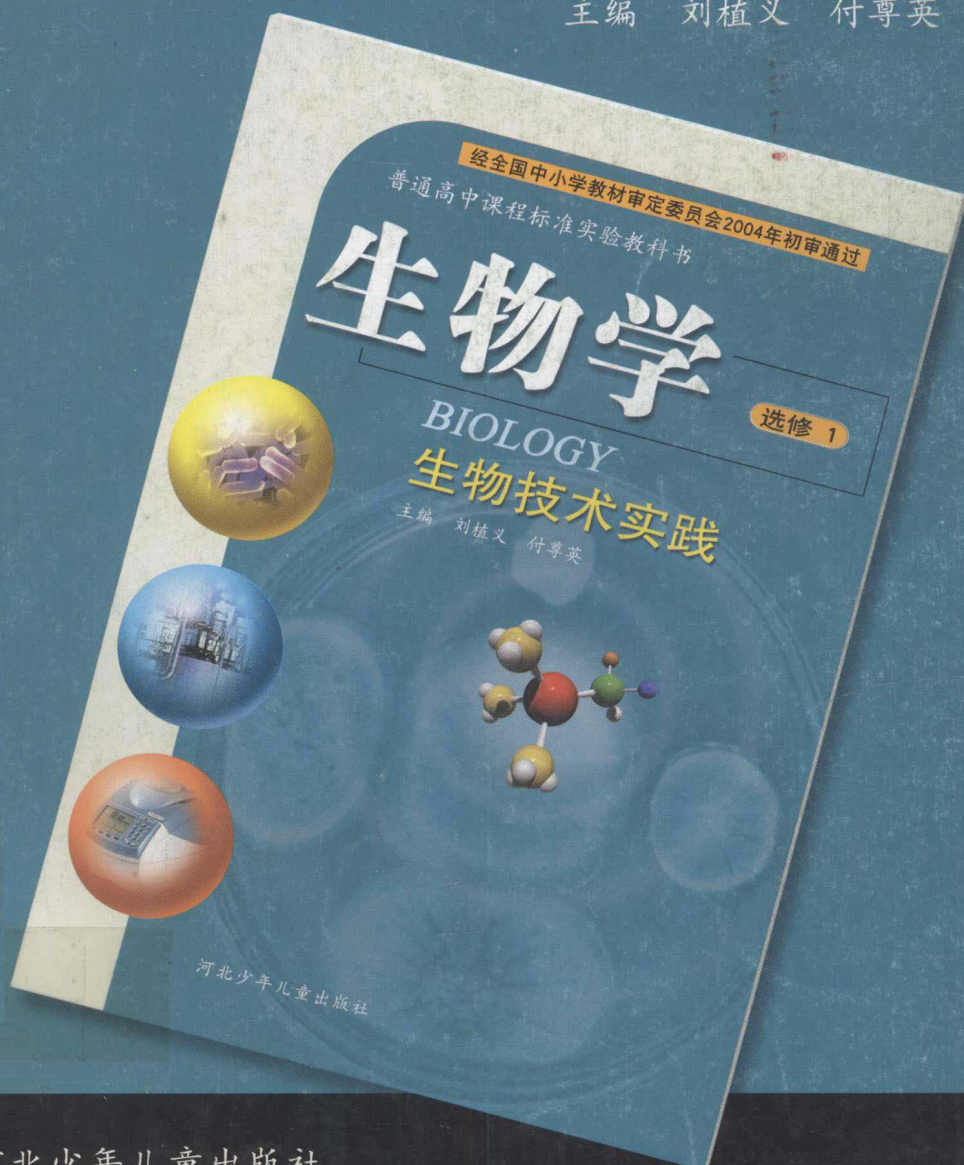


普通高中课程标准实验教科书

生物学 生物技术实践 教师教学用书

主编 刘植义 付尊英



河北少年儿童出版社

普通高中课程标准实验教科书

生物学 生物技术实践

教师教学用书

主 编 刘植义 付尊英
副主编 李红敏 潘紫千

河北少年儿童出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物技术实践教师教学用书/刘植义,付尊英主编;
李红敏等编. —石家庄:河北少年儿童出版社,
2006. 12

ISBN 7-5376-2922-6

I. 生… II. ①刘…②付…③李… III. 生物课-高中-教学参考资料 IV. G633.913

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 138449 号

主 编 刘植义 付尊英
副主编 李红敏 潘紫千
编 者 (按姓氏笔画为序)
边艳青 石振华 赵宝华 葛荣朝

书 名	生物学 生物技术实践 教师教学用书
主 编	刘植义 付尊英
副 主 编	李红敏 潘紫千
策 划	赵 杰
责任编辑	翁永良 王亚琴
美术编辑	杨晨光
责任校对	张 昕
封面设计	李 欣
出版发行	河北少年儿童出版社(石家庄市工农路 359 号)
印 刷	河北新华印刷一厂
开 本	787×1092 毫米 1/16
印 张	6.5
版 次	2006 年 12 月第 1 版 2006 年 12 月第 1 次印刷
书 号	ISBN 7-5376-2922-6/G·2081
定 价	12.00 元

版权所有 翻印必究

目 录

第1章 微生物技术	(1)
第1节 培养基对微生物的选择作用	(3)
第2节 微生物的纯培养	(12)
第3节 微生物数量的测定	(16)
第4节 微生物的利用	(21)
第2章 酶技术	(25)
第1节 果胶酶的制作方法及其作用	(27)
第2节 酶活力的测定	(32)
第3节 酶在食品制作和洗涤方面的应用	(35)
第4节 固定化酶的制备和应用	(38)
第3章 食品加工技术	(43)
第1节 发酵食品加工	(45)
第2节 天然食品添加剂的制备	(55)
第3节 食品加工过程中产生的有害物质的测定	(60)
第4章 现代生物技术	(69)
第1节 植物的组织培养	(72)
第2节 蛋白质的提取和分离	(85)
第3节 聚合酶链式反应技术	(91)

第1章 微生物技术

教学目标

知识性目标

1. 说出制备培养基的原理。
2. 分析培养基对微生物的选择作用。
3. 简述进行微生物分离和培养的一般步骤。
4. 设计一个生产或科研中分离优良菌株的实验流程。
5. 概述测定某种微生物数量的方法和步骤。
6. 总结微生物的利用价值并进行交流和讨论。
7. 收集利用微生物进行发酵生产特定产品的实例。

技能性目标

1. 尝试培养基对环境中微生物的选择作用。
2. 使用大肠杆菌为材料进行平板培养，分离菌落。
3. 运用仅以尿素为氮源的培养基从土壤中分离能生长的细菌并测定其数量。
4. 尝试分解纤维素的微生物能否分解其他物质。

情感性目标

1. 探讨微生物技术与人类生产生活的关系。
2. 关注微生物技术的发展对国民经济的影响。
3. 养成良好的无菌意识，防止微生物对环境的污染。

教材分析

微生物技术是现代生物技术的基础，与人类的生产、生活和国民经济的发展密切相关。学习微生物技术，有助于后续技术的学习和利用该技术生产特定的发酵产品。本章主要介绍了四方面的内容：一、培养基对微生物的选择作用；二、微生物的纯培养；三、微生物数量的测定；四、微生物的利用。本章内容知识性和技能性目标都是比较基础的，难度不是特别大，一般中学生都可以做到。本章的重点内容为：培养基的制备和灭菌技术、微生物的纯培养技术和微生物数量的测定。微生物的利用则为本章的难点内容。通过本章的学习，旨在使学生了解制备培养基的原理，学会配制培养基的一般方法和步骤，分析培养基对微生物的选择作用，掌握进行微生物分离和培养的一般步骤，学会测定某种微生物数量的方法，了解微生物的利用价值，使学生获得微生物技术与人类

生产生活的关系的知识,关注微生物技术的发展对国民经济的影响,培养学生养成良好的无菌意识,防止微生物对环境的污染,增强环保意识。

关于培养基对微生物的选择作用,主要讲述了培养基的配制、灭菌、接种、培养等基本环节。培养基是用人工的办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培养基。配制培养基时不仅要考虑满足不同微生物的营养成分需求,还要考虑适宜的pH、缓冲能力及渗透压等。在微生物实验、生产和科学研究工作中,需要对所有器材、培养基进行严格灭菌,不能有任何的外来杂菌。高压蒸汽灭菌是微生物研究和教学中应用最广泛、效果最好的灭菌方法。接种必须在一个无杂菌污染的环境中进行严格的无菌操作。接种前要准备无菌室、接种工具。接种时接种工具要严格灭菌。培养一般在恒温箱中进行。为了让学生积极参与探讨培养基对微生物的选择作用,教材在编写时首先让学生学习培养基制备的方法和步骤,然后让学生探究不同培养基中生长的优势菌群,让学生自己作出假设、设计实验、实施实验,通过实验得出结论并进行交流和讨论,培养学生求实创新及勇于实践的科学精神和科学态度。

微生物的纯培养技术是微生物学实验中最基本的技术之一,教材在学生掌握培养基对微生物选择作用的基础上,主要介绍了微生物纯培养的原理和基本操作步骤。在自然界的天然环境中,微生物常常互相混杂在一起生活。一小块泥土、一滴污水中可以找到成千上万种微生物。这就给微生物的研究和应用带来了很大的困难。19世纪后期,德国著名的细菌学家科赫发明了固体培养基,尤其是用琼脂作凝固剂的固体培养基,成功地解决了这个问题。经常采用的微生物纯种分离方法有两种,一是平板划线分离法:将已经熔化的培养基倒入培养皿制成平板,用接种环蘸取少量的待分离的材料,在培养基表面平行或分区划线,然后将培养皿放入恒温箱里培养。在线的开始部分,微生物往往连在一起生长,随着线的延伸,菌数逐渐减少,最后可能形成纯种的单个菌落;二是涂布分离法:将待分离的样品经过大量稀释后,取稀释液均匀地涂布在培养皿表面,培养后可得到单个菌落。

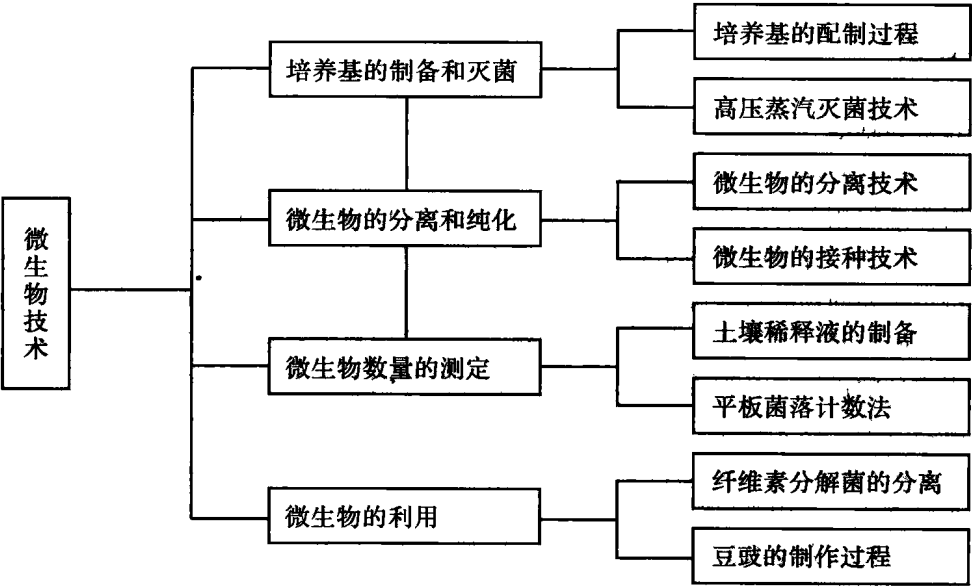
微生物数量测定一般是采用平板菌落计数法,教材主要介绍了平板菌落计数法的原理和步骤。平板菌落计数法是一种应用广泛的微生物生长繁殖的测定方法,此法是根据微生物在高度稀释条件下,固体培养基上所形成的单个菌落,是由一个单细胞繁殖而成,这一培养特征设计的计数方法,即一个菌落代表一个单细胞。计数时,首先将待测样品制成均匀的系列稀释液,尽量使样品中的微生物细胞分散开,使呈单个细胞存在,再取一定稀释度、一定量的稀释液接种到平板上,使其均匀分布在平板中的培养基内,经培养后,统计菌落数目,即可计算出样品中的含菌数。因为所计算的菌数是培养基上长出的菌落数,故又称活菌计数法。

在微生物的利用中,主要介绍了从土壤中分离纤维素分解菌的原理和步骤以及利用微生物发酵生产特定产品的过程。微生物是自然界中的强大的分解者,微生物可以产生多种酶类,如纤维素酶、果胶酶、淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶等分解自然界中的物质,并通过发酵可以产生对人类有益的产品。为了让学生积极参与探讨纤维素分解菌能否分解其他物质,教材在编写时首先让学生学习分离纤维素分解菌的方法和步骤,然后让学生探究纤维素分解菌是否只能分解纤维素,让学生自己提出问题、作出假设、设计实验、

实施实验，通过实验得出结论并进行交流和讨论，培养学生提出质疑、求实创新及勇于实践的科学精神和科学态度。最后介绍了发酵食品豆豉的制作过程，让学生了解微生物与人类的密切关系。

本章教学建议安排 10 课时，其中培养基对微生物的选择作用 3 课时，微生物的纯培养 2 课时，微生物数量的测定 2 课时，微生物的利用 3 课时。可以根据学校的实际情况，在每天都做实验，灵活安排。

知识网络



第 1 节 培养基对微生物的选择作用

课前准备

1. 关于“培养基的配制和灭菌”的准备

学生准备：

请学生利用课余时间，预习教材和参照相关微生物学实验指导参考书，写出简单的实验流程。

教师准备：

(1) 本次微生物学实验教案；(2) 实验用的材料用具：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, 酸度计或精密 pH 试纸 (pH5.5 ~ 9.0), 天平, 称量纸, 药匙, 纱布, 棉花, 玻璃棒, 铁架台, 漏斗, 牛皮纸, 记号笔, 线绳, 高压蒸汽灭菌锅, 酒精灯, 恒温箱和电炉等。

2. 培养基对微生物的选择作用

学生准备:

利用课后时间, 请学生预习教材, 分组写出具体的实验流程。

教师准备:

(1) 本次微生物学实验教案; (2) 实验用的材料用具: 牛肉膏蛋白胨琼脂平板, 马铃薯葡萄糖琼脂平板, 微生物接种用的工具等; (3) 学生讨论的流程。

教学建议

●培养基的制备

本实验最好和下一个实验一起连续做 3h。教师应安排学生预习实验, 使学生首先具备培养基的相关背景知识。在教学中教师的主要任务是给学生提供实验的条件, 指导学生进行实验。开始微生物实验前, 教师应组织学生学习微生物实验的守则。实验前, 请勿将不必要的物品带入微生物实验室。实验进行时, 请尽量避免在实验室内走动, 以免染菌。同时勿高声谈话, 保持室内安静。在实验中教师务必要求学生注意安全, 如接种时用酒精消毒后, 必须等酒精完全挥发后才能开始靠近酒精灯操作。接种时手和衣袖不要碰到火焰, 以免烧伤。高压蒸汽灭菌时, 不要离开, 注意压力和时间, 如出现意外, 应立即报告老师, 及时处理, 切勿隐瞒。实验结束后, 应将仪器放回原处, 擦净桌面, 收拾整齐, 并用肥皂洗手。

教师应重点介绍配制培养基的流程: 原料称量→溶解→(加琼脂溶化)→调节 pH→分装→塞棉塞和包扎→灭菌。并分别介绍 3 种培养基的具体制备过程。

1. 牛肉膏蛋白胨固体培养基的配制过程如下: 以配制 1 000mL 为例, 在容器中加入 900mL 水, 称取蛋白胨 10g, NaCl 5g, 放入已装有水的容器中, 取牛肉膏 3g 连同称量纸一并放入容器中, 边加热边用玻璃棒搅拌使牛肉膏和蛋白胨溶解, 将称量纸取出, 加入琼脂(粉状琼脂可直接加入, 条状琼脂用剪刀剪成小段, 以便溶化) 20g, 继续加热至琼脂完全溶化。在加热过程中应注意不断搅拌, 以防琼脂沉淀在锅底烧焦, 并应控制火力, 以免培养基因爆沸而溢出容器。待琼脂完全溶化后, 再用热水补足因蒸发而损失的水分。调节培养基酸碱度最简单的方法是用精密 pH 试纸进行测定, 用玻璃棒蘸少许培养基, 点在试纸上进行对比, 用滴管逐滴滴入 1mol/L 的 NaOH 调 pH 至 7.4 ~ 7.6 (注意不要调过, 如果调过了加入适量稀 HCl 中和), 固体培养基酸碱度的调节, 应注意将培养基温度保持在 80℃ 以上, 以防因琼脂凝固影响调节操作。最后加水定容至 1 000mL。

2. 简易制备培养细菌的固体培养基: 取已去筋膜和脂肪的新鲜瘦牛肉 300g, 用绞肉机充分绞碎后, 加入 900mL 蒸馏水, 于冰箱中 0℃ ~ 4℃ 浸泡过夜, 而后煮沸 30min,

用4层纱布过滤，在滤液中加入NaCl 5g，搅拌溶解后，加入琼脂20g，加热熔化后用1mol/L的NaOH调pH至7.4~7.6，最后加蒸馏水定容至1 000mL。

3. 马铃薯葡萄糖培养基（PDA）的配制：将马铃薯去皮，取200g切成小块，于锅中加水1 000mL煮沸30min，用双层纱布过滤，取其滤液加糖（蔗糖或葡萄糖）20g，用玻璃棒搅拌使糖溶解，并加水补足1 000mL。制备固体培养基时，用500mL或300mL锥形瓶分别装入200mL或100mL液体培养基，加入4g或2g（质量体积分数为20%）琼脂，高压蒸汽灭菌即可。

培养基配好后，教师应演示培养基的分装过程，在演示前教师需介绍培养基分装原则和要求以及注意事项。培养基分装时，要根据不同的使用目的，分装到各种不同的容器中。不同用途的培养基，其分装量应视具体情况而定，要做到适量、实用。分装量过多、过少或使用容器不当，都会影响随后的工作。培养基是多种营养物质的混合液，大都具有黏性，在分装过程中，应注意不使培养基沾污管口或瓶口，以免污染棉塞造成杂菌生长。分装培养基时，不同的容器装量不一样。（1）分装锥形瓶：其装量以不超过锥形瓶总容量的3/5为宜，一般250mL锥形瓶装150mL培养基。若装量过多，灭菌时培养基易沾污棉塞而导致染菌。（2）分装试管：通常采用大漏斗人工分装，将液体培养基或熔化的固体培养基加至漏斗上（装置见教材图1-2）。液体培养基分装时分装量以试管高度的1/4左右为宜；分装制作斜面的固体培养基时，其装量不超过试管高度的1/5（如15×150mm的试管装量约为3~4mL）；分装半固体培养基时，培养基装量一般以试管高度的1/3为宜，灭菌后垂直待凝。具体操作时，左手并排地拿数根试管，右手控制弹簧夹开关，将玻璃管插入试管内。不要触及管壁，松开弹簧夹，注入一定量培养基，然后加紧弹簧夹，止住液体，再抽出试管，仍不要触及管壁或管口。

培养基分装完毕后，教师马上演示塞棉塞和包扎，培养基分装到各种规格的容器（试管、锥形瓶、克氏瓶等）后，应按管口或瓶口的不同大小分别塞以大小适度、松紧适合的棉塞。加棉塞时，应使棉塞总长的3/5塞入试管口或瓶口内，以防止棉塞脱落。若锥形瓶口较大而棉花纤维又短，则可在制好的棉塞外包一层纱布，这样的棉塞既耐用又便于操作。某些微生物需要更良好的通气，则可用8层纱布制成通气塞。此外，现配现用的培养基和试管无菌水，还可使用硅胶橡胶塞或聚丙烯塑料试管帽。棉塞的作用主要在于阻止外界微生物进入培养基内，防止可能导致的污染。同时还可保证良好的通气性能，使微生物能不断地获得无菌空气。塞棉塞后，试管培养基可若干支扎成一捆，也可排放在铁丝筐内。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管口、瓶口或试管筐包起来。

注意事项：培养基如果较长时间搁置不用或存贮不当，往往会因污染、脱水或光照等因素而变质。所以培养基一次不宜配制过多，最好是现配现用。因工作需要或一时用不掉的培养基应放在低温、干燥、避光而洁净的地方保存。

如没有现成的棉塞，教师可带领学生制作棉塞，讲清楚其用途和制备技术，如试管棉塞的制作：按试管口径大小，取适量市售棉花（不宜用脱脂棉，因为脱脂棉易吸水）铺成近方形，中间稍厚，边缘稍薄。然后将近方形棉花的一角往里折（此处棉花较厚，将制成棉塞的“头”）略成三角形。再用拇指和食指将三角形的一角卷起，边卷边压紧

(越近中心越卷紧,以发挥“主心骨”作用),最后,让边缘的棉絮起缚线的功能,勿使棉卷松开。将棉花卷成筒状的过程中要不断地将絮状纤维往里卷,呈外形光洁如未开伞的蘑菇。棉塞的直径和长度依试管或锥形瓶大小而定,要松紧合适,紧贴管壁,不留缝隙;棉塞塞入试管后,再拔出时应不松散、不变形,这样的棉塞才算合格。

教师在上述工作完毕以后,让学生将待灭菌的物品放入灭菌锅中,参照实物,介绍灭菌的原理和方法。灭菌是指采用强烈的理化因素使任何物体内外所有的微生物永远丧失生长繁殖能力的措施。消毒则是用较温和的物理或化学的方法杀死物体上绝大多数微生物,实际上就是部分灭菌。在微生物实验、生产和科学研究工作中,需要进行微生物纯培养,不能有任何的外来杂菌。因此对所有器材、培养基都要进行严格灭菌,对工作场所进行消毒,以保证工作顺利进行。无菌技术有两个重要的目的,一是防止实验室的培养物被外来微生物污染,二是防止实验室的工作人员被微生物污染。要把所有微生物培养物都当成含有潜在危害的有害微生物来对待。无菌技术是安全措施的一个重要组成部分,所有实验室器具的表面都有污染的微生物,除非已用某种灭菌的方式除去。只要这些灭过菌的器具不与有菌环境接触,就可保持无菌状态。实验室最常用的灭菌方法,是利用高温处理达到灭菌效果。高温灭菌分为干热灭菌和湿热灭菌两大类,湿热灭菌比干热灭菌效果好,湿热条件下热量易于传递,更容易破坏保持蛋白质稳定性的氢键结构,从而加速其变性。高压蒸汽灭菌是微生物学研究和教学中应用最广泛、效果最好的湿热灭菌方法,教师应重点介绍高压蒸汽灭菌的方法。

高压蒸汽灭菌法:

(1) 使用高压蒸汽灭菌锅:这种灭菌方法是基于水在沸腾时所形成的蒸汽不能溢出,而增加了密封容器的压力,从而使沸点升高,待高于 100°C 后,最终使菌体蛋白质凝固变性,高压蒸汽是最有效的灭菌法,能迅速地完全彻底灭菌。

打开高压蒸汽灭菌锅盖,向锅内加水。放入待灭菌物品,不要放得太密,锅中应留有 $1/3$ 的空间,以免影响蒸汽流通和灭菌效果,物品也不要紧靠锅壁,以免冷凝水流入。加盖旋紧螺旋。加热使锅内水沸腾产生蒸汽排尽锅内冷空气后,关闭排气阀继续加热使压力升高。一般以 0.1MPa , 121°C ,灭菌 20min ;含糖培养基应控制在 0.053MPa , 100°C ,灭菌 30min ,然后停止加热。待压力降至 0 时,开盖,取出灭菌物品。抽取少数培养基置 28°C 恒温箱 24h ,若无菌生长可保存备用。

(2) 家用高压锅:由于锅上缺乏压力表等装置,无法准确掌握灭菌时间,用时应先进行灭菌时间的试验。方法是需将需要灭菌的物品放入锅内,加热出气后,盖好阀,继续加热 $30\sim 40\text{min}$,冷却后取出,将其中的培养基放置一天,观察是否有杂菌生长。如有,则再延长加热时间,直至不再出现杂菌污染为止。

(3) 普通铝锅间歇灭菌:各种微生物的营养体在 100°C 下, 30min 即可被杀死,而其芽孢和孢子在这种条件下却不会失去生活力。间歇灭菌的方法是用 100°C 、 30min 杀死培养基内杂菌的营养体,然后将这种含有芽孢和孢子的培养基在温箱内或室温下放置 24h ,使芽孢和孢子萌发成营养体。这时再以 100°C 处理 30min ,再放置 24h 。如此连续 3 次,即可达到完全灭菌的目的。

灭菌完毕后教师演示倒平板和摆斜面的方法,倒平板通常采用两种方法:(1)持

皿法：将培养基冷却至 $45^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$ （低于 45°C 易凝固），左手拿已灭菌的培养皿，右手拿锥形瓶底部，用左手小指和手掌将锥形瓶口的棉塞拔下，并握在手中，灼烧瓶口灭菌，在酒精灯火焰旁将培养皿打开少许，使瓶口正好伸入，倾入培养基约 15mL，轻轻摇匀，平置、凝固即成。（2）叠皿法：此法步骤与持皿法基本相同。不同点是左手不必持培养皿，而是将培养皿放在酒精灯的左侧并靠近火焰，用右手拿住锥形瓶的底部，左手的掌背对着瓶口，用小指与无名指夹住瓶塞，将其拔出，随即使瓶口过火，同时用左手开启最上面的皿盖，倒入培养基，盖上皿盖，而后即移至水平位置待凝，再依次倒下面的平板。在操作过程中，瓶口应向着火焰保持斜状，以防空气中微生物污染。

摆斜面：灭菌后，如需制成斜面培养基，应待培养基冷却至 $50^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ （以防止斜面上冷凝水太多）后，将试管口一端搁在玻璃棒或其他高度适中的木棒上，调整搁置的斜度，使斜面的长度不超过试管总长的一半。注意摆放时不可使培养基沾污棉塞，冷凝过程中勿再移动试管。待斜面完全凝固后，再进行收存。试管斜面培养基，因灭菌时棉塞受潮，容易引起棉塞和培养基污染。因此，新配制的琼脂斜面最好在恒温室放置一段时间，等棉塞上的冷凝水蒸发后再贮存备用。装于锥形瓶或其他容器的培养基，灭菌前最好用牛皮纸包扎瓶口，以防灰尘落入棉塞或瓶口而引起污染。贮存过程中，不要取下包头纸，以减少水分蒸发。对含有染料或其他对光敏感物质的培养基，要特别注意避光保存，特别是避免阳光长时间直接照射。

本次实验结束后，可以让学生思考以下问题：

1. 为什么配制好的培养基要立即灭菌？

提示：如果不立即灭菌，会因杂菌繁殖生长，导致培养基变质而不能使用，培养基中的养料被消耗，同时由于杂菌的生长改变了培养基的 pH，使欲分离的微生物不能很好地生长。如确实不能立即灭菌，可将培养基暂放于 4°C 冰箱或冰柜中，但时间也不易过久。

2. 如何检查灭菌是否彻底？

彻底灭菌后的检查是将制好的平板培养基，放入 37°C 的恒温箱中 1~2d。取出后观察有无微生物生长，无微生物生长才能使用。

●培养基对微生物的选择作用

本实验最好是接着上个实验进行，在实验前教师让学生思考不同培养基中生长的优势菌群分别是哪一类？在此基础上作出假设，假设采用牛肉膏蛋白胨培养基时，细菌为优势菌；采用马铃薯葡萄糖培养基时，酵母菌和霉菌为优势菌。教师引导学生参照技能卡，分组设计实验方案，一般 4 人一组，根据学生的兴趣教师统一调配，如一个实验班 40 人，可以分成 10 个组，4 个组设计的方案为用同一种培养基检测不同类群的微生物，其中 2 个组采用牛肉膏蛋白胨培养基，2 个组采用马铃薯葡萄糖培养基；另外 6 个组设计方案为用不同的培养基检测同一类群的微生物，其中 2 个组检测细菌，2 个组检测酵母菌，2 个组检测霉菌。教师一定要强调在设计实验时，需要重复 3 个平板，并设空白对照实验，学生选用的检测方法需参照技能卡，尽量每个环境都能涉及到。教师可以让每个组的学生代表讲述自己的设计方案，教师评述正确后即可开始实验。接着教师的主要任务是强调学生的无菌意识，并演示无菌接种的方法，讲清楚环境中微生物接种的方

法，具体如下：

1. 空气：作实验室空气中微生物检测时，打开无菌平板，让其在空气中暴露 30 ~ 60min，然后将皿盖盖上即成检测平板。

2. 桌面：做试验台微生物检测时，用一根无菌棉塞，先在无菌平板的一个区域润湿和试划几下，然后用其擦抹桌面，再用此棉塞在平板的另一区域内来回划线接种。本操作应以无菌操作要求进行，即在火焰旁手持平板并开启培养皿盖成一缝，右手持棉签在培养基表面划线接种，无菌棉签润湿和试划区可做无菌对照。

3. 头发：打开无菌平板的皿盖，使头发部位保持在平皿上方，并用手指拨动头发数次，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，再在另一侧按手印。盖好皿盖，待培养后比较两边杂菌生长情况。

5. 口腔：打开无菌平板的皿盖，用嘴对准培养基表面，咳嗽或打喷嚏，再盖上皿盖。最后将检测平板倒置于培养箱中 28℃ 培养 4d 后，观察平板上菌落生长状况，并将实验结果记录在教材中第 9 页的表格内。让学生根据实验的结果得出结论。教师组织学生进行表达交流，分组汇报探究实验结果和实验中存在的问题，讨论教材中列出的三个问题。参考答案如下：

1. 同种培养基上生长的微生物类群主要有：细菌、放线菌、霉菌和酵母菌。

2. 在牛肉膏蛋白胨培养基中细菌的数量多，为优势菌；在马铃薯葡萄糖培养基中霉菌的数量多，为优势菌。

3. 首先要配制相应的培养基，采用适当的稀释度，得到某一种微生物的纯培养物，即单菌落。

参考答案

1. 原料称量→溶解→（加琼脂溶化）→调节 pH→分装→塞棉塞和包扎→灭菌。

2. 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，在培养不同种或株的微生物时，培养基的配方需要相应改变。

参考资料

1. 培养基的种类和应用

（1）按照配置培养基营养物质来源，可将培养基分为天然培养基、合成培养基和半合成培养基三类。使用合成培养基时，应根据不同微生物种类和不同实验目的，选择需要的培养基。

天然培养基（complex medium；nonsynthetic medium）是指一些利用动植物和微生物产品或其提取物制成的培养基。培养基的主要成分是复杂的天然物质，如马铃薯、豆芽、麦芽、牛肉膏、蛋白胨、鸡蛋、酵母膏、血清等。一般难于知道其中的营养成分。

实验室常用的培养各种细菌所用的牛肉膏蛋白胨培养基，培养酵母菌的麦芽汁等培养基均属天然培养基。这类天然培养基的优点是营养丰富、种类多样、配制方便；缺点是化学成分不甚清楚。因此，天然培养基多适合于实验室用的各种基础培养基及生产中用的种子培养基或发酵培养基。

合成培养基 (defined medium; synthetic medium) 是一类采用多种化学试剂配制的，各种成分 (包括微量元素) 及其用量都确切知道的培养基。例如培养细菌的葡萄糖铵盐培养基，培养放线菌的淀粉硝酸盐培养基 (即高氏一号培养基)，培养真菌的蔗糖硝酸盐培养基 (即察氏培养基) 等。合成培养基一般用于营养、代谢、生理、生化、遗传、育种、菌种鉴定和生物测定等要求较高的研究工作。

半合成培养基：既含有天然物质又含有化学试剂的培养基称为半合成培养基。这类培养基的特点是其中的一部分化学成分和用量是清楚的，而另一部分的成分还不十分清楚。例如，培养真菌用的马铃薯葡萄糖培养基。其中葡萄糖及其用量是已知的，而马铃薯的成分则不完全清楚。在微生物学研究中，半合成培养基是应用最广泛的一类培养基。

(2) 按培养基外观的物理状态可将其分成三类，即液体培养基、固体培养基和半固体培养基。

液体培养基：液体培养基是指呈液体状态的培养基。微生物在液体培养基中生长时，可以更均匀地接触和利用营养物质，有利于微生物的生长和代谢产物的积累。在微生物的研究和生产中，液体培养基的应用极其广泛。在实验室中主要用于各种生理、代谢研究和获得大量菌体。在生产实践上，绝大多数发酵培养基都采用液体培养基。目前，微生物发酵工业或微生物制品工业大多采用液体培养基在发酵罐中进行深层培养或深层通气培养，进行生产。在实验室中，多用液体培养基培养微生物以观察其生长特性，如好气或兼性厌氧微生物，常使液体培养基变得浑浊或产生沉淀、絮凝等。液体培养基还用于研究微生物的某些生理生化特性。如糖类发酵、V.P. 反应、吲哚产生、硝酸盐还原等。此外，进行土壤微生物区系分析时，也常应用液体培养基进行稀释培养记数以反映各生理类群的数量关系。

固体培养基：外观呈固体状态的培养基，称为固体培养基。根据固体的性质又可将它分为凝固培养基和天然固体培养基。如在液体培养基中加入 1% ~ 2% 琼脂或 5% ~ 12% 明胶作凝固剂，就可以制成加热可溶化、冷却后则凝固的固体培养基，此即凝固培养基。微生物培养时常用的凝固剂有琼脂 (agar 或称冻粉、洋菜)、明胶、硅酸钠等，其中琼脂是应用最广的凝固剂。琼脂是由海洋红藻中的石花菜、须状石花菜等加工制成。其成分主要为多糖类物质 (琼脂糖约 70%，琼脂果胶约 30%)，其化学性质较稳定，一般微生物不能分解利用，故用做凝固剂不致引起化学成分的变化。就物理性质而言，琼脂在 95℃ 以上温度中开始由凝胶溶化为溶胶。溶化后的琼脂冷却到 45℃ 时重新开始凝固。加热后可溶化，冷却后又可凝固，反复多次凝溶后性质不变。因此，用琼脂制成的固体培养基理化性质稳定，且在一般微生物的温度培养范围内 (25℃ ~ 37℃) 不会溶化而保持良好的固体状态。此外，琼脂溶于水冷凝后，形成透明的胶冻，在用琼脂制成的固体培养基上培养微生物，便于观察和识别微生物菌落的形态。微生物实验

中，琼脂培养基正广泛应用于微生物的分离、纯化、培养、保存、鉴定等工作。实验室中，琼脂的使用量一般控制在 1.5% ~ 2.0%。此外，明胶也可作凝固剂，但其化学成分是动物蛋白质，一般在 25℃ 以上即熔化，20℃ 以下即凝固，因而难于作为常用的凝固剂。由于有的微生物能够分解利用明胶而使之液化，所以用明胶制成的固体培养基多用于穿刺培养，用以观察不同微生物对明胶液化的能力。明胶在配制固体培养基时的用量为 10% ~ 12% 或更多。除琼脂和明胶可作为凝固剂外，研究土壤微生物，特别在分离自养菌时，常用硅酸钠作为凝固剂，其常用量约在 5% ~ 6%。天然固体培养基，是由天然固体状基质直接制成的培养基，例如培养各种真菌用的由麸皮、米糠、木屑、纤维、稻草粉等配制成的固体培养基，马铃薯片、胡萝卜条、大米、麦粒、面包、动物或植物组织制备的固体培养基等，这类培养基在微生物生产中具有特殊的重要意义，其制法大都是直接用固体原料加水拌成的。酿造工业上用于制曲。

半固体培养基：在凝固性固体培养基中，如凝固剂含量低于正常量，培养基呈现出在容器倒放时不致流动，但在剧烈震荡时则能破散的状态，这种固体培养基即称半固体培养基。它一般加 0.5% 的琼脂作凝固剂。半固体培养基在微生物学实验中有许多用途，如细菌运动性的观察（在半固体琼脂柱中央进行细菌的穿刺接种，观察细菌的运动能力），噬菌体效价测定（双平板法），微生物趋化性的研究，各种厌氧菌的培养以及菌种保藏等。

(3) 按照培养基的功能和用途，可将其分为基础培养基、加富培养基、选择培养基、鉴别培养基等。

基础培养基：代谢类型相似的微生物所需要的营养物质比较接近。除少数次要成分外，其大多数营养物质是相同的，例如牛肉膏蛋白胨琼脂培养基。同样，马铃薯葡萄糖琼脂培养基，麦芽汁琼脂培养基，可作为酵母菌和霉菌的基础培养基。另外，在实验工作中可根据某些微生物种类要求的大部分营养物质相同这一原则，也可先配制一种基础培养基，再根据某种微生物的特殊要求，在培养基内加入所需的其他物质。

加富培养基：也称增殖培养基。此类培养基是在培养基中加入有利于某种或某类微生物生长繁殖所需的营养物质，使这类微生物繁殖速度快于其他微生物，从而使这类微生物能在混有多种微生物的培养条件下占有生长优势。培养基中加富的营养物质通常是被加富的对象专门需求的碳源和氮源。例如加富石油分解菌时用石蜡油，加富固氮菌时加甘露醇。自然界中数量较少的微生物，经过有意识地加富培养后再进行分离，就增加了分离到这种微生物的机会。

选择培养基：选择培养基是在一定的培养基中加入某些物质或除去某些营养物质以阻抑其他微生物的生长，从而有利于某一类群或某一目标微生物的生长。有时也可在培养基中加入某些药剂（如染料、有机酸、抗生素等）以抑制某些微生物的生长而造成有利于特定微生物种类优先生长的条件。这种培养基是在 19 世纪末由荷兰学者 M. W. Beijerinck 和俄国的 S. N. Winogradsky 发明的。我国在 12 世纪（宋代）时，根据红曲霉有耐酸和耐高温的特性，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，实际上就是采用了选择性培养基。混合样品中数量很少的某种微生物，如直接采用平板稀释或划线法进行分离，必难以奏效。这时，如果利用该分离对象对某种抑菌

物质的抗性，在混合培养物中加入该抑制物质，经培养后，由于原来占优势的它种微生物的生长受到抑制，而分离对象却可大大增殖，在数量上占优势。通过这种办法，可选择性分离和培养多种微生物。用于抑制它种微生物生长的选择性抑制剂有染料（如结晶紫等）、抗生素和脱氧胆酸钠等；有利于选择培养的理化因素有温度、氧气、pH 或渗透压等。

鉴别培养基：此类培养基主要用来检查微生物的某些代谢特性。一般是在基础培养基中加入能与某一微生物的无色代谢产物发生显色反应的指示剂，从而能使该菌菌落容易与外形相似的它种菌落相区分开来。常见的鉴别性培养基是伊红美蓝乳糖培养基，即 EMB 培养基。它在饮用水、牛乳的大肠杆菌等细菌学检验以及遗传学研究上有着重要的用途。其中的伊红和美蓝两种苯胺染料可抑制革兰氏阳性细菌和一些难培养的革兰氏阴性细菌。在低酸度时，这两种染料结合形成沉淀，起着产酸指示剂的作用。有些细菌在 EMB 培养基上产生容易区分的特征菌落，因而易于辨认。尤其是大肠杆菌，因其强烈分解乳糖而产生大量混合酸，菌体带 H^+ ，故可染上酸性染料伊红，又因伊红与美蓝结合，所以菌落被染上深紫色。此外，测定微生物其他生理生化特性用的培养基，也是应用类似的原理。例如，醋酸铅培养基可用于鉴别细菌是否产生硫化氢；明胶培养基可用来观察细菌是否有液化明胶的能力等。

2. 四大类微生物菌落的形态识别

菌落是由某一微生物的少数细胞或孢子在固体培养基表面繁殖后所形成的子细胞群体，因此，菌落形态在一定程度上是个体细胞形态和结构在宏观上的反应。由于每一大类微生物都有其独特的细胞形态，因而其菌落形态特征也各异。在四大类微生物的菌落中，细菌和酵母菌的形态较相似。

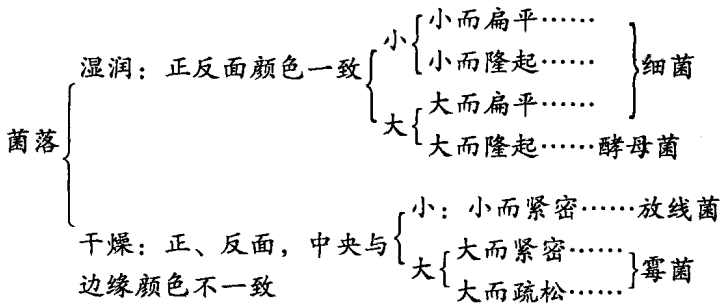
(1) 细菌和酵母菌的异同：细菌和多数酵母菌都是单细胞微生物。菌落间各种细胞间都充满毛细血管水、养料和某些代谢产物，因此，细菌和酵母菌的菌落形态具有类似的特征，如湿润、较光滑、较透明、易挑起、菌落正反面及边缘、中央部位的颜色一致，且菌落质地较均匀等。他们之间的区别如下：①细菌：由于细胞小，故形成的菌落也较小、较薄、较透明且有“细腻”感。不同的细菌会产生不同的色素，因此常会出现五颜六色的菌落。此外，有些细菌具有特殊的细胞结构，因此在菌落形态上也有所反映，如无鞭毛不能运动的细菌其菌落外形较圆而凸起；有鞭毛能运动的细菌其菌落往往大而扁平，周缘不整齐，而运动能力特强的细菌则出现更大、更扁平的菌落，其边缘从不规则、缺刻状直至出现迁移性的菌落，例如变形杆菌属的菌种。具有荚膜的细菌其菌落更黏稠、光滑、透明。荚膜较厚的细菌其菌落甚至呈透明的水珠状。有芽孢的细菌常因其折光率和其他原因而使菌落呈粗糙、不透明、多皱褶等特征。细菌还常因分解含氮有机物而产生臭味，这也有助于菌落的识别。②酵母菌：由于细胞较大（直径比细菌约大 10 倍）且不能运动，故其菌落一般比细菌大、厚而且透明度较差。酵母菌产生的色素较为单一，通常成矿蜡色，少数为橙红色，个别为黑色。但也有例外，如假丝酵母因形成藕节状的假菌丝，故细胞易向外围蔓延，造成菌落大而扁平且边缘不整齐等特有形态。酵母菌因普遍能发酵含碳有机物而产生醇类，故其菌落常伴有酒香味。

(2) 放线菌和霉菌的异同：放线菌和霉菌的细胞都是丝状的，当生长于固体培养

基上时有营养菌丝（或基内菌丝）和气生菌丝的分化。气生菌丝向空间生长，菌丝之间无毛细管水，因此菌落外观呈干燥、不透明的丝状、绒毛状或皮革状等特征。由于营养菌丝深入培养基中使菌落和培养基连接紧密，故菌丝不易被挑起。由于气生菌丝、孢子和营养菌丝颜色不同，常使菌落正反面呈不同颜色。丝状菌是以菌丝顶端延长的方式进行生长的，越近菌落中心的气生菌丝其生理年龄越大，也越早分化出子实体器官或分生孢子，从而反映在菌落颜色上的变化，一般情况下，菌落中心的颜色常比边缘深。有些菌的营养菌丝还会分泌水溶性色素并扩散到培养基中而使培养基变色。有些菌的气生菌丝在生长后期还会分泌液滴，因此，在菌落上出现“水珠”。它们之间的区别如下：

①放线菌：放线菌属原核生物，其菌丝纤细，生长较慢，气生菌丝生长后期逐渐分化出孢子丝，形成大量的孢子，因此菌落较小，表面呈紧密的绒状或粉状等特征。由于菌丝伸入培养基中常使菌落边缘的培养基呈凹陷状。不少放线菌还产生特殊的土腥味或冰片味。

②霉菌：霉菌属真核生物，它们的菌丝一般较放线菌粗（几倍）且长（几倍至几十倍），其生长速度比放线菌快，故菌落大而疏松或大而紧密。由于气生菌丝会形成一定形状、构造和色泽的子实器官，所以菌落表面往往有肉眼可见的构造和颜色。根据上述特征可将四大类微生物菌落的识别要点归纳如下：



根据上述要点就可基本上识别大部分未知菌落。由于菌落特征往往还受培养基成分、培养时间（幼龄菌落和成熟菌落的差别）及菌落在平板上分布的疏密等因素的影响，因而给四大类菌落形态的识别带来了一些困难，况且在自然条件下各类微生物还存在有过渡类型。所以，对于一些难以区别的菌落还应借助显微镜来观察其细胞形态，以进一步作出正确的判断。

第2节 微生物的纯培养

课前准备

学生准备：

利用课后时间，请学生预习教材，写出简单的实验流程。

教师准备：

(1) 本次微生物学实验教案；(2) 实验用的材料用具：培养 16 ~ 24h 的大肠杆菌培养液；灭菌的牛肉膏蛋白胨培养基斜面和平板，盛有 9mL 无菌水的试管；无菌玻璃涂棒，无菌吸管，接种环等。

教学建议

本实验教学 2 课时，教师在课前应准备好培养基平板，分离实验在课堂上做，但观察结果时可以利用课余时间。

教师主要介绍本实验的主要步骤，包括样品稀释、划线或涂布及培养三个步骤，教师边操作边讲解。

1. 稀释菌液：每次稀释样品前，先将待测样品充分摇匀。然后用 1mL 无菌移液管在待稀释样品中来回吹吸数次（注意：吹出菌液时，移液管尖端必须离开液面！），再精确移取 0.5mL 菌液至 10^{-1} 稀释度的试管中（注意：这根已接触过原始菌样的移液管的尖端不能再接触 10^{-1} 试管的液面）。另取 1mL 无菌移液管，以同样的方式，先在 10^{-1} 试管中来回吹吸样品数次，并精确移取 0.5mL 菌液至 10^{-2} 的试管中，如此稀释至 10^{-6} 为止。整个稀释流程如教材图 1-8 所示。

2. 划线或涂布：

(1) 平板划线分离：按照教材图 1-9 所示，在近酒精灯火焰处，左手拿皿底，右手拿接种环，用火焰灼烧的平整圆滑的接种环蘸取少量的待分离的材料稀释液，在培养基表面作平行划线或连续划线。注意平行划线时，线条多少以挑菌量的多少而定，划完一个区域后，立即烧掉接种环上的残菌转动一个角度继续划线。在烧接种环时，左手持皿底并将其覆盖在皿盖上方（不要放入皿盖内），以防止杂菌的污染。

(2) 涂布法：取 3 个平板，底面分别用记号笔写上 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} ，然后从标有 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 的各管中分别吸 0.1mL 菌液滴在相应编号的平板表面上，左手拿培养皿，并将皿盖开启一缝，右手拿玻璃涂棒将平板表面的菌液轻轻地涂开。注意务必使菌液均匀地涂在平面上。涂布时不要用力过猛，以免涂破培养基。涂布操作见教材图 1-10。

3. 恒温培养：将划线平板放入恒温箱里，37℃ 倒置培养 16 ~ 24h，在线的开始部分，微生物往往连在一起生长，随着线的延伸，菌数逐渐减少，最后可能形成纯种的单个菌落。

4. 接斜面：用无菌的接种环挑取大肠杆菌的单菌落，接种于牛肉膏蛋白胨斜面培养基上，经培养后即为纯种。挑取单菌落时应特别小心，尽量挑选分散孤立的典型菌落，以期获得纯种。

实验完毕后，教师组织学生进行总结和讨论，(1) 学生所做的实验一般能够较好地得到单菌落，如果不是，主要原因可能在于：菌体密度太大，划线或涂布不均匀，平板冷凝水太多。(2) 平行划线时，每转一个角度烧一次接种环，使菌液逐渐稀释，能够较好地得到单个菌落。(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，基本步骤同本次实验的流程，只是在培养基中加入氨苄青霉素，在培养基表面