

微生物学

第一章绪论

一、什么是微生物

(一) 定义：

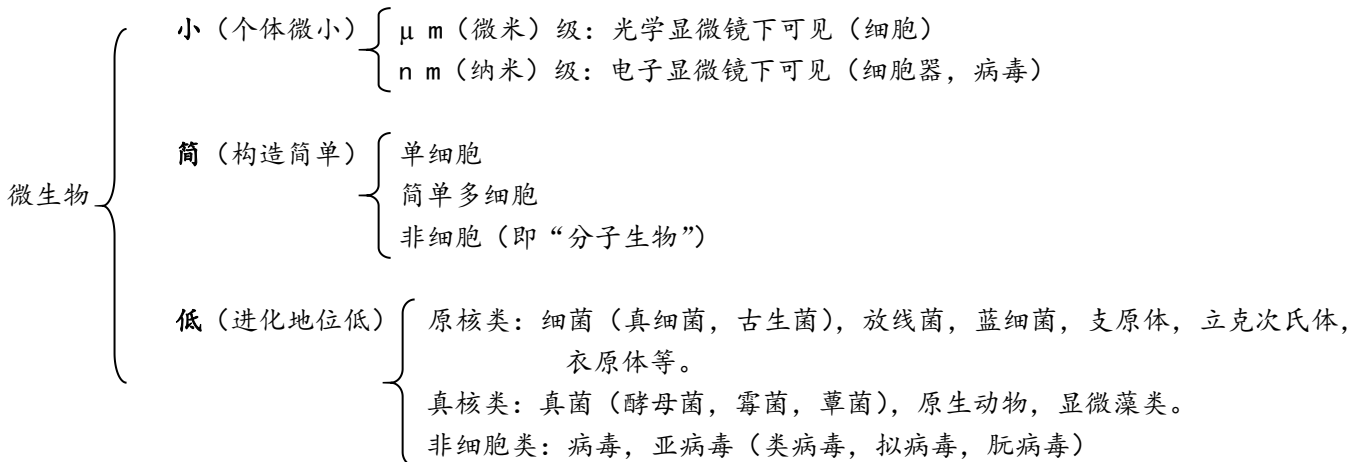
传统定义：微生物 (microorganism, microbe) 是一切肉眼看不见或看不清的微小生物的总称。它们是一些个体微小 (一般小于 0.1mm)、构造简单的低等生物。

现代定义：一般是指绝大多数凭肉眼看不见或看不清，必须借助显微镜才能看见或看清，以及少数能直接通过肉眼看见的单细胞、多细胞和无细胞结构的微小生物的总称。

(二) 类群：

1. 原核类：细菌 (真细菌，古生菌)，放线菌，蓝细菌，支原体，立克次氏体，衣原体等。
2. 真核类：真菌 (酵母菌，霉菌，蕈菌)，原生动物，显微藻类
3. 非细胞类：病毒，亚病毒 (类病毒，拟病毒，朊病毒)

(三) 特点：



$$1\text{mm}=10^3 \mu\text{m}=10^6 \text{nm}=10^7 \text{\AA}$$

分辨率：肉眼:0.1mm；显微镜:0.2 μm ；电子显微镜:10 $\text{\AA}$

二、为什么要学习微生物

1. 微生物无处不在
2. 微生物对人类有利也有害。因此，发掘、利用、改造和保护有益微生物；控制、消灭和改造有害微生物
3. 最终目的：为人类社会的进步服务

细菌数亿/g 土壤，土壤中的细菌总重量估计为： 10034×10^{12} 吨

每张纸币带细菌：900 万个

人体体表及体内存在大量的微生物：

皮肤表面：均 10 万个 细菌/平方厘米

口腔：细菌种类超过 500 种

肠道：微生物总量达 100 万亿

粪便干重的 1/3 是细菌， 每克粪便的细菌总数为：1000 亿个

每个喷嚏的飞沫含 4500-150000 个细菌

福：1、微生物在许多重要产品中所起的不可替代的作用，例如：面包、奶酪、啤酒、抗生素、疫苗、维生素、酶等重要产品的生产。

2、体内的正常菌群是人及动物健康的基本保证；帮助消化、提供必需的营养物质、组成生理屏障

3、是人类生存环境中必不可少的成员，有了它们才使得地球上的物质进行循环。

4、以基因工程为代表的现代生物技术的发展及其美妙的前景也是微生物对人类作出的又一重大贡献。

祸：鼠疫 艾滋病(AIDS) 癌症 肺结核 疟疾 霍乱 埃博拉病毒 疯牛病 SARS 禽流感

三、微生物学与人类进步的关系

(一) 微生物与医疗保健 (在医疗保健战线上的六大“战役”)

1. 外科消毒术的建立 2. 寻找人畜病原菌 3. 免疫防治法的应用 4. 化学治疗剂的发明

5. 抗生素治疗的兴起 6. 用遗传工程和生物工程技术使微生物生产生化药物

(二) 微生物与工业发展(微生物在工业发展过程中的六个里程碑)

1. 自然发酵与食品、饮料的酿造 2. 罐头保藏 3. 厌氧纯种发酵技术

4. 深层液体通气搅拌培养 5. 代谢调控理论在发酵工业上的应用 6. 生物工程的兴起

(三) 微生物学促进了农业进步

(四) 微生物与能源、生态和环境保护

(五) 微生物学对生物学基础理论研究的贡献

1. 以微生物作为研究对象解决了生物学上的许多重大争论问题

2. 是分子生物学的三大来源和三大支柱之一

3. 遗传学研究对象的微生物化促使经典遗传学发展为分子遗传学

4. 微生物与基因工程

5. 高等生物研究和利用中的微生物化趋向方兴未艾

6. 微生物学中的一套独特实验技术迅速扩散到生命科学的各研究领域

四、微生物的共性(五大共性)

1. 体积小，结构简单，表面积/体积比值大

杆菌的平均长度：2 微米； 1500 个杆菌首尾相连= 一粒芝麻的长度；

10-100 亿个细菌加起来重量 = 1 毫克

大的比表面积特别有利于它们和周围环境进行物质、能量、信息的交换。微生物的其它很多属性都和这一特点密切相关。

2. 代谢活力强，吸收多，转化快

吸收营养物质和排出废物，有最大的代谢速率。从单位重量来看，微生物的代谢强度比高等生物大几千倍到几百万倍。

消耗自身重量 2000 倍食物的时间：

大肠杆菌：1 小时

人：500 年（按 400 斤/年计算）

（发酵乳糖的细菌 1 小时内可以分解其自身重 1000-10000 倍的乳糖）

产阮假丝酵母（*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。

3. 生长旺，繁殖快

大肠杆菌一个细胞重约 10 - 12 克，平均 20 分钟繁殖一代， 24 小时后，就有了 72 代，其子代数量可达 4722366500 万亿个，重量达到 4722 吨；

48 小时后：2.2 × 10⁴³ 个后代，重量达到 2.2 × 10²⁵ 吨，相当于 4000 个地球重量

实际上，由于各种原因，细菌的指数分裂速度只能维持几个小时，液体培养基中，细菌细胞的数量一般仅能达到 10⁸-10⁹ 个/ml

生产效率高，发酵周期短

4. 分布广，种类多（多样性）

在各种自然环境界中（土壤、水体、空气，动植物体内和体表，万米高空，万米海底，强酸、强碱、高热的极端环境，常年封冻的冰川等）都生存有大量的微生物

微生物的种类多主要体现在下列 5 个方面：**物种的多样性；微生物的生理代谢类型的多样性；代谢产物的多样性；遗传基因的多样性；生态类型的多样性**

5. 适应性强，易变异

微生物对极端恶劣的环境的适应能力，堪称“世界之最”。个体小，数量多，单细胞（大多数），繁殖快，分布广泛，与外界环境直接接触，即使自发变异的频率很低（10⁻⁵-10⁻¹⁰），也可以在短时间内产生大量变异后代。

福：抗生素效价提高，酶活性提高，代谢产物产量提高等

祸：耐药性的产生

五、微生物学及其研究内容与分科

微生物学(Microbiology)定义：是一门在细胞、分子或群体水平上研究微生物的形态构造、生理代谢、遗传

变异、生态分布和分类进化等生命活动基本规律，并将其应用于工业发酵、医药卫生、生物工程和环境保护等实践领域的科学。

根本任务：1. 发掘、利用、改造和保护有益微生物 2. 控制、消灭和改造有害微生物

最终目的：为人类社会的进步服务

六、微生物学发展简史

影响认识微生物的四大障碍：

1. 个体过于微小
2. 群体外貌不显
3. 种间杂居混生
4. 形态与其作用的后果很难被认识

(一) 可分为五个时期

1. 史前期：约 8000 年前-1676

实质：朦胧阶段

8000 年前我国就开始出现了曲蘖酿酒；

4000 年前埃及人已学会烘制面包和酿制果酒；

2500 年前我国发明酿酱、醋，用曲治消化道疾病；

公元六世纪(北魏时期)贾思勰的巨著“齐民要术”详细地记载了制曲、酿酒、制酱和酿醋等；

公元九世纪到十世纪我国已发明用鼻苗法种痘；

16 世纪，古罗巴医生 G. Fracastoro：疾病是由肉眼看不见的生物(living creatures)引起的；

1641 年，我国明末医生吴又可也提出“戾气”学说，认为传染病的病因是一种看不见的“戾气”，其传播途径以口、鼻为主。

2. 初创期：1676-1861

实质：形态描述阶段

开创者：列文虎克(Robert Hooke)

1664 年，英国人虎克(Robert Hooke)曾用原始的显微镜对生长在皮革表面及蔷薇枯叶上的霉菌进行观察。

3. 奠基期：1861-1897

实质：生理水平研究阶段 开创者：巴斯德，德国人柯赫

特点：①建立了一系列研究微生物所必要的独特方法和技术，从而解决了认识微生物的第二、三、四个障碍；②借助于良好的研究方法，开创了寻找病原微生物的“黄金时期”；③把微生物学的研究从形态描述推进到生理学研究的新水平；④开始客观上以辩证唯物主义的“实践—理论—实践”的思想方法指导科学实验；⑤微生物学以独立的学科形式开始形成，但当时主要还是以其各应用性分支学科的形式存在

微生物学奠基人：法国化学家巴斯德

(1) 彻底否定了“自然发生”学说：著名的曲颈瓶试验无可辩驳地证实，空气内确实含有微生物，是它们引起有机质的腐败。

(2) 免疫学——预防接种：首次制成狂犬疫苗

(3) 发现并证实发酵是由微生物引起的：化学家出生的巴斯德涉足微生物学是为了治疗酒病”和“蚕病”

(4) 其他贡献 巴斯德消毒法：60~65℃作短时间加热处理，杀死有害微生物

细菌学奠基人：德国人柯赫

(1) 微生物学基本操作技术方面的贡献

a) 细菌纯培养方法的建立 土豆切面 → 营养明胶 → 营养琼脂(平皿)

b) 设计了各种培养基，实现了在实验室内对各种微生物的培养

c) 流动蒸汽灭菌

d) 染色观察和显微摄影

(2) 对病原细菌的研究作出了突出的贡献：

a) 具体证实了炭疽杆菌是炭疽病的病原菌

b) 发现了肺结核病的病原菌；(1905 年获诺贝尔奖)

c) 证明某种微生物是否为某种疾病病原体的基本原则——著名的柯赫原则

1、在每一相同病例中都出现这种微生物；

2、要从寄主分离出这样的微生物并在培养基中培养出来；

3、用这种微生物的纯培养接种健康而敏感的寄主，同样的疾病会重复发生；

4、从试验发病的寄主中能再度分离培养出这种微生物来。

4. 发展期：1897-1953

实质：生化水平研究阶段

开创者：E. Büchner, 生物化学奠基人

特点：(1) 进入了微生物生化水平的研究。并发现代谢途径的同一性。对无细胞酵母菌“酒化酶”进行研究。以研究微生物对维生素需要、酶的特性、寻找和研究抗生素以及逐步深入到以研究它们的遗传变异和基因为主的新阶段。因此，微生物学家就从“微生物猎人”而发展为“维生素猎人”、“酶猎人”、“抗生素猎人”和“基因猎人”了。(2) 应用微生物的分支学科更为扩大，出现了抗生素等新学科。(3) 开始出现微生物学史上的第二个“淘金热”——寻找各种有益微生物代谢产物的热潮。(4) 一门以研究微生物基本生物学规律的综合学科——普通微生物学开始形成，代表人物是美国加利福尼亚大学伯克利分校的 M. H. Urey, (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。

5. 成熟期：1953-

实质：分子生物学水平研究阶段

开创者：J. Watson, F. Crick。分子生物学奠基人

特点：(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，迅速成长为一门十分热门的前沿基础学。(2) 在基础理论的研究方面，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、更有效和可人为控制的方向发展，至 70 年代初，有关发酵工程的研究已与遗传工程、细胞工程和酶工程等紧密结合，微生物已成为新兴的生物工程中的主角。

七、我国微生物的发展：

汤飞凡：沙眼病原体的分离和确证

抗生素的总产量已耀居世界首位

两步法生产维生素 C 的技术居世界先进水平

八、主要参考书

周德庆 著：微生物学教程（第一、二版）

武汉大学、复旦大学编：微生物学。（第二版）

沈萍 著：微生物学。

九、复习题

1. 简述微生物的定义和类群
2. 试述微生物学与人类进步的关系
3. 试述微生物的共性，讨论其对人类的利弊
4. 简述微生物的发展简史上 5 个时期的特点和代表人物
5. 试述微生物学的多样性

第二章原核微生物的形态、构造与功能

一、研究意义

1. 形态是入门的向导，构造是研究的基础。
2. 提高定向筛选的效率。
3. 掌握发酵进程。
4. 及时检测杂菌。
5. 分类鉴定中应用。

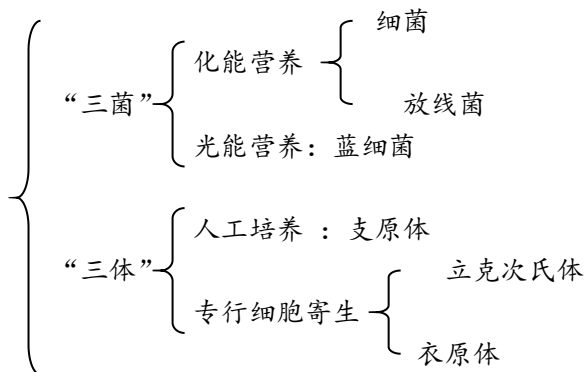
微生物分为三大类群（根据进化地位、性状上明显差别）

1. 原核微生物 (prokaryotes)
2. 真核微生物 (eukaryotic microorganisms)
3. 非细胞微生物 (acellular microorganisms)

原核微生物与真核微生物属于细胞型微生物

二、原核生物的定义及种类

1. 原核生物：指一大类细胞核无核膜包裹，只存在称作核区的裸露 DNA 的原始单细胞生物。包括两大类群真细菌 (eubacteria)（包括普通细菌、放线菌、蓝细菌、枝原体、立克次氏体和衣原体等）和古生菌 (archaea)
2. 古生菌 (Archaea)：一类生活在条件十分恶劣的极端环境（如高温、高盐、高酸等）下的古老的微生物。“伯杰氏手册”将古生菌分为 5 个主要类群：产甲烷菌、极端嗜盐菌、还原硫酸盐细菌、极端嗜热 S^0 代谢菌、无细胞壁古生菌。它们的细胞结构（如细胞壁结构和化学、膜脂类结构、分子生物学及代谢）既不完全相同于原核生物，也不同于真核生物，但其结构与真细菌更为接近。
3. 原核生物 6 种类群



第一节 细菌 (bacteria, bacterium 单数)

细菌：细胞细短（直径约 0.5μm，长 0.5~5μm）；结构简单；胞壁坚韧；二分裂繁殖；水生性强；单细胞原核生物

生活特性：喜温暖、潮湿、富含有机物；微碱环境（大多数）；腐生或寄生，好氧或厌氧，自养或异养

本节内容

一、细胞的形态、构造及功能

（一）个体形态和排列

基本形状：球状、杆状、螺旋状

1、球状(球菌 coccus, cocci)

细胞个体呈球形或椭圆形，不同种的球菌在细胞分裂时会形成不同的空间排列方式，常被作为分类依据。

2、杆状(杆菌 bacillus, bacilli)

细胞呈杆状或圆柱形，一般其粗细（直径）比较稳定，而长度则常因培养时间、培养条件不同而有较大变化。杆状细菌的排列方式常因生长阶段和培养条件而发生变化，一般不作为分类依据。

3、螺旋状(螺旋菌 spirilla, spirilla)

弧菌：菌体只有一个弯曲，其程度不足一圈，形似“C”字或逗号，鞭毛偏端生。

螺旋菌：菌体回转如螺旋，螺旋满 2—6 环，螺旋数目和螺距大小因种而异。鞭毛二端生。细胞壁坚韧，菌体较硬。

螺旋体：菌体旋转周数在 6 环以上，菌体柔软，用于运动的类似鞭毛的轴丝位于细胞外鞘内。

4、其它形状

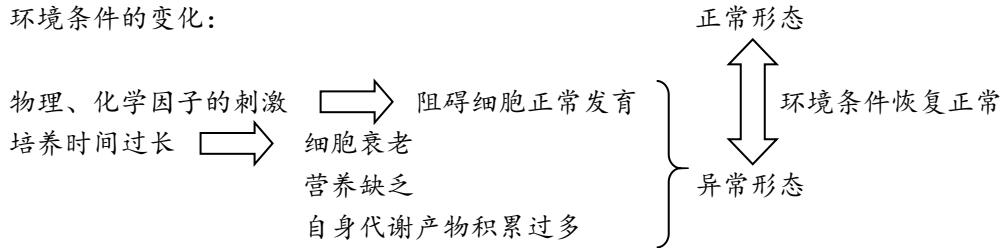
1) 柄杆菌 (prosthecate bacteria) 细胞上有柄 (stalk)、菌丝 (hyphae)、附器 (appendages) 等细胞质伸出物，细胞呈杆状或梭状，并有特征性的细柄。一般生活在淡水中固形物的表面，其异常形态使得菌体的表面积与体积之比增加，能有效地吸收有限的营养物；

2) 星形细菌 (star-shaped bacteria)

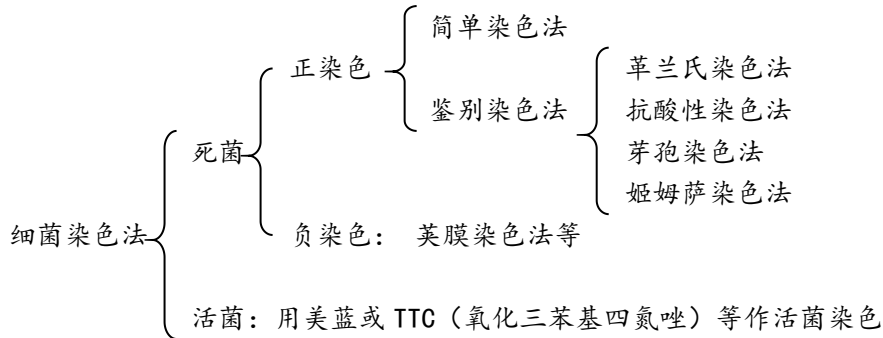
3) 方形细菌 (square-shaped bacteria)

4) 异常形态 (畸形, 衰颓型)

环境条件的变化:



常用的染色方法



(二) 大小

1、范围

一般细菌的大小范围: 测量单位—— μm (微米)

球菌: $0.5 \sim 1 \mu\text{m}$ (直径)

杆菌: $0.2 \sim 1 \mu\text{m}$ (直径) $\times 1 \sim 80 \mu\text{m}$ (长度)

螺旋菌: $0.3 \sim 1 \mu\text{m}$ (直径) $\times 1 \sim 50 \mu\text{m}$ (长度) (长度是菌体两 endpoint 之间的距离, 而非实际长度)

2、测量方法

显微镜测微尺; 显微照相后根据放大倍数进行测算

3、细菌大小测量结果的影响因素

个体差异; 干燥、固定后的菌体会一般由于脱水而比活菌体缩短 $1/3 \sim 1/4$; 染色方法的影响, 一般用负染色法观察的菌体较大; 幼龄细菌一般比成熟的或老龄的细菌大; 环境条件, 如培养基中渗透压的改变也会导致细胞大小的变化。

(三) 构造

一般构造: 一般细菌都有的构造

特殊构造: 部分细菌具有的或一般细菌在特殊环境下才有的构造

1、细胞壁 (cell wall)

(1) 概念: 是紧贴细胞质膜外侧的一层厚实、坚韧的外被。

(2) 证实细胞壁存在的方法:

- 1) 细菌超薄切片的电镜直接观察;
- 2) 质、壁分离与适当的染色, 可以在光学显微镜下看到细胞壁;
- 3) 机械法破裂细胞后, 分离得到纯的细胞壁;
- 4) 制备原生质体, 观察细胞形态的变化;

(3) 细胞壁的功能:

- 1) 固定细胞外形和保护细胞免受外力损伤;
- 2) 为细胞的生长、分裂和鞭毛运动所必需;
- 3) 渗透屏障, 阻拦酶蛋白和某些抗生素等大分子物质 (分子量大于 800) 进入细胞;
- 4) 细菌特定的抗原性、致病性以及对抗生素和噬菌体的敏感性的物质基础;

(4) 革兰氏染色、细胞壁的化学组成与结构:

革兰氏染色法 1) 结晶紫初染 2) 碘溶液媒染 3) 乙醇脱色

4) 沙黄复染: 革兰氏阴性细菌呈红色, 革兰氏阳性细菌呈深紫色

G⁺菌：单层，厚（20~25nm），组分简单，90%肽聚糖（含量高，交联紧密），10%磷壁酸

G⁻菌：多层，薄（10~15nm），组分复杂，内壁层：肽聚糖（含量低，交联疏松），外膜有脂多糖、磷脂、脂蛋白

1) G⁺细菌的细胞壁

G⁺细菌的细胞壁特点：厚度大（20~25nm）化学组分简单，一般只含 90%肽聚糖和 10%磷壁酸。

G⁺细菌的细胞壁 { 肽聚糖 (peptidoglycan): 又称粘肽 (mucoprotein)、胞壁质 (murein) 或粘质复合物 (mucocomplex), 是真细菌细胞壁中的特有成分。
磷壁酸 (teichoic acid): 又称“垣酸”，结合在革兰氏阳性细菌细胞壁上一种酸性多糖

A、肽聚糖：厚约 20~25nm，由 40 层左右的网格状分子交织成的网套覆盖在整个细胞上。

(N—乙酰胞壁酸——原核生物所特有的已糖)

肽聚糖单体由三部分组成：1、双糖单位 2、四肽尾 3、肽桥

双糖单位中的 β -1,4-糖苷键很容易被溶菌酶 (lysozyme) 所水解，从而引起细菌因肽聚糖细胞壁的“散架”而死亡。

由四个氨基酸分子按 L 型与 D 型交替方式连接而成。

D 型氨基酸和 DAP 可保护肽聚糖免受肽酶的水解。

肽桥：短肽尾中的第四个氨基酸残基 D-丙氨酸的羧基通过肽键与相邻另一短肽尾中的第三个氨基酸的氨基相连。但有些细菌的肽桥不是两个短肽尾直接连接，而是通过一个短肽作为肽桥连接于两条短肽尾的氨基酸之间，例如金黄色葡萄球菌中的短肽为 5 个甘氨酸残基组成。大部分革兰氏阴性菌中的肽桥不需要短肽而直接通过 D-丙氨酸和碱性氨基酸的氨基相连而成。

目前所知的肽聚糖已超过 100 种，在这一“肽聚糖的多样性”中，主要的变化发生在肽桥上。

B、磷壁酸：革氏阳性细菌细胞壁上特有的化学成分（酸性多糖）

按成分分为 { 甘油磷酸
核糖醇磷酸
按结合部位分为 { 壁磷壁酸
膜磷壁酸

壁磷壁酸，它与肽聚糖分子间进行共价结合（以末端磷酸二酯键连接在 M 第 6 位碳原子上），含量会随培养基成分而改变，一般占细胞壁重量的 10%，有时可接近 50%。用稀酸或稀碱可以提取。

跨越肽聚糖层并与细胞膜相交联的膜磷壁酸（又称脂磷壁酸），由甘油磷酸链分子与细胞膜上的磷脂进行共价结合后形成。其含量与培养条件关系不大。可用 45% 热酚水提取，也可用热水从脱脂冻干细菌中提取。

磷壁酸的主要生理功能（自学）：p19

1、细胞壁形成负电荷环境，增强细胞膜对二价阳离子的吸收，提高膜结合酶的活力；二价阳离子，特别是高浓度的 Mg^{2+} 的存在，对于保持膜的硬度，提高细胞膜上需 Mg^{2+} 的合成酶的活性极为重要。

2、贮藏磷元素；

3、增强某些致病菌对宿主细胞的粘连、避免被白细胞吞噬以及抗补体的作用；

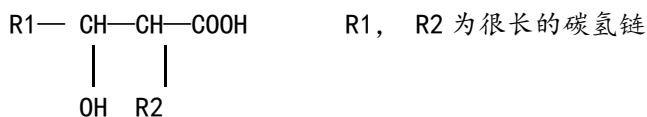
4、革兰氏阳性细菌特异表面抗原的物质基础；

5、噬菌体的特异性吸附受体；

6、能调节细胞内自溶素 (autolysin) 的活力而调节细胞壁的增长，防止细胞因自溶而死亡。

C、细胞壁中含有一些特殊成分的革氏阳性细菌

大部分 G⁺细菌细胞壁含脂量很低，但**棒杆菌属**、**分支杆菌属**、**诺卡氏菌属**的细胞壁却含有丰富的称为**分支菌酸** (Mycolic acid) 的枝链羟基脂质：



分支菌酸与肽聚糖复合在一起。分支杆菌具有**抗酸染色**的特性，是由于细胞壁中含分支菌酸的缘故。

分支菌酸被认为与这些细菌（白喉棒杆菌，结核分支杆菌）的**致病性**有关。

用抗酸性染色（一种鉴别染色技术）对宿主体内的分枝杆菌病原体（红色，非抗酸性细菌呈兰色）进行检测

A 族链球菌细胞壁中有特异性的**M 蛋白**，它有抗吞噬作用。

大多数金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 细胞壁中有葡萄球菌 A 蛋白 (SPA)，它与肽聚糖共价结合，对胰酶敏感，有抗吞噬和抗噬菌体的作用。

2) 革兰氏阴性细菌的细胞壁

A、肽聚糖 (参见 P16)

埋藏在外膜层之内，是仅由 1~2 层肽聚糖网状分子组成的薄层 (2~3nm)，含量约占细胞壁总重的 10%，故对机械强度的抵抗力较革兰氏阳性菌弱。

革兰氏阳性菌与阴性菌肽聚糖结构的差别：

没有特殊的肽桥，只形成较为疏松、机械强度较差的肽聚糖网套

内消旋二氨基庚二酸 (m-DAP) (只在原核微生物细胞壁上发现)

肽聚糖只存在于真细菌中，古生菌和真核生物细胞壁中没有肽聚糖。

D-谷氨酸、D-丙氨酸、m-DAP 在蛋白质中未出现过。

B、外膜 (outer membrane) (参见 P19)

又称外壁层，位于革兰氏阴性细菌细胞壁外层，可分为内、中、外三层，从内到外由脂蛋白、磷脂和脂多糖等若干种蛋白质组成的膜。

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)

位于细胞壁最外层的一层较厚的类脂多糖类物质 (相对分子质量在 10000 以上) 由三部分组成：类脂 A (内毒素的主要成分)、核心多糖、O-特异侧链 (O-多糖，O-抗原)

O-特异侧链糖的种类、顺序和空间构型是菌株特异的，是抗原特异性的物质基础

KDO: 2-酮-3-脱氧辛糖酸；Hep: L-甘油-D-甘露庚糖；Man: 甘露糖；Rha: 鼠李糖；Gal: 半乳糖；Abe: 阿可比糖

LPS 层的主要功能：

1) LPS 结构的多变，决定了革兰氏阴性细菌细胞表面抗原决定簇的多样性；

根据 LPS 抗原性的测定，沙门氏菌 (*Salmonella*) 的抗原型多达 2107 种，一般都源自 O-特异侧链种类的变化。这种多变性是革兰氏阴性细菌躲避宿主免疫系统攻击，保持感染成功的重要手段。也可依此用灵敏的血清学方法对病原菌进行鉴定，在传染病的诊断中有其重要意义。

2) LPS 负电荷较强，与磷酸相似，也有吸附 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等阳离子以提高其在细胞表面浓度的作用，对细胞膜结构起稳定作用。

3) 类脂 A 是革兰氏阴性细菌致病物质——内毒素的物质基础；

4) 具有控制某些物质进出细胞的部分选择性屏障功能；

5) 许多噬菌体在细胞表面的吸附受体；

外膜蛋白 (outer membrane protein)

嵌合在 LPS 和磷脂层外膜上的蛋白。有 20 余种，但多数功能尚不清楚。

孔蛋白 (porins) 是由三个相同分子量 (36000) 蛋白亚基组成的一种三聚体跨膜蛋白，中间有一直径约 1nm 的孔道，通过孔的开、闭，可对进入外膜层的物质进行选择。

非特异性孔蛋白：可通过分子量小于 800~900 的任何亲水性分子

特异性孔蛋白：只容许一种或少数几种相关物质通过，如维生素 B12 和核苷酸等。

脂蛋白 (lipoprotein) 是一种通过共价键使外膜层牢固地连接在肽聚糖内壁层上的蛋白，分子量约为 7200。

C、周质空间 (periplasmic space, periplasm)，又称壁膜间隙

在革兰氏阴性细菌中，一般指其外膜与细胞膜之间的狭窄空间 (宽约 12~15nm)，呈胶状。

周质空间是进出细胞的物质的重要中转站和反应场所。

在周质空间中，存在着多种周质蛋白 (periplasmic proteins)：水解酶类；合成酶类；结合蛋白；受体蛋白；

D. 粘合位点：P19

革兰氏阴性菌细胞壁的许多部位，外膜与质膜直接接触，是加固革兰氏阴性菌细胞壁并支撑外膜的另一结构。

有人认为物质可通过粘合位点进入细胞而不必穿越周质空间。

革兰氏阳性和阴性细菌一系列生物学特性的比较 (参见周德庆 P16)

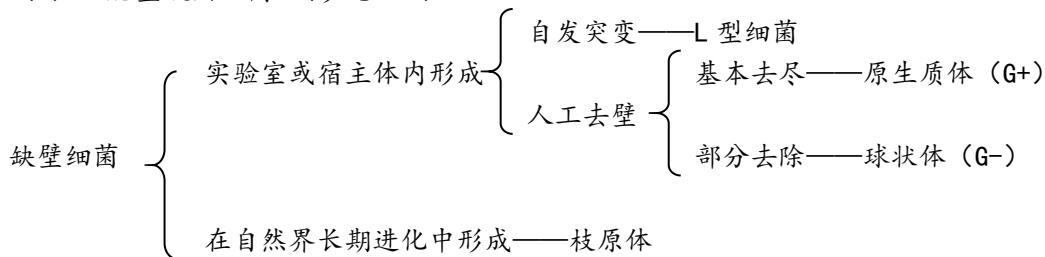
3) 革兰氏染色原理

革兰氏染色的阳性或阴性，与细胞的物理结构有关。

细胞壁结构与革兰氏染色的关系

	革氏阳性菌	革氏阴性菌
肽聚糖	含量高，交联密	含量低，交联疏松
脂类	一般无	含量高
乙醇作用	脱水作用 孔径缩小，结构更紧密 大分子复合物滞留	脂溶作用 孔径增大，结构变得疏松 大分子复合物溶出
结果	紫色	红色

(5) 细胞壁缺陷细菌：(参见 P21)



1) L 型细菌 (L-form of bacteria)

细菌在某些环境条件下 (实验室或宿主体内) 通过自发突变而形成的遗传性稳定的细胞壁缺陷变异型。

因英国李斯德 (Lister) 预防研究所首先发现而得名 (1935 年，念珠状链杆菌 *Streptobacillus moniliformis*)

大肠杆菌、变形杆菌、葡萄球菌、链球菌、分枝杆菌和霍乱弧菌等 20 多种细菌中均有发现，被认为可能与针对细胞壁的抗菌治疗有关。

特点：没有完整而坚韧的细胞壁，细胞呈多形态；

有些能通过细菌滤器，故又称“滤过型细菌”；

对渗透敏感，在固体培养基上形成“油煎蛋”似的小菌落 (直径在 0.1mm 左右)；

2) 原生质体 (protoplast)

在人为条件下，用溶菌酶处理或在含青霉素的培养基中培养而抑制新生细胞壁合成而形成的仅由一层细胞膜包裹的，圆球形、对渗透压变化敏感的细胞，一般由革兰氏阳性细菌形成。

特点：对环境条件变化敏感，低渗透压、振荡、离心甚至通气等都易引起其破裂；

有的原生质体具有鞭毛，但不能运动，也不被相应噬菌体所感染；

在适宜条件 (如高渗培养基) 可生长繁殖、形成菌落，形成芽孢。及恢复成有细胞壁的正常结构；

比正常有细胞壁细菌更易导入外源遗传物质，是研究遗传规律和进行原生质体育种良好实验材料。

3) 球状体 (sphaeroplast)，又称原生质球

采用上述同样方法，针对革兰氏阴性细菌处理后而获得的残留部分细胞壁 (外壁层) 的球形体。与原生质体相比，它对外界环境具有一定的抗性，可在普通培养基上生长。

4) 支原体 (Mycoplasma)

在长期进化过程中形成的、适应自然生活条件的无细胞壁的原核生物。因它的细胞膜中含有甾醇 (一般原核生物没有)，所以即使缺乏细胞壁，其细胞膜仍有较高的机械强度。

青霉素的杀菌作用

作用原理： β -内酰胺环的结构与肽聚糖单体五肽尾末端 D-Ala-D-Ala 二肽结构相近，因而可竞争性地抑制转肽

酶的活性，抑制肽聚糖单体间的交联，形成缺损的细胞壁。

作用特点：对生长旺盛的革氏阳性菌有明显的抑制作用。

青霉素 b-内酰胺环结构与 D-丙氨酸末端结构相似，从而能占据 D-丙氨酸的位置与转肽酶结合，并将酶灭活，肽链之间无法彼此连接，抑制了细胞壁的合成。

溶菌酶的作用：

通过水解 N-乙酰葡萄糖胺与 N-乙酰胞壁酸间的 β -1,4-糖苷键，引起细胞壁“散架”，形成细胞壁完全脱去或部分除去的原生质体（革氏阳性菌）或球状体（革氏阴性菌）。

在低渗溶液中，原生质体或球状体因吸水膨胀并最终导致破裂而死亡；

在等渗蔗糖溶液中，能得到原生质体或球状体。

古生菌的细胞壁（周德庆 p16）

古生菌除了热原体属没有细胞壁外，其余都有与真细菌类似功能的细胞壁。

古生菌细胞壁中没有真正的肽聚糖，而是由假肽聚糖、糖蛋白或蛋白质构成。

假肽聚糖：

双糖单位：N-乙酰葡萄糖胺 β -1,3 糖苷键

N-乙酰塔罗糖胺（不被溶菌酶水解）

肽尾：L-Glu, L-Ala, L-Lys 3 个

肽桥：L-Glu 1 个氨基酸组成

2、细胞膜（cell membrane）

细胞质膜（cytoplasmic membrane），又称质膜（plasma membrane）、细胞膜（cell membrane）或内膜（inner membrane），是紧贴在细胞壁内侧、包围着细胞质的一层柔软、脆弱、富有弹性的半透性薄膜，厚约 7~8nm，由磷脂（占 20%~30%）和蛋白质（占 50%~70%）组成。

观察方法：

质壁分离后结合鉴别性染色在光学显微镜下观察；原生质体破裂；超薄切片电镜观察；

电镜观察到的细胞质膜，是在上下两暗色层之间夹着一浅色中间层的双层膜结构，这与细胞膜的化学组成有关。

（1）化学组成：磷脂（20~30%）；蛋白质（50~70%）

A. 磷脂

亲水的极性端；疏水的非极性端

在极性头的甘油 3C 上，不同种微生物具有不同的 R 基，如磷脂酸、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸或磷脂酰肌醇等。

非极性尾则由长链脂肪酸通过酯键连接在甘油的 C1 和 C2 位上组成，其链长和饱和度因细菌种类和生长温度而异。

在生理温度下，脂肪酸末端排列成固定的晶格。

不饱和脂肪酸的双键可导致膜结构的变形。当磷脂分子中二者同时存在时，在一定条件下就阻碍了形成晶格结构所需要的有序排列。

膜的流动性很大程度上取决于不饱和脂肪酸的结构和相对含量。细胞膜上长链脂肪酸的链长和饱和度因细菌种类和生长温度而异，通常生长温度要求越高的种，其饱和度也越高，反之则低。

甾醇类物质

由磷脂分子形成的双分子膜中加入甾醇类物质可以提高膜的稳定性

B. 膜蛋白

约占细菌细胞膜的 50%~70%，比任何一种生物膜都高，而且种类也多。——细胞膜是重要的代谢活动中心。

根据作用	{	功能蛋白：担负生理机能（转运蛋白、电子传递蛋白、ATP 合成酶、合成细胞壁及糖被的酶）
		结构蛋白：维持膜结构
根据分布	{	整合蛋白（integral protein）或内嵌蛋白（intrinsic protein）
		周边蛋白（peripheral protein）或膜外蛋白（extrinsic protein）

（2）结构

液态镶嵌模型（fluid mosaic model）P24

- ①膜的主体是脂质双分子层；
- ②脂质双分子层具有流动性；
- ③整合蛋白因其表面呈疏水性，故可“溶”于脂质双分子层的疏水性内层中；
- ④周边蛋白表面含有亲水基团，故可通过静电引力与脂质双分子层表面的极性头相连；
- ⑤脂质分子间或脂质与蛋白质分子间无共价结合；
- ⑥脂质双分子层犹如一“海洋”，周边蛋白可在其上作“漂浮”运动，整合蛋白则似“冰山”状沉浸在其中作横向移动。

细胞膜是高度有序且不对称的系统，同时又是柔韧、动态的。

流动性：1) 膜经受一定程度变形而不被破坏

2) 膜中各种成分按需要调整分布，表现出膜的多种功能

不对称性：保证膜的方向性功能 如：能量转换中质子梯度产生物质的传递

(3) 细胞膜的生理功能 (参见 P 24)

- ①物质运输, 选择性地控制营养物质和代谢产物的运送；
- ②渗透屏障, 维持细胞内正常的渗透压；
- ③合成细胞壁和糖被的各种组分 (肽聚糖、磷壁酸、LPS、荚膜多糖等) 的重要基地；
- ④膜上含有氧化磷酸化或光合磷酸化等能量代谢的酶系，是细胞的产能场所；
- ⑤鞭毛基体的着生部位和鞭毛旋转的供能部位；

(4) 间体 (mesosome):

细胞质膜内褶而形成的泡囊状、管状或层状的构造。多见于革兰氏阳性细菌。

不同看法：青霉素酶分泌、DNA 复制、分配以及细胞分裂有关；

“间体”仅是电镜制片时因脱水操作而引起的一种假像

(5) 古生菌细胞膜的独特性和多样性 参见周德庆 p20

- ① 古生菌与真细菌细胞膜中的磷脂有明显差异

真细菌：磷酸甘油酯

古生菌：异戊二烯甘油醚

- ② 古生菌细胞膜中存在着独特的单分子层或单、双分子层混合膜

3、细胞质和内含物 P25

细胞质 (cytoplasm) 是细胞质膜包围的除核区外的一切半透明、胶状、颗粒状物质的总称。含水量约 80%。

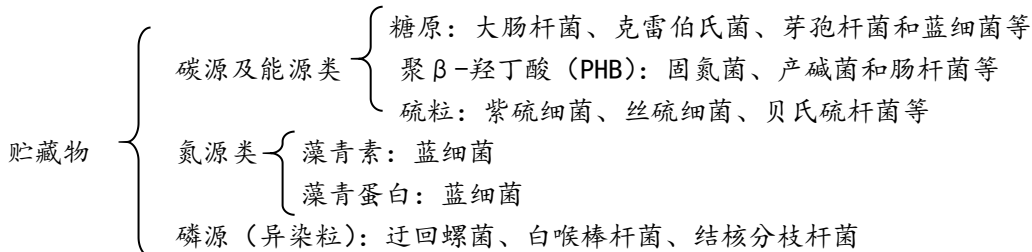
细胞质的主要成分为核糖体、贮藏物、酶类、中间代谢物、各种营养物和大分子的单体等，少数细菌还有类囊体、羧酶体、气泡或伴孢晶体等有特定功能的组分。

一些内含物无膜包裹，自由存在于细胞质中，如多聚磷酸盐颗粒、藻青素颗粒和一些糖原颗粒；另一些内含物则由单层膜 (不是典型的双层膜) 所包裹，如聚 β -羟丁酸颗粒、某些糖原和硫粒、羧酶体及气泡等。

内含物膜在组成上各不相同，有些为蛋白质，而另一些则包含脂类。

(1) 颗粒状贮藏物 (reserve materials) P26

各种有机或无机物质的颗粒，主要功能是贮存 (碳水化合物、无机物和能源)，也可将分子连接为特定的形式来降低渗透压。



A. 聚- β -羟丁酸 (poly- β -hydroxybutyrate, PHB) (P26)

细菌特有的一种类脂性质的碳源类贮藏物。

PHB 于 1929 年被发现，至今已发现 60 属以上的细菌能合成并贮藏。

巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 在含乙酸或丁酸的培养基中生长时，细胞内贮藏 PHB 可达其干重的 60%。

作用：细菌特有的碳源和能源储藏物；维持胞内中性环境；降低胞内渗透压

用途：它无毒、可塑、易降解，被认为是生产医用塑料、生物降解塑料的良好原料。

B. 多糖类贮藏物（糖原粒和淀粉粒）

在真细菌中以糖原为多糖原粒较小，不染色需用电镜观察，用碘液染成红棕色，可在光学显微镜下看到。
有的细菌积累淀粉粒，用碘液染成深兰色。

C. 异染粒(metachromatic granules)，又称迂回体或捩转菌素（参见 P26）

用兰色染料染色后呈红紫色

组成：无机偏磷酸的聚合物（一般在含磷丰富的环境下形成。）

功能：磷源和能量；可降低细胞的渗透压

D. 硫粒(sulfur globules)

很多光合细菌（紫硫细菌、紫色细菌、绿色细菌和蓝细菌），在进行产能代谢或生物合成时，常涉及对还原性的硫化物（ H_2S ，硫代硫酸盐等）的氧化，所产生的折光性很强的硫粒，可在周质空间或细胞质中积累。

功能：硫元素储藏物；参与产能代谢和生物合成

E. 藻青素(cyanophycin)

氮源贮藏物，同时还兼有贮存能源的作用。通常存在于蓝细菌中。

微生物储藏物的特点及生理功能：

- ①不同微生物其储藏性内含物不同（例如厌气性梭状芽孢杆菌只含 PHB，大肠杆菌只储藏糖原，但有些光和细菌二者兼有）
- ②微生物合理利用营养物质的一种调节方式：当环境中缺乏能源而碳源丰富时，细胞内就储藏较多的碳源类内含物，甚至达到细胞干重的 50%，如果把这样的细胞移入有氮的培养基时，这些储藏物将被作为碳源和能源而用于合成反应。
- ③储藏物以多聚体的形式存在，有利于维持细胞内环境的平衡，避免不适合的 pH，渗透压等的危害。（例如羟基丁酸分子呈酸性，而当其聚合成聚-β-羟丁酸（PHB）就成为中性脂肪酸了，这样便能维持细胞内中性环境，避免菌体内酸性增高。）

储藏物在细菌细胞中大量积累，还可以被人们利用。

（2）磁小体(magnetosome) P26

趋磁细菌细胞中含有的大小均匀、数目不等的 Fe_3O_4 颗粒，外有一层膜包裹。

存在：少数水生螺菌属等。

功能：导向作用。即借鞭毛游向对该菌最有利的泥、水界面微氧环境处生活。

实用前景：生产磁性定向药物或抗体，制造生物传感器等。

（3）羧酶体(carboxysome)（参见周德庆 P21）

一些自养细菌（蓝细菌、硝化细菌和硫杆菌）细胞内由单层膜围成的多角形或六角形内含物
内含 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶（卡尔文循环的关键酶）作用：自养细菌的 CO_2 固定场所

（4）气泡(gas vacuoles)（参见 P25）

许多光合营养型、无鞭毛运动的水生细菌中存在的充满气体的泡囊状内含物，大小为 $0.2 \sim 1.0 \mu m \times 75nm$ ，内由数排柱形小空泡组成，外有 2nm 厚的蛋白质膜包裹。

功能：调节细胞比重以使细胞漂浮在最适水层中获取光能、 O_2 和营养物质

专性好氧的盐杆菌属（*Halobacterium*）的细菌，却生活在含氧极少的饱和盐水中，它们细胞中气泡显著，其作用被认为是使菌体浮于盐水表面，以保证细胞更接近空气。

有些厌氧性光合细菌利用气泡集中在水下 10-30 米深处，这样既能吸收适宜的光线和营养进行光合作用，又可以避免直接与氧接触。

蓝细菌生长时依靠细胞内的气泡而漂浮于湖水表面，并随风聚集成块，常使湖内出现“水花”。

气泡的膜只含蛋白质而无磷脂。二种蛋白质相互交连，形成一个坚硬的结构，可耐受一定的压力。膜的外表面亲水，而内侧绝对疏水，故气泡只能透气而不能透过水和溶质。

（5）核糖体(ribosome)

原核生物核糖体的沉降系数是 70S

{ 50S 大亚基

30S 小亚基

在细菌中，80%~90%核糖体串连在 mRNA 上，以多聚体的形式存在。

功能：合成蛋白质的场所

链霉素等抗生素通过作用于细菌核糖体的 30S 亚基而抑制细菌蛋白质的合成，而对人的 80S 核糖体不起作用，故可治疗细菌引起的疾病，而对人体无害。

(6) 质粒 (plasmid) (放第八章“微生物学遗传学”讲)

4、核区 (nuclear region or area)

又称核质体，原核，拟核、核基因组、细菌染色体

无核膜、无固定形态的原始细胞核

细菌染色体 DNA：1 个环状双链（通常），高度折叠

细菌染色体 DNA 也与一些碱性蛋白结合（不是组蛋白，称为类组蛋白），这种结合使 DNA 得以超螺旋，具有稳定细菌染色体 DNA、适应和调节 DNA 复制、转录、转译的作用。

细菌染色体的组织结构：

大肠杆菌染色体由 50~100 个结构域 (domain) 或环 (loop) 组成。其固定在蛋白质-膜的核心或支架上，而此核心或支架又与内膜系统中的间体相连，起着阻止 DNA 旋转的屏障作用，以确保结构域在拓扑学上相互独立。

功能：负载遗传信息的主要物质基础

5、芽孢 (spore) P33

1) 概念

某些细菌在其生长发育后期，在细胞内形成一个圆形或椭圆形、厚壁、含水量极低、抗逆性极强的休眠体，称为芽孢（偶译“内生孢子”，endospore）。

2) 芽孢的特点 P25

A. 抗逆性强（热、干燥、辐射等）。

整个生物界中抗逆性最强的生命体，是否能消灭芽孢是衡量各种消毒灭菌手段的最重要的指标。

B. 芽孢是休眠体，不是繁殖体。

在适宜的条件下可以重新转变成成为营养态细胞（每个细胞只形成一个芽孢，一个芽孢萌发也只形成一个营养体细胞，所以，芽孢仅仅是芽孢细菌生活中一部分）。

产芽孢细菌的保藏多用其芽孢。

C. 折光性强，不易着色（芽孢染色法）。

3) 形成条件

A. 由菌种的遗传特性决定

B. 所需条件因种而异

必需的养料（碳源和/或氮源）耗尽而停止生长时（既进入稳定期时）形成；

富含有机氮的培养基（苏云金芽孢杆菌）；

培养基中加入 Mn^{2+}

温度改变

各种细菌有其形成芽孢的最适条件，包括 pH、供氧情况、温度、营养、培养基中的离子浓度和种类等。

4) 形成芽孢的菌种

产芽孢的细菌多为 G⁺ 杆菌，也有一些球菌

杆菌 { (好气性) 芽孢杆菌属 (Bacillus) 主要产芽孢菌
(厌气性) 梭菌属 (Clostridium)

球菌：芽孢八叠球菌属

5) 构造与耐热机制 P34

芽孢与母细胞相比不论化学组成（皮层含吡啶二羧酸钙 DPA-Ca，芽孢肽聚糖）、细微结构、生理功能等方面都完全不同：（参见 P33 图 2-27）

芽孢衣结构致密对多价阳离子和水分的透性很差

皮层的离子强度很高，产生极高的渗透压夺取芽孢核心的水分，结果造成皮层的充分膨胀。

核心部分的细胞质却变得高度失水，因此，具极强的耐热性。

渗透调节皮层膨胀学说

芽孢抗热性的可能原因

- ①芽孢衣的不通透性；
- ②原生质体的高度脱水状态；
- ③含高浓度的吡啶二羧酸钙 DPA-Ca（形成耐热凝胶样的物质）；
- ④存在酸溶性结合蛋白对 DNA 的稳定作用；
- ⑤含 DNA 修复酶，可对核心复活后的出芽和生长过程中的 DNA 进行修复。
- ⑥与所含的一些酶有关。这些酶本身并不抗热，只是在芽孢中与一些物质结合之后才有抗热性。（如蜡状芽孢杆菌中的丙氨酸消旋酶附着在芽孢衣上时抗热，与芽孢衣分离后不抗热。）

6) 芽孢形成与萌发

萌发：3 个阶段

活化：加热、化学物质（ Mn^{2+} ，表面活性剂，氨基酸，糖）

出芽

生长

7) 研究芽孢的意义

①消毒灭菌的最重要的指标

肉类罐头：肉毒梭状芽孢杆菌

外科器械：破伤风梭菌、产气荚膜梭菌

工业发酵：嗜热脂肪芽孢杆菌

121°C, 15 min 或 115°C, 30 min 以上

②筛选菌种（土样+肉汤培养基（80°C, 10-15 min）

③分类依据（芽孢的形态、大小和着生位置是细菌分类和鉴定中的重要指标。）

④有些产芽孢细菌可伴随产生有用的产物，如抗生素（短杆菌肽、杆菌肽等）。

8) 伴孢晶体（parasporal crystal）

少数芽孢杆菌，例如苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringiensis*，简称“Bt”）在其形成芽孢的同时，会在芽孢旁形成一颗菱形或双锥形的碱溶性蛋白晶体—— δ 内毒素，称为伴孢晶体。

特点：不溶于水，对蛋白酶类不敏感；容易溶于碱性溶剂。

用途：伴孢晶体对 200 多种昆虫尤其是鳞翅目的幼虫有毒杀作用，因而可将这类产伴孢晶体的细菌制成有利于环境保护的生物农药——细菌杀虫剂。

伴孢晶体→鳞翅目幼虫口服→伴孢晶体在肠道迅速溶解（中肠 pH 为 9.0-10.5）→吸附于上皮细胞，引起渗透性丧失，肠道穿孔→肠道中的碱性溶液进入血液，后者 pH 升高，昆虫全身麻痹而死亡

9) 细菌的其他休眠构造（参见周德庆 P26）

孢囊(cyst)：营养细胞外壁加厚、细胞失水形成抗干旱、紫外线和电离辐射，但不抗热的圆形休眠体。

棕色固氮菌（*Azotobacter vinelandii*）

6、糖被（glycocalyx）

1) 概念 P28

包被于某些细菌细胞壁外的一层厚度不定的胶状物质。

糖被按其有无固定层次、层次厚薄又可细分为荚膜（capsule 或 macrocapsule，大荚膜）、微荚膜（microcapsule）、粘液层（slimelayer）和菌胶团（zoogloea）。

{	包裹在单个细胞上	{	在壁上有固定层	层次厚：（大）荚膜
			层次薄：微荚膜	
	包裹在群体细胞上：菌胶团（分泌的粘液将许多菌体粘合在一起，形成分支状的大型粘胶物，细菌群体的共同糖被）	松散，未固定在细胞壁上：粘液层		

2) 成分

组分依种而异，多糖、多肽或蛋白质（多糖居多）

3) 形成条件

菌种的遗传特性决定；也与环境条件有关

糖被并非细胞生活的必要结构，但它对细菌在环境中的生存有利。

4) 特性

(1) 对染料亲和力低。

经特殊的荚膜染色，特别是负染色（又称背景染色）后可在光学显微镜清楚地观察到它的存在。

(2) 在固体培养基上形成表面湿润、粘液状的光滑型菌落，即 S 型菌落。在液体培养基中使培养液的粘度增加；不产糖被的细菌形成表面干燥、粗糙的粗糙型菌落，即 R 型菌落。

5) 功能

(1) 保护作用（保护菌体免受干旱损伤；防止噬菌体的吸附和裂解；保护致病菌免受宿主白细胞吞噬。）

(2) 储藏养料（营养缺乏时重新使用）

(3) 致病作用（是某些病原菌的毒力因子，如 S 型肺炎链球菌；也是某些病原菌的粘附因子，如唾液链球菌和变异链球菌附着牙齿表面——龋齿）

(4) 堆积代谢废物

(5) 透性屏障（保护细菌免受重金属离子毒害）

(6) 细菌间的信息识别

6) 应用

利 (1) 菌种鉴定：利用糖被物质的血清学反应

(2) 制备代血浆和生化试剂（肠膜状明串珠菌的葡聚糖糖被）

(3) 制备黄原胶：石油开采、印染、食品等工业

(4) 污水处理：形成菌胶团的细菌（如生枝动胶菌）是活性污泥中的主要微生物。

弊 (1) 食品发粘变质

(2) 污染发酵液，阻碍发酵的正常进行

(3) 增强致病力

(4) 发生龋齿

7、鞭毛(flagellum, 复 flagella)

1) 概念 P29

某些细菌细胞表面着生的一至数十条长丝状、螺旋形附属物，具有推动细菌运动功能，为细菌的“运动器官”。

所有弧菌、螺菌和假单胞菌，约半数杆菌和少数球菌有鞭毛。

鞭毛的有无和着生方式具有十分重要的分类学意义。

2) 观察和判断细菌鞭毛的方法

电子显微镜直接观察

鞭毛长度：15~20 μm；直径：0.01~0.02 μm

光学显微镜下观察：鞭毛染色和暗视野显微镜

根据培养特征判断：

半固体穿刺接种：菌体沿穿刺线扩散生长

平板培养基上的菌落形状：大、薄、不规则，边缘不整齐

3) 结构及运动机制

三部分 { 基体
钩形鞘（鞭毛钩）
鞭毛丝

(参见 P31 图 2-25)
革兰氏阴性菌的鞭毛构造

鞭毛的生长方式是在其顶部延伸

鞭毛的合成是的自装配的一个极好例子。其过程“是一个比我们任何人以前所想象的都要更复杂的过”。鞭毛丝组装所需要的信息就存在于鞭毛蛋白亚基结构中。

鞭毛推动细菌运动的特点

速度：一般速度在每秒 20~80 μm 范围，最高可达每秒 100 μm（每分钟达到 3000 倍体长），超过了陆上跑得最快的动物——猎豹的速度（每分钟 1500 倍体长或每小时 110 公里）。

拴菌实验 (teched-cell experiment)：研究鞭毛运动机制

将细菌放在固定有鞭毛丝或鞭毛钩蛋白抗体的载玻片上时，鞭毛被其抗体固定，细胞却围绕鞭毛迅速旋转。同样，如果鞭毛吸附在聚苯乙烯颗粒上，这些颗粒固定了鞭毛而使细菌围绕鞭毛轴自旋。

方式：**细菌以推进方式做直线运动**，鞭毛主要通过旋转来推动细菌运动，犹如轮船的螺旋桨以**翻腾形式做短促转向运动**。

细菌的趋避运动：鞭毛的功能是运动，这是原核生物实现其趋性（taxis）即趋向性的最有效方式。

趋化作用（chemotaxis）：细菌对某化学物质敏感，通过运动聚集于该物质的高浓度或低浓度区域。

趋光性（phototaxis）：有的细菌能区别不同波长的光而集中在一定波长光区内

趋磁性（magnetotaxis）：趋磁细菌根据磁场方向进行分布。

8、菌毛（fimbria，复数 fimbriae）（参见 P32）

长在细菌体表的纤细、中空、短直、数量较多的蛋白质类附属物，具有使菌体附着于物体表面的功能。

每个细菌约有 250~300 条菌毛。有菌毛的细菌一般以**革兰氏阴性致病菌居多**，借助菌毛可把它们牢固地粘附于宿主的呼吸道、消化道、泌尿生殖道等的粘膜上，进一步定植和致病。

9、性毛（pili，单数 pilus）

构造和成分与菌毛相同，但比菌毛长，数量仅一至少数几根。

一般见于革兰氏阴性细菌的雄性菌株（即供体菌）

功能 { 向雌性菌株（即受体菌）传递遗传物质；
RNA 噬菌体的特异性吸附受体。

比较：

鞭毛	菌毛	性菌毛
粗长，柔，少	细短，硬直，多	比菌毛长，1~数根
运动	附着	传递遗传物质
G ⁺ ，G ⁻ 都有	G ⁻ 较多	G ⁻ 雄性菌株

相同点：菌体表面的中空、丝状蛋白质类附属物

二、细菌的繁殖

1、方式：裂殖为主（绝大多数为二等分裂）

- 2、分裂过程（1）核的分裂和隔膜的形成
（2）横隔壁的形成
（3）子细胞的分离

三、细菌的群体形态

（一）固体培养基上（内）的群体形态

1、菌落的定义（p36）：

将微生物的单个细胞或少量同种细胞接种到固体培养基表面（内部），在适宜的条件下培养一定时间后，在培养基表面（或内部）形成的有一定形态和构造、肉眼可见的细胞集团。

（划线分离、涂布分离、倾注分离）

菌苔：众多菌落连成一片（斜面接种植物）

菌落特征描述：p36

大小、形状、隆起程度、边缘情况、表面状态、光泽、质地、颜色、透明度

2、细菌菌落的特点：**湿、粘、半透明、易挑起、质地均匀、内外正反颜色一致**

不同形态结构 细菌的菌落的特点：

球菌菌落：小、圆、隆起、边缘整齐

杆菌菌落：较大、较圆

鞭毛菌菌落：大、扁平、形态不规则或边缘多缺刻

芽孢菌菌落：不透明、粗糙、多褶皱、边缘不规则

荚膜菌菌落：光滑、粘稠、湿润（透明蛋清状）

3、菌落的用途

（1）分离纯化

（2）分类鉴定：细菌菌落也受环境的影响而产生变化，故在菌种鉴定时要注意检测条件一致。

(3) 细胞计数

(4) 选种与育种

(二) 半固体培养基上(内)群体形态

穿刺接种：运动能力

明胶液化情况

(三) 液体培养基中的群体形态

浑浊，沉淀，菌膜、菌醭

四、食品发酵工业、医药上常用的细菌

1、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) ——专性好氧菌

个体形态： G^+ 杆状，周生鞭毛，有芽孢(椭圆到柱状，中生到近端生，芽孢囊不膨大)

菌落形态：粗糙，不透明，扩张，污白色

用途：淀粉酶、蛋白酶；杆菌肽(bacitracin)；抗菌谱与青霉素G相似，对 G^+ 有抑制作用

2、醋酸杆菌

个体形态： G^- ，短杆，单生、成对或链状。培养时间长易形成丝状、弯曲、棒状等多种畸形。

最适生长温度：30℃

最适pH：5.4~6.3

用途：醋酸发酵；恶臭醋杆菌(AS.1.41)；巴氏醋酸菌(沪酿1.01)

3、保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) (改名为德氏乳杆菌保加利亚亚种)

形态： G^+ ，杆状(常为长杆)，成单或成链，

最适生长T：40~43℃

用途：酸奶发酵剂

4、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)

形态： G^+ ，球状，成对或成链

最适生长T：40~41℃

用途：酸奶发酵剂

5、北京棒杆菌 (*Corynebacterium pekinese*)

形态： G^+ ，短杆或小棒状，单个或八字排列，无芽孢

最适生长温度：30~32℃

用途：谷氨酸发酵

6、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)

形态： G^- ，短杆

最适生长温度：37℃

用途：食品卫生重要指示菌，作为粪便污染指标来评价食品的卫生质量

7、肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)

G^+ 球菌，常成对或链形排列；兼性厌氧

用途：生产右旋糖酐(代血浆)和葡聚糖(sephadex)

8、双歧杆菌 (*Bifidobacterium*)

G^+ 、弯曲和常分叉的杆菌，专性厌氧

分离自哺乳婴儿粪便，能在肠道定植的益生菌

最适生长温度：37℃

用途：微生态调节剂

9、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)

用途：细菌杀虫剂

本节重点

一、细菌的形态与大小

二、细菌的细胞结构与功能

1、细胞壁的结构

图示 G⁺和 G⁻菌细胞壁的主要构造，并简要说明其异同。

2、肽聚糖的构造

单体组成；G⁺和 G⁻菌肽聚糖结构的异同；溶菌酶与青霉素抑菌作用的机制和特点

3、LPS

三个组成部分；与抗原性有关的部分和毒性的物质基础

4、革兰氏染色机理

5、四类缺壁细菌

形成、特点和实际应用；原生质体的制备方法

6、细胞膜：化学组成；结构模型；

7、内含物

8、芽孢（是休眠体，细胞分化体，不是繁殖体）

耐热机制；产芽孢的微生物种类；与孢囊的不同点；

9、糖被、鞭毛、菌毛

10、古生菌：种类；在结构组分上与真细菌的不同（肽聚糖、细胞膜、16Sr RNA）

三、细菌的繁殖方式

四、菌落

定义；细菌菌落的一般特征；细胞形态与菌落形态间的相关性；

五、食品发酵工业常用微生物（菌名，用途）

名词：菌落，芽孢，伴孢晶体，肽聚糖，磷壁酸，LPS，原生质体，间体，古生菌，S、R 型菌落，L 型细菌

第二节 放线菌（Actinomycetes）

放线菌是一类多数呈菌丝状生长，以无性孢子繁殖、陆生性强，高 G+C 含量的革氏阳性原核生物（60%~70%）mol%

放线菌菌落中的菌丝常从中心向四周辐射状生长，并因此得名。

放线菌是一类“介于细菌与丝状真菌之间又接近细菌的一类丝状单细胞原核生物”：一方面，在形态上具有分枝状菌丝、菌落形态与霉菌相似，以孢子进行繁殖，这些特征与霉菌相似；另一方面，细胞结构和细胞壁化学组成与细菌相似，同属原核生物。

放线菌实际上是属于真细菌范畴内的原核微生物，只不过其细胞形态为分枝状菌丝。

放线菌属真细菌范畴

放线菌与细菌的相同点：

- ①属于原核生物，为单细胞；
- ②菌丝直径与细菌相仿；
- ③细胞壁主要成分是肽聚糖；
- ④有的放线菌产生有鞭毛的孢子，其鞭毛类型与细菌相同；
- ⑤放线菌的噬菌体形态与细菌的相似；
- ⑥最适生长 pH 与多数细菌相似；
- ⑦DNA 重组方式相同；
- ⑧核糖体同为 70S；
- ⑨对溶菌酶敏感；
- ⑩凡对细菌敏感的抗生素，对放线菌亦敏感；

放线菌与细菌的不同点：

- ①细胞为分枝状菌丝；
- ②菌落形态与霉菌相似；
- ③孢子繁殖；

分布特点及与人类的关系：

- ①以孢子或菌丝状态极其广泛地存在于自然界，土壤中最，其代谢产物使土壤具有特殊的泥腥味。

- ②能产生大量的、种类繁多的抗生素（在已报道过的近万种抗生素中，约 70%由放线菌产生；而其中 90%由链霉菌属产生）。
- ③有的放线菌可生产维生素（B12）、酶制剂（葡萄糖异构酶，蛋白酶）；此外，在甾体转化、石油脱蜡、烃类发酵、污水处理等方面也有应用。
- ④少数寄生型放线菌可引起人、动物（如皮肤、脑、肺和脚部感染）、植物（如马铃薯和甜菜的疮痂病）的疾病。

一、形态构造

放线菌的形态极为多样。

共同特征是：

- ①单细胞，大多由分枝发达的无隔膜菌丝组成；
- ②菌丝直径与杆菌类似，约 1mm；
- ③细胞壁组成与细菌类似，革兰氏染色阳性（少数阴性）；
- ④细胞的结构与细菌基本相同，

根据肽聚糖的组分和结构，即肽链第 3 位氨基酸、肽桥有无甘氨酸、糖的成分，放线菌细胞壁分 4 大类。

细胞壁类型	DAP	肽桥上的甘氨酸	特征糖	代表属
I	L, L	+	NA	类诺卡氏菌属，链霉菌属
II	内消旋	+	NA	小单胞菌属，发仙菌属，游动放线菌属
III	内消旋	-	NA	杜马拉放线菌属，弗兰克氏菌属
IV	内消旋	-	NA	糖单胞菌属，诺卡氏菌属

NA：表示不适用或无特征性糖

以典型的丝状放线菌——链霉菌，说明放线菌的一般形态结构。

一株完整的链霉菌（Streptomyces）由三部分组成（按发生顺序）

1、营养菌丝（基内菌丝）

匍匐生长于培养基内，吸收营养。一般无隔膜，直径 0.2-0.8 mm，长度差别很大，有的可产生色素。

2、气生菌丝

营养菌丝发育到一定阶段，伸向空间形成气生菌丝，叠生于营养菌丝上，可覆盖整个菌落表面。在光学显微镜下观察，颜色较深，直径较粗（1-1.4 mm），有的产色素。

3、孢子丝

气生菌丝发育到一定阶段，其上可分化出形成孢子的菌丝，即孢子丝，又称产孢丝或繁殖菌丝。其形状和排列方式因种而异，常被作为对放线菌进行分类的依据。

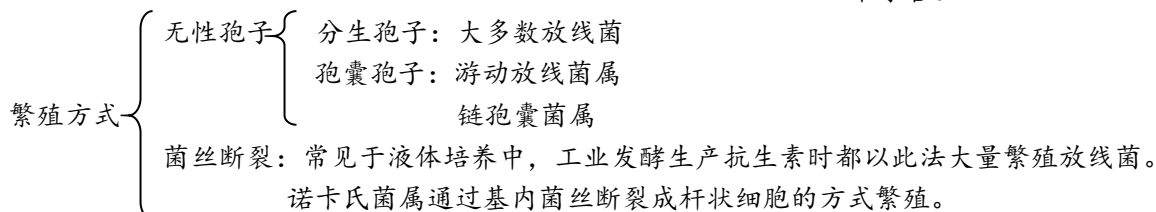
链霉菌的各种孢子丝形态（参见 P38，图 2-30）

孢子丝的形态及分生孢子的表面结构是链霉菌重要的分类鉴定指标。

二、生长与繁殖

大多数放线菌以分生孢子繁殖

营养菌丝→气生菌丝→繁殖菌丝（孢子丝）→孢子丝释放分生孢子→分生孢子在适宜的条件下萌发，长出 1-3 个芽管。



细菌的芽孢是休眠体，而放线菌的孢子是繁殖体。

放线菌的孢子一般不耐热。但普通高温放线菌却产生耐热的孢子（含有吡啶二羧酸）。

三、菌落形态

能产生大量分枝和气生菌丝的菌种（如链霉菌属）：菌落干燥，不透明，菌落质地致密，小而不蔓延，上覆不同颜色的干粉（孢子），正反颜色常不一致。与培养基结合紧密，不易挑起或挑起后不易破碎。

不能产生大量菌丝体的菌种（如诺卡氏菌属）：菌落外形与细菌接近，粘着力差，粉质，针挑起易粉碎

四、生长要求

培养基：高氏一号培养基

培养条件：中性偏碱 (pH 7.5 ~ 8.5)；需氧；23 °C—37 °C；5—7d

五、有重要应用价值的放线菌

1、链霉菌属 (*Streptomyces*)

氨基糖苷类抗生素：

灰色链霉菌 (*Str. griseus*)：链霉素(streptomycin)

卡那霉素链霉菌 (*Str. kanamyceticus*)：卡那霉素(kanamycin)

弗氏链霉菌 (*Str. fradiae*)：新霉素(neomycin)

四环类抗生素：

金色链霉菌 (*Str. aureofaciens*)：四环素(tetracycline)；金霉素(氯四环素)

龟裂链霉菌 (*Str. rimosus*)：土霉素(氧四环素)

大环内酯类抗生素：

红霉素链霉菌 (*Str. erythreus*)：红霉素(erythromycin)

产二素链霉菌 (*Str. ambofaciens*)：螺旋霉素(spiramycin)

其他抗细菌抗生素：

委内瑞拉链霉菌 (*Str. venezuelae*)：氯霉素(chloramphenicol)

多烯类抗生素：

节状链霉菌 (*Str. erythreus*)：两性霉素(amphotericin, 抗真菌)

诺尔斯链霉菌 (*Str. noursei*)：制霉菌素(nystatin, 抗真菌)

抗肿瘤药物：

波塞链霉菌青灰变种 IMRU 3920：阿霉素(adriamycin)

加利链霉菌：阿克拉霉素(spiramycin)

轮枝链霉菌：博来霉素(bleomycin)

头状链霉菌 NRRL 2564：丝裂霉素(mitomycin)

免疫抑制剂：

橄榄网状链霉菌：乌苯美司(bestatin)，对多种肿瘤有免疫治疗作用

2、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)

地中海诺卡氏菌 (*N. mediterranei*)：利福霉素(rifamycin) (对结核分支杆菌和麻风杆菌有特效)

地中海诺卡氏菌康乐变种：康乐霉素C(kanglemycin C) (免疫抑制剂)

石油脱蜡、烃类发酵、含氟废水的处理等。

3、弗兰克氏菌属 (*Frankineae*)

能与非豆科木本植物共生固氮 (根瘤)

4、小单孢菌属 (*Micromonospora*)

氨基糖苷类抗生素：棘孢小孢菌 (*M. echinospora*)：庆大霉素(gentamicin)、紫苏霉素、福提霉素、达地米星

本节重点

1、什么叫放线菌？

2、放线菌的形态构造 (链霉菌属)。

3、放线菌的繁殖方式。

4、菌落特点。

5、有代表性放线菌的学名与重要用途。

第三节 蓝细菌 (*Cyanobacteria*)

1、概念 P39

旧名蓝藻或蓝绿藻 (blue-green algae)。一类进化历史悠久、G⁻、无鞭毛、含叶绿素 a (但不形成叶绿体)、能进行产氧型光合作用的大型原核生物。

以前曾归于藻类，因为它和高等植物一样具有光合色素——叶绿素 a，能进行产氧型光合作用。

2、特性

- 1) 分布极广；从热带到两极,从海洋到高山,到处都有它们的踪迹。土壤、岩石、以至在树皮或其它物体上均能成片生长. 甚至各种恶劣环境（温泉、盐湖）
- 2) 形态差异极大，有球状、杆状和丝状等形态；
- 3) 细胞中含有叶绿素 a，进行产氧型光合作用（光合器—类囊体，片层状膜系统）
蓝细菌被认为是地球上生命进化过程中**第一个产氧的光合生物**，对地球上从无氧到有氧的转变、真核生物的进化起着里程碑式的作用。
- 4) 具有原核生物的典型细胞结构：
- 5) 营养极为简单，不需要维生素，以硝酸盐或氮作为氮源，多数能固氮，其异形细胞（heterocyst）是进行固氮的场所。
许多蓝细菌生长在池塘和湖泊中，在夏、秋两季大量繁殖，并形成胶质团浮于水面，形成“水花”，使水体变色。
- 6) 分泌粘液层、荚膜或形成鞘衣，因此具有强的抗干旱能力。
- 7) 无鞭毛，但能在固体表面滑行，进行光趋避运动。
- 8) 许多种类细胞质中有气泡，使菌体漂浮，保持在光线最充足的地方，以利光合作用。

光合细菌 3 个类群：紫细菌，绿细菌，蓝细菌

	蓝细菌	紫、绿细菌
光合色素	叶绿素 a 藻胆素（辅助光合色素）	细菌叶绿素
光合作用	产氧型	不产氧型
电子供体	水	H ₂ S, S, H ₂

异形胞： p40

位于丝状生长蓝细菌细胞链的中间或末端，由营养细胞特化而来的形大、壁厚、专司固氮功能（N₂→NH₃）的细胞。

一些有异形胞的菌种形成静息孢子：一种特化细胞，壁厚、色深、与异形胞相似，着生在菌丝的中间或末端，可抵抗干旱或冷冻的休眠细胞。

3、经济效益和理论价值

特点：既可进行光合作用，又可固氮；可抗污染环境；

应用：保健产品（“螺旋藻”）、优质饲料；

提取有用成分：EPA 和 DHA 等多不饱和脂肪酸；藻蓝素等天然色素；

第四节 支原体、立克次氏体和衣原体

支原体（Mycoplasma），立克次氏体（Rickettsia），衣原体（Chlamydia）：G⁻，其大小和特性均介于通常的细菌与病毒之间的原核生物。

一、立克次氏体（Rickettsia）

1、概念 p41

大小介于通常的细菌与病毒之间，在许多方面类似细菌，专性活细胞（真核细胞）内寄生的原核微生物。

2、特性

1) 某些性质与病毒相近

专性活细胞寄生物，除五日热（战壕热）立克次氏体（*Rickettsia wolhynica*）外均不能在人工培养基上生长繁殖。

体内酶系不完全，一些必需的养料需从宿主细胞获得；

细胞膜比一般细菌的膜疏松：可透性膜，使它们有可能容易从宿主细胞获得大分子物质，但也决定了它们一旦离开宿主细胞则易死亡

大小介于病毒与一般细菌之间，其中伯氏立克次氏体 (*Rickettsia burneti*) 能通过细菌过滤器，一般个体：球状体：0.2-0.5 mm；杆状体：0.3-0.5 x 0.3-2 mm；

2) 从一种宿主传至另一宿主的特殊生活方式

主要以节肢动物(虱、蜱、螨等)为媒介，寄生在它们的消化道表皮细胞中，然后通过节肢动物叮咬和排泄物传播给人和其他动物(虫媒微生物)。

有的立克次氏体酿成严重疾病，如人类的流行性**斑疹伤寒**、**Q 热**等，并常伴随着灾害、战争和饥饿，曾长期与人类的痛苦、灾难联系在一起。

防治：预防为主

类立克次氏：侵染植物的立克次氏

二、支原体 (Mycoplasma)

1、概念 (参见 P41)

又称类菌质体，是介于一般细菌与立克次氏体之间的原核微生物。

2、特性

1) 无细胞壁，只有细胞膜 (含甾醇)，细胞形态多变；

2) 个体很小，能通过细菌过滤器，曾被认为是最小的可独立生活的细胞型生物。

球状体：0.2-0.25 mm，最小达 0.1 mm；丝状体最长可达 150 mm，因细胞柔软且具扭曲性，致使细胞能通过孔径比自身小得多的过滤器。

3) 可进行人工培养，但营养要求苛刻 (血清或腹水)，菌落微小，呈典型的“油煎荷包蛋”形状；

4) 一些支原体能引起人类、牲畜、家禽和作物的病害疾病。

5) 应用活组织细胞培养病毒或体外组织细胞培养时，常被支原体污染；

类支原体：侵染植物的支原体

如何分离支原体？

(1) 样品经细菌滤器 (支、衣、极小细菌、病毒)；

(2) 滤液划线接种 (培养基含青霉素，血清，pH7.0)，30℃培养 1-2 周；

(3) 解剖镜观察 “油煎荷包蛋” 菌落。

三、衣原体 (Chlamydia)

1、概念 (参见 P41)

介于立克次氏体与病毒之间，能通过细菌滤器，在真核细胞内专性能量寄生的一类原核微生物。

过去误认为“大病毒”，但它们的生物学特性更接近细菌而不同于病毒。

2、特性

1) 细胞结构与细菌类似；

具有类似的细胞壁，细胞壁内也含有胞壁酸、二氨基庚二酸；70S 核糖体也是由 30S 和 50S 二个亚基组成)

2) 细胞呈球形或椭圆形，直径 0.2-0.3 mm，能通过细菌滤器；

3) 专性活细胞内寄生；

衣原体有一定的代谢活性，能进行有限的大分子合成，但缺乏产生能量的系统，必须依赖宿主获得 ATP，因此又被称为“**能量寄生型生物**”。

4) 在宿主细胞内生长繁殖具有独特的生活周期，即存在原体和始体两种形态。(参见 P41)

①具有感染性的原体通过胞饮作用进入宿主细胞，被宿主细胞膜包围形成空泡。

②原体逐渐增大成为始体。始体无感染性，但能在空泡中以二分裂方式反复繁殖，形成大量新的原体，积聚于细胞质内成为各种形状的包涵体。

③宿主细胞破裂，释放出的原体则感染新的细胞。

5) 衣原体广泛寄生于人类、哺乳动物及鸟类，少数致病；

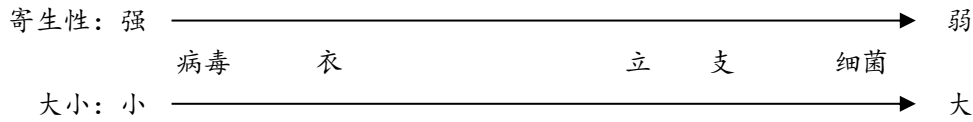
沙眼衣原体是人类砂眼的病原体，甚至引起结膜炎、角膜炎、角膜血管翳等临床症状，成为致盲的重要原因。1956 年，我国微生物学家汤飞凡等应用鸡胚卵黄囊接种法，在国际上首先成功地分离培养出沙眼衣原体。

6) 衣原体不耐热，60 度 10 分钟即被灭活，但它不怕低温，冷冻干燥可保藏多年。对红霉素、氯霉素、四环素敏感。

表 13-1 支原体、立克次氏体、衣原体与细菌、病毒的比较 (P41)

“三体”相同点：

1) 介于病毒与细菌之间的原核生物



2) 具细胞结构

3) 含 DNA、RNA 两种核酸，有核糖体，G-

4) 二等分裂繁殖，有致病性

5) 对常用抗生素/化学药物敏感（支原体对青霉素例外），均怕热不怕冷。

“三体”不同点：

支原体	立克次氏体	衣原体
能在体外独立生活的最小生物	专性细胞内寄生	专性细胞内寄生
光镜勉强可见	光镜可见	光镜勉强可见
无细胞壁	有	有
细胞膜含甾醇	不含	不含
可通过细菌滤器	不能通过	可通过
有大分子合成能力	有	无
有产 ATP 系统	有	无
呼吸系统感染	斑疹伤寒、Q 热	砂眼

第三章 真核微生物的形态、构造与功能

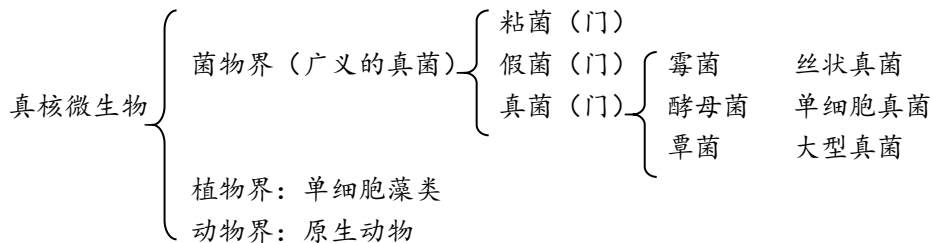
真核微生物的特征：p42

细胞核具有核膜；能进行有丝分裂；细胞质中存在线粒体或同时存在叶绿体等细胞器和内质网等内膜结构；

一、真核生物与原核生物的比较（p53 表 3-3）

	原核生物	真核生物
细胞大小	小（通常 $<2\mu\text{m}$ ）	大（通常 $>2\mu\text{m}$ ）
细胞核	拟核（无核膜）	真正细胞核
细胞器	无	有
核糖体	70S	80S
细胞膜中甾醇	不含	含
细胞壁主要成分	肽聚糖	纤维素、几丁质
繁殖方式	无性（二等分裂）	有性或无性等多种

二、真核微生物的主要类群（周德庆 p41）



“菌物界”：指与动物界、植物界相并列的一大群无叶绿体、依靠细胞表面吸收有机养料、细胞壁一般含几丁质的真核微生物。一般包括真菌、粘菌和假菌 3 类。（我国学者裘维蕃 1990 年提出。）

本章主要内容-----真菌：

真菌是一类低等真核生物

特点：

- 1、细胞质中含有线粒体但没有叶绿体，不进行光合作用，无根、茎、叶的分化；
- 2、一般具发达的菌丝体；
- 3、细胞壁多数含几丁质；
- 4、营养方式为化能有机营养（异养吸收型）、好氧；
- 5、以产生有性孢子 and 无性孢子二种形式进行繁殖；
- 6、陆生性较强；

真菌门：鞭毛菌亚门；接合菌亚门；子囊菌亚门；担子菌亚门；半知菌亚门

第一节 酵母菌（yeast）

一、概念（P54）

一群单细胞真菌的统称，这个术语是无分类学意义。（凡是生活史中大部分以单细胞生活的、主要营出芽繁殖的一类低等真菌，统称为酵母菌。）

在分类学上分别归属于：子囊菌亚门；担子菌亚门；半知菌亚门

5 个特点：（周德庆 p47）

个体一般以单细胞存在；多数营出芽繁殖；能发酵糖类产能；细胞壁常含甘露聚糖；常生活在含糖量较高、酸度较大的水生环境中。

二、分布及与人类的关系

- 1、多分布在含糖的偏酸性环境，也称为“糖菌”。

水果、蔬菜、叶子、树皮等处，及葡萄园和果园土壤中等。腐生性生物。

不能以 CO_2 为主要碳源，必须以有机碳化合物，主要是葡萄糖等单糖为碳源和能源。

2、重要的微生物资源；

酵母是人类的第一种“家养微生物”，酿酒，发面；乙醇和甘油发酵，石油脱蜡，生产 SCP；提取核酸、麦角甾醇、辅酶 A、细胞色素 C、维生素和凝血质等生化药物；

酵母菌是一种优良的单细胞蛋白 (single cell protein, 缩写 SCP)：饲用、药用或食用单细胞蛋白：一般指来自各类微生物的蛋白

原因：蛋白质含量高 (50%以上)，含人体必需的氨基酸；

口味好，无毒，易消化吸收；

制造容易，价格低廉 (生长速度快，体积大)。

3、重要的科研模式微生物；

啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 第一个完成全基因组序列测定的真核生物 (1997)

4、有些酵母菌具有危害性；

皮肤、呼吸道、消化道、泌尿生殖道 (白色念珠菌) 疾病；

果酱、蜂蜜变质 (高渗酵母)；

污染发酵工业 (酱油、酱类、腐乳表面生白花、产酸臭——醭膜酵母)

三、细胞形态与构造

(一) 个体形态 (P55)

大多数为球状、卵圆、椭圆、圆柱等单细胞，有的酵母菌子代细胞连在一起成为链状，称为假丝酵母。

- 六种
- | | |
|--------|-------|
| 1) 圆形 | 圆球酵母 |
| 2) 椭圆形 | 葡萄酒酵母 |
| 3) 卵圆形 | 啤酒酵母 |
| 4) 柠檬形 | 汉逊氏酵母 |
| 5) 腊肠形 | 巴斯德酵母 |
| 6) 假丝状 | 假丝酵母 |

假丝酵母的子细胞与母细胞常连在一起形成链状，称为假菌丝。

区别：

假菌丝：藕节状细胞串 (细胞间以极窄小面积相连)

真菌丝：竹节状细胞串 (细胞间横隔面与细胞直径一致)

大小：

长：约 $5\sim 20\mu\text{m}$ ，可达 $50\mu\text{m}$ ；

宽：约 $1\sim 5\mu\text{m}$ ，可达 $10\mu\text{m}$ 以上；比细菌粗 10 倍左右

一般用高倍镜 (40×10) 观察

细胞大小与培养方式、菌龄、制片方式有关。

成熟细胞比幼龄细胞大；

菌体在液体培养基中比在固体培养基中大。

(二) 细胞构造

典型真核细胞结构：细胞壁，细胞膜，细胞质，细胞核，液泡，线粒体等内含物。

但不存在高等动、植物细胞中普遍存在的具有高度分化的高尔基体。

1、细胞壁

厚： 25nm ，占细胞干重 25%。

成分：“酵母纤维素”

- 三明治状
- | | |
|---|---|
| { | 内层：葡聚糖， $\beta -1, 6$ ， $\beta -1, 3$ (主要结构成分) |
| | 外层：甘露聚糖： $\alpha -1, 6$ ， $\alpha -1, 2$ ； $\alpha -1, 3$ |
| | 中层：蛋白质 (大多与多糖结合，也有以酶的形式与细胞壁结合) |

几丁质 (N-乙酰葡萄糖胺的 $\beta -1, 4$ 多聚物)，在细胞壁上以环状形式分布于芽痕周围。

蜗牛酶 (混合酶，包括甘露聚糖酶，葡聚糖酶，脂酶，纤维素酶等 30 多种)：

水解 { 酵母细胞壁 → 原生质体
子囊壁 → 子囊孢子

功能：与原核生物类似

固定外形；保护作用；存在酶和性结合物质，利于营养物质透过及细胞间性识别；抗原性

2、细胞膜

结构、成分与原核生物基本相同，其功能不及原核生物那样具有多样性，但已有膜分化的细胞器。

三层结构：上下两层磷脂，中间嵌杂甾醇和蛋白质分子（周德庆 p48 图 2-6）

成分 { 蛋白质（包括吸收糖和氨基酸的酶）
脂类 { 甘油的单、双、三酯
甘油磷脂 { 磷脂酰胆碱
磷脂酰乙醇胺
甾醇 { 麦角甾醇（居多）
酵母甾醇
糖类（少量，多为甘露聚糖）

多烯类抗生素（制霉菌素）与甾醇作用，可破坏膜的稳定性。对原核生物膜没有作用（支原体例外）。

3、细胞核（p50）

典型的真核生物细胞核的结构，有核膜、核仁、染色体，进行有丝分裂和减数分裂。

{ 核膜：双层单位膜，核孔（核、质间物质交流）
核仁：合成 rRNA 和装配核糖体的场所
染色体：DNA 与组蛋白结合，
含很多基因，高度折叠
条数、碱基对、G:C 比值—物种特征（酿酒酵母：17 条染色体）
核基质：蛋白纤维——网状结构（支撑作用）

功能：遗传信息（DNA）的贮存、复制和转录的主要场所。

2 μm 质粒（p56）

结构：闭合环状超螺旋 DNA 分子，周长 2 μm (6318bp)

高拷贝存在（每个单倍体基因组含 60~100 个拷贝）

只携带与复制和重组有关的 4 个蛋白质基因，不赋予宿主体任何遗传表型，属隐秘性质粒。

用途：酵母菌分子克隆和基因工程的重要载体；

研究真核基因调控和染色体复制的理想模型；

4、细胞质和内含物

细胞器：线粒体，核糖体，内质网等

(1) 线粒体（p47）：杆状，1~20 个/细胞

结构：双层膜，内膜折叠成嵴（电子传递和氧化磷酸化酶系），嵴的两侧分布着基粒，嵴间充满基质（TCA 酶系）。在缺氧情况下只形成无嵴的简单线粒体。

功能：细胞呼吸作用的场所，为生命活动提供 ATP。真核生物的“动力车间”。

线粒体内含 1 个 DNA 片段（核外遗传系统，为线粒体行使功能所需的 rRNA、tRNA 及某些酶如细胞色素、ATP 合成酶编码）

在培养的酵母群体中，常有 1%~2% 的细胞自发出现小菌落表型

“小菌落”（呼吸缺陷型菌落）：

酵母菌由于线粒体 DNA 严重缺损或大部分丢失，缺失细胞色素 a、b 及细胞色素 c 氧化酶，即使在通气条件下，细胞生长也很缓慢，在葡萄糖培养基上只能形成小菌落。

(2) 核糖体

两种：

{ 80S { 40S 亚基 游离于细胞质或位于内质网上
60S 亚基
70S { 30S 亚基 存在于线粒体中

50S 亚基

功能：蛋白质的合成场所

(3) 内质网：分布于细胞质中的膜的管道结构，连接在核膜的外侧膜上。由脂质双分子构成。

两类：糙面内质网（表面有核糖体颗粒）：合成和运送胞外分泌蛋白功能。

光面内质网（表面无核糖体颗粒）：与脂质和钙代谢相关

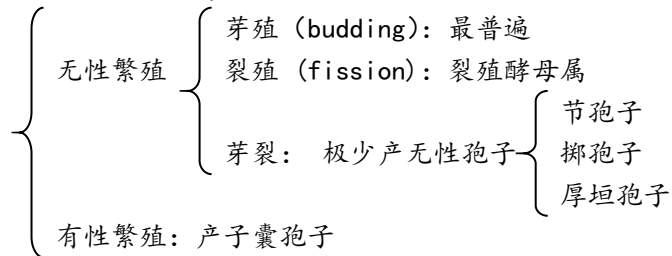
在合成膜脂肪酸、固醇及其不饱和化及在利用方面起重要作用

(4) 液泡：成熟细胞中出现一个大的液泡。

功能：调节渗透压；储存营养物（聚磷酸）；储存水解酶类（蛋白酶，核酸酶，磷酸酯酶等）

四、繁殖方式和生活史 p56

(一) 繁殖方式 p56



酵母菌中尚未发现其有性阶段的被称为假酵母

1、无性繁殖

1) 芽殖

主要的无性繁殖方式。成熟细胞长出一个芽，到一定程度后脱离母体继续长成新个体。方式可分为多边出芽（最普遍），两端出芽和三端出芽。

2) 裂殖

少数酵母菌可以象细菌一样借细胞横割分裂而繁殖，例如裂殖酵母。

2、有性繁殖

(1) 方式：形成子囊和子囊孢子

(2) 过程

1) 两个性别不同的单倍体细胞靠近，相互接触；

2) 接触处细胞壁消失，质配；

3) 核配，形成二倍体核的接合子：

A、以二倍体方式进行营养细胞生长繁殖，独立生活；下次有性繁殖前进行减数分裂。

B、进行减数分裂，形成4个或8个子囊孢子，而原有的营养细胞就成为子囊。子囊孢子萌发形成单倍体营养细胞。

几个概念

单倍体细胞(n)：细胞核中只含一套染色体的细胞（不管细胞中有多少个核）

双倍体细胞(2n)：细胞核中只含二套染色体的细胞（不管细胞中有多少个核）

只有单倍体细胞才具有接合能力。

二倍体细胞是由二个性别不同的单倍体亲本接合而来，因此，成对染色体分别来自父本和母本。

形成子囊孢子的条件：参考“工业微生物实验技术”

①营养充足的强壮细胞

②适当的温度（25℃）和湿度（80%以上）

③通风良好

④适当的生孢子培养基，营养贫瘠。

子囊孢子的意义：

理论意义：分类鉴定依据

实践意义：

1) 杂交育种，人工定向培育新品种

两亲本菌株的选择

↓ 产孢子

单倍体细胞分离（带遗传标记）

↓

杂交（不同接合型）→ 杂合子检出 → 优良性状个体

2) 检验生产菌是否被杂菌污染（利用子囊孢子形成速度和形状）

石膏块培养基：

啤酒生产酵母：慢（72h），每个子囊中有 4 个子囊孢子，孢子圆形光滑。

野生酵母：快（40-48h）

（二）生活史（life cycle）

指上代个体经一系列生长发育阶段而产生下一代个体的全部历史。

酵母菌生活史有三种类型：

1) 单、双倍体型：营养体既可以单倍体也可以双倍体形式存在，都可进行出芽繁殖。

2) 单倍体型：营养体只能以单倍体形式存在（核配后立即进行减数分裂）

3) 双倍体型：营养体只能以双倍体形式存在（核配后不立即进行减数分裂）

（1）单双倍体型

营养体既可以单倍体（n）也可以双倍体（2n）形式存在，都可进行出芽繁殖。

代表：酿酒酵母（*Sacharomyces cerevisiae*）

特点（p58）：一般情况以营养体状态进行出芽繁殖。

营养体既可以单倍体（n）也可以双倍体（2n）形式存在。

在特定条件下进行有性繁殖。

（2）单倍体型（p58）

营养体只能以单倍体形式存在（核配后立即进行减数分裂）

代表：八孢裂殖酵母（*Schizosaccharomyces octosporus*）

特点：营养细胞为单倍体

以裂殖方式进行无性繁殖

二倍体细胞不能独立生活（只是生活史中一部分，阶段很短）

（3）双倍体型（p58）

营养体只能以双倍体形式存在（核配后不立即进行减数分裂）

代表：路德氏酵母（*Saccharomycodes ludwigii*）

特点：营养体为双倍体形，以出芽方式繁殖。

单倍体子囊孢子在子囊内发生接合。

单倍体阶段仅以子囊孢子形式存在，不能独立生活，阶段很短。

五、菌落特征

与细菌菌落类似，但一般较细菌菌落大且厚，表面湿润，粘稠，易被挑起，多为乳白色，少数呈红色。

六、工业上常用的酵母菌

1、啤酒生产

酿酒酵母（*Sacharomyces cerevisiae*）

发酵特性 { 上面啤酒酵母（*S. cerevisiae*）：不易凝集沉淀而浮在上面
下面啤酒酵母（*S. carlsbergensis*，卡尔斯伯酵母）：易凝集沉淀，发酵度低

区别：根据棉子糖发酵

半乳糖+葡萄糖+果糖 = 棉子糖（三糖）

└──┘ └──┘

蜜二糖 蔗糖

上面啤酒酵母：不含蜜二糖酶，只能发酵 1/3 棉子糖

下面啤酒酵母：能发酵全部棉子糖

用途：啤酒，葡萄酒，白酒，酒精，面包，食用、药用和饲用酵母，提取核酸、麦角甾醇和维生素 C 等。

2、假丝酵母属（Candida）

热带假丝酵母 (*C. tropicalis*): 氧化烃类能力强, 利用石油生产 SCP。

产朊假丝酵母 (*C. utilis*): 利用五碳糖和六碳糖, 既可利用造纸工业的亚硫酸纸浆废液, 也能利用糖蜜和木材水解液等生产 SCP。

3、异常汉逊氏酵母

产乙酸乙酯: 用于酱油和白酒等增香 (增香菌)

本节重点

一、酵母菌的形态和大小

二、酵母菌的细胞结构

三、繁殖方式

四、生活史 (比较三种生活史, 图示并说明酿酒酵母生活史及特点)

五、原核生物与真核微生物的比较

第二节 霉菌 (mould, mold)

概念: p58

丝状真菌的统称, 不是分类学上的名词。通常指那些菌丝体较发达而又不产生大型子实体的真菌。在营养基上形成绒毛状、蜘蛛网状或絮状菌丝体的小型真菌。

霉菌: 鞭毛菌亚门; 接合菌亚门; 子囊菌亚门; 半知菌亚门

一、分布及与人类的关系 (P59)

在自然界分布极广;

在自然界中无所不在 (从高山、湖泊到田野, 从海洋到高空到处都有真菌。真菌虽然不在空气中生长, 但它的孢子却成群飘在空中); 基本是陆生生物;

分布: 阴暗潮湿; 合适的有机物 (只要存在有机物, 就有它们的踪迹); 适宜的温度 ($25\sim 30^{\circ}\text{C}$); 绝大多数好氧

有益方面:

①有用产品的生产:

风味食品 (酱油, 腐乳, 红曲等)

抗生素 (青霉素, 头孢霉素、灰黄霉素)

酶抑制剂 (环孢菌素)

有机酸 (柠檬酸, 葡萄糖酸, 延胡索酸等)

酶制剂 (淀粉酶, 果胶酶, 纤维素酶等)

甾体激素转化

杀虫农药 (白僵菌剂)

②自然界物质转化中的重要作用 (有机物分解者);

它们能够将地球上存在数量巨大的、其它生物不能利用的植物残体的主要组分——纤维素、半纤维素和木质素彻底分解, 成为绿色植物可以利用的养料, 从而保证了陆地生物圈的可持续发展。

有害方面

①食物、工农业制品的霉变:

全世界平均每年由于霉变而不能食 (饲) 用的谷物约占 2%。我国每年约有 10% 的柑橘因霉坏而损失。

②产生毒素而引起人或动物发生食物中毒;

少部分能产生毒素的霉菌主要是曲霉菌属、青霉菌属和镰刀菌属中的一些霉菌。据统计, 目前已知的霉菌毒素大约有 200 多种, 其中与人类关系密切的主要代表有黄曲霉毒素、展青霉毒素、赭曲霉毒素 A、杂色曲霉毒素、黄变米毒素等。真菌毒素中, **黄曲霉毒素的毒性和致癌能力最强**。

③人 (如皮肤癣病)、动物和植物致病;

19 世纪中叶欧洲流行的马铃薯晚疫病; 我国在 1950 年发生的麦锈病和 1974 年发生的稻瘟病, 使小麦和水稻分别减产了 60 亿公斤。

二、细胞形态与构造

菌丝 (hypha): 霉菌营养体的基本构成单位。(管状)

菌丝体 (mycelium): 许多菌丝交织在一起而形成的丝状集团。

(一) 菌丝

1、形态 直径 3-10um (比放线菌菌丝约粗 10 倍)

根据菌丝中是否存在隔膜 (septa)，霉菌菌丝分为两大类：

- 无隔膜菌丝 (aseptate hyphae)：单细胞，多核体
- 有隔膜菌丝 (septate hyphae)：多细胞，每段为 1 个细胞

低等真菌 (如毛霉属，根霉属，犁头霉) 的菌丝为无隔膜菌丝，

高等真菌 (如曲霉属，青霉属，木霉) 的菌丝为有隔膜菌丝。

无隔膜菌丝：整个菌丝为长管状单细胞，细胞质内含有多个核。其生长过程只表现为菌丝的延长和细胞核的裂殖增多以及细胞质的增加。

有隔膜菌丝：菌丝由横隔膜分隔成串多细胞，每个细胞内含有一个或多个细胞核。有些菌丝，从外观看虽然像多细胞，但横隔膜上有小孔，使细胞质和细胞核可以自由流通，而且每个细胞的功能也都相同。菌丝隔膜孔附近存在着几种蛋白晶体和伏鲁宁体：堵塞横隔膜孔，防止细胞质流失。

2、细胞结构

具有典型的真核生物的细胞结构：

细胞壁，细胞膜，细胞核，细胞质，细胞器 (液泡，线粒体，内质网，核糖体，泡囊，膜边体)

储藏物 (糖原，脂肪滴等)

细胞壁：

①成分：“钢筋混凝土”结构)

- 几丁质 (高等真菌) } 主要成分，构成网状 (微纤丝)，坚韧
- 纤维素 (低等真菌) }
- 甘露聚糖 } 少，填充 (无定型物质)
- 葡聚糖 }
- 蛋白质 }

几丁质：N-乙酰葡萄糖胺的 β -1,4 多聚物

纤维素：葡萄糖的 β -1,4 多聚物

几丁质酶 (或纤维素酶) 消化 $\longrightarrow$ 原生质体

②在不同生长阶段，霉菌细胞壁成分不同

③菌丝顶端延伸 $\longrightarrow$ 生长

粗糙脉孢霉菌丝顶端细胞各部位的成熟程度是不同的，其细胞壁成分变化，见周德庆 p54，图 2-10

细胞膜：

蛋白质镶嵌的磷脂双分子膜，包含甾醇

膜通常紧贴于细胞壁，某些部位坚固地附着，，所以很难发生质壁分离

某些部位增生形成管状或转绕状的膜边体

膜边体 (lomasome)：

丝状真菌所特有的膜结构，类似于间体。

(位于细胞壁与细胞膜之间，由单层膜围成，形态呈管状、囊状、球状或多层折叠膜状)

功能：可能与合成细胞壁有关。

(二) 菌丝体及各种分化形式

按生理功能不同，霉菌的菌丝体分为两个基本类型：

营养菌丝体：营养基质内，吸收营养

气生菌丝体：伸展到空中，产生子实体

菌丝体的特化

营养菌丝和气生菌丝对于不同的真菌来说，在它们的长期进化过程中，对于相应的环境条件已有了高度的适应性，并明显地表现在产生各种形态和功能不同的特化结构上。也称菌丝的变态。

- 营养菌丝的特化形式 p60
- 气生菌丝的特化形式 (子实体：指在其里面或上面可产有性 or 无性孢子的有一定形态和构造的菌丝体组织)

1) 菌环：菌丝交织成套状

2) 菌网：菌丝交织成网状

捕虫菌目(Zoopagales)在长期的自然进化中形成的特化结构，特化菌丝构成巧妙的网，可以捕捉小型原生动物或无脊椎动物，捕获物死后，菌丝伸入体内吸收营养。

3) **匍匐枝和假根**：匍匐菌丝、假根(类似树根，吸收营养)，功能是固着、延伸和吸收营养。根霉和犁头霉属

4) **附着枝**：若干寄生真菌由菌丝细胞生出1-2个细胞的短枝，以将菌丝附着于宿主上，这种特殊结构即附着枝。

5) **吸器**：一些专性寄生真菌从菌丝上分化出来的旁枝，侵入细胞内分化成指状、球状或丝状，用以吸收细胞内的营养。

6) **附着胞**：许多植物寄生真菌在其芽管或老菌丝顶端发生膨大，并分泌粘性物，借以牢固地粘附在宿主的表面，这一结构就是附着胞，附着胞上再形成纤细的针状感染菌丝，以侵入宿主的角质层而吸取营养。

当感染植物的时候，这种附着胞牢牢地附着到宿主的叶片表面，并且通过提高附着胞内渗透压活性物质的浓度产生巨大的膨压，射出一钉状结构进入植物细胞，为真菌的感染炸开一条通道。

侵染垫：附着胞由孢子萌发，萌发管延伸，形成膨大的附着胞，在附着胞的下面产生细的侵染菌丝，可穿透寄主细胞，再膨大成正常粗细的菌丝。而侵染垫是菌丝顶端受到重复阻塞后，构成了多分枝，分枝菌丝顶端膨大而发育成一种垫状的组织结构。

7) **菌核**：是由菌丝聚集和粘附而形成的一种**休眠体**，同时它又是糖类和脂类营养物质的**储藏体**。由菌丝密集地交织在一起，其外层较坚硬、色深，内层疏松，大多呈白色。

假菌核：寄生性真菌与宿主共同形成，例如冬虫夏草，真菌寄生于鳞翅目昆虫，使虫体转变为假菌核，当孢子萌发，虫体死亡，菌自虫体内生长出子实体。含有虫草酸，是名贵中药。

8) **子座**：许多有**隔菌丝**在生长到一定时期产生菌丝聚集物，有**规律或无规律**的膨大而形成结实的**团块状组织**。菌丝交织成垫状、壳状等，在子座外或内可形成繁殖器官。

9) 菌索和菌丝束

菌索(rhizomorph)一般生于树皮或地下，呈白色或其他颜色的**根状结构**，具有**营养运输和吸收**的功能。菌索一般形成于高等丝状真菌如伞菌菌丝的顶端。

菌丝束(mycelial strand)是由正常菌丝发育而来的简单结构，正常菌丝的分枝快速平行生长且紧贴母体菌丝而不分散开，次生的菌丝分枝也按照这种规律生长，使得菌丝束变得浓密而集群，并借助分枝间大量联结而成统一体。

菌索和菌丝束能在缺少营养的环境中为菌体生长**提供基本的营养来源**。

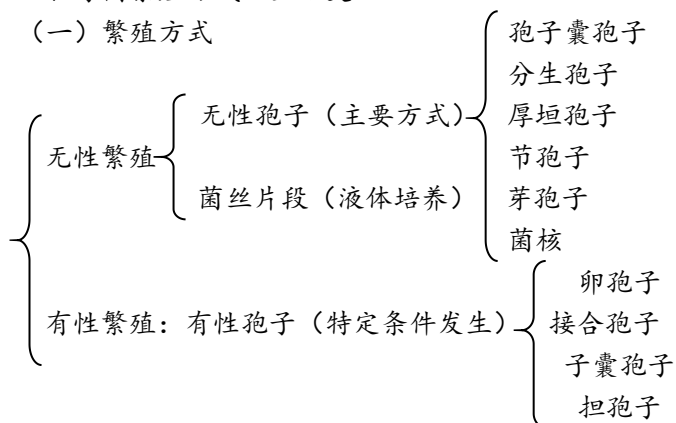
液体培养时菌丝体的特化形态

菌丝球：(周德庆 p57)

有的霉菌在液体培养基中通风搅拌或振荡培养时，菌丝体缠结形成颗粒状，均匀地分布在培养液中，有利于氧的传递。如黑曲霉进行柠檬酸发酵

三、霉菌繁殖方式及生活史

(一) 繁殖方式



1、无性孢子繁殖 (p62)

不经两性细胞配合，只是营养细胞的分裂或营养菌丝的分化(切割)而形成新个体的过程。**无性孢子有：厚垣孢子、节孢子、分生孢子、孢子囊孢子等。**

孢子囊孢子(sporangiospore)：内生孢子，当菌丝发育到一定阶段，气生菌丝的顶端细胞膨大成圆形、椭圆形或梨形的孢子囊，然后膨大部分与菌丝间形成隔膜，囊内的原生质分化成许多包含1~2个核的小块，每一小块的

周围形成一层膜，将原生质包起来，如此形成许多孢子囊孢子。

顶端形成孢子囊的菌丝称**孢囊梗**，孢囊梗深入到孢子囊内的部分称为**囊轴**。

分生孢子(conidium)：是一种外生孢子，是霉菌中最常见的无性孢子。气生菌丝的顶端细胞或菌丝分化形成的分生孢子梗的顶端细胞分割缢缩而形成的单个或成簇的孢子。

厚垣孢子：一些霉菌，如毛霉，特别是总状毛霉(*Mucor racemosus*)常在菌丝中间形成厚垣孢子。

节孢子(arthrospore)：少数菌种的菌丝中间会形成许多横隔，然后断裂形成节孢子。

芽孢子(budding spore)：某些毛霉或根霉在液体培养基，由菌丝细胞如同发芽一般产生小突起，经细胞壁紧缩而形成一种耐久体，形似球状，这种细胞被称为酵母型细胞，也叫芽孢子。

霉菌无性孢子的特点：

- ①分散，量大（有利于接种和扩大培养）；
- ②干，休眠期长，具一定抗性（利于菌种保藏）；
- ③形态、颜色各异（菌种鉴定的重要指标）；
- ④小、轻（有助于广泛传播）；

霉菌孢子与细菌芽孢的比较

项目	霉菌孢子	细菌芽孢
大小	大	小
数目	一条菌丝或一个细胞产多个	一个细胞产一个
形态	形态、色泽多样	形态简单
形成部位	可在细胞内或细胞外形成	只在细胞内形成
细胞核	真核	原核
功能	最重要的繁殖方式	不是繁殖方式，是抗性构造（休眠方式）
抗热性	不强，在 60—70℃下易杀死	极强，一般 100℃数十分钟才能杀死
产生菌	绝大多数种类可以产生	少数细菌可产生

2、有性孢子繁殖（有性繁殖）

两个性细胞结合产生新个体的过程（3个阶段）：

- a) **质配**：两个性细胞结合，细胞质融合，成为双核细胞，每个核均含单倍染色体 ($n+n$)。
- b) **核配**：两个核融合，成为二倍体接合子，此时核的染色体数是二倍 ($2n$)。
- c) **减数分裂**：具有双倍体的细胞核经过减数分裂，成为单倍体的有性孢子，即核中的染色体数目又恢复到单倍体状态。

霉菌有性孢子繁殖的特点：

- a) 霉菌的有性繁殖不如无性繁殖那么经常与普遍，多发生在特定条件下，往往在自然条件下较多，在一般培养基上不常见。
- b) **有性繁殖方式因菌种不同而异**，有的两条营养菌丝就可以直接结合，有的则由特殊的性细胞（性器官）-----配子囊或由孢子囊产生的配子来相互交配，形成有性孢子。
- c) 核配后一般**立即进行减数分裂**，因此菌体染色体数目为单倍，双倍体只限于接合子。
- d) 霉菌的有性繁殖存在**同宗配合**（同一菌体的菌丝可自身结合）和**异宗配合**（两种不同质的菌才能结合）两种情况。
- e) 霉菌的有性孢子包括：接合孢子；子囊孢子；卵孢子；担孢子

霉菌的分类，主要根据有性生殖方式的不同。

（二）生活史

无性繁殖阶段：菌丝体（营养体）在适宜的条件下产生无性孢子，无性孢子萌发形成新的菌丝体，多次重复。

有性繁殖阶段：在发育后期，在一定条件下，在菌丝体上分化出特殊性器官（细胞），质配、核配、减数分裂后形成单倍体孢子，再萌发形成新的菌丝体。

有一些霉菌，至尽尚未发现其生活史中有有性繁殖阶段，这类真菌称为半知菌。

四、菌落形态

质地疏松，呈絮状、蜘蛛网状、绒毛状 或地毯状。

形态大，分为 { 局限性生长（青霉，曲霉）

蔓延性生长（根霉，毛霉，菌落没有固定大小）

干燥，颜色丰富，正反，中心与边缘常不一致。

（各种霉菌，在一定培养基上形成的菌落大小、形状、颜色等相对稳定，所以菌落特征也为分类依据之一。）

4 大类微生物的细胞形态与菌落特征比较（周德庆 p59 表 2-5）

五、工业上重要霉菌的形态特征

（一）单细胞霉菌

菌丝无隔，无性孢子为孢子囊孢子和厚壁孢子

分类地位：接合菌亚门→接合菌纲→毛霉目→毛霉科（毛霉属、根霉属、梨头霉）

1、毛霉（Mucor）

个体特征：菌丝无隔；

囊根分枝情况可分为：

不分枝
分枝 { 总状分枝（单轴分枝）
假轴状分枝

孢子囊球形，成熟后壁易破裂或消失。无囊托。无假根和匍匐枝

菌落特征：白色，絮状，蔓延

用途：制作腐乳和豆豉（产蛋白酶）；

如：鲁氏毛霉（*M. rouxianus*）

总状毛霉（*M. racemosus*）

原料的糖化（产淀粉酶，糖化酶）

酒精、有机酸发酵。

早期酒精生产：阿明诺法（双边发酵法。鲁氏毛霉能糖化淀粉并生成少量酒精）

2、根霉（Rhizopus）

个体特征 p60 图 3-19：菌丝无隔；有假根和匍匐枝；与假根相对处向上长出孢囊梗；有囊托（孢子囊壁的残片）。

菌落特征：蜘蛛网状，蔓延生长

用途：淀粉酶活力强，用作糖化菌（制曲酿酒，甜酒曲，米根霉（*R. oryzae*））

甾体化合物的转化（11 α - 羟基化，黑根霉（*R. nigricans*））

产乳酸（华根霉，少根根霉，米根霉）

3、梨头霉（Rhizopus）

个体形态：无隔膜；有假根和匍匐枝；孢囊梗着生在匍匐枝中间，同假根并不对生，2~5 成簇；孢子囊顶生，呈洋梨形。孢囊成熟后壁易消失，有残留的囊托；囊轴锥形、近球形或其它形状。

菌落特征：蜘蛛网状，蔓延生长

用途：甾体转化（11 β - 羟基化，蓝色梨头霉（*R. coerulea*））

根霉、毛霉和梨头霉形态比较参见“工业微生物实验技术” p89

（二）多细胞霉菌

菌丝有隔，多核，孢子多为外生孢子（分生孢子）

分类地位：半知菌亚门→丝孢纲→丝孢目→丛根孢科（曲霉属、青霉属）

1、曲霉属（Aspergillus）

个体形态：多细胞，有隔膜；

分生孢子梗从足细胞生出，无横隔，顶部膨大形成顶囊（棍棒形、椭圆形、半圆形等）。顶囊表面产生小梗（单层或双层），分生孢子自小梗顶端相继形成。

分生孢子头（顶囊、小梗及分生孢子链构成）具有不同形状和颜色。

菌落特征：绒毛状，局限性生长

用途：传统发酵食品，如：酱，酱油（米曲霉（*A. oryzae*）（沪酿 3.042）：淀粉糖化及分解蛋白质）

酶制剂（淀粉酶黑曲霉（*A. niger*）；蛋白酶黄曲霉（*A. flavus*）；果胶酶）

有机酸（柠檬酸，葡萄糖酸）（黑曲霉）

洛伐他汀（lovastatin）：土曲霉

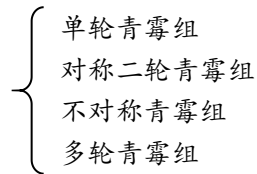
抑制胆固醇生物合成，是 β -羟基- β 甲基戊二酰辅酶A还原酶抑制剂，治疗高血脂

2、青霉属 (*Penicillium*)

个体形态 (p67 图 3-32): 有隔膜，多细胞；

分生孢子梗由菌丝生出，有分隔，顶端生有帚状枝。

依据帚状枝的分枝情况，分为四组 (群):



无足细胞和顶囊

菌落特征: 地毯状，局限性生长

用途: 青霉素: 产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)

点青霉 (*Penicillium notatum*) 早期使用

青霉素和头孢菌素对细菌有抗菌作用, 抑制细胞壁合成, 作用于细胞壁合成中的转肽酶和羧肽酶。

灰黄霉素: 展青霉 (*Pen. patulum*)

黄青霉 (*Pen. griseofulvum*)

抑制真菌生长

头孢菌素 C: 顶头孢霉 (*Cephalosporium acremonium*)

本节重点

一、霉菌的细胞形态与构造

1、菌丝 (2 类, 细胞壁的组成与结构, 膜边体)

2、菌丝体 (两个类型, 特化结构, 菌丝球)。

二、繁殖方式

1、繁殖方式

2、无性孢子和有性孢子 (种类, 特点)

三、菌落特征

四、根、毛、青、曲霉菌的形态特征

五、有重要生产价值霉菌的用途, 菌名

二型性

有些真菌是二型的, 即存在酵母 (Y) 和霉菌 (M) 两种形态。

在动物体内以酵母形式存在, 在体外以霉菌或菌丝体形式存在 (白假丝酵母);

与植物致病有关的真菌中, 以相反的二型性形式存在。

第四章 病毒

第一节 概述

一、病毒的发现和研究历史

1886 年，A. Mayer 发现具有传染性的烟草花叶病；
1892 年，D. Ivanovsky 烟草花叶病病原体能通过细菌滤器：一种能通过细菌滤器的“细菌毒素”或“极小的细菌”
1898 年，M W Beijerinck 对烟草花叶病病原体的研究结果：
能通过细菌滤器；可被乙醇沉淀而不失去其感染性；能在琼脂凝胶中扩散；
用培养细菌的方法不能被培养出来，推测只能在植物活细胞中生活；

比细菌小的具有传染性的活的流质 (contagium vivum fluidum)

一、病毒的发现和研究历史

病毒学 (virulogy)：
研究病毒 (virus) 的本质及其与宿主的相互作用的科学，是微生物学的重要分支学科。
极大地丰富了现代生物学 (微生物学、分子生物学、分子遗传学) 的理论与技术；
有效地控制和消灭人及有益生物的病毒病害；利用病毒对有害生物、特别是害虫进行生物防治；发展以基因工程为中心的生物高新技术产业；

二、病毒的特点和定义

- 1、特点——与细胞型微生物的区别 (p71)
- 1) 形体微小，在电子显微镜下才能看见；
 - 2) 不具有细胞结构，其主要成分为核酸和蛋白质，故称为“分子生物”；
 - 3) 一种病毒只含有一种核酸，DNA 或者 RNA；
 - 4) 绝对的细胞内寄生：既无产能酶系，也无蛋白质和核酸合成酶系，只能利用宿主活细胞内现成的代谢系统合成自身的核酸和蛋白质；
 - 5) 没有个体生长，也不进行二均分裂，以核酸和蛋白质等“元件”的装配实现其大量繁殖；
 - 6) 在离体条件下，能以无生命的生物大分子状态存在；
 - 7) 对大多数抗生素不敏感，对干扰素敏感。

病毒是一类既具有化学大分子属性，又具有生物体基本特征；既具有细胞外的感染性颗粒形式，又具有细胞内的繁殖性基因形式的独特生物类群。——→ 超显微的、没有细胞结构的、专性活细胞内寄生的实体

单细胞微生物与病毒性质的比较

性质	细菌	立克次氏体	支原体	衣原体	病毒
直径大于 300nm	+	+			-
在无生命培养基生长	+	-		-	-
专性活细胞内寄生	-	+		+	+
双分裂	+	+	+	+	-
含有 DNA 和 RNA	+	+	+	+	-
核酸感染性	-	-	-	-	+a
核糖体	+	+	+	+	-
产能代谢	+	+	+	+	-
细胞膜	+	+	+	+	-
对抗生素的敏感	+	+	+	+	-b

对干扰素的敏感	-	-	-	-	+
---------	---	---	---	---	---

a DNA 病毒和 RNA 病毒中的一部分;b 利福平可抑制痘病毒复制

2、种类

非细胞生物 { (真) 病毒: 至少含核酸和蛋白质二种组分
亚病毒 { 类病毒: 只含具侵染性的 RNA 组分
拟病毒: 只含有不具有独立侵染性的 RNA 组分
朊病毒: 只含蛋白质

三、病毒的宿主范围

病毒几乎可以感染所有的细胞生物, 并具有宿主特异性

人们习惯根据其宿主种类将病毒分类

{ 噬菌体 (phage)、真菌病毒等
植物病毒 (plant viruses)
动物病毒 (animal viruses)

四、病毒的培养和纯化

同微生物学其他学科分支一样, 病毒学的进步完全得益于研究方法和技术手段的发展。

通过病毒的分离与纯化获得纯化的、有感染性的病毒制备物是病毒学研究和实践的基本技术。

1、病毒的培养: 二元培养物法

1) 噬菌体的培养

噬菌体 → 细菌培养物 { 培养液 → 细菌培养液变清亮
营养琼脂平板 → 细菌平板成为残迹平板

若是噬菌体标本经过适当稀释再接种细菌平板, 经过一定时间培养, 在细菌菌苔上可形成圆形局部透明区域, 即噬菌斑 (plaque) p71。

噬菌斑: 将少量噬菌体与大量宿主细胞混合后, 在合适条件下培养一定时间后, 在平板表面布满宿主细胞的菌苔上, 出现一个个肉眼可见的透明小圆斑。(“负菌落”)

如同对细菌计数一样, 形成的噬菌斑也可用于对噬菌体的数目进行估算。

2) 动物病毒的培养

动物病毒 → { 实验动物
鸡胚
多种细胞培养

大多数动物病毒感染敏感细胞后, 能引起其显微表现的改变, 即产生致细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE), 如细胞聚集成团、肿大、圆缩、脱落, 细胞融合形成多核细胞, 细胞内出现包涵体 (inclusion body), 乃至细胞裂解等。

若标本经过适当稀释进行接种并辅以染色处理, 病毒可在培养的细胞单层上形成肉眼可见的局部病损区域, 即蚀斑 (plaque) 或称空斑。

包涵体 (inclusion body) p71

在某些感染病毒的宿主细胞质或细胞核内, 出现光学显微镜下可见的大小、形状和数量不等的小体。不同病毒包含体的大小、形状、组分及在宿主细胞中的部位不同——病毒快速鉴别和某些病毒疾病诊断指标多数位于细胞质内, 如如痘病毒、狂犬病毒

少数位于细胞核内, 如: 疱疹病毒和腮腺炎病毒

有的既可在细胞质内, 又可在细胞核内, 如: 麻疹病毒

包含体可以是病毒粒子的聚集体, 如昆虫核型多角体病毒和质型多角体病毒的包含体; 也可以是病毒结构蛋白与感染有关蛋白质等病毒组分的聚集体;

多角体: p92

昆虫细胞内形成的多角形包涵体, 可作为病毒杀虫剂。

核型多角体病毒 (NPV): 棉铃虫、粘虫桑毛虫

完成中国棉铃虫单核衣壳核型多角体病毒基因组全序列的测定, 是我国自主研究并应用于农业实践的第一个

病毒杀虫剂。

质型多角体病毒 (CPV)：马尾松松毛虫等

3) 植物病毒的培养

植物病毒→敏感植物叶片→产生坏死斑，或称枯斑

2、病毒纯化

标准 { 病毒是有感染性的生物体→纯化的病毒制备物应保持其感染性
病毒具有化学大分子的属性→纯化的病毒制备物的理化性质应具有均一性

方法 { 主要化学组成为蛋白质→蛋白质提纯方法 (盐析、等电点沉淀、有机溶剂沉淀、凝胶层析、离子交换等)
具有一定的大小、形状和密度 { 差速离心
梯度离心 (超速离心)

第二节 病毒的形态结构与化学组成

病毒是一类既具有化学大分子属性，又具有生物体基本特征；既具有细胞外的感染性颗粒形式，又具有细胞内的繁殖性基因形式的独特生物类群。

毒粒 (virion)，病毒粒，病毒粒子 (virus particle)：P70

指结构完整的、有感染性的单个病毒。(病毒的细胞外颗粒形式，也是病毒的感染性形式)

一团能够自主复制的遗传物质+蛋白质外壳+包膜→保护遗传物质免遭环境破坏，并作为将遗传物质从一个宿主细胞传递给另一个宿主细胞的载体。

一、病毒的大小与形态

1、病毒的大小

个体小 (测量单位是 nm)，必需在电镜下观察；

不同病毒的毒粒大小差别很大 (10—300nm)；

2、病毒的形态

基本形态：球状 (花椰菜花叶病毒)；杆状 (烟草花叶病毒)；蝌蚪状 (T 偶数噬菌体)；

其他形态：弹状 (狂犬病毒)、丝状、砖状等；

流感病毒呈多形性，新分离的毒株呈丝状，在细胞内稳定传代后转变为拟球状。

三、病毒 (毒粒) 的结构

1. 病毒的基本结构

基本构造：核衣壳 (nucleocapsid) { 核心 (core)：DNA 或 RNA
衣壳 (capsid)：蛋白质
非基本构造 { 包膜：脂蛋白或类脂糖蛋白 (envelope)
刺突
裸病毒：只具有核衣壳这一基本结构的病毒。
有包膜病毒：在核衣壳外还有包膜，有的包膜上还有刺突 (流感病毒)。

核壳 (nucleocapsid)：病毒的蛋白质壳体和病毒核酸 (核心) 构成的复合物，又称核衣壳。

裸露毒粒 (naked virion)：仅由核衣壳构成的病毒颗粒

包膜 (envelope)：

如烟草花叶病毒、脊髓灰质炎病毒 (Poliovirus) 等一些简单的病毒的毒粒。

有些病毒核衣壳包裹着的一层脂蛋白膜，它是病毒以出芽 (budding) 方式成熟时，由细胞膜衍生而来的。有维系毒粒结构，保护病毒核壳的作用。特别是病毒的包膜糖蛋白，具有多种生物学活性，是启动病毒感染所必需的。

2、病毒壳体的对称性

壳体，或衣壳 (capsid)：包围着病毒核酸的蛋白质外壳。

由大量称为衣壳粒 (capsomer) 的蛋白质亚单位通过次级键、按对称的形式、有规律地排列而成。(自我装配)

壳体结构类型 { 螺旋对称壳体
二十面体对称壳体
复合对称壳体

螺旋对称壳体：代表：TMV

衣壳粒螺旋状排列，形成一个长 300nm，直径 15—18nm 的中空柱。RNA 盘绕在壳体内面由亚基形成的沟内，与蛋白质亚基通过弱键结合。

二十面体对称壳体：代表：腺病毒

衣壳粒（形态学亚基）围绕二十面体的角（五邻体）、棱和三角面（六邻体）排列，形成一个封闭的、具立方对称的蛋白质鞘，外观呈球形。

若以一定数目的亚基排列成具有一定表面积的立方对称实体，以二十面体容积为最大，能包装更多的病毒核酸，所以病毒壳体多取二十面体对称（icosahedral symmetry）结构。

具有复合对称结构的典型例子是有尾噬菌体（tailed phage），其壳体由头部和尾部组成。包装有病毒核酸的头部通常呈二十面体对称，尾部呈螺旋对称。

3、病毒的非基本结构

包膜：动物病毒的包膜来自宿主细胞的核膜或质膜（病毒包膜的基本结构与生物膜相似，是脂双层膜），其脂类或糖类为宿主细胞组分，包膜蛋白由病毒基因编码。在包膜形成时，细胞膜蛋白被病毒的包膜糖蛋白取代。

刺突（spike）：包膜或核衣壳上的突起（糖蛋白）

流感病毒有 2 种包膜刺突，参与对宿主细胞表面的吸附：

- 具有唾液酸苷酶；帮助病毒侵入呼吸道上皮细胞黏液层进而达到宿主细胞
- 具有血凝素；使毒粒黏附在红细胞膜上并引起凝血而得明

二、病毒（毒粒）的化学组成

毒粒（化学组成） $\left\{ \begin{array}{l} \text{核酸;} \\ \text{蛋白质;} \\ \text{脂类;} \\ \text{碳水化合物;} \end{array} \right\}$ 基本化学组成 $\longrightarrow$ 病毒颗粒在化学上表现为核蛋白

1、病毒的核酸（P75）

核酸是病毒的遗传物质；

一种病毒的毒粒只含有一种核酸：DNA 或是 RNA；

病毒核酸类型多样：

4 种类型 $\left\{ \begin{array}{l} \text{单链 DNA (ss DNA);} \\ \text{双链 DNA (ds DNA);} \\ \text{单链 RNA (ss RNA);} \\ \text{双链 RNA (ds RNA);} \end{array} \right.$

除 ds RNA 外，其它各类核酸均有线状和环状形式

单链病毒核酸有正链（+）和负链（-）之分

+RNA：病毒 RNA 碱基序列与病毒 mRNA 序列一致（可作为 mRNA 直接翻译）

-RNA：病毒 RNA 碱基序列与 mRNA 序列互补

+DNA：与 mRNA 序列相同

-DNA：mRNA 序列互补

某些病毒的 RNA 是双意（ambisense），即部分为正极性、部分为负极性。

病毒核酸的特征丰富

粘性末端；循环排列；末端重复序列；

5' 有帽子结构，3' 端有 poly(A) 尾巴（一些真核生物的 RNA 病毒核酸）含稀有碱基（T 偶数噬菌体：5-羟胞嘧啶）

动物病毒 4 种类型核酸都有；

植物病毒大多数为 ssRNA；

噬菌体大多为 ds DNA；

2、病毒的蛋白质

非结构蛋白 $\rightarrow$ 病毒基因组编码的，在病毒复制过程中产生并具有一定功能，但并不结合于毒粒中的蛋白质。

结构蛋白 $\rightarrow$ 构成一个形态成熟的有感染性的病毒颗粒所必需的蛋白质 $\left\{ \begin{array}{l} \text{壳体蛋白;} \\ \text{包膜蛋白;} \end{array} \right.$

存在于毒粒中的酶；

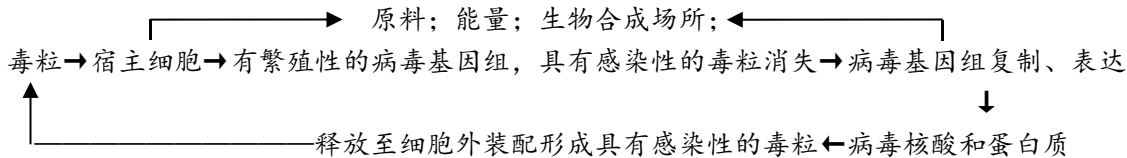
病毒结构蛋白的主要生理功能：

- 1) 构成蛋白质外壳，保护病毒核酸免受核酸酶及其它理化因子的破坏；
- 2) 决定病毒感染的特异性，与易感细胞表面存在的受体具特异性亲和力，促使病毒粒子的吸附和入侵；
- 3) 决定病毒的抗原性，能刺激机体产生相应的抗体；
- 4) 构成毒粒酶，或参与病毒对宿主细胞的入侵（如 T4 噬菌体的溶菌酶等），或参与病毒复制过程中所需要病毒大分子的合成（如逆转录酶等）；

一般来说，病毒是不具酶或酶系极不完全的，所以一旦离开宿主就不能独立进行代谢和繁殖。

第三节 病毒的增殖

病毒的特点：严格细胞内寄生物，只能在活细胞内繁殖。



病毒的增殖：是病毒基因组复制与表达的结果，它完全不同于其他生物的繁殖方式，又称为病毒的复制。

病毒感染敏感宿主细胞后，病毒核酸进入细胞，通过其复制与表达产生子代病毒基因组和新的蛋白质，然后由这些新合成的病毒组分装配（assembly）成子代毒粒，并以一定方式释放到细胞外。病毒的这种特殊繁殖方式称做**复制（replication）**。

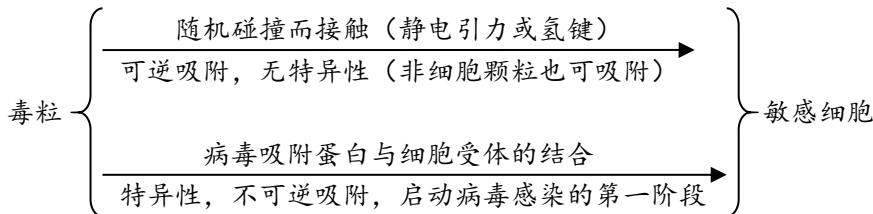
一、病毒的复制周期 P77

复制周期（replicative circle）或称复制循环：自病毒吸附于细胞开始，到子代病毒从感染细胞释放到细胞外的病毒复制过程。

一般分为 5 个阶段：

- ① 吸附；② 侵入与脱壳；③ 病毒大分子的合成，包括病毒基因组的表达与复制；④ 装配；⑤ 释放；

（一）吸附：



病毒吸附蛋白（viral attachment protein, VAP），亦称反受体能够特异性地识别细胞受体并与之结合的病毒表面的结构蛋白。

无包膜病毒的 VAP 往往是衣壳的组成部分，如：T-偶数噬菌体的尾丝蛋白；

有包膜病毒的 VAP 为包膜糖蛋白，如：流感病毒包膜表面的血凝素；

细胞受体：能被病毒吸附蛋白特异性地吸附并与之结合，介导病毒侵入的宿主细胞表面的成分。

狂犬病毒的受体：细胞表面的乙酰胆碱受体

单纯疱疹病毒的受体：硫酸乙酰肝素

T3, T4, T7 噬菌体的受体：脂多糖

T2 和 T5 噬菌体的受体：脂蛋白

沙门氏菌的 X 噬菌体吸附在细菌的鞭毛上

人免疫缺陷病毒（HIV）的感染需要辅助受体，这种稍后与病毒结合并引发病毒穿入或膜融合的细胞组分，又称为第二受体。

病毒吸附蛋白（viral attachment protein, VAP）与细胞受体间的结合力来源于空间结构的互补性，相互间的电荷、氢键、疏水性相互作用及范德华力。

不同种系的细胞具有不同病毒的细胞受体，病毒受体的细胞种系特异性决定了病毒的宿主范围。

动物宿主细胞及细菌表面病毒受体的存在可通过生化、遗传等实验证明，但至今未发现植物病毒的细胞受体存在。

（二）侵入

侵入又称病毒内化，它是一个病毒吸附后几乎立即发生，依赖于能量的感染步骤。

不同的病毒-宿主系统的病毒侵入机制不同

有尾噬菌体：注射方式将噬菌体核酸注入细胞

吸附→尾钉固着→尾鞘收缩→尾管穿入→DNA 注入

通过尾部刺突固着于细胞；

尾部的酶水解细胞壁的肽聚糖，使细胞壁产生小孔；

尾鞘收缩，核酸通过中空的尾管压入胞内，蛋白质外壳留在胞外；

如果大量噬菌体在短时间内吸附于同一细胞上，使细胞壁产生许多小孔，也可引起细胞立即裂解，但并未进行噬菌体的增殖，这种现象称为**自外裂解**（lysis from without）。

动物病毒：3 种侵入方式

①完整病毒穿过细胞膜的移位方式；

②细胞的吞噬功能；

③毒粒包膜与细胞质膜的融合；

植物病毒：

通过因人为地或自然的机械损伤所形成的微伤口进入细胞；或者靠携带有病毒的媒介，主要靠是有吮吸式口器的昆虫取食将病毒带入细胞。

植物病毒一旦进入细胞后，增殖产生的子代病毒或病毒核酸可通过病毒编码的运动蛋白（movement protein）与胞间连丝的相互作用从受染细胞进入邻近细胞。

脱壳：

脱壳是病毒侵入后，病毒的包膜和/或壳体除去而释放出病毒核酸的过程。

脱壳是病毒基因组进行功能表达所必需的感染事件。

T-偶数噬菌体脱壳与侵入是一起发生的。

动物病毒存在不同的结构类型和不同的侵入方式，其脱壳过程也较复杂。

病毒的毒粒消失，失去原有的感染性，进入潜隐期。

（三）病毒大分子的合成（参见 P79—80）

病毒基因组进入胞内→宿主细胞的代谢发生改变→病毒利用宿主的生物合成机构和场所，使病毒核酸表达和复制，产生大量的病毒蛋白质和核酸。

病毒大分子的合成包括：核酸的复制、转录与蛋白质的生物合成

病毒基因组的表达与复制存在着强烈的时序性

1. 核酸的复制、转录

根据病毒核酸的类型和复制、转录方式的不同，可分为 6 类：参考“微生物学”（第二版）黄秀梨

病毒生物合成的第一步是病毒 mRNA 的合成→病毒复制所需要的病毒特异性酶蛋白及蛋白质外壳的合成（5 种核酸，6 条途径）

2. 病毒蛋白质的生物合成

病毒合成出 mRNA，就可由 mRNA 翻译出病毒蛋白质。

以 T7 噬菌体为例，合成的蛋白质可分为 3 类：

早期蛋白：病毒侵染细胞后 4—8min 合成，主要为转录其自身 mRNA 所需的酶，如 mRNA 聚合酶

中期蛋白：病毒侵染细胞后 6—15min 合成，主要为 DNA 复制所需的酶，如 DNA 酶，DNA 聚合酶 DNA 连接酶等。

晚期蛋白：DNA 复制完成后到细胞裂解期间合成的蛋白质，如头部蛋白、尾部蛋白、装配蛋白等。

病毒基因组的表达与复制的高度时序性主要表现为基因组转录是分期进行的，分三个阶段：

1) 早期转录和转译：病毒早期蛋白的表达（次早期 mRNA 聚合酶，更改蛋白——改变转录酶的启动子特异性）T4 早期 mRNA 由大肠杆菌 RNA 多聚酶完成

2) 次早期转录和转译：降解宿主 DNA 的酶和病毒基因组复制所需酶（DNA 酶，DNA 聚合酶，晚期 mRNA 聚合酶等）

3) 晚期转录和转译：病毒晚期基因的表达（结构蛋白）

晚期转录也需要 DNA 的复制，只有正在复制、结构发生改变的病毒 DNA 才能作为晚期转录的模板。早期基因与晚期基因定位于不同的 DNA 链上，它们的转录分别以不同方向进行。

（T4 噬菌体研究最为充分，参见 p79）

吸附→侵入→病毒大分子合成（早期：病毒特异性酶的合成→病毒核酸复制→病毒结构蛋白质合成）→装配→释放

(四) 病毒的装配与释放

新合成的毒粒结构组分组装成完整的病毒颗粒，称做病毒的装配，亦称成熟 (maturation) 或形态发生 (morphogenesis)。成熟的子代病毒颗粒然后依一定途径释放到细胞外

病毒的释放标志病毒复制周期结束

T4 噬菌体的装配是一个极为复杂的自我装配的过程。大致分为 4 个独立的亚装配途径：(参见 P79)

- 1) 头部壳体装入 DNA 形成成熟的头部
- 2) 由基板、尾管、尾鞘组装成无尾丝的尾部；
- 3) 头部与尾部自发结合；
- 4) 装上尾丝

大多数噬菌体都是以裂解细胞方式释放

丝杆噬菌体 (如 M13 或 fd) 不杀死细胞，子代毒粒以分泌方式不断从受染细胞中释放，并同时完成毒粒的组装。有包膜病毒的装配与释放有时也是同时完成的。

有包膜的动物病毒是在从宿主细胞核芽出或细胞质膜芽出的过程中裹上包膜而形成包膜病毒。

烟草花叶病毒的装配：RNA 穿过螺旋的中心孔并在生长端形成一个可移动环。

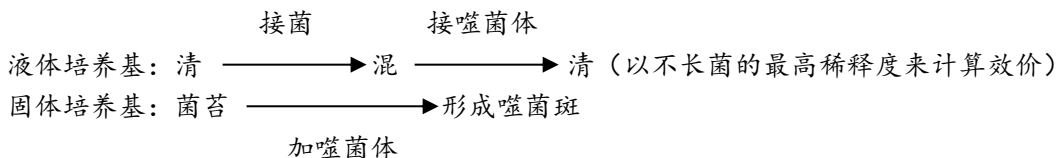
区别：

内裂解：宿主细胞内大量噬菌体分泌酶引起的细胞裂解，释放大量噬菌体。

自外裂解：胞外噬菌体分泌酶引起的细胞裂解，没有子代噬菌体的释放。

效价 (titre) 或噬菌斑形成单位 (plaque-forming unit, pfu) 每毫升试样中所含有的噬菌体粒子数。p78

测定方法 (p78)：液体稀释管法；噬菌斑法：双层平板法



二、一步生长曲线 (one step growth curve) (参见 P77)

研究病毒复制的一个实验，定量描述烈性噬菌体生长规律的曲线。

反映 3 个参数：1) 潜伏期；2) 裂解期；3) 裂解量

该实验标志着分子病毒学、分子生物学和分子遗传学的建立

- 1、用噬菌体的稀释液感染高浓度的宿主细胞；
- 2、数分钟后，加入抗噬菌体的抗血清 (中和未吸附的噬菌体)；
- 3、将上述混合物大量稀释，终止抗血清的作用和防止新释放的噬菌体感染其它细胞；
- 4、保温培养并定期检测培养物中的噬菌体效价 (对噬菌体含量进行计数)；
- 5、以感染时间为横坐标，病毒的感染效价为纵坐标，绘制出病毒特征性的繁殖曲线；

一步生长曲线 (one step growth curve)

噬菌体复制 (裂解周期) 分为三个阶段：

- 1、潜伏期：从噬菌体吸附到细胞到释放出新噬菌体的最短时期。
 - 1) 隐晦期：无成熟的噬菌体粒子。2) 胞内积累期。
- 2、裂解期：随着宿主细胞迅速裂解，溶液中噬菌体粒子数目急剧增加，直到最高值的一段时间。
- 3、平稳期：指感染后的宿主已全部裂解，溶液中噬菌体效价达到最高点后的时期。

裂解量：每个受染细胞所产生的子代病毒颗粒的平均数目。其值等于平稳期受染细胞所释放的全部子代病毒数除以潜伏期受染细胞的数目，即等于稳定期病毒效价与潜伏期病毒效价之比。

以适量的病毒接种于标准培养的高浓度的敏感细胞，待病毒吸附后，离心除去未吸附的病毒，或以抗病毒抗血清处理病毒—细胞培养物以建立同步感染，然后继续培养并定时取样测定培养物中的病毒效价，并以感染时间为横坐标，病毒的感染效价为纵坐标，绘制出病毒特征性的繁殖曲线，即一步生长曲线。

潜伏期：不同病毒的潜伏期长短不同，噬菌体以分钟计；动物病毒和植物病毒以小时或天计。

裂解量：噬菌体的裂解量一般为几十到上百个；植物病毒和动物病毒可达数百乃至上万个。

第四节 噬菌体与宿主的关系

1. 烈性噬菌体 (virulent phage): 感染宿主细胞后能在细胞内正常复制并引起宿主细胞迅速裂解的噬菌体。
2. 温和噬菌体 (temperate phage): 感染宿主细胞后，噬菌体基因组长期存在于宿主细胞内（整合于宿主的基因组上或以质粒形成独立存在），并随宿主基因组的复制而同步复制，没有成熟噬菌体产生，不引起宿主细胞裂解的噬菌体。

这种噬菌体与宿主之间的关系称为**溶源性 (lysogeny)**。凡能引起溶源性的噬菌体称为温和噬菌体，其宿主称为**溶源菌**。

3 种存在形式:

游离态: 指成熟后被释放并有侵染性的游离噬菌体粒子

整合态: 指已整合到宿主基因组上的前噬菌体 (处于整合态的噬菌体核酸，称为前噬菌体 prophage)

前噬菌体所携带的遗传信息由于受噬菌体本身编码的一种特异阻遏物的阻遏作用而得不到表达，因此不进行 DNA 复制和蛋白质合成。但随宿主基因组的复制而同步复制。

营养态: 指前噬菌体经外界理化因子诱导后，脱离宿主核基因组而处于积极复制、合成和装配的状态

温和噬菌体的溶源性反应: (参见 P82)

整合于细菌染色体或以质粒形式存在的温和噬菌体基因组称做原噬菌体 (prophage)

在原噬菌体阶段，噬菌体的复制被抑制，宿主细胞正常地生长繁殖，而噬菌体基因组与宿主细菌染色体同步复制，并随细胞分裂而传递给子代细胞。

细胞中含有以原噬菌体状态存在的温和噬菌体基因组的细菌称做溶源性细菌 (lysogenic bacteria)

溶源性细菌经自发裂解或诱发裂解，进入裂解循环

λ 噬菌体的溶源性反应:

进入宿主后线状基因组依靠粘性末端环化

基因组的表达与复制存在着强烈的时序性

早期基因表达，产生 $gpcII$ ， $gpcro$ 及 $gpcIII$ ，后者可防止宿主的裂解酶对 $gpcII$ 的降解。

$gpcII$ 的积累促使阻遏蛋白 cI 的表达

阻遏蛋白 cI 的积累导致噬菌体基因转录的终止，形成原噬菌体。

早期表达的 $gpcro$ 与 cI 的竞争最终确定 λ 噬菌体是进入溶源状态，还是进入裂解循环。($gpcro$ 表达得早，但与基因组的结合能力较 cI 弱)

阻遏蛋白 cI 的同样可以抑制其它新侵入的 λ 噬菌体的表达，从而使溶源性细菌具有“免疫性”

阻遏蛋白 cI 在一般情况下通过自身的转录激活保持低水平的表达，但有时种种原因转录水平下降，会偶尔导致溶源性噬菌体进入裂解循环 (10^{-5} — 10^{-2})。

通过特定位点整合 (切离) 细菌染色体

外界因素如紫外线可引起宿主染色体的破坏，宿主产生应急反应合成具有 DNA 重组活性的 RecA 蛋白，导致 cI 的被降解，噬菌体进入裂解循环。

诱发裂解是检查是否存在溶源性细菌的有效方法

3. 溶源菌 (lysogen 或 lysogenic bacteria)

含有温和噬菌体的宿主细胞，称为溶源菌 (或: 在核基因组上整合有前噬菌体并能正常生长繁殖而不被裂解的宿主细胞)

表示: *E. coli* K12(λ)

溶源菌的特性 (周德庆“微生物学教程”第一版 p81)

1) 遗传特性 (溶源菌产生的子细胞一般也是溶源菌);

2) 可自发裂解 (10^{-2} ~ 10^{-5});

溶源菌的检测方法 (周德庆 p74):

法 1: 少量溶源菌+大量敏感指示菌+肉汤琼脂培养基

特殊噬菌斑 (中央菌落，周围透明)

法 2: 溶源菌经 uv 照射，进一步培养，滤去培养物中活细菌，将滤液与敏感菌混合培养，形成透明噬菌斑。

3) 可诱导裂解 (uv, x-射线, 丝裂霉素 C, 氮芥);

4) 免疫性 (被温和噬菌体感染后形成的溶源性细菌具有“免疫性”，即其它同类噬菌体虽然可以再次感染该细胞，

但不能增殖，也不能导致溶源性细菌裂解。而非同源噬菌体可以同时被感染，表现出双重溶源性。免疫性是由原噬菌体产生阻遏蛋白的可扩散性质决定的。)

5) 复愈性 (10^{-5} ，丧失其前噬菌体，变为非溶源菌)

6) 溶源转变 (lysogenic conversion)，溶源性细菌有时还能获得一些新的生理特性，例如白喉杆菌只有在含有特定类型的原噬菌体时才能产生白喉毒素，引起被感染机体发病。原噬菌体引起的溶源性细菌除免疫性外的其他的表形改变，包括溶源菌细胞表面性质的改变和致病性转变被称为溶源转变。

白喉棒杆菌 (不产毒素): β 噬菌体感染而发生溶源化 (产白喉毒素)

鸭沙门氏菌: $\epsilon 15$ 噬菌体感染而发生溶源化 (细胞表面多糖结构改变)

溶源性感染对细胞的影响:

溶源菌中的温和噬菌体基因组通常不影响细胞的繁殖功能，但它们可能引起其他的细胞变化。

(1) 免疫性

被温和噬菌体感染后形成的溶源性细菌具有“免疫性”，即其它同类噬菌体虽然可以再次感染该细胞，但不能增殖，也不能导致溶源性细菌裂解。

免疫性是由原噬菌体产生的阻遏蛋白的可扩散性质所决定的。

(2) 溶源转变

溶源性细菌有时还能获得一些新的生理特性，例如白喉杆菌只有在含有特定类型的原噬菌体时才能产生白喉毒素，引起被感染机体发病。

原噬菌体引起的溶源性细菌除免疫性外的其他的表形改变，包括溶源菌细胞表面性质的改变和致病性转变被称为溶源转变 (lysogenic conversion)。

第五节 病毒与实践

一、病毒与人类健康

1、人类 80% 的传染病由病毒引起：艾滋病的病原体是人类免疫缺陷病毒 (human immuno-deficiency virus, HIV)；流行性感病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、脊髓灰质炎病毒分别引起流行性感、甲型肝炎及乙型肝炎，小儿麻痹症。

2、人类恶性肿瘤中，约 15% 由病毒感染引发：

EB 病毒与鼻咽癌，人乳头病毒与皮肤癌、宫颈癌的发生有关；

猿猴空泡病毒 (SV40) 基因组编码的抗原能诱导正常细胞向癌细胞转化；

Rous 肉瘤病毒的 src 基因表达的 PP60src 蛋白，能促进蛋白质中酪氨酸残基磷酸化，诱导细胞转化。

病毒基因组中编码能使细胞发生癌细胞转化的基因，称病毒癌基因

3、乙型肝炎病毒疫苗、脊髓灰质炎病毒疫苗、狂犬病病毒疫苗等已广泛应用

二、噬菌体与发酵工业

1. 噬菌体的侵染与异常发酵

发酵周期延长；碳源消耗缓慢；OD 值不升或下降；pH 值变化大，明显上升；发酵液产气泡，粘稠，拉丝；革氏染色不均匀，菌体少，有碎片；发酵产物形成缓慢或根本不形成；用敏感菌作平板检查时，出现大量噬菌斑；电镜观察，可见大量噬菌体粒子。

2. 噬菌体的分离与检查

直接观察法 (电镜)；双层平板法或液体法

3. 噬菌体的防治
净化环境，消灭噬菌体的各种来源；控制活菌排放；使用抗噬菌体菌株和定期轮换生产用菌

三、病毒与农业

应用昆虫病毒防治农业害虫

第六节 亚病毒

类病毒、卫星病毒、卫星 RNA、朊病毒

类病毒和朊病毒能独立复制；

卫星病毒和卫星 RNA 必须依赖辅助病毒进行复制。

一、类病毒 (viroids)

1. 定义：只含 RNA 组分、专性活细胞内寄生的分子病原体。
2. 与其它病毒不同点：
 - 没有衣壳；
 - 单股共价闭合环状小分子 RNA (250-370bp)。环状 ssRNA 呈双链区与未配对的环状区相间排列；
 - 无 mRNA 活性，不能编码蛋白质；能在宿主细胞内自我复制。
3. 致病性：马铃薯纺锤形块茎病

二、卫星病毒 (satellite virus)

一类基因组缺陷、需要辅助病毒，基因组才能复制和表达，才能完成增殖的亚病毒因子。
大肠杆菌噬菌体 P4，缺乏编码衣壳蛋白的基因，需辅助病毒大肠杆菌噬菌体 P2 同时感染，且依赖 P2 合成的壳体蛋白装配成 P4 壳体 (含 P2 壳体 1/3 左右)，较小的 P4 DNA 组装成完整的 P4 颗粒，完成增殖过程。
丁型肝炎病毒必须利用乙型肝炎病毒的包膜蛋白才能完成复制周期

三、卫星 RNA (sat-RNA)，又称拟病毒 (virusoids)

寄生在辅助病毒壳体内，虽然与辅助病毒基因组无同源性，但必须依赖辅助病毒才能复制的小分子 ssRNA 片段。
绒毛烟斑驳病毒 (VTMoV) 的卫星 RNA (环状卫星 RNA -2 或其线状形式卫星 RNA -3) 单独不能复制，但与 VTMoV 基因组 RNA -1 共存时可感染和复制。

许多卫星 RNA 可干扰其辅助病毒的复制和减轻其对宿主的病害 (生物防治)

四、朊病毒 (prion)，又称“普利昂”或“蛋白侵染子”

1. 定义：一类不含核酸的侵染性蛋白质分子。
2. 致病性：哺乳动物中枢神经系统 退化性紊乱
羊瘙痒病；牛海绵状脑病 (疯牛病)；库鲁氏病；格-史氏综合症
3. 朊病毒感染会导致多拷贝的朊病毒蛋白质的产生，是否违背“中心法则”？
在宿主细胞中发现了朊病毒的编码基因，朊病毒以某种方式对这种正常蛋白质进行修饰成为病原蛋白质。

本章重点

1. 名词概念

病毒粒子，噬菌体，噬菌斑，噬菌体效价，裂解量，自外裂解，感染复数，包涵体，多角体，烈性噬菌体，温和噬菌体，溶源菌，溶源转变，一步生长曲线

2. 病毒 (噬菌体) 的特性。
3. 病毒的形态、结构、对称机制和化学组成，尤其是 E. coli T 偶数噬菌体的形态构造。
4. 病毒的增殖过程 (烈性噬菌体的裂解性生活史)。
5. 一步生长曲线中的几个参数和时期。
6. 温和噬菌体的三种存在形式。
7. 溶源性细菌的几个特性及检出。
8. 噬菌体效价的测定方法和噬菌体的分离检测方法 (双层平板法)
9. 几种亚病毒的特点。

第五章 微生物的营养

第一节 微生物的化学组成和营养要素

一、微生物细胞的化学组成

微生物细胞 { 水：70%-90%
干物质 { 无机物（盐）
有机物：蛋白质、多糖、脂、核酸（占干重 96%）维生素、有机酸等及其降解产物

细胞化学元素组成：

主要元素：碳、氢、氧、氮、磷、硫（90~97%）、钾、镁、钙、铁；

微量元素：锌、锰、钠、氯、钼、硒、钴、铜、钨、镍、硼等。

微生物、动物、植物之间存在“营养上的统一性”

这些化学元素都来自胞外环境。微生物细胞利用这些化学元素物质制造其细胞物质和组分，并进一步将它们组织成为细胞结构。

营养：微生物在其生长过程中获取生命活动所需的能量和结构物质的生理过程。

营养物质：外界环境可为细胞提供结构组分、能量、代谢调节物质和良好生长环境的化学物质。

营养物质是微生物生存的物质基础，而营养是生物维持和延续其生命形式的一种生理过程。

二、微生物营养要素及其生理功能

微生物的 6 大营养要素：碳源，氮源，能源，生长因子，无机盐和水

功能：1) 构成细胞结构组分和代谢产物的原料 2) 提供能量 3) 调节新陈代谢

微生物与动植物营养要素的比较：

	动物（异氧）	微 生 物		绿色植物（自养）
		异 氧	自 养	
碳 源	糖类、脂肪	糖、醇、有机酸等	二氧化碳、碳酸盐等	二氧化碳
氮 源	蛋白质及其降解物	蛋白质及其降解物、 有机氮化物	无机氮化物、氮	无机氮化物
能 源	与碳源同	与碳源同	氧化无机物或利用日光能	利用日光能
生长因子	维生素	有些需要维生素等	不需要	不需要
无机元素	无机盐	无机盐	无机盐	无机盐
水 分	水	水	水	水

（一）碳源（carbon source）：在微生物生长过程中提供碳素来源的物质

1. 功能

构成细胞成分的重要元素（需要量最大的元素，~50%）；

形成代谢产物和储藏物；

为异养型微生物提供能源。2. 碳源谱（周德庆 p83 表 4-1）

无机碳： CO_2 、碳酸盐等

有机碳： { C.H 型 烃类
C.H.O 型 糖、有机酸、醇、脂肪酸等（葡萄糖、淀粉等）

C. H. O. N 型 氨基酸、简单蛋白质

C. H. O. N. X 型 复杂蛋白质、核酸等（牛肉膏、蛋白胨、花生饼粉等）

3. 特点

1) 根据微生物利用有机碳或无机碳，可将微生物分为：

有机碳：异养微生物；

无机碳：自养微生物

2) 碳源谱广（微生物>>植物>动物）；

3) 最适碳源：C. H. O 型，糖类（异养微生物）

糖 > 有机酸，醇 > 脂；单糖 > 双糖 > 多糖（淀粉 > 纤维素，木质素，几丁质）；

己糖 > 戊糖；葡萄糖，果糖 > 甘露糖，半乳糖

4) 微生物对碳源利用具有选择性

混合存在 { 葡萄糖——首先利用（速效碳源）
乳糖——后利用（迟效碳源）

5) 不同微生物，其碳源谱不同（利用碳源物质的能力有差别）

洋葱假单胞菌：90 种以上；甲烷菌：甲醇和甲烷

6) 异养微生物：碳源=能源（双功能营养物）

4. 如何选择碳源？

原则：1) 根据微生物的生理机能选择；

2) 考虑经济效益，防止降格使用

（二）氮源（nitrogen source）：提供微生物生长繁殖所需氮元素来源的营养物质。

1. 功能

构成细胞组分（需要量仅次于碳，~12%）；

构成代谢产物；

某些自养菌的能源（硝化细菌，氨和亚硝酸盐兼氮源和能源）；

2. 氮源谱（周德庆 p101，表 5-4）

无机氮：N. H, N. O, N 硫酸胺、硝酸钾、氨、铵盐、氮气

有机氮：N. C. H. O 尿素、氨基酸、简单蛋白质

N. C. H. O. X 复杂蛋白质、核酸（牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、鱼粉、饼粉、蚕蛹粉、玉米浆等）

意义：

无机氮（胺盐，硝酸盐，N₂）
有机氮（尿素）

转化
氨基酸自养型 M

菌体蛋白（SCP）
含氮代谢产物

充足人、动物的氨基酸营养，丰富食物资源

3. 微生物对氮源利用具有选择性

抗生素发酵：

混合氮源 { 玉米浆——速效氮源（菌体生长）
黄豆饼粉，花生饼粉——迟效氮源（代谢产物）

有机氮源中的氮往往是蛋白质或其降解产物，其中氨基酸可以直接吸收而参与细胞代谢。蛋白质需经菌体分泌的胞外酶水解后才能利用，一般被称为**迟效性氮源**

氨基酸自养型微生物：不需要氨基酸为氮源，他们能将非氨基酸类的简单氮源自行合成所需要的一切氨基酸

氨基酸异养型微生物：必须从外界吸收现成氨基酸作为氮源的微生物

（三）能源（energy source）：为微生物生命活动提供最初能量来源的物质或辐射能

能源谱：

化学物质：化能营养型 { 有机物：化能异养微生物（能源=碳源）
无机物：化能自养微生物（还原态无机物：NH₄⁺、NO₂⁻、H₂S、H₂、Fe²⁺）
辐射能：光能营养型 { 光能自养微生物
光能异养微生物

（四）生长因子（growth factor）

1. 定义：指那些微生物生长所必需而且需要量小，但微生物自身不能合成或合成量不足以满足微生物生长需要的有机化合物。
2. 谱：维生素（狭义的生长因子）；氨基酸；嘌呤和嘧啶；卟啉及其衍生物，甾醇，胺类，C4—C6 脂肪酸
3. 功能：作为辅酶或辅基参与新陈代谢；核酸的成分；维持代谢；
4. 如何提供？

天然培养基 { 酵母膏（19 种氨基酸，维生素）
玉米浆（20 种氨基酸，6 种维生素）
半合成培养基 { 肝浸汁
麦芽汁

合成培养基：维生素复合液

5. 生长因子的微生物学分析法或微生物分析法

定义：当微生物丧失合成某种生长因子的能力时，必须从培养基中获取该生长因子才能生长。利用微生物的这种特性可以分析食物、药品等物质中的维生素、氨基酸及其他生长因子的含量，这种方法称为生长因子的微生物学分析法或微生物分析法。

方法：在培养基中须提供除了待测物质以外的全部营养物质，然后把生长因子以较低的浓度加到培养基中，培养后获得的微生物生长量与生长因子的浓度成正比（图 5-1）。测定时以标准样品作为对照。

优点：灵敏度高和简便易行等

（五）无机盐（inorganic salt）

1. 谱

常量元素：P、S、K、Mg、Na、Ca 等（ 10^{-3} — 10^{-4} mol/L）；

微量元素：Fe、Zn、Mn、Mo、Ce、Co、Cu 等（ 10^{-6} — 10^{-8} mol/L）

2. 功能（p97）：

常量元素：构成细胞组分；酶的活性中心成分或酶的激活剂；调节并维持细胞渗透压、pH 值和氧化还原电位；
自养微生物的能源物质。

微量元素：酶的激活剂；特殊分子结构成分

3. 提供方式

常量元素：化学试剂， K_2HPO_4 ， $MgSO_4$

微量元素：试剂、水或培养基的杂质，自来水，玻璃器皿

（六）水

功能：

- 细胞的重要组成成分；
- 良好溶剂与运输介质（营养物及代谢产物都是溶解和分散在水而进出细胞的）；
- 细胞内各种生化反应进行的介质，并参与许多生化反应；
- 维持生物大分子稳定的天然构象；
- 高比热，是热的良好导体，有利于散热，保证了细胞内的温度不会因代谢过程中释放的热量骤然上升。

• 单功能营养物：光（能源）

• 双功能营养物：Glu（C 源，能源）

• 多功能营养物：酵母膏（C 源，N 源，生长因子等）

第二节、微生物的营养类型

生长所需要的营养物质 { 自养型生物
异养型生物

生物生长过程中能量的来源 { 光能营养型
化能营养型

根据 C 源和能源分为：

光能自养型：以光为能源，不依赖任何有机物即可正常生长

光能异养型：以光为能源，但生长需要一定的有机营养

化能自养型：以无机物的氧化获得能量，生长不依赖有机营养物

化能异养型：以有机物的氧化获得能量，生长依赖于有机营养物质

微生物营养类型(I) (P99)

划分依据	营养类型	特 点
碳 源	自养型	以二氧化碳为唯一或主要碳源
	异养型	以有机物为碳源
能 源	光能营养型	以光为能源
	化能营养型	以有机物氧化释放的化学能为能源
电子供体	无机营养型	以还原性无机物为电子供体
	有机营养型	以有机物为电子供体

微生物营养类型(II) (P99)

代谢特点	营养类型			
	光能自养型 (光能无机自养型)	化能自养型 (化能无机自养型)	光能异养型 (光能有机异养型)	化能异养型 (化能有机异养型)
碳源	CO ₂ 或可溶性碳酸盐	CO ₂ 或可溶性碳酸盐	小分子有机物	有机物
能源	光能	无机物的氧化	光能	有机物的氧化降解
供氢体	无机物 (H ₂ O、H ₂ S 等)	无机物 (H ₂ S、H ₂ 、Fe ²⁺ 、 NH ₃ 、NO ₂ ⁻ 等)	小分子有机物	有机物
代表种	蓝细菌、绿硫细菌	硝化细菌、硫化菌、 氢细菌、铁细菌	红螺菌	大多数细菌，全部真 菌、放线菌

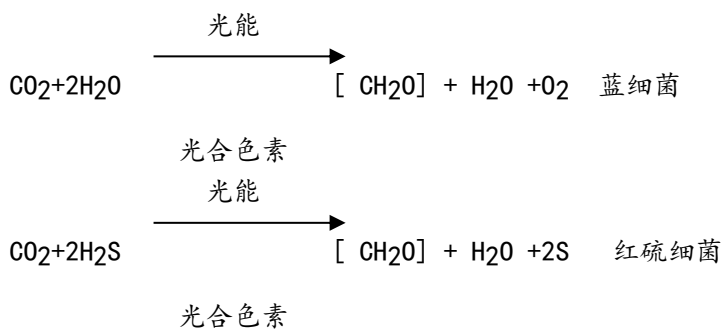
1. 光能自养型 (光能无机营养型)

能以 CO₂ 为主要唯一或主要碳源；

进行光合作用获取生长所需要的能量；

以无机物如 H₂、HS⁻、S 等作为供氢体或电子供体，使 CO₂ 还原为细胞物质；

例如，藻类及蓝细菌等和植物一样，以水为电子供体 (供氢体)，进行产氧型的光合作用，合成细胞物质。而红硫细菌，以 H₂S 为电子供体，产生细胞物质，并伴随硫元素的产生。



2. 光能异养型 (光能有机营养型)

不能以 CO₂ 为主要或唯一的碳源；

光能作为生长所需要的能量；

以有机物作为供氢体，利用光能将 CO₂ 还原为细胞物质；

在生长时大多数需要外源的生长因子；

例如，红螺菌属中的一些细菌能利用异丙醇作为供氢体，将 CO₂ 还原成细胞物质，同时积累丙酮。





H₃C

光合色素

光能自养型和光能异养型微生物可利用光能生长，在地球早期生态环境的演化过程中起重要作用。

3. 化能自养型（化能无机营养型）

生长所需要的能量来自无机物氧化过程中放出的化学能；

以 CO₂ 或碳酸盐作为唯一或主要碳源进行生长时，利用 H₂、HS⁻、Fe²⁺、NH₃ 或 NO²⁻ 等作为电子供体使 CO₂ 还原成细胞物质。

化能自养型只存在于微生物中，可在完全无机及无光的环境中生长。

它们广泛分布于土壤及水环境中，参与地球物质循环；

4. 化能异养型（化能有机营养型）

生长所需要的能量均来自有机物氧化过程中放出的化学能；

生长所需要的碳源主要是一些有机化合物，如淀粉、糖类、纤维素、有机酸等。

有机物通常既是碳源也是能源；

大多数细菌、真菌、原生动物都是化能异养型微生物；

所有致病微生物均为化能异养型微生物；

化能异养型：根据生态习性分：

腐生型 (metatroph)：可利用无生命的有机物 (如动植物尸体和残体) 作为碳源；

寄生型 (paratroph)：寄生在活的寄主体内吸取营养物质，离开寄主就不能生存。

在腐生型和寄生型之间还存在中间类型：

兼性腐生型 (facultive metatroph)：动植物尸体和残体和人工培养基

兼性寄生型 (facultive paratroph)：活的生物体内和动植物尸体和残体 (大肠杆菌)

不同营养类型之间的界限并非绝对：

异养型微生物并非绝对不能利用 CO₂；

自养型微生物也并非不能利用有机物进行生长；

有些微生物在不同生长条件下生长时，其营养类型也会发生改变；

紫色非硫细菌 (purple nonsulphur bacteria)：

没有有机物时，同化 CO₂，为自养型微生物；

有机物存在时，利用有机物进行生长，为异养型微生物；

光照和厌氧条件下，利用光能生长，为光能营养型微生物；

黑暗与好氧条件下，依靠有机物氧化产生的化学能生长，为化能营养型微生物；

微生物营养类型的可变性无疑有利于提高其对环境条件变化的适应能力

第三节 营养物质进入细胞的方式

一、概述

1. 细胞膜是控制营养物质进出细胞的主要屏障，具选择通透性。

2. 影响营养物质进入细胞的主要因素：

(1) 营养物质的性质 (分子质量，电负性，结构等)

(2) 细胞所处的环境 (温度，pH 值，渗透压，表面活性剂等)

(3) 细胞的结构和功能 (种类，菌龄，生理状态，代谢活性)

3. 能透过细胞膜的物质

(1) 脂溶性物质

(2) 水、气体 (O₂, CO₂)、乙醇

胞外酶

(3) 大分子物质 $\xrightarrow{\text{胞外酶}}$ 小分子物质 $\longrightarrow$ 进入细胞

(4) 极性物质 } 不易直接通过，需经特殊运输系统
带电荷分子 }
(糖类、氨基酸、核苷酸、离子)

二、营养物质进入细胞的方式

1、单纯扩散(simple diffusion)

2、促进扩散(facilitated diffusion)

3、主动运输(active transport)

4、基团移位(group translocation)

1. 单纯扩散 (simple diffusion) 又称被动扩散 (passive transport) 或扩散

物理扩散，不耗能，无载体参与，利用浓差 (高浓 $\rightarrow$ 低浓)

特点：

- 非特异性，高浓 $\rightarrow$ 低浓扩散；- 有一定选择性 (原生质膜上含水小孔的大小和形状)；
- 不发生反应，性质 (结构) 不变；- 不需能，依靠浓差；- 运送速度随浓差降低而减小。

运送物质：水， CO_2 ， O_2 ，乙醇，甘油

物质跨膜扩散的能力和速率与该物质的性质有关，分子量小、脂溶性、极性小的物质易通过扩散进出细胞。

扩散并不是微生物细胞吸收营养物质的主要方式，水是唯一可以通过扩散

自由通过原生质膜的分子，脂肪酸、乙醇、甘油、苯、一些气体分子 (O_2 、 CO_2) 及某些氨基酸在一定程度上也可通过扩散进出细胞。

2. 促进扩散 (facilitated diffusion)

载体蛋白参与，不耗能，借助浓差扩散 (高浓 $\longrightarrow$ 低浓)

特点：

- 借助膜上特异性的载体蛋白 (carrier) 参与；
- 载体蛋白具有较高的专一性 (每种载体只运输相应的物质，但某些载体蛋白可运输几种物质。);
- 不消耗能量，借助浓差，高浓 $\longrightarrow$ 低浓 (载体蛋白与运输物质间的亲和力在原生质膜内外的大小不同，被运输物质与载体蛋白亲和力大小的变化是通过载体分子构象变化而实现的);
- 运输物质的分子结构不发生变化。- 运输速率与膜内外物质的浓度差成正比。

运送物质：

- 糖，氨基酸 (真核生物)；- 甘油 (沙门氏菌等，原核生物少见)；

载体只影响物质的运输速率，并不改变该物质在膜内外形成的动态平衡状态；

这种性质类似于酶的作用特征，因此载体蛋白也称为透过酶；

透过酶大都是诱导酶，只有在环境中存在机体生长所需的营养物质时，相应的透过酶才合成。

3. 主动运输 (active transport)

载体蛋白，消耗能量，逆浓差

特点：

- 耗能；- 需载体蛋白参与；- 载体蛋白具有高度选择性；- 载体蛋白在运送物质时，发生构象变化，需要能量；
- 主动运输是广泛存在于微生物中的一种主要的物质运输方式运输物质所需能量来源：

好氧型微生物与兼性厌氧微生物直接利用呼吸能；

厌氧型微生物利用化学能 (ATP)；

光合微生物利用光能；

嗜盐细菌通过紫膜 (purple membrane) 利用光能；

运送物质：

- 无机离子 (Na^+ ， Ca^{2+} 等)；- 糖 (乳糖，麦芽糖，葡萄糖等)；- 大部分氨基酸和有机酸。

4. 基团转位 (group translocation)

需载体蛋白，耗能，被运送物质分子结构发生变化

特点：

- 需能；- 需载体蛋白；- 逆浓差；- 运输系统具有专一性；- 物质在运送过程中发生化学变化（磷酸化）。

磷酸基团来源：PEP

运送机制：磷酸转移酶系统（PTS）

包括

- 酶 I（非特异性，胞内）
- 酶 II c（特异性，疏水性，膜上）
- 酶 II b（特异性，亲水性，接近膜）
- 酶 II a（非特异性，胞内）
- HPr（热稳载体蛋白）（非特异性，胞上）

基团转位主要存在于厌氧型和兼性厌氧型细菌中，主要用于糖的运输。脂肪酸、核苷、碱基等也可通过这种方式运输。

目前尚未在好氧型细菌及真核生物中发现这种运输方式；尚未发现氨基酸通过这种方式运输。

第四节 培养基（medium, media）

培养基是人工配制的，适合微生物生长繁殖或产生代谢产物的

任何培养基都应该具备微生物生长所需要六大营养要素：碳源、氮源、无机盐、能源、生长因子、水
任何培养基一旦配成，必须立即进行灭菌处理；

常规高压蒸汽灭菌： $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$, 121°C , 15-30 分钟； $0.56\text{kg}/\text{cm}^2$, 112.6°C , 15-30 分钟

某些成分进行分别灭菌；过滤除菌；

一、选用和设计培养基的原则和方法

1、目的明确 2、营养协调 3、物理、化学条件适宜 4、经济节约

培养不同的微生物必须采用不同的培养条件；培养目的不同，原料的选择和配比不同；

实验室一般培养：普通常用培养基；

遗传研究：成分清楚的合成培养基；

生理、代谢研究：选用相应的培养基配方；

例如枯草芽孢杆菌：

一般培养：肉汤培养基或 LB 培养基；

自然转化：基础培养基；

观察芽孢：生孢子培养基；

产蛋白酶：以玉米粉、黄豆饼粉为主的产酶培养基；

实验室的常用培养基：

细菌：牛肉膏蛋白胨培养基（或简称普通肉汤培养基）；

放线菌：高氏 1 号合成培养基；

酵母菌：麦芽汁培养基；

霉菌：查氏合成培养基；

2、营养协调

营养物质的浓度适宜；营养物质之间的配比适宜；

高浓度糖类物质、无机盐、重金属离子等不仅不能维持和促进微生物的生长，反而起到抑制或杀菌作用。

培养基中各营养物质之间的浓度配比也直接影响微生物的生长繁殖和（或）代谢产物的形成和积累，其中碳氮比（C/N）的影响较大。

C/N 比：培养基所含碳源中碳原子的摩尔数与氮源中氮原子的摩尔数之比。

但通常由于培养基中元素 C 和 N 的摩尔数难以计算，在实际应用中多以培养基中的总碳源和总氮源（或总糖和粗蛋白）的比值来表示

发酵生产谷氨酸时：

C/N 比为 4/1 时，菌体大量繁殖，谷氨酸积累少；

C/N 比为 3/1 时，菌体繁殖受到抑制，谷氨酸产量则大量增加。

3、理化条件适宜

pH；渗透压；氧化还原电位；

1) pH

培养基的 pH 必须控制在一定的范围内，以满足不同类型微生物的生长繁殖或产生代谢产物。

通常培养条件：

细菌：pH7.0—8.0；放线菌：pH7.5—8.5；酵母菌：pH3.8—6.0；霉菌：pH4.0—5.8

为了维持培养基 pH 的相对恒定，通常在培养基中加入 pH 缓冲剂，或在进行工业发酵时补加酸、碱。

调节方式 $\left\{ \begin{array}{l} \text{内源调节缓冲液：} \left\{ \begin{array}{l} \text{磷酸盐 (pH6.0-7.6)} \\ \text{固体碳酸盐：CaCO}_3 \end{array} \right. \\ \text{外源调节：补加酸或碱} \end{array} \right.$

2) 渗透压和水活度

渗透压 (osmotic pressure) p105

渗透压大小由溶液中所含的分子或离子的质点数决定。

等重的物质，如果其分子或离子越小，则质点数越多，因而产生的渗透压越大。

等渗溶液：适宜微生物生长；

高渗溶液：细胞发生质壁分离；

低渗溶液：细胞吸水膨胀；

水活度 (water activity) p95

在天然环境中，微生物可实际利用的自由水或游离水的含量

一般用在一定的温度和压力条件下，溶液的蒸汽压力与同样条件下纯水蒸汽压力之比表示。

$a_w = P_w / P_{0w}$ P_w ：代表溶液蒸汽压力； P_{0w} ：代表纯水蒸汽压力。

纯水 a_w 为 1.00，溶液中溶质越多， a_w 越小

微生物一般在 a_w 为 0.60~0.99 的条件下生长， a_w 过低时，微生物生长的迟缓期延长，比生长速率和总生长量减少。微生物不同，其生长的最适 a_w 不同。

3) 氧化还原电位

4、经济节约

配制培养基时应尽量利用廉价且易于获得的原料作为培养基成份，特别是在发酵工业中，以降低生产成本。

以粗代精；

以“野”代“家”：以野生植物原料代替栽培植物原料，如木薯、橡子、薯芋等都是富含淀粉质的野生植物，可以部分取代粮食用于工业发酵的碳源。

以废代好：以工农业生产中易污染环境的废弃物作为培养微生物的原料。例如，糖蜜(制糖工业中含有蔗糖的废液)、乳清(乳制品工业中含有乳糖的废液)、豆制品工业废液及黑废液(造纸工业中含有戊糖和己糖的亚硫酸纸浆)等都可作为培养基的原料。工业上的甲烷发酵主要利用废水、废渣作原料，在我国农村，已推广利用粪便及禾草为原料发酵生产甲烷作为燃料。另外，大量的农副产品或制品，如麸皮、米糠、玉米浆、酵母浸膏、酒糟、豆饼、花生饼、蛋白胨等都是常用的发酵工业原料。

以简代繁；

以烃代粮：以石油或天然气副产品代替糖质原料来培养微生物。生产石油蛋白将石油产品转化成一些产值更高的高级醇、脂肪酸、环烷酸等化工产品 and 若干合成物；对石油产品的品质进行改良，如脱硫、脱蜡等。

以纤代糖：开发利用纤维素这种世界上含量最丰富的可再生资源。将大量的纤维素农副产品转变为优质饲料、工业发酵原料、燃料及人类的食物及饮料。

以无机氮代蛋白：以大气氮、铵盐、硝酸盐或尿素等一类非蛋白质或非氨基酸廉价原料用作发酵培养基的原料，让微生物转化成菌体蛋白质或含氮的发酵产物供人们利用。

(二) 四种方法

1. 进行生态模拟，研究某种微生物的培养条件；

2. 文献查阅，设计特定微生物的培养基配方；

3. 精心设计（正交设计等优选法）

4. 试验比较，确定特定微生物的最佳培养条件；

二、培养基的种类

1. 按对培养基成份的了解划分

天然培养基(complex medium)：以化学成分还不清楚或化学成分不恒定的天然有机物组成

合成培养基(synthetic medium)：由化学成份完全了解的物质配制而成的培养基，也称组合培养基(chemically defined medium)

半合成培养基(symi-synthetic medium)：主要以化学试剂配制，同时还加有某种或某些天然成分的培养基，也称半组合培养基，如马铃薯葡萄糖培养基

2. 根据物理状态划分

固体培养基(solid medium)：1.5—2.0%琼脂

半固体培养基(semi-solid medium)：0.2—0.8%琼脂

液体培养基(liquid medium)：

凝固剂：

琼脂：96°C 融化，40°C 凝固，1.5—2.0%；明胶：25°C 融化，20°C 凝固，5—12%；

3. 按用途划分

1) 加富培养基(enrichment medium)

在普通培养基（general purpose medium，如肉汤蛋白胨培养基）中加入某些特殊营养物质制成的一类营养丰富的培养基。

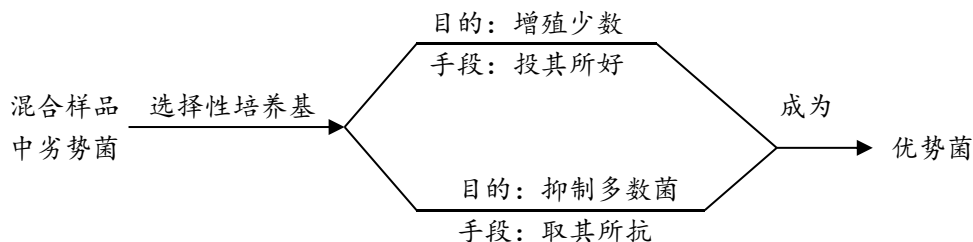
这些特殊营养物质包括血液、血清、酵母浸膏、动植物组织液等。用来培养营养要求比较苛刻的异养型微生物，如培养百日咳博德氏菌(*Bordetella pertussis*)需要含有血液的加富培养基。

根据待分离微生物的特点设计的培养基，用于从环境中富集和分离某种微生物。（目的微生物在这种培养基中较其他微生物生长速度快，并逐渐富集而占优势，从而容易达到分离该种微生物的目的。）

2) 选择培养基(selective medium)

用于将某种或某类微生物从混杂的微生物群体中分离出来的培养基。

根据不同种类微生物的特殊营养需求或对某种化学物质的敏感性不同，在培养基中加入相应的特殊营养物质或化学物质，抑制不需要的微生物的生长，有利于所需微生物的生长。



选择培养基 {
基础培养基+嗜好营养物
基础培养基+抑制剂

以纤维素或石蜡油为唯一碳源的选择性培养基，可从混杂微生物群体中分离出能分解纤维素或石蜡油的微生物。缺乏氮源的选择性培养基可用来分离固氮微生物。

抑制剂：

抗生素 {
青霉素（抑制 G⁺ 细菌）→ 选择 G⁻ 细菌
氯霉素，链霉素（抑制细菌）→ 选择酵母菌，霉菌
放线菌酮（抑制酵母，霉菌）→ 选择细菌，放线菌

染料 {
结晶紫：抑制 G⁺ → 分离 G⁻
胆盐：抑制 G⁺ → 分离 G⁻

孟加拉红：抑制细菌、放线菌 → 分离酵母，霉菌

其它：叠氮化钠：抑制霉菌 → 分离乳酸菌

10%酚数滴：抑制细菌，霉菌 → 分离放线菌

物理因素：温度，氧气，pH 值，渗透压等

3) 鉴别培养基(differential medium)：用于鉴别不同类型微生物的培养基。

在培养基中加有能与目的菌的无色代谢产物发生颜色反应的指示剂，从而用肉眼就能将该种微生物的菌落与外形相似的其它微生物菌落相区分的培养基。

伊红和美蓝二种苯胺染料可抑制 G^+ 细菌和一些难培养的 G^- 细菌。在低酸度时，这二种染料结合形成沉淀，起着产酸指示剂的作用。试样中的多种肠道菌会在 EMB 培养基上产生相互易区分的特征菌落，因而易于辨。例如大肠杆菌强烈分解乳糖而产生大量的混合酸，菌体呈酸性，菌落被染成深紫色，从菌落表面的反射光中还可看到绿色金属闪光。

从土样中分离产蛋白酶/淀粉酶菌株(枯草芽孢杆菌等)：

1) 样品接入肉汤培养基中， 80°C 水浴加热 10 分钟，然后 37°C 振荡培养 24h。

2) 采用酪素平板/可溶性淀粉平板(鉴别性培养基)进行涂布分离。

3) 挑取透明圈/不变色圈(碘液熏蒸)较大的菌落进行发酵性能测定(摇瓶发酵)。

思考题：

在某一自然土壤样品中，已知其中存在有极少量的大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、丙酮丁醇梭菌、自生固氮菌和酵母菌，请设计实验方案，把上述五菌一一分离出来。

1. “M”是一株光合自养且能自生固氮的赖氨酸缺陷型光合细菌，试设计其主要的培养条件。

2. 比较酵母菌与细菌营养类型的异同。

3. 在下列给出的物质中适当选择、分别组成供细菌、放线菌和毛霉培养用的固体培养基、供酵母菌生长用的液体培养基。

本章重点

一、微生物所需营养物的种类及功能(六大营养要素；生长因子的种类)。

二、微生物的营养类型(以能源和碳源来划分)。

三、培养基

1. 配制培养基的原则；2. 四大类微生物常用的培养基；3. 培养基的分类；

4. EMB 培养基的用途、反应原理及大肠菌群细菌特征性的菌落颜色；

5. 特定微生物的筛选方法(选择性培养基，培养条件)

四、营养物质进入细胞的 4 种方式(特点，比较)

五、名词概念：培养基，选择性培养基，鉴别性培养基，碳氮比，生长因子，(化能)自养、(化能)异养微生物

第六章 微生物的代谢

第一节 代谢概论

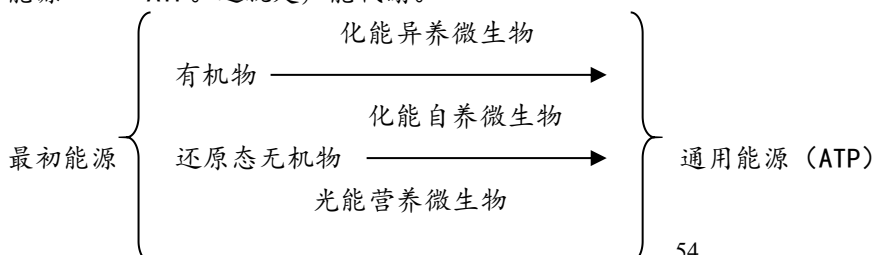
代谢(metabolism)：细胞内发生的各种化学反应的总称

代谢 { 分解代谢(catabolism)
合成代谢(anabolism)

复杂分子 $\xrightleftharpoons[\text{合成代谢}]{\text{分解代谢}}$ 简单小分子 + ATP + [H]
(有机物)

一切生命活动都是耗能反应，因此，能量代谢是一切生物代谢的核心问题。

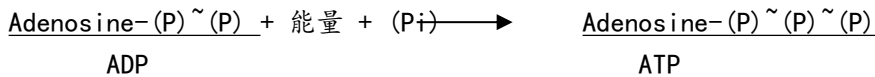
能量代谢的中心任务，是生物体如何把外界环境中的多种形式的最初能源转换成对一切生命活动都能使用的通用能源-----ATP。这就是产能代谢。



日光 $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$

产生 ATP 的三种磷酸化反应

定义：把磷酸基团增加到一个化合物上叫作磷酸化。



- 1. 底物水平磷酸化**：高能磷酸基团直接从磷酸化合物（底物）转移到 ADP 而形成 ATP。一般地，磷酸基团在较早的底物被氧化的反应中就获得能量。
- 2. 氧化磷酸化**：电子从有机化合物通过一系列电子载体（NAD⁺等）被转给分子氧或其他有机分子时发生氧化磷酸化。氧化磷酸化发生在原核微生物的质膜内膜上或真核微生物的线粒体的内膜上。氧化磷酸化中的一系列电子载体组成了电子传递链。电子从一个电子载体转移到下一个电子载体时，能量被释放，这些被释放的能量中，一部分通过化学渗透作用把能量传递给 ADP 而形成 ATP。
- 3. 光合磷酸化**：只存在于光合作用细胞中。这种细胞含有捕获光能的色素，如叶绿素等。在光合作用时，利用光能，由低能化合物 CO₂ 和水所合成有机分子，例如糖的合成。在此过程中，光合磷酸化把光能转化为以 ATP 和 NADH 形式储存的化学能，进而被用于合成有机分子。与氧化磷酸化一样，光合磷酸化中也有电子传递链。

第二节 糖的分解代谢与产能

一. 生物氧化 (biological oxidation)

生物氧化就是发生在活细胞内的一切产能性氧化反应的总称

生物氧化与燃烧的比较

比较项目	燃烧	生物氧化
反应步骤	一步式快速反应	顺序严格的系列反应
条件	激烈	由酶催化，条件温和
产能方式	热、光	大部分为 ATP
能量利用率	低	高

生物氧化的三种形式：与氧结合、脱氢或脱电子

生物氧化的功能：产能 (ATP)、产还原力 [H] 和产小分子中间代谢物

分解代谢实际上是物质在生物体内经过一系列连续的氧化还原反应，逐步分解并释放能量的过程，这个过程就是生物氧化，是一个产能代谢过程。

异养微生物利用有机物，自养微生物则利用无机物，通过生物氧化来进行产能代谢。

二、化能异养微生物的生物氧化

根据氧化还原反应中最终电子受体的不同，可把生物氧化分为 3 种类型：

化能异养微生物的产能方式

{	发酵 (1)	{	
	呼吸		
	有氧呼吸 (2) 厌氧呼吸 (3)		

1. 发酵 (fermentation) p125

广义的“发酵”，是指利用微生物生产有用代谢产物的一种生产方式。

定义：狭义的“发酵”是指在能量代谢或生物氧化中以自身代谢产物作为最终氢（电子）受体的产能过程。

有机物氧化释放的氢（电子）直接交给本身未完全氧化的某种中间产物，同时释放能量并产生各种不同的代谢产物。

发酵过程的氧化是与有机物的还原偶联在一起的。被还原的有机物来自于初始发酵的分解代谢，即不需要外界提供电子受体。

实质：底物水平磷酸化

特点：底物氧化不彻底，产能水平低；积累各种中间代谢产物不可缺少的途径。

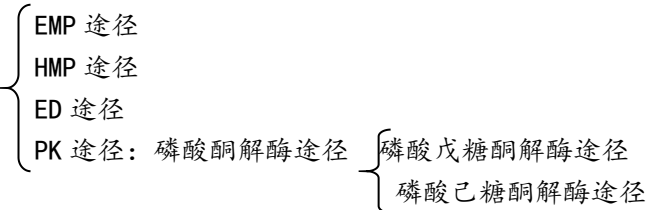
发酵作用的两个共同点：NADH 被氧化成 NAD⁺；电子受体通常是丙酮酸或它的衍生物；

由于没有外源电子受体，NADH 不能通过电子传递链氧化。通过利用丙酮酸或它的衍生物作为电子（或氢）受体，以实现 NADH 再氧化成 NAD⁺，以实现甘油醛-3-磷酸的氧化，使酵解作用不被中断。

可发酵的底物有碳水化合物、有机酸、氨基酸等，其中以微生物发酵葡萄糖最为重要。

生物体内葡萄糖被降解成丙酮酸的过程称为糖酵解 (glycolysis)

糖酵解是发酵的基础，主要有四种途径：(自学)



有 HMP 途径的微生物往往同时存在 EMP 途径，单独具有 HMP 途径的微生物少见，如弱氧化醋杆菌和氧化单胞菌。

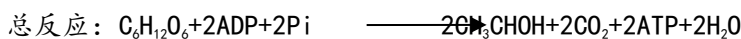
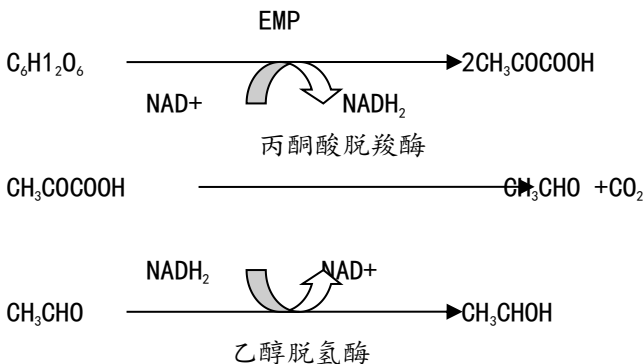
没有 EMP、HMP 和 ED 途径的细菌通过 PK 途径分解葡萄糖

丙酮酸进一步被还原，以生成不同的产物。(原核生物的丙酮酸还原途径是多种多样的)

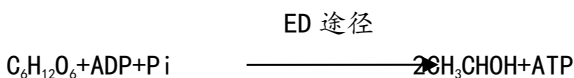
1) 乙醇发酵 p127

多种微生物能通过一种称为乙醇发酵的过程，将糖转变成乙醇和 CO_2 。如：酵母菌，根霉、曲霉和某些细菌

酵母菌进行的乙醇发酵 P127



细菌进行的酒精发酵(运动发酵单胞菌) p127



ED 途径特点: p115

1 分子葡萄糖经 4 步反应就生成 2 分子丙酮酸。其中 1 分子由 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸 (KDPG) 裂解直接产生，另 1 分子由 3-磷酸甘油醛经 EMP 途径转化而来。

KDPG 裂解成丙酮酸和 3-磷酸甘油醛，故也称 KDPG 裂解途径

特征酶为 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸醛缩酶。

产能效率低，1 分子葡萄糖经 ED 途径分解只产 1 分子 ATP

只是缺乏 EMP 途径的少数细菌产能的一条替代途径利用 ED 途径的微生物不多见。

优点：代谢速率高、产物转化率高、发酵温度高；

缺点：对乙醇耐受力低；pH 较高 (pH5)，易染菌；

在不同条件下，酵母菌利用葡萄糖进行的发酵分为 3 种类型

在 pH3.5~4.5 及厌氧条件下，进行正常的酒精发酵；(酵母的一型发酵)

存在亚适量亚硫酸钠 (3%)，生成甘油；(酵母的二型发酵)

在弱碱性 (pH7.6) 厌氧条件下，生成甘油、乙醇、乙酸和 CO_2 。(酵母的三型发酵) 该条件下乙醛不能作为正常的氢受体，于是 2 分子乙醛发生歧化反应，分别氧化和还原生成 1 分子乙酸和 1 分子乙醇。

2) 甘油发酵(酵母菌)

3) 丙酮、丁醇发酵 p128

生产菌：丙酮丁醇梭菌(Clostridium acetobutylium)：在 EMP 途径基础上进行丙酮-丁醇发酵。

4) 乳酸发酵(乳酸菌) p125

乳酸菌能发酵葡萄糖产生乳酸。

根据产物的不同，乳酸发酵有三种类型：

同型乳酸发酵：产物只有乳酸(德氏乳杆菌，植物乳杆菌)

EMP 途径

葡萄糖 $\longrightarrow$ 2 乳酸+2ATP

异型乳酸发酵：产物除了乳酸，还有乙醇（或乙酸）等产物（肠膜明串珠菌或短乳杆菌）

HMP (或 PK) 途径

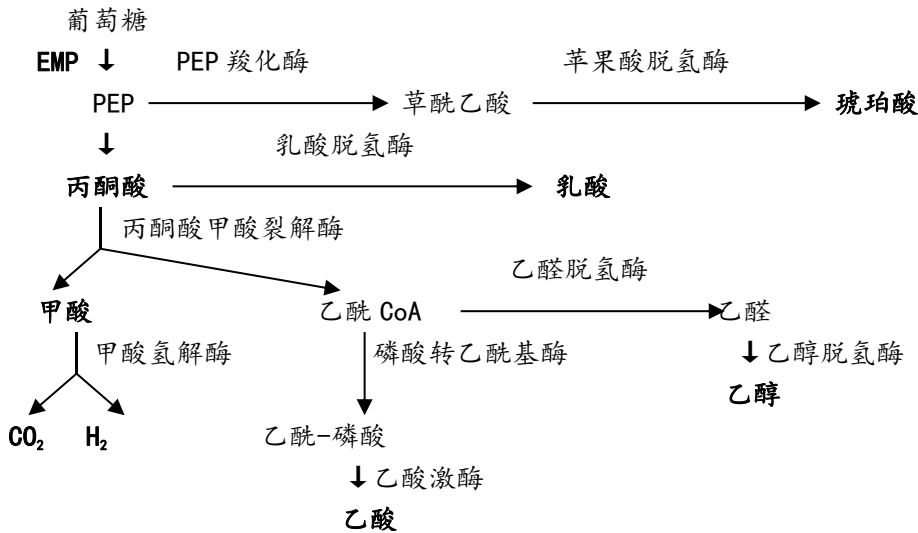
葡萄糖 $\longrightarrow$ 乳酸+乙醇+CO₂+ATP

双歧发酵：双歧杆菌

PK (磷酸戊糖解酮酶) 途径

葡萄糖 $\longrightarrow$ 乳酸+1.5 乙酸+2.5 ATP

5) 混合酸发酵 (p127) (大肠杆菌) 发酵液 pH<4.5, 甲基红反应 (M. R) 阳性



不同微生物发酵产物的不同，也是细菌分类鉴定的重要依据。（参见“微生物学实验”P119-123）

大肠杆菌：产酸产气，丙酮酸裂解生成乙酰 CoA 与甲酸，甲酸在酸性条件下可进一步裂解生成 H₂ 和 CO₂

志贺氏菌：产酸不产气，丙酮酸裂解生成乙酰 CoA 与甲酸，但不能使甲酸裂解产生 H₂ 和 CO₂

丁二醇发酵 p127 (丁二醇发酵的中间产物—3-羟基丁酮是 V. P 试验的物质基础)

产气杆菌：V. P. 试验阳性，甲基红试验阴性

大肠杆菌：V. P. 试验阴性，甲基红试验阳性

氨基酸的发酵产能——Stickland 反应 p129

Stickland 反应是一种氨基酸为电子供体，另一种氨基酸作为电子受体时的氧化-还原脱氨基反应。

用作电子（氢）供体的氨基酸主要有：

丙氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸，苯丙氨酸，色氨酸、组氨酸和酪氨酸。

用作电子（氢）受体的氨基酸主要有：

甘氨酸，脯氨酸，鸟氨酸，精氨酸，甲硫氨酸

已知能进行 Stickland 反应的细菌都是转性厌氧的梭菌，如肉毒梭菌，但不是所有梭菌都能进行 Stickland 反应。

此发酵过程对于在厌氧和蛋白质丰富的环境中生长的微生物是十分有用的。

2. 呼吸作用 (respiration) P119

指从葡萄糖或其它有机基质脱下的电子（氢）经过一系列电子载体最终传递给外源分子氧或其它氧化型化合物并产生较多 ATP 的生物氧化过程。

是微生物中最普遍和最重要的生物氧化方式和主要的产能方式。

有氧呼吸 (aerobic respiration): 以分子氧作为最终电子受体

无氧呼吸 (anaerobic respiration): 以氧化型化合物作为最终电子受体

好氧微生物从有氧呼吸中获取能量。

由于葡萄糖在有氧呼吸中产生的能量要比发酵中产生的多得多，所以在有氧条件下，兼性厌氧微生物终止厌氧发酵而转向有氧呼吸，这种呼吸抑制发酵的现象称为巴斯德效应 (Pasteur effect)。

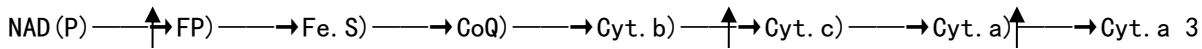
有些厌氧微生物通过无氧呼吸取得能量。

呼吸作用与发酵作用的根本区别：电子载体不是将电子直接传递给底物降解的中间产物，而是交给电子传递系统，

逐步释放出能量后再交给最终电子受体。

呼吸作用的实质：最终电子受体是外源物质（氧或氧化型化合物）；产能方式是氧化磷酸化

电子传递链：又称呼吸链，由一系列按氧化还原电位由低到高顺序排列起来的氢（电子）传递体



两个功能：1) 传递电子；2) 储存电子传递过程释放的能量，用于合成 ATP

原核生物的呼吸链在细胞膜上，真核生物的呼吸链位于线粒体内膜，但呼吸链的主要成分是类似的

原核生物呼吸链的特点（多样化）

①除了葡萄糖或其它有机基质外， H_2 、S、 Fe^{2+} 、 NH_4^+ 、 NO_2^- 等都可用作电子供体；

②除了 O_2 外，可用作电子受体的还有 NO^- 、 3NO_2^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 S_2^- 、 CO_3^{2-} ，甚至延胡索酸、甘氨酸、二甲亚砷和氧化三甲胺等有机物

③有各类型细胞色素，如 a、a1、a2、a4、b、b1、c、c1、c4、c5、d、o 等

④末端氧化酶，不仅有细胞色素 a1、a2、a3、d、o 等，还有 H_2O_2 酶和过氧化物酶；

⑤呼吸链组分与含量多变，随氧气的供应、生长阶段、基本营养供应、 Fe^{2+} 、 SO_4^{2-} 浓度等变化而改变；

⑥不仅有一般呼吸链，还有分支呼吸链；

⑦电子传递方式多样化，在细菌中可经 CoQ 传递给细胞色素，也可不经 CoQ 传递给细胞色素。

电子通过典型的 NAD^+ 呼吸链时，只有 3 处释放出足够的能量能与 ADP 磷酸化相偶联，产生 3 分子 ATP； NAD 呼吸链的 P/O （ATP/氧原子，表示呼吸链氧化磷酸化效率）=3；

电子在 FAD^+ 呼吸链传递时，只有 2 处释放出足够的能量能与 ADP 磷酸化相偶联，故仅产生 2 分子 ATP， FAD 呼吸链的 $\text{P/O}=2$

具有抑制电子传递、能量转移和解偶联作用的物质都会阻止氧化磷酸化。

抑制电子传递的有： KCN 、 NaN_3 、 CO 等；

解偶联剂：2, 4-二硝基苯酚，短杆菌肽等

氧化磷酸化产能机制

氧化磷酸化又称电子传递磷酸化。

指将呼吸链在传递氢（电子）过程中释放的能量与 ADP 磷酸化偶联产生 ATP 的过程。

氧化磷酸化产生 ATP 的机制有 3 种假说：

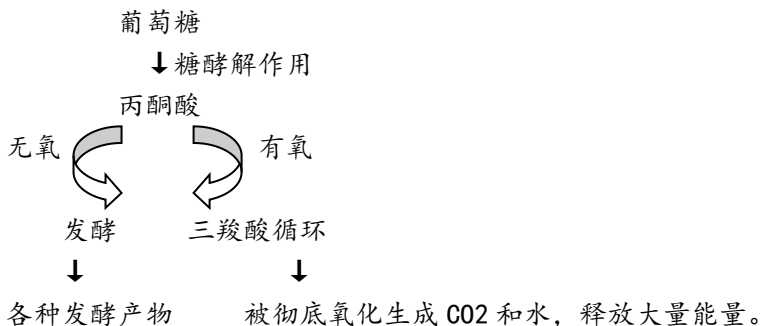
化学偶联假说；构象偶联假说；化学渗透假说（为多数人所接受）

化学渗透假说 p122

在氧化磷酸化过程中，位于细胞膜或线粒体内膜的呼吸链组分传递来自基质的氢时，在将电子传递给下一个电子载体的同时把质子从膜内泵到膜外，由于电子不能自由透过膜因而造成了膜内外两侧的质子梯度和电位梯度，由此产生质子动势，这种动势蕴藏着电子传递过程中所释放的能量。在质子动势的驱动下，质子通过跨膜的 ATP 酶从膜外回到膜内，并释放能量驱使 ADP 磷酸化生成 ATP。

ATP 酶合成 ATP 的构象假说或旋转催化假说（ATP 合成酶是目前已知的最小的旋转发动机）

(1) 有氧呼吸



有氧呼吸由 3 部分组成

通过 EMP 途径 $\rightarrow$ 2 丙酮酸（细胞质）

丙酮酸氧化脱羧、脱氢并与 CoA 结合 $\rightarrow$ 2 乙酰 CoA + 2 ($\text{NADH} + \text{H}^+$)（原核生物细胞质，真核线粒体）

乙酰 CoA 进入 TCA 循环

上述过程脱出的氢（电子）最终交给 O_2 生成 H_2O ，形成的 8 ($\text{NADH} + \text{H}^+$)，2 ($\text{NADPH} + \text{H}^+$) 2 FADH_2 ，通过呼吸链产 34 ATP

有氧呼吸：电子传递链；氧分子；（最终电子受体）

1) 定义：有氧呼吸：呼吸链末端的电子受体是 O_2 的一种生物氧化 (p119)

2) 微生物：大多数细菌，几乎所有的放线菌和真菌

3) 特点：

好氧和兼性厌氧微生物在有氧条件下进行的产能代谢；

通过电子传递链传递电子，通过氧化磷酸化产能；

底物（氧化基质）是有机物，最终电子受体是 O_2 ；

底物氧化彻底，产能效率高。

葡萄糖的氧化为例：



(2) 无氧呼吸（参见 P123）

某些厌氧和兼性厌氧微生物在无氧条件下进行无氧呼吸；

无氧呼吸的最终电子受体不是氧，而是 NO_3^- 、 NO_2^- 、 SO_4^{2-} 、 $S_2O_3^{2-}$ 、 CO_2 等无机物，或延胡索酸 (fumarate) 等有机物。

无氧呼吸也需要细胞色素等电子传递体，并在能量分级释放过程中伴随有磷酸化作用，也能产生较多的能量用于生命活动。

由于部分能量随电子转移传给最终电子受体，所以生成的能量不如有氧呼吸产生的多。

1) 定义：呼吸链末端最终电子受体是外源无机氧化物（少数为有机氧化物）的生物氧化。

最终电子受体：无机物： NO_3^- 、 NO_2^- 、 SO_4^{2-} 、 $S_2O_3^{2-}$ 、S、 CO_2 ；有机物：延胡索酸 (fumarate)，罕见

2) 类型 (p123)

根据末端氢（电子）受体的不同分为多种类型

硝酸盐呼吸；硫酸盐呼吸；硫呼吸；碳酸盐呼吸；延胡索酸呼吸等

3) 特点

① 某些厌氧和兼性厌氧微生物在无氧条件下进行的产能代谢；

② 进行厌氧呼吸的微生物极大多数是细菌；

③ 通过电子传递链传递电子，通过氧化磷酸化产能；

④ 底物（氧化基质）是有机物，电子受体是 O_2 以外的无机氧化物（少数为有机氧化物）；

⑤ 底物氧化不够彻底，产能水平居中；

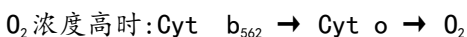
硝酸盐呼吸 p123，又称“反硝化作用”，或“硝酸盐还原”

区别：很多细菌、真菌及植物将 NO_3^- 还原成 NH_3 ，为生长提供氮源，将它转化为有机氮构成蛋白质，称“同化性硝酸盐还原”

能进行硝酸盐呼吸的细菌被称为硝酸盐还原细菌（又称反硝化细菌），主要生活在土壤和水环境中，如地衣芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、依氏螺菌、脱氮副球菌、脱氮硫杆菌和生丝微菌属中的一些成员等。

大肠杆菌也是一种反硝化细菌，但它只能将 NO_3^- 还原成 NO_2^- 。

大肠杆菌 (a) 有氧呼吸：传递 3 个质子；(b) 硝酸盐呼吸：传递 2 个质子



硝酸盐还原细菌都是兼性厌氧菌，无氧但环境中存在硝酸盐时进行厌氧呼吸；，有氧时其细胞膜上的硝酸盐还原酶合成被阻，细胞进行有氧呼吸。

反硝化作用的生态学作用：

土壤及水环境

↓ 好氧性机体的呼吸作用

氧被消耗而造成局部的厌氧环境（硝酸盐还原细菌进行厌氧呼吸）

害：土壤中植物能利用的氮 (NO_3^-) 还原成氮气而消失，从而降低了土壤的肥力。防止措施：松土，排除过多的水分，保证土壤中有良好的通气条件。

利：反硝化作用在氮素循环中的重要作用

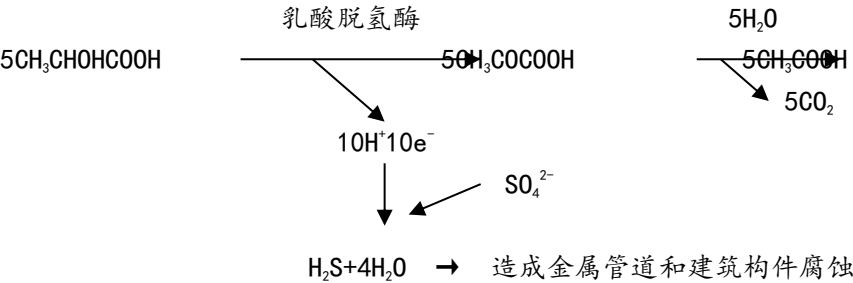
硝酸盐是一种容易溶解于水的物质，通常通过水从土壤流入水域中。如果没有反硝化作用，硝酸盐将在水中

积累，会导致水质变坏与地球上氮素循环的中断。

硫酸盐呼吸 p124

进行硫酸盐呼吸的细菌称“硫酸盐还原细菌”，包括脱硫弧菌属、脱硫单胞菌属、脱硫球菌属、脱硫肠状菌属、脱硫八叠球菌属等。它们都是严格厌氧的古生菌。

极大多数为专性能异养型，利用有机酸（乳酸、丙酮酸、延胡索酸和苹果酸等）、脂肪酸（乙酸和甲酸）和醇类（乙醇）等有机质生长。少数营混合营养型生长，在有适宜有机碳源和能源时营化能异养生活，若无适宜有机物时也能以 H_2 、 CO_2 进行自养生长。

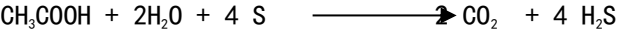


硫呼吸 p125

硫呼吸是元素硫氧化性还原形成 H_2S 的过程。

主要：硫还原菌属、脱硫单胞菌属

例如，利用乙酸为电子供体：



其它厌氧呼吸：

利用 H_2 作电子供体， CO_2 或碳酸盐为末端电子受体的厌氧菌称为甲烷菌。

延胡索酸呼吸：兼性厌氧，将延胡索酸还原成琥珀酸，以往都是把琥珀酸的形式作为微生物的一般发酵产物来考虑。实际上在延胡索酸呼吸中，延胡索酸是最终电子受体，而琥珀酸是还原产物。p125

有关“鬼火”的生物学解释：

在无氧条件下，某些微生物在没有氧、氮或硫作呼吸作用的最终电子受体时，可以磷酸盐代替，其结果是生成磷化氢（ PH_3 ），一种易燃气体。当有机物腐败变质时，经常会发生这种情况。

若埋葬尸体的坟墓封口不严时，这种气体就很易逸出。农村的墓地通常位于山坡上，埋葬着大量尸体。在夜晚，气体燃烧会发出绿幽幽的光。长期以来人们无法正确地解释这种现象，将其称之为“鬼火”。

化能异养微生物生物氧化 3 种类型比较

厌氧呼吸的产能较有氧呼吸少，但比发酵多，它使微生物在没有氧的情况下仍然可以通过电子传递和氧化磷酸化来产生 ATP，因此对很多微生物是非常重要的。

除氧以外的多种物质可被各种微生物用作最终电子受体，充分体现了微生物代谢类型的多样性。

产能方式	有氧呼吸	无氧呼吸	发酵
微生物	好氧菌、兼性厌氧菌	兼性厌氧菌、厌氧菌	兼性厌氧菌、厌氧菌
电子受体	O_2	外源无机氧化物 (少数有机氧化物)	更氧化的有机中间代谢物
底物	有机物	有机物	有机物
酶类	脱氢酶、氧化还原酶	脱氢酶、特殊氧化还原酶	脱氢酶
产 ATP 方式	呼吸链 (氧化磷酸化)	呼吸链 (氧化磷酸化)	直接产生 (底物水平磷酸化)
产能效率	高	居中	低

三. 自养微生物的生物氧化 p129

化能自养型：

以无机物（ NH_4^+ 、 NO_2^- 、 H_2S 、 S 、 H_2 和 Fe^{2+} 等）为电子供体→从无机物的氧化获得能量

这些微生物一般也能以 CO_2 为唯一或主要碳源合成细胞物质→自养微生物

从对无机物的生物氧化过程中获得生长所需要能量的微生物一般都是化能自养型微生物。

化能自养型微生物均为细菌，且绝大多数为好氧菌，存在：土壤，水

能量代谢特点：

产能途径：氧化磷酸化（主要）：无机底物脱下的氢直接进入呼吸链

底物水平磷酸化：少数菌，在无机硫化物存在条件下还能部分通过底物磷酸化产能。

电子可从多处进入呼吸链，所以，呼吸链多样；

产能效率低，故化能自养菌生长缓慢，细胞产率低；

分解代谢

复杂分子 $\xrightleftharpoons{\text{合成代谢}}$ 简单小分子 + ATP + [H]

(有机物)

自养微生物的合成代谢：将 CO_2 先还原成 $[\text{CH}_2\text{O}]$ 水平的简单有机物，然后再进一步合成复杂的细胞成分。

化能异养微生物：ATP 和还原力均来自对有机物的生物氧化

化能自养微生物：无机物氧化过程中主要通过氧化磷酸化产生 ATP

如果作为电子供体的无机物的氧化还原电位足够低，也在氧化磷酸化的过程中产生还原力，但大多数情况下都需要通过电子的逆向传递，以消耗 ATP 为代价获得还原力。

氢细菌： $\text{H}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$

硫细菌： $\text{H}_2\text{S} \longrightarrow \text{SO}_4^{2-}$

亚硝化细菌： $\text{NH}_4^+ \longrightarrow \text{NO}_2^-$

硝化细菌： $\text{NO}_2^- \longrightarrow \text{NO}_3^-$

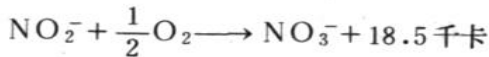
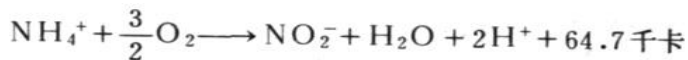
铁细菌： $\text{Fe}^{2+} \longrightarrow \text{Fe}^{3+}$

(1) 氮的氧化 p130

NH_3 、亚硝酸 (NO_2^-) 等无机氮化物可以被某些化能自养细菌用作能源

亚硝化细菌 (亚硝化假单胞菌属)：将氨氧化为亚硝酸并获得能量

硝化细菌 (硝化杆菌属，硝化球菌属)：将亚硝酸氧化为硝酸并获得能量



这两类细菌往往伴生在一起，在它们的共同作用下将铵盐氧化成硝酸盐，避免亚硝酸积累所产生的毒害作用。

这类细菌在自然界的氮素循环中也起着重要的作用，在自然界中分布非常广泛。

NH_3 、 NO_2^- 的氧化还原电势均比较高，以氧为电子受体进行氧化时产生的能量较少，而且进行合成代谢所需要的还原力需消耗 ATP 进行电子的逆呼吸链传递来产生，因此这类细菌生长缓慢，平均代时在 10h 以上。

区别：

		无氧呼吸 (化能异养型)	无机物氧化 (化能自养型)
同		都涉及无机物	
异	电子供体 (底物)	有机物	还原型无机物
	电子受体	氧化型无机物 (主)	O_2
	过程	电子传递链 有机物 $\longrightarrow$ 脱氢 $\longrightarrow$ 无机物	电子传递链 无机物 $\longrightarrow$ 脱氢 $\longrightarrow$ O_2 或氧化
	举例	反硝化细菌	硝化细菌

2. 光能自养微生物 p131

光合作用是地球上最重要的生物过程之一。

光合作用分成两部分：

光反应：捕获光能并转变成化学能，提供 ATP 和 NADPH

(位于真核生物叶绿体类囊体膜，原核生物的内膜系统)

暗反应：还原或固定 CO_2 并合成细胞物质 (真核生物位于叶绿体基质中，原核生物的羧酶体)

3. 光合磷酸化 (photophosphorylation)：光能转变为化学能的过程

当一个叶绿素分子吸收光量子时，叶绿素性质上即被激活，导致其释放一个电子而被氧化，释放出的电子在

电子传递系统中的传递过程中逐步释放能量，这就是光合磷酸化的基本动力。

光合磷酸化和氧化磷酸化一样都是通过电子传递系统产生ATP

光合作用 {
 产氧 { 真核生物：藻类及其它绿色植物
 原核生物：蓝细菌
 不产氧（仅原核生物有）：光合细菌

细菌叶绿素具有和高等植物中的叶绿素相类似的化学结构，二者的区别在于侧链基团的不同，以及由此而导致的光吸收特性的差异。

光合系统：在类囊体膜内，叶绿素分子高度组织化排列（大约 300 个），形成一个复合体。包括**反应中心色素**和**天线色素**。

(1) 环式光合磷酸化 p131

光合细菌主要通过环式光合磷酸化作用产生 ATP

不是利用 H_2O ，而是利用还原态的 H_2 、 H_2S 等作为还原 CO_2 的氢供体，进行不产氧的光合作用；

电子传递的过程中造成了质子的跨膜移动, 为 ATP 的合成提供了能量。

通过电子的逆向传递产生还原力:

不产氧光合作用的反应中心为 P870

循环光合磷酸化特点:

- 电子循环式传递，光合色素为菌绿素；
- 厌氧环境进行；
- 产物只有 ATP；
- NADPH 的氢来自： H_2 、 H_2S 、S 和有机物（丁酸、乳酸、琥珀酸、苹果酸）；
- 不产 O_2 ；
- 只在绿色和紫色光合细菌中发现（4 类：绿色硫细菌，绿色非硫细菌，紫色硫细菌，紫色非硫细菌）。

(2) 非环式光合磷酸化 p131

产氧型光合作用（绿色植物、蓝细菌）

产氧光合作用包括两个光合系统:

光合系统 I：吸收较长波长的光 ($\geq 680\text{nm}$)，并将能量传递到 **P700** 的叶绿素 a。

光合系统 II：吸收较短波长的光 ($\leq 680\text{nm}$)，并将能量传递到 **P680** 的叶绿素 a。

非环式光合磷酸化的反应式： $2\text{NADP}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NADPH} + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP} + \text{O}_2$

非循环光合磷酸化特点:

- 电子传递途径属非循环式;
- 在有 O_2 条件下进行;
- 有 PS I 和 PS II 2 个光合系统;
- 反应中同时产 ATP、还原力 [H] 和 O_2 ;
- NADPH 的电子来自 H_2O 光解产物 H^+ 和电子;
- 存在于植物、藻类和蓝细菌, 依靠叶绿素。

(3) 嗜盐菌紫膜的光合作用 p133

一种只有嗜盐菌才有的，无叶绿素或细菌叶绿素参与的独特的光合作用。

嗜盐菌细胞膜 { 红色部分（红膜）：主要含细胞色素和黄素蛋白等用于氧化磷酸化的呼吸链载体
紫色部分（紫膜）：在膜上呈斑片状（直径约 0.5 μm）独立分布，其总面积约占细胞膜的一半，主要由细菌视紫红质组成。

实验发现, 在波长为 550-600 nm 的光照下, 嗜盐菌 ATP 的合成速率最高, 而这一波长范围恰好与细菌视紫红质的吸收光谱相一致。

视紫质分子中的辅基是视黄醛，吸收光后由构型改变，导致将质子抽到膜外，形成质子梯度，驱动 ATP 酶合成 ATP。

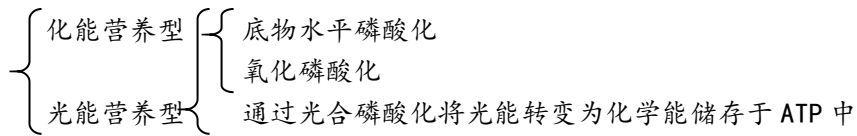
紫膜的光合磷酸化是迄今为止所发现的最简单的光合磷酸化反应

嗜盐菌紫膜的光合作用特点:

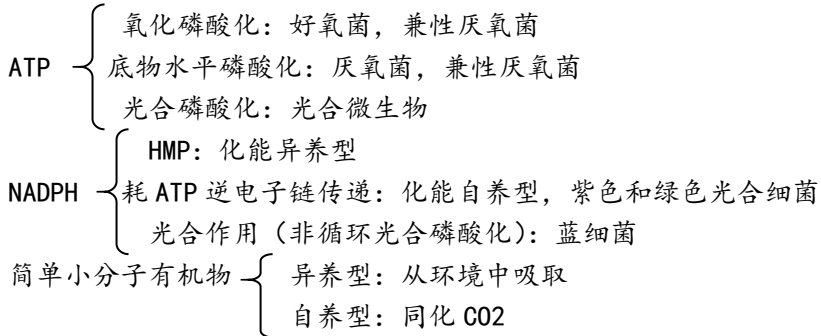
- 无 02 条件下进行:

- 不产 O_2 ;
- 最简单的光合磷酸化反应;
- 无叶绿素和细菌叶绿素，光合色素是紫膜上的视紫红质。

四、能量转换



生物合成三要素（简单小分子，ATP，NADPH）如何获得？



第三节 微生物独特合成代谢途径（自学）

- 一、自养微生物的 CO_2 固定（自学）
- 二、生物固氮

固氮酶（微生物）



1. 固氮酶微生物种类 p142

- 3 大生态类型
 - 自生固氮菌（固氮菌属，红假单胞菌属）
 - 共生固氮菌（根瘤菌属，弗兰克氏菌属）
 - 联合固氮菌（固氮螺菌）

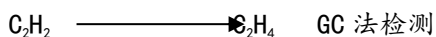
具有固氮作用均为原核生物，目前尚未发现真核微生物具有固氮作用。

2. 固氮机制

生物固氮反应 6 要素（p143）：

- 1) ATP
 - 2) NADPH 及传递载体;
 - 3) 固氮酶二个组分：固氮酶（钼铁蛋白，活性中心）；固氮酶还原酶（铁蛋白，电子活化中心）
 - 4) 还原底物 N_2
 - 5) Mg^{2+} ;
 - 6) 严格厌氧微环境：蓝细菌：异形胞；豆科植物根瘤菌：类菌体，豆血红蛋白
3. 固氮酶活力测定：乙炔还原法

固氮酶



4. 好氧固氮菌防止氧损伤固氮酶的机制 p143-144(自学)：

三、肽聚糖的生物合成（自学）p137

四、次级代谢与次级代谢（p348 第十三章）（自学）

第 4 节 微生物的代谢调节和发酵生产

调节代谢的 2 种主要方式：

- (1) 酶量的调节：诱导、阻遏机制（粗调）
 - 转录水平和翻译水平的调节
 - 原核生物的基因调控主要发生在转录水平

(2) 酶活性的调节：激活、抑制机制（细调）

酶蛋白合成之后的调节（变构调节，修饰调节）

代谢调节在发酵工业的应用（自学）

1. 应用营养缺陷型菌株解除正常的反馈调节（赖氨酸发酵，肌苷酸发酵）
2. 应用抗反馈调节的突变株解除反馈调节

本章重点

- 一、化能异养微生物产能方式：有氧呼吸、无氧呼吸、发酵（概念、异同点）
- 二、微生物发酵类型的多样性（途径，微生物）
- 三、光合磷酸化途径（特点，微生物）
- 四、不同条件下各营养类型微生物产 ATP 和 NAD (P) H 的方式。
- 五、生物固氮（微生物种类，固氮酶，条件，异形胞，类菌体）
- 六、代谢调节的两种主要方式

第七章 微生物的生长与控制

生长：生物个体物质有规律地、不可逆增加，导致个体体积扩大的生物学过程。

繁殖：生物个体生长到一定阶段，通过特定方式产生新的生命个体，即引起生命个体数量增加的生物学过程。

生长是一个逐步发生的量变过程，繁殖是一个产生新的生命个体的质变过程。

在高等生物里这两个过程可以明显分开，但在低等特别是在单细胞的生物里，由于细胞小，这两个过程是紧密联系又很难划分的过程。

一个微生物细胞



合适的外界条件，吸收营养物质，进行代谢



如果同化作用的速度超过了异化作用



个体的生长原生质的总量（重量、体积、大小）就不断增加



如果各细胞组分是按恰当的比例增长时，则达到一定程度后就会发生繁殖，引起个体数目的增加。



群体内各个个体的进一步生长→群体的生长

微生物生长：在一定时间和条件下细胞数量的增加（微生物群体生长）



在微生物学中提到的“生长”，一般均指群体生长，这一点与研究大生物时有所不同。

个体生长 → 个体繁殖 → 群体生长

群体生长 = 个体生长 + 个体繁殖

对以出芽和二分裂繁殖的微生物来说，生长就会导致细胞数量增加，细胞个体增长到一定程度就分裂成两个大小基本相等的子代细胞。

多核微生物而言，细胞核的分裂并不伴随细胞分裂，生长意味着细胞体积增加而个体数目不变。

第一节 微生物的生长规律

微生物的特点：个体微小



肉眼看到或接触到的微生物是成千上万个单个的微生物组成的群体。



微生物接种是群体接种，接种后的生长是微生物群体繁殖生长。

对细菌群体生长规律的了解是对其进行研究与利用的基础

一、生长曲线

在微生物学中提到的“生长”，均指群体生长。

生长曲线 (Growth Curve)：将少量纯种单细胞微生物接种到定量的液体培养基中，定时取样测定细胞数量，以培养时间为横坐标，以菌数的对数值为纵坐标作图，得到的一条反映在整个培养期间菌数变化规律的曲线。

生长曲线一般用菌数的对数值为纵坐标作图

一条典型的生长曲线至少可以分为延滞期，对数期，稳定期和衰亡期四个生长时期

1. 延滞期 (Lag phase)

将少量菌种接入新鲜培养基后，在开始一段时间内菌数不立即增加，或增加很少，生长速度接近于零。也称延迟期、适应期。

延滞期的特点：分裂迟缓、代谢活跃

- 细胞数量不增加（生长速率常数 R 等于 0）；
- 细胞形态变大或增长；（巨大芽孢杆菌：延滞期末细胞的平均长度比刚接种时长 6 倍。一般来说处于迟缓期的细胞体积最大）
- 细胞合成代谢活跃；（rRNA 含量增高，核糖体、酶类和 ATP 合成加快，易产生诱导酶）
- 对外界不良条件反应敏感；

细胞处于活跃生长中，只是分裂迟缓在此阶段后期，少数细胞开始分裂，曲线略有上升。

迟缓期出现的原因：调整代谢

微生物接种到一个新的环境，暂时缺乏分解和催化有关底物的酶，或是缺乏充足的中间代谢产物等。为产生诱导酶或合成中间代谢产物，就需要一段适应期。

迟缓期的长短与菌种的遗传性、菌龄以及移种前后所处的环境条件等因素有关，短的只需要几分钟，长的需数小时。

在生产实践中缩短迟缓期的常用手段

- (1) 通过遗传学方法改变种的遗传特性使迟缓期缩短；
- (2) 利用对数期的细胞作为种子；
- (3) 尽量使接种前后所使用的培养基组成不要相差太大；
- (4) 适当扩大接种量

2. 对数期 (Log phase)，又称指数期 (Exponential phase)

以最大的速率生长和分裂，细菌数量呈对数增加，细胞内各成分按比例有规律地增加，表现为平衡生长。

对数生长期的细菌个体形态、化学组成和生理特性等均较一致，代谢旺盛、生长迅速、代时稳定，所以是研究微生物基本代谢的良好材料。它也常在生产上用作种子，使微生物发酵的迟缓期缩短，提高经济效益。

(1) 特点

生长速率常数 R 最大，细胞以几何级数增长；

细胞均衡生长（细胞各组分以彼此相对稳定速度合成）；

酶系活跃，代谢旺盛。

(2) 三个重要参数的计算 (p162)

繁殖代数 (n)

生长速率常数 (R)：单位时间内的世代数

代时 (G)：在细菌个体生长里，每个细菌分裂繁殖一代所需的时间为代时 (Generation time)，在群体生长里细菌数量增加一倍所需的时间称为倍增时间 (Doubling time)。

纳米细菌 (nanobacteria)，三天才分裂一次；

九十年代初期从地下数公里发现的超微型细菌，用代谢产生的 CO_2 作指标，计算出这些超微菌的代谢速率仅为地上正常细菌的 10^{-15} ，有人认为它们需要 100 年才能分裂一次。

(3) 影响代时的因素

1) 菌种，不同的微生物及微生物的不同菌株代时不同；

2) 营养成分，在营养丰富的培养基中生长代时短

3) 营养物浓度，在一定范围内，生长速率与营养物浓度呈正比，

4) 温度，在一定范围，生长速率与培养温度呈正相关。

凡是处于较低浓度范围内，可影响生长速率的营养物成分，就称为生长限制因子。

(4) 应用

• 适宜作“种子”；• 研究基础代谢的材料；• 噬菌体增殖的最好阶段；• 革兰氏染色；• 诱变育种；

细胞重要的分化调节阶段；

储存糖原等细胞质内含物，芽孢杆菌在此阶段形成芽孢或建立自然感受态等。也是发酵过程积累代谢产物的重要阶段，某些放线菌抗生素的大量形成也在此时期。

生产上常通过补充营养物质（补料）或取走代谢产物、调节 pH、调节温度、对好氧菌增加通气、搅拌或振荡等措施延长稳定期，以获得更多的菌体物质或积累更多的代谢产物。

3. 稳定期 (Stationary phase)： 又称恒定期或最高生长期

由于营养物质消耗，代谢产物积累和 pH 等环境变化，逐步不适宜于细菌生长，导致生长速率降低直至零（可能由于细菌分裂增加的数量等于细菌死亡数，或者细胞仅停止分裂而保持代谢活性）。

此时培养液中活细菌数最高并维持稳定。

(1) 特点

R 等于 0；

G 延长；

细胞重要的分化调节阶段；

细胞开始衰老，原生质分布不均匀，出现液泡，

开始积累储藏物（糖原等），

产芽孢的菌开始形成芽孢；

次生代谢产物开始大量合成（抗生素等）；

菌体的最大收获期；

(2) 原因

营养物（尤其是生长因子）的消耗；营养物比例失调；有害代谢产物积累；物化条件不适；

(3) 应用

收获菌体；收获与菌体生长相平行的代谢产物；

(4) 延长稳定期

补充营养物质（补料）或取走代谢产物；调节 pH、温度、增加通气、搅拌；

细菌代谢活性降低，细菌衰老并出现自溶，产生或释放出一些产物，如氨基酸、转化酶、外肽酶或抗生素等。细胞呈现多种形态，有时产生畸形，细胞大小悬殊，有些革兰氏染色反应阳性菌变成阴性反应等。

4. 衰亡期 (Decline 或 Death phase)

营养物质耗尽和有毒代谢产物的大量积累，细菌死亡速率超过新生速率，整个群体呈现出负增长。

该时期死亡的细菌以对数方式增加，但在衰亡期的后期，由于部分细菌产生抗性也会使细菌死亡的速率降低，仍

有部分活菌存在。

由于采用活菌计数比较麻烦，并要求严格进行操作，否则不易得到准确的结果，重复性也差，因此在实际工作中多采用分光光度计测定 OD 值的方法绘制细菌的生长曲线

不同的微生物或同一种微生物对不同物质的利用能力是不同的。有的物质可直接被利用(例如葡萄糖或 NH_4^+ 等)；有的需要经过一定的适应期后才能获得利用能力（例如乳糖或 NO_3^- 等）。前者通常称为速效碳源（或氮源），后者称为迟效碳源（或氮源）。当培养基中同时含有这两类碳源（或氮源）时，微生物在生长过程中会形成二次生长现象。

丝状真菌的生长曲线：在液体振荡培养或深层通气培养中，不同时间取样，以菌丝干重（毫克）作为衡量生长状况的纵坐标，以时间为横坐标，可得到丝状真菌的生长曲线

3 个时期：

延滞期：菌丝干重没有明显增加。孢子萌发前的真正的停滞；生长已经开始但却因菌丝生长量少而无法测量

快速生长期：干重的立方根与时间成直线关系

衰亡期：菌丝体干重下降

研究生长曲线的意义：

扩大培养时，各级种子应选择适宜的菌龄，以缩短延滞期，提高设备利用率。

确定菌体或代谢产物的最佳收获期，并设法延长对数期或稳定期。

实现连续培养的理论依据。

二、同步培养（参见 P163）

同步培养(Synchronous culture)：使群体中的所有个体细胞处于同样细胞生长和分裂周期中（即大多数细胞能同时进行生长或分裂）的培养方法。

同步生长：以同步培养方法使群体细胞能处于同一生长阶段，并同时进行分裂的生长。

通过同步培养方法获得的细胞被称为**同步细胞或同步培养物**

同步培养的方法

机械筛选法 { 离心法
过滤分离法
硝酸纤维素滤膜法：最经典的同步培养方法

环境条件诱导法 { 温度
培养基成份控制
其他（如光照和黑暗交替培养）

机械法优点：不影响菌体的代谢与活性，细胞保持自然状态；

诱导法缺点：细胞活性受到不同程度的影响

同步培养物常被用来研究在单个细胞上难以研究的生理与遗传特性和作为工业发酵的种子，是一种理想的材料。

硝酸纤维素滤膜法是最经典的获得同步生长的方法

由于细胞的个体差异，同步生长往往只能维持 2-3 个世代，随后又逐渐转变为随机生长。

三、连续培养

将微生物置于一定容积的培养基中，经过培养生长，最后一次收获。

分批培养(batch culture) or 封闭培养(closed culture)，培养基一次加入，不予补充，不再更换。

连续培养(Continuous culture)：在微生物的整个培养期间，通过一定的方式使微生物能以恒定的比生长速率生长并能持续生长下去的一种培养方法。

若在一个开放的系统中(恒定容积的流动系统)培养微生物，培养过程中不断的补充营养物质和以同样的速率移出培养物，是实现微生物连续培养的基本原则。

培养系统中的细胞数量和营养状态恒定，即处于稳态。

连续培养的方法：

区别是控制培养基流入到培养容器中的方式不同。

恒浊连续培养：不断调节流速以使培养液浊度保持恒定

恒化连续培养：保持恒定的流速

（一）恒浊连续培养：不断调节流速使培养液的浊度保持恒定

测定所培养微生物的光密度值



自动调节新鲜培养基流入和培养物流出培养室的流速



使培养物维持在某一恒定浊度

当培养室中的浊度超过预期数值时，流速加快，使浊度降低；

当培养室中的浊度低于预期数值时，流速减慢，使浊度升高；

恒浊培养器的工作精度是由**光电控制系统**的灵敏度来决定的

如果所用培养基中有过量的必需营养物，就可以使菌体维持最高的生长速率。

(二) 恒化连续培养：使培养液流速保持不变，通过控制培养基中某一生长限制性底物的浓度来调节微生物的生长速率及其细胞密度。

使微生物始终在低于其最高生长速率下进行生长繁殖。

限制性因子必须是机体生长所必需的营养物质，如氨基酸和氨等氮源，或是葡萄糖、麦芽糖等碳源或者是无机盐，因而可在一定浓度范围内能决定该机体生长速率。

恒化连续培养中，必需将某种必需的营养物质控制在较低的浓度，以作为限制性因子，而其他营养物均过量。

(细菌的生长速率取决于限制性因子的浓度，并低于最高生长速率)

微生物生长依赖于稀释率(培养基流速与容器体积的比值)和生长限制性底物的浓度。

当稀释率很高时，菌体数目增加的速率低于因稀释而使菌体数目减少的速率，最终导致培养容器中的微生物被流加的新培养基逐渐洗去；

当稀释率很低时，微生物细胞的生长速率大于稀释速率使细胞数目增加，结果培养基成分的补充低于微生物的消耗量，最终导致细胞因饥饿而大量死亡；

当稀释率等于或小于微生物的最大生长速率，生长速率就会增加直到和稀释率相等，培养容器中细胞数目将维持恒定，微生物因生长而增加的数目就是因稀释作用而被取走的数目，因此生长速率于稀释率成正比。

当稀释率不变，而生长限制性底物浓度升高时，培养容器中的细胞密度升高。因此，恒化器中的菌体浓度不是由稀释率决定的，而是由生长限制性底物浓度决定的。

通过控制流速可以得到生长速率不同但密度基本恒定的培养物(在一个较宽的稀释率范围内，系统内微生物密度保持恒定。稀释率增加，代时减小)。

多用于科研：遗传学：突变株分离；

生理学：不同条件下的代谢变化；

生态学：模拟自然营养条件建立实验模型；

两种连续培养系统的差别

装置	控制对象	培养基	培养基流速	生长速率	产物	应用
恒浊器	菌体密度	无限制生长因子	不恒定	最高	菌体或与菌体相平行的代谢产物	生产
恒化器	培养基流速	有限制生长因子	恒定	低于最高速率	不同生长速率的菌体	实验室

第二节 微生物生长的测定

微生物生长：单位时间里微生物数量或生物量(Biomass)的变化

微生物生长的测定方法：质量法(生物量，原生质总量)；计数法

微生物生长的测定方法有多种，可根据研究对象或要解决的问题加以选择

评价培养条件、营养物质等对微生物生长的影响；

评价不同的抗菌物质对微生物产生抑制(或杀死)作用的效果；

客观地反映微生物生长的规律；

一、计数法

(一) 直接显微镜计数法(细胞总数)

1、细菌计数板或血球计数板(酵母菌，霉菌孢子)

采用细菌计数板或血球计数板，在显微镜下对微生物数量进行直接计数(计算一定容积里样品中微生物的数量)。

优点：快速

缺点：不能区分死菌与活菌；只适用于单细胞状态的微生物或丝状微生物的孢子不适于对运动细菌的计数；

需要相对高的细菌浓度（10⁶/mL 以上）；个体小的细菌在显微镜下难以观察；

2、其它方法

比例计数：将已知颗粒浓度的样品（例如血液）与待测细胞浓度的样品混匀后在显微镜下根据二者之间的比例直接推算待测微生物细胞浓度

过滤计数：当样品中菌数很低时，可以将一定体积的湖水、海水或饮用水等样品通过膜过滤器。然后将滤膜干燥、染色，并经处理使膜透明，再在显微镜下计算膜上（或一定面积中）的细菌数；

活菌计数：采用特定的染色技术也可分别对活菌和死菌进行分别计数（美兰，能区分死菌和活菌的荧光试剂盒）

（二）间接法（活菌计数法）

通常用来测定细菌、酵母菌等单细胞微生物的生长情况或样品中所含微生物个体的数量（细菌、孢子、酵母菌）。

1、平板菌落计数法：（最常用）倾注法；涂布法

采用培养平板计数法要求操作熟练、准确，否则难以得到正确的结果：

样品充分混匀；

每支移液管及涂布棒只能接触一个稀释度的菌液；

同一稀释度三个以上重复，取平均值；

每个平板上的菌落数目合适，便于准确计数；

一个菌落可能是多个细胞一起形成，所以在科研中一般用菌落形成单位（colony forming units, CFU）来表示，而不是直接表示为细胞数。

2、膜过滤培养法

当样品中菌数很低时，可以将一定体积的湖水、海水或饮用水等样品通过膜过滤器，然后将膜转到相应的培养基上进行培养，对形成的菌落进行统计。

二、测生长量法

微生物生长的测定可以测定细胞的生长量以及与生长量相平行的生理指标

（一）直接法

1. 重量法：干重，湿重（测定丝状真菌生长情况的有效方法）

2. 体积法：刻度离心管；

（二）间接法

1. 比浊法：在一定波长下，测定菌悬液的光密度，以光密度(optical density, 即 O.D.)表示菌量。

实验测量时应控制在菌浓度与光密度成正比的线性范围内，否则不准确。

2. 生理指标法

含氮量：粗蛋白含量=含氮量/16%=含氮量× 6.25；细胞总量=蛋白总量/65%（50%—80%）

DNA 含量：细胞总量=总 DNA/（8.4×10⁻⁵ng）

含碳量

产酸、产气量

呼吸强度、耗氧量、酶活性、生物热

样品中微生物数量多或生长旺盛，这些指标愈明显，因此可以借助特定的仪器如瓦勃氏呼吸仪、微量量热计等设备来测定相应的指标。（常用于对微生物的快速鉴定与检测）

第三节 影响微生物生长的主要因素

主要的环境理化因素：温度，水活度（或渗透压），氧气，pH，辐射

一、温度

温度是影响微生物生长的一个重要因素。

低温下，细胞膜处于凝固状态，不能进行正常的物质运输或形成质子梯度，因而生长不能进行。

温度升高时，细胞内的化学反应和酶反应以较快速率进行，生长速率加快。

当超过某一温度时，蛋白质、核酸和细胞其它成分发生不可逆的变性作用，导致微生物死亡。

1. 每种微生物都有 3 个基本温度（cardinal temperature）

最低生长温度：能生长的最低温度；

最适生长温度：生长速度最高的温度；

最高生长温度：能生长的最高温度；

最适生长温度 $\neq$ 最适发酵温度

2. 根据生长温度范围，可将微生物分为 4 类

1) 嗜冷微生物：最低生长温度在 0°C 或更低，最适生长温度 $\leq 15^{\circ}\text{C}$ ，最高生长温度 20°C 左右；(北极，海洋深处)

耐冷微生物：能够在 0°C 生长，但最适生长温度为 $20-40^{\circ}\text{C}$ 。在 0°C 生长慢(冷水，土壤，引起冰箱食物腐败的主要微生物类群)

嗜冷微生物在低温下能生长的原因：

所含的酶在低温下能有效地催化反应，而对较高的温度敏感；

原生质膜中含较多不饱和脂肪酸，使其在低温下仍可维持膜的半流动性；

2) 嗜温微生物(中温菌)：最适生长温度 $20-45^{\circ}\text{C}$ 。(大多数微生物，人类病原菌)

3) 嗜热微生物：最适生长温度 $50-65^{\circ}\text{C}$ 。(堆肥)

4) 嗜高热微生物：最适生长温度 80°C 以上，有的为 100°C 以上(都是古生菌，热泉、火山喷气口、海底火山喷气口)如：水生栖热菌(75°C 热泉)，Taq DNA 聚合酶(PCR 反应， 92°C 不失活)

微生物在高温环境下为何能生存呢？

它们的酶和其它蛋白质在高温时更稳定(分子中 1 个或多个部位被某些氨基酸所取代，能以特殊的方式折叠，抵抗温度的变性作用)

蛋白质的合成机构(核糖体和其它成分)及细胞质膜富含饱和脂肪酸，因而膜在高温下仍很稳定并发挥功能。

二、pH $\text{pH} = -\lg [\text{H}^+]$

pH 影响微生物的生长，因为①环境的 pH 会影响到细胞膜所带电荷，从而引起细胞对营养物质的吸收状况的改变；②通过改变培养基中有机化合物的离子化程度，而对细胞施加间接的影响(多数非离子状态化合物比离子状态化合物更容易渗入细胞)；③改变某些化合物分子进入细胞的状况，从而促进或抑制微生物的生长。

1. 微生物生长的 pH 值范围

每一种微生物，存在 pH 的 3 个基点：最低生长 pH，最适生长 pH，最高生长 pH，最适生长 pH $\neq$ 最适发酵 pH

根据微生物生长的 pH 范围，将其分为：

嗜酸菌(acidophile)：能在 pH 5.4 以下生长硫杆菌属，热原体属等一些古生菌

嗜中性菌(neutrophile)：生长的 pH 范围为 5.5-8.0。人类的大多数病原菌

嗜碱菌(alkalophile)：生长的 pH 范围在 8.5-11.5。存在于盐湖、高碳酸盐的土壤等

嗜酸或嗜碱微生物能够耐盐或耐碱，是由于细胞具有维持 pH 值接近中性的能力。

嗜酸微生物在酸性环境中，细胞可阻止 H^+ 进入胞内，并不断将胞内 H^+ 排出胞外

嗜碱或耐碱微生物，可阻止 Na^+ 进入胞内并将其不断排出胞外

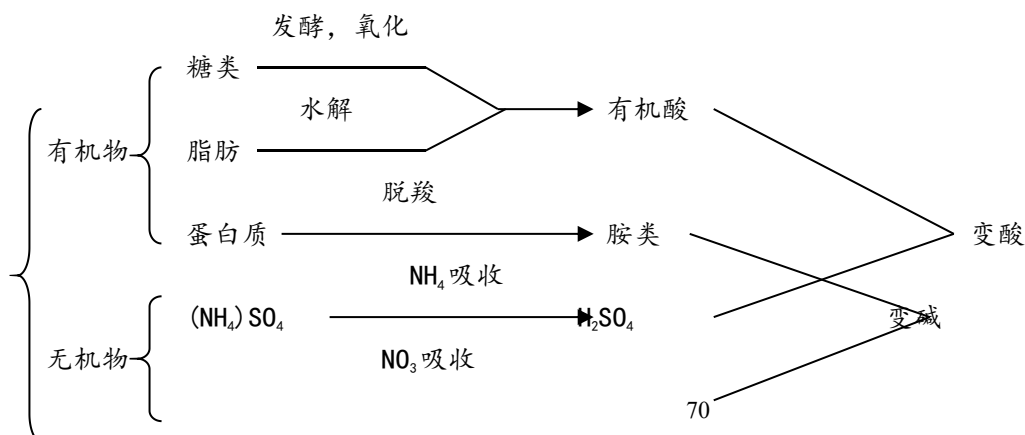
酸耐受性应答的机制

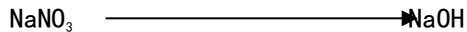
细菌可通过 K^+/H^+ 和 Na^+/H^+ 逆向运输系统，应付小幅度 pH 变化；

当 pH 降到 5.5-6.0 时，合成一系列新蛋白。质子转位 ATP 酶用于产生较多 ATP，或将质子泵出胞外；

当 pH 降到 4.5 或更低时，合成分子伴侣，如酸休克蛋白和热休克蛋白，以防止胞内其它蛋白的酸变性或帮助变性蛋白在折叠。

2. 培养基 pH 值变化的原因 (p172)





3. 微生物生长环境 pH 调节措施 (p173)

“治标”：外源直接流加酸、碱中和（直接，快速但不能持久）

“治本”：调节培养基中的碳氮比或改变通风量（缓慢，但较持久）

过酸 { 加适当氮源：尿素、 NaNO_3 、 NH_4OH 或蛋白质
提高通气量
过碱 { 加适当碳源：糖、乳酸、醋酸或油脂等
降低通气量

三、水活度（渗透压）

低渗环境：吸水膨胀；高渗环境：质壁分离

微生物如何适应低渗和高渗环境？

大多数细菌、藻类和真菌具有坚硬的细胞壁，可维持细胞的形状和完整性；

大多数原核生物在高渗环境中通过合成或吸收胆碱、甜菜碱、氨基酸（脯氨酸，谷氨酸等）、 K^+ ；而藻类和真菌利用蔗糖和多元醇（阿拉伯糖醇、甘油、甘露醇）来提高胞内渗透压。

水活度与渗透压呈负相关性，如果渗透压高， a_w 则低。

水活度 (a_w)：天然环境中微生物可实际利用的自由水的含量。

$a_w = P_w/P_{w0} = \text{ERH}/100$ （如果系统中相对湿度为 95%， a_w 就为 0.95）

不同微生物对低水活度环境的适应能力有很大差别。尽管少数微生物可耐受渗透压，大多数微生物只能在水活度接近 0.98 或更高的环境中生长。利用这一点，人们可将食品干燥或在高盐、高糖浓度条件下保存，以防止微生物污染（50~70%糖溶液；10~15%盐溶液）。

等重的物质，分子或离子越小，则质点数越多，产生的渗透压越大

四、氧气

根据微生物与氧的关系，可将微生物分为 2 大类，细分为 5 类：

好氧菌 (aerobe)：能在有氧条件下生长的微生物

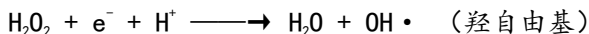
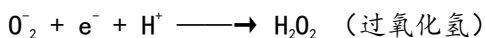
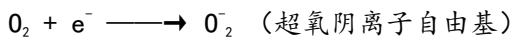
{ 专性好氧菌 (strict aerobe)：必须在有氧条件下生长。（绝大多数真菌，多数放线菌，部分细菌）
兼性厌氧菌 (facultative aerobe)：不需氧可生长，而在有氧条件下生长更好（酵母菌，许多细菌）
微好氧菌 (microaerophilic bacteria)：只能在较低的氧分压下生长。

厌氧菌 (anerobe)：能在无氧条件下生长的微生物

{ 耐氧菌：在有氧和无氧条件下生长状况相同
{ (专性) 厌氧菌：只能在无氧条件下生长，有氧时即被杀死

氧对微生物的毒害作用

由于在氧还原成水的过程中，可形成某些有毒的中间产物。



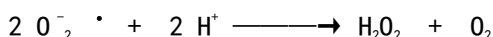
所形成的氧还原产物是强氧化剂，能迅速破坏细胞成分。

好氧微生物具有降解这些产物的酶，而专性厌氧微生物缺乏全部或部分这些酶。

1. 好氧菌

具有超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, 简称 SOD), 过氧化氢酶

SOD



过氧化氢酶

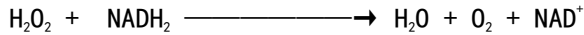


2 厌氧菌 (无过氧化氢酶)

1) 耐氧菌 (aerotolerant anaerobe) 如：乳酸菌

缺乏过氧化氢酶，但有 SOD 和过氧化物酶。

过氧化物酶



2) 厌氧菌 (anaerobe) 如: 梭菌属, 双歧杆菌属

既无 SOD, 也无过氧化氢酶。接触 O_2 , 即致死

两类微生物的培养方法

好氧菌: 振荡或通气搅拌

厌氧菌: 含还原剂 (巯基乙醇, 半胱氨酸, 庖肉等) 的培养基;

抽取培养系统的空气, 填充氮气和 CO_2 ;

厌氧罐 (利用 H_2 和钯催化剂, 使氧与 H_2 结合成水)

五、辐射

高能或短波辐射 (如 X-射线和 γ -射线) 使分子发生解离, 并破坏 DNA 或其它细胞组分。

紫外线 (UV) 辐射诱导胸腺嘧啶二聚体的形成, 并导致 DNA 发生断裂

可见光可为激活单线态氧的形成提供能量, 而单线态氧会对细胞造成损害。

六、表面张力
七、液体静压强
八、声能

} 自学

第四节 微生物的生长控制控制

控制 (有害) 微生物的生长速率或消灭不需要的微生物, 在实际应用中具有重要的意义。

抑制法: 生长停止, 但不死亡;

{ 防腐 (Antisepsis): 防止或抑制霉腐微生物在食品等物质上的生长
化疗 (Chemotherapy): 高度选择毒力的化学物质, 杀死或抑制宿主体内的病原微生物

杀灭法: 生长能力不可逆丧失;

{ 消毒 (Disinfection): 杀死或灭活病原微生物 (营养体细胞)
灭菌 (Sterilization): 杀死包括芽孢在内的所有微生物;

(参见 P178, 4 种措施, 名词概念)

防腐的措施: 低温; 缺氧; 干燥; 高渗; 高酸; 添加防腐剂

杀死或抑制微生物生长的方法:

物理方法: 加热; 低温; 干燥; 辐射; 过滤

化学方法: 消毒剂; 防腐剂; 化学治疗剂

理化因子抑菌还是杀菌作用的相关因素:

理化因子的强度或浓度; 同一浓度理化因子作用时间的长短; 不同种类的微生物; 同种微生物的不同生长时期;

一、物理因素对微生物生长的控制

(一) 温度 p180

当温度超过微生物生长的最高温度或低于生长的最低温度都会对微生物产生杀灭作用或抑制作用

加热引起的死亡率与时间呈指数函数关系 (即微生物以指数速率死亡)

(例如第 1 分钟后群体中有 20% 的细胞死亡, 第 2 分钟后将有剩余群体中的 20% 死亡, 即一定时间中微生物群体将有一定比例的细胞死亡)

微生物的死亡速率与起始菌体浓度无关, 而与加热温度有关。

温度越高, 菌体的死亡速率越高, 灭菌所需时间越短。

特定温度下使菌体浓度降低 10 倍所需的时间, 称为拾-存活时间 (D)。

D 与温度呈指数关系温度越高, D 越小。

D 值大小还随微生物的种类、生长时期、检测培养基的性质等因素有关。

高温的杀菌时间与样品中的微生物浓度有关。

当微生物的浓度一致时, 可以通过比较热致死时间长短来衡量不同微生物的热敏感性。

衡量温度灭菌效果的指标 p180

十倍致死时间 (decimal reduction time, D):

在特定温度下, 杀死某一样品中 90 % 微生物 (即微生物数量十倍减少) 所需的时间。

热致死时间 (thermal death time): 在一定温度下, 杀死悬液中所有微生物的最短时间。

热致死温度 (thermal death point): 在一定时间内 (一般为 10 分钟) 杀死悬液中微生物的最低温度。

1、干热灭菌 p181

烘箱内热空气灭菌: 140°C , 3h; 160°C , 2h; (适用于金属和玻璃器皿; 石蜡油和粉料物质)

火焰灼烧: 接种针、接种环和试管口

2、湿热灭菌: 湿热灭菌是利用热蒸汽灭菌

在相同的温度下, 湿热比干热灭菌更有效: p181

对细胞成分的破坏作用更强。水分子的存在有助于破坏维持蛋白质三维结构的氢键和其它弱键, 更易使蛋白质变性; 可以使细胞膜脂溶解; 破坏核酸结构;

热蒸汽穿透力强, 能更有效地杀灭微生物;

蒸汽存在潜热, 当气体转变为液体时可放出大量热量, 故可迅速提高被灭菌物品的温度;

湿热灭菌的条件: P181

多数细菌和真菌的营养细胞: 60°C 处理 5-10 分钟;

酵母菌和真菌的孢子: 80°C 以上处理;

细菌的芽孢: 121°C 处理 15 分钟以上;

常用的湿热灭菌方法:

(1) 巴斯德消毒法 (pasteurization) 温和加热处理法

适用于牛奶、啤酒和果酒等液态食品

可使食品中微生物数量下降 97%~99%, 并能杀死病原微生物 (营养体), 而不破坏食品的营养和风味;

低温维持 (LTH) 法: 63°C , 30min p 181

高温瞬时 (HTST) 法: 72°C , 15s

(2) 煮沸消毒法: 物品置水中, 加热到 100°C , 维持 15min 以上

(3) 间歇灭菌法 (fractional sterilization or tyndallization)

分段灭菌法, 适用于不耐热培养基 (如含硫培养基)。80~100 $^{\circ}\text{C}$ 下蒸煮 15~60min, 然后在 37°C 下保温过夜, 如此重复 2~3 次。

(4) 连续加压灭菌 (continuous autoclaving), “连消法”

使培养基在管道流动过程中快速升温、维持和冷却, 然后进入发酵罐能减少营养成分的破坏

135°C ~ 150°C , 5~15s, 工业发酵培养基

135°C ~ 150°C , 1~3s, 牛奶等液态食品 (超高温消毒法 (ultrahigh temperature, UHT))

(5) 常规高压蒸汽灭菌法 (autoclaving)

利用提高压力使水的沸点升高, 以提高水蒸气的温度, 根据有效地杀灭微生物。

该法是通过增加温度, 而不是压力来杀死微生物的。

通常使用高压蒸汽灭菌锅。

在 0.1MPa 压力下, 水蒸气温度达 121°C , 在此温度保持 15~30min, 能杀死所有微生物。

该法适用于各种耐热耐湿物品的灭菌, 如一般培养基、生理盐水等各种溶液、工作服及实验器材等。

使用高压蒸汽锅时, 要注意完全排除锅内的冷空气, 使之充满饱和水蒸气, 否则会因蒸汽中混有空气而比相应的纯水蒸气的温度低, 影响灭菌效果。

高温对培养基成分有害影响 p182

产生浑浊和沉淀; 有机物: 如多肽类沉淀;

无机物: 磷酸盐, 碳酸盐等;

破坏营养, 提高色泽 (褐变);

1) 发生糖氨反应 (迈拉德反应: 氨基与羰基反应)

羰基化合物 (糖) + 氨基化合物 $\longrightarrow$ 氨基糖 (褐色)

分解

2) 糖 $\longrightarrow$ 焦糖

pH 值的改变: 通常降低 pH 值

降低培养基浓度。气温低时会增加冷凝水

防止措施：

(1) 特殊加热灭菌法

分别灭菌（糖液；磷酸盐等）；低压灭菌（含糖类等的培养基 115°C，15 分）；间歇灭菌；

(2) 过滤除菌法

(3) 添加金属螯合剂 0.01% (EDTA) 或 0.01% (NTA, 氮川三乙酸)，防止金属离子沉淀

(二) 辐射作用 p183

辐射灭菌 (Radiation Sterilization) 是利用电磁辐射产生的电磁波杀死大多数物质上的微生物的一种有效方法。

用于灭菌的电磁波有微波，紫外线 (UV)、X-射线和 γ -射线等

1. 紫外线 (ultraviolet ray, UV) P 212, 实验书 p37, 170 (非电离辐射)

波长范围：100~400nm, 200~300nm 范围的紫外光杀菌作用最好 (260nm 杀菌力最强)

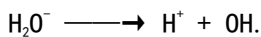
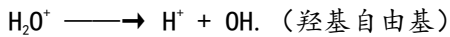
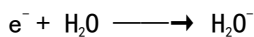
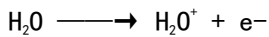
2. 电离辐射

主要使用 X-射线：0.06~0.136nm;

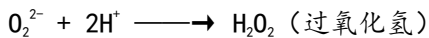
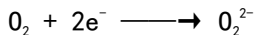
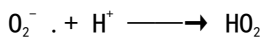
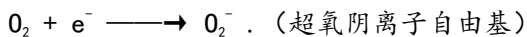
γ -射线：0.01~0.14nm;

电离辐射最重要的是对环境和细胞中水分子的作用

H₂O 分解为相关离子和自由基的变化如下：



上述离子常与氧分子作用，产生一些具有强氧化性的过氧化物和自由基：



这些过氧化物和自由基能破坏细胞内蛋白质、酶、核酸等生物大分子的结构（如使酶蛋白的-SH 基氧化，打断氢键，氧化双键，破坏环状结构或使某些分子聚合等方式），从而使细胞受到损伤或死亡。

主要用于其它方法不能的塑料制品、医疗设备、药品和食品的灭菌。（只能用于湿润的食品）

(三) 过滤除菌法 p183

多孔材料

(1) 空气过滤器（发酵工业）

介质：棉花、玻璃纤维、石棉、多层滤纸等。

(2) 液体过滤器（不耐热的液体成分，如含有酶或维生素的溶液、血清等）

滤膜过滤器（通常由硝酸纤维素制成）

烧结玻璃板过滤器；石棉板过滤器；素烧瓷过滤器；硅藻土过滤器

优点：不破坏营养成分和物质的化学性质

缺点：病毒除不掉 (0.22 μm 孔径的滤膜)

过滤除菌器的三种类型

(1) 深度滤器；(2) 膜滤器；(3) 核孔滤器

二、化学因素对微生物生长的控制 p183

抗微生物剂 (Antimicrobial agent)：生物合成的天然产物；人工合成的化合物

一类能够杀死微生物或抑制微生物生长的化学物质

化学物质的抗微生物能力的测定：

液体培养法：最低抑制浓度 (minimum inhibitory concentration (MIC)) 实验

平板培养法：抑菌圈 (zone of inhibition) 试验

随着微生物对药物敏感性增加，MIC 值减小而抑菌圈变大感染部位的药物浓度必须超过病原菌的 MIC 方有效。

对杀菌或抑菌作用无法区分

尿嘧啶)、胸腺嘧啶对抗物(5-溴胸腺嘧啶)等等

生长因子类似物指那些在结构上与微生物的生长因子相似但又有区别,它们不能够在菌体细胞内起者生长因子的同样作用,但却能够阻止微生物对生长因子的利用,因而可以抑制微生物的生长。

磺胺类药物:是最早发现,也是最常见的化学药剂,抗菌谱广,能治疗多种传染性疾病。

大多数革兰氏阳性细菌(如肺炎球菌、溶血性链球菌等)
某些革兰氏阴性细菌(如痢疾杆菌、脑膜炎球菌、流感杆菌等)
对放线菌也有一定的作用。

2. 作用机理 p186

磺胺是叶酸组成部分——对氨基苯甲酸的结构类似物

磺胺的抑菌作用是因为很多细菌不能利用外界提供的叶酸,需要利用对氨基苯甲酸合成生长所需的叶酸(叶酸是嘌呤和嘧啶合成必要的)。对氨基苯甲酸可由细菌自身合成,也可从生长介质中获得。而磺胺的存在则可与对氨基苯甲酸竞争性地与二氢叶酸合成酶结合,阻止叶酸的合成,因而抑制细菌的生长。

人类因为缺乏二氢叶酸合成酶,不能用外界提供的对氨基苯甲酸自行合成叶酸,只能从食物中获得叶酸。因而,对磺胺药物不敏感。

(三) 抗生素(Antibiotic) P187

1. 定义:一类由微生物或其他生物生命活动过程中合成的次级代谢产物或其人工衍生物,在很低浓度下就能抑制其它微生物的生长甚至杀死它们。

很多学者认为上述定义应有所发展:

抗生素产生者不仅是微生物,也包括其它生物;

抗生素的抑制对象超出微生物的界限,扩大到包括动物的肿瘤细胞、寄生虫、螨类等许多生物;

抗生素已不仅局限于生物合成所产生的抗生素,还包括用生物加上化学或生物化学方法合成的半合成抗生素;由某些生物合成或半合成的一类次级代谢产物或衍生物,它们在很低浓度时就能抑制或影响它种生物的生命活动,如杀死微生物或抑制其生长。

2、作用机制

抑制微生物的生长或杀死它们:抑制细菌细胞壁合成、破坏细胞质膜、作用于呼吸链以干扰氧化磷酸化、抑制蛋白质和核酸合成

(1) 抑制细胞壁合成(此类抗生素最有选择性) P187 表 7-6 自学

青霉素:青霉素 b-内酰胺环结构与 D-丙氨酸- D-丙氨酸末端结构相似,从而能占据 D-丙氨酸- D-丙氨酸的位置与转肽酶结合,肽链之间无法彼此连接,而导致渗透裂解

3. 抗菌谱 P187 自学

抗生素抑制或杀死微生物的能力可以从抗生素的抗菌谱和效价两方面来评价。

广谱抗生素: G⁺和 G⁻细菌、立克次氏体、衣原体

窄谱抗生素: G⁺细菌;

由于不同微生物之间的细胞化学结构和代谢的差异,不同的抗生素的抗菌谱各异。

4、细菌抗药性的产生 p190

抗性细菌的出现(a)抗生素的使用与分离自腹泻病人的细菌抗性菌株的比例。使用最多的抗生素出现抗性细菌的比例最多。(b)由抗性菌株造成的淋病发生百分率。

抗性机制 参见 P191

1) 缺乏某类药物作用的结构;如支原体无细胞壁,对青霉素不敏感;

2) 细胞质膜透性改变,使抗生素不进入细胞内;

3) 产生一种使药物失去活性的酶;如某些金黄色葡萄球菌耐药菌株产生 β -内酰胺酶,使青霉素分子中的 β -内酰胺环开裂而失去抑菌作用;

4) 药物的作用部位被修饰改变;如大肠杆菌耐药菌株的 30S 核糖体亚基发生改变,不再与链霉素结合;

5) 被药物阻断的代谢途径发生遗传改变;如有的抗磺胺药物的菌株,改变了二氢叶酸合成酶的性质,合成一种对磺胺不敏感的酶,该菌株即使在有磺胺存在的条件下,仍能大量合成叶酸而正常生长;

6) 将进入到胞内的药物泵出胞外;如抗性菌株可产生某种代谢途径将药物变成衍生物,该药物衍生物外渗速度比药物渗入速度大。

微生物的抗药性由染色体或质粒 DNA 编码的。由染色体编码的药物抗性是通过自发突变和自然选择产生。

避免出现细菌的耐药性的措施：

- (1) 第一次使用的药物剂量要足；
- (2) 避免在一个时期或长期多次使用同种抗生素；
- (3) 不同的抗生素(或与其他药物)混合使用；
- (4) 对现有抗生素进行改造；
- (5) 筛选新的更有效的抗生素；

本章重点

一、微生物的生长

1. 生长量的测定方法
2. 典型生长曲线(几个时期，特点，对数期 3 个参数的计算，指数期微生物的应用，如何缩短延滞期？稳定期为何到来？)
3. 了解同步培养的目的和方法。
4. 了解两类连续培养的装置和原理、用途。

二、环境因素对微生物的影响

1. 温度
2. 水活度和渗透压
3. 氧气(分类，酶，氧对厌氧菌毒害的机制)
4. pH(培养过程中培养基 pH 变化的原因及如何调节)
5. 辐射(紫外辐射，电离辐射)

三、有害微生物的控制

1. 灭菌、消毒、防腐、化疗的异同，并举例。
2. 常用的灭菌方法(巴氏消毒法，高压蒸汽灭菌法，紫外线的功能及用途)
3. 了解常用的消毒剂和防腐剂的种类及原理，石炭酸系数
4. 化学治疗剂——抗代谢药物，抗生素(定义，磺胺的作用原理，常用抗生素的作用机制)
5. 抗药性产生的机制

第八章 微生物遗传学

引言

1. 遗传与变异

遗传(inheritance): 亲代与子代相似

变异(variation): 亲代与子代、子代间不同个体不完全相同

遗传和变异是生命的最本质特性之一

遗传保证了微生物种的相对稳定性、种的存在和延续，而变异则推动了种的进化和发展。

2. 遗传型和表型

遗传型(genotype): 生物的全部遗传因子及基因(生物发育的可能性)

表型(phenotype): 具有一定遗传型的个体，在特定环境条件下通过生长发育所表现出来的形态等生物学特征的总和。(具体化)

表型是由遗传型所决定，但也和环境有关。

3. 变异与饰变

饰变(modification): 表型的差异只与环境有关。不涉及遗传物质结构改变而只发生在转录、转译水平上的表型改变。

特点: 暂时性、不可遗传性、表现为全部个体的行为

变异：（遗传型变异，基因突变）遗传物质改变，导致表型改变

特点：遗传性、群体中极少数个体的行为（自发突变频率通常为 10^{-6} – 10^{-9} ）

微生物是遗传学研究中的明星

微生物细胞结构简单，营养体一般为单倍体，方便建立纯系。

很多常见微生物都易于人工培养，快速、大量生长繁殖。

对环境因素的作用敏感，易于获得各类突变株，剪操作性强。

第一节 遗传变异的物质基础

一、3个经典实验（参见 P193）

1. 经典转化实验：证明 DNA 是遗传变异的物质基础。

2. 噬菌体感染实验

3. 植物病毒的重建实验：说明病毒蛋白质的特性为它的核酸所决定，而不是由蛋白质所决定。证明核酸（RNA）是遗传的物质基础

二、遗传物质在细胞内存在的部位和方式（周德庆 p192–197；自学）

（一）七个水平

细胞水平（单核，多核）

细胞核水平（真核，拟核）

染色体水平

核酸水平（DNA，部分病毒为 RNA；双链，少数病毒为单链）

基因水平（遗传功能单位）

密码子水平（遗传信息单位）

核苷酸水平（最低突变单位和交换单位）

基因（gene）：生物体内具有自主复制能力的遗传功能单位

第二节 质粒（P196）

质粒（plasmid）：一种独立于染色体外，能进行自主复制的细胞质遗传因子，主要存在于各种微生物细胞中。

附加体：指那些既可以整合到核染色体上，作为染色体的一部分而进行复制，又可以再游离出来或携带一些寄主的染色体基因游离出来，这类质粒被称为附加体。

1. 质粒的分子结构

（1）结构

通常以共价闭合环状（covalently closed circle，简称 CCC）的超螺旋双链 DNA 分子存在于细胞中；

也发现有线型双链 DNA 质粒和 RNA 质粒；

质粒分子的大小范围从 1kb 左右到 1000kb；（细菌质粒多在 10kb 以内）

2. 质粒的分离

碱提取法：

①菌体的培养和收集：一般采用丰富培养基对菌体进行培养，当细胞生长到指数期后期时，离心收集细胞。

②溶菌：一般用溶菌酶去壁以形成原生质体或原生质球。

③碱变性处理：在 SDS 等表面活性剂存在下加 NaOH 液使 pH 升至 12.4，可使菌体蛋白质、染色体 DNA 以及质粒 DNA 变性。

④质粒复性：加入 pH4.8 的 KAc-HAc 缓冲液，将提取液调至中性，由于质粒分子量小而容易复性，并稳定存在于溶液中；染色体 DNA 分子量太大，在复性过程中形成 DNA 之间的交联导致其形成更大分子的不溶性物质。

⑤离心分离：经高速离心可以使细胞碎片和已变性的菌体蛋白及染色体 DNA 一起沉淀，上清液中主要是质粒 DNA，经乙醇沉淀后，可获得质粒 DNA。

3. 质粒的检测（参见 P197）

提取所有胞内 DNA 后电泳观察；超速离心或琼脂糖凝胶电泳后观察；对于实验室常用菌，可用质粒所带的某些特点，如抗药性初步判断。

对于由于三种构型同时存在时造成的多带现象（提取质粒时造成或自然存在），可以进行特异性单酶切，使其成

为一条带。

4. 质粒的特性

位于核基因组外；cccDNA（链霉菌和酵母菌中发现了线状 dsDNA 质粒和 RNA 质粒）；自主复制；

有的质粒可整合到核染色体上；可重组（质粒与质粒间，质粒与染色体间）；

人为消除（丫叮类，UV，电离辐射，高于最适温度，利福平等）

有的质粒可在细胞间转移（F 因子，R 因子）；

质粒所含的基因对宿主细胞一般是非必需的；有时能赋予宿主细胞以特殊的机能，从而使宿主得到生长优势

5. 质粒的主要类型

质粒所编码的功能和赋予宿主的表型效应

致育因子（Fertility factor, F 因子）

抗性质粒（Resistance factor, R 因子）

产细菌素的质粒（Bacteriocin production plasmid）

毒性质粒（virulence plasmid）

代谢质粒（Metabolic plasmid）

隐秘质粒（cryptic plasmid）

2μm 质粒

（1）致育因子（Fertility factor, F 因子）（参见 P197）

又称 F 质粒，其大小约 100kb，这是最早发现的一种与大肠杆菌的有性生殖现象（接合作用）有关的质粒。

携带 F 质粒的菌株称为 F⁺菌株（相当于雄性），无 F 质粒的菌株称为 F⁻菌株（相当于雌性）。

F 因子能以游离状态（F⁺）和以与染色体相结合的状态（Hfr）存在于细胞中，所以又称之为附加体（episome）。

（2）抗性因子（Resistance factor, R 因子）（参见 P197）

包括抗药性和抗重金属两大类，简称 R 质粒。

抗性质粒在细菌间的传递是细菌产生抗药性的重要原因之一。

R100 质粒（89kb）可使宿主对下列药物及重金属具有抗性：汞（mercuric ion, mer）、四环素（tetracycline, tet）、链霉素（Streptomycin, Str）、磺胺（Sulfonamide, Su）、氯霉素（Chloramphenicol, Cm）、夫西地酸（fusidic acid, fus）负责这些抗性的基因是成簇地存在于抗性质粒上。

（3）Col 质粒：产细菌素的质粒（Bacteriocin production plasmid）

细菌素：许多细菌都能产生某些代谢产物，抑制或杀死其他近缘细菌或同种不同菌株，因为这些代谢产物是由质粒编码的蛋白质，不象抗生素那样具有很广的杀菌谱，所以称为细菌素（bacteriocin）。细菌素种类很多，都按其产生菌来命名，如大肠杆菌素、枯草杆菌素、乳酸菌素、根瘤菌素等。

细菌素结构基因、涉及细菌素运输及发挥作用（processing）的蛋白质的基因、赋予宿主对该细菌素具有“免疫力”的相关产物的基因，一般都位于质粒或转座子上，因此，细菌素可以杀死同种但不携带该质粒的菌株。

细菌素	抗生素
抑制或杀死，甚至同种不同株的细菌	较广的抗菌谱
通过核糖体直接合成的多肽类物质	一般是次级代谢产物
编码细菌素的结构基因及相关的基因一般位于质粒或转座子上	一般无直接的结构基因，相关酶的基因多在染色体上

细菌素一般根据产生菌的种类进行命名：

大肠杆菌（*E. coli*）产生的细菌素为 colicins（大肠杆菌素），而质粒被称为 Col 质粒。

大肠杆菌素是产自大肠杆菌的一种蛋白质，具有专一性地杀死其亲缘关系很近的、不具 Col 质粒的其它肠道细菌的功能。

由 G⁺细菌产生的细菌素或与细菌素类似的因子与 colicins 有所不同，但通常也是由质粒基因编码，有些甚至有商业价值，例如一种乳酸细菌产生的细菌素 NisinA 能强烈抑制某些 G⁺细菌的生长，而被用于食品工业的保藏。

（4）毒性质粒（virulence plasmid）

许多致病菌的致病性是由其所携带的质粒引起的，这些质粒具有编码毒素的基因，其产物对宿主（动物、植物）造成伤害。

产毒素大肠杆菌是引起人类和动物腹泻的主要病原菌之一，其中许多菌株含有为一种或多种肠毒素编码的质粒。

苏云金杆菌含有编码 δ 内毒素(伴孢晶体中)的质粒

根癌土壤杆菌所含 Ti 质粒是引起双子叶植物冠瘿瘤的致病因子

(5) 代谢质粒 (Metabolic plasmid)

质粒上携带有利于微生物生存的基因，如能降解某些基质的酶，进行共生固氮，或产生抗生素(某些放线菌)等。

降解质粒：将复杂的有机化合物降解成能被其作为碳源和能源利用的简单形式，环境保护方面具有重要的意义。

假单胞菌：具有降解一些有毒化合物

TOL 质粒：含分解甲苯的基因；

CAM-OCT 质粒：含分解樟脑辛烷的基因

(6) 隐秘质粒 (cryptic plasmid)

隐秘质粒不显示任何表型效应，它们的存在只有通过物理方法，例如用凝胶电泳检测细胞抽提液等方法才能发现。

在应用上，很多隐秘质粒被加以改造作为基因工程的载体(一般加上抗性基因)

(9) $2\mu\text{m}$ 质粒

大多数酵母菌含有一种称为 $2\mu\text{m}$ 的质粒

(1) 它们是闭环的双链 DNA 分子，周长约 $2\mu\text{m}$ (6318bp)，以高拷贝数存在于酵母细胞中，每个单倍体基因组含 60~100 个拷贝，约占酵母细胞总 DNA 的 30%。

(2) 含各约 600bp 长的一对反向重复顺序。

(3) 由于反向重复顺序之间的相互重组，使 $2\mu\text{m}$ 质粒在细胞内以两种异构体(A 和 B)形式存在。

(4) 该质粒只携带与复制和重组有关的 4 种蛋白质的基因，不赋予宿主体任何遗传表型，属隐蔽性质粒。

意义： $2\mu\text{m}$ 质粒是酵母菌中进行分子克隆和基因工程的重要载体，因此以它为基础构建的克隆和表达载体已得到广泛的应用。另一方面，该质粒也是研究真核基因调控和染色体复制的一个十分有用的模型

根据拷贝数或复制特点，质粒可分为：

高拷贝数(high copy number)质粒(每个细胞中可以有 $10^3\sim 10^5$ 个拷贝)如 ColE1、ColE2 等——松弛型质粒(relaxed plasmid)

低拷贝数(low copy number)质粒(每个细胞中只有 1~2 个拷贝)如 F 因子，R100——严谨型质粒(stringent plasmid)

窄宿主范围质粒(narrow host range plasmid)(只能在一种特定的宿主细胞中复制)

广宿主范围质粒(broad host range plasmid)(可以在许多种细菌中复制)

第三节 基因突变的规律及类型

一、基因突变 (gene mutation)(简称突变)

广义上，突变指细胞内遗传物质的分子结构或数量发生变化的现象。包括基因突变(又称点突变)和染色体畸变。

狭义的突变专指基因突变(点突变)

基因突变是重要的生物学现象，它是一切生物变化的根源，连同基因转移、重组一起提供了推动生物进化的遗传多变性。

二、基因突变的特点(规律)(参见 P199)

1. 特点：7 个

自发性：菌种衰退的根本原因

不对应性：突变的性状与突变的原因无关系

稀有性：自发突变几率低($10^{-6}\sim 10^{-10}$)

突变率：每一个细胞在每一世代中发生某一性状突变的几率。(某一单位群体在每一世代中产生突变株的数目)

独立性：某基因的突变率不受它种基因突变率的影响

可诱变性：自发突变的频率可因诱变剂的影响而提高($10^{-3}\sim 10^{-6}$)

稳定性：基因突变后的新性状是稳定的

可逆性：野生型菌株某一性状可发生正向突变，也可发生反向的回复突变

突变表型可以回复到野生型的 2 种可能：

真正的回复突变(突变体的核苷酸序列恢复到野生型的排列)；

抑制突变（另一基因的突变或同一基因内发生第二次突变，可克服第一次突变的作用）；

三、实验证据 P200 自学

三个经典实验：变量实验、涂布实验、影印实验

证明突变的性状与引起突变的原因间无直接对应关系！

四、基因突变的类型 p202

1. 按照发生突变的原因分类

自发突变：自然发生的突变，频率低（ 10^{-6} – 10^{-9} ）。它是生物进化的根源。

诱变：某些物理、化学因素对生物体的 DNA 进行直接作用，突变以较高的频率产生。

引起自发突变的原因主要有以下几方面：

- 背景辐射和环境因素引起；
- 有害代谢产物引起；
- 互变异构效应引起的碱基配对错误；
- DNA 复制过程中碱基配对错误；
- 转座因子的作用；

2. 按照突变对遗传物质的影响程度分类（突变的机制）：

3. 突变所引起的遗传信息的改变分为三种：p203

同义突变：表型不发生改变（密码子是简并的，如 CGU 变成 CGC，但都编码精氨酸）；

错义突变：改变的密码子编码的氨基酸改变了；

无意义突变：终止密码子（UAA, UAG, UGA）

DNA 损伤修复机制 $\longleftrightarrow$ 基因突变

前突可以通过 DNA 复制而成为真正的突变，也可以重新变为原来的结构，这取决于修复作用和其它多种因素。

4. 按照突变的表型分类：p202

营养缺陷型

抗性突变型

条件致死突变型

形态突变型

抗原突变型

产量突变型

选择性突变株（能在选择性培养基上或其它的选择性条件下迅速选出或鉴别出）

非选择性突变株

突变体的检出：采用有效的选择技术，即只允许突变体生长而野生型不能生长的培养条件，如回复突变、对环境压力的抗性突变、基质利用的突变等。

（1）营养缺陷型（auxotroph）（参见 P203）

一种缺乏合成其生存所必需的营养物（包括氨基酸、维生素、碱基等）的突变型，只有从周围环境或培养基中获得这些营养或其前体物（precursor）才能生长。

表型判断的标准：在基本培养基上能否生长

营养缺陷型是微生物遗传学研究中重要的选择标记和育种的重要手段

特点：在选择培养基（一般为基本培养基）上不生长→负选择标记

突变株不能通过选择平板直接获得

实验步骤见 P 215

营养缺陷型的表示方法：

基因型：所需营养物的前三个英文小写斜体字母表示：*hisC*（组氨酸缺陷型，其中的大写字母 C 同一表型中不同基因的突变）

表型：同上，但第一个字母大写，且不用斜体：HisC

在具体使用时多用 *hisC*⁻和 *hisC*⁺，分别表示缺陷型和野生型。

（2）抗药性突变型（resistant mutant）（参见 P203）

基因突变使菌株对某种或某几种药物，特别是抗生素，产生抗性。

特点：正选择标记（突变株可直接从抗性平板上获得——在加有相应抗生素的平板上，只有抗性突变能生长。所以很容易分离得到。）

表示方法：所抗药物的前三个小写斜体英文字母加上“r”表示 str^r 和 str^s 分别表示对链霉素的抗性和敏感性

(3) 条件致死突变型 (conditional lethal mutant) 203

在某一条件下具有致死效应，而在另一条件下没有致死效应的突变型。

常用的条件致死突变是**温度敏感突变**，用 ts (temperature sensitive) 表示，这类突变在高温下 (如 42°C) 是致死的，但可以在低温 (如 $25-30^\circ\text{C}$) 下得到这种突变。

特点：负选择标记

这类突变型常被用来分离生长繁殖必需的突变基因

(4) 形态突变型 (morphological mutant)

造成形态改变的突变型

特点：非选择性突变，突变株和野生型菌株均可生长，但可从形态特征上进行区分。

举例：产蛋白酶缺陷突变株的筛选；菌落颜色变化；形成芽孢缺陷菌株

(5) 抗原突变型

指由于基因突变引起的细胞抗原结构发生的变异类型，包括细胞壁缺陷变异、荚膜或鞭毛成分变异等。

(6) 产量突变型

通过基因突变而引起的目标代谢产物的产量发生变化的变异菌株，其在产量上高于或低于原始出发菌株。如果产量提高的突变株，被称为“正突变” (plus-mutant)，也称为“高产突变株” (high producing mutant)；如果产量低于出发菌株的突变株，则称为“负突变” (minus-mutant)。

(7) 其它突变类型

毒力、生产某种代谢产物的发酵能力的变化等在实际应用中具有重要意义突变类型一般都不具有很明显或可直接检测到的表型。其突变株的获得往往需要较大的工作量。

第四节 基因突变的机制

一、基因突变的分子基础

自发突变：自然发生的突变，频率低 ($10^{-6}-10^{-9}$)。它是生物进化的根源。

诱发突变：某些物理、化学因素对生物体的 DNA 进行直接作用，突变以较高的频率产生。

二、诱变剂及其诱变机制

诱变剂 (mutagen)：凡能提高基因突变频率的因素统称为诱变剂

诱变剂的种类：物理诱变剂；化学诱变剂

(一) 化学诱变剂及其诱变机制

从遗传物质结构变化的特点，将化学诱变剂分为：

引起碱基置换的诱变剂；移码突变诱变剂；引起染色体畸变的诱变剂；

从诱变剂本身的特点，将诱变剂分为：

碱基类似物诱变剂；与碱基起化学反应的诱变剂；嵌入诱变剂；辐射和热；生物诱变因子：转座因子

1. 引起碱基置换的诱变剂 p205

{	转换(主要)	{	直接
	颠换		间接

(1) 直接引起置换的诱变剂 (与碱基起化学反应，改变碱基的结构，导致错配)

亚硝酸： $G-C \longrightarrow A-T$ 转换互变

羟胺：只引起 $G-C \longrightarrow A-T$ 转换 (专一性与 C 起反应)

各种烷化剂： $G-C \longrightarrow A-T$ 互变

有些诱变剂的作用具有选择性，偏向与某些碱基作用，并产生特殊类型的损伤。

亚硝酸：对碱基的主要作用是氧化脱氨作用 (使氨基变为酮基，改变配对性质，引起碱基转换)。

(2) 间接引起置换的诱变剂 P204-205

一类与正常碱基结构相似的物质，称为碱基类似物。

它们在 DNA 复制中能掺入 DNA 分子中，由于其产生异构体的频率高，因此发生的错误配对可引起碱基的置换。

2. 移码突变的诱变剂—嵌入诱变剂 p203

3. 引起染色体畸变的诱变剂

烷化剂 } 拟辐射诱变剂
亚硝酸 }

4. 转座因子 (transposable element) “又称“跳跃基因” p206

位于染色体或质粒上的一段能改变自身位置的 DNA 序列。广泛分布于原核和真核细胞中。

特点：

转座因子可在 DNA 分子的许多位点插入及整合，不需要转座子和目标位点之间广泛的同源性。

转座因子不能自主复制和独立存在染色体外（有别于质粒）。没有像病毒那样的生命循环周期而不同于噬菌体。

典型转座是复制型转座，即转座子的一个拷贝插入靶 DNA，而转座子本身却留在染色体原来的位置。

根据分子结构和遗传性质，转座因子可分为 3 类：

插入序列 (Insertion sequence, IS)：只含转座基因，可编码特殊的酶和调节蛋白，而并不赋予细菌任何表型特征。但其插入可干扰基因的正常读码序列，导致基因失活或引起突变。

转座子 (Transposon, Tn)：除转座基因外，还有抗药性基因。能在同一细胞内从一个质粒移至另一个质粒，也能从质粒移到细胞染色体或前噬菌体上。分为复合转座子和复杂转座子

Mu 噬菌体：是以大肠杆菌为宿主的温和性噬菌体。与其它温和性噬菌体的差别：Mu 的基因组无论进入裂解周期或处于溶源状态均可整合到宿主染色体上，而且整合的部位是随机的，即它同时具有温和噬菌体和转座因子的双重功效。

转座的遗传学效应：

引起突变；染色体畸变；阻断翻译或转录；打开或关闭基因；帮助 F 因子插入，携带抗药性基因

质粒既可作为携带抗性基因的转座子的来源，也可以作为转座的靶。事实上，多重抗药性质粒很可能是由于转座子在单个质粒上的积累而形成的。因为转座子也可以在质粒和染色体之间移动，所以抗药性基因能够在质粒和染色体之间交换，导致抗药性的进一步传播。

5. 诱变及化学致癌物质的检测——Ames 试验 P208

很多种化学物质，能以各种机制导致 DNA 的突变

- a) 利用各种诱变剂获得各类遗传突变，进行诱变育种；
- b) 对有害微生物进行控制；
- c) 危害人类自身的健康

“生物化学统一性”法则：人和细菌在 DNA 的结构及特性方面是一致的，能使微生物发生突变的诱变剂必然也会作用于人的 DNA，使其发生突变，最后造成癌变或其他不良的后果。

诱变剂的共性原则：

化学药剂对细菌的诱变率与其对动物的致癌性成正比。

超过 95% 的致癌物质对微生物有诱变作用；90% 以上的非致癌物质对微生物没有诱变作用；

Ames 试验

具体操作：检测鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 组氨酸营养缺陷型菌株 (his-) 的回复突变率（为了进一步增加试验的敏感性，这些菌株的切除修复 DNA 的能力是缺陷的）。

回复突变 (reverse mutation 或 back mutation)：突变体失去的野生型性状，可以通过第二次突变得以恢复，这种第二次突变称为回复突变。

用途：广泛用于检测环境和食品中是否存在化学致癌物。

特点：快速、准确、费用廉价

(二) 物理诱变剂及其诱变机制

紫外线，x-射线， γ - 射线，快中子，超声波等

1. 紫外线 (UV) p205

(1) 诱变机制

大剂量导致菌体死亡，小剂量可引起突变。

嘧啶比嘌呤对 UV 的作用更敏感。

可在同一条链或两条链上形成胸腺嘧啶二聚体，前者是双链的解开和复制受阻，后者破坏腺嘌呤的正常掺入和碱基正常配对，从而导致突变的发生。

(2) 紫外线照射的操作方法

诱变箱，紫外灯（功率：15 W，照射距离：30 cm，波长：253.7 nm）

四、DNA 损伤的修复 p209 自学

第五节 微生物的诱变育种

一、诱变育种：指利用物理或化学诱变剂处理微生物群体细胞，促进其突变率显著提高，然后设法从中选取少数符合育种目的的突变株。

2 个主要环节：

诱变（随机）：选用合适的诱变剂和诱变剂量处理大量均匀、分散的微生物细胞，以引起绝大多数细胞致死的同

时，使存活个体中的突变频率大大提高。

筛选（定向）：设计有效的筛选方法，将少量正变株中的优良菌株挑选出来。

工业微生物育种过程分为三个阶段：

（1）菌种基因型改变；

（2）筛选菌种，确认并分离出具有目的基因型或表型的变异株；

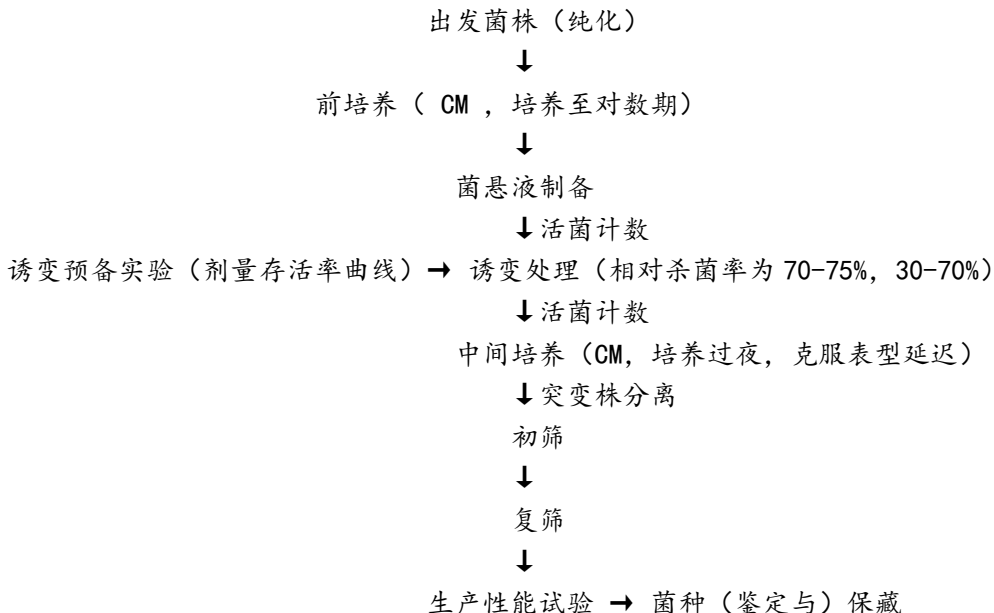
（3）产量评估，全面考察此变异株在工业化生产上的接受性。

诱变育种的目的：高产菌株；抗性突变株；营养缺陷型突变株

诱变育种的基本原则：p210-212

- 选择简便有效的诱变剂；
- 挑选优良的出发菌株；
- 处理单细胞或单孢子悬液；
- 选用最适的诱变剂量；
- 充分利用复合处理的协同效应；
- 利用和创造形态、生理与产量间的相关指标；
- 设计高效筛选方案；
- 创造新型筛选方法；

诱变育种的程序：实验讲义 p175



（一）出发菌株（original strain）p211

出发菌株指用于诱变育种的起始菌株。

出发菌株的选择标准：

- 具有有利性状（如高产、生长速度快、营养要求粗放、标记明显等）；
- 对诱变剂敏感

出发菌株的来源：

- 野生型菌株；

- 从生产中选育的自发突变菌株；
- 诱变获得的高产菌株（不一定是产量继续提高潜力最大的菌株）

（二）菌悬液的制备

1. 选用单细胞或单孢子悬液（均匀、分散）

目的：①使每个细胞能均匀接触诱变剂；

②减少表型延迟现象（诱变后性状的分离及退化现象）；

2. 同步培养（生理状态一致）

3. 菌龄：对诱变剂最敏感时期

{	营养细胞：对数期
	孢子或芽孢：萌发前期

4. 菌悬液的制备方法

{	物理诱变：生理盐水配制
	化学诱变：缓冲液配制

5. 菌悬液的浓度

{	酵母菌，霉菌的孢子： 10^6 个/mL
	细菌，放线菌孢子： 10^8 个/mL

（三）诱变剂的选择及处理方法

1. 诱变剂的选择（高效，简便）

物理诱变剂：频度低、大损伤，难修复，且操作简便；

化学诱变剂：频度高，点突变，易回复突变，操作麻烦。（NTG——超诱变剂）

UV 是最常用的一种诱变剂

（四）中间培养（CM，培养过夜）

目的：克服表型延迟（分离性延迟）。

对数生长期中，单核细胞常出现双核现象，多核细胞的核也成倍增加，人工诱变对数期的细胞时，突变通常发生在一个核上，故其变异或非变异的细胞必须经过一代或几代繁殖才能分离，这种纯种变异细胞出现的推迟现象称为分离延迟现象，这个培养过程称为中间培养。

表型延迟（phenotypic lag）：表型的改变落后于基因型改变的现象

分离性延迟：突变的基因经 DNA 复制和细胞分裂后变成纯合状态，表型才能表现出来。

生理性延迟：由杂合状态变为纯合状态，突变表型仍不能表现出来。如营养缺陷型

（五）突变株的筛选（初筛和复筛）

1. 初筛（以量为主）方法需简便、快速

（1）利用形态变异：需预先测定形态与产量的相关性

（2）根据平板颜色反应直接挑选

透明圈法（蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶）；

抑菌圈法（抗生素）；

变色圈法（柠檬酸）、显色圈（氨基酸）；

沉淀圈法（外毒素）

透明圈直径（H）/菌落直径（C）：产量高低（初筛指标）

2. 复筛（以质为主，定量测定）摇瓶培养法，直接检测所需产物

3. 营养缺陷型突变株的筛选

（1）几个概念：p213

三类培养基：

基本培养基（MM, minimal medium）[-]：某野生型能生长的最低成分的组合培养基。

完全培养基（CM, complete medium）[+]：各种营养缺陷型能生长的天然或半组合培养基

补充培养基（SM, supplemental medium）[A]：[-]+A 或 [B]：[-]+B 相应营养缺陷型能生长的组合或半组合培养基

3 种遗传型：

野生型（wild type）：从自然界分离到的、发生营养缺陷型突变前的原始菌株。[A+B+]，可在[-]生长。

营养缺陷型（auxotroph）：野生型菌株经诱变剂处理后，由于发生了丧失某酶合成能力的突变，因而只能在加有该酶合成产物的培养基中才能生长的突变菌株（主要指合成维生素、氨基酸及嘌呤、嘧啶的能力）。

[A+B-]：能在[+]、[B]生长

[A-B+]：能在[+]、[A]生长

[A-B-]：能在[+]生长

原养型 (prototroph)：营养缺陷型经回复突变或重组，回到原来野生型的营养要求。[A+B+]，可在[-]生长

(2) 筛选步骤 (5 步) P213—215

诱变处理→中间培养→淘汰野生型→检出缺陷型→鉴定缺陷型

①中间培养：CM 或 SM 培养基，培养过夜。克服表型延迟。

②淘汰野生型：即浓缩缺陷型，以提高检出率

方法 { 抗生素法 (G+细菌：青霉素；酵母菌和霉菌：制霉菌素)
 菌丝过滤法 (丝状真菌、放线菌)

青霉素法：饥饿培养 (无 N) MM

↓ 6—12 h

2N 培养 (2N) MM

↓ 1—2 h

加抗生素，培养过夜

③ 营养缺陷型的检出

方法：夹层培养法；限量补充培养法；逐个检出法；影印平板法

④ 营养缺陷型的鉴定

生长谱法：快速，直观

滤纸片法：a. 不含维生素的酪素水解液或氨基酸混合液或蛋白胨

b. 水溶性维生素混合液

c. 0.1%碱水解酵母核酸液

d. 酵母膏溶液

分两步：a. 三大类营养要求 (氨基酸、维生素、核苷酸) 的鉴定

b. 单一营养物质缺陷型的鉴定 (实验讲义 p180)

18 种氨基酸分为 6 组

特点：每组有一种独特物质，每 2 组有一种共同物质

(3) 营养缺陷型的用途

- 生产菌 (氨基酸、核苷酸、维生素等)；
- 研究代谢途径和杂交、转化等遗传规律的标记菌；
- 基因标记

4. 抗性突变株的筛选 p212

(1) 抗药性突变株

a. 高于临界浓度的平板进行分离；

b. 梯度平板法；

(2) 抗代谢药物的抗性突变株

用途：筛选相应代谢物的高产菌株

例：异烟肼 (“雷米封”) 是吡哆醇的结构类似物，利用含异烟肼梯度平板筛选异烟肼抗性突变株，可达到定向培育吡哆醇高产突变株的目的。

二、自发突变与育种

1. 从生产中选育

2. 定向培育优良品种

一般指用特定因素长期处理微生物群体，同时不断地对它们进行移种传代，以达到积累并选择相应的自发突变株的目的。例：卡介苗 (牛型结核分枝杆菌的减毒活菌苗)

第六节 原核生物的基因重组

基因重组 (gene recombination)：将两个不同性状个体的基因通过一定的方式转移到一起，并发生重新组合，

产生新的遗传性状的过程，称为基因重组 (gene recombination) 或遗传重组。

重组：遗传物质在分子水平上的杂交；

杂交：细胞水平上的杂交；

杂交必然包含着重组，但重组不仅限于杂交这一形式。

一、原核生物的基因重组 类型 p215

4 种形式：1) 转化 2) 转导 3) 接合 4) 原生质体融合

特点：1) 片段性 2) 单向性 3) 基因转移机制多样

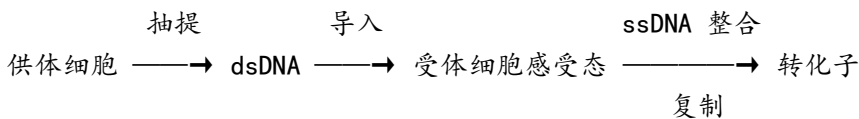
转化 (transformation)：游离 DNA 分子 + 感受态细胞

转导 (transduction)：由噬菌体介导

接合 (conjugation)：细胞与细胞的直接接触 (由 F 因子介导)

二、转化 (transformation) (参见 P216)

定义：受体细胞直接吸收供体细胞的 DNA 片段，并与其染色体同源片段进行遗传物质交换，从而使受体细胞获得新的遗传性状的现象。



经转化后出现了供体性状的受体细胞称为转化子 (transformant)，即转化成功的菌落。

$$\text{转化频率} = \frac{\text{每毫升菌液的转化子数}}{\text{每毫升菌液的细胞数}}$$

(一)、感受态：是指受体细胞最易接受外源 DNA 片段并能实现转化的一种生理状态。一个细菌能否出现感受态是由其遗传性决定的，但受环境条件的影响也很大，因而表现差别很大。

感受态细胞 (competent cell)：具有摄取外源 DNA 能力的细胞

- ┌ 自然遗传转化 (natural genetic transformation)
- └ 人工转化 (artificial transformation)

感受态因子：调节感受态的一类特异蛋白，它包括三种主要成分：膜相关 DNA 结合蛋白、细胞壁自溶素和几种核酸酶。

自然感受态的出现是细胞一定生长阶段的生理特性 (如肺炎链球菌的感受态出现在对数生长期) 受细菌自身的基因控制；

人工感受态则是通过人为诱导的方法，使细胞具有摄取 DNA 的能力，或人为地将 DNA 导入细胞内。(该过程与细菌自身的遗传控制无关！)

1、自然转化

进行自然转化，需要二方面必要的条件：建立了感受态的受体细胞；外源游离 DNA 分子

感受态的机理研究：

局部原生质体化假说：处于感受态的细胞局部失去了细胞壁，使外源 DNA 能顺利经膜进入菌体。

酶受体假说：受体细胞表面出现了一种能结合 DNA 并使之进入细胞的酶。

转化模型：

转化因子：本质是离体的 DNA 片断或质粒 DNA。转化因子进入细胞前还会被酶解成更小的片段，约 8kb。在不同的微生物中，转化因子的形式不同，dsDNA, ssDNA.

转化的频率通常为 0.1%~1%，最高为 20%。

有些细菌 (如肺炎链球菌) 生长到一定的阶段，分泌一种称为“感受态因子”的小分子蛋白。

感受态因子与细胞表面受体 (M) 相互作用，诱导一些感受态特异蛋白，如自溶素和一些核酸酶等表达。自溶素的表达使细胞表面的 DNA 结合蛋白及核酸酶裸露出来，使其具有与 DNA 结合并对其切割及部分降解的活性。

自然转化过程的特点：

- a) 对核酸酶敏感；
- b) 不需要活的 DNA 给体细胞；
- c) 转化是否成功及转化效率的高低主要取决于转化 (DNA) 给体菌株和转化受体菌株之间的亲缘关系；

d) 通常情况下质粒的自然转化效率要低得多；

提高质粒的自然转化效率的二种方法：

- 1) 使质粒形成多聚体，这样进入细胞后重新组合成有活性的质粒的几率大大提高；
- 2) 在质粒上插入受体菌染色体的部分片段，或将质粒转化进含有与该质粒具有同源区段的质粒的受体菌——重组获救

转染(transfection)：(参见 P218)

定义：噬菌体 DNA 被感受态细胞摄取并产生有活性的病毒颗粒。

特点：提纯的噬菌体 DNA 以转化的（而非感染）途径进入细胞并表达后产生完整的病毒颗粒。

现在把 DNA 转移至动物细胞的过程也称转染

2、人工转化（参见 P217）

在自然转化的基础上发展和建立的一项细菌基因重组手段，是基因工程的奠基石和基础技术。

不是由细菌自身的基因所控制；

用多种不同的技术处理受体细胞，使其人为地处于一种可以摄取外源 DNA 的“人工感受态”。

用 CaCl_2 处理细胞，PEG 介导、电穿孔、基因枪法等是常用的人工转化手段（使细胞膜更易于透过 DNA）。

质粒的转化效率高（不像线型 DNA 那样易于降解，而且还能在宿主中复制。任何来源的 DNA 将其连接到质粒上都能进入受体细胞）；

三、转导(transduction)（参见 P218）

由噬菌体介导的细菌细胞间进行遗传交换的一种方式：一个细胞的 DNA 通过病毒载体的感染转移到另一个细胞中由转导作用而获得供体细胞部分遗传性状的重组受体细胞称为转导子(transductant)

携带供体部分遗传物质（DNA 片段）的噬菌体称为转导噬菌体。

细菌转导的二种类型：普遍性转导；局限性转导

1、普遍性转导(generalized transduction)（参见 P219）

噬菌体可以转导给体染色体的任何部分到受体细胞中的转导过程

转导模型（参见 P219）

噬菌体的 DNA 包装酶也能识别染色体 DNA 上类似 pac 的位点并进行切割，以“headful”的包装机制包装进 P22 噬菌体外壳，形成只含宿主 DNA 的转导噬菌体颗粒（假噬菌体）。

因为染色体上的 pac 与 P22 DNA 的 pac 序列不完全相同，利用效率较低，这种“错装”机率一般仅约 10^{-6} – 10^{-8}

普遍性转导的基本要求：形成转导颗粒的噬菌体可以是温和的，也可以是烈性的，但必须具有能偶尔识别宿主 DNA 的包装机制，并在宿主基因组完全降解以前进行包装。

DNA 不能复制，因此群体中仅一个细胞含有 DNA，而其它细胞只能得到其基因产物，故在基本培养基上形成微小菌落。

特点：在选择培养基平板上形成微小菌落

普遍性转导(generalized transduction)

定义：通过完全缺陷噬菌体对供体基因组上的任何 DNA 片段进行“误包”，而将其遗传性状传递给受体细胞的现象。

媒介：普遍性转导噬菌体（完全缺陷噬菌体，“假噬菌体”）

依据转移到受体菌中的 DNA 片段能否整合，

普遍性转导分为：

- 完全普遍转导：能配对、交换和整合
- 流产普遍转导：不能，仅能表达性状

2. 局限转导(restricted transduction) p219

定义：通过部分缺陷的温和噬菌体把供体菌的少数特定基因携带到受体菌中，并与后者的基因组整合、重组，形成转导子的现象。

媒介：部分缺陷噬菌体（丢失自身一部分基因，并被同等长度的宿主基因所取代）只能转导个别特定基因

2、局限性转导(specialized transduction)

温和噬菌体感染→整合到细菌染色体的特定位点上宿主细胞发生溶源化

→溶源菌因诱导而发生裂解时，在前噬菌体二侧的少数宿主基因因偶尔发生的不正常切割而连在噬菌体 DNA 上

→部分缺陷的温和噬菌体→把供体菌的少数特定基因转移到受体菌中

诱导溶源性大肠杆菌而产生的细胞裂解产物中，除含有正常的噬菌体外，还有少数(10^{-6})转导噬菌体颗粒，因此，用诱导入溶源性菌株得来的噬菌体进行转导时的转导频率不过 10^{-6} ，称为低频转导(LFT)。

缺陷噬菌体可在宿主细胞内像正常的 λ DNA分子一样进行复制、包装，提供所需要的裂解功能，形成转导颗粒。但没有正常噬菌体的溶源性和增殖能力，感染受体细胞后，通过DNA整合进宿主染色体而形成稳定的转导子。

如果细菌染色体中整合有一个正常的 λ 噬菌体时，缺陷 λ 噬菌体也能整合到同一细菌染色体上(因为正常 λ 噬菌体整合后，产生两个细菌/噬菌体杂合att位点，缺陷 λ 噬菌体可以在该位点插入，补充了缺陷噬菌体中失去的基因)，在这种情况下，正常 λ 噬菌体称为辅助噬菌体，因为它帮助缺陷噬菌体整合和繁殖。但这些双重溶原菌是不稳定的，因为原噬菌体可在紫外辐射等因子的诱导下被切割下来，产生等量的缺陷噬菌体和正常噬菌体，该裂解物称为高频率转导裂解物，用这样的裂解物去感染细菌，将比低频率转导裂解物产生多得多的转导子。

普遍转导与局限转导的特性比较

	普遍转导	局限转导
转导的发生	自然发生	人工诱导(uv)
噬菌体形成	误包	前噬菌体的“误切”
内含DNA	只含宿主DNA	含噬菌体和宿主DNA
转导性状	供体的任何性状	前噬菌体两端邻近基因
转导过程	双交换(转导DNA替换受体DNA同源区)	转导DNA插入，使受体菌为部分二倍体

溶源转变(lysogenic conversion):

温和噬菌体感染细胞后使之发生溶源化，因噬菌体的基因整合到宿主染色体上，而使后者获得了新性状的现象。

溶源转变与转导的不同：a) 不携带任何供体菌的基因；b) 这种噬菌体是完整的，而不是缺陷的；

四、接合(conjugation)：通过细胞与细胞的直接接触而产生的遗传信息的转移和重组过程

1. 实验证据：细菌的多重营养缺陷型杂交实验

为了减少所培养的结果是回复突变的机会，采用了双重或三重营养缺陷型。该实验是建立在不大可能同时发生两种或三种回复突变的设想上的。

中间平板上长出的原养型菌落是两菌株之间发生了遗传交换和重组所致

2. 机制(大肠杆菌的接合机制)

接合作用是由一种被称为F因子的质粒介导

F因子的分子量通常为 5×10^7 ，上面有编码细菌产生性菌毛(sex pili)及控制接合过程进行的20多个基因。

含有F因子的细胞：“雄性”菌株(F+)，其细胞表面有性菌毛

不含F因子的细胞：“雌性”菌株(F-)，细胞表面没有性菌毛

F因子为附加体质粒，既可以脱离染色体在细胞内独立存在，也可通过存在于质粒和宿主染色体上的同源插入序列之间的重组而插入(整合)到染色体上。

F因子的四种细胞形式 (参见P224)

a) F-菌株，不含F因子，没有性菌毛，但可以通过接合作用接收F因子而变成雄性菌株(F+)；

b) F+菌株，F因子独立存在，细胞表面有性菌毛。

c) Hfr菌株，F因子插入到染色体DNA上，细胞表面有性菌毛。

d) F'菌株，Hfr菌株内的F因子因不正常切割而脱离染色体时，形成游离的但携带一小段染色体基因的F因子，特称为F'因子。细胞表面同样有性菌毛。

1) F+ × F- 杂交 → F+ (参见P 223)

2) Hfr × F- 杂交 → F- (参见P 223)

3) F' × F- 杂交 → F'

F' × F- 与 F+ × F- 的不同：给体的部分染色体基因随F'一起转入受体细胞

a) 与染色体发生重组；b) 继续存在于F'因子上，形成一种部分二倍体；

接合(conjugation)：细胞与细胞的直接接触(由F因子介导)

转导(transduction)：由噬菌体介导

自然遗传转化(natural genetic transformation)：游离DNA分子 + 感受态细胞

“接合” “转导” 及 “自然转化” 这三种在自然界中存在的细菌遗传重组过程各自的特点：

a) 外源 DNA 的来源及进入途径有差异；b) 决定因素也各有不同；

五、原生质体融合 (protoplast fusion) p224

1. 定义：通过人为的方法，使遗传性状不同的两个细胞的原生质体进行融合，以获得兼有双亲遗传性状的稳定重组子的过程。融合子 (fusant)

意义：打破了微生物的种界界限，可实现远缘菌株的基因重组。

可使遗传物质传递更为完整、获得更多基因重组的机会。

可与其他育种方法相结合，如把常规诱变和原生质体诱变所获得的优良性状，组合到一个单株中。

2. 操作过程：

两亲本菌株的选择和遗传标记的制作 (选择不同的营养缺陷型，对药物抗性差异)

(A: [a+b-], B: [a-b+])



原生质体的制备 (高渗条件)



原生质体再生 (测定再生率)



融合 (PEG、离心沉淀、电脉冲等)



融合子的检出 (直接检出法和间接检出法)



实用性菌株的筛选

六、微生物的基因组结构

1. 基因组 (genome): 指存在于细胞或病毒中的所有基因。(一个物种的单倍体的所有染色体及其所包含的遗传信息的总称)

原核生物，多为单倍体 (在一般情况下只有一条染色体)

真核微生物，通常为双倍体 (多条染色体，啤酒酵母有 16 条染色体。)

2. 微生物与人类基因组计划

人类基因组计划 (Human Genome Project)

1985 年提出；1990 年正式开始实施；2001 年 2 月，测序工作完成；

被选择进行全基因组测序的微生物：

(1) 人类基因组计划中的模式生物

a) 从技术上从低等入手，建立技术、积累经验。

通过对基因组结构相对简单生物，特别是微生物基因组的测序，对大规模测序的策略及技术进行检验，积累经验；

b) 理论上利用基因组在进化上的连续性进行比较研究

通过对不同进化程度的基因组的分析、比较揭示更多的基本生物学信息。通过研究较为简单的基因组而解答复杂的人类基因组问题，

(2) 与人类生活关系密切的微生物：重要的致病菌及一些工业生产菌

(3) 对阐明生物学基本问题有价值的微生物

一些古生菌：如 *Methanococcus jannaschii* (詹氏甲烷球菌) 等，它们是微生物世界多样性的代表，它们的序列比较有助于找出其进化关系。

3. 微生物基因组结构的特点

3.1 原核生物 (细菌、古生菌) 基因组

(1) 染色体为双链环状的 DNA 分子 (单倍体)；例外：布氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 的染色体是线状的链环状的染色体在细胞中以紧密缠绕成的较致密的不规则小体形式存在于细胞中，该小体称为拟核 (nucleoid)，其上结合有类组蛋白蛋白质和少量 RNA 分子，使其压缩成一种手脚架形的致密结构。

(2) 基因组上遗传信息具有连续性；

(3) 功能相关的结构基因组成操纵子结构；

(4) 结构基因的单拷贝及 rRNA 基因的多拷贝；

(5) 基因组的重复序列少而短；

操纵子 (operon): p195 功能相关的几个基因前后相连，再加上一个共同的调节基因和一组共同的控制位点 (启动子、操纵基因等) 在基因转录时协同动作。

3.2 真核微生物 (啤酒酵母) 的基因组

(1) 典型的真核染色体结构；

啤酒酵母基因组大小为 $13.5 \times 10^6 \text{bp}$ ，分布在 16 条染色体中。

(2) 没有明显的操纵子结构；

(3) 有间隔区 (即非编码区) 和内含子序列；

内含子 (intron): 真核细胞基因 DNA 中的间插序列，这些序列被转录成 RNA，但随即被剪除而不翻译。

外显子 (exon): 真核细胞基因 DNA 中的编码序列，这些序列可被转录为 RNA 并进而翻译为蛋白质。

(4) 重复序列多；

第七节 真核微生物的基因重组

4 种方式: (1) 有性杂交 (2) 准性杂交 (3) 原生质体融合 (4) 转化

一、有性杂交 (sexual hybridization) p226

1. 定义: 不同遗传型两性细胞间发生的接合和随之进行的染色体重组，进而产生新遗传型后代的一种育种技术。凡能产有性孢子的酵母菌、霉菌和蕈菌，原则上都能应用与高等动、植物杂交育种相似的有性杂交方法进行育种。

2. 酵母菌的接合型遗传 p226

单倍体可以是 α 或 a 两种接合型的其中之一，一个单倍体酵母细胞是 α 型还是 a 型是由其本身的遗传特性所决定的，是一种稳定的遗传特征。

一种接合型的单倍体细胞有时会发生转变，即由 α 型变成 a 型或再回到 α 型

3. 酿酒酵母的有性杂交育种程序: p226

两亲本菌株的选择



单倍体细胞的分离



单倍体细胞遗传标记的制作



杂交



杂合子的检出



优良性状个体的筛选

二、准性杂交/生殖 (parasexual hybridization/reproduction) p227

1. 定义: 同种生物两个不同菌株的体细胞 (即带有不同遗传性状的两个单倍体细胞或菌丝) 经融合后，不经减数分裂而导致低频率基因重组并产生重组子的生殖方式。

准性生殖是丝状真菌，特别是不产生有性孢子的丝状真菌 (半知菌亚门的真菌) 特有的遗传现象。

2. 过程: 4 步

1) 菌丝联结；

2) 异核体的形成；(同时具有一个以上不同遗传型细胞核的细胞)

3) 核融合和杂合二倍体的形成；(细胞核中含有 2 个不同来源染色体组的菌体细胞。发生机会为百万分之一。)

4) 单倍体化 (杂合二倍体极不稳定，在其有丝分裂过程中，有极少数细胞，其同源染色体的两条染色单体之间发生交换，在体细胞分裂时，产生 1 个或 1 个以上标记的纯合现象，从而形成新性状的单倍体杂合子。其单元化不是一次有丝分裂的结果，而要经过若干次有丝分裂过程，每次分裂都有可能从二倍体核中失去部分染色体，最后才回复成单倍体核。)

3. 有性生殖与准性生殖的比较 (见周德庆 p235 表 7-12)

三、酵母菌的线粒体遗传 p228

功能：细胞呼吸作用的场所，为生命活动提供 ATP。真核生物的“动力车间”。

线粒体内含 1 个 DNA 片段（核外遗传系统，为线粒体行使功能所需的 rRNA、tRNA 及某些酶如细胞色素、ATP 合成酶编码），是一种细胞质遗传，也称非孟德尔遗传。

酵母菌中典型的细胞质遗传现象是小菌落突变型的遗传：在培养的酵母群体中，常有 1%~2% 的细胞自发出现小菌落表型

“小菌落”（呼吸缺陷型菌落）：酵母菌由于线粒体 DNA 严重缺损或大部分丢失，缺失细胞色素 a、b 及细胞色素 c 氧化酶，即使在通气条件下，细胞生长也很缓慢，在葡萄糖培养基上只能形成小菌落。

小菌落突变株的三种类型：

野生型 mtDNA： $(\rho+)$ ；

中性小菌落(neutral petite) $(\rho 0)$ ：mtDNA 全部丧失

抑制性小菌落(suppressive petite) $(\rho-)$ ：mtDNA 部分缺失突变

分离型小菌落(segregational petite)：染色体基因突变

鉴别方法：

中性小菌落 $(\rho 0)$ ： $\rho+ \times \rho 0$ ：野生型：小菌落=4:0

抑制性小菌落 $(\rho-)$ ： $\rho+ \times \rho-$ ：野生型：小菌落=0:4

分离型小菌落：野生型：小菌落=2:2

第八节 菌种的衰退、复壮和保藏（参见 P228）

性状稳定的菌种是微生物学工作最重要的基本要求，否则生产或科研都无法正常进行。

影响微生物菌种稳定性的因素：a) 变异；b) 污染；c) 死亡；

一、菌种的衰退(degeneration) p228

1. 衰退的表现

- 1) 原有形态形状变得不典型；2) 生长速度变慢；3) 代谢产物生产能力下降；
- 4) 致病菌对宿主侵袭力下降；5) 对外界不良环境的抵抗力下降。

2. 衰退的原因

- 1) 根本原因在于基因自发突变；
- 2) 传代次数的影响，使负突变株的比例逐渐占了优势；
- 3) 与培养条件有关。

衰退是发生在微生物细胞群体中的一个由量变到质变的逐步演变的过程。

二、衰退的防止与复壮

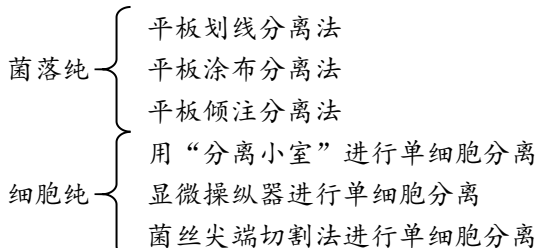
（一）防止衰退的措施 p228

1. 减少传代次数；2. 创造良好的培养条件；3. 利用不易衰退的细胞传代；4. 采用有效的菌种保藏方法；

（二）菌种的复壮(rejuvenation)

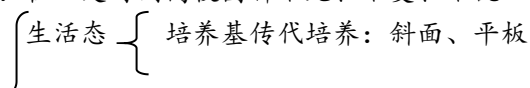
1. 从衰退的菌种群体中把少数个体再找出来，重新获得具有原有典型性状的菌种(狭义复壮，消极措施)。
a) 纯种分离；b) 通过寄主体进行复壮；
2. 有意识地利用微生物会发生自发突变的特性，在日常的菌种维护工作中不断筛选“正变”个体(广义复壮，积极措施)。

纯种的分离方法



三、菌种保藏

基本要求：在一定时间内使菌种不死、不变、不乱



寄主传代培养

基本方法：休眠态 { 冷冻：液氮、低温冰箱
干燥：沙土管、冷冻真空干燥

1. 原理：人为地创造有利于微生物长期休眠的条件，主要是低温、干燥、缺氧。

2. 保藏方法：7种常用方法 (p244 表 7-13)

(1) 斜面冰箱保藏法 (2) 半固体冰箱保藏法 (3) 石蜡油封藏法 (4) 甘油悬液保藏法
(5) 沙土管保藏法 (6) 冷冻干燥保藏法 (7) 液氮保藏法

ATCC 采用的菌种保藏法：(American Type Culture Collection, 美国典型菌种保藏中心)

冷冻干燥保藏法；液氮保藏法

CCCM 采用的菌种保藏法：

(China Committee for Culture Collections of Microorganism, 中国微生物菌种保藏委员会)

斜面传代法；冷冻干燥保藏法；液氮保藏法

由于微生物的多样性，不同的微生物往往对不同的保藏方法有不同的适应性，迄今为止尚没有一种方法能被证明对所有的微生物均适宜。因此，在具体选择保藏方法时必须对被保藏菌株的特性、保藏物的使用特点及现有条件等进行综合考虑。对于一些比较重要的微生物菌株，则要尽可能多的采用各种不同的手段进行保藏，以免因某种方法的失败而导致菌种的丧失。

本章重点

一、了解证明核酸是遗传变异物质基础的 3 个经典实验

比较：基因型与表型，变异与饰变

质粒的概念，特点及主要类型。

二、基因突变和诱变育种

1. 基因突变的类型

2. 基因突变的规律

3. 了解常用诱变剂及其诱变机制

4. 艾姆氏法检测致癌剂的理论依据、方法和优点

5. 了解诱变育种的主要环节及常用的初筛方法；掌握 UV 诱变育种的操作程序及注意事项。

6. 筛选营养缺陷型突变株的主要步骤和方法，淘汰野生型的方法

7. 抗生素高产突变株及抗性突变株的筛选方法。

8. 名词：营养缺陷型，野生型，原养型，基本培养基，完全培养基，补充培养基，点突变，转换，颠换，移码突变，染色体畸变，光复活作用

三、基因重组与杂交育种

1. 了解原核生物和真核微生物基因重组的方式。

名词概念：转化，转染，转导，普遍转导，局限转导，低频转导，高频转导，双重溶源菌，接合，性导，Hfr 菌株，溶源转变。

比较：转化与转染，转导与性导，转导与溶源转变，普遍转导与局限转导，LFT 与 HFT，
有性生殖与准性生殖，转化、转导、接合和原生质体融合

2. E. coli F⁺、F⁻、Hfr 和 F' 菌株的异同及相互间关系。

3. 原生质体融合的基本操作及优点。

4. 酿酒酵母有性杂交的育种程序。

四、基因工程

名词，基本操作

五、菌种的衰退、复壮与保藏

1. 菌种衰退的表现、原因与防止措施。

2. 菌种保藏的原理与常用的保藏方法。ATCC 和 CCCM 采用的菌种保藏法。

