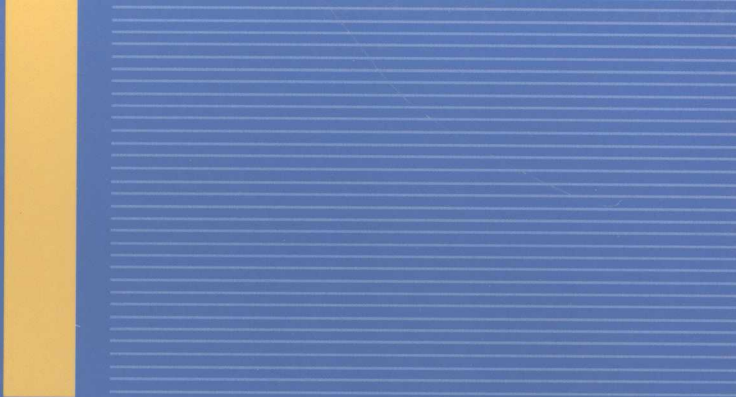




WEISHENGWUXUE
SHIYAN

微生物学实验



刘爱民 ◆ 主编

安徽人民出版社

- ### 要對客肉

WEISHENGWUX
SHIYAN

刘爱民◆主编

端主彰來名

安徽人民出版社

内 容 提 要

本书内容着重在如何反映与微生物相关的实验的先进性、启发性和创新性等方面,加强了综合性、研究性实验,增加了新技术,充实了新内容。全书共 32 个实验,有基础实验、微生物的分离鉴定、生理生化、遗传变异和育种以及免疫学实验技术等。本书适合作为高等院校微生物学、微生物生态学、发酵工程学、食用菌学、食品微生物学、医学微生物学等实验课的教材,也可作为从事与微生物相关工作的有关教师及科研人员的实验参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验 / 刘爱民主编. —合肥:安徽人民出版社,2007. 11

ISBN 978-7-212-03135-0

I. 微… II. 刘… III. 微生物学—实验—高等学校—教材 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 168715 号

微 生 物 学 实 验

刘 爱 民 主 编

出版发行:安徽人民出版社

地 址:合肥市政务文化新区圣泉路 1118 号出版传媒大厦 8 楼

发 行 部:0551-3533258 0551-3533292(传真) 邮编:230071

组 编:安徽师范大学编辑部 电 话:0553-3937079 3883579

经 销:新华书店

印 制:芜湖新欣传媒有限公司

开 本:787 × 960 1/16 印张:10 字数:190 千

版 次:2009 年 8 月第 1 版 2009 年 8 月第 1 次印刷

标准书号:ISBN 978-7-212-03135-0

定 价:16.00 元

本版图书凡印刷、装订错误可及时向承印厂调换

前 言

微生物学实验是生物学重要的基础课之一,随着分子生物学的发展与拓宽,微生物学实验方法与技术显得尤为重要。医学、农学、林学、地质学、太空学等都需要微生物的研究方法与技术。因此,熟悉掌握微生物学方法与技术,对其它很多学科的发展有直接的影响。无菌操作技能和无菌概念的建立是微生物学实验中最重要内容。

1. 微生物学实验主要任务是使学生掌握研究与应用微生物的主要方法与技术,包括经典的、常规的、以及现代的方法与技术;训练学生掌握微生物学最基本的操作技能;使学生具有适应于从事相关学科的基础理论研究与实际生产应用的微生物学实验技能,培养学生观察、思考、分析问题和解决问题的能力;实事求是、严肃认真的科学态度以及勤俭节约、爱护公物的良好作风。

2. 与微生物学基础理论课紧密结合,使学生将理性知识与感性认识有机地结合,将书本知识用于实验,在实验中更深地理解基础理论,提高学生的综合能力与创新意识。

3. 提高学生分析问题和解决问题的能力。根据本学科的特点,逐步使学生认识微生物的基本特性,比较它们与其它生物的相似和不同之处,知道如何研究微生物以及对研究中所出现的问题进行分析,并加以解决。

目 录

前 言	1
-----------	---

第一部分 微生物学基础性实验

实验 1 常用培养基的配制	3
实验 2 高压蒸汽灭菌	10
实验 3 干热灭菌	14
实验 4 微生物的接种技术和培养特征	16
实验 5 细菌的染色技术与形态结构的观察	20
实验 6 放线菌的形态观察	35
实验 7 酵母菌的形态观察及死活细胞的鉴别	38
实验 8 霉菌的形态观察	40
实验 9 微生物大小的测定	43
实验 10 细菌数量的测定	47
实验 11 细菌淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶的定性测定	50
实验 12 糖发酵试验	53
实验 13 IMViC 与硫化氢试验	55
实验 14 菌种保藏	58
实验 15 凝集反应	64

第二部分 综合研究性实验

实验 16 从土壤中分离和纯化微生物	71
实验 17 从自然环境中分离和纯化噬菌体	75
实验 18 噬菌体的效价测定	78
实验 19 大肠杆菌生长曲线的测定	80
实验 20 抗药性突变株的分离	82
实验 21 抗生素的效价测定	84

实验 22	水中细菌总数的测定	87
实验 23	多管发酵法测定水中大肠菌群	91
实验 24	酸乳的制作及乳酸菌的分离	96
实验 25	酒精发酵及糯米甜酒的酿制	101
实验 26	酚降解菌的分离及其性能的测定	103
实验 27	表面活性剂降解菌的分离	106
实验 28	丛枝菌根生态调查方法	109
实验 29	微生物在自然界氮素循环中的作用	112
实验 30	微生物的物质转化实验	115
实验 31	小型自控发酵罐的使用和主要生化指标检测	121
实验 32	固体曲糖化酶活力的测定	126
附录 I	微生物学实验室常用的器皿	128
附录 II		134
一、染色液的配制		134
二、常用培养基的配方		137
三、试剂和溶液的配制		147
附录 III	微生物学实验理论测试题	151
参考文献		153

第一部分 微生物学基础性实验

基础性实验包括了微生物学实验的基本操作和技能训练,是微生物学这门课程中最基本的、最代表学科特点的实验方法和技术,通过本部分实验使学生掌握微生物学科的基本知识与基本技能,为综合性实验奠定基础。

Journal of Management Inquiry 16(4) 409–427

实验1 常用培养基的配制

培养基(culture medium)是人工配制的适合微生物生长繁殖或积累代谢产物的营养基质,用以培养、分离、鉴定、保存各种微生物或积累代谢产物。在自然界中,微生物种类繁多,营养类型多样,加之实验和研究目的不同,所以培养基的种类很多。

培养基按物理状态可分为液体、固体和半固体培养基。固体培养基是指在液体培养基中加入一定量的凝固剂(常加1.5%~2.0%的琼脂)经融化冷凝而成,用作凝固剂的物质有琼脂、明胶、硅胶等,以琼脂最为常用。固体培养基在实际中用得十分广泛,在实验室中,它被用作微生物的分离、鉴定、检验杂菌、计数、保藏、生物测定等。半固体培养基是指在液体培养基中加入0.8%~1.0%左右的琼脂,经融化冷凝而成,这种培养基可用来观察微生物的运动能力或保藏菌种。液体培养基是指培养基中不加凝固剂琼脂,培养基呈液体状,没有明显的固形物。液体培养基营养成分分布均匀,易于控制微生物的生长代谢状态。

培养基按组成成分可分为天然、合成和半合成培养基。天然培养基是指利用动物、植物、微生物或其他天然有机成分配制而成的培养基,如实验室常用的肉汁或麦芽汁培养基。用作这种培养基的主要原料有:牛肉膏、麦芽汁、蛋白胨、酵母膏、玉米粉、麸皮、各种饼粉、马铃薯、牛奶、血清等,其优点是营养丰富、价格便宜,缺点是成分不能准确确定且不稳定。合成培养基是指完全利用已知种类和成分的化学试剂配制而成的培养基,如实验室常用的高氏I号培养基。优点是各成分均为已知且含量稳定,缺点是价格较贵,而微生物又生长缓慢,所以它只适用于做一些科学研究,例如营养、代谢的研究。半合成培养基是指由天然有机成分和已知化学试剂混合组成的培养基,如实验室常用的马铃薯葡萄糖培养基。

根据培养基的用途来区分,可分为选择培养基、增殖培养基、鉴别培养基等。选择培养基是在培养基中加入某种物质以杀死或抑制不需要的菌种生长的培养基,称为选择培养基。如链霉素、氯霉素等抑制原核微生物的生长,制霉菌素、灰黄霉素等能抑制真核微生物的生长,结晶紫能抑制革兰氏阳性细菌的生长等。在自然界中,不同种的微生物常生活在一起,为了分离我们所需要的微生物,在普通培养基中加入一些某种微生物特别喜欢的营养物质,以增加这种微生物的繁殖速度,逐渐淘汰其它微生物,这种培养基称为增殖培养基,常用于菌种筛选和选择增菌中。在某种程度上讲,增殖培养基也是一种选择培养基。鉴别培养基是在培养基中加入某种试剂或化学药品,使难以区分的微生物经培养后呈现出明显差别,因

而有助于快速鉴别某种微生物,这样的培养基称为鉴别培养基。例如用以检查饮水和乳品中是否含有肠道致病菌的伊红美蓝培养基就是一种常用的鉴别性培养基。有些培养基是具有选择和鉴别双重作用,如食品检验中常用的麦康凯培养基是一例,含有胆盐、乳糖和中性红。胆盐具有抑制肠道菌以外的细菌的作用(选择性),乳糖和中性红(指示剂)能帮助区别乳糖发酵肠道菌(如大肠杆菌)和不能发酵乳糖的肠道致病菌(如沙门氏菌和志贺氏菌)。

另外,根据培养基的营养成分是否“完全”,可以分为基本培养基、完全培养基和补充培养基,这类术语主要是用在微生物遗传学中。根据培养基用于生产目的来区分,可以分为种子培养基和发酵培养基。还有专门用于培养病毒等寄生微生物的活组织培养基,如鸡胚等;专门用于培养自养微生物的无机盐培养基等。

但是,不同种类的培养基中,一般应含有水分、碳源、氮源、能源、无机盐、生长因素等。不同微生物对 pH 要求不一样,霉菌和酵母的培养基的 pH 一般是偏酸性的,而细菌和放线菌的培养基的 pH 一般为中性或微碱性的(嗜碱细菌和嗜酸细菌例外)。所以配制培养基时,都要根据不同微生物的要求将培养基的 pH 调到合适的范围。

此外,由于配制培养基的各类营养物质和容器等含有各种微生物,因此,已配制好的培养基必须立即灭菌,否则就会杂菌丛生;如果来不及灭菌,应暂存冰箱内,以防止其中的微生物生长繁殖而消耗养分和改变培养基的酸碱度带来不利的影响。

本次实验主要配制牛肉膏蛋白胨培养基、高氏 I 号培养基、PDA 培养基,并将配制好的培养基进行高压蒸汽灭菌。

【目的要求】

(1)明确培养基的配制原理。

(2)通过对基础培养基的配制,掌握配制细菌、放线菌、霉菌和酵母菌培养基的一般方法和步骤。

【基本原理】

正确掌握培养基配制方法是从事微生物学实验工作的重要基础。虽然培养微生物的培养基的种类很多,它们的配方及配制方法各有差异,但一般培养基的配制程序却大致相同。

【实验材料】

1. 溶液或试剂

牛肉膏, 蛋白胨, NaCl, 可溶性淀粉, KNO_3 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 琼脂, 1 mol/L NaOH, 1 mol/L HCl。

2. 仪器或其他用具

试管, 三角瓶, 烧杯, 量筒, 玻棒, 培养基分装器, 天平, 牛角匙, 高压蒸汽灭菌锅, pH 试纸 (pH5.5 ~ 9.0), 棉花, 牛皮纸, 记号笔, 皮筋, 纱布等。

【实验步骤】

一、牛肉膏蛋白胨培养基的配制

牛肉膏蛋白胨培养基是一种应用最广泛和最普通的细菌基础培养基, 又称为普通培养基。由于这种培养基中含有一般细菌生长繁殖所需要的最基本的营养物质, 可供作微生物生长繁殖之用。基础培养基含有牛肉膏、蛋白胨和 NaCl。其中牛肉膏为微生物提供碳源、能源、磷酸盐和维生素, 蛋白胨主要提供氮源和维生素, 而 NaCl 提供无机盐。在配制固体培养基时还要加入一定量琼脂作凝固剂, 琼脂没有什么营养价值, 又称洋菜, 是用某些红藻 (石花菜) 制成的, 主要成分为硫酸半乳糖, 通常不被微生物分解利用, 在常用浓度下 96℃ 时溶化, 实际应用时, 一般在沸水浴中或下面垫以石棉网煮沸溶化, 以免琼脂在常用浓度下 40℃ 时凝固。固体培养基中琼脂的含量根据琼脂的质量和气温的不同而有所不同。由于这种培养基多用于培养细菌, 因此要用稀酸或稀碱将其 pH 调至中性或微碱性, 以利于细菌的生长繁殖。

1. 培养基的配方 (见附录 2)

2. 配 制

(1) 称 量

按培养基配方比例依次准确地称取牛肉膏、蛋白胨、NaCl 放入烧杯中。牛肉膏常用玻棒挑取, 放在小烧杯或表面皿中称量, 用热水溶化后倒入烧杯。也可放在称量纸上, 称量后直接放入水中, 这时如稍微加热, 牛肉膏便会与称量纸分离, 然后立即取出纸片。

蛋白胨很易吸湿, 在称取时动作要迅速。另外, 称药品时严防药品混杂, 一把牛角匙用于一种药品, 或称取一种药品后, 洗净、擦干, 再称取另一药品。瓶盖也不要盖错。

(2) 溶 化

在上述烧杯中先加入少于所需要的水量, 用玻棒搅匀, 然后, 在石棉网上加热使其溶解, 或在磁力搅拌器上加热溶解。将药品完全溶解后, 补充水到所需的总体积, 如果配制固体培养基时, 将称好的琼脂放入已溶的药品中, 再加热溶化, 最后补足所损失的水分。在制备用三角瓶盛固体培养基时, 一般也可先将一定量的液体培养基分装于三角瓶中, 然后按 1.5% ~ 2.0% 的量将琼脂直接分别加入各三角瓶中, 不必加热溶化, 而是灭菌和加热溶化同步进行。在琼脂溶化过程中, 应

控制火力,以免培养基因沸腾而溢出容器。同时,需不断搅拌,以防琼脂糊底烧焦。配制培养基时,不可用铜或铁锅加热溶化,以免离子进入培养基中,影响细菌生长。

(3) 调 pH

在未调 pH 前,先用精密 pH 试纸测量培养基的原始 pH,如果偏酸,用滴管向培养基中逐滴加入 1mol/L NaOH,边加边搅拌,并随时用 pH 试纸测其 pH,直到 pH 达 7.6。反之,用 1mol/L HCl 进行调节。对于有些要求 pH 较精确的微生物,其 pH 的调节可用酸度计进行。pH 不要调过头,以避免回调而影响培养基内各离子的浓度。配制过碱或过酸 pH 的琼脂培养基时,若预先调好 pH 并在高压蒸汽下灭菌,则琼脂因水解不能凝固。因此,应将培养基的成分和琼脂分开灭菌后再混合,或在中性 pH 条件下灭菌,再调整 pH。

(4) 过 滤

趁热用滤纸或多层纱布过滤,以利某些实验结果的观察。一般无特殊要求的情况下,这一步可以省去(本实验勿需过滤)。

(5) 分 装

按实验要求,可将配制的培养基分装入试管内或三角烧瓶内。

① 液体分装 分装高度以试管高度的 1/4 左右为宜。分装三角瓶的量则根据需要而定,一般以不超过三角瓶容积的一半为宜,如果是用于振荡培养用,则根据通气量的要求酌情减少;有的液体培养基在灭菌后,需要补加一定量的其他无菌成分,如抗生素等,则装量一定要准确。

② 固体分装 分装试管其装量不超过管高的 1/5,灭菌后制成斜面。分装三角烧瓶的量以不超过三角烧瓶容积的一半为宜。

③ 半固体分装 一般以试管高度的 1/3 为宜,灭菌后垂直待凝。分装过程中,注意不要使培养基沾在管(瓶)口上,以免沾污棉塞而引起污染。



图 1-1 培养基分装

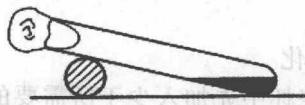


图 1-2 摆斜面

(6) 加 塞

培养基分装完毕后,在试管口或三角烧瓶口上塞上棉塞(或泡沫塑料塞或试管帽等),以阻止外界微生物进入培养基内而造成污染,并保证有良好的通气性能。

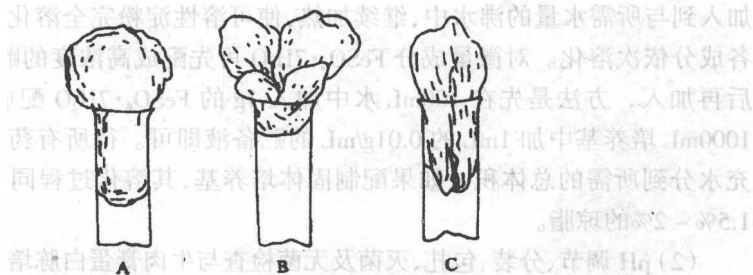


图 1-3 棉塞(A 正确,B、C 不正确)

(7) 包 扎

加塞后,将全部试管每 10 支用皮筋捆好,再在棉塞外包一层牛皮纸,以防止灭菌时冷凝水润湿棉塞,其外再用皮筋扎好。用记号笔注明培养基名称、组别、配制日期。三角烧瓶加塞后,外包牛皮纸,用皮筋扎好,同样用记号笔注明培养基名称、组别、配制日期(有条件的实验室,可用市售的铝箔代替牛皮纸,省去外扎,而且效果好)。

(8) 灭 菌

将上述培养基以 0.1MPa, 121℃, 20min 高压蒸汽灭菌。

(9) 搁置斜面

将灭过菌的试管培养基冷至 50℃左右(以防斜面上冷凝水太多),将试管口端搁在玻棒或其他合适高度的器具上,搁置在斜面长度以不超过试管总长的一半为宜。

(10) 无菌检查

将灭菌培养基放入 37℃的温室中培养 24~48h,以检查灭菌是否彻底。

二、高氏 I 号培养基的制备

高氏 I 号培养基是用来培养和观察放线菌形态特征的合成培养基。如果加入适量的抗菌药物(如各种抗生素、酚等),则可用来分离各种放线菌。此合成培养基的主要特点是含有多种化学成分已知的无机盐,这些无机盐可能相互作用而产生沉淀。如高氏 I 号培养基中的磷酸盐和镁盐相互混合时易产生沉淀,因此,在混合培养基成分时,一般是按配方的顺序依次溶解各成分,甚至有时还需要将二种或多种成分分别灭菌,使用时再按比例混合。此外,合成培养基有的还要补加微量元素,如高氏 I 号培养基中的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的量只有 0.001%,因此在配制培养基时需预先配成高浓度 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 贮备液,然后再按需加入一定的量到培养基中。

1. 高氏 I 号培养基配方(见附录 2)

2. 配 制

(1) 称量和溶化

按配方先称取可溶性淀粉放入小烧杯中,并用少量冷水将淀粉调成糊状,再

加入到与所需水量的沸水中,继续加热,使可溶性淀粉完全溶化,然后再称取其他各成分依次溶化。对微量成分 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 可先配成高浓度的贮备液按比例换算后再加入,方法是先在 100mL 水中加入 1g 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 配成 0.01g/mL, 再在 1000mL 培养基中加 1mL 的 0.01g/mL 的贮备液即可。待所有药品完全溶解后,补充水分到所需的总体积。如果配制固体培养基,其溶化过程同前一实验,并添加 1.5%~2% 的琼脂。

(2) pH 调节、分装、包扎、灭菌及无菌检查与牛肉膏蛋白胨培养基的配制相同。

三、PDA 培养基的制备

1. PDA 培养基配方(见附录 2)

2. 配 制

(1) 称量和溶化

称取所需去皮马铃薯(出芽的马铃薯不能用),切成小块,加水煮沸 20min,用 4~6 层纱布过滤,配制成 20% 马铃薯浸汁。加入所需的葡萄糖,加热煮沸后再加入 1.5%~2.0% 的琼脂,继续加热溶化并补足失水。

(2) 分装、加塞、包扎、灭菌、无菌检查与前两个培养基配制相同。

(3) 链霉素的加入

可先将链霉素配成 1% 的溶液(配好的链霉素溶液保存于 -20°C),在 100mL 培养基中加入 1% 链霉素液 0.3mL,使每毫升培养基中含链霉素 $30\mu\text{g}$ 。由于链霉素受热容易分解,所以临用时,将培养基溶化后待温度降至 $45\sim 50^\circ\text{C}$ 时才能加入。

【实验报告】

(1) 记录你所配制培养基的名称及成分。

(2) 分析你所配制培养基的碳源、氮源、能源、无机盐及维生素的来源。

棉塞的制作

棉塞的作用有二:一是防止杂菌污染,二是保证通气良好。因此棉塞质量的优劣对实验的结果有很大的影响。正确的棉塞要求形状、大小、松紧与试管口(或三角烧瓶口)完全适合,过紧则妨碍空气流通,操作不便;过松则达不到滤菌的目的。加塞时,应使棉塞长度的 $1/3$ 留在管口外, $2/3$ 在试管口内。做棉塞的棉花要选纤维较长的,一般不用脱脂棉做棉塞,因为它容易吸水变湿,造成污染,而且价格也贵。此外,在微生物实验和科研中,往往要用到通气塞。所谓通气塞,就是几层纱布(一般 8 层)相互重叠而成,或是在两层纱布间均匀铺一层棉花而成,这种通气塞通常加在装有液体培养基的三角烧瓶口上。经接种后,放在摇床上进行振荡培养,以获得良好的通气促使菌体的生长或发酵。

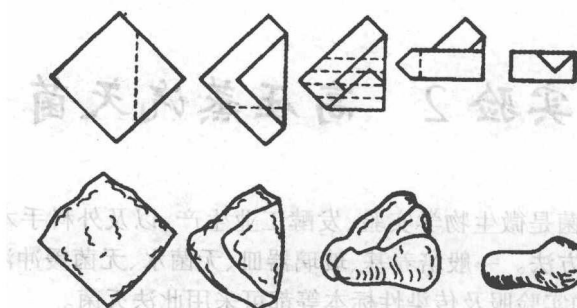


图 1-4 棉塞的做法

【思考题】

1. 培养基配好后,为什么必须立即灭菌?如何检查灭菌后的培养基是无菌的?
2. 在配制培养基的操作过程中应注意些什么问题?为什么?
3. 配制合成培养基加入微量元素时最好用什么方法加入?天然培养基为什么不需要另加微量元素?
4. 有人认为自然环境中微生物是生长在不按比例基质中,为什么在配制培养基时要注意各种营养成分的比例?
5. 你配制的高氏 I 号培养基有沉淀产生吗?说明产生或未产生的原因。
6. 细菌能在高氏 I 号培养基上生长吗?为了分离放线菌,你认为应该采取什么措施?
7. 现有培养基成分如下:
葡萄糖 10g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.2g, NaCl 0.2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, K_2SO_4 0.2g, $CaCO_3$ 5g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000mL, pH 7.2~7.4。
①分析各营养成分的作用。
②根据培养成分来源和物理状态,此培养基属何种类型培养基?

实验 2 高压蒸汽灭菌

高压蒸汽灭菌是微生物学实验、发酵工业生产,以及外科手术器械等方面最常用的一种灭菌方法。一般培养基、玻璃器皿、无菌水、无菌缓冲液、金属用具、橡皮物品、接种室的实验服及传染性标本等都可采用此法灭菌。

【目的要求】

- (1)了解高压蒸汽灭菌的基本原理及应用范围。
- (2)学习高压蒸汽灭菌的操作方法。

【基本原理】

高压蒸汽灭菌是将待灭菌的物品放在一个密闭的加压灭菌锅内,通过加热,使灭菌锅隔套间的水沸腾而产生蒸汽。待水蒸汽急剧地将锅内的冷空气从排气阀中驱尽,然后关闭气阀,继续加热,此时由于蒸汽不能溢出,而增加了灭菌器内的压力,从而使沸点增高,得到高于 100°C 的温度,致使菌体蛋白质凝固变性达到灭菌的目的。在同一温度下,湿热的杀菌效力比干热大。其原因有三:一是湿热中细菌菌体吸收水分,蛋白质较易凝固,因蛋白质含水量增加,所需凝固温度降低(见表 2-1),二是湿热穿透力比干热大(表 2-2),三是湿热的蒸汽有潜热存在。 1g 水在 100°C 时,由气态变为液态时可放出 2.26kJ (千焦)的热量。这种潜热,能迅速提高被灭菌物体的温度,从而增加灭菌效力。

表 2-1 蛋白质含水量与凝固所需温度的关系

卵白蛋白含水量 /%	30min 内凝固所需温度 / $^{\circ}\text{C}$
50	56
25	74 ~ 80
18	80 ~ 90
6	145
0	160 ~ 170

表 2-2 干热湿热穿透力及灭菌效果比较

温度 / $^{\circ}\text{C}$	时间 /h	透过布层的温度 / $^{\circ}\text{C}$			灭菌
		20 层	10 层	100 层	
干热 130 ~ 140	4	86	72	70.5	不完全
湿度 105.3	3	101	101	101	完全

在使用高压蒸汽灭菌锅灭菌时,灭菌锅内冷空气的排除是否完全极为重要,因为空气的膨胀压大于水蒸汽的膨胀压,所以,当水蒸汽中含有空气时,在同一压力下,含空气蒸汽的温度低于饱和蒸汽的温度。灭菌锅内留有不同分量空气时,压力与温度的关系见表 2-3。

表 2-3 灭菌锅留有不同分量空气时,压力与温度的关系

MPa	压力数		全部空气 排出时的 温度 /℃	2/3 空气 排出时的 温度 /℃	1/2 空气 排出时的 温度 /℃	1/3 空气 排出时的 温度 /℃	空气排出 时的温度 /℃
	kg/cm ²	lb/in ²					
0.03	0.35	5	108.8	100	94	90	72
0.07	0.70	10	115.6	109	105	100	90
0.10	1.05	15	121.3	115	112	109	100
0.14	1.40	20	126.2	121	118	115	109
0.17	1.75	25	130.0	126	124	121	115
0.21	2.10	30	134.6	130	128	126	121

现在法定压力单位已不用磅和 kg/cm² 表示,而是用 Pa 或 bar 表示,其换算关系为:

$$1 \text{ kg/m}^2 = 98.066.5 \text{ Pa}; 1 \text{ lb/in}^2 = 6894.76 \text{ Pa}$$

一般培养基用 0.1 MPa(相当于 15 lb/in² 或 1.05kg/cm²), 121.3℃, 15 ~ 30min 可达到彻底灭菌的目的。灭菌及维持的时间随灭菌物品的性质和容量等具体情况而有所改变。例如含糖培养基用 0.06MPa(8 lb/in² 或 0.59kg/cm²) 112.6℃ 灭菌 15min, 但为了保证效果,可将其他成分先行 121.3℃, 20min 灭菌,然后以无菌操作手续加入灭菌的糖溶液。

灭菌时的过高温度的常对培养基造成不良影响:(1)出现混浊、沉淀,天然培养基成分加热沉淀出大分子多肽聚合物,培养基中 Ca、Mg、Fe、Zn、Cu、Sb 等阳性离子与培养基中的可溶性磷酸盐共热沉淀;(2)营养成分破坏或改变,酸度较高时淀粉、蔗糖、乳糖或琼脂灭菌过程中不易水解,pH7.5、0.1MPa 灭菌 20min,葡萄糖破坏 20%,麦芽糖破坏 50%,若培养基中有磷酸盐共存,葡萄糖转变成酮糖类物质,培养液由淡黄变为红褐色,破坏更为严重;(3)pH7.2 时培养基中的葡萄糖、蛋白质、磷酸盐在 0.1MPa 灭菌 15min 以上可产生对微生物生长的某种抑制物;(4)高压蒸汽灭菌后培养基 pH 下降 0.2~0.3;(5)高压蒸汽灭菌过程会增加冷凝水,降低培养基成分浓度。

实验中常用的非自控高压蒸汽灭菌锅有卧式和手提式二种。其结构和工作原理相同,见图 2-1,本实验以手提式高压蒸汽灭菌锅为例,介绍其使用方法。

【实验材料】

牛肉膏蛋白胨培养基,培养皿(9 套一包),手提式高压蒸汽灭菌锅等。