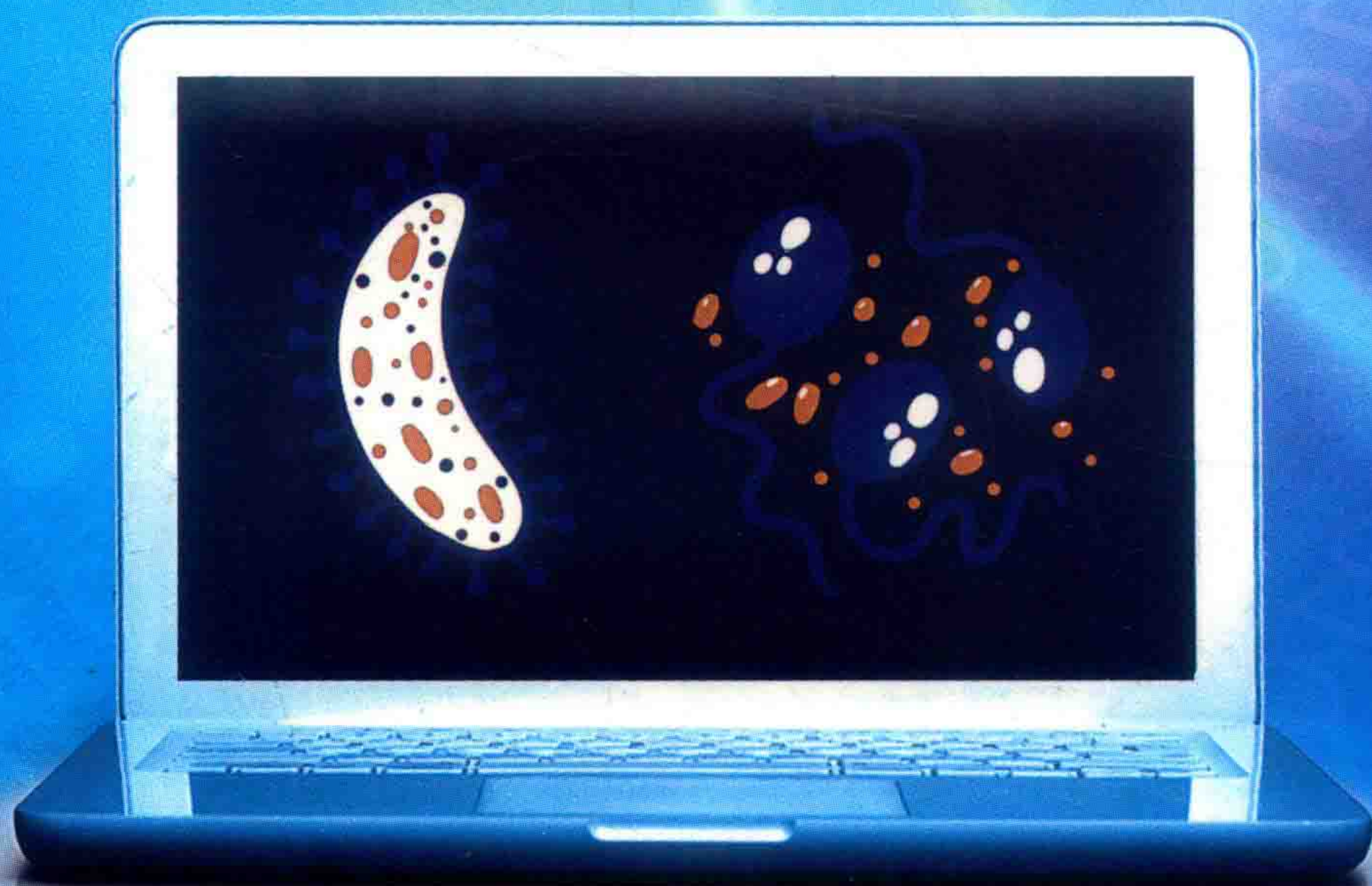


高等院校生物技术和生物工程专业“十三五”规划教材

现代工科

微生物学实验教程

主编 谢晖



西安交通大学出版社
XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY PRESS

国家一级出版社
全国百佳图书出版单位

高等院校生物技术和生物工程专业“十三五”规划教材

现代工科 微生物学实验教程

主 编 谢 晖

副主编 梁继民 陈雪利 詹勇华
应琼琼 徐欣怡

编 者 (按姓氏笔画为序)

朱守平 李 军 沈晓敏
陈 丹 陈多芳 赵 恒
秦 伟 曾 琦 曾 鋆



西安交通大学出版社
XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY PRESS

国家一级出版社
全国百佳图书出版单位

图书在版编目(CIP)数据

现代工科微生物学实验教程/谢晖主编. —西安:西安交通大学出版社,2019.8

ISBN 978-7-5693-1161-7

I. ①现… II. ①谢… III. ①微生物学-实验-高等学校-教材
IV. ①Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2019)第 090129 号

书 名 现代工科微生物学实验教程
主 编 谢 晖
责任编辑 杨 花

出版发行 西安交通大学出版社
(西安市兴庆南路1号 邮政编码 710048)
网 址 <http://www.xjtupress.com>
电 话 (029)82668357 82667874(发行中心)
(029)82668315(总编办)
传 真 (029)82668280
印 刷 西安日报社印务中心

开 本 787mm×1092mm 1/16 印张 20.625 字数 419千字
版次印次 2019年8月第1版 2019年8月第1次印刷
书 号 ISBN 978-7-5693-1161-7
定 价 62.00元

读者购书、书店添货,如发现印装质量问题,请与本社发行中心联系、调换。
订购热线:(029)82665248 (029)82665249
投稿热线:(029)82668803 (029)82668804
读者信箱:med_xjup@163.com

版权所有 侵权必究

前 言

在我国工科高校高等教育面临的新形势下，生命科学基础课在工科院校的实践教学活动中，具有作用重要、受益面广和影响深远等特点，更是理工学科产生交叉创新的源泉。作者将多年来从事微生物学教学和有关实验工作中的一些心得和资料积累加以精选，旨在通过较少的篇幅提供较全面和丰富的实践应用技术，内容尽可能涵盖微生物学实验应用的主要工科领域，以适应工科院校微生物类专业实验课程。

根据现阶段生命科学和微生物学的进展，本教程内容不但加入大量实际工作岗位所需的实用性微生物实验技术，以及大量微生物工程应用内容，更注重微生物学中解决实际问题的计算与推导过程，并加入大量高等数学、生物统计学、数据库应用、生物信息学及虚拟仿真实验项目等现代工科微生物学实验内容。本教程尽量贴近学科前沿，以便更好地调动工科学生学习微生物学实验技术的兴趣，真正做到学科交叉、学以致用。

全书站在工科应用实践角度，以阐明微生物的五大重要规律（即结构功能、代谢产能、生长繁殖、遗传变异和系统进化）为主线，主要内容共分五章，四十三个实验，部分实验中还嵌套有拓展性、选择性、自主性综合实验。本书分别从基本实验技能、微生物检测鉴定、微生物工程应用及微生物生物信息学四个方面，介绍了各类微生物领域和学科交叉领域的实用实验技术，突出工科应用特色、学科交叉特色、学科的重点及难点，并努力联系工程实际应用。

本书宜作为工科高校及综合性大学微生物学实验课程的教材，建议将本课程安排在生物化学实验、细胞生物学实验、分子生物学实验课程后，不限制学时；同时也希望各校在选用时视具体情况加以取舍。对若干描述性及可能发生重复的实验内容，应放手让学生自主开展各类综合实验、自行整理实验报告，努力向教育信息化新形势下教学 2.0、3.0 的新目标不断靠拢。

本书主体内容由主编撰写完成，尽量做到前后思路统一、内容不重复、格式一致，但因时间仓促，加之作者水平有限、经验不足，书中难免存在不足之处，敬请读者予以批评指正。感谢所有参编老师及西安电子科技大学 2017 年度、2018 年度校级精品课程教材项目及生命科学技术学院学科经费项目的支持，以及陕西省自然科学基金（2019JQ-201）的支持。

谢 晖

2019 年 3 月 8 日

目 录

第一章 微生物实验基础	(1)
第二章 微生物学基本实验技术	(5)
实验一 微生物实验前准备及经典培养基的制备	(5)
实验二 无菌操作技术	(10)
实验三 实验室环境和人体表面的微生物检查	(13)
实验四 微生物的消毒灭菌	(16)
实验五 微生物的常用培养技术	(23)
实验六 细菌的形态结构观察及常见显微技术	(31)
实验七 细菌的经典染色观察技术	(35)
实验八 细菌的常用生理生化反应	(40)
实验九 细菌的药敏及耐药性检测	(44)
实验十 微生物相关动物实验	(53)
实验十一 L型细菌的培养	(61)
第三章 微生物的鉴定技术	(63)
实验一 常见球菌检测技术	(65)
实验二 常见杆菌检测技术	(75)
实验三 螺旋体及螺旋菌属检验	(102)
实验四 厌氧菌检验	(112)
实验五 支原体、衣原体与立克次体检验	(121)
实验六 细菌的数字编码鉴定和自动化检测技术	(124)
实验七 病原菌的分子生物学检测和其他检测技术	(128)
实验八 病原性真菌检验	(132)
实验九 病毒的培养和形态学检查	(136)
实验十 病毒的血凝试验与血凝抑制试验	(142)
实验十一 病毒的免疫学检测和分子生物学检测技术	(145)
第四章 微生物发酵工业的现代工科微生物学应用	(150)
实验一 菌株的筛选	(151)
实验二 放线菌的筛选	(153)
实验三 菌株的诱变育种	(157)
实验四 正突变菌株的筛选	(159)
实验五 高产菌株复筛	(161)
实验六 高产生产菌株的稳定性	(163)

实验七	酶活力测定	(165)
实验八	正交设计法	(172)
实验九	一次回归正交实验设计	(174)
实验十	发酵过程	(179)
实验十一	生物发酵罐的操作实验	(181)
实验十二	流加培养酵母菌及其动力学参数的检测	(182)
实验十三	$k_L a$ 的测定方法 (亚硫酸钠氧化法)	(186)
第五章	微生物生物信息学实验技术	(188)
实验一	核酸序列的检索	(189)
实验二	核酸序列分析	(190)
实验三	PCR 引物设计及评价	(194)
实验四	微生物基因家族的多序列比对分析	(204)
实验五	微生物基因家族的分子进化分析	(206)
实验六	多重序列比对及系统发生树的构建	(212)
实验七	微生物蛋白的结构分析	(222)
实验八	生物信息学数据库和软件的搜索	(224)
创新导读	新工科背景下微生物实验研究前沿进展	(226)
附 录		(240)
附录一	常用培养基的制备和用途	(240)
附录二	常用染色液和试剂的配制	(261)
附录三	药敏试验结果解释标准	(265)
附录四	BIOF-2010 型发酵罐系统概述	(276)
附录五	常用微生物学仪器设备使用操作规范	(295)
附录六	医疗及质检机构国标微生物检查方法概述	(307)
参考文献		(322)

第一章 微生物实验基础

一、微生物生物安全防护

微生物生产研究相关工作人员长期接触有潜在传染性的血液、粪便、体液等标本，这些标本往往是各种细菌、病毒等病原微生物的传播载体。无论是实验人员感染，还是造成实验室和周围环境的污染，都将导致严重的后果。因此微生物实验室工作人员在实验过程中必须高度重视实验室生物安全防护，强化生物安全意识，熟悉生物安全防护有关知识，严格无菌操作。

1. 微生物的分类等级

根据世界卫生组织（WHO）出版的《实验室生物安全手册》，将微生物分为四个不同危险度等级：危险度 1 级指不能引起人或动物致病的微生物，此类微生物无或仅具有极低的个体和群体危险；危险度 2 级的病原体具有中度个体危险、低度群体危险，能引起人或动物致病，但对实验室工作人员、社区、家畜或环境不易导致严重危害，对所引起的感染具有有效的预防和治疗措施，并且疾病传播的危险有限；危险度 3 级的病原体具有高度个体危险、低度群体危险，通常能引起人或动物的严重疾病，但一般不会发生感染的播散，并对所引起的感染具有有效的预防和治疗措施；危险度 4 级的病原体具有高度的个体危险和群体危险，通常能引起人或动物的严重疾病，并且很容易发生个体之间的直接或间接传播，对所引起的感染一般没有有效的预防和治疗措施。

基于以上划分标准，结合微生物的致病性、传播方式、目前所具有的预防和治疗措施等因素，我国卫生部于 2006 年制订了《人间传染的病原微生物名录》，对各种病原微生物的危害程度及其相关实验活动需要达到的生物安全实验室级别做了详细分类，各实验室进行有关实验均须参照此标准。

2. 生物安全实验室分级与要求

由于各种病原微生物的危险度等级不同，因此实验室必须达到相应的生物防护等级才能开展有关实验。根据 WHO《实验室生物安全手册》和我国卫生部 2002 年颁布的《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》，实验室从生物安全防护的角度共分为四级：一级生物安全防护实验室（BSL-1）为实验室结构设施、安全操作规程、安全设备适用于危险度 1 级的微生物，依据标准操作程序可进行开放性操作，如用于教学的普通微生物实验室即属此类。二级生物安全防护实验室（BSL-2）适用于对人或环境具有中等潜在危害的微生物，即危险度 2 级的病原体，该级别实验室应具备生物安全柜和密封的离心管，以免发生泄漏和产生气溶胶。三级生物安全防护实验室（BSL-3）适用于有明显危害、可以通过空气传播的病原微生物（如结核杆菌、伯氏立克次体等），通常已有预防传染的疫苗，该级别实验室除了有严

格的一级和二级安全设施要求外，还须具备合适的空气净化系统。四级生物安全防护实验室（BSL-4）适用于对人体具有高度的危险性、通过气溶胶途径传播或传播途径不明、目前尚无有效的疫苗或治疗方法的致病微生物及其毒素。BSL-4 实验室必须与其他实验室隔离，并具备特殊的空气和废物处理系统，实验操作须在Ⅲ级生物安全柜内或全身穿戴特制的正压防护服。

根据以上定义，医院内的临床实验室因接触可能含有致病微生物的标本，通常应达到二级生物安全防护实验室要求。根据《实验室生物安全认可准则》，二级生物安全实验室结构设施须符合以下几点。

(1) 实验室须具有防止节肢动物和啮齿动物进入的设计，有可开启的窗户，有纱窗，实验室门有可视窗带锁并能自动关闭。

(2) 每个实验室均应设置洗手池，宜设置在靠近出口处。

(3) 实验室工作区域外有足够的存储空间及摆放个人衣物的设施。

(4) 实验室内墙壁、地面应平整、防滑、易于清洁，不适宜用地毯。

(5) 实验台面应能防水、耐腐蚀、耐热。

(6) 实验室内应保证工作照明，避免反光和强光。

(7) 在实验室内应穿戴隔离衣、帽、手套，必要时戴防护眼镜。实验室应备有生物安全柜。

(8) 有适当的消毒设施，如高压蒸汽灭菌器，并设置洗眼装置、应急喷淋装置、急救药箱、灭火器等。

(9) 有可靠的电力供应和应急照明。

(10) 在实验室出口处设有在黑暗中可明确辨认方向、通道的标识。

(11) 在实验室入口处和装有传染性物质的设备表面贴有生物危险标志。

3. 实验室生物安全管理制度

对于临床实验室而言，实验室生物安全管理制度建设是生物安全防护的核心，实验室生物安全管理制度应包括：实验室准入制度、生物安全培训制度、生物安全责任制度和责任追究制度、生物防护与安全制度、安全检查制度、个人防护制度、实验室管理制度、清洁消毒制度、安全计划审核制度、废弃物处理制度、事故报告制度、生物安全防护应急预案、标准操作程序等。

建立健全各项生物安全制度外，还应成立生物安全管理领导小组，加强生物安全制度实施情况的监督管理，实验室入口处须粘贴生物安全标志，注明危险因素、生物安全级别、负责人姓名和电话、进入实验室的特殊要求及离开程序，禁止非工作人员进入实验室，如需参观实验室等特殊行为须经实验室负责人的批准后方可进入。

4. 实验室常见生物危险

实验室生物污染的途径包括：空气传播（临床标本中的污染源在空气中传播、微生物气溶胶的吸入）、直接传播（工作中偶然刺伤、割伤，碎玻璃划伤直接感

染)、皮肤黏膜接触(临床标本中的传染源通过破损皮肤黏膜接触造成的感染)、其他不明原因的实验室相关感染。

实验室伤害以及与工作有关的感染主要是由于人为失误、不良实验技术以及仪器使用不当造成的。因此,实验室人员必须提高生物安全意识,认真学习生物安全相关的各种法规和文件,定期进行生物安全防护知识培训,熟悉生物防护有关知识,加强基本技能的培养,严格执行操作规程。实验室管理者应对实验室的风险级别进行分析,尤其对风险级别较高的、接触高危标本概率较大的区域如微生物和分子生物学实验室予以高度重视,保护实验室工作人员和环境的安全。

5. 生物废弃材料的管理

实验室内所有用过的样本、培养物及其他生物性材料等废弃物,严禁未经处理就随意丢弃,应置于贴有生物危害标志的专用废弃物处理容器内,注意容器的充满量不能超过其设计容量,利器(如针头、小刀、玻璃等)应置于耐扎锐器盒内,在去污染或最终处置前应存放在指定的安全地方,经过高压灭菌或其他无害化处理后再安全运出实验室;有害气体、气溶胶、污水、废液等均须经无害化处理后排放;动物尸体、组织的处置和焚化应符合国家相关要求。处理危险废弃物的人员须经过专业培训,并使用适当的防护设备。

二、微生物学实验室安全

1. 微生物学实验室规则

由于微生物学实验是以病原微生物为研究对象,在实验过程中任何疏忽大意都有可能引起实验人员的自身感染或实验室和周围环境的污染。因此,实验中应严格遵守实验规则,建立无菌观念,严格无菌操作,防止实验过程中出现意外情况,并确保实验结果的准确。

(1) 实验前须预习实验内容,了解实验目的、方法和注意事项,做到心中有数,避免发生错误,提高实验效率。

(2) 进入实验室必须穿工作服,必要时还须戴口罩、帽子和手套,并做好实验前的各项准备工作。

(3) 非必需物品禁止带入实验室,带入实验室的物品应远离操作区,放在指定的区域。

(4) 实验室内不准大声喧哗、嬉戏,应保持实验室的安静、整洁和有序。不准在实验室内吸烟、饮水和进食,尽量避免用手触摸头、面部,防止感染,尽量减少室内活动,以免引起风动。

(5) 实验中注意节约试剂,爱护仪器,避免有菌材料的污染,如有传染性材料污染桌面、地面、手、衣服或发生其他意外情况,应立即报告老师及时做适当处理。

(6) 用过的污染物品应放到指定的地点,经专人消毒灭菌之后再行清洗,切勿乱丢或冲入水池中。禁止将本实验室的物品带出实验室外。需送恒温箱培养的物

品，应标记清楚后送到指定地点。

(7) 实验完毕后应将桌面整理清洁，试剂、仪器放回原处，并用浸有消毒液的抹布将操作台擦拭干净，打扫卫生，关好水、电、门窗。

(8) 离室前脱下工作服，反折放在指定的地方；双手在 2% 来苏尔中浸泡 5 分钟左右，再用肥皂、清水洗净，方可离开实验室。

2. 实验室意外的紧急处理方法

(1) 发生皮肤破损或刺伤：首先用肥皂和水冲洗伤口，尽量挤出损伤处的血液，并用 70% 乙醇或其他皮肤消毒剂进行消毒，立即进行医疗处理。

(2) 化学药品腐蚀伤：若为强酸，用大量清水冲洗后再以 5% 碳酸氢钠溶液中和；若为强碱，用大量清水冲洗后再以 5% 醋酸或 5% 硼酸溶液中和；若受伤处是眼部，经上述方法处理后，再滴入橄榄油或液体石蜡 1~2 滴。

(3) 烧伤：局部涂凡士林、5% 鞣酸或 2% 苦味酸。

(4) 菌液误入口中：立即将菌液吐入消毒容器中，再用 1 : 1000 高锰酸钾或 3% 过氧化氢漱口，根据菌种服用适当抗生素预防感染。

(5) 菌液污染环境：将适量 2%~3% 来苏尔或 0.1% 新洁尔灭浸泡污染面半小时后除去，如手上有菌污染，也可浸泡于上述消毒液中 3~5 分钟，之后用肥皂和清水洗净。



扫码进入虚拟仿真模块

第二章 微生物学基本实验技术

微生物千姿百态，有些是腐败性或致病性的，能够造成食品、布匹、皮革等发霉腐烂，或导致机体患病。有些微生物是有益的，它们可用来生产食物，如奶酪、面包、泡菜、啤酒和葡萄酒；还可用来生产药物，最早是弗莱明从青霉菌抑制其他细菌的生长中发现了青霉素，这对医药界来讲是一个划时代的发现。后来大量的抗生素从放线菌等的代谢产物中筛选出来，抗生素的使用在第二次世界大战中挽救了无数人的生命。一些微生物被广泛应用于工业发酵，生产乙醇、食品及各种酶制剂等；一部分微生物能够降解塑料、处理废水废气等，并且可再生资源的潜力极大，称为环保微生物；还有一些能在极端环境中生存的微生物，例如在高温、低温、高盐、高碱以及高辐射等普通生命体不能生存的环境中，依然存在着一部分微生物。看上去，我们发现的微生物已经很多，但实际上由于培养方式等技术手段的限制，人类现今发现的微生物还只占自然界中存在的微生物的很少一部分。因此想要真正意义上运用微生物的一系列特性造福人类，必须要掌握其相关基础实验技能，帮助我们更好地了解微生物。

实验一 微生物实验前准备及经典培养基的制备

【目的和要求】

- (1) 熟悉常用玻璃器皿的清洗、灭菌前的包装准备。
- (2) 熟悉培养基的种类、主要成分及用途。
- (3) 掌握基础培养基的制备程序、方法和注意事项。

【试剂与器材】

- (1) 试剂：牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、琼脂粉、1 mol/L NaOH、1 mol/L HCl 等。
- (2) 器材：试管、吸管、平皿、锥形瓶、量筒、精密 pH 试纸、天平、滤纸等。

【实验内容】

一、常用玻璃器材的洗涤和准备

微生物学实验所用的玻璃器皿，大多要进行消毒、灭菌才能用来培养微生物，因此对其质量、洗涤和包装方法均有一定的要求。玻璃器皿的质量一般要求硬质玻璃，才能承受高温和短暂灼烧而不致破坏；玻璃器皿的游离碱含量要少，否则会影响培养基的酸碱度；对玻璃器皿的形状和包装方法的要求，以能防止污染杂菌为准；洗涤玻璃器皿的方法不当也会影响实验的结果。目前微生物学实验室中，有些玻璃器皿（如培养皿、吸管等）已被一次性塑料制品所代替，但玻璃器皿仍是重要

的实验室用具。

1. 玻璃器材的洗涤

玻璃器材若不清洁，常可影响实验结果，如影响培养基的 pH 值，甚至由于某些化学物质的存在可抑制微生物的生长；试管不清洁也可影响血清学反应的结果，如在 $\text{pH} < 3$ 时可发生酸凝集。因此，微生物实验所用的各种玻璃器材必须清洗干净后才能使用。

(1) 新的玻璃器材：先用肥皂水煮沸半小时，再用自来水冲洗多次，晾干水后浸于 2% HCl 内数小时，将游离的杂质除去，最后用自来水反复冲洗除尽残余 HCl 后，晾干备用。

(2) 用过的玻璃器材。

1) 凡含有培养基或病原微生物的玻璃器材，均应先煮沸或高压蒸汽灭菌法灭菌，然后趁热倒出培养基，用 5% 肥皂水刷洗，再用自来水冲净后倒置架上，晾干备用。

2) 试管：做血清反应的试管若不含病原微生物，可先用 5% 热肥皂水刷洗，再用自来水冲洗；若不够清洁，可先用清洁液（配制法见附录二）浸泡数小时，然后用自来水冲洗 7 次以上，晾干备用。

3) 吸管：吸过病原微生物的吸管，应插入盛有消毒液（3%~5% 来苏尔）的玻璃筒中（筒底应垫纱布或棉花，以免碰破吸管尖），使消毒液盖过吸管，浸泡 24 小时后，用 5% 肥皂水洗涤，再用自来水冲洗（若无病原微生物污染，则可用自来水浸泡或直接自来水冲洗），晾干水后，用清洁液浸泡数小时，最后用自来水冲洗 7 次以上，晾干备用。

4) 载玻片及盖玻片：用后分别浸入 3%~5% 的来苏尔中，浸泡 24 小时后，用 5% 肥皂水煮沸 10 分钟，再用自来水冲洗，晾干后于清洁液中浸泡数小时，最后用自来水洗净，晾干备用。

5) 注射器：用后若无病原微生物污染，立即用自来水将注射器及针头等抽洗干净；若有病原微生物污染，则立即进行煮沸消毒（若含有芽孢菌，则应用高压蒸汽灭菌）。在消毒或灭菌之前，均应先将清水抽入针头及注射器内反复抽洗几次，并连同洗出水一起消毒或灭菌，以免加热时有蛋白质凝固而阻塞针头或注射器。若用上述方法不能洗净，可再置清洁液中浸泡数小时（针头不能用清洁液浸泡），取出用自来水冲洗 7 次以上，干燥后备用。

2. 常用无菌器材的准备

(1) 包装：用纸包好，或盛入金属盒内。

1) 试管和锥形瓶：空的或盛有培养基的均可用棉塞塞好，并用不透水的厚纸包于棉塞外。若是盛有液体培养基的试管，应直立并扎成捆，以免灭菌时倾倒。

2) 吸管：于吸口端先垫入少许棉花（不可太松或太紧），然后每支分别用纸包好，或以数支放入金属筒内。

3) 注射器：最好将内芯取出，与外套一起用纸或纱布包好；针头最好装入小试管内（管底垫有少量棉花），管口塞上棉塞。

(2) 灭菌：上述玻璃器材可用高压蒸汽灭菌法，也可用干烤法进行灭菌。如用干烤法应注意控制温度和时间在 160~170 °C 2 小时，以免烧焦棉塞及外包的纸张等。

注意：任何已灭菌的器材，在使用前不能随意打开，一经打开则不再认为是无菌的。

二、基础培养基的制备程序和方法

培养基是用人工方法将细菌生长所需要的营养物质按一定比例配制而成的营养基质。按照物理性状分为液体、半固体和固体培养基三类，其区别主要是凝固剂的有无和多少；按用途分为基础、营养、选择、鉴别、增菌、特殊培养基等。

培养基的成分因种类不同而异，其中基础培养基含有一般细菌生长所需要的基本营养成分，如蛋白胨、肉浸液（或牛肉膏）、氯化钠和水，这些营养物质能为细菌提供生命所需的碳源、氮源、无机盐、水分，并能调节菌体内外的渗透压，为细菌提供能量。其他培养基大多是在基础培养基中加入某些特殊成分（如营养物质、抑菌剂、检测基质、指示剂等）配制而成。

1. 培养基配制的基本程序

培养基配制的基本程序包括调配、溶化、矫正 pH、过滤澄清、分装、灭菌、鉴定等几个主要步骤。

(1) 调配：先在锥形瓶或烧杯中加入少量蒸馏水（事先量好），按照培养基的配方准确称取各种成分加入瓶中混合，再将剩余的水冲洗瓶壁。

(2) 溶化：将调配好的混合物置电炉上隔水加热，使其完全溶解，注意随时搅拌，防止溶液外溢，溶解完毕，应补足失去的水分。

(3) 矫正 pH：用 pH 比色计、比色法或精密 pH 试纸矫正溶液的 pH，一般矫正至 7.2~7.6。其中 pH 试纸矫正法操作简便、快速，但误差较大；用 pH 比色计和比色法测定 pH 较为准确。

比色法：取 3 支与标准管口径相同的试管，按表 2-1-1 加样。

表 2-1-1 pH 比色法

试管号	培养基	蒸馏水	0.2 g/L 酚红
1 (测试管)	5 mL	—	0.25 mL
2 (蒸馏水管)	—	5 mL	—
3 (培养基管)	5 mL	—	—

第 4 管为标准 pH 比色管（配方见附录二）。

将 4 支试管按图 2-1-1 所示插入比色架中进行比色。

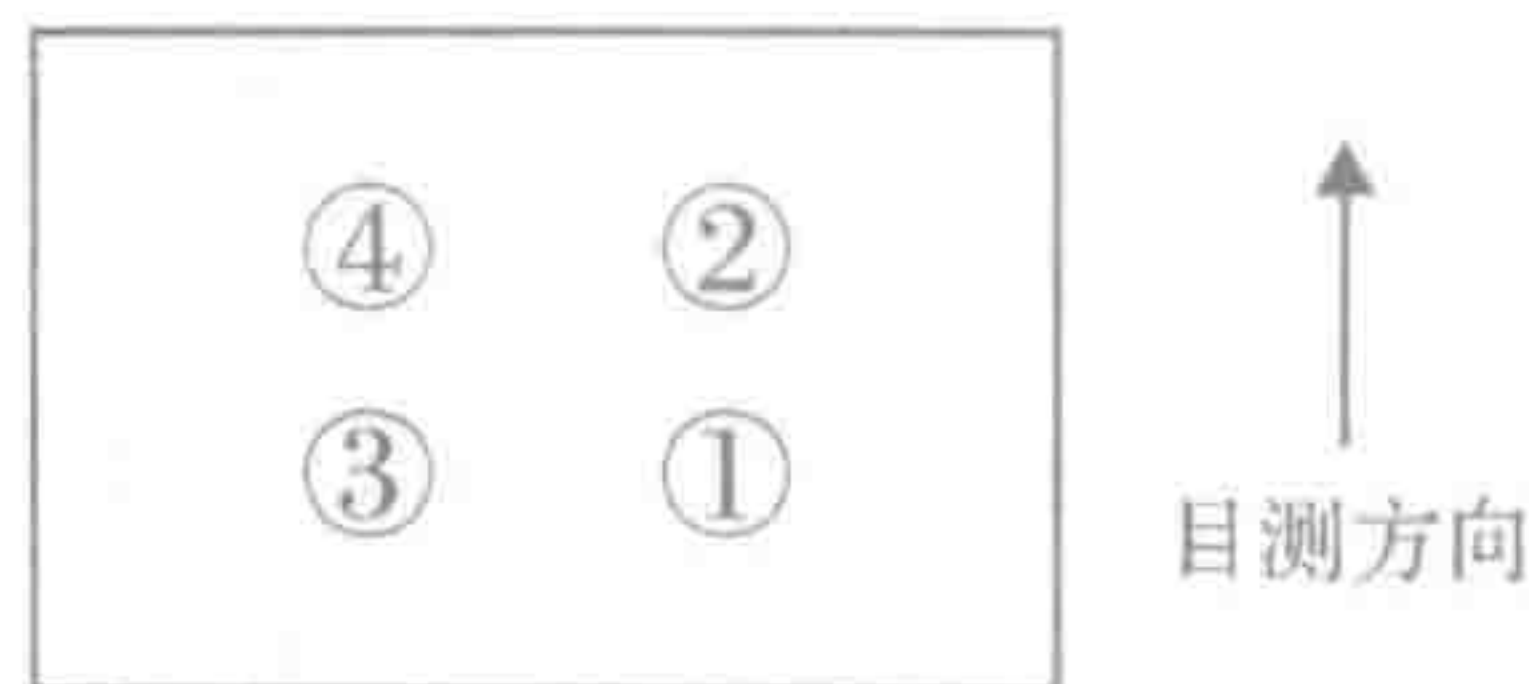


图 2-1-1 比色法

若测定管偏酸或偏碱，可分别加入 0.1 mol/L NaOH、0.1 mol/L HCl 矫正，直到测定管的颜色与标准管相同为止。注意：在加酸或加碱矫正时要缓慢，并准确记录加入的量，按下式计算培养基中需加入的量。

计算：设 5 mL 培养基矫正 pH 至 7.4 需加入 0.15 mL NaOH，现配制 1000 mL 培养基，需加入 NaOH 的量为：

$$5 : 1000 = 0.15 : X, \text{ 则 } X = (0.15 \times 1000) / 5 = 30 \text{ mL}$$

为防止培养基因矫正 pH 而加入过多的水，可将 0.1 mol/L NaOH 换算成 1 mol/L NaOH，则需 3 mL。在培养基中加入 NaOH 后需再测一次 pH，如仍未达到所需 pH，再按上述方法进行矫正。

(4) 过滤澄清：若培养基有混浊或沉淀，则需过滤。液体或半固体培养基用滤纸过滤，固体培养基在加热溶化后用绒布或双层纱布加脱脂棉过滤。

(5) 分装：根据需要将培养基分装于不同的容器中，并进行包扎。

1) 基础培养基：一般分装于锥形瓶，灭菌后备用，便于随时分装倾注平板或制备营养培养基。灭菌后的基础培养基在倾注平板前应冷却至 50 °C 左右，以无菌操作分装于无菌平皿内（直径 9 cm 的平皿分装量 13~15 mL），待培养基冷却后将平皿翻转，即为琼脂平板。

2) 琼脂斜面：分装于试管，分装量为试管高度的 1/4~1/3，灭菌后趁热放置成斜面，斜面长度占试管长度的 2/3 左右，斜面下方保持 1 cm 高。

3) 半固体培养基：分装于试管，量为试管高度的 1/4~1/3，灭菌后趁热将试管直立凝固。

4) 琼脂高层培养基：分装于试管，量为试管高度的 2/3，灭菌后趁热将试管直立凝固。

(6) 灭菌：根据培养基的成分、性质采用不同的灭菌方法。

1) 高压蒸汽灭菌法：用于基础培养基等耐高温培养基的灭菌。

2) 间歇灭菌法：用于含糖、明胶、血清、牛乳、鸡蛋等不耐高温物质配制的培养基灭菌。

3) 水浴低温灭菌法：将血清、腹水、组织液等配制的培养基在水浴中加热 56~57 °C 维持 1 小时，以保持液体状态，连续 5~7 天，此法较少用。

4) 血清凝固器灭菌：用于富含蛋白质的培养基（如含血清、鸡蛋清的培养基）灭菌，方法：将分装好的培养基（一般做成斜面）放在血清凝固器中，第一天 75 °C 30 分钟，第二天 80 °C 30 分钟，第三天 85 °C 30 分钟，在三次灭菌的间隙将培

培养基置 35 °C 温箱孵育过夜。

5) 过滤除菌：用于血清、细胞培养液的灭菌。

(7) 鉴定：包括以下两项内容。

1) 无菌试验：将灭菌后的培养基置 35 °C 温箱孵育 24 小时，无菌生长为合格。

2) 效果检验：将已知菌种接种于培养基上，观察细菌的生长情况、生化反应等是否符合。

(8) 保存：制备好的培养基须注明制备日期、名称，置 4 °C 冰箱或冷暗处保存，但不宜放置过久。

2. 常用培养基的配制和用途

见附录一。

3. 培养基配制的注意事项

(1) 在进行调配时应在瓶中先加入少量水，再加入各种固体成分，以免固体成分黏附在瓶壁上。装培养基的容器不能用铁、铜等材质的容器，若铁进入培养基中，含量超过 0.14 mg/L 时可抑制细菌毒素的产生；含铜量超过 0.3 mg/L 时可抑制细菌的生长。某些特殊成分（如染料、胆盐、指示剂等）应在矫正 pH 后加入。

(2) 如需要制备十分澄清的培养基，可用卵蛋白加热澄清法：取一个鸡蛋的卵蛋白加水 20 mL，搅拌至出现泡沫，倒入 1000 mL 液体或溶化的固体培养基，混匀，流通蒸汽加热 30~60 分钟，使培养基中的不溶性物质附着于凝固蛋白，取出后用纱布加脱脂棉（固体培养基）或滤纸（液体或半固体培养基）过滤。

(3) 灭菌后的培养基在进行分装时应注意无菌操作，倾注平板时培养基的温度不能过高，否则冷凝水多，影响细菌的分离并易造成污染；也不能温度过低，否则琼脂过早凝固，使平板表面高低不平。

(4) 在加热溶化时注意溶液不能溢出瓶外，否则会影响培养基的营养成分，若水分蒸发，应补足失去的水分。

【结果记录、报告和思考】

实验二 无菌操作技术

【目的和要求】

- (1) 熟练掌握从固体培养物和液体培养物中转接微生物的无菌操作技术。
- (2) 体会无菌操作的重要性。
- (3) 掌握倒平板的基本操作方法。

【试剂与器材】

超净工作台、接种工具、斜面培养基、酒精灯、酒精棉球等。接种工具有接种环、接种钩、接种针、接种圈、接种锄、玻璃涂棒、其他接种工具。

【实验内容】

一、实验原理

在微生物学实验或科研生产中，经常要把一定种类的微生物菌种接种或移植到新鲜培养基中。由于接种的微生物都是纯种的，所以接种工作都必须在无菌环境下（在无菌室或超净工作台）进行，并严格遵守无菌操作技术。利用接种工具（如接种环、接种铲等）进行菌种的移植。因此无菌操作是接种培养微生物的关键。

常用的接种方法有斜面接种法、平板接种法、液体接种法、试管深层固体培养基的穿刺接种法。

1. 斜面接种法

把各种培养条件下的菌种，接入斜面上（包括从试管斜面、培养基平板、液体纯培养物等中把菌种移接于斜面培养基上）。这是微生物学中最常用、最基本的技术之一。接种前，需在待接种试管上贴好标签，注明菌名及接种日期。接种最好在无菌室或无菌箱内进行，若无此条件，可在较清洁密闭的室内进行。

2. 液体接种法

液体接种是一种用移液管、滴管或接种环等工具将菌液移接到培养基中的方法。吸管不同于其他接种工具，不能灼烧，可预先对其进行烘烤法灭菌。

3. 穿刺接种法

穿刺接种常用于保藏菌种或细菌运动性的检查。一般适用于细菌、酵母菌的接种培养。用接种针沾取少许菌种，移入装有固体或半固体培养基的试管中，自培养基中心垂直刺入到底，然后按原来的穿刺线将针慢慢拔出。

二、操作流程

1. 无菌操作要点

- (1) 要求建立“无菌观念”。
- (2) 接种时要有一个洁净的环境，整个操作过程必须在火焰旁进行。

(3) 接种环、棉塞一定要拿在手上，不能随便乱丢。

2. 用接种环转接菌种

接种细菌应用接种针（环）来沾取细菌标本，进行接种。接种环与接种针为用白金丝或合金丝所制，亦可用电炉丝代替，因它能耐高温且散热快，便于接种前后通过火焰灭菌（整个接种环烧红即达到灭菌目的）。

在使用接种环时一般用右手持笔式较为方便，左手可持培养基进行配合，其接种程序可分为：灭菌接种环—稍冷—沾取细菌样品—进行接种（包括启盖或塞、接种划线、加盖或塞）—进行接种环灭菌等五个程序。不同培养基，接种方法也不同。

接种方法如下：

(1) 接种前用酒精棉球擦净桌面。

(2) 将试管贴上标签，注明菌名、接种日期、接种人姓名等，然后用酒精棉球擦手消毒。

(3) 待手干后，点燃酒精灯，在火焰旁将每一支试管内的棉塞稍微转一下，使其松动，以便在接种时易拔出，并将试管放在试管架上，放在接种台的左前方。

(4) 将菌种和斜面培养基的两支试管，用大拇指和其他四指握在左手中，使中指位于两试管之间，试管口平行斜向上；也可将试管横放在左手掌中央，用四个手指托住试管，大拇指压在试管上，斜面向上。

(5) 右手拿接种环，在火焰上将环的部分烧红灭菌，环以上凡在接种可能进入试管内的部分，均应通过火焰灼烧。以下操作，需要使试管口靠近火焰。

(6) 用右手小指、无名指和手掌拔掉棉塞。

(7) 以火焰灼烧试管口，灼烧时应不断转动试管口，使试管口沾染的少量菌得以烧死。

(8) 将烧过的接种环伸入菌种试管内，先将环接触没有长菌的培养基部分，使其冷却，以免烧死被接种的菌体，然后轻轻接触菌体，取出少许，慢慢将接种环抽出试管，注意尽量不要使环的部分碰到管壁，取出后不可使环通过火焰。

(9) 迅速将接种环在火焰旁伸进另一试管，在斜面培养基上从底部划线到顶部，但不要把培养基划破，也不要使菌种沾染管壁。

(10) 取出接种环，灼烧试管口，并在火焰旁将棉塞塞上，不要用试管去迎棉塞，以免试管在运动时灌入不洁的空气。

(11) 将接种环在火焰上再灼烧灭菌，放回原处后，再用右手将棉塞塞紧，将新接种的斜面试管放在试管架上。

(12) 接种后的斜面培养基放在恒温箱内培养。

3. 液体培养基中的菌种接入液体培养基中

接种工具中移液器、无菌移液管和无菌滴管、移液管和滴管不能在火焰上烧，应预先灭菌。用无菌移液管自菌种管中吸取一定量的菌液接到另一管液体培养基