

Food

A Series of Food Science
& Technology Textbooks

食品科技
系列

普通高等教育“十三五”规划教材



食品微生物学实验 简明教程

柴新义 主编



化学工业出版社

食品微生物学实验简明教程

柴新义 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

本书介绍了与食品微生物学教学、科研和生产中有关的微生物学实验的基本原理和操作技术,同时适当介绍了一些当前生产实践有关的新技术。全书分三部分:第一部分介绍微生物学的基本实验技术;第二部分介绍微生物学上的应用实验技术;第三部分介绍食品微生物学综合设计性实验,与生产实际相结合。本书涵盖显微镜技术、无菌操作技术、染色技术、形态结构观察,培养基制备、消毒灭菌、接种与培养,分离与纯化、生理生化反应、食品中微生物学检测、菌种保藏等内容。

本书可作为高等院校食品科学与工程、食品质量与安全专业的教科书,也可作为制药工程、发酵工程等相关专业的参考书,还可作为食品相关企业、食品卫生检验部门以及从事食品微生物和发酵工作的人员的参考资料。

图书在版编目(CIP)数据

食品微生物学实验简明教程/柴新义主编. —北京:
化学工业出版社, 2016. 1
ISBN 978-7-122-25698-0

I. ①食… II. ①柴… III. ①食品微生物-微生物
学-实验-教材 IV. ①TS201.3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 282495 号

责任编辑:魏巍 赵玉清
责任校对:边涛

文字编辑:焦欣渝
装帧设计:关飞

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)
印 装:三河市延风印装有限公司
710mm×1000mm 1/16 印张12 字数258千字 2016年2月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899
网 址: <http://www.cip.com.cn>
凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:29.00元

版权所有 违者必究

本书编写人员名单

主 编 柴新义
编 者 (按照姓名笔画排序)
于士军 张磊 柴新义 殷培峰
主 审 孙艳辉

前言

食品微生物学实验是食品微生物学的重要组成部分，是食品微生物学教学的重要内容。

我们总结分析了滁州学院长期开设微生物学实验课的经验及实施效果，在把握学生应该学习和掌握的微生物学实验技能和应该具备的综合能力与创新意识的基础上，大力精简了部分实验内容，并参考了国内有关教材以及相关资料编写而成。本书力求重点突出，层次分明，条理清晰，简洁易懂，技术实用，能让学生掌握关键“核心知识和技术”，切实做到学以致用。

全书共分三大部分：第一部分“食品微生物学基础实验”，介绍微生物学的基本实验技术；第二部分“食品微生物学应用实验”，介绍食品行业中微生物学上的重要应用实验技术；第三部分“食品微生物学综合设计性实验”，与生产实际相结合培养学生的创新能力。全书涵盖了显微镜技术、无菌操作技术、染色技术、形态结构观察，培养基制备、消毒灭菌、接种与培养，分离与纯化、生理生化反应、食品中微生物学检测、菌种保藏等内容。

本书由柴新义任主编，参编人员还有于士军、张磊、殷培峰。第一部分由柴新义、张磊编写（其中实验一至实验十六由柴新义编写，实验十七至实验二十一由张磊编写），第二部分由张磊和于士军编写（其中实验二十二至实验三十一由张磊编写，实验三十二至实验三十六由于士军编写），第三部分（实验三十七至实验四十一）由于士军负责编写，食品微生物学实验须知和附录部分由殷培峰编写。柴新义负责统稿。本书初稿完成后，由柴新义改写和重写了部分实验，并对书稿进行校阅修改和定稿。本书引用了一些作者的图表，在此对原作者表示感谢！

在本书的编写过程中，孙艳辉教授审阅了编写大纲和教材书稿。

本教材是国家教育部资助的大学生工程实践教育基地建设的研究成果之一。

本教材涉及的学科较多，内容广泛，加之编者水平和能力有限，缺点和错误在所难免，恳请同行专家和广大读者提出宝贵意见，以便本书在使用中不断修改完善和提高。

编者

2015年8月

目录

| | |
|------------|---|
| 食品微生物学实验须知 | 1 |
|------------|---|

第一部分 食品微生物学基础实验 / 3

| | |
|-----------------------------|----|
| 实验一 普通光学显微镜的使用与微生物形态观察 | 3 |
| 实验二 细菌的革兰氏染色技术 | 6 |
| 实验三 细菌的芽孢、荚膜和鞭毛染色技术 | 8 |
| 实验四 培养基的制备与灭菌技术 | 14 |
| 实验五 微生物的分离、纯化和培养技术 | 21 |
| 实验六 四大类微生物类群的接种与培养技术 | 26 |
| 实验七 四大类微生物类群菌落形态特征的识别 | 30 |
| 实验八 酵母菌子孢子的培养与观察技术 | 35 |
| 实验九 微生物大小的测定技术 | 38 |
| 实验十 微生物的显微镜直接计数法 | 42 |
| 实验十一 微生物数量的测定(比浊法) | 45 |
| 实验十二 食品生产环境中微生物的检测技术 | 47 |
| 实验十三 利用常规生化试验反应鉴定微生物 | 51 |
| 实验十四 微生物的抗原与抗体反应实验(细菌的凝聚反应) | 57 |
| 实验十五 不同环境对微生物生长的影响 | 60 |
| 实验十六 食品中常用的食品防腐剂抑菌效果的测定技术 | 65 |
| 实验十七 营养素对微生物生长的影响 | 68 |
| 实验十八 紫外线人工诱变细菌产淀粉酶的育种技术 | 70 |
| 实验十九 大肠埃希氏菌营养缺陷型突变株的筛选技术 | 73 |
| 实验二十 细菌原生质体制备与融合技术 | 77 |
| 实验二十一 几种常见的微生物菌种保藏技术 | 80 |

第二部分 食品微生物学应用实验 / 85

| | |
|-------------------------|----|
| 实验二十二 食品生产用水中细菌总数的测定 | 85 |
| 实验二十三 食品中大肠菌群数的检测技术 | 87 |
| 实验二十四 新鲜乳制品中抗生素残留量的检测技术 | 92 |
| 实验二十五 火腿肠中金黄色葡萄球菌的检测 | 94 |

| | | |
|-------|-----------------------|-----|
| 实验二十六 | 花生制品中黄曲霉毒素的检测 | 98 |
| 实验二十七 | 食品中沙门氏菌属的检验 | 99 |
| 实验二十八 | 食品中志贺氏菌属的检测技术 | 103 |
| 实验二十九 | 海产品中副溶血性弧菌的检测技术 | 108 |
| 实验三十 | 食品中致病性大肠埃希氏菌的检验 | 110 |
| 实验三十一 | 发酵食品中肉毒梭菌的检验 | 115 |
| 实验三十二 | 蛋白质分解菌的检测 | 118 |
| 实验三十三 | 大肠埃希氏菌噬菌体的分离、检测及其效价测定 | 120 |
| 实验三十四 | 食品中诱变剂与致癌剂的检测技术 | 124 |
| 实验三十五 | 酸奶的制作和乳酸菌的分离、培养与性状观察 | 131 |
| 实验三十六 | 发酵风干香肠中葡萄球菌和微球菌的检测与鉴定 | 133 |

第三部分 食品微生物学综合设计性实验 / 137

| | | |
|-------|-------------------------------------|-----|
| 实验三十七 | 饮用水的微生物检测 | 137 |
| 实验三十八 | 调研购物超市中微生物发酵食品种类并制备其中的一种—— 泡菜的制作 | 140 |
| 实验三十九 | 产脂肪酶菌株的分离及选育 | 143 |
| 实验四十 | 微生物饮料的生产与质量控制技术 | 147 |
| 实验四十一 | 利用微生物进行食品保鲜 | 151 |

附录 / 156

| | |
|-----------------------|-----|
| 一、若干微生物的学名 | 156 |
| 二、酸碱指示剂的配制 | 160 |
| 三、常用培养基配方 | 162 |
| 四、染色液的配制 | 170 |
| 五、蒸汽压力与温度的关系 | 173 |
| 六、培养基容积与加压灭菌所需时间 | 173 |
| 七、缓冲液的配制表 | 174 |
| 八、常用消毒剂表 | 176 |
| 九、常用干燥剂 | 176 |
| 十、洗液的配制及器皿的洗涤 | 177 |
| 十一、标准筛孔对照表 | 179 |
| 十二、部分国家的菌种保藏机构名称和网址信息 | 180 |
| 十三、食品安全国家标准 | 182 |
| 十四、药品规格及其应用范围 | 182 |

参考文献 / 184

食品微生物学实验须知

微生物学实验课是微生物学及其相关专业学生学习和理解微生物学知识的基础，是锻炼和掌握微生物学基本操作技能的重要教学环节。为了圆满完成实验课的教学任务，实现教学目的，进入微生物学实验室从事相关实验的人员均应谨记如下实验室规则及注意事项。

1. 实验室登记

实验课前登记签到，若有失约应事先请假。

2. 实验室着装

进入实验室应着干净整洁的实验服，长发者应将头发束于脑后或实验帽内，实验操作人员最好勿穿高跟鞋，严禁穿拖鞋进入实验室。

3. 实验室课堂纪律

遵守课堂纪律，维护课堂秩序。不迟到早退。提倡独立思考，合作研究，勿喧哗，忌闲聊。实验室内禁止饮食和吸烟。衣物、书包和其他杂物应放置在远离实验台的位置。

4. 实验前准备

实验前应预习实验内容，了解实验目的、原理和方法，熟悉实验室环境。

5. 实验室安全

严格执行实验室各项规章制度，养成良好的实验习惯。实验室药品和试剂均应标签完整。实验前后应对实验者和操作环境进行消毒处理，有条件的应在无菌室中、超净工作台上、酒精灯前进行无菌操作。对于实验室的仪器设备谨记“不懂不动”的原则，应在掌握实验仪器设备的性能和使用方法的前提下规范使用（养成事先阅读说明书的好习惯）。使用压力容器（如高压灭菌锅等）时，须熟悉操作要求，时刻注意观察压力表，控制在规定压力范围内，以免发生危险。注意安全用电，电气设备使用前应检查有无绝缘损坏、接触不良或地线接地不良，故障电器应及时标记，并尽快上报维修。实验室应保持良好的通风条件，时刻注意实验室中水、火、电、气等方面的使用规范和安全要求。实验室必须配备消防器材、实验人员要熟悉其使用方法并掌握使用方法。

6. 实验室环境卫生

实验中产生的废液、废物应集中处理，不得任意排放（严禁弃物于洗涤槽内）。所有废弃的微生物培养物以及被污染的玻璃器皿、阳性的检验标本，均应先消毒灭菌处理（消毒水浸泡过夜，煮沸或高压蒸汽消毒灭菌等）后再清洗处置，有毒易污染的实验废液应倒入专门的废液回收器内。实验器具用完后应及时清洁并归位原处，玻璃器皿等容器应洗净倒置，摆放于固定位置。

7. 实验课组织

分组实验应该安排实验组长，组织实验活动，收发实验报告，教学沟通，安排值日。值日生负责监督各实验台的卫生，打扫并保持实验室环境卫生，倾倒垃圾，离开实验室前检查水、火、电、气及门窗等安全。

第一部分

食品微生物学基础实验

实验一 普通光学显微镜的使用与微生物形态观察

一、实验目的

1. 了解普通光学显微镜的基本构造。
2. 学会显微镜的正确使用方法。
3. 观察几种常见微生物的显微形态。

二、实验原理

显微镜的放大效能（分辨率）是由所用光波长和物镜数值口径决定，缩短使用的光波波长或增加数值口径可以提高分辨率，可见光的光波范围比较窄，紫外光波长短可以提高分辨率，但不能用肉眼直接观察。所以利用减小光波长来提高光学显微镜分辨率是有限的，提高数值口径是提高分辨率的理想措施。要增加数值口径，可以提高介质折射率，当空气为介质时折射率为 1，而香柏油的折射率为 1.51，和载片玻璃的折射率（1.52）相近，这样光线可以不发生折射而直接通过载片、香柏油进入物镜，从而提高分辨率。显微镜总的放大倍数是目镜和物镜放大倍数的乘积，而物镜的放大倍数越高，分辨率越高。微生物学使用的显微镜的物镜通常有低倍镜（10×）、高倍镜（40×）和油镜（100×），油镜是三者中放大倍数最大的。油镜的焦距和工作距离最短。油镜与其他物镜不同的是载玻片与物镜之间隔的不是一层空气（干燥系），而是一层油脂，称为“油浸系”。利用油镜的目的是增加显微镜的分辨力。

三、实验材料

1. 菌种

大肠杆菌 *Escherichia coli*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 等菌种装片。

2. 试剂

香柏油，二甲苯。

3. 仪器与其他用具

普通光学显微镜（图 1-1），擦镜纸等。



图 1-1 显微镜的实物构造图

现代普通光学显微镜由机械系统和光学系统两大部分组成。

机械系统主要包括：镜座、镜臂、载物台、转换器、调节装置等。

光学系统主要包括：物镜、目镜、聚光器、光源等。

四、实验流程

取镜→安放→低倍镜观察→高倍镜观察→油镜观察→整理

五、实验步骤

（一）观察前的准备

1. 显微镜的放置

将显微镜置于平稳的实验台上，镜座距实验台边沿约为 10cm。坐正，练习用左眼观察，右眼绘图或记录。

2. 调节光源

将低倍物镜转到工作位置，把光圈完全打开，聚光器升至与载物台相距约 1mm。可通过调节光源亮度旋钮将安装在镜座内的光源控制为适当的照明亮度。观察染色装片时，光线宜强；观察未染色装片时，光线不宜太强。

（二）低倍镜观察染色装片

首先，上升镜筒，将枯草芽孢杆菌染色装片置于载物台上，用弹簧夹夹住，将观察位置移至物镜正下方，物镜降至距离标本装片 0.5cm 处，适当缩小光圈，然后两眼从目镜观察，转动粗调节器使物镜逐渐上升（或使镜台下降）至发现物像时，改用

细调节器调节到物像清楚为止。移动装片，把合适的观察部位移至视野中心，仔细观察并绘图。

(三) 高倍镜观察

眼睛离开目镜从侧面观察，旋转转换器，将高倍镜转至正下方，注意避免镜头与玻片相撞。再由目镜观察，仔细调节光圈，使光线的明亮度适宜。用细调节器校正焦距使物镜观察到的物像清晰为止。将最适宜观察部位移至视野中心，左眼观察，右眼绘图。结束后，不要移动装片位置，准备用油镜观察。

(四) 油镜观察

1. 提起镜筒约 2cm，将油镜镜头转至正下方。在玻片标本的镜检部位（镜头的正下方）滴一滴香柏油，切勿滴加过多，否则易造成视野模糊。

2. 从侧面注视，小心慢慢降下镜头，使油镜浸入香柏油中至油圈不扩大为止，镜头几乎与装片接触，但不可压及装片，以免压碎玻片，损坏镜头。

3. 将光线调亮，左眼从目镜观察，用粗调节器将镜筒徐徐上升（切忌反方向旋转），当视野中有物像出现时，再用细调节器校正焦距。如因镜头下降未到位或镜头上升太快未找到物像，必须再从侧面观察，将油镜降下浸入油中，重复操作直至看清物像为止。仔细观察，并绘图。

4. 再次观察，提起镜筒，换上金黄色葡萄球菌或大肠杆菌染色装片，依次用低倍镜、高倍镜和油镜观察，并绘图。

(五) 镜检完毕后的整理

1. 移开物镜镜头。

2. 取出装片。

3. 清洁油镜。油镜使用完毕后，须用擦镜纸擦去镜头上的香柏油，再用擦镜纸蘸少许二甲苯擦掉残留的香柏油，最后再用干净的擦镜纸擦干残留的二甲苯。

4. 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。最后，套上镜罩，对号放入镜箱中，置阴凉干燥处存放。

六、注意事项

1. 取显微镜时必须右手握镜臂，左手托镜座，严禁单手提镜，勿使镜体倾斜，防止目镜从镜筒中滑出或碰撞显微镜。

2. 将显微镜平稳地放在自己左侧的适当地方，镜臂向着自己，镜检者姿势要端正。一般用左眼观察，右眼便于绘图或记录。两眼必须同时睁开，以减少疲劳。

3. 将镜台向上调节时，须从侧面观察，以防压碎标本玻片或损坏物镜镜头。油镜的工作距离较短，因此，操作时要特别谨慎，切忌用眼睛对着目镜一边观察一边下降镜筒。

4. 一般情况下观察标本均要加盖盖玻片，切忌水、酒精或其他药品浸损镜头或镜台。观察标本时，须按低“倍镜→高倍镜→油镜”的顺序进行。

5. 显微镜各部要保持清洁，光学部分必须用镜头纸擦拭，绝对禁止用其他物品

擦拭。其他部分可用纱布轻轻擦拭。各个镜面切忌用手涂抹，以免手上的油或汗沾于镜面而使得日后引起发霉或腐蚀。

6. 使用显微镜时一定要严格按规程操作，遇到问题，如机件不灵，千万不可用力转动，切忌任意拆修，应立即报告指导教师。

七、实验结果与报告

分别绘出在低倍镜、高倍镜和油镜下观察到的枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的形态，并注明物镜放大倍数和总放大率。

八、思考题

1. 用油镜便于观察细菌的依据是什么？使用油镜时，应特别注意哪些问题？
2. 当物镜从低倍镜转到高倍镜和油镜时，对照明度有何要求？应如何调节？

实验二 细菌的革兰氏染色技术

一、实验目的

1. 学习微生物涂片、染色的基本技术，并掌握革兰氏染色的方法。
2. 了解革兰氏染色法的原理及其在细菌分类鉴定中的重要性。
3. 巩固普通光学显微镜的使用方法。

二、实验原理

革兰氏染色反应是细菌分类和鉴定的重要特征。革兰氏染色技术是 1884 年由丹麦医师 Gram 创立的。采用革兰氏染色法不仅能观察到细菌的形态，而且还可将所有细菌区分为两大类：染色反应呈蓝紫色的称为革兰氏阳性细菌，用 G^+ 表示；染色反应呈红色（复染颜色）的称为革兰氏阴性细菌，用 G^- 表示。细菌对革兰氏染色的不同反应，是由于它们细胞壁的成分和结构不同而造成的。

通过结晶紫初染和碘液媒染后，在细胞壁内形成了不溶于水的结晶紫与碘的复合物，革兰氏阳性菌由于其细胞壁较厚、肽聚糖网层次较多且交联致密，故遇乙醇脱色处理时，因失水反而使网孔缩小，再加上它不含类脂，故乙醇处理不会出现缝隙，因此能把结晶紫与碘复合物牢牢留在壁内，使其仍呈蓝紫色；而革兰氏阴性菌因其细胞壁薄、外膜层类脂含量高、肽聚糖层薄且交联度差，在遇脱色剂后，以类脂为主的外膜迅速溶解，薄而松散的肽聚糖网不能阻挡结晶紫与碘复合物的溶出，因此通过乙醇脱色后呈无色，再经沙黄等红色染料复染，就使革兰氏阴性菌呈红色。

三、实验材料

1. 菌种

大肠杆菌 *Escherichia coli*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、金黄色葡萄球菌

Staphylococcus aureus 等斜面菌种。

2. 试剂

草酸铵结晶紫染色液、碘液、95%乙醇、0.5%番红(沙黄)染色液、香柏油、二甲苯、无菌生理盐水。

3. 仪器与其他用具

光学显微镜、灭菌的载玻片、盖玻片、酒精灯、火柴、小试管(75mm×10mm)、烧杯(300mL)、滴管、接种环、擦镜纸、镊子、吸水纸、洗瓶、计时器等。

四、实验流程

涂片→干燥→固定→结晶紫染液初染(1~2min)→水洗→碘液媒染(1min)→水洗→95%乙醇脱色(20~30s)→水洗→番红染液复染(1~2min)→水洗→干燥→镜检

五、实验步骤

1. 涂片

取两块载玻片,各滴一小滴生理盐水于玻片中央,用接种环以无菌操作分别从培养14~16h的枯草芽孢杆菌和培养24h的大肠杆菌的斜面上挑取少量菌苔于水滴中,混匀并涂成薄膜。

注意事项:载玻片要洁净无油迹;滴生理盐水和涂菌不宜过多;涂片要均匀,不宜过厚。

2. 干燥

室温,自然风干。

3. 固定

固定时通过酒精灯火焰2~3次即可,其目的是使细胞质凝固,以固定细胞形态,并使之牢固附着在载玻片上。

注意事项:热固定温度不宜过高,以载玻片背面不烫手为宜,否则会改变甚至破坏细胞形态,影响染色结果。

4. 染色(图2-1)

(1) 初染 加草酸铵结晶紫1滴,将菌膜覆盖,约1~2min,水洗。

(2) 媒染 滴加碘液冲去残水,并覆盖约1min,水洗。

(3) 脱色 将载玻片上面的水用吸水纸轻轻吸去,并衬以白背景,用95%酒精滴洗,至流出酒精刚刚不出现蓝紫色时为止,约20~30s,立即用水冲净酒精。

(4) 复染 用番红液复染1~2min,水洗。

(5) 镜检 干燥后,置光学显微镜下观察。革兰氏阴性菌呈红色,革兰氏阳性菌呈蓝紫色。

注意事项:水洗,以洗出的水无色为准。以分散开的细菌的革兰氏染色反应为准,过于密集细菌,常常呈假阳性。革兰氏染色的关键在于严格掌握酒精脱色程

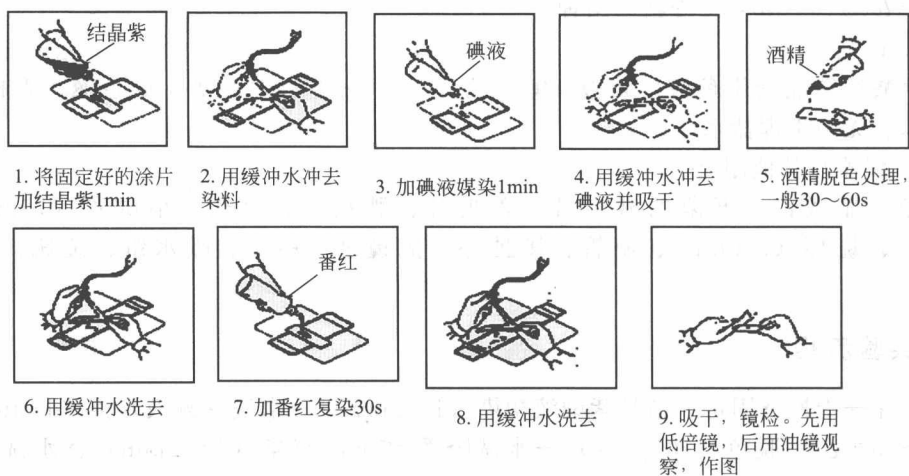


图 2-1 革兰氏染色过程图

度，如脱色过度，则阳性菌可被误染为阴性菌；而脱色不够时，阴性菌可被误染为阳性菌。此外，菌龄长短也会影响染色结果，如阳性菌培养时间过长，或已死亡及部分菌自行溶解了，都常呈阴性反应。镜检时，从低倍镜到高倍镜依次查找物像。

六、实验结果与报告

请将各菌株的染色结果填写至下表中。

| 序号 | 菌种 | 染色结果 | G ⁺ / G ⁻ | 备注说明 |
|----|--------------------------------------|------|---------------------------------|------|
| 1 | 大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> | | | |
| 2 | 枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> | | | |
| 3 | 金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> | | | |

七、思考题

1. 为什么革兰氏染色涂片时要涂得均匀且薄？革兰氏染色成败的关键一步是什么？为什么？
2. 如何证明未知菌染色结果的可靠性？

实验三 细菌的芽孢、荚膜和鞭毛染色技术

一、实验目的

1. 掌握芽孢涂片及芽孢染色的原理和步骤。
2. 学习并掌握荚膜染色法。

3. 学习并初步掌握鞭毛染色法，观察细菌鞭毛的形态特征。
4. 巩固显微镜操作技术及无菌操作技术。

二、实验原理

芽孢是芽孢杆菌属和梭菌属细菌生长到一定阶段形成的一种抗逆性很强的休眠体结构，也被称为内生孢子，通常呈圆形或椭圆形。细菌能否形成芽孢及芽孢的形状、着生位置、芽孢囊是否膨大等特征都是鉴定细菌的重要指标。与正常细胞或菌体相比，芽孢壁厚、透性低而不易着色，但是芽孢一旦着色就很难被脱色。利用这一特点，首先用着色能力较强的染料，如孔雀绿或碱性品红在加热条件下进行染色，此染料不仅可以进入菌体，而且也可以进入芽孢，进入菌体的染料可经水洗脱色，而进入芽孢的染料则难以透出。再用对比度大的复染剂（如番红液）染色后，菌体染上复染剂颜色，而芽孢仍为原来的颜色，这样就可以将两者区别开来。

某些细菌生长到一定阶段，在一定条件下会向细胞壁外分泌一层黏性的多糖类物质——荚膜。荚膜含水分多，疏松且较薄，受热易失水变形。荚膜不易染色，故常用衬托染色法，即将菌体着色，而将不着色的透明荚膜衬托出来。目前，荚膜染色法一般有湿墨水法、干墨水法和 Tyler 法。

鞭毛是细菌的运动器官，鞭毛的有无、数量及着生方式也是细菌分类的重要指标。鞭毛直径一般为 10~30nm，只有用电镜才能直接观察到。若要用普通光学显微镜观察，必须使用鞭毛染色法。首先，用媒染剂（如单宁酸或明矾钾）处理，使媒染剂附着在鞭毛上使其加粗。然后，用碱性复红（Gray 氏染色法）、碱性复品红（Leifson 氏染色法）、硝酸银（West 氏染色法）或结晶紫（Difco 氏染色法）进行染色。本实验介绍硝酸银染色法和改良的 Leifson 氏染色法，前一种方法更容易掌握，但染色剂配制后保存期较短。

三、实验材料

1. 菌种

巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*、胶质芽孢杆菌 *Bacillus mucilaginosus*、普通变形杆菌 *Proteus vulgaris* 或枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。

2. 试剂

孔雀绿染色液、沙黄染色液、草酸铵结晶紫、番红水溶液、6%葡萄糖水溶液、1%甲基紫水溶液、甲醇、冰醋酸、20%硫酸铜水溶液、结晶紫水溶液、硝酸银鞭毛染色液（A 液、B 液）、Leifson 氏鞭毛染色液、美蓝水溶液、香柏油、蒸馏水、95%乙醇溶液。

Leifson 氏鞭毛染色液：

A 液：碱性复红 1.2g，95%乙醇 100mL。

B 液：鞣酸 3g，蒸馏水 100mL，0.2%苯酚。

C 液：氯化钠 1.5g，蒸馏水 100mL。

染色液分别贮藏于玻璃瓶中，在室温下比较稳定。使用前将上述 A、B、C 溶液

等比例混合，混合液置冰箱中可存放数周。

3. 仪器与其他用具

普通光学显微镜、载玻片、盖玻片、接种环、玻片搁架、酒精灯、擦镜纸、镊子、香柏油、二甲苯、无菌水、吸水纸、记号笔等。

四、实验流程

1. 芽孢染色法

制片→染色→水洗→复染→水洗→镜检

2. 荚膜染色法

(1) Tyler 法

涂片→干燥→固定→染色→脱色→干燥→镜检

(2) 湿墨水法

制菌液→制片→镜检

(3) 干墨水法

制菌液→制片→干燥→固定→干燥→染色→水洗→镜检

3. 鞭毛染色法

(1) 硝酸银染色法

制片→干燥→染色→干燥→镜检

(2) Leifson 氏染色法

清洗→涂片→染色→镜检

五、实验步骤

(一) 芽孢染色法

1. 制片

按常规涂片、干燥、固定。

(1) 涂片 取两块载玻片，各滴一小滴生理盐水于玻片中央，用接种环以无菌操作分别从培养 12~14h（培养温度 37℃）的巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* 的斜面上挑取少量菌苔于水滴中，混匀并涂成薄膜。

注意事项：载玻片要洁净无油迹；滴生理盐水和涂菌不宜过多；涂片要均匀，不宜过厚。

(2) 干燥 室温下自然风干。

(3) 固定 固定时通过酒精灯火焰 2~3 次即可，其目的是使细胞质凝固，以固定细胞形态，并使之牢固附着在载玻片上。

2. 染色

加数滴 5% 孔雀绿染色液于涂片上，用木夹夹住载玻片一端，在微火上加热至染色液微冒蒸汽，并开始计时，维持 5min。加热过程中及时补充染色液，切勿让涂片干涸。

3. 水洗

待玻片冷却后，用缓流自来水冲洗载玻片，直至流出的水无色为止。