 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
.....	错误!未定义书签。

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，旋动粗调节器，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×或4×)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 Leeuwenhock ,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、體液、酒、醋、牙垢等，他發現了微生物，當時他以為是微小的動物，稱為“微動體”。他描繪了的一些微生物的形態。

2) 微生物學的奠基

是不是列文·虎克 (Antony Van Leeuwenhock, 1632 - 1723) 看到了微生物就標誌着微生物學建立了呢？不是。是 200 年以後的法國的巴斯德 (Louis Pasteur, 1822 - 1895) 建立了微生物學。為什麼經歷了 200 年呢？也是顯微鏡，經過 200 年，顯微鏡得到了的進一步完善、放大倍數不斷提高。巴斯德被稱為是微生物學之父。巴斯德的一生給人類生活帶來了史無前例的影響。

(1) 否定了微生物自然發生學說。

(2) 創造了免疫學 - 預防接種。1877 年，巴斯德研究了雞霍亂，發現將病原菌減毒可誘發免疫性，就是經過培養選育不致病的菌株，可以使雞產生抗體，這樣就可以預防雞霍亂病。其後他又研究了當時流行的牛、羊炭疽病和狂犬病，並首次製成狂犬疫苗，為人類防病、治病作出了重大貢獻。

(3) 發酵的研究。巴斯德證實酒精發酵是由酵母菌引起的，巴斯德還發現乳酸發酵、醋酸發酵和丁酸發酵都是不同細菌所引起的。

(4) 創造了一些微生物學實驗方法。比如“巴氏滅菌法”，他發現啤酒里如果摻雜有其他細菌，就會使啤酒變壞，巴斯德嘗試使用不同的溫度來殺死這些細菌，而又不會破壞啤酒本身。最後，巴斯德的研究結果是以 50~60 °C 的溫度加熱啤酒半小時，就可以殺死啤酒里的細菌，而不必煮沸。這種滅菌法也就被稱為“巴氏滅菌法”。

科赫 (Robert Koch , 1843—1910) 和巴斯德 (Louis Pasteu , 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 Pasteu , 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，我们可以看一看细菌到底有多小。一个杆菌平均长度有 $2\ \mu\text{m}$ ；1500 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比较少，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异种后

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 °C 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 8 h 才被杀死；微生物的抗寒性也很强，有些微生物可以在 -12 ~ -30 °C 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

* 标准大气压：非法定计量单位，1 标准大气压 = 1.013×10^5 Pa。

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。

我国王大耜教授提出六界：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，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* *Kützing* 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？这就是反差，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 镜臂；③ 镜筒；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 \times 、10 \times) 和高倍物镜 (40 \times) 和油镜 (100 \times)。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 \times 、10 \times 、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。

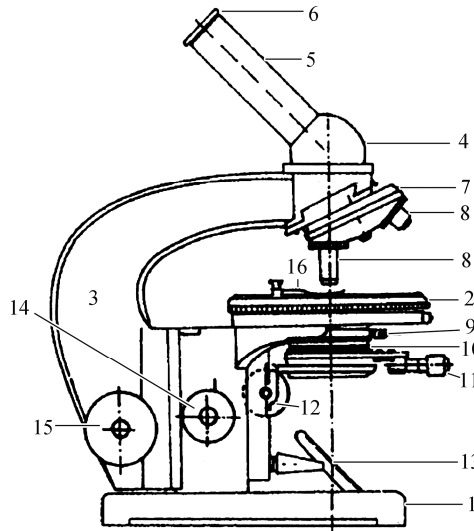


图 1-1 普通光学显微镜的构造

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。

(4) 染色：将涂片放在搁架上，滴加染色液一滴，铺满涂菌部分，染色 1~2 min。

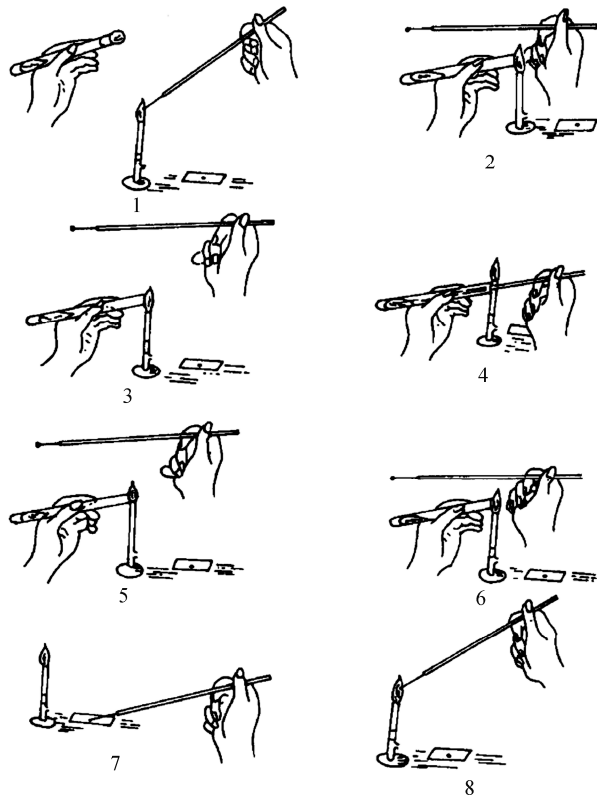


图 1-2 无菌操作过程

(5) 冲洗：倾去染液，斜置载片，用水轻轻冲去多余染液，直至流水变清为止。注意水流不得直接冲在涂菌处，以免将菌体冲掉。

(6) 吸干：将洗过的涂片放在空气中晾干或用吸水纸吸干。

(7) 镜检：先用低倍镜，把要观察的部位放在视野里，找到目的物后，在涂片上加香柏油一滴，换上油镜头，将油镜头浸入油滴中仔细调焦观察细菌的形状和排列方式。

▲获得本实验成功的关键

(1) 涂片时取菌时要适宜且要涂抹均匀，避免贪多而造成菌体堆积而难以看清菌体形态。同时也要避免取量太少难以在显微镜中找到细胞。

(2) 无菌操作时一定要等接种环冷却后再取菌，以免高温使菌体变形。

(3) 必须等涂片干燥后再加热固定，避免加热时间过长造成菌体破裂或变形。

二、细菌革兰氏染色及形态观察



< 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、大肠杆菌。

(2) 染色液和试剂：革兰氏染液、二甲苯、香柏油。

(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拷的时间过长，以免载玻片破裂。

(2) 使用染料时注意避免沾到衣物上。

(3) 使用乙醇脱色时勿靠近火焰。

(4) 实验后洗手、金黄色葡萄球菌为致病菌、二甲苯为有毒物质。

(1) 制片：取斜面培养物如前法涂片、干燥、固定。

(2) 初染：加适量结晶紫染色液（以刚好将菌膜覆盖为宜）染色 1 min，水洗。

(3) 媒染：用革兰氏碘液冲去残水，并用碘液覆盖 1 min，水洗。

(4) 脱色：将玻片倾斜在水池边，连续滴加 95% 乙醇脱色，直至流出的乙醇液无色（约 30 s），立即水洗。

(5) 复染：滴加沙黄或复红，染色 1~2 min，水洗。

(6) 吸干：将染好的涂片放空气中晾干或者用吸水纸吸干。

(7) 镜检：镜检时先用低倍镜，再用高倍镜，最后用油镜观察，菌体被染成蓝紫色的是革兰氏阳性细菌，被染成红色的是革兰氏阴性细菌。

▲获得本实验成功的关键

- (1) 涂片不要太厚，以免脱色不完全造成假阳性。
- (2) 选取活跃生长的细胞染色，老龄的革兰氏阳性菌会被染成红色造成假阴性。
- (3) 脱色是革兰氏染色的关键。脱色不够造成假阳性、脱色过度造成假阴性。



< 任务三 > 实验报告

(1) 显微拍照金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌并打印形态图，并注明它们的革兰氏染色的反应性。

(2) 描述各种细菌的菌落特征。



< 任务四 > 问题探讨

(1) 有一未知菌种进行革兰氏染色，你如何判断染色是正确的？

(2) 小明同学把金黄色葡萄球菌染成了红色（假阴性）？他重做的时候要注意什么？

【相关知识】

一、细菌的形态结构和功能

细菌是一类个体微小、结构简单、以二分裂繁殖的单细胞原核微生物。“小、简、原核”。

小的意思是肉眼看不到，要借助显微镜才看得到，简就是简单，单细胞，一个细胞一个生命；

什么是原核生物？真核生物是真核、原核生物是拟核，就是细胞核无核膜包裹，称作核区（或

拟核）。真核生物细胞器中最明显的什么细胞器是原核没有的？是线粒体和叶绿体。

在自然界中，细菌分布最广、数量最多。尽管不少细菌对人类有害，如使人畜致病、食品腐败变质等。然而更多的是对人类有益的细菌，可以利用它们生产出许多产品。

1. 细菌的形态

细菌的基本形态有 3 大类，分别被称为球菌、杆菌和螺旋菌（见图 1-3）。其中以杆菌最为常见，球菌次之，螺旋菌较少见。近年来还陆续发现少数其他形态如梨状、星形、三角形、方形和圆盘形等的细菌。

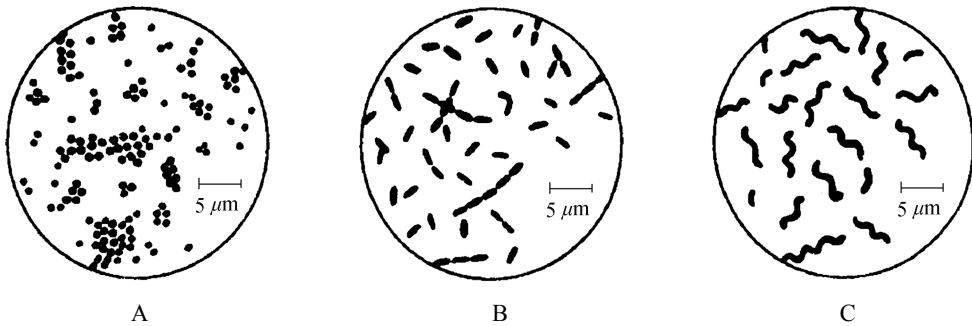


图 1-3 常见的典型细菌形态
A—球菌；B—杆菌 C—螺旋菌

(1) 球菌：由于是球形的。所以球菌分裂的方向会很多，分裂后各子细胞排列状态的不同，可以分为 6 种。

① 单球菌：分裂后的细胞分散而单独存在的球菌称为单球菌。如尿素小球菌。

② 双球菌：由一个平面分裂，分裂后两个菌体成对排列的称为双球菌，如肺炎双球菌。

③ 链球菌：由一个平面分裂，分裂后的菌体呈链状排列的称为链球菌，如乳链球菌。

④ 四联球菌：由两个互相垂直的平面分裂，分裂后每 4 个菌体呈田形的称为四联球菌，如四联小球菌。

⑤ 八叠球菌：由 3 个互相垂直的平面分裂，分裂后每 8 个菌体呈立方形排列的称为八叠

球菌，如乳酪八叠球菌。

⑥ 葡萄球菌：分裂方向不规则，分裂后许多菌体无规则地堆积在一起，呈葡萄串状的称为葡萄球菌，如金黄色葡萄球菌。

球菌的各种形态及排列方式如图 1-4 所示。

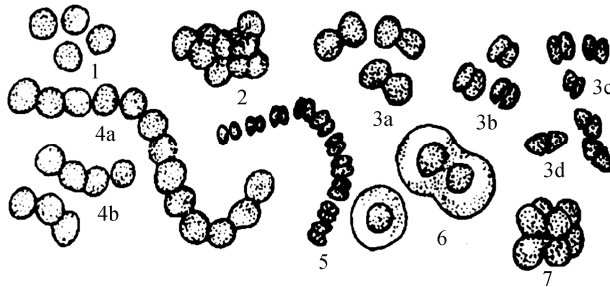


图 1-4 球菌的各种形态及排列方式

1—球菌；2—葡萄球菌；3—双球菌；4—链球菌；5—含有双球菌的链球菌；
6—具有荚膜的球菌；7—八叠球菌

(2) 杆菌：杆状的细菌称为杆菌。菌体细胞的直径变化不大，但长短有一定差异。杆菌的形态呈多样性如图 1-5 所示。



图 1-5 杆菌的形态

杆菌分裂方向没那么多，多数只有一个方向，根据杆菌的长短不同，可以分为长杆菌（长宽相差较大，如枯草芽孢杆菌）、短杆菌或球杆菌（长宽非常接近，如大肠杆菌）；根据菌体某个部位是否膨大，可以分为棒状杆菌（菌体一端膨大，如北京棒状杆菌）和梭状杆菌（菌体中间膨大，如丙酮丁醇梭菌）；根据芽孢的有无，可以分为无芽孢杆菌（如大肠杆菌）和芽

孢杆菌 (如枯草芽孢杆菌) ; 多数菌体两端钝圆 (如蜡状芽孢杆菌) , 只有少数是平截的 (如炭疽芽孢杆菌) ; 有的杆菌在一端分支, 故呈“Y”或叉状 (如双歧杆菌属) ; 有的杆菌稍弯曲而呈月亮状或弧状 (如脱硫弧菌属) ; 多数杆菌是单独存在的, 但也有分裂后呈链状 (如念珠状链杆菌) 或分枝状排列 (如结核分枝杆菌) 。

食品工业上用到的细菌大多是杆菌, 如用来生产淀粉酶和蛋白酶的枯草芽孢杆菌; 生产谷氨酸的北京棒状杆菌; 乳品工业中的保加利亚乳杆菌等。

(3) 螺旋菌: 菌体呈弯曲状的细菌称为螺旋菌。根据其弯曲情况可分为弧菌和螺菌。弧菌菌体的螺旋不到一周, 呈弧形或逗号形, 例如霍乱弧菌、逗号弧菌; 螺菌菌体的螺旋有一周或多周, 如干酪螺菌。螺旋菌的形态如图 1-6 所示。

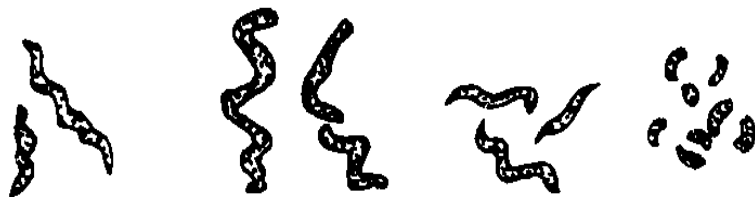


图 1-6 螺旋菌的形态

细菌的形态还与环境因素有关, 如培养温度、培养时间、培养基的成分和其组分浓度等发生改变均可引起细菌形态的改变。一般在幼龄及生产条件适宜时, 细菌形态正常; 而在较老的培养物中, 或在不正常的培养条件下, 如有药物、抗生素存在时, 细菌细胞常表现出不正常形态, 尤其是杆菌, 如有的细胞膨大或出现梨形、丝状等不规则形态。这些不正常形态的细菌, 如移植到新鲜的培养基内, 并在适宜条件下培养, 会重新出现原来的正常形态。因此, 在观察细菌的形态时, 必须注意因培养条件的变化而引起细胞形态的改变。

2. 细菌的大小

我们知道动物和植物个体形态大小悬殊很大的，微生物那么小，个体差异是不是也很大呢？大小差异也是很大的，比如最小的细菌与无细胞结构的病毒相仿（50 nm）；最大的细菌（0.75 mm）我们肉眼看得见，因为我们肉眼的分辨力是 0.2 mm。

芬兰科学家 EO Kajander 1999 年发现了一种能引起尿结石的纳米细菌其细胞直径最小仅为 50 nm，甚至比最大的病毒更小一些。这种细菌分裂缓慢，三天才分裂一次，是目前所知最小的具有细胞壁的细菌。纳米细菌的发现引起科学界就独立生命个体到底有多小的讨论，因为人们一般认为维持一个独立细胞生活的生物大分子所需的基本空间是 140 nm，低于 250 nm，就没有足够的空间装入生命的元件进行生命复制。所以纳米细菌也许不是细菌。迄今为止所知的个体最大的细菌，则是德国科学家 H. N. Schulz 等 1999 年在纳米比亚海岸的海底沉积物中发现的一种硫黄细菌，其大小一般在 0.1 ~ 0.3 mm，有些甚至可达到 0.75 mm，能够清楚地用肉眼看到。

怎么表示细菌的大小呢？度量单位是微米。因此其大小通常是使用显微测微尺在显微镜下进行测量（见图 1-7）。

球菌的大小用其直径来表示。一般球菌直径在 0.5 ~ 2.0 μm 之间。

杆菌的大小用宽度×长度表示。典型细菌的大小可用大肠杆菌来表示，其平均长度约 2.0 μm ，宽约 0.5 μm 。大小一般为 (0.5 ~ 1.0) μm × (1.0 ~ 5.0) μm 。

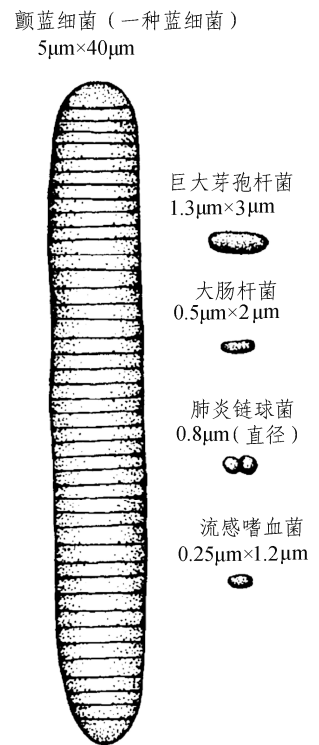


图 1-7 几种细菌大小的比较

螺旋菌的大小与杆菌一样，螺旋菌的大小也以其宽度×长度表示。但测量螺旋菌长度时，一般只测量其弯曲形长度，而不是测量其真正的总长度。螺旋菌为 $(0.3 \sim 1.0) \mu\text{m} \times (1.0 \sim 5.0) \mu\text{m}$ 。

由于菌种不同，细菌的大小存在着较大的差异。染色方法的不同，即使同一种菌测得的结果也会不一样。

3. 细菌的细胞结构

细菌的细胞结构，分为一般结构和特殊结构。细菌的一般结构包括细胞壁、细胞膜、细胞质、核质体，是所有细菌所共有的结构，也称为基本结构，其中核质体和细胞质合称为原生质体。有些细菌还具有鞭毛、菌毛、荚膜、芽孢等特殊结构（见图 1-8）。

1) 一般结构

(1) 细胞壁：细胞壁位于细胞菌体的最外层，为坚韧而略具弹性的结构。约占细胞干重的 10%~25%。通过染色、质壁分离或制成原生质体后再在光学显微镜下观察，即可以看到细胞壁的存在。

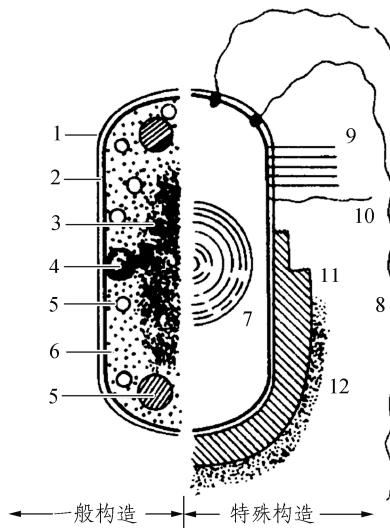


图 1-8 细菌细胞结构的模式图

1—细胞壁；2—细胞膜；3—核质体；4—间体；5—储藏物；6—细胞质；7—芽孢；
8—鞭毛；9—菌毛；10—性菌毛；11—荚膜；12—黏液层

要了解细胞壁就要了解细菌革兰氏染色，革兰氏染色法是丹麦医生革兰(Christian gram) 于 1884 年首创，是微生物学中一种重要的常用的染色方法。几乎可以将所有细菌分成两大类：革兰氏阳性细菌(G^+) 和革兰氏阴性细菌(G^-)。它的主要过程为：先用草酸铵结晶紫液初染，再加碘液媒染，使细菌着色，然后用 95% 乙醇脱色，最后用蕃红(沙黄) 等红色染料复染。如果用乙醇脱色后，仍保持其初染的紫色，称为革兰氏阳性细菌；如果用乙醇处理后脱去原来的颜色，而染上番红的红色，则为革兰氏阴性细菌。一般认为细菌的革兰氏反应与细菌细胞壁的化学组成和结构、细胞壁的通透性等有关。当用 95% 乙醇作脱色处理时，既溶解了细胞壁中的脂类，又使细胞壁引起脱水作用，使细胞壁肽聚糖的孔径变小。由于革兰氏阳性细菌细胞壁肽聚糖的含量较高，细胞壁厚且结构紧密，壁上的间隙也较小，媒染后形成的结晶紫-碘复合物不易脱出细胞壁，结果结晶紫-碘复合物就留在细胞内而呈紫色。而革兰氏阴性细菌细胞壁肽聚糖的含量较低，层次也少(大多仅一层，至多也是两层)，故其壁薄，壁上的孔隙较大，被乙醇作用后，细胞壁因脂类被溶解而孔隙更大，使结晶紫-碘复合物极易脱出细胞壁，变成无色，经过番红复染，结果呈现红色。

细胞壁的功能：① 固定细胞外形。不论细胞原来是什么形状，一旦除掉细胞壁后的原生质体将呈球形；② 协助鞭毛运动；③ 保护细胞免受外力的损伤；④ 正常细胞分裂所需要；⑤ 阻止有害物质进入细胞；⑥ 与细菌的抗原性、致病性和对噬菌体的敏感性密切相关。

(2) 细胞膜：是紧贴在细胞壁内侧的一层柔软、富有弹性的半透性薄膜。细胞膜约占细

胞干重的 10%。厚约 75 nm。其主要成分为双层磷脂和蛋白质，还有少量糖类。多糖仅 2% 左右。蛋白质含量高，占 60%~70%，种类多。紧密结合于膜的蛋白质称为整合蛋白，它们插入或贯穿磷脂双分子层，后一种称跨膜蛋白；疏松地附着于膜的称为周边蛋白，主要分布于双分子层的内外表面（见图 1-9），周边蛋白脂类占 20%~30%，细胞膜所含的脂类均为磷脂。磷脂种类因菌种和培养条件而异。

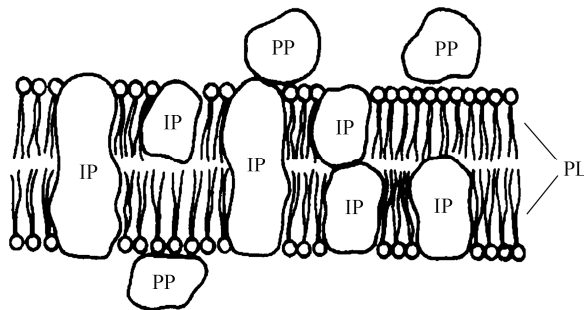


图 1-9 膜蛋白的类型和分布

磷脂双分子层 (PL) 中的小圆圈 (o) 表示亲水部分；双线表示疏水部分；
IP 表示整合蛋白；PP 表示边缘蛋白

细胞膜的生理功能：① 控制细胞内、外的物质（营养物质及代谢废物）的运送、交换；② 维持细胞内正常的渗透压；③ 参与合成膜脂、细胞壁各种组分和荚膜等大分子；④ 参与产能代谢，在细菌中，电子传递和 ATP 合成酶均位于细胞膜；⑤ 分泌细胞壁和荚膜的成分、胞外蛋白（各种毒素、细菌溶菌素）以及胞外酶；⑥ 鞭毛的着生点和提供其运动所需的能量等。

(3) 间体：细胞膜内陷而成的一个或几个片层状、管状或囊状结构，称为间体，又称中体。间体的化学组成与结构和细胞膜相同。它的功能目前还不完全了解。位于细胞中央的间体可能与 DNA 复制与横隔壁的形成有关，位于细胞周围的间体可能是分泌胞外酶（如青霉素酶）的地点。可能还与细菌的呼吸和芽孢的形成有关。有人认为，它在细菌中相当于高等

生物中线粒体的作用。

(4) 细胞质：细胞膜包裹着的一团胶体中，除核质体以外的一切无色、透明、黏稠的胶状物质统称为细胞质。其主要成分是蛋白质、核酸、脂类、多糖类、水分及少量无机盐类。由于细胞质内存在着较多的核酸，所以呈现较强的嗜碱性，易被碱性和中性染料着色，幼龄细胞尤为明显。细胞质中含有很多酶系，是新陈代谢的主要场所，各种复杂的生命活动不断更新细胞内部的结构和成分，使生命活动正常进行。细胞质中无真核细胞所具有的细胞器，但存在着各种内含物。根据化学性质和功能可分为以下几类

① 核糖体：核糖体分散存在于细菌细胞质中，沉降常数为 70S，由 30S 和 50S 两个亚基组成，是细胞合成蛋白质的场所。它由 RNA 与蛋白质组成，其中 RNA 占 60%，蛋白质占 40%。链霉素等抗生素通过作用于细菌核糖体的 30S 亚基而抑制细菌蛋白质的合成，而对人的 80S 核糖体不起作用，故可用链霉素治疗某些细菌引起的疾病，而对人体无害。

② 贮藏颗粒：这些颗粒通常较大，被单层膜所包围，经适当染色可在光学显微镜下观察到。它们在营养物质过剩时积累，在营养物质贫乏时利用，所以称为贮藏颗粒。其种类和数量常随菌种和培养条件而异，一般一种细菌只储存一种贮藏颗粒，但也有贮藏两种或多种的。根据化学性质和功能可分为：异染颗粒、多糖颗粒、聚 β -羟丁酸颗粒、硫粒、液泡和气泡等。

(5) 核质体与质粒：细菌是原核生物，无真正的细胞核，只是在菌体中央有一个大量遗传物质 (DNA) 所在的核区。其功能相当于细胞核，故有“类核”、核区、核质体等之称。核质体很原始，不具核膜和核仁，由一个环状双链 DNA 分子高度缠绕而成，其长度约 0.25 ~

3.00 mm。核质体一般位于细胞的中央部分，呈球状、卵圆状、哑铃状或带状。在快速分裂的细胞中，核质体常呈条状、H 状、V 状或哑铃状。核质体是细菌遗传的物质基础，与细菌的遗传变异有着密切的关系。

质粒是染色体外能够进行自主复制的遗传单位，目前，已发现有质粒的细菌有几百种，质粒的相对分子质量一般较小，约为细菌染色体的 0.5%~3%。天然质粒的 DNA 长度从数千碱基对至数十万碱基对都有。有时候一个细胞里面可以同时有一种乃至数种的质粒同时存在。

有时有些质粒含有某种抗药基因（如大肠杆菌中就有含有抗四环素基因的质粒）。有一些质粒携带的基因则可以赋予细胞额外的生理代谢能力，乃至于在一些细菌中提高它的致病力。一般来说，质粒的存在与否对宿主细胞生存没有决定性的作用。它是基因工程最常见的运载体。

2) 特殊结构

细菌的特殊结构在分类鉴定上具有重要的意义。

(1) 鞭毛。

① 概念：鞭毛是某些细菌表面生长的一种纤长而呈波浪形弯曲的丝状物。起源于细胞膜内侧的基粒上，穿过细胞膜和壁而伸到外部。数目不一，从 1~2 根到数百根。鞭毛的直径很细，只有 10~20 nm，而其长度为 3~20 μm，可超过菌体长度数倍到数十倍。

② 观察和判断鞭毛的方法：一是用电子显微镜直接观察。但是电子显微镜不普遍。二是用特殊的鞭毛染色法，鞭毛太细，鞭毛染色法使染料沉积在鞭毛上增加鞭毛的直径。在光学显微镜下观察。三是通过半固体琼脂穿刺培养也可以判断鞭毛的存在，有鞭毛的细菌是要运

动的，细菌呈毛刷状生长。四是在平板上菌落边缘相对不整齐、呈扩散生长。

③ 鞭毛着生的位置、数目和排列方式：是细菌种的特征，在分类鉴定上具有意义。

根据鞭毛的数目和着生方式，可将其分为如下几种类型，如图 1-10 所示。

i. 单毛菌：一端单毛菌(如霍乱弧菌和铜绿假单胞菌)和两端单毛菌(如鼠咬热螺旋体)。



图 1-10 鞭毛菌的几种主要类型

ii. 丛毛菌：一端丛毛菌(如荧光假单胞菌)和两端丛毛菌(如红色螺菌)；

iii. 周毛菌：如伤寒沙门氏菌、大肠杆菌、枯草杆菌等。

鞭毛是细菌的运动器官，具有很高的运动速度，一般每秒可移动 $20 \sim 80 \mu\text{m}$ 。单毛菌和丛毛菌多作直线运动，运动速度快；周毛菌的运动速度缓慢，多作翻转运动。依赖鞭毛的运动称为真性运动；不具鞭毛的无规则的翻动称为布朗运动。衰老的细胞或在不良条件下，菌体常会失去鞭毛。所有弧菌、螺菌和假单胞菌，约半数杆菌和少数球菌具有鞭毛。

(2) 荚膜。

① 概念：覆盖在某些细菌细胞壁外的一层疏松、黏胶状物质，称为荚膜。菌种不同，荚膜的厚度不定。较厚(约 200 nm)、有明显的外缘和一定的形状，较紧密结合于细胞壁外的称为大荚膜；很薄、且与细胞壁结合也较紧密的称为微荚膜；如果厚而没有明显的边缘、结合比较松散的称黏液层。荚膜一般围绕在一个细菌细胞的外面，但也有一个荚膜内含有多个

细菌，这种荚膜称为菌胶团（见图 1-11）。

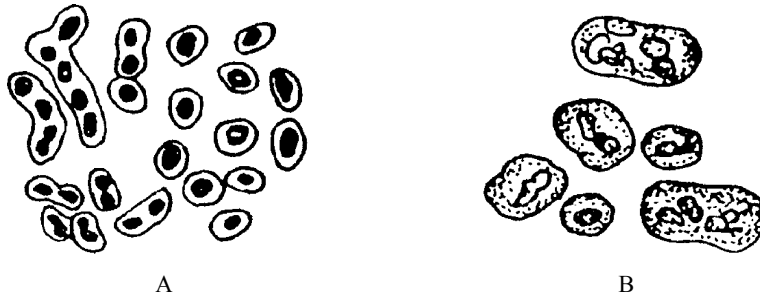


图 1-11 细菌荚膜的形态

A—细菌的荚膜；B—细菌的菌胶团

② 荚膜的特点：i. 主要成分是多糖或多肽和蛋白质，尤其以多糖居多。荚膜不易着色，可以通过碳素墨水进行负染色或用荚膜染色法染色，在光学显微镜下观察。ii. 是否产荚膜是细菌的一种遗传特性。产荚膜的细菌，在固体培养基上形成的菌落表面湿润、黏稠、有光泽、边缘光滑，故称为光滑型（smooth，简称 S-型）菌落。不产荚膜的细菌，所形成的菌落表面较干燥、粗糙，称为粗糙型（rough，简称 R-型）菌落。iii. 荚膜并非细菌生活的必要结构，但它的存在对细菌在环境中的生存是有利的。失去荚膜后仍能正常生活。但有荚膜对细菌生存是有好处的。比如葡萄球菌产生荚膜黏糊在尿道口，不被尿液冲掉。引起尿道感染；肺炎链球菌由于有荚膜，进入到人和动物体内保护自己免受宿主吞噬细胞的吞噬，这样加强了病原菌的致病力。但荚膜一旦失去，则致病力降低。iv. 荚膜和生产实践有密切的关系。如在用微生物对废水进行处理，这些产荚膜的细菌可形成菌胶团，菌胶团可以对很多有害物质进行吸附，并参与活性污泥的形成并促进污泥下沉；工业发酵中的一些管道，尤其是弯道的地方，容易被堵塞，就是由于产生荚膜的微生物而引起的；肠膜明串珠菌的葡聚糖荚膜已用于生产代血浆的主要成分——右旋糖酐和葡聚糖凝胶制剂；从野菜黄单胞菌荚膜提取食品添加剂黄

原胶；产荚膜菌使糖厂的糖液以及酒类、牛乳和面包等饮料和食品发黏变质；可使细菌黏附于牙齿表面，由细菌发酵糖类产生的乳酸累积后，腐蚀牙齿，引起龋齿。

(2) 芽孢。

① 概念：某些细菌生长到后期，在细胞内形成一个壁厚、折光性强、对不良环境条件具有较强抵抗能力的、圆形或椭圆形的休眠体，称为芽孢。

② 芽孢的特点：用特殊的芽孢染色法可在显微镜下看到芽孢的存在。

目前认为芽孢是自然界抗逆性最强的生命体，对干燥、热、化学药物（酸类和染料）和辐射等具有高度抗性。例如，很难有生物生存的沙漠中有大量枯草杆菌和巨大芽孢杆菌的芽孢。肉毒梭菌在 100 °C 沸水中要 5.0~9.5 h 才被杀死，121 °C 下也要 10 min 才能杀死。

芽孢的形状、大小和位置因菌种而异（见图 1-12），也是细菌分类鉴定的依据之一。大多数厌气性芽孢杆菌的芽孢直径大于菌体的宽度且位于细胞中央，故整个菌体呈梭形，如丙酮丁醇梭菌；有些细菌的芽孢位于菌体的一端，且直径大于细菌的宽度，使芽孢囊呈鼓槌状，如破伤风梭菌；有些芽孢位于细胞中央，直径小于菌体的宽度，如枯草杆菌。

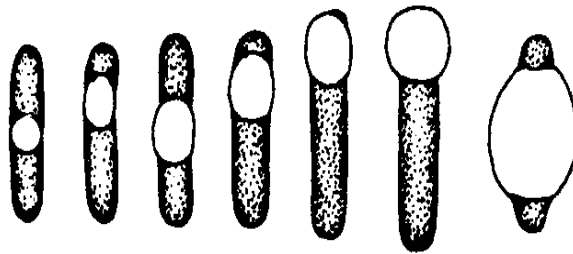


图 1-12 细菌芽孢的几种类型

成熟的芽孢具有多层结构（图 1-13）。芽孢外壁位于最外层，它是一个保护层，主要由蛋白质、脂质和糖类组成；其次还有一层或几层芽孢衣，其主要成分为蛋白质，非常致密，

通透性差，能抗酶和化学物质的透入；从芽孢衣向内是很厚的皮层，约占芽孢总体积的一半。

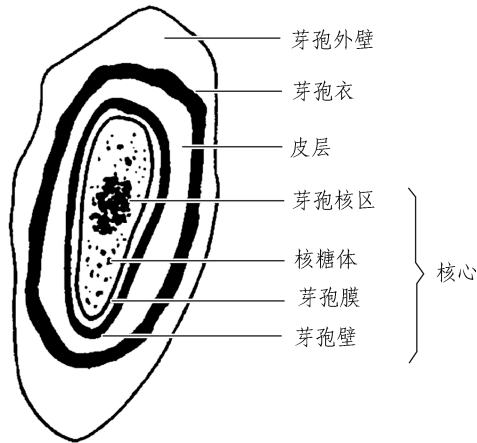


图 1-13 巨大芽孢杆菌成熟芽孢

对细菌芽孢的深入研究，具有很重要的理论和实践意义：i. 芽孢是细菌分类鉴定的重要形态特征之一。ii. 芽孢是灭菌标准的主要依据。主要是以杀灭肉毒梭菌、破伤风梭菌、产气荚膜梭菌和嗜热脂肪芽孢杆菌等强致病性或高耐热性细菌的芽孢为标准的。肉毒梭菌的芽孢在 pH 7.0 时，121 °C 需要 10 min 才能杀死，所以一般非酸性罐头食品，工厂需 121 °C 灭菌 20 ~ 70 min。嗜热脂肪芽孢杆菌的芽孢，121 °C 下经过 12 min 才能杀死，因此规定湿热灭菌在 121 °C 下至少 15 min 才能算是达到无菌要求。iii. 有些产芽孢细菌可伴随产生有用的产物，例如抗生素短杆菌肽、杆菌肽等。iv. 伴孢晶体：少数芽孢杆菌，例如苏云金芽孢杆菌在其形成芽孢的同时，会在芽孢旁形成一颗菱形或双锥形的碱溶性蛋白晶体（即 δ 内毒素），称为伴孢晶体。它的干重可达芽孢囊重量的 30% 左右，由 18 种氨基酸组成，大小约 $0.6 \mu\text{m} \times 2.0 \mu\text{m}$ 。由于伴孢晶体对 200 多种昆虫尤其是鳞翅目的幼虫有毒杀作用，因而可将苏云金芽孢杆菌制成细菌杀虫剂。

4. 细菌的繁殖

细菌最普遍和最主要的繁殖方式是无性繁殖的二分裂法。分子生物学研究表明，细菌二分裂时，细菌 DNA 先复制，形成两个原核，随着细菌的生长，原核彼此分开，同时，细胞膜向细胞质延伸，然后闭合，形成细胞质隔膜，使细胞质和原核分开；接着形成横隔壁，随着细胞膜向内延伸，细胞壁也向内延伸，最终形成了横隔壁，至此，两个子细胞具备了完整的细胞壁；最后子细胞分裂，形成完全独立的新细胞。

5. 细菌菌落的特征

单个细菌用肉眼是看不到的，但如将单个微生物细胞或少数同种细胞接种在固体培养基的表面（有时为内部），当给予适宜的培养条件时，该细胞就迅速进行生长繁殖。结果会形成以母细胞为中心的一个肉眼可见的、有一定形态构造的子细胞群，这就是菌落（见图 1-14）。大量的菌落相互联结成一片，这就是菌苔。

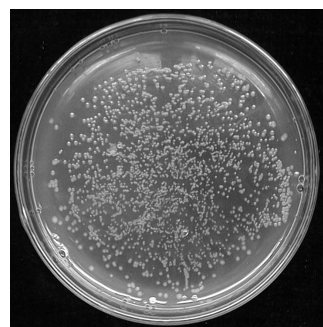


图 1-14 细菌菌落

细菌太小，在显微镜下不好区分，但是他们在培养基上长出来的菌落各具特色，可以作为菌种鉴定的依据之一。菌落形态包括菌落大小、形状、边缘、隆起、光泽、质地、颜色、扩展性、透明度等（见图 1-15）。

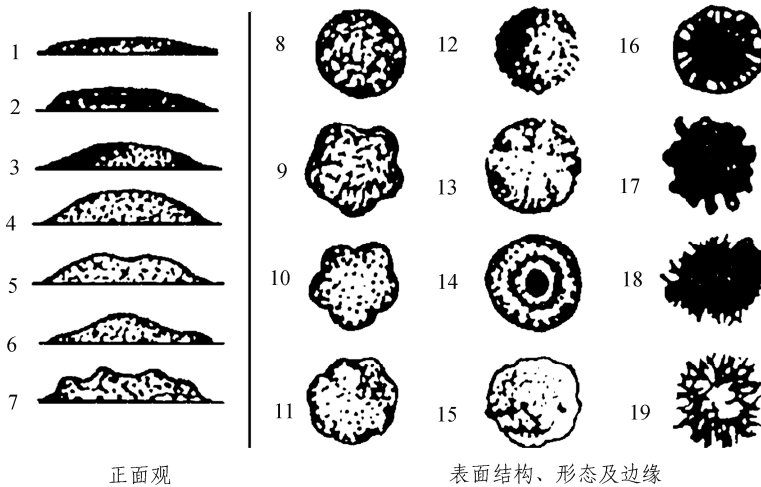


图 1-15 细菌菌落特征

1—扁平；2—隆起；3—低凸起；4—高凸起；5—脐状；6—乳头状；7—草帽状表面结构、形状及边缘；8—圆形，边缘完整；9—不规则，边缘波浪；10—不规则颗粒状，边缘叶状；11—规则，放射状，边缘叶状；12—规则，边缘呈扇边状；13—规则，边缘齿状；14—规则，有同心环、边缘完整；15—不规则，似毛毯状；16—规则，似菌丝状；17—规则，卷发状，边缘波状；18—不规则，呈丝状；19—不规则，根状

细菌菌落具有共同特征，如湿润、较光滑、较透明、较黏稠、易挑取（菌体和培养基结合不紧密）、质地均匀以及菌落正反面或边缘与中央部位的颜色一致等。气味为臭味。

但是不同细菌的菌落也有自己的独有特征，如对无鞭毛、不能运动的细菌来说，它们就形成了较小、较厚、边缘极其圆整的菌落。有鞭毛的细菌，其菌落具有大而扁平、形状不规则和边缘呈锯齿状、波浪状的特征。有荚膜的细菌，其菌落较大、光滑、并呈透明的蛋清状，无荚膜的则表面较粗糙。具有芽孢的细菌，因其芽孢引起的折光率变化而使菌落的外形变得很不透明或有“干燥”之感，并因其细胞分裂后常连成长链状而引起菌落表面粗糙、有褶皱感，再加上它们一般都有周生鞭毛，因此形成粗糙、多褶、不透明、外形及边缘不规则的独特菌落，如蕈状芽孢杆菌。运动能力强的细菌还会出现树根状甚至能移动的菌落，如普通变形杆菌。

6. 食品中常见的细菌

在日常生活中食品经常受到细菌的污染，从而使食品变质；此外尚有些对人有益的细菌，人们常常利用它们制造一些食品或药品。现将常见的、主要的几个细菌属分述如下。

(1) 假单胞杆菌属 (*Pseudomonas*): 直或杆状 ($0.5 \sim 1 \mu\text{m} \times 1.5 \sim 4 \mu\text{m}$)，革兰氏阴性菌，端生鞭毛、不生芽孢。化能有机营养型，需氧，在自然分布很广。某些菌株具有很强的分解脂肪和蛋白质的能力。它们污染食品后如环境条件适宜，可在食品表面迅速生长，一般产生水溶性色素、氧化产物和黏液，引起食品产生异味及变质，很多菌在低温下能很好地生长，所以在冷藏食品的腐败变质中起主要作用。例如荧光假单胞菌 (*Ps. fluorescens*) 在低温下可使肉、牛乳及乳制品腐败。腐败假单胞菌 (*Ps. putrefacicus*)，可使鱼、牛奶及乳制品腐败变质。可使奶油的表面出现污点。菠萝假单胞菌 (*Ps. ananas*) 可使菠萝果实腐烂，被侵害的组织变黑并枯萎。

(2) 醋酸杆菌属 (*Acetobacter*): 醋酸杆菌分布也很普遍，一般从腐败的水果、蔬菜及变酸的酒类、果汁等食品中都能分离出醋酸杆菌。细菌细胞呈椭圆形杆状、单生或成链状，不生芽孢，需氧，运动或不运动。本属菌有很强的氧化能力，可将乙醇氧化成醋酸。醋酸菌有两种类型的鞭毛，一群为周生鞭毛，它们可以把生成的醋酸进一步氧化成 CO_2 和水；另一群为端生鞭毛，它们不能进一步氧化醋酸。醋酸杆菌是制醋的生产菌株，在日常生活中常常危害水果与蔬菜，使酒、果汁变酸。

(3) 无色杆菌属 (*Achromobacter*): 为革兰氏阴性杆菌，分布在水和土壤中，有鞭毛，能运动。多数能分解葡萄糖和其他糖类产酸而不产氧，能使禽、肉和海产品变质发黏。

(4) 产碱杆菌属 (*Alicaligenes*): 为革兰氏阴性菌，这个属细菌不能分解糖类而产酸，

能产生灰黄色、棕黄色、或黄色色素。分布极广，存在于水、土壤、饲料和人畜的肠道内。

能使乳制品及其他动物性食品产生黏性而变质，能在培养基上产碱。

(5) 黄色杆菌属 (Flavobacterium): 细胞直杆或弯曲状 ($0.2 \sim 2.0 \mu\text{m} \times 0.5 \sim 6.0 \mu\text{m}$)，通常端生鞭毛，革兰氏染色阴性。好氧或兼性厌氧，有机营养型。中温或嗜冷，大多来源于水和土壤。菌落可产生黄色、橘红色、红色或褐色非水溶性色素，有强分解蛋白质的能力，可产生热稳定的胞外酶，故可在低温下使牛乳及乳制品酸败。有的黄色杆菌在 4°C 引起牛乳变黏等。对其他食品如禽、鱼、蛋等食品同样引起腐败变质。

(6) 埃希氏杆菌属 (Escherichia) 和肠细菌属 (Enterobacter): 这两个属均归于大肠菌群，细胞杆状 ($0.4 \sim 0.7 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 4.0 \mu\text{m}$) 通常单个出现，周生鞭毛，可运动或不运动，革兰氏阴性菌，好氧或兼性厌氧，化能有机型。是食品中重要的腐生菌。存在于人类及牲畜的肠道中，在水、土壤中也极为常见。大肠杆菌 (*E. coli*) 在合适条件下使牛乳及乳制品腐败产生一种不洁净或粪便气味。

(7) 沙门氏菌 (Salmonella): 沙门氏菌为无芽孢杆菌，不产荚膜，通常可运动，具有周生鞭毛，也有无动力的变种，革兰氏阴性。该属菌常常污染鱼、肉、禽、蛋、乳等食品，特别是肉类。是人类重要的肠道致病菌。误食由此菌污染的食品，可引起肠道传染病或食物中毒。

(8) 变形杆菌 (Proteus): 无芽孢的革兰氏阴性菌 ($0.4 \sim 0.6 \mu\text{m} \times 1 \sim 3 \mu\text{m}$)，卵圆形。幼龄时常常变成缕状或弯曲状，周生鞭毛，运动性强。广泛分布于土壤、水及粪便之中。有较强分解蛋白质的能力，是食品的腐败菌，可引起食物中毒。

(9) 乳杆菌属 (*Lactobacillus*): 菌体单个或呈链状。不运动或极少能运动, 厌氧或兼性厌氧, 革兰氏染色阳性, 分解糖的能力很强。从牛乳、乳制品和植物产品中能分离出来。常被用作生产乳酸、干酪、酸乳等乳制品的发酵菌剂。

(10) 明串珠菌属 (*Leuconostoc*): 菌体呈圆形或卵圆形, 呈链状排列, 革兰氏阳性, 分布较广, 常常在牛乳、蔬菜、水果上发现。

肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroide*) 能利用蔗糖合成大量荚膜物质——葡萄糖。已被用来生产右旋糖酐, 作为代血浆的主要成分。右旋糖酐具有维持血液渗透压的增加血容量的作用, 在临床上可以用于抗休克、消肿和解毒。但是, 明串珠菌常给食品的污染带来麻烦, 如牛乳的变黏以及制糖工业中增加了糖液黏度, 影响过滤而延长了时间, 降低了产量。

(11) 双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*): 双歧杆菌最初于 1899 年由法国巴斯德研究院的蒂赛尔首先从健康母乳喂养婴儿的粪便中分离出来。为革兰氏染色阳性多形态杆菌, 呈 Y 字形、V 字形、弯曲状、棒状、勺状等。菌种不同其形态不同。专性厌氧, 目前市场上保健饮品风行, 其中发酵乳制品及一些保健饮料常常加入双歧杆菌, 以提高产品保健效果。

(12) 芽孢杆菌属 (*Bacillus*): 细胞杆状, 有些很大 ($0.3 \sim 2.2 \mu\text{m} \times 1.2 \sim 7.0 \mu\text{m}$)。能出现单个、成对或短链状。端生或周生鞭毛, 运动或不运动, 革兰氏阳性, 好氧或兼性厌氧, 可产生芽孢, 在自然界中广泛分布, 在土壤、水中尤为常见。此菌产生芽孢具有一定对热的抗性。因此, 在食品工业中是经常遇到的污染菌。蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 污染食品引起食物变质, 尚可引起食物中毒。枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 常常引起面包腐败, 但它们产生蛋白酶的能力强, 常用作蛋白酶产生菌。这属中尚有炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus*

anthracis) 能引起人、畜共患的烈性传染病——炭疽病。

(13) 梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*): 为厌氧性革兰氏阳性杆菌，罐装食品中引起腐败的主要菌种，解糖嗜热梭状芽孢杆菌 (*Cl. thermosaccharolyticum*) 可分解糖类引起罐装水果、蔬菜等食品的产气性变质。腐败梭状芽孢杆菌 (*Cl. putrefaciens*) 可以引起蛋白质食物的变质。肉类罐装食品中最重要的是肉毒梭状芽孢杆菌 (*Cl. botulinum*)，其芽孢产生在菌体的中央或极端，芽孢耐热性极大，能产生很强的毒素。

(14) 微球菌属 (*Micrococcus*): 小球状的革兰氏阳性菌，需氧或兼性厌氧。在自然界分布很广，如土壤、水及人、动物体表面都可以分离出来。非致病性，菌落呈黄色、淡黄色、绿色或橘红色。污染食品可使食品变色。微球菌有耐热性和有较高的耐盐性，有些菌并且可在低温下生长，故可引起冷藏食品的腐败变质。

(15) 链球菌 (*Streptococcus*): 细胞为球形、卵形。呈短链或长链排列。革兰氏阳性，很少运动，化能异养型，好氧或兼性厌氧。其中有些是人类或牲畜的病原菌。例如：酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 可以从人类的口腔、喉、呼吸道、血液等有炎症的地方或渗出物中分离出来。是肌体发红发烧的原因，是溶血性的链球菌。乳房链球菌 (*Sc. uberis*)、无乳链球菌 (*Sc. agalactiae*) 常常是引起牛乳房炎的病原菌，有些也是引起食品变质的细菌。

(16) 葡萄球菌 (*Staphylococcus*): 呈葡萄串状，革兰氏阳性。如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 主要在鼻黏膜、人及动物的体表上发现，可引起感染。污染食品产生肠毒素，使人食物中毒。

二、细菌染色方法与原理

细菌的菌体很小，活细胞含水量在 80%~90%，因此对光的吸收和反射与水溶液相差不多，所以观察其细胞结构必须染色。根据实验目的不同，可分为简单染色法、鉴别染色法和特殊染色法等。

简单染色法是利用单一染料对细菌进行染色的一种方法；鉴别染色法是用化学试剂将细胞内某一细胞器或成分染成一种特殊的颜色而使之得以区分的方法；特殊染色法是为了显示与确定组织或细胞中的正常结构或病理过程中出现的异常物质、病变及病原体等，需要分别选用相应的显示这些成分的染色方法进行染色。包括：胶原纤维染色（Masson 等）、网状纤维染色、弹力纤维染色、肌肉组织染色（磷钨酸苏木素）、脂肪染色（苏丹 III）、糖原染色（PAS）、黏液染色（PAS）等。

微生物染色的染料主要有碱性染料、酸性染料和中性染料 3 大类。碱性染料的离子带正电荷，能和带负电荷的物质结合。细菌蛋白质等电点较低，大约在 pI2~5 之间，通常情况下带负电荷，常采用碱性染料使其着色，如美蓝、结晶紫、碱性复红或孔雀绿等。而酸性染料的离子带负电荷，能与带正电荷的物质结合。当细菌生长繁殖时使培养基的 pH 降低，所带的正电荷增加，易被酸性染料着色，如伊红、酸性复红、刚果红等。中性染料是酸性染料和碱性染料的结合物，亦称复合染料，如伊红美兰、伊红天青等。

影响染色的其他因素，除了菌体细胞的构造和膜的通透性外，还与培养基的组成、菌龄、染色液中的电解质含量、pH、温度和药物的作用有关。

项目三 放线菌制片、简单染色及形态观察

目 标

(1) 学习并掌握观察放线菌形态的基本方法。

(2) 了解放线菌菌落特征和个体形态特征。

【项目实施】



< 任务一 > 准备材料与仪器

(1) 菌种：培养 5~7 d 的细黄链霉菌（即“5406”抗生素 *Streptomyces microflavus*）或青色链霉菌（*S. glaucus*）或弗氏链霉菌（*S. fradiae*）的斜面菌种。

(2) 培养基：灭菌的高氏 1 号琼脂培养基。

(3) 仪器或其他用具：无菌平皿、玻璃纸、9 mL 无菌水若干支、酒精灯、火柴、接种环、接种铲、镊子、玻璃涂布棒、1 mL 无菌吸管、剪刀、载玻片、石炭酸复红染色液、显微镜。



< 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拷的时间过长，以免载玻片破裂。

(2) 使用染料时注意避免沾到衣物上。

(3) 对放线菌进行制片时减少空气流动，避免吸入孢子。

1. 玻璃纸法

玻璃纸是一种透明的半透膜，将灭菌的玻璃纸覆盖在琼脂平板表面，然后将放线菌接种于玻璃纸上，经培养，放线菌在玻璃纸上生长形成菌苔。观察时，揭下玻璃纸，固定在载玻片上直接镜检。这种方法既能保持放线菌的自然生长状态，也便于观察不同生长期的形态特征。

(1) 玻璃纸的选择与灭菌：选择能够允许营养物质透过的玻璃纸。也可收集商品包装用的玻璃纸，加水煮沸，然后用冷水冲洗。经此处理后的玻璃纸若变硬，则不可用。将玻璃纸剪成培养皿大小，经水浸湿后，放入培养皿中，121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。

(2) 孢子悬液的制备：将放线菌斜面菌种制成 10^{-3} 的孢子悬液。

(3) 倒平板：将高氏 1 号琼脂培养基熔化后倒入无菌培养皿内，每皿约 15 mL。

(4) 铺玻璃纸：待培养基凝固后，在无菌操作下用镊子将无菌玻璃纸紧贴在琼脂平板上，玻璃纸和琼脂平板之间不能留气泡，即制成玻璃纸琼脂平板培养基。

(5) 接种：分别用 1 mL 无菌吸管取 0.2 mL 链霉菌孢子悬液滴加在玻璃纸琼脂平板培养基上，并用无菌玻璃涂布棒涂匀。

(6) 培养：将已接种的玻璃纸琼脂平板倒置于 28 ~ 30 °C 下培养。

(7) 镜检：当培养至 3 d、5 d、7 d 时，从温室中取出平皿，在无菌环境下打开培养皿，用无菌镊子将玻璃纸与培养基分离，用无菌剪刀取小片置于载玻片上用显微镜观察，先低倍镜，再高倍镜。也可将培养皿直接置于显微镜下观察。

2. 插片法

将放线菌接种在琼脂平板上，插上灭菌盖玻片后培养，使放线菌菌丝沿着培养基表面与盖玻片的交接处生长而附着在盖玻片上。观察时，轻轻取出盖玻片，置于载玻片上直接镜检。

这种方法可观察到放线菌自然生长状态下的特征，而且便于观察不同生长期的形态。

(1) 孢子悬液的制备：同玻璃纸法。

(2) 倒平板：同玻璃纸法。

(3) 接种：同玻璃纸法。

(4) 插片：以无菌操作用镊子将灭过菌的盖玻片以约 45° 角插入琼脂中，插片数量可根据需要而定。

(5) 培养：将插片平板倒置 28~30 °C 下培养，培养时间根据观察目的而定，通常 3~5 d。

(6) 镜检：用镊子小心拔出盖玻片，擦去背面培养物，然后将有菌的一面朝上放在载玻片上，直接镜检。先低倍镜，再高倍镜。如果用 0.1% 美蓝对培养后的盖玻片进行染色后观察，效果会更好。

3. 印片法

放线菌的孢子丝形状和孢子排列情况是放线菌分类的重要依据，为了不打乱孢子的排列情况，常用印片法进行制片观察。

(1) 制片：取干净载玻片一块，用接种铲将平板上的放线菌菌苔连同培养基切下一小块，放在载玻片上。另取一洁净载玻片在火焰上微热后，对准菌苔的气生菌丝轻轻按压，使培养物（气生菌丝、孢子丝或孢子）“印”在另一载玻片中央，然后将载玻片垂直拿起。注意不要使培养体在玻片上滑动，否则会打乱孢子丝的自然形态。

(2) 固定：将印有放线菌的涂面朝上，通过酒精灯火焰 2~3 次加热固定。

(3) 染色：用石炭酸复红染色 1 min，水洗。

(4) 晾干：不能用吸水纸吸干。

(5) 镜检：先低倍镜，再高倍镜，再用油镜观察孢子丝、孢子的形态及孢子的排列情况。

▲获得本实验成功的关键

(1) 在插片法和玻璃纸法操作过程中，注意在移动附着有菌体的盖玻片和玻璃纸时勿碰动菌丝体，必须菌面朝上，以免破坏菌丝体形态。

(2) 在印片过程中，用力要轻且不要错动，染色水洗时要缓，以免破坏孢子丝形态。



< 任务三 > 实验报告

绘出链霉菌自然生长的个体形态图、绘出所观察链霉菌的孢子丝和孢子的形态图。



< 任务四 > 问题探讨

比较不同放线菌形态特征的异同点。

【相关知识】

放线菌的形态结构和功能

放线菌由于首先发现的菌落呈放射状而得名。它是一类呈菌丝状生长、主要以孢子繁殖和陆生性强的革兰氏阳性原核微生物。大多为腐生菌，少数为寄生菌。在自然界中分布很广，土壤是它们的主要生活场所，尤其是喜欢含水量较低、中性或偏碱性的有机质丰富的土壤。

放线菌与人类的关系相当密切。它是主要的抗生素产生菌。到目前为止，已知的抗生素

中约有 2/3 是由放线菌产生的，而其中 90% 又是由放线菌中的链霉菌属所产生。此外，有的放线菌还能用来生产酶制剂和维生素，有的也被用来菌体转化、石油脱蜡、污水处理等方面。只有少数放线菌能引起人类、动物和植物的病害。

1. 放线菌的形态结构

放线菌菌体是由无隔膜的分枝状菌丝组成，菌丝直径很小 ($< 1 \mu\text{m}$)，细胞质中往往有多个分散的核质体，因此是单细胞原核微生物。细胞壁的主要成分是肽聚糖。放线菌的菌丝有基内菌丝、气生菌丝和孢子丝 3 种 (见图 1-16)。

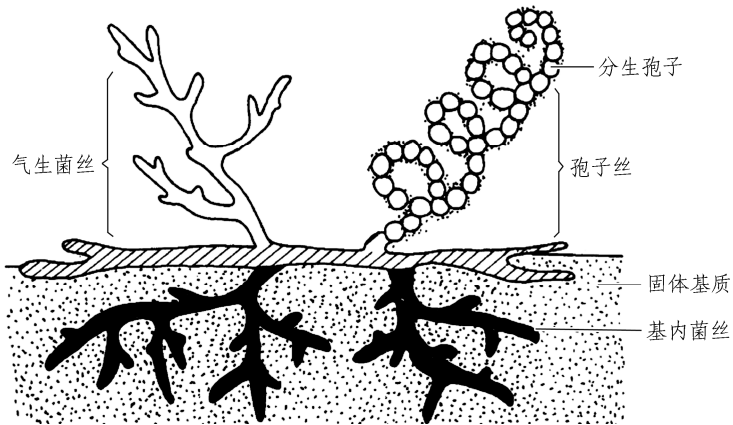


图 1-16 链霉菌一般形态结构的模式图

基内菌丝 (又称营养菌丝) 是紧贴固体培养基表面并向培养基里面生长的菌丝。主要功能是起固着和吸收营养的作用。

气生菌丝是基内菌丝伸向空中的、较粗、颜色较深的菌丝。

孢子丝是气生菌丝特化形成的，其形状以及在气生菌丝上的排列方式，随不同种类而异。有直的、波曲、钩状、螺旋、丛生、轮生等各种形态 (见图 1-17)。其中以螺旋状的孢子丝较为常见。

孢子丝上进一步产生各种颜色和形态的分生孢子 (见图 1-18)。

2 . 放线菌的菌落特征

放线菌的菌落由菌丝体组成，具有不同于其他原核微生物的菌落特征，如放线菌的菌丝很细、生长缓慢、相互交错，所以形成的菌落较小、质地致密、不透明；由于气生菌丝、孢子丝和干粉状分生孢子的形成而使表面呈丝绒状、干燥、多皱、上覆不同颜色的干粉(孢子)；基内菌丝和孢子丝所产生色素各异而使菌落正反面的颜色不一致，因基内菌丝生长在培养基内，故菌落与培养基结合紧密，不易挑起。

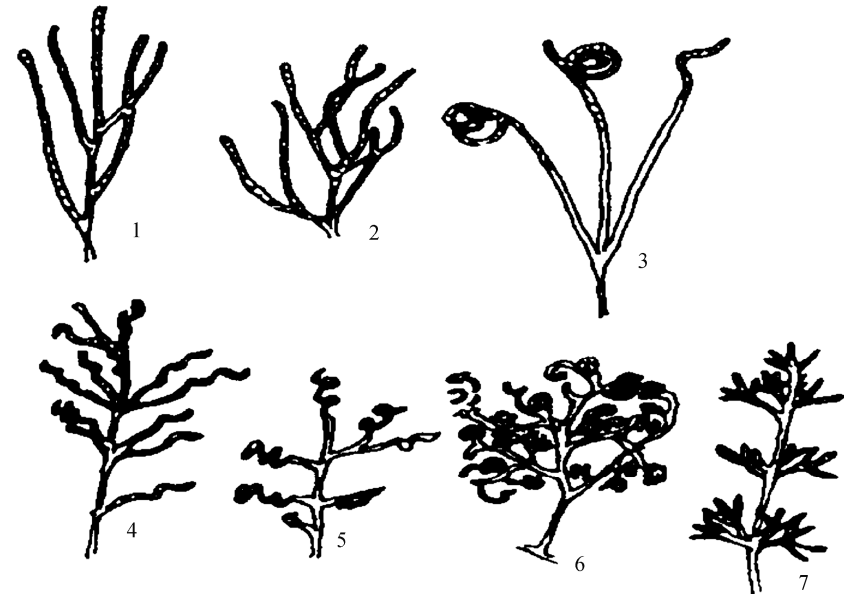


图 1-17 放线菌孢子丝的不同形态

- 1—孢子丝直、单搓分枝；2—孢子丝丛生、波曲；3—孢子丝顶端大螺旋；4—孢子丝松螺旋（一级轮生）；
5—孢子丝紧螺旋；6—孢子丝紧螺旋成团；7—孢子丝短而直（二级轮生）

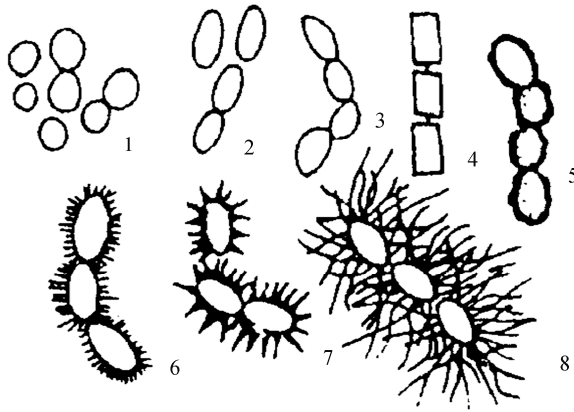


图 1-18 放线菌的孢子形态

1—光滑型及粗糙型球状；2~4—光滑型、椭圆形、瓜子形及柱状；5—疣突形；
6、7—刺形、椭圆形；8—毛发形

3. 放线菌的繁殖与生活史

放线菌主要通过形成无性孢子的方式进行繁殖。放线菌的孢子就像是植物的种子一样是繁殖“器官”。孢子成熟以后掉落在培养基上发育成新的菌丝体。

4. 放线菌的重要类群

(1) 链霉菌属：在固体培养基上生长时，形成发达的基质菌丝和气生菌丝。气生菌丝生长到一定时候分化产生孢子丝，孢子丝有直、波曲、螺旋形等各种形态。孢子有球形、椭圆、杆状等各种形态，并且有的孢子表面还有刺、疣、毛发等各种纹饰。链霉菌的气生菌丝和基质菌丝有各种不同的颜色，有的菌丝还产生可溶性色素分泌到培养基中，使培养基呈现各种颜色。腐生。本属的主要特点是产生抗生素。已发现的千余种中，能产生抗生素的就有 600 多个菌种。占其他种类微生物所产抗生素的 90% 以上。如链霉素、红霉素、四环素等，是工业化发酵生产抗生素的主要菌种资源。

(2) 诺卡氏菌属：在固体培养基上生长时，只有基质菌丝，没有气生菌丝或只有很薄一层气生菌丝，靠菌丝断裂进行繁殖。大多好气腐生，少数厌气寄生。该属有 30 余种能产生抗

生素。对结核分支杆菌和麻疯分支杆菌特效的利福霉素就是由该属菌产生的。另外，一些种类能分解烃类物质，在石油脱蜡、烃类发酵和污水处理中都有应用。

(3) 小单孢菌属：本属无气生菌丝，在基内菌丝上长出孢子梗，梗顶端产生一个球形或卵圆形分生孢子，一般好气腐生。一些种能产生抗生素，如庆大霉素等。

项目四 酵母菌制片、简单染色及形态观察

目 标

(1) 熟练酵母菌制片与染色方法，观察酵母菌的个体形态及出芽繁殖方式，掌握鉴别酵母菌死活细胞的染色方法。

(2) 掌握酵母菌的菌落特征。

【项目实施】



< 任务一 > 准备材料与仪器

(1) 菌种：酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 斜面菌种。

(2) 染色液或试剂：吕氏碱性美蓝染色液。

(3) 仪器或其他用具：接种环、载玻片、盖玻片、镊子、显微镜等。



< 任务二 > 实践操作

1. 美蓝染色液浸片的观察

(1) 制片：在洁净载玻片中央加 1 滴吕氏碱性美蓝染色液，然后按无菌操作接种环挑取少量酵母菌放在染色液中，混合均匀，染色 3~5 min。

(2) 加盖玻片：先将盖玻片一端与菌液接触，然后慢慢将盖玻片放下使其盖在菌液上。盖玻片不宜平放，以免产生气泡影响观察。

(3) 镜检：先低倍镜，后高倍镜，观察酵母的形态、构造、内含物和出芽情况，并根据颜色来区别死活细胞。

2. 水浸片的观察

在载玻片中央加一小滴水，取少许酵母菌放入水中混匀，盖上盖玻片后镜检。

3. 菌落特征和菌苔特征的观察

用划线分离的方法接种酵母在平板上，28~30℃培养 3 d，观察菌落表面干燥或湿润、隆起形状、边缘整齐度、大小、颜色等。取斜面的菌种观察菌苔特征。

▲获得本实验成功的关键

(1) 用接种环将菌体与染液混合时不要剧烈涂抹，以免破坏细胞。

(2) 滴加染液要适中，否则盖玻片覆盖时，染液过多会溢出，过少会产生大量气泡。

(3) 盖玻片要缓慢倾斜覆盖，否则产生大量气泡。



< 任务三 > 实验报告

显微拍照或者绘图说明所观察的酵母菌的形态特征。



< 任务四 > 问题探讨

- (1) 你在调试显微镜观察美蓝染色液浸片和水浸片时有什么体会？
- (2) 在同一平板上有细菌和酵母菌两种菌落，你如何识别？
- (3) 如何鉴别死活酵母菌？

【相关知识】

一、酵母菌的形态结构和功能

酵母菌是指以出芽繁殖为主的单细胞真菌的俗称。主要分布在含糖质较高的偏酸环境中，如果品、蔬菜、花蜜、植物叶子的表面和果园的土壤中，固有“糖菌”之称。此外，在动物粪便、油田和炼油厂附近的土壤中也能分离到利用烃类的酵母菌。酵母菌大多为腐生型，少数为寄生型。

酵母菌应用很广，它与人类密切相关，在酿造、食品、医药等行业和工业废水的处理方面都起着重要的作用。例如可以利用酵母菌酿酒、制造出美味可口的饮料和营养丰富的食品；可以利用酵母菌生产多种药品。当然，也有少数酵母菌是有害的，如鲁氏酵母、蜂蜜酵母等能使蜂蜜、果酱变质；有些酵母菌是发酵工业污染菌，使发酵产量降低或产生不良气味，影响产品质量；白假丝酵母，可引起皮肤、黏膜、呼吸道、消化道以及泌尿系统等多种疾病。

1. 酵母菌的形态、大小、结构

多数酵母菌为单细胞，细胞的形态多种多样，一般有卵圆形、圆形、圆柱形、柠檬形香肠形及假菌丝等（见图 1-19、图 1-20）。假菌丝是指有些酵母菌的细胞进行一连串的芽殖后，长大的子细胞与母细胞不分离，彼此连成藕节状或竹节状的细胞串，形似霉菌菌丝，为了区

别于霉菌的菌丝，称之为假菌丝。酵母菌细胞的大小依其种类差别很大，一般长约 $5 \sim 30 \mu\text{m}$ ，宽 $1 \sim 5 \mu\text{m}$ ，比细菌大几倍至几十倍。酵母菌的形状与大小，可因培养条件及菌龄不同而改变，如一般的成熟的细胞大于幼龄细胞，液体培养的细胞大于固体培养的细胞。

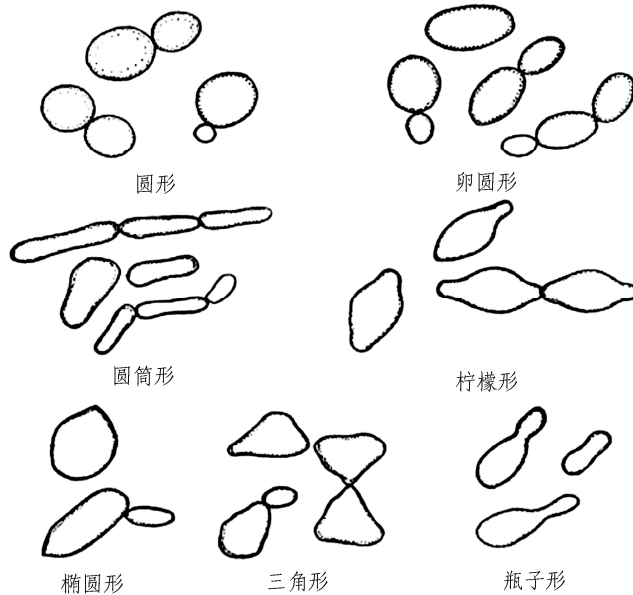


图 1-19 酵母的基本形态示意图



图 1-20 酵母菌的显微形态

酵母菌是真核微生物，具有典型的真核细胞结构（见图 1-21）。酵母菌的细胞与细菌的细胞一样有细胞壁、细胞膜和细胞质等基本结构以及核糖体等细胞器，此外酵母菌细胞还具有一些真核细胞特有的结构和细胞器，如细胞核有核仁和核膜，染色体由 DNA 与蛋白质结合形成，能进行有丝分裂，细胞质中有线粒体、中心体、内质网和高尔基体等细胞器以及多

糖、脂类等储藏物质。

(1) 细胞壁：幼龄酵母菌的细胞壁与细胞膜均较薄，老龄酵母菌的细胞壁与细胞膜较厚。酵母菌的细胞壁厚约 25~70 nm，约占细胞干重的 25%。其结构类似于化“三明治”的结构，即内层为葡聚糖、外层为甘露聚糖、中间层为蛋白质。此外还含有不等量的类脂质和几丁质。细胞壁决定着细胞的形状，具抗原性，起到保护菌体的作用。

(2) 细胞膜：酵母菌细胞膜厚约 7.5 nm，结构成分与细菌基本相同，主要有蛋白质和类脂以及少量糖类组成。细胞膜具有半渗透性，主要是控制细胞内外物质的交换，参与细胞壁和部分酶的合成。

(3) 细胞质及贮藏物：细胞质是细胞新陈代谢的场所，它是一种黏稠的胶体，幼细胞的细胞质较稠密而均匀，老细胞的细胞质则出现较大的液泡和各种贮藏物。液泡的成分为有机酸及其盐类水溶液，贮藏物则以颗粒存在。

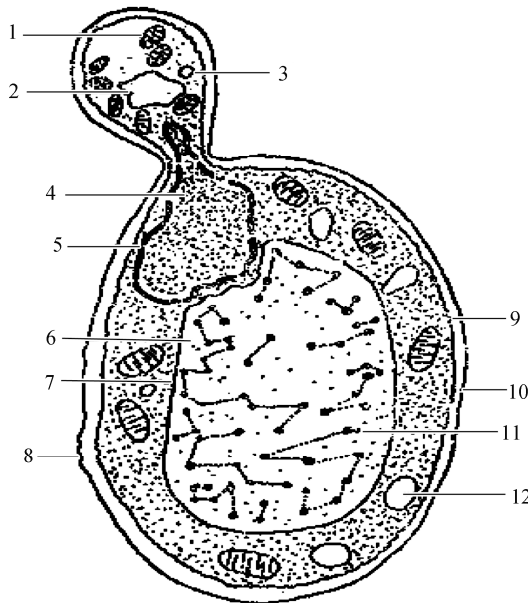


图 1-21 酵母菌的基本结构图

1—线粒体；2—芽体内的液泡；3—芽体；4—细胞核；5—核孔；6—液泡；7—液泡膜；
8—出芽痕；9—细胞膜；10—细胞壁；11—液泡颗粒；12—贮藏颗粒

(4) 细胞核：酵母菌为真核生物，细胞质中具有明显完整的细胞核。幼龄细胞核呈圆形，位于细胞中央，成年后由于液泡的出现和扩大而被挤到一边，呈肾形。核外有包裹着核的核膜，核内有核仁和染色体。核膜是将细胞质与核质分开的双层膜，膜上有许多小孔，称为核孔。核孔是核质与胞质之间交换物质的选择性通道。核仁是比较稠密的圆球形构造，主要成分是 RNA 和蛋白质、核仁与 RNA 和蛋白质的合成有着密切的关系。

2. 酵母菌的繁殖与生活史

1) 酵母菌的繁殖

酵母菌的繁殖方式分无性繁殖和有性繁殖。多数酵母菌以无性繁殖为主，无性繁殖包括芽殖、裂殖和产生无性孢子。有性繁殖的主要方式是产生子囊孢子。繁殖方式是酵母鉴别的重要依据。

(1) 无性繁殖。

① 芽殖：芽殖是酵母菌的最普遍的无性繁殖方式。酵母菌成熟时，细胞核附近的液泡产生一根小管，同时在细胞表面生出一个突起。接着小管穿过细胞壁进入突起，然后母细胞核分裂成两个，一个核留在母细胞内，另一个核随母细胞的部分原生质进入小突起内，小突起逐渐增大，而成为芽体。最后，当芽体长到母细胞大小一半时两者相连部分收缩，使芽体与母细胞分开，成为独立生活的新细胞（见图 1-22），子细胞脱离后，在母细胞上留下的痕迹即芽痕（见图 1-23）。

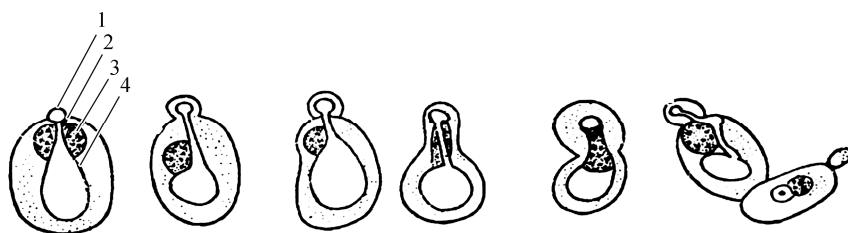


图 1-22 酵母菌芽殖过程

1—突起；2—小管；3—核；4—液泡

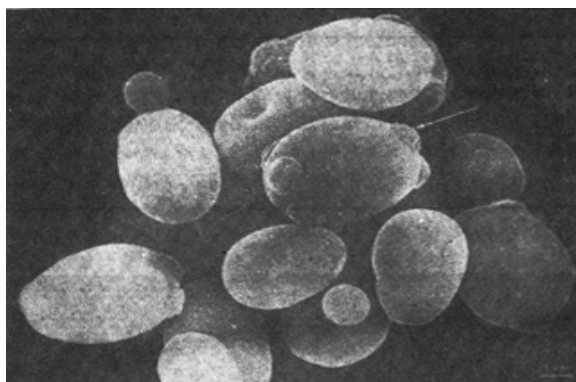


图 1-23 酿酒酵母的扫描电子显微镜照片
(酵母菌出芽痕)

芽殖完成后，子细胞可脱离母细胞独立生活，也可与母细胞暂时相接。若酵母菌生长旺盛，而且环境条件适宜，子细胞在形成后不脱离母细胞，而继续进行芽殖，这样可以形成许多成串的细胞群，称为酵母菌的假菌丝如产朊假丝酵母。



图 1-24 裂殖酵母的细胞分裂

② 裂殖：裂殖是少数酵母菌的繁殖方式（如裂殖酵母属），其过程类似细菌的二分裂法。其过程是母细胞先延长，核分裂为二，细胞中央出现隔膜，将细胞分为两个具有单核的子细胞（见图 1-24）。

③ 无性孢子繁殖：有些酵母菌可形成一些无性孢子进行繁殖。这些无性孢子有掷孢子、厚垣孢子和节孢子等。如掷孢酵母属等少数酵母菌产生掷孢子，这种孢子是在卵圆形的营养

细胞生出的小梗上形成的。孢子成熟后通过一种特有的喷射机制将孢子射出。此外有的酵母菌还能在假菌丝的顶端产生厚垣孢子，如白假丝酵母菌等（见图 1-25）。

(2) 有性繁殖。

有性繁殖是指通过两个具有性差异的细胞相互接合形成新个体的繁殖方式。有性繁殖过程一般分为 3 个阶段，即质配、核配和减数分裂。

质配是两个不同性别的细胞的原生质融合在同一细胞中，而两个细胞核并不结合，每个核的染色体数都是单倍的。核配即两个核结合成一个双倍体的核。减数分裂则使细胞核中的染色体数目又恢复到原来的单倍体。

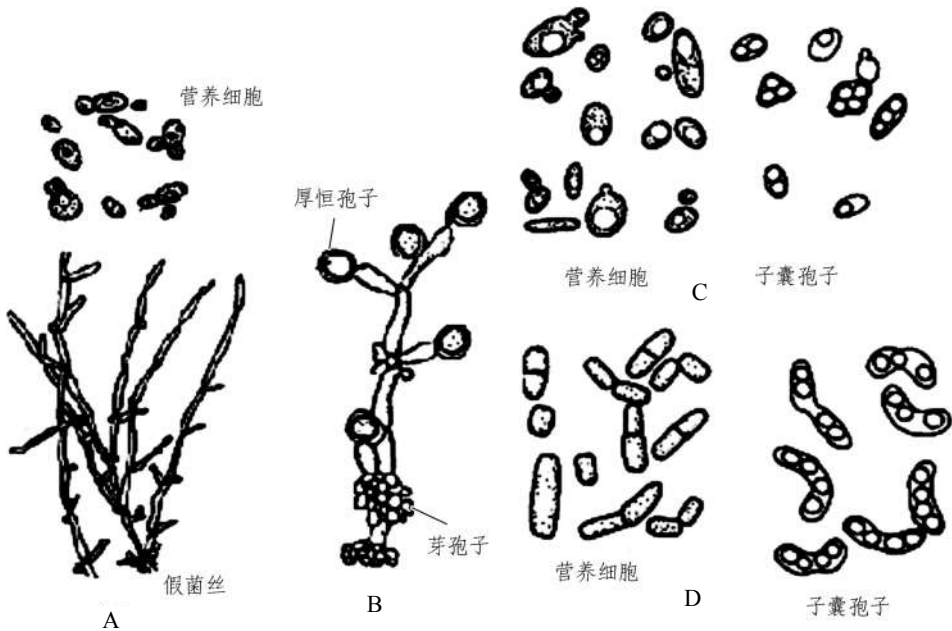


图 1-25 几种酵母菌的繁殖

A—热带假丝酵母；B—白假丝酵母；C—酿酒酵母；D—粟酒裂殖酵母

当酵母菌细胞发育到一定阶段，邻近的两个性别不同的具有单倍体核的酵母菌营养细胞各自伸出一根管状原生质突起，随即相互接触，接触处的细胞壁溶解，融合成通道，两

个细胞的细胞质由通道结合进行质配，两个单倍体核也在此进行核配，形成双倍体接合子细胞。双倍体细胞可以出芽方式形成双倍体营养细胞，进行多代的生长繁殖。在一定条件下双倍体核进行减数分裂，形成 4 个或 8 个子核，每一子核与其附近的原生质一起，在其表面形成一层孢子壁后，就形成了一个子囊孢子，而原有的接合子细胞就成了子囊。子囊孢子的数目可以是 4 个或 8 个，因种而异，子囊及子囊孢子的形态是酵母菌分类鉴定的依据 (图 1-26)。

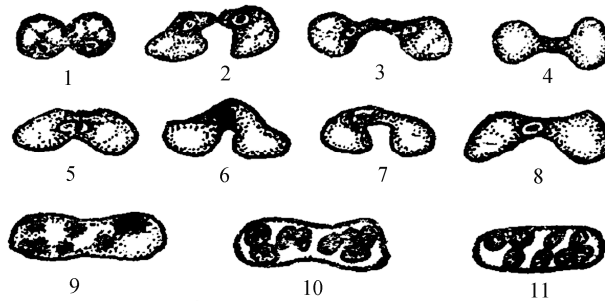


图 1-26 酵母菌子囊孢子的形成过程

1~4—两个细胞结合；5—结合子；6~9—核分裂；10~11—核形成孢子

2) 酵母菌的生活史

酵母菌个体经过一系列生长发育产生下一代个体的全部过程，即为酵母菌的生活史或生命周期。由于酵母菌的单倍体细胞 (n) 和二倍体细胞 ($2n$) 都有可能独立存在，并各自进行生长和繁殖。因此，酵母菌的生活史包含了单倍体生长阶段和二倍体生长阶段两个部分。

根据酵母菌生活史中单倍体和二倍体阶段存在时间的长短，可以把酵母菌分成单倍体型、双倍体型和单双倍体型 3 种类型。(见图 1-27)。

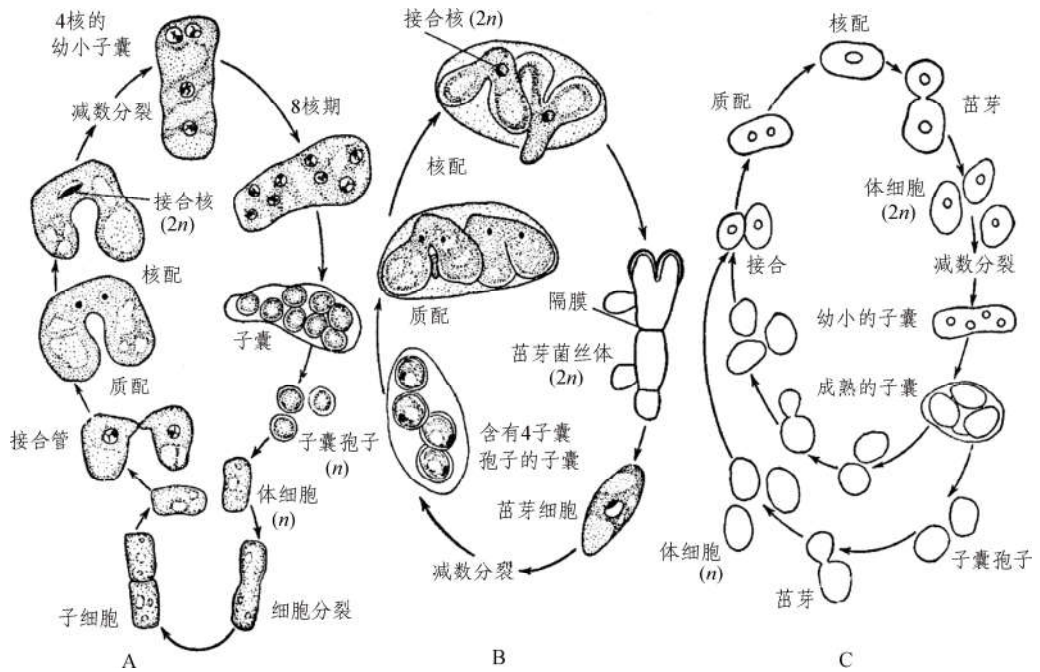


图 1-27 酵母菌生活史

A—八孢裂殖酵母图；B—路德酵母；C—啤酒酵母

(1) 单倍体型：例如八孢裂殖酵母，单倍体营养细胞通过裂殖进行无性繁殖形成营养细胞，两个营养细胞合适条件接触后形成接合管，质配后立即核配，两个单倍体细胞核 (n) 合成二倍体核 ($2n$)。二倍体核 ($2n$) 细胞阶段很短，不能独立生活，连续分裂 3 次，第一次为减数分裂，形成包含 8 个单倍体子囊孢子的子囊，子囊破裂，释放子囊孢子。

(2) 二倍体型：例如路德酵母，单倍体子囊孢子在孢子囊内成对接合，发生质配和核配后形成二倍体的子囊孢子。二倍体细胞子囊孢子萌发，穿破子囊壁，为二倍体营养细胞。二倍体的营养细胞可独立生活，通过芽殖方式进行无性繁殖，此阶段较长。在二倍体营养细胞内的核进行减数分裂，营养细胞成为子囊，其中形成 4 个单倍体的子囊孢子，单倍体时期只能以子囊孢子形式存在，故不能独立生活。

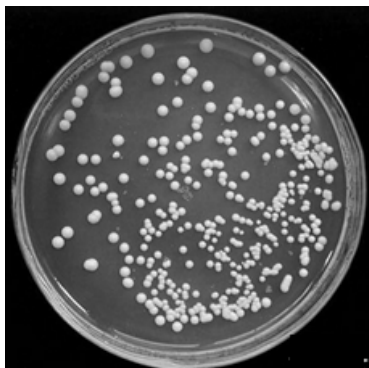
(3) 单双倍体型：例如啤酒酵母，单倍体营养细胞和二倍体营养细胞都可进行出芽繁殖；

整个生活过程一般以出芽繁殖为主，特定条件下进行有性繁殖。

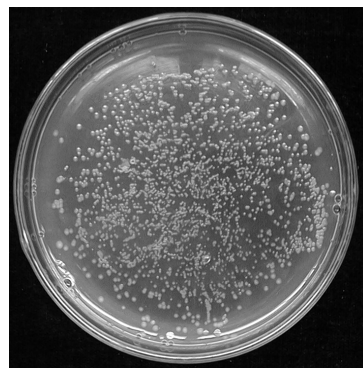
啤酒酵母生活史的全过程：子囊孢子在合适的条件下出芽产生单倍体营养细胞。单倍体细胞不断进行出芽繁殖。两个不同性别的单倍体营养细胞相互接触、融合发生质配，在质配后发生核配，形成接合子细胞即二倍体营养细胞。二倍体营养细胞并不立即进行核分裂，而是不断进行出芽繁殖，成为二倍体营养细胞。在特定条件下，二倍体营养细胞细胞核经减数分裂后形成4或8个子核，每一子核被周围原生质包围形成子囊孢子，原接合子细胞即成为子囊，子囊破裂释放出单倍体子囊孢子。

啤酒酵母的二倍体营养细胞因其体积大，生活力强，从而被广泛应用于食品发酵工业生产、科学研究或是遗传工程实践中。

3. 酵母菌的菌落特征 (见图 1-28)



酵母菌菌落



细菌菌落

图 1-28 酵母菌和细菌菌落

在固体培养基上酵母菌的菌落与细菌很相似。但由于酵母菌的个体细胞较大，胞内颗粒明显，胞间含水量比细菌的少，所以菌落较大而厚，外观表现光滑、湿润、有黏性，与培养基结合不紧密。菌落颜色较单调，多数呈乳白色，只有少数呈红色、黑色等。有些菌落因培

养时间较长，会逐渐生皱，变得较为干燥，颜色亦较原先为暗。假丝酵母因其边缘常产生丰富的藕节状假菌丝，故细胞易向外围蔓延，使菌落较大，扁平而无光泽，边缘不整齐。

菌落的颜色、光泽、质地，表面和边缘等特征都是酵母菌菌种鉴定的依据。表 1-1 是酵母菌与细菌的菌落比较。

表 1-1 酵母菌与细菌的菌落比较

比较项目	主要特征			参考特征					
	菌落	细胞		菌落透明度	结合程度	颜色	边缘	生长速度	气味
	外观	相互关系	形态特征						
细菌	很湿或较湿，小而短，或大而平坦	单个分散或有一定排列	小而均一，高倍镜无法分辨内部结构	透明或透明度差	不结合	多样	用低倍镜一般看不到细胞，需用高倍镜、油镜	很快	常有臭味
酵母菌	很湿，大而突起，光滑有黏性	单个分散	大而分化，高倍镜下可见内部结构	不透明	不结合	多为乳白色少数红色	用低倍镜有时可见细胞	较快	多数有酒香味

4. 食品中常见的酵母

1) 酵母菌属 (Saccharomyces)

酵母菌属属于子囊菌亚门，半子囊菌纲，内孢霉目，酵母科。

这属的一些菌种具有典型的酵母菌的形态和构造。细胞为圆形、椭圆形或腊肠形。有的有假菌丝，无性繁殖为芽殖，有性繁殖为形成子囊孢子。种类较多，有 41 种。但最主要的是啤酒酵母和葡萄汁酵母。

(1) 啤酒酵母 (S. cerevisiae): 啤酒酵母是酵母菌属中的典型菌种，也是重要的菌种，广泛应用于啤酒，白酒、果酒的酿造和面包的制造中，由于酵母菌含有丰富的维生素和蛋白质，因而可作为药用，也可用于饲料，具有较大的经济价值。分布也很广泛，在各种水果的

表皮上，发酵的果汁、酒曲、土壤中，特别是果园土壤中都可分离到。

啤酒酵母的种类也很多，根据细胞长与宽的比例，可将啤酒酵母分为3组。第一组的细胞多为圆形，短卵形或卵形。细胞长与宽之比为1~2。应用广泛，如啤酒、白酒和酒精发酵及面包制作中多应用这类菌种；第二组的细胞为卵形或长卵形，长与宽之比通常为2，常用于葡萄酒和果酒的酿造。第三组的细胞为长圆形，长与宽之比大于2。这组的酵母比较耐高渗透压。用甘蔗糖蜜做原料时可供酒精发酵。

在麦芽汁琼脂上的啤酒酵母菌的菌落为乳白色，有光泽、平坦、边缘整齐。

(2) 葡萄汁酵母 (*S. uvarum*): 它与啤酒酵母的主要区别是全发酵棉子糖。在麦芽汁中，在25℃下培养3d，细胞圆形、卵形、椭圆或长形。供啤酒酿造底层发酵，或作饲料和药用。此外，是维生素的测定菌，可测定泛酸、硫胺素、吡哆醇、肌醇等。

2) 裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*)

裂殖酵母属于子囊菌亚门、酵母科中的裂殖酵母亚科。细胞为椭圆形或圆柱形。无性繁殖为分裂繁殖。有时形成假菌丝。有性繁殖是营养细胞结合形成子囊，子囊内有1~4个或8个子囊孢子。子囊孢子是球形或卵圆形，具有酒精发酵的能力，不同化硝酸盐。八孢裂殖酵母 (*S. octosporus*) 是这一属的重要菌种。无性繁殖为裂殖，麦芽汁，25℃，培养3d，液面无菌膜，液清，菌体沉于管底。在麦芽汁琼脂培养基上菌落为乳白色，无光泽，曾经从蜂蜜、粗制蔗糖和水果上分离到。

3) 假丝酵母属 (*Candida*)

此属属于半知菌亚门，芽孢菌纲，隐球酵母目，隐球酵母科。细胞为圆形、卵形或长形，无性繁殖为多边芽殖，形成假菌丝，也可形成厚垣孢子，未发现此属酵母菌的有性繁殖，不

产生色素，此属中有许多种具有酒精发酵的能力。有的菌种能利用农副产品或碳氢化合物生产蛋白质，可用于食用或饲料。

(1) 热带假丝酵母 (*G. tropicalis*): 是最常见的假丝酵母。在葡萄糖-酵母汁-蛋白胨液体培养基中培养，25 °C，3 d，细胞呈球形或卵球，其中大小为 (4~8) μm × (6~11) μm。在麦芽汁琼脂上菌落为白色到奶油色，无光泽或稍有光泽。软而平滑或部分有皱纹。培养时间长时，菌落变硬。在加盖玻片的玉米粉琼脂培养基上培养，可看到大量的假菌丝和芽生孢子。

热带假丝酵母氧化烃类的能力强，在 230~290 °C 石油馏分的培养基中，经 22 h 后，可得到相当于烃类重量 92% 的菌体。所以，是生产石油蛋白质的重要菌种。用农副产品和工业废弃物也可培养热带假丝酵母。如用生产味精的废液培养热带假丝酵母作饲料，既扩大了饲料来源，又减少了工业废水对环境的污染。

(2) 解脂假丝酵母 (*C. lipolytica*): 细胞为卵形到长形，有的细胞可长达 20 μm。在加盖玻片的玉米粉琼脂培养基上，可看到假菌丝或具有横隔的真菌丝。在菌丝顶端或中间有单个或成双的芽生孢子。

解脂假丝酵母能利用的糖类很少，但它们分解脂肪和蛋白质的能力很强。主要用于石油发酵，可用廉价的石油为原料生产酵母蛋白，同时可使石油脱蜡，降低石油分馏的凝固点。此外，还可利用解脂假丝酵母生产柠檬酸、维生素、谷氨酸和脂肪酸等。从黄油、石油井口的油黑土中，炼油厂或生产油脂车间等地方都可以分离到这种微生物。

(3) 产朊假丝酵母 (*G. utilis*): 产朊假丝酵母又叫产朊圆酵母或食用圆酵母。其蛋白质和维生素 B 的含量都比啤酒酵母高，它能以尿素和硝酸作为氮源，在培养基中不需要加入

任何生长因子即可生长。它能利用五碳糖和六碳糖，既能利用造纸工业的亚硫酸废液，还能利用糖蜜、木材水解液等生产出可食用的蛋白质。

4) 球拟酵母属 (*Torulopsis*)

此属与假丝酵母同属隐球酵母科，细胞为球形、卵形或略长形，生殖方式为芽殖。无假菌丝，无色素，有酒精发酵能力。有些种能产生甘油等多元醇。在适宜条件下能将40%的糖转化为多元醇。由于甘油是重要的化工原料，所以这属的酵母菌是工业中的重要种类。其代表菌种为白色球拟酵母，广泛存在于自然界，能发酵甘油。球形球拟酵母能耐高渗透压，可在高糖浓度的基质上生长，如蜜饯、蜂蜜等食品上。有的菌种也可进行石油发酵，可生产蛋白质或其他产品。

5) 红酵母属 (*Rhodotorula*)

此属亦属于隐球酵母科，细胞为圆形、卵形或长形，为多边芽殖，多数种类没有假菌丝，其特点是，有明显的红色或黄色色素，很多种因形成荚膜而使菌落呈黏质状，如黏红酵母。

红酵母菌没有酒精发酵的能力，少数种类为致病菌，在空气中时常发现。有的菌，如黏红酵母，能产生脂肪，其脂肪含量可达干物质质量的50%~60%。但合成脂肪的速度较慢，如培养液中添加氮和磷，可加快其合成脂肪的速度。产1g脂肪大约需4.5g葡萄糖。此外，黏红酵母还可产生丙氨酸、谷氨酸、蛋氨酸等多种氨基酸。

6) 掷孢酵母属 (*Sporobolomyces*)

此属属于担子菌亚门，冬孢菌纲，黑粉菌目，掷孢酵母科。掷孢指投掷其孢子的真菌。它们的孢子是由卵圆形的营养细胞生出的小突起形成的，然后由一种机制有力的射出。Buller证明，这种机制是担子菌所特有的。也有一些学者认为掷孢酵母是一种低等的担子菌。这一

属的特点是，形成红至鲑肉粉红色的菌落及肾形或豆形的掷孢子。

二、酵母菌美蓝染色原理

美蓝染色液是一种弱氧化剂，它的氧化型呈蓝色，还原型无色。用美蓝对酵母的活细胞进行染色时，由于细胞的新陈代谢作用，能使美蓝还原。因此，酵母活细胞是无色的，而死细胞或代谢作用微弱的衰老细胞则呈蓝色或淡蓝色。

项目五 霉菌制片、染色及形态观察

目 标

- (1) 学习并掌握观察霉菌形态的基本方法。
- (2) 识别霉菌菌落的特征。
- (3) 区分毛霉、根霉、曲霉和青霉的形态特征。

【项目实施】



< 任务一 > 准备材料与仪器

- (1) 菌种：用马铃薯葡萄糖琼脂平板培养 2~5 d 的黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、橘青霉 (*Penicillium citrinum*)、黑根霉 (*Rhizopus nigricans*)、总状毛霉 (*Mucor racemosus*)。
- (2) 染色液和试剂：50% 乙醇 (V/V)、马铃薯葡萄糖琼脂、乳酸石炭酸棉蓝染色液。
- (3) 仪器或其他用具：剪刀、镊子、载玻片、盖玻片、接种针、显微镜、蒸馏水。



< 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) 对霉菌进行制片时减少空气流动，避免吸入孢子。

1. 霉菌菌落特征观察

观察 PDA (马铃薯葡萄糖琼脂培养基) 平板上的霉菌菌落，描述其菌落特征，注意菌落形态大小，菌丝高矮、生长紧密度、孢子颜色和菌落表面等情况，比较与细菌、放线菌、酵母菌菌落特征的异同。

2. 水浸片观察法

(1) 制片：在一洁净载玻片上滴加一滴乳酸石炭酸棉蓝染色液，用接种针挑取霉菌菌落边缘处的幼嫩菌丝，先置于 50% 的乙醇中浸润，再用蒸馏水将浸过的菌丝洗一下，以洗去脱落的孢子，然后放入载玻片上的染色液中，小心地用接种针将菌丝分散开来。挑菌和制片时要细心，尽可能保持霉菌的自然生长状态。盖上盖玻片，勿产生气泡，且不要移动盖玻片，以免搞乱菌丝。

(2) 镜检：先用低倍镜，必要时转换高倍镜观察。

3. 玻璃纸透析培养观察法

(1) 玻璃纸灭菌：将玻璃纸剪成培养皿大小，经水浸湿后，放入平皿内，121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。

(2) 菌种培养：按无菌操作法，倒 PDA 平板，凝固后用灭菌的镊子夹取无菌玻璃纸紧紧贴附于平板上，再用接种环蘸取少许霉菌孢子，在玻璃纸上方轻轻抖落于纸上。然后将平板置 28~30 °C 下培养 2~5 d。

(3) 制片：剪取经玻璃纸透析法培养 2~5 d 后长有菌丝和孢子的玻璃纸一小块，先放在 50% 乙醇中浸一下，然后正面向上贴附于干净载玻片上，滴加 1~2 滴乳酸石炭酸棉蓝染色液，小心盖上盖玻片。

(4) 镜检：先用低倍镜观察，必要时再换高倍镜。注意观察菌丝有无隔膜，有无假根、足细胞等特殊形态的菌丝。注意其无性繁殖器官的形状和构造，孢子着生的方式和孢子的形态、大小等。

4. 载玻片培养观察法

(1) 准备湿室：在培养皿底部铺一张圆形滤纸片，滤纸片上依次放上“U”形载玻片搁架、载玻片、盖玻片（两片），盖上皿盖，外用纸包扎，高压灭菌（ 9.8×10^4 Pa）20 min 后，60 °C 烘箱干燥，备用。

(2) 加培养基：用无菌细口滴管吸取少许培养基，滴加到载玻片中间，培养基应滴得圆而薄，直径约为 0.5 cm（滴加量一般以 1 小滴为宜），注意无菌操作。

(3) 取菌接种：在培养基凝固，用接种环挑取少量待观察的霉菌孢子，置于湿室的载玻片上，每张载玻片可接同一菌种的孢子两处。接种时只要将带菌的接种环在载玻片上轻轻碰几下即可（接种量要少，以免培养后菌丝过于稠密而影响观察）。

(4) 盖玻片：用无菌镊子将皿内的盖玻片盖在琼脂薄层上，用镊子轻压盖玻片，使盖玻片和载玻片之间的距离相当接近，但不能压扁。

（盖玻片不能紧贴载玻片，要彼此留有小缝隙，一是为了通气，二是使各部分结构平行排列，易于观察。）

(5) 倒保湿剂：每皿倒入约 3 mL 20% 的无菌甘油，使皿内滤纸完全湿润，以保持皿内湿度，盖上皿盖。制成载玻片湿室，28 °C 培养。

(6) 观察：将培养好的载玻片取出，置于显微镜下用低倍镜和高倍镜直接观察。

获得本实验成功的关键

(1) 在直接制水浸片观察中，用接种钩取菌体和用镊子分散菌丝时，尽量减少菌丝的断裂。

(2) 在载玻片培养观察中，接种量要少并尽可能将分散孢子接种在琼脂的边缘，避免培养菌丝过于密集而影响观察。



< 任务三 > 实验报告

绘出 4 种霉菌的个体形态图，并注明各部位名称。



< 任务四 > 问题探讨

(1) 载玻片培养观察法在制片时要注意哪些细节？观察时找中心还是边缘来进行观察？

(2) 水浸片观察法在制片时要注意什么？

【相关知识】

一、霉菌的形态结构和功能

霉菌也称丝状真菌，通常把在基质上长成绒毛状、棉絮状或蜘蛛网状菌丝体的真菌，称为霉菌。霉菌是发酵工业、医药工业、食品工业的重要菌种。应用于酿酒、制酱、生产酒精、柠檬酸、青霉素、灰黄霉素、赤霉素、淀粉酶和发酵饲料等。

霉菌喜偏酸性、糖质、潮湿环境。生长最适温度为 30~39℃。大多数为好氧性微生物。多为腐生菌，少数为寄生菌。

1. 霉菌的形态和结构

(1) 霉菌的形态：构成霉菌营养体的基本单位是菌丝。菌丝是一种管状的细丝，显微镜下观察很像一根透明胶管，它的直径一般为 3~10 μm，比细菌和放线菌的细胞约粗几倍到几十倍。菌丝可伸长并产生分枝，许多分枝的菌丝相互交织在一起，就叫菌丝体。

根据菌丝中是否存在隔膜，可把霉菌菌丝分成两种类型（见图 1-29）。

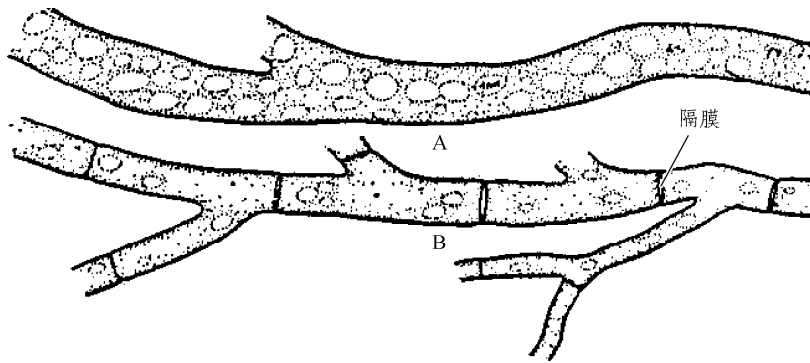


图 1-29 霉菌菌丝与菌丝的隔膜

A—无隔菌丝；B—有隔菌丝

一种是无隔菌丝，菌丝中无隔膜，整团菌丝体就是一个单细胞，其中含有多个细胞核如毛霉、根霉等。另一种是有隔菌丝，菌丝中有隔膜，被隔膜隔开的一段菌丝就是一个细胞，菌丝体由很多个细胞组成，每个细胞内有 1 个或多个细胞核。有隔膜菌丝在隔膜上有 1 至多个小孔，使细胞之间的细胞质和营养物质可以相互沟通，如青霉、曲霉等。

霉菌菌丝可以分化，在固体培养基上，以部分菌丝伸入培养基内部，吸收养料，称为营养菌丝或基内菌丝。另一部分菌丝伸出基质外向空中生长，称气生菌丝。一部分气生菌丝发育到一定阶段产生孢子，又称繁殖菌丝。有些菌丝会分泌色素，呈现不同的颜色，有的色素也可分泌到细胞外渗入基质。为了适应环境，霉菌的菌丝会形成许多特殊化的结构，如吸器、假根、子座、菌核、菌索、菌网、匍匐菌丝等特化结构。

(2) 霉菌的结构：霉菌菌丝细胞由细胞壁、细胞膜、细胞质、细胞核及各种内含物组成。细胞壁成分各有差异，多数霉菌细胞壁含有几丁质，约占干重的 2%~26%，少数为低等的水生霉菌，以纤维素为主。细胞膜厚约 9~10 nm，细胞核有核膜、核仁和染色体。细胞质中含有线粒体、核糖体和颗粒状内含物，如糖原、脂肪颗粒等。幼龄菌丝细胞质均匀，老龄菌丝中出现液泡（见图 1-30）。

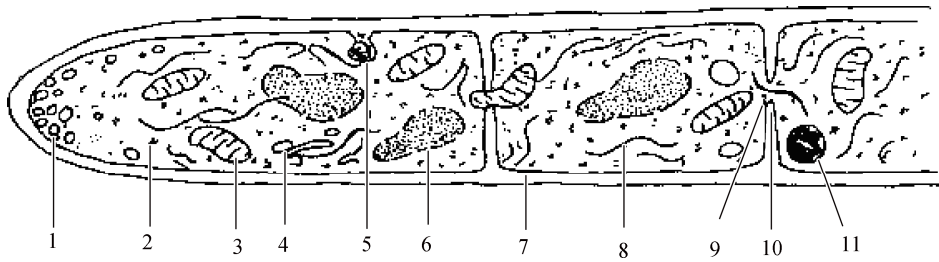


图 1-30 霉菌的细胞结构图

1—孢囊；2—核蛋白体；3—线粒体；4—孢囊产生系统；5—膜边体；6—细胞核；
7—细胞壁；8—内质网；9—隔膜孔；10—隔膜；11—伏鲁宁体

2. 霉菌的繁殖和生活史

(1) 霉菌的繁殖：霉菌主要依靠各种孢子进行繁殖，产生孢子的方式分无性孢子和有性孢子两种。霉菌菌丝片段也可以生长成新的菌丝，即断裂繁殖。

① 无性繁殖：霉菌主要用无性孢子进行繁殖，它的特点是分散，数量大，而且孢子有一定抗性。利用霉菌的这一特点，在工业发酵中可短期得到大量菌体，所以常利用无性孢子来进行繁殖、扩大培养，或进行菌种保藏。霉菌的无性繁殖主要通过产生孢囊孢子、分生孢子、节孢子和厚垣孢子来实现的（见图 1-31）。

i. 孢囊孢子：孢囊孢子是一种内生孢子，霉菌的气生菌丝或孢囊梗顶端膨大，形成孢子囊，囊内充满许多细胞核，每一个核外包以细胞质，产生孢子壁，即形成孢子囊孢子。顶端形成孢子囊的菌丝（称孢囊梗）。孢囊梗伸入孢子囊的部分（称囊轴）。孢子成熟后孢子囊破裂，孢子囊孢子即分散出来。如毛霉、根霉等（见图 1-31）。

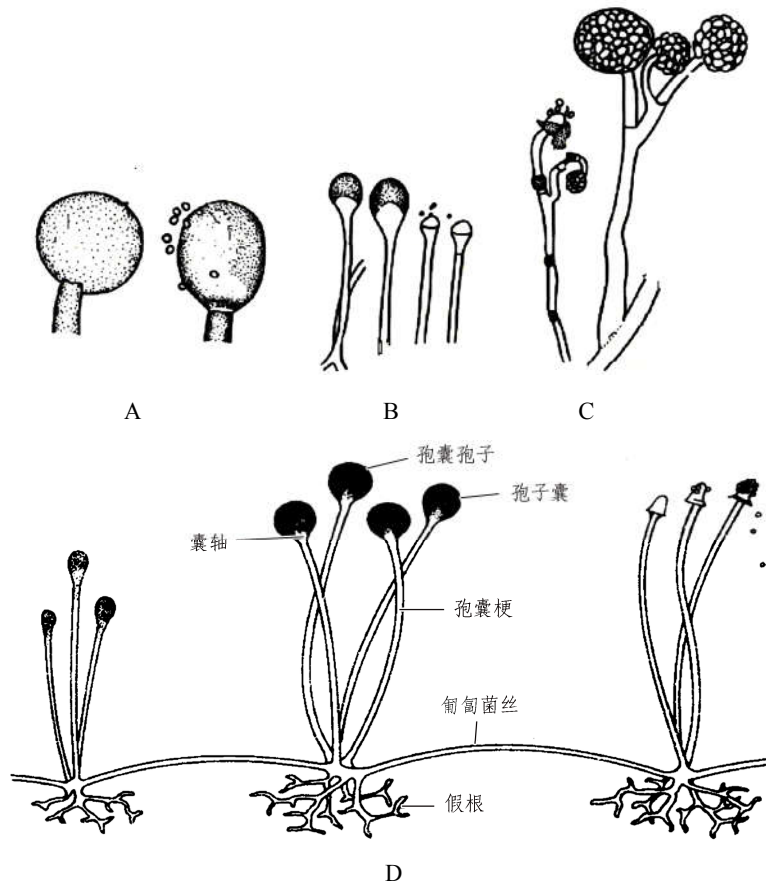


图 1-31 孢子囊、孢囊孢子和孢子梗

A—大毛霉：左是未成熟的孢子囊，右是孢子囊和几个孢囊孢子；B—灰绿梨头霉的孢囊孢子和囊轴；
C—总状毛霉的孢子梗和孢子囊；D—根霉的形态图

ii. 分生孢子：分生孢子生于细胞外，是一种外生孢子，霉菌菌丝顶端或分生孢子梗上，以类似于出芽或缢缩的方式形成单个或成簇的孢子，称为分生孢子。它是霉菌中最常见的一类无性孢子。分生孢子形状、大小、颜色、结构及着生方式因菌种不同而异。分生孢子着生在菌丝或其分枝的顶端，产生的孢子可以是单生的、成链的或是成簇的。

有的霉菌如青霉菌和曲霉（见图 1-32），菌丝已分化成分生孢子梗和小梗，分生孢子生着在小梗顶端，成链或成团，壁较厚。

iii. 节孢子：节孢子又称粉孢子、裂生子，是由霉菌菌丝断裂形成。菌丝生长到一定阶

段，出现许多隔膜，然后从隔膜处断裂，产生许多单个的孢子，孢子形态多为圆柱形。如白地霉（见图 1-32）。

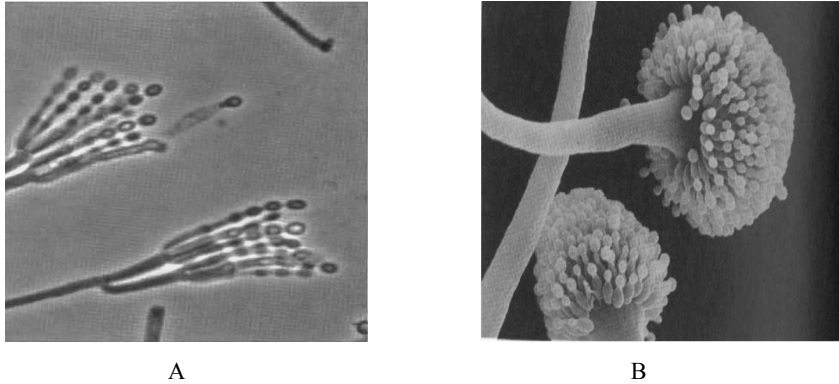


图 1-32 分生孢子扫描电镜图
A—青霉菌；B—曲霉菌

iv. 厚垣孢子：厚垣孢子具有很厚的壁，因此又名厚壁孢子。是霉菌菌丝的顶端或中间部分细胞的原生质浓缩、变圆、细胞壁加厚，形成球形或纺锤形的休眠体，对恶劣环境有很强的抵抗力。若菌丝遇到不良环境而死亡，厚垣孢子还具有生命力，当环境适宜时，能萌发成菌丝（见图 1-33）。

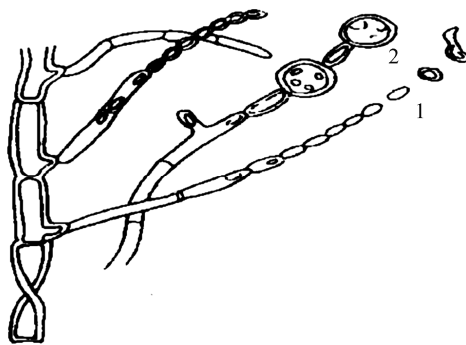


图 1-33 白地霉的节孢子和厚壁孢子
1—节孢子；2—厚垣孢子

v. 芽孢子：霉菌菌丝细胞象发芽一样产生小突起，经过细胞壁紧缩而形成的无性孢子，

形似球形。如毛霉、根霉在液体培养基中形成的酵母型细胞属芽孢子。

② 霉菌的有性繁殖：霉菌的有性繁殖是通过不同性别的细胞或菌丝结合后，产生的有性孢子来繁殖的。

霉菌的有性繁殖的过程一般可分为 3 个阶段。第一阶段为质配，即两个不同性别的细胞的细胞质融合在一起 ($n+n$)。第二阶段为核配，即两个细胞的核融合，产生二倍体的接合子核 ($2n$)。第三阶段为减数分裂，又恢复了核的单倍体状态 (n)。大多数霉菌的菌体是单倍体，因为核配后，一般随即发生减数分裂，而二倍体只限于接合子。霉菌的有性孢子包括卵孢子、接合孢子和子囊孢子等。

霉菌的有性繁殖多发生于特定条件下，而在一般培养基上不常出现。霉菌的种类不同，其有性繁殖方式亦不同。有些霉菌可通过菌丝接合，而多数霉菌的有性繁殖是通过分化了的特殊性细胞的接合来实现的。

i. 卵孢子：卵孢子是由两个大小形状不同的配子囊结合后而成的有性孢子。小型配子囊称为雄器，大型的配子囊称为藏卵器。藏卵器内有一个或数个卵球，雄器与藏卵器相配，雄器中的细胞质与细胞核，通过受精管进入藏卵器与卵球接合成卵孢子（见图 1-34）。

ii. 接合孢子：接合孢子是由形态相同或略有不同的配子囊结合形成的。当相接近的两菌丝相接触，接触处的细胞壁溶解，两个菌丝内的核和细胞质融合形成结合孢子（合二为一）。接合孢子的壁很厚，表面有棘状或疣状隆起，外界条件适宜，接合孢子即萌发出新菌丝。接合孢子主要分布在接合菌类中，如高大毛霉和黑根霉（见图 1-35）。

iii. 子囊孢子：在子囊中形成的有性孢子称子囊孢子。形成子囊孢子是子囊菌的主要特

征。子囊是一种囊状结构，呈球形、棒形、圆筒形，因种而异。一般每个子囊中形成 8 个子囊孢子（见图 1-36）。大多数的子囊包在由很多菌丝聚集而形成的子囊果中（见图 1-37），子囊孢子、子囊及子囊果的形态、大小、颜色、质地等特征是霉菌分类鉴定的依据。

（2）霉菌的生活史：霉菌的生活史是指霉菌从孢子萌发开始，经过一定的生长和发育，到最后又产生孢子的过程。整个生活史中包括了无性世代和有性世代。较典型的生活史为霉菌的菌丝体（即营养体）在适宜的条件下，产生无性孢子，无性孢子萌发形成新的菌丝体，即是无性世代，如此多次重复。霉菌生长后期，可能进入有性阶段，在菌丝体上形成配子囊，从而质配、核配而形成二倍体的细胞核，接着经过减数分裂，形成单倍体的有性孢子，经历有性世代。

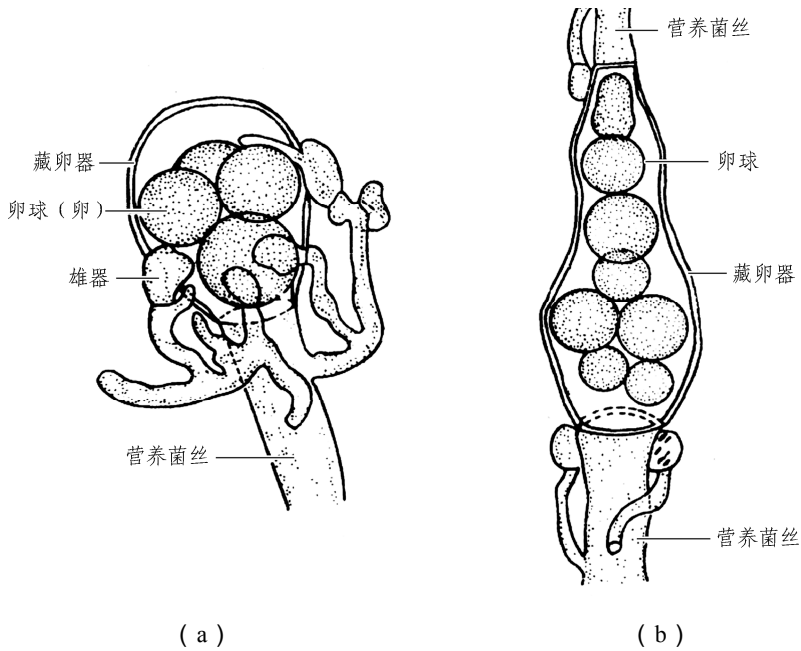


图 1-34 霉菌的卵孢子

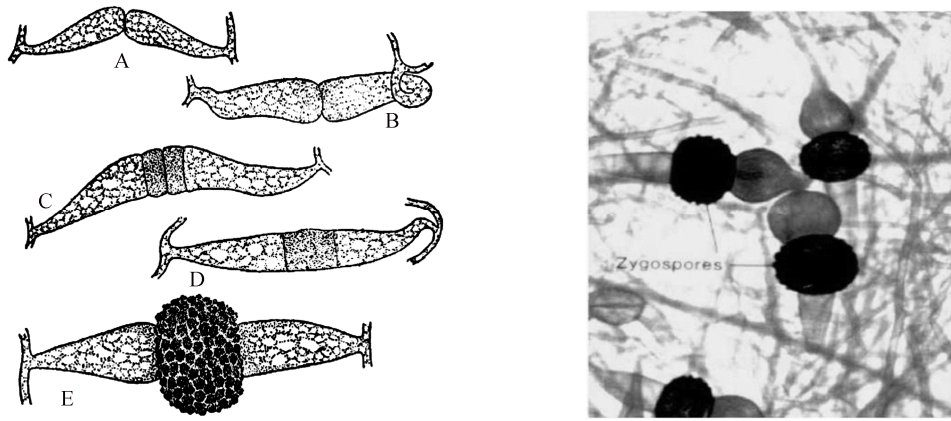


图 1-35 接合孢子的形成

A—原配子囊；B—配子囊；C、D—接合子；E—接合孢子

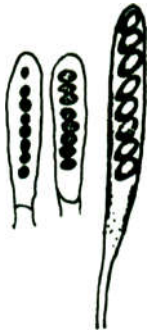


图 1-36 子囊孢子

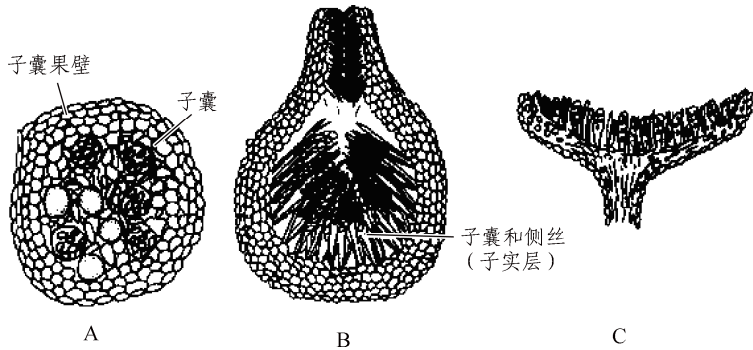


图 1-37 子囊果的 3 种类型

A—闭囊果；B—子囊果；C—子囊盘

霉菌的无性孢子通常较能抗干燥和辐射，但不耐高温，不是休眠体。只要条件适宜就能萌发。霉菌的有性孢子一般能休眠，较能耐热，经活化后才能萌发。

3. 霉菌的菌落特征

霉菌的菌落由分枝状的菌丝组成。由于霉菌的菌丝较粗而长，固体培养基上形成的菌落质地疏松，外观干燥，不透明，一般呈现绒毛状、絮状或蛛网状。由于霉菌形成的孢子有不同的形状、构造与颜色，所以菌落表面往往呈现肉眼可见的不同结构与色泽特征。有些菌丝的水溶性色素可分泌至培养基中，使得菌落背面呈现与正面不同的颜色。有些霉菌生长较快，处于菌落中心的菌丝菌龄较大，而生长在菌落边缘的菌丝则较为幼小，也可显示不同的特征。霉菌的菌落比细菌的菌落大几倍到几十倍。一般霉菌的菌落直径1~2 cm或更小。霉菌菌落的大小、颜色、形状、结构等特征，对不同的霉菌，有很大差别，可作菌种分类鉴别的依据（见图 1-38）。表 1-2 是霉菌与放线菌的菌落比较。

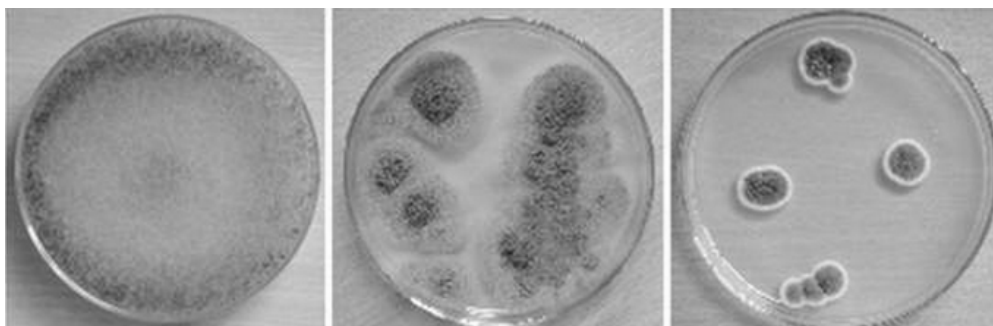


图 1-38 霉菌菌落

液体培养基培养霉菌，如果是静止培养，霉菌往往在表面上生长，液面上形成菌膜，培养基不浑浊。如果是振荡培养，形成的菌丝球可能均匀的悬浮在培养液中或沉淀于培养液底部。

4. 食品中常见的真菌

(1) 毛霉属 (*Mucor*): 毛霉是接合菌亚门中的重要类群，属接合菌纲，毛霉目，毛霉科。种类较多，在自然界广泛分布。如在土壤、空气中经常发现，是食品工业的重要微生物。毛

表 1-2 霉菌与放线菌的菌落比较

比较项目	主要特征			参考特征					
	菌落	细胞		菌落透明度	结合程度	颜色	边缘	生长速度	气味
	外观	相互关系	形态特征						
放线菌	干燥或较干燥，小而紧密，短丝状，坚实，多皱	丝状交织	细而均一，高倍镜下无法分辨	不透明	牢固结合不易挑取	多样	用低倍镜有时可见细丝状细胞	慢	常有泥腥味
霉菌	干燥，大而疏松，或小而紧密，绒毛状，絮状，蜘蛛网状	丝状交织	粗而分化，高倍镜下可见内部结构	不透明	较牢固	多样	用低倍镜有时可见粗丝状细胞	一般较快	往往有霉味

霉的淀粉酶的活力很强，可把淀粉转化为糖。在酿酒工业上多用作淀粉质原料酿酒的糖化菌。

毛霉还能产生蛋白酶，有分解大豆蛋白质的能力，多用于制作豆腐乳和豆豉。有些毛霉还能产生草酸、乳酸、琥珀酸和甘油等。

毛霉的菌丝体发达，呈棉絮状，由许多分枝的菌丝构成。菌丝无隔膜，有多个细胞核。

其无性繁殖为孢囊孢子。

毛霉生长迅速，产生发达的菌丝。菌丝一般白色，不具隔膜，不产生假根，是单细胞真菌。以孢囊孢子进行无性繁殖，孢子囊黑色或褐色，表面光滑。有性繁殖则产生接合孢子。

(2) 根霉属 (*Rhizopus*): 根霉与毛霉同属毛霉目 (*mucorales*)，很多特征相似，主要区别在于，根霉有假根和匍匐菌丝。匍匐菌丝呈弧形，在培养基表面水平生长。匍匐菌丝着生孢子囊梗的部位，接触培养基处，菌丝伸入培养基内呈分枝状生长，犹如树根，故称假根，这是根霉的重要特征。其有性繁殖产生接合孢子，无性繁殖形成孢囊孢子。

根霉菌菌丝体白色、无隔膜、单细胞，气生性强，在培养基上交织成疏松的絮状菌落，生长迅速，可蔓延覆盖整个表面 (图 1-39A)。

在自然界分布很广，空气、土壤以及各种器皿表面都有存在。并常出现于淀粉质食品上，引起馒头、面包、甘薯等发霉变质，或造成水果蔬菜腐烂。

根霉在生命活动过程中能产生淀粉酶、糖化酶，是工业上有名的生产菌种。有的用作发酵饲料的曲种。我国酿酒工业中，用根霉作为糖化菌种已有悠久的历史，同时也是家用甜酒曲的主要菌种。近年来在甾体激素转化、有机酸（延胡索酸、乳酸）的生产中被广泛利用。

常见的根霉有匍枝根霉 (*Rhizopus stolonifer*) (即黑根霉 (*Rhizopus nigricans*) 俗称面包霉)，米根霉 (*Rhizopus oryzae*) 等。

(3) 曲霉属 (*Aspergillus*): 是发酵工业和食品加工业的重要菌种，已被利用的近 60 种。2000 多年前，我国就用于制酱，也是酿酒、制曲的主要菌种。现代工业利用曲霉生产各种酶制剂（淀粉酶、蛋白酶、果胶酶等）、有机酸（柠檬酸、葡萄糖酸、五倍子酸等），农业上用作糖化饲料菌种。例如黑曲霉、米曲霉等。

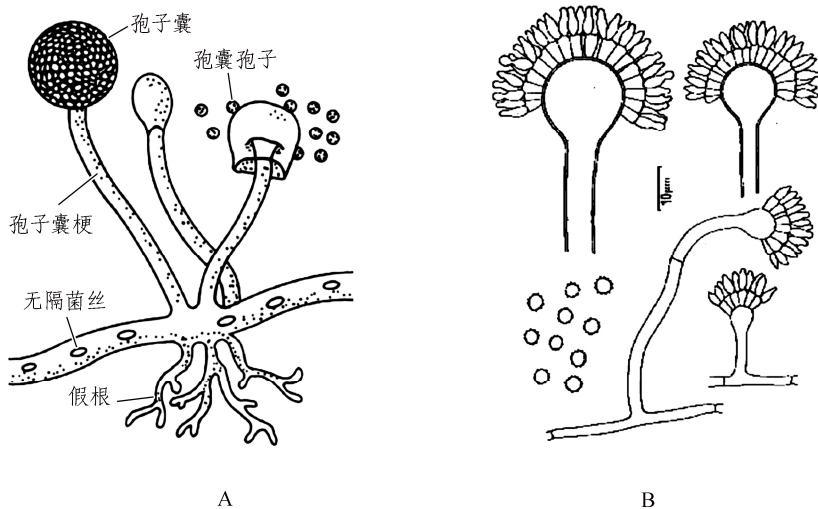


图 1-39 根菌

A—根霉；B—曲霉

曲霉广泛分布在谷物、空气、土壤和各种有机物品上。生长在花生和大米上的曲霉，有

的能产生对人体有害的真菌毒素，如黄曲霉毒素 B1 能导致癌症，有的则引起水果、蔬菜、粮食霉腐。

曲霉菌丝有隔膜，为多细胞霉菌。在幼小而活力旺盛时，菌丝体产生大量的分生孢子梗。分生孢子梗顶端膨大成为顶囊，一般呈球形。顶囊表面长满一层或两层辐射状小梗（初生小梗与次生小梗）。最上层小梗瓶状，顶端着生成串的球形分生孢子。以上几部分结构合称“孢子穗”。孢子呈绿、黄、橙、褐、黑等颜色。这些都是菌种鉴定的依据。分生孢子梗生于足细胞上，并通过足细胞与营养菌丝相连（图 1-39B）。曲霉孢子穗的形态，包括分生孢子梗的长度、顶囊的形状、小梗着生是单轮还是双轮，分生孢子的形状、大小、表面结构及颜色等，都是菌种鉴定的依据。

曲霉属中的大多数仅发现了无性阶段，极少数可形成子囊孢子，故在真菌学中仍归于半知菌亚门。

（4）青霉属（*Penicillium*）：是产生青霉素的重要菌种。广泛分布于空气、土壤和各种物品上，常生长在腐烂的柑桔皮上呈青绿色。目前已发现几百种，其中黄青霉（*Penicillium chrysogenum*）、点青霉（*Penicillium notatum*）等都能大量产生青霉素。青霉素的发现和大规模地生产、应用，对抗生素工业的发展起了巨大的推动作用。此外，有的青霉菌还用于生产灰黄霉素及磷酸二酯酶、纤维素酶等酶制剂、有机酸。

青霉菌菌丝与曲霉相似，但无足细胞。分生孢子梗顶端不膨大，无顶囊，经多次分枝，产生几轮对称或不对称小梗，小梗顶端产生成串的青色分生孢子。孢子穗形如扫帚。因此把青霉属分为 4 组。即一轮青霉，分生孢子梗只有一轮分枝；二轮青霉分生，孢子梗产生两轮

分枝；多轮青霉分生孢子梗具3轮以上分枝；不对称青霉，分生孢子梗上不对称地产生或多或少轮层的分枝。孢子穗的形态构造是分类鉴定的重要依据。青霉属中大多数种的有性阶段至今还不知道。

(5) 脉孢菌属 (*Neurospora*): 因子囊孢子表面有纵形花纹，犹如叶脉而得名，又称链孢霉。它具有疏松网状的长菌丝，有隔膜、分枝、多核；无性繁殖形成分生孢子，一般为卵圆形，在气生菌丝顶部形成分枝链，分生孢子呈桔黄色或粉红色，常生在面包等淀粉性食物上，故俗称红色面包霉。脉孢菌的有性过程产生子囊和子囊孢子，属异宗配合。一株菌丝体形成子囊壳原，另一株菌丝体的菌丝与子囊壳原的菌丝结合，两株菌丝中的核在共同的细胞质中混杂存在，反复分裂，形成很多核；两个异宗的核配对，形成很多二倍体核，每个结合的核包在一个子囊内；子囊里的二倍体核经两次分裂形成4个单倍体核；再经一次分裂，则成为8个单倍体核，围绕每个核发育成一个子囊孢子。每个子囊中有8个子囊孢子。

此时，子囊壳原发育成子囊壳。子囊壳圆形，具有一个短颈，光滑或具松散的菌丝，褐色或褐黑色，在一般情况下，脉孢菌很少进行有性繁殖。

脉孢菌是研究遗传学的好材料。因为它的子囊孢子在子囊内呈单向排列，表现出有规律的遗传组合。如果用两种菌杂交形成的子囊孢子分别培养，可研究遗传性状的分离及组合情况。在生化途径的研究中也被广泛应用。此外，菌体内含有丰富的蛋白质、维生素B12等。有的用于发酵工业。最常见的菌种如粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)、好食脉孢菌 (*Neurospora sitophila*)。有的可造成食物腐烂。

(6) 交链孢霉属 (*Alternaria*): 是土壤、空气、工业材料上常见的腐生菌，植物的叶子、

种子和枯草上也常见到，有的是栽培植物的寄生菌。菌丝暗至黑色，有隔膜，以分生孢子进行无性繁殖。分生孢子梗较短，单生或丛生，大多数不分枝，与营养菌丝几乎无区别。分生孢子呈纺锤状或倒棒状，顶端延长成喙状，多细胞，有壁砖状分隔，分生孢子常数个成链，一般为褐色。尚未发现有性世代。有些菌种可用于生产蛋白酶，某些种可用于甾族化合物转化。

(7) 红曲属 (*Monascus*): 属散囊菌目，红曲科。由于能产生红色色素，可用作食品加工中天然红色色素的来源，如在红腐乳、饮料、肉类加工中用的红曲米，就是用红曲霉制作的。常用的菌种为紫红曲 (*M. purpureus*)。

紫红曲在麦芽汁琼脂上菌落成膜状的蔓延生长物，菌丝体最初白色，以后呈红色，红紫色，色素可分泌到培养基中。闭囊壳为橙红色，球形，子囊球形，含8个子囊孢子。子囊孢子卵圆形、光滑、无色或淡红色。分生孢子着生在菌丝及其分支的顶端、单生或成链、球形或梨形。

(8) 赤霉属 (*Gibberella*): 在真菌分类中属于核菌纲，球壳菌目，肉座霉科。其有性繁殖产生子囊和子囊孢子。子囊壳球状，光滑，为蓝色。子囊长棒形，内含8枚子囊孢子，排列成两个不规则的行，子囊孢子直而狭长。

赤霉菌在自然环境和人工培养条件下都很少产生有性世代，一般按其无性分生孢子世代进行鉴定，其菌落为棉絮状，白色或有色。菌丝有隔膜，分枝，无色或有色。分生孢子梗分枝或不分枝。其无性世代产生的分生孢子有两种类型，一种为小型分生孢子，为单细胞，有圆形，卵形到长柱形。另一类型为大型分生孢子，由多个细胞组成，有隔膜，孢子呈镰刀形

或长柱形。两种类型的孢子都在菌丝顶端串生或集聚成团，无色或有各种颜色。

赤霉属包括许多寄生植物的病原菌。有的赤霉可起水稻秧苗的疯长，水稻秧苗变黄，瘦弱。因此，赤霉菌又叫水稻恶苗病菌。在研究这种病菌时发现，水稻秧苗的疯长是由于赤霉菌所产生的赤霉素的作用，赤霉素是赤霉菌的代谢产物，是一种激素，除能刺激植物生长以外，还能打破种子和块茎器官的休眠，对蔬菜，特别是叶菜类的增产中有一定的作用。

(9) 木霉属 (*Trichoderma*): 木霉属于半知菌，分布较广，在朽木，种子，动植物残体，有机肥料，土壤和空气中都有木霉存在。木霉也常寄生于某些真菌的子实体上。栽培蘑菇中有时会污染木霉。但对木霉的利用比较广泛，如木霉分解纤维素的能力很强，可用来制备纤维素酶。有的木霉能合成核黄素，并可转化甾体，也有的木霉能产生抗生素。

木霉的菌落生长迅速，棉絮状，开始为白色，以后呈绿色，产孢区常排列成同心轮纹。菌丝无色，有隔膜，有分枝，并有厚垣孢子。分生孢子梗呈对生或互生分枝，分枝上还可再分枝，分枝顶端着生瓶状小梗，由小梗生出多个分生孢子。由黏液聚成球形孢子头，分生孢子呈球形或椭圆形，光滑或粗糙，孢子为黄绿色。

(10) 虫草属 (*Cordyceps*): 虫草属真菌寄生于昆虫，把虫体变成充满菌丝的僵虫，从僵虫前端生出有柄头状或棍棒状的子座。

此属最常见的是冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*)，它寄生在鳞翅目昆虫的幼虫上，被害的昆虫(如尺蠖)冬天钻入土内，夏天虫草菌从被害虫体生出一有柄的子座(即所谓的草)。子座单个，罕见 2~3 个，长 4~11 cm，基部粗 1.5~4 mm，向上渐细，头部不膨大或膨大成圆柱形，褐色，初期内部充实，后变中空。子囊壳椭圆形至卵形，生在子座近表面，基部稍

陷于子座内。子囊产生在子囊壳内，细长。每个子囊内含有 2 个具隔膜的子囊孢子，子囊孢子透明，线状。

(11) 伞菌属 (*Agaricus*): 又称蘑菇属。伞菌属的担子果为蕈子，菌盖肉质，菌盖腹面有辐射状的蕈褶，在蕈褶内形成担子和担孢子。蕈柄肉质，容易与菌盖分离，有菌环。孢子卵圆形或椭圆形。本属有几十个种，生于田野和林中土壤上，大部分的种可食用，少数有毒。最普遍的栽培种是洋蘑菇 (*Agaricus bisporus*) (即双孢蘑菇)。

(12) 灵芝属 (*Ganoderma*): 担子果一年生或多年生，木质或木栓质，有柄或无柄。菌盖表面有坚硬的皮壳，它的柄或菌盖从下端到上端都覆盖着一层坚硬的像漆一样有光泽的物质。菌盖腹面多管孔，管孔内生担子和担孢子。本属真菌是分解纤维素、木质素能力较强的一类真菌，在各种阔叶树林、针阔叶混交林的腐木上或木桩上可以找到。有的种类是重要药材，如灵芝 (*Ganoderma lucidum*)、紫芝 (*Ganoderma japonicum*) 等。

(13) 木耳属 (*Auricularia*): 木耳属的担子果杯状、耳状或叶状，全部胶质或仅子实层胶质。子实层平滑，有皱折或网格。担子圆柱形，有 3 个横隔，将担子隔成 4 个细胞，每个细胞上产生一个小梗，小梗上生担孢子。

本属在我国最常见的是木耳，亦即黑木耳。黑木耳是一种营养丰富的食用菌，并且还有药用价值，是保健食品。黑木耳在我国的分布很广，北自黑龙江，南到海南岛，西自甘肃，东至福建和台湾都可生长和栽培。

黑木耳是一种木材腐朽菌，能分解纤维素和木质素。由于它是一种腐生性很强的真菌，故只在死了的木头上才能生长、吸取养分。

二、霉菌制片染色原理

霉菌菌丝和孢子的大小通常比细菌和放线菌大得多，因此用低倍镜即可观察。霉菌菌丝细胞还容易收缩变形，且孢子也容易飞散，所以制标本时不将菌体置于水中，常用乳酸石炭酸棉蓝染色液。此染色液制成的霉菌标本片的特点是细胞不变形；具有杀菌防腐作用，且不易干燥，能保持较长时间；能防止孢子飞散；溶液本身呈蓝色，能增强反差，具有较好的染色效果。

利用培养在玻璃纸上的霉菌作为观察材料，可以得到清晰、完整、保持不同生长阶段自然状态的霉菌形态；也可以直接挑取生长在平板中的霉菌菌体制水浸片观察。

【知识拓展】

一、其他原核微生物—蓝细菌

蓝细菌在过去曾一直被称为蓝藻或蓝绿藻，它是一类含有叶绿素、具有产氧性光合作用的、古老的原核微生物。

蓝细菌分布广泛，存在于淡水、海水和土壤中，富营养的湖泊或水库中所见到的水华就是蓝细菌形成的。

1. 蓝细菌的形态

蓝细菌形态多样。单细胞呈球状或杆状；多细胞排列成丝状，包括有异形胞的丝状蓝细菌（如鱼腥蓝细菌属）和分支的丝状蓝细菌（如飞氏蓝细菌属）（见图 1-40）。

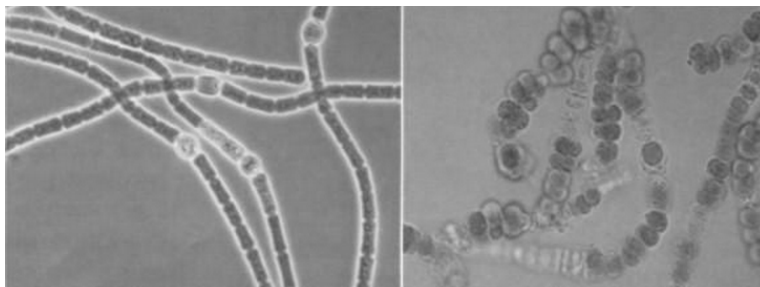


图 1-40 有异型细胞的蓝细菌

细胞直径一般为 $0.5 \sim 1.0 \mu\text{m}$ ，大的达 $60 \mu\text{m}$ ，如巨颤蓝细菌是已知原核微生物中较大的细胞。

2. 蓝细菌的结构

细胞结构类似于革兰氏阴性细菌，细胞壁含肽聚糖，外有脂多糖层，细胞壁外有黏胶质形成的黏膜外套或鞘。多数丝状蓝细菌无鞭毛，但可作滑行运动。

大多数蓝细菌由于兼有藻蓝素和叶绿素 a 而呈蓝绿色。缺乏氮素时，藻蓝素被降解而呈绿色。藻红素使某些蓝细菌呈红色或棕色。异型细胞含丰富的固氮酶，是蓝细菌生物固氮的场所。

3. 蓝细菌的繁殖

只发现蓝细菌的无性繁殖。单细胞蓝细菌进行二分裂或多分裂。多数丝状蓝细菌进行单平面方向的分裂，分支的丝状蓝细菌则进行多平面方向的分裂产生静息孢子。此外，丝状蓝细菌还可通过其丝状体断裂形成短片段（段殖体）的方式进行繁殖。

二、病 毒

病毒是在 19 世纪末才被发现的—类极其微小的非细胞生物。广泛寄生于各类微生物、植物、动物和人类的细胞中，随着研究的深入，现代病毒学家已把这类非细胞生物分成病毒和亚病毒两大类。本节阐述病毒。

1. 病毒概念和特点

(1) 病毒的概念：病毒是一类超显微的、结构极其简单、专性活细胞内寄生的非细胞微生物，在活细胞外能以无生命的化学大分子状态长期存在并保持侵染活性。

(2) 病毒的基本特征：与其他生物相比，病毒具有以下几个重要特征。

① 形体极其微小。常用纳米 (nm) 度量，直径多数为 100 nm (20 ~ 200 nm) 上下。一般都能通过细菌滤器，必须电子显微镜才能观察，因此又称超显微生物。

② 没有细胞构造。其主要成分仅为核酸和蛋白质两种，而且只含一种核酸 (DNA 或 RNA) 故又称“分子生物”。

③ 专性寄生。病毒没有完整的酶系统，只能利用宿主活细胞内现成的代谢系统复制合成自身的核酸和蛋白质来实现自己的增殖。所以不能独立生活只能专性寄生。

④ 在离体条件下，病毒能以无生命的生物大分子状态存在，并可长期保持其侵染活力。

⑤ 病毒对一般抗生素不敏感，但对干扰素敏感。

⑥ 有些病毒的核酸还能整合到宿主的基因组中，并诱发潜伏性感染。

2. 病毒的分类

按病毒感染宿主的种类，将病毒分为植物病毒、动物病毒、微生物病毒。

(1) 植物病毒：植物病毒大多数是单链 RNA 病毒，植物病毒寄生的植物专一性不强，一种病毒往往能寄生在不同的科、属、种的植物上，如烟草花叶病毒能侵染十几个科、百余种植物。昆虫传播是自然条件下植物病毒最主要的传播途径；嫁接也是植物病毒传染的途径；病株的汁液接触健康植株的伤口也可以传染。

(2) 动物病毒：动物病毒是寄生于人与动物细胞内，能引起人和动物多种疾病。如流感、麻疹、腮腺炎、肝炎、艾滋病、狂犬病、非典、甲流、禽流感、口蹄疫等疾病都是由动物病毒感染一起的。动物病毒传播迅速、流行广泛、危害严重，一般通过接触、呼吸、饮食等传

播，应提高防范意识，做到防患于未然。

(3) 微生物病毒：微生物病毒分为细菌噬菌体和真菌病毒。

① 细菌噬菌体：寄生于细菌或放线菌的病毒为噬菌体。噬菌体具有病毒的共同特点，有严格的寄生性。噬菌体分布广、种类多，一直以来是研究分子生物学的一种重要的实验材料，其危害主要存在于发酵工业中。

② 真菌病毒：首先发现于双孢蘑菇中，后又在玉米黑粉病菌、牛肝菌、香菇、啤酒酵母等中也有发现，产黄青霉、黑曲霉中也发现有病毒颗粒，与食用菌生产、工业发酵等密切相关。

3. 病毒形态、结构和化学组成

(1) 病毒形态：成熟具有侵染力的病毒称为病毒粒子。其形态多样（见图 1-41），一般分为 5 类。

① 球状或近球形：人、真菌或动物多为球状病毒，如腺病毒、脊髓灰质炎病毒等。

② 杆状或丝状：杆状病毒（包括棒状或线状）。许多植物病毒多呈杆状，如烟草花叶病毒、苜蓿花叶病毒等。

③ 蝌蚪形：大多数噬菌体为蝌蚪型病毒，如 T 偶数噬菌体。

④ 砖形形：常见的如天花病毒，痘病毒等。

⑤ 子弹型：如植物弹状病毒、狂犬病病毒等。

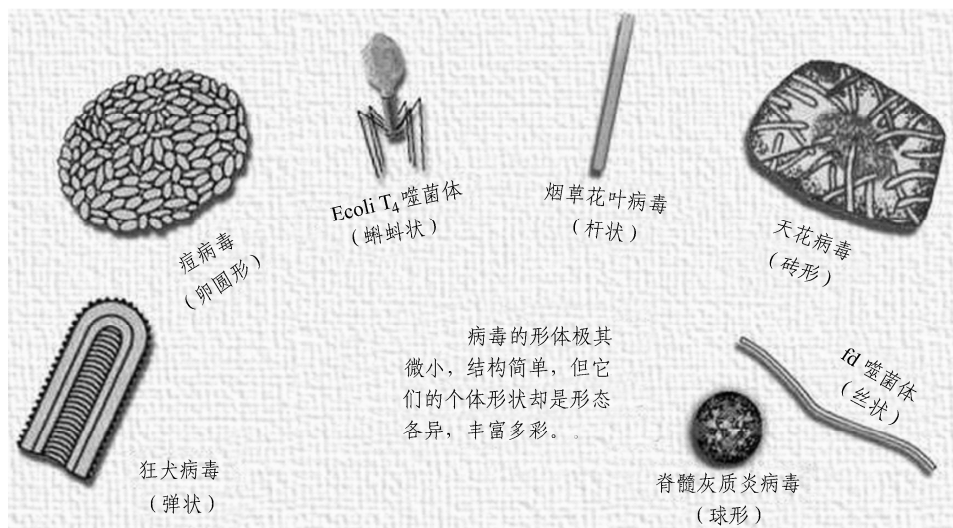


图 1-41 常见的几种病毒形态

(2) 病毒的结构和化学组成：病毒粒子主要有蛋白质和核酸组成，核酸位于病毒粒子中心构成其核心 (DNA 或 RNA)；蛋白质包围于核心的周围，即病毒粒子的衣壳。核心和衣壳合称核壳，构成了病毒的基本结构。最简单的病毒就是核壳体，较为复杂的外边还有包膜、刺突等 (见图 1-42)。

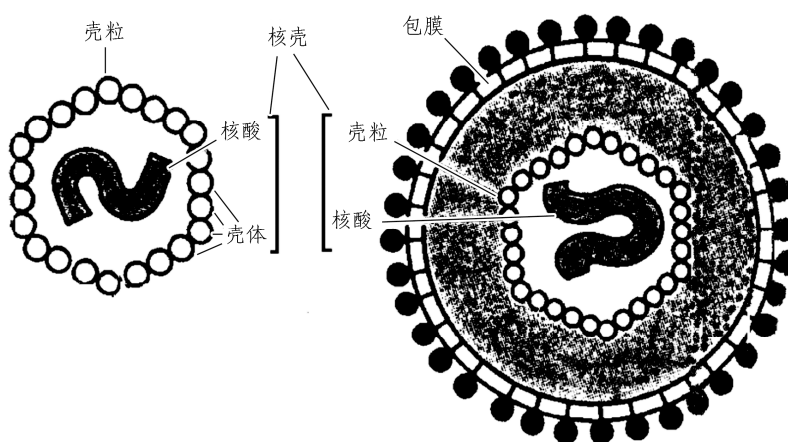


图 1-42 病毒结构图

① 核酸：一种病毒只有有一种核酸，核糖核酸或脱氧核糖核酸 (DNA 或 RNA)；核酸构成病毒的基因组，其在大小、结构和核苷酸的组成上是多种多样的，有线状、环状、双链

DNA、单链 DNA、双链 RNA、单链 RNA。病毒的基因组携带着病毒的全部遗传信息，决定着病毒的遗传特性。

② 衣壳：即蛋白质外壳，由壳粒组成，壳粒是构成病毒粒子的最小的形态单位，是有一定数量的蛋白质亚单位按一定排列程序组成的，也称为衣壳粒。

③ 包膜：有的病毒在壳体外层还具有一双层膜，主要成分是蛋白质、多糖、脂类。是病毒粒子穿过被侵染细胞核膜或原生质膜形成的。具有维系病毒粒子结构保护核衣壳的作用。

包膜可能含有少量的糖蛋白，具有多种生物活性，与病毒吸附和穿入寄主有关。

4. 病毒的复制

病毒没有完整的酶系统，只能依靠活的宿主细胞进行复制，由病毒基因组的核酸指令宿主细胞复制大量病毒核酸和蛋白质，最后装配成病毒粒子，并从宿主细胞内释放出来。病毒的这种繁殖方式称为病毒的增殖或复制。其过程可分为吸附、侵入、复制、装配以及释放等 5 个阶段。现以研究得最清楚的噬菌体为例来说明（见图 1-43）。

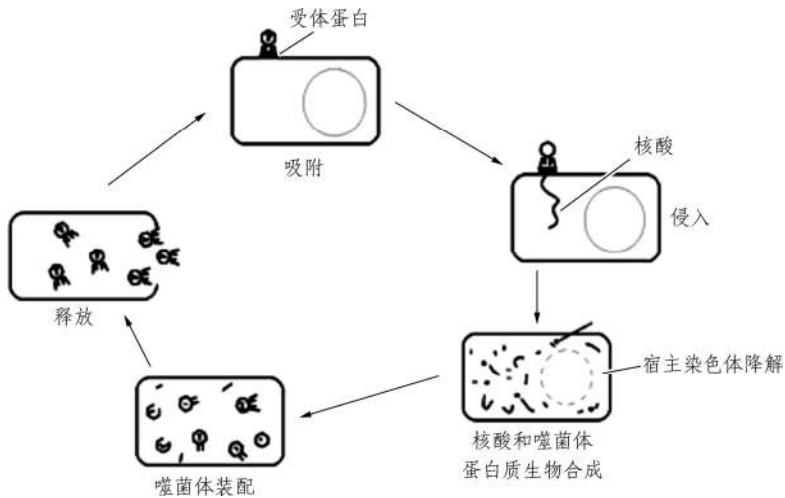


图 1-43 大肠杆菌 T 系噬菌体增殖过程

电子显微镜观察下，噬菌体有 3 种形态 微球型、丝型、蝌蚪型（见图 1-44）。

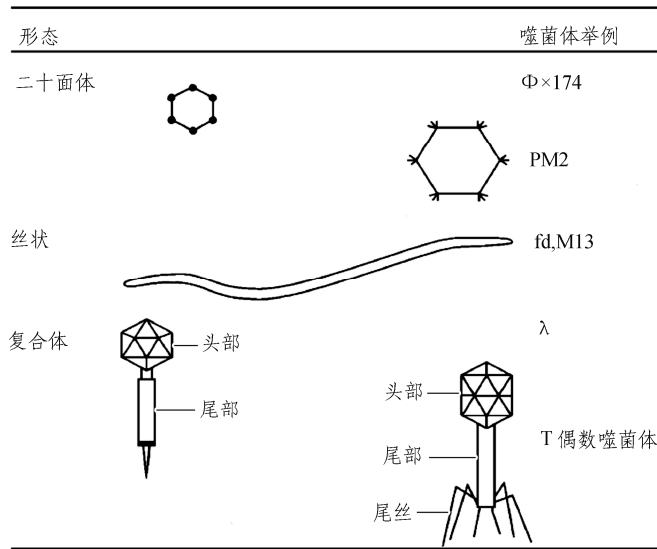


图 1-44 典型的噬菌体形态

大多数噬菌体呈蝌蚪型，如大肠杆菌 T4 噬菌体。头部立体对称，内含遗传物质 DNA，尾部是一管状结构，由中空的尾髓和外面的尾鞘组成。尾髓具收缩功能，可使头部核酸注入寄主体内。尾部末端有基板、尾丝和尾刺，基板内有溶菌酶，尾丝为噬菌体的吸附器官，能识别寄主表面的特殊受体。头、尾连接处有一尾领结构，称为颈部，可能与头部核酸的装配有关（见图 1-45）。

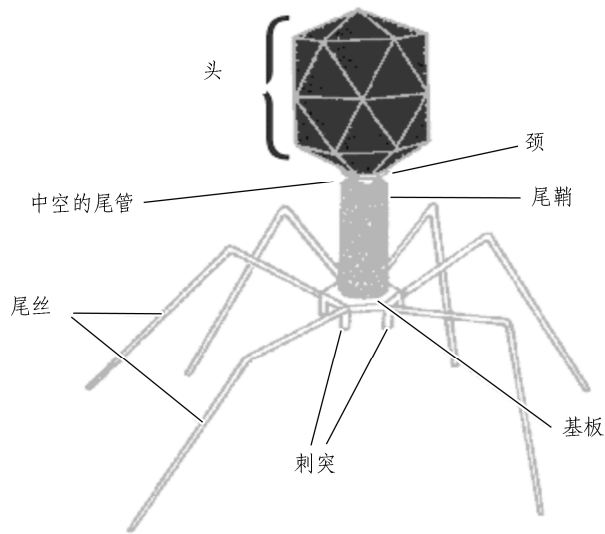


图 1-45 T₄ 噬菌体结构示意图

(1) 吸附：噬菌体与寄主接触，附着在细胞表面的特异受体，噬菌体的尾部由此吸附侵入，这是高度特异性的反应。吸附时噬菌体末端尾丝散开，固着在特异性受点上，基板和刺突也固着于特异性受点。

(2) 侵入：当噬菌体尾部插于寄主细胞特异受点，在噬菌体头部的溶菌酶溶解寄主细胞壁肽聚糖产生一个小孔，噬菌体通过长的尾丝吸附和基板接触细胞壁之后，尾鞘收缩露出尾髓，将尾髓伸于寄主细胞，通过空管的尾髓将噬菌体的 DNA 注入寄主细胞内，噬菌体蛋白质外壳留在寄主细胞外。

(3) 复制：噬菌体的核酸进入寄主细胞后，借助寄主细胞的代谢机构和酶系统，大量复制噬菌体的遗传物质，合成噬菌体的衣壳蛋白质。

(4) 组装：一旦噬菌体衣壳成分和核酸充分合成，新的衣壳包装核酸，完成子代噬菌体的组装。

(5) 释放：子代噬菌体成熟时，溶解寄主细胞壁的溶菌酶增加促使寄主细胞裂解而释放

大量的子代噬菌体。

以上噬菌体的生活周期常称为裂解周期或溶菌周期，而这种噬菌体称为烈性噬菌体。被噬菌体裂解的细菌称敏感性细菌。

某些噬菌体，侵入寄主细胞后，没有立即使寄主细胞裂解，而是噬菌体的基因组整合到寄主细胞的染色体上，随染色体复制而复制，并随寄主细胞的分裂而传至下一代，这种噬菌体称为溶源性噬菌体或温和噬菌体，这种过程成为溶源现象（见图 1-46）。整合到细菌基因组上的噬菌体基因称为原噬菌体或前噬菌体。带有原噬菌体基因组的细菌称为溶源性细菌。

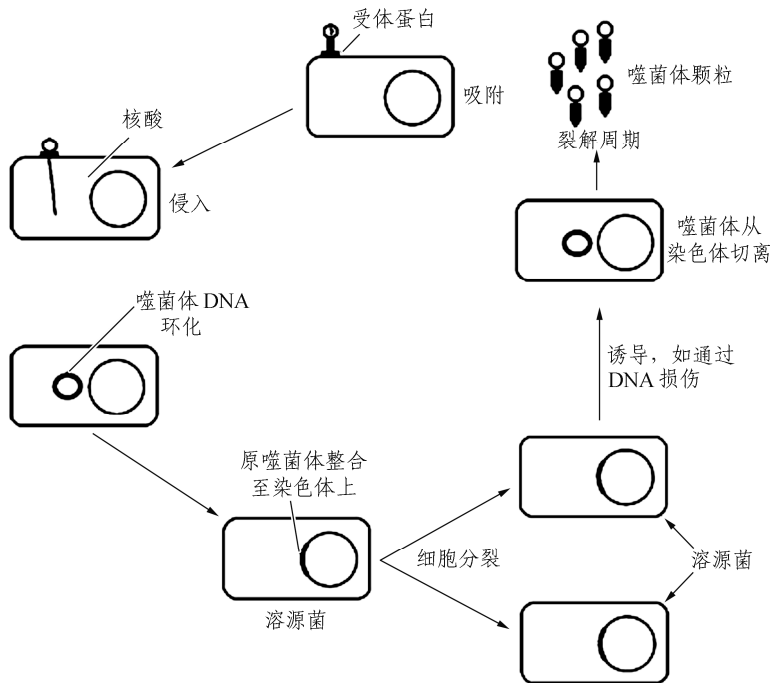


图 1-46 溶源菌噬菌体的生活周期

在溶源细菌中极少数会自发地发生原噬菌体大量复制、成熟，导致寄主细胞裂解，这种现象称为溶源细菌的自发裂解。原噬菌体在生物因素或其他物理、化学方法诱导下，进入溶菌周期，释放成熟噬菌体，导致细菌裂解，这就是溶源细菌的诱发裂解。

烈性噬菌体颗粒感染细菌后可迅速生成几百个子代噬菌体，每个子代噬菌体又可感染细菌细胞再生成几百个噬菌体颗粒。当把少量噬菌体与大量敏感性细菌混合培养在琼脂平板中，在平板表面布满细菌菌苔上，用肉眼可以看到一个个透明的空斑，称为噬菌斑（见图 1-47）。若把噬菌体接种于含有敏感菌的液体培养基中，可观察到液体培养基出现澄清现象。

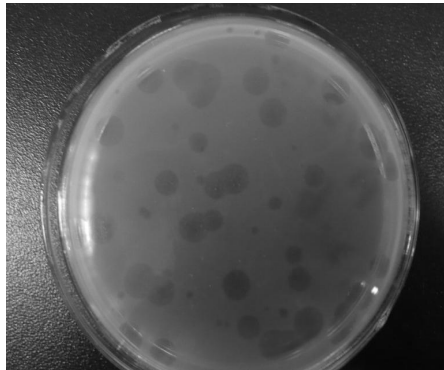


图 1-47 噬菌斑

5. 发酵工业噬菌体的检测与预防

发酵工业生产过程中，噬菌体污染生产菌种，造成菌体裂解，无法积累发酵产物，损失极其严重。感染发酵菌种的噬菌体有烈性噬菌体，也有温和噬菌体。噬菌体感染菌种后，会导致发酵菌种生物学特性的改变，如菌体生长迟缓、产酸能力下降等，从而造成发酵产物的品质低下。

(1) 噬菌体的检测：噬菌体个体极小，在光学显微镜下不能看见，在人工培养基上又无法生长，所以只能采用间接方法对其进行监测。检测噬菌体的方法主要是根据噬菌体的生物学特性而设计的。比如依据噬菌体对宿主细胞的高度特异性，利用敏感菌株对其进行培养；也可依据噬菌体侵染细胞后引起裂解，通过观察在琼脂平板上是否出现噬菌斑或在液体培养基中培养物是否变清来进行判断。若每个噬菌体产生一个噬菌斑，则根据在固体培养基上形成的噬菌斑数，可测得每毫升试样中所含有的侵染性的噬菌体粒子数，即噬菌体效价，也即

噬菌斑形成单位 (plaque-formingunit , pfu) 数。噬菌体常用的检测方法有载片快速检测法、双层平板法和单层平板法。

① 载片快速检测法 :载片快速检测法是将噬菌体和敏感的宿主细胞与适量的琼脂培养基 (约含 0.5% ~ 0.8% 琼脂 , 事先熔化) 充分混合 , 涂布在无菌载片上 , 经短期培养后 , 即可在低倍显微镜或放大镜下计数 , 但其精确度相对较差。

② 双层平板法 :双层平板法是一种被普遍采用并能精确测定效价的方法。由于试样中一般噬菌体粒子含量较高 , 故应先对试样进行梯级稀释 , 然后再测定。

双层平板法的步骤如下 : 预先分别配制含 2% 琼脂的底层培养基和 1% 琼脂的上层培养基。先用前者在培养皿上浇一层平板 , 再在后者 (须先熔化并冷却到 45 °C 以下) 中加入较浓的对数期敏感菌和一定体积的待测噬菌体样品 , 于试管中充分混匀后 , 立即倒在底层平板上铺平待凝 , 然后保温。一般经 10 余小时后即可进行噬菌体计数。

双层平板法的优点是定量性好 , 由于上层培养基中琼脂较稀 , 故形成的噬菌斑较大 , 容易计数 ; 而且全部噬菌体斑都接近处于同一平面上 , 因此边缘清晰 , 无上下噬菌斑的重叠现象。其缺点是费时、麻烦。

③ 单层平板法 : 与双层平板法相比 , 单层平板法省略了底层平板 , 但所用培养基浓度高 , 加的量也多。此法虽较简便 , 但由于全部噬菌体斑不在同一平面上 , 彼此重叠 , 实验效果较差。

(2) 噬菌体的预防措施 : 发酵工业生产上 , 发酵菌种一旦被噬菌体污染会造成巨大的损失。具体表现为发酵周期明显延长 , 碳源消耗缓慢 , 发酵液变清 , 镜检时有大量异常菌体出

现，发酵产物的形成缓慢或根本不形成，用敏感菌做平板检查时，出现大量噬菌斑，用电子显微镜观察时可见到有无数噬菌体粒子存在。因此，噬菌体的污染对发酵工业等是一个很大的威胁，例如在谷氨酸发酵、细菌淀粉酶或蛋白酶发酵、丙酮丁酸发酵及各种抗生素发酵中司空见惯，而且目前对污染噬菌体的发酵菌液还无法阻止其溶菌作用，故只有预防其感染，建立“防重于治”的观念。

发酵工业生产上，预防噬菌体污染的措施主要有：加强灭菌，包括发酵管道、操作人员等；严格保持环境卫生；认真检查斜面、摇瓶及种子罐所使用的菌种，坚决废弃任何可疑菌种；空气过滤器要保证质量并经常进行严格灭菌，空气压缩机的取风口应设在 30~40 m 高空；决不排放或随便丢弃活菌液，摇瓶菌液、种子液、检验液和发酵后的菌液绝对不能随便丢弃或排放；正常发酵液或污染噬菌体后的发酵液均应严格灭菌后才能排放；不断筛选抗性菌种，并应经常轮换生产菌种。

若发现噬菌体污染时，要及时采取合理措施。主要有以下措施：及时改用抗噬菌体生产菌株；使用药物抑制，例如在谷氨酸发酵中，加入某些金属螯合剂（如 0.3%~0.5% 草酸盐、柠檬酸铵）可抑制噬菌体的吸附和侵入；加入 1~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 金霉素、四环素或氯霉素等抗生素或聚氧乙烯烷基醚等表面活性剂均可抑制噬菌体的增殖或吸附；尽快提取产品，如果发现污染时发酵液中的代谢产物含量已较高，即应及时提取或补加营养并接种抗噬菌体菌种后再继续发酵，以挽回损失。

【作业习题】

1. 什么是微生物？它包括哪些类群？

2. 简述微生物的特点。
3. 试比较原核微生物和真核微生物的区别。
4. 试举例说明不用显微镜观察，也可证明在我们的生活环境中，到处都有细菌在活动。
5. 细菌有哪几种基本形态？其中球菌的空间排列方式有哪几种？
6. 什么是革兰氏染色法？革兰氏染色的机理是什么？它的主要步骤是什么？哪一步是关键？为什么？
7. 什么叫荚膜？其化学成分和生理功能如何？
8. 什么叫鞭毛？其化学成分、结构和生理功能如何？细菌鞭毛着生的方式有哪几类？
9. 什么叫芽孢？其结构、化学成分和生理功能如何？研究细菌的芽孢有何实践意义？
10. 什么叫菌落？
11. 细菌的繁殖过程如何？
12. 什么是放线菌的基内菌丝、气生菌丝和孢子丝？它们之间有何联系？
13. 试述酵母细胞的形态结构、酵母菌的菌落特征、举例说明酵母菌生活史。
14. 试述霉菌的细胞结构特征。
15. 霉菌可形成哪几种无性孢子，有哪几种有性孢子？
16. 举例说明霉菌菌落的主要特征。
17. 简述食品中常见的酵母菌和霉菌。

