

微生物学概述

学习目标

知识目标

学习微生物概念及分类、微生物与人类关系、医学微生物学的发展。

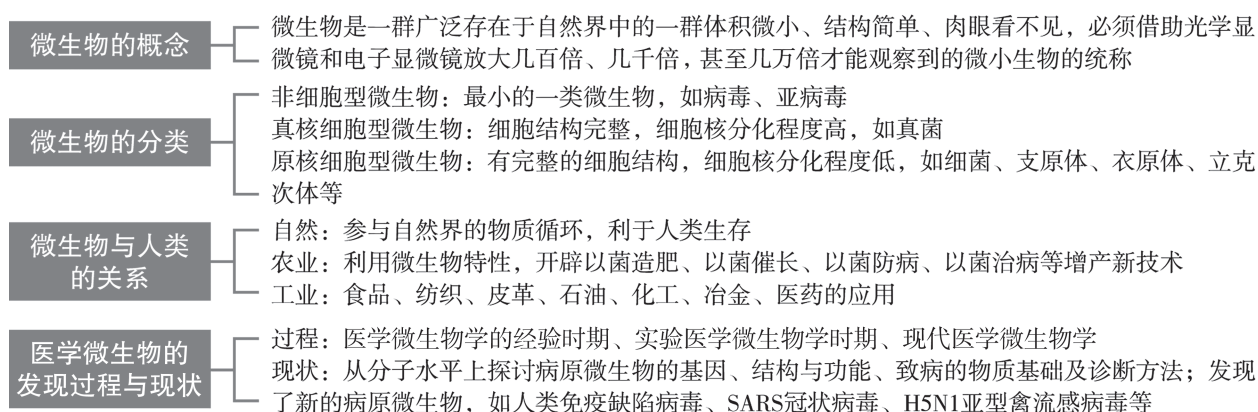
能力目标

掌握微生物学概念及分类；熟悉微生物与人类的关系；了解医学微生物学的发展过程及其意义。

素质目标

培养学生创新精神，将理论与实践相结合。

思维导图



案例引入

1910年冬，中俄边境小城满洲里的一家客栈里，从俄国回来的两位皮毛商人突然口吐血沫而死，怪异的是他们死后全身的皮肤都呈紫红色。这场疾病在短短几天内就席卷了整个城市，城中居民纷纷乘火车逃离这座城市。在这时，只有两位年轻人逆风前来，他们就是伍连德和助手林家瑞。经过一系列的调查，他们将这次在东三省流行的鼠疫称为“肺鼠疫”，这是一种通过飞沫传播的鼠疫。得出结论后，由伍连德牵头开始了对该鼠疫的系统抗疫行动，为防止疫情蔓延，采取戴口罩、隔离、消毒、阻断交通、火化尸体等措施。截至1911年，蔓延6个月、波及多个地区、共吞噬6万多人生命的东三省鼠疫大流行宣告结束。1935年，伍连德获得诺贝尔生理学或医学奖提名，成为第一个获此提名的华人。

思考：案例中的“肺鼠疫”是哪类微生物导致的？

一、微生物的概念和分类

（一）微生物的概念

微生物是一群广泛存在于自然界中的一群体积微小、结构简单、肉眼看不见，必须借助光学显微镜或电子显微镜放大几百倍、几千倍，甚至几万倍才能观察到的微小生物的统称。具有个体微小、种类繁多、分布广泛、结构简单、繁殖迅速、容易变异等特点。

（二）微生物的分类

微生物种类繁多，根据其大小、结构可分为 3 类。

1. 非细胞型微生物 是至今为止最小的一类微生物。无典型的细胞结构，缺乏产生能量的酶系统，必须在活细胞内才能增殖，如病毒、亚病毒。

2. 真核细胞型微生物 真核细胞型微生物细胞结构完整，细胞核分化程度较高，有核膜、核仁和染色体；细胞器完整，包括内质网、核糖体、线粒体等，真菌是真核细胞型微生物的代表。

3. 原核细胞型微生物 原核细胞型微生物有完整的细胞结构，细胞核分化程度低，仅有原始核质呈环状裸 DNA 团块结构，无核膜与核仁。细胞器不完善，仅有核糖体。细菌、支原体、衣原体、立克次体、螺旋体和放线菌都属于此类。

二、微生物与人类的关系

自然界中绝大多数微生物对人类和动植物是有益无害的，有些甚至是必需的。

在物质循环方面，如土壤中的微生物能将死亡动植物的蛋白质转化为无机含氮化合物，供植物生长利用；固氮菌可将空气中的氮气固定，供植物吸收和利用；而植物又被人类和动物所利用。因此，没有微生物，自然界的物质循环就不能进行，人类和动物也将无法生存。

在农业方面，人类广泛利用一些微生物的特性，开辟了以菌造肥、以菌催长、以菌防病、以菌治病等农业增产新技术。

在工业方面，微生物在食品、纺织、皮革、石油、化工、冶金、医药等领域的应用日趋广泛，尤其是在医药方面，几乎所有的抗生素都是微生物的代谢产物，另外还可利用微生物制造一些维生素、辅酶等。近年来，在基因工程技术中，微生物如大肠埃希菌、酵母菌等可作为基因载体生产胰岛素和干扰素等生物制品。

总之，微生物与人类的关系极为密切，在人类生产和生活的各个领域都有重要的作用。但是，也有少数微生物能引起人和动植物的疾病，这些具有致病性的微生物称为病原微生物。有些微生物正常情况下不致病，但在特殊条件下可导致疾病的发生，这类微生物称为机会致病性微生物。

三、医学微生物学的发展过程与现状

医学微生物学是主要研究与人类疾病有关的病原微生物的生物学特性、致病性、免疫性，以及特异性诊断和防治措施的一门学科，是人类在探索感染性疾病的病因、流行规律和疾病防治过程中逐渐发展和完善的一门学科。其发展过程大致可分 3 个时期。

（一）医学微生物学的经验时期

古代人类虽未观察到微生物，但早已将微生物学知识用于工农业生产和疾病防治中。例如，公元前两千多年的夏朝，就有仪狄酿酒的记载；北魏（386—534）《齐民要术》一书中详细记载了制醋的方法。长

期以来民间常用的盐腌、糖渍、烟熏、风干等保存食物的方法，实际上正是通过抑制微生物的生长而防止食物的腐烂变质。关于传染病的发生与流行，我国北宋末年刘真人就提出肺癆由虫引起之说。意大利佛拉卡斯托罗（Fracastoro, 1478—1553）认为传染病的传播有直接、间接和通过空气传播等多种途径。清乾隆年间，我国师道南在《天愚集·鼠死行篇》中生动地描述了当时鼠疫流行的凄惨境况，并正确地指出鼠疫与鼠的关系。在预防医学方面，我国自古就有将水煮沸后饮用的习惯。大量古书证明，我国在明隆庆年间（1567—1572）就已广泛应用人痘来预防天花，并先后传至俄国、朝鲜、日本、土耳其、英国等国家，人痘接种预防天花是我国对预防医学的一大贡献。

（二）医学实验微生物学

荷兰人列文·虎克（A. Leeuwenhoek, 1632—1723）于1676年用自磨镜片创制了一架原始显微镜，首次观察和描述了各种形态的微生物，为微生物的存在提供了科学依据，也为微生物形态学的建立奠定了基础。随后，法国科学家巴斯德（Louis Pasteur, 1822—1895）率先实验证明有机物质的发酵与腐败由微生物所引起，由此创用了酒类和乳类的巴氏消毒法。在巴斯德的影响下，英国的外科医生李斯特（Joseph Lister, 1827—1912）开创性使用石炭酸（苯酚）喷洒手术室和煮沸手术用具，以防止术后感染，为防腐、消毒以及无菌操作奠定了基础。微生物学的另一奠基人是德国学者郭霍（Robert Koch, 1843—1910），他创用了固体培养基和染色技术，先后确定了多种传染病的病原菌。在19世纪的最后20年，大多数细菌性传染病的病原体由郭霍及其带动下的一大批学者发现并成功分离培养。俄国学者伊凡诺夫斯基于1892年发现了第一种病毒，即烟草花叶病毒。1897年勒夫勒和弗勒施发现动物口蹄疫病毒。1901年美国学者瓦尔特·里德首先分离出对人类致病的黄热病毒。1915年英国学者图尔特发现了细菌病毒（噬菌体）。此后又相继分离出人类和动、植物的许多病毒。

（三）现代微生物学时期

近几十年来，生物化学、遗传学、细胞生物学、分子生物学等学科的发展，以及电子显微镜，气相、液相色谱技术，免疫学技术，单克隆抗体技术，分子生物学技术的进步，促进了医学微生物学的发展。人们得以从分子水平上探讨病原微生物的基因、结构与功能、致病的物质基础及诊断方法，使人们对病原微生物的活动规律有了更深刻的认识，并发现了许多新的病原微生物，如人类免疫缺陷病毒、SARS冠状病毒、H5N1亚型禽流感病毒等。实验检测技术更是突飞猛进，向着特异、灵敏、快速、简便的方向发展。新型疫苗不断问世；新的抗生素不断被制造出来，有效地控制了细菌性传染病的流行；细胞因子、单克隆抗体及基因治疗等手段在病毒性疾病治疗中的应用研究也日益广泛和深入。

学习主题一

细菌学总论

学习目标

知识目标

学习细菌的大小、细菌的形态结构、细菌生长繁殖的遗传变异，细菌的分布，细菌的消毒与灭菌，细菌的致病性和感染，细菌感染的发生与结局。

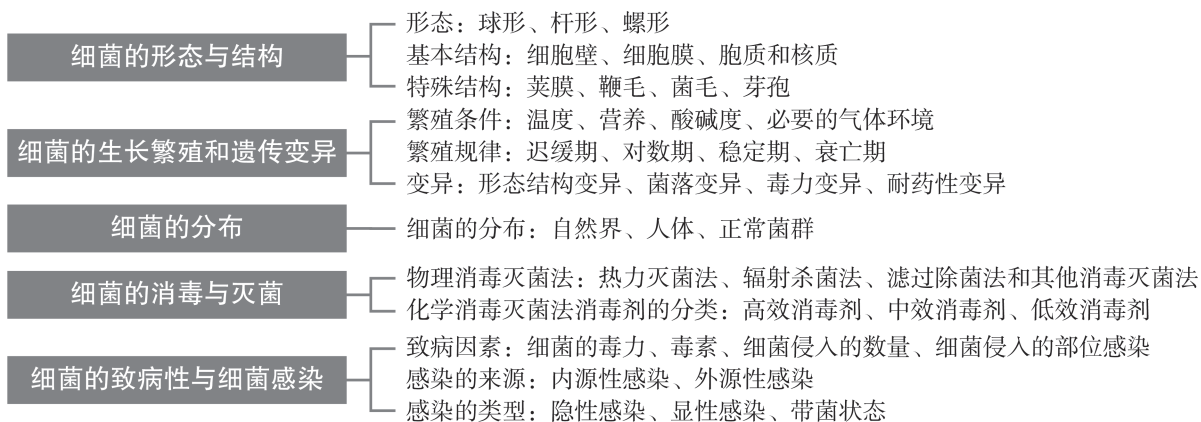
能力目标

掌握细菌的基本形状与结构；熟悉各类细菌的繁殖、变异和致病性；了解细菌的分布及消毒灭菌。

素质目标

培养学生创新精神与动手能力，激发学生的自主学习能力。

思维导图



案例引入

患者，男，33岁，于18天前劳累后出现干咳，午后低热，体温波动于37.6~38.4℃，1周后咳黄痰数口，痰中偶有血丝，伴有深吸气及咳嗽时胸痛加重。经青霉素静脉点滴后，痰量略有减少，但低热，胸痛缓解不明显。发病以来食欲不佳，二便正常，睡眠尚可，盗汗，体重下降2kg。既往体健，吸烟史10余年，20支/天。胸X线片示右上肺纤维索条状影，右肺下叶背段可见一空洞，内壁欠光滑，有液平面，空洞周围有渗出影。血中白细胞 $10.2 \times 10^9/L$ ，中性粒细胞78%，血红蛋白132g/L。

思考：此患者的症状是什么细菌感染导致的？

项目一 细菌的形态与结构

细菌（bacteria）是一类主要以二分裂方式进行无性繁殖的、具有细胞壁单细胞原核细胞型微生物，原始核质，无核膜和核仁。广义的细菌泛指各类原核细胞型微生物，包括细菌、放线菌、支原体、衣原体、立克次体、螺旋体；狭义的细菌专指数量大、种类多、具有典型性的细菌。

任务一 细菌的大小与形态

一、细菌的大小

细菌体积微小，通常以微米（ μm ）（ $1\ \mu\text{m}=1/1000\ \text{mm}$ ）为单位。光学显微镜是观察细菌最常用的仪器，不同种类的细菌大小不一，同一种细菌也可因菌龄和环境因素的影响而有差异。球菌的大小一般以其直径表示，平均直径为 $1.0\ \mu\text{m}$ ；杆菌的大小一般以其长度和宽度表示，常见杆菌的大小为 $(1\sim 5)\ \mu\text{m} \times (0.5\sim 1.0)\ \mu\text{m}$ 。

二、细菌的形态

细菌的形态受温度、pH、培养基成分及培养时间等因素影响较大。一般的细菌在适宜的生长条件下培养 $18\sim 24\ \text{h}$ 形态比较典型，当环境条件改变或培养时间过长时，其基本形态常发生变化，出现梨形、气球状、丝状等不规则形态，表现多形性。因此，观察细菌的大小和形态时，选择适宜生长条件下的对数生长期为宜。

按照细菌的基本形态球形、杆形、螺形，可分为球菌、杆菌和螺形菌三大类（图 1-1）。

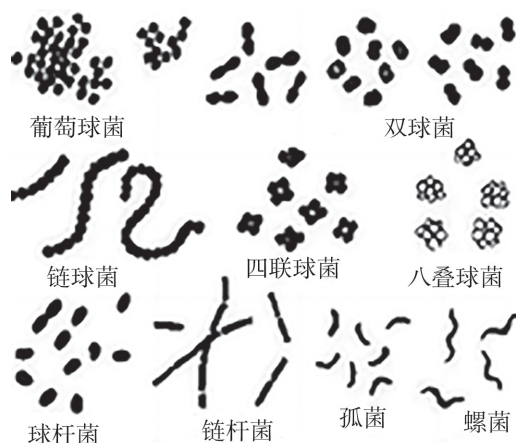


图 1-1 细菌的基本形态

(一) 球菌

单个菌体外观呈球形或近似球形，有的呈肾形或矛头状。由于繁殖时细菌分裂平面不同和分裂后菌体之间相互黏附程度不一，可按其分裂平面和分裂后菌体之间排列方式不同，将球菌分为以下 5 种（图 1-2）。

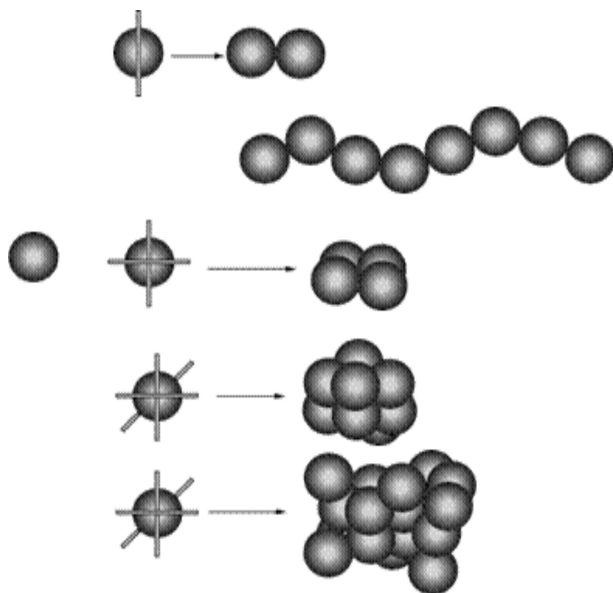


图 1-2 球菌的分裂及分裂后的排列方式示意图

1. 双球菌 在一个平面分裂，分裂后两个菌体成对排列，如肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟菌。
2. 链球菌 在一个平面分裂，分裂后多个菌体连接成链状，如乙型溶血性链球菌。
3. 四联球菌 在两个相互垂直的平面上分裂，分裂后 4 个细胞黏附在一起呈正方形，如四联加夫基菌。
4. 八叠球菌 在三个相互垂直的平面上分裂，分裂后 8 个细胞黏附在一起呈立方体状，如藤黄八叠球菌。
5. 葡萄球菌 在多个不规则的平面上分裂，分裂后细胞无规则地粘连在一起呈葡萄串状，如金黄色葡萄球菌。

(二) 杆菌

杆菌在细菌中种类最多。其大小、长短、弯度、粗细差异较大，呈杆状或近似杆状，多数杆菌两端钝圆，少数两端平齐，如炭疽芽孢杆菌两端平齐；白喉棒状杆菌一端或两端膨大呈棒状；分支杆菌呈分枝状生长；双歧杆菌一般分散存在，无固定排列形式，偶有成对或链状。

(三) 螺形菌

螺形菌菌体呈弯曲或螺旋状，根据弯曲的程度不同分为两类。

1. 弧菌 菌体只有一个弯曲，呈弧形或逗点状，如霍乱弧菌等。
2. 螺菌 菌体有数个弯曲，呈螺旋状，如鼠咬热螺菌等。弯曲呈“S”形或“海鸥”形者如空肠弯曲菌、幽门螺杆菌等。

任务二 细菌的结构

细菌的结构分为基本结构和特殊结构。基本结构是维持细菌正常生理功能，所有细菌均具有的结构，包括细胞壁、细胞膜、细胞质和核质。特殊结构是仅某些细菌具有的，甚至只在某些特定生长时期所具有的结构，包括荚膜、鞭毛、菌毛等（图 1-3）。

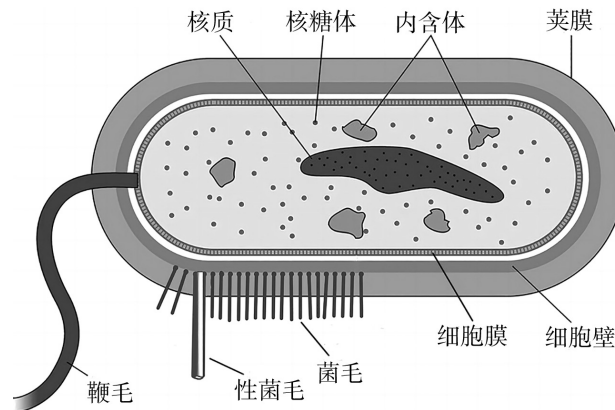


图 1-3 细菌的结构模式图

一、细菌的基本结构

(一) 细胞壁

细胞壁 (cell wall) 位于细菌细胞的最外层, 包绕在细胞膜的周围, 是一层无色透明、坚韧而富有弹性的膜状结构。因不同细菌细胞壁的结构和化学组成不同, 用革兰染色法可将细菌分为两大类, 即革兰阳性菌和革兰阴性菌。两类细菌细胞壁的共有组分为肽聚糖, 但肽聚糖的组成与连接方式有差别, 各自还有其特殊组分 (表 1-1)。

表 1-1 革兰阳性菌和革兰阴性菌特殊组分区别

区别点	革兰阳性菌	革兰阴性菌
坚韧度	较坚韧	较疏松
厚度	20 ~ 80 nm	10 ~ 15 nm
肽聚糖含量 (占细胞壁干重)	50% ~ 80%	5% ~ 20%
磷酸壁	有	无
外膜	无	有
结构	三维空间 (立体结构)	二维空间 (平面结构)

1. 革兰阳性菌的细胞壁 细胞壁较厚, 为 20 ~ 80 nm, 由肽聚糖和穿插其内的磷壁酸组成。

(1) 肽聚糖: 又称“黏肽”, 是革兰阳性菌细胞壁的主要成分, 其组成包括聚糖骨架、四肽侧链和五肽交联桥 (图 1-4)。肽聚糖是由 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸间隔排列, 经 β -1, 4 糖苷键联结成的聚合糖链。四肽侧链的氨基酸依次排列为 L-丙氨酸、D-谷氨酸、L-赖氨酸和 D-丙氨酸。四肽侧链的 L-丙氨酸连接在 N-乙酰胞壁酸上, 5 个甘氨酸组成的五肽交联桥, 将相邻的四肽侧链一侧的第 3 位赖氨酸与另一侧的第 4 位丙氨酸交联起来, 从而构成机械强度十分坚韧的三维立体网状结构。

(2) 磷壁酸: 是结合在革兰阳性菌细胞壁上的一种酸性多糖, 为革兰阳性菌细胞壁的特有成分 (图 1-5)。根据结合部位可分为壁磷壁酸和膜磷壁酸。壁磷壁酸一端结合在肽聚糖骨架的 N-乙酰胞壁酸上, 膜磷壁酸又称脂磷壁酸, 一端与细胞膜外层上的磷脂共价结合, 两者的另一端均伸展在细胞壁外。磷壁酸免疫原性很强, 是革兰阳性菌的重要表面抗原。膜磷壁酸具有黏附宿主细胞的功能, 与某些病原菌的致病性有关。



革兰氏阳性菌的细胞壁结构

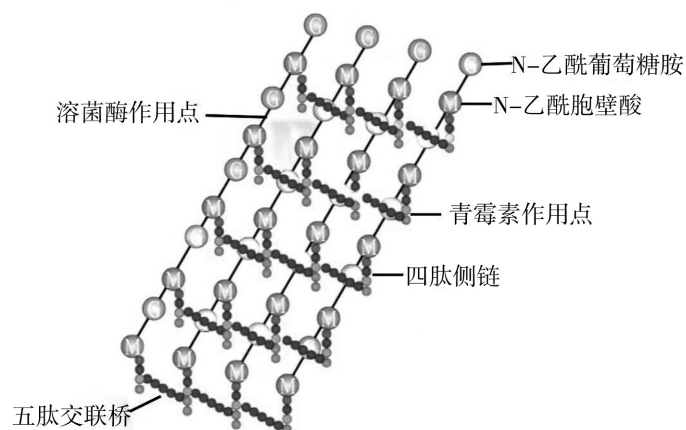


图 1-4 革兰阳性菌肽聚糖结构

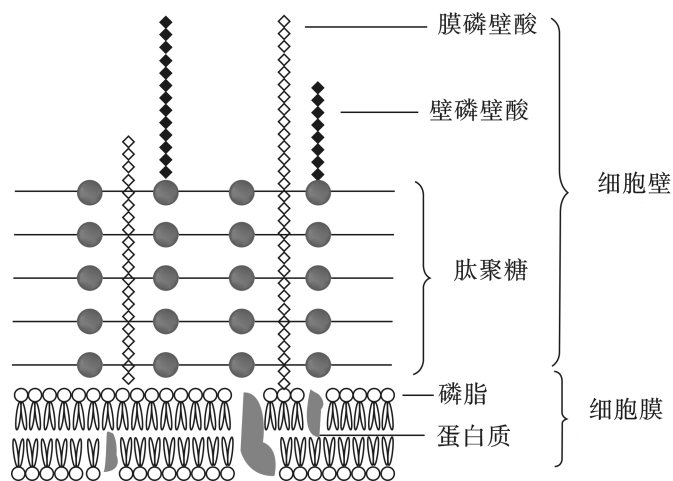


图 1-5 革兰阳性菌细胞壁结构

2. 革兰阴性菌的细胞壁 细胞壁较薄，为 10~15 nm，但结构较复杂。除含有 1~2 层的肽聚糖结构外，尚有其特殊组分外膜（outer membrane），约占细胞壁干重的 80%（图 1-6）。

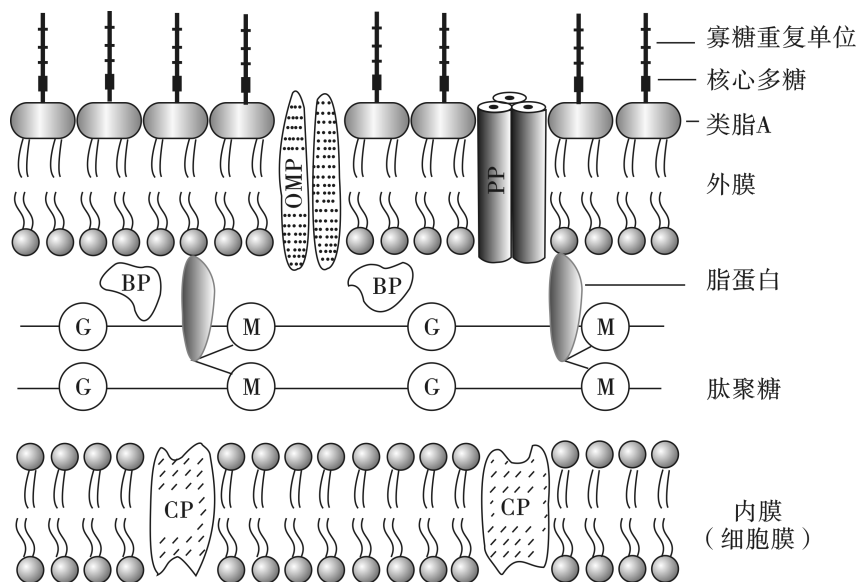


图 1-6 革兰阴性菌细胞壁结构



革兰氏阴性菌的
细胞壁结构

(1) 肽聚糖：由聚糖骨架、四肽侧链两部分组成。四肽侧链中的第 3 位氨基酸是二氨基庚二酸（DAP），并由 DAP 与另一相邻四肽侧链末端的 D- 丙氨酸直接连接，由于没有五肽交联桥，因而只形成稳定性稍差的单层平面二维结构（图 1-7）。

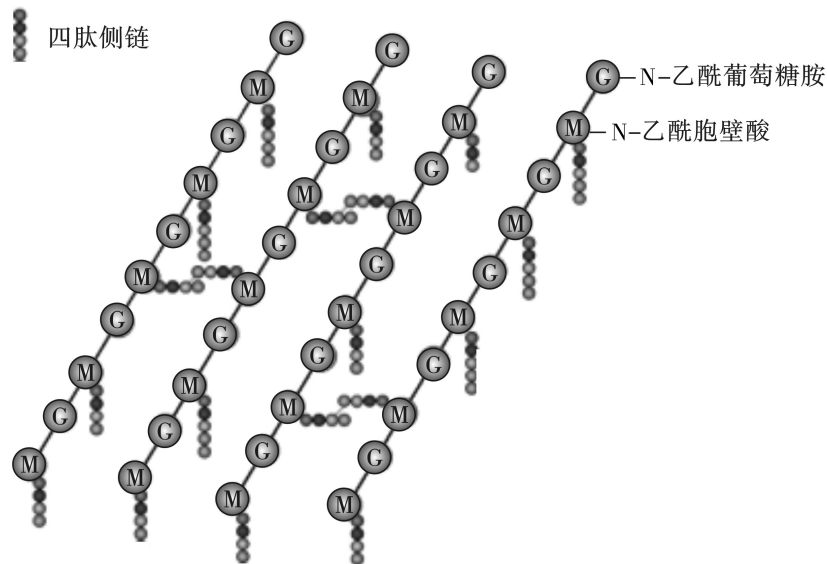


图 1-7 革兰阴性菌肽聚糖结构

(2) 外膜：是革兰阴性菌细胞壁的特有成分，由脂蛋白、脂质双层和脂多糖 3 部分组成。从结构上看，外膜是一个不对称的双层膜结构。其内层与细胞膜的内层膜结构相似，但其外层则为脂多糖结构。脂多糖位于外膜的最外层，由脂质双层向细胞外伸出，为革兰阴性菌的内毒素，包括脂质 A、核心多糖和特异多糖 3 部分。类脂 A 是内毒素的毒性成分，无种属特异性，故不同细菌产生的内毒素的毒性作用相似。核心多糖位于脂质 A 的外侧，有种属特异性。特异多糖位于脂多糖的最外层，构成革兰阴性菌的菌体抗原（O 抗原），具有种属特异性。脂蛋白由类脂和蛋白质组成，位于肽聚糖层和脂质双层之间，蛋白质部分以共价键连接于肽聚糖的四肽侧链的 DAP 上，脂质部分以共价键连接于脂质双层的磷酸上。其功能是稳定外膜并将之固定于肽聚糖层。脂质双层结构类似细胞膜，其中镶嵌着多种功能蛋白，称为外膜蛋白。外膜蛋白除进行细胞内外物质的交换外，还有屏障作用，能阻止多种物质透过，抵抗许多化学药物的作用，所以革兰阴性菌（除淋病奈瑟菌外）较革兰阳性菌对溶菌酶、青霉素、去污剂和碱性染料等具有更大的抵抗力。

3. 细胞壁缺陷型细菌（L-型细菌）细菌细胞壁的肽聚糖可因诸多因素（青霉素、溶菌酶和抗体）作用而受损，在普通环境中不能生存，但在高渗环境下仍能存活的细菌称为 L-型细菌。1935 年，Emmy Klieneberger-Nobel 在英国 Lister 研究所研究念珠状链杆菌时发现，该菌培养物中有一种菌落形态类似支原体的微生物，就以研究所第一个字母命名为 L-型细菌。其形态呈高度多形性，着色不均，大多为革兰阴性菌（图 1-8）。在高渗培养基中呈“油煎蛋”状小菌落。细菌 L-型仍有致病能力，可引起尿路感染、骨髓炎、心内膜炎等慢性感染，且多在使用作用于细胞壁的抗菌药物（如青霉素、头孢菌素等）的治疗过程中诱发产生。临床上遇有症状明显而常规细菌培养阴性者，应考虑 L-型细菌感染的可能性。

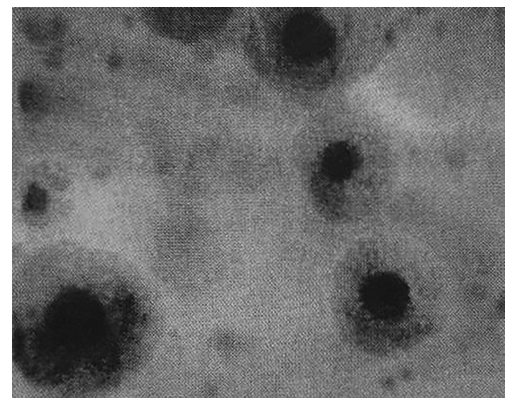


图 1-8 L-型细菌

（二）细胞膜

细胞膜（cell membrane）位于细胞壁内侧，是紧包着细胞质的一层柔软而富有弹性的半渗透性生物膜，占细胞干重的 10%~30%。细菌细胞膜的结构与真核细胞基本相同，由磷脂和多种蛋白质组成，但不含胆固醇。细菌细胞膜是细菌赖以生存的重要结构之一，其主要功能有物质转运、生物合成和呼吸与分泌。

（三）细胞质

细胞质（cytoplasm）是细胞膜所包裹的除拟核外的全部物质，为无色、半透明的溶胶状物质，由水、蛋白质、核酸、脂类、少量的糖和无机盐组成。细胞质中 RNA 的含量很高，决定了菌体易被碱性染料着色。细胞质中含有核糖体、质粒、胞质颗粒等亚显微结构。

1. 核糖体 细菌合成蛋白质的场所，游离存在于细胞质中，每个细菌体内可达数万个沉降系数为 70S 的核糖体，由 50S 和 30S 两个亚基组成，红霉素能与 50S 亚基结合，从而干扰细菌蛋白质的合成而导致细菌的死亡。真核细胞的核糖体沉降系数为 80S，由 60S 和 40S 两个亚基组成，因此，在多数情况下，抗生素对人体细胞无影响。

2. 质粒 细菌染色体外的遗传物质，存在于细胞质中。为环状闭合的双股 DNA 分子，携带某些遗传信息，控制细菌某些特定的遗传性状。医学上重要的质粒包括致育质粒（F 质粒）、耐药质粒（R 质粒）、毒力质粒（Vi 质粒）等。

3. 胞质颗粒 是存在于细胞质中的各种内含颗粒，大多贮藏的是营养物质，包括糖原、脂类、磷酸盐和淀粉多糖等。

（四）核质

核质（nucleoplasm）又称拟核，集中于细胞质的某一区域，多在菌体中央，无核膜、核仁和有丝分裂器，由单一密闭环状 DNA 分子卷曲盘绕，决定细菌的遗传特性。细菌的核质具有细胞核的功能，决定细菌的生命活动，控制细菌的生长、繁殖、遗传、变异等多种遗传性状。

二、细菌的特殊结构

（一）荚膜

荚膜（capsule）是指某些细菌在生长过程中合成并分泌至细胞壁外的一层黏液状物质。厚度 $\geq 0.2 \mu\text{m}$ 者称为荚膜或大荚膜，厚度 $< 0.2 \mu\text{m}$ 者称为微荚膜。荚膜的化学成分随细菌的菌种而异，也与细菌生长的环境有关，多数细菌的荚膜为多糖，对一般碱性染料的亲和力低，不易着色（图 1-9）。荚膜具有抗吞噬作用、抗杀菌物质损伤作用、黏附作用和抗干燥作用。

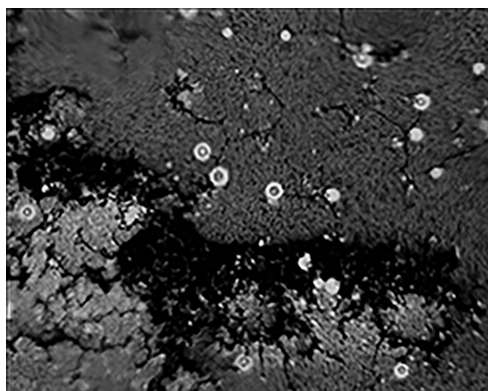


图 1-9 新生隐球菌肥厚荚膜

（二）鞭毛

鞭毛（flagellum）是某些细菌菌体上具有的细长呈波浪状弯曲的丝状物，是细菌的运动器官。根据鞭毛在菌体上的位置和数量不同，可将有鞭毛的细菌分为单毛菌、双毛菌、丛毛菌和周毛菌 4 类（图 1-10）。鞭毛的化学成分主要是蛋白质，具有免疫原性，通常被称为 H 抗原，可用于细菌的鉴别和分型。有些细菌的鞭毛与致病性有关，如霍乱弧菌、空肠弯曲菌等借鞭毛的运动穿透小肠黏膜表面的黏液层，使菌体黏附于肠黏膜上皮细胞产生毒性物质而致病。

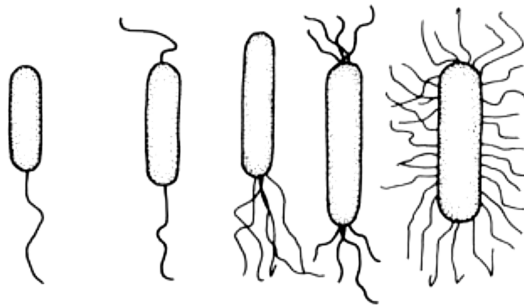


图 1-10 细菌鞭毛的类型

(三) 菌毛

菌毛 (pilus) 是许多革兰阳性菌与少数革兰阴性菌表面分布的细而短、多而直的蛋白性丝状物。在普通光学显微镜下看不到，必须用电子显微镜观察，菌毛与细菌的运动无关。菌毛由结构蛋白亚单位菌毛蛋白 (pilin) 组成，螺旋状排列成圆柱体，新形成的菌毛蛋白分子插入菌毛的基底部。菌毛蛋白具有抗原性，其编码基因位于细菌的染色体或质粒上。

菌毛依形态、分布和功能不同分为普通菌毛与性菌毛两种类型。普通菌毛遍布菌体表面，可达数百根。它是细菌的黏附器官，具有黏附于宿主细胞表面的能力。若菌毛失去，则细菌的致病力也随之丧失，故菌毛与细菌的致病性密切相关。性菌毛仅见于少数革兰阴性菌，一个菌体只有 1~4 根，比普通菌毛长而粗，它通过接合方式在细菌间传递遗传物质 (图 1-11)。



图 1-11 细菌的菌毛

(四) 芽孢

芽孢 (spore) 是某些革兰阳性菌在一定条件下细胞质脱水浓缩，在菌体内形成的具有多层膜包裹、通透性低、折光性强的圆形或椭圆形小体。一个细菌只形成一个芽孢，不同细胞形成的芽孢的大小、形状、位置也不同，芽孢的壁厚、通透性差，普通的革兰染色法不能使之着色，在普通光学显微镜下只能看到透光的小体，必须采用电子显微镜观察。染色时需经媒染、加热等处理才能观察到菌体内的芽孢 (图 1-12)。

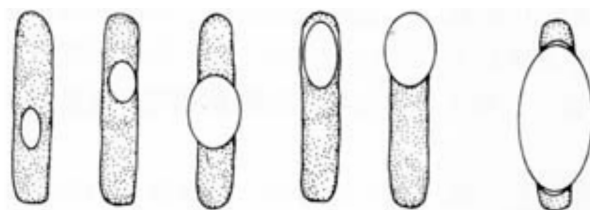


图 1-12 细菌芽孢的形态

芽孢对热力、干燥、辐射、化学消毒剂等理化因素均有强大的抵抗力，而杀死细菌的芽孢是判断灭菌效果的指标。细菌是否形成芽孢是由菌体内的芽孢基因和芽孢形成条件决定的。例如，炭疽杆菌的芽孢在有氧条件下形成，而破伤风梭菌则相反。

任务三 细菌的形态学检查

细菌的形态学检查是研究细菌的一个重要方面，了解细菌的形态和结构对研究细菌的生理活动、致病性和免疫性，以及鉴别细菌、诊断疾病和防治细菌性感染等均有重要的理论和实际意义，可分为显微镜放大法和染色法两大类。

一、显微镜放大法

细菌形态结构小，必须使用显微镜放大后才能看到，可观察到细菌的显微镜有普通光学显微镜和电子显微镜。

（一）普通光学显微镜

普通光学显微镜以可见光（日光或灯光）为光源，用油镜观察细菌（放大 1000 倍）。观察细菌时，需将细菌染色，以增加其与周围环境的对比度，以便观察清楚。

（二）电子显微镜

电子显微镜是利用电子流代替可见光波，以电磁圈代替放大透镜。不仅能看清细菌的外形，也可看清细菌的内部超微结构。电子显微镜显示的形象，可投射到荧光屏上，也可照相拍摄。

二、染色法

（一）不染色标本检查

不染色标本检查主要用于检查细菌的动力及运动状况。有鞭毛的细菌运动活泼，无鞭毛的细菌则做布朗运动。常用方法有压滴法、悬滴法和暗视野显微镜法。

（二）染色标本检查

细菌个体微小呈半透明状，经染色后才能清楚地观察细菌的形态、大小、排列、染色特性，以及荚膜、芽孢、异染颗粒等结构，有助于细菌的初步鉴定。常用的染色方法可分为单染色法和复染色法两大类。

1. 单染色法 指仅用一种染色剂进行染色，如亚甲蓝染色法。用于观察细菌的形态、大小与排列，但不能显示细菌的结构与染色特性。

2. 复染色法 指用 ≥ 2 种染色剂进行染色，不仅能观察细菌的大小、形态与排列，还能鉴别细菌的结构与染色特性。常用的有革兰染色法、抗酸染色法、特殊染色法（如芽孢染色法、鞭毛染色法等）。

（1）革兰染色法

由丹麦细菌学家革兰（Hans Christian Gram）创建，是最常用、最重要的经典染色方法。方法如下：细菌标本经涂片、干燥、固定后，用结晶紫初染 1 min，水洗；以碘液媒染 1 min，水洗；然后用 95% 乙醇脱色 10~30 s，直至无明显紫色洗脱液为止，水洗；最后用稀释石炭酸复红复染 1 min，使脱色的细菌重新着色，水洗。吸干或晾干玻片，油镜检查。结果为染成紫色者是革兰阳性菌，用 G^+ 表示，染成红色者是革兰阴性菌，用 G^- 表示。革兰染色法具有重要的医学实际意义。

①鉴别细菌：革兰染色法将所有细菌分为革兰阳性菌和革兰阴性菌两大类，缩小了鉴定范围。

②指导临床选择用药：革兰阳性菌与革兰阴性菌因细胞壁结构的差异，对抗生素和化学药剂的敏感性不同，大多数革兰阳性菌对青霉素、红霉素、头孢菌素等敏感，而大多数革兰阴性菌对氯霉素、庆大霉素、卡那霉素等敏感，临床上可根据病原菌的革兰染色法，初步选择有效的药物治疗。

③与致病性有关：大多数革兰阳性菌主要以外毒素致病，而大多数革兰阴性菌主要以内毒素致病，且两者致病机制与临床表现也不相同。

(2) 抗酸染色法：抗酸染色法可鉴别抗酸菌与非抗酸菌。染色方法是将固定的标本经石炭酸复红加温染色，再用 3% 盐酸乙醇脱色，最后用美蓝复染。抗酸菌染成红色，非抗酸菌则染成蓝色。

(3) 特殊染色法：细菌的特殊结构如鞭毛、荚膜、芽孢等，用上述染色法不易着色，必须用特殊染色法才能着色，如荚膜染色法、芽孢染色法等。这些染色法可使细菌的特殊结构着色并与菌体染成不同颜色，有利于细菌的观察和鉴别。

知识链接

冰川蕴藏着丰富的低温微生物，其生态环境赋予了冰川微生物物种、遗传和代谢多样性。我国多年来致力于冰川低温细菌资源的收集保藏、系统进化和生态适应机制研究，积累了 11 条冰川来源的低温细菌菌种 4000 余株，在中国普通微生物菌种保藏管理中心建立了我国特色的冰川低温细菌菌种资源库。但是，法国国家科学研究中心环境病毒学研究员尚塔尔·阿贝格尔 (Chantal Abergel) 表示，我们离采样地球上所有的病毒还很遥远。人为造成的气候变化可能使科学家们无法发现许多保存在冰川中的古老病毒，并释放出被冰封了数万至数十万年的微生物和病毒，在 2015 年，法国科学家从西伯利亚永久冻土层中复活了一种 30 000 年前的巨型病毒——*Mollivirus sibericum*，复活后的病毒仍能感染单细胞的阿米巴原虫（变形虫）。然而最糟糕的情况似乎已经发生，2016 年，西伯利亚暴发的炭疽热杀死了 2 000 多只驯鹿，致使 96 人入院治疗。炭疽芽孢可以存活数年，而那次暴发很可能是由西伯利亚多年冻土层的融化使一具感染了炭疽菌的鹿尸解冻引起的。

课后习题

- 测量细菌大小采用的单位是 ()。

A. nm	B. μm	C. cm
D. m	E. mm	
- 细菌细胞壁的主要功能是 ()。

A. 生物合成	B. 维持细菌的外形	C. 形成中介体
D. 呼吸作用	E. 能量产生	
- 有关革兰阳性菌细胞壁的特点不正确的是 ()。

A. 主要成分为肽聚糖	B. 含有磷壁酸	C. 对青霉素敏感
D. 含有大量脂多糖	E. 易被溶菌酶裂解	

A. 蛋白质

B. 脂蛋白

C. 肽聚糖

D. 磷壁酸

E. 脂多糖

A. 细胞膜上

B. 膜磷壁酸上

C. 肽聚糖层上

D. 外膜上

E. 壁磷壁酸上

6. 对荚膜叙述正确的是 ()。

A. 菌体分泌到体外的一层黏液状物质

B. 化学成分是多糖或多肽

C. 可抗吞嚥

D. 具有抗原性, 可用于鉴别细菌

E. 以上均是

7. L-型细菌是()。

A. 细胞壁缺陷的细菌

B. 无核质的细菌

C. 细胞膜缺陷的细菌

D. 质粒丢失的细菌

E. 无致病力的细菌

8. 不属于细菌基本结构的是 ()。

A. 鞭毛

B. 细胞质

C. 细胞膜

D. 核质

E. 细胞壁

9. 革兰阳性菌与革兰阴性菌的细胞壁肽聚糖结构的主要区别在于()。

A. 聚糖骨架

B. 四肽侧链

C. 五肽交联桥

D. β -1,4 糖苷键

E. 以上都不是

实训工单 细菌革兰染色

【实验目的】

- (1) 描述并记忆细菌的革兰染色法。
- (2) 学会使用油镜观察革兰阳性菌和革兰阴性菌的形态结构。

【实验原理】

最常用的细菌复染色法是革兰染色法。染色步骤为结晶紫初染、卢戈碘液媒染、乙醇脱色和复红复染等步骤。革兰染色法是细菌分类和鉴定的基础，可将细菌分为两大类：能保留第一种染料结晶紫呈紫色的细菌叫作革兰阳性菌；被乙醇脱色后染上对比染液稀释复红而呈红色的细菌叫作革兰阴性菌。

一般认为，革兰染色法与下列因素有关：①革兰阳性菌等电点低（pH 2 ~ 3），而革兰阴性菌等电点高（pH 4 ~ 5），因此在一般生理条件下（pH 7.4 左右），革兰阳性菌所带的负电荷要比阴性菌多，从而与碱性染料结晶紫结合牢固。②革兰阴性菌细胞壁有外膜结构，含有较多的脂质成分，对乙醇作用敏感，脂质被乙醇溶解，造成细胞壁破损，结晶紫-碘复合物容易被抽提出来而脱色。③革兰阳性菌细胞壁脂质含量低，对乙醇作用不敏感，且革兰阳性菌细胞壁含有多层致密（交联度大）的肽聚糖层以及带有大量负电荷的磷壁酸，结晶紫与细胞壁结合紧密，染料不易被乙醇抽提出来，保留结晶紫的紫色。

【实验用品】

- (1) 细菌：金黄色葡萄球菌平板培养物、大肠埃希菌（*Escherichia coli*）平板培养物。
- (2) 试剂：结晶紫、95% 乙醇、碘液、稀释复红染液各 1 瓶、香柏油、擦镜液、生理盐水。
- (3) 其他：载玻片、吸水纸、接种环、酒精灯、擦镜纸、显微镜。

【实验步骤】

- (1) 涂片、干燥、固定，同细菌单染色法。
- (2) 初染：加结晶紫染液于标本上，使其覆满标本，染色 1 ~ 2 min，细水冲洗。
- (3) 媒染：加卢戈碘溶液染 1 min，细水冲洗。
- (4) 脱色：加 95% 乙醇于载玻片上，脱色约 30 s，倾去乙醇，脱色 1 次，细水冲洗。
- (5) 复染：加稀释复红染液复染约 30 s，细水冲洗，待其自然干燥或用吸水纸轻轻吸干。
- (6) 镜检：油镜观察。

【实验总结】

实训名称	细菌革兰染色			
序号	评估项目	分值	实训要求	得分
1	实验准备	15	按实验要求完成实验用品准备	
2	完成情况	15	按时按要求完成实训任务	
3	掌握程度	25	掌握细菌革兰染色的基本操作	
4	实训记录	25	实验记录规范、完整	
5	团队合作	20	服从老师安排，能配合完成工作	

续表

实训名称	细菌革兰染色	
实验结果及分析：		