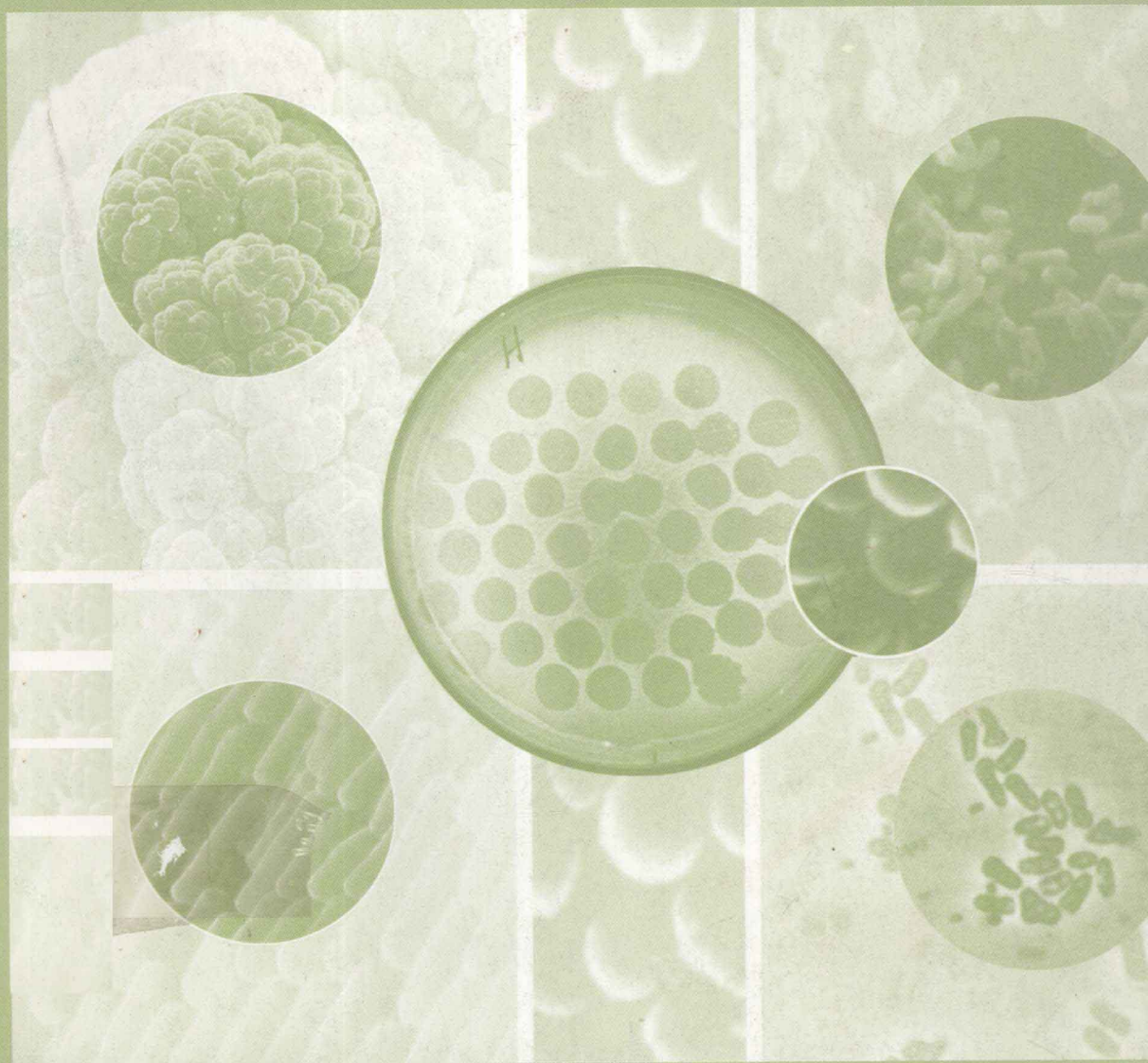


普通高中课程标准实验教科书

生物学

生物技术实践 (选修一)

教师教学用书



中国地图出版社出版

普通高中课程标准实验教科书

生 物 学

生物技术实践(选修一)

教 师 教 学 用 书

主编 石 建

中国地图出版社出版

本册主编:石 建

编 著 者:(以姓氏笔画为序)

石 建 冯永康 何兴明

李德成 赵广宇 屈寄成

审 校:李俊生

出版审定:陈洪玲

普通高中课程标准实验教科书

生物学·生物技术实践(选修一)

教师教学用书

中国地图出版社出版

社址:北京市白纸坊西街3号 邮编:100054

地图教学网:www.ditu.cn

三河市紫恒印装有限公司印刷

新华书店发行

787×1097 16开本 5½印张

2005年12月第1版 2006年6月河北第2次印刷

ISBN 7-5031-4145-X/G·1555

定价:7.50元

目 录

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	15

第二章 食品加工与食品安全

第一节	发酵与食品加工	23
第二节	食品安全的评估	26

第三章 酶的制备及应用

第一节	酶的制备及活力测定	31
第二节	酶在食品加工中的应用	38
第三节	加酶洗衣粉的洗涤条件	42
第二节	酶的固定化	45

第四章 植物有效成分的提取

第一节	植物色素的提取	51
第二节	植物芳香油的提取	57

第五章 植物的组织培养技术

第一节	植物快速繁殖技术	61
第二节	植物种苗脱毒技术	65

第六章 蛋白质和 DNA 技术

第一节	蛋白质的提取和分离	71
第二节	DNA 片段的扩增——PCR 技术	77

第一章 微生物培养技术

☆ 课标解读

根据教育部制订的普通高中《生物课程标准》，本章的具体内容标准是：进行微生物的分离和培养，测定某种微生物的数量，研究培养基对微生物的选择作用。活动建议有：用大肠杆菌为材料进行平面培养，分离菌落；用土壤浸出液进行细菌培养，仅以尿素为氮源，测定能生长的细菌的数量；观察并分离土壤中能分解纤维素的微生物，观察该微生物能否分解其他物质，讨论这类微生物的应用价值。

微生物实验技术是生物学最基本的实验技能，是分子生物学、动植物育种学等学科的基础，目前已广泛应用于植物组织培养、动物细胞培养等领域，对学生来说，它是一项实用性很强的实验技能。在当代生命科学研究中，微生物实验技术和方法在遗传学、分子生物学、基因工程等许多领域中发挥着独特而重要的作用。《生物课程标准》所要求的这些，是研究微生物学的基本实验技能，具有很强的实践性，可为后面章节的学习与实践活动奠定基础。

进行微生物的分离和培养，属技能性目标中独立操作水平的要求。微生物的分离和培养涉及微生物实验操作中的灭菌和消毒、接种、培养等基本技术。《生物课程标准》要求学生在课程的起始阶段就能独立完成微生物实验的基本操作，这样高起点要求的目的是使学生掌握微生物实验的基本技能，并且能根据实验内容进行适当地调整和改进，为日后从事相关方面的研究奠定扎实的理论和技能基础。

测定某种微生物的数量，也属技能性目标中独立操作水平的要求。通过测定微生物的数量，使学生掌握“微生物计数”这项基本实验技术，同时引导、鼓励学生应用“微生物计数”的实验方法进行食品安全的微生物学检验和制作菌肥时的产品检验等实践活动，体现出 STS(科学、技术和社会)的教学新理念。

研究培养基对微生物的选择作用，是知识性目标中应用水平的要求。教科书通过探究活动的形式，让学生通过选择培养基完成所需微生物的分离，理解选择培养基的作用。

☆ 教材分析

本章内容是选修模块《生物技术实践》的第一部分，旨在使学生掌握微生物实验操作的基本技术，为后面的知识学习和技能训练奠定基础。

本章内容的安排遵从循序渐进的学习宗旨，根据普通高中《生物课程标准》的目标要求，将其中涉及的微生物实验技术划分为三个部分，按照学科体系 and 技术的难易程度，以三节的形式呈现学习内容。第一节“微生物的分离和纯培养”，重点讲微生物的接种、分离和纯培养技术，主要介绍了用平板划线法进行微生物的接种分离。第二节“培养基对微生物的选择作用”，讲培养基的配制，目的是使学生学会配制培养基，通过探究利用选择性培养基分离特定的微生物，掌握灭菌的方法和稀释涂布平板接种法。第三节“测定微生物的数量”，主要侧重于介绍微生物实验技术的应用，是在前两节所学的微生物实验技能的基础上，让学生测定特定样品中微生物的数量，掌握稀释混合平板接种法。教科书把普通高中《生物课程标准》中的“活动建议”

以探究活动的形式呈现出来,引导学生在现实生活中学习生物学,应用生物学的原理和方法参与公众事务的讨论或作出相关的个人决策,从而培养学生的科学探究能力。

在每一节内容中,都重点安排了学生需要掌握的一两项基本实验技术。例如,在第一节中,只要求学生掌握微生物接种和培养技术,在第二节中介绍了培养基的配制,而微生物的不同接种方法——划线法、稀释涂布平板法和稀释混合平板法则分别安排在3节当中,让学生依次掌握。这样的安排有利于将难点分散,而且教科书前后之间形成了较为完整的知识和技能体系,有利于学生较全面地掌握微生物实验的基本技术。

在本章学习中,允许学生只选学其中的部分内容,即以某一节的活动为核心,将培养基的配制,微生物的灭菌、消毒、接种、培养,微生物的计数等操作技能联系在一起,在一个探究活动中完成。

教科书的这种编排方式,使各节的知识和技能之间既紧密联系,又相对独立,从而有利于学生对实验内容的自主选择。

本章的教学,建议安排18课时,每节各用6课时。

第一节 微生物的分离和纯培养

一、教学目标

1. 概述微生物纯培养的基本技术及其原理。
2. 运用划线接种法,进行微生物的分离和纯培养。
3. 运用火焰灼烧法进行灭菌。
4. 通过菌落特征的观察,识别微生物。

二、教学重点和难点

重点:①微生物分离和纯培养的基础知识;②平板划线法接种技术;③火焰灼烧灭菌法。

难点:平板划线法接种技术。

三、教学策略

学生可能是初次接触微生物方面的实验,既不具备相应的基础知识,也缺乏相关的实验技术和操作技能,因此,教师可以先安排并指导学生自学微生物的范畴及种类和微生物实验技术所包括的内容。在此基础上,教师再对相关基础知识进行较为系统、细致地讲解,让学生了解微生物实验的基本方法及其操作程序,理解微生物实验的基本原理。然后,教师可以引导学生按照教科书中提供的“实践案例”完成实验。在教学过程中,教师可以分步进行微生物的接种、培养、观察等基本技术的规范性地演示,并对相关的技术原理和注意事项进行细致讲解。学生则跟随老师的示范和讲解进行模仿操作,学会微生物的接种、培养、观察等基本技术,了解微生物实验的基本操作程序和相关的注意事项。

在完成上述基础知识和基本技能的初步学习和训练后,教师可以安排学生模仿“实践案例”,尝试完成探究活动。在进行探究活动时,教师应根据本节的内容安排和学生的实际情况,给学生提供实验材料和已配制好的相关培养基。在活动过程中,要对学生进行现场技术指导,特别要指导学生反复进行平板划线接种、火焰灼烧灭菌等基本技术的练习。学生通过模仿操作和反复训练,应掌握微生物分离和纯培养的基本技术,达到独立操作的水平。

四、活动指南

1. 实践案例指导

(1) 实验工具

①无菌室。在微生物实验中,一般小规模接种操作,都是使用无菌接种箱或超净工作台;大规模的接种操作要在无菌室进行;灭菌要求非常严格时,需要在无菌室内的超净工作台中工作。

教师可以自制接种箱(图 1-1)。以木料和玻璃作为材料,做成一面倾斜(单人操作)或两面倾斜(双人操作)的密闭箱。接种箱还需要开两个直径为 5 cm 的通气孔,通气孔用两层纱布夹 1 cm 厚的普通棉花覆盖。接种箱的侧面开两个(双人操作两侧各开两个)手孔,并装上套袖。箱内可以装上紫外线灭菌灯,还要放置酒精灯、接种针等接种工具。每次使用前,箱内都要进行消毒处理。常用的消毒方法有紫外线照射、甲醛-高锰酸钾熏蒸、硫磺熏蒸等方法。

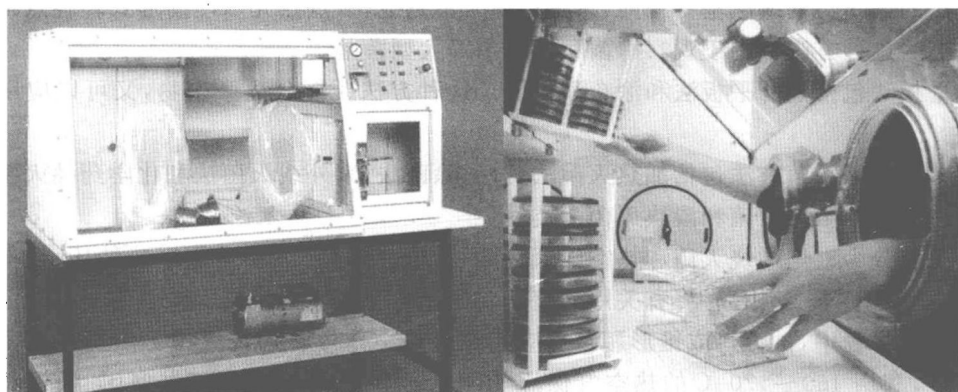


图 1-1 接种操作箱

②接种工具。接种环(inoculating loop)是最常用的接种工具,用于挑取菌苔或液体培养物。接种环前端要求圆而闭合;根据不同的用途,接种环前端可以改换成其他形式,如接种针(inoculating needle)等(图 1-2)。

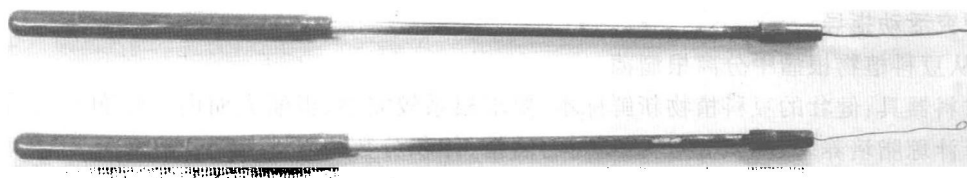


图 1-2 接种环和接种针

玻璃刮铲是稀释平板法进行菌种分离或微生物计数时常用的工具(图 1-3)。



图 1-3 玻璃刮铲

接种工具通常用火焰灭菌,为了快速操作,可将烧红的接种工具放入无菌水或体积分数为 70% 的酒精中冷却。冷却后,再将接种工具快速通过火焰,待酒精挥发后即可使用。

(2) 实验技术

① 接种方法。微生物的接种方法主要包括固体斜面接种、液体接种、穿刺接种和平板接种等。

实验室最常用的是平板接种方法。平板接种就是将菌种移植到平板培养基的过程。平板接种的具体操作方法包括:

划线法用于分离、观察或挑取单一菌落。

点种法的操作与划线法基本相同,只是接种时不划线,以点点儿(·)的形式轻轻点种在平板培养基上。这种方法常用于观察霉菌和酵母菌等大型菌落。

液体平板法包括混合平板法和涂布平板法。这种方法既能分离微生物,又可以应用于微生物计数。

② 灭菌方法。灭菌方法包括加热灭菌法、过滤除菌法、紫外线灭菌法和化学药品灭菌法。

加热法又分为干热灭菌和湿热灭菌两类。

干热灭菌分为火焰灼烧灭菌和热空气灭菌两种。火焰灼烧灭菌适用于接种环、接种针和金属用具(如镊子)等。灭菌时将有关用具直接在酒精灯火焰上进行灼烧,这种方法灭菌迅速彻底。在接种过程中,试管口或锥形瓶口也应该在火焰上作短暂灼烧灭菌。热空气灭菌是在电热烘箱中,利用 160~170 °C 的热空气保温 2 h 进行灭菌,适用于玻璃器皿(如吸管和培养皿)等仪器的灭菌。

湿热灭菌法分为高压蒸汽灭菌和常压蒸汽灭菌。其中高压蒸汽灭菌法是微生物学研究和教学中应用最广、效果最好的湿热灭菌方法。

过滤除菌法一般适用高温下不稳定的材料(如血清、糖溶液等)的灭菌。

紫外线灭菌法可用于无菌室、无菌接种箱中空气的灭菌。

化学药品灭菌法常用于实验室桌面、用具的灭菌。

2. 探究活动指导

(1) 从豆科植物根瘤中分离根瘤菌

① 材料器具:健壮的豆科植物新鲜标本(要求根系较完整、根瘤大而内部红润);结晶紫甘露醇酵母汁琼脂培养基、体积分数为 95% 的酒精、体积分数为 3% NaClO 溶液、结晶紫溶液、卢哥氏碘液、番红染色液;恒温培养箱、无菌平皿、小剪刀、酒精灯、接种环、眼科镊子、无菌水、洗瓶、废液瓶。

② 培养基及相关试剂的配制。

结晶紫甘露醇酵母汁琼脂培养基配方:甘露醇 10.0 g, K_2HPO_4 0.5 g, NaCl 0.1 g, $CaCO_3$ 3.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.20 g, 酵母汁 100 mL, 10g/L 结晶紫溶液 1 mL。以上物质溶解后定容至 1 000 mL, 此时溶液的 pH 值应该在 7.2 附近。

酵母汁制法:干酵母 100 g, 加蒸馏水 1 000 mL 煮沸 1 h 后, 121 °C 下灭菌 30 min。冷却后置冰箱中保存,待酵母完全沉淀,取上层清液即可。

结晶紫溶液制法: 结晶紫 1 g 研碎后,加少量体积分数为 95% 的酒精细研至完全溶解,加蒸馏水稀释成 100 mL,得到 10g/L 结晶紫溶液。使用时,每 1 000 mL 培养基中加入 1 mL 该结晶紫溶液即可。结晶紫溶液可以低温储存备用。

卢哥氏(Lugol)碘液: 将碘化钾 2.0 g 溶解在一定量的蒸馏水中,再将碘 1.0 g 溶解在碘化钾溶液中,然后定容至 300.0 mL 即可。

番红染色液: 番红 2.0 g,加蒸馏水定容至 100.0 mL。

③根瘤菌分离培养和观察:洗净根上泥土,剪根瘤 5~8 个(剪时带一点根,以免损伤根瘤)。将剪下的根瘤放入体积分数为 95% 酒精中浸泡 5 min,转入体积分数为 3% 的 NaClO 溶液中浸 5 min,换试管用无菌水浸洗 4 次(洗时要振摇,每次 5 min)。将镊子尖端灼烧灭菌,用其取出一个根瘤置于无菌平皿中,用力压破。然后,用接种工具在盛有甘露醇酵母汁琼脂的培养基上进行划线接种。划线后,将平板倒置,并用记号笔在平板底部标注菌种和日期。将平板倒置在 28 °C 的恒温箱中培养,时间根据根瘤菌的种类而定,如快生型的豌豆根瘤菌培养 4~5 d,慢生型的大豆根瘤菌培养 7~10 d。

选择典型的根瘤菌菌落(在培养基上形成荚膜或黏液层,菌落光滑、呈黏液状)进行涂片和革兰氏染色。革兰氏染色方法如下:

涂片 在洁净无脂的载玻片上,先用无菌接种环放入 1~2 环生理盐水,将接种环灼烧灭菌后从试管中沾取菌液一环,均匀涂在生理盐水上,形成薄而均匀、直径约 1 cm 的菌膜。涂菌后将接种环灼烧灭菌。

干燥 让涂片自然晾干,或在酒精灯火焰上方用文火烘干。

固定 手执涂片一端,菌膜面朝上,将载玻片来回通过酒精灯火焰 3 次,以载玻片背面不烫手为宜(目的是杀死细菌并使其黏附在载玻片,便于染料着色)。

初染 在涂片上滴加结晶紫溶液,染色 1 min 后,用水洗去剩余染料。

媒染 滴加卢哥氏碘液,媒染 1 min 后水洗。

脱色 将涂片倾斜,在白色背景下滴加体积分数为 95% 的酒精,直到流下的酒精刚为无色或稍呈淡紫色为止。脱色时间一般约为 20~30 s。

复染 用番红染色液复染 3~5 min,水洗。

镜检 将染好色的涂片用吸水纸吸干,用油镜镜检。

镜检后,若发现菌种不纯,可进一步分离纯化。

④菌种保存:将纯化的根瘤菌转接到适宜的培养基培养后,置于冰箱中保存,可供其他实验活动使用。

(2)从酒曲中分离酵母菌

①材料器具:酒曲;豆芽汁培养基;小刀、无菌平皿、9 mL 无菌水、1 mL 无菌吸管、恒温培养箱、试管、锥形瓶、酒精灯、容量瓶等。

②培养基配制:取黄豆芽 200.0 g,洗净后在水中煮沸 30 min,用纱布过滤,取豆芽汁滤液加蔗糖 30.0 g,定容至 1 000 mL,制成培养液。取 500 mL 培养液,添加琼脂,制成蔗糖豆芽汁琼脂培养基,分装于试管和锥形瓶中,灭菌。再取 500 mL 培养液加 2.5 mL 的乳酸制成酸性蔗糖豆芽汁培养液,分装于试管中,灭菌。

③酵母菌的培养:用已灭菌小刀切开曲块,挖出米粒大小一块,放入酸性蔗糖豆芽汁培养液中,摇动后,将该试管置于 25 °C 培养箱中培养,两天后转接到另一管酸性蔗糖豆芽汁培养液

中,如发现霉菌菌丝球可用接种环剔除。然后每隔两天转接一次,一周后将转接试管的培养液用划线法移植到蔗糖豆芽汁琼脂斜面培养基上,置于 25 ℃ 下培养。

五、参考答案

分析讨论

1. 根据实际情况回答是否成功。取得成功的关键是保证操作过程中的无菌化。

2. 菌种的保藏方法有:①传代培养保藏法;②液体石蜡覆盖保藏法;③载体保藏法;④寄主保藏法;⑤冷冻保藏法;⑥真空干燥保藏法等。

不需要保留的菌种则要经过灭菌处理后遗弃。

巩固提高

1. 将暴露在外的部分进行火焰灭菌,以避免空气中杂菌污染。

2. 防止杂菌落在平板培养基上,造成污染。同时,还可防止微生物代谢产生的 H_2O 留存于培养基表面,影响微生物的生长和菌落的形成。

六、资源摘英

1. 大肠杆菌(*Escherichia coli*)

大肠杆菌即大肠埃希氏菌,真细菌目肠杆菌科埃希氏菌属,是人和许多动物肠道中最主要的,也是数量最多的一种细菌。

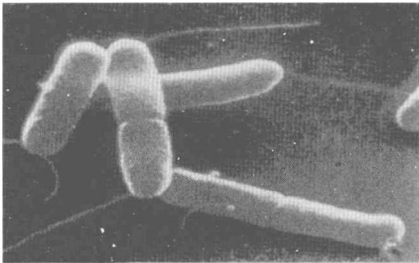


图 1-4 大肠杆菌

大肠杆菌(图 1-4)两端钝圆,周生鞭毛,能运动,无芽孢,革兰氏阴性。在普通培养基上的菌落为圆形,光滑,低平或微突起,边缘整齐,乳白色。最适生长温度为 37 ℃。在正常条件下,约 20 min 可繁殖一代。

大肠杆菌一般无致病性,在初生儿或初生动物哺乳后,大肠杆菌即进入肠道。大肠杆菌在肠道中能合成维生素 B 和维生素 K,对人体

有益。大肠杆菌容易培养,是常用的科学研究材料,在分子生物学和遗传学的研究中占有很重要的地位。

2. 固氮菌

目前农业生产中所用的重要微生物固氮菌大多属于两个相关的属,即根瘤菌属(*Rhizobium*)和慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*),它们都是革兰氏阴性细菌,有鞭毛,外形呈杆状,与豆科植物共生,不能形成芽孢。两属中的每一种细菌都与某几种豆科植物专一性地对应,即只与这几种植物建立共生关系,而不与其他种类的植物共生。如从豌豆根瘤内分离出的根瘤菌只能在豌豆、蚕豆等植物根部形成根瘤,而从大豆根瘤中分离出根瘤菌只能在大豆根部形成根瘤。

根瘤菌属的细菌是需氧细菌,生长的适宜 pH 值是 6.5~7.5,生长的最适温度是 25~30℃。在根瘤的形成过程中,根瘤菌的形态会逐渐发生改变,随着根瘤的生长,细菌的菌体一般会逐渐膨大成粗杆状,随后会有一段膨大为梨形、茄形或者发生分叉成为 Y 型、T 形等,这种状况下的细菌称为类菌体。

用根瘤菌制成根瘤菌剂给作物拌种,能使幼苗形成更多的根瘤,从而提高作物产量,增加

土壤肥力。

3. 酵母菌

酵母菌属真菌,细胞呈圆形、卵形或椭圆形。细胞内有分化完善的细胞核、细胞质,细胞质内有线粒体、内质网等。

酵母菌既可进行有氧呼吸,又可进行无氧呼吸。它的生殖方式包括无性生殖和有性生殖两种。无性生殖通常为出芽生殖,极少数为分裂生殖。有性生殖则形成子囊孢子。凡能够进行有性生殖产生子囊孢子的酵母菌称为真酵母,而未发现进行有性生殖的酵母菌称为假酵母。

酵母菌大多为腐生型,是重要的发酵真菌。工业上用来生产酒精、甘油、脂肪酸;利用酵母菌体可提取核黄素、细胞色素 C、核苷酸等贵重药物。酵母菌细胞内含有丰富的蛋白质和人体必需的氨基酸,有的菌体能生产大量的维生素。工业生产中常用的酵母菌有面包酵母、啤酒酵母等。大多数酵母菌形成的菌落与细菌菌落相似,但比细菌菌落大而厚,菌落表面湿润、黏稠,易被挑起,菌落多呈乳白色。

4. “微生物学之父”——巴斯德

路易斯·巴斯德(Louis Pasteur, 1822—1895, 图 1-5), 法国著名的微生物学家。他在同分异构现象、微生物发酵、细菌培养和疫苗等方面的研究中取得了重大成就,奠定了工业微生物学和医学微生物学的基础,并开创了微生物生理学,从而被后人誉为“微生物学之父”。巴斯德还把微生物发酵原理广泛应用于指导工业生产,开创了“微生物工程”,又被人们尊称为“微生物工程学之父”。



图 1-5 巴斯德

巴斯德的主要贡献之一是他彻底地否定了统治长久的微生物“自然发生”学说。该学说认为一切生物是自然发生的,可以从一些没有生命的材料中产生。当时人们对烧瓶中的有机物浸汁的腐败,究竟是自然发生的,还是空气中的微小生物造成的问题一直在争论。巴斯德设计了具有细长曲颈的玻璃瓶(现称巴斯德烧瓶),他把有机物浸汁装入瓶内煮沸灭菌后,瓶口虽然开放,瓶内的有机物却不腐败。因为空气虽能进入玻璃瓶,但其中所含的微小生物不能从弯曲的细管进入瓶内,而是附着在管壁上。一旦将瓶颈打破,或将瓶内的浸汁倾湿管壁后再倒回去,瓶内的有机物浸汁就会腐败变质。这个实验现象否定了自然发生说,表明腐败物质中的微生物来自空气,没有生命的物质中不能自然产生微生物。

巴斯德的另一重要贡献是对微生物发酵研究的成就。他所工作的法国里尔市盛产啤酒和葡萄酒,当时这些酒类的腐败问题干扰着生产的发展。巴斯德通过多年的研究证明了酒、醋的酿造过程是微生物引起的发酵,而不是发酵产生了微生物,并且不同的发酵是由不同种类微生物引起的。这个研究成果给当时的法国葡萄酒业在酿造过程中出现的酒变酸、变味等问题找到了原因,即酒变酸是有害微生物繁殖的结果。为了防止产品的腐败,巴斯德在研究各种物质发酵的同时,提出了一种可以消灭不需要的微生物的方法,这就是著名的巴氏灭菌法:先将需要灭菌的物质加热到 65°C (30 min) 或 72°C (15 min), 然后迅速冷却到 10°C 以下。这样既不破坏营养成分,又能杀死细菌的营养体。巴斯德发明的这种灭菌方法解决了酒质变酸的问题,拯救了法国的酿酒业。直到今天,巴氏灭菌在乳制品和酒制品等食品工业中仍在使用。

巴斯德还通过研究弄清了蚕病的原因,并提出了合理可行的防治措施,从而使法国的丝绸工业摆脱了困境。

巴斯德还研究了动物的炭疽病、鸡的霍乱病等，证明了传染病是由病原微生物引起的，并在世界上最早成功研制出炭疽病减毒活性疫苗。1881年，巴斯德组成研究小组研究狂犬病，经过几年艰苦攻关，制成了原始的巴斯德狂犬病疫苗。1885年7月6日，9岁法国小孩梅斯特被狂犬咬伤14处，医生诊断后宣布他生存无望。可是，巴斯德每天给他注射一支狂犬病疫苗。两周后，小孩转危为安。巴斯德成为世界上第一个挽救狂犬病病人生命的人。

巴斯德一生为微生物学、免疫学、医学等学科的发展做出了不朽的贡献。

5. 细菌学的奠基人——柯赫

罗伯特·柯赫(Robert Koch, 1843—1910)，德国细菌学家，细菌学的奠基人之一，曾任柏林大学卫生学和细菌学教授、传染病研究所所长。柯赫对传染病的病原菌学说有重要的贡献。他发明了使用固体培养基的“细菌纯培养法”，并用此法分离出了炭疽杆菌、结核杆菌和霍乱弧菌。他还建立了一整套研究微生物的技术方法，如分离、培养、接种、染色等，并对具体的技术方法进行了改进。

他提出了柯赫法则，确证了炭疽病、结核病和霍乱病等严重传染病的病原菌。柯赫法则的主要内容包括：①病原微生物总是在患传染病的动物中发现，而不存在于健康个体中；②这一微生物可以从寄主体内分离出来，并进行纯培养；③分离出的微生物回接到健康的寄主，可产生相同的疾病；④该微生物可以从患病的实验动物中重新分离出来，并能在实验室中再次培养，培养后的微生物应该与原始微生物相同。

实践证明，柯赫法则对大多数病原菌的确定是实用的。在以后的年代中，这个法则得到了某些修正和丰富。例如，植物病理学家在确定植物病原菌时，提出了用于人工接种的寄主必须不曾感染过这种病毒，这一法则也适用于其他生物。至今，柯赫法则仍然是行之有效的确定未知病原菌的常规方法。

第二节 培养基对微生物的选择作用

一、教学目标

1. 概述利用选择培养基分离微生物的原理。
2. 配制培养基。
3. 运用高压蒸汽灭菌法，完成培养基和各种器皿的灭菌。
4. 运用稀释涂布平板法进行接种。

二、教学重点和难点

重点：①配制培养基；②高压蒸汽灭菌；③稀释涂布平板接种法。

难点：①配制培养基；②稀释涂布平板接种。

三、教学策略

在上一节的学习中，学生对微生物的基础知识有了一些认识，并掌握了微生物实验的一些基本技能。因此，在本节的教学中，教师可以指定或提供有关的学习资料，要求学生自学有关培养基的知识和消毒灭菌的知识，掌握选择培养基的概念及配制方法，理解选择培养基的原理和高压蒸汽灭菌的原理。然后，指导学生选定探究的课题，并模仿“实践案例”设计的方案进行活动。

在完成探究活动方案时,应以配制选择培养基为核心内容。教师可以引导学生模仿“实践案例”的相关程序,通过配制选择培养基,掌握培养基配制的一般方法。在配制培养基的过程中,要用高压蒸汽灭菌的方法对所用器材和培养基进行灭菌。在学生活动过程中,教师需要对培养基的分装包扎、棉塞的制作、高压蒸汽灭菌的操作方法等技术环节进行指导,让学生反复练习,直至能独立操作。最后,指导学生应用稀释涂布平板法完成相关微生物的接种和分离。

在完成本节的教学后,可引导学生归纳、总结出微生物分离和纯培养的一般方法和程序。这样安排,有利于培养和提高学生的逻辑归纳能力、自学能力和动手操作能力。

四、活动指南

1. 实践案例指导

(1) 培养基的配制

配制培养基的程序为:原料称量→溶解→调节 pH→分装→塞棉塞和包扎→灭菌。

①原料称量和溶解:在铝锅、不锈钢锅或大型锥形瓶等容器内加入所需水量一半的蒸馏水,然后准确称取各种原料加入容器中,再用玻璃棒搅拌使之溶解。蛋白胨、牛肉膏等不易溶解的原料可先在小容器中加少许蒸馏水,加热溶解后再冲入容器内。有些原料用量很少,不易称量,可先配成高浓度的溶液,然后按比例换算成一定体积的溶液加入容器中。在所有原料经加热充分溶解后,补足所需的水分,就配成了液体培养基。配制固体培养基时,须预先将琼脂称好洗净(粉状可直接加入,条状需剪成小段),将液体培养基煮沸后,再把琼脂放入,继续加热至琼脂完全熔化,然后用热水补足因蒸发失去的水分。加热过程中,一要不断进行搅拌,以防琼脂沉淀在锅底而被烧焦;二要控制火力,避免加热时培养基溢出容器。

②调节 pH:液体培养基配好后,一般需调节至所需要的 pH 值(方法见教科书)。固体培养基 pH 的调节与液体培养基基本相同,一般在加入琼脂后进行,操作时需将培养基的温度保持在 80 ℃ 以上,以防因琼脂凝固而影响 pH 值的调节。

③培养基的分装:要根据不同的使用目的,将配好的培养基分装到各种不同类型、不同规格的试管、锥形瓶等容器中。分装培养基时,可用大漏斗进行小容量分装,用医用灌肠器进行大容量分装,而大批量定量分装则采用定量加液器或直接倒入。培养基的分装量需根据使用目的及实验的具体情况而定。在分装过程中要注意,不让培养基沾污试管口或瓶口,以免具有黏性的培养液污染棉塞,造成杂菌生长。

④塞棉塞和包扎:按试管口或瓶口的不同分别塞以大小相宜、松紧适度的棉塞(可用硅胶橡胶塞或聚丙烯塑料试管帽替代)。棉塞的做法如图 1-6 所示。棉塞的作用主要在于阻止外

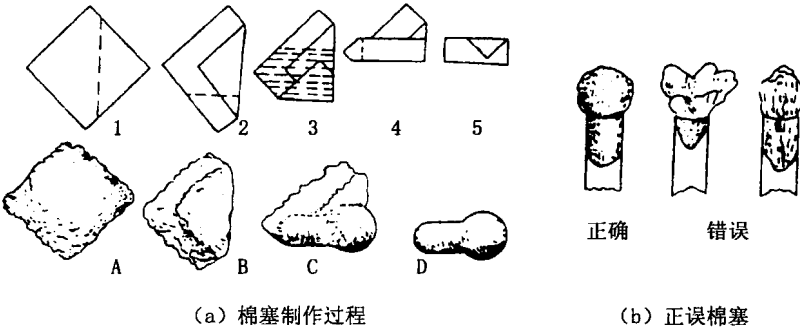


图 1-6 棉塞的做法

界微生物进入培养基,以防可能出现的污染。塞棉塞后,将装有培养基的容器(可将多支试管扎成捆)排放在铁丝筐中。由于棉塞外面容易附着灰尘及杂菌,且灭菌时容易凝结水气,因此,在灭菌前和存放过程中,应用牛皮纸或旧报纸将试管口、瓶口和试管筐包起来。

⑤灭菌:培养基制备及分装完毕后,应立即进行高压蒸汽灭菌,否则会因杂菌繁殖生长而导致培养基变质不能使用。若确实不能立即灭菌,可将培养基暂时放入 4℃ 的冰箱或冰柜中保存,但时间不宜过久。

(2) 稀释涂布平板法

①制备样品稀释液:准确称取待测样品,放入装有小玻璃珠和无菌水的锥形瓶中,振荡一定时间,配制成 10% 的稀释液。再用 1 mL 的无菌吸管吸取 10% 稀释液 1 mL,移入装有 9 mL 无菌水的试管中,吹吸 3 次,让菌液混合均匀,即配成 1% 的稀释液。以此类推,连续稀释,可制成 0.1%、0.01%、0.001%、0.0001% 的系列稀释液。每配制一种浓度的稀释液需要更换一次吸管。

②倒平板:右手持培养基锥形瓶,置于酒精灯火焰旁;左手拿培养皿并松动瓶塞,用手掌边缘和小指、无名指夹住拔出(如果培养基可一次用完,则瓶塞不必夹在手中);右手将锥形瓶口在火焰上灭菌;在火焰附近用左手将培养皿盖打开一条缝,迅速倒入 15 mL 左右的培养基,盖上盖再轻轻摇动培养皿,使培养基均匀分布;将培养皿平置于桌面上。

③涂布:待培养皿中的培养基冷却成凝胶后,用记号笔在培养皿底面标上不同的稀释度。然后,用不同的无菌吸管分别在相应编号的样品稀释液中吸取一定量的稀释液,对号放入不同稀释度编号的平板中。再用无菌玻璃刮铲(涂布器)将菌液涂抹均匀。每种稀释液可使用同一个无菌涂布器,每次涂布前都需将涂布器灼烧灭菌。

2. 探究活动指导

(1) 分离苏云金芽孢杆菌

①材料器具:患病死亡的菜青虫;分离苏云金杆菌的培养基;石炭酸复红染色液、体积分数为 75% 或 95% 的酒精、无菌生理盐水、无菌水;解剖针、解剖剪、丝线、小镊子、吸管、锥形瓶、无菌玻璃刮铲(或接种环)、载玻片、试管、恒温培养箱、摇床。

②培养基的配制:分离苏云金杆菌的培养基,配方见教科书附录二。

③苏云金杆菌的分离和培养:

虫尸消毒 先将病虫尸体浸入体积分数为 75% 的酒精中 3~5 min,用小镊子取出后转至无菌生理盐水中洗涤 3 遍,再浸泡在无菌生理盐水中。亦可直接浸入体积分数为 95% 的酒精中立即提起,火焰点燃数秒后转入无菌生理盐水中。以上方法均可达到表面消毒的目的。

制备虫尸体液 用丝线结扎死虫的口腔和肛门,用无菌解剖剪从虫体背面或腹面进行纵向解剖,用接种环取出死虫肠道黏液,放入盛有玻璃珠和 10 mL 无菌水的锥形瓶中,充分振荡 10 min,即为虫尸体液(用虫尸体液作涂片观察,可以看到大量的病原体)。将虫尸体液置于 BPA 培养基中,充分振荡后,置于摇床中恒温(35℃)振荡培养 42 h,取出后置于 75~80℃ 水中热处理 10~15 min。

菌液稀释分离 用 1/10 稀释法将虫尸体液稀释为系列稀释液,在无菌平板中倒入熔化的 BP 培养基,分别从 0.01%、0.001% 和 0.0001% 的稀释液中各取 0.1 mL 放在相应编号的平板上,每一浓度的虫体液各取放三次。用无菌玻璃刮铲将稀释液涂布均匀,倒置于培养箱中在 30℃ 下培养 24 h。

培养和观察 在牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上,30℃培养24 h后,苏云金杆菌的平板菌落形成大头针大小的乳白色或淡黄色小点,有平滑边缘或不平滑边缘,72 h后圆盘状菌落的直径约为1 cm,边缘整齐或不整齐。菌落特征因培养基不同亦有所区别,在斜面培养基上,苏云金杆菌形成的菌苔形态为乳白色,光滑或有皱,可能产生可溶性的色素。

在平板上分别培养24 h、48 h、72 h后,挑取菌落制作装片。用石炭酸复红染色液染色1~2 min,镜检。记录菌体、芽孢、伴孢晶体的形态。观察记录培养72 h后单个菌落的特征,并与培养24 h、48 h的菌落特征进行比较。

挑选3~5个类似苏云金芽孢杆菌的菌落接种到BP斜面上,30℃培养72 h以上。常规制片,石炭酸复红染色液染色,镜检。有伴孢晶体的分离物即可确定为苏云金芽孢杆菌。可将此菌种转到另一支BP斜面,培养后保存。

④苏云金芽孢杆菌菌体与晶体的染色与观察:

按常规方法将苏云金芽孢杆菌制成涂片,让其自然干燥。然后于涂片中央滴加一小滴MBB染色液(其中含有 HgCl_2 ,操作时要戴上手套,格外小心)。染色液向四周扩散,须臾干燥并有白色晶体析出。5~6 min后用蒸馏水轻轻洗去多余的染色液,再滴加复染液(番红)染色约30 s,水洗。干后用油镜镜检。

细菌的晶体呈深天蓝色,芽孢无色,细菌细胞呈复染的浅红色。

(2)分离纤维素分解细菌

有些细菌可以分泌纤维素酶,使纤维素水解。在基础培养基中只添加纤维素作为唯一的有机碳源,接种后观察细菌能否生长或其他变化特征,便可以判断该细菌能否在以此为唯一碳源的培养基上生长。测定细菌对纤维素的水解常利用纤维滤纸,通过液体培养基培养或固体培养基培养进行鉴定。在液体培养基中的滤纸条被分解后,发生断裂或失去原有的物理性状;在固体培养基上,滤纸被降解后可以形成水解斑,可以以此判断细菌能否分解纤维素。

纤维素分解菌的分离和检测:

①试管测试法 将培养基分装试管,在培养基中浸泡一条优质滤纸,如新华一号滤纸。纸条宽度以易放入试管为宜,纸条长度约5~7 cm。培养好氧菌时,应有部分滤纸露于培养基液面外;培养厌氧菌时,纸条应全部浸泡在培养基中。实验时,还应该准备不接种的试管作为对照。适温培养1~4周后观察,能将滤纸条分解为一团纤维或将滤纸条折断(或变薄)者为阳性,滤纸条无变化者为阴性。

②平皿测试法 在培养基中加0.8%的纤维素粉和1.5%的琼脂。在平皿(直径9 cm)中先加15 mL的液体琼脂,凝固后加5 mL混有纤维素粉的琼脂培养基,凝固后进行接种。同时,在不含纤维素的培养基上接种,作为对照组。适温培养1~4周后观察,菌落周围有较澄清的晕环者为阳性,无晕环者为阴性。

五、参考答案

分析讨论

1. 需要对照实验。分离分解纤维素的细菌时,可设计空白对照(不接种或在不含纤维素的培养基上接种)。

2. 提示:分离得到的苏云金芽孢杆菌进一步培养所用的培养基分别为:斜面菌种(用固体培养基)→种子扩大培养(用液体种子培养基)→发酵(用液体发酵培养基)。

巩固提高

1. 利用微生物对某种或某些化学物质的敏感性不同的特性,在培养基中加入这类物质,抑制不需要的微生物生长,而促进所需分离的微生物生长,从而达到分离某种微生物的目的。

2. 火焰灼烧灭菌适用于接种环、接种针和金属用具(如镊子)等,而高压蒸汽灭菌法适用于培养基、工作服、橡皮物品等。

六、资源精英

1. 培养基

(1)培养基的成分

培养基是用人工的方法将多种营养物质按微生物生长代谢的需要配制成的一种营养物质,用以培养、分离、鉴定、保存各种微生物或其代谢产物。由于微生物种类繁多,对营养物质的要求各异,加上实验和研究的目的不同,所以培养基在组成成分上也各有差异。但是,不同组成的培养基中均应含有满足微生物生长发育且比例合适的水、碳源、氮源、无机盐、生长因子及某些必需的微量元素。其中碳是组成微生物细胞的主要元素,有些碳源还是异养微生物的主要能源物质。在实验室中,制备培养基最常用的碳源为葡萄糖,其他糖类如蔗糖、麦芽糖、甘露醇、淀粉、纤维素,以及脂肪、有机酸、醇类、烃等都可以作为培养微生物时的碳源。米粉、玉米粉、麦麸和米糠等原料是微生物固体发酵的常用碳源。氮是构成所有微生物细胞的基本物质,从 N_2 、无机氮化物到复杂的有机含氮化合物均能不同程度地为微生物所利用。无机氮中的铵盐、硝酸盐,有机氮中的蛋白胨、牛肉膏或牛肉浸汁、多肽、各种氨基酸,以及豆芽汁、酵母膏等都是常用的氮源。生长因子是一类需要量很少但却能促进微生物生长的有机化合物的统称。微生物生长所需的生长因子大部分是维生素类物质,常见的主要是硫胺素、核黄素、烟酰胺、泛酸和叶酸等。

(2)培养基的种类

按照配制培养基的营养物质来源,可分为天然培养基、合成培养基和半合成培养基三类。天然培养基中主要营养物质来源于一些动植物或微生物产品或其提取物,如马铃薯、玉米、豆芽、麦芽、牛肉、血清等。这些复杂天然物的成分人们还无法确切知道,所以配制培养基时的用量也不恒定。但此类培养基营养丰富、取材方便、配制简单,是实验室常用的培养基。合成培养基主要营养物质来源于化学成分明确的多种高纯化学试剂,如葡萄糖、蔗糖、淀粉等。此类培养基成分精确,但配制麻烦,一般用于微生物的营养代谢、分类鉴定、菌种筛选等要求较高的实验。半合成培养基中既含有天然物质又含有化学成分,如培养真菌的马铃薯蔗糖培养基,是应用最广的培养基。

按照培养基外观的物理状态可分为液体培养基、固体培养基和半固体培养基。液体培养基指配制时没有加入任何凝固剂(如琼脂、琼脂糖、明胶和硅胶),配好后呈液体状态的培养基。液体培养基在微生物学实验和生产中应用非常广泛,常用于微生物的培养、生理代谢的研究和工业发酵等。固体培养基指在液体培养基中加入凝固剂,外观呈固体状态的培养基。固体培养基用途广泛,可用于微生物的分离、鉴定、纯化、培养、菌种计数和菌种保藏等。半固体培养基指在液体培养基中加入少量凝固剂的培养基,这样处理后,在倒置时培养基不致流出。此类培养基常用于细菌运动性的观察、噬菌体的效价、微生物趋化性研究、各种厌氧菌的培养及菌种保藏等。

按照培养基的功能和用途,培养基可分为基础培养基、加富培养基、选择培养基、鉴别培养