兴趣是最好的老师,在进行教学设计时,应以提高学生的学习兴趣为出发点,以提高课堂教学效率为最终目标,以实施因材施教为努力方向。除了前面介绍的自主选择实验材料,融合验证性实验和探究性实验等设计外,还可选择一些贴近生活的实验内容,如牙垢细菌的形态观察,活性乳中细菌的运动性观察,乳酸菌饮料中细菌的计数,常用消毒剂对微生物生长的抑制作用,甜酒酿发酵,泡菜制作等,从而增加学生对课程的兴趣。此外,还可根据学生实验能力的差异,把实验内容分成必做、选做和示范三块。对那些实验基础好,能力强、速度快的同学,除了必做内容外,还要求他们完成选做内容;而对实验技能一般的同学,选做内容只要求观察一下结果就可以(相当于示范)。为此,我们将相关性较高的内容安排在一起,如对细菌的染色实验,我们把单染色、革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色和鞭毛染色整合在一起,将单染色和革兰氏染色设置成必做实验,将芽孢染色和荚膜染色设置成选做实验,将鞭毛染色设置成示范实验,以尽量减少等候时间,充分利用课内学时,使学到的知识最大化。

基础微生物实验教学的主要目的是使学生掌握实验技能。因此,实验教学的内容选择应以操作技能的练习为出发点。如微生物的生理生化实验种类繁多,但作为实验技能,无非是配培养基、灭菌、接种和观察。所以我们以接种技能(如划线、穿刺等)的训练为导向,同时考虑培养基类别(如斜面、平板、液体试管等),选择了淀粉水解试验(斜面-平板点种),硫化氢产生试验(斜面-液体试管接种,加醋酸铅滤纸条),石蕊牛奶试验(斜面-液体试管接种),明胶液化试验(斜面-半固体穿刺接种)和柠檬酸盐利用试验(斜面-斜面划线接种)等5个实验内容。同时,考虑到新建的校园普遍较大,同学们所选课程不一,统一来实验室观察结果很不方便,我们在微生

物培养时采用较低温度,较长时间的培养方式,统一安排在第二周的固定课时内观察,必要时培养后由实验员统一冷藏保存。

本教材是在浙江大学微生物学教研室多年的教学和科研实践基础上编写而成的。教材继承了闵航等老一辈教学工作者多年的实践经验,历经了浙江大学理工农医类专业几十年的实验教学检验,效果良好。本教材具有如下特点:

(1) 内容丰富而精炼。整个教材仅列 18 个实验,除了表 2 中列举的 13 个基本技能训练实验外(周次 3 中包括了生长曲线的测定实验,周次 10 中包括泡菜发酵实验和细菌接合实验),还包括供微生物方向学生选做的 5 个综合性实验。内容既涵盖了微生物实验所必须掌握的基本技能,又没有太多的重复。如培养基的配制和高压蒸汽灭菌是微生物实验中最常用的技术,对不同的培养基,配制和灭菌技术大同小异,所以我们在正式实验中只安排了一次操作,其他实验中所用的培养基都由实验员准备,学生如果觉得不过瘾,可参看视频,有时间也可以与实验员一起准备。

(2) 安排合理而紧凑。相关性较强的操作安排在同一实验中进行,既减少了等候时间、拓展了知识结构,又可使不同基础的同学在单位课时内最大限度地获得相关知识。为了提高教学效率,便于同学们预习和复习,我们把实验中的基本操作技巧和技能拍成视频,要求同学们按教材网站的提示认真预习,实验时做到心中有数。

(3) 实用且可操作性强。实验内容和安排历经多个专业的学生 20 多年的实践,具有很强的可操作性。教材中还对实验的准备和分组安排等给出了详细的建议,便于实验教师和教辅人员参考。

表 2 微生物学实验(基础部分)安排

周次	实验内容	学习的基本技能
1	参观微生物实验室,认识球菌、杆菌和螺旋菌,观察细菌的运动。	油镜使用技术;细菌运动观察技术
2	细菌单染色、革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色和鞭毛染色	无菌取样技术,涂片技术,油镜使用技术
3	枯草杆菌细胞大小的测定,酵母培养液中细胞数量的测定,根据光密度和酵母数量变化制作生长曲线	细胞大小测定技术;显微直接计数技术;生长曲线制作技术
4	放线菌、酵母菌、霉菌的形态观察	微生物制片技术;显微镜使用技术
5	培养基的配制及高压蒸汽灭菌;培养皿、移液管的包扎及干热灭菌。	培养基配制技术;干热灭菌技术;高压蒸汽灭菌技术
6	土壤中细菌、放线菌、霉菌的分离和活菌计数	平板制备技术,稀释分离技术,涂布技术,混菌培养技术
7	菌落形成单位测定;细菌分离株纯化;甜酒酿发酵	微生物活菌计数技术,菌落识别技术,划线分离技术,固态发酵技术
8	微生物菌种保藏;分离株生理生化试验;环境因子对微生物生长的影响	菌种保藏技术;斜面接种、穿刺接种、液体接种、平板接种技术

续表

周次	实验内容	学习的基本技能
9	生理生化实验及环境因子影响实验的结果观察;微生物在碳、氮和磷素循环中的作用	微生物选择培养技术;消毒灭菌技术;最小抑菌浓度测定技术
10	微生物在物质转化中作用的结果观察;泡菜发酵,细菌间接合的观察	最大或然数计数技术;自然发酵技术;细菌接合技术
11	泡菜发酵、细菌接合的结果观察;考试(菌落识别,革兰氏染色、无菌操作等)	菌落识别技术;无菌取样技术;涂片技术;染色技术;各类接种技术

本教材由高海春策划并制定大纲,吴根福具体负责并实施主要编写工作,吕镇梅、应盛华、袁洁、陈中云等老师参与部分编写工作。全书由吴根福统稿,高海春审阅并定稿。所附操作视频由北京师范大学教育学院吴科杰友情制作。在教材编写过程中,得到了高等教育出版社王莉副编审和高新景编辑的指导和帮助;在教材出版过程中,得到了浙江大学竺可桢学院(浙大)和生命科学学院的支持和资助,在此一并致谢。鉴于编者水平有限,错误和不当之处在所难免,恳请同行和专家批评指正。

主编

2015年5月

目 录

微生物学实验室守则	1
-----------------	---

第一篇 基本技能

基本技能 1 显微镜(油镜)的使用技术	5
基本技能 2 微生物涂片和染色技术	6
基本技能 3 无菌取样技术	7
基本技能 4 微生物细胞大小的测量技术	8
基本技能 5 显微直接计数技术	9
基本技能 6 培养基配制技术	10
基本技能 7 灭菌技术	11
基本技能 8 微生物分离纯化技术	12
基本技能 9 微生物最大或然数测定技术(MPN 法)	13
基本技能 10 微生物接种技术	14
基本技能 11 微生物菌种保藏技术	15

第二篇 学生实验

实验一 油镜的使用和细菌显微形态的观察	19
实验二 细菌的染色和细胞构造的观察	27
实验三 微生物细胞大小和数量的测定	36
实验四 放线菌和真菌的形态观察	41
实验五 培养基的配制和灭菌	47
实验六 微生物的分离、纯化和保藏	54
实验七 啤酒酵母分批培养时生长曲线的测定	67
实验八 甜酒酿发酵及酒药中功能微生物的分离	70
实验九 微生物的生理生化反应	77

实验十 环境条件对微生物生长的影响	84
实验十一 水体中功能微生物菌群的数量测定	89
实验十二 泡菜的发酵	97
实验十三 细菌间的接合	103
实验十四 致突变物的检测 (Ames 试验)	107
实验十五 细菌分离株 16S rDNA 序列的测定及其系统发育分析	113
实验十六 不依赖培养的细菌种群结构分析	118
实验十七 噬菌体效价的测定	124
实验十八 细菌内毒素的定性检测	128
附录 实验报告	133
参考文献	159

微生物学实验室守则

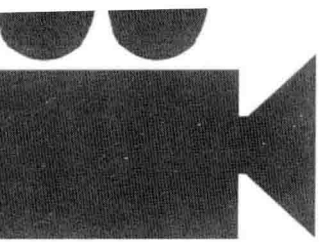
1. 实验前须充分预习,明确实验目的,了解实验内容,观看技能微视频,做到心中有数。
2. 进实验室须穿实验服,不带入与实验无关的物品。
3. 按时进入实验室,不得迟到。
4. 老师集中讲解实验要点时专心听讲,不懂的及时提问。
5. 实验开始前清点实验台上物品,结束后按老师要求放回。
6. 实验时认真操作,仔细观察,及时记录。
7. 对微生物的形态构造进行记录时须用铅笔,线条要平滑,粗细要均一,对各细胞结构应作简要注释。
8. 严格遵守各项操作规程,特别是显微镜用完后必须将镜油擦干净。
9. 独立完成各项实验,不懂的及时请教,不得窃取别人的实验成果。
10. 实验过程中不高声喧哗,尽量少走动,保持实验室安静。
11. 废弃物放于指定地点,不随地丢垃圾,保持实验室整洁。
12. 注意安全,特别要注意酒精灯火焰和高温蒸汽以及被它们加热过的物品,以防烫伤;处理玻璃器具时要小心,以防割伤划伤。长头发同学最好将长发盘起,以防被火焰烧焦。若体表遭微生物沾污,须清洗后进行消毒处理(如用酒精棉球擦拭)。
13. 节约水电,操作结束后及时切断电源,熄灭酒精灯。
14. 爱护公物,如有损坏,及时报告老师,凡属责任事故的,按有关规定赔偿。
15. 实验完毕,整理好实验台上的各种器材和试剂,清洗用过的各种器具,并放于指定位置,注意要把各种标记清洗干净,把标签纸刮掉。
16. 实验结束后,必须待指导老师同意,方能离开实验室。
17. 未经允许,实验室内的各类物品(包括微生物菌种)不准带离实验室。
18. 值日生须将台面、地面、水槽整理或打扫干净,把共用物品清洗干净。
19. 按时上交实验报告,实验报告应整洁,有完整的格式。
20. 若有意外发生,及时报告指导老师。



第一篇

基本技能

- 基本技能 1 显微镜(油镜)的使用技术
- 基本技能 2 微生物涂片和染色技术
- 基本技能 3 无菌取样技术
- 基本技能 4 微生物细胞大小的测量技术
- 基本技能 5 显微直接计数技术
- 基本技能 6 培养基配制技术
- 基本技能 7 灭菌技术
- 基本技能 8 微生物分离纯化技术
- 基本技能 9 微生物最大或然数测定技术(MPN 法)
- 基本技能 10 微生物接种技术
- 基本技能 11 微生物菌种保藏技术



基本技能 1

显微镜(油镜)的使用技术

