



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材



iCourse · 教材

微生物学实验

(第5版)

主编 沈萍 陈向东

高等教育出版社



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材



iCourse · 教材

微生物学实验

(第5版)

主编 沈 萍 陈向东

编者 (按姓氏笔画排序)

方呈祥 安志东 沈 萍 陈向东

郑从义 黄玉屏 唐 兵 唐晓峰

谢志雄 曹军卫 彭 方 彭珍荣

内容提要

《微生物学实验》第5版仍遵循第3版和第4版的编写指导思想和基本要求，并按照第4版的编排模式将其分成“微生物学基本实验技术”和“微生物学综合型、研究型实验”两大部分，但对其内容和形式均进行了更新和修订。第一部分包括：无菌概念和无菌操作，消毒灭菌，分离纯化，显微观察，涂片染色，培养基及微生物培养，生理生化反应，快速微量检测，基因突变，基因转移，基因文库构建，PCR技术及其在鉴定细菌中的应用，免疫学的基本技术等。第二部分包括：高产蛋白酶（或其他代谢产物）菌株的筛选及其基因的克隆和表达，杀虫微生物的分离，微生物产沼气，水和食品的微生物检测，酸乳、啤酒和泡菜的制作，人体表面正常菌群的分离鉴定，用互联网和计算机辅助基因分析鉴定古菌和细菌，细菌系统发育树的构建，发现和鉴定细菌新种，用来分离严格厌氧菌的“滚管实验”等。其内容涉及微生物在工业、农业、环境、食品、医学等领域的应用。

本版在编写形式上仍突出了以学生为本的思想，在每一个实验中除让学生明确其目的、原理和基本操作外，还在相应位置以Box形式告知学生“本实验为什么用这种（或这些）菌株？”“安全警示”“本实验成功的关键”等。

与本书配套的数字课程附有实验技术相关视频、附录和参考书目，供读者查阅和参考以及后续内容拓展与更新。

本书适合理、工、农、林、医各类高等院校和师范院校生命科学方向本科生学习使用，也可供其他生物科技人员查阅参考。

图书在版编目（CIP）数据

微生物学实验 / 沈萍，陈向东主编. --5版. --北京：高等教育出版社，2018.3

ISBN 978-7-04-049022-0

I. ①微… II. ①沈… ②陈… 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（2018）第030053号

Weishengwuxue Shiyan

策划编辑 李光跃 责任编辑 田红 封面设计 张楠 责任印制 田甜

出版发行	高等教育出版社	网 址	http://www.hep.edu.cn
社 址	北京市西城区德外大街4号		http://www.hep.com.cn
邮政编码	100120	网上订购	http://www.hepmall.com.cn
印 刷	三河市华润印刷有限公司		http://www.hepmall.com
开 本	787mm×1092mm 1/16		http://www.hepmall.cn
印 张	17.75	版 次	1981年3月第1版
字 数	440千字		2018年3月第5版
购书热线	010-58581118	印 次	2018年3月第1次印刷
咨询电话	400-810-0598	定 价	32.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题，请到所购图书销售部门联系调换

版权所有 侵权必究

物 料 号 49022-00

数字课程 (基础版)

微生物学实验

(第5版)

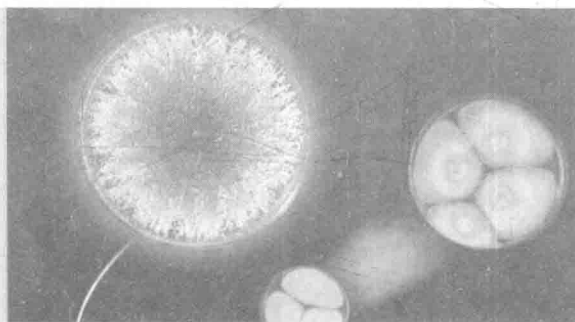
主编 沈 萍 陈向东

登录方法:

1. 电脑访问 <http://abook.hep.com.cn/49022>, 或手机扫描下方二维码、下载并安装 Abook 应用。
2. 注册并登录, 进入“我的课程”。
3. 输入封底数字课程账号 (20 位密码, 刮开涂层可见), 或通过 Abook 应用扫描封底数字课程账号二维码, 完成课程绑定。
4. 点击“进入学习”, 开始本数字课程的学习。

课程绑定后一年为数字课程使用有效期。如有使用问题, 请发邮件至:

lifescience@pub.hep.cn



微生物学实验 (第5版)

微生物学实验数字课程和纸质教材一体化设计, 为学生提供自主学习空间。数字课程内容包括: 实验技术相关视频、附录和主要参考书目等。

用户名: 密码: 验证码: 5360 忘记密码?

<http://abook.hep.com.cn/49022>



扫描二维码, 下载 Abook 应用

数字课程资源目录

- 视频 I -a 使用接种环取菌
- 视频 II -a 显微镜油镜使用后的镜头擦拭
- 视频 III -a 放线菌形态观察
- 视频 III -b 酵母出芽生殖
- 视频 III -c 疯狂的霉菌
- 视频 III -d 黑曲霉的形态观察（挖孔法）
- 视频 III -e 革兰氏染色实验
- 视频 III -f 四区划线
- 视频 IV -a 制备固体培养平板
- 视频 IV -b 斜面制作
- 视频 V -a 灭菌锅的使用
- 视频 V -b 用报纸包培养皿
- 视频 V -c 用报纸包移液管
- 视频 VI -a 倒平板
- 视频 VI -b 微生物稀释涂布
- 视频 VI -c 微生物斜面接种培养技术
- 视频 VI -d 冻干管的开启和接种
- 视频 VI -e 滴水法开冻干管
- 视频 IX -a 细菌生理生化鉴定 API-20NE

- 附录 I 染色液的配制
- 附录 II 培养基的配制
- 附录 III 试剂和溶液的配制
- 附录 IV 常用的微生物名称
- 附录 V 常用的计量单位
- 附录 VI 酚的重蒸馏与饱和
- 附录 VII 微生物学实验室常用的玻璃器皿
- 附录 VIII 洗涤液的配制与使用
- 附录 IX 微生物菌种保藏
- 附录 X MEGA 软件构建微生物菌株进化树
- 附录 XI 教学实验菌株信息
- 附录 XII 需要鉴定的古菌和细菌 16S rRNA 序列文本

主要参考书目

第5版前言

《微生物学实验》第5版的编写在总体指导思想上仍遵循第3、4版的原则，即：正确处理该教材的基础性、可操作性和先进性的关系；强调教材的启发性、开拓性和应用性。在总结前几版的基础上，充分吸收了广大教师和学生的意见和建议，本版在内容和编排上吸收和整合了前两个版本的长处，即：第3版内容的编排、归纳更方便教师的教学；第4版的内容和形式比较新颖、具体实用，有利于学生学习和思考，更方便学生取得实验的成功。

本版仍按照第4版分成“微生物学基本实验技术”和“微生物学综合型、研究型实验”二大部分。

对第一部分的修订：在强调基础性和实用性的基础上，根据教学实践，本版对实验内容和顺序进行了适当增加和调整，并将各个实验归并入12个模块。除了对原有实验进行修正外，还增补了一些新的实验：在显微镜技术实验中，对光学显微镜和电子显微镜的原理进行了补充和完善；在细菌染色实验中，增加了“用KOH区分革兰氏阴性和阳性细菌”；在免疫印迹实验的最后显色一步增加了更适合学生实验的OPD显色。为了进一步完善本版的内容，这一部分还增加了：TCID₅₀病毒定量法、紫外线对微生物生长的影响、λ噬菌体的局限性转导。

对第二部分的修订：根据学科进展和实际应用的需要，对实验XVI“水中细菌总数和总大肠菌群的测定”按照国家新的《生活饮用水卫生标准》进行了更新；在相应的实验中还增加了米酒和泡菜的制作；对实验XX“利用互联网和计算机辅助基因分析鉴定古菌和细菌”中，对生物信息学相关数据和软件应用进行了更新，并按当前的NCBI网络实际运行界面，对操作步骤进行了调整，还增加了操作截图，使学生更直观地了解相关操作。其他各实验，包括思考题和插图，也都进行了不同程度地的更新和调整。此外，根据实际需要，在本部分还增加了一个用来分离严格厌氧菌的“滚管实验”和一个实用性很强的综合型实验：“利用多相分类学方法对细菌进行初步鉴定”。

本版每一个实验均补加了实验用菌株的学名；将“目的要求”和“实验原理”移到“实验器材”之前，以增强学生对实验的理解。

本版将“实验技术相关视频”“附录”和“主要参考书目”等放在与本书配套的数字课程上 (<http://abook.hep.com.cn/49022>)。读者可以登录网站查阅和参考相关内容。

因为实验用菌种(株)是顺利开展微生物学实验的关键,因此,编者联合“国家微生物资源平台-教学实验子平台”的“中国典型培养物保藏中心(CCTCC)”,承诺为开设本书所列实验的学校以优惠价提供经教学实验检验过的优质菌种(株),具体信息见附录。

在《微生物学实验》第5版即将问世之际,我们对曾在前四版编写中做出重要贡献的老师,特别是范秀容先生和李广武先生致以衷心的感谢和敬意!对多年来一直信任和支持我们的同行、广大师生和读者致以衷心的感谢!对为本书的出版付出辛勤劳动的高等教育出版社生命科学分社的李光跃、田红等同志表示诚挚的谢意!

由于编者水平和能力有限,本书仍然会有不当或错漏之处,敬请广大师生、同行和读者多批评指正。谢谢!

编者
2016年7月

第4版前言



第3版前言



第2版前言



第1版前言



目 录

微生物学实验规则与安全	1
-------------------	---

第一部分 微生物学基本实验技术

I 无菌概念和无菌操作技术	5
实验 1 实验室环境和人体表面的微生物检查	5
实验 2 无菌操作技术	9
II 显微镜的构造、性能和使用方法	14
实验 3 普通光学显微镜的使用	14
实验 4 电子显微镜样品的制备	21
实验 5 相差、暗视野和荧光显微镜的示范观察	27
III 微生物的染色、形态和表面结构观察	35
实验 6 细菌、放线菌、酵母菌和霉菌的制片和简单染色	35
实验 7 革兰氏染色法和 KOH 快速鉴定革兰氏阴性和阳性菌法	43
实验 8 细菌芽孢、荚膜和鞭毛染色	47
实验 9 微生物大小的测定	53
IV 培养基的制备	58
实验 10 牛肉膏蛋白胨培养基的制备	58
实验 11 高氏 I 号培养基的制备	62
实验 12 马丁培养基的制备	63
实验 13 血液琼脂培养基的制备	65
V 消毒与灭菌	67
实验 14 干热灭菌	67
实验 15 高压蒸汽灭菌	69
实验 16 紫外线灭菌	73
实验 17 微孔滤膜过滤除菌	75
VI 微生物的纯培养	78
实验 18 微生物的分离与纯化	79
实验 19 厌氧微生物的培养	85
实验 20 病毒的培养	89
实验 21 食用真菌的培养	94
VII 微生物数量的测定	100

实验 22	显微镜直接计数法	100
实验 23	平板计数法	104
实验 24	光电比浊计数法	106
实验 25	大肠杆菌生长曲线的制作	108
实验 26	TCID ₅₀ 病毒定量法	111
实验 27	噬菌体的效价测定	115
VIII	环境因素对微生物生长的影响	118
实验 28	化学因素对微生物生长的影响	118
实验 29	紫外线对微生物生长的影响	122
实验 30	温度对微生物生长的影响	123
实验 31	渗透压对微生物生长的影响	125
实验 32	pH 对微生物生长的影响	127
实验 33	生物因素 (抗生素) 对微生物生长的影响	129
IX	微生物鉴定中常用的生理生化试验	132
实验 34	大分子物质的水解试验	132
实验 35	糖发酵试验	136
实验 36	IMViC 试验	138
实验 37	快速、简易的检测微生物技术	141
X	微生物的基因突变及基因转移	147
实验 38	微生物的诱发突变	147
实验 39	细菌的接合作用	152
实验 40	噬菌体的转导	155
实验 41	Ames 致突变和致癌试验	162
XI	分子微生物学基础技术	166
实验 42	细菌质粒 DNA 的小量制备	166
实验 43	质粒 DNA 的转化	171
实验 44	细菌总 DNA 的制备	174
实验 45	细菌基因组文库的构建	178
实验 46	应用 PCR 技术鉴定细菌	183
XII	免疫学技术	188
实验 47	凝集反应	188
实验 48	抗原与免疫血清的制备	192
实验 49	双向免疫扩散试验	194
实验 50	酶联免疫吸附试验 (ELISA)	196
实验 51	蛋白质印迹法	199

第二部分 | 微生物学综合型、研究型实验

XIII	苏云金芽孢杆菌的分离和鉴定	207
XIV	碱性蛋白酶高产菌株的选育与基因克隆	213
	实验 XIV -1 产蛋白酶菌株的筛选	213
	实验 XIV -2 蛋白酶产生菌株的初步鉴定和诱变育种	217
	实验 XIV -3 碱性蛋白酶基因的克隆与表达	221
XV	微生物产沼气	226
XVI	水中细菌总数和总大肠菌群的测定	232
XVII	牛乳的巴氏消毒、细菌学检查及酸乳、泡菜的制作	243
XVIII	固定化酵母发酵产啤酒和米酒的制作	251
XIX	利用 Biolog 自动分析系统分离鉴定人体正常菌群	256
XX	利用互联网和计算机辅助基因分析鉴定古菌和细菌	261
XXI	利用多相分类学方法对细菌进行初步鉴定	267

微生物学实验规则与安全

普通微生物学实验课的目的是：训练学生掌握微生物学最基本的操作技能，了解微生物学的基本知识，加深理解课堂讲授的某些微生物学理论。同时，通过实验，培养学生观察、思考、提出问题、分析问题和解决问题的能力，实事求是、严肃认真的科学态度以及敢于创新的开拓精神；树立勤俭节约、爱护公物的良好作风。

微生物学实验室是一个严肃的实验场所。虽然普通微生物学实验所用的微生物材料一般为非致病菌或条件致病菌，但许多微生物是否具有致病性不是绝对的，与其数量、条件、感染途径等有关，所以在实验操作中，必须将所有的微生物培养物都看成是具有潜在致病性的。

为了上好微生物学实验课，并保证安全，特制定如下规则和安全措施：

1. 每次实验前必须对实验内容进行充分预习，以了解实验的目的、原理和方法，做到心中有数，思路清楚。
2. 在整个实验过程中必须穿上实验服，留长发者，必须将长发挽在背后。实验台上除了记录本和笔（记录笔和记号笔）以外，不准堆放任何个人物品。
3. 认真及时做好实验记录，对于当时不能得到结果而需要连续观察的实验，则需记下每次观察的现象和结果，以便分析。
4. 实验室内应保持整洁，勿高声谈话和随便走动，关闭手机保持室内安静。
5. 实验时小心仔细，全部操作应严格按操作规程进行，禁止用嘴吸取菌液或试剂，万一遇有盛菌试管或瓶不慎打破、皮肤破伤等意外情况发生时，应立即报告指导教师，及时处理，切勿隐瞒。
6. 实验过程中，切勿使乙醇（酒精）、乙醚、丙酮等易燃药品接近火焰。如遇火险，应先关掉火源，再用湿布或沙土掩盖灭火。必要时用灭火器。
7. 使用显微镜或其他贵重仪器时，要求细心操作，特别爱护。显微镜的目镜在使用前后必须用浸有乙醇的透镜纸擦净。对消耗材料要力求节约，对药品

和其他持续公用品用毕后，仍放回原处，严禁将药匙交叉使用。

8. 每次实验完毕后，必须把所用仪器抹净放妥，将实验室收拾整齐，擦净桌面，如有菌液污染桌面或其他地方时，可用 3% 来苏尔（即煤酚皂溶液）或 50 g/L 石炭酸（即苯酚）覆盖半小时后擦去，如系芽孢杆菌，应适当延长消毒时间。凡带菌之工具（如吸管、玻璃刮棒等）在洗涤前须浸泡在 3% 来苏尔中进行消毒。

9. 每次实验需进行培养的材料，应标明自己的组别或姓名及处理方法，放于教师指定的地点进行培养。实验室中的菌种和物品等，未经教师许可，不得携出室外。

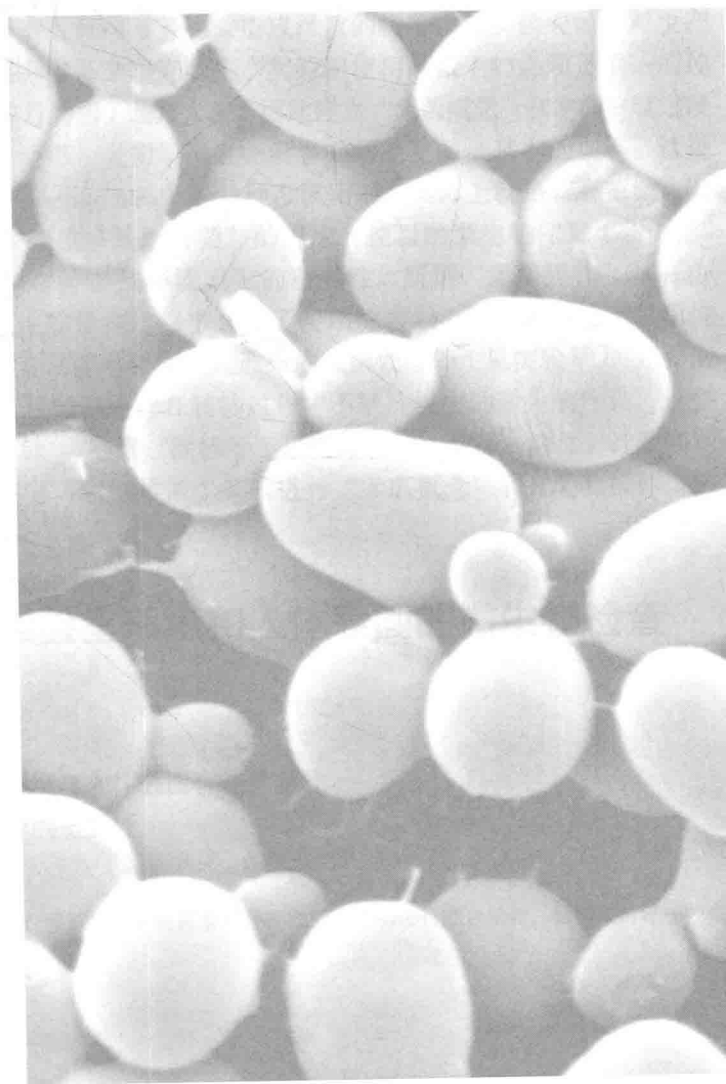
10. 每次实验的结果（包括负结果），应以实事求是的科学态度填入报告表格中，力求简明准确，认真回答思考题，并及时汇交教师批阅。

11. 离开实验室前将手洗净，注意关闭门窗、灯、火、煤气等。

（沈 萍）

第一部分

微生物学基本 实验技术



I

无菌概念和无菌操作技术

微生物多种多样且无处不在。它们就存在于我们周围和我们身体的许多部位，但我们却看不见它们。当我们进行微生物操作时，它们随时可能在我们完全不知晓的情况下，潜入目的培养物，造成严重的污染，使实验失败，对生产造成巨大的损失。因为在科学研究和生产实践中使用的微生物必须是单一的纯种或菌株^{*}，杂菌（非目的菌）是其大敌，因此建立“无菌概念”和掌握一套过硬的“无菌操作技术”是每一名初学微生物学者必须经受的最基本的训练。这里所指的“无菌概念”（aseptic idea）是一种习惯用语，实际上就是“有菌概念”，也就是在我们头脑中树立“处处有菌”的思想，使目的微生物“无（杂）菌”污染，也使我们进一步体会到环境卫生的重要性。所谓“无菌操作”（aseptic technique）是指在微生物操作过程中，除了使用的容器、用具（试管、三角烧瓶、平皿和吸管等）和培养基必须进行严格的灭菌处理外（见实验 V），还要通过一定的技术来保证目的微生物在转移过程中不被环境中的微生物污染，这些技术包括用接种环（针）、吸管、涂棒等工具进行接种、稀释、涂片、计数和划线分离等。因此，本部分将安排两个实验进行“无菌概念”和“无菌操作”的训练。

实验 1 实验室环境和人体表面的微生物检查

一、目的要求

1. 证实实验室环境与人体表面存在微生物。
2. 体会无菌操作的重要性。

^{*} 在科学研究和生产实践中，有时需要几种不同的微生物进行混合培养，但其中的每一种微生物也必须是纯种（株）。

3. 观察不同类群微生物的菌落形态特征。

二、基本原理

如何知道我们周围存在看不见的微生物呢？也就是说如何使“看不见”变得“看得见”呢？第Ⅱ部分介绍的显微镜技术是其中一种方法，这是通过放大微生物个体，使我们能够看到它们；另一种方法是通过“放大”成子细胞群体（菌落），使我们看到它们的存在，即通过培养的方法使肉眼看不见的单个菌体在固体培养基上，经过生长繁殖形成几百万个菌聚集在一起的肉眼可见的菌落（colony）。本实验将采取后一种方法检查实验室环境和人体表面的微生物，从而使学生牢固树立“无菌概念”。

三、实验器材

1. 培养基

肉膏蛋白胨琼脂平板培养基。

2. 溶液和试剂

无菌水。

3. 仪器和其他用品

试管，灭菌湿棉签（装在试管内），试管架，煤气灯或酒精灯，记号笔和废物缸等。

四、操作步骤

1. 标记

分别在2套平板的底部划分出4个小区，并在其边缘写上自己的名字和日期，在4个小区内分别标明待接种的样品名，为了不影响观察，可用符号或数字代表（图 I -1）。在另外2套平板的底部，用记号笔写上姓名、日期以及“空气1”和“空气2”。

注意：不能在皿盖上作标记，因为在微生物学实验中，经常需要同时观察很多平板，很容易错盖皿盖。

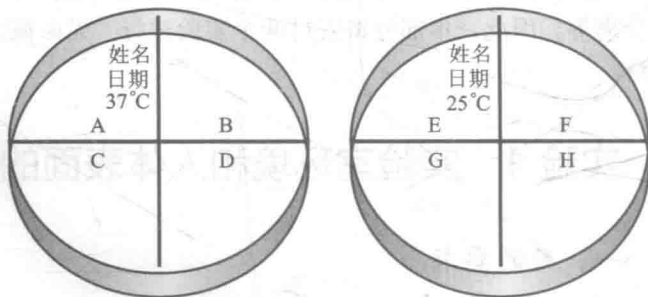


图 I -1 平板底部标记

A. 洗前手指 B. 洗后手指 C. 头发 D. 鼻腔 E. 实验台 F. 门旋钮 G. 灰尘 H. 无菌水

2. 人体表面微生物的检查

(1) 手指表面：在火焰旁，半开皿盖，用洗前的手指在平板的A区轻轻按一下，迅速盖上皿

盖。然后用肥皂清洗手 2 次，自然干燥后，在 B 区轻轻按一下，迅速盖上皿盖。

(2) 头发：将你的 1~2 根头发轻轻放在平板的 C 区，迅速盖上皿盖。

(3) 鼻腔：按图 I-2 的操作，取出灭菌的湿棉签在自己的鼻腔内滚动数次后，立即在平板的 D 区轻轻摩擦 2~3 次，盖上皿盖，并按图 I-2 的操作将用过的棉签放回试管中。

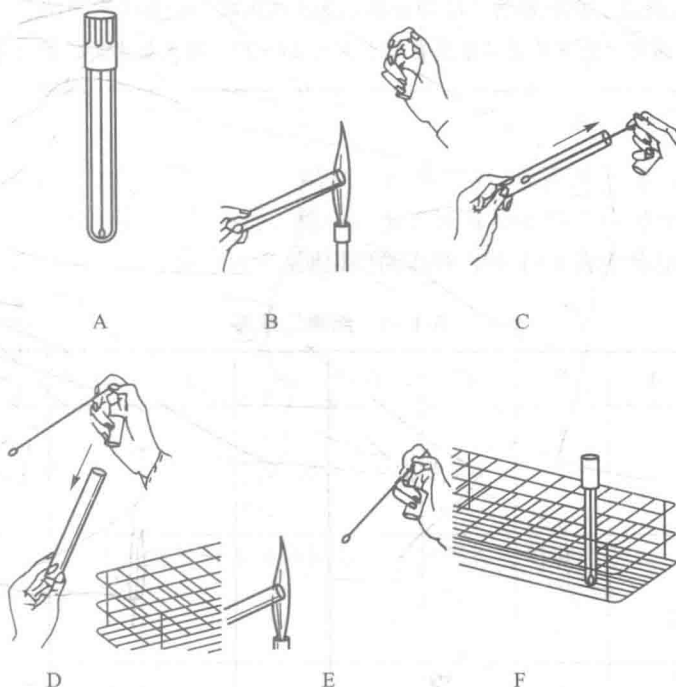


图 I-2 灭菌棉签的取出与放入试管

A. 盛灭菌棉签的灭菌试管 B. 取出管帽并灼烧管口 C. 取出棉签 D. 放回管帽
E. 棉签接种后放回试管前，拔出管帽灼烧管口 F. 用过的棉签插入试管后，放回至试管架

3. 实验室环境的检查

(1) 将标有“空气 1”的平板在实验室打开皿盖，使琼脂培养基表面完全暴露在空气中；将另一标有“空气 2”的平板放在已灭菌的无菌操作箱（室）内，打开皿盖，1 h 后盖上 2 个皿盖。

注意：在记录本上记下“空气 1”和“空气 2”分别代表的含义。

(2) 按图 I-2 的操作方法取出灭菌湿棉签，在实验台面擦拭约 2 cm^2 的范围，然后将棉签从平板的开启处伸进平板表面，在图 I-1 标示的 E 区滚动一下，立即闭合皿盖，放回棉签。用同样的方法将擦拭了门旋钮的棉签在图 I-1 标示的 F 区进行滚动接种，将沾有灰尘的棉签在 G 区接种。将灭菌湿棉签在 H 区接种。

4. 培养

将所有的琼脂平板翻转，使皿底朝上，置 37°C 培养 1~2 d。