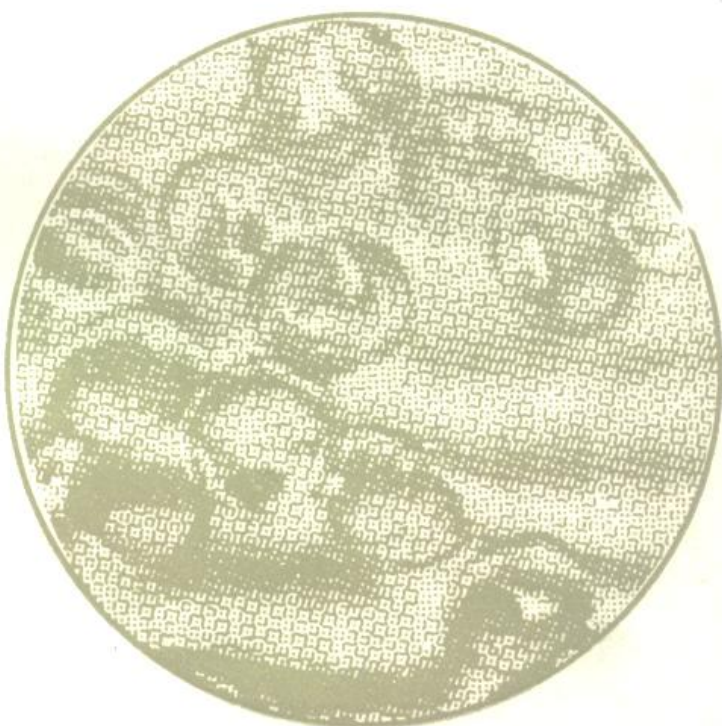


XIANDAI YINGYONG WEISHENGWU

XUE SHIYAN JISHU

现代应用微生物学实验技术

夏淑兰 编著



轻工业出版社

现代应用微生物学 实验技术

夏淑兰 编著

轻工业出版社

内 容 提 要

本书共分微生物的接种与培养技术、微生物的诱变育种及基因重组和杂交育种三章，内容有微生物的厌氧、透析、同步培养技术，固定化微生物细胞、菌种诱变、营养缺陷型菌株的筛选、呼吸缺失型酵母的筛选、转化和转导实验、杂交育种以及细菌、酵母菌、黑曲霉菌的原生质体融合实验等技术。

本书可作为工业发酵专业硕士研究生的实验教材，也可供有关从事应用微生物方面工作的教师、科研人员参考。

现代应用微生物学实验技术

夏淑兰 编著

轻工业出版社出版

(北京广安门南滨河路25号)

轻工业出版社印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

各地新华书店经售

787×1092毫米1/32 印张：3⁴/₈ 字数：65千字

1988年3月 第一版第一次印刷

印数：1—5,800 定价：0.79 元

ISBN 7-5019-0080-9/TS·0048

序 言

本书是根据天津轻工业学院食品工程系为研究生开设的《现代微生物学实验技术》课编写的教材，以及近年来在应用微生物学方面的科学研究工作中，围绕微生物育种为中心所建立的实验方法和接触到的实验技术，并参考有关文献，经过整理编写而成的。

实验内容分三个部分：一是微生物实验的基本操作技术。包括接种技术、培养方法和固定化细胞技术。二是诱变育种，包括物理及化学因素诱变、营养缺陷型菌株的筛选、酵母呼吸缺失型的筛选。三是基因重组实验，包括转化、转导、真菌的有性杂交以及微生物细胞融合技术。

本书在编写时，注意到各个实验的有关的基础理论及其发展的动向，有助于学生对该课题概括性的了解。同时从加强基础的观点出发，给学生以微生物学中基本的实验方法和技能的训练，重点是对新近发展起来的重要微生物学研究技术的训练。

作为一个工科院校的研究生或高年级的学生，在生物学基础（包括实验技能的训练）不足的情况下，要在应用微生物学方面有所深入和发展，加强现代微生物学实验技能的训练，看来是非常必要的。经过几届的教学实践证明，此课程尚能弥补不足。

本书可供高等院校食品、发酵等专业研究生和高年级学生使用，也可供中等专业学校的有关教师参考，同时也为从事应用微生物方面的研究人员、工厂技术人员提供了必要的研究技术和实验方法。

本书承蒙北京大学钱存柔教授审阅，天津调味品研究所鲁梅芳同志参加了部分实验的探索 and 确立，特此致谢。

由于编者水平有限，书中的错误和不妥之处，衷心地欢迎读者批评指正。

目 录

第一章 微生物的接种与培养技术	(1)
第一节 概述.....	(1)
一、微生物的接种.....	(1)
二、微生物的培养.....	(1)
第二节 实验内容.....	(13)
一、厌氧培养.....	(14)
二、透析培养.....	(15)
三、同步培养.....	(16)
四、固定化微生物细胞.....	(17)
第二章 微生物的诱变育种	(25)
第一节 概述.....	(25)
第二节 实验内容.....	(29)
一、紫外线对粘质赛氏杆菌的诱变效应.....	(29)
二、硫酸二乙酯对枯草赛氏杆菌的诱变效 应.....	(32)
三、营养缺陷型菌株的筛选.....	(36)
四、呼吸缺失型酵母的筛选.....	(45)
第三章 基因重组和杂交育种	(49)
第一节 遗传转化.....	(49)
一、概述.....	(49)
二、 <i>E.coli</i> cia (P4amp) 质粒DNA 的提取.....	(55)
三、 <i>E.coli</i> cia 遗传转化.....	(57)
第二节 转导.....	(59)

一、概述	(59)
二、实验材料	(61)
三、实验步骤	(62)
第三节 微生物的杂交育种	(66)
一、概述	(66)
二、酵母菌单倍体细胞的分离	(69)
三、酵母菌单倍体细胞群体杂交试验	(72)
四、根霉接合孢子形成的观察	(73)
第四节 原生质体融合育种	(75)
一、概述	(75)
二、细菌的原生质体融合实验	(81)
三、酵母菌的原生质体融合实验	(86)
四、黑曲霉原生质体的形成和再生	(89)
主要参考文献	(92)

第一章 微生物的 接种与培养技术

第一节 概 述

微生物学工作者，必须具备正确的微生物接种技术和熟练的培养微生物的技能。

一、微生物的接种

微生物的接种就是将一定量的纯种微生物转移到另一培养基中的过程。这是进行微生物实验时最重要的基本操作之一，要求在严格的无菌条件下进行。

根据不同的实验目的和培养方法，可以采用不同的接种工具和接种方法。常用的接种工具有接种针、接种环、接种钩、玻璃涂棒、滴管和移液管等（图1）。常用的接种方法有试管斜面接种、液体接种、穿刺接种以及平板接种等（图2~图5）。

二、微生物的培养

由于研究的目的和所研究的微生物不同，微生物的培养方法有着很大的区别。为了分类、鉴定和保藏而进行的培养，一般要求遵循已固定的培养基和培养条件；对好气性微生物需要给予通气培养；厌氧性微生物则需要无氧的条件下培养；而在微生物生理生化的研究中需要大量微生物细胞时，

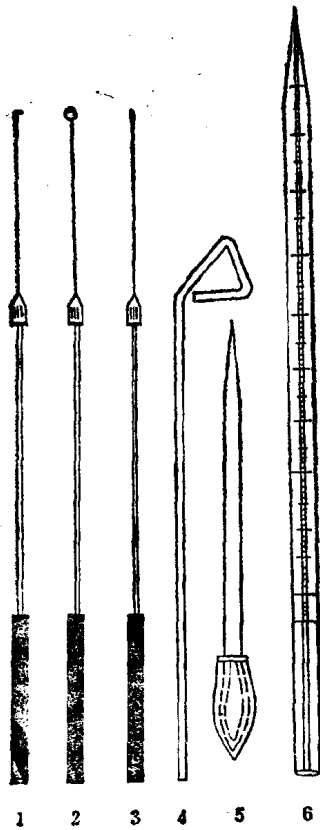


图 1 微生物接种用工具

- | | |
|-------|--------|
| 1—接种钩 | 4—玻璃涂棒 |
| 2—接种环 | 5—滴管 |
| 3—接种针 | 6—移液管 |

就要进行大量的平板培养或液体振荡（或通气搅拌）培养。

要设计好一种培养试验，在培养方法上必须注意以下几个方面：培养基的选择、种子的种龄、接种量、接种时间、培养温度以及厌氧或通气培养等。

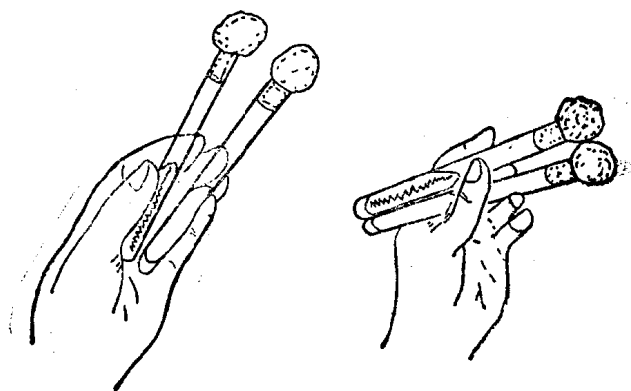
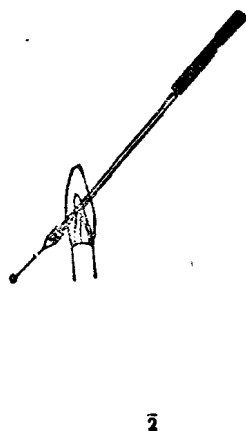
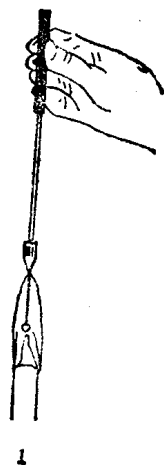


图 2 斜面接种时试管的两种拿法



1.2—接种环的灭菌

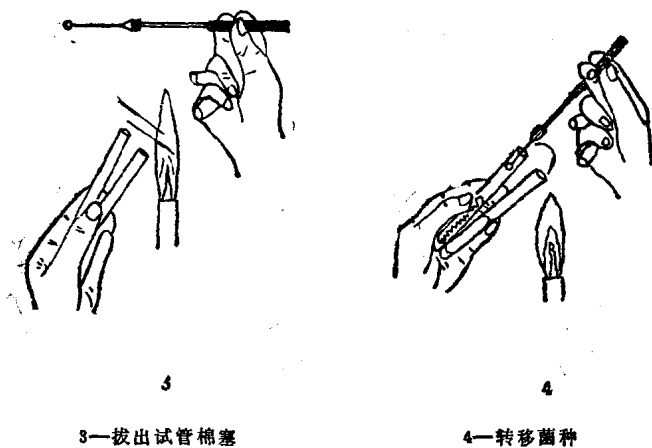


图 3 斜面接种无菌操作程序

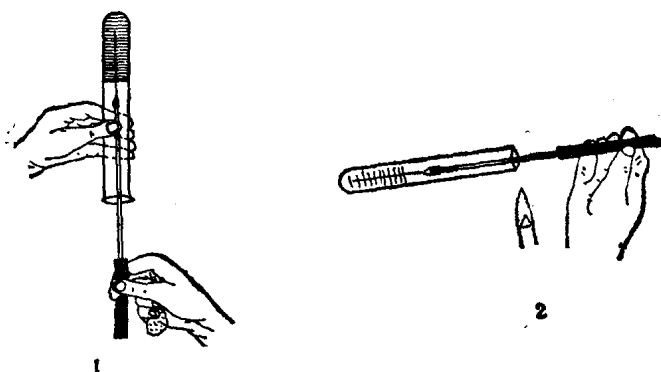


图 4 穿刺接种法

1—倒插法 2—横插法

(一) 表面培养

表面培养是使微生物在液体或固体培养基的表面生长繁殖的一种方法,广泛应用于培养好气性微生物。例如,用于微

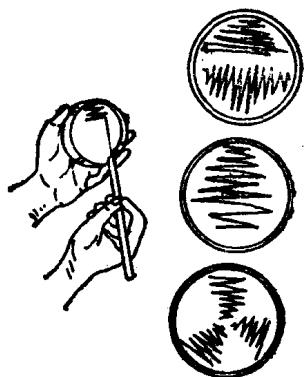


图5 平板划线分离法

生物形态观察或保藏的琼脂斜面培养和用于平板分离或活细胞计数的平板培养等都属于表面培养法。用表面培养法培养微生物时，有下列特点：

（1）细胞多半是重叠地生长繁殖，因此直接与培养基相接触的细胞和在此细胞上再长出的细胞会有所不同。

（2）从摄取营养的角度来看，上面的细胞就得通过下面的细胞或细胞间隙来获得营养。

（3）从供氧方面来说，从上到下逐渐形成缺氧的环境。

因此，可以认为每个细胞之间的生长环境未必相同，细胞的生长繁殖因受其生长环境的制约，所以常用增大培养基的表面积以提高培养效率。实验室内一般采用试管斜面、培养皿、三角瓶、克氏瓶等培养；工厂大多采用曲盘、帘子以及通风制曲池等。

（二）深层培养

深层培养是指用液体培养厌氧性微生物和好气性微生物

的方法。培养厌氧性微生物不需搅动培养液，而培养好气性微生物则要搅动培养液。搅动方式有振荡、机械搅拌或通气搅拌。

(1) 振荡培养细菌、酵母菌及藻类等单细胞微生物，可以得到均一的细胞悬浊液，而真菌或放线菌一类菌丝状细胞，则可得到纤维糊状的培养物。如果振荡不充分，培养物的粘度又高，则形成许多小球状的菌团培养物。

振荡培养可以采用液体不易溢出的各种形状的玻璃容器，如锥形瓶、T形瓶、L形瓶以及圆底烧瓶等（见图6）。振荡器有箱式恒温振荡器、旋转式振荡床和往复式振荡床（摇床）。

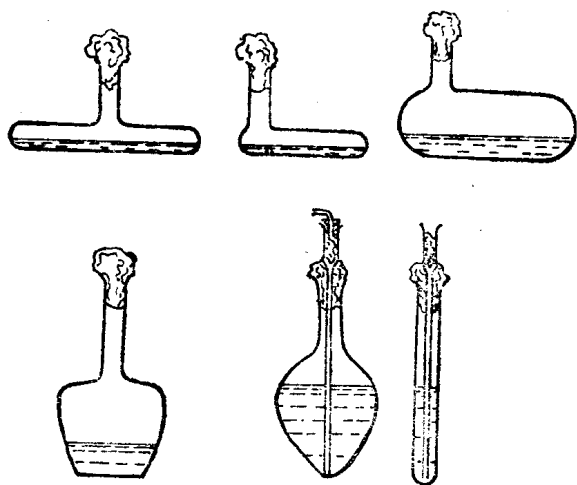


图6 振荡培养用的玻璃容器

(2) 通气培养。实验室内自制通气培养装置如图7所示。对培养藻类以及细菌、酵母菌、霉菌均可运用。

从白箭头处拆开，分成搅拌、三颈烧瓶（装培养基用）、洗气瓶、棉花过滤器（40~50cm），各部分的开口处用锡纸

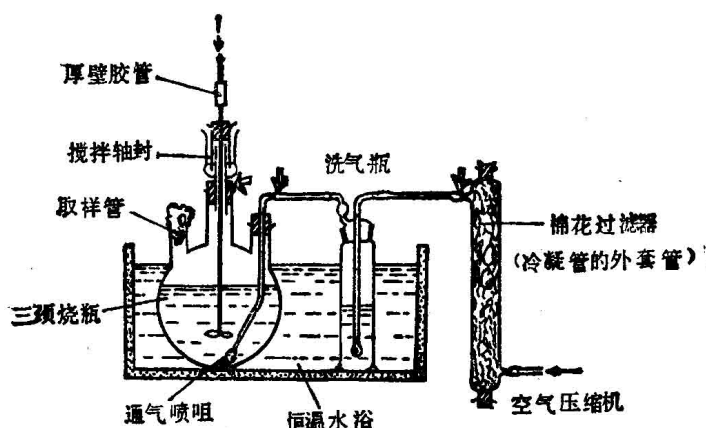


图 7 用有机化学实验用的仪器装成的一种通风搅拌培养装置

或棉花包上，进行加压灭菌。灭菌后按图连接。用于此装置的塞子和管子最好用硅氧橡胶的。过滤器中的棉花必须尽量塞紧。取样口兼作接种口。

台式自动发酵罐是理想的实验室通气培养设备（见图 8），一般是用玻璃制成的圆筒状的容器。主要部件有发酵罐主体、温度调节系统、搅拌系统、空气过滤系统、空气流量计以及各种检测仪表。发酵罐的容量有 1.2、3、5 和 10l 等。这种通气培养设备有如下优点：

- （1）可以大量生产微生物细胞和代谢产物；
- （2）根据需要可随时调节氧的供给速率、营养物的流加量、温度以及 pH 等；
- （3）可直接观察发酵罐中的培养物以及培养液的变化情况，给研究工作带来方便。

（三）厌氧培养

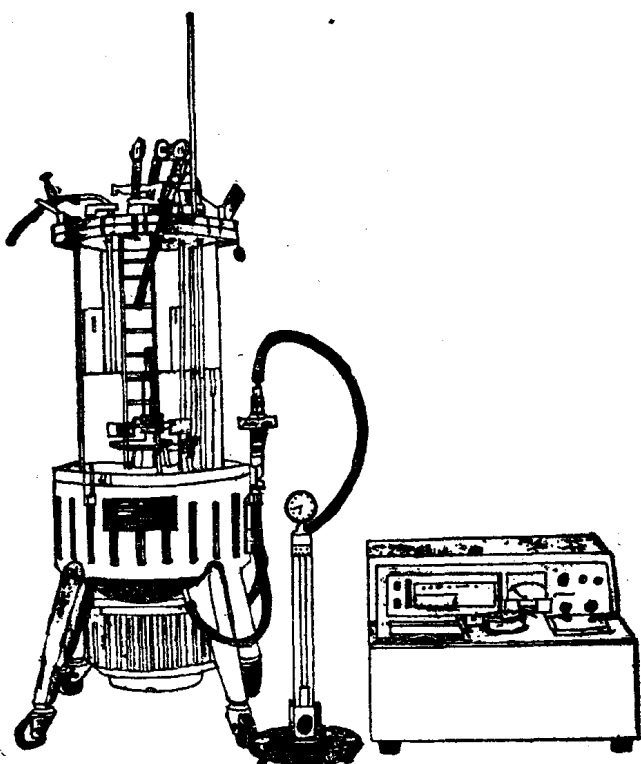


图8 台式发酵罐

厌氧培养的原理有两个方面：一是除去培养容器中的氧气；二是增强培养基的还原能力。

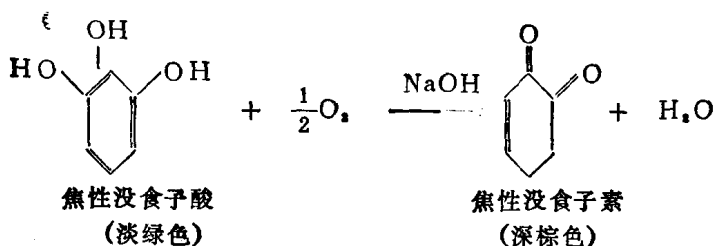
厌氧培养的方法很多，较普遍的有：

(1) 在培养基中加入可溶性的还原性化合物，如葡萄糖、半胱氨酸、甲酸钠、硫代羟乙酸 (HSCH_2COOH) 和它的盐等，以增强培养基的还原能力。

(2) 用惰性气体或还原性气体完全代替空气，如以

N_2 、 H_2 、 CO_2 取代空气。

(3) 利用焦性没食子酸吸收容器中的氧气。焦性没食子酸在碱性条件下与氧结合生成焦性没食子素，反应过程中吸收了容器中的氧气，反应式如下：



实验室简易的厌氧培养装置如图9所示。

(四) 同步培养

同步培养主要是通过生物化学方法，研究以细胞生长过程为主的一种培养方法。通常有关微生物的生长、生理生化特性的测定，都是取群体的平均值。但群体中的所有细胞不是处于同一生长阶段，以群体测定结果平均值来代表单个细胞的生长或生理特性，显然是不够合理的。为了使培养液中的全部细胞能处于同一生长阶段(即同时进行分裂——生长——分裂)而设计的培养方法，即同步培养。获得同步生长的方法有二种：

(1) 选择法：选择法是通过过滤、密度梯度离心、膜吸附和直接选择等方法，从对数期的细胞群落中，选择仅处于某生长阶段的细胞来进行培养的方法。多数情况是专门选择细胞分裂后子细胞有显著变化的那一生长阶段。方法见图10。

(2) 诱导法：诱导法是通过改变细胞群落的环境条件，如交替的温度变化、营养变化，使用能够影响细胞生长周

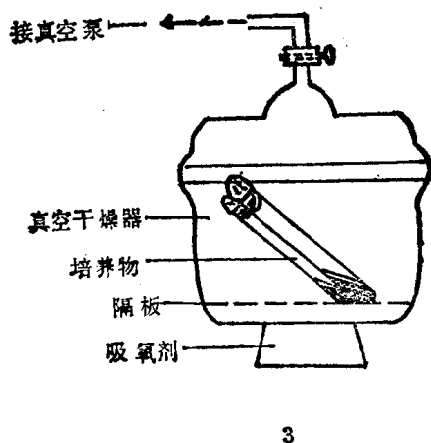
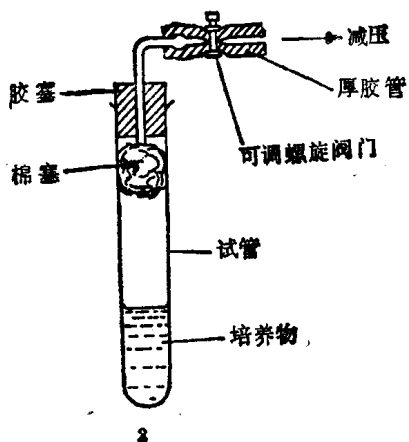
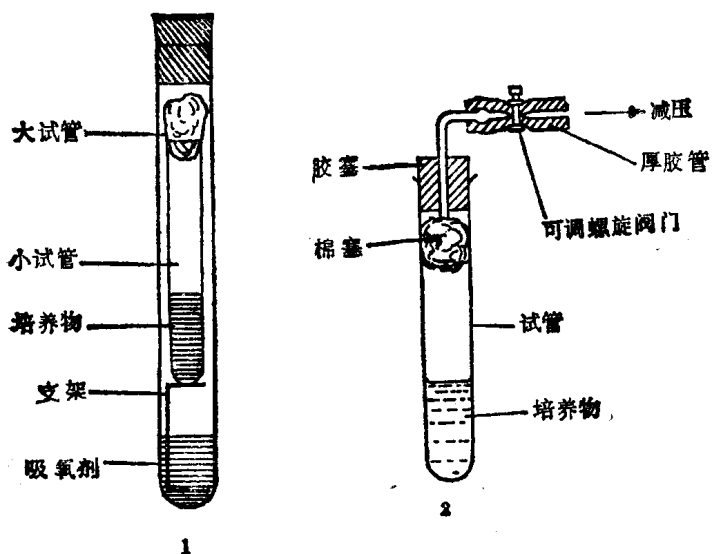


图9 简易厌氧培养装置

1, 2—试管装置 3—真空干燥器装置