

黄文芳 张 松 编



微生物学实验指导

WEISHENGWUXUE
SHIYAN
ZHIDAO



普通物理学实验指导

WEISHENGWUXUE
SHIYAN
ZHIDAO



生命科学实验教材系列

微生物学实验指导

黄文芳 张松 编

暨南大学出版社

中国·广州

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学实验指导/黄文芳, 张松编. —广州: 暨南大学出版社, 2003.8
(生命科学实验教材系列)
ISBN 7-81079-272-5

I. 微…

II. ①黄…②张…

III. 微生物学—实验—高等学校—教学参考资料

IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 072132 号

出版发行: 暨南大学出版社

地 址: 中国广州暨南大学

电 话: 编辑部 (8620) 85226205 85228986

营销部 (8620) 85226712 85228291 85220602 (邮购)

传 真: (8620) 85221583 (办公室) 85223774 (营销部)

邮 编: 510630

网 址: <http://www.jnupress.com> <http://press.jnu.edu.cn>

排 版: 暨南大学出版社照排中心

印 刷: 暨南大学印刷厂

开 本: 787mm × 1092mm 1/16

印 张: 11.125

字 数: 210 千

版 次: 2003 年 8 月第 1 版

印 次: 2003 年 8 月第 1 次

定 价: 19.00 元

(暨大版图书如有印装质量问题, 请与出版社营销部联系调换)

前 言

微生物学实验课是培养学生独立工作能力和解决问题能力的重要环节，实验教材是指导学生上好实验课和掌握基本技能的重要工具。根据教育部教学大纲的要求，结合我们自己多年实验教学的实践经验和体会，在吸取兄弟院校的经验与信息资料的基础上，编写了《微生物学实验指导》一书。本书介绍了微生物学研究的基本技术和方法，如微生物的分离纯化技术、无菌接种技术、微生物制片观察技术、生理生化测定与鉴定、微生物培养技术和菌种保藏等；每个实验都编写了“注意事项”和“思考题”，有利于学生更好地把握实验操作中的关键因素以及实验前后进行思考和总结提高。本书还包含综合实验内容，能较全面地培养学生正确理解实验原理和掌握微生物学实验技能和技术，初步培养进行科学研究的能力。

全书内容分为二部分。第一部分为基础实验，突出微生物学实验特点，比较系统地介绍了基本技能和技术。第二部分为综合实验，学生在完成规定的基础实验后，在老师的指导下，以小组为单位，选题开展综合实验。目的是培养学生独立操作和设计实验的能力，为开展科学研究和完成毕业论文打下基础。

生命科学实验教材含：《生物学基础实验指导》、《微生物学实验指导》、《生物化学与分子生物学实验指导》，由华南师范大学生命科学学院基础课实验教学示范中心组织编写和审核。

本书可作高等师范大学生命科学学院各专业本科生实验教学用书，也可作研究生参考及其他院校教学参考。本书除实验 35 由张松编写外，其余实验内容由黄文芳编写。鉴于我们的知识和能力所限，书中的错误与不足之处在所难免，敬请各位同行提出宝贵意见。

华南师范大学生命科学学院

2003 年 7 月

实验规则

1. 每个学生必须遵守实验室规则。
2. 实验时不准迟到、早退或无故缺席，有病或有事应向任课教师请假。
3. 进入实验室后要求做到安静，不得在室内喧哗、打闹；不得吸烟、吃东西、随地吐痰、乱丢纸屑和其他杂物。
4. 不得将与实验无关的物品带入实验室；不得将实验物品随便带出实验室；不允许在实验台和仪器上乱涂乱画，未经许可不得操作、搬弄仪器设备。
5. 要爱护仪器、设备和标本，使用仪器要小心，严格遵守操作规程，因违反操作规程而损坏仪器设备及物品者要按有关规定赔偿。
6. 在实验过程中仪器设备发生故障或损坏时，应首先切断电源，并立即报告任课教师及时处理。
7. 使用贵重仪器设备，一定要在老师的指导下操作；使用完毕，要进行登记。
8. 实验中使用易燃、易爆、有毒试剂及传染性强的物质时，应严格操作，注意自我保护。如发生意外，应立即报告任课教师及时处理。
9. 实验完成后，将仪器设备、用具等放归原处，所用器皿处理干净。值日生应负责清扫室内卫生，关好水、电开关和窗户，经任课教师检查后，方可离开实验室。

实验报告的书写

实验报告是对实验观察、比较或结果的真实记载，是科学的记录。实验报告的形式可以根据实验内容的不同而分为文字描述、绘图和列表 3 种形式。

1. 文字描述

文字描述是将观察所得的实验结果客观地加以描述，有时还需要做进一步分析。在此过程中，要抓住主要问题，描述准确，条理清楚，文字简明。

2. 绘图

将所观察标本的形态结构或显微镜下观察视野图，通过作图的方式来表达。

(1) 准备一支 3H 或 HB 黑铅笔及橡皮、直尺、绘图纸和削笔刀。绘图必须真实准确，注意整洁明了。不可抄袭教材或他人的图。

(2) 图中的各部分比例应与标本或图像一致，在绘图纸的一面绘图，每幅图的大小、位置必须分配适宜，布局合理。一般较大的图，每页绘一个，较小的图可绘数个。

(3) 图的位置一般偏于纸的左侧，右侧作引线及注字。

(4) 绘图时，先用软铅笔 (HB) 把标本轮廓及主要部分轻轻绘出，然后添加各部分详细结构，再加以修改，最后用尖的硬铅笔 (3H) 以清晰的笔画绘出全图。

(5) 绘图纸上所有的字必须用硬铅笔以楷书写出，不可潦草。注字引线应水平伸出，各引线不能交叉，图的名称应写在图的下面。

3. 制图

实验报告中用图形可以表达信息，图形有多种，如曲线图、柱形图、三维图、扇形图等。图形经常表明两种变量 (x 和 y) 之间的关系，两个数轴是相互垂直的。横轴为横坐标 (x 轴)，纵轴为纵坐标 (y 轴)。通常， x 轴表示自变量 (如某实验处理)， y 轴表示因变

量（如生物效应）。每个数轴都要有说明性的标注和合适的测量单位。每个数轴都要有刻度和参照标记。

4. 制表

表格通常是简洁、准确、有条理地表示数值型数据的合适方式，它能有效地压缩和展示实验结果，并有助于详尽地对数据进行比较。表格包括的内容如下：

（1）标题：必要时写上参考标注和日期。

（2）行和列的表头：附上合适的测量单位。将相关数据或特性按类别垂直列出，用行展示不同的实验处理、生物类型等。对照值常放在表格的开头，相互比较的列要靠在一起。

（3）数据值：引用有意义的有效数字，根据需要列出统计参数。

（4）脚注：解释缩写符号、修饰符号及某个细节。

目 录

实验规则	(1)
实验报告的书写	(1)
[基础实验]	
实验 1 培养基配制	(1)
实验 2 消毒与灭菌	(6)
I 干热灭菌	(6)
II 高压蒸汽灭菌	(7)
III 紫外线灭菌	(10)
IV 微孔滤膜过滤除菌	(12)
实验 3 微生物的接种技术	(16)
实验 4 微生物分离与纯化技术	(20)
实验 5 圆褐固氮菌的分离、纯化与测定	(23)
实验 6 从病鱼体上分离、纯化病原菌	(26)
实验 7 噬菌体分离、纯化与效价测定	(28)
I 噬菌体的分离、纯化	(28)
II 噬菌体效价的测定	(31)
实验 8 各种微生物菌落形态的观察	(35)
实验 9 细菌个体形态的观察	(39)
实验 10 细菌细胞单染色观察	(41)
实验 11 细菌的革兰氏染色	(44)
实验 12 细菌鞭毛染色与观察	(47)
实验 13 细菌芽孢染色与观察	(50)
实验 14 细菌荚膜染色与观察	(53)
实验 15 放线菌的形态观察	(56)
实验 16 酵母菌的形态观察	(59)
实验 17 霉菌的形态观察	(62)
实验 18 细菌和酵母菌体大小的测量	(65)
实验 19 微生物数量的测定	(68)

I	显微镜直接计数法	(68)
II	平板菌落计数法	(71)
III	分光光度计计数法	(74)
IV	苏云金芽孢杆菌生长曲线的测定	(76)
实验 20	细菌生理生化反应实验	(78)
I	细菌水解淀粉	(78)
II	细菌水解油脂	(79)
III	细菌水解明胶	(80)
IV	细菌水解尿素	(81)
V	细菌对牛乳的利用	(81)
VI	糖发酵实验	(82)
VII	甲基红实验	(84)
VIII	乙酰甲基甲醇实验	(84)
IX	硫化氢产生实验	(86)
X I	柠檬酸盐利用实验	(87)
X II	硝酸盐还原实验	(87)
X III	产氨实验	(89)
实验 21	多项微量生化反应快速鉴定技术	(92)
实验 22	氧影响微生物生长	(96)
实验 23	厌氧微生物的培养	(101)
实验 24	温度影响微生物生长	(105)
实验 25	不同 NaCl 浓度对微生物生长的影响	(108)
实验 26	pH 影响微生物生长	(110)
实验 27	不同碳源物质对微生物生长的影响	(113)
实验 28	微生物菌种保藏	(115)
实验 29	免疫血清的制备	(118)
实验 30	凝集反应	(121)
实验 31	沉淀反应	(124)
[综合实验]		
实验 32	水中细菌学检查	(127)
I	水中细菌总数的测定	(127)
II	水中大肠菌群的检测	(130)
实验 33	酒精发酵及糯米甜酒的酿制	(133)
实验 34	高淀粉酶活性枯草芽孢杆菌菌株的筛选与育种技术	(134)
实验 35	食用菌培养	(136)

I	平菇栽培·····	(139)
II	金针菇栽培·····	(141)
III	草菇栽培·····	(144)
IV	灵芝栽培·····	(146)
附 录		
附录 1	实验室意外事故的处理·····	(149)
附录 2	常用培养基·····	(150)
附录 3	酸碱指示剂的配制·····	(156)
附录 4	常用染色液及试剂的配制·····	(157)
附录 5	常用消毒剂·····	(163)
附录 6	玻璃器皿洗涤法·····	(164)
附录 7	生物学教学中观察微生物方法·····	(166)
主要参考文献·····		(168)

[基础实验]

实验 1 培养基的配制

一、目的

学习和掌握培养基配制的一般方法与步骤。

二、原理

由人工配制供给微生物生长繁殖或积累代谢产物所需的营养基质，称之为培养基。培养基中含有氮素、碳素、矿质元素、生长因子、水等物质，可分为固体培养基、液体培养基和半固体培养基等。

三、材料、试剂与器具

(1) 试剂。

牛肉膏蛋白培养基配方如下：

牛肉膏 5g，蛋白胨 10g，NaCl 5g，琼脂 15~20g，水 1 000mL，pH 7.4~7.6。

高氏 1 号固体培养基配方如下：

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

马丁氏固体培养基配方如下：

K₂HPO₄·7H₂O 1g，MgSO₄·7H₂O 0.5g，蛋白胨 5g，葡萄糖 10g，琼脂 15~20g，3.3mL 1% 孟加拉红水溶液，0.3mL 1% 链霉素水溶液，水 1 000mL，自然 pH。

阿须贝无氮琼脂培养基配方如下：

甘露醇（或葡萄糖 15g 或蔗糖 15g）10g，K₂HPO₄·7H₂O 0.2g，NaCl 0.2g，MgSO₄·7H₂O 0.5g，CaCO₃ 5g，CaSO₄·2H₂O 0.1g，水 1 000mL，琼脂 18~20g，pH 7.0。

(2) 器具。试管，三角瓶，瓷量杯，量筒，玻璃棒，天平，牛角匙，pH 试纸，棉花，牛皮纸，记号笔，线绳，纱布，漏斗，漏斗架，胶管，止水夹等。

四、操作步骤

1. 牛肉膏蛋白胨固体培养基的配制

牛肉膏蛋白胨培养基是一种适合许多细菌生长的最普通的细菌基础培养基。

(1) 称药品。按实际用量计算后,按配方称取各种药品入瓷杯中。牛肉膏可放在称量纸上称量,随后放入热水中,牛肉膏溶解后,立即取出纸片。

(2) 加热溶解。在烧杯中加入少于所需要的水量,然后放在石棉网上,小火加热,并用玻棒搅拌,待药品完全溶解后再补充水分至所需量。若配制固体培养基,则将称好的琼脂放入已溶解的药品中,再加热融化。此过程中,需不断搅拌,以防琼脂糊底或溢出,最后补足所失的水分。

(3) 调 pH。用 pH 试纸检测培养基的 pH,若偏酸,可滴加 1mol/L NaOH,边加边搅拌,并随时用 pH 试纸检测,直至达到所需 pH 范围;若偏碱,则用 1mol/L HCl 进行调节。pH 的调节通常放在加琼脂之前。

(4) 过滤。液体培养基可用滤纸过滤,固体培养基可用 4 层纱布趁热过滤,除去杂质以利微生物培养的观察。但是供一般使用的培养基,这步可省略。

(5) 分装。按实验要求,可将配制的培养基分装入试管或三角瓶内。分装时可用漏斗以免使培养基沾在管口或瓶口上而造成污染。固体培养基装量约为试管高度的 1/5,三角瓶装量为容积的一半为宜。

(6) 加棉塞。试管口和三角瓶口塞上用普通棉花(非脱脂棉)制作的棉塞。分装过程和装置如图 1-1。棉塞的形状、大小和松紧度要合适,四周紧贴管壁,不留缝隙,才能起到防止杂菌侵入和有利通气的作用。要使棉塞总长约 3/5 塞入试管口或瓶口内,以防棉塞脱落(图 1-2)。有些微生物需要更好的通气,则可用 8 层纱布制成通气塞。有时也可用试管帽或塑料塞代替棉塞(图 1-3)。

(7) 包扎。加塞后,将三角瓶的棉塞外包一层牛皮纸或双层报纸,以防灭菌时冷凝水沾湿棉塞。若培养基分装于试管中,则应以 5 支或 7 支在一起,再于棉塞外包一层牛皮纸,用绳扎好;然后用记号笔注明培养基名称、组别、日期。

(8) 灭菌。将上述培养基于 121.3℃ (0.11MPa) 湿热灭菌 20min。如因特殊情况不能及时灭菌,则应放入冰箱内暂存。

(9) 摆斜面。灭菌后,如制斜面培养基,则需趁热将试管口端搁在一根长木条上,并调整斜度,使斜面的长度不超过试管总长的 1/2 (图 1-4)。

若制平板培养基,则培养基装入三角瓶中灭菌后,无菌操作倒入灭菌过的

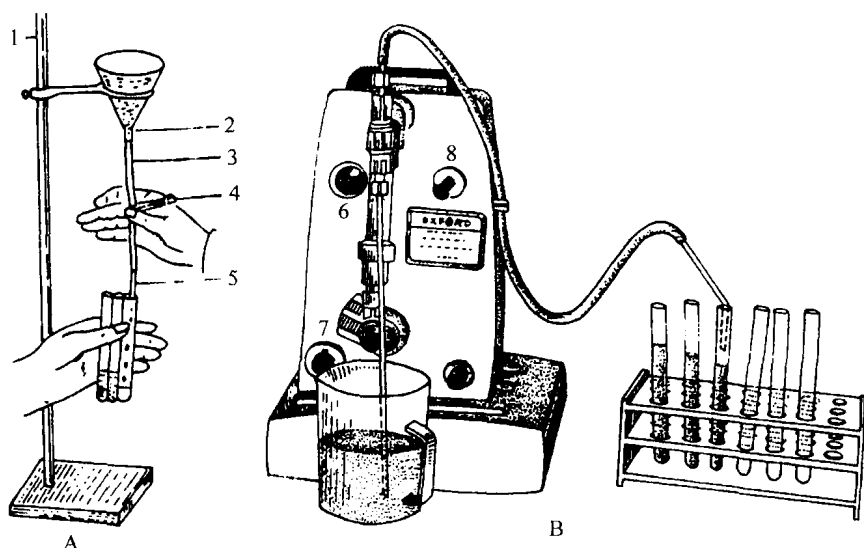


图 1-1 培养基分装装置

A. 漏斗分装装置；B. 自动分装器

1. 铁架；2. 漏斗；3. 乳胶管；4. 弹簧夹；5. 玻管；6. 流速调节；7. 装量调节；8. 开关

平皿中，约 1.5~2mm 厚。

(10) 无菌检查。将灭菌的培养基放入 37℃ 温箱中培养 24~28h，无菌生长即可使用；或储存于冰箱或清洁的橱内，备用。

2. 高氏 1 号固体培养基的配制

高氏 1 号培养基是用于分离和培养放线菌的合成培养基。

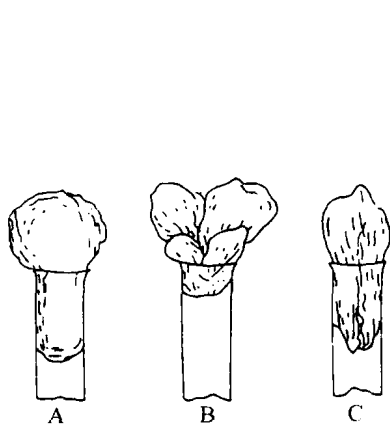


图 1-2 棉塞

A. 正确 B. C. 不正确

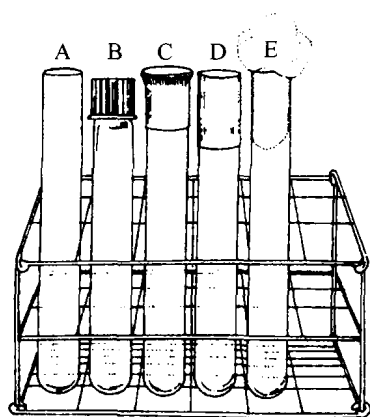


图 1-3 试管与试管帽

A. 细菌学试管；B. 螺帽；C. 塑料帽
D. 金属帽；E. 棉塞

(1) 称量和溶解。按用量先称取可溶性淀粉, 放入小烧杯中, 并用少量冷水将其调成糊状, 再加一定水量的水, 加热, 边加热边搅拌, 至其完全溶解, 再加入其他成分依次溶解。对微



图 1-4 摆斜面

量成分 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 可先配成高浓度的储备液后再加入, 方法是先在 10mL 中加入 0.1g 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 配成浓度为 0.01g/mL 的储备液, 再在 1 000mL 培养基中加入以上储备液 1mL 即可。待所有药品完全溶解后, 补充水分到所需的总体积。如要配制固体培养基, 其琼脂溶化过程同牛肉膏蛋白胨培养基配制。

(2) pH 调节、分装、包扎及无菌检查。同牛肉膏蛋白胨培养基配制。

3. 马丁氏固体培养基的配制

马丁氏固体培养基是用于分离真菌的选择培养基。

(1) 称量和溶解。先计算后称量, 按用量称取各成分, 并将其溶解在少于所需的水中。待各成分完全溶解后, 补充水分到所需体积, 在 1 000mL 培养基中加入 1% 的孟加拉红水溶液 3.3mL, 混匀后, 加入琼脂加热融化, 方法同牛肉膏蛋白胨培养基配制。

(2) 分装、包扎、灭菌及无菌检查。同牛肉膏蛋白胨培养基配制。

(3) 链霉素的加入。链霉素受热容易分解, 因此临用时, 将培养基融化后待温度降至 45℃ 左右时才能加入。可先将链霉素配成 1% 的溶液 (配好的链霉素溶液保存于 4℃), 在 1 000mL 培养基中加入 1% 链霉素水溶液 0.3mL, 混匀。

4. 阿须贝 (Ashby) 无氮琼脂培养基的配制

此培养基用于分离自生固氮菌。

配制方法如同牛肉膏蛋白胨培养基配制方法。

五、注意事项

(1) 称药品用的牛角匙不要混用, 称完药品应及时盖紧瓶盖以免吸潮。调节 pH 时要小心操作, 避免回调。不同培养基各有配制特点, 要注意具体操作。

(2) 若配制液体培养基, 则不加琼脂; 若配制半固体培养基, 1 000mL 水中则加入 5~8g 琼脂。

六、实验报告

记录本实验配制培养基的名称、数量, 并图解说明其配制过程, 指出要点。

七、思考题

- (1) 配制固体培养基的在操作过程中应注意哪些问题？为什么？
- (2) 培养基配制完成后，为什么必须立即灭菌？若不能及时灭菌应如何处理？已灭菌的培养基如何进行无菌检查？
- (3) 试设计对饮料进行无菌检查的实验。

实验 2 消毒与灭菌

I 干热灭菌

一、目的

了解干热灭菌的原理和应用范围；学习掌握干热灭菌的操作技术。

二、原理

只杀死病原微生物，称之为消毒；把所有微生物杀死，称之为灭菌；把物体上的微生物去除掉，称之为除菌。

干热灭菌是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。与湿热灭菌相比，干热灭菌所需温度要高（ $160^{\circ}\text{C} \sim 170^{\circ}\text{C}$ ），时间要长（1~2h），但干热灭菌温度不能超过 180°C ，否则，包装器皿的纸或棉塞就会烧焦，甚至引起燃烧。用于干热灭菌的设备主要是电烘箱或干燥箱。

三、材料、试剂与器具

器具：培养皿，试管，吸管，电烘箱等。

四、操作步骤

（1）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。

物品不要摆得太挤，以免妨碍热气流通；灭菌物品不要接触电烘箱内壁的铁板，以防包装纸烤焦起火。

（2）接通电源，拨动开关，打开电烘箱排气孔，旋动恒温调节器至红灯亮，让温度逐渐上升。当温度升到 100°C 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 $160^{\circ}\text{C} \sim 170^{\circ}\text{C}$ 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）当温度升达到 $160^{\circ}\text{C} \sim 170^{\circ}\text{C}$ 时，恒温调节器会自动控制调节温度，保持此温度 2h。

（4）切断电源，自然降温。