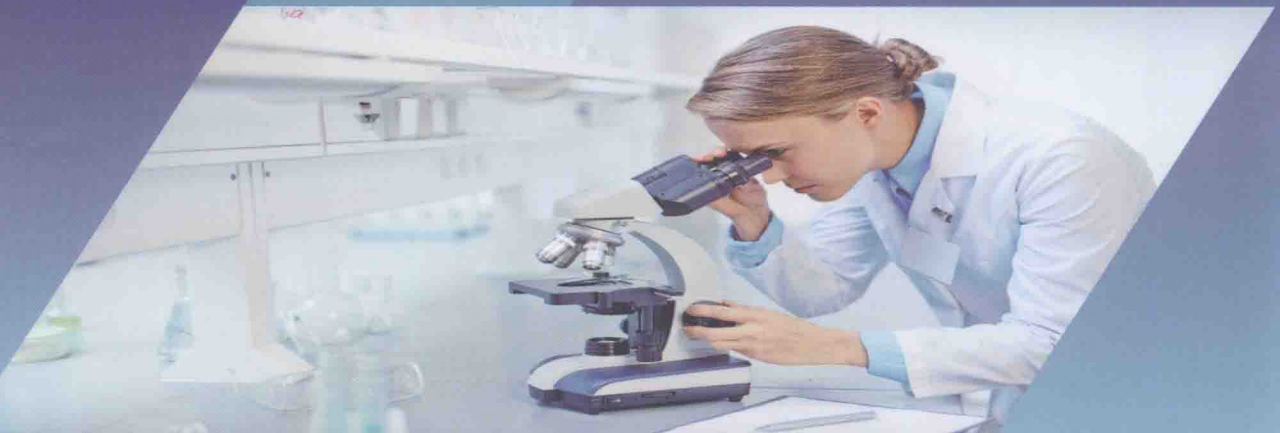


微生物学实验

WEISHENGWUXUE SHIYAN

■ 主 编 蔡尽忠 赵 丽



大连理工大学出版社

微生物学实验

WEISHENGWUXUE SHIYAN

主 编 蔡尽忠 赵 丽
副主编 何少贵 陈金垒
胡 佳 庄峙厦
鄢庆枇



大连理工大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验 / 蔡尽忠, 赵丽主编. — 大连: 大连理工大学出版社, 2018. 6

ISBN 978-7-5685-1452-1

I. ①微… II. ①蔡… ②赵… III. ①微生物学—实验 IV. ①Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 098896 号

大连理工大学出版社出版

地址:大连市软件园路 80 号 邮政编码:116023

发行:0411-84708842 邮购:0411-84708943 传真:0411-84701466

E-mail:dutp@dutp.cn URL:<http://dutp.dlut.edu.cn>

大连理工印刷有限公司印刷

大连理工大学出版社发行

幅面尺寸:185mm×260mm

印张:6.75

字数:149 千字

2018 年 6 月第 1 版

2018 年 6 月第 1 次印刷

责任编辑:王晓历

责任校对:王晓彤

封面设计:张 莹

ISBN 978-7-5685-1452-1

定 价:21.80 元

本书如有印装质量问题,请与我社发行部联系更换。

前 言

本教材主要面向应用型本科食品质量与安全、环境科学与工程、制药工程专业学生,亦适用于高职食品分析与检验、环境监测与评价、药品质量检测技术专业学生,旨在训练学生掌握微生物基本的实验操作技能,掌握检测食品、环境、药学常见微生物项目的实验技能,加深和巩固对微生物学理论知识的理解。

本教材主要包括四部分内容:第一部分为基础微生物学实验方法与技术;第二部分为食品微生物学实验方法与技术;第三部分为药学微生物学实验方法与技术;第四部分为环境微生物学实验方法与技术。第一部分主要介绍微生物学实验的基本操作知识;第二、三、四部分为微生物学综合实验,分别介绍了食品、药学、环境中常见微生物检测项目的操作方法。

本教材由厦门华厦学院蔡尽忠、赵丽任主编,厦门华厦学院何少贵、陈金垒、胡佳、庄峙厦以及集美大学鄢庆枇任副主编。

在编写本教材的过程中,我们参考、借鉴了许多专家、学者的相关著作,对于引用的段落、文字尽可能一一列出,谨向各位专家、学者一并表示感谢。

编 者
2018年6月



新世纪

所有意见和建议请发往:dutpbk@163.com

欢迎访问教材服务网站:<http://www.dutpbook.com>

联系电话:0411-84708445 84708462

微生物学实验指导书



录

微生物学实验目的与基本要求	1
实验室检验总则	3
第一部分 基础微生物学实验方法与技术	5
实验一 微生物学实验常用器皿的包扎	7
实验二 普通光学显微镜的使用	11
实验三 微生物形态观察	16
实验四 革兰氏染色	18
实验五 干热灭菌及高压蒸汽灭菌	22
实验六 培养基配制	24
实验七 接种技术和分离培养技术	27
实验八 微生物显微镜直接计数法	32
实验九 微生物大小的测定	35
实验十 菌种保藏	38
实验十一 环境因素对微生物生长的影响	42
第二部分 食品微生物学实验方法与技术	45
实验十二 酸乳的制作与乳酸菌单菌株发酵	47
实验十三 食品中细菌总数的监测	50
实验十四 食品中大肠菌群的检测	54
实验十五 食品接触面的微生物检测	57
实验十六 罐头食品中平酸菌的检测	59
实验十七 食品中金黄色葡萄球菌的检测	62
实验十八 食品中沙门氏菌的检测	65

第三部分 药学微生物学实验方法与技术	71
实验十九 抗生素效价测定技术(二剂量法)	73
实验二十 药物体外抗菌实验	75
实验二十一 口服药品的细菌总数检查和注射剂的无菌检查	77
实验二十二 常用的细菌生化检验方法(IMViC 实验)	79
第四部分 环境微生物学实验方法与技术	81
实验二十三 水中细菌总数的监测	83
实验二十四 水中大肠菌群的检测	86
实验二十五 水体沉积物中的 H ₂ S 产生菌的测定	92
实验二十六 土壤中微生物数量的监测	94
实验二十七 空气、皮肤、口腔中微生物分布测定技术	96
参考文献	102

微生物学实验目的与基本要求

一、目的

微生物学实验课的目的是通过实验达到训练学生掌握微生物学基本的操作技能;使学生掌握微生物的基本知识;加深对课堂讲授的微生物学理论知识的理解。通过实验课还可以培养学生观察、思考、分析问题、解决问题和提出问题的能力;养成实事求是、严肃认真的科学态度以及敢于创新的开拓精神。

二、基本要求

为了上好微生物学实验课,并保证安全,特提出如下要求:

1. 每次实验课必须对实验内容进行充分预习,以了解实验目的、原理和方法,达到心中有数,思路清楚。
2. 进入实验室后应穿实验服,禁止吸烟及吃东西。
3. 在实验室内不要趴在桌子上。
4. 认真、及时做好实验记录,对于当时不能得到结果而需要连续观察的实验,则需记下每次观察的现象和结果,以便实验结束后分析。
5. 实验室内应保持整洁,勿高声谈话和随便走动,保持室内安静。
6. 实验时小心仔细,全部操作应严格按操作规程进行,万一遇到盛菌试管或瓶不慎打破;皮肤或菌液吸入口中等意外情况发生时,应立即报告指导教师,及时处理,切勿隐瞒。
7. 实验过程中,切勿使乙醇、乙醚、丙酮等易燃品接近火焰。如遇火险,应先关掉火源,再用湿布或沙土掩盖灭火。必要时使用灭火器。
8. 加热培养基时,人要在旁边看着,防止爆沸。
9. 手擦完医用酒精时,要等手干后才能靠近酒精灯,防止手着火烧伤。
10. 使用显微镜或其他贵重仪器时,要求细心操作,特别爱护。对消耗材料和药品等要求节约,用毕后要盖好瓶盖,放回原处。
11. 每次实验完毕后,必须把所用仪器抹净放妥,将实验室收拾整齐,擦净桌面,如有菌液污染桌面或其他地方时,可用 3% 来苏尔液或 5% 石炭酸液或 0.1% 新洁尔灭覆盖 0.5 h 后擦去,如系芽孢杆菌,应适当延长消毒时间。

12. 凡带菌的工具(如吸管、玻璃涂布棒等)在洗涤前必须浸泡在消毒剂中消毒或用开水煮沸 5 分钟以上才可洗涤。

13. 每次实验需进行培养的材料,应标明自己的组别、样品名称、实验日期及稀释倍数等信息,放于教师指定的地点进行培养。实验室中的菌种和物品等,未经教师许可,不得携带出实验室外。

14. 每次实验结束,应以实事求是的科学态度填写报告表格,力求简明准确,认真回答思考题,并及时汇交教师批阅。

15. 实验完成后值日生留下做好清洁工作。

16. 离开实验室之前将手洗净,并关闭灯、火、水、电、门、窗等。

实验室检验总则

一、样品的采集

(一) 采样目的

确保采集的样品能代表全部被检验的物质,使检验分析更具代表性。

(二) 采样原则

1. 采集的样品要有代表性,采样时应首先对该批原料、加工、运输、贮藏方法及条件,周围环境卫生状况等进行详细调查,检查是否有污染源存在,同时能反映全部被检食品的组成、质量和卫生状况。

2. 应设法保持样品原有微生物状况,在进行检验前不得污染,不得使微生物形态发生变化。

3. 采样必须遵循无菌操作规程,容器必须灭菌,避免环境中微生物污染,容器不得使用煤酚皂溶液,新洁尔灭、酒精等消毒物灭菌,更不能含有此类消毒药物,以避免杀掉样品中的微生物,所用剪、刀、匙等用具也须灭菌后方可使用。

(三) 采样数量

采样数量的确定,应考虑分析项目的要求、分析方法的要求及被检物的均匀程度三个因素。样品应一式三份,分别供检验、复检及备查使用,每份样品数量一般不少于 200 g。

根据不同种类采样数量略有不同,实验室检验样品一般为 25 g。

(四) 采样方法

1. 采取随机抽样的方式。

2. 直接食用的小包装食品,尽可能取原包装,直到检验前不要开封,以防污染。

3. 如为非冷藏易腐食品,应迅速将所采样品冷却至 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 。

4. 不要使样品过度潮湿,以防样品中固有的细菌增殖。

5. 在将冷冻食品送到实验室前,要始终保持样品处于冷冻状态。样品一旦融化,不得再次冷冻,保持冷却状态即可。

(五) 样品的保存和运送

1. 样品采集完后,应迅速送往实验室检验,送检过程一般不超过 3 h,如路程较远,可保存在 $1\sim 5^{\circ}\text{C}$ 环境中,如需冷冻,则在冷冻状态下送检。

2. 冷冻样品应存放在 -15°C 以下冰箱内;冷却和易腐食品应存放在 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 冰箱或冷却库内;其他食品可放在常温冷暗处。

3. 运送冷冻和易腐食品应在包装容器内加适量的冷却剂或冷冻剂。保证途中样品不升温或不融化。

4. 待检样品存放时间一般不应超过 36 h。

二、检验样品的制备

(一) 样品的全部制备过程均应遵循无菌操作程序。

(二) 检验冷冻样品前应先使其融化。可在 $0\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 融化, 时间不超过 18 h, 也可在温度不超过 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的环境中融化, 时间不超过 15 min。

(三) 检验液体或半固体样品前应先将其充分摇匀。如容器已装满, 可迅速翻转 25 次; 如未装满, 可于 7 s 内以 30 cm 的幅度摇动 25 次。从混样到检验间隔时间不应超过 3 min。

(四) 开启样品包装前, 先将表面擦干净, 然后用 75% 乙醇消毒开启部位及其周围。

1. 非黏性液体样品可用胶头滴管吸取一定量, 然后加入适量的稀释液或培养基内, 吸管插入样品内的深度不应超过 2.5 cm, 也不得将吸有样品的胶头滴管浸入稀释液或培养基内。

2. 黏性液体样品可用灭菌容器称取一定量, 然后加入适量的稀释液或培养基。

3. 固体或半固体样品可用灭菌的均质杯称取一定量, 再加适量的稀释液或培养基进行均质, 从样品的均质、稀释以及接种, 间隔时间不应超过 15 min。

三、检验

(一) 实验室收到样品后, 首先进行外观检验, 及时按照国家标准检验方法进行检验, 检验过程中要认真、负责, 严格进行无菌操作, 避免环境中微生物污染。

(二) 检验所使用的稀释液、试剂以及培养基接触的一切器皿必须经过有效的灭菌。

(三) 实验室所用仪器、设备的性能应定期检查和校正。

(四) 制备试剂和培养基所用的水, 应为去离子水或用玻璃器皿蒸馏的蒸馏水。

(五) 检验结束后, 所有带菌的培养基、试剂、稀释液和器皿必须尽快灭菌和洗刷。清洗过的器皿不应残留洗涤剂的痕迹。

四、检验记录和结果的报告

(一) 经检验的每份样品都应有完整的检验记录。样品检验过程中实验方法、实验现象和实验结果等均应用文字进行实验记录, 作为结果分析和判定的依据, 记录要求详细、清楚、真实、客观、不得涂改和伪造。

(二) 检验结束后, 根据检验结果, 及时填写检验报告书, 签字并经负责人审核签字后发出。

第一部分 基础微生物学实验方法与技术

实验一

微生物学实验常用器皿的包扎

一、实验目的

1. 熟悉微生物实验所需的各种常用器皿名称和规格。
2. 掌握微生物实验常用器皿的包扎。

二、实验原理

微生物实验一般要求无菌操作,直接接触样品、菌种的器皿在使用之前应先灭菌。对于需要灭菌的器皿,在灭菌前必须正确包扎,灭菌之后取出才不会被污染,只有在使用之前才能按要求拆开包扎物。

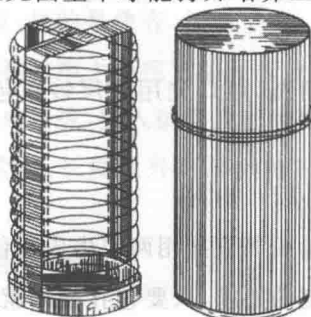
三、实验器材及试剂

牛皮纸、报纸、纱布、脱脂棉、剪刀、培养皿、枪头盒、移液管、涂布棒、试管、三角瓶、镊子、移液枪枪头。

四、实验步骤

1. 培养皿

洗净晾干后每 10 套叠在一起,用牛皮纸卷成一筒,应尽量包紧,外面用绳子捆扎,然后进行灭菌。有条件的,最好放在特制的铁皮圆筒里,加盖扣严(图 1-1)。包装后的培养皿经灭菌后方可使用,使用时在无菌室中才能打开培养皿。



(a)内部框架

(b)带盖外筒

图 1-1 装培养皿的铁皮圆筒

2. 枪头盒

枪头盒单独用牛皮纸包扎,应尽量包紧。

3. 涂布棒

每支涂布棒先用一条宽 4~5 cm 的报纸条包扎,应尽量包紧,然后再几支一起用牛皮纸包扎。

4. 移液管

为防止细菌进入移液管管口,并避免将管口细菌吹入移液管内,移液管应在距管口 1~2 mm 处塞入棉花少许(2~3 cm 长)。棉花要塞得松紧适宜:吹时能通气,但棉花不滑下去。

塞好棉花的移液管用报纸条包扎,应尽量包紧(图 1-2)。然后再几支一起用牛皮纸包扎。或者把包装好的移液管放在特别制作的铁皮圆筒内,加盖密封后待灭菌(图 1-3)。

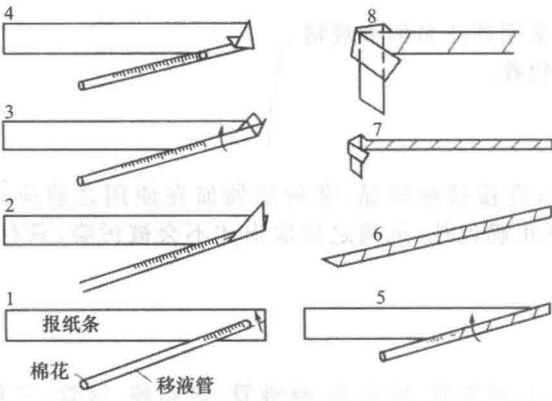


图 1-2 单支移液管的包装方法和步骤



图 1-3 移液管筒

5. 试管

试管用棉花塞或试管塞塞好后,几根扎一捆后,在试管口包一层牛皮纸。

6. 三角瓶

装培养基或用来培养厌氧微生物的三角瓶,瓶口先用两层铝箔包扎,然后外面再用一层牛皮纸包扎。

用来培养需氧微生物的三角瓶,瓶口先用 8 层纱布包扎,然后外面再用一层牛皮纸包扎。

7. 其他用具的包扎

镊子、剪刀、10 mL 移液枪枪头等直接用两层牛皮纸包扎。

微生物器皿的包扎没有固定的要求,只要包扎密闭就可以。上述操作方法只是常用

的包扎方法,实际应用中可根据不同情况调整包扎方法。

五、思考题

1. 微生物实验器皿为什么要进行包扎?
2. 微生物实验器皿包扎时应注意什么事项?

附：棉花塞的制作

试管和三角瓶都需制作合适的棉花塞。棉花塞起过滤作用,可避免空气中的微生物进入试管或三角瓶。

棉花塞应紧贴玻璃壁,没有皱纹和缝隙,不能过紧或过松,过紧易挤破管口或不易塞入,过松易掉落或污染。棉花塞的长度不小于管口直径的 2 倍,约 $\frac{2}{3}$ 塞进管口。将若干支试管用绳子扎在一起,在棉花塞部分外包油纸或牛皮纸,再在纸外用绳扎紧。三角瓶则每个单独用油纸包扎棉花塞(图 1-4)。

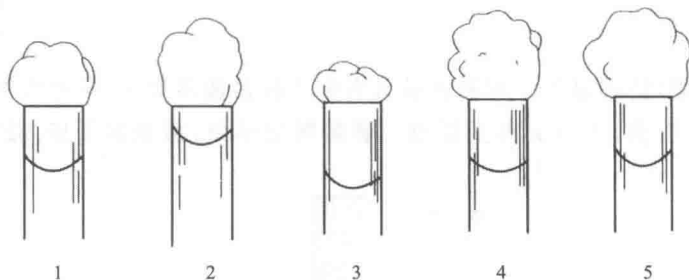


图 1-4 棉花塞

1—正确的样式;2—管内部分太短,外部太松;3—外部过小;

4—整个棉花塞过松;5—管内部分过紧,外部过松

不能用脱脂棉制作棉花塞,必须用普通棉花。制作方法如下:

1. 根据所做棉花塞的大小撕一块较平整的棉花。
2. 把长边的两头各叠起一段,目的是叠齐、加厚。
3. 按住短边把棉花卷起来,卷时两手要捏紧中间部分,两头不要卷得太紧。
4. 卷成棉卷后,从中间折起来并拢,插入试管或三角瓶,深度如上所述。
5. 检查一下插入部分的松紧度、长度及外露部分的长度、粗细和结实程度是否合乎要求。

此外,还有一种制作法,如图 1-5 所示。

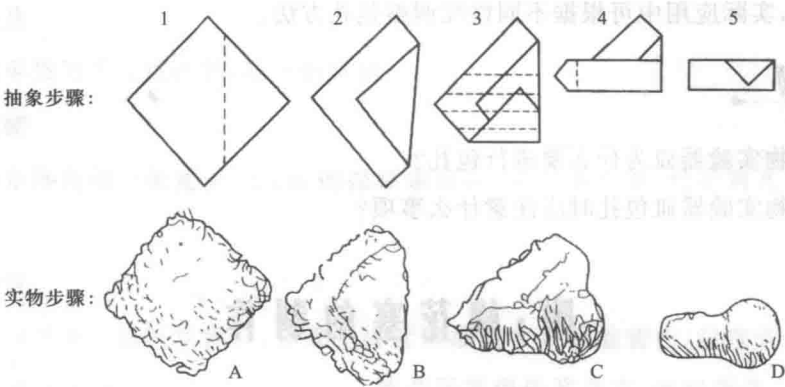


图 1-5 棉塞的制作过程

为了便于无菌操作,减小棉花塞的污染概率或因棉花纤维过短而影响使用效果,可在棉塞外面包上1~2层纱布,延长其使用时间。

新做的棉花塞弹性比较大,不易定型。插在容器上经过一次高压蒸汽灭菌后,其形状、大小即可固定。按不同的大小分类存放,备用。

实验二

普通光学显微镜的使用

一、实验目的

1. 学习显微镜的结构、功能和使用方法。
2. 学习并掌握油镜的原理和使用方法。

二、实验原理

显微镜的种类很多,主要依据目的不同将其分为普通光学显微镜(图 2-1)、暗视野显微镜、荧光显微镜、电子显微镜、相差显微镜等。在微生物实验中,普通光学显微镜的使用最为常见。

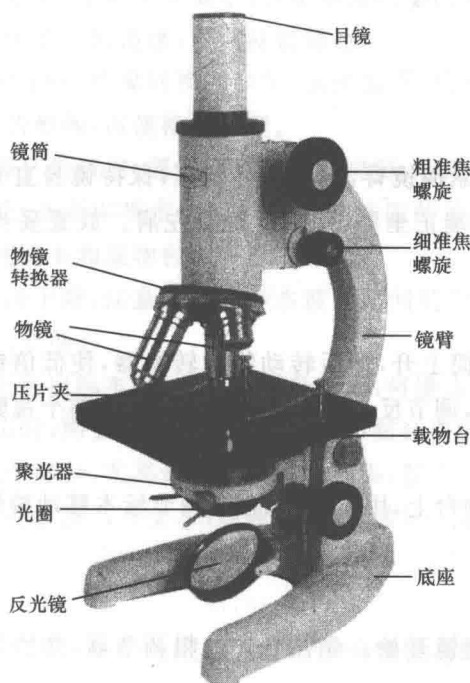


图 2-1 普通光学显微镜