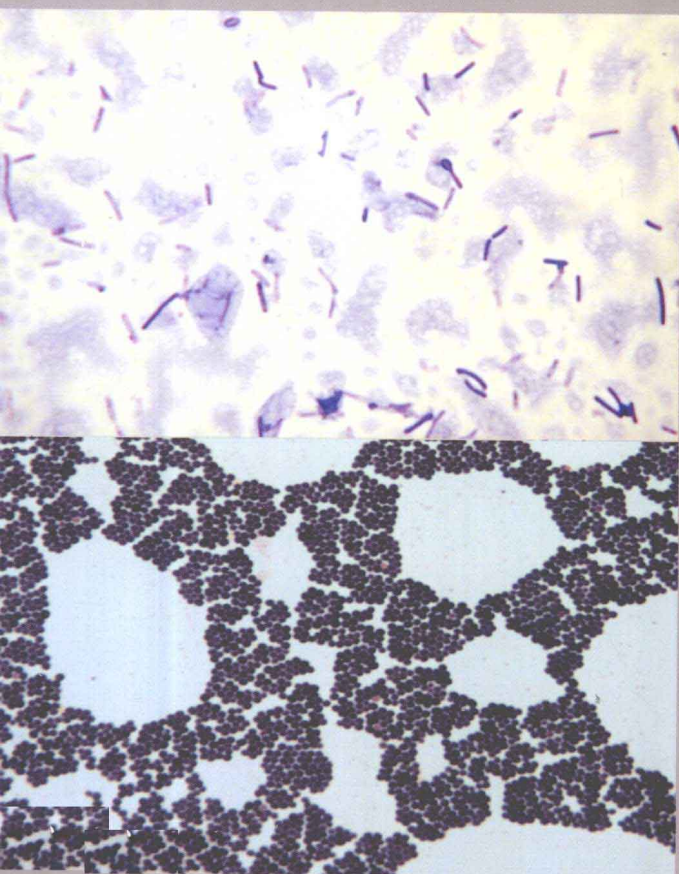




国家级生物学实验教学示范中心教材

现代微生物学实验技术



MODERN
EXPERIMENTAL
TECHNIQUE
OF
MICROBIOLOGY

◆ 朱旭芬 编著



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

国家卫生和计划生育委员会规划教材
全国高等医药院校教材

现代微生物学实验技术



MODERN
EXPERIMENTAL
TECHNIQUE
OF
MICROBIOLOGY

周俊英 主编

科学出版社
SCIENCE PUBLISHING

国家级生物学实验教学示范中心

国家生命科学与技术人才培养基地

生物学国家理科基础研究和教学人才培养基地教材

现代微生物学实验技术

编 著	朱旭芬	
参 编	贾小明	张心齐
	吴月红	陈中云



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

现代微生物学实验技术/朱旭芬编著. —杭州: 浙江大学出版社, 2011. 8

ISBN 978-7-308-08872-5

I. ①现… II. ①朱… 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 (2011) 第 139542 号

内容提要

本教材以自然环境中功能微生物的分离、筛选、鉴定及生物活性物质的研究为主线, 主要包括了八部分 107 个实验内容, 既有微生物分离、形态观察、生理生化特征等基础性实验, 还涵盖了微生物分子生物学、化学分类和生物活性分析等设计性和科研性综合实验内容。每一个实验介绍试剂、设备仪器和实验操作过程, 还突出介绍实验原理、注意事项以及评议方面的内容, 将多年来积累的教学以及科研方面的经验充实到教材内容中去, 并且在教材中加入一些原理的说明图片与实验结果的照片。本书可供不同层次、不同教学学时数要求的人员使用。

现代微生物学实验技术

朱旭芬 编著

责任编辑 杜玲玲 (dll@zju.edu.cn)

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州大漠照排印刷有限公司

印 刷 德清县第二印刷厂

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 19.25

插 页 4

字 数 511 千

版 次 2011 年 8 月第 1 版 2011 年 8 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-08872-5

定 价 36.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话 (0571) 88925591

前 言

微生物学是现代生物科学的前沿学科之一。它就像蓬勃旺盛的生长点,促进整个生物科学向前发展。据统计,在国际上获得诺贝尔生理学或医学奖的研究中,有近 60%的工作是以微生物作为材料的。此外在高等动植物的许多研究中,在技术手段上有逐渐微生物化的趋势,因此掌握微生物学的知识和操作技能,无疑是掌握向生命科学进军的一把“金钥匙”。

为了满足当前学科发展的需要,使学生得到很好的微生物学实验操作与技能的训练,充分了解与掌握先进的实验技术与方法,尽快与发展的学科前沿接轨,我们本着基础性、实用性与先进性结合的原则,在总结多年的科研与教学经验的基础上编写了本实验教材。

教材系统介绍了微生物学研究中大量使用的实验技术,从较为基础的微生物分离、形态观察、生理生化特征研究到相对复杂的分子生物学、化学分类特征以及微生物生物活性的研究。除了系统介绍常用和经典的实验技术以外,教材的编写突出了当前微生物分子生物学研究领域中采用的新技术与新方法,可为初学者提供有益的帮助,对科研人员以及研究生也有一定的参考价值。

本教材共包含了 107 个实验,按类归纳为八个部分,每一部分进行了综合性说明。每一个实验又系统介绍其原理、试剂、设备仪器和实验操作过程,让读者明了实验目的、方案设计以及具体步骤和结果处理。此外,实验注意事项以及评议部分是作者多年研究工作的心得与体会,并且将实验获得的结果图片结合进去加以说明,相信对读者会有所帮助。

作者都是长期在第一线从事微生物学科研与教学工作的同志,在编写过程中,我们参考了国内外大量微生物学实验技术方面的书籍和互联网的资料以及编著人员的科研教学成果,引用了其中的一些图片。教材的建设得到了浙江大学 2009 年校级实验教学研究立项。浙江大学出版社阮海潮副编审以及杜玲玲编辑在出版过程中给予了大力的支持,并付出了辛勤的劳动,在此一并表示衷心的感谢。

限于我们的学识水平,书中难免有不当之处,敬请专家和同仁给予指导,衷心希望读者提出宝贵意见,以利教材的不断完善。

朱旭芬

2011 年春于浙江大学紫金港校区

实验室守则及要求

1. 衣着整洁,穿白大褂,禁止穿拖鞋。留有长发者,请戴帽套或以皮圈束于脑后,以防头发被火点着和污染实验材料。

2. 自觉遵守课堂纪律,维持课堂秩序,做到不迟到、不早退,中途不随意离开。实验室内禁止饮食,实验桌上勿堆放书包、衣物及其他杂物,勿高声谈话及随意走动,保持安静、整洁的环境。

3. 实验前须认真预习,熟悉实验目的、原理及操作内容,了解所用的仪器用具,做到心中有数;实验中应严格按操作规程进行,认真操作、仔细观察,及时记录实验现象及结果。注意上课所告知的注意事项。如有任何状况或疑问,请随时提问,切勿私自变更实验程序;实验结束后,仔细地分析和总结实验结果,认真做好每一天的实验报告,严禁抄袭。

4. 仪器使用前须了解其性能、配备及正确的操作方法,严禁拆卸仪器零件及附件,勿私自调整。实验器具应保持清洁,任何使用过的器具及玻璃器皿须洗净后放回原处。使用贵重精密仪器时,应严格遵守操作规程,发现故障立即报告,不得擅自拆检。切勿触摸电极或电泳槽内的溶液,手湿切勿开启电源。

5. 实验台面应随时保持整洁,仪器、药品摆放整齐。仪器损坏时,应及时报告。公用试剂用完后,应立即盖好盖子放回原处。打翻任何药品试剂,请随即清理。

6. 实验室内的一切物品未经同意不得随意携带出室外。每组分配的仪器、试剂请妥善保管,课程结束后如数清点返回,公用仪器请爱惜使用。实验前后请清理擦拭工作区,并随时保持环境清洁。

7. 实验完毕后,请清理实验台,倒垃圾,关闭灯光和空调,离开实验室前记得洗手。

8. 值日生制度:每天安排3~4人值日,其职责是组织协调实验器具的使用以及实验的进程,负责公共实验器具的整理,操作台、水槽、地板等实验室卫生工作和一切服务性工作,并注意实验室的水、电、门、窗等方面情况的检查,严防安全事故的发生。

目 录

实验守则及要求

导论	1
----------	---

1 微生物实验器材与基本操作	5
----------------------	---

1-1 实验室的基本设置	5
--------------------	---

1-2 培养器皿准备	7
------------------	---

1-3 培养基的制备	10
------------------	----

1-4 灭菌与消毒	17
-----------------	----

1-5 微生物的无菌操作与检查	22
-----------------------	----

1-6 微生物的接种与培养	27
---------------------	----

2 微生物的形态特征	32
------------------	----

2-1 光学显微镜的使用	32
--------------------	----

2-2 微生物的单染色	37
-------------------	----

2-3 革兰氏染色	39
-----------------	----

2-4 鞭毛染色与运动观察	41
---------------------	----

2-5 荚膜染色	45
----------------	----

2-6 芽孢染色	47
----------------	----

2-7 细菌的异染颗粒	49
-------------------	----

2-8 细菌类脂粒 PHB	50
---------------------	----

2-9 放线菌的观察	51
------------------	----

2-10 霉菌的观察	54
------------------	----

2-11 酵母菌的观察	58
-------------------	----

2-12 噬菌斑及效价	61
-------------------	----

2-13 微生物的群体特征	63
---------------------	----

2-14 电子显微镜	67
------------------	----

3 微生物菌种的自然选育	74
--------------------	----

3-1 自然界微生物的采样与保藏	75
------------------------	----

3-2 目标微生物的富集	77
--------------------	----

3-3 微生物的分离、纯化	80
---------------------	----

3-4 目标微生物的初筛	85
--------------------	----

3-5 苯酚降解菌的分离	90
--------------------	----

3-6 表面活性剂降解菌的分离	91
-----------------------	----

3-7 光合细菌的分离及培养	92
----------------------	----

3-8 抗生素产生菌的分离	94
---------------------	----

3-9 厌氧微生物的分离与培养	96
-----------------------	----

3-10 产甲烷菌分离和纯化	102
----------------------	-----

3-11 厌氧培养箱的使用	104
---------------------	-----

3-12 菌种保藏	107
-----------------	-----

4 微生物的生长特征与计数	113
---------------------	-----

4-1 微生物大小的测定	113
--------------------	-----

4-2 微生物的显微直接计数法	115
-----------------------	-----

4-3 微生物的活菌计数	117
--------------------	-----

4-4 微生物的最大或然数法	119
----------------------	-----

4-5 光电比浊法测定微生物生长曲线	125
--------------------------	-----

4-6 温度对微生物生长的影响	128
-----------------------	-----

4-7 pH对微生物生长的影响	130
-----------------------	-----

4-8 渗透压对微生物生长的影响	132
------------------------	-----

4-9 氧气对微生物生长的影响	134
-----------------------	-----

4-10 紫外线对微生物生长的影响	135
-------------------------	-----

4-11 化学药剂对微生物生长的影响	136
--------------------------	-----

4-12 抗生素对微生物生长的影响	137
-------------------------	-----

5 微生物的分子生物学特征	139
---------------------	-----

5-1 染色体 DNA 的提取	140
-----------------------	-----

5-2 核酸检测	144
----------------	-----

5-3 PCR 扩增 16S 或 18S rRNA	147
---------------------------------	-----

5-4 TA 克隆	154
-----------------	-----

5-5 质粒的提取	157
-----------------	-----

5-6 测序与序列同源性分析	160
----------------------	-----

5-7 微生物的系统发育分析	163
----------------------	-----

5-8 G+C 含量的测定	168
---------------------	-----

5-9 核酸杂交	173
----------------	-----

5-10 非培养样品的分析	176
---------------------	-----

5-11 变性梯度凝胶电泳	179
---------------------	-----

5-12 宏基因组文库构建与筛选	185
------------------------	-----

5-13 脉冲场凝胶电泳	191
--------------------	-----

5-14 荧光原位杂交技术	193	6-27 赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶试验	234
6 微生物的生理生化特征	198	6-28 精氨酸双水解试验	236
6-1 糖(醇、苷)类利用	198	6-29 抗生素敏感性试验	236
6-2 氧化-发酵试验(O-F 试验)	200	6-30 微量多相试验鉴定系统	239
6-3 甲基红试验	203	7 微生物的化学分类特征	242
6-4 V-P 试验	204	7-1 细胞壁肽聚糖组分分析	243
6-5 七叶苷水解	206	7-2 细胞膜中醌类的分析	248
6-6 淀粉水解试验	207	7-3 脂肪酸的分析	252
6-7 葡萄糖酸盐(或酯)氧化试验	208	7-4 极性酯的分析	257
6-8 纤维素分解	209	7-5 细胞壁氨基酸与多糖的分析	262
6-9 石蕊牛乳试验	210	7-6 多胺分析	264
6-10 吲哚试验	211	8 微生物发酵与生物活性的测定	266
6-11 硫化氢试验	213	8-1 几丁质或壳聚糖酶活测定	266
6-12 蛋白氨化试验	215	8-2 淀粉酶活性的测定	269
6-13 明胶液化试验	216	8-3 蛋白酶活性的测定	271
6-14 酪素水解试验	217	8-4 脂肪酶活性的测定	274
6-15 酪氨酸水解试验	218	8-5 纤维素酶活性测定	275
6-16 硝酸盐还原试验(反硝化作用)	219	8-6 脱氢酶活性的测定	280
6-17 硝化作用	222	8-7 酚分解能力的测定	282
6-18 过氧化氢酶试验	223	8-8 表面活性剂的含量测定	283
6-19 氧化酶试验	225	8-9 抗生素的效价	284
6-20 脲酶试验	227	8-10 COD 的测定	287
6-21 苯丙氨酸脱氨酶	228	8-11 BOD 的测定	291
6-22 脂肪酶	229	8-12 甜酒酿发酵	294
6-23 磷酸酶试验	231	8-13 泡菜发酵及亚硝酸含量的测定	296
6-24 DNA 酶活性	231	9 设计性实验	300
6-25 β -半乳糖苷酶试验	232	参考文献	302
6-26 卵磷脂酶试验	233		

导 论

微生物(microorganism, microbe)在地球上已存活 38 亿年,漫长的历史进化使其具备了近乎无限的代谢能力。微生物在自然界中分布极为广泛,除火山中心区域以外,在生物圈的每一个角落都有微生物的踪迹。万米深的海底、千米以下的地层、几万米的高空以及动、植物的体表、体内,几乎都有微生物的存在。

土壤有“微生物天然培养基”或“微生物大本营”的称号,是人类最丰富的“菌种资源库”。土壤中微生物的数量和种类很多,包含细菌、放线菌、真菌、藻类和原生动物等类群。其中细菌最多,约占土壤微生物总量的 70%~90%,放线菌、真菌次之,藻类和原生动物等较少。1 g 土壤中约有 1 亿个细菌,1 000 万个放线菌,100 万个真菌,55 万个藻类。此外,据报道 1 g 新鲜叶子表面可附生 100 多万个微生物。人体肠道中经常聚集着 100~400 种不同类群的微生物,估计它们的个体总数大于 100 万亿,重量约等于粪便干重的 1/3。

海洋覆盖地球表面积的 71%,其平均深度为 4 km,一般含盐范围为 3.2%~4%。而海洋水深大于 1 000 m 的深海,占被海水覆盖的海洋表面积的 88%和海洋总体积的 75%。深海具有高压、低温或高温和低营养水平等特点。深海的大部分区域常年低温,保持在 2~3 ℃左右,海水的 pH 多为碱性(pH 8.3~8.5)。按每 10 m 水深增加 1 大气压计算,在 11 000 m 的海洋深处,压力可以达到 100 MPa。据估计,浮游植物光合作用产生 95%的有机物质在海水表层 100 m 和 300 m 之间进行循环,仅有 1%的有机物质可以到达深海底部。深海环境复杂多样,包括海底平原、海山、深海峡谷、热液口、冷渗口等,加之季风洋流等的影响,形成了形形色色的海底生态系统,孕育了各式各样的深海微生物群落。1977 年 2 月科学家乘着“阿尔文”(Alvin)号潜水艇来到了赤道附近的东太平洋加拉帕戈斯群岛,当下潜到 2 500 m 深的海底时,发现数十个高约 2~5 m 的柱状物正向海水中喷着黑色的烟雾,即“黑烟囱”(图 0-1)。黑烟囱(black chimney)是由海底地壳的裂缝制造的、大量溶解了地底金属元素和硫化物的液体从裂缝中喷涌出来后,一遇到冰冷的海水就形成了浓密的黑色烟雾,这些喷发口被称为海底热液口(hydrothermal vent),如今已经发现 140 多处这样的喷口场。黑烟囱附近的生物量往往是附近深海环境中生物量的数万倍,生活着大量奇形怪状的生物。此外,深度 1 万米的海底温泉中,硫细菌的含量达每毫升 100 万~100 亿个,它们既耐高温(100 ℃)又耐高压(1 140 大气压)。

此外,还有些特殊的微生物能在一般生物不能生存的极端环境中(如高温、高压、强酸、强碱、高盐或无氧)生活,如饱和盐浓度的盐湖、pH 值低于 2 的酸性地域都生活着形形色色的微生物,人们称之为极端微生物(extremophiles)。先前已发现的支持极端微生物生长的最高温度极限为 113 ℃,最低的 pH 值

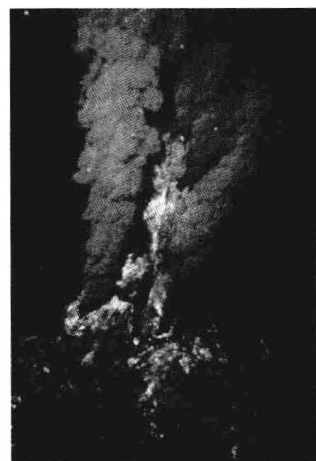


图 0-1 海底热液口的“黑烟囱”

达到 0.8,最高的盐浓度达到饱和的 5.2 mol/L(30%)。随着研究的深入和新研究方法的采用,被发现的微生物生存的条件极限也不不断地被改写。2003 年 8 月美国马萨诸塞大学的研究人员在《科学》杂志上报道了一种极端嗜热古菌——能够在 121℃ 高温下生存繁殖的食铁微生物。这种微生物是在太平洋深海海床火山口被发现的,该处温度高达 400℃。

有分析表明,微生物占地球生物总量的 60%,全世界海洋中微生物的总量估计达 280 亿吨。这些数据说明了微生物在自然界中的数量巨大。但由于微生物的发现较晚,加上鉴定微生物种的工作以及划分种的标准等问题较复杂,1973 年已知微生物约有 10 万种,1995 年约 20 万种。据《国际微生物学会联盟通讯》有关专家于 1995 年的估计,全球约有 50 万~600 万种微生物。而有人估计至今已被研究和记载过的还不到 5%~10%,目前在人类生产和生活中开发应用的不会超过其存在量的 1%。所以说自然界微生物的资源是极其丰富的,微生物利用的前景十分广泛,微生物研究工作大量而繁重。

微生物是生物学基础理论研究中最为热衷的研究对象,微生物学在现代生物科学中占有重要的地位,它既是基础学科,又是应用学科,它是了解自然界奥妙、打开自然界知识宝库极为重要的工具。特别是在生命的起源、生命的自我复制、生命的进化、生命分子的构成、遗传工程、发酵工程等重大课题研究中,由于微生物结构简单、生长繁殖速度快、易于培养等特点,使它早已成为科学家的掌上明珠。据统计,在国际上获得诺贝尔生理学或医学奖的研究中,有近 60%的工作是以微生物作为材料的,遗传工程的研究也首先在微生物方面找到突破口。因此微生物学是现代生物科学的前沿之一,它就像蓬勃旺盛的生长点一样,促进整个生物科学向前发展。此外在高等动、植物的许多研究中,在技术手段上有逐渐微生物化的趋势。如液体培养基培养方法的应用、单倍体培养、体细胞重组等无一不是从微生物技术中演化而来。因此掌握微生物学的知识和技能,无疑是掌握向生命科学进军的一把“金钥匙”,它将有助于我们在攀登生物科学的高峰过程中开启一扇扇奇妙之门。

未知微生物或许是环境微生物的主体,是一个极具利用潜力的巨大种群,也是地球上最大的尚未开发的自然资源,其可能赋予无限多样的次生代谢产物,是开拓新资源的目标。开发未知微生物一般包括以下几个环节。

1. 菌株分离:自然界微生物资源的开发原则与方法是:采集样品(土壤、水体等)→富集培养(增殖培养)→纯种分离→初筛→复筛(生产性能测定)→发酵试验→菌种鉴定与微生物分类。

2. 菌株的鉴定:微生物形态微小,结构简单,除了像高等生物那样采用传统特征(classical characteristics)之外,还采用分子特征(molecular characteristics)分类鉴定。传统特征主要指形态学特征(morphological characteristics)、生理生化特征(physiological characteristics)、生态学特征(ecological characteristics)和遗传学特征(genomic characteristics)。随着研究方法的进步,细菌分类学的研究从最初的形态描述、生理生化鉴定,发展到后来的数值分类、生物大分子的化学分析以及目前的基因组碱基构成、DNA 相似性和系统发育的分析(表 0-1)。

表 0-1 细菌的分类鉴定

技 术	内 容
培养特性	菌落、形态、颜色、气味
形态观察	细菌染色形态、大小、运动性、是否形成芽孢、鞭毛、内含物等
生理特性	生长温度范围、pH 值范围、耐盐性、需氧特性等
生化特性	碳源利用、碳水化合物氧化反应与发酵、酶谱等
抑制实验	选择培养基、抗生素抗性、染料等
核酸分析技术	16S rRNA 序列的分析、核酸杂交、G+C 含量的测定
化学分类技术	脂肪酸、极性脂、分枝酸、醌类、糖类、多胺分析、全菌蛋白和外膜蛋白电泳分析等

3. 代谢产物(metabolite)研究: 微生物在生长过程中,除利用外源营养物质合成新的细胞外,还会产生一些有机化合物分泌到微生物的体外,这些胞外代谢产物的种类繁多,且因微生物的种类而异。一般来说,微生物的胞外代谢产物主要包括以下四个部分。

(1) 代谢副产物(outgrowth): 见表 0-2。

表 0-2 代谢副产物

产物名称	用 途	主要生产菌
甲烷	能源	奥式甲烷杆菌
乙醇、异丙醇	医药、化工原料、饮料等	酵母菌
异丙醇、丙酮、丁醇	防冻剂、火胶溶剂、树胶等	丁酸梭菌
丙酮、丁醇、甘油	重要的有机溶剂	丙酮丁醇梭菌
甘油、甘露醇	溶剂、润滑剂、化妆品、硝化甘油炸药	酵母菌
甘露醇、乙酸	合成树脂、增韧剂等	曲霉菌
乙酸	食醋、化工原料	醋酸杆菌
草酸	印染、漂洗皮革、制造塑料和染料	曲霉菌和青霉菌
乳酸	食品乳酸、医药和化工原料	乳酸菌

(2) 中间代谢产物: 指细胞在代谢途径中产生的用于合成蛋白质、核酸、类脂和多糖等细胞物质的一些小分子物质(表 0-3)。如氨基酸、核苷酸、有机酸和单糖的衍生物。中间代谢产物一般不分泌到微生物体外,而只有当微生物细胞生物合成受阻或外源碳源浓度较高的情况下,才会有大量的积累和外流。

表 0-3 中间代谢产物

产物名称	用 途	主要产生菌
延胡索酸	抗氧化剂、合成树脂、染料	黑根霉
琥珀酸	制漆、染料	根霉菌
苹果酸	食品	黑曲霉
柠檬酸	饮料、化工原料	黑曲霉
核黄素	医药	棉病囊霉
谷氨酸	味精	谷氨酸棒杆菌
肌苷酸	调味品	产氨短杆菌

(3) 次生代谢产物(secondary metabolites): 指由微生物细胞合成的, 分子结构比较复杂的一些化合物, 它既不参与细胞的组成, 又不是酶的活性基团, 也不是细胞的储存物质, 它们中的大多数分泌于微生物的体外, 如抗生素(antibiotic)、毒素(toxin)、维生素(vitamin)、激素(hormone)和色素(pigment)等。

(4) 胞外水解酶(hydrolase)类: 许多微生物可产生胞外水解酶。这类水解酶包括淀粉酶(amylase)、蛋白酶(protease)、脂肪酶(lipase)、果胶酶(pectase)、纤维素酶(cellulase)、葡萄糖氧化酶(oxidase)、葡萄糖异构酶(isomerase)等。水解酶可用于食品、酿造、纺织、制革、医药和生化试剂等各个领域。

参考文献

1. Whitaker R J, Grogan D W, Taylor J W. Geographic Barriers Isolate Endemic Populations of Hyperthermophilic Archaea. Science, 2003, 301(5635): 976 - 978.
2. Colwell R R. Polyphasic taxonomy of the genus vibrio; numerical taxonomy of vibrio cholerae, vibrio parahaemolyticus, and related vibrio species. J Bacteriol, 1970, 104: 410 - 433.
3. Stackebrandt E, Goebel B M. Taxonomic note: a place for DNA - DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44: 846 - 849.
4. Stackbrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiology Today, 2006, 33: 152 - 155.

1 微生物实验器材与基本操作

1-1 实验室的基本设置

进行微生物学相关实验须具备的仪器设备包括：无菌室、超净工作台、离心机、微波炉、恒温培养箱、高压灭菌锅、恒温摇床、水浴锅、冰箱、显微镜、干燥箱、分析天平、温度计、试管架、漏斗、碾钵、容量瓶、pH 计、纯水装置、抽滤装置、微量移液器、厌氧培养箱、厌氧罐、液氮瓶等，具体见表 1-1-1 所示。

表 1-1-1 微生物实验常用器具

名 称	数 量
接种环(inoculating loop)	15 根
接种针(inoculating needle)	15 根
杜氏小管(Durham tube): 6 mm×36 mm	30 支
微量移液器(pipetman): 1 000 μL、200 μL、20 μL	各 15 支
1 000 μL、200 μL、20 μL 吸头以及吸头盒,Eppendorf 管以及饭盒	30 套
移液管(glass pipette): 1 mL、2 mL、5 mL、10 mL 的刻度玻璃吸管	90 支
试管(test tube): 大 18 mm×180 mm、中 15 mm×150 mm、小 12 mm×100 mm	300 支
试管塞(硅胶塞)、铝制或塑料制的试管帽	300 个
螺口试管(screw-cap test tube)	200 支
试管架(test tube rack)	15 个
三角瓶(Erlenmeyer flask)100 mL、250 mL、500 mL、1 000 mL	各 50 只
培养皿(petri dish): 底直径 90 mm,高 15 mm	200 付
载玻片(slide): 75 mm×25 mm,用于微生物涂片、染色,供形态观察等	300 片
盖玻片(cover slip)	500 片
凹玻片(concave slide): 有一圆形凹窝,作悬滴观察活细菌以及微室培养用	30 片
血细胞计数板(haemocytometer)	15 片
目镜测微尺(ocular micrometer)	30 片
镜台测微尺(stage micrometer)	30 片
光学显微镜(microscope)	30 台
双层瓶(double bottle): 内层小锥形瓶盛放香柏油(cedar oil),供油镜头观察微生物时使用,外层瓶盛放二甲苯,用以擦净油镜头	30 只
滴瓶(dropper bottle): 用来装各种染料、生理盐水等	100 只

续 表

名 称	数 量
烧杯(beaker): 50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1 000 mL 等	30 只
玻璃漏斗(glass filler)	20 只
量筒(cylinder)	10 个
玻棒(stirring rod)	15 支
三角刮刀(涂棒)(glass scraper)	30 支
试剂瓶(reagent bottle)	300 个
滴管(dropper tube)	100 个
高压灭菌锅(autoclave)	2 台
培养箱(incubator)	2 台
电热恒温干燥箱 180 °C	1 台
摇床(shaker)	3 台
培养室(incubation chamber)	1 个
超净台(clean bench)	2 个
恒温水浴锅(water bath)	3 个
分析天平(analytical balance)	2 台
分光光度计(spectrophotometer)	1 台
pH 计(酸度计,pH meter)	1 台
冰箱(refrigerator)	1 台
微波炉(microwave oven)	1 台
记号笔、洗耳球、药勺、镊子(forceps)	15 支
电炉(electric furnace)、石棉网	10 个
离心机(centrifuge)、离心管(centrifuge tube)	2 台
酒精灯(alcohol burner)	15 个
紫外分光光度计(ultraviolet spectrophotometer)	1 台
石英杯(quartz cup)	1 个
核酸电泳装置(electrophoresis apparatus)	3 套
凝胶成像仪	1 台
制冰机(ice machine)	1 台
PCR 仪	1 台
冰箱	3 台
注射器(injector): 1 mL、2 mL、5 mL、10 mL、20 mL、50mL	各 15 只
水纯化装置	1 台
抽滤装置	1 台

评议

1. 微量移液器有不同的量程(图 1-1-1),请选择合适的量程范围的微量移液器。

2. 微生物学实验所用的玻璃试管,其管壁必须较厚,这样在塞塞子时,管口才不会破损。试管的形状要求没有翻口,否则微生物很容易从塞子与管口的缝隙间进入而造成污染。

3. 接种工具有接种环(inoculating loop)、接种针(inoculating needle)、接种钩(inoculating hook)、接种铲(inoculating shovel)、玻璃涂棒(glass scraper)等。制造环、针、钩、铲的金属一般为铂或镍,要求软硬适度,能经受火焰反复烧灼,又易冷却。

4. 接种环采用一段长约 5~8 cm 硬度适中的镍质电阻丝或特制的铂丝,安置在一金属棒上。接种细菌和酵母菌用接种环,其铂丝或镍丝的直径以 0.5 mm 为宜,环的内径约 2 mm,环面应平整。接种某些不易与培养基分离的放线菌和真菌,有时用接种钩或接种铲,其丝的直径要求粗一些,约 1 mm。

5. 用涂布法在琼脂平板上分离单个菌落时需用玻璃涂棒(glass scraper),涂棒是用直径 3~5 mm、长约 20 cm 的普通玻璃棒,在酒精喷灯火焰上把一端弯成三角形而成的。用于涂抹的一边要求平滑,否则会引起涂抹不均匀。同时前端应稍向下方倾斜,便于操作。

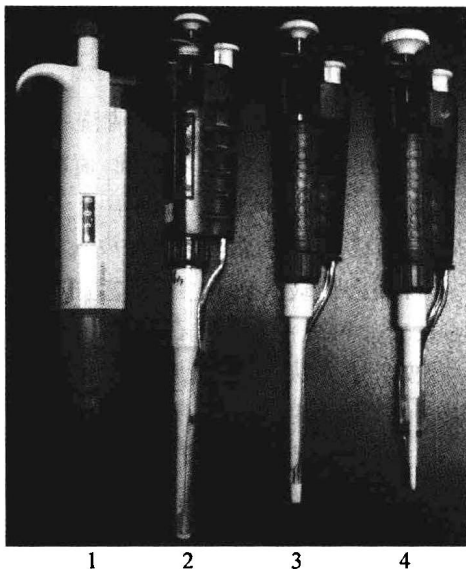


图 1-1-1 不同量程的微量移液器

1. 5 mL; 2. 1 mL; 3. 200 μ L; 4. 10 μ L

1-2 培养器皿准备

在进行微生物分离、纯化、培养等过程中,常会使用一些玻璃器皿,如试管、三角瓶、培养皿、烧杯、涂棒(三角刮刀)、移液管、量筒、载玻片与盖玻片等,这些器皿在使用前应根据具体的情况经过一定的处理,洗刷干净后,置于干燥箱中吹干或置于通风无尘的场所自然晾干,然后进行包装、经过灭菌后才能使用。

一、清洗

清洁的玻璃器皿是得到正确实验结果的重要条件之一。清洗的目的在于除去玻璃器皿上的污垢(灰尘、油污、无机盐等物质)。

实验室常用洗涤剂的种类及其应用: ① 洗衣粉: 使用时多用湿刷子(试管刷、瓶刷)蘸少许洗衣粉刷洗容器或载玻片和盖玻片,再用水冲洗。② 洗洁精: 在清洗盆中加入水后添加少量的洗洁精,然后用刷子擦拭、洗刷玻璃器皿等物品,用水冲洗干净,再用蒸馏水冲洗。③ 洗涤液: 通常用的洗涤液是重铬酸钾(或重铬酸钠)的硫酸溶液(具体见本节“四、评议”)。重铬酸钾与硫酸作用后形成铬酸,铬酸是一种强氧化剂,去污能力很强,实验室常用其洗去玻璃和瓷质器皿上

的有机质,但切不可用于洗涤金属器皿。

1. 玻璃仪器的清洗

(1) 新购买的玻璃器皿的清洗:新购买的玻璃器皿(包括载玻片、盖玻片、试管、吸管、平皿、三角瓶等)表面常附有游离的碱性物质,可先用洗洁精洗刷,用自来水洗净,然后浸泡在1%~2%盐酸溶液中过夜(不可少于4 h),以中和其碱质,再用自来水充分冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗两次,在55℃烘箱内烘干备用。

(2) 石英和玻璃比色皿的清洗:决不可用强碱清洗,因为强碱会侵蚀抛光的比色皿。只能用洗液浸泡,然后用自来水冲洗,清洗干净的比色皿也应内外壁不挂水珠。

(3) 使用过的玻璃器皿的清洗

① 载玻片:用过的载玻片放入1%洗衣粉溶液中煮沸20~30 min(注意:溶液一定要浸没玻片,否则会使玻片钙化变质),待冷却后逐个用自来水洗净,浸泡于95%乙醇中备用。带有活菌的载玻片可先浸在5%石炭酸(苯酚),或2%~3%来苏水,或0.1%升汞溶液中消毒24~48 h后,再按上述方法洗涤。使用前,将载玻片从酒精中取出,经火焰点燃,使载玻片表面的残余酒精烧净,方可使用。

② 血细胞计数板(或 Petrof Hausser 细菌计数板):使用后应立即用水冲净,必要时可用95%酒精浸泡,或用酒精棉轻轻擦拭。切勿用硬物洗刷或抹擦,以免损坏网格刻度。洗涤完毕后镜检计数区是否残留菌体或其他沉淀物。洗净后自然晾干或吹干后,放入盒内保存。

③ 一般玻璃器皿:先用毛刷蘸洗涤剂洗去灰尘、油污、无机盐等物质,再用自来水冲洗干净。如果器皿要盛高纯度的化学药品或者做较精确的实验,可先在洗涤液中浸泡过夜,再用自来水冲洗,最后用蒸馏水洗2~3次。洗刷干净的玻璃器皿烘干备用。

染菌的玻璃器皿应先经121℃高压蒸汽灭菌20~30 min后取出,趁热倒出容器内的培养物,再用洗洁精洗刷干净,最后用水冲洗。染菌的移液管和毛细吸管,使用后应立即放入5%石炭酸溶液中浸泡数小时,先灭菌,然后再冲洗。

④ 含有琼脂培养基的玻璃器皿:先用玻璃棒等将器皿中的琼脂培养基刮下。如果琼脂培养基已经干燥,可将器皿放在少量水中煮沸,使琼脂熔化后趁热倒出。再将培养皿底或皿盖上的记号擦去,用自来水洗刷至无污物,再用合适的毛刷蘸洗液擦洗内壁,然后用清水冲洗干净;或浸泡在0.5%清洗剂中超声清洗(比色皿决不可超声清洗),用自来水彻底洗净后,用蒸馏水洗2次,洗净的培养皿的盖子或底部全部向下,一个接一个压着皿边,扣在桌子上(图1-2-1)晾干备用。清洗后器皿内外不可挂有水珠,否则需用洗液浸泡数小时后,重新清洗。

如果器皿上沾有蜡或油漆等物质,可用加热的方法使之熔化后揩去,或用有机溶剂(二甲苯、丙酮等)擦拭。

⑤ 用过的吸管应及时浸泡在水中,进行清洗。清洗后的吸管,倒转使吸管顶尖向上,使吸管内的水分晾干,或放在烘箱中烘干。

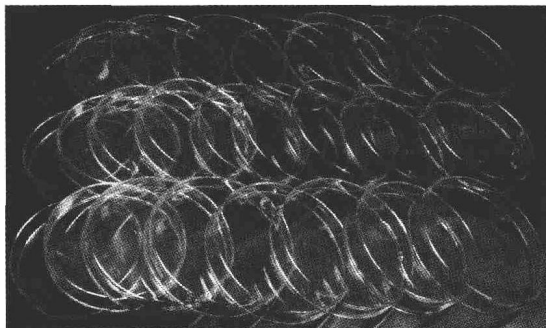


图1-2-1 洗后的培养皿叠放

2. 塑料器皿的清洗

硅胶塞：由于新购置的硅胶塞带有大量滑石粉，应先用自来水冲洗干净，再用 2% NaOH 溶液煮沸 10~20 min，以除去胶塞上的蛋白质。自来水冲洗后，再用 5% 盐酸溶液浸泡 30 min，最后用自来水冲洗干净。

二、包扎

包扎是为了防止器皿消毒灭菌后再次受到污染，常规的包扎应采用牛皮纸与报纸，尽量使包扎的物品不外露。

1. 培养皿的包扎：洗净晾干的培养皿，用旧报纸进行包扎，每包 6~10 套(图 1-2-2)。包扎后的培养皿经过灭菌后才可使用。

2. 吸管的包扎：首先在吸管的上端塞上一小段棉花(非脱脂棉)，塞入的棉花应与吸管口保持 5 mm 左右的距离。然后将旧报纸撕成长条(一般竖截为 8 张纸条)，将试管的尖端放在纸条的一端，并呈 45°角，折叠纸条，包住尖端。一手捏住管身，一手将吸管压紧在桌面上，向前滚动，以螺旋式进行包扎，剩余的纸条折叠打结(图 1-2-3)。最后把包扎好的吸管成捆扎好，以备灭菌。

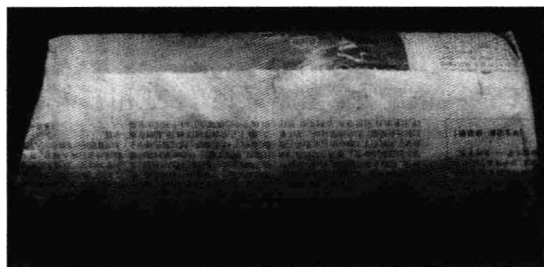


图 1-2-2 培养皿的包扎

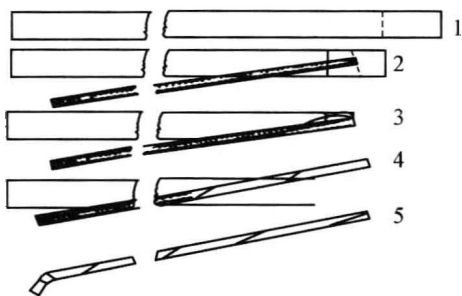


图 1-2-3 吸管的包扎

3. 试管的包扎：先塞上合适的硅胶塞(塞子应有 1/2~2/3 进入试管)，或盖上合适的试管套，然后 7~10 支一捆用报纸包扎(图 1-2-4)，灭菌。

4. 试剂瓶的包扎：用报纸或牛皮纸包扎后，灭菌。

5. 三角瓶的包扎：塞上合适的试管塞，或盖上 8 层纱布，外加一层报纸，用棉绳包扎后灭菌(具体见 1-3 培养基的制备)。

6. 吸头与 Eppendorf 管：吸头根据不同的规格戴手套装入不同的盒子、Eppendorf 管装入饭盒中后高压灭菌、50 °C 烘干后备用。

三、注意事项

1. 含有对人有传染性或非传染性致病菌的玻璃器皿，应先浸在 5% 石炭酸溶液内或经高压灭菌后再行洗涤。

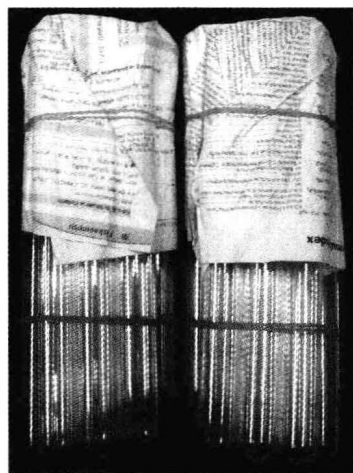


图 1-2-4 试管的包扎