

菌种保存和微生物常识

1、常用培养基的制备、灭菌与消毒

营养：从外部环境摄取其生命活动所必需的能量和物质，满足生长和繁殖需要的一种生理过程。是生命活动的物质基础，是生命活动的起点。

营养物：具有营养功能的物质。也包括光能。提供生物的结构物质、能量、代谢调节物质和良好的生理环境。

营养要素：碳源、氮源、能源、生长因子、无机盐和水

培养基：人工配制、适合微生物生长繁殖或产生代谢产物的混合养料。

要求：应具备 6 大营养要素；物质比例合适；必须灭菌。

2、选用和设计培养基的原则、方法及制备过程

原则：目的明确、营养协调、经济节约

物理化学条件适宜

方法：生态模拟、查阅文献

精心设计、试验比较

步骤：称量、融化、调 PH、过滤、分装、

加塞、包扎、灭菌、冷却、无菌检查

培养基种类：

一、按成分的不同分

天然培养基、合成培养基、半合成培养基

二、按培养基的物理状态分

固体培养基、液体培养基、半固体培养基

三、按培养基用途

基础培养基、选择培养基、加富培养基鉴别培养基

消毒与灭菌：

消毒：消灭病原菌和有害微生物的营养体

灭菌：杀灭一切微生物的营养体，芽胞和孢子。

方法：

一、物理的方法：加热、过滤、辐射

二、化学的方法：用化学试剂抑制或杀灭微生物。主要破坏细菌代谢机能。如重金属离子，磺胺类药物及抗生素等。

加热法：

(1) 干热法：火焰灼烧灭菌和热空气灭菌。

1、火焰灼烧适用于接种环、接种针和金属用具如镊子等，试管口和瓶口，涂布用玻璃棒。

2、热空气灭菌利用高温干燥空气（160—170C）加热灭菌 1—2h，适用于玻璃器皿和培养皿等。原理加热使蛋白质变性，与水的含量有关，当环境和细胞含水量越大，凝固越快。

3、注意事项：

1) 培养基、橡胶制品、塑料制品不能用此法；

- 2) 温度控制在 $<180^{\circ}$;
- 3) 物品不能太挤;
- 4) 温度降至 70° 时才开箱门。

(2) 湿热法 : 原理: 因为湿热中菌体吸水, 蛋白质容易凝固, 因蛋白质含水量增加, 所需凝固温度降低; 湿热的蒸气有潜热存在。所以效果比同温度下干热好。

高压蒸汽灭菌法:

1、设备: 高压灭菌锅

- 2、时间长短根据灭菌物品的种类和数量不同有所变化。
- 3、适用于培养基、工作服、橡胶物品等的灭菌, 也可用于玻璃器皿的灭菌。
- 4、注意事项:
 - 1) 冷空气彻底排除;
 - 2) 加水;
 - 3) 压力降为“0”时方可打开。

常压蒸汽灭菌:

对于不宜用高压蒸汽灭菌的培养基如明胶培养基、牛乳培养基, 含糖培养基等可采用此法。彻底灭菌则采用间歇灭菌方法。

煮沸灭菌法: 适用注射器和解剖器皿, 时间 10—15min,
超高温杀菌: $135-150^{\circ}\text{C}$ 和 2-8s 对牛乳和其它液态食品。

优点 : 保持食品价值和营养成分。

过滤除菌:

原理: 介质在有压力时阻隔微生物。

适用范围: 许多材料如血清、抗生素及糖溶液采用此法。

设备: 蔡氏过滤器, 滤膜过滤器。

优缺点: 不破坏培养基成分, 只适用少量滤液。需大量无菌空气以及净化工作台。

- 注意事项: 1、压力适当;
- 2、无菌条件下进行;
 - 3、防止渗透现象。

辐射灭菌:

原理: 紫外线波长在 200—300nm, 具有杀菌作用, 以 265-266 杀菌力强。此段波长易被细胞中核酸吸收; 可产生臭氧和过氧化氢。杀菌效力与强度和时间的乘积成正比。

缺点: 穿透力不大。距照射物 $<1.2\text{m}$ 为宜。

应用: 无菌室, 医院。

注意事项: 对眼睛和皮肤有刺激作用。

射线灭菌: γ 射线, 穿透力强, 适用于堆积物品的灭菌。

化学药品灭菌:

原理: 应用化学制剂破坏细菌代谢机能。

杀菌剂如重金属离子;

抑菌剂如磺胺类及多数抗生素。

注意: 与药品的浓度高低, 时间长短, 微生物种类以及微生物所处的环境有关。

常用化学杀菌剂有: 乙醇、醋酸、石碳酸, 福尔马林、升汞、高锰酸钾、新洁尔灭等

3、微生物的分离、纯化及培养技术

分离与纯化：从混杂的微生物群体中获得只含某一种或某一株微生物的过程。

为什么要进行纯培养：平板上的单一菌落并不一定保证是一种菌。

常用的分离、纯化方法：

单细胞挑取法 稀释涂布平板法

稀释混合平板法 平板划线法

稀释涂布平板法：

步骤：

1、倒平板：牛肉膏蛋白胨培养基，高氏 I 号培养基，查氏培养基冷却至 55-60℃时，混匀后倒平板，牛肉膏蛋白胨培养基倒 4 皿，高氏 I 号培养基和查氏培养基各倒 3 皿。

2、制备污水稀释液：10g 土样，加入 90ml 无菌水中，在三角瓶中振摇 20min。取 0.5ml 加入盛有 4.5ml 无菌水的试管中，以此类推，制成不同稀释度。

3、涂布：将上述每种培养基平板底面标记稀释度，然后用无菌吸管从最后三种稀释度，即 10⁻⁴、10⁻⁵ 和 10⁻⁶ 的试管中吸取 0.1ml 对号放入平板上，用玻棒涂布。

4、培养：高氏 I 号和查氏倒置培养于 28℃培养箱中培养 3-5days，牛肉膏蛋白胨琼脂培养基在 37℃培养 1-2days。

5、挑菌落：转至斜面，检查是否一致，保存。

平板划线法：

1、倒平板，标记培养基名称，编号和实验日期。

2、划线方法

稀释混合平板法：

1、先加菌

2、倒平板时注意培养基温度

3、混合均匀

4、微生物培养技术

1、斜面试种

2、液体培养基接种

3、穿刺接种

4、将已接种的斜面、半固体和液体培养基放置培养箱中培养

5、将生长好的菌种用牛皮纸包好，置 4℃冰箱中保存。

几种常用的保藏方法：

1、传代培养法

保藏的菌种通过斜面、穿刺或疱肉培养基（用于厌氧细菌）培养好后，置 4℃冰箱中存放，定期进行传代培养、再存放。

可用胶塞代替棉塞或在斜面上覆盖一层无菌液体石蜡来进一步延长保存期。

2、载体法

使生长合适的微生物吸附在一定的载体上进行干燥。

常用的载体有土壤、砂土、硅胶、明胶、麸皮、磁珠和滤纸片等。

3、悬液法

将细菌、酵母菌细胞悬浮在一定的溶液中保存。

溶液包括蒸馏水、糖溶液、磷酸缓冲液、食盐水等。

4、冷冻法

使菌种始终存放在低温环境下的保藏方法。包括低温法和液氮法。

此法关键是要克服细胞的冷冻损伤。注意控制降温速率及保护剂的使用。

5、真空干燥法

这类方法包括冷冻真空干燥法和 L-干燥法。

冷冻真空干燥法是将要保藏的微生物样品先经低温预冻，然后在低温状态下进行减压干燥。

L-干燥法则不需要低温预冻样品，只是使样品维持在 10—20℃ 范围内进行真空干燥。

操作方法

1、斜面保藏法

将菌种转接在适宜固体斜面培养基上，待其充分生长后，用牛皮纸将棉塞部分包扎好（棉塞换成胶塞效果更好），置 4℃ 冰箱中包藏。

保藏时间依微生物的种类而定。霉菌、放线菌及芽孢菌保存 2—4 个月移种一次，酵母菌间隔两个月，普通细菌一个月，假单胞菌两周传代一次。

此法优点是操作简单、使用方便，缺点是保藏时间短、易被污染。

2、液体石蜡保藏法

将无菌石蜡加在已长好菌的斜面上，其用量以高出斜面顶端 1cm 为准，使菌种与空气隔绝。

将试管直立，置低温或室温下保存。

此法实用且效果较好。霉菌、放线菌、芽孢菌可保藏两年以上，酵母菌可保藏 1—2 年，普通细菌也可保藏 1 年左右。

3、穿刺保藏法

按穿刺接种方式培养菌种，菌种长好后用胶塞封严，置 4℃ 冰箱存放。

4、砂土管保藏法

(1)河砂处理

取河砂若干加入盐酸 10%，加热煮沸 30min 除去有机机质。倒去盐酸溶液，用自来水冲洗至中性，最后一次用蒸馏水冲洗，烘干后用 40 目筛子过筛，弃去粗颗粒，备用。

(2)土壤处理

取非耕作层不含腐殖质的瘦黄土或红土，加自来水浸泡洗涤数次，直至中性。烘干后碾碎，用 100 目筛子过筛，粗颗粒部分丢掉。

(3)砂土混合

处理妥当的河砂与土壤按 3: 1 的比例掺合(或根据需要而用其他比例，甚至可全部作砂或土)均匀后，装入 10x100mm 的小试管或安瓿管中，每管分装 1g 左右，塞上棉塞，进行灭菌(通常采用间歇灭菌 2--3 次)，最后烘干。

(4)无菌检查

每 10 支砂土管随机抽 1 支，将砂土倒入肉汤培养基中，30℃ 培养 40h，若发现有微生物生长，所有砂土管则需重新灭菌，再作无菌试验，直至证明无菌后方可使用。

(5)菌悬液的制备

取生长健壮的新鲜斜面菌种，加入 2-3ml 无菌水(每 18x180mm 的试管斜面菌种)，用接种环轻轻将菌苔洗下，制成菌悬液。

(6)分装样品

每支砂土管(注明标记后)加入 0.5ml 菌悬液(刚刚使砂土润湿为宜)，用接种针拌匀。

(7)干燥

将装有菌悬液的砂土管放入干燥器内，干燥器底部盛有干燥剂。用真空泵抽干水分后火焰封口(也可用橡皮塞或棉塞塞住试管口)。

(8)保存

置 4℃冰箱或室温干燥处，每隔一定的时间进行检测。此法多用于产芽孢的细菌、产生孢子的霉菌和放线菌。在抗生素工业生产中应用广泛、效果较好，可保存几年时间，但对营养细胞效果不佳。

5、冷冻真空干燥法

- (1) 冻干管的准备：中性硬质玻璃，烘干，灭菌。
- (2) 菌种培养：细菌芽孢脱落；放，霉孢子丰满。
- (3) 保护剂的配制：配制，灭菌，检查。
- (4) 菌悬液的制备：2-3ml 保护剂。
- (5) 分装样品：菌悬液每管 0.2ml。
- (6) 预冻：程序控温仪降温。
- (7) 冷冻真空干燥：-50℃下抽真空。
- (8) 取出样品：轻敲松散即达标。
- (9) 第二次干燥。
- (10) 熔封。
- (11) 存活性检测：抽取一管进行存活性检查