



面向21世纪课程教材  
Textbook Series for 21st Century

EXPERIMENTAL FOOD MICROBIOLOGY  
EXPERIMENTAL FOOD MICROBIOLOGY  
EXPERIMENTAL FOOD MICROBIOLOGY

# 食品微生物学实验技术

(第2版)

牛天贵 ◎ 主编



中国农业大学出版社

ZHONGGUONONGYEDAXUE CHUBANSHE

面向21世纪课程教材  
Textbook Series for 21st Century

# 食品微生物学实验技术

(第2版)

牛天贵 主编

中国农业大学出版社

· 北 京 ·

### 图书在版编目(CIP)数据

食品微生物学实验技术/牛天贵主编.—2版.—北京:中国农业大学出版社,2011.9  
ISBN 978-7-5655-0381-8

I. ①食… II. ①牛… III. ①食品微生物-微生物学-实验 IV. ①TS201.3-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第158505号

书 名 食品微生物学实验技术(第2版)  
Shipin Weishengwuxue Shiyan Jishu

作 者 牛天贵 主编

策划编辑 宋俊果 刘 军

封面设计 郑 川

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路2号

电 话 发行部 010-62818525,8625

编辑部 010-62732617,2618

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

经 销 新华书店

印 刷 涿州市星河印刷有限公司

版 次 2011年9月第2版 2011年9月第1次印刷

规 格 787×1092 16开本 12.25印张 271千字

定 价 19.50元

责任编辑 田树君

责任校对 王晓凤 陈 莹

邮政编码 100193

读者服务部 010-62732336

出 版 部 010-62733440

e-mail: cbsszs@cau.edu.cn

图书如有质量问题本社发行部负责调换

# 出版说明并代序

承蒙广大读者厚爱,食品科学与工程系列教材出版6年来,业已成为目前全国高等学校本科食品类专业教育使用最为广泛的教科书。出版之初,这套教材便被整体列为教育部“面向21世纪课程教材”,至今已累计发行33万册,其中《食品生物技术导论》、《食品营养学》、《食品工程原理》、《粮油加工学》、《食品试验设计与统计分析》等书已成为“十五”、“十一五”国家级规划教材。实践证明,这套教材的设计、编写是成功的,它满足了这一时期我国食品生产发展和学科建设的需要,为我国食品专业人才培养做出了积极的贡献。

教材建设是学科建设的重要内容,是人才培养的重要支柱,也是社会 and 经济发展需求的反映。近年来,随着我国加入世界贸易组织,食品工业在机遇和挑战并存的形势下得以持续快速的发展,食品工业进入到了一个产业升级、调整提高的关键时期。食品产业出现了许多新情况和新问题,原有的教材无论在内容的广度上,还是在深度上,都已经难以满足时代的需要。教材建设无疑应该顺应时代发展,与时俱进,及时反映本学科科学技术发展的最新内容以及产业和社会经济发展的最新需求。正是在这样的思想指导下,我们重新修订和补充了这套教材。

在中国农业大学出版社的支持下,我们组织了全国40多所大专院校、科研院所的300多位一线专家教授,参与教材的编写工作,专家涉及生物、工程、医学、农学等领域。在认真总结原有教材编写经验的基础上,综合一线任课教师和学生的使用意见,对新增教材进行了科学论证和整体策划,以保证本套教材的系统性、完整性和实用性。新版系列教材在原有15本的基础上新增至20本,主要涉及食品营养、食品质量与安全、市场与企业管理等相关内容,几乎覆盖所有食品学科专业的骨干课程和主要选修课程。教材既考虑到对食品科学与工程最新理论发展的介绍,又强调了食品科学的具体实践。该系列教材力求做到每本既相对独立又相互衔接,互为补充,成为一个完整的课程体系。本套教材除可作为大专院校的教科书外,也可作为食品企业技术人员的参考材料和技术手册。

感谢参与策划、编写这套教材的所有专家学者,他们为这套教材贡献了经验、智慧、心血和时间,同时还要感谢各参与院校和单位所给予的支持。

由于本系列教材的编写工程浩大,加之时间紧、任务重,不足之处在所难免,希望广大读者、专家在使用过程中提出宝贵意见,以使这套教材得以不断完善和提高。

罗云波

2008年8月16日

于马连洼

## 第 2 版前言

“马克思的整个世界观不是教义,而是方法。它提供的不是现成的教条,而是进一步研究的出发点和供这种研究使用的方法”。正确的、科学的、聪明的方法,是人类智慧的结晶、宝贵的精神财富。

当今微生物技术已成为微生物学科的一个重要分支学科,它不仅是微生物学发展的基石,而且生命科学的许多重大发现、发明和理论的证实,微生物技术都起着重要作用,不少非生命科学也广泛地采用它,它在工、农、食、医、药方面和人们日常生活中的应用更是越来越普遍。人们通常将微生物技术分为以酿造技术为代表的传统微生物技术、以发酵技术为代表的近代微生物技术和以基因重组为代表的现代微生物技术。而显微镜观察、无菌操作、纯种分离、纯菌培养、菌种鉴定和保存等一系列基本实验技术,对微生物的发现、研究、开发和利用,无论过去、现在和将来,都是不可缺少的。

为了适应 21 世纪科学技术更为迅猛发展的挑战,迎接微生物学迅速向分子生物学水平和微生物产业化发展的机遇和挑战,为社会培养微生物学领域的高素质科技人才,我们希望通过微生物学实验让学生验证理论,巩固和加深理解所学过的专业课知识,熟悉和掌握实验和操作技能,培养学生独立分析问题和解决问题的能力,进一步启发和提高学生的创新意识和创新能力。

总结分析以往开课内容及效果,去除某些重复的实验内容;适当删减某些已经淘汰、过时或不太重要的实验内容;将某些原来分别在普通微生物学、微生物技术学、微生物生理学、微生物遗传学、食品微生物学和发酵食品学中单独开设的小实验,集中、综合为系统、连贯、效果较好的实验系列;并注意适当添加现代分子微生物学的实验方法与技术,在此基础上我们编写了《食品微生物学实验技术》第 2 版。

本书第 2 版由牛天贵任主编,杨幼慧、孔庆学任副主编。全书共分 3 篇,第一篇实验一、二、三、四由孔庆学编写;实验五、六、七由梁志宏编写;第二篇实验十二由陈静编写;实验十四、十五、十六由张伟编写;第三篇实验二十二、二十六由侯洪萍编写;实验二十三、二十四、二十八、二十九、三十一、三十二、三十三由杨幼慧编写;实验二十五、二十七由钟士清编写;实验三十由李平兰编写;其余部分由牛天贵编写;牛天贵负责全书的通编和定稿。

由于食品微生物学检验标准的更新,本书主要修订了食品微生物学的实验部分,主要由牛天贵主编和杨幼慧副主编修订。

本书涉及的学科很多,内容很广,发展变化快,加之编者水平和能力有限,难免存在不足、错误和不妥之处,敬请同行专家和广大读者批评指正,以使本书在使用中不断完善和提高。

编者

2010年11月1日

# 第 1 版前言

恩格斯曾指出：“马克思的整个世界观不是教义，而是方法。它提供的不是现成的教条，而是进一步研究的出发点和供这种研究使用的方法。”正确的、科学的、聪明的方法，是人类智慧的结晶，是宝贵的精神财富。

方法有各种各样，适用不同的领域，在不同的时空发挥不同的作用。生命科学是 21 世纪的带头学科，生物工程是 21 世纪的主流产业。微生物学是生命科学研究中最活跃的学科领域，微生物技术是生物工程技术的核心主体。

当今微生物技术已成为微生物学科的一分支学科，它不仅是微生物学进展的基石，而且生命科学的许多重大发现，发明和理论的证实，微生物技术都起着重要作用，不少非生命科学也广泛地采用它，它在工、农、医方面和人们日常生活中的应用更是越来越普遍。人们通常将微生物技术分为以酿造技术为代表的传统微生物技术、以发酵技术为代表的近代微生物技术和以基因重组为代表的现代微生物技术。而显微镜观察、无菌操作、纯种分离、纯种培养等一系列基本实验技术，对微生物的发现、研究、开发和利用，无论在过去、现在还是将来，则都是不可缺少的。

为了适应 21 世纪科学技术更为迅猛发展的需要，迎接微生物学迅速向分子生物学水平和微生物产业化发展的机遇与挑战，为社会培养微生物学领域的高素质科技人才，我们希望通过微生物学实验让学生验证理论，巩固和加深理解所学过的专业课知识，熟悉和掌握实验和操作技能，培养学生独立分析问题和解决问题的能力，进一步启发和提高学生的创造意识和创新能力。

总结分析以往开课内容及效果，去除某些重复的实验内容；适当删减某些已经淘汰、过时或不太重要的实验内容；集中或改变某些原来分析在普通微生物学、微生物技术学、微生物生理学、微生物遗传学、食品微生物学和发酵食品学中单独开设的小实验，编写成系统、连贯、效果较好的实验系列；并注意适当添加现代分子微生物学的实验方法与技术，在此基础上我们编写了《食品微生物学实验技术》一书。本教材是高等教育面向 21 世纪教学内容和课程体系改革项目(04-10)研究成果。

本书由牛天贵任主编，孔庆学、杨幼慧任副主编。全书共分 3 篇，第一篇的实验一、二、三、四由孔庆学编写；五、六、七由梁志宏编写；第二篇的实验十二由陈静编写；实验十四、十五、十六由张伟编写；第三篇的实验二十二、二十六由侯红萍编写；实验二十三、二十四、二十八、二十九由杨幼慧编写；实验二十五、二十七由钟士清编写；实验三十由李平兰编写；其余部分由牛天贵编写。牛天贵负责全书的统编定稿。

在本书的编写过程中，薛景珍教授和李淑高教授审阅了编写大纲和教材。

本书涉及的学科较多,内容范围广,加之编者水平和能力有限,难免有不足、错误和不妥之处,敬请同行专家和广大读者批评指正,以便使本书在使用中不断完善和提高。

**编 者**

2002年6月



# 微生物学实验室守则

微生物学实验课的目的主要是：训练学生掌握微生物学最基本的操作技能；了解微生物学的基本知识；加深和巩固对自学和讲课内容的理解。另一方面，通过实验不仅可培养学生观察、思考、分析问题和解决问题的能力；还可以培养学生实事求是、严肃认真的科学态度，以及良好的合作精神，同时也有益于培养爱护公物的道德风范。

为了上好微生物学实验课，并保证安全，特提出如下注意事项：

- (1)每次实验前必须对实验内容进行充分预习，以了解实验的目的、原理和方法。
- (2)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。
- (3)实验中严格遵守实验要求，全部操作应严格按操作规程进行，遇有意外情况发生时，应立即报告指导教师，及时处理。
- (4)认真并及时做好实验记录，对于当时不能得到结果而需要连续观察的实验，则需在指定时间内观察，并记录每次观察的现象和结果，以便日后分析。
- (5)在使用仪器、设备时，要认真小心，特别爱护。如有损坏，须做好登记。对耗材和药品的使用要杜绝浪费，用完后放回原处。
- (6)每次实验需进行培养的材料，标明自己的组别及处理方法，放于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。
- (7)每次实验的结果，应以实事求是的科学态度填入报告表格中，力求简明准确，并连同思考题及时汇交教师批阅。
- (8)每次实验完毕，必须把所用仪器擦拭干净，放置妥当。将实验室收拾整齐，打扫干净。
- (9)离开实验室前一定要用肥皂将手洗净。注意关闭门窗以及水、电、煤气等开关。

# 目 录

## 第一篇 基础微生物学实验

实验一	普通显微镜的使用和细菌形态观察	(2)
实验二	简单染色法和革兰氏染色法	(6)
实验三	培养基的配制与灭菌	(12)
实验四	微生物的分离、纯化和接种	(17)
实验五	放线菌、酵母菌、霉菌形态观察	(24)
实验六	微生物的培养特征	(31)
实验七	微生物细胞大小的测定和显微镜直接计数	(35)
实验八	物理、化学因素对微生物的影响	(40)
实验九	细菌的生理生化试验	(46)
实验十	微生物菌种保藏方法	(51)

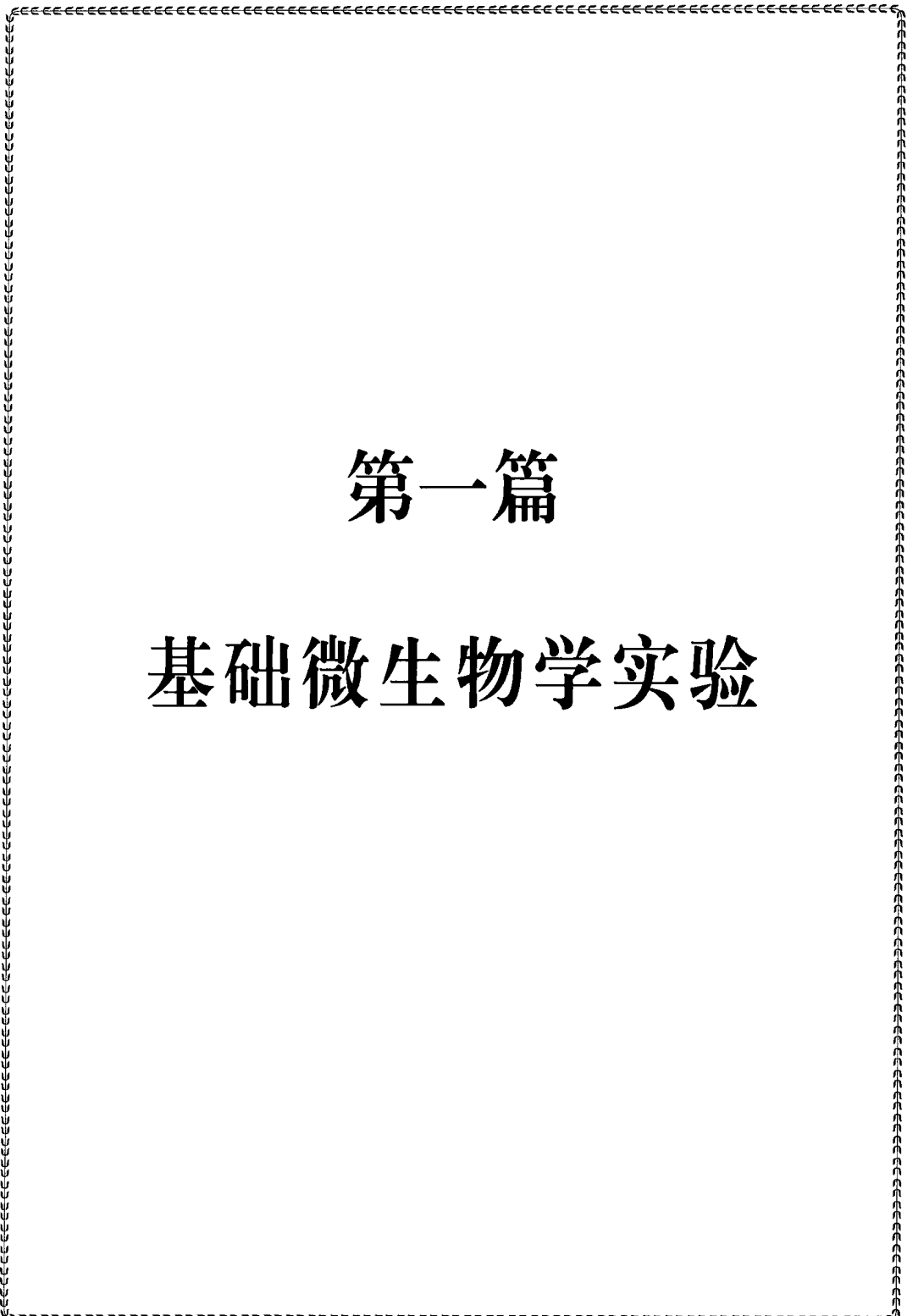
## 第二篇 食品微生物学实验

实验十一	食品中菌落总数的测定	(58)
实验十二	大肠菌群计数	(63)
实验十三	肉毒梭菌及肉毒毒素的检验	(66)
实验十四	沙门氏菌属的检验	(70)
实验十五	志贺氏菌属检验	(78)
实验十六	金黄色葡萄球菌检验	(82)
实验十七	Ames 法检测诱变剂和致癌剂	(86)
实验十八	食品中霉菌计数法	(93)
实验十九	食品中病原性大肠埃希氏菌的检验	(98)
实验二十	微生物的微量诊断系统	(103)

## 第三篇 发酵微生物学实验

实验二十一	生牛乳自然发酵过程中微生物菌相的变化	(112)
-------	--------------------	-------

实验二十二	糖化曲的制备及其酶活力的测定·····	(115)
实验二十三	噬菌体的检查及效价测定·····	(119)
实验二十四	甜酒酿的制作·····	(124)
实验二十五	酸乳中乳酸菌的测定·····	(126)
实验二十六	从自然界中分离筛选微生物菌种·····	(128)
实验二十七	酱油种曲孢子数及发芽率的测定·····	(131)
实验二十八	毛霉的分离和豆腐乳的制备·····	(136)
实验二十九	细菌生长曲线的测定·····	(140)
实验三十	厌氧菌的分离和培养·····	(143)
实验三十一	食用菌菌种的分离和制种技术·····	(146)
实验三十二	食品中黄曲霉毒素的检测·····	(152)
实验三十三	台式自控发酵罐的原理、构造和使用·····	(156)
附录	·····	(162)
参考文献	·····	(178)



# 第一篇

## 基础微生物学实验

# 实验一 普通显微镜的使用和细菌形态观察

## 1 目的

- (1)学习并掌握油镜的工作原理和使用方法。
- (2)复习光学显微镜的结构、各部分的功能和使用方法。

## 2 原理

微生物的最显著特点是个体微小,必须借助显微镜才能观察到它们的个体形态和细胞结构。熟悉显微镜和掌握其操作技术是研究微生物不可缺少的手段。本实验将介绍目前微生物学研究中最常用的普通光学显微镜的结构和样品制作。目的在于使同学们通过实验,对光学显微镜有比较全面的了解,并重点掌握明视野普通光学显微镜中油镜的使用。

## 3 材料

### 3.1 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)染色玻片标本。

链霉菌(*Streptomyces* sp.)及青霉菌(*Penicillium* sp.)的水封片。

### 3.2 溶液或试剂

香柏油、二甲苯。

### 3.3 仪器及其他用品

显微镜、擦镜纸等。

## 4 流程

安置→调光源→调目镜→调聚光器→镜检(低倍镜→高倍镜→油镜)→擦镜→复原

## 5 步骤

### 5.1 观察前的准备

#### 5.1.1 显微镜的安置

置显微镜于平整的实验台上,镜座距实验台边缘约 10 cm。镜检时姿势要端正。

#### 5.1.2 光源调节

安装在镜座内的光源灯可通过调节电压以获得适当的照明亮度,若使用反光镜采集自然光或灯光作为照明光源时,应根据光源的强度及所用物镜的放大倍数选用凹面或凸面反光镜并调节其角度,使视野内的光线均匀,亮度适宜。

#### 5.1.3 双筒显微镜的目镜调节

根据使用者的个人情况,双筒显微镜的目镜间距可以适当调节,而左目镜上一般还配有曲光度调节环,可以适应眼距不同或两眼视力有差异的不同观察者。

#### 5.1.4 聚光器数值孔径值的调节

正确使用聚光镜才能提高镜检的效果。聚光镜的主要参数是数值孔径,它有一定的可变范围,一般聚光镜边框上的数字是代表它的最大数值孔径,通过调节聚光镜下面可变光阑的开放程度,可以得到各种不同的数值孔径,以适应不同物镜的需要。

### 5.2 显微观察

在目镜保持不变的情况下,使用不同放大倍数的物镜所能达到的分辨率及放大率都是不同的。一般情况下,特别是初学者,进行显微观察时应遵守从低倍镜到高倍镜再到油镜的观察程序,因为低倍数物镜视野相对大,易发现目标及确定检查的位置。

#### 5.2.1 低倍镜观察

将金黄色葡萄球菌染色标本玻片置于载物台上,用标本夹夹住,移动推进器使观察对象处在物镜的正下方。下降 10 倍物镜,使其接近标本,用粗调节器慢慢升起镜筒,使标本在视野中初步聚焦,再使用细调节器调节使物像清晰。通过玻片夹推进器慢慢移动玻片,认真观察标本各部位,找到合适的目的物,仔细观察并记录所观察到的结果。

#### 5.2.2 高倍镜观察

在低倍镜下找到合适的观察目标,并将其移至视野中心后,将高倍镜移至工作位置。对聚光器光圈及视野亮度进行适当调节后微调细调节器使物像清晰,利用推进器移动标本找到需要观察的部位,并移至视野中心仔细观察或准备用油镜观察。

### 5.2.3 油镜观察

在高倍镜或低倍镜下找到要观察的样品区域后,用粗调节器将镜筒升高,然后将油镜转到工作位置。在待观察的样品区域加滴香柏油,从侧面注视,用粗调节器将镜筒小心地降下,使油镜镜头浸在油中,并几乎与标本接触时止(注意:切不可将油镜镜头压到标本,否则不仅压碎玻片,还会损坏镜头)。将聚光器升至最高位置并开足光圈(若所用聚光器的数值孔径值超过 1.0,还应在聚光镜与载玻片之间也加滴香柏油,保证其达到最大的效能),调节照明使视野的亮度合适,用粗调节器将镜筒徐徐上升,直至视野中出现物像并用细调节器使其清晰准焦为止。然后用相同的方法观察其他样本。

## 5.3 显微镜用后的处理

上升镜筒,取下载玻片。先用擦镜纸擦去镜头上的油,再用擦镜纸蘸取少许二甲苯擦去镜头上的残留油迹,尔后用擦镜纸擦去残留的二甲苯,最后用绸布清洁显微镜的金属部件。将各部分还原,反光镜垂直于镜座,将物镜转成“八”字形,再向下旋。同时把聚光镜降下以免接物镜与聚光镜发生碰撞。套上镜套,放回原处。

## 6 结果

分别绘出在低倍镜、高倍镜和油镜下观察到的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、链霉菌及青霉菌的形态,包括在 3 种情况下视野中的变化,同时注明物镜放大倍数和总放大率。

## 7 思考题

- (1)用油镜观察时应注意哪些问题?在载玻片和镜头之间加滴什么油?起什么作用?
- (2)试列表比较低倍镜、高倍镜及油镜各方面的差异。为什么在使用高倍镜及油镜时应特别注意避免粗调节器的误操作?
- (3)什么是物镜的同焦现象?它在显微镜观察中有什么意义?
- (4)影响显微镜分辨率的因素有哪些?
- (5)根据实验体会,谈谈应如何根据所观察微生物的大小,选择不同的物镜进行有效的观察。

### 附注

#### 显微镜的基本结构及工作说明

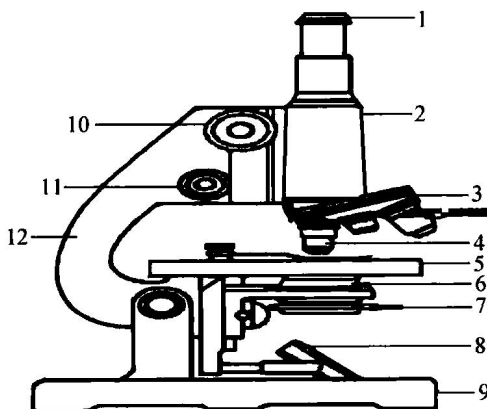
普通光学显微镜利用目镜和物镜两组透镜系统来放大成像。它由机械装置和光学系统两大部分组成(图 1-1)。显微镜的光学系统包括物镜、目镜、反射镜和聚光器 4 个部件,其中物镜的性能最为关键,它直接影响着显微镜的分辨率。

一般微生物学使用的显微镜有 3 个物镜即低倍镜(4~10 倍)、高倍镜(40~45 倍)和油镜(90~100 倍),油镜对微生物学研究非常重要。油镜使用时需在载玻片与镜头之间

加滴香柏油,一方面是增加照明亮度,油镜的放大倍数大、焦距短、直径小,但所需要的光照强度却最大。从承载标本的玻璃片透过来的光线,因介质密度不同(从玻璃片进入空气,再进入物镜),有些光线会因折射或全反射不能进入镜头,致使在使用油镜时会因射入的光线较少,物像显现不清。为了减少通过光线的损失,在使用油镜时须在油镜与玻片之间加入与玻璃的折射率( $n=1.55$ )相仿的镜油(通常用香柏油,其折射率 $n=1.52$ )。另一方面是增加显微镜的分辨率。显微镜的分辨率或分辨力(resolution or resolving power)是指显微镜能辨别两点之间的最小距离的能力。显微镜的优劣主要取决于分辨率 $D$ (最小可分辨距离)的大小:

$$D=\lambda/(2NA)$$

式中: $\lambda$ =光波波长; $NA$ =物镜的数值孔径值。



1. 接目镜 2. 镜筒 3. 转换器 4. 接物镜 5. 载物台 6. 聚光器 7. 虹彩光圈  
8. 反光镜 9. 镜座 10. 粗调节器螺旋 11. 细调节器螺旋 12. 镜臂

图 1-1 显微镜构造示意图

光学显微镜的光源不可能超出可见光的波长范围( $0.4\sim 0.7\ \mu\text{m}$ ),而数值孔径值则取决于物镜的镜口角(光线投射到物镜上最大角度)和玻片与镜头间介质的折射率,可表示为:

$$NA=n \cdot \sin \alpha$$

式中: $\alpha$ 为镜口角的半数。它取决于物镜的直径和焦距。一般来说,在实际应用中最大只能达到 $120^\circ$ ,而 $n$ 为介质折射率。由于香柏油的折射率( $1.52$ )比空气及水的折射率(分别为 $1.0$ 和 $1.33$ )要高,因此以香柏油作为镜头与玻片之间介质的油镜所能达到的数值孔径值( $NA$ 一般在 $1.2\sim 1.4$ )要高于低倍镜、高倍镜等物镜( $NA$ 都低于 $1.0$ )。若以可见光的平均波长 $0.55\ \mu\text{m}$ 来计算,数值孔径通常在 $0.65\ \mu\text{m}$ 左右的高倍镜只能分辨出距离不小于 $0.4\ \mu\text{m}$ 的物体,而油镜的分辨率却可达到 $0.2\ \mu\text{m}$ 左右。大部分细菌的直径在 $0.5\ \mu\text{m}$ 以上,所以油镜更能看清细菌的个体形态。



# 实验二 简单染色法和革兰氏染色法

## (一) 细菌的简单染色法

### 1 目的

- (1) 学习微生物涂片、染色的基本技术。
- (2) 掌握细菌的简单染色法。
- (3) 初步认识细菌的形态特征, 巩固学习油镜的使用方法和无菌操作技术。

### 2 原理

细菌的涂片和染色是微生物学实验中的一项基本技术。细菌的细胞小而透明, 在普通的光学显微镜下不易识别, 必须对它们进行染色。利用单一染料对细菌进行染色, 使经染色后的菌体与背景形成明显的色差, 从而能更清楚地观察到其形态和结构。此法操作简便, 适用于菌体一般形状和细菌排列的观察。

常用碱性染料进行简单染色, 这是因为在中性、碱性或弱酸性溶液中, 细菌细胞通常带负电荷, 而碱性染料在电离时, 其分子的染色部分带正电荷, 因此碱性染料的染色部分很容易与细菌结合使细菌着色。经染色后的细菌细胞与背景形成鲜明的对比, 在显微镜下更易于识别。常用作简单染色的染料有美蓝、结晶紫、碱性复红等。

当细菌分解糖类产酸使培养基 pH 值下降时, 细菌所带正电荷增加, 此时可用伊红、酸性复红或刚果红等酸性染料染色。

染色前必须固定细菌。其目的有二: 一是杀死细菌并使菌体黏附于玻片上; 二是增加其对染料的亲和力。常用的有加热和化学固定两种方法。固定时尽量维持细胞原有的形态。

### 3 材料

#### 3.1 菌种

枯草芽孢杆菌 12~18 h 营养琼脂斜面培养物, 藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 约