

微生物学 实验教程

祖若夫 胡宝龙 周德庆 编著



Fudan University Press

● 复旦大学出版社

Q93-33

337

V4127/18

微生物学实验教程

祖若夫 胡宝龙 周德庆 编著

复旦大学出版社

(沪)新登字 202 号

内 容 提 要

本书分两大部分。第一部分为基本实验,包括:微生物染色技术,观察和培养微生物的方法,培养基的配制与灭菌,纯种分离和接种技术,菌种保藏方法等共 56 个实验。第二部分为任选实验(共 7 个),主要为有余力的学生和有条件的学校开展课外兴趣小组活动提供参考。每个实验都附有操作中的注意事项,为初学者提供成功的经验。书末附有 16 个附录及主要参考书目。

本书可作为综合性大学及师范等院校微生物学实验课的教材,也可供其他高等院校有关专业师生和研究机构、工厂等科技人员的参考。

责任校对 马金宝

微生物学实验教程

祖若夫 胡宝龙 周德庆 编著

复旦大学出版社出版

(上海国权路 579 号)

新华书店上海发行所发行 常熟文化印刷厂印刷

开本 850×1168 1/32 印张 9.5 字数 282,000

1993 年 4 月第 1 版 1993 年 4 月第 1 次印刷

印数 1—3,000

ISBN7-309-00988-6/Q·38

定价: 5.50 元

前 言

微生物学是生物学中第一个建立起一套自己特有实验技术的学科。随着时代的进步和科技的发展,微生物学在其原有的一些经典实验技术的基础上,又获得了极大的丰富和飞速的发展。今天,微生物学实验技术已渗透到现代生命科学的各分支领域,在推动有关研究和应用中正发挥着越来越重要的作用。

微生物学实验课是培养未来生命科学工作者掌握有关基本实验方法和技术的一门必修课。良好的教材是提高实验课质量的先决条件之一。在长期的教学实践中,我们认为在微生物学实验教学和教材编写中均应努力贯彻“培养兴趣,严格要求;操作为主,验证为辅;重点技术,反复实践;善于活用,巧于动手”等原则。

本书是在我们长期使用的讲义的基础上加以适当修改和充实而成的。在编写过程中,我们力求使它成为一本内容较全面、技术较完整、体系较新颖、编写有特色的基础微生物学实验教程。在“教程”这一总目标下,我们按一学期一般有20个教学周的常规,把第一部分的56个“基本实验”按周编排成19套(另一周留作考试用),每套都有一个主题,围绕主题按主次开设几个可供选择的实验。这不但有利于全学期教学内容和基本技术的均衡安排,而且还为周学时差别较大的不同学校提供了一个选择的参考。其次,为了让有余力的学生或有条件的学校开展兴趣小组活动,我们还特意安排了一组“任选实验”作为教程的第二部分,其内容都是一些条件简便、联系实际、有利于培养兴趣和训练综合动手能力的实验。

本书的出版为我们创造了一个与国内同行进行实验教材交流的良好机会。我们热切地期待广大青年学生和同行专家们对本书提出各种

批评和建议。

周德庆

1992.3.8

目 录

| | |
|---------------|---|
| 实验须知 | 1 |
| 实验器皿一览表 | 3 |

第一部分 基本实验

| | |
|-------------------------------|----|
| 第一周 环境微生物的检测 | 5 |
| 实验 1-1 环境中微生物的检测 | 5 |
| 实验 1-2 斜面接种法 | 10 |
| 第二周 光学显微镜的使用及革兰氏染色 | 17 |
| 实验 2-1 普通光学显微镜的使用 | 17 |
| 实验 2-2 细菌的涂片及简单染色法 | 24 |
| 实验 2-3 革兰氏染色法 | 27 |
| 实验 2-4 显微测微尺的使用 | 30 |
| 第三周 细菌的芽孢和荚膜染色法 | 34 |
| 实验 3-1 芽孢染色法 | 35 |
| 实验 3-2 荚膜染色法 | 37 |
| 实验 3-3 相差显微镜的使用 | 40 |
| 第四周 细菌的鞭毛染色法及其动力观察 | 45 |
| 实验 4-1 鞭毛染色法 | 45 |
| 实验 4-2 穿刺接种法及细菌动力的观察 | 49 |
| 实验 4-3 用悬滴法观察细菌的运动 | 52 |
| 实验 4-4 用暗视野显微镜观察细菌的运动 | 55 |
| 第五周 四大类微生物菌落形态的识别 | 58 |
| 实验 5-1 四大类微生物菌落形态的比较和识别 | 58 |
| 实验 5-2 三点接种法与霉菌菌落形态的观察 | 65 |
| 第六周 丝状菌的培养与观察 | 69 |
| 实验 6-1 载片培养和真菌个体形态的观察 | 69 |

| | | |
|-------------|--------------------------------|------------|
| 实验 6-2 | 放线菌的培养与观察(一) | 75 |
| 实验 6-3 | 放线菌的培养与观察(二) | 77 |
| 第七周 | 根霉和酵母菌独特形态构造的观察 | 80 |
| 实验 7-1 | 根霉孢子囊和假根的观察 | 80 |
| 实验 7-2 | 根霉接合孢子的形成和观察 | 84 |
| 实验 7-3 | 酵母菌子囊孢子的形成和观察 | 87 |
| 第八周 | 培养基的配制和灭菌 | 91 |
| 实验 8-1 | 培养基的配制 | 92 |
| 实验 8-2 | 加压蒸汽灭菌 | 98 |
| 第九周 | 微生物生长繁殖的测定 (一)微生物生长量的测定 | |
| | 和生长曲线的绘制 | 106 |
| 实验 9-1 | 液体接种法及细菌培养特征的观察 | 106 |
| 实验 9-2 | 细菌生长曲线的测定 | 111 |
| 实验 9-3 | 用干重比色法测定微生物的生长量 | 115 |
| 第十周 | 微生物生长繁殖的测定 (二)用显微镜观察法直接 | |
| | 计繁殖数 | 119 |
| 实验 10-1 | 显微镜直接计数法 | 119 |
| 第十一周 | 微生物生长繁殖的测定 (三)用形成菌落法间接 | |
| | 计繁殖数 | 126 |
| 实验 11-1 | 平板菌落计数法 | 126 |
| 实验 11-2 | 用 TTC 营养纸片测水中活细菌数 | 131 |
| 实验 11-3 | 玻片琼脂薄层菌落计数法 | 135 |
| 第十二周 | 微生物的纯种分离 | 140 |
| 实验 12-1 | 菌种的分离纯化技术 (一)平板划线法 | 140 |
| 实验 12-2 | 菌种的分离纯化技术 (二)稀释平板法 | 143 |
| 实验 12-3 | 菌种的分离纯化技术 (三)简易单孢子分离法 | 147 |
| 实验 12-4 | 菌种的分离纯化技术 (四)菌丝尖端分离法 | 150 |
| 第十三周 | 噬菌体的分离纯化与效价测定 | 153 |
| 实验 13-1 | 大肠杆菌噬菌体的分离和纯化 | 153 |
| 实验 13-2 | 噬菌体效价的测定 | 157 |

| | |
|--|-----|
| 第十四周 厌氧菌的培养技术 | 163 |
| 实验 14-1 用厌氧袋法分离培养丙酮丁醇梭菌 | 163 |
| 实验 14-2 厌氧罐培养法 | 168 |
| 实验 14-3 针筒厌氧培养法 | 173 |
| 第十五周 微生物的诱变及突变株的筛选 | 177 |
| 实验 15-1 紫外线的诱变作用 | 177 |
| 实验 15-2 抗药性突变株的筛选 | 180 |
| 实验 15-3 营养缺陷型突变株的筛选 | 184 |
| 第十六周 生长抑制剂制菌效力的测定 | 191 |
| 实验 16-1 用最低抑制浓度(MIC)法测制菌效力 | 192 |
| 实验 16-2 用琼脂块法筛选抗菌素 | 196 |
| 实验 16-3 用杯碟法测定抗生素的效价 | 199 |
| 第十七周 菌种保藏法 | 207 |
| 实验 17-1 常用的简易保藏法 | 207 |
| 实验 17-2 干燥保藏法 | 210 |
| 实验 17-3 冷冻干燥保藏法 | 214 |
| 实验 17-4 液氮超低温保藏法 | 218 |
| 第十八周 细菌鉴定中常用的生理生化反应 | 222 |
| 实验 18-1 常规的生理生化反应 | 222 |
| 实验 18-2 鉴定细菌的微量、快速生化试验方法 | 230 |
| 实验 18-3 应用SWF(A)细菌鉴定系统鉴定发酵性 革兰氏阴性杆菌 | 234 |
| 第十九周 血清学反应和巨噬细胞吞噬功能的测定 | 241 |
| 实验 19-1 凝集反应 | 241 |
| 实验 19-2 双向琼脂扩散沉淀反应 | 246 |
| 实验 19-3 火箭免疫电泳 | 249 |
| 实验 19-4 巨噬细胞吞噬功能的测定 | 252 |

第二部分 任 选 实 验

| | |
|---------------------------------|-----|
| I-1 从土壤中分离好氧性自生固氮菌 | 257 |
|---------------------------------|-----|

| | | |
|--------------|--------------------|------------|
| I-2 | 从土壤中分离酵母菌 | 259 |
| I-3 | 食用菌菌种的采集和分离 | 261 |
| I-4 | 从病虫体中分离苏云金杆菌 | 263 |
| I-5 | 酸乳的制作及乳酸菌的分离 | 266 |
| I-6 | 甜酒酿的酿制及根霉的分离纯化 | 269 |
| I-7 | 拮抗性放线菌的筛选法 | 273 |
| 附录 | | 279 |
| 一、 | 实验用菌种学名及其发音 | 279 |
| 二、 | 酸碱指示剂的配制 | 280 |
| 三、 | 实验用培养基 | 281 |
| 四、 | 染色液和试剂的配制 | 284 |
| 五、 | 蒸汽压力与温度的关系 | 287 |
| 六、 | 培养基容积与加压灭菌时间(min) | 287 |
| 七、 | 缓冲液的配制 | 288 |
| 八、 | 常用消毒剂 | 290 |
| 九、 | 市售浓酸和氨水的比重和浓度 | 291 |
| 十、 | 比重糖度换算表 | 291 |
| 十一、 | 标准筛孔对照表 | 292 |
| 十二、 | 各国主要菌种保藏机构名称及保藏菌株数 | 293 |
| 十三、 | 常用干燥剂 | 293 |
| 十四、 | 洗液的配制 | 294 |
| 十五、 | 十进制倍数和分数的词冠表(国际制) | 294 |
| 十六、 | 常用的计量单位 | 295 |
| 主要参考书 | | 296 |

实 验 须 知

微生物学实验课是一门操作技能较强的课程。通过本课程学习要求学生：牢固地建立无菌概念，掌握微生物实验的一套基本操作技术；树立严谨、求实的科学态度，提高观察、分析问题和解决问题的能力；树立勤俭节约、爱护公物、相互协作的优良作风。

为了提高教学效果，保证实验的质量和实验室的安全，我们根据微生物实验工作的特点提出如下几点注意事项：

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。初步熟悉实验操作中的主要步骤和环节，使对整个实验的安排做到先后有序、有条不紊和避免差错。

2. 非必要的物品不要带进实验室，必须带进的物品(包括帽子、围巾等)应放在不影响实验操作的地方。

3. 每次实验前须用湿布擦净台面，必要时可用“洁尔灭”溶液擦(0.1%浓度)。实验前要洗手，以减少染菌的几率。

4. 微生物实验中最重要的一环，就是要严格地进行无菌操作、防止杂菌污染。为此，在实验过程中，每个人要严格做到以下几点：

(1) 在进行接种操作时，要关闭门窗，以防止空气对流。

(2) 接种时尽量不要走动和讲话，以免因尘埃飞扬和唾沫四溅，而导致杂菌污染。

(3) 凡用过的带菌移液管、滴管或涂布棒等，在实验后应立即投入5%石炭酸或其他消毒液中浸泡20 min，然后再取出清洗，以免污染环境。

(4) 在清洗带菌的培养皿、三角烧瓶或试管等之前，应先煮沸半小时或进行加压蒸汽灭菌。

(5) 微生物学工作者在进行实验操作时应穿上工作服，离开时脱去，并经常洗涤以保持清洁。

5. 凡须进行培养的材料, 都应注明菌名、接种日期及操作者姓名(或组别), 放在指定的温箱中进行培养, 按时观察并如实地记录实验结果和按时交实验报告。

6. 实验室内严禁吸烟, 不准吃东西, 切忌用舌舐标签、笔尖或手指等物, 以免感染。

7. 节约药品和水、电、煤气。

8. 各种仪器应按要求操作, 用毕按原样放置。

9. 实验完毕, 立即关闭煤气, 整理和擦净台面, 离开实验室之前要用肥皂洗手。值日生负责打扫实验室及进行安全检查(门窗、水、电、煤气等)。

10. 意外事故的处理:

(1) 如因玻璃器皿打碎而使菌液撒到桌面或地上时, 应立即以5% 石炭酸液或0.1% 新洁尔灭溶液覆盖其上, 半小时后再擦去。

(2) 如菌液污染手部时, 应先用70% 乙醇棉花拭去, 再用肥皂水洗刷干净。如污染致病菌时, 应将手浸于2—3% 来苏尔或0.1% 新洁尔灭溶液中。10—20min 后, 再刷洗。

(3) 如不慎将菌液吸入口中, 应立即吐出, 并用大量自来水嗽口多次, 再根据该菌的致病程度作进一步处置。

(4) 如遇衣服或易燃品着火, 应先断绝火源, 再用湿布掩盖灭火, 必要时及时用灭火器灭火。

实验器皿一览表

| 器皿名称 | 规格 | 数量/组 |
|----------|----------|------|
| 移液管 | 5ml | 4 支 |
| | 1ml | 20支 |
| 烧杯 | 250ml | 1 只 |
| 三角烧瓶 | 250ml | 5 只 |
| 培养皿 | 9cm | 20套 |
| 量筒 | 100ml | 1 只 |
| 试管 | 15×150mm | 40支 |
| 玻璃漏斗 | 9cm | 1 只 |
| 载玻片 | | 15块 |
| 石棉网 | | 1 块 |
| 铝制试管架 | 40孔 | 1 只 |
| 滴管 | | 5 支 |
| 乳胶管 | | 1 根 |
| 橡皮夹 | | 1 个 |
| 玻棒 | | 1 根 |
| 橡皮头 | | 5 只 |
| ∏形搁棒 | | 3 只 |
| 载玻片搁棒 | | 1 只 |
| 涂布棒 | | 2 只 |
| 试管帽 | | 20只 |
| 培养皿筒(铜制) | | 2 只 |
| 移液管筒(铜制) | | 1 只 |

第一部分 基本实验

第一周 环境微生物的检测

在我们周围的环境中存在着各种各样的微生物。土壤是微生物栖居的“大本营”，它含有的微生物种类和数量最多；有些微生物附着在尘埃上，飘浮于大气中或沉降在各种物体的表面；此外，人和动物体的口腔、呼吸道和消化道及动、植物体表面都存在着各种微生物。由于这些微生物个体微小、构造简单、肉眼难以观察到，因此，人们往往忽略了它们的存在，而这些微生物又往往是引起工业生产和实验室中各种实验材料、实验菌种污染的祸根。所以，对初学者来说必须树立“处处有菌”的观念，在实验过程中必须严格掌握无菌操作，牢固地树立无菌概念，经常保持台面及周围环境的清洁，认真掌握好各种操作技术（如斜面接种植技术，倒平板技术等），避免杂菌的污染，这是保证实验成功的必要条件。

实验 1-1 环境中微生物的检测

【目的】

1. 了解周围环境中微生物的分布状况。
2. 懂得无菌操作在微生物实验中的重要性。
3. 学会以无菌操作倒平板培养基的方法。

【概述】

在我们周围的环境中存在着种类繁多、数量庞大的微生物。由于它们很微小，因此人们的肉眼无法观察到它们的存在。如果将这些微生物通过某种方法接种到适合于它们生长的固体培养基（含有微生物

生长所必需的营养物)表面上,在适宜的温度下培养一段时间后,少量分散的菌体或孢子就可生长繁殖成一个个肉眼可见的细胞群体,此即为菌落。如果平板上的单菌落是由单个细胞(或单个孢子)生长繁殖而成的,则称为纯菌落;将它移植传代后所得的菌种(如斜面培养物等形式),就称为纯种微生物(或纯培养物)。不同种的微生物可形成大小、形态各异的菌落,因此根据微生物菌落形态的不同,就可鉴别四大类微生物——细菌、放线菌、酵母菌和霉菌。

微生物学是一门实践性很强的学科,熟练地掌握一套微生物实验操作技能,是初学者的首要任务。本周所用无菌操作倒平板就是一例。倒平板就是在火焰旁,将三角瓶中已融化的琼脂培养基倒入无菌培养皿中,然后置水平位置待凝,凝固后即成为无菌培养基平板。在操作前应认真观察示范操作和示意图,然后进行模拟操作训练,经反复练习,在切实领会操作要点后再开始正式倒平板。

【材料和器皿】

1. 培养基:牛肉膏蛋白胨培养基,马铃薯葡萄糖培养基(简称PDA),高氏1号培养基。
2. 器皿:无菌培养皿若干套。
3. 其他:无菌棉签,火柴,煤气灯,标签纸,恒温培养箱等。

【方法和步骤】

1. 融化培养基:取装在三角瓶内的无菌培养基置水浴中煮沸、融化后取出,待冷却至 50°C 左右(以不烫手为宜),供倒平板用。

2. 倒平板:有持皿法和叠皿法两种(参见图1),其操作要点为:

(1) 持皿法

① 将若干无菌培养皿叠放在左侧,便于拿取。

② 点燃煤气灯,将火焰调到适中(空气不要太大,以免气流过急)。

③ 倒平板时,先用左手握住三角瓶的底部,倾斜三角瓶,用右手旋松棉塞,然后用右手的小指和手掌边缘夹住棉塞并将它拔出(切勿将棉塞放在桌面上),随之将瓶口周缘在火焰上过一下(不可灼烧,以防爆

裂),以杀死可能沾在瓶口外的杂菌。然后将三角瓶从左手传至右手中(用右手的拇指、食指和中指拿住三角瓶的底部),在这操作过程中瓶口应保持在离火焰2—3 cm处,瓶口始终向着火焰。左手拿起一套培养皿,用中指、无名指和小指托住培养皿底部,用食指和大拇指夹住皿盖并开启成一缝,恰好能让三角瓶口伸入,随后倒出培养基。一般约倒入12ml的培养基即可铺满整个皿底。盖上皿盖,置水平位置待凝。然后再将三角瓶移至左手,瓶口再次过火并塞紧棉塞。

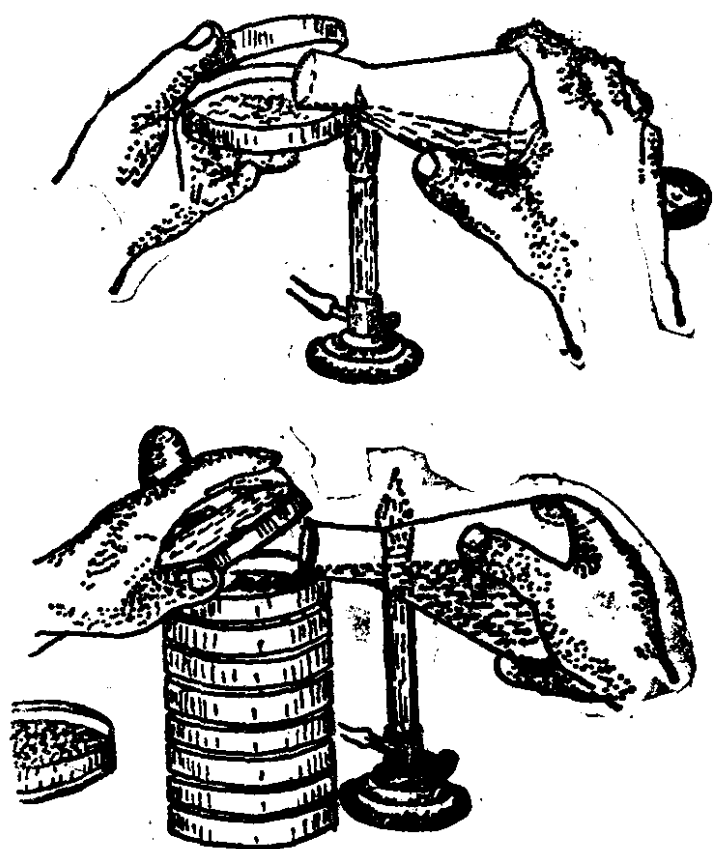


图1 倒平板操作示意图
上: 持皿法, 下: 叠皿法

平板培养基的冷凝方法有两种,一种是将平板一个个摊开在桌面上冷凝,另一方法是将几个平板叠放在一起冷凝。前者冷凝速度较快,在室温较高时采用;而后者冷凝速度较慢,可在室温较低时采用,其优点是形成冷凝水少,尤其适用于平板划线等的需要。

(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,而是将培养皿叠放在煤气灯的左侧并靠近火焰,用右手拿住三角瓶的底部,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倾斜状,以防空气中微生物的污染。

3. 贴标签: 待培养基完全凝固后在皿底贴上标签,并注明检测类型、组别及日期等(也可用记号笔书写在皿底)。

4. 检测方法：环境中存在的微生物种类多样，检测方法也各异，现列举几种如下：

(1) 空气：作实验室空气中微生物检测时，只要打开无菌平板的皿盖，让其在空气中暴露一段时间(5—10 min)，然后将皿盖盖上即成检测平板。

(2) 桌面：作实验台桌面微生物检测时，可用一根无菌棉签，先在无菌平板的一个区域内润湿和试划几下，然后用其擦抹桌面等物体表面，再用此棉签在平板的另一区域内作来回划线接种(如图 2)。本操作应以无菌操作要求进行，即在火焰旁与持皿法倒平板一样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作无菌对照。

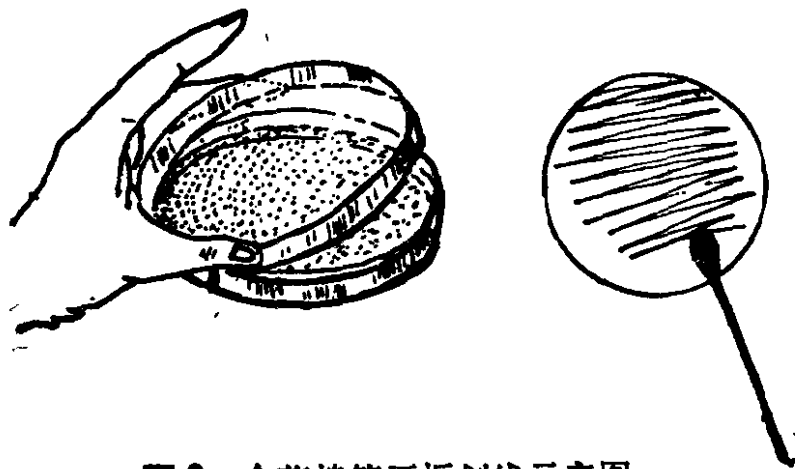


图 2 含菌棉签平板划线示意图

左：开启皿盖法， 右：划线示意图

(3) 头发：移去放在桌面上的无菌平板的皿盖，使头发部位保持在平板的上方，并用手指拨动头发数次，再盖上皿盖即可。

(4) 手指：可用未洗的手指先在无菌的平板培养基一侧(约一半面积)作划线接种，并在皿底作好标记。然后用肥皂洗手，在冲洗干净后于平板培养基的另一侧作同样的划线接种，盖好皿盖。待培养后比较两边杂菌生长情况。

(5) 口腔：打开无菌平板培养基的皿盖，使口对着平板培养基的表面，以咳嗽或打喷嚏方式接种，然后盖上皿盖。

(6) 弹土法：若要检测土壤微生物，则可用弹土法接种。其要点