



普通高等院校规划教材

★ 孙 燕 主编

微生物学实验指导

LABORATORY MANUAL FOR
MICROBIOLOGY

陕西师范大学出版总社



普通高等院校规划教材

微生物学实验指导

主编 孙 燕

编者 梁 健 魏希颖 李 治

陕西师范大学出版总社

图书代号 JC15N0581

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验指导 / 孙燕主编. —西安: 陕西师范大学出版总社有限公司, 2015. 8

ISBN 978-7-5613-8229-5

I. ①微… II. ①孙… III. ①微生物学—实验
IV. ①Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 181216 号

微生物学实验指导

WEISHENGWUXUE SHIYAN ZHIDAO

孙 燕 主编

责任编辑 / 田均利

责任校对 / 李 恒

封面设计 / 鼎新设计

出版发行 / 陕西师范大学出版总社

(西安市长安南路 199 号 邮编 710062)

网 址 / <http://www.snupg.com>

经 销 / 新华书店

印 刷 / 兴平市博闻印务有限公司

开 本 / 787mm × 1092mm 1/16

印 张 / 11.25

字 数 / 233 千

版 次 / 2015 年 8 月第 1 版

印 次 / 2015 年 8 月第 1 次印刷

书 号 / ISBN 978-7-5613-8229-5

定 价 / 28.00 元

读者购书、书店添货或发现印刷装订问题,请与本社高教出版分社联系。

电 话:(029)85303622(传真) 85307864



前言

微生物学实验技术是微生物学不可分割的一部分,它包括显微技术、染色技术、无菌操作技术和接种培养技术等多个方面。随着生命科学的不断进步,尤其是分子生物学技术的迅猛发展,以及各学科之间的交叉渗透,现代微生物学实验技术内涵更广、发展更快,覆盖了微生物学、病毒学、分子生物学和免疫学等多学科技术。微生物学实验成为帮助学生认识和理解微生物学基本知识和规律,学习和掌握微生物技术的重要手段。因此,微生物学实验课程是本科生十分重要的基础实验课程之一。

《微生物学实验指导》一书为配合微生物理论课和实验教学编写。它的主要目的是指导学生掌握基本的微生物学实验技能,同时让学生了解和掌握先进的技术和方法。本书主要内容包括“基础实验”和“综合型及研究型实验”两个部分。第一部分包括“无菌技术”“分离培养”“制片及染色”“常用生理生化实验”“微生物分子鉴定”和“基础免疫学技术”等相关内容,重点在于训练学生掌握微生物学基本实验技能。第二部分主要以我校教师科研项目为依托,与微生物的实际应用相结合,进行微生物学的综合创新实验训练。内容包括“有应用前景菌株的筛选”“微生物代谢产物的研究”和“微生物生态学研究”等方面,重点在于培养学生自主规划实验的能力、发现和分析解决问题的能力,这些综合训练内容有助于提高学生的科研思维能力和实践创新能力。

限于编者的学识和水平,本书尚有不妥甚至错误的地方,还望广大同行和各位同学在使用过程中提出宝贵的批评和修改意见,以待再版时进一步改进。

编者

2015年7月

Mulu 目录

第一部分 基础实验

实验 1	微生物学实验室规则及注意事项	2
实验 2	培养基的配制与消毒灭菌	4
实验 3	校园环境和人体表面的微生物检测	12
实验 4	细菌的制片和简单染色	17
实验 5	细菌的革兰氏染色	22
实验 6	细菌的芽孢、荚膜、鞭毛染色	25
实验 7	酵母菌形态观察及测定	29
实验 8	霉菌的形态观察	35
实验 9	病毒的电子显微镜样品制备及观察	38
实验 10	噬菌体的分离及效价测定	42
实验 11	物理和化学因素对微生物生长的影响	47
实验 12	生长谱法测定微生物的营养需求	52
实验 13	厌氧菌的分离和培养	55
实验 14	细菌的生理生化试验	58
实验 15	微生物的物理和化学诱变育种	63
实验 16	酵母菌营养缺陷型的筛选	67
实验 17	细菌的抗药性突变株筛选	70
实验 18	Ames 试验	73
实验 19	微生物的分子鉴定	77
实验 20	凝集试验和双向免疫扩散试验	80

实验 21	抗原与免疫血清的制备	83
实验 22	酶联免疫吸附试验	86
实验 23	免疫印迹试验	90

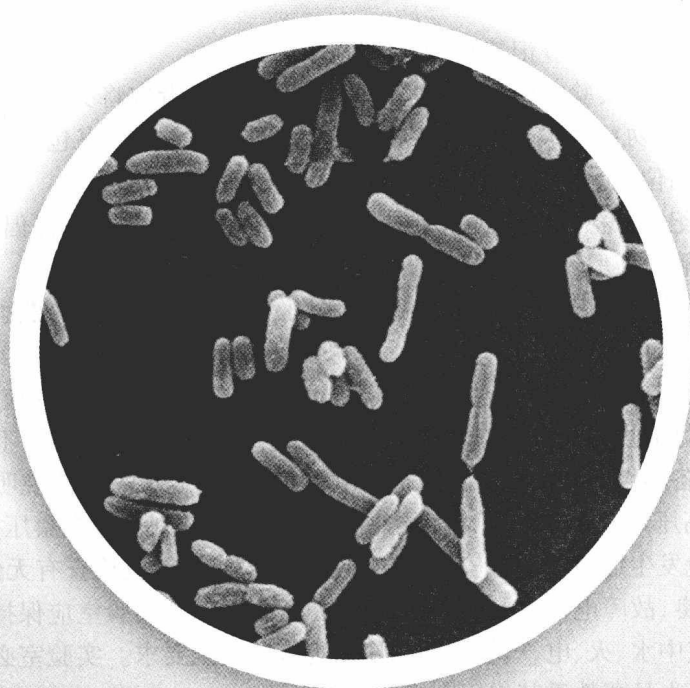
第二部分 综合型及研究型实验

实验 1	产表面活性剂生防菌的分离	95
实验 2	植物内生菌的分离	98
实验 3	产环脂肽的荧光性假单胞菌的分子筛选	101
实验 4	生防荧光性假单胞菌的菌种鉴定	106
实验 5	抗多重耐药菌的抗菌肽筛选	109
实验 6	植物内生真菌抑菌能力的测定	112
实验 7	化肥施用对土壤微生物氮素生理群组成的影响	115
实验 8	生防菌的生长曲线测定	121
实验 9	草本植物根际土壤细菌群落结构的 T-RFLP 分析	123
实验 10	不同草地群落土壤微生物生物量碳特征	127
实验 11	吸烟者与非吸烟者肠道细菌群落结构的 DGGE 分析	131
实验 12	不同石油污染条件下土壤细菌群落的时空结构	137
实验 13	肠道菌群的 16S rDNA 文库构建及菌群结构解析	143
实验 14	人体肠道益生菌的定量检测	149

附录

附录 I	常用培养基的配制	154
附录 II	染色液和溶液的配制	159
附录 III	常见微生物名称	163
附录 IV	常用计量单位	171
附录 V	常用菌种保藏机构信息	172
附录 VI	最大或然数表	173

第一部分 基础实验



微生物学实验室规则 及注意事项

微生物学实验课是微生物学及其相关专业学生学习和理解微生物学的基本知识和基础理论,锻炼和掌握微生物学实验基本操作技能的重要教学环节。为了圆满完成实验课的教学任务,实现教学目的,进入微生物学实验室从事相关实验的学生及研究人员均应谨记如下实验室规则及注意事项:

①实验室登记:实验课前登记签到,若有事应事先请假。

②实验室着装:进入实验室应着干净整洁的实验服,长发者应将头发束于脑后或实验帽内,实验操作人员最好勿穿高跟鞋,严禁穿拖鞋进入实验室。衣物、书包和其他杂物应放置在远离实验台的适当位置。

③实验室课堂纪律:遵守课堂纪律,维护课堂秩序。不迟到早退。提倡独立思考,合作研究,勿喧哗,忌闲聊。实验室内禁止饮食和吸烟。

④实验前准备:实验前应预习实验内容,了解实验目的、原理和方法,熟悉实验室环境。

⑤实验室安全:严格执行实验室各项规章制度,养成良好的实验习惯。实验室药品和试剂均应标签完整。实验前后须对个人和操作环境进行消毒处理,有条件的应在无菌室中、超净工作台上和酒精灯前进行无菌操作。对于实验室的仪器设备谨记“不懂不动”的原则,应在掌握实验仪器设备的性能和使用方法前提下规范使用(养成事先阅读说明书的好习惯)。使用压力容器(如高压蒸汽灭菌锅等)时,须熟悉操作要求,时刻注意观察压力表,控制在规定压力范围内,以免发生危险。注意安全用电,电气设备使用前应检查有无绝缘损坏、接触不良或地线接地不良,故障电器应及时标记,并尽快上报维修。实验室应保持良好的通风条件,时刻注意实验室中水、火、电、气等方面的使用规范和安全要求。实验室必须配备有效期内的消防器材,实验人员要熟悉其使用方法。

⑥实验室环境卫生:实验中产生的废液、废物应集中处理,不得任意排放(严禁弃物于洗涤槽内)。所有废弃的微生物培养物以及被污染的玻璃器皿及阳性的检验标本,均应先消毒或灭菌处理(消毒水泡过夜,煮沸或高压蒸汽灭菌等)后再清洗处置,有毒易污染的实验废液应倒入专门的废液回收器内。实验器具用完后应及时清洁并归位,玻璃器皿等容器应洗净倒置,摆放于固定位置。

⑦实验课组织:分组实验应该安排实验组长,其职责是组织实验活动,收发实验报告,进

➤ ➤ ➤ 实验1 微生物学实验室规则及注意事项

行教学沟通,安排值日。值日生负责各实验台的卫生,打扫并保持实验室环境卫生,倾倒垃圾,离开实验室前检查水、火、电、气及门窗等方面安全。

【思考题】

如果实验室发生了紧急事故,如火灾、有毒有害试剂泄漏的情况,该如何处理?

培养基的配制与消毒灭菌

【实验原理】

培养基是人工配制的适合微生物生长繁殖或产生代谢产物的营养基质。培养基的配制必须满足微生物需要的六大类营养物质(碳源、氮源、水、无机盐、生长因子和能源)。培养基类型多样,依物理状态可分为液体培养基、固体培养基和半固体培养基;依组成成分可分为天然培养基、组合培养基和半组合培养基;依实际用途可分为基础培养基、加富培养基、选择性培养基和鉴别性培养基。

固体培养基、半固体培养基和液体培养基三者的主要区别在于凝固剂(通常是琼脂)的使用量,固体培养基琼脂含量一般为1.5%~2.0%,半固体培养基为0.2%~0.7%,液体培养基为0。固体培养基适合于微生物的分离、鉴定、活菌计数和菌种保藏等;半固体培养基常用于观察微生物的运动特征、发酵特性研究、噬菌体效价测定以及促进厌氧生长等;液体培养基常用来大规模工业化繁殖微生物,以及实验室的各种生物化学分析。

培养基配制好后应该立即消毒灭菌,以防性质变化。消毒是采用较温和的理化因素,仅杀死物体表面或内部的病原微生物,而对被消毒的物体基本无害的措施。灭菌则是采用强烈的理化因素以杀死物体内外包括芽孢和孢子在内的一切微生物,使其永远丧失生长繁殖能力的措施。消毒和灭菌方法须依照实验要求和条件加以选择。

在微生物学研究中,干热灭菌法、高压蒸汽灭菌法、紫外线照射灭菌法和微孔滤膜过滤除菌法是最为常用的灭菌法。干热灭菌法包括烘箱内热空气法和火焰焚烧法,前者灭菌指标是160~170℃,1.5~2 h,适宜于金属及玻璃器皿等的灭菌;后者是一种最彻底的干热灭菌法,接种环、针、试管口、疫病生物尸体等均可采用此法。高压蒸汽灭菌法是最为常用的湿热灭菌法,其灭菌指标为121.3℃(压强为0.10 MPa或1.05 kg/cm²),维持15~20 min(也可115℃,维持35 min)。高压蒸汽灭菌法适合于对培养基及多种器材和物料的灭菌。紫外线照射灭菌法属于利用电磁辐射作用灭菌。其中200~300 nm波长的紫外线杀菌作用最强,常用于空气和物体表面灭菌。微孔滤膜过滤除菌法属于利用过滤作用除菌,适用于不耐高温的液体材料等的除菌。

【实验目的】

①理解培养基的概念及其配制原理。

②掌握配制培养基的一般方法和步骤。

③了解实验室常用灭菌方法;掌握干热灭菌法和高压蒸汽灭菌法。

【实验器材】

1. 培养基的配制

①药品试剂:牛肉膏、蛋白胨、NaCl、琼脂、1mol/L NaOH 溶液、1mol/L HCl 溶液。

②仪器和器具:电热鼓风干燥箱、高压蒸汽灭菌锅、恒温培养箱、调温电炉、电子天平、玻璃烧杯、刻度搪瓷杯、三角瓶、量筒、培养基分装漏斗、试管、滴管、玻棒、称量纸、药匙、精密 pH 试纸(5.5~9.0)、牛皮纸、普通棉花、麻绳、铁丝框和记号笔等。

2. 干热灭菌法

电热鼓风干燥箱、试管、吸管、培养皿、三角烧瓶等。

3. 高压蒸汽灭菌法

牛肉膏蛋白胨培养基、培养皿、滴管和高压蒸汽灭菌锅等。

4. 紫外线照射灭菌法

牛肉膏蛋白胨培养基平板、紫外线灯(15 W)和超净工作台。

5. 微孔滤膜过滤除菌法

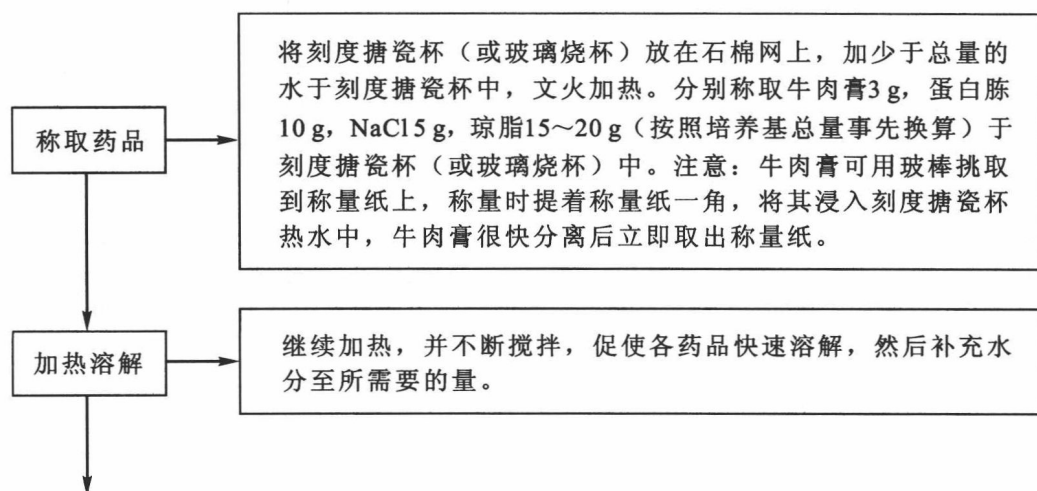
①药品试剂:2%的葡萄糖溶液。

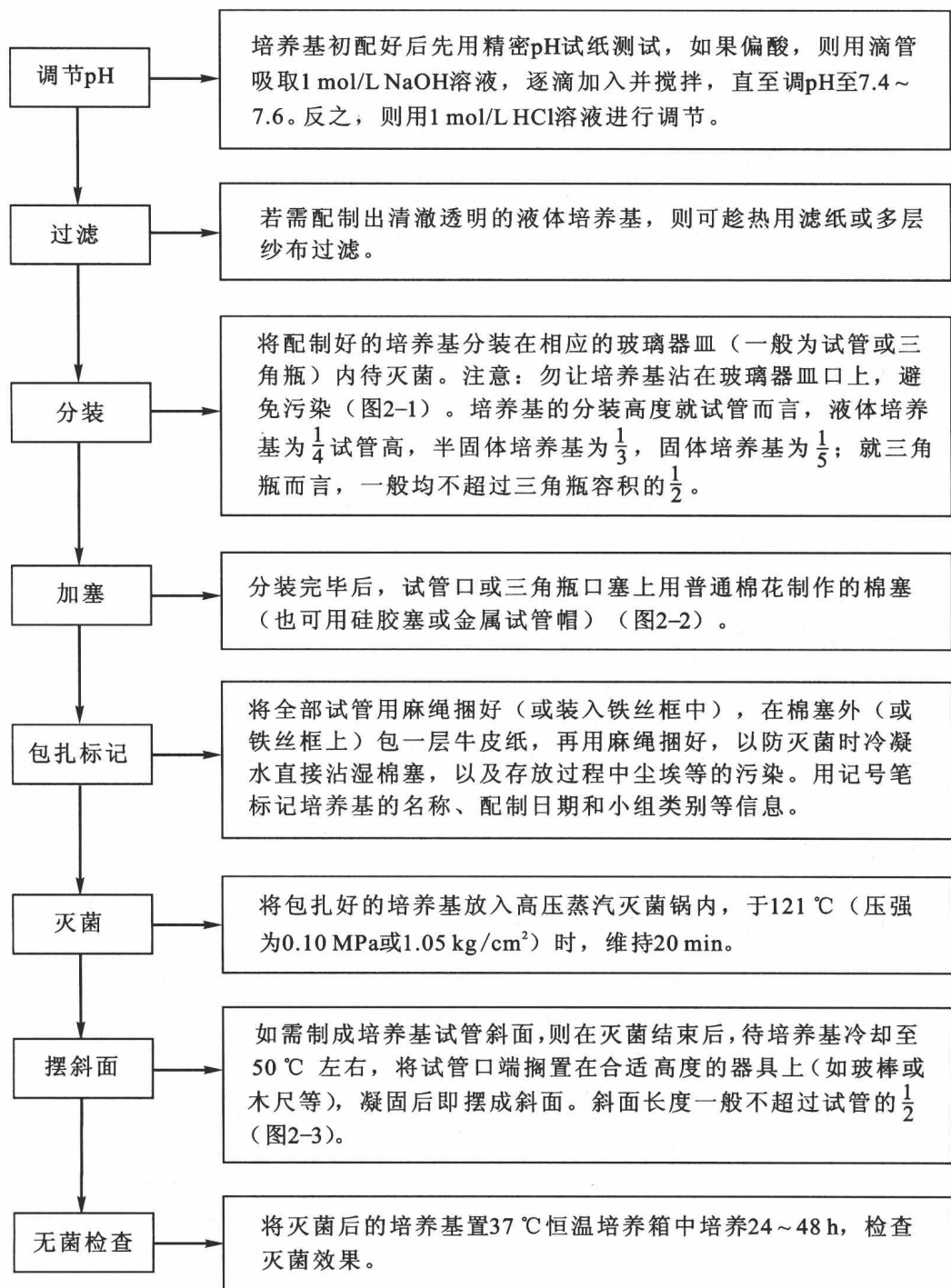
②培养基:牛肉膏蛋白胨培养基平板。

③仪器和器具:高压蒸汽灭菌锅、恒温培养箱、注射器、微孔滤膜过滤器、0.22 μm 微孔滤膜、无菌试管、镊子和无菌玻璃涂布器等。

【实验步骤】

1. 牛肉膏蛋白胨固体培养基的配制





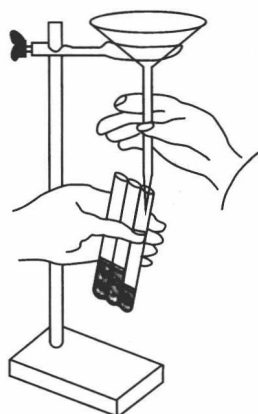


图 2-1 培养基的分装

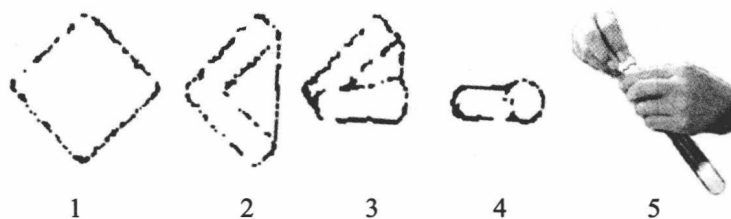


图 2-2 试管棉塞制作方法

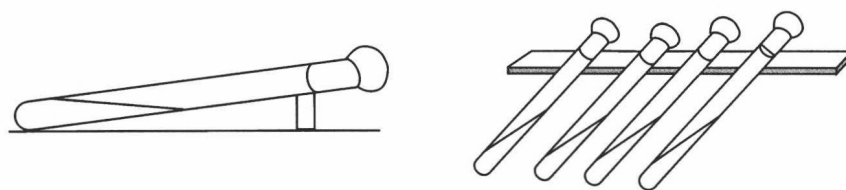
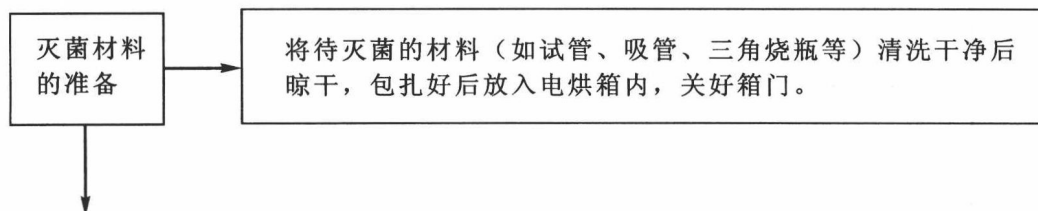
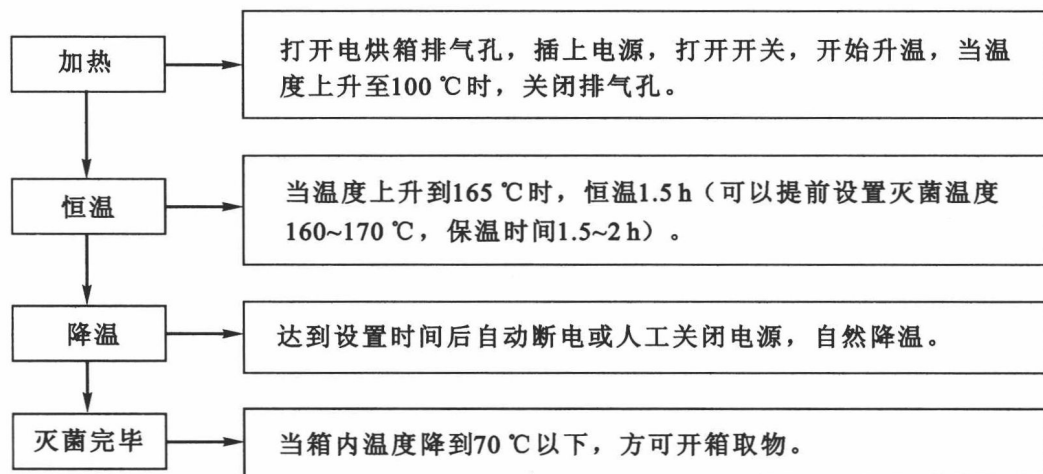


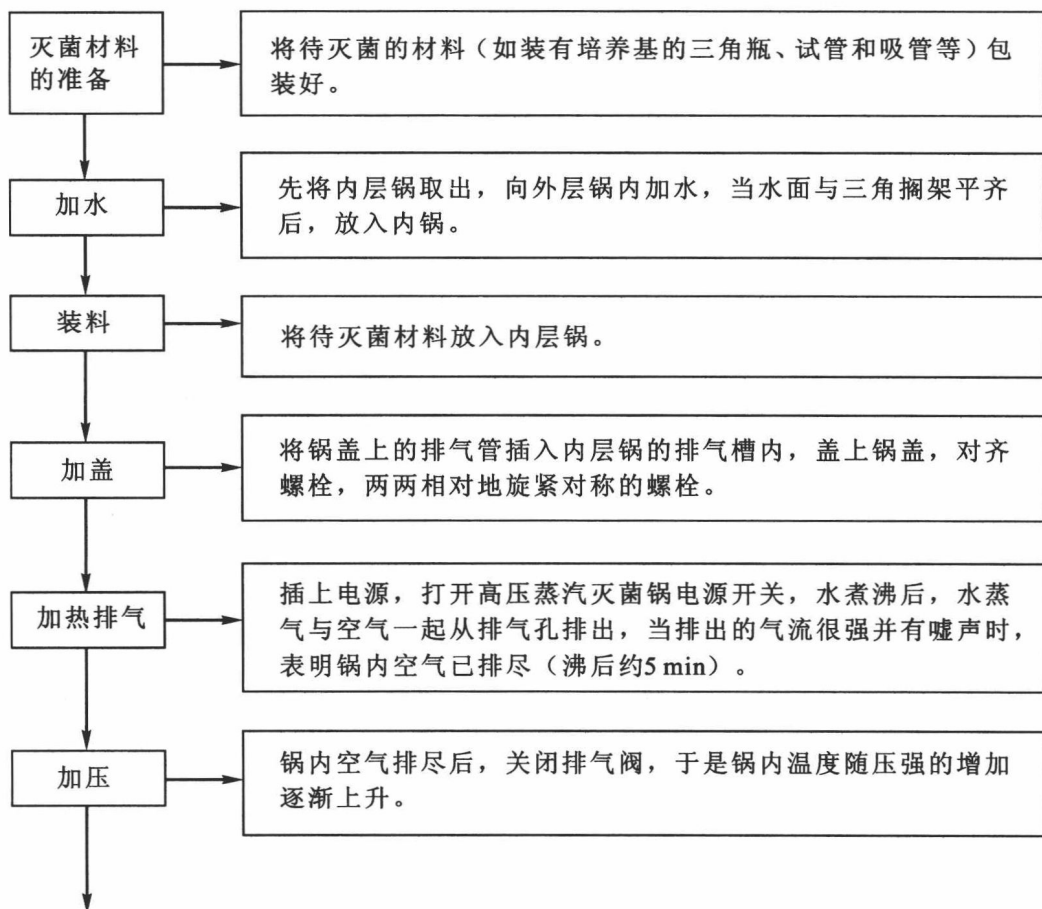
图 2-3 试管斜面的摆放

2. 干热灭菌法

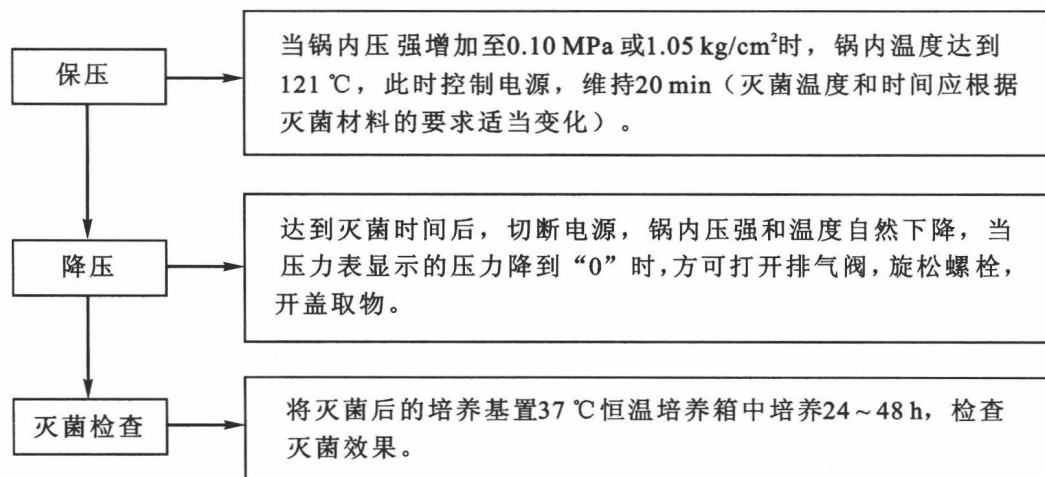




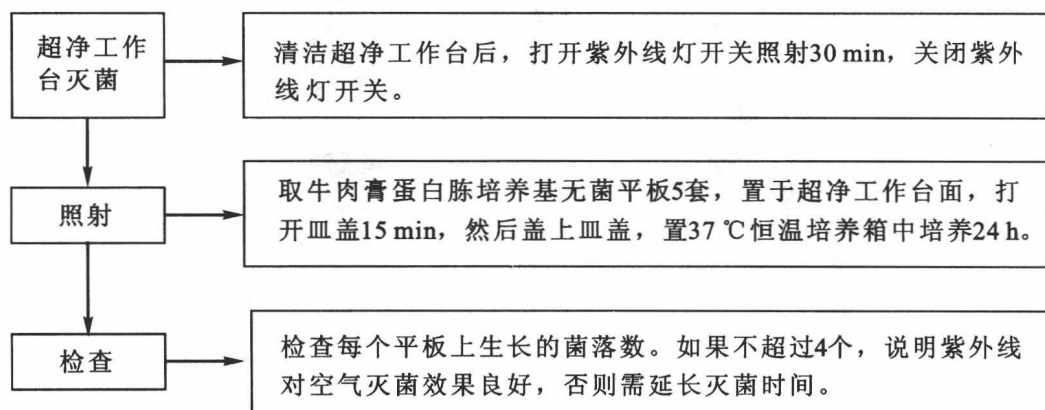
3. 高压蒸汽灭菌法



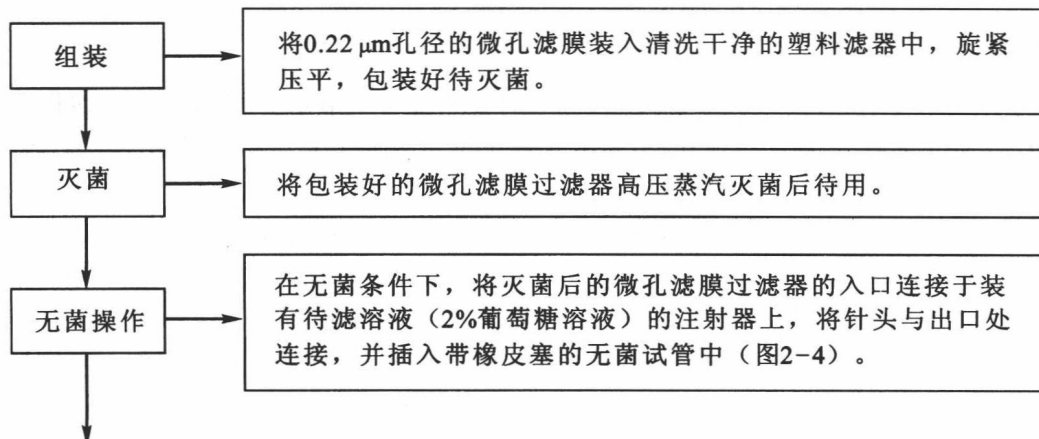
实验2 培养基的配制与消毒灭菌



4. 紫外线照射灭菌法



5. 微孔滤膜过滤除菌法



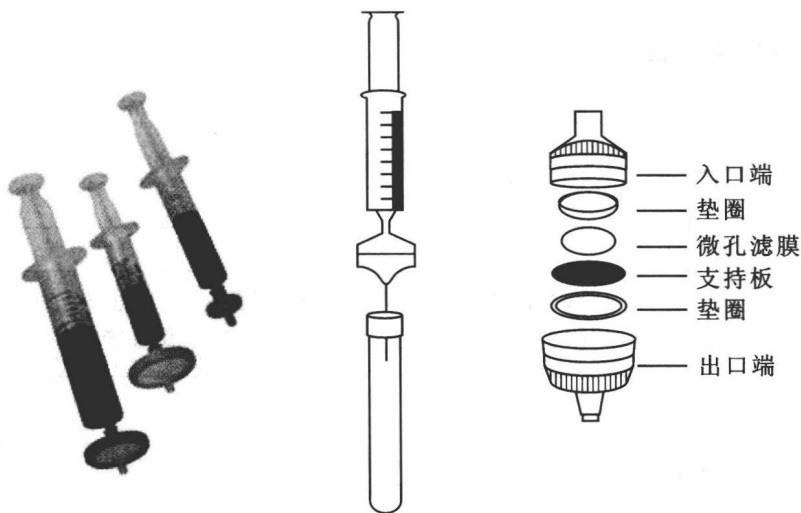
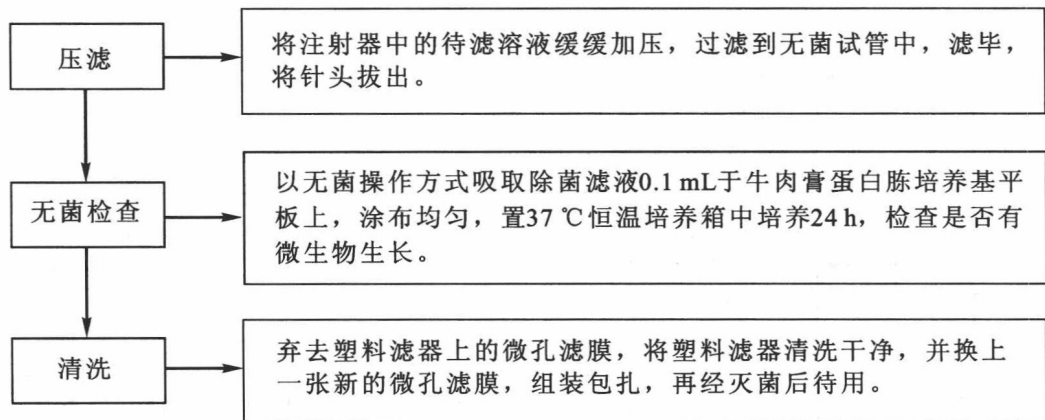


图 2-4 微孔滤膜过滤器

【注意事项】

①配制培养基时，蛋白胨极易吸潮，称取时要迅速。调节培养基 pH 时，要缓慢加入 NaOH 或 HCl 溶液，边滴加边搅拌，不要调过头，以免影响培养基中离子组成。分装培养基时，切勿使培养基沾到管（瓶）口，以免污染棉塞。

②干热灭菌时，物品不要摆得太拥挤，以免妨碍空气流通；灭菌物品不要接触灭菌箱内壁，以免烤焦包装材料引起着火。注意检查和严防恒温调节失控，以免造成安全事故。干燥箱内温度降到 70℃ 以下时方可打开箱门。否则，骤然降温可能引起玻璃器皿炸裂。

③高压蒸汽灭菌时，注意观察外锅是否加水及水量是否合适（水面一般与三角搁架平齐），以防干烧炸裂。内层锅物品不要摆得太拥挤，以免妨碍蒸汽流通。管（瓶）口不要挨着锅内壁，以免冷凝水淋湿包口纸及下方棉塞。加热排气时，锅内冷空气必须完全排尽方可关

上排气阀。灭菌时间到后关闭电源,自然降温,当压力表显示压力降到“0”时,才能打开排气阀,开盖取物,否则由于锅内压力骤降会导致培养基冲出试管或三角瓶口造成培养基污染,甚至人员烫伤事故。

④紫外线灭菌时,注意不要直视紫外灯光,勿在紫外光下工作,以免受到损伤。

⑤微孔滤膜过滤时,压滤过程中不要用力过猛过快,以免将细菌挤压过滤膜。

【实验报告】

①描述牛肉膏蛋白胨固体培养基的配制过程及注意事项。

②比较几种灭菌方法的原理。

【思考题】

①培养基配制完成后为何需要立即灭菌?如何检测培养基的灭菌效果?

②微生物学实验所用的棉塞为何不能用脱脂棉?如何判定所做试管棉塞是否符合要求?

③高压蒸汽灭菌时为何要排尽锅内空气?为何灭菌结束后要待压力表读数回到“0”后,才能打开排气阀,开盖取物?

④利用电烘箱灭菌,为何灭菌温度和时间均比高压蒸汽灭菌法长?