

微生物学基础知识与 实验指导

钱存柔·董碧虹 编



科学出版社

微生物学基础知识 与实验指导

钱存柔 董碧虹 编



北林图 A00067888



科学出版社

1979

025072

内 容 简 介

本书是一本中级科普读物，着重介绍了微生物学基础知识和实验的基本操作方法，其中包括微生物形态学，微生物的营养和生长，微生物的代谢活动，微生物菌种的选育和保藏以及微生物学实验指导等六个部分。书末附有微生物的接种技术，常用培养基的配制，常用染液、指示剂的配制以及常用试剂、溶液的配制等四个附录。本书可供具有中等文化的广大工农兵、干部、科技工作者和青年阅读，也可供大专院校生物、医、农专业师生参考。

微生物学基础知识与实验指导

钱存柔 董碧虹 编

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1979年1月第一版 开本：787×1092 1/32
1979年1月第一次印刷 印张：10
印数：0001—46,030 字数：195,000

统一书号：13031·912

本社书号：1203·13-9

定 价：0.80元

目 录

第一部分 微生物形态学	1
第一章 细 菌	4
第二章 放线菌	15
第三章 酵母菌	20
第四章 霉 菌	23
第五章 病 毒	33
第二部分 微生物的营养和生长	47
第六章 微生物的营养	47
第七章 微生物的生长及其控制	66
第三部分 微生物的代谢活动	83
第八章 微生物生命活动中的酶	83
第九章 微生物对不含氮有机物的分解	92
第十章 微生物的氮素代谢	115
第十一章 化学治疗剂及抗菌素的作用机制	144
第四部分 微生物菌种的选育和保藏	156
第十二章 微生物的选种	162
第十三章 微生物诱变育种的原理和方法	171

第十四章 微生物的菌种保藏和复壮	186
微生物学展望	195
第五部分 微生物学实验指导	207
实验须知	207
第十五章 培养基与灭菌法	208
第十六章 微生物的纯种分离与菌种保藏	220
第十七章 微生物的形态观察	228
第十八章 细菌的生理生化反应	248
第十九章 微生物的生长与环境条件的影响	261
第二十章 菌种的诱变	274
第二十一章 微生物引起的物质转化过程的观察	276
附录一 微生物的接种技术	293
附录二 常用培养基的配制	297
附录三 常用染液、指示剂的配制	306
附录四 常用试剂、溶液的配制	311

第一部分 微生物形态学

微生物包括一大类个体微小、结构简单的生物。和我们一般常见的动物或植物不同,它们多数是单细胞,少数是多细胞的个体,甚至还有一些是无细胞结构的大分子生物。因此,微生物对一般人来说是比较生疏的,我们只有在光学显微镜或电子显微镜下才能看见它们。然而,不易见到并不意味着它们和我们没有关系,实际上微生物和人们的生活关系是很密切的。首先,很多人、畜、禽、及植物的传染病是由微生物引起的。其次,它们很多有益的活动也是人们日常生活中所熟知的,如发面要用酵母、泡菜是乳酸菌的作用、青霉素是青霉菌的发酵产物、酱油和醋也都是微生物参加酿造的。

微生物种类很多,但它们都有如下的特点:

1. 分布广、种类多:微生物是一个十分庞杂的生物类群,它们具有各种生活方式和营养类型,广泛分布在自然界。一克土壤中的微生物就可以达数亿之多。无论是高空、矿井、河水、海洋、土壤或动植物的表面,都可找到它们的踪迹。

2. 繁殖快:一般细菌在适宜条件下,每20分钟就可繁殖一代,24小时就有72代,其数量可达4万亿亿个。这就为利用微生物和科学研究提供了有利的条件。

3. 易于变异:微生物比高等动物或植物更易发生变异。

这个特点对人们利用微生物来讲既是优点也是缺点。人们利用微生物易于变异的特点进行菌种选育，可在短时间内获得优良菌种，提高发酵产量，这在抗菌素工业中已有不少例证；但若保存不当，菌种的优良特性很易发生退化。

4. 易于培养：微生物能够利用多种农副产品作为营养，无论是固体原料或液体原料都可用来培养微生物。并且不占耕地面积，不受季节限制，有利于因地制宜、就地取材进行生产。

我们在研究和利用微生物时，首先就是要找到符合我们要求的菌种。不论是菌种筛选，或是检查生产过程中杂菌的污染，或是进行育种工作，如果我们对微生物没有正确的认识，就不可能把工作做好。因此在开始学习微生物时，应首先熟悉一下它们的形态。

微生物的个体是肉眼看不见的，但是单个微生物的细胞在固体培养基上生长繁殖，经过一定时间培养之后，许多个体在培养基的表面堆集在一起，就形成肉眼可见的集落，称为菌落。菌落的形态、结构、大小、色泽、透明度、粘稠度，以及边缘的情况，在每一种微生物都有一定的特点。所以我们在认识微生物时，可以首先根据菌落的特征，初步将细菌、酵母、放线菌、霉菌等几大类微生物区别开来。

观察微生物的个体形态，需要在显微镜下进行。有的微生物如细菌，因个体太小而且透明，所以还需要经过染色以后才能看清。但对一些较大的微生物如酵母菌和霉菌，就可直接取样放在玻片上，便可在显微镜下观察。根据观察到的细

胞形态、结构、大小和繁殖方式，就可进一步确定 它们是哪一类的微生物。但因微生物的形态结构比较简单，对于有些微生物，有时还需参考一些生理方面的特征，才能最后确定是哪一种。

电子显微镜的分辨力比光学显微镜至少增加200倍。观察细菌细胞更细微的结构，或观察病毒之类更微小的生物时，则应通过电子显微镜来进行。如欲了解微生物细胞各种结构的化学成分，则先用匀浆器或超声波等机械方法破碎，或用溶菌酶将细胞壁分解，使细胞内各种物质流出，然后进行梯度离心，将各种成分分离后进行化学分析。

“种”是生物最基本的单位。根据微生物间的形态和生理性状相似的程度，可以将许多相似的种列为一属，相似的属列为一科，相似的科再列为一目。亦即类似对图书的编目工作那样，将微生物分别编入不同的门、纲、目、科、属、种之中，以便从事这方面工作的人进行查阅和参考。为了应用及相互交流方便起见，按照国际通用的惯例，用拉丁字或希腊字依双名法来给每种微生物命名。例如工业生产淀粉酶及蛋白酶的枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)，制杀虫菌粉的苏云金杆菌(*Bacillus thuringensis*)，发酵丙酮丁醇溶剂的丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)，由于它们都是能够产生芽孢的细菌，所以把它们都列为芽孢杆菌科(Bacillaceae)中。但枯草杆菌为好气性细菌，列为芽孢杆菌属(*Bacillus*)，而丙酮丁醇梭菌是嫌气性细菌，列为梭菌属(*Clostridium*)。此外生产淀粉酶和蛋白酶的枯草杆菌虽然都有枯草杆菌种的特征，

但因它们生理特性方面还有微小的差别，各实验室在工作过程中往往也还自行加以分离选种，得到性能各异的菌株。将这些菌株分别加以编号，在生产中使用某一菌株后，往往就习惯以菌号来代替某一菌株了。如1398是工业上生产淀粉酶的枯草杆菌菌株，7658是工业生产蛋白酶的枯草杆菌菌株。我们在使用时，应当对这些基本概念有一个初步的了解。

这一部分我们将分别介绍与工、农、医关系最密切的五大类微生物——即细菌、放线菌、酵母菌、霉菌和病毒的形态。

第一章 细 菌

细菌在自然界分布极为广泛，和人类的生活关系非常密切。除去我们熟悉的一些引起人生病的细菌外，还有许多细菌能引起家畜及植物生病，以及造成食物腐败变质等。不过，也有不少细菌已被人们用于农业生产、工业发酵、疾病预防以及处理污水等方面，为人类创造了不少财富，成为人们改造自然的有力工具。

我们日常接触细菌时，最常见的是菌落和菌苔。细菌菌落是微生物中比较小的，一般直径为1—2毫米。我们通常可根据菌落表面湿润或干燥、光滑或折皱、高低及透明度，边缘整齐或缺刻的情况以及颜色等特点来加以识别。

细菌个体很小，必须在显微镜下才能看到。细菌的大小一般以微米(μ)为单位，1微米相当于千分之一毫米。球菌以直径大小表示，杆菌以长 \times 宽表示。一般球菌直径约0.5—

2 μ , 杆菌约 1—5 μ × 0.5—1 μ 。

在光学显微镜下看到的细菌形态有球状、杆状、螺旋状, 还有很少数是丝状的。按照它们的形状, 我们分别叫做球菌、杆菌、螺旋菌及丝状菌。这些细菌有的单独存在, 有的两两成对, 有的联接成链。其中球菌排列形式最多, 可以单独存在, 也可以是两个、四个、八个或许多个联接在一起。所以根据球菌排列的方式, 又可分为细球菌、双球菌、四联球菌、葡萄球菌、八叠球菌、链球菌等多种。丝状菌如在水中活动的铁细菌是成串的细胞形成分枝或不分枝的丝状, 细胞外有鞘衣包围, 故又称衣细菌。(图 I-1)

在显微镜下观察细菌形态一般可用碱性染料进行染色, 对特殊的细菌及特殊结构可以用不同的染色方法, 其中最常用的是革蓝氏染色法。这种染色法的过程: 首先是将固定在玻片上的细菌标本用一种染料(如结晶紫)染色, 然后用碘-碘化钾混合溶液进行媒染, 继之以丙酮或乙醇洗脱, 最后用另一种色彩较淡的染料(如沙黄)进行复染。革蓝氏染色阳性细菌保持了最初结晶紫的颜色, 而革蓝氏染色阴性细菌由于脱色时被有机溶剂将最初染料洗去, 只留下复染时所用沙黄的颜色。其原理根据细胞壁成分研究结果, 认为革蓝氏阳性细菌细胞壁较厚, 呈网状分子结构包在细胞外部, 虽然其本身并未被染料着色, 但起着渗透障碍作用, 使染料-碘复合物分子保留在细胞内, 不能被有机溶剂洗脱; 而革蓝氏阴性细菌的细胞壁则不能保留此复合物。全部芽孢杆菌、棒状菌及大多数球菌均呈革蓝氏染色阳性反应。芽孢杆菌中的多数及少



北林图 A00067888

229872

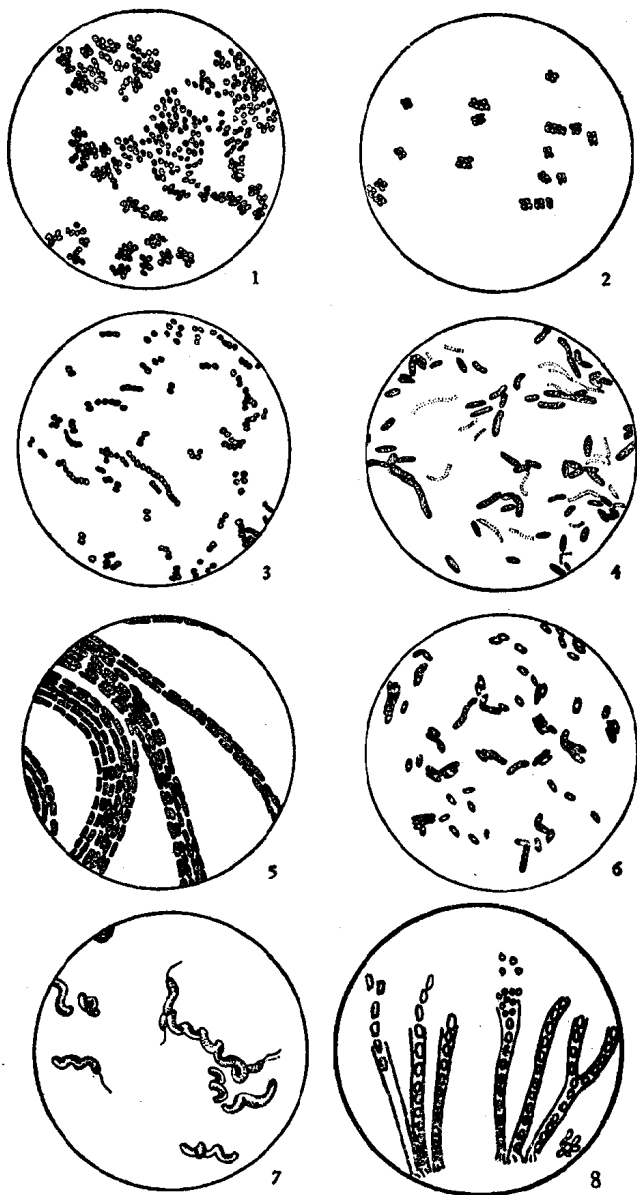


图 1-1 细菌的各种形态

1. 葡萄球菌 2. 八叠球菌 3. 链球菌 4. 杆菌 5. 链杆菌
6. 芽孢杆菌 7. 螺旋菌 8. 衣细菌

多数致病性球菌为革蓝氏染色阴性反应。

细菌属于原核微生物。其细胞的基本结构如图 I-2 所示，现分别介绍如下：

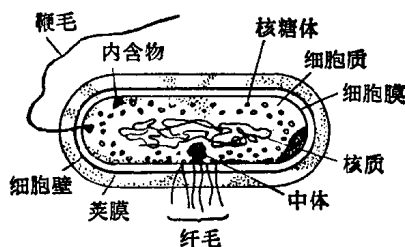


图 I-2 细菌细胞典型结构

1. 鞭毛及纤毛

(1) 鞭毛: 有些细菌有鞭毛, 鞭毛是细菌的运动器官。鞭毛在细菌上着生的位置和数目是认识细菌的一种依据 (图 I-3)。

(2) 纤毛: 除鞭毛外, 某些革蓝氏染色阴性细菌周围还有很多比鞭毛细短、但较直硬的纤毛。病原菌的纤毛有附着在器官上的作用。大肠杆菌 K-12 结合时, 雄株 (F^+) 有 1—2 根中空的纤毛, 使染色体上游离的基因通过而进入雌株 (F^-) 细胞内, 具性的作用, 故称性纤毛。

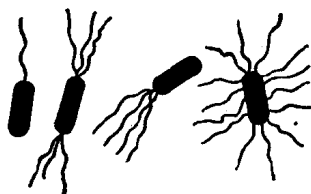


图 I-3 细菌鞭毛着生的各种方式

2. 荚膜: 许多细菌在细胞壁外还包裹着一层胶粘的、无

定形、能抵抗干燥的物质,叫荚膜。致病菌有了荚膜就仿佛人穿上盔甲一样,使人体内的白血球无法吞噬,因此有荚膜的病原菌一般毒力较强。

3. 细胞壁:细胞壁包于细菌细胞外部,给细菌以一定形态,具坚韧性,保护细胞不致破裂,并有类似分子筛的作用,使某些物质不能通过,起着渗透障碍作用。除枝原体比较特殊,没有细胞壁外,其他细菌都有细胞壁。

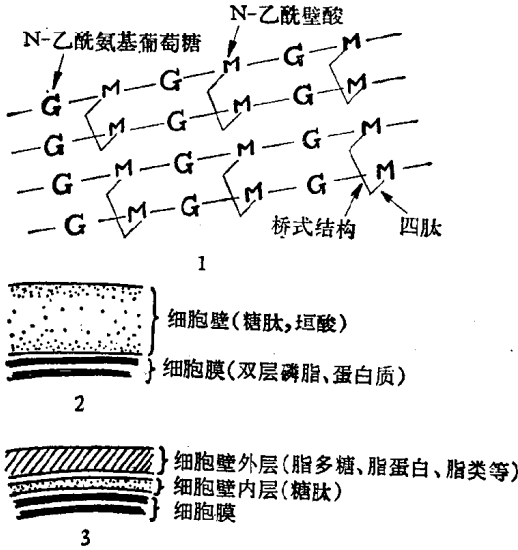
根据电子显微镜超薄切片的观察,以及化学成分分析结果表明,革兰氏染色阳性细菌与阴性细菌的细胞壁结构不同。革兰氏染色阳性细菌的细胞壁在电镜下观察是比较厚的、无分化结构的一层,约为10—50毫微米^①。其化学成分全要由糖肽构成,约占细胞壁重量的50—80%。糖肽是由N-乙酰氨基葡萄糖、N-乙酰壁酸和由四个氨基酸组成的小肽(L-丙氨酸、D-谷氨酸、二氨基庚二酸或赖氨酸或其他、D-丙氨酸)所构成,其中N-乙酰氨基葡萄糖和N-乙酰壁酸以 β -1,4键相连,并相互交替形成葡聚糖的线状多聚体骨架,各条线状多聚体之间再由短肽交联成“桥”式结构(如金黄色葡萄球菌的细胞壁是由5个甘氨酸组成的短肽)。此种结构有多层,故整个细胞壁呈网状,网孔间填以多糖,此外还含垣酸。有些革蓝氏阳性菌细胞壁的表层还有蛋白质。

革蓝氏阴性细菌的细胞壁比较薄。在电子显微镜下可以看到有明显的两层:外层约7—8 μ 厚,由脂多糖、脂蛋白和蛋

① 毫微米即 10^{-9} 米,简写 $m\mu$ 或 nm 。

白质等组成。脂多糖和其抗原性有关，噬菌体的受点也往往在这部分。内层比较薄而硬，约2—3毫微米厚，其化学成分主要为糖肽。在革兰氏阴性细菌的细胞壁中，不含垣酸。

细菌细胞壁的结构如图 I-4 所示：



图I-4 细菌细胞壁的结构

1. 细菌细胞壁糖肽分子结构示意图 2. 革兰氏阳性细菌细胞壁剖面示意 3. 革兰氏阴性细菌细胞壁剖面示意

4. 细胞膜：细胞膜紧贴在细胞壁内部，是一层柔软而又有弹性的半透性薄膜，约10毫微米厚，由双层的磷脂层组成，其中包含有各种蛋白质。细胞膜主要控制细胞内外物质的交换和渗透，对细胞的生命活动有极为重要的作用。有些地方的细胞膜向细胞质或核质内摺入成为囊状，管状或层状的结构，

叫作中体。

原核生物的细胞膜还有一个特点，即含有许多重要生理功能的酶系，特别是与好气性呼吸有关的呼吸链的各种成分均在细胞膜内，而真核生物是在线粒体膜内。

5. 细胞质：整个细菌的细胞膜内包含有细胞质和核质。在原核生物的细胞质内没有线粒体、高尔基体等细胞器，并且没有核膜将核质与细胞质分开，这是和真核细胞主要的区别。细胞质内还有各种贮藏物的颗粒和核糖体。在光合细菌的细胞质内还有载色体，功能与高等植物的叶绿体相似。

6. 核质：上面已经说过，细菌细胞内的核质外没有核膜包围，也不含组蛋白。一般呈球状、卵状或哑铃状，在细胞质中央成一比较透明的区域，是由双股环状的 DNA 组成，具有传递遗传信息的功能。

某些细菌细胞质中，除核质外，还有质体。质体也是由双股环状的 DNA 分子组成，分子量比核质小，可以随同细胞分裂而复制，也可携带一部分遗传信息，如抗药性质体、青霉素酶质体及大肠杆菌性因子的质体等等。

7. 芽孢：有些杆菌在生活周期的一定阶段，营养细胞内部能产生芽孢。产生芽孢的杆菌称芽孢杆菌（好气性）或梭菌（厌气性）。不同细菌中芽孢的形状和位置不同，有时在细胞中央，有时偏于细胞一端，成圆或椭圆形，比菌体膨大或否，可作为鉴定细菌的标志之一。

芽孢能抵抗高温、干燥、和许多化学药物，是细菌处于休眠和抵制不良环境的特殊结构，在检查制罐头工业，发酵工业

及外科器材灭菌是否彻底时，均以能否彻底杀死耐热性芽孢为标准。

8. 内含物：

(1) 异染颗粒：其成分为多聚偏磷酸盐，强嗜碱性，用甲苯胺蓝或次甲基蓝可以染色。细胞内含异染颗粒是棒状菌和某些乳酸杆菌的特征。

(2) 多肽：苏云金杆菌在细胞质内形成一菱形的多肽结晶，有毒杀昆虫的作用。

(3) 硫磺：硫磺细菌细胞内可积累硫磺颗粒。

(4) 贮藏物：有些芽孢杆菌常积累肝糖，有些细菌如巨大芽孢杆菌则聚集 β -羟基丁酸。

细菌主要是借二分裂法来进行繁殖。就是一个细菌在适宜条件下，菌体逐渐伸长，长大，到一定阶段，在细胞中央以横切方式形成隔膜，最后断开成两个细胞，这两个细胞又可重复分裂成4个细胞，如此继续下去。例如大肠杆菌每18分钟就可分裂一次，因此在很短时间就可生成大量菌体。微生物如此迅速地生长繁殖，也是我们利用它们进行工业生产各种代谢产物的基础之一。

在某些革蓝氏染色阴性细菌中（大肠杆菌、沙门氏菌、变形杆菌等），还发现有接合的现象。在进行接合时，给体细胞（如大肠杆菌的 F^+ 株及 Hfr 株）内的质体可以通过纤毛将所携带的基因送入受体细胞内（如大肠杆菌的 F^- 株），经过重新组合，产生新的遗传性状。

现将常见的数种细菌特性举例如下：

1. 大肠杆菌(*Escherichia coli*)

大肠杆菌是人和动物消化道内正常寄居的细菌，一般无致病性，但当它侵入盲肠、胆囊、腹腔或泌尿系统时，可以引起炎症；有的也可引起婴儿腹泻及肠胃炎。由于肠道中还有许多重要的致病菌存在，如伤寒杆菌、痢疾杆菌及霍乱弧菌等，这些菌也经常通过人的排泄物污染食品和饮用水，因此大肠杆菌被作为防疫工作中检查水、食品及土壤等污染程度的指标。在工业上，大肠杆菌用来制备L-门冬酰胺酶，是治疗白血病的一种较好的药物；还可利用其产生的酰胺酶来制新型青霉素；利用其谷氨酸脱羧酶来测定谷氨酸的含量等。在科学研究中，大肠杆菌是用得最广泛的菌种。

大肠杆菌是不生荚膜和芽孢的杆状菌，大小为 $0.5 \times 1.0 - 3.0 \mu$ ，二端钝圆，周生鞭毛，能运动，革蓝氏染色呈阴性反应。大肠杆菌菌落为白色或污白色、平滑、有光泽、低平或微凸起的圆形小菌落，边缘整齐。大肠杆菌能发酵葡萄糖和乳糖产生酸和气体，最适生长温度为 37°C ，在 44°C 也可生长。

在卫生检查样品时，要将大肠杆菌与性质相似的产气杆菌区别开来。一般是先将样品接种在葡萄糖培养液中， 44°C 培养24—48小时，若有菌生长且产生气体则可能是大肠杆菌。此时可进一步将长出的菌接种到含乳糖和伊红-美蓝的鉴别培养基上，如出现有深蓝黑色并具金属光泽的圆形菌落，则肯定为大肠杆菌。产气杆菌在 44°C 不能生长，在此种鉴别培养基上表现为灰棕色、粘质、无闪光的菌落。除此之外，利用产生吲哚(I)、甲基红(M)、V.P反应(Vi)及利用柠檬酸盐(C)的