**河南师范大学教案**

2019-2020学年 第 二 学期

**课 程 名 称** 食品微生物学实验

**授 课 教 师** 赵丽丽 杨刚刚

**教 师 所 在 院 系** 生命科学学院

**授 课 对 象** 食品质量与安全专业

**总 学 时 、学 分** 36学时 1学分

河南师范大学

、

**实验一 实验仪器培训**

**一、培训仪器种类**

**灭 菌 器、无 菌 操 作 台、摇 床**

**二、使用方法**

**（1）灭菌器使用方法**

1.加水

2.装灭菌物品

3.加盖密封

4.排气升压

接通电源进行加热，并同时打开排气阀，使水沸腾以排除锅内的冷空气。

5.降压

达到规定的灭菌时间后，切断电源，让其自然降压冷却。

6.取物品

**（2）净化工作台**

净化工作台是一种局部层流装置，能在局部造成高洁度的工作环境。它由工作台、过滤器、风机、静压箱和支撑体等组成。采用过滤空气使工作台操作区达到净化除菌的目的。与无菌室和接种箱比较，使用净化工作台具有工作条件好、操作方便、无菌效果可靠、无消毒药剂对人体危害、占用面积小且可移动的优点。如果放在无菌室内使用，无菌效果更好。商品化的超净工作台有不同型号与规格如：垂直送风的单人双面、双人单面和双人双面的超净工作台。

1 开启电源，同时打开紫外灯，30分钟后关闭紫外灯，启动风机。

2 操作区不允许存放不必要的物品，保持工作区的洁净气流流型不受干扰。

3 操作区尽量避免作用明显扰乱气流流型的动作。

4 操作区的使用温度不可以超过60℃。

5 根据环境洁净程度，可定期将粗滤布拆下清洗或给予更换。

6 定期对工作台表面进行清洗，保持表面清洁，否则影响杀菌效果。

**（3）摇床（振荡器）**

是一种温度可控的恒温培养箱和振荡器相结合的生化仪器，主要适用于各种液态、固态化合物的振荡培养。

**主要技术性能：**

一、 使用电源： 220V 50Hz

二、振荡频率： 起动—300转/分,可调

三、恒温范围： 室温—50℃（可控温型）

四、振荡方法： 往复、回旋

**使用须知：**

1 在转速范围内中速使用，可延长仪器的使用寿命。

2 仪器应放置在较牢固的工作台上，环境应清洁整齐，温度适中，通风良好。

3 使用仪器前，先将调速旋钮置于最小位置。

4 装培养试瓶，为了使仪器工作时平衡性能好，避免产生较大的振动，装瓶时应将所有试瓶布满，各瓶的培养液应大致相等。若培养瓶不足数，可将试瓶对称放置或装入其它等量溶液的试瓶布满空位。

**实验二 细菌三型的显微观察**

**一、实验目的：**

1. 了解普通光学显微镜的构造及原理； 

2. 熟悉显微镜油镜的原理并掌握其使用方法。

**二、实验原理：**

（一）普通普通光学显微镜的基本构造

1.机械装置

（1）镜座和镜臂；（2）镜筒；（3）物镜转换器；

（4）载物台；（5）调焦装置。

2.光学系统

（1）物镜；（2）目镜；（3）聚光器；（4）彩虹光阑；（5）光源；（6）滤光器。

（二）显微镜的成像原理和性能

油镜，也称油浸物镜。使用油镜时，需将镜头浸在香柏油中进行观察，这是为了消除光由一种介质进入另一种介质时发生散射，结果不仅提高了放大倍数，还增加了照明度和分辨率。

1.照明度高

香柏油(n=1.515)的折射率和玻璃的折射率(n=1.52)相近的。

2.分辨率强

D=λ（波长）/ 2NA(物镜的数值口径)

NA=n×sinα

n为介质折射率

油镜分辨率可达0.2μm

**三、实验器材**

显微镜，擦镜纸，香柏油，二甲苯；

细菌三型染色标本涂片。

**四、实验步骤**

1.显微镜的放置与观察

2.调节光源

3.放置标本

4.调焦、观察

先用低倍镜观察，调节粗、细调节器，找出标本的范围，换用高倍镜观察。

5.油镜观察

6.用毕后的处理

上升镜筒(或下降载物台)，取下玻片标本，用擦镜纸仔细清洁显微镜的机械部件。

**五、实验记录**

绘出在油镜下观察到的细菌形态，并注明物镜和目镜的放大倍数及总放大率。

**六、思考题**

1.用油镜观察标本，为什么在标本玻片上滴加香柏油?

2.在明视野下观察细菌形态，用染色标本好还是用未染色标本好?为什么?

**实验三 微生物涂片技术及细菌的简单染色法**

**一、实验目的：**

1.了解染色的基本原理；

2.学习微生物制片与染色技术；

3.掌握细菌的单染色方法及无菌操作技术。

二、实验原理：

单染色法是利用一种染色剂对涂片进行染色的方法。在一般情况下，细菌菌体多带负电荷，易于和带正电荷的碱性染料结合，因此多用碱性染料进行染色。常用的碱性染料有美蓝、孔雀绿、碱性复红、结晶紫和番红等。

细菌体积小，较透明，如未经染色常不易识别，而经着色后，与背景形成鲜明的对比，易于在显微镜下进行观察。

**三、实验器材**

显微镜，酒精灯，火柴，载玻片，接种环，双层瓶，吸水纸，擦镜纸，蒸馏水；

石炭酸复红染色液；

枯草芽孢杆菌，37℃培养8小时的斜面菌种；

**四、实验步骤**

1. 涂片 取一小滴蒸馏水于干净的载玻片上，用接种环挑取枯草芽孢杆菌菌体于水滴中，涂成均匀的一薄层，在空气中自然干燥。

2. 固定 将载玻片有菌面向上，手持载玻片一端，迅速通过酒精灯火焰2～3次。

3. 染色 滴加染色液于载玻片的涂布区，染2~3分钟

4. 水洗 倾去染液，用自来水从标本表面未染色部分开始冲洗，经染色部分缓慢流下，直至冲下来的水无色为止。

5. 干燥 用吸水纸吸净标本上多余的水，自然干燥。

6. 镜检 置高倍镜或油镜下观察细菌的形态。

7. 结果 绘图。

**五、注意事项**

1.载玻片要求洁净无油，否则菌液涂不开，且固定效果不好，水洗时易被水冲掉；

2.菌量宜少，涂片宜薄，过厚则不宜观察。

六、思考题

1.根据实验体会，你认为制备染色标本时，应注意哪些事项?

2.制片为什么要完全干燥后才能用油镜观察?

**实验四 细菌的革兰氏染色法**

**一、实验目的**

1.了解革兰氏染色的原理；

2.掌握革兰氏染色的方法。

**二、实验原理**

革兰氏染色法是一种重要的细菌鉴别染色法，可以将所有细菌区分为两大类：革兰氏阳性菌 (G+表示)和革兰氏阴性菌(G-表示)。

革兰氏染色的机理是由于两类细菌的细胞壁成分和结构不同。G-的细胞壁中含有较多的类脂，而肽聚糖含量较少。G+细胞壁中肽聚糖的含量多且交联度大，类脂质含量少。

**三、实验器材**

1. 显微镜、酒精灯、火柴、载玻片、接种环、双层瓶、滤纸、擦镜纸、蒸馏水；

2. 草酸铵结晶紫染色液，卢戈氏(Lugol)碘液，95％酒精，番红复染液；

3. 大肠杆菌，37℃培养24小时；枯草芽孢杆菌，37℃培养8小时。

**四、实验步骤**

1.涂片 三区涂片

2.固定 按常规方法加热固定

3.染色

(1) 初染 用草酸铵结晶紫染色液染1分钟，水洗。

(2) 媒染 滴加卢戈氏碘液，冲去残水，并覆盖约1分钟，水洗。

(3) 脱色 滴加95％酒精，脱色时间约为30秒，立即水洗。

(4) 复染 用番红复染液染色1～2分钟，水洗。

4.镜检 干燥后，用油镜观察。

结果： G+呈蓝紫色， G-呈红色

**五、实验记录**

将观察结果记录于表中。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **菌名** | **菌体颜色** | **菌体形态** | **G+或G-** |
| **大 肠 杆 菌** |  |  |  |
| **枯草芽孢杆菌** |  |  |  |

**实验五 几种培养基的制备与灭菌**

**一、实验目的：**

1. 什么是培养基

2. 了解培养基的配制原则

目的明确、营养协调（C/N）、合适的pH、节约成本

3. 学习几种培养基制备的方法；

**二、实验原理：**

1. 牛肉膏蛋白胨固体培养基

天然培养基，主要培养细菌

2. 土豆固体培养基

半合成培养基，主要培养真菌

3. 高氏一号培养基

合成培养基，主要培养放线菌

4. 麦芽汁培养基

半合成培养基，主要培养酵母

**三、实验器材**

高压蒸汽灭菌锅，电炉，天平，牛角匙，搪瓷缸，称量纸，pH试纸，棉塞，牛皮纸，线绳，记号笔，pH试纸；

小烧杯，量筒，玻璃棒，培养基分装装置，试管，三角瓶，滴管；1N NaOH，1N HCl。

**四、实验步骤**

1. 称量

2. 溶化

3. 调pH

4. 分装

5. 加棉塞与包扎

6. 灭菌

7. 摆斜面

8. 无菌检查

**牛肉膏蛋白胨培养基的制备：**

配方：

牛肉膏 3.0 g

蛋白胨 10 g

NaCl 5.0 g

琼脂 20 g 

水 1000 ml

pH 7.0～7.2

**马铃薯培养基（固体）的制备：**

马铃薯培养基配方：

马铃薯(去皮) 200g

葡萄糖(或蔗糖) 20g

琼脂 20g

水 1 000ml

pH 自然

1. 将马铃薯去皮，称取200 g切成小块，放入1000ml水中煮沸30分钟，煮沸过程中不可搅动。

2. 用4层纱布过滤，补足因蒸发而减少的水量。

3. 在滤液中加入称好的琼脂，不断搅拌至琼脂完全熔化。 

4. 然后加入20g葡萄糖(或蔗糖)，搅拌溶解，停止加热。

5. 补足水分至1 000ml。pH自然，无需调整。

6. 分装、包扎、灭菌。****

**高氏1号培养基的制备：**

高氏1号培养基配方：****

可溶性淀粉 20g

NaCl 0.5g

KNO3 1.0g

K2HPO4·3H2O 0.5g

MgSO4·7H2O 0.5g

FeSO4·7H2O 0.01g

琼脂 15～20g

蒸馏水 1 000ml

pH 7.4～7.6

1. 按配方先称取可溶性淀粉，放入小烧杯中，并用少量冷水将淀粉调成糊状，再加入少于所需水量的沸水中，继续加热，使可溶性淀粉完全溶化。再称取其它各成分依次逐一加入溶化。

2. 对微量成分FeSO4·7H2O可先配成高浓度的贮备液后加入。方法是先在1000ml培养基中加入1ml的0.01g／ml的贮备液即可。待所有药品完全溶解后，补充水分到所需的总体积。

**培养基的分装装置如图：**

液体培养基可分装至试管高度1／4左右为宜；

用于制作斜面的固体培养基的分装量为管高1／5；

半固体培养基分装量为管高的1／3为宜。

**斜面的摆法：**斜面长度不超过试管长度l／2为宜。如制作半固体或固体深层培养基时，灭菌后则应垂直放置至凝固。

**五、思考题：**

培养基配制完成后，为什么必须立即灭菌？若不能及时灭菌应如何处理？

已灭菌的培养基如何进行无菌检查?

**实验六、七 消毒灭菌技术**

**——包装材料、真菌培养材料的准备**

**一、实验目的：**

1. 学习几种常用灭菌技术的原理及操作技术。

2. 学习几种包装材料包扎和制作技术。

**二、实验原理：**

(一) 加热法：又分干热灭菌和湿热灭菌两类。

(二) 过滤除菌：指将带菌的液体或气体通过一个称为滤器的装置，借助机械的方法，把微生物截留在过滤介质上，从而达到除菌的目的。 

(三) 紫外线灭菌：以265～266nm杀菌力最强

(四) 化学药品灭菌：常用的有2％来苏尔、0.1％升汞、0.25％新洁尔灭、3～5％的甲醛溶液、75％酒精溶液等

**三、实验器材：**

电烘箱、高压蒸汽灭菌锅、过滤器、紫外灯、镊子、培养皿、滴管、滤纸、棉球、载玻片、盖玻片、“U”或“V”形玻璃棒等

**四、实验内容**

4人一组，需准备下列物品灭菌

1.湿室：4套

2.无菌水：6支/4人 4.5毫升

3.小滴管：1支/2人

4.水棉球：1瓶（8个）

**五、思考题**

1. 湿热灭菌有哪些方法？各有何用途？
2. 简述紫外线杀菌的作用机制和注意事项。

实验八 酵母菌水浸片的制备及死、活细胞鉴别

**一、目的要求：**

观察酵母菌形态及出芽生殖方式;

掌握鉴别酵母菌死、活细胞的染色方法。

**二、基本原理**

酵母菌是单细胞真菌，菌体比细菌大，多呈圆形、卵圆形、圆柱形，有的呈分枝状假菌丝。

酵母菌的繁殖方式比较复杂，无性繁殖以出芽生殖为主；有性繁殖是通过接合产生子囊孢子。

美蓝是一种无毒性的染料，氧化型呈蓝色，还原型是无色。

用美蓝对酵母菌的活细胞进行染色时，由于细胞的新陈代谢作用，细胞内具有较强的还原能力，能使美蓝由蓝色的氧化型变成无色的还原型。

因此，具有还原能力的酵母活细胞是无色的或淡蓝色，而死细胞或代谢缓慢的衰老细胞则被美蓝染成蓝色，借此即可对酵母菌的死、活细胞进行鉴别。

**三、实验器材**

活材料：酿酒酵母（Saccharomyces cerevisiae）斜面或培养液

染液: 0.1%美蓝染色液

器材：显微镜、载玻片、盖玻片、镊子、擦镜纸、接种环。

**四、实验步骤**

1、取美蓝染色液一滴，置于载玻片中央。

2、用滴管吸取少许菌悬液，加一滴至染色液中，染色3分钟。

3、用镊子取一块盖玻片，先将一边与菌液接触，再慢慢放下盖在菌液上，尽量避免产生气泡。

4、先用低倍镜再用高倍镜观察酵母菌的形态和出芽情况，并根据颜色来区别死、活细胞。

5、染色半小时后，再观察一下死、活细胞数目是否增加。

**五、实验报告**

绘图说明你所观察到的酵母菌的形态特征。

实验九、十 水细菌学检测

**一、实验目的**

1）学习水的细菌学检查方法及原理

2) 学习水样的采集方法，了解大肠菌群的数量在饮用水中的平板计数原则及其在饮用水中的重要性。

3）整个实验操作要求学生自己独立完成，培养学生的实验设计及动手能力。

**二、实验原理**

饮用水是否合乎标准，通常通过水中细菌总数和大肠菌群数来确定。

细菌总数是指1毫升水样在普通琼脂培养基中，37℃，24小时培养后所生长的菌落数。

一般规定，1毫升自来水的总菌数不得超过100个。

如果水源被粪便污染，则有可能也被肠道病原菌污染而引起伤寒、痢疾、霍乱等肠道病的流行，但肠道病原菌在水中数量较少，又易变异与死亡，故从水中特别是自来水中分离出病原菌，常常有困难。

而大肠菌群是肠道好氧菌中最普遍和数量最多的一种，所以常将其作为粪便污染的标志，即根据水中大肠菌群的数目来判断水源是否被粪便所污染，并间接推测水源受肠道病原菌污染的可能性。一般规定每1000毫升自来水中大肠菌群不超过3个。

1）平板菌落计数。

2）大肠菌群的检查。多管发酵法和滤膜法

3) 多管发酵法测定水中大肠菌群。

包括初发酵实验、平板分离和复发酵实验。

初发酵实验是在发酵管内装有乳糖蛋白胨培养液，内倒置一杜氏小管，以溴甲酚紫为pH指示剂。能发酵乳糖产酸产气的为阳性结果，产酸不产气为可疑结果，两者均需进一步验证。

平板分离采用伊红美兰琼脂培养基，以伊红和美篮作为指示剂，乳糖发酵产酸时，在酸性条件下两种染料结合成复合物，使大肠菌群产生有金属光泽的深紫色菌落。

以阳性菌落进行复发酵实验，最后产酸又产气者为大肠菌群阳性。

**三、实验器材**

镊子，无菌三角瓶，移液管（10ml、25ml）、杜氏小管、小试管、滴管（往小管中加发酵液）、吸耳球、报纸（包移液管）、试管

1.6%溴甲酚紫酒精溶液（反应范围pH5.2-6.8，黄色紫色）

三倍浓缩乳糖蛋白胨发酵管，

伊红美蓝琼脂平板，

自来水、纯净水、池水

10ml移液管：本次实验装发酵管用。

25ml移液管：进行包扎、灭菌，下次实验取样用。

**四、实验步骤**

一、培养基的制备与灭菌

1）实验分组

本实验需分a，b，c三组，

a组（第一排）为自来水的细菌学检测；

b组（第二排）瓶状纯净水的细菌学检测；

c组（第三、四）为池水

a组和b组的培养基制备与灭菌：

50mL三倍浓缩的三角瓶发酵瓶2个；5mL三倍乳糖蛋白胨发酵管10支；25毫升移液管1支（包扎、塞棉花）；无菌三角瓶1个（塞棉塞）；

c组的培养基制备与灭菌：

50mL三倍浓缩的三角瓶发酵瓶1个；5mL三倍乳糖蛋白胨发酵管1支；10mL乳糖发酵管3支；25毫升移液管1支（包扎、塞棉花）；无菌三角瓶1个（塞棉塞）；1mL无菌枪头2支；4.5mL无菌水2支

杜氏小管：装满乳糖发酵液后倒置于发酵试管中，不能有气泡。

小试管：装满乳糖发酵液后倒置于三角瓶中，不能有气泡。

1.6%溴甲酚紫酒精溶液: 1人做, 配备100ml。

EMB培养基的配制：按试剂瓶说明书配制。一组做。一共1200ml，分装于四个三角瓶中，包扎灭菌。

普通乳糖蛋白胨培养基的配制：

蛋白胨 10g

牛肉膏 3.0g

乳糖 5.0g

氯化钠 5.0g

1.6%溴甲酚紫酒精溶液 1.0ml

蒸馏水 1000ml

pH 7.2~7.4

三倍浓缩发酵基是除水、指示剂 以外所有的量为原来的3倍。

二、水样的采取

1、自来水和纯净水

先将自来水龙头用火焰灼烧3分钟灭菌，再开放水龙头，让水流5分钟后，以无菌容器取水样，以待分析。

纯净水可直接取样。

2、池水

应取距水面10~15cm的深层水样。

先将无菌小口瓶向下浸入水中，然后翻转过来，让水流入瓶中，盛满后塞上瓶塞。

三、水中细菌总数的测定（略）

四、初发酵实验

1）自来水，纯净水

在2个盛有50ml三倍发酵三角瓶中加入100ml水样；

在10支5ml三倍发酵试管中各加入10ml水样，混匀后，

37度培养24h。

2）池水

1：10、1：100稀释水样.

分别吸取1ml稀释水样和1ml原水样，加入盛有10ml普通发酵管。

另取10ml和100ml原水样加入盛有5ml和50ml三倍浓缩发酵管中。

三、平板分离

经24h培养后；

将产酸产气和只产酸不产气的发酵管划线接种于EMB培养基上；

培养18~24h；

将符合下列特征的菌落的一部分，革兰氏染色，镜鉴。

1）深紫黑色，具有金属光泽的菌落；

2）紫黑色，不带或略带金属光泽的菌落；

3）淡紫红色，中心颜色较深的菌落。

四、复发酵实验（略）

**五、结果的计算（查表）**

**六、实验报告**

水细菌学检查（一）：多糖发酵管培养基制备及灭菌，所用器皿的包装与灭菌

水细菌学检查（二）：大肠菌数的测定——初发酵实验

水细菌学检查（三）：大肠菌数的测定——复发酵实验，大肠菌群的初步鉴定

实验十一

**一、目的要求：**

1、了解发酵乳制作常用的发酵剂。

2、掌握发酵乳生产的工艺过程和方法。

二、**基本原理**

（1）酸奶：以牛奶为主要原料，接入一定量乳酸菌，经发酵后制成的一种乳制品饮料。

（2）生理生化原理

牛奶（乳糖）→接种乳酸菌→β-D-半乳糖苷酶→乳糖→乳糖发酵（葡萄糖）→乳酸→破坏钙-酪蛋白-磷酸复合物的稳定性→蛋白质凝结→酸奶

2、酸奶中含有乳酸菌的菌体及代谢产物，因而对人体的肠胃消化道疾病有良好的治疗效果。

**三、实验材料**

量勺、不锈钢盆1个/组，将上述用具洗净，备用。

纯牛奶480g，白砂糖20g

**四、实验步骤**

1.将酸奶制备过程中的量勺、不锈钢盆1个/组，将上述用具洗净，备用。

2.牛乳及添加料的溶解及处理：

将纯牛奶480g，

白砂糖20g

加入不锈钢盆中溶解，在炉灶上煮开10-15min。

3.接种及发酵：

把过滤后的牛奶量冷至40℃，加入100mL的活性乳酸菌酸牛奶，用玻璃棒搅拌均匀，分装到一次性塑料杯中每个150mL。

用保鲜膜封住杯口。

放入发酵箱中37℃，湿度75%条件下发酵6h。

4.将主发酵好的酸奶放入冰箱中，在1-5℃条件下发酵24h。

**五、感官评定**

酸奶质量的评定以品尝为标准，通常有凝块状态、表层光洁度、酸度及香味等多项指标。

**六、思考题**

试述凝固型酸奶和发酵型酸奶的区别？