

实验五 微生物培养基 的配制和灭菌

- 目的要求
- 实验材料
- 实验程序



目的要求

- 了解培养基(普通营养琼脂、乳糖胆盐发酵管等)的配制原理和方法，掌握其配制过程。
- 了解几种灭菌方法，掌握干热灭菌法和加压蒸汽灭菌法的原理及其使用方法。
- 熟悉分离、培养微生物前的有关准备工作及操作方法。



实验材料

- 药品：牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、琼脂、蛋白胨、乳糖、胆盐、溴钾酚紫等。
- 高压蒸汽灭菌器、恒温干热灭菌箱。
- 其它：天平、牛角匙、电炉、1N NaOH、pH试纸、刻度搪瓷杯、量筒、漏斗、漏斗架、玻棒、带玻璃珠的三角瓶、带棉塞的无菌试管、无棉塞的空试管、培养皿、吸管、各种包装纸、防水纸、绳索、棉花、标签等。

实验程序

- 培养基的配制
- 分离培养微生物常用器皿的准备
- 培养基和玻璃器材的灭菌方法



培养基的配制

- 培养基的种类
- 培养基的配制方法和步骤
- 三种培养基的配方及配制
- 无菌水的制备



培养基的种类

- 据组成成分可分为：

- 1.合成培养基：由各种纯化学物质按一定比例配制而成。

- 2.半合成培养基：有一部分纯化学物质和另一部分天然物质配制而成。

- 3.天然培养基：利用天然来源的有机物配制而成。

- 从培养基的物理状态可分为

- 1.液体培养基：不加凝固剂的液体状态培养基。

- 2.固体培养基：在液体培养基中加入2%左右的凝固剂的固体状态的培养基或农副产品培养基。

- 3.半固体培养基：在液体培养基中加入0.2—0.5%凝固剂而成的半固体状培养基。

培养基的种类

常用凝固剂为琼脂（其次为明胶），又叫洋菜、冻粉。

表 6-1 琼脂与明胶特性比较

| 比较项目 | 琼 脂 | 明 胶 | 比较项目 | 琼 脂 | 明 胶 |
|--------|------|-----------|---------|-------------------|----------------|
| 熔 点(℃) | 96 | 25 | 微生物可利用性 | 绝大多数微生物 不能水解利用 | 部分微生物 能水解利用 |
| 凝固点(℃) | 40 | 20 | 耐热性 | 强 | 弱 |
| 酸碱度 | 微酸 | 酸性 | 来源 | 植物 | 动物 |
| 灰 分(%) | 16.0 | 14.0—15.0 | 化学本质 | 多糖 | 蛋白质 |
| 氧化钙(%) | 1.15 | 0.0 | 常用浓度(%) | 1.5—2 | 5—12 |
| 氧化镁(%) | 0.77 | 0.0 | | | |
| 氮(%) | 0.40 | 18.3 | | | |

培养基的配制方法和步骤

- **称量**：按照配方正确称取各种原料放于搪瓷杯中。
- **溶化**：在搪瓷杯中加入所需水量，玻棒搅匀，加热溶解。
- **调pH值**：用1N NaOH或1N HCl调pH，用pH试纸对照。
- **加琼脂溶化**：加热过程中要不断搅拌，可适当补水。
- **分装**：注意不要污染棉塞
 - 半固体： $1/3$
 - 液体分装
 - 试管 $<1/4$
 - 三角烧瓶 $<1/2$
 - 固体分装
 - 试管 $<1/5$
 - 三角烧瓶 $<1/2$

培养基的配制方法和步骤

- 分装
- 加塞

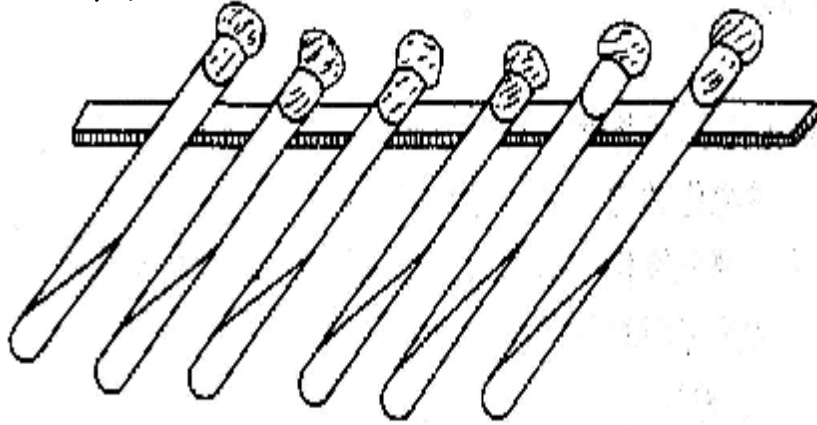


图 6-1 斜面的摆法和冷凝

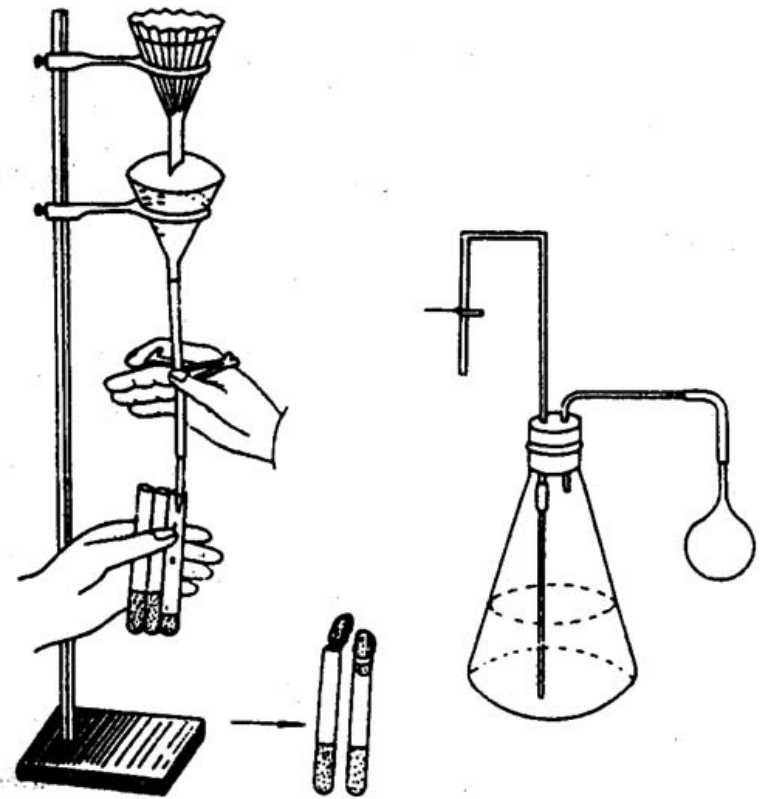


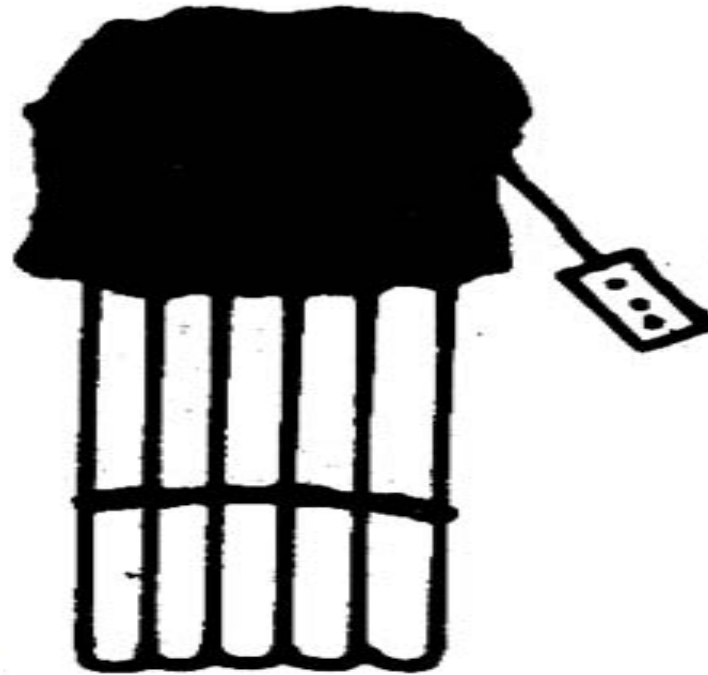
图 6-2 培养基的分装

培养基的配制方法和步骤

- 包扎、标记：包扎成捆，标签，注明何种培养基。
- 灭菌：

| | | |
|-----------|---|---------------------------|
| 牛肉膏蛋白胨培养基 | } | 121 ⁰ C, 15min |
| 伊红美兰培养基 | | |
| 生理盐水 | | |
| 乳糖胆盐发酵管 | } | 115 ⁰ C, 15min |
- 搁置斜面：<1/2
- 无菌检查：培养基灭菌后必须在37⁰C下恒温培养24~48h，确定无菌生长，方可使用。

培养基的配制方法和步骤



包扎成捆挂标签

三种培养基的配方及配制

- 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基（用于分离和培养细菌，是一种天然培养基）配方如下：

| | |
|-----|--------------------------------|
| 牛肉膏 | 3g |
| 蛋白胨 | 10g |
| 氯化钠 | 5g |
| 琼脂 | 15~20g |
| 自来水 | 1000ml |
| pH | 7.2~7.4 |
| 灭菌 | 1.05kg/cm ² , 15min |



三种培养基的配方及配制

- 乳糖胆盐发酵管（用于分离和培养大肠菌群）
配方如下：

| | |
|--------------|-------------|
| 蛋白胨 | 40g |
| 乳糖 | 20g |
| 胆盐 | 10g |
| 0.04%溴钾酚紫水溶液 | 50ml |
| 自来水 | 1000ml |
| pH | 7.4 |
| 灭菌 | 115°C 15min |

三种培养基的配方及配制

- 伊红美兰培养基（用于分离和鉴别大肠菌群）
配方如下：

| | |
|---------|------------|
| 伊红美兰培养基 | 36g |
| 自来水 | 1000ml |
| pH | 7.1 |
| 灭菌 | 121℃ 15min |



三种培养基的配方及配制

- 无菌生理盐水的制备（用于制作样品稀释液）
配方如下：

| | |
|-----|------------|
| 氯化钠 | 0.85~0.9g |
| 自来水 | 100ml |
| 灭菌 | 121℃ 15min |

500mL三角烧瓶（装有玻璃珠），分装225ml
18x80试管，分装9.0ml

分离培养微生物常用器皿的准备

- 清洗一些玻璃仪器：如三角烧瓶、试管、培养皿、吸管等。
- 棉塞的制作： 包装培养皿和吸管等。

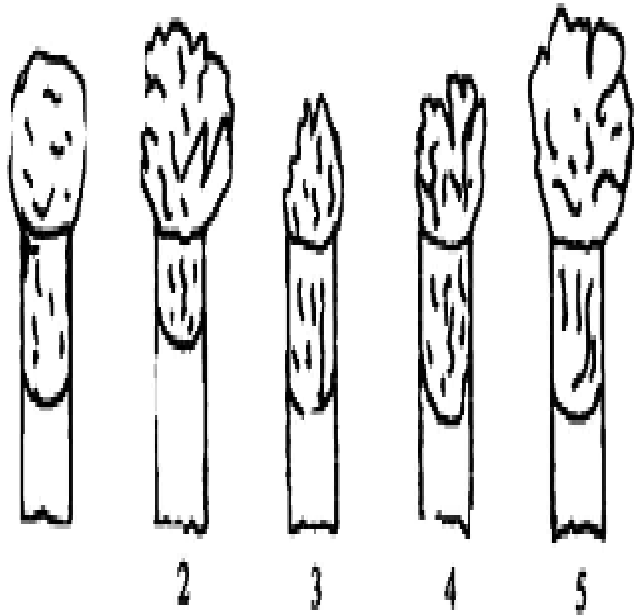


图 6-4 棉塞的要求条件

1. 正确的式样 2. 管内部分太短, 外部太松 3. 外部过小 4. 整个棉塞过松 5. 管内部分过紧, 外部太松

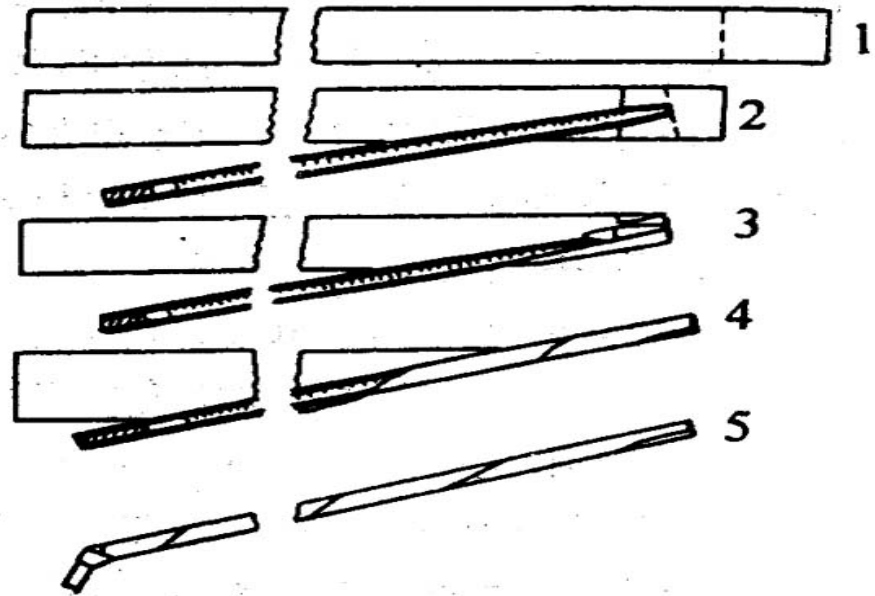


图 6-5 吸管灭菌前的包装
(用纸卷包的情况)

培养基和玻璃器材的灭菌方法

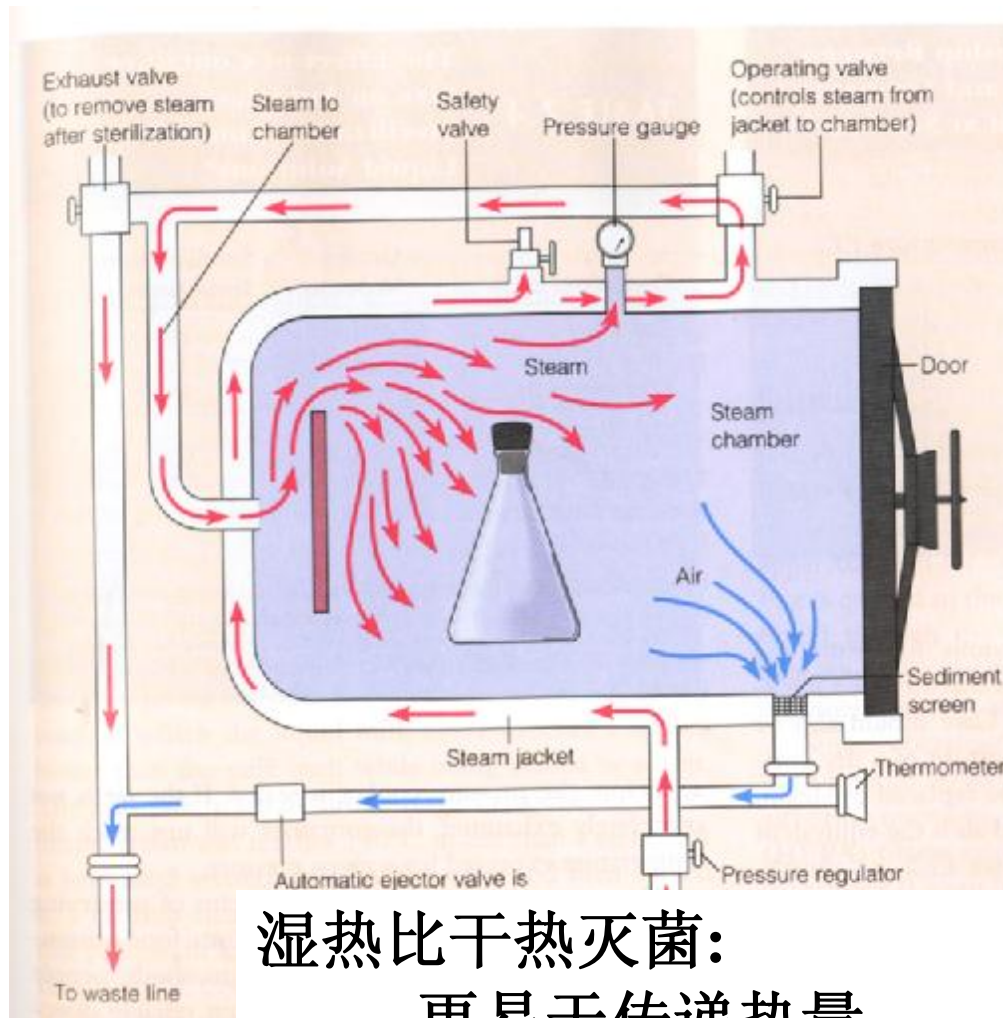


Figure 7.2 An autoclave. The entering steam forces the air out of the bottom (blue arrows). The automatic ejector valve remains open as long as an air-steam mixture is passing out of the waste line. When all the air has been ejected, the higher temperature of the pure steam closes the valve, and the pressure in the chamber increases.

Autoclaving is the preferred method of sterilization, provided the material to be sterilized will not be damaged by heat or moisture.

湿热比干热灭菌：

更易于传递热量；

更易破坏保持蛋白质稳定性的氢键等结构；

培养基和玻璃器材的灭菌方法

加压蒸汽灭菌法 其步骤如下：

1. 灭菌器内加入一定量的水
2. 将用防水纸包扎好的物品放入其中。
3. 接通电源，进行加热。
4. 排气：排除高压锅内的冷空气，可将排气阀打开，待排出大气后关闭排气阀；或关闭排气阀，待压力上升到 $0.5\text{kg}/\text{cm}^2$ 时再打开排气阀，待压力回复到0时再关闭排气阀。
5. 升压保温：当压力达 $15\text{lb}/\text{in}^2$ （即 $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$ ）时，此时灭菌器内的温度为 121°C ，维持15min。对热不稳定的培养基如含有葡萄糖、氨基酸等物时，应适当降低压力，延长时间。
6. 降压、取料：灭菌时间一到，切断电源，待压力降至零时，才能打开排气阀，然后打开灭菌器盖，取出物品。
7. 摆放物品

培养基和玻璃器材的灭菌方法

菌体蛋白质的凝固温度与其含水量的关系

| 蛋白含水量(%) | 凝固温度(℃) |
|----------|---------|
| 50 | 56 |
| 25 | 74—80 |
| 18 | 80—90 |
| 6 | 145 |
| 0 | 160—170 |

培养基和玻璃器材的灭菌方法

加压蒸汽灭菌器压力数与蒸汽温度间的关系

| 压力表所示压力 | | 全部水蒸汽(无空气) | 50%空气 | 全部空气 |
|--------------------|--------------------|------------|-------|------|
| bl/in ² | kg/cm ² | | | |
| 5 | 0.35 | 108℃ | 94℃ | 72℃ |
| 10 | 0.7 | 115℃ | 105℃ | 90℃ |
| 15 | 1.05 | 121℃ | 112℃ | 100℃ |
| 20 | 1.41 | 126℃ | 118℃ | 109℃ |

培养基和玻璃器材的灭菌方法

- **干热灭菌法：**电热烘箱作为干热灭菌器其步骤如下：
 - 1.将包扎好的物品放入电热烘箱。
 - 2.接通电源，设定参数。
 - 3.升温。
 4. $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ ，维持2h。
 - 5.降温
 6. 开箱取物。待压力降至 $<70^{\circ}\text{C}$ 时，才能打电热烘箱，取出物品。

培养基和玻璃器材的灭菌方法

- 间歇灭菌法：
待灭菌的物品放在灭菌器或蒸笼里，每天蒸煮1次，每次煮沸1h，连续3d重复进行。在每两次蒸煮之间，将物品（指培养基）放在37°C恒温条件下培养过夜，这样可以使每次蒸煮后未杀死残留的芽孢萌发成营养体，以便下次蒸煮时杀灭。
- 过滤除菌法：
不能用加热灭菌的液体物质（如维生素、血清），一般可用细菌过滤器进行除菌。

培养基和玻璃器材的灭菌方法

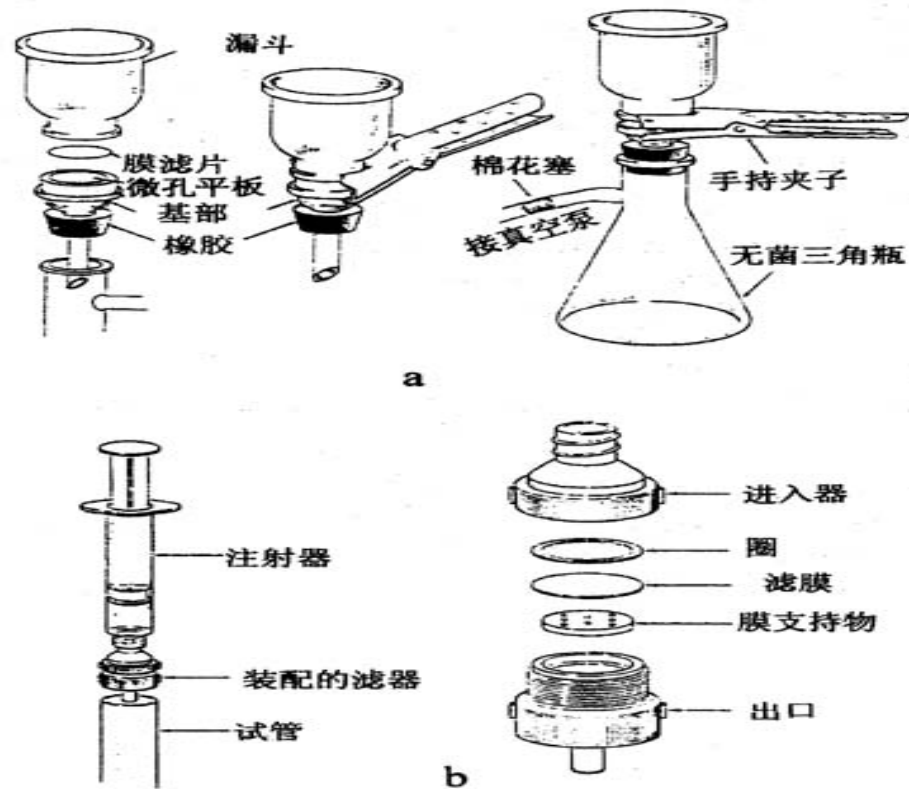


图 6—6 用于除菌的滤器
a. 蔡氏滤器 b. 注射器装置滤器

培养基和玻璃器材的灭菌方法

- 紫外线灭菌法：
一般30W灯管，9m³空间，距地面2m每次打开紫外线照射0.5h，就使室内空气灭菌。若照射紫外线时先喷洒石炭酸等化学消毒剂，可增强灭菌效果。紫外线虽有较强的杀菌力，但穿透力弱，即使一薄层玻璃或水层就能将大部分紫外线滤除，因此只适用于空气及表面杀菌。
- 化学药剂消毒灭菌：
微生物实验室中常用的化学杀菌剂有升汞、甲醛、高锰酸钾、酒精、碘酒、龙胆紫、石炭酸、漂白粉、新洁尔灭、煤酚皂溶液，它们有的是杀菌剂，有的是抑菌剂。

培养基和玻璃器材的灭菌方法

常用化学抑菌剂和杀菌剂

| 类别 | 代表 | 常用浓度 | 作用方式 | 用途及用法 |
|-------|-------------|---|--------------|--------------------|
| 醇类 | 乙醇 | 70—75% | 抑制细菌使蛋白质凝固变性 | 皮肤和器皿消毒对芽孢、孢子无效 |
| 醛类 | 甲醛 | 37~40% 2mL/m ³ | 与蛋白质胺基结合使其变性 | 接种室、接种箱熏蒸,杀死空气中微生物 |
| 酚类 | 石炭酸 来苏儿 | 5% 2—5% | 破坏细胞膜,蛋白质变性 | 接种室空气及器皿消毒空气及皮肤消毒 |
| 重金属离子 | 升汞 | 0.1% | 细菌细胞酶失活而中毒死亡 | 植物组织,如根瘤的消毒(有剧毒) |
| 氧化剂 | 高锰酸钾 漂白粉 | 0.1—3% 1—5% | 蛋白质及酶氧化变性 | 水果、皮肤、器皿消毒饮水及粪便消毒 |
| 表面活性剂 | 肥皂新洁尔灭 | 水稀释 20 倍 | 破坏细胞膜的渗透压 | 皮肤、手及器皿的消毒 |
| 卤素 | 碘 | 1%碘酒 | 蛋白质、酶受破坏 | 皮肤消毒 |
| 染料 | 结晶紫 | 2—4%水溶液 | 抑制细胞壁的合成作用 | 皮肤创伤消毒 |
| 酸类 | 乳酸 食醋 | 80%乳酸 1mL/m ³ 3—5 mL/m ³ | 与细胞原生质结合 | 熏蒸消毒空气,可预防流感病毒 |
| 碱类 | 石灰水 | 3—5%水溶液 | 破坏酶的活性 | 地面消毒 |

思考题

- 固体培养基加琼脂后加热溶化时要注意哪些问题？
- 培养基中加琼脂的作用是什么？
- 干热灭菌、高压蒸汽灭菌和间歇灭菌的场合有何不同？
- 如何检查培养基灭菌是否彻底？