



普通高等教育“十二五”规划教材
能力培养型生物学基础课系列实验教材

微生物学实验教程

（第三版）

MICROBIOLOGY
EXPERIMENT

杨革 主编



科学出版社

能力培养型生物学基础课系列实验教材
山东省高等学校优秀教材

微生物学实验教程

(第三版)

杨 革 主编

科学出版社
北京

内 容 简 介

全书共分基础性实验、综合性实验和研究性实验三大部分,涵盖 59 个实验,其中包括微生物的纯培养技术、微生物形态结构、微生物的生化反应、微生物生长、病毒、育种、菌种保藏、微生物分类、微生物发酵和环境微生物等,为了扩大学生的适应面,在原来的抗生素效价的检测、微生物培养条件的优化设计、小型微生物反应器的操作和主要发酵参数的测定的内容上,又增加了光合细菌、厌氧菌、植物内生菌、果酒酵母、石油烃降解菌、16S rDNA 方法鉴定、乙醇发酵、解淀粉芽孢杆菌抗菌蛋白、生物表面活性剂、微生物浸渍法去除污泥中重金属等方面的内容。本书特别加强了研究性实验的设计。书后附有详细的附录和参考文献,供读者查阅和参考。

本书可作为高等院校微生物学实验课教材,也可作为从事微生物工作的有关教师及科研人员的实验参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验教程/杨革主编. — 3 版. — 北京:
科学出版社, 2015. 4

能力培养型生物学基础课系列实验教材 山东省高等
学校优秀教材

ISBN 978-7-03-044084-6

I. ①微… II. ①杨… 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(2015)第 075237 号

责任编辑: 陈 露 谭宏宇
责任印制: 韩 芳 / 封面设计: 殷 靓

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号
邮政编码: 100717

http://www.sciencep.com

南京展望文化发展有限公司排版

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014 年 9 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2015 年 4 月第 三 版 印张: 10 1/4

2015 年 4 月第九次印刷 字数: 226 000

定价: 30.00 元

能力培养型生物学基础课系列实验教材 第三版编委会

主任委员：安利国

副主任委员：郭善利 徐来祥 孙虎山 黄 勇

委 员：(按姓氏笔画排序)

王洪凯 朱道玉 刘林德 刘顺湖

刘淑娟 安利国 孙虎山 李师鹏

李荣贵 林光哲 姚志刚 徐来祥

郭善利 黄 勇 曹 慧 焦德杰

《微生物学实验教程》第三版编写人员

主 编：杨 革

副主编：戴美学 刘 艳

编 委：(按姓氏笔画排序)

王东方 王红妹 王宜磊 朱九滨

朱兰英 刘世武 刘明河 刘 艳

刘海娟 许俊杰 杜秀菊 杨 革

张韩杰 姚淑敏 程显好 缪 静

戴美学

第三版前言

进入 21 世纪以来,人类所面临的资源、能源和环境等方面的问题日趋严重,新发和再发传染病也一再发生。微生物通常形体微小,但与其他生物相比,其生物量极为庞大,生物多样性最为丰富,分布也最为广泛。在自然界,微生物参与元素循环,推动物质转化,影响我们的生存环境。微生物与人类关系密切,人体表面及体内的正常微生物菌群有益于人类健康,但少数微生物能够引起人类疾病。人类对微生物的利用有着悠久的历史(例如制曲、酿酒、制酱、酿醋等),如今已经融入了我们日常生活的方方面面。作为一种简单的生命形式,微生物在现代生物学中被当作模式生物,对认识生命的基本规律发挥了至关重要的作用,并帮助催生了分子生物学等新兴生物学科。当下以微生物和微生物酶技术为主要支撑的白色生物技术来制造生物基产品,如化工、食品和饲料、医疗保健、洗涤剂、造纸、纺织和生物能源。白色生物技术是继红色生物技术(医学生物技术)和绿色生物技术(农业生物技术)之后兴起的第三种生物技术,也称工业生物技术。工艺过程是利用活细胞像霉菌、酵母菌、细菌等微生物进行物质转化,大规模地生产所需的各种产品。在化工、能源、环保、医药、清洁剂、纺织品等行业能广泛应用。白色生物技术是利用活体细胞作催化剂,在温和的条件下高效地进行物质转化,与传统的高温高压的化学转化相比,生产过程能耗低,废弃物少,产品可生物降解,可以缓解温室效应等环境危机。白色生物技术是人类由化石经济向生物经济过渡的必要工具,是解决人类目前面临的资源、能源及环境危机的有效手段。

微生物学实验技术是配套微生物学开设的一门基础实验课程,为生物工程、食品科学与工程、制药工程、环境工程等专业的专业基础课,其目的是为了使学生加深理解微生物基础理论,掌握微生物学实验的基本技术与技能,培养观察、思考、分析和解决问题的综合能力,熟悉并掌握微生物学研究方法与综合实验能力,能用微生物学方法解决一些专业实际问题。近年来,随着创新人才教育的开展,能力培养已引起国家



和学校的普遍重视。微生物学实验对于激发学生学习微生物学的兴趣,验证微生物学理论,帮助学生理解和掌握微生物学的基本原理、研究方法,提高他们的独立能力均具有重要作用,同时也为继续学习生物化学和分子生物学奠定基础。一本好的实验教材对于帮助教师合理安排实验教学内容,指导学生顺利完成实验具有重要作用,逐渐使实验教学以原来的学科知识为体系,以验证理论知识和学习实验技术为主要目的的旧模式转向注重培养学生综合素质、创新精神与实践能力的新模式。

我们着手编写的能力培养型实验教材,总结了我国长期微生物学实验课和科学研究中的部分工作经验,参考了国内兄弟院校编写的有关教材以及国外的有关资料,适当增加了部分新技术,充实了新内容,结构体系是“基础+专业+综合+探究”动态式微生物学实验教程内容体系,其显著特色是将实验教材由知识技能型转变为能力培养型。能力培养型实验教学体系中的实验教学处于主体中心地位,其目标不仅是验证知识和掌握技能,更重要的培养学生的综合分析能力和创新能力,可为进一步学习和实践现代微生物学及相关领域的研究奠定现代理论和技术基础,对促进我国微生物科学专业的实验教学改革具有一定的推动意义。概括起来本实验教材内容分为基础性实验、综合性实验和研究性实验三部分:

1) 基础性实验:包括了微生物学实验的基本操作和技能训练,是微生物学这门课程中最基本的、最代表学科特点的实验方法和技术,通过本部分实验使学生掌握生物学科的基本知识与基本技能,为综合性实验奠定基础。

2) 综合性实验:本部分由多种实验手段与技术 and 多层次的实验内容所组成,要求学生独立完成预习报告、试剂配制、仪器安装与调试、实验记录、数据处理和总结报告。综合性实验主要训练学生对所学知识和实验技术的综合运用能力、对实验过程的独立工作能力、对实验结果的综合分析能力,为研究性实验的顺利开展做好准备。

3) 研究性实验:本部分是在完成基础性和综合性实验的基础上,以微生物学的研究为主结合其他学科的知识与技术,由学生自己设计实验方案,开展科学研究,撰写课程研究论文,使学生得到科学研究的初步训练,为毕业论文研究工作的开展打下基础。部分优秀研究性实验报告可进一步深化、充实,作为毕业论文参加答辩。

以上内容共编成 59 个实验,三种类型实验所占比例应根据课程的特点和所开年级而确定。低年级课程以基础性实验为主,基础性、综合性 and 研究性实验的比例为 7:2:1。本书特点是:以微生物学基本实验技术为“前奏曲”,有利于学生顺利完成基础实验;专业方向实验的安排,突出了微生物学的应用与理工科特色;综合实验的实施,有利于培养学生的工程实践能力、创新能力与合作精神;内容集“技术、基础、专



业与综合”为一体,这种知识结构体系不同于单纯介绍基础微生物学实验,它既强调了基本技能的训练,又重视了创新能力的培养,且具有明显的专业导向性。随年级升高,逐渐增加综合性和研究性实验的比例,基础性、综合性和研究性实验的比例达到5:3:2。大量实验设计为从事微生物学不同领域的工作者提供了充分选择的余地,满足不同研究领域的需要。另外实验的难易程度也不同,本书中所收录的实验从简单到复杂,分别适合初级和高级微生物学课程。教师可根据不同领域和不同难易程度,从大量可供选择的实验中挑选自己所需要的内容,制定自己的实验计划。本书适合作为高校微生物学实验课程的教材,也可作为从事微生物科学研究人员的参考用书。

本书出版、再版工作都得到了安利国教授始终如一的关心与帮助,同时科学出版社给予了大力支持,在此,谨向他们致以诚挚的谢意。

我们真诚希望读者在使用本书时,对所发现的不足之处提出批评和改进的意见,以便及时能得到修正和补充。

编者

2014.12.6

目 录

第三版前言

第一部分 基础性实验

第一章 微生物的纯培养技术	(2)
实验 1 常用培养基的配制	(2)
实验 2 常用的灭菌方法	(5)
实验 3 无菌操作和微生物接种技术	(11)
实验 4 微生物的培养特征	(14)
第二章 原核微生物的形态和结构	(17)
实验 5 细菌的染色技术	(17)
实验 6 放线菌的形态和结构	(23)
实验 7 放线菌的印片染色法	(24)
第三章 真核微生物的形态和结构	(26)
实验 8 酵母菌的形态观察及死活细胞的鉴别	(26)
实验 9 酵母菌子囊孢子的培养与观察	(27)
实验 10 霉菌标本片的制备与观察	(28)
实验 11 根霉接合孢子的培养与观察	(30)
第四章 病毒	(32)
实验 12 噬菌体的分离与纯化	(32)
实验 13 噬菌体效价的测定	(33)
实验 14 溶源性细菌的检查和鉴定	(35)
第五章 微生物生长的测定	(38)
实验 15 微生物大小的测定	(38)
实验 16 显微镜直接计数法	(40)



实验 17	平板菌落计数法	(42)
实验 18	用于重比色法测定微生物的生长量	(44)
第六章	微生物的生化反应	(46)
实验 19	糖发酵试验	(46)
实验 20	IMVIC 与硫化氢试验	(47)
第七章	菌种保藏技术	(50)
实验 21	常用简便保藏法	(50)
实验 22	冷冻干燥保藏法	(53)
实验 23	液氮超低温保藏法	(54)

第二部分 综合性实验

实验 24	微生物的分离与纯化	(58)
实验 25	常见细菌的初步鉴定	(73)
实验 26	理化因素的诱变效应	(79)
实验 27	抗药性突变株的分离	(82)
实验 28	酵母菌营养缺陷型的筛选	(84)
实验 29	产氨基酸抗反馈调节突变株的选育	(88)
实验 30	抗噬菌体菌株的选育	(91)
实验 31	用 Ames 实验检测诱变剂和致癌剂	(93)
实验 32	细菌生长曲线的测定	(97)
实验 33	环境因素对微生物生长的影响	(99)
实验 34	用生长谱法测定微生物的营养要求	(104)
实验 35	固定化活细胞的制备及其发酵实验	(104)
实验 36	乳酸发酵与乳酸菌饮料的制备	(107)
实验 37	酵母菌乙醇发酵及其影响因素	(110)
实验 38	青霉素效价的生物测定	(113)
实验 39	小型自控发酵罐的使用和主要生化指标检测	(117)
实验 40	免疫血清的制备	(121)
实验 41	凝集反应	(123)

第三部分 研究性实验

实验 42	检测发酵和食品工业用水微生物的数量	(126)
实验 43	微生物技术在食品保鲜中的应用	(127)
实验 44	检测几种常见消毒剂的杀菌效果	(127)



实验 45	研究牛乳在酸败过程中细菌的生态学演变	(128)
实验 46	微生物之间相互作用的研究	(128)
实验 47	从土壤中分离和纯化产脂肪酶的菌株并选育高产株	(129)
实验 48	微生物酶制剂的合成受多水平调控	(130)
实验 49	研究青霉素发酵过程中糖的变化	(131)
实验 50	统计超市内的微生物发酵食品种类并研制其中的一种	(131)
实验 51	乳酸菌筛选及抑菌作用研究	(132)
实验 52	微生物菌肥生产与质量控制	(133)
实验 53	Nisin 产生菌的筛选、鉴定及其应用	(134)
实验 54	酚降解菌的分离、纯化及高效菌株的选育	(135)
实验 55	果酒酵母的分离、纯化及选育	(135)
实验 56	石油烃降解菌的分离	(136)
实验 57	解淀粉芽孢杆菌抗菌蛋白的研究	(137)
实验 58	生物表面活性剂的研究与应用	(137)
实验 59	微生物浸沥法去除污泥中重金属	(138)
附录		
附录 1	培养基的配制	(139)
附录 2	试剂和溶液的配制	(147)
附录 3	芽孢杆菌属典型菌株检索表	(148)
附录 4	染色液的配制	(149)
参考文献	(152)

第一部分

基础性实验

第一章 微生物的纯培养技术

自然界中各种微生物是混杂在一起的,即使取很少量的样品也是许多微生物共存的群体。人们要研究某种微生物的特性,首先应使该种微生物处于纯培养状态。纯培养是指培养物中的所有细胞和孢子只是某一个种或株,它们有着共同的来源,是同一细胞的后代。在通常情况下纯培养物能较好地研究、利用和重复结果。微生物的纯培养技术包括培养基的配制、灭菌消毒、无菌操作、微生物接种、纯种分离、微生物培养等。

实验 1 常用培养基的配制

【目的要求】

1. 了解培养基的概念、种类及用途。
2. 了解培养基的配制原理及其常规配制程序。
3. 学习和掌握细菌、放线菌、霉菌、酵母菌常用培养基的配制方法。

【基本原理】

培养基(culture medium)是指利用人工方法将适合微生物生长繁殖或积累代谢产物的各种营养物质混合配制而成的营养基质,主要用于微生物的分离、培养、鉴定、菌种保藏或积累代谢产物等方面。自然界中微生物的种类繁多,营养类型多样,加之实验和研究的目的不同,所以培养基的种类很多。但不同种类的培养基一般应含有微生物生长繁殖所需要的碳源、氮源、能源、无机盐、生长因子和水等营养成分。此外,为了满足微生物生长繁殖或积累代谢产物的要求,还必须控制培养基的 pH。一般细菌、放线菌适于生长在中性或微碱性的(嗜碱细菌和嗜酸细菌例外)环境中,而酵母菌和霉菌则适于生长在偏酸性的环境中。因此,在配制培养基时,须将培养基调节在一定 pH 范围内。

培养基按成分可分为天然培养基、合成培养基和半合成培养基。天然培养基是指利用动物、植物、微生物或其他天然有机成分配制而成的培养基。其优点是营养丰富、价格便宜,缺点是成分不能准确确定且不稳定。实验室常用的牛肉汁或麦芽汁培养基即为天然培养基。合成培养基是指完全利用已知种类和成分的化学试剂配制而成的培养基,优点是各成分均为已知且含量稳定,缺点是价格较贵。实验室常用的高氏一号培养基即为合成培养基。半合成培养基是指由天然有机成分和已知化学试剂混合组成的培养基,实验室常用的马铃薯葡萄糖培养基即为半合成培养基。

培养基按物理状态可分为固体培养基、半固体培养基和液体培养基。固体培养基是指在液体培养基中加入一定量的凝固剂(常加 1.5%~2.0%的琼脂)经融化冷凝而成。半固体培养基是指在液体培养基中加入 0.8%~1.0%左右的琼脂,经融化冷凝而成。液



体培养基是指培养基中不加凝固剂琼脂,培养基呈液体状。

正确掌握培养基的配制方法是从事微生物学实验工作的重要基础。由于微生物种类及代谢类型的多样性,因而用于培养微生物的培养基的种类也很多,它们的配方及配制方法虽各有差异。但一般培养基的配制程序却大致相同。

肉膏蛋白胨培养基是一种广泛用于培养细菌的培养基,属半合成培养基。高氏一号培养基是一种用于培养放线菌的合成培养基。麦芽汁培养基和马铃薯葡萄糖培养基被广泛用于培养酵母菌和霉菌。马铃薯葡萄糖培养基有时也可用于培养放线菌和细菌。豆芽汁葡萄糖培养基也是培养酵母菌及霉菌的一种优良培养基。察氏培养基主要用于培养霉菌观察形态用。麦芽汁培养基为天然培养基,马铃薯葡萄糖培养基和豆芽汁葡萄糖培养基两者均为半合成培养基,而察氏培养基则为合成培养基。

【材料与用品】

1. 材料与试剂

牛肉膏、蛋白胨、葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、琼脂、新鲜麦芽汁、黄豆芽、马铃薯、NaCl、KNO₃、KCl、NaNO₃、K₂HPO₄、MgSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O。

2. 仪器与用品

天平、高压蒸汽灭菌锅、微波炉、移液管、试管、烧杯、量筒、锥形瓶、培养皿、玻璃漏斗、药匙、pH试纸、称量纸、记号笔、棉花、纱布、线绳、塑料试管盖、牛皮纸、报纸等。

【实验步骤】

1. 肉膏蛋白胨培养基的配制

(1) 培养基成分(见附录2)

(2) 配制

1) 称量及溶化 分别称取所需的蛋白胨和 NaCl,置于烧杯中,加入所需水量的 2/3 左右的蒸馏水。用玻棒挑取牛肉膏置于另一小烧杯中,进行称量。然后加入少量蒸馏水于小烧杯中,加热融化后加入上述烧杯中。将烧杯置于石棉网上加热,用玻棒搅拌或放在微波炉中加热,使药品全部溶化。

2) 加琼脂 加入所需的琼脂,加热溶化。

3) 定容 将溶液倒入量筒中,补充水量至所需体积。

4) 调 pH 待溶液冷至室温时,用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.2。

5) 分装、加塞、包扎。

6) 高压蒸汽灭菌 0.1 MPa 灭菌 20 min。

2. 高氏合成一号培养基的配制

(1) 培养基成分(见附录2)

(2) 配制

1) 称量及溶化 量取所需水量的 2/3 左右加入到烧杯中,置于石棉网上加热至沸。称量可溶性淀粉,置于另一小烧杯中,加入少量冷水,将淀粉调成糊状,然后倒入上述装沸水的烧杯中,继续加热,使淀粉完全融化。分别称量 KNO₃、NaCl、K₂HPO₄·3H₂O 和 MgSO₄·7H₂O,依次逐一加入水中溶解,按每 100 mL 培养基加入 0.1% FeSO₄ 溶液 1.0 mL。

2) 定容 将溶液倒入量筒中,加水至所需体积。



- 3) 调 pH 用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.4。
- 4) 加琼脂 加入所需的琼脂,加热溶化,补充失水。
- 5) 分装、加塞、包扎。
- 6) 高压蒸汽灭菌 0.1 MPa 灭菌 20 min。

3. 麦芽汁培养基的配制

(1) 培养基成分: 新鲜麦芽汁一般为 10~15 波美度。

(2) 配制

1) 用水将大麦或小麦洗净,用水浸泡 6~12 h,置于 15℃ 阴凉处发芽。上盖纱布,每日早、中、晚浇水一次。待麦芽伸长至麦粒的 2 倍时,让其停止发芽,晒干或烘干,研磨成麦芽粉,贮存备用。

2) 取 1 份麦芽粉加 4 份水,在 65℃ 水浴锅中保温 3~4 h,使其自行糖化,直至糖化完全。检查方法是取 0.5 mL 的糖化液,加 2 滴碘液,如无蓝色出现即表示糖化完全。

3) 糖化液用 4~6 层纱布过滤,滤液如仍混浊,可用鸡蛋清澄清。即用一个鸡蛋清加水 20 mL,调匀至产生泡沫,倒入糖化液中,搅拌煮沸,再过滤。

4) 用波美比重计检测糖化液中糖浓度,将滤液用水稀释到 10~15 波美度,调 pH 至 6.4。如当地有啤酒厂,可用未经发酵、未加酒花的新鲜麦芽汁,加水稀释到 10~15 波美度后使用。

5) 如配固体麦芽汁培养基时,加入 2% 琼脂,加热融化,补充失水。

6) 分装、加塞、包扎。

7) 0.1 MPa 高压蒸汽灭菌 20 min。

4. 马铃薯葡萄糖培养基的配制

(1) 培养基成分(见附录 1)

(2) 配制

1) 称取所需去皮马铃薯(出芽的马铃薯不能用),切成小块,加水煮沸 20 min 或在 80℃ 的热水中浸泡 1 h,用 4~6 层纱布过滤,配制成 20% 马铃薯浸汁。

2) 加入所需的葡萄糖,加热煮沸后再加入 2% 琼脂,继续加热溶化并补足失水,pH 自然。

3) 分装、加塞、包扎。

4) 0.1 MPa 高压蒸汽灭菌 20 min。

5. 豆芽汁葡萄糖培养基的配制

(1) 培养基成分(见附录 1)

(2) 配制

1) 称取新鲜黄豆芽 10 g,置于烧杯中,再加入 100 mL 水,小火煮沸 30 min,用纱布过滤,补足失水,即制成 10% 豆芽汁。

2) 配制时,按每 100 mL 10% 豆芽汁加入 5 g 葡萄糖,煮沸后加入 2 g 琼脂,继续加热溶化,补足失水,pH 自然。

3) 分装、加塞、包扎。

4) 0.1 MPa 高压蒸汽灭菌 20 min。



6. 察氏培养基的配制

(1) 培养基成分(见附录 1)

(2) 配制

1) 称量及溶化 量取所需水量约 2/3 左右加入到烧杯中,分别称取蔗糖、 NaNO_3 、 K_2HPO_4 、 KCl 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。依次逐一加入水中溶解。按每 100 mL 培养基加入 1 mL 0.1% 的 FeSO_4 溶液。

2) 定容 待药品全部溶解后,将溶液倒入量筒中,加水至所需体积,pH 自然。

3) 加琼脂 加入所需琼脂,加热融化,补足失水。

4) 分装、加塞、包扎。

5) 高压蒸汽灭菌 0.1 MPa 灭菌 20 min。

【实验报告】

1. 记录你所配制培养基的名称及成分。

2. 分析你所配制培养基的碳源、氮源、能源、无机盐及维生素的来源。

【思考题】

1. 培养细菌一般常用什么培养基? 培养放线菌常用什么培养基?

2. 麦芽汁培养基、马铃薯葡萄糖培养基、豆芽汁葡萄糖培养基、察氏培养基各常用于培养哪类微生物?

3. 何谓半合成培养基? 何谓合成培养基?

4. 牛肉膏应置于何种容器中称量为宜?

5. 配制高氏合成一号培养基时,可溶性淀粉需经怎样处理后才能倒入到沸水中?

6. 在配制麦芽汁培养基时,如何检查麦芽粉水溶液糖化是否完全?

7. 何谓培养基的自然 pH?

实验 2 常用的灭菌方法

灭菌与消毒、显微镜技术、纯种分离技术、微生物培养技术构成微生物学的 4 项基本技术。它们不仅促进了微生物学的建立和发展,而且对生物学科许多领域的发展发挥了巨大的作用。

众所周知,杀死无芽孢病原菌而不损害饮料营养价值和风味的“巴斯德消毒法”,用石炭酸消毒手术器械、喷洒手术室的“李斯特外科消毒法”,都曾经创造了巨额财富,拯救了亿万人的生命,并沿用至今。现代物理和化学灭菌技术就是在人们对有害微生物的控制活动中建立和发展起来的,有许多过去使用的方法现在仍是无菌技术的重要组成部分。

微生物在自然界中分布广泛,为了保证生产和科学实验中的所需菌株不受其他杂菌干扰,灭菌和消毒技术是至关重要的。灭菌与消毒两者概念不同,灭菌是指杀死或消灭环境中的所有微生物(包括芽孢与孢子);消毒是指消灭病原菌和有害微生物营养体。但对于同一种方法来说,不同的作用强度和作用时间也可达到灭菌或消毒不同目的。

灭菌与消毒方法有多种,可分为物理法和化学法两大类。物理法包括加热灭菌(干热



灭菌和湿热灭菌)、过滤除菌、紫外线辐射灭菌等。化学法主要是利用无机或有机化学药剂进行消毒与杀菌。人们可根据微生物的特点、待灭菌材料与实验目的和要求选用灭菌和消毒方法。

1. 加热灭菌

加热灭菌主要利用高温使菌体蛋白质变性或凝固、酶失活而达到杀菌的目的。根据加热方式不同,又分干热灭菌和湿热灭菌两类。干热灭菌主要指火焰灼烧法和干热空气灭菌法。湿热灭菌包括高压蒸汽灭菌法、间歇灭菌法、煮沸法和巴斯德消毒法等。湿热灭菌时,蒸汽穿透力大,蒸汽与较低温的物体表面接触凝结为水时可放出潜热,吸收蒸汽水分的菌体蛋白质易凝固,所以在同一温度下湿热灭菌比干热灭菌效果好。菌体蛋白质的凝固温度与含水量密切相关,蛋白质含水量多者凝固温度低,如细菌、酵母菌及霉菌的营养细胞,含水量 $>50\%$, $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ 、 10 min 即可使蛋白质凝固而达杀菌目的;蛋白质含水量较少者需较高温度方可使蛋白质凝固变性,如含水较少的放线菌及霉菌孢子,蛋白质凝固温度为 $80\sim 90^{\circ}\text{C}$,故 $80\sim 90^{\circ}\text{C}$ 加热 30 min 可杀死;细菌的芽孢不仅含水量低,且含吡啶二羧酸钙,蛋白质的凝固温度在 $160\sim 170^{\circ}\text{C}$,干热灭菌需 $140\sim 160^{\circ}\text{C}$,维持 $2\sim 3\text{ h}$ 方可将芽孢杀死;湿热灭菌需 120°C 维持 20 min 。因此,一般以能否杀死细菌的芽孢作为彻底灭菌的标准。

2. 紫外线灭菌

紫外线的波长在 $200\sim 300\text{ nm}$ 范围内都有杀菌力,其中杀菌最强的波长为 $256\sim 266\text{ nm}$ 。在波长一定的条件下,紫外线的杀菌效率与强度和时间的乘积成正比。其杀菌机制主要是因为紫外线导致同链DNA相邻的胸腺嘧啶间形成胸腺嘧啶二聚体和胞嘧啶水合物,从而抑制了DNA正常复制。另外,空气在紫外线辐射下产生的臭氧(O_3)也有一定杀菌作用,水在紫外线辐射下被氧化生成的过氧化氢(H_2O_2 和 $\text{H}_2\text{O}_2\cdot\text{O}_3$)也有杀菌效果。

紫外线不能引起水分子等离子化,它的透过物质能力差,一般只适用于接种室、超净工作台、无菌培养室及手术室空气及物体表面的灭菌。紫外线灭菌是通过紫外线灭菌灯进行的,紫外线灯距离照射物体以不超过 1.2 m 为宜。近年来我国已制造出各种多功率的紫外线灯管,用于大规模饮用水消毒。紫外线对人体有伤害作用,可严重灼烧眼结膜,损伤视神经,对皮肤也有刺激作用,所以不能直视开着的紫外光灯,更不能在开着的紫外灯下工作。可见光能激活微生物体内的光复活酶,使形成的胸腺嘧啶二聚体拆开复原,因此也不能在开着日光灯或钨丝灯情况下开启紫外灯。

3. 过滤除菌

微生物虽小,但有一定的体积。因此,可用一些比它们更小筛孔的“筛子”把它们过滤除掉。这种特殊的“筛子”,即过滤器上是由各种多孔径介质构成的滤板,把含菌的液体或气体中的微生物通过过滤器截留在滤板上,而达到除菌的目的。

过滤除菌适用于一些对热不稳定的、体积小的液体材料(如血清、酶、毒素、疫苗、噬菌体等),各种高温灭菌易遭破坏的培养基成分(如尿素、碳酸氢钠、维生素、抗生素、氨基酸等)和空气中的细菌等微生物(如安装在超净工作台、发酵罐的空气进口、微生物无菌培养室、细胞培养室、精密仪器仪表厂、医药和食品等部门、科研单位的各种空气过滤装置)。



按照过滤的对象和滤板的介质,滤菌器有液体滤菌器和空气滤菌器两类。液体过滤除菌多为细菌滤器。依滤板介质区分有硅藻土滤器、石棉板滤器、玻璃滤器、陶瓷滤器、石棉胶滤器、滤膜滤菌器。每类滤器又依过滤孔径大小分成不同型号、规格,可依据实验要求加以选择。一般空气滤菌器常用的介质是棉花纤维和玻璃纤维。前者如实验室的试管棉塞、棉滤管过滤器和发酵工厂车间中的总过滤器。玻璃纤维纸是超净工作台、接种室和发酵工厂常用的一种空气滤菌器的过滤介质。

2-1 干热空气灭菌法

【目的要求】

1. 了解干热灭菌的原理和应用范围。
2. 学习干热灭菌的操作技术。

【基本原理】

干热灭菌是利用高温使微生物细胞内的蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。细胞内的蛋白质凝固变性与其本身的含水量有关,当环境和细胞内含水量越大,则蛋白质凝固就越快,反之含水量越小,凝固越慢。因此,与湿热灭菌相比,干热灭菌所需温度高(160~170℃),时间长(1~2 h)。但干热灭菌温度不能超过 180℃,否则包器皿的纸或棉塞就会烧焦,甚至引起燃烧。干热灭菌使用的电烘箱的壁有双层金属壁、中间有隔热石棉板,顶端有调气阀及插温度计的小孔,下底夹层装有供通电加热的电炉丝。

适用范围包括常用于空的玻璃器皿(如培养皿、锥形瓶、试管、离心管、移液管等)、金属用具(如牛津杯、镊子、手术刀等)和其他耐高温的物品(如陶瓷培养皿盖、菌种保藏采用的沙土管、石蜡油、碳酸钙)等的灭菌。其优点是灭菌器皿保持干燥。但带有胶皮、塑料的物品、液体及固体培养基均不能用干热灭菌。

【材料与用品】

培养皿、试管、吸管、电烘箱等。

【实验步骤】

1. 装入待灭菌物品

将包好的待灭菌物品(如培养皿、试管、吸管等)放入电烘箱内,关好箱门。物品不要摆得太挤,以免妨碍空气流通。灭菌物品不能用油纸包扎,不要接触电烘箱内壁的铁板,以防包装纸烤焦起火。

2. 升温

接通电源,打开开关,旋动恒温调节器至红灯亮,让温度逐渐上升。在升温过程中,如果红灯熄灭,表示箱内停止加温,此时如果还未达到所需的温度(160~170℃),则需转动温度调节器使红灯再亮。如此反复调节,直至达到所需温度。

3. 恒温

当温度升到 160~170℃时,借恒温调节器的自动控制,保持此温度 2 h。干热灭菌过程中严防恒温调节器的自动控制失灵而造成安全事故。万一电烘箱内有焦糊味,应立即切断电源。

4. 降温

切断电源,自然降温。