




普通高等教育农业部“十二五”规划教材
全国高等农林院校“十二五”规划教材
国家级实验教学示范中心植物学科系列实验教材

微生物学实验教程

WEISHENGWUXUE
SHIYAN JIAOCHENG

刘雅婷 陈建斌·主编



 中国农业出版社

014036476

Q93-33
41

普通高等教育农业部“十二五”规划教材
全国高等农林院校“十二五”规划教材
国家级实验教学示范中心植物学科系列实验教材

编写委员会

微生物学实验教程

刘雅婷 陈建斌 主编



吴德 (西北农业大学)
邹德 (西北农业大学)
张金文 (甘肃农业大学)
张宪省 (山东农业大学)
陈建斌 (云南农业大学)
周 琴 (南京农业大学)
项文化 (中南林业科技大学)
崔大方 (华南农业大学)
彭方仁 (南京林业大学)
彭明喜 (中国农业出版社)
胡万棣 (湖南农业大学)

中国农业出版社



Q93-33
41

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学实验教程 / 刘雅婷, 陈建斌主编. —北京: 中国农业出版社, 2013. 6

普通高等教育农业部“十二五”规划教材 全国高等农林院校“十二五”规划教材 国家级实验教学示范中心植物学科系列实验教材

ISBN 978-7-109-17964-6

I. ①微… II. ①刘…②陈… 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 124244 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100125)

责任编辑 刘 梁

人民教育出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2013 年 6 月第 1 版 2013 年 6 月北京第 1 次印刷

开本: 720mm×960mm 1/16 印张: 10.5

字数: 182 千字

定价: 19.50 元

刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)



北航

C1723616

内容简介

本教材共 19 个实验，分为三部分，包括基础实验、综合应用实验和自主设计实验。内容涵盖了从经典微生物学实验技术中培养基的配置、分装、灭菌，显微镜的使用，微生物的分离、接种，微生物制片和染色，个体形态学和群体形态观察鉴定，微生物大小数量的测定，到沉淀、凝聚、酶联免疫吸附等现代血清学技术和现代分子生物学基础研究技术，以及环境中微生物检测、葡萄球菌、肠杆菌、表面活性剂降解菌等综合应用实验，还涉及了旨在培养学生创新能力的内容灵活的自主设计实验。为了方便教学，每一实验按照实验目的、实验原理、材料和器皿、步骤与方法、注意事项、结果与分析和思考题 7 个部分来编写，各实验所需的试剂、培养基的配方均列在附录内。

本教材具有内容简洁、体系科学、易教易学等特点，适合于农林、师范以及综合性院校本科和专科生的微生物学实验教学。

国家级实验教学示范中心植物 学科系列实验教材

编写委员会

- 主任** 张宪省 (山东农业大学)
吴伯志 (云南农业大学)
- 副主任** 李滨 (山东农业大学)
崔大方 (华南农业大学)
彭明喜 (中国农业出版社)
- 委员** (按姓名笔画排列)
- 李滨 (山东农业大学)
李保同 (江西农业大学)
杨学举 (河北农业大学)
肖建富 (浙江大学)
吴伯志 (云南农业大学)
邹德堂 (东北农业大学)
张金文 (甘肃农业大学)
张宪省 (山东农业大学)
陈建斌 (云南农业大学)
周琴 (南京农业大学)
项文化 (中南林业科技大学)
崔大方 (华南农业大学)
彭方仁 (南京林业大学)
彭明喜 (中国农业出版社)
蔺万煌 (湖南农业大学)
燕玲 (内蒙古农业大学)

微生物学实验教程

编写人员

主 编 刘雅婷 陈建斌

副主编 魏兰芳 刘旭川 田应华

编 委 (按姓名笔画排列)

田应华 刘旭川 刘晓宇

刘雅婷 李石友 李凌飞

吴毅歆 张以芳 陈建斌

赵 跃 胡永金 钱林东

湛方栋 燕平梅 魏兰芳

志白昊

董新雅

文金米

曾凌燕

谢毅桐

琴 凯

刘文丽

式大峰

刁式凌

喜阳道

献氏商

贺 燕

前言

微生物学 (microbiology) 是生物学的重要分支学科,也是生物学中第一个建立起一套自己特有实验技术的学科,其实验技术和方法为整个生命科学技术发展作出重要的贡献。随着血清学技术和分子生物学技术的诞生和发展,多学科交叉融合,在原有经典实验技术的基础上,微生物学又得到极大丰富和飞速发展,为推动有关研究和应用发挥着越来越重要的作用。

微生物学实验课是培养学生动手能力和独立科研能力、掌握基本实验方法和技术的重要环节,实验教程是指导学生上好实验课程的重要工具。本教材是在学习兄弟院校大量实验教材和实验的基础上编写而成。

参加本教材编写的为云南农业大学、云南农业职业技术学院、太原师范学院、沈阳农业大学等长期从事微生物学教学和科研工作的教师,他们根据本单位的教学特点进行编写。本教材得到云南大学程立忠和云南农业大学杨济龙等同志的协助,在此一并表示感谢!

由于编者水平所限,书中存在疏漏之处,敬请批评指正。

编者

2013年1月

实验十五 环境中微生物检测	70
实验十六 葡萄球菌的分离与鉴定	79
实验十七 肠杆菌科的分离与鉴定	83
实验十八 真菌活性剂降解菌的分离	89
第二部分 自主设计实验	90
实验十九 设计性实验	92
附录	96
附录一 实验室的注意事项	96
附录二 常用仪器设备的使用	100

目录

前言

第一部分 基础实验	1
实验一 显微镜的使用及微生物形态观察	1
实验二 培养基的制作与灭菌	7
实验三 微生物菌落形态观察	9
实验四 微生物的分离培养	16
实验五 微生物的制片和染色技术	21
实验六 微生物大小的测定	28
实验七 微生物生理生化实验	30
实验八 细菌生长曲线的测定	38
实验九 抗菌实验	41
实验十 动物实验	47
实验十一 沉淀和凝集反应	52
实验十二 酶联免疫吸附技术	57
实验十三 16S rDNA 分析	61
实验十四 病毒的分子生物学检测	67
第二部分 综合应用实验	70
实验十五 环境中微生物检测	70
实验十六 葡萄球菌的分离与鉴定	79
实验十七 肠杆菌科的分离与鉴定	83
实验十八 表面活性剂降解菌的分离	89
第三部分 自主设计实验	92
实验十九 设计性实验	92
附录	96
附录一 实验室的注意事项	96
附录二 常用仪器设备的使用	100

附录三 染色液的配制及染色方法 123

附录四 常用溶液及试剂的配制 128

附录五 培养基与培养基的制备 134

附录六 实验用菌种、毒种和细胞株的保存 153

主要参考文献 157

吉倩

1	培养基	份	一	类
1	培养基	份	一	类
2	培养基	份	二	类
3	培养基	份	三	类
4	培养基	份	四	类
5	培养基	份	五	类
6	培养基	份	六	类
7	培养基	份	七	类
8	培养基	份	八	类
9	培养基	份	九	类
10	培养基	份	十	类
11	培养基	份	十一	类
12	培养基	份	十二	类
13	培养基	份	十三	类
14	培养基	份	十四	类
15	培养基	份	十五	类
16	培养基	份	十六	类
17	培养基	份	十七	类
18	培养基	份	十八	类
19	培养基	份	十九	类
20	培养基	份	二十	类
21	培养基	份	二十一	类
22	培养基	份	二十二	类
23	培养基	份	二十三	类
24	培养基	份	二十四	类
25	培养基	份	二十五	类
26	培养基	份	二十六	类
27	培养基	份	二十七	类
28	培养基	份	二十八	类
29	培养基	份	二十九	类
30	培养基	份	三十	类
31	培养基	份	三十一	类
32	培养基	份	三十二	类
33	培养基	份	三十三	类
34	培养基	份	三十四	类
35	培养基	份	三十五	类
36	培养基	份	三十六	类
37	培养基	份	三十七	类
38	培养基	份	三十八	类
39	培养基	份	三十九	类
40	培养基	份	四十	类
41	培养基	份	四十一	类
42	培养基	份	四十二	类
43	培养基	份	四十三	类
44	培养基	份	四十四	类
45	培养基	份	四十五	类
46	培养基	份	四十六	类
47	培养基	份	四十七	类
48	培养基	份	四十八	类
49	培养基	份	四十九	类
50	培养基	份	五十	类
51	培养基	份	五十一	类
52	培养基	份	五十二	类
53	培养基	份	五十三	类
54	培养基	份	五十四	类
55	培养基	份	五十五	类
56	培养基	份	五十六	类
57	培养基	份	五十七	类
58	培养基	份	五十八	类
59	培养基	份	五十九	类
60	培养基	份	六十	类
61	培养基	份	六十一	类
62	培养基	份	六十二	类
63	培养基	份	六十三	类
64	培养基	份	六十四	类
65	培养基	份	六十五	类
66	培养基	份	六十六	类
67	培养基	份	六十七	类
68	培养基	份	六十八	类
69	培养基	份	六十九	类
70	培养基	份	七十	类
71	培养基	份	七十一	类
72	培养基	份	七十二	类
73	培养基	份	七十三	类
74	培养基	份	七十四	类
75	培养基	份	七十五	类
76	培养基	份	七十六	类
77	培养基	份	七十七	类
78	培养基	份	七十八	类
79	培养基	份	七十九	类
80	培养基	份	八十	类
81	培养基	份	八十一	类
82	培养基	份	八十二	类
83	培养基	份	八十三	类
84	培养基	份	八十四	类
85	培养基	份	八十五	类
86	培养基	份	八十六	类
87	培养基	份	八十七	类
88	培养基	份	八十八	类
89	培养基	份	八十九	类
90	培养基	份	九十	类
91	培养基	份	九十一	类
92	培养基	份	九十二	类
93	培养基	份	九十三	类
94	培养基	份	九十四	类
95	培养基	份	九十五	类
96	培养基	份	九十六	类
97	培养基	份	九十七	类
98	培养基	份	九十八	类
99	培养基	份	九十九	类
100	培养基	份	一百	类

第一部分

基础实验

实验一 显微镜的使用及微生物形态观察

一、实验目的

显微镜是微生物学实验中最常用且必不可少的仪器之一，无论是观察微生物的个体形态结构还是测定微生物细胞大小都必须使用它。因此，只有正确了解显微镜的构造和原理，才能达到正确使用和保养的目的。本实验通过了解显微镜的构造、性能及原理，掌握显微镜的基本使用技术和保养方法，掌握显微镜观察及识别细菌基本形态的方法。

二、实验原理

(一) 普通光学显微镜的构造

显微镜的构造包括机械和光学两部分（图 1-1）。

1. 机械部分 机械部分包括包括镜座、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台、推动器、粗调焦螺旋、细调焦螺旋。

(1) 镜座。镜座是显微镜的底座，用以支撑整个显微镜。

(2) 镜臂。镜臂是携带或移动显微镜的把手。上连镜筒，下连镜座，用以支撑镜筒和镜座。

(3) 镜筒。镜筒是显微镜前方的空心圆筒，上端放置目镜，下端连接转换器，形成目镜和物镜的暗室，有单镜筒和双镜筒两种。

(4) 物镜转换器。物镜转换器在镜筒的基部，上面有 3~4 个圆孔，可安装不同放大倍数的物镜。转动转换器可以选择所需放大倍数的物镜。

(5) 载物台。载物台呈方形或圆形，是放置标本的平台，中央有一孔，为光线通路，台上有用来固定标本的夹子，台下有可移动载物台的十字推动器。

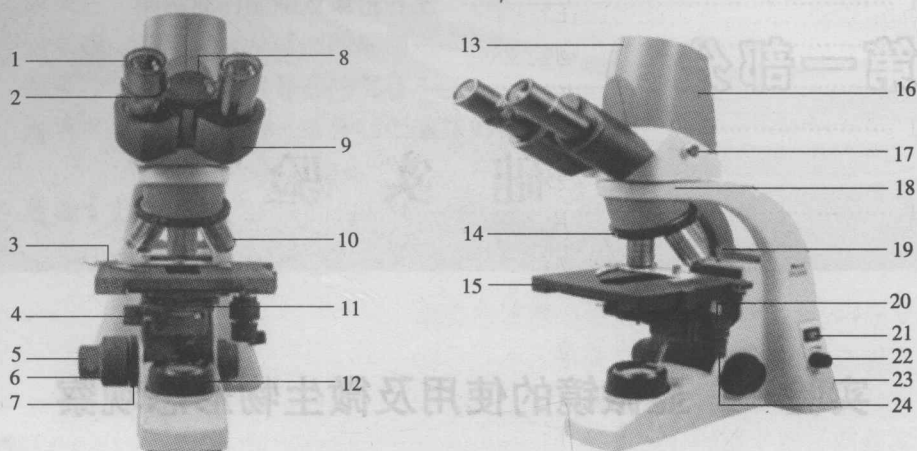


图 1-1 显微镜的结构

(魏兰芳拍摄)

1. 目镜 2. 视度补偿圈 3. 片夹 4. 聚光镜升降调节手轮 5. 微调焦螺旋 6. 粗调焦螺旋
7. 粗调调焦扭矩(松紧调节圈) 8. 瞳距刻度 9. 双目镜筒 10. 物镜 11. 聚光镜 12. 集光镜
13. 指示灯 14. 物镜转换器 15. 机械移动载物台 16. 铰链式双目数码头 17. 拉杆 18. 镜筒
固定螺钉 19. 粗动调节高度限位调节螺钉 20. 载物台 Y 向调节手轮 21. 电源开关 22. 亮度
调节手轮 23. 电源输入 24. 载物台 X 向调节手轮

(6) 推动器(或称十字推动器)。推动器附加在载物台上,是有一纵横两个推进齿轮的架子构成,用以移动标本的位置,以便将镜检对象移于视野中心。

(7) 粗调焦螺旋(粗调焦手轮)。粗调焦螺旋是调节物镜和标本间距离的机件,螺旋向逆时针方向转动,镜筒即上升,反之镜筒下降。有的显微镜是调整载物台上升或下降,顺时针旋转,载物台上升,反之载物台下降。

(8) 细调焦螺旋(细调焦手轮)。细调焦螺旋升降幅度极小,每转一周,镜筒(或载物台)上下移动 0.1mm,可用来精确地校准焦距。

2. 光学部分 可分为放大和照明两个部分,前者包括目镜和物镜,后者包括聚光器、虹彩光圈和集光镜,有的还有特殊的光源部件。

(1) 目镜。目镜在镜筒的上方,由两块透镜组成,它的作用是将来自物镜的影像作第二次放大形成虚像以供观察。目镜只能把物镜造成的像再次放大,没有辨析性能。目镜上标有放大倍数,一般显微镜有 8×、10×、15×、20× 等几种,在目镜中可粘入一根发丝作视野指针。因为目镜的口径尺寸都是统一的,可以根据需要互换使用。

(2) 物镜。物镜是显微镜最重要的结构,由许多块透镜组成,不仅可以放

大标本,而且具有辨析能力。在转换器上一般安装有4个物镜,即干燥系物镜和油浸系物镜,前者包括低倍物镜 $4\times$ 、 $10\times$ 和高倍物镜 $40\times$,使用时物镜和标本片之间的介质是空气;后者简称为油镜 $100\times$,使用时物镜和标本片之间的介质是诸如香柏油之类的油类物质。在物镜上一般标有两组数字,可反映其特性,如 $40/0.65$ 、 $160/0.17$ 表示放大倍数是40倍,数值口径为0.65,要求镜筒长度为160mm,指定盖玻片的厚度为0.17mm。

(3) 聚光器。聚光器在载物台下面,可以升降,用于聚集光线并调整视野亮度,使光线集中到标本片上。聚光器上升,视野变亮,反之,视野变暗。

(4) 虹彩光圈。虹彩光圈位于聚光器的下方,可以放大或缩小,以调节光束的直径和视野的亮度。在图1-1上没有显示出来。

(5) 集光镜。集光镜可以弥补光量的不足和适当改变从光源射来的光的性质,而且将光线聚焦于被检物体上,以得到最好的照明效果。集光镜系统调节的好坏,可以直接影响到显微镜视域照明的均匀性,也可以影响显微镜的分辨率,还可以直接影响显微照相底片上的反差。

(二) 显微镜的基本原理

显微镜的放大作用由物镜和目镜共同完成。标本经物镜放大后,在目镜的焦平面上形成一个倒立的实像,再经目镜的进一步放大形成虚像,即可看到。

(三) 显微镜的性能

1. 分辨力和数值口径 显微镜的分辨力是指显微镜能将标本中相互接近的两点清晰地分辨出来的能力。这主要取决于物镜的分辨力,物镜的分辨力与所用光的波长和物镜的数值口径呈函数关系。分辨力(D)用镜头所能分辨出的两点间最小距离表示,距离越小,分辨能力越高,其关系如下: $D = \frac{\lambda}{2N.A}$,

式中 λ 为入射光的波长, $N.A = \eta \times \sin\theta$ 。 $N.A$ 为物镜的数值口径(numerical aperture),表示从聚光镜发出的锥形光柱照射在观察的标本上,能被物镜所聚集的量; η 为标本和物镜之间介质的折射率(表1-1); θ 为入射角。

从式中可见,减少入射光的波长,可以提高分辨能力,但由于可见光波长范围比较窄,而紫外线只使用于显微摄影而不能用于直接观察。因此,提高分辨力的最好方法还是增加数值口径。

物镜的数值口径(numerical aperture),简称为 $N.A$,表示从聚光镜发出的锥形光柱照射在观察的标本上,能被物镜所聚集的量。它由下式决定: $N.A = \eta \sin\theta$ 。式中, η 为标本和物镜之间介质的折射率; θ 为入射角(表1-1)。

表 1-1 实验室中几种常用物质的折光率

品 名	折光率
玻璃	1.52~1.59
檀香油	1.52
香柏油	1.51
加拿大树胶	1.52
二甲苯	1.49
松节油	1.47
液体石蜡油	1.48
甘油	1.475
冬青油	1.536
丁香油	1.535
空气	1.0
水	1.33

光线投射到物镜的角度越大，数值口径就越大。该角度的大小取决于物镜的直径和焦距。以空气为介质时 ($\eta=1.00$)，数值口径不超过 1；如果采用一些高折射率的物质作介质，如使用油镜时采用香柏油 ($\eta=1.51$) 作介质，数值口径增大，从而提高分辨能力。

2. 放大倍数、焦距和工作距离 显微镜的放大倍数是物镜放大倍数和目镜放大倍数的乘积。一般情况下，使用低倍镜、高倍镜、油镜时，显微镜的放大倍数依次为 10×10 、 40×10 、 100×10 ，即 100 倍、400 倍、1 000 倍。观察不同的微生物，要选择适宜的物镜，如细菌是单细胞原核微生物，形体很小，大多直径或宽度小于 $1\mu\text{m}$ ，必须用油镜才能观察清楚；而酵母菌、霉菌分别要选用高倍镜、低倍镜。

一般说，增大显微镜放大倍数最好选用放大倍数高的物镜，但物镜的放大倍数越大，焦距就越短，物镜和标本片之间的工作距离就越短，因此在使用高倍镜、油镜时必须注意防止损坏标本和物镜。

三、材料和器皿

各种形态细菌的染色标本片、显微镜、香柏油、酒精和乙醚的混合液、擦镜纸。

四、步骤与方法

1. 移动显微镜时,要一手握持镜臂,一手托镜座。显微镜应平稳地置于实验台上,放置好后,镜检中不得随意移动。在观察标本时,镜检者姿势要端正,两眼应同时睁开,这样即能用左眼观察,又能用右眼绘图、记录,还可减少疲劳。

2. 打开电源,调整光源亮度。检查不染色标本或用低倍镜观察时宜用较弱光线。此时,可用3种方法调节光线强弱:①调节光源亮度调节旋钮(降低),使视野变暗;②将聚光器稍微降低,可使视野变暗;③将虹彩光圈缩小,视野变暗。检查染色标本或用高倍镜观察时,宜用较强光线,此时可调整光源亮度调节旋钮(增大),使光源变亮,将聚光器升高或将虹彩光圈开大,使视野变亮。

3. 将标本片放在载物台上,用弹簧夹或推进器固定,先用低倍镜找到适宜的视野,然后换用高倍镜或油镜。使用油镜时,先加香柏油一滴于标本片上,从侧面看着油镜头,小心转动粗调焦螺旋,使载物台上升(或目镜筒下降),直到物镜头与油滴接触或几乎与载玻片接触,但不要碰到玻片为止。然后从目镜观察,一面徐徐转动粗调焦螺旋下降载物台(或提升目镜筒)直到视野出现模糊的物像,再转动细调焦螺旋校准焦距至物像清晰。如果镜头已离开油面,仍未见到物像时,则可按照上述步骤重复操作一次,直到看清物像为止。必须注意的是只能让粗调焦螺旋向逆时针方向转动下降载物台(或提升物镜头),绝对不能向顺时针方向转动提升载物台(或下降物镜头),否则有压碎玻片和损坏油镜镜片的危险。

4. 观察完毕,关闭电源,下降载物台,用擦镜纸立即抹去镜头上的香柏油。然后滴一滴酒精和乙醚的混合液于擦镜纸上,用左手食指拖住擦镜纸擦拭镜头,用酒精和乙醚的混合液溶解并抹去镜头上的油渍,再用干净擦镜纸拭去残存的酒精和乙醚的混合液,以免酒精和乙醚的混合液溶化镜片周围的粘胶,使镜片脱落。然后取出标本片,用擦镜纸浸吸标本片上的香柏油,重新取擦镜纸滴一滴酒精和乙醚的混合液溶解标本片上残余的香柏油,换纸把标本片上的香柏油、酒精和乙醚的混合液擦拭干净,直到放上擦镜纸后,看不到油迹为止,切记不可硬擦标本片上的香柏油,以防损坏标本片。

5. 显微镜用完后,下降聚光器,转动转换器,将低倍镜对准载物台中央圆孔(或摆成“八”字形),将载物台降至最低,再用纱布将各部件抹干净,罩上镜罩,填好使用记录,和显微镜一同放入箱内。实验过程中如有故障或损坏,须向任课老师说明。

五、注意事项

1. 显微镜应严禁与挥发性药品及腐蚀性酸碱类物品放在一起，如碘片、醋酸、盐酸、硫酸等。
2. 显微镜应存在干燥阴凉的地方，不要放在强烈的日光下暴晒，梅雨季节应在镜箱内放置干燥剂（硅胶）。如长时间不用，则光学部分应卸下放在干燥器中，以免受潮生霉。
3. 移动显微镜时要轻缓，勿使劲震动。搬动时右手把持镜臂，左手托住镜座。
4. 显微镜不能随便拆卸，各镜面避免用手接触，以防印上手印或长霉。
5. 观察荚膜时，注意荚膜的位置、形状、厚薄及相互间的连接。
6. 观察鞭毛时，注意鞭毛的形状、长度、大小、数目及其在菌体上的排列（单生、丛生、周生）。
7. 观察芽孢时，注意芽孢的形状，与菌体大小的比较以及在菌体内的位置（中央、侧端、末端）。

六、结果与分析

绘出所观察到的细菌基本形态及细菌的特殊结构图（芽孢、鞭毛、荚膜），并注明菌名及各部分结构名称。

七、思考题

1. 各物镜的放大倍数分别是多少？其中哪个物镜的工作距离最短？哪个最长？
2. 哪些部件控制调节物镜的光亮强弱？
3. 如何提高显微镜的分辨率？
4. 如何正确使用油镜观察细菌？使用中应特别注意什么问题？
5. 使用油镜时为何要滴加香柏油？

实验二 培养基的制作与灭菌

一、实验目的

培养基是人工配制的适合微生物生长的营养基质，含有碳源、氮源、无机盐、生长因子和水等营养物质，常用于分离、培养、鉴定和研究各种微生物。通过本实验掌握配置培养基的原则和制备方法；掌握干热灭菌、高压蒸汽灭菌等实验室常用的灭菌技术。

二、实验原理

培养基的种类很多，按其制成的物理状态可分为液体培养基、固体培养基和半固体培养基；按其物质来源分为合成培养基、半合成培养基和天然培养基；按其用途分为基础培养基、加富培养基、选择培养基、鉴别培养基。不同的培养基，其配方也不同，本实验以牛肉膏蛋白胨琼脂培养基的制作为例（配方：牛肉膏 3.0g，蛋白胨 10.0g，氯化钠 5.0g，自来水 1 000mL，琼脂为 15~20g，即成固体培养基，pH 7.0~7.2）。

配制好的培养基必须进行灭菌才能使用，一般采用高压蒸汽灭菌法。灭菌是指杀死一定环境中的全部微生物。微生物实验室常用的灭菌方法包括灼烧法、烘干法、常压蒸汽灭菌法、高压蒸汽灭菌法、间歇灭菌法、煮沸灭菌法、过滤除菌、紫外线灭菌法、化学药剂消毒灭菌等。

三、材料和器皿

（一）材料

牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、琼脂、蒸馏水、1mol/L NaOH、1mol/L HCl 等。

（二）器皿

试管、三角瓶、量筒、烧杯、漏斗、玻璃棒、铁架台、天平、纱布、精密 pH 试纸、牛皮纸、高压蒸汽灭菌锅、干燥箱等。

四、步骤与方法

1. 称样 根据配方准确称取各种药品和琼脂。
2. 融化 把称好的琼脂放入烧杯中，加所需水量的水放在电炉上加热熔

化,不断搅拌直至其完全熔化,把称好的药品放在已熔化的琼脂溶液中,加热搅拌,使药品熔化,全部熔化完后补充水分至所需水量。

3. 调节 pH 用 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 调 pH,用 pH 试纸测量是否到所需值。

4. 过滤、分装 本实验不要求过滤,可直接进行分装,分别装入试管和三角瓶。分装量要适当,如分装三角瓶的培养基的量一般为其容积的 1/3~1/2;如用 15mm×150mm 的试管作斜面,则每管应装入 5mL 左右(为管长的 1/5~1/4)。在此过程中,应注意尽量快速,以免培养基凝固,还要注意勿使培养基沾污瓶口、试管口、棉塞,以免造成污染。

5. 塞棉塞和包扎 塞上棉塞,牛皮纸包扎,注明培养基名称、配制时间、组别,然后立即进行灭菌。

6. 灭菌 培养基的灭菌一般采用高压蒸汽灭菌。用手提式灭菌锅在 121℃ 灭菌 30min,等压力降为“0”时,方可打开锅盖(具体使用见附表一)。取出灭菌物品可以摆斜面和倒培养皿,但最好等培养基冷却至 50~60℃,否则温度过高时,易产生较多的冷凝水。倒平板时所需培养基量约为 15mL/平板。一般灭菌后的培养基应先置于 28℃ 恒温箱中培养 24h,如无菌生长,则为合格,可保存备用。

五、注意事项

1. 称取药品时严防药品混杂,一把牛角匙只称一种药品。

2. 称完药品应及时拧紧瓶盖。

3. 调 pH 很重要,不可以忽略,避免回调。

4. 固体培养基应趁热分装,灭菌后应趁热摆放成斜面。

六、结果与分析

记录本实验配制培养基的名称、数量,并说明其配制过程,指明要点。

七、思考题

1. 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基为何种培养基?它除了培养细菌外,能培养真菌和放线菌吗?为什么?

2. 培养基配制完成后,为什么必须立即灭菌?若不能及时灭菌应如何处理?已灭菌的培养基如何进行无菌检查?

3. 为什么湿热灭菌比干热灭菌法更有效?

4. 高压蒸汽灭菌开始之前,为什么要将锅内冷空气排尽?灭菌完毕后,为什么待压力降低到“0”时才能打开排气阀,开盖取物?