

食品微生物学实验 2

王一非 杨晓波 叶琳 编

适用课程：食品安全与分析课程群

适用专业：食品科学与工程

上海应用技术大学

二零二零年六月

实验一 培养基的配制和无菌操作准备

一、目的要求

- (1) 了解一般培养基配制原理，掌握培养基常规配制程序。
- (2) 掌握制作斜面、玻璃器皿的包装方法和实验室各种灭菌技术。

二、基本原理

(一) 培养基配制

培养基是供微生物生长、繁殖、代谢的混合养料，要求含有微生物生长繁殖所必需的碳源、氮源、无机盐、生长因子及水分，并要求具有适宜的 pH 值、合适的渗透压等。微生物的营养类型不同，对营养物质的要求也各不相同，加之实验和研究的目的不同，所以培养基的种类很多，使用的原料各有差异，但一般配制程序却大致相同。

在配制固体培养基时一般加入一定量琼脂作凝固剂。琼脂在常用浓度下 96°C 时溶化，一般实际应用时在下面垫以石棉网煮沸溶化，以免琼脂烧焦。琼脂在 40°C 时凝固，通常不被微生物分解利用。

(二) 按照制备工艺的培养基分类

培养基按照制备工艺可以分成三类：自行配制培养基的成本相对较低，但繁琐，质量不稳定；即用型培养基“Ready to Use”使用方便，但保质期短，运输不便。

干粉培养基是将配制好的培养基进行脱水处理，这样便于保存及销售。使用时只需按照比例加入水溶解使用即可。使用方便，质量稳定，易保存，推广空间广阔。国外知名品牌有 BD、Oxoid 和 Merck 等，国内知名品牌为青岛海博、北京路桥等。目前上海应用技术大学微生物实验室普遍使用干粉培养基（图 1.1）。

培养基的保存条件：避光保存于阴凉干燥处，使用后，拧紧瓶盖，避免吸潮、氧化或污染。一般未开封的培养基可保质 3 年，已开封的可保质半年。



图 1.1 干粉型营养琼脂 (NA)

（三）灭菌原理

高压蒸汽灭菌是将待灭菌的物品放在一个密闭的加压灭菌锅内，通过加热，使灭菌锅隔套间的水沸腾而产生蒸汽。待水蒸气急剧地将锅内的冷空气从排气阀中驱尽，然后关闭排气阀，继续加热，此时由于蒸汽不能溢出，而增加了灭菌器内的压力，从而使沸点增高，得到高于 100°C 的温度，导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。在同一温度下，湿热的杀菌效力比干热大，其原因有三：一是湿热中细菌菌体吸收水分，蛋白质较易凝固；二是湿热的穿透力比干热大；三是湿热的蒸汽有潜热存在，这种潜热，能迅速提高被灭菌物体的温度，从而增加灭菌效力。

灭菌的温度及维持的时间随灭菌物品的性质和容量等具体情况而有所改变。通常为 121.3°C 灭菌 15~20 min；不耐高压的培养基则可采用流通蒸汽灭菌或间歇灭菌。含糖培养基（比如麦芽汁）用 112.6°C 灭菌 15 min。

紫外线灭菌是用紫外线灯进行的，紫外线杀菌机制主要是因为它诱导了胸腺嘧啶二聚体的形成，从而抑制了 DNA 的复制；由于辐射能使空气中的氧电离成 $[\text{O}]$ 再使 O_2 氧化生成臭氧 O_3 或使水 H_2O 氧化生成过氧化氢 H_2O_2 ， O_3 和 H_2O_2 均有杀菌作用。紫外线穿透力不大，所以，只适用于无菌室、接种箱的空气及物体表面的灭菌。

三、实验材料

（1）天平、称量纸、钥匙、量筒、试管、橡胶塞、试管架、三角瓶、移液管、洗耳球、培养皿、玻璃棒、烧杯、剪刀、酒精灯、线绳、牛皮纸或报纸、纱布、煤气灯、灭菌锅等。

（2）国产系列干粉培养基等。

四、操作步骤

斜面制作步骤：

（1）称量：见具体品牌说明。

（2）溶化：在放有培养基的三角瓶中可先加入少于所需要的水量，用玻棒搅匀，然后，在石棉网上加热使其溶解。待药品完全溶解后，补充水分到所需的总体积。

（3）分装：按实验要求，可将配制的培养基分装入试管内或三角瓶内（见图 1.2）。分装过程中注意不要使培养基沾在管口或瓶口上，以免沾污棉塞而引起污染。分装试管，其装量不超过管高的 $1/5$ ，灭菌后制成斜面；分装三角瓶的量以不超过容积达一半为宜。

（5）加塞：培养基分装完毕后，在试管口或三角瓶口上塞上棉塞，以阻止外界微生物进入培养基内而造成污染，并保证有良好的通气性能。应使棉塞长度的 $1/3$ 在试管口外， $2/3$ 在试管口内。

（6）包扎：加塞后，将全部试管用橡皮筋捆扎好，再在棉塞外保一层牛皮纸或报纸，



图 1.2 分装

以防止灭菌时冷凝水润湿棉塞，其外再用橡皮筋扎好。用记号笔注明培养基名称、日期和实验分组编号。

(7) 灭菌（国产小型高压蒸汽锅）：①将内层灭菌桶取出，再向外层锅加入适量的水，使水面与三角搁架相平为宜。放回灭菌桶，并装入待灭菌物品。三角瓶与试管口端均不要与桶壁接触，以免冷凝水淋湿包口的纸而透入棉塞；②加盖，将盖上的排气软管插入内层灭菌桶的排气槽内。再以两两对称的方式同时旋紧相对的两个螺栓；③通电加热，并同时打开排气阀，使水沸腾以排除锅内的冷空气。待冷空气完全排尽后，关上排气阀，让锅内的温度随蒸汽压力增加而逐渐上升，当锅内压力升到所需压力时，控制热源，维持压力至所需时间；④灭菌所需时间到后，切断电源，让灭菌锅内温度自然下降，当压力表的压力降至 0 时，打开排气阀，旋松螺栓，打开盖子，取出灭菌物品。如果压力未降到 0 时，打开排气阀，就会因锅内压力突然下降，使容器内的培养基由于内外压力不平衡而冲出烧瓶或试管口，造成棉塞沾染培养基而发生污染。

(8) 搁置斜面：将灭菌的含有固体培养基的试管（此时灭菌刚结束，为液体形态）的塞子端搁在稍高的物体上形成斜（图 1.3）。

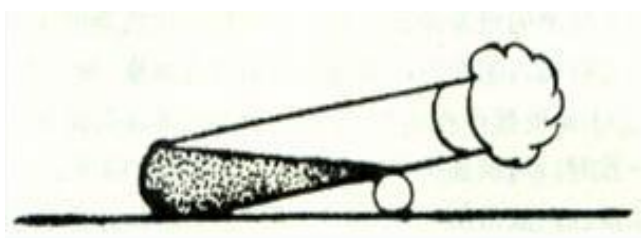


图 1.3 搁置斜面

五、实验报告

(1) 完成结果分析与讨论。

(2) 思考题

1、本学期的实验，你认为哪些适合用干热灭菌，哪些适合用湿热灭菌。

实验二 食品防腐剂的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度测定

一、目的要求

- (1) 学习并掌握复合型食品防腐剂最低抑菌浓度的原理和方法。
- (2) 学习并掌握复合型食品防腐剂最低杀菌浓度的原理和方法。

二、基本原理

食品中的防腐剂种类颇多。目前国家对化学合成防腐剂剂量限制的日趋严格，大众希望食品中少添加或不添加化学防腐剂的呼声日益高涨。另一方面，在食品中添加浓度高的单一防腐剂，具有潜在的安全风险。因此，防腐剂复配是当前食品行业的常见做法，一些复配具有协同增效的抑菌作用，通常通过测定 MIC 和 MFC 值，获得的复合型食品防腐剂的基本抑菌特性。

最低抑菌浓度（minimal inhibitory concentration, MIC）是指在体外培养微生物细胞 18 至 24 h 后能抑制培养基内病原菌生长的最低药物浓度，是测量抗菌物质的抗菌活性大小的一个指标。试验时肉眼未见微生物生长的最低药物浓度就为 MIC。

最低杀菌浓度（minimum bactericidal concentration, MBC）是指杀死 99.9%（降低 3 个数量级）的供试微生物所需的最低药物浓度。从 MIC 试验中无明显微生物细胞生长处理中，各取 100 μL 涂布于培养基，培养后无菌落生长的处理中的最低浓度为 MBC。

三、实验材料

- (1) 菌种：大肠杆菌（*Escherichia coli*）；
- (2) 培养基：溶菌肉汤培养基（Luria-Bertani broth, LB）；
- (3) 实验仪器及物品：苯甲酸钠、山梨酸钾和乳酸链球菌素等防腐剂、玻璃涂布棒（或一次性无菌塑料涂布棒）、玻璃试管、移液器、吸头和吸头盒若干。

四、操作步骤

- (1) 菌种活化：将从冰箱保藏的大肠杆菌斜面，在实验一自己制作的斜面上活化一代，然后接入含有 LB 培养基的试管或三角瓶，37°C 培养约 18 h；
- (2) 细菌细胞悬浮液制备：将步骤（1）培养的液体发酵液，用无菌水配制成一定浓度待用；
- (3) 准备 5 支含有 5 mL 体积 2 倍浓度 LB 的试管，湿热灭菌，待用；
- (4) 按照 2 倍稀释法添加单一或复合防腐剂抗菌剂添加量为 4.8 mL，每个小组自己设计对比实验，包含 2 个单独处理和 1 个复合处理；
- (5) 接菌：用 1 mL 移液器将 0.2 mL 菌液加入试管，使得菌液浓度最终为 10^6 CFU/mL 左右；
- (6) 37°C 培养 24-48 h 后，肉眼观察，记录浓度最低且没有微生物生长仍旧澄清透明

的试管为 MIC 值；

(7) 从 MIC 试验中无明显微生物细胞生长处理中，各取 100 μL 涂布于培养基，培养后无菌落生长的处理中的最低浓度为 MBC。

五、实验报告

(1) 结果：给出复合防腐剂对酵母菌的最低抑菌浓度，并通过文献检索，分析讨论与防腐剂单独添加相比，复配防腐剂的特点。

(2) 思考题

- 1、试分析食品微生物检测实验与抗菌实验的主要区别。
- 2、要在具体食品中添加新型食品防腐剂，除了 MIC 和 MBC 值，还需要做些什么？

实验三 冷藏条件下抗菌剂的抑菌动态测定

一、目的要求

- (1) 学会使用比浊法测定细菌的生长动态。
- (2) 学会用 origin 软件绘制动态抑菌曲线图。

二、基本原理

比浊法又称浊度测定法，原理是悬浮颗粒在液体中造成投射光的减弱，减弱的程度与悬浮颗粒的量相关，也就是利用培养液中微生物的数量不同造成的吸光度差异来确定微生物的生长量。本法测定的是微生物的总量。适用于菌体分散良好的非丝状单细胞微生物的测定。在进行大量培养时，此法比平板计数法能较快得出结果，省时省力。

在食品中使用的防腐剂种类颇多。随着国家对化学喝茶防腐剂限制的严格，天然防腐剂的需求日去迫切。天然防腐剂通常情况下抑菌效果不及化学合成防腐剂，因此经常复配使用，本实验采用比浊法，分析比较天然复配抑菌剂在液体培养基中的生长动态。

三、实验材料

- (1) 几种天然抑菌物质、大肠杆菌斜面培养基
- (2) 培养基：NB 培养基。
- (3) 仪器：酶标仪，移液器。
- (4) 根据本组设计复合抑菌剂，撰写试验方案（预习报告），去实验员处领取所需的培养基和三角瓶等耗材。

四、操作步骤

(1) **大肠杆菌活化**：从固体斜面中挑取一环接种到含有 NB 培养基的试管中， $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24h。

(2) **接种与培养**：用移液器取不同浓度抑菌剂单独或复配加入 24 孔酶标板，再加入 NB 培养液和大肠杆菌细胞发酵液， $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养，每隔一定时间取样测定发酵液的 OD 值。

(3) **比浊**：打开酶标仪预热 30 min 后，在软件中将测定波段设置为 600 nm，放入酶标板读数，每个处理包含 2 个平行。不接菌的 NB 培养液为 blank。不加抑菌剂的处理为 control 组。

- (4) **绘制动态抑菌曲线**：采用 excel 或 origin 软件绘制。

五、实验报告

- (1) 完成结果分析与讨论。
- (2) 思考题

谈谈如何减少在食品中使用化学防腐剂。

实验四 熟肉制品金黄色葡萄球菌测定

一、目的要求

- (1) 学会熟肉制品中金黄色葡萄球菌检验。
- (2) 了解常见生理生化鉴定和血清学鉴定的原理。

二、基本原理

(1) 金黄色葡萄球菌可产生多种毒素和酶。在血平板上，生成金黄色色素使菌落早现金黄色，并产生凝固酶，使血浆凝固，多数致病菌株能产生溶血素，使血琼脂平板菌落周围出现溶血环，在试管中出现溶山反应；Baird-Parker 平板上，将亚碲酸钾还原成碲酸钾使菌落呈灰黑色，产生脂酶使菌落周围有一混浊带，并在外层产生蛋白水解酶有一透明带。

(2) 肉汤中培养时菌体可生成血浆凝固酶并释放于培养基中，该酶被血浆中的致活剂激活后，变成耐热的凝血酶样物质，可使血浆中的液态纤维蛋白原变成纤维蛋白，血浆因而成凝固状态。

三、实验材料

- (1) 不同贮藏条件下的熟肉制品 2 份；
- (2) 撰写实验方案(预习报告)，去实验员处领取所需的培养基和三角瓶等耗材；
- (3) 培养基：7.5%氯化钠肉汤增菌液； Baird-Parker 平板；脑心浸出液(BHI)；
- (4) 试剂：兔血浆;生理盐水。

四、操作步骤

(1) 采样：无菌条件下，称取 25 g(固体)样品至盛有 225 mL7.5% NaCl 肉汤增菌液的无菌锥形瓶(瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠)中，充分混匀，制成 1:10 的样品匀液。称量步

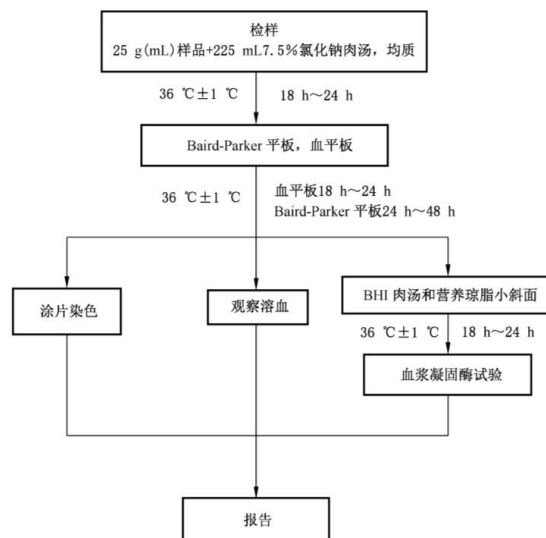


图 1 金黄色葡萄球菌检验程序

骤同前。

(2) 稀释与增菌: 吸取 5 mL 上述混悬液于 50 mL。36±1°C 培养 24 h。

(3) 平板分离: 从培养好的 7.5% NaCl 肉汤增菌液中挑取一环分离于血平板和 Bird-Parker 平板。36±1°C 培养 24 h。观察培养好的血平板和 Bird-Parker 平板上的菌落, 根据金黄色葡萄球菌菌落特征选取可疑菌落。记录菌落特征。

菌落特征: Baird-Parker——圆形, 光滑凸起, 湿润, 呈灰色到黑色, 边缘色淡, 周围有浑浊带, 其外层有透明圈。

(4) 生化鉴定: 挑取可疑菌落接种 BHI。36±1°C 培养 24 h。

血浆凝固酶试验: 取 0.5 mL 血浆于无菌空试管, 再吸取 0.2 - 0.3 mL 的 BHI 培养物, 振荡拥摇匀, 置于 36°C±1°C 恒温箱或水浴锅 (生物安全柜内有水浴锅, 外面有恒温箱), 每半小时观察一次, 共观察 6 个小时。同时用表皮葡萄球菌做阴性对照。

(5) 染色鉴别: 革兰氏染色(涂片、固定)。

五、实验报告

(1) 结果部分①完成不同贮藏条件下的热肉制品的检测报告:②查阅我国或行业对熟肉制品的产品标准, 完成结果分析与讨论。

(2) 思考题

谈谈大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在食品检测上的区别?