

高等院校精品课程实验教材

# 微生物学

## 实验

● 主 编 石 鹤

● 副主编 胡远亮

*M*icrobiology  
Lab Manual

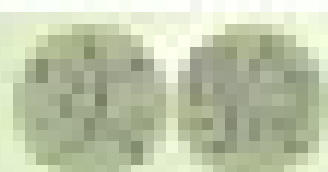


华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

普通高等教育“十一五”国家级规划教材  
教育部推荐教材

# 微生物学



李金梅 主编  
李金梅 李金梅

Cell Biology

高等教育出版社  
Higher Education Press

高等院校精品课程实验教材

# 微生物学实验

主 编 石 鹤

副主编 胡远亮

编 者 (按姓氏笔画排列)

冯艳丽 石 鹤 李京京

余 翔 胡远亮 涂俊铭

董昌金

华中科技大学出版社

中国·武汉

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验/石 鹤 主编. —武汉: 华中科技大学出版社, 2010. 10  
ISBN 978-7-5609-6615-1

I. 微… II. 石… III. 微生物学-实验-高等学校-教材 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 193457 号

微生物学实验

石 鹤 主编

## 前 言

近年来,随着微生物学科的迅速发展,教学内容更新较快。微生物学作为主干基础课程已列入高等院校生命科学各专业的教学计划中,微生物学实验课已被许多院校单独作为一门课程。为了提高教学水平,根据教学大纲的要求和课程设置,在参阅中外相关文献、学习兄弟院校的教学经验的基础上,编写了这本实验教材。该实验教材反映本学科特点,注重实验内容的实用性、综合性和创新性。

本书为生命科学学院相关专业微生物学实验指导书,同时可供其他相关专业学生学习参考。

本书由湖北师范学院生命科学学院微生物学课程组编写。全书分四个部分,其中,基础性实验由冯艳丽、胡远亮、石鹤完成,综合性实验由石鹤、董昌金、余翔、涂俊铭完成,微生物学实验基本操作技术和附录等由胡远亮完成,最后由石鹤和胡远亮统稿。李京京参与了本书部分内容的编写和修改。其中,本书的第一部分图按顺序编写,第二部分与第三部分图的编号以实验顺序编写。

书中引用了其他作者部分内容,在此致以诚挚的谢意。

编 者

2010年3月于青山湖

# 目 录

|                           |      |
|---------------------------|------|
| 微生物学实验守则                  | (1)  |
| I 微生物学实验基本操作技术            | (3)  |
| II 基础性实验                  | (11) |
| 实验一 玻璃器皿的包扎及灭菌            | (11) |
| 实验二 实验室环境和人体表面微生物的检查      | (15) |
| 实验三 培养基的配制                | (17) |
| 实验四 微生物形态特征的观察            | (20) |
| 实验五 细菌革兰氏染色法              | (28) |
| 实验六 微生物大小及数量测定            | (31) |
| 实验七 微生物的生理生化反应——大分子物质的水解  | (37) |
| 实验八 大肠杆菌生长曲线的制作           | (40) |
| 实验九 水中细菌总数的测定             | (42) |
| 实验十 食品中大肠菌群的测定            | (45) |
| 实验十一 常用菌种的保藏方法            | (49) |
| 实验十二 微生物液体深层培养——发酵罐的使用    | (52) |
| III 综合性实验                 | (55) |
| 实验十三 苯酚生物降解菌的筛选           | (55) |
| 实验十四 乳酸菌的分离与鉴定            | (59) |
| 实验十五 紫外线对枯草芽孢杆菌产生淀粉酶的诱变效应 | (63) |
| 实验十六 柠檬酸液体深层发酵和提取         | (65) |
| 实验十七 重组藻胆蛋白生物合成条件的优化      | (71) |
| 附录                        | (75) |
| 附录 A 实验室意外事故的处理           | (75) |
| 附录 B 常见培养基的配制             | (76) |
| 附录 C 常用染色液及试剂的配制          | (80) |
| 参考文献                      | (84) |

# 微生物学实验守则

## 一、微生物学实验课程的教学目的和要求

微生物学实验是生物专业学生的实验类专业必修课,通过本课程的学习,可使学生完整、全面地了解 and 掌握微生物学的基本理论和研究方法,使学生得到有关微生物实验技能的基本训练,进一步加深对微生物基础理论的理解,培养学生动手能力,并力求达到系统地培养学生分析问题、解决问题的能力,在实验中进一步提高学生的科学素养。

实验教学的要求包括:在基本实验操作技术方面要求学生掌握显微镜的使用,生物染色技术,形态学观察的方法,大小测定和计数,无菌操作技术,培养基的配制和灭菌方法,微生物分离、纯化等;在实验仪器方面,要求学生对微生物实验室常用的仪器设备的基本原理、构造、使用方法及使用中的注意事项有正确的理解和掌握;实验过程中要求学生仔细观察实验现象,完整记录原始实验数据、结果,分析实验现象并认真填写实验报告。实验报告主要包括实验目的和原理、实验步骤、实验结果、分析与讨论等内容。

## 二、实验的进行程序和要求

1. 预习。学生在课前应认真预习实验指导以及教材中的有关内容,必须对该次实验的目的、要求、实验内容、基本原理和操作方法有一定的了解。

2. 讲解。教师对该实验内容的安排及注意事项进行讲解,让学生有充分的时间按实验指导的要求进行独立操作与观察。

3. 独立操作与观察。除个别实验分组进行外,一般由学生个人独立进行操作和观察。在实验中要按实验指导认真操作,仔细观察,做好记录。

4. 示教。每次的实验都备有示教内容,其目的是帮助学生了解某些实验中的难点,增加获得更多感性知识的机会。

5. 作业。实验报告必须强调科学性,实事求是地记录、分析、综合,在实验结束后呈交。学生应认真阅读教师批改后的实验报告,了解自己在完成实验过程中存在的问题。

6. 小结。实验结束后,由师生共同小结本次实验的主要收获及今后应注意的问题。

## 三、实验规则和注意事项

1. 每次上课前,必须认真阅读实验指导,明确本次实验的目的、要求、实验原理和注意事项,熟悉实验内容、方法和步骤。

2. 上实验课时必须携带实验指导、实验报告纸及绘图文具等,按规定座位入座。

3. 实验前,要认真检查所用仪器、药品是否完好、齐备,如有缺损应及时向教师报告,自己不得随意调换标本、仪器等。没有得到教师的允许,不能动用实验室其他非本次实验所用的仪器设备和药品。

4. 遵守实验课堂纪律。有问题时举手提问,严禁谈笑喧哗,不准在实验室吃零食和会客。

5. 遵守实验操作规程,严格按照教师的安排和实验指导的要求进行。使用显微镜检查非永久装片时,要特别小心,防止染料或试剂沾污镜头和镜台,不要用高级显微镜观察非永久装片。操作规范,观察认真仔细,及时完成实验报告。

6. 爱护仪器、标本和器材设备,注意节约实验材料、药品和水、电。如有损坏器材应立即报告,并做好详细记录,说明情况;人为因素损坏的,应按规定赔偿。

7. 凡是自配的试剂和溶液,必须贴上标签,注明名称、成分、浓度、配制日期及配制人。

8. 实验结束后,应清理实验台面,所有酸类、染料等废物,应倒在废物缸内,不能倒在水槽中。认真清理好仪器、药品及其他用品,并放回原处。值日生要负责清扫地面,收拾实验用品,处理垃圾,关好水、电、门窗后再离开。



# I 微生物学实验基本操作技术

## 一、棉塞的制作

棉塞的作用有二：一是防止杂菌污染；二是保证通气良好。因此，棉塞质量的优劣对实验的结果有较大的影响。正确的棉塞要求形状、大小、松紧与试管口（或三角瓶口）完全吻合，过紧妨碍空气流通，操作不便；过松则达不到滤菌的目的（制作过程见图 1）。塞上棉塞时，应使棉塞长度的  $\frac{1}{3}$  在试管口外， $\frac{2}{3}$  在试管口内。做棉塞的棉花要选纤维较长的，一般不用脱脂棉做棉塞，因为它容易吸水变湿，造成污染，而且价格昂贵。

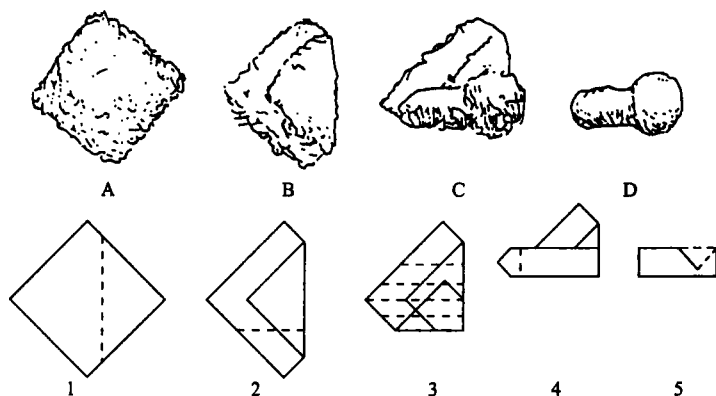


图 1 棉塞制作过程

此外，在微生物学实验和科研中，往往要用到通气塞，即用几层纱布（一般为 8 层）相互重叠而成，或是在两层纱布间均匀铺一层棉花而成。这种通气塞通常加在装有液体培养基的三角烧瓶口上。经接种后，放在摇床上进行振荡培养，以获得良好的通气，促使菌体生长或发酵。通气塞的形状如图 2 所示。

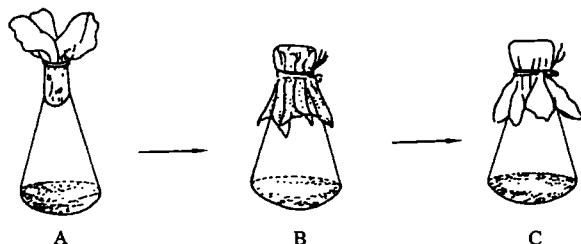


图 2 通气塞

A. 配制时纱布塞法 B. 灭菌时包牛皮纸 C. 培养时纱布翻出

## 二、玻璃器皿的清洗

1. 不能使用有腐蚀性的化学试剂,也不能使用比玻璃硬度大的物品来擦拭玻璃器皿;新的玻璃器皿应用 2% 的盐酸溶液浸泡数小时,用水充分洗干净。

2. 使用过的器皿应立即洗涤。

3. 强酸、强碱、琼脂等能腐蚀、阻塞管道的物质不能直接倒在洗涤槽内,必须倒在废液缸内。

4. 含有琼脂培养基的器皿可先将培养基刮去,或用水蒸煮,至培养基融化后倒出,然后再用洗洁精清洗。对含有传染性材料的器皿,应经高压蒸汽灭菌后再进行清洗。

5. 一般的器皿可以用去污粉、肥皂或洗洁精清洗,油脂很重的器皿应先将油脂擦去。沾有煤膏、焦油及树脂一类物质的,可用浓硫酸或 40% 氢氧化钠或洗液浸泡;沾有蜡或有油漆物的,可加热使之熔融后揩去,或用有机溶剂(苯、二甲苯、汽油、丙酮等)揩去。

6. 载玻片或盖玻片。先擦去油垢再清洗干净,然后在稀的洗液里浸泡 2 h,用清水冲净,最后用蒸馏水冲洗,干后浸于 95% 酒精中保存备用。

7. 洗涤后的器皿应达到玻璃壁能被水均匀润湿而无条纹和水珠。

## 三、玻璃器皿的包装

### (一) 培养皿的包装

常用旧报纸紧紧包裹培养皿,一包 7~10 套,包好后干热或湿热灭菌。如果将培养皿放入金属筒内进行干热或湿热灭菌,则不必用纸包。金属筒有一圆筒形的带盖外筒,里面放一装培养皿的带底框架(图 3),此框架可自圆筒内提出,以便装取培养皿。

### (二) 移液管的包装

准备好干燥的移液管,在距其粗头顶端约 0.5 cm 处,塞约 1.5 cm 长的棉花,以免使用时将杂菌吹入其中,或不慎将微生物吸出管外。棉花要松紧适当(过紧,吹吸液体太费力;过松,吹气时棉花会下滑),接着按图 4 方法包扎后,将移液管集中在一起,用一张大报纸包好,进行干热或湿热灭菌。

### (三) 试管和三角瓶的包扎

试管管口和三角瓶瓶口塞上棉花塞或硅胶塞后,再用双层报纸包扎好(如用牛皮纸包扎则效果更好),进行干热或湿热灭菌。试管较多时,一般 7 个或 10 个一组,再用双层报纸包扎。

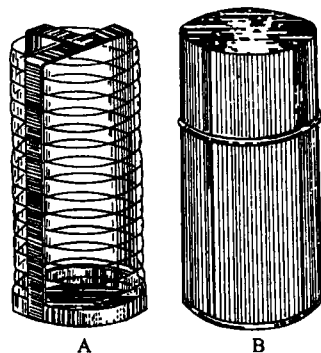


图 3 培养皿金属灭菌筒

A. 内部框架 B. 带盖外筒

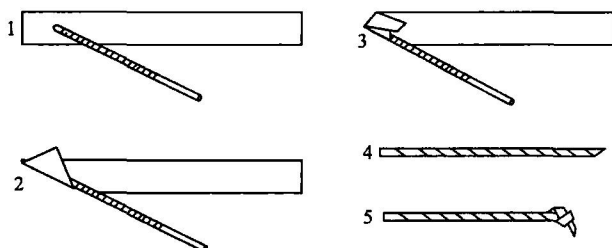


图4 移液管的包扎方法与步骤

## 四、灭菌设备操作技术

### (一) 上海申安 LDZX-50KBS 高压蒸汽灭菌器的使用

操作 LDZX-50KBS 高压蒸汽灭菌器(图 5)的步骤如下。

1. 打开电源与开关,检查水位显示灯,视水位显示灯状况,不加或添加适量水(高水位:不必加水;低水位:视情况而定;缺水:必加水;无显示:视情况而定)。

2. 加灭菌物品(注意:物品不能过于密集,否则会影响灭菌效果)。

3. 将锅盖旋到灭菌锅正上方密封处(注意:锅盖用手提着缓慢旋至正上方,不要触及密封圈,否则可能会造成密封圈破损;也不要将锅盖旋得太高,以免锅盖无法归位至正上方)。

4. 按待灭菌物品的要求,设定温度和时间。

5. 进入工作状态后,查看排气(水)阀,将阀门旋至排气处。

6. 待有大量白色蒸汽产生时,关闭排气阀,关闭后温度持续上升(注意:在使用高压蒸汽灭菌锅灭菌时,灭菌锅内冷空气的排除是否完全极为重要)。

7. 灭菌结束、压力降至“0”时,打开排气阀,气体排尽后方可开盖。利用锅内温度烤干棉塞和纱布后再取物。(注意:压力一定要降到“0”时,才能打开排气阀,开盖取物,否则就会因锅内压力突然下降,使容器内的培养基由于内外压力不平衡而冲出烧瓶口或试管口,造成棉塞沾染培养基而发生污染,甚至灼伤操作者)。

### (二) BCM-1300A 超净工作台的使用

BCM-1300A(图 6)的使用步骤如下。

1. 依次打开电源开关及工作开关,紫外灯照射 20 min,开启鼓风机运转 10 min,方可进行实验操作。



图5 LDZX-50KBS 高压蒸汽灭菌器

2. 将紫外灯切换到照明灯(鼓风机保持运转),打开玻璃门(玻璃门开启幅度不能过高,以不超过下巴为宜),手臂进入操作台前先点燃酒精灯,再用 75% 的酒精棉球擦净工作面,并对手进行消毒。

3. 操作时,应在工作台中央无菌区域进行(尽量不要讲话)。

4. 操作完毕后熄灭酒精灯,清理工作台。离开前,关闭工作台工作开关及电源开关,将所有物品归位,并带走废弃物。

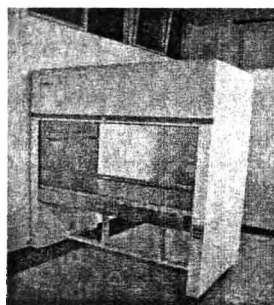


图 6 BCM-1300A 超净工作台

## 五、斜面培养基制备及倒平板技术

1. 搁置斜面。将灭菌的试管培养基冷至  $55^{\circ}\text{C}$  左右(以防斜面冷凝水太多),将试管口端搁在移液管或其他合适高度的器具上,搁置的斜面长度以不超过试管总长的  $1/2$  为宜(图 7)。

2. 倒平板。培养基冷至  $55^{\circ}\text{C}$  左右时,右手持装有培养基的三角瓶,左手将瓶塞取出,瓶口对着火焰。左手持培养皿将皿盖在火焰旁打开一缝,迅速倒入培养基约 15 mL(图 8),加盖,轻轻晃动培养皿,使培养基均匀分布在培养皿底部,然后平置于桌面上,冷却凝固后即成平板。



图 7 摆斜面

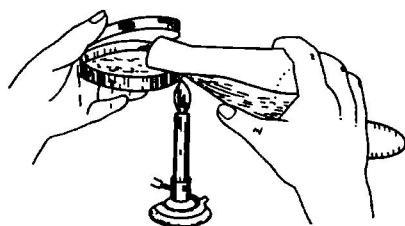


图 8 倒平板

## 六、接种技术

### (一) 接种环转接菌种

1. 接种环灭菌。左手持斜面培养物,右手持接种环,按图 9 所示方法将接种环进行火焰灼烧灭菌(烧至发红),然后在火焰旁边打开斜面培养物的试管塞(注意:塞子尽量避免置于桌上),并将管口在火焰上灼烧数秒(图 10)。

2. 取培养物。在火焰旁,将接种环轻轻插入试管的上半部(此时不要接触斜面培养物),至少冷却 5 s 后,挑取少许培养物(菌苔),再烧一下管口,加塞,并将其置于试管架中(图 10)。

3. 接种。用左手迅速从试管架上取出一支未接种的斜面培养基,在火焰旁取

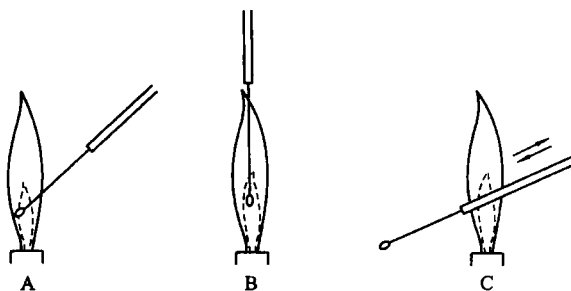


图9 接种环(针)的火焰灭菌步骤

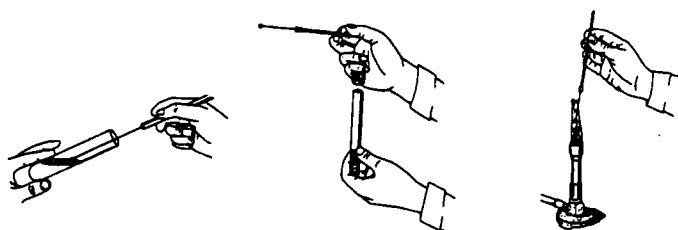


图10 接种环取斜面培养物的操作程序

下塞子,管口灼烧数秒,将沾有少量菌苔的接种环迅速接触试管底部培养基表面(注意:接种环不要接触试管口),并从下至上划一直线,或从其底部开始向上作波浪形划线接种。完毕后,同样烧一下试管口,加塞,将接种环在火焰上灼烧后放回原处。如果是向盛有液体培养基的试管和三角瓶中接种,则应将挑有菌苔的接种环首先在液体表面的管内壁上轻轻摩擦,使菌体分散从环上脱开,进入液体培养基中。

上述无菌操作技术也可按图 11 的方式,将待接和被接的两支试管同时拿在左手上进行。

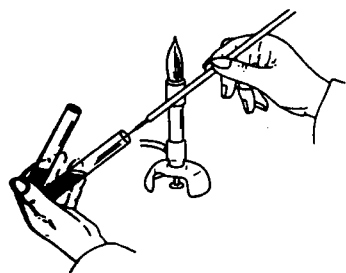


图11 手持两支试管的接种方式

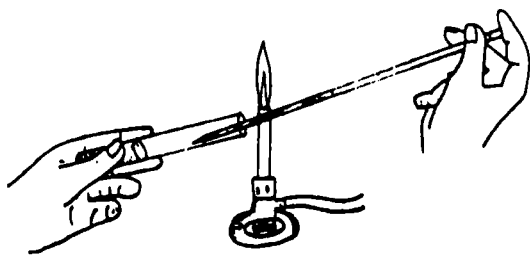


图12 用移液管吸取菌液

## (二) 移液管转接菌液

轻轻晃动装有菌液的试管(注意:不要溅到管口),暂置于试管架上。取一支已灭菌的移液管,按图 12 所示方式取一定量的菌液,迅速转入另一支装有培养液或无菌

水的试管中。

### (三) 平板划线技术

按无菌操作(参考图 11),用接种环取菌悬液或菌苔。在近火焰处,左手拿皿底,右手拿接种环(图 13),划线。方法如下(划线的方法有很多,但无论采用哪种方法,其目的都是通过划线将样品在平板上进行稀释,培养后能形成单菌落)。

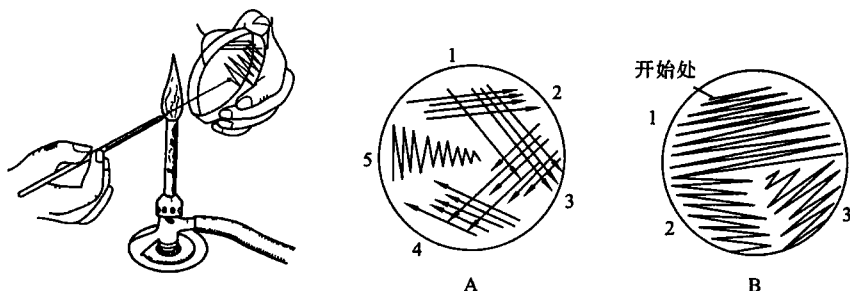


图 13 平板划线

方法一:用接种环先在平板的一边作第一次平行划线 3~4 次,再转动平板约  $70^\circ$ ,并将接种环上剩余物烧掉,待冷却后通过第一次划线部分作第二次平行划线(这样第二次划线是在第一次基础上稀释的),再用同样的方法划 1~2 次(图 13A)。划线完毕后,盖上皿盖,倒置于培养箱中培养。

方法二:直接连续密集划线,划线完毕后,盖上皿盖,倒置于培养箱中培养(图 13B)。

### (四) 土壤样品的梯度稀释涂平板技术

1. 取土样。取表层以下 5~10 cm 处的土壤,放入取样袋中,置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中暂存。

2. 土样处理。取土样 10 g,迅速倒入带玻璃珠的 90 mL 无菌水瓶中(玻璃珠用量以充满瓶底为宜),振荡 15~25 min,使土样充分打散。

3. 梯度稀释。用 1 mL 的无菌移液管,从中吸取 1 mL 的土壤悬液,加入盛有 9 mL 无菌水的试管中,充分混匀,然后用无菌移液管从此试管中吸取 1 mL 加入另一盛有 9 mL 无菌水的试管中,混合均匀,以此类推制成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  等不同梯度的土壤溶液(图 14)。

注意:严格的条件下,稀释前,先用移液管吸吹 3 次(混合均匀)。每一个稀释度更换一支移液管。每次吸上的液面要高于前一次,以减少稀释中的误差。

4. 涂布。取平板,皿底分别用记号笔写上稀释度,然后用无菌移液管分别从  $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$  三管土壤稀释液中各吸取 0.1 mL,对号放入已写好稀释度的平板中(从低浓度到高浓度依次取,不用更换移液管),用无菌玻璃涂布棒按图 15 所示方式在培养基表面轻轻涂布均匀,室温下静置 5~10 min,使菌液吸附进入培养基。

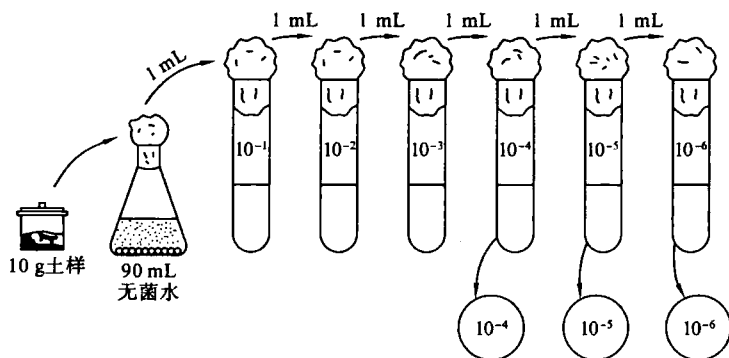


图 14 土壤梯度稀释操作过程

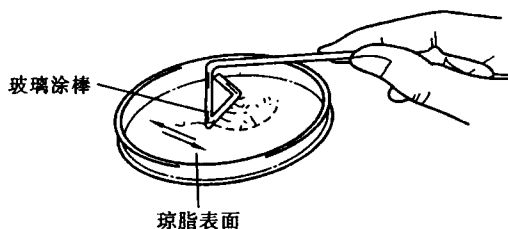


图 15 平板涂布操作图

平板涂布方法:将 0.1 mL 菌悬液小心滴在平板培养基表面中央位置(为使 0.1 mL 的菌液全部滴在培养基上,将移液管倾斜,尖端轻轻接触培养基表面,液体会自然全部流下)。右手拿无菌涂布棒平放在平板培养基表面上,将菌悬液先沿一条直线轻轻地来回推动,使之分布均匀,然后改变方向沿一垂直线来回推动,平板内的边缘处可改变方向,用涂布棒再涂几次。

## 七、光学显微镜油镜的使用

1. 装片放在载物台上,用压片夹固定。
2. 低倍镜找出待检菌的范围,然后在待检部位上加一滴香柏油,转动镜头转换器,将油镜头置于工作位置,从侧面观察并缓慢转动调节器,使油镜头浸没在油滴内,当油镜头几乎接触玻片时停止转动。
3. 眼睛移至目镜,缓慢转动微调节器(只能朝远离装片的方向调节,以免压碎装片和损坏镜头),待看到模糊物象时,再用细调节器转动至物象完全清晰为止。
4. 观察完毕,取下装片,立即用擦镜纸顺一个方向旋转擦拭镜头上的香柏油。若油已干,应先将二甲苯滴在擦镜纸上,擦净,再用另一干净擦镜纸拭去镜头上沾有的二甲苯。
5. 使用完毕后,填上使用记录,并将显微镜旋转妥当。

## 八、标 签

任何一个实验,在动手操作前均需首先将器皿用记号笔做上记号(最好用记号笔的小头书写,字尽量小些,易清洗),记好班级、姓名、日期、材料名称等必要信息。

注意:培养皿的记号一般写在培养皿底部,便于观察,也不易与其他平板相混淆。

---

附:

### 油镜提高分辨率原理

油镜与其他物镜不同的是载玻片与物镜之间隔一层油质。如香柏油的折射率  $n=1.52$ ,与玻璃相同。油镜的作用:① 光线通过油镜不减低视野的照明度;② 更主要的是能增加数值孔径,提高显微镜的放大效能。

$$\text{分辨率} = \frac{\lambda}{2NA}$$

其中, $\lambda$  为光波波长;物镜的数值孔径值  $NA=n \times \sin \alpha$ , $\alpha$  为镜口角的半数。可知  $n$  (介质折射率)的大小对提高显微镜的分辨率起着关键性的作用。

---



## II 基础性实验

### 实验一 玻璃器皿的包扎及灭菌

#### 【课前预习】

1. 高压蒸汽灭菌原理。
2. 上海申安 LDZX-50KBS 灭菌锅的使用方法。

#### 【目的要求】

1. 学习并掌握玻璃器皿的包扎方法。
2. 掌握高压蒸汽灭菌的基本原理及操作方法。

#### 【基本原理】

微生物学实验所用的器皿大多数要进行消毒、灭菌,才能用来培养微生物。只有玻璃器皿的包扎方法正确合理,才能在使用过程中有效防止杂菌的污染。玻璃器皿包扎好后,一般用高压蒸汽灭菌法进行灭菌。

高压蒸汽灭菌是将待灭菌的物品放在一个密闭的加压灭菌锅内,通过加热,使灭菌锅隔套间的水沸腾而产生蒸汽。待蒸汽急剧地将锅内的冷空气从排气阀中驱尽,然后关闭排气阀,继续加热。此时由于蒸汽不能溢出而增加了灭菌锅内的压力,从而使沸点增高,得到 100℃ 以上的高温,导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。

#### 【实验用品】

棉花,试管,培养皿,纱布,三角瓶,棉线,量筒,牛皮纸(或旧报纸),LDZX-50KBS 立式高压蒸汽灭菌锅等。

#### 【方法步骤】

1. 清洗试管、三角瓶、培养皿等玻璃器具,烘干。
2. 制作试管棉塞及三角瓶棉塞(参照微生物学实验基本操作技术)。
3. 用量筒或吸管取适量自来水于三角瓶和试管中,包扎好以制备无菌水。
4. 包扎空培养皿、移液管。
5. 灭菌(参照微生物学实验基本操作技术)。

#### 【实验结果】

记录自己制作的实验用品(含无菌水)的名称、规格与数量。

#### 【注意事项】

1. 实验前,熟悉实验室布局,了解实验仪器用品摆放规律及用途。
2. 制备无菌水时,试管装水量一般控制在试管高度的  $1/5 \sim 3/5$ ,三角瓶装水量不宜超过规格容量的  $1/2$ (装量过多,灭菌过程中易润湿棉塞甚至喷出管口或瓶口)。
3. 灭菌锅的操作安全。