

食品科学与工程类 系列规划教材

Food Microorganism Inspection Principle and Method

食品微生物检验原理与方法

贺稚非 刘素纯 刘书亮 主编



科学出版社

食品科学与工程类系列规划教材

食品微生物检验原理与方法

贺稚非 刘素纯 刘书亮 主编



科学出版社

北京

内 容 简 介

本书系统地介绍与食品有关的微生物的检验原理和方法,包括微生物的生物化学实验技术;食品中菌落总数、大肠菌群及霉菌和酵母菌的检测,食品中常见病原微生物的检测技术;食品企业生产过程中用水卫生微生物检测、空气中微生物检测及食品企业加工设备、用具和包装材料的微生物检验技术;以及食品微生物的现代检测新技术和新方法,如聚合酶链反应(PCR)技术、免疫学检测技术(抗原-抗体反应,如免疫凝集实验、免疫电泳技术、免疫荧光技术、免疫磁珠技术和免疫酶技术)、核酸分子杂交技术等。

全书文字精练,内容丰富,叙述清楚易懂,可作为高等院校食品质量与安全、食品科学与工程等相关专业本科生教材,同时也是从事食品检测检验人员、食品生产品质管理人员、食品研究者的参考书和重要工具书。

图书在版编目(CIP)数据

食品微生物检验原理与方法/贺稚非,刘素纯,刘书亮主编. —北京:科学出版社, 2016

食品科学与工程类系列规划教材

ISBN 978-7-03-048757-5

I. ①食… II. ①贺… ②刘… ③刘… III. ①食品微生物-食品检验
IV. ①TS207.4

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第131744号

责任编辑:席 慧/责任校对:蒋 萍

责任印制:赵 博/封面设计:铭轩堂

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>

文林印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016年8月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2016年8月第一次印刷 印张:16

字数:464 000

定价:39.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《食品微生物检验原理与方法》编委会名单

主 编 贺稚非 (西南大学)

刘素纯 (湖南农业大学)

刘书亮 (四川农业大学)

副主编 钟青萍 (华南农业大学)

师俊玲 (西北工业大学)

周红丽 (湖南农业大学)

周 康 (四川农业大学)

主 审 何国庆 (浙江大学)

英文审稿 李 翔 (澳大利亚南澳大学)

前言

微生物学是生命科学研究中最活跃的学科领域，食品微生物学是食品科学与工程、食品质量与安全专业的核心骨干课程。食品微生物检验实验是微生物学产生和发展的基础，为整个生命科学技术的发展做出了积极而又重要的贡献，同时也是生物工程技术的核心和主体。随着分子生物学的发展，各学科相互交叉渗透，极大地丰富了食品微生物检验实验技术的内容，并将其推向一个新的发展阶段。

我们正面临着全球非常重视食品安全的时代，近年来食品安全事件频繁发生，从美国的花生酱沙门氏菌引起的食物中毒，到日本的神户牛肉食物中毒和欧洲豆苗菜的大肠杆菌食物中毒等，由微生物引发的食物中毒成为食物中毒的主要原因。如何在食品生产过程中进行 HACCP 质量控制，快速有效地检测出食品中的微生物，降低微生物引发的食源性疾病，保障食品的安全性，是从事食品质量管理和研究的科技人员的重要责任和工作。

本书系统地介绍与食品有关的微生物的检测原理和方法，包括微生物的生物化学实验技术；食品中菌落总数、大肠菌群及霉菌和酵母菌的检测，食品中常见病原微生物的检测技术；食品企业生产过程用水卫生微生物检测、空气中微生物检测及食品企业加工设备、用具和包装材料的微生物检验技术；以及食品的现代微生物检测新技术和新方法，如聚合酶链反应（PCR）技术、免疫学检测技术（抗原-抗体反应，如免疫凝集实验、免疫电泳技术、免疫荧光技术、免疫磁珠技术和免疫酶技术）、核酸分子杂交技术等。

书中淘汰了过时的检验方法，改变了某些原来分别在普通微生物学、微生物生理学、微生物遗传学、食品微生物学、发酵工程和发酵食品学中单独开设的小实验，编写成系统、连贯、实践性强、教学效果良好的实验教材。此外，还适当增加了一些现代分子生物学的实验方法与新技术，力求做到既避免与理论教材脱节又能启发学生的主动思考能力和创新思维能力。编者希望通过食品微生物检验实验让学生验证理论，巩固和加深理解所学过的专业理论知识，熟悉和掌握食品微生物检验实验操作技能，培养学生理论联系实际，独立分析问题和解决问题的能力，进一步启发学生的创新意识，并提高创新能力。

全书共分六章。第一章为微生物生物化学实验技术，第二章为食品中微生物指标常规检测；第三章为食品中常见病原微生物检测技术；第四章为食品企业的卫生微生物检验；第五章为各类食品的微生物检验；第六章为食品的微生物现代检测新技术；书后还有参考文献和附录，其中部分附录内容配有二维码，读者可扫描二维码阅读或下载。以上内容共 36 个实验，每个实验相对独立，因而各个院校可根据具体情况酌情选做。

本书由贺稚非、刘素纯、刘书亮担任主编，参加编写的还有师俊玲、钟青萍、周红丽、周康。第一章周红丽编写，第二章贺稚非、刘素纯编写，第三章刘书亮编写，第四章钟青萍编写，第五章师俊玲编写，第六章周康编写，附录贺稚非、周红丽、刘书亮编写。

本书在编写过程中得到了各编委所在单位和领导的支持，科学出版社领导和责任编辑也给予了许多关心和支

西南大学食品科学学院食品微生物学方向及食品加工方向研究生甘奕博士、谢跃杰博士及硕士生邓泽丽、陈康、夏启禹等对本书的校阅做了大量具体的工作。在本书出版之际谨向他们表示诚挚的谢意！

由于本书涉及内容范围较广，加之该配套教材体系初次建立，使用效果还要在实践中去检验。随着检测检验学科不断发展，其内容也需要不断地修订与更新。同时由于编者水平有限，难免有不足、错误和不妥之处，敬请使用本书的老师、同学及同行专家和广大读者批评指正，以便本书不断完善和提高。

贺稚非

2016年2月

目 录

前言

第一章 微生物的生物化学实验技术	1
实验一 碳源代谢实验	2
实验二 氮源代谢实验	12
实验三 碳源和氮源利用实验	20
实验四 酶类实验	23
实验五 抑菌实验	33
实验六 其他实验	37
思考题	40
第二章 食品中微生物指标常规检测	41
实验七 食品中菌落总数的测定	41
实验八 食品中大肠菌群的计数	44
实验九 食品中霉菌和酵母菌的计数	49
思考题	52
第三章 食品中常见病原微生物检测技术	53
实验十 食品中沙门氏菌检验	53
实验十一 食品中志贺氏菌检验	67
实验十二 食品中金黄色葡萄球菌检验	75
实验十三 食品中致泻大肠埃希氏菌检验	84
实验十四 食品中溶血性链球菌检验	90
实验十五 食品中蜡样芽孢杆菌检验	94
实验十六 食品中副溶血性弧菌检验	103
实验十七 食品中产气荚膜梭菌检验	110
实验十八 食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌检验	114
实验十九 食品中肉毒梭菌及肉毒毒素检验	119
实验二十 食品中空肠弯曲菌检验	123
实验二十一 食品中肠球菌检验	129
实验二十二 食品中单核细胞增生李斯特菌检验	136
实验二十三 食品中阪崎肠杆菌检验	141
实验二十四 食品中大肠埃希氏菌 O157: H7/NM 检验	146
思考题	155
第四章 食品企业的卫生微生物检验	157
实验二十五 食品用水卫生微生物检验	157

实验二十六	空气中的细菌检验	169
实验二十七	食品企业加工设备、用具的细菌检验	171
实验二十八	包装材料的微生物检验	172
思考题		173
第五章	各类食品的微生物检验	174
实验二十九	罐头食品的商业无菌检验	174
实验三十	鲜乳中抗生素残留量检验	184
实验三十一	食品中乳酸菌检验	189
思考题		194
第六章	食品的微生物现代检测新技术	195
实验三十二	聚合酶链反应 (PCR) 技术	195
实验三十三	实时荧光定量 PCR	200
实验三十四	免疫学检测技术	203
实验三十五	核酸分子杂交技术	208
实验三十六	生物芯片检测技术	211
思考题		215
主要参考文献		216
附录	食品微生物检验实验常用染色液、培养基和试剂	217

第一章

微生物的生物化学实验技术

【内容提要】

本章主要介绍了微生物检测基本技术中的生物化学实验技术。解释了各个生化反应的原理和应用范围，着重阐明了各个生化实验所涉及的实验培养基和试剂、操作方法及结果判定方法。

【实验教学目标】

1. 通过本章实验加深对细菌生化反应原理和意义的理解；
2. 掌握常规细菌生化实验的操作方法。

【重要概念及名词】

生化实验

从化学的观点来看，微生物细胞的化学成分以有机物和无机物两种状态存在。有机物包含各种大分子，它们是蛋白质、核酸、类脂和糖类，占细胞干重的 99%；无机物包括小分子无机物和各种离子，占细胞干重的 1%。微生物细胞的元素构成由 C、H、O、N、P、S、K、Na、Mg、Ca、Fe、Mn、Cu、Co、Zn、Mo 等组成，其中 C、H、O、N、P、S 六种元素占微生物细胞干重的 97%，其他为微量元素。微生物细胞的化学元素组成的比例常因微生物种类的不同而异。组成微生物细胞的化学元素分别来自微生物生长所需要的营养物质，即微生物生长所需的营养物质应该包含组成细胞的各种化学元素。这些物质为提供构成细胞物质的碳源物质、构成细胞物质的氮源物质和一些含有 K、Na、Mg、Ca、Fe、Mn、Cu、Co、Zn、Mo 元素的无机盐。

从生物学的观点来看，微生物活细胞是个新陈代谢的动力系统，它从环境中不断地吸取营养物质，通过新陈代谢实现生长和繁殖，同时排出“废物”。而微生物的新陈代谢是在微生物自身的一系列酶的控制与催化下进行的。不同微生物体内的酶系统不同，其代谢方式与过程，分解和合成代谢的产物等都不同。因此可以利用一些生物化学的方法来分析微生物对营养物质和能源的利用情况及其代谢产物、代谢方式和条件等，鉴别一些在形态和其他方面不易被区别的细菌。这种利用生物化学方法检测微生物代谢状况的实验，称为细菌的生物化学反应实验，是鉴定细菌的重要依据。

一、常规生化实验的方法

(1) 在培养物中加入某种底物与指示剂，经接种、培养后，观察培养基的颜色变化，即 pH 的变化。

(2) 在培养物中加入试剂，观察它们同细菌代谢产物所生成的颜色反应。

(3) 根据酶作用的反应特性，测定微生物细胞中某种酶的存在。

(4) 根据细菌对理化条件和药品的敏感性，观察细菌的生长情况。

二、生化实验的注意事项

- 1) 待检菌应是纯种培养物 对细菌进行分类鉴定首要的条件是所鉴定的菌必须是纯菌。在生化特性的测定中当然也必须要有此要求，以避免可能污染的其他菌干扰测定结果，而导致错误的结论。因此在实验开始时，要先通过琼脂平板划线稀释法或厌氧滚管分离培养法对生长于培养基内分散的单个菌落进行观察，并结合对培养物进行革兰氏染色镜检的形态，确认菌株的纯度。一般需要培养 18~24h。
- 2) 待检菌应是新鲜培养物 生化实验的培养基中需接种活跃生长的培养物。用新培养的菌液或斜面培养物制成菌悬浮液作为接种物为宜。
- 3) 遵守培养时间和观察结果时间 多数生化反应培养一天后即可测定。对于一些生长缓慢的实验菌株则需适当延长培养时间。生化实验测定时间的确定一般可待其中的培养物生长好后再培养 8~18h，如生长物未见继续增长时即可进行测定。
- 观察结果的时间多为 24~48h，具体每种实验结果的观察时间要根据国标方法要求的时间观察。
- 4) 做必要的对照实验 为确保实验结果的准确性，应按照实验的要求，同时接种阳性对照管、阴性对照管或空白对照管。对比各实验管结果后，报告结论。
- 5) 提高阳性检出率 为提高阳性检出率，至少挑取 2~3 个待检的疑似菌落分别进行实验。

实验一 碳源代谢实验

营养物质是微生物生命活动的物质基础，没有这个基础，生命活动就无法进行。微生物生长时需要大量的水分，足够量的碳、氮，适量的磷，一些含硫、镁、钙、钾、钠的盐类，以及微量的铁、铜、锌、锰等元素。在微生物细胞的干物质中，碳占了 50%左右，在微生物的各种营养需求中，对碳的需要量也最大。在微生物生长过程中为微生物提供碳素来源的物质称为碳源（source of carbon）。碳水化合物及其衍生物（包括单糖、寡糖、多糖、醇和多元醇）、有机酸（包括氨基酸）、脂肪、烃类，甚至二氧化碳或碳酸盐类均可作为微生物的碳源（表 1-1）。

表 1-1 微生物利用的碳源物质

种类	碳源物质	备注
碳水化合物	葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉、半乳糖、乳糖、甘露糖、纤维二糖、纤维素、半纤维素、甲壳素、木质素等	单糖优于双糖，己糖优于戊糖，淀粉优于纤维素，纯多糖优于杂多糖
有机酸	糖酸、乳酸、柠檬酸、延胡索酸、低级脂肪酸、高级脂肪酸、氨基酸等	与糖类比效果较差，有机酸较难进入细胞，进入细胞后会 导致 pH 下降。当环境中缺乏碳源物质时，氨基酸可被微生物作为碳源利用
醇	乙醇	在低浓度条件下被某些酵母菌和醋酸菌利用
脂	脂肪、磷脂	主要利用脂肪，在特定条件下将磷脂分解为甘油和脂肪酸而加以利用

续表

种类	碳源物质	备注
烃	天然气、石油、石油馏分、石蜡油等	利用烃的微生物细胞表面有一种由糖脂组成的特殊吸收系统，可将难溶的烃充分乳化后吸收利用
CO ₂	CO ₂	为自养微生物所利用
碳酸盐	NaHCO ₃ 、CaCO ₃ 等	为自养微生物所利用
其他	芳香族化合物、氰化物 蛋白质、核酸等	利用这些物质的微生物在环境保护方面有重要作用，当环境中缺乏碳源物质时，可被微生物作为碳源而降解利用

不同的微生物对各种碳源的分解能力及其所产生的代谢产物各不相同。例如，大肠埃希氏菌能使乳糖发酵，产酸、产气，而伤寒杆菌则不能；大肠埃希氏菌能使葡萄糖发酵，产酸、产气，而伤寒杆菌只能产酸，不产气；大肠埃希氏菌和产气杆菌都能使葡萄糖产酸、产气，大肠埃希氏菌所产生的丙酮酸使培养基呈明显酸性，而产气杆菌却能使丙酮酸脱羧，生成中性的乙酰甲基甲醇。

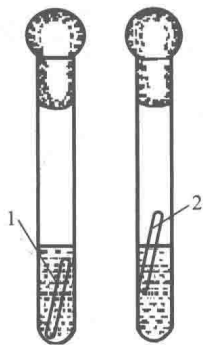
碳源代谢实验主要是通过检测细菌在利用碳源时的代谢途径及方式和利用碳源后所产生的特定代谢产物等来鉴别细菌的生化实验。从食品质检的角度出发，主要是实验各种糖类能否作为碳源被利用及其利用途径和产物。

一、糖（醇、苷）类发酵实验

本实验主要是检查细菌对各种糖、醇和糖苷等的发酵能力，从而进行各种细菌的鉴别，因而每次实验常需同时接种多管。本实验是鉴定细菌最主要和最基本的实验，特别对肠杆菌科细菌的鉴定尤为重要。不同细菌可发酵不同的糖类，如大肠埃希菌可发酵葡萄糖及乳糖；沙门氏菌属则只发酵葡萄糖，不发酵乳糖；大肠埃希菌和志贺菌属均可发酵葡萄糖，但前者产酸、产气，而后者仅产酸。

糖（醇、苷）类发酵实验通常是采用不含碳的无机氮培养基作为基础培养基，然后加入指定的碳源物质配成培养基，其中常用的糖、醇类物质有：单糖类的葡萄糖、果糖、木糖、半乳糖、鼠李糖；双糖类的乳糖、蔗糖、麦芽糖、蕈糖；三糖类的棉子糖；多糖类的菊糖、肝糖、淀粉、纤维素；醇类的甘露醇、山梨醇、肌醇、卫茅醇等，并加入合适的指示剂，用于微生物培养实验。培养基可为液体、半固体、固体或微量生化管几种类型。一般常用的指示剂为酚红、溴甲酚紫、溴百里蓝和安德烈（Andrade）等。此碳源能否被微生物利用，可以通过观察培养基在培养后是否产酸、产气，凡出现产酸、产气现象则说明该碳源可以被利用。

培养方法为两种。一种是在发酵管内用发酵液培养。实验时，可在各实验管中加一倒置小管，称为杜氏管（Durham tube），分装入实验用培养基，高压灭菌培养基将压进杜氏管，并赶走管内气体，随后进行培养。若发酵管中倒置的杜氏小管内有小气泡，则是由于微生物在生长过程中产生气体而形成的（图 1-1）。另一种是用琼脂培养



1-培养前的情况；2-培养后杜氏管出现气体

图 1-1 糖醇类发酵实验

基培养，若产气则会使琼脂层裂开。

无论使用何种方法进行培养，若被检菌在利用碳源后产酸，其酸性物质的积累有时会超出培养基的缓冲范围，培养基的 pH 会下降。在培养基中添加指示剂即可鉴别。例如，使用溴甲酚紫作为指示剂，其在 pH 中性时为紫色，碱性时为深红色，而在酸性时呈现黄色。当溴甲酚紫的颜色由紫色变为黄色时，即培养基颜色发生相应变化时，表明微生物利用碳源产生了酸性物质。

(一) 适用于需氧菌的方法

1. 培养基和试剂

(1) 培养基 I。邓亨氏蛋白胨水溶液：称取蛋白胨 1g，氯化钠 0.5g，蒸馏水 100mL，溶解后调 pH 为 7.6。

0.2%溴麝香草酚蓝溶液：称取溴麝香草酚蓝 0.2g，0.1mol/L NaOH 5mL，溶解于蒸馏水 95mL。

1.6%溴甲酚紫乙醇溶液：称取溴甲酚紫 1.6g，倒入小烧杯，用少量无水乙醇溶解，移至 100mL 容量瓶，用无水乙醇多次洗涤小烧杯，洗液移入容量瓶，最后用无水乙醇定容至 100mL，摇匀备用。

制法 每 100mL 邓亨氏蛋白胨水溶液中按 0.5%~1%的比例分别加入各种作为碳源的糖、醇类和某些苷类碳水化合物，加入 1.2mL 的 0.2%溴麝香草酚蓝（或用 1.6%溴甲酚紫乙醇溶液 0.1mL）作指示剂。分装于小试管（每一个试管预置一枚倒立的杜氏管），每管约 5mL，121℃高压灭菌 15min 备用。

(2) 培养基 II（可选用）。蛋白胨 10g，牛肉膏 3g，氯化钠 5g，安德烈（Andrade）指示剂 10mL，蒸馏水 1000mL，各种糖（醇）类 5~10g。

制法 将上述成分混合后，加热溶解。校正 pH 至 7.2。根据需要，分别再加相应的糖和醇。分装于 13mm×100mm 的试管，每管约 3mL，115℃灭菌 15min。

注意事项：不同的碳水化合物在培养基中最终的浓度有所不同。配制这类培养基的基本要求可参阅表 1-2。对于含有这些基质的培养基灭菌的温度不宜过高，时间也不宜过长。某些糖如阿拉伯糖、木糖、鼠李糖、核糖等，如能经过滤器除菌可达到好的效果。如添加糖类为蔗糖，因其不纯，加热后会自行分解，应采用过滤法除菌。可将这些拟测定的碳水化合物配成 10 倍于最终浓度，灭菌后再加至无菌的基础培养基中。接种后适温培养。

表 1-2 碳水化合物培养基简表

培养基的基质	数量/[g (mL) /100mL]	灭菌后 pH	灭菌条件	灭菌时间/min
苦杏仁苷	1.0	6.8±0.2	过滤除菌	—
L-阿拉伯糖	0.5	6.9	过滤除菌	—
纤维二糖	1.0	6.9	121℃	15
核糖醇	0.5	6.9		
卫矛醇	1.0	6.9	121℃	15
DL-赤藓精醇	0.5	6.7		

续表

培养基的基质	数量/[g (mL)/100mL]	灭菌后 pH	灭菌条件	灭菌时间/min
七叶苷	0.5	6.6	121℃	15
D-果糖	1.0	6.9	115℃	15
D-半乳糖	1.0	6.9	121℃	15
葡萄糖	1.0	6.9	115℃	15
甘油	0.8mL	6.7	121℃	20
糖原	0.5	6.9		
马尿酸盐 (马尿酸钠)	1.0	6.9	121℃	20
乳醇	1.0	6.9		
菊粉	1.0	6.9	115℃	15
乳糖	1.0	6.9	115℃	15
D (+) 麦芽糖	1.0	6.9	115℃	15
D (+) 甘露醇	1.0	6.9	121℃	15
D-甘露醇	1.0	6.9	121℃	15
松三糖	0.5	6.9	过滤除菌	—
D-蜜二糖	1.0	6.8±0.2	过滤除菌	—
D (+) 棉子糖	1.0	6.9	115℃	15
L-鼠李糖	1.0	6.8±0.2	过滤除菌	—
D (-) 核糖	0.5	6.7	过滤除菌	—
水杨苷	1.0	6.9	121℃	15
D-山梨醇	1.0	6.8±0.2	过滤除菌	—
L-山梨糖	1.0	6.9	115℃	15
可溶性淀粉	1.0	6.5	121℃	20
D-蔗糖	1.0	6.8±0.2	过滤除菌	—
海藻糖	0.5	6.9	过滤除菌	—
木糖	1.0	6.7	121℃	15
葡萄糖酸盐 (钠盐)	1.0	6.9	121℃	15

如在培养基中加入琼脂达 0.5%~0.7%，则成半固体，可省去倒立的杜氏管。

2. 实验方法

从琼脂斜面的纯培养物上，用接种环取少量被检细菌接种于杜氏管培养基中（如为半固体，应用接种针穿刺接种），在 37℃ 培养，一般观察 2~3d。迟缓反应需观察 14~30d，同时取一支试管不接种检测菌，做空白对照。

3. 实验结果

接种菌若能分解培养基中的糖（醇）类而生成酸，将使培养基中指示剂呈酸性反应；若产生气体，则可使液体培养基中的杜氏管内出现气泡，若为半固体培养基，则检视沿穿刺线和管壁及管底有无微小气泡。有时还可看出接种菌有无动力，若有动力，培养物可呈弥散生长；若接种菌不分解糖（醇）则无反应。

例如, 使用培养基 I 培养后, 培养基由蓝色变黄色 (指示剂溴麝香草酚蓝遇酸由蓝色变黄色), 并有气泡, 则说明被检菌可以分解特定添加的糖 (醇、苷) 类, 产酸、产气; 若培养基仍为蓝色, 没有产气现象, 则被检菌不分解该糖类; 若仅培养基变黄, 则说明被检菌仅分解该糖类产酸。

结果报告为:

产酸不产气, 阳性, 以 “+” 表示;

产酸产气, 阳性, 以 “⊕” 表示;

不产酸不产气, 阴性, 以 “-” 表示。

(二) 适用于厌氧菌的方法

1. 培养基和试剂

将蛋白胨 20g、氯化钠 5g、硫乙醇酸钠 1g、琼脂 16g 和 1000mL 水放于烧瓶内, 加热使溶化, 再加入所需的糖 10g, 调整 pH 到 7.0, 加入 1.6% 溴甲酚紫乙醇溶液 1mL 作为指示剂, 分装试管, 在 121℃ 高压灭菌 15min 后, 做成高层。配制培养基时需在厌氧条件下进行。

2. 实验方法

将厌氧菌的培养物用穿刺接种法接种于上述培养基的深部, 置培养箱中于 37℃ 培养数小时至 2 周后, 观察结果。同时取一支试管不接种检测菌, 作空白对照。

若用微量发酵管, 或要求培养时间较长时, 应保持湿度, 以免培养基干燥。

3. 实验结果

结果判定及报告同 “(一) 适用于需氧菌的方法”。

二、葡萄糖代谢类型鉴别实验 (O/F 实验)

O/F 实验即葡萄糖氧化发酵实验。在细菌鉴定中, 糖类发酵产酸是一项重要依据。

细菌对糖类的利用有两种类型: 一种是从糖类发酵产酸, 不需要以分子氧作为最终受氢体, 称发酵型产酸; 另一种则是以分子氧作为最终受氢体, 称氧化型产酸。前者包括多数菌种类型。氧化型细菌在有氧的条件下才能分解葡萄糖, 无氧的条件下不能分解葡萄糖; 发酵型细菌在有氧无氧条件下均可分解葡萄糖; 不分解葡萄糖的细菌称为产碱型。氧化型产酸量较少, 所产生的酸常常被培养基中的蛋白胨分解时所产生的胺所中和, 而不表现产酸。为此, Hugh 和 Leifson 提出一种含有机氮低的培养基, 根据培养后培养基的颜色变化以鉴定细菌从糖类产酸是属氧化型产酸还是发酵型产酸。一般用葡萄糖作为糖类代表, 也可利用这一基础培养基来测定细菌利用其他糖类或醇类产酸的能力。这一实验广泛用于细菌种属间的鉴定。肠杆菌科细菌为发酵型, 非发酵菌通常为氧化型或产碱型; 此外微球菌属可氧化葡萄糖, 而葡萄球菌属则能发酵葡萄糖。

1. 培养基和试剂

HL (Hugh-Leifson) 培养基

成分 蛋白胨 2g, 氯化钠 5g, 磷酸氢二钾 0.3g, 琼脂 4g, 葡萄糖 10g, 0.2% 溴麝香草酚蓝溶液 12mL, 蒸馏水 1000mL, pH7.2。

制法 将蛋白胨和盐类加水溶解后, 校正 pH 至 7.2。加入葡萄糖、琼脂煮沸, 溶化琼脂,

然后加入指示剂。混匀后，分装试管，121℃高压灭菌 15min，直立凝固备用。

2. 实验方法

取 18~24h 的幼龄待检菌种，以穿刺接种在 HL 培养基中，每株菌接 4 管，其中 2 管用油（凡士林：液体石蜡=1：1，混合后灭菌）封盖，加 0.5~1cm 厚，以隔绝空气为闭管。另外 2 管不封油为开管，同时取一支不接种检测菌的闭管作为空白对照。在 37℃适温培养 1d、2d、4d、7d 观察结果。

3. 结果判定与报告

实验结果参照表 1-3 进行报告。

表 1-3 O/F 实验结果判定表

类型	封油管		未封油管	
	颜色	结果判定	颜色	结果判定
发酵型	黄色	+	黄色	+
氧化型	紫色	-	黄色	+
产碱型	紫色	-	紫色	-

注：“+”表示产酸；“-”表示不产酸。

三、甲基红实验（methyl red test, MR 实验）

甲基红为酸性指示剂，其 pH 范围为 4.4~6.0，其 pK 值为 5.0。因此在 pH5.0 以下，其颜色随酸度的增大而红色增强；在 pH5.0 以上，其颜色则随碱度的增大而黄色增强。细菌分解葡萄糖产生丙酮酸后，有的细菌可使丙酮酸转化生成乳酸、琥珀酸、醋酸和甲酸等大量酸性产物，使培养基 pH 下降至 4.5 以下，使甲基红指示剂变红色，为甲基红实验阳性；有的细菌使丙酮酸脱羧后形成酮、醇类中性产物，使培养基 pH 上升至 5.4 以上，甲基红指示剂呈橘黄色，为甲基红实验阴性。该实验主要用于大肠埃希菌和产气肠杆菌的鉴别，前者为阳性，后者为阴性。此外，沙门氏菌属、志贺菌属、枸橼酸杆菌属、变形杆菌属等为阳性；肠杆菌属、克雷伯菌属等为阴性。

1. 培养基和试剂

1) 缓冲葡萄糖蛋白胨水培养基

成分 磷酸氢二钾 5g，多胨 7g，葡萄糖 5g，蒸馏水 1000mL。

制法 溶化后校正 pH 为 7.0，分装试管，每管 1mL，121℃高压灭菌 15min。

2) 甲基红试剂 10mg 甲基红溶于 30mL 95%乙醇中，然后加入 20mL 蒸馏水混匀。

2. 实验方法

挑取新鲜的待试培养物少许，接种于缓冲葡萄糖蛋白胨水培养基，于 36℃±1℃或 30℃（以 30℃较好）培养，哈夫尼亚菌则应在 22~25℃培养。培养 3~5d，从第 48h 起，每日取培养液 1mL，加入甲基红指示剂 1~2 滴，立即观察现象。直至发现阳性或至第 5 天仍为阴性即可判定结果。在 pH5.0 或上下接近时，可能变色不够明显，此时应延长培养时间，重复实验。

3. 结果判定及报告

滴入指示剂，呈鲜红色或橘红色为阳性，呈淡红色为弱阳性，记 MR 实验“+”；滴入指示剂，呈橘黄色或黄色为阴性，记 MR 实验“-”。

四、 β -半乳糖苷酶实验（ONPG 实验）

细菌分解乳糖依靠两种酶的作用，一种是 β -半乳糖苷酶透性酶(β -galactosidase permease)，它位于细胞膜上，可将乳糖通过细胞壁运送至细胞内。另一种为 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)，亦称乳糖酶(lactase)，位于细胞内，能使进入菌细胞的乳糖水解成半乳糖和葡萄糖。具有上述两种酶的细菌，能在 24~48h 内迅速发酵乳糖；而缺乏这两种酶的细菌，不能分解乳糖。乳糖迟缓发酵菌只有 β -D-半乳糖苷酶(胞内酶)，而缺乏 β -半乳糖苷酶透性酶，或是其活性很弱，因而乳糖进入细菌细胞很慢，所以通常需要几天时间经培养基中 1%乳糖较长时间的诱导，产生相当数量的透性酶后，才能较快分解乳糖，故呈迟缓发酵现象。邻硝基酚- β -D-半乳糖苷(*O*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, ONPG)与乳糖分子结构相似，且分子较小，不需半乳糖苷渗透酶的运送就可以迅速进入细菌细胞内，被细菌细胞内的半乳糖苷酶水解为半乳糖和黄色的邻硝基苯酚(ortho-nitrophenyl, ONP)，即使在很低浓度下也可检出。因此液体培养基变黄可判定 β -半乳糖苷酶的存在，从而确知该菌为乳糖迟缓发酵菌。

本实验主要用于迟缓发酵乳糖菌株的快速鉴定。迅速及迟缓分解乳糖的细菌 ONPG 实验为阳性，而不发酵乳糖的细菌为阴性，如枸橼酸菌属、亚利桑那菌属与沙门菌属的鉴别，埃希菌属、枸橼酸杆菌属、克雷伯菌属、哈夫尼亚菌属、沙雷菌属和肠杆菌属等均为实验阳性，而沙门氏菌属、变形杆菌属和普罗威登斯菌属等为阴性。

1. 培养基和试剂

邻硝基酚- β -D-半乳糖苷(ONPG)培养基

成分 邻硝基酚- β -D-半乳糖苷(ONPG) 60mg, 0.01mol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.5) 10mL, 1%蛋白胨水(pH7.5) 30mL。

制法 将 ONPG 溶于磷酸钠缓冲液内，加入蛋白胨水，用 30% NaOH 调 pH 为 7.0，以过滤法除菌，分装于 10mm×75mm 试管，每管 0.5mL，用橡皮塞塞紧。置 4℃冰箱中保存。ONPG 溶液为无色，如出现黄色，则不应再用。

2. 实验方法

自培养基上取菌一满环，于 0.25mL 无菌生理盐水中制成菌悬液，加入 1 滴甲苯并充分振摇，使酶释放。将试管置 37℃水浴 5min，加入 0.25mL ONPG 试剂，水浴 20min~3h 观察结果。

一般在 20~30min 内显色，菌悬液呈现亮黄色为阳性反应，记为“+”；无色为阴性，记为“-”。

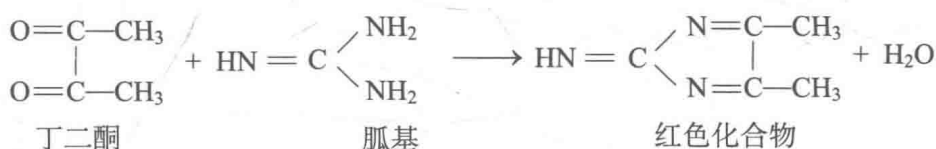
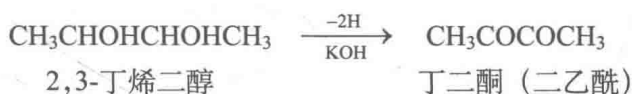
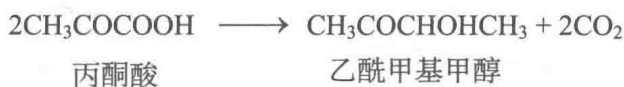
从琼脂斜面上挑取培养物一满环，接种于培养基中，36℃±1℃培养 1~3h 和 24h 观察结果。

3. 实验结果

如果有酶产生，则变黄色；如无此酶则 24h 不变色。

五、乙酰甲基甲醇实验 (V.P.实验)

某些细菌能分解葡萄糖产生丙酮酸, 丙酮酸经缩合、脱羧生成乙酰甲基甲醇, 后者在强碱环境下, 被空气中的氧氧化为二乙酰 (丁二酮), 在 α -萘酚和肌酸的催化作用下, 二乙酰与蛋白胨中的精氨酸的胍基生成红色化合物, 称为 V.P. 实验阳性反应。



本实验常与甲基红实验一起使用。前者为阳性的细菌, 后者为阴性, 反之亦如此, 如大肠埃希菌、沙门氏菌属、志贺菌属等甲基红呈阳性反应, V.P. 反应则阴性。相反, 如沙雷菌、阴沟肠杆菌等 V. P. 反应阳性, 而甲基红反应阴性。

1. 培养基和试剂

1) 磷酸盐缓冲葡萄糖蛋白胨水培养基

成分 多价蛋白胨 7g, 葡萄糖 5g, 磷酸氢二钾 5g, 蒸馏水 1000mL。

制法 将上述成分混合溶解后, 调 pH 至 7.2, 分装小试管, 121℃ 灭菌 15min。置 4℃ 冰箱中保存备用。

2) 奥梅拉 (O'Meara) 试剂

成分 氢氧化钾 40g, 肌酐 0.3g, 蒸馏水 100mL。

制法 首先将氢氧化钾溶解于蒸馏水中, 然后加入肌酐混匀。可保存 3~4 周。

3) 试剂

6% α -萘酚无水乙醇溶液: 取 α -萘酚 6g, 溶于无水乙醇 100mL。

40% 氢氧化钾溶液。

2. 实验方法

1) 奥梅拉 (O'Meara) 法 将实验菌接种于磷酸盐缓冲葡萄糖蛋白胨水培养基, 于 36℃±1℃ 培养 48h, 每 1mL 培养液加 O'Meara 试剂 0.1mL, 摇动试管 1~2min, 静置于 37℃ 恒温箱 4h, 或在 48~50℃ 水浴放置 2h 后判定结果。

2) 贝立脱 (Barritt) 氏法 贝立脱氏方法相当敏感, 它可检出以前认为 V.P. 实验阴性的某些细菌。目前, 国内多采用该方法。

将实验菌接种于磷酸盐缓冲葡萄糖蛋白胨水培养基, 于 36℃±1℃ 培养 2d, 每 2mL 培养液先加入 6% α -萘酚无水乙醇溶液 1mL, 再加 40% 氢氧化钾水溶液 0.4mL, 摇动 2~5min,