

普通高中课程标准实验教科书

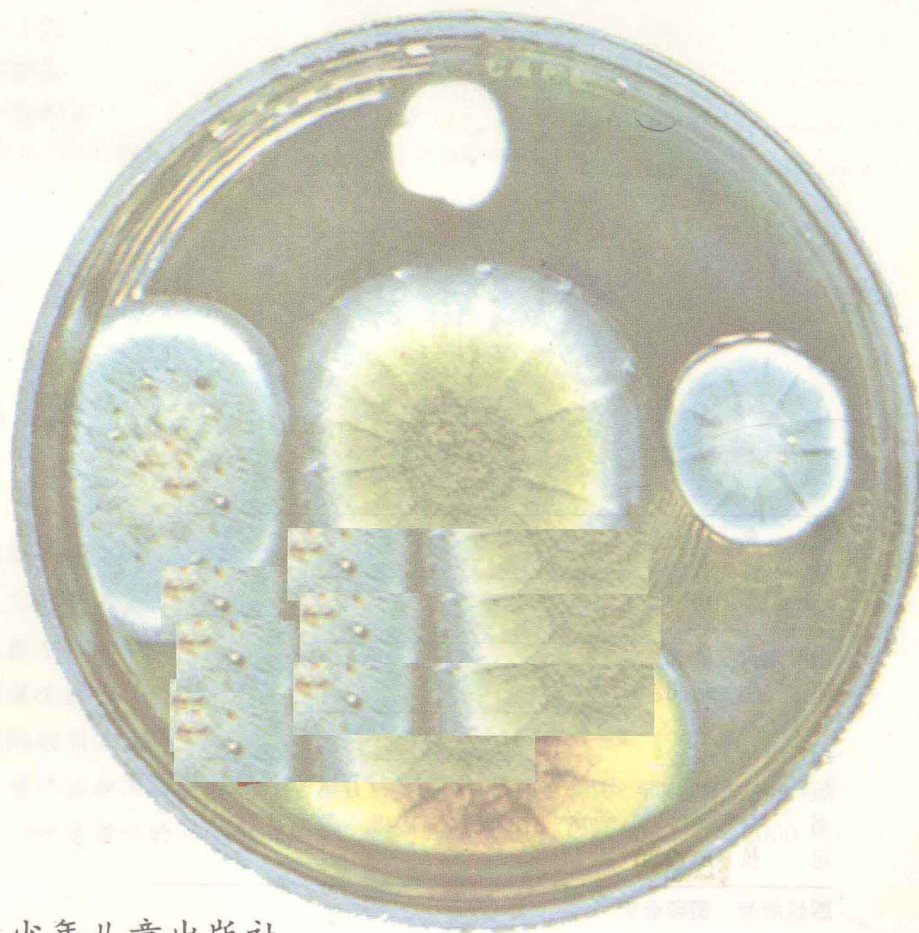
生物学

选修 1

BIOLOGY

生物技术实践

主编 刘植义 付尊英



河北少年儿童出版社

目 录

《生物技术实践》模块学习目标	1
----------------------	---

第 1 章 微生物技术	2
-------------------	---

第 1 节 培养基对微生物的选择作用	4
--------------------------	---

【实验】 培养基的配制和灭菌	4
----------------------	---

【探究】 探究不同培养基中生长的优势菌群	8
----------------------------	---

第 2 节 微生物的纯培养	12
---------------------	----

【实验】 微生物的分离与纯化	12
----------------------	----

第 3 节 微生物数量的测定	16
----------------------	----

【实验】 测定土壤中微生物的数量	17
------------------------	----

第 4 节 微生物的利用	22
--------------------	----

【实验】 从土壤中分离纤维素分解菌	22
-------------------------	----

【探究】 探究纤维素分解菌是否只能分解纤维素	25
------------------------------	----

【实验】 利用微生物制作豆豉	26
----------------------	----

第 2 章 酶技术	30
-----------------	----

第 1 节 果胶酶的制作方法及其作用	32
--------------------------	----

【实验】 果胶酶的制作及对苹果匀浆的作用	32
----------------------------	----

第 2 节 酶活力的测定	36
--------------------	----

【实验】 检测果胶酶的活力	36
---------------------	----

【探究】 探究果胶酶作用的最佳条件	38
-------------------------	----

第 3 节 酶在食品制作和洗涤方面的应用	40
----------------------------	----

【实验】 蛋液发酵饮料的制作	40
----------------------	----

【探究】 探究带有不同污渍衣物的洗净方法	42
----------------------------	----

【探究】 探究加酶洗衣粉的最佳使用条件	43
---------------------------	----

第4节 固定化酶的制备和应用	45
【实验】 固定化乳糖酶的制备	45
【实验】 检测牛奶中乳糖的分解	47
第3章 食品加工技术	52
第1节 发酵食品加工	54
【实验】 利用发酵法以果汁制作酒和醋	54
【实验】 制作豆腐乳	58
第2节 天然食品添加剂的制备	62
【实验】 用蒸馏法从柑橘皮中提取芳香油	63
第3节 食品加工过程中产生的有害物质的测定	68
【实验】 制作泡菜并测定亚硝酸盐含量的变化	68
第4章 现代生物技术	74
第1节 植物的组织培养	76
【实验】 胡萝卜的组织培养	76
第2节 蛋白质的提取和分离	82
【实验】 乳酸脱氢酶同工酶的提取和分离	82
第3节 聚合酶链式反应技术	86
【实验】 DNA片段的扩增和琼脂糖凝胶电泳检测	87
附录 I 中英文词汇对照表	93
附录 II 书海拾贝	93
附录 III 相关网站	94

《生物技术实践》模块学习目标

研究培养基对微生物的选择作用。

进行微生物的分离和培养。

测定某种微生物的数量。

探讨微生物的利用。

尝试利用微生物进行发酵,生产特定的产品。

研究酶的存在和简单制作方法。

尝试酶活力测定的一般原理和方法。

探讨酶在食品制造和洗涤等方面的应用。

尝试制备和应用固定化酶。

研究从生物材料中提取某些特定成分。

运用发酵食品加工的基本方法。

测定食品加工过程中可能产生的有害物质。

尝试植物的组织培养。

尝试蛋白质的提取和分离。

尝试 PCR 技术的基本操作和应用。

第1章 微生物技术

主要内容

1. 培养基对微生物的选择作用

- 培养基的制备
- 实验 培养基的配制和灭菌
- 培养基对微生物的选择作用
- 探究 探究不同培养基中生长的优势菌群

2. 微生物的纯培养

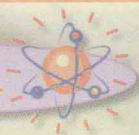
- 实验 微生物的分离与纯化

3. 微生物数量的测定

- 实验 测定土壤中微生物的数量

4. 微生物的利用

- 从土壤中分离有益微生物
- 实验 从土壤中分离纤维素分解菌
- 微生物对有机物质的分解
- 探究 探究纤维素分解菌是否只能分解纤维素
- 利用微生物制作食品
- 实验 利用微生物制作豆豉



从史前时代起,微生物技术就一直为人们所开发和利用,以造福人类。古人虽未观察到微生物,却早已将微生物学知识应用于工农业生产和疾病防治中。我国人民早在石器时代后期就会利用谷物造酒;周代后期,就能制造酱和醋;公元 10 世纪,我国就有了预防天花的活疫苗;到了明代,种痘预防天花的方法被广泛应用。在西方,苏美尔人和巴比伦人公元前 6000 年开始利用发酵方法酿制啤酒;埃及人在公元前 4000 年就开始制作面包。

1676 年,荷兰人列文虎克(A. von Leewenhoek, 1632—1723)首先观察到了微生物。19 世纪 60 年代,法国科学家巴斯德(L. Pasteur, 1822—1895)发明了巴氏消毒法和一系列研究微生物所必需的独特方法和技术,证实了发酵是由微生物引起的,并将病原菌减毒后转化为疫苗,为人类防病、治病作出了巨大贡献。英国外科医生李斯特(J. Lister, 1827—1912)首先利用石炭酸喷洒手术室和煮沸手术用具,为防腐、消毒以及无菌操作打下基础。德国学者科赫(R. Koch, 1843—1910)成功设计了固体培养基,从而建立了微生物的纯培养技术,为微生物技术的发展提供了理论基础,将其纳入了科学的轨道。20 世纪 20 年代,工业生产中开始采用大规模的纯培养技术发酵生产化工原料,如丙酮和丁醇。50 年代,在青霉素大规模发酵生产的带动下,发酵工业和酶制剂工业大量涌现,发酵技术和酶技术被广泛应用于医药、食品、化工、制革和农产品加工等部门。从 70 年代开始,以微生物技术为基础、基因工程为核心的现代发酵工程、酶工程、细胞工程以及蛋白质工程得到了长足的发展,它们共同组成了具有划时代意义和战略价值的现代生物技术。

第 1 节 培养基对微生物的选择作用

形形色色的微生物与人类关系非常密切。预防疾病的疫苗,如白百破、卡介苗等;治疗疾病的抗生素,如青霉素和红霉素等;许多可口的食品和调味品,如酸奶、奶酪、味精和醋等;各种酒类产品,如白酒、啤酒和葡萄酒等,都是利用微生物制作的。在实验室条件下进行科学研究或在工业生产上大规模制造微生物产品都需要用到培养基(图 1-1)。那么,什么是培养基呢?培养基是如何制备的?不同微生物对培养基的要求有哪些不同呢?



图 1-1 配制培养基的试剂

● 培养基的制备



实验

培养基的配制和灭菌

活动目标

1. 尝试培养基的制备。
2. 使用高压蒸汽灭菌法灭菌。

实验原理

培养基是人工配制的适合微生物生长繁殖或积累代谢产物的营养基质,用以培养、分离、鉴定和保存各种微生物。为了满足微生物的生长,培养基的营养成分一般包括水分、碳源、氮源、微量元素和无机盐等。不同种类微生物的生长繁殖对营养的要求不同,通过选择不同的培养基,人为控制培养基的 pH、碳源、氮源、渗透压等条件,使选择的培养基利于某类或某种微生物的生长,而不利于其他微生物的生存,可以达到分离、培养不同微生物的目的。

由于配制培养基的各类营养物质和容器等含有多种不同的微生物,配制好的培养基必须立即灭菌,及时杀灭培养基中的微生物,同时防止

微生物大量繁殖造成的培养基营养成分的改变。

常用的灭菌方法是高压蒸汽灭菌。高压蒸汽灭菌是将待灭菌的物品放在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。待水蒸气急剧地将锅内的冷空气从排气阀中排尽后,关闭排气阀,继续加热。此时蒸汽不能排出,灭菌锅内的压力增加,水的沸点增高,从而使蒸汽温度高于 100°C ,导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。

因为高压蒸汽属于湿热蒸汽,其穿透力大,而且蒸汽由气态变为液态时可放出大量的热,所以能迅速提高被灭菌物品的温度,从而增加了灭菌的效果。同时,灭菌时还需要一定的压力,保证灭菌温度达到要求。灭菌物品中一般的菌体在 60°C 下保温 10min 就可全部杀死,但嗜热细菌在 120°C ,可耐受 20~30min,因此,为彻底杀死灭菌物品中的微生物,一般将灭菌温度、压力和时间定为 121°C , 0.11MPa , 20~30min。用家用高压锅灭菌时,由于压力和温度达不到以上要求,需要延长灭菌时间。

材料用具

牛肉膏,蛋白胨,马铃薯;葡萄糖,琼脂, NaCl , 1mol/L NaOH , 1mol/L HCl ; 试管,锥形瓶,培养皿,烧杯,量筒,玻璃棒,铁架台,漏斗,天平,药匙,高压蒸汽灭菌锅,酸度计或精密 pH 试纸(pH 5.5~9.0),棉花,牛皮纸,记号笔,麻绳,纱布等。

方法步骤

参照技能卡分组选择并制作一种培养基。培养基的制作流



技能卡

培养基的配制

1. 培养细菌用培养基的配制

(1) 牛肉膏蛋白胨培养基

称取牛肉膏 3g、蛋白胨 10g、 NaCl 5g 和琼脂 20g,依次加入盛有 900mL 蒸馏水的烧杯中,加热使其溶解,用 1mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.4~7.6,最后将溶液倒入量筒中,加蒸馏水至 1 000mL。

(2) 简易制备细菌用培养基

取已去筋膜和脂肪的新鲜瘦牛肉 300g,充分绞碎后,加入 900 mL 蒸馏水,于冰箱中 0°C ~ 4°C 浸泡过夜,再煮沸 30min,用 4 层纱布过滤,在滤液中加入 NaCl 5g、琼脂 20g,加热溶化后用 1mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.4~7.6,再补充蒸馏水至 1 000mL。

2. 培养真菌用培养基的配制

取去皮切成块的马铃薯 200g,放入盛有 900 mL 蒸馏水的烧杯中,加热煮沸 20min,用 4 层纱布过滤,向滤液中加入葡萄糖 20g 和琼脂 20g,加热溶解后再补充蒸馏水至 1 000mL。

程为：称量→溶化→调 pH→分装→加塞和包扎→灭菌→摆斜面及倒平板。

1. 配制培养基

参照技能卡，配制相应的培养基。

2. 分装、加塞和包扎

将配制的培养基分装入试管内或锥形瓶内(图 1-2)，试管和锥形瓶的装量均为其容积的 1/5。然后将分装好的试管和锥形瓶加塞和包扎(图 1-3)，并用记号笔注明培养基名称、组别和配制日期。

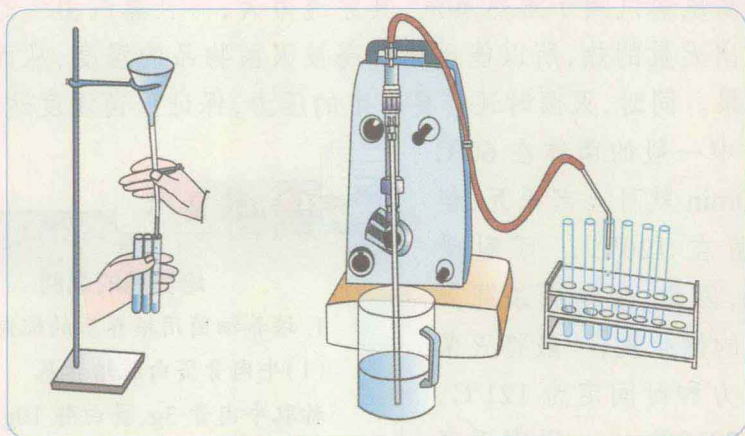


图 1-2 分装试管培养基

3. 灭菌

参照技能卡，将上述培养基和实验所需的培养皿等以 121℃ 20 min 高压蒸汽灭菌(图 1-4)。若没有手提式高压蒸汽消毒器，可采取以下替代措施：(1)采用家庭用高压锅代替，自大量冒蒸汽开始维持 40 min。(2)使用家用蒸锅，常温常压下 100℃维持 1~2 h。



图 1-3 加塞试管和包装好的试管

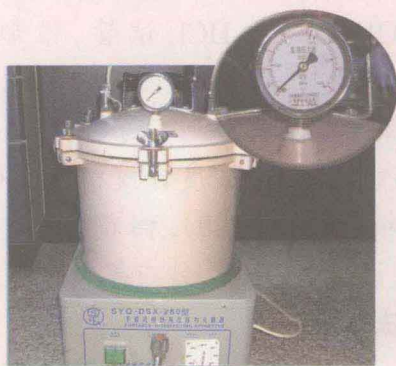


图 1-4 手提式高压蒸汽消毒器



技能卡

手提式高压蒸汽消毒器的使用

1. 加水:按说明书往锅内加适量的水。
2. 装料:装入待灭菌的物品,不能太满。
3. 加盖:摆正锅盖,使螺口对齐,然后采用对角螺丝同时拧的方式,逐一拧紧螺丝,密闭灭菌锅,并打开排气阀。
4. 排气:加热待水煮沸后,使蒸汽和空气一起从排气孔排出。
5. 升压:当锅内空气排尽时,即关闭排气阀,使压力上升。
6. 保压:当压力表指针指到 121°C 时,调节热源,使压力维持不变,并开始计算灭菌时间,根据灭菌的物品确定灭菌时间。
7. 降压:达到规定的灭菌时间后,立即关闭热源,当压力表指针指到零刻度后,打开排气阀,放空剩余的蒸汽。再打开锅盖,取出灭菌物品。
8. 灭菌后处理:每次灭菌完毕,必须倒掉锅内剩水,然后按原样放置。

4. 摆斜面或倒平板

取出培养基,待培养基冷却至 $50^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$ 后,制成斜面或平板后备用(图 1-5,图 1-6)。

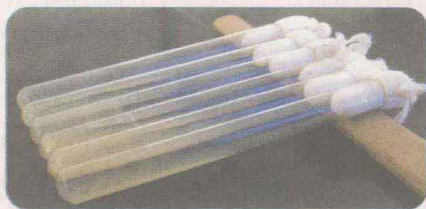


图 1-5 摆斜面示意图

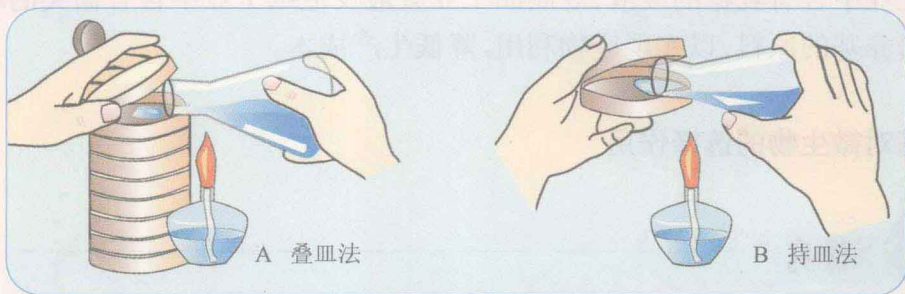


图 1-6 倒平板示意图

总结与讨论

根据实验操作过程写出实验报告,讨论以下问题:

1. 在配制培养基的操作过程中易出现哪些差错? 如何防止?

2. 进行加压蒸汽灭菌操作有哪几个步骤? 升压前为什么要排尽锅内空气?

3. 培养基配好后必须立即灭菌, 为什么? 如何检查灭菌后的培养基是无菌的?

4. 采用高压蒸汽灭菌时, 利用的是温度还是压力? 为什么?

5. 配制培养基时为什么要调 pH? 调 pH 时应注意什么?

6. 棉塞的作用是什么?

培养基 (medium) 的种类繁多, 培养不同类型的微生物需要不同的培养基。培养基按物理状态可分为液体培养基和固体培养基。液体培养基是在微生物学研究和生产中应用极其广泛的一种培养基, 主要用于各种生理、代谢研究和获得大量菌体。绝大多数发酵工业生产都采用液体培养基。固体培养基常用琼脂做凝固剂, 应用于微生物的分离、纯化、培养、保存和鉴定等。另外, 一些由天然固体基质制成的培养基也属于固体培养基, 例如, 由马铃薯块、胡萝卜条、小米、大米、麸皮、米糠和稻草粉等制成固体状态的培养基, 可用于培养各种真菌; 生产食用菌的棉籽壳等也属于固体培养基。

培养基的制备是研究和利用微生物的最基本技术之一。配制培养基包括配制和灭菌两大步骤, 关键要准确称量、调准 pH、规范制作棉塞、彻底灭菌。而且, 在配制培养基时应尽量利用廉价且易于获得的原料作为培养基成分, 特别是发酵工业中, 培养基用量很大, 利用低成本的原料更体现出其经济价值。例如, 在酵母菌单细胞蛋白的工业生产过程中, 常常利用制糖工业中含有蔗糖的废液、乳制品工业中含有乳糖的废液、豆制品工业废液及造纸工业中含有糖类的纸浆等作为培养基的原料, 以实现废物利用, 降低生产成本。

● 培养基对微生物的选择作用



探究

探究不同培养基中生长的优势菌群

问题

不同培养基中生长的优势菌群分别是哪一类?

作出假设

采用_____培养基时,细菌为优势菌;采用_____培养基时,酵母菌和霉菌为优势菌。

设计实验

参照技能卡,分组设计实验方案,用同一种培养基检测不同类群的微生物,或者用不同培养基检测同一类群的微生物。在设计实验时要注意设置对照实验和实验重复等。



技能卡

环境中微生物的接种方法

- 可采用下列方法接种不同环境中的微生物:
- 1. 空气 打开无菌平板,让其在空气中暴露 30~60min。
 - 2. 桌面 用一根无菌棉签,先在无菌平板的一个区域润湿,然后用其擦抹桌面,再用此棉签在平板的另一区域内来回划线。
 - 3. 头发 打开无菌平板的血盖,将几根头发放在平板培养基上,再盖上皿盖。
 - 4. 手指 用未洗的手在无菌平板一侧按手印,用清洁剂洗手后,在另一侧按手印。
 - 5. 口腔 打开无菌平板的血盖,用嘴对准平板培养基表面,咳嗽或打喷嚏,再盖上皿盖。
- 将检测平板倒置于培养箱中 28℃培养。

实施实验

根据实验设计,认真进行实验,将实验结果填入下面的表格中。

培养基	优势菌落数 / 皿	优势菌落形态特征			优势菌类型
		颜色	大小	形状	

得出结论

根据实验过程分析实验结果,得出结论。

表达交流

分组汇报探究结果和实验中存在的问题,然后讨论以下问题。

1. 同种培养基上生长的微生物类群有几种？优势菌是哪一类？
2. 不同培养基上的优势菌分别是哪一类？
3. 在科研或工业生产中如果想获得一种微生物应采取哪些措施？

通过本实验可以看出,微生物通过某种方法接种到适于生长的固体培养基表面上,在适宜的温度下培养一段时间后,单个的菌体或孢子就可以生长繁殖成一个个肉眼可见的细胞群体,称为菌落(colony)。不同种微生物对营养要求不一样,在相应的培养基上可形成大小、形态各异的菌落(图 1-7)。细菌菌落的共同特征为:湿润、黏稠、易用接种环挑起,菌落各部位颜色一致。酵母菌菌落外形上与细菌极为相似,但比细菌菌落大而厚,颜色也较单调。霉菌菌落较疏松,常呈绒毛状、絮状或蜘蛛网状,一般比细菌菌落大几倍到几十倍。细菌生长需要的氮源高(C/N 为 4:1),pH 中性或微碱性(pH 7.2~7.6),因此培养细菌常采用牛肉膏蛋白胨培养基。酵母菌和霉菌生长所需的碳源含量高(C/N 为 16:1),pH 偏酸性(pH 5~6),因此分离真菌常采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(简称 PDA)。

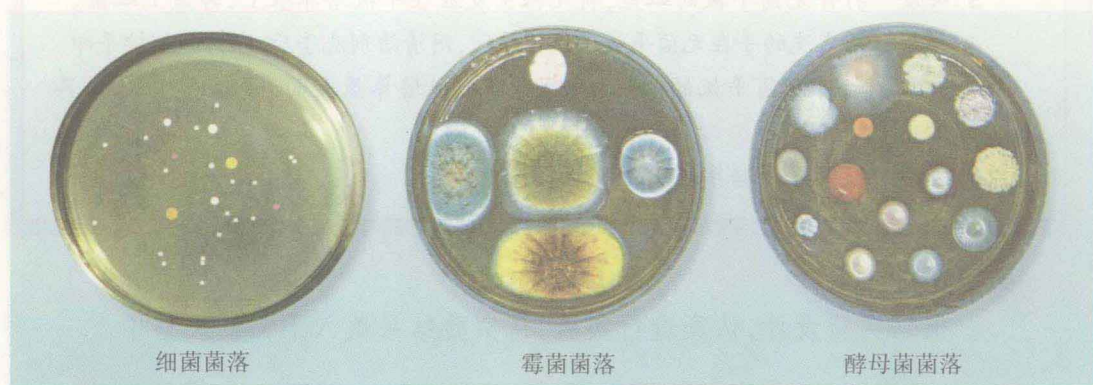


图 1-7 不同微生物的菌落

微生物学实验一般都要求在无菌条件下进行,为此,实验用的材料、器皿、培养基、移液管和滴管等都要经过灭菌后才可使用。实验室最常用的灭菌方法是高温处理。

不同培养基对微生物的选择作用在科研和生产实践中具有重要意义,它是分离和纯化不同类型微生物的基础,因此微生物科技工作者们在长期的科研和生产实践中得到了很多实验用和生产用的培养基,这些都是微生物工作者的财富。但在培养不同种或株的微生物时,培养基的配方还需要改变,这就需要我们不断地探索高效的、能够适应新的微生物种类的培养基,以更好地为人类造福。



自我检测

1. 简述制作细菌培养基的操作程序。
2. 培养基对微生物的选择作用有什么意义？



开阔眼界

常用的灭菌和消毒方法

灭菌和消毒种类	主要方法	应用范围
火焰灭菌	酒精灯火焰灼烧	微生物接种工具如接种环、接种针或其他金属用具等,接种过程中试管口或三角瓶口等
干热灭菌	电热鼓风干燥箱 160℃~170℃加热 1~2h	玻璃器皿(如吸管、培养皿等)、金属用具等凡不适宜用其他方法灭菌而又能耐高温的物品
巴氏消毒法	60℃~85℃下处理 15~30min	牛奶、啤酒、果酒和酱油等不宜进行高温灭菌的液体
间歇灭菌法	100℃下蒸煮 30~60min 连续重复 3d,每天 1 次	含有葡萄糖或氨基酸等不耐高温药品的培养基等
蒸汽持续灭菌法	100℃持续加热 3~6h	微生物制品的土法生产或食用菌菌种制备
高压蒸汽灭菌法	121℃维持 15~30min	培养基及多种器材、物品
紫外线消毒	30W紫外灯照射 30min	接种室空气
化学药物消毒	用体积分数为 70%~75% 的乙醇、碘酒涂抹,来苏儿喷洒等	用于皮肤、伤口、动植物组织表面消毒,空气、手术器械、塑料或玻璃器皿等

第 2 节 微生物的纯培养

自然界中各种微生物几乎都是混杂在一起生活,即使取很少量的样品也是许多微生物共存的群体。但人们要研究某种微生物的特性,就要从混杂的样品中取得所需的纯种,或者把受污染的菌种重新分离出来,使该微生物处于纯培养状态。也就是说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。那么,如何才能分离并得到一个微生物的纯种呢?



微生物的分离与纯化

活动目标

进行微生物分离和纯化的基本操作。

实验原理

微生物的分离与纯化就是将待检测微生物样品通过划线或涂布接种在固体培养基上,样品中的每一个细胞或孢子都可以生长繁殖形成单个菌落。将单个菌落接种到斜面培养基上,经培养后,即可得到一个微生物的纯种。

材料用具

培养 16~24 h 的大肠杆菌 (*E. coli*) 培养液;灭菌的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基斜面和平板,盛有 9mL 无菌水的试管;无菌玻璃涂棒,无菌吸管,接种环等。

方法步骤

1. 微生物的分离

微生物的分离包括样品稀释、划线或涂布及培养三个步骤(图 1-8)。

(1) 稀释 用 1mL 无菌吸管吸取 1mL 大肠杆菌培养液,加入到盛有 9mL 无菌水的大试管中,充分混匀,然后用无菌吸管从此试管中吸取

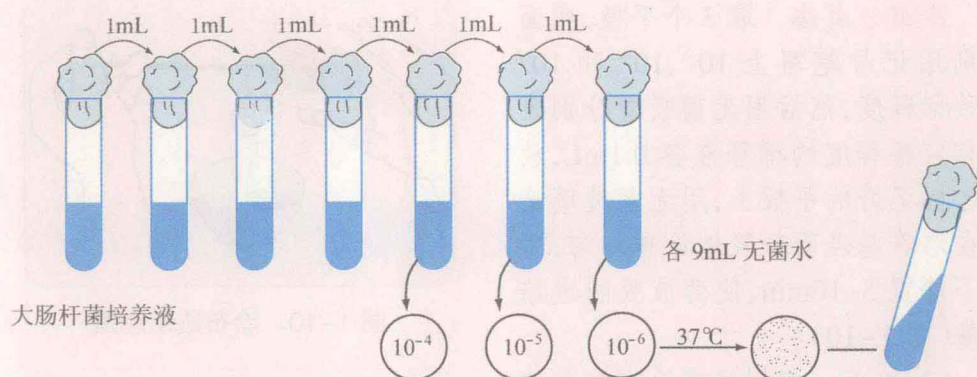


图 1-8 微生物分离操作流程图

1mL 加入另一支盛有 9mL 无菌水的试管中，混和均匀，依次类推制成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 系列稀释度的大肠杆菌稀释液。

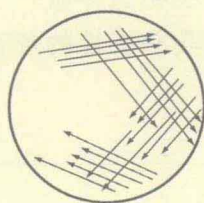
(2)划线或涂布

平板划线分离法 在近火焰处，左手拿皿底，右手拿接种环，挑取大肠杆菌培养液一环在平板上划线，常用的划线方法有平行划线和连续划线两种(图 1-9)。平行划线时，每转一个角度烧一次接种环。划线完毕后，盖上培养皿盖，做好标记。

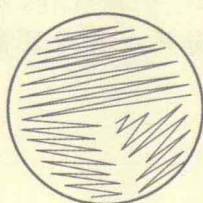


思考

划线时应注意什么？



平行划线



连续划线

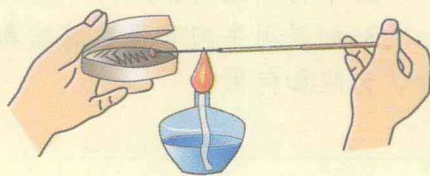


图 1-9 划线示意图

涂布分离法 取3个平板,底面分别用记号笔写上 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 三种稀释度,然后用无菌吸管分别吸取相应稀释度的稀释液各0.1mL,放入已标记好的平板上,用无菌玻璃涂棒在培养基表面轻轻地涂布均匀,室温下静置5~10min,使菌液吸附进培养基(图1-10)。

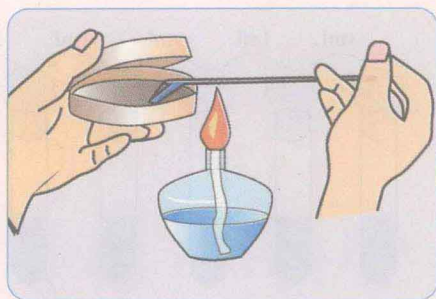


图 1-10 涂布法示意图

(3)培养 将划线或涂布接种的平板倒置于培养箱或温室中 37°C 培养16~24h,即可长出单菌落。

2. 接斜面

分别从培养后长出的单个菌落上挑取少许细胞,接种到斜面培养基上(图1-11),置培养箱或温室 37°C 培养24h,斜面上菌种长好后, 4°C 保存备用。

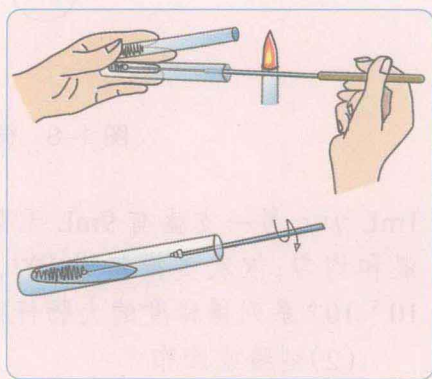


图 1-11 斜面接种法

总结与讨论

根据实验操作过程写出实验报告,讨论以下问题:

1. 你所做的平板划线分离法或涂布分离法是否较好地得到了单菌落?如果不是,请分析原因。
2. 平行划线时,每转一个角度烧一次接种环,为什么要这样做?
3. 如果用牛肉膏蛋白胨培养基分离一种对青霉素具有抗性的细菌,你认为应如何做?

分离和纯化微生物是微生物技术的重要操作方法。微生物种类不同,对培养基和生长条件等要求也不一样。一般根据微生物对营养物质、pH、氧气等要求的不同,供给它们适宜的生活条件,或加入某种抑制剂,造成只利于要分离的微生物生长、不利于其他微生物生长的环境,从而淘汰不需要的微生物,分离得