

生物科学
生物技术
系 列

Microbiology Experiment

普通高等教育“十二五”规划教材

微生物学实验

张兰河 贾艳萍 王旭明 张海丰 等编



化学工业出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

微生物学实验

张兰河 贾艳萍 王旭明 张海丰 等编



化学工业出版社

本书内容注重微生物学的基本实验技能的培养,如微生物菌种的分离、纯化、培养、选育和保藏技术;同时,介绍了微生物的前沿研究技术,增加了与当前水处理工程有关的新技术,如饮用水的卫生检查等。

本书可使读者系统掌握微生物学的基本知识和基本实验技能,掌握环境工程微生物学的原理和微生物在环境工程中的应用,加强实践能力,提高创新意识,了解环境工程微生物发展的最新动态及趋势,熟悉现代环境生物技术的新理论、新方法和新技术。

本实验教程适合生物工程、环境工程、环境科学、市政工程等专业的本、专科大学生及专业工程技术人员和专业教师使用。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验/张兰河等编. —北京:化学工业出版社,
2013.6

普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-122-17041-5

I. ①微… II. ①张… 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 076425 号

责任编辑:赵玉清

文字编辑:周 侗

责任校对:宋 玮

装帧设计:尹琳琳

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装:大厂聚鑫印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张 11 字数 279 千字 2013 年 7 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:25.00 元

版权所有 违者必究

前言

微生物学是研究微生物及其生命活动规律的一门基础学科，微生物个体极其微小，肉眼难以观察，因而增加了认识和研究微生物的难度。分子生物学的诞生及其技术的应用，以及各学科的交叉和渗透，极大地丰富了微生物学实验技术的内容，微生物学实验技术和方法也已广泛渗透到现代生命科学的各分支领域。因此，微生物学实验是一门非常重要的专业基础课实验，在本科教学中占有举足轻重的地位，是学生理解和掌握微生物学基本原理的必需环节，对训练学生基础实验技能、提高学生动手能力和创新能力具有重要作用。

微生物学实验是微生物学的重要组成部分，是微生物学教学的重要内容。与微生物学基础理论课紧密结合，使学生将理性知识与感性认识有机地结合，将书本知识用于实验，在实验中更深地理解基础理论，提高学生的综合能力与创新意识，提高学生分析问题和解决问题的能力。《微生物学实验》教程主要针对大学或师范院校中的微生物学实验课程的要求，总结了我校长期开设微生物学实验课和科学研究中的工作经验，并参考了国内有关教材以及有关资料编写而成。实验内容主要分为三个方面。

1. 微生物学实验的基本操作和技能训练：如无菌操作技术，显微镜技术，水生细菌的鉴定及其方法，土壤、空气中微生物数量和种类的测定，微生物形态观察，细菌染色，微生物测定和计数以及培养基制备等技术。这些内容分别编成不同的实验，其中一些基本内容在不同实验中可得到多次重复与强化，以求学生对这些基本训练能达到操作正确、运用熟练的要求。

2. 微生物学的综合性、设计性实验：微生物菌种的分离、纯化、培养、选育和保藏技术。实验不仅可从环境中分离出具特殊生理性能的微生物，还可以通过诱变、转化或转导、原生质体融合及基因工程等手段进行菌种的遗传改造，并从中筛出性状优良的突变菌株和重组体。

3. 微生物学的研究性、创新性实验：如环境因素对微生物生长的影响，微生物生长曲线的测定，活性污泥的培养和驯化等实验。

同时，本书运用“思考题”巩固所学的理论知识和实践知识，加强教材的启发性、开拓性和应用性。在基础实验教材中做到既要对每一个实验进行严格要求，强调基本技能的训练，同时又使学生的思维不受其束缚，启发他们的创新精神，通过不同类型的提问使学生在做和想中能够达到举一反三，触类旁通。理解和复习性质的问题主要加强学生对基本技能和基础知识的消化与吸收；启发性和开拓性的问题主要是启发学生思维，使学生敢于提出分析问题和解决问题的新思路和新方法。与实际应用相联系的问题，主要在于使学生在学习了基础性实验的基础上能够举一反三，并用于实践。

本书共十章，每一章均有对应的基础实验，教师备课时可根据每个实验所列出的需用菌种、仪器、试剂的种类和数量，根据具体情况，或单个实验进行，或组织成综合性实验，或作为示范性实验组织教学。书后附录有常用汉英微生物学词汇和微生物培养基成分。

参与本书编写的主要人员：东北电力大学张兰河、贾艳萍、张海丰、邱晓春、李巍巍、鲁敏、张宇、周广吉、宋达、徐恒铎，北京农业生物技术研究中心王旭明，吉林建筑工程学院赵可等。编写分工：张兰河负责本书的整体结构安排和审核及最后定稿；贾艳萍、王旭明

负责稿件的校对及第四、九章的编写；张海丰负责第七、八章的编写；丘晓春、张宇负责第一、二、三章的编写，李巍巍、周广吉负责第五、六章的编写，宋达、徐恒铎负责第十章的编写，赵可、鲁敏负责微生物实验室管理制度、微生物实验室守则和附录的编写。

本书可作为高等学校生物工程、环境工程、环境科学、给水排水等专业微生物学实验教材，也可作为从事相关专业教师及研究人员的实验参考用书。由于编者水平有限，我们热切希望老师和同学们在使用本书时对所发现的疏漏或存在的问题提出批评和改进的意见，以便及时得到修正和补充。

编者

2013年2月

目 录

微生物实验室管理制度	1
微生物实验室守则	2
第一章 微生物实验室的环境设置及设备仪器	4
第一节 微生物实验室的环境设置	4
第二节 微生物实验室主要仪器设备和常用器皿	5
第二章 微生物实验的基本方法	7
第一节 培养基的配制和灭菌	7
第二节 显微镜的使用	11
思考题	16
第三章 水样的准备与采集	17
第一节 采样前的准备	17
第二节 采样点的确定与要求	18
第三节 水样的采集	19
第四节 水样的保存和运送	20
思考题	21
第四章 水体中水生细菌的计数	22
第一节 血细胞计数板计数法及微生物细胞大小的测量	22
第二节 水中细菌总数的测定	26
第三节 水中大肠菌群数的测定	29
第四节 水中粪大肠菌群的检验	33
第五节 液体稀释法 (MPN 法)	38
思考题	48
第五章 水生细菌的鉴定及其方法	50
第一节 水生细菌的分离和纯化	50
第二节 基本操作技术	52
第三节 细菌形态特征的观察	54
第四节 细菌培养特征的观察	64
第五节 细菌的生理和生化反应	66
第六节 细菌分类及废水处理中常见的细菌	78
思考题	82
第六章 废水处理相关细菌学实验	83
第一节 铁细菌的计数、富集和分离	83
第二节 厌氧菌的测定	85
第三节 活性污泥性质的测定	93
第四节 活性污泥的活性测定	95
第五节 细菌的纯种分离、培养和接种技术	119

	思考题·····	123
第七章	废水处理中其他微生物的测定·····	124
	第一节 平板菌落计数法·····	124
	第二节 浮游生物的测定·····	126
	第三节 废水中微型动物的观察和常见种类·····	132
	第四节 富营养化湖中藻量的测定·····	133
	第五节 循环水冷却系统中有关的微生物检验·····	136
	思考题·····	138
第八章	土壤微生物的数量及其组成的测定·····	140
	第一节 土壤样品采集·····	140
	第二节 微生物的分离·····	141
	第三节 富集培养·····	143
	第四节 土壤微生物的计数法·····	144
	第五节 污染土壤的微生物恢复技术·····	145
	思考题·····	150
第九章	空气中细菌数量的测定·····	151
	第一节 自然沉降法·····	151
	第二节 撞击法·····	152
	第三节 过滤法·····	152
	思考题·····	152
第十章	活性污泥的培养与驯化·····	153
	第一节 活性污泥的培养方法与生物相的演替·····	153
	第二节 好氧活性污泥的培养与驯化·····	155
	第三节 厌氧活性污泥的培养与驯化·····	156
	第四节 影响活性污泥培养驯化的因素·····	157
	第五节 EPS 的测定方法·····	158
	思考题·····	160
附录 ·····		161
	附录 1 常用汉英微生物学词汇·····	161
	附录 2 微生物培养基成分·····	163
参考文献 ·····		170

微生物实验室守则

一、微生物学实验须知

(1) 实验室工作人员要热爱实验与仪器管理工作，树立为教学服务的思想，面向教学，面向师生。

(2) 实验必须在任课教师指导下进行，对所做实验必须向学生提出要求和注意事项，讲清实验要领、设备性能和操作规程。

(3) 使用仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约，不要使用过期的药品和试剂。应特别注意保持药品和试剂的纯净，严防混杂污染。试剂用完后应及时归放到试剂架上，便于别人使用。试剂瓶塞不得乱盖。

(4) 实验台、试剂药品架必须保持整洁，仪器药品摆放井然有序。实验完毕，需将药品、试剂排列整齐，仪器洗净放好，实验台面抹拭干净，经教师验收仪器后，方可离开实验室。

(5) 使用和洗涤仪器时，应小心谨慎，防止损坏仪器。使用精密仪器时，应严格遵守操作规程，发现故障应立即报告教师，不要自己动手检修。

(6) 使用洗液时不得滴到桌面和地面上，洗涤时要将仪器放在搪瓷盆内进行。

(7) 在实验过程中要听从教师的指导，严肃认真地按操作规程进行实验，并简要、准确地将实验结果和数据记录在实验记录本上。实验完成后经教师检查同意，方可离开。课后写出实验报告，由课代表收齐交给教师。

(8) 液体（强酸、强碱溶液必须先用水稀释）可倒入水槽内，同时用水冲走。废纸、火柴头及其他固体废弃物和带有渣滓沉淀的废弃物都应倒入废品缸内，不能倒入水槽或到处乱扔。

(9) 仪器损坏时，应如实向教师报告，认真填写损坏仪器登记表。

(10) 实验室内一切物品，未经本室负责教师批准，严禁携出室外，借物必须办理登记手续。

(11) 保持实验室整洁，做完实验将仪器、药品放回规定地方，并认真进行清扫。

二、实验室灭火法

(1) 酒精与其他可溶于水的液体着火，可用水灭火。

(2) 汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时，应用石棉布或沙土扑火。绝对不能用水，否则会扩大燃烧面积。

(3) 导线着火时，不能用水及二氧化碳灭火器，应切断电源或用四氯化碳灭火器。

(4) 衣服被烧着时，切忌奔走，可用衣服、大衣等包裹身体或躺在地上滚动，以灭火。

(5) 发生火灾时，应注意保护现场，较大的着火事故应立即报警。

三、实验室急救

(1) 玻璃割伤及其他机械损伤：首先，必须检查伤口内有无玻璃或金属等碎片。然后用硼酸水洗净，再涂擦碘酒，必要时用纱布包扎。若伤口较大或过深而大量出血，应立即在伤口上部和下部扎紧血管止血，立即送医院救治。

(2) 烫伤：一般用浓的（90%~95%）酒精消毒后，涂上苦味酸软膏。如果伤处红痛或

红（一级灼伤），可擦医用橄榄油或用棉花沾酒精敷盖伤处；若皮肤起泡（二级灼伤），不要弄破水泡，以防止感染；若伤处皮肤呈棕色或黑色（三级灼伤），应用干燥而无菌的消毒纱布轻轻包扎好，急送医院治疗。

（3）强碱（如氢氧化钠、氢氧化钾）、钠、钾等触及皮肤而引起的灼伤，要先用大量自来水冲洗，再用 5% 硼酸溶液或 2% 乙酸溶液涂洗。

（4）强酸、溴等触及皮肤而致灼伤时，要立即用大量自来水冲洗，再用 5% 碳酸氢钠溶液或 5% 氢氧化铵溶液洗涤。

（5）如酚触及皮肤引起灼伤，可用酒精洗涤。

（6）若煤气中毒时，应到室外呼吸新鲜空气，若严重时应立即到医院诊治。

（7）水银容易由呼吸道进入人体，也可以经皮肤直接吸收而引起积累性中毒。严重中毒的症状是口中有金属味，呼出气体也有气味；唾液、牙床及嘴唇上有硫化汞的黑色；淋巴结及唾腺肿大。若不慎中毒时，应送医院救治。急性中毒，通常用炭粉或呕吐彻底洗胃，或者食入蛋白（如 1L 牛奶加 3 勺鸡蛋清），或蓖麻油解毒并使之呕吐，若不慎将水银洒在桌面或地面上，又无法回收时，可洒些硫黄粉在其上。硫可直接与汞反应，产生微毒的黑色硫化汞。

四、触电时的救治

关闭电源，用干木棍使导线与触电者分开；使触电者和地分离。急救时急救者必须做好防止触电的安全措施，手和脚必须绝缘。

第一章 微生物实验室的环境 设置及设备仪器

微生物实验室的常规工作包括器具的洗涤和灭菌、培养基的配制和灭菌、显微镜检查、形态观察和计数、生理生化反应的测定等。从事这些工作最好有专门的操作房间：细菌实验室和理化分析实验室。微生物实验室必须保证人身安全、环境安全、废弃物安全和样本安全，能长期而安全地运行，同时还需要保持实验室环境清洁。

第一节 微生物实验室的环境设置

一、细菌实验室

一般细菌实验室包括：①细菌检验操作室；②无菌室；③培养基室；④洗刷消毒室。

1. 细菌检验操作室（常规操作）

细菌检验操作室是细菌培养与检验的主要操作室，主要设施是实验台，实验台位置应在实验室中心位置，要有充足的光线；实验台材料要以耐热、耐酸碱为最佳。

2. 无菌室

无菌室是处理样品和接种培养的主要工作间，应与细菌检验操作室紧密相连。室内要求空气里无任何杂菌，因此，入口避开走廊，设在细菌检验操作室内；入口与操作室利用两道缓冲间隔开；无菌室与缓冲间均装有紫外灯，要求每 3m^2 安装 30W 紫外灯一盏；无菌室与操作室之间设有无菌传递窗。

3. 培养基室

培养基室是制作、配制培养所需培养基及检验使用试剂的场所，其主要设备应为边台与药品橱。边台上要放置电炉，以满足熔化煮沸培养基时使用；边台材料要耐高温、耐酸碱。药品橱分门别类存放一些一般药品及试剂；危险、易腐、易燃、有毒、有害药品单独设保险柜存放。

4. 洗刷消毒室

利用高压灭菌锅消毒待用与已用的玻璃器皿、培养基及污物。洗刷消毒室应设有 1~2 个洗刷池，洗刷池上下水网要畅通；器皿橱或工作台，以放置洗刷好的器皿；室内安有通风装置或换气扇。

二、理化分析实验室

一般的理化分析实验室包括：①理化分析室（兼作感观检验室）；②仪器室（兼放细菌室显微镜等少量仪器）。

1. 理化分析室（如果没有条件，可以和微生物常规实验室合并）

理化分析室是进行物理、化学分析的主要操作室，实验台与细菌操作室要求相同，设置通风橱以满足加热、消化、干燥、烧灼和化学处理等工作需要。

2. 仪器室（如果没有条件，可以和微生物常规实验室合并）

仪器室放置显微镜、电子天平及理化分析用小型仪器；要求清洁干燥、防潮防虫、避光；仪器台要稳固、牢靠。

第二节 微生物实验室主要仪器设备和常用器皿

一、一般仪器设备

- ① 培养箱：培养微生物的主要设备，可以选择干热恒温或者生化培养箱。
- ② 电热干燥箱：用于吸管、平皿类玻璃器皿的干热、灭菌和烘烤。
- ③ 离心机：离心机（如图 1-1）用于收集微生物菌体以及其他沉淀物。离心机有冷冻和常温之分。有些样品由于在常温下不太稳定，需要低温环境，要视样品的种类而定。
- ④ 冰箱：冰箱是实验室中保存试剂和样品必不可少的仪器。
- ⑤ 电子天平：用于精确称量各类试剂。
- ⑥ 显微镜：观察细菌形态和活动的必备仪器。

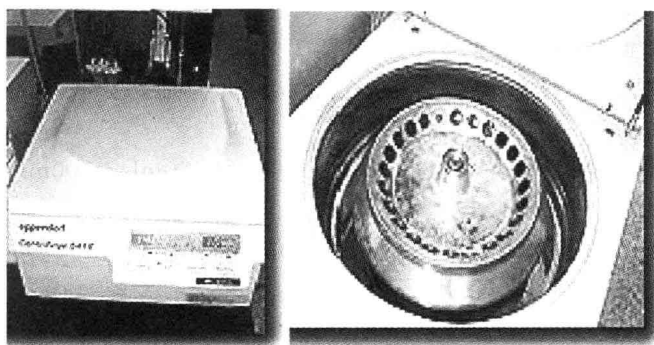


图 1-1 高速离心机

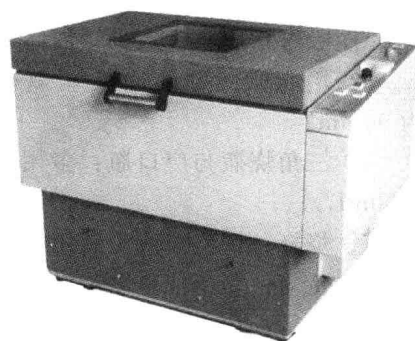


图 1-2 摇床培养箱

⑦ 摇床：摇床（如图 1-2）是实验室比较常用的一种仪器，在微生物实验操作过程中，液体培养基培养细菌时需要在特定温度下振荡培养。

- ⑧ 蒸馏水器：提供蒸馏水。
- ⑨ 水浴锅：部分培养温度需要水浴（如大肠杆菌检验）。
- ⑩ 微波炉/电炉：主要用于溶液的快速加热，微生物固体培养基的加热熔化。
- ⑪ 移液器：用于精密量取各类液体。常见的液体量器有量筒、微量取液器、移液管、刻度试管、烧杯等。

⑫ 超净工作台：超净工作台（如图 1-3）的主要用途是微生物的接种及处理时的无菌操作。

⑬ 高压蒸汽灭菌器（又叫高压灭菌锅，如图 1-4）：物品的灭菌。

⑭ 酸度计：用于配制试剂时精确测量 pH 值，从而保证配制的溶液的精确性。

⑮ 分光光度计：分光光度计在微生物试验中用于测定微生物悬液的浓度，从而可以正确选取合适的培养时间。一般是在 600nm 波长测定菌液浓度。

⑯ 无菌室：无菌室（如图 1-5）是一间光照度良好、无直接空气对流，并与外界隔离的小室。其外有一缓冲过道，在内室门上开一小活动窗，以便室内外物品的传递。室内有紫外灯（其多少取决于无菌室空间的大小）。

无菌室应经常保持清洁，工作前应将室内抹净，地上用拖把洗湿，然后将需用的器材放入室内，关好门后，开启紫外线灯照射 1h。工作者进入时应穿戴无菌衣、帽及口罩，并换清洁的胶底鞋（无菌室专用）。进入前关闭紫外线灯，在工作未完成前，不应随便开门出入。工作完毕，将室内打扫干净后方可离开。

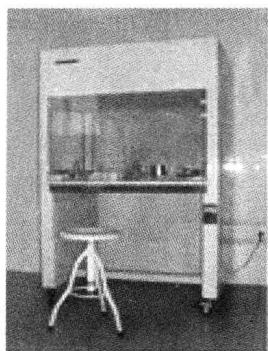


图 1-3 超净工作台

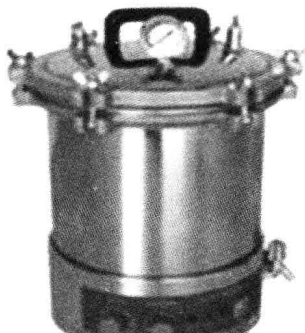


图 1-4 灭菌锅

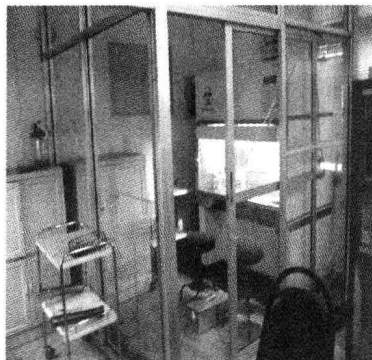


图 1-5 无菌室

二、常规玻璃器皿

- ① 吸管：用于吸取少量液体，常用的吸管为 0.1 刻度 1mL 及 1.0 刻度的 10mL 吸管。
- ② 培养皿：为硬质玻璃双碟，常用于分离培养，盖与底大小应合适，常用规格为 90mm。
- ③ 三角烧瓶与广口瓶：多用于盛培养基及配制溶液，常用的规格为 250mL、500mL、1000mL。
- ④ 烧杯：供盛液或煮沸用，常用的规格为 100mL、250mL、500mL、1000mL。
- ⑤ 量筒：用于液体测量，常用规格为 100mL、250mL、1000mL。
- ⑥ 试管：用于细菌培养，有多种规格。
- ⑦ 载玻片、盖玻片：细菌涂片观察用。
- ⑧ 试剂瓶：装试剂用，常用棕色避光。
- ⑨ 其他：如试管架、毛刷、酒精灯、接种棒、镍铬丝、涂布棒等。实验人员可以根据自己的需求为微生物实验室配置合适的仪器和耗材。

第二章 微生物实验的基本方法

第一节 培养基的配制和灭菌

培养基的种类很多,如果按成分划分,可分为天然培养基和合成培养基;如果按状态划分,可分为固体培养基、半固体培养基和液体培养基;如果按用途划分,可分为基础培养基、选择培养基、加富培养基和鉴别培养基。

一、实验目的

(1) 熟悉玻璃器皿的洗涤和灭菌前的准备工作。

(2) 了解配制微生物培养基的基本原理,掌握配制、分装培养基的方法。本实验通过常用的细菌培养基的配制,使学生了解常规配制培养基的方法。

(3) 学会各类物品的包装、配制和灭菌技术。

二、基本原理

培养基是人工配制的适合微生物生长繁殖或积累代谢产物的营养基质,用以培养、分离、鉴定、保存各种微生物或积累代谢产物。在自然界中,微生物种类繁多,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。但是,不同种类的培养基,一般应含有水分、碳源、氮源、能源、无机盐、生长因子等。不同微生物对 pH 的要求不一样,霉菌和酵母培养基的 pH 一般偏酸性,而细菌和放线菌培养基的 pH 一般为中性或微碱性(嗜碱细菌和嗜酸细菌例外)。因此,配制培养基时要根据不同微生物的要求将培养基的 pH 调到合适的范围。

三、实验器皿和材料

高压蒸汽灭菌器、干燥箱、酒精灯、培养皿、试管、移液管、锥形瓶、烧杯、量筒、天平、石棉网、药匙、铁架、表面皿、pH 试纸和棉花等;牛肉膏、蛋白胨、NaCl、NaOH 和琼脂等。

四、实验内容

1. 玻璃器皿的准备

(1) 洗涤 玻璃器皿在使用前必须洗涤干净。培养皿、试管、锥形瓶等可用洗衣粉加去污粉洗刷并用自来水冲净。移液管先用洗液浸泡,再用水冲洗干净。洗刷干净的玻璃器皿自然晾干或放入干燥箱中烘干,备用。

(2) 包装

① 平皿:培养皿由一盖一底组成一套,可以 5~9 套为一叠,用纸包好或盛入金属盒内,加盖灭菌。

② 试管和锥形瓶:空的试管、空的或盛有培养基的锥形瓶均可用棉塞塞好,并用不透水的厚纸包于棉塞外。若是盛有培养基的试管,应直立并扎成捆,以免灭菌时倾倒。

③ 吸管:干燥的吸管,在距其粗头顶端约 0.5cm 处,塞一小段约 1.5cm 长的棉花(棉花过紧,吹吸液体太费劲;过松,吹气时棉花会滑下),然后分别将已塞好棉花的每支吸管尖端斜放在旧报纸条的近左端,与报纸约呈 45°角,并将左端多余的部分覆折在吸管上,再

将整根吸管卷入报纸，将多余的纸条部分打一小结（图 2-1）。如此包好的很多吸管可再用一张大报纸包好，进行灭菌。

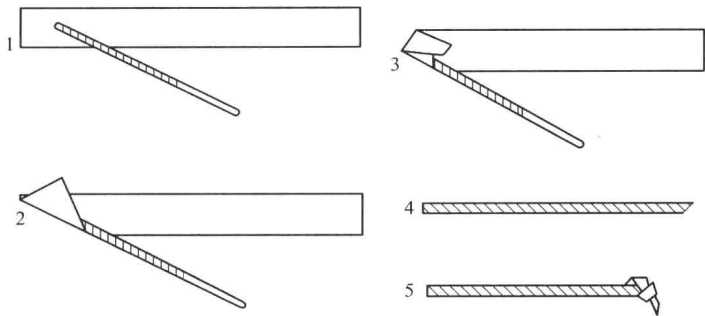


图 2-1 单支吸管的包装

④ 注射器：最好将内芯取出，与外套一起用纸或纱布包好；针头装入管底垫有少量棉花的小试管内，管口塞上棉塞。

棉塞的制作：棉塞的作用主要是防止杂菌污染和保证通气良好，所以好的棉塞应该形状、大小和松紧与试管口或三角瓶口完全适合。加塞时，棉塞长度的 1/3 在管口（瓶口）外，2/3 在管口内。如图 2-2 所示，取适量棉花铺成长方形，纵向松卷起来对折后塞入管（或瓶）口；或将棉花铺成方形，于其中央衬以小块棉花，用左手拇指为中心制作棉心，再由外侧棉花包入制成棉塞。一般用纤维长的棉花做塞子，不用脱脂棉，因为脱脂棉易吸水变湿，造成污染。

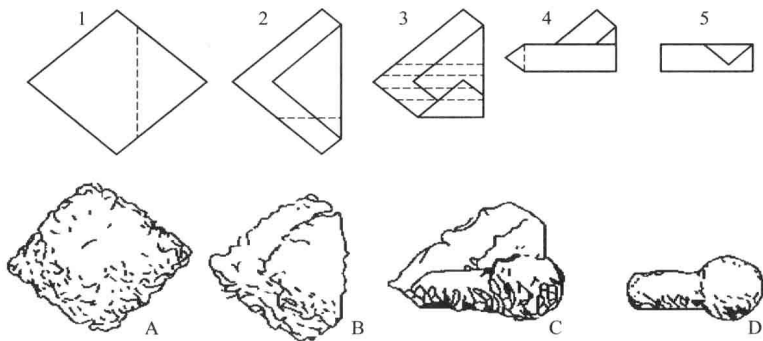


图 2-2 棉塞的制作

此外，液体培养中还经常用到通气塞（图 2-3），即 8 层纱布重叠而成，或在两层纱布间均匀铺一层棉花做成。

2. 液体及固体培养基的配制过程

(1) 液体培养基配制

① 称量 一般可用 1/100 粗天平称量配制培养基所需的各种药品。先按培养基配方计算各成分的用量，然后进行准确称量。

② 溶化 将称好的药品置于一烧杯中，先加入少量水（根据实验需要可用自来水或蒸馏水），用玻棒搅动，加热溶解。

③ 定容 待全部药品溶解后，倒入一量筒中，加水至所需体积。如某种药品用量太少时，可预先配成较浓溶液，然后按比例吸取一定体积溶液，加入至培养基中。

④ 调 pH 一般用 pH 试纸测定培养基的 pH。用剪刀剪出一小段 pH 试纸，然后用镊

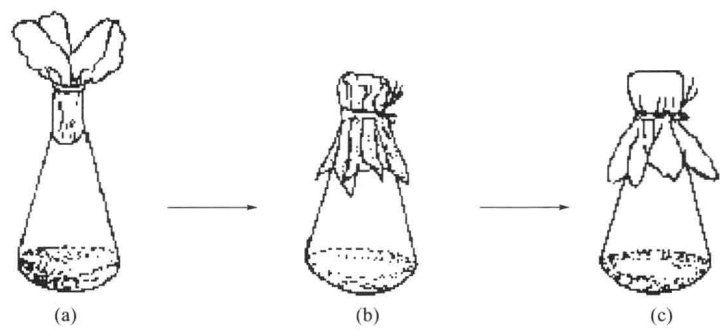


图 2-3 通气塞

(a) 配制时纱布塞法；(b) 灭菌时包牛皮纸；(c) 液体培养时纱布翻出

子夹取此段 pH 试纸，在培养基中蘸一下，观看其 pH 范围，如培养基偏酸或偏碱时，可用 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 溶液进行调节。调节 pH 时，应逐滴加入 NaOH 或 HCl 溶液，防止局部过酸或过碱，破坏培养基中的成分。边加边搅拌，并不时用 pH 试纸测试，直至达到所需 pH 为止。

⑤ 过滤 用滤纸或多层纱布过滤培养基。一般无特殊要求时，此步可省去。

⑥ 分装

a. 分装锥形瓶：培养基分装量一般以不超过锥形瓶总容量的 3/5 为宜，若分装量过多，灭菌时培养基易沾污棉花而导致染菌。

b. 分装试管：将培养基趁热加至漏斗中。分装时左手并排拿多根试管，右手控制弹簧夹，将培养基依次加入各试管（图 2-4）。用于制作斜面培养基时，一般装量不超过试管高度的 1/5（图 2-5）。分装时谨防培养基沾在管口上，否则会使棉塞沾上培养基而造成染菌。

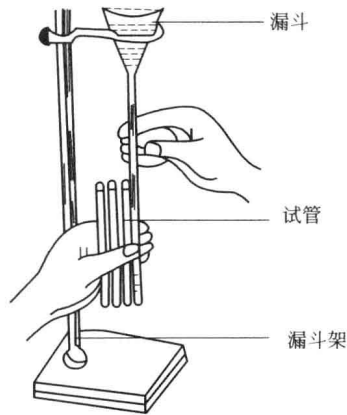


图 2-4 培养基的分装

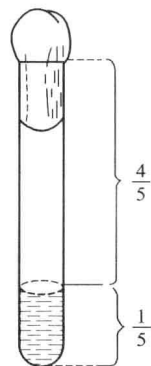


图 2-5 斜面培养基的装量

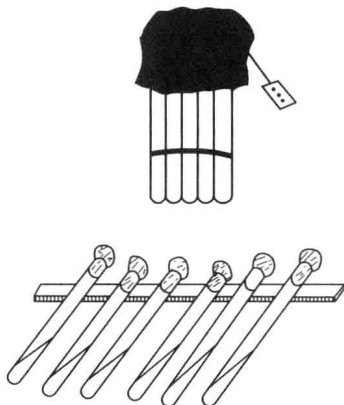


图 2-6 斜面的摆法和冷凝

⑦ 斜面的制作 灭菌后如需制成斜面培养基，应在培养基冷却至 50~60℃ 时，将试管搁置成一定的斜度，斜面高度不超过试管总高度的 1/3~1/2（图 2-6）。

(2) 固体培养基的配制 配制固体培养基时，应将已配好的液体培养基加热煮沸，再将称好的琼脂（1.5%~2%）加入，若配成半固体的，可加入 0.2%~0.5% 的琼脂。并用玻棒不断搅拌，以免糊底烧焦。继续加热至琼脂全部溶化，最后补足因蒸发而失去的水分。

3. 培养基的灭菌

(1) 干热灭菌 通过使用干热空气杀灭微生物的方法。一般是把待灭菌的物品包装就绪

后,放入烘箱中烘烤,即加热至 $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ 维持 $1\sim 2\text{h}$ 。干热灭菌法常用于空玻璃器皿、金属器具的灭菌。凡带有胶皮的物品、液体及固体培养基等均不能用此法灭菌。

① 干燥箱灭菌 将包扎好的物品放入干燥烘箱内,注意不要摆放太密,以免妨碍空气流通;不得使器皿与烘箱的内层底板直接接触。将烘箱的温度升至 $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ 并恒温 $1\sim 2\text{h}$,注意勿使温度过高,超过 170°C ,器皿外包裹的纸张、棉花会被烤焦燃烧。如果是为了干燥玻璃器皿,温度 120°C 持续 30min 即可。温度降至 $60\sim 70^{\circ}\text{C}$ 时方可打开箱门,取出物品,否则玻璃器皿会因骤冷而爆裂。用此法灭菌时,绝不能用油、蜡纸包扎物品。

② 火焰灭菌 直接用火焰灼烧灭菌,迅速彻底。对于接种环、接种针或其他金属用具,可直接在酒精灯火焰上烧至红热进行灭菌。此外,在接种过程中,试管或三角瓶口,也采用通过火焰灼烧而达到灭菌的目的。

玻璃器皿等在灭菌前必须经正确包裹和加塞,以保证玻璃器皿于灭菌后不被外界杂菌所污染。常用玻璃器皿的包扎和加塞方法如下:平皿用纸包扎或装在金属平皿筒内;三角瓶在棉塞与瓶口外再包以厚纸,用棉绳以活结扎紧,以防灭菌后瓶口被外部杂菌所污染;吸管以拉直的曲别针一端放在棉花的中心,轻轻将棉花插入粗头顶端管口,棉花松紧必须适中,管口外露的棉花纤维统一通过火焰烧去,灭菌时将吸管装入金属管筒内进行灭菌,也可用纸条斜着从吸管尖端包起,逐步向上卷,头端的纸卷捏扁并拧几下,再将包好的吸管集中灭菌。

(2) 湿热灭菌

① 煮沸消毒法 注射器和解剖器械等均可采用此法。先将注射器等用纱布包好,然后放进煮沸消毒器内加水煮沸。对于细菌的营养体煮沸 $15\sim 30\text{min}$,对于芽孢则需煮沸 $1\sim 2\text{h}$ 。

② 高压蒸汽灭菌法 高压蒸汽灭菌用途广,效率高,是微生物学实验中最常用的灭菌方法。这种灭菌方法是基于水的沸点随着蒸汽压力的升高而升高的原理设计的。当蒸汽压力达到 1.05kgf/cm^2 ^①时,水蒸气的温度升高到 121°C ,经 $15\sim 30\text{min}$,可全部杀死物品上的各种微生物和它们的孢子或芽孢。一般培养基、玻璃器皿以及传染性标本和工作服等都可应用此法灭菌。

操作方法和注意事项如下。

a. 加水:打开灭菌锅盖,向锅内加水到水位线。立式消毒锅最好用已煮开过的水,以减少水垢在锅内的积存。注意水要加够,防止灭菌过程中干锅。

b. 装料、加盖:灭菌材料放好后,关闭灭菌器盖,采用对角式均匀拧紧锅盖上的螺旋,使蒸汽锅密闭,勿使漏气。

c. 排气:打开排气口(也叫放气阀)。用电炉加热,待水煮沸后,水蒸气和空气一起从排气孔排出,当有大量蒸汽均匀排出时,锅内冷空气完全排净。

d. 升压、保压和降压:当锅内冷空气排净时,即可关闭排气阀,压力开始上升。当压力上升至所需压力时,控制压力以维持恒温,并开始计算灭菌时间,待时间达到要求(一般培养基和器皿灭菌控制在 121°C , 20min)后,停止加热,待压力降至接近“0”时,打开放气阀。注意不能过早过急地排气,否则会由于瓶内压力下降的速度比锅内慢而造成瓶内液体冲出容器之外。

在同一温度下,湿热的杀菌效力比干热大。其原因有三:一是湿热中细菌菌体吸收水分,蛋白质较易凝固,因蛋白质含水量增加,所需凝固温度降低(表2-1);二是湿热的穿透力比干热大(表2-2);三是湿热的蒸汽有潜热存在。 1g 水在 100°C 时,由气态变为液态时

① $1\text{kgf/cm}^2 = 98.0665\text{kPa}$ 。

可放出 2.26kJ 的热量。这种潜热，能迅速提高被灭菌物体的温度，从而增加灭菌效力。

表 2-1 蛋白质含水量与凝固所需温度的关系

卵蛋白含水量/%	30min 内凝固所需要温度/℃
50	56
25	74~80
18	80~90
6	145
0	160~170

表 2-2 干热、湿热穿透力及灭菌效果比较

项 目	时间/h	透过布层的温度/℃			灭菌
		20 层	10 层	100 层	
干热(130~140℃)	4	86	72	70.5	不完全
湿热(105.3℃)	3	101	101	101	完全

灭菌锅留有不同分量空气时，压力与温度的关系见表 2-3。

表 2-3 灭菌锅留有不同分量空气时，压力与温度的关系

压 力			全部空气排出	2/3 空气排出	1/2 空气排出	1/3 空气排出	空气全不排出
/MPa	/(kgf/cm ²)	/(lbf/in ²)	时的温度/℃	时的温度/℃	时的温度/℃	时的温度/℃	时的温度/℃
0.03	0.35	5	108.8	100	94	90	72
0.07	0.70	10	115.6	109	105	100	90
0.10	1.05	15	121.3	115	112	109	100
0.14	1.40	20	126.2	121	118	115	109
0.17	1.75	25	130.0	126	124	121	115
0.21	2.10	30	134.6	130	128	126	121

第二节 显微镜的使用

一、实验目的

了解普通光学显微镜的构造和原理，掌握显微镜的操作和保养方法。

二、显微镜的基本结构及原理

现代普通光学显微镜利用物镜和目镜两组透镜系统放大成像，故又称为复式显微镜。显微镜的基本结构包括三大部分：光学系统、机械部件和附加装置（图 2-7）。光学系统包括物镜、目镜以及由聚光器和反光镜组成的照明装置。机械部件主要包括调焦系统、载物台和物镜转换器等运动部件以及镜座、镜臂、镜筒等支持部件。

1. 机械部分

（1）镜座 显微镜最下面的马蹄形铁座。其作用是支持显微镜的全部重量，使其稳立于工作台上。

（2）镜柱 镜座上的直立短柱叫做镜柱。

（3）镜臂 镜柱上方弯曲的弓形部分叫做镜臂，是握镜的地方。镜臂和镜柱之间有一个能活动的倾斜关节，可使显微镜向后倾斜，便于观察。

（4）镜筒 安装在镜臂上端的圆筒叫做镜筒。镜筒长度一般为 160mm，上端安装目镜，下端连接物镜转换器。