

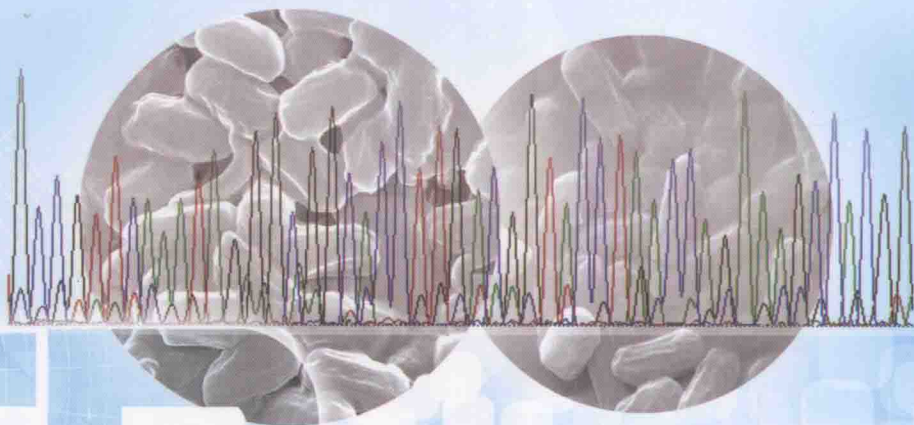
高等学校教材

# 环境地质微生物学实验指导

Enviromental Geomicrobiology Experiments

万云洋 董海良 编著

80 110 130  
CCCGTTCA AATAGGSCGGCAGCTTG ACGGTAACC TAACCAGAAAGCCACCG



石油工业出版社  
Petroleum Industry Press

高等学校教材

# 环境地质微生物学实验指导

Environmental Geomicrobiology Experiments

万云洋 董海良 编著

石油工业出版社

## 内 容 提 要

本书融汇多学科交叉的特点,规范了培养基成分及其来源,规范了学术歧义,以图表、公式和方程直观展示原理和机理,把微生物学“转基因”到环境地质中,是对发展中的环境地质生物学的一次有益尝试。

本书可作为环境地质和微生物学相关领域的学生、教师和研究人員教学用书和研究参考用书。

### 图书在版编目(CIP)数据

环境地质微生物学实验指导/万云洋,董海良编著.

北京:石油工业出版社,2014.10

(高等学校教材)

ISBN 978-7-5183-0236-9

I. 环…

II. ①万…②董…

III. 环境地质学-微生物学-实验-高等学校-教学参考资料

IV. Q939.99-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 127047 号

---

出版发行:石油工业出版社

(北京安定门外安华里 2 区 1 号 100011)

网 址:<http://pip.cnpc.com.cn>

编辑部:(010)64523612 发行部:(010)64523620

经 销:全国新华书店

印 刷:北京晨旭印刷厂

---

2014 年 10 月第 1 版 2014 年 10 月第 1 次印刷

787×1092 毫米 开本:1/16 印张:18

字数:460 千字

---

定价:36.00 元

(如出现印装质量问题,我社发行部负责调换)

版权所有,翻印必究

# 序 一

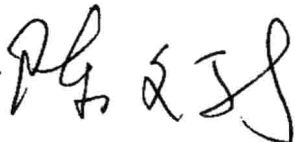
最近,中国石油大学(北京)的年轻教授万云洋和中国地质大学(北京)的年轻教授董海良合作编写了《环境地质微生物学实验指导》一书。该书结合并且主要面向地质矿产类和油气地质类的本科和研究生的需求,是一本颇为实用的实验指导书。

本书介绍了环境地质微生物的常规实验技术,特定环境地质样品之采集、前处理、无菌操作、培养基设计和配制、微生物筛选、观察、鉴定和保存、微生物的基本生理生化特性、代谢产物(含分子生物学)分析等技术要领,在体例安排上具有一定的直观性、灵活性和创新性,便于培养学生独立思考、独立动手、独立分析和团队协作能力。现代科学所要求的多学科交叉性在其中也有所体现,反映了环境、地质、生化和微生物学的需求。

本书分六个实验六十一个部分,并附有培养基配制、染色液配制、生物学指示剂和常用化合物分子结构、常用器具图、微生物中文和拉丁文名等,便于读者的对比和查询。

我相信这本著作将对环境地质微生物学的发展做出贡献。

中国科学院院士



2014年8月30日

## 序 二

以认识地球为目标的地球科学有三个研究及应用领域,即勘察和开发矿产资源、保护生态环境、防治地质灾害。在 20 世纪,地球科学在开发地球上的矿产资源方面取得前所未有的成就,特别是能源矿产开发所达到的水平,使人类的物质文明达到目前这样的高度。进入 21 世纪以来,资源开发的后续问题,即保护生态环境问题,成为全世界更为关注的重要议题,因而保护生态环境日益成为地球科学中更受重视的研究和应用领域。可以预期,在 21 世纪,保护生态环境会成为地球科学中最活跃和最有实际应用价值因而备受关注的研究领域。

在这样的背景下,像环境地质学、环境地球物理学、环境地球化学这样一些新兴学科应运而生。这些学科拓宽了传统的地球科学的研究领域视野,并带来了研究方法的深入和更新,而各不同的传统学科的相互渗透和交融则更为明显。

万云洋老师原来从事化学生物学的研究工作,到中国石油大学(北京)工作后开始将化学和生物学的部分研究方法向地质科学移植,其现在实验主攻方向即是地质微生物学、地球化学方面的教学,近年来关注环境地球化学方面的研究工作,这些都是新的探索领域。从我和万老师的接触和对他的了解来看,他更重视学科领域中的微观和实验环节,非常强调培养学生的实验室工作能力,他自己更重视实验技能的提高和实验室工作内容的扩充。

《环境地质微生物学实验指导》就是他近年来所关注的工作的部分总结。应该说,有关微生物的实验在生物学和医学领域已经相当成熟,但是万老师所编的实验指导书,将传统的微生物实验研究的应用领域扩展到环境地质学科,随之而来的是实验方法和内容的某些变更,这些都留有万老师探索的痕迹。万老师的书,对实验步骤和操作过程叙述甚详,对实验结果的分析引导颇有见解,特别是对实验的准备工作描述和要求十分严格详尽,这些都有利于培养现在大学生对实验室工作的兴趣和现在学生中所缺乏的实验技能即动手能力。作为希望则是,能够在微观的实验中引申出实验内容可能的宏观效果,应该有所表述,即所谓能够“微言大义”。

《环境地质微生物学实验指导》在学科领域上是新兴的,所涉及的研究方法和内容上是微观的、实用的,在地球科学这样非常注重实践的学科中,有这样一本书出版,无疑是一个好的开端。希望万老师以这本书为起点,能够在今后有内容更深入、更有探索性的著作问世。谨为之序。

全国首批首席科学传播专家  
中国石油大学(北京)特聘教授

楚泽沛

2014年8月9日

# 前 言

环境地质微生物实验课程是微生物学理论课程的补充和深化。事实上,微生物是环境的产物。本书以环境和地质的实践环节为主,围绕技术、应用和创新等要素设计课程内容,以理论课的直观验证为基础,相对独立,并以技巧、技术和技能为主,逐渐完善学生考核体系,注重对学生综合运用科学知识、技术能力和创新能力的培养。本书设计 64 学时教学(教师可根据自身实际选择开展),包括理论教学 8 学时,实验教学 56 学时。本书适合环境科学、环境生物学、微生物学、地球化学、地质微生物学、生物化学、环境工程、环境生物工程、石油工程等交叉学科教学参考。

本书主要分成如下六个方面展开:

实验 1 是对微生物实验的初步入门和准备,也是所有微生物分析的基础,包括器皿消毒和除菌、经典培养基的一般制备方法等。这部分虽然尚不涉及对微生物的操作,但处处针对微生物,并在操作中有目的地消除了可能的杂菌污染,设置了创新性提问。

实验 2 是对培养微生物进行初步计数、测量和观察,主要运用(光学)显微镜技术和染色方法,对各类微生物如细菌、酵母菌、放线菌、霉菌等的死体和/或活体菌落进行计数,观察其运动和形态。这部分以已知模式菌为实验目标,为初学者提供一个感性的认知过程,锻炼和规范初学者的基本操作技能。可以说,实验 1 和实验 2 是所有研究微生物或对微生物有兴趣的人首先应解决或了解的,是共性的。

实验 3 是对环境地质样品采集、前处理和保存的规范化描述。由于环境地质样品的复杂性、微生物样品的多样性和脆弱性,一旦此环节出现问题,后面所有环节都会出现问题。为了横纵向比对,规范化操作尤为重要,我们结合有关国家标准,对各种特定的环境介质(如空气、水、土壤等)、特定的环境样品(如食品、饲料、化妆品)、特定的环境空间(如口腔、皮肤、油藏)等都作了举例,带有一定的研究性,抛砖引玉,以飨同行。

实验 4 是考察各种环境因素对微生物的不同影响效果,考察了化学因素(有

机和无机化合物)对微生物的影响,高阶学者可以进一步深入。

实验5是应用实验1至实验4的各项训练和条件保障,对于自然界的各种(特定)微生物进行筛选和鉴别,包括水中大肠杆菌的测定、抗药性突变菌株分离、酸乳和牛乳菌株分离,以及 BIOLOG 分类鉴定;包括生理、生物化学测定,如吲甲伏柠(IMViC)—硫化氢实验、糖发酵实验等;包括动力学实验,如细菌生长曲线的测定、细菌 DNA 中 G+C 值的紫外测定、质粒 DNA 转化实验等。

实验6是选做实验,包括免疫电泳等,以补充对微生物的认识和利用。

本书的鲜明特点之一是培养基的基础,各种组成成分尽可能地明确了现行技术要求和规范,大量地引用了我国已经明确规范了的各类技术标准。如引入本书涉及的化学试剂现行标准 200 多条,重要原材料(包括大米、大麦、玉米、豌豆等,大分子如琼脂、明胶、淀粉等)标准 50 多条,为规范各类培养基的统一性和基础性奠定可比性。

本书的鲜明特点之二是对于一些可能引起歧义的化合物和概念,特别是由于中文命名中混乱引起的歧义,尽可能地予以纠正,给出多个同义名词,同时给出化合物的结构式,避免引起二次混淆,也给出一些常见、常用和复杂化合物的结构式,以利于统一和避免歧义。

本书的鲜明特点之三是给出大量图谱、公式、反应方程,说明实验流程、操作步骤和/或机理等,尽可能以可看的实验生动直观地展示文字所不能尽言的内容,初学者也非常容易掌握。

通过环境地质微生物实验教学,使学生掌握环境地质微生物的常规实验技术,掌握规范的特定/特殊环境地质样品采集、前处理、无菌操作,培养基设计和配制,微生物筛选、观察、鉴定和保存,微生物基本生理及生物化学特性,代谢产物分析等技术要领,并在此基础上通过综合性实验设计的锻炼使学生达到对理论与各项实验技术的灵活运用,大量地使用了图谱等直观反映实验步骤和内容的方式,使得学生基本上能够按图索骥,初步地培养学生独立思考、独立动手、独立分析和团队协作解决实际问题的能力。

环境地质学微生物实验是综合性很强的多学科交叉实验。本书特色是体现了近年来环境、地质、生物化学和微生物学的结合,并特别加强了化学的内容,强调和突出了一些生物化学反应机理,以利于环境、地质和微生物学专业的研究者和学生阅读和理解。

在本书编著过程中,得到侯卫国博士和陈梅梅博士的大力帮助,两位博士分



别撰写了实验 5 第十部分、第十一部分和实验 6 第五部分初稿。楚泽涵教授和林壬子教授对全书进行了全面的审阅和指导。书中部分图片全部由费佳佳绘制。研究生宫瑞、田燕、穆红梅、孙午阳等也为本书的出版做了大量的文字工作。在此表示衷心的感谢。

本书的出版,部分地受到北京市青年英才支持计划(YETP0670)、中国石油大学(北京)优秀青年教师基金(KYJJ2012-01-10)、中国石油大学(北京)重点教改基金(京教[2013]2号,2013-2-8)和国家自然科学基金(41373086)的资助。

由于编著者水平和时间有限,错误和不足肯定难免,请读者和专家不吝赐教。欢迎随时来信来函批评指正,帮助我们提高,邮箱:hjdzsw@126.com。谢谢!

**编著者**

**2014年3月**

# 目 录

<b>实验 1 灭菌与培养基的制备</b> .....	1
第一部分 高压蒸汽灭菌 .....	1
第二部分 干热灭菌 .....	4
第三部分 间歇灭菌和巴斯德消毒法 .....	5
第四部分 紫外线灭菌和化学灭菌及其联合 .....	7
第五部分 微孔滤膜过滤除菌 .....	9
第六部分 天然培养基——牛肉膏胨培养基的制备 .....	12
第七部分 合成培养基——高氏 I 号培养基的制备 .....	18
第八部分 选择性培养基——马丁氏培养基的制备 .....	19
第九部分 血液琼脂培养基的制备 .....	20
<b>实验 2 微生物的计数、测量、运动和形态观察</b> .....	23
第一部分 显微镜的使用 .....	23
第二部分 微生物细胞大小和质量的测定 .....	27
第三部分 显微镜直接计数法 .....	30
第四部分 平板菌落计数法 .....	34
第五部分 细菌的简单染色和革兰氏染色 .....	37
第六部分 细菌运动观察 .....	41
第七部分 细菌的芽孢染色法 .....	45
第八部分 荚膜染色法 .....	47
第九部分 酵母菌的形态观察及死活细胞的鉴别 .....	49
第十部分 放线菌的形态观察 .....	51
第十一部分 霉菌的形态观察 .....	55
<b>实验 3 环境地质样品采集、前处理和保存</b> .....	58
第一部分 空气中微生物的检测 .....	58
第二部分 水样的采集 .....	60
第三部分 土壤样品的采集、前处理和保存 .....	66
第四部分 水中细菌总数的测定 .....	70
第五部分 特定环境地质微生物的采集、定性和定量检测 .....	72
第六部分 土壤耗氧微生物的分离与纯化 .....	83
第七部分 厌氧微生物的培养技术 .....	90
第八部分 菌种和核酸样品的保藏 .....	94

<b>实验 4 环境因素对微生物生长发育的影响</b> .....	106
第一部分 化学因素对微生物的影响 .....	106
第二部分 氧对微生物的影响 .....	109
第三部分 温度对微生物的影响 .....	111
第四部分 渗透压(盐度)对微生物的影响 .....	113
第五部分 pH 对微生物的影响 .....	114
第六部分 生物因素对微生物的影响 .....	116
第七部分 紫外线和化学品对微生物的影响 .....	120
第八部分 微生物分析测定抗生素的效价 .....	124
第九部分 用生长谱法测定微生物的营养要求 .....	128
<b>实验 5 综合实验</b> .....	131
第一部分 细菌生长曲线的测定 .....	131
第二部分 多管发酵法测定水中大肠杆菌 .....	134
第三部分 抗药性突变株的分离 .....	139
第四部分 最低抑制浓度法测定抑菌效力 .....	141
第五部分 糖发酵实验 .....	143
第六部分 风味乳酸的制作及乳酸菌的分离、纯化 .....	145
第七部分 吡甲伏柠(IMViC)—H <sub>2</sub> S 实验 .....	149
第八部分 小型发酵罐的使用与发酵过程中的主要生物化学指标测定 .....	154
第九部分 微生物多糖的提取及测定 .....	157
第十部分 土壤微生物产酶制剂的制备和酶促降解 .....	165
第十一部分 利用 BIOLOG 系统进行微生物的分类鉴定 .....	168
第十二部分 细菌 DNA 中 G+C 值的紫外测定 .....	171
第十三部分 质粒 DNA 转化实验 .....	176
第十四部分 微生物细胞的固定化 .....	178
第十五部分 微生物和酶对环境各种分子的利用和降解 .....	180
第十六部分 微生物对原油的生物化学作用 .....	184
第十七部分 微生物群落结构分析 .....	185
第十八部分 微生物功能代谢活性分析 .....	188
<b>实验 6 选做实验</b> .....	191
第一部分 噬菌体的效价测定 .....	191
第二部分 从自然环境中分离和纯化噬菌体 .....	193
第三部分 免疫电泳 .....	196
第四部分 脱氧核糖核酸重组 .....	198
第五部分 细菌和真菌的分子鉴定 .....	201
第六部分 凝集反应 .....	203
<b>参考文献</b> .....	207

附录..... 208

附录 1 部分培养基配制 ..... 208

附录 2 环境地质微生物学实验相关标准 ..... 237

附录 3 生物学指示剂和染色常用化合物分子结构及其特点简介 ..... 244

附录 4 染色液配制及染色法 ..... 256

附录 5 生长因子 ..... 258

附录 6 环境地质微生物实验室常用器具 ..... 262

附录 7 环境地质微生物实验室要求简则 ..... 264

附录 8 实验室临时急救指南 ..... 265

附录 9 本书相关微生物拉丁文名称 ..... 266

附录 10 本书相关名词解释 ..... 268

# 实验 1 灭菌与培养基的制备

在人类活动的自然环境中,生物无处不在,尤其是微生物。在环境地质微生物样品的制备和研究中,为了保证目的菌群不被污染和干扰,所有器皿和培养基的无菌状态是首要条件。否则,杂菌的引入会使得研究复杂化或难以进行。因此,在环境地质微生物实验研究中,第一步就要进行器皿等的无菌处理。同时注意,利用各种灭菌方法灭菌后的器皿或物件应立即使用;或者妥善地进行相应的无菌防护,比如放置于无菌、干燥、带盖密封的干燥器中;或者在灭菌前即进行了相应的包裹,比如包裹在双层的棉布、纸张或其他相应材料(注意材料的多孔性、通透性)中。第二步就要进行培养基的配制,以利于目标微生物的生长繁殖和鉴定之用。注意,培养基按成分可分为天然培养基、合成培养基和介于两者间的半合成培养基。天然培养基如牛肉膏(牛肉粉)、豚胶、肉浸液(meat infusion)、玉米、血液和/或血清(一般针对营养要求较高的细菌)、马铃薯、豆粉、大米等,此类材料配成的培养基很难做到不同批号之间质量的稳定一致,实验结果之间可能有差异,实验条件务必注明原料的商品名称、批号、产地、制作过程等,在正式实验前,最好有小试。由于天然培养基成本低、微生物繁殖较好,所以一般常用的培养基均以天然培养基为主。培养基按形态可分为液体培养基、流体培养基、半固体培养基和固体培养基。除了一些特殊用途的培养基,如鸡蛋斜面培养基和吕氏血清斜面培养基分别用鸡蛋和血清作凝固剂,观察明胶液化用明胶作固化剂(见明胶培养基),硅胶可用于自养微生物生长的固体培养基外,当前科研用大多数培养基的凝固剂都采用琼脂(琼胶),因此培养基也可以根据琼脂的浓度来分:无琼脂加入的为液体培养基,加入 0.05%~0.07%的为流体培养基,加入约 0.3%的为半固体培养基,加入量大于 1%左右的即为固体培养基。培养基按用途可分为基础培养基(basic media)、增菌培养基(enrichment media)、选择性培养基(selective media)、鉴别培养基(differential media)、厌氧培养基(anaerobic media)等。除以上新鲜配制的培养基外,近来出现的干燥培养基使用时只需按比例加入水、灭菌后即可使用,省时、省力、简便、易带且易标准化,但针对性略差。

## 第一部分 高压蒸汽灭菌

### 一、实验目的和要求

- (1)了解高压蒸汽灭菌的基本原理及应用范围。
- (2)学习高压蒸汽灭菌的操作方法。

### 二、基本原理

高压蒸汽灭菌是将待灭菌的物品放在一个密闭的灭菌锅内,通过加热,使灭菌锅隔套间的水沸腾而产生蒸汽,通过加压(1~2atm, 1atm=101325Pa)而使水的沸点增高,得到高于 100℃的水饱和蒸汽温度,并使菌体蛋白(本书中,所有蛋白或蛋白质一词均用蛋白代替)凝固变性、核酸

分解、代谢混乱而达到灭菌和灭孢子/芽孢的目的。

### 三、实验材料与设备

培养皿(6套/包)、试管、平皿、移液器、手提式高压蒸汽灭菌锅或自动电热压力蒸汽灭菌锅(图1-1)、牛肉膏朊胨培养基(见实验1第六部分,如果仅仅练习高压灭菌操作可省略,由指导教师事先准备。建议同具体实验结合起来教学)等。相关器皿须符合GB/T 21298—2007《实验室玻璃仪器 试管》、QB/T 2561—2002《实验室玻璃仪器 试管和培养管》以及其他实验室玻璃仪器系列标准(附录2)。

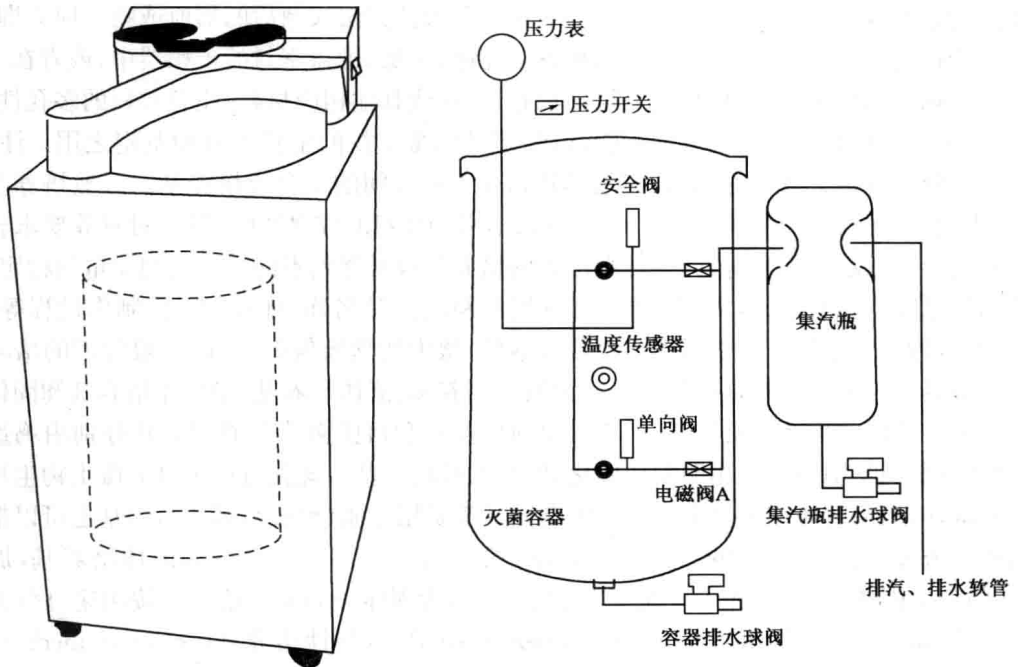


图1-1 自动电热压力蒸汽灭菌锅及工作原理图

### 四、操作步骤

这里描述一般灭菌锅的操作步骤,具体情况请参考仪器操作指南或使用说明。

#### 1. 取锅加水

首先将内层锅取出,再向外层锅内加入适量的水,使水面与三角搁物架相平为宜。此步骤在新式的仪器中已经不需要,可以直接加水。

**注意:**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。现在有些灭菌锅并不需要取出内层锅,直接从边缘加水至一定高度即可。

#### 2. 放锅装物

放回内层锅,并装入待灭菌物品。

**注意:**不要装得太挤,以免妨碍蒸汽流通而影响灭菌效果。三角烧瓶与试管等带灭菌器皿口端均不要与桶壁接触,以免冷凝水淋湿包口的纸而透入棉塞(或泡沫塑料塞、试管帽、试管纸

等封口器件)。

### 3. 加盖保密

加盖,并将盖上的排气软管插入内层锅的排气槽内(自动电热压力蒸汽灭菌锅无此步骤)。再以两两对称的方式同时旋紧相对的两个或四个螺栓,使螺栓松紧一致,勿使漏气。

### 4. 通电加热

开启电源加热,并同时打开手动排气阀(自动电热压力蒸汽灭菌锅无需此步骤),使水沸腾以排除锅内的冷空气。待冷空气完全排尽后,关上排气阀,让锅内的温度随蒸汽压力增加而逐渐上升。当锅内压力升到所需压力时,控制热源,维持压力至所需时间。

本实验所用压力为 1atm,所用温度为  $121^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 。一般来说,对于未包裹的物件,20min 灭菌;对于有所包裹的物件(注意包裹材料的通透性和多孔性),30min 灭菌。如果所用温度达到  $131^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,压力达到 2atm,则灭菌时间可以缩短到 15min。由于不同厂商的产品会有一些的差异,具体温度和操作最好遵守厂家的使用说明。同时,特定菌种的灭菌时间最好根据文献和研究目的确定。

老式灭菌锅可能用电炉或煤气加热,开、关排气阀除冷空气等步骤和要求相同。

高压灭菌的主要因素是温度,压力提供一个维持高温饱和蒸汽状态。灭菌锅实际起灭菌效果的是饱和蒸汽,在一定的压力和温度下,蒸汽实际上处于一种饱和状态。这种蒸汽温度较高,湿度较大,可以较好杀菌。但因为是饱和蒸汽,所以又不会让灭菌材料浸湿。要想形成饱和蒸汽,至关重要的就是在灭菌前排冷空气,只有排除了锅内的冷空气,才能保证锅里的饱和蒸汽能够充满。因此,排冷空气至关重要,也是高压灭菌最关键的。

**注意:**如果灭菌锅是手动排气阀,先手动将排气阀打开,让温度升高一阵再关上(如果是自动排气的就无此步骤)。降温时,待温度降至  $0^{\circ}\text{C}$ (或室温)再打开排气阀,因为如果灭菌的是液体容易爆炸。具体操作请遵守仪器厂商使用说明。

### 5. 断电待零

灭菌所需时间到后,切断电源或关闭热源,让灭菌锅内温度自然下降。当且仅当压力表的压力降至“0”时,打开排气阀,旋松螺栓,打开盖子,取出灭菌物品。

**注意:**压力表的压力一定要降到“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容器口,造成棉塞沾染培养基而发生污染,甚至灼伤操作者。

### 6. 无菌复查

实验室一般常用的灭菌锅体积不大,所装药品常见,器皿结构并不复杂,物件量并不多且包裹适当,则可以将取出的灭菌培养基放入  $37^{\circ}\text{C}$  温箱培养 1d,经检查若无菌生长,即可待用。

如果所用灭菌锅体积庞大,所用药品特殊,一次所装器皿和物件众多,或者要进行彻底的无菌检查,则需把灭菌后的培养基按灭菌锅内的不同位置每处抽取数管(瓶),标上记号,置  $25 \sim 37^{\circ}\text{C}$  培养一周左右进行检查。如果培养基没什么变化,说明灭菌效果良好;如果某一位置的培养基出现了杂菌菌落,可能是摆放得太紧导致蒸汽不畅,或锅的结构不合理等原因所致,应根据情况进行改进;如果大部分或全部菌种瓶都出现杂菌,说明灭菌温度或灭菌时间不够,应提高压力、提高温度或延长灭菌时间。如经过几次检验都证明能彻底灭菌后,以后可按相同条件灭菌,可不必进行检查。

**注意:**培养微生物的培养皿,用后必须先经  $121^{\circ}\text{C}$ 、30min 高压灭菌,再行清洗。同时要注

意,可能存在高温高压菌。如果某些菌落在高温下生存良好并有增殖现象,即可证明是耐高温菌或超高温菌等,应要特别注意。

对于一些特殊的环境器具和物品,可参考表 1-1 灭菌。

表 1-1 一些物件的灭菌条件(据陈天寿,1995)

灭菌物件	容器	灭菌压力 MPa	灭菌温度 ℃	灭菌时间 min
硫乙醇酸盐、改良马丁糖肉汤等培养基	中号试管、茄形瓶	0.06	114	30
含糖汉氏液、破伤风培养基	10L 瓶	0.06	114	30
流脑、百日咳培养基	克氏瓶、小罐	0.06~0.07	114~117	30
稀释液	铝筐	0.07	116	30
保养液、采血器	包布、铝皮箱等	0.07	116	30
工作服、小盐水等	包布、铁皮箱、茄形瓶	0.105	121	30~60
肉汤琼脂	克氏瓶	0.105	121	30
无糖汉氏液、乙类瓶等	50~60L 瓶	0.105	121	30
各类盐水、交换水、蒸馏水等	50~60L 瓶	0.105	121	40
带活菌活毒培养基		0.105	121	30
实验动物尸体垃圾	铁皮箱罐等	0.105	121	60
破伤风等芽孢菌活菌	瓶、滤器等	0.105	121	90
甲类瓶、导引管、空中管种括棒等杂件	5L 瓶、10L 瓶、铁皮箱等	0.105	121	60

## 第二部分 干热灭菌

### 一、实验目的和要求

- (1)了解干热灭菌的原理和应用范围。
- (2)学习干热灭菌的操作技术。

### 二、基本原理

干热灭菌是利用高温使微生物细胞内的朊凝固变性、核酸降解和/或代谢混乱而达到灭菌的目的。细胞内的朊凝固性、核酸降解和/或代谢混乱与其本身的含水量有关。在菌体受热时,环境和细胞内含水量越大,则朊凝固、核酸降解就越快;反之,含水量越小,朊凝固和核酸降解缓慢。

### 三、实验材料与设备

培养皿、试管、吸管、移液器、电烘箱(0~200℃或 300℃,视实验需要而定)等。

### 四、操作步骤

#### 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。



**注意:**物品摆放得不要太挤,待灭菌的器皿或物件之间以及到炉壁的距离最好保持3~5cm,以免妨碍箱内空气流通;器皿或物件不接触电烘箱炉壁也是防止包装材料考焦起火。

## 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℃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约170℃、160℃、150℃、140℃和121℃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

当温度升到约170℃时,借恒温调节器的自动控制,保持此温度1h。

如选择温度升到约160℃,保持温度2h。

如选择温度升到约150℃,保持温度2.5h。

如选择温度升到约140℃,保持温度3h。

如选择温度升到约121℃,保持温度过夜(不小于8h)。

干热灭菌过程中,严防恒温调节的自动控制失灵造成安全事故。

## 4. 降温

切断电源,自然降温或使仪器按程序降温。

## 5. 开箱取物

待电烘箱内温度降到室温后,打开箱门,取出灭菌物品。

170℃灭菌总需时约2~3h,包括放器皿入炉、预热、加热到约170℃、保持1h和冷却降温。

160℃灭菌总需时约3~4h,包括放器皿入炉、预热、加热到约160℃、保持2h和冷却降温。

150℃灭菌总需时约4~5h,包括放器皿入炉、预热、加热到约150℃、保持2.5h和冷却降温。

140℃灭菌总需时约5~6h,包括放器皿入炉、预热、加热到约140℃、保持3h和冷却降温。

121℃灭菌总需时约7~10h,包括放器皿入炉、预热、加热到约121℃、保持此温度过夜和冷却降温。

如果待灭菌器皿和材料摆放得过于紧密,灭菌时间需要增加。

电烘箱内温度未降到70℃以下,切勿自行打开罐门,以免骤然降温导致玻璃炸裂。

另外,接种环在酒精灯上的短暂灼烧也是干热灭菌的一种,即直接燃烧法。简单的灭菌可用此法。

# 第三部分 间歇灭菌和巴斯德消毒法

## 一、实验目的和要求

(1)了解间歇灭菌和巴斯德消毒的基本原理。

(2)掌握间歇灭菌和巴斯德消毒方法。

## 二、基本原理

间歇灭菌,也称廷道尔灭菌法(Tyndallization),是针对热抗性细菌(如芽孢/孢子)的灭菌