

 四川工商职业技术学院

省级重点专业建设项目成果

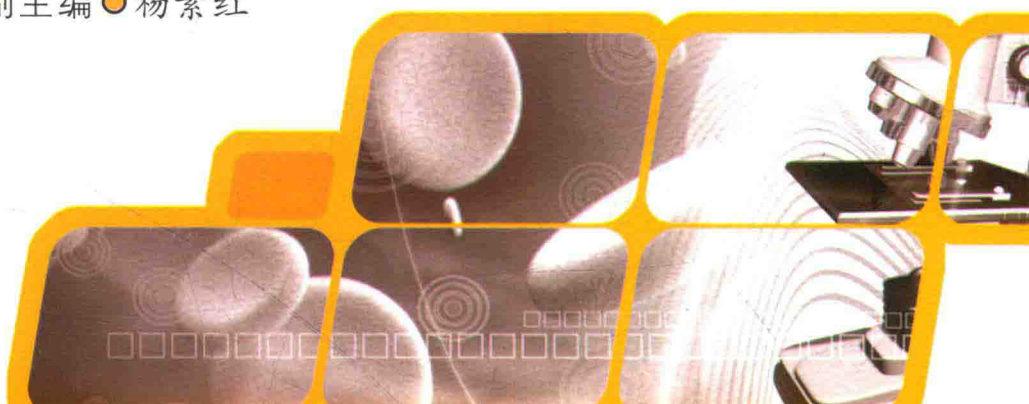
食品微生物

检验技术

SHIPIN

WEISHENGWU JIANYAN JISHU

校内主编 ● 曾杨清
校内副主编 ● 余彩霞 邓林
校外副主编 ● 杨素红



西南交通大学出版社

 四川工商职业技术学院

省级重点专业建设项目成果

食品微生物检验技术

校内主编 曾杨清

校内副主编 余彩霞 邓 林

校外副主编 杨素红

西南交通大学出版社

· 成 都 ·

图书在版编目 (C I P) 数据

食品微生物检验技术 / 曾杨清主编. — 成都: 西南交通大学出版社, 2016.1
ISBN 978-7-5643-4435-1

I. ①食… II. ①曾… III. ①食品微生物 - 食品检验
IV. ①TS207.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 304369 号

食品微生物检验技术

主编 曾杨清

责任编辑 王 旻
特邀编辑 王玉珂
封面设计 何东琳设计工作室

出版发行 西南交通大学出版社
(四川省成都市二环路北一段 111 号
西南交通大学创新大厦 21 楼)

发行部电话 028-87600564 028-87600533

邮政编码 610031

网 址 <http://www.xnjdcbs.com>

印 刷 成都中铁二局永经堂印务有限责任公司

成 品 尺 寸 185 mm × 260 mm

印 张 14.25

字 数 356 千

版 次 2016 年 1 月第 1 版

印 次 2016 年 1 月第 1 次

书 号 ISBN 978-7-5643-4435-1

定 价 34.00 元

课件咨询电话: 028-87600533

图书如有印装质量问题 本社负责退换

版权所有 盗版必究 举报电话: 028-87600562

前 言

为适应现代职业教育的需要，我们食品生物教学团队联合企业编写这本《食品微生物检验技术》教材，本教材以项目和工作任务为载体，强调理实一体的教学理念，注重“做中学”，是融教、学、做于一体的“工学结合”教材。在教材编写过程中结合了食品企业和食品质量控制监督部门的实际工作中常见的检验项目及国标推荐方法，也针对学生来源中既有理科生又有文科生的特点，力求学生能读得懂，按学生的思路进行。教材将企业典型工作任务优化组合，形成5个教学模块：微生物制片、染色及观察技术；无菌操作技术；微生物分离、纯化和培养技术；菌种保存技术；微生物分析检验技术；模块下设置22个项目，在每个项目中明确理清各项任务，在实际操作中增加了“安全警示”和“获得本次实验成功的关键”。从基础微生物检验技术的训练到企业常见的检验项目的检验训练，使学生在今后的工作岗位上能够胜任食品微生物检验项目的设计、检测操作、结果分析与出具检验报告的职业能力。本教材在每个项目后加入与项目相关的微生物基础知识，突出“必需、够用、实用”的原则，满足了理解检验原理和学生职业能力拓展的需要。

本书由四川工商职业技术学院曾杨清副教授担任主编；由四川工商职业技术学院余彩霞、邓林副教授，五粮液保健酒公司副总经理杨素红担任副主编；参加本书编写的有四川工商职业技术学院的林晶晶、苏学香、周文、易晓成；四川省食品发酵工业研究设计院发酵所高级工程师李峰以及四川省食品发酵工业研究院科技处处长陈宏毅。担任本书主审的有四川工商职业技术学院的魏明英副教授以及成都大学生物工程学院万萍教授。

本教材可作为高等职业教育食品加工、食品生物技术、食品营养与检测、工业分析与检测、生物制药等专业教材使用，也可供相关企业技术人员参考。

作 者

2015年6月

目 录

模块一 微生物制片、染色及观察技术	1
项目一 普通光学显微镜的使用及微生物标本片观察	1
项目二 细菌制片、简单染色、革兰氏染色及形态观察	11
项目三 放线菌制片、简单染色及形态观察	25
项目四 酵母菌制片、简单染色及形态观察	30
项目五 霉菌制片、染色及形态观察	40
【知识拓展】	52
【作业习题】	59
模块二 无菌技术	60
项目六 微生物培养常用玻璃器皿的洗涤、包扎和干热灭菌	60
项目七 微生物接种技术	68
【知识拓展】	71
【作业习题】	72
模块三 微生物分离、纯化和培养技术	73
项目八 培养基的配制与高压蒸汽灭菌	73
项目九 微生物的分离纯化与培养	89
【知识拓展】	92
【作业习题】	98
模块四 菌种保存技术	99
项目十 菌种常规保存	99
【知识拓展】	106
【作业习题】	109
模块五 微生物分析检测技术	110
项目十一 微生物细胞大小的测定	110
项目十二 酵母细胞的计数及发芽率的测定	113
项目十三 细菌的生理生化试验	122
项目十四 食品中菌落总数的测定	129
项目十五 食品中大肠菌群计数法	133
项目十六 沙门氏菌的检验	152

项目十七 金黄色葡萄球菌的检验	161
项目十八 空气中微生物的检验	168
项目十九 细菌生长曲线的测定	171
项目二十 糖化曲的制备及其酶活力的测定	178
项目二十一 啤酒酵母扩大培养与酵母生长形态观察	186
项目二十二 乳酸菌的测定 (GB 4789.35—2010)	190
【知识拓展】	195
【作业习题】	201
附录一 实验常用培养基及制备	202
附录二 常用染色液配制	211
附录三 常用试剂配制	214
附录四 GB 4789.1—2010 食品微生物学检验总则 前言	218
参考文献	222

模块一 微生物制片、染色及观察技术

【知识目标】

1. 掌握微生物的概念和特点。
2. 掌握与食品有关的微生物（细菌、放线菌、酵母菌、霉菌）的形态结构和功能。
3. 掌握显微镜的构造和原理。

【能力目标】

1. 会熟练调试普通光学显微镜。
2. 会对微生物细胞进行制片、染色、观察，区分不同的微生物类群的形态与结构。

项目一 普通光学显微镜的使用及微生物标本片观察

目 标

- (1) 熟悉普通光学显微镜的结构。
- (2) 正确调试显微镜，尤其是油镜的正确使用。
- (3) 观察各种染色标本，认识微生物的基本形态和结构。
- (4) 观察大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、根霉、曲霉、青霉、酵母菌、放线菌等微生物的平板菌落，注意菌落形状、大小、颜色、光泽、透明度、边缘状况等。

【项目实施】



<任务一> 准备材料与仪器

- (1) 菌种：根霉、曲霉、青霉、酵母菌、放线菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌。
- (2) 试剂：香柏油、二甲苯。
- (3) 仪器和其他用品：普通光学显微镜、擦镜纸和绸布。



<任务二> 实践操作

▲安全警示

(1) 显微镜是精密仪器,从镜箱中取镜时,一手握镜臂,一手托镜座,保持镜体直立,以防反光镜及目镜脱落被摔坏,切记单手拎提。

(2) 镜检时两眼同时睁开、减少疲劳。

(3) 显微镜有聚集校正功能,观察时一般可以摘下眼镜观察,确需要戴眼镜观察的,注意眼镜不要和目镜镜头接触、以免相互划伤。

(4) 载玻片和盖玻片很薄,不要用力过猛使玻璃碎裂划伤自己;取载玻片时不要触摸到加有样品的部位,以免影响结果观察。

1. 观察前的准备

(1) **显微镜的安置:**将显微镜放置于平稳的实验台上、镜座距实验台边缘 7~10 cm。端正坐姿。

(2) **光源调节:**使低倍镜与镜筒成一直线,调节反光镜,让光线均匀照射在反光镜上,电光源显微镜打开照明光源,并使整个视野都有均匀的照明。调节亮度然后将聚光器调到合适的位置(一般聚光器的焦点在其上方 1.25 mm 处,而其上升限度为载物台平面下方 0.1 mm),以后则不动它了,开启虹彩光圈,将光线调至合适的亮度。

2. 显微镜观察

一般情况下,特别是初学者,进行显微镜观察时应该遵守从低倍镜到高倍镜再到油镜的观察程序,因为低倍镜观察的视野相对较大,容易发现目标。

(1) **低倍镜观察:**将要观察的标本放在载物台上,调节待检部位位于物镜正下方,为了防止物镜压在标本玻片上而受到损伤,一定要在侧面观察,用粗调节器下降镜筒(或是上升载物台),使物镜接近盖玻片,然后从目镜中观察视野,旋转粗调节器,使镜筒徐徐上升(或是下降载物台),直至出现物象,再用细调节器调至物像清晰为止,使用推动器移动标本,认真观察标本各部分,寻找要观察的目标。

(2) **高倍镜观察:**在低倍镜下找到合适的观察目标并移到视野中心后,上升镜筒,再转动转换器,将高倍镜移至工作位置。从侧面观察,下降镜筒,避免镜头与玻片相撞。然后用细调节器稍加调节,就可获得清晰的图像。转动转换器时,不要用手指直接扳动物镜镜头。

(3) **油镜观察:**在高倍镜下找到合适的观察目标并移到视野中心后,升高镜筒,将油镜转到光路轴上来。在载玻片目标物上滴加一滴香柏油。从侧面注视,下降镜筒,使油镜前端浸入香柏油。调节光照,然后一边观察一边用细调节器缓缓升高镜筒,直至视野中出现清晰的物像。

(4) **观察细菌的菌落:**观察根霉、酵母菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌等细菌平板菌落,注意菌落形状、大小、颜色、光泽、透明度、边缘状况等。

3. 显微镜用毕后的处理

(1) 以粗调节器调开油镜,移去标本片。

(2) 用擦镜纸擦去油镜上的香柏油。用擦镜纸沾少许二甲苯擦镜, 然后立即用干擦镜纸擦去残留二甲苯, 以免镜头脱胶。

(3) 加少许二甲苯于滴过油的标本上, 以毛边纸向一个方向轻轻拖拉, 除去标本上的油。一次不行可重复, 但不可来回擦抹, 以免擦掉标本。

(4) 将显微镜各部分还原, 聚光器下降, 反光镜垂直于镜座, 物镜镜头离开通光孔上方转成八字形。放入镜箱。

▲ 获得本实验成功的关键

(1) 在任何情况下都要先用低倍镜 ($10\times$ 或 $4\times$) 搜寻、聚集样品、确定待观察目标的大致位置后再转换到高倍镜或油镜。

(2) 有些使用时间较长的显微镜上的霉点等污物也会被聚集造成观察到样品的假像, 此时只需稍微移动载玻片, 根据物像是否随着载玻片的移动而移动来判断物像是不是要观察的物品, 也可以转动目镜, 如果物像跟着转动证明是目镜上的污物。

(3) 对虹彩光圈和视野照明亮度进行调节可以获得反差合适的观察物像, 初学者可以用不同物镜观察到物像后边观察边改变虹彩光圈、增强或降低亮度及升降聚光器的位置、实际体会上述变化对观察效果的影响。



<任务三> 问题探讨

(1) 用油镜观察时, 载玻片与镜头的距离很近, 怎么避免镜头与载玻片碰撞损坏?

(2) 在使用高倍镜和油镜之前要先用低倍镜进行观察? 为什么?

(3) 在使用显微镜时有时会看见一些污物, 你怎么判断污物是载玻片上的污物还是目镜上的污物, 还是物镜上的污物?

【相关知识】

一、认识微生物

1. 微生物的概念

微生物通常是描述一切不借助显微镜用肉眼看不见的微小生物。也就是指所有形体微小, 单细胞或结构简单的多细胞, 或没有细胞结构的一群低等生物。

微生物	{	非细胞生物 (病毒)
		原核生物 (细菌、放线菌、立克次氏体、衣原体等)
		部分真核生物 (真菌 (酵母、霉菌、蕈菌)、单细胞藻类、原生动物)

微生物通常包括病毒和比病毒大一点的部分原核生物 (真细菌、古生菌), 还有部分真核生物真菌 (包括酵母、霉菌、蕈菌等)。蕈菌就是蘑菇之类, 蕈菌为什么也是微生物呢? 微生物的概念还不能完全按大小来区分, 还要看是不是按微生物的研究方法来研究它, 比如, 要

把它的细胞进行分离、培养、得到纯培养。所以蕈菌也归于微生物。另外原生动物和单细胞藻类也归到微生物中。它们分别是显微的动物和显微的植物。

2. 微生物和人类的密切关系

微生物是朋友还是敌人？回答是微生物既是朋友也是敌人。是朋友，是因为微生物分解自然界中的各种物质，使得物质循环得以进行；人和动物体肠道内的正常菌群可以帮助消化、提供必需的营养物质，比如可以合成一些维生素；我们利用微生物给我们制造了很多产品，比如白酒、啤酒、酶、味精、酱油、生物农药、生物肥料等；还可以利用微生物来进行环境污染的处理；研究基因工程主要以微生物作为研究对象，为什么呢？是因为微生物的特点是、繁殖快，容易比较快的出结果。微生物是敌人，是因为它给人类带来了疾病，比如 SARS、禽流感、乙肝、狂犬病、结核、艾滋病等。微生物导致食品的腐败变质等等。可以说，微生物与人类关系的重要性，你怎么强调都不过分，微生物是一把十分锋利的双刃剑，它们在给人类带来巨大利益的同时也带来“残忍”的破坏。

3. 微生物学的建立和发展

1) 微生物的发现

当我们还不认识微生物的时候，实际已经在应用它了，比如中国 8000 年前就开始出现了曲蘖酿酒；4000 年前埃及人已学会烘制面包和酿制果酒；2500 年前发明酿酱、醋；用曲治疗消化道疾病；公元 2 世纪，张仲景禁食病死兽类的肉和不清洁食物；公元前 112—212 年间，华佗“割腐肉以防传染”；在漫长的时间里，我们一直在应用微生物或者和微生物做斗争，但是我们不认识它。

那么为什么长达几千年的时间里人们没有发现与人类密切相关的微生物呢？是因为看不见？那个时候还没有显微镜。那么显微镜是什么时候发明的呢？是 1590 年荷兰的眼镜制造匠人詹森发明的。但是在 1664 年，荷兰一个叫安东尼·列文虎克（Antony Van Leeuwenhoek, 1632—1723）的人，他被称为显微镜学家、微生物学的开拓者。他磨制的透镜远远超过同时代人。他一生磨制了 400 多个透镜，但是最大放大倍数只有 200 多倍，他用自己制作的显微镜观察了几乎每一样想看到的東西，如雨水、污水、血液、体液、酒、醋、牙垢等，他发现了微生物，当时他以为是微小的动物，称为“微动物”。他描绘了的一些微生物的形态。

2) 微生物学的奠基

是不是列文·虎克（Antony Van Leeuwenhoek, 1632—1723）看到了微生物就标志着微生物学建立了呢？不是。是 200 年以后的法国的巴斯德（Louis Pasteur, 1822—1895）建立了微生物学。为什么经历了 200 年呢？也是显微镜，经过 200 年，显微镜得到了进一步完善、放大倍数不断提高。巴斯德被称为是微生物学之父。巴斯德的一生给人类生活带来了史无前例的影响。

(1) 否定了微生物自然发生学说。

(2) 创造了免疫学—预防接种。1877 年，巴斯德研究了鸡霍乱，发现将病原菌减毒可诱发免疫性，就是经过培养选育不致病的菌株，可以使鸡产生抗体，这样就可以预防鸡霍乱病。其后他又研究了当时流行的牛、羊炭疽病和狂犬病，并首次制成狂犬疫苗，为人类防病、治病作出了重大贡献。

(3) 发酵的研究。巴斯德证实酒精发酵是由酵母菌引起的, 巴斯德还发现乳酸发酵、醋酸发酵和丁酸发酵都是不同细菌所引起的。

(4) 创造了一些微生物学实验方法。比如“巴氏灭菌法”, 他发现啤酒里如果掺杂有其他细菌, 就会使啤酒变坏, 巴斯德尝试使用不同的温度来杀死这些细菌, 而又不会破坏啤酒本身。最后, 巴斯德的研究结果是以 $50 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 的温度加热啤酒半小时, 就可以杀死啤酒里的细菌, 而不必煮沸。这种灭菌法也就被称为“巴氏灭菌法”。

科赫 (Robert Koch, 1843—1910) 和巴斯德 (Louis Pasteur, 1822—1895) 是同时代的人, 是一个乡村医生。当时有一种动物的传染病流行, 就是炭疽, 他发现炭疽病是由炭疽芽孢杆菌引起。因此他建立了疾病细菌说 (细菌会引起疾病, 患病是因为健康者接触了有病者会得病); 他首创了细菌染色法; 首创了细菌的纯培养 (固体培养基) 技术。提出了著名的科赫法则, 证明某微生物是某疾病病原菌的 4 项要求:

- ① 在患病动物中存在可疑病原微生物, 而健康动物中没有。
- ② 可疑有机体在纯培养中生长。
- ③ 纯培养中的可疑有机体细胞, 能引起健康动物发病。
- ④ 可疑有机体被再次分离, 并且和最初分离的有机体一样。

3) 发展时期 (生物化学水平)

巴斯德 (Louis Pasteur, 1822—1895) 发现了酵母发酵产生酒精, 1897 年德国学者毕希纳 (Karl Georg Büchner, 1813—1837) 做了这样一个实验: 用石英砂将酵母进行研磨后过滤, 得到滤液, 滤液中已经没有活的酵母细胞了, 他再用滤液对葡萄糖进行发酵同样会产生酒精。他认识发现了酶, 这样微生物学与酶化学结合起来。进入到了生物化学水平研究时期。

从 20 世纪 30 年代起, 经过科学家的研究成果, 人们已经利用微生物进行乙醇、丙酮、丁醇、甘油、各种有机酸、氨基酸、蛋白质、油脂等的工业化生产。

4) 成熟时期 (分子水平)

到 20 世纪 50 年代, 电子显微镜的使用和 DNA 双螺旋的发现, 微生物研究进入分子生物学水平。

由于所有的生物在生物化学、代谢、基因等方面都具有共同性。但是微生物以具有独特的特点小、繁殖快, 以微生物为研究材料比动植物更好, 因为以微生物为研究对象会在很短的时间就会出结果。所以微生物成了生物学研究的“明星”, 微生物学很快与生物学主流汇合, 并被推到了整个生命科学发展的前沿。同时与微生物有关的产业, 比如抗菌素工业、微生物发酵工业、微生物治理环境污染、微生物免疫工程技术、微生物遗传与基因工程技术快速发展。

4. 微生物的特点

微生物的特点总结为“三字经”: 个体小、结构简、胃口大、食谱广、繁殖快、易培养、数量大、分布广、种类多、级界宽、变异易、抗性强、休眠长、起源早、发现晚。

1) 个体小

微生物的大小用什么来表示呢? 是用 μm 和 nm 。这儿有一些数据, 可以我们看一看细菌

到底有多小。一个杆菌平均长度有 $2\ \mu\text{m}$ ；1 500 个杆菌首尾相连才只有 1 粒芝麻的长度；80 个杆菌肩并肩才有一根头发丝的宽度。一个细菌掉在手上是没有感觉的，需要 10 到 100 亿个细菌加起来才有 1 mg，非常非常轻。细菌虽然很小，但是它表面积和体积之比很大，表面积和体积之比称为比表面积。如果人的比表面积是 1 的话，大肠杆菌是 30 万，这个意义非常重要，微生物必然有一个巨大的营养吸收，代谢废物排泄和环境信息接受面。这一特点也是微生物与一切大型生物相区别的关键所在。原因都是因为微生物“小”。

2) 结构简

结构简单的意思是无细胞、单细胞、简单的多细胞。病毒没细胞结构，当然结构是简单的；细菌是单细胞结构也很简单、即便是多细胞也是简单得多细胞。

3) 胃口大

胃口大的意思是吃得多。消耗自身重量 2 000 倍食物的时间，大肠杆菌需要 1 h；人需要 500 年（按 200 kg/年计算）。发酵乳糖的细菌在 1 h 内就可以分解相当于其自身重量 1 000 ~ 10 000 倍的乳糖产生乳酸；1 kg 酵母菌体，在一天内可发酵几千千克的糖生成酒精。这一特点也是我们应用微生物快速生产产品的原因。

4) 食谱广

食谱广的意思是什么都吃，比如纤维素、木质素、几丁质、角蛋白、石油、甲醇、甲烷、天然气、塑料、酚类、氰化物、各种有机物均可被微生物作为粮食。微生物获取营养的方式多种多样，其食谱之广是动植物完全无法相比的。我们动物能吃的东西，微生物当然能吃，动物不能吃的微生物也能吃。当然不是一种微生物都能吃以上所有的这些东西，但都有相应的微生物去吃。这一特点也就是我们利用微生物来处理环境中的污水、废物的原因。

5) 繁殖快

微生物有极高的生长繁殖速度，如 *E. coli*（大肠杆菌）20 min 繁殖一代，数量就是 2^n ，一天繁殖 72 代，也就是 2^{72} ，重量是多少呢？有 4 722 t。让它繁殖 48 h 可产生 2.2×10^{43} 个后代。当然你看到 *E. coli* 有那么多吗？这可能吗？这是不可能的，我们没那么多东西给它吃，实际上在自然情况下，细菌一般都是处于饥饿状态的。所以不可能长那么快。

由于微生物长得快，如果我们真的遇到粮食危机，微生物作用就大了，我们可以用微生物来解决粮食问题。比如养一头奶牛（500 kg）24 h 合成 0.5 kg 蛋白质；同样重量的酵母菌，我们给它吃的东西比给牛吃的还要次，24 h 合成自身质量 50 000 kg 的蛋白质，而且酵母菌所含的营养物很多。我们吃动物蛋白、植物蛋白、微生物蛋白也是可以吃的。微生物比动物和植物繁殖要快得多，真要是解决粮食问题可能还是要由微生物来完成。

另外，发酵乳糖的细菌在 1 h 内就可以分解相当于其自身重量 1 000 ~ 10 000 倍的乳糖产生乳酸；1 kg 酵母菌体，在一天内可发酵几千千克的糖生成酒精；这对于我们搞发酵工业有太大的好处。利用微生物的这一特性就可以实现发酵工业的短周期、高效率生产。

细菌比植物繁殖大概快 500 倍，比动物快 2 000 倍。这对于危害人、畜和植物等的病原微生物或使物品发霉的微生物来说，它们的这个特性就会给人类带来极大的麻烦甚至严重的祸害。

6) 易培养

很多微生物可以很方便在实验室进行人工培养。微生物对营养要求一般都不高，农副产品、工厂下脚料都可以用来培养微生物。沼气发酵池就是利用粪便、草木纤维等生产沼气的。大多数微生物的反应条件温和，能在常温常压下生长繁殖，不需要昂贵的设备，这比用化学法生产化工原料要优越得多。微生物培养不受季节、气候影响，因而能长年累月地进行工业化生产。

7) 分布广

分布之广可以用八个字来形容“无处不在，无孔不入”。任何有其他生物生存的环境中，都能找到微生物，而在其他生物不可能生存的极端环境中也有微生物存在。在正常的环境下有微生物，在很高的高空（85 km 高空）也有微生物，在很深的地层（2 000 m 深）也有微生物，在热的温泉也有微生物，酸性环境、碱性环境、永冻层也有微生物存在，科学家在 3 500 m 冰下取到了生命物质。有的人认为放在冰箱中食品可以保存很久不变质，但不是这样的，因为有的微生物在零下几十度也会生活得很好，只不过生长会慢一点。所以放在冰箱中的食品时间长了也是会变质的。

8) 种类多

种类多意思有 3 层：一是微生物生理代谢类型多，微生物代谢类型绝对比动物植物多，我们以前讲过微生物食谱广，微生物很多东西都可以吃，排到环境中的有我们认为有毒的东西，过一段时间也会筛到可以吃这些东西的微生物，为什么呢？是因为微生物生理代谢类型多。这点对环境废水处理很重要。二是代谢产物种类多，因为代谢类型多，所以代谢产物也多，这个特点对我们很有用，可以利用微生物生产很多对我们人类有用的产品。比如白酒，果酒、啤酒、酱油、味精、酶制剂、泡菜、氨基酸等等。三是微生物的数量多，目前生物中数量最多的是昆虫有 70 万种、植物 20 万种、动物 20 万种、微生物 10 万种。从这个意义上讲微生物的种类好像是较少，但是实际上我们发现和认识的微生物可能只是地球上微生物的 1%，给科学家足够长的时间去研究的话，可能微生物会是最多的。有人认为微生物占地球生物量的 60%。

9) 易变异

微生物由于个体小，和外界环境直接接触，很容易受到外界环境的影响而发生变异。生物的突变频率一般为 $10^{-5} \sim 10^{-10}$ ，就是说每 10 万到 10 亿个细胞有一个发生突变，所有的生物都是一样的。但是微生物个体小、繁殖快、数量多，在短时间内可出现大量变异的后代，这一点是很有用的。人们才能够按照自己的要求不断改良在生产上应用的微生物。但也有一些不利的地方。比如青霉素的生产，青霉素是在 20 世纪 30 年代、40 年代开始生产，那时青霉素的价格是很高的，据说和黄金价格是一样的，为什么那么贵呢？是因为当时的产量只有每毫升 20 单位，所以价格很贵，但当时使用了青霉素以后是很有效的，得病以后使用青霉素很快就好。现在青霉素变成了最便宜的抗生素，为什么呢？是因为青霉素菌经过诱变育种后青霉素菌的发酵水平由每毫升 20 单位上升到现在的 10 万单位，利用变异和育种得到如此大幅度的产量提高，在动植物育种工作中简直是不可思议的。所以青霉素变得很便宜。但是，与此同时青霉素的用量却在提高，1940 年打一次青霉素只要 10 万元单位/次，1980 年输液

80万单位/次，2000年输液800万~1000万单位/次，这是因为细菌产生了抗药性的变异。

10) 抗(逆)性强

“逆”就是不良环境的意思。2003年发表在《科学》杂志的一篇论文表明，研究人员发现了一种食铁的微生物能够在121℃高温下生长。微生物的抗热性很强，尤其是微生物的芽孢，抗热性非常强，需加热煮沸8h才被杀死；微生物的抗寒性也很强，有些微生物可以在-12~-30℃的低温生长，当然生长的速度是比较慢的；微生物抗酸碱，一般生物生活的最适环境在pH中性左右，有的细菌能耐受并生长的pH范围在0.5~13；微生物耐渗透压，比如蜜饯、腌制品、饱和盐水(NaCl, 32%)中都有微生物生长；微生物抗压力，有些细菌可在深海的海底也存在微生物，在1400个标准大气压*下生长。

11) 休眠长

发现的世界上最古老细菌(芽孢)生活了2.5亿年。

12) 起源早

地球是在46亿年前形成，生命是什么时候出现的呢？38亿年前，生命在海洋中出现，26亿年前，陆地上就可能存在微生物。

13) 发现晚

300多年前人们才真正发现微生物的存在，为什么，因为小看不见，显微镜出现以后才看到了微生物。

5. 微生物的分类与命名

1) 微生物的分类

为了识别和研究微生物，各种微生物按其客观存在的生物属性(如个体形态及大小、染色反应、菌落特征、细胞结构、生理生化反应、与氧的关系、血清反应等)及它们的亲缘关系，有次序的分门别类排列成一个系统，从大到小，按界、门、纲、目、科、属、种等分类。把属性类似的微生物排列成界，在界内从类似的微生物中找出它们的差别，再列为门，依次类推，直分到种。“种”是分类的最小单位。种在微生物之间的差别很小，有时为了区分小差别可用株表示，但“株”不是分类单位。在两个分类单位之间可加亚门、亚纲、亚目、亚科、亚属、亚种及变种等次要分类单位。最后对每一属或种给予严格的科学名称。

1969年魏泰克(Whittaker)提出生物五界分类系统，后来被Margulis修改成为普遍接受的五界分类系统原核生物界(包括细菌、放线菌、蓝绿细菌)原生生物界(包括蓝藻以外的藻类及原生动物)真菌界(包括酵母菌和霉菌)、动物界和植物界。

我国王大相教授提出六界：病毒界、原核生物界、真核原生生物界、真菌界、动物界和植物界。

长久以来，细菌分类学以形态学特征、表型特征、生理特征、生态特征、血清学反应、噬菌体反应等为分类依据，现在不仅限于上述方法，还采用DNA中的G+C%，DNA杂交、DNA-rRNA杂交、16S rRNA碱基顺序分析和比较微生物。尤其是细菌的属和种进行分类，

* 标准大气压：非法定计量单位，1标准大气压=1.013×10⁵ Pa。

将原来一直放在细菌范畴的古菌识别出来,对古菌在分类学中的地位有比较明确的认识,将古菌、细菌和真核生物并列。

2) 微生物的命名

微生物的命名是采用生物学中的双名法,即用两个拉丁字命名一个微生物的种。这个种的名称是由一个属名和一个种名组成,属名和种名都用斜体字表达,属名在前,用拉丁文名词表示,第一个字母大写。种名在后,用拉丁文的形容词表示,第一个字母小写。如大肠埃希氏杆菌的名称是 *Escherichia coli*。为了避免同物异名或同名异物,在微生物名称之后缀有命名人的姓,如:大肠埃希氏杆菌 *Escherichia coli* *Castella and Chalmers*。浮游球衣菌的名称是 *Sphaerotilus natans* *K ü tzing* 等。枯草芽孢杆菌的名称是 *Bacillus subtilis*。如果只将细菌鉴定到属,没鉴定到种,则该细菌的名称只要属名,没有种名。如:芽孢杆菌属的名称是 *Bacillus*。梭状芽孢杆菌属的名称是 *Clostridium*。也可在属名后面加 *sp.* (单数) 或 *spp.* (复数), *sp.* 和 *spp.* 是种 *species* 的缩写,如 *Bacillus sp.* (*spp.*)。

二、显微镜和显微技术

1. 几个概念

(1) **放大**: 我们看书的时候如果拿远了,大家是不是看不清楚,为什么呢?因为远了以后字太小,当然看不清楚,我们要看清楚,要怎么样?拿近一点,字大一点就看清楚了,但你再拿近点、看得清楚吗?看不清楚,很模糊,那么拿到多少距离比较合适呢?25 cm、这个25 cm 是人的眼睛的工作距离,这个距离一般人的眼睛成像是最清楚的。如果近了也想看得清楚,或是再想放大?怎么办呢?就要借助于工具,比如放大镜、显微镜。

(2) **分辨率**: 我们有一台显微镜,不是任意加大放大倍数都看得清。放大是否有效要取决于你使用这个显微镜的分辨率,分辨率是能辨别两点之间最短的距离的能力。我们想象一下,晚上对面开来一辆汽车,很远的时候,你只看见一个灯,因为分辨率低,但是开近了以后是不是就看清楚两个灯了。这就是分辨率。我们肉眼的分辨率是0.2 mm,光学显微镜分辨率可以达到0.2 μm ,电子显微镜分辨率可达0.2 nm。显微镜的分辨率大小取决于显微镜的性能。

(3) **反差**: 反差是指被观察的构体区别于背景的程度。我们看看下面两排字。

被观察的物体区别于背景的程度

被观察的物体区别于背景的程度

一样的字体一样的大小,哪个更清楚一目了然,为什么呢?这是就反差,反差就是被观察的物体区别于背景的程度。如果没有适当的反差,是看不清楚的。对于显微镜来说呢,放大、分辨率、反差这3个非常重要。怎么利用好这3点呢?一方面和显微镜的性能有关,好的显微镜几万到几十万、差的显微镜几千元钱。另一方面也取决于使用者的技术,比如在显微镜观察时对显微镜的正确使用、良好的标本制作和调式观察技术,这就是显微技术。

2. 普通光学显微镜构造和原理

普通光学显微镜由机械部分和光学部分组成。

(1) 机械部分主要包括：① 镜座；② 载物台；③ 镜臂；④ 物镜转换器；⑤ 载物台和推动器；⑥ 调焦螺旋；⑦ 聚光器升降螺旋。

(2) 光学系统主要包括：① 聚光器；② 虹彩光圈；③ 物镜，一般物镜包括低倍物镜（4×、10×）和高倍物镜（40×）和油镜（100×）。一般放大倍数越高的物镜工作距离（当所观察的标本最清楚时物镜的前端透镜下面到标本的盖玻片上面的距离）越小，10倍物镜有效工作距离为 6.5 mm，40倍物镜有效工作距离为 0.48 mm，油镜的工作距离只有 0.2 mm。很近，调节的时候注意不要碰破标本。④ 目镜，目镜上刻有表示放大倍数的标志，如 5×、10×、16×。目镜中可安置目镜测微尺，用于测量微生物的大小。目镜一般用 10 倍较多。

普通光学显微镜的构造如图 1-1 所示。

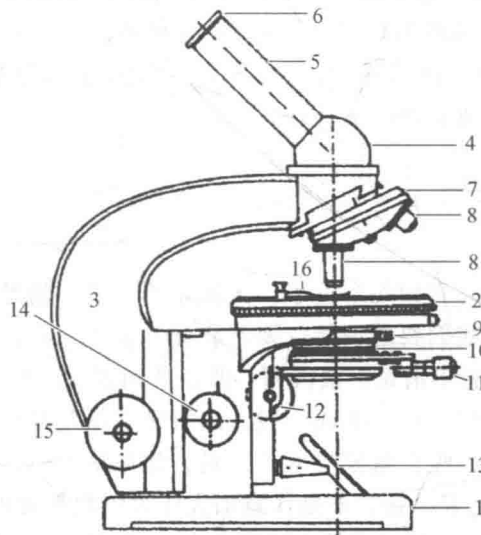


图 1-1 普通光学显微镜的构造

1—镜座；2—载物台；3—镜臂；4—棱镜套；5—镜筒；6—接目镜；7—转换器；8—接物镜；9—聚光器；
10—虹彩光圈；11—光圈固定器；12—聚光器升降螺旋；13—反光镜；
14—细调节器；15—粗调节器；16—标本夹

100 倍物镜称之为油镜，使用的时候要在 100 倍物镜和标本之间加香柏油。为什么要加香柏油呢？因为物镜放大到 100 倍，分辨率不够，影像无效放大，看不清楚。怎么提高分辨率呢？分辨率 [分辨距离 (R)] = $0.61\lambda/n \times \sin\alpha$

其中， λ 为照明光波长； n 为折射率。

从分辨率公式可以看出分辨力与波长成反比，波长越短分辨力越高。一般可见光的波长范围为 400 ~ 700 nm，用可见光中最短波长的紫色光，则分辨距离约为 0.2 μm ，这是一般光学显微镜分辨力极限。用高速电子束（其波长短到 0.005 nm）作为电子显微镜照明，分辨力可达 0.2 nm 左右。比光学显微镜分辨力提高 1 000 倍。所以电子显微镜放大率可以达到十几万到几十万倍。

从分辨率公式还可以看出分辨力还与折射率 (n) 有关， n 越大分辨力越高。光线从载玻片透过被空气折射（空气折光率 1.00、玻璃折光率为 1.52），不易射入镜头内，致使光线较弱物象不清。当在透镜与玻片之间滴加和玻璃折射率 ($n=1.52$) 相仿的香柏油 ($n=1.515$)，则可以提高分辨力，由于香柏油折光率与玻璃相近，可消除光线通过玻璃与物镜间空气时发

生的折射现象,避免光线损失,使亮度和清晰度都得到了提高,几乎可以看清所有细菌。故100倍的物镜也因此称为油镜。

项目二 细菌制片、简单染色、革兰氏染色及形态观察

目 标

- (1) 学习细菌制片、染色的基本技术,掌握细菌的简单染色方法和革兰氏染色技术。
- (2) 认识细菌的个体形态和菌落特征。

【项目实施】

一、细菌制片、简单染色及形态观察



<任务一> 准备材料与仪器

- (1) 菌种:培养24 h的金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和大肠杆菌。
- (2) 染色液和试剂:石炭酸复红染液、吕氏碱性美蓝染色液。
- (3) 仪器或其他用具:显微镜、酒精灯、擦镜纸、载玻片、接种环、蒸馏水(或生理盐水)。



<任务二> 实践操作

▲安全警示

- (1) 加热固定时使用载玻片夹子,以免烫伤,不要将载玻片在火焰上烤的时间过长,以免载玻片破裂。
- (2) 使用染料时注意避免沾到衣物上。
- (3) 实验后洗手,金黄色葡萄球菌为致病菌。

(1) 涂片:取干净载玻片一块,将其在火焰上微微加热,除去油脂,冷却,在中央部位滴加一小滴蒸馏水(或生理盐水),按无菌操作法(见图1-2),用接种环从斜面上挑取少量菌体与水混匀,涂成均匀的薄层。注意取菌不要太多,涂布面积直径约1.5 cm为宜。

(2) 干燥:让涂片在室温中自然晾干或者在酒精灯火焰上方用小火烘干。

(3) 固定:手执玻片一端,让有菌膜的一面朝上,通过微火3~4次固定(用手指接触涂片反面,以不烫手为宜,否则会改变甚至破坏细胞的形态)。固定的目的是杀死活菌,使菌体蛋白质凝固,以固定细胞的形态,使之牢固附着在载片上。