

微生物应用技术

W E I · S H E N G · W U

甘肃人民出版社

.9

内 容 简 介

本书从应用微生物角度出发，比较系统地介绍了微生物的染色、观察、分离培养技术，生理代谢和微生物诱变、杂交育种的方法，以及显微照相技术、电子显微镜微生物标本的制作等。内容较丰富，方法简便具体，适用面广。可供食品、环保、教学、科研等方面从事微生物工作的同志参考。

微生物应用技术

冯清平 葛瑞昌编

甘肃人民出版社出版

(兰州第一新村51号)

甘肃省新华书店发行 兰州新华印刷厂印刷

开本787×1092毫米 1/32 印张8.75 字数181,000

1984年3月第1版 1984年3月第1次印刷

印数：1—3,300

书号：13096·92 定价：0.76元

前 言

近年来，应用微生物学有了较快的发展，实验手段不断改进，并日益广泛地被应用在工农业生产、医药卫生、国防建设和环境保护等方面。为了更好地发挥微生物在四化建设中的作用，我们以日本微生物教材化研究会编的《微生物による生物实验》为基础，适当吸收了国内外一些较先进的技术方法，并结合编者在工作中的体会，编译整理成这本小册子。全书共分十一部分。除了微生物实验中所必须掌握的基本操作技术外，还选编了一些较新颖的技术方法。为了力求理论与实践的结合，每个实验都有简明扼要的理论叙述，并注意突出新方法技术在实践中的应用，如大肠杆菌的快速测定、微生物的简易计数法等。同时着重介绍了在一般设备条件下可以采用的效果较好的方法。

由于编者水平有限，文中的缺点和错误在所难免，希望读者批评指正。

编 者

目 录

一、微生物实验准备	(1)
(一)无菌室的设置及无菌程度的检查方法...	(1)
(二)玻璃仪器的清洁方法.....	(2)
(三)无菌室消毒方法及常用化学杀菌剂.....	(4)
(四)接种用具及制作.....	(7)
二、微生物实验基本操作技术	(9)
(一)培养基制备技术.....	(9)
1.培养基的种类.....	(9)
2.培养基的制备.....	(11)
(二)移植技术.....	(20)
1.火焰灭菌.....	(20)
2.火焰封口.....	(21)
3.各种移植操作技术.....	(21)
(三)染色技术.....	(23)
1.染色的目的及基本原理.....	(23)
2.染色剂的种类及结构.....	(24)
3.标本的制备及固定.....	(24)
4.常用染色方法.....	(28)
(1)立克次体染色法.....	(28)
(2)区别支原体与细菌L-型菌落染色法.....	(29)

(3) 苯酚品红染色法	(30)
(4) 亚甲蓝(美蓝)染色法	(30)
(5) 负染法	(31)
(6) Giemsa染色法	(31)
(7) 瑞特氏染色法	(32)
(8) 革兰氏染色法(Gram staining)	(33)
(9) 固酸染色法	(34)
(10) 荧光染色法	(35)
(11) 土壤细菌染色法	(36)
(12) 科氏(Козловский)染色法	(36)
(13) 螺旋体染色法	(37)
(14) 霉菌染色法	(37)
三、微生物观察技术	(41)
实验1 原核微生物与真核微生物细胞核的	
观察	(41)
实验2 支原体形态观察	(42)
实验3 细菌个体形态观察及死活鉴别法	(43)
实验4 细菌芽孢的观察——简易法	(44)
实验5 细菌活体观察技术	(46)
实验6 鞭毛观察技术——改进法	(49)
实验7 细菌荚膜的观察	(52)
实验8 硫细菌贮藏物质的观察——压	
片法	(54)
实验9 细菌细胞壁的观察	(55)
实验10 细菌细胞中类脂粒的观察	(56)
实验11 细菌中异染粒的观察	(57)

实验12	细菌中晶体的观察·····	(59)
实验13	细菌菌落特征的观察·····	(59)
实验14	放线菌自然生长状态的观察·····	(61)
实验15	放线菌气丝与基丝的比较观察·····	(64)
实验16	放线菌孢子丝与孢子的观察·····	(65)
实验17	酵母菌形态及无性繁殖方式的观察 ——水浸片·····	(66)
实验18	酵母菌死活细胞的鉴别·····	(67)
实验19	酵母菌子囊孢子的观察·····	(69)
实验20	霉菌形态观察——琼脂片、凹片、 透析法·····	(71)
实验21	霉菌巨大菌落的形成·····	(73)
四、	微生物数量测定技术·····	(76)
实验 1	管道循环水中自养菌数量的测定 ——序列法·····	(76)
实验 2	活细菌计数——改进法·····	(81)
实验 3	厌氧微生物的计数法·····	(84)
实验 4	酵母菌细胞数测定(I)——计数 器法·····	(86)
实验 5	酵母菌细胞数测定(II)——曲线 法·····	(87)
实验 6	污水中微生物总数的简易测定法··	(89)
实验 7	水中大肠杆菌群的简易测定法····	(91)
实验 8	微生物的显微测量·····	(93)
五、	微生物分离培养技术·····	(95)
实验 1	污染空气中微生物类群的分离····	(95)

实验 2	好氧微生物的分离培养法·····	(97)
实验 3	好气性芽孢菌的分离方法·····	(99)
实验 4	厌氧菌的分离培养法·····	(100)
实验 5	发光菌的分离·····	(102)
实验 6	单孢子简易分离技术·····	(103)
实验 7	好气性自生固氮菌的分离·····	(105)
实验 8	嫌气性自生固氮菌的分离·····	(106)
实验 9	好气性纤维素分解菌的分离·····	(107)
实验10	高温嫌气性纤维素分解菌的分离··	(109)
实验11	硫化细菌的分离·····	(111)
实验12	硅酸盐细菌的分离·····	(112)
实验13	放线菌的分离·····	(113)
实验14	软腐病病菌的分离·····	(115)
实验15	噬菌体的分离培养·····	(117)
实验16	微生物工业中抗噬菌体菌株的 选育·····	(119)
实验17	根腐病菌的分离·····	(121)
实验18	红曲霉简易分离法·····	(122)
实验19	乳及乳制品中微生物的分离·····	(123)
实验20	乳制品中大肠菌群的快速检测····	(124)
实验21	食品微生物的分离·····	(125)
实验22	粮食微生物的分离培养·····	(128)
实验23	食品及谷物中产毒青、曲霉菌的分 离与鉴定·····	(130)
实验24	发酵食品所用菌种中黄曲霉毒素的 测定·····	(142)

六、微生物的生理与代谢	(148)
实验 1 微生物细胞物质成份的分离.....	(148)
实验 2 细胞质膜的选择透性.....	(151)
实验 3 藻类吞食酵母的观察.....	(153)
实验 4 脱氢酶的作用.....	(154)
实验 5 脱氢酶活力的测定.....	(156)
实验 6 从氨基酸上脱离氨基的实验.....	(158)
实验 7 L-天门冬酰胺酶活力的测定	(160)
实验 8 转氨酶活力的测定.....	(162)
实验 9 精氨酸的微生物测定法.....	(166)
实验10 光与藻类的增殖.....	(169)
实验11 细菌氮源的输入.....	(170)
实验12 大肠杆菌代谢产物的测定.....	(172)
实验13 发光细菌发光机制的研究.....	(177)
七、微生物育种	(179)
实验 1 亚硝基甲基脲对细菌的诱变效应.....	(179)
实验 2 亚硝酸对细菌的诱变效应.....	(181)
实验 3 亚硝基胍对霉菌的诱变效应.....	(182)
实验 4 微波对霉菌的诱变效应.....	(185)
实验 5 快中子对放线菌的诱变效应.....	(187)
实验 6 紫外线对酵母菌的诱变效应.....	(189)
实验 7 营养突变株的选育.....	(191)
实验 8 酵母菌杂交.....	(195)
实验 9 曲霉菌异核体的形成.....	(197)
实验10 原生质体融合.....	(199)
实验11 放线菌的杂交育种.....	(201)

八、微生物与环境	(204)
实验 1 个体发育与环境.....	(204)
实验 2 群体变化与环境.....	(205)
实验 3 微生物之间的相互作用.....	(207)
实验 4 抗菌素的作用.....	(208)
九、常见常用微生物的保存技术	(211)
(一)细菌的保存.....	(211)
(二)放线菌的保存.....	(216)
(三)酵母菌的保存.....	(217)
(四)霉菌的保存.....	(218)
(五)噬菌体的保存.....	(219)
十、显微照相技术	(220)
(一)显微镜.....	(220)
I、显微镜的构造和工作能力.....	(220)
II、几种重要的显微镜.....	(239)
(二)显微照相.....	(242)
I、显微照相设备.....	(242)
II、黑白显微照相.....	(244)
III、彩色显微照相.....	(251)
十一、电子显微镜微生物标本制备技术	(257)
(一)电子显微镜与光学显微镜的异同点.....	(257)
(二)微生物标本的制备.....	(258)
附录	
一、微生物实验中应注意的问题.....	(262)
二、常用指示剂的配制及浓度.....	(262)
三、常用缓冲溶液的配制.....	(263)

- 四、常用试剂当量浓度的配制……………(266)
- 五、用95%乙醇配制其他浓度酒精的简便方法……………(267)
- 六、微生物学中常用的计量单位……………(268)

一、微生物实验准备

(一) 无菌室的设置及无菌程度的检查方法

无菌室可单独设置，也可附设在实验室的一侧，其大小可根据具体情况而定。无菌室的地面、墙壁要光滑，门窗要严密。门为单扇拉门，窗为玻璃窗格，其下部为木板。如有条件，室内最好安置降温设备。为了严密起见，可在无菌室外增设1—2个缓冲间。缓冲间开门的位置要与无菌室开门的位置错开，不要相重。

室内设置力求简单。在与门相反的一端，放上一个工作台，台上有酒精灯、75%的酒精、各种接种用具，以及消毒用的5%的石炭酸溶液和小型喷雾器。在室中央悬挂紫外线杀菌灯（1—3 M³可用1—2支30W的紫外线灯，距工作台上方1米左右）和照明灯。缓冲间里也要悬挂紫外线杀菌灯，并且需要配备无菌衣、无菌鞋等。

无菌程度的检查方法：

1. 平板法 此法简便易行。取营养琼脂平板数只，分别放在欲测位置（一般在工作台的四角和中央），打开皿盖，暴露在空气中10分钟，盖上皿盖。然后倒置于37℃恒温箱内培养24—48小时，统计其菌落数。

2. 吸气法 用CD—1型便携式大气采样器测定。在采样瓶里以无菌操作装入25—30毫升无菌水，然后将采样器放

在无菌室的工作台上，调好流量（1升/分钟），打开开关，5分钟后关上。以无菌操作自采样瓶中吸1毫升水样放入灭菌皿里，再加入已冷却到45—50℃的营养琼脂培养基充分混合。同时做5—6个平板。待平板凝固后，倒置于37℃恒温箱内培养24—48小时，统计其菌落数。

检查结果，以无菌落者为最佳；平均每个平板不超过1个菌落者也可使用。

（二）玻璃仪器的清洁方法

1. 洗涤剂

（1）铬酸洗涤液：通常用的洗涤液是重铬酸钾（或重铬酸钠）的硫酸溶液。这是一种强氧化剂，去污能力很强，实验室常用它来洗去玻璃和瓷质器皿的有机物质。但不能用于金属器皿。

常用洗涤液的配方有浓配方和稀配方。

浓配方：

重铬酸钾（工业用）	40克
清 水	160毫升
浓硫酸（粗）	800毫升

稀配方：

① 重铬酸钾（工业用）	50克
清水	850毫升
浓硫酸（粗）	100毫升
② 重铬酸钾	20克
清水	100毫升

浓硫酸（工业用） 100毫升

配法：将重铬酸钾溶解在温水中，冷却后将硫酸慢慢加入。边加边搅拌。为了更安全起见可将配制容器放在冷水浴里，以利于散热。配好后可盛在有玻璃塞的玻璃容器内，以防氧化变质。此液可反复使用，直到变成青褐色为止。这时铬酸已经被还原而没有去污的作用了。

用洗涤液进行洗涤时，要尽量避免稀释。如要加快作用速度，可将洗涤液加热到45—50℃再进行洗涤。若器皿上有大量有机物质，不要直接用洗涤液，应先将有机质除去，再用洗涤液洗涤，否则会使洗涤液很快失效。

（2）高锰酸钾：5%的高锰酸钾溶液是很好的洗涤液。如加入少许硫酸再加热，它的氧化和去污能力就更强了。使用方法是将高锰酸钾溶液加在需要洗涤的器皿中，加入少许浓硫酸（100毫升溶液加3—5毫升浓硫酸），再将溶液加热到50—60℃洗涤。经高锰酸钾洗涤后的玻璃器皿，必须用流水冲净。如玻璃上有褐色物质，可用草酸溶液洗去。注意不要用盐酸代替硫酸。因为盐酸会被高锰酸钾分解产生有毒的氯气。

2. 玻璃器具的洗涤

（1）新玻璃仪器洗涤：新的玻璃器皿含有游离碱，因此应先将它浸入洗液或2%的盐酸溶液中数小时后，再用自来水充分冲洗干净，干燥后灭菌备用。

（2）用过的玻璃仪器的洗涤：

①一切用过的玻璃仪器，应先用清水冲洗。长有菌的试管和培养皿，应先加热灭菌，再用水冲洗，然后放在洗衣粉水中煮沸20—30分钟并洗刷清洁，用清水洗净，最后用蒸馏水

冲洗2次，晾干备用。如经洗衣粉水洗刷后仍未清洁者，可用洗液浸泡，取出以清水和蒸馏水冲洗干净。

②比色管不可用毛刷刷洗，以免将玻璃磨坏，影响读数的精确度。可用棉花棒蘸肥皂水擦拭，或用洗液浸泡。

③吸管用后应立即用清水和蒸馏水冲洗，如管内附有污物，可用洗液浸泡。

④带有脂肪油污的仪器，如用热肥皂水洗不清洁时，可用热酒精、汽油或丙酮洗涤。也可浸泡于2%的氢氧化钠热溶液内，15分钟左右，取出清水冲洗，再用2%盐酸溶液洗一次，清水冲净。但不可用洗液浸泡。经上述洗涤后，若油污仍未除净，可再重复一次。

(3)载玻片的清洁法：新的载玻片可在2%的盐酸酒精(95%的酒精100份加盐酸2份)中浸泡几小时(一般8—10小时)，流水冲洗干净，再用蒸馏水冲2次，取出放入95%酒精中。用时，用镊子取出，通过火焰使酒精燃烧，再次除去油气，冷却后使用。

用过的载玻片可先用热洗衣粉水煮沸20分钟左右，再用纱布擦洗，并用清水冲净，在洗液中浸24小时，取出用清水和蒸馏水冲洗，然后放入95%的酒精中备用。载玻片在煮沸时，应把各片撒开，或用铁丝网架起，勿使其重叠在一起，以免互相磨擦损坏其光亮度。

(三)无菌室消毒方法及常用化学杀菌剂

1.紫外线杀菌 紫外线除日光中含有一部分外，实际应用都是由人工紫外线灯产生的。在波长一定的条件下，紫外

线的杀菌效率与照射强度和时间的乘积成正比。在无菌室接种前应先搞好清洁卫生，然后打开紫外线灯，照射20—30分钟，即可起到室内杀菌作用。

2. 乳酸熏蒸 乳酸蒸气具有高度的杀菌作用，适于空气消毒。具体用法是：每立方米用1—1.5毫升80%的乳酸，按无菌室总容积，计算好所用的乳酸量，将乳酸放入一个瓷表面皿内，把皿放在三角架上，下面用酒精灯加热。当皿内乳酸蒸发完后，将酒精灯的盖盖上（为操作方便起见，可将三角架放在近门口的地方；或在灯内放入少量酒精，使燃烧与乳酸蒸发完的时间相差不大），密封6—8小时即可。或用0.33—1 N的乳酸喷雾，也可达到空气消毒的目的。

3. 石炭酸消毒 在一般情况下，可用5%的石炭酸溶液喷雾进行空气消毒。此法与紫外线结合使用效果较好。

4. 福尔马林熏蒸 当无菌室用过一段时间，无菌效果不好时，可用福尔马林熏蒸法。用法是：每4立方米空间用35毫升福尔马林（37—40%甲醛），加17—18克的高锰酸钾作氧化剂，房间密封24小时或更长一些时间。福尔马林的残余气味延续时间较长，对眼睛刺激性较大，不宜经常使用。

为使用方便起见，表1介绍了一些常用化学杀菌剂的作用原理及使用方法。

表1 常用化学杀菌剂及其浓度

种 类	常用浓度	用 处	作用 机制
苯 酚 (石炭酸)	2—5%	器械及空气喷雾 消毒	破坏细胞膜， 使蛋白质变性

种 类	常用浓度	用 处	作 用 机 制
来 苏 儿	2 %	皮肤、器皿消毒	同 上
石 灰 水	1—3%	粪便消毒	破坏细胞膜和酶类
福 尔 马 林	37—40%	熏蒸无菌室、 厂 房	使蛋白质和酶类变性
乙 醇	70—75%	皮肤消毒， 工作台消毒	脱水，使蛋白质变性
乳 酸	0.33—1N	喷雾作空气消毒	破坏细胞膜和酶类
龙 胆 紫	2—4%	外用消毒	使蛋白质变性
食 醋	3—5 (ml/M ³)	熏蒸消毒空气、 预防流感病毒	破坏细胞膜和酶类
升 汞	0.1%	植物组织、非金 属器皿表面消毒	使菌体蛋白质变性、酶类失活
红 药 水 (红汞)	2 %	皮肤小创伤消毒	同 上
新洁而灭(5% 季胺盐表面 活性剂)	0.25%	皮肤、器具消毒	破坏细胞膜， 使蛋白质变性
高 锰 酸 钾	0.1%	皮肤、水果、 茶杯消毒	使蛋白或酶氧化变性
双 氧 水	3 %	清洗伤口	同 上
氯 气	0.2—1p.pm	饮水消毒	同 上
漂 白 粉	1—5%	洗刷培养室、 饮水消毒	同 上

(四)接种用具及制作

接种用具是微生物实验中必备工具之一，而且由于目的和要求不同，需要多种形式的接种用具。下面仅介绍几种常用的接种工具及制备方法。

1.接种环 用来移植菌苔或菌液。制作方法：

(1)取一根长7厘米的旧电炉丝(800—1000W的镍铬合金丝)，将它烧接在长18—20厘米的细玻璃棒上，把另一端作成圆形的环，环的标准内径是2毫米。因为接种环的量是表示菌体的量，所以环的大小必须注意。用玻璃棒作柄在火焰灭菌时容易炸断，因而用金属棒作柄比较好。

(2)取一段长20厘米左右的塑胶铅芯电线(截面积10平方毫米)，在一端留下8—9厘米的塑胶套，将其余的塑胶套剥去露出铅芯，在铅芯末端平分劈开(长约0.5厘米)，夹上一根长约7厘米的镍铬合金丝，再把劈口夹牢封严。另一端作成内径2毫米的圆环。若有条件可用胶木(或有机玻璃)铜棒作柄。

2.接种针 用于固体点接或深层穿刺培养。制作方法如上述，但需将镍铬合金丝拉直，顶端磨尖。

3.接种钩 选取微小菌落时使用，因其着点面积小，故不易混杂，也比较方便。根据需要可将镍铬合金丝顶端3—4毫米处垂成 90° 角或略大于 90° 的角，先端要光滑稍尖。

4.接种圈 用于从沙土管移植菌种。制作方法：将镍铬丝末端卷起数圈成盘形即可。

5.接种耙 用于刮取真菌菌丝和孢子。制作方法：将