



“十三五”江苏省高等学校重点教材

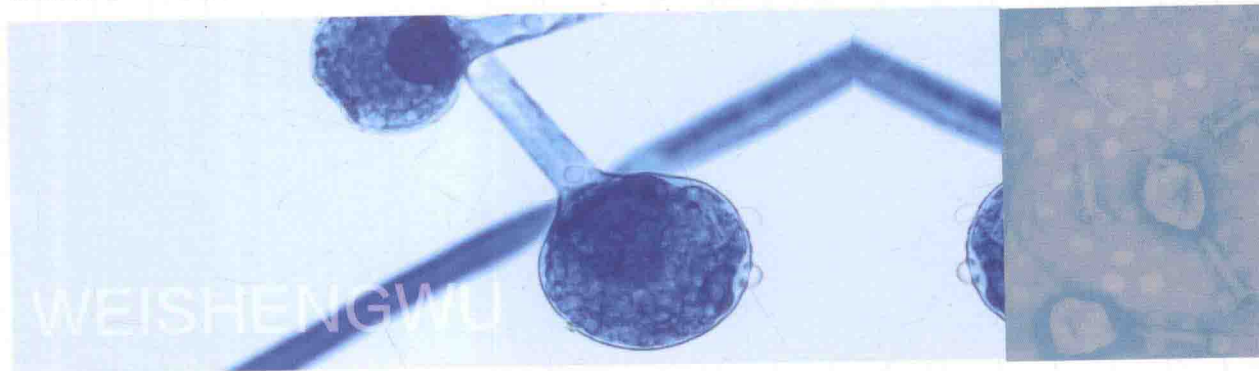
# 微生物应用技术

第二版

万洪善 主编

袁芹 范思思

副主编



更多精彩扫描书中二维码



化学工业出版社



“十三五”江苏省高等学校重点教材（编号：2016-1-067）

# 微生物应用技术

第二版

万洪善 主编

袁芹 范思思

副主编



化学工业出版社

· 北京 ·

本书是“十三五”江苏省高等学校重点教材。根据高职高专特点，采用项目化编写，突出实用性。

全书分为四大模块，模块一：认识微生物，介绍了微生物的特点、研究对象、微生物学的发展过程以及微生物学与人类的关系；模块二：微生物基础知识，介绍了原核微生物、真核微生物、病毒等微生物的生物学特性和应用；模块三：微生物技能操作，介绍了微生物的营养及生长测定技术、微生物的分布与控制技术、药品生产过程中微生物控制技术、微生物菌种保藏技术、免疫学技术；模块四：拓展项目，介绍了药品微生物限度检查、药物的体外抗菌性检测、食品卫生微生物检查和发酵型乳酸饮料的制作。为了拓宽学生知识面，开阔视野，本书还设计了生动有趣的知识链接、视野拓展等内容。

本书配有案例、动画、微课等教学资源，可以通过扫描二维码获取学习。

本书可作为高职高专院校药品生产技术、药品生物技术、食品/药品质量检测技术等与药学相关的制药技术类专业的教材，也可作为相关专业学生参考用书。

## 图书在版编目(CIP)数据

微生物应用技术/万洪善主编. —2版. —北京:  
化学工业出版社, 2018.8  
ISBN 978-7-122-32206-7

I. ①微… II. ①万… III. ①微生物学-高等学校-  
教材 IV. ①Q93

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第106002号

---

责任编辑：窦 臻

文字编辑：李 瑾

责任校对：吴 静

装帧设计：王晓宇

---

出版发行：化学工业出版社（北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011）

印 装：三河市延风印装有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张16 字数416千字 2018年9月北京第2版第1次印刷

---

购书咨询：010-64518888（传真：010-64519686） 售后服务：010-64518899

网 址：<http://www.cip.com.cn>

凡购买本书，如有缺损质量问题，本社销售中心负责调换。

---

定 价：42.00元

版权所有 违者必究

The top banner features a grayscale illustration of a microscope on the left and a series of concentric, overlapping circles on the right, creating a textured, circular pattern. The title '前言' and 'FOREWORD' is centered within a white circle on the right side of the banner.

# 前言

## FOREWORD

2013年为了配合“化学制药技术”国家重点建设专业的建设，我们出版了《微生物应用技术》教材。该教材在以往的教学中发挥了较好的作用。

本教材适用的主要专业为药品生产技术、药品生物技术、食品/药品质量检测技术等与药学相关的制药技术类专业。本书针对高职高专教育和高职高专学生的特点，面向制药企业生产和管理第一线，按照药品行业技术领域相关职业岗位（药品检验、药品生产加工、药品工业发酵等）的任职要求，以强化技能训练和素质教育这一理念编写的。

本书以国内现有的微生物应用技术相关教材及讲义为基础，根据教学需要，结合编者长期的教学实践经验，本着“理实一体化，突出技能操作”的原则，采用项目化编写，在每一项目中，注重突出岗位要求的核心知识与技能，边讲边练，工学结合，校企合作，同时兼顾学生的可持续发展。

本教材为“十三五”江苏省高等学校重点教材（编号：2016-1-067）、江苏省高等职业教育高水平骨干专业建设项目（编号：GGZY2017-97）。

本次重新修订的教材在原有教材基础上增加了药品生产最新版GMP中的微生物控制、污染防控知识，以及《中华人民共和国药典》最新版要求的主要微生物检验等内容。学习内容即工作所需，并且增加了目标检测的答案；为顺应“互联网+”时代的发展趋势，深化高等教育教学改革，推动信息技术与教育教学深度融合，教材修订以纸质教材为核心，以互联网为载体，以信息技术为手段，将数字资源与纸质教材充分交融，比如通过加上二维码，扫描生成相对应的各种案例、动画、微课，让学生充分利用手机等工具，拓展学习外延网络，加强纸质教材和数字化资源的一体化建设。

本书共分四大模块，十二个项目，分别介绍了认识微生物、微生物基础知

识、微生物技能操作（微生物的营养及生长测定技术、微生物的分布与控制技术、药品生产过程中微生物控制技术、微生物菌种保藏技术以及免疫学技术）的内容；为了培养学生综合训练能力和创新能力，在拓展项目中，安排了药品微生物限度检查、药物的体外抗菌性检测、食品卫生微生物检查和发酵型乳酸饮料的制作等内容。为了增强教材内容的可读性、趣味性，突出培养学生合作能力和创新能力，教材中设立了“知识目标”“能力目标”“知识链接”“视野拓展”“案例分析”“课堂互动”“知识小结”“目标检测”等内容，供学习者提高学习效果；根据实际需要安排了相应的实操内容，每个实操任务有任务描述和任务执行过程（接受指令、查阅依据、制订计划、实施操作和结果报告），其间按需插入“训练”“操作注意事项”和“思考讨论”等，避免了实操过程的失误；项目小结采用树状结构，一目了然；项目后安排了目标检测内容，便于学生自学。为方便选用本教材的学校开展教学，本书配有教学大纲和电子课件，使用本教材的学校可以与化学工业出版社联系（[cipedu@163.com](mailto:cipedu@163.com)），免费获取。

全书由万洪善主编并统稿，模块三中的项目三及模块四拓展项目由袁芹编写，书中的二维码资源由范思思制作。编写过程中得到连云港职业技术学院、连云港高等师范专科学校、连云港中医药高等职业技术学校的全力支持，另外在编写过程中，连云港恒瑞医药股份有限公司、江苏正大天晴药业股份有限公司给予了相关技术上的支持，在此表示衷心的感谢。

由于微生物技术涉及面广，各个区域行业、企业有各自特点，加之编者的水平和能力有限，书中疏漏之处在所难免，敬请广大读者批评指正。

万洪善

2018年5月



# 目 录

## CONTENTS

### 模块一 认识微生物

1

一、微生物	/ 1
二、微生物学	/ 4
三、微生物技术的应用	/ 8
四、实操练习	/ 11
知识小结	/ 21
目标检测	/ 21

### 模块二 微生物基础知识

23

#### 项目一 原核微生物 23

一、细菌	/ 23
二、实操练习——微生物镜检技术	/ 31
三、放线菌	/ 36
知识小结	/ 39
目标检测	/ 40

#### 项目二 真核微生物 41

一、酵母菌	/ 42
二、霉菌	/ 45
三、几类常见真菌	/ 50
四、实操练习	/ 51
知识小结	/ 57

一、病毒的生物学特性	/ 58
二、病毒的干扰现象与干扰素	/ 67
三、亚病毒	/ 68
四、病毒与实践	/ 69
五、实操练习——噬菌体的分离、纯化与效价的测定	/ 70
知识小结	/ 74
目标检测	/ 75

## 项目一 微生物的营养及生长测定技术 76

一、微生物的营养物质	/ 76
二、培养基	/ 84
三、微生物的生长与培养	/ 91
四、微生物生长的测定	/ 98
五、微生物的代谢	/ 104
六、实操练习——微生物的接种、分离、纯培养技术	/ 108
知识小结	/ 118
目标检测	/ 118

## 项目二 微生物的分布与控制技术 120

一、微生物的分布	/ 120
二、实操练习——微生物的检测	/ 123
三、微生物与环境的关系	/ 127
四、微生物控制	/ 129
五、实操练习——消毒灭菌技术	/ 137
知识小结	/ 142
目标检测	/ 142

## 项目三 药品生产过程中微生物控制技术 143

一、制药生产环境对药品质量的影响	/ 144
二、药品生产过程中微生物污染来源	/ 146

三、微生物污染对药品的影响	/ 148
四、药品生产过程中的微生物控制	/ 149
五、实操练习——制药用水中大肠菌群的检测	/ 154
知识小结	/ 158
目标检测	/ 158

## 项目四 微生物菌种保藏技术 159

一、微生物的遗传	/ 160
二、微生物的变异	/ 161
三、菌种的衰退、复壮和保藏	/ 164
四、实操练习——育种及菌种的保藏技术	/ 167
知识小结	/ 177
目标检测	/ 177

## 项目五 免疫学技术 178

一、免疫学基础	/ 179
二、血清学试验	/ 189
三、实操练习——免疫学检测技术	/ 192
知识小结	/ 199
目标检测	/ 199

## 模块四 拓展项目

202

### 项目一 药品微生物限度检查 203

一、药品微生物限度检查方法	/ 203
二、不同药品供试液的制备	/ 205
三、控制菌检查	/ 206

### 项目二 药物的体外抗菌性检测 214

一、药物体外抗菌性检测	/ 214
二、药物联合抗菌作用检测	/ 218
三、实操练习——药物体外抗菌检测技术	/ 219

### 项目三 食品卫生微生物检查 221

一、总则	/ 221
------	-------



二、菌落总数测定	/ 223
三、霉菌和酵母菌计数	/ 226
四、大肠菌群计数	/ 227



## 项目四 发酵型乳酸饮料的制作 230

一、接受指令	/ 230
二、查阅依据	/ 231
三、制订计划	/ 231
四、实施操作	/ 231
五、结果报告	/ 233

## 附录

234

一、染色液的配制	/ 234
二、指示液的配制	/ 235
三、培养基的配制	/ 236
四、药品微生物限度标准（2015年版《中国药典》）	/ 239
五、制药行业微生物检验室要求	/ 240
六、药品微生物限度检查原始记录参考范本	/ 243

## 目标检测参考答案

245

## 参考文献

248



# 模块一

## 认识微生物

### 知识目标

1. 掌握微生物的概念和特点；
2. 熟悉微生物学的发展简史；
3. 了解微生物与人类的关系、微生物技术在工农业生产中的应用。

### 能力目标

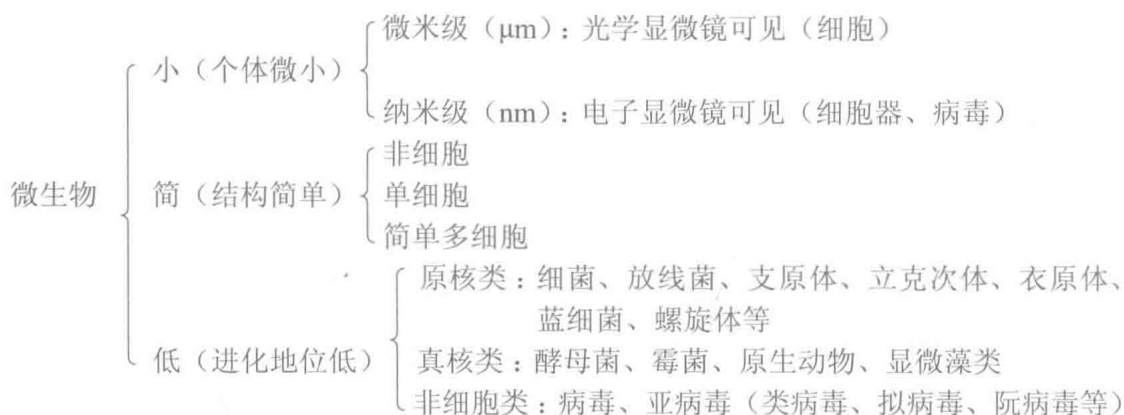
1. 熟练掌握实验室规则；
2. 学会生物废弃物的处置方法；
3. 学会实验室发生意外时的应急处理办法；
4. 学会配制微生物实验室常用洗涤剂；
5. 能够熟练清洗玻璃器皿并对其进行包扎。

## 一、微生物

微生物与人类的关系十分密切，它们的生命活动与人类日常生活和生产息息相关；一方面部分微生物可给人类带来毁灭性的疾病和灾害；另一方面大多数微生物对人类不仅是无害的，而且是有益的。如何正确使用微生物这把“双刃剑”，利用有益微生物，控制有害微生物，造福于人类，是我们学习微生物应用技术的目的。

### (一) 微生物的概念

微生物不是分类学上的名词，而是指一群个体微小、结构简单、肉眼难以看清、必须借助于光学显微镜或电子显微镜才能观察到的微小生物（ $<0.1\text{mm}$ ）类群的总称。它们大多为单细胞，少数为多细胞，还包括一些没有细胞结构的生物。按其结构、组成分为三大类：非细胞微生物、原核微生物和真核微生物。



## (二) 微生物的特点

微生物和动植物一样具有新陈代谢等生物的基本特征, 但微生物也有其自身的特点。

### 1. 个体微小, 结构简单

微生物的个体极其微小 (见表 1-1), 测量其大小通常以微米 ( $\mu\text{m}$ , 如细菌) 或纳米 ( $\text{nm}$ , 如病毒) 为单位。如一个典型的球菌体积仅为  $1\mu\text{m}^3$ ; 最近芬兰科学家 E. O. Kajander 等发现了一种能引起尿结石的纳米细菌, 其直径最小仅为  $50\text{nm}$ , 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, 是目前所知的最小的具有细胞壁的细菌。迄今为止, 所知的个体最大的细菌是硫细菌, 其大小一般在  $0.1 \sim 0.3\text{mm}$ , 能够清楚地用肉眼看到。

表 1-1 微生物形态、大小和细胞类型

微生物	大小近似值	细胞的特性
病毒	$0.01 \sim 0.25\mu\text{m}$	非细胞的
细菌	$0.1 \sim 10\mu\text{m}$	原核生物
真菌	$2 \sim 1000\mu\text{m}$	真核生物
原生动物	$2 \sim 1000\mu\text{m}$	真核生物
真核藻类	几微米至几米	真核生物

微生物本身具有极为巨大的比表面积, 小体积大面积必然有一个巨大的营养物质的吸收面、代谢废物的排泄面和环境信息的交换面, 这对于微生物与环境之间进行物质、能量和信息的交换极为有利。比表面积示例如下:

$$\text{表面积/体积} \begin{cases} \text{乳酸菌}=120000, \text{大肠杆菌}=300000 \\ \text{人}=0.3 \\ \text{鸡蛋}=1.5 \end{cases}$$

微生物和动植物相比, 它们的结构也是非常简单的, 大多数微生物为单细胞, 只有少数为简单的多细胞。又如马铃薯纺锤形块茎病类病毒 (PSTV) 是由 359 个核苷酸组成的 RNA, 长度为  $50\text{nm}$ ; 阮病毒仅由蛋白质分子组成。

### 2. 吸收多, 转化快

科学家研究发现, 微生物吸收和转化物质的能力比动物、植物要高很多倍, 如在合适

的环境下，大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 每小时可消耗其自重2000倍的乳糖。产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 合成蛋白质的能力比大豆强100倍，比食用公牛强10万倍，微生物的这个特性为它们的高速生长繁殖和产生大量代谢产物提供了充分的物质基础，从而使微生物有可能更好地发挥“活的化工厂”的作用，人类对微生物的利用主要体现在它们的生物化学转化能力上。

### 3. 生长旺，繁殖快

生物界中，微生物具有惊人的生长繁殖速度，其中二等分裂的细菌尤为突出。人们研究得最透彻的微生物是大肠杆菌 (*Escherichia coli*)，其细胞在合适的生长条件下，每繁殖一代的时间是12.5 ~ 20.0min。如按20min繁殖一代计，则每小时繁殖3代，24h可繁殖72代，菌体数目可达到 $4.722 \times 10^{24}$ 个 (约 $4.722 \times 10^6$ kg)，如果把这些细胞排列起来可将整个地球表面覆盖。但事实上，由于营养、空间、代谢产物等种种条件的限制，细菌的指数分裂速度只能维持数小时，而在液体培养基中，细菌细胞的浓度一般仅能达到 $10^8 \sim 10^9$ 个/mL。

微生物快速繁殖的特点为在短时间内获得大量菌体提供了极为有利的条件。同样，如果是微生物引起污染、腐败等，其破坏速度也是惊人的。

### 4. 适应强、易变异

微生物有极其灵活的适应性，这是高等动植物无法比拟的，诸如抗热性、抗寒性、抗盐性、抗酸性、抗压力等能力。例如：在海洋深处的某些硫细菌可在250 ~ 300℃之间生长；嗜盐细菌可在饱和盐水中正常生长繁殖；氧化硫杆菌 (*Thiobacillus thiooxidans*) 在pH1 ~ 2酸性环境中生长。芽孢杆菌属 (*Bacillus. sp.*) 的芽孢在琥珀内蜜蜂肠道中已保存了2500万 ~ 4000万年。

微生物的个体一般都是单倍体，加之它具有繁殖快、数量多以及与外界环境直接接触等特性，虽然微生物的变异频率仅为 $10^{-9} \sim 10^{-6}$ ，但也可在短时间内产生大量变异的后代。在微生物育种中利用变异这一特性可获得高产菌株。如在1943年，利用产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 发酵生产青霉素，每毫升青霉素发酵液中只能产生20单位的青霉素，生产1茶匙青霉素约需数千英镑。而现在通过微生物遗传育种工作者的不懈努力，使该菌产量变异逐渐累积，加之其他条件的改进，每毫升发酵液中达到5万单位，甚至达到10万单位，成本大大降低。这在动植物育种工作中是不可思议的。这是对人类有益的变异。

实践中常遇到一些有害变异，在医疗中最常见的是致病菌对抗生素所产生的抗药性变异。青霉素于1943年刚问世时，对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 最低抑菌浓度为0.02μg/mL，过了几年，抑菌浓度不断提高，有的菌株的耐药性竟比原始菌株提高了1万倍。如在20世纪40年代用青霉素治疗时，即使是严重感染的病人，每天只需10万单位，而现在成人需800万单位，新生儿也不少于40万单位。病情严重时，甚至用数千万。同时也说明了“滥用抗生素无异于玩火”的口号是有充分科学依据的。

微生物容易变异，使得微生物育种工作相对高等动植物育种容易得多。但也存在许多不利的方面，会给菌种保藏工作带来一定不便。若致病菌发生耐药性变异，会造成原来的有效药物失去药效，迫使人们不得不去寻找新的药物。



## 5. 分布广, 种类多

微生物在自然界的分布极为广泛。土壤中、海洋内、河流里、空气中、高山上、岩石内到处都有微生物。人们用地球物理火箭在距地球表面 85km 的空中找到了微生物, 在万米深的海底找到了微生物, 在 427m 的沉积岩心中也找到了活的细菌。食物(手指甲盖大的生肉上有上万个)中、粮食(1g 上有几千到几万个)内、饮料(1 汤匙生牛奶中有 2000 万个)里、动植物体内及人的肠道(100 万亿个, 近 400 种)中都有微生物。

微生物的种类繁多。目前已发现的微生物约有 15 万种。但据苏联的科学家估计这只占微生物总量的 5% ~ 10%。随着分离、培养方法的改进和研究工作的进一步深入, 将会有更多的微生物被发现。因而研究和开发微生物资源的前景是十分灿烂的。



## 二、微生物学

### (一) 微生物学及其研究内容

微生物学是研究微生物及其生命活动规律和应用的学科。研究内容涉及微生物在群体、细胞或分子水平上的形态结构、分类鉴定、生理生化、生长繁殖、遗传变异、生态分布以及微生物各类群之间、微生物与其他生物之间的相互作用、相互影响, 微生物在农业、工业、环境保护、医疗卫生事业等方面的应用。

### (二) 微生物学的任务

微生物学是研究微生物及其生命活动规律, 以及其与人类关系的一门学科, 它的根本任务就是发掘微生物资源, 充分利用和改善有益微生物; 控制、消灭或改造有害微生物, 消除其有害影响, 使其更好地造福人类。

### (三) 微生物学的发展

#### 1. 发展简史

微生物学的发展是随着人类认识自然和改造自然的过程中发展起来的。微生物学的发展史分为 5 个时期: 史前期、初创期、奠基期、发展期和成熟期(见表 1-2)。

表 1-2 微生物学的发展简史

发展时期	经历时间	实质	特点	代表人物
史前期	约 8000 年前 ~ 1676 年	朦胧阶段	人类已在应用微生物, 如发酵、酿造等, 但未发现微生物的存在	各国劳动人民
初创期	1676 ~ 1861 年	形态描述阶段	世界上第一次发现了微生物的存在(当时称为“微动物”)	列文·虎克——微生物学的先驱者
奠基期	1861 ~ 1897 年	生理水平研究阶段	①微生物学开始建立; ②创立了一整套独特的微生物学基本研究方法; ③开始运用“实践-理论-实践”的思想方法开展研究; ④建立了许多应用性分支学科; ⑤进入寻找人类和动物病原微生物的“黄金时期”	①巴斯德——微生物学奠基人; ②科赫——细菌学奠基人

续表

发展时期	经历时间	实质	特点	代表人物
发展期	1897 ~ 1953年	生化水平研究阶段	①对单细胞酵母菌“酒化酶”进行生化研究；②发现微生物的代谢统一性；③开始寻找各种有益微生物代谢产物；④普通微生物学开始形成；⑤各相关学科和技术方法相互渗透、相互促进，加速了微生物学的发展	E. Buchner——生物化学奠基人
成熟期	1953年至今	分子生物学水平研究阶段	①微生物学从一门在生命科学中较为孤立的以应用为主的学科，成为一门十分热门的前沿基础学科；②在基础学理论的研究方面，逐步进入到分子水平的研究，微生物迅速成为分子生物学研究中的最主要的对象；③在应用研究方面，向着更自觉、更有效和可被人控制的方向发展	J. Watson和F. Crick——分子生物化学奠基人

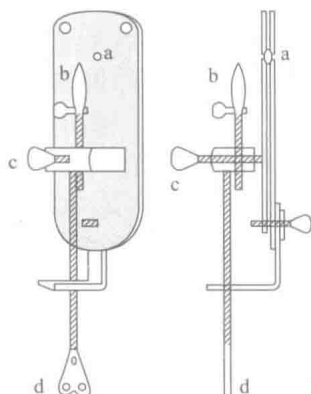
## 2. 微生物学的先驱及其贡献

从表1-2中可以看出，从微生物的发现到微生物学的创立，经历了近3个世纪，这是无数科学家共同努力的结果。在微生物学的发展史上，有许多科学家为微生物学的建立、发展做出了巨大的贡献。

列文·虎克（Antony van Leeuwenhoek，荷兰，1632—1723年）自制了世界上第一台显微镜（见图1-1），其放大倍数为50～300倍，仅用一个透镜安装在两片金属薄片中间，在透镜前有一根金属短棒，在棒的尖端放上需要观察的样品，利用中部的调焦螺旋来调节焦距。1676年他利用这种显微镜，观察到了一些细菌和原生动物，当时称为“微动物”，首次揭示了微生物世界。由于他的杰出贡献，1680年他当选为英国皇家学会会员。随后，许多研究者凭借显微镜对微生物类群进行了广泛的观察和研究，充实和扩大了人类对微生物类群认识的视野。

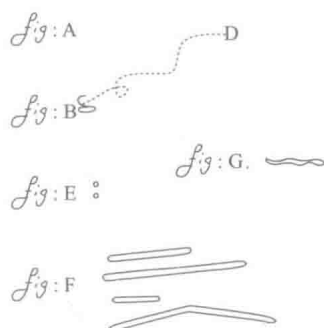


(a) 列文·虎克像



(b) 单式显微镜

a为透镜，b为装样针，c和d为调焦螺旋



(c) 各种口腔细菌

图1-1 列文·虎克及其单式显微镜

在列文·虎克首次发现微生物之后的200年，人们对微生物的研究基本停留在形态描述和分类工作方面，未能将其形态和生理活动与人类生产实践联系起来。直到19世纪中期以法国的巴斯德（Louis Pasteur）和德国的科赫（Robert Koch）为代表的科学家的出现，才改变了这种格局。

巴斯德（Louis Pasteur，法国，1822—1895年）是微生物学的奠基人。他把微生物学的研究从形态描述推进到生理学研究的水平，并开创了寻找病原微生物的兴盛时期，使微

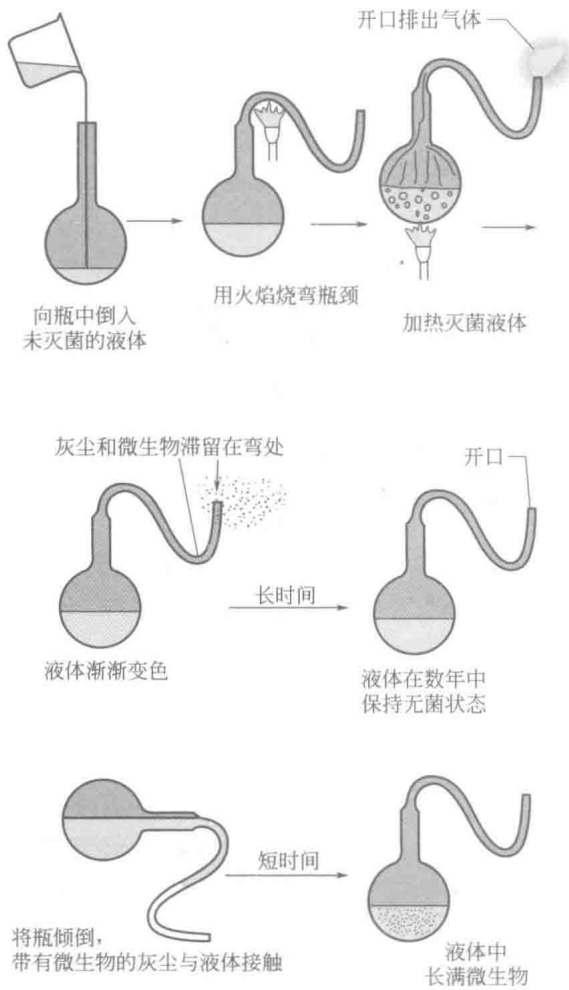


图1-2 曲颈瓶实验

生物学开始以独立的学科形式形成。巴斯德的卓越贡献主要集中在以下几个方面：①彻底否定了“自然发生学说”（简称“自生说”）。“自生说”是一个古老的学说，认为一切生物是自然发生的。到了17世纪，虽然由于研究植物和动物的生长发育和生活循环，使“自生说”逐渐软弱，但是由于技术问题，如何证实微生物不是自然发生的仍然是一个难题，这不仅是“自生说”的一个顽固阵地，同时也是人们正确认识微生物生命活动的一大屏障。巴斯德在前人工作的基础上，进行了许多实验，其中著名的曲颈瓶实验无可辩驳地证实，空气内确实含有微生物，它们引起有机质的腐败。巴斯德自制了一个具有细长而弯曲的颈的玻璃瓶，其中盛有有机物水浸液（见图1-2），经加热灭菌后，瓶内可一直保持无菌状态，有机物不发生腐败，因为弯曲的瓶颈阻挡了外面空气中微生物直达有机物浸液内，一旦将瓶颈打断，瓶内浸液中才有了微生物，有机质发生腐败。巴斯德的实验彻底否定了“自生说”，并从此建立了病原学说，推动了微生物学的发展。②免疫学——预防接种。英国医生琴纳（Jenner）虽然早在1798年发明了种痘法可预防天花，但却不了解这个免疫过程的基本机制，因此，这个发现没能获得继续发展。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，以预防鸡霍乱病。其后他又研究了牛、羊炭疽病和狂犬病，并首次制成狂犬病疫苗，证实其免疫学说，为人类防病、治病作出了重大贡献。③证实发酵是由微生物引起的。酒精发酵是一个由微生物引起的生物过程还是一个纯粹的化学反应过程，曾是化学家和微生物学家激烈争论的问题。巴斯德在否定“自生说”的基础上，认为一切发酵作用都可能和微生物的生长繁殖有关。经不断地努力，巴斯德终于分离到了许多引起发酵的微生物，并证实酒精发酵是由酵母菌引起的。此外，巴斯德还发现乳酸发酵、醋酸发酵和丁酸发酵是由不同细菌所引起的，为进一步研究微生物的生理生化奠定了基础。④发明了巴氏消毒法。在60～65℃短时间加热处理，可杀死有害微生物。该消毒方法一直沿用至今。

科赫（Robert Koch，德国，1843—1910年）作为细菌学的奠基人，在病原菌的研究及细菌的分离、培养等方面做出了杰出的贡献：①发明了明胶固体培养基，并建立通过固体培养分离纯化微生物的技术。②用自创的方法分离到许多病原菌，如霍乱弧菌（1883年）、炭疽芽孢杆菌（1887年）、链球菌（1882年）、结核分枝杆菌（1882年），发现了肺结核的病原菌，这是当时死亡率极高的传染病，科赫因此而获得了诺贝尔奖。③提出了科赫法则。科赫法则的要点是：病原微生物必须能自原宿主分离出来，并在培养基中培养成纯培养，用这种微生物的纯培养接种健康而敏感的宿主，同样的疾病会重复发生，能重新分离出同一病原微

生物学开始以独立的学科形式形成。巴斯德的卓越贡献主要集中在以下几个方面：①彻底否定了“自然发生学说”（简称“自生说”）。“自生说”是一个古老的学说，认为一切生物是自然发生的。到了17世纪，虽然由于研究植物和动物的生长发育和生活循环，使“自生说”逐渐软弱，但是由于技术问题，如何证实微生物不是自然发生的仍然是一个难题，这不仅是“自生说”的一个顽固阵地，同时也是人们正确认识微生物生命活动的一大屏障。巴斯德在前人工作的基础上，进行了许多实验，其中著名的曲颈瓶实验无可辩驳地证实，空气内确实含有微生物，它们引起有机质的腐败。巴斯德自制了一个具有细长而弯曲的颈的玻璃瓶，其中盛有有机物水浸液（见图1-2），经加热灭菌后，瓶内可一直保持无菌状态，有机物不发生腐败，因为弯曲的瓶颈阻挡了外面空气中微生物直达有机物浸液内，一旦将瓶颈打断，瓶内浸液中才有了微生物，有机质发生腐败。巴斯德的实验彻底否定了“自生说”，并从此建立了病原学说，推动了微生物学的发展。②免疫学——预防接种。英国医生琴纳（Jenner）虽然早在1798年发明了种痘法可预防天花，但却不了解这个免疫过程的基本机制，因此，这个发现没能获得继续发展。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，以预防鸡霍乱病。其后他又研究了牛、羊炭疽病和狂犬病，并首次制成狂犬病疫苗，证实其免疫学说，为人类防病、治病作出了重大贡献。③证实发酵是由微生物引起的。酒精发酵是一个由微生物引起的生物过程还是一个纯粹的化学反应过程，曾是化学家和微生物学家激烈争论的问题。巴斯德在否定“自生说”的基础上，认为一切发酵作用都可能和微生物的生长繁殖有关。经不断地努力，巴斯德终于分离到了许多引起发酵的微生物，并证实酒精发酵是由酵母菌引起的。此外，巴斯德还发现乳酸发酵、醋酸发酵和丁酸发酵是由不同细菌所引起的，为进一步研究微生物的生理生化奠定了基础。④发明了巴氏消毒法。在60～65℃短时间加热处理，可杀死有害微生物。该消毒方法一直沿用至今。



生物并培养成纯培养(图1-3)。<sup>④</sup>创立了许多显微镜技术,如细菌鞭毛染色法、显微摄影技术等。

巴斯德和科赫的杰出工作,使微生物学作为一门独立的学科开始形成,并为今后微生物学的研究和发展奠定了重要基础。

1860年,英国外科医生李斯特应用药物杀菌,并创立了无菌的外科手术操作方法。1897年德国学者毕希纳发现了酵母菌酒精发酵的酶促过程,将微生物生命活动与酶化学结合起来。1929年英国人弗莱明发现青霉菌能抑制葡萄球菌的生长。自1940年青霉素被美国人Florey和Chain分离出来并由此开始了现代抗生素发酵工业,微生物作为药物来源的重要地位才被普遍确认。而仅仅经过半个多世纪,微生物药物已经从单一品种发展成为抗病原生物、抗肿瘤、免疫调节剂、酶制剂、调节细胞功能、调节动植物生长等诸多领域应用的重要药物种类。

20世纪以后,相邻学科研究成果的应用使微生物学沿着两个方向发展,即应用微生物学和基础微生物学。在应用方面,对人类疾病和躯体防御技能的研究,促进了医学微生物学和免疫学的发展,同时农业微生物学、兽医微生物学也相继成为重要的应用学科。应用成果不断涌现,促进了基础研究的深入,细菌和其他微生物的分类系统得到不断完善。对细胞化学结构和酶及其功能的研究发展了微生物生理学和生物化学。微生物遗传与变异的研究导致了微生物遗传学的诞生。微生物生态学在20世纪60年代也形成了独立的学科。

在基础理论研究的同时,微生物学的实验技术同样发展迅速,19世纪后期微生物的培养技术已趋成熟,如显微技术、灭菌方法、加压灭菌器、纯化培养技术、革兰染色法、培养皿和琼脂作凝固剂等。如今微生物学实验技术已相当完善,包括形态研究、纯培养技术、微生物的营养与环境条件、微生物的分离纯化与鉴定、微生物遗传学实验、应用微生物实验等。这些技术已不仅仅作为基础研究的手段,更重要的是其在应用学科的发展中发挥了巨大的作用。

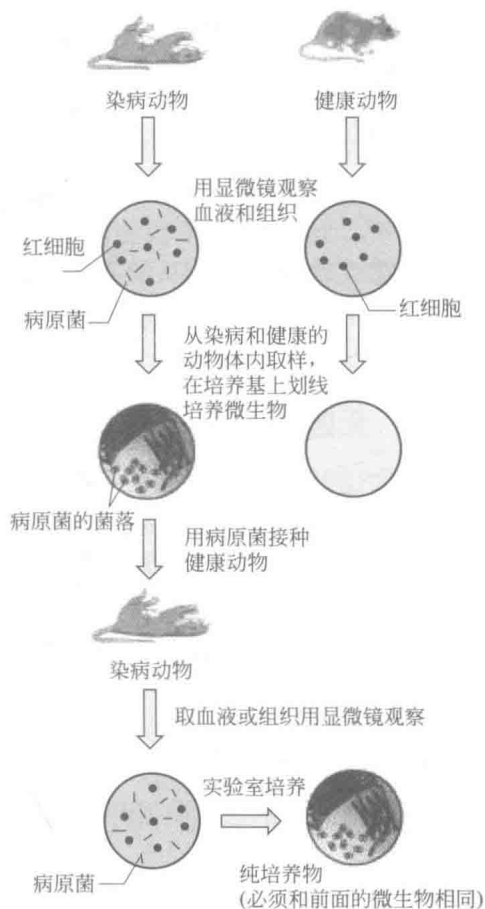


图1-3 科赫法则

#### (四) 微生物学研究的基本方法

在自然科学中,微生物世界难以被认识的主要障碍是:个体微小、外貌不显、杂居混生、因果难联。在微生物学的创立和发展中,克服这四道难关的主要代表是列文·虎克、巴斯德、科赫等人。由他们所创建的显微镜技术、无菌技术、纯种分离技术和微生物纯种培养技术四项独特研究方法,为微生物学的创建和发展奠定了基础,而且至今仍有力地推动着现代生物学的研究和生产实践的发展。

##### 1. 显微镜技术

栖居于自然界中的微生物是以肉眼难以分辨地杂居丛生着。在显微镜问世之前,人们





是无法目睹这个丰富多彩的微生物世界的。光学显微镜的诞生，将肉眼的分辨率提高到微米级水平，而电子显微镜的出现使人眼分辨率达到纳米水平。从此过去视而不见、触而不觉的微生物世界就展现在人们的眼前。第一台显微镜是由荷兰的詹森父子发明的。列文·虎克是第一个用显微镜来观察和描述微生物的人。以后光学显微镜中相继出现了相差、暗视野和荧光等新附件，加上良好的制片和染色技术等又大大推动着微生物学形态、解剖和分类等研究。20世纪30年代初电子显微镜技术，以及与之配套的各种新技术和新方法的应用，使微生物学的研究从细胞水平逐渐向亚细菌和分子水平迈进。所以显微镜技术的问世和完善，不仅为揭开微生物世界作出贡献，同是也为揭示微观领域的奥秘提供了强有力的工具。

## 2. 无菌技术

要真正揭开微生物世界的奥秘，就得深入研究，也就是必须创造一个无其他微生物干扰的无菌环境，即我们常说的无菌技术。无菌技术是在分离、转接及培养纯培养物时防止其被其他微生物污染的技术。现代无菌技术是由法国人阿贝特（Appert）在食品保藏中偶然发现的。而对灭菌技术的原理等作出科学解释的是巴斯德，他所进行的举世闻名的曲颈瓶实验，不仅彻底否定了当时十分流行的“生命自然发生学说”，而且为微生物学中的无菌技术的创立和发展奠定了理论和实践基础。

## 3. 纯种分离技术

纯种分离技术是人类揭开微生物世界奥秘的重要手段。要揭开在自然条件下处于杂居混生状态的某一微生物的特点，以及它们对人类是有益还是有害，就必须采用在无菌技术基础上的纯种分离方法。早期对微生物群体进行单个纯化分离者是李斯特，但真正取得突破的是科赫发明的培养皿琼脂平板技术。从此，它为微生物的纯种分离技术奠定了扎实的基础。直到现在它仍广泛地应用于微生物菌种的筛选、鉴定、育种、计数及各种生物测定等工作中。

## 4. 微生物纯种培养技术

微生物纯种培养技术在科学实验和生产实践中有着极其重大的理论与实践意义。若为微生物提供一个初级培养的实验方法并不复杂，但要使微生物在大规模生产中良好地生长或累积代谢产物，就得考虑一些最为合理的培养装置和有效的工艺条件，并且还要在整个微生物的发酵过程中严防其他微生物的干扰，即防止杂菌污染。在整个微生物纯种培养技术的发展过程中，大规模液体深层通气搅拌发酵装置，即发酵罐的发明及大规模地普及使用，为生物工程学开辟了崭新的前景。同时微生物发酵工业也已成为国民经济的重要支柱之一。

综上所述，微生物学中四项独特的基础研究技术无疑为微生物学的创始、奠基和发展提供了基础。随着微生物在工、农、医及环保等领域中日益广泛地应用，微生物学的研究方法和技术必将日趋完善和发挥更大的作用。



# 三、微生物技术的应用

## （一）微生物与制药工业的关系

微生物与制药工业、药品质量和人的关系非常密切，在制药工业中，有些药品和制剂本