



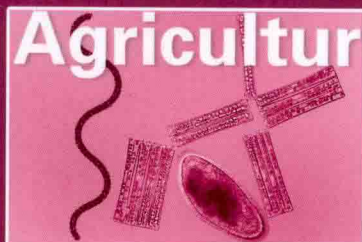
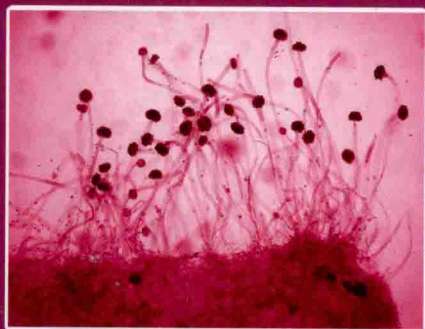
全国高等农林院校生物科学类
专业“十二五”规划系列教材

农业微生物学实验技术

丁延芹 杜秉海 余之和 **主编**

第2版

Experiment of Agricultural Microbiology



中国农业大学出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS



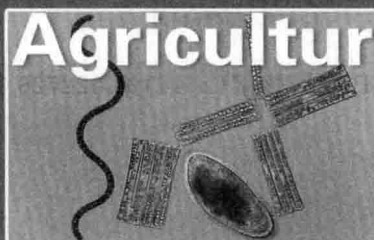
全国高等农林院校生物科学类
专业“十二五”规划系列教材

农业微生物学实验技术

丁延芹 杜秉海 余之和 **主编**

第2版

Experiment of Agricultural Microbiology



中国农业大学出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS

内 容 简 介

本书是在第1版的基础上精心修改、补充完善而成的。按照实验技术重新修订为8个部分,包括微生物学实验准备、微生物形态研究技术、微生物培养技术、微生物分类与鉴定技术、微生物育种技术、免疫学技术、微生物生态学实验技术和农业微生物学应用技术。本书具有以下几个特点:①及时反映了微生物学农业应用前沿的新技术、新方法;②以图片直观展示实验预期结果;③增强了各实验技术之间的实用性和连贯性。

本书适合作为普通高等院校的生物科学类专业、大农学类专业(农学、林学、园艺、植保、资环、食科等专业)学生的实验教材,也可作为从事农业生物产品开发与检验、食品加工和环境保护等技术人员的实用参考书。

图书在版编目(CIP)数据

农业微生物学实验技术/丁延芹,杜秉海,余之和主编. —2版. —北京:中国农业大学出版社,2014.3

ISBN 978-7-5655-0900-1

I. ①农… II. ①丁… ②杜… ③余… III. ①农业-应用微生物学-实验技术
IV. ①S182-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 022726 号

书 名 农业微生物学实验技术 第2版

作 者 丁延芹 杜秉海 余之和 主编

策划编辑 孙 勇 潘晓丽

封面设计 郑 川

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路2号

电 话 发行部 010-62818525,8625

编辑部 010-62732617,2618

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

经 销 新华书店

印 刷 北京时代华都印刷有限公司

版 次 2014年4月第2版 2014年4月第1次印刷

规 格 787×1 092 16开本 10.75印张 263千字 彩插4

印 数 1~3 000

定 价 26.00元

责任编辑 韩元凤

责任校对 王晓凤 陈 莹

邮政编码 100193

读者服务部 010-62732336

出 版 部 010-62733440

e-mail cbsszs@cau.edu.cn

图书如有质量问题本社发行部负责调换

全国高等农林院校生物科学类专业“十二五”规划系列教材
编审指导委员会
(按姓氏拼音排序)

姓 名	所 在 院 校	姓 名	所 在 院 校
蔡庆生	南京农业大学	刘国琴	中国农业大学
蔡永萍	安徽农业大学	刘洪章	吉林农业大学
苍 晶	东北农业大学	彭立新	天津农学院
曹贵方	内蒙古农业大学	秦 利	沈阳农业大学
陈雯莉	华中农业大学	史国安	河南科技大学
董金皋	河北农业大学	宋 渊	中国农业大学
冯玉龙	沈阳农业大学	王金胜	山西农业大学
郭 蓓	北京农学院	吴建宇	河南农业大学
郭立忠	青岛农业大学	吴晓玉	江西农业大学
郭图强	塔里木大学	殷学贵	广东海洋大学
郭兴启	山东农业大学	余丽芸	黑龙江八一农垦大学
郭玉华	沈阳农业大学	张 炜	南京农业大学
李 唯	甘肃农业大学	赵 钢	仲恺农业工程学院
林家栋	中国农业大学出版社	赵国芬	内蒙古农业大学

第2版编写人员

主 编 丁延芹(山东农业大学)
杜秉海(山东农业大学)
余之和(长江大学)

副 主 编 林榕姗(山东农业大学)

编写人员 (按姓氏笔画为序)

丁延芹(山东农业大学)
卢伟东(青岛农业大学)
刘丽英(山东农业大学)
刘 凯(山东农业大学)
李 利(长江大学)
余之和(长江大学)
宋 鹏(河南科技大学)
杜秉海(山东农业大学)
林榕姗(山东农业大学)
赵现方(河南科技学院)
靳永胜(北京农学院)

第1版编写人员

主 编 杜秉海

副 主 编 贾隽永 李培香 温尚昆

参 编 (按姓氏笔画为序)

丁立孝 丁志勇 闫培生 李淑环

张万福 姚良同 贾 乐 高秀环



出版说明

生物学是近几十年来发展最为迅速的学科之一,它给人类的生产和生活带来巨大变化,尤其在农业和医学领域更是带来了革命性的变革。生物科学与各个学科之间、生物科学各个分支学科之间的广泛渗透,相互交叉,相互作用,极大地推动了生物科学技术进步。生物科学理论和方法的丰富和发展,在持续推动传统农业和医学创新的同时,其应用领域不断扩大,广泛应用的领域已包括食品、化工、环保、能源和冶金工业等各个方面。仿生学的应用还对电子技术和信息技术产生巨大影响。生物防治、生物固氮等生物技术的应用,极大地改变了农业过分依赖石化工业的局面,继而为自然生态平衡的恢复做出无可替代的贡献。以大量消耗资源为依赖的传统农业被以生物科学和技术为基础的生态农业所替代和转变。新的、大规模的现代农业将由于生物科学的快速发展而迅速崛起。

生物科学在农业领域中越来越广泛的应用,以及不可替代作用的发挥,既促进了生物科学教育的发展,也为生物科学教育提出了新的更高的要求。农业领域高素质、应用型人才对生物科学知识的需求具有自身独特的使命和特征。作为培养高素质、应用型人才重要途径和方式的农业高等教育亟须探索出符合实际需求和发展的教育教学模式和内容。为此,中国农业大学生物学院和中国农业大学出版社与全国 30 余所高等农林院校合作,在充分汲取各校生物科学类专业教改实践经验和教改成果的基础上,经过进一步集成、融合、优化、提升,凝聚形成了比较符合农林院校教学实际、适应性更好、针对性更强、教学效果更佳的教学理念和教材编写思路,进而精心打造了“全国高等农林院校生物科学类专业‘十二五’规划系列教材”。系列教材覆盖了近 30 门生物科学类专业骨干课程。

本系列教材站在生物科学类专业教育教学整体目标的高度,以学科知识内容关联性为依据,审核确定教材品种和教材内容,通过相关课程教材小规模组合、专家交叉多重审定、编审指导委员会统一把关等措施,统筹解决相关教材内容衔接问题;以统一的编写指导思想因课制宜确定各门课程教材的编写体例和形式。因此,本系列教材主导思想整体归一、各种教材各具特色。

农业是生物科学最早也是应用范围最广的领域,其厚重的实践积累和丰硕成果使得农业高等教育生物科学类专业教学独具特色和更高要求。本系列教材比较好地体现了农业领域生物科学应用的重要成果和前沿研究成就,并考虑到农林院校生源特点、教学条件等,因而具有很强的适用性、针对性和前瞻性。

系列教材编审指导委员会在教材品种的确定、内容的筛选、编写指导思想以及质量把关等环节中发挥了巨大作用。其组成专家具有广泛的院校代表性、学科互补性和学术权威性,以及



丰富的教学科研经验。专家们认真细致地工作为系列教材打造成为农林院校生物科学类专业精品教材奠定了扎实的基础,在此谨致深深谢意。

作为重点规划教材,为准确把握教学需求,突出特色和确保质量,教材的策划运行被赋予更为充分的时间,从选题调研、品种筛选、编写大纲的拟制与审定、组织教师编写书稿,直至第一种教材出版至少3年时间,按照拟定计划主要品种的面世需近4年。系列教材的运行经过了几个阶段。第一个阶段,对农林院校生物科学教学现状进行深入的调查研究。2010—2011年,出版社用了近1年的时间,先后多批次走访了近30所院校,与数百位生物科学教学一线的专家和教师进行座谈,深入了解我国高等农林院校生物科学教学的进展状况及存在的问题。第二个阶段,召开教学和教材建设研讨会。2011年12月,中国农业大学生物学院和中国农业大学出版社组织召开了有30余所院校、100余位教师参加的生物教学研讨会,与会代表就农林院校生物科学类专业教学和教材建设问题进行了广泛和深入的研讨,会上还组织参观了中国农业大学生物学院教学中心、国家级生命科学实验教学示范中心以及两个国家重点实验室,给与会代表留下了深刻的印象和较大的启发。第三个阶段,教材立项编写。在广泛达成共识的基础上,有30多所高等农林院校、近500人次教师参加了系列教材的编写工作。从2013年4月起,系列教材将陆续出版,希望这套凝聚了广大教师智慧、具有较强的创新性、反映各校教改探索实践经验与成果的系列教材能够对农林院校生物科学类专业教育教学质量的提高发挥良好的作用。

良好的愿望和教学效果需要实践的检验和印证。我们热切地期待着您的意见反馈。

中国农业大学生物学院

中国农业大学出版社

2013年3月16日

第2版前言



在如今生物产业和生物经济快速发展的时代,微生物学发展日新月异,其应用技术在各个领域的作用越来越突出,掌握和了解微生物学实验技术已经成为农学、林学、食品、环保等领域必需的技能。微生物学实验教材版本多,适应面广,但是很难找到一本适合农林院校的教材。本书在第1版的基础上,紧密围绕微生物学在农业生产中的应用,强调实验技能的培养,进一步突出农林特色。修订内容如下:

(1)打破第1版的布局,全书按照微生物学涉及的实验技术共分8个部分。

(2)增加了对相关单独实验之间关系的说明,例如微生物分类与鉴定部分把形态学、生态特征和分子生物学技术等相关的实验项目综合利用,可以对未分类菌种进行鉴定;农业微生物实验技术部分拮抗菌、纤维素降解菌等功能菌种的筛选,可以用于生物有机肥制备的菌种资源,这样增强了该书的实用性和连贯性。

(3)在保留第1版实验目的和原理、实验器材、操作步骤和注意事项等内容的基础上,添加预期结果,尽可能用照片或图片说明,增加其直观效果。

(4)为方便学习,突出每一个实验的注意事项,在文中以不同字体进行标记。

(5)增加了现代农业微生物学技术研究方法,例如细菌总DNA提取、PCR技术、RFLP技术等。

(6)增加了免疫学技术,使内容更加丰富全面。

(7)突出农业微生物学应用技术,增加生物肥料研制等实用技术。

在本书的编写过程中,我们组织了6所学校的11名教学一线教师,参考国内外多部微生物学实验教材,对杜秉海主编的《微生物学实验》(北京农业大学出版社,1994)进行修订。全书按照实验技术分为8个部分:第一部分微生物学实验准备由靳永胜编写;第二部分微生物形态研究技术由林榕姗编写;第三部分微生物培养技术由赵现方编写;第四部分微生物分类与鉴定技术由刘丽英和丁延芹编写;第五部分微生物育种技术由刘凯编写;第六部分免疫学技术由宋鹏编写;第七部分微生物生态学实验技术由卢伟东编写;第八部分农业微生物学应用技术由李利和余之和编写;全文统稿由丁延芹完成;杜秉海在全书框架拟定中给予合理化建议。

本书大量图片是各位编者精心制作的。各位参加编写的老师在有限的时间内认真负责地完成承担任务,并多次仔细修改,对他们的付出表示衷心感谢!

本书力求达到实用、文字精练、结果直观、突出农业特色等几个特点,但由于编者水平有限,书中难免会有错误和不足之处,敬请各位读者批评指正。

编者

2013年12月



随着现代生物科学的急速发展,微生物学已渗入各有关学科领域,同时现代化实验手段在微生物学实验技术上也得到广泛的应用,促进了微生物学科的纵深发展,为微生物学实验教学提出了至为迫切的新问题。近年来,国内高等农林院校增设了不少新专业,随之拓宽了微生物学实验教学的领域,为适应不同专业对微生物学实验教学的不同需要,我们深感尽快编著内容较为系统全面、材料较为充实、方法较为先进的实验教材,已是刻不容缓的任务。

《微生物学实验》共分五部分。第一部分为微生物学实验内容,共 104 个实验,既包括显微镜检技术、制片染色技术、无菌操作技术、纯培养技术及菌种保藏技术等基本操作技术,也安排了微生物生理生化、菌种选育、微生物发酵及微生物监测检验等实际应用技术。可根据不同专业需要取舍。第二部分介绍了显微镜种类、结构、原理,显微摄影的原理和方法及染色剂、染色机制等。第三部分为微生物学实验的准备,包括玻璃器皿的准备,棉塞制作技术,无菌室的设置、设备、灭菌、检查及操作规则等。第四部分介绍了培养基的类型、配制基本过程及设计原则。第五部分介绍了灭菌和消毒的种类、基本原理和方法。

本书可作为高等农林院校植物生产、环保、食品加工贮藏等专业的微生物学实验教材,也是从事微生物发酵、食品加工、保藏、卫生检验、环保等技术人员的重要工具书。

本教材在编写过程中,承蒙山东农业大学张鹏图、李旺杰、洪淑梅先生和莱阳农学院蔡德华先生悉心指导,谨在此表示衷心的感谢。

由于编者水平有限,再加上时间仓促,教材中难免存在某些不足。希望广大读者提出宝贵意见,以便我们作进一步的修订。

编 者

1994 年 6 月

目 录



第一部分 微生物学实验准备	1
一、简易棉塞制作	1
二、微生物接种	1
三、无菌操作	2
四、消毒和灭菌	4
五、显微技术	8
第二部分 微生物形态研究技术	22
实验 1 微生物形态观察	22
实验 2 细菌的简单染色及革兰氏染色	25
实验 3 细菌芽孢染色法	29
实验 4 放线菌形态的观察	31
实验 5 酵母菌形态观察及死活细胞鉴别	33
实验 6 霉菌形态的观察	34
实验 7 微生物的大小测定与镜检计数法	37
I 微生物细胞大小的测定	37
II 微生物细胞数量的测定——镜检计数法	39
实验 8 微生物培养特征的观察	42
I 细菌培养特征的观察	42
II 放线菌菌落特征的观察	45
III 酵母菌菌落特征的观察	46
IV 霉菌菌落特征的观察	47
第三部分 微生物培养技术	50
实验 9 培养基的制备方法	50
I 牛肉膏蛋白胨培养基	50
II 高氏一号培养基	53
III 马铃薯葡萄糖培养基	54
IV 马丁氏培养基	55



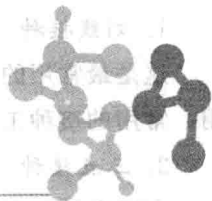
实验 10 微生物纯系分离与纯化	57
I 放线菌的分离与纯化	57
II 根瘤菌的分离与鉴定	58
III 组织分离法分离植物病原菌	60
实验 11 水中细菌总数的测定	61
实验 12 微生物生长曲线测定	64
I 大肠杆菌生长曲线测定	64
II 绿色木霉生长曲线的测定	65
实验 13 厌氧微生物纯培养技术	67
实验 14 噬菌体的分离、纯化与效价测定	69
第四部分 微生物分类与鉴定技术	72
实验 15 微生物对糖的分解	72
实验 16 VP 反应	75
实验 17 甲基红实验	76
实验 18 微生物对淀粉的水解	77
实验 19 微生物对纤维素的分解	79
实验 20 微生物对果胶物质的分解	81
实验 21 微生物对尿素的分解	83
实验 22 微生物对蛋白质、氨基酸的分解	84
实验 23 微生物对明胶的液化	88
实验 24 吡啶试验	89
实验 25 石蕊牛奶反应	90
实验 26 微生物对硝酸盐的还原	92
实验 27 细菌细胞总 DNA(genomic DNA)提取	93
实验 28 细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及序列分析	95
实验 29 微生物自动化鉴定	96
实验 30 菌种保藏技术	98
第五部分 微生物育种技术	100
实验 31 紫外线诱变育种	100
实验 32 亚硝基胍诱变育种	102
实验 33 原生质体融合育种	104
实验 34 基因组改组技术	107
实验 35 细菌接合作用	108
实验 36 营养缺陷型的筛选	110
第六部分 免疫学技术	113
实验 37 抗血清的制备	113



实验 38	直接凝集反应	116
实验 39	双向免疫扩散实验	118
实验 40	免疫电泳	120
实验 41	酶联免疫吸附实验(ELISA)	122
第七部分	微生物生态学实验技术	124
实验 42	环境因素对微生物生长的影响	124
实验 43	微生物间的拮抗作用	129
实验 44	土壤微生物区系分析	131
实验 45	土壤微生物多样性分析	134
第八部分	农业微生物学应用技术	140
实验 46	平菇菌种的组织分离法	140
实验 47	木耳菌种的孢子分离法	141
实验 48	食用菌原种及栽培种的制作	143
实验 49	平菇生料袋栽技术	144
实验 50	苏云金芽孢杆菌的分离	147
实验 51	纤维素降解菌的筛选	149
实验 52	生物有机肥的制备	150
附录	教学常用溶液配制	153
参考文献		157

第一部分

微生物学实验准备



一、简易棉塞制作

在微生物学实验中,培养微生物的试管和三角瓶的瓶口都要加上棉塞。棉塞既可以通气,保证微生物生长有充足的氧气,又可以过滤去除空气中的杂菌,防止培养的微生物受到污染。

棉塞制作的基本要求:棉塞要松紧适度,不能太紧、太松。太紧会影响空气的流通;太松又容易透过杂菌,造成污染。棉塞插入试管口或瓶口的长度要适当,一般为管口直径的 1.5 倍。

棉塞制作基本方法:将纱布裁剪成适当大小的方块,取一块纱布,将其中心铺于管口任其自然下垂至管外壁,将试管上端与纱布一并握住,然后用一小木棒将纱布中心向管内推进,至该棉塞所需长度后握紧试管上端,用木棒将适量棉花向管内填塞并压紧充实后将纱布尾端敛紧,抽出约 1/3 长度,散开纱布将棉塞尾部加适量棉花并压紧使之略大于试管,再敛紧尾部纱布并用棉线扎紧,剪去多余线头纱布,一个大小和松紧适宜的棉塞制作完毕。

二、微生物接种

将微生物接到适于它生长繁殖的人工培养基上或活的生物体内的过程叫作接种。

(一)接种工具

在实验室或工厂实践中,用得最多的接种工具是接种环、接种针。由于接种要求或方法的不同,接种针的针尖部常做成不同的形状,有刀形、耙形等之分。有时滴管、吸管也可作为接种工具进行液体接种。在固体培养基表面要将菌液均匀涂布时,需要用到涂布棒(图 1-1)。

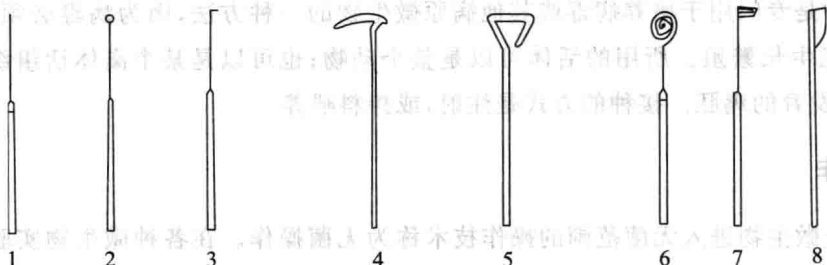


图 1-1 接种和分离工具

1. 接种针 2. 接种环 3. 接种钩 4. 5. 玻璃涂棒 6. 接种环 7. 接种环 8. 小解剖刀



(二) 接种方法

常用的接种方法有以下几种：

1. 划线接种

这是最常用的接种方法。即在固体培养基表面作来回直线形的移动，就可达到接种的作用。常用的接种工具有接种环、接种针等。在斜面接种和平板划线中就常用此法。

2. 三点接种

在研究霉菌形态时常用此法。此法即把少量的微生物接种在平板表面上，成等边三角形的三点，让它各自独立形成菌落后，来观察、研究它们的形态。除三点外，也有一点或多点进行接种的。

3. 穿刺接种

在保藏厌氧菌种或研究微生物的动力时常采用此法。做穿刺接种时，用的接种工具是接种针。用的培养基一般是半固体培养基。它的做法是：用接种针蘸取少量的菌种，沿半固体培养基中心向管底作直线穿刺，如某细菌具有鞭毛而能运动，则在穿刺线周围能够生长。

4. 浇混接种

该法是将待接的微生物先放入培养皿中，然后再倒入冷却至 45°C 左右的固体培养基，迅速轻轻摇匀，这样菌液就达到稀释的目的。待平板凝固之后，置合适温度下培养，就可长出单个的微生物菌落。

5. 涂布接种

与浇混接种略有不同，就是先倒好平板，让其凝固，然后再将菌液倒入平板上面，迅速用涂布棒在表面作来回左右地涂布，让菌液均匀分布，就可长出单个的微生物的菌落。

6. 液体接种

从固体培养基中将菌洗下，倒入液体培养基中，或者从液体培养物中，用移液管将菌液接至液体培养基中，或从液体培养物中将菌液移至固体培养基中，都可称为液体接种。

7. 注射接种

该法是用注射的方法将待接的微生物转接至活的生物体内，如人或其他动物中，常见的疫苗预防接种，就是用注射接种，接入人体，来预防某些疾病。

8. 活体接种

活体接种是专门用于培养病毒或其他病原微生物的一种方法，因为病毒必须接种于活的生物体内才能生长繁殖。所用的活体可以是整个动物；也可以是某个离体活组织，例如猴肾等；也可以是发育的鸡胚。接种的方式是注射，或拌料喂养。

三、无菌操作

用于防止微生物进入无菌范围的操作技术称为无菌操作。在各种微生物实验中，为了防止杂菌生长和繁殖，进而影响实验的进度，需要在无菌的环境下操作。图 1-2 为无菌操作间。

(一) 无菌操作原则

(1) 环境要清洁，进行无菌操作前半小时，须停止清扫地面等工作。避免不必要的人群流

动,防止尘埃飞扬。

(2) 执行无菌操作前,先戴帽子、口罩、洗手,并将手擦干,注意空气和环境清洁。

(3) 在执行无菌操作时,必须明确物品的无菌区和非无菌区。

(4) 夹取无菌物品,必须使用无菌持物钳。



图 1-2 无菌操作间

(5) 进行无菌操作时,凡未经消毒的手、臂均不可直接接触无菌物品或超过无菌区取物。

(6) 无菌物品必须保存在无菌包或灭菌容器内,不可暴露在空气中过久。无菌物与非无菌物应分别放置。无菌包一经打开即不能视为绝对无菌,应尽早使用。凡已取出的无菌物品虽未使用也不可再放回无菌容器内。

(7) 无菌包应按消毒日期顺序放置在固定的柜橱内,并保持清洁干燥,与非灭菌包分开放置,并经常检查无菌包或容器是否过期,其中用物是否适量。

(8) 无菌盐水及酒精、新洁尔灭棉球罐每周消毒一次,容器内敷料如干棉球、纱布块等,不可装得过满,以免取用时碰到容器外面被污染。

(二) 无菌操作准备工作

1. 无菌操作实验所用器皿的清洁

(1) 新购买的玻璃器皿如培养皿应用热肥皂水洗刷,流水冲洗,再用 1%~2% 盐酸溶液浸泡,以除去游离碱,再用流水冲洗干净,最后用蒸馏水润洗。容量较大的器皿如试剂瓶、烧杯或量具等,经清水洗净后应注入浓盐酸少许,慢慢转动,使盐酸布满容器内壁数分钟后倾出盐酸,再用流水冲洗干净,最后用蒸馏水润洗。

(2) 使用过的玻璃器皿像一般试管或容器可先用 3% 煤酚皂溶液或 5% 石炭酸浸泡,再煮沸 30 min,或用 3%~5% 漂白粉澄清液浸泡 4 h,用流水冲洗干净,最后用蒸馏水润洗。使用过的吸管应集中用 3% 煤酚皂溶液浸泡 24 h,逐支用流水冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗。

(3) 细菌培养用过的试管和培养皿进行集中后用 1 kg/cm^2 高压灭菌 15~30 min,再用热水洗涤后,用热肥皂水洗刷,流水冲洗干净,最后用蒸馏水润洗。

(4) 接种工具的洗涤灭菌方法同上。



2. 无菌器材和无菌培养基的准备

将玻璃器具中的培养皿、培养瓶、试管和吸管等按上述方法洗净烘干后,用一洁净纸包好瓶口并把吸管尾端塞上棉花,装入干净的铝盒或铁盒中,放入 $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ 的干燥箱中干燥灭菌2 h,取出备用。手术器械、瓶塞、工作服以及培养微生物所用培养基,则采用高压蒸气灭菌法,即压力 $103.4\text{ kPa}(1.05\text{ kg/cm}^2)$,温度 121.3°C ,维持 $15\sim 30\text{ min}$ 进行高压灭菌。

经高温高压灭菌后的培养基应在室内存放 $3\sim 7\text{ d}$,选择无杂菌污染的培养基进行试验操作。

(注意:不能进行高温高压灭菌的培养基需要使用 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ 或 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 孔径滤膜在无菌超净台进行过滤除菌。或者将培养基中不能高温高压灭菌的试剂或药品在无菌超净台进行过滤灭菌后,添加到经高温高压灭菌后的培养基中。)

(三) 无菌操作技术及注意事项

(1)实验进行前,无菌室及无菌操作台以紫外灯照射 $30\sim 60\text{ min}$ 灭菌,以 70% 乙醇擦拭无菌操作台面,并开启无菌操作台风机运转 10 min 后,才开始实验操作。每次操作只处理一株菌株,即使培养基相同亦不共享培养基,以避免失误混淆或细胞间污染。实验完毕后,将实验物品带出工作台,以 70% 乙醇擦拭无菌操作台面。操作间隔应让无菌操作台运转 10 min 以上,再进行下一个操作。

(2)无菌操作工作区域应保持清洁及宽敞,必要物品如试管架、吸管吸取器或吸管盒等可以暂时放置,其他实验用品用完即应移出,以利于气流流通。实验用品以 70% 乙醇擦拭后才可带入无菌操作台内。实验操作应在台面中央无菌区域,切忌在边缘非无菌区域操作。

(3)小心取用无菌实验物品,避免造成污染。勿碰触吸管尖头部或是容器瓶口,亦不可在打开容器正上方实验操作。容器打开后,用手夹住瓶盖并握住瓶身,倾斜约 45° 角取用,尽量勿将瓶盖盖口朝上放置桌面。

(4)检查无菌操作台内的气流压力,定期更换紫外线灯管及HEPA过滤膜,预滤网(300 h /预滤网, $3\ 000\text{ h}$ /HEPA)。

四、消毒和灭菌

消毒和灭菌是从事微生物学实验和生命科学研究必需的基本操作,在医疗卫生、食品、环境保护和生物制品等领域也是必不可少的操作环节。消毒(disinfection)是指消灭病原菌和有害微生物或其他非目标微生物的生物体;灭菌(sterilization)则是指杀灭一切微生物的生物体,包括微生物的芽孢和孢子。在微生物实验中,需要对目标微生物进行纯培养,不能有任何的杂菌污染,因此对所用器材、培养基和工作场所都要进行严格的消毒和灭菌。根据不同的试验要求和条件,要选用合适的消毒灭菌方法。常见的灭菌方法主要有以下几种:干热灭菌、高压蒸汽灭菌、物理灭菌和化学灭菌等。

(一) 干热灭菌

干热灭菌是利用高温或灼烧将微生物杀死达到灭菌目的,包括干热空气灭菌和火焰灼烧灭菌两种方式。

1. 火焰灼烧灭菌

火焰灼烧灭菌(incineration)是利用火焰直接把微生物烧死。这种方法灭菌彻底迅速。灼烧灭菌一般适用于接种前后的所用器皿的灭菌,如接种环、试管口、三角瓶口、接种的移液管和