

# 揭阳职业技术学院

## 化学工程系课程教案

2025-2026 学年第一学期

专业课程： 微生物检验

专业班级： 分检技术 241、242

任课教师： 李海彬、陈敏杰

计划学时： 72

揭阳职业技术学院化工系

2025 年 8 月

# “微生物检验”课程综述

## 一、课程内容与目标

学习微生物检验的基础知识，包括微生物的生理特性、形态结构及微生物检验在商品检验中的意义和作用；掌握微生物检验的常规技术，包括培养基配制、微生物的分离与培养、接种等；结合微生物检验的工作实际和工位技能需求，重点掌握食品、药品、化妆品和环境等方面的微生物检测综合技能，满足行业发展的人才需求，提高学生的行业核心技能。

## 二、与其他课程的关系

本课程是分析检验技术专业的专业核心课程和职业技能课程，开设于第3学期，以有机化学、无机化学、分析化学、物理常数检测和中学生物学为基础进行教学，后续课程有食品分析、药品分析、化妆品分析和综合技能实训等专业课程。

## 三、课程现状

本课程是分析检验技术专业的专业核心课程和职业技能课程，从内容到形式均力求体现行业职业技术发展的最新特色，并以实践技能培训为主导、理论知识够用为原则，突出应用能力和综合素质的培养。在课程内容的设置上，注重课堂教学与实际工作的一致性，以微生物检验人员需要掌握的应知应会基本知识和操作技能为主，根据具体工作过程和职业岗位分析开发课程内容，注重提升学生职业能力，满足行业的人才需求。

## 四、课程发展

随着经济的高速发展，在产品的生产企业、流通领域及质量技术监督部门，需要从事产品质量控制、商品质量检验、质量技术监督与管理等方面的专业人才。在各级技术监督与商品检测机构、进出口商品检验等部门的质量检测、监督及卫生检验等岗位中均有微生物检验相关职位；在化工产品、药品、轻工产品、食品等行业的产品生产质量检测、质量分析、质量监控与管理、环境保护等环节中均有微生物检验相关岗位。本课程主要涉微生物学检验基础、微生物学检验常规技术以及结合产品标准和检测标准突出行业岗位需要的检验技术。随着科学技术的进步，微生物检验技术将朝着快速、简便的方向发展。

## 五、课程思政目标

当前，国家对人才的要求不仅要有较强的专业知识和技能，更要有高尚的职业理想和职业道德。结合课程内容挖掘思政元素，实施思政教育于专业课程教学中，微生物检验技术课程主要内容包括微生物发展简史、微生物筛选和培养等内容，这些内容涉及到很多思政元素可融入教育教学中，如思政元素“文化自信”、“爱国主义”、“国家情怀”、“爱岗敬业”、“工匠精神”等。将这些思政元素融入到课程教学中，有利于培养学生爱国爱党、爱岗敬业精神，认真严谨的工作作风，追求卓越的“工匠精神”，提升学生的综合素质和职业认同感，增强学生的就业能力。

## 一、理论教学

授课日期		教案编号	1
课程名称	微生物检验	专业班级	分检 241、242
教材名称	微生物检测技术 化学工业出版社		
授课题目	微生物及微生物检测概述		
授课学时	2 学时		
课 型	理论 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 实验 ( <input type="checkbox"/> ); 见习 ( <input type="checkbox"/> ); 实训 ( <input type="checkbox"/> ); 其它 ( <input type="checkbox"/> )		
教学目的	1. 了解微生物和微生物学的含义与发展史。 2. 掌握微生物的主要特征。 3. 了解微生物检验的含义。		
思政目标	树立热爱大自然、崇尚科学、科技服务人类的观念。		
教学重点	掌握微生物的概念与主要特征。		

教学难点	微生物的主要特征。	
教学方法	讲授 (√); 讨论 (√); 指导 ( ); 示教 (√); 其它 ( )	
电子教案	有 (√)	Microsoft PowerPoint (√); Author ware ( ); 其它 ( )
	无 ( )	
教学资源	多媒体 (√); 模型 ( ); 标本 ( ); 实物 ( ); 音像 ( ); 其它 ( )	
教学过程 时间安排	1. 微生物和微生物学的概念, 0.5 学时。 2. 微生物的主要特点, 1 学时。 3. 微生物检验的概述, 0.5 学时。	
思考题	怎样学好这门课程?	
作业	详细阅读课本项目一的所有内容。	
教学后记		

## 微生物及微生物检测概述 (绪论)

### [教学要求]

1. 了解微生物和微生物学的含义与发展史。
2. 掌握微生物的主要特征。
3. 了解微生物检验的含义。

### [教学重点]

1. 微生物和微生物学的含义。
2. 微生物的主要特征。
3. 微生物检验的含义。

### [教学难点]

微生物的主要特征。

### [基本概念]

生物学、微生物学、微生物检验。

### [授课内容要点]

\*什么是微生物？（充分讨论）

\*未来的话题将是微生物！（食品、医药、健康等）

### 微生物的含义

微生物是指存在于自然界的一群个体微小（一般 $\Phi < 0.1\text{mm}$ ）、结构简单、肉眼看不见或看不清楚，必须借助光学或电子显微镜才能观察到的低等生物的总称。

\*杰出微生物学家

列文虎克、巴斯特和柯赫

**列文虎克：**（1632—1723）荷兰显微镜学家、微生物学的开拓者，其一生磨制了400多个透镜，有一架简单的透镜，其放大率竟达270倍。1676年首次观察到细菌细胞，被誉为“微生物学的先驱者”。

**巴斯特：**（1822-1895）法国生物学家，化学家。研究了微生物的类型、习性、营养、繁殖、作用等，奠定了工业微生物学和医学微生物学的基础，并开创了微生物生理学，以倡导疾病细菌学说、发明预防接种方法最为闻名，被誉为“微生物学之父”。

主要功绩：否定微生物自然发生学说；疾病的细菌学说；免疫学。晚年对狂犬病疫苗的研究是其事业的光辉顶点。

**推翻生命起源的自然发生学说（无生源论），建立生命的胚种学说（生源论）。**

**乳酸杆菌的发现：**发现葡萄酒和啤酒的酸变是由乳酸杆菌引起。并发明了“巴氏消毒法”：只要把酒放在摄氏五六十度的环境里，保持半小时，就可杀死酒里的乳酸杆菌。

治疗鸡霍乱：用陈旧鸡霍乱病菌培养液给鸡接种，可使被接种鸡对鸡霍乱病菌产生非常强的抵抗力，并创立了“免疫学”。

**柯赫：**（Robert Koch， 1843~1910）德国细菌学家，曾做过医生、大学教授、研究所所长，近代微生物学（细菌学）的奠基人，因对结核菌的一系列研究获1905年诺贝尔生理学或医学奖。

**主要成就：**1.建立了研究微生物的基本操作，如微生物的纯培养及染色方法，细

菌的片染色基本方法，设计了细菌培养用的肉汁胨培养液和营养琼脂培养基等；  
2.证实了疾病的病原菌学说，如证实了炭疽杆菌是炭疽病的病原体，结核病的病原体结核杆菌等。

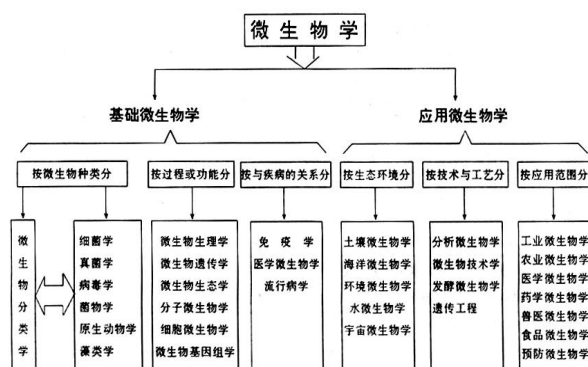
## 什么是微生物学？

微生物学,是一门在分子、细胞或群体水平上研究微生物的形态构造、生理代谢、遗传变异、生态分布和分类进化等生命活动基本规律及其应用的科学。

## 微生物学的研究对象与任务

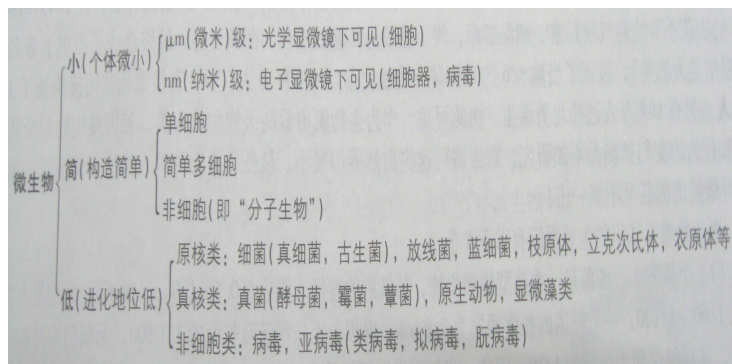
研究对象：所有微生物类群。

根本任务：发掘、利用、改善和保护有益微生物，控制、消灭或改造有害微生物，为人类社会的进步服务。



## 2.微生物的特征

微生物是指存在于自然界的一群个体微小（一般 $\Phi < 0.1\text{mm}$ ）、结构简单、肉眼看不见或看不清楚，必须借助光学或电子显微镜才能观察到的低等生物的总称。



### 生物基本特征

具新陈代谢和生命周期。

微生物特征：体积小；生长旺，繁殖快；适应强，易变异；分布广，种类多；

#### 2.1 体积小

个体单位：微米、纳米。

#### 2.2 生长旺，繁殖快

世代短，大肠杆菌一个细胞重约 10<sup>-12</sup> 克，平均 20 分钟繁殖一代。24 小时后：4722366500 万亿个后代，重量达到：4722 吨；48 小时后：2.2 × 10<sup>43</sup> 个后代，重量达到 2.2 × 10<sup>25</sup> 吨，相当于 4000 个地球重！

#### 若干微生物的代时(表)

微生物名称	代时	每日分裂次数	温度
乳酸菌	38分	38	25
大肠杆菌	18分	80	37
根瘤菌	110分	13	25
枯草杆菌	31分	46	30
光合细菌	144分	10	30
酿酒酵母	120分	12	30
小球藻	7小时	3.4	25
念珠藻*	23小时	1.04	25
硅藻	17小时	1.4	20
草履虫	10.4小时	2.3	26

#### 世代短

---

一头 500 kg 的食用公牛, 24 小时生产 0.5 kg 蛋白质, 而同样重量的酵母菌, 以质量较次的糖液 (如糖蜜) 和氨水为原料, 24 小时可以生产 50000 kg 优质蛋白质。

### 2.3 适应强, 易变异

具有极灵活的适应性; 众多灵活的代谢调控机制; 具多种诱导酶; 对恶劣的“极端环境”具有惊人的适应能力。

**海洋深处的某些硫细菌**可在 100℃ 以上的高温下正常生长; 一些嗜盐细菌能在 32% 的盐水中正常活动; 产芽孢的细菌可在干燥条件下保藏几十年、几百年甚至上千年; 氧化硫杆菌能生长在 pH0.5 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中; 脱氮硫杆菌的生长最高 pH 值为 10.7; 青霉和曲霉能在 pH9~11 的碱性条件下生长。

#### 易培养

能在常温常压下利用简单的营养物质, 甚至工农业废弃物生长繁殖, 积累代谢产物。对化妆品的影响:

#### 污染化妆品

影响化妆品的安全性和稳定性; 给化妆品的生产和保藏带来困难

#### 易变异

个体小、结构简、且多与外界环境直接接触, 繁殖快、数量多; 突变率:  $10^{-5}$ – $10^{-10}$

#### 易变异性

### 2.4 分布广, 种类多。

无微不至、无孔不入、无远不届、无物不食、无险不攀。物种的多样性、生理代谢类型多、代谢产物种类多、遗传基因的多样性、生态类型的多样性。

(1) **人体肠道中的正常菌群**。在人体肠道中经常聚居着 100~400 种不同种类的微生物, 估计它们的个体总数大于 100 万亿, 重量约等于粪便干重的 1 / 3。

(2) 万米深海底部的耐热硫细菌。它们以地壳中逸出的硫化氢气体为能源, 以二氧化碳为碳源, 在厌氧条件下营自养生活。

极端环境中的生命 (3 图)

#### 代谢类型多

- 进行有氧呼吸
- 进行无氧呼吸

- 
- 固定分子态氮
  - 利用复杂有机氮化物
  - 利用光能，进行光合作用
  - 利用分解有机物放出的能量
  - 从无机物的氧化中获得能量
  - 有的具有抗热、冷、酸、碱、高渗、高压、高辐射剂量等极端环境的特殊能力

授课日期		教案编号	2
课程名称	微生物检验	专业班级	分检 241、242
教材名称	微生物检测技术 化学工业出版社		
授课题目	微生物的分布		
授课学时	2 学时		
课 型	理论 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 实验 (    ); 见习 (    ); 实训 (    ); 其它 (    )		
教学目的	1. 掌握微生物在自然界中分布特征。 2. 掌握微生物污染的防治与控制。		
思政目标	培养环境保护意识, 培养科学生活观和人生观。		
教学重点	微生物的分布特征。		
教学难点	微生物的分布特征。		
教学方法	讲授 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 讨论 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 指导 (    ); 示教 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 其它 (    )		
电子教案	有 ( <input checked="" type="checkbox"/> )	Microsoft PowerPoint ( <input checked="" type="checkbox"/> ); Author ware (    ); 其它 (    )	
	无 (    )		
教学资源	多媒体 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 模型 (    ); 标本 (    ); 实物 (    ); 音像 (    ); 其它 (    )		
教学过程 时间安排	1. 微生物的分布, 1 学时。 2. 微生物污染的防治与控制, 1 学时。		
思 考 题	自然界中微生物的分布特征?		
作 业	1. 仔细阅读课本项目一的所有内容。 2. 预习项目二的内容。		
教学后记			

---

# 微生物的分布

## [教学要求]

1. 掌握微生物在自然界中分布特征。
2. 掌握微生物污染的防治与控制。

## [教学重点]

1. 掌握微生物在自然界中分布特征。
2. 掌握微生物污染的防治与控制。

## [教学难点]

微生物在自然界中分布特征。

## [基本概念]

微生态平衡、水的自净作用、正常菌群

## [授课内容要点]

### 3 微生物的分布

无处不在、适应力强、繁殖快速

#### 微生物在自然环境中的分布

- ⊕ 土壤中的微生物
- ⊕ 水体中的微生物
- ⊕ 空气中的微生物
- ⊕ 人体及动物体上的微生物
- ⊕ 产品原料及辅料
- ⊕ 加工机械、设备和包装材料

#### 3.1 土壤中的微生物

土壤是微生物良好的生活场所（天然培养基）

- 1、满足了微生物对水分的要求。
- 2、为微生物提供了良好的C源、N源、能源。
- 3、为微生物提供有机物、无机盐、微量元素。
- 4、土壤PH值范围5.5—8.5之间。
- 5、温度、季节与昼夜温差不大。
- 6、土壤颗粒空隙间充满着空气和水分。
- 7、适宜的渗透压。

### 土壤中微生物的数量和种类

- 土壤中微生物的数量：按种类递减

细菌---放线菌---霉菌---酵母菌---藻类---原生动物  
 $\sim 10^8$     $\sim 10^7$     $\sim 10^6$     $\sim 10^5$     $\sim 10^4$     $\sim 10^3$  (个/g)

—土壤微生物是构成土壤肥力的重要因素：微生物的代谢活动，可改变土壤的理化性质，进行物质转化。

表 9-1 几种土壤中微生物的数量\*      单位：万/（g 干土）

土壤类型	细菌	放线菌	真菌
黑龙江黑土	2 111	1 024	19
浙江红壤	1 103	123	4
宁夏棕钙土	140	11	4
江苏滨海盐土	466	41	0.4
黑龙江暗棕壤	2 327	612	13
沈阳棕壤	1 284	39	36
广东砖红壤	507	39	11
黑龙江草甸土	7 863	29	23
西沙磷质石灰土	2 229	1 105	15

\* 据中国科学院南京土壤研究所资料

### 微生物在土壤中分布的影响因素

- ✚ 土壤深度对微生物分布的影响
- ✚ 表层缺水且受紫外线照射，深层少养分和空气等，不利于生存，5-20cm土壤层中微生物数量最多。

深度/cm	细菌	放线菌	真菌	藻类
3~8	9 750 000	2 080 000	119 000	25 000
20~25	2 179 000	245 000	50 000	5 000
35~40	570 000	49 000	14 000	500
65~75	11 000	5 000	6 000	100
135~145	1 400	—	3 000	—

### ✚ 有机物含量对微生物分布的影响

### ✚ 碳源对微生物分布的影响

### ✚ 酸碱度对微生物分布的影响

## 3.2 水体中的微生物

微生物的水域环境

水中无机盐、水中有机物、P H值、温度、光线

### 不同水体中的微生物种类

水体是微生物的第二天然场所，在水中几乎能找到所有的细菌。

淡水中的微生物

清水型水生微生物：自养型为主

腐败型水生微生物：腐生型为主

深层较多为厌氧微生物

表层多为好氧微生物

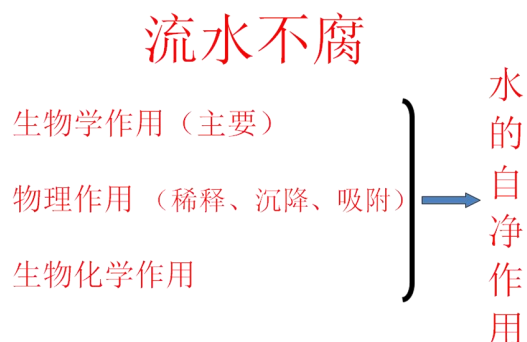
### 海水中的微生物

- 多为嗜盐、耐高渗透压微生物
- 表层多为好氧微生物

### 水的自净作用

- 在自然水体尤其是快速流动的水中，存在着对有机或无机污染物的自净作用。其原因是多方面的，有稀释、沉降、吸附等物理作用，更重要的是各种生物学和生物化学作用，这种作用称为水的自净作用，是流水不腐的原因
- 水源的饮用价值：良好的饮用水细菌含量应在 100 个/ml 以下，当超过 500 个/ml 时，即不适宜作为饮用水。更重要的是水中的微生物种类，一般用大肠菌群数作为是否含有病原菌的指标。

## 流水不腐（图）



我国相关法规对饮用水微生物指标的规定：

细菌总数不得超过：100 个/毫升

大肠菌群指数不得超过：3 个/升

饮用水消毒常用方法：

加入液态氯或次氯酸盐

### 3.3 空气中的微生物

- 环境条件：无营养和水分、紫外线直射
- 存在状态：漂浮，短暂停留，以吸附于尘埃微粒上的形式存在。
- 分布：越接近地面的空气含菌量越高。

目前人类检测到微生物存在的最高处为 85km 的高空。

- 种类：球菌、芽孢杆菌、产色素细菌、真菌孢子

**空气中微生物的杀灭与去除：**紫外线照射、甲醛熏蒸、药物喷雾、过滤除菌等，常用的过滤介质有棉花、纱布、石棉滤板、活性炭或超细玻璃纤维过滤纸等。

某些通风系统特别是中央空调系统常是许多传染病的传染源（如 SARS 等）！

### 3.4 正常人体及动物体上的微生物

#### 正常菌群

生物在健康动物各部位、数量大、种类较稳定、一般能发挥有益作用的微生物种群。

与人体或动物体表现为互生关系，与寄主的平衡关系是相对的、可变的和有条件的。

在人体表面 27 个部位分布着 4200 多种微生物！

---

## 微生态平衡

正常菌群与人体保持着一种和谐的平衡状态，在菌群内部各微生物间也相互制约、维持稳定、有序的相互关系。

## 菌群失调

- 寄主体防御机能减弱
- 正常菌群生长部位发生改变
- 正常菌群的相互制约关系受破坏

## 4 微生物污染的预防与控制

- 加强环境卫生管理
- 加强企业卫生管理
- 加强产品卫生检测

### 4.1 加强环境卫生管理

做好粪便卫生管理工作

    做好收集与运输

    无害化处理

做好污水的卫生管理工作

    无害化处理

### 污水处理厂

做好垃圾的卫生管理工作

    减量化、资源化、无害化

### 4.2 加强企业卫生管理

做好内部卫生管理

    控制污染源

    切断污染途径

加强卫生教育

    提高卫生意识

    养成良好卫生习惯

### 4.3 加强产品卫生检测

做好内部产品卫生检测工作

---

原料检测、生产加工检测、产品检测

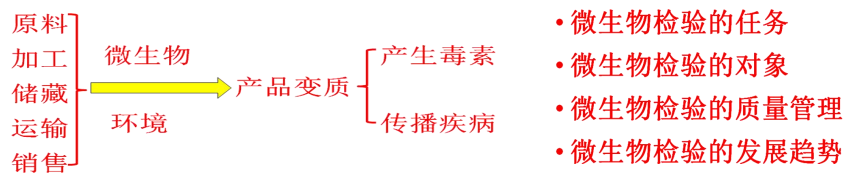
加强监督管理工作

产品质量监督管理部门

卫生防疫部门

## 7 微生物检验

微生物检验是基于微生物学基本理论，利用微生物试验技术，根据各类产品卫生标准的要求，研究产品中微生物的种类、性质、活动规律等，用以判断产品卫生质量的一门应用技术学科，是确保产品质量和安全、防止疾病菌污染和疾病传播的重要手段。



### 7.1 微生物检验的任务

- 研究各类产品的样品采集、运送、保存及预处理方法，提高检出率。
- 根据产品选择最佳检验方法
- 正确、及时有效地进行对产品的检验
- 对结果进行统计、分析、处理和评价报告
- 对相关微生物进行调查、分析与质量控制

### 7.2 微生物检验的对象

- 生产环境
- 产品原料及辅料
- 产品加工、储藏、销售等环节
- 产品

### 化妆品的微生物学检验

- 1.按《化妆品检验规则》(QBT 1684-2006 ) 进行检验。
- 2.检验原料和产品中微生物 数量是否达标，如细菌总数、绿脓杆菌等 。
- 3.检验用于化妆品的防腐剂的

- 
- 防腐效能。

### **食品的微生物学检验**

- 菌落总数
- 大肠杆菌
- 致病菌

### **药品的微生物学检验**

- 药品无菌检验
- 微生物限度检验

### **环境的微生物学检验**

- 空气洁净度的微生物检验
- 水质的微生物检验

## **7.3 微生物检验的质量管理**

- 建立质量体系，抓好质量管理
- 加强业务技术培训，提高检验人员素质
- 加强微生物检验的质量控制

### **建立质量体系，抓好质量管理**

- 1.制定相应检验工作程序，严格按照检测流程和质量保证体系进行操作。
- 2.全面落实相应制度，提高认识，严格遵守。

### **加强业务技术培训，提高检验人员素质**

- 做好职业道德教育，提高爱岗敬业意识
- 加强人员业务培训和知识更新，提高业务水平
- 做好人员业务考核工作，提高综合素质

### **加强微生物检验的质量控制**

- 按要求对设备仪器进行检定、维护和保养
- 严格控制检验物品的质量
- 有效良好保存菌种
- 科学选择有效检验方法，严格科学进行检验试验，认真规范填写和审核原始记录和检验报告

## **7.4 微生物检验的发展趋势**

---

### 常规检验技术

显微技术、染色技术、灭菌和消毒技术、培养基制备技术、接种、分离纯化和培养技术、无菌取样技术、微生物的计数技术.....

### 新兴检验技术

改进的微生物培养法、免疫学方法、分子生物学法、气相色谱法、基因芯片技术.....

### 作 业

- 简述微生物的特点？
- 造成产品微生物污染的原因有哪些？如何采取有效措施加以预防和控制？

授课日期		教案编号	3
课程名称	微生物检验	专业班级	分检 241、242
教材名称	微生物检测技术 化学工业出版社		
授课题目	微生物的形态结构		
授课学时	8 学时		
课 型	理论 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 实验 (    ); 见习 (    ); 实训 (    ); 其它 (    )		
教学目的	1. 了解原核微生物和真核微生物的概念及主要区别 2. 掌握细菌的大小和形态。 3. 掌握细菌的细胞结构及其功能。		
思政目标	传承革命精神，培养爱国精神、文化自信。		
教学重点	细菌的大小、形态、结构及其功能		
教学难点	细菌的结构及其功能。		
教学方法	讲授 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 讨论 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 指导 (    ); 示教 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 其它 (    )		
电子教案	有 ( <input checked="" type="checkbox"/> )	Microsoft PowerPoint ( <input checked="" type="checkbox"/> ); Author ware (    ); 其它 (    )	
	无 (    )		
教学资源	多媒体 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 模型 (    ); 标本 (    ); 实物 (    ); 音像 (    ); 其它 (    )		
教学过程 时间安排	1. 细菌的大小和形态, 1 学时。 2. 细菌的结构及其功能, 5 学时。		
思 考 题	细菌的基本结构有哪些?		
作 业	详细阅读课本项目二的所有内容。		
教学后记			

# 微生物的形态结构

## [教学要求]

1. 了解原核微生物和真核微生物的概念及主要区别
2. 掌握细菌的大小和形态。
3. 掌握细菌的细胞结构及其功能。

## [教学重点]

1. 掌握原核微生物和真核微生物的概念及主要区别。
2. 掌握细菌的大小、形态、结构及其功能。

## [教学难点]

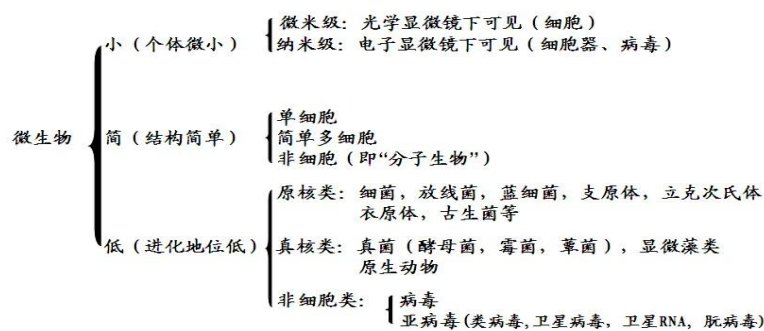
细菌的大小、形态、结构及其功能。

## [基本概念]

真核微生物、原核微生物、细菌

## [授课内容要点]

## 微生物的主要类群



## 原核微生物与真核微生物的概念及其主要区别

真核微生物：细胞核具有核膜和核仁，遗传物质以染色体形式存在，能进行有丝分裂，细胞质中存在线粒体或同时存在叶绿体等多种细胞器的微生物。

细胞内有明显核区，但没有核膜包围，核区内含有裸露 DNA 构成的遗传物质且无细胞器的原核微生物：原始单细胞生物。能量代谢和很多合成代谢均在质膜上进

---

行；蛋白质合成“车间”——核糖体分布在细胞质中。

## 原核微生物与真核微生物结构图

### 原核微生物的形态、构造和功能

#### 原核微生物的种类（图）

##### 1. 细菌

细菌 (bacterium) 是属原核生物界 (prokaryotae) 的一类个体微小、结构简单的单细胞微生物。

广义：指所有的原核生物。

狭义：指一类细胞细短（ $\Phi:0.5\mu\text{m}$ ,  $L:0.5\sim 5\mu\text{m}$ ）、结构简单、胞壁坚韧、多以二分裂方式繁殖和水生性较强的原核生物。

#### 细菌结构图

##### 举出生活中常见的细菌现象

##### 1.1 细菌的形态

1. 个体形态。球菌（单球菌，双球菌，四联球菌，八叠球菌，链球菌，葡萄球菌），杆菌（单杆菌，双杆，链杆，球杆菌），

不同杆菌的大小、长短、粗细很不一致。

##### 杆菌的形态多样（2图）

螺旋菌（弧菌，菌体只有一个弯曲，其程度不足一圈，犹如“C”字；螺菌，菌体回转如螺旋状，并呈现较多的螺旋和弯曲；螺旋体 (spirochaete) >6 圈）。

#### 螺旋菌

##### 电镜下的螺旋菌

##### 细菌的其它形态：

柄杆菌：细胞上有柄 (stalk)、菌丝 (hyphae)、附器 (appendages) 等细胞质伸出物，细胞呈杆状或梭状，并有特征性的细柄。

球衣菌：能形成衣鞘 (sheath)，杆状的细胞呈链状排列在衣鞘内而成为丝状。

支原体：由于只有细胞膜，没有细胞壁，故细胞柔软，形态多变，具有高度多形性。

细菌形态若干共性：细菌的形态明显地受环境条件的影响，如培养温度、培养时间、培养基的组成与浓度等发生改变，均可能引起细菌形态的改变。

**细菌形态若干共性:**一般处于幼龄阶段和生长条件适宜时,细菌形态正常、整齐,表现出特定的形态。在较老的培养物中,或不正常的条件下,细胞常出现不正常形态,尤其是杆菌,有的细胞膨大,有的出现梨形,有的产生分枝,有时菌体显著伸长以至呈丝状等,这些不规则的形态统称为异常形态。它们转移到新鲜培养基中或适宜的培养条件下可恢复原来的形态。

## 1.2 细菌细胞的大小

**表示:**细菌细胞的大小一般用显微测微尺测量,并以多个菌体的平均值或变化范围表示。 球菌大小以直径表示;杆菌以宽×长表示;螺旋菌以宽×菌体两端点间长度表示。

**单位:**um, 亚细胞构造单位 nm。

**细胞的大小是细菌分类特征,**不同细菌细胞大小不同,同一细菌的不同菌龄细胞大小不同,细菌细胞大小还与营养等因素相关,细胞大小的测量结果只是近似值或平均值。

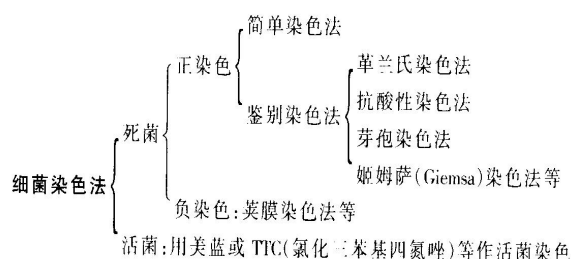
**球菌**直径多为 0.2~1.25 微米;杆菌直径与球菌相似,长度约为直径的一倍或几倍。螺旋菌为 0.3~ 1×1~ 50 微米。

**目前最小的细菌**只 0.05 微米,但一般不超过几微米。

## 1.3 细菌的观察法

**活体观察:**压滴法、悬滴法、菌丝埋片法。

**染色观察**

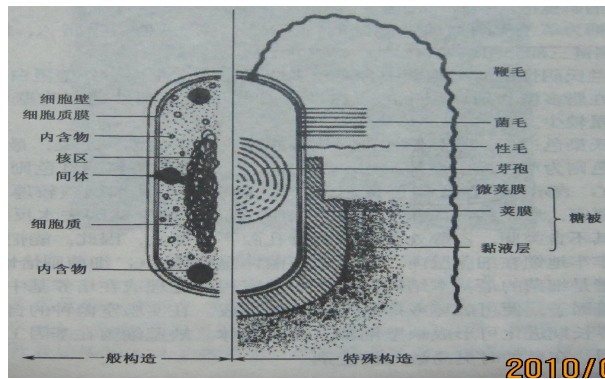


### 革兰氏染色法

革兰氏染色法(Gram staining) 由丹麦医生 Christian Gram 于 1884 年创立。它是鉴别细菌的重要方法。通过革兰氏染色法可将所有细菌分为:革兰氏阳性(G+)和革兰氏阴性(G-)。

**菌物**—初染(结晶紫)—媒染(碘液)—脱色(95%乙醇)—复染(红色染料)  
--- G-为红色, G+为深蓝紫色。

## 1.4 细菌的细胞结构



### 1.4.2 细胞壁(cell wall)

位于细胞表面，内侧紧贴细胞膜的一层较为坚韧、略具弹性的结构。占细胞干重的10-25%。

**功能：**固定细胞外形和提高机械强度，保护细菌抵抗低渗环境，为细胞的生长、分裂和鞭毛运动所需，参与菌体内外的物质交换，阻挡大分子有害物质（如水解酶）进入细胞，具特定的抗原性、致病性和对噬菌体的敏感性。

**成分：**肽聚糖、磷壁酸、脂多糖、蛋白质……

**肽聚糖：**细菌细胞壁中的特有成分，呈多层网状结构的大分子复合体，由许多亚单位（肽聚糖单体）交联而成。由双糖单位、短肽和肽桥组成。生理功能：细菌细胞壁中的特有成分，构成壁的坚硬度，决定细胞的形态，并防止渗透压引起的裂解。

**磷壁酸：**是一类G<sup>+</sup>特有的、同肽聚糖混在一起的、分子比较短(6~9个)的多聚物，以甘油磷壁酸和核糖醇磷壁酸为主链。

**脂多糖：**是一类G<sup>-</sup>特有的位于外壁外层，厚度8~10nm，类脂+各种多糖的多聚物。

革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌细胞壁的化学组成和结构不同（2图）

#### G<sup>+</sup>和G<sup>-</sup>细胞壁的比较

细胞壁	革兰阳性菌	革兰阴性菌
强度	较坚韧	较疏松
厚度	20-80nm	10-15nm
肽聚糖层数	可多达560层	1-2层
肽聚糖含量	占细胞壁干重50%-80%	占细胞壁干重5%-20%

磷 壁 酸	有	无
脂多糖	无	有

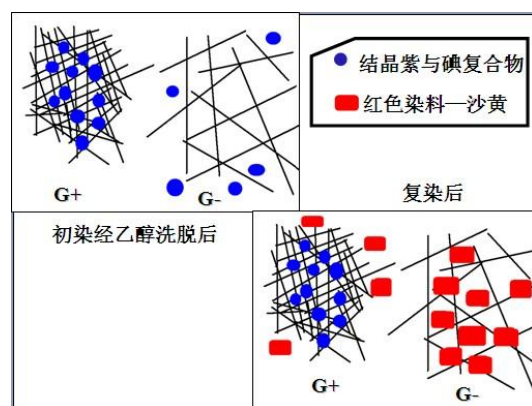
### 革兰氏染色的机制

一般认为革兰氏染色是基于细菌细胞壁特殊化学组分基础上的一种物理原因。

通过初染和媒染后，细胞内形成了不溶于水的结晶紫-碘的大分子复合物：

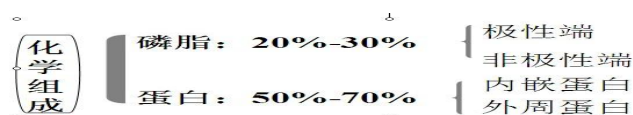
①革兰氏阳性细菌：细胞壁较厚、肽聚糖含量较高和其分子交联度较紧密，用乙醇洗脱时，肽聚糖网孔会因脱水而明显收缩，加上它基本不含类脂，故乙醇处理不能在壁上溶出缝隙，因此，结晶紫与碘复合物仍牢牢阻留在细胞壁内，使其呈现紫色。

②革兰氏阴性细菌：壁薄、肽聚糖含量低和交联松散，故遇乙醇后，肽聚糖网孔不易收缩，加上它类脂含量高，所以当乙醇把类脂溶解后，细胞壁上出现较大缝隙，复合物容易溶出细胞壁，因此经乙醇脱色后，细胞又成无色。再用红色染料进行复染，革兰氏阴性细菌获得一层新的颜色—红色。

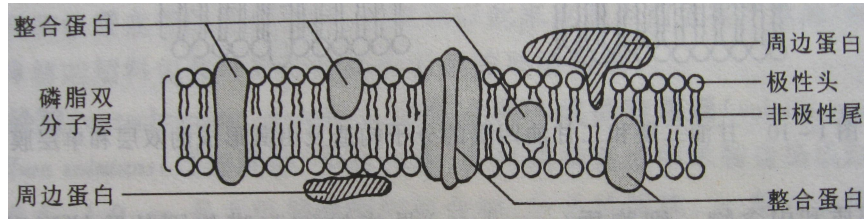


### 1.4.2 细胞膜(cell membrane)

是一层紧贴在细胞壁内侧，包围着细胞质的柔软、脆弱、富有弹性的半透性薄膜，厚度约 7-8nm，磷脂和蛋白质组成，也称细胞质膜。



### 细胞膜模式结构图(2 图)



### 液体镶嵌模型要点

1. 膜的主体是脂质双分子层
2. 脂质双分子层具有流动性
3. 整合蛋白表面呈疏水性，可溶于脂质双分子层的疏水性内层中
4. 周边蛋白表面含有亲水基团，可通过静电引力与脂质双分子层表面的极性头相连
5. 脂质分子间或脂质与蛋白质分子间无共价结合
6. 在脂质双分子层上，周边蛋白质可作“漂浮”运动，整合蛋白可作横向移动

### 细胞膜的功能

选择性控制细胞内、外物质的运送、交换，维持细胞内正常渗透压以保证屏障作用，合成细胞壁和糖被的各种组分的场所，进行氧化磷酸化或光合磷酸化的产能基地，鞭毛着生点和提供其运动所需的能量，许多酶和电子传递链组分的所在部位等。

#### 1.4.3 细胞质(cytoplasm)和内含物(inclusion body)

**细胞质：**被细胞膜包围着的除核质体外的一切透明、胶状体、颗粒状物质的总称。

**主要成分：**水、蛋白、核酸、脂类、少量糖和无机盐、富含核糖核酸。

**内含物：**指细胞质内一些形状较大的颗粒状结构。

**主要成分：**贮藏物：营养贮存；磁小体：导向；羧酶体：CO<sub>2</sub>固定；气泡：调节细胞相对密度；核糖体：合成蛋白质；质粒：环状DNA。

#### 聚-β-羟丁酸(PHB)

##### 磁小体

**细胞质和内含物功能：**具有生命物质所有的各种特征，含有丰富的酶系，是营养物质合成、转化、代谢的场所，其不断地更新细胞内的结构和成分，使细菌细胞与周围环境不断的进行新陈代谢。

#### 1.4.4 核质体

---

又称核质体、原核、核区、核基因组,指原核生物所特有的无核膜包裹、无固定形态的原始细胞核。

**特点:** 无核膜、核仁、固定形态,结构简单,细胞分裂前核分裂。一般为单倍体。

**形态特征:** 呈球状、棒状或哑铃状,在电镜下呈透明区域。

**成分:** DNA—环状双链,超线圈结构。

**功能:** 是负载遗传信息的物质基础。

#### 1.4.5 质粒 (plasmid)

存在于细胞质中,能进行自我复制的且游离的小型双股环状 DNA 分子,每个细菌细胞可含有一至数个,能控制细菌产生菌毛、毒素、耐药性等遗传性状。

#### 原核生物与真核生物不同

- 细菌是原核细胞,不具有成形的核。
- 细菌的遗传物质称为核质或拟核,无核膜、核仁和有丝分裂器,只有一个核质体或称染色质体。染色质体没有固定形态,结构也很简单,功能与真核细胞的染色体相似。这是原核生物与真核生物的主要区别之一。
- 核质由单一合闭环状 DNA 分子反复回旋卷曲盘绕组成松散网状结构。

授课日期		教案编号	4
课程名称	微生物检验	专业班级	分检 241、242
教材名称	微生物检测技术 化学工业出版社		
授课题目	微生物的特殊形态结构		
授课学时	4 学时		
课 型	理论 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 实验 ( <input type="checkbox"/> ); 见习 ( <input type="checkbox"/> ); 实训 ( <input type="checkbox"/> ); 其它 ( <input type="checkbox"/> )		
教学目的	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 了解和掌握细菌的特殊结构及其功能。</li> <li>2. 了解细胞的繁殖方式。</li> <li>3. 掌握细菌的菌落特征。</li> </ol>		
思政目标	培养工匠精神，树立奋斗人生的价值观。		
教学重点	细菌的特殊结构及其功能，细菌的菌落特征。		
教学难点	细菌的特殊结构及其功能，细菌的菌落特征。		
教学方法	讲授 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 讨论 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 指导 ( <input type="checkbox"/> ); 示教 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 其它 ( <input type="checkbox"/> )		
电子教案	有 ( <input checked="" type="checkbox"/> )	Microsoft PowerPoint ( <input checked="" type="checkbox"/> ); Author ware ( <input type="checkbox"/> ); 其它 ( <input type="checkbox"/> )	
	无 ( <input type="checkbox"/> )		
教学资源	多媒体 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 模型 ( <input type="checkbox"/> ); 标本 ( <input type="checkbox"/> ); 实物 ( <input type="checkbox"/> ); 音像 ( <input type="checkbox"/> ); 其它 ( <input type="checkbox"/> )		
教学过程 时间安排	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 细菌的特殊结构及其功能，3 学时。</li> <li>2. 细菌的菌落特征, 1 学时。</li> </ol>		
思 考 题	细菌的特殊结构有哪些？		
作 业	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 仔细阅读课本项目二的所有内容。</li> <li>2. 预习项目三的内容。</li> </ol>		
教学后记			

---

# 细菌细胞的附加（特殊）结构

## [教学要求]

1. 了解和掌握细菌的特殊结构及其功能。
2. 了解细胞的繁殖方式。
3. 掌握细菌的菌落特征。

## [教学重点]

1. 掌握细菌的特殊结构及其功能。
2. 掌握细菌的菌落特征。
3. 细胞的繁殖方式。

## [教学难点]

芽孢的结构及其功能，细菌的菌落特征，细菌的裂殖方式，

## [基本概念]

芽孢、鞭毛、糖被、伴孢晶体、菌落

## [授课内容要点]

## 1.5 细菌细胞的附加（特殊）结构

### 1.5.1 芽孢(endospore/spore)

某些细菌在其生长发育后期，在细胞内形成一个圆形或椭圆形、厚壁、含水量极低、抗逆性极强的休眠体。**成分：**含水量低、壁致密、结构复杂。

**形态：**呈梭状、棒槌状等。芽孢有较厚的壁和高度折光性，在显微镜下观察为透明体。（图）

**细菌**是否形成芽孢是由其遗传性决定，但是也需要一定的环境条件。大多数芽孢杆菌是在营养缺乏等不良条件下在衰老的细胞体内形成芽孢。

**芽孢具有极强的抗逆性（抗热、抗化学药物、抗辐射等）**

1. 芽孢具高度耐热性。肉毒梭菌的芽孢在沸水中需 5-9.5 小时才被杀死
2. 芽孢具很强的休眠性。常规条件下，芽孢休眠可保持几年至几十年而不死亡
3. 芽孢具抗辐射能力。巨大芽孢杆菌芽孢的抗辐射能力比大肠杆菌细胞强 36 倍。

**芽孢抵抗力强的原因：**(1) 芽孢含水量少，蛋白质受热后不易变性。(2) 芽孢具有多层致密的厚膜，理化因素不易透入。(3) 含有的 DPA 与钙结合的盐能提高芽孢中各种酶的稳定性。

### 芽孢的形成

**芽孢的萌发：**由休眠状态的芽孢变为营养状态的细菌过程，包括活化—出芽—生长。

**细菌芽孢的特点：**1) 整个生物界中抗逆性最强的生命体，是否能消灭芽孢是衡量各种消毒灭菌手段的最重要的指标；2) 芽孢是细菌的休眠体，在适宜的条件下可以重新转变成营养态细胞，产芽孢细菌的保藏多用其芽孢；3) 芽孢的有无、形态、大小和着生位置是细菌分类和鉴定中的重要指标；4) 芽孢与营养细胞相比，其化学组成存在较大差异，易在光学显微镜下观察。

**芽孢的大小、形状、位置等随菌种而异，有重要的鉴别意义。**

**研究芽孢的意义：**细菌分类、鉴定中的重要形态学指标，有利提高菌种的筛选效率和指导菌种保藏，制定灭菌参数。

如何杀灭培养基中的芽孢？

### 1.5.2 鞭毛(Flagellum)

运动性微生物细胞表面具有的一根或数根由细胞内伸出的细长、波曲、毛发状的丝状体结构即为鞭毛，它是细菌的“运动器官”。**功能：**运动。

**观察：**鞭毛用电子显微镜观察；经特殊染色法在光镜下；根据运动方式，半固体穿刺培养，观其是否有浑浊扩散区；根据菌落外形，若形状较大，薄而不规则，边缘极不圆整则具极强运动能力。

**类型：**单端单生、两端单生、单端丛生、两端丛生、周生。

(图)

### 1.5.3 糖被(glycocalyx)

包被于某些细菌细胞壁外的一层厚度不定的透明胶状物质。

**种类：**

糖被 { 包裹在单个细胞上 { 在壁上有固定层次 { 层次厚：(大)荚膜  
层次薄：微荚膜  
松散、未固定在壁上：粘液层  
包裹在细胞群上：菌胶团 [ 动胶菌属 (*Zoogloea*) 含有 ]

(图)

---

**成分:** 90%以上为水, 余为多糖(肽)或蛋白质, 也有多糖与多肽组成的复合物。

**功能:** 保护细菌免受干旱损伤; 加强致病力, 保护病原菌免受宿主吞噬细胞的吞噬; 贮藏养料, 以备营养缺乏时重新利用; 堆积某些代谢产物; 通过荚膜或其有关构造可使菌体附着于适当的物体表面; 作为透性屏障和离子交换系统, 以保护细菌免受重金属离子的毒害; 细菌间的信息识别作用; 是细菌的分类依据之一。

**与生产实践的关系:** 用于菌种鉴定——性质与有无; 用作药物和生化试剂——提取葡萄糖(代血浆); 用作工业原料——产黄原胶; 用于污水的生物处理——吸附沉降; 有些细菌的糖被会给人类带来有害作用——影响发酵生产、污染、病毒。

#### 1.5.4 伴孢晶体

少数芽孢杆菌产生的糖蛋白昆虫毒素, 也称 $\delta$ 内毒素, 对鳞翅目、双翅目和鞘翅目等 200 多种昆虫和动、植物线虫有毒杀作用, 可作为生物农药。不同菌株产生的伴孢晶体, 有不同的对宿主致毒范围。

#### 苏云菌农药

#### 1.5.5 菌毛 (pilus)

普通菌毛

吸附作用

性菌毛

传递 DNA

#### 1.6 细菌的繁殖方式

简单的无性的二均裂殖是细菌最普遍、最主要的繁殖方式, 通常表现为横分裂。

电子显微镜表明, 细菌分裂大致经过细胞核和细胞质的分裂、横隔壁的形成、子细胞分离等过程。

#### 杆菌二分裂过程模式图

图

#### 大肠杆菌分裂 (2 图)

#### 1.7 细菌的菌落特征

**菌落:** 在适宜的培养条件下, 微生物在固体培养基表面(有时为内部)生长繁殖, 形成以母细胞为中心的一堆肉眼可见的、有一定形态构造的子细胞集团。

**菌苔:** 将某一纯种的大量细胞密集地接种到固体培养基表面, 结果长出的大量

---

“菌落”互相连成一片，这就是菌苔。

(2 图)

**菌落特征参数：**大小、形状(圆形、假根状、不规则状等)、隆起形状(扩展、台状、低凸、凸面、乳头状等)、边缘情况(整齐、波状、裂叶状、锯齿状等)、表面状态(光滑、皱褶、颗粒状、龟裂状、同心环状等)、表面光泽(闪光、金属光泽、无光泽等)、质地(油脂状、膜状、粘、脆等)、颜色，透明程度等。

(2 图)

**菌落形态是个体形态的集中表现。**

个体球状体，群体小、圆、隆起；个体杆状，群体大、圆、隆起大、扁平；个体鞭毛，群体很大、不规则；个体芽孢，群体透明度差，皮肤状皱褶；荚膜个体，群体透明度高，鼻涕状，菌落大。

**细菌菌落特征：**菌落湿润，较光滑，较透明，较粘稠，易挑取，小而突起或大而平坦，菌落正反面或边缘与中央部位的颜色一致，一般有臭味。

**常见细菌菌落特征：**球菌：菌落小而突起，边缘极其圆整。

长有鞭毛的细菌：菌落大而扁平，形状不规则。

有荚膜的细菌：菌落十分光滑，并呈透明的蛋清状。

产芽孢的细菌：菌落表面粗糙、多褶、不透明、外形及边缘不规则。

**菌落培养特征，**在固体培养基上，多生于培养基表面，光滑或粗糙、干燥或湿润，有不同气味，但菌落菌苔易于被挑起。

(2 图)

**在液体培养基上，**1. 多数细菌呈现均匀浑浊(表现均匀生长)。2. 部分形成菌膜(专性需氧菌)，在液体培养基表面上形成菌膜，液体透明或者稍浑浊。3. 形成菌环，在液体中间形成一圈环状物形成沉淀。4. 在液体底部形成沉淀。

**在半固体培养基上，**用穿刺接种方法，如该细菌有鞭毛，能运动则沿穿刺线扩散生长，若无鞭毛不能运动，只在穿刺线处生长。

**菌落意义**

各种细菌，在一定条件下形成的菌落特征具有一定的稳定性和专一性，这是衡量菌种纯度，辨认和鉴定菌种的重要依据。不同形态、生理类型的细菌，在其菌落形态、构造等特征上也有许多明显的反映。

---

## 菌落意义

各种细菌，在一定条件下形成的菌落特征具有一定的稳定性和专一性，这是衡量菌种纯度，辨认和鉴定菌种的重要依据。不同形态、生理类型的细菌，在其菌落形态、构造等特征上也有许多明显的反映。

### 1.7 常见细菌

#### 大肠杆菌 (E. coli):

是人和哺乳动物肠道中的正常菌。广泛分布于水、污水、土壤、谷类、乳制品等当中。革兰氏阴性，有的近似球形，有的则为长杆状。不产芽孢，一般无荚膜，周身鞭毛，运动或不运动。单个或成对，生长最适温度 30—37℃，兼性厌氧，菌落白色到乳白色，光滑闪光。在简单培养基上易生长，发酵葡萄糖和其它碳水化合物产生乳酸、乙酸和甲酸。是食品污染的指标菌。

#### 芽孢杆菌属 (Bacillus)

革兰氏阳性，直的或近乎直的杆菌。周生和侧生鞭毛，能运动，产芽孢。好氧或兼性厌氧。广泛存在于土壤、水、植物表面及其它环境中。在粮食上特别多。

#### 乳酸杆菌属 (Lactobacillus)

革兰氏阳性杆菌，形态变化较大，从细长杆状到球杆状，单生或连生。通常不运动，运动者周生有鞭毛。不产芽孢，微好氧、厌氧。营养要求严格，可发酵乳糖，不利用乳酸。生长最适温度为 30~40℃，最适 pH 值为 5.5~5.0。常见于粮食、蔬菜、发酵面团、酒、麦芽汁、水、酸泡菜中，尤其在乳制品、青贮饲料和人的肠道中很多。

授课日期		教案编号	5
课程名称	微生物检验	专业班级	分检 241、242
教材名称	微生物检测技术 化学工业出版社		
授课题目	微生物的营养		
授课学时	4 学时		
课 型	理论 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 实验 ( <input type="checkbox"/> ); 见习 ( <input type="checkbox"/> ); 实训 ( <input type="checkbox"/> ); 其它 ( <input type="checkbox"/> )		
教学目的	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 了解和掌握微生物的六大营养要素。</li> <li>2. 掌握微生物的营养类型。</li> </ol>		
思政目标	培养科学生活观，激发勤奋学习的青春动力。		
教学重点	六大营养要素及其功能、四大营养类型。		
教学难点	四大营养类型的区别与特征。		
教学方法	讲授 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 讨论 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 指导 ( <input type="checkbox"/> ); 示教 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 其它 ( <input type="checkbox"/> )		
电子教案	有 ( <input checked="" type="checkbox"/> )	Microsoft PowerPoint ( <input checked="" type="checkbox"/> ); Author ware ( <input type="checkbox"/> ); 其它 ( <input type="checkbox"/> )	
	无 ( <input type="checkbox"/> )		
教学资源	多媒体 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 模型 ( <input type="checkbox"/> ); 标本 ( <input type="checkbox"/> ); 实物 ( <input type="checkbox"/> ); 音像 ( <input type="checkbox"/> ); 其它 ( <input type="checkbox"/> )		
教学过程 时间安排	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 六大营养要素及其功能，2 学时。</li> <li>2. 四大营养类型的区别与特征，2 学时。</li> </ol>		
思考题	四大营养类型的有何区别？		
作 业	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 仔细阅读课本项目三的所有内容。</li> <li>2. 预习营养物质吸收的内容。</li> </ol>		
教学后记			

---

## 微生物的营养

### [教学要求]

1. 了解和掌握微生物的六大营养要素。
2. 掌握微生物的营养类型。

### [教学重点]

1. 掌握微生物的六大营养要素及其功能。
2. 掌握微生物的四大营养类型。

### [教学难点]

微生物的四大营养类型的区别与特征

### [基本概念]

碳源、能源、氮源、无机盐、生长因子

### [授课内容要点]

**营养：**生物体从外部环境中摄取对其生命活动必需的能量和物质，以满足正常生长和繁殖需要的一种最基本的生理过程。

营养是生命的起始点，为一切生命活动提供必需的物质基础。

**营养物质：**自然界中能被微生物用于分解和合成代谢的物质，在机体中可参与细胞组成、构成酶的活性成分，能为物质运输系统和机体进行各种生理活动提供所需要的能量。

营养物质的功用：建造微生物体细胞的原料，为微生物体生命活动提供所需要的能源。

### 1. 微生物营养的六类营养要素

碳源、能源、氮源、无机盐、生长因子、水分

#### 1.1 碳源

**碳源：**一切能满足微生物生长繁殖所需碳元素的营养源。

**功能：**构成细胞结构物质；供给生长发育所需要的能量。

**最适碳源：**C-H-O；最适碳源：糖 > 醇 > 有机酸 > 脂类；最适糖类：单糖 > 双糖 > 多糖；最适单糖：己糖 > 戊糖；最适多糖：淀粉 > 纤维素 > 木质素、几丁质。

**种类：**无机含碳化合物：如 CO<sub>2</sub> 和碳酸盐等。有机含碳化合物：糖与糖的衍生物（多糖：如淀粉、麸皮、米糠等；饴糖；单糖）、脂醇类、有机酸、烃类、芳香族化合物等。

---

**利用特点：**自养微生物：利用无机碳源合成各种物质，如 CO<sub>2</sub>、碳酸盐等。异养微生物：利用有机碳源，也作能源物质，如葡萄糖、淀粉等。利用最广泛的是糖类。

注：碳源谱的广度是将微生物类一整体来考察的，如果就某一具体物种来看，其碳源差异则极大，有的物种（如洋葱伯克氏菌）可利用的碳源化合物可达 100 多种，有的仅能利用 CO<sub>2</sub> 和少数的 1C 或 2C 化合物（如产甲烷菌）。

## 1.2 氮源

**氮源：**凡是提供微生物生长繁殖所需氮元素的营养源，如花生饼等。

**功能：**组成微生物体结构成分，蛋白质、酶、核酸；少数细菌可以铵盐、硝酸盐等氮源为能源，亚硝化细菌、硝化细菌。

**种类：**无机氮：铵盐、硝酸盐、亚硝酸盐、尿素、氨等；有机氮：蛋白质及其降解产物（如胨、肽、氨基酸等）、牛肉膏、鱼粉、花生、饼粉、黄豆饼粉、玉米浆等；分子氮：少数固氮微生物能利用。

**利用特点：**氨基酸自养型生物：不需要氨基酸作为氮源，能把非氨基酸类简单氮源自行合成所需要的一切氨基酸。氨基酸异养型生物：需要从外界吸收现成的氨基酸作氮源。

**速效氮源：**以蛋白质降解产物存在的氮源，如牛肉膏。

**迟效氮源：**以蛋白质形式存在的氮源，如花生饼。

氮源一般不提供能量。

**常用氮源：**铵盐（NH<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>）

## 1.3 无机盐

**无机盐：**为微生物细胞生长提供碳、氮源以外的多种重要元素（包括大量元素和微量元素）的物质，多以无机盐的形式供给。如：P、S、K、Mg、Ca、Na、Fe、Cu、Zn、Mn、Mo、Co 等。

**大量元素：**P、S、K、Mg、Ca、Na、Fe（微生物生长所需浓度在 10<sup>-3</sup>~10<sup>-4</sup>mol/L）；

**微量元素：**Cu、Zn、Mn、Mo、Co（微生物生长所需浓度在 10<sup>-6</sup>~10<sup>-8</sup>mol/L）。

**功能：**维持生物大分子和细胞结构的稳定性，如 Ga 可调节膜的通透性；有些无机盐还可做为自养微生物的能源，如 S 和 Fe 分别为硫化细菌和铁细菌用作能源。

**应用：**一般微生物生长所需要的无机盐有：硫酸盐、磷酸盐、氯化物以及含有钠、钾、镁、铁等金属元素的化合物。在配制培养基时，首选加入磷酸氢二钾和硫酸镁，基本时可以同时提供 4 种需要量最大的元素。微量元素：除配制精细培养基，一般不加入。

## 1.4 水

### 功能：

胞外：	溶剂（营养物质吸收）
	溶剂（代谢产物的分泌）
胞内：	反应介质（如在光合反应、蛋白质水解中，水是反应物）
	维持膨压
	组成成分：70~90%左右
	调节温度：水的比热高

### 存在状态：

结合水：与溶质等其他分子结合在一起，结构组成成分，不可被利用。游离水：可被利用，含量用水活度（ $A_w$ ）表示。

## 1.5 生长因子

生长因子：微生物在生长过程中必需的，对调节微生物正常代谢所必需的微量有机物。

**作用：**参与微生物体的代谢和结构物质、参与酶的组成部分或活性基团、刺激和调节微生物体的生长。

**种类：**维生素类、氨基酸类、嘌呤(或嘧啶)类、脂肪酸类。

**来源：**酵母膏、玉米浆、肝浸出液、麦芽汁、血液或血清、新鲜动植物组织……

### 生长因子与微生物的关系

生长因子自养型微生物：不需要外界提供生长因子的微生物，包括多数真菌、放线菌、霉菌。

生长因子异养型微生物：需要外界提供多种生长因子的微生物，包括乳酸菌、动植物致病菌、原生动物、支原体等。

生长因子过量合成微生物：指在代谢活动中能合成并累积维生素等生长因子的微生物。在实践上将它们作为维生素等的生产菌，如产 VB12 的甲烷菌。

## 1.6 能源

能为微生物的生命活动提供最初能量来源的营养物或辐射能。

能源谱 { 化学物质 { 有机物：化能异养微生物的能源（同碳源）  
无机物：化能自养微生物的能源（不同于碳源）  
辐射能：光能自养和光能异养微生物的能源

## 2. 微生物的营养类型

依碳源不同：异养型：不能以 CO<sub>2</sub> 为主要或唯一碳源；自养型：能以 CO<sub>2</sub> 为主要或唯一碳源。

依能源不同：光能营养型：光反应产能；化能营养型：物质氧化产能。

依氢供体不同：无机营养型：以无机化合物为氢供体；有机营养型：以有机物作为供氢体。

分类标准	营养类型
1. 以能源分	光能营养型(phototroph)
	化能营养型(chemotroph)
2. 以氢供体分	无机营养型(lithotroph)
	有机营养型(organotroph)
3. 以碳源分	自养型(autotroph)
	异养型(heterotroph)
4. 以合成氨基酸能力分	氨基酸自养型(amino acid autotroph)
	氨基酸异养型(amino acid heterotroph)
5. 以生长因子分	原养型(prototroph)或野生型(wild type)
	营养缺陷型(auxotroph)
6. 以取食方式分	渗透营养型(osmotroph)
	吞噬营养型(phagotroph)
7. 以取得死或活有机物分	腐生(saprophytism)
	寄生(parasitism)

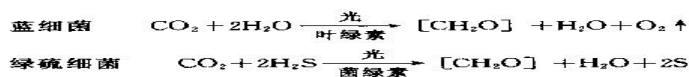
营养类型	能源	供氢体	基本碳源	实例
光能自养型 (光能无机营养型)	光	无机物	CO <sub>2</sub>	蓝细菌、紫硫细菌、绿硫细菌、藻类
光能异养型 (光能有机营养型)	光	有机物	CO <sub>2</sub> 及简单有机物	红螺菌科的细菌(紫色无硫细菌)
化能自养型 (化能无机营养型)	无机物*	无机物	CO <sub>2</sub>	硝化细菌、硫化细菌、铁细菌、氢细菌、硫黄细菌等
化能异养型 (化能有机营养型)	有机物	有机物	有机物	绝大多数细菌和全部真核微生物

\* NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、S、H<sub>2</sub>S、Fe<sup>2+</sup>、H<sub>2</sub> 等。

### 2.1 光能自养型

特征：以 CO<sub>2</sub> 为唯一或主要碳源；利用光能进行光作用获取生长所需要的能量；

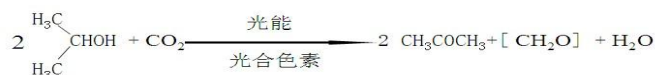
代表物种：蓝细菌、绿硫细菌、红硫细菌



### 2.2 光能异养型

特征：以有机物作为供氢体和碳源；在生长时大多数需要外源的生长因子；具光合色素，可利用光能还原 CO<sub>2</sub>；

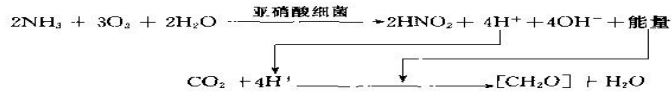
代表物种：红螺菌利用异丙醇作为供氢体，将 CO<sub>2</sub> 还原成细胞物质，同时积累丙酮。



### 2.3 化能自养型

特征：以 CO<sub>2</sub> 或碳酸盐作为唯一或主要碳源；以无机物氧化释放的化学能为能源；以各自合适的无机化合物为氢供体，将 CO<sub>2</sub> 还原合成有机物；

代表物种：硫化细菌、硝化细菌、氢细菌与铁细菌等。



## 2.4 化能异养型

特征：能量来自有机物的氧化分解；碳源直接取自于有机碳化合物。

代表物种：大多数细菌、真菌、原生动物、所有致病微生物。

### 不同营养类型之间的界限并非绝对

异养型微生物并非绝对不能利用 CO<sub>2</sub>；自养型微生物也并非不能利用有机物进行生长；有些微生物在不同生长条件下生长时，其营养类型会发生改变。

如紫色非硫细菌 (purple nonsulphur bacteria)：没有有机物时，同化 CO<sub>2</sub>，为自养型微生物；有机物存在时，利用有机物进行生长，为异养型微生物；光照和厌氧条件下，利用光能生长，为光能营养型微生物；黑暗与好氧条件下，依靠有机物氧化产生的化学能生长，为化能营养型微生物。

微生物营养类型的可变性有利于提高其对环境条件变化的适应能力。

授课日期		教案编号	6
课程名称	微生物检验	专业班级	分检 241、242
教材名称	微生物检测技术 化学工业出版社		
授课题目	营养物质进入细胞的方式		
授课学时	2 学时		
课 型	理论 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 实验 (    ); 见习 (    ); 实训 (    ); 其它 (    )		
教学目的	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 了解和掌握营养物质进入细胞的方式。</li> <li>2. 了解培养基的种类和用途。</li> <li>3. 常用培养基设计和选择的原则和方法。</li> </ol>		
思政目标	培养创新精神，探索求真的科学精神。		
教学重点	细胞膜运送营养物质主要方式、培养基的设计原则和方法。		
教学难点	细胞膜运送营养物质主要方式。		
教学方法	讲授 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 讨论 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 指导 (    ); 示教 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 其它 (    )		
电子教案	有 ( <input checked="" type="checkbox"/> )	Microsoft PowerPoint ( <input checked="" type="checkbox"/> ); Author ware (    ); 其它 (    )	
	无 (    )		
教学资源	多媒体 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 模型 (    ); 标本 (    ); 实物 (    ); 音像 (    ); 其它 (    )		
教学过程 时间安排	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 细胞膜运送营养物质主要方式，1 学时。</li> <li>2. 培养基的设计原则和方法，1 学时。</li> </ol>		
思 考 题	营养物质四种运送方式有何区别？		
作 业	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 仔细阅读课本项目三的所有内容。</li> <li>2. 预习微生物生长的内容。</li> </ol>		
教学后记			

---

## 营养物质进入细胞的方式

### [教学要求]

1. 了解和掌握营养物质进入细胞的方式。
2. 了解培养基的种类和用途。
3. 常用培养基设计和选择的原则和方法。

### [教学重点]

1. 掌握微生物细胞膜运送营养物质主要方式。
2. 掌握微生物培养基的设计原则和方法。

### [教学难点]

细胞膜运送营养物质主要方式。

### [基本概念]

单纯扩散、促进扩散、主动扩散、基团移位

### [授课内容要点]

细胞膜对物质的交换具高度选择通透性,营养物质进入微生物细胞的方法和速率取决于以下诸因素:

营养物质的性质。包括分子大小、电荷、结构及光学异构类型等。大分子:先水解为小分子,再吸收;脂溶性物质:易透过;离子化合物:弱快强慢(极性)。

细胞的结构和功能。如种类、表现形态、菌龄、生理状态及代谢活性等。

细胞(即质膜)所处的环境条件。即渗透压、pH、温度、氧分压、表面活性剂等。

**细胞膜运送营养物质主要方式:**单纯扩散、促进扩散、主动扩散、基团移位。

**单纯扩散:**疏水性双分子层细胞膜在无载体蛋白参与下,单纯依靠物扩散方式让许多小分子、非电离分子尤其是亲水性分子被动通过的一种物质运送方式,是物质进出细胞的一种最简单方法。

特 征:无特异性、顺浓度梯度运输、不消耗代谢能、不需要载体蛋白。

主要物质:水、二氧化碳、氧气、甘油、乙醇等。

**促进扩散:**溶质在运送过程中,必须借助存在于细胞膜上的底物特异载体蛋白的协助,但不消耗能量的一类扩散性运送方式,如葡萄糖。(顺浓度梯度进入细胞的方式)特 征:顺浓度梯度运输、需载体蛋白、不耗能、有特异性。

### 促进扩散与被动扩散的主要区别

在于通过促进扩散进行跨膜运输的物质需要借助与载体的作用才能进入细胞。每种载体只运输相应的物质,具有高度的专一性。

**主动运送：**通过细胞膜上特异性载体蛋白构型变化，同时消耗能量，使膜外低浓度物质进入膜内的一种物质运送方式，是微生物吸收营养物质的主要机制，如氨基酸。

**特征：**逆浓度梯度运输、耗能、需载体蛋白、具高度立体特异性、吸收营养物的主要机制。

**基团移位：**指被运输的物质在膜内受到化学修饰，以被修饰的形式进入细胞的物质运输方式，过程需要消耗能量和与特异性蛋白结合，如核苷酸等。

**特征：**属主动运送、溶质分子发生化学修饰-定向磷酸化。

**运送机制：**磷酸转移酶系统

#### 四种运送营养物质方式的比较

无载体	不耗能	溶质分子不变	扩散
有载体	不耗能	溶质分子不变	促进扩散
	耗能	溶质分子不变 溶质分子改变	主动运输 基团移位

## 4 培养基

**培养基：**是一种人工配制的、含有六大营养要素，适合微生物生长繁殖或产生代谢产物用的混合营养料。

**用途：**促使微生物生长；积累代谢产物；分离微生物菌种；鉴定微生物种类；微生物细胞计数；菌种保藏；制备微生物制品。

### 4.1 培养基的种类及用途

#### （一）按培养基成分来源

**合成培养基：**成分为已知的纯化学物质，如葡萄糖铵盐组合培养基。

**天然培养基：**成分天然有机物，如麦芽汁培养基

**半合成培养基（综合培养基）：**天然有机物+已知纯化学物质，如马铃薯蔗糖培养基。

#### （二）按培养基物理状态

**液体培养基：**广泛应用于实验室、生产实践和大规模培养微生物

**固体培养基：**加凝固剂：明胶、硅胶、琼脂（无营养、无分解能力，熔点 96℃，凝点 40℃

）1.5-2%；天然固体：米糠、木屑、马铃薯块；滤膜：微孔醋酸纤维薄膜。

**半固体培养基**

琼脂量少：0.2-0.5%，呈柔软糊状。

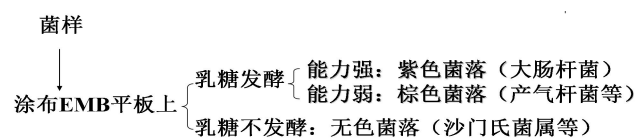
### (三) 按培养基用途

**基本培养基：**满足野生菌正常生长的最低成分合成培养基，如 PDA 培养基。

**选择培养基：**抑制性选择培养基（取其所抗），加入特殊的物质（抑菌物质）以抑制不需要的微生物。如 Martin 培养基。加富性选择培养基（投其所好），加入有利（嗜好）物质以筛选需要的微生物，如酵母菌富集培养基。

**鉴别培养基：**通过指示剂的显色反应而鉴别不同微生物，如 EMB 培养基。

伊红美蓝培养基(EMB 培养基)



## 4.2 选用和设计培养基的原则和方法

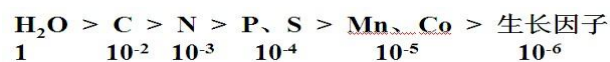
四个原则：（一）培养基组分应适合微生物的营养特点（目的明确）；（二）营养物的浓度与比例应恰当（营养协调）；（三）物理化学条件适宜（条件适宜）；（四）根据培养目的选择原料及其来源（经济节约）

### 目的明确。

何菌？自养菌：供给简单无机物；异养菌：供给有机物。何产物？细菌：牛肉膏蛋白胨培养基；放线菌：高氏一号培养基；酵母菌：麦芽汁培养基；霉菌：查氏培养基。何种规模？实验室培养、种子罐培养、发酵罐培养。

### 营养协调。

1) 各营养元素之间的比例要协调。浓度过高——对生长起抑制作用；浓度过小——不能满足生长需要。



### 2) 碳氮比 (C/N)

$$\text{C/N比值} = \frac{\text{碳源中的碳原子的mol数}}{\text{氮源中所含的氮原子的mol数}}$$

氮源过多：菌体生长过旺，不利于积累代谢产物。氮源不足：菌体繁殖受到抑制，代谢产物积累。

注意：速效性氮（或碳）源与迟效性氮（或碳）源的比例，各种金属离子间的比例。

### 3) 物理化学条件适宜

控制 pH 值:细菌:6.5~7.5;放线菌: 7.0~7.5;霉菌: 4.0~5.8;酵母菌: 3.8~6.0。

培养基 pH 值调节方式:

内源性 { 缓冲液 {  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  } 等克分子量, pH值为6.8  
备用碱:  $\text{CaCO}_3$   
外加调节: 直接加酸、碱(工业适用)

**渗透压:** 等渗溶液, 适宜微生物的生长; 高渗溶液, 细胞发生质壁分离; 低渗溶液, 使细胞吸水膨胀, 甚至破裂。

**水活度:** 在相同的温度、压力下, 溶液中水的蒸汽压和纯水蒸汽压之比。

微生物对水的需要程度(水对微生物生长的影响)常用环境(或基质)中的水活度值(activity of the water,  $A_w$ )表示, 即水的有效浓度,

$$A_w = \frac{P_{\text{溶液}}}{P_{\text{水}}}$$

细菌 > 酵母菌 > 霉菌、放线菌 > 耐盐菌  
0.9~0.99    0.8以上    0.7以上    0.6以上

**调节 O<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 浓度(氧化还原电势):** 好氧菌: 空气、通气; 厌氧菌: 加入还原剂等。

### 4) 经济节约

根据培养微生物的目的决定成分的量。以粗代精、以废代好、以简代繁、以“野”代“家”、以氮代脘、以纤代糖、以烃代粮。

#### 四种方法

- (一) 生态模拟。模拟微生物生长繁殖的环境。
- (二) 借鉴文献。收集、查阅、分析和利用与相关培养对象有关的文献资料。
- (三) 精心设计。对各营养因子进行反复比较与试验, 以获得最优化的配方。
- (四) 试验比较。对初选配方作具体试验和比较, 遵循从定性到定量、由小到大、由实验室到工厂等逐步扩大原则。

授课日期		教案编号	7
课程名称	微生物检验	专业班级	分检 241、242
教材名称	微生物检测技术 化学工业出版社		
授课题目	微生物的生长		
授课学时	4 学时		
课 型	理论 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 实验 ( <input type="checkbox"/> ); 见习 ( <input type="checkbox"/> ); 实训 ( <input type="checkbox"/> ); 其它 ( <input type="checkbox"/> )		
教学目的	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 了解和掌握微生物生长和繁殖的含义。</li> <li>2. 掌握微生物生长曲线的含义。</li> <li>3. 掌握微生物生长曲线的特征和意义。</li> </ol>		
思政目标	培养实事求是工作作风和科学务实的创新思维。		
教学重点	生长曲线的不同时期特征及意义。		
教学难点	生长曲线的不同时期特征。		
教学方法	讲授 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 讨论 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 指导 ( <input type="checkbox"/> ); 示教 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 其它 ( <input type="checkbox"/> )		
电子教案	有 ( <input checked="" type="checkbox"/> )	Microsoft PowerPoint ( <input checked="" type="checkbox"/> ); Author ware ( <input type="checkbox"/> ); 其它 ( <input type="checkbox"/> )	
	无 ( <input type="checkbox"/> )		
教学资源	多媒体 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 模型 ( <input type="checkbox"/> ); 标本 ( <input type="checkbox"/> ); 实物 ( <input type="checkbox"/> ); 音像 ( <input type="checkbox"/> ); 其它 ( <input type="checkbox"/> )		
教学过程 时间安排	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 生长曲线不同时期特征及应用, 3 学时。</li> <li>2. 微生物细胞数量的测定, 1 学时。</li> </ol>		
思 考 题	生长曲线的不同时期特征及意义?		
作 业	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 仔细阅读课本项目三的所有内容。</li> <li>2. 预习微生物生长理化因素的内容。</li> </ol>		
教学后记			

## 微生物的生长

**生长:** 微生物细胞在适合的环境中吸取各种营养物质, 并不断地进行新陈代谢, 通过同化作用转化成自身的细胞物质, 因而出现体积增大、质量增加的过程。

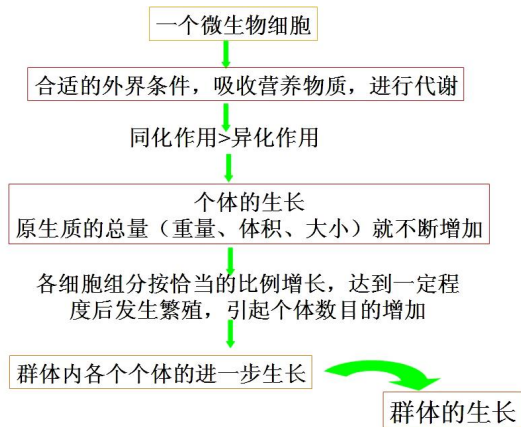
**繁殖:** 是微生物生长到一定阶段, 由于细胞内各种细胞结构的复制和重建而产生新的细胞个体, 即引起细胞个体数量增加的整个生物学过程。

生长是一个逐渐发生的量变的过程, 是繁殖的基础;

繁殖是一个质变的过程, 是生长的结果。

个体生长 → 个体繁殖 → 群体生长

群体生长 = 个体生长 + 个体繁殖



### 微生物的生长曲线

**生长曲线:** 定量描述液体培养基中微生物群体生长规律的实验曲线, 是单细胞菌体在各生长时期菌体数目与时间变化的关系曲线。

**测法:** 定时取样测定单位体积的细胞数目, 以细胞数目的对数作纵坐标, 以培养时间作横坐标。

根据微生物的生长速率的不同, 生长曲线可分为四个时期:

I. 延滞期、II. 指数期、III. 稳定期、IV. 衰亡期

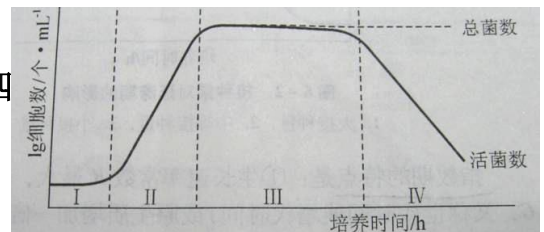


图 6-1 微生物的典型生长曲线

I. 延滞期, II. 指数期, III. 稳定期, IV. 衰亡期

#### 1) 延迟期

指少量单细胞微生物接种到新鲜培养液中后, 在开始培养的一段时间内, 因代谢系统适应新环境的需要, 细胞数目没有增加的一段时期, 又称停滞期、调整期或

---

适应期。

## 2) 指数期

指在生长曲线中，紧接着延滞期的一段细胞数目以几何级数增长的时期，也称对数期。

**1. 特点：**活菌数和总菌数接近；生长速率常数最大，代时最短；细胞生长粗壮、整齐，细胞内的化学组成及形态、生理特性比较一致（平衡生长）；酶系活跃，代谢旺盛。

该期在微生物生产中多被用作种子和科学试验材料。

## 3) 稳定期

随着细胞不断的生长繁殖，培养基中营养物质逐渐消耗，代谢产物也逐渐形成，使得细胞的生长速度逐渐下降，此时细胞的繁殖速度与死亡速度相等，活细胞数保持相对稳定的时期，又称恒定期、最高生长期、平衡期。

**特点：**a. 生长速率常数为零；b. 菌体产量达到最高；c. 活菌数相对稳定；d. 细胞开始贮存贮藏物；e. 芽孢开始形成；f. 有些微生物在此时形成次生代谢产物。

## 4) 衰亡期

在微生物的生长曲线中，个体死亡速度超过新生速度，整个群体呈现负生长状态，总活菌数明显下降的时期。

**原因：**

——外界环境越来越不利于细胞的生长，细胞分解代谢远超于合成代谢。

## 细胞数量的测定

直接计数法：血球计数器、比浊法

间接计数法：平板菌落计数法

### 直接计数法

1) 比浊法（比色法）：在一定波长下，测定菌悬液的光密度，以光密度表示菌量。实验测量时应控制在菌浓度与光密度成正比的线性范围内，否则不准确。

2) 血球计数板，是测定一定容积中的细胞总数目的常规方法。

### 间接计数法

平板菌落计数法：涂布法和倾注法

授课日期		教案编号	8
课程名称	微生物检验	专业班级	分检 241、242
教材名称	微生物检测 技术 化学工业出版社		
授课题目	微生物的培养		
授课学时	2 学时		
课 型	理论 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 实验 (    ); 见习 (    ); 实训 (    ); 其它 (    )		
教学目的	1. 了解和掌握微生物培养的类型。 2. 掌握微生物生长的影响理化因素。		
思政目标	培养正确认识问题、分析问题和解决问题的能力。		
教学重点	影响微生物生长的理化因素。		
教学难点	影响微生物生长的理化因素。		
教学方法	讲授 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 讨论 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 指导 (    ); 示教 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 其它 (    )		
电子教案	有 ( <input checked="" type="checkbox"/> )	Microsoft PowerPoint ( <input checked="" type="checkbox"/> ); Author ware (    ); 其它 (    )	
	无 (    )		
教学资源	多媒体 ( <input checked="" type="checkbox"/> ); 模型 (    ); 标本 (    ); 实物 (    ); 音像 (    ); 其它 (    )		
教学过程 时间安排	1. 微生物培养的类型, 0.5 学时。 2. 影响微生物生长的理化因素, 1.5 学时。		
思 考 题	影响微生物生长的理化因素主要有哪些?		
作 业	1. 仔细阅读课本项目三的所有内容。 2. 预习项目五的内容。		
教学后记			

# 微生物的培养

培养基上培养。



## 1) 分批培养

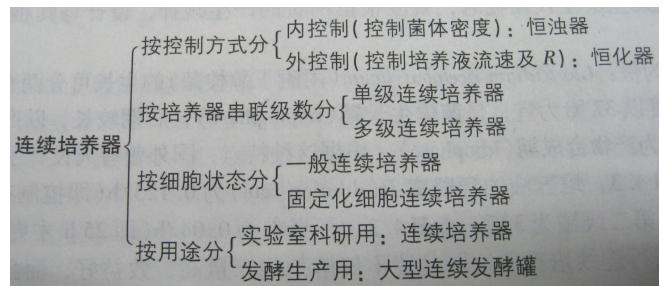
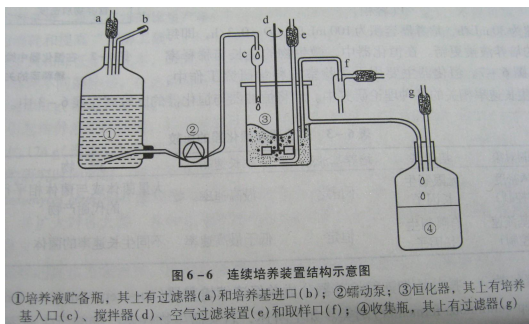
将微生物置于一定容积的培养基中，最后结束培养，一次性收获产物。

优点：技术、设备要求较简单；

缺点：基质环境不断变化，

## 2) 连续培养

指向培养容器中连续流加新鲜培养液，使微生物的液体培养物长期维持稳定、高速增长状态的一种溢流培养技术，也称开放培养。



## 控制方式

恒浊连续培养：不断调节培养液的流速而使细菌培养液浊度（密度）保持恒定

恒化连续培养：保持恒定的培养液流速

### 1) 恒浊连续培养：

不断调节培养液的流速，使微生物始终在其最高生长速率条件下进行生长繁殖的一种连续培养。

### 2) 恒化连续培养：

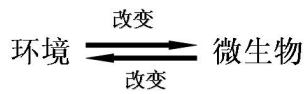
恒定培养液流速，及时补充营养，使营养物浓度基本恒定，从而保持恒定生长速率，又称恒组成连续培养。

## 2) 混菌培养

多种微生物混合培养，使其代谢活动产生互补性，如大曲酒的发酵。

缺点：反应机制复杂；工艺技术难以掌握

### 3.1.4 环境条件的影响



pH、温度、含氧量

#### pH

不同微生物的 pH 适应范围

微生物	最低PH	最适PH	最高PH
细菌	3-5	6.5-7.5	8-10
酵母菌	2-3	4.5-5.5	7-8
霉菌	1-3	4.5-5.5	7-8

#### 温度

生长温度三基点：

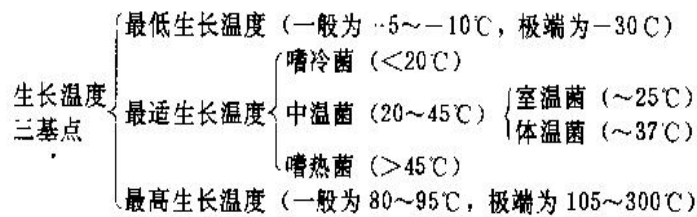
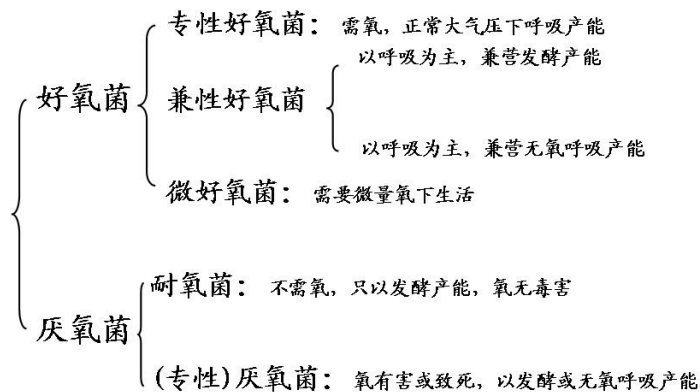


表 6-4 若干微生物的生长温度三基点

类型	菌名	温度三基点/°C		
		最低	最适	最高
嗜冷菌	<i>Polaromonas vacuolata</i> (液泡极地单胞菌)	-4	4	12
中温菌	<i>Escherichia coli</i> (大肠埃希氏菌)	8	39	48
嗜热菌	<i>Bacillus stearothermophilus</i> (嗜热脂肪芽孢杆菌)	42	60	68
超嗜热菌	<i>Thermococcus celer</i> (速生热球菌)	65	88	97
极端超嗜热菌	<i>Pyrolobus fumarii</i> (烟孔火叶菌)	90	106	114

#### 含氧量



微生物类型	最适生长的O <sub>2</sub> 体积分数
好氧	≥20%
微好氧	2%–10%
耐氧型	<2%
兼性厌氧	有氧或无氧
专性厌氧	有氧时死亡

### 3.1.5 微生物的多样性

- 物种的多样性
- 生理代谢类型多
- 代谢产物种类多
- 遗传基因的多样性
- 生态类型的多样性
- ……

#### 极端环境下的微生物

嗜热微生物、嗜冷微生物、嗜酸微生物、嗜碱微生物、嗜盐微生物、嗜压微生物、嗜辐射微生物

### 3.1.6 工业和医学上重要的细菌

假单胞菌属（铜绿假单胞菌）：常引起眼部化妆品的污染。菌体存在于水系统和发泡剂等原料中。

沙雷氏菌属：常污染杀菌剂和表面活性剂

埃希氏菌属：存在于生产设备的水系统中，常引起管道的腐蚀。

变形杆菌属：存在于化妆品原料中。

葡萄球菌属：潜在的致病菌，是化妆品人为污染 的指示菌。

## 3.2 霉菌和酵母菌

霉菌和酵母菌属真核生物，具有真正的细胞核结构，细胞质中有由膜包围的各具功能的细胞器。

### 3.2.1 细胞结构

### 3.2.2 生长和繁殖

- 菌丝断裂、有性孢子、无性孢子

表 2-6 使用过或被污染过的化妆品中分离出的常见微生物

革兰氏阴性 非发酵型细菌	革兰氏阴性 发酵型细菌	革兰氏阴性菌	酵母菌	霉菌
不动杆菌 ( <i>Acetobacter</i> spp.)	弗氏柠檬酸杆菌 ( <i>Citrobacter freundii</i> )	枯草芽孢杆菌 ( <i>Bacillus</i> spp.)	假丝酵母 ( <i>Candida</i> )	犁头霉属 ( <i>Absidia</i> )
产碱菌 ( <i>Alcaligenes</i> spp.)	阴沟肠杆菌 ( <i>Enterobacter cloacae</i> )	金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	酵母菌 ( <i>Saccharomyces</i> )	交链孢属 ( <i>Alternaria</i> )
洋葱假单胞菌 ( <i>Pseudomonas cepacia</i> )	成团肠杆菌 ( <i>E. agglomerans</i> )	表皮葡萄球菌 ( <i>S. epidermidis</i> )	圆酵母 ( <i>Torula</i> )	曲霉属 ( <i>Aspergillus</i> )
恶臭假单胞菌 ( <i>P. putida</i> )	产气肠杆菌 ( <i>E. aerogenes</i> )	肠球菌 ( <i>Enterococcus</i> spp.)	接合酵母属 ( <i>Zygosaccharomyces</i> )	柠檬酸霉属 ( <i>Citromyces</i> )
荧光假单胞菌 ( <i>P. fluorescens</i> )	日勾维肠杆菌 ( <i>E. gergoviae</i> )	小球菌 ( <i>Micrococcus</i> spp.)		分支孢子菌属 ( <i>Cladosporium</i> )
少动假单胞菌 ( <i>P. paucimobilis</i> )	产酸克雷伯氏菌 ( <i>Klebsiella oxytoca</i> )	八叠球菌 ( <i>Sarcina</i> spp.)		暗色孢属 ( <i>Dematiium</i> )
绿脓杆菌 ( <i>P. aeruginosa</i> )	变形杆菌 ( <i>Proteus</i> spp.)	链球菌 ( <i>Streptococcus</i> spp.)		镰刀菌属 ( <i>Fusarium</i> )
嗜麦芽假单胞菌 ( <i>P. maltophilia</i> )	液化沙雷氏菌 ( <i>Serratia liquefaciens</i> )	丙酸菌属 ( <i>Propionibacterium</i> )		长箭孢属 ( <i>Helminthosporium</i> )
	黏质沙雷氏菌 ( <i>S. marcescens</i> )			丝状菌属 ( <i>Hormodendrium</i> )
	气味沙雷氏菌 ( <i>S. odorifera</i> )			毛霉( <i>Mucor</i> )
	深红沙雷氏菌 ( <i>S. rubidaeu</i> )			地霉属 ( <i>Geotrichum</i> )

### 3.2.3 真菌的多样性

## 二、实训教学

### 实训一 普通光学显微镜的使用及微生物的形态观察

#### 教学设计

项目名称	普通光学显微镜的使用及微生物的形态观察		项目编号	1
隶属课程	微生物检验			
教学目标	1.掌握普通光学显微镜的构造及使用方法; 2.了解油浸系物镜的基本原理和使用方法; 3.掌握对微生物标本的形态观察。			
思政目标	培养科学思维和探索精神			
教学课时	3 学时			
教学设计	<b>教学重点</b>	<b>教学难点与要求</b>	<b>教学方法</b>	<b>备注</b>
	显微镜的构造	认识和了解普通光学显微镜的结构构造。	实物观察与操作。	
	粗调节器和细调节器的使用	掌握粗调节器和细调节器的功能、使用方法和注意事项。	教师讲授并示范,学生实践操作。	
	载物台和推动器的使用	掌握载物台和推动器的功能、使用方法和注意事项。	教师讲授并示范,学生实践操作。	
	油浸系物镜的基本原理和使用方法	掌握油浸系物镜的使用方法	教师讲授并示范,学生实践操作。	
	观察使用	1. 显微镜的放置。 2. 光线的采集与调节。 3. 标本的安装。 4. 观察、寻找观察对象过程 5. 油镜的使用 6. 观察结束后的养护。	教师讲授并示范,学生实践操作。	
	实验报告的书写	能正确编制报告,内容完整、书写正确、清晰。		课后完成
考核方法	实践考核。			
考核标准	1、 实践操作 (50 分); 2、 实训报告 (40 分); 3、 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯 (10 分)。			
分组要求	<b>独立操作。</b>			
其它要求				

---

## 实训一 普通光学显微镜的使用及微生物的形态观察 教学过程设计

### 一、实训目的：

1. 掌握的结构及使用方法；
2. 了解油浸系物镜的基本原理和使用方法；
3. 掌握对微生物标本的形态观察。

### 二、实训材料：

普通光学显微镜、微生物染色装片标本、香柏油、二甲苯、擦镜纸，面巾纸

### 三、实训步骤：

#### 1. 实验室安全教育

进入实验室禁止喧哗、追逐；

食品、零食、水杯禁止带进实验室；严禁在实验室内玩火；

禁止未经许可乱动实验药品和实验器材，严禁将实验药品带出实验室，严禁将多余或实验之后的可食用性实验材料进行食用；

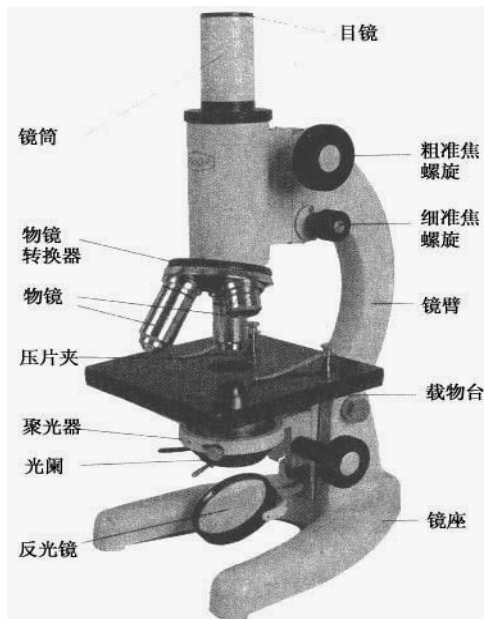
进实验室后，禁止随意移动实验台上的一切药品及用具，对他人的实验结果（如培养物）只看不动；

实验完毕，应将所有用具清洗干净，放回原位，保持刚进实验室的状况；

结束时，注意做好卫生值日工作，离开时，确保关水关电及锁门。

#### 2. 显微镜、油浸系物镜的使用

##### 2.1 讲述、演示普通光学显微镜的结构和性能



注意：变更物镜（转动器的转动）和调焦时的镜筒变化方向（逐渐上升）。

观察顺序：装片——低倍镜到视野——高倍镜观察。

## 2.2 低倍镜观察染色装片

上升镜筒 → 放置装片 → 下降物镜至距装片 0.5cm 处 → 调光 → 用粗调节器调焦距（徐徐上升） → 用细调节器细调焦距 → 观察

## 2.3 高倍镜观察染色装片

低倍镜观察后换高倍镜（注意避免镜头与玻片相撞） → 调节光度 → 细调节器校正焦距 → 观察。

## 2.4 讲述油浸系物镜的工作原理与使用方法

### 2.4.1 油镜的辨认：

油镜上有 OI 或 HI 字样，或一圈红或黑线标记，要物镜中，油镜的放大倍数和数值孔径最大，工作距离最短。

### 2.4.2 工作原理：

油镜在物镜与装片之间的介质为香柏油，其折射率与玻璃相近，光线经载玻片后可直接通过香柏油进入物镜而不发生折射，可通过增加数值孔径而提高分辨率，同时增加视野的亮度。

## 2.5 油镜观察装片

高倍镜观察后提起镜筒、换油镜至正下方 → 玻片的镜检部位加一滴香柏油 → 下降油镜浸于油中（以油圈不扩大为止，镜头不可压及装片） → 调光、上升镜筒

---

调焦距 → 观察

3. 微生物的形态观察

将各种微生物的染色装片放于显微镜下观察。

4. 镜检完毕后的工作

4.1 移开物镜镜头

4.2 取出装片

4.3 清洁油镜，用擦镜纸擦去香柏油，再沾少许二甲苯擦去残留的香柏油，再擦净残留的二甲苯。

4.4 擦净显微镜，将各部分还原。

四、记录与总结（本次实训结果记录、实训完成情况、实训过程中出现问题、自我解决问题的记录、所吸取经验、心得体会及建议等）

五、作业

1. 绘制观察至的标本形态。

2. 为什么在使用高倍镜和油镜观察标本之前要先用低倍镜进行观察？

## 实训二 微生物的显微镜直接计数法

### 教学设计

项目名称	微生物的显微镜直接计数法		项目编号	2
隶属课程	微生物检验			
教学目标	1.进一步掌握普通光学显微镜使用方法; 2.掌握对微生物菌体的计数方法。			
思政目标	培养实事求是, 求真务实的科学精神。			
教学课时	3 学时			
教学设计	教学重点	教学难点与要求	教学方法	备注
	血球计数板的结构	认识和了解血球计数板的结构和特征。	实物观察与操作。	
	血球计数计数的原理	了解和掌握计数室的构造与特征; 掌握菌体的计数方法与原则; 掌握计数板的计算公式。	教师讲授并示范, 学生实践操作。	
	菌悬液的稀释与制备	掌握菌悬液的 10 倍系列梯度稀释方法	教师讲授并示范, 学生实践操作。	
	菌液滴加过程	掌握菌液的滴加过程—毛细渗透作用	教师讲授并示范, 学生实践操作。	
	实验报告的书写	能正确编制报告, 内容完整、书写正确、清晰。		课后完成
考核方法	实践考核。			
考核标准	1、 实践操作 (50 分); 2、 实训报告 (40 分); 3、 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯 (10 分)。			
分组要求	独立操作。			
其它要求				

---

## 实训二 微生物的显微镜直接计数法

### 教学过程设计

#### 一、实训目的：

1. 进一步掌握普通光学显微镜使用方法；
2. 掌握对微生物菌体的计数方法。

#### 二、实训材料：

普通光学显微镜、血球计数板、酵母菌、盖玻片，二甲苯、擦镜纸、面巾纸、三角瓶，滴管等。

#### 三、实训步骤：

##### 1. 血球计数板的构造

由 3 个平台组成，每平台有含 9 个大格的方格网，中间大格为计数室。

计数室：长和宽各为 1mm，中间平台下陷 0.1mm，故计数室体积为 0.1mm<sup>3</sup>。

##### 2. 细菌数量的测定

制备稀释菌液 → 镜检计数室 → 计数

##### 2.2.1 菌悬液的制备

采用 10 倍系列稀释法，稀释度以每小格内含 5-10 个酵母为宜。

##### 2.2.2 镜检计数室

加样前，先对计数板的计数室进行镜检，确保清洁。如有污物，清洗，用电风吹干后使用。

##### 2.2.3 加样品

向血球计数板盖上盖片，再用无菌毛细滴管将菌悬液沿盖片边缘的缝隙以毛细渗透作用自动进入计数室，用吸水纸吸去多余水液，样品要均匀充满计数室，注意避免气泡的产生。

##### 2.2.4 计数

静置 5min，先用低倍镜找出计数室所在位置，后用高倍镜进行计数。

为容易看清计数室的方格线，光线要暗些。

对于位于线上的细胞计数原则：查上不查下，查左不查右。当酵母菌芽体达到母细胞大小 1/2 时可计为两个细胞。

将计数结果填写于课本 P111 表 8-1 之中。

---

### 3. 镜检完毕后的工作

擦净显微镜，清洗计数板，将各部分还原。

四、记录与总结（本次实训结果记录、实训完成情况、实训过程中出现问题、自我解决问题的记录、所吸取经验、心得体会及建议等）

### 五、作业

1. 为什么计数室内不能有气泡？
2. 为什么计数前需先静置 5 分钟？

## 实训三 培养基的配制及灭菌技术

### 教学设计

项目名称	培养基的配制及灭菌技术		项目编号	3
隶属课程	微生物检验			
教学目标	1. 掌握培养基配制的原理与方法； 2. 熟悉和掌握牛肉膏蛋白胨培养基培养基的配制； 3. 了解高压蒸汽灭菌锅的构造与正确使用方法。			
思政目标	培养认识问题、分析问题和解决问题的能力。			
教学课时	3 学时			
教学设计	教学重点	教学难点与要求	教学方法	备注
	培养基的配制方法	掌握培养基配制的基本方法与技能	实物观察与操作。	
	高压蒸汽灭菌锅的工作原理	了解并掌握高压蒸汽灭菌锅的工作原理	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	高压蒸汽灭菌锅的使用方法	掌握高压蒸汽灭菌锅的使用方法	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	掌握斜面培养基的制作	掌握斜面培养基的制作	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	掌握灭菌培养基的无菌检验技术	掌握灭菌培养基的无菌检验技术	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。		课后完成
考核方法	实践考核。			
考核标准	1、 实践操作（50分）； 2、 实训报告（40分）； 3、 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10分）。			
分组要求	独立操作。			
其它要求				

---

## 实训三 培养基的配制及灭菌技术

### 教学过程设计

#### 一、实训目的：

1. 掌握培养基配制的原理与方法；
2. 熟悉和掌握牛肉膏蛋白胨琼脂培养基的配制；
3. 了解高压蒸汽灭菌锅的构造与正确使用方法。

#### 二、实训材料：

高压蒸汽灭菌锅、电炉、烧杯、三角瓶（300ml）、试管、三角瓶塞、玻棒、牛皮纸、棉绳、长颈漏斗、勺子、牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、电子称、量筒、PH试纸等。

#### 三、实训步骤：

##### 1. 培养基的配制方法

称药品 → 加热溶解 → 调 PH → 过滤 → 分装 → 加棉塞 → 包扎 → 灭菌 → 摆斜面 → 无菌检查

##### 2. 培养基配制的方法与步骤

###### 2.1 培养基配方：

牛肉膏 3g，蛋白胨 10g，NaCl 5g，琼脂 15~20g，水 1000ml，pH 7.0~7.2。

###### 2.2. 配制步骤：

- ①称药品。按配方称取各成分，放入已加适量水的烧杯中。
- ②加热溶解。烧杯于石棉网上加热，并用玻棒搅拌，将琼脂加入已溶解药品中，继续加热并不断搅拌，最后补足水分。
- ③调 PH。若 PH 偏酸，用 1mol/L 的 NaOH 调；偏碱，用 1mol/L 的 HCl 调。PH 的调整通常放在加琼脂前。
- ④分装。将熬成的培养基趁热分装。培养基高度约为试管长度的 1/5~1/4，约 10~15ml，注意避免将培养基沾于试管口内外。分装后的试管，在培养基凝固前必须立放。
- ④制棉塞。用叠放式将未脱脂棉做成棉球，塞入试管口，管口内棉塞底部要

---

求光滑，棉塞侧面要求无褶皱，棉塞长度的 2/3 在管口内。棉塞的松紧以手提棉塞轻晃试管不滑出为度。

⑤捆把。包扎，贴上标签，准备灭菌。

3. 高压蒸汽灭菌锅的结构、工作原理与使用方法。

3.1 结构：实体认识。

包括锅体、压力表、安全阀、排气阀、灭菌锅腔、筛架、锅盖、胶垫圈、紧固螺栓等。

3.2 原理：利用高压产生的高蒸汽温度杀灭微生物的方法。

3.3 使用方法：装锅→加热排气→升压→保压灭菌→降压出锅

关键：排净冷空气

注意：灭菌时间和压力因培养基而异。

升降压力要稳

灭菌时间从保压时算起

压力降至“0”才能开盖

4. 培养基的灭菌

加水→培养基入锅→上盖→对称、均匀地扭紧螺栓→加热升温→冒热气

3-5min，以排冷空气→关闭排气阀，继续升温，压力升至 1 kg/cm<sup>2</sup>，温度过到 121℃时，开始稳压 25~30min→熄火，自然降压至压力为 0（若降压太快，试管中的培养基易沸腾浸湿棉塞）→锅盖半开，让锅内多余蒸汽逸出，锅内的余热烘干棉塞→开盖，取物→摆斜面→斜面试管上可覆盖洁净和厚毛巾或几层纱布，防止试管内产生过多的冷凝水。

5. 无菌检验

制作斜面培养基，室温或 37℃培养 48 小时，观察培养结果。

四、记录与总结（本次实训结果记录、实训完成情况、实训过程中出现问题、自我解决问题的记录、所吸取经验、心得体会及建议等）

五、作业

1、如何检验培养基灭菌是否彻底？

2、高压蒸汽灭菌时，为什么要排尽锅内的冷空气？

## 实训四 微生物的接种和分离技术

### 教学设计

项目名称	微生物的接种和分离技术		项目编号	4
隶属课程	微生物检验			
教学目标	1. 掌握培养基配制的原理与方法； 2. 熟悉和掌握牛肉膏蛋白胨培养基培养基的配制； 3. 了解高压蒸汽灭菌锅的构造与正确使用方法。			
思政目标	树立科学世界观和科技服务生活的意识。			
教学课时	3 学时			
教学设计	教学重点	教学难点与要求	教学方法	备注
	无菌操作	掌握无菌操作的基本概念和技能	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	斜面接种	掌握微生物的斜面接种操作	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	接种环境消毒	掌握接种环境的消毒方法	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	超净工作台的使用	掌握超净工作台的使用方法	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。		课后完成
考核方法	实践考核。			
考核标准	1、 实践操作（50分）； 2、 实训报告（40分）； 3、 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10分）。			
分组要求	独立操作。			
其它要求				

---

## 实训四 微生物的接种和分离技术

### 教学过程设计

#### 一、实训目的：

1. 帮助学生建立无菌操作概念
2. 学习、掌握无菌操作技术
3. 学习、掌握微生物的斜面接种和分离技术

#### 二、实训材料：

无菌试管培养基，超净工作台，酒精灯，接种环，酒精棉球、酵母菌、枯草杆菌、大肠杆菌等。

#### 三、实训步骤：

##### 1. 无菌操作

将微生物分离、转接及培养时防止被其他微生物污染的技术称为无菌技术。

##### 2. 无菌操作技术要点

接种空间一定要彻底的消毒灭菌；

菌中所暴露或通过的空间必须是无菌区；

菌种管口、瓶口的部分必须用酒精灯火焰封闭；

各种接种工具在和菌种接触前应该经火焰灼烧灭菌，冷却后再接触菌种，以免烫死或烫伤菌种；

棉塞塞入管口或瓶口的部分，拔出后不要与未经灭菌的物体接触；

每次接种的时间不宜过长，以免空气中杂菌的基数积累太多，影响转管、接种效果；

操作人员应换消毒的工作服、戴口罩，双手要用 70-75%的酒精消毒；

不戴口罩操作时应尽量少说话；

整个操作过程中，动作必须准确迅速无误，时时刻刻树立无菌观念。

##### 3. 斜面接种技术

###### 3.1 接种前的准备

1) 检查接种工具，进行环境消毒；

2) 在欲接种的培养基试管或平板上贴好标签，标上接种的菌名、操作者、接种日期等。

3) 将培养基、接种工具和其他用品全部放在实验台上摆好，进行环境消毒。

---

### 3.2 接种方法

1) 将菌种试管与待接种的试管培养基依次排列，挟于左手的拇指与其他四指之间，用右手的无名指与小指和手掌边拔出棉塞并挟住。

2) 置试管口于酒精火焰附近。

3) 将接种工具垂直插入酒精火焰中烧红，再横过火焰 3 次，然后再放入有菌试管内，在管壁上停留片刻待其冷却。

4) 取少许菌种置于另一支试管中，用接种环在菌种中沾取少量菌样，在培养基斜面上作“之”字形划线，把菌种接种到新的培养基上。

5) 取出接种工具，试管口和棉塞进行火焰灭菌。

6) 重新塞上棉塞。

7) 烧死接种工具上的残余菌，把试管和接种工具放回原处。

注意：划线过程不能划破培养基表面。

### 4. 培养

斜面接种后于 37℃ 恒温培养 48h，观察。

## 四、作业

1、为什么从事微生物实验工作的基本要求是无菌操作？

## 实训五 平板培养基的制作与划线分离和涂布接种技术

### 教学设计

项目名称	平板培养基的制作与划线分离和涂布接种技术		项目编号	5
隶属课程	微生物检验			
教学目标	1.帮助学生进一步建立无菌操作概念 2.学习、掌握平板培养基的制作技术 3.学习、掌握微生物的平板划线分离技术 4.学习、掌握微生物的平板涂布接种技术			
思政目标	培养工匠精神的工作作风			
教学课时	3 学时			
教学设计	教学重点	教学难点与要求	教学方法	备注
	平板培养基制作技术	无菌操作 厚度适宜、厚薄均匀	教师讲授并示范， 学生实践操作。	
	涂布接种技术	涂布均匀 不涂破培养基面	教师讲授并示范， 学生实践操作。	
	划线分离技术	划线均匀 不划破培养基面	教师讲授并示范， 学生实践操作。	
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。		课后完成
考核方法	实践考核。			
考核标准	1、 实践操作（50分）； 2、 实训报告（40分）； 3、 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10分）。			
分组要求	独立操作。			
其它要求				

---

## 实训五 平板培养基的制作与划线分离和涂布接种技术

### 教学过程设计

#### 一、实训目的：

1. 帮助学生进一步建立无菌操作概念
2. 学习、掌握平板培养基的制作技术
3. 学习、掌握微生物的平板划线分离技术
4. 学习、掌握微生物的平板涂布接种技术

#### 二、实训材料：

无菌牛肉膏蛋白胨培养基，无菌培养皿、三角瓶，玻璃珠，滴管，超净工作台，酒精灯，接种环，无菌涂布棒、酒精棉球、枯草杆菌，记号笔，标签纸等。

#### 三、实训步骤：

##### 1. 平板培养基的制作

###### 1.1 对工作台面进行全面消毒

1.2 在火焰区内将约 50℃ 的融化培养基倒向无菌培养皿，每皿约倒 15-20ml 培养基。

###### 1.3 将已倒入培养基培养皿水平摊放，待冷却凝固。

##### 2. 涂布接种

###### 2.1 将菌种或样品进行适当稀释。

2.2 用无菌滴管或取液器，取少量菌种液或样品液，并滴一滴于平板上。

2.3 用灭菌涂布棒将平板上的菌种液或样品液涂抹均匀。

2.4 将用过的涂布棒灼烧灭菌。

2.5 将涂布好的平板平放 20-30min，然后倒置保温培养。

##### 3. 划线分离技术

3.1 在无菌条件下，将菌种或样品进行适当稀释。

3.2 用接种环取一环样品或菌种。

3.3 在近火焰处，左手拿平板并稍抬皿盖，右手将取有样品或菌种的接种环伸入皿内，在培养基表面轻轻划线。

---

3.4 划线完毕后，用火焰快速灼烧皿盖打开处，并盖回。将接种环灼烧灭菌。

3.5 将划好线的平板平放 20-30min，然后倒置保温培养。

、记录与总结（本次实训结果记录、实训完成情况、实训过程中出现问题、自我解决问题的记录、所吸取经验、心得体会及建议等）

## 五、作业

1. 平板培养基制作过程就注意哪些方面？
2. 涂布接种时应注意什么？
3. 划线分离时应注意什么？

## 实训六 微生物的平板菌落计数法

### 教学设计

项目名称	微生物的平板菌落计数法		项目编号	6	
隶属课程	微生物检验				
教学目标	1. 了解平板菌落计数的原理 2. 掌握样品稀释液的制备方法 3. 掌握涂布平板培养法和倾注平板培养法的操作技术 4. 掌握菌落计数的原则 5. 掌握总菌落的计算方法				
思政目标	培养规范、严谨、求真、务实的科学态度。				
教学课时	3 学时				
教学设计	教学重点	教学难点与要求		教学方法	备注
	样品稀释操作	无菌操作 10 倍系列梯度稀释		教师讲授并示范， 学生实践操作。	
	倾注平板制作	加菌液时培养基温度在 50℃ 左右 菌液与培养基混合应均匀		教师讲授并示范， 学生实践操作。	
	菌落的计数	菌落特征的认识 单菌落的识别与计数 菌落与菌苔的区别 菌落数的统计方法与公式		教师讲授并示范， 学生实践操作。	
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。			课后完成
考核方法	实践考核。				
考核标准	1、 实践操作（50 分）； 2、 实训报告（40 分）； 3、 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10 分）。				
分组要求	分组操作。 单独计数。				
其它要求					

---

## 实训六 微生物的平板菌落计数法

### 教学过程设计

#### 一、实训目的：

1. 了解平板菌落计数的原理
2. 掌握样品稀释液的制备方法
3. 掌握涂布平板培养法和倾注平板培养法的操作技术
4. 掌握菌落计数的原则
5. 掌握总菌落的计算方法

#### 二、实训材料：

无菌牛肉膏蛋白胨培养基，无菌培养皿、三角瓶，无菌水，无菌试管、玻璃珠，滴管，超净工作台，酒精灯，无菌涂布棒、酒精棉球、枯草杆菌（菌悬液），记号笔，标签纸等。

#### 三、实训步骤：

##### 1. 样品稀释液的制备

于试管中制备枯草杆菌的 10 倍系列梯度稀释液，可制至  $10^{-9}$  浓度，具体应根据样品而定。注意避免吸取菌液时的交叉感染。

##### 2. 平板接种培养法

###### 2.1 涂布平板接种法

将已熔化并冷却至  $45-50^{\circ}\text{C}$  的培养基倒入培养皿中，静置凝固，后编号；

用无菌吸管吸取 0.1ml 菌液滴在相应编号的平板培养基面上，用无菌涂布棒（刮铲）将菌液在平板上涂抹均匀。注意每个浓度用一个涂布棒。

涂布好的平板平放静置 10-20min，使菌液渗透入培养基内，后将平板倒转， $37^{\circ}\text{C}$  保温培养，至长出菌落后即可计数。

###### 2.2 倾注平板培养法

对无菌平板编号，向相应的平板吸入 1ml 的稀释菌液，再向其倒入约  $50^{\circ}\text{C}$  的熔化培养基，轻转动平板，混均菌液和培养基，静置凝固， $37^{\circ}\text{C}$  倒置培养，至长出菌落后即可计数。

---

### 3. 计数（计数方法见 P63）

当菌落形成时即可计数。计算每个平板上的菌落数，求出同稀释度的各平板平均菌落数，现乘以稀释倍数，算出原始样品中的菌落数。完成课本 P113 的表 8-2。

统计公式：

倾注平板培养法：每 ml 样品的菌数=同一稀释度几次重复的菌落平均数×稀释倍数

涂布平板培养法：每 ml 样品的菌数=同一稀释度几次重复的菌落平均数×10×稀释倍数

合适的稀释度有如下标准：

(1) 同一稀释度各个重复的菌数相差不太悬殊。

(2) 细菌、放线菌和酵母菌以每皿 30-300 个菌落为宜，霉菌以每皿 10-100 个菌落为宜。

四、记录与总结（本次实训结果记录、实训完成情况、实训过程中出现问题、自我解决问题的记录、所吸取经验、心得体会及建议等）

### 五、作业

1. 平板菌落计数法的原理是什么？

2. 平板菌落计数法与显微镜直接计数法相比，各有何优缺点？

# 实训七 细菌涂片制作及革兰染色技术

## 教学设计

项目名称	细菌涂片制作及革兰染色技术	项目编号	7
隶属课程	微生物学检验		
教学目标	1.掌握微生物涂片基本技术 2.掌握微生物的染色基本技术 3.掌握微生物的革兰氏染色技术 4.初步认识细菌的形态特征		
思政目标	培养细心、谨慎、规范、专业的科学思维。		
教学课时	3 学时		
教学设计	教学重点	教学难点与要求	教学方法
	细菌的涂片技术	菌液涂散应尽可能的薄。 涂片完毕后，取种器应经火焰灭菌。 固定时，加热程度以玻片不烫手为宜。	教师讲授并示范， 向学生强调注意事项，由学生具体操作
	革兰氏染色的原理	细菌细胞常带有电荷，可与相关酸碱性染料结合而使细菌着色，易于观察；细胞壁的化学组成及结构不同而产生不同的染色结果。	教师讲授
	实验数据的记录及结果处理，实训总结	规范操作、真实记录。	对学生操作过程中出现的不规范操作进行强调并纠正
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。	课后完成
考核方法	过程考核：操作（80分）+ 报告（20分）		
考核标准	1、细菌的革兰氏染色（70分）； 2、实训报告（20分）； 3、实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10分）。		
分组要求	独立完成		
场地要求	微生物室		
设备仪器	接种针、显微镜、酒精灯、载玻片		

---

## 实训七 细菌涂片制作及革兰染色技术

### 教学过程设计

#### 一、实训目的：

1. 掌握微生物涂片基本技术
2. 掌握微生物的染色基本技术
3. 掌握微生物的革兰氏染色技术
4. 初步认识细菌的形态特征

#### 二、实训材料：

培养 24 小时左右的大肠杆菌（G<sup>-</sup>）和培养 12 小时左右枯草杆菌（G<sup>+</sup>）、革兰氏染色试剂、香柏油、二甲苯、显微镜、载玻片、盖玻片、吸水纸、擦镜纸、接种环、酒精灯等。

#### 三、实训步骤：

##### 1. 细菌的革兰氏染色原理

1.1 细菌细胞常带有电荷，可与相关酸碱性染料结合而使细菌着色，易于观察。

1.2 在革兰氏染色中，由于细菌细胞壁的化学组成及结构不同而产生不同的染色结果。

①革兰氏阳性细菌：细胞壁较厚、肽聚糖含量较高和其分子交联度较紧密，用乙醇洗脱时，肽聚糖网孔会因脱水而明显收缩，加上它基本不含类脂，故经乙醇处理不能在壁上溶出缝隙，因此，结晶紫与碘复合物仍牢牢阻留在细胞壁内，使其呈现紫色。

②革兰氏阴性细菌：壁薄、肽聚糖含量低和交联松散，故遇乙醇后，肽聚糖网孔不易收缩，加上它类脂含量高，所以当乙醇把类脂溶解后，细胞壁上出现较大缝隙，复合物容易溶出细胞壁，因此经乙醇脱色后，细胞又成无色。再用红色染料进行复染，革兰氏阴性细菌获得一层新的颜色—红色。

##### 2. 细胞的涂片技术

在玻片中央滴一滴清水，取一环菌体，轻涂于滴水中，并涂散成适当大小的薄层，用火焰进行干燥和固定。

---

### 3. 革兰氏染色的方法与步骤

#### 3.1 简单涂片染色法

涂片 → 干燥 → 固定 → 染色 → 水洗 → 干燥 → 镜检观察

1) 涂片。取清洁干净载玻片一块，于中央加一滴蒸馏水，按无菌操作接种环取一环菌物，然后在水滴中均匀地涂成薄涂片。涂布后须将接种环烧灼灭菌。

2) 干燥。涂片放室温自然干燥；也可将标本面向上，在离火焰约 15 cm 高处微微加热烘干，切勿靠近火焰；或用电风吹干。

3) 固定。手执玻片一端，让涂菌的一面朝上，通过火焰 2-3 次（以不烫手为宜）。

4) 染色。将玻片平放于台面上，滴加 1 滴或 2 滴染液于涂片上（以染液刚好覆盖涂片薄膜为宜），1-2 分钟。

5) 水洗。倾去染液，用蒸馏水从载玻片的一端轻轻进行冲洗，直到从涂片上流下的水无色为止。水洗时，不要让水流直接冲洗涂面，水流不宜过急、过大，以免涂片薄膜脱落。

6) 干燥。自然干燥。

7) 镜检。将涂片置于显微镜下进行形态观察。

#### 3.2 革兰氏染色法

涂片 → 干燥 → 固定 → 初染 → 媒染 → 脱色 → 复染 → 镜检观察

1) 涂片。同简单涂片染色法。

2) 干燥。同简单涂片染色法。

3) 固定。同简单涂片染色法。

4) 初染。将玻片平放于台面，加适量的结晶紫染色液，染色 1min。

5) 水洗。倾去染色液，用水冲洗，直到从涂片上流下的水无色为止。

6) 媒染。滴加碘液，染色 1 min。

7) 水洗。倾去染色液，用水冲洗。

8) 脱色。将玻片倾斜，连续滴加 95%乙醇脱色 20-30S, 至流出液无色，立即水洗。

9) 水洗。用水冲洗。

10) 复染。滴加蕃红复染 5min。

---

11) 水洗。倾去染色液，用水冲洗。

12) 干燥。自然风干。

13) 镜检。将涂片置于显微镜下进行形态观察。

14) 实验完毕后的处理

先用擦镜纸将浸过油的油镜头上的油擦去，再用擦镜纸蘸少许无水乙醇将镜头擦 2-3 次，再用干净的擦镜纸擦 2-3 次。

观察后的染色玻片用无水乙醇将油擦干净。

#### 4. 注意事项

4.1 革兰氏染色成败的关键是酒精脱色。如脱色过度，革兰阳性菌可被脱色而染成阴性菌；如脱色时间过短，革兰阴性菌会被染成革兰阳性菌。脱色时间的长短还受涂片厚薄及乙醇用量多少等因素的影响，难以严格规定。

4.2 染色过程中勿使染色液干涸。用水冲洗后，应吸去玻片上的残水，以免染色液被稀释而影响染色效果。

4.3 选用幼龄细菌。若菌龄太老，由于菌体死亡或自溶常革兰阳性菌转呈阴性反应。

四、记录与总结（本次实训结果记录、实训完成情况、实训过程中出现问题、自我解决问题的记录、所吸取经验、心得体会及建议等）

#### 五、作业

1. 做革兰氏染色涂片时为什么不能过于浓厚？其染色成败的关键一步是什么？

## 实训八 生活饮用水中细菌总数的测定

### 教学设计

项目名称	生活饮用水中细菌总数的测定	项目编号	8
隶属课程	微生物学检验		
教学目标	1. 了解和学习水中细菌总数的测定原理和意义 2. 进一步掌握平板培养的制作方法 3. 掌握用稀释平板计数法测定水中细菌总数的方法		
思政目标	培养科学严谨、实事求是的工作作风。		
教学课时	3 学时		
教学设计	教学重点	教学难点与要求	教学方法
	样品的取样和处理	无菌操作 10 倍系列梯度稀释	教师讲授并示范， 学生具体操作
	倾注培养基的制作	加菌液时培养基温度在 50℃ 左右 菌液与培养基混合应均匀	教师讲授并示范， 学生具体操作
	菌落的计数	菌落特征的认识 单菌落的识别与计数 菌落与菌苔的区别 菌落数的统计方法与公式	教师讲授并示范， 学生具体操作
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、 清晰。	课后完成
考核方法	过程考核：操作（80 分）+ 报告（20 分）		
考核标准	1、 实践操作（50 分）； 2、 实训报告（40 分）； 3、 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10 分）。		
分组要求	独立完成		
场地要求	微生物室		
设备仪器	超净工作台、酒精灯等		

---

## 实训八 生活饮用水中细菌总数的测定

### 教学过程设计

#### 一、实训目的：

1. 了解和学习水中细菌总数的测定原理和意义
2. 进一步掌握倾注平板培养的技术
3. 掌握用稀释平板计数法测定水中细菌总数的方法

#### 二、实训材料：

超净工作台、无菌三角瓶、1mL 无菌吸管、10mL 无菌吸管、无菌试管、无菌水、酒精灯、标签纸、培养皿、75%酒精棉球、牛肉膏蛋白胨琼脂培养基等。

#### 三、实训步骤：P209

生活饮用水国标（GB5749-2006）规定 1mL 水中的细菌总数不得超过 100 个。

##### 1. 水样的采集

采集对象：自来水和地面水源水。

无菌采集 P209。

##### 2. 水样的稀释

根据水样受有机物或粪便污染的程度，作相应的 10 倍系列稀释菌液。

##### 3. 倾注平板接种

吸取 1mL 菌液注入无菌培养皿中，再向其中倾注入 20mL 熔化的 45℃左右的培养基，混均，静置凝固，设 3 个重复，同时设对照实验。

##### 4. 培养

37℃恒温倒置培养 24 小时。

##### 5. 菌落计数

计数每个培养皿的菌落数，取其平均值。

若培养皿中有较大的菌苔形成，且面积超过一半，则剔除该培养皿的菌落数；若菌苔面积不到培养皿的一半，且其余一半的菌落分布均匀，则计数半个培养皿的菌落数，乘以 2 以代表整个平皿菌落数。

## 6. 计算方法

稀释度												
菌落数	1	2	3	平均	1	2	3	平均	1	2	3	平均
1ml 样品活菌数												

四、记录与总结（本次实训结果记录、实训完成情况、实训过程中出现问题、自我解决问题的记录、所吸取经验、心得体会及建议等）

## 五、作业

1. 如何确保对自来水和地面水源水取样的科学性？（张青-微生物学，P262）

## 实训九 \_\_\_\_\_空气中细菌数量的测定 教学设计

项目名称	_____空气中细菌数量的测定		项目编号	9
隶属课程	微生物学检验			
教学目标	1. 了解和学习空气中细菌总数的测定原理和意义 2. 进一步掌握平板培养的制作方法 3. 掌握用沉降法测定空气中细菌总数的方法			
思政目标	培养严谨的科研思维			
教学课时	3 学时			
教学设计	教学重点	教学难点与要求		教学方法
	无菌操作	无菌操作概念和操作要求		教师讲授并示范， 学生具体操作
	沉降法	沉降法操作与应用		教师讲授并示范， 学生具体操作
	平板培养基制备	无菌操作		教师讲授并示范， 学生具体操作
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。		课后完成
考核方法	过程考核：操作（80分）+ 报告（20分）			
考核标准	1、 实践操作（50分）； 2、 实训报告（40分）； 3、 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10分）。			
分组要求	独立完成			
场地要求	微生物室			
设备仪器	超净工作台、酒精灯等			

---

## 实训九 \_\_\_\_\_空气中细菌数量的测定

### 教学过程设计

#### 一、实训目的：

1. 掌握沉降法检测空气中微生物的方法
2. 能够计算空气中的微生物数量
3. 能够根据试验结果分析空气质量

#### 二、实训材料：

无菌牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、超净工作台、无菌三角瓶、1mL 无菌吸管、10ml 无菌吸管、无菌试管、无菌水、酒精灯、标签纸、无菌培养皿、5L 蒸馏水瓶、具 50ml 无菌水的三角瓶等。

#### 三、实训步骤：P210

##### 1 制作平板培养基

注意无菌操作。

##### 2 暴露取样

在指定的地点取三种平板培养基打开皿盖，在空气中暴露 5min，合上皿盖。

##### 3 培养

倒置 30℃ 恒温培养。细菌培养 48 小时，真菌和放线菌培养 4-6 天。

##### 4 观察计数

计数平板上的菌落，观察各种菌落的形态、大小、颜色等特征。

##### 5 计算 1m<sup>3</sup> 空气中细菌数量

根据奥氏公式计算 1m<sup>3</sup> 空气中微生物数量。

$$C=1000/10 \div (t/5 \times A/100)N=50000N/At$$

C: 1m<sup>3</sup> 空气所含菌数，(个) 菌/m<sup>3</sup>；

N: 平板上的菌落数；

A: 平板面积 (cm)<sup>2</sup>；

t: 时间 (min)；

##### 6 数据记录

---

	培养皿			
菌落数	1	2	3	4
细菌数 ((个) 菌/m <sup>3</sup> )				

## 实训十 大肠菌群的初步检验（乳糖胆盐培养基发酵试验）

### 教学设计

项目名称	大肠菌群的初步检验（乳糖胆盐培养基发酵试验）	项目编号	10
隶属课程	微生物学检验		
教学目标	1. 了解和掌握大肠杆菌的检验原理和方法 2. 掌握乳糖胆盐培养基发酵培养技术		
思政目标	培养爱护环境、爱护卫生的意识。		
教学课时	3 学时		
教学设计	教学重点	教学难点与要求	教学方法
	大肠杆菌的检验原理和方法	大肠杆菌的检验原理和常用方法	教师讲授并示范，学生具体操作
	乳糖胆盐培养基	培养基组成及功能	教师讲授并示范，学生具体操作
	乳糖胆盐培养技术	乳糖胆盐培养技术的操作	教师讲授并示范，学生具体操作
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。	课后完成
考核方法	过程考核：操作（80分）+ 报告（20分）		
考核标准	1、 实践操作（50分）； 2、 实训报告（40分）； 3、 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10分）。		
分组要求	独立完成		
场地要求	微生物室		
设备仪器	超净工作台、酒精灯等		

---

## 实训十 大肠菌群的初步检验（乳糖胆盐培养基发酵试验）

### 教学过程设计

#### 一、实训目的

1. 能熟悉样品中大肠菌群的检测程序及操作要点
2. 能进行大肠菌群发酵产酸产气的生物学特性鉴定

#### 二、实训原理

在乳糖胆盐发酵培养基中，大肠杆菌能产酸和产气。

在乳糖胆盐发酵培养基中，大肠杆菌能利用乳糖产酸，使培养基从紫色变为黄色；大肠杆菌产气，能使培养液内倒置杜氏小管顶部有气体，或液面有小泡，或试管壁上有小气泡。

#### 三、实训材料

无菌乳糖胆盐发酵管、大肠杆菌（无毒素型）、超净工作台、接种环、试管、1mL 无菌吸管、10ml 无菌吸管、无菌水、酒精灯、标签纸、培养箱等。

#### 四、实训步骤

大肠杆菌：指一群能发酵乳糖、产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。

##### 1. 阳性发酵管的制作

用接种环取一环大肠杆菌菌种，接种于乳糖胆盐发酵管中。

##### 2. 阴性发酵管的制作

用接种环取一环枯草芽孢杆菌菌种，接种于乳糖胆盐发酵管中。

##### 3. 空白发酵管制作

取无菌乳糖胆盐发酵管向作为空白组。

##### 4. 培养

于 37℃ 培养 24 小时。

##### 5. 观察

- (1) 如乳糖胆盐发酵管都不产气，则可报告为大肠杆菌阴性，记录。
- (2) 如乳糖胆盐发酵管产酸产气，初步报告为大肠杆菌阳性，记录。

## 实训十一 大肠菌群的进一步检验（伊红美蓝平板试验）

### 教学设计

项目名称	大肠菌群的初步检验（伊红美蓝平板试验）	项目编号	11
隶属课程	微生物学检验		
教学目标	1. 了解和掌握大肠杆菌的检验原理和方法 2. 掌握伊红美蓝平板培养技术		
思政目标	培养勇攀技能高峰、探索求真的科学精神。		
教学课时	3 学时		
教学设计	教学重点	教学难点与要求	教学方法
	大肠杆菌的检验原理和方法	大肠杆菌的检验原理和常用方法	教师讲授
	伊红美蓝鉴定试验	原理，培养组份及功能，培养物生物学特性	教师讲授
	伊红美蓝鉴定试验技术	技术操作	教师讲授并示范，学生具体操作
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。	课后完成
考核方法	过程考核：操作（80分）+ 报告（20分）		
考核标准	1、 实践操作（50分）； 2、 实训报告（40分）； 3、 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10分）。		
分组要求	独立完成		
场地要求	微生物室		
设备仪器	超净工作台、酒精灯等		

---

## 实训十一 大肠菌群的进一步检验（伊红美蓝平板试验）

### 教学过程设计

#### 一、实训目的：

1. 能熟悉样品中大肠菌群的检测程序及操作要点
2. 能进行大肠菌群在伊红美蓝培养基上的生物学特性鉴定

#### 二、实训材料：

无菌伊红美蓝平板培养基、大肠杆菌（无毒素型）、超净工作台、接种环、涂布棒、试管、1mL 无菌吸管、10ml 无菌吸管、无菌水、酒精灯、标签纸、培养箱等。

#### 三、实训步骤：

将经乳糖胆盐发酵试验中产气的发酵管转接种（划线或涂布）到伊红美蓝平板培养基上，37℃培养 18-24 小时。

观察菌落形态。在伊红美蓝平板培养基上，大肠杆菌菌落一般呈深紫黑色，带金属光泽；紫黑色，略有或无金属光泽；淡紫黑色，中心颜色较深；粉紫色，中心颜色较深。

四、记录与总结（本次实训结果记录、实训完成情况、实训过程中出现问题、自我解决问题的记录、所吸取经验、心得体会及建议等）

#### 五、思考题：

1. 伊红美蓝培养基是鉴别培养基，简述其鉴别原理。

## 实训十二 化妆品中霉菌和酵母菌的检验 教学设计

项目名称	化妆品中霉菌和酵母菌的检验		项目编号	12
隶属课程	化妆品微生物与检验技术			
教学目的	1. 进一步建立无菌操作概念 2. 巩固和掌握无菌操作技术 3. 掌握化妆品中霉菌和酵母菌的检验技术			
思政目标	培养实事求是、认真负责的工作作风。			
教学学时	3 学时			
教学设计	技能点	训练要求与标准		训练方法
	检验原理	在含有孟加拉红（虎红）和氯霉素的培养基中，样品中的细菌被抑制，霉菌和酵母菌能正常生长。		教师讲授
	样品的稀释	训练在无菌条件下利用玻璃吸管稀释样品至一系列浓度的方法		教师讲授并示范，学生实践操作
	倾注法	掌握在无菌条件下进行样品与培养基倾注混匀的方法		教师讲授并示范，学生实践操作
	菌落总数的计算方法	掌握菌落总数的计数原则(P163)，计算 1g 或 1ml 化妆品中所污染的活的霉菌和酵母菌的数量。		教师讲授，学生根据实验结果编制实训报告
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。		
考核方法	实践考核			
考核标准	1、实践操作（50 分）； 2、实训报告（40 分）； 3、实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10 分）。			
分组要求	分组实验			
场地要求	微生物室			
设备仪器	酒精灯、灭菌培养基和培养皿，超净工作台			

---

## 实训十二 化妆品中霉菌和酵母菌的检验

### 教学过程设计

#### 一、实训目的：

1. 进一步建立无菌操作概念
2. 巩固和掌握无菌操作技术
3. 掌握化妆品中霉菌和酵母菌的检验技术

#### 二、实训材料：

无菌虎红（孟加拉红）培养基、无菌培养皿、超净工作台、霉菌菌种（青霉）、酵母菌、无菌三角瓶、1mL 无菌吸管、10mL 无菌吸管、无菌试管、无菌水、酒精灯、标签纸、培养皿等。

#### 三、实训步骤：

##### 1. 样品稀释

用 1ml 无菌移液管从样品中吸取 1ml，吹入 9ml 无菌水中，吹吸二次，使溶液充分混匀，制成浓度为  $10^{-1}$  的溶液；反复重复此操作，制成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$  两个浓度的溶液。

##### 2. 阳性样品制作

取各一环霉菌和酵母菌，充分混匀于 10ml 无菌水中制成原液，再分别稀释成 10 倍液。

##### 3. 空白平板制作（倾注倒平板）

在酒精灯附近向每个平板倒入约 20ml 培养基，平板待凝固。

##### 4. 阳性对照平板制作

分别从阳性样品原液、 $10^{-1}$  二个浓度的试管中各吸取 1ml 溶液吹入无菌培养皿中，各 1 个平板，迅速倒入已溶解并冷却至  $46^{\circ}\text{C}$  左右的培养基中，每个平板倒入约 20ml 培养基，进行混匀，以上各步骤均需在酒精灯附近进行无菌操作。

##### 5. 检验样品平板的制作倾注倒平板

分别从样品原液、 $10^{-1}$ 、 $10^{-1}$  三个浓度的试管中各吸取 1ml 溶液吹入无菌培养皿中，各 1 个平板，迅速倒入已溶解并冷却至  $46^{\circ}\text{C}$  左右的培养基中，每个平板倒入约 20ml 培养基，进行混匀，以上各步骤均需在酒精灯附近进行无菌操作。

## 6. 培养

所有平板倒置于 28℃，培养 72 小时左右，取出计数，并计算菌落总数。

## 7. 培养结果

虎红（孟加拉红）培养基是用于检测霉菌和酵母菌总数的一种培养基，因其中含有氯霉素，可抑制大部分细菌，但不抑制真菌。

7.1 霉菌在虎红平板上的菌落形态具有放射状或树枝状的菌丝是菌落特征。初形成时多无色透明，有明显的折光性，在较暗背景下，以透射光观察易于识别。少数生长在琼脂表面的菌落，起初时似如一小块水迹，需借助暗反射光才能看清。形成孢子的菌落多数有各种颜色，是鉴定的特征之一。

7.2 在虎红琼脂板上，酵母菌多数为圆形凸起，边缘整齐，表面光滑湿润，呈不透明乳脂状，乳白色或粉红色，少数表面粗糙或皱褶。有的菌落周边呈细分枝状，位于琼脂内的菌落可呈铁饼形、三角形及多角形。

## 8. 计算化妆品中霉菌和酵母菌含量（CFU/g (mL)）

### 8.1 计算方法

先点数每个平板上生长的霉菌和酵母菌菌落数，求出每个稀释度的平均菌落数，乘以稀释倍数后，即为每 g (或 mL) 检测样品中所含的霉菌和酵母菌数。

8.2 每 g (或 mL) 化妆品中霉菌和酵母菌数以 CFU/g (可 mL) 表示。

霉菌检测结果记录表

	CK			霉菌原液			霉菌 10 <sup>-1</sup>			样品原液			样品 10 <sup>-1</sup>			样品 10 <sup>-2</sup>		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
菌落数																		
平均菌落数																		
菌落总数 (CFU/g 或 CFU/mL)																		

酵母菌检测结果记录表

	CK			酵母菌原液			酵母菌 $10^{-1}$			样品原液			样品 $10^{-1}$			样品 $10^{-2}$		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
菌落数																		
平均菌落数																		
菌落总数 (CFU/g 或 CFU/mL)																		

四、记录与总结（本次实训结果记录、实训完成情况、实训过程中出现问题、自我解决问题的记录、所吸取经验、心得体会及建议等）

五、思考题：

1. 根据培养结果，计算出每 g 或 ml 样品中所含的霉菌和酵母菌数。