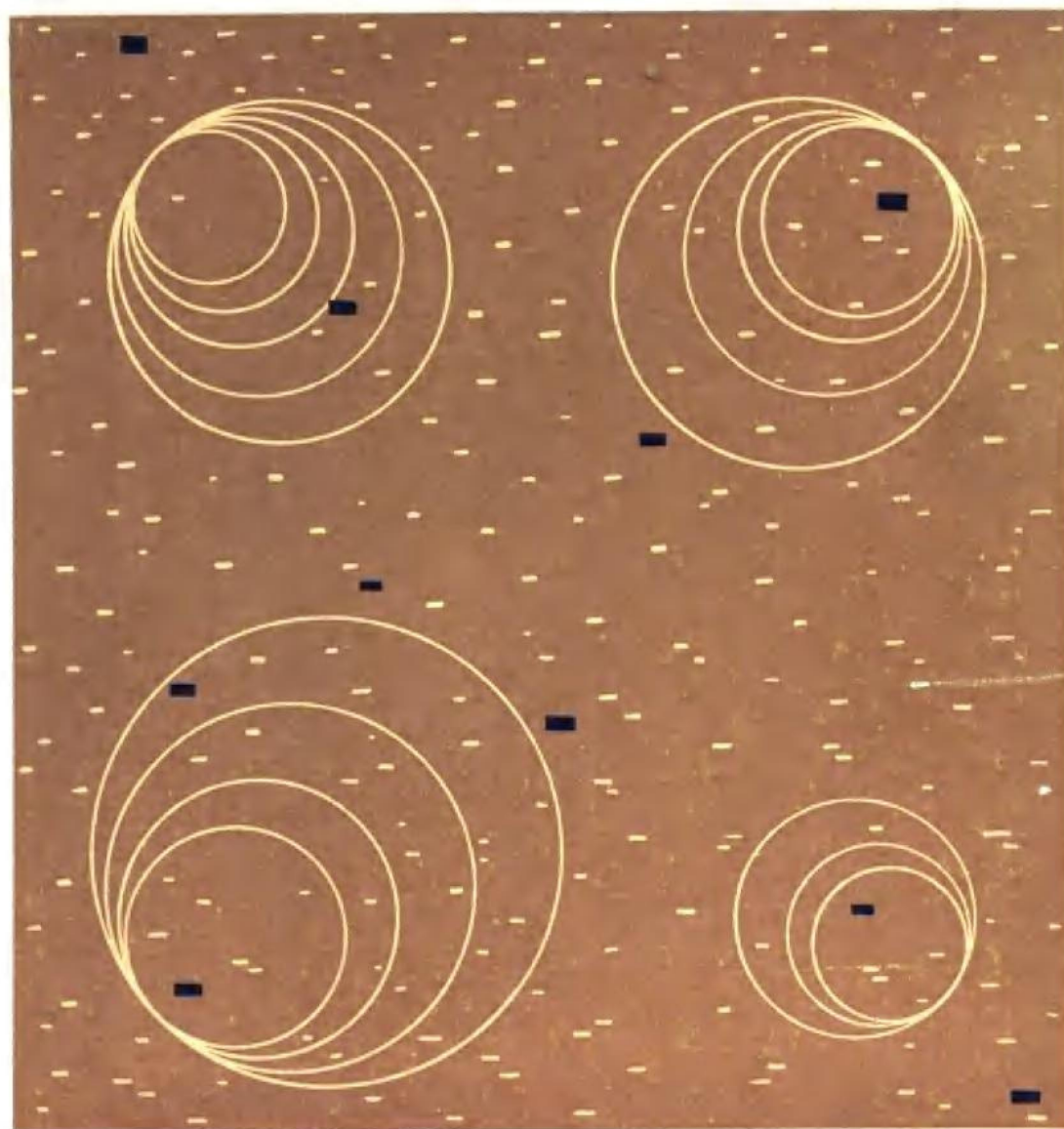


微生物世界

R. Y. 斯塔尼尔

[美] E. A. 阿德尔伯格 著

J. L. 英格拉哈姆



科学出版社

内 容 简 介

本书是 R. Y. Stanier 等所著的《微生物世界》一书的第四版。这是一本介绍普通微生物学基础知识的专著，内容全面，资料较新，与第三版相比有较大的增改，特别是细菌及微生物遗传部分几乎全部改写，对微生物的代谢作用及生理、生化等方面也有较详细的介绍，为了进一步深入探讨，每章后还附有重要的阅读文献。本书是从事微生物科研人员及有关大专院校师生较好的参考书。

R. Y. Stanier, E. A. Adelberg, J. L. Ingraham

THE MICROBIAL WORLD

Prentice-Hall, Inc., New Jersey, U. S. A., 1976

微 生 物 世 界

R. Y. 斯塔尼尔

〔美〕 E. A. 阿德尔伯格 著

J. L. 英格拉哈姆

《微生物世界》翻译组 译

陈华癸 校

责任编辑 范淑琴

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1983年12月第一版 开本：787×1092 1/16

1983年12月第一次印刷 印张：44 1/4 插页：2

印数：0001—4,900 字数：1,066,000

统一书号：13031·2423

本社书号：3308·13—9

定价：7.70 元



译 序

这本书是R. Y. 斯塔尼尔等著的《The Microbial World》的第四版(1976)的中译本。

这本书的第一版是在1957年问世的。当时原著者们认识到,随着微生物学和整个生命科学的发展,微生物学孤立于整个生命科学之外的时代已经结束了,在许多生命科学的基本问题上,微生物学研究已经开始成为整个生命科学的先头部队。因此,有必要写出一本以整个生命科学为框架的微生物学。这本书第一版问世后立即获得了学术界的极大重视和极高评价。

在第一版问世之后,生命科学,包括微生物学的迅速发展,促使以后的版本每次都有很大的修改和重组,而原著者们的指导思想也愈来愈透彻,愈来愈鲜明了。

在历史的叙述中,这本书的原著者们指出,本世纪四十、五十年代中微生物学、遗传学和生物化学的合流是生命科学继达尔文学说之后的又一革命性的发展。我们姑且不讨论这个估价是否确切。但是,近三、四十年来生命科学的巨大发展是不能否认的,微生物学研究在促进生命科学的发展中所起的带头作用以及微生物学本身的巨大发展也是不能否认的。这个版本系统地、卓有成效地介绍了这三、四十年中微生物学、遗传学和生物化学的合流发展,正是它的精华所在。

如果说,这本书的第一版、第二版是适合作为大学微生物学教科书之用的;那么,第三、四版已经突破了大学教科书的局限与约束,因而能更充分地从生命科学的现代发展上介绍微生物世界。因此,现在翻译的第四版更为适合微生物专业工作者的需要。它向从事微生物学专业工作的新手们全面地介绍了现代生命科学对微生物世界的认识,帮助他们打下坚实的基础;同时也向多年从事微生物学专业工作的老手们介绍了微生物学和其它生命科学之间的互相渗透、互相促进,帮助他们对自己已有的知识进行重新组织、重新认识和认真充实。

陈华癸

1980年9月

第四版序

本书第四版献给《微生物世界》的原始著者之一，我们的朋友和同行 Michael Doudoroff，作为对他的纪念。他的一生都是在加利福尼亚大学(伯克利)度过的。在第二次世界大战以后的几十年中，他是使伯克利成为微生物生物化学和生理学的一个重要研究中心的主要人物。他于1940年来到细菌学系，只身一人组织了普通微生物学的教学计划，我们两人(Roger Y. Stanier 和 Edward A. Adelberg)在几年之后才参加了这项工作。《微生物世界》首次出版于1957年，它是在伯克利教这门入门课的产物。这门课几乎完全是 Michael Doudoroff设计的，因此，他也是这本书的真正创写人。

在写第一版的时候，和过去几十年的情况一样，微生物学仍然与其它生物学几乎完全处于隔绝状态。我们在1957年的目标是以普通生物学的观念范畴来阐述微生物学，因为当时已经毫无疑问地到了这种隔绝状态要终结的时候了。那时，微生物学已经开始为发现生物功能的分子基础提供了实验材料，尽管分子生物学革命仅处于开创时期。现在，二十年以来，整个生物学，特别是微生物学已经变化得完全不象早先的面貌了。这就迫使我们在编写《微生物世界》的后几版中必需重新规定书中内容的范畴和水平，并大大改变书的结构。这次修订比前几次的改变较小。我们保留了第三版的结构和范畴，尽管几乎每章都是重写过的。和过去一样，我们诚恳地欢迎读者的评论和批评。

借此感谢很多位帮助我们编制这一版的人们。我们再次感谢向我们提供图、表的同行们。Mark Wheelis 通读了全稿，并对内容和文体提了很多建议，Marjorie Ingraham 协助打手稿和校对。

Roger Y. Stanier
Edward A. Adelberg
John L. Ingraham

目 录

译序.....	iii
第四版序	v
第 一 章 微生物学的诞生.....	1
第 二 章 微生物学方法.....	15
第 三 章 微生物世界的性质.....	43
第 四 章 原生生物.....	67
第 五 章 原核生物概述.....	92
第 六 章 微生物代谢: ATP的生成	121
第 七 章 微生物代谢: 生物合成	148
第 八 章 调节作用	202
第 九 章 微生物的生长	222
第 十 章 环境对微生物生长的影响	235
第 十 一 章 原核生物细胞的构造与功能之间的关系	251
第 十 二 章 病毒	292
第 十 三 章 在分子水平上研究突变和基因功能	324
第 十 四 章 病毒、细胞和细胞群体中突变的表达.....	348
第 十 五 章 基因重组	365
第 十 六 章 细菌分类	407
第 十 七 章 光合性原核生物	427
第 十 八 章 革兰阴性细菌: 化能自养菌和甲基营养菌	457
第 十 九 章 革兰阴性细菌: 好氧化化能异养生物	478
第 二 十 章 肠道细菌群和有关生物	495
第 二 十 一 章 革兰阴性细菌: 粘细菌及其它滑行生物	508
第 二 十 二 章 革兰阳性细菌: 单细胞的内生孢子细菌	519
第 二 十 三 章 革兰阳性细菌: 放线菌类	541
第 二 十 四 章 无芽孢的严格厌氧细菌	567
第 二 十 五 章 微生物在地化学中的作用	575
第 二 十 六 章 共生作用	589
第 二 十 七 章 光合生物和非光合生物的共生联合	600
第 二 十 八 章 两种非光合生物间的共生关系	615
第 二 十 九 章 微生物的致病性	630
第 三 十 章 人类的微生物疾病	649
第 三 十 一 章 微生物的利用	665
学名和人名索引	682
内容索引	688

第一章 微生物学的诞生

微生物学是研究肉眼难以看清的称为微生物的小生物。直径小于 0.1 毫米的物体肉眼是看不见的,直径 1 毫米的物体的细节肉眼也是看不见的。大致地说,直径小于或等于 1 毫米的生物是微生物,属于微生物学的研究范畴。微生物在分类学上的分布是很广泛的,它们包括一些多细胞动物、原生动物、很多藻类和真菌、细菌和病毒。在发明显微镜以前我们并不知道有个微生物世界。显微镜是一种光学仪器,它放大观察对象,帮助我们看见肉眼本来看不清的小物体。在十七世纪初发明的显微镜打开了对于非常小的生物界的系统的科学研究。

早期显微镜有两种。一种是简单显微镜,它有一个焦距很短的透镜,能将观察物放大很多倍;这种仪器和只能放大几倍的普通放大镜在光学原理上并无区别。另一种是复合显微镜,它由一个目镜和物镜组成。复合显微镜在本质上具有更大的放大能力,因而终于完全代替了简单显微镜。现代用的显微镜都是复合显微镜。但是,几乎所有早期的在显微镜下伟大的发现都是用简单显微镜取得的。

I. 微生物世界的发现

发现微生物世界的是一个荷兰商人,名叫 Antony van Leeuwenhoek(图 1.1)。他的科学活动是在一生繁忙的商业和文职生活中进行的。就这点而言,他和当时其它科学家都是一样的,他们都是业余科学家,从事其它工作维持生活;或者是很富有,无须营生。可是 Leeuwenhoek 有一点和当时的其它科学家不同,他没有上过大学。对于科学而言,这可能并不是一种缺陷,因为当时的科学对于他一生的事业并没有什么好处。困难却在于他与当时的科学界缺乏联系,而且他只会荷兰文,不会其它文字,因而他的发现的传播受到了限制。只是由于偶然的机会,他的发现才在他还活着的时候就被别人知道了,并立即引起了重视。在 Leeuwenhoek 开始他的科学研究时,英国成立了皇家学会,传播推广科学。学会邀请 Leeuwenhoek 将他的发现告诉给会员们,并在几年后(1680)发展他为会员。以后有五十年时间,一直到他逝世(1723),Leeuwenhoek 用荷兰文以一系列书信的方式将他的发现告知皇家学会。书信的大部份都译成英文,发表在皇家学会会刊上,因而较快、较广泛地传播开了。



图 1.1 Antony van Leeuwenhoek(1632—1723)。在这张照片中,他手持一个自己做的显微镜。自 Rijks 博物馆,阿姆斯特丹

Leeuwenhoek 的显微镜(图 1.2)和我们熟知的显微镜相象之处很少。接近圆形的透镜(a)装在两个金属板上。标本放在一个钝针的尖端(b),钝针附着在后面的板上。用两个螺旋(c)、(d)调正焦距,操作时,观察者将眼睛对着仪器的另一面,透过透镜进行观察。放大

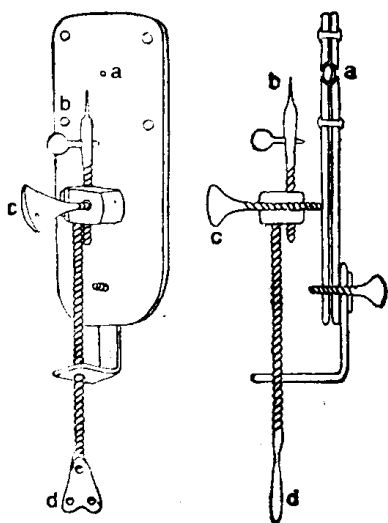


图1.2 一个Leeuwenhoek的显微镜构造图：(a)透镜；(b)装样针；(c)和(d)调焦距的螺旋。自C.E. Dobbell, 1932

倍数是不可变的。显微镜的放大倍数是透镜本身的特性。尽管构造十分简单，Leeuwenhoek 的显微镜映出的物象却很清晰，随着透镜焦距的长短，可放大 50 到 300 倍。它所达到的放大倍数约为现代复合显微镜的最大放大倍数的三分之一。Leeuwenhoek 制作了几百个这样的仪器，有几个现在还保存着。

Leeuwenhoek 在科学史上的地位还不仅由于他是一个制作显微镜的能工巧匠，更为重要的是他的显微镜观察的广泛领域和高明的技巧。他具有非凡的好奇心，他用显微镜观察了几乎每一件想看到的东西，他出色的观察了植物的种子和胚的构造以及微小的无脊椎动物。他发现了精子和红血球的存在，因而是动物组织学的创始人。他发现和描述了微血管循环，从而完成了Harvey在半个世纪之前开始的血液循环的研究。单只为他的高等植物和动物的构造的主要发现开出一个清单就很容易写满一张纸。然而，他的最大的名望还是在于他发现了微生物世界：他和他的同时代的人们称之为微小动物。他的发现为生物界增添了一个新境界。我们现在知道的主要单细胞微生物(原生动物、藻类、酵母菌和细菌)都是Leeuwenhoek 最先描述的，而且时常描述得很正确以至于根据他的描述可以鉴定出种来。在微生物的多种多样之外，Leeuwenhoek 还强调了它们数量上的无比繁盛。例如，在第一次描写口腔中的细菌的书信中，他写道：

“我家里的几位女眷想要看醋里的线虫，可是看了之后，厌恶地发誓说再也不用醋了。要是有人告诉他们在口腔里牙垢上生活着的动物比全国的人口还多，他们将会怎样反应呢？”

虽然 Leeuwenhoek 的同代人对他的发现十分惊奇，可是，对于他这样出色地开创的关于微生物世界的显微镜研究，在他死后的一个世纪中并没有持续发展。这很可能主要是由于技术上的困难，放大倍数高的简单显微镜在制造和应用上都是困难的，制造很小的透镜要求很高的技巧。因此，绝大多数 Leeuwenhoek 的同代人和他们的直接后辈采用的都是复合显微镜。尽管复合显微镜在本质上是优越的，可是十七、十八世纪的仪器都具有严重的光学缺陷，在实效上不如 Leeuwenhoek 的简单显微镜。英国的Robert Hooke (Leeuwenhoek 的同代人)是一位很能干、很细心的观察者，但是，他用自己的复合显微镜并不能够重复验证Leeuwenhoek 报道的一些细致的观察结果。

导致我们现在使用的高质量显微镜的主要的光学改进开始于 1820 年左右，一直持续了半个世纪。这些改进紧密地伴随着关于微生物世界的探讨的再度发展；到十九世纪末叶，对于微生物界的组成类群已经取得了详尽的知识。微生物学的其它方面，关于微生物在物质转化中的作用和疾病的微生物起因也被发现了。

II. 关于自然发生的争论

在 Leeuwenhoek 阐明了自然界中存在着众多微小生物之后，科学家们开始议论它们的起源。起初议论分为两派。一派认为微小动物是从无生命的物质自然发生而来。另一派(包

括 Leeuwenhoek 自己)认为它们是从微小动物的“种子”或“胚”形成的,“种子”或“胚”存在于空气之中。前一种见解称为自然发生学说或无生源说,这种学说是很古老的,在古时候人们就认为很多种植物和动物都是在特殊条件下自然发生的,并认为这种见解是理所当然的,直到文艺复兴,从没有人怀疑过。

随着关于生命知识的不断丰富,逐渐地表明了植物和动物从来也没有自然发生过。到 1665 年,意大利的一位医生 Francesco Redi 做的实验终于导致了对动物的自然发生学说的扬弃。Redi 将肉放在容器里,容器口上遮一块纱布,防止苍蝇进入产卵,腐肉就不能生蛆了。这项试验摧毁了腐肉生蛆的神话。随着动物和植物发生科学的发展,到 Leeuwenhoek 发现微生物的时代,动物和植物的自然发生学说已经很孱弱了。可是,由于技术上的困难,很难确切证明微生物也不是自然发生的,因此,自然发生学派的鼓吹者们就将有机汁液中生长出这些最简单的生命做为他们的论证根据。那些不相信自然发生学说的人都处于难以提出否定证据的境地。一直到十九世纪中叶,才逐渐积累起足够的证据以导致自然发生学说的全面扬弃。

提出微生物不能从有机汁液中自然发生的第一个有力的实验证据是意大利的自然学家 Lazzaro Spallanzani 做出的。在十八世纪中叶,他进行了一系列试验。他反复证明了加热能阻止有机汁液中生长出微生物,虽然必需的加热时间长短不一。Spallanzani 的结论是,有些充分加热的有机汁液中长出微生物的原因是由于空气将微生物带进了加热后的汁液。早期的研究者用加塞子的方法,但 Spallanzani 不满足于这样的机械堵塞,他采用了完全密封隔绝的封闭法。他观察到封闭的有机汁液能保持长时期的无生命状态,而一旦有了个小裂缝,微小动物就随着发生了。他的最终结论是,要保持有机汁液的无生命状态,必须密封和煮沸。除非有新的空气进入容器并与汁液接触,微小动物就绝不能出现。

Spallanzani 的漂亮的试验,也明显地表明了这类试验是不容易做到的。可是,错误的试验却持续地做着,并将其结果作为自然发生的证据。与此同时,Spallanzani 的发现却得到了实际应用。他的试验表明了,如无微小动物出现,即使是十分容易腐败的植物或动物汁液也不会腐败或发酵,这样,腐败或发酵的化学变化很可能与微生物的发育有关。在十九世纪初叶 Francois Appert 发现可以将食品密封在罐头里,将罐头加热,达到保存食品的效果。采用这种方法,能将易腐败食物无限期保存。从此出现了罐头食品的生产方法(称为阿波尔特法),在科学争论还远未终结之前就广泛应用了。

在十八世纪后期 Priestley、Cavendish 和 Lavoisier 的工作奠定了气体化学的基础。氧气是最先发现的气体之一,并很快就认识了它对动物生命是不可缺少的。根据这种知识,似乎有可能,按照 Spallanzani 所推荐的,Appert 所实行的密封对于防止微生物生长和有机物质分解是有效的,这并不是由于防止了空气带菌,而是由于排除了氧气,氧气是微生物生活和发酵或腐败的发生所需要的。因而,氧气对于这些过程的作用是十九世纪早期的一个热烈讨论的问题。最后终于证明了,充分加热的汁液暴露于空气,只要将空气中的微生物完全排除了,就不会腐败,也长不出微生物来。

巴斯德的试验

1860 年左右,有些科学家开始认识到,有机汁液中微生物的发展和汁液产生的化学变



图 1.3 Louis Pasteur
(1822—1895)。自巴斯德
研究所,巴黎

化是有关联的,微生物是引起化学变化的作用者。这些研究工作的伟大的先驱者是巴斯德(图 1.3)。可是,要接受这种观念,首先要否定自然发生的存在。自然发生学说的拥护者们的不断的烦扰,使得巴斯德把自己的注意力集中在这个问题上。他关于这个问题的研究工作发表于 1861 年,书名为《关于大气中的有机体的研究报告》。

巴斯德首先验证了空气中确实含有显微镜可以观察到的“有机体”。在一根管子里塞上火棉,作为过滤器,通过大量空气后取出,溶解于乙醇和乙醚的混合液中,在显微镜下观察溶液中出现的沉淀物。沉淀物中除无机物质以外,还有不少很小的、圆形或卵圆形的物体,很象微生物。接着,巴斯德证实了,将加热过的空气通进煮沸了的有机汁液中并不导致微生物的发育。证明了这一点之后,他又证明了,在一个封闭的容器中;对完全灭菌的汁液加上一些带有微生物的火棉,无例外地都引起微生物生长。这些试验向巴斯德表明了,微生物是如何进入有机汁液的,并引导他进行了这个课题中可说是最漂亮的试验。这就是证明,敞开的、暴露于空气的瓶子中的有机汁液也能够长期保持无菌,只要将瓶颈拉长成弯曲形,使空气中的微生物不能往上升起。巴斯德的鹅颈瓶如图 1.4 所示。一旦瓶颈破裂,汁液就很快地长满微生物。如果将汁液倾出一些直到瓶颈的弯曲部,然后再倒回去,也得到同样的结果。

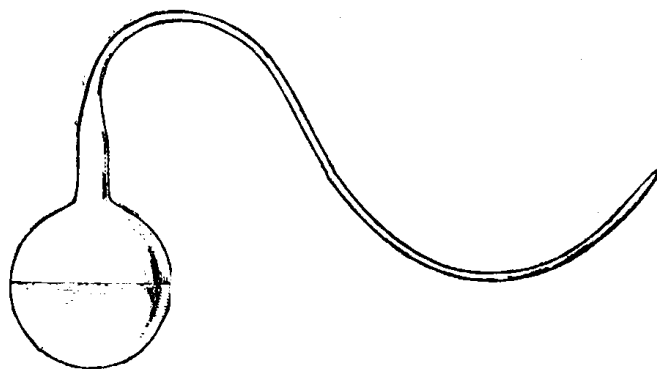


图 1.4 巴斯德研究自然发生用的鹅颈瓶。颈的构造允许
空气自由进入瓶内,但防止空气中的微生物进入

最后巴斯德以半定量的试验结束这一研究课题。他研究了空气中微生物的分布情况,并证明了空气中微生物的分布是很不均匀的。

Tyndall 的试验

自然发生学的拥护者们仍然坚持着他们的最后阵地。英国物理学家 John Tyndall 是 Pasteur 的一位热诚的拥护者,也设计和进行了一系列试验来反驳自然发生学说。在这一系列研究中,Tyndall 明确了一项重要的、却被 Pasteur 忽略了的事实,而这项事实又是自然发生论者提出不同论点的根据。

在一系列的试验中,含有用肉和新鲜蔬菜制备的汁液的试管,在盐水浴中煮沸 5 分钟就完全灭菌了,而对含有干草制备的汁液的试管,这种灭菌处理就达不到灭菌效果。更糟的

是,再做其它汁液的试验,原来的试验结果也重复不出来了,即使煮沸 1 小时也不行。经过许多次试验之后,Tyndall 终于认识了这是怎么回事。干草含有细菌孢子。细菌孢子的抗热性比他以前处理过的任何微生物都强。由于实验室里有干草,空气中感染了大量细菌孢子。抓住了这一点,他立即开始了考查干草细菌孢子的抗热性,发现即使煮沸 $5\frac{1}{2}$ 小时也不能保证完全灭菌。他的结论是,这种细菌有两个生长阶段,一个阶段是比较不耐热的(煮沸 5 分钟就杀死了),一个阶段是高度抗热的。这项结论很快就被一位德国科学家 Ferdinand Cohn 证实了,他证明干草细菌能产生在显微镜下看得见的休眠体(内生孢子),这种休眠体是高度耐热的。

Tyndall 接着发展了间断加热灭菌法,后来称为丁道尔处理,它能够杀死汁液中的一切细菌。因为只要煮沸很短的时间就能杀死生长着的细菌,那么,只要在煮沸之前让孢子发芽,失去抗热性,再煮沸就行了。只需煮沸很短的时间,如果需要,可以间歇地重复几次,让发芽晚的孢子也有发芽的机会。Tyndall 发现,每次煮沸 1 分钟,间歇煮沸 5 次,能够完全灭菌,而一次连续煮沸 1 小时却达不到。认识细菌孢子的高抗热性对发展灭菌技术是很重要的。

曾经有人声称 Pasteur 和 Tyndall 的研究工作“否定”了自然发生的可能性,并用它们的试验结果作为自然发生从来也没有出现过的见解的证据。这实际上是他们研究结果的过分的夸张。我们只能在有限度的范围内做结论:现在,在妥善灭菌了的有机汁液中,微生物不能自然发生。关于地球上生命的起源,或许是包括自然发生的,如果有过,也该是一种渐进的、难以捉摸的过程,不会象十八、十九世纪的自然发生学者们所想象的那种情况。

III. 微生物在有机质转化中作用的发现

在关于自然发生的长时期争论中,时常观察到有机汁液中微生物的生长和化学变化的发生是关联着的。这些化学变化称为“发酵”和“腐败”。腐败是一种分解过程,产生有恶臭的产物,以肉类的分解为典型代表,恶臭是蛋白质降解的后果,蛋白质是这类自然物质中的主要有机成分。发酵是形成醇类或有机酸的过程,以植物物质为典型代表,醇类和有机酸是碳水化合物降解的后果,碳水化合物是植物组织的主要有机化合物。

发酵作为一种生物学过程

1837 年, C. Cagniard-Latour、Th. Schwann 和 F. Kützing 三个人分别独立地提出,乙醇发酵中出现的酵母是一种显微植物,乙醇发酵中糖转化为乙醇和二氧化碳是酵母细胞的生理功能。这个理论遭到了当时的化学权威 J. J. Berzelius、J. Liebig 和 F. Wohler 等人的强烈反对,他们认为发酵和腐败是纯粹的化学反应。在十九世纪的前十年,化学迅速发展,1828 年从无机物合成了第一种有机化合物(尿素),因而开创了整个有机合成化学领域。当证实了一向认为只能是生命活动的产物的有机化合物能够在实验室中制备出来之后,化学家们很自然地会认为很多自然现象都能够从物理化学的角度加以探讨。糖转化为乙醇和二氧化碳看来是比较简单的化学过程。因此化学家们不赞成将这种过程解释为生物作用结果的任何尝试。

适得其反的是,恰恰是受过化学家训练的巴斯德最终说服了科学界:一切发酵过程都

是微生物作用的结果。巴斯德关于发酵作用的研究持续了 20 年(1857—1876),中间很少间断。这项研究工作本来是为了解决实际问题的。用甜菜糖造酒是里尔的重要地方工业,里尔的制酒者遇到了困难,找巴斯德帮助解决。巴斯德发现他们的困难是由于乙醇发酵部分地被另一种发酵替代了,将糖转化成了乳酸。当他用显微镜检查产生了乳酸的发酵桶的内容物时,发现在正常乙醇发酵中出现的酵母细胞被一些小得多的杆状和球状体代替了。当将这些小东西加到含有一些石灰的糖溶液中,就发生旺盛的乳酸发酵,并形成一些灰色的沉淀物,用显微镜检查沉淀,发现又是由小的球状和杆状的生物组成的。接连的将少量物质移植到含有同样培养基的新鲜的瓶子中去,总是产生乳酸发酵和接种物的繁殖。巴斯德的论证认为这种活跃因子(或新的“酵母”)是具有转化糖为乳酸的特殊功能的一种微生物*。

应用类似方法,巴斯德在以后的二十年中研究了很多种发酵过程。他证明了,发酵作用总是和微生物的发育相伴发生的。并且证明了,如每种特殊的发酵化学反应,产生的主要的有机终产物不同(如乳酸、乙醇、丁酸发酵),都是伴随着一种特殊类型的微生物发育的。这些特殊微生物的许多种,在显微镜下可以根据它们的大小和形状识别。另外,它们还可以根据它们最适合的生活条件的差别区别。举一个这些生理学的特异性的例子。巴斯德在他的早期工作中就发现乙醇发酵的作用者在酸性环境中生长旺盛,而乳酸发酵的作用者则在中性环境中生长旺盛。正是因为这个原因,他培养乳酸微生物时在培养基中加石灰(CaCO_3)。石灰是一种中和剂,防止培养基的过分酸化,而过分酸化又是乳酸形成的结果。

厌氧生命的发现

在研究丁酸发酵的过程中,巴斯德发现了另外一项基础的生物学现象:自然界存在着只能在没有氧气的环境中生活的生命形式。当他用显微镜观察进行着丁酸发酵的液体时,发现在一滴液体的边缘的细菌失去了运动性,而在小滴中部的细菌却活跃地运动着。靠近边缘,接触空气,因而指出了空气可能对这种微生物有抑制作用。巴斯德很快地就证实了这种设想,向发酵液通空气,会减缓、甚至完全抑止丁酸发酵。他得出结论说,有些微生物只能在缺乏氧气的环境中生活。在这以前,人们都认为氧气是一切生命的必需条件。他引进了好氧和厌氧这两个术语来表示在有氧和无氧存在时的生命。

发酵作用的生理学意义

丁酸发酵的厌氧性质的发现向巴斯德提供了一个重要的启示,有助于理解微生物引起的发酵作用对于微生物生活的作用。对于绝大多数微生物种类来说,氧气是氧化有机化合物产生二氧化碳的必要因子。这种与氧气连接着的生物氧化作用(统称为好氧性呼吸)向生命的维持和生长提供所需的能量。

巴斯德第一个认识到有些微生物先利用没有氧气参加的有机化合物的降解作用取得能量;正象他说的:发酵是没有空气的生命。一些严格的厌氧微生物(如丁酸细菌)依靠发酵机制得到能量。许多别的微生物(包括一些酵母菌)则是兼性厌氧性的,具有两种产能机制。

* 乳酸发酵的因子实际上是细菌,但在 Pasteur 的时代,微生物的各种类别还没有分辨清楚。

在有氧气时它们利用好氧性呼吸机制，在环境中缺乏自由氧气时它们利用发酵机制。巴斯德十分出色地证明了这种属性，在缺乏氧气时酵母菌将糖转化为乙醇和二氧化碳，而在氧气丰富时则不形成或只形成很少乙醇，在好氧性反应中二氧化碳是主要的终产物。

消耗有机物质而生长的生长量主要决定于能够从有机物质分解中得到很少能量。发酵作用的产能效率不及好氧性呼吸作用，因为被分解的有机物质所含的能量有一部分仍旧保存在有机终产物中(如乙醇或乳酸)，这类终产物是发酵作用的特征。巴斯德第一个指出，分解同等重量的糖，在厌氧条件下比在好氧条件下酵母菌的生长量少得多，从而阐明了发酵作用是产能效率较低的机制。

巴斯德的研究说明了发酵是“生命过程”，对于细胞生命具有基本的生理学重要意义。关于发酵性质的知识的进一步发展则是H. Buchner 在 1897 年偶然发现的结果。为了保存酵母的抽提物(酵母和砂混合研磨制备的)，Buchner 加了很多糖，出乎意外地产生了二氧化碳和乙醇。这样就发现了，一个溶解的酵母制备物能够进行乙醇发酵。Buchner 的发现开创了现代生物化学的发展。对于非细胞乙醇发酵机制的分析，表明了可以按照一系列已知的化学反应的结果来阐明这种复杂的代谢过程，每一个化学反应由一种特殊的酶催化。现今，即使是最复杂的生理过程也同样可以用物理、化学的术语来阐明这种观点已经为所有的生物学家认为是当然的了。就这种意义来说，十九世纪的化学家们反对发酵的生物学的斗争又被证明是正确的事了。

IV. 微生物致病作用的发现

巴斯德在研究发酵的时期中，总是关心着他的科学研究的实际应用，他对于啤酒和葡萄酒的败坏问题很重视，并阐明了败坏是由于有害的微生物造成的。巴斯德采用了一个特别的、引人入胜的名词来表示这种微生物引起的败坏，称之为啤酒和葡萄酒的“疾病”。实际上，他已经在考虑微生物可能是高等生物传染病的原因。这种假说的证据当时已经有一些了。1813 年已经阐明了有些特殊的真菌是小麦和黑麦病害的病原体；1845 年 M. J. Berkley 证明了爱尔兰的马铃薯枯萎病(影响爱尔兰历史的大自然灾害)是由于一种真菌引起的。对于真菌和动物病害可能有联系的认识开始于 1836 年，那是意大利的 A. Bassi 关于家蚕的真菌病害的研究。几年以后，J. L. Sahönlein 表明某些人的传染性皮肤病是由于真菌的感染。尽管有这些启示，很少几个医学科学家乐意接受人的主要传染病可能是由微生物引起的这个见解；而相信象细菌这样小而且看起来十分简单的生物可能是病因的人就更少了。

外科防腐剂

1840 年左右麻醉剂的应用促进了外科学技术的快速发展。手术速度已经不是一项首要的考虑因素了，外科手术的冗长和复杂性过去是无法想象的。可是，随着外科学技术的精细程度的不断提高，外科败血症(由于外科手术而引起的传染病)也越来越严重，病人因之而死亡。Pasteur 关于自然发生的研究证明了空气中有微生物，并且提出了防止微生物进入有机汁液和防止微生物在有机汁液中发展的方法。一位年青的英国外科医生，Joseph Lister，对巴斯德的研究产生了很深刻的印象，他想外科败血症可能是由于在外科手术中组织暴露受

微生物感染而引起的。他致力于发展防止微生物进入外科伤口的方法。外科器具的严格灭菌、应用消毒包扎物、并在消毒剂喷雾的环境中进行手术以防止空气感染,使得外科败血症的发生率大大减少了。Lister在1864年提出的消毒外科手术,开始时相信的人不多,随着它的防止外科败血症的成效日益显著,逐渐地发展成为广泛采用的外科技术。这项研究工作作为疾病的微生物病原学说提供了间接的证据,但对于微生物可能是人的特定的疾病的病原的认识并没有直接的贡献。这和半个世纪以前 Appert 发展了罐头食品保存方法一样,实践走在了理论的前面。

炭疽病的细菌病原学

细菌是特定的动物病害的病原的认识是通过对炭疽病(一种家畜的严重传染病,并能传染到人)的研究发现的。在炭疽病发生的后期,病畜的血液中充满了杆状细菌,这种细菌就是炭疽病的病原菌。最初是在1850年观察到的,在以后的十五年间,不断地报道了这种现象。C. J. Davaine 在1863—1868年之间对此进行了详尽的研究,他表明了,这种杆状体在病畜中无例外地存在,但在健康的家畜中却找不到,而且用病畜的带菌血液接种健康畜能导致疾病的传染。

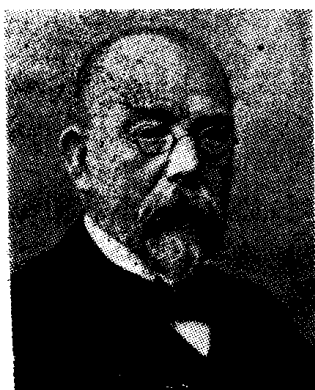


图1.5 Robert Koch (1843—1910)。自 VEB George Thieme, 莱比锡

对于炭疽病的细菌病原学的确证是 Robert Koch (图1.5)在1876年提供的。Robert Koch是一位乡村医生,没有实验室,他的研究工作是在家里进行的,试验用的是小动物,试验设备十分简陋。他证明了病畜材料能感染家鼠。用家鼠进行了连续20次接种感染,每次接种都引起了同样的典型病征。他取一点发病动物严重感染的脾脏接种于几滴灭菌血清中,培养1小时,1小时后观察细菌在这种培养基中的生长情况。他观察到,杆状物变为含有卵圆形、强折光率的颗粒体是孢子,这是以前的研究者们没有见过的(图1.6)。将带孢子的物质移植给灭菌的新鲜血清,孢子发芽,形成典型的杆状体。以这种方式,他进行了8次连续培养。用最后一次的培养物注射健康畜,还是产生了典型的疾病,并且从病畜中又能分离培养出这种微生物来。

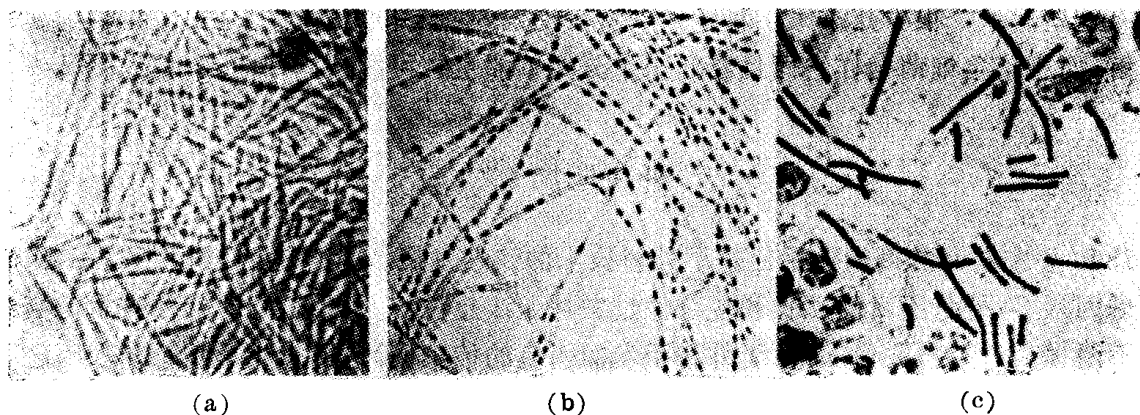


图1.6 Robert Koch 在1877年摄的第一张细菌显微照象。(a)未染色的 *Bacillus anthracis* 的营养细胞链;(b)未染色的 *B. anthracis* 链,细胞含有折光度强的孢子;(c)用感染动物的脾脏涂抹的 *B. anthracis* 的染色涂片,注意杆状的细菌和大一些的组织细胞

这一系列试验完全符合了 36 年前 J. Henle 提出来的准则。J. Henle 提出,要证实特定微生物和特定疾病之间的关系,必需符合的准则一般规定是:①在每一病例中都出现这种微生物;②要从寄主分离出这种微生物并在培养基中培养起来;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。由于 Koch 是第一个应用这一准则进行试验,通常也将这一准则称为 Koch 准则。

Koch 又进行了另外一系列试验来验证病原体的生物专一性。他表明了,用另一种形成孢子的细菌——枯草杆菌注射不会引起炭疽病,他也将其他疾病的病原细菌和炭疽病的病原细菌区分开来。从这些研究他做出的结论是:“只有一种细菌能引起这种特殊的疾病,而用其它细菌接种或者不能致病或者导致其它疾病。”

同时,巴斯德找到了一个合作者,J. Joubert,他懂得医学。他们并不知道 Koch 的工作,也进行关于炭疽病的研究。他们对 Koch 达到的结果并没有增加什么,只是证实了 Koch 的工作,提供了更多的证据证明这种细菌是这种疾病的特定的病原菌,而不是什么其它东西。

医学细菌学的兴起

关于炭疽病的研究将医学细菌学引入了黄金时代,这时在巴黎和柏林分别为 Pasteur 和 Koch 新建立了一些研究所,后来成为细菌学的世界中心。以 Koch 为首的德国学派,集中力量从事于人的主要传染病病原体的分离、培养和鉴定。巴斯德领导的法国学派几乎立即转入了更为难以捉摸的复杂的问题:试验分析传染病在动物体中怎样发生的,以及疾病是怎样痊愈的和免疫是如何发生的。在 25 年间,绝大多数人类疾病的主要病原细菌就都发现和鉴定了,用人工免疫和其它保健手段来预防许多种疾病的方法也发展起来了。这可能是人类历史上最伟大的医学革命。

过滤性病毒的发现

Pasteur 的新研究所的早期成就之一是发明了能够挡住细菌细胞的滤器,可以制备不含细菌的滤液。常常用这种滤器来验证感染液中是否含有病原细菌,如果过滤后,滤液不能引起疾病,就表明原感染液中含有细菌。1892 年一位俄国科学家, D. Iwanowsky 应用这种试验方法来研究感染了花叶病的菸草,却得到了出乎意外的结果,滤液有感染性,接种滤液于健康植物,发生花叶病。他的特殊发现很快地被证实了,几年之内其它研究者发现许多种动物和植物的疾病是由于类似的,能过滤的,显微镜看不见的病原体引起的。这就发现了另一类传染病病原体,比过去所知的生物还要小得多,称之为病毒。关于病毒的本质,有好几十年处于很不理解的状态,以后终于证明了它们是另一类生物,在构造和发展方式上与所有的细胞生物完全不同(见第十二章)。

V. 纯培养方法的发展

尽管研究的培养体是多种微生物的混合物,Pasteur 也能够把握它并取得关于发酵过程的正确结论,这是巴斯德的天赋。Koch 和 Pasteur 关于炭疽病的经典研究奠定了动物疾病

的病原菌学说,但当时并不能肯定病原生物的培养体是纯培养。用复杂的群体研究是有漏洞的,而在十九世纪中期研究微生物的科学家们并不都象巴斯德和 Koch 那样有技巧。时常有人声称微生物的多形态性学说;另一种与之对立的信念,认为各种细菌的形态和功能都是恒定的,并且各不相同的,称为单一形态性学说。

多形态性学说信念的起源

让我们考查一下,当一培养基接种了混杂的微生物群体之后,会出现什么情况。自然选择必然立即起作用,在当时条件下长得最快的种类就会占优势。由于生长和化学变化的结果,培养基的成分会起变化。过了一段时间,条件变得不适于原来的占优势的种类,而可能适合于最初同时引进的但得不到发展条件的第二种微生物了,第二种微生物就逐渐代替第一种微生物成为占优势的种类。由于这种情况,在一个接种了混杂微生物群的培养瓶中就会出现不同微生物类型的逐类代替。如果反复地将培养的时间都缩短,就能够保持最先占优势的种类在每一次移植中都占优势,这就是 Pasteur 研究发酵作用时采取的办法。

如果我们不认识这种微生物种类替代的可能性,就会对用混杂群体接种的培养基中随时间的推移而出现的现象看成为单一种微生物经历的变化。在 1865 年到 1885 年之间,宣称微生物变化多端,常常是根据上述这种观察提出的。

多形态性学说(pleomorphism, 来源于希腊文)这个术语的字意是说拥护这个学说的人的着眼点首先是形态变化的可能性。实际上并非如此,多形态性学说也包括功能变化的多样性。对于这些拥护者们,乙醇发酵或某一种疾病的发生并不存在什么特定的微生物原因,而是环境的性质决定了微生物的形态和功能。这种信念的广泛传播对于微生物学的发展是十分有害的,因而被这门新科学的领导者们(如 Pasteur Koch 和 Cohn)所强烈反对,坚持微生物形态和功能的恒定性。

到 1870 年左右,人们开始认识到彻底地了解微生物的形态和功能,只能在用纯培养研究避免混杂菌群所造成的混乱情况下才能取得。纯培养只含单一种微生物。应用纯培养的倡导者是两位伟大的真菌学家——A. de Bary 和 O. Brefeld。

最初的纯培养

关于纯培养的很多开创性的研究是 Brefeld 在研究真菌中进行的。他引进了单细胞分离技术,在固态培养基上培养真菌,为了这个目的,他在培养液中加明胶。他的纯培养方法对培养真菌是很满意的,但对培养更小的细菌就不那么适用,而需要为细菌创造别的方法。最先提出的方法之一是稀释法。用灭菌培养基逐级稀释一含有混杂细菌群的液体,希望迟早会得到一瓶从单个细胞发展而成的培养物。事实上,这个方法是很费事、很困难而且无把握的,并且很显然,它只能分离出混杂群体中数量最多的那一种。

Koch 早就认识到发展简单的纯培养技术是这门新科学发展的要害,稀释法明显地是太费事、太没有把握了,不适用于常规操作。最初 J. Schroeter 的观察提出了一种更为有希望的办法,他观察到,在固体培养基(如马铃薯、淀粉糊、面包、蛋白)上长出相互分离的细菌群体,即菌落。各种菌落形态不同,而每一个菌落中的细菌都是同一类的。开始, Koch 用灭

菌的马铃薯块做试验,他将灭菌的马铃薯放在灭菌的、加盖的容器里,接种细菌。可是,马铃薯有明显的缺点,表面太湿,运动的细菌很容易扩散开来;同时基质是不透明的,不容易看清菌落;更重要的是,马铃薯对许多细菌不是一种良好的培养基。Koch 设想,如果能用某种透明物质将经过多次试验的培养液固化可能更好。这样就可以制备出半透明的固体培养基,上面长出的菌落能够看得很清楚。同时,不同细菌需要的不同养料也可以随需要改变。他采用明胶做为固化剂。固态化后,用一白金丝蘸取少量细菌细胞(接种物)接种在表面上。接种前白金丝经火焰灭菌。接种时将白金丝在表面上迅速而轻巧地划几条。不同的细菌菌落很快发展起来。重复这种划线接种方法能够得到纯培养。这个方法以后就称为分离细菌的划线法。将纯培养移植到棉花塞口的营养明胶斜面试管上,这样的培养体称为斜面培养。不久之后,Koch 发现,除在固化的明胶表面划线培养之外,还可以将菌体与融化的明胶混合,明胶固化以后,细菌就固定下来,并发展形成菌落。这种方法后来称为分离细菌的倒平板法。

Koch 用的第一个固化剂是明胶,明胶有几个缺点。它是一种蛋白质,容易被微生物消化和液化。而且,超过 28°C 明胶就从凝胶转变为液体。接着就采用了另一种固化剂,即琼脂。琼脂是一种从红藻中提取的复杂的多糖。洋菜凝胶在 100°C 才融化,因此在各种微生物的培养温度范围之内都保持固态。同时,一旦融化后,要冷却到 44°C 左右才重新凝固,这就为制备和应用倒平板法培养细菌成为可能。琼脂形成一强而透明的凝胶。最后,它是一种复杂的碳水化合物,只有很少几种细菌能分解它,液化的情况是很稀少的。由于这些原因,琼脂很快就代替了明胶,成为细菌学研究的较理想的固化剂。迄今为止,还没有找到和琼脂一样好的合成的代用品。

Koch 及其学派对培养基的发展

Pasteur 用的是透明的、化学成分已知的液体培养基进行发酵微生物选择培养。为了分离病原微生物,需要不同类型的培养基,这就是 Koch 和他的同事们关心的第二项主要的技术问题。致病细菌通常在罹病寄主的组织里发展,在动物体外培养它们,培养基要尽可能地近似寄主组织显然是合乎逻辑的。这种想法引导 Koch 采用了肉汤和肉膏作为他的培养基的基本成分。营养肉汤和它的固态对应物营养洋菜是 Koch 在这方面的试验研究的贡献,一直到现在仍然是一般细菌学工作中最广泛应用的一种培养基。营养肉汤含 0.5% 蛋白胨(肉的酶解产物)、0.3% 肉膏(肉的可溶成分的浓缩物)和 0.8% NaCl(使培养基接近组织内的盐分浓度)。为了培养更难生长的微生物,可以在这种基础培养基上补充其它成分(如糖、血液、血清)。从当时设计的针对性看,选择这些成分是合乎逻辑的,至于,加食盐的真实价值并无可靠根据,因为绝大多数细菌对环境中的盐分浓度的变化范围的适应性是很广的。然而,随着时间的推移,许多细菌学家习惯地认为这类培养基是万能,几乎适合于培养一切细菌。这是不正确的,各种细菌对营养的要求差别很大,任何一种培养基都只能培养自然界中很少一部分细菌类(见第二章)。

VI. 微生物作为地化学因子

虽然在十九世纪末期,微生物在传染病中的作用是微生物学的中心问题,但有些科学家



图 1.7 Sergius Winogradsky(1856—1953)。自 Masson et Cie, 巴黎

却继续着 Pasteur 早期关于微生物发酵作用的研究工作, 这项研究表明了微生物能推动特殊的大规模化学变化, 并且指出了, 微生物的不同种类可能对于多种多样的其它的化学变化也起作用。

阐明微生物对于地球上重要生物学意义的物质循环(碳、氮、硫循环)中起重大作用的主要是 S. Winogradsky(图 1.7)和 M.W. Beijerinck(图 1.8)两位科学家的研究工作。与动物和植物相比微生物的生理学的多样性是异常广阔的。许多类群能够推动植物和动物不能推动的特殊化学变化, 因而在物质转化中起着极为关键的作用。

自养细菌是微生物生理的特殊性的一个例子, 这是 Winogradsky 发现的。这些细菌能够在完全是无机物的环境中生活, 从还原无机化合物的氧化作用中取得能量, 并以二氧化碳为唯一碳源。Winogradsky 还发现自养细菌有许多类群, 每一类群各自要求特定的无机能源。例如, 硫细菌氧化无机硫化物, 硝化细菌氧化无机氮化物。

Winogradsky 和 Beijerinck 共同发现了微生物在固定大气中的氮气中所起的作用。绝大多数生物是不能利用氮气作为氮素养料的。他们发现有些细菌能利用气态氮合成自己的细胞成分, 其中有些是和高等植物共生的, 有些是自由生活的。这些微生物有助于供应其它生物种类所必需的结合态氮。

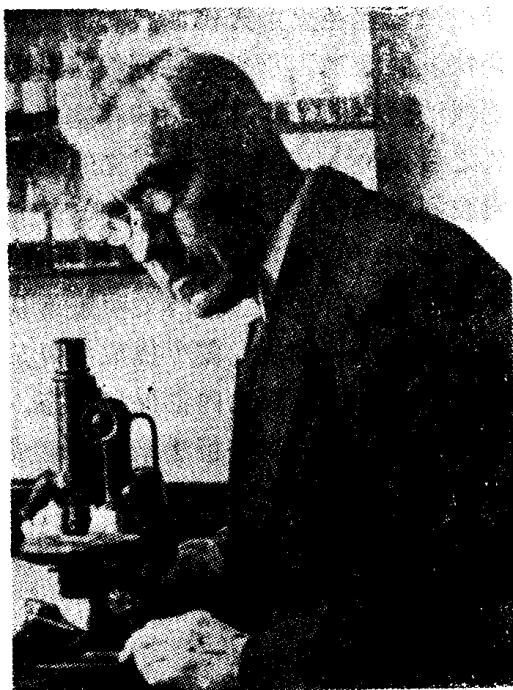


图 1.8 Martinus Willem Beijerinck (1851—1931)。自 Martinus Nijhoff, 海牙

加富培养法

为了分离和研究自然界各种各样的微生物生理类型, Winogradsky 和 Beijerinck 发展了一种新的、意义重大的研究方法: **加富培养法**。这在本质上是自然选择原理在极小范围中的应用。研究者设计了某种含有特定化学成分的培养基, 接种混合微生物群体(如这种群体可以在少量的土壤中找到), 然后根据检查确定哪类微生物在其中生长占优势。这种占优势是由于接种物中这类微生物在规定的培养基环境中生长得比其它种类快的结果, 因而称为**加富培养基**。举个特殊例子说, 如果我们希望发现能够利用大气中 N_2 为唯一氮源的微生物, 就制备不含任何结合氮但含有生长必需的其它成分(能源、碳源、各种矿质)的培养基, 接种土壤, 暴露于 N_2 , 在适宜的物理环境中培养。因为氮素是各种生物细胞必需的, 因而接种物所含各种微生物中只有能够固定氮气的才能生长、繁殖。这类试验可以多种方式进行, 改变各种因素, 如碳源、能源、温度、氢离子浓度等等。对于每一种特定条件, 就有一类特定微生物占优势, 只要接种物中含有这类微生物。因而, 加富培养法是微生物学家的一种