



普通高等教育食品类专业“十三五”规划教材  
高等学校食品类国家特色专业建设教材


# 食品微生物学实验

SHIPIN WEISHENGWUXUE SHIYAN



□□□□□□□□□□□□□□□□  
□□□□□□□□□□□□□□  
□□□□□□□□□□□□□□

雷晓凌 刘颖 王玲◎主编

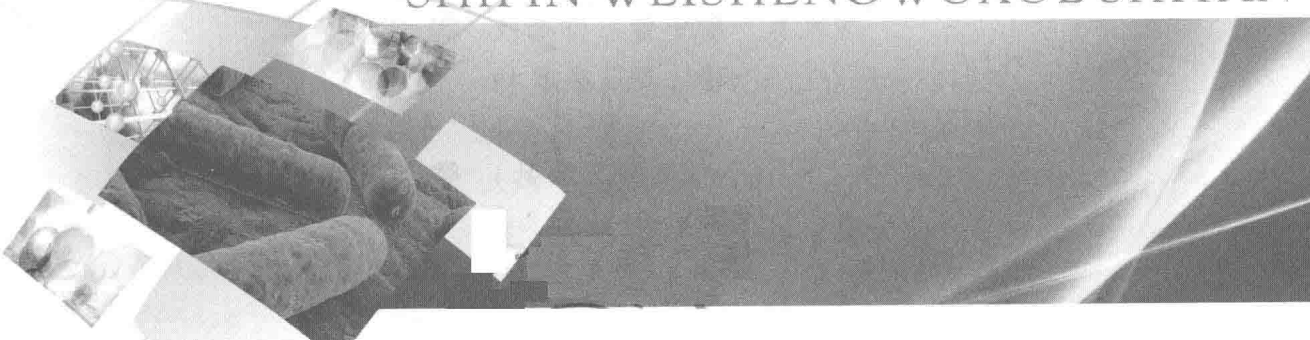
 郑州大学出版社




普通高等教育食品类专业“十三五”规划教材  
高等学校食品类国家特色专业建设教材

# 食品微生物学实验

SHIPIN WEISHENGWUXUE SHIYAN



雷晓凌 刘颖 王玲◎主编

 郑州大学出版社

郑州

## 图书在版编目(CIP)数据

食品微生物学实验/雷晓凌,刘颖,王玲主编.—郑州:郑州大学出版社,2017.2

普通高等教育食品类专业“十三五”规划教材

ISBN 978-7-5645-3932-0

I. ①食… II. ①雷…②刘…③王… III. ①食品微生物学-微生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①TS201.3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 029706 号

郑州大学出版社出版发行

郑州市大学路 40 号

出版人:张功员

全国新华书店经销

河南文华印务有限公司印制

开本:787 mm×1 092 mm 1/16

印张:7.25

字数:170 千字

版次:2017 年 2 月第 1 版

邮政编码:450052

发行部电话:0371-66966070

印次:2017 年 2 月第 1 次印刷

---

书号:ISBN 978-7-5645-3932-0

定价:16.00 元

本书如有印装质量问题,由本社负责调换



# Food

## 本书作者

主 编 雷晓凌 刘 颖 王 玲

副 主 编 刘唤明 曾少葵 房志家  
叶日英 伍 彬

编 委 (按姓氏笔画排序)

王 玲 叶日英 伍 彬

刘 颖 刘唤明 房志家

曾少葵 雷晓凌



# Food

## 前言

本书主要是配合食品科学类专业开设的微生物学和食品微生物学课程而撰写的实验课程教材。由于微生物本身以及在食品科学类专业中的应用特点,决定了食品微生物学是一门实践性极强的课程,所以掌握食品微生物学实验最基本的操作技术以及与食品密切相关的综合实验技术对于学好这门课程极其重要。

本书所安排的实验内容主要从教学需要出发,在本校自编的《食品微生物学实验》基础上,参考国内外实验教材及结合教学实践精选编写而成。全书共22个实验,分为微生物学基础实验、食品微生物安全综合检测和微生物发酵食品设计性实验三个部分。通过从掌握微生物基础实验技术开始,到培养综合运用这些技术能力,最终进行自主设计性实验递进式教学方式,使学生系统掌握食品微生物学实验相关技能。每个实验内容均包括实验目的、实验原理、实验材料、实验步骤、实验报告和思考题,方便教学及学生更深层次地掌握实验内容。此外,还包含常用染液、培养基、指示剂和试剂的配制方法4个附录。

本书特点着重于紧密结合理论教学,兼顾贴近专业和日常生活,旨在引导学生对课程教学的兴趣。重视基础训练,兼顾实用性和灵活性,既有严谨的基础单元训练,又有食品微生物学安全的综合检测,还有学生自行设计的发酵食品实验,能较好训练学生的综合素质。

基础微生物学实验部分包含14个实验,内容包括微生物的形态观察、培养基的配制、生理生化、菌种鉴定和保藏等;食品微生物安全综合检验包含3个实验,内容包括饮用水、食品和罐藏食品的检验,并列有常用的食品微生物安全检验标准;微生物发酵食品设计性实验包含5个实验,以细菌、酵母菌和霉菌在食品中的不同应用为例,供学生选择并根据要求自行设计及进行实验,发挥学生的主观能动性。

本书主要由广东海洋大学“食品微生物学”省级精品资源共享课课程组教师精心编写而成,主要成员为雷晓凌、刘颖、王玲等。编写过程力求完善、实用,注重经典与现代结合,自认为是较为系统、连贯、实践性强的食品微生物学实验教材。由于我们水平有限,肯定还存在不足,敬请使用该书的读者给我们提出宝贵意见。

编者

2016年12月



# Food

## 目录

食品微生物学实验室守则与安全要求 .....	1
第一篇 基础微生物学实验 .....	3
实验一 普通光学显微镜的使用 .....	3
实验二 细菌的形态观察 .....	10
实验三 细菌特殊结构的观察 .....	15
实验四 放线菌的形态观察 .....	18
实验五 酵母菌的形态观察 .....	20
实验六 霉菌的形态观察 .....	22
实验七 微生物的大小测量和血球计数板直接计数 .....	24
实验八 培养基的配制与灭菌技术 .....	28
实验九 微生物的分离、纯化和接种 .....	35
实验十 环境因素对微生物生长发育的影响 .....	43
实验十一 细菌鉴定中常用的生理生化反应试验 .....	48
实验十二 常规的抗原与抗体反应试验 .....	54
实验十三 细菌 16S rDNA 的分子鉴定 .....	58
实验十四 微生物菌种的保藏 .....	61
第二篇 食品微生物安全综合检验 .....	64
实验十五 生活饮用水微生物指标的检验 .....	64
实验十六 水产品中菌落总数和大肠菌群的检验 .....	73
实验十七 罐藏食品的商业无菌检验 .....	81
第三篇 微生物发酵食品设计性实验 .....	88
实验十八 乳酸菌发酵酸奶的制备 .....	88
实验十九 利用枯草芽孢杆菌制备糖化酶 .....	90
实验二十 活性干酵母发酵力的测定及果酒酿造 .....	92
实验二十一 利用米曲霉制备黄豆酱 .....	94
实验二十二 利用毛霉制作豆腐乳 .....	96

附录 .....	97
附录一 实验常用染液配制法 .....	97
附录二 教学常用培养基配制法 .....	100
附录三 常用指示剂的性能及配制 .....	105
附录四 实验用试剂的配制 .....	107
参考文献 .....	109

# 食品微生物学实验室守则与安全要求

为确保食品微生物学实验的教学效果,以及保证实验操作者的安全,培养学生严肃认真的科学态度,充分认识实验安全要求,参与实验的老师和学生均应严格遵守实验室守则以及安全要求。

## 一、食品微生物学实验室守则

食品微生物学实验室守则规范了进入实验室的学生和实验过程的要求。具体如下:

1. 每次实验前对实验内容进行充分预习,以了解实验目的、原理和实验步骤。
2. 请勿在实验室进食、饮水,也不要带零食、水杯进入实验室,严禁在实验室食用实验样品。
3. 实验室内应保持整洁,勿高声谈话和随便走动,保持室内安静;实验操作台除了实验指导书或实验记录本之外,不能放置书包、衣服等物品,以免影响实验操作。
4. 实验操作时应穿实验服。上课时如有新鲜伤口或疾病应及时告知指导老师,以采取防护措施。
5. 实验时要细心谨慎,严格按操作规程进行,遇到实验样品喷洒污染等意外情况时,应立即报告指导教师和实验员,及时处理。
6. 及时认真做好实验记录,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,及时将实验报告交老师批阅。
7. 实验需进行培养的材料,应标明自己的组别、名称及处理方法,放于教师指定的位置进行培养。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。
8. 实验过程各实验组使用各自实验材料,用完放回原处,不要随意动用其他组同学的材料,以免混乱。
9. 实验结束后,必须将自己或所在实验小组的实验器材清洗干净并摆放整齐,将实验台面擦洗干净。每次实验安排值日生,负责实验结束后全面的整理和清洁工作。凡带菌的器材或物品需经浸泡消毒或高温灭菌后才能清洗,以免污染。
10. 离开实验室前要用肥皂或消毒液洗手,注意关闭灯、火、门、窗等。

## 二、食品微生物学实验的安全要求

食品微生物学实验可能受到实验涉及菌种的危害,以及有毒、易燃、腐蚀等化学危害,高压电、紫外线和其他辐射的危害。尽管实验中有关的微生物菌株多数是非致病性,但有些是致病菌,需要严格遵守实验安全要求,才能保证操作者的安全。

### 1. 人员防护及用具

(1) 工作服或隔离服,在实验工作时,必须穿着工作服或隔离服,离开实验室前,必须脱下并留在实验室内,不得穿着工作服进入办公室或厕所,用过的工作服定期高压灭菌或其他方法消毒。

(2) 手套,在进行可能直接或意外接触到样本的血液、体液以及其他具有潜在感染性



## 2 食品微生物学实验

微生物的操作时,应戴上橡胶手套,手套用完后进行消毒或丢弃,随后必须清洗消毒手才能离开工作区域。

(3)防护口罩、眼罩或防护面具,实验过程为了防止吸收挥发性真菌孢子以及防止眼睛、面部受到喷溅物、碰撞物或人工紫外线的伤害,必须根据需要戴防护口罩、眼罩或其他防护面具。

### 2. 实验操作安全规范

(1)严禁用口吸移液管,严禁将实验材料置于口内。制定安全使用锐利器具(如注射器针头、手术刀片等)的方案。

(2)仔细进行每一步操作,以减少飞溅物或气溶胶和微小液滴的产生。工作台面在每天工作结束前至少应消毒一次。

(3)对环境具有污染的液体或样品在排放前必须采用化学或物理方法清除污染,需要带出实验室的手写文件必须保证在实验室内没有受到污染。

### 3. 实验室安全管理守则

(1)微生物材料根据对人体有害或无害分类存放,并遵循国家和国际的相关规定。

(2)在使用有毒或易挥发化学试剂时,必须在排风良好的地方或通风橱中进行;在使用易爆品、浓酸和浓碱等化学试剂时,应戴护目镜和橡胶手套。危险试剂必须由专人保管和储存。

(3)对贵重的精密仪器,必须仔细阅读仪器说明书,负责老师同意后方可使用。对高温高压设备,如烘箱、高压灭菌锅等须严格按照操作规程进行,以免发生安全事故。

# Food 第一篇 基础微生物学实验

基础微生物学实验设计紧密结合基础微生物学理论教学,跟微生物的形态结构、微生物的营养与生长、微生物的代谢、遗传变异、生态学和免疫学等知识密切相关,通过实验增强对相关知识的理解和应用。该篇着重基础实验技能的训练,主要包括显微镜的使用和细菌、放线菌、酵母菌、霉菌的形态观察;微生物的测微技术及血球计数板计数,培养基的制备和灭菌,微生物的分离与纯化,环境因素对微生物生长发育的影响,细菌鉴定中常用的生化反应试验,常规的抗原与抗体反应试验,微生物菌株的分子鉴定,微生物菌种的保藏等。学生经过基础训练可以较为全面地掌握微生物学基本实验技术。

## 实验一 普通光学显微镜的使用

### 一、实验目的

- (1)了解普通光学显微镜各部分的构造、性能和基本原理。
- (2)学会普通光学显微镜的正确使用方法,特别是油镜的使用方法。
- (3)了解普通光学显微镜的维护和保养方法。

### 二、实验原理

显微镜是观察微生物的重要工具,实验室最常用的显微镜为普通光学显微镜。由于微生物个体微小,因此微生物的观察常常需要使用油镜观察。因此,这里重点学习普通光学显微镜的构造和原理,油镜的基本原理。

#### (一) 普通光学显微镜的构造

光学显微镜是由一组光学放大系统和支持及调节它的机械系统组成,有的还附加光源部分,显微镜的构造示意图 1-1。

##### 1. 机械部分

由镜座、镜臂、物镜转换器、镜筒、镜台、移动器、调节器等构成。

(1)镜座:显微镜的底座,起支撑和稳固作用,镜座可呈马蹄形、圆形等形状,有较大的底面积和质量。

(2)镜臂:显微镜的脊梁,立于镜座上面,起支撑镜筒、镜台和光学部件的作用,有的可调节倾斜度,便于观察。

(3)物镜转换器:是一个能转动的圆盘,用于装配不同放大倍数的物镜,通过旋转物镜转换器,选择使用的物镜。

(4)镜筒:位于镜臂上端,是一个空心圆筒,上端放入目镜,下端接转换器和物镜,从镜筒的上端目镜至下端螺纹口的距离一般为 160 mm,镜筒有直筒式、单斜筒式和双斜筒

式等。

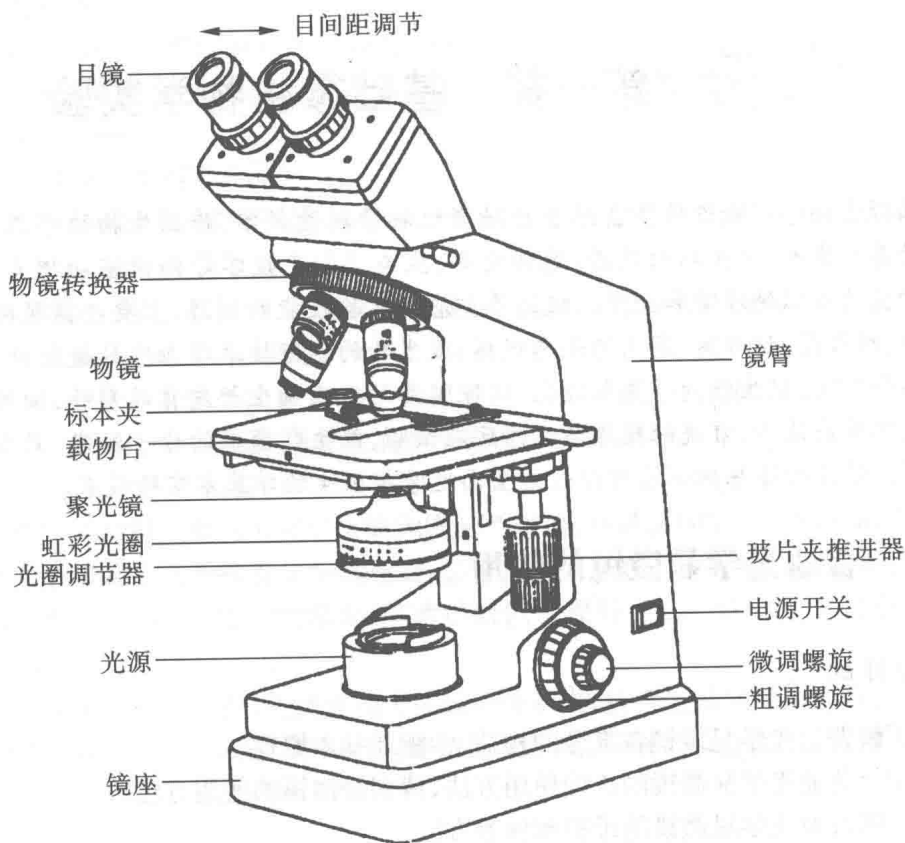


图 1-1 双筒普通光学显微镜的构造

(5) 镜台: 又称载物台, 是放置标本的平台, 有方形或圆形。镜台上有标本夹, 用以固定标本, 还有标本移动器, 转动螺旋可使标本前后、左右移动, 有的标本移动器带有标尺, 可标定标本的位置, 便于重复观察。

(6) 调节器: 有粗调螺旋和细调螺旋, 能使镜筒或镜台升降, 调节物镜与标本的距离, 以便能最清晰地观察标本。现在显微镜的粗细调节常是共轴式。

## 2. 光学部分

由目镜、物镜、聚光器、虹彩光阑(光圈)、光源等构成。

(1) 目镜: 目镜插在镜筒的上端, 基本上是一个放大镜, 它可将物镜所形成的实像进一步放大, 形成虚像, 并映入眼部。不同的目镜上刻有  $5\times$ 、 $10\times$ 、 $16\times$  等字样以表示该目镜的放大倍数, 使用时可根据需要选用适当的目镜。

(2) 物镜: 物镜是显微镜中最重要的光学部件, 安装在物镜转换器上, 起着放大标本片上被检物物像(实像)的作用, 一般装有低倍镜、高倍镜和油镜三种。物镜的性能可以用数值孔径(numerical aperture, NA)来表示。一般物镜上标有放大倍数、数值孔径、镜筒长度及要求的盖载玻片厚度等参数(见图 1-2)。在低倍镜、高倍镜和油镜三种物镜中, 随着放大倍数的增大, 数值孔径也增大, 工作距离缩短, 油镜最接近标本片。

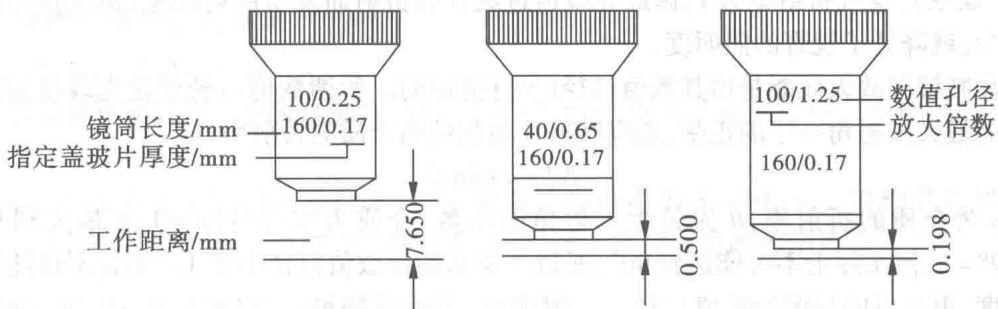


图 1-2 物镜的标注及工作距离

物镜可分为干燥系和油浸系两种物镜,干燥系物镜与标本之间的介质是空气,如低倍镜和高倍镜;而油浸系物镜与标本间的介质是香柏油,为油镜。观察时根据需要转动物镜转换器,选择合适的物镜。油镜刻有“Oil”或“HI”字样,也有刻一圈红线或黑线为标记,用于区别其他物镜。

(3) 聚光器:聚光器装在镜台下,可以升降,其作用是将光线聚焦于标本之上,增强照明度;聚光器内有虹彩光阑(俗称光圈),通过调整光阑孔径的大小,调节光线强弱。

(4) 光源:现在的显微镜多数是自带光源,光源安装在镜座内,通过按钮开关或拉杆来获得适当的照明度。如果没有自带光源,则使用反光镜采集自然光或灯光作为照明光源。反光镜一面是平面镜,一面是凹面镜,一般情况下低倍镜和高倍镜使用平面镜,油镜使用凹面镜。

## (二) 普通光学显微镜的基本原理

普通光学显微镜利用目镜和物镜两组透镜系统进行放大成像,因此也称为复式显微镜。在光学系统中物镜的性能最为重要,因为它直接影响着显微镜的分辨率。

### 1. 显微镜的放大倍数

被观察物体经显微镜的物镜和目镜放大后的总放大倍数是两者的乘积,即

$$\text{被观察物体的放大倍数} = \text{目镜放大倍数} \times \text{物镜放大倍数} = E \times O$$

式中, $E$  为目镜放大倍数, $O$  为物镜放大倍数。

如用  $40\times$  物镜和  $16\times$  目镜观察,即总放大倍数为  $640\times$ 。不过目镜的有效放大倍数是有限的,过大的目镜放大倍数并不能提高显微镜的分辨率,显微镜的有效放大倍数为

$$E \times O = 1000 \times NA$$

目镜的有效放大倍数为

$$E = \frac{1000 \times NA}{O}$$

当用油镜观察时,如放大倍数为  $100\times$ , $NA$  为  $1.25$ ,经计算目镜的有效放大倍数为  $12.5$ ,即使目镜的放大倍数为  $16\times$ ,但实际上不能达到相应的分辨效果。

### 2. 显微镜的分辨率及油镜工作原理

油镜与普通物镜不同,为油浸系,载片和物镜之间的介质是一层油质,一般常用香柏油或液状石蜡,其折射率分别为  $1.515$  或  $1.52$ ,与玻璃的折射率  $1.52$  相近,光线通过载玻片后,可直接通过香柏油进入物镜而不发生折射;如果载玻片与物镜之间的介质是空

## 6 食品微生物学实验

气(干燥系),空气折射率为1,因此光线通过载片后折射而发生散射现象,进入物镜的光线减少,就降低了视野的照明度。

显微镜的放大效能是由其数值口径( $NA$ )决定的。所谓数值口径就是光线投射到物镜上的最大入射角一半的正弦,乘以载玻片与物镜间介质的折射率。

$$NA = n \times \sin \theta$$

$n$  为介质的折射率,  $\theta$  为最大入射角的半数, 介质为空气时,  $n = 1$ ,  $\theta$  最大到  $90^\circ$ ,  $\sin 90^\circ = 1$ , 但实际上不可能达到  $90^\circ$ , 所以干燥系物镜数值口径小于 1。油镜不仅能增加照明度, 更主要的是增加数值口径。一般来说, 干燥系物镜的  $NA = 0.05 \sim 0.95$ , 油镜的  $NA = 0.85 \sim 1.40$ 。介质的折射率对光线通路的影响, 如图 1-3 所示。

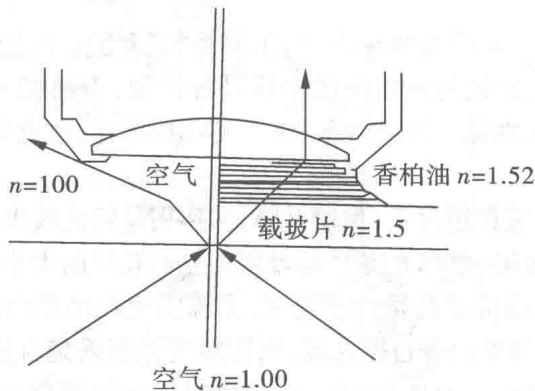


图 1-3 介质的折射率对光线通路的影响

左侧为干燥系物镜;右侧为油浸系物镜

评价一台显微镜的质量优劣, 不仅要看其总放大倍数, 更重要的是看其分辨率(又称解像力, resolution)。分辨率是指显微镜能够辨别两点或两根细线之间最小距离的能力。它与物镜的数值口径成反比, 与光线的波长成正比。公式如下:

$$R = \frac{\lambda}{2NA} = \frac{\lambda}{2n \sin \theta}$$

式中,  $R$  为分辨率,  $\lambda$  为光线波长。可见光波长范围是  $400 \sim 750 \text{ nm}$ , 平均是  $550 \text{ nm}$ , 这是对人眼睛最亮的红绿光。假如用  $NA = 1.25$  的油镜, 则分辨率  $\delta = 0.55/2 \times 1.25 = 0.22 \mu\text{m}$ 。

### 三、实验材料

(1) 显微镜、香柏油或液状石蜡、二甲苯、擦镜纸等。

(2) 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 染色标本。

### 四、实验步骤

显微镜的操作步骤: 显微镜移动和安置 → 照明调节 → 低倍镜观察 → 确定目标 → 高倍镜观察或油镜观察 → 显微镜的维护。

## (一) 显微镜使用前的准备

### 1. 显微镜移动和安置

显微镜移动时应一手握住镜臂,另一手托住底座,使显微镜保持直立平稳,切忌单手拎提,如图 1-4 所示。

显微镜安置于平稳的实验台上,镜座距实验台边沿为 3 ~ 10 cm。镜检者姿势要端正,观察时双眼同时睁开,以减少眼睛疲劳,同时便于边观察边画图记录等。

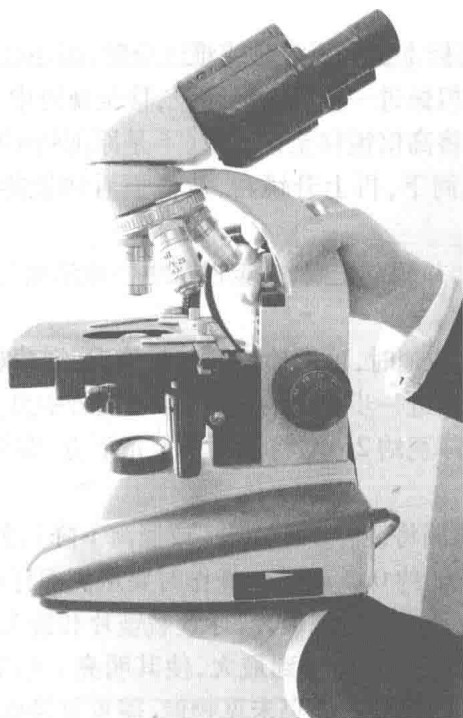


图 1-4 显微镜的移动

### 2. 照明调节

自带光源显微镜的照明调节。

(1) 先将聚光器升高,至距离载物台底面约为 1 mm。

(2) 打开自带光源开关,将光源强度调节至中等或稍偏大。

(3) 旋转物镜转换器,将低倍镜转到镜筒下方,旋转粗调节器,使物镜与镜台的距离约为 1 cm。

(4) 在镜筒上观察,并调节聚光器上的孔径光阑控制最佳照明效果。

无自带光源显微镜的照明调节,也是先将聚光器升高,然后通过反光镜调节照明,凹面镜反光强度较大。

## (二) 显微镜的观察

### 1. 低倍镜(10×)观察

镜检任何标本一般都先用低倍镜观察。因为低倍镜视野较大,易于发现目标和确定检查的位置。

(1)取标本置于载物台前边沿,一手打开标本固定装器,另一手将标本推入至直角固定处,放开手使固定装置将标本卡住;移动推动器,使被观察的标本处在物镜正下方。

(2)转动粗调节旋钮,使镜台上升(或镜筒下降)至距低倍镜3~5 mm处。

(3)用左眼或双眼在目镜上观察,同时用粗调节旋钮慢慢下载物台(或上升镜筒),直至视野内出现物像为止,再用微调调节旋钮使物像清晰。如所观察的物体不够理想,可旋转标本移动器改变观察的视野。

(注意:可单手也可双手调节,但两手一定要同步,否则会损坏调节器螺旋)。

## 2. 高倍镜(40×)观察

当在低倍镜下被观察标本仍看不清时或难区分时,需用高倍镜做进一步放大。

(1)先在低倍镜下将拟做进一步放大的部位,移至视野中央。

(2)转动物镜转换器将高倍镜移至镜筒下(不是原配物镜时,需先下降镜台后再转动转换器,将高倍镜移至镜筒下,再上升镜台,从侧面看物镜距标本约0.5 mm时停止上升)。

(3)用微调调节焦距,并调节光圈,直至视野中物像清晰为止。

## 3. 油镜(100×)的观察

在高倍镜下观察不够清楚时,可用油镜进一步放大,细菌观察一般要用油镜。

(1)在高倍镜下将拟做进一步放大的部位,移至视野中央。

(2)用粗调将镜台下降至约2 cm,将油镜移至正下方,在标本的镜检部位滴上1滴香柏油。

(3)从侧面注视,用粗调将镜台小心上升(或镜筒下降),使油镜镜头前端浸入香柏油中,镜头几乎与标本相接触(约0.2 mm)。操作时要从侧面仔细观察,只能让镜头浸入油中紧贴着标本而避免让镜头撞击载玻片,导致载玻片和镜头受损。

(4)从目镜内观察,把孔径光阑开到最大,使其明亮。然后用微调将镜台下降,直至视野内物像清晰。如油镜已离开油面仍未见物像,需重复操作。

(5)观察完毕,下载物台2 cm,将油镜转出,先用擦镜纸擦去镜头上的香柏油,然后用擦镜纸蘸少许二甲苯擦拭镜头,最后用擦镜纸将镜头擦干(只能向一个方向擦拭)。

(注意:①下降镜头时,要从侧面注视,在通过目镜观察时,切勿使用粗调上升镜台来调节焦距,以免压碎载玻片而损坏镜头。②使用二甲苯擦镜头时,注意二甲苯不能太多,以防溶解固定透镜的树脂)

## (三) 普通光学显微镜用后处理及维护

为了避免显微镜的损坏以及保证仪器的良好性能,需要注意显微镜的清洁维护。

(1)观察完毕后,关闭电源,取下标本。

(2)擦油镜镜头:先用擦镜纸将油镜上的香柏油擦去,然后另用擦镜纸蘸取二甲苯等擦洗油镜镜头,方法是用食指将蘸满二甲苯的擦镜纸按着镜头往同一个方向擦拭,重复动作数次直至将香柏油擦拭干净,然后再用干净的擦镜纸将油镜擦拭一次。

(3)擦高倍镜镜头:用擦镜纸往同一个方向擦拭,换擦镜纸重复2次。

(4)将载物台的污迹擦拭干净。

(5)将显微镜镜头转成“八”字形,下降至距镜台最低处,电线妥善收好,套上镜罩,放入显微镜柜中。

(6)填写显微镜使用记录本,经指导老师检查无误后即可离开。

强烈的阳光、热、酸、碱、潮湿等对显微镜都有损害,由此使用和存放显微镜时,应避免放置在有热源、强烈的阳光及酸碱的地方,并保持干燥。

## 六、实验报告

1. 按照显微镜的操作步骤,学习每个操作。
2. 用铅笔绘出高倍镜或油镜下观察到的细菌形态,并注明观察的倍数,格式如图 1-5 所示。

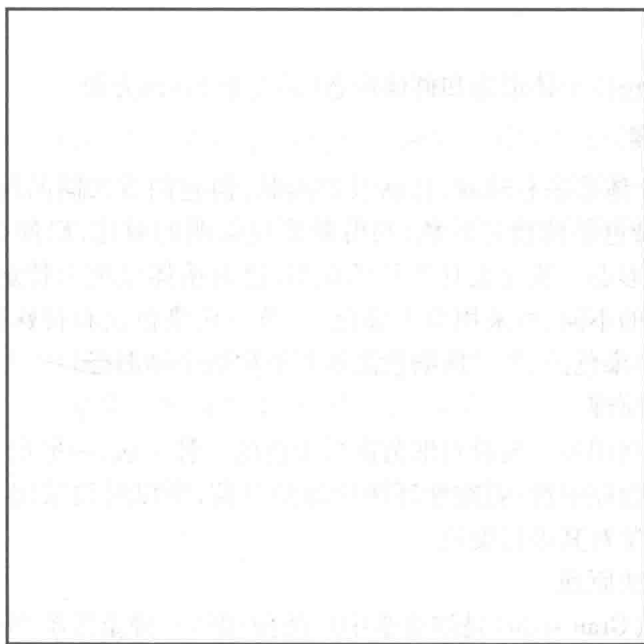


图 1-5 菌种名称+放大倍数(目镜倍数×物镜倍数)

## 七、思考题

- (1)如何区别高倍镜和油镜?
- (2)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错误操作?
- (3)用油镜观察时应注意哪些问题?在载玻片和镜头之间加滴什么油?起什么作用?
- (4)在调节焦距时,往往出现一些疑似观察标体的物像点,物像点可能是目镜或物镜上的杂质,也可能是标本片上的观察对象,如何通过操作判断这些物像点是否在标本片上?



## 实验二 细菌的形态观察

### 一、实验目的与要求

- (1) 了解简单染色法和革兰氏染色法观察细菌个体形态的原理,掌握其操作步骤。
- (2) 学习微生物的无菌操作。
- (3) 学会观察细菌的菌落特征。

### 二、实验原理

形态观察主要包括个体形态和群体形态(菌落形态)两方面。

#### (一) 个体形态观察

细菌种类多,个体形态有球状、杆状及螺旋状,但它们有共同的特点,即体型微小且透明,一般须借助染色法使菌体着色,与背景形成鲜明的对比,以便在显微镜下进行观察。观察细菌个体形态一般应在其生长活跃期,这时菌体呈现出特定的形态,正常而整齐。根据实验目的的不同,可采用简单染色法、革兰氏染色法和特殊染色法等使菌体着色,本实验学习简单染色法、革兰氏染色法观察细菌的个体形态。

##### 1. 简单染色法原理

简单染色法是利用单一染料对细菌进行染色的一种方法,一般用于观察个体形态与排列方式。由于细菌在中性、弱碱性环境中带负电荷,所以通常采用一种碱性染料如美蓝、碱性复红、结晶紫对其进行染色。

##### 2. 革兰氏染色法原理

革兰氏染色法(Gran stain)是细菌学中广泛使用的一种重要鉴别染色法。通过该法把细菌鉴定为革兰氏阳性菌(Gran positive bacteria,  $G^+$ )和革兰氏阴性菌(Gran negative bacteria,  $G^-$ )两大类。革兰氏染色法所用4种溶液及作用如下:

(1) 碱性染料:草酸铵结晶紫液。

(2) 媒染剂:碘液,其作用是增强染料与细菌的亲合力,加强染料和细胞的结合。

(3) 脱色剂:乙醇,有助于染料从被染色的细胞中脱色,利用细菌对染料脱色的难易程度不同而加以区分。革兰氏阳性细菌不易被脱色剂脱色,而革兰氏阴性细菌则易被脱色剂脱色。常用脱色剂是丙酮或乙醇。

(4) 复染剂:蕃红溶液(也称沙黄溶液),目的是使经脱色的细菌重新染上另一种颜色,以便与未脱色细菌进行比较。

细菌细胞经结晶紫初染和碘液媒染后,在细胞膜或细胞质形成结晶紫-碘复合物,该物质能被脱色的细菌为革兰氏阴性菌( $G^-$ ),相反未脱色的为革兰氏阳性菌( $G^+$ )。这是因为革兰氏阴性菌与革兰氏阳性菌的细胞壁化学组成和结构的差异。 $G^+$ 细胞壁厚,肽聚糖含量高,交联度大,当乙醇脱色时,肽聚糖因脱水而孔径缩小,故结晶紫-碘复合物被阻留在细胞内,细胞不能被酒精脱色,仍呈紫色。 $G^-$ 细胞壁肽聚糖层薄,含量低,交联松散,并含有脂类物,乙醇脱色不仅未能使其结构收缩,反而因乙醇将脂质溶解,通透性增加,结晶紫-碘复合物被溶出细胞壁,使细胞脱色,番红(或沙黄)复染后呈红色。