



国家示范性高等职业院校建设计划资助项目

应用微生物技术

实训指导

YINGYONG WEISHENGWU JISHU
SHIXUN ZHIDAO

主编 © 刘美杰



黄河出版传媒集团
宁夏人民教育出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

应用微生物技术实训指导/刘美杰主编. —银川:
宁夏人民教育出版社, 2010. 4
ISBN 978-7-80764-254-1

I. ①应… II. ①刘… III. ①微生物—生物技术
IV. ①Q93

中国版本图书馆CIP数据核字 (2010) 第045406号

应用微生物技术实训指导

刘美杰 主编

责任编辑 马明德
装帧设计 宁夏画报实业有限公司
责任印制 刘 佳

黄河出版传媒集团 出版发行
宁夏人民教育出版社

地 址 银川市北京东路139号出版大厦 (750001)
网 址 www.nxcbn.com
网上书店 www.hh-book.com
电子信箱 nxhhsz@yahoo.cn
邮购电话 0951-5014294
经 销 全国新华书店
印刷装订 宁夏华地彩色印刷厂

开本 787mm × 1092mm 1/16 印张 9.25 字数 150千
印刷委托书号 (宁) 0004316 印数 500册
版次 2010年3月第1版 印次 2010年3月第1次印刷
书号 ISBN 978-7-80764-254-1/G · 1189

定 价 17.00元

版权所有 翻印必究

**宁夏职业技术学院国家示范性
高职院校建设项目教材编写委员会**

主任

张怀斌 撒承贤

副主任

孔斌

委员

任全录 赵晓瑞 任杰 李慧云 马锦才

詹发荣 冷晓红 徐军 张敏 殷正行

编委会办公室主任

孔斌

编委会办公室副主任

任全录 吴轶勤 李强



前言

宁夏职业技术学院于 2007 年被国家教育部、财政部确定为国家一百所示范性高等职业院校立项建设单位。项目实施以来,学院以专业建设为龙头,围绕自治区经济发展战略定位。按照“专业对接市场、课程对接能力、质量对接需求”的理念,有针对性地设置和调整专业。积极实践工学结合、校企合作人才培养模式改革和课程体系改革。以“开放、合作、包容、共赢”为原则,与区域内近二百家企业实施校企合作、人才共育。在工作过程系统化的课程体系建构和工学结合专业课程建设中,以设备、工作对象、案例、典型产品等为载体,组织教学内容,实施教学,取得了一批标志性成果。为了推广在课程建设中取得的成效,决定编辑出版部分教材和实训指导书。

特别感谢合作企业给予学校的大力支持。由于编者水平所限和时间仓促,书中难免有不妥之处,恳请业内专家和广大读者指正。

宁夏职业技术学院国家示范性
高职院校建设项目教材编写委员会
2010 年 3 月 18 日

目录

CONTENTS

实训项目一	玻璃器皿的清洗、烘干、包扎	001
实训项目二	显微镜的构造及油镜的使用技术	005
实训项目三	细菌的染色技术	014
实训项目四	BPA 培养基的制备	022
实训项目五	消毒灭菌技术	029
实训项目六	细菌的接种及无菌操作技术	036
实训项目七	细菌与真菌的分离纯化技术	044
实训项目八	大肠杆菌生长曲线的测定技术	051
实训项目九	放线菌形态观察	056
实训项目十	土壤中放线菌的稀释分离技术	061
实训项目十一	酵母菌形态及菌落特征观察技术	067
实训项目十二	微生物数目直接测定技术	072
实训项目十三	霉菌的形态及菌落特征观察技术	078
实训项目十四	菌种保藏技术	083
实训项目十五	水中细菌总数的检测技术	088
实训项目十六	空气中微生物检测技术	094
实训项目十七	抗生素效价测定技术(管碟法)	099
实训项目十八	酸奶制作技术	106
实训项目十九	葡萄糖注射液的无菌检查	112
实训项目二十	银翘解毒片的微生物限度检查	119
附录一	微生物实训室实训规则	124
附录二	主要仪器使用操作规程与注意事项	127
附录三	有关试剂及培养基的配制	136
主要参考文献	142
后记	143

实训项目一 玻璃器皿的清洗、烘干、包扎

一、目的要求

- 1.掌握玻璃器皿等器材的清洗、烘干、包扎技术。
- 2.为下一次的课做好器材的准备工作。

二、技能目标

- 1.学会玻璃器皿的清洗、烘干和包扎。
- 2.能认识各种玻璃器皿并知道其用途。

三、基本原理

为确保微生物实验顺利地进行,要求把实验所用的玻璃器皿清洗干净。为保持灭菌后的无菌状态,需要对培养皿、吸管等进行包扎,对试管和三角瓶等加棉塞。这些工作看起来很普通简单,但如操作不当或不按操作规定去做,则会影响实验结果,甚至会导致实验的失败。

四、试剂和器材

试管、三角瓶、培养皿、吸管、棉线、纱布、棉花、牛皮纸、报纸、硅胶塞等。

五、操作步骤

(一)玻璃器皿的洗涤

1.新购玻璃器皿的洗涤

将器皿放入 2% 盐酸溶液中浸泡数小时,以除去游离的碱性物质,最后用流水冲净。

对容量较大的器皿,如大烧瓶、量筒等,洗净后注入浓盐酸少许,转动容器使其内部表面均沾有盐酸,数分钟后倾去盐酸,再以流水冲净,倒置于洗涤架上晾

干,即可使用。

2.常用旧玻璃器皿的洗涤

确实无病原菌或未被带菌物污染的器皿,使用前后,可按常规用洗衣粉水进行刷洗。

吸取过化学试剂的吸管,先浸泡于清水中,待到一定数量后再集中进行清洗。

3.带菌玻璃器皿的洗涤

凡实验室用过的菌种以及带有活菌的各种玻璃器皿,必须经过高温灭菌或消毒后才能进行刷洗。

(1)带菌培养皿、试管、三角瓶等物品,做完实验后放入消毒桶内,用 0.1MPa 灭菌 20 ~ 30min 后再刷洗。含菌培养皿的灭菌,底盖要分开放入不同的桶中,再进行高压灭菌。

(2)带菌的吸管、滴管,使用后不得放在桌子上,立即分别放入盛有 3% ~ 5% 来苏儿或 5% 石炭酸或 0.25% 新洁而灭溶液的玻璃缸(筒)内消毒 24h 后,再经 0.1MPa 灭菌 20min 后,取出冲洗。

(3)带菌载玻片及盖玻片,使用后不得放在桌子上,立即放入盛有 3% ~ 5% 来苏儿或 5% 石炭酸或 0.25% 新洁而灭溶液的玻璃缸(筒)内消毒 24h 后,用夹子取出经清水冲干净。

如用于细菌染色的载玻片,要放入 50g/L 肥皂水中煮沸 10min,然后用肥皂水洗,再用清水洗干净。

最后将载玻片浸入 95% 酒精中片刻,取出用软布擦干,或晾干,保存备用。

若用皂液不能洗净的器皿,可用洗液浸泡适当时间后再用清水洗净。

(4)含油脂带菌器材的清洗

单独高压灭菌:用 0.1MPa 灭菌 20 ~ 30min → 趁热倒去污物 → 倒放在铺有吸水纸的篮子上 → 用 100℃ 烘烤 0.5h → 用 5% 的碳酸氢钠水煮两次 → 再用肥皂水刷洗干净。

(二)玻璃器材的晾干或烘干

1.不急用的玻璃器材:可放在实验室中自然晾干。

2.急用的玻璃器材:把器材放在托盘中(大件的器材可直接放入烘箱中),再放入烘箱内,用 80℃ ~ 120℃ 烘干,当温度下降到 60℃ 以下再打开取出器材使用。

(三)灭菌前玻璃器皿的包扎

1.培养皿的包扎

培养皿由一盖一底组成一套,可用报纸将几套培养皿包成一包,或者将几套培养皿直接置于特制的铁皮圆筒内,加盖灭菌。包装后的培养皿须经灭菌之后才

能使用。

2. 移液管的包扎

在移液管的上端塞入一小段棉花(勿用脱脂棉),它的作用是避免外界及口中杂菌进入管内,并防止菌液等吸入口中。塞入此小段棉花应距管口 0.5cm 左右,棉花自身长度 1~1.5cm。塞棉花时,可用一外围拉直的曲别针,将少许棉花塞入管口内。棉花要塞得松紧适宜,吹时以能通气而又不使棉花滑下为准。具体见图 1-1。

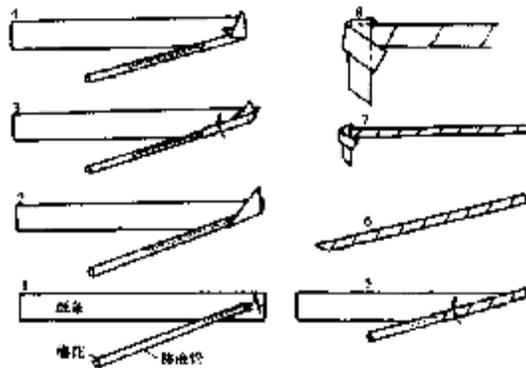


图 1-1 移液管的包扎

先将报纸裁成宽 5cm 左右的长纸条,然后将已塞好棉花的移液管尖端放在长条报纸的一端,约成 45° 角,折叠纸条包住尖端,用左手握住移液管身,右手将移液管压紧,在桌面上向前搓转,以螺旋式包扎起来。上端剩余纸条,折叠打结,准备灭菌。

3. 试管和三角瓶棉塞

试管和三角瓶都需要做合适的棉塞,棉塞可起过滤作用,避免空气中的微生物进入容器。制作棉塞时,要求棉花紧贴玻璃壁,没有皱纹和缝隙,松紧适宜。过紧易挤破管口和不易塞入,过松易掉落和污染。棉塞的长度不小于管口直径的 2 倍,约 2/3 塞进管口。

目前,国内已开始采用塑料试管塞,可根据所用的试管的规格和试验要求来选择和采用合适的塑料试管塞。

若干支试管用绳扎在一起,在棉花部分外包裹油纸或牛皮纸,再用绳扎紧。三角瓶加棉塞后单个用油纸包扎。

(1) 试管棉塞的制作

制棉塞时,应选用大小、厚薄适中的普通棉花一块,铺展于左手拇指和食指扣成的团孔上,用右手食指将棉花从中央压入团孔中制成棉塞,然后直接压入试管或三角瓶口。也可借用玻璃棒塞入,也可用折叠卷塞法制作棉塞。具体见图 1-2。

制作的棉塞应紧贴管壁,不留缝隙,以防外界微生物沿缝隙侵入,棉塞不宜过紧或过松,塞好后以手提棉塞,试管不下落为准。棉塞的 2/3 在试管内,1/3 在试管外。具体是否正确请参照图 1-3。目前也有采用硅胶塞代替棉塞直接盖在试管口上。

将装好培养基并塞好棉塞或硅胶塞的试管捆成一捆,外面包上一层牛皮纸。用记号笔注明培养基名称及配制日期,灭菌待用。

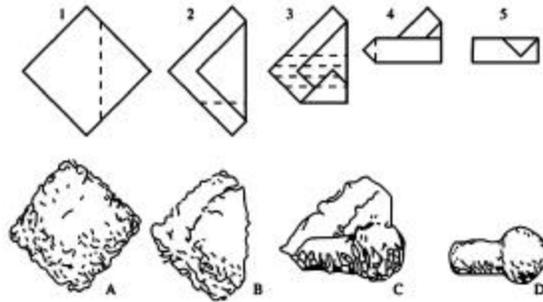


图 1-2 棉塞的制作步骤

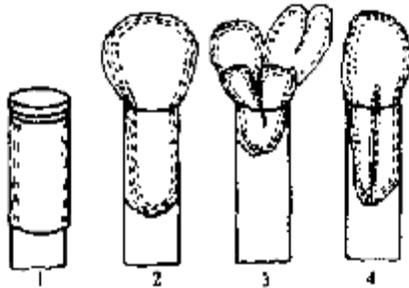


图 1-3 正确与不正确的棉塞

1.金属塞 2.正确 3.不正确 4.不正确

(2) 三角瓶棉塞制作

通常在棉塞外包上一层纱布,再塞在瓶口上。有时为了进行液体振荡培养加大通气量,则可用 8 层纱布代替棉塞包在瓶口上,目前也采用硅胶塞直接盖在瓶口上。

在装好培养基并塞好棉塞或包扎 8 层纱布或盖好硅胶塞的三角瓶口上,再包上一层牛皮纸并用线绳捆好,灭菌待用。

【思考题】

- 1.玻璃器皿清洗的注意事项有哪些?
- 2.请简述有菌玻璃器皿清洗的一般步骤。

实训项目二 显微镜的构造及油镜的使用技术

一、目的要求

- 1.掌握油镜的使用技术及维护方法。
- 2.熟悉普通光学显微镜的结构、各部分的功能和使用方法。

二、技能目标

- 1.会使用显微镜进行微生物的观察。
- 2.能使用油镜对微生物的形态进一步观察。
- 3.能认识显微镜各部件,并知道其用途。

三、试剂和器材

- 1.显微镜、香柏油、二甲苯、擦镜纸、吸水纸等。
- 2.细菌三种形态、酵母菌示教标本。

四、显微镜的基本结构及油镜的工作原理

微生物的最显著的特点就是个体微小,必须借助显微镜才能观察到它们的个体形态和细胞结构。熟悉显微镜并掌握其操作技术是研究微生物不可缺少的手段。

显微镜可分为电子显微镜和光学显微镜两大类。光学显微镜包括:明视野显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、偏光显微镜、荧光显微镜、立体显微镜等。其中明视野显微镜为最常用普通光学显微镜,其他显微镜都是在此基础上发展而来的,基本结构相同,只是在某些部分作了一些改变。明视野显微镜简称显微镜。

(一)显微镜的构造

普通光学显微镜的构造可以分为机械和光学系统两大部分,具体结构见图 2-1。

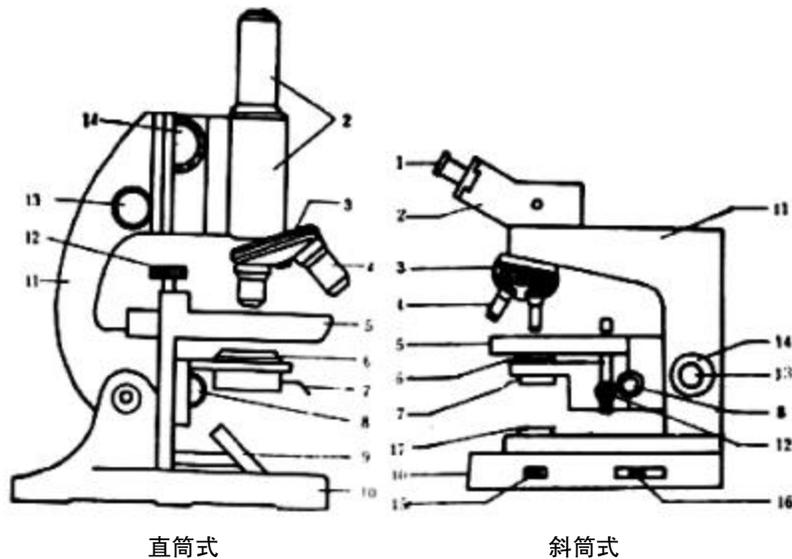


图 2-1 显微镜构造

- 1.目镜 2.镜筒 3.转换器 4.物镜 5.载物台 6.聚光器 7.虹彩光圈
8.聚光镜调节钮 9.反光镜 10.底座 11.镜臂 12.标本片移动钮
13.细调焦旋钮 14.粗调焦旋钮 15.电源开关 16.光亮调节钮 17.光源

1.机械系统

(1)镜座:在显微镜的底部,呈马蹄形、长方形、三角形等。

(2)镜臂:连接镜座和镜筒之间的部分,呈圆弧形,作为移动显微镜时的握持部分。

(3)镜筒:位于镜臂上端的空心圆筒,是光线的通道。镜筒的上端可插入接目镜,下面可与转换器相连接。镜筒的长度一般为 160mm。显微镜分为直筒式和斜筒式;有单筒式的,也有双筒式的。

(4)旋转器:位于镜筒下端,是一个可以旋转的圆盘。有 3~4 个孔,用于安装不同放大倍数的接物镜。

(5)载物台:是支持被检标本的平台,呈方形或圆形。中央有孔可透过光线,台上有用来固定标本的夹子和标本移动器。

(6)调焦旋钮:包括粗调焦钮和细调焦钮,是调节载物台或镜筒上下移动的装置。

2.光学系统

(1)接物镜筒称物镜,是由许多块透镜组成。其作用是将标本上的待检物进行放大,形成一个倒立的实像,一般显微镜有 3~4 种物镜,根据使用方法的差异可分为干燥系和油浸系两组。干燥系物镜包括低倍物镜(4~10x)和高倍物镜(40~45x),

使用时物镜与标本之间的介质是空气;油浸系物镜(90~100x)在使用时,物镜与标本之间加有一种折射率与玻璃折射率几乎相等的油类物质(香柏油)作为介质。具体见图 2-2。

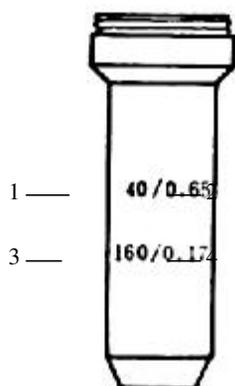


图 2-2 物镜的各种标记

1.放大倍数 2.数值口径 3.镜筒长度要求 4.指定盖玻片厚度

(2)接目镜:通常称为目镜,一般由 2~3 块透镜组成。其作用是将由物镜所形成的实像进一步放大,并形成虚像而映入眼帘。一般显微镜的标准目镜是 10x。

(3)聚光镜:位于载物台的下方,由两个或几个透镜组成,其作用是将由光源来的光线聚成一个锥形光柱。聚光镜可以通过位于载物台下方的聚光镜调节旋钮进行上下调节,以求得最适光度。聚光器还附有虹彩光圈,以调节锥形光柱的角度和大小,来控制进入物镜的光的量。

(4)反光镜:反光镜是一个双面镜,一面是平面,另一面是凹面,起着把外来光线变成平行光线进入聚光镜的作用。使用内光源的显微镜就无需反光镜。

(5)光源:日光和灯光均可,以日光较好,其光色和光强都比较容易控制,有的显微镜采用装在底座内的内光源。

(二)显微镜的成像原理

显微镜的放大作用是由物镜和目镜共同完成的。标本经物镜放大后,在目镜的焦平面上形成一个倒立实像,再经目镜进一步放大形成一个虚像,被人眼所观察到(图 2-3)。

在油镜系中,载玻片与镜头之间多用香柏油作介质。因香柏油的折射率($n=1.51$)与玻璃的折射率($n=1.52$)几乎相等,故透过载玻片的光线通过香柏油后,直接进入物镜,而不发生折射。两组物镜光线通路的区别如图 2-4 所示。

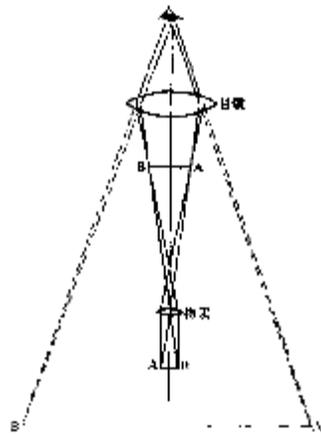


图 2-3 显微镜成像原理

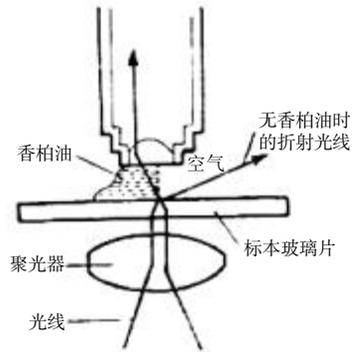


图 2-4 物镜光线通路

(三)显微镜的性能

1.分辨率和数值口径

衡量显微镜性能好坏的指标主要是显微镜的分辨率，显微镜的分辨率是指显微镜将样品上相互接近的两点清晰分辨出来的能力。它主要取决于物镜的分辨能力，物镜的分辨力是所用光的波长和物镜数值口径的函数。分辨率用镜头所能分辨出的两点间的最小距离表示，距离越小，分辨能力越好。可用公式表示：

$$D = \frac{1}{2} \frac{\lambda}{N.A}$$

物镜的数值口径，简称为 (N.A)：表示从聚光镜发出的锥形光柱照射在观察标本上，能被物镜所聚集的量。可用公式表示：

$$N.A = n \sin \theta$$

式中 n ——标本和物镜之间介质的折射率；

θ ——由光源投射到透镜上的光线和光轴之间的最大夹角。

光线投射到物镜的角度越大，数值口径就越大。如果采用一些高折射率的物质作介质，如使用油镜时采用香柏油作介质，则数值口径增大，从而提高分辨能力。物镜镜筒上标有数值口径，低倍镜为 0.25，高倍镜为 0.65，油镜为 1.25。这些数值是在其他条件都适宜的情况下的最高值，实际使用时，往往低于所标的值。

2.放大倍数、焦距和工作距离

显微镜的放大倍数是物镜和目镜放大倍数的乘积。放大倍数一样时,由于目镜和物镜搭配不同,其分辨率也不同。一般来说,增加放大倍数应该是尽量用放大倍数高的物镜。物镜的放大倍数越大,焦距越短,物镜和样品之间的距离(工作距离)便越短。

五、显微镜的使用操作步骤

1.观察前的准备

显微镜的安置:取放显微镜时应一手握住镜臂、一手托住底座,使显微镜保持直立、平稳。置显微镜于平整的实验台上,镜座距实验台边缘 3 ~ 4cm。镜检时姿势要端正。

检查零件是否齐全,镜头是否清洁。

接通电源,根据所用物镜的放大倍数,调节光亮度调节钮和虹彩光圈的大小,使视野内的光线均匀、亮度适宜。

2.显微观察

(1)接通电源。一般情况下,对于初学者,进行显微观察时应遵从低倍镜到高倍镜再到油镜的观察程序,因为低倍镜视野较大,易发现目标及确定检查的位置。

(2)低倍镜观察。将做好的细菌标本片固定在载物台上,用标本夹夹住,移动推进器使观察对象处在物镜的正下放。转动物镜转换器,将 10x 物镜调至光路中央。旋转粗调焦钮将载物台升起,从侧面注视小心调节物镜接近标本片,然后用目镜观察,慢慢降载物台,使标本在视野中初步聚焦,再使用细调节钮调节并使图像清晰。通过玻片夹推进器慢慢移动玻片,认真观察标本各部位,找到合适的物像,仔细观察并记录所观察的结果。调焦时应只降载物台,以免一时的误操作而损坏镜头。注意无论使用单筒显微镜还是双筒显微镜均应双眼同时睁开观察,以减少眼睛的疲劳,这样也便于边观察边绘图记录。

(3)高倍镜观察。在低倍镜下找到合适的观察目标并将其移至视野中心,轻轻转动物镜转换器将高倍镜移至工作位置。对聚光镜光圈及视野亮度进行适当调节后,微调细调节钮使物像清晰,仔细观察并记录。

(4)油镜观察。在高倍镜或低倍镜下找到要观察的样品区域,用粗调焦钮先降载物台,然后将油镜转到工作位置。在待观察的样品区域加一滴香柏油,从侧面注视,用粗调节钮将载物台小心地上升,使油镜浸在香柏油并几乎与标本片相接。将聚光镜升至最高位置并开足光圈。慢慢地降载物台至视野中出现清晰图像为止,仔细观察并做记录。

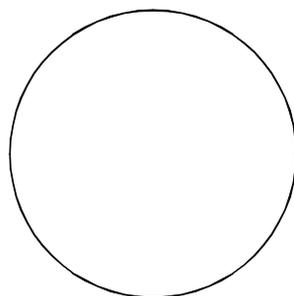
3.显微镜的维护

- (1)观察结束后,先降载物台,取下载玻片。
- (2)用擦镜纸分别擦拭物镜和目镜。
- (3)用擦镜纸拭去镜头上的油,然后用擦镜纸蘸少许二甲苯擦去镜头上残留的油迹,最后再用干净的擦镜纸擦去残留的二甲苯。
- (4)清洁显微镜的金属部件。
- (5)将各部分还原,将物镜转成“八”字形,同时把聚光镜降下,以免物镜和聚光镜发生碰撞危险。
- (6)罩上防尘套,把显微镜放回原处。

四、实训步骤

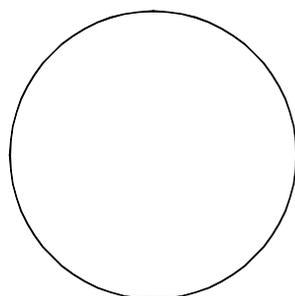
五、实训结果及分析

- 1.对照实物，熟悉显微镜的构造。
- 2.按显微镜的使用方法，分别用低倍镜和高倍镜对细菌细胞示教标本进行观察。
- 3.画图并说明。



形状：
排列：
染色性：

金黄色葡萄球菌



形状：
排列：
特殊结构：

大肠杆菌