



教育部高职高专规划教材

工业微生物实验技术

陈剑虹 主编

杨艳芳 主审



化学工业出版社
教材出版中心

教育部高职高专规划教材

工业微生物实验技术

陈剑虹 主编

杨艳芳 主审



化学工业出版社
教材出版中心

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

工业微生物实验技术/陈剑虹主编. —北京: 化学工业出版社, 2005. 11
教育部高职高专规划教材
ISBN 7-5025-7920-6

I. 工… II. 陈… III. 工业微生物学-实验-高等学校: 技术学院-教材 IV. Q939. 97-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 139369 号

教育部高职高专规划教材 工业微生物实验技术

陈剑虹 主编
杨艳芳 主审
责任编辑: 张双进
责任校对: 李 林
封面设计: 于 兵

*

化学工业出版社 出版发行
教材出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销
北京市昌平振南印刷厂印刷
三河市宇新装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 7½ 字数 161 千字

2006 年 1 月第 1 版 2006 年 1 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-7920-6

定 价: 14.00

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

生物技术类专业规划教材编审委员会

主任委员：王红云

副主任委员：张义明 杨百梅 赵玉奇 陈改荣 于文国

委 员：（按姓氏汉语拼音排序）

卞进发	蔡庄红	陈改荣	陈剑虹	程小冬
高 平	高兴盛	胡本高	焦明哲	李文典
李晓华	梁传伟	刘书志	罗建成	盛成乐
孙祎敏	王世娟	杨百梅	杨艳芳	于文国
员冬梅	藏 晋	张苏勤	周凤霞	

内 容 提 要

本教材主要介绍工业微生物实验室建设及设备仪器微生物的纯种分离与培养技术,微生物的鉴定,微生物菌种的筛选、诱变与保存技术,微生物在各行业生产中的应用,微生物控制技术,微生物的检验技术等内容。本教材以“实用”为目标,介绍技术方法,力求创新,努力反映新知识、新技术和新的科研成果,尽量做到与生产应用实践保持同步。

本教材是高等职业学校生物技术类专业的专业基础课《工业微生物》的配套教材,供高等职业技术学院和高等专科学校生物技术类专业使用,也可供其他相关专业师生和从事生物技术工作的科技人员参考。

目 录

微生物实验室守则.....	1
第一章 实验室建设及设备仪器.....	3
第一节 实验室建设.....	3
一、微生物实验室设计.....	3
二、微生物实验室基本要求.....	3
第二节 实验环境控制.....	6
一、检验的方法.....	6
二、检验时间.....	6
三、检验结果分析.....	6
第三节 常用仪器及其使用要领.....	7
一、显微镜.....	7
二、恒温培养箱.....	10
三、灭菌器.....	11
四、冰箱.....	13
五、水浴锅.....	13
六、细菌过滤器.....	14
七、超净工作台.....	15
八、电动抽气机.....	16
九、电动离心机.....	16
十、天平.....	17
第四节 常用器皿.....	17
一、常用的玻璃器皿.....	17
二、常用的玻璃器皿的洗涤与消毒.....	17
三、常用的玻璃器皿的包装.....	18
第五节 小型微生物厂主要仪器及设备.....	20
第二章 微生物的纯种分离及培养技术.....	23
实验 2-1 土壤中微生物的分离与纯化.....	23
一、实验目的.....	23
二、实验原理.....	23
三、实验材料.....	23
四、实验方法.....	24
五、实验报告.....	27
实验 2-2 化能自养微生物的分离与纯化.....	29

一、实验目的	29
二、实验原理	29
三、实验材料	29
四、实验内容	29
五、实验报告	30
实验 2-3 厌氧菌的分离与培养	31
一、实验目的	31
二、实验原理	31
三、实验材料	32
四、实验方法	32
五、实验报告	33
第三章 微生物的鉴定	35
实验 3-1 微生物的形态观察	35
一、实验目的	35
二、实验原理	35
三、实验材料	35
四、实验方法	35
五、实验报告	37
实验 3-2 细菌特殊结构的观察	37
一、实验目的	37
二、实验原理	37
三、实验材料	38
四、实验方法	38
五、实验报告	39
实验 3-3 革兰氏染色法	40
一、实验目的	40
二、实验原理	40
三、实验材料	40
四、实验方法	40
五、实验报告	41
实验 3-4 微生物的大小测定与计数	42
一、实验目的	42
二、实验原理	42
三、实验材料	43
四、实验方法	43
五、实验报告	45
实验 3-5 微生物的理化性能鉴定	45
一、实验目的	45

二、实验原理	46
三、实验材料	46
四、实验方法	46
五、实验报告	48
第四章 微生物菌种的保藏、筛选及诱变技术	49
实验 4-1 降解苯酚微生物的选育	49
一、实验目的	49
二、实验原理	49
三、实验材料	49
四、实验方法	49
五、实验报告	50
实验 4-2 利用紫外线诱变筛选营养缺陷型突变株	51
一、实验目的	51
二、实验原理	51
三、实验材料	51
四、实验方法	52
五、实验报告	54
实验 4-3 微生物菌种的保藏方法	54
一、实验目的	54
二、实验原理	54
三、实验材料	54
四、实验方法	54
五、实验报告	56
实验 4-4 苏云金杆菌的复壮	57
一、实验目的	57
二、实验原理	57
三、实验材料	57
四、实验方法	57
五、实验报告	58
第五章 微生物在各行业生产中的应用	61
实验 5-1 酸乳的制作	61
一、实验目的	61
二、实验原理	61
三、实验材料	61
四、实验方法	61
五、实验报告	62
实验 5-2 甜酒酿的酿制	62
一、实验目的	62

二、实验原理	62
三、实验材料	63
四、实验方法	63
五、实验报告	63
实验 5-3 谷氨酸发酵	64
一、实验目的	64
二、实验原理	64
三、实验材料	64
四、实验方法	65
五、实验报告	66
实验 5-4 乙醇发酵试验	66
一、实验目的	66
二、实验原理	66
三、实验材料	67
四、实验方法	67
五、实验报告	68
实验 5-5 阿维菌素的发酵	69
一、实验目的	69
二、实验原理	69
三、实验材料	69
四、实验方法	69
五、实验报告	70
实验 5-6 单细胞蛋白的生产	71
一、实验目的	71
二、实验原理	71
三、实验材料	71
四、实验方法	71
五、实验报告	71
实验 5-7 纤维素的分解	72
一、实验目的	72
二、实验原理	72
三、实验材料	72
四、实验方法	72
五、实验报告	73
实验 5-8 有机磷农药的生物降解	73
一、实验目的	73
二、实验原理	73
三、实验材料	73

四、实验方法	74
五、实验报告	75
实验 5-9 活性污泥中菌胶团及生物相的观察	75
一、实验目的	75
二、实验原理	75
三、实验材料	75
四、实验方法	76
五、实验报告	78
第六章 微生物控制技术	79
实验 6-1 温度对微生物的影响	79
一、实验目的	79
二、实验原理	79
三、实验材料	79
四、实验方法	79
五、实验报告	80
实验 6-2 紫外线对微生物的影响	80
一、实验目的	80
二、实验原理	80
三、实验材料	80
四、实验方法	81
五、实验报告	81
实验 6-3 渗透压对微生物的影响	82
一、实验目的	82
二、实验原理	82
三、实验材料	82
四、实验方法	82
五、实验报告	82
实验 6-4 氢离子浓度对微生物生长的影响	83
一、实验目的	83
二、实验原理	83
三、实验材料	83
四、实验方法	84
五、实验报告	84
实验 6-5 化学药剂对微生物的影响	84
一、实验目的	84
二、实验原理	85
三、实验材料	85
四、实验方法	85

五、实验报告	85
第七章 微生物检验技术	87
实验 7-1 饮料食品中细菌总数测定	87
一、实验目的	87
二、实验原理	87
三、实验材料	87
四、实验方法	87
五、实验报告	89
实验 7-2 饮料食品中大肠菌群测定	89
一、实验目的	89
二、实验原理	89
三、实验材料	90
四、实验方法	90
五、实验报告	91
实验 7-3 食品中霉菌计数法	92
一、实验目的	92
二、实验原理	92
三、实验材料	92
四、实验方法	92
五、实验结果	95
实验 7-4 食品中金黄色葡萄球菌检验	96
一、实验目的	96
二、实验原理	96
三、实验材料	96
四、实验方法	97
五、实验报告	98
附录	99
附录 I 常用的消毒剂	99
附录 II 实验室常用的洗涤剂	99
附录 III 常用的培养基	99
附录 IV 染色液的配制	103
附录 V 常用试剂的配制	104
参考文献	107

微生物实验室守则

微生物实验的目的是：在训练学生牢固建立无菌概念、扎实掌握微生物实验基本操作技能的基础上，培养学生发现问题、分析问题和解决问题的能力，树立学生实事求是、严肃认真的科学态度和勤俭节约、协作攻关的优良作风。

为了提高教学效果，保证实验质量和实验室安全，特提出如下注意事项。

1. 每次实验前必须充分预习实验教材，以了解实验的目的、原理和方法，熟悉实验操作中的主要步骤和环节。

2. 非必要的物品不要带进实验室，必须带进的物品（如书包等）应放在不影响实验操作的地方。

3. 除严格按规定进行无菌操作外，要培养良好习惯以防止杂菌污染。

① 实验前洗手并用湿布擦净台面，必要时可用“新洁尔灭”溶液（质量分数为0.1%）。

② 进行接种操作时，要关闭门窗，以防止空气对流，要尽量减少走动和讲话，以防止尘埃飞扬和唾沫四溅。

4. 严防微生物污染环境和危害身体健康。

① 严禁吸烟、严禁餐饮。

② 严禁以口吸方式对致病性菌液进行移液操作。

③ 带菌移液管、滴管、涂布棒、培养皿、三角烧瓶或试管等器材，应置于专用盘、架，确定不再使用后，应立即投入5%石炭酸或其他消毒液中浸泡20min以上，或煮沸0.5h，或进行蒸汽灭菌后再清洗。

④ 离开实验室之前要用肥皂洗手。

⑤ 实验室中的菌种和物品等，未经教师许可，不得携带出实验室。

⑥ 凡需进行培养的材料，都应注明菌名、接种日期、处理方法及操作者姓名（或组别），放在指定的温箱中进行培养。

5. 发生意外情况时，应立即报告，在老师指导下及时处理。

① 如不慎将菌液吸入口中，应立即吐出，并用大量自来水漱口。

② 如菌液沾染身体，应先用70%乙醇棉花拭去，再用肥皂水清洗干净；如沾染致病菌，应用2%~4%来苏尔或0.1%新洁尔灭溶液浸泡或湿敷20min后用自来水清洗干净。

③ 如致病性菌液溅洒到桌面、地面、衣物时，应立即以5%石炭酸液或0.1%新洁尔灭溶液覆盖30min后再用自来水清洗干净。

6. 爱护仪器、设备，认真按操作规程使用仪器、设备，并做好使用记录。

7. 按时观察实验现象，如实记录实验结果，清晰填写报告表格，科学阐述实验

结论。

8. 节约水、电，适量取用药品等耗材。
9. 实验完毕，认真清洗器皿、保养仪器、清理试剂、清洁台面。
10. 值日生负责打扫实验室卫生及检查实验室安全状况（门窗、水、电、煤气等）。

第一章 实验室建设及设备仪器

第一节 实验室建设

一、微生物实验室设计

微生物实验室由准备室、洗涤室、灭菌室、无菌室、恒温培养室和普通实验室六部分组成。这些房间的共同特点是地板和墙壁的质地光滑坚硬，仪器和设备的陈设简洁，便于打扫卫生。

二、微生物实验室基本要求

1. 准备室

准备室用于配制培养基和样品处理等。室内设有试剂柜、存放器具或材料的专柜、实验台、电炉、冰箱和上下水道、电源等。

2. 洗涤室

洗涤室用于洗刷器皿等。由于使用过的器皿已被微生物污染，有时还会存在病原微生物。因此，在条件允许的情况下，最好设置洗涤室。室内应备有加热器、蒸锅，洗刷器皿用的盆、桶等，还应有各种瓶刷、去污粉、肥皂、洗衣粉等。

3. 灭菌室

灭菌室主要用于培养基的灭菌和各种器具的灭菌，室内应备有高压蒸汽灭菌器、烘箱等灭菌设备及设施。

4. 无菌室

无菌室也称接种室，是系统接种、纯化菌种等无菌操作的专用实验室。在微生物工作中，菌种的接种移植是一项主要操作，这项操作的特点就是要保证菌种纯种，防止杂菌的污染。在一般环境的空气中，由于存在许多尘埃和杂菌，很易造成污染，对接种工作干扰很大。因此，接种工作要在空气经过灭菌的环境里进行，小规模的可利用超净工作台，大规模的则在无菌室里操作。

(1) 无菌室的设置

无菌室应根据既经济又科学的原则来设置。其基本要求有以下几点。

① 无菌室应有内、外两间，内间是无菌室，外间是缓冲室。房间容积不宜过大，以便于空气灭菌。内间面积 $2\text{m} \times 2.5\text{m} = 5\text{m}^2$ ，外间面积 $1\text{m} \times 2\text{m} = 2\text{m}^2$ ，高以 2.5m 以下为宜，都应有天花板。

② 内间应当设拉门，以减少空气的波动，拉门应设在离工作台最远的位置上；外间的门最好也用拉门，要设在距内间最远的位置上。

③ 在分隔内间与外间的墙壁或“隔扇”上，应开一个小窗，做接种过程中必要的内外传递物品的通道，以减少人员进出内间的次数，降低污染程度。小窗宽 60cm、高 40cm、厚 30cm，内外都挂对拉的窗扇。

④ 无菌室容积小而严密，使用一段时间后，室内温度很高，故应设置通气窗。通气窗应设在内室进门处的顶棚上（即离工作台最远的位置），最好为双层结构，外层为百叶窗，内层可用抽板式窗扇。通气窗可在内室使用后、灭菌前开启，以流通空气。有条件可安装恒温恒湿机。

(2) 无菌室内设备和用具

① 无菌室内的工作台，不论是何种材质、用途的，都要求表面光滑和台面水平。光滑是便于用消毒剂擦洗，水平是在倒琼脂平板时可以保证培养皿内平板的厚度一致。

② 在内室和外室各安装一个紫外灯（多为 30W）。内室的紫外线灯应安装在经常工作的座位正上方，离地面 2m，外室的紫外线灯可安装在外室中央。

③ 外室应有专用的工作服、鞋、帽、口罩、盛有来苏儿水的瓷盆和毛巾、手持喷雾器和 5% 石炭酸溶液等。

④ 内室应有酒精灯、常用接种工具、不锈钢制的刀、剪、镊子、70% 的酒精棉球、工业酒精、载玻璃片、特种蜡笔、记录本、铅笔、标签纸、胶水、废物筐等。

(3) 无菌室的灭菌消毒

这里介绍无菌室在不同情况下采用的灭菌或消毒措施。常用消毒剂见附录 I。

① 熏蒸。这是无菌室彻底灭菌的措施。无菌室使用了较长时间，污染比较严重时，应进行熏蒸灭菌。可用甲醛、乳酸或硫磺熏蒸。熏蒸前应将无菌室清扫干净，打开通气窗通风干燥。

② 喷雾。在每次使用无菌室前进行。喷雾可促使空气中微粒及微生物沉降，防止桌面、地面上的微尘飞扬，并有杀菌作用。可用 5% 石炭酸喷雾。

③ 紫外线照射。在每次使用无菌室前进行。紫外线有较好的杀菌效果。通常应开启紫外线灯照射 30~60min。

(4) 无菌室工作规程

① 无菌室灭菌。每次使用前开启紫外线灯照射 30min 以上，或在使用前 30min，对内室外用 5% 石炭酸喷雾。

② 用肥皂洗手后，把所需器材搬入外室；在外室换上已灭菌的工作服、工作帽和工作鞋，戴好口罩，然后用 2% 来苏尔液将手浸洗 2min。

③ 将各种需用物品搬进内室清点、就位，用 5% 石炭酸在工作台面上方和操作员站位空间喷雾，返回外室，5~10min 后再进内室工作。

④ 接种操作前，用 70% 酒精棉球擦手；进行无菌操作时，动作要轻缓，尽量减少空气波动和地面扬尘。

⑤ 工作中应注意安全。如遇棉塞着火，用手紧握或用湿布包裹熄灭，切勿用嘴吹，以

免扩大燃烧；如遇有菌培养物洒落或打碎有菌容器时，应用浸润 5% 石炭酸的抹布包裹后，丢到废物筐内，并用浸润 5% 石炭酸的抹布擦拭台面或地面，用酒精棉球擦手后再继续操作。工作中用完的火柴、废纸等，应丢到废物筐内。

⑥ 工作结束，立即将台面收拾干净，将不应在无菌室存放的物品和废弃物全部拿出无菌室后，对无菌室用 5% 石炭酸喷雾，或开紫外线灯照射 30min。

5. 恒温培养室

每一类微生物生长所需的温度范围各不相同，且各有其最适温度。如果温度较低，微生物代谢低下，则生长缓慢。如果温度适宜，微生物代谢旺盛，生长快。如果温度太高，则会因为高温将导致蛋白质变性，使酶失去活力而抑制生长，甚至引起死亡。恒温培养室就是对接种微生物提供恒定适宜温度进行培养的场所。

(1) 培养室的设置

① 培养室应有内、外两间，内室是培养室，外室是缓冲室。房间容积不宜大，以利于空气灭菌，内室面积在 $3.2\text{m} \times 4.4\text{m} \approx 14\text{m}^2$ 左右，外室面积在 $3.2\text{m} \times 1.8\text{m} \approx 6\text{m}^2$ 左右，高以 2.5m 左右为宜，都应有天花板。

② 分隔内室与外室的墙壁上部应设带空气过滤装置的通风口，使内室有良好的空气供应，以满足好氧微生物对氧的需要。

③ 为满足微生物对温度的需要，需安装恒温恒湿机。恒温恒湿机的主机部分应安装在内室以外。

④ 内外室都应在室中央安装紫外线灯，以供灭菌用。

(2) 培养室内设备及用具

① 内室通常配备培养架和摇瓶机（摇床）。常用的摇瓶机有旋转式、往复式两种。

② 外室应有专用的工作服、鞋、帽、口罩、手持喷雾器和 5% 石炭酸溶液、70% 酒精棉球等。

(3) 培养室的灭菌、消毒

同无菌室的灭菌、消毒措施。

小规模的培养可不启用恒温培养室，而在恒温培养箱中进行。

6. 普通实验室

进行微生物的观察、计数和生理生化测定工作的场所。室内的陈设因工作侧重点不同而有很大的差异。一般均配备实验台、显微镜、柜子及凳子。实验台要求平整、光滑，实验柜要足以容纳日常使用的用具及药品等。

教学用的微生物实验室，通常按 $80\text{m}^2/40$ 名学生设计，最好是长方形，应设置讲台、黑板、实验桌。实验桌上配有药品架，药品架的适当高度安装日光灯，作为观察微生物时的光源。

在非专业化实验时或条件有限时，准备室、洗涤室、普通实验室的划分并不十分明确，甚至合而为一。在专业化研究或条件允许的情况下，上述六室最好都单独设置。

7. 实验室其他要求

水、电、气等的容量、布设、性能均应满足实验室工作的需要。

第二节 实验环境控制

微生物实验操作中的环境控制主要是对无菌室空气污染情况的检验。

无菌室应定期进行空气污染情况的检验，其目的是一是了解无菌室灭菌的效果，二是了解在操作过程中操作行动对空气的污染影响，以便有的放矢地及时改进灭菌措施和操作方法。

一、检验的方法

1. 平板检验法

用培养微生物主要类群的常规培养基，如牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、高氏1号培养基、马丁氏培养基、马铃薯葡萄糖培养基，分别倒成平板，每种两个，都放入无菌室内。检验时，按无菌操作各将其中一个平板的盖子打开，经过预定时间后再行盖好；另外一个不开盖子的作为对照，一起放入30℃环境培养，48h后检验有无菌落生长。

2. 斜面检验法

将常用的牛肉膏蛋白胨培养基斜面（与上相同）各取2管，放入无菌室。按无菌操作各将其中的一管打开棉塞，将棉塞放入灭菌的培养皿内。经过预定时间后，再将棉塞通过火焰塞好试管。连同对照一起培养，48h后检验有无杂菌生长。

二、检验时间

1. 空气灭菌后的检验

无菌室用甲醛或其他药剂熏蒸后，在开始使用前30min或1h打开培养皿盖子，至使用无菌室时盖好，其目的是为了检验无菌室内空气灭菌的效果。

2. 操作过程中空气污染情况的检验

为了检验在使用无菌室的过程中，由于人员的进出、器材的搬放、接种操作的动作等原因造成的空气污染的情况，可在准备工作结束后接种操作开始时打开盖子，经5min、30min或直到工作结束时再盖好，以检验在不同的使用时间内空气污染的程度。

3. 紫外线灭菌效果的检验

无菌室用紫外线灯照射后，可在不同高度和不同位置用琼脂平板检验空气中的杂菌，以判断紫外线的灭菌效果。必要时应调整照射时间或紫外线灯的高度。

三、检验结果分析

检验用的平板或斜面，在30℃培养48h后，检验是否长有菌落、菌落的数量，并由菌落形态判断杂菌的种类。一般要求平板开盖5min者应不超过3个菌落；斜面开塞30min者应不长菌落为合格。从空气中杂菌的种类可以考虑采取有效措施，增进灭菌效果。如霉菌较多，可先用5%石炭酸灭菌后，再用甲醛熏蒸；如细菌较多时，可采用乳酸与甲醛交替熏蒸的办法。