



21世纪

高等院校教材

生物科学系列

微生物学研究技术

陈声明 张立钦 主编



科学出版社

www.sciencep.com

21 世纪高等院校教材——生物科学系列

微生物学研究技术

陈声明 张立钦 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书涵盖了微生物学各分支学科的实验技术,除经典实验技术外,还有森林保护、植物保护、食品、发酵、环境、土壤及农林方面的微生物实验技术。全书共5篇21章,第一篇基础方法,包括经典实验技术;第二篇生物防治微生物及制品,包括杀虫、杀菌和除草微生物及其制剂;第三篇食品微生物及其发酵产物,包括食品微生物检测、发酵微生物的测定、食用菌的制种技术;第四篇土壤和环境微生物及其物质转化,包括土壤、环境微生物和物质转化;第五篇微生物学研究的一些新技术。

本书适合综合性大学、高等师范院校、高等农林院校微生物学及其相关学科的教师、大学本科二年级学生以及研究机构从事微生物学研究的工作人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学研究技术/陈声明,张立钦主编. —北京:科学出版社. 2006
21世纪高等院校教材—生物科学系列
ISBN 7-03-016807-0

I. 微… II. ①陈…②张… III. 微生物学-生物技术-高等学校-教材
IV. Q93

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 005074 号

责任编辑:周 辉 甄文全 李久进 沈晓晶/责任校对:宋玲玲
责任印制:张克忠/封面设计:陈 敬

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2006年2月第 一 版 开本: B5 (720×1000)
2006年2月第一次印刷 印张: 21 3/4
印数: 1—4 500 字数: 405 000

定价: 35.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈双青〉)

序

微生物学的发展史清楚地说明,研究方法的建立对促进学科的发展至关重要。由于发明了光学显微镜,人们才得以认识了众多的微小生物,它们活跃在各种自然生境中。纯种微生物的分离、培养、保藏和灭菌技术的建立,进一步为微生物学科的建立奠定了基础。从此人们可以研究各种微生物的作用。有的微生物在自然界物质循环中扮演着重要角色,有些是危害动植物的病原,有些可产生有益于人类的各种化合物(各种酿造食品、化工原料、抗生素、促进生长的物质等)。进而衍生出各种分支学科,如医学微生物学、土壤微生物学、工业微生物学、食品微生物学等,并各自建立起其独特的研究技术和试验方法。

电子显微镜的发明又使人们看到了非细胞形态的最小生物——病毒,而病毒的化学组成只是蛋白质和核酸大分子的复合体,这就使微生物学领先进入分子生物学的领域。由于微生物形体小、生长繁殖快(大肠杆菌约 20min 就可繁殖一代),并可在控制条件下大规模工业化生产,因而成为分子生物学基础理论研究的理想对象,并发展成当今的生物技术。

由陈声明教授和张立钦教授牵头编写的这本《微生物学研究技术》,包括了传统的和现代的微生物学基本技术,涉及面广、内容翔实、操作性强,可供高等院校、研究机构和相关微生物产业部门从事微生物教学和研究人员参考和选用。该书可作为生物、生物技术、森林保护、食品、农林、植物保护、环境保护、土壤等专业的微生物学实验指导教学用书。

中国科学院院士

李季伦

2005 年 10 月 25 日于北京

前 言

微生物学研究技术是生命科学中最重要的一项生物技术，微生物学的发展，甚至生命科学的发展都离不开微生物学实验方法和研究技术的重大创新。

微生物学 300 多年的发展历史，特别是近百年的飞速发展历程突出地表明，微生物学实验方法和研究技术的创建对每一个重大发现和每项基础理论的确立都起了决定性的作用。

1676 年列文虎克发明了世界上第一架显微镜，尽管是一架简陋的单式显微镜，但是他第一次看见自然界中的微小生物，从而揭开了微生物世界的奥秘，开创了微生物学研究的新纪元。

巴斯德结束了学术界长期争论不休的自然发生说，并奠定了灭菌和无菌操作的微生物学基本原理，正是依靠他创建的“曲颈瓶实验”。研究传染性病害中的“科赫氏假说”，也是在科赫学派共同创立了一系列研究技术的基础上提出来的。近代多聚核酸酶链式反应（PCR）的发明，不仅使基因操作技术向前跨了一大步，为工、农、医、食品和环保等应用部门带来了巨大的方便，还使微生物系统发生的研究进入了一个崭新的阶段。

微生物学研究技术是理论和实践紧密结合，广泛渗透和相互融合的实用型技术。我国的微生物学基本上是从 20 世纪 50 年代初才开始建立和发展的。随着我国现代化的迅速发展，无论在教学科研领域，还是各应用领域，都希望有更新颖和更实用的微生物学研究技术得到普及。陈声明教授和张立钦教授根据长期在浙江林学院和原浙江农业大学的教学实践，曾多次编写过供高等农林院校使用的《微生物实验指导》。10 年前，陈声明教授和刘丽丽教授编著的《微生物研究法》一书幸得周德庆教授和程光胜教授作序并受到同行首肯。而今，作者根据当前的形势和积累的微生物学教学经验，再次对作者和其他有关方面的资料进行了整合、精选，增加较多的分子微生物学研究技术，组织人员重新编著了《微生物学研究技术》教科书，并有幸请中国科学院院士李季伦先生作序，在此作者对多年来各位专家、学者给予的建议、指导、关心和帮助一并表示衷心的感谢！

本书编写分工如下：绪论由陈声明编写，第一篇由毛胜凤、张昕编写，第二篇由张立钦编写，第三篇由陈声明编写，第四篇由张昕、毛胜凤编写，第五篇由陈声明、张立钦编写。全文由陈声明教授和张立钦教授统稿。

由于微生物学研究技术涉及面很广，书中难免会有遗漏，企盼读者指正，以便再版时修正。

陈声明 张立钦

2005 年 9 月 28 日于杭州古城临安

目 录

序

前言

绪论.....	1
---------	---

第一篇 基础方法

第一章 显微镜的构造及其使用.....	7
---------------------	---

第一节 普通光学显微镜的构造和使用	7
第二节 相差显微镜的构造和使用	12
第三节 暗视野显微镜的构造和使用.....	15
第四节 透射电子显微镜的构造和使用	17
第五节 扫描电子显微镜的构造和使用	30
第六节 扫描透射电子显微镜的构造和使用	38
第七节 超高压电子显微镜	40

第二章 微生物的形态及其观察	41
----------------------	----

第一节 细菌的三种基本形态及其简单染色	41
第二节 细菌的运动观察及其鞭毛染色	42
第三节 细菌的革兰氏染色	45
第四节 细菌的芽孢染色	47
第五节 细菌的荚膜染色	48
第六节 霉菌和假丝酵母的载片培养与观察	50
第七节 酵母菌子孢子的培养与观察	52
第八节 放线菌的插片、搭片培养及观察	54
第九节 放线菌的玻璃纸覆盖法和印片染色法	56
第十节 病毒粒子的电镜观察	58
第十一节 几大类微生物菌落的识别与观察	61

第三章 微生物大小的测定及计数	65
-----------------------	----

第一节 微生物细胞大小的测定	65
第二节 微生物的显微镜直接计数	67
第三节 微生物平板稀释法计数	71
第四节 最大近似值法计数 (MPN) (稀释培养计数)	73
第五节 细菌生长曲线的测定	75

第四章 培养基的制备与灭菌消毒	77
第一节 培养基的制备	77
第二节 干热灭菌法	80
第三节 常压蒸汽灭菌法	82
第四节 加压蒸汽灭菌法	83
第五节 过滤除菌法	85
第六节 紫外线灭菌	88
第七节 化学药剂消毒灭菌	89
第五章 无菌操作与接种技术	93
第一节 无菌操作技术(讲解和示范)	93
第二节 微生物接种技术	96
第六章 微生物育种和菌种保藏	101
第一节 紫外线诱变育种	101
第二节 化学诱变育种	103
第三节 原生质体融合育种	105
第四节 微生物菌种常规保藏方法	113
第五节 微生物菌种的冷冻干燥保藏法	118
第六节 液氮超低温保藏法	121

第二篇 生物防治微生物及制品

第七章 杀虫微生物及其制剂	127
第一节 从感病死亡昆虫体分离杀虫苏云金杆菌	127
第二节 从感病死亡昆虫体分离杀虫日本金龟子芽孢杆菌(乳状菌)	128
第三节 用选择性培养基从土壤中分离苏云金杆菌	130
第四节 苏云金杆菌芽孢和伴胞晶体的区别(染色)	131
第五节 苏云金杆菌感染菜青虫	132
第六节 乳糖-丙酮沉淀法制备苏云金杆菌粉剂	135
第七节 白僵菌的分离与鉴定	136
第八节 白僵菌生产菌株的虫体复壮	138
第九节 用液体-固体培养法制备白僵菌粉	139
第十节 核多角体病毒的分离及提纯	141
第十一节 棉铃虫核多角体病毒制剂的制备	144
第十二节 昆虫病毒多角体的染色观察	145
第八章 杀菌微生物及其制剂	148
第一节 生防菌的主要微生物种类	148
第二节 生防菌生产工艺	149

第三节 生防菌制剂及应用	150
第九章 除草微生物及其制剂	154
第一节 除草剂的微生物种类	154
第二节 除草剂制剂及其应用	155

第三篇 食品微生物及其发酵产物

第十章 食品微生物检验及测定	161
第一节 食品中细菌总数的测定	161
第二节 食品中大肠菌群的检验	163
第三节 番茄制品中的霉菌直接镜检计数	166
第四节 食品中耐热性细菌的检验及计数	167
第五节 商业性灭菌试验	169
第六节 微生物热力致死时间的测定	173
第十一章 发酵微生物及其制品的鉴定、测定	175
第一节 糖化曲中糖化酶的测定	175
第二节 酒曲中酵母菌的分离	178
第三节 红曲的制备及红方腐乳的生产	179
第四节 泡菜制作及乳酸菌的分离与初步鉴定	182
第五节 酸奶的酿造及乳酸的快速测定（酶法）	184
第六节 食醋的酿造及醋醅中醋酸菌的分离	187
第七节 食品中乙醇的快速测定（酶法）	189
第八节 噬菌体的培养及噬菌斑的观察	191
第十二章 食用菌的制种方法和栽培技术	193
第一节 子实体形态观察	193
第二节 平菇的母种、原种、栽培种的制备	194
第三节 平菇的出菇试验	197
第四节 香菇的纯种分离与培养	198
第五节 灵芝的纯种分离与培养	200
第六节 食用菌的菌种保藏与复壮	202

第四篇 土壤和环境微生物及其物质转化

第十三章 土壤、环境微生物	209
第一节 土壤中好氧细菌的分离与计数	209
第二节 土壤中放线菌的分离与计数	211
第三节 土壤中真菌的分离与计数	213
第四节 土壤生物量的测定	215

第五节	外生菌根菌的分离及染色观察	217
第六节	根瘤菌固氮酶活性的测定	219
第七节	环境微生物的观察	220
第十四章	物质转化	223
第一节	纤维素的微生物降解	223
第二节	果胶物质的微生物分解	225
第三节	钾素的微生物分解	226
第四节	磷素的微生物分解	227
第五节	硫化作用及硫化细菌观察	228
第六节	氨化作用	229
第七节	硝化与反硝化作用	231

第五篇 微生物学研究的一些新技术

第十五章	单克隆抗体技术	237
第一节	杂交瘤技术	237
第二节	单克隆抗体技术的进展与应用	251
第十六章	PCR 技术	254
第一节	PCR 技术的基本原理和方法	254
第二节	PCR 技术的应用	265
第十七章	质粒 DNA 的提取	266
第一节	碱裂解法制备质粒 DNA	266
第二节	SDS 裂解法制备质粒 DNA	269
第三节	质粒 DNA 的纯化	271
第十八章	DNA 的重组技术	274
第一节	黏端连接法	274
第二节	黏-平端连接法	277
第三节	重组质粒的鉴定	279
第十九章	DNA 序列分析	289
第一节	循环测序——银染色测定 DNA 序列	289
第二节	Maxam-Gilbert 化学法测定 DNA 序列	295
第三节	DNA 序列的自动化测定	300
第二十章	核酸探针的制备	307
第一节	双链 DNA 缺口平移标记法	308
第二节	随机引物标记法	312
第三节	RNA 探针标记法	314
第四节	沉淀法纯化标记探针	317

第五节 柱层析法纯化标记探针	318
第六节 探针标记效率的检测	321
第二十一章 基因组 DNA 的分离与纯化	324
参考文献	331

绪 论

一、微生物学研究技术的根本内涵

1. 定义

借助物理学（或生物物理学）方法、化学（或生物化学）方法或生物学方法来研究微生物的形态结构、生理生化、遗传变异、诱变育种、菌种保藏、生态分布等方面的实验方法和技术，统称为微生物学研究技术，其中包括经典方法和现代技术。研究的跨度从整体水平到细胞水平，直至分子水平。

2. 内容

微生物学研究技术所包涵的内容十分丰富，并将微生物学理论和实践紧密结合在一起，其内容主要包括以下几方面。

(1) 基础方法

- 1) 各种显微镜（有光学的和电子的）的构造及其使用；
- 2) 各种微生物类群细胞形态（一般结构和特殊结构）及其观察；
- 3) 各种染色技术、微生物制片技术；
- 4) 微生物生长量、大小、数量测定；
- 5) 各种培养基的制备方法及各种灭菌方法；
- 6) 无菌操作与接种技术；
- 7) 微生物诱变育种技术和菌种保藏的方法；
- 8) 微生物分离、纯化和培养技术；
- 9) 微生物的免疫学技术。

(2) 生物防治（森林保护、植物保护）微生物及其制剂

- 1) 杀虫微生物及其制剂；
- 2) 杀菌微生物及其制剂；
- 3) 除草微生物及其制剂。

(3) 食品微生物及其发酵产物

- 1) 常见食品微生物检验与测定；
- 2) 常用发酵微生物及其制品的鉴定、测定；
- 3) 主要食（药）用菌的制种方法和栽培技术。

(4) 土壤和环境微生物及其物质转化

- 1) 土壤好氧性细菌、放线菌和真菌分离、计数；
- 2) 土壤生物量、呼吸强度的测定；

- 3) 外生菌根菌分离、染色观察;
 - 4) 根瘤菌固氮酶活性的测定;
 - 5) 纤维素、果胶物质的微生物降解;
 - 6) 土壤磷、钾元素的微生物分解;
 - 7) 氨化作用、硫化作用及其作用的细菌观察;
 - 8) 硝化与反硝化作用。
- (5) 分子微生物学研究技术
- 1) 单克隆抗体技术;
 - 2) PCR 技术;
 - 3) 质粒 DNA 提取的几种方法;
 - 4) DNA 的重组的几种方法;
 - 5) DNA 序列分析的几种方法;
 - 6) 探针制备的若干方法;
 - 7) 基因组 DNA 的分离与纯化。

二、微生物学研究技术的基础设施

微生物学研究技术是生命科学中一项非常重要的生物技术,具有非常强的基础性、科学性、系统性和先进性。若的保障该项技术能准确、规范地实施和进行,首先要考虑微生物学研究技术的基本建设和基础设施。最主要和最基础的设施是良好的工作环境和精良的仪器设备。

1. 基础设施

(1) 无菌的接种室

要求墙面、地面和接种台面全都是白色,以示清洁干净,一尘不染。除照明灯外,还备有紫外灯,工作之前和之后,都要用紫外线杀菌。该室有缓冲走廊带,把接种室和外界隔开,走廊墙有挂白大衣工作服的衣架,走进接种室要换上白色工作服。

现许多实验室购有超净工作台,以替代接种室。接种室和超净工作台各有利弊,前者大,可供多人工作,但需较大空间,后者灵活方便,可以移动,但空间偏小。

(2) 清洁的恒温室

是一种有隔热材料墙的房间,室内有控温加热电器,根据不同微生物类群要求不同的生长培养温度,既可调温,又可控温,保持恒定温度,所以称之为恒温室,又叫培养室。也可用生化培养箱代替。

(3) 安全的灭菌室

室内备有各种灭菌器(干热和湿热等)。

(4) 良好的菌种保藏室

室内备有各种类型的冰箱和液氮罐，确保保藏的菌种不死、不变、不杂。

(5) 有序的准备室

房间清洁明亮，操作桌和试剂柜（试剂齐全和内装试剂的试剂瓶），便利实验的准备。

2. 仪器设备

(1) 常用玻璃器皿和接种工具

- 1) 各种型号试管、吸管、加样器、烧杯等；
- 2) 各种型号培养皿、三角瓶、载玻片、盖玻片；
- 3) 各种接种工具。

(2) 常用精密仪器

- 1) 各种分光光度计、气相、液相色谱仪；
- 2) 各种精密光学显微镜；
- 3) PCR 等分子微生物学研究技术用的仪器。

(3) 大型精密仪器

如电镜类大型精密仪器，不一定每个实验室都配备，可一个学科组群或系、院校集中购买，集中保管，集中使用，以提高利用率。

三、微生物学研究技术的基本要求

除一般实验室所要遵守的规则外，还应根据微生物学研究技术的特点，要求做到如下 3 条。

1. 安静

同学们实验前认真预习实验指导书，了解每次实验内容、原理和办法。任课老师讲解时，应仔细聆听其内容，仔细观察其示范操作，以掌握操作要领，自己做实验时，要保持绝对安静，切勿大声喧哗和随意走动，全神贯注地做自己的实验，以提高整体实验效果和技术操作水平。

2. 清洁

实验结束后，所用玻璃器皿，清洗干净，放回指定地点，所用仪器擦拭清洁，放妥。

3. 无菌

微生物学研究技术所用玻璃器皿，不但要像化学实验那样要求清洁，而且还要无菌（玻璃器皿、接种工具、材料要灭菌），实验过程中要严格无菌操作。实验结束后若桌面被菌液污染，可用 3% 来苏尔液擦拭干净，带菌工具（吸管、塑料吸嘴、玻璃刮棒、染色涂片等）洗涤前浸泡在 3% 来苏尔液中，消毒后再清洗。有微生物污染的废物要集中处理，不能污染环境。

第一篇 基础方法

第一章 显微镜的构造及其使用

第一节 普通光学显微镜的构造和使用

微生物学实验室最常用的仪器是普通光学显微镜，无论是观察微生物个体形态还是测量微生物细胞大小都必须用它。因此显微镜是研究微生物的重要工具，显微镜是一种精密的光学仪器，使用时应了解其构造和原理，以达到正确使用和保养的目的。

一、目的要求

了解普通光学显微镜的构造和原理；掌握普通光学显微镜，重点是油镜正确使用的方法。

二、实验材料

- 1) 显微镜，显微镜灯，香柏油，二甲苯，擦镜纸，吸水纸等。
- 2) 细菌的染色标本。
- 3) 载玻片，盖玻片，接种环，酒精灯。

三、实验程序

(一) 显微镜的构造和油镜使用的原理

1. 显微镜的构造

普通光学显微镜由机械装置和光学系统两部分组成（图 1.1）。

(1) 机械装置

1) 镜座和镜臂：它们是显微镜的基本骨架，起稳固和支撑显微镜的作用。直筒显微镜的镜臂与镜座之间有一倾斜关节，可使显微镜倾斜一定的角度，便于观察。

2) 镜筒：它是一个金属制的圆筒，上端安放目镜，下端安装转换器，镜筒长 160mm。有些显微镜的镜筒长度是可调节的。

3) 转换器：它是一个用于安装物镜的圆盘，其上装 3~4 个物镜。为使用方便，物镜应按低倍到高倍的顺序安装。转换物镜时，必须用手按住圆盘旋转，勿用手指直接推动物镜，以免使物镜和转换器之间的螺旋松脱而损坏显微镜。

4) 镜台：用于安放载玻片。镜台上有载玻片夹或载玻片移动器，调节移动