

Fermentation

发酵

工程实验

Engineering
Experiment

陈宜涛 主编

Fermentation

发酵

Engineering
Experiment

陈宜涛 主编



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

发酵工程实验 / 陈宜涛主编. —杭州: 浙江大学出版社, 2018. 6

ISBN 978-7-308-18328-4

I. ①发… II. ①陈… III. ①发酵工程—实验—高等学校—教材 IV. ①TQ92-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 129866 号

发酵工程实验

陈宜涛 主编

责任编辑 秦 瑕

责任校对 王安安

封面设计 续设计

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 杭州中大图文设计有限公司

印 刷 绍兴市越生彩印有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 12

字 数 307 千

版 印 次 2018 年 6 月第 1 版 2018 年 6 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-18328-4

定 价 30.00 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中心联系方式: 0571-88925591; <http://zjdxcbbs.tmall.com>

编委会名单

主 编 陈宜涛(浙江中医药大学)

副主编 李加友(嘉兴学院)

陈少云(浙江中医药大学)

付永前(台州学院)

编 者 (按姓氏笔画排序)

于 岚(湖州师范学院)

钟传青(山东建筑大学)

曹广祥(山东第一医科大学)

彭春龙(台州学院)

葛立军(浙江中医药大学)

裴晓林(杭州师范大学)

潘佩蕾(浙江中医药大学)

薛栋升(湖北工业大学)

主 审 蒋新龙(浙江树人大学)

前言

发酵工程是利用现代生物技术和工程手段,通过利用、改造微生物的某些特定功能,获取人类所需产品的学科。随着分子生物学、生物信息学、组学等相关理论和技术的迅猛发展,以及机械制造、自动化生产等技术瓶颈的突破,发酵工程技术的重要性也日益显现,特别是在清洁能源建设、生物制药、环境保护等民生相关领域显现了其强大的推动力,成为生物技术产业化的主要桥梁和科学技术转化为生产力的重要推动力量。

国家教育事业发展“十三五”规划明确提出,“十三五”期间我国高等教育改革目标是推进高等教育分类发展、合理布局,推动具备条件的普通本科高校向应用型高校转变,提高应用型、技术技能型和复合型人才培养比重。应用型人才培养需要在理论教学的同时培养其动手能力。发酵工程是一门实践性很强的学科,要求学生应用微生物学、生物化学、化工原理、分子生物学等基本理论分析和解决生产过程中的具体问题,从而提高生产过程的经济效益和社会效益。

本教材为浙江大学出版社《发酵工程》(“十一五”浙江省重点教材建设项目)配套实验用书,秉承《发酵工程》的编写宗旨,提倡“先进性、实用性、可操作性”的编写原则,坚持“宽基础、重应用”的编写风格,力求满足不同层次、不同研究人群的基本需求。编写过程中,我们力求从基础到应用,循序渐进、由简入难,既有发酵工程专业的基本技术和技能,也包含本学科的一些新技术、新突破,使本书在保证系统性、科学性的同时,也能反映发酵工程的进展和技术更新。

本教材共5篇,30个实验:第1篇为基础性实验,包含10个本学科基础实验项目;第2篇为综合性实验,包含7个综合应用实验项目;第3篇为设计性实验,包含6个可依实际情况综合设计的实验项目;第4篇为研究性实验,包含4个研究探索实验项目;第5篇为典型发酵产品生产,包含好氧发酵、厌氧发酵和固态发酵3种经典发酵模式实验项目。编写分工分:实验1、实验10和实验13由潘佩蕾编写;实验2、实验14和实验28由陈少云编写;实验3、实验16和实验27由葛立军编写;实验4、实验9和实验30由彭春龙编写;实验5、实验7和实验24由于岚编写;实验6、实验21和实验25由裴晓林编写;实验8、实验12和实验19由薛栋升编写;实验11、实验15和实验22由付永前编写;实验17和实验26由李加友编写;实验18和实验20由陈宜涛编写;实验23由钟传青编写;实验29由曹广祥编写。全书由陈宜涛统稿,蒋新龙审稿。

本教材参考了国内外相关教材及文献资料,借鉴引用了部分图表,在此向各位前辈及同行致以衷心的感谢和由衷的敬意。由于编者水平所限,加之时间仓促,书中错误和不足之处在所难免,敬请读者赐教指正。

目 录

第 1 篇 基础性实验

- 实验 1 培养基的配制和灭菌 / 3
- 实验 2 发酵种子制备 / 11
- 实验 3 发酵罐的构造及使用 / 17
- 实验 4 发酵液中微生物生物量的测定 / 23
 - 实验 4-1 酵母菌的显微直接计数法 / 23
 - 实验 4-2 平板菌落计数法 / 26
 - 实验 4-3 比浊法和细胞干重法测定菌体浓度 / 29
- 实验 5 发酵过程参数测定 I / 31
 - 实验 5-1 无机磷的测定 / 31
 - 实验 5-2 亚硫酸氧化法测定溶氧传质系数 / 34
- 实验 6 发酵过程参数测定 II / 38
 - 实验 6-1 还原糖及葡萄糖值测定 / 38
 - 实验 6-2 铵离子浓度的测定 / 40
 - 实验 6-3 蛋白质浓度的测定 / 43
- 实验 7 发酵过程参数测定 III / 46
 - 实验 7-1 高效液相测定虫草素 / 46
 - 实验 7-2 纸层析法测定谷氨酸和 γ -氨基丁酸浓度 / 49
- 实验 8 红曲霉红色素提取 / 53
- 实验 9 微生物的菌种保藏 / 56
 - 实验 9-1 甘油保藏法 / 56
 - 实验 9-2 干燥保藏法 / 58
- 实验 10 微生物细胞固定化技术 / 61

第2篇 综合性实验

- 实验 11 乳酸菌的分离纯化及乳酸发酵酸奶的制作 / 67
- 实验 12 己酸菌厌氧发酵生产己酸 / 72
- 实验 13 谷氨酸发酵及测定 / 76
- 实验 14 米曲霉发酵生产蛋白酶及测定 / 81
- 实验 15 香菇多糖的粗提取及提取率测定 / 87
- 实验 16 黑曲霉固体发酵法生产柠檬酸 / 92
- 实验 17 单细胞蛋白的发酵生产过程控制 / 97

第3篇 设计性实验

- 实验 18 氨基酸营养缺陷型菌株的诱变育种 / 105
- 实验 19 小曲法固态酿造白酒 / 111
- 实验 20 啤酒的简易酿造 / 115
- 实验 21 鼠李糖乳杆菌发酵生产 L-乳酸 / 120
- 实验 22 米根霉的分离纯化及发酵生产 / 124
- 实验 23 重组大肠杆菌高密度发酵表达脱氧核糖磷酸醛缩酶 / 130

第4篇 研究性实验

- 实验 24 产 γ -氨基丁酸菌株的分离筛选、发酵及产物测定 / 143
- 实验 25 透明质酸的发酵 / 148
- 实验 26 灵菌红素的发酵制备 / 153
- 实验 27 桑黄液体发酵生产多糖 / 157

第5篇 典型发酵产品生产流程

- 实验 28 厌氧发酵产品生产工艺流程——啤酒 / 163
- 实验 29 克拉维酸的发酵与检测 / 168
- 实验 30 陈化籼米固态发酵法生产柠檬酸 / 173
- 参考文献 / 176
- 附录 常用培养基 / 181

第 1 篇

基础性实验

实验 1 培养基的配制和灭菌

一、目的要求

1. 掌握培养基配制的方法及基本步骤;
2. 掌握消毒与灭菌的区别;
3. 熟悉消毒、灭菌的常用方法;
4. 了解常用培养基的分类方法及用途。

二、基本原理

(一)培养基的配制

培养基是人工配制的营养基质,为微生物生长繁殖或积累代谢产物提供营养成分。培养基一般应包含水分、碳源、氮源、能源、无机盐、生长素等主要成分。碳源指供给微生物生长繁殖过程中所需碳元素的营养物质,如合成核酸、蛋白质、糖等;氮源指供给微生物生长繁殖所需氮元素的营养物质,如合成蛋白质、核酸;能源指提供微生物生命活动最初能量来源的营养物或辐射能;无机盐指提供微生物生长繁殖所需的各种重要元素;生长素指微生物生长所必需,但又不能自行合成的微量有机物;水分则是保证生命活动的重要介质,常以水活度来表示,一般细菌最适水活度在 0.91 左右,酵母菌最适水活度在 0.88 左右,霉菌最适水活度在 0.80 左右。另外,在配制培养基时,要根据不同微生物的要求,将培养基的 pH 值调到合适的范围。常见微生物 pH 值需求的范围:细菌在 7.0~8.5,酵母菌在 3.5~6.0,霉菌在 4.0~6.0。

实际使用过程中,可根据成分来源、物理状态、用途等,对培养基进行多种分类。

1. 按培养基成分来源分类

(1)天然培养基:该种培养基主要成分来源于复杂的天然有机物质,是实验室与发酵工厂常用的培养基。常见原料有牛肉膏、蛋白胨、马铃薯、玉米粉、麸皮、酵母膏、各种饼粉、麦芽汁、牛奶、血清等。特点是营养丰富、全面,来源广泛,价格低廉,适于微生物的生长繁殖。缺点是具体成分不清楚或不恒定。

(2)合成培养基:用化学成分完全了解的纯化合物药品配制成的培养基,也称作化学成分明确的培养基。特点是化学成分结构明确,易于重复,多用于微生物形态观察、营养代谢、品种选育、分类鉴定、遗传分析等研究。缺点是成分单一,需在培养基中添加多种成分方能

满足微生物的需求。

(3)半合成培养基:在以天然有机物作为微生物营养来源的同时,适当补充一部分成分已知的化学药品配制而成的培养基。其特点是营养成分全面,绝大多数的微生物都能在此种培养基上生长,因此应用广泛。

2. 按培养基物理状态分类

(1)液体培养基:培养基中不含任何凝固剂,配好后呈液体状态。可用于微生物的纯培养、生理生化代谢与遗传学的研究及工业发酵等。

(2)半固体培养基:在液体培养基中加入少量的凝固剂,使培养基呈硬度较小的固态。

理想的凝固剂有如下特点:凝固剂在灭菌过程中不易被破坏;凝固点温度不能太低;在微生物生长的温度范围保持固体状态;对所培养的微生物无毒害作用;不被培养的微生物分解利用;配制方便且价格低廉;透明度好,黏着力强。常用的凝固剂有琼脂粉、明胶、琼脂糖、硅胶等。微生物实验室中最常用的是凝固点 40°C 、熔点 96°C 的琼脂粉。

半固体培养基中常加入浓度为 $0.2\%\sim 0.7\%$ 的琼脂粉,实验室常用浓度为 0.5% ,可用于观察微生物的运动特征、保存菌种和噬菌体的分离纯化及制备等。

(3)固体培养基:在液体培养基中加入一定浓度的凝固剂,使培养基保持一定硬度。依据用途不同,常用琼脂粉浓度约为 $1.5\%\sim 2.5\%$ 。培养基灭菌后倒入平皿或者试管中,制成平板或者斜面,常用于微生物的分离、鉴定、保存及活菌计数等。

(4)脱水培养基:培养基中含有除水以外的所有营养成分。常指培养基配制完成后通过一定干燥手段获得的商品化培养基粉末。按说明书加入一定量水分,灭菌后即可使用。

3. 按培养基的用途分类

(1)基础培养基(minimum medium, MM):含有一般细菌生长繁殖需要的基本营养物质,可作为一些特殊培养基的基础成分。最常用的基础培养基是天然培养基中的牛肉膏蛋白胨培养基。

(2)加富培养基(enrichment medium, EM):也叫营养培养基,指在基础培养基中加入一些特殊的营养物质,如血清、血液、生长因子或动物(或植物)组织液等,用于培养对营养要求苛刻的微生物,或用于分离富集某种微生物。

(3)鉴别培养基(differential medium, DM):是一类含有某种特定化合物或试剂的培养基。微生物在这种培养基上培养后,产生的代谢产物可以与培养基中特定的化合物或试剂发生明显的特征性的反应(如颜色变化),根据这一特征性的反应可将不同的微生物区分开来。主要用于不同类型微生物的生理生化鉴定等。

(4)选择培养基(selective medium, SM):利用微生物对某种或某些化学物质敏感性的不同,在培养基中加入这类物质,以利于所需微生物生长而抑制其他微生物的生长,从而达到分离或鉴别某种微生物的目的。

(二)灭菌

灭菌是指采用物理或化学的方法,杀死或除去物体表面和内部所有的微生物,包括高温灭菌、过滤除菌、辐射灭菌、化学药品灭菌等。灭菌是否彻底以是否杀死细菌的芽孢为标准。消毒是指消灭物体表面和内部有危害的病原菌和有害微生物的营养体,是一种常用的卫生措施。防腐是指防止或抑制皮肤表面微生物生长繁殖。无菌状态一般是通过灭菌来实现的,指体系中不存在活的微生物的状态。

1. 高温灭菌

高温能破坏微生物细胞中酶的活性,并使原生质中的蛋白质变性或凝固,引起微生物死亡。微生物细胞内蛋白质的凝固性与它本身的含水量有关,在菌体受热时,环境和细胞内含水量越多,蛋白蛋就越快凝固;含水量少,则凝固缓慢。不同微生物热阻不同,对热的抵抗力也不同,芽孢细菌热阻高,对热的抵抗力强;非芽孢细菌热阻小,对热的抵抗力弱。在同一温度下,处理的时间越长或温度越高,微生物死亡得越快。灭菌彻底与否以是否杀死细菌的芽孢为标准。

高温灭菌包括干热灭菌法和湿热灭菌法。干热灭菌法包括火焰烧灼灭菌和热空气灭菌。火焰烧灼灭菌是直接用火将微生物烧灼而死,如接种环的灭菌处理。热空气灭菌是用电热恒温鼓风干燥箱(图 1-1)加热,使内部干燥空气上升至 $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ 的高温,烘烤 2h 进行灭菌,常用于平皿、试管等耐高温器皿的无菌处理。

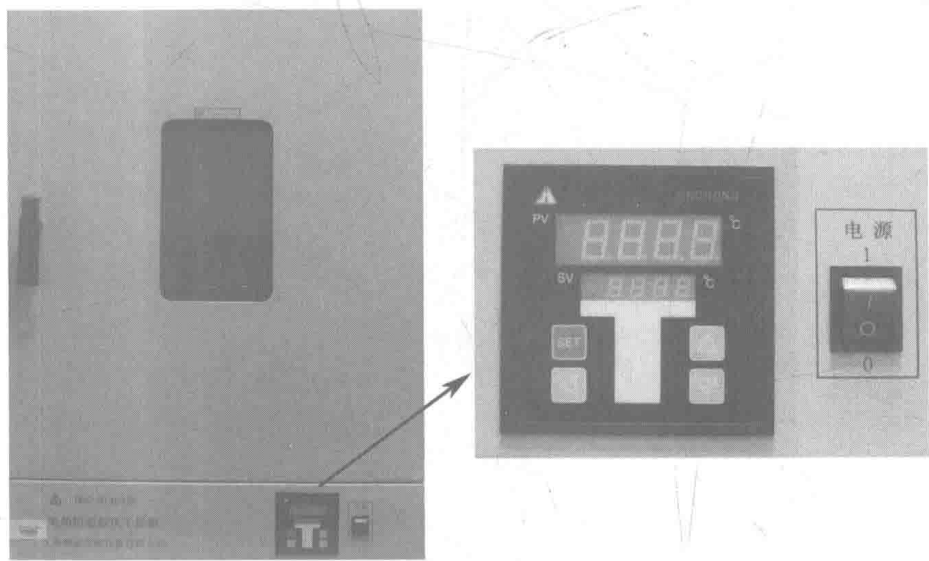


图 1-1 电热恒温鼓风干燥箱

湿热灭菌法有高压蒸汽灭菌法、巴氏消毒法、煮沸消毒法、间歇灭菌法等。对微生物进行湿热灭菌时,培养基中的微生物受热死亡的速率与残存的微生物数量成正比,这就是对数残留定律。

与干热灭菌法相比,湿热灭菌法温度较低、灭菌时间较短。同一温度下,湿热灭菌法的杀菌效力比干热灭菌法大。原因有三:一是菌体蛋白质的含水量越高其凝固温度越低,湿热环境中,细菌菌体吸收水分,蛋白质较易凝固;二是湿热灭菌法的穿透力比干热灭菌法强;三是湿热灭菌法的蒸汽冷凝时能放出大量潜热,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。

(1)高压蒸汽灭菌法:目前实验室最常用、灭菌效果最好的一种灭菌方法,适用于培养基、玻璃器皿、橡皮物品、工作服等的灭菌。该方法利用水的沸点会随着压力增加而上升的特点,达到高温灭菌的目的。

高压蒸汽灭菌的装置为高压蒸汽灭菌锅(图 1-2),接通电源,加热使水沸腾而产生水蒸气,待水蒸气急剧地将锅内的冷空气从放气阀中全部排出后,关闭放气阀,继续加热。此时



图 1-2 高压蒸汽灭菌锅

由于水蒸气不能溢出,高压蒸汽灭菌锅内的压力增加,水的沸点增高,锅内温度高于 100°C ,引起微生物菌体蛋白质凝固变性,从而达到灭菌的目的。

一般培养基用 0.1MPa , 121°C , 处理 $15\sim 30\text{min}$ 可以达到彻底灭菌的效果。灭菌温度及持续时间可随灭菌物品的性状等而改变。例如含糖的培养基一般用 0.06MPa , 112.6°C 处理 15min ,也可以先将其他成分用 121°C 灭菌处理 20min ,再加入无菌的糖溶液。

(2)巴氏消毒法:巴斯德首先应用的一种方法,即将待消毒的液体放在 63°C 下加热 30min 或 72°C 加热 15s ,以达到杀灭致病微生物的目的,常用于饮料、牛奶、果汁、罐头类食品等。该法优点是既可杀死病原微生物又能保持待灭菌液体原有的营养和风味。

(3)煮沸消毒法:一般煮沸消毒时间为 $10\sim 15\text{min}$,可以杀死细菌所有营养细胞和部分芽孢。若想增强杀菌效果,可延长煮沸时间,并加入 1% 碳酸氢钠溶液或 $2\%\sim 5\%$ 石炭酸溶液。

(4)常压间歇灭菌法:通过反复多次的流动蒸汽间歇加热以达到灭菌的目的。将培养基放入灭菌锅内, 100°C 加热 30min , 1次/d ,连续 3d 。第一天加热可杀死营养体,将培养物取

出,放 37°C 孵育 $18\sim 24\text{h}$,其中残存的芽孢受热后会发芽变为营养体;第二天再用 100°C 加热处理 30min ,则新形成的营养体又被杀死,但可能仍然有芽孢存在,所以应再重复一次,以达到彻底灭菌的效果。

(5)超高温瞬时杀菌:在温度和时间分别为 $140\sim 150^{\circ}\text{C}$, $2\sim 5\text{s}$ 的条件下,对牛乳或其他液态食品(如果汁及果汁饮料、豆乳、茶、酒及矿泉水等)进行处理的一种工艺。该法既能杀死产品中的微生物,又能较好地保持食品品质与营养价值。

2. 过滤除菌、

通过机械作用滤去气体或液体中的微生物的方法。根据不同的需要选用不同的滤器和滤板材料。常用于高温灭菌会被破坏的材料的不菌处理,如血清、抗生素等。一次性细菌滤器(图 1-3)中的滤膜是用醋酸纤维酯和硝酸纤维酯的混合物制成的薄膜,有不同的孔径,实验室中用于除菌的滤膜孔径一般为 $0.22\mu\text{m}$ 和 $0.45\mu\text{m}$ 。



图 1-3 一次性细菌滤器

3. 紫外线灭菌

波长在 $200\sim 300\text{nm}$ 的紫外线易被细胞中的核酸吸收,造成细胞损伤而起到杀菌作用(波长 $265\sim 266\text{nm}$ 的紫外线杀菌力最强)。波长相同,紫外线的杀菌效率与强度和时间的乘积成正比。紫外线杀菌的原理主要是,它能诱导胸腺嘧啶二聚体的形成与 DNA 链的交联,从而抑制 DNA 的复制。但是紫外线穿透力弱,仅适用于无菌室,手术室内空气、接种箱及物体表面的灭菌。

4. 电子束辐照灭菌

指以电力为能源基础,利用射线的穿透性,用一种可控的电子束辐照穿透物品,使被照射物质吸收电子束辐射能量后产生一系列的生物学效应,以杀死被照物体表面或内部的微生物,达到杀菌、保鲜的目的。该法广泛应用于医疗产品、农产品、海产品、化妆品的灭菌以及改色、着色等加工方面。它是 21 世纪以来用得最好的一种辐照灭菌技术,具有定向性好,辐照剂量均匀,功率密度高,灭菌速度快,灭菌时间短,环保且对环境无污染,加工速度快,产品氧化效应小,材料性能退化小等特点,尤其适用于一些不宜进行加热、熏蒸、湿煮处理的食品。相比电子加速器辐照灭菌,钴 60 辐照灭菌在重复性的利用率上较差;另外,气体化学辐照灭菌时间长且有有害气体残留,影响产品的后期使用;X 线辐照灭菌成本更高,所以利用上不是很好;高温高压熏蒸辐照灭菌正慢慢被淘汰。

5. 化学药品灭菌

应用能抑制或杀死微生物的化学制剂进行消毒灭菌的方法,包括杀菌剂、抑菌剂等。杀菌剂指破坏微生物的代谢机能并有致死作用的化学药物,如重金属离子等;而抑菌剂只是阻碍或抑制微生物代谢,使其不能增殖,如磺胺类及大多数抗生素等。实验室中常用的化学药品有:75%乙醇溶液,3%~5%煤酚皂溶液(来苏尔),1%新洁尔灭,0.1%升汞溶液,3%~5%甲醛溶液等。

常用细菌培养基是牛肉膏蛋白胨培养基,常用放线菌培养基是高氏一号合成培养基,常用酵母菌培养基是麦氏培养基,常用丝状真菌培养基是马铃薯蔗糖培养基(PDA培养基)和查氏培养基。常用培养基配方见附录。本次实验内容是牛肉膏蛋白胨培养基的制备。牛肉膏蛋白胨培养基是一种最普通、应用最广泛的微生物基础培养基;主要成分是牛肉膏、蛋白胨、氯化钠。牛肉膏为微生物提供碳源、磷酸盐和维生素;蛋白胨提供氮源与维生素;氯化钠作为无机盐起作用。

三、实验器材

1. 实验材料

10×浓缩肉汤,1mol/L NaOH 溶液,1mol/L HCl 溶液,琼脂粉,蛋白胨,蒸馏水,牛肉膏,NaCl。

2. 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基:3g 牛肉膏,10g 蛋白胨,5g NaCl,1000mL ddH₂O,pH 7.2~7.4。

3. 器皿和仪器

量筒,移液管,烧杯,小试管,中试管,搪瓷杯,pH 试纸,500mL 锥形瓶,玻璃棒,称量纸,电子天平,微波炉,电磁炉,高压蒸汽灭菌锅。

四、操作步骤

1. 10×浓缩肉汤培养液的配制

按培养基配方称取 30g 牛肉膏、100g 蛋白胨和 50g NaCl 于容器中,适当加热溶解后以 ddH₂O 定容至 1000mL。

2. 浓缩肉汤的稀释

每大组取 50mL(4 人/大组)稀释 10 倍,用低浓度 NaOH 溶液或 HCl 溶液调整 pH 值至 7.2~7.6,最后定容到 500mL。

注意:不要调过头,以免由于回调而影响培养基内各离子的浓度。

3. 实验分组

每 4 位同学作为一大组,再均分成 A、B 两小组,每小组各取 250mL 培养液。

A 组:配液体培养基和半固体培养基。

液体培养基:取稀释后的培养液 20mL 分装入 5 支小试管中,每支 4mL。

半固体培养基:取稀释后的培养液 30mL 于小烧杯中,加入 0.5%的琼脂粉(0.15g),加热溶化,补液,分装入 6 支小试管中,每支 5mL。

B 组:配液体培养基和斜面培养基。

液体培养基:取稀释后的培养液 20mL 分装入 5 支小试管中,每支 4mL。

斜面培养基:取稀释后的培养液 30mL 于小烧杯中,加入 1.8%的琼脂粉(0.54g),加热溶化,补液,分装入 5 支中试管中,每支 6mL。

每小组剩余 200mL 培养液,分别置于 500mL 锥形瓶中,加入 1.8%(3.6g)的琼脂粉。

注意:琼脂粉溶化过程中,注意控制火力,避免因沸腾而溢出。溶化过程中需不断搅拌,以防琼脂粉糊底烧焦,避免使用铜锅或铁锅加热溶化,否则离子进入培养基中,会影响微生物的生长繁殖。

4. 加塞和包扎

分别对试管和锥形瓶加塞,用棉线和牛皮纸包扎后准备灭菌。

5. 标记

在靠近试管口 2cm 处及锥形瓶瓶体上贴标签,注明培养基名称,制作者的班级、姓名及日期。

6. 湿热高压灭菌

将所有物品摆放于高压蒸汽灭菌锅内,以 121℃,20min 条件进行高压蒸汽灭菌。

7. 搁置斜面

灭菌完成后,取出需放置斜面试管按图 1-4 摆放,待冷却后收起。

注意:培养基应盖住试管整个底部,斜面上端距试管口 2cm 左右。

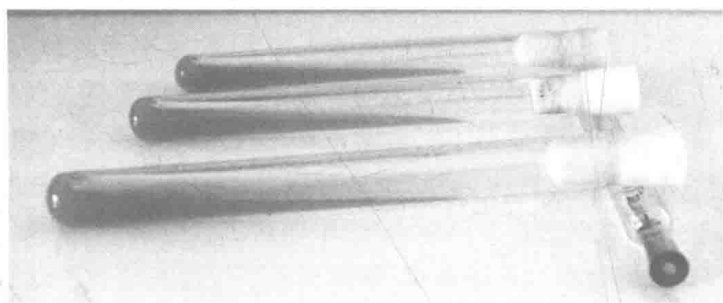


图 1-4 斜面摆放

8. 倒平板

灭菌完成后,将装有培养基的锥形瓶取出,当用手触摸锥形瓶感觉刚好不烫手时按图 1-5 所示倒平板。

(1)用酒精棉球擦拭双手和实验台面,点燃酒精灯,将无菌平皿叠放在桌面上;

(2)取掉包扎锥形瓶的棉线和牛皮纸,右手拿锥形瓶,瓶口靠向酒精灯,待左手拔出塞子,迅速将瓶口旋转通过火焰三次;

(3)左手打开平皿盖,右手将锥形瓶中的培养基(15~20mL)倒入平皿中,盖上盖子,待其凝固后,倒置放置。

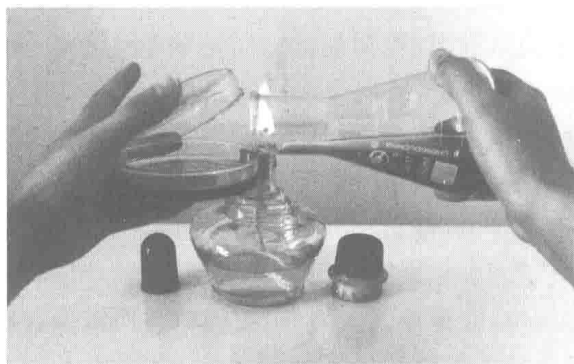


图 1-5 倒平板

五、实验报告

1. 实验结果

将培养基放于 37°C 环境中培养过夜,观察并记录有无细菌及真菌生长。

2. 思考题

- (1)培养基配制的影响因素有哪些?
- (2)培养基配好后为什么要立即灭菌?
- (3)干热灭菌和高压蒸汽灭菌设定温度和时间依据是什么?

六、实验拓展

对异养微生物来说,含 C、N 的化合物既是碳源也是氮源,为什么? 有些微生物需添加特殊营养物质才能生长繁殖,为什么?

(潘佩蕾)