

高等学校試用教材

食品微生物学实验法

余蔚英 編

中国財政經濟出版社

高等学校試用教材

食品微生物学实验法

余蔚英 编

中国财政经济出版社

1964年 北京

前 言

本书是根据1961年3月轻工业部召开的高等学校专业教材会议的决定，由华南工学院负责主持，无锡轻工业学院、轻工业部食品工业科学研究所、广东省轻工业厅和广州市轻工业研究所等单位参加选编的。全书由华南工学院余蔚英同志执笔编写。本书编就后，余蔚英同志不幸病逝，现作为余蔚英同志的遗著出版。

本书与余蔚英同志所编的“食品微生物学”一书相配合，目的是为了巩固学生的食品微生物学的理论，训练学生进行微生物实验的基本技能。全书共八章，分为基础技术和应用技术两部分。第一章至第六章为基础技术部分，内容有：微生物实验室及设备，杀菌法及培养基的制备，微生物的分离及培养法，微生物的形态检查、生理试验及微生物的鉴定等六章；第七、八两章为应用技术部分，内容有：空气及水中微生物的检验法，食品中大肠杆菌群、沙门氏菌群等检验法，各种食品如乳和乳制品、蛋和蛋制品、鱼、肉和肉制品、罐头、冰淇淋、果蔬和谷类等微生物的检验法等。

本书编就后，曾请中山医学院细菌研究室进行了审查。最后经轻工业部委托发酵工业科学研究所和食品工业科学研究所作了校阅，可作为轻工业高等学校试用教材，也可供食品工厂工程技术人员参考。

目 录

第一章 微生物实验室及仪器	(5)
第一节 微生物实验室的设置.....	(5)
第二节 微生物实验用仪器.....	(7)
第二章 杀菌法及培养基的制备	(14)
第一节 杀菌法.....	(14)
第二节 培养基的制备.....	(19)
第三章 微生物一般分离及培养法	(38)
第一节 集积培养法.....	(38)
第二节 好气性培养法.....	(39)
第三节 嫌气性培养法.....	(48)
第四节 细菌、酵母、霉菌的分离及培养法.....	(51)
第五节 微生物的增殖法.....	(55)
第六节 菌种保藏法.....	(64)
第四章 微生物的形态检查	(68)
第一节 显微镜的构造及其使用技术.....	(68)
第二节 显微镜的制片法.....	(79)
第三节 微生物的大小及数量的测定.....	(89)
第四节 微生物的绘图及摄影.....	(94)
第五节 其他显微镜.....	(96)
第五章 微生物的生理试验	(101)
第一节 细菌的生理试验法.....	(101)
第二节 酵母的生理试验法.....	(105)
第三节 霉菌的生理试验法.....	(109)
第四节 发酵试验法.....	(110)
第六章 微生物的鉴定	(117)

第一节	细菌的鉴定	(117)
第二节	酵母的鉴定	(120)
第三节	霉菌的鉴定	(121)
第四节	免疫反应——凝集反应检验法	(122)
第七章	空气及水中的微生物检验	(126)
第一节	空气中的微生物检验法	(126)
第二节	水中微生物的检验法	(127)
第八章	食品微生物的检验	(130)
第一节	总菌数和生菌数的测定法	(130)
第二节	食品中一般微生物的检验法	(138)
第三节	食品微生物的专门检验法	(141)

第一章 微生物实验室及仪器

第一节 微生物实验室的设置

微生物是微小的生物，培养时容易受杂菌侵袭，因此研究微生物时，需要有适应它的特性的环境，即微生物实验室。微生物实验室又根据工作需要可分为显微镜实验室，微生物培养室，培养基制备室，菌种保藏室，无菌室及定温室等。兹将各室所应具备的条件分述如下：

一、显微镜实验室及微生物培养室

显微镜实验及微生物培养可在同一室进行。为了利用天然光线，而又避免太阳光直射，实验室应面向东北；如果利用电灯照明，则可任意选择。实验室的东北面全部装上玻璃窗，沿着这个方向设置几列宽60厘米的长实验台，作观察显微镜用。这样可满足在同一时期内，容纳更多人实验的需要。在实验室内可设置无菌室或无菌箱及恒温箱等。

室内设置废弃物收容箱。棉花、纸片、火柴头等必须投入该箱内。

微生物繁殖用的试管或玻璃瓶等，不要在实验室内任意开盖，同时不要在室内进行发生尘埃或使空气污浊的工作。

恒温箱的门在不必要时不可打开。

二、培养基制备室

培养基制备室是制备培养基和器具杀菌的地方，由于经常使用火力，因此要具有适当的防火结构。地台铺洋灰，墙壁用砌砖或用洋灰。另在室内设置防火设备，以保安全。

培养基制备室的设备有干热杀菌器，湿热杀菌釜，实验台，培养基制备器具等。

三、无 菌 室

为了防止在接种微生物、平板培养及其它实验时空气中杂菌侵入，将在实验室内另设置一小的无菌室进行实验。无菌室的面积约为 2×3 米²，高2~3米。无菌室的一面设双重壁、双重门，其它三面，从地面至高90厘米处铺木或砖，90厘米以上起则设置玻璃板。沿室的玻璃壁的三面设置实验台板，放置煤气灯或酒精灯、白金线、火柴等实验器具。地面与实验室一样铺洋灰，墙壁门窗要密封得很好，室内要光洁，干爽，全无杂物。门是双重门，双重门中间有一间室，工作人员入内工作，先开一重门，站在间室内，关上第一重门，然后开第二重门，进入无菌室工作。无菌室是用紫外线灯杀菌，使用前，先用紫外线灯照射全室杀菌40分钟，使室内成为无菌状态，然后进入工作。工作人员进入无菌室时，应穿无菌工作服，戴口罩和手套，当操作时如需继续照射紫外光线，则要带上有色眼镜，因为达到2537 Å线辐射密度 $0.1 \mu\text{w}/\text{平方厘米}$ 时，有伤害眼睛的作用

四、定 温 室

实验人数较多，而恒温箱容量有限，因此有设置定温室的必要。定温室的大小要适当，过大则保温困难，大概为面积2平方米，高2米左右。四周墙壁可用砖砌，厚度约30厘米左右；地面铺水泥。在室顶适当地方设置直径20厘米的换气筒，如果不能在室顶设置，可改在墙壁两方开设。在室内放置若干个木架，为盛载培养容器之用。保温设备可用300~500伏特电炉，以变压器调节温度。

第二节 微生物实验用仪器

一、镜检用的仪器

1. 显微镜 是研究微生物的主要工具之一，它的构造和使用技术，将在第四章第一节作详细介绍。

2. 显微镜摄影装置 见第四章第四节，显微镜摄影装置。

3. 描图器 这是方便于描写显微镜图像的装置，如图1。将描图器安装在显微镜筒的上部，则由于棱镜的作用，就可同时看见由接目镜反映出来的检体像和写生用的纸面。

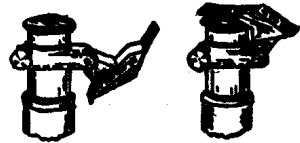


图1 描图器

4. 载玻片 用来盛载被检查样本，通常用7.6×2.6厘米的载玻片。

5. 凹窝载玻片 作悬滴培养及少量糖类发酵的试验时用。

6. 盖玻片 用来复盖被检样本，通常用1.8×1.8厘米的盖玻片。

7. 表面皿 形状是圆形，中间凹陷，作菌体检查时用。

8. 染色针 制标本染色用；挟紧载玻片，使保持水平位置。

9. 目镜测微计 是一有刻度的圆形玻璃片，用作测量微生物的大小。

10. 物镜测微计 是一中间有标准刻度的玻璃片，用来测定目镜测微计的大小。

11. 血球计数器 用作测量单位容积中微生物的数量。

12. 菌落计数器 用来计算平板培养中，单位面积微生物的数量。

13. 玻璃罩 用来盖罩长期使用的显微镜。

14. 有盖玻璃瓶或广口瓶 内装60%酒精，为贮存清洁的载

玻片，凹窝载玻片用。

15. 小型培养皿 4×2 厘米或 5×2 厘米，内装60%酒精，为贮存清洁的盖玻片用。

16. 试剂瓶 约100毫升的狭口软木塞玻璃瓶，为贮存色素液、二甲苯、醋酸等用。

17. 香柏油瓶 如图2所示，内装约30毫升的特制小瓶，用内塞的中央部伸下的玻璃棒或角骨棒，蘸取内装的香柏油，作油浸系镜检用。



图2 香柏油瓶

18. 滤纸、纱布 为抹净载玻片、盖玻片用。

19. 记录簿、标签纸、笔、浆糊、试管架等。

二、培养基制备用的仪器和器具

1. 高可氏杀菌锅 是利用水蒸气杀菌的杀菌锅，它的构造如图3所示。由一圆筒、圆锥形的盖及下部锅身三部分所构成。是用铜、锌片或镀锌的铁片制造。为了保温隔热，圆筒及盖都以石棉纸或毛毡包裹。盖上插有温度计。锅身附有水位计，可调节锅内的水量。在锅内设有铁网蒸笼和数层铁线篮，用来装载培养基及玻璃仪器等，以便进行杀菌。

2. 高压杀菌锅 是一高压高热杀菌锅，分为直立式或横卧式两种，它的构造如图4所示。盖的周围装有活动螺栓，能栓紧锅身，以便进行密封高压杀菌。为了保证安全，必须安装压力计和安全阀，安全阀要时时检

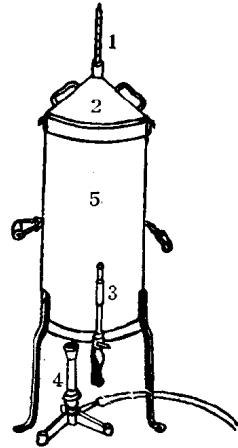


图3 高可氏蒸气杀菌锅
1—温度计；2—盖；3—水位计；4—煤气灯；5—锅

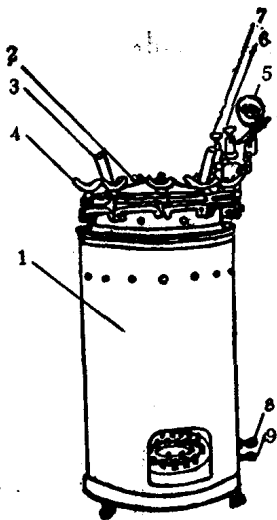


图4 高压杀菌锅

1—圆筒；2—盖；3—把手；
4—螺旋；5—压力表；6—安全阀；7—排气阀；8—煤气
管；9—煤气管

查，以免生锈失效。

3. 恒温槽 是长方形金属制成的槽，用电加热水来保温。试验微生物对温度的抵抗力时，常用这种恒温槽保温。

4. 保温漏斗 为过滤琼脂、明胶等培养基用，如图5所示。具有闭口支管的铜制漏斗状的外壁，内套玻璃漏斗，在两壁间载水。从支管的下部点火加热，过滤时不断将水煮沸。

5. 干热杀菌箱 利用干热将玻璃仪器杀菌。它的构造，是由铁片制成长方形二重壁的箱子，外壁包以石棉

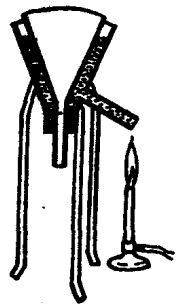


图5 保温漏斗

纸，内装置数层有孔铁板。热源常用电或煤气。

6. 搪瓷锅 为制备培养基用。

7. 试管 普通用16×1.6厘米的硬质玻璃试管，为培养基分注用。

8. 试管罩 铁线制成或竹织成的小箩，为收容分注试管进行湿热杀菌用。

9. 三角瓶 200、300、500毫升的硬质玻璃三角瓶。

10. 棉花 使用普通纺织用的棉花，作试管、三角瓶、烧瓶等的棉塞用。

11. 药棉 为过滤培养基或代滤纸用。

12. 温度计 100°C及200°C的。

13. 天平 能够称量0.05~0.1克至100克~1公斤的。但称量

合成培养基材料时需要用精密天平。

14. 布袋 约30×60厘米，为装载培养基材料用。
15. 玻杯 1~2升，高身的为好。
16. 漏斗 培养基过滤用，大形的为好。
17. 培养基分液装置 可使用如图6所示的装置。
18. 漏斗架 使用如图7所示的漏斗架为好。

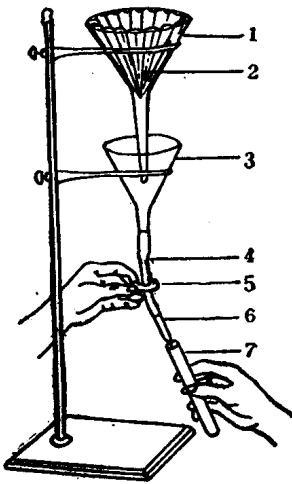


图6 培养基分液装置

- 1—大漏斗；2—滤纸；3—小漏斗；
- 4—橡皮管；5—弹簧夹；6—吸管；
- 7—培养试管

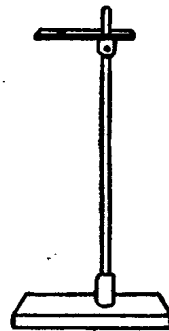


图7 漏斗架

19. 平底烧瓶 容量1~2升，短颈的为好。
20. 滤纸 漏斗中过滤用。
21. 磁制皿 反应观察用。
22. 石蕊试纸、pH试纸 培养液反应调整用。
23. 量筒 容量1升。
24. 巴林氏 (Balling) 计，即检糖计 为测定曲汁或麦芽汁的糖液浓度用。

25. 本生灯 或酒精喷灯 为加热水浴和培养基制备锅用。

26. 玻璃棒、小刀、抹布。

三、分离及培养用仪器

1. 恒温箱 如图8所示, 为保持一定温度使微生物生长, 通常用铜片或其他合金制成二重壁的箱子。热源多用电热。箱内设有数层有孔的平板, 以载培养器具进行保温。外壁包有石棉纸。恒温箱常用隔门, 内门是玻璃门; 箱顶上开有小窗, 窗上装有温度计及温度调节器。

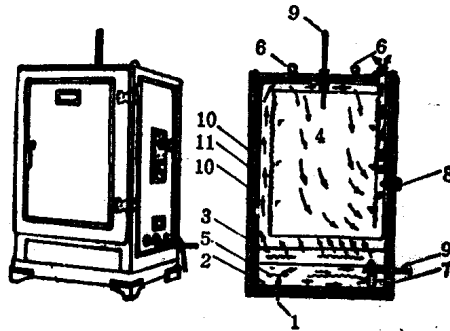


图8 恒温箱

1—空气孔; 2—预备加热室; 3—调整室; 4—内室;
5—发热体; 6—灭点灯; 7—预备加热器; 8—调整器;
9—温度计; 10—木板; 11—炭化软木

2. 电冰箱 为低温试验和菌种保藏用。电冰箱有各种形状, 冷冻剂常用二氯氟甲烷 (CCl_2F_2)。

3. 无菌箱 这是为分离、培养微生物用的玻璃箱。如图9所示, 四壁和上下都是在一个木架上铺玻璃板。通常高56厘米, 宽63厘米, 深50厘米; 前面玻璃壁的两侧, 设置上下移动的门, 工作时从这里伸手进去。在工作前, 用布片或棉花浸透0.1%升

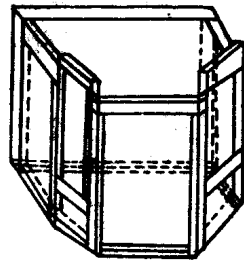


图9 无菌箱

汞水，将无菌箱的全部玻璃板和木架洗抹，或用如图10所示的喷雾器喷雾。密闭静置20~30分钟。则空气中的微生物由于空气流动，完全粘在四面和上下的玻璃板上而死灭，使箱内成为无菌状态。

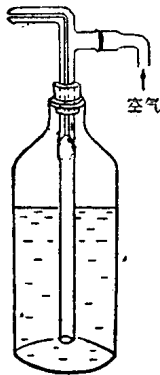


图10 喷雾器

4. 白金线 取直径0.6毫米长约6厘米的白金线，装于玻璃棒的一端使用。如果将白金线末端弯曲成直径2毫米的环，则称为白金耳。若要收集大量菌体时，可将白金线末端卷成蜗卷状。处理霉菌时应将白金线的末端卷成钩状，称为白金钩。

标准的白金耳，是用直径1毫米，长5厘米的白金线制成，它的一端制成直径2毫米的环；当环装满经过24小时培养的大肠杆菌菌苔时，则一白金耳的菌量约为2毫克，相当于25亿个大肠杆菌。

为了在整个培养基面涂抹细菌，可用如图11所示的用玻璃棒制成的康勒地棒（Conradi）。

白金线可用铬合金线代替，铬合金线价廉，容易获得，但冷却慢。

5. 巴氏瓶 通常使用容积为250~1000毫升的玻璃瓶，用于培养微生物，特别是培养酵母用。

6. 培养皿 是平板培养用的有盖玻璃皿，大小通常是直径10厘米、高1.5厘米。盖与皿要密切相合但开闭自

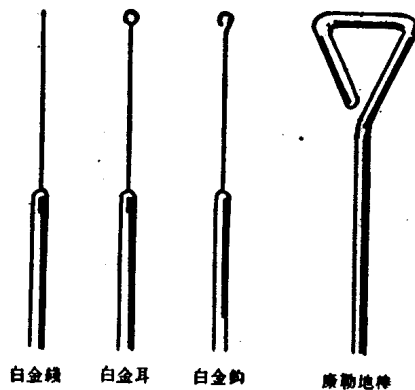


图11 培养用的白金线等仪器

由的，如图12所示，此皿杀菌后才用。

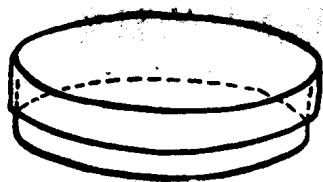


图12 培养皿

11. 吸管 普通用1毫升、5毫升和10毫升有刻度而且短管的，便于杀菌。吸管的杀菌，如图13所示。

12. 纪录簿、笔。

7. 水浴锅 溶解固体培养基用。

8. 本生灯或酒精灯 为固体培养基加热熔融，白金线及试管棉塞杀菌，染色制片固定等用。

9. 标签 约 3×2 厘米。

10. 写玻璃用的腊笔。



图13 吸管杀菌

第二章 杀菌法及培养基的制备

第一节 杀 菌 法

凡处理微生物所用的一切玻璃仪器或培养基等都须无菌，否则，培养目的以外的微生物侵入，就会妨碍实验。

杀菌就是将所有微生物杀灭，使变为无菌状态。

杀菌的方法有多种，常用的有下列几种：

一、火焰杀菌法

这种方法，在杀菌法中是最简单的一种，利用酒精灯或煤气灯所发生的火焰，将白金线、有柄针及其他简单的金属仪器等杀菌。又接种微生物于培养试管或玻璃瓶中的前后，它的棉塞及管口、瓶口也要在火焰上轻轻烧过，将其所附着在表面的菌类杀灭。解剖刀及镊子等所需用的物件，可置于醚或酒精浸湿，然后立即通过火焰2~3回，使醚或酒精燃烧，也可达到完全杀菌的目的。

二、干热杀菌法

这种方法是将玻璃仪器放入干热杀菌箱，以一定温度的干燥热气进行杀菌。一般玻璃仪器杀菌应用这种方法。

将需杀菌的玻璃仪器放入干热杀菌箱后，关门，开电流开关，至箱内空气达150°C时，调节温度调节器，使在150°C保持30分钟至1小时。不能使干燥箱温度增高到175°C以上，否则棉塞和纸包易燃烧或变脆而碎裂。

在干热杀菌过程中或杀菌后，在高温下，不宜打开干燥箱门，否则，包纸和棉花都被燃烧，而玻璃仪器也破裂。这是需要

注意的。

三、煮沸杀菌法

这种方法是用煮沸的热水进行杀菌，通常除孢子以外，一切的菌体用 100°C 的热水经10分钟至1小时都可将它杀死。因此，注射器，镊子，解剖刀等金属工具，及小玻璃仪器用这种方法杀菌较为方便。

四、蒸气杀菌法

这种方法是在蒸气杀菌锅内，以蒸气进行杀菌。蒸气杀菌锅通常是采用高可氏杀菌锅及高压杀菌锅。

(一) 巴士德杀菌法

没有孢子的细菌，以 100°C 的蒸气经过5~30分钟，即可将它杀死。但有挥发性的或化学不稳定性的培养基，如果用 100°C 蒸气杀菌，则会凝固或变质，从而失去作用。因此，需要用低温的 $56\sim 80^{\circ}\text{C}$ 热水进行杀菌。例如，血清是用 60°C 杀菌。这种低温杀菌法，称为巴士德杀菌法。

(二) 间歇杀菌法

这种方法是以 100°C 的蒸气，每天杀菌30分钟，连续杀菌三天。杀菌原理是基于普通细菌以 100°C 的蒸气经过30分钟杀菌便可全部杀死。但如枯草芽孢杆菌，马铃薯芽孢杆菌等有芽孢的细菌，难以杀死，所以要连续杀菌三天。即虽然经过第一天杀菌而尚未死灭的芽孢放在 $30\sim 37^{\circ}\text{C}$ 的地方，待至第二天发芽，变成通常细菌体后，再将它用 100°C 蒸气再行杀菌，这样反复杀菌三次，便能保证杀菌完全。间歇杀菌器通常是采用高可氏杀菌锅。

高可氏杀菌锅的使用法是先加水于锅内，加热，待水沸腾产生蒸气时，放入杀菌物，加盖。当温度上升至所需要的温度时，开始计算杀菌时间。杀菌完毕后开盖，待蒸气冷却，才可伸手入锅，取出杀菌物。

(三) 高压杀菌法

用高压杀菌锅所发生的高压蒸汽（15磅或1大气压的）进行杀菌，这样可以比一般杀菌法缩短杀菌时间，通常对在高压下不会有变化的培养基及实验用的玻璃仪器，适宜采用高压杀菌法。有芽孢的细菌，以0.7大气压蒸汽杀菌20分钟或1大气压蒸汽杀菌15分钟，就可达完全杀菌的目的。

使用高压蒸汽杀菌锅时，先加水于锅内，接着放入杀菌物，栓紧密封顶盖，加热使水沸腾。开放排气阀，驱除锅内的空气，否则，温度上升困难。待有水蒸气喷出后，密闭排气阀。这样，压力计指针慢慢上升，到达了所需要的压力时，调节火力，保持它的压力，使经过一定的时间。杀菌完毕，则熄火，待压力计指针回降后，逐步打开排气阀，放尽水蒸汽，开盖，冷却片刻，才可取出杀菌物。

从杀菌方面来说，高压杀菌法能够保证杀菌完全，但对于加糖培养基，则采用高压杀菌法往往会使糖焦化。对于肉汁培养基的细菌营养物质也有些破坏。这些缺点，应当注意。

五、化学药品杀菌法

化学药品杀菌法的应用范围比加热杀菌法较窄，但对于实验用的培养皿、试管、载玻片及盖玻片等，以及工作人员的手指，实验用动植物体的消毒，采用化学药品杀菌则较为方便。实验需用的吸管、三角瓶等玻璃仪器，先以蒸馏水洗净，然后用升汞、酒精、醚等依次浸渍，最后在弱火焰上使它烘干，这样，可以达到完全杀菌的目的。常用的化学杀菌剂有下列几种。

1. 升汞 (HgCl_2) 杀菌力最强，通常用0.1%的升汞水溶液，数分钟即可将细菌杀灭，有芽孢的细菌，则经一至数小时也全部杀灭。

升汞遇水，易起分解，为了防止分解和帮助升汞溶于水，则需加一些食盐或盐酸。升汞水溶液制备方法如下。