

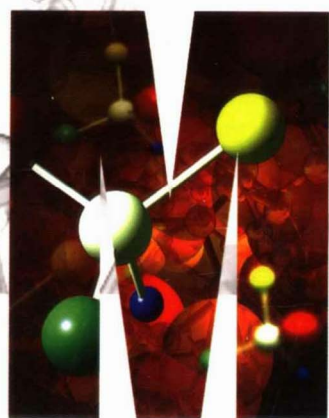


“十一五” 高等院校精品规划教材

“SHI YI WU” GAODENG YUANXIAO JINGPIN GUIHUA JIAOCAI

# 微生物学实验指导

主编 张 玲



icrobiology



北京交通大学出版社  
<http://press.bjtu.edu.cn>

“十一五”高等院校精品规划教材

---

# 微生物学实验指导

主 编 张 玲

编 者 韩珍琼 李琼方 任 飞

北京交通大学出版社

· 北京 ·

## 内 容 简 介

微生物学实验是对生命科学类专业的学生进行独立工作能力培养的重要环节,实验指导教材是学生上好实验课的重要工具。

本教材重点介绍了显微镜检技术、制片染色技术、无菌操作技术及微生物的纯培养技术等基本技能,同时也适当补充了部分先进的实验技术。在此基础上,本教材注重广泛的专业适应性,结合各专业编写了部分具有专业特色的实验项目。

本教材注意突出对学生独立工作能力的训练和培养。全书共 49 个实验,供各专业根据具体需要和专业特点酌情选择。书后附有详细的附录和参考书,供读者查阅和参考。本教材适用于高等院校生命科学方向本科生的微生物学实验教学,也可供研究生学习使用、还可作为其他相关专业或教师的参考用书。

版权所有,侵权必究。

### 图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验指导/张玲主编. —北京:北京交通大学出版社, 2007. 8

(“十一五”高等院校精品规划教材)

ISBN 978-7-81123-066-6

I. 微… II. 张… III. 微生物学-实验-高等学校:技术学校-教学参考资料 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 120118 号

责任编辑:史鸿飞 特邀编辑:杨圣杰

出版发行:北京交通大学出版社

电话:010-51686414

北京市海淀区高粱桥斜街 44 号

邮编:100044

印刷者:北京市梦宇印务有限公司

经 销:全国新华书店

开 本:185×230 印张:16 字数:348 千字

版 次:2007 年 8 月第 1 版 2007 年 8 月第 1 次印刷

书 号:ISBN 978-7-81123-066-6/Q·2

印 数:1~3 000 册 定价:24.00 元

本书如有质量问题,请向北京交通大学出版社质监组反映。对您的意见和批评,我们表示欢迎和感谢。

投诉电话:010-51686043, 51686008; 传真:010-62225406; E-mail: press@bjtu.edu.cn.

# 前 言

微生物学是生命科学中实践性最强的学科之一。它在科学研究、生产实践中的卓越成就和巨大作用是众所周知的。随着近代生物科学的发展,微生物学已经渗入各有关科学领域。同时,现代化实验手段在微生物学实验教学中提出了至为迫切的新问题。

本教材主要介绍了各类微生物的形态观察、大小测定和计数,微生物的培养方法,培养基制备与消毒、灭菌,无菌操作技术,微生物的分离纯化、生理测定,育种与菌种保藏、微生物与生态环境、基本的免疫化学方法等,除常规实验外,注意与前沿技术接轨,适当补充了部分分子生物学的实验内容,以及与实际应用相结合的实验内容。

本教材注意对学生独立工作能力的训练和培养。全书共 49 个实验,书后附有详细的附录和参考书,供读者查阅和参考。

本教材适用于高等院校生命科学方向本科生的微生物学实验教学,也可供研究生学习使用,还可作为其他相关专业或教师的参考用书。

微生物学实验技术正飞速发展,由于微生物学实验方法涉及面广、学科发展快,加之编者的水平所限,教材中的错漏之处在所难免,恳请读者批评指正。

张 玲  
2007 年 7 月

## 微生物学实验的目的要求

微生物学实验课的目的通过一系列的实验操作，使学生能比较熟练地掌握研究微生物的最基本的操作技能；通过具体观察不同材料，进行各项操作、分析实验结果、完成实验作业各环节，使学生加深和巩固对微生物基本理论知识的理解；同时，通过实验培养学生观察、思考、分析问题和解决问题的能力；培养学生实事求是、严肃认真的科学态度。实验内容包括显微镜的使用、基本微生物类群的形态观察、微生物的染色制片技术、培养基的制备及灭菌方法、微生物的分离、接种和培养、微生物细胞的大小测定及数量测计技术、细菌鉴定的常规生理生化实验方法等。通过一系列的实验操作，要求学生能较熟练地掌握研究微生物的基本方法和微生物工作的基本技能。为将来微生物学生产应用工作奠定良好基础。

为了保证实验课的质量和实验效果，要求学生做到以下几点。

第一，每次实验前必须对实验内容进行充分的预习，明确实验目的、内容、原理及操作中应注意的事项，以保证实验的进度和效果。

第二，认真执行微生物工作中无菌操作规程，切实按照实验指导所列的实验步骤，循序进行各项操作，以确保实验安全和获得预期结果。

第三，实验时注意科学应用和分配时间，在规定时间内保质保量完成各项实验内容。

第四，在实验中要有严谨的科学态度，尊重事实与实验结果，要善于发现新现象。

第五，按规定时间观察实验结果时，必须实事求是地进行观察，记录实验的现象与结果，认真进行分析，得出结论。若遇有与理论不符的结果，应探究其原因，以培养科学思维能力。

第六，树立密切合作的风气，加强学生与老师、班与班、组与组、组员之间的密切配合。

第七，每次实验完成后，按作业要求写出实验报告。文字力求简明准确，绘图力求真实，有代表性，图表力求简洁明了。

# 微生物学实验室规则

一、实验室应保持整洁，注意保持实验室台面及地面洁净。用过的纸屑、废棉花、火柴杆等应放入废物缸内，不能随地乱扔。严禁随地吐痰及在室内吸烟。

二、实验室环境应保持安静，不要高声说话、谈笑，尽量避免不必要的走动和减少空气流动，为微生物学实验的无菌操作创造良好环境，同时避免影响他人实验。

三、实验时，非必要物品禁止带入室内。要求按规定座次入座。使用显微镜按规定镜号取用。用完后仔细检查，保持镜身洁净、干燥，使用油镜头后务必将油拭净。

四、爱护仪器，厉行节约。公用仪器、药品用完后放回原处。对显微镜、天平等贵重仪器要细心操作，特别爱护。从温箱或冰箱中取放物品时应随手关门。对消耗性物品要力求节约，反对浪费。如有仪器损毁，应立即报告教师，说明原因，填写报损单，由教师签署意见后按学校有关规定处理。

五、实验台上的各种实验材料，在教师讲解前不要乱动。实验中需要培养的材料应写好标签，注明组别、姓名、实验日期等，并放到指定地点进行培养。

六、实验完毕后，实验台上的材料按原来的位置整理好。用过的材料不再用时，按指定地点集中后统一处理。最后由值班人员再将实验台面整理洁净，地面打扫干净，关好水、电、门、窗后再离开实验室。

# 目 录

微生物学实验的目的要求

微生物学实验室规则

## 第 1 部分 微生物实验基础技术

|                     |    |
|---------------------|----|
| 1 微生物学实验室的准备 .....  | 3  |
| 一、常用玻璃器皿及准备 .....   | 3  |
| 二、棉塞的制作技术 .....     | 8  |
| 三、无菌室的准备 .....      | 9  |
| 四、接种工具 .....        | 11 |
| 五、常用仪器及其使用要求 .....  | 12 |
| 2 培养基 .....         | 14 |
| 一、培养基的主要成分 .....    | 14 |
| 二、培养基的类别 .....      | 15 |
| 三、配制培养基的基本过程 .....  | 18 |
| 四、固体曲料的配制 .....     | 18 |
| 五、种子培养基和发酵培养基 ..... | 19 |
| 3 消毒灭菌 .....        | 20 |
| 一、火焰灭菌及干热灭菌 .....   | 20 |
| 二、常压蒸汽灭菌 .....      | 21 |
| 三、高压蒸汽灭菌 .....      | 23 |
| 四、巴氏消毒与煮沸消毒 .....   | 26 |
| 五、过滤除菌 .....        | 27 |
| 六、紫外杀菌 .....        | 29 |
| 七、化学方法杀菌 .....      | 30 |

## 第 2 部分 微生物学基础实验

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 实验 1 培养基的配制 .....           | 35 |
| 实验 2 实验室环境和人体表面微生物的检测 ..... | 40 |
| 实验 3 微生物的接种技术 .....         | 46 |
| 实验 4 微生物的分离与纯化 .....        | 50 |

|       |                        |     |
|-------|------------------------|-----|
| 实验 5  | 微生物的平板菌落计数 .....       | 54  |
| 实验 6  | 微生物的培养特征观察 .....       | 58  |
| 实验 7  | 厌氧菌的分离与培养 .....        | 62  |
| 实验 8  | 显微镜油浸系物镜使用 .....       | 64  |
| 实验 9  | 细菌形态的观察 .....          | 68  |
| 实验 10 | 细菌单染色法及口腔微生物的观察 .....  | 70  |
| 实验 11 | 细菌的革兰氏染色 .....         | 73  |
| 实验 12 | 污水中微生物观察 .....         | 75  |
| 实验 13 | 细菌荚膜染色法 .....          | 76  |
| 实验 14 | 细菌芽孢染色 .....           | 79  |
| 实验 15 | 细菌的鞭毛染色 .....          | 81  |
| 实验 16 | 细菌的运动性观察 .....         | 84  |
| 实验 17 | 放线菌形态的观察 .....         | 86  |
| 实验 18 | 酵母菌形态的观察 .....         | 89  |
| 实验 19 | 霉菌形态的观察 .....          | 92  |
| 实验 20 | 微生物细胞大小的测定 .....       | 95  |
| 实验 21 | 微生物细胞数量的显微镜直接计数法 ..... | 99  |
| 实验 22 | 光电比浊计数法 .....          | 102 |
| 实验 23 | 大肠杆菌生长曲线的测定 .....      | 104 |

### 第 3 部分 选做实验

|       |                               |     |
|-------|-------------------------------|-----|
| 实验 24 | 紫外线对枯草芽孢杆菌产生淀粉酶的诱变效应 .....    | 109 |
| 实验 25 | 电场诱导酵母菌原生质体融合 .....           | 111 |
| 实验 26 | 用艾姆氏试验检测诱变剂和致癌剂 .....         | 114 |
| 实验 27 | 抗药性突变菌株的分离 .....              | 120 |
| 实验 28 | 菌种的保藏 .....                   | 122 |
| 实验 29 | 环境因素对微生物生长的影响 .....           | 131 |
| 实验 30 | 细菌鉴定中常用的生理生化试验 .....          | 136 |
| 实验 31 | 食品中细菌总数的测定 .....              | 139 |
| 实验 32 | 食品中大肠菌群的检测 .....              | 143 |
| 实验 33 | 生牛乳自然发酵过程微生物菌相的变化 .....       | 148 |
| 实验 34 | 乳酸发酵与乳酸菌饮料 .....              | 151 |
| 实验 35 | 啤酒酵母细胞的固定化技术 .....            | 154 |
| 实验 36 | 微生物的酒精发酵作用 .....              | 159 |
| 实验 37 | 小型发酵罐的使用与发酵过程中主要生化指标的测定 ..... | 161 |



|       |                        |     |
|-------|------------------------|-----|
| 实验 38 | 用选择培养基从自然界中分离微生物 ..... | 169 |
| 实验 39 | 噬菌体的分离、纯化及效价测定 .....   | 171 |
| 实验 40 | 生长谱法测定微生物的营养要求 .....   | 174 |
| 实验 41 | 光合细菌处理高浓度有机废水 .....    | 176 |
| 实验 42 | 沼气发酵 .....             | 178 |
| 实验 43 | 抗生素效价的生物测定 (管碟法) ..... | 180 |
| 实验 44 | 抗生素抗菌谱及抗生素的抗药性测定 ..... | 183 |
| 实验 45 | 凝集反应 .....             | 186 |
| 实验 46 | 环状沉淀反应 .....           | 188 |
| 实验 47 | 酶联免疫吸附试验 (ELISA) ..... | 190 |

#### 第 4 部分 微生物实验技能的测评

|       |                    |     |
|-------|--------------------|-----|
| 实验 48 | 基本实验技能的检测 .....    | 195 |
| 实验 49 | 实验设计及实施能力的测评 ..... | 198 |

#### 第 5 部分 附录

|      |                          |     |
|------|--------------------------|-----|
| 附录 A | 普通光学显微镜的使用与维护 .....      | 203 |
| 附录 B | 实验室意外事故的处理 .....         | 210 |
| 附录 C | 酸碱指示剂的配制 (按笔画顺序排列) ..... | 211 |
| 附录 D | 染色液的配制 .....             | 212 |
| 附录 E | 实验用溶液及试剂的配制 .....        | 215 |
| 附录 F | 培养基的配制 .....             | 218 |
| 附录 G | 微生物学实验中的一些常用数据表 .....    | 231 |
| 附录 H | 琼脂的制造和检查方法 .....         | 233 |
| 附录 I | 各国主要菌种保藏机构 .....         | 234 |
| 附录 J | 实验用缩写名称对照表 .....         | 235 |
| 附录 K | 常见微生物名称索引 .....          | 237 |
| 参考文献 | .....                    | 243 |

# 第 1 部分

## 微生物实验基础技术



# 1 微生物学实验室的准备

## 一、常用玻璃器皿及准备

微生物学实验室所使用的玻璃器皿主要用于微生物的培养（培养皿、锥形瓶）、微生物的保存（试管）、吸取菌液（吸管、移液器）、制片（载玻片、盖玻片）等。使用前都需要经过洗涤清洁处理，至少无灰尘、油垢、无机盐等杂质，才能保证获得正确的实验结果。有的器皿在洗涤后还要用一定方法包装、经过灭菌才能使用。

### （一）玻璃器皿的类别、规格和使用

#### 1. 培养皿 (petri dish)

常用培养皿皿底直径 90 mm，高 15 mm (图 1-1)，皿底皿盖均为玻璃制成，但有特殊需要时，可使用陶器皿盖，因其能吸收水分，使培养基表面干燥。如测定抗生素效价时，培养皿不能倒置培养，则用陶器皿盖为好。

在培养皿内倒入适量固体培养基制成平板，可用于分离、纯化、鉴定菌种，或细胞计数及测定抗生素、噬菌体的效价。

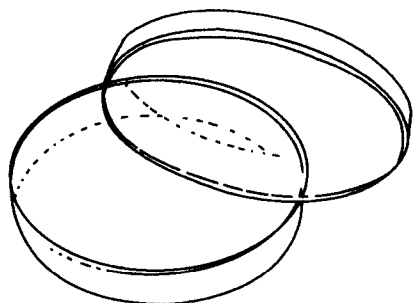


图 1-1 培养皿

#### 2. 试管 (test tube)

微生物学实验所用的试管为直口；需要加盖棉塞、或塑料帽、铝帽、硅胶泡沫塑料塞 (图 1-2)。

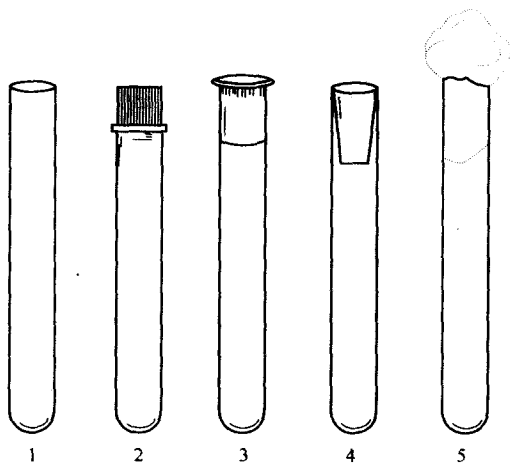
① 大试管 (约 18 mm×180 mm)：可用于盛装制平板的固体培养基，制备琼脂斜面，盛装液体培养基进行微生物的振荡培养。

② 中试管 (约 13~15 mm×100~150 mm)：可用于制备琼脂斜面、盛液体培养基，或用于菌液、病毒悬液的稀释及血清学试验。

③ 小试管 (10~12 mm×100 mm)：一般于细菌或酵母菌的糖发酵试验或血清学试验。

#### 3. 德汉氏小管 (Durham tube)

一种用于观察细菌在糖发酵培养基内产气情况的套管，倒置于盛有液体培养基的试管或三角烧瓶内 (图 1-3)。



1. 细菌学试管；2. 螺帽；3. 塑料帽；4. 硅胶泡沫塞；5. 棉塞

图 1-2 试管与试管帽（塞）

#### 4. Eppendorf 管

亦称小塑料离心管（图 1-4），分 1.5 mL 和 0.5 mL 两种型号。主要用于微生物分子生物学实验中小量菌体的离心、DNA、RNA 的提取等。



图 1-3 德汉式小管



图 1-4 Eppendorf 管

#### 5. 吸管 (pipette)

① 玻璃吸管 (glass pipette) 微生物学实验室常用的刻度玻璃吸管为：0.1 mL、1 mL、2 mL、5 mL 和 10 mL，用于吸取溶液和菌悬液，此外吸取不计量的液体，如染色液、离心上清液、无菌水、少量抗原、抗体、酸、碱溶液等可用具乳胶头的毛细吸管。

② 微量加样器 (micropipette) 微量加样器又称微量吸管，用于吸取微量液体，规格型号较多，每种在一定范围内可调节几个体积，并标有使用范围，如：1~10  $\mu\text{L}$ 、2~20  $\mu\text{L}$ 、20~100  $\mu\text{L}$  等，使用时，将合适的塑料吸嘴牢固地套在微量加样器的下端，旋动调节键，使数字显示器显示出所需吸取的体积；用大拇指按下调节键并将吸嘴插入液体中，缓慢放松调节键，使液体进入吸嘴，并将其移至接收试管中，按下调节键，使液体进入接收管，按下

排除键，将吸嘴脱卸（图 1-5）。

#### 6. 三角烧瓶 (erlenmeyer flask) 与烧杯 (beaker)

多用于储存培养基和生理盐水，有 50 mL、100 mL、150 mL、200 mL、250 mL、500 mL、1 000 mL、2 000 mL 等多种规格，其底大口小，便于加塞，放置平稳。常用烧杯有 50 mL、100 mL、250 mL、500 mL 和 1 000 mL 等，用于配置培养基与各种溶液。

#### 7. 注射器 (injector)

注射器的容量有 1 mL、2 mL、5 mL、10 mL、20 mL、25 mL 几种，通常用于免疫实验、薄层层析、电泳点样、色谱进样。

#### 8. 试剂瓶 (reagent bottle)

磨口分为广口和小口，根据需储存试剂的量选用不同大小的试剂瓶，有棕色和无色两种，棕色主要用来装避光试剂。

#### 9. 玻璃缸 (glass vat)

盛放石炭酸或来苏水等消毒液，以备浸泡用过的载玻片、盖玻片等。

#### 10. 载玻片 (slide) 和盖玻片 (coverslip)

普通为长方形，常用微生物涂片、染色进行形态观察及免疫学中的凝集反应。凹玻片（图 1-6）是在中央有一个圆形凹窝的载玻片，用于制作悬滴片进行细菌运动的观察。

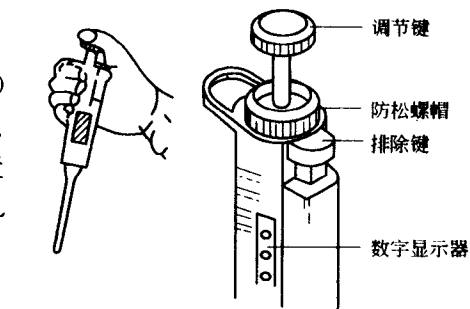


图 1-5 微量加样器

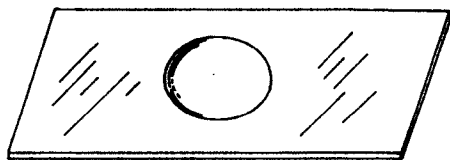


图 1-6 凹玻片

#### 11. 双层瓶 (double bottle)

由内外两个玻璃瓶组成，内层小锥形瓶装香柏油，外层瓶装二甲苯，如图 1-7 所示。

#### 12. 滴瓶 (dropper bottle)

用来盛装各种染液和无菌水等。如图 1-8 所示。

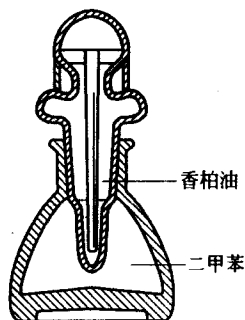


图 1-7 双层瓶



图 1-8 滴瓶

## (二) 玻璃器皿的洗涤

### 1. 注意事项

(1) 用过的玻璃器皿必须立即洗涤。若放置太久,会增加洗涤难度,随时洗涤可以提高器皿使用率。

(2) 有油污的器皿不要同无油污的器皿放在一起,以免使本无油污的器皿沾上油垢,洗涤时浪费药剂和时间。

(3) 含有对人、畜、植物有致病性的微生物的试管、培养皿或其他容器,应先浸入5%石炭酸溶液中5 min以上,或经蒸煮灭菌后再进行洗涤。

(4) 装过有毒物品的器皿,必须与其他器皿分开,经妥善处理后再单独洗涤,以防扩散和发生意外。

(5) 无论用什么方法洗涤,都不应该损伤玻璃器皿。不能使用对玻璃有腐蚀作用的化学试剂,也不能使用比玻璃硬度大的物品来擦拭玻璃器皿。

### 2. 洗涤剂的种类及应用

(1) 水。水是最主要的洗涤剂,但只能洗去可溶解于水的污物。而不溶于水的污物如油、蜡等必须先用其他方法处理后再用水洗。要求盛装过无杂质颗粒或无机盐离子的玻璃器皿,在用清水洗过后,应再用蒸馏水进行漂洗。

(2) 去污粉。去污粉内含有碳酸钙、硫酸镁,有时加些食盐、硼砂。其主要作用是摩擦去污,也有一定的去油垢作用。一般玻璃或搪瓷器皿都可使用去污粉。用时先将器皿湿润,再用湿布或刷子沾上去污粉擦拭,最后用水冲洗掉去污粉。

(3) 肥皂。肥皂是很好的去污剂。有油污的器皿,常用肥皂来洗涤。通常用湿刷子涂抹些许肥皂后刷洗容器,再用水清洗。5%热肥皂水去油能力很强,洗涤器皿上的油脂效果很好。油脂很重的器皿或玻片,应先用纸将油层擦去,然后用热肥皂水洗。洗涤时若加热煮沸效果更好。

(4) 洗衣粉。洗衣粉有很强的去污、去油能力。用1%的洗衣粉溶液洗涤玻璃器皿,特别是洗涤带油的载玻片和盖玻片,有良好的清洁效果。

(5) 洗涤液。通常是指重铬酸钾的硫酸溶液,是一种强氧化剂,去污能力很强。洗涤液常用于洗涤玻璃或搪瓷器皿上的污垢或有机物,切记不能用于金属器皿。配好的洗涤液可用很多次,每次用完后倒入原瓶中保存,直至溶液变为青褐色时才失去效用。使用洗涤液应该尽量避免混入水分稀释。将洗涤液加热至40℃~50℃后使用,可以加快作用速度。用洗涤液洗过的器皿应立即用水冲洗干净。如器皿上带有大量的有机物质,不可直接加洗涤液,否则会使洗涤液很快失效。洗涤液有很强腐蚀性,溅在桌椅上,应立即用水洗并用湿布擦拭;皮肤或衣服上沾有洗涤液时,就应立即用水洗,然后再用苏打(碳酸钠)或氨液洗。

(6) 浓硫酸与强碱液。器皿上如沾有煤膏、焦油以及树脂一类物质,可用浓硫酸或40%的氢氧化钠溶液浸洗。以上这些有机物大都可以溶解于浓硫酸或碱液中。处理所需时间

由所沾物质的性质决定。一般需要 5~10 min, 有的需要数小时。

(7) 有机溶剂。有时洗涤浓重的有机物质及其他不溶于水也不溶于酸和碱的物质, 需要用特定的有机溶剂。常用的有机溶剂有汽油、丙酮、酒精、苯、二甲苯及松节油等, 可根据具体情况选用。

### 3. 常用玻璃器皿的洗涤方法

(1) 新玻璃器皿的洗涤、新购置的玻璃器皿含有游离碱, 应用 2% 的盐酸溶液浸泡数小时, 再用水充分冲洗干净。

(2) 用过的玻璃器皿的洗涤。装过液体培养物或琼脂培养基的玻璃器皿, 应先将培养物倒入或刮入废物缸中, 另行处理。经固体培养基培养后带菌的培养皿、斜面、试管等应先在 2% 的来苏水或消毒液中浸泡 24 h 或者开水煮沸 30 min 再洗, 带病原菌的培养物先进行高温灭菌再洗。如果琼脂培养基已经干燥, 可将培养皿放在水中蒸煮, 使琼脂溶化后趁热倒出。

洗涤时用试管刷或瓶刷, 以清水冲洗。若器皿上有污垢刷不掉时, 可沾去污粉擦拭; 如有油脂, 可沾肥皂或洗衣粉擦洗; 最后用清水冲洗。为了检查是否已将油污完全除去, 可将器皿外壁擦干, 观察水在壁内的形态, 如果均匀地扩展成一薄层而不现水珠, 即为洗涤干净。经过这样洗涤的玻璃器皿, 可以装一般实验的培养基和无菌水等。如要装纯化学药品或用于较精密的实验, 则在用自来水冲洗之后, 还要用蒸馏水淋洗 3 次, 烘干备用。

(3) 吸管的洗涤。吸取过一般液体的吸管, 用后浸入装有清水的量筒或标本筒内, 勿使管内干燥以减少洗涤麻烦。吸过菌液的吸管, 应先浸入 5% 的石炭酸溶液内, 经 5 min 以上灭菌后, 再浸入清水中; 吸过有油液体的吸管, 应先浸入 10% 氢氧化钠溶液内, 经 1 h 以上, 再行清洗。如仍有油污, 则需浸入洗涤液内, 经 1 h 后再洗涤。

无菌操作所用的吸管, 上端管口内塞有棉花。洗涤前应用尖端弯有小钩的钢针将棉花取出。

用自来水冲洗吸管时, 可用直径为 6~7.5 mm 的橡胶管, 一端连于装有细接嘴的自来水龙头上, 另一端在吸管的尖端上, 放水冲洗, 洗涤快而干净。

洗涤后的吸管可以倒立于垫有干净纱布的容器内, 将水控干。必要时可放烘箱内烘干备用。

(4) 载玻片及盖玻片洗涤。新载玻片和盖玻片, 需先在 2% 的盐酸溶液中浸泡 1 h 后用自来水冲洗, 再用蒸馏水洗 2 次; 也可用 1% 的洗衣粉水洗涤。用洗衣粉洗涤新载玻片时, 先将洗衣粉液煮沸, 然后将玻片散开放入煮沸液中, 持续煮 15~20 min (注意勿使玻片露出液面以防钙化变质)。冷却后用自来水冲洗, 再用蒸馏水洗二次; 用洗衣粉液洗盖片时, 将盖片散开放入煮沸的洗衣粉液后, 保持 1 min。待泡沫平下后再煮 1 min, 如此 2~3 次 (煮沸时间过长, 会使玻片钙化、变白、变脆易碎), 冷却后用自来水冲洗, 再用蒸馏水洗。

用过的载玻片和盖玻片, 擦去油垢后, 放在 5% 的肥皂水 (或 1% 苏打液) 中, 煮沸 10 min 后立即用自来水冲洗。然后放入洗涤液 (稀配方) 浸泡 2 h, 再用清水冲洗和蒸馏水洗; 如果用洗衣粉液洗, 也要先用纸擦去油垢, 再将玻片浸入洗衣粉液中, 其余方法同上, 但煮沸后要保持 30 min。

洗涤干净的载玻片可以晾干或烘干。然后用干净的纱布包好或放在干净的容器内备用;



也可在用蒸馏水洗后直接放入装有 95% 酒精的容器中。用时用镊子夹出，在酒精灯焰上点着，使酒精自行燃尽，冷却后即可使用。

洗净的盖玻片只能干燥后备用，不能浸于酒精中（盖玻片很薄，如带酒精点燃，即被烧破）。

#### 4. 玻璃器皿灭菌前的包装

微生物学工作中所用的玻璃器皿，如无菌培养皿、无菌吸管等，在灭菌之前需进行隔离包装。包装方法可根据条件作不同处理。

(1) 培养皿的包装。洗净干燥的培养皿，可以装入特制的白铁套筒中（图 1-9）。如无金属套筒，可按 6~10 套培养皿为一组，用旧报纸卷起来，将上下两端封严，进行干热灭菌。

(2) 吸管的包装。吸管经洗净干燥后，在灭菌之前也要进行包装。首先在吸管上端的管口内塞棉花，作为隔离过滤杂菌之用。棉柱以用脱脂棉为宜，用量根据吸管口径大小而定。取一缕棉花，用伸直的曲别针将其塞入。棉柱长度不少于 10 mm，上端与管口应有一定距离（5 mm 左右）。注意，不要塞得太紧、太松，也不可弄湿，以免影响空气的流通的滤菌效果。

塞好棉柱的吸管需用纸条卷起包好（图 1-10）。先将旧报纸裁成 5 cm 左右宽的纸条。再把吸管尖端封住，然后卷起，卷至吸管上端的 3~4 cm 处即可，留一小段露在纸卷外，并用糨糊粘住。注意不要卷得太紧，以免使用时不易抽出；也可将吸管顶端完全包住，再将纸卷末端折回固定。也可用金属套筒将塞好棉柱的吸管成批的放入，试管上端向外，盖好筒盖，经灭菌后随时抽出使用，比较方便。

此外，试管、三角瓶等容器（空用或装入培养基后），先行塞上棉塞（方法见后），用牛皮纸或旧报纸将棉塞封好扎紧，然后进行灭菌。

#### 5. 灭菌

用干热灭菌或高压蒸汽灭菌方法进行灭菌，冷却后备用。

## 二、棉塞的制作技术

### （一）棉塞的作用和要求

一般情况下，在培养微生物所用的试管或三角瓶上需加棉塞。其作用是既要保持空气的

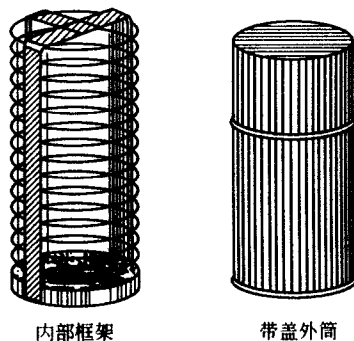


图 1-9 装培养皿的金属筒

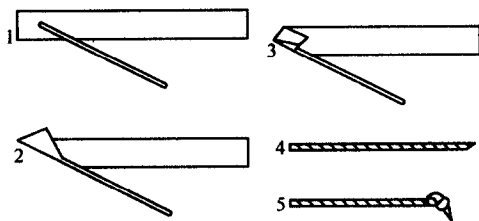


图 1-10 吸管的包装方法和步骤