



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

微生物学实验指导

(第2版)

■ 主编 黄秀梨 辛明秀



高等教育出版社
Higher Education Press



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

微生物学实验指导

(第2版)

主 编 黄秀梨 辛明秀

编著者 黄秀梨 辛明秀 夏立秋 张 松

刘丽丽 赵宝华 陶树兴 刘国生

王 磊 李 宏 刘 文 赵书云



高等教育出版社

Higher Education Press

内容提要

本书是《微生物学实验指导》一书的修订版。本书在修订过程中,注重保持上一版简明扼要、重点突出和实用性强的特点,并从多方面进行了扩展和补充。实验由原来的 44 个增加为 54 个,并增加了“自主设计实验”内容。每个实验都精心设计了实验原理简介和实验结果分析的内容,以帮助读者更好理解。在编写过程中注意引入新的微生物学研究技术,增加了外源蛋白在大肠杆菌中诱导表达及检测、细菌系统发育学分析及荧光原位杂交等综合性新实验。与本书配套出版有“教学辅助光盘”,内容包括实验操作演示、实验结果展示、重要实验菌株的基本特性描述及附录 4 部分内容。

本教材特别适用于师范院校的本科生和专科生使用,亦可作为农、林等其他有关专业或教师的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验指导/黄秀梨,辛明秀主编. —2版.

—北京:高等教育出版社,2008.1

ISBN 978-7-04-021968-5

I. 微… II. ①黄…②辛… III. 微生物学—实验—高等学校—教学参考资料 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 190404 号

策划编辑 赵晓媛 责任编辑 赵晓媛 封面设计 张楠 责任绘图 郝林
版式设计 史新薇 责任校对 杨凤玲 责任印制 尤静

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街 4 号
邮政编码 100011
总 机 010-58581000

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 北京泽明印刷有限责任公司

开 本 787×1092 1/16
印 张 10.75
字 数 260 000

购书热线 010-58581118
免费咨询 800-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landracom.com>
<http://www.landracom.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 1999 年 6 月第 1 版
2008 年 1 月第 2 版
印 次 2008 年 1 月第 1 次印刷
定 价 17.00 元(含光盘)

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 21968-00

第2版前言

《微生物学实验指导》第1版自1999年问世至今已有8年了,本书得到同行的大力支持与关照,已被许多师范院校、农林等高等院校作为实验教材使用,受到好评。随着科学技术的发展和教学改革的需要,赋予了新的内容。《微生物学实验指导》(第2版)已列入“十一五”国家级规划教材。我们根据第1版的使用情况,在学习兄弟院校实验教学先进经验的基础上,进行修改和补充,使第2版在内容上更加丰富和完善,并增加了一套配合教材使用的“教学辅助光盘”,使其实用性更强,应用范围更广,更能适应广大读者的需求。

第2版继续保持第1版简明扼要、重点突出和实用性强的特点,并从多方面进行了扩展和补充。为适应学科发展与实际需要扩展了实验内容,由原来的44个实验增加到54个。每个实验增加了实验原理简介和实验结果分析,以帮助读者更好地理解实验。为了增加教材的实用性和可操作性,增添了“教学辅助光盘”,与本教材配套使用。光盘内容包括4个部分:一、以视频方式演示部分实验操作过程及注意事项;二、通过彩色照片、图解等展示部分实验的真实结果;三、图文配合介绍重要实验菌株的形态和基本特性;四、通过图表和链接查询等方式显示的附录内容。在附录中增加了国内外著名微生物学网站和国外著名微生物学期刊及影响因子两项内容。便于读者及时从网上获取更多的微生物学资源,及向国外微生物学期刊投稿时参考。本教材注意引入新的微生物学研究技术,如增加了外源蛋白在大肠杆菌中诱导表达及检测、细菌系统发育学分析及荧光原位杂交等综合性新实验。本书是《微生物学》(第2版)(黄秀梨主编,高等教育出版社,2003)的配套实验教材。为使知识体系和实验体系成为一个完整的有机整体,我们将实验顺序及内容进行了调整,并增加了“自主设计实验”内容。

参加本书修订工作的单位有:北京师范大学、湖南师范大学、华南师范大学、天津师范大学、河北师范大学、陕西师范大学、河南师范大学、中国农业科学院、河北科技大学及山东理工大学等。参加本书修订的作者都是多年从事微生物学教学和微生物学实验教学的一线教师,具有丰富的知识体系和教学经验,在此我们对他们的精诚合作表示衷心的感谢!并特别感谢高等教育出版社生命科学分社吴雪梅社长,王莉、潘超、赵晓媛等编辑同志的关心、支持和帮助,她们为本书的出版付出了艰辛的劳动。同时也感谢参加本书校对的室研究生潘青、李倩、陈彦闯和姜莉莉等同学。

本书特别适合作为高等师范院校本科生和专科生的微生物学实验教材,亦可作为农、林、医等其他院校相关专业的参考教材。对从事微生物学研究的科研人员以及研究生也具有一定的参考价值。

由于编者水平有限,本书还会存在不少缺点和不足,敬请各位同仁批评指正和提出宝贵意见,谢谢!

黄秀梨 辛明秀

2007.12 于北京师范大学

第 1 版前言

微生物学实验课是对学生进行独立工作能力培养的重要环节,实验教材是指导学生上好实验课的重要工具。师范院校的微生物实验课时少、后续课程缺乏,具有与综合性大学不同的要求和具体目标。为适应师范院校教学的特点,我们在学习兄弟院校大量实验教材和实验经验的基础上编写了《微生物学实验指导》。本实验指导是《微生物学》(黄秀梨主编,高等教育出版社,1998)的配套实验教材。全书约 20 万字,共 44 个实验,分五部分,包括基础实验、实际应用实验、分子微生物学基础实验、专题实验及微生物实验技能测评等。在基础实验中,突出了微生物实验的特点,首先学会制作培养基和消毒灭菌,然后逐渐掌握培养、分离、纯化、观察和检测微生物的系列基本技能,如各类微生物的形态观察,微生物大小的测定、计数、生理生化测定和鉴定,基本的免疫化学方法等。在实际应用及专题实验中,尽量结合工农业生产及医学工作实际,如病毒、螺旋体检测,食用菌栽培、苏云金芽孢杆菌的发酵生产、 α 淀粉酶的固定化、从虫体中分离杀虫微生物,检测水体中的大肠菌群,微生物的诱变育种、营养缺陷型筛选、原生质体融合等。在分子微生物学基础实验中概括了几个常用的操作技术,如 DNA 的小量制备、DNA 重组、感受态细胞的制备、转化、PCR 技术等,为进一步从事分子生物学工作打下基础。在实验中设计了注意事项、演示、问题和思考等项目,以提示学生要特别注意的操作步骤和注意思考的问题,每个实验均给学生提出一个自己独立设计和完成的实验题目,并设有与本实验有关的参考书目,为年青教师和学生提供进一步的参考指南。

参加本书编写的有:北京师范大学、湖南师范大学、华中师范大学、华南师范大学、陕西师范大学、河北师范大学、天津师范大学、山东淄博大学、河北科技大学、河南许昌卫生学校等单位长期从事微生物学教学和科研工作的教授、副教授、讲师等,他们根据本单位的教學特点进行撰稿,全书由黄秀梨统编。本书得到代忠新、王冬梅等同志的协助,在此一并表示感谢!

为提高学生对实验课的重视程度,并逐步做到实验技术规范,本书从考试和实验设计两方面提出了测评学生微生物实验技能的做法,供同行参考。

书后设置附录的出发点,是为同行们在指导实验中能方便查找到所需的参考资料,如实验室的意外处理、实验中常见英文缩写名称对照表及常用中英名词对照表等,在实验用培养基、染色液、试剂的配制中,为了方便读者查找而设计了按笔画顺序排列的查阅一览表,具有一目了然的作用。

本书具有简明扼要、实用性强的特点,并注意突出对学生独立工作能力的训练和培养。

本教材特别适用于师范院校的本科生和专科生的微生物学实验教学,亦可作为农林等其他有关专业或教师的参考用书。

限于编者的水平,书中存在不当之处,请批评指正。

目 录

第一部分 基础实验

实验 1	培养基的配制	1
实验 2	消毒和灭菌	4
实验 3	土壤微生物的分离、纯化及无菌操作技术	7
实验 4	微生物菌落的观察	11
实验 5	显微镜油浸系物镜的使用	15
实验 6	细菌形态的观察	18
实验 7	细菌单染色法及口腔微生物的观察	20
实验 8	细菌的革兰氏染色	22
实验 9	细菌鞭毛染色及细菌运动的观察	25
实验 10	细菌芽孢、荚膜的染色及观察	27
实验 11	支原体、衣原体的形态观察	29
实验 12	放线菌的形态观察	31
实验 13	酵母菌的形态观察	33
实验 14	霉菌的形态观察	36
实验 15	细菌大小的测定	39
实验 16	细菌数量的测定	43
实验 17	细菌的生理生化反应(V-P 反应、甲基红试验、吲哚试验、糖发酵试验)	48
实验 18	微生物与氧关系的检测	51
实验 19	厌氧微生物的培养	53
实验 20	免疫血清的制备	60
实验 21	凝集反应	63
实验 22	沉淀反应	66
实验 23	巨噬细胞体外吞噬实验	69
实验 24	细菌生长曲线的测定	71

第二部分 基础专题实验

实验 25	水中大肠菌群的检测	74
实验 26	噬菌体的提取及效价测定	78
实验 27	细菌转导的测定	80
实验 28	微生物的诱变育种	83
实验 29	营养缺陷型的筛选和鉴定	85
实验 30	微生物的原生质体融合	88

第三部分 分子微生物学基础实验

实验 31	质粒 DNA 的小量制备	92
实验 32	感受态细胞的制备及转化	94
实验 33	DNA 重组	96
实验 34	外源蛋白在大肠杆菌中诱导表达及检测	98
实验 35	应用荧光原位杂交(FISH)技术检测变形菌纲 β 亚纲细菌	101
实验 36	应用 16S rDNA 序列进行细菌系统发育学分析	104

第四部分 实际应用实验

实验 37	乳酸发酵与乳酸菌饮料	108
实验 38	酒精发酵及糯米甜酒的酿制	111
实验 39	抗生素抗菌谱及抗生素的抗药性测定	113
实验 40	固定化枯草芽孢杆菌连续生产 α -淀粉酶	116
实验 41	食用菌的培养	119
实验 42	苏云金芽孢杆菌的发酵生产	122
实验 43	病毒的血清学反应	125
实验 44	螺旋体的检测	129
实验 45	从虫体中分离杀虫微生物	133
实验 46	微生物菌种保藏	136
实验 47	蛋白酶产生菌的筛选	140
实验 48	淀粉酶产生菌的筛选	143
实验 49	脂肪酶产生菌的筛选	146
实验 50	表面活性剂降解菌的分离	149
实验 51	光合细菌的分离	152

第五部分 自主设计实验

实验 52	自主设计实验	155
-------	--------------	-----

第六部分 微生物学实验技能的测评

实验 53	基本实验技能的检测	157
实验 54	实验设计及实施能力的测评	159

第一部分 基础实验

实验 1 培养基的配制

一、实验目的和内容

目的: 1. 明确配制培养基的原理。

2. 学习和掌握配制培养基的一般方法和步骤。

内容: 1. 牛肉膏蛋白胨培养基的配制。

2. 高氏 1 号培养基的配制。

3. 马丁氏培养基的配制。

二、实验原理

培养基是供微生物生长、繁殖和代谢的营养基质。培养基中一般含有微生物所必需的碳源、氮源、能源、无机盐、生长因子及水分等。培养基还应具有适宜的 pH、一定的缓冲能力、一定的氧化还原电位及合适的渗透压。在液体培养基中加入 0.5%~1% 的琼脂配置为半固体培养基, 加入 1%~2% 的琼脂配置为固体培养基。琼脂是从石花菜等海藻中提取的多糖, 是应用最广的凝固剂。琼脂在 96~100℃ 融化, 46℃ 以下凝固。培养基经灭菌后方可使用。

三、实验材料和用具

1. 试剂 牛肉膏、蛋白胨、琼脂、可溶性淀粉、葡萄糖、孟加拉红、链霉素、1 mol/L NaOH、1 mol/L HCl、 KNO_3 、NaCl、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 。

2. 仪器及用具 试管、三角瓶、烧杯、量筒、玻璃棒、天平、药匙、pH 试纸、称量纸、棉花、纱布、线绳、塑料试管盖、牛皮纸或报纸、纱布等。

四、操作步骤

(一) 牛肉膏蛋白胨培养基的配制(成分见附录 2)

1. 称量 按所需量称取各种药品放入大烧杯中。牛肉膏可以放在小烧杯或表面皿中称量, 用热水溶解后倒入大烧杯; 也可以在称量纸上称量, 随后放入热水中, 待牛肉膏与称量纸分离立即取出称量纸。蛋白胨极易吸潮, 故称量时要迅速。

2. 溶解 向烧杯中加入少许所需要的水量, 然后隔以石棉网小心加热, 用玻璃棒搅拌, 也可以在磁力搅拌器上(或电磁炉)加热溶解, 待药品完全溶解后定容, 补足水分。若配制固体培养基, 则将称量好的琼脂放入已溶解的药品中, 再加热融化, 在此过程中需不断搅拌, 以防止琼脂糊底或溢出, 最后补足水分。

3. 调 pH 待培养基冷至室温时检测其 pH, 若偏酸, 滴加 1 mol/L NaOH, 并不停搅拌, 随

时用 pH 试纸检测,直到达到所需的 pH 范围;若偏碱则用 1 mol/L HCl 调节。pH 的调节通常放在加琼脂之前。应注意 pH 不要调过头,以免回调影响各离子浓度。

4. 过滤 液体培养基用滤纸过滤,固体培养基用 4 层纱布趁热过滤,以利于结果的观察。供一般用的培养基此步骤可省略。

5. 分装 按照实验要求将配制的培养基分装入试管或三角瓶中。分装时可用漏斗,以免培养基沾在管口或瓶口上而造成污染。

分装量:固体培养基约为试管高度的 $1/5$,灭菌后摆斜面(图 1-1)。分装入三角瓶内以不超过其容积的 $1/2$ 为宜。半固体培养基以试管高度的 $1/3$ 为宜,灭菌后垂直待凝。

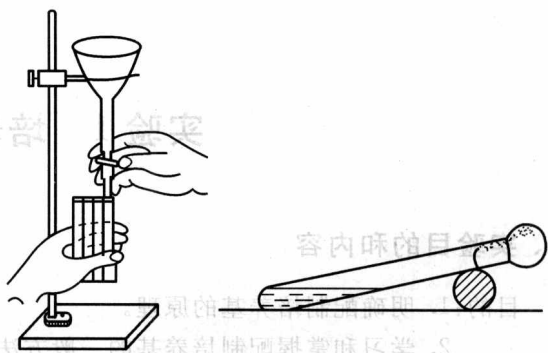


图 1-1 培养基的分装和斜面的摆放

6. 加棉塞 试管口和三角瓶口塞上用普通棉花(非脱脂棉)制作的棉塞,制作方法如图 1-2。棉塞的形状、大小和松紧度要合适,四周紧贴管壁,不留缝隙,才能起到防止杂菌侵入和有利通气的作用。要使棉塞总长约 $3/5$ 塞入试管口或瓶口内,以防棉塞脱落。有些微生物需要更好地通气,则可用 8 层纱布制成通气塞。有时也可用试管帽或塑料塞代替棉塞。



图 1-2 试管棉塞的制作过程

7. 包扎 加塞后,将三角瓶的棉塞外包一层牛皮纸或双层报纸,以防灭菌时冷凝水沾湿棉塞。若培养基分装于试管中,则应先把试管扎成捆后,再于棉塞外包一层牛皮纸,用绳扎好。然后用记号笔注明培养基名称、组别及日期。

8. 灭菌 将上述培养基于 121.0°C 湿热灭菌 20 min。如因特殊情况不能及时灭菌,则应放入冰箱内暂存。

9. 摆斜面 灭菌后,如制斜面,则需趁热将试管口端搁在一根长木条上,并调整斜度,使斜面的长度不超过试管总长的 $1/2$ 。

10. 无菌检查 将灭菌的培养基放入 37°C 温箱中培养 24~48 h,无菌生长即可使用,贮存于冰箱或清洁的橱内,备用。

(二) 高氏 1 号培养基的配制(成分见附录 2)

1. 称量和溶解 先计算后称量,按用量先称取可溶性淀粉,放入小烧杯中,并用少量冷水将其调成糊状,再加至少于所需水量的水,继续加热,边加热边搅拌,至其完全溶解。再加入其他成分依次溶解。对微量成分 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 可先配成高浓度的贮备液后再加入,方法是先在 100 mL 中加入 1 g 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,配成浓度为 0.01 g/mL 的贮备液,再在 1000 mL 培养基中加入以上贮备液 1 mL 即可。待所有药品完全溶解后,补充水分到所需的总体积。如要配制固体培养基,其琼脂溶解过程同牛肉膏蛋白胨培养基配制。

2. pH 调节、分装、包扎及无菌检查 方法同牛肉膏蛋白胨培养基配制。

(三) 马丁氏培养基的配制(成分见附录 2)

1. 称量和溶解 先计算后称量,按用量称取各成分,并将其溶解在少于所需的水中。待各成分完全溶解后,补充水分到所需体积。再将孟加拉红配成1%的水溶液,在1 000 mL培养液中加入以上孟加拉红溶液3.3 mL,混匀后,加入琼脂加热融化,方法同牛肉膏蛋白胨培养基配制。

2. 分装、包扎、灭菌及无菌检查 方法同牛肉膏蛋白胨培养基配制。

3. 链霉素的加入 链霉素受热容易分解,所以临用前将培养基融化后待温度降至45℃左右时才能加入。可先将链霉素配成1%的溶液(配好的链霉素溶液保存于-20℃),在100 mL培养基中加1%链霉素0.3 mL,使每毫升培养基中含链霉素30 μg。

五、注意事项

称药品用的牛角匙不要混用,称完药品应及时盖紧瓶盖。调pH时要小心操作,避免多次回调。不同培养基各有配制特点,要注意具体操作。分装过程中注意不要使培养基沾在管(瓶)上,以免污染过的棉塞再引起试剂污染。

六、演示

1. 培养基的分装方法。
2. 棉塞的制作方法。
3. 试管斜面的搁置方法。

七、实验结果分析

若灭菌的培养基在温箱中培养24~48 h后有菌生长,说明灭菌不彻底,应该重新灭菌。高氏1号培养基中的无机盐可能相互作用产生沉淀,因此,在配制时按配方的顺序依次加入各成分,也可以分别灭菌,用时再混合。

八、实验报告

记录本实验配制的培养基的名称、数量,并图解说明其配置过程,指明要点。

九、问题和思考

1. 配置培养基过程中应注意些什么问题?
2. 培养基配制完成后为什么必须立即灭菌?
3. 已灭菌的培养基如何进行无菌检查?
4. 在用马丁氏培养基分离真菌时发现细菌生长,试分析原因。如何进一步分离纯化所要的真菌?
5. 配制培养基时为什么要调节pH?

十、参考书目

- [1] 钱存柔,黄仪秀主编.微生物学实验教程.北京:北京大学出版社,2005.
- [2] 黄秀梨主编.微生物学实验指导.北京:高等教育出版社;德国:施普林格出版社,1999.

实验2 消毒和灭菌

一、实验目的和内容

目的:了解消毒和灭菌的原理并掌握各种灭菌方法的操作步骤。

内容:1. 高压蒸汽灭菌法。

2. 干热灭菌法。

3. 过滤除菌法。

二、实验原理

高压蒸汽灭菌法是利用高压蒸汽很高的温度和压力使菌体的酶、蛋白质等凝固变性而达到灭菌的目的,适用于一般培养基、玻璃器皿、水、缓冲液、金属用具、实验服及传染性标本等的灭菌。干热灭菌是利用高温使微生物细胞内的蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的,适用于玻璃器皿的灭菌。过滤除菌是通过机械作用滤去液体或气体中的细菌、真菌孢子等的方法,适用于酶液、抗生素等不耐热溶液的灭菌。

三、实验材料和用具

1. 试剂 待灭菌培养基和链霉素溶液。

2. 仪器及用具 高压蒸汽灭菌锅、电热烘箱、过滤除菌器、培养皿、试管。

四、操作步骤

(一) 高压蒸汽灭菌法

全自动高压蒸汽灭菌器的使用需在教师指导下按操作程序进行(可参考本书的“教学辅助光盘”),以下是手提式高压蒸汽灭菌锅的使用方法:

1. 加水 将内层锅取出,向外层锅内加入适量的水,使水面与三角搁架相平为宜。

2. 装料 放回内层锅,装入待灭菌物品。注意不要装得太挤,以免妨碍蒸汽流通而影响灭菌效果。装有培养基的容器放置时要防止液体溢出,瓶塞不要与锅壁接触,以免冷凝水沾湿棉塞。

3. 加盖 将盖上的排气软管插入内层锅的排气槽内,摆正锅盖,以对称的方式同时旋紧相对的两个螺栓,并打开排气阀。

4. 排气 加热,待水沸腾后水蒸气和空气一起从排气孔排出。当排出的气流很强并有嘘声时,表明锅内的空气已排净(沸腾后约 5 min)。

5. 升压 当锅内空气排净时,即可关闭排气阀,压力开始上升。

6. 保压 当锅内压力升到所需压力时,控制热源,计时并维持压力至所需时间。本实验用 0.1 MPa, 121.0℃, 20 min 灭菌。

7. 降压 达到所需灭菌时间后,关闭热源,让压力自然下降到零后,打开排气阀。放净蒸汽后,打开锅盖,取出灭菌的物品,倒掉剩水。

8. 无菌检查 将已灭菌的培养基于 37°C 培养 24 h,无菌生长即可使用。

(二) 干热灭菌法

1. 装入待灭菌物品 将包好的待灭菌物品(培养皿、试管,吸管等)放入电烘箱内,关好箱门。物品不要摆得太挤,以免妨碍空气流通,灭菌物品不要接触电烘箱内壁的铁板,以防包装纸烤焦起火。

2. 升温 接通电源,拨动开关,打开电烘箱排气孔,旋动恒温调节器至绿灯亮,让温度逐渐上升。当温度升至 100°C 时,关闭排气孔。在升温过程中,如果红灯熄灭,绿灯亮,表示箱内停止加温,此时如果还未达到所需的 $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ 温度,则需转动调节器使红灯再亮,如此反复调节,直至达到所需温度。

3. 恒温 当温度升达到 $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ 时,恒温调节器会自动控制调节温度,保持此温度 2 h。干热灭菌过程严防恒温调节的自动控制失灵而造成安全事故。

4. 降温 切断电源、自然降温。

5. 灭菌物品的取出 待电烘箱内温度降到 70°C 以下后,打开箱门,取出灭菌物品。电烘箱内温度未降到 70°C ,切勿自行打开箱门以免骤然降温导致玻璃器皿炸裂。

(三) 过滤除菌法

有些物质,如抗生素、血清、维生素等易受热分解,要采用过滤除菌法。当溶液通过滤膜时,溶液中的细菌等微生物由于不能通过滤膜而被阻挡在滤膜上,从而起到除菌的作用。

1. 过滤器的种类

(1) 滤膜滤器:由醋酸纤维、硝酸纤维素等制成,有孔径大小不同的多种规格(如 $0.1\ \mu\text{m}$ 、 $0.22\ \mu\text{m}$ 、 $0.3\ \mu\text{m}$ 、 $0.45\ \mu\text{m}$ 等),过滤细菌常用 $0.45\ \mu\text{m}$ 孔径。其优点是吸附性小,滤速快,每张滤膜只能用 1 次,不用清洗。

(2) 蔡氏滤器:是一种金属制成的过滤漏斗,其过滤部分是一种用石棉纤维和其他填充物质制成的片状结构。溶液中的细菌通过石棉纤维的吸附和过滤而被去除,但对溶液中其他物质的吸附性也大。每张纤维板只能用 1 次。

(3) 玻璃滤器:是一种由玻璃制成的过滤漏斗,其过滤部分是由细玻璃粉烧结成的板状构造。玻璃滤器规格很多,5 号(孔径 $2\sim 5\ \mu\text{m}$)和 6 号(孔径小于 $2\ \mu\text{m}$)适用于过滤细菌。其优点是吸附量少,但每次使用后要洗净再用。清洗方法:用水充分冲洗,然后浸于含 1% KNO_3 的浓硫酸中 24 h,再用蒸馏水抽洗数次。在抽洗液中加入数滴 BaCl_2 ,至不出现 BaSO_4 沉淀时,即表示已洗净。

2. 过滤装置

(1) 将过滤器和收集滤液的试管按图 2-1 装好,抽滤瓶口塞一段棉花以阻止空气中细菌进入滤瓶,外用纸包好, 121°C 灭菌 20 min。

(2) 为加快过滤速度,一般用负压抽气过滤,可以在自来水龙头上装一抽气装置,利用自来水流动造成负压。也可以用真空泵抽滤。

(3) 过滤时应注意设备连接处是否漏气,以防染菌。

(4) 针头式过滤器的安装和使用十分简单(图 2-2)。

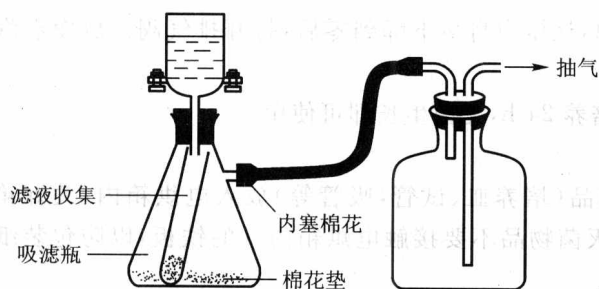


图 2-1 过滤装置

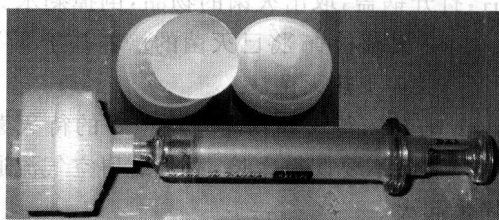


图 2-2 针头式过滤器

五、注意事项

1. 使用高压蒸汽灭菌锅时，切勿忘记加水并且水量不可过少，以防止灭菌锅烧干引起炸裂；在灭菌过程中，操作者切勿擅自离开，随时注视压力的变化。
2. 使用高压蒸汽灭菌锅时，必须待锅内冷空气排尽后才能关上排气阀；灭菌完毕后等到压力降到“0”后才能打开排气阀，开盖取物。否则由于锅内压力骤然下降，培养基由于容器的内外压力不平衡而喷出试管，使棉塞受污染甚至烫伤操作者。
3. 干热灭菌时，物品不要摆得太拥挤，以免阻碍空气流通影响灭菌效果；灭菌物品不要接触电烘箱的铁板，以防包装纸烤焦起火。
4. 过滤除菌时应注意过滤装置连接处是否漏气，以防污染。过滤时用力要适当，不要太猛，以免细菌被挤压通过滤膜。

六、演示

1. 高压蒸汽灭菌锅的结构和使用方法。

2. 电烘箱的使用方法。

3. 过滤除菌装置的安装及使用方法。

七、实验结果分析

将已灭菌的培养基于 37°C 培养 24 h，若有菌长出，说明灭菌不彻底。原因可能是：锅内压力（或温度）未达到要求值；锅内待灭菌物品过多；灭菌时间不够长；锅内空气未排尽。过滤除菌后的溶液为非常清澈透明的溶液。

八、实验报告

1. 记录各种不同物品所用的灭菌方法及灭菌条件（温度、压力等）。
2. 试述高压蒸汽灭菌的操作过程及注意事项。

九、问题和思考

1. 试比较各种灭菌方法的原理及适用范围。
2. 高压蒸汽灭菌开始之前，为什么要将锅内冷空气排尽？灭菌完毕后，为什么待压力降至

“0”时才能打开排气阀,开盖取物?

3. 灭菌在微生物实验操作中有何重要意义?

4. 在干热灭菌操作过程中应注意哪些问题?

5. 举几个实际生活中灭菌或消毒的例子。

十、参考书目

[1] 沈萍,陈向东主编.微生物学实验.第4版.北京:高等教育出版社,2007.

[2] 黄秀梨主编.微生物学实验指导.北京:高等教育出版社;德国:施普林格出版社,1999.

实验3 土壤微生物的分离、纯化及无菌操作技术

一、实验目的和内容

- 目的:1. 掌握从土壤中分离微生物的方法。
2. 掌握常用的分离纯化微生物的操作技术。

- 内容:1. 用稀释法分离细菌、放线菌和霉菌。
2. 用平板划线方法分离微生物。
3. 斜面接种及穿刺接种。

二、实验原理

从混杂的微生物群体中获得只含有某一种或某一株微生物的过程称为微生物的分离与纯化。常用的分离纯化方法有:单细胞挑取法、平板划线法和稀释倒平板法。本实验利用稀释倒平板法从土壤中分离细菌、放线菌和霉菌。基本原理为:将含有各种微生物的土壤悬液进行稀释后涂布接种到各种选择培养基平板上,在不同条件下培养,从而使各类微生物在各自的培养基上形成单菌落。单菌落是由一个细胞繁殖而成的集合体,即是一个纯培养。

三、实验材料和用具

- 菌种 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和普通变形菌(*Proteus vulgaris*)斜面菌种。
- 培养基 已灭菌的牛肉膏、高氏1号、土豆蔗糖固体培养基。
- 仪器及用具 99 mL 无菌水(带玻璃珠,玻璃珠用量以充满瓶底为最好)1瓶,含9 mL 无菌水的试管6支,80%乳酸,10%酚液,95%乙醇,无菌培养皿,1 mL 无菌移液管,土壤样品、天平、称量纸、药匙、试管架、涂布器。

四、操作步骤

(一) 土壤稀释分离法分离纯化细菌、放线菌和霉菌

- 1. 取土壤 取表层以下 5~10 cm 处的土样,放入无菌的袋中备用,或放在 4℃ 冰箱中暂存。
- 2. 无菌操作制备土壤稀释液

(1) 制备土壤悬液:称取土样 1 g,迅速倒入含有 99 mL 无菌水的三角瓶中,振荡 5~10 min,使土样充分打散,即成为 10^{-2} 的土壤悬液。

(2) 稀释:用无菌移液管吸 10^{-2} 的土壤悬液 1 mL,吹入 9 mL 无菌水中即为 10^{-3} 稀释液,如此重复,可依次制成 $10^{-3} \sim 10^{-8}$ 的稀释液(图 3-1)。注意:操作时管尖不能接触液面,每一个稀释度换用一支移液管,每次吸入土液后,要将移液管插入液面,吹吸 3 次,每次吸上的液面要高于前一次,以减少稀释中的误差。

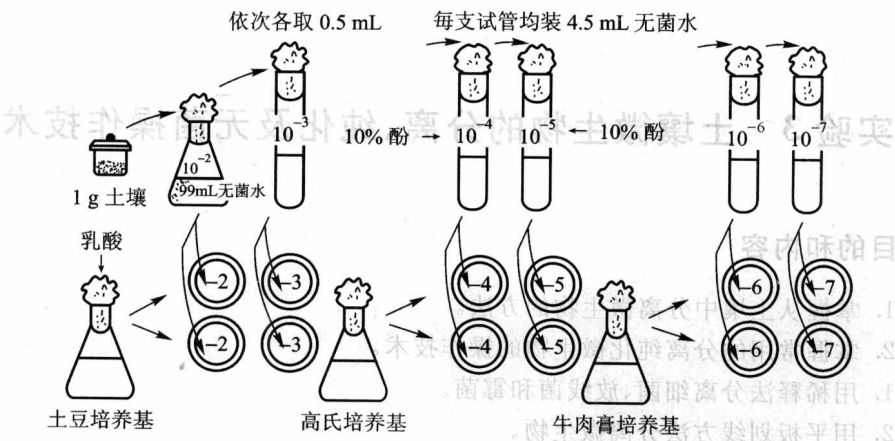


图 3-1 稀释法分离土壤微生物操作过程图解

3. 涂布法测定菌落数的方法

(1) 倒平板:右手持盛有培养基的三角瓶于火焰旁,用左手将瓶塞轻轻拔出,用右手小指与无名指夹住瓶塞,瓶口保持对着火焰。左手中指和无名指托住培养皿底用拇指和食指捏住盖将培养皿在火焰附近打开一个缝隙,迅速倒入培养基(装量以铺满皿底的 1/3 为宜),加盖后轻轻摇动培养皿使培养基均匀铺在培养皿底部,平置于桌面上,待其凝固后即成为平板(图 3-2)。

(2) 涂布法(无菌操作):将 0.1~0.2 mL 菌悬液滴在平板表面中央位置,右手拿无菌涂布器平放于平板表面,将菌液先沿一条直线轻轻地来回推动,使之均匀分布,然后改变方向沿另一垂直线来回推动,平板边缘可改变方向用涂布器再涂布几次(图 3-3)。

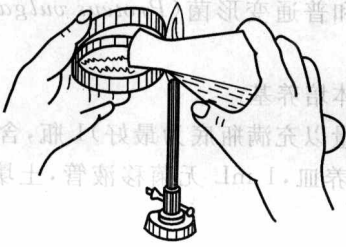


图 3-2 倒平板的方法



图 3-3 平板涂布菌

(3) 接种量和培养基:细菌:取 10^{-6} 、 10^{-7} 两管稀释液各 0.2 mL, 分别接入两个牛肉膏蛋白胨琼脂平板中, 涂布均匀。放线菌:取 10^{-4} 、 10^{-5} 两管稀释液, 在每管中加入 10% 酚液 5~6 滴, 摇匀, 静置片刻, 然后分别从两管中吸出 0.2 mL 加入高氏 1 号培养基平板中, 涂布均匀。霉菌:取 10^{-2} 、 10^{-3} 两管稀释液各 0.2 mL, 分别接入土豆蔗糖培养基平板中(每 100 mL 培养基加入灭菌的乳酸 1 mL), 涂布摇匀。

4. 培养 将接种好的细菌、放线菌、霉菌平板倒置, 即皿盖朝下放置, 于 $28\sim 30^{\circ}\text{C}$ 中恒温培养, 细菌培养 1~2 d, 放线菌培养 5~7 d, 霉菌培养 3~5 d。观察生长的菌落, 用于进一步纯化分离或直接转接斜面。

(二) 划线分离方法

1. 划线分离 用接种环从待纯化的菌落或待分离的斜面菌种只沾取少量菌样, 在相应培养基平板中划线分离。划线的方法多样, 目的是获得单个菌落。常用的划线的方法有以下两种, 即连续划线和分区划线(图 3-4)。

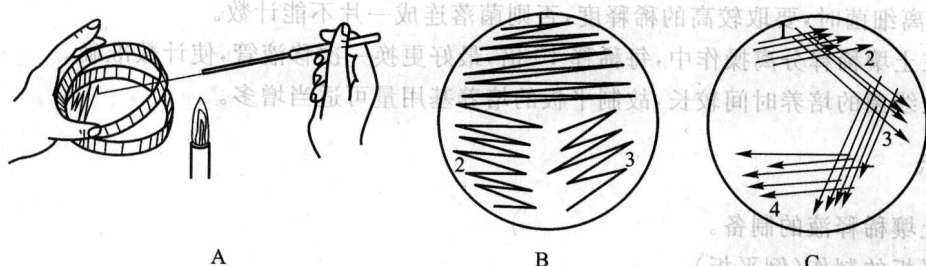


图 3-4 平板划线方法示意图

A. 划线分离操作; B. 连续划线; C. 分区划线

2. 培养 划线完毕后盖上培养皿盖, 培养方法与涂布法测定菌落数中的方法相同。

(三) 斜面接种和穿刺接种

1. 斜面接种

(1) 取新鲜固体斜面培养基, 分别做好标记(标明菌名、接种日期、接种人等), 然后用无菌操作方法, 把待接菌种接入以上新鲜培养基斜面上。

接种的方法是: 用左手握住菌种试管和待接种的斜面试管, 试管底部放在手掌内并将中指夹在两个试管之间, 使斜面向上呈水平状态, 在火焰边用右手松动试管塞以利于接种时拔出。右手拿接种环通过火焰灼烧灭菌, 在火焰旁边用右手的小指和无名指分别夹住棉塞将其拔出, 并迅速灼烧管口。待接种环冷却后挑取少量待接菌种并退出菌种试管, 迅速伸入待接种的斜面试管, 然后在新鲜斜面上“之”字形划线, 方向是从下部开始, 一直划至上部(图 3-5)。注意划线要轻, 不可把培养基划破。将接种环退出斜面试管并用火焰灼烧管口, 在火焰边将试管塞上, 将接种环逐渐接近火焰灼烧。

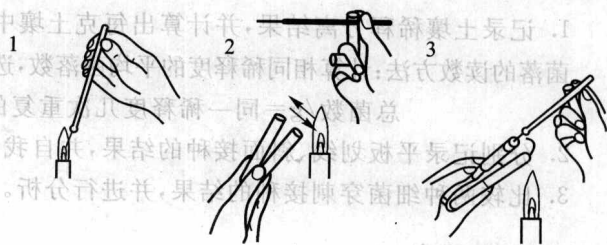


图 3-5 斜面接种

白蛋白(2)接种后 30℃ 恒温培养,细菌培养 48 h,放线菌、霉菌培养至孢子成熟方可取出保存。

2. 穿刺接种

(1) 取两支新鲜半固体牛肉膏蛋白胨柱状培养基,做好标记,然后分别接种金黄色葡萄球菌和变形杆菌。接种的方法是:用接种针沾取少量待接菌种,然后从柱状培养基的中心穿入其底部(但不要穿透),然后沿原刺入路线抽出接种针,注意接种针不要移动(图 3-6)。



图 3-6 穿刺接种示意图

(2) 接种后 30℃ 恒温培养,24 h 后观察,比较两种菌的生长结果。

五、注意事项

1. 一般土壤中,细菌最多,放线菌及霉菌次之,而酵母菌主要见于果园及菜园土壤中。故从土壤中分离细菌时,要取较高的稀释度,否则菌落连成一片不能计数。
2. 在土壤稀释分离操作中,每稀释 10 倍,最好更换一次移液管,使计数准确。
3. 放线菌的培养时间较长,故制平板的培养基用量可适当增多。

六、演示

1. 土壤稀释液的制备。
2. 平板的制作(倒平板)。
3. 涂布法接种、斜面接种和穿刺接种(参见“教学辅助光盘”)。
4. 划线分离方法。

七、实验结果分析

在牛肉膏蛋白胨培养基、高氏 1 号培养基和土豆蔗糖培养基上可分别分离到细菌、放线菌和霉菌,但也不是绝对的。如在牛肉膏蛋白胨培养基上也可有霉菌的生长,在土豆培养基上也可有细菌和放线菌生长,因为微生物的营养类型和代谢类型是非常多样的。经穿刺接种金黄色葡萄球菌在培养基中沿刺入的路线上有菌长出;经穿刺接种变形杆菌的培养基中沿刺入的路线上及路线周围都有菌长出,其原因是变形菌有鞭毛使该菌有运动性(见“教学辅助光盘”)。

八、实验报告

1. 记录土壤稀释分离结果,并计算出每克土壤中的细菌、放线菌和霉菌的数量。
菌落的读数方法:计算相同稀释度的平均菌落数,选择平均菌数在 30~300 之间的进行计数。
$$\text{总菌数/g} = \text{同一稀释度几次重复的菌落平均数} \times \text{稀释倍数}$$
2. 分别记录平板划线、斜面接种的结果,并自我评价。
3. 比较两种细菌穿刺接种的结果,并进行分析。

九、问题和思考

1. 为什么高氏 1 号培养基和土豆蔗糖固体培养基中要分别加入酚和乳酸?