

微生物学实验

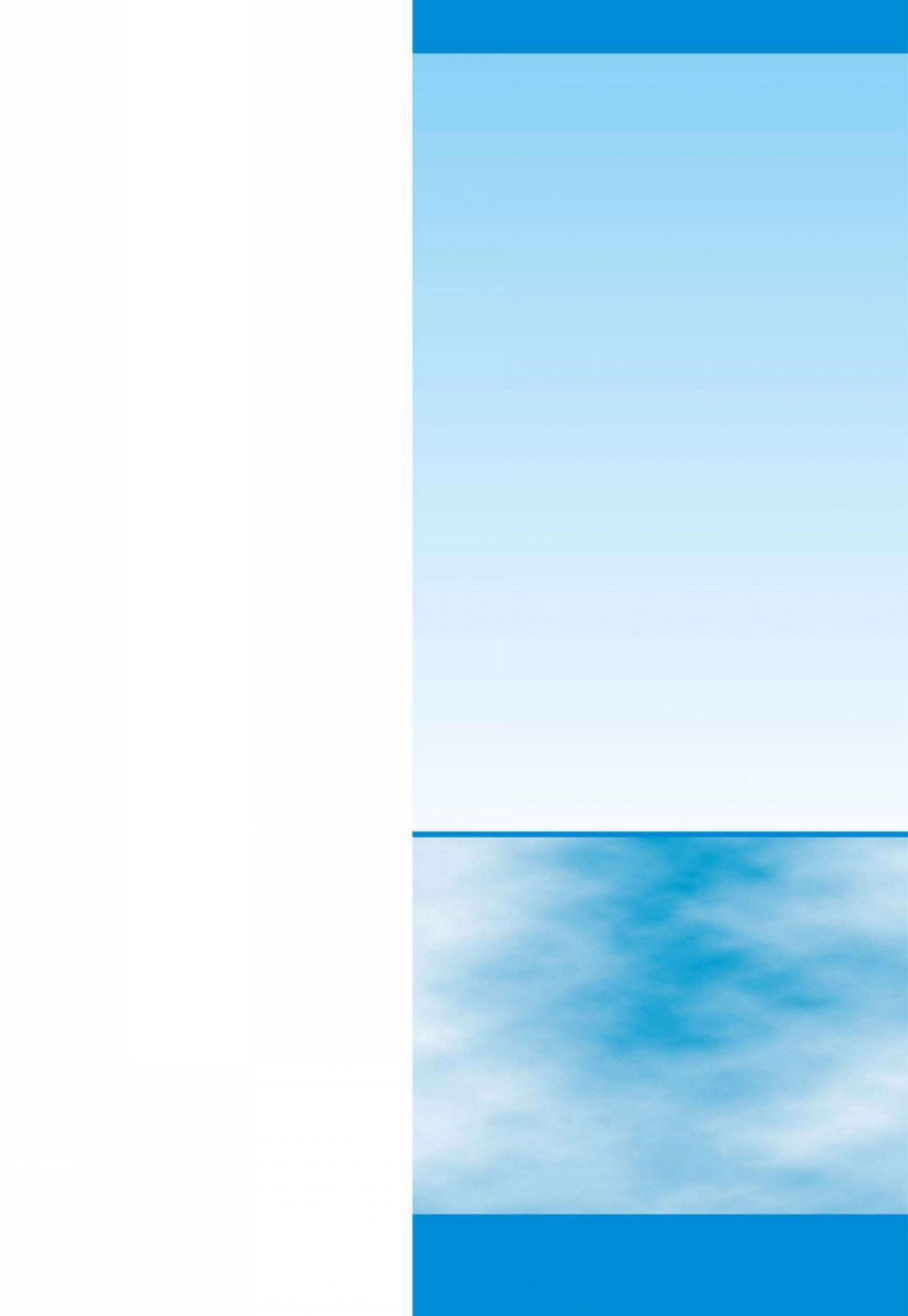
Weishengwuxue Shiyan

张悦 曹艳茹 编著



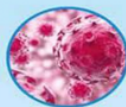
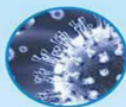
云南大学出版社
YUNNAN UNIVERSITY PRESS





微生物学实验

Weishengwuxue Shiyan

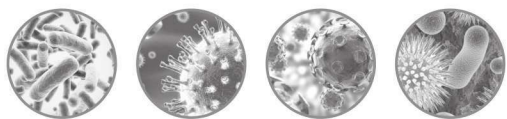


ISBN 978-7-5482-2743-4



9 787548 227434 >

定价：20.00元



微生物学实验

Weishengwuxue Shiyan

张悦 曹艳茹 编著



云南大学出版社
YUNNAN UNIVERSITY PRESS



微生物学实验

Weishengwuxue Shiyān

张悦
曹艳茹 编著

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验 / 张悦, 曹艳茹编著. — 昆明: 云南大学出版社, 2016

ISBN 978-7-5482-2743-4

I. ①微… II. ①张… ②曹… 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(2016)第184237号

策划编辑: 赵红梅

责任编辑: 万 斌

封面设计: 王嫣一

出版发行: 云南大学出版社

印 装: 昆明富新春彩色印务有限公司

开 本: 787mm×1092mm 1/16

印 张: 6.25

字 数: 122千

版 次: 2016年8月第1版

印 次: 2016年8月第1次印刷

书 号: ISBN 978-7-5482-2743-4

定 价: 20.00元

社 址: 昆明市翠湖北路2号云南大学英华园内

邮 编: 650091

电 话: (0871) 65031071 65033244

网 址: <http://www.ynup.com>

E-mail: market@ynup.com

微生物实验室安全及操作规定

微生物学实验的对象为微生物，肉眼看不到，操作不当会带来安全隐患，因此要求进入实验室后必须严格遵守微生物实验室安全及操作规定：

1. 进入实验室应穿实验服，离室时脱下，不必要的物品不得带入实验室，以免实验室受到污染。
2. 实验室内严禁饮食，不得高声谈笑或随便走动。
3. 实验过程中发生差错或意外事故时，第一时间报告老师进行正确的处理，禁止隐瞒或自作主张不按规定处理。
4. 实验课前认真听老师讲解，严格按老师要求进行操作，不慎损坏了器材等，应主动报告老师进行处理；不按要求操作造成仪器损害，由学生本人全额赔偿。
5. 各种实验物品应按指定位置存放，用过的器材、用具等严格按任课教师的要求进行处理。
6. 任何放入培养箱及冰箱等公共设备的物品，都必须做好标记，如名称、时间和组名等。
7. 爱护实验室内仪器设备，严格按操作规则使用。节约使用实验材料。
8. 切忌用手直接接触标本及已灭菌的器材内部。
9. 使用完超净工作台要将里面的物品全部拿出，不得留有任何物品。
10. 实验完毕，应物归原处并将桌面整理清洁，把实验室打扫干净。洗手后离开。

前 言

《微生物学实验》是一本选材于实际并具有一定特色的微生物学实验指导教材。它总括了参与昆明学院微生物学实验及理论教学的几位老师在多年的微生物学教学、科研及生产应用方面的宝贵经验，吸收了同类教材及研究手册的优点，为适应当今生物科技的发展、贴合微生物学理论教学编写而成。

全书共包括 15 个经典的微生物学实验，图文并茂地介绍了培养基的配制与灭菌消毒技术，环境微生物检测，显微镜使用技术，各类微生物的制片及形态结构观察，各类微生物的分离、纯化和培养，微生物生理生化反应，微生物生长等内容。着重训练学生微生物学实验的基本操作和技能，同时适当增加了一些探究性问题，引导学生在掌握基础实验内容后，去思考如何将实验与理论知识及具体实践应用相结合的问题。全书每个实验中都附有相关染色液及试剂等的配制方法，取材尽量贴合实际环境及条件，方便学生实验操作。在每个实验内容后还引入了延伸阅读部分，主要介绍一些和实验相关的趣闻、新的研究进展及相应实验在实际生活中的应用，这加深了相关实验内容的广度和深度，体现出一定的实用性和灵活性，也便于提起学生学习兴趣，引导学生课后主动查阅更多的与实验相关的知识。

本书可供高等院校生物科学专业、生物技术专业、发酵工程、农学等专业的大学本、专科学生使用，也可供从事微生物学及相关学科教学及生产的科技工作者参考使用。

编 者

2016 年 6 月

目 录

实验一 器皿包扎及消毒与灭菌	(1)
实验二 培养基的制备	(10)
实验三 无菌操作技术	(16)
实验四 实验室环境和人体表面的微生物检查	(23)
实验五 普通光学显微镜的使用及微生物形态观察	(29)
实验六 平板分离技术——土壤微生物的分离纯化	(37)
实验七 霉菌的形态观察及放线菌的制片	(43)
实验八 放线菌与酵母菌的形态观察	(49)
实验九 革兰氏染色	(55)
实验十 显微镜直接计数	(59)
实验十一 IMViC 试验	(65)
实验十二 环境因素对微生物生长的影响	(71)
实验十三 糖发酵试验	(78)
实验十四 大肠杆菌生长曲线的制作	(82)
实验十五 微生物大小的测定	(86)

实验一 器皿包扎及消毒与灭菌

一、实验目的

1. 了解玻璃器皿的清洗、棉塞制作、移液管和培养皿的包扎方法。
2. 了解干热灭菌、紫外线灭菌、微孔滤膜过滤除菌和高压蒸汽灭菌的原理和应用范围。
3. 掌握高压蒸汽灭菌的操作技术。

二、实验原理

1. 实验室中使用的玻璃器皿简介

微生物学实验所使用的玻璃器皿，很多要灭菌后才能用来培养微生物，因此其质量、洗涤和包装方法均有一定的要求。玻璃器皿的质量一般为硬质玻璃，才能承受高温灭菌和短暂灼烧等操作而不致破损；玻璃器皿的游离碱含量要求较少，否则会影响培养基的酸碱度；对玻璃器皿的形状和包装方法的要求，以能防止杂菌污染为准。洗涤玻璃器皿的方法不当也会影响实验的结果。目前微生物学实验室中，部分玻璃器皿（如培养皿、移液管等）已经被一次性塑料制品所代替，但大多数玻璃器皿仍然是实验室重要的常用用具。

2. 灭菌的常用方法和基本原理

实验室常用的灭菌方法有干热灭菌法、紫外线照射法、微孔滤膜过滤除菌法和高压蒸汽灭菌法等。

(1) 干热灭菌是用电热干燥箱加热，利用高温使微生物细胞内的酶、蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。

(2) 紫外线杀菌机制主要是因为它诱导了胸腺嘧啶二聚体的形成和 DNA 链的交联，从而抑制了 DNA 的复制。

(3) 微孔过滤除菌是通过机械作用滤去液体或气体中细菌、真菌孢子等的方法。

(4) 高压蒸汽灭菌也是使蛋白质变性而灭菌的。高压蒸汽灭菌锅（图 1 -

1、图 1-2) 灭菌时是将待灭菌的物品放在一个密闭的加压灭菌锅内，通过加热使灭菌锅隔套间的水沸腾而产生蒸汽。待水蒸气将锅内的冷空气从排气阀中驱尽，再关闭放气阀，由于此时蒸汽不能排出，从而增加了灭菌锅内的压力，使锅内水的沸点增高，达到高于 100℃ 的温度，导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。

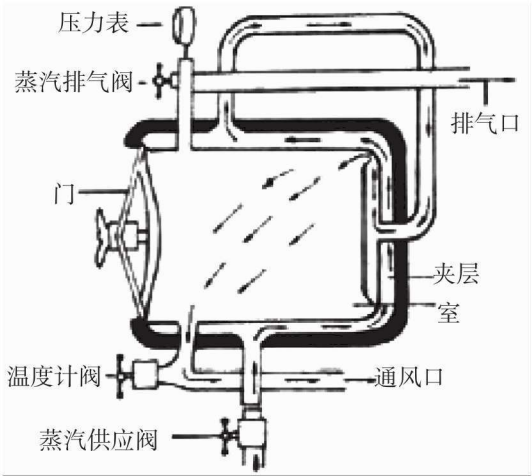
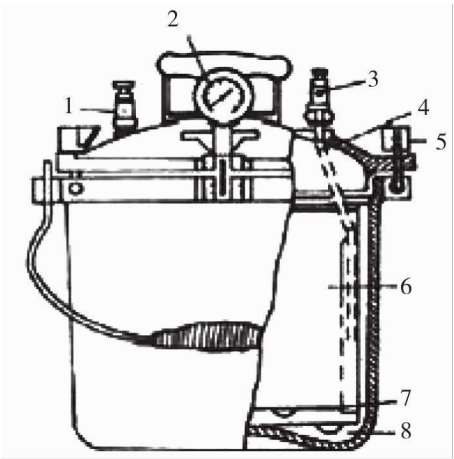


图 1-1 卧式灭菌锅



1. 安全阀 2. 压力表 3. 放气阀 4. 软管 5. 紧固螺栓 6. 灭菌桶 7. 筛架 8. 水

图 1-2 手提式灭菌锅

干热灭菌和高压蒸汽灭菌的灭菌效果与所灭物品的蛋白质含水量有很大的

关系（表 1-1）。就效果而言，湿热灭菌效果要比干热灭菌效果好（表 1-2）。在用高压蒸汽灭菌锅进行灭菌时，锅体内冷空气的排除是否完全极为重要（表 1-3），因为空气的膨胀压大于水蒸气的膨胀压，所以，当水蒸气中含有空气时，在同一压力下，含空气蒸汽的温度低于饱和蒸汽的温度。

表 1-1 蛋白质含水量与凝固所需温度的关系

卵清白蛋白含水量（%）	30 分钟内凝固所需温度（℃）
50	56
25	74 ~ 80
18	80 ~ 90
6	145
0	160 ~ 170

表 1-2 干热、湿热穿透力及灭菌效果比较

温度（℃）		时间（h）	透过布层的温度（℃）			灭 菌
			10 层	20 层	100 层	
干热	130 ~ 140	4	86	72	70.5	不完全
湿热	105.3	3	101	101	101	完全

表 1-3 灭菌锅内留有不同分量空气时压力与温度的关系

压力数			全部空气排出时的温度（℃）	2/3 空气排出时的温度（℃）	1/2 空气排出时的温度（℃）	1/3 空气排出时的温度（℃）	空气全不排出时的温度（℃）
MPa	kg/cm ²	b/in ²					
0.03	0.35	5	108.8	100	94	90	72
0.07	0.70	10	115.6	109	105	100	90
0.10	1.05	15	121.3	115	112	109	100
0.14	1.40	20	126.2	121	118	115	109
0.17	1.75	25	130.0	126	124	121	115
0.21	2.10	30	134.6	130	128	126	121

注：b/in² 即磅/英寸²。

三、实验材料

1. 各种玻璃器皿、试管刷、洗涤剂、培养皿、移液管、牛皮纸或报纸等。
2. 棉花、纱布、线绳、三角瓶和试管等。
3. 高压蒸汽灭菌锅。

四、实验步骤

1. 棉塞制作

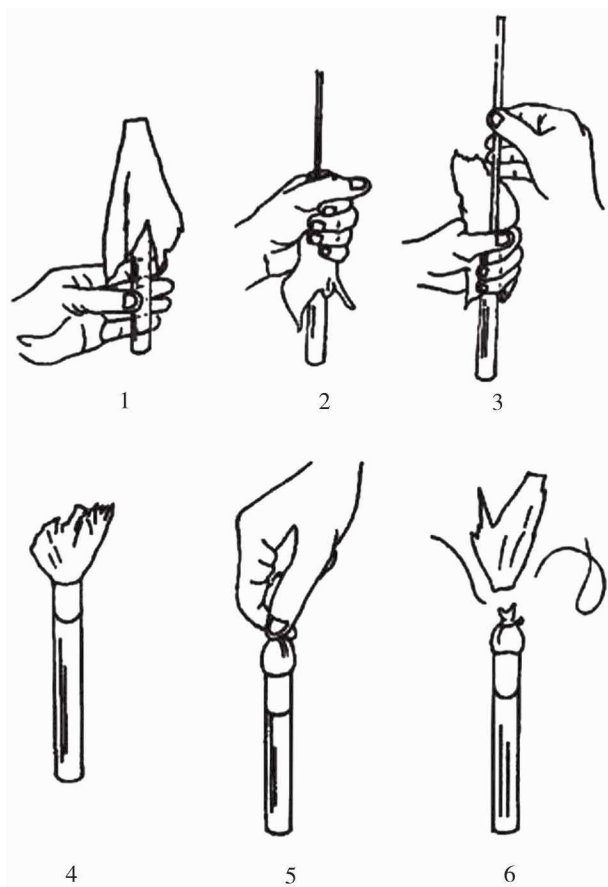


图 1-3 棉塞制作方法及步骤

2. 移液管的包扎

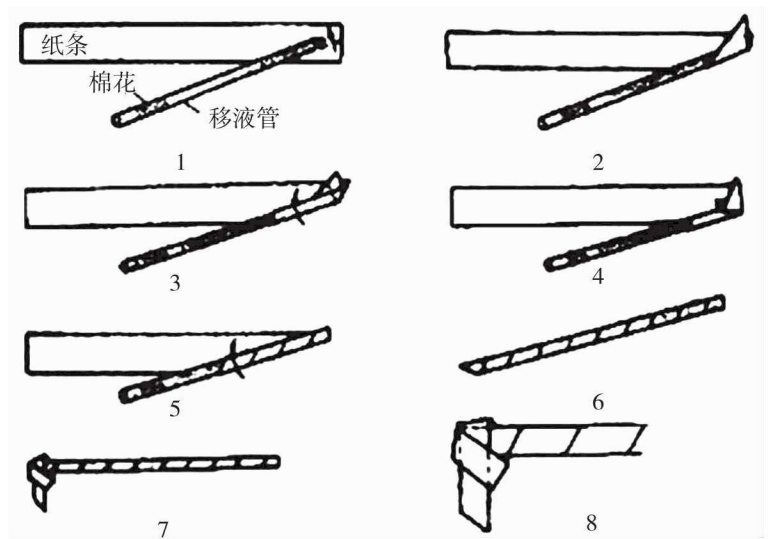


图 1-4 移液管的包扎方法及步骤

3. 培养皿的包扎





图 1-5 培养皿的包扎方法及步骤

4. 高压蒸汽灭菌锅的操作

- (1) 加水：将内层锅取出，再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，并装入待灭菌物品。
- (3) 加盖：将盖上的排气软管插入内层锅的排气槽内，再以两两对称的方式同时旋紧相对的两个螺栓。
- (4) 排气：通电加热，待冷空气完全排尽后，关上排气阀。
- (5) 升压：升压至 0.1MPa。
- (6) 保压：当锅内压力升到所需要的压力时，控制热源，维持压力至设定

时间。本实验用 0.1MPa、121.5℃、20min 灭菌。

(7) 降压：到灭菌所需的时间后，关闭电源，让灭菌锅内温度自然下降，当压力表降至“0”时，打开排气阀，旋松螺栓，打开盖子，取出灭菌物品。

(8) 无菌检查：将取出的灭菌培养基放入 37℃ 温箱培养 24h，经检查若无杂菌生长，即可待用。

五、注意事项

1. 切勿忘记加水，同时加水量不可过少，以防灭菌锅烧干而引起炸裂事故。

2. 一定要待压力降到“0”时，才能打开排气阀开盖取物。否则就会因锅内压力突然下降，使容器内的培养基由于内外压力不平衡而冲出烧瓶口或试管口，造成棉塞沾染培养基而发生污染，甚至灼伤操作者。

六、实验结果

1. 了解主要的灭菌技术有哪几种。
2. 灭菌锅的使用（步骤）。
3. 玻璃器皿包扎（培养皿、移液管）。

操作：每人尝试使用手提式灭菌锅 1 次，每组制作试管塞 4 个、三角瓶塞 3 个（2 小、1 大），练习包扎移液管 4 根，包扎玻璃培养皿 1 组，灭菌。

七、思考题

1. 为什么干热灭菌比湿热灭菌所需要的温度高、时间长？请设计干热灭菌和湿热灭菌效果比较的实验方案。

2. 高压蒸汽灭菌开始之前，为什么要将锅内冷空气排尽？灭菌完毕之后，为什么待压力降至“0”时才能打开排气阀开盖取物？

3. 你知道紫外线灯管是用什么玻璃制作的吗？为什么不用普通玻璃？

延伸阅读

1. 紫外线灭菌

紫外线灭菌是用紫外线灯进行的。波长为 200~300nm 的紫外线都有杀菌能力，其中以 260nm 的杀菌力最强。一方面，在波长一定的条件下，紫外线的杀菌效率与强度和时间的乘积成正比。紫外线杀菌机制主要是因为它诱导了胸腺嘧啶二聚体的形成和 DNA 链的交联，从而抑制了 DNA 的复制。另一方面，由于辐射能使空气中的氧电离成

[O], 再使 O_2 氧化生成臭氧 (O_3) 或使水 (H_2O) 氧化生成过氧化氢 (H_2O_2)。 O_3 和 H_2O_2 均有杀菌作用。紫外线穿透力不强, 所以, 只适用于无菌室、接种箱、手术室内的空气及物体表面的灭菌。紫外线灯距照射物以不超过 1.2m 为宜。

此外, 为了加强紫外线灭菌的效果, 在打开紫外线灯以前, 可在无菌室内 (或接种箱内) 喷洒 3% ~ 5% 的石炭酸溶液, 一方面使空气中附着有微生物的尘埃降落, 另一方面也可以杀死部分细菌。无菌室内的桌面、凳子可用 2% ~ 3% 的来苏尔擦洗, 然后再开紫外线灯照射, 即可增强杀菌效果, 达到灭菌目的。

2. 化学试剂灭菌

大多数化学药剂在低浓度下起抑菌作用, 高浓度下起杀菌作用。常用 5% 石炭酸、70% 乙醇和乙二醇等。化学灭菌剂必须有挥发性, 以便清除灭菌后材料上残余的药物。

化学灭菌常用的试剂有表面消毒剂、抗代谢药物 (磺胺类等)、抗生素、生物药物素。抗生素是一类由微生物或其他生物生命活动代谢过程中合成的次生代谢产物或人工衍生物, 它们在很低浓度时就能感染其他生物 (如病原菌等) 或抑制它们的生命活动, 因而可用作优良的化学治疗剂。

气体灭菌法, 是利用环氧乙烷或甲醛气体等杀灭微生物的一种方法。本办法主要用于玻璃制品、磁制品、金属制品、橡胶制品、塑料制品、纤维制品以及设施、设备或粉末状的医药品等。使用气体灭菌时, 被灭菌的物品不能发生变质是前提条件。药液灭菌法, 是用药液杀灭微生物的方法。本办法主要用于玻璃制品、磁制品、金属制品、橡胶制品、塑料制品、纤维制品等物品的灭菌, 还可用于手指、无菌箱或无菌设备等的消毒。药液灭菌用于未变质的物品。通常使用的有酒精 (70% ~ 75% 乙醇)、0.1% ~ 1% (w/v) 盐化苯类溶液、甲醛、苯酚水或福尔马林水等。

3. 超声波杀菌

超声波杀菌的机理是基于超声波生物、物理和化学效应。研究发现, 在含有空气或其他气体的液体中, 在超声波辐射下, 主要由于空化的强烈机械作用能有效地破坏和杀死某些细菌与病毒或使其丧失毒性。例如, 超声波作用可以破坏荧光细菌和大肠杆菌族的细菌, 伤寒沙门氏菌可以用 4.6MHz 频率的超声将其全部杀死。用 960kHz 的超声波在水溶液和生理盐水中作用于百日咳菌, 发现超声波对这些微生物