



GAODENG XUOXIAO ZHUANYE JIAOCAI

• 高等学校专业教材 •

[高校教材]

乳品微生物学实验技术

主编 杜 鹏

主审 霍贵成

THE EXPERIMENTAL TECHNIQUES IN
DAIRY MICROBIOLOGY



中国轻工业出版社

高等学校专业教材

乳品微生物学实验技术

主 编 杜 鹏

副主编 姜瞻梅 刘丽波

主 审 霍贵成

 中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

乳品微生物学实验技术 / 杜鹏主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2008.7

高等学校专业教材

ISBN 978-7-5019-6369-0

I. 乳… II. 杜… III. 乳制品—微生物学—实验—高等学校—教材 IV. TS252.1-33

中国版本图书馆CIP数据核字 (2008) 第025613号

责任编辑: 李亦兵 张 靓 责任终审: 张乃柬 封面设计: 锋尚制版
版式设计: 王超男 责任校对: 吴大鹏 责任监印: 胡 兵 张 可

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街6号, 邮编: 100740)

印 刷: 利森达印务有限公司

经 销: 各地新华书店

版 次: 2008年7月第1版第1次印刷

开 本: 787×1092 1/16 印张: 17.25

字 数: 346千字

书 号: ISBN 978-7-5019-6369-0/TS·3710 定价: 32.00元

读者服务部邮购热线电话: 010-65241695 85111729 传真: 85111730

发行电话: 010-85119845 65128898 传真: 85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社读者服务部联系调换

70999J4X101ZBW

《乳品微生物学实验技术》编写人员

主 编 杜 鹏

副 主 编 姜瞻梅 刘丽波

参编人员 (按姓氏拼音字母排序)

都立辉 杜 鹏 冯 镇 国立东 侯俊财

姜瞻梅 金 钟 李艾黎 李 春 刘 芳

刘 飞 刘丽波 马春丽 穆 莹 潘明喆

王玉堂 徐 渐 张 筠 赵 琳

主 审 霍贵成

序 言

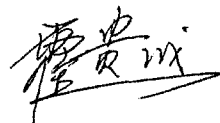
“国以民为本，民以食为天，食以乳为先”。乳是人类及其他哺乳动物出生后的第一口食物，它也是最接近于完善的食品。随着经济发展和人民生活水平的提高，居民的乳制品人均消费量在不断攀升。目前市场上的乳制品种类繁多，为各消费群体提供了不同的产品，乳制品市场的不断膨胀，也促进了我国乳品加工业、乳畜养殖业和其他相关产业的快速发展。但是在乳品产业快速发展的同时也出现了一些不和谐的音符，与乳品相关的一些重大安全事件屡有发生，这凸显了我国在乳品科学方面研究和监管还较为薄弱的问题，特别是在乳品微生物学、乳品化学和乳品安全监测等基础研究和高新技术发展领域与发达国家还有一定的差距，这就为我们乳品科研工作者和监管部门提出了新的挑战！

2003年教育部批准依托东北农业大学筹建国内第一个“乳品科学教育部重点实验室（KLDS）”。经过三年的紧张筹建和试运行，2006年4月实验室通过了教育部组织的专家验收，并正式挂牌运行，成为我国惟一以乳品科学为研究方向的教育部重点实验室。KLDS将“乳品质量与安全”、“乳品微生物学和生物工程”、“乳品理化与营养”、“乳品工艺与工程”和“乳腺生物学及调控”作为核心研究方向，实验室的使命是“为人们提供安全、健康、优质的乳制品”。KLDS还建立了“乳品工业微生物菌种保藏中心（KLDS-DICC）”，为发酵乳制品和益生菌新资源食品的生产储备了大量的菌种资源。

乳品生物安全是乳制品安全的重要环节，若想实现乳品质量控制就必须有科学的乳品微生物学检测方法。近年来国内外在乳品微生物检测技术和益生菌发酵技术方面取得了很多进展，如微生物快速检测技术、致病菌和微生物毒素的鉴别诊断技术以及乳酸菌基因工程技术等。这些技术和方法的引入有助于提高我国乳制品质量控制的水平，同时也弥补了乳品微生物学技术方面的不足。

鉴于KLDS的“乳品微生物学和生物技术”研究部在乳酸菌和益生菌研究领域取得了一些进展，积累了一些方法和经验，一批富有激情的青年科技人员为推进乳品微生物安全检测技术的发展，自发组成了《乳品微生物学实验技术》编写团队，分工合作，书中涉及的相关实验内容都是他们对日常科研和教学实际工作经验的总结，并引入了一些最新的实验研究方法。本书既着眼基础，又兼顾实际应用和科研需要，不仅可为学习微生物学的本科生奠定坚实的微生物实验基础和开拓创新意识，还能为立志从事乳品微生物研究的科研人员 and 研究生提供详实的实验技术和方法。据悉在乳品微生物学领域目前还没有类似的实验技术书籍出版，因此本书不啻为一本优秀的乳品微生物实验操作参考书。

乳品科学教育部重点实验室主任，首席专家，
“龙江学者”特聘教授



2007年12月
于东北农业大学

前 言

《乳品微生物学实验技术》是根据乳与乳制品安全与微生物检测的要求编写的。本书可作为高等农林院校食品科学与工程、乳品工程等专业的本科生和研究生实验教材。既适合本科教学使用,又为研究生提供了有一定难度和深度的微生物实验操作内容,同时也是适用于微生物与安全检测的职业技能培训及生产一线的技术人员、化验员的参考书。本书共分四章,根据教学、科研和实际生产的需要,分别从乳品微生物学基础实验技术、乳品微生物学应用实验技术、乳酸菌遗传学技术和乳品微生物学综合实验技术四个角度安排了一些常用的和可操作性强的实验和综合实验项目,并着重于微生物学实践基本操作技能的训练,目的是使学生和操作人员能掌握实际操作技能,为完成科研和实际生产任务打下坚实的基础。本书在编写过程中参考了大量的微生物学实验教程和最新的科研论文,并结合乳与乳制品生产加工中涉及的微生物实际操作,以满足科研和实际生产的要求,具有广泛的理论与实践指导意义。

本书提供了乳品微生物学教学和科研的43个实验,并涉及乳品实际生产中微生物检测 and 操作的5个综合实验。本书由东北农业大学杜鹏主编,姜瞻梅和刘丽波任副主编,李春、李艾黎、侯俊财、冯镇、马春丽、徐渐、穆莹及乳品科学教育部重点实验室(东北农业大学)王玉堂、刘飞、刘芳、都立辉,东北农业大学成栋学院潘明喆,黑龙江中医药大学国立东,黑龙江出入境检验检疫局金钟,黑龙江东方学院张筠,黑龙江省农业科学院赵琳均参与了本书的编写工作。具体撰写分工如下:

第一章乳品微生物学基础实验技术:实验1~6(姜瞻梅);实验7~12(刘丽波);实验13(杜鹏)。

第二章乳品微生物学应用实验技术:实验14~17(杜鹏);实验18~20(李艾黎);实验21和22(赵琳);实验23和24(张筠);实验25和26(金钟);实验27~29(王玉堂);实验30~36(杜鹏)。

第三章乳酸菌遗传学实验技术:实验37~39(刘芳、都立辉);实验40(国立东);实验41(刘飞);实验42(穆莹);实验43(徐渐)。

第四章乳品微生物学综合实验技术:实验44(潘明喆);实验45(冯镇);实验46(马春丽);实验47和48(杜鹏)。

附录I(侯俊财);附录II~VIII(李春)。

杜鹏负责全书的图片和表格的绘制与整理。初稿完成后,由杜鹏改写和重写了部分实验,并完成了对全书的校对和修改,乳品科学教育部重点实验室的黄丽坤硕士进行了初稿的排版工作。乳品科学教育部重点实验室主任霍贵成教授审阅了全部书稿,并为本书作序。

本书出版要特别感谢“乳品科学教育部重点实验室”的资助。

本书涉及的学科较多,内容范围广,加之编者水平和能力有限,难免有不足、错误和

不妥之处，敬请同行专家和广大读者批评指正，以使本书在使用中不断完善和提高。

杜鹃

2007年12月

于马家花园

目 录

绪论	1
第一章 乳品微生物学基础实验技术	3
实验1 普通显微镜的使用和细菌形态观察	3
实验2 常用的染色法	7
实验3 培养基的配制与灭菌	13
实验4 微生物的分离、纯化和接种	18
实验5 放线菌、酵母菌、霉菌形态观察	24
实验6 微生物的培养特征	30
实验7 微生物细胞大小的测定和显微镜直接计数	32
实验8 物理、化学因素对微生物的影响	41
实验9 用比浊法测定细菌、酵母菌的数量及其生长曲线	47
实验10 实验室环境中微生物的检测	51
实验11 微生物鉴定用常规生化反应试验	53
实验12 常规的抗原与抗体反应试验	63
实验13 微生物的菌种保藏技术	72
第二章 乳品微生物学应用实验技术	82
实验14 乳品中微生物菌落总数的测定	82
实验15 大肠菌群的检验	87
实验16 还原试验法对原料乳中细菌总数的测定	93
实验17 鲜乳中抗生素残留量的测定	95
实验18 沙门氏菌属的检验	97
实验19 乳与乳制品中致病性大肠杆菌的检验	104
实验20 志贺氏菌属的检验	108
实验21 乳与乳制品中金黄色葡萄球菌的检验	111
实验22 肉毒梭菌及肉毒毒素的检验	114
实验23 原料乳中黄曲霉毒素的检测	116
实验24 Ames法检测诱变剂和致癌剂	119
实验25 乳制品中单核细胞增生李斯特氏菌的检测	124
实验26 婴儿乳粉中阪崎肠杆菌的检测	129
实验27 乳与乳制品中芽孢总数及耐热芽孢菌的检测	133
实验28 乳与乳制品中嗜冷菌的检测	135
实验29 肠球菌的检测	138
实验30 生牛乳自然发酵过程中微生物的菌群演替	140

实验31 发酵乳制品中乳酸菌的培养与性状观察	142
实验32 酸乳中乳酸菌的测定与菌种活力的测定	144
实验33 乳酸菌的菌种保藏、活化及其发酵剂的制作	148
实验34 发酵乳制品生产菌种的复壮技术	153
实验35 发酵乳制品中乳酸菌的分离与初步鉴定	155
实验36 双歧杆菌的分离和培养	159
第三章 乳酸菌遗传学实验技术	163
实验37 乳酸菌基因组的提取	163
实验38 DNA的琼脂糖凝胶电泳	165
实验39 PCR方法获得微生物的目的基因	167
实验40 从凝胶中回收DNA	169
实验41 质粒DNA的提取	171
实验42 乳酸菌的人工诱变育种	174
实验43 双歧杆菌和酿酒酵母原生质体的融合	179
第四章 乳品微生物学综合实验技术	183
实验44 微生物检测的取样方法	183
实验45 乳品加工厂的微生物检测	190
实验46 乳品加工用水的微生物学检验	195
实验47 乳与乳制品的微生物学检验	198
实验48 乳酸菌饮料中乳酸菌的微生物学检验	220
附录	224
附录 I 116种常用培养基配方	224
附录 II 常用染色液的配制	244
附录 III 常用试剂和指示剂的配制	247
附录 IV 常用消毒剂和杀菌剂的配制	250
附录 V 微生物学实验中一些常用数据表	251
附录 VI 玻璃器皿及玻片洗涤法	253
附录 VII 各国和地区主要菌种保藏机构	255
附录 VIII 实验室意外事故的处理	257
参考文献	258

绪 论

微生物学实验室操作标准

微生物学实验课的目的主要是：训练学生掌握微生物学最基本的操作技能；了解微生物学的基本知识；加深和巩固对自学和讲课内容的理解。另一方面，通过实验不仅可培养学生观察、思考、分析问题和解决问题的能力，还可以培养学生实事求是、严肃认真的科学态度，以及良好的合作精神，同时也有益于培养爱护公物的道德风范。

为了得到准确、完整的微生物实验数据，并保证安全，进行实验的人员须遵守微生物实验室的操作标准。

安全设备

(1) 实验服和鞋子。只要进实验室，就要穿白大褂并穿好鞋子。长期从事微生物操作的研究人员的实验服应放在实验室。进行了与致病菌有关的实验操作后，实验服必须进行消毒处理。

(2) 眼罩。实验中有可能接触到高浓度的人类致病菌，必须戴眼罩来保护眼睛。

(3) 橡胶手套。应时刻戴好手套。如果手上的皮肤受到伤害，应立刻用绷带包扎好伤口，并戴上手套。当与致病菌接触，或者与富集致病菌的增菌培养液进行接触时，应该一直戴着手套。用完后的手套应该作为生物垃圾来处理，并且需要洗手。

标准操作

(1) 实验前做好准备。进入实验室之前，应仔细阅读和学习实验室注意事项，确信你已意识到实验中可能存在的危害，并对实验内容进行充分预习，以了解实验的目的、原理和方法。

(2) 不要在实验室吃东西，不要用化妆品，不要用手接触眼睛。实验室中的食物样品绝对不能吃！

(3) 经常洗手。接触任何微生物培养物或摘掉手套后，以及结束一天工作离开实验室之前，都要洗手。

(4) 对实验室消毒。实验开始前或离开实验室之前，要用消毒剂对实验台进行清洗。

(5) 注意实验室的环境。注意灭火器和眼药水存放的位置，注意紧急情况下可能要打的电话的位置。

(6) 安全使用明火。酒精灯不用时要熄灭，离开实验室时要确认酒精灯是否熄灭。留长发的操作者要把长发扎好，以免接触到酒精灯火焰引起烧伤。酒精摆放位置应离明火至少有5.5m远。

(7) 保持实验室整洁。要把实验记录本放到实验台上。衣服、背包、钱包应该放在实验台的指定位置。要与你的同伴有条不紊地进行实验，因为很多人挤在一个地方工作容易出现差错。

(8) 一旦你或你的同伴在实验中受伤, 应立即通知指导老师。

(9) 一旦实验过程中有东西溅出或损坏, 应立即通知指导老师。如果培养基或被污染设备中的一部分接触到了实验台、地板或器材的话, 应该立即用纸巾擦去污染, 并用清水清洗。清洗后应通知老师或实验管理员。如果污物溅洒到手套上, 应立即通知老师。手套应立刻摘下, 作为生物垃圾来处理。然后, 用热水和肥皂洗手30s以上。

(10) 当不安全操作或者实验器材破损时, 应及时通知指导老师。为避免出现安全问题, 当实验器材部分破损时, 要及时通知老师。在实验过程中, 如果你认为同伴处于不安全的工作状态, 请通知老师。

(11) 工作要细心, 切忌过急。急躁往往会造成实验事故。

(12) 轻松自在地进行实验。完成一项实验, 仅仅是你完成了指导教师开出的实验的一小部分。实际上, 实验的大部分时间和工作是花在了策划实验、准备实验和清洗。请感谢实验老师花时间和精力为你准备实验练习。正是老师前期的精心准备, 才能让我们轻松地完成每个实验中最引人入胜的部分。

(13) 认真并及时做好实验记录。对于当时不能得到结果而需要连续观察的实验, 则需在指定时间内观察, 并记录每次观察的现象和结果, 以便日后分析。每次实验的结果, 应以实事求是的科学态度填入报告表格中, 力求简明准确, 并连同思考题及时汇交教师批阅。

(14) 爱护仪器设备, 杜绝浪费。设备如有损坏, 须做好登记。对耗材和药品的使用要杜绝浪费, 用完后放回原处。

(15) 认真标记, 严守纪律。每次实验需进行培养的材料, 标明自己的组别及处理方法, 放于指定的地点进行培养。实验室中的菌种和物品等, 未经教师许可, 不得携带出实验室。

(16) 保持实验室整洁, 注意安全。每次实验完毕, 必须把所用仪器擦拭干净, 放置妥当。将实验室收拾整齐, 打扫干净。离开实验室前一定要用肥皂将手洗净, 注意关闭门窗以及水、电、煤气等开关。

一旦出现意外事故, 要保持冷静。如果不知如何处理, 请把书翻到最后参阅附录Ⅷ或寻求他人帮助!

第一章 乳品微生物学基础实验技术

实验 1 普通显微镜的使用和细菌形态观察

实验目的

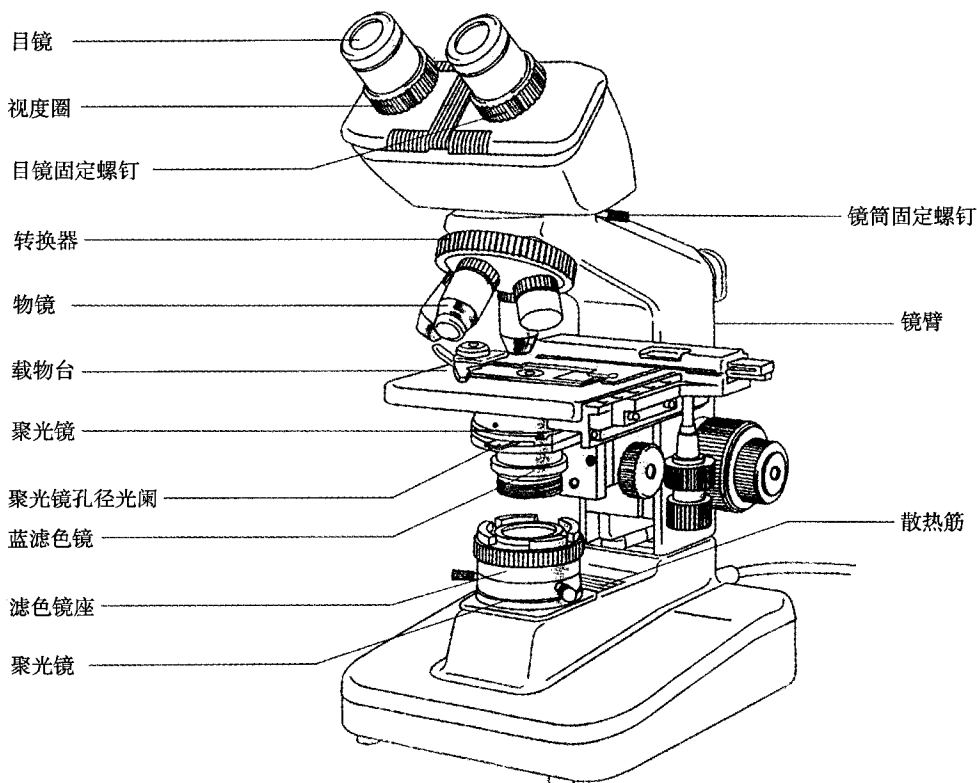
- (1) 学习并掌握油镜的工作原理和使用方法。
- (2) 复习光学显微镜的结构、各部分的功能和使用方法。

实验原理

微生物的最显著特点是个体微小，必须借助显微镜才能观察到它们的个体形态和细胞结构。熟悉显微镜和掌握其操作技术是研究微生物不可缺少的手段。本实验将介绍目前微生物学研究中最常用的普通光学显微镜的结构和样品制作。

普通光学显微镜利用目镜和物镜两组透镜系统来放大成像。它由机械装置和光学系统两大部分组成（图1-1）。显微镜的光学系统包括：物镜、目镜、反射镜和聚光器四个部件，其中物镜的性能最为关键，它直接影响着显微镜的分辨率。

一般微生物学使用的显微镜有三个物镜，即低倍镜（4~10倍）、高倍镜（40~45倍）和



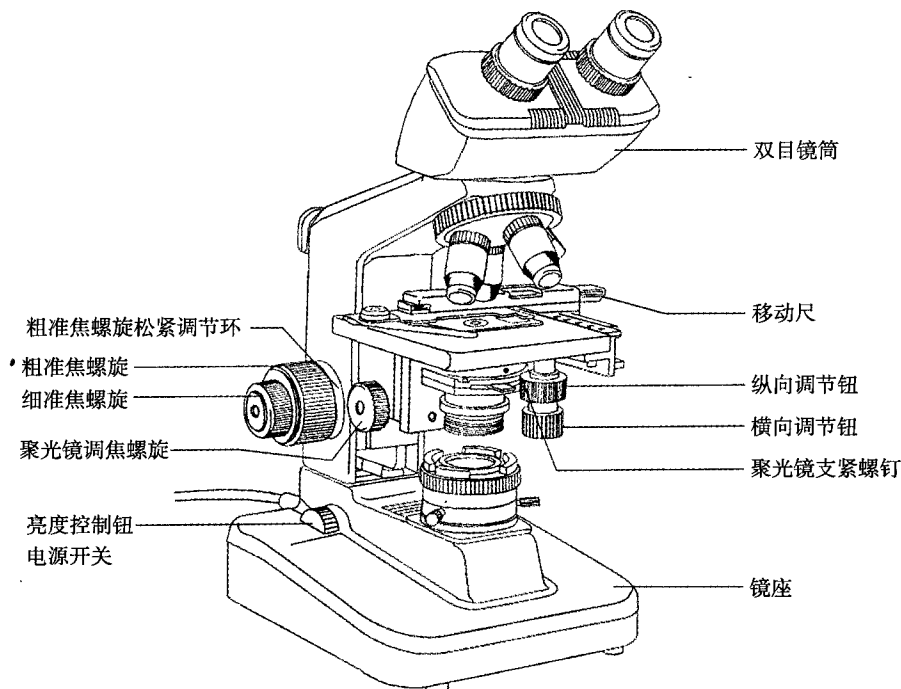


图 1-1 显微镜构造示意图

油镜（90~100倍），油镜对微生物学研究非常重要。油镜使用时需在载玻片与镜头之间滴加香柏油，一方面是增加照明亮度，油镜的放大倍数大、焦距短、直径小，但所需要的光照强度却最大。从承载标本的玻璃片透过来的光线，

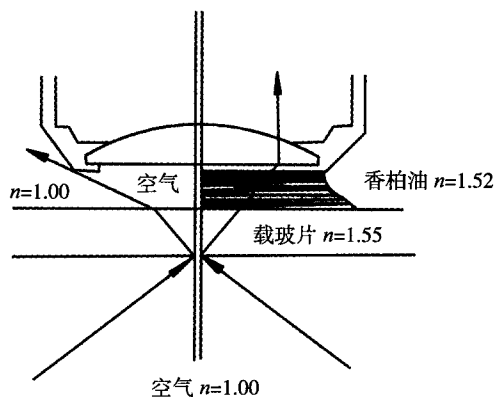


图 1-2 油镜使用原理

因介质密度不同（从玻片进入空气，再进入物镜），有些光线因折射或反射不能进入镜头，致使在使用油镜时会因射入的光线较少，物像显现不清。为了减少通过光线的损失，在使用油镜时须在油镜与玻片之间加入与玻璃的折射率（ $n=1.55$ ）相仿的镜油（通常用香柏油，其折射率 $n=1.52$ ），其原理见图1-2。另一方面是增加显微镜的分辨率。显微镜的分辨率或分辨力（resolution of resolving power）是指显微镜能辨别两点之间的最小距离的能力。显微镜的优劣主要取决于分辨率（ D ）的大小：

$$\text{分辨率（最小可分辨距离）} = \frac{\lambda}{2NA}$$

式中 λ ——光波波长

NA ——物镜的数值孔径值

光学显微镜的光源不可能超出可见光的波长范围（0.4~0.7 μm ），而数值孔径值则取决于物镜的镜口角（光线投射到物镜上的最大角度）和玻片与镜头间介质的折射率，可表示为：

$$NA = n \sin \alpha$$

式中 α ——镜口角的半数，它取决于物镜的直径和焦距。一般来说，在实际应用中最大只能达到120

n ——介质折射率

由于香柏油的折射率（1.52）比空气及水的折射率（分别为1.00和1.33）要高，因此以香柏油作为镜头与玻片之间介质的油镜所能达到的数值孔径值（ NA 一般在1.2~1.4）要高于低倍镜、高倍镜等物镜（ NA 都低于1.0）。若以可见光的平均波长 $0.55\mu\text{m}$ 来计算，数值孔径通常在 $0.65\mu\text{m}$ 左右的高倍镜只能分辨出距离不小于 $0.4\mu\text{m}$ 的物体，而油镜的分辨率却可达到 $0.2\mu\text{m}$ 左右。大部分细菌的直径在 $0.5\mu\text{m}$ 以上，所以油镜更能看清细菌的个体形态。

实验材料

（一）菌种

金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、嗜热链球菌（*Streptococcus thermophilus*）和德氏乳杆菌（*Lactobacillus delbrueckii*）染色玻片标本。

链霉菌（*Streptomyces* sp.）及青霉菌（*Penicillium* sp.）的水封片。

（二）溶液或试剂

香柏油、二甲苯。

（三）仪器及其他用品

显微镜、擦镜纸等。

实验流程

安置→调光源→调目镜→调聚光器→镜检（低倍镜→高倍镜→油镜）→擦镜→复原

实验步骤

（一）观察前的准备

1. 显微镜的安置

置显微镜于平整的实验台上，镜座距实验台边缘约10cm。镜检时姿势要端正。

2. 光源调节

安装在镜座内的光源灯可通过调节电压以获得适当的照明亮度。若使用反光镜采集自然光或灯光作为照明光源时，应根据光源的强度及所用物镜的放大倍数选用凹面或凸面反光镜并调节其角度，使视野内的光线均匀，亮度适宜。

3. 双筒显微镜的目镜调节

根据使用者的个人情况，双筒显微镜的目镜间距可以适当调节，而左目镜上一般还配有屈光度调节环，可以适应眼距不同或两眼视力有差异的不同观察者。

4. 聚光器数值孔径值的调节

正确使用聚光镜才能提高镜检的效果。聚光镜的主要参数是数值孔径，它有一定的可变范围，一般聚光镜边框上的数字是代表它的最大数值孔径，通过调节聚光镜下面可变光阑的开放程度，可以得到各种不同的数值孔径，以适应不同物镜的需要。

（二）显微观察

在目镜保持不变的情况下,使用不同放大倍数的物镜所能达到的分辨率及放大率都是不同的。一般情况下,特别是初学者,进行显微观察时应遵守从低倍镜到高倍镜再到油镜的观察程序,因为低倍数物镜视野相对宽,易发现目标及确定检查的位置。

1. 低倍镜观察

将细菌染色标本玻片置于载物台上,用标本夹夹住,移动推进器使观察对象处在物镜的正下方。下降10倍物镜,使其接近标本,用粗准焦螺旋慢慢升起镜筒,使标本在视野中初步聚焦,再使用细准焦螺旋调节使物像清晰。通过玻片夹推进器慢慢移动玻片,认真观察标本各部位,找到合适的目的物,仔细观察并记录所观察到的结果。

2. 高倍镜观察

在低倍镜下找到合适的观察目标,并将其移至视野中心后,将高倍镜移至工作位置。对聚光器光圈及视野亮度进行适当调节后,微调细准焦螺旋使物像清晰,利用推进器移动标本找到需要观察的部位,并移至视野中心仔细观察或准备用油镜观察。

3. 油镜观察

在高倍镜或低倍镜下找到要观察的样品区域后,用粗准焦螺旋将镜筒升高,然后将油镜转到工作位置。在待观察的样品区域加滴香柏油,从侧面注视,用粗准焦螺旋将镜筒小心地降下,使油镜镜头浸在油中,并几乎与标本接触时止(注意:切不可将油镜镜头压到标本,否则不仅压碎玻片,还会损坏镜头)。将聚光器升至最高位置并开足光圈(若所用聚光器的数值孔径值超过1.0,还应在聚光镜与载玻片之间也滴加香柏油,保证其达到最大的效能),调节照明使视野的亮度合适,用粗准焦螺旋将镜筒徐徐上升,直至视野中出现物像并用细准焦螺旋使其清晰准焦为止。然后用相同的方法观察其他样本。

(三) 显微镜用后的处理

上升镜筒,取下载玻片。先用擦镜纸擦去镜头上的油,再用擦镜纸蘸取少许二甲苯擦去镜头上的残留油迹,而后用擦镜纸擦去残留的二甲苯,最后用绸布清洁显微镜的金属部件。将各部分还原,反光镜垂直于镜座,将物镜转成“八”字形,再向下旋。同时把聚光镜降下以免物镜与聚光镜发生碰撞。套上镜套,放回原处。

实验结果

分别绘出在低倍镜、高倍镜和油镜下观察到的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、嗜热链球菌、德氏乳杆菌、链霉菌及青霉菌的形态,包括在3种情况下视野中的变化,同时注明物镜放大倍数和总放大率。

思考题

- (1) 用油镜观察时应注意哪些问题?在载玻片和镜头之间滴加什么油?起什么作用?
- (2) 试列表比较低倍镜、高倍镜及油镜各方面的差异。为什么在使用高倍镜及油镜时应特别注意避免粗调节器的误操作?
- (3) 什么是物镜的同焦现象?它在显微镜观察中有什么意义?
- (4) 影响显微镜分辨率的因素有哪些?
- (5) 根据实验体会,谈谈应如何根据所观察微生物的大小,选择不同的物镜进行有效地观察。

实验 2 常用的染色法

一、细菌的简单染色法

实验目的

- (1) 学习微生物涂片、染色的基本技术。
- (2) 掌握细菌的简单染色法。
- (3) 初步认识细菌的形态特征, 巩固学习油镜的使用方法和无菌操作技术。

实验原理

细菌的涂片和染色是微生物学实验中的一项基本技术。细菌的细胞小而透明, 在普通的光学显微镜下不易识别, 必须对它们进行染色。利用单一染料对细菌进行染色, 使经染色后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。此法操作简便, 适用于菌体一般形状和细菌排列的观察。

常用碱性染料进行简单染色, 这是因为在中性、碱性或弱酸性溶液中, 细菌细胞通常带负电荷, 而碱性染料在电离时, 其分子的染色部分带正电荷, 因此碱性染料的染色部分很容易与细菌结合使细菌着色。经染色后的细菌细胞与背景形成鲜明的对比, 在显微镜下更易于识别。常用做简单染色的染料有美蓝、结晶紫、碱性复红等。

当细菌分解糖类产酸使培养基pH下降时, 细菌所带正电荷增加, 此时可用伊红、酸性复红或刚果红等酸性染料染色。

染色前必须固定细菌。其目的有二: 一是杀死细菌并使菌体黏附于玻片上; 二是增加其对染料的亲和力。常用的有加热和化学固定两种方法。固定时尽量维持细胞原有的形态。

实验材料

(一) 菌种

枯草芽孢杆菌12~18h营养琼脂斜面培养物, 藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 约24h营养琼脂斜面培养物, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 24h营养琼脂斜面培养物。

(二) 染色剂

吕氏碱性美蓝染液 (或草酸铵结晶紫染液), 石炭酸复红染液 (见附录II)。

(三) 仪器及其他用品

显微镜、酒精灯、载玻片、接种环、玻片搁架、双层瓶 (内装香柏油和二甲苯)、擦镜纸、生理盐水或蒸馏水等。

实验流程

涂片→干燥→固定→染色→水洗→干燥→镜检

实验步骤

(一) 涂片

取两块洁净无油的载玻片, 在无菌的条件下各滴一小滴生理盐水 (或蒸馏水) 于玻片

中央，用接种环以无菌操作（见图2-1），分别从枯草芽孢杆菌、藤黄微球菌和大肠杆菌斜面上挑取少许菌苔于水滴中，混匀并涂成薄膜。若用菌悬液（或液体培养基）涂片，可用接种环挑取2~3环直接涂于载玻片上。注意滴生理盐水（蒸馏水）和取菌时不宜过多且涂抹要均匀，不宜过厚。

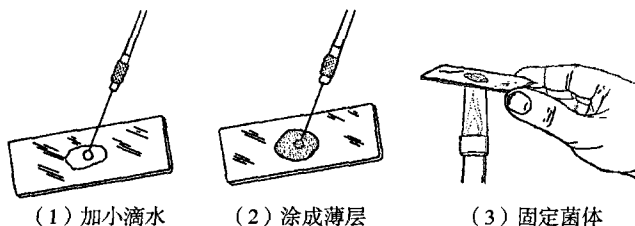


图 2-1 涂片制备过程

（二）干燥

室温自然干燥。也可以将涂面朝上在酒精灯上方稍微加热，使其干燥。但切勿离火焰太近，因温度太高会破坏菌体形态。

（三）固定

如用加热干燥，固定与干燥合为一步，方法同干燥。

（四）染色

将玻片平放于玻片搁架上，滴加染液1或2滴于涂片上（染液刚好覆盖涂片薄膜为宜）。吕氏碱性美蓝染色1~2min，石炭酸复红（或草酸铵结晶紫）染色约1min。

（五）水洗

倾去染液，用自来水从载玻片一端轻轻冲洗，直至从涂片上流下的水无色为止。水洗时，不要用水流直接冲洗涂面。水流不宜过急、过大，以免涂片薄膜脱落。

（六）干燥

甩去玻片上的水珠自然干燥、电风吹干或用吸水纸吸干均可（注意勿擦去菌体）。

（七）镜检

涂片干后镜检。涂片必须完全干燥后才能用油镜观察。

实验结果

绘制单染色后观察到的大肠杆菌和藤黄微球菌的形态图。

二、革兰氏染色法

实验目的

- （1）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。
- （2）学习掌握革兰氏染色技术，巩固光学显微镜油镜的使用方法。

实验原理

革兰氏染色法是1884年由丹麦病理学家Christain Gram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。革兰氏染色法是细菌学中最重要鉴别染色法。

革兰氏染色法的基本步骤是：先用初染剂结晶紫进行初染，再用碘液媒染，然后用乙醇（或丙酮）脱色，最后用复染剂（如复红）复染。经此方法染色后，细胞保留初染剂蓝紫色的细菌为革兰氏阳性菌；如果细胞中初染剂被脱色剂洗脱而使细菌染上复染剂的颜色（红色），该菌属于革兰氏阴性菌。