

微生物学实验 简明教程

◎ 张美玲 贾彩凤 编著

Weishengwuxue Shiyan Jianming Jiaocheng



著名
上海市
商标

华东师范大学出版社

全国百佳图书出版单位

微生物学实验 简明教程

张美玲 贾彩凤 编著

Weishengwuxue Shiyan Jianming Jiaocheng



上海市
著名商标

华东师范大学出版社
全国百佳图书出版单位

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验简明教程/张美玲,贾彩凤编著. —上海:
华东师范大学出版社,2015.6
华东师大教材基金
ISBN 978-7-5675-3731-6

I. ①微… II. ①张…②贾… III. ①微生物学—实
验—师范大学—教材 IV. ①Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 136521 号

华东师范大学教材出版基金资助出版
微生物学实验简明教程

编 著 张美玲 贾彩凤
组稿编辑 孔繁荣
项目编辑 夏 玮
审读编辑 陈俊学
装帧设计 高 山

出版发行 华东师范大学出版社
社 址 上海市中山北路 3663 号 邮编 200062
网 址 www.ecnupress.com.cn
电 话 021-60821666 行政传真 021-62572105
客服电话 021-62865537 门市(邮购)电话 021-62869887
地 址 上海市中山北路 3663 号华东师范大学校内先锋路口
网 店 <http://hdsdcbs.tmall.com>

印 刷 者 当纳利(上海)信息技术有限公司
开 本 787×1092 16 开
印 张 7.5
字 数 109 千字
版 次 2015 年 7 月第一版
印 次 2015 年 7 月第一次
书 号 ISBN 978-7-5675-3731-6/Q·028
定 价 22.00 元

出 版 人 王 焰

(如发现本版图书有印订质量问题,请寄回本社客服中心调换或电话 021-62865537 联系)

前言

微生物学是生命科学领域中最重要,研究最为活跃的学科之一。微生物形态微小,结构简单,但是它们与人类关系非常密切。以微生物作为研究载体的许多实验原理和方法已经广泛应用于生命科学、农业、畜牧业、工业、医学及环境保护等许多领域。

微生物学实验教学是培养学生动手能力的重要环节。该课程旨在训练学生掌握微生物学最基本的实验操作技能,了解微生物学的基本知识,加深理解课堂讲授的微生物学理论知识;同时,通过实验培养学生观察、思考、分析问题和解决问题的能力,和实事求是、严肃认真的科学态度。微生物学科发展迅速,许多新型的研究技术不断涌现,我们总结、整理了华东师范大学使用多年的实验讲义,同时参考国内兄弟高校的相关教材,编写了这本《微生物学实验简明教程》。本书适用于普通高校的微生物学实验教学,共涵盖 17 个实验,包括基础实验部分和综合应用实验部分。在基础实验部分,我们增加了环境微生物多样性分析的实验内容,以适应微生物分子生态学领域的快速发展。在综合应用实验部分,我们安排了从环境样品中分离筛选目标微生物的实验,该实验的开展可以有效整合基础实验部分学习到的培养基配制、高压蒸汽灭菌、分离纯化、染色镜检、细菌 DNA 抽提及多样性分析等多个实验内容;此外我们还安排了应用性较强的菌种选育和酸奶制备的实验。

与目前常用的实验用书相比,本书具有以下特点:

1. 在注重基础实验学习的同时,加强系统性训练。
2. 以问题为导向,帮助学生明确实验目的,增强学习兴趣。
3. 加入实验自评环节,督促学生在实验操作中关注自身操作的规范性,在课后总结并发现问题,便于学生在下一次的实验操作中有所改进。
4. 每一次实验后推荐相关文献,让学生了解每次实验的目的和意义,同时学习科学论文的撰写。

限于编者的水平和时间,不当之处在所难免,恳请微生物学界同行和读者指正。

编者

2015 年 3 月

目 录

实验一 培养基的配制和灭菌	1
实验二 微生物的接种及无菌操作技术	5
实验三 显微镜油镜的使用和细菌形态观察	11
实验四 细菌特殊结构的观察	15
实验五 酵母菌和细菌的大小测定及计数	18
实验六 大肠埃希氏菌生长曲线的测定	23
实验七 放线菌和真菌的形态观察	25
实验八 细菌的生理生化反应	29
实验九 物理、化学因素对微生物生长的影响	35
实验十 细菌基因组 DNA 的提取及检测	38
实验十一 基于基因组成差异的微生物多样性分析	41
实验十二 噬菌斑的观察和噬菌体效价的测定	44
实验十三 菌种的保藏	47
实验十四 环境样品中特定微生物的分离、纯化及鉴定	51
实验十五 水中细菌总数及大肠菌群数的测定	54
实验十六 乳酸发酵和酸奶的制备	58
实验十七 紫外线诱变选育高产蛋白酶菌株	60
附录	62
微生物学实验报告	71

实验一 培养基的配制和灭菌

一、想解决的问题

1. 微生物极其微小,很难用肉眼直接观察,如何让这些肉眼“看不见”的微生物变得“看得见”呢?
2. 细菌生长“吃”什么? 如何给细菌“烧饭”?

二、实验目的

1. 明确培养基配制的原理、操作方法和步骤。
2. 掌握高压蒸汽灭菌的操作步骤及原理。

三、实验原理

培养基是根据微生物生长、繁殖和代谢所需要的各种营养物质,用人工方法配制而成的基质。培养基除保证供给微生物生长所必需的营养物质外,还应提供适宜的酸碱环境、缓冲条件、盐类浓度等。微生物种类繁多,对营养的需求也各不相同;因此,在实际生产和实验中,我们需要配制不同种类的培养基,来满足微生物的生长需求。

按照培养基的物理状态,可以把培养基分为液体、半固体和固体三种类型。在液体培养基中,加入1%~2%的凝固剂如琼脂即为固体培养基。琼脂不能被微生物利用,仅起到凝固剂的作用。液体培养基中加入0.5%~1%的琼脂即配制成半固体培养基。液体培养基常用于菌种发酵、扩大生产等,半固体培养基常用于噬菌体效价测定、细菌运动能力的观察、厌氧菌的分离和菌种鉴定等固体培养基常用于微生物的分离、鉴定、计数和菌种保存。

按照用途的不同,培养基又可分为以下四种。

(一) 基础培养基(minimum medium)

基础培养基是含有一般微生物生长、繁殖所需的基本营养物质的培养基,如牛肉膏蛋白胨培养基。

(二) 加富培养基(enrichment medium)

加富培养基也称营养培养基,即在基础培养基中加入某些特殊营养物质,如:血液、血清、酵母浸膏、动植物组织液等制成的一类营养丰富的培养基。

(三) 鉴别培养基(differential medium)

鉴别培养基是用于鉴别不同类型微生物的培养基。在培养基中加入某种特殊化学物质,微生物在培养过程中能产生某种代谢产物;而这种代谢产物可以与培养基中的某些成分发生特定的化学反应,产生明显的特征性变化,从而可将该种微生物与其他微生物区分开来。鉴别培养基主要用于微生物的快速分类鉴定,以及分离和筛选产生某种代谢产物的微生物菌种,如用于鉴别大肠杆菌的伊红美兰培养基。

(四) 选择培养基(selective medium)

选择培养基是用来将某种或某类微生物,从混杂的微生物群体中分离出来的培养基。根据不同种类微生物的特殊营养需求,或对某种化学物质的敏感性不同,在培养基中加入相应的特殊营养物质或化学物质,抑制不需要的微生物的生长,促进所需微生物的生长,如阿什比无氮培养基。

为了培养目的微生物,培养基必须是无菌的,常用的灭菌方法是高压蒸汽灭菌。高压蒸汽灭菌是将待灭菌物品放入高压蒸汽灭菌锅内,排净锅内的空气,利用加热产生蒸汽;随着蒸汽压力的增加,温度逐渐上升;通常压力达到 1.05 kg/cm^2 的时候,灭菌锅内的温度达到 121°C ;在该温度下保持 $20\sim 30 \text{ min}$,可以有效杀死包括芽孢在内的所有微生物。该方法用于一般培养基、玻璃器皿等的灭菌。除了高压蒸汽灭菌,其他常用的灭菌方法有干热灭菌、紫外灭菌、过滤除菌等。

四、实验材料

1. 试剂:以牛肉膏蛋白胨培养基为例,牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、 1 mol/L 盐酸溶液、 1 mol/L 氢氧化钠溶液。
2. 用具:三角烧瓶、试管、试管帽、烧杯、量筒、天平、脱脂棉、牛皮纸、玻棒、pH 试纸。

五、实验内容

(一) 培养基的配制

1. 用量筒量取所需水量,倒入烧杯中。
2. 按照比例,用天平准确称取培养基的各种成分,并逐个溶入水中。
3. 配制固体培养基时,需加入琼脂粉,煮沸使之充分溶解,后用量筒定容。
4. 用氢氧化钠溶液或盐酸溶液调节至所需 pH。
5. 将培养基趁热倒入三角烧瓶或通过漏斗分装于试管中,每支试管的装入量为试管总体积的 $1/5$,即 4 mL 左右;在分装过程中,必须注意防止培养基沾在管口或瓶口上,以免

沾污棉塞而引起污染。在用三角瓶盛装固体培养基时,也可以将一定量的液体培养基分装后,按照所需要的量在三角瓶中加入相应的琼脂粉;灭菌过程中琼脂会自行溶化。

6. 分装完毕,塞上棉塞或者盖上试管帽。棉塞的大小和松紧程度必须适当,塞入长度约为棉塞总长的 $\frac{3}{5}$,棉塞的正确塞法和制作过程如图 1、图 2 所示。

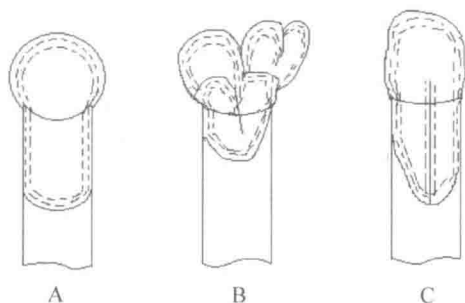


图 1 棉塞塞法

A 正确; B、C 不正确

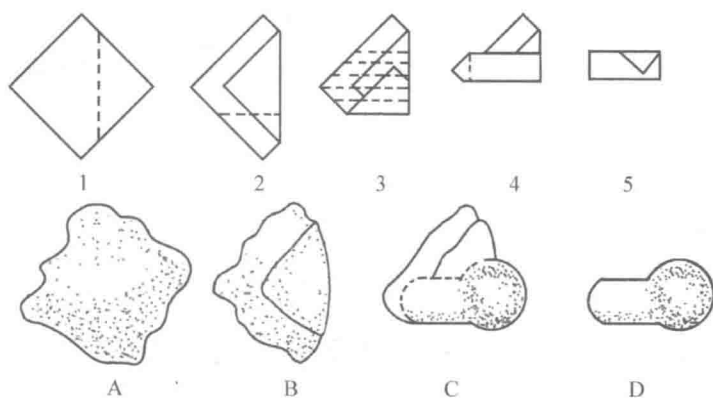


图 2 棉塞制作过程

7. 将试管用牛皮纸或者报纸包扎成捆(一般 7 支试管为一捆),塞好棉塞的三角烧瓶也应用牛皮纸包扎。注上班级、组别以及培养基名称和配制时间。

(二) 高压蒸汽灭菌技术

1. 在灭菌锅内加蒸馏水至水线(图 3)。
2. 把欲灭菌的培养基或其他玻璃器皿放入锅内,加盖,以对称方式旋紧螺旋,使灭菌锅紧闭。
3. 点火加热,当压力上升至 0.04 MPa 时打开排气阀,排尽锅内冷空气,压力也随着下降到“0”,关上排气阀。
4. 继续加热,待压力由“0”上升至 0.1 MPa ,即 121°C 时,调节火焰,保温 30 min。为了

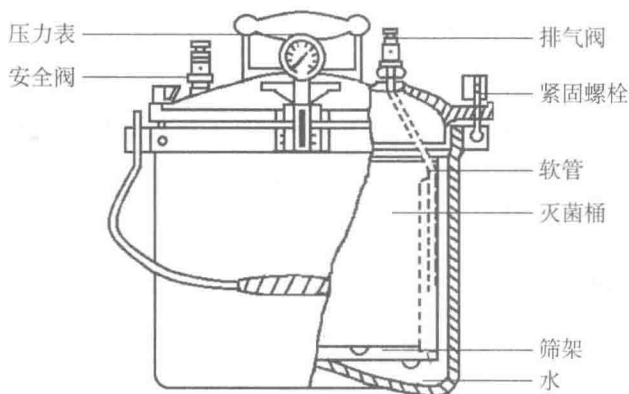


图3 手提式灭菌锅构造

防止葡萄糖在高温下发生碳化,对于有些含有糖类的培养基灭菌温度为 115°C ,灭菌时间为 15 min。

5. 灭菌结束后,关掉煤气灯,等锅内压力自然降至“0”时,打开排气阀(先部分打开,后全部打开),打开锅盖。

6. 取出灭菌锅内物品,高压灭菌的器皿可以放置于烘箱内烘干后备用。

7. 为了检查培养基灭菌是否彻底,可将制备好的培养基放在 37°C 下培养 24~48 h,观察有无杂菌生长。

六、注意事项

1. 称量牛肉膏或酵母膏时,可将称量纸一同放入水中,待原料溶解后,去除纸片即可。

2. 当所称量药品种类较多时,注意按照培养基配方中的顺序逐一进行称量,以免漏加或者重复。

3. 称量时严防药品混杂。药勺洗净、擦干后方可称取第二种药品。当所量取的药品质量非常少时,可以配成浓度较高的母液,经过计算后加入相应的体积即可。

4. 对于需要调整 pH 值的培养基,一定要在所有溶质都溶化、定容以后才能用盐酸溶液或氢氧化钠溶液调整。

七、推荐阅读材料

1. 张毅、费晓雯、彭世清、邓晓东:《4种培养基对小球藻 *Chlorella* spp. 生长和油脂积累的影响》,《热带作物学报》,2010年第8期。

2. 袁辉林、康丽华、王胜坤:《红树林植物促生菌 SZ7-1 菌株的培养基优化》,《微生物学通报》,2011年第3期。

实验二 微生物的接种及无菌操作技术

一、想解决的问题

1. 为了更好地让细菌生长,在实验中我们经常需要给细菌“搬家”,如何在“搬家”的过程中,避免杂菌污染?

2. 在细菌培养过程中,既要避免所培养的细菌被杂菌污染,也要避免所培养的细菌污染环境,因此我们要进行无菌操作。如何进行无菌操作呢?

二、实验目的

1. 掌握常用的微生物接种的操作方法。
2. 学习无菌操作技术。

三、实验原理

微生物接种技术是进行微生物实验和相关研究的基本操作技能。无菌操作是微生物接种技术的关键,它能保证实验用或检测用微生物不被其他微生物污染,同时也可以保证实验人员不被微生物感染。接种是一种必须在一个无杂菌污染的环境中进行的严格的无菌操作。因实验目的、培养基种类及实验器皿等的不同,所用接种方法不尽相同,斜面接种、液体接种、固体接种和穿刺接种均为常用的接种方法。

在每次无菌操作前后,均应打开紫外灯照射 30 min,进行紫外灭菌。

四、实验材料

1. 培养基:牛肉膏蛋白胨固体培养基、牛肉膏蛋白胨液体培养基、牛肉膏蛋白胨半固体培养基。
2. 器械:接种环、接种针、涂布棒、煤气(酒精)灯、恒温培养箱。
3. 菌种:大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)菌液。

五、实验内容

(一) 斜面的制备

灭菌的试管培养基趁热斜放在架子上,使管内的培养基凝固成斜面。放置时注意不要



图1 搁置斜面

使试管来回移动以致凝固后的斜面不平整,也不要使斜面超过试管总长的 $\frac{2}{3}$,更不要使培养基碰到棉塞造成杂菌污染(见图1)。

(二) 倒平板

常用的倒平板的方法有两种,即持皿法和叠皿法。将需倒平板的培养基放置于水浴锅中冷却到 $50\sim 55^{\circ}\text{C}$,按照图2所示进行操作。

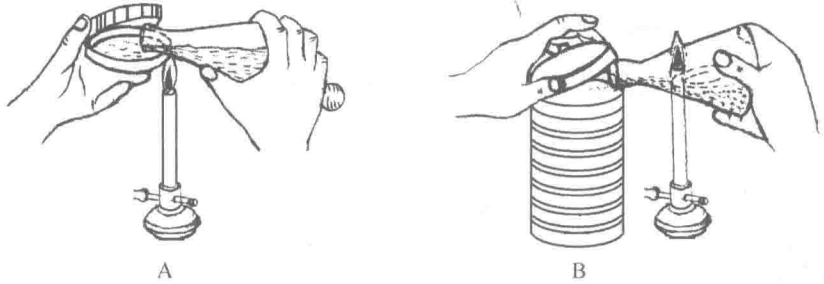


图2 倒平板

A 持皿法; B 叠皿法

持皿法的操作过程如下。

1. 在煤气(酒精)灯火焰旁左手握住锥形瓶底部,倾斜锥形瓶,然后用右手的小指和手掌边缘夹住棉塞并将它拔出,勿将棉塞放在桌面上,随之将瓶口周缘在火焰上过一下,不可灼烧,以防爆裂,杀死可能沾在瓶口外的杂菌即可。

2. 然后将三角瓶从左手传至右手中(用右手的拇指、食指和中指拿住三角瓶的底部),操作过程中瓶口应保持在离火焰 $2\sim 3\text{ cm}$ 处,瓶口始终向着火焰,目的是杀灭瓶口的杂菌,防止杂菌污染培养基。

3. 左手拿起一套培养皿,用中指、无名指和小指托住培养皿底部,用食指和拇指夹住皿盖并开启一缝,恰好能让三角瓶伸入,右手将培养基倒入培养皿中,一般约 $15\sim 20\text{ mL}$ 的培养基即可铺满整个皿底,立刻盖上皿盖。

4. 平板培养基的冷凝方法有两种,一种是将平板一个个摊在桌面上冷凝,另一种是将几个平板叠在一起冷凝。前者冷凝速度较快,在室温较高时采用;而后者冷凝速度较慢,可在室温较低时采用,其优点是形成冷凝水少,尤其适用于平板划线等的需要。待平板冷却凝固后,将平板倒过来放置,目的是防止培养基冷却过程中形成的水滴落到培养基表面。

5. 如果瓶中仍有剩余的培养基,可将三角瓶移至左手,瓶口再次过火并塞紧棉塞,以备后用。

叠皿法的步骤与持皿法基本相同。不同点是左手不必持培养皿,而是将培养皿叠放在

煤气(酒精)灯的左侧并靠近火焰,用右手拿住三角瓶的底部,左手的小指与无名指夹住瓶塞,将其拔出,随即使瓶口过火,同时用左手打开最上面的皿盖,倒入培养基,盖上皿盖即移至水平位置待凝,再依次倒下面的平板。在操作过程中,瓶口应向火焰保持倾斜状,以防空气中微生物的污染。

(三) 斜面的接种

斜面接种是从已经长好的菌种斜面上挑取少量菌种到另一新鲜斜面培养基上的一种方法。具体操作如下(见图3)。

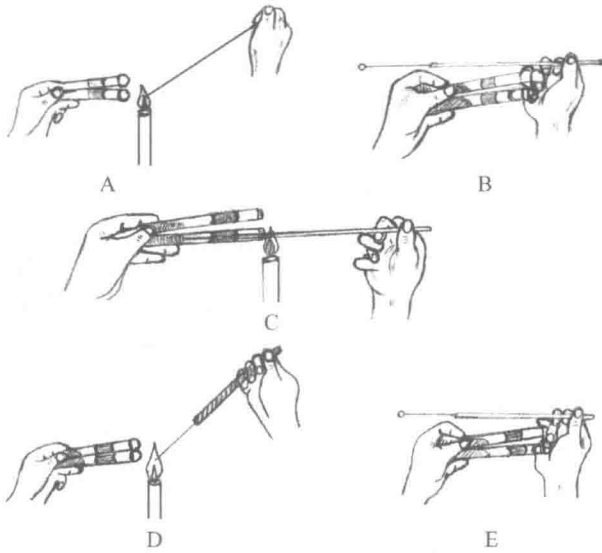


图3 斜面试管的握法及无菌操作接种的流程

1. 接种前在试管上贴标签,注明菌名、接种日期、接种者姓名等。标签贴在距试管口约2~3 cm的位置,也可用记号笔注明上述内容。

2. 点燃酒精灯,进行菌种的转接。将菌种和待接斜面的两支试管用大拇指和其他四指握在左手中,使中指位于两试管之间部位,使斜面向上,以便观察。

3. 用右手的无名指、小指和手掌边,先后取下菌种试管和待接种试管的管塞。随即试管口缓缓过火灭菌,切勿烧得过烫。

4. 将灼烧过的接种环伸入菌种试管,先使环接触没有长菌的培养基部分,使其冷却。待接种环冷却后,轻轻蘸取少量菌体或孢子,然后将接种环移出菌种试管,注意不要使接种环碰到管壁,取出后不可使接种环通过火焰(见图4)。

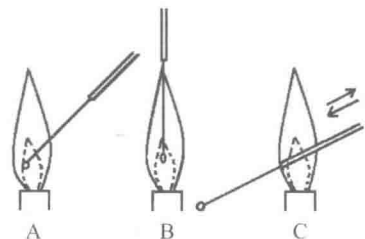


图4 接种环(或针)的灭菌

5. 接种:在火焰旁迅速将沾有菌种的接种环伸入另

一支待接斜面试管。从斜面培养基的底部向上部作“Z”形来回密集划线,切勿划破培养基。

6. 盖试管盖:取出接种环,灼烧试管口,并在火焰旁将试管盖盖上。盖试管盖时,不要移动试管去迎试管盖,以免试管在移动时混入不洁空气。

7. 将接种环灼烧灭菌后,放下接种环。

(四) 平板划线及涂布

通过平板划线方法,将混杂的细菌在平板表面按照一定的梯度逐一分散,经培养后,各自形成菌落(colony)。根据菌落形态、特征挑选单个菌落,再次划线培养后,即得到纯种细菌。

分区划线法是常用的平板划线法之一。分区划线法适用于含菌多的检测标本,如粪便,咳痰、细菌固体培养物等,操作过程如下(见图5)。

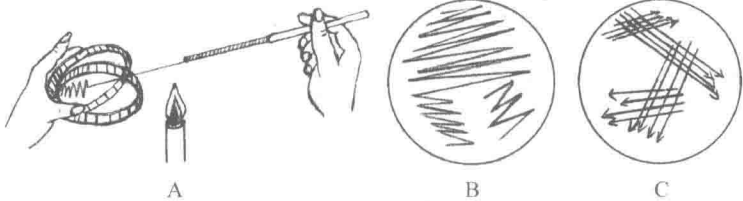


图5 平板划线

A. 划线分离操作; B. 用于稀释菌液,可连续划线;
C. 用于较浓的菌样,分数次划线,每次划线后要灼烧接种环,然后再划下一区

1. 左手斜持平板皿底,右手持接种环。接种环在火焰上灭菌,冷却后,蘸取标本,先在平板的一端涂开,并从此处开始向下划密集的平行线,约占平板面积的 $1/5 \sim 1/4$,随后接种环过火灭菌。

2. 将平板转约 70° 角,待接种环冷却后,使接种环通过已划线的第1区,与第1区首尾相连作连续密集划线,约占平板面积的 $1/4$,接种环再过火灭菌。

3. 再转平板约 70° 角,同上法在第3区划线。

4. 重复上述操作在第4区划线,划满余下的培养基表面。盖上培养皿盖,接种环灭菌后放好,培养皿倒置培养。

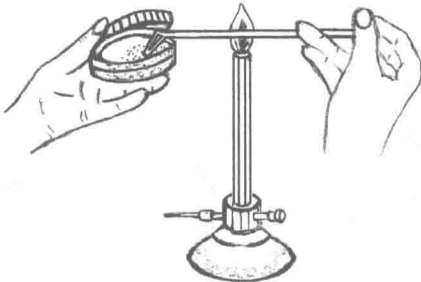


图6 平板涂布

(五) 平板涂布

平板涂布操作过程如下(见图6)。

1. 将 0.1 ml 菌液加入到平板表面中央位置。

2. 右手拿推棒过火加热灭菌,左手持培养皿打开盖子,可以把推棒在培养皿盖上靠一段时间,

使之彻底冷却。

3. 然后使推棒置于平板表面,将菌液先沿一条直线轻轻地来回推动,使之均匀分布,然后改变方向沿另一直线来回推动,平板边缘处推棒可以改变方向再涂布几次。

4. 盖上培养皿盖,过火使推棒灭菌,培养皿倒置培养。

(六) 穿刺接种

穿刺接种技术是一种用接种针挑取少量菌体,并把它穿刺到固体或半固体的深层培养基中的接种方法。经穿刺接种后的菌种,常作为保藏菌种的一种形式,同时也是检查细菌运动能力的一种方法,它只适宜于细菌和酵母菌的接种培养。具体操作如下。

1. 左手持试管,旋松试管盖,右手拿接种针将针端以及在穿刺中可能伸入试管的其他部位,在火焰上灼烧灭菌。

2. 用右手的小指和手掌边拔出试管盖。接种针先在培养基部分冷却,再用接种针的针尖沾到少量菌种。

3. 接种有两种手持操作法。一种是水平法,它类似于斜面接种法,如图 7 所示。另一种是垂直法,穿刺时所用接种针都必须挺直,将接种针自培养基中心垂直地刺入培养基中。穿刺时要做到手稳、动作轻巧快速,并且要将接种针穿刺直到针尖接近试管的底部,然后沿着接种(垂直)线将针拔出,最后盖上试管盖,再将接种针上残留的菌种过火灼烧灭菌。

4. 将接种过的试管直立于试管架上,放在恒温箱中培养。

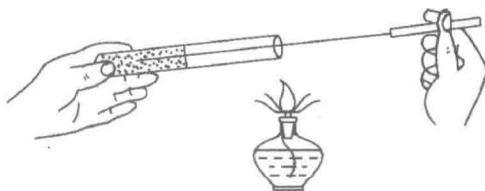


图 7 穿刺接种

六、注意事项

1. 在进行无菌操作时,切记关闭紫外灯。

2. 接种前在待接种的试管或者培养皿底部正确位置写清标记,以免因样品太多、时间过长而发生混淆。

3. 接种之后的涂布棒、接种环、接种针必须经无菌处理后方可放回操作台面的指定位置,以防污染环境。

七、推荐阅读材料

1. 朱广廉:《植物组织培养中灭菌和无菌操作的几个问题》,《植物生理学通讯》,1995年第5期。
2. 黄碧芳、余文英:《微生物实验教学改革之无菌操作技术关联实验》,《中国科技信息》,2010年第20期。

实验三 显微镜油镜的使用和细菌形态观察

一、想解决的问题

1. 细菌个体微小,它们到底是什么样子的? 我们如何对它们进行观察?
2. 很多药品说明书都会说明该药品对革兰氏阳性菌或者革兰氏阴性菌有效,那么这两类细菌是如何区分的呢?

二、实验目的

1. 掌握显微镜油镜的使用方法。
2. 掌握细菌简单染色和革兰氏染色的基本技能。

三、实验原理

(一) 显微镜结构介绍及使用原理

显微镜是微生物学研究中必不可少的实验设备,借助于各种显微镜,人们可以观察到各类细菌及真菌的形态结构。在微生物学实验的操作中,最常用到的是光学显微镜,它分为机械装置和光学系统两部分,其中机械装置包括镜座、镜臂、镜筒、物镜转换器、镜台、调焦装置;光学系统包括目镜、物镜、聚光器和反光镜(见图1)。

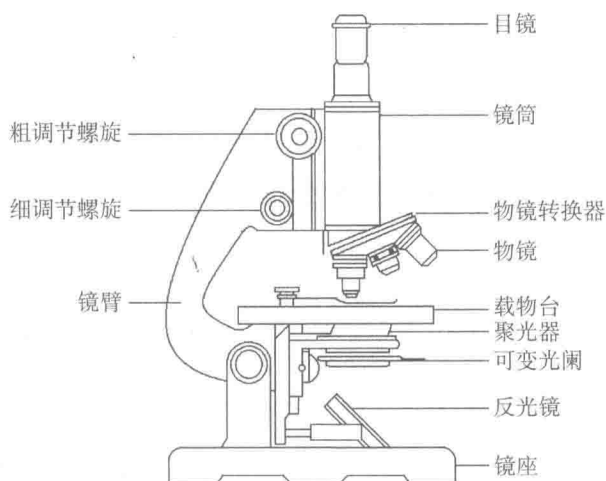


图1 光学显微镜的构造

对于显微镜而言,分辨率是指显微镜能分辨两点之间最小距离的能力,一台显微镜所

能达到的最小可分辨距离越小,则该显微镜的分辨率就越高,分辨率是决定其观察效果的最重要指标。

$$\text{最小可分辨距离} = 0.5\lambda / n \sin \theta$$

其中 λ 为所用光源的光波, n 为玻片与物镜间介质的折射率, θ 为物镜镜口角的半数(见图 2)。从公式可见,增加玻片与物镜间介质的折射率可以提高显微镜的分辨率。在载玻片和物镜(油镜)之间,滴 1 滴与玻璃折射率基本相似的香柏油(1.52 : 1.515),消除光线由一种介质经空气进入另一种介质时所产生的散失,可使视野清晰(见图 3)。

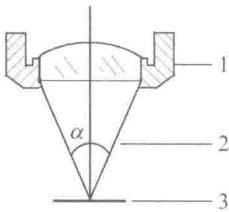


图 2 物镜的镜口角

1. 物镜; 2. 镜口角; 3. 标本

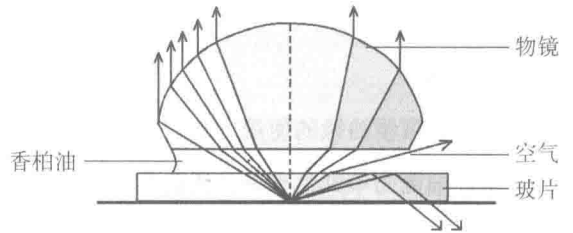


图 3 油浸系(左)和干燥系(右)的光线通路

但由于光学显微镜在最短的可见光波长($\lambda=450 \text{ nm}$)下可达的最小分辨距离为 $0.18 \mu\text{m}$,肉眼正常分辨能力一般为 0.25 mm ,所以光学显微镜有效的放大倍数为 $1000\sim 1500$ 倍。

(二) 细菌的简单染色法和革兰氏染色法

细菌个体微小,无色透明,在普通光学显微镜下不易识别,必须用适当的染料使其着色,经染色的菌体与背景形成明显的色差,从而能更清楚地观察到其形态和结构,因此染色技术是细菌观察鉴定中的基本技术之一。

简单染色法是只用一种染料使细菌着色以显示其形态的染色法。简单染色法不能辨别细菌内部的构造。该方法操作简单,常用于观察细菌的形态。在进行染色前通常要利用加热或者化学方法使细菌固定,这样可以杀死细菌并使细菌粘附在玻片上,同时可以增加菌体对染料的亲和力。

革兰氏染色法于 1884 年由丹麦病理学家 Christain Gram 创立,该法主要根据细菌细胞壁结构的不同,对细菌进行分类,是细菌分类上常用的鉴别染色方法。革兰氏阳性菌细胞壁结构比较致密,肽聚糖层厚,脂质含量少,乙醇不易渗透;革兰氏阴性菌细胞壁结构比较疏松,肽聚糖层薄,含大量脂质,乙醇易渗入;其次,革兰氏阳性菌等电点比革兰氏阴性菌低,在相同 pH 条件下,革兰氏阳性菌所带负电荷要多,故与带正电荷的结晶紫染料结合得较紧密,不易脱色;再次,革兰氏阳性菌菌体含大量核糖核酸镁盐,可与碘、结晶紫紧密结合,使已着色的细菌不易被乙醇脱色,革兰氏阴性菌则易被脱色。因此经乙醇脱色后,革兰