

经全国中小学教材审定委员会 2005 年初审通过

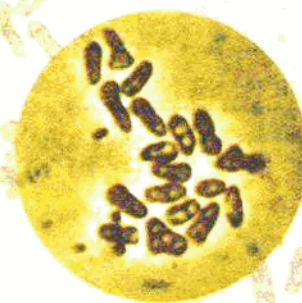
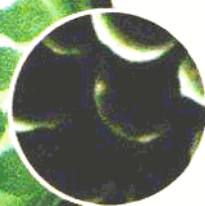
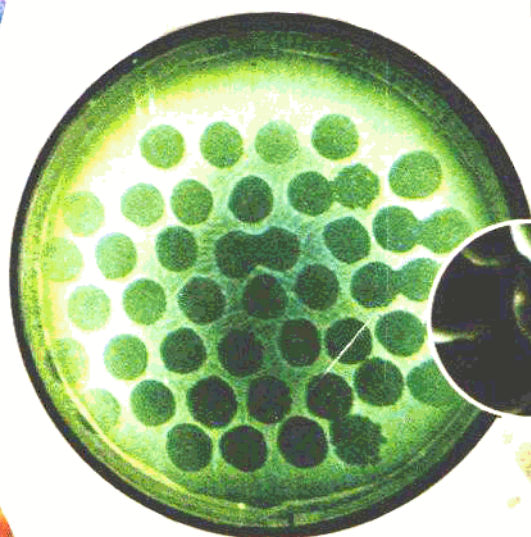
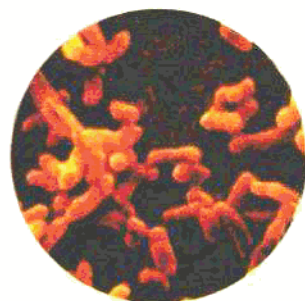
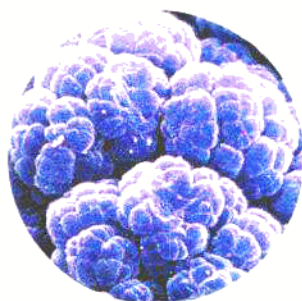
普通高中课程标准实验教科书

生物学

张新时 主编

生物技术实践

选修一



中国地图出版社出版

普 通 高 中 生 物 学 实 验 教 科 书

生 物 学

生物技术实践

选修一

主编 张新时

中国地图出版社出版

本套教材是根据教育部颁发的《普通高中课程方案（实验）》和《普通高中生物课程标准（实验）》编写的。教材不仅吸纳了现行高中生物学教育的优点，而且反映了学习是一个主动建构知识、发展能力、形成正确的情感态度与价值观的过程。教材在贴近社会实际和学生生活经验的同时，注意反映生物科学和技术的新进展，重视发展学生的创新精神和实践能力，尊重学生多样化发展的需求。

本套教材共六册，其中必修三册，选修三册。必修包括：《分子与细胞》、《遗传与进化》、《稳态与环境》；选修包括：《生物技术实践》、《生物科学与社会》和《现代生物科技专题》。学生在学习了《分子与细胞》的内容之后，可以学习《遗传与进化》的内容，也可先学习《稳态与环境》的内容。在修完必修模块的基础上，进行选修模块的学习。每模块（册）教学用36学时、2学分。

在教材编写过程中，我们得到了山东省教育厅、山西省教育厅、四川省教育厅领导和各学科专家学者的热情帮助和支持。在教材出版之际，我们特别感谢朱敏、冯恩旭、郑光美、刘植义、杨帆、韩贻仁、崔克勇、段志光、毕润成、李生才、林宏辉、王玉国、师广禄、姚敦义、王茂林、张洪震、刘培正、王振芳、许传明、韩花翠、吕仙艳、张艳、曹慧仁、周黎军、马文放、余广琪、张作国、田洪民、王兰以及对这套教材提出修改意见、提供过帮助和支持的所有专家、学者和教师。

由于时间仓促，书中难免有疏漏之处，通过一年的试用，各实验区的老师和教研人员给我们提出许多修改建议，此次我们一并做了修改。恳请大家在今后的使用过程中，不断给我们的教材提出宝贵意见，我们将不胜感谢。

2006年5月

第一章 微生物培养技术

第一节	微生物的分离和纯培养	2
第二节	培养基对微生物的选择作用	8
第三节	测定微生物的数量	14
	课外阅读 纯种分离和培养技术的发展	19

第二章 食品加工与食品安全

第一节	发酵与食品加工	22
第二节	食品安全的评估	26
	课外阅读 食品卫生标准	31

第三章 酶的制备及应用

第一节	酶的制备及活力测定	34
第二节	酶在食品加工中的应用	40
第三节	加酶洗衣粉的洗涤条件	45
第四节	酶的固定化	48
	课外阅读 纤维素酶的神奇作用	52

第四章 植物有效成分的提取

第一节	植物色素的提取	54
第二节	植物芳香油的提取	58
	课外阅读 食用色素与健康	61

目
录

第五章 植物的组织培养技术

第一节 植物快速繁殖技术 64

第二节 植物种苗脱毒技术 70

 课外阅读 兰花工业 73

第六章 蛋白质和DNA技术

第一节 蛋白质的提取和分离 76

第二节 DNA片段的扩增——PCR技术 80

 课外阅读 PCR技术的诞生 86

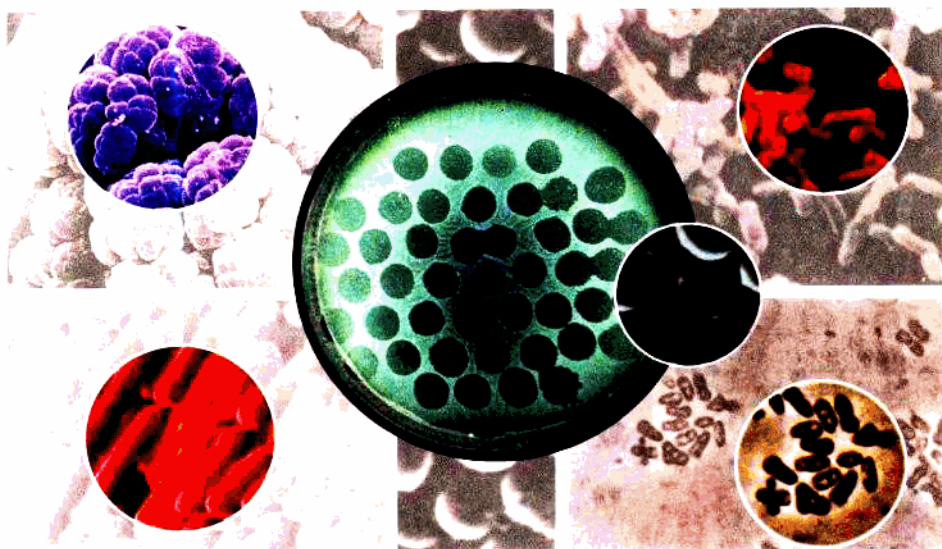
附录一：实验室规则 88

附录二：部分培养基配方 89

附录三：电泳试剂及配制方法 91

附录四：部分中英文对照表 92

第一章 微生物培养技术



课题研究

在江河湖海、土壤大气、动植物的体内体表，微生物无处不在。这些微小的生物在维持自然生态系统的稳定性上起着极其重要的作用。

微生物具有结构简单、代谢产物多样、生长繁殖迅速、易于培养、突变率较高等特点，是生物学基础研究和实践应用中的重要材料。人类利用自然界中丰富多样的微生物资源，解决了工业、农业及医药卫生领域中的许多问题。

▲ 研究计划

1. 查阅微生物培养技术的资料，收集有关微生物培养的实验材料。
2. 运用微生物培养技术，完成所需要微生物的分离和培养。
3. 观察微生物菌落的特征。
4. 测定特定样品中的微生物数量。

▲ 总结交流

1. 总结微生物分离和培养的关键技术及注意事项。
2. 交流各小组测定的特定样品中的微生物数量，提出改善环境或食品卫生状况的建议。

第一节 微生物的分离和纯培养



图 1-1-1
柯赫(前)和他的
助手在观察
炭疽杆菌



19 世纪 70 年代,德国科学家柯赫(R.Koch, 1843-1910, 图 1-1-1)研究牛的炭疽病时,将病牛的血液转移到人工配制的养料中,在适宜条件下培养,使得血液中的各种细菌大量繁殖,形成了不同形状和颜色的细菌群体。他将这些细菌分别注射到健康牛的体内,结果发现牛的炭疽病是由炭疽芽孢杆菌引起的。在此过程中,柯赫所采用的细菌培养方法,开创了微生物分离(isolation)和纯培养(pure culture)技术的先河。



自然界中的微生物(microorganism)主要包括细菌、放线菌、酵母菌、霉菌以及立克次氏体、支原体、病毒等类群。这些微生物都需要从生活环境中获取各种营养物质,以维持自身的生命活动。由于微生物代谢方式的不同,因而对营养物质的需求也是有差异的。根据这个特点,在进行微生物的分离和纯培养时,可根据微生物生长繁殖和代谢的需要,将各种营养物质混合在一起,配制成适合微生物生存的营养基质——培养基(culture medium)。其中,将溶化后的固体培养基基质倒入无菌培养皿,冷却凝固后制成的培养基称为平板培养基。

把相应的研究对象移入培养基中的过程称为接种(inoculation)。在平板培养基上接种的方法有平板划线法、稀释涂布平板法、稀释混合平板法等。通过这些方法,可将所需要的微生物从混杂的微生物群体中分离出来,获得纯种微生物,这个过程称为纯培养。实验中要根据实验目的、培养基种类和实验器皿的差异,采用不同的接种方法。接种技术是进行微生物实验和相关研究(如植物的组织培养)的基本技术。

微生物的生长繁殖还需要适宜的温度,一般是将接种后的培养基放入恒温培养箱中,在一定的温度下培养一定的时间,以得到所需要的微生物。

在微生物的分离和纯培养中,一定不能有外来的污染性杂菌,所

以必须采用无菌技术(aseptic technique)进行操作。因此,在实验过程中,要对所用的器材、培养基进行严格的灭菌,对工作场所进行消毒。灭菌(sterilization)是指用强烈的理化因素杀死环境或物体内外所有的微生物,常用的是高温灭菌法。而消毒(disinfection)一般是用相对温和的理化方法杀死环境或物体上的病原微生物和有害微生物的营养细胞,常用的是射线消毒法和化学药剂消毒法。

实践案例

大肠杆菌的分离和纯培养

大肠杆菌是人体肠道中普遍存在且容易培养的一类细菌,常作为分子生物学、遗传学和基因工程研究的重要材料。

材料器具

含大肠杆菌的混合菌液;牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(附录二)、无菌水;酒精灯、接种环、高压蒸汽灭菌锅、恒温培养箱、培养皿、试管等。

活动程序

1. 配制培养基

由教师提供配制好的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基
(配制方法请参考本章第二节的内容)

2. 接种

采用平板划线分离法进行接种。

接种前的准备工作 将所用的实验器材全部放入超净工作台或无菌箱(室),用紫外灯照射30min。进入无菌室前,要用消毒液清洁双手,还要换好工作服、鞋、帽,戴上口罩。

将接种环环端在酒精灯火焰上烧红,再将接种环斜放,沿环向上,烧至可能碰到培养皿的部分。来回数次(图1-1-2)。



图1-1-2
接种环灭菌

图 1-1-3
试管口的灭菌



在酒精灯火焰附近冷却接种环。左手拿取混合菌液试管，让试管口缓缓通过火焰灭菌(图1-1-3)。

图 1-1-4
沾取混合菌液



将接种环伸入试管内，沾取一环混合菌液(图 1-1-4)。

图 1-1-5
接种



左手持培养皿并开启一条缝隙，右手将接种环迅速伸入平板，进行划线(图 1-1-5)。

划线的方法包括连续划线法和交叉划线法(图 1-1-6)。

连续划线法是从菌液处开始，连续作平滑的波状式划线。交叉划线法是先将菌液作第一次划线若干条，然后培养皿盖上，将接种环直立并灭菌并冷却后，通过第一次划线处作

图 1-1-6
平板划线菌落图



采用连续划线法经培养得到的菌落



采用交叉划线法经培养得到的菌落

1. 第一划线：划线（同法接种第二、三、四划线）

通过十次划线，聚集的多种微生物经分散到培养基的表面。在数次划线后，可以分离得到由一个细菌繁殖而来的细菌。

3. 培养

划线完毕后，盖上培养皿盖，将培养皿倒置，放入 37℃ 的恒温培养箱中培养 24 h(图 1-1-7)。

4. 观察记录

将观察到的大肠杆菌的菌落特征记录于表 1-1-1 中。



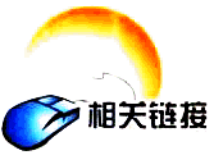
图 1-1-7
恒温培养

表 1-1-1 大肠杆菌的菌落特征

形 状	大 小	表 面	边 缘	隆 起	透 明 度	颜 色

5. 纯化培养

挑取单个大肠杆菌菌落接种到培养基上，仍在 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h，可获得大肠杆菌的纯培养。检查后如果发现有杂菌，可进一步划线挑菌，直至纯化。



在固体平板培养基上，单个微生物细胞或孢子可生长繁殖成一个具有特定形状的菌落。在一定培养条件下，微生物的菌落形状、大小、边缘、隆起度和颜色等是稳定的。如细菌菌落光滑，易与基质脱离；放线菌菌落质地致密，菌落较小而不致广泛延伸；酵母菌菌落较细细菌菌落大而厚；霉菌形成的菌落较稀松，多呈绒毛状、絮状。通过对菌落特征的观察可以识别微生物的类群。

形态	 标点状	 圆形	 丝状	 不规则状	 假根	 纺锤状
突起	 扁平	 隆起	 凸透镜状	 垫状	 脐突状	
边缘	 完整	 波形	 裂片状	 腐蚀状	 丝状	 卷曲

结果分析

1. 经过第一次恒温培养后, 培养基上是否只有大肠杆菌的菌落?
2. 如果要进一步认识大肠杆菌的特征, 应该如何操作? 不妨查阅有关资料, 学会观察细菌形态的方法。

探究活动

探究特定微生物的分离和纯培养

在豆科植物根部生活的固氮菌, 能直接固定空气中的氮气, 为植物的生长提供所需要的氮肥(图1-1-8)。我们可以利用微生物的分离和纯培养技术, 将根瘤菌从豆科植物的根部分离出来, 制成菌肥, 用于农业生产, 会有明显的增产效果。

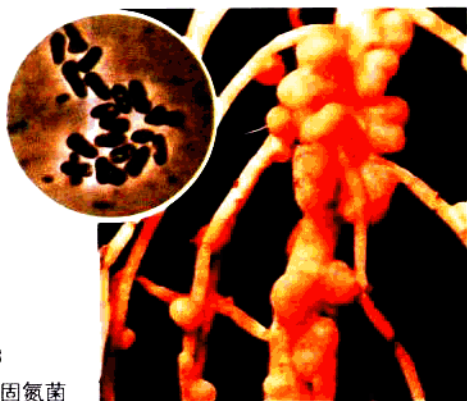


图 1-1-8
根瘤中的固氮菌

活动建议

1. 从豆科植物根瘤中分离和培养根瘤菌

选用根系比较完整, 根瘤大而内部红润的新鲜豆科植物作为材料。由于根瘤表面杂菌多, 分离培养的关键是杀死表面杂菌。

2. 从酒曲中分离和培养酵母菌

酒曲中含有霉菌、酵母菌、细菌等大量微生物(图1-1-9)。宜选用酸性液体培养基培养, 再用划线分离法在固体培养基上分离培养。



图 1-1-9
酵母菌

培养不同的微生物, 使用的培养基、培养的温度和时间有所不同。大多数微生物适宜生长的温度在 $25 \sim 40^{\circ}\text{C}$ 之间, 实验室中常采用 $28 \sim 30^{\circ}\text{C}$ 培养微生物。一般的细菌适合于中性环境生长, 放线菌适合于偏碱性环境, 而酵母菌和霉菌适合于微酸性环境, 配制培养基时需要根据微生物的类群调节pH。

分析讨论

1.在本次活动中,你是否获得了所需微生物的纯培养?你认为取得成功的关键技术是什么?

2.你在实验中获得细菌或其他微生物的纯培养,如果需要保留便于以后使用,应该如何保存?如果不需要保留,应该如何处理?

琼脂平板培养基分离纯化技术是一种简便有效的微生物学常规技术,它至今仍广泛应用于微生物菌种的筛选、鉴定、育种、计数以及各种微生物的测定工作中。纯种分离技术还在不断发展完善,如许多用于活菌计数的平板等已日趋微型化、简便化、商品化和系列化。

巩固提高

1.在平板划线时,若需再次取菌液划线,需要先将接种环灼烧。这是为什么?

2.接种以后,为什么要将培养皿倒置放入恒温箱中培养?

第二节 培养基对微生物的选择作用

我们食用的火腿肠等熟肉制品中常常添加食用色素——红曲，从而使这些食品显得更加诱人(图1-2-1)。你知道吗？早在宋代，我国就根据红曲霉有耐酸和耐高温的特点，采用明矾调节酸度和用酸米抑制杂菌的方法，培养出纯度很高的红曲。这实际上是



图 1-2-1
添加红曲的熟
肉制品



背景知识

有些微生物可以分泌纤维素酶，使纤维素分解，以作为生命活动所需要的碳源。如果在固体培养基中加入纤维滤纸作为惟一碳源，则只有能分解纤维素的微生物可以生存，其他微生物由于缺乏纤维素酶，不能利用纤维素作为碳源而无法生存。这样就可以分离到能分解纤维素的微生物。

这种能让特定的微生物生长、抑制其他微生物生长，从而将所需要的微生物从混杂的微生物群体中分离出来的培养基，称为选择培养基(selective medium)。很多微生物都可以通过选择培养基进行分离纯化。

配制选择培养基时，可以根据某一种或某一类微生物的特殊营养要求，加入某些物质或除去某些营养物质(如碳源、氮源、水、无机盐、生长因子等)，抑制其他微生物的生长，从而有利于某一类群或某一种特定的微生物生长。此外，也可以根据某些微生物对一些物理、化学因素的抗性，在培养基中加入某种化学物质，以抑制不需要的微生物的生长繁殖，造成有利于特定微生物种类优先生长的条件。



实践案例

用惟一碳源培养基分离微生物

自然界的纤维素资源十分丰富，在植物的枝叶、秸秆和糠壳中都含有大量的纤维素，但是多数的纤维素原料都作为燃料或废物处理掉了(图1-2-2)。如果我们利用分解纤维素的微生物，将纤维素转变成

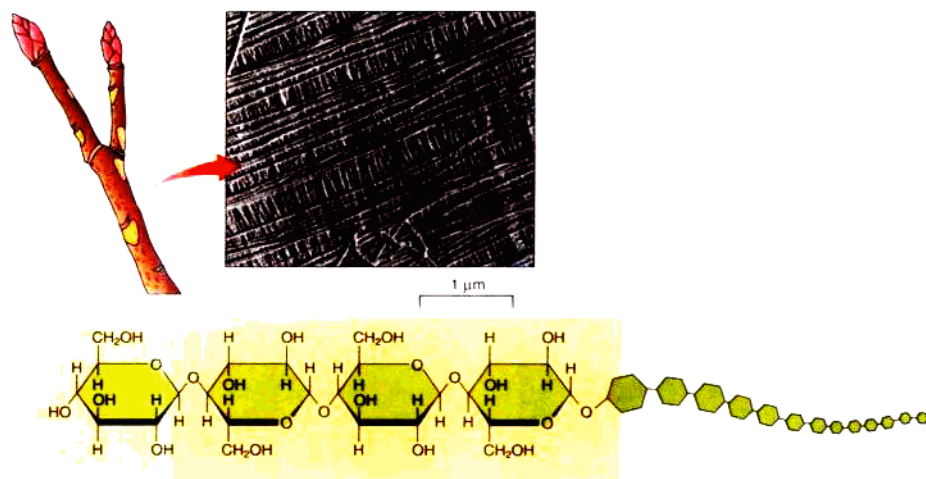


图 1-2-2
树皮中含有大量的纤维素

糖类等可溶性的碳水化合物，将为饲料、食品及发酵工业开辟新的原料来源。

材料器具

土壤悬液；赫奇逊培养基（附录二）、蒸馏水；滤纸、酒精灯、电炉、高压蒸汽灭菌锅、电子秤、培养皿、pH 试纸、棉花、锥形瓶、镊子、吸管、干燥器、恒温箱等。

活动程序

1. 配制培养基

原料称量、溶解 根据培养基的配方，准确称取各原料成分置于锥形瓶中，并加入适量蒸馏水，在电炉上边加热边搅拌，直至琼脂完全溶化，然后加蒸馏水至 1 000 mL(图 1-2-3、图 1-2-4)。

调节 pH 先用精密 pH 试纸测定培养基的原始 pH，再滴加物质的量浓度为 1 mol/L 的 NaOH 或盐酸溶液，边加边搅拌，并随时用 pH 试纸测试 pH，直至 pH 达 7.2 ~ 7.4。

分装、包扎 将配制好的培养基分装到锥形瓶内（不超过其容积一半为宜），用棉塞塞紧(图 1-2-5)。棉塞外包一层牛皮纸。用记号笔注明名称、组别、日期。



图 1-2-3
原料称量



图 1-2-4
加热溶化



图 1-2-5
培养基的分装

灭菌 将上述培养基放置于高压蒸汽灭菌锅中， 121°C 下灭菌20 min。

2.倒平板

将灭菌后的培养液倒入培养皿中(图 1-2-6 a、b、c)。



(a)

待培养基冷却至 50°C 左右时，在酒精灯火焰旁拔出棉塞。



(b)

手拿锥形瓶，瓶口通过火焰，灼烧灭菌。



(c)

左手持培养皿，打开皿盖。右手将锥形瓶中的约15 mL培养液倒入培养皿。立即盖上皿盖，待平板冷却后备用。

图 1-2-6(a,b,c)
倒平板的操作方法

3.接种

采用稀释涂布平板法进行接种(图 1-2-7 a、b、c)。



(a)

将长玻璃吸管在酒精灯火焰上灼烧，把一端弯成 30° 呈“了”字形，制成涂布器。

用无菌吸管吸取 0.05 mL 的土壤稀释液滴于平板上，再用无菌涂布器涂布。涂布时可转动培养皿，使涂布均匀。



(b)

用无菌镊子取无菌滤纸覆盖于培养基上，并用涂布器压平。



(c)

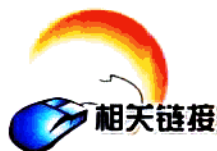
图 1-2-7(a,b,c)
稀释涂布平板
操作方法

4. 培养

先向干燥器中加入适量无菌蒸馏水，以保持一定的湿度，再将培养皿置于干燥器隔板上，于 28~30℃ 条件下恒温培养 10 d 左右(图 1-2-8)。



图 1-2-8
恒温培养



相关链接

手提式高压蒸汽灭菌锅的使用方法

加水 打开高压蒸汽灭菌锅，将里面的灭菌桶取出，向锅内加水，水面与底架平齐为宜。

装料 将锥形瓶瓶口向上竖放在灭菌桶内，再将灭菌桶放回灭菌锅。物品之间要保留空隙，以利于通气。

密封 加盖，将排气软管插入灭菌锅的排气管内。以两两对称的方式，同时拧紧相对的两个紧固螺栓，以防漏气。

排气 加热，当压力上升到 49 kPa 时，打开排气阀放气，当压力降到 0 时，关闭排气阀。重复上述放气过程一次，以彻底排出锅内的冷空气。

升压 当锅内的压力升到 98 kPa 左右时，保持 20 min。

降压 停止加热，让其自然降压。当压力降至 0 以后，打开排气阀，10 min 后，拧开紧固螺栓，取出锥形瓶。最后将灭菌锅里

结果分析

1. 如何判断培养基中的微生物能分解纤维素?
2. 观察培养基上的菌落, 判断培养基上有哪些类群的微生物?

探究活动

利用选择培养基分离微生物

苏云金芽孢杆菌细胞内形成的伴孢晶体能够杀死包括棉铃虫在内的许多农作物害虫。1993年, 我国科学家成功地将苏云金芽孢杆菌中的抗虫基因转入棉植株, 培育出抗棉铃虫的转基因抗虫棉(图1-2-9)。利用选择培养基, 可极大地提高从虫体中分离苏云金芽孢杆菌的效率。

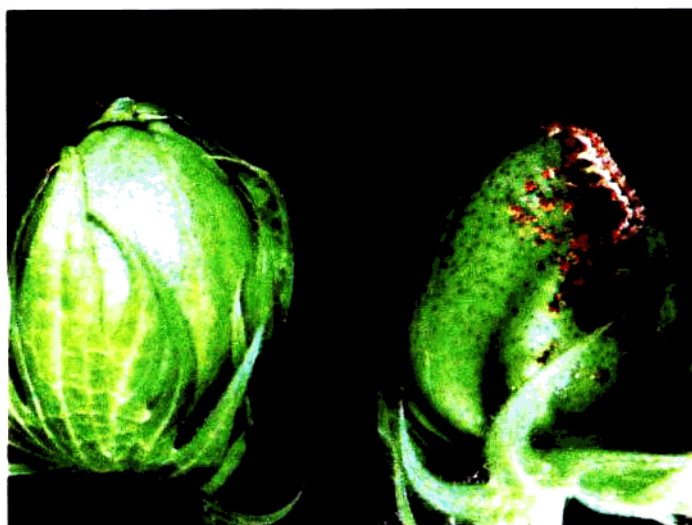


图 1-2-9
抗虫棉(左)和普通棉(右)

抗虫棉叶

普通棉叶

活动建议

1. 分离苏云金芽孢杆菌

在未使用农药的田间, 染病死亡的棉铃虫等幼虫大多是因为感染了苏云金芽孢杆菌中毒所致。可以利用染病的棉铃虫、玉米螟、菜青虫为材料, 配制菌液, 采用附录二提供的选择培养基, 分离出苏云金芽孢杆菌。

2. 分离分解纤维素的细菌

实践案例只是分离到能分解纤维素的微生物类群。可以在此基础