



“十二五”国家立项重点专业和课程规划系列教材

SHIERWU GUOJIA LIXIANG ZHONGDIAN ZHUANYE HE KECHENG GUIHUA XILIE JIAOCAI

生物工程专业类实践教学系列教材

应用微生物学 实验

张 恒 总主编

赵玉萍 方 芳 主 编

9-33.....



东南大学出版社
SOUTHEAST UNIVERSITY PRESS

“十二五”国家立项重点专业和课程规划系列教材
生物工程专业类实践教学系列教材

应用微生物学实验

张 恒 总主编

赵玉萍 方 芳 主 编

东南大学出版社

• 南京 •

内 容 提 要

微生物学实验是一门实践性课程,实验教材是指导学生上好实验课的重要工具。作为国家特色专业、江苏省重点专业类建设成果和江苏省高等教育教学改革重点项目研究成果,本书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与当前生产实践、生物工程应用有关的新技术。

全书包括微生物学实验须知,微生物显微及染色技术,微生物的分离纯化、培养和保藏技术及设计型、综合型和探究型实验几部分。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。

本书可作为高等院校微生物学基础实验课教材,此外也可作为从事微生物工作的有关教学及科研人员的实验参考书。

图书在版编目(CIP)数据

应用微生物学实验 / 赵玉萍,方芳主编. —南京:
东南大学出版社,2013. 11

“十二五”国家立项重点专业和课程规划系列教材
生物工程专业类实践教学系列教材/张恒总主编

ISBN 978-7-5641-4570-5

I. ①应… II. ①赵… ②方… III. ①微生物学—应
用—实验—高等学校—教材 IV. ①Q939.9-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 235864 号

应用微生物学实验

主 编	赵玉萍 方 芳	责任编辑	陈 跃
电 话	(025)83795627/83362442(传真)	电子邮箱	chenyue58@sohu.com
出版发行	东南大学出版社	出 版 人	江建中
社 址	南京市四牌楼 2 号	邮 编	210096
销售电话	(025)83794121/83795801		
网 址	http://www.seupress.com	电子邮箱	press@seupress.com
经 销	全国各地新华书店	印 刷	江苏省测绘院印刷厂
开 本	787 mm×1092 mm 1/16	印 张	7.25
字 数	181 千字		
版 次	2013 年 11 月第 1 版		2013 年 11 月第 1 次印刷
书 号	ISBN 978-7-5641-4570-5		
定 价	16.00 元		

本社图书若有印装质量问题,请直接与营销部联系。电话:025-83791830。

序

生物工程是20世纪70年代初开始兴起的一门新兴的综合性应用学科,该学科是以生物学特别是微生物学及生物化学的理论和技術为基础,结合化工、机械、电子、计算机等现代工程技术,充分运用分子生物学的最新成就,自觉地操纵遗传物质,定向地改造生物或其功能,通过合适的生物反应器对这类“工程菌”或“工程细胞株”进行大规模的培养,生产大量有用代谢产物并发挥其独特生理功能。目前,生物工程技术已广泛渗透到食品、医药、农业、环境、化工等领域,它的广泛应用使传统食品、发酵、饲料等工业领域的生产工艺与手段发生根本性变革。

根据江苏省“十二五”规划纲要以及十大战略性新兴产业重点发展要求,淮阴工学院实施建设了生物工程重点专业类。该专业类是由生物工程、食品科学与工程、食品质量与安全三个专业组成。在重点专业类建设中,我们始终坚持以满足经济社会发展需求为导向,以提升专业人才培养质量为目的,以国家特色专业建设点、江苏省特色专业——生物工程核心专业为基础,将学科基础、知识结构体系、行业技术基础、教学资源相近的食品科学与工程、食品质量与安全专业进行深度交叉融合,作为专业类重点建设的目标,以带动相关专业整体水平的提高。

生物工程类相关专业学科基础和实践环节是在同一平台上实施的,首先,它可以起到深化专业交叉融合、拓宽专业面、增强适应性、拓展应用领域、相互促进、共同发展的作用,并使得相关专业的建设得到较快、全面的提升,形成较完整的专业类特色。其次,在搭建有效地实践教学大平台上,可实现平台资源共享。其三,注重专业间的交叉渗透融合,发挥专业类建设的优势,为区域经济建设提供强有力的人才支撑。

工科专业实践性很强,实践教学占有相当重要的地位。按照人才培养要求,除了在办学定位、人才培养模式、实践教学平台构建等方面凸显工程特色以外,与之匹配的工程类系列教材是不可缺少的。现有的课程实验教材基本沿用传统的课程理论教学体系,工程特色不明显,尚缺乏能覆盖专业所有实践环节、知识点全面、规范性、凸显应用型的实践教学系列教材,且适合于认识实习、生产实习等实践环节的教材则很难寻觅。建设与工程实践环节匹配的系列教材,是解决上述矛

盾的有效途径。

《生物工程专业类实践教学系列教材》是由《应用生物化学实验》、《应用微生物学实验》、《生物工程专业类实习指导书》和《生物工程专业类专业实验》等四册教材构成,涵盖专业基础课、专业课、工程实习、综合训练、毕业设计等专业实践教学各环节,是国家特色专业建设成果、江苏省重点专业类建设成果和江苏省高等教育教学改革重点项目研究成果。本系列教材以应用型人才培养为目标,以生物工程、食品工程、制药工程、环境工程、新能源科学与工程(生物质能)等工科相关专业为对象,以基本理论、知识、技能以及思想性、科学性、先进性、启发性、知识性为要求,融入了编者的教学经验和部分科研成果,突出地方本科院校的应用特征,力求实现教材内容的准确性、系统性、实用性和新颖性。

本系列教材的编写和出版是一次尝试,难免会出现疏漏和错误,恳请读者提出批评意见,以便今后修改和订正。

总主编 张恒

2013年10月

前 言

微生物学实验是一门实践性课程。本教材通过一系列的实验,使学生掌握微生物学实验的基本操作、基本技能,培养学生的实验设计思路,提高实验操作水平和数据分析的能力,并将所学的微生物理论知识有机结合起来,为微生物的实际应用打下坚实基础。而实验教材是指导学生上好实验课的重要工具。近年来,随着微生物学的迅速发展及其在多个领域的不断渗透,无论在理论研究还是在实际应用,尤其是微生物学教学改革实施,新的培养目标和教学大纲的要求等方面,都要求有更实用和新颖的微生物学实验教材做基垫。

本教材以本科应用型学历教育为特定目标,以生物工程、食品科学与工程、农业工程、制药工程、环境工程等工科相关专业为特定对象,融入了编者的教学经验和部分科研内容,突出微生物学基础理论的应用特征,力求使教材内容体现新颖、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,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与当前生产实践、生物工程应用有关的新技术。目的在于编出适合现在教学改革特点、适合现代教学方式与学习方法、给学生提供高水平知识源泉的教材。本教材是国家特色专业建设成果、江苏省重点专业类建设成果和江苏省高等教育教学改革重点项目研究成果。

全书共有 22 个实验,分四部分,包括微生物学实验须知,微生物显微及染色技术,微生物的分离纯化、培养和保藏技术及设计型、综合型和探究型实验。本书第一部分主要介绍微生物实验所需的常用器皿和仪器,以及注意事项,同时列出了一些染色液及培养基的配方。第二部分主要介绍了光学显微镜和电子显微镜的使用,细菌、放线菌、酵母和霉菌形态观察的方法,以及测定微生物大小和数目的方法。第三部分主要介绍了培养基如何配制、消毒和灭菌,微生物的接种技术和培养特征观察,以及如何分离纯化和保藏微生物。第四部分为设计型、综合型和探究型实验,涉及内容较广,主要包括检测、培养或观察一些食品、农业和环境工程中的微生物。通过这些实验,可以提高学生的创新意识和创新能力,有利于培养学生的动手能力和实际应用能力,有利于提高学生的综合素质。书中的各个

实验相对独立,可根据具体情况酌情选做,也可作为从事微生物工作的有关教师及科研人员的实验参考书。

本教材编写人员多年从事微生物学理论与实验教学,具有丰富的工作经验。全书由赵玉萍和方芳编写,在编写过程中,参考了许多国内外出版的书籍、网站的相关内容,同时得到淮阴工学院生命科学与化学工程学院领导和教师们的大力支持,并提出了许多宝贵的意见和建议,使得编写工作得以顺利完成,在此一同表示感谢。

限于编者的水平,书中难免存在不当之处,请批评指正。

编者

2013年10月

目 录

前言	1
第一章 微生物学实验须知	1
一、安全注意事项	1
二、微生物检验员工作职责	1
三、微生物实验室常用器皿	2
四、微生物实验室主要器皿和用具的洗涤方法	4
五、微生物实验室常见仪器设备介绍	7
六、常用染色液及其试剂配制	10
七、常用培养基的制备	12
八、各国主要菌种保藏机构	15
第二章 微生物显微及染色技术	16
实验一 普通光学显微镜的使用与细菌形态观察	16
实验二 细菌的简单染色与革兰氏染色	21
实验三 细菌特殊结构染色法(附运动性观察)	26
实验四 放线菌的形态观察(含电镜观察)	30
实验五 酵母的形态观察及死活细胞的鉴别	35
实验六 霉菌的形态观察	38
实验七 微生物测微技术	41
实验八 微生物直接计数法	43
第三章 微生物的分离纯化、培养和保藏技术	46
实验九 培养基的配制	46
实验十 培养基及器皿的消毒和灭菌	50
实验十一 微生物的接种技术和培养特征观察	53
实验十二 土壤中细菌、放线菌和霉菌计数分离纯化及保藏	57
第四章 设计型、综合型和探究型实验	68
实验十三 微生物育种	68
实验十四 微生物生长的测定	72
实验十五 水和食品中细菌总数及大肠菌群的检测	75

实验十六	细菌的分布及外界因素对细菌的影响	84
实验十七	生活垃圾可发酵物降解菌的筛选	91
实验十八	酸奶中混合益生菌的分离及鉴定	94
实验十九	杀虫微生物——苏云金芽孢杆菌的发酵生产	96
实验二十	活性污泥絮状体及其生物相的观察	100
实验二十一	内生真菌的分离和鉴定	101
实验二十二	传统酱类食品的微生物状况分析	105
参考文献		107

第一章 微生物学实验须知

一、安全注意事项

(1) 使用显微镜和其他贵重仪器时,应事先熟知操作规程,要细心操作,特别爱护。遇到仪器故障时请任课教师帮助解决,切勿擅自拆卸。对消耗材料和药品等要力求节约,用毕后仍放回原处。

(2) 实验过程中,切勿使乙醇、乙醚、丙酮等易燃药品接近火焰。如遇火险,应关闭电源,用湿布或沙土阻燃灭火,必要时使用灭火器。

(3) 实验时小心仔细,全部操作应严格按操作规程进行,万一遇到盛有菌的试管或三角瓶不慎打破、皮肤破伤或菌液吸入口中等意外情况发生时,应立即报告指导教师,及时处理,不得隐瞒,以免酿成后患。

(4) 每次实验需进行培养的材料,应标明自己的组别及处理方法,放于教师指定的地点进行培养。未经教师同意,实验室中的任何菌种和物品不得携出室外。

(5) 每次实验的结果,应实事求是填入报告表格中,有疑难问题向教师求教。对于需要连续观察的实验,则需记下每次观察的现象和结果,以便进行综合分析。

(6) 每次实验完毕后,必须把所有的仪器抹净放妥,将所用玻璃器皿清洗干净,放回指定地点,将实验室收拾整齐。如桌面或其他地方被菌液污染时,可用 3% 来苏尔液或 5% 石炭酸液覆盖 1.5 h 后擦去,如芽孢杆菌,应适当延长消毒时间。凡带菌之工具(如吸管、塑料吸嘴、玻璃刮棒、染色涂片等)在洗涤前须浸泡在 3% 来苏尔液中进行消毒后再清洗。

(7) 离开实验室之前将手洗净,注意关闭门窗、水、电和气等。

二、微生物检验员工作职责

(1) 按标准对成品、原料、辅料进行取样,做好取样记录,进行微生物限度实验。

(2) 按《中国药典》及公司质量标准对厂房、设备等硬件设施定期进行微生物监测。

(3) 按照检验标准及岗位标准作业程序(Standard Operation Procedure, SOP),对微生物进行检验。

(4) 对仪器、试剂的使用做到规范操作和登记,对实验过程进行记录,保证检测结果的准确性。

(5) 定期对微生物实验的检测数据进行统计分析。

(6) 负责微生物实验室的卫生维护,仪器和试剂的购买申请。定期维护和保养仪器设备;负责微生物检验用培养基、稀释液等的配制,消毒和贮存。

(7) 严格遵守安全操作规程,认真做好安全防护工作,确保安全检测。严格执行国家菌种和有毒菌种管理规定,认真登记,按期传代、鉴定。做好有关检验记录,制定严格的有毒菌种管

理细则,防止意外事故发生。

(8) 做好相关验证工作,包括检查相关仪器、设备验证方案、微生物检查分析方法验证方案的执行,验证项目数据汇总,配合品质保证(Quality Assurance, QA)进行相关验证项目的实施等。

(9) 做好生产质量管理规范(Good Manufacturing Practice, GMP)文件管理工作,包括微生物检验标准操作规程的起草,所用仪器、设备标准操作规程的起草,相关记录格式的起草等。

三、微生物实验室常用器皿

微生物实验室常用器皿有培养皿和锥形瓶(用于微生物的培养)、试管(用于微生物的保存和菌液的稀释等)、吸管(用于吸取菌液)等,使用前一般需经洗涤、包装、灭菌(干热或湿热)后才能使用,因此对其质量、洗涤和包装方法均有一定的要求。一般玻璃器皿选用硬质玻璃方可耐受高温($121\text{ }^{\circ}\text{C}$)、高压(0.1 MPa)和短时火焰灼烧,以下对实验常用器皿的类别、规格和使用进行介绍:

1. 试管(test tube)

微生物学实验所用的试管为直口(勿使用翻口,以防止外界空气进入造成污染);盛装培养基时需加盖棉塞或塑料帽、铝帽、硅胶泡沫塑料塞。

根据用途和大小(一般是用管外径与管长的乘积来表示)分为三种:

(1) 大试管($18\text{ mm}\times 180\text{ mm}$): 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。

(2) 中试管($15\text{ mm}\times 150\text{ mm}$): 可用于制备琼脂斜面、盛液体培养基,也可用于菌液、病毒悬液的稀释及血清学试验。

(3) 小试管($10\sim 12\text{ mm}\times 100\text{ mm}$): 一般用于细菌或酵母菌的糖发酵试验或血清学试验。

2. 烧杯(beaker)与三角烧瓶(erlenmeyer flask)

常用的烧杯容积分别为 50 mL 、 100 mL 、 250 mL 、 500 mL 和 $1\text{ }000\text{ mL}$ 等,主要用于配制培养基和各种溶液。三角烧瓶的容积有 100 mL 、 250 mL 、 500 mL 和 $1\text{ }000\text{ mL}$ 等,主要用于盛装无菌水、琼脂固体培养基和液体培养基。

3. 培养皿(petri dish)

在微生物学实验中,培养皿是进行微生物培养、分离纯化、菌落形态观察、菌落计数、遗传突变株筛选、噬菌斑形成、基因工程菌株筛选等最常用的器皿。培养皿材质基本上分为两类,主要为塑料材质和玻璃材质。塑料可能是聚乙烯材料,有一次的和多次使用的。培养皿(图 1-1)由一个底和一个盖组成。

一般常用的培养皿,皿底直径 90 mm ,高 15 mm ,皿盖和皿底均为玻璃材质。用于抗生素生物效价测定时,培养皿不能倒置培养,为防止培养时皿盖冷凝水滴下,需选用陶瓦盖。

4. 德汉式小管(Durham tube,又称杜氏小管)

一种用于观察细菌在糖发酵培养基内产气情况的小套管($6\text{ mm}\times 36\text{ mm}$),倒置于盛有液体培养基的试管或三角烧瓶内(图 1-2)。

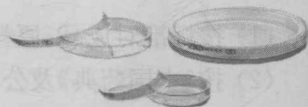


图 1-1 培养皿

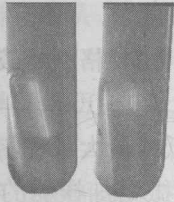


图 1-2 杜氏小管



图 1-3 Eppendorf 管

5. Eppendorf 管

这类管又称小塑料离心管(图 1-3)。有多种型号,如 0.2 mL,0.5 mL,1.5 mL,2.0 mL。主要用于微生物分子生物学实验中少量菌体的离心、DNA 和 RNA 的提取等。

6. 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、10 mL 和 25 mL,是一种精密计量液体的仪器,用于吸取菌悬液或其他溶液(图 1-4)。

刻度玻璃吸管的使用方法:

① 使用前 观察吸管有无破损,污渍。观察吸管的规格:所用吸管的规格应等于或近似等于所要吸取溶液的体积。观察有无“吹”字:若有,说明刻度到尖端,放液后需将尖端的溶液吹出,否则不吹。

② 握法 拇指和中指夹住吸管,食指游离。

③ 取液 垂直入液,入液深度适中,洗耳球吸取,取液高度高于刻度 2~3 cm,食指按紧吸管上端,刻度吸管提离液面,观察液内无气泡,则擦净管壁。

④ 放液至刻度 刻度吸管垂直,右眼与刻度线平行,轻轻松开食指(转动刻度吸管),使液面缓慢降低,直至最低点与刻度线相切。

⑤ 放液至容器 刻度吸管垂直,容器倾斜 45 °,使溶液自然流入容器,注意吹与不吹。

⑥ 一根吸管只吸取一种试剂,用后立即浸入水中。

刻度玻璃吸管的读数方法:

① 在吸液与读数时保持吸管垂直。

② 读数时保持液面与双眼成一水平线。

③ 液体在吸管中因表面张力作用会形成一个凹面,读数时要取凹面底部的数值。

注意在吸取不计量的液体,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,即滴管(图 1-5)。

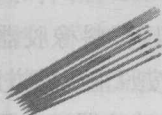


图 1-4 玻璃吸管



图 1-5 滴管



图 1-6 微量加样器

(2) 微量加样器(micropipette)

微量加样器又称微量吸管(图 1-6),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 μL 、2~20 μL 、20~100 μL 等。加样器只能在特定量程范围内准确移取液体,不可超过量程使用,如超出最低或最大量程,会损坏加样器并导致计量不准。使用时:① 将合适的塑料吸嘴(tip)牢固地套在微量加样器的下端;② 旋动调节键,使数字显示器显示出所需吸取的体积;③ 手握移液器,大拇指按下按钮,直到遇到一个阻力即第一止点位置,将加样器垂直浸入液面 2~3 mm,然后缓慢平稳地松开拇指,慢慢吸入液体,注意不要有气泡,尽量避免使用加样器吸取腐蚀性液体,防止由于过快吸入造成腐蚀性液体溅到加样器杆上,造成加样器被腐蚀;④ 释放液体:将枪头头部靠在容器壁上,并保持 10~40° 倾斜,平稳地把按钮压到第一停点,即第一阻力点,停 1~2 s,继续按压到第二停点,排除残余液体;⑤ 提起加样器,同时松开按钮,使之回到起始位置;⑥ 按压卸枪头按钮去除吸头,将吸头弃在废液缸内;⑦ 使用完毕,将加样器调到最大量程,这样有利于加样器的保养。

注意:改用不同样本时必须更换吸头。移液器必须卸下枪头后才能放到桌面上,防止吸头内未释放完的液体回流至移液器内。微量移液器应每年做定期校准,以保证其精确性。

7. 载玻片(slide)与盖玻片(cover slip)(图 1-7)

普通载玻片为长方形,大小为 75 mm×25 mm,常用于微生物涂片、染色进行形态观察及免疫学中的凝集反应等。盖玻片是盖在载玻片上的材料,可以避免液体和物镜相接触,以免污染物镜,并且可以使被观察的细胞最上方处于同一平面。

凹玻片是在中央有一圆形凹窝的厚载玻片(图 1-8),用于制作悬滴片进行细菌运动的观察或微室培养等。



图 1-7 载玻片与盖玻片

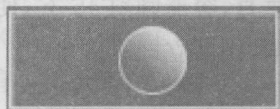


图 1-8 凹玻片



图 1-9 双层瓶

8. 双层瓶(double bottle)

由内外两个玻璃瓶组成(图 1-9),内层小锥形瓶内盛香柏油,滴加在细菌经染色后的涂片上,进行油镜观察。外层瓶盛有二甲苯,用于擦拭油镜头。

9. 滴瓶(dropper bottle)

用来盛装各种染液、无菌水等。

四、微生物实验室主要器皿和用具的洗涤方法

微生物实验室主要器皿、用具按材质主要分为四种:玻璃器皿、塑料橡胶器皿、金属用品、搪瓷制品。根据材质用途不同,洗涤也不相同。实验室人员必须按照正确的方法洗涤,才能使实验用品保持完好无损坏以及保证实验结果准确。微生物实验室玻璃器皿主要有:培养皿、刻度吸管、玻璃棒、载玻片、盖玻片、烧杯、量筒、锥形瓶、胶头滴管、试管、表面皿等。实验室塑料

橡胶器皿主要有:移液器、吸头、橡胶塞。实验室金属用品主要有:药匙、接种环、镊子、剪刀、试管架、平皿筒、不锈钢滚珠、刀片、消毒盒、铝箔纸。实验室常用搪瓷制品是蒸发皿。

(一) 常用清洁剂和洗液

1. 清洁剂及适用范围

主要有:肥皂、洗衣粉、洗洁精。可用于用刷子直接刷洗的器皿,如培养皿、烧杯、锥形瓶、玻璃棒、试管、表面皿等。如污物较难清洗,可用温水加上清洁剂浸泡一段时间,再进行刷洗。

2. 洗液特性及配制方法

对于不使用毛刷清洗或清洗不干净的器皿或较精密的量器,可配制下述清洗液进行化学清洗。

(1) 强酸氧化剂洗液

① 配制方法:用重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)和浓硫酸(H_2SO_4)配成。配制浓度各有不同,从5%~12%的各种浓度都有。配制方法大致相同:取一定量的 $K_2Cr_2O_7$ (工业品即可),先用约1~2倍的水加热溶解,稍冷后,将工业品浓 H_2SO_4 所需体积数徐徐加入 $K_2Cr_2O_7$ 溶液中(千万不能将水或溶液加入 H_2SO_4 中),边倒边用玻璃棒搅拌,并注意不要溅出,混合均匀,等冷却后,装入洗液瓶备用。新配制的洗液为红褐色,氧化能力很强。当洗液用久后变为黑绿色,即说明洗液无氧化洗涤力,但可加入固体高锰酸钾使其再生。

② 洗液特点: $K_2Cr_2O_7$ 在酸性溶液中有很强的氧化能力,对玻璃仪器又极少有侵蚀作用,所以这种洗液在实验室内使用最广泛。

③ 注意事项:这种洗液在使用时一定要注意不能溅到身上,以防烧破衣服和损伤皮肤。将洗液倒入要洗的仪器中,应使仪器周壁全浸洗后稍停一会再倒回洗液瓶。第一次用少量水冲洗刚浸洗过的仪器,废水不要倒在水池或下水道里,否则会腐蚀水池和下水道,应倒在废液缸中。

(2) 高锰酸钾的碱性溶液

① 配制方法:将20 g高锰酸钾溶于50 mL水中,再加入300 mL 0.5 mol/L氢氧化钠溶液,然后倒入瓶中,用蒸馏水清洗烧杯里残留的高锰酸钾,用蒸馏水稀释至500 mL,盖上瓶盖,贴上标签。

② 洗液特点:适于洗涤带油污的玻璃器皿,但余留的二氧化锰沉淀物需用盐酸或盐酸加过氧化氢洗去。由于它对有机污迹的去除能力强、速度快,并且较铬酸洗液相比,它腐蚀性小,毒性小,配制简单、安全。

③ 注意事项

- 碱性高锰酸钾洗液虽然比铬酸洗液安全,但是沾到皮肤上会形成二氧化锰,不易洗去;
- 由于高锰酸钾的碱性溶液在光照时会分解,所以需装在棕色瓶中避光保存;
- 同大多数碱一样,碱性高锰酸钾洗液对玻璃也是有腐蚀性的,尤其是仪器的磨口部分,在清洗时,它的磨口应尽量不要长时间浸泡;
- 使用一段时间后, $KMnO_4$ 洗液会变成浅红或无色,底部有时出现 MnO_2 沉淀,这时洗液已不具有强氧化性,不能再继续使用。

(3) 硝酸-过氧化氢洗液

① 配制方法:15%~20%的硝酸加等体积的5%过氧化氢。

② 洗液特点:适用于特别油污的玻璃器皿。

③ 注意事项:久存易分解,现用现配,如需储存,应存放于棕色瓶中。

(4) 盐酸乙醇溶液

① 配制方法:1份盐酸和2份乙醇的混合物。

② 洗液特点:用以洗涤有机试剂染色的器皿。

(二) 玻璃器皿的洗涤

1. 新购玻璃器皿的洗涤

新购置的玻璃器皿中含有游离碱,长期使用后内壁会析出乳白色的碱膜,器皿变得不透明,影响观察,同时也会影响培养基的酸碱度。因此,使用前先用自来水简单刷洗,然后在2%稀盐酸溶液中浸泡数小时,取出后用纯化水冲洗干净,晾干备用。新的载玻片和盖玻片,先用肥皂水洗净,随后用2%稀盐酸溶液浸泡1h,再用蒸馏水冲洗干净,浸入酸化的95%的酒精中,使用时取出晾干或在火焰上烧去酒精即可。

2. 使用过的玻璃器皿的洗涤方法

洗刷玻璃仪器时,应首先将手用肥皂洗净,以防手上的油污附在仪器上,增加洗刷的困难。如仪器沾有微生物应先在2%来苏尔(煤酚皂)溶液或0.25%新洁尔灭消毒液中浸泡24h后,或用高压蒸汽灭菌,或放入沸水中煮沸以杀死微生物再进行洗涤。根据仪器上污染物性质选择常用清洁剂和洗液洗涤。如用洗衣粉,将刷子蘸上少量洗衣粉,将仪器内外全刷一遍,再边用水冲边刷洗至肉眼看不见有泡沫时,用自来水洗3~6次,再用蒸馏水洗3次。如用碱性高锰酸钾洗液,一般油污可直接用它浸泡10~15min后,再用草酸-盐酸洗液洗净即可,但遇到沉淀的硫或者其他难洗的污迹,可在温水水浴中用碱性高锰酸钾洗液浸泡半小时,再用草酸-盐酸洗液洗净。如用硝酸-过氧化氢洗液处理油污、肮脏的玻璃器皿可浸泡20min或更长时间,因为其对玻璃器皿无腐蚀作用。洗液不能加热,防止洗液失效。浸泡后,用自来水充分冲洗。冲洗干净后,再用蒸馏水冲洗3次。一个洗干净的玻璃仪器,应该以挂不住水珠为度。如仍能挂住水珠,仍然需要重新洗涤。用蒸馏水冲洗时,要用顺壁冲洗方法并充分振荡,经蒸馏水冲洗后的仪器,用指示剂检查应为中性。

注意:(1)玻璃吸管、吸过糖溶液、染液、血液、血清、菌液(非致病菌)的玻璃吸管和毛细吸管,使用后应立即投入底部垫有脱脂棉或玻璃棉、盛有自来水的量筒或标本瓶内,以免干燥后难以冲洗干净。若吸管顶部塞有棉花,应先用牙签或尖嘴自来水龙头将棉花取出,再进行洗涤。风干或烘干备用。(2)用过的载玻片与盖玻片,如涂有活菌和致病菌的应经消毒液处理24h后,方可进行洗涤。如滴有香柏油,应先用卫生纸擦去油面,再用浸有二甲苯的脱脂棉擦拭,溶解油垢。在湿热的含洗洁精的水中用纱布或脱脂棉擦拭洗涤,自来水冲洗,沥干水分,于洗液中浸泡1~2h,自来水冲洗,蒸馏水冲洗后,经目测,玻片或盖玻片上无残留水珠,可视为洗涤干净,风干后于95%酒精中保存备用,使用时用镊子取出,烧去残留酒精即可。

(三) 塑料橡胶用品的洗涤

1. 塑料器皿的清洗

目前我国培养使用的塑料器皿主要是从国外购置的,是一种无毒并已经消毒过灭菌密封包装的商品。用时,只要打开包装即可,是一次性使用物品。必要时,用后经无菌处理后,尚可反复使用2~3次,但不宜过多。再用时仍然需要清洗和灭菌处理。塑料器皿因质地软,不宜用毛刷刷洗而造成清洗困难。为此使用中一是防止划痕,二是用后要立即浸入水中,严防附着

物干结;如残留有附着物,可用脱脂棉清洁掉,用流水冲洗干净,晾干,再用 2% NaOH 溶液浸泡过夜,用自来水充分冲洗,然后用 5% 盐酸溶液浸泡 30 min,最后用自来水冲洗和蒸馏水漂洗干净,晾干后备用。

2. 胶塞的清洗

新购置的胶塞先用自来水冲洗干净后,再做常规处理。

常规洗涤方法:浸泡→2% NaOH 煮沸(10~20 min)→自来水冲洗→1% 稀盐酸浸泡(30 min)→蒸馏水清洗(2~3 次)→晾干备用

(四) 金属用品的洗涤

1. 洗涤方法

不用洗液浸泡洗涤。一般用水冲洗即可,对于油污、锈迹,可用洗洁精、钢丝球刷洗掉。

2. 注意事项

不用时放在干燥的环境中,不同材质分开存放,防止生锈。

(五) 搪瓷制品的洗涤

不能用碱液洗涤,可用 0.1 mol/L 盐酸浸泡。一般用毛刷和洗衣粉刷洗即可。使用时,蒸发皿加热后不能骤冷。

五、微生物实验室常见仪器设备介绍

1. 显微镜(microscope)

显微镜是由一个透镜或几个透镜的组合构成的一种光学仪器,是人类进入原子时代的标志。主要用于放大微小物体使其能为人的肉眼所看到。

显微镜根据显微原理可分为光学显微镜(optical microscope)与电子显微镜(electron microscope)。光学显微镜通常由光学部分、照明部分和机械部分组成。其中光学部分是最为关键的,它由目镜和物镜组成。现在的光学显微镜可把物体放大 1 600 倍,分辨的最小极限达 0.1 μm 。目前光学显微镜的种类很多,主要有明视野显微镜(普通光学显微镜,详见实验一)、暗视野显微镜(详见实验五)、荧光显微镜、相差显微镜、激光扫描共聚焦显微镜、偏光显微镜、微分干涉差显微镜、倒置显微镜。电子显微镜(详见实验四)有与光学显微镜相似的基本结构特征,但它的放大倍数及分辨本领却比光学显微镜高得多。它以电子流作为光源,使物体成像。

2. 干热消毒箱(干热灭菌器,电烘箱 electric dry oven,详见实验十)

可供工矿企业、大专院校、生物制药、食品加工、科研、医疗单位及各类实验室等作非易燃易爆物品及非挥发性物品的干燥、烘培、熔腊、消毒、灭菌之用。在微生物实验室中,干热消毒箱主要用于玻璃容器的干燥灭菌。电烘箱的控温温度在室温至 250 $^{\circ}\text{C}$,任意调节。电烘箱的使用详见实验十。电烘箱安全操作规范:(1) 通电前应检查电源线路绝缘应良好,不准有漏电。加热器电阻丝之间不得有碰触,以防短路。(2) 使用非防爆电烘箱,严禁带挥发性的物件进入烘箱内。(3) 使用温度绝不能超过机器规定温度,使用时随时观察并调整箱内温度。(4) 在使用过程中听到声音异常应立即停止工作,检查马达及风叶轮,以免烧坏马达。(5) 高温烘烤物品后,不能立即关掉总开关,应打开风扇开关让热量散发出去后方可关机,以免烤箱局部受热变形。(6) 保持电烘箱内清洁,应经常擦拭,以免腐蚀性物质黏附在内胆上,影响其使用寿命。应经常检查和清除烘箱内电阻丝旁的氧化皮。不可将风道和风孔堵死,以保证正常送风风道。(7) 电控制箱应定期检修,由于电热接触器频繁通断,定期更换,以防触头烧坏

咬死,不能切断电热电源,炉内温度升高会烤坏产品。

3. 灭菌锅(sterilization pot)

灭菌锅又名蒸汽灭菌器,实验室常用灭菌锅可分为手提式高压灭菌锅和立式高压灭菌锅(图 1-10 和 1-11)。利用电热丝加热水产生蒸汽,并能维持一定压力的装置。主要由一个可以密封的桶体、压力表、排气阀、安全阀、电热丝等组成。可对医疗器械、敷料、玻璃器皿和培养基等进行消毒灭菌,是微生物实验室、食品厂、饮用水厂等的必备设备。灭菌锅的使用和注意事项详见实验十。

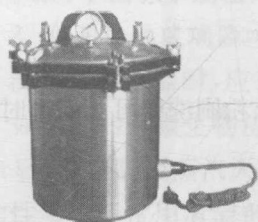


图 1-10 手提式高压灭菌锅



图 1-11 立式高压灭菌锅

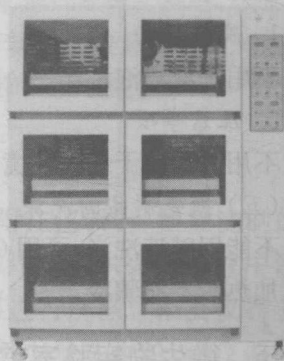


图 1-12 多层摇床

4. 摇床(shakers)

摇床(图 1-12),又名振荡器,可以摇动,其振荡频率为启动-300 转/分(r/min),广泛用于对振荡频率有较高要求的微生物培养、发酵、杂交等过程。目前的摇床往往不再只是单一的振荡功能,通常集其他功能于一身。如恒温培养摇床集恒温培养箱和摇床于一体,可控制温度;光照振荡培养箱可同时控制温度、光照和振荡频率;功能完善的细胞培养摇床需要具备温度控制、湿度控制、二氧化碳控制、光照控制以及高性能的保温密封功能及可消毒灭菌的功能。

5. 培养箱(incubator)

培养箱,具有制冷和加热双向调温系统,温度可控的功能,是植物、生物、微生物、遗传、病毒、医学、环保等科研、教研教育部门不可缺少的实验室设备,广泛应用于低温恒温试验、培养试验、环境试验等。在微生物实验中,主要用于微生物的平板和斜面等固体培养或液体静置培养等。

使用操作方法:(1) 接通电源,按下电源开关,此时电源指示灯亮。(2) 操作人员需仔细阅读使用说明,了解、熟悉培养箱的功能后,才能接通电源。(3) 设定培养温度,当培养箱显示温度达到设定温度时,加热或制冷中断,如箱内即时温度超过设定上限报警温度(出厂设置为超过 5°C),控温仪温度跟踪报警指示灯亮,同时自动切断加热器电源。(4) 如打开门取样品时,加热器、循环风机会停止工作,当关上玻璃门后,加热器和风机才能正常运转,这样可避免培养物的污染及温度的过冲现象。

注意事项和保养维修:(1) 仪器不宜在高压、强电流、强磁场条件下使用,以免干扰温控仪及发生触电危险。(2) 培养箱外壳必须有效接地,以保证使用安全。(3) 控温仪菜单设定数据在出厂前已经过严格调试,请勿随意修改。(4) 请勿放置易燃易爆物品进行升温,严防发生危险。(5) 电镀零件和表面饰漆,应经常保持清洁,如长期不用,应在电镀件上涂中性油脂或