

# 微生物学实验指导

北京大学微生物学教学小组编



人民教育出版社

# 微生物学实验指导

北京大学微生物学教学小组编

人民教育出版社

本书根据北京大学生物学系近几年来开设的微生物学实验课的实验指导编写而成。内容包括培养基的配制与灭菌，微生物的纯种分离与保藏，微生物形态的观察，细菌生理以及环境条件对微生物生命活动的影响等五个部分，共九次实验。每次实验是按一个单元时间（一般为4学时）所能完成的分量来安排的。书末附有数种微生物基本操作的原理，实验中涉及的微生物名称和培养要求，以及实验中用到的培养基、溶液和染料的配方等，可供读者参考。

本书的对象是综合性大学和高等师范院校的学生，也可作为其他大专学校有关专业微生物学实验课的参考材料。

## 微生物学实验指导

北京大学微生物学教学小组编

北京市书刊出版业营业登记证字第2号

人民教育出版社出版（北京景山东街）

人民教育印刷厂印装

新华书店北京发行所发行

各地新华书店经售

统一书号K13010·1155 开本 850×1168 1/32 印张 3 3/16  
字数 74,000 印数 0,001—1,500 定价（5）¥ 0.34  
1964年12月第1版 1964年12月北京第1次印刷

## 序　　言

本书是根据北京大学生物学系开设的普通微生物学实验课的实验指导编写而成的，基本上符合高等教育部拟定的教学大纲的内容。

全部实验可按性质分为五部分：一、培养基的配制与灭菌；二、微生物的纯种分离与保藏；三、微生物形态的观察；四、细菌的生理；五、环境条件对微生物生命活动的影响。每部分由一个或几个实验组成，大部分实验按一个单元时间（一般为4学时，个别实验2学时）所能完成的份量安排，个别实验的学时略有增减，总计九次实验，但可根据具体情况适当加以变更。如学时比较充裕，建议在第一次实验前用2学时介绍实验课的目的和要求，以及实验室规则。使用油镜的训练也可考虑提至此次，以免实验三的时间过于紧迫。实验完毕后，有一次机动时间，可用来补做实验及考察同学是否掌握基本操作。如学时较少，则可将上述两次实验省略，或适当减去验证课堂理论性的实验份量（注有“\*”号的实验），或将部分实验改为示范。

实验与课堂讲授若能配合进行，可以相互促进，教学效果较佳。实验内容以训练基本操作为主，适当验证课堂讲授的理论。在编排实验时，同一性质而操作方法不同的技术，有时是分散在各个实验中进行训练的（如各种接种技术、测定微生物生长的不同方法等），其中一些基本训练可能多次出现在不同的实验中（如接种、培养基的配制、油镜的使用、高压蒸汽灭菌等）。有的实验彼此之间联系比较密切，例如，第一次实验所准备的材料是第二次实验所用的物品，第二次分离出的菌种又可作为补充形态部分的内容；又

如进行细菌鉴定时，需要复习有关的形态、染色特性及生理生化反应的结果。我们认为，这样安排不致影响实验内容的完整性，但教师必须在适当阶段帮助同学及时总结，使同学能够循序渐进，熟练操作技术，灵活地运用所学的方法。

思考题不要求同学写入报告中，目的在于帮助同学预习及总结之用。实验中涉及的基本操作技术原理，实验需用菌种的名称及培养基的配制方法，常用染料及试剂的配方，以及伯杰氏真细菌目检索表等均编成附录列于书后，可供读者参考。

本书由钱存柔主编，参加编写的还有林稚兰、黄仪秀、陈德元等。由于我们经验不足，水平有限，错误或不当之处在所难免。敬请读者提出宝贵意见，以便进一步修订。

在编写此书时，承沈同先生关怀与指导，罗妙芳同志为本书提供不少宝贵的意见与经验，李伯时同志为本书绘制插图，特此一并致谢。

北京大学微生物学教学小组

1964年5月

# 目 录

实验须知 ..... 1

## 第一部分 培养基的配制与灭菌

|               |   |
|---------------|---|
| 实验一 培养基的配制与灭菌 | 3 |
| 一、实验目的        | 3 |
| 二、实验材料及仪器     | 3 |
| 三、实验内容        | 3 |
| 1. 培养基的配制     | 3 |
| 2. 玻璃器皿的洗刷和包装 | 7 |
| 3. 灭菌法        | 8 |
| 四、报告要求        | 8 |
| 五、思考题         | 9 |

## 第二部分 微生物的纯种分离与保藏

|                      |    |
|----------------------|----|
| 实验二 微生物的纯种分离与保藏      | 9  |
| 一、实验目的               | 9  |
| 二、实验材料及仪器            | 10 |
| 三、实验内容               | 10 |
| 1. 土壤微生物的分离          | 10 |
| 2. 用划线分离法进行细菌的纯化     | 12 |
| 3. 微生物菌种的冰箱保藏法       | 13 |
| 4. 根据菌落及培养特征鉴别微生物的类型 | 13 |
| 5. 微生物的平板计数法         | 15 |
| 四、报告要求               | 16 |
| 五、思考题                | 16 |

## 第三部分 微生物形态的观察

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 实验三 病毒、细菌、放线菌形态的观察       | 16 |
| 一、实验目的                   | 17 |
| 二、实验材料及仪器                | 17 |
| 三、实验内容                   | 17 |
| 1. 病毒                    | 17 |
| (1) 病毒的鸡胚培养及病斑观察         | 17 |
| (2) 病毒形态的观察              | 18 |
| 2. 细菌                    | 18 |
| (1) 利用暗视野显光法观察生活的变形杆菌的运动 | 18 |
| (2) 细菌细胞大小的测量            | 19 |
| (3) 细菌的形态和构造             | 21 |
| 3. 放线菌                   | 21 |
| (1) 孢子丝形态的观察             | 21 |
| (2) 孢子形态的观察              | 21 |
| 四、报告要求                   | 21 |
| 五、思考题                    | 22 |

实验四 细菌染色技术 ..... 22

|                                     |    |                       |    |
|-------------------------------------|----|-----------------------|----|
| 一、实验目的 .....                        | 22 | 四、报告要求 .....          | 27 |
| 二、实验材料及仪器 .....                     | 22 | 五、思考题 .....           | 27 |
| 三、实验内容 .....                        | 22 | <b>实验五 酵母菌和霉菌形态的•</b> |    |
| 1. 细菌的简单染色法.....                    | 22 | 观察 .....              | 28 |
| 2. 革兰氏染色法(Hucker 改良法).....          | 23 | 一、实验目的 .....          | 28 |
| 3. 芽孢染色法(Conklin 改进 Wirtz 的方法)..... | 25 | 二、实验材料及仪器 .....       | 28 |
| 4. 荚膜染色法(墨汁背景染色法).....              | 25 | 三、实验内容 .....          | 29 |
| 5. 鞭毛染色法(按申云生氏法略加改进).....           | 26 | 1. 酵母菌的形态.....        | 29 |
|                                     |    | 2. 霉菌的形态.....         | 29 |
|                                     |    | 四、报告要求 .....          | 29 |
|                                     |    | 五、思考题 .....           | 30 |

#### 第四部分 细菌的生理生化反应

|                             |    |                           |    |
|-----------------------------|----|---------------------------|----|
| <b>实验六 细菌的生理生化反应</b> .....  | 30 | (5) 甲基红试验 (M.R. 试验) ..... | 34 |
| 一、实验目的 .....                | 30 | 2. 含氯化合物的分解和利用 .....      | 35 |
| 二、实验材料 .....                | 31 | (1) 明胶液化试验 .....          | 35 |
| 三、实验内容 .....                | 31 | (2) 硝酸盐还原试验 .....         | 35 |
| 1. 含碳化合物的分解和利用 .....        | 31 | (3) 产氨试验 .....            | 37 |
| (1) 油脂水解试验 .....            | 31 | (4) 硫化氢产生的试验 .....        | 37 |
| (2) 淀粉水解试验 .....            | 32 | (5) 呼吸产生试验 .....          | 38 |
| (3) 糖类(醇或糖苷)发酵试验 .....      | 33 | (6) 石蕊牛乳试验 .....          | 39 |
| (4) 乙酰甲基甲醇试验(V.P. 试验) ..... | 33 | 四、报告要求 .....              | 41 |
|                             |    | 五、思考题 .....               | 42 |

#### 第五部分 环境条件对微生物生命活动的影响

|                              |    |                                  |    |
|------------------------------|----|----------------------------------|----|
| <b>实验七 大肠杆菌生长曲线的测定</b> ..... | 42 | (1) 接种 .....                     | 43 |
| 一、实验目的 .....                 | 43 | (2) 培养 .....                     | 43 |
| 二、实验材料和仪器 .....              | 43 | (3) 比浊 .....                     | 44 |
| 三、实验内容 .....                 | 43 | 四、报告要求 .....                     | 44 |
| 1. 实验处理 .....                | 43 | 五、思考题 .....                      | 44 |
| 2. 实验步骤 .....                | 43 | <b>实验八 环境因素对微生物生长发育的影响</b> ..... |    |
|                              |    |                                  | 45 |

|                              |    |                                      |    |
|------------------------------|----|--------------------------------------|----|
| <b>一、实验目的</b>                | 45 | <b>五、思考题</b>                         | 59 |
| <b>二、实验材料及仪器</b>             | 45 | <b>附录一 显微镜油镜的使用方法</b>                |    |
| <b>三、实验内容</b>                | 46 | 一、显微镜的全部结构                           | 60 |
| 1. 物理因素的影响                   | 46 | 二、显微镜的使用方法                           | 60 |
| (1)紫外光线对金黄色葡萄球菌生长的影响         | 46 | 1. 显微镜的放置                            | 60 |
| (2)氧对醋酸杆菌芽孢杆菌的影响             | 46 | 2. 调节光照                              | 60 |
| 2. 化学因素的影响                   | 47 | 3. 低倍镜观察                             | 61 |
| (1)pH值对金黄色葡萄球菌生长的影响          | 47 | 4. 高倍镜观察                             | 61 |
| (2)化学药剂对金黄色葡萄球菌生长的影响         | 48 | 5. 油镜观察                              | 61 |
| 3. 生物因素的影响                   | 49 | 6. 镜检完毕后的工作                          | 62 |
| (1)青霉菌对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草杆菌的影响  | 49 | <b>附录二 玻璃器皿的清洁</b>                   |    |
| (2)痢疾杆菌714噬菌体对痢疾杆菌的裂解作用      | 49 | 一、洗涤液配制法                             | 62 |
| (3)抗原抗体的凝聚反应                 | 50 | 二、各种玻璃器皿的洗涤                          | 63 |
| <b>四、报告要求</b>                | 51 | <b>附录三 灭菌技术</b>                      |    |
| <b>五、思考题</b>                 | 52 | 一、机械灭菌法                              | 64 |
| <b>实验九 酵母菌的酒精发酵以及影响发酵的条件</b> | 52 | 1. 硅藻土过滤器(又称 Berkefeld 或 Mandler 滤器) | 64 |
| <b>一、实验目的</b>                | 52 | 2. 蔡氏石棉板滤器(又称 Seitz 滤器)              | 64 |
| <b>二、实验材料及仪器</b>             | 53 | 3. 玻璃滤器                              | 65 |
| <b>三、实验内容</b>                | 53 | <b>二、化学灭菌法</b>                       | 66 |
| 1. 培养基的配制及仪器的准备              | 53 | <b>三、物理灭菌法</b>                       | 66 |
| 2. 接种及发酵                     | 54 | 1. 干热灭菌                              | 67 |
| 3. 结果观察                      | 54 | 2. 间歇灭菌                              | 68 |
| (1)酵母菌细胞的计数                  | 55 | 3. 高压蒸汽灭菌                            | 69 |
| (2)酒精蒸馏及酒精度的测定               | 56 | 4. 紫外线                               | 72 |
| (3)甘油的定性分析法                  | 57 | <b>附录四 微生物的接种技术</b>                  |    |
| <b>四、报告要求</b>                | 58 | 一、斜面接种技术                             | 73 |
| <b>附录五 实验用菌种一览表</b>          |    |                                      |    |
|                              |    | 二、液体接种                               | 75 |
|                              |    | 三、由液体培养基接种液体培养基                      | 75 |
|                              |    | 四、穿刺接种                               | 75 |
|                              |    | 五、病毒的鸡胚接种                            | 75 |
|                              |    |                                      |    |

|                                  |           |   |           |
|----------------------------------|-----------|---|-----------|
| 一、細菌及放綫菌                         | 77        | 三、淀粉水解試驗用碘液                             | 84        |
| 二、酵母菌                            | 78        | 四、亚硝酸盐試剂                                | 84        |
| 三、霉菌                             | 79        | 五、氨試剂(奈氏試剂)                             | 84        |
| 四、其他                             | 79        | 六、吲哚試剂(Ehrlich試剂)                       | 84        |
| <b>附录六 实驗用培养基配制法</b>             | <b>80</b> | 七、乳酸石炭酸溶液(观察霉<br>菌形态用)                  | 84        |
| 一、糖发酵液体培养基                       | 80        | 八、1%来苏尔溶液                               | 85        |
| 二、M.R.-V.P. 試驗培养<br>基(葡萄糖蛋白胨培养基) | 80        | 九、5%石炭酸溶液                               | 85        |
| 三、淀粉培养基(試驗淀粉<br>水解用)             | 80        | 十、0.1% $HgCl_2$ 溶液                      | 85        |
| 四、油脂培养基                          | 81        | 十一、1%硫酸銅溶液                              | 85        |
| 五、硝酸盐还原試驗培养基                     | 81        | 十二、正丁醇-醋酸-水溶液<br>(4:1:5)                | 85        |
| 六、产氨試驗培养基(蛋白<br>胨牛肉膏液体培养基)       | 82        | 十三、硝酸銀丙酮溶液                              | 85        |
| 七、产生硫化氫試驗的培养<br>基                | 82        | 十四、碱性酒精溶液(1%氫<br>氧化鈉酒精溶液)               | 85        |
| 八、石蕊牛乳培养基                        | 82        | 十五、7.5N 氢氧化銨溶液                          | 85        |
| 九、明胶培养基                          | 83        | <b>附录八 实驗用染液配制法</b>                     | <b>86</b> |
| 十、肉膏蛋白胨液体培养基                     | 83        | 一、普通染色法常用染液                             | 86        |
| 十一、肉膏蛋白胨琼脂培养<br>基                | 83        | 二、革兰氏染色染液                               | 86        |
| 十二、淀粉琼脂培养基(培养<br>放綫菌用)           | 83        | 三、芽孢染色染液                                | 87        |
| 十三、豆芽汁葡萄糖(或蔗糖)<br>培养基            | 83        | 四、齐氏(Ziehl)石炭酸复紅<br>染液                  | 87        |
| 十四、玉米深层培养基                       | 83        | 五、鞭毛染色染液                                | 87        |
| <b>附录七 实驗用試劑、溶液配<br/>制法</b>      | <b>83</b> | <b>附录九 伯杰(Bergey)氏真細<br/>菌目檢索表(第七版)</b> | <b>88</b> |
| 一、甲基紅試劑(M.R. 試驗<br>試劑)           | 83        | 一、真細菌目分科檢索表                             | 88        |
| 二、乙酰甲基甲醇試驗試劑<br>(V.P. 試劑)        | 84        | 二、腸杆菌科檢索表                               | 89        |
|                                  |           | 三、小球菌科檢索表                               | 90        |
|                                  |           | 四、芽孢杆菌科檢索表                              | 91        |
|                                  |           | 五、埃希氏杆菌族檢索表                             | 91        |
|                                  |           | 六、埃希氏杆菌屬分种檢索表                           | 91        |
| <b>附录十 微生物学教学进度表</b>             | <b>92</b> | <b>主要参考书目</b>                           | <b>93</b> |

## 实验须知

**一、实验课的目的和要求** 本课程实验以“少而精，学到手”为原则，着重训练微生物学基本操作技能。如显微镜的使用，微生物的基本形态观察，细菌染色技术，培养基的配制和灭菌，微生物的分离、接种和培养等。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；通过观察具体材料和分析自己的实验结果，配合课堂讲授，有利于验证和巩固微生物学的理论知识。

1. 实验预习 每次实验前必须对实验内容进行预习。预习应做到：了解实验的目的和原理，懂得每一操作的意义和操作步骤，初步了解需用仪器的使用方法，以保证实验的进度和效果。教师可以在实验开始时抽查同学预习的情况，只有达到预习要求的同学，才能参加实验。

2. 实验观察及记录 本课程各个实验之间大多是密切关联的。有时上一实验准备的材料要在下次实验时应用，有时一个实验过程需要在一定时间内进行观察。因此，要求同学能认真和及时地作好实验记录。

3. 实验报告 每次实验的结果，应以实事求是的科学态度填入报告内，尽量附入原始记录。文字力求简明准确。报告形式可以使用图表。

4. 爱护仪器，厉行节约 公用仪器、药品等，用后仍放还原处。对显微镜、天平、比色计等贵重仪器，要细心操作，特别爱护。从温箱或冰箱取物放物时，应随时关门。对消耗性的材料和药品等要力求节约。如有仪器损毁，应立即报告导师，声明原因，填写仪器损毁登记表。

**二、实验室规则** 微生物实验室中经常会接触到一些致病性的和非致病性的微生物，因此在整个实验过程中，应严格遵守无菌操作规程，谨防污染和感染。

1. 实验室应特别保持整洁。非必要的书籍、物品，勿带入室内。实验时，应按固定座位入座，保持肃静，尽量减少不必要的走动，也不得在室内吸烟进食。每次实验前后应收拾整齐，擦净桌面。

2. 工作前，应洗手。离开实验室前，应用3%来苏尔或肥皂洗手，再用冷水冲净。

3. 遇有菌液污染桌面或地上时，应以3%来苏尔水或5%石炭酸溶液复盖其上，半小时后擦去。如系芽孢杆菌，则应适当地将消毒时间延长。

4. 如有打破盛菌容器、皮肤破伤或吸入菌液等意外情况发生时，应立即报告导师，及时处理（一般皮肤破伤可用碘酒或红汞水消毒，包扎伤口；菌液吸入口中时，应立即吐到3%来苏尔溶液缸中，再以大量清水或0.1%高锰酸钾溶液漱口）。

5. 实验用过的器材，必须随时灭菌。如吸管、载玻片等附有活菌时，应先浸泡在3%来苏尔溶液中灭菌后，再用水冲洗。带菌的试管、培养皿、锥形瓶等，须经高压蒸汽灭菌后，再行洗涤。

6. 每次实验所用的菌种（特别是有毒菌种）用毕后，须按原数交给实验员，统一灭菌销毁。

7. 实验中需要进行培养的材料，应贴好标签，注明自己的组别、座号、实验日期及处理方法等，放入教师指定的地点进行培养。

8. 勿使酒精、乙醚、丙酮等易燃药品接近火焰。如遇火险，先关煤气门，再用湿布或砂土掩盖灭火。火猛时，需用灭火机。

9. 离开实验室前，注意关闭门、窗、灯、水、煤气等。

10. 实验完毕，经导师在报告上签字及检查仪器后，方能离开。

# 实验一 培养基的配制与灭菌

实验一(培养基的配制与灭菌)和实验二(微生物的纯种分离与保藏)组成一个独立的实验单元,其中包括了微生物实验工作中一些最基本的实验技术。通过实验要学会如何由混杂的微生物群体中分离出所要研究的纯种,同时将所分得的单个菌落接种到无菌培养基上,经过适当的培养,使之增殖。

本次实验为下次实验作准备。包括三种常用培养基的配制、斜面接种、准备稀释分离及划线分离时所需的全套仪器及无菌水,以及用高压蒸汽将培养基与玻璃器皿进行灭菌等。

## 一、实验目的

1. 了解培养基的配制原理及掌握固体培养基(斜面、深层)配制的方法。
2. 了解几种常用的灭菌方法,学会高压蒸汽灭菌技术。
3. 学会玻璃仪器的洗涤和灭菌前的准备工作。

## 二、实验材料及仪器

1. 牛肉膏、蛋白胨、黄豆芽、可溶性淀粉、葡萄糖、琼脂、食盐、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10% HCl、10% NaOH等。
2. 锥形瓶、试管、移液管、烧杯、量筒、玻棒、培养皿、纱布、棉花、报纸等。
3. pH试纸或氢离子浓度比色计或pH电位计、天平、台秤、水浴锅等。

## 三、实验内容

1. 培养基的配制 培养基是按照微生物生长繁殖所需要的各

种营养物质用人工方法配制而成的基质。其中除含有水分、碳化化合物、含氮化合物和无机盐类外，还需要各种必要的维生素，以提供能源、组成菌体细胞的原料及调节代谢活动。由于不同微生物营养类型不同，对营养物质的要求也各不相同，因此，需提供不同种类的培养基。一般培养细菌常用肉膏蛋白胨培养基，培养放线菌常用淀粉培养基，培养霉菌常用豆芽汁、麦芽汁培养基等。

培养基除了要满足微生物所要求的各种营养条件外，还应保证微生物所需要的其他生活条件，如适宜的酸碱度、渗透压等。因此，对不同种类的微生物，应将培养基调节到一定的 pH 范围。

根据研究目的不同，可以将培养基制成固体、半固体和液体三种形式。固体培养基的成分与液体相同，仅在液体培养基中加入凝固剂做支持物。通常加入 1.5—2% 的琼脂，半固体则加入 0.3—0.5% 琼脂作支持物。有时也用明胶或硅胶等。

配制培养基的基本过程简述如下：

(1) 配制溶液 容器中先盛所需水量的一部分(蒸馏水或自来水，视实验要求而定)，然后按照培养基配方，称取各种原料，依次加入溶解，最后补足所需水量。用蛋白胨、肉膏等物质配制培养基时，需加热溶解，合成培养基则无需加热。加热过程所蒸发的水分，应在全部溶解后加水补足。

配制固体培养基时，先将上述已配好的液体培养基煮沸，再将称好的琼脂加入，继续加热至完全融化，并不断搅拌，避免琼脂糊底烧焦。

(2) 调节 pH 用 pH 试纸(或 pH 电位计或氯离子浓度比色计)。以 10% HCl 或 10% NaOH 调节至所需的 pH 值。

(3) 培养基的澄清与过滤 用滤纸或棉花或纱布或鸡蛋白趁热过滤。

(4) 培养基的分装 取玻璃漏斗一个，装在铁架上。漏斗下连

一橡皮管，与一玻璃管嘴相接。橡皮管上加一弹簧夹，可开放及关闭。分装时，用左手拿住空试管的中部，并将漏斗下的玻璃管嘴插入试管内，以右手拇指及食指开放弹簧夹，中指及无名指夹住玻璃管嘴，使培养基直接流入管内（图 1）。注意不得沾污上段管壁，以免浸湿棉塞，引起杂菌污染。

装入试管的培养基量，视试管大小及需要而定，一般制成斜面培养基时，每支小试管（ $15 \times 150$  毫米）约装 3—4 毫升 ( $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$  试管高度)，如制深层培养基时，每支大试管（ $20 \times 220$  毫米）约装 12—15 毫升即可。

(5) 斜面培养基的制作法 将分装后已行灭菌的琼脂培养基，趁热置于木棒上，使成适当斜度（切勿使斜面沾着棉塞！），俟凝固后即成斜面。制得的斜面以有凝结水析出者为佳（图 2）。

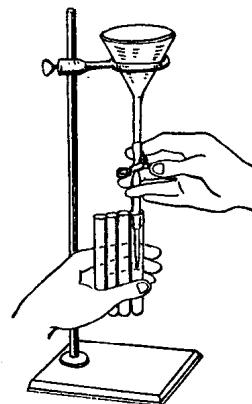


图 1. 培养基的分装。

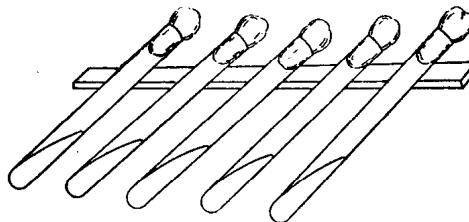


图 2. 斜面的摆法。

用深层培养基制成平板的方法，见实验 2。

数种常用培养基的配法如下：

### (1) 豆芽汁葡萄糖(或蔗糖)琼脂培养基

|     |        |
|-----|--------|
| 黄豆芽 | 10 克   |
| 葡萄糖 | 5 克    |
| 琼脂  | 1.5 克  |
| 水   | 100 毫升 |

称新鲜豆芽 10 克，放入烧杯中，加 100 毫升自来水，煮沸约半小时，用纱布过滤。以水补足原量，制成 10% 浓度的豆芽汁。再加入葡萄糖 5 克，煮沸，加入琼脂 1.5 克，继续加热使之融化，补足失水，分装于大、小试管，加棉塞，高压蒸汽灭菌(15 磅 20 分钟)。

### (2) 肉膏蛋白胨琼脂培养基

|            |         |
|------------|---------|
| 牛肉膏        | 0.5 克   |
| 蛋白胨        | 1.0 克   |
| NaCl       | 0.5 克   |
| 琼脂         | 1.5—2 克 |
| 水          | 100 毫升  |
| pH 7.0—7.2 |         |

在烧杯中加水，称取牛肉膏、蛋白胨、NaCl，加热溶化后，加入琼脂 1.5—2 克，补足失水。调节 pH 至 7.0—7.2。分装大、小试管。加棉塞，高压蒸汽灭菌(15 磅 20 分钟)。

### (3) 淀粉琼脂培养基

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| 可溶性淀粉                                | 2 克     |
| KNO <sub>3</sub>                     | 0.1 克   |
| NaCl                                 | 0.05 克  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0.05 克  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.05 克  |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.001 克 |
| 琼脂                                   | 1.5 克   |
| 水                                    | 100 毫升  |
| pH 7.4                               |         |

配制时，先用少量冷水，使淀粉调成糊状，在火上加热，然后加水，再加入其他药品，在烧杯中加热溶化，补足失水。调节 pH 至 7.4。分装大、小试管。加棉塞，高压蒸汽灭菌(15 磅 20 分钟)。

附 无菌水的制备：每个锥形瓶内装水 99 毫升。每个大试管内装水 9

毫升，塞上棉花，灭菌待用。

## 2. 玻璃器皿的洗刷和包装

(1) 玻璃器皿的洗刷 玻璃器皿在使用前必须洗刷干净。锥形瓶、试管、培养皿等浸入水中洗涤，用毛刷及去污粉或肥皂洗刷，然后用水冲净。移液管先用洗液浸泡，再用水冲洗。洗刷干净的玻璃仪器在烘箱中烘干(详见附录二 玻璃器皿的清洁)。

(2) 玻璃器皿灭菌前的准备工作 无菌吸管、试管及培养皿的准备：

1) 培养皿又称双碟，由一底一盖组成一套。可以每套单独用纸包装，也可将几套培养皿一起用纸包装。

2) 吸管应在距管口约1—2毫米处用铁丝塞入棉花少许(约1—1.5厘米长)，以防止细菌吸入口中，并避免将口中细菌吹入吸管内。棉花要塞得松紧适宜，吹时以能通气但不使棉花滑下为准。将塞好棉花的吸管尖端，放在4—5厘米宽的长纸条的一端，约成45°角，折叠报纸包住尖端，用左手捏住吸管身，右手将吸管压紧，在桌面上向前搓转，每支吸管分别以螺旋式包扎起来。上端剩余报纸，折叠打结。准备灭菌。

3) 试管或锥形瓶口，也需用棉花堵塞(脱脂棉易吸水，勿用)。主要目的是过滤空气，避免污染。

制成的棉塞应紧贴管壁，不留缝隙，以防空气中微生物会沿缝隙侵入。棉塞不宜过松或过紧，塞好后，以手提棉塞，瓶、管不下落为准。棉塞的 $\frac{2}{3}$ 应在管内；上端露出少许棉花，便于拔放。棉塞大小及形状，应如图3.1左所示。如在制作中不小心将棉塞沾上了培养基，则不可再用。塞好后，在棉塞和瓶口外包以厚纸，或将塞好棉塞之试管放在铁丝筐内，上盖厚纸，用线绳捆扎，准备灭菌，以避免灭菌时冷凝水淋湿棉塞，并防止接种前培养基水分散失。

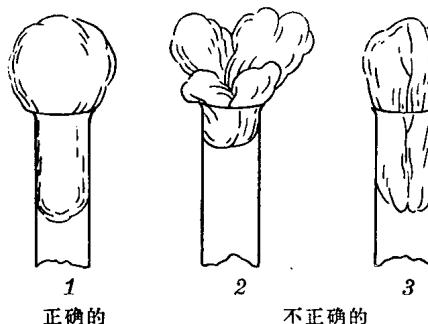


图 3. 棉塞。

**3. 灭菌法** 灭菌是微生物学实验的基本技术之一。在接种所需要的微生物之前，必须事先杀死培养基、容器和接种用具上的一切微生物，然后以无菌操作将所要研究的菌接入，才能获得纯粹培养。灭菌方法很多，随

材料、实验目的的不同而采用不同的方法(详见附录三 灭菌技术)。

(1) 培养基、无菌水和玻璃器皿的高压蒸汽灭菌。

(2) 干热灭菌(示范)。

(3) 过滤除菌(示范)。

灭菌后的玻璃器皿，从灭菌锅取出后，应放入烘箱内烘干再保存。灭菌后的培养基，最好从中取出1—2管，放在37°C恒温箱中，保溫培养1—3天，不长菌者即证明已經彻底灭菌，再放在阴暗地方保存。

每个同学应准备的培养基与器皿：

(1) 配制100毫升固体培养基(肉膏蛋白胨琼脂培养基、淀粉琼脂培养基或豆芽汁琼脂培养基，三种中的一种)，分装于6支大試管，作成固体深层培养基；装5支小試管，灭菌后制成斜面。

(2) 包装1支移液管及4套培养皿。

(3) 准备1瓶无菌水(99毫升)及4管无菌水(每試管装9毫升水)。

(4) 如上准备完毕后，置于高压蒸汽灭菌鍋中，在15磅/吋<sup>2</sup>或1公斤/厘米<sup>2</sup>的条件下，灭菌20分钟。

#### 四、报告要求