生物化学考试大纲

一、考试总体要求

生物化学重点讲述了生物体内糖类、脂类、蛋白质、核酸和酶的组成、结构和功能，以及这些生物大分子的生物合成与降解代谢、能量代谢、基因信息传递等知识。

通过本课程的教学，使学生掌握生物化学的基本原理、基础知识和基本技能，培养学生分析和解决一些简单的生化实际问题的能力，为今后学习其它专业基础课和专业课奠定基础。

二、考试形式和试卷结构

答卷方式：闭卷，笔试

答题时间：100 分钟

题型比例：名词解释约 15％；填空和选择题约 45％；判断约 10%；简答和计算约 30％

三、考查的知识范围

（一）蛋白质的结构及功能

1、蛋白质的化学组成

2、氨基酸及蛋白质的理化性质：包括蛋白质的两性解离和等电点、蛋白质分子的大小、紫外吸收和胶体性质、蛋白质的沉淀作用、蛋白质的变性作用、蛋白质的颜色反应等

3、肽的结构、性质

4、蛋白质分子结构：一级、二级、高级结构的概念及形式，包括超二级结构、结构域等

5、蛋白质的高级结构：蛋白质的二级结构（二级结构的基本类型、超二级结构）；三级结构和四级结构等

6、蛋白质结构与功能的关系:包括一级结构和高级结构与功能的关系，如血红蛋白分子病的机理。

（二）核酸的结构和功能

1、核酸的基本化学组成、种类

2、核苷酸的结构——组成、碱基分子式、稀有碱基等

3、RNA 的分子结构

包括 RNA 一级结构、高级结构，如 tRNA 的二、三级结构，真核生物 mRNA 结构特点。

4、RNA 的分类及各类 RNA 的生物学功能。

5、DNA 的分子结构：DNA 的一、二、三级结构的概念和结构特点；双螺旋结构模型。

6、核酸及核苷酸的性质:包括溶解性、紫外吸收、核酸及其组分的两性性质.

7、核酸的变性、复性与杂交

（三）糖化学

1、单糖的分子结构、单糖的理化性质、重要的单糖

2、双糖的构成、还原性和非还原性

3、淀粉的分布及作用、淀粉分子的结构（直链淀粉、支链淀粉）、淀粉的理化性质

（四）脂质和生物膜

1、简单脂、甘油脂类：结构、脂肪酸共同特点、甘油的理化特性和应用、甘油三酰酯的物理性质、化学性质（水解和皂化、氢化和卤化、氧化、酸败、乙酰化）]、蜡的构成

2、复合脂类：磷脂(甘油醇磷脂、鞘氨醇磷脂)、糖脂(脑苷脂、神经节苷脂)、脂蛋白（核蛋白类、磷蛋白类、单纯蛋白类）

3、生物膜的化学组成（脂质、膜蛋白、糖类)、生物膜的流动性。

（五）酶学

1、酶和生物催化剂的概念

2、酶的作用特点

3、酶的化学本质及组成

4、酶的分子结构与其生物活性的关系：包括酶分子的必需基团、活性中心、酶原的激活与调节等

5、酶促反应动力学

包括米氏方程、米氏常数、双倒数作图法、抑制剂对酶反应的影响等；酶的抑制作用；酶反应的影响因素等

6、酶的调节：别构调节和共价修饰调节；

（六）维生素与辅酶

1、维生素的分类及性质

包括维生素的概念、与辅酶的关系、脂溶性维生素和水溶性维生素（维生素 B2 与 FMN、FAD、泛酸、叶酸、生物素、维生素 B6、维生素 B 族与辅酶等）

2、各种维生素的活性形式、生理功能

包括水溶性维和脂溶性生素的结构特点、生理功能和缺乏病（维生素 A 在视觉中的作用、维生素 D 与固醇、维生素 C 与坏血病等）

（七）生物氧化

1、线粒体氧化体系

包括呼吸链的概念、呼吸链的组成成份、呼吸链中各组分的排列顺序等

2、生物氧化中能量的转移和利用

包括 ATP 与高能磷酸化合物的概念、电子传递过程与 ATP 的生成方式、氧化磷酸化偶联机制及其影响因素

（八）糖的分解代谢和合成代谢

1、糖的代谢途径，包括物质代谢、能量代谢和有关的酶

2、糖的无氧分解、有氧氧化的概念、部位和过程

3、磷酸戊糖途径、限速酶调控部位及其生理意义

4、糖异生作用的概念、场所、原料、主要途径及生理意义

5、糖原合成作用的概念、反应步骤及限速酶

6、糖酵解、丙酮酸的氧化脱羧和三羧酸循环的反应过程及催化反应的关键酶

7、蔗糖和淀粉的合成过程

（九）脂类代谢与合成

1、脂肪动员的概念、限速酶；

2、甘油代谢

3、脂肪酸的 β-氧化过程及其能量计算

4、酮体的生成和利用

5、脂肪和脂肪酸的生物合成

6、磷脂的合成与分解

7、胆固醇合成的部位、原料

（十）蛋白质和氨基酸代谢

1、氨基酸的脱氨基、脱羧基作用

2、尿素循环及 α-酮酸的代谢

（十一）核酸的降解和核苷酸代谢

1、嘌呤、嘧啶核苷酸的分解代谢与合成代谢的途径

2、核苷酸的生物合成：包括嘌呤、嘧啶核苷酸的从头合成途径，脱氧核苷酸的合成及 dTMP 的合成

（十二）DNA 的生物合成
1、DNA 复制的一般规律——半保留复制
2、参与 DNA 复制的酶类与蛋白质因子的种类和作用（重点是原核生物的 DNA 聚合酶）
3、原核、真核细胞 DNA 复制特点
（十三）RNA 的生物合成
转录的基本概念：参与转录的酶及有关因子（包括转录因子、终止因子等）
启动子与转录起始：包括启动子的基本结构、启动子的识别、酶与启动子的结合、增强子及其功能等
转录的终止，包括不依赖于 ρ 因子的终止、依赖于 ρ 因子的终止等
4、RNA 转录与 DNA 复制的比较
（十四）蛋白质的生物合成和转运
mRNA 在蛋白质生物合成中的作用、原理和密码子的概念、特点
tRNA、核糖体在蛋白质生物合成中的作用和原理
包括 tRNA 的结构、功能及种类，氨酰－tRNA 合成酶；核糖体的结构和功能等
蛋白质生物合成过程，包括氨基酸的活化，肽链的起始、延伸和终止等

备注：遗传信息传递部分即十二、十三、十四章节内容主要以学生了解形式进行授课，不作为考试重点。

四、参考书

理论课教材：《生物化学》（第五版），张丽萍主编，高等教育出版社，2015 年。

食品工艺学考试大纲

一、考试的总体要求

食品工艺学是研究食品加工和保藏的一门应用科学，作为食品营养与检测专业的一名学生，应掌握食品保藏和加工基本原理、相关技术和工艺、食品加工条件和因素对食品质量方面的影响。

二、考试内容

第一章：**总论** 食物与食品的概念，食品的品质要求，食品的营养和感官功能。

第二章: **食品的脱水干制** 食品脱水干制保藏原理：水分活度与微生物的关系 、水分活度对酶活力的影响、水分活度与脂肪氧化的关系、水分活度与非酶褐变的关系；食品中水的存在形式：自由水、结合水、化学结合水；自由水概念；食品中水分活度概念；影响湿热传递的因素：食品的表面积、干燥介质的温度、空气流速、空气的相对湿度、真空度；分析干燥速率曲线，干制对食品品质的影响：物理方面 干缩、多孔性、表面硬化、热塑性、溶质迁移，化学变化 营养成分、色泽、风味

第三章：**食品的热处理和杀菌技术** 影响微生物耐热性的因素：水分活度、脂肪、盐类、糖类、pH；TDT 值概念；热处理对植物品质的影响：质构、颜色、风味、营养素；食品罐藏得概念；罐藏食品加工工艺：原料的预处理、装罐和预封、罐头的排气、罐头的密封、罐头食品的杀菌和冷却、罐头的检验、包装和储藏；罐头食品的变质形式：胀罐、平酸败坏、黑变、发霉；热烫的目的；巴氏杀菌法的概念

第四章：**食品的冷加工与冷冻保藏** 低温保藏基本原理：低温对微生物的影响、低温对酶的影响、低温对其它变质因素的影响；常用食品冷却方法：空气冷却、冷水冷却、碎冰冷却、真空冷却；最大冰晶生成区概念；冻结烧概念

第五章：**食品化学、腌渍、烟熏和辐射保藏** 食品化学保藏的概念；腌制过程中有关因素的控制：食盐的纯度、食盐用量或盐水浓度、原料的化学成分、温度、空气；腌制品

的品质控制：腌制品色泽形成与腌制品风味形成；烟熏的目的：杀菌和抗菌作用、抗氧化作用、色香味作用；辐射保藏的分类：辐射商业无菌、辐射巴氏杀菌、辐射耐贮杀菌第六章：**食品加工新技术** CO_2 作为超临界流体萃取剂的原因；影响超临界流体技术的因素：萃取压力的影响、萃取温度的影响、萃取颗粒大小、CO_2 的流量；基因工程概念

三、试题类型

名词解释、选择题、填空题、简答题

四、考试形式

笔试

五、主要参考教材

食品加工技术概论 张孔海主编 中国轻工业出版社

《微生物学》课程考试大纲

一、课程性质与任务

本课程是食品营养与检测专业的一门专业基础课程，主要学习各类群微生物的基本知识，微生物的营养代谢特征和培养基的配制，微生物的分离、培养、纯化和生长测定，有益微生物在食品生产加工中的应用，有害微生物对食品的污染及其控制。培养学生全面掌握和了解微生物学的基础理论、基础知识和基本技术，训练学生分析和解决微生物学研究及生产领域中实际问题的基本能力，为学生从事微生物学领域科研、教学、生产、开发等工作奠定良好基础。本课程注重培养学生的职业素质和职业道德，提高学生的综合素养与职业能力，对学生后续课程学习和职业生涯发展起到重要作用。

二、课程基本要求

1. 知识要求

（1）掌握食品中常见的微生物类群、形态、结构、繁殖方式等基本知识；

（2）掌握微生物的营养要素构成及营养类型；

（3）掌握微生物吸收营养物质的方式；

（4）熟悉培养基配制的基本原则及其类型；

（5）理解微生物的代谢途径及其在食品生产中的应用；

（6）掌握微生物生长的规律以及影响微生物生长的因素；

（7）了解微生物遗传变异的基础知识，掌握微生物菌种选育的方法；

（8）掌握微生物菌种保藏的原理及保藏方法；

（9）了解微生物发酵产品的类别及发酵菌种；

（10）掌握微生物污染食品的途径及其控制措施；

（11）掌握常见类别食品的腐败变质及食品保藏中的防腐与杀菌措施；

（12）掌握事物中毒的概念及引起事物中毒的微生物的种类。

（13）掌握食品卫生标准中的微生物指标。

2. 能力要求

（1）会运用显微镜观察细菌、酵母菌、霉菌等微生物大小形态及细胞结构；

（2）能对细菌进行革兰氏染色；

（3）能制备不同类型的培养基；

（4）会分离纯化细菌并描述不同培养基上菌落特征；

（5）会分析日常生活和生产实际中的消毒灭菌方法；

（6）能利用自然界微生物的资源自行设计实验分离某种特殊性能微生物并保藏该菌种。

3. 素质要求

（1）养成生产操作规范意识、食品质量安全意识和环境保护意识；

（2）形成严谨求实的科学态度；

（3）养成良好的职业道德和认真细致的工作作风；

（4）具备团队合作精神、具有摄取知识和信息、知识技能的迁移、探索创新等职业关键能力和可持续发展能力。

三、考核知识点与考核要求

绪论

（一）考核知识点

1. 微生物的概念
2. 微生物的生物学特点
3. 微生物学及其分支学科
4. 微生物学的发展史
5. 微生物学发展趋势

（二）考核要求

1. 掌握微生物及其生物学特点；
2. 了解微生物学的发展史；
3. 了解微生物与人类的关系，微生物在自然界的位置，微生物学的发展趋势。

第一章　微生物的形态与结构

（一）考核知识点

1. 细菌的形态结构、繁殖方式及食品中常见的细菌类群
2. 酵母菌的形态结构、繁殖方式及食品中常见的酵母菌
3. 霉菌的形态结构、繁殖方式及食品中常见的霉菌
4. 病毒及其他类群微生物

（二）考核要求

1. 掌握芽孢、荚膜、菌落、噬菌体、温和噬菌体的概念；
2. 掌握细菌、酵母菌、霉菌等各类微生物的形态结构和繁殖方式；
3. 掌握细菌革兰氏染色的原理、步骤和注意事项；
4. 了解食品中常见的细菌、酵母菌和霉菌；
5. 了解病毒及其他类群微生物。

第二章　微生物的营养和培养基

（一）考核知识点

1. 微生物细胞的化学组成
2. 微生物的营养要素及其生理功能
3. 微生物的营养类型
4. 微生物吸收营养物质的方式
5. 培养基配制的基本原则及其类型

（二）考核要求

1. 了解微生物细胞的化学组成；
2. 掌握微生物营养要素的构成，了解各营养要素的生理功能；
3. 熟悉微生物的四大营养类型；
4. 掌握微生物吸收营养物质的方式；
5. 熟悉培养基配制的基本原则及其类型；
6. 掌握生长因子、培养基的概念。

第三章　微生物的新陈代谢

（一）考核知识点

1. 微生物的能量代谢
2. 微生物的分解代谢
3. 微生物的发酵代谢途径

4. 微生物的合成代谢

（二）考核要求

1. 掌握微生物 3 种能量代谢方式的异同点；
2. 了解糖、蛋白质、脂肪和脂肪酸的分解代谢；
3. 掌握微生物的主要发酵代谢途径；
4. 掌握有氧呼吸、无氧呼吸、发酵的概念；
5. 了解糖、蛋白质、脂肪、核酸的合成代谢。

第四章　微生物的生长及其控制

（一）考核知识点

1. 微生物生长的概念
2. 微生物的群体生长规律
3. 微生物生长量的测定
4. 物理因素对微生物生长的影响
5. 化学因素对微生物生长的影响
6. 生物因素对微生物生长的影响

（二）考核要求

1. 掌握单细胞微生物生长曲线、巴氏消毒法、灭菌、商业灭菌、抗生素的概念；
2. 掌握微生物生长曲线的概念、特点，理解微生物生长曲线在生产中的应用；
3. 掌握测定微生物生长的方法；
4. 理解物理因素、化学因素对微生物生长的影响，理解微生物与环境的相互关系。

第五章　微生物菌种的选育与菌种保藏

（一）考核知识点

1. 微生物遗传变异的物质基础
2. 微生物的变异
3. 微生物的选种
4. 微生物的育种
5. 微生物菌种的退化与复壮
6. 微生物菌种的保藏

（二）考核要求

1. 了解微生物的遗传变异现象及遗传变异的物质基础；
2. 掌握微生物菌种的选种方法；
3. 了解诱变育种、杂交育种、原生质体融合育种等常用的微生物菌种的育种方法；
4. 掌握微生物菌种的退化的原因及防止退化的措施；
5. 掌握微生物菌种的保藏原理及常用的菌种保藏方法。

第六章　微生物在食品工业中的应用

（一）考核知识点

1. 微生物在发酵食品中的作用
2. 发酵食品中的主要微生物类型
3. 主要发酵食品及所用菌种
4. 主要酶制剂及产酶微生物
5. 微生物与食品添加剂生产
6. 微生物菌体

（二）考核要求

1. 掌握各类发酵食品及发酵菌种；
2. 了解微生物发酵生产的酶制剂、食品添加剂的种类；
3. 掌握单细胞蛋白（SCP）及其营养价值和应用前景。

第七章　食品腐败变质及微生物污染

（一）考核知识点

1. 食品微生物污染的途径
2. 食品微生物污染的控制
3. 微生物引起食品腐败变质的原理、环境条件
4. 常见类别食品的腐败变质
5. 食品保藏中的防腐与杀菌措施

（二）考核要求

1. 了解微生物污染食品的途径；
2. 掌握食品腐败变质的概念；
3. 掌握、分析发生食品腐败变质的原理和环境条件；
4. 了解常见类别食品的腐败变质；
5. 了解食品保藏中的防腐与杀菌措施。

第八章　食品卫生微生物

（一）考核知识点

1. 食物中毒的概念
2. 引起食物中毒的微生物的种类
3. 食品卫生标准中的微生物指标

（二）考核要求

1. 掌握食物中毒的概念；
2. 了解引起食物中毒的微生物的种类；
3. 掌握食品卫生标准中的微生物指标。

《食品理化检测》理论考试大纲

一、总体要求

《食品理化检测》是我院食品营养与检测专业课程体系的核心课程，是满足食品检验工作岗位要求的实践性、技术性很强的课程，旨在培养学生具备食品安全和质量意识，系统掌握食品检测基本知识，熟练掌握食品检测基本技能和技术。通过考核，旨在检查学生对食品检测基础知识、检测基本技能、检测工作流程的掌握程度，能够将食品检测的基础知识和检测技能融会贯通、灵活应用。

二、考试内容

课程在设计的过程中，通过 5 个学习情境（饮料检验、乳及乳制品检验、肉蛋及制品检验、罐头食品检验、调味品、酱腌制品检验），学生能够运用食品检验相关知识，根据国家标准，能独立操作，正确处理检验数据，对产品进行常规检验并做出质量判断。

考核内容包括：样品的采集和制备基础知识；理化检验基本知识；数据处理方法；食品总酸度、可溶性固形物、维生素 C 含量的测定原理、方法相关知识；食品水分、酸度、脂肪含量、还原糖含量的测定原理、方法相关知识；食品灰分、蛋白质、酸价、过氧化值、亚硝酸盐、氯化钠的测定原理、方法相关知识。

三、试题类型

填空题、选择题、判断题、简答题、综合题

四、考试形式

笔试

五、主要参考教材

按项目自编的讲义。

《食品分析与检验技术》，李京东、余奇飞、刘丽红主编，化学工业出版社出版。

《食品理化检测》技能考试大纲

一、总体要求

《食品理化检测》是我院食品营养与检测专业课程体系的核心课程，是满足食品检验工作岗位要求的实践性、技术性很强的课程，旨在培养学生具备食品安全和质量意识，系统掌握食品检测基本知识，熟练掌握食品检测基本技能和技术。通过考核，旨在检查学生对食品检测基础知识、检测基本技能、检测工作流程的掌握程度，能够将食品检测的基础知识和检测技能融会贯通、灵活应用。

二、考试内容

课程在设计的过程中，采用理实一体的形式，通过 5 个学习情境（饮料检验、乳及乳制品检验、肉蛋及制品检验、罐头食品检验、调味品、酱腌制品检验），学生能够运用食品检验相关知识，根据国家标准，能独立操作，正确处理检验数据，对产品进行常规检验并做出质量判断。

按照课程标准，对学生能力的考核主要内容是：

1．常压烘箱干燥法测定水分含量的原理、过程及注意事项。
2．高温灼烧法测定灰分含量的原理、过程及注意事项。
3．索氏提取法测定脂肪含量的原理、过程及注意事项。
4．酸水解法测定脂肪含量的原理、过程及注意事项。
5．凯氏定氮法测定蛋白质含量的原理、过程及注意事项。
6．果汁酸度含量测定原理、过程及注意事项。
7．直接滴定法测定乳粉还原糖含量的原理、过程及注意事项。
8．2,4-二硝基苯肼比色法测定维生素 C 含量的原理、过程及注意事项。
9．牛乳酸度的测定原理、过程及注意事项。
10．盐酸萘乙二胺法测定亚硝酸盐含量的原理、过程及注意事项。

三、试题类型

综合应用题。

四、考试形式

笔试

五、主要参考教材

按项目自编的讲义。

《食品分析与检验技术》，李京东、余奇飞、刘丽红主编，化学工业出版社出版。

《食品微生物检验》技能考试大纲

一、总体要求

《食品微生物检验》是我院食品营养与检测专业课程体系的核心课程，培养学生的微生物检验技能，支撑食品检验岗位群。通过该门课程的学习，使学生掌握食品微生物学检验基础知识和基本操作技术；能够按照国家标准进行各类食品的微生物指标检测，能够根据检测结果进行正确判断，并出具检测报告。养成严谨的科学态度和实事求是的科学精神。

二、考试内容

按照《食品微生物检验》课程标准，主要开设以下实验：

实验一 普通光学显微镜的使用及霉菌形态的观察

一、实验目的

1．熟悉普通光学显微镜的构造及基本操作。
2．掌握用显微镜观察霉菌的操作方法，了解青霉、曲霉等常见霉菌的形态特征。

二、实验步骤

（一）认识普通光学显微镜的构造，掌握其基本操作。

1.显微镜的基本构造

（1）机械部分：

镜壁、镜座、载物台、粗调节螺旋、细调节螺旋、推进器、玻片夹

（2）光学部分

光源、目镜、镜筒、物镜转换器、接物镜、聚光器、虹彩光圈

2.显微镜低倍镜、高倍镜的操作方法

（1）取镜

一手握住镜壁，一手托住镜座。

（2）打开光源，将玻片放在载物台上，先用低倍镜（10×）观察，调节粗调节螺旋，将载物台和镜头的距离调到最小，然后一边观察目镜中的视野，一边调节粗调节螺旋降低载物台的距离，当视野中有模糊的物像时，在慢慢旋转细调节螺旋，上下微微移动载物台的高度，直到看见清晰的物像，用推进器找到理想的观察部位。

（二）用显微镜观察青霉、曲霉等霉菌的形态特征，并绘图。

标明放大倍数和微生物的名称。

(三)镜检完毕后工作

1．移开物镜镜头。

2．取出装片。

3．擦净显微镜，将各部分还原。将接物镜呈“八”字形降下，不可使其正对聚光器，同时降下聚光器，转动反光镜使其镜面垂直于镜座。最后套上镜罩，对号放入镜箱中，置阴凉干燥处存放。

三、思考与作业

1. 绘出观察的霉菌的菌丝、分生孢子、分生孢子梗的形态，并注明物镜与目镜的放大倍数。

2．使用光学显微镜特别注意哪些问题？

实验二 显微镜油镜的使用及细菌形态的观察

一、实验目的

1．掌握显微镜油镜的使用方法及注意事项。

2．掌握细菌的形态特征。

二、实验原理

对于个体微小，用高倍镜仍观察不清的微生物，则必须使用油镜。使用时，需要在标本和物镜间加入一种镜头油。如香柏油，所以叫油浸接物镜，简称油镜。

由于油镜镜面很小，使用时检视物与镜面又非常靠近（0.14~0.19mm 左右），因而使进入镜头的光线较少。当光线由反光镜通过玻片与镜头之间的空气时，由于玻片与物镜之间的介质为空气（接物镜干燥系）。空气折射率为 1，由于空气与玻片的密度不同，使光线受到曲折，发生散射现象，结果进入物镜的光线必然减少，这样就降低了视野的照明度。若载玻片与物镜之间的介质不是空气，而是一层油质，一般常用香柏油，其折射率为 1.515，与玻璃的折射率（1.52）相近。光线通过载玻片可直接通过香柏油进入物镜而几乎不发生折射（接物镜油浸系），使视野增加进光量，这样就能使物像更加清晰。

三、实验器材

普通光学显微镜、细菌三型玻片、香柏油、二甲苯、高级镜头纸

四、实验步骤

1．低倍镜观察

低倍物镜视野面广，焦点深度较深，易于发现目标确定观察位置，故应先用低倍镜观察为宜。将载片标本（涂面朝上）置于载物台的标本夹上，并将标本部位处于物镜的正下方，转动粗调节器，使镜头下降至镜面距离检视物大约 10mm 处。然后以左眼看目

镜，另一眼睁开，一边观察视野，一边扭动粗调节器使镜头缓慢地升高，至视野内出现物像后，改用细调节器上下微微转动，仔细调节焦距和照明，直至视野内获得清晰的物像，选择适宜部位，移到视野中心，待换高倍镜观察。

2．高倍镜观察

在物镜依次由低倍至中倍、高倍的观察过程中，应逐次上升聚光镜以调节光线亮度，同样选择适宜的部位移至视野中央。

5．油镜观察并绘图

用低倍镜找到观察部位后，在观察部位滴一滴香柏油，将 100 倍物镜对准观察部位，旋转粗调节螺旋升高载物台的距离，同时用眼睛从侧面观察，当油镜头几乎和标本片贴近时（先旋转粗调节螺旋，再旋转细调节螺旋，直到几乎转不动细调节螺旋为止，当油镜头几乎与标本片贴近时，不能用力旋转粗（细）调节螺旋，以免压坏玻片或损坏镜头），一边旋转细调节螺旋缓慢降低载物台的高度一边观察目镜中的视野，当观察到模糊的物像时，再调节细调节螺旋直至观察到清晰的物像，用推进器找到理想的观察部位。

当观察到清晰物像时，油镜头与标本片的距离为 0.19mm，油镜头将香柏油滴压得很扁。每次将镜头从香柏油里拿出来后，再观察时必须重新滴香柏油。

3．镜检后显微镜油镜的保养

（1）用一块镜头纸擦掉镜头上的香柏油。

（2）另外取一张镜头纸，滴上几滴二甲苯，将镜头上残留的二甲苯擦掉。

（3）再取一张干净的镜头纸将镜头上的二甲苯擦掉。玻片上的香柏油也要用镜头纸擦干净。

五、注意事项

1.不准擅自拆卸显微镜的任何部件，以免损坏。

2.镜面只能用擦镜纸擦，不能用手指或粗布擦，以保证镜面的光洁度。

3.观察标本时，必须依次用低倍镜、高倍镜，最后用油镜、当目视接目镜时，特别在使用油镜时，切不可用粗调节器向下旋，以免物镜碰到胶片损伤镜面或压碎玻片。

4.观察时，两眼睁开养成两眼能够轮换观察的习惯以免眼睛疲劳，并目能够在左眼观察时，右眼注视绘图。

5.拿显微镜时，一定要右手拿镜臂，左手托镜座，不可单手拿，更不可倾斜拿动。

6.显微镜应存放在阴凉干燥处，以免镜片滋生霉菌而腐蚀镜片。

六、思考题

1. 油镜与普通物镜在使用万法上有何不同？应特别注意些什么？
2. 使用油镜时，为什么必须用镜头油？
3. 镜检标本时，为什么先用低倍镜观察，而不是直接用高倍镜或油镜观察？

实验三　酵母菌的形态观察及死活细胞的鉴别技术

一、实验目的

1．观察酵母菌形态，加深理解酵母菌的形态特征。

2．掌握用美蓝染色液鉴定酵母菌细胞死活的操作方法。

二、实验原理

美蓝是一种无毒性的染料，它的氧化型呈蓝色，还原型无色。用美蓝对酵母活细胞染色时，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为无色的还原型，而对代谢作用微弱或死细胞，无此还原能力或还原能力极弱，而被美蓝染成蓝色或淡蓝色。因此，不仅用此法可观察酵母细胞形态，也可用来鉴别酵母菌的死细胞和活细胞。

三、实训器材

1．材料

鲜酵母液。

2．染色液及试剂

0.1％吕氏碱性美蓝染色液、碘液、0.9%生理盐水。

3．器材

显微镜、载玻片、盖玻片、酒精灯、接种环、吸水纸。

四、实训内容

1．水浸片观察

(1) 酵母液体培养物水浸片观察

在干净的载玻片中央加一滴预先稀释至适宜浓度的酵母液体培养物，从侧面盖上一片盖玻片，用吸水纸吸去多余的水分。将制好的水浸片置于显微镜的载物台上，先用低倍镜，后用高倍镜进行观察，注意观察各种酵母的细胞形态和繁殖方式，并进行记录。

2．水-碘液浸片观察

在载玻片中央加一小滴碘液，然后在其上加三小滴水，取少许酵母菌苔放在水–碘液中混匀，盖上盖玻片后镜检。注意观察酵母菌细胞中是否有淀粉粒（蓝色）和肝糖粒（红色）。

3．美蓝染色观察

(1) 酵母液体培养物美蓝染色观察

在干净的载玻片中央加一小滴 0.1％吕氏碱性美蓝染色液，然后再加一小滴预先稀释至适宜浓度的酵母液体培养物，混匀后从侧面盖上一片盖玻片，并吸去多余的水分和染色液。将制好的染色片置于显微镜的载物台上，先用低倍镜，后用高倍镜进行观察，根据细胞颜色区分死细胞和活细胞，并进行记录。

染色约 30min 后再次进行观察，注意死细胞数量是否增加。

(2) 酵母固体培养物美蓝染色观察

在干净的载玻片中央加一滴 0.1％吕氏碱性美蓝染色液，然后按无菌操作用接种环挑取少量酵母菌苔放在染液中，混合均匀。用镊子取一块盖玻片，先将盖玻片一边与菌液接触，然后慢慢将盖玻片放下时期盖在菌液上。将制片放置约 3min 后镜检，先用低倍镜，后用高倍镜观察酵母的形态和出芽情况，并根据颜色来区别死活细胞。

五、关键步骤及注意事项

1．加染液不宜过多或过少，否则，在盖上盖玻片时，菌液会溢出或出现大量气泡。

2．盖玻片不宜平着放下，以免产生气泡影响观察。

实验四　细菌标本片的制备及简单染色法

一、实验目的

1．熟悉细菌标本片的制备程序及各步作用、方法。

2．掌握细菌的简单染色法。

二、实验原理

细菌个体微小，无色而半透明，折光性弱，在普通光学显微镜下观察活细胞时，只能见其大致轮廓。必须制成标本，应用适当染料染色后，才能较清楚地观察到细菌的形态及某些构造。此外，还可根据细菌呈现出的不同颜色反应而对其进行鉴别。

三、实验材料

1．物品

接种环、酒精灯、火柴、载玻片、纱布

2．染色液及试剂

草酸铵结晶紫、石碳酸复红、番红、0.9%生理盐水

3．菌种

大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、白色葡萄球菌

四、实验步骤

（一） 细菌标本片的制备：

1.载玻片处理

载玻片应清晰透明、清洁而无油渍，滴上水后能均匀展开，附着良好，如有残余油渍，可按下法处理：

滴上 95%酒精 2-3 滴，用清洁纱布擦拭，然后以钟摆速度通过酒精灯 3-4 次。

2.涂片

用经酒精灯火焰烧过的接种环，蘸取生理盐水 2 环于清洁无油脂的载玻片中央，再勾取细菌的固体培养物少许混于生理盐水中，涂抹成直径为 1-1.5cm 大小的均匀的抹片。切忌涂片太厚，否则不利于染色和观察。

3.干燥 将抹片置于空气中让其自然干燥。

4.固定

（1）目的：

①除去抹片上的水分，使菌体蛋白附着在载玻片上，以防染色过程中被水冲掉。

②使抹片易于着色，变性的蛋白质着色力强。

③能杀死抹片中的部分微生物。

（2）方法：

将已干燥的抹片菌膜向上，以钟摆速度在酒精灯火焰上通过数次（以不烫手背为宜）。

（二）细菌常用的染色方法

简单染色法，只用一种染料进行染色的方法。只能显示出细菌的外形，大小及排列。

1.准备载玻片 2．涂片 3．干燥 4．固定 5．染色 6．水洗 7．干燥 8．镜检

五、作业

1.细菌为何在染色前要固定？

2.绘出你所观察到的细菌形态。（标明放大倍数和名称）

实验五 细菌的革兰氏染色法

一、实验目的

1．了解细菌革兰氏染色法在细菌分类中的应用。

2．掌握细菌的革兰氏染色技术。

二、实验原理

革兰氏染色法是 1884 年由丹麦病理学家 C．Gram 所创立的。革兰氏染色法可将所有的细菌区分为革兰氏阳性菌（G+）和革兰氏阴性菌（G-）两大类，是细菌学上最常用的鉴别性染色法。革兰氏染色属于最重要的鉴别染色。一般认为革兰氏染色结果的主要原因是由于这两类细菌的细胞壁的结构和化学组成不同。革兰氏阳性菌细胞壁较厚（20-80nm），主要成分为肽聚糖，网状结构紧密。而革兰氏阴性菌细胞壁肽聚糖层较薄（2-3nm），主要成分是脂蛋白和脂多糖。细菌经过初染和媒染，在细胞内形成深紫色的结晶紫-碘复合物，当用酒精脱色时细胞壁脱水，阳性细菌细胞壁的肽聚糖层网状结构孔径收缩以至关闭，阻止不溶性复合物结晶紫-碘的逸出，这样使菌体呈蓝紫色。阴性菌脂类物质溶解，结晶紫－碘复合物随之被洗脱出，用复染剂复染后菌体呈复染后的红色。

三、实验材料

1．物品

接种环、酒精灯、火柴、载玻片、纱布

2．染色液及试剂

草酸铵结晶紫、碘液、番红、95%乙醇、0.9%生理盐水

3．菌种

大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、白色葡萄球菌

四、实验步骤

1．涂片

在载玻片中央部位滴加一小滴生理盐水，用接种环在火焰旁从斜面上挑取少量菌体与水混合。烧去环上多余的菌体后，再用接种环将菌体涂成直径 1cm 的均匀薄层，以淡淡的乳白色为宜。制片是染色的关键，载片要洁净，不得玷污油脂，菌体才能徐布均匀。注意初次涂片，取菌量不应过大，以免造成菌体重叠。

2．干燥

涂布后，待其自然干燥或在酒精灯上方稍微加热，切勿靠近火焰。

3．固定

将已干燥好的涂片标本向上，在微火上以钟摆速度通过 3-4 次进行固定。固定的作用为：a.杀死细菌；b.使菌体蛋白质凝固，菌体牢固粘附于载片上，染色时不被染液或水冲掉；c.增加菌体对染料的结合力，使涂片易着色。

4．初染

在涂片处加草酸按结晶紫染色液（加量以盖满菌膜为度），染色 1min。倾去染色液，用自来水细水小心地冲洗至洗出液为无色，水洗时水流不要直接冲洗涂面，以免水流过大将菌体冲掉。

5．媒染

滴加碘液，染 lmin，水洗。

6．脱色

用滤纸吸去残水，滴加 95％乙醇，轻轻摆动玻片脱色 10-30s 立即水洗，以终止脱色。

7．复染

滴加番红，染色 1min，水洗后晾干，也可以用吸水纸轻轻吸干。

8．干燥

9．镜检

干燥后，置油镜下观察。被染成紫色者即为（G^+)；被染成红色者是革兰氏阴性菌（G^-）。

五、注意事项

1.涂片不宜过厚，否则宜脱色不完全造成假阳性。

2.火焰固定不宜过热，以玻片不烫手为宜，否则菌体细胞容易变形。

3.滴加染色液和酒精时一定要覆盖整个菌膜,否则部分菌膜未受处理,亦可造成假象。

4.乙醇脱色是关键，如脱色过度，则 G^+菌被误染成 G^-菌；脱色不足，G^-菌被误染成 G^+菌。

5.染色要用处于活跃生长期的幼龄培养物，如菌龄过长，死亡或细胞壁受损的 G^+菌也会成阴性反应。

六、作业

根据革兰氏染色结果，判断三种供试菌种分别是革兰氏阳性细菌还是革兰氏阴性细菌？

七、思考题

1. 为什么必须用培养 24h 以内的菌进行革兰氏染色？

2. 要得到正确的革兰氏染色结果，必须注意哪些操作？哪一步是关键？为什么？

实验六 微生物细胞大小的测定技术

一、实验目的

1．了解用显微镜测定微生物细胞大小的原理。

2．掌握显微镜下测定微生物细胞大小的技术。

二、实验器材

光学显微镜、目镜测微尺、镜台测微尺、酵母菌悬液、细菌三型玻片、载玻片、盖玻片、香柏油、二甲苯、擦镜纸

三、实验步骤

1．装目镜测微尺

目镜测微尺共 50 个小格，每一个小格代表的实际长度与显微镜镜筒的长度、目镜放大倍数和物镜放大倍数有关。

2．放置镜台测微尺

1mm 被等分成 100 个小格，一个小格实际长度是 10μm。

3．在 40×物镜下标定目镜刻度

在 40×物镜下找到镜台测微尺的刻度，将目镜测微尺最左边的刻度线和镜台测微尺最左边的刻度线对齐，然后找另一对完全对齐的刻度线，分别数出两个对齐格线间镜台测微尺的格数和目镜测微尺的格数，根据下面的公式计算目镜测微尺每一小格代表的实际长度。

$$目镜测微尺每格长度=\frac{镜台测微尺格数}{目镜测微尺格数}\times 10\mu m$$

4．在油镜下标定目镜刻度

在油镜下找到镜台测微尺的刻度，将目镜测微尺最左边的刻度线和镜台测微尺最左边的刻度线对齐，然后找另一对完全对齐的刻度线，分别数出两个对齐格线间镜台测微尺的格数和目镜测微尺的格数，根据下面的公式计算目镜测微尺每一小格代表的实际长度。

$$目镜测微尺每格长度=\frac{镜台测微尺格数}{目镜测微尺格数}\times 10\mu m$$

5．酵母菌大小的测定

将镜台测微尺拿下来，换上酵母水浸片，在 40×物镜下找到酵母菌物像，用目镜测微尺测量酵母菌直径的大小，重复测三次求平均值。

6．细菌大小的测定

将酵母水浸片拿下来，换上细菌三型玻片，在油镜下找到细菌三型图像，分别用目镜测微尺测量球菌、杆菌和螺旋菌的大小，重复测三次求平均值。

实验七　微生物细胞数量的测定技术

一、实验目的

1. 了解血球计数板测定微生物细胞数量的原理。

2. 了解血球计数板的结构，掌握用血球计数板测定微生物细胞数量的技术。

二、实验原理

显微镜直接计数法是将小量待测样品的悬浮液置于一种特别的具有确定面积和容积的载玻片上(又称计菌器)，于显微镜下直接计数的一种简便、快速、直观的方法。显微镜直接计数法的优点是直观、快速、操作简单。但此法的缺点是所测得的结果通常是死菌体和活菌体的总和。目前已有一些方法可以克服这一缺点，如结合活菌染色等方法来达到只计数活菌体的目的。本实验以血球计数板为例进行显微镜直接计数。

用血细胞计数板在显微镜下直接计数是一种常用的微生物计数方法。该计数板是一块特制的载玻片，其上由四条槽构成三个平台；中间较宽的平台又被一短横槽隔成两半，每一边的平台上各刻有一个方格网，每个方格网共分为九个大方格，中间的大方格即为计数室。血细胞计数板计数室的刻度一般有两种规格，一种是一个大方格分成 25 个中方格，而每个中方格又分成 16 个小方格；另一种是一个大方格分成 16 个中方格，

而每个中方格又分成 25 个小方格，但无论是哪一种规格的计数板，每一个大方格中的小方格都是 400 个。每一个大方格边长为 1mm，则每一个大方格的面积为 $1mm^2$，盖上盖玻片后，盖玻片与载玻片之间的高度为 0.1mm_，所以计数室的容积为 $0.1mm^3$。

计数时，通常数五个中方格的总菌数，然后求得每个中方格的平均值，再乘上 25 或 16，就得出一个大方格中的总菌数，然后再换算成 1ml 菌液中的总菌数。设五个中方格中的总菌数为 A，菌液稀释倍数为 B，如果是 25 个中方格的计数板，则 1mL 菌液中的总菌数=$A/5\times25\times10^4\times B=50000A\cdot B$(个)

同理，如果是 16 个中方格的计数板，ImL 菌液中的总菌数=$A/5\times16\times10^4\times B$
$=32000A\cdot B$(个)

三、实验器材

光学显微镜、血球计数板、酵母菌悬液、滴管

四、实验步骤

1．准备血球计数板

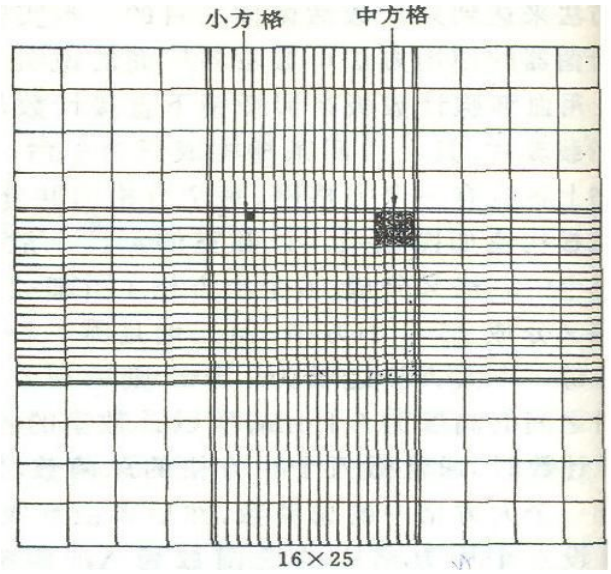
在加样前，先对计数板的计数室进行镜检。若有污物，则需清洗，吹干后才能进行计数。

2．加样

将清洁干燥的血细胞计数板盖上盖玻片，再用无菌的毛细滴管将摇匀的酿酒酵母菌悬液由盖玻片边缘滴一小滴，让菌液沿缝隙靠毛细渗透作用自动进入计数室，一般计数室均能充满菌液。取样时先要摇匀菌液；加样时计数室不可有气泡产生。

3．计数

显微镜计数加样后静止 5min，然后将血细胞计数板置于显微镜载物台上，先用低倍镜找到计数室所在位置，然后换成高倍镜进行计数。调节显微镜光线的强弱适当，对于用反光镜采光的显微镜还要注意光线不要偏向一边，否则视野中不易看清楚计数室方格线，或只见竖线或只见横线。在计数前若发现菌液太浓或太稀，需重新调节稀释度后再计数。一般样品稀释度要求每小格内约有 5～10 个菌体为宜。每个计数室选 5 个中格(可选 4 个角和中央的一个中格)中的菌体进行计数。位于格线上的菌体一般只数上方和右边线上的。如遇酵母出芽，芽体大小达到母细胞的一半时，即作为两个菌体计数。计数一个样品要从两个计数室中计得的平均数值来计算样品的含菌量。



4．计算

5．清洗血球计数板

使用完毕后，将血细胞计数板在水龙头上放大后的方格网，中间大方格为计数室用水冲洗干净，切勿用硬物洗刷，洗完后自行晾干或用吹风机吹干。镜检，观察每小格内是否有残留菌体或其他沉淀物。若不干净，则必须重复洗涤至于净为止。

五、作业

计算给定酵母菌悬液中细胞的浓度。

实验八 牛肉膏蛋白胨培养基的制备及灭菌

一、实验目的

1．熟悉制备培养基的基本步骤。

2．掌握牛肉膏蛋白胨培养基的制备方法。

3．掌握高压蒸汽灭菌锅的使用方法。

二、实验药品及仪器

1．药品：牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、琼脂粉

2．仪器：电磁炉、不锈钢锅、烧杯、漏斗、铁架台、铁圈、胶皮管、铁夹

三、实验步骤

1．制备培养基的基本步骤：

称量药品→溶解药品→融化琼脂→调节 pH 值→过滤分装→包扎标记→消毒灭菌→趁热摆斜面或倒平板

2．牛肉膏蛋白胨培养基的制备

称取牛肉膏 5g，蛋白胨 10g，氯化钠 5g，倒入不锈钢锅中，加入 1000mL 蒸馏水，加热溶解，加入 15~20g 琼脂粉，一边加热一边溶解（需烧开沸腾几分钟），然后用漏斗分装到试管中，加入量为试管体积的 1/5 左右，盖上棉塞，用牛皮纸包扎，放入高压蒸汽灭菌锅灭菌。灭菌后拿出试管趁热摆斜面。

3.牛肉膏蛋白胨培养基的灭菌

本试验采用高压蒸气灭菌法。

①检查水位并加水

②装入待灭菌物品

③加盖

④加热并排气

⑤保持压力灭菌

⑥关闭开关并关掉电源

⑦开盖取出试管，趁热摆斜面

4. 抽取灭好菌的试管斜面置于 25℃恒温箱中培养 48h，观察斜面上是否有杂菌生长。

四、结论

经过培养，试管斜面上没有杂菌生长，说明培养基已达到灭菌目的，可以使用。

实验九 微生物的斜面接种技术

一、实验目的

掌握细菌、酵母菌的斜面接种技术。

二、实验材料

1．菌种：大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、白色葡萄球菌、啤酒酵母

2．培养基：牛肉膏蛋白胨培养基

3．仪器和其他用品：酒精灯、接种环、火柴

三、实验步骤

1. 左手平托两支试管，拇指按住试管底部。外侧是菌种试管，内侧是待接的空白斜面。（两支试管的斜面同时向上），右手将棉塞旋松，以便在接种时容易拔出。

2. 右手拿接种环，在火焰上先将环端烧红灭菌，然后将有可能伸入试管的其余部位也过火灭菌。

3. 将两支试管的上端并齐，靠近火焰，用右手小指和掌心将两支试管的棉塞一并夹住拔出，棉塞仍夹在手中，然后让试管口缓缓过火焰。

4. 将已灼烧过的接种环伸入外侧的菌种试管内。先冷却，而后再用环沾取一定量的菌苔，将沾有菌苔的接种环抽出试管。

5. 迅速将沾有菌种的接种环伸入另一支待接斜面试管的底部，轻轻向上划线（直线或曲线）。

6. 接好种的斜面试管口再次过火焰，棉塞底部过火焰后立即塞入试管内。

7. 将沾有菌苔的接种环在火焰上烧红灭菌。先在内焰中烧灼，使其干燥后，再在外焰中烧红，以免菌苔骤热，使菌体爆溅，造成污染。

8. 放下环后，再将棉塞旋紧，在试管斜面上距试管口 2～3cm 处贴上标签。

实验十　果汁中菌落总数的测定

一、目标要求

知识目标：了解菌落总数的概念及测定意义；

掌握山楂汁中菌落总数的测定原理、方法。

技能目标：能正确根据国标方法对果汁中菌落总数进行测定。

二、预前知识

（一）菌落总数的概念

菌落总数是指食品检样经过处理，在一定条件下培养后(如培基成分、培养温度和时间、pH、需氧性质等)，所得 1mL(g)检样中所含菌落的总数。

（二）测定菌落总数的意义

菌落总数主要作为判定食品被污染程度的标志，也可用于观察细菌在食品中繁殖的动态，从而对被检样品进行卫生学评价提供依据。

每种细菌都有它一定的生理特性，培养时应用不同的营养条件及其他生理条件（如温度、培养时间、pH、需氧性质等）去满足其要求才能将各种细菌都培养出来。但在实际工作中，一般都只用一种常用的方法去作。细菌菌落总数的测定，所得结果，只包括一君能在营养琼脂上发育的嗜中温性需氧菌的菌落总数。

三、任务实施

果汁中菌落总数的测定（平板菌落计数法）（依据 **GB4789.2-2016**）

（一）设备和材料

（1）冰箱：0～4℃。

（2）恒温培养箱：36±1℃。

（3）恒温水浴锅：46±1℃。

（4）均质器或灭菌乳钵。

（5）架盘药物天平：0g～500g,精确至 0.5g。

（6）菌落计数器。

（7）放大镜 4X。

（8）灭菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）。

（9）灭菌锥形瓶：500 mL。

（10）灭菌玻璃珠。5 mm。

（11） 灭菌培养皿：直径 90mm。

（12）灭菌试管。16X16 mm。

（13） 广口瓶或三角瓶：容量为 500mL。

（14） 电炉。

（15）试管架。

（16）酒精灯。

（17）灭菌镊子、灭菌刀或剪子等。

（二）培养基和试剂

（1）营养琼脂培养基：按 GB/T4789.28 中 4.7 规定。

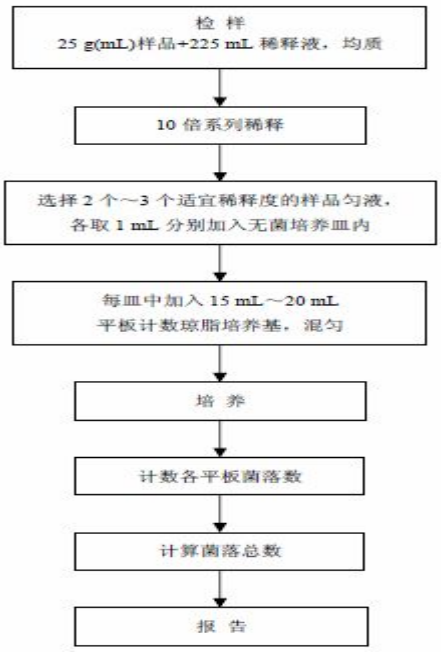
（2）磷酸盐缓冲稀释液：按 GB/T4789.28 中 3.22 规定。

（3）0.85%灭菌生理盐水。

（4）75%乙醇。

（三）检验程序

菌落总数的检验程序如下。



（四）操作步骤

1.检样稀释及培养

（1）以无菌操作,取样 25mL 或 25 g 放入 225mL 灭菌生理盐水中，经充分振摇作成 1：10 均匀稀释液。

固体检样在加入稀释液后,最好置均质器中以 8000r/min～10000r/min 的速度处理 1min,做成 1:10 的均匀稀释液。

（2）用 1mL 灭菌吸管吸取 1∶10 稀释液 1mL，沿管壁徐徐注入含有 9mL 灭菌生理盐水或其他稀释液的试管内(注意吸管尖端不要触及管内稀释液)，振摇试管，混合均匀，做成 1∶100 的稀释液。

（3）根据食品卫生标准要求或对标本污染情况的估计，选择 2～3 个适宜稀释度，分别在做 10 倍递增稀释的同时，以吸取该稀释度的吸管移取 1ml 稀释液于灭菌平皿中，每个稀释度做两个平皿。同时分别取 1ml 稀释液（不含样品）加入两个灭菌平皿内作空白对照。

（4）稀释液移入平皿后，应及时将凉至 46℃营养琼脂培养基(可放置于 46±1℃水浴保温)注入平皿约 15mL，并转动平皿使混合均匀。同时将营养琼脂培养基倾入加有 1mL 稀释液的灭菌平皿内作空白对照。

（5）待琼脂凝固后，翻转平板，置 36±1℃温箱内培养 48±2h。

2.菌落计数方法

做平板菌落计数时，可用肉眼观查，必要时用放大镜检查，以防遗漏。在记下各平板的菌落数后，求出同稀释度的各平板平均菌落总数。

（1）平板菌落数的选择

选取菌落数在 30～300 之间的平板作为菌落总数测定标准。每一个稀释度应采用两个平皿，大于 300 的可记为多不可计。

（2）一个稀释度使用两个平板，应采用两个平板平均数，其中一个平板有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数，若片状菌落不到平板的一半，而其余一半中菌落分布又很均匀，即可计算半个平板后乘 2 以代表全皿菌落数。平皿内如有链状菌落生长时(菌落之间无明显界线)，若仅有一条链，可视为一个菌落；如果有不同来源的几条链，则应将每条链作为一个菌落计。

3.菌落总数的计算

（1）若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内，计算两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为每 g（mL）中菌落总数结果（见表 1 例 1）。

表 1 稀释度选择及菌落数报告方式

例次	稀释液及菌落数			两稀释液之比	菌落总数 [cfu/g(mL)]	报告方式 [cfu/g(mL)]
	10-1	10-2	10-3			
1	多不可计	164	20	-	16 400	16000 或 1.6X104
2	多不可计	295	46	1.6	37 750	38000 或 3.8X104
3	多不可计	271	60	2.2	27 100	27000 或 2.7X104
4	多不可计	多不可计	313	-	313 000	310000 或 3.1X105
5	27	11	5	-	270	270 或 2.7X102
6	0	0	0	-	<1X10	<10
7	多不可计	305	12	-	30 500	31000 或 3.1X104

（2）若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时，按如下公式计算：

$N=\sum C/（n_1+0.1n_2）d$……（1)

式中：

N — 样品中菌落数；

∑C — 平板（含适宜范围菌落数的平板）菌落数之和；

n_1 — 第一个适宜稀释度平板数；

n_2 — 第二个适宜稀释度平板数；

d — 稀释因子（第一稀释度）。

示例：

稀释度	1:100（第一稀释度）	1:1000（第二稀释度）
菌落数（CFU）	232，244	33，35

$$N=\sum C\Big/(n_1+0.1n_2)d$$

$$=\frac{232+244+33+35}{[2+(0.1\times 2)]\times 10^{-2}}=\frac{544}{0.022}=24727$$

上述数据按7.2.2数字修约后，表示为25000或2.5×10^4。

（3）若所有稀释度的平板菌落数均>300，则取最高稀释度的平均菌落数乘以稀释倍数计算（见表 1 例 4）。

（4）若所有稀释度平板菌落数均<30，则以最低稀释度的平均菌落数乘稀释倍数计算（见表 1 例 5）。

（5）若所有稀释度均不在 30～300 之间，有的>300，有的又<30，则应以最接近 300 或 30 的平均菌落数乘以稀释倍数计算（见表 1 例 7）。

（6）若所有稀释度平板均无菌落生长，则应按<1 乘以最低稀释倍数计算（见表 1 例 6）。

4.菌落计数报告方法

（1）菌落数在 1～100 时，按四舍五入报告两位有效数字。

（2）菌落数≥100 时，第三位数字按四舍五入计算，取前面两位有效数字，为了缩短数字后面的零数，也可以 10 的指数表示。

（3）若所有平板上为蔓延菌落而无法计数，则报告菌落蔓延。

（4）若空白对照上有菌落生长，则此次检测结果无效。

（5）称重取样以 CFU/g 为单位报告，体积取样以 CFU/mL 为单位报告。

5.注意事项

（1）无菌操作

操作中必须有“无菌操作”的概念，所用玻璃器皿必须是完全灭菌的。所用剪刀、镊子等器具也必须进行消毒处理。样品如果有包装，应用 75%乙醇在包装开口处擦拭后取样。操作应当在超净工作台或经过消毒处理的无菌室进行。

（2）每递增稀释一次即换用 1 支 1ml 灭菌吸管。

（3）倾注用培养基应在 46℃水浴内保温，温度过高会影响细菌生长，过低琼脂易于凝固而不能与菌液充分混匀。如无水浴，应以皮肤感受较热而不烫为宜。

实验十一　果汁中大肠菌群最可能数（MPN）的测定

一、目标要求

知识目标：了解大肠菌群的概念及测定意义；

掌握山楂汁中大肠菌群的测定原理、方法。

技能目标：能正确根据国标方法对果汁中大肠菌群的数量进行测定。

二、预前知识

（一）大肠菌群的概念

大肠菌群系指一群在 37℃、24 小时能发酵乳糖产酸产气，需氧或兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。

大肠菌群主要由肠杆菌科中埃希氏菌属、肠杆菌属、克雷伯氏菌属的一部分及沙门氏属的Ⅲ亚属细菌组成。

（二）测定意义

该菌主要来源于人畜粪便，故以此作为粪便污染指标来评价食品的卫生质量，具有广泛的卫生学意义。

（1）它反映了食品是否被粪便污染，同时间接地指出食品是否有肠道致病菌污染的可能性。

（2）表示对人体健康是否具有潜在的危险性。

（三）测定方法

第一法：大肠菌群 MPN 计数法。

第二法：大肠菌群平板计数法。

三、任务实施

果汁中大肠菌群 MPN 的测定（多管发酵法）（依据 **GB4789.3-2016**）

（一）设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

（1）恒温培养箱：36 ℃±1 ℃。

（2）冰箱：2 ℃～5 ℃。

（3）恒温水浴箱：46 ℃±1 ℃。

（4）天平：感量 0.1 g。

（5）均质器。

（6）振荡器。

（7）无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。

（8）无菌锥形瓶：容量 500 mL。

（9）无菌培养皿：直径 90 mm。

（10）pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

（11）菌落计数器。

（二）培养基和试剂

（1）月桂基硫酸盐胰蛋白胨（Lauryl Sulfate Tryptose，LST）肉汤。

（2）煌绿乳糖胆盐（Brilliant Green Lactose Bile，BGLB）肉汤。

（3）结晶紫中性红胆盐琼脂（Violet Red Bile Agar，VRBA）。

（4）磷酸盐缓冲液。

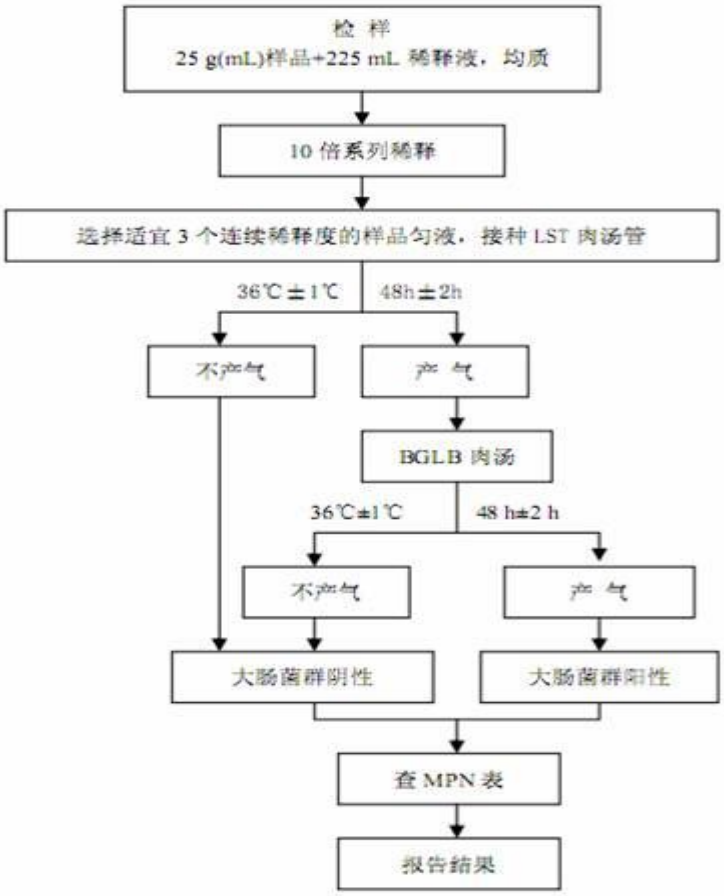
（5）无菌生理盐水。

（6）无菌 1 mol/L NaOH。

（7）无菌 1 mol/L HCl。

（三）检验程序

大肠菌群 MPN 计数的检验程序如下。



（四）操作步骤

1．样品的处理和稀释

（1）固体和半固体样品：称取 25 g 样品,放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内, 8000 r/min～10000 r/min 均质 1 min～2 min，或放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质袋 中，用拍击式均质器拍打 1 min～2 min，制成 1:10 的样品匀液。

（2）液体样品：以无菌吸管吸取 25 mL 样品置盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶 （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。

（3）样品匀液的 pH 值应在 6.5～7.5 之间，必要时分别用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调节。

（4）用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓缓注入 9 mL 磷酸盐缓冲液 或生理盐水的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用 1 支 1 mL 无菌 吸管反复吹打，使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

（5）根据对样品污染状况的估计，按上述操作，依次制成十倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次，换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头。从制备样品匀液至样品接种完毕，全过程不得超过 15 min。

2．初发酵试验

每个样品，选择 3 个适宜的连续稀释度的样品匀液（液体样品可以选择原液），每个稀释度接种 3 管月桂基硫酸盐胰蛋白胨（LST）肉汤，每管接种 1mL（如接种量超过 1 mL，则用双料 LST 肉汤），36 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察倒管内是否有气泡产生，24 h±2 h 产气者进行复发酵试验，如未产气则继续 培养至 48 h±2 h，产气者进行复发酵试验。未产气者为大肠菌群阴性。

3．复发酵试验

用接种环从产气的 LST 肉汤管中分别取培养物 1 环，移种于煌绿乳糖胆盐肉汤（BGLB）管中，36 ℃±1 ℃培养 48 h±2 h，观察产气情况。产气者，计为大肠菌群阳性管。

4．大肠菌群最可能数（MPN）的报告

按复发酵试验确证的大肠菌群 LST 阳性管数，检索 MPN 表，报告每 g（mL）样品中大肠菌群的 MPN 值。

大肠菌群最可能数（MPN）检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
0.1	0.01	0.001		上限	下限	0.1	0.01	0.001		上限	下限
0	0	0	<3.0	——	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100

2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	——
注 1：本表采用 3 个稀释度[0.1g(mL)、0.01g(mL)和 0.001g(mL)]，每个稀释度接种 3 管。注 2：表内所列检样量如改用 1g(mL)、0.1g(mL)和 0.01g(mL)时，表内数字应相应降低 10 倍；如改用 0.01g(mL)、0.001g(mL)0.0001g(mL)时，则表内数字应相应提高 10 倍，其余类推。											

实验十二　果汁中霉菌和酵母菌的测定

一、目标要求

知识目标：了解霉菌计数的概念及测定意义；

掌握山楂汁中霉菌计数的测定原理、方法。

技能目标：能正确根据国标方法对果汁中霉菌的数量进行测定。

二、预前知识

霉菌和酵母广泛分布于自然界并可作为食品中正常菌相的一部分。长期以来，人们利用某些霉菌和酵母加工一些食品，如用霉菌加工干酪和肉，使其味道鲜美；还可利用霉菌和酵母酿酒、制酱；食品、化学、医药等工业都少不了霉菌和酵母。但在某些情况下，霉菌和酵母也可造成中腐败变质。由于它们生长缓慢和竞争能力不强，故常常在不适于细菌生长的食品中出现，这些食品是 pH 低、湿度低、含盐和含糖高的食品、低温贮藏的食品，含有抗菌素的食品等。

由于霉菌和酵母能抵抗热、冷冻，以及抗菌素和辐照等贮藏及保藏技术，它们能转换某些不利于细菌的物质，而促进致病细菌的生长；有些霉菌能够合成有毒代谢产物一霉菌毒素。霉菌和酵母往往使食品表面失去色、香、味。例如，酵母在新鲜的和加工的食品中繁殖，可使食品发生难闻的异味，它还可以使液体发生混浊，产生气泡，形成薄膜，改变颜色及散发不正常的气味等。因此霉菌和酵母也作为评价食品卫生质量的指示菌，并以霉菌和酵母计数来制定食品被污染的程度。目前已有若干个国家制订了某些食品的霉菌和酵母限量标准。我国已制订了一些食品中霉菌和酵母的限量标准。

三、任务实施

果汁中霉菌和酵母菌计数的测定（依据 **GB4789.15-2016**）

（一）设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

（1）恒温培养箱：28 ℃±1 ℃

（2）均质器或振荡器

（3）无菌吸管：1ml（具 0.01ml 刻度）、10ml（具 0.1ml 刻度）或微量移液器及吸头。

（4）无菌锥形瓶：容量 250ml、500ml。

（5）无菌培养皿：直径 90 mm。

（6）无菌广口瓶：500ml。

（7）无菌试管：10 mm×75 mm。

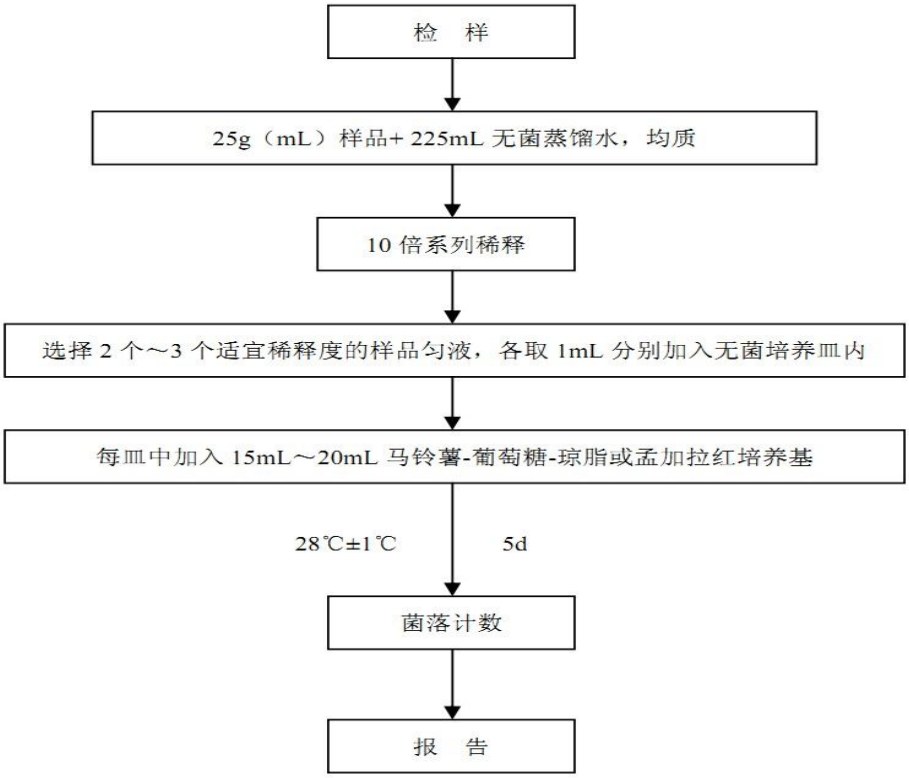
（二）培养基和试剂

（1）马铃薯-葡萄糖-琼脂（Potato Dextrose Agar，PDA）。

（2）孟加拉红培养基（Rose Bengal Medium）。

（三）检验程序

霉菌计数的检验程序如下。



（四）操作步骤

1．样品的稀释

25 g(ml)样品+225 ml 蒸馏水，均质。10倍系列稀释。每递增稀释一次，换用 1 次 1 ml 无菌吸管或吸头。（注意吸管或吸头尖端不要触及蒸馏水面）选择2个～3个适宜稀释度的样品匀液，各取1 ml分别加入无菌培养皿内。吸取 1 ml 空白蒸馏水作空白对照。（每个样品两个平行）及时将15 ml～20 ml冷至46 ℃的马铃薯-葡萄糖-琼脂或孟加拉红培养基（可放置于46 ℃±1 ℃恒温水浴箱中保温）倾注平皿。旋转平皿，充分混匀。

2．培养

待琼脂凝固后，正置，28 ℃±1 ℃培养 5 d，观察并记录。

3．菌落计数

记录各稀释倍数和相应的霉菌和酵母菌数。以菌落形成单位（CFU）表示。选取 10～150CFU 的平板，分别计霉菌和酵母数。霉菌蔓延生长为多不可计。取两个平板平均值。

4．结果与报告

若所有平板菌落数≥150 CFU，则对稀释度最高平板计数，其他记为多可不计，结果按稀释度最高平板计算。

若均＜10 CFU 时，则按稀释度最低倍数计算。

若所有稀释度平板均无生长，则以＜1 乘以稀释倍数；如为原液，则以＜1 计数。

菌落数＜100 CFU 时，按“四舍五入”原则修约，以整数报告。

菌落数≥100 CFU 时，第 3 位数字采用“四舍五入”原则，修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数；也可用 10 的指数形式来表示，按“四舍五入”原则，修约后，采用两位有效数字。

称重取样以 CFU/g 为单位报告，体积取样以 CFU/ml 为单位报告，报告或分别报告霉菌和/或酵母数。