

四川工商职业技术学院
省级重点专业建设项目成果

发酵微生物

主 编 魏明英



科学出版社

四川工商职业技术学院
省级重点专业建设项目成果

发酵微生物

主 编 魏明英

副主编 邓 林 胡太健

参 编 隋 明 韩素群 张兴波 尹显峰

窦 勇 张敬慧 汪晓雪 王娟丽

主 审 朱克永

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书主要介绍了发酵乳制品、泡菜、酿酒、调味品、抗生素等发酵行业中微生物的应用,每个模块中选取该行业简单、典型的例子对该行业的情况进行以点带面的阐述。旨在将传统的微生物知识和技能全部融入各模块中,使知识、技能与微生物应用有效融为一体,能更好地引导学生进行知识技能的学习。

本书适合作为高等职业教育生物技术专业、酿酒专业、食品营养与检测专业等的教材,同时可作为各类微生物检测、微生物应用等机构的培训教材。

图书在版编目(CIP)数据

发酵微生物 / 魏明英主编. —北京: 科学出版社, 2016
(四川工商职业技术学院·省级重点专业建设项目成果)
ISBN 978-7-03-024484-0

I. ①发… II. ①魏… III. ①发酵学-微生物学-高等职业教育-教材
IV. ①TQ920.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 074955 号

责任编辑: 沈力匀 冯 涛 袁星星 / 责任校对: 刘玉靖
责任印制: 吕春珉 / 封面设计: 耕者设计工作室

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号
邮政编码: 100717
<http://www.sciencep.com>

铭浩彩色印装有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 6 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16
2016 年 6 月第一次印刷 印张: 13 3/4
字数: 326 000

定价: 35.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈骏杰〉)

销售部的电话 010-62136230 编辑部的电话 010-62138978-8208

版权所有, 侵权必究

举报电话: 010-64030229; 010-64034315; 13501151303

前 言

本书以微生物在发酵行业中的应用为主线，遵循使用微生物、培养微生物、认识微生物以及微生物污染控制、微生物筛选与育种、微生物发展现状等逻辑顺序进行编排。全书坚持以技能、知识的获取顺序为逻辑编排顺序，以案例和项目为载体，打破了长期以来的学科体系；选用简单、贴近生活、贴近专业的案例，将案例、任务、理论知识有机融合，消除了理论和实践分离的缺陷。

全书包含六个模块，每个模块与四川省主要发酵行业紧密联系，模块下有的项目中含有若干个任务，每个任务都属于实践性任务，学生可从每个任务中获得相应的技能与知识。

本书的编写人员主要是四川工商职业技术学院微生物课程的教师，同时也有企业人员参与编写。其中，主编为魏明英，副主编为邓林、胡太健（四川食品科学技术协会理事），参编人员有隋明、韩素群（四川味聚特食品有限公司）、张兴波（成都菊乐企业（集团）股份有限公司）、尹显峰、窦勇、张敬慧、汪晓雪、王娟丽等，主审为朱克永。

企业编写人员主要为教材编写方案提供意见和建议，并提供企业案例与工作任务，对教材初稿进行修改。

由于编者水平有限，书中难免有疏漏与不妥之处，敬请广大读者批评指正。

目 录

模块一 微生物在发酵乳制品生产中的应用	1
项目一 实验室酸乳的制作	1
项目二 企业凝固型发酵乳生产	2
任务一 牛乳液体培养基配制及灭菌	4
任务二 乳酸菌的接种与培养	5
任务三 培养基的制备	6
任务四 微生物的接种与培养	11
任务五 乳酸菌染色制片及形态观察	14
任务六 细菌菌落特征、形态特征观察	17
项目三 原料乳中抗生素鉴定及用含抗生素原料乳制作发酵乳	19
知识拓展	21
模块二 微生物在泡菜生产中的应用	35
项目一 传统四川泡菜的制作	35
项目二 四川工业泡菜的制作	39
任务一 泡菜中菌落总数的测定 (GB 4789.2—2010)	41
任务二 泡菜中大肠菌群的测定 (GB 4789.3—2010)	44
知识拓展	48
模块三 微生物在酿酒生产中的应用	61
项目一 实验室米酒的制作	61
项目二 酒精生产	62
项目三 白酒生产	64
项目四 酒曲生产	66
项目五 啤酒生产	67
任务一 酵母染色制品及形态观察	71
任务二 酵母菌总数的测定 (GB 4789.15—2010)	74
任务三 啤酒酵母与枯草芽孢杆菌大小的测定	76
任务四 酒曲中微生物的分离纯化	77
知识拓展	80
模块四 微生物在调味品生产中的应用	119
项目一 实验室豆腐乳制作	119
项目二 食醋的生产——山西老陈醋生产	120
项目三 酱油的生产	122
任务一 毛霉形态观察	124

任务二 霉菌菌落特征、形态特征观察.....	125
知识拓展.....	126
模块五 抗生素生产与微生物	152
项目一 青霉素生产.....	152
项目二 红霉素生产.....	153
任务 链霉菌形态观察	155
知识拓展.....	157
模块六 微生物的综合应用.....	168
项目一 泡菜的制作以及乳酸菌的分离.....	168
项目二 胶原蛋白酶产生菌的筛选.....	171
项目三 噬菌体的分离和纯化及噬菌体效价的测定.....	172
项目四 固定化酿酒酵母细胞的培养技术	175
项目五 利用紫外线诱变筛选营养缺陷型突变株	176
项目六 食用真菌的组织分离、液体培养和固体栽培	179
项目七 牛乳在自然发酵过程中细菌的测定	181
项目八 食品中沙门氏菌的测定.....	184
参考文献.....	194
附录	198
附录一 常用玻璃器材的准备	198
附录二 常用仪器的使用	202
附录三 实验室意外事故的处理.....	208
附录四 实验用染色液及试剂的配制	209
附录五 微生物学实验中一些常用数据.....	214
附录六 各国主要菌种保藏机构.....	214

模块一 微生物在发酵乳制品生产中的应用

【知识目标】

1. 了解发酵乳制品生产中微生物的类型。
2. 理解实验室、企业凝固型发酵乳制品的生产流程。
3. 理解发酵乳制品的发酵条件。
4. 熟悉乳酸菌、细菌的细胞形态与菌落特征及繁殖方式。
5. 熟悉细菌染色法相关知识，理解革兰氏染色机理。
6. 熟悉发酵工业中常见细菌的应用情况。
7. 熟悉化学因素对微生物生长的影响情况。

【能力目标】

1. 会用乳酸菌进行酸乳制作。
2. 会使用恒温培养箱。
3. 熟练采用简单染色法与革兰氏染色法对细菌进行染色制片。
4. 会进行培养基制备。
5. 熟练使用无菌操作技术。

项目一 实验室酸乳的制作

一、材料与器材

1. 主要材料

乳酸菌种：市售酸乳，内含活性乳酸菌。

无糖全脂奶粉：含脂肪（质量分数 28%）、蛋白质（质量分数 27%）、乳糖（质量分数 37%）、矿物质（质量分数 6%）、水分（质量分数 2%）。

2. 主要器材

无菌血浆瓶、无菌移液管、不锈钢锅、电炉、培养箱、冰箱等。

二、酸乳制作

1. 工艺流程

奶粉+蔗糖→混合调配→杀菌→装瓶→冷却→接种→培养→冷藏→成品。

2. 操作要点

混合调配：奶粉：水按 1：7 的比例将无糖全脂奶粉配成复原牛乳，并加入质量分数为 5%~6% 的蔗糖。

杀菌：用不锈钢锅将复原牛乳煮沸。

装瓶：在血浆瓶中加入 200mL 牛乳。

冷却：将血浆瓶中的牛乳冷却至 40~43℃。

接种：按 2%~5%（质量分数）接种量将市售酸乳接种到冷却至 45℃ 的牛乳中，充分振摇，使接入的酸乳种子与冷却后的牛乳混合均匀。

培养：将接种后的血浆瓶置于 40~42℃ 的培养箱中培养 4~6h，使乳酸菌大量增殖，当出现凝固时结束培养。

冷藏：将培养后的凝固酸乳置于 4~7℃ 的冰箱中低温储藏 24h，使乳酸菌发酵产生酸乳风味物质，完成酸乳的后熟作用。

三、项目结果与分析

(1) 牛乳如何从液态变为凝固态的酸乳？

(2) 如果将杀菌后原料乳冷却至 50℃ 时就开始接种，牛乳发酵过程中会出现什么现象？

(3) 如果将接种样品放入 30℃ 培养，牛乳发酵过程中可能出现什么现象？

(4) 如果将接种样品放入 50℃ 培养，牛乳发酵过程中可能出现什么现象？

(5) 根据上述工艺流程制作酸乳，培养 4h 后，牛乳依然未凝固，请设计 2 种方案，解决酸乳制作中出现的问题。

项目二 企业凝固型发酵乳生产

一、材料与器材

1. 主要材料

(1) 牛乳、嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌、双歧杆菌。

(2) 蔗糖、果胶、黄原胶、磷酸盐等。

2. 主要器材

巴氏杀菌机、净乳机、配料罐、管道过滤器、灌装机、发酵室、无菌操作台、显微镜等。

二、发酵生产

1. 工艺流程

纯菌种→菌种活化→母发酵剂→生产发酵剂→接种

↓

原料乳验收→原料乳预处理→原料乳标准化→配料→均质→杀菌→冷却→分装→发酵→冷藏→成品。

2. 操作要点

1) 发酵剂制备

(1) 菌种活化: 取灭菌的脱脂牛乳培养基 2 支, 按无菌操作法用灭菌接种勺分别接种保加利亚乳杆菌及嗜热链球菌各 1 勺, 摇匀后前者置 40~43℃ 下培养 12~14h, 后者于 37℃ 下培养 12h 进行活化, 如此反复活化 3~4 代后, 镜检细胞形态, 无杂菌时即可使用。

(2) 母发酵剂的培养: 取 100mL 新鲜脱脂乳 2 份, 分装于 250~500mL 经干热灭菌的三角烧瓶中, 于 0.07MPa (115℃) 下灭菌 20min。待冷却至 37℃ 左右, 按乳量的 1%~2% 分别接入经活化的纯种, 摇匀后, 置室温下培养 6~8h, 凝固后备用。

(3) 生产发酵剂的培养: 可用原料乳制作, 基本方法同母发酵剂。一般采用 1000~2000mL 的三角烧瓶或不锈钢的发酵罐进行。以 90℃ 60min 或 100℃ 30~60min 消毒, 冷却至菌种发育的最适温度, 然后按生产量的 1%~2% 接入母发酵剂 (保加利亚乳杆菌: 嗜热链球菌以 2:3 混合后接种), 充分搅拌, 置 43℃ 下培养, 达到所需酸度 (>0.8%) 时 (6~8h) 取出, 此时活菌数应达到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ CFU/mL, 降温, 冷藏备用。

(4) 冷却: 如果生产发酵剂在 6h 之内使用, 常冷却至 10~20℃, 如果储存时间超过 6h, 建议冷却至 5℃。

2) 原料乳验收

原料乳应根据我国现行国家标准进行验收, 感官指标与理化指标应符合要求, 尤其微生物指标中菌落总数不大于 2×10^7 CFU/mL, 原料乳不得含有抗菌素与其他杀菌剂。

3) 原料乳预处理

经验收合格的原料乳应及时过滤、净乳、预杀菌、冷却和储藏。生鲜乳杀菌一般采用巴氏杀菌法, 一般就是 85℃ 保温 15s。

4) 原料乳标准化

通常好的原料乳蛋白质、脂肪等各项指标均能达标, 但是在奶源未选择好的情况下, 仍有原料乳蛋白质、脂肪等指标不达标的情况, 可通过添加全脂或脱脂乳粉或乳清粉等, 或采用牛乳浓缩等方式进行标准化, 使指标达到要求。

5) 配料

配料主要是将蔗糖、增稠剂等添加到原料乳中得到调配料。蔗糖的添加量一般控制在 4%~8%。如果添加水果或者果酱类原料, 应该控制总糖的量, 防止糖度过高影响乳酸菌生长。蔗糖的添加方法为将糖加入已预热的原料乳中, 一边添加蔗糖一边搅拌, 再加热至 65℃, 用泵循环通过管道过滤器滤除杂质。

增稠剂或稳定剂的使用应符合《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760—2014), 增稠剂一般用复配性的, 所含成分通常由果胶、豆胶、黄原胶、魔芋胶、CMC 等胶体物中的一种或两种单体, 再添加磷酸盐复配, 各种单体与磷酸盐按一定的比例组成。增稠剂添加时一般先与蔗糖混合好, 然后同蔗糖一起加入加热的原料乳中

溶解。

6) 均质

为保障发酵乳的稳定性与稠度，并且使酸乳口感细腻，原料乳需进行均质。均质一般在 55~65℃ 时进行，均质压力一般为 20~25MPa。

7) 杀菌

通常将均质的调配料加热到 95℃，保温 5min 进行杀菌，以杀灭原料乳及其他原料中的细菌，钝化原料乳中的天然抑制物，使乳清蛋白变性，提高黏稠度和防止成品乳清析出。

8) 冷却与接种

根据生产发酵剂的菌种不同，冷却的温度一般是 40~43℃，也有特殊的只有 32~38℃。一般接种量为调配料的 2%~4%，接种时应严格控制操作卫生，防止发生微生物污染。发酵剂加入后要充分搅拌，使发酵剂与调配料充分混匀。

9) 发酵

根据发酵剂菌种不同，通常发酵温度控制在 40~43℃，直到牛乳 pH 降低到 4.7，发酵时间一般为 4~6h，特殊的可长达 30h。

10) 冷却

发酵终点到了立刻转入冻库进行冷却，当酸乳冷却到 10℃ 左右转入冷库，在 2~7℃ 下进行冷藏后熟。

三、项目结果与分析

(1) 如果原料乳中含有抗生素，发酵乳发酵可能出现什么现象？如何控制抗生素对发酵乳生产的影响？

(2) 企业凝固型发酵乳发酵是在分装后进行的，请总结分析企业凝固型发酵乳生产过程中哪些因素是影响质量的关键因素。

(3) 根据上述企业工艺流程制作凝固型发酵乳，培养 4h 后，牛乳依然未凝固，请设计 2 种方案，解决凝固型发酵乳制作中出现的问题。

任务一 牛乳液体培养基配制及灭菌

一、材料与器材

1. 主要材料

纯牛乳。

2. 主要器材

试管、三角烧瓶、高压灭菌锅、漏斗架、漏斗、电炉、培养箱、脱脂棉、纱布、线绳等。

二、任务实施

1. 牛乳培养基制备

取新鲜牛乳 2000mL，分装至试管中，分装量为试管高度的 $1/5 \sim 1/4$ ，装入三角烧瓶的培养基的量一般为三角瓶容积的 $1/3 \sim 1/2$ 。塞上棉塞或专用试管塞，用牛皮纸或报纸包扎。

2. 牛乳培养基灭菌

高压蒸汽灭菌，0.1MPa 灭菌 20min。灭菌操作方法如下：

(1) 在高压灭菌锅内加入适量的水，约接近金属隔板处。

(2) 将试管与三角烧瓶包扎好，小心放于隔板上。

(3) 将盖子盖好，扭紧螺旋，打开排气阀，待排气阀冒热气 3~5min 后关闭排气阀。至压力表所示压力升至 0.1MPa 时开始计时，恒压 20min，停止加热，压力随之下降。

(4) 待压力自行降至零时，方可将排气阀慢慢打开、放气。放气完毕后，开盖取出灭菌物品，气未放完前切不可开盖。

三、任务结果与分析

(1) 总结培养基配制的基本流程。

(2) 总结高压蒸汽灭菌的流程及注意事项。

任务二 乳酸菌的接种与培养

一、材料与器材

1. 主要材料

菌种：保加利亚乳杆菌及嗜热链球菌。

培养基：牛乳液体培养基。

2. 主要器材

接种针、接种环、接种钩、酒精灯、培养箱、试管架、镊子、火柴。

二、任务实施

1. 接种前的准备工作

(1) 检查接种工具是否准备充分。

(2) 在待接种的培养基试管、斜面或平板上，根据实验中的要求贴好标签，标上待接种的菌名、操作者和接种日期。

(3) 将培养基、接种工具和其他用品全部放在超净工作台或试验台上，摆好，将超净工作台的紫外灯打开进行消毒。关好实验室门、窗，用 5% 的苯酚溶液或 5% 的来苏水

溶液进行喷雾空气消毒或擦拭台面，尽可能在无菌室内进行无菌操作，在无菌室或超净工作台上进行接种。

2. 接种操作

1) 液体菌种接入液体培养基

菌种为液体时，接种除用接种环外，还可用无菌吸管或滴管。方法：在火焰旁拔去棉塞，将试管口通过火焰灭菌，用无菌吸管吸取菌液 0.1~0.2mL 注入平板，然后用无菌的玻璃棒在平板表面均匀涂布。

2) 斜面菌种接入液体培养基

由斜面菌种接入液体培养基，其取菌种方法与斜面试种相同，但液体培养基试管口部略高些，以免培养基流出。接种环取到菌种后，将接种环伸入液体培养基中，使接种环于试管壁轻轻地研磨将菌体擦下接入液体培养基。接好菌种后，将棉塞通过火焰，塞好棉塞，将试管在手中轻轻敲打，使菌体充分分散。

3. 乳酸菌培养

保加利亚乳杆菌置于 40~43℃ 下培养 12~14h，嗜热链球菌接种后于 37℃ 下培养 12h 进行活化。

三、任务结果与分析

(1) 如果接种时未按无菌操作，乳酸菌培养会出现什么现象？

(2) 乳酸菌在 28℃ 培养 12h，能达到活化的目的吗？

任务三 培养基的制备

一、材料与器材

1. 主要材料

马铃薯、葡萄糖、琼脂、蔗糖、 NaNO_3 、 K_2HPO_4 、 KCl 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 FeSO_4 、水。

2. 主要器材

高压灭菌锅、漏斗架、漏斗、台秤、培养箱、脱脂棉、纱布、滤纸、线绳，精密 pH 试纸、三角烧瓶、试管、培养皿、移液管等。

二、任务实施

1. 玻璃器皿的洗涤、包装和灭菌

1) 新购入玻璃器皿的处理

新购入的玻璃器皿常附有游离碱质，不可直接使用，应先在 2% 盐酸溶液中浸泡数小时，以中和碱性，然后用肥皂水及洗衣粉洗刷玻璃器皿的内外，再以清水反复冲洗数

次，以除去残留的酸质，最后用蒸馏水冲洗。

2) 用后玻璃器皿的处理

凡被病原微生物污染过的玻璃器皿，在洗涤前必须进行严格的消毒，然后再行处理，其方法如下：

(1) 一般玻璃器皿（如平皿、试管、烧杯、烧瓶等）均可置高压灭菌器内在 0.1MPa 下进行 20~30min 灭菌。随即趁热将内容物倒净，用温水冲洗后，再用 5%肥皂水煮沸 5min，然后按新购入玻璃器皿的处理方法进行同样处理。

(2) 吸管类器皿使用后，投入 2%来苏水或 5%苯酚溶液内 48h，以使其消毒，但要在盛来苏水溶液的玻璃瓶底部垫一层棉花，以防投入吸管时损破。吸管洗涤时，先浸在 2%肥皂水中 1~2h，取出，用清水冲洗以后再用蒸馏水冲洗。

(3) 各种玻璃器皿若用上述方法处理后，仍未达到清洁目的，则可将其浸泡于下述清洁液中过夜，取出后用水反复冲洗数次，最后用蒸馏水冲洗。

清洁液的配制方法：重铬酸钾 60g，硫酸 60mL，自来水 100mL。清洁液可连续使用，直至液体变绿后不再使用。此种清洁液内含有硫酸，腐蚀性很强，使用时应注意对衣服和皮肤的灼损。

(4) 凡含油脂（如凡士林、石蜡等）的玻璃器皿，应单独进行消毒及洗涤，以免污染其他玻璃器皿。这类玻璃器皿在未洗刷之前应尽量去油，然后用肥皂水煮沸趁热洗刷，再用清水反复冲洗数次，最后用蒸馏水冲洗。

3) 玻璃器皿的干燥

玻璃器皿洗净后，通常倒置于干燥架上，令其自然干燥，必要时亦可放于烘箱中 50℃左右烘干，以加速其干燥，温度不宜太高，以免玻璃器皿碎裂。干燥后以干净的纱布或毛巾拭去干后的水迹，以备做进一步处理使用。

4) 玻璃器皿包装

玻璃器皿在消毒之前，需妥当包装，以免消毒后又被杂菌所污染。

(1) 一般玻璃器皿（试管、三角烧瓶、烧杯等）在包装时，用做好的适宜大小的棉塞（图 1-1）将试管或三角烧瓶口塞好，外面再用纸张包扎，烧杯可直接用纸张包扎。

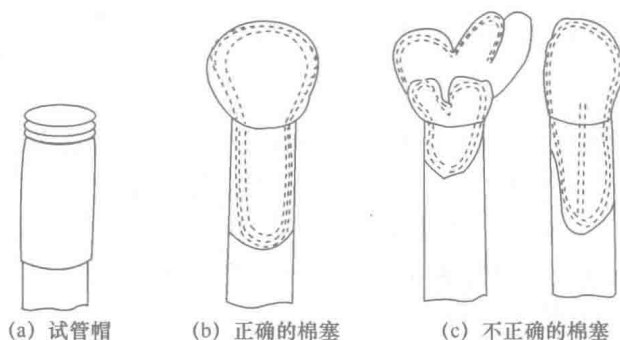


图 1-1 试管帽和棉塞

(2) 吸管。将吸管洗净、烘干后，用细铁丝或长针头塞少许脱脂棉于吸管口端，以免使用时，将病原微生物吸入管口中，同时又可过滤从口中吹出的空气，防止造成

污染。塞进的脱脂棉大小要适度，太松太紧对其使用都有影响。最后，每个吸管均需用纸分别包卷，用 4~5cm 的纸条，以 $30^{\circ}\sim 45^{\circ}$ 的螺旋形卷起来，吸管的尖端在头部，另一端用剩余的纸条打成一个结，如图 1-2 所示，以防散开，标上容量，按图中序号顺序将若干支包好的吸管在中间包扎成一束进行灭菌。使用时，从吸管中间拧断纸条，抽出吸管。

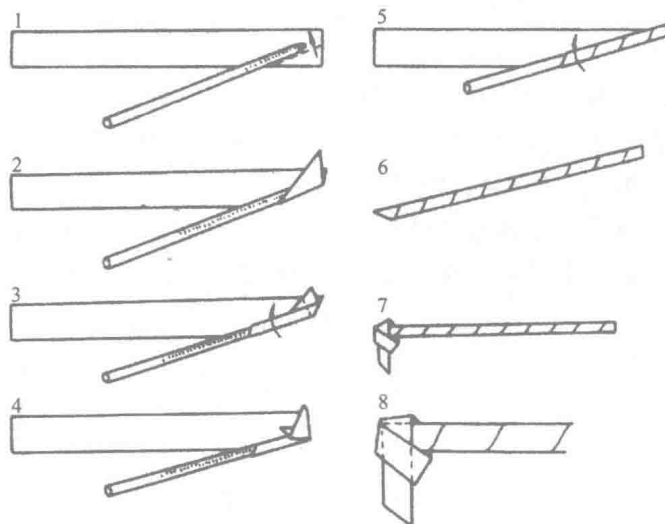


图 1-2 单支吸管的包扎方法

(3) 培养皿。洗净的培养皿烘干后，每 10 套（根据需求而定）培养皿叠在一起，用无油质的纸（如牛皮纸或旧报纸）包成一包或者不用纸包扎，直接放入特制的金属铁筒中，然后进行灭菌。

5) 玻璃器皿灭菌

玻璃器皿干燥包装后，均置于干热灭菌器内，调节温度至 160°C 维持 1~2h 进行灭菌，灭菌后的玻璃器皿须在 1 周内用完，过期应重新灭菌，再行使用。必要时，也可将玻璃器皿用油纸包装后，用 121°C 高压蒸汽灭菌 20~30min。

2. 马铃薯葡萄糖液体培养基配制

1) 配制方法

(1) 20%马铃薯浸汁的制备。用精度为 0.1g 的天平称取马铃薯 200g，切成小块，加水 1000mL， 80°C 浸泡 1h，用纱布过滤，然后补足失水至所需体积。 0.1MPa 灭菌 20min，即得到 20%马铃薯浸汁。将其放置在冰箱中储存备用。

(2) 配制时，每 100mL 马铃薯浸汁加 2g 葡萄糖，加热融化并补足失水。

(3) 分装、加塞，包扎。

(4) 高压蒸汽灭菌： 0.1MPa 灭菌 20min。

2) 液体培养基的配制流程说明

(1) 配制流程。称量配料→混合溶解、定容→调节 pH→过滤→分装→加棉塞、包装→灭菌。

(2) 操作步骤。

① 称量配料。先根据培养基配方计算各成分的用量，然后用 1/100 粗天平称量配制培养基所需的各种药品。对于牛肉膏、酵母膏等原料，在称量后要连同称量纸一起投入水中，待原料被洗下后再将称量纸取出。

② 混合溶解、定容。用容器量取所需水量的一半或 2/3 的蒸馏水或自来水（视培养基需要而定），将称好的药品置于容器水中，用玻璃棒搅拌，加热促进溶解，待各种药品溶解后，再加水至所需的量。

③ 调节 pH。一般用 pH 试纸测定培养基的 pH。用镊子取适当范围内的精密 pH 试纸一小块，用玻璃棒将冷至室温的培养基搅拌均匀，蘸取少量，滴在 pH 试纸上，马上用比色卡进行比较，测出 pH。若该数值不符合培养基配方要求，就滴加 10% NaOH 或者 10% HCl 溶液进行调整。调整时应避免调整过头再回调，因为这样会影响培养基的体积和渗透压。

④ 过滤。用滤纸或双层纱布过滤液体培养基，一般在无特殊要求的情况下，可以省去此步。

⑤ 分装。分装量一般以试管高度的 1/4 为宜，分装操作如图 1-3 所示。

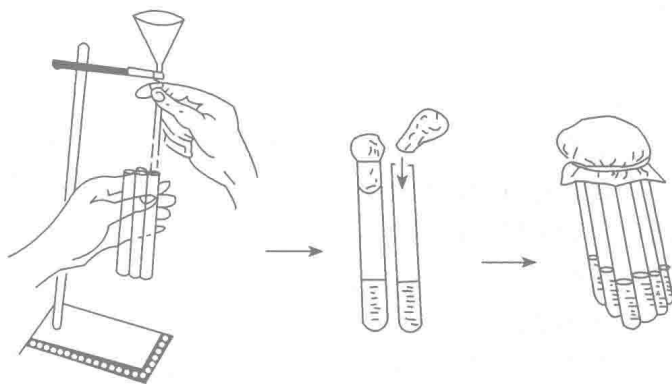


图 1-3 培养基分装

⑥ 加棉塞、包装。给试管、三角烧瓶等加棉塞，要注意棉塞大小合适，勿污染。将三角烧瓶棉塞处用牛皮纸包好，将试管捆扎包装好。用铅笔在牛皮纸上标明培养基的名称、配制日期、配制组别和配制者等。

3. 察氏培养基的制备

1) 配制方法

(1) 量取 600mL 水加入干净的烧杯中，分别称取蔗糖 30g， NaNO_3 3g， K_2HPO_4 1g，KCl 0.5g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g，依次加入水中溶解，加入 10mL 0.1% FeSO_4 溶液，加水定容至 1000mL。

(2) 加入 15~20g 琼脂，加热融化，补足水至 1000mL。

(3) 趁热将培养基分装至试管与培养皿中，分装量为试管高度的 1/5~1/4，装入三角烧瓶的培养基的量一般为三角烧瓶容积的 1/3~1/2。塞上棉塞或专用试管塞，用牛皮

纸或报纸包扎。

(4) 高压蒸汽灭菌：0.1MPa 灭菌 20min。

2) 固体、半固体培养基的配制流程说明

(1) 配制程序。称量配料→混合溶解、定容→调节 pH→融化琼脂→过滤→分装→灭菌。

(2) 操作步骤。

① 称量配料、混合溶解、定容、调节 pH、过滤、加棉塞、包装操作同液体培养基的配制。

② 融化琼脂。固体或半固体培养基需加一定量的琼脂。将调好 pH 的液体培养基放在加有石棉网的电炉上加热，在沸腾状态下将琼脂加入，并不断搅拌直至琼脂完全融化，然后补充水分至加热前的量。琼脂的添加量视培养基的要求及琼脂的质量而定，一般为 1.5%~2.5%。

③ 分装。根据不同的需求，把配制好的培养基分装入试管或者三角烧瓶里面，分装时注意不要使培养基沾染试管口或三角瓶口，以免引起污染。分装入试管时可用定量加液器或漏斗（图 1-3），分装量为试管高度的 1/5~1/4。装入三角烧瓶的培养基的量一般为三角烧瓶容积的 1/3~1/2。

4. 灭菌基本操作

培养基包扎好后，立即按培养基配方中规定的灭菌条件进行灭菌。一般采用湿热灭菌中的高压蒸汽灭菌。高压蒸汽灭菌的过程如下：

(1) 在高压灭菌锅内加入适量的水，约近金属隔板处。

(2) 将灭菌物品包扎好，小心放于隔板上。

(3) 将盖盖好，扭紧螺旋，打开排气阀，待排气阀冒热气 3~5min 后关闭排气阀。至压力表所示压力升至所需压力时开始计时。通过调整热源，维持一定的压力，维持所需时间，一般培养基控制在 0.1MPa、20min，含糖培养基控制在 0.06MPa、30min，然后停止加热，压力随之下降。

(4) 待压力自行降至零时，方可将排气阀慢慢打开、放气。排气完毕后，开盖取出灭菌物品，气未排完前切不可开盖。

5. 摆斜面或倒平板

1) 摆斜面

培养基杀菌完毕后，要摆斜面的试管培养基应立即摆斜面。摆斜面的具体操作方法如下：将试管置于木棒上（图 1-4），使其成适当斜度，凝固后即成斜面。

2) 平板的制作

将装在三角烧瓶或试管中已灭菌的琼脂培养基融化后，待冷却至 50℃左右倾倒入无菌培养皿中。注意：温度过高时，培养皿盖上的冷凝水多，温度低于 50℃时培养基易凝固而无法制作平板。平板的制作应在超净工作台中，在酒精灯旁进行，左手拿培养皿，右手握住锥形瓶的底部或试管，左手同时用小指和手掌将棉塞打开，灼烧瓶口，用左手大拇指将培

养皿盖打开一条缝,至瓶口刚好伸入(图 1-5),倾入 10~12mL 的培养基,迅速盖好培养皿盖,置于桌面上,轻轻旋转培养皿,使培养基均匀分布整个培养皿中,冷凝后即成平板。



图 1-4 斜面的放置

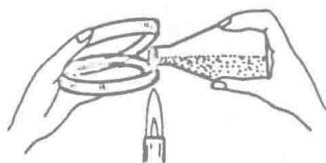


图 1-5 培养基倒平板示意图

三、任务分析

液体培养基和固体培养基各有什么优缺点?

任务四 微生物的接种与培养

一、材料与器材

1. 主要材料

- (1) 菌种: 大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、霉菌和啤酒酵母菌悬液。
- (2) 培养基: 麦汁斜面、葡萄糖肉汤培养基(试管垂直)、葡萄糖肉汤半固体培养基(试管垂直)、葡萄糖肉汤固体培养基试管斜面、葡萄糖肉汤固体培养基琼脂平板, 察氏培养基试管斜面、察氏培养基琼脂平板。

2. 主要器材

接种针、接种环、接种钩、酒精灯、培养箱、试管架、镊子、火柴。

二、任务实施

1. 接种前的准备工作

- (1) 检查接种工具是否准备充分。
- (2) 在欲接种的培养基试管、斜面或平板上, 根据实验要求贴好标签, 标上待接种的菌名、操作者和接种日期。
- (3) 将培养基、接种工具和其他用品全部放在超净工作台或试验台上, 摆好, 将超净工作台的紫外灯打开进行消毒。关好实验室门、窗, 用 5% 的苯酚溶液或 5% 的来苏尔溶液进行喷雾空气消毒或擦拭台面, 尽可能在无菌室内进行无菌操作, 在无菌室或超净工作台上进行接种。

2. 接种操作

1) 斜面接种

- (1) 操作前, 先用 75% 的酒精擦手, 待酒精挥发后, 再点燃酒精灯。