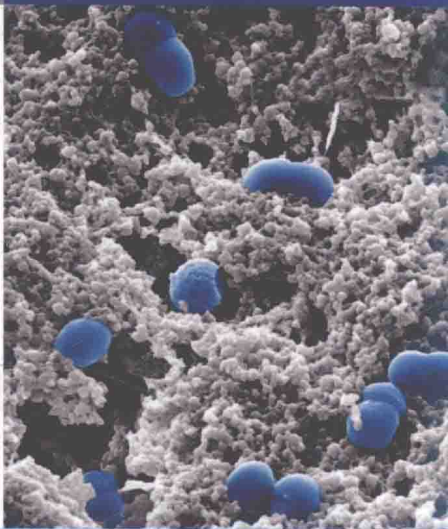




全国高等学校“十三五”农林规划教材
生物学实践教学改革系列教材

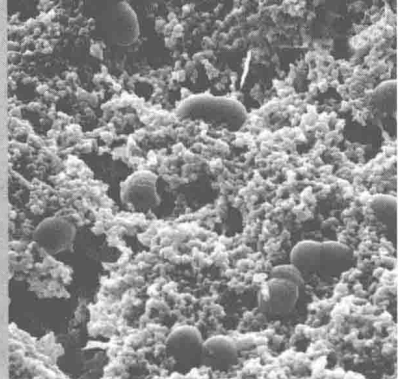
微生物学实验

主编 咸洪泉 郭立忠 李树文



高等教育出版社

全国高等学校“十三五”农林规划教材
生物学实践教学改革系列教材



微生物学实验

主 编 咸洪泉 郭立忠 李树文

副主编 燕淑海 李雅华 杨 松 徐丽丽

编 者 (以姓氏笔画为序)

于 浩 朱丽萍 李树文 李雅华

杨 松 张 莉 张燕娇 陆秀华

陈师勇 咸洪泉 徐丽丽 郭立忠

燕淑海

内容简介

本书是根据高等农林院校微生物学相关课程教学要求,结合多年教学经验以及现代微生物学实验技术前沿编写而成,全书共分为基础性实验、综合性实验、研究性实验三篇,内容涉及微生物的形态和结构、营养和培养基、代谢和发酵、生长和控制、遗传变异和基因表达、生态和分类以及鉴定和应用等,共 35 个实验。本书针对一些实验新增了教学课件、操作视频、拓展学习等数字课程资源(教材中用 $\textcircled{\text{e}}$ 表示),供教学人员参考,提升教学效果。

本书可供高等院校生物科学、生物技术、农学、环境科学、食品科学、植物保护学、园艺学以及药学等专业学生学习使用,也可供相关人员查阅和参考。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验 / 咸洪泉, 郭立忠, 李树文主编. -- 北京: 高等教育出版社, 2018.2

生物学实践教学改革系列教材

ISBN 978-7-04-048694-0

I. ①微… II. ①咸… ②郭… ③李… 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 (2017) 第 248681 号

Weishengwuxue Shiyan

策划编辑 高新景
责任印制 刘思涵

责任编辑 高新景

特约编辑 赵晓玉

封面设计 张志奇

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印 刷 山东临沂新华印刷物流集团
开 本 850mm×1168mm 1/16
印 张 13.25
字 数 300千字
购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.hepmall.com.cn>
<http://www.hepmall.com>
<http://www.hepmall.cn>

版 次 2018年2月第1版
印 次 2018年2月第1次印刷
定 价 25.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物 料 号 48694-00

数字课程 (基础版)

微生物学 实验

主编 咸洪泉 郭立忠 李树文

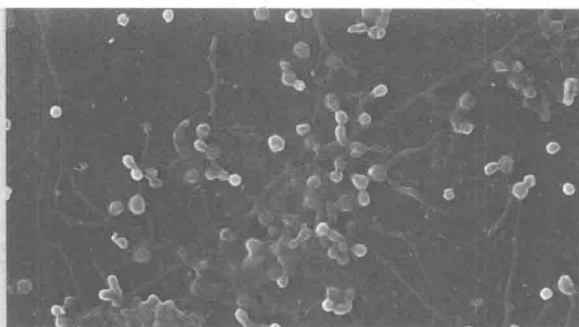


登录方法:

1. 电脑访问 <http://abook.hep.com.cn/48694>, 或手机扫描下方二维码、下载并安装 Abook 应用。
2. 注册并登录, 进入“我的课程”。
3. 输入封底数字课程账号 (20 位密码, 刮开涂层可见), 或通过 Abook 应用扫描封底数字课程账号二维码, 完成课程绑定。
4. 点击“进入学习”, 开始本数字课程的学习。

课程绑定后一年为数字课程使用有效期。如有使用问题, 请发邮件至:

lifescience@pub.hep.cn



微生物学实验

“微生物学实验”数字课程与纸质教材配套使用, 是纸质教材的拓展和补充。数字课程内容包括教学课件、操作视频、拓展学习、应用案例、拓展实验等, 丰富知识的呈现形式, 有助于提升教学效果, 方便学生自主学习。

用户名: 密码: 验证码: 5360 忘记密码?

<http://abook.hep.com.cn/48694>

扫描二维码, 下载 Abook 应用



► 前 言

本书在前一版《微生物学实验教程》的基础上,结合现代微生物学实验技术的发展前沿,采用“纸质教材+数字课程”的新形态教材出版模式,对相应内容增补编写而成,使实验内容在满足教学需求的前提下,进一步加强学生动手能力、自主分析问题和解决问题能力培养。本书增加了拓展学习、拓展实验、应用案例和资源链接等数字资源,使实验内容更加直观形象,与前沿技术联系更紧密,有效拓展了学生的视野和思维,有利于从感官认识到理性操作、从基础理论到实践应用方面培养学生对微生物学实验技术的学习及运用能力。本书分为3篇,即基础性实验、综合性实验和研究性实验,形成基础-综合-创新的梯级实验体系,内容涉及微生物的形态和结构、营养和培养基、代谢和发酵、生长和控制、遗传变异和基因表达、生态和分类以及鉴定和应用等共35个实验项目,各相关专业师生可根据自身教学任务和条件酌情选择。

本书编者由青岛农业大学和潍坊工程职业学院的有多年教授微生物学实验课程经验的优秀教师组成,编写具体分工是实验1、7、26由李雅华执笔,实验2和25由张莉执笔,实验3由李雅华和张燕娇执笔,实验4、6、8、9、27、28、29由李树文执笔,实验5、17、31、32、33、34由咸洪泉执笔,实验10由陆秀华执笔,实验11由朱丽萍执笔,实验12由杨松执笔,实验13、15、30由郭立忠和徐丽丽执笔,实验14、20、21、23由燕淑海执笔,实验16、18、19、35由于浩执笔,实验22由陈师勇执笔,实验24由张燕娇执笔。本书在编写过程中得到了青岛农业大学与各兄弟院校领导和教师的大力支持和帮助,在此一并表示感谢。

本书适合高等院校生物科学、生物技术、农学、环境科学、食品科学、植物保护学、园艺学以及药学等专业学生学习使用,也可供相关人员查阅和参考。

由于编者水平有限,难免有错误和不足之处,恳请读者批评指正。

编 者

2017年2月

目 录

第一篇 基础性实验

实验 1 培养基的配制与灭菌技术	3
实验 2 微生物的分离、纯化与微生物的培养特征	8
I 微生物的分离与纯化	8
II 微生物的培养特征	12
实验 3 细菌的染色方法及形态观察	16
I 细菌的简单染色及油镜的使用	16
II 细菌的革兰氏染色	18
III 细菌的鞭毛染色	20
IV 细菌的芽孢染色	21
V 细菌的荚膜染色	22
VI 细菌类脂粒 PHB 的染色	23
实验 4 放线菌、酵母、霉菌形态观察	26
I 放线菌形态观察	26
II 酵母形态观察	29
III 霉菌形态观察	31
实验 5 微生物细胞大小的测定和显微镜直接计数	35
实验 6 稀释培养测数法 (MPN)	40
实验 7 细菌生长曲线的测定	45
实验 8 细菌的生理生化实验 (IMViC 与硫化氢试验)	48
实验 9 糖发酵与淀粉水解实验	51
实验 10 物理、化学因素对微生物的影响	54
I 物理因素对微生物的影响	54
II 化学因素对微生物的影响	55

实验 11	生长谱法测定微生物的营养需求	57
实验 12	微生物的物理、化学诱变	60
实验 13	微生物菌种保藏方法	64
实验 14	厌氧菌的分离和培养	71
实验 15	噬菌体的分离纯化与效价测定	74
实验 16	微生物的趋化性和细菌运动性实验	78
实验 17	机械搅拌通风发酵罐的结构和基本操作技术	82

第二篇 综合性实验

实验 18	大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	93
实验 19	大肠杆菌抗药性突变株的分离	100
实验 20	水中生化需氧量 (BOD) 的测定	103
实验 21	葡萄酒的制作	108
实验 22	快速、简易的微生物检测技术	112
实验 23	酵母细胞的固定化与酒精发酵	117
实验 24	细菌形态的电镜观察	120
I	细菌形态的透射电镜观察	120
II	细菌形态的扫描电镜观察	123

第三篇 研究性实验

实验 25	从土壤中分离、纯化、筛选产淀粉酶菌株	129
实验 26	产氨基酸抗反馈调节突变株的筛选	132
实验 27	单级溶媒萃取——青霉素提取	136
实验 28	发酵培养基的正交试验设计	139
实验 29	发酵条件的响应面优化	146
实验 30	药用真菌多糖的提取	157
实验 31	细菌的分子生物学鉴定	160
实验 32	真菌的分子生物学鉴定	164
实验 33	外源基因的原核表达	169
实验 34	外源基因的真核表达	173
实验 35	利用 CRISPR/Cas9 系统编辑大肠杆菌目的基因	179

附录

I 染色液的配制·····	184
II 常用培养基的配制·····	187
III 常用试剂和溶液的配制·····	195
IV 微生物基因克隆表达常用试剂与培养基的配制·····	197
V 酵母原生质体融合实验用培养基及溶液配制·····	200
参考文献·····	201

第一篇 基础性实验



实验 I

培养基的配制与灭菌技术

一、目的要求

1. 掌握培养基的配制原理及几种常用培养基的配制方法。
2. 掌握高压蒸汽灭菌原理及普通培养基的灭菌方法。

二、实验原理

培养基是一种人工配制的、适合不同微生物生长繁殖或积累代谢产物的营养基质。由于微生物具有不同的营养类型，对营养物质的要求各不相同，加之实验和研究目的不同，所以培养基的种类很多，使用的原料也差异很大；但从营养角度分析，培养基中一般应含有微生物生长所必需的碳源、氮源、无机盐、生长因子及水等。

牛肉膏蛋白胨培养基是一种应用最广泛的细菌基础培养基。高氏 I 号培养基是用来分离和培养放线菌的合成培养基。马铃薯葡萄糖琼脂培养基（简称 PDA）主要用于真菌的培养，有时也用于植物病原细菌的培养。马丁氏培养基是用来分离真菌的选择性培养基。察氏培养基主要用于培养霉菌供形态观察用。

在配制固体培养基时需要加入琼脂。琼脂是从石花菜等海藻中提取的胶体物质，是应用最广的凝固剂，其熔点为 96°C ，凝固点为 40°C 。

任何一种培养基配制结束后均应及时彻底灭菌，以备使用。一般培养基灭菌采用高压蒸汽灭菌。高压蒸汽灭菌是基于水的沸点随着蒸汽压力升高而升高的原理设计的，是将待灭菌的物品置于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，产生高于 100°C 的温度，导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。

三、主要器材与试剂

1. 材料与试剂

牛肉膏、蛋白胨、可溶性淀粉、马铃薯、葡萄糖、蔗糖、琼脂、 NaOH 、 HCl 、 KNO_3 、 NaCl 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NaNO_3 、 KCl 、孟加拉红、链霉素。

2. 仪器与用具

高压蒸汽灭菌锅、天平、电炉、试管、锥形瓶、烧杯、量筒、漏斗分装架、牛角匙、精密 pH 试纸、玻璃棒、纱布、棉花、线绳、石棉网、牛皮纸或报纸等。

© 1-1

实验 I 教学课件

四、实验步骤

1. 常用培养基的配制

(1) 牛肉膏蛋白胨培养基

配方：牛肉膏 3 g，蛋白胨 5~10 g，NaCl 5 g，琼脂 15~20 g，水 1 000 mL，pH 7.0~7.2。

配制方法：将称好的牛肉膏、蛋白胨和 NaCl 溶于水中，加入琼脂加热至融化，测定 pH，用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 调 pH 至 7.0~7.2，补加水至所需总体积。

注意：在操作过程中，称量药品用的牛角匙不能混用，称取完药品后应及时盖紧瓶盖，特别是蛋白胨极易吸水，称量时动作要快；配制培养基使用的水，一般情况下可以选用自来水；融化琼脂时，一般在锅底下面垫以石棉网煮沸融化，并用玻璃棒不断搅拌，以免琼脂粘锅、烧焦；调 pH 时要小心缓慢操作，尽量避免回调而带入过多的无机离子。

(2) 高氏 I 号培养基

配方：可溶性淀粉 20 g，NaCl 0.5 g，KNO₃ 1 g，K₂HPO₄·3H₂O 0.5 g，MgSO₄·7H₂O 0.5 g，FeSO₄·7H₂O 0.01 g，琼脂 15~20 g，水 1 000 mL，pH 7.4~7.6。

配制方法：称取可溶性淀粉，放入小烧杯中，用少量冷水将淀粉调成糊状，再加入少于所需水量的沸水中，继续加热，使其完全融化。然后称取其他各成分依次融化。待所有药品完全溶解后，加入琼脂加热至融化，调节 pH，补充水至所需总体积。

对于微量成分 FeSO₄·7H₂O，可先配成高浓度的贮备液后再加入：先在 100 mL 水中加入 1 g 的 FeSO₄·7H₂O 配制成 0.01 g/mL 溶液，再在 1 000 mL 培养基中加入 1 mL 的 0.01 g/mL 的贮备液即可。

(3) 马铃薯葡萄糖琼脂培养基

配方：马铃薯 200 g，葡萄糖（或蔗糖）10~20 g，琼脂 15~20 g，水 1 000 mL，pH 自然。

配制方法：将马铃薯洗净、去皮，切成 1 cm³ 大小，天平称取后，放入约与总体积相等的水中煮沸 30 min，用 4 层纱布过滤，取滤液，加入琼脂加热至融化，加葡萄糖（或蔗糖）搅拌使之溶解，pH 自然，补充水至所需总体积。

(4) 马丁氏培养基

配方：葡萄糖 10 g，蛋白胨 5 g，KH₂PO₄·3H₂O 1 g，MgSO₄·7H₂O 0.5 g，10 g/L 孟加拉红水溶液 3.3 mL，琼脂 15~20 g，水 1 000 mL，pH 自然，10 g/L 链霉素 3 mL。

配制方法：称取各成分，依次溶于水中。然后加入孟加拉红水溶液，混匀后，加入琼脂加热至融化，补充水至所需总体积，灭菌后备用。使用前将培养基融化冷却至 45~50℃ 时加入链霉素，使每毫升培养基中含链霉素 30 μg。

孟加拉红和链霉素是细菌和放线菌的抑制剂，对真菌无抑制作用，从而达到分离真菌的目的。

注意：由于链霉素受热易分解，所以需要在培养基灭菌之后添加，且添加时培养基的温度不能太高。

(5) 察氏琼脂培养基

配方：蔗糖 30 g，NaNO₃ 2 g，K₂HPO₄·3H₂O 1 g，KCl 0.5 g，MgSO₄·7H₂O 0.5 g，

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 琼脂 15~20 g, 水 1 000 mL, pH 自然。

配制方法：称取各成分，依次溶于水中。然后加入琼脂加热至融化，补充水至所需总体积。

2. 培养基的分装

根据不同需要，可将配制好的培养基趁热分装入试管或锥形瓶中。用试管分装培养基时，取玻璃漏斗一个，装在铁架上，玻璃漏斗下连接一根乳胶管，乳胶管的另一端连接一细玻璃管，乳胶管上夹一弹簧夹。操作时，用左手拿住空试管中部，并将漏斗下的细玻璃管插入试管内，以右手拇指与食指开放弹簧夹，中指和无名指夹住玻璃管，使培养基直接流入试管内（图 1-1）。装入量视试管大小及用途而定，固体培养基的分装量为试管高度的 $1/5 \sim 1/4$ 。用锥形瓶分装培养基时，容量以不超过容积的 $1/2$ 为宜，装量过多，培养基在灭菌时会因沸腾而污染棉塞。

注意：分装时不要将培养基沾到管口或瓶口上，以免棉塞沾到培养基而引起杂菌污染。

3. 加塞、捆扎

分装完毕后，通常用棉塞塞住管口或瓶口。加棉塞的主要目的是过滤空气，避免污染，并保证有良好的通气性能。棉塞应采用普通新鲜、干燥的棉花制作，不要用脱脂棉，以免因脱脂棉吸水使棉塞无法使用。棉塞制作方法：根据管口或瓶口大小取适量棉花铺成近正方形，将一角往里折，使其略成五边形，然后从一侧往另一侧卷紧（图 1-2）。

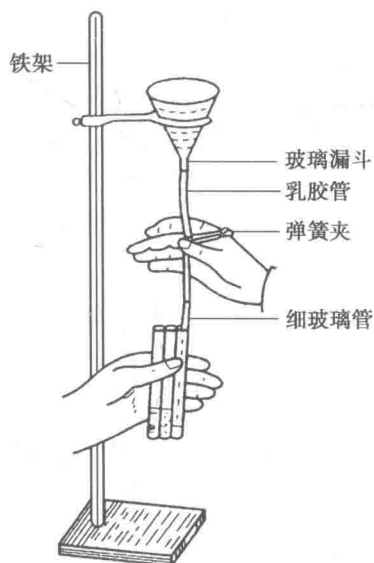


图 1-1 培养基的分装

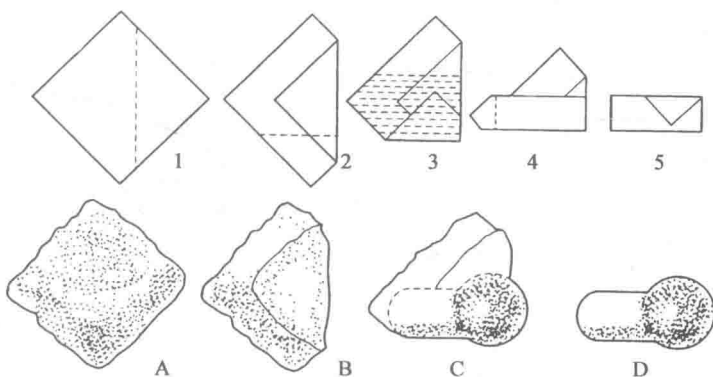


图 1-2 棉塞制作过程

制成的棉塞不要过紧或过松，塞好后，以手提棉塞，管、瓶不下落为合适。棉塞的 $2/3$ 应在管内或瓶内，上端露出少许棉花便于拔取。

塞好棉塞的试管 7 支扎成一捆。由于棉塞外面容易附着灰尘及杂菌，且灭菌时容易

凝结水汽，因此，在灭菌前应用牛皮纸或报纸将试管口、锥形瓶口包起来。再贴上标签，注明培养基名称、配制日期、配制人，准备灭菌。

4. 灭菌

手提式高压蒸汽灭菌锅结构如图 1-3 所示。

(1) 加水：打开灭菌锅盖，向灭菌锅内加水，使水面与三角搁架齐平。

(2) 装料、加盖：装入待灭菌物品，加盖，将盖上的排气软管插入内层灭菌桶的排气槽内。采用对角式均匀拧紧锅盖上的螺栓，使灭菌锅密闭，勿漏气。

(3) 排气：通电加热，并同时打开排气阀，当有大量蒸汽排出时，维持 5 min 左右，使灭菌锅内冷空气完全排出。

注意：若排空气不彻底，会因灭菌锅内温度达不到预期温度而影响灭菌效果。

(4) 升压：待冷空气完全排尽后，关上排气阀，让锅内的温度随蒸气压力增加而逐渐上升。

(5) 保压：当锅内蒸汽压力达到 0.103 MPa (1.05 kg/cm^2) 时，水蒸汽的温度升高到 121°C ，维持 15 ~ 30 min。

(6) 降压：灭菌所需时间到后，切断电源，让灭菌锅内温度自然下降，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：如果过早打开排气阀，就会因灭菌锅内压力突然下降，使容器内的培养基由于内外压力不平衡而冲出试管口或锥形瓶，造成棉塞沾染培养基而发生污染。

5. 灭菌后的处理

试管培养基灭菌后，待冷却到 $50 \sim 60^\circ\text{C}$ ，将试管棉塞端抬高一定高度，摆斜面，使培养基斜面长度为试管长度的 $2/5 \sim 3/5$ (图 1-4)。

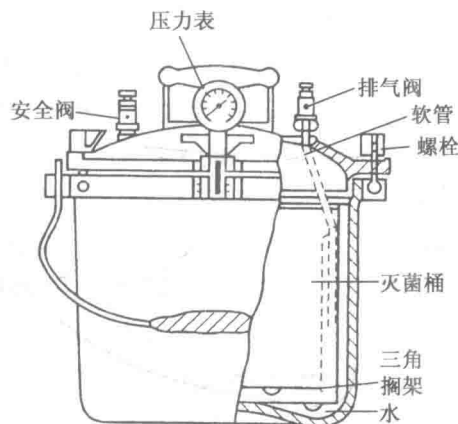


图 1-3 手提式高压蒸汽灭菌锅结构

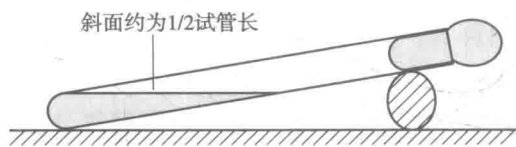


图 1-4 试管培养基摆斜面

注意：摆斜面时若培养基温度过高，斜面上会出现过多的冷凝水；冷凝过程中切勿移动试管。

锥形瓶中的培养基置于冰箱内，保存备用。

五、实验报告

1. 记录本实验所配制培养基的名称、配制过程，总结制备培养基的一般程序。

2. 试述高压蒸汽灭菌的过程及注意事项。

六、思考题

1. 做过本次实验后,你认为在制备培养基时要注意些什么问题?
2. 试管口、锥形瓶口为什么要用棉塞塞住?能否用木塞或橡皮塞代替,为什么?
3. 培养基配制完成后,为什么必须立即灭菌?已灭菌的培养基如何进行无菌检查?
4. 高压蒸汽灭菌过程中,是否只要压力表上的指针指到所需压力时就能达到所需灭菌温度,为什么?

拓展学习

1. 微生物培养基质量控制技术和标准。
2. 培养基对解淀粉芽孢杆菌 ES_2 菌株产抗菌脂肽的影响。
3. 不同培养基组合提高土壤细菌可培养性的研究。
4. 超声波灭菌技术的研究进展。
5. 不同灭菌处理对蓝莓汁品质的影响。
6. 超高压灭菌及其对食品品质的影响。
7. 视频:其他灭菌技术。

(李雅华)

实验 2

微生物的分离、纯化与微生物的培养特征

I 微生物的分离与纯化

一、目的要求

1. 掌握分离、纯化微生物的操作技术。
2. 进一步熟悉和掌握微生物的无菌操作技术。

二、实验原理

自然界中各种微生物混杂在一起,即使很少量的样品也可能含有许多种类的微生物。人们要研究某种微生物的特性或要确定某些微生物的分类地位,首先应该获得该微生物的纯培养体(pure culture),即培养物中所有细胞只是微生物的某一个种或株,它们有着共同的来源,是同一细胞的后代。单细胞挑取法、稀释涂布平板法和平板划线法是分离与纯化微生物、获得纯培养体的常规方法。

微生物的培养特征是指微生物在培养基上所表现出的群体形态和生长情况。一般可用斜面、液体和固体培养基来检验不同微生物的培养特征,这些特征可作为微生物种类鉴定和识别纯培养体是否被污染的依据。

三、主要器材与试剂

1. 材料与试剂

黑曲霉、土壤、10%苯酚、无菌水、25%乳酸、4%水琼脂、链霉素溶液。

2. 培养基

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、高氏 I 号培养基、马丁氏培养基、PDA 培养基。

3. 仪器与用具

无菌培养皿、无菌吸管、无菌涂布棒、试管、三角瓶(盛有少许玻璃珠)、酒精灯、接种环、接种针(铲)、显微解剖镜、移液管、培养箱、灭菌锅、记号笔等。

四、实验步骤

1. 稀释涂布平板法

(1) 倒平板:将牛肉膏蛋白胨培养基、高氏 I 号培养基、马丁氏培养基加热融化,待冷却至 55~60℃时,在高氏 I 号培养基中加入 10%苯酚数滴,马丁氏培养基中加入链霉素溶液(最终质量浓度为 30 μg/mL),混匀后分别倒平板,每种培养基倒 3 个培养

● 2-1
实验 2 演示视频

● 2-2
实验 2 教学课件

皿。倒平板的方法如图2-1所示：右手持盛培养基的三角瓶置于酒精灯火焰旁边，用左手将瓶塞轻轻拔出，瓶口始终保持对着火焰；然后用右手手掌边缘或者小指与无名指夹住瓶塞（也可将瓶塞放在左手手掌边缘或者小指与无名指之间；如果培养基一次性用完，则瓶塞直接置于实验台上即可）。左手拿培养皿并将皿盖在火焰附近打开，迅速倒入培养基约15 mL，加盖后轻轻摇动培养皿，使培养基均匀分布在培养皿底部，然后平放在实验台上，冷却至凝固即为平板。然后在无菌培养皿底部注明培养基的名称、实验日期及班级组别等。

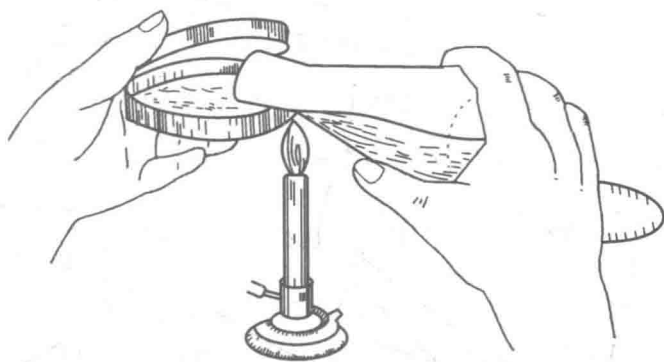


图2-1 倒平板的方法

（引自：沈萍等，2007）

（2）制备土壤稀释液

① 取样：用无菌锥形瓶取一定量的土壤（活性污泥、湖水），迅速带回实验室。

② 稀释土样：称取10 g土样，在火焰旁加入到盛有90 mL无菌水和少许玻璃珠的三角瓶内，振荡摇晃约20 min，使二者充分混合，将细胞分散。用一支1 mL无菌吸管从中吸取1 mL土壤悬液，加入到盛有9 mL无菌水的大试管中充分混匀，然后用无菌吸管从该试管中吸取1 mL加入另一盛有9 mL无菌水的试管中，混合均匀，依次类推分别制成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 等不同稀释度的土壤溶液（图2-2）。

注意：在土壤稀释过程中，需换用不同的吸管。

③ 吸取稀释液：将上述每种培养基的3个平板底部用记号笔分别写上 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 3个稀释度，然后取吸管，以无菌操作法分别吸取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 土壤稀释液0.1 mL，滴在已制好的平板培养基上。

注意：每一稀释度换一个无菌吸管。

（3）涂布：用无菌涂布棒在培养基表面轻轻地涂布均匀，并于室温下静置5~10 min，使菌液吸附在培养基上。

平板涂布方法（图2-3）：取0.1 mL菌悬液小心地滴在平板培养基表面中央位置（注意：0.1 mL的菌悬液要全部滴在培养基上，若移液管尖端有剩余，需将移液管尖端在培养基表面上轻轻地按一下）。右手拿无菌涂布棒平放在培养基表面上，将菌悬液先