



面向 21 世纪课程教材

Textbook Series for 21st Century

食品微生物学实验技术

牛天贵 主编

33

中国农业大学出版社

面向21世纪课程教材

Textbook Series for 21st Century

食品微生物学实验技术

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. —北京:中国农业大学出版社,2002.8

ISBN7-81066-442-5/TS·6

面向 21 世纪课程教材

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

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 061780 号

出版 中国农业大学出版社
发行
经销 新华书店
印刷 涿州市星河印刷厂
版次 2002 年 8 月第 1 版
印次 2002 年 8 月第 1 次印刷
开本 16 印张 12.25 千字 221
规格 787×980
印数 1~3 050
定价 15.00 元

图书如有质量问题本社负责调换

社址 北京市海淀区圆明园西路 2 号 邮政编码 100094

电话 010-62892633,62893089 网址 www.cau.edu.cn

主 编 牛天贵(中国农业大学)

副主编 孔庆学(天津农学院)

杨幼慧(华南农业大学)

编 者 (按拼音顺序排列)

陈 静(江淮工学院)

侯红萍(山西农业大学)

梁志宏(中国农业大学)

李平兰(中国农业大学)

钟士清(华南农业大学)

张 伟(河北农业大学)

主 审 薛景珍

李淑高

全国高等农业院校食品
专业“面向 21 世纪课程”系列教材
编审指导委员会委员

- 罗云波 中国农业大学教授博士生导师 (生物技术)
孙远明 华南农业大学教授博士生导师 (食品营养)
陈宗道 西南农业大学教授博士生导师 (食品化学)
李里特 中国农业大学教授博士生导师 (食品工程)
李新华 沈阳农业大学教授博士生导师 (粮油加工)
李士靖 中国食品科学技术学会副秘书长教授
李云飞 上海交通大学教授博士生导师 (食品工程)
何国庆 浙江大学教授博士生导师 (食品微生物)
杨公明 西北农林科技大学教授博士生导师 (食品工程)
周光宏 南京农业大学教授博士生导师 (畜产品加工)
林家栋 中国农业大学教授全国高等学校教学研究中心特聘专家
南庆贤 中国农业大学教授博士生导师 (畜产品加工)
谢笔钧 华中农业大学教授博士生导师 (食品化学)

出版说明并代序

我国农业结构的调整,解决农村、农业、农民的发展出路,已将农产品的贮藏加工及食品科学推到了举足轻重的位置,成为拉动农业产业化、提高农产品附加值以及实现国家现代化的牵引力。而大专院校食品科学各专业的教学工作为这种牵引力提供了人才保障。

全国高等农业院校的食品学科大多建立于20世纪80年代改革开放的初期,经过近20年的发展,现已成为我国食品科学人才培养的最为重要的人才基地。农业院校的食品学科之所以能快速发展,后来居上,成为我国食品科学的主要力量,其主要原因是:食品科学与生物学科广泛地联系在一起。农业院校的食品学科得益于它植根于生物科学学科群之中,借助于生物科学飞速发展的翅膀而不断地深化自己的研究内容,提高自己的学科水平。

在学科发展的起步阶段,教学工作一直沿用过去轻工院校所编写的食品工程专业教材。然而,经过20年的发展,这些教材已经远远不能适应今天的教学需要。虽然各院校针对这种情况也曾先后编写过一些教材,但终因不成体系,很难系统地将食品学科内容广泛的课程体系和教学内容很好地衔接起来。要培养面向21世纪的高素质食品科学人才,迫切地需要将现代生物学理论与食品科学紧密地结合在一起,编写一套理论性和实践性俱强的完整教材。

这套教材正是在这样的背景和需要的前提下,在教育部、农业部有关领导部门的指导下,通过全国40多所院校在第一线的教师的共同努力下,由中国农业大学出版社组织编写而成的。教材力求反映最新的食品科学的理论与实践,同时针对食品科学是多学科集成的优点,特别注重了教材的系统性,避免课程教学内容的重复;针对食品科学实践性强的特点,教材中使用了较多的案例分析。在写作方式上,力求教材能启发学生的主动思考能力,培养学生的创新思维能力。

这套教材还得到了食品学界一批有声望的老专家、老教授的关怀和指导。由于时间紧、任务重,加之该教材体系初次建立,使用效果怎样,还要在实践中去检验。随着学科的不断发展,其内容也需要不断地修改补充,编者真诚地期待着使用这套教材的教师和同学们能够提出宝贵意见,以使这套教材充实和得以完善。

罗云波

2002年7月

于马连洼

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，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、二十七由钟土清

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	(7)
实验三	培养基的配制与灭菌	(14)
实验四	微生物的分离、纯化和接种	(20)
实验五	放线菌、酵母菌、霉菌形态观察	(28)
实验六	微生物的培养特征	(36)
实验七	微生物细胞大小的测定和显微镜直接计数	(41)
实验八	物理、化学因素对微生物的影响	(47)
实验九	细菌的生理生化试验	(54)
实验十	微生物菌种保藏方法	(60)

第二篇 食品微生物学实验

实验十一	食品中细菌总数的测定	(68)
实验十二	大肠菌群检验	(72)
实验十三	肉毒梭菌及肉毒毒素的检验	(76)
实验十四	沙门氏菌属的检验	(81)
实验十五	志贺氏菌属检验	(89)
实验十六	金黄色葡萄球菌检验	(93)
实验十七	Ames 法检测诱变剂和致癌剂	(97)
实验十八	食品中霉菌计数法	(105)
实验十九	食品中病原性大肠埃希氏菌的检验	(111)
实验二十	微生物的微量诊测系统	(117)

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	(126)
实验二十二	糖化曲的制备及其酶活力的测定	(129)

实验二十三	噬菌体的检查及效价测定·····	(134)
实验二十四	甜酒酿的制作·····	(139)
实验二十五	酸乳中乳酸菌的测定·····	(141)
实验二十六	从自然界中分离筛选微生物菌种·····	(144)
实验二十七	酱油种曲孢子数及发芽率的测定·····	(147)
实验二十八	毛霉的分离和豆腐乳的制备·····	(152)
实验二十九	细菌生长曲线的测定·····	(156)
实验三十	厌氧菌的分离和培养·····	(159)
附录	·····	(162)
参考文献	·····	(182)



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屈光度调节环,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,再用擦镜纸沾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?

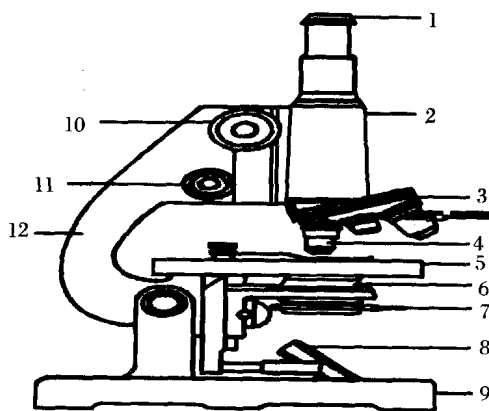
(4)影响显微镜分辨率的因素有哪些?

(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、反射镜和聚光器四个部件,其中物镜的性能最为关键,它直接影响着显微镜的分辨率。



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

一般微生物学使用的显微镜有三个物镜即低倍镜(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)的大小:

$$\text{分辨率(最小可分辨距离)}=\lambda/2NA$$

式中: λ =光波波长; NA =物镜的数值孔径值。

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: α 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° ,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。