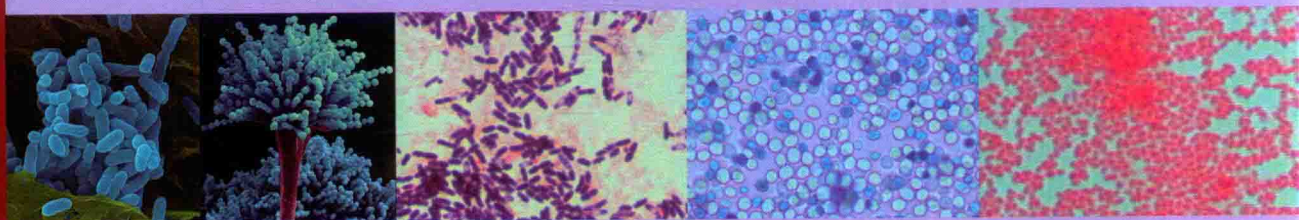


EXPERIMENTAL  
TECHNIQUE OF ENVIRONMENTAL  
MICROBIOLOGY

# 环境微生物学 实验技术

陈兴都 刘永军 主编



非外借

中国建筑工业出版社

# 环境微生物学实验技术

陈兴都 刘永军 主编

中国建筑工业出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

环境微生物学实验技术/陈兴都, 刘永军主编. —北京: 中国建筑工业出版社, 2017. 11

ISBN 978-7-112-21226-2

I. ①环… II. ①陈… ②刘… III. ①环境微生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①X172-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 223068 号

本书针对高等学校环境类专业学生及环境工作者的实际需求, 结合环境学科对环境微生物学方法和技术发展的新需求, 从最基本的微生物实验室基础知识入手, 在注重环境微生物实验基本操作技术的同时, 力求详细地介绍现代分子微生物学技术和显微技术, 使读者能够由浅入深、系统全面地理解和掌握环境微生物学实验技术的内在联系。在此基础上, 增加了环境微生物相关的综合性、研究性实验项目, 培养综合实践能力、创新能力和科学研究能力。

本书适用于高等学校环境工程、环境科学、给排水科学与工程、环境监测专业本科生作教材使用, 也可作为相关专业的研究生教材, 并可供从事污水处理及环境领域研究工作的人员参考。

责任编辑: 石枫华 张 健

责任校对: 王宇枢 李欣慰

## 环境微生物学实验技术

陈兴都 刘永军 主编

\*

中国建筑工业出版社出版、发行 (北京海淀三里河路9号)

各地新华书店、建筑书店经销

北京佳捷真科技发展有限公司制版

北京建筑工业出版社印刷

\*

开本: 787×1092 毫米 1/16 印张: 10 插页: 6 字数: 264 千字

2018年1月第一版 2018年1月第一次印刷

定价: 46.00 元

ISBN 978-7-112-21226-2

(30866)

版权所有 翻印必究

如有印装质量问题, 可寄本社退换

(邮政编码 100037)

# 前 言

近年来，随着环境微生物学的迅猛发展，环境微生物学实验技术在水环境的监测保护与生态改善、污水生物处理与资源化利用、大气环境污染生物净化、土壤生态修复等方面发挥着重要作用，并受到越来越多的重视。环境微生物学实验技术具有很强的实践操作性，在掌握基本实验原理的基础上必须动手操作，且操作规范、结果正确，才能具备环境微生物实验所需要的实验素养和技能。同时，环境微生物学实验技术具有系统性、全面性的特点，需要从整体上理清不同操作技术的内在联系，理解环境微生物学实验技术与环境质量控制、环境污染物生物处理等实践应用的紧密联系，才能更好地将环境微生物实验技术运用于实践中。

《环境微生物学实验技术》的编写考虑到高等学校环境类专业学生及环境工作者的实际需求，结合环境学科对环境微生物学方法和技术发展的新需求，按照科研系统性原则，从最基本的微生物实验室基础知识入手，在注重讲解环境微生物实验基本操作技术的同时，详细地介绍了现代分子微生物学技术和显微技术，使读者能够由浅入深、系统全面地理解和掌握环境微生物学实验技术的内在联系。在此基础上，增加了环境微生物相关的综合性、研究性实验项目，培养综合实践能力、创新能力和科学研究能力。

全书分三个部分八个章节，共 43 个实验项目。第一部分为环境微生物学基础实验技术，包括微生物实验室常用设备如超净工作台、灭菌器的工作原理和使用方法，常用器皿的准备及使用方法，以及微生物分离、接种与培养技术、显微技术、微生物染色与观察技术等基本常规实验技术。附加的活性污泥生物相诊断图谱，将活性污泥中的菌胶团、原生动物和微型后生动物的形态结构通过实体显微照片直观呈现，同时辅以手绘图帮助观察者对观察到的生物进行种属鉴别。第二部分为微生物的生化及分子生物学特征测定实验技术，在微生物常规生理生化试验技术的基础上，利用现代分子微生物学实验技术，如 DNA 提取、PCR 扩增、DNA 测序及序列同源性分析、系统发育树构建、DGGE、FISH 等技术，能够对环境微生物进行更深层次的研究和探索。第三部分为环境微生物综合性、研究性实验，涉及环境微生物检测、环境毒理检测、酶活力检测、环境污染物微生物降解等应用性较强的实验项目，所编排实验项目的综合性和研究性依次增强，研究层面逐渐深入，技术水平要求和应用性越来越高。为巩固读者对实验的理解和掌握程度，提高其科学研究的技能和水平，每个实验都附加了思考题，以引起读者的注意和思考。附录部分列出环境微生物实验中常用的染色液、培养基配置方法，以便读者查阅。

本书为西安建筑科技大学 2015 年校级实验教材建设立项，由西安建筑科技大学国家级环境类专业实验教学示范中心陈兴都、刘永军主编，杨成建参与第八章部分实验及附录的编著，刘伟参与活性污泥生物相诊断图谱的拍摄、绘图及文稿校对等工作。感谢张爱宁、葛碧洲、蒋欣、苏含笑、胡静等在资料搜集方面所做的工作。此外还要感谢陕西师范大学旅游与环境学院吉铮在编写过程中提供的支持和帮助。本书编写过程中参考了国内外大量微生物实验技术方面的书籍、科研成果，并引用了其中的一些图片，在此一并表示感谢。

限于编者水平有限，书中难免有不妥之处，敬请专家和同仁批评指正。

# 目 录

实验规则与安全 .....	1
---------------	---

## 第一部分 环境微生物学基础实验技术

第一章 微生物实验室常用器材 .....	2
一、常用设备及使用方法 .....	2
二、常用器皿及使用方法 .....	6
第二章 微生物分离与培养技术 .....	12
实验一 培养基的制备与灭菌 .....	12
实验二 微生物的分离与纯化 .....	14
实验三 接种与无菌操作技术 .....	17
实验四 微生物的纯培养技术 .....	19
实验五 菌种保藏 .....	24
第三章 显微镜技术 .....	29
实验六 普通光学显微镜的使用及微生物形态观察 .....	29
实验七 荧光显微镜的使用 .....	34
实验八 暗视野显微镜的使用 .....	36
实验九 相差显微镜的使用 .....	37
实验十 电子显微镜的使用及样品制备 .....	39
第四章 微生物染色与形态观察 .....	45
实验十一 细菌单染色与革兰氏染色 .....	45
实验十二 细菌芽孢染色 .....	46
实验十三 细菌的荚膜染色 .....	47
实验十四 细菌的鞭毛染色 .....	48
实验十五 微生物显微直接计数（血球计数板） .....	50
实验十六 酵母菌的形态观察及死、活细胞鉴别 .....	53
实验十七 放线菌的形态观察 .....	54
实验十八 霉菌的形态观察 .....	56

实验十九 活性污泥生物相观察及污泥沉降性能测定 .....	58
-------------------------------	----

## 第二部分 微生物的生化及分子生物学特征测定实验技术

第五章 细菌生化特征常规测定试验 .....	61
一、氧化酶 .....	61
二、过氧化氢酶 .....	62
三、葡萄糖氧化发酵 .....	62
四、甲基红 (M. R) .....	62
五、V-P 测定 .....	63
六、淀粉水解 .....	63
七、纤维素分解 .....	63
八、硝酸盐还原 .....	64
九、亚硝酸还原 .....	65
十、产氨试验 .....	65
十一、脲酶 .....	65
第六章 现代分子微生物学技术 .....	67
实验二十 细菌染色体 DNA 的提取和检测 .....	67
实验二十一 聚合酶链式反应技术 (PCR) .....	70
实验二十二 RT-PCR 实验技术 .....	73
实验二十三 实时定量 PCR (Real-time QPCR) 实验技术 .....	76
实验二十四 DNA 测序与序列同源性分析 .....	79
实验二十五 系统发育树的构建 .....	83
实验二十六 Biolog 自动微生物鉴定系统的应用 .....	95
实验二十七 变性梯度凝胶电泳技术 (DGGE) .....	99
实验二十八 荧光原位杂交技术 (FISH) .....	102

## 第三部分 环境微生物综合性、研究性实验

第七章 环境微生物综合性实验 .....	106
实验二十九 大肠杆菌生长曲线的测定 .....	106
实验三十 环境因素对微生物的影响 .....	107
实验三十一 水体中细菌总数 CFU 的测定 .....	110
实验三十二 水中大肠菌群的测定 .....	113
实验三十三 富营养化湖泊中藻量的测定 .....	118
实验三十四 空气中微生物的检测 .....	120
实验三十五 发光细菌的生物毒性检测 .....	122

实验三十六	BOD <sub>5</sub> 的测定 .....	123
实验三十七	液体培养条件下细菌淀粉酶的检测 .....	128
<b>第八章</b>	<b>污染物微生物处理 .....</b>	<b>130</b>
实验三十八	硝化细菌的分离与硝化能力测定 .....	130
实验三十九	反硝化细菌的分离及反硝化能力测定 .....	132
实验四十	聚磷菌的分离、形态观察及除磷效率测定 .....	135
实验四十一	石油降解菌的分离与降解能力测定 .....	138
实验四十二	苯酚降解微生物的分离及除苯酚能力的测定 .....	140
实验四十三	微生物细胞固定化包埋及其在污染物降解中的应用 .....	143
<b>附录</b> .....		<b>146</b>
附录一	常用染色液的配制 .....	146
附录二	常用培养基的配制 .....	147
附录三	Biolog 微生物鉴定培养基种类及接种液的配置 .....	150
<b>诊断图谱——活性污泥中常见原生及微型后生动物图谱</b> .....		<b>153</b>
<b>参考文献</b> .....		<b>164</b>



# 实验规则与安全

环境类微生物学实验课的目的是：训练学生掌握微生物学最基本的操作技能；了解生物学的基本知识；加深理解课堂讲授的某些微生物理论。同时，通过实验培养学生观察、思考、分析问题、解决问题和提出问题的能力；养成实事求是、严肃认真的科学态度，以及敢于创新的开拓精神；树立勤俭节约、爱护公物的良好作风。

为了上好微生物实验课，保证实验安全，特提出如下注意事项：

1. 每次实验课前必须对实验内容进行充分预习，以了解实验目的、原理和方法，做到心中有数，思路清楚。
2. 上实验课要准备实验记录本。认真、及时做好实验记录，对于当时不能得到结果而需要连续观察的实验，则需记下每次观察的现象和结果，以便分析。
3. 实验室内应保持整洁，勿高声谈话和随便走动，保持室内安静。
4. 实验时小心仔细，全部操作应严格按操作规程进行，万一遇有盛菌试管或瓶不慎打破、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，切勿隐瞒。
5. 实验过程中，切勿使乙醇、丙酮等易燃药瓶接近火焰。如遇火险，在保证人身安全的情况下，应先关掉火源，再用湿布或沙土掩盖灭火。必要时使用灭火器。
6. 使用显微镜或其他贵重仪器时，要求细心操作，特别爱护。对消耗材料和药品等要力求节约，用毕后仍放回原处。
7. 每次实验完毕后，必须把所有仪器抹净放妥，将实验室收拾整齐，擦净桌面，如有菌液污染桌面或其他地方时，可用3%来苏尔液覆盖0.5h后擦去。凡带菌工具（如吸管、玻璃刮棒等）在洗涤前需浸泡在3%来苏尔液中进行消毒。
8. 每次实验需进行培养的材料，应标明自己的组别和处理方法，放于教师指定的地点进行培养。实验室中的菌种和物品等，未经教师许可，不得携出室外。
9. 每次实验的结果，应以实事求是的科学态度填入报告表格中，力求简明准确，认真回答思考题，并及时汇交教师批阅。
10. 离开实验室前请务必将手洗净，注意关闭火、电源、门窗、灯等。

# 第一部分 环境微生物学基础实验技术

## 第一章 微生物实验室常用器材

### 一、常用设备及使用方法

#### (一) 消毒与灭菌设备

微生物实验需要对实验环境采取必要的消毒措施，对所用的实验器材及培养基等进行严格的灭菌处理，以保证实验工作进行顺利。消毒（disinfection）一般是指采用较温和的理化手段，杀死或除去特定环境中微生物营养体的过程。灭菌（sterilization）则是指采用强烈的理化因素，杀灭特定环境中的所有微生物的营养体、芽孢和孢子的过程。实验室常用的消毒与灭菌方法有加热（包括直接灼烧、干热、湿热灭菌等）、过滤、紫外照射和使用化学试剂等，消毒与灭菌的方法因对象不同而各异。实验室常用的消毒与灭菌设备有电热鼓风干燥箱、高压蒸汽灭菌器、超净工作台等。

#### 1. 电热鼓风干燥箱（干热灭菌）

##### (1) 灭菌原理

干热灭菌通过将灭菌物品置于电热鼓风干燥箱内，通电加热，利用高温使微生物细胞内的蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。细胞内的蛋白质凝固性与其含水量有关，在菌体受热时，当环境和细胞内含水量越大，则蛋白质凝固就越快，反之含水量越小，凝固越慢。因此，与湿热灭菌相比，干热灭菌所需温度更高（160~170℃），时间更长（2h左右）。电热鼓风干燥箱灭菌温度不能超过180℃，否则，烘箱内器皿的包扎纸或棉塞就会烤焦，甚至引起燃烧。电热鼓风干燥箱（图1-1）是通过温度传感器来控制箱内的温度，采用热风循环系统（由能在高温下连续运转的风机和特殊风道组成），使工作室温度均匀，而不会出现局部温度过高的现象。

##### (2) 操作方法

① 样品放置：把需灭菌物品包扎好后放入干燥箱内，上下四周应留存一定空间，保持工作室气流畅通，关闭箱门。

② 灭菌：接通电源，打开电热鼓风干燥箱的排气孔，开启鼓风开关，设定灭菌温度160℃，时间2h，开始灭菌，温度升至160℃后恒温2h。

③ 降温：切断电源，自然降温。

④ 开箱取物：待电热鼓风干燥箱内温度降

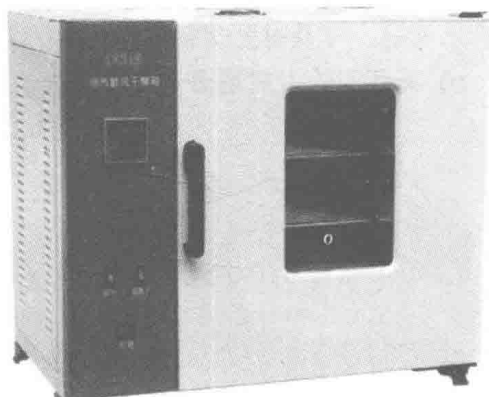


图 1-1 电热鼓风干燥箱

到 70℃ 以下，打开箱门，取出灭菌物品放置备用。

### (3) 注意事项

① 玻璃器皿（如培养皿、吸管、涂布玻璃棒等）、金属用具（如镊子）等耐高温的物品可用此法灭菌。但液体、橡胶制品、塑料制品等不能使用干热灭菌法。

② 物品堆放不宜太紧、太满，以免影响热风循环，造成工作室内温度不均匀。

③ 干热灭菌过程中，要保证风机正常运行，避免局部温度过高出现烤焦或燃烧等现象。

④ 温度降到 70℃ 以下才能开箱取物，避免因温度过高时骤降导致玻璃器皿炸裂。

## 2. 高压蒸汽灭菌器（湿热灭菌）

### (1) 灭菌原理

在微生物实验教学和科学研究中，高压蒸汽灭菌法是应用最普遍、效果最好的一种湿热灭菌方法。高压蒸汽灭菌是在密闭的高压蒸汽灭菌器中进行的。将待灭菌的物体放置在盛有适量水的高压蒸汽灭菌器内，打开排气阀，将水加热煮沸而产生蒸汽，把灭菌器内部原有的冷空气彻底驱尽后关闭排气阀，使灭菌器密闭，再继续加热就会使锅内的蒸汽压逐渐上升，导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。一般要求温度应达到 121℃（压力为 0.1MPa），时间 20min，即可达到良好的灭菌效果。也可采用在较低的温度（115℃，0.075MPa）下维持 35min 的方法。

湿热灭菌法比干热灭菌法更有效。在相同温度下，湿热的灭菌效力比干热灭菌好的原因是：①热蒸汽对细胞成分的破坏作用更强。水分子的存在更易使蛋白质变性凝固，随着蛋白质含水量增加，所需凝固温度会降低；②热蒸汽比热空气穿透力强，能更加有效地杀灭微生物；③蒸汽存在潜热，当水由气态转变为液态时可放出大量热量，故可迅速提高灭菌物体的温度，增加灭菌效力。

在使用高压蒸汽灭菌器灭菌时，灭菌器内冷空气的排除是否完全极为重要，因为空气的膨胀压大于水蒸气的膨胀压，所以当水蒸气中含有空气时，压力表所显示的压力是水蒸气压力和部分空气压力的总和，不是水蒸气的实际压力，它所对应的温度与灭菌器内的温度是不一致的。在同一压力下的实际温度，含空气的蒸汽低于饱和蒸汽。若不将灭菌器内的空气排除干净，就达不到灭菌所需的实际温度，便会造成灭菌不彻底，灭菌后仍有杂菌污染的现象出现。故必须将灭菌器内的冷空气完全排除，才能达到彻底灭菌的目的。

实验室中常见的高压蒸汽灭菌器有立式、卧式和手提式等几种（图 1-2），本实验介绍



图 1-2 高压蒸汽灭菌器

立式高压蒸汽灭菌器的使用方法。

### (2) 操作方法

① 接通电源，观察蒸汽灭菌器水位指示灯（缺水/低水位/高水位），向灭菌器内添加适量蒸馏水至正常水位。

② 放入要灭菌的物品，关闭并拧紧灭菌器顶盖，打开排气阀。设定灭菌温度和时间，如温度 121℃（压力 0.1MPa），时间 20min，开始灭菌。

③ 温度升至 98~100℃ 时，排气阀开始大量排出水蒸气，计时排放 6~10min，彻底排除灭菌器内空气，然后关闭排气阀。注意观察水位指示灯，若低水位灯亮，则应立即关闭排气阀，避免烧干损坏灭菌器。

④ 灭菌器的温度继续升温至 121℃，开始 20min 灭菌倒计时。

⑤ 到预定灭菌时间后，灭菌器提示灭菌结束，此时可切断电源，让灭菌器自然降压，压力指针回“0”时，打开排气阀。

⑥ 揭开灭菌器顶盖，取出物品。若长时间不再使用灭菌器，应将剩余的水放掉，保持灭菌器干燥。

### (3) 注意事项

① 排气过程中注意观察水位指示灯，若低水位灯亮则应立即关闭排气阀，避免烧干而造成灭菌器损坏。

② 切勿在压力未降至“0”时，打开排气阀，否则会因为压力骤降，而造成培养基剧烈沸腾冲出管口或瓶口，浸湿棉塞，造成杂菌污染。

③ 灭菌过程中注意观察灭菌器温度和压力显示是否正常，若出现不正常情况，立即断电，打开排气阀并远离灭菌器。

## 3. 超净工作台（空气过滤及紫外灭菌）

在微生物实验中，一般小规模接种操作，使用无菌接种箱或超净工作台即可。工作量大时使用无菌室进行接种等无菌操作。要求严格的或涉及致病微生物操作时，应在无菌室内配置超净工作台进行接种，避免造成可能的感染。本部分主要介绍超净工作台的使用方法。

### (1) 灭菌原理

超净工作台（图 1-3）是一种供单人或多人操作的通用型局部净化设备，气流形式为垂直层流，它可造就局部高清洁度空气环境。超净工作台内部需要配置紫外线杀菌灯、高效过滤器等除菌设备，保证工作台内部无菌的高洁净的环境。

超净工作台工作原理是在特定的空间内，室内空气经初效过滤器初滤，由小型离心风机压入静压箱，再经空气高效过滤器二级过滤，从空气高效过滤器出风面吹出的洁净气流具有一定的和均匀的断面风速，可以排除工作区原来的空气，将尘埃颗粒和生物颗粒带走，以形成无菌的高洁净的工作环境（无菌风从工作台顶部吹入，从工作台底部吹出）。超净工作台顶置的紫外线杀菌灯，是利用适当波长的紫外线能够破坏微生物机体细胞中的 DNA（脱氧核糖



图 1-3 超净工作台

核酸)或RNA(核糖核酸)的分子结构,造成生长性细胞死亡和(或)再生性细胞死亡,达到杀菌消毒的效果。

### (2) 操作方法

① 使用前清空超净工作台内杂物,用消毒试剂(75%酒精或来苏水)棉球彻底擦拭工作台面。然后放入酒精灯、接种环、试管架及无菌斜面、培养皿等必须物品。

② 在开始接种等操作前,用喷壶向工作空间喷洒消毒试剂(75%酒精或来苏水),进行消毒处理。关闭超净工作台的前玻璃,打开紫外灯,开启工作台风机,杀菌消毒处理时间约20~30min即可。风机速度不宜过大,以防空气流动,增加污染机会。消毒处理完毕后,关闭紫外灯,打开照明灯。

③ 实验操作前应用肥皂将手洗净,待干燥后再用消毒试剂(75%酒精)擦拭双手进行消毒处理。

④ 将工作台的前玻璃上抬约20cm(不影响操作即可),点燃酒精灯,开始在工作台内进行接种等实验操作。操作最好在中央位置进行,操作完的物品应及时从超净工作台内取出,避免堆积过多造成内部空间污染。

⑤ 操作完成后,需要按照前述方法对超净工作台进行彻底的消毒处理后,关闭电源。

### (3) 注意事项

① 根据实际使用情况,初效过滤器清洗周期一般为3~6个月,空气高效过滤器使用寿命一般1~2年,到期应联系厂家拆下清洗或及时更换,保证超净工作台内部无菌高洁净的环境。

② 紫外线对眼黏膜、视神经及皮肤有损伤作用,接种操作时,切记关闭紫外灯。

③ 双手酒精消毒后,待酒精自然挥发至手干燥方可进行操作,切忌点火或在酒精灯上烘烤而灼伤双手。

## (二) 培养设备

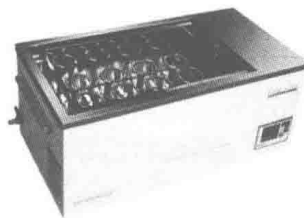
### 1. 恒温培养振荡器

#### (1) 工作原理

恒温培养振荡器是一种温度可控的恒温培养箱(或水浴槽)和振荡器相结合的生化仪器,根据加热方式不同,可分为气浴式(图1-4(a))和水浴式(图1-4(b))两种。现在主流产品多为微电脑控制,通过液晶显示屏显示转速、温度、震荡方式等各项参数。转速范围上限不超过300r/min,温控范围上限一般不超过50℃。震荡方式可分为回旋振荡(水平面上360°旋转振荡)和往复式振荡两种。震荡的目的是通过震荡方式将空气中的氧



(a) 气浴式恒温培养振荡器



(b) 水浴式恒温培养振荡器

图 1-4 恒温培养振荡器

气溶入培养液中，为好氧微生物的培养提供充足的氧气。

### (2) 操作方法

① 将接种好的锥形瓶装入恒温培养振荡器万能弹簧瓶架上。为了使仪器工作时平衡性能好，避免产生较大的振动，装瓶时应将所有瓶位布满，各瓶的培养液应大致相等。若培养瓶不足数，可将锥形瓶对称放置或装入其他等量溶液的瓶布满空位。

② 接通电源，选择“设定”模式通过按键或旋钮设定培养所需转速、温度、振荡方式、时间等各项参数。微生物摇瓶培养一般选择回旋振荡方式，转速一般控制在 100~150r/min 范围内，温度一般控制在 30~37℃ 范围内。

③ 选择“测量”模式，开启振荡按钮，开始震荡培养。此时显示的温度为箱内实际温度和转速。

④ 培养结束，取出锥形瓶，关闭电源并清理机器，不能留有水滴、污物残留。

### (3) 注意事项

① 整机应放置在较牢固的工作台面上或平整干燥的地面上，环境应整洁无湿度，通风良好。

② 严禁在正常工作的时候移动机器。

③ 使用时必需接地，确保安全。

## 2. 恒温培养箱

### (1) 工作原理

恒温培养箱（图 1-5）一般用于好氧微生物的培养，目前多采用温度显示调节仪自动控制温，微电脑温度控制系统，具有定、计时功能，加热方式可分为气套式加热（电热）和水套式加热两种，两种加热系统都是精确和可靠的。水套式加热是通过一个独立的水套层包围内部的箱体来维持温度恒定的，其优点：水是一种很好的绝热物质，当遇到断电的时候，水套式系统就可以比较长时间的保持培养箱内的温度准确性和稳定性，有利于实验环境不太稳定（如有用电限制或经常停电）的用户选用。气套式与水套式相比，具有加热快、温度的恢复比水套式培养箱迅速的特点，特别有利于短期培养以及需要箱门频繁开关取放样的培养。



图 1-5 恒温培养箱

### (2) 操作方法

恒温培养箱操作相对简单，将需要培养的试管斜面或培养皿等待培养物放入箱内，根据实际需要设定培养温度和培养时间即可。

### (3) 注意事项

① 整机应放置在较牢固的工作台面上或平整干燥的地面上，环境应整洁无湿度，通风良好。

② 使用时必需接地，确保安全。

## 二、常用器皿及使用方法

### (一) 培养皿的使用

培养皿（图 1-6）是一种用于微生物或细胞培养的玻璃器皿，一套培养皿由一个平面

圆盘状的底和一个盖组成。培养皿可选尺寸范围较多（皿底直径 35~150mm），一般选择皿底直径 90mm、高 15mm 的培养皿较常见。

### 1. 清洗晾干

培养皿一般用玻璃或塑料制成，质地脆弱、易碎，故在清洗及拿放时应小心谨慎、轻拿轻放。清洗装有固体培养基的培养皿时，先用玻璃棒或药勺等将皿内的培养基刮下。若培养基已干燥，可将培养皿放在沸水中加热使琼脂溶化，趁热倒出琼脂。然后用合适的毛刷蘸取干去污粉和洗衣粉的混合物，轻柔刷洗掉污物，不要留死角。然后用清水冲洗干净，最后再用蒸馏水洗 2~3 次。洗净的培养皿盖或底全部朝下，后一个培养皿斜压前一个的皿边，扣在桌子上晾干备用。

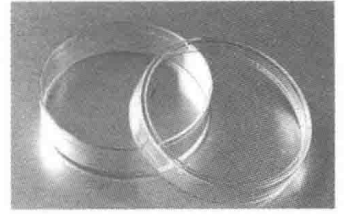


图 1-6 培养皿

### 2. 包扎

包扎的目的是防止器皿消毒灭菌后再次受到污染。培养皿常用旧报纸紧密包扎，一般以 4~10 套培养皿为一包，具体包扎方法见图 1-7。包扎后的培养皿经过灭菌才可使用。

## （二）移液管（器）的使用

微生物实验室一般要准备 1mL、5mL、10mL 刻度的移液管（玻璃吸管）或不同量程的微量移液器（图 1-8）。微量移液器根据需要调节相应的容积即可，用完只需调换吸头，将吸嘴洗净后消毒灭菌可再次使用。

### 1. 移液管的清洗

移液管用完应立即清洗，以免干燥后难以洗净。

### 2. 移液管的包扎

在吸管的上端约 0.5cm 处，用掰直的回形针向内塞上一小段棉花（约 2cm），以免使用时将杂菌吹入或不慎将微生物吸出管外。棉花要塞的松紧适度，不宜过紧或过松，过紧吹吸液体太费力，过松吹气时棉花会下滑。将旧报纸撕成 2cm 左右宽的长条，然后将每支移液管尖斜放在旧报纸条的一端，移液管与报纸条呈 45° 夹角，折叠纸条，包住尖端。再将整支移液管螺旋状卷入报纸，剩余报纸条打结（图 1-9）。包扎好的移液管可进行干热灭菌。

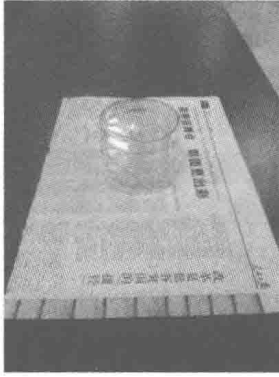
## （三）试管的包扎

### 1. 试管的清洗

微生物实验根据用途不同，可准备 3 种型号试管。大试管（18mm×180mm）可盛装倒培养皿用的培养基；中试管（15mm×150mm）做琼脂固体斜面、盛液体培养基或血清学试验等用途；小试管（10mm×100mm）一般用于糖发酵试验或血清学试验。装溶液的试管用完立即清洗干净即可。若是固体斜面试管，使用完后需要先用勺子或试管刷的柄部将固体培养基刮出，然后用毛刷蘸上去污粉清洗干净管壁。若管壁外有马克笔标记（接种后一般不建议贴标签纸，而是用马克笔直接在试管外壁标明菌种名称、接种时间等内容，利于清洗），可用酒精溶液擦拭干净。

### 2. 试管的包扎

先塞上合适的棉塞或硅胶塞子（1/2~1/3 塞入试管），然后 7~10 支一捆，用报纸包扎试管口段，用棉线绑好后，可放入试管篮中，湿热灭菌。



第1步 将培养皿放于报纸中央



第2步 将报纸紧贴皿壁向上折起，在顶部交叉



第3步 贴皿壁按下，形成凹槽



第4步 将凹槽两侧纸贴壁十字交叉

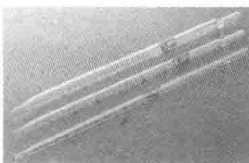


第5步 两侧对折后，将伸出部分折入底部

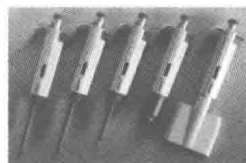


第6步 完成包扎

图 1-7 培养皿的包扎过程



(a) 移液管



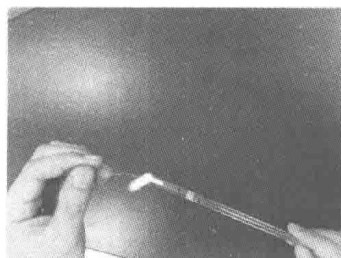
(b) 微量移液器



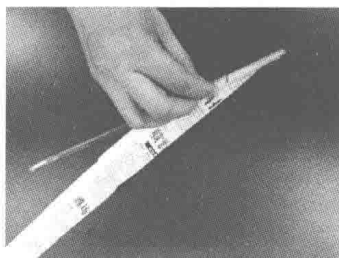
(c) 微量移液器吸头

图 1-8

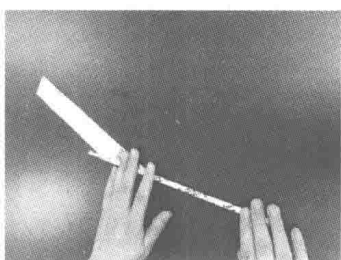




第1步 脱脂棉塞入吸管约2cm



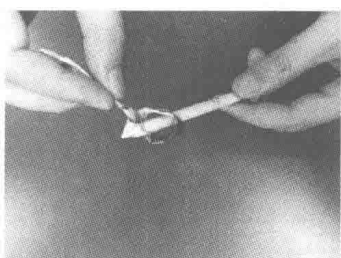
第2步 折叠报纸将吸管尖端包住



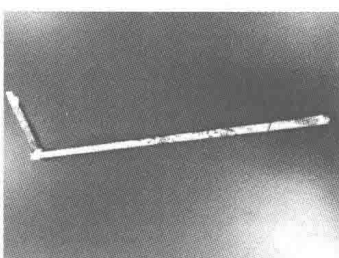
第3步 以螺旋式在桌面搓转吸管，至报纸条全部卷成圆柱状



第4步 将吸管顶端报纸打成环状



第5步 拉紧报纸环扣打成结



第6步 包扎完毕

图 1-9 移液管的包扎

#### (四) 锥形瓶的包扎

##### 1. 锥形瓶的清洗

微生物实验中，锥形瓶常用于装固体或液体培养基，容量 250mL 较为常用。盛装液体的锥形瓶用完立即清洗干净即可。若是盛装固体培养基，使用完后需要先用勺子或试管刷的柄部将残余固体培养基刮出，然后用毛刷蘸上去污粉清洗干净瓶壁。

##### 2. 锥形瓶的包扎

塞上合适的棉塞（或硅胶塞），或盖上 8 层左右的纱布，再在瓶口加盖 2 层报纸，用棉绳包扎（图 1-10），然后湿热灭菌。

#### (五) 双层瓶

由内外 2 个玻璃瓶组成（图 1-11），内层小锥形瓶盛放香柏油，供油镜观察微生物时使用，外层瓶盛放二甲苯，用以擦净油镜头。

#### (六) 载玻片与盖玻片

普通载玻片 (a) 大小为 75mm×25mm，用于微生物涂片、染色观察等。盖玻片为 18mm×18mm。凹玻片是在一块厚玻片的中间有一个圆形凹窝 (c)，用于悬滴观察活细胞及微室培养等用途。