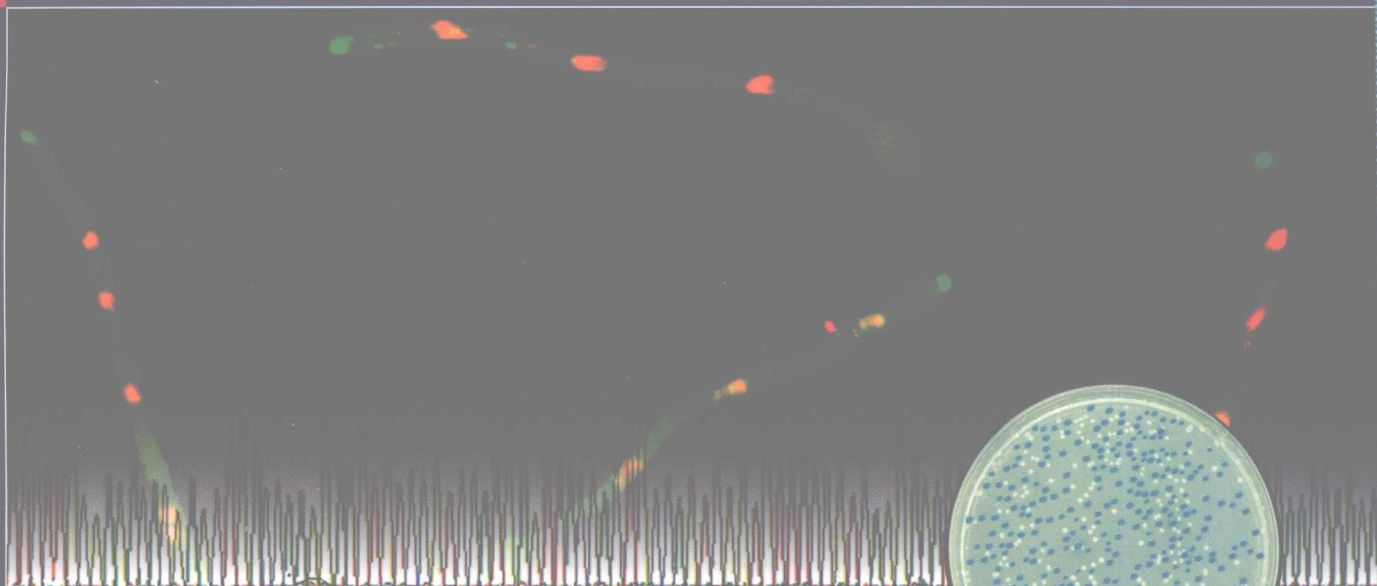




普通高等教育“十一五”国家级规划教材



# 微生物学

## Microbiology

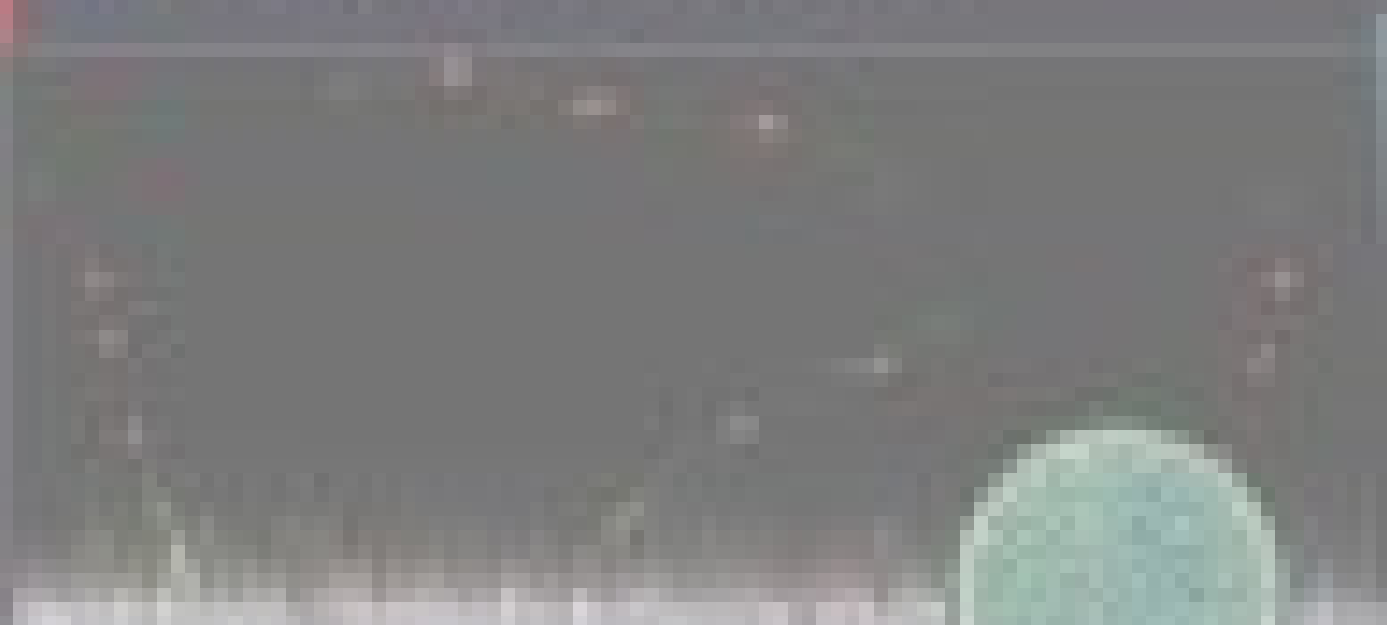
袁 生 主编



高等教育出版社  
Higher Education Press



中国轻工业出版社 中国轻工业出版社



# 微生物学

Microbiology

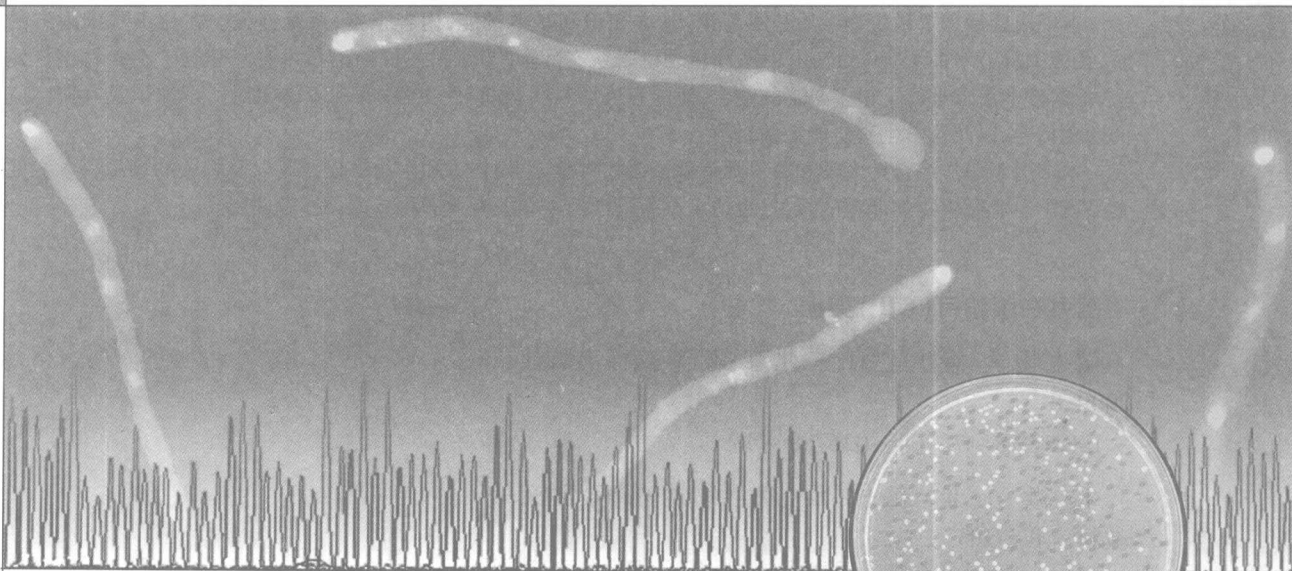
第 1 版



中国轻工业出版社



普通高等教育“十一五”国家级规划教材



# 微生物学

## Microbiology

袁 生 主编

编著者（按姓氏汉语拼音顺序）

陈双林 戴传超 董宏平 何孔旺 连 宾  
邵蔚蓝 薛业敏 闫淑珍 袁 生



高等教育出版社  
Higher Education Press

## 内容提要

本书内容涵盖了微生物学的基本理论、基本知识和基本技能,内容丰富,系统性强。在注重基础内容的同时,在相关章节增加了实践、应用知识,注重理论联系实际,并与学科发展前沿技术息息相通。在教材编排体例上,根据教学需求进行了很多必要的整合,使内容更加紧凑、逻辑性更强,有利于学生对所学知识及其实际应用的融会贯通,以及对学生科研能力的培养。

本书适于用作综合性大学和高等师范院校生物科学、生物技术和生物工程专业以及相关的环境科学专业和食品科学专业微生物学课程的教材,也适于微生物学及其相关专业的科技人员参考使用。

## 图书在版编目(CIP)数据

微生物学/袁生主编. —北京:高等教育出版社,  
2009.8

ISBN 978-7-04-026720-4

I. 微… II. 袁… III. 微生物学-高等学校-  
教材 IV. Q93

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 090037 号

|      |     |      |     |      |     |      |    |
|------|-----|------|-----|------|-----|------|----|
| 策划编辑 | 赵晓媛 | 责任编辑 | 张晓晶 | 特约编辑 | 孙晓洁 | 封面设计 | 张楠 |
| 责任绘图 | 尹莉  | 版式设计 | 范晓红 | 责任校对 | 姜国萍 | 责任印制 | 韩刚 |

出版发行 高等教育出版社

社址 北京市西城区德外大街4号

邮政编码 100120

总机 010-58581000

经销 蓝色畅想图书发行有限公司

印刷 北京中科印刷有限公司

开本 850×1168 1/16

印张 20

字数 500 000

购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598

网址 <http://www.hep.edu.cn>

<http://www.hep.com.cn>

网上订购 <http://www.landracom.com>

<http://www.landracom.com.cn>

畅想教育 <http://www.widedu.com>

版次 2009年8月第1版

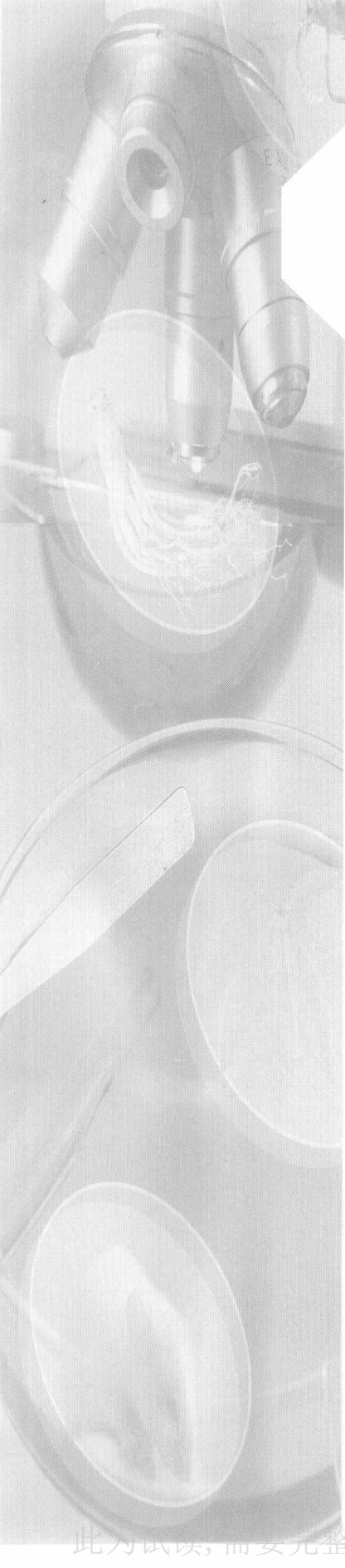
印次 2009年8月第1次印刷

定价 27.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 26720-00



# 序

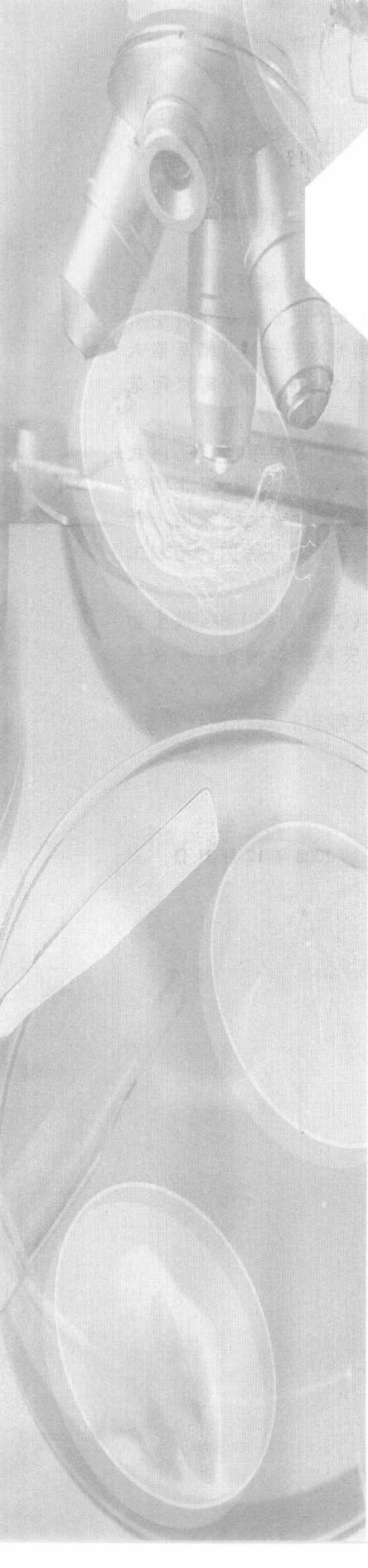
微生物学是生命科学中的一门极为重要的基础学科,涉及工、农、医、环境等领域的基础研究和应用,特别是与人的关系极为密切。由于微生物(包括病毒)是最简单的生命体而又具有高等生物的基本生命过程,因此,当它们在显微镜下被发现以后,很快就成了人们关注的焦点,并逐渐成为研究生命现象的主要材料。特别是进入“基因组”时代后,微生物更起着“先锋”的作用。第一个全基因组序列测定完成的独立生命体就是微生物。微生物基因组学的研究不仅将微生物学自身的发展推向一个新的阶段,而且也极大地促进了人类基因组学的深入和发展,为整个生命科学的发展做出了(并将继续做出)巨大的贡献。

微生物学教材是生物学各专业和相关学科有关专业的必备教材,微生物课程是培养生命科学人才过程中必不可少的基础课,应用十分广泛,需要不同版本、不同风格和不同特色的微生物学教材出版,以适应我国不同高等院校的需求。

由袁生教授主编的“十一五”规划教材“微生物学”,是在多年教学实践的基础上,根据该课程教学的基本要求、学科的发展以及学生的知识结构和需求撰写而成。该教材涵盖了微生物学的基本理论、基本知识和基本技能,并与学科发展前沿技术息息相通,内容丰富,剪系统性强。在注重基础内容的同时,强调了微生物的多样性、实践性,注重理论联系实际;教材具有明显的先进性、实用性。

该教材在内容的编排上颇具特色,特别是对微生物分类学内容的处理显示了一种新的尝试;对相关内容(如微生物的营养、生长、纯培养和纯种保藏,微生物代谢与生产实践等)进行的有机整合,使教材内容紧凑、逻辑性强,有利于学生对所学知识及其实际应用的融会贯通,有利于学生能力的培养。该教材适用于师范院校和其他高等院校生命科学有关专业的教学,同时,对于从事微生物学研究及其相关专业的科技人员也是一本好参考书。

沈 萍



# 前言

我们结合精品课程建设,汲取、借鉴和参考国内外一些优秀教材的长处,在微生物学教学中作了一些尝试和改革,本书反映了我们这方面的努力。简要说明如下:

1. 加强微生物现代分子生物学前沿知识的介绍。如近年来一直处于学科发展前沿的微生物基因组学、蛋白质组学和蜂拥而起的各种组学研究,近年来发展较快、研究得较为清楚的各种基因调控机制的研究,微生物分子生态学和环境基因组学的研究。

2. 加强微生物多样性知识的介绍。国外微生物学教材通常采用很大篇幅介绍微生物的多样性,但鉴于国内教学课时的限制,如何在教学中体现微生物的多样性是一个难题。我们尝试将微生物系统分类单元和细胞生物的拉丁双名法等内容调到绪论中,使学生掌握共性的基础分类知识。然后在原核微生物、真核微生物和病毒章节中在介绍完它们的形态和结构特点之后,引出它们的特殊分类标准和方法,并以图表概括方式介绍各个类群微生物的多样性,对一些主要微生物类群再适当予以详细介绍。

3. 注意对当前热点问题的介绍。如近年来社会关注的 SARS、禽流感、猪链球菌感染等传染性疾病,新生病毒与肿瘤病毒,环境污染与微生物修复,未能培养微生物、海洋微生物(特别是海底微生物)的研究进展等。

4. 在教材编排体例上做了一些新的尝试。除了没有单独设置微生物分类一章外,考虑到营养物是影响微生物生长的重要因素,将微生物的营养与微生物的生长合并为一章。由于微生物纯培养分离获得之后就面临菌种保藏问题,将菌种保藏内容放入微生物营养与生长一章中相关部分。将有关代谢调控的内容按其属性放入微生物遗传一章中介绍。鉴于微生物学课程在许多高校同时为生物学专业、生物技术专业、生物工程专业、食品科学和环境科学专业学生开设,在相关章节中增加实践和应用知识,以满足不同需要。

5. 注意内容简明扼要,尽可能减去不必要的赘述和重复,不致因

新增加的学科前沿内容,导致课程内容大幅膨胀。本书已经作者试讲5年,其间不断根据教学情况进行修改,以便让教师能在50课时左右时间内讲授完成。

本书适用于综合性大学和高等师范院校生物学专业、生物技术专业、生物工程专业,以及相关的环境科学专业和食品科学专业微生物学课程的教材。

本书由长期从事相关领域研究工作的同志参加编写。袁生(南京师范大学)编写第一章,连宾(南京师范大学)编写第二章,陈双林(南京师范大学)编写第三章,何孔旺(江苏省农业科学研究院)编写第四章,戴传超(南京师范大学)和袁生编写第五章,薛业敏(南京师范大学)编写第六章,邵蔚蓝(南京师范大学)编写第七章,闫淑珍(南京师范大学)编写第八章,董宏平(南京师范大学)编写第九章。袁生负责全书的统稿和修订工作。

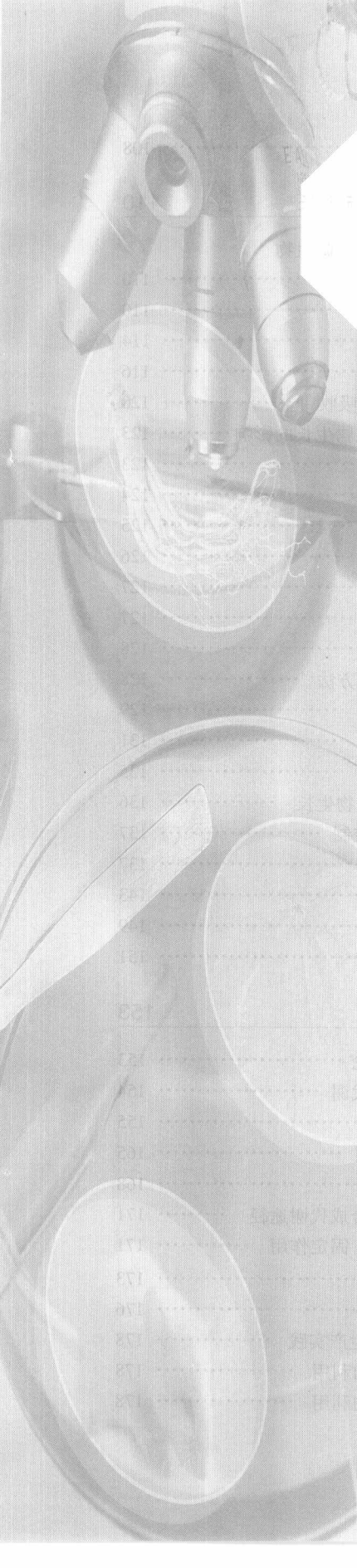
感谢高等教育出版社吴雪梅和赵晓媛编辑对本教材编写的大力支持、关心和帮助。感谢武汉大学沈萍教授为本书审稿并作序,感谢武汉大学陈向东教授、南开大学李明春教授、河北师范大学赵孝宝教授、安徽师范大学柯丽霞教授、云南师范大学黄遵锡教授、南京师范大学徐旭士教授、陆玲教授、尚广东副教授审阅全书并提出很好意见。感谢孙磊同志参与了部分插图的绘制工作。

我们长期使用的教材《微生物学教程》(周德庆主编)、《微生物学》(沈萍主编)和《微生物学》(黄秀梨主编),为本书编写提供了重要参考作用。沈萍教授和周德庆教授对编者的积极鼓励使得本书得以顺利完成。

限于作者水平和能力,本书恐将存在一些错漏及不当之处,欢迎广大师生和同行批评指正,以便再版时改进。

袁 生

2008年12月31日



# 目 录

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| <b>第一章 绪论</b>           | <b>1</b>  |
| 一、微生物及其特点 .....         | 1         |
| 二、微生物的观察方法 .....        | 2         |
| 三、微生物在生命世界的位置 .....     | 6         |
| 四、微生物的分类 .....          | 8         |
| 五、微生物学的研究范围 .....       | 10        |
| 六、学习微生物学的重要性与社会需求 ..... | 10        |
| 七、微生物的发现与微生物学发展 .....   | 14        |
| 摘要 .....                | 17        |
| 思考题 .....               | 18        |
| <b>第二章 原核微生物</b>        | <b>19</b> |
| 第一节 细菌的形态、结构和功能 .....   | 19        |
| 一、细菌的形态和大小 .....        | 19        |
| 二、细菌的细胞结构和功能 .....      | 21        |
| 三、细菌的繁殖与培养特征 .....      | 36        |
| 第二节 原核微生物的多样性与分类 .....  | 37        |
| 一、原核微生物的鉴定特征与方法 .....   | 38        |
| 二、原核微生物分类系统 .....       | 40        |
| 第三节 某些特殊原核微生物介绍 .....   | 45        |
| 一、放线菌 .....             | 45        |
| 二、蓝细菌 .....             | 49        |
| 三、支原体 .....             | 51        |
| 四、立克次氏体 .....           | 51        |
| 五、衣原体 .....             | 52        |
| 六、螺旋体 .....             | 52        |
| 七、古生菌 .....             | 53        |
| 摘要 .....                | 56        |
| 思考题 .....               | 58        |

## 第三章 真核微生物 59

|                         |    |
|-------------------------|----|
| 第一节 真核微生物的多样性与特征 .....  | 59 |
| 一、真核微生物的多样性与主要类群 .....  | 59 |
| 二、真核微生物的细胞结构和化学组成 ..... | 60 |
| 第二节 真菌 .....            | 62 |
| 一、真菌的特征与重要性 .....       | 62 |
| 二、真菌的形态与结构 .....        | 62 |
| 三、真菌的繁殖 .....           | 65 |
| 四、真菌的多样性与分类 .....       | 71 |
| 第三节 其他真核微生物 .....       | 72 |
| 一、黏菌 .....              | 72 |
| 二、卵菌 .....              | 74 |
| 三、藻类 .....              | 76 |
| 四、原生动物 .....            | 77 |
| 摘要 .....                | 79 |
| 思考题 .....               | 80 |

## 第四章 病毒 82

|                        |     |
|------------------------|-----|
| 第一节 病毒研究的基本方法 .....    | 83  |
| 一、病毒的培养 .....          | 83  |
| 二、病毒的纯化 .....          | 83  |
| 三、病毒的测定 .....          | 83  |
| 四、病毒的鉴定 .....          | 84  |
| 第二节 病毒的形态结构与化学组成 ..... | 84  |
| 一、病毒的形状与大小 .....       | 85  |
| 二、病毒的结构 .....          | 85  |
| 三、病毒形态与结构类型 .....      | 85  |
| 四、病毒的化学组成 .....        | 88  |
| 第三节 病毒的多样性与繁殖方式 .....  | 90  |
| 一、病毒的主要类群与分类系统 .....   | 90  |
| 二、细菌病毒(噬菌体) .....      | 91  |
| 三、脊椎动物病毒 .....         | 96  |
| 四、昆虫病毒 .....           | 103 |
| 五、植物病毒 .....           | 103 |
| 六、真核微生物病毒 .....        | 104 |
| 第四节 亚病毒 .....          | 104 |
| 一、类病毒 .....            | 104 |
| 二、卫星因子 .....           | 104 |
| 三、朊病毒 .....            | 106 |
| 摘要 .....               | 107 |

|           |     |
|-----------|-----|
| 思考题 ..... | 108 |
|-----------|-----|

## 第五章 微生物营养与生长 110

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 第一节 微生物营养及其对微生物生长的影响 ..... | 110 |
| 一、微生物的营养因子 .....           | 110 |
| 二、培养基 .....                | 114 |
| 三、微生物的培养 .....             | 116 |
| 四、微生物对营养物的吸收 .....         | 120 |
| 第二节 环境因素对微生物生长的影响 .....    | 123 |
| 一、温度 .....                 | 123 |
| 二、pH .....                 | 124 |
| 三、氧 .....                  | 125 |
| 四、水活度 .....                | 126 |
| 五、压力 .....                 | 127 |
| 六、营养物 .....                | 127 |
| 第三节 微生物生长 .....            | 128 |
| 一、微生物生长的测定方法 .....         | 128 |
| 二、微生物的个体生长 .....           | 129 |
| 三、微生物的群体生长 .....           | 131 |
| 四、微生物的连续培养 .....           | 135 |
| 五、天然环境中的微生物生长 .....        | 136 |
| 第四节 微生物生长的控制 .....         | 137 |
| 一、物理控制方法 .....             | 137 |
| 二、化学控制方法 .....             | 143 |
| 摘要 .....                   | 149 |
| 思考题 .....                  | 151 |

## 第六章 微生物代谢 153

|                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| 第一节 微生物代谢概论 .....                   | 153 |
| 第二节 微生物的产能代谢 .....                  | 154 |
| 一、化能异养作用 .....                      | 155 |
| 二、无机化能自养作用 .....                    | 165 |
| 三、光合作用 .....                        | 168 |
| 第三节 微生物特有的合成代谢途径 .....              | 171 |
| 一、自养微生物的 CO <sub>2</sub> 固定作用 ..... | 171 |
| 二、固氮作用 .....                        | 173 |
| 三、肽聚糖的合成 .....                      | 176 |
| 第四节 微生物代谢与生产实践 .....                | 178 |
| 一、微生物代谢产物的利用 .....                  | 178 |
| 二、微生物代谢功能的利用 .....                  | 178 |

|                    |     |
|--------------------|-----|
| 三、微生物代谢与代谢工程 ..... | 179 |
| 摘要 .....           | 180 |
| 思考题 .....          | 181 |

## 第七章 微生物遗传 183

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| 第一节 遗传的物质基础及其特性 .....   | 183 |
| 一、遗传物质的鉴定 .....         | 183 |
| 二、核酸的特性 .....           | 185 |
| 三、基因组 DNA 和染色体 .....    | 187 |
| 四、染色体以外的遗传因子 .....      | 187 |
| 第二节 基因的表达与调控 .....      | 189 |
| 一、原核微生物基因的转录与调控 .....   | 189 |
| 二、真核微生物基因的转录与调控 .....   | 192 |
| 三、翻译过程中的调控 .....        | 193 |
| 四、全局性调控 .....           | 194 |
| 第三节 细胞中遗传信息的变异 .....    | 197 |
| 一、基因突变 .....            | 197 |
| 二、基因突变的影响 .....         | 201 |
| 三、DNA 损伤的修复 .....       | 202 |
| 四、基因突变体及其筛选 .....       | 203 |
| 五、基因重组 .....            | 207 |
| 六、原核微生物细胞间的基因转移 .....   | 209 |
| 七、真核微生物细胞间的基因交换 .....   | 213 |
| 第四节 微生物的遗传育种和遗传工程 ..... | 214 |
| 一、自然选育 .....            | 214 |
| 二、诱变育种 .....            | 214 |
| 三、杂交育种 .....            | 216 |
| 四、基因工程 .....            | 217 |
| 第五节 微生物基因组学 .....       | 221 |
| 一、结构基因组学 .....          | 221 |
| 二、功能基因组学 .....          | 222 |
| 三、比较基因组学 .....          | 225 |
| 四、环境基因组学 .....          | 225 |
| 摘要 .....                | 225 |
| 思考题 .....               | 227 |

## 第八章 微生物生态 229

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| 第一节 自然环境中微生物的分布 ..... | 229 |
| 一、土壤中的微生物 .....       | 229 |
| 二、水体中的微生物 .....       | 230 |
| 三、空气中的微生物 .....       | 232 |

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| 四、生物体内外生存的微生物 .....             | 233 |
| 五、自然环境中的未能培养微生物及其<br>研究方法 ..... | 234 |
| 六、微生物资源的保护与开发利用 .....           | 235 |

|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| 第二节 微生物间及与其他生物间的<br>相互关系 ..... | 236 |
| 一、中性关系 .....                   | 236 |
| 二、互生关系 .....                   | 236 |
| 三、共生关系 .....                   | 237 |
| 四、寄生关系 .....                   | 239 |
| 五、拮抗关系 .....                   | 240 |
| 六、捕食关系 .....                   | 240 |
| 第三节 微生物在自然界物质循环中的作用 .....      | 240 |
| 一、碳素循环 .....                   | 240 |
| 二、氮素循环 .....                   | 241 |
| 三、硫素循环 .....                   | 243 |
| 四、磷素循环 .....                   | 243 |
| 五、铁素循环 .....                   | 244 |
| 第四节 微生物与环境污染 .....             | 245 |
| 一、微生物引起的环境污染 .....             | 245 |
| 二、微生物对环境污染的指示作用 .....          | 247 |
| 三、微生物对环境污染的修复作用 .....          | 248 |
| 摘要 .....                       | 253 |
| 思考题 .....                      | 255 |

## 第九章 微生物感染与免疫 256

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| 第一节 微生物的感染与致病性 .....  | 256 |
| 一、病原微生物的感染 .....      | 256 |
| 二、病原微生物的致病性 .....     | 257 |
| 三、影响病原微生物致病性的因素 ..... | 260 |
| 四、感染的类型和结果 .....      | 261 |
| 第二节 宿主非特异性免疫 .....    | 261 |
| 一、非特异性免疫屏障作用 .....    | 261 |
| 二、非特异性细胞免疫 .....      | 262 |
| 三、非特异性分子免疫 .....      | 266 |
| 第三节 宿主特异性免疫 .....     | 269 |
| 一、淋巴系统 .....          | 269 |
| 二、抗原 .....            | 270 |
| 三、特异性细胞免疫 .....       | 271 |
| 四、特异性分子免疫 .....       | 274 |

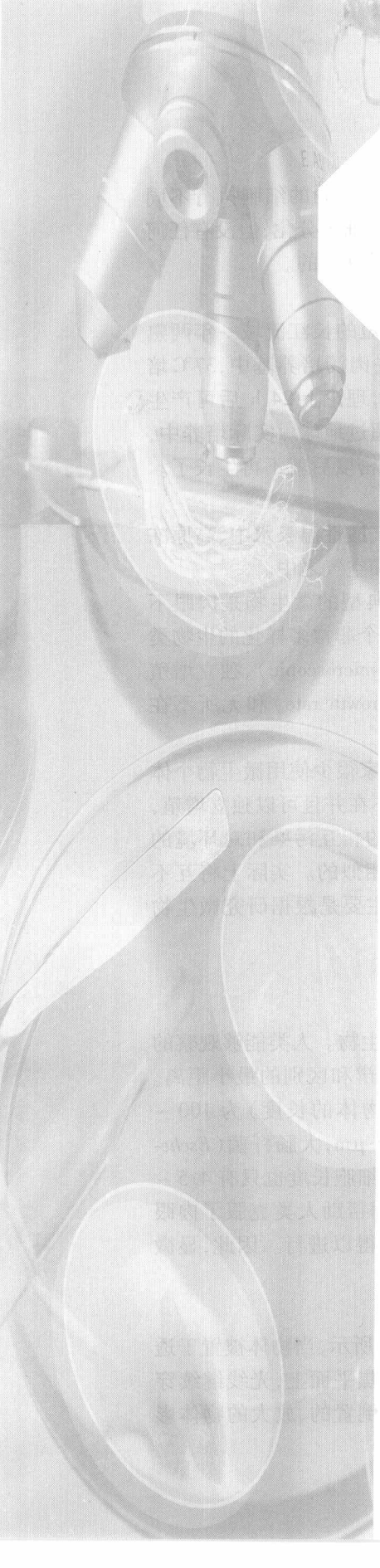
|                   |     |
|-------------------|-----|
| 五、免疫应答的病理反应 ..... | 281 |
| 第四节 免疫学应用 .....   | 283 |
| 一、免疫预防 .....      | 283 |
| 二、免疫技术 .....      | 284 |
| 摘要 .....          | 286 |
| 思考题 .....         | 287 |

|              |     |
|--------------|-----|
| 主要参考文献 ..... | 289 |
|--------------|-----|

|                      |     |
|----------------------|-----|
| 附录 I 微生物名称中拉对照 ..... | 292 |
|----------------------|-----|

|                |     |
|----------------|-----|
| 附录 II 索引 ..... | 297 |
|----------------|-----|

|              |     |
|--------------|-----|
| 主要网站名录 ..... | 304 |
|--------------|-----|



# 第一章 绪 论

## 一、微生物及其特点

微生物通常是指那些微小、简单、肉眼难以观察的生物。英文“微生物(microorganism)”一词,就是在“生物(organism)”词之前加上前缀“非常小(micro)”所构成。需要指出的是,微生物并不是一个分类学上的术语,它们主要是根据生物体的大小而被人为地划归在一起。实际上微生物是由生物多样性非常广泛的不同生物类群所组成,它包含真核生物中的真菌、微型藻类、原生动物,原核生物中的细菌、放线菌、蓝细菌和古生菌,非细胞生物中的病毒和亚病毒。

为什么要把上述范围如此广泛的不同生物类群与其他生物(动物和植物)相区别,另列为微生物呢?这是由于不同的微生物类群尽管差异非常大,但却具有一些共同特点。

### 1. 大多数微生物肉眼难以直接观察

在我们周围世界中,到处都存在微生物,但我们却看不见它们。这是由于它们个体比较微小,一般小于  $100\text{ }\mu\text{m}$ ,而人的肉眼分辨率有限,一般人能看清的最小物体为  $100\sim 200\text{ }\mu\text{m}$ 。所以肉眼一般不能直接观察到微生物,需要借助光学显微镜甚至电子显微镜才能观察到它们的存在。典型细菌体积只有大约  $1\text{ }\mu\text{m}^3$ ,为人体细胞的  $1/1\text{ }000$  左右,较小体积意味着具有较大的表面体积比,细菌的表面体积比约为动物细胞的  $1\text{ }000$  倍,使其容易以较高速率从环境中吸收营养物质,支撑细菌细胞得以快速生长。

### 2. 微生物通常以独立的增殖单位存在

例如,相同细菌组成的群体中的每一个细菌的增殖都是独立的,它对群体中的其他细菌既不依赖,又没有很大的影响。将任何一个细胞移开单独放置,它都可以通过自我增殖产生新的群体。当然也有例外,特别是在藻类、原生动物和真菌当中,有些类群具有多细胞形式,有些具有非常复杂的生活周期并且有不同的细胞类型参与其中。

### 3. 微生物结构较简单

这主要是与动植物相比较而言的。动植物具有特别复杂的细胞分化,不同的细胞执行不同的功能。尽管有些微生物确实具有多细胞的形式,有些微生物甚至出现了细胞分化,但没有任何微生物的多细胞性和细胞分化结合在一起,而这样的结合对于动植物是最基本的。

### 4. 微生物生长快速

有些细菌比如大肠杆菌仅仅 20 min 就可增殖一代,而生长周期比较短的长江流域一年两熟的早稻从播种到收获至少也要 115 d 左右。如将一个大肠杆菌细胞在牛肉汤培养基中,37℃ 培养 6 h 40 min,理论上大肠杆菌细胞数目就会达 10 亿个。按此生长速率,理论上 24 h 后可产生 4 722 366 500 万亿个细胞,重约 4 722 t,不到 48 h 细胞总体积就可大大超过地球。实际培养中,由于营养物质的消耗、有害物质的积累和空间条件限制,细胞生长到一定密度后就不再生长了。

### 5. 微生物几乎无所不在

微生物大量地存在于土壤、水体和人体表面,它们可以生活在岩石里、酸性温泉水中、高原冻土、南极海岸冰川下的海水之中,它们也存在于桌面、水龙头等物体表面和空气之中。

因而有人试图根据上述 5 大特点给微生物一个更加全面的定义:“典型的微生物是肉眼不可见、以独立增殖单位存在、结构较不复杂、生长快速、几乎无所不在的一个非常多样化的生物类群”。并据此给出“micro”新的诠释,即由上述 5 大特点——肉眼不可见(microscopic)、独立增殖单位(independent unit)、较不复杂(less complex)、快速生长速率(rapid growth rate)和无所不在(opmipresent)的英文首字母所组成。

另外,微生物研究使用相同的方法。由于微生物非常微小,微生物学家很少使用微生物个体进行研究,而代之以使用一种微生物的群体进行研究。由于微生物无所不在并且可以独立增殖,微生物学家研究微生物时还要使用特殊的无菌技术,以防止微生物之间的相互污染和对环境的污染。在对不同微生物类群进行鉴定、培养和研究时所使用的技术也是相似的。实际上将互不相关的微生物类群放在一起作为一门独立学科——微生物学加以研究,主要是根据研究微生物的方法和技术,而不是根据微生物之间的相关性。

## 二、微生物的观察方法

由于微生物太小,肉眼难以观察,就需要借助显微镜来观察和了解微生物。人类能够观察的物体大小取决于观察者眼睛的分辨率。分辨率是两个物体之间能够被分辨和区别的最小距离。前已指出,人类视网膜的分辨率(也就是人类眼睛所能够看到的最小物体的长度)为 100 ~ 200  $\mu\text{m}$ ,而一种海洋原绿球菌(*Prochlorococcus marinus*)细胞直径只有 0.4  $\mu\text{m}$ ,大肠杆菌(*Escherichia coli*)细胞长度只有 2.5  $\mu\text{m}$ ,真核酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞长度也只有 4.5 ~ 21  $\mu\text{m}$ ,因而一般微生物细胞都在人类视网膜分辨率以下。显微镜的发明帮助人类克服了肉眼观察事物分辨率的限制,发现了自然界存在的微生物,使微生物学的研究得以进行。因此,显微镜技术成为微生物学的基本实验技术之一。

### (一) 光学显微镜

光学显微镜工作原理在于通过透镜产生一个放大的影像。如图 1-1 所示,当物体被置于透镜焦平面里时,从物体发出的所有光线都被透镜折射,会聚在透镜相反的焦平面上,光线继续穿过焦点,直到和被透镜折射的非平行光会聚,在会聚的平面就会产生一个倒置的、放大的物体影

像。影像通过折射光线向外扩散而被放大,影像各部分之间的距离随之被拉大,使得我们眼睛能够分辨被观察物体的精细结构。

根据德国物理学家 Abbe 在 19 世纪 70 年代建立的 Abbe 公式,两物体之间最小可分辨距离被称为最小距离( $d$ ), $d$  值计算公式如下:

$$d = 0.5\lambda / (n \sin\theta)$$

式中  $\lambda$  是用来代表照射样品所用光线的波长, $\lambda$  越小, $d$  就越小; $d$  越小,则分辨率越高。在可见光范围内,蓝光波长最短(450 ~ 500 nm),所提供的分辨率最高。 $n \sin\theta$  代表所用透镜的数值孔径( $NA = n \sin\theta$ ),数值孔径就是透镜的聚光能力。 $n$  表示光线穿过的介质(如空气)的折射率, $\theta$  是样品光线进入物镜的光锥角的 1/2(图 1-2A)。由于  $\sin\theta$  最大为 1( $\theta = 90^\circ$ ),显然,只有通过提高介质折射率( $n$ )来提高分辨率。空气折射率为 1,因而空气中使用物镜的数值孔径总是小于 1。为了提高分辨率,通常使用香柏油代替空气作为介质。因为香柏油的折射率(1.52)比空气及水的折射率(分别为 1.0 和 1.33)高,所以使用香柏油作为镜头与玻片之间介质的油镜所能达到的数值孔径值  $NA$  可以达到 1.2 ~ 1.4,高于低倍镜、高倍镜( $NA$  都低于 1.0)。若以可见光的平均波长 0.55  $\mu\text{m}$  来计算,数值孔径通常在 0.65 左右的高倍镜只能分辨出距离不小于 0.4  $\mu\text{m}$  的物体,而油镜的分辨率却可达到 0.2  $\mu\text{m}$  左右。另外,从承载标本的玻片透过来的光线,因介质密度不同(从玻片进入空气,再进入镜头),有些光线会因折射或全反射,不能进入镜头,致使在使用物镜时会因射入的光线较少,物像显现不清;在样品和透镜之间插入香柏油之后,因物镜透镜和玻片表面反射和折射而不能进入物镜的光线就可以进入物镜,增加了照明亮度,物像更加清晰(图 1-2B)。这就是为什么观察特别微小的细菌需要使用油镜的缘故。

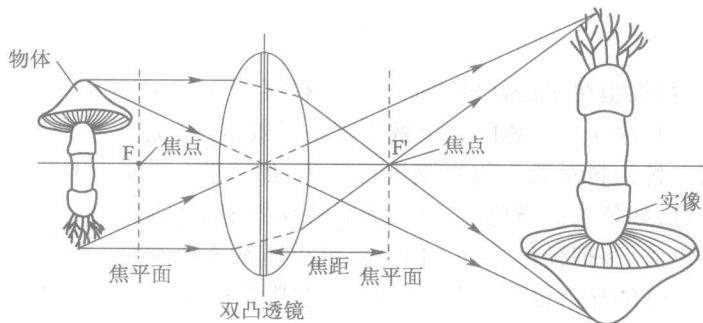


图 1-1 透镜产生放大的物像示意图

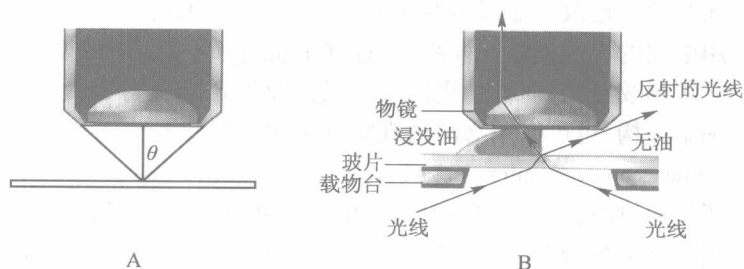


图 1-2 显微镜物镜的孔径角度  $\theta$ (A)和使用浸油为介质的工作情况(B)

### 1. 明视野显微镜(bright-field microscope)

明视野显微镜是微生物学实验室最常使用的光学显微镜,用于观察染色和未染色的微生物样品。因其是在较亮的背景下形成一个较暗的图像,所以被称作明视野。图1-3显示的是一台明视野显微镜和其工作原理图。

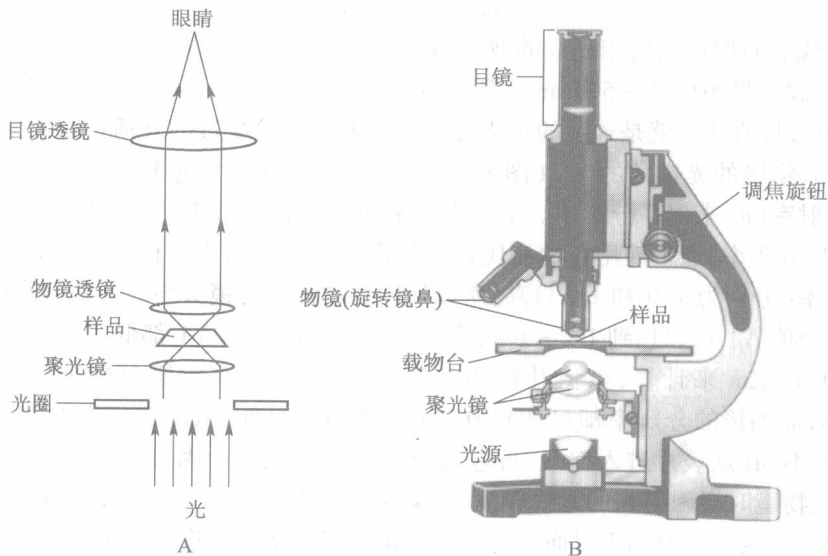


图1-3 明视野显微镜

A. 光路原理图 B. 侧面图

尽管无色的微生物细胞在明视野显微镜下可以观察,但由于细胞和水介质几乎没有什么反差,图像不是很清晰。解决这个问题的一個做法就是对微生物细胞进行染色,常用的微生物染色方法有单染色,即用一种染料对微生物细胞进行染色,如美蓝(又称亚甲蓝)、结晶紫、石炭酸复红等染料;还有复染色,如革兰氏染色法,以及针对特殊的细胞结构发展出来的特殊染色方法,如鞭毛染色法、荚膜染色法、芽孢染色法等。但染色过程通常杀死细胞,而很多研究工作需要观察活体细胞,因而一些特殊的显微镜被发明,它们是暗视野显微镜、相差显微镜、微分干涉相差显微镜、荧光显微镜和激光共聚焦显微镜。

### 2. 暗视野显微镜(dark field microscope)

暗视野显微镜通过简单地改变显微镜照光的方法使活的、未染色细胞的精细形态结构能够被观察。其做法是用中空的光锥聚焦在样品上,这样不反射和不折射的光线就不进入物镜,只有样品反射或折射的光线形成图像,而样品周围的背景是黑的。暗视野显微镜可以用来观察较大的真核细胞的内部细微结构,也可以用来清晰观察细菌细胞形态。

### 3. 相差显微镜(phase contrast microscope)

相差显微镜主要是通过将折射光和透射光发生相改变,以便能像明视野和暗视野显微镜那样观察折射率的差别。这种显微镜在聚光器中安装一种特殊的环状光阑,在物镜中安装一种特殊的相板。观察样品时,聚光器产生一种中空圆桶状的光束。当这种光束通过细胞时,一部分光线会由于在样品内密度和折射率的差异而发生偏斜,从相板上除相板环以外的地方通过,相位被

滞后约  $1/4$  波长,这种偏斜光聚焦后形成物像;而非偏斜光从相板上的相环通过,相位被提前  $1/4$  波长,结果与偏斜光之间产生  $1/2$  波长的相位。当偏斜光和非偏斜光相遇形成图像时就会相互抵消,由未偏斜光形成的背景是亮的,而偏斜光形成的不染色的样品图像则显得较暗和清晰。相差显微镜主要用于观察细菌的运动、细菌活细胞的形态和内含物,在真核微生物细胞观察研究中也有广泛应用。

#### 4. 微分干涉相差显微镜(differential interference contrast microscope)

微分干涉相差显微镜通过检测样品折射率和厚度差异产生物像。利用棱镜产生两束相互垂直的平面偏振光,一束作为目标光束通过样品,另一束作为参考光束穿过玻片上无样品的区域。分别穿过样品或玻片的两束光聚合,相互干扰形成样品图像。活的未染色的样品在微分干涉相差显微镜下呈现出色彩鲜亮、三维立体感的图像,一些细胞内含物或细胞器等结构清晰可见。

#### 5. 荧光显微镜(fluorescence microscope)

荧光显微镜就是利用紫外线、紫光或蓝光照射样品,通过样品产生的荧光形成物体的图像。因此荧光显微镜要有一个激发光源,通常选用汞蒸气弧光灯,并用一个激发滤光片选择特定波长的光波用以照射激发样品。为了观察样品发出的荧光,还需要在物镜后面安装一个阻断滤光片,去除影响观察的可能的激发光波,只让特定波长的发射荧光通过。由于只有少数微生物细胞可以自发荧光,大多数普通微生物细胞是不能够经照射发出荧光的,因此通常需要利用一些特殊的荧光染料对细胞进行染色,经过光激发,被荧光染料所标记的微生物就能够形成图像。

#### 6. 激光共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope)

激光共聚焦显微镜是用来观察自身可发荧光的微生物细胞,或经荧光染料染色后的微生物细胞。激光共聚焦显微镜利用激光发出的特定波长光束穿过物镜棱镜聚焦在样品某一点上,被激发的样品生色团在较长波长区域发出荧光,荧光返回到棱镜处被反射到光电倍增管。只有从聚焦点发出的共聚焦光才能穿过针孔到达光电倍增管,而其他散色光则被阻挡掉。一个狭窄聚焦的激光束代表一个图像的像素。通过激光束在样品的某一平面进行扫描,并用光电倍增管收集样品各个点发射的荧光,就形成一个平面的光学物像。而激光束对样品上下不同平面进行扫描,可得到一系列不同平面的光学物像。这些图像可堆积在一起,经计算机处理产生一个重建的三维立体细胞图像,这样就可以克服普通荧光显微镜由于使用混合波长光源对样品的大区域照射激发,引起物像景深较大,整个细胞都成像,使观察到的物像清晰度不够的问题。

### (二) 电子显微镜

由于光学显微镜最大分辨率只有大约  $0.2\ \mu\text{m}$ ,只能观察到原核微生物的形状和主要的形态特征,即使较大的真核微生物,其细胞的内部结构也不能被有效观察。分辨率最大的限制是由可见光波长所决定,电子显微镜可以克服光学显微镜分辨率不足的问题。电子显微镜工作原理是利用电子束也具有波的特性,并可以像光学显微镜所使用的光波一样被会聚。若将电子束用作样品的照明光源,将大大提高显微镜的分辨率,因为它的波长只有大约  $0.005\ \text{nm}$ ,比可见光要短约 10 万倍。透射电子显微镜的实际分辨率比光学显微镜高约 1 000 倍,很多电镜的分辨率可达  $0.5\ \text{nm}$ ,有效放大倍数超过 100 000 倍。

#### 1. 透射电子显微镜(transmission electron microscope)

透射电子显微镜是靠穿过样品的电子束的聚焦而形成样品物像的一种电子显微镜。其工作原理是,用一个电子源代替光源,由电子枪中的钨丝被加热产生电子束,采用一种电磁圈(磁透

镜)作为使电子束聚焦的聚光器。要想得到清晰的物像,装载磁透镜和样品的柱体必须处于高度真空环境,否则电子会和空气分子发生碰撞而偏转。穿过样品时被散射的电子束再被磁透镜所聚焦,并在荧光屏上形成一个放大的、肉眼可见的样品图像。由于细胞样品的不同区域密度高低不一,造成电子发生散射程度不同,因而导致明暗不同的物像产生(图 1-4)。由于电子非常容易被固体物质所吸收或散射,所以观察微生物样品时要求使用非常薄的样品切片(20 ~ 100 nm)。样品超薄切片需要经过特殊的固定、脱水、包埋和超薄切片等过程。同样,超薄切片在电镜观察之前,也要进行染色(如乙酸双氧铀染色),样品固定时使用的四氧化锇也具有染色功能。

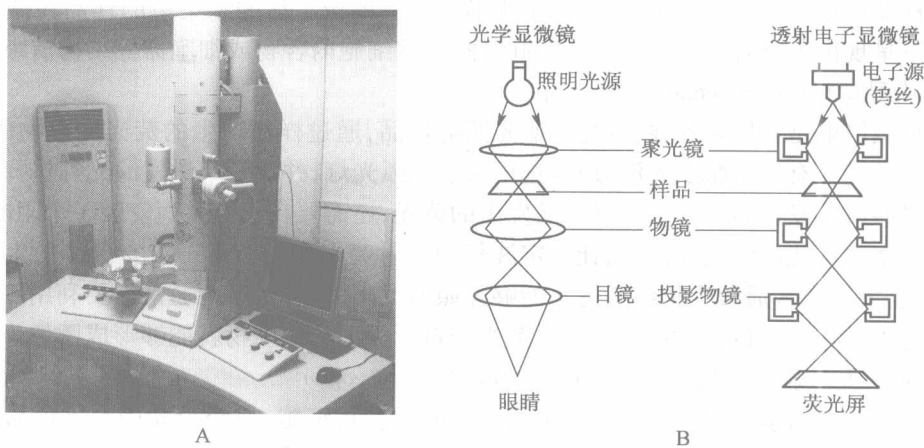


图 1-4 透射电子显微镜(A)和原理示意图(B)

## 2. 扫描电子显微镜(scanning electron microscope)

扫描电子显微镜是通过由样品表面所激发的电子束而非由透过样品的电子束聚焦而形成物像的一种电子显微镜。扫描电子显微镜利用一个锥形细小电子束在样品上前后扫描,在电子束扫描到的相应的区域可激发样品表面的原子产生二次电子,后者被一个特殊的探测器所采集,转换成光信号,再经光电倍增管转换成电流信号并被放大。电流信号同步输入到阴极射线管,就可在荧光屏上形成物像。扫描电子显微镜主要用以观察微生物细胞表面及其附着物形态结构,以及微生物在生态环境中的分布,如观察生长在人类皮肤及肠黏膜上的微生物。

## 三、微生物在生命世界的位置

人类在漫长的生活实践中对周围的动植物,逐步有了粗浅的了解,对于动植物形态和类别的认识也逐步有了一些系统的知识,逐渐形成了生物可分成动物和植物两大类的认识。1735 年瑞典博物学家林奈在《自然系统》中首次对两界系统进行了较为科学的阐述,把一切生物分成截然不同、区别明显的两大界——能够运动、摄食异养的动物界和不能运动、光合自养的植物界。虽然列文虎克 1766 年在显微镜下发现了微生物,但当时因很多微生物被发现具有快速运动性而被归为动物。19 世纪 80 年代,因发现微生物中的藻类、真菌和细菌更类似植物,而将它们归于植物界,但原生动物继续归于动物界。

后来发现,几乎不同微生物类群都既含有类似植物特性的种类又含有类似动物特性的种类。