

## 周德庆微生物学笔记

### 第一节：微生物学的研究对象与任务

#### 一、“微生物”的含义（什么是微生物）

非分类学上名词，来自法语“Microbe”一词。

是形体微小、单细胞或个体结构简单的多细胞、甚或无细胞结构的低等生物的通称。（插入）

#### 二、生物分界（微生物在生物界的位置）

##### 1、两界系统（亚里斯多德）

动物界 Animalia：不具细胞壁，可运动，不行光合作用。

植物界 Plantae：具有细胞壁，不运动，可行光合作用。

三界：原生生物界 Protista：（E. H. Haeckel, 1866 年提出）

##### 2、五界系统

R. H. Whitaker, Science, 163: 150-160, 1969

原核生物界 Monera：细菌、放线菌等

原生生物界 Protista：藻类、原生动物、粘菌等

真菌界 Fungi：酵母、霉菌

动物界 Animalia：

植物界 Plantae：

五界系统是以细胞结构分化的等级以及和光合、吸收、摄食这三种主要营养方式有关的组织类型为基础的。

六界：加上病毒界。

##### 3、三界（域）系统

Woese 用寡核苷酸序列编目分析法对 60 多株细菌的 16SrRNA 序列进行比较后，惊奇地发现：产甲烷细菌完全没有作为细菌特征的那些序列，于是提出了生命的第三种形式——古细菌 (archaebacteria)。随后他又对包括某些真核生物在内的大量菌株进行了 16Sr

RNA (18SrRNA) 序列的分析比较，又发现极端嗜盐菌和极端嗜酸嗜热菌也和产甲烷细菌一样，

具有既不同其他细菌也不同于其核生物的序列特征，而它们之间则具有许多共同的序列特征。

于是提出将生物分成为三界 (Kingdom) (后来改称三个域)：古细菌、真细菌 (Eubacteria) 和真核生物 (Eukaryotes)。1990 年，他为了避免把古细菌也看作是细菌的一类

，他又把三界 (域) 改称为：Bacteria (细菌)、Archaea (古生菌) 和 Eukarya (真核生物)。并构建了三界 (域) 生物的系统树。

#### 四、微生物特点

生命基本特征：

生命通过它的持久性、适应性、它的生长及修复的能力和它的繁殖而延续下去，这是生命的基本的和普遍的特征。

新陈代谢，包括外部的和内部的，是一切生命的另一基本特征。

控制与调节，是生命的又一基本特征。

体积小、比表面积大

大小以  $\mu\text{m}$  计，但比表面积（表面积/体积）大，（插入表），必然有一个巨大的营养吸收，代谢废物排泄和环境信息接受面。

这一特点也是微生物与一切大型生物相区别的关键所在。

特点 1 举例

乳酸杆菌：120, 000

鸡蛋：1.5

人 (200 磅): 0.3

2、吸收多、转化快

这一特性为高速生长繁殖和产生大量代谢物提供了充分的物质基础。

特点 2 举例

重量相同下: 乳酸菌: 1 小时可分解其体 重 1000 至 10000 倍乳糖。

人:  $2.5 \times 10^5$  小时消耗自身体重 1000 倍乳糖。

3、生长旺、繁殖快

极高生长繁殖速度, 如 E. coli 20-30 分钟分裂一次, 若不停分裂, 48 小时  $2.2 \times 10^{43}$  菌数增加, 营养消耗, 代谢积累, 限制生长速度。

这一特性可在短时间内把大量基质转化为有用产品, 缩短科研周期。

也有不利一面, 如疾病、粮食霉变。

4、适应强、易变异

极其灵活适应性, 对极端环境具有惊人的适应力。遗传物质易变异。

5、分布广、种类多

分布区域广, 分布环境广。

生理代谢类型多, 代谢产物种类多, 种数多。

五、微生物作用

1、在自然界物质循环中作用

2、空气与水净化, 污水处理

3、工农业生产: 菌体, 代谢产物, 代谢活动

4、对生命科学的贡献

六、分支学科

根据不同研究领域和不同研究对象划分

第二节、微生物学发展简史

“科学的历史就是科学本身。”——歌德

中国古代

酒文化, “仪狄作酒, 禹饮而甘之。”《书经》“若作酒醴, 尔惟曲蘖(nie)”《齐民要术》提倡轮作制。宋真宗时代(公元 998-1022)

二、国外微生物学发展

1、微生物的发现——形态学时期

Antony Van Leeuwenhock, 1632-1723

第一个报告自己观察的人。他观察了几乎每一个想看到的东西, 雨水、污水、血液、体液、酒、醋、牙垢等, 发现了微生物, 称为“微动物”。

2、微生物学的奠基——生理学时期

Louis Pasteur, 1822-1895

他的一生给人类生活带来了史无前例的影响。

(1) 证实了微生物活动和否定了微生物自然发生学说。

(2) 免疫学——预防种痘

(3) 发酵的研究

(4) 其他贡献

否定自生说

关于自然发生的争论:

自然发生说(无生源说): 认为微小动物是从无生命的物质自然发生的。

生源说：认为微小动物是从微小动物的“种子”或“胚”形成的，“种子”或“胚”存在于空气中。

已进行的实验：1665 年，Francesco Redi 腐肉生蛆实验，否定了动物自生说。

Spallanzani 实验，充分加热的有机汁液中长出微生物原因是由于空气将微生物带进了汁液，因而采取完全密封隔绝的封闭法。

18 世纪末发现  $O_2$ ，意识到  $O_2$  是动物生活必需一种气体。

Pasteur 实验

1、首先验证了空气中确实含有显微镜可观察到的“有机体”。

2、加热过的空气通入汁液（煮沸过）并不导致微生物生长。

3、在一封闭容器内，对完全灭菌的汁液加上一些收集到的微生物，无例外地引起微生物生长。

4、设计鹅颈瓶进行实验，最终否定自生说。

免疫学贡献

Edward Jenner, 1796 发明种痘，不了解机制。

Pasteur 1877 研究了鸡霍乱、炭疽病和恐水病，发现钝化病原体可以诱发免疫性和预防疾病。

发酵研究

相信一切发酵作用都和微生物的存在及繁殖有关。不同的发酵是由不同的微生物引起的。

发明巴斯德消毒法。

观察丁酸发酵时，发现厌氧生命，提出好氧、厌氧术语。

Robert Koch 1843-1910

1、建立微生物学研究基本技术

(1) 分离和纯化细菌：划线法，混合倒平板法。琼脂、培养皿 (Petri)

(2) 设计了培养细菌用的肉汁胨培养液和营养琼脂培养基。

(3) 设计了细菌染色技术

2、证实疾病的病原菌学说，提出了柯赫准则。

柯赫准则

1、某一种微生物，当被怀疑是病原体时，它一定伴随着病害而存在。

2、必须能自原寄主分离出这种微生物，并培养成为纯培养。

3、用已纯化的纯培养微生物，人工接种寄主，必须能诱发与原来病害相同病害。

4、必须自人工接种发病的寄主内，能重新分离出同一病原微生物并培养成纯培养。

其他人

Serge Winogradsky, 1856-1953, 发现微生物的自养生活。

Beijerinck M. W., 1851-1931, 发现了非共生固氮菌。

Joseph Lister, 1864, 提出无菌外科操作技术。

Elie Metchnikoff 发现白细胞的吞噬作用。

Ivanovsky 发现烟草花叶病毒。

P. Ehrlich 现代化疗的开始

3、现代微生物学发展-分子生物学阶段

1、现代发酵工业的形成：1941, Florey & Chain

将青霉素投入生产，是通气培养微生物的开端，将微生物学与工程学结合。

2、微生物代谢作用研究；

1944, Avery 肺炎球菌转化实验，确定 DNA 是遗传物质，标志着分子生物学的形成。

1953, Watson & Crick 提出 DNA 双螺旋结构以及半保留复制假说。

3、分子生物学阶段

20 世纪 70 年代，基因工程的发展，工程菌的构建更促进了微生物学的发展。

微生物学推动生命科学的发展促进许多重大理论问题的突破对生命科学研究技术的贡献与“人类基因组计划”展望

### 3 节：工业微生物简介

#### 1、酿酒工业

白酒：四大名酒，五大香型

啤酒、黄酒、葡萄酒（威士忌、白兰地、伏特加、朗姆、金酒）

#### 2、酒精工业

#### 3、溶剂工业（丙酮、丁醇）

#### 4、有机酸工业：乳酸、柠檬酸、衣康酸、延胡索酸、琥珀酸、苹果酸、酒石酸等。

#### 5、抗生素工业

#### 6、酶制剂工业

#### 7、氨基酸工业

#### 8、酵母工业

#### 9、多糖工业：黄原胶、右旋糖苷、等等

#### 10、石油发酵

#### 11、生物活性物质：核酸类、维生素等

#### 12、其它：微生物农药、沼气发酵、生物制品（菌苗、疫苗）

### 4 节：微生物分类 Microbial taxonomy

分类主要是探索生物之间的亲缘关系，把它们归纳为互相联系的不同类群。

具体任务就是分类、鉴定和命名。

#### 一、分类单位与命名

##### （一）分类单位：

界, 门, 纲, 目, 科, 属, 种

种是最基本的分类单位, 它是一大群表型特征高度相似, 亲缘关系极其相近, 与同属内其它种有着明显差异的菌株的总称。

种以下又分亚种(变种), 型, 类群, 菌株(品系)

菌株(品系)(strain): 表示任何由一个独立分离的单细胞繁殖成的纯种群体及其一切后代。

##### （二）命名

命名按照《国际细菌命名法规》, 采用林奈氏双名法。

属名 + 种名 + 命名人

如大肠杆菌: *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers 1919

属名: 名词, 大写首字母, 一般描绘主要形态或生理特征。

种名: 形容词, 小写, 代表一个种次要特征。

未确定种名或不指特定的种时, 可在属名后加 sp. 表示。

举例

真菌界 Fungi

真菌门 Eumycophyta

子囊菌纲 Ascomycetes

原子囊亚纲 Protoascomycetes

内孢霉目 Endomycetales

内孢霉科 Endomycetaceae

酵母亚科 Sacchromycetoideae

酵母属 Sacchromyces

酿酒酵母 *S. cerevisiae* Hansen

## 二、分类依据

### 1、形态特征（个体和群体）

细胞形态：形状、大小、排列、染色反应等。

培养：固体—菌落，半固体—穿刺，液体。

### 2、生理生化反应

营养要求：碳源、氮源、营养类型

代谢产物：种类、产量、显色反应

酶：产酶种类、反应特性

### 3、生态学特征

相互关系、宿主种类、与氧关系等。

### 4、生活史

### 5、血清学反应

近年又发展了红外光谱，GC 含量，DNA 杂交等。

## 三、分类方法

### （一）经典分类法

随机地和不系统地根据一些特征进行分类。主要是形态、生理生化特征。

### （二）数值分类法

根据较多特征分类，每一特征地位相同。

1、每一菌株为一操作单位，确定很多特征（50-60 个）

2、比较菌株间的最大相似性

阳性和阴性符合的总和

----- × 100%

总的测定数 --- 无效测定数

>85%为同种，>65%为同属

3、据数值绘出矩阵图并转换成树状谱。

### （三）分子与遗传方法

1、DNA 碱基组成：GC%

相同不能说明是同种，但不同则肯定不是同种。

差别>10%不是同种，<10%可能是同种。

2、核酸分子杂交

比较碱基顺序的同源性

3、16s rRNA 寡核苷酸编目分析

水解 rRNA 产生一系列寡核苷酸片段，顺序分析。

近年来，采用红外、核磁、电镜等新技术越来越广泛。

## 四、分类系统

原核生物：

《伯杰氏细菌鉴定手册》第 8 版，1973

《伯杰氏系统细菌学手册》第 9 版，1984

真菌：Ainsworth (1973) 系统

酵母：Lodder 分类系统

菌种鉴定工作三部曲

1、获得该微生物的纯培养



2、测定一系列必要的鉴定指标

3、查找权威性鉴定手册

一章：微生物类群与形态结构

非细胞型：病毒

细胞型：原核微生物：细菌、放线菌等，

无明显核，也无核膜、核仁。

真核微生物：酵母菌、霉菌，

有明显核，有核膜、核仁。

1 节：细菌 Bacteria

是微生物一大类群，主要研究对象。

细菌是单细胞的，大小在  $1\mu\text{m}$  左右，1000 倍以上显微镜才能看到其形状。

一、细菌的形态和大小

(一) 基本形态

1、球菌

Coccus：球形或近球形，根据空间排列方式不同又分为单、双、链、四联、八叠、葡萄球菌。不同的排列方式是由于细胞分裂方向及分裂后情况不同造成的。

2、杆菌 Bacillus (Bacterium)：杆状或圆柱形，径长比不同，短粗或细长。是细菌中种类最多的。

3、螺旋菌

Spirillum：是细胞呈弯曲杆状细菌统称，一般分散存在。根据其长度、螺旋数目和螺距等差别，分为弧菌 Vibrio (菌体只有一个弯曲，形似 C 字) 和螺旋菌 (螺旋状，超过 1 圈)。

与螺旋体 Spirochaeta 区别：无鞭毛。

细菌形态不是一成不变的，受环境条件影响 (如温度、培养基浓度及组成、菌龄等)

异常形态

一般，幼龄，生长条件适宜，形状正常、整齐。老龄，不正常，异常形态。

畸形：由于理化因素刺激，阻碍细胞发育引起。

衰颓形：由于培养时间长，细胞衰老，营养缺乏，或排泄物积累过多引起。

(二) 细菌大小

如何测量：显微测微尺

球菌直径  $0.5-1\mu\text{m}$

杆菌直径  $0.5-1\mu\text{m}$ ，长为直径 1-几倍

螺旋菌直径  $0.3-1\mu\text{m}$ ，长  $1-50\mu\text{m}$

细菌大小也不是一成不变的。

细胞重量  $10^{-13}-10^{-12}\text{g}$ ，每 g 细菌

二、细菌细胞结构

研究细菌细胞结构是分子生物学重要内容之一，有了电子显微镜才有可能。

其结构分为基本结构和特殊结构。

基本结构是细胞不变部分，每个细胞都有，如细胞壁、膜、核。

特殊结构是细胞可变部分，不是每个都有，如鞭毛、荚膜、芽孢。

(一) 基本结构

1、细胞壁 cell wall：位于细胞表面，较坚硬，略具弹性结构。

功能：1) 维持细胞外形；2) 保护细胞免受机械损伤和渗透压危害；3) 鞭毛运动支点；4) 正常细胞分裂必需；5) 一定的屏障作用；6) 噬菌体受体位点所在。另外与细菌的抗原性、致病性有关。

革兰氏染色

Cristein Gram, 1884 发明 (Koch 实验室)

染色过程: (插入)

凡是不能被乙醇脱色, 呈蓝紫色, 称为革兰氏阳性菌  $G^+$

凡是经乙醇脱色, 呈复染剂颜色, 称为革兰氏阴性菌  $G^-$

结果不同主要是细胞壁组成及结构差异造成的。

### (1) 革兰氏阳性菌 Gram positive

以金黄色葡萄球菌为例, *Staphylococcus aureus*

细胞壁构成: 一连续层, 厚 20-80nm

两部分: 网状骨架: 微纤丝组成

基质: 骨架埋于基质中

化学组成: 主要是肽聚糖和磷壁酸

肽聚糖 peptidoglycan (粘肽、胞壁质)

大分子复合体, 许多亚单位交联而成。

亚单位

1) 双糖单位: N-乙酰胞壁酸 (NAM) 和 N-乙酰葡萄糖胺 (NAG) 通过  $\alpha$ -1, 4 糖苷键相连而成。

2) 短肽: L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala

3) 肽桥: 短肽之间连接。

短肽全部或部分连至 NAM 上, 短肽之间也有连接, 组成一网状结构。

肽聚糖是细菌细胞壁特有成分, 也是原核微生物特有成分 (古生菌没有)

磷壁酸 teichoic acid (垣酸)

$G^+$ 特有成分。

多元醇与磷酸复合物, 通过磷酸二酯键与 NAM 相连。

根据多元醇不同, 有甘油型、核糖醇型等 5 种类型。

主要功能: 使壁形成负电荷环境, 吸附二价金属离子, 维持壁硬度和一些酶活性。还可提供噬菌体位点。

### (2) 革兰氏阴性菌 Gram negative

以大肠杆菌为例:

内壁层: 厚 2-3 nm, 单 (双) 分子层, 由肽聚糖构成。

与  $G^+$ 区别: 交联低; DAP 取代 L-Lys; 肽桥。

外壁层: 内层: 脂蛋白层, 以脂类部分与肽聚糖相连。中层: 磷脂层。外层: 脂多糖层, 外壁重要成分, 8-10 nm。

脂多糖 lipopolysaccharide LPS

$G^-$ 特有成分。

结构: 类脂 A + 核心多糖 + O-侧链

功能: 1) 内毒素物质基础; 2) 吸附镁、钙离子; 3) 决定  $G^-$ 表面抗原; 4) 噬菌体受体位点。

钙离子是维持 LPS 稳定性所必需的。

D-AA 存在优点

$G^+$ 与  $G^-$ 比较

革兰氏染色机制

在细胞壁与细胞膜之间, 有周质空间 (隙), 含水解酶、载体蛋白等。

### (3) 细胞壁缺陷细菌

1、原生质体 protoplast: 人工条件下用溶菌酶除去细胞壁或用青霉素抑制细胞壁合成后, 所留下的部分。一般由  $G^+$ 形成。

2、球形体 spheroplast: 残留部分细胞壁, 一般由  $G^-$ 形成。有一定抗性。

特点: 对渗透压敏感; 长鞭毛也不运动; 对噬菌体不敏感; 细胞不能分裂等。

3、细菌 L 型：一种由自发突变形成的变异型，无完整细胞壁，在固体培养基表面形成“油煎蛋”状小菌落。

4、支原体：长期进化形成。

## 2、细胞膜 cell membrane

在细胞壁与细胞质之间的一层柔软而富有弹性的半透性膜。厚 7-8nm。

化学组成：蛋白和磷脂，蛋白含量高达 75%，种类也多。膜不含甾醇类。

膜结构（插入）

功能：1) 高度选择透性膜，物质运输；2) 渗透屏障，维持正常渗透压；3) 重要代谢活动中心；4) 与壁、荚膜合成有关；5) 鞭毛着生点，供运动能量。

## 3、间体 mesosome(中质体)

细胞膜内陷形成。

功能：1) 拟线粒体，呼吸酶系发达。

2) 与壁合成，核分裂，芽孢形成有关。

## 4、细胞核 nuclear body

核质体

原核无明显核，一反差弱的核区。

特点：无核膜、核仁、固定形态，结构简单，细胞分裂前核分裂。一般单倍体。

成分：DNA：环状双链，超线圈结构，负电荷被镁离子、有机碱（精胺、腐胺）所中和。

与真核区别：

## 5、核糖体 ribosome RS

核糖核蛋白的颗粒状结构，RNA+蛋白。

原核：游离态、多聚核糖体，70S

真核：游离态、结合内质网上，70、80S

多聚核糖体：一条 mRNA 与一定数目的单个 RS 结合而成。

功能：

## 6、细胞质及内含物

是无色透明胶状物，原核与真核不同。

主要成分：水、蛋白、核酸、脂类及少量糖和无机盐。富含核糖核酸。

不同细菌细胞内，含不同内含物，是细胞的贮藏物质或代谢产物。（插入）

内含物优点？

## （二）特殊结构

1、荚膜 capsule：某些细菌细胞壁外面覆盖着一层疏松透明粘性物质。厚度不同，名称不同。

折光率低，负染法观察。

成分：90%以上为水，余为多糖（肽）。

功能：1) 抵抗干燥；2) 加强致病力，免受吞噬；3) 堆积某些代谢废物；4) 贮存物。

## 2、鞭毛和菌毛

鞭毛 flagellum：某些细菌表面一种纤细呈波状的丝状物，是细菌运动器官。

直径 20-25nm，长超过菌体若干倍。电镜或特殊染色法观察，悬滴法观察运动。

化学成分：主要是蛋白质。

结构：G+与 G-区别；原核与真核区别

鞭毛着生位置与数目，可作为分类依据。

鞭毛着生状态决定运动特点。

趋性运动：栓菌实验

菌毛 fimbria (pilus)：许多 G-尤其是肠道菌，表面有比鞭毛更细，数目多，短直硬的丝状体。



直径 7-10nm , 长 2-3um。

性菌毛 (F 菌毛)

### 3、芽孢 spore, endospore

某些菌生长一定阶段, 于营养细胞内形成一个内生孢子, 是对不良有抗性的休眠体。

每一细胞仅形成一个芽孢, 所以其没有繁殖功能。

形成芽孢属于细胞分化 (形态发生)

Bacillus, clostridium, Spirillum, Vibrio, Sarcina

结构组成特点: 含水量低 (平均 40%), 壁致密, 芽孢肽聚糖和吡啶-2, 6-二羧酸钙 (DPA-Ca )

芽孢有极强的抗热、辐射、化学药物和静水压的能力, 休眠力惊人。

芽孢结构、形成、萌发 (自学)

伴孢晶体

孢囊 cyst, 等等。

### 三、细菌繁殖与群体形态

1、繁殖方式: 裂殖为主, 少数有性接合。

2、菌落形态: 菌落 colony: 由单个或少数几个细胞在固体培养基表面繁殖出来的, 肉眼可见的子细胞群体。

形态包括大小、形状、隆起、边缘、表面状态、表面光泽、质地、颜色等等。

纯培养: 克隆 clone

菌苔 lawn

### 四、常见常用细菌

细胞结构、菌落特点、代谢产物等。

### 2 节: 放线菌 Actinomycetes

因菌落呈放射状而得名, 是丝状分枝细胞的细菌。

一般分布在含水量低, 有机质丰富的中性偏碱性土壤中, 特殊土腥味。

大多数是腐生菌, 少数寄生; 多数异养, 好氧。

突出特性是产各种抗生素。

#### 一、形态与结构

由菌丝构成, 直径 0.2-1.2um, 无横隔, 仍是单细胞。

菌丝分为: 基内菌丝 (营养菌丝)

气生菌丝

孢子丝

菌丝组成菌落, 分为两类。

放线菌仍是原核微生物?

#### 二、繁殖

以无性孢子为主, 菌丝断裂片段也可繁殖成新菌体。

孢子形成方式: 横隔分裂

孢囊孢子

放线菌生活史 (发育周期)

#### 三、代表属及常见菌

(一) 链霉菌属 Streptomyces

90% 抗生素, 菌丝发育良好。如龟裂链霉菌 *S. rimosus*, 灰色链霉菌 *S. griseus*

(二) 小单孢菌属 Micromonospora

无气生菌丝, 基内菌丝顶端着生一孢子。

(三) 诺卡氏菌 Nocardia

原放线菌属，降解能力强。

#### (四) 放线菌属 *Actinomyces*

只有基内菌丝，不形成孢子，厌氧。

#### (五) 链孢囊菌属 *Streptosporangium*

形成孢子囊，孢囊孢子。

放线菌、细菌异同？

### 3 节：其它几类原核微生物

重要了解大小、G<sup>-</sup>、培养、细胞及代谢。

#### 一、立克次氏体

*Rickettsia*：介于细菌、病毒之间，专性真核活细胞内寄生，不能人工培养。不滤过，直径 0.3-0.6μm，存在与寄主细胞质和核中。细胞球状或杆状，不运动。G<sup>-</sup>，膜疏松，酶系统不完全，不完整的产能代谢，抵抗性差。

二、支原体 *Mycoplasma*：介于细菌、立克次氏体之间。不具细胞壁，细胞膜含甾醇类。G<sup>-</sup>，直径 0.2-0.25μm，可滤过。已知可独立生活的最小的细胞型生物。可人工培养，营养要求苛刻，油煎蛋菌落。

三、衣原体 *Chlamydia*：介于立克次氏体、病毒之间。可滤过，专性活细胞内寄生。G<sup>-</sup>，“能量寄生物”。

各类原核微生物与病毒比较表。

蓝细菌 *Cyanobacteria*：含叶绿素，进行放氧型光合作用的原核生物。由于抵抗力和固氮能力，可在贫瘠沙滩荒岩上生长，称为“先锋生物”。

蛭弧菌 *Bdellovibrio*：寄生于其他细菌并导致裂解，可滤过，运动活跃，G<sup>-</sup>。生物防治。

### 4 节：酵母菌 *yeast*

非分类名词，一群单细胞微生物，属真菌类。第一种“家养微生物”，与人类关系密切。主要分布在含糖较高偏酸性环境中，又称“糖真菌”。

#### 一、形态大小

单细胞，无鞭毛。细胞形态多样，常见球、卵、圆桶形。

大小在 1-5μm X 5-30μm 之间。

#### 二、细胞结构

1、细胞壁：厚 0.1-0.3μm，三层，由酵母纤维素组成（甘露聚糖、葡聚糖、蛋白、类脂）。用蜗牛酶（*helias*e）破坏壁来制备原生质体。

2、细胞膜：与原核基本相同，但含甾醇（麦角固醇）。由于有细胞器分化，功能不及细菌多，主要是调节渗透压、吸收营养、分泌代谢物等

#### 3、细胞质及内含物

4、细胞核：真核：双层单位膜，大量核孔，可见染色体，一个或几个核仁，核膜外有中心体。

5、线粒体：含有一环状 DNA。呼吸酶系载体，“动力工厂”。有氧时需要，厌氧或过量葡萄糖存在时，被阻遏。

环状“2μm 质粒”：外源 DNA 载体。

6、核糖体：细胞质中 80S，线粒体 70S。

#### 三、菌落特征

与细菌相似，但大且厚。

#### 四、繁殖方式与生活史

##### (一) 繁殖方式

##### 1、无性繁殖

(1) 芽殖 budding：最普遍方式（过程）

(2)裂殖 fission: 少数(裂殖酵母)

(3)无性孢子: 节孢子、掷孢子、厚垣孢子。

## 2、有性繁殖

产生子囊和子囊孢子。过程: 质配--核配--减数分裂

## 3、形成孢子条件

营养充足强壮幼龄细胞

适当温、湿度(25-30, 80%)

空气要流通

适当的生孢子培养基

## (二)生活史 life history(life cycle)

某种生物在整个发育阶段, 有一个或几个同形或不同形的个体前后相继形成一个有规律的循环。

四种基本类型:

1、无生殖, 仅有营养繁殖。(细菌)

2、仅有一个单倍体生活, 双倍体短。

3、仅有一个双倍体生活, 单倍体短。

4、有世代交替现象, 单倍体有性, 双倍体无性。

酵母菌有三种类型:

单倍体型: 八孢裂殖酵母

双倍体型: 路德类酵母

世代交替型: 酿酒酵母

## 五、常见常用酵母菌

酵母图示

## 5 节: 霉菌 molds

非分类名词, 丝状真菌统称。通常指菌丝体发达而又不产生大型子实体的真菌。

### 一、形态和构造

营养体由菌丝(hyphae)构成, 直径3-10um, 菌丝再形成菌丝体(mycelium)

菌丝: 无隔, 多核单细胞, 低等真菌

有隔, 多细胞, 高等真菌

菌丝体: 营养菌丝, 伸入培养基吸收营养

气生菌丝, 向空中生成, 形成繁殖器官。(特化形式)

细胞壁厚100-250nm, 多含几丁质。

不同类型真菌壁成分比较

### 二、繁殖与生活史

#### (一)繁殖

1、无性孢子: 主要方式, 特点是分散, 数量大。

孢囊孢子: 内生孢子, 毛、根、犁头霉

分生孢子: 外生孢子, 最普遍

节孢子: 粉孢子, 菌丝断裂形成

厚垣孢子: 真菌休眠体

#### 2、有性孢子

卵孢子: 配子囊(雄器、藏卵器)

接合孢子: 同宗、异宗配合

子囊孢子: 形态多样。子实体、子囊果

担孢子：担子菌特征

## （二）生活史

霉菌指从一种孢子开始，经过一定的生长和发育，最后又形成同一种孢子为止。

## 三、菌落

疏松，绒毛状、絮状、蛛网状。

四大类微生物比较：

## 四、分类

过去依据菌丝体及有性繁殖特征分为三纲一类，藻状菌纲、子囊菌纲、担子菌纲、半知菌类。

Ainsworth 分类系统：

## 五、常见常用霉菌

中国食用和药用大型真菌

### （一）食用真菌

1、种类资源：担子菌 675 种，子囊菌 45 种。通常栽培的仅 10 多种。

2、营养：蛋白含量高，AA 多达 18 种左右，特别是人体必需 AA。还含有多种维生素、糖类和矿物质。Lys 含量一般较高。

3、栽培：发展栽培同时，重视采用菌丝体的深层培养，特别是风味特殊而鲜美的种类。菌丝体培养物可新鲜食用，或冷冻干燥成粉，制成食品。

目前栽培广而产而产量大的品种：双孢菇、大肥菇、香菇、草菇、金针菇、侧耳（平菇）、凤尾侧耳、滑菇、银耳、木耳、猴头菌、长裙竹荪等。

培养料来源多且广，棉子壳、锯末、秸秆、蔗渣、酒糟等。

4、应用：食用子实体、菌丝体深层培养。作调味品、香味、饮料等。

### （二）药用真菌

1、资源：担子菌 345 种，子囊菌 28 种，其它 11 种。

2、应用：有 20 多个方面，主要抗癌、抑菌。目前认为抗癌物质主要是多糖，如香菇多糖、银耳酸性异多糖、芸芝多糖（PSK）、茯苓多糖、猪苓多糖、灵芝多糖等。

## 细胞型生物小结

真菌、细菌、放线菌比较：

真核、原核区别：

## 6 节：病毒 virus

非细胞型生物，有区别于细胞型特征：

1、形体十分微小，滤过，电镜可见；

2、无细胞结构，分子生物，由核酸和蛋白组成，且一种病毒仅含一种类型核酸；

3、专性活细胞内寄生，有宿主专一性，无独立代谢酶系，依赖宿主自身复制；

4、对抗生素不敏感，对干扰素敏感。

概念：病毒是超显微的，无细胞结构，专性活细胞内寄生，在活细胞外具一般化学大分子特征，一旦进入宿主细胞又具有生命特征。

根据宿主不同，可把病毒分为几类，如动物病毒、植物病毒、昆虫病毒、细菌病毒等。

病毒的核酸与细胞型也不同。

### 一、形态、结构和化学组成

1、大小：nm，多在 100nm 左右。图片

2、病毒粒子 virion（病毒颗粒）

成分：核酸—核心 core 核衣壳

蛋白—衣壳 capsid nucleocapsid

衣壳粒 capsomere

包膜（类脂或脂蛋白）envelope

病毒粒子对称体制：螺旋对称（TMV）

廿面体对称（腺病毒）

功能：核酸：遗传物质基础

蛋白：构成外壳，保护病毒免受核酸酶及其它因子破坏；决定感染特异性；决定抗原性。

3、噬菌体 phage：多为蝌蚪状，结构模式图。头部为廿面体对称，尾部为螺旋对称。

4、群体形态：病毒包涵体、噬菌斑

二、繁殖（烈性噬菌体为例）

1、吸附：分两阶段。感染复数 m. o. i

2、侵入：头部 DNA 通过尾管注入至细胞中，外壳留在胞外。自外裂解

3、增殖：包括 DNA 复制和蛋白质合成。双链 DNA 噬菌体三阶段转录：

遗传信息转移：

4、成熟（装配）：潜伏期

5、裂解（释放）：裂解期

上述烈性噬菌体的生长方式，称为一步生长。

一步生长曲线：

裂解量：每个被感染的细菌释放新的噬菌体的平均数。

三、噬菌体与宿主关系

1、烈性噬菌体：凡能引起宿主细胞迅速裂解的噬菌体。敏感细菌。

2、温和性噬菌体：噬菌体侵染宿主后，并不增殖，裂解，而与宿主 DNA 结合，随宿主 DNA 复制而复制，此时细胞中找不到形态上可见的噬菌体，这种噬菌体称为温和性噬菌体。含有温和性噬菌体的细菌称为溶源性细菌 lysogenic bacteria

温和性噬菌体存在状态

1) 游离具感染性的 virion;

2) 前噬菌体 (prophage): 附着或整合在宿主染色体上，一道复制;

3) 营养期噬菌体: 指导合成。

3、溶源性细菌特性

1) 遗传性

2) 自发裂解

3) 诱发裂解：双氧水、UV、X、等。

4) 免疫性

5) 复愈（消失溶源性）

6) 溶源转变

溶源性菌株命名

四、噬菌体分离检查与防治

（一）分离检查（效价测定）

怎样证实有噬菌体存在：宿主特异性；噬菌斑、液体培养变清等。

1、双层平板法

2、单层平板法

3、玻片快速法

效价 (titre)，噬菌斑形成单位 (pfu)



## (二) 防治措施

- 1、消灭 phage，杜绝其依赖生存条件。
- 2、选育和使用抗 phage 菌株。
- 3、菌种轮换使用。
- 4、药物防治：加入某些金属螯合剂、表面活性剂。

## 五、亚病毒

- 1、类病毒 viroid：没有衣壳包裹的 RNA 分子。
- 2、拟病毒 virusoids(类病毒)：一类包括在植物病毒粒子中的类病毒，RNA。
- 3、朊病毒 prion, virino：一类能侵染动物并在宿主细胞内复制的小分子无免疫性的疏水性蛋白。

## 艾滋病

### AIDS 获得性免疫缺陷综合征

1981 年首先在 USA 发现，1983 年巴斯德研究所宣布分离出一种 virus 证实为 AIDS 的病原，1986 年 WHO 定名为人类免疫缺陷病毒 (HIV)。

HIV 专门侵犯淋巴细胞，造成免疫缺陷。

传播途径：血液、母婴、体液

## 第二章：微生物营养和培养基

了解不同微生物需要什么营养物，怎样吸收，起什么作用，如何为其配餐。

营养物：必须得到的细胞结构成分，必须得到的能量储存物质。

营养：把营养物从外界吸收至细胞内，复制出新细胞结构的过程。

### 1 节：营养物及其功能

#### 一、细胞化学组成

整个生物界大体相同，主要是 C、H、O、N (占干重 90-97%)，C (约 50%)，此外为各种无机元素，由这些元素再组成化合物。其中 C/N 一般是 5:1。

#### 1、水分和无机元素

含水 70-90% (鲜重)，无机元素 (3-10%干重) 依次为 P、S、K、Mg、Ca、Fe、Zn、Mn 等。

#### 2、有机物

蛋白质, 核酸, 碳水化合物, 类脂, 维生素等

#### 二、主要营养物及其功能

主要功能：提供合成原生质和代谢产物原料；产生合成反应及生命活动所需能量；调节新陈代谢。

#### (一) 碳源物质

定义：凡能提供微生物营养所需碳元素的营养源。

功能：碳源、能源

微生物碳源谱：

#### (二) 氮源物质

定义：凡能提供微生物营养所需氮元素的营养源。

功能：氮源，一般不作能源。

微生物氮源谱：

氨基酸自养型和异养型生物

速效氮源和迟效氮源

生理碱性、酸性、中性盐

#### (三) 能源

化学能：有机物-化能异养微生物

无机物-化能自养微生物

光能

#### (四) 生长因子

定义：一类对微生物正常代谢必不可少且又不能从简单的碳、氮源自行合成的所需极微量的有机物。

种类：维生素、AA、base、FA 等。

作用：辅酶或酶活化

来源：酵母膏、玉米浆、麦芽汁等，复合维生素。

浓度：

#### (五) 无机盐

所需浓度在  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ M 的元素为大量元素

所需浓度在  $10^{-6}$ – $10^{-8}$ M 为微量元素。

主要功能：构成菌体成分；酶活性基组成或维持酶活性；调节渗透压、pH、Eh；化能自养微生物能源等。

无机元素来源与功能：

一些无机元素加入盐：

#### (六) 水

存在状态：游离态（溶媒）和结合态（结构组成）

生理作用：组成成分；反应介质；物质运输媒体；热的良导体。

#### 2 节：微生物营养类型

依碳源不同：

异养型 heterotrophs（不能以  $\text{CO}_2$  为主要或唯一碳源。

自养型 autotrophs（能以  $\text{CO}_2$  为主要或唯一碳源。

依能源不同：

光能营养型 phototrophs（光反应产能）

化能营养型 chemotrophs（物质氧化产能）

这样可将微生物分成四种营养类型

（插入）

其中，化能异养型又据利用有机物特性，分成腐生和寄生。

营养类型划分不是绝对的，不同生活条件下，可相互转变。

#### 3 节：营养物吸收与代谢物分泌

营养物吸收至胞内被利用，代谢物分泌到胞外以免积累，这就是物质运输过程。

通透性与吸收是不同概念。

一般 大分子：先水解为小分子，再吸收。

脂溶性物质：易透过

离子化合物：弱快强慢（极性）

#### 一、营养物吸收

##### 1、单纯扩散 simple diffusion

依靠胞内外溶液浓度差，顺浓度梯度运输，不消耗代谢能，无特异性。水、二氧化碳、氧气、甘油、乙醇等。

##### 2、促进扩散 facilitated diffusion

借助载体蛋白顺浓度梯度运输，不耗能，有特异性。载体蛋白（渗透酶）有底物特异性，是诱导产生的。硫酸根、磷酸根、糖（真核）

##### 3、主动运输 active transport

吸收营养物的主要机制。

逆浓度梯度运输，耗能，需载体蛋白，有特异性。氨基酸、乳糖等糖类、钠、钙等无机离子。

亲和力改变 ← 蛋白构象改变 → 耗能

上述 3 种方式中，被运输的溶质分子都不发生改变。

#### 4、基团转位 group translocation

属主动运输，但溶质分子发生化学修饰-定向磷酸化。主要依赖磷酸烯醇式丙酮酸（PEP）和磷酸转移酶系统（PTS）。

$\text{PEP} + \text{HPr} \rightleftharpoons \text{丙酮酸} + \text{P-HPr} \quad (\text{EI})$

$\text{糖} + \text{P-HPr} \rightleftharpoons \text{糖-P} + \text{HPr} \quad (\text{EII})$

膜对大多数磷酸化合物具有高度的不渗透性。葡萄糖、果糖、甘露糖、嘌呤、核苷、脂肪酸等。

#### 二、代谢物分泌

微生物能分泌多种物质，如有机酸、糖类、胞外酶、荚膜多糖等，由此可知，分泌与吸收不是同一机制。

#### 4 节：培养基 medium

选用各种营养物质，经人工配制用来培养微生物的基质。

##### 一、培养基类型

1、依来源不同：合成、天然、半合成。

2、依状态不同：固体、半固体、液体。

3、依功能不同：选择、鉴别

##### 二、选择和配制培养基的原则和方法

###### （一）四个原则

###### 1、目的明确

培养什么微生物，获得什么产物，用途

###### 2、营养协调

恰当配比，尤其是 C/N 比（100/0.5-2）

###### 3、物理化学条件适宜

pH，考虑区别，培养基调节能力。采用磷酸缓冲液或假如碳酸钙，流加酸碱。

渗透压和水活度  $a_w$ ：等渗适宜。

$a_w$  表示在天然环境中，微生物可实际利用的自由水或游离水含量。微生物适宜生长的  $a_w$  为 0.6-0.998 之间。氧化还原

电位 Eh：好氧微生物+0.1v 以上；兼性厌氧+0.1v 以上行好氧呼吸，

+0.1v 以下行发酵；厌氧微生物+0.1v 以下生长。

###### 4、经济节约

以粗代精、以废代好、以简代繁等。

###### （二）四种方法

###### 1、生态模拟

###### 2、查阅文献

###### 3、精心设计

###### 4、实验比较

#### 第三章：微生物代谢

广义的代谢--生命体进行的一切化学反应。

代谢分为能量代谢和物质代谢，分解代谢和合成代谢。

分解代谢：复杂营养物分解为简单化合物（异化作用）。

合成代谢：简单小分子合成为复杂大分子（同化作用）

##### 二者关系

##### 初级和次级代谢

依据代谢产物在微生物中作用不同，又有初级代谢和次级代谢。

初级代谢：能使营养物转化为结构物质、具生理活性物质或提供生长能量的一类代谢。产物有小分子前体物、单体、

多聚体等生命必需物质。

次级代谢：某些微生物中并在一定生长时期出现的一类代谢。产物有抗生素、酶抑制剂、毒素、甾体化合物等，与生命活动无关，不参与细胞结构，也不是酶活性必需，但对人类有用。

二者关系：先初后次，初级形成期也是生长期，只有大量生长，才能积累产物。

## 1 节：微生物能量代谢

微生物对能量利用：

有机物 化能异养菌

日光 光能营养菌 通用能源

还原态无机物 化能自养菌 ATP

只有 ATP 和酰基辅酶 A 起偶联作用，其他高能化合物只作为 P 供体。

生物氧化过程分为：脱氢、递氢、受氢三个阶段。

生物氧化功能：产能（ATP）、产还原力 [H]、产小分子中间代谢物。

以下主要讲述化能异养微生物的生物氧化和产能。

### 一、底物（基质）脱氢的四条主要途径

以葡萄糖作为典型底物

#### 1、EMP 途径（糖酵解途径）

有氧时，与 TCA 连接，将丙酮酸彻底氧化成二氧化碳和水。

无氧时，丙酮酸进一步代谢成有关产物。

#### 2、HMP 途径（己糖-磷酸途径）

产生大量 NADPH<sub>2</sub> 和多种重要中间代谢物。

#### 3、ED 途径 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸裂解途径 KDPG

是少数缺乏完整 EMP 的微生物具有的一种替代途径，细菌酒精发酵经 ED 进行。

#### 4、TCA 循环（三羧酸循环）

真核在线粒体中，原核在细胞质中。

TCA 在代谢中占有重要枢纽地位

四种途径产能比较：

### 二、递氢和受氢

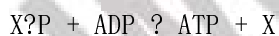
根据递氢特别是最终氢受体不同划分

#### 1、发酵（分子内呼吸）

无氧条件下，底物脱氢后产生的还原力不经呼吸链而直接传递给某一中间代谢物的低效产能反应。

在此过程中，有机物是氧化基质，又是最终氢受体，且是未彻底氧化产物，结果仍积累有机物，产能少。

在发酵过程中，借底物水平磷酸化合成 ATP，是合成 ATP 唯一方式。



高能化合物：1, 3-二磷酸甘油酸、乙酰磷酸、氨甲酰磷酸、PEP、酰基辅酶 A。

#### 2、有氧呼吸（呼吸作用）

底物脱氢后，经完整的呼吸链（电子传递链）递氢，以分子氧作为最终氢受体，产生水和放出能量。

在电子传递过程中，通过与氧化磷酸化反应偶联，产生 ATP，称氧化磷酸化。

##### 1) 呼吸链组成与顺序：

##### 2) 真核与原核生物呼吸链比较：

位置、组成

#### 3、无氧呼吸（厌氧呼吸）

以无机氧化物代替分子氧作为最终氢受体的生物氧化。

氧化磷酸化合成 ATP，但有些能量转移到最终受体，产能不多。

依据最终氢受体不同，分成多种类型。

#### 1) 硝酸盐还原作用（反硝化作用）

由硝酸盐逐步还原成分子氮的过程。使土壤 N 损失，肥力下降。属异化性硝酸盐还原。

#### 2) 硫酸盐还原作用（异化性）

通常以乳酸为基质，积累乙酸，以  $\text{SO}_4^{2-}$  为最终氢受体。脱硫弧菌 *Desulfovibrio* sp.

#### 3) 甲烷发酵作用

产甲烷菌以二氧化碳为最终氢受体。如甲烷杆菌 *Methanobacterium*

### 四、不同呼吸类型微生物

与分子氧的不同关系

#### 1、好氧微生物 aerobic

有氧条件下生长，进行有氧呼吸。

#### 2、厌氧微生物 anaerobic

不需分子氧，进行无氧呼吸或发酵。

专性厌氧菌-只能在无氧条件下生长，分子氧对其有害。主要梭菌、产甲烷细菌、脱硫弧菌。

耐气厌氧菌 (aerotolerant)-无论有氧无氧，都进行发酵，分子氧无害。如乳酸菌。

#### 3、兼性厌氧微生物 facultative anaerobic

有氧与无氧条件下均能生长，但以不同氧化方式获得能量。

如酵母菌、一些肠道菌、反硝化细菌。

酵母菌酒精发酵时通入氧气，发酵减慢，停止产生乙醇，葡萄糖消耗速率下降，氧对发酵的这种抑制现象称为巴斯德效应。

#### 4、微好氧微生物 microaerophilic

在氧浓度较低条件下生长，进行有氧呼吸。

氧的危害

$\text{O}_2 + e \rightarrow \text{O}_2^-$  超氧化物自由基

有一些酶可解除危害。

### 五、不同发酵类型

对 G 发酵产物不同划分，糖的无氧降解。

#### （一）乙醇发酵：

EMP 脱羧酶 脱氢酶

1. 酵母无氧条件： $\text{G} \rightarrow \text{丙酮酸} \rightarrow \text{乙醛} \rightarrow \text{乙醇}$

此属正常形式，称 I 型发酵，亦称同型酒精发酵

2. 若有亚硫酸氢钠存在，与乙醛结合，而使磷酸二羟丙酮作为受氢体。

磷酸二羟丙酮  $\rightarrow \alpha$ -磷酸甘油  $\rightarrow$  甘油

此称为 II 型发酵，但仍有乙醇产生。

3. 碱性条件下 (PH7.6)，乙醛分子间歧化反应

一分子乙醛  $\rightarrow$  乙酸（氧化）

一分子乙醛  $\rightarrow$  乙醇（还原）

还有磷酸二羟丙酮  $\rightarrow$  甘油

4. 细菌同型酒精发酵，ED 途径进行，产生 2 分子乙醇。

5. 细菌异型酒精发酵，通过 HMP 途径进行，产生 1 分子乙醇和 1 分子乳酸。

总反应式如下：

$\text{G} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \rightarrow 2 \text{乙醇} + 2 \text{CO}_2 + 2\text{ATP}$

$\text{G} + \text{HSO}_3^- \rightarrow \text{甘油} + \text{乙醛} + \text{HSO}_3^- + \text{CO}_2$



$$2G \rightarrow 2 \text{ 甘油} + \text{乙酸} + \text{乙醇} + \text{CO}_2$$

$$G + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow 2 \text{ 乙醇} + 2 \text{ CO}_2 + \text{ATP}$$

$$G + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{乳酸} + \text{乙醇} + \text{CO}_2 + \text{ATP}$$

## (二) 乳酸发酵

发酵产物中只有乳酸，经 EMP 途径，称为同型乳酸发酵（德氏乳杆菌）。

发酵产物中除乳酸外，还有其他，如乙醇、CO<sub>2</sub> 等称异型乳酸发酵。经 HMP 途径。如肠膜状明串珠菌 *Leuconostoc mesenteroides*

总反应式：

同型： $G + 2\text{ADP} + 2\text{Pi} \rightarrow 2 \text{ 乳酸} + 2\text{ATP}$

异型： $G + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow 1 \text{ 乳酸} + \text{乙醇} + \text{CO}_2 + \text{ATP}$

真菌：丙酮酸  $\rightarrow$  2 分子乙醇  $\rightarrow$  琥珀酸  $\rightarrow$  延胡索酸  $\rightarrow$  苹果酸  $\rightarrow$  乳酸

## 三) 丁酸型发酵

*Clostridium*

所进行，特点是产物中都有丁酸。不同种类因酶系统不同，最终产物除丁酸外，还有其他产物。重要的有丁酸发酵、丙酮丁醇发酵、丁醇异丙醇发酵。

## (四) 丙酸发酵

由丙酸细菌 *Propionibacterium*，与乳酸细菌相似，发酵产物有丙酸、乙酸、CO<sub>2</sub>。

丙酸  $\rightarrow$  丙酸钙（防腐剂）

## (五) 混合酸发酵

肠杆菌特征，产物有甲酸、乙酸、乳酸、琥珀酸等有机酸，还有 CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>、少量 2, 3-丁二醇、乙酰甲基甲醇、甘油等。其中两个重要的鉴定反应：

### 1. V. P. 实验 (Vagex-Proskauer)

产气杆菌产 2, 3-丁二醇比较多，碱性条件下可氧化为二乙酰，再与肌酸或胍类衍生物缩合成红色物质，若加入  $\alpha$ -萘酚、肌酸可促进反应，此称 VP 反应。

大肠杆菌不产生或少产生 2, 3-丁二醇，VP 反应阴性。

### 2. 甲基红 (M.R) 反应

大肠杆菌产酸多，使 pH 降至 4.2，

甲基红由黄变红，反应阳性。产气杆菌产 2, 3-丁二醇，产酸少 (pH5.3)，甲基红反应阴性。

3. 另外，甲酸只在碱性环境下积累 (pH7.3)，而 pH6.2 以下，不产甲酸， $\text{HCOOH} \rightarrow$

$\text{CO}_2 + \text{H}_2$ 。甲酸脱氢酶与氢化酶联合作用。

伤寒杆菌无甲酸脱氢酶，只产酸不产气。

## 2 节：分解代谢

### 一、淀粉的分解

淀粉有两类：一类是直链淀粉 ( $\alpha$ -1, 4-糖苷键)；另一类是支链淀粉 (支链  $\alpha$ -1, 4、分支点  $\alpha$ -1, 6-糖苷键)。

1、液化型淀粉酶 ( $\alpha$ -淀粉酶)：分子内  $\alpha$ -1, 4-糖苷键，不作用  $\alpha$ -1, 6-糖苷键以及靠近  $\alpha$ -1, 6-糖苷键的  $\alpha$ -1, 4-糖苷键。作用的结果是产生麦芽糖，含有 6 个葡萄糖单位的寡糖和带有支链的寡糖，使黏度下降。枯草杆菌通常用作  $\alpha$ -淀粉酶的生产菌。

2、糖化型淀粉酶：这是一类酶的总称。共同特点是可以将淀粉水解成麦芽糖或葡萄糖，包括以下三种：

(1) 淀粉-1, 4-麦芽糖苷酶 ( $\beta$ -淀粉酶)：从非还原性末端开始，按双糖为单位，逐步作用于  $\alpha$ -1, 4 生成麦芽糖。但不作用于  $\alpha$ -1, 6，遇到  $\alpha$ -1, 6 时，作用停止。作用于淀粉后的产物是麦芽糖与极限糊精。

(2) 淀粉-1, 4-葡萄糖糖苷酶 (糖化酶)：

从非还原性末端开始，依次以葡萄糖为单位逐步作用于  $\alpha$ -1, 4，生成葡萄糖，但能越过  $\alpha$ -1, 6。根霉与曲霉普遍都

能合成与分泌此酶。

(3) 淀粉-1, 6-葡萄糖苷酶 (异淀粉酶): 此酶专门作用  $\alpha$ -1, 6-糖苷键。

## 二、纤维素与半纤维素的分解

纤维素是葡萄糖通过  $\beta$ -1, 4-糖苷键连接, 分子量更大, 不溶于水, 不能直接被人和动物消化, 但它可以被许多真菌包括木霉、青霉、根霉以及放线菌与细菌中的一些菌株分解与利用

纤维素酶复合物: 纤维二糖酶 ( $\beta$ -葡萄糖苷酶), C1 酶, C<sub>x</sub> 酶。

天然纤维素 C1 酶 水合非结晶纤维素 C<sub>x</sub> 酶 纤维二糖+葡萄糖

纤维二糖酶

葡萄糖

细菌的纤维素酶位于细胞膜上, 真菌和放线菌的纤维素酶是胞外酶。

自然界中纤维素丰富, 对纤维素的研究早就成为重要的课题了。

在植物细胞壁还有半纤维素, 包括各种聚戊糖与聚己糖, 最常见的半纤维素是木聚糖。半纤维素容易被微生物分解, 但由于半纤维素的组成类型很多, 因而分解它们的酶也各不同。生产半纤维素酶的微生物主要有曲霉、根霉、木霉等。

## 三、果胶质的分解

果胶质是构成高等植物细胞间质的主要物质, 主要由 D-半乳糖醛酸通过  $\alpha$ -1, 4-糖苷键连接。

天然果胶质 (原果胶) 原果胶酶 水溶性果胶 果胶甲酯水解酶 果胶酸 果胶酸酶 半乳糖醛酸。

分解果胶的微生物主要是一些细菌和真菌, 麻类植物沤浸脱胶技术就是为了利用果胶分解菌分解果胶的能力。

## 四、几丁质的分解

几丁质由 N-乙酰葡萄糖胺通过  $\beta$ -1, 4-糖苷键连接起来, 含氮多糖。是真菌细胞壁和昆虫体壁的组成成分, 一般生物都不能分解与利用, 只有某些细菌和放线菌能分解与利用。

几丁质酶使几丁质水解生成几丁二糖, 再通过几丁二糖酶进一步水解生成 N-乙酰葡萄糖胺。

## 五、油脂的分解

油脂在脂肪酶 (Lipase) 的作用下, 逐步被水解生成甘油与脂肪酸, 脂肪酸通过  $\beta$ -氧化进行分解。脂肪酶一般广泛存在于真菌中。

## 六、烃类化合物的分解

烃类化合物是一类高度还原性的物质, 在好氧条件下, 可以被一些微生物分解, 主要是假单胞菌、分枝杆菌、诺卡氏菌、某些酵母等。

### 1、甲烷氧化:

### 2、正烷烃氧化:

先烃化酶 (单氧酶)、铁硫蛋白和铁硫蛋白-NADH<sub>2</sub> 还原酶作用。

三种方式: a: 末端甲基氧化,

b: 次末端亚甲基氧化,

c: 两端甲基氧化 ? 氧化。

### 3、芳香烃氧化

含苯环或联苯类化合物, 在氧化过程中逐步被氧化生成儿茶酚或原儿茶酚。儿茶酚或原儿茶酸可以在苯环的邻位上或间位上被氧化打开, 生成脂肪族化合物, 再逐步分解成糖分解途径中的中间物质, 再按糖代谢的方式进行分解。

苯 (联苯)  $\rightarrow$  儿茶酚  $\rightarrow$  开环 (邻位、间位)  $\rightarrow$  继续降解。

## 七、蛋白质的分解

蛋白酶 (胞外) 肽酶 (胞内)

蛋白质 肽 AA

一般真菌分解蛋白质的能力强, 并能分解天然的蛋白质, 而大多数细菌不能分解天然蛋白质, 只能分解变性蛋白以及蛋白质的降解产物。

根据肽酶作用部位不同, 分为氨肽酶 (作用于有游离氨基端的肽键); 羧肽酶 (作用于有游离羧基端的肽键)。

腐化 decay 和腐败 putrefaction

## 八、氨基酸的分解

### 1、脱氨作用

有机含氮化合物在微生物作用后放出氨的生物学过程中，通常称为氨化作用。

(1) 氧化脱氨：氨基酸在有氧条件下脱氨，产生氨与  $\alpha$ -酮酸，由氨基酸氧化酶催化。包括脱氨反应（酶促）与水解反应（非酶促）。

(2) 还原脱氨作用：在无氧条件下进行，生成饱和脂肪酸和氨。

天冬氨酸 琥珀酸+ $\text{NH}_3$

(3) 水解脱氨与减饱和脱氨：

氨基酸经水解产生羧酸与氨：

氨基酸+水 羧酸+  $\text{NH}_3$

通过减饱和方式进行脱氨，生成不饱和脂肪酸和氨：

天冬氨酸 延胡索酸+  $\text{NH}_3$

(4) 脱水脱氨：含羟基氨基酸（如丝氨酸）在脱水过程中脱氨。

Ser  $\rightarrow$  氨基丙烯酸  $\rightarrow$  亚氨基丙酸  $\rightarrow$  丙酮酸 +  $\text{NH}_3$

$\text{H}_2\text{O}$

(5) Stickland 反应

某些专性厌氧细菌如梭状芽孢杆菌在厌氧条件下生长时，以一种氨基酸作为氢的供体，进行氧化脱氨，另一种氨基酸作氢的受体，进行还原脱氨，两者偶联进行氧化还原脱氨。这其中有 ATP 生成。这个反应被称为 Stickland 反应。

供氢体：Ala、Leu、Val、Ser、Phe、Cys、His、Asp、Glu。

受氢体：Gly、Pro、Hyp、Orn、Arg、Trp。

丙氨酸+2 甘氨酸 3 乙酸+3 $\text{NH}_3$

### 2、脱羧作用

通过氨基酸脱羧酶作用，生成有机胺和二氧化碳。有机胺在胺氧化酶作用下放出氨生成相应的醛，醛再氧化成有机酸，最后按脂肪酸  $\beta$ -氧化的方式分解。

氨基酸脱羧酶具有高度的专一性，基本上是一种氨基酸有一种脱羧酶来催化它的分解。

反应中放出的二氧化碳可以用微量测压计测定，因此可根据一定基质在一定时间内，被单位细胞作用后、产生二氧化碳的量来测定脱羧酶的酶活。另外，也可以分析样品中的氨基酸的含量。

二元 AA 生成的二胺有毒。Lys-尸胺，Orn-腐胺

## 鉴定反应

吲哚实验与硫化氢实验是常用的两个鉴定实验

1、吲哚实验：有些细菌可以分解色氨酸生成吲哚可以与二甲基氨基苯甲醛反应生成红色的玫瑰吲哚，因此可根据细菌能否分解色氨酸产生吲哚来鉴定菌种。

2、硫化氢实验：许多细菌能分解含硫氨基酸（胱氨酸、半胱氨酸）产生硫化氢，如果在蛋白胨培养基中加进重金属盐，接种细菌培养后观察，若产生硫化氢，则出现黑色的硫化铅或硫化铁。

## 3 节：合成代谢

### 一、生物合成三要素

能量、还原力、小分子前体物

1、能量由 ATP 供给，ATP 产生有三种方式（底物水平磷酸化，氧化磷酸化，光合磷酸化）

2、还原力产生：还原力主要指  $\text{NADH}_2$  和  $\text{NADPH}_2$

EMP 与 TCA 产生的  $\text{NADH}_2$  有 3 个去向：

1) 供 H 体（中间产物还原成发酵产物）；

2) 通过呼吸链产生 ATP;

3) 用于细胞物质合成。

但 NADH<sub>2</sub> 要先在转氢酶作用下转变成 NADPH<sub>2</sub> 才能用。

$\text{NADP}^+ + \text{NADH}_2 \rightarrow \text{NADPH}_2 + \text{NAD}$

在体内还有 HMP 供给 NADPH<sub>2</sub> 与磷酸糖。

$1\text{G} + 2\text{NADPH}_2 + \text{CO}_2 + 5\text{-P-核酮糖}$

NADPH<sub>2</sub> 在光细菌中可通过非环式光合磷酸化方式产生。

3、小分子前体物：通常指糖代谢过程中产生的中间代谢物，有 12 种。

代谢回补顺序

1、合成草酰乙酸 (OA) 回补顺序

$\text{PEP} + \text{CO}_2 \xrightarrow{\text{羧化酶}} \text{OA} + \text{P}_i$

$\text{PY} + \text{CO}_2 + \text{ATP} \xrightarrow{\text{羧化酶}} \text{OA} + \text{ADP} + \text{P}_i$

$\text{PEP} + \text{CO}_2 + \text{GDP} \xrightarrow{\text{羧化激酶}} \text{OA} + \text{GTP}$

$\text{PY} + \text{CO}_2 + \text{NADH}_2 \xrightarrow{\text{苹果酸酶}} \text{苹果酸} + \text{NAD}$

$\alpha\text{-KD} + \text{CO}_2 + \text{NADH}_2 \xrightarrow{\text{脱氢酶}} \text{异柠檬酸} + \text{NAD}$

好氧性，利用乙酸微生物，以乙醛酸循环补充草酰乙酸。

2、合成 PEP 的回补顺序

$\text{PY} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{PEP 合酶}} \text{PEP} + \text{ADP} + \text{P}_i$

$\text{PY} + \text{ATP} + \text{P}_i \xrightarrow{\text{PY 双激酶}} \text{PEP} + \text{AMP} + \text{P}_{\text{pi}}$

$\text{OA} + \text{GTP} \xrightarrow{\text{羧激酶}} \text{PEP} + \text{GDP} + \text{CO}_2$

$\text{OA} + \text{P}_{\text{pi}} \xrightarrow{\text{PEP 羧转磷酸酶}} \text{PEP} + \text{P}_i + \text{CO}_2$

综合总结：

二、糖类合成

(一) 单糖合成

1、卡尔文环 Calvin cycle (光合菌、某些自养菌)

(还原的磷酸戊糖环) 分为三个阶段：

①CO<sub>2</sub> 固定②固定 CO<sub>2</sub> 的还原③CO<sub>2</sub> 受体的再生。

关键酶：1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶、磷酸核酮糖激酶。

总反应式：

$6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + 18\text{ATP} + 12\text{NADPH}_2 \rightarrow \text{G} + 18\text{ADP} + 12\text{NADP} + 18\text{P}_i$

另外，产甲烷细菌有厌氧乙酰辅酶 A 途径，少数光合细菌中有还原性 TCA 途径等新的自养 CO<sub>2</sub> 固定途径。

2、EMP 逆过程。

3、糖异生作用。

4、糖互变作用：大量是在核苷二磷酸糖水平上进行。

(二) 多糖合成

E. coli 肽聚糖合成：需 1 个多糖引物。

1、单糖组分在细胞质中合成 (UDP 是第一个载体)

2、逐步加上 AA 生成 UDP-NAM-五肽 (Park 核苷酸)，顺序为 L-Lys, D-Glu, DAP, D-Ala,

D-Ala (不需 tRNA 参与)。其中，2D-Ala D-丙酰-D-Ala (青霉素类似)

此阶段在细胞质中进行。

3、UDP-NAM-五肽转至膜上，与一脂质载体 (细菌萜醇

-C55 类异戊二烯醇) 结合，释放出 NAM-五肽焦磷脂，在膜内侧与 UDP-NAG 结合，构成肽聚糖亚单位。

细菌萜醇是第二个载体。

4、亚单位转移至细胞壁的生长点上（插入），万古霉素、杆菌肽抑制。

5、在细胞膜外侧，亚单位与引物相连（转糖基作用），再通过转肽酶作用，将亚单位末端的 D-丙-D-丙拆开，第四个 AA 与另一亚单位的 DAP 之间交联，另一 D-Ala 释放。

在这一步，由于青霉素是 D-丙-D-丙的结构类似物，则转肽酶被抑制，造成肽链间无法交联，网状结构也连不起来，形成“软壁”，极易破裂死亡。青霉素只对正生长菌起作用，对静息细胞无作用。

## 氮类物质合成

### （一）生物固氮

分子  $N_2$  通过固氮微生物作用形成  $NH_3$  的过程。

1、固氮微生物（都是原核微生物）

①自生固氮菌：好氧、厌氧、兼性厌氧及各种营养类型。

②共生固氮菌：与豆科共生为根瘤菌，与非豆科共生是放线菌。

③联合固氮菌：根际、叶面微生物。

2、固氮机制

只有在不含有化合态氮的培养基上生长，且提供 ATP、还原力等条件下才能固氮。

总反应式： $Mg^{2+}$

$N_2 + 6e + 6H^+ + 12ATP \rightarrow 2NH_3 + 12ADP + 12P_i$

固氮酶

固氮酶 组分 I：钼铁蛋白（MoFd）

组分 II：铁蛋白（Azofd）

都对氧极敏感，遇氧失活，需厌氧条件固氮。

固氮过程：

电子载体：铁氧还蛋白（Fd），黄素氧还蛋白（F1d）也可以。

每步只传递  $2e$ ， $N_2 \rightarrow 2NH_3$  需  $6e$ ，连续三次。

固氮酶底物专一性不高，还能催化一些反应。

$C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$ ,

$N_2O \rightarrow N_2 + H_2O$ ,

$HCN \rightarrow CH_4 + NH_3 + CH_3NH_2$ ,

$2H^+ \rightarrow H_2$ 。

其中  $C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$ ，可用气相色谱检测，可作为固氮系统存在的有效指标。

$N_2 \rightarrow 2NH_3$  去路：自生固氮菌不能储存，也不分泌，很快同化；共生固氮菌分泌至根瘤细胞中为植物所利用。

### （二）氨基酸合成

1、直接从培养基中吸收。

2、通过转氨作用合成其他的氨基酸：

$Glu + \text{丙酮酸} \xrightarrow{\alpha\text{-酮戊二酸}} \text{Ala}$

$Glu + \text{草酰乙酸} \xrightarrow{\alpha\text{-酮戊二酸}} \text{Asp}$

这类反应是由氨基移换酶催化而成。

3、微生物经氨化作用或经固氮作用生成的氨可以通过特定的反应来吸收生成新的氨基酸（氨同化作用）

$\alpha\text{-酮戊二酸} + NH_3 \xrightarrow{\text{谷氨酸脱氢酶}} Glu + H_2O$

$NH_3 + ATP \xrightarrow{Glu} \alpha\text{-KD} + PY + OA$

Gln 合成酶 转移酶

$ADP + Pi \xrightarrow{Gln} Glu + Ala + Asp$

4、从前体合成氨基酸。



按前体不同可将 20 种氨基酸为六组：

- (一) 3-磷酸甘油醛：丝氨酸、半胱氨酸、甘氨酸
- (二) 4-磷酸赤藓糖和磷酸烯醇式丙酮酸：色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸
- (三) 丙酮酸：丙氨酸、亮氨酸、缬氨酸
- (四)  $\alpha$ -酮戊二酸：谷氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸、精氨酸、赖氨酸（真菌中）
- (五) 草酰乙酸：天冬氨酸、天冬酰胺、甲硫氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、赖氨酸（细菌）
- (六) 5-磷酸核酮糖+ATP：组氨酸

初生氨基酸：Ala, Glu, Asp, Gly, 氨基化所生成的氨基酸。

次生氨基酸：以初生氨基酸为前体合成。

工业生产氨基酸

最初利用蛋白质水解法生产，1957 年开始用发酵法生产。近年采用生化合成法：

1、酶转化法

反丁烯二酸+NH<sub>3</sub> Asp 酶 L-Asp

丙酮酸+NH<sub>3</sub>+苯酚 Tyr 酶 Tyr

2、完整细胞酶合成：选用酶活力高菌种，处理菌体使物质易透过。

DL-Ser+丙酮酸+苯酚 菌体 L- Tyr

丙酮酸+ NH<sub>3</sub>+吲哚 菌体 L-Trp

4 节：代谢调控

代谢-生化反应-酶催化-基因编码→基因调控

↓

环境因子影响 环境调控

代谢调节部位：真核和原核

合成调节：诱导合成、终产物阻遏、分解代谢物阻遏

酶

活性调节：反馈（终产物）抑制、酶活性共价修饰

一、主要调节机制

(一) 酶的诱导合成

Karstrom 适应酶 Monod 诱导酶

组成酶 Cohn 组成酶

诱导剂不一定是底物，但底物大多数情况下是有效诱导剂。

诱导酶只在有诱导剂时才合成，除去诱导剂就停止。是全新合成，而不是原有酶的激活。

某些酶的诱导物

操纵子学说

Monod & Jacob, 1962

调节基因 操纵子

P R t P O z y a t

mRNA RNA 多聚酶

无诱导物时，结合。

阻遏物 有诱导物时，脱落。

(二) 终产物阻遏（反馈阻遏）

主要在合成代谢途径中，终产物或其衍生物对该途径上一个或多个酶形成的抑制作用。

如 E. coli Met, Arg 的合成。

机制：调节基因 原阻遏物（阻遏物蛋白）

与终产物结合时被激活，与操纵基因结合，阻止结构基因转录。终产物为辅阻遏物。属于正调节。

### （三）分解代谢物阻遏（葡萄糖效应）

Monod 研究 E. coli 对混合碳源利用，发现葡萄糖抑制其它糖利用，出现二次生长。

所有迅速代谢能源都能阻抑较慢代谢的能源所需酶的合成。酶的生成被易分解碳源所阻遏。此称葡萄糖效应。

酶大多数是诱导酶。

葡萄糖效应并不是由葡萄糖直接造成，而是葡萄糖某种分解代谢物引起。

cAMP（环腺苷酸）是关键控制因子。

其与分解代谢物活化蛋白（CAP）结合，促使 RNA 多聚酶与启动基因结合而开始转录。cAMP 浓度低时，影响结合，不能转录。

葡萄糖的某种代谢产物降低了 cAMP 水平，即使有诱导剂存在，也不能合成分解其它糖的酶，只有葡萄糖消耗完，cAMP 水平上升，才能开始转录、合成。

ATP 腺苷酸环化酶 cAMP 磷酸二酯酶 AMP

### （四）反馈抑制

1、协同反馈抑制：终产物不能单独抑制，要几个终产物同时作用，合作抑制。如多粘芽孢杆菌的 Asp 族氨基酸合成。图 6-53

2、合作反馈抑制：两种终产物同时存在，起着比一种大得多的抑制。图 6-54

3、同工酶：多个酶催化同一个反应，分别受不同终产物抑制。图 6-51

如大肠杆菌的 Asp 族氨基酸合成，图 6-52

4、顺序反馈抑制：代谢途径中第一个酶不受终产物抑制，而受分支处中间产物抑制，终产物抑制引起中间产物积累，从而抑制第一个酶。图 6-57

如红色假单胞菌的 Ile 合成。

5、积累反馈抑制：每一个终产物单独、部分地抑制共同步骤的第一个酶，互不影响。图 6-55

如大肠杆菌的 Gln 合成酶受 8 个终产物抑制。图 6-56

调节位点（变构中心）

反馈抑制机制：变构酶

底物位点（活性中心）

### （五）酶活性共价修饰

由一个修饰酶（活化酶）催化另一种酶起共价修饰的改变，从而改变后者活性。

酶-X 酶 + X（X：小分子化合物）

修饰酶

如大肠杆菌 Gln 合成酶：AMP 与酶共价结合时（腺苷酰转移酶催化）活性低，脱去 AMP，活性高。

胶质假单胞菌柠檬酸裂解酶：乙酰化（有活性），脱乙酰化（无活性）

## 二、代谢调控应用

### （一）在初级代谢产物生产上应用

反馈调节最重要，要绕过，方法如下：

1、降低末端产物浓度（应用营养缺陷型解除正常反馈调节）

单线途径：应用营养缺陷型积累中间代谢物，采用低浓度终产物供给。

Ea Eb Ec

A B C D E

Ec 缺失，积累 C，低浓度供给 E。

分支途径：积累末端产物。

E1 F G

A B C D E

E2 H I

E1 缺失, 限制 I, 少量 E→G, 大部分分泌。

Lys 生产: 高 Ser 缺陷型, 图 6-62

肌苷酸生产: 腺嘌呤缺陷型, 图 6-63

## 2、筛选抗反馈突变株 (解除反馈)

在含有抗代谢物的培养基中培养, 筛选抗性突变株, 其中一些可分泌大量末端产物。如对氨基 Phe/Tyr, 7-氮杂 Trp/Trp

## 3、控制细胞膜渗透性

通过生理学或遗传学方法, 改变膜透性, 使胞内代谢物迅速渗漏到胞外, 解除反馈抑制。

### (二) 在次级代谢产物生产上应用

次级代谢产物通常在细胞生长后期形成, 主要是抗生素、毒素、甾体化合物等。在自然条件下, 微生物产生次级产物能力一般不高, 其生产也受代谢调控。

可通过诱变育种和控制环境条件来提高产量, 但次级产物合成途径比较复杂, 许多还不清楚, 因此关于次级产物合成的确实控制部位还大多不明。

青霉素生产中, 葡萄糖虽能很好利用, 但生产不适宜, 而乳糖虽缓慢利用, 却可多产青霉素。在含葡萄糖和乳糖混合培养基中, 生长阶段迅速利用葡萄糖, 葡萄糖用尽时, 对乳糖利用解阻遏, 不生长, 但产青霉素。也可利用后期流加限量葡萄糖的方法实现。

其他次级产物生产也广泛采用这种方法。另外, 氮源种类、浓度对次级产物产生与积累也有很大的影响, 磷酸盐也有影响。

### (三) 在酶生产上应用

酶合成受基因和代谢物双重控制

#### 1、加诱导剂

诱导酶只有在诱导剂存在时形成, 在培养基中加入诱导剂。要注意底物诱导剂的浓度。

#### 2、降低阻遏物浓度

参与分解代谢的酶, 通常受诱导和阻遏双重控制, 包括终产物阻遏和分解代谢物阻遏。为了大量生产酶, 要避免使用丰富, 复杂培养基, 不要含快速利用的糖类。合成酶类通常被终产物阻遏, 要对产生阻遏的化合物加以限制。

#### 3、利用突变产生不需诱导物或不受阻遏的突变体

(1) 生长在低浓度诱导物中选育不需诱导剂的组成性突变株。

(2) 利用抗代谢物, 筛选不受终产物阻遏的突变体。

(3) 利用被阻遏的酶的底物作唯一的碳源, 可筛选不受分解代谢物阻遏的突变体。

#### 4、增加基因模板

将外源特异基因导入微生物体内, 增加酶产量。

(1) 游离基因转移法

(2) phage 转导法

## 5 节: 自养菌代谢 (微生物的自养代谢)

### 一、光能自养菌

蓝细菌与高等植物相同, 含叶绿素 a, b, 其余含菌绿素, 有光合膜。光合作用只有在有光合色素存在时才进行。

叶绿素 (主要色素): 捕获能量与光反应中心

光合色素

类胡萝卜素 (辅助色素): 只捕能并传至叶绿素

#### (一) 主要类群

P150 表解

属于原核微生物，归于红螺菌目，利用硫化氢、氢气或有机物作为供氢体。常存在于水较清，可透光的厌氧环境中。

- 1、红螺菌科（紫色无硫细菌）：有机物为供氢体，兼性光合。光能异养。
- 2、着色菌科（紫色硫细菌）：专性厌氧，专性光合，硫化物为供氢体，体内外积累硫。光能自养。
- 3、绿菌亚目：绿菌科-绿硫细菌，绿弯菌科-绿色非硫细菌。专性厌氧，专性光合，硫化物为供氢体，胞外积累硫。

## （二）光合作用

光反应：光合色素吸收光能并转化为化学能  
 学能的能量转换反应。

暗反应：利用能量进行 CO<sub>2</sub> 同化。

光合磷酸化即光能引起叶绿素分子逐出电子，并通过电子传递产生 ATP 的方式。

### 1、环式光合磷酸化

逐出电子经电子传递又回到菌绿素，使其恢复到原状态，其间产生 ATP，但不产生还原力，不放出氧气。光合细菌属此类。P151，图 6-33

光合菌还原力来自硫化氢，方式可能是逆向电子传递，消耗光反应产生的 ATP。

$H_2S + NAD^+ \rightarrow S + NADH_2$  积累硫

$NADH_2 + NADP^+ \rightarrow NAD^+ + NADPH_2$

### 2、非环式光合磷酸化

两个光反应系统，除产生 ATP，还有还原力，放出氧气。植物、蓝细菌属此类。

还原力来自水的光解。P151，图 6-34

### 3、噬盐菌紫膜的光合作用

无叶绿素或菌绿素参与的独特的光合作用，是迄今为止最简单的光合磷酸化反应。（自学）

## 二、化能自养菌

无机物氧化获能，通过卡尔文环同化 CO<sub>2</sub>

产能主要方式是氧化磷酸化，还原力产生是逆向电子传递。P148，图 6-30

无机物氧化时，以不同位置进入呼吸链，这与异养菌不同，产能效率低。图 6-31

### 1、硝化细菌

将氨氧化成亚硝酸-亚硝酸细菌

亚硝酸氧化成硝酸-硝酸细菌

$NH_4^+ + 1.92 O_2 \rightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O + 66 \text{ 千卡}$

$NO_2^- + 0.5 O_2 \rightarrow NO_3^- + 18 \text{ 千卡}$  图 6-32

### 2、硫细菌

引起元素硫或还原态硫化物氧化，包括光能与化能。化能即硫化细菌。最多是硫杆菌 Thiobacillus。

$S_2 \rightarrow S \rightarrow SO_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$

由于产硫酸，会引起金属腐蚀，也可用于湿法冶金。

$2S + 3O_2 + 2H_2O \rightarrow 2H_2SO_4$  (T. thiooxidans)

$4FeS_2 + 15O_2 + 14H_2SO_4 \rightarrow 2Fe_2(SO_4)_3 + 8H_2O$  (T. ferrooxidans)

硫酸及硫酸高铁是有效浸溶剂。

$Cu_2S + 2Fe_2(SO_4)_3 \rightarrow 2CuSO_4 + 4FeSO_4 + S$

$FeS_2 + 7Fe_2(SO_4)_3 + 8H_2O \rightarrow 15FeSO_4 + 8H_2SO_4$

### 3、氢细菌

兼性自养菌。  $H_2 + 0.5 O_2 \rightarrow H_2O + 56.5 \text{ 千卡}$

#### 4、铁细菌

将亚铁氧化成高铁，尚未纯培养。

自养菌总结

光合细菌类群 主要供氢体、碳源、生长因子、 $O_2$  释放

绿硫细菌  $S^{2-}$ 、 $S_2O_3^{2-}$ ， $H_2$   $CO_2$  - -

着色细菌  $S^{2-}$ 、 $S_2O_3^{2-}$ ， $H_2$   $CO_2$  - -

红螺细菌 有机物 有机物 + -

蓝细菌 水  $CO_2$  - +

化能自养型菌生理类群

类群 氧化基质及电子供体 氧化产物

亚硝酸细菌  $NH_4^+$   $NO_2^-$   $H_2O$

硝酸细菌  $NO_2^-$   $NO_3^-$   $H_2O$

硫化细菌  $H_2S$ 、 $S$ 、 $S_2O_3^{2-}$ 、 $Fe^{2+}$   $SO_4^{2-}$   $H_2O$   $Fe^{3+}$

氢细菌  $H_2$   $H_2O$

铁细菌  $Fe^{2+}$   $Fe^{3+}$

最终电子受体均为  $O_2$

#### 第四章：微生物生长

生长：有机体的细胞组分与结构在量方面的增加。

繁殖：单细胞-由于细胞分裂引起个体数目的增加。

多细胞-通过无性或有性孢子使个体数目增加的过程。

发育：适合条件下，生长与繁殖始终是交替进行的，从生长到繁殖是一个由量变到质变的过程，这个过程称为发育。

##### 1 节：微生物的发育周期

###### 一、概念

发育周期、单细胞微生物、丝状真菌

###### 二、发育周期中细胞学上变化

###### 1、细胞壁与质膜的延伸

质膜合成位点在赤道带，细胞壁生长也定位在赤道区，并具有种的特异性。

###### 2、DNA 的复制

1) 单向复制 John Cairns: E. Coli 作材料，放射自显影技术。染色体从起始点开始，反时针旋转一周完成。

2) 双向复制 Hiroshi Yoshikawa: 不只按一个方向复制，起点与终点不重合。

3) 滚环模型：不对称复制。一股线状，一股环状复制。

真核微生物复制有多个位点，都是双向。

###### 3、发育循环中基因的表达

DNA 的复制与细胞分裂是协调的。细胞分裂总是发生在 DNA 复制后的一定时间内。抑制 DNA 合成的各种化学处理或突变也抑制细胞分裂。细菌 DNA 复制需 DNA 起始蛋白作用。

E. coli 细胞分裂总是发生在 DNA 复制完成后大约 20 分钟，而 DNA 复制需 40 分钟，这样世代时间应是 60 分钟，但…...

###### 三、细胞分化现象

在某些微生物的发育循环中，一个或一群细胞会从一种形态与功能转变为另一种形态与功能，此称细胞分化或形态发生。

##### 2 节：微生物纯培养的生长

###### 一、纯培养的分离方法 表



## 二、生长测定（适用、注意事项）

直接计数法（全数）

间接计数法（活菌数）

测细胞物质量

## 三、细菌纯培养群体生长规律

将少量纯培养接种到一恒定体积的新鲜液体培养基中，适宜条件下培养，定时取样测定细菌含量，以培养时间为横坐标，以细菌数目的对数或生长速率为纵坐标，得繁殖曲线，对单细胞而言，又称生长曲线。

根据生长速率不同，分为几个时期。

### （一）延迟期 lag phase(停滞期、调整期)

表现：不立即繁殖，生长速率近于 0，菌数几乎不变，细胞形态变大。

特点：分裂迟缓，合成代谢活跃，体积增长快，对外界不良环境敏感。

原因：调整代谢，合成新的酶系和中间代谢产物以适应新环境。

消除：增加接种量；采用最适菌龄接种；培养基成分（种子、发酵）

### （二）对数期 log phase

表现：代谢活性最强，几何级数增加，代时最短，生长速率最大。

特点：细菌数目增加与原生质总量增加，与菌液浊度增加呈正相关性。

代时 (generation time)：单个细胞完成一次分裂所需时间，亦即增加一代所需时间。

$$G = (t_1 - t_0) / n \quad y = x_0 \cdot 2^n \quad n = (\lg y - \lg x) / \lg 2$$

$$\text{导出 } G = (t_1 - t_0) / 3.3 (\lg y - \lg x)$$

影响 G 因素：菌种、营养成分、营养物浓度（很低时影响）、培养温度。

### （三）稳定期 stationary phase(最高生长期、静止期)

表现：新增殖细胞数与老细胞的死亡数几乎相等，活菌数动态平衡。

特点：生长速率又趋于 0，细胞总数最高。

原因：养分减少；有毒代谢物产生。

稳定期细胞内开始积累贮存物，此阶段收获菌体，也是发酵过程积累代谢产物的重要阶段。

延长：补料，调 pH、温度等。

此时，菌体总数量与所消耗的营养物之间存在一定关系，称为产量常数（生长效率）。 $Y = X - X_0 / C$

其中 X-稳定期细胞干重/ml， $X_0$ -接种时干重/ml，C-限制性营养物浓度。

根据这一原理，可进行生物测定。

将未知混合物加到只缺乏特定限制性营养物的完全培养基中，测定培养基所能达到的生长量，就可以计算出原混合物中特定限制性营养物的浓度。

### （四）衰亡期 decline phase

表现：出现“负生长”，有些细胞开始自溶。

对于丝状真菌，细胞数目不呈几何级数增加，无对数生长期，一般有调整期，最高生长期，衰退期。

## 四、连续培养 continuous cultivation

分批培养 batch culture：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。

若不断补充新鲜营养，并及时不断以同样速度排出培养物，则可延长对数期。

只要培养液的流动量能使增殖的新菌数相当于流出的老菌数，就可保证总菌量不变，此即连续培养原理。

主要参数： $D$ （稀释率）= $F$ （流动速率）/ $V$ （容积）

连续培养方法

### 1、恒浊连续培养 turbidostat

不断调节流速使培养液浊度保持恒定。

装置

适用：收获菌体及与菌体相平行的产物。

## 2、恒化连续培养 chemostat

恒定流速，及时补充营养，营养物质浓度基本恒定，从而保持恒定生长速率。又称恒组成连续培养。培养基成分中，必须将某种必需的营养物控制在较低的浓度，以作为限制性因子，而其它营养物过量。常用的有氨、氨基酸、葡萄糖、生长因子、无机盐等。

适用：科研

两种方法比较：

## 五、同步生长 synchronous growth

概念：使所有的细胞都能处于同一生长阶段，同时分裂的生长方式。

同步培养法获得：

### （一）机械法（选择法）

1、离心沉降分离法

2、过滤分离法

3、硝酸纤维素薄膜法

### （二）调整生理条件法（诱导法）

1、温度调整法：亚适生长温度→最适生长温度培养。

2、营养条件调整法：控制浓度或组成，使细胞只能进行一次分裂。

3、用稳定期的培养物接种：稳定期细胞处于衰老状态，移入新鲜培养基，可得同步生长。

### （三）抑制 DNA 合成法

DNA 合成是细胞分裂前提。抑制一段时间再解除抑制。

## 3 节：环境条件对生长影响

### 一、温度

影响两方面。

最低、最适、最高生长温度，致死温度。

微生物生长温度类型：

低温型（嗜冷微生物）

中温型（嗜温微生物）

高温型（嗜热微生物）

### 二、pH

主要影响：引起膜电荷变化，从而影响营养吸收；影响酶活性；改变营养物状态和有害物毒性。

有最适 pH，此时酶活性最高，其他条件适合，生长速率最高，但不是生产的最适 pH。

微生物细胞内的 pH 多接近于中性。

pH 调节措施：

### 三、氧化还原电位 Eh

Eh 与氧分压有关，也与 pH 有关。

不同种类微生物所要求的 Eh 不同。

Eh 影响酶活性，也影响呼吸作用。

### 四、辐射

指通过空气或外层空间以波动方式从一个地方传播或传递到另一个地方的能量。

#### （一）紫外线（非电离辐射）10-380nm

致死主要是细胞中很多物质对紫外线吸收。杀菌作用随剂量增加而增加。紫外线穿透力弱，应用于空气消毒、表面消毒、菌种诱变。

## （二）电离辐射（X、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ）

效应无专一性， $\alpha$ 、 $\beta$  穿透力较弱，X、 $\gamma$  较强。

KI 对电离辐射具保护作用。

## 五、干燥

水分对正常生长必不可少，各种微生物抵抗干燥能力不同。

## 六、渗透压

微生物对渗透压有一定适应能力。高渗溶液-质壁分离，低渗溶液-细胞膨胀破裂。

## 七、超声波（20,000Hz 以上）

使细胞破裂，科研中破碎细胞。

## 八、表面张力

$4.5-6.5 \times 10^{-4}$  N/cm，降低影响。

## 4 节：灭菌与消毒

灭菌 sterilization：杀死所有微生物。

消毒 disinfection：杀死一切病原微生物。

防腐 antisepsis：利用理化因素抑制微生物生长繁殖。

化疗 chemotherapy：利用具有选择毒性化学药物或抗生素来抑制宿主体内病原微生物的生长繁殖，借以达到治疗的一种措施。

## 一、常用灭菌消毒方法

### 1、干热灭菌法

火焰灭菌（灼烧灭菌）、干热灭菌

### 2、湿热灭菌

巴氏消毒、煮沸消毒、高压蒸汽灭菌、间歇加热灭菌、实罐灭菌

### 3、过滤除菌

### 4、放射线灭菌

## 二、常用的消毒剂

理想的消毒剂：杀菌力强，使用方便；价廉；对人、畜无害；能长期保存；溶解度大；无腐蚀性等。

消毒剂种类：氧化剂、重金属盐、有机化合物

相对药效：

## 三、影响灭菌与消毒因素

### 1、微生物种类

### 2、培养基

### 3、消毒剂

### 4、环境因素

## 5 节：化学药剂对微生物作用

能直接干扰病原微生物的生长繁殖并可用于治疗感染性疾病的化学药物。

化学药剂能选择性地作用于病原微生物新陈代谢的某个环节，使其生长受到抑制或致死。

## 一、抗代谢物

结构上类似，竞争性地与酶结合，只有当正常代谢物量少或不存在时才起作用。

最常用的是磺胺类药物。是氨苯磺胺衍生物，其结构与对氨基苯甲酸（PABA）类似，而 PABA 是叶酸分子组成。叶酸是辅酶，在氨基酸、维生素合成中起重要作用，许多细菌需自己合成叶酸，而人和动物利用现成叶酸，因此不受磺胺干扰。

还有异烟肼 rimifon，是吡哆醇对抗物。

## 二、抗生素

作用范围：抗菌谱

作用位点：

- 1、抑制细胞壁合成：青霉素，多氧霉素
- 2、影响细胞膜功能：多肽类，多烯类
- 3、干扰蛋白合成：抑制而非杀死
- 4、阻碍核酸合成：对细胞有毒

三、微生物抗药性

对药物的适应性即是抗药性。

抗药性主要表现（产生机制）

- 1、菌体内产生钝化或分解药物的酶
- 2、改变膜的透性而导致抗药性产生
- 3、被药物作用的部位发生改变
- 4、形成救护途径。

五章：微生物遗传

遗传 heredity-亲代将其特有的生物学特性传递给子代。

遗传性-子代总保持与亲代相同的生物学特性。

遗传型 genotype-生物体所具有的全套遗传物质总称。又称基因型。

表型 phenotype-特定环境中生物体表现出的种种形态与生理特征。

变异 variation-遗传型的改变。

适应或饰变 modification-表型的改变。

基因-指带有足以决定一个蛋白质全部组成所需信息的最短 DNA 片段。

菌株&克隆-指一组遗传型相同的细胞群。

微生物在遗传上特点：

- 1、微生物细胞结构简单，营养体一般为单倍体，方便建立纯系。
- 2、很多常见微生物都易于人工培养，快速、大量生长繁殖。
- 3、对环境因素的作用敏感，易于获得各类突变株，操作性强。大多是无性生殖，变异易保留。

1 节：遗传变异的物质基础

一、证明经典实验

（一）转化实验

1928, Griffith 首次发现 *Streptococcus pneumoniae* 的转化现象。

1944, Avery 等在离体条件下重复这一实验，并对转化本质进行了研究。

终于证明了 DNA 是遗传物质。

Griffith 转化实验：

Avery 转化实验

（二）噬菌体 T2 的感染实验

1952, Hershey & Chase 用 *E. coli*, phage T2 做材料，利用同位素示踪法进行实验。

蛋白质只含 S 不含 P, DNA 只含 P 不含 S, 分别用 <sup>35</sup>S、<sup>32</sup>P 标记 *E. coli*, 用 T2 感染，得到 <sup>35</sup>ST<sub>2</sub>、<sup>32</sup>PT<sub>2</sub>。

实验过程（插入）

（三）病毒拆开与重建实验

1956, Fraenkel & Conrat

用 TMV（烟草花叶病毒）和 HRV（霍氏车前病毒）进行实验，说明遗传信息在 RNA 中。

（插入）

二、遗传物质在细胞中存在方式

- (一) 细胞水平
- (二) 核水平 (plasmid)
- (三) 染色体水平
- (四) 核酸水平
- (五) 基因水平 (遗传功能单位)
- (六) 密码子水平 (遗传信息单位)
- (七) 核苷酸水平 (最低突变或交换单位)

染色体外遗传物质-质粒

染色体外, 独立存在的, 能自主复制的遗传物质。

双股环状 DNA, 可游离存在, 也可整合到宿主 DNA 上。

吖啶类染料、高温、某些离子作用可消除质粒。

附加体 episome: 质粒插入到染色体上和染色体一起复制。

质粒种类

- 1、F 因子 (致育因子): 大肠杆菌中发现, 含质粒为  $F^+$  ( $\delta$ ); 无质粒为  $F^-$  ( $\phi$ ); 质粒 DNA 整合到染色体上为 Hfr.
  - 2、R 因子 (耐药性): 痢疾杆菌, 多价耐药性, 耐药信息携带在质粒上。
  - 3、Col 因子 (大肠杆菌素产生因子)
  - 4、青霉素酶质粒
  - 5、Ti 质粒 (诱癌质粒): 植物根癌, 植物基因工程重要载体。
  - 6、降解质粒: Pseudomonas
- 隐蔽质粒、表达质粒、分泌质粒等。

## 2 节: 基因突变

突变 mutation-遗传物质核酸中的核苷酸顺序突然发生了可遗传的变化。

包括基因突变 (点突变)-由于 DNA 链上的一对或少数几对碱基发生改变而引起。

染色体畸变-DNA 的大段变化现象, 表现为插入、缺失、重复、易位、倒位。

由于重组或附加体等外源遗传物质的整合而引起的 DNA 改变, 不属突变范围。

## 一、基因突变

### (一) 类型

按突变体 mutant 表型 特征不同

- 1、形态突变型: 细胞或菌落形态改变。
  - 2、生化突变型: 代谢途径变异
- 营养缺陷型-由基因突变引起某酶合成能力丧失, 必须在原有培养基中添加相应的营养成分才能生长。
- 抗性突变型-能抵抗有害理化因素, 包括抗药性、抗噬菌体等。
- 抗原突变型-细胞成分尤其是表面成分的细致变异。
- 3、致死突变型: 基因突变导致个体死亡。
  - 4、条件致死突变型: 在某一条件下呈现致死效应, 如温度敏感突变型。

如果从研究者能否从巨大群体中迅速检测和分离出个别突变体的目的来看, 则只有两类突变:

选择性突变-具有选择性标记, 可通过某种环境条件使它们得到优势生长, 从而取代原始菌株。

非选择性突变-无选择性标记, 而只有一些性状的数量差别, 如菌落大小、颜色深浅、代谢物产量等。

### (二) 特点

- 1、不对应性:

突变的性状与引起突变的原因间无直接的对应关系。

相应的环境仅起着淘汰原有非突变型个体的作用, 如果说其有诱变作用, 也可以诱发任何性状的变异, 而不是专一性



地诱发一种变异。

## 2、自发性:

各种突变可以在没有人造的诱变因素下自发发生。

## 3、稀有性:

自发突变频率较低, 一般  $10^{-6}$ ~ $10^{-9}$ 。

突变率- 每个细胞在每一世代中发生某一性状突变的几率。或每单位群体在繁殖一代过程中形成的突变体的数目。

一个细胞长大分裂成两个细胞的过程称为细胞世代。

细胞世代数= $n-n_0$ , 对于非同步生长来说, 对数生长期, 平均世代数= $(n-n_0)/\ln 2$ ,  $m$  为  $n-n_0$  期突变体数目,

突变率=  $m$

$(n-n_0)/\ln 2$

测定  $m$  的简单办法是将一细胞群体培养在平板上, 让突变在平板培养中发生。这种情况下, 每一突变产生一固定在原位的突变体克隆, 经适当处理可以以单一菌落状态检出。

非选择性突变的突变率很难测定。

## 4、独立性:

突变的发生一般是独立的, 某一基因的突变, 既不提高也不降低其他基因的突变率。突变不仅对某一细胞是随机的, 而且对某一基因也是随机的。

## 5、诱变性:

诱变剂作用可提高突变率。

## 6、稳定性:

遗传物质结构发生的稳定变化, 因而产生的新性状也是稳定的, 可遗传的。

## 7、可逆性

野生型 $\rightarrow$ 突变型, 为正向突变

野生型 $\rightarrow$ 突变型, 为回复突变(回变)。

### (三) 自发性与不对应性的证明

突变是通过适应而产生的, 突变的原因与性状间是相对应的。

突变是自发的, 与环境是不相对应的。

### 1、变量试验(1943, Luria & Delbruck)

实验要点:(插入)

结果: 甲各皿抗性菌落数相差较大, 乙各皿数基本相同。

说明: 抗性突变不是由噬菌体诱导出来的。

如果是噬菌体诱导的话, 结果会怎样?

突变发生在什么时间?

噬菌体起什么作用?

### 2、涂布试验(1949, Newcombe 设计)

实验要点(插入)

说明: 抗性突变发生在未接触噬菌体之前, 噬菌体加入只起筛选作用。

如果不是这样, 结果会怎样?

### 3、影印培养试验(1952, Lederberg 设计)

影印培养法- 使在一系列培养皿相同位置上能出现相同菌落的一种接种培养方法。

利用此法可以从在非选择性条件下生长的群体中, 分离出各类突变体。

实验要点:(插入)

结果: 3 上出现抗性菌落, 在 2 上找出相应菌落接种到含药平板上, 长出抗性菌落。而取与 3 上无对应关系的菌落接种到含药平板上则无生长。

#### (四) 突变机制

##### 1、诱变机制 induce mutation , mutagen

###### 1) 碱基对置换 (点突变)

只涉及一对碱基被另一对碱基所置换, 分为转换和颠换。

###### ①直接引起置换的诱变剂

可直接与碱基发生反应, 不论在体内还是离体都起作用。包括亚硝酸、羟胺和各种烷化剂 (硫酸二乙酯、NTG 等)。

以  $\text{HNO}_2$  为例:

$\text{HNO}_2$  可使碱基氧化脱氨, 使  $\text{A} \rightarrow \text{H}$ ,  $\text{C} \rightarrow \text{U}$ ,  $\text{G} \rightarrow \text{X}$ 。

$\text{AT} \rightarrow \text{HeT HkC HkC}$

###### ②间接引起置换的诱变剂

一些碱基结构类似物, 但稳定性比正常碱基小, 易发生互变。通过活细胞的代谢活动掺入到 DNA 中, 只对正在生长发育的细胞有作用, 即 DNA 复制时起作用。

主要是 5-BU, 5-AU, 2-AP, 8-NG 等。

以 5-BU 为例:

$\text{AT A:5-BU (酮式) AT GC}$

$\text{AT G:5-BU (烯醇式) A:5-BU (酮式)}$

还可以看出 5-BU 掺入引起 GC 回复至 AT 的过程。

碱基对置换对密码子影响

简拼 UCG(Ser) (不表现突变现象)

错义 UAC(Tyr)

UCC 错义 UUC(Phe) (所合成蛋白质

(Ser) 有活性或纯化)

无义 UAA(终止符) (合成一些蛋白质碎片)

###### 2) 移码突变

由一种诱变剂引起 DNA 分子中一个或少数几个核苷酸的增添或缺失, 从而使该部位后面的全部密码的转录和转译发生错误。也属于 DNA 分子的微小损伤。

主要是吡啶类染料, 一系列 ICR 化合物。

在 DNA 链上增缺 1、2、4、5 碱基, 可引起移码突变, 增缺 3、6, 则不影响读码, 只引起短的缺、增。

###### 3) 染色体畸变

DNA 分子大的损伤。

①数量变化: 真核有倍数性变化和非倍数性变化; 原核只一条染色体, 获得一段 DNA, 形成部分二倍体。

②结构变化: 又分染色体内与染色体间畸变 (非同源染色体间易位)。

###### 4) 转座因子 transposable element

1940's B. McClintock 玉米遗传研究发现染色体易位。

在染色体组中或染色体组间能改变自身位置的一段 DNA 序列称作转座因子。

有三类:

插入序列 IS: 0.7-1.4 kb, 只能引起转座效应, 不含其它基因。

转座子 Tn : 2-2.5 kb, 含有几个至十几个基因。

Mu 噬菌体: 37 kb, 含有 20 多个基因。

##### 2、自发突变机制

Spontaneous mutation: 指微生物在没有人参与下发生的突变。

- 1) 背景辐射和环境因素的诱变：低剂量长期效应。辐射、高温、低浓度诱变剂。
- 2) 自身代谢产物的诱变： $H_2O_2$ -内源诱变剂。
- 3) 互变异构效应：T、G 酮式或烯醇式，A、C 氨基式或亚氨基式。一般倾向于酮式和烯醇式。T 以烯醇式与 G 配对，C 以亚氨基式与 A 配对。
- 4) 环出效应：DNA 复制过程中偶尔环出。

#### (五) 紫外线对 DNA 的损伤及机体对损伤 DNA 的修复

紫外线作用：同链 DNA 的相邻 T 间形成共价 T 二聚体，阻碍碱基间正常配对，从而引起突变或死亡。

机体对损伤 DNA 的修复：

- 1、光复活作用：经 UV 照射后的微生物暴露于可见光下，可明显降低起死亡率，此称光复活作用。
- 2、暗修复作用（切补修复）：与光无关，须 4 种酶参与：核酸内切酶、核酸外切酶、DNA 聚合酶、DNA 连接酶。
- 3、重组修复：发生在 DNA 复制过程或复制之后，不切除 DNA 损伤部位的修复。DNA 链在复制时，受损的模板作用消失，互补单链（新链）里留下空隙，产生诱导信号，recA 基因被诱导，产生大量重组蛋白，与新链缺口结合，引起子链和母链交换。交换后母链缺口，通过聚合作用，以对侧子链为模板合成 DNA 片段填充，连接酶连接新旧链完成复制。
- 4、SOS 修复：一种能够引起误差修复的紧急呼救修复，是在无模板 DNA 情况下合成酶的诱导修复。正常情况下无活性有关酶系，DNA 受损伤而复制又受到抑制情况下发出信号，激活有关酶系，对 DNA 损伤进行修复，其中 DNA 多聚酶起重要作用，在无模板情况下，进行 DNA 修复再合成，并将 DNA 片段插入受损 DNA 空隙处。

#### 5、DNA 多聚酶的校正作用：DNA

多聚酶除了对多核苷酸的多聚作用外，还具有 3' 到 5' 核酸外切酶作用，依靠这一作用，能在复制过程中随时切除不正常的核甘酸。

上述修复中前 3 种属无错误修复，使诱变作用降低。而 SOS 修复属易误修复，造成误差修复，引起突变。

#### 3 节：突变与育种

菌种工作包括三方面：选种、育种、复壮和保藏。

选种-从自然界和生产中选择符合需要菌种。

育种-进一步提高已有菌种某种性能，使更符合要求。

选育新菌种可从几方面着手：

- 1) 从原有菌株入手进行各种遗传改造工作。
- 2) 根据文献资料报导的微生物种属，向国内外菌种保藏机构索取同种或同属菌株，从中寻求符合要求者。
- 3) 根据所需菌种特性、嗜好或工艺要求，从特定的生态环境中以特定方法重新分离自然菌株。

#### (一) 从自然界分离菌种（菌种分离与筛选）

一般步骤：（插入）

##### 一、采样

主要以土壤为样品，一般采 5-20cm 深处土，须记录日期、地点、环境情况等。要根据筛选目的、微生物分布、菌种特性以及与之有关的环境，综合考虑，具体分析来决定。

##### 二、增殖培养（富集培养）

实际上是初筛浓缩，方法主要是：

- 1、控制营养成分；2、控制培养条件。

菌种筛选主要步骤

调查研究及查阅充分的资料

↓

设计实验方案

↓ 确定采集样品的生态环境

## 采样

↓ 确定特定的增殖条件

## 增殖培养

↓ 确定特殊的选择培养基及可能的

↓ 定性或半定量快速检出法

## 平板分离

↓

## 原种斜面

↓ 确定发酵培养基基础条件

## 筛选

↓

初筛（1 株 1 瓶）

↓

复筛（1 株 3~5 瓶）

↓ 结合初步工艺条件摸索

再复筛（1 株 3~5 瓶）

↓

3~5 株

↓

单株纯种分离

↓ 生产性能试验

↓ → 毒性试验

## 菌种鉴定

## 三、分离

目的微生物不纯，需分离纯化。采用简便迅速，有一定准确性的检出方法，提高筛选效率。常用平皿反应法：

纸片培养显色法：浸有指示剂滤纸。

透明圈法：混浊底物被分解后形成透明圈。如可溶性淀粉、碳酸钙等。

变色圈法：直接用显色剂或指示剂。

生长圈法：利用某些具有特殊营养要求的微生物作为工具菌，要分离的微生物能在一般培养条件下生长而合成该营养物质而使工具菌能生长，形成生长圈。

抑制圈法：琼脂块培养法。

## 四、筛选

即进行生产性能测定，确定适合生产要求菌种。

一般初筛、复筛、再复筛，少数几株进行全面考察。

筛选时培养条件确定是关键，培养基组成、通风、pH、温度等应根据菌株性能、产物代谢途径、类似产品的培养条件及前人的工作进行综合考察，慎重选定。

初筛一株一瓶，取其中 10~20%复筛，一株 3 瓶，直至最后 3~5 株，广泛考察。

### （二）自发突变与育种

#### 一、生产育种

#### 二、定向育种

用某一特定环境长期处理某一微生物群体，同时不断地进行移种传代，以达到积累和选择合适的自发突变体的一种古老育种方法。

近年发展代谢类似物的梯度培养皿法。

### （三）诱变育种

利用物理或化学诱变剂处理均匀分散的微生物细胞群，促进其突变率大幅度提高，然后设法采用简便、快速、高效的筛选方法，从中挑选少数符合目的的突变株，以供生产科研之用。

基本工作步骤：

基本步骤

原种（出发菌株）→纯化→斜面→同步培养→离心洗涤→振荡打散→过滤→菌悬液  
→诱变处理→平板分离→斜面→斜面→斜面→保藏及扩大试验  
（活菌计数）（计数）（变异率）（初筛）（复筛）（再复筛）

#### 一、出发菌株的选择

用作出发菌株有：野生型菌株；生产菌株；经过诱变的菌株。

一般要求生长快，营养要求粗放，发育早，产孢子多，对诱变剂敏感性高，已能积累少量产品或前体物的菌株。

#### 二、菌悬液制备

一般采用单孢子或单细胞悬液。

诱变剂一般只作用与 DNA 的一条链，发生变异无法反映在当代表型上，只有经过 DNA 复制和细胞分裂后，才会使表型发生变异，此即表型延迟。

制备菌悬液时要注意生理状态、均一性、细胞浓度、菌悬液介质（生理盐水或缓冲液）。

#### 三、诱变处理

##### 1、常用诱变剂：

物理诱变剂：紫外线（UV）、X 射线、 $\gamma$  射线、快中子（0.2-10MeV）。

化学诱变剂：硫酸二乙酯 DES，甲基磺酸乙酯 EMS，亚硝基胍 NTG。

总结表

##### 2、诱变剂量：

诱变剂作用：提高突变率；扩大产量变异幅度；使变异朝正变或负变方向移动。

凡是在高诱变率基础上，既能扩大变异幅度，又能使变异移向正变范围的剂量就是合适剂量。图 8-21

##### 3、处理方法：

采用复合处理，包括诱变剂先后使用，同时使用和重复使用，提高效果。

表 8-8

#### 四、变异菌株的分离和筛选

诱变处理后一般要经过培养和变异株筛选。

一般将筛选分为初筛和复筛。

初筛重点在于分离培养尽可能多菌株，采用预先设计的相同培养条件，以量为主，准确性其次，减少漏筛机会。

复筛以质为主，反复多次。

高效筛选方案：

寻找利用和创造形态、生理与生产性状间的相关性。

筛选抗生素生产菌时，可采用琼脂块培养法：图 8-22

### （四）营养缺陷型筛选

基本培养基（MM，[-]）：凡能满足某一菌种野生型和原养型菌株营养要求的最低成分的组合培养基。

完全培养基（CM，[+]）：在基本培养基中加入一些富含生长因子的物质，以满足该微生物各种营养缺陷型要求。

补充培养基（SM，[X]）：在基本培养基中有针对性地加上某一种或几种其自身不能合成的成分，以满足相应营养缺陷型生长的培养基。

营养缺陷型表示：所要求的营养物的头三个字母表示，如 bio-，对应的野生型以 bio+ 表示。

一般步骤：



## 1、诱变处理

2、淘汰野生型：抗生素法、菌丝过滤法。

3、检出缺陷型：方法有

1) 夹层培养法：图 8-23。

2) 限量补充培养法：含微量蛋白胨 (0.01%) 的 [-] 上。

3) 逐个检出法：分别接种到 [-] 和 [+] 上。

4) 影印接种法：[+] 培养，影印至 [-] 上。

4、鉴定缺陷型：

1) 生长谱法：缺陷型斜面培养后，制成菌悬液涂布于 [-] 上，平板上划成不同区域，分别加上一种所需测验的营养物，培养观察。

2) 组合补充培养基法：菌株较多时用。

营养缺陷型应用

1、标记菌种：代谢途径、杂交、基因重组中。

2、生物测定用菌

3、生产菌株：前体积累。

## (五) 抗性突变株筛选

1、一次性筛选：在对于出发菌株完全致死的环境中一次性筛选少数抗性突变株。

2、阶梯性筛选：使用浓度梯度与某一空间或时间。

空间-梯度培养皿法：图 8-18。

时间-类似于驯化。

4 节：基因重组与杂交育种

杂交 hybridization：两个性状不同的菌株或变种之间进行细胞结合，遗传物质交换重新组合成新的性状。

基因重组 gene

recombination：两个不同性状个体内的遗传基因转移到一起，经过遗传分子的重新组合后，形成新遗传型个体的方式。

## 第四章：微生物生长

生长：有机体的细胞组分与结构在量方面的增加。

繁殖：单细胞-由于细胞分裂引起个体数目的增加。

多细胞-通过无性或有性孢子使个体数目增加的过程。

发育：适合条件下，生长与繁殖始终是交替进行的，从生长到繁殖是一个由量变到质变的过程，这个过程称为发育。

1 节：微生物的发育周期

### 一、概念

发育周期、单细胞微生物、丝状真菌

### 二、发育周期中细胞学上变化

1、细胞壁与质膜的延伸

质膜合成位点在赤道带，细胞壁生长也定位在赤道区，并具有种的特异性。

2、DNA 的复制

1) 单向复制 John Cairns: E. Coli 作材料，放射自显影技术。染色体从起始点开始，反时针旋转一周完成。

2) 双向复制 Hiroshi Yoshikawa: 不只按一个方向复制，起点与终点不重合。

3) 滚环模型：不对称复制。一股线状，一股环状复制。

真核微生物复制有多个位点，都是双向。

3、发育循环中基因的表达

DNA 的复制与细胞分裂是协调的。细胞分裂总是发生在 DNA 复制后的一定时间内。抑制 DNA 合成的各种化学处理或突变

也抑制细胞分裂。细菌 DNA 复制需 DNA 起始蛋白作用。

E. coli 细胞分裂总是发生在 DNA 复制完成后大约 20 分钟, 而 DNA 复制需 40 分钟, 这样世代时间应是 60 分钟, 但……

### 三、细胞分化现象

在某些微生物的发育循环中, 一个或一群细胞会从一种形态与功能转变为另一种形态与功能, 此称细胞分化或形态发生。

## 2 节: 微生物纯培养的生长

### 一、纯培养的分离方法 表

### 二、生长测定 (适用、注意事项)

直接计数法 (全数)

间接计数法 (活菌数)

测细胞物质量

### 三、细菌纯培养群体生长规律

将少量纯培养接种到一恒定体积的新鲜液体培养基中, 适宜条件下培养, 定时取样测定细菌含量, 以培养时间为横坐标, 以细菌数目的对数或生长速率为纵坐标, 得繁殖曲线, 对单细胞而言, 又称生长曲线。

根据生长速率不同, 分为几个时期。

#### (一) 延迟期 lag phase (停滞期、调整期)

表现: 不立即繁殖, 生长速率近于 0, 菌数几乎不变, 细胞形态变大。

特点: 分裂迟缓, 合成代谢活跃, 体积增长快, 对外界不良环境敏感。

原因: 调整代谢, 合成新的酶系和中间代谢产物以适应新环境。

消除: 增加接种量; 采用最适菌龄接种; 培养基成分 (种子、发酵)

#### (二) 对数期 log phase

表现: 代谢活性最强, 几何级数增加, 代时最短, 生长速率最大。

特点: 细菌数目增加与原生质总量增加, 与菌液浊度增加呈正相关性。

代时 (generation time): 单个细胞完成一次分裂所需时间, 亦即增加一代所需时间。

$$G = (t_1 - t_0) / n \quad y = x_0 2^n \quad n = (\lg y - \lg x) / \lg 2$$

$$\text{导出 } G = (t_1 - t_0) / 3.3 (\lg y - \lg x)$$

影响 G 因素: 菌种、营养成分、营养物浓度 (很低时影响)、培养温度。

#### (三) 稳定期 stationary phase (最高生长期、静止期)

表现: 新增殖细胞数与老细胞的死亡数几乎相等, 活菌数动态平衡。

特点: 生长速率又趋于 0, 细胞总数最高。

原因: 养分减少; 有毒代谢物产生。

稳定期细胞内开始积累贮存物, 此阶段收获菌体, 也是发酵过程积累代谢产物的重要阶段。

延长: 补料, 调 pH、温度等。

此时, 菌体总数量与所消耗的营养物之间存在一定关系, 称为产量常数 (生长效率)。Y = X - X<sub>0</sub> / C

其中 X-稳定期细胞干重/ml, X<sub>0</sub>-接种时干重/ml, C-限制性营养物浓度。

根据这一原理, 可进行生物测定。

将未知混合物加到只缺乏特定限制性营养物的完全培养基中, 测定培养基所能达到的生长量, 就可以计算出原混合物中特定限制性营养物的浓度。

#### (四) 衰亡期 decline phase

表现: 出现“负生长”, 有些细胞开始自溶。

对于丝状真菌, 细胞数目不呈几何级数增加, 无对数生长期, 一般有调整期, 最高生长期, 衰退期。

## 四、连续培养 continuous cultivation

分批培养 batch culture：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。

若不断补充新鲜营养，并及时不断以同样速度排出培养物，则可延长对数期。

只要培养液的流动量能使增殖的新菌数相当于流出的老菌数，就可保证总菌量不变，此即连续培养原理。

主要参数： $D$ （稀释率）= $F$ （流动速率）/ $V$ （容积）

连续培养方法

1、恒浊连续培养 turbidostat

不断调节流速使培养液浊度保持恒定。

装置

适用：收获菌体及与菌体相平行的产物。

2、恒化连续培养 chemostat

恒定流速，及时补充营养，营养物浓度基本恒定，从而保持恒定生长速率。又称恒组成连续培养。培养基成分中，必须将某种必需的营养物控制在较低的浓度，以作为限制性因子，而其它营养物过量。常用的有氮、氨基酸、葡萄糖、生长因子、无机盐等。

适用：科研

两种方法比较：

五、同步生长 synchronous growth

概念：使所有的细胞都能处于同一生长阶段，同时分裂的生长方式。

同步培养法获得：

（一）机械法（选择法）

1、离心沉降分离法

2、过滤分离法

3、硝酸纤维素薄膜法

（二）调整生理条件法（诱导法）

1、温度调整法：亚适生长温度→最适生长温度培养。

2、营养条件调整法：控制浓度或组成，使细胞只能进行一次分裂。

3、用稳定期的培养物接种：稳定期细胞处于衰老状态，移入新鲜培养基，可得同步生长。

（三）抑制 DNA 合成法

DNA 合成是细胞分裂前提。抑制一段时间再解除抑制。

3 节：环境条件对生长影响

一、温度

影响两方面。

最低、最适、最高生长温度，致死温度。

微生物生长温度类型：

低温型（嗜冷微生物）

中温型（嗜温微生物）

高温型（嗜热微生物）

二、pH

主要影响：引起膜电荷变化，从而影响营养吸收；影响酶活性；改变营养物状态和有害物毒性。

有最适 pH，此时酶活性最高，其他条件适合，生长速率最高，但不是生产的最适 pH。

微生物细胞内的 pH 多接近于中性。

pH 调节措施：

三、氧化还原电位 Eh

Eh 与氧分压有关，也与 pH 有关。

不同种类微生物所要求的 Eh 不同。

Eh 影响酶活性，也影响呼吸作用。

#### 四、辐射

指通过空气或外层空间以波动方式从一个地方传播或传递到另一个地方的能量。

##### （一）紫外线（非电离辐射）10-380nm

致死主要是细胞中很多物质对紫外线吸收。杀菌作用随剂量增加而增加。紫外线穿透力弱，应用于空气消毒、表面消毒、菌种诱变。

##### （二）电离辐射（X、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ）

效应无专一性， $\alpha$ 、 $\beta$  穿透力较弱，X、 $\gamma$  较强。

KI 对电离辐射具保护作用。

#### 五、干燥

水分对正常生长必不可少，各种微生物抵抗干燥能力不同。

#### 六、渗透压

微生物对渗透压有一定适应能力。高渗溶液-质壁分离，低渗溶液-细胞膨胀破裂。

#### 七、超声波（20,000Hz 以上）

使细胞破裂，科研中破碎细胞。

#### 八、表面张力

4.5--6.5 $\times 10^{-4}$  N/cm，降低影响。

#### 4 节：灭菌与消毒

灭菌 sterilization：杀死所有微生物。

消毒 disinfection：杀死一切病原微生物。

防腐 antisepsis：利用理化因素抑制微生物生长繁殖。

化疗 chemotherapy：利用具有选择毒性化学药物或抗生素来抑制宿主体内病原微生物的生长繁殖，借以达到治疗的一种措施。

##### 一、常用灭菌消毒方法

###### 1、干热灭菌法

火焰灭菌（灼烧灭菌）、干热灭菌

###### 2、湿热灭菌

巴氏消毒、煮沸消毒、高压蒸汽灭菌、间歇加热灭菌、实罐灭菌

###### 3、过滤除菌

###### 4、放射线灭菌

##### 二、常用的消毒剂

理想的消毒剂：杀菌力强，使用方便；价廉；对人、畜无害；能长期保存；溶解度大；无腐蚀性等。

消毒剂种类：氧化剂、重金属盐、有机化合物

相对药效：

##### 三、影响灭菌与消毒因素

###### 1、微生物种类

###### 2、培养基

###### 3、消毒剂

###### 4、环境因素

#### 5 节：化学药剂对微生物作用

能直接干扰病原微生物的生长繁殖并可用于治疗感染性疾病的化学药物。

化学药剂能选择性地作用于病原微生物新陈代谢的某个环节，使其生长受到抑制或致死。

## 一、抗代谢物

结构上类似，竞争性地与酶结合，只有当正常代谢物量少或不存在时才起作用。

最常用的是磺胺类药物。是氨苯磺胺衍生物，其结构与对氨基苯甲酸（PABA）类似，而 PABA 是叶酸分子组成。叶酸是辅酶，在氨基酸、维生素合成中起重要作用，许多细菌需自己合成叶酸，而人和动物利用现成叶酸，因此不受磺胺干扰。

还有异烟肼 rimifon，是吡哆醇对抗物。

## 二、抗生素

作用范围：抗菌谱

作用位点：

- 1、抑制细胞壁合成：青霉素，多氧霉素
- 2、影响细胞膜功能：多肽类，多烯类
- 3、干扰蛋白合成：抑制而非杀死
- 4、阻碍核酸合成：对细胞有毒

## 三、微生物抗药性

对药物的适应性即是抗药性。

抗药性主要表现（产生机制）

- 1、菌体内产生钝化或分解药物的酶
- 2、改变膜的透性而导致抗药性产生
- 3、被药物作用的部位发生改变
- 4、形成救护途径。

## 五章：微生物遗传

遗传 heredity-亲代将其特有的生物学特性传递给子代。

遗传性-子代总保持与亲代相同的生物学特性。

遗传型 genotype-生物体所具有的全套遗传物质总称。又称基因型。

表型 phenotype-特定环境中生物体表现出的种种形态与生理特征。

变异 variation-遗传型的改变。

适应或饰变 modification-表型的改变。

基因-指带有足以决定一个蛋白质全部组成所需信息的最短 DNA 片段。

菌株&克隆-指一组遗传型相同的细胞群。

微生物在遗传上特点：

- 1、微生物细胞结构简单，营养体一般为单倍体，方便建立纯系。
- 2、很多常见微生物都易于人工培养，快速、大量生长繁殖。
- 3、对环境因素的作用敏感，易于获得各类突变株，操作性强。大多是无性生殖，变异易保留。

## 1 节：遗传变异的物质基础

### 一、证明经典实验

#### （一）转化实验

1928, Griffith 首次发现 *Streptococcus pneumoniae* 的转化现象。

1944, Avery 等在离体条件下重复这一实验，并对转化本质进行了研究。

终于证明了 DNA 是遗传物质。

Griffith 转化实验：

Avery 转化实验

#### （二）噬菌体 T2 的感染实验

1952, Hershey & Chase 用 *E. coli*, phage T2 做材料，利用同位素示踪法进行实验。



蛋白质只含 S 不含 P, DNA 只含 P 不含 S, 分别用  $^{35}\text{S}$ 、 $^{32}\text{P}$  标记 E. coli, 用 T2 感染, 得到  $^{35}\text{S}$ T2、 $^{32}\text{P}$ T2。

实验过程 (插入)

### (三) 病毒拆开与重建实验

1956, Fraenkel & Conrat

用 TMV (烟草花叶病毒) 和 HRV (霍氏车前病毒) 进行实验, 说明遗传信息在 RNA 中。

(插入)

## 二、遗传物质在细胞中存在方式

(一) 细胞水平

(二) 核水平 (plasmid)

(三) 染色体水平

(四) 核酸水平

(五) 基因水平 (遗传功能单位)

(六) 密码子水平 (遗传信息单位)

(七) 核苷酸水平 (最低突变或交换单位)

## 染色体外遗传物质-质粒

染色体外, 独立存在的, 能自主复制的遗传物质。

双股环状 DNA, 可游离存在, 也可整合到宿主 DNA 上。

吡啶类染料、高温、某些离子作用可消除质粒。

附加体 episome: 质粒插入到染色体上和染色体一起复制。

## 质粒种类

1、F 因子 (致育因子): 大肠杆菌中发现, 含质粒为  $F^+$  ( $\delta$ ); 无质粒为  $F^-$  ( $\phi$ ); 质粒 DNA 整合到染色体上为 Hfr。

2、R 因子 (耐药性): 痢疾杆菌, 多价耐药性, 耐药信息携带在质粒上。

3、Col 因子 (大肠杆菌素产生因子)

4、青霉素酶质粒

5、Ti 质粒 (诱癌质粒): 植物根癌, 植物基因工程重要载体。

6、降解质粒: Pseudomonas

隐蔽质粒、表达质粒、分泌质粒等。 ←

## 2 节: 基因突变

突变 mutation-遗传物质核酸中的核苷酸顺序突然发生了可遗传的变化。

包括基因突变 (点突变)-由于 DNA 链上的一对或少数几对碱基发生改变而引起。

染色体畸变-DNA 的大段变化现象, 表现为插入、缺失、重复、易位、倒位。

由于重组或附加体等外源遗传物质的整合而引起的 DNA 改变, 不属突变范围。

## 一、基因突变

(一) 类型

按突变体 mutant 表型 特征不同

1、形态突变型: 细胞或菌落形态改变。

2、生化突变型: 代谢途径变异

营养缺陷型-由基因突变引起某酶合成能力丧失, 必须在原有培养基中添加相应的营养成分才能生长。

抗性突变型-能抵抗有害理化因素, 包括抗药性、抗噬菌体等。

抗原突变型-细胞成分尤其是表面成分的细致变异。

3、致死突变型: 基因突变导致个体死亡。

4、条件致死突变型: 在某一条件下呈现致死效应, 如温度敏感突变型。

如果从研究者能否从巨大群体中迅速检测和分离出个别突变体的目的来看, 则只有两类突变:

选择性突变-具有选择性标记，可通过某种环境条件使它们得到优势生长，从而取代原始菌株。

非选择性突变-无选择性标记，而只有一些性状的数量差别，如菌落大小、颜色深浅、代谢物产量等。

## （二）特点

### 1、不对应性：

突变的性状与引起突变的原因间无直接的对应关系。

相应的环境仅起着淘汰原有非突变型个体的作用，如果说其有诱变作用，也可以诱发任何性状的变异，而不是专一性地诱发一种变异。

### 2、自发性：

各种突变可以在没有人造的诱变因素下自发发生。

### 3、稀有性：

自发突变频率较低，一般  $10^{-6}$ ~ $10^{-9}$ 。

突变率- 每个细胞在每一世代中发生某一性状突变的几率。或每单位群体在繁殖一代过程中形成的突变体的数目。

一个细胞长大分裂成两个细胞的过程称为细胞世代。

细胞世代数= $n-n_0$ ，对于非同步生长来说，对数生长期，平均世代数= $(n-n_0) / \ln 2$ ， $m$  为  $n-n_0$  期突变体数目，

突变率=  $m$

$(n-n_0) / \ln 2$

测定  $m$  的简单办法是将一细胞群体培养在平板上，让突变在平板培养中发生。这种情况下，每一突变产生一固定在原位的突变体克隆，经适当处理可以以单一菌落状态检出。

非选择性突变的突变率很难测定。

### 4、独立性：

突变的发生一般是独立的，某一基因的突变，既不提高也不降低其他基因的突变率。突变不仅对某一细胞是随机的，而且对某一基因也是随机的。

### 5、诱变性：

诱变剂作用可提高突变率。

### 6、稳定性：

遗传物质结构发生的稳定变化，因而产生的新性状也是稳定的，可遗传的。

### 7、可逆性

野生型?突变型，为正向突变

野生型?突变型，为回复突变（回变）。

## （三）自发性与不对应性的证明

突变是通过适应而产生的，突变的原因与性状间是相对应的。

突变是自发的，与环境是不相对应的。

### 1、变量试验（1943, Luria & Delbruck）

实验要点：（插入）

结果：甲各皿抗性菌落数相差较大，乙各皿数基本相同。

说明：抗性突变不是由噬菌体诱导出来的。

如果是噬菌体诱导的话，结果会怎样？

突变发生在什么时间？

噬菌体起什么作用？

### 2、涂布试验（1949, Newcombe 设计）

实验要点（插入）

说明：抗性突变发生在未接触噬菌体之前，噬菌体加入只起筛选作用。

如果不是这样，结果会怎样？

### 3、影印培养试验（1952, Lederberg 设计）

影印培养法—使在一系列培养皿相同位置上能出现相同菌落的一种接种培养方法。

利用此法可以从在非选择性条件下生长的群体中，分离出各类突变体。

实验要点：（插入）

结果：3 上出现抗性菌落，在 2 上找出相应菌落接种到含药平板上，长出抗性菌落。而取与 3 上无对应关系的菌落接种到含药平板上则无生长。

#### （四）突变机制

##### 1、诱变机制 induce mutation , mutagen

###### 1) 碱基对置换（点突变）

只涉及一对碱基被另一对碱基所置换，分为转换和颠换。

###### ①直接引起置换的诱变剂

可直接与碱基发生反应，不论在体内还是离体都起作用。包括亚硝酸、羟胺和各种烷化剂（硫酸二乙酯、NTG 等）。

以 HNO<sub>2</sub> 为例：

HNO<sub>2</sub> 可使碱基氧化脱氨，使 A→H, C→U, G→X。

AT→HeT HkC HkC

###### ②间接引起置换的诱变剂

一些碱基结构类似物，但稳定性比正常碱基小，易发生互变。通过活细胞的代谢活动掺入到 DNA 中，只对正在生长发育的细胞有作用，即 DNA 复制时起作用。

主要是 5-BU, 5-AU, 2-AP, 8-NG 等。

以 5-BU 为例：

AT A:5-BU(酮式) AT GC

AT G:5-BU(烯醇式) A:5-BU(酮式)

还可以看出 5-BU 掺入引起 GC 回复至 AT 的过程。

##### 碱基对置换对密码子影响

简拼 UCG(Ser)（不表现突变现象）

错义 UAC(Tyr)

UCC 错义 UUC(Phe)（所合成蛋白质

(Ser) 有活性或纯化）

无义 UAA(终止符)（合成一些蛋白质碎片）

###### 2) 移码突变

由一种诱变剂引起 DNA 分子中一个或少数几个核苷酸的增添或缺失，从而使该部位后面的全部密码的转录和转译发生错误。也属于 DNA 分子的微小损伤。

主要是吡啶类染料，一系列 ICR 化合物。

在 DNA 链上增缺 1、2、4、5 碱基，可引起移码突变，增缺 3、6，则不影响读码，只引起短的缺、增。

###### 3) 染色体畸变

DNA 分子大的损伤。

①数量变化：真核有倍数性变化和非倍数性变化；原核只一条染色体，获得一段 DNA，形成部分二倍体。

②结构变化：又分染色体内部与染色体间畸变（非同源染色体间易位）。

###### 4) 转座因子 transposable element

1940's B. McClintock 玉米遗传研究发现染色体易位。

在染色体组中或染色体组间能改变自身位置的一段 DNA 序列称作转座因子。

有三类:

插入序列 IS: 0.7-1.4 kb, 只能引起转座效应, 不含其它基因。

转座子 Tn : 2-2.5 kb, 含有几个至十几个基因。

Mu 噬菌体: 37 kb, 含有 20 多个基因。

## 2、自发突变机制

Spontaneous mutation: 指微生物在没有人参与下发生的突变。

1) 背景辐射和环境因素的诱变: 低剂量长期效应。辐射、高温、低浓度诱变剂。

2) 自身代谢产物的诱变: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-内源诱变剂。

3) 互变异构效应: T、G 酮式或烯醇式, A、C 氨基式或亚氨基式。一般倾向于酮式和烯醇式。T 以烯醇式与 G 配对, C 以亚氨基式与 A 配对。

4) 环出效应: DNA 复制过程中偶尔环出。

(五) 紫外线对 DNA 的损伤及机体对损伤 DNA 的修复

紫外线作用: 同链 DNA 的相邻 T 间形成共价 T 二聚体, 阻碍碱基间正常配对, 从而引起突变或死亡。

机体对损伤 DNA 的修复:

1、光复活作用: 经 UV 照射后的微生物暴露于可见光下, 可明显降低起死亡率, 此称光复活作用。

2、暗修复作用(切补修复): 与光无关, 须 4 种酶参与: 核酸内切酶、核酸外切酶、DNA 聚合酶、DNA 连接酶。

3、重组修复: 发生在 DNA 复制过程或复制之后, 不切除 DNA 损伤部位的修复。DNA 链在复制时, 受损的模板作用消失, 互补单链(新链)里留下空隙, 产生诱导信号, recA 基因被诱导, 产生大量重组蛋白, 与新链缺口结合, 引起子链和母链交换。交换后母链缺口, 通过聚合作用, 以对侧子链为模板合成 DNA 片段填充, 连接酶连接新旧链完成复制。

4、SOS 修复: 一种能够引起误差修复的紧急呼救修复, 是在无模板 DNA

情况下合成酶的诱导修复。正常情况下无活性有关酶系, DNA 受损伤而复制又受到抑制情况下发出信号, 激活有关酶系, 对 DNA 损伤进行修复, 其中 DNA 多聚酶起重要作用, 在无模板情况下, 进行 DNA 修复再合成, 并将 DNA 片段插入受损 DNA 空隙处。

5、DNA 多聚酶的校正作用: DNA

多聚酶除了对多核苷酸的多聚作用外, 还具有 3' 到 5' 核酸外切酶作用, 依靠这一作用, 能在复制过程中随时切除不正常的核糖酸。

上述修复中前 3 种属无错误修复, 使诱变作用降低。而 SOS 修复属易误修复, 造成误差修复, 引起突变。

## 3 节: 突变与育种

菌种工作包括三方面: 选种、育种、复壮和保藏。

选种-从自然界和生产中选择符合需要菌种。

育种-进一步提高已有菌种某种性能, 使更符合要求。

选育新菌种可从几方面着手:

1) 从原有菌株入手进行各种遗传改造工作。

2) 根据文献资料报导的微生物种属, 向国内外菌种保藏机构索取同种或同属菌株, 从中寻求符合要求者。

3) 根据所需菌种特性、嗜好或工艺要求, 从特定的生态环境中以特定方法重新分离自然菌株。

(一) 从自然界分离菌种(菌种分离与筛选)

一般步骤:(插入)

### 一、采样

主要以土壤为样品, 一般采 5-20cm 深处土, 须记录日期、地点、环境情况等。要根据筛选目的、微生物分布、菌种特性以及与之有关的环境, 综合考虑, 具体分析来决定。

### 二、增殖培养(富集培养)

实际上是初筛浓缩，方法主要是：

1、控制营养成分；2、控制培养条件。

菌种筛选主要步骤

调查研究及查阅充分的资料

↓

设计实验方案

↓ 确定采集样品的生态环境

采样

↓ 确定特定的增殖条件

增殖培养

↓ 确定特殊的选择培养基及可能的

↓ 定性或半定量快速检出法

平板分离

↓

原种斜面

↓ 确定发酵培养基基础条件

筛选

↓

初筛（1株 1瓶）

↓

复筛（1株 3~5瓶）

↓ 结合初步工艺条件摸索

再复筛（1株 3~5瓶）

↓

3~5株

↓

单株纯种分离

↓ 生产性能试验

↓ → 毒性试验

菌种鉴定

### 三、分离

目的微生物不纯，需分离纯化。采用简便迅速，有一定准确性的检出方法，提高筛选效率。常用平皿反应法：

纸片培养显色法：浸有指示剂滤纸。

透明圈法：混浊底物被分解后形成透明圈。如可溶性淀粉、碳酸钙等。

变色圈法：直接用显色剂或指示剂。

生长圈法：利用某些具有特殊营养要求的微生物作为工具菌，要分离的微生物能在一般培养条件下生长而合成该营养物质而使工具菌能生长，形成生长圈。

抑制圈法：琼脂块培养法。

### 四、筛选

即进行生产性能测定，确定适合生产要求菌种。

一般初筛、复筛、再复筛，少数几株进行全面考察。

筛选时培养条件确定是关键，培养基组成、通风、pH、温度等应根据菌株性能、产物代谢途径、类似产品的培养条件



及前人的工作进行综合考察，慎重选定。

初筛一株一瓶，取其中 10-20%复筛，一株 3 瓶，直至最后 3-5 株，广泛考察。

## （二）自发突变与育种

### 一、生产育种

### 二、定向育种

用某一特定环境长期处理某一微生物群体，同时不断地进行移种传代，以达到积累和选择合适的自发突变体的一种古老育种方法。

近年发展代谢类似物的梯度培养皿法。

## （三）诱变育种

利用物理或化学诱变剂处理均匀分散的微生物细胞群，促进其突变率大幅度提高，然后设法采用简便、快速、高效的筛选方法，从中挑选少数符合目的的突变株，以供生产科研之用。

基本工作步骤：

基本步骤

原种（出发菌株）→ 纯化→斜面→同步培养→离心洗涤→振荡打散→过滤→菌悬液

→诱变处理 → 平板分离 → 斜面 → 斜面→ 斜面 → 保藏及扩大试验

（活菌计数）（计数）（变异率）（初筛）（复筛）（再复筛）

### 一、出发菌株的选择

用作出发菌株有：野生型菌株；生产菌株；经过诱变的菌株。

一般要求生长快，营养要求粗放，发育早，产孢子多，对诱变剂敏感性高，已能积累少量产品或前体物的菌株。

### 二、菌悬液制备

一般采用单孢子或单细胞悬液。

诱变剂一般只作用与 DNA 的一条链，发生变异无法反映在当代表型上，只有经过 DNA 复制和细胞分裂后，才会使表型发生变异，此即表型延迟。

制备菌悬液时要注意生理状态、均一性、细胞浓度、菌悬液介质（生理盐水或缓冲液）。

## 三、诱变处理

### 1、常用诱变剂：

物理诱变剂：紫外线（UV）、X 射线、r 射线、快中子（0.2-10Mev）。

化学诱变剂：硫酸二乙酯 DES，甲基磺酸乙酯 EMS，亚硝基胍 NTG。

总结表

### 2、诱变剂量：

诱变剂作用：提高突变率；扩大产量变异幅度；使变异朝正变或负变方向移动。

凡是在高诱变率基础上，既能扩大变异幅度，又能使变异移向正变范围的剂量就是合适剂量。图 8-21

### 3、处理方法：

采用复合处理，包括诱变剂先后使用，同时使用和重复使用，提高效果。

表 8-8

## 四、变异菌株的分离和筛选

诱变处理后一般要经过后培养和变异株筛选。

一般将筛选分为初筛和复筛。

初筛重点在于分离培养尽可能多菌株，采用预先设计的相同培养条件，以量为主，准确性其次，减少漏筛机会。

复筛以质为主，反复多次。

高效筛选方案：

寻找利用和创造形态、生理与生产性状间的相关性。

筛选抗生素生产菌时，可采用琼脂块培养法：图 8-22

#### (四) 营养缺陷型筛选

基本培养基 (MM, [-]): 凡能满足某一菌种野生型和原养型菌株营养要求的最低成分的组合培养基。

完全培养基 (CM, [+]): 在基本培养基中加入一些富含生长因子的物质, 以满足该微生物各种营养缺陷型要求。

补充培养基 (SM, [X]): 在基本培养基中有针对性地加上某一种或几种其自身不能合成的成分, 以满足相应营养缺陷型生长的培养基。

营养缺陷型表示: 所要求的营养物的头三个字母表示, 如 bio-, 对应的野生型以 bio+表示。

一般步骤:

1、诱变处理

2、淘汰野生型: 抗生素法、菌丝过滤法。

3、检出缺陷型: 方法有

1) 夹层培养法: 图 8-23。

2) 限量补充培养法: 含微量蛋白胨 (0.01%) 的 [-] 上。

3) 逐个检出法: 分别接种到 [-] 和 [+] 上。

4) 影印接种法: [+] 培养, 影印至 [-] 上。

4、鉴定缺陷型:

1) 生长谱法: 缺陷型斜面培养后, 制成菌悬液涂布于 [-] 上, 平板上划成不同区域, 分别加上一种所需测验的营养物, 培养观察。

2) 组合补充培养基法: 菌株较多时用。

营养缺陷型应用

1、标记菌种: 代谢途径、杂交、基因重组中。

2、生物测定用菌

3、生产菌株: 前体积累。

#### (五) 抗性突变株筛选

1、一次性筛选: 在对于出发菌株完全致死的环境中一次性筛选少数抗性突变株。

2、阶梯性筛选: 使用浓度梯度与某一空间或时间。

空间-梯度培养皿法: 图 8-18。

时间-类似于驯化。

#### 4 节: 基因重组与杂交育种

杂交 hybridization: 两个性状不同的菌株或变种之间进行细胞结合, 遗传物质交换重新组合成新的性状。

基因重组 gene

recombination: 两个不同性状个体内的遗传基因转移到一起, 经过遗传分子的重新组合后, 形成新遗传型个体的方式。

二者关系

一、原核微生物的基因重组

##### (一) 转化 transformation

概念: 受体菌直接吸收了来自供体菌的 DNA 片段, 通过交换, 把它组合到自己的基因组中, 从而获得供体菌部分遗传性状的现象。

转化后的受体菌, 称转化子 transformant

DNA-转化因子。

条件:

1、能进行转化的细胞必须是感受态的。即受体菌最易接收外源 DNA 片段并实现转化的生理状态。

2、DNA 一般都是线状双链 DNA, 不小于  $5 \times 10^5$ D, 转化的片段小于  $10^7$ D, 平均含 15 个基因。

转化频率较低, 一般  $0.1 \sim 1\%$ 。

过程：图 8-25

双链 DNA 结合→酶促分解、形成片段→一条单链降解，一条进入→同源配对、受体相应段切除，交换，杂种 DNA→复制、分离、转化子。

图 8-26

转化育种：DNA 提取，感受态细胞培养和转化。

转染：把噬菌体或其他病毒 DNA (RNA) 提取出来，用它去感染感受态的宿主细胞，并产生正常噬菌体或病毒后代。

## (二) 转导 transduction

概念：通过缺陷噬菌体的媒介，把供体细胞的 DNA 片段携带到受体细胞中，从而使后者获得前者部分遗传性状的现象。

U 型管实验：两株营养缺陷型 LA-22 (try<sup>-</sup>)，溶源性细菌 (受体)；LA-2 (his<sup>-</sup>)，敏感菌 (供体)；温和性噬菌体 P22。结果在 LA-22 端出现原养型 his<sup>+</sup>try<sup>+</sup>。原因？

### 1、普遍转导

噬菌体可误包裹供体菌中任何基因 (包括染色体外遗传物质)，并使受体菌实现各种性状的转导。

#### 1) 完全普遍转导：

噬菌体误包入供体菌 DNA 片段，形成完全不含本身 DNA 的假噬菌体 (一种完全缺陷噬菌体)，感染受体菌后，受体不会溶源化，也不会裂解。导入的 DNA 片段与同源区配对，通过两次交换而重组到受体菌 DNA 上，形成稳定转导子。

#### 2) 流产普遍转导

在获得供体菌 DNA 片段的受体菌内，如果转导的 DNA 不能进行重组和复制，其上的基因仅经过转录而得到表达。此外源 DNA 能够保持下去，任何时候只有一个细胞含有它。表型上仍 出现供体菌特征，能在选择性培养基上形成微小菌落。

### 2、局限转导

通过某些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的转导现象。

产生机制：不正常切割 图 8-30

温和噬菌体整合到细菌 DNA 特定位点上，诱导裂解时，在插入位点两侧的少数宿主基因会因偶尔发生的不正常切割而连在噬菌体 DNA 上，一起包入噬菌体中，形成部分缺陷噬菌体，无正常噬菌体的溶源性和增殖能力。

Compbell 模型

#### (1) 低频转导 (LFT)

E. coli k12 的  $\phi$  phage 成熟时，产生转导噬菌体 ( $\phi$  dgal) 频率为  $10^{-4}$ — $10^{-6}$

，称低频转导。LFT 裂解物在低 moi 下感染宿主，可得极少量局限转导子。

$\phi$  dgal<sup>-</sup> 带有半乳糖基因的  $\phi$  缺陷噬菌体。

#### (2) 高频转导 (HFT)

E. coli gal<sup>-</sup> 受体菌用高 moi 的 LFT 裂解物进行感染时，则凡感染有  $\phi$  dgal 的 细胞，几乎同时感染有正常  $\phi$  。

两种噬菌体可同时整合到受体菌 DNA 上，使其成为双重溶源菌，诱导裂解时，正常  $\phi$  可补偿  $\phi$  dgal 所缺失基因功能，两个噬菌体同时复制，产生裂解物中，大体上含等量  $\phi$  和  $\phi$  dgal。用低 moi 的 HFT 裂解物感染宿主，可高频率转导。

### 3、溶源转变 lysogenic conversion

当温和噬菌体感染其宿主而使之发生溶源化时，因噬菌体基因整合到宿主基因上，而使后者获得了除免疫性以外新性状的现象，称溶源转变。

与转导本质上不同，噬菌体不携带任何供体菌基因，是完整的，而非缺陷的。

普遍转导与局限转导比较 (插入)

## (三) 接合 conjugation

概念：通过供体菌和受体菌完整细胞间的直接接触而传递大段 DNA 的过程。也称杂交。

基本原理：

细菌、放线菌中都存在接合现象。放线菌中天蓝色链霉菌(Streptomyces coelicolor)研究的最为详细。细菌中,大肠杆菌研究最清楚。

$F^+ + F^- = F^+$

F 因子传递过程-滚环模型:

$Hfr + F^- = F^-$

与 F-接合时, Hfr 染色体在 F 因子处发生断裂,环状变成线状,转移至 F-约 100 分钟, F 因子最后转移。转移过程中经常会发生断裂,所以重组频率高,但很少出现 F+。

转移过程与 F 因子传递过程基本相同,但进入 F-

的单链 DNA 经双链化后,形成部分合子,然后同源配对,经过两次或以上的交换才能发生重组。

中断杂交实验

Hfr 染色体转移有严格的顺序性,实验中可每隔一定时间利用强烈搅拌等措施,中断接合,从而获得呈现不同数量 Hfr 性状的 F-

接合子。

根据在 F- 中出现 Hfr 各种性状的时间早晚,可以画出一幅较完整的环状染色体图。

F<sup>-</sup> 菌株-Hfr 菌株的 F 因子因不正常切割而脱离染色体时,可形成游离的但带有一小段染色体基因的 F 因子,称为 F<sup>'</sup> 因子。

此带有 F<sup>'</sup> 因子的菌株-初生 F<sup>'</sup> 菌株。

初生 F<sup>'</sup> + F<sup>-</sup> = F<sup>'</sup> (次生 F<sup>'</sup> 菌株)

既获得了 F 因子,又获得了来自初生 F<sup>'</sup> 菌株的若干遗传性状,以这种接合来传递供体菌基因的方式,称 F 因子转导。(F-duction)

次生 F<sup>'</sup> 菌株中,一部分 F 因子可重新整合到染色体上,恢复成 Hfr 菌株。

接合育种

育种前所选择的亲本必须具有一定的选择性标记,还必须具有 F 因子,受体菌无 F 因子,但必须为 F 因子可亲和。

1、菌株准备

2、杂交

3、重组体检出

(四)原生质体融合 Protoplast Fusion

通过人为方法,使遗传性状不同的两细胞的原生质体发生融合,并产生重组子的过程,又称细胞融合。

1、杂交频率高

2、受接合型或致育性限制较少,但与亲缘性有一定关系。

3、遗传物质传递更完整。

4、存在两株以上亲株同时参与融合可能。

5、可以采用产量性状较高菌株作融合亲株。

6、提高生产性状的潜力较大。

7、原生质体较容易进行转化,可用于工业微生物育种工作

二、主要步骤

1、原生质体制备:

作为育种菌株须:①具有良好生产性状②具有一些稳定的明显的遗传标记。

一般采用双标记,避免回复突变干扰。离心收集对数后期菌体,破壁。原生质体低渗中易破裂,使用渗透压稳定剂进行保护。(甘露醇、山梨醇、蔗糖、氯化钾、氯化钠等)

离心收集原生质体。

## 2、原生质体融合：

加入促融合剂-聚乙二醇（PEG）及  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ ，使原生质体表面形成电极性，相互易于吸引，形成聚集物。UV、电场、激光等技术可应用。

## 3、再生成正常细胞：

融合后的原生质体不具细胞壁，不能在普通培养基上增殖，无法表现，必须使其重新形成壁。再生培养基必须具有与原生质体体内相同渗透压，常用含  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  及渗透压稳定剂的完全培养基。

检出融合细胞。

外源基因命运

1、具备复制的必要因子，能在受体细胞中坚持下去并进行复制，发展成部分二倍体无性系。

2、流产转导。

3、被酶解-寄主限制。

4、重组。

## 二、真核微生物基因重组

### （一）有性杂交

一般指性细胞间的接合和随之发生染色体重组，并产生新遗传型后代的一种方式。

常见有性孢子。

### （二）准性生殖 parasexual reproduction

类似于有性生殖但更为原始的一种生殖方式。可使同一生物的两个不同来源的体细胞经融合后，不通过减数分裂而导致低频率的基因重组。

主要过程：图 8-37

1、菌丝联结、质配。

2、形成异核体。

3、核配。

4、体细胞交换和单倍体化。

体细胞中染色体交换-有丝分裂交换：双倍体杂合子遗传性状不稳定，进行有丝分裂过程中，极少数核中染色体会发生交换和单倍体化，而形成具有新性状的单倍体杂合子。

有性生殖与准性生殖区别：表 8-12

准性杂交

主要步骤：图 8-38

1、选择亲本：要有选择性标记。

2、强制形成异核体。

3、移单菌落。

4、检验稳定性。

5、促进变异。然后筛选。

归纳总结：表 8-10

基因工程 gene engineering

5 节：菌种衰退、复壮和保藏

### 一、衰退与复壮

对产量性状而言，菌种的负变就是衰退，其他原有典型性状变得不典型了，也是衰退。

一个重要原因是基因突变，与控制生产性状有关的基因负变造成生产性状劣化。培养、保藏条件等也有影响。

#### （一）衰退的防止

1、控制传代次数；

2、创造适宜的培养条件；



- 3、利用不同类型细胞进行接种传代；
- 4、采用有效的菌种保藏方法，加强菌种管理措施。

## （二）复壮

- 1、纯种分离
- 2、通过宿主体进行复壮（寄生性微生物）
- 3、淘汰已退化个体

## 二、菌种保藏

首先挑选典型优良纯种，其次创造一个有利于休眠的环境条件，还要考虑方法的通用性与简便性。

- 1、低温保藏：冰箱、超低温。
- 2、干燥保藏：土壤、细砂、硅胶等。
- 3、隔绝空气保藏：石蜡油封。
- 4、冻干保藏：综合低温、干燥、真空。
- 5、活体保藏：病原微生物、病毒。

实验室常用方法：

菌种保藏机构简介

中国微生物菌种保藏管理委员会 CCCC

### 1、普通微生物菌种保藏管理中心

中科院北微所（AS）：真菌、细菌

武汉病毒所（AS-IV）：病毒

### 2、农业微生物菌种

农科院土肥所（ISF）

### 3、工业微生物菌种

食品发酵所（IFFI）

### 4、医学微生物菌种

医科院皮研所（ID）：真菌

卫生部检定所（NICBP）：细菌

医科院病毒所（IV）：病毒

### 5、抗生素菌种

医科院医药生物技术所（IA）

四川抗研所（SIA）：新抗菌种

华药抗研所（IANP）：生产菌种

### 6、兽医微生物菌种

农业部兽医药品监察所（CIVBP）

中国典型培养物收藏中心（武汉大学）

国外

美国典型菌种收藏所（ATCC）

美国农业部北方地区研究室（NRRL）

日本大阪发酵研究所（IFO）

荷兰真菌中心收藏所（CBS）

法国里昂巴斯德研究所（IPL）

西德柯赫研究所（RKI）

苏联科学院微生物研究所（IM）

## 六章：微生物生态与环境保护

（自然条件下的微生物）

生物圈 biosphere

：地球上所有生命活动的范围，是地球上全部生活有机体与其环境相互作用的统一整体。是所有生态系统的总和。

微生物生态：研究处于环境之中的微生物，和与微生物相联系的物理、化学和生物等环境条件，以及它们之间的关系。

生态系 ecosystem：生物与其生境通过能量流动和物质循环所组成的一个整体结构。生物群落是核心。

1 节：自然界中的微生物

一、土壤中微生物

土壤是自然界最适宜微生物生长的环境，具有微生物所需一切营养物及各种条件。种类主要是异养型种类。

二、水中微生物

种类和数量要比土壤中少得多。

淡水中微生物主要来源于土壤、空气、污水或死亡腐败的动植物体。海水中微生物总量超过陆地。

饮用水标准：每 ml 水细菌总数不超过 100 个，E. coli 每升水不超过 3 个。

三、空气中微生物

空气非微生物生长良好环境。微生物通过各种方式传入空气，又随风传播。

数量取决于环境。

潮湿空气中微生物比干燥空气中少，因为潮湿空气中微生物被小水滴带着沉降下去了。

空气中菌数测定：过滤收集，培养计数。

四、极端环境微生物

了解这些微生物，可以利用其特殊基因、机能，创造有用新种。

2 节：微生物间以及与其他生物间的关系

生物间关系：

一、微生物间关系

1、互生：较松散联合，可以是一方得利，或双方有利。（混菌培养）

2、共生：紧密结合在一起，高度发展时，形成特殊共住体，生理上有分工，组织、形态上产生新结构。

地衣：藻类 + 真菌

3、寄生：一种生物生活在另一种生物表面或体内，从后者获得营养。

4、拮抗：一种生物产生不利于另一种生物生存的代谢物质或改变环境条件，抑制甚至杀死另一种生物的现象。

5、捕食：一种生物直接吞食另一种生物。

二、与高等植物关系

共生：根瘤菌，菌根菌

互生：根际微生物

寄生：植物病原微生物

三、与人及动物关系

共生：瘤胃微生物，白蚁

互生：人体肠道正常菌群

寄生：病原微生物，寄生于昆虫（生物杀虫剂）

择生生物（悉生生物）：接种有一种或多种已知微生物的无菌动物。

3 节：微生物与自然界中的物质循环

物质循环：一切生物将所需重要化学元素自非生命物质状态转变为有生命的物质状态，再自有生命的物质状态转变为非生命的物质状态，如此循环不已。

微生物既是分解者、消耗者，又是生产者。

一、碳素循环

微生物作用：1) 光和作用 2) 分解作用

大气二氧化碳(0.02%)约 6000 亿吨,植物光合作用年消耗 600 到 700 亿吨,燃烧年产生 50~60 亿吨,人和动物呼吸产生的二氧化碳仅够植物光合作用一个月之需,90%二氧化碳由微生物代谢活动产生。

经光合作用固定地二氧化碳,大部分以聚糖形式累积在木本、草本内。

## 二、氮素循环

分子态氮、有机态氮、无机态氮

图 9-6。微生物作用:固氮、硝化、反硝化、氨化、氨同化

## 三、硫素循环

元素态、无机化合态、有机态

图 9-7。微生物作用:脱硫、硫酸盐还原作用(同化性、异化性)、硫化(无机硫氧化)。

## 四、磷素循环

自然界无机磷主要是磷酸钙,有机磷主要是核蛋白、核酸、卵磷脂等,都是非溶性的。

转变为可溶性,主要是微生物作用。

## 4 节:微生物与环境保护

当有害物质浓度超过了生态系统的净化能力时,就会造成对生态系统结构和机能的破坏,打破生态系统的平衡,使人类生活的环境发生变化,此即环境污染。

### 一、微生物对污染物的降解与转化

#### 1、主要污染物

无毒有机物:易被生物降解;

有毒有机物:不易被生物降解。

无毒无机物:一些营养性无机盐;

有毒无机物:重金属等 Hg As Pb Cd。

#### 2、微生物的降解与转化

##### 对无机污染物的转化

微生物不能降解重金属,只能使它们发生形态之间的相互转化及分散和富集过程。也就是改变金属在环境中的存在形态,从而改变它们的毒性

有机 Hg Pb 无机 Hg Pb

##### 对有机污染物的降解

农药:主要通过催化作用使农药分子发生一些结构改变,使其被分解。

石油:多种烃类混合物,多种微生物共同作用,

## 二、水污染及防治

### 1、水的污染源

污染指标:

COD(化学需氧量):使用强氧化剂(高锰酸钾、重铬酸钾)使 1L 污水中的有机物进行化学氧化时所消耗的氧的毫克数。  
mg/L

BOD5(五日生化需氧量):20℃时,每 L 废水所含有有机物在 5 天内进行微生物氧化时所消耗的氧量,mg/L。

### 2、处理废水的微生物法

#### (1) 厌氧处理法(产能型)

采用厌氧消化器把微生物可降解的有机物转化成甲烷、二氧化碳、水和其它气体的一种处理方法。

过程:三个阶段,图 9-11:涉及到的微生物,发生的反应。

#### (2) 好氧处理法

过程

①活性污泥法(曝气法)(耗能型):利用含有好氧微生物的活性污泥,在通气条件下,使污水净化的生物学方法。

活性污泥是一种絮状污泥,主要是菌胶团形成菌,原生动物,有机和无机胶体以及悬浮物组成。人工培养、驯化获得。

根据污水在系统中流动状况分为推流式和完全混合式。

②生物膜法：以好氧微生物组成的生物膜为净化主体的生物处理方法。

A、滴滤池法（节能型）（洒水滤床法）

B、生物转盘法（耗能型）

③氧化塘法（节能型）（稳定塘）：大面积敞开式污水处理池，利用藻菌互生系统来分解有机物，使污水得以净化。

固体废物采用堆肥法和沼气发酵法。

七章：传染与免疫

1 节：传染 infection

非传染性：生理性、遗传性等

疾病 病原微生物（病毒、细菌）

传染性

其它生物（寄生虫等）

传染是病原微生物侵入机体后，在机体一定部位生长繁殖，并引起一系列病理生理的过程。

传染是宿主、病原菌、环境因素三方面力量作用的结果。

一、传染的三种可能结局

1、隐性传染

2、带菌状态

3、显性传染

传染病专指显性传染。

二、决定传染结局的三个因素

（一）病原微生物在传染免疫中作用

要造成感染，必须能抵抗机体内的天然防御机能而不被消灭，并在侵入体内后能生长繁殖，扰乱机体的新陈代谢，造成传染。

要具备一些条件才能传染（P320）

1、毒力或致病性

某种微生物对一定宿主，在一定条件下引起疾病的能力。

强弱取决于以下因素：

1) 侵袭力：与酶（卵磷脂酶、透明质酸酶、胶原酶、链激酶、凝固酶）和微生物结构（荚膜、菌毛、表面抗原）有关。

2) 毒素

①内毒素：多由 G<sup>-</sup>产生，化学组成为脂多糖。

②外毒素：某些 G<sup>+</sup>分泌到体外的毒性物质，化学组成为蛋白质。如破伤风毒素、肉毒毒素、白喉外毒素等。

外毒素可用 0.3-0.4% 甲醛脱毒，成为类毒素（仍保持抗原性）。

内、外毒素比较：P322，表 10-1

2、数量

与毒力强弱有关。多数病原微生物需要足够数量侵入机体，才能发病。

3、侵入途径

不同菌侵入途径不同，只有侵入易感机体的一定部位，才能发病。

（二）机体在传染免疫中作用（宿主的免疫力）

1、免疫定义 Immune

机体对体内外生物性刺激的反应，在正常情况下机体识别异物、排除异物、消灭异物的生理功能。

或者说机体识别自己、排除异己抗原物质的一种生理功能。

既有有利一面，也有有害一面。

2、免疫反应分类

### 1) 非特异性免疫与特异性免疫

非特异性免疫是机体对所有病原微生物都有防御作用，没有特殊的选择性。它受遗传控制，是机体在长期的种系发育与进化过程中逐渐建立起来的一系列防卫机能，在个体一出生就具有。

又称天然免疫（先天免疫）

特异性免疫是指机体针对某一种或某一类微生物或其产物所产生的特异性抗力。

是个体在生活过程中通过隐性感染或预防接种等方式，使抗原与免疫系统的细胞相接触后而获得的防卫机能。又称后天获得性免疫

### 2) 自动免疫与被动免疫

自动免疫是指用人工方法注射抗原（菌苗、疫苗、类毒素），使机体产生免疫功能。

被动免疫是指用人工方法注射抗体（抗毒素、抗血清）而产生对病原体的抵抗力。

### 3) 细胞免疫与体液免疫

细胞免疫是指致敏淋巴细胞与其相应抗原作用所产生的特异性免疫。

体液免疫是抗体的免疫作用。

### 3、免疫的功能

1) 生理防御功能（免疫防御）

2) 自身稳定功能（免疫稳定）

3) 免疫监视作用（及时排除突变细胞。）

#### （三）环境因素

P325 表解

### 2 节：非特异性免疫

#### 一、机体的天然屏障作用

1、皮肤和粘膜（体外屏障）

2、内部屏障

#### 二、吞噬细胞

白细胞分类：P327，表 10-4，图 10-1

1、噬中性粒细胞：吞噬过程。图 10-2

2、巨噬细胞：来源、功能。

### 三、炎症反应

#### 四、体液因素（正常体液中的抗微生物因素）：P330，表 10-5

##### 1、补体系统

补体是存在于正常血清中一组具有酶活性的蛋白，有补充抗体作用能力，其作用无特异性，可与抗原抗体复合物作用，不能单独作用于抗原或抗体。补体由巨噬细胞、肠上皮细胞及肝、脾细胞产生。

补体系统由 11 个血清蛋白构成，C1-C9，C1 又分 C1q、C1r、C1s。是一组酶原，被激活后发挥作用。

补体攻击细胞结果，使膜损伤，导致细胞裂解。促进吞噬作用。与变态反应有关。

##### (2) 干扰素 interferon IFN

干扰素是一类在同种细胞上具有抗病毒活性的蛋白质，其活性发挥又受细胞基因组的调节和控制，涉及到 RNA 和蛋白质合成。

人干扰素有  $\alpha$  干扰素（白细胞干扰素）， $\beta$  干扰素（成纤维细胞干扰素）， $\gamma$  干扰素（免疫干扰素）。

干扰素诱生剂：P331

天然干扰素是分子量为 2 万的糖蛋白，其作用无特异性，但产生干扰素的动物和被保护的动物之间却有种属特异性。

不过也有交叉保护作用。干扰素作用时间短，仅几天。



作用机制：P331, 图 10-3

主要抑制病毒的复制，其可激活宿主 DNA, 产生抗病毒蛋白 (AVP)，与核糖体作用，使其只能合成宿主蛋白，而不能合成病毒蛋白。

### 3 节：特异性免疫

#### 一、参与特异性免疫的组织器官

胸腺、腔上囊、骨髓、淋巴结、脾脏。前三者称中央淋巴组织，后二者称外周淋巴组织。

#### 二、参与特异性免疫的细胞

免疫活性细胞是指在免疫过程中受抗原刺激后能进行分化、增殖并发生特异性免疫应答的 T、B 细胞。

免疫细胞主要是各类淋巴细胞、巨噬细胞等

免疫细胞均来源于骨髓干细胞。

1、干细胞：分化图 P336, 图 10-5

2、T 淋巴细胞（胸腺依赖淋巴细胞）

T 细胞发育过程（细胞免疫）

T 细胞表面标志：绵羊红细胞 (sRBC) 受体、有丝分裂原受体等。

T 细胞分类：

T 调节细胞 辅助性 T 细胞 (TH)

(TR) 抑制性 T 细胞 (TS)

T 效应细胞 迟发型超敏 T 细胞 (TD)

(TE) 细胞毒 T 细胞 (TC)

2、B 淋巴细胞（骨髓依赖淋巴细胞）

发育过程：体液免疫

标志：膜表面免疫球蛋白 SmIg。

还有一些淋巴细胞，如 K 细胞、NK 细胞等。

#### 3、巨噬细胞

在特异性免疫中，淋巴细胞不易直接接触抗原，须经巨噬细胞吞噬消化，将抗原信息传递给淋巴细胞。此外，巨噬细胞还能释放白细胞介素-1，参与免疫。

#### 三、特异性体液免疫

由抗体介导的免疫

1、中和外毒素

2、调理作用

3、凝集作用

4、阻止病原菌对粘膜的吸附

#### 四、特异性细胞免疫

致敏 T 淋巴细胞介导的

1、TD 细胞的作用：释放淋巴因子，其作用于免疫活性细胞而产生免疫效应。

主要的淋巴因子：表 10-8

淋巴因子作用无特异性，但其释放需特异性抗原刺激。

2、TC 细胞作用：能特异性地识别靶细胞表面抗原，与其结合，使其溶解。

#### 非特异性免疫与特异性免疫关系

免疫应答 (immune

response): 从一个抗原刺激开始, 机体内抗原特异性淋巴细胞识别抗原 (感应) 后, 发生活化、增殖和分化, 表现出一定的体液免疫和细胞免疫的效应的过程。

分三阶段, 两种类型。

4 节: 抗原与抗体 Antigen and Antibody

一、抗原

(一) 定义: 一类能刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞, 并能与这些产物在体内或体外发生特异性反应的物质, 具有一定的化学结构、物理及生物学特性, 并具有免疫原性 (抗原性) 和反应原性。

免疫原性: 刺激机体产生特异性抗体或致敏淋巴细胞的免疫应答能力。

反应原性: 能和特异性抗体或致敏淋巴细胞结合, 发生特异性反应的能力。

(二) 种类

1、完全抗原: 具有抗原性和反应原性

2、半抗原: 只有反应原性, 没有抗原性。

(三) 性质

(免疫原性的物质基础)

1、异物性

1) 异种间物质

2) 同种异体间物质: ABO 血型, 移植排斥。

3) 自体隔绝成分

4) 自体组织蛋白变性, 成为自身抗原。

2、一定的物化特性

1) 大分子物质

2) 一定的结构

3) 特异性: 由分子表面上的特定化学基团—抗原决定基所决定的。半抗原实际上就是抗原决定基。任何抗原都可看成是一个载体与半抗原的复合物。

(四) 微生物抗原结构

鞭毛抗原 (H 抗原)

菌体抗原 (O 抗原)

表面抗原: 如荚膜抗原

外毒素和类毒素

二、抗体

(一) 定义: 由抗原刺激机体的 B 细胞, 由 B 细胞转化成浆细胞所产生的具有特异性的免疫球蛋白。Immunoglobulin Ig 抗体在体外可与相应抗原作用产生可见反应—血清学反应; 在体内可起抗传染作用。

(二) 种类

IgG, IgM, IgA, IgE, IgD.

(三) 结构

5 种 Ig 结构基本上相似。

单体由 4 条多肽链组成, 两条长链称重链 (H 链), 两条短链称轻链 (L 链), 呈 Y 字形, 链间由二硫键相连。

P344, 图 10-11

不变区 (C 区) 与可变区 (V 区), 枢纽区, 抗原结合在 V 区。

木瓜蛋白酶水解 IgG, 可得 3 个片段, 2 个相同片段称 Fab (抗原结合片段), 1 个片段称 Fc (可结晶片段)。

因此 1 个 Y 字抗体有 2 个抗原结合点, 是两价抗体。

胃蛋白酶、巯基试剂水解产物

五类抗体性质及特性（补充讲义）

（四）抗体形成一般规律

1、初次反应与再次反应：图 10-17

2、回忆反应

3、几类抗体出现顺序

（五）抗体形成机理

P350 表解

1、诱导学说（模板学说）

2、无性繁殖系选择学说 P352，图 10-18

3、抗体多样性分子生物学机制

（六）淋巴细胞杂交瘤技术与单克隆抗体

1、多克隆抗体及缺点

2、淋巴细胞杂交瘤技术建立 图 10-20

3、单克隆抗体应用

三、抗原抗体反应

（血清学反应）

（一）抗原抗体结合的一般特点

1、高度特异性

2、是分子表面结合

3、需要合适的比例（区域现象）

4、反应分两个阶段

1) 特异结合阶段

2) 可见反应阶段

（二）反应组成成分

1、抗原

2、特异抗体

3、环境因素

基本因素：需电解质、温度、pH 等。

特殊因素：有的需补体、白细胞。

（三）反应类别

1、沉淀反应

抗原、抗体都处于溶解状态，按适当比例混合后，在电解质、温度适合的条件下，产生沉淀现象。

抗原称沉淀原，抗体称沉淀素。

实验方法有玻片法、试管法、环状试验、琼脂扩散法、免疫电泳

2、凝集反应：

颗粒性抗原与其特异性抗体在有电解质情况下，结合成可见凝集块。

抗原称凝集原，抗体称凝集素。

与沉淀反应区别

实验方法有直接凝集实验、间接凝集实验、间接凝集抑制实验（免疫妊娠试验）、交叉凝集与凝集素吸收实验（图 10-10）。

### 3、补体结合反应

补体作用没有特异性，可与任何抗原抗体复合物结合，但不能单独与抗原或抗体结合。

如结合的抗原是红细胞，则出现溶血现象；如抗原是细菌，则溶菌；如抗原是自身成分，则发生免疫损伤。

(1) 结合系统：主要是抗原（可溶性）、抗体及补体，都是液体，无可见反应，要有：

(2) 指示系统（溶血系统）：羊红细胞与羊红细胞抗体（溶血素），若补体被结合，不溶血，反应阳性，说明抗原、抗体是对应的；若补体不结合，则与溶血系统结合，出现溶血，反应阴性，说明抗原、抗体不对应。

示意图：图 10-23

血清学反应总结（补充讲义）

抗原抗体反应应用（现代免疫标记技术）

1、免疫荧光方法（荧光抗体法）：荧光标记抗体，荧光标记抗抗体。

2、酶免疫测定：酶标记抗体或抗抗体进行抗原抗体反应。示意图：图 10-24

常用酶是辣根过氧化物酶 HRP，以二氨基联苯胺 DRP 为底物，产生棕褐色。

双抗体夹心法和间接免疫吸附法（酶联免疫吸附试验法 ELISA、酶标法）

3、放射免疫测定法 RIA

4、免疫电泳技术 IEM

5、发光免疫测定法 LIA

各种免疫反应的敏感性比较：表 10-10

### 5 节：免疫病理

（变态反应、过敏反应）

#### 一、概念

机体再次接受抗原或半抗原刺激后，产生的体液性或细胞性的异常免疫反应，从而引起组织损伤或生理机能障碍。

根据出现症状快慢分为速发性（与抗体有关）、迟发性（与致敏 T 淋巴细胞有关）变态反应。

#### 二、各型变态反应（补充讲义）

### 6 节：生物制品（自学）