

第1章

微生物与环境

1.1 微生物的研究与显微镜之间的关系

微生物(microorganism)是一切肉眼看不见或看不清的微小生物的总称。它们都是一些个体微小(一般 $<0.1\text{mm}$)、结构简单的低等生物,其成员包括:属于原核类的真细菌、放线菌、蓝细菌、支原体、衣原体和立克次氏体;属于真核类的真菌(酵母菌、霉菌和蕈菌)、原生动物和显微藻类;介于原核和真核之间的古生菌,以及属于非细胞类的病毒和亚病毒因子(类病毒、拟病毒和朊病毒等)。

1. 微生物学发展史上的五位先驱

微生物在我们身边无处不在。人体内外以及包围着整个地球表层的土壤圈、水圈和大气圈都分布着难以计数的微生物,它们与人类的食物、药品以及疾病密切相关。现在我们已经知道人类早在几千年前就会利用微生物进行酿酒、酿醋、发面、治病等,但由于微生物个体微小,无法用肉眼直接观察到,直到1676年,荷兰人列文·虎克自己制作了一个透镜装在金属附件中组成的一架单式显微镜(图1-1),其放大率约200倍。他用该简易显微镜观察到了形态微小、用肉眼无法观察到的细菌,并作图描绘出了这些细菌的形态和大小(图1-2)。由于列文·虎克首次克服了人类认识微生物世界的第一个难关——“个体微小”,使人类初步踏进了微生物世界的大门,所以我们称他为“微生物学的先驱者”。

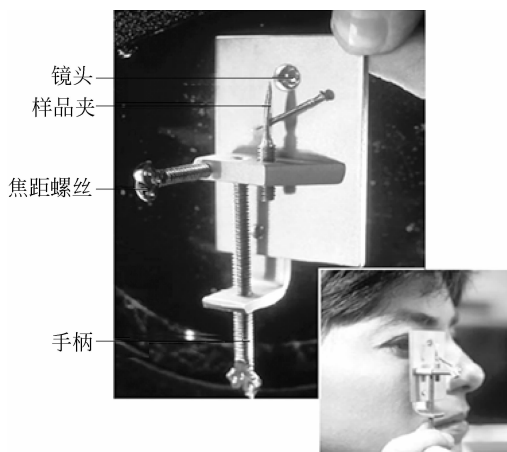


图 1-1 列文·虎克的单式显微镜

引自: Joanne M W, et al. Prescott's Microbiology, 8th ed. McGraw-Hill, 2010.

列文·虎克这一时期主要集中在对微生物的形态进行描述,而对微生物与人类之间的关系并不十分清楚。到 19 世纪中叶,巴斯德设计了一个既可允许空气自由进入容器又可阻止容器内无菌肉汤不能“自然发生”腐败的简便、巧妙的曲颈瓶试验,令人信服地证实了肉汤腐败产生大量细菌的原因是接种了来自空气中的微生物,从而建立了微生物学这一新的学科,故巴斯德被称为“微生物学的奠基人”(图 1-3,图 1-4)。

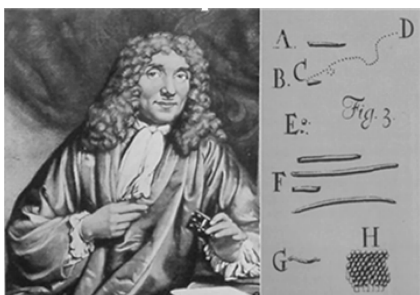


图 1-2 列文·虎克像及其观察到的口腔微生物
引自: Joanne M W, et al. Prescott's Microbiology, 8th ed. McGraw-Hill, 2010.



图 1-3 微生物学的奠基人——巴斯德
引自: Joanne M W, et al. Prescott's Microbiology, 8th ed. McGraw-Hill, 2010.

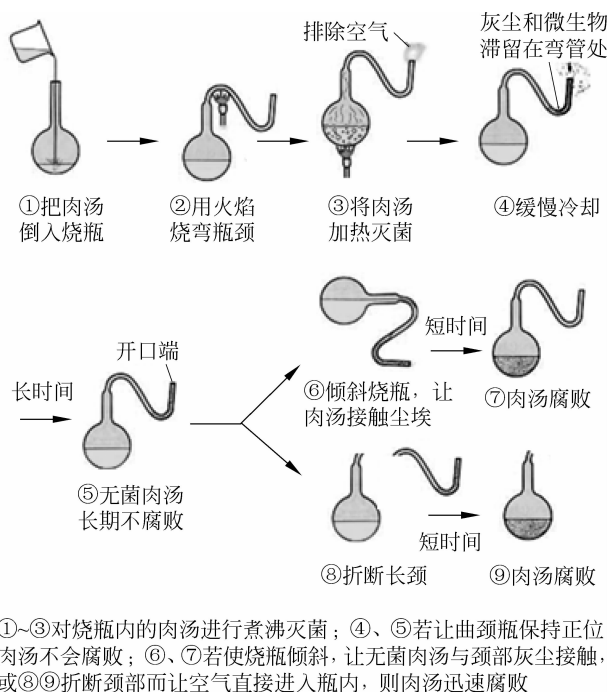


图 1-4 奠定微生物学基础的巴斯德曲颈瓶试验

引自: Joanne M W, et al. Prescott's Microbiology, 8th ed. McGraw-Hill, 2010.

与此同时,微生物的另一重要奠基人科赫(图 1-5)建立了细菌的纯种分离培养与灭菌方法,并发明了细菌细胞的染色技术,从而能够更加清楚地利用显微镜观察微生物,为微生物学的发展立下了汗马功劳,因此,科赫被称为“细菌学奠基人”。这一时期的微生物学家主要系统研究微生物的生长、繁殖以及代谢等。

到了 1953 年,沃森和克里克发现了 DNA 的双螺旋结构(图 1-6),从此微生物学进入了分子微生物学时代。它为广泛运用分子生物学理论和现代研究方法来揭示微生物的各种生命活动规律打下了基础,并直接促进了基因工程、生物信息学和合成生物学等学科的发展。



图 1-5 细菌学的奠基人——科赫

引自: Joanne M W, et al. Prescott's Microbiology, 8th ed. McGraw-Hill, 2010.

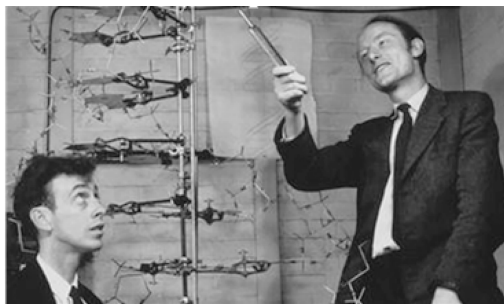


图 1-6 DNA 双螺旋的发现者——沃森和克里克

2. 现代显微镜的种类及在微生物学中的应用

微生物学中常用的显微镜根据显微原理可以分为光学显微镜和电子显微镜。通常皆由光学部分、照明部分和机械部分组成,二者之间最主要的区别是光源。

恩斯特·鲁斯卡于 1931 年成功研制出电子显微镜,这使得科学家能观察到百万分之一毫米那么小的物体,使生物学发生了一场革命。

随着摄影技术的快速发展,目前大部分显微镜都实现了与摄像系统以及计算机相结合,达到快速、清晰并且大量储存信息的目的。

1) 光学显微镜

光学显微镜的种类很多,主要有普通光学显微镜(明视野显微镜)、暗视野显微镜、荧光显微镜、相差显微镜、激光扫描共聚焦显微镜、偏光显微镜、微分干涉差显微镜、倒置显微镜。一般结构包括目镜、镜筒、转换器、物镜、载物台、通光孔、遮光器、压片夹、镜座、粗准焦螺旋、细准焦螺旋、镜臂、镜柱。普通光学显微镜的构造如图 1-7 所示。



图 1-7 普通光学显微镜的构造

引自: Joanne M W, et al. Prescott's Microbiology, 8th ed. McGraw-Hill, 2010.

普通光学显微镜的分辨率为 $0.2\mu\text{m}$ 左右,最大放大倍数约为 1000 倍,主要用于观察微生物的简单形态、大小等,如图 1-8 所示。

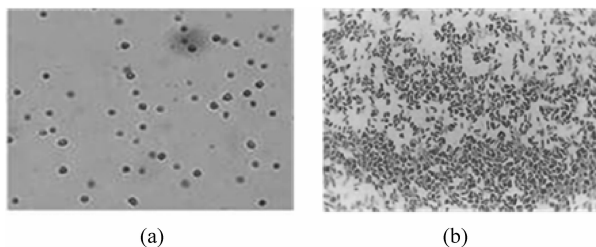


图 1-8 普通光学显微镜下的微生物

(a) 酵母菌; (b) 革兰氏染色后的大肠杆菌

引自: Joanne M W, et al. Prescott's Microbiology, 8th ed. McGraw-Hill, 2010.

暗视野显微镜(dark field microscope)是利用丁铎尔(Tyndall)光学效应的原理,在普通光学显微镜的结构基础上改造而成的。暗视野显微镜的聚光镜中央有挡光片,使照明光线不直接进入物镜,只允许被标本反射和衍射的光线进入物镜,因而视野的背景是黑的,物体的边缘是亮的。暗视野显微镜常用来观察未染色的透明样品。这些样品因为具有和周围环境相似的折射率,不易在一般明视野之下看得清楚,于是利用暗视野提高样品本身与背景之间的对比。这种显微镜的分辨率可比普通显微镜高 50 倍,能看到物体的存在、运动和表面特征,但不能辨清物体的细微结构,如图 1-9。

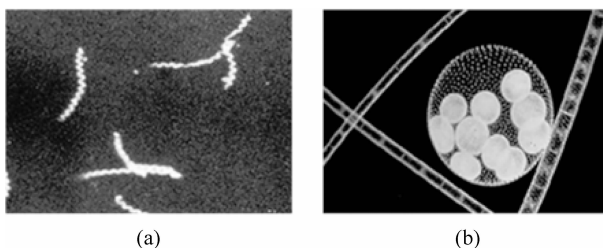


图 1-9 暗视野显微镜下的微生物

(a) 苍白密螺旋体; (b) 团藻虫

引自: Joanne M W, et al. Prescott's Microbiology, 8th ed. McGraw-Hill, 2010.

相差显微镜是荷兰科学家 Zernike 于 1935 年发明的,用于观察未染色标本的显微镜。活细胞和未染色的生物标本,因细胞各部细微结构的折射率和厚度不同,光波通过时,波长和振幅并不发生变化,仅相位发生变化(振幅差),这种振幅差人眼无法观察。而相差显微镜通过改变这种相位差,并利用光的衍射和干涉现象,把相差变为振幅差来观察活细胞和未染色的标本。相差显微镜和普通显微镜的区别是:用环状光阑代替可变光阑,用带相板的物镜代替普通物镜,并带有一个合轴用的望远镜。相差显微镜有四个特殊结构:相差物镜、具有环状光阑的转盘聚光器、合轴调中望远镜和绿色的滤光片。主要用于观察未经染色的标本和活细胞,如图 1-10。

荧光显微镜是以紫外线为光源,用以照射被检物体,使之发出荧光,然后在显微镜下观察物体的形状及其所在位置的一种显微装置。荧光显微镜因其能使观察者直观形象地看到

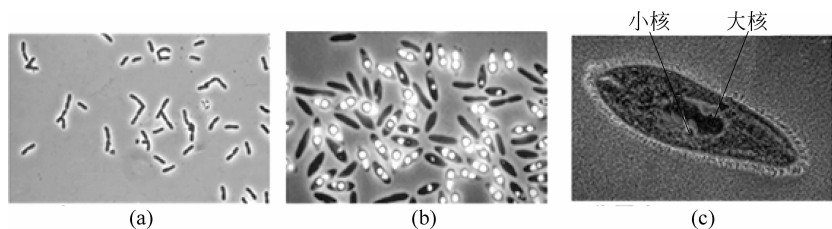


图 1-10 相差显微镜下的微生物

(a) 假单胞菌；(b) 变形虫；(c) 草履虫

引自：Joanne M W, et al. Prescott's Microbiology, 8th ed. McGraw-Hill, 2010.

目的物而被广泛使用,主要用于研究微生物体内物质的吸收、运输、化学物质的分布及定位等,如图 1-11。

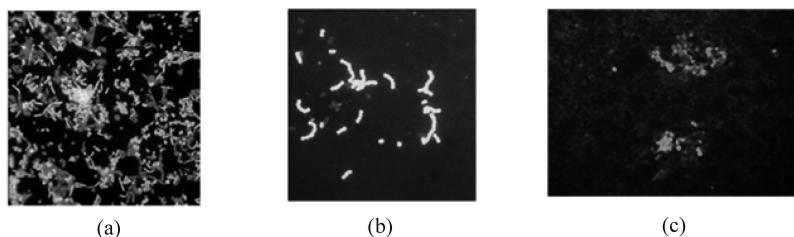


图 1-11 荧光显微镜下的微生物

(a) 绿色荧光为活细胞,红色荧光为死细胞；(b) 荧光染色后的链球菌；(c) 荧光标记的猪瘟病毒感染猪肾细胞图

引自：Joanne M W, et al. Prescott's Microbiology, 8th ed. McGraw-Hill, 2010.

2) 电子显微镜(electron microscope)

由于光学显微镜放大倍数有限,很难直接对病毒以及一些非常微小的亚细胞结构进行观察,从而限制了微生物学的发展,因此,在 20 世纪中期迫切需要一种能够显示在光学显微镜中无法分辨的病原体如病毒等的更为先进的显微镜。电子显微镜(图 1-12)是以电子束为照明源,通过电子流对样品的透射或反射及电磁透镜的多级放大后在荧光屏上成像的大型仪器。与普通光学显微镜采用可见光为照明源,并以玻璃透镜为光镜不同的是,电子显微镜的照明源是电子束,电镜为电磁透镜,从而大大提高了电子显微镜的分辨率,使其可观察小至 0.2nm 的物体,其放大倍数约 10^6 倍,能够清晰地观察病毒以及微生物内部的一些更为微细的结构。随着显微镜技术的不断发展,现代电子显微镜的最大放大倍率已超过 300 万倍,能直接观察到某些重金属的原子和晶体中排列整齐的原子点阵。这些极高分辨率的电子显微镜为分子微生物学的发展提供了极其重要的工具。

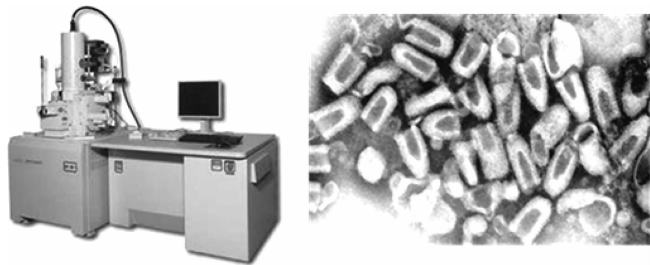


图 1-12 电子显微镜及观察到的狂犬病病毒

3) 扫描隧道显微镜(scanning tunnel microscope, STM)

1981年格尔德·宾宁及海因里希·罗雷尔发明了一种利用量子理论中的隧道效应探测物质表面结构的仪器,叫扫描隧道显微镜(也称为“扫描穿隧显微镜”、“隧道扫描显微镜”)。该显微镜可以让科学家观察和定位单个原子,它具有比同类原子力显微镜更高的分辨率(图 1-13)。此外,扫描隧道显微镜在低温(4K)下可以利用探针尖端精确操纵原子,因此能够更加准确地从原子而不仅仅是从分子水平了解生命的本质构造。格尔德·宾宁、海因里希·罗雷尔和恩斯特·鲁斯卡因为在显微镜发明中的杰出贡献而获得了 1986 年的诺贝尔物理学奖。

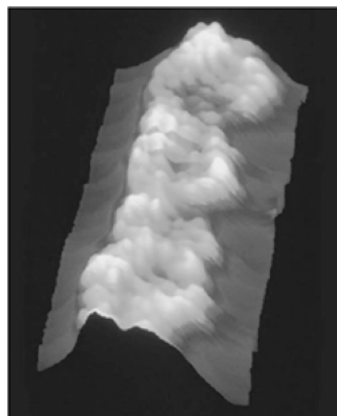


图 1-13 扫描隧道显微镜观察到的 DNA
引自: Joanne M W, et al. Prescott's Microbiology, 8th ed. McGraw-Hill, 2010.

这三类显微镜的测量范围及可能观察到的微生物代表种类,见图 1-14。

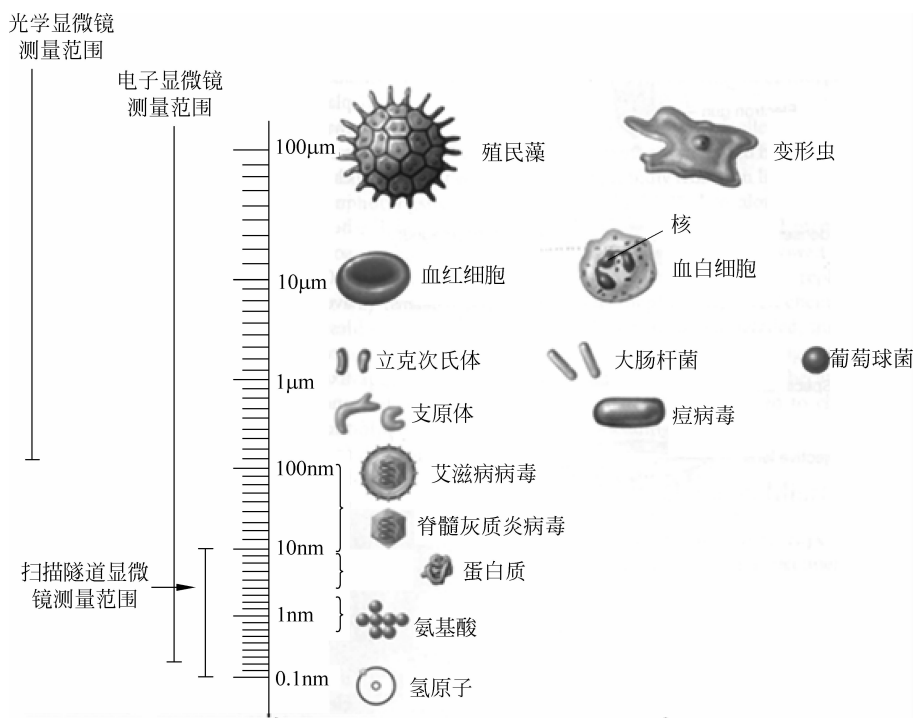


图 1-14 三类显微镜的测量范围及能观察到的代表物质
引自: Joanne M W, et al. Prescott's Microbiology, 8th ed. McGraw-Hill, 2010.

1.2 微生物的特点

微生物的长度一般都在数微米甚至纳米范围内,由于其体型极其微小,因而具有如下重要的共性:

(1) 个体微小,结构简单,表面积大。微生物大多是单细胞生物,有些复杂点的多细胞微生物也仅仅是由细胞简单排列构成,很少有组织器官的分化。因其小,所以有一个巨大的营养物质吸收面、代谢废物的排泄面和环境信息的交换面。

(2) 吸收多,转化快。有资料表明,大肠杆菌在1小时内可分解其自重1000~10000倍的乳糖;产朊假丝酵母合成蛋白质的能力比大豆强100倍,比食用牛强10万倍;一些微生物的呼吸速率也比高等动、植物的组织强数十至数百倍。这个特性为微生物的生长繁殖和合成大量代谢产物提供了充分的物质基础,从而使微生物能在自然界和人类实践中更好地发挥其超小型“活的化工厂”的作用。

(3) 生长旺,繁殖快。微生物具有极高的生长和繁殖速率。大肠杆菌在合适的生长条件下,细胞分裂1次仅需12.5~20min。若按平均20min分裂1次计,则1h可分裂3次,每昼夜可分裂72次,这时,最开始的一个细菌已产生了 $4722366500 \times 10^{12}$ 个后代,总重约4722t。据报道,当前全球的细菌总数约为 5×10^{30} 个。事实上,由于营养、空间和代谢产物等条件的限制,微生物的几何级数分裂速率充其量只能维持数小时而已。因而在液体培养过程中,细菌细胞的浓度一般仅达 $10^8 \sim 10^9$ 个/mL。微生物的这一特点使得其在物种竞争上取得优势,这是生存竞争的保证。

(4) 适应强,易变异。微生物结构简单,整个细胞直接与环境接触,易受环境因素影响,使得其具有极其灵活的适应性或代谢调节机制,这是任何高等动、植物所无法比拟的。它们对环境条件尤其是地球上那些恶劣的“极端环境”,例如对高温、高酸、高盐、高辐射、高压、低温、高碱或高毒等的惊人适应力,堪称生物界之最。

(5) 分布广,种类多。因微生物极小,很轻,附着于尘土随风飞扬,漂洋过海,栖息在世界各处,分布极广。微生物在地球上“无孔不入”,只要条件合适,它们就可“随遇而安”。地球上除了火山的中心区域等少数地方外,从土壤圈、水圈、大气圈到岩石圈,到处都有它们的踪迹。例如,2006年《科学》杂志就报道了在南非一座金矿的2.8km深水层中分离到一种以硫酸盐为主要营养物质的硫细菌。可以认为,微生物将永远是生物圈上下限的开拓者和各项生存纪录的保持者。不论在动、植物体内外,还是在土壤、河流、空气,平原、高山、深海,污水、垃圾、海底淤泥,冰川、盐湖和沙漠,甚至油井、酸性矿水和岩层下,都有大量与其相适应的各类微生物在活动着。

(6) 杂居混生,因果难联。在自然条件下,微生物一般都是许多种相互杂居混生在一起的,如果对这些混合在一起的群落不进行纯种分离,人们就无法了解某一微生物的具体生命活动及其对人类和环境的影响(如引起人类或动、植物疾病,降解环境中的某些污染物等)。因此,如何从环境中分离纯化出目标微生物仍旧是环境微生物领域科研工作者最基础、最重要的工作之一。

1.3 环境微生物学的定义、研究内容

1. 环境微生物学的定义

微生物学(microbiology)是一门在分子、细胞或群体水平上研究微生物的形态结构、生

理代谢、遗传变异、生态分布和分类进化等生命活动基本规律,并将其应用于工业发酵、农业生产、医疗卫生、生物工程和环境保护等领域的学科。微生物学与环境科学相互渗透产生了一门新型交叉学科——环境微生物学(environmental microbiology),它是研究微生物与环境之间的相互关系和作用规律,并将其应用于污染防治的学科。通俗地说,环境微生物学就是利用微生物学的理论、方法和技术来探讨环境现象,解决环境问题的科学。

2. 环境微生物学的研究内容

1) 环境中微生物的分离、鉴定、培养及生理生化研究

要想利用微生物解决目前面临的诸多环境问题,良好的微生物种源非常重要,因此,环境微生物领域的科研工作者需要根据自己的目的从环境中筛选微生物,并对其进行培养,以达到充分利用微生物的目的。据报道,目前已能培养的微生物还不到自然界存在微生物的十分之一,因此,此项工作任重道远。

2) 微生物与自然环境之间的关系

早在地球诞生之初,整个世界处于一片混沌状态,那时地球的大气中并没有氧气或者氧气含量很低,正是由于蓝细菌以及其他微生物的光合作用产生氧气,才逐渐地、一步一步地形成了今天的地球。微生物在地球上已经有约 35 亿年的历史,它们在自然环境中广泛居住,既是生产者又是消费者,对今后地球的发展仍然起着非常重要的作用。这部分内容主要研究微生物与自然环境的相互关系及其在生物地球化学循环中的各种作用。

3) 微生物对环境的污染和危害

由于微生物无处不在,以至在许多不需要它出现的地方也大量出现,从而影响我们的工农业生产和生活。微生物污染是指对人类和生物有害的微生物污染水体、大气、土壤和食品,影响生物产量和质量,危害人类健康的现象。具体体现为:①病原菌所致的生物安全问题,比如微生物直接导致疾病;②菌体生长所致的生物安全问题,比如水体富营养化问题;③代谢活动所致的生物安全问题,比如黄曲霉污染饲料,产生黄曲霉素,会导致鱼和哺乳动物患原发性肝癌。

因此,研究有害微生物在环境中的生活方式和危害途径,并提出有效的防控措施是环境微生物学的重要内容。

4) 微生物对受污染环境的净化和修复

受污染环境是指因人类排放废水、废气和废渣(“三废”)而受污染的环境。据统计,全球已生产和应用的多氯联苯(PCB)超过 100 万 t,其中 1/4 至 1/3 进入环境。所有这些环境污染问题都迫切需要环境微生物研究者加倍努力:针对特定污染物,探寻高效菌群,采用现代基因工程技术,构建多功能“高效菌株”;探明微生物的生长条件、代谢条件和污染物降解规律,不断推出新型、高效、安全的生物处理技术。

生物净化(biological purification)是指通过生物代谢(异化作用和同化作用),使环境中的污染物数量减少、浓度下降、毒性减弱甚至消失的过程。其中,微生物起着重要而独特的作用。随着生产水平的提高和科学技术的进步,生物净化将在更大规模上得到应用,并将成为环境生物技术的重要组成部分。生物修复是指人为强化下的生物净化作用。在陆地和海洋环境中,生物净化现象普遍存在,但净化能力各不相同。研究自然生物净化的基本规律并

提出有效的强化措施,也是环境微生物学的重要内容。

5) 微生物在环境检测中的应用

微生物检测是通过微生物个体、种群或群落对环境污染或环境变化所产生的反应,阐明环境污染状况,从微生物学角度为环境质量的检测和评价提供依据的过程。每种微生物对环境因素的变化都有一定的适应范围和反应特点。微生物的适应范围越小,反应特点越显著,对环境因素变化的指示意义越大。

6) 微生物产品

利用微生物生产抗生素、疫苗、类固醇、醇、维生素、氨基酸等产品。

复习思考题



- 1-1 何谓微生物? 它主要包括哪些类群?
- 1-2 微生物有哪些特点?
- 1-3 环境微生物学的主要研究内容有哪些?
- 1-4 试述显微镜的种类及与微生物学之间的关系。

第2章

微生物的进化、系统发育及分类鉴定

2.1 微生物的起源与进化

生命的起源是一个古老而神秘的问题,自从人类诞生就一直没有停止过对这一问题的思考与探索,直到今天,也没有一个完全的定论。图 2-1 是科学家根据现有知识推测出的一个生物进化时间表,进化过程中的关键事件用箭头标出,从中可以看出,地球上生命最早出现在大概 35 亿年以前,而人类则是最近才出现在地球上的。本节主要从原核微生物细胞的起源与进化、真核微生物的进化两个方面进行简单介绍。

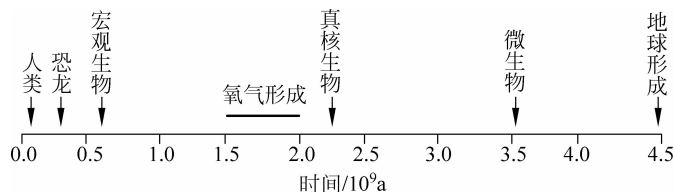


图 2-1 推测的生物进化时间表

引自: Joanne M W, et al. Prescott's Microbiology, 8th ed. McGraw-Hill, 2010.

2.1.1 原核微生物细胞的起源与进化

在 20 世纪 50 年代, Miller 和 Urey 等模拟早期地球环境无氧、含大量甲烷和二氧化碳、紫外辐射强、温度高等特点,采用装有水和还原性混合气体的简单装置,通过加热、放电或紫外线照射,合成了许多有机物,其中包括组成生物所必需的氨基酸和碱基。然后将氨基酸混合物倒在 160~200℃ 热砂土上,水分蒸发后,氨基酸之间发生聚合生成蛋白质样大分子,这类蛋白质被称为“嗜热类蛋白”(thermal proteinoid)。它们能自发聚集成微球体(microsphere)。研究表明,一些非生物来源的类蛋白具有原始催化活性(酶的功能)。另外试验发现,一些核酸除了具有复制能力外,也具有催化活性。核酶(ribozyme)便是一类具有催化活性的 RNA 分子。由于代谢和繁殖是生命的本质属性,蛋白质和核酸具有催化(代谢)和复制(繁殖)能力,因此,也就拥有了生命的基本特征。

Oparin 等发现,在含有两种聚合物(如阿拉伯树胶和组蛋白)的胶体溶液中,可自发形成微球体。他们将这些微球体称为团聚体(coacervate)。将磷脂放入水中,也可自发形成团聚体(脂质体),呈双分子层,类似细胞膜。这种脂质体能够吸收体外磷脂而生长,并能凸出而形成新的团聚体,后者很像酵母菌的芽殖。在脂质体围成的内穴中可进行化学反应。若