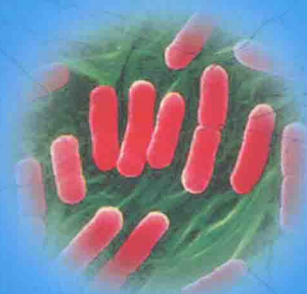
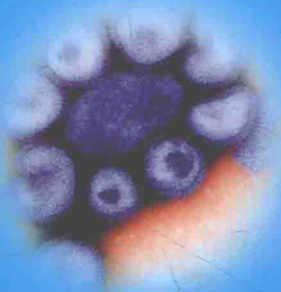
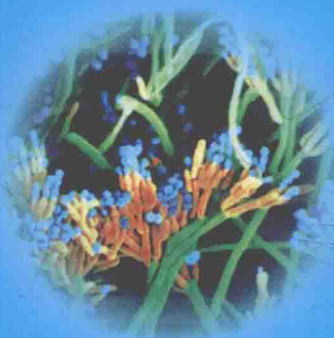


高等学校“十一五”规划教材

微生物学实验技术

(第2版)

主编 叶明



合肥工业大学出版社
HEFEI UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PRESS

高等学校“十一五”规划教材

微生物学实验技术

(第2版)

主 编 叶 明

副主编 许 晖 李军红



合肥工业大学出版社

内 容 简 介

微生物学实验技术是微生物学的重要内容,是学生进行实验的必备指导书。

本书分为5篇,第一篇为微生物学实验基本技术,包括显微技术、染色技术、消毒与灭菌技术、接种技术、纯种分离技术、培养技术、菌种鉴定技术与菌种保藏技术;第二篇为微生物学基础实验,共35个实验,是微生物学及相关专业的基础实验;第三篇为专业方向实验,共18个实验,供相关专业选择开设;第四篇为综合实验,共35个题目,各个专业可根据需要选择开设;第五篇为附录,共6部分,供读者查阅和参考。

本书可作为高等院校生物工程、生物技术、食品科学与工程、制药工程、环境工程及其他相关专业的本科教学用书,也可作为研究生或教师的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验技术/叶明主编. —2版. —合肥:合肥工业大学出版社,2016.8
ISBN 978-7-5650-2914-1

I. 微… II. 叶… III. 微生物学—实验—高等学校—教材 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 195991 号

微生物学实验技术

(第2版)

主编 叶 明

责任编辑 陆向军

出 版	合肥工业大学出版社	版 次	2009年9月第1版
地 址	合肥市屯溪路193号		2016年8月第2版
邮 编	230009	印 次	2016年8月第4次印刷
电 话	综合编辑部:0551-62903028	开 本	787毫米×1092毫米 1/16
	市场营销部:0551-62903198	印 张	9.5 彩 插 1 页 字 数 231千字
网 址	www.hfutpress.com.cn	印 刷	合肥现代印务有限公司
发 行	全国新华书店	印 数	6001—8000

ISBN 978-7-5650-2914-1

定价:22.00元

如果有影响阅读的印装质量问题,请与出版社市场营销部联系调换。

前言

本书是高等学校“十一五”规划教材,也是合肥工业大学等多所高校编写的《微生物学》配套教材。

微生物学实验与微生物学是“血”与“肉”的关系,其实验技术涉及工业、农业、医学等领域,在生命科学研究和生产实践中发挥着巨大作用。

作为基础实验的“前奏曲”,本书首先简要介绍了微生物学显微技术、染色技术、消毒与灭菌技术、接种技术、纯种分离技术、培养技术、菌种鉴定技术与菌种保藏技术,使学生在实验前能够熟悉相应的实验技术内容,增强理性认识,有利实验顺利进行。

本书第二篇为微生物学基础实验,内容涉及显微镜的使用、微生物细胞的染色、形态结构观察、培养基制备、菌株的分离培养、生理生化、生长、育种、免疫、分类等方面的 35 个实验,旨在通过这些实验训练,使学生掌握微生物学的基本实验原理与操作技能。

第三篇为专业方向实验,选编了 18 个实验,为生物工程、生物技术、食品科学与工程、制药工程与环境工程等专业选做的实验,旨在强化学生的实验技能并了解微生物技术在科研与专业实践中的应用。

第四篇为综合实验,共给出 35 个题目,要求学生自主设计实验方案进行实验,完成一篇“论文式”实验报告,为其撰写学位论文奠定基础。

第五篇为附录,包括玻璃器皿的洗涤与包装、常用培养基配方及配制、常用染色液配方、常用试剂的配制、常见微生物学名、微生物群体及个体形态等 6 个部分,供读者查阅和参考。

本书由合肥工业大学(叶明、李军红、杨柳、潘利华、章建国、操丽丽、胡雪芹、周本军、马道荣、李延红)、安徽中医学院(程惠娟)、蚌埠学院(许晖、王晓云)与宿州学院(曹稳根)共同编写,由南京农业大学生命科学院博士生导师崔中利教授主审。在编写过程中承蒙多位老师与研究生帮助,在此一并表示感谢!

由于编者水平所限,在取材、实验内容等方面难免存在不足之处,请广大师生与同行批评指正。

叶 明

2009 年 8 月

目 录

第一篇 微生物学实验基本技术	(1)
一、显微技术	(1)
二、微生物染色技术	(6)
三、消毒与灭菌技术	(8)
四、微生物接种技术	(10)
五、微生物纯种分离技术	(13)
六、微生物培养技术	(15)
七、微生物菌种鉴定技术	(17)
八、微生物菌种保藏技术	(18)
第二篇 微生物学基础实验	(21)
实验 1 普通光学显微镜的使用	(21)
实验 2 细菌的简单染色与革兰氏染色	(24)
实验 3 细菌的特殊染色	(26)
实验 4 支原体、衣原体的形态观察	(29)
实验 5 放线菌的形态观察	(30)
实验 6 酵母菌的形态观察及测微技术	(31)
实验 7 霉菌的形态观察	(34)
实验 8 培养基的制备和灭菌	(35)
实验 9 自然界中微生物的分离与纯化	(38)
实验 10 脂肪酶产生菌的筛选	(41)
实验 11 光合细菌的分离	(42)

实验 12	稀有放线菌的分离	(44)
实验 13	自生固氮菌的分离	(45)
实验 14	原生动物的分离	(46)
实验 15	食用菌孢子的分离	(47)
实验 16	食用真菌的栽培	(48)
实验 17	厌氧微生物的培养	(50)
实验 18	病毒的培养	(52)
实验 19	噬菌体的分离、纯化和效价测定	(55)
实验 20	细菌水解大分子物质的试验	(57)
实验 21	肠道细菌鉴定的常用生化试验	(59)
实验 22	血球计数板直接计数法测定酵母菌的数量	(61)
实验 23	比浊法测定细菌的数量	(63)
实验 24	大肠杆菌生长曲线的测定	(64)
实验 25	环境因素对微生物生长的影响	(65)
实验 26	Ames 试验	(68)
实验 27	微生物的诱变育种	(70)
实验 28	香菇杂交育种	(73)
实验 29	真菌原生质体的制备与再生	(74)
实验 30	细菌总 DNA 的制备	(75)
实验 31	聚合酶链反应体外扩增 DNA	(77)
实验 32	凝集反应	(79)
实验 33	抗原与免疫血清的制备	(81)
实验 34	抗生素抗菌谱与抗生素的抗药性测定	(83)
实验 35	螺旋体的检测	(85)

第三篇 专业方向实验

(88)

实验 1	真菌胞外多糖的发酵、提取与纯化	(88)
实验 2	真菌多糖抗氧化活性	(89)
实验 3	酵母细胞的固定化	(91)

实验 4 谷氨酸的发酵	(93)
实验 5 淀粉酶产生菌的诱变选育	(94)
实验 6 原生质体融合	(96)
实验 7 营养缺陷型突变株筛选	(98)
实验 8 细菌质粒 DNA 的微量制备	(100)
实验 9 感受态细胞的制备及转化	(102)
实验 10 食品中耐热性细菌的检测	(104)
实验 11 泡菜制作与乳酸菌的分离鉴定	(105)
实验 12 牛乳中细菌的检查	(107)
实验 13 酶联免疫吸附试验(ELISA)	(108)
实验 14 0.9%氯化钠注射液的无菌检查	(110)
实验 15 咳嗽糖浆微生物限度检查	(111)
实验 16 表面活性剂降解菌的分离	(113)
实验 17 微生物传感器测定水质 BOD 值	(115)
实验 18 水体富营养化程度的评价	(116)
第四篇 综合实验	(119)
一、实验目的	(119)
二、实验题目	(119)
三、报告内容与要求	(120)
第五篇 附 录	(121)
附录 1 玻璃器皿的洗涤与包装	(121)
附录 2 常用培养基配方及配制	(123)
附录 3 常用染色液配方	(134)
附录 4 常用试剂的配制	(136)
附录 5 常见微生物学名	(142)
附录 6 微生物群体及个体形态	(145)

第一篇 微生物学实验基本技术

一、显微技术

显微技术(microscopy)是利用光学系统或电子光学系统设备,观察肉眼所不能分辨的微小物体形态结构及其特性的技术。包括:①各种显微镜的基本原理、操作和应用的技术;②显微镜样品的制备技术;③观察结果的记录、分析和处理的技术。

微生物个体微小,必须利用显微镜才能观察到它们的形态。根据光源不同,显微镜可分为光学显微镜和电子显微镜两大类。前者以可见光(紫外线显微镜以紫外光)为光源,后者则以电子束为光源。光学显微镜主要有普通光学显微镜、荧光显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、倒置显微镜、微分干涉差显微镜和激光共聚焦扫描显微镜;电子显微镜主要有透射电子显微镜和扫描电子显微镜。

不同显微镜有不同的制片要求,但总体都需要注意:①在制片时尽可能保持材料的结构和某些化学成分生活时的状态;②制片必须薄而透明;③需长期保存的制片,还应进行脱水和封固。

光学显微镜所观察到的图像结果能够被肉眼所接收和识别,可直接用笔依像勾画,即可记录,也可用显微摄影或录像进行记录。电子显微镜分辨率高,用于观察极精细的结构,但必须在图像和样品之间加以校正和分析才能获得理想的图像。

这里简要介绍一些常见显微镜的应用。

1. 光学显微镜

光学显微镜是利用光学原理,把人眼所不能分辨的微小物体放大成像,以供人们提取微观结构信息的光学仪器。

(1) 普通光学显微镜

普通光学显微镜是最常用的显微镜,通常由载物台、聚光照明系统、物镜、目镜和调焦结构组成(图 1-1),主要用于观察生物细胞和组织(图 1-2)。

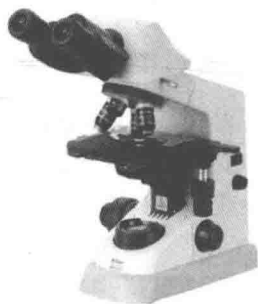


图 1-1 普通光学显微镜



图 1-2 普通光学显微镜下的大肠杆菌

载物台用于承放被观察的物体。利用调焦旋钮可以驱动调焦机构,使载物台作粗调和微调的升降运动,使被观察物体调焦清晰成像。它还可以在水平面内作精密移动,使被观察的部位调放到视场中心。

聚光照明系统由光源和聚光镜构成,聚光镜的功能是使更多的光能集中到被观察的部位。照明灯的光谱特性必须与显微镜接收器的工作波段相适应。

物镜位于被观察物体附近,是实现第一级放大的镜头。在物镜转换器上同时装着几个不同放大倍率的物镜,转动转换器就可让不同倍率的物镜进入工作光路,物镜的放大倍数通常为5~100倍。

物镜是显微镜中对成像质量优劣起决定性作用的光学元件。常用的有能对两种颜色的光线校正色差的消色差物镜,质量更高的还有能对三种色光校正色差的复消色差物镜,以及能保证物镜的整个像面为平面,以提高视场边缘成像质量的平像场物镜。高倍物镜多采用浸液物镜,即在物镜的下表面和标本片的上表面之间填充折射率为1.5左右的液体,它能显著提高显微观察的分辨率。

目镜是位于人眼附近实现第二级放大的镜头,目镜放大倍率通常为5~20倍。按照所能看到的视场大小,目镜可分为视场较小的普通目镜和视场较大的大视场目镜(或称广角目镜)两类。

普通光学显微镜的放大倍数为物镜放大倍数与目镜放大倍数的乘积。

(2) 荧光显微镜

荧光显微镜(图1-3)是一种较为常用的光学显微镜,它多以紫外光为光源,用以照射被检物体,使之激发出可见荧光,以观察物体的形状及其所在位置。按照荧光源位置的不同,荧光显微镜分为透射式和落射式两种,它们均可用于研究细胞内物质的吸收、运输、化学物质的分布及定位等。



图 1-3 OLYMPUS BX51 荧光显微镜

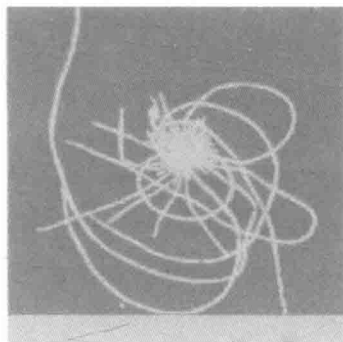


图 1-4 荧光显微镜下的丝状细菌

荧光显微镜和普通显微镜的主要区别:①照明方式通常为落射式,即光源通过物镜投射于样品上;②光源为紫外光,波长较短,分辨力高于普通显微镜;③有两个特殊的滤光片,光源前的滤光片用以滤除可见光,目镜和物镜之间的用于滤除紫外线,以保护人的眼睛。

(3) 暗视野显微镜

暗视野显微镜(图1-5)是在普通光学显微镜中装入特殊的暗视野聚光器的一种光学显微镜,经暗视野聚光器后,照明光线改变途径,不直接进入物镜,而是倾斜地照射到样品

上,由样品表面的绕射光线入射到物镜内,产生样品的衍射图像。

由于暗视野显微镜能使标本和背景形成强烈的明暗对比,所以在明视野显微镜下观察不到的活菌体,在暗视野显微镜下则清晰可见,但仅能看到菌体的轮廓,而看不清它的内部结构,因此主要用于观察细菌、螺旋体(图 1-6)的形态及细菌的运动。

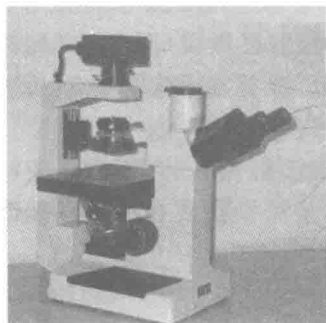


图 1-5 暗视野显微镜



图 1-6 暗视野显微镜下的梅毒螺旋体

(4) 相差显微镜

相差显微镜(图 1-7)是利用物体不同结构成分之间的折射率和厚度的差别,把通过物体不同部分的光程差转变为振幅(光强度)的差别,经过带有环状光阑的聚光镜和带有相位片的相差物镜实现观测的显微镜。主要用于观察活细胞或不染色的组织切片(图 1-8),同时还能看到细胞的内部结构及其随时间变化的过程;有时也可用于观察缺少反差的染色样品。

相差显微镜具有两个其他显微镜所不具有的功能:①将直射的光(视野中背景光)与经物体衍射的光分开;②将大约一半的波长从相位中除去,使之不能发生相互作用,从而引起强度的变化。



图 1-7 相差显微镜

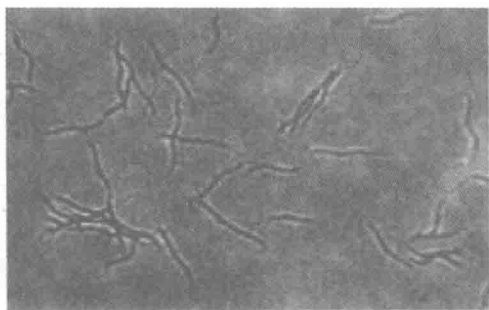


图 1-8 相差显微镜下的迂回螺菌

(5) 倒置显微镜

倒置显微镜的组成和普通显微镜一样,只不过物镜与照明系统颠倒,前者在载物台之下,后者在载物台之上(图 1-9)。它和放大镜起着同样的作用,就是把近处的微小物体成

一放大的像,只是它比放大镜具有更高的放大率而已。主要用于细胞、组织培养、悬浮体、沉淀物等的观察,并可连续观察细胞在培养液中繁殖分裂的过程。在细胞学、寄生虫学、肿瘤学、免疫学与工业微生物学等领域中应用广泛。

(6)微分干涉差显微镜

1952年,Nomarski在相差显微镜原理的基础上发明了微分干涉差显微镜(differential interference contrast microscope,DIC显微镜),又称Nomarski相差显微镜(图1-10),其优点是能显示细胞结构的三维立体投影影像。与相差显微镜相比,其标本可略厚一点,折射率差别更大,故影像的立体感更强。

DIC显微镜使细胞的结构,特别是一些较大的细胞器,如细胞核、线粒体等,立体感特别强,适合于显微操作。目前像基因注入、核移植、转基因等的显微操作常在这种显微镜下进行。



图1-9 倒置显微镜

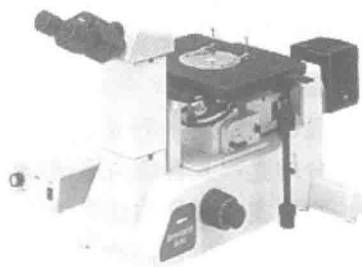


图1-10 明暗场微分干涉差显微镜

(7)激光共聚焦扫描显微镜

激光共聚焦扫描显微镜(图1-11)用激光作扫描光源,逐点、逐行、逐面快速扫描成像,扫描的激光与荧光收集共用一个物镜,物镜的焦点即扫描激光的聚焦点,也是瞬时成像的物点。由于激光束的波长较短,光束很细,所以激光共聚焦扫描显微镜有较高的分辨力,大约是普通光学显微镜的3倍。系统经一次调焦,扫描限制在样品的一个平面内。调焦深度不



图1-11 激光共聚焦扫描显微镜

一样时,就可以获得样品不同深度层次的图像,这些图像信息都储存于计算机内,通过计算机分析和模拟,就能显示细胞样品的立体结构。

与普通光学显微镜相比,激光共聚焦扫描显微镜具有更高的分辨率,既可以用于观察细胞形态,也可以用于细胞内生化成分的定量分析、光密度统计以及细胞形态的测量,配合焦点稳定系统可以实现长时间活细胞动态观察。

2. 电子显微镜

简称电镜,是根据电子光学原理,用电子束和电子透镜代替光束和光学透镜,使物质的细微结构在非常高的放大倍数下成像的仪器。用于观察小于 $0.2\ \mu\text{m}$ 的亚显微结构或超微结构。

(1) 透射电子显微镜

以电子束为光源的透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM, 图 1-12),是 Ruska 在 1932 年发明的,它是把经加速和聚集的电子束投射到非常薄的样品上,电子与样品中的原子碰撞而改变方向,从而产生立体角散射。散射角的大小与样品的密度、厚度相关,因此可以形成明暗不同的影像。

透射电子显微镜在材料科学、生物学上应用较多(图 1-13)。由于电子易散射或被物体吸收,故穿透力低,样品的密度、厚度等都会影响到最后的成像质量。必须制备超薄切片,通常为 $50\sim 100\ \text{nm}$ 。样品处理的方法有:超薄切片法、冷冻超薄切片法、冷冻蚀刻法、冷冻断裂法等。对于液体样品,通常是挂在预处理过的铜网上进行观察。



图 1-12 透射电子显微镜

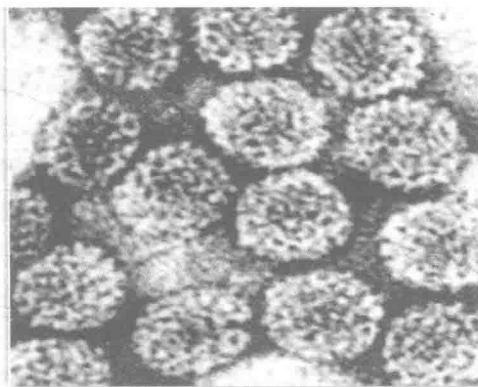


图 1-13 冠状病毒透射电镜照片

(2) 扫描电子显微镜

扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM, 图 1-14)是 1965 年发明的较现代的细胞生物学研究工具。主要是利用二次电子信号成像来观察标本的表面结构,即用极

狭窄的电子束去扫描样品,通过电子束与样品的相互作用产生各种效应,其中主要是样品的二次电子发射。二次电子能够产生样品表面放大的形貌像,这个像是在样品被扫描时按时序建立起来的,即使用逐点成像的方法获得放大像。

目前扫描电镜的分辨力为 $6\sim 10\text{ nm}$,因为人眼能够区别荧光屏上两个相距 0.2 mm 的光点,则扫描电镜的最大有效放大倍率为 $0.2\text{ mm}/10\text{ nm}=20\,000$ 。

扫描电镜的应用范围很广,在生物学、医学、遗传学、细胞生物学及材料科学、工农业等方面广泛应用。可用于研究样品表面的超微结构(图 1-15),可以用胶体金免疫标记细胞膜上的抗原(抗体),可以抽提处理单层细胞以显示其细胞骨架,还可以用冷冻蚀刻技术研究细胞中各种细胞器的结构。

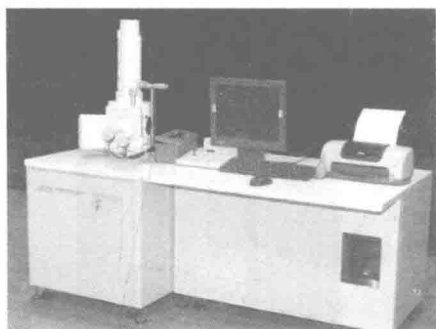


图 1-14 扫描电子显微镜

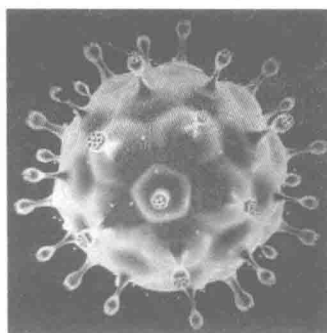


图 1-15 扫描电镜下的艾滋病毒

(李军红)

二、微生物染色技术

微生物细胞个体微小、含水量高(一般在 80% 以上)且透明,在光学显微镜下,细胞体液及结构对光线的吸收和反射与水溶液的差别很小,与周围背景无明显的明暗差,不易看清,若用压滴法或悬滴法进行观察时,只能看到其大体形态和运动情况。因此,在绝大多数情况下,若要在光学显微镜下观察其细微形态和主要结构,一般都需要对它们进行染色,从而借助颜色的反衬作用提高观察样品不同部位的反差。微生物学发展到现在,已发明和完善了很多染色技术,这些技术除能对菌体染色,还能对细胞内部或外部的细微结构进行染色。

1. 染色的基本原理

微生物细胞染色是借助物理因素和化学因素共同作用的结果。物理因素如细胞及细胞物质对染料的毛细现象、渗透、吸附作用等,化学因素则是根据细胞物质和染料的不同性质而发生的各种化学反应。酸性物质对于碱性染料较易吸附,且吸附作用稳固,而碱性物质对酸性染料较易吸附。如酸性物质细胞核对于碱性染料就有化学亲和力,易于吸附。但是,要使酸性物质染上酸性染料,必须把它们的物理形式加以改变(如改变 pH 值),才利于吸附作用的发生。碱性物质(如细胞质)通常仅能染上酸性染料,若把它们变为适宜的物理形式,也同样能与碱性染料发生吸附作用。

细菌的等电点较低, pH 值在 2~5 之间, 故在中性、碱性或弱酸性溶液中, 菌体蛋白质电离后带负电荷, 而碱性染料电离时染料离子带正电荷。因此, 带负电荷的细菌可以和带正电荷的碱性染料进行结合。所以, 在细菌学上常用碱性染料进行染色。

此外, 菌体细胞的构造、外膜的通透性以及培养基的组成、菌龄、染色液中的电解质含量、温度、药物的作用等均能影响微生物的染色效果。

2. 染料的种类和选择

染料是一类供染色用的有机化合物。常用于微生物染色的染料分为天然染料和人工染料。天然染料有胭脂虫红、地衣素、石蕊和苏木素等, 它们多从植物体中提取, 其成分较复杂, 有些至今还未完全搞清楚。目前微生物染色多采用人工染料, 且多为有机物, 从煤焦油中提取获得, 其化学结构多是苯的衍生物。染料分子常由苯环、连接在苯环上的染色基团(或称发色基团、色基)和助色基团(或称作用基团)三部分组成, 其中的助色基团具有电离特性。大多数染料难溶于水, 易溶于有机溶剂。为使它们易溶于水, 通常制成盐类。

根据染料电离后染料离子所带电荷的性质, 可分为酸性染料、碱性染料、中性染料(复合染料)和单纯染料四大类。

(1) 酸性染料 酸性染料电离后, 染料分子带负电, 如伊红、刚果红、藻红、苯胺黑、苦味酸和酸性复红等, 可与碱性物质结合成盐。在含糖培养基中, 培养基因其中糖类分解产酸使 pH 大幅下降, 超过细菌的等电点, 细菌所带的正电荷增加, 这时用酸性染料易被染色。

(2) 碱性染料 碱性染料电离后, 染料分子带正电荷, 可与酸性物质结合成盐。微生物实验常用的碱性染料有美蓝、甲基紫、结晶紫、碱性复红、中性红、孔雀绿和番红等。在一般的情况下, 细菌带负电荷, 易被碱性染料染色。

(3) 中性染料 为酸性染料和碱性染料按一定的比例复配后的染料, 又称为复合染料, 如伊红美蓝、瑞脱氏(Wright)和姬姆萨氏(Gimsa)染料等。

(4) 单纯染料 单纯染料的化学亲和力低, 不能和被染的物质生成盐。其染色能力视其是否溶于被染物而定。它们大多数都属于偶氮化合物, 不溶于水, 但溶于有机溶剂中, 如苏丹类(sudanb)染料。

3. 染色方法

在对微生物细胞染色时应根据染色目的选用不同的染料和染色方法。根据观察对象的不同, 微生物染色方法可分为菌体染色法、异染颗粒染色法、芽孢染色法、鞭毛染色法、荚膜染色法和核染色法等, 可用于细胞形态及各种特殊结构的观察与鉴别; 根据菌体的生活状态可分为活菌染色和死菌染色, 可鉴别菌体的死活; 根据所用染料的种类, 微生物染色可分为单染色法和复染色法。单染法是指用一种染料(如美蓝、番红、结晶紫等)对微生物进行染色, 可用于微生物细胞形态观察, 但不能鉴别微生物; 复染色法是用两种或两种以上染料对微生物进行染色, 可协助鉴别微生物。常用的复染色法有革兰氏染色法、芽孢染色法和抗酸性染色法。

要强调的是, 染色后的微生物标本是死的, 且在染色过程中微生物的形态与结构均会发生一些变化, 不能完全代表其生活细胞的真实情况, 染色观察时必须注意。

(操丽丽)

三、消毒与灭菌技术

在微生物实验和生产中,必须要保证培养基和培养环境无杂菌,因此工作中所用的器材、培养基、管道、空气环境等要进行严格的消毒和灭菌。

灭菌和消毒的概念不同。灭菌是指利用物理或化学方法杀死物体内外的一切生命物质的过程。消毒则是杀死或消除所有病原微生物的过程,一般只能杀死营养细胞。

灭菌和消毒的方法种类较多,采用何种方法除菌,应根据微生物的特性和实验要求进行选择。

1. 消毒技术

(1) 化学药物消毒

化学药物消毒技术是利用化学药物渗透微生物体内,使菌体蛋白凝固变性,干扰微生物酶的活性,破坏其生理功能,从而除去微生物的方法。化学消毒剂仅对微生物繁殖体有效,不能杀灭芽孢。化学药物消毒技术适用于生产车间环境的消毒、接种操作前小型器具的消毒等。

① 气体消毒:是指采用气态消毒剂(如臭氧、环氧乙烷、甲醛和过氧乙酸蒸汽等)进行消毒的技术。该法特别适合环境消毒以及不适合加热消毒的医用器具、设备和设施的消毒,亦可用于粉末注射剂,但不适用于对产品质量有损害的场所。

② 液体消毒:是指采用液体消毒剂进行消毒的技术。该法常作为其他消毒方法的辅助措施,适合于皮肤、无菌器具和设备的消毒。常采用的消毒液有 75% 乙醇、0.1%~0.25% 高锰酸钾、0.02%~0.2% 的过氧乙酸、0.1%~0.2% 苯扎溴铵(新洁尔灭)、2% 左右的戊二醛等。

(2) 辐射消毒

辐射消毒技术是利用电磁波、紫外线、X 射线、 γ 射线或加速电子射线(最为常见的是 Co^{60} 和 Cs^{137} 的 γ 射线)以及低温等离子等对物品的穿透力杀死物品中微生物的一种冷消毒技术。

① 紫外线消毒:紫外灯是人工制造的人工水银灯,能辐射出主要波长为 253.7 nm 的紫外线,杀菌能力强且稳定。当微生物被紫外线照射时,其细胞的部分氨基酸和核酸吸收紫外线,产生光化学作用,引起细胞内这些成分的变性失活,从而导致微生物的死亡。紫外线进行直线传播,其强度与距离平方成比例地减弱,并可被不同的表面反射,穿透力弱,仅适用于表面灭菌和无菌室、培养室等空间的消毒,不适用于培养基的消毒。

② 远红外线消毒:食品中的很多成分及微生物在 3~10 μm 的远红外区有强烈的吸收。远红外加热消毒不需要传媒,热直接由物体表面传递到内部,因此不仅可用于一般的粉状和块状食品的消毒,而且还可用于坚果类食品(如咖啡豆、花生)、谷物以及袋装食品的消毒。

③ 微波消毒:微波消毒是微波热效应和生物效应共同作用的结果。微波对细菌的生物效应是微波电场改变细胞膜断面的电位分布,影响细胞膜周围电子和离子浓度,从而改变细胞膜的通透性能,使细菌营养不良,不能正常新陈代谢,生长发育受阻碍死亡。微波消毒正是利用电磁场效应和生物效应使微生物致死。实践证明,微波消毒具有穿透力强、节约能

源、加热效率高、适用范围广等特点,而且微波消毒便于控制,加热均匀,食品的营养成分及色、香、味在消毒后仍接近食物的天然品质。

④ 低温等离子消毒:等离子体是指不断从外部对物质施加能量而使其离解成阴、阳电荷粒子的物质状态。低温等离子体的消毒机理主要有三种:A. 等离子体形成过程中产生的大量紫外线直接破坏微生物的基因物质;B. 紫外光子固有的光解作用打破微生物分子的化学键,最后生成挥发性的化合物,如 CO 、 CH_x ;C. 通过等离子体的蚀刻作用,即等离子体中活性物质与微生物体内的蛋白质和核酸发生化学反应,能够破坏微生物和扰乱微生物的生存功能。低温等离子体消毒技术具有时间短、操作温度低、适用范围广泛的优点,因此这一技术已广泛应用于食品加工和医疗卫生等领域。

(3) 湿热消毒

湿热消毒主要通过加热杀死微生物,是较为常用的方法。

① 煮沸消毒:100℃下煮沸 5 min 可杀死一切细菌的繁殖体,一般消毒以煮沸 10 min 为宜。一般用于外科器械、注射器、饮水和食具的消毒。

② 巴氏消毒:是一种低温湿热消毒技术,专用于牛奶、啤酒、果酒或酱油等不宜进行高温消毒的液态风味食品或调料的消毒。此法既可杀灭物品中的无芽孢病原菌,又不影响其原有风味。其方法可分两类:第一类是低温维持法,如用于牛奶消毒在 63℃ 维持 30 min 即可;第二类是高温瞬时法,该法消毒牛奶只需在 72℃ 下保持 15 s。

2. 灭菌技术

(1) 干热灭菌

干热可使细胞膜破坏、蛋白质变性和原生质脱水,并可使各种细胞成分发生氧化变质,从而导致微生物菌体死亡。

① 火焰灼烧法:也称焚烧灭菌,即以火直接焚烧或灼烧被灭菌的物品,是一种迅速且最彻底的灭菌方法。该法适用微生物接种工具(如接种环、接种针等)及其他金属工具、试管口或锥形瓶口、吸管等工具的灭菌。

② 干热空气灭菌法:即用干燥热空气杀死微生物。通常将灭菌物品放入干燥灭菌器(烘箱、干燥箱等)中,在 160~170℃ 下维持 1~2 h。灭菌时间可根据灭菌物品性质与体积作调整,以彻底除菌。该法主要适用于试管、吸管、培养皿、烧瓶等空玻璃器皿和各种解剖、手术器械等物品的灭菌。在使用干热灭菌时需注意:A. 灭菌物品(培养皿、试管、吸管等)在灭菌前应洗净、晾干并包装(常用锡箔纸、铁盒、铝盒等)后才能放入烘箱内;B. 物品在箱内不能放得太满,一般不超过总容量的 65%,灭菌物品间应留有空隙;C. 灭菌完毕,要自然降温至 70℃ 以下时再打开箱门取出灭菌物品。

(2) 湿热灭菌

湿热灭菌是指用 100℃ 及 100℃ 以上的加热蒸汽进行灭菌。在湿热温度下,多数细菌和真菌的营养细胞在 60℃ 左右处理 5~10 min 后即被杀死。酵母菌细胞和真菌的孢子稍耐热,在 80℃ 下才被杀死,细菌的芽孢最耐热,一般要在 121℃ 下处理 15 min 才被杀死。

① 间歇灭菌:指在不能密闭的容器里,将水煮沸产生蒸汽以进行灭菌的方法。此法灭菌温度不超过 100℃,主要适用于一些含有不宜用高压蒸煮成分的(如糖液、牛奶、明胶等)培养基的灭菌。方法是:将待灭菌的培养基放在 80~100℃ 下蒸煮 15~60 min,以杀灭其中

微生物的营养体。然后放在室温或 37°C 下保温过夜,诱导其中芽孢萌发,第二天再以同法煮沸和保温过夜,如此连续重复 3 次即起到彻底灭菌的目的。例如,培养硫细菌的含硫培养基就可采用此法灭菌,因其内所含元素硫在 $99\sim 100^{\circ}\text{C}$ 下可保持正常结晶,若在 121°C 下灭菌,就会引起硫的变化。

② 加压蒸汽灭菌:又称高压蒸汽灭菌,简称高压灭菌。指将待灭菌物品放入高压蒸汽灭菌锅中进行灭菌,通常是在 0.1 Mpa 压力、 121°C (或 115°C) 下维持 20 min (或 30 min),可完全杀死物品内外的所有微生物及其芽孢。蒸汽来源方便、价格低廉,是目前最常用的灭菌方法。

3. 过滤除菌技术

过滤除菌是用物理阻留的方法将液体或空气的微生物除去,从而达到除菌的目的。此法主要用于动物血清、毒素、抗生素等不耐热生物制品及空气的除菌。所用的器具是含有微小孔径的滤菌器,常用的滤菌器有薄膜滤菌器($0.45\text{ }\mu\text{m}$ 和 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 孔径)(图 1-16)、陶瓷滤菌器、石棉滤菌器(即 Seitz 滤菌器)、烧结玻璃滤菌器等。



图 1-16 细菌过滤器

膜滤器采用微孔滤膜作材料,它通常由硝酸纤维素制成,可根据需要使之具有从 $0.25\text{ }\mu\text{m}\sim 25\text{ }\mu\text{m}$ 不同大小的孔径。当含有微生物的液体通过孔径为 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 的微孔滤膜时,大于滤膜孔径的微生物不能穿过滤膜而被阻拦在膜上,与通过的滤液分离开来。微孔滤膜具有孔径小、价格低、可高压灭菌、滤速快及可处理大容量的液体等优点。

使用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 孔径滤膜虽然可以滤除溶液中存在的细菌,但病毒或支原体等仍可滤过。必要时需使用小于 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 孔径的滤膜,但滤孔容易阻塞。

膜过滤除菌技术具有耗能少、常温操作、适于热敏性物料、工艺适应性强等优点,其应用前景广阔,现已广泛用于食品、生化、制药、用水及空气、乳品、果汁等的过滤除菌。

(杨 柳)

四、微生物接种技术

将微生物的培养物或含有微生物的样品移植到培养基上的操作技术称为接种。无论微生物的分离、培养、纯化、鉴定以及有关微生物的形态、生理的实验及观察研究都必须进行接种。接种的关键要注意严格的无菌操作,否则会引起污染。

1. 接种工具

常用的接种工具有接种针、接种环、接种钩、涂布棒、接种圈、接种锄、小解剖刀(图 1-17)。接种环、接种针、接种钩均由金属丝和柄两部分组成,金属丝的软硬要合适,传热和散热要快,以铂金丝为最理想,但价格昂贵。目前我国主要用镍铬丝代替,柄的部分常用铝