



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

微生物学 实验教程

第3版



主编 周德庆 徐德强



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

013031210



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

微生物学 实验教程

Weishengwuxue Shiyān Jiāochéng

第3版

主编 周德庆 徐德强

编著者（以写作量为序）

胡宝龙 祖若夫 周德庆 徐德强

范长胜 宋大新 全哲学 肖义平

丁晓明 郭惠民 王英明



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING



北航

C1636638



013180810

郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任；构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人进行严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话 (010) 58581897 58582371 58581879
反盗版举报传真 (010) 82086060
反盗版举报邮箱 dd@hep.com.cn
通信地址 北京市西城区德外大街4号 高等教育出版社法务部
邮政编码 100120

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学实验教程 / 周德庆, 徐德强主编. --3版.
--北京: 高等教育出版社, 2013.3
ISBN 978-7-04-036938-0

I. ①微… II. ①周… ②徐… 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 (2013) 第 031244 号

策划编辑 赵晓媛

责任编辑 赵晓媛

封面设计 张楠

责任印制 尤静

出版发行 高等教育出版社
社址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印刷 化学工业出版社印刷厂
开本 850mm×1168mm 1/16
印张 23.75
字数 560千字
购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
版 次 1993年1月第1版
2013年3月第3版
印 次 2013年3月第1次印刷
定 价 35.00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 36938-00

第3版前言

微生物学是生命科学中的一门最有自己独特实验方法的学科。一个多世纪以来,它的迅猛发展是紧紧依靠研究方法的不断创新和生产技术持续革新而取得的。如果说现代微生物学的进步是因为学者们不断地“站在巨人肩膀上”的结果,那么,现代微生物学实验方法的进步就需要学者们不断自觉地“站在巨人手掌上”才能达到。

本书第2版列入教育部的“普通高等教育‘十一五’国家级规划教材”。自2006年至今,已连续印刷了10次,累计印数达数万册,在同行中有较大影响。为迅速跟上学科发展的步伐,为更好服务于广大同行和读者,我们深感有责任及时对第2版作进一步的修订,主要通过删繁就简、削枝强干和去陈推新,以达到紧跟前沿、提高质量和更好地“站在巨人手掌上”的目标。

本版力图在保留前版主要内容和优点的基础上,删去一些选用频率较低、相对次要的实验(20个);重点增强了现代分子微生物学(7个)和微生物遗传学实验(3个),适量增加几个环境微生物学、微生物生理学和免疫学实验;此外,还对原有7个实验的内容作了更新和提高,从而使本版在不增加篇幅的前提下,做到数量适中(共有实验98个,包括基础实验65个和任选实验33个),重点更加突出,内容更加全面,质量更为提高。

本书是复旦大学数代教师在微生物学实验教学中长期实践经验的总汇。在本版的编写过程中,除继续发挥老、中、青教师的各自专长外,还特别注意发掘一些青年教师在现代分子微生物学实验领域的特长,由此也使本书更显特色。在与本书配套的数字课程网站中,还载有一套肖义平等老师制作和整理的相关图像资料,可供学习参考。

本书的出版,得到了高等教育出版社生命科学与医学出版事业部领导的大力支持和王莉等编辑的具体指导和精心加工;此外,我院乔守怡教授也长期关心和支持本教材的建设。在此,我们代表全体编著者向他们表示诚挚的谢意!

周德庆 徐德强

于复旦大学生命科学学院

2012.9.1

第2版前言

本书首版自复旦大学出版社于1993年正式出版至今,已有10余年。这是一本凝聚我专业数代教师40余年来教学经验的总结,具有历史悠久、内容丰富、特色鲜明、定位明确和易教易学等优点。该书出版后,受到全国同行的欢迎和广泛选用,至今还经常收到求购和要求再版的信件。

由于学科的发展及我校新一代教师的成长,10余年来,我们在教学和科学研究中又累积了不少新内容和新经验,从而为本书第2版的出版提供了良好的物质基础和精神准备;同时,由于理论课教材《微生物学教程》(第2版)在全国同行中被广泛选用和获得较好反响,也为这本配套实验教材的出版提出了要求和创造了有利条件。

本教材共安排了104个实验,包括76个基础实验和28个任选实验,内容比第1版丰富得多。其中有不少实验是我们通过原创或革新等措施而成,形成了一批设计巧妙、条件简单、易于掌握和便于推广的特色实验,如四大类微生物菌落的识别、真菌单孢子分离、乳酸菌和双歧杆菌的简便快速计数法、厌氧菌的针筒培养法、根霉的假根观察、用侧臂试管测定细菌的生长曲线,以及改良的霉菌载片培养、划线分离技术和芽孢染色法等。通过讲解和学习这类自创实验,不仅可活跃教学气氛和提高学习效果,还可激发同学创新欲望和培养他们的创新能力。

本书是一份集体创作。编写过程中,得到我院副院长乔守怡教授的关心和支持,并受到高等教育出版社领导的大力支持和吴雪梅副编审的具体指导。在此,谨对他们表示由衷的感谢。

最后,欢迎全国同行和新老读者随时对本书提出宝贵的意见和建议,以臻逐步完善和提高。

周德庆

于复旦大学生命科学学院
微生物学和微生物工程系

2005. 4. 15

第1版前言

微生物学是生物学中第一个建立起一套自己特有实验技术的学科。随着时代的进步和科技的发展,微生物学在其原有的一些经典实验技术的基础上,又获得了极大的丰富和飞速的发展。今天,微生物学实验技术已渗透到现代生命科学的各分支领域,在推动有关研究和应用中正发挥着越来越重要的作用。

微生物学实验课是培养未来生命科学工作者掌握有关基本实验方法和技术的一门必修课。良好的教材是提高实验课质量的先决条件之一。在长期的教学实践中,我们认为在微生物学实验教学和教材编写中均应努力贯彻“培养兴趣,严格要求;操作为主,验证为辅;重点技术,反复实践;善于活用,巧于动手”等原则。

本书是在我们长期使用的讲义的基础上加以适当修改和充实而成的。在编写过程中,我们力求使它成为一本内容较全面、技术较完整、体系较新颖、编写有特色的基础微生物学实验教程。在“教程”这一总目标下,我们按一学期一般有20个教学周的常规,把第一部分的59个“基本实验”按周编排成19套(另一周留作考试用),每套都有一个主题,围绕主题按主次开设几个可供选择的实验。这不但有利于全学期教学内容和基本技术的均衡安排,而且还为周学时差别较大的不同学校提供了一个选择的参考。其次,为了让有余力的学生或有条件的学校开展兴趣小组活动,我们还特意安排了一组“任选实验”作为教程的第二部分,其内容都是一些条件简便、联系实际、有利于培养兴趣和训练综合动手能力的实验。

本书的出版为我们创造了一个与国内同行进行实验教材交流的良好机会。我们热切地期待广大青年学生和同行专家们对本书提出各种批评和建议。

周德庆

1992.3.8

实验须知

微生物学实验课是一门操作技能较强的课程。通过本课程学习,要求学生牢固建立无菌概念,掌握微生物实验的一套基本操作技术;树立严谨、求实的科学态度,提高观察、分析问题和解决问题的能力;树立勤俭节约、爱护公物、相互协作的优良作风。

为了提高教学效果,保证实验的质量和实验室的安全,我们根据微生物实验工作的特点提出如下几点注意事项:

1. 每次实验前必须充分预习实验教材,以了解实验的目的、原理和方法。初步熟悉实验操作中的主要步骤和环节,对整个实验的安排做到先后有序、有条不紊和避免差错。

2. 非必要的物品不要带进实验室,必须带进的物品(包括帽子、围巾等)应放在不影响实验操作的地方。

3. 每次实验前须用湿布擦净台面,必要时可用0.1%新洁尔灭溶液擦。实验前要洗手,以减少染菌的概率。

4. 微生物实验中最重要的一环,就是要严格地进行无菌操作,防止杂菌污染。为此,在实验过程中,每个人要严格做到以下5点:

(1) 操作时要预防空气对流:在进行微生物实验操作时,要关闭门窗,以防止空气对流。

(2) 接种时不要走动和讲话:接种时尽量不要走动和讲话,以免因尘埃飞扬和唾沫四溅而导致杂菌污染。

(3) 含菌器具要消毒后清洗:凡用过的带菌移液管、滴管或涂布棒等,在实验后应立即投入5%石炭酸或其他消毒液中浸泡20 min,然后再取出清洗,以免污染环境。

(4) 含培养物的器皿要杀菌后清洗:在清洗带菌的培养皿、三角烧瓶或试管等之前,应先煮沸10 min或进行加压蒸汽灭菌。

(5) 要穿干净的白色工作服:微生物学工作者在进行实验操作时应穿上白色工作服,离开时脱去,并经常洗涤以保持清洁。

5. 凡须进行培养的材料,都应注明菌名、接种日期及操作者姓名(或组别),放在指定的温箱中进行培养,按时观察并如实地记录实验结果,按时交实验报告。

6. 实验室内严禁吸烟,不准吃东西,切忌用舌舐标签、笔尖或手指等物,以免感染。

7. 节约药品、器材和水、电、煤气。

8. 各种仪器应按要求操作,用毕按原样放置妥当。

9. 实验完毕,立即关闭煤气,整理和擦净台面,离开实验室之前要用肥皂洗手。值日生负责打扫实验室及进行安全检查(门窗、水、电及煤气等)。

10. 冷静处理意外事故:

(1) 打碎玻璃器皿:如遇因打碎玻璃器皿而把菌液洒到桌面或地上时,应立即以5%石炭酸液或0.1%新洁尔灭溶液覆盖,30 min后擦净。若遇皮肤破伤,可先去除玻璃碎片,再用蒸馏水洗净后,涂上碘酒或红汞。

(2) 菌液污染手部皮肤:先用70%乙醇棉花拭净,再用肥皂水洗净。如污染了致病菌,应将手浸于2%~3%来苏尔或0.1%新洁尔灭溶液中,经10~20 min后洗净。

(3) 菌液吸入口中:应立即吐出,并用大量自来水漱口多次,再根据该菌的致病程度做进一步处理:

① 非致病菌:用0.1%高锰酸钾溶液漱口。

② 一般致病菌(葡萄球菌、酿脓链球菌、肺炎链球菌等):用3% H_2O_2 、0.1%高锰酸钾溶液或0.02%米他芬液漱口。

③ 致病菌:如吸入白喉棒杆菌,在用②法处理后,再注射1000 U白喉抗毒素作紧急预防;若吸入伤寒沙门氏菌、痢疾志贺氏菌或霍乱弧菌等肠道致病菌,在经②法处理后,可注射抗生素预防发病。

(4) 衣服或易燃品着火:应先断绝火源或电源,搬走易燃物品(乙醚、汽油等),再用湿布掩盖灭火,或将身体靠墙或着地滚动灭火,必要时可用灭火器。

(5) 皮肤烫伤:可用5%鞣酸、2%苦味酸(苦味酸氨苯甲酸丁酯油膏)或2%龙胆紫液涂抹伤口。

(6) 化学药品灼伤:

① 强酸、溴、氯、磷等酸性药剂:先用大量清水洗涤,再用5% $NaHCO_3$ 或5% $NaOH$ 中和。

② $NaOH$ 、金属钠(钾)、强碱性药剂:先用大量清水洗涤,再用5%硼酸或5%乙酸中和。

③ 石炭酸:用95%乙醇洗涤。

④ 如遇眼睛灼伤:则应先用大量清水冲洗,再根据化学品的性质作分别处理,例如,遇碱灼伤可用5%硼酸洗涤,遇酸灼伤可用5% $NaHCO_3$ 洗涤,在此基础上再滴入1~2滴橄榄油或液体石蜡加以润湿即可。

(周德庆)

实验常用器皿一览表

器皿名称	规格	数量/组
接种环	柄金属杆(22 cm) + 环丝长(8 ~ 9 cm)	1 根
接种针	柄金属杆(22 cm) + 针丝长(8 ~ 9 cm)	1 根
移液管	10 ml/5 ml/1 ml	4 支/20 支
移液管筒	长(36 ~ 38 cm)/直径(6 cm)	1 支
培养皿	9 cm	20 套
培养皿筒(盒)	高(21 cm)/直径(10.5 cm)	2 个
三角烧瓶	250 ml	5 ~ 6 个
三角烧瓶塞(套)	符合口径	5 ~ 6 个
试管	15 mm × 150 mm	40 支
试管帽(塞)	符合口径	40 个
铝制试管架	40 孔	1 个
载玻片	25 mm × 75 mm	15 ~ 20 片
载片培养皿形玻璃搁棒	置 9 cm 培养皿内适宜	3 ~ 5 个
细菌染色载片搁架	置染色废液缸上适宜	1 个
玻璃烧杯	250 ml	1 个
石棉网	14 cm × 14 cm	1 块
量筒	100 ml	1 支
玻璃漏斗	9 cm	1 个
乳胶管		1 根
橡胶管夹		1 个
滴管		5 支
橡皮滴管头		5 个
洗耳球		1 个
玻璃搅拌棒		1 根
菌液涂布棒		3 ~ 5 根
移液枪(各种规格)		各种规格(公用)
杜氏发酵集气小管		10 支
刻度试管	10 ml	5 支
离心管(各种规格)	50 ml/10 ml/5 ml/1 ml	各 2 支
目镜测微尺		1 块(公用)
镜台测微尺		1 块(公用)
镊子	大/小	1 把
微量进样器	25 μl	2 支(公用)
层析缸		公用
染色废液缸		1 个(公用)
显微镜	Nikon 等(有油镜)	1 台(公用)

目 录

实验须知

实验常用器皿一览表

第一部分 基础实验

第一周 环境微生物的检测和菌落识别	3	形成和观察	58
实验 I - 1 - 1 环境中微生物的检测	3	实验 I - 4 - 5 霉菌子囊壳、子囊和子囊孢子的观察	60
实验 I - 1 - 2 斜面接种与培养	8	第五周 培养基的配制、分装和灭菌	63
实验 I - 1 - 3 三点接种与培养	13	实验 I - 5 - 1 通用培养基的配制	63
实验 I - 1 - 4 穿刺接种法和细菌运动力的观察	16	实验 I - 5 - 2 鉴别性培养基的配制	70
实验 I - 1 - 5 四大类微生物菌落形态的识别	18	实验 I - 5 - 3 选择性培养基的配制	73
第二周 细菌染色法和光学显微镜的使用	23	实验 I - 5 - 4 加压蒸汽灭菌法	76
实验 I - 2 - 1 普通光学显微镜的使用	23	实验 I - 5 - 5 培养皿的干热灭菌法	79
实验 I - 2 - 2 细菌的涂片及简单染色法	28	实验 I - 5 - 6 过滤除菌技术	81
实验 I - 2 - 3 革兰氏染色法(经典法)	30	第六周 微生物生长量的测定和生长曲线的绘制	84
实验 I - 2 - 4 革兰氏染色法(三步法)	32	实验 I - 6 - 1 细菌的液体接种法和培养特征的观察	84
实验 I - 2 - 5 显微测微尺的使用	34	实验 I - 6 - 2 细菌生长曲线的测定	88
第三周 细菌的芽孢、荚膜和鞭毛染色法	37	第七周 微生物的显微镜直接计数法	91
实验 I - 3 - 1 芽孢染色法	37	实验 I - 7 - 1 酵母菌和霉菌孢子的直接计数法	91
实验 I - 3 - 2 荚膜染色法	39	实验 I - 7 - 2 细菌细胞的直接计数法	95
实验 I - 3 - 3 鞭毛染色法	41	第八周 微生物的间接计数法	99
实验 I - 3 - 4 相差显微镜的使用	45	实验 I - 8 - 1 平板菌落计数法	99
实验 I - 3 - 5 暗视野显微镜的使用	48	实验 I - 8 - 2 乳酸菌和双歧杆菌的简便快速计数法	103
第四周 放线菌和真菌的培养与形态观察	50	实验 I - 8 - 3 用 MPN 法测定活性污泥中的硝化细菌数	106
实验 I - 4 - 1 放线菌的插片、搭片培养和形态观察	50	第九周 微生物的纯种分离法	110
实验 I - 4 - 2 真菌的载片培养和形态观察	52	实验 I - 9 - 1 用平板划线法分离菌种	110
实验 I - 4 - 3 根霉孢子囊和假根的观察	55	实验 I - 9 - 2 用浇注平板法和涂布平板法分离菌种	113
实验 I - 4 - 4 蓝色犁头霉接合孢子囊的		实验 I - 9 - 3 真菌的单孢子分离法	115

第十周 检测噬菌体的基本实验技术	121
实验 I - 10 - 1 大肠埃希氏菌噬菌体的 分离和纯化	121
实验 I - 10 - 2 噬菌体效价的测定	124
实验 I - 10 - 3 溶原性细菌的检测和 鉴定	128
第十一周 微生物的遗传变异实验	132
实验 I - 11 - 1 紫外线对枯草芽孢 杆菌产生淀粉酶的 诱变效应	132
实验 I - 11 - 2 用梯度平板法筛选大肠 埃希氏菌抗药性 突变株	134
实验 I - 11 - 3 大肠埃希氏菌营养缺陷型 突变株的筛选	137
实验 I - 11 - 4 Ames 试验法	142
实验 I - 11 - 5 细菌的原生质体融合	145
第十二周 物理、化学因素对微生物 生长的影响	150
实验 I - 12 - 1 温度、pH 和渗透压对 微生物生长的影响	150
实验 I - 12 - 2 消毒剂和杀菌剂最低抑制 浓度(MIC)的测定	154
实验 I - 12 - 3 用杯碟法测定抗生素的 效价	157
第十三周 菌种的保藏原理与方法	162
实验 I - 13 - 1 常用的简易保藏法	162
实验 I - 13 - 2 甘油保藏法	164
实验 I - 13 - 3 干燥保藏法	167
实验 I - 13 - 4 冷冻真空干燥保藏法	170

实验 I - 13 - 5 液氮超低温保藏法	173
第十四周 细菌鉴定中的常规和微量 快速生理生化反应	177
实验 I - 14 - 1 若干常规生理生化 反应	177
实验 I - 14 - 2 应用 API - 20E 细菌鉴定 系统鉴定肠杆菌科和部分 其他革兰氏阴性杆菌	182
第十五周 微生物分子生物学 基础实验	188
实验 I - 15 - 1 细菌总 DNA 的小量 制备	188
实验 I - 15 - 2 利用 PCR 技术制备基因 片段	189
实验 I - 15 - 3 蓝白斑筛选技术在基因 克隆中的应用	191
实验 I - 15 - 4 氯化钙法制备大肠 埃希氏菌感受态细胞和 质粒 DNA 的转化	193
实验 I - 15 - 5 重组质粒 DNA 的小量制备 和电泳验证	194
第十六周 血清学反应实验技术	197
实验 I - 16 - 1 免疫血清的制备	197
实验 I - 16 - 2 凝集反应	203
实验 I - 16 - 3 环状沉淀试验	206
实验 I - 16 - 4 用鲎试剂法测定细菌内 毒素	209
实验 I - 16 - 5 双向琼脂扩散沉淀 反应	211

第二部分 任 选 实 验

1. 菌种分离、纯化和筛选技术	217
实验 II - 1 - 1 利用选择性培养基分离 固氮菌、酵母菌和土壤 真菌	217
实验 II - 1 - 2 酸奶的制作和其中 乳酸菌的分离	219
实验 II - 1 - 3 甜酒酿的制作及酒药中 根霉的分离	223
实验 II - 1 - 4 杀虫细菌——苏云金芽孢 杆菌的分离	225

实验 II - 1 - 5 杀虫真菌——白僵菌的 分离	227
实验 II - 1 - 6 酚降解细菌的分离、纯化和 筛选	230
实验 II - 1 - 7 食用菌菌种的分离和 制种技术	236
实验 II - 1 - 8 顽固性放线菌的 筛选法	241
2. 厌氧菌培养技术	245
实验 II - 2 - 1 厌氧罐技术	245

实验 II - 2 - 2 用厌氧袋法分离培养 丙酮丁醇梭菌	248	6. 微生物遗传变异实验技术	302
实验 II - 2 - 3 针筒厌氧培养法	252	实验 II - 6 - 1 转座子 Tn5 的遗传学 效应	302
实验 II - 2 - 4 用亨盖特滚管技术分离 严格厌氧菌	255	实验 II - 6 - 2 <i>lac</i> ⁻ 突变型的互补 测验	306
3. 动、植物病毒实验技术	260	实验 II - 6 - 3 大肠埃希氏菌 λ 噬菌体的 高频转导	311
实验 II - 3 - 1 植物病毒的接种、培养和 定量测定	260	实验 II - 6 - 4 质粒 DNA 转化酵母 细胞	314
实验 II - 3 - 2 动物病毒的鸡胚接种、 培养和病毒滴度测定	263	实验 II - 6 - 5 质粒从大肠埃希氏菌到 链霉菌的接合转移	317
实验 II - 3 - 3 家蚕质型多角体病毒的 培养和分离提纯	266	7. 分子微生物学实验技术	319
4. 水体微生物学检测技术	269	实验 II - 7 - 1 细菌 DNA 中 (G + C) mol% 值的测定	319
实验 II - 4 - 1 水中细菌总数的测定	269	实验 II - 7 - 2 利用 16S rRNA 基因序列 鉴定细菌	325
实验 II - 4 - 2 水中总大肠菌群的 检测	272	实验 II - 7 - 3 利用 ITS 序列鉴定 真菌	328
实验 II - 4 - 3 应用测菌管检测野外 水体中微生物的数量	278	实验 II - 7 - 4 环境样品中微生物群落 结构的分析	331
实验 II - 4 - 4 五日生化需氧量 (<i>BOD</i> ₅) 的 测定	282	8. 免疫学实验技术	335
5. 微生物培养技术	285	实验 II - 8 - 1 巨噬细胞吞噬功能的 测定	335
实验 II - 5 - 1 微生物细胞的固定化 及其应用	285	实验 II - 8 - 2 用间接 ELISA 测定抗 血清的效价	338
实验 II - 5 - 2 培养基的正交设计与 分析	289	参考文献	341
实验 II - 5 - 3 台式自控发酵罐的原理、 构造和使用	295		

附 录

一、若干微生物的学名及其音标	345	十、相对密度与糖度换算表	358
二、酸碱指示剂的配制	349	十一、常用干燥剂	358
三、常用培养基成分	350	十二、十进制倍数和分数的词冠表 (国际制)	359
四、染色液和试剂的配制	353	十三、常用的计量单位	359
五、蒸汽压力与温度的关系	355	十四、洗液的配制	359
六、培养基容积与加压灭菌所需时间	355	十五、标准筛孔对照表	360
七、缓冲液的配制表	355	十六、部分国家的菌种保藏机构名称和 网址信息	361
八、常用消毒剂表	357		
九、市售浓酸和氨水的相对密度和实际 浓度	357		

第一部分 基础实验

第一周 环境微生物的检测和菌落识别

微生物资源具有最丰富的物种多样性。在我们周围的环境中存在着各种各样的微生物,其种类繁多,形态多样。在光学显微镜下常见的微生物主要有细菌、放线菌、酵母菌和霉菌四大类。土壤是微生物栖居的“大本营”,它含有的微生物种类和数量最多;有些微生物附着在尘埃上,飘浮于大气中或沉降在各种物体的表面;此外,人和动物体的口腔、呼吸道和消化道及动、植物体表面都存在着各种微生物。可识别它们的方法很多,其中最简便的方法是观察其菌落的形态和特征。此法对菌种筛选、鉴定和杂菌识别等实际工作十分重要。

由于这些微生物个体微小、构造简单、肉眼难以观察到,因此,人们往往忽略了它们的存在,而这些微生物又常常是引起工厂、医院和微生物学实验室中各种实验材料、实验菌种、产品或手术创口等污染的祸根。所以,对初学者来说必须树立“处处有菌”的观念,在实验过程中必须严格实行无菌操作,牢固地树立无菌概念,经常保持桌面及周围环境的清洁,认真掌握好各种操作技术。

微生物的接种技术是微生物学实验室中最为常用的基本操作。接种是指在无菌操作条件下,将某种微生物的纯种移接到适合其生长繁殖的新鲜培养基中或生物体内的一种操作过程。微生物学实验室中常用的接种方法有斜面接种、穿刺接种、三点接种等。根据实验的目的和要求不同可采用相应的接种工具与方法,避免杂菌污染的一切技术措施是确保实验成功的必要条件。

实验 I - 1 - 1 环境中微生物的检测

【目的】

1. 初步了解周围环境中微生物的分布状况。
2. 懂得无菌操作在微生物学实验中的重要性。
3. 学会用无菌操作倒平板培养基的方法。

【概述】

在我们周围的环境中存在着种类繁多、数量庞大的微生物。它们很微小,因此人们的肉眼无法观察到它们的存在。如果将这些微生物通过某种方法接种到适合于它们生长的固体培养基(含有微生物生长所必需的营养物)表面,在适宜的温度下培养一段时间后,少量分散的菌体或孢子就可生长繁殖成一个个肉眼可见的细胞群体,此即为菌落。如果平板上的单菌落是由单个细胞(或单个孢子)生长繁殖而成的,则称为纯菌落;将它移植传代后所得的菌种(如斜面培养物等形式),就称为纯种微生物(或纯培养物)。不同种的微生物可形成大小、形态各异的菌落,因此,根据微生物菌落形态的不同,就可鉴别四大类微生物——细菌、放线菌、酵母菌和霉菌(见实验 I - 1 - 5)。

微生物学是一门实践性很强的学科,熟练地掌握一套微生物实验操作技能是初学者的首要任务。本周所用无菌操作倒平板就是一例。倒平板就是在火焰旁,将三角瓶中已融化的琼脂培养基倒入无菌培养皿中,然后置水平位置待凝,凝固后即成为无菌培养基平板(简称平板),完成此操作的过程称为倒平板。在操作前应认真观察示范操作和示意图,然后进行模拟操作训练,经反复练习,在切实领会操作要点后再开始正式倒平板。

为使初学者能正确与熟练地掌握好首项微生物实验操作技能,我们在微生物学实验教学中总结了一套“一视、二看、三仿、四做”的教学经验,即在学习微生物学无菌操作之前,首先从电视屏上注视实验教学示范操作的片段,然后看清与明白教师规范的操作演示,再由学生用自己的器皿反复模仿(在学生的模拟操作中,教师的巡视与纠错十分重要),直至切实领会操作要领和达到熟能生巧为止,最后让学生进入正式的操作实践,如完成用无菌操作倒平板等。在操作技能的传授中,教师还应及时对学生的模仿或正式倒平板操作进行适当的点评与记录。

【材料和器皿】

- (1) **菌源:**实验室环境中的微生物(如人体口腔、手指、皮肤、头发、土壤和桌面等)。
- (2) **培养基:**牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,马铃薯葡萄糖琼脂培养基(简称PDA),高氏1号琼脂培养基等。
- (3) **器皿:**无菌培养皿若干套。
- (4) **其他:**培养皿,三角瓶,无菌棉签,火柴,煤气灯,标签纸和恒温培养箱等。

【方法和步骤】

1. 融化培养基

可用沸水浴融化,也可用微波炉或压力锅快速融化等。

(1) **沸水浴融化法:**取装有无菌营养琼脂培养基的三角瓶(或大试管)一个,放在沸水浴中煮沸维持,待琼脂彻底融化(从水浴中取出,在不摇动下对着透视光观察为均质无块状液态)后取出,室温下放置待冷。

(2) **微波炉融化法:**若采用微波炉加热融化琼脂培养基,应根据加热功率大小及待融化培养基的量来决定所需时间。否则将导致培养基中水分蒸发过多、或因培养基剧烈沸腾使三角瓶口棉塞冲脱而溢出培养基或有时会引起棉花塞燃烧等事故。

(3) **压力锅融化法:**当需融化的培养基量较多时,用家庭或实验室压力锅融化较快速。方法是将待融化琼脂培养基放入锅内,采用100~105℃的锅压维持5~10 min即可。

(4) **冷却注意点:**融化的琼脂培养基一般采用室温冷却,但在室温较低时切莫用冷水直冲瓶壁某处(会首先导致琼脂凝块现象)。若将融化的培养基直接放在冰凉而热传导很快的瓷砖或不锈钢桌面上,也可因瓶底过冷而产生凝结现象。

2. 清洁桌面

正式倒平板前须清理与清洁桌面,以减少桌面尘埃,降低平板污染的概率。

3. 倒无菌平板

无菌操作倒平板培养基的方法有持皿法和叠皿法两种,以下分别叙述其要点:

(1) 持皿法倒无菌平板(见图 I - 1 - 1 - ①):



图 I - 1 - 1 - ① 持皿法倒无菌平板操作示意图

① 正确放置器皿:正式操作前先将若干套无菌培养皿与融化并冷却至 50 ~ 60 ℃ 的待倒培养基放在煤气灯的左侧,便于操作时取放,同时也可避免在操作时由于动作幅度过大而导致大范围的气流运动,增加污染的概率。

② 点燃煤气灯:点燃煤气灯,并将火焰调至适中(气流量不能太大,以免气流过急引起回火,若回火使灯管内燃烧会有严重烫伤手指等事故发生)。

③ 持皿倒无菌平板步骤

a. 手握瓶底:先用左手握住三角瓶的底部。

b. 瓶口位于无菌操作区:倾斜三角瓶,将瓶口移至煤气灯火中上方位置的火焰旁的无菌操作区域内。

c. 夹住棉花塞:用右手旋松棉塞,然后以右手的小指和手掌边缘夹住棉塞并将其轻轻拔出(切莫将棉塞放在桌面上,以免造成棉塞污染)。

d. 瓶口与瓶塞过火:将瓶口周缘在煤气灯火焰上过火一下(以杀灭可能黏附在瓶口外的杂菌,但切莫让瓶口在火焰中久留,以防瓶口过热而引起爆裂),棉塞也稍过火一下。然后将三角瓶口维持在火焰旁的无菌操作区域内。

e. 瓶移交右手:将斜握在左手中的三角瓶迅速移交(移交中瓶口面向火焰)给右手,仍以右手的拇指、食指和中指握住三角瓶的底部(瓶塞仍夹在右手小指与手掌间)。

f. 瓶口面向火焰:在取培养皿期间,三角瓶口始终维持在火焰无菌操作区域内,同时瓶口面向火焰,在倒平板的整个操作过程中始终如此,严防杂菌污染瓶内培养基。

g. 左手取培养皿:然后用左手托起一套培养皿,用中指、无名指和小指托住培养皿底部,保持水平。

h. 开启培养皿:以食指握住皿盖与作为开启皿盖时的轴,用拇指开启培养皿成一缝,恰好能让三角瓶口伸入。

i. 倒出培养基:随后迅速倒出瓶内融化培养基液至无菌培养皿内。一般倒入量为 12 ~ 15 ml。

j. 水平冷凝:迅速盖上培养皿的盖,置水平位置冷凝。冷凝方法有两种:一种是将平板一个个摊平在桌面上让其迅速冷凝,另一方法是将几个平板叠放成一叠让其缓慢冷凝。前者冷凝较快,在室温较高时常采用。但缺点是有时在皿盖或凝结的培养基表面有冷凝水产生。而后者冷凝速度较慢,常在室温较低时应用,其优点是在缓慢冷凝中平板表面及盖内侧很少有冷凝水微滴形成。

k. 包扎三角瓶:将倒好平板的三角瓶在火焰旁迅速转移至左手,在此操作中仍让瓶口过火