



农用微生物

基本知识和创新技术

尹莘耘 编著

NONGYONG WEISHENGWU
JIBENZHISHI HE
YANJIU JISHU

浙江科学技术出版社

65-284
137
C2

农用微生物基本知识和创新技术

尹莘耘 编著

浙江【科1997技27出】版社

责任编辑 吴兆祥

封面设计 曹所生

农用微生物基本知识和创新技术

尹莘耘 编著

*

浙江科学技术出版社出版

浙江新华印刷厂印刷

浙江省新华书店发行

开本787×1092 1/32 印张5.625 字数125,000

1986年1月第一版

1986年1月第一次印刷

印数1-2,500

前 言

四十年来，作者从事植物病理和抗菌菌、抗菌素的研究，深感微生物在农业生产中的潜力很大。无论是防病、治虫、除草、造肥，还是刺激动植物的快速生长，或者在畜牧兽医、疾病等防治业上，以及蘑菇、木耳等副业生产、蛋类果蔬的保藏中，都可利用微生物或其代谢产物抗菌素、刺激素等为人类服务。

我国地处温带和亚热带，微生物的资源特别丰富。1955年在北京召开的抗生素学术会议上，日本代表住木谕介说：“贵国土地辽阔，保藏着大量微生物资源，真是取之不尽。”1957年参观莫斯科新抗菌素研究所时，专家们曾对我说：“你们两广的土壤中，微生物的抗菌活性最高，我们每年从那里搜集四、五千份土样，获得不少高效新菌种。”事实确是这样，过去，我们从京郊土壤中分离的真菌，具有抗菌活性的只占15%左右，而从海南岛土壤中分离的常高达85%。但是在寒冷地区，也能找到高效新品种。例如“769”、“5406”等，都是在我国北部地区发现的。可见农用微生物新品种的搜寻，除注意其地域分布而外，筛选的方法和技术，尤当予以重视。

为了便于广大群众开发祖国微生物的宝库，加速我国四化的建设，特利用业余时间总结国内外及本人的实践经验，编写成《农用微生物基本知识和创新技术》这本书。在第一篇的两章中，简要介绍细菌、放线菌、真菌、病毒四大类微生物与农业的关系以及它们的形态、分布、营养、生长等情况，使研究

农用微生物工作者有一个概观，大致哪些微生物对农业是有害的，哪些是有益可被利用的，到哪里去找寻？怎样培养它们才能促使快速生长繁殖，以便于大规模生产应用。第二篇的三章，重点介绍研究农用微生物的基本技术，例如微生物的显微观测、活性检定、菌体染色、孢子计数、培养基的配制和灭菌，以及微生物的分离和接种等技术。掌握了这些技术，才便于识别各类微生物的外表形态，测知它们的代谢活性（抗菌素和刺激素等），选择它们最适合的培养配方和灭菌方法，分离出寄生于农作物的单纯病原菌和土壤中有利的益生菌及多功能微生物，用人工方法使病原菌接种于寄主作物，然后考验益生菌的防治效果。第三篇详细阐述农用微生物的创新技术，包括内吸抗菌素、杀虫素、刺激素以及多功能菌剂新菌种筛选的方法；新选良种的诱变提高和复壮保藏，以及新菌剂的田间试验和标本制作等一整套的方法和技术。全面掌握了农用微生物的基础知识、基本技术以及创新的系统方法后，就可以心中有数，按部就班地把新品种迅速地创造出来。

但为作者的水平和精力所限，本书还难免有不少缺漏的地方，希望读者不吝指出，以便修正补充。

最后，对我院陶天申教授大力协助修饰全文，对北京农业大学董元同志为本书描绘插图，表示深切感激，特志谢忱。

尹莘耘

1985年5月于中国农业科学院

目 录

前 言

第一篇 研究农用微生物必备的基本知识

第一章 农用微生物的概观	(1)
第一节 细菌	(1)
一、细菌与农业的关系	(1)
二、细菌的形态	(2)
三、细菌的细胞结构	(4)
四、细菌的繁殖及生活史	(7)
第二节 放线菌	(8)
一、放线菌与农业的关系	(8)
二、放线菌的分布	(8)
三、放线菌的生活史和形态特征	(9)
四、放线菌的分群	(13)
第三节 真菌	(17)
一、真菌与农业的关系	(17)
二、真菌的形态	(18)
三、真菌的生活史	(20)
四、真菌的分类	(21)
第四节 病毒	(22)
一、病毒与人类的关系	(22)
二、病毒的生物学特性	(24)
三、病毒的分类	(26)

第二章 微生物的营养与生长 (30)

第一节 微生物的营养 (30)

一、微生物细胞的化学组成 (30)

二、微生物营养物质的选择 (32)

三、微生物培养基的配制原则 (35)

四、微生物培养基的类型 (37)

第二节 微生物的生长发育 (39)

一、影响微生物生长发育的环境因子 (40)

二、微生物的生长规律 (44)

三、微生物生长的测定 (45)

第二篇 研究农用微生物的基本技术

第三章 微生物的观测及染色技术 (49)

第一节 微生物的显微观测技术 (49)

一、显微镜及其使用观察技术 (49)

二、微生物的显微测量技术 (51)

第二节 微生物活孢子计数法 (54)

第三节 微生物活性的测定法 (57)

一、抗菌素的微生物效价测定法 (57)

二、微生物刺激素活性测定法 (63)

第四节 微生物染色技术 (72)

一、微生物的一般染色法 (72)

二、微生物的特殊染色法 (73)

第四章 微生物的培养基和灭菌技术 (77)

第一节 微生物培养基的配方 (77)

一、细菌的各种培养基配方 (77)

二、放线菌的各种培养基配方 (82)

三、真菌的各种培养基配方 (87)

第二节 微生物研究和生产中的灭菌技术	(91)
一、物理因子灭菌法	(91)
二、化学因子灭菌法	(99)
第五章 微生物的分离和接种技术	(102)
第一节 植物病原菌的分离技术	(102)
一、病原真菌的分离	(102)
二、病原细菌的分离	(106)
第二节 土壤微生物的分离技术	(109)
一、放线菌类抗生素的分离	(109)
二、真菌类抗生素的分离	(113)
三、芽孢类拮抗性细菌的分离	(116)
第三节 微生物的接种技术	(117)
一、真菌性病害的接种技术	(118)
二、细菌性病害的接种技术	(121)
三、病毒性病害的接种技术	(123)
第三篇 农用微生物的创新技术	
第六章 农用微生物新品种的筛选法	(127)
第一节 内吸新农抗菌种的筛选法	(127)
一、真菌性病害新农抗菌种的筛选法	(128)
二、细菌性病害新农抗菌种的筛选法	(132)
三、防治病毒病害的新农抗菌种的筛选法	(138)
第二节 杀虫性新农抗菌种的筛选法	(141)
一、防治昆虫类新农抗菌种的筛选问题	(141)
二、杀螨类新农抗菌种的筛选问题	(142)
三、杀线虫抗菌素菌种的筛选法	(142)
第三节 刺激素新菌种的筛选法	(143)
一、小球藻或栅藻的测定法	(143)

二、豆芽弯曲测定法	(144)
三、固氮菌刺激测定法	(145)
四、酵母菌刺激测定法	(145)
五、黄瓜子叶贴块测定法	(146)
六、红萍分裂测定法	(146)
七、愈合组织测定法	(146)
八、植株直接测定法	(147)
第四节 多功能新菌剂的筛选法	(147)
第七章 新选良种的诱变提高和复壮保藏	(149)
第一节 新选良种的诱变	(149)
一、诱变育种	(149)
二、杂交育种	(152)
第二节 优良菌种的复壮和保藏	(154)
一、优良菌种的复壮	(154)
二、良种的保藏	(156)
第八章 新菌剂的田间试验及标本制作	(160)
第一节 新菌剂的田间试验法	(160)
一、田间试验的一般知识	(160)
二、新菌剂田间药效试验技术	(163)
第二节 新菌剂试验标本制作技术	(168)
一、干标本的制作技术	(168)
二、液浸标本的制作及保色处理	(169)

第一篇 研究农用微生物必备的基本知识

第一章 农用微生物的概观

微生物是一群个体微小、结构简单的生物，包括细菌、放线菌、真菌（霉菌和酵母等）、立克次氏体、病毒、单细胞藻类和原生动物等。农用微生物中，主要是细菌、放线菌、真菌和病毒四大类。当前以放线菌的作用最广，发展最快。

一般微生物的个体均小，不易用肉眼观察，必须借助于显微镜放大到几百倍或上千倍才能看到。象病毒这类东西，个体更小，需用电子显微镜扩大到几万倍才能观察。当微生物大量生长繁殖，聚集成堆后，肉眼也能看清。例如麦类的锈病和黑穗病、浆糊上发的霉、工厂里生产的5406菌肥等，都是它们的个体堆集而成的群体。

在自然界里，微生物的种类繁多，对人和动植物凡是有危害的要加以控制；其中对农业有益的要研究利用。本章将重点介绍与农业有关的细菌、放线菌、真菌和病毒的形态、构造和生物学特性等，以便对它们有所了解、认识，进一步研究、控制和利用它们。

第一节 细菌

一、细菌与农业的关系

细菌是一群个体微小的单细胞生物。其大小常以微米(μ)

来表示。它的种类繁多，已经知道的大约有一千五百多种。早先，人们对细菌能引起肺病、霍乱、伤寒、痢疾等病有些害怕；后来，又发现它还是引起白菜软腐病、水稻白叶枯病、棉花角斑病的敌人，对它有些憎恨；近年由于科学技术的发达，已把细菌不断应用于工农业生产上和卫生医疗事业中。例如用枯草芽孢杆菌生产的淀粉酶和蛋白酶已普遍被食品、皮革和纺织工业所采用；酶法生产葡萄糖、皮革脱毛、棉布退浆等工艺的改革取得了重大成果；根瘤菌、固氮菌、磷细菌、钾细菌作为细菌肥料已在一些地区推广应用；苏云金杆菌等（杀螟杆菌、青虫菌、7216）细菌农药已广泛使用于害虫防治中；在国际上五千多种抗菌素中，大约有10%是用细菌生产的，其中杆菌肽素等，已普遍应用于各国医疗事业中。

二、细菌的形态

细菌的形态包括个体形态和菌落特征两个部分。

（一）细菌的个体形态 从外形上看，可分球状、杆状和弧状三种基本形态。

1. 球菌 呈球状的细菌称为球菌。球菌平均直径一般在0.5~1.0微米。单独存在时成正圆形或扁圆状。按其分裂方向

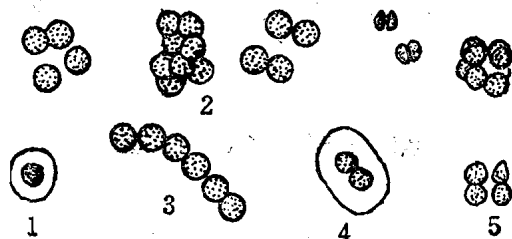


图1 球菌的各种形态

1. 单球菌；2. 葡萄球菌；3. 链球菌；4. 双球菌；5. 四链球菌和八迭球菌

和分裂后排列的情况，可分为单球菌、双球菌、链球菌、四链球菌、八迭球菌和葡萄球菌。后者由许多球菌聚在一起如一串葡萄，其中金黄色葡萄球菌常被用为抗菌素的检验菌种。

2. 杆菌 细菌呈杆状，一般长 $1\sim 8$ 微米，宽 $0.5\sim 1.0$ 微米，其大小有显著的差别。有些杆菌很长，呈圆柱状，为长杆菌。有些较短而粗，为短杆菌。杆菌的两端因菌种不同而呈现各种形态，有的两端平截状，有的钝圆，有的略尖，有的膨大。这些特征对细菌的识别有一定的帮助。有的杆菌可形成芽孢，叫芽孢杆菌（如杀螟杆菌、青虫菌等属于晶体芽孢杆菌），有的杆菌在不同的发育阶段中出现变形体，如根瘤菌，可呈不规则的分枝杆状（见图2）。

3. 弧菌 细胞呈弯曲状的细菌通称为螺旋菌。根据其弯曲的程度和螺旋的次数将它们分为弧状菌和螺旋状菌。菌细胞略弯呈弓形的为弧菌，如霍乱弧菌。细胞作螺旋状的为螺旋菌，如小螺菌（见图3）。



图2 各种杆菌形态

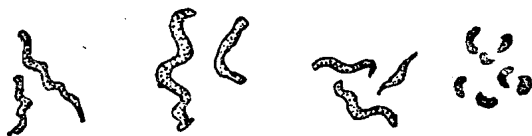


图3 螺旋菌和弧菌形态

细菌的形状与环境因子有关，如温度、培养菌龄、基质浓度

和成分等。各种细菌在幼嫩时期和适宜的培养条件下，表现正常的形态。当培养条件改变或菌体变老时，则常出现变形体。若把它们转移到新鲜培养基上，并在适合条件下生长，则又能恢复其原来的形状。

(二) 细菌的菌落特征 将细菌接种到固体培养基上，在适宜的温度下，经过一定时间，可由一个菌体通过分裂繁殖形成一堆肉眼可以看见的群体，即称为菌落。

细菌的菌落多数是表面光滑、润湿、半透明或不透明，有些还具有各种颜色。但也有些表面干燥带皱折的。一般都比较小，菌体与培养基结合不紧，易被接种针尖挑起。菌落外形的特点如菌落大小、形状、颜色、光泽度、透明度等都是鉴别细菌的依据。细菌菌落和放线菌菌落不同的地方，放线菌菌落表面大都有短毛，正反面颜色不同；而细菌菌落的表面是光滑的，两面的颜色是一致的。

三、细菌的细胞结构

细菌的细胞包括细胞壁、细胞膜、细胞质、细胞核物质及各种内含体（见图4），有些细菌外部有鞭毛或荚膜，有的细菌在细胞内部可形成芽孢。

(一) 细菌细胞的基本结构

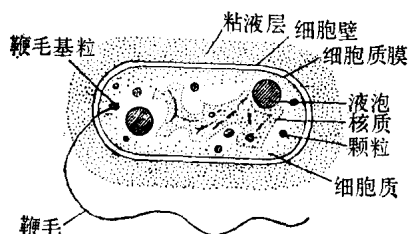


图4 细菌细胞的结构

1. 细胞壁 细菌细胞壁位于菌体的外表面，是一层无色透明的薄膜。细胞壁比较坚韧而富有弹性，具有固定菌体外形和保护菌体的作用。它是由蛋白质、类脂质和多糖复合物等组成。也有些细菌（如

醋酸菌)的细胞壁中含有纤维素等成分。

2.细胞膜 细胞膜紧贴细胞壁内,是一层薄而柔软、具有弹性的膜,主要由脂类、蛋白质和糖类组成。膜有选择性吸收的半透性功能,在吸收营养物质方面起重要作用,并可调节菌体内与环境间的平衡,同时也是许多重要酶系统的活动场所。了解细胞膜的性质,对研究抗菌素的应用及作用机制等具有重大的意义。

3.细胞质 是一种无色透明的粘稠状胶体。其主要成分是水、蛋白质、核酸和脂类等。细胞质的体外,有细胞膜包围,膜外又包有细胞壁。采用溶菌酶把细菌的细胞壁消化掉,在含有抗菌素和0.2M蔗糖培养基上即能生存。抗菌素起防腐作用,蔗糖可维持适当的渗透压。这样培养的细胞质能进行许多代谢作用,包括呼吸作用、合成蛋白质、核酸、酶以及抗菌素等。两个不同性质的各不具有细胞壁的细菌,混合在一起时,其细胞质可能起杂交作用,为当前微生物遗传工程中研究遗传变异,提高效价的一种手段。

4.细胞核物质 细菌细胞核物质的主要成分是去氧核糖核酸(DNA)和核糖核蛋白紧密联系成为一个海绵状的基本结构。其中不含染色体,也无核膜包围,和植物的细胞核是有较大区别的。但是细菌的细胞核物质仍然是细菌传递遗传特性的器官。

5.内含物 细胞质内的内含物可分两大类:一是属于贮藏物质的,有脂肪、肝糖、淀粉以及异染颗粒等;二是属于代谢产物的,有硫酸钙、草酸钙、色素和某些杀虫细菌(如杀螟杆菌)所特有的伴胞晶体等。这些内含物在细菌的分类上也常作为依据。

(二)细菌细胞的特殊结构 1.荚膜 有些细菌能向细胞壁表面分泌粘液状物质,形成较厚的膜,称为荚膜。有荚膜

的细菌，外观多呈粘滑状。其一般的厚度在200毫微米以上，硬性和弹性远远小于细胞壁。荚膜中含有的水分占90%，有些细菌还含有多糖、磷质及蛋白质。

荚膜可以保护菌体免受外界干燥的影响。营养缺乏时，可以补充碳原及能量。在肌体内，具有荚膜的细菌不易被白血球吞噬，故易生长繁殖，引起感染。

2. 芽孢 很多杆菌当生长到一定时期，繁殖速度降低，菌

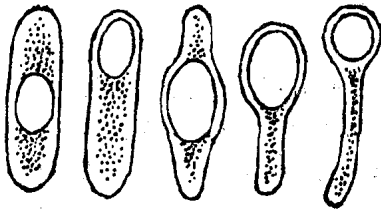


图5 细菌的芽孢

体细胞质出现浓缩凝集现象，逐步形成圆形或椭圆形的结构，称为芽孢（见图5）。能形成芽孢的杆菌称为芽孢杆菌（如杀螟杆菌、枯草杆菌等）。

芽孢是细菌生活史中的一个休眠器官。在干燥情况下，它能保存几十年而不丧失生活力。它们的代谢活动力低，并含有少量的酶，而且壁厚，含水量少，化学物质不易渗透，所以对高温、干燥、光线、化学药品等具有很强的抵抗力。芽孢在100℃下经三小时方可致死。由于芽孢具有这些特性，在发酵工业和医疗工作中的灭菌，应以杀死芽孢为标准，否则会给发酵生产和外科手术的进行带来极坏的结果。

3. 鞭毛 有许多细菌能从体内长出细长的丝状物，称为鞭毛。鞭毛是细菌的运动器官，也被认为是细菌生存适应的产物。细菌借鞭毛游动能走向营养物质和适宜的生长环境以及离开有害的物质。水生细菌通常只有一根或少数几根极生鞭毛；而陆生细菌通常产生周身鞭毛，适合它在潮湿环境下游动。鞭毛也不是一切细菌共同具有的结构，球菌中只有极少数有鞭毛，杆菌和弧菌大多具有鞭毛。鞭毛数目、着生的位置等，各

有不同，故被利用为细菌分类的一个依据。

四、细菌的繁殖及生活史

细菌以分裂的方式进行繁殖，一变二、二成四，继续到生活条件限制时为止。繁殖一代，短的只几十分钟，长的几小时。其繁殖过程包括三个连续步骤。首先是细胞核物质分裂，细胞膜在菌体的中央以横切方向形成横隔膜，使细胞质分开。其次是细胞壁向内生长把细胞膜隔分为两层，形成子细胞的细胞壁。最后，子细胞分离形成两个独立菌体。

一般细菌在水分、温度、营养物质、氧的浓度适合条件下，可以通过上述步骤不断地进行生活循环，扩大繁殖。

芽孢杆菌的生活史比较复杂，它在正常的条件下和上述的情况一样，可直接用营养细胞进行繁殖；遇到不良环境，它即产生芽孢，忍受高温或长期的干燥或药物的侵袭。环境适宜时，芽孢开始吸收水分、盐类和营养物质而体积胀大。在一小时内，孢子衣破裂，突出新细菌（图6）。

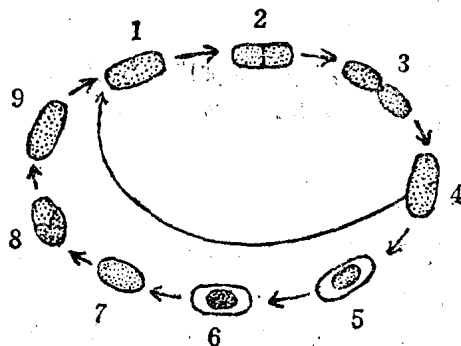


图6 芽孢杆菌的生活史

1~4 营养细胞分裂繁殖数代；5~9 芽孢的形成和萌发。1.成熟的营养细胞；2.细胞分裂；3.两个子细胞；4.子细胞生长；5.成熟细胞内形成芽孢；6.成熟的芽孢；7.芽孢从营养细胞内放出；8.芽孢萌发；9.幼小的营养细胞

第二节 放 线 菌

一、放线菌与农业的关系

放线菌的菌落呈辐射状，因而得名。它比细菌和真菌研究的历史较短，但在农业上起的作用是很大的。它不仅能够产生抗菌素防病、杀虫；同时还能分泌刺激素，促进植物细胞分裂、增大，使农作物早熟丰收。它在土壤里，还能疏松土质、转化氮、磷、钾元素，有利于农作物的生长发育。例如“5406”抗生素就是兼具以上多种性能的放线菌，所以它的增产效果比较稳定。目前使用的农业抗菌素如井冈霉素、春雷霉素、内疗素、多抗霉素等，也都是放线菌的产物。国际上抗菌素先后报道的大约有五千多种，其中半数以上是由放线菌产生的。如链霉素、土霉素、金霉素等几十个品种，早在医学上普遍应用。另外，放线菌还产生各种酶和维生素等，并已应用于皮革脱毛、石油脱蜡、烃类发酵、污水处理等各个方面。因此，放线菌在工、农、医各条战线中，都被广泛地使用。放线菌也能引起动、植物病害，但和其他微生物比，就显得次要多了。

二、放线菌的分布

放线菌在自然界中的分布极为广泛。高山、深海和北极地区都有它们的存在，而主要生存于陆地和淡水中，尤其是土壤，为这类微生物的习居场所，无论在种类和数量上都比其他地方繁多。土壤的性质、季节、植被种类等条件都影响放线菌的种类和数量。一般来说，在中性或偏碱性的土壤和有机质较丰富的土壤中较多，南方比北方为多，春、秋季比夏、冬两季