

水 域 微 生 物 学

主编 刘敏 管雪婷

东北农业大学

目 录

第一章 绪论	1
第一节 微生物学概述	1
第二节 水产微生物学概述	5
第一篇 总论	8
第一章 细菌的形态与构造	8
第一节 细菌的形态	8
第二节 细菌的结构	10
第三节 细菌形态和结构的观察方法	21
第二章 细菌的生理	23
第一节 细菌的理化性状	23
第二节 细菌的营养与代谢过程	23
第三节 细菌的新陈代谢产物	27
第四节 细菌的生长繁殖	29
第五节 细菌的人工培养	31
第六节 细菌生存的调节	33
第三章 细菌的致病性与传染	35
第一节 细菌的致病性和毒力	35
第二节 细菌的毒力因子及分泌系统	36
第三节 细菌致病性和毒力的现代概念	40
第四节 细菌毒力的增强与减弱	41
第五节 传染	42
第四章 细菌的鉴定	46
第一节 细菌鉴定的步骤	46
第二节 细菌鉴定的主要方法	47
第五章 真菌概述	51
第一节 真菌的分类及生物学特性	51
第二节 真菌的致病性	59
第三节 真菌病的诊断与防治	60
第六章 病毒概述	62
第一节 病毒的结构特征	62
第二节 病毒的化学组成	63
第三节 病毒的复制	65
第四节 病毒的致病机理	72
第五节 病毒的感染与免疫	75
第六节 病毒性感染的检测	79
第七节 噬菌体	86

第八节 亚病毒	89
第七章 其他类型微生物	92
第一节 放线菌	92
第二节 黏细菌	94
第三节 鞘细菌	94
第四节 蛭弧菌	96
第五节 立克次体、衣原体、霉形体、螺旋体	97
第八章 微生物的遗传与变异	103
第一节 细菌的遗传与变异	103
第二节 病毒的遗传与进化	110
第三节 微生物菌种的保藏	116
第九章 微生物的控制	120
第一节 微生物控制的相关名词术语	120
第二节 控制微生物的物理方法	121
第三节 控制微生物的化学方法	129
第四节 控制微生物的生物学方法	133
第十章 微生物的分类和命名	139
第一节 细菌的分类与命名	139
第二节 病毒的分类与命名	145
第十一章 水生微生物生态学	148
第一节 水体中微生物的分布	148
第二节 环境因素对水生微生物的影响	159
第三节 水生微生物在生态系统中的主要作用	170
第二篇 各论	190
第一章 病原细菌	190
一、气单胞菌属	190
二、弧菌属	194
三、链球菌属	198
四、爱德华氏菌属	200
五、假单胞菌属	202
六、耶尔森氏菌属	204
七、屈挠杆菌属	206
第二章 病原真菌	211
一、水霉属	211
二、绵霉属	214
三、鳃霉属	215
四、丝囊霉属	216
五、镰刀菌属	217
六、霍氏鱼醉菌	219
七、链壶菌属	220

第三章 病原病毒	222
一、疱疹病毒科	222
二、弹状病毒科	224
三、虹彩病毒科	228
四、呼肠孤病毒科	230
五、杆状病毒科	233
六、双 RNA 病毒科	234
第四章 其他病原微生物	238
一、立克次体及类立克次体	238
二、衣原体	242
第三篇 水产微生物学应用	244
第一章 微生物与水产品	244
第一节 水产品中的微生物	244
第二节 微生物与水产品卫生	250
第三节 水产品的微生物检验	262
第二章 微生物与水产动物饲料	272
第一节 单细胞蛋白饲料	272
第二节 发酵饲料	274
第三节 益生素	275
第四节 酶制剂	278

第一章 绪论

第一节 微生物学概述

一、微生物概念及其分类地位

微生物(microorganism)是存在于自然界中的一群个体微小、结构简单、必须借助显微镜放大数百倍甚至数万倍才能观察清楚的一类微小生物的总称。虽然其“群体”可以看见,然其单一的个体通常不能为肉眼所辨识。例如一个细菌是肉眼看不见的,但许多细菌聚集成“群体”(菌落)时,眼睛就看得见;又如一个霉菌用眼睛难于看见,而豆腐、馒头等长了霉,由许许多多霉菌个体聚集在一起,眼睛就看到了。微生物种类繁多,按结构、组成差异,可分成3大类:

1. 非细胞型微生物 这类微生物主要是病毒。其特点是个体极小,能通过细菌滤器,无典型细胞结构,只能在敏感宿主的活细胞内生长繁殖。

2. 原核细胞型微生物 这类微生物包括细菌、放线菌、霉形体、立克次体、衣原体、螺旋体、蓝细菌。其细胞形态和结构明显,但细胞核无核膜或核仁,细胞器不很完善。

3. 真核细胞型微生物 这些微生物有真菌、原生动物等。

二、微生物的发展历史

微生物存在于自然界,人类在从事生产实践中,早已应用了微生物。例如在出土的商代(公元前 1766—1122 年)甲骨文中就有关于酒的记载;北魏时期(约公元 386—534 年)的《齐民要术》一书中对不同的酒曲、醋、豆豉等的作法也有较详细的记录,这都是利用微生物制作的食品;我国少数民族中的牧民,祖祖辈辈做“酸奶子”,而且知道做前要先煮(灭菌),冷后接种上一点“老底”,实际上就是接种微生物。

在微生物所致疾病的预防方面,我国也早有记载。《左传》记载春秋时期鲁襄公 17 年(公元前 566 年)“十一月,甲午,国人逐瘕狗……”。很明显,人们已经知道疯狗咬人后人要致病,所以驱瘕狗以防御狂犬病传染。到明代隆庆年间(公元 1567—1572 年),我国用人的痘痂接种以预防天花已广泛使用。至少在 100 多年以前在甘肃夏河等地就应用了“灌花”(是我国少数民族很早用来预防牛瘟的方法,即灌服稀释的病牛血)以预防牛瘟。

尽管我们的祖先对微生物已有初步的认识,但作为一门科学,是 18 世纪以后的事。

微生物的发展可概括为三个阶段。

第一阶段——形态学时期 由于航海的需要,有了望远镜,到了 16 世纪由望远镜就发展到显微镜。最早的显微镜只能放大 32 倍,以后逐渐改进。1683 年荷兰人吕文虎克(Antony vanLeeuwenhoek 1632—1723)用自制的放大 200 倍以上的显微镜,首次观察到微生物。1695 年,他将过去所观察到的微生物,绘图并叙述公诸于世。从此以后,人们对微生物的形态、排列、大小等有了初步的认识,但仅限于形态学方面,进展不大。其主要原因之一是自然发生论(即无生源论)起着阻碍的作用。

自然发生论的核心是“生物可以无中生有,破布中可生出老鼠来”,用宗教的语言来说即“生物是神创造的”。如果生物可以无中生有的话,无论微生物有什么作用,人们是不能控制的,对微生物是无能为力的,因而也就没有必要再去研究它。所以显微镜虽然有了,微生物也观察到了,可是将近 200 年,微生物学仍旧停留在初级的形态学阶段。到 1861 年,巴斯德(Louis Pasteur, 1822—1895)以实验证明自然发生论是荒谬的。他用了一个颈细

长而弯曲的玻璃瓶，内盛肉汤，经灭菌后久置不坏，内无微生物生长，因为空气虽能自由进入玻璃瓶，但其中所含有的微生物却不能随管上升进入瓶内，而是附着在颈的低弯处。若将液体与低弯处接触后就有微生物生长的。他最终证明微生物来自微生物的“种子”。

无生源论被否定之后，精神枷锁解除了，人们才感到微生物有研究的价值。那时已有了更好的显微镜，能制造培养基并加以灭菌，无机和有机化学也在迅速地发展，加上生产过程中所出现的蚕病、酿酒败坏以及人畜疾病等问题，使微生物学进入了生理学和免疫学时期。

第二阶段——生理学及免疫学的奠基时期 这个时期大约是从 1870 年到 1920 年，在这约 50 年期间，微生物已经发展成一门独立的科学，在理论上、技术上、生产上都取得了不少成果(如下表)。在这个阶段，巴斯德作出了历史性的贡献。他从 1861 年推翻无生源论开始到 1895 年逝世为止，一直从事微生物的研究。他是微生物学、生理学及免疫学的主要奠基人。当他研究酒的败坏时确定：①酒是某种微生物的发酵产物；②不同微生物的代谢不一样，在做酒过程中设法让需要的酵母菌生长良好，不让有害的微生物起坏作用，便可保证产品质量，从而解决了酒的败坏问题。同样，在研究动物的炭疽病、人的狂犬病时，他确定：①这些疾病是由相应的微生物所引起的；②微生物可以致弱作预防传染病用，而且对致弱的途径作了示范性的试验，例如，狂犬病疫苗就是通过兔体致弱获得的。现在世界上许许多多国家用的各种弱毒苗，例如兔化牛瘟疫苗、兔化猪瘟疫苗等，都是以巴斯德的工作为基础，在人及动物的传染病的预防工作中起了巨大的作用。

微生物的生理学及免疫学时期所取得的进展

理论上的进展	技术上的进展	生产上的收获
细菌生理学的启蒙：即微生物有其新陈代谢，酒的发酵、手术后感染是微生物的作用	巴斯德消毒法，消毒剂的应用，使用滤器分离病毒	人类能控制酒的发酵，经消毒后的外科手术不易受感染，病毒病的发现与确定
免疫学的开始：微生物及其产物作为抗原与其相应抗体之间的作用	凝集反应 毒素中和反应	抗毒素的治疗作用
补体的发现	补体结合反应	免疫学应用于疾病诊断
疫苗的免疫作用	狂犬病疫苗、动物炭疽病菌苗等的制造法，琼脂作为固体培养基及纯培养的获得	应用免疫防治，减少了人畜传染病的死亡。大量种类的细菌、真菌被分离鉴定，它与疾病或人类生活的关系被确定

第三阶段——近代及现代微生物学 大约从 1920 年起，特别是近半个世纪以来，微生物学在理论研究、技术创新及实际应用方面都取得了重要进展。

三、微生物的主要特性

微生物分类地位不同，生物学性状也互有差异，但一般有如下共性：

(一)个体微小，结构简单

微生物是个体最小的生物，其大小通常用 μm (微米)或 nm (纳米)表示，一般球菌的直径为 $0.5\sim 4.0\mu\text{m}$ ，多数病毒粒子的直径在 100nm 左右，最小病毒的直径为 $9\sim 11\text{nm}$ 。在结构上，虽然部分真菌为多细胞，有营养器官和繁殖器官的分化，但绝大部分的微生物(细菌、放线菌和部分真菌)为单细胞构造，病毒则不具备细胞结构，类病毒仅是一个无蛋白

质外壳的游离的 DNA 分子。因此，观察微生物的形态结构必须借助显微镜或电子显微镜。这也是微生物发现较晚的重要原因。由于微生物个体过小、结构简单，用显微镜鉴别形态相似的不同种类的微生物时，其作用十分有限。

(二)种类繁多，分布广泛

人类发现微生物的时间较晚。从 1683 年吕文虎克第一次用自制的显微镜观察了细菌等微生物的形态以来，已比较肯定的微生物达 10 万余种。随着分离方法和研究技术的进步，大量未知种类会不断被发现。微生物因个体小、重量轻，不仅可主动运动，而且可随水和空气的流动或物体移动而四处传播，无处不在。地球上除火山的中心区域外，从土壤圈、水圈、大气圈直至岩石圈都有微生物存在。在动物体内外、植物表面、高空、深海、冰川、海底淤泥、盐湖、沙漠、地层下、酸性矿水以及有氧或无氧的自然界极端环境中，都有与环境相适应的微生物存在。其中土壤环境较恒定，是微生物存在的第一大天然场所。由于水域面积大于陆地面积，水域是微生物生物量最多的场所。

(三)生长繁殖快，适应能力强

单细胞微生物的体积增长和多细胞微生物的细胞增数是微生物生长的标志，这一过程能在很短的时间内完成。个体代数的增加则是繁殖的结果。微生物的繁殖速度超过任何生物，一般细菌约每 20min 分裂一次(一代)。按此速度计算，24h 可繁殖 72 代，后代菌数为 $4\,722\,366\,500$ 万亿个，总重量约 $4\,722\text{t}$ ，48h 的总重量相当于 4000 个地球的重量，然而，因为营养消耗、环境不断恶化，细菌的实际繁殖速度远远低于此理论速度。因此，在培养有益微生物时，如何尽可能缩小这两种速度的差距是值得追求的一个目标。微生物对环境有很强的适应能力，这是因为它们有许多灵活的代谢调控机制和诱导酶。当环境不良时，它们出现形态、生理、毒力等变异，如芽孢菌产生芽孢，黏细菌形成黏孢子，霉菌形成孢子，病原菌产生抗药性。长期适应时，有些微生物可在一些极端的环境中正常生活。如海洋深处的某些硫细菌能在 $250\sim 300^{\circ}\text{C}$ 的条件下生长繁殖；有些嗜盐菌可在 32% 饱和盐水中生活；霉菌在静水压下，能耐受 3.03×10^5 的压强。微生物的非凡适应能力是任何生物都无法比拟的。

(四)群居混杂，相生相克

在某个自然环境中，往往同时有大量不同种类的微生物生长繁殖，构成该环境微生物群落或区系，它们与动物、植物共同组成一个生态系统中的生物群落。它们内部和相互之间互相作用，或共生、协同，或竞争、拮抗、寄生，维持着生态平衡。这种平衡依赖于环境，也作用于环境。这种错综复杂的关系给微生物的纯种分离、有益微生物的利用和有害微生物的控制都留下了巨大的研究空间。

(五)生物遗传性状典型，实验技术体系完善

微生物是生物界最小的个体，含有与高等动、植物同样的基本遗传物质和蛋白质，多数为单倍体并具有多种原始遗传重组方式，能在人工条件下大量培养，在很短时间内产生比动、植物更容易辨认的遗传变异性状的表达。目前，人们从无菌操作、取样、分离纯化、分类鉴定、育种和分子生物学检测等方面形成了一套独特而完整的实验技术。因此，微生物已被广泛用作实验生物材料去研究生物化学、遗传学、生命起源、生物进化等基本问题和开发高新技术生物产品。

四、微生物的主要作用

微生物在自然界及人类的生产、生活中有重要作用，主要表现在有益和有害两方面。

总的来说，利大于弊。

(一)有益作用

1. 推动自然界物质循环和能量流动 自然界的物质总是处在由无机物转化成有机物，再由有机物转化成无机物的往复循环中。其中高等绿色植物和少数自养型微生物通过光合作用，从太阳能获得能量，将无机物合成有机物质，太阳能也就转化成贮藏于植物和光能微生物体内的化学能；人、动物和异养微生物通过食物链的方式，将有机物转化成其他形式的有机物，并伴随能量逐级流动，形成能量金字塔；最后异养微生物又将所有动、植物和其他生物的残体等有机物矿化分解成无机物，这一过程无限循环，生命也由此而生生不息。如果没有微生物，物质循环必将中断，能量转化和流动也不能进行，一切生物将无法生存。

2. 净化环境，维持生态平衡 微生物无处不在，种类繁多，生理和代谢功能多样，能清除各种环境中几乎所有天然的和人工合成的化合物，是污染环境自净的主力军，在维持自然界生态平衡中具有重要作用。当今世界，由于人类活动所造成的环境污染日益加剧，大量污染物质进入大气、水体、土壤，其数量、浓度和维持时间已远远超过了环境自净能力，生态平衡受到严重破坏，治理污染已成为全球共同关注的问题。在人工消除污染的实际工作中，利用微生物净化污水、处理工农业废物，用生物农药、生物肥料代替化学农药、化肥等方面均收到显著效果。

3. 维护人和动物健康 人和动物的体表以及与外界相通的孔道中都有正常微生物群落，它们可抵御外来病原微生物的侵袭。消化道的正常菌群，有的可降解大分子的物质，以利于机体吸收，有的可合成机体需要的物质，如维生素 B1、维生素 B2 和维生素 K 等多种营养物质，供机体利用。如果正常菌群受到破坏，人和动物就会发生某些疾病。

4. 制造加工食品和工农业产品 很多微生物本身含有人和动物所需的营养物质和酶系列等活性物质，新陈代谢过程中产生大量有益产物，如维生素、抗生素、酒精等。因此微生物被广泛应用于食品、饲料、医药和发酵工业等各个领域。如酿酒，制酱，发酵酸奶，生产酱油、味精、单细胞蛋白饲料、酶制剂、抗生素、微生物制剂、微肥、醋酸和丙酮等。

5. 用于生物科学研究和生物工程 微生物的行为模式、生态分布、细胞和超微结构、化学组成、新陈代谢、遗传变异等生命活动基本规律都是人类深入研究生命学科的极好突破口。以微生物为基因供体、载体、受体和微生物学实验技术为基础的基因工程在微生物育种和生物药物的开发中有旺盛的生命力，并在整个生物工程技术体系中发挥了重要作用。

(二)有害作用

1. 某些微生物能引起人和动植物的疾病 由微生物引起人和动、植物的疾病种类很多，这些疾病有一定的潜伏期和传染性，统称传染病。如人类的天花、麻疹、霍乱、结核、脊髓灰质炎、病毒性肝炎和艾滋病等；畜禽的巴氏杆菌病、大肠杆菌病、沙门氏菌病、猪瘟、牛瘟、疯牛病、鸡新城疫等；人畜共患的炭疽、破伤风、口蹄疫等；鱼类的肠炎病、赤皮病、烂鳃病、草鱼出血病以及牛蛙的红腿病等；农作物的水稻白叶枯病、小麦赤霉病、大豆病毒病等。引起这些疾病的微生物叫病原微生物。

2. 毁坏工农业产品、农副产品和生活用品 微生物利用的营养物质广泛，分解能力强，对很多产品和物品有很强的破坏性，能使粮食、蔬菜、水果、畜禽产品和水产品等腐败变质，使衣物、饲料等发生霉变，甚至腐蚀金属和玻璃制品，给人类生产和生活造成巨

大损失。

五、微生物学及其分科

微生物学(microbiology)是在细胞、分子或群体水平上研究微生物的形态构造、生理代谢、遗传变异、生态分布、分类进化、生命活动基本规律以及微生物与人类、动植物和自然界的相互关系,并将其应用于农牧渔业、工业、医药卫生、环境保护、生物工程等领域的科学。广义的微生物学还包括免疫学,甚至还包括寄生虫学,特别是原虫学。其根本任务是发掘、利用和改善有益微生物,控制、改造和消灭有害微生物,为人类造福。微生物学是生物学科中最年轻的学科之一,人类发现微生物现象和应用微生物的时间虽然较早,但真正观察到微生物至今仅 300 余年,确证微生物与腐败、发酵和疾病等的关系也只有 100 余年,而真正形成独立的学科是在 19 世纪的后半期。然而,随着研究领域的扩展和其他相关学科知识与技术的渗透,微生物学的研究不断深入,是目前发展最快的学科之一,并形成了很多分支学科。着重研究微生物学基本问题的分支学科有:普通微生物学、微生物分类学、微生物生理学、微生物生物化学、微生物遗传学、微生物生态学、分子微生物学、实验微生物学等,着重研究每一类微生物的分支学科有细菌学、真菌学、霉形体学、噬菌体学、病毒学、自养微生物学、厌氧微生物学、原生动物学、藻类学等,着重于各个应用领域的微生物学分支学科有农业微生物学、工业微生物学、医学微生物学、药学微生物学、兽医微生物学;畜牧微生物学、水产微生物学、食品微生物学、环境微生物学、海洋微生物学、石油微生物学、土壤微生物学等,各分支学科间相互联系和配合,共同促进整个微生物学不断向前发展。

第二节 水产微生物学概述

一、 水产微生物学的任务与特点

水产微生物学(microbiology in aquaculture)是微生物学应用于水产养殖业后逐渐发展而成的一个分支学科,其主要任务是在研究微生物学的一般理论和技术的基础上,研究微生物与水产养殖环境、水产动物饲料、水产动物疾病和水产品保鲜、贮藏的关系,充分发挥微生物在改善养殖环境、提高抗病力和健康水平、防治水产动物疾病以及防止水产品腐败变质中的作用,保障水产业的持续发展。因此,该分支学科既是基础学科,也是应用学科,与其他微生物学比较,水产微生物学具有如下主要特点。

(一)研究范围较广

本学科的主要任务决定了其研究范畴不像医学微生物学和兽医微生物学那样集中,除了研究病原微生物外,与水产养殖环境、饵料、水产品等相关的微生物学问题都是重要的研究内容。涉及到多学科的知识与技术方法,如各类基础微生物学和应用微生物学及其相关基础学科。在水产学科中,主要涉及水产动物疾病学、水生生物学、鱼类营养与饲料、鱼类增养殖、水产品加工等课程。因此,水产微生物学是在多学科交叉融合的基础上形成的。

(二)研究时间较短

水产微生物学起始于对水产动物疾病的病原及免疫学研究。1894 年,Emmeerich 和 Weibel 分离鉴定了水产动物第一个病原菌——杀鲑气单胞菌,揭开了水产动物传染病病原研究的序幕。1912 年,Plahn 首次报道了鱼类真菌病病原——鳃霉属。1953 年,Ruckerl 分离鉴定了传染性造血组织坏死病毒。1903 年,Babes 和 Rleddler 发现丁鳗等能产生凝集

抗体。然而这些都迟于医学微生物学和兽医微生物学的同类研究。在我国，鱼类病原研究是从王德铭(1956)分离鉴定赤皮病致病菌——荧光假单胞菌开始的。1962年，他最早开展了鱼类免疫研究——草鱼、青鱼肠炎菌苗研究。1979年，中国科学院水生生物研究所第一次分离了水产动物病毒——草鱼出血病病毒。1993年，水产养殖本科教材《水产微生物学》正式出版。

(三) 研究难度较大

水体环境中的微生物，在一定条件下与水质改变、疾病的发生与流行以及水产动物的产量、质量、保鲜等密切相关。了解这些关系对控制环境污染、阐明疾病发生发展机理乃至整个水产业的发展有重要意义。然而，由于其关系错综复杂，并受季节、温度、洪水、污染、投饵、投药、放养鱼的种类和数量等诸多因素的影响，要及时查明某种情况下微生物种群及数量变动与多种生物和理化因子的相关性并达到轻易控制的程度是一项十分浩大的工程，不仅涉及的研究方法多，而且耗时耗力。开拓新思路，创建快速有效的研究体系，也是水产微生物学重要的研究领域。

(四) 水产动物病原微生物的致病力有较强的条件依赖性

引起水产动物疾病的微生物多数是条件性病原微生物，有的既可营寄生生活又可营腐生生活，对水域环境有广泛的适应性，正常条件下不表现致病性，一旦环境不利于水产动物或者其防御屏障受损，就可侵袭机体，导致疾病发生或流行。口服有毒力的肠炎病原菌难于复制肠炎以及多数水域微生物都有能引起疾病的报道已证明了这一特点。

(五) 水产动物的免疫学研究基础薄弱

人类对于自身和较高等动物的免疫研究已达到较高水平，鱼类免疫研究也较深入，但水产动物涉及到分类地位不同的动物，如贝类、虾蟹类、两栖类、爬行类等，这些动物进化程度不同，免疫学上必然存在差别，但对这些动物的免疫研究是零碎的，对其免疫器官、免疫类型及其应答过程等缺乏系统了解，它们之间的差别究竟如何？免疫机制是否按现有研究方法和模式就可真实反映出来？这些都少有报道，现有的免疫学知识尚不能完全概括水产动物的免疫状况。尽快完善和深入研究水产动物免疫学基础理论和实验技术，形成完整的理论和实践体系，创立水产动物免疫学分支学科是水产微生物学面临的紧迫任务。

二、水产微生物学的研究进展

(一) 水产动物病原细菌

从1894年首次分离鉴定杀鲑气单胞菌以来，人类从各种水产动物分离鉴定的病原细菌已经达40种，分别归于10余个属。鉴定方法从传统的形态、生理生化特性鉴定发展到应用启动鉴定系统、免疫学检测、核酸探针及PCR技术，其敏感性、特异性和实用程度有很大提高。在防治上，高残留、有毒性药物逐渐被淘汰，无公害药物、免疫制剂、微生物生态制剂应用较普遍。对病原菌的致病性及其机理研究已进入分子水平。

(二) 水产动物病原真菌

水产动物致病真菌研究是从Plehn(1912)确认鳃霉病的病原为鳃霉属开始的，目前已鉴定的致病真菌有水霉、绵霉、鳃霉、鱼醉菌、链壶菌、离壶菌、镰刀菌等。此外，存在于饲料中的霉菌也可引起鱼类真菌病。第一世界大战期间，美国发生的鲑鱼肝脏病被证实是黄曲霉和寄生曲霉所致。我国倪达书教授在20世纪50年代就开始了水霉致病种类、致病机理和防治方法的研究，并出版了《水霉病的防治研究》专著。我国还发现了一种新水霉——厚壁丝囊霉(*Aphanomyces crassus* Nie et Li, 1982)，3种新镰刀菌——尖孢镰刀菌

(*Fusarium oxysporus*)、三隔镰刀菌(*Fusarium tricinctum*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)；对水产饲料中黄曲霉毒素对虹鳟的 LD₅₀ 和防止在饲料中产毒的加工、贮存条件、防霉剂进行了研究；目前主要是研究高效、低毒或无毒、无残留防治霉菌病的药物和方法。

(三) 水产动物病原病毒

上世纪 50~70 年代，国外先后分离鉴定了 10 多种水产动物病原病毒。目前，全世界已确认的水产动物病原病毒有 90 余种，分别归属于 10 多个科。我国自 1979 年首次发现草鱼出血病病毒至今，已从草鱼、鲤、鳊、鲢、鲴、牛蛙、中华鳖、虾、蟹等动物分离鉴定了 20 余种病毒。在检测方法上，除了应用电镜观察、细胞培养、形态和感染性检查以及免疫学方法外，还广泛采用生物化学和分子生物学方法。在防治上，研制了多种疫苗，草鱼出血病疫苗在我国草鱼病防治上取得了显著成效。抗病育种、转基因抗病鱼研究也获得一定效果。

(四) 水生微生态的研究

国内外对微生物在水产动物的养殖水质改善、营养与免疫、高产优质等方面所起作用的基础研究较多，不仅开展了对高产养殖池或应用药物后的水体、水产动物体表、消化道微生物的种群变动情况的调查研究，而且发现了一些可供开发利用的有益微生物，如光合细菌、硝化细菌、蛭弧菌等。并应用这些有益微生物制成了微生态制剂，应用后获得了较好效果，如光合细菌制剂、EM(effective microorganisms)制剂、单细胞蛋白鱼饵料；微生物免疫增强剂、微生物絮凝剂等。现在利用选育、诱变、基因重组等方法构建“超级菌”的工作正方兴未艾。

(五) 水产动物免疫学研究

20 世纪初人类才开展鱼类免疫研究。1903 年 Babes 等首先发现丁鳙可产生凝集抗体；1935 年 Nybelin 发现鱼黏液中存在抗体；1942 年 Duff 研制了疖疮病口服疫苗，1947 年 Bisset 发现鱼类免疫受温度影响。此后，相继研究了鱼类迟发性超敏反应、同种移植抑制反应、免疫器官、组织和细胞、免疫应答种系发生、非特异性免疫机制、影响免疫应答的主要因素、免疫球蛋白的构成与特性，建立了多种免疫学检测方法，制备了单克隆抗体，制造了多种疫苗投入使用，至今鱼类免疫已基本形成较完整体系。20 世纪 60~80 年代，也开展了两栖类、爬行类动物和其他分类地位不同的水产动物免疫研究，但研究范围、深度都十分有限。我国鱼类免疫研究起步于 20 世纪 50 年代后期，从 70 年代起至今，开展了以草鱼为主的免疫研究，从免疫器官、免疫细胞、抗体及其检测到疫苗研制、免疫途径和效果以及抗病育种都进行了较深入探讨。目前，围绕一些名特水产动物如中华鳖、对虾、蟹、贝类、鳊等的研究已成热点。据不完全统计，1999~2001 年在国内公开发表的关于水产动物免疫研究的学术论文达 140 余篇，约占有关水产微生物学论文总数的 50%，现在每年仍以此速度在发展，预计今后几年我国这方面的研究水平将居世界先进行列。

思考题

1. 微生物有哪些类型？分类地位如何？
2. 微生物有哪些特性？了解这些特性有何实际意义？
3. 什么是微生物、微生物学和水产微生物学？
4. 微生物有什么作用？
5. 水产微生物学的主要研究内容及进展如何？

第一篇 总论

第一章 细菌的形态与构造

第一节 细菌的形态

细菌(bacterium)是原核生物界(Prokaryotae)中的一大类单细胞微生物,有广义和狭义两种范畴。广义上泛指各类原核细胞型微生物,包括细菌、立克次体(*Rickettsia*)、衣原体(*Chlamydia*)、霉形体(*Mycoplasma*)、螺旋体(*Spirochaete*)及放线菌(*Actinomyces*)等。狭义上则专指其中数量最大、种类最多、具有典型代表性的细菌。它们的个体微小,形态与结构简单,具有细胞壁和原始核质,无核仁和核膜,除核糖体外无其他细胞器。

一、细菌的大小

细菌个体微小,要经染色后在光学显微镜下才能看见。测定细菌大小的单位通常是微米(micrometer, μm);各种细菌的大小和表示有一定的差别。球菌以直径表示,常为 $0.5\sim 2.0\mu\text{m}$ 。杆菌和螺旋状菌用长和宽表示,较大的杆菌长 $3\sim 8\mu\text{m}$,宽 $1\sim 1.25\mu\text{m}$;中等大的杆菌长 $2\sim 3\mu\text{m}$,宽 $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$;小杆菌长 $0.7\sim 1.5\mu\text{m}$,宽 $0.2\sim 0.4\mu\text{m}$ 。螺旋状菌以其两端的直线距离作长度,一般在 $2\sim 20\mu\text{m}$ 之间,宽 $0.2\sim 1.2\mu\text{m}$ 。细菌的大小介于动物细胞与病毒之间。

细菌的大小以生长在适宜的温度和培养基中的幼龄(指对数期)培养物为标准,各种细菌的大小是相对稳定的,可以作为鉴定它们的一个依据。同种细菌在不同的生长环境(如动物体内、外)和不同的培养条件下,其大小会有变化。在实际测量时,制片方法、染色方法和使用的显微镜不同也会有影响和差异,因此,测定和比较细菌的大小时,各种因素、条件和技术操作等均应一致。

二、细菌的基本形态

细菌的外形比较简单,有球状、杆状和螺旋状三种基本类型及某些其他形态(图 1-1)。

细菌的繁殖方式都是简单的裂殖,不同细菌裂殖后其菌体排列方式不同。有些细菌分裂后单个存在,有些细菌分裂后彼此仍有原浆带相连,形成一定的排列方式,在正常情况下,各种细菌的外形和排列方式是相对稳定而有特征性的,可以作为分类与鉴定的一种依据。

(一) 球菌(coccus, 复数 cocci) 多数球菌呈正球形,有的呈肾形、豆形等。按其分裂方向及分裂后的排列情况,又可分为几种。

1. 双球菌(diplococcus) 沿一个平面分裂,分裂后两两相连,其接触面有时呈扁平或凹入,菌体变成肾状、扁豆状或矛头状。例如肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)。

2. 链球菌(*Streptococcus*) 沿一个平面分裂,分裂后三个以上菌体连成短链或长链。例如化脓链球菌(*Streptococcus suis*)。

3. 葡萄球菌(*Staphylococcus*) 沿多个不规则的平面分裂,分裂后多个球菌不规则地堆在一起,似一串葡萄。例如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。

此外还有四联球菌(tetracoccus)和八叠球菌(sarcina),分别成“田”字形及八球捆扎状。

(二) 杆菌(bacillus, 复数 bacilli) 杆菌一般呈正圆柱形,也有的近似卵圆形。菌体两端多为钝圆,少数是平截,如炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)。有些杆菌的菌体短小,近似

球状，称为球杆菌(*coccobacillus*)，如多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)。有些杆菌会形成侧支或分枝，称为分枝杆菌(*mycobacterium*)。有的杆菌呈长丝状，如坏死梭杆菌(*Fusobacterium necroporum*)。

杆菌的分裂与菌体长轴相垂直(横分裂)。多数杆菌分裂后单独散在，称为单杆菌，如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。有些杆菌分裂后成对存在，或者两个以上连成链状排列，前者称为双者称为链杆菌(*streptobacilli*)，例如炭疽杆菌。

杆菌的大小依种类的不同而异，大杆菌，如柱状屈挠杆菌，长 3~10 μm ；中等大杆菌，如大肠杆菌长 2~3 μm ；小杆菌，如流感嗜血杆菌仅长 0.7~1.5 μm 。此外，少数杆菌呈分支状，如海分支杆菌；有的菌体一端膨大，呈棒槌状，如棒状杆菌；有的菌体很短，近似球杆状，如杀鱼巴氏杆菌。杆菌的排列方式有 3 种，即单在、成双或成链。

(三) 螺旋状菌(*spirillum*) 菌体呈弯曲或螺旋状的圆柱形，两端圆或尖突。螺旋状菌又可分弧菌(*vibrio*)和螺菌(*spirillum*)两种，前者菌体只有一个弯曲，呈弧形或逗点状，例如鳃弧菌(*Vibri-
oanguinarum*)。后者菌体较长，有两个以上的弯曲，捻转呈螺旋状，例如鼠咬热螺菌(*Spirillum minus*)。

细菌在适宜条件下培养，在对数繁殖期的菌形比较典型和一致。不良环境或老龄期，会出现和正常形状不一样的个体，称为衰老型或退化型(*involution form*)。重新处于正常的培养环境时，可恢复正常的形状。但也有些细菌，纵使在适宜的环境中生长，其形状也很不一致，这种现象称为多形性(*pleo-
morphism*)，如嗜血杆菌(*Haemophilus*)。

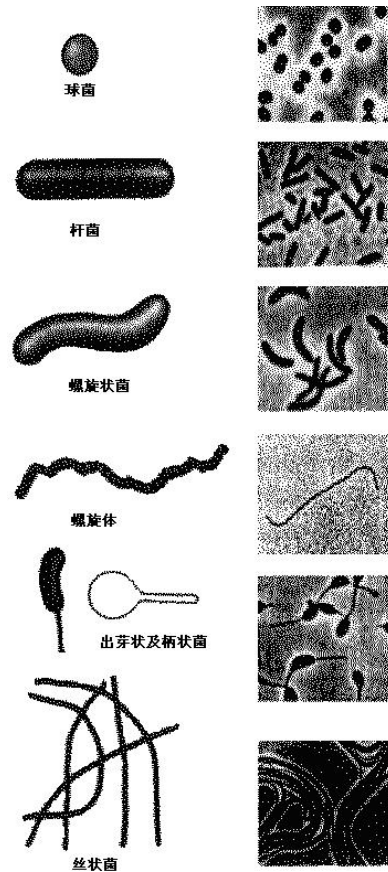


图 1-1 细菌各种形态示意图及电镜照片
(据 Madigan 等)

三、细菌的群体形态

某个细菌在适合生长的固体培养基表面或内部，在适宜的条件中，经过一定时间培养，多数为 18~24h，生长繁殖出巨大数量的菌体，形成一个肉眼可见的、有一定形态的独立群体，称为菌落(*colony*)，又称克隆(*clone*)。若长出的菌落，联成一片，称为菌苔(*lawn*)。在细菌培养中，常将细菌作固体平板培养基表面划线接种，以获得单个菌落。

细菌的菌落可用肉眼观察到，也可在光学显微镜中观察。各种细菌的菌落在大小、色泽、质地、表面性状、边缘结构等方面均有各自的特征。菌落的特征与细菌个体的形态、结构的特征密切相关，例如金黄色葡萄球菌菌落较厚、黄色、圆形、边缘整齐；猪丹毒杆菌的菌落微小、透明、圆形；炭疽杆菌的菌落大而扁平，形状不规则，边缘多缺损。在细菌学工作中，常通过固体培养基上的菌落，进行细菌的分离、纯化、计数及鉴定等。

细菌的菌落一般分为 3 型：

(1)光滑型菌落(*smooth colony*, S 型菌落)：新分离的细菌大多呈光滑型菌落，表面光

滑、湿润，边缘整齐。

(2)粗糙型菌落(rough colony, R 型菌落): 菌落表面粗糙、干燥, 呈皱纹或颗粒状, 边缘大多不整齐。R 型细菌多由 S 型细菌变异失去菌体表面多糖或蛋白质形成。R 型细菌抗原不完整, 毒力和抗吞噬能力都比 S 型菌弱。但也有少数细菌新分离的毒力株就是 R 型, 如炭疽芽孢杆菌等。

(3)黏液型菌落(mucoïd colony, M 型菌落): 黏稠、有光泽, 似水珠样。多见于有厚荚膜或丰富黏液层的细菌。

第二节 细菌的结构

一、细菌的基本结构

细菌的基本结构均具有细胞壁、细胞膜、细胞质、核体等基本结构(图 1-2)。

(一) 细胞壁(cell wall)

细胞壁在细菌细胞的外围, 是一层坚韧而具有一定弹性的膜。将细菌经高渗溶液处理后染色, 或用特殊方法染色, 在光学显微镜下察, 可见细胞壁。或将细菌制观作超薄切片, 用电镜观察, 更可确证细胞壁的存在。用革兰氏 (Gram) 染色法染色, 可以把细菌分为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌两大类, 两类细菌细胞壁的共有组分为肽聚糖, 但各自有其特殊组分, 它们的细胞壁结构和组分有区别(图 1-3)。

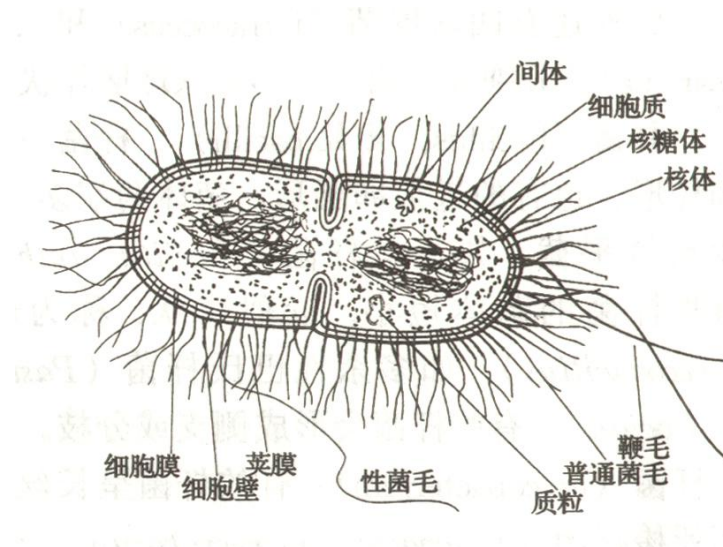


图 1-2 细菌细胞结构模式图

1.革兰氏阳性菌的细胞壁 (图 1-3A) 较厚, 约 15~80nm。其化学成分主要是肽聚糖, 占细胞壁物质的 40%~95%, 形成 15~50 层的聚合体。此外, 还有磷壁酸、多糖、蛋白质(如金黄色葡萄球菌的 A 蛋白, A 群链球菌的 M 蛋白)等。分支杆菌的细胞壁则含有多量的脂类, 多数以分支杆菌酸(mycolic acid)或蜡质的形式存在。

(1) 肽聚糖 (peptidoglycan) 又称黏肽 (mucopolysaccharide)、糖肽 (glycopeptide) 或胞壁质(murein), 是细菌细胞壁所特有的物质。革兰氏阳性菌细胞壁的肽聚糖是由聚糖链支架、四肽侧链和五肽交联桥三部分组成的复杂聚合物(图 1-4B)。聚糖链支架由 N 乙酰葡萄糖胺(N-acetylmuramic acid) 和 N 乙酰胞壁酸(N-acetylglucosamine)通过 β -1, 4 糖苷键交替

连接组成。四肽侧链依次由 L 丙氨酸、D 谷氨酸(或 D 异谷氨酰胺)、L 赖氨酸、D 丙氨酸所组成，均联接于胞壁酸。五肽联桥由 5 个甘氨酸组成，交联于相邻两条聚糖链支架的四肽侧链上第一条第 3 位 L 赖氨酸及第二条第 4 位 D 丙氨酸之间，于是构成十分坚韧的三维立体结构。溶菌酶能水解肽聚糖链支架中的 β -1, 4 糖苷键，故能裂解肽聚糖。

(2) 磷壁酸 (teichoic acid) 又名垣酸，是一种由核糖醇 (ribitol)或甘油 (glycerol) 残基经磷酸二酯键相互联接而成的多聚物，并带有一些氨基酸或糖。约 30 个或更多的磷壁酸分子组成长链，穿插于肽聚糖层中(图 1-3A)。有的长链一端与肽聚糖上的胞壁酸以共价键连接，另一端游离于细胞壁外，称为壁磷壁酸 (wall teichoic acid)。有的长链一端与细胞膜外层的糖脂以共价键相连，另一端穿过肽聚糖层到达细胞壁表面，称为膜磷壁酸 (membrane teichoic acid)，又叫脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)。

磷壁酸是革兰氏阳性菌特有的成分，其主要生理功能为：①赋予革兰氏阳性细菌以特异的表面抗原；②增强某些致病菌如 A 族链球菌对宿主细胞的粘连、避免被白细胞吞噬以及抗补体的作用；③贮藏磷元素；④其磷酸分子上较多的负电荷可提高细胞周围 Mg^{2+} 的浓度，可以提高细胞膜上一些需 Mg^{2+} 合成酶的活性；⑤可作为噬菌体的特异性吸附受体，⑥能调节细胞内自溶素(autolysin)的活力，以防止细胞因自溶而死亡。因为在细胞正常分裂时，自溶素可使旧壁适度水解并促使新壁不断插入，而当其活力过强时，则细菌会因细胞壁迅速水解而死亡。

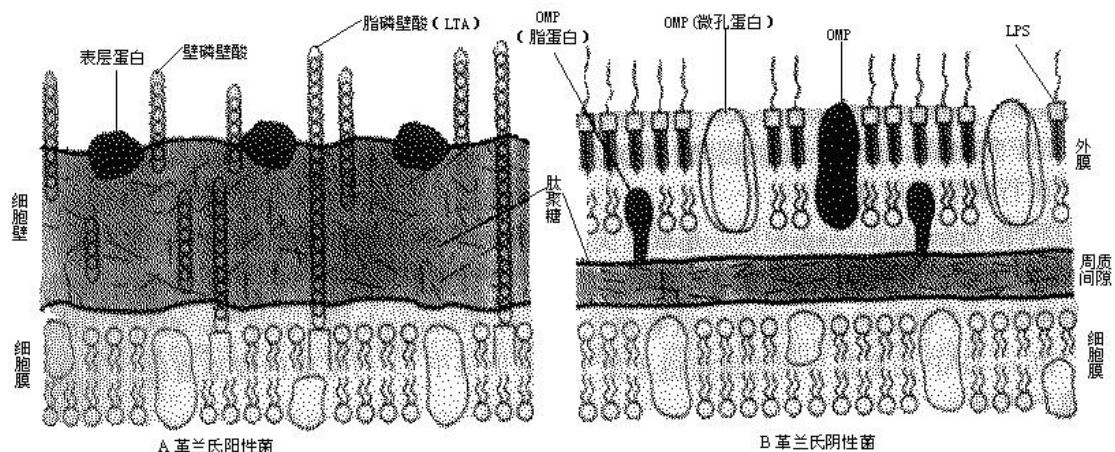


图 1-3 细菌细胞壁结构模式图

2. 革兰氏阴性菌的细胞壁

革兰氏阴性菌的细胞壁较薄，约 10~15nm，其结构和成分较复杂(图 1-3B)，由外膜 (outer membrane)和周质间隙组成。外膜由脂多糖、磷脂、蛋白质和脂蛋白等复合构成，周质间隙是一层薄的肽聚糖，革兰氏阴性菌的肽聚糖仅由聚糖骨架和四肽侧链两部分组成，约仅占细胞壁的 10%~20%。

(1) 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) 为革兰氏阴性细菌所特有，位于外壁层的最表面，厚约 8~10nm。由类脂 A，核心多糖和侧链多糖三部分组成。类脂 A (lipid A) 是一种结合有多种长链脂肪酸的氨基葡萄糖聚二糖链，是内毒素的主要毒性成分，发挥多种生物学效应，能致动物体发热，白细胞增多，直至休克死亡。各种革兰氏阴性菌类脂 A 的结构

极相似, 无种属特异性。核心多糖位于类脂 A 的外层, 由葡萄糖、半乳糖等组成, 与类脂 A 共价联结, 核心多糖具有属特异性。侧链多糖在 LPS 的最外侧, 即为菌体(O)抗原, 由 3~5 个低聚糖单位重复构成的多糖链, 其中单糖的种类、位置、排列和构型均不同, 具有种、型特异性。LPS 有吸附 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等阳离子的作用, 也是噬菌体在细菌表面的特异性吸附受体。脂多糖主要功能为: ①其中的类脂 A 是革兰氏阴性细菌致病物质——内毒素的物质基础; ②因其负电荷较强, 故与磷壁酸相似, 也有吸附 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等阳离子以提高其在细胞表面浓度的作用; ③由于 LPS 结构的多变, 决定了革兰氏阴性细菌细胞表面抗原决定簇的多样性, 例如根据 LPS 抗原性的测定, 国际上已报道过的沙门氏菌属(*Salmonella*)的抗原型多达 2107 种(1983 年); ④是许多噬菌体在细胞表面的吸附受体; ⑤具有控制某些物质进出细胞的部分选择性屏障功能, 例如它可让若干种较小的分子(嘌呤、嘧啶、双糖、肽类和氨基酸等)通过, 但能阻拦溶菌酶、抗生素(青霉素等)、去污剂和某些染料等较大分子进入细胞膜。要维持 LPS 结构的稳定性, 必须有足够的 Ca^{2+} 存在。如果用 EDTA 等螯合剂去除 Ca^{2+} 和降低离子键强度, 就会使 LPS 解体。这时, 其内壁层的肽聚糖分子就会暴露出来, 因而易被溶菌酶所水解。

(2) 外膜蛋白(outer membrane protein, OMP) 是外膜层中镶嵌的多种蛋白质的统称。按含量及功能的重要性可将 OMP 分为主要及次要两类。主要外膜蛋白包括微孔蛋白(porin)及脂蛋白等。微孔蛋白由三个相同分子量的亚单位组成, 形成跨越外膜的微小孔道, 起分子筛的作用, 仅允许小分子量的营养物质如双糖、氨基酸、二肽、三肽、无机盐等通过, 大分子物质不能通过, 因此溶菌酶之类的物质不易作用到革兰氏阴性菌的肽聚糖。某些特异的微孔蛋白与细菌对宿主细胞的黏附或与某些特定物质的摄取有关, 发挥受体的作用。例如嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)在缺铁的环境下分泌载铁体(siderophore)摄取 Fe^{3+} , 此时菌体可产生相应 OMP 条带作为载铁体的受体。脂蛋白(lipoprotein)的作用是使外膜层与肽聚糖牢固地连接, 可作为噬菌体的受体, 或参与铁及其他营养物质的转运。将 OMP 作电泳, 呈现一定的图谱, 据此可对某些革兰氏阴性菌及菌株进行鉴定、分型以及提供分子流行病学的信息。

(3) 周质间隙(periplasmic space) 是革兰氏阴性菌一层的肽聚糖 (图 1-3B)很薄, 仅 2~3nm, 由 1~2 层网状分子构成。其结构单体与革兰氏阳性菌有差异(图 1-4A): 聚糖链支架相同, 但四肽侧链中第三个氨基酸是内消旋二氨基庚二酸(*m*-diaminopimelic acid, *m*-DAP), 没有五肽交联桥, 由 *m*-DAP 的氨基与相邻聚糖链支架上四肽侧链中 D-丙氨酸的羧基直接连接成二维结构, 故较为疏松。

革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌间由于细胞壁和其他构造的不同, 就产生了一系列形态、构造、化学组分、染色反应、生理功能和致病性等的差别, 这些差别对微生物学的研究和实际应用都十分重要(表 1-1)。

细胞壁的主要功能有: ①维持细胞外形和提高机械强度, 从而使其免受渗透压等外力的损伤。细菌细胞质内含有大分子营养物质和高浓度的无机盐, 渗透压约为 50 万~250 万 Pa, 因有细胞壁菌体不会破裂。②为细胞的生长、分裂和鞭毛运动所必需, 失去了细胞壁的原生质体, 也就丧失了这些重要功能。③阻拦酶蛋白和某些抗生素等大分子物质(相对分子质量大于 800)进入细胞, 保护细胞免受溶菌酶、消化酶和青霉素等有害物质的损伤。④与细菌的致病性、抗原性、对噬菌体与药物的敏感性及其革兰氏染色特性等密切相关。例如革兰氏阴性菌细胞壁的结构和组成比革兰氏阳性菌复杂, 所以一般来说, 革兰氏阴性菌对

多种抗菌药物具有抵抗力，而革兰氏阳性菌则比较敏感，例如对青霉素，革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌敏感。

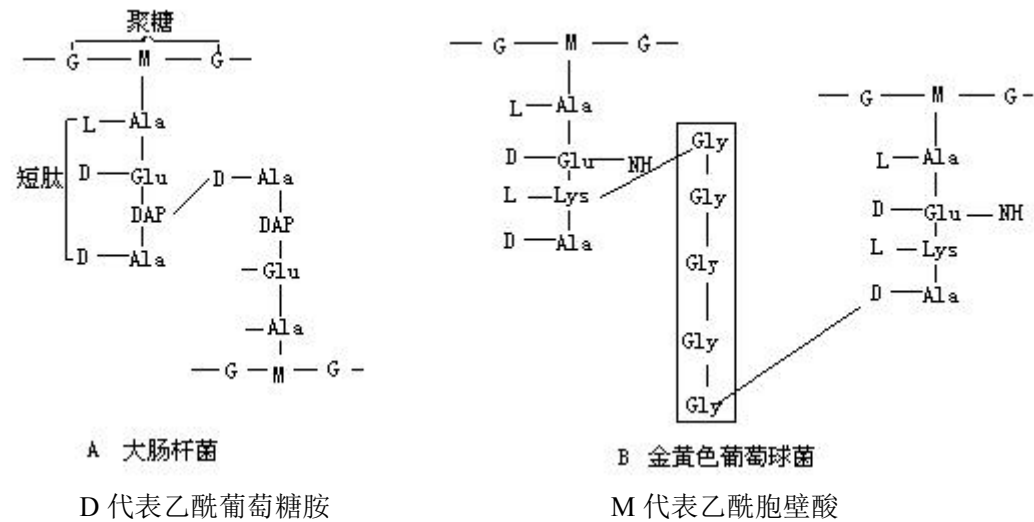


图 1-4 肽聚糖的短肽组成及交联方式示意图

表 1-1 革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌某些特性的比较

项目	革兰氏阳性菌	革兰氏阴性菌
革兰氏染色反应	能阻留结晶紫而染成紫色	可经脱色而复染成红色
肽聚糖层	厚，层次多，可达 50 层	薄，一般 1~2 层
磷壁酸	多数含有	无
外膜	无	有
脂多糖(LPS)	无	有
类脂和脂蛋白含量	低(仅抗酸性细菌含类脂)	高
鞭毛结构	基体上着生两个环	基体上着生四个环
产毒素	以外毒素为主	以内毒素为主
对机械力的抗性	强	弱
细胞壁对溶菌酶的抗性	弱	强
对青霉素和磺胺	敏感	不敏感
对链霉素、氯霉素、四环素	不敏感	敏感
碱性染料的抑菌作用	强	弱
对阴离子去污剂	敏感	不敏感
对叠氮化钠	敏感	不敏感
对干燥	抗性强	抗性弱
产芽孢	有的产生	不产生

3.原生质体与原生质球 在一定条件下，可除去或缺损细菌的细胞壁并不损害细菌的生命。革兰氏阳性菌经溶菌酶或青霉素处理后，可完全除去细胞壁，形成仅由细胞膜包住细胞质的菌体，称为原生质体(protoplast)。原生质体内细胞质渗透压高达 200 万~250 万 Pa，在等渗的普通培养基中极易胀裂死亡，必须在高渗培养基中才能维持和再生。用溶菌

酶等作用革兰氏阴性菌，仅能去除细胞内的肽聚糖，形成仍有外膜层包裹的菌体，称为原生质球(spheroplast)，以区别革兰氏阳性菌的原生质体。革兰氏阴性菌细胞内渗透压较低，仅 50 万~60 万 Pa，形成原生质球后对低渗仍有一定的耐受力。将两个不同的原生质体或原生质球融合并再生成一个细菌的技术，称为原生质体融合技术，该技术应用于细菌及其他微生物的遗传育种研究工作中。

4.细菌 L 型 1935 年李斯特预防医学研究所(Lister Institute of Preventive Medicine)最先从念珠链杆菌(*streptobacillus moniliformis*)的陈旧培养基中发现细胞壁缺陷的念珠链杆菌，于是以该研究所的第一个字母“L”命名此种细菌。目前通常将细胞壁缺陷的细菌，包括原生质体及原生质球，统称为细菌 L 型。但是严格意义的细菌 L 型是指细菌自发、或经诱导剂诱导形成的遗传稳定的细胞壁缺陷菌株。而原生质体和原生质球是细菌由人工处理形成的，不能分裂的细胞。

青霉素通过竞争转肽酶的作用抑制五肽桥与四肽侧链之间的联结，使革兰氏阳性菌不能完成肽聚糖的合成。溶菌酶能裂解肽聚糖中的 β -1, 4 糖苷键，使细菌细胞壁的肽聚糖崩解。所以，青霉素和溶菌酶是细胞 L 型的常用诱导剂。某些细菌 L 型对人仍有一定致病力，常发生于用青霉素、头孢菌素等抗菌药物治疗疾病过程中。细菌 L 型在动物中的致病问题也值得注意。

细菌 L 型的形态呈多形性，有球形、杆形和丝状等。其大小不一，革兰氏染色多呈阴性。其生长繁殖时的基本营养要求与原菌相似，但培养基中应补充 3%~5%NaCl、10%~20%蔗糖或 7%聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等，以提高渗透压。并需添加 10%~20%的马血清。细菌 L 型生长繁殖较原菌缓慢，在琼脂平板(含琼脂 0.8%~1.0%)上，一般需培养 2~7d，长出中间较厚，四周较薄的荷包蛋样小菌落。在液体培养基中生长后呈较疏松的絮状颗粒，沉于管底，上面的培养液澄清。

5.革兰氏染色的机制 通过一个多世纪的实践证明，由革兰(C. Gram)于 1884 年发明的革兰氏染色法是一种极其重要的鉴别染色法，它不仅可用于鉴别真细菌，也可鉴别古细菌。20 世纪 60 年代初，萨顿(Salton)曾提出细胞壁在革兰氏染色中的关键作用。至 1983 年，彼弗里奇(T Beveridge)等用铂代替革兰氏染色中媒染剂碘的作用，再用电子显微镜观察到结晶紫与铂复合物可被细胞壁阻留，这就进一步证明了革兰氏阳性和阴性菌主要由于其细胞壁化学成分的差异而引起了物理特性(脱色能力)的不同，正是这一物理特性的不同才决定了其染色反应的不同。其中细节为：通过结晶紫初染和碘液媒染后，在细胞膜内形成了不溶于水的结晶紫与碘的复合物。革兰氏阳性细菌由于其细胞壁较厚、肽聚糖网层次多和交联致密，故遇乙醇或丙酮作脱色处理时，因失水反而使网孔缩小，再加上它不含类脂，故乙醇处理不会溶出缝隙，因此能把结晶紫与碘复合物牢牢留在壁内，使其仍呈紫色。反之，革兰氏阴性细菌因其细胞壁薄、外膜层的类脂含量高、肽聚糖层薄和交联度差，在遇脱色剂后，以类脂为主的外膜迅速溶解，薄而松散的肽聚糖网不能阻挡结晶紫与碘复合物的溶出，因此通过乙醇脱色后细胞退成无色。这时，再经沙黄等红色染料进行复染，就使革兰氏阴性菌呈现红色。而革兰氏阳性菌则仍保留紫色(实为紫加红色)。

(二)细胞膜

细胞膜(cell membrane)又称细胞质膜(cytoplasmic membrane)。位于细胞壁内侧，包围在细胞浆的外面，是一层富有弹性的半透性薄膜。将细菌用高渗溶液处理，使细胞质与细胞壁分离，在光学显微镜下可以观察到它的存在。用电子显微镜观察，可见细胞膜的内外

两层是电子稠密层，中间一层电子透明层，整个厚度约 5~10nm。重量占菌体干重的 10% 左右。细胞膜的主要化学成分是磷脂和蛋白质，亦有少数碳水化合物和其他物质。磷脂约占细胞膜干重的 20%~30%，蛋白质占 55%~75%，碳水化合物占 2% 左右，其结构基本类似于真核细胞膜的液态镶嵌结构。

在常温下，磷脂双分子层呈液态，其中嵌埋着许多具有运输功能、有的分子内含有运输通道的整合蛋白(integral protein)或内嵌蛋白(intrinsic protein)，在磷脂双分子层的上面则“漂浮着”许多具有酶促作用的周边蛋白(peripheral protein)或膜外蛋白(extrinsic protein)。它们都可在磷脂表层或内层做侧向移动，以执行其相应的生理功能。至今有关细胞质膜的结构与功能的解释，较多的学者仍倾向于 1972 年由辛格(J S Singer)和尼科尔森(G L Nicolson)提出的液态镶嵌模型(fluid mosaic model)。其要点为：①膜的主体是脂质双分子层；②脂质双分子层具有流动性；③整合蛋白因其表面呈疏水性，故可“溶”于脂质双分子层的疏水性内层中；④周边蛋白表面含有亲水基团，故可通过静电引力与脂质双分子层表面的极性头相连，⑤脂质分子间或脂质与蛋白质分子间无共价结合；⑥脂质双分子层如“海洋”，周边蛋白可在其上做“漂浮”运动，而整合蛋白则似“冰山”状沉浸在其中做横向移动。

细菌细胞膜的功能也与真核细胞膜相似，主要为：①选择性地控制细胞内、外的营养物质和代谢产物的运送；②维持细胞内正常渗透压；③合成细胞壁和糖被的各种组分(肽聚糖、磷壁酸、LPS、荚膜多糖等)；④膜上含有氧化磷酸化或光合磷酸化等能量代谢的酶系，是细胞的产能场所，⑤是鞭毛基体的着生部位和鞭毛旋转的供能部位。

细菌细胞膜可形成一种特有的结构，称为间体或中介体(mesosome)，是部分细胞膜内陷、折叠、卷曲形成的囊状物，多见于革兰氏阳性细菌。间体常位于菌体侧面或靠近中部，可有一个或多个。间体一端连在细胞膜上，另一端与核质相连，细胞分裂时间体亦一分为二，各携一套核质进入子代细胞，有类似真核细胞纺锤丝的作用。间体的形成，有效地扩大了细胞膜面积，相应地增加了酶的含量和能量的产和，其功能类似于真核细胞的线粒体，故亦称为拟线粒体(chondroid)。

(三)核体

细菌为原核生物，其基因组 DNA 无核膜包围，分布于细胞质内，称为核体(nuclear body)或拟核(nucleoid)。核体常被细胞质中大量的 RNA 掩盖，需用 RNA 酶将 RNA 水解，以特殊的 Feulgen 法染色，才可在光学显微镜观察，核体在细胞质中心或边缘区，呈球状、哑铃状、带状、网状等形态。因其功能与真核细胞的染色体相似，故习惯上亦称为细菌的染色体(chromosome)。

细菌核体是一个共价闭合、环状的双链大型 DNA 分子，由两股方向相反的 DNA 多聚链呈右手双螺旋结构。细菌染色体 DNA 的超螺旋依赖于—类拓扑异构酶(topoisomerase)，其中所有细菌共有的一种酶为旋转酶(gyrase)。核体仅在复制的短时间内为双倍体，一般均是单倍体。核体含细菌的遗传基因，控制细菌的遗传与变异。

细菌的染色体与真核细胞者相比，有两个显著的不同：①前者的 DNA 量要小得多，其序列的组织性也就简单得多；②除了 RNA 基因通常是多拷贝，以便装备大量的核糖体满足细菌的迅速生长繁殖外，细菌绝大多数的蛋白质基因保持单拷贝形式，很少有重复序列。

(四)细胞质

细胞质(cytoplasm)通常指细菌细胞膜内包围的、除核体以外的所有物质，是一种无色透明、均质的黏稠胶体。主要成分是水、蛋白质、脂类、多糖类、核糖核酸和少量无机盐类等，具有明显的胶体性质。细胞质是细菌进行营养物质代谢以及合成核酸和蛋白质的场所，在细胞质内含有各种酶系统，还有核糖体、质粒、包含体、气泡等内含物。

1.核糖体 (ribosome) 核糖体又名核蛋白体，是散布在细胞质中的一种核糖核酸蛋白质小颗粒。呈小球形或不对称形，约由 2 / 3 的核糖核酸 rRNA 和 1 / 3 蛋白质所组成。rRNA 有 5S、16S 及 23S 三种。其长 10~20nm，沉降系数约为 70S，由 50S 和 30S 两个亚基构成 (图 1-5)而真核细胞核糖体为 80S，两个亚基为 60S 和 40S。核糖体的数目随生长阶段而异，生长旺盛时最多，生长静止时减少。有些细菌的核糖体总数可达 15000 个，占细菌细胞干重的 25%。

核糖体是合成蛋白质的地方。其合成蛋白质的作用与真核细胞的核糖体相同，但因细菌核糖体与人和动物细胞核糖体的两个亚基结构不同，有些药物，例如红霉素和链霉素能与细菌核糖体的两个亚基结合，干扰蛋白质合成，将细菌杀死，但对人和动物细胞的核糖体则不起作用。

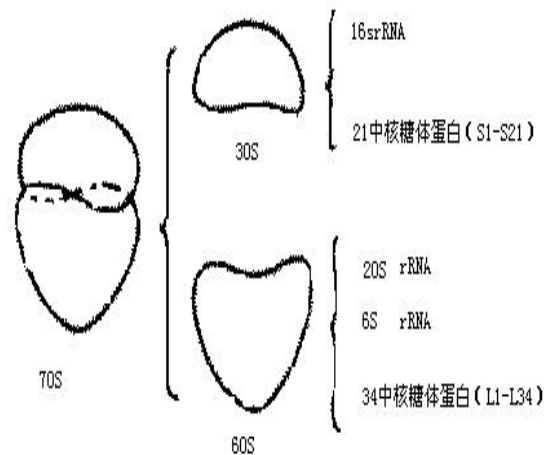


图 1-5 细菌核糖体结构模式图

2.质粒(plasmid) 是在核体 DNA 以外，游离的小型双股 DNA 分子。多为共价闭合环状，也发现有线状，分子量在 $10^6 \sim 10^8$ 之间。质粒基因组约为核体的 1%，含细菌生命非必需的基因，其功能是控制产生菌毛、毒素、耐药性和细菌素等遗传性状。

质粒能独立复制，随宿主分裂传给子代菌体。有些质粒能与核体 DNA 整合或脱离，这类质粒又称为附加体(episome)。质粒具有与外来 DNA 重组的功能，所以在基因工程中被广泛应用作载体。

3.包含物(inclusion) 细菌等原核生物细胞内往往具有一些贮存营养物质或其他物质的颗粒样结构，称之为包含物，它与病毒感染所致的包涵体(inclusion body)完全不同。细菌包含物有脂肪滴、糖原及异染颗粒等。

4.脂肪滴(fat drop) 细菌最常见的包含物为聚β-羟基丁酸(poly-β-hydroxybutyric acid, PHB)，是一种脂质成分，是一些原核生物特有的碳源和能源的贮存形式。

5.异染颗粒 (metachromatic granule) 是某些细菌细胞质中一种特有的酸性小颗粒，对碱性染料的亲和性特别强，特别是用陈旧美蓝染色时，呈红紫色，而菌体其他部分则呈蓝色。异染颗粒的主要成分是 RNA 和无机聚偏磷酸盐，其功能主要是贮存磷酸盐和能量。某些细菌[如棒状杆菌(*Corynebacterium*)等]的异染颗粒非常明显，有助于细菌鉴定。

6.糖原 (glycogen) 和淀粉粒 (starch) 有些细菌能积累多聚葡萄糖在细胞浆内，一般以糖原或淀粉粒的形式存在，直径约为 50~100nm，用碘染成红棕色的是糖原粒，染成蓝色的是淀粉粒。它们是贮存的碳素营养。

7.气泡(gas vacuoles) 某些水生性的细菌如蓝细菌(*Cyanobacteria*)、盐杆菌(*Halobacterium*)等，在其细胞质中能形成气泡，具有吸收空气，供氧的代谢，调节比重帮

助浮起等作用。

二、细菌的特殊结构

细菌细胞除上节所述的细胞壁等基本结构外，有的还有荚膜、芽孢、鞭毛、菌毛、S层等具特殊功能的结构，有些与细菌的致病力有关，也有助于细菌鉴定。

(一)荚膜(capsule) 某些细菌在其生活过程中可在细胞壁的外周产生一种黏液样的物质，包围整个菌体，称为荚膜。当多个细菌的荚膜融合形成一个大的胶状物，内含多个细菌细胞时，则称为菌胶团(zoogloea)。

荚膜的折光性低，不易用普通染色方法着色，因此普通方法染色后的细菌，在光学显微镜下观察时，可见菌体周围的一层无色透明圈，即为荚膜。如果用荚膜染色法，可以清楚地看见荚膜的存在。荚膜的厚度如在200nm以下，用光学显微镜不能看见，但可在电子显微镜下看到，称为微荚膜(microcapsule)。有些细菌分泌一层很疏松、与周围边界不明显，易与菌体脱离的黏液样物质，则称为黏液层(slime layer)。有些细菌具有介于荚膜和黏液层二者之间的结构，称为糖萼(glycocalyx)。

多数细菌的荚膜主要含多糖类，如猪链球菌，少数则主要含多肽类，如炭疽杆菌，也有极少数细菌两者都有，如巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。荚膜、微荚膜成分具有抗原性，并具有种和型特异性，可用于细菌的鉴定。黏液层的主要成分是纯多糖类。

细菌产生荚膜或黏液层可使液体培养基具有黏性，在固体培养基上则形成表面湿润、有光泽的光滑(S)型或黏液(M)型的菌落。失去荚膜后的菌落则变为粗糙(R)型。

荚膜的产生是种的特征，但也与环境条件有密切的关系。如炭疽杆菌等致病菌，常需在动物组织中才能明显地形成荚膜，在人工培养基中，往往不形成荚膜。

荚膜不是细菌的主要构造，除去荚膜对菌体的生长代谢没有影响，很多有荚膜的菌株可产生无荚膜的变异。总的来说，荚膜的主要功能有：①其上大量极性基团可保护菌体免受干燥损伤；可防止噬菌体的吸附和裂解；一些动物致病菌的荚膜还可保护它们免受宿主白细胞的吞噬，例如有荚膜的肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)就更易引起人的肺炎；②贮藏养料，以备营养缺乏时重新利用；③作为透性屏障或(和)离子交换系统，可保护细菌免受重金属离子的毒害；④有表面附着作用，例如某些水生丝状细菌的鞘衣状荚膜有附着作用；⑤有细菌间的信息识别作用，如根瘤菌属(*Rhizobium*)；⑥堆积代谢废物。

细菌的荚膜也可以利用。产生菌胶团的细菌，可利用其吸附和分解有害物质的能力处理污水。从一些细菌荚膜中可获得有用的制品，例如从肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)的荚膜中，可提取葡聚糖，制备代血浆或葡聚糖凝胶(sephadex)等；从甘蓝黑腐病黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)的荚膜中，可提取多糖，制备黄原胶(xanthan)，供食品、印染和石油开采业中使用。

(二)芽孢(spore) 某些革兰氏阳性菌在一定的环境条件下，在其生长发育后期，在细胞内形成一个圆形或椭圆形、厚壁、含水量极低、抗逆性极强的休眠体，称为芽孢(endospore或spore，偶译为“内生孢子”)。未形成芽孢的菌体称为繁殖体或营养体(vegetative form)，老龄芽孢将脱离原菌体独立存在，称为游离芽孢。由于每一营养细胞内仅生成一个芽孢，故芽孢无繁殖功能。芽孢是整个生物界中抗逆性最强的生命体，在抗热、抗化学药物、抗辐射和抗静水压等方面，更是首屈一指。一般细菌的营养细胞不能经受70℃以上的高温，可是它们的芽孢却有惊人的耐高温能力。例如，肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)的芽孢在100℃沸水中要经过5.0~9.5h才被杀死，至121℃时，平均也要10min才能杀死；热解糖

梭菌(*C.thermosaccharolyticum*)的营养细胞在 50℃下经数分钟即可杀死,但它的一群芽孢却需在 132℃下经 4.4min 才能杀死其中的 90%。芽孢的抗紫外线能力一般是其营养细胞的一倍。巨大芽孢杆菌芽孢的抗辐射能力要比大肠杆菌的营养细胞强 36 倍。芽孢的休眠能力更是突出。在其休眠期间,不能检查出任何代谢活力,因此称为隐生态(cryptobiosis)。一般的芽孢在普通条件下可保持几年至几十年的生活力。但文献中还有许多更突出的记载,如环状芽孢杆菌(*B.circulans*)的芽孢在植物标本上(英国)已保存 200~300 年;一种高温放线菌(*Thermoactinomyces sp.*)的芽孢在建筑材料中(美国)已保存 2000 年;普通高温放线菌(*T. vulgaris*)的芽孢在湖底冻土中(美国)已保存 7 500 年;一种芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)的芽孢在琥珀内蜜蜂肠道中(美国)已保存 2 500 万~4000 万年。

1. 产芽孢细菌的种类 能产芽孢的细菌不多,最主要的是属于革兰氏阳性杆菌的两个属——好氧性的芽孢杆菌属(*Bacillus*)和厌氧性的梭菌属(*Clostridium*),球菌中只有芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*)产生芽孢,螺菌中的孢螺菌属(*Sporospirillum*)也产芽孢。此外,还发现少数其他杆菌可产生芽孢,如芽孢乳杆菌属(*Sporolactobacillus*)、脱硫肠状菌属(*Desulfotomaculum*)、考克斯氏体属(*Coxiella*)、鼠孢菌属(*Sporomusa*)和高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)等。芽孢的有无、形态、大小和着生位置是细菌分类和鉴定中的重要指标。

2. 芽孢的构造 主要包括孢外壁、芽孢衣、皮层和核心(图 1-6)。

(1) 皮层(cortex): 在芽孢中占有很大的体积(36%~60%),内含大量为芽孢皮层所特有的芽孢肽聚糖,其特点是呈纤维束状、交联度小、负电荷强、可被溶菌酶水解。此外,皮层中还含有占芽孢干重 7%~10%的吡啶二

羧酸钙盐(calcium picolinate, DPA-Ca),但不含磷壁酸。皮层的渗透压可高达 $2.03 \times 10^6 \text{Pa}$ (20 个大气压)左右,含水量约 70%,略低于营养细胞(约 80%),但比芽孢整体的平均含水量(40%左右)高出许多。

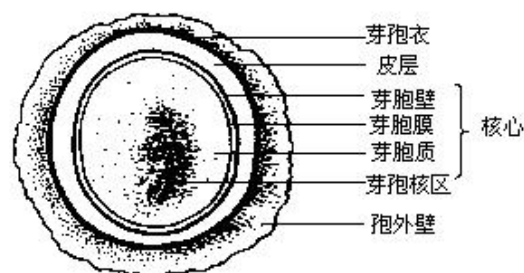


图 1-6 细菌芽孢构造模式

(2) 核心: 芽孢的核心(core)又称为芽孢原生质体,由芽孢壁、芽孢膜、芽孢质和核区 4 部分组成。它的含水量很低(10%~25%),因而特别有利于抗热、抗化学药物(如 H_2O_2),并可避免酶的失活。除芽孢壁中不含磷壁酸以及芽孢质中含 DPA-Ca 外,核心中的其他成分与一般细胞相似。

3. 芽孢形成(sporulation, sporogenesis) 产芽孢的细菌当其细胞停止生长即环境中缺乏营养及有害代谢物积累过多时,就开始形成芽孢。从形态上看,芽孢形成可分为 7 个阶段(图 1-7): ①DNA 浓缩,束状染色质形成;②细胞膜内陷,细胞发生不对称分裂,其中小体积部分即为前芽孢(forespore);③前芽孢的双层隔膜形成,这时芽孢的抗辐射性提高;④在上述两层隔膜间充填芽孢肽聚糖后,合成 DPA,累积钙离子,开始形成皮层,再经脱水,使折光率增高;⑤芽孢衣合成结束;⑥皮层合成完成,芽孢成熟,抗热性出现;⑦芽孢囊裂解,芽孢游离外出。在枯草芽孢杆菌中,芽孢形成过程约需 8h,其中参与的基因约有 200 个。

4. 芽孢萌发(*germination*) 由休眠状态的芽孢变成营养状态细菌的过程,称为芽孢的萌发。萌发的整个过程大约需要 90min。热刺激(如 60℃ 1h 或 85℃ 5min)和 pH 降低均可活化芽孢发芽, L-丙氨酸、葡萄糖、肌苷和腺苷均为启动剂。芽孢壳经活化后,其富含二硫键的蛋白构型发生变化,引起渗透性改变,致使阳离子渗入,细胞膜脂质活性增强,并启动电子传递链。同时,随着水分渗入,芽孢特有成分吡啶二羧酸钙、皮质肽聚糖和芽孢壳物质等大量降解,使芽孢通透性加强,耐热、抗辐射等特性消失。由于代谢活性和呼吸增强,生物合成加速,合成顺序为 RNA、蛋白质、脂质,最后是 DNA。继而芽孢核心体积增大、皮质膨松、芽孢壳破裂,芽管长出并逐渐长大,发育成新的繁殖体细胞。

5. 芽孢的功能 细菌的芽孢对热、干燥、辐射、化学消毒等理化因素均有强大的抵抗力。一般细菌繁殖体在 80℃ 水中就迅速死亡,而有的细菌芽孢可耐 100℃ 沸水数小时。被炭疽芽孢杆菌芽孢污染的草原,传染性可保持 20~30 年。

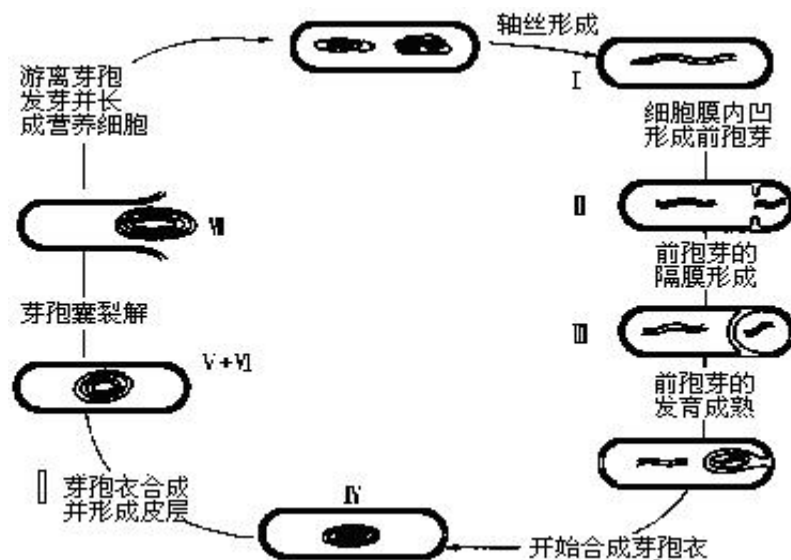


图 1-7 芽孢形成的 7 个阶段

细菌芽孢并不直接引起疾病,仅当发芽成为繁殖体后,才能迅速大量繁殖而致病。例如土壤中常有破伤风梭菌的芽孢,一旦外伤深部伤口被泥土污染,进入伤口的芽孢在适宜条件下即可发芽成繁殖体再产毒致病。

被芽孢污染的用具、敷料、手术器械等,用一般方法不易将其杀死。杀死芽孢最可靠的方法是高压蒸汽灭菌。当进行消毒灭菌时,应以芽孢是否被杀死作为判断灭菌效果的指标。

细菌芽孢抵抗力强的原因,可能与下列因素有关:①芽孢含水量少,约占繁殖体的 40%,蛋白质受热后不易变性;②芽孢具有多层致密的厚膜,理化因素不易透入,③芽孢的核心和皮质中含有一种特有的化学组分吡啶二羧酸(*dipicolinic acid*, DPA), DPA 与钙结合生成的盐能提高芽孢中各种酶的热稳定性。芽孢形成过程中很快合成 DPA,同时也获得耐热性,芽孢发芽时, DPA 从芽孢内渗出,其耐热性亦随之丧失。

(三) S 层 (S-layer) S 为 *surface* 之意,是某些细菌的一种特殊的表层结构,它完整地包裹菌体,由单一的蛋白质亚单位组成,规则排列,呈类晶格结构。以嗜水气单胞菌为例,其 S 层覆盖了 LPS,但菌毛可从晶格的孔隙中伸出。S 层是一种最简单的生物膜,其

功能除作为分子筛和离子通道外，还具有类似荚膜的保护屏障作用，能抗噬菌体、蛭弧菌及蛋白酶。新近还发现气单胞菌等的 S 层是一种黏附素，可介导细菌对宿主细胞的黏附以及内化 (internalization) 进入巨噬细胞等。许多致病菌或致病菌株具有 S 层结构，如气单胞菌、弯曲菌(Campylobacter)、拟杆菌(Bacteroides)、芽孢杆菌(Bacillus)、立克次体等。

(四) 鞭毛 (flagellum) 多数弧菌、螺菌、许多杆菌、个别球菌的菌体表面长有一至数十根弯曲的丝状物，称为鞭毛。鞭毛的直径约 5~20nm，长度比菌体长几倍，约 50~20μm。电镜能直接观察到细菌的鞭毛。细菌经特殊的鞭毛染色法，使染料沉积在鞭毛表面，增大其直径，在光学显微镜下也可看到。鞭毛具有运动功能，将细菌穿刺接种含 3%~0.4% 琼脂的半固体营养琼脂柱中，培养后观察，若在穿刺线周围混浊扩散，表明该菌有鞭毛，具有运动力；若穿刺线周围仍透明，不混浊，则表明该菌无鞭毛。

鞭毛的显微结构由基体、鞭毛钩和鞭毛丝三部分构成。革兰氏阴性和阳性菌的鞭毛的细微结构有些差异。

革兰氏阴性菌的基体(basal body)由鞭毛杆(rod)穿插于固定在细胞膜中的 S-M 环，内壁层肽聚糖中的 P 环和与外壁层 LPS 连接的 L 环构成。鞭毛钩(hook)位于菌体表，内侧与鞭毛杆连接，呈 90°钩状弯曲后，长出约 10~20μm 长的鞭毛丝(filament)伸出菌体外。革兰氏阳性菌的鞭毛结构较简单，基体仅由鞭毛杆穿插于 S-M 环构成。

鞭毛的成分是蛋白质，由鞭毛蛋白(flagellin)的亚单位组成，鞭毛蛋白与动物的肌动蛋白相似，具有收缩性。鞭毛具有抗原性，称为鞭毛抗原或 H 抗原，不同细菌的 H 抗原具有型特异性，常作为血清学鉴定的依据之一。

根据鞭毛的数量和在菌体上的排列可将细菌分为四类(图 1-8)：①单毛菌 (monotrichate)：只有一根鞭毛，位于菌体一端，如霍乱弧菌；②双毛菌(amphitrichate)：菌体两端各有一根鞭毛，如空肠弯曲菌；③丛毛菌(lophotrichate)：菌体一端或两端有一丛鞭毛，如铜绿假单胞菌；④周毛菌(peritrichate)：菌体周身遍布许多鞭毛，如伤寒沙门氏菌。细菌是否产生鞭毛，以及鞭毛的数目和排列方式，都具有种的特征，可作为鉴定细菌的依据之一。

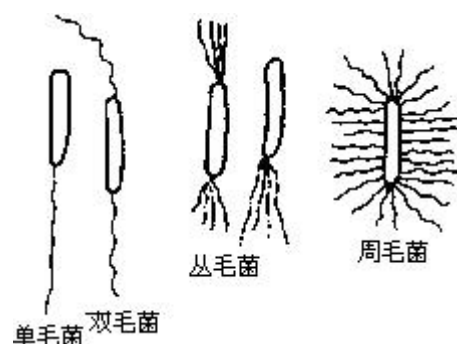


图 1-8 细菌鞭毛的类型

鞭毛是细菌的运动器官，鞭毛有规律的收缩，引起细菌运动；细菌细胞膜上有许多异信号的受体；细菌的运动具有趋向性。运动的方式与鞭毛的排列方式有关，单毛菌和丛毛菌一般呈直线迅速运动，周毛菌则无规律地缓慢运动或者滚动。细菌运动的速度也有差别，最快的是一端单毛菌，每秒钟可达 80nm 以上。在菌种衰老或处于不适宜的外界环境中(如过高或过低的温度，有害的化学药物等)，细菌运动不但缓滞或不能运动，甚至可以抑制细菌形成鞭毛。

鞭毛与细菌的致病性也有关系。霍乱弧菌等通过鞭毛运动可穿过小肠黏膜表面的黏液层，黏附于肠黏膜上皮细胞，进而产生毒素而致病。

(五) 菌毛 (pilus 复数, pili 或 fimbria, 复数 fimbriae) 大多数革兰氏阴性菌和少数革兰氏阳性菌的菌体上生长有一种较短的毛发状细丝，称为菌毛，又称纤毛或伞毛。比鞭毛数量多。菌毛的直径约 5~10nm，长度约 0.2~1.5μm，少数达 4μm，只能在电子显微镜下

才能看见。

菌毛是一种空心的蛋白质管(图 1-9)，由菌毛素(pilin)亚单位组成，每根菌毛的菌毛素多达 1000 多个。菌毛具有良好的抗原性。菌毛具有不同类型，分类系统比较复杂，普遍公认的主要有经典分类及 Ottow 分类两种，经典分类是将菌毛分为普通菌毛和性菌毛两类。前者较纤细和较短，数量较多，每个细菌有 50~400 条，周身排列；后者较粗、长，每个细菌一般不超过 4 条。

性菌毛(sex pilus) 是由质粒携带的致育因子(F 因子)编码产生的，故又称 F 菌毛。与细菌的接合 (conjugation) 有关。另外，性菌毛也是噬菌体吸附在细菌表面的受体。

根据 Ottow (1975) 提出的标准，可将菌毛分类 6 类，分别用阿拉伯(或大写罗马)字母表示。其中 2 型菌毛就是性菌毛。其余均为普通菌毛。在 6 种菌毛中，只有 1 型菌毛和 4 型的名称得到普遍采用。1 型菌毛能使菌体自凝，或能凝集某些种类的红细胞，但此种凝集能被甘露糖所抑制，即所谓甘露糖敏感性血凝(mannose sensitive haemagglutination, MSHA)。病原菌及动物原籍菌都可具有 1 型菌毛。

4 型菌毛具有黏附作用，能使细菌牢固地附着于动物消化道、呼吸道和泌尿生殖道的黏膜上皮细胞上，是公认的毒力因子。4 型菌毛有两种存在形式，一种为单个弯曲的。菌毛，另一种由数根菌毛相缠成束状，称束状菌毛(bundle forming pili, BFP)。已发现不同种类的细菌如大肠杆菌、嗜水气单胞菌、霍乱弧菌等的 BFP 具有一定同源性。

菌毛虽然具有重要的生理功能，但是并非细菌生命所必需。在体外培养的细菌，如条件不适宜，未必能产生能检测得到的菌毛。其亚单位蛋白的第一个氨基酸为 N 甲基丙氨酸。



图 1-9 菌毛亚单位的排列(上)及横切面(下)

第三节 细菌形态和结构的观察方法

人的眼睛只能看见 0.2mm 以上的物体，细菌仅有 0.2~20μm 大小，所以肉眼不能直接看到细菌，必须借助光学显微镜或电子显微镜将细菌放大后，才能观察到细菌的形态或结构。

(一) 普通光学显微镜观察法 普通光学显微镜(light microscope)以可见光(自然光或灯光)为光源，光波长 0.4~0.7μm，平均约 0.5μm，细菌经放大 100 倍的物镜和放大 10 倍的目镜联合放大 1 000 倍后，达到 0.2~2mm，肉眼便能看见。光学显微镜中有普通显微镜、相差显微镜、荧光显微镜等，分别适用于观察不同状态的细菌形态或结构，最常用的是明视野显微镜。

细菌细胞微小，无色半透明，经过染色后，在普通光学显微镜下才能清楚地观察到细菌的形态和结构。细菌的染色方法很多，有单染色法，如美蓝染色法；复染色法，又称鉴别染色法，例如革兰氏染色法，姬姆萨染色法和抗酸性染色法等。此外，还有荚膜、鞭毛、芽孢等特殊染色法。最常用最重要的是革兰氏染色法，这种方法由丹麦植物学家革兰

(Christian Gram)创建于 1884 年,以此法将所有细菌区分成革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌两大类,前者染成紫色,后者染成红色,在鉴别细菌和选择抗菌药物等方面具有重要意义,至今仍被广泛应用。

(二)电子显微镜观察法 电子显微镜(electron microscope, EM)简称电镜,是利用电子流代替可见光波,电磁圈代替放大透镜的放大装置。电子流波长极短,约 0.005nm,可放大数十万倍,能观察 1nm 的微粒。电镜包括透射电镜(transmissive electron microscope)和扫描电镜(scanning electron microscope)。细菌的超薄切片,经负染、冰冻蚀刻等处理后,在透射电镜中可清晰观察到细菌内部的超微结构。经金属喷涂的细菌标本,在扫描电镜中,则能清楚地显示细菌表面的立体形象。电镜观察的细菌标本必须干燥,并在高度真空的装置中接受电子流的作用,所以电镜不能观察活的细菌。

思考题

- 1.绘出细菌的基本结构模式图。
- 2.比较革兰氏阳性菌和阴性菌细胞壁的结构及化学组成的差异。
- 3.试述脂多糖及外膜蛋白的组成及功能。
- 4.什么是菌落?研究菌落有何意义?
- 5.什么是原生质体、球状体、细菌 L 型?
- 6.试述鞭毛的结构功能。
- 7.菌毛的本质、分类及功能如何?
- 8.叙述芽孢的结构、功能及对外界环境抵抗力强的原因。
- 9.什么是革兰氏染色?有何意义?其染色机制如何?
10. 细菌的特殊结构包括哪些? 哪些与细菌的致病力有关?

第二章 细菌的生理

细菌生理学是细菌学中的基础理论部分。它的研究对象是细菌的组成成分、营养要求、能量代谢、生物合成和生长繁殖等一系列理论知识。对于细菌生理学的研究，不但可从理论上分析细菌生命活动的基本规律，而且对生产实践也有其重要的意义。例如细菌的致病性和免疫机制、抗药性、人工培养、疫苗的制造、毒素与抗毒素的生产等方面，都与细菌生理学的研究有极密切的关系。

第一节 细菌的理化性状

(一)细菌的化学组成

细菌和其他生物细胞相似，含有多种化学成分，包括水、无机盐、蛋白质、糖类、脂质和核酸等。水分是细菌细胞重要的组成部分，占细胞总重量的 75%~90%。菌细胞去除水分后，主要为有机物，包括含碳、氢、氮、氧、磷和硫等的化合物。还有少数的无机离子，如钾、钠、铁、镁、钙、氯等，用以构成菌细胞的各种成分及维持酶的活性和跨膜化学梯度。细菌还含有一些原核细胞型微生物所特有的化学成分，如肽聚糖、胞壁酸、磷壁酸、D 型氨基酸、吡啶二羧酸等。这些物质在真核细胞中还未发现。

(二)细菌的物理性状

1. 光学性质 细菌为半透明体。当光线照射至细菌，部分被吸收，部分被折射，故细菌悬液呈混浊状态。菌数越多浊度越大，使用比浊法或分光光度计可以粗略地估计细菌的数量。由于细菌具有这种光学性质，可用相差显微镜观察其形态和结构。

2. 表面积 细菌体积微小，相对表面积大，有利于同外界进行物质交换。葡萄球菌直径约 $1\mu\text{m}$ ，则 1cm^3 体积细菌的总表面积可达 60000cm^2 ，直径为 1cm 的生物体，每 1cm^3 体积的表面积仅 6cm^2 ，两者相差 1 万倍。因此细菌的代谢旺盛，繁殖迅速。

3. 带电现象 细菌固体成分的 50%~80% 是蛋白质，蛋白质由碱性离子氨基酸组成。革氏阳性菌 pI 为 2~3，革兰氏阴性菌 pI 为 4~5，故在近中性或弱碱性环境中，细菌均带负电荷，尤其前者所带负电荷更多。细菌的带电现象与细菌的染色反应、凝集反应、抑菌和杀菌作用等都有密切关系。

4. 半透性 细菌的细胞壁和细胞膜都有半透性，允许水及部分小分子物质通过，有利于吸收营养和排出代谢产物。

5. 渗透压 细菌体内含有高浓度的营养物质和无机盐。一般革兰氏阳性菌胞内的渗透压高达 $(2.026\sim 2.533)\times 10^6\text{Pa}$ (20~25 个大气压)，革兰氏阴性菌为 $(5.065\sim 6.078)\times 10^6\text{Pa}$ (5~6 个大气压)。细菌所处的一般环境相对低渗，但因有坚韧的细胞壁的保护，细菌不致崩裂。若处于比胞内渗透压更高的环境中，菌体内水分逸出，胞质浓缩，细菌就不能生长繁殖。

第二节 细菌的营养与代谢过程

一、细菌的营养物质

对细菌进行人工培养时，必须供给其生长所必需的各种成分，一般包括水、碳源、氮源、无机盐和生长因子等。

1. 水 细菌所需营养物质必须先溶于水，营养物质的吸收与代谢均需有水才能进行。

2. 碳源 各种碳的无机或有机物都能被细菌吸收和利用, 以合成菌体组分和作为获得能量的主要来源。病原菌主要从糖类获得碳。

3. 氮源 细菌对氮源的需要量仅次于碳源, 其主要功能是作为菌体成分的原料。很多细菌可以利用有机氮化物, 病原性微生物主要从氨基酸、蛋白胨等有机氮化物中获得氮。少数病原菌如克雷伯菌亦可利用硝酸盐甚至氮气, 但利用率较低。

4. 无机盐 细菌需要各种无机盐以提供细菌生长的各种元素, 其需要浓度在 $10^{-3} \sim 10^{-4} \text{mol/L}$ 的元素为常用元素, 如磷、硫、钾、钠、镁、钙、铁等; 其需要浓度在 $10^{-6} \sim 10^{-8} \text{mol/L}$ 的元素为微量元素, 如钴、锌、锰、铜、钼等。

各类无机盐的功用如下: ①构成有机化合物, 成为菌体的成分; ②作为酶的组成部分, 维持酶的活性; ③参与能量的储存和转运; ④调节菌体内外的渗透压; ⑤某些无机盐与细菌的生长繁殖和致病作用密切相关。

5. 生长因子 大部分细菌在用上述各种营养物质配合的培养基中, 都能生长繁殖。但有些细菌仍不能生长, 还必须加入一些其他物质。这些能促进细菌生长的物质, 称为生长因子 (growth factor)。细菌对生长因子要求的量很少, 它既不是碳源和氮源, 也不能作为能源使用。它在细菌代谢过程中, 是一种不被分解的有机物, 包括维生素、某些氨基酸、嘌呤、嘧啶等。主要起辅酶或辅基的作用。

二、细菌的营养类型

各类细菌的酶系统不同, 代谢活性各异, 因而对营养物质的需要也不同。根据细菌所利用的能源和碳源不同, 将细菌分为两大营养类型。

1. 自养菌(autotroph) 该类细菌以简单的无机物为原料, 如利用 CO_2 、 CO_3^{2-} 作为碳源, 利用 N_2 、 NH_3 、 NO_2^- 、 NO_3^- 等作为氮源, 合成菌体成分。这类细菌所需能量来自无机物的氧化, 称为化能自养菌(chemotroph), 或通过光合作用获得能量称为光能自养菌(phototroph)。

2. 异养菌(heterotroph) 该类细菌必须以多种有机物为原料, 如蛋白质、糖类等, 才能合成菌体成分并获得能量。异养菌包括腐生菌(saprophyte)和寄生菌(parasite)。腐生菌以动植物尸体、腐败食物等作为营养物; 寄生菌寄生于活体内, 从宿主的有机物中获得营养。所有的病原菌都是异养菌, 大部分属寄生菌。

三、细菌细胞的代谢过程

细菌与其他生物一样, 有独立的生命活动, 涉及复杂的新陈代谢。对细菌的新陈代谢的了解主要是从大肠杆菌的研究获得的。细菌与动物真核生物新陈代谢的主要区别有如下几点:

第一, 细菌生长和繁殖速度极快, 超过动物细胞 10~100 倍。

第二, 细菌利用各种化合物作为能源的能力远远强于动物细胞。

第三, 细菌对营养的需求比动物细胞更为多种多样, 因为它们有多种代谢旁路。

第四, 细菌可利用超常流水线式生产的方式合成大分子物质。

第五, 细菌能产生诸如肽聚糖、脂多糖、磷壁酸等特殊物质。

细菌的新陈代谢包括细菌细胞的生物合成、能量供给、运动以及多达 2000 种化学反应表现的各种活性。形成细菌细胞的代谢过程可按其功能分为物质摄取、生物合成、聚合作用及组装四个步骤。

(一) 物质摄取(fueling)

细菌的物质吸收过程涉及细胞的能量提供及十余种前体代谢物质。物质吸收的第一步是从周围环境获得营养。革兰氏阳性或阴性菌的细胞膜是一层双脂膜，具有高度的选择通透性，革兰氏阴性菌的 OMP 等在物质吸收过程中也发挥重要作用。物质主要通过单纯扩散、促进扩散、主动输送及基团转位等方式进出细菌细胞。

1. 单纯扩散(simple diffusion)亦称被动扩散，是细胞内外物质最简单的一种交换方式。细胞膜两侧的物质靠浓度差(浓度梯度)进行分子扩散，不需要能量。某些气体(O₂、CO₂)、水、乙醇及甘油等水溶性小分子以及某些离子(Na⁺)等可进行单纯扩散。此种方式无特异性或选择性，速度较慢，细胞内外溶质浓度一旦达到平衡，扩散便停止，因此不是物质运输的主要方式。

2. 促进扩散(facilitated diffusion)某些物质如糖或氨基酸与某些位于细胞膜的特异性的载体蛋白(carrier protein)相结合，而后将其转运至细胞内，这一过程具有特异性和选择性，也不需要能量。甘油进入大肠杆菌等肠道菌的细胞内，厌氧菌吸收营养物质及排出代谢产物，均是通过这一方式。载体蛋白在革兰氏阴性菌属于 OMP，可能是通过构象改变而完成促进扩散的。

3. 主动输送 (active transport) 是细菌吸收营养物质的一种主要方式，与促进扩散一样，需要特异性的载体蛋白，能将特异性溶质逆浓度梯度“泵”入细胞，因此需要能量。

革兰氏阴性菌有两种主动输送的方式：休克敏感式(shock-sensitive)及休克不敏感式(shock-insensitive)。在作渗透休克处理时，前者载体蛋白释放出所结合的可溶性分子如半乳糖，通过细菌外膜的微孔进入细胞，该过程伴随 ATP 的水解。休克不敏感伴随 H⁺的跨膜，其能量由获能的细胞膜的电子运输而获得，有特异性载体蛋白(透性酶)参与，乳糖的输送即用此方式。

4. 基团转位(group translocation) 物质在运输的同时受到化学修饰，从而能源源不断输入细胞，此种方式在缺氧环境中最为常见。其过程涉及从可溶物向分子的化学变化，需要特异性载体蛋白参与，需要能量。有磷酸转移酶系统 (phosphotransferase system) 参与的葡萄糖磷酸化是个例证。

(二) 生物合成 (biosynthesis)

吸收的各种前体代谢物通过代谢途径的网络，合成多种氨基酸、核苷酸、糖、脂肪酸及其合成大分子所需物质。在此过程中还需要碳的前体、还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐(NADPH)、ATP、氨基氮以及硫。上述物质的合成与其他生物相似，但因细菌不能自身合成，必须从环境中获得，不同种类细菌对营养的需要有所不同，又有其不同的合成途径，据此可作为细菌实验室诊断的重要指标。

极少数的细菌生物合成环节可被药物影响，例如磺胺类药物干扰了细菌所需的叶酸的生物合成，因此被广泛用作抑菌药。

(三) 聚合作用(polymerization)

细菌 DNA 的聚合作用称为复制。从大肠杆菌得知，其 DNA 复制从基因组的特定起始部位开始，而后沿环状的染色体 DNA 的复制叉(replication fork)部位，从 5' 端到 3' 端双向进行。复制的方式是半保留(semiconservative)复制，其 DNA 双链解离，其中一条链作为母板合成互补链。另一条链则沿相反方向复制，最后由酶连接成完整 DNA 链。细菌 DNA 复制的频率因细菌细胞的生长率而异，DNA 链的延伸率(elongation rate)则相对稳定。

某些抗生素以不同途径干扰细菌 DNA 的复制，例如新生霉素等抑制细菌 DNA 复制过

程中所需的促旋酶的活性。

1. 转录 细菌的转录在某些方面与真核生物不同，特点之一是，细菌由同一个 RNA 聚合酶、催化合成细菌的 mRNA、tRNA 及 rRNA。该酶还可像真核生物那样利用活化的 ATP、GTP、CTP 及 UTP，并可作为模板合成 DNA 互补链。

细菌转录的另一个特点是，细菌 mRNA 不需要通过核膜转运到胞浆，因此不需要聚 A 帽状结构，也不要特异的转运方式，而且在 mRNA 合成早期直接与核糖体蛋白结合形成多聚体。

RNA 聚合酶是一个复杂的大分子，由 α_2 、 β 、 β_1 、 σ 亚单位组成。 σ 亚单位可与特异的 DNA 序列即启动子(promoter)结合。细菌 RNA 聚合酶一般具有一个以上的 σ 亚单位，可识别不同的启动子，从而激活相关的基因，完成芽孢形成、氮获得、热休克反应及适应非生长条件等。细菌 RNA 聚合酶是利福平类药物的靶分子，后者阻断了转录的起始。

像真核细胞一样，大分子的前体被核酸酶等加工、修饰，而后产生稳定的 RNA 分子如 tRNA、rRNA 等。

2. 翻译 是蛋白质合成过程。20 种氨基酸激活后与相应的 tRNA 结合，形成的氨基酰-tRNA 通过某些可溶性蛋白从核糖体上脱落，并进入下一轮氨基酰循环。

以上过程在原核细胞和真核细胞基本一致，但存在一些差别。细菌核糖体较小，结构也较简单。细菌的 mRNA 不需要经过加工和转运，为大的顺反子，包含多个基因，可指导多个多肽链的合成。细菌 RNA 聚合酶合成 mRNA 的速率为 55 核苷酸 / s(37℃)，核糖体合成多肽链的速率为 18 氨基酸 / s。因此细菌中 mRNA 的翻译与 DNA 的转录不仅同时进行，而且两者速率也相等(55 核苷酸 / 每个密码子 3 个核苷酸 / s=18 氨基酸 / 3)，这意味着核糖体在 mRNA 链上移动速率与 RNA 聚合酶合成 mRNA 的速率相等。

细菌的上述翻译特性决定了细菌高效合成过程。细菌胞质内充满多聚核糖体。每个核糖体几乎都最大限度地发挥作用。细菌生长越快，需要合成蛋白质用的核糖体就越多。在丰富培养基上生长的大肠杆菌，一半以上菌体由核糖体和其他翻译组分构成。

多种抗生素以细菌翻译过程有抑制作用，氯霉素、林可霉素和红霉素等抑制核糖体大亚基，四环素、链霉素和壮观霉素等抑制小亚基，还有一些作用于核糖体链(fusidic acid)等可溶性蛋白因子，后者参与多肽的合成。

除 DNA 以外，细菌其他重要组分的聚合作用可举肽聚糖为例。肽聚糖的生物合成过程复杂，在细菌细胞不同部位经历三个阶段。

第一阶段在细胞质内，合成 N 乙酰胞壁酸五肽需要尿苷二磷酸(UDP)作为载体。合成过程可被环丝氨酸阻断。

第二阶段在细胞膜上，由 N 乙酰胞壁酸五肽与 N 乙酰葡萄糖胺形成双糖肽亚单位，或称肽聚糖前体，需要一种脂质体载体细菌萜醇 (bactoprenol) 参与。合成过程可被万古霉素或杆菌肽阻断。

第三阶段在细胞膜外，双糖肽亚单位以末端为生长点，大量亚单位聚合交联形成肽聚糖。这一过程需要若干酶如青霉素结合蛋白(PBPs)参与。青霉素能与这些酶竞争性结合，从而影响双糖肽的交联，造成菌体细胞壁缺损，从而显现抑菌作用。

(四) 组装 (assembly)

细菌细胞结构的组装有两种方式：自我组装(self-assembly，又名自我凝聚)及指导组装(guided assembly，又名特异机制)。自我组装可在体外试管内完成，鞭毛及核糖体即采用此

种方式。细菌表面膜结构则只能依赖指导组装来完成，过程尚不完全清楚，涉及蛋白质的分泌，跨膜运输及载体分子如细菌萜醇等。

杆菌肽或万古霉素可干扰细菌细胞成分组装所需的载体的功能，多黏菌素可影响细胞膜的组装。

第三节 细菌的新陈代谢产物

细菌不能直接利用较复杂的大分子的多糖和蛋白质，而是通过胞外酶的作用把多糖水解成单糖，将蛋白质分解成氨基酸及其他简单物质进行吸收利用。上述物质被细菌吸收到菌体后，再按其本身的需要可直接被利用，或者进一步分解后而利用，这一过程称为分解代谢。将吸收入菌体的简单物质，通过胞内酶的作用合成为新的糖类、蛋白质等，构成菌体细胞的成分或作为贮藏的营养，这一过程为合成代谢。分解代谢与合成代谢并不是截然分开的，而是互相交错、互相依存的。细菌就是通过细胞膜的渗透作用，进行菌体与环境中的营养物质交换，完成其生命活动。

细菌在其物质代谢过程中，除利用各种营养物质合成菌体和产生能量外，还可产生出多种代谢产物，其中有的对人和动物是有害的，有的可供鉴别细菌之用，有的可供制药之用。

(一)分解产物

1. 糖分解产物 细菌分解糖类后，可以产生有机酸(主要为乳酸、醋酸、丙酮酸、酪酸等)、气体(主要为 CO_2 、 H_2 和沼气等)和醇类。

2. 蛋白分解产物 细菌应用各种蛋白酶分解蛋白质，其最后产物包括有机酸，胺类、胨基质、硫化氢、硫醇、 CO_2 和氢等。

上述各种产物中，分解糖类产生的酸和气体以及分解蛋白质产生的硫化氢、胨基质等，因细菌种类而有区别。据此特点，可利用生物化学方法来鉴别细菌。常见的细菌生化反应试验有氧化酶试验、触酶试验、氧化发酵(O / F)试验、VP 试验及甲基红试验等。可采用微量法和常量法。目前一般多用商品化的微量生化试剂检测试剂盒。

(1)氧化酶试验(oxidase test) 氧化酶又名细胞色素氧化酶、细胞色素氧化酶 C 或呼吸酶。试验用于检测细菌是否有该酶存在。原理是氧化酶在有分子氧或细胞色素 C 存在时，可氧化四甲基对苯撑二胺(tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride)出现紫色反应。假单胞菌属(*Pseudomonas*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)等阳性，肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)阴性，可区别。

(2)触酶试验(catalase test) 触酶又名接触酶或过氧化氢酶，滴加过氧化氢能被催化分解为水和氧。乳杆菌(*Lactobacillus*)及许多厌氧菌为阴性。

(3)氧化发酵(O / F)试验(oxidation-fermentation test) 不同细菌对不同糖的分解能力及代谢产物不同，有的能产酸并产气，有的则不能。而且这种分解能力因是否有氧的存在而异，在有氧条件下称为氧化，无氧条件下称为发酵。试验时往往将同一细菌接种相同的糖培养基一式两管，一管用液体石蜡等封口，进行“发酵”，另一管置有氧条件，培养后观察产酸产气情况。O / F 试验一般多用葡萄糖进行。

目前“糖发酵”一词已泛指有氧及厌氧状况下细菌对糖的分解反应，如不加特别说明的，均是有氧状况。

(4)VP 试验(VP test) 由 Voges 和 Proskauer 两学者创建，故名。大肠杆菌和产气肠杆

菌(*Enterobacter aerogens*)均能发酵葡萄糖,产酸产气,两者不能区别。但产气杆菌能使丙酮酸脱羧,生成中性的乙酰甲基甲醇(aecetylmethyl-carbinol),后者在碱性溶液中被空气中分子氧所氧化,生成二乙酰(diacetyl)与培养基中含胍基(guanidine group)的化合物发生反应,生成红色化合物,是为阳性。大肠杆菌不能生成乙酰甲基甲醇,故为阴性。

(5)甲基红试验(methyl red test) 在VP试验中,产气杆菌分解葡萄糖,产生的2分子酸性的丙酮酸转变为1分子中性的乙酰甲基甲醇,故最终的酸类较少,培养液 $\text{pH} > 5.4$;以甲基红(MR)作指示剂时,溶液呈橘黄色,是为阴性。大肠杆菌分解葡萄糖时,丙酮酸不转变为乙酰甲基甲醇,故培养液酸性较强, $\text{pH} \leq 4.5$,甲基红指示剂呈红色,则为阳性。

(6)枸橼酸盐利用试验(citrate utilization test) 某些细菌(如产气肠杆菌)能利用枸橼酸盐作为唯一的碳源,能在除枸橼酸盐外不含其他碳源的培养基上生长。分解枸橼酸盐生成碳酸盐,并分解其中的铵盐生成氨,使培养基由酸性变为碱性,从而培养基中的指示剂溴麝香草酚蓝(BTB)由淡绿色转为深蓝色,是为阳性。大肠杆菌不能利用枸橼酸盐为唯一碳源,在该培养基上不能生长,培养基颜色不改变,是为阴性。

(7)吲哚试验(indole test) 有些细菌如大肠杆菌、变形杆菌(*Proteus*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)等能分解培养基中的色氨酸生成吲哚。如在培养基中加入对二甲基氨基苯甲醛,则与吲哚结合生成红色的玫瑰吲哚(rosindole),是为阳性。

(8)硫化氢试验(H_2S test) 有些细菌如变形杆菌等能分解胱氨酸、甲硫氨酸等含硫氨基酸,生成硫化氢。若遇醋酸铅或硫酸亚铁,则生成黑色的硫化铅或硫化亚铁。

(9)脲酶试验(urease test) 脲酶又名尿素酶。变形杆菌有脲酶,能分解培养基中的尿素生产氨,使培养基的碱性增加,可用酚红指示剂检出,是为阳性。沙门氏菌无脲酶,培养基颜色不改变,则为阴性。

细菌的生化反应主要用途是鉴别细菌,对革兰氏染色反应和菌体及菌落形态相同或相似的细菌尤为必要。其中吲哚(I)、甲基红(M)、VP(Vi)、枸橼酸盐利用(C)四种试验常用于鉴定肠道杆菌,合称为IMViC试验。例如大肠杆菌对这四种试验的结果是++-- ,而产气肠杆菌则为--++。

(二)合成产物

这里所指的合成产物,是指菌体成分以外的其他合成物质。

1. 毒素 病原性细菌可以合成各种有毒物质,称为毒素。毒素和细菌的致病作用有直接关系,它又分为外毒素和内毒素两种。外毒素是蛋白质,内毒素则是糖、磷脂和蛋白质的复合物。

2. 酶 细菌除合成其新陈代谢所必需的酶以外,还合成以下几种酶,这些酶在代谢过程中的作用尚不明了,但和细菌的致病性有一定关系:

(1)卵磷脂酶:此酶能分解细胞壁的卵磷脂,使细胞坏死或红细胞溶解,魏氏梭菌和水肿梭菌等含有此酶。

(2)胶原酶:此酶分解肌纤维的网状组织,使肌纤维发生崩解。杀鲑气单胞菌等含此酶。

(S)透明质酸酶:此酶分解组织细胞间结合物质(结缔组织)的透明质酸,因而可增加组织渗透性,便于细菌和毒素的扩散。

(4)凝血酶:能使人、兔及马的血浆凝固。葡萄球菌中的金黄色葡萄球菌含有此酶,但白色和柠檬色葡萄球菌则不含此酶。人们通常将此酶视为葡萄球菌具有毒力的指标之一。

(5)溶纤维蛋白酶：使血清中的溶血浆素原活化，变为溶血浆素，因而使已经凝固的血浆或血块发生溶解。新分离的溶血性链球菌和葡萄球菌等含有此酶。

(6)溶血素：某些细菌可产生一种能溶解动物红细胞的溶血毒素。溶血素也是一种酶类物质。嗜水气单胞菌、杀鲑气单胞菌和鳗弧菌等可产生溶血素。

另外，有的细菌还能合成明胶溶解酶和凝乳酶，可引起明胶液化和牛乳凝固现象。这些现象往往可以作为鉴定细菌的参考指标。

3. 抗生素 许多细菌、放线菌、真菌可以合成、抑制或杀灭其他微生物或肿瘤细胞的物质，称为抗生素。例如青霉菌产生的青霉素、灰色链丝菌产生的链霉素、委内瑞拉链丝菌产生的氯霉素和金色链丝菌产生的金霉素等。

4. 维生素 某些细菌和酵母有合成维生素的能力。一般认为大肠杆菌所合成的维生素是动物所需维生素的重要来源。

5. 热原质 许多细菌，特别是革兰氏阴性菌，能在水中发育产生一种使人或动物发生热反应的多糖物质，称为热原质。这种物质很耐热，甚至高压蒸汽灭菌 15~20min 也不能将它破坏，但可被活性炭吸附或石棉板滤除。因此普通蒸馏水若在蒸馏后保存不当，革可能含有热原质，若注射到动物或人体内，能引起发热反应。在制造化学注射药液或生物制品时，需要保证没有热原质存在。

6. 色素 某些细菌在适宜的条件下能产生色素。其中有些溶于水，可使菌落及培养基着色。如杀鲑气单胞菌的褐色素。有些不溶于水，但溶于酒精。故只能使菌落本身着色，例如葡萄球菌、八联球菌的色素。色素对于细菌的鉴别有一定价值，例如葡萄球菌的分型，其所产生的色素是分型的依据之一。

第四节 细菌的生长繁殖

(一)影响细菌生长的环境因素

营养物质、能量和适宜的环境是细菌生长繁殖的必备条件。

1. 营养物质 充足的营养物质可以为细菌的新陈代谢及生长繁殖提供必要的原料和能量。

2. 氢离子浓度(pH) 每种细菌都有一个可生长的 pH 范围，以及最适生长 pH 范围。大多数嗜中性细菌生长的 pH 范围是 6.0~8.0，嗜酸性细菌最适生长 pH 低至 3.0，嗜碱性细菌最适生长 pH 可高达 10.5，多数病原菌最适 pH 为 7.2~7.6，在宿主体内极易生存。细菌依靠细胞膜上的质子转运系统调节菌体内的 pH，使其保持稳定。质子转运系统包括 ATP 驱使的质子泵， Na^+ / H^+ 和 K^+ / H^+ 交换系统。

3. 温度 各类细菌对温度的要求不一样，借此可将细菌分为 3 种类型：嗜冷菌(psychrophile)，其生长温度范围为-5~30℃，最适生长范围为 10~20℃，嗜温菌(mesophile)生长温度范围为 10~50℃，最适生长范围为 20~40℃；嗜热菌(thermophile)，生长温度范围为 25~95℃，最适生长范围为 50~60℃。人的病原菌在长期进化过程中适应人体环境，均为嗜温菌，最适生长温度为人的体温，即 37℃。当细菌突然暴露于高出适宜生长温度的环境时，可暂时合成热休克蛋白(heat-shock proteins)。这种蛋白质对热有抵抗性，并可稳定菌体内热敏感的蛋白质。

4. 气体 根据细菌代谢对分子氧的需要与否，可以将细菌分为 5 类(图 2-1)

(1)需氧型：环境中需要有氧气存在才能生长繁殖，大多数细菌都属于此类。在需氧菌

中有一些细菌对氧的要求特别严格，只能在有充分的氧气存在的条件下才能生长，这些细菌称为专性需氧菌，如鱼害黏球菌、柱状屈挠杆菌等。

(2)微需氧型：呼吸时需要低浓度的氧气，在振荡培养时，生长于试管培养基表面下数毫米处，如假单孢菌属中的某些种。

(3)兼性厌氧型：在有氧和无氧的环境中都能生长的细菌称为兼性厌氧型细菌，如鳃弧菌、嗜水气单胞菌、迟钝爱德华氏菌等。

(4)厌氧型：对厌氧条件要求不十分苛刻，在振荡培养时，于培养基的中部也有不同程度的生长，如破伤风梭菌。

(5)专性厌氧型：只有在无氧条件下才能生长的细菌，称为专性厌氧菌。在振荡培养时，这类细菌生长于试管培养基的底部。这类细菌对于无氧环境的要求特别严格，有一些氧分子存在就不能生长，如梭状芽孢杆菌等。

5. 渗透压 一般培养基的盐浓度和渗透压对大多数细菌是安全的，少数细菌如嗜盐菌(*Halophilic bacterium*)需要在高浓度(3%)的 NaCl 环境中才生长良好。

(二)细菌的生长繁殖

细菌的生长繁殖表现为细菌的组分和数量的增加。

1. 细菌个体的生长繁殖 细菌一般以简单的二分裂方式(binary fission)进行无性繁殖。在适宜条件下，多数细菌繁殖速度很快。细菌分裂数量倍增所需要的时间称为代时(generation time)，多数细菌为 20~30min。个别细菌繁殖速度较慢。

细菌分裂时细胞首先增大，染色体复制。革兰氏阳性菌的染色体与间体相连，当染色体复制时，间体一分二，各向两端移动，分别将复制好的一条染色体拉向细胞的一侧。接着染色体中部的细胞膜向内凹陷，形成横隔。同时细胞壁亦向内生长，最后肽聚糖水解酶使细胞壁的肽聚糖共价键断裂，分裂成为两个菌细胞。革兰氏阴性菌无间体，染色体直接连在细胞壁上。复制产生的新染色体则附着在邻近的一点上，在两点间形成的新细胞膜将各自的染色体分隔在两侧，最后细胞壁沿横隔内陷，整个细胞分裂成两个子代细胞。

2. 细菌群体的生长繁殖 细菌生长速度很快，一般细菌约 20min 分裂一次。若按此速度计算，一个细胞经 7h 可繁殖到约 200 万个，10h 后可达 10 亿个以上，细菌群体将庞大到难以想像的程度。但事实上由于细菌繁殖中营养物质的逐渐耗竭，有害代谢产物的逐渐积累，细菌不可能始终保持高速度的无限繁殖。经过一段时间后，细菌繁殖速度渐减，死亡菌数增多，活菌增长率随之下降并趋于停滞。

3. 细菌的生长曲线 将一定数量的细菌接种于适宜的液体培养基中，连续定时取样检查活菌数，可发现其生长过程的规律性。以培养时间为横坐标，培养物中活菌数的对数纵坐标，可绘制出一条生长曲线(growth curve)。根据生长曲线，细菌的群体生长繁殖可分为 4 期(图 2-2)：

(1)迟缓期(lag phase)：细菌进入新环境后的短暂适应阶段。该期菌体增大，代谢活跃，为细菌的分裂繁殖合成并积累充足的酶、辅酶和中间代谢产物。但分裂迟缓，繁殖极少。迟缓期长短不一，按菌种、接种菌的菌龄和菌量，以及营养物等不同而异，一般为 1~4h。

(2)对数期(logarithmic phase)：又称指数期(exponential phase)。细菌在该期生长迅速，

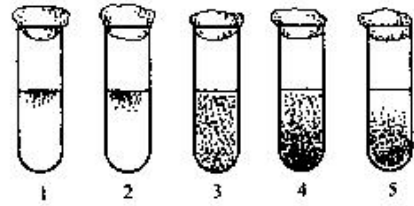


图 2-1 细菌的呼吸类型

1.需氧型 2.微需氧型 3.兼性厌氧型
4.厌氧型 5.专性厌氧型

活菌数以恒定的几何级数增长，生长曲线图上细菌数的对数呈直线上升，达到顶峰状态。此期细菌的形态、染色性、生理活性等都较典型，对外界环境因素的作用敏感。因此，研究细菌的生物学性状(形态染色、生化反应、药物敏感试验等)应选用该期的细菌。一般细菌对数期在培养后的 8~18h。

(3)稳定期(stationary phase): 由于培养基中营养物质的消耗，有害代谢产物的积聚，该期细菌繁殖速度渐减，死亡数逐渐增加，细菌形态，染色性和生理性状常有改变。一些细菌的芽孢、外毒素和抗生素等代谢产物大多在稳定期产生。

(4)衰亡期(decline phase): 稳定期后细菌繁殖越来越慢，死亡数越来越多，并超过活菌数。该期细菌形态显著改变，出现衰退型或菌体自溶，难以辨认，生理代谢活动也趋于停滞。因此，陈旧培养的细菌难以鉴定。

细菌生长曲线只有在体外人工培养的条件下才能观察到。在自然界或人类、动物体内繁殖时，受多种环境因素和机体免疫因素等多方面的影响，不可能出现在培养基中的那种典型的生长曲线。

细菌的生长曲线在研究工作和生产实践中都具有指导意义。掌握细菌生长规律，可以人为地改变培养条件，调整细菌的生长繁殖阶段，更为有效地利用对人类有益的细菌。例如在培养过程中，不断地更新培养液和对需氧菌进行通气，使细菌长时间地处于生长旺盛的对数期，这种培养称为连续培养。

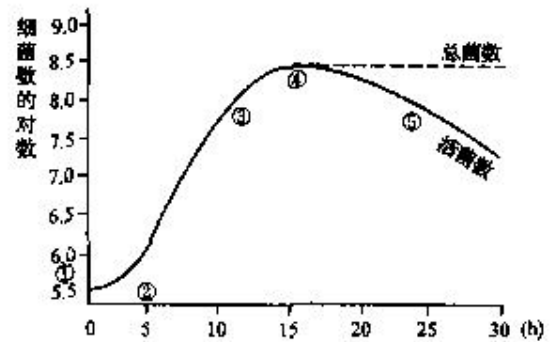


图 2-2 细菌的生长曲线

①~②迟缓期 ②~③对数期
③~④稳定期 ④~⑤衰亡期

第五节 细菌的人工培养

用人工方法，提供细菌在动物体内生长繁殖需要的基本条件，达到培养细菌，进行鉴定及进一步利用的目的。因此细菌的人工培养技术是微生物学研究和实践的十分重要的手段。通过了解细菌的生理需要，掌握细菌生长繁殖的规律，从而可用人工方法提供细菌所需要的条件来培养细菌。人工培养细菌，除需提供充足的营养物质外，尚需有合适的酸碱度、适宜的温度及必要的气体环境。

(一)培养细菌的方法

人工培养细菌，除需要提供充足的营养物质使细菌获得生长繁殖所需要的原料和能量外，还要有适宜的环境条件，如酸碱度、渗透压、温度和必要的气体等。

根据不同标本及不同培养目的，可选用不同的接种和培养方法。常用的有细菌的分离培养和纯培养两种方法。已接种标本或细菌的培养基应置于合适的气体环境中，需氧菌和厌氧菌置于空气中即可，专性厌氧菌需在无游离氧的环境中培养。多数的细菌在代谢过程中需要 CO_2 ，但分解糖类时产生的 CO_2 已足够其所需，且空气中还有微量 CO_2 ，所以不必额外补充。只有少数细菌如布氏杆菌，初次分离培养时必须在 5%~10% CO_2 环境中才能生长。

病原菌的人工培养温度一般采用 35~37℃，培养时间多数为 18~24h，但有时需根据

菌种及培养目的做最佳选择，如细菌的药物敏感试验则应选用对数期的培养物。

(二) 培养基

培养基(culture medium)是用人工方法配制而成的，专供微生物生长繁殖的混合营养物制品。培养基的 pH 一般为 7.2~7.6，少数的细菌按生长要求调整 pH 使其偏酸或偏碱。许多细菌在代谢过程中分解糖类产酸，故常在培养基中加入缓冲剂，以保持稳定的 pH。培养基制成后必须经灭菌处理。

培养基按其营养组成和用途不同，分为以下几类：

1. 基础培养基(basic medium) 含有多数细菌生长繁殖所需的基本营养成分。它是配制特殊培养基的基础，也可作为一般培养基使用。如营养肉汤(nutrient broth)、营养琼脂(nutrient agar)、蛋白胨水等。

2. 增菌培养基 若了解某种细菌的特殊营养要求，可配制出适合这种细菌而不适合其他细菌生长的增菌培养基(enrichment medium)。包括通用增菌培养基和专用增菌培养基，前者为基础培养基中添加合适的生长因子或微量元素等，以促使某些特殊细菌生长繁殖。例如链球菌、杀鱼巴氏杆菌等需在含血液或血清的培养基中生长。后者又称为选择性增菌培养基，即除固有的营养成分外，再添加特殊抑制剂，有利于目的菌的生长繁殖，而抑制其他细菌生长，如碱性蛋白胨水用于霍乱弧菌的增菌培养。

3. 选择培养基 在培养基中加入某种化学物质，使之抑制某些细菌生长，而有利于另一些细菌生长，从而将后者分离出来，这种培养基称为选择培养基(selective medium)。例如培养肠道致病菌的 SS 琼脂，其中的胆盐能抑制革兰氏阳性菌，枸橼酸钠和煌绿能抑制大肠杆菌，因而使致病的沙门氏菌和志贺氏菌容易分离到。若在培养基中加入抗生素，也可起到选择作用。实际上有些选择培养基、增菌培养基之间的界限并不十分严格。

4. 鉴别培养基 用于培养和区分不同细菌种类的培养基称为鉴别培养基(differential medium)。利用各种细菌分解糖类和蛋白质的能力及其代谢产物不同，在培养基中加入特定的作用底物和指示剂，一般不加抑菌剂，观察细菌在其中生长后对底物的作用如何，从而鉴别细菌。如常用的有糖发酵管、三糖铁培养基、伊红-美蓝琼脂等。

5. 厌氧培养基 专供厌氧菌的分离、培养和鉴别用的培养基，称为厌氧培养基(anaerobic medium)。这种培养基营养成分丰富，含有特殊生长因子、氧化还原电势低，并加入美蓝作为氧化还原指示剂。其中心、脑浸液和肝块、肉渣含有不饱和脂肪酸，能吸收培养基中的氧，硫乙醇酸盐和半胱氨酸是较强的还原剂，维生素 K₁、氯化血红素可以促进某些类杆菌的生长，常用的有庖肉培养基(cooked meat medium)、硫乙醇酸盐肉汤等，并在液体培养基表面加入凡士林或液体石蜡以隔绝空气。

此外，还可根据对培养基成分了解的程度将其分为两大类：化学成分确定的培养基(defined medium)，又称为合成培养基(synthetic medium)，化学成分不确定的培养基(undefined medium)，又称天然培养基(complex medium)。也可根据培养基的物理状态的不同分为液体培养基、固体培养基和半固体培养基 3 大类。在液体培养基中加入 1.5%~2.5% 的琼脂粉，即凝固成固体培养基；琼脂粉含量在 0.3%~0.5% 时，则为半固体培养基。琼脂在培养基中起赋形剂作用，对病原菌不具营养意义。液体培养基可用于大量繁殖细菌，但必须接种纯种细菌；固体培养基常用于细菌的分离和纯化；半固体培养基则用于观察细菌的动力和短期保存细菌。

(三) 细菌在培养基中的生长情况

1. 在液体培养基中的生长情况 大多数细菌在液体培养基生长繁殖后呈现均匀混浊状态；少数链状的细菌是呈沉淀生长；枯草芽孢杆菌、结核分枝杆菌等专性需氧菌呈表在生长，常形成菌膜。

2. 在固体培养基中的生长情况 将标本或培养物划线接种在固体培养基的表面，因划线的分散作用，使许多原来混杂的细菌在固体培养基表面上散开，称为分离培养。一般经过 18~24h 培养后，单个细菌分裂繁殖成一个肉眼可见的细菌集团，称为菌落(colony)。挑取一个菌落，移种到另一培养基中，生长出来的细菌均为纯种，称为纯培养(pureculture)。这是检查鉴定细菌很重要的一步。各种细菌在固体培养基上形成的菌落，其大小、形状、颜色、气味、透明度、表面光滑或粗糙、湿润或干燥、边缘整齐与否，以及在血琼脂平板上的溶血情况等方面均有不同表现，这些有助于识别和鉴定细菌。此外，取一定量的液体标本或培养液均匀接种于琼脂平板上，可计数菌落，推算标本中的活菌数。这种菌落计数法常用于检测自来水、饮料、污水和样本的活菌含量。

3. 在半固体培养基中的生长情况 半固体培养基黏度低，有鞭毛的细菌在其中仍可自由游动，沿穿刺线呈羽毛状或云雾状混浊生长。无鞭毛细菌只能沿穿刺线呈明显的线状生长。

第六节 细菌生存的调节

细菌的生存有赖于本身的调节机制，在应激环境中的调节以及趋化性是两个较典型的例子。

(一) 细胞应激调节因子(cell stress regulons)

1.SOS 系统 大肠杆菌在恶劣环境下之所以能生存，是因为具有相关的调控机制。SOS 系统是其中之一，当细胞 DNA 发生损伤时，SOS 系统的 17 个基因就会开放。这些基因的表达产物与 DNA 损伤修复的过程有关，并且能阻止细胞在修复过程中分裂。

2.热休克反应(heat-shock response) 是另一个重要的细菌应激调节。在一定的温度下或在乙醇等化学物质的存在时，与反应有关的 20 个基因被激活。大肠杆菌的热休克调节蛋白是一种 RNA 聚合酶，它由热休克基因的特殊启动子区域编码，其中的一个特殊亚基 σ -32 取代了正常的亚基 σ -70。至少半数以上的热休克基因编码的是蛋白酶，或者是帮助蛋白质折叠、成熟和转运的伴侣蛋白(chaperone)。已知在高温下需要较多的蛋白酶和伴侣蛋白。细菌的伴侣蛋白与哺乳动物的伴侣蛋白高度相似，如大肠杆菌中的 HtpG、DnaK、GroEL 分别与哺乳动物伴侣蛋白家族中的 hsp90、hsp70、hsp60 相对应。热休克反应的作用虽然不完全确定，但是毫无疑问，抗细菌热休克蛋白的抗体是动物抗感染的血清学反应的一个重要成分。动物发热使体温升高，足以诱导产生热休克反应及相应的免疫应答。另一方面，某些细菌能够利用宿主细胞的热休克蛋白，促进自身的复制。

3.信号转导蛋白(signal transduction protein) 应激调节还与渗透休克、高或低 pH、氧化损伤、有毒金属离子、磷、氮、硫和碳等基本营养元素的缺乏有关。这些调节涉及到信号转导蛋白质。它们构成一个反应系统，其蛋白激酶通过 ATP 在一个特别保守的组氨酸残基上发生磷酸化，从而对环境刺激作出反应。蛋白激酶与磷酸化反应调节子(phosphorylated response regulator)相级联，前者的磷酸基团转移到后者的天冬氨酸残基上，后者进而激活相关基因的转录。上述两类信号转导蛋白在不同细菌中都存在高度保守区域。

某些革兰氏阳性细菌形成芽孢是细菌生存调节的一个范例。芽孢形成与其亚基 σ 依次

激活。芽孢萌发均涉及相关的调节子及级联反应的协同作用。

(二)趋化性

趋化性是向化学诱导物运动，或远离化学抑制物。由一个分子感受系统完成，除编码鞭毛蛋白外，还有运动基因(mot)、趋化基因(che)等 30 余种基因编码多种蛋白质，如受体蛋白、信号蛋白、滚动调节蛋白、马达蛋白等。该系统的特点之一是具有记忆及适应性。不论细菌趋向诱导物还是远离抑制物，细菌都用改变滚动频率引起的随机步移的方式。当细菌向诱导物趋近时，细菌的滚动被抑制，以移动为主。如果细菌需要离开，则滚动时间变长，移动时间变短。通过调节滚动的频度，细菌能够确定运动方向。

趋化的机制通过对大肠杆菌的研究得知一二。小分子通过外膜的微孔扩散，直接与外膜上的受体蛋白相结合，或者先与周质间隙特定的结合蛋白结合，然后再结合受体蛋白。甲基接受趋蛋白(methyl-accepting chemotaxis protein, MCP)是蛋白激酶家族的成员，上述结合了受体的复合物与之相互作用，会发生自身磷酸化，然后通过级联信号转导采传递感受的信息。级联反应结束时，大肠杆菌名为 CheY 的一种磷酸化的滚动反应调节蛋白(tumble response regulator protein)，从滚动复合体上释放，与鞭毛的马达蛋白(motor protein)结合，引起鞭毛的逆时针转动。在刺激物持续存在时，CheY 很快回复到无活性状态。之所以如此，是因为 MCP 甲基化失去活性，磷酸化信号也因而终止。这样导致另一个 CheY 从滚动复合体上释放，然后与鞭毛上的另一个马达蛋白结合，引起鞭毛的顺时针转动，细菌就发生滚动。

趋化性是细菌的一种生存机制，如避免接触毒性物质，也是一种促进生长机制，如寻找食物。在细菌定居动物宿主时，又是一种毒力因子。

思考题

- 1.形成细菌个体的代谢过程有何特点？
- 2.根据细菌代谢对分子氧的需要与否，可以将细菌分为哪几类？
- 3.细菌的生长曲线如何确定？有何意义？
- 4.试述细菌生长的各个时期的特点。
- 5.培养基有哪些种类？
- 6.病原菌对氧气和温度的需求有何特点？
- 7.试述主要的细菌生化反应的种类及用途。
- 8.试述细菌的应激调节因子的作用。

第三章 细菌的致病性与传染

感染(infection)是指病原微生物在宿主体内持续存在或增殖。发病(disease)表示病原微生物感染之后,对宿主造成明显的损害。病原菌(pathogenic bacteria)是指那些导致机体发病的细菌。是一群高度特化了的微生物,为了自身的生存,已适应而且必须在宿主生物体内持续存在或增殖,有时可造成宿主发病。

微生物学研究侧重于感染。因为感染的范围更广,发病仅仅是感染可能出现的后果之一。感染不一定都导致发病,而发病则离不开感染。

第一节 细菌的致病性和毒力

一定种类的病原菌在一定的条件下,能在宿主体内引起感染的能力称为致病性(pathogenicity)。细菌的致病性是针对宿主而言,有的仅对人致病,如霍乱弧菌,有的则仅对某些动物致病,如雏沙门氏菌(*Salmonella pullorum*),而有的则兼而有之,如炭疽杆菌等。不同的病原菌对宿主可引起不同的疾病,表现为不同的临床症状和病理变化,如炭疽杆菌引起炭疽,而霍乱弧菌则引起霍乱。因此,致病性是细菌种的特征之一。病原菌致病力的强弱程度称为毒力(virulent),同一细菌的不同菌株,其毒力不一样,因此,毒力是菌株的特征。

一、细菌致病性的确定

著名的柯赫法则(Koch's postulates)是确定某种细菌是否具有致病性的主要依据,其要点是,第一,特殊的病原菌应在同一疾病中查见,在健康者不存在;第二,此病原菌能被分离培养而得到纯种;第三,此纯培养物接种易感动物,能导致同样病症;第四,自实验感染的动物体内能重新获得该病原菌的纯培养。

柯赫法则在确定细菌致病性方面具有重要意义,特别是鉴定一种新的病原体时非常重要。但是,它也具有一定的局限性,某些情况并不符合该法则。如健康带菌或隐性感染,有些病原菌迄今仍无法在体外人工培养,有的则没有可用的易感动物。另外,该法则只强调了病原微生物一方面,忽略了它与宿主的相互作用,是不足之处。

近年来随着分子生物学的发展,“基因水平的柯赫法则”(Koch's postulates for genes)应运而生。取得共识的有以下几点:第一,应在致病菌株中检出某些基因或其产物,而无毒力菌株中无。第二,如有毒力菌株的某个基因被损坏,则菌株的毒力应减弱或消除。或者将此基因克隆到无毒菌株内,后者成为有毒力菌株。第三,将细菌接种动物时,这个基因应在感染的过程中表达。第四,在接种动物检测到这个基因产物的抗体,或产生免疫保护。该法则也适用于细菌以外的微生物,如病毒。

二、细菌毒力的测定

在疫苗研制、血清效价测定、药物筛选等工作中,都必须知道细菌的毒力。细菌毒力的表示方法很多,最具实用的是半数致死量和半数感染量。

半数致死量(median lethal dose, LD₅₀)是指能使接种的实验动物在感染后一定时限内死亡一半所需的微生物量或毒素量。测定 LD₅₀ 应选取品种、年龄、体重乃至性别等各方面都相同的易感动物,分成若干组,每组数量相同,以递减剂量的微生物或毒素分别接种各组动物,在一定时限内观察记录结果,最后以生物统计学方法计算出 LD₅₀。由于半数致死量采用了生物统计学方法对数据进行处理,因而避免了动物个体差异造成的误差。

半数感染量(median infectious dose, ID₅₀) 某些病原微生物只能感染实验动物、鸡胚或细胞,但不引致死亡,可用 ID₅₀ 来表示其毒力。测定的方法与测定 LD₅₀ 类似,只不过在统计结果时以感染者代替死亡者。

第二节 细菌的毒力因子及分泌系统

构成细菌毒力的物质称为毒力因子(virulent factor),主要有侵袭力和毒素,此外有些毒力因子尚不明确。近年来的研究发现,细菌的许多重要毒力因子的分泌与细菌的分泌系统有关。

一、侵袭力(invasiveness)

病原菌在机体内定殖,突破机体的防御屏障,内化作用,繁殖和扩散,这种能力称为侵袭力。

(一)定殖(colonization) 细菌感染的第一步就是在体内定殖(或称定居),实现定殖的前提是细菌要黏附在宿主消化道、呼吸道、生殖道、尿道及眼结膜等处,以免被肠蠕动、黏液分泌、呼吸道纤毛运动等作用所清除。

凡具有黏附作用的细菌结构成分,统称为黏附素(adhesin),通常是细菌表面的一些大分子结构成分,主要是革兰氏阴性菌的菌毛,其次是非菌毛黏附素,如某些外膜蛋白(OMP)以及革兰氏阳性菌的脂磷壁酸(LTA)等。

某些黏附素无宿主特异性及组织嗜性(tissue tropism)。例如 F1(1 型菌毛)能与细胞表面的 D 甘露糖残基结合,不论何种动物、何种组织细胞的 D 甘露糖均可。但大多数细菌的黏附素具有宿主特异性及组织嗜性,如大肠杆菌的 F4(K88)菌毛仅黏附于猪的小肠前段, F6(987P)仅黏附于猪的小肠后段,而 F2(CFA I)及 F3(CFA II)仅黏附于人的小肠, P 菌毛仅黏附于人的尿道上段。

细胞或组织表面与黏附素相互作用的成分称为受体(receptor),多为细胞表面糖蛋白,其中的糖残基往往是黏附素直接结合部位,如大肠杆菌 1 型菌毛结合 D 甘露糖、霍乱弧菌的 4 型菌毛结合岩藻糖及甘露糖、大肠杆菌的 F5(K99)菌毛结合唾液酸和半乳糖。部分黏附素受体为蛋白质,最有代表性的是细胞外基质(extracellular matrix, ECM),ECM 的成员有 1 型及 4 型胶原蛋白(collagen)、层黏连蛋白(laminin)、纤黏蛋白(fibronectin)等,如金黄色葡萄球菌的黏附素原结合蛋白受体为胶原蛋白。

(二)干扰或逃避宿主的防御机制 病原菌黏附于细胞或组织表面后,必须克服机体局部的防御机制,特别是要干扰或逃避局部的吞噬作用及分泌抗体介导的免疫作用,才能建立感染。

抗吞噬作用 包括以下几个方面,第一,不与吞噬细胞接触,如通过外毒素破坏细胞骨架以抑制吞噬细胞的作用,如链球菌溶血素等。第二,抑制吞噬细胞的摄取,如荚膜、菌毛和链球菌的 M 蛋白。第三,在吞噬细胞内生存,如沙门氏菌的某些成分可抑制溶酶体与吞噬小体的融合;再如李氏杆菌被吞噬后,很快从吞噬小体中逸出,直接进入细胞质。而金黄色葡萄球菌则产生大量的过氧化氢酶,能中和吞噬细胞中的氧自由基。第四,杀死或损伤吞噬细胞,细菌通过分泌外毒素或蛋白酶来破坏吞噬细胞的细胞膜,或诱导细胞凋亡,或直接杀死吞噬细胞。

抗体免疫机制 细菌逃避体液免疫主要通过:第一,抗原伪装或抗原变异,前者主要是在细菌表面结合机体组织成分,如金黄色葡萄球菌通过细胞结合性凝固酶结合血纤维

蛋白,或通过 SPA 结合免疫球蛋白。第二,分泌蛋白酶降解免疫球蛋白,嗜血杆菌等可分泌 IgA 蛋白酶,破坏黏膜表面的 IgA。第三,通过 LPS、OMP、荚膜及 S 层等的作用,逃避补体,抑制抗体产生。

(三)内化作用(internalization) 指某些细菌黏附于细胞表面之后,能进入吞噬细胞或非吞噬细胞内部的过程。结核杆菌、李氏杆菌、衣原体等严格的胞内寄生菌及大肠杆菌、沙门氏菌、耶尔森菌等胞外寄生菌的感染都离不开内化作用,这些细菌一旦丧失进入细胞的能力,毒力则显著下降。

内化作用对细菌的意义在于,细菌通过这种移位作用进入深层组织,或进入血循环,细菌借以从感染的原发病灶扩散至全身或较远的靶器官。宿主细胞为进入其内的细菌提供了一个增殖的小环境和庇护所,使细菌逃避宿主免疫机制的杀灭。

(四)在体内增殖 细菌在宿主体内增殖是感染的核心问题,增殖速度对致病性极其重要,如果增殖较快,细菌在感染之初就能克服机体防御机制,易在体内生存。反之,若增殖较慢,则易被机体清除。

铁是许多细菌生长所必需,然而宿主体内无游离铁存在,细菌通过获铁系统为细菌生长提供所需的铁,获铁系统包括生产和利用载铁体或直接利用宿主的含铁化合物,如血红转铁蛋白、乳铁蛋白等。

赤藓醇(erythritol)能刺激布氏杆菌在体内的生长。雄性及妊娠母畜生殖系统中有赤藓醇存在,因此布氏杆菌可在其中大量增殖,其感染局限于生殖系统。

(五)在体内扩散 细菌分泌助蛋白酶称为胞外蛋白酶(extracellular proteinase),它们具有多种致病作用,例如激活外毒素、灭活血清中的补体等,有的蛋白酶本身就是外毒素。此外,最主要的作用是作用于组织基质或细胞膜,造成它们的损伤,增加其通透,有利于细菌在体内的扩散性。此类常见的有①透明质酸酶(hyaluronidase),旧称扩散因子(spreading factor),分解结缔组织的透明质酸,葡萄球菌、链球菌等可产生。②胶原酶(collagenase),主要分解 ECM 中的胶原蛋白,见之于梭菌、气单胞菌等。③神经氨酸酶(neuraminidase),主要分解肠黏膜上皮细胞的细胞间质,霍乱弧菌及志贺菌可产生。④磷脂酶(phospholipase)又名毒素,可水解细胞膜的磷脂,产气荚膜梭菌产生。⑤卵磷脂酶(lecithinase),分解细胞膜的卵磷脂,产气荚膜梭菌产生。⑥激酶(kinase),能将血纤维蛋白溶酶原激活为血纤维蛋白溶酶。包括链球菌产生的链激酶和葡萄球菌等产生的激酶,以分解血纤维蛋白,防止形成血凝块。⑦凝固酶(coagulase),细菌在体内的扩散也可通过内化作用完成。特别是细胞结合性凝固酶,可为细菌提供抗原伪装外,使之不被吞噬或机体免疫机制所识别。见于致病性金黄色葡萄球菌。

二、毒素(toxin)

细菌毒素按其来源、性质和作用等的不同,可分为外毒素和内毒素两大类。在大多数情况下,外毒素一般简称毒素。

(一)外毒素(exotoxin) 是某些病原菌在生长繁殖过程中所产生的对宿主细胞有毒性的可溶性蛋白质。大多数外毒素在菌体内合成后必须分泌于胞外,故名“外毒素”。但也有少数外毒素存在于菌体细胞的胞周间隙,只有当菌体细胞裂解后才释放至胞外。

多种细菌能产生外毒素,革兰氏阳性菌主要有破伤风杆菌、炭疽杆菌、肉毒梭菌、产气荚膜梭菌、溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌等;革兰氏阴性菌中有大肠杆菌、霍乱弧菌、铜绿假单胞菌、气单胞菌、多杀性巴氏杆菌等。

特性 通常具有菌种特异性,如破伤风梭菌产生破伤风毒素、炭疽杆菌产生炭疽毒素、霍乱弧菌产生霍乱毒素等。

外毒素的毒性作用极强,如 1mg 纯化的肉毒毒素能杀死 2 000 万只小鼠。破伤风毒素对小鼠的致死剂量,是马钱子碱的 10^6 倍。

外毒素的毒性具有高度的特异性。不同细菌产生的外毒素,对机体的组织器官有一定的选择作用,引起特征性的病症。如破伤风毒素选择性地作用于脊髓前角运动神经细胞,引起肌肉的强直性痉挛;而肉毒毒素选择性地作用于眼神经和咽神经,引起眼肌和咽肌麻痹(图 3-1)。但是,也有一些毒素具有相同的作用,霍乱弧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、气单胞菌等许多细菌均可产生作用类似的肠毒素。

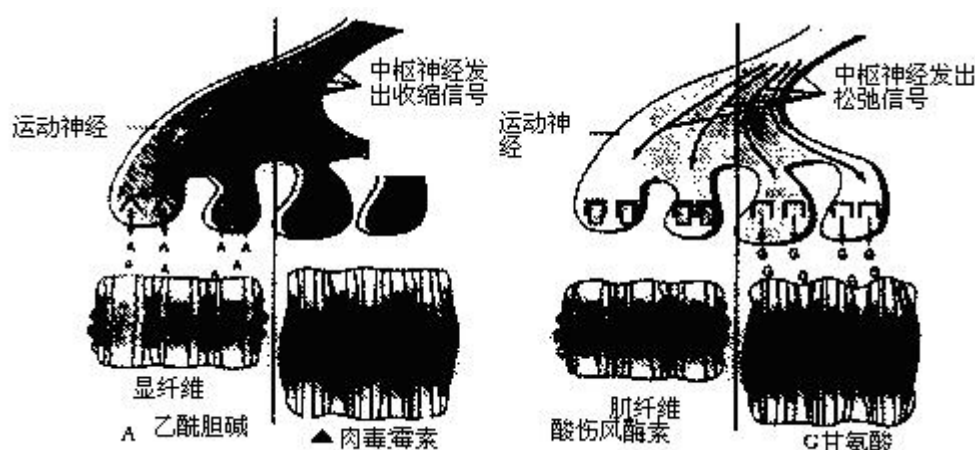


图 3-1 作用于调控肌纤维神经的毒素

外毒素具有良好的免疫原性,可刺激机体产生特异性的抗体,而使机体具有免疫保护作用,这种抗体称为抗毒素(antitoxin),可用于紧急治疗和预防。外毒素在 0.4% 甲醛溶液作用下,经过一段时间可以脱毒,但仍保留原有抗原性,称之为类毒素(toxoid)。类毒素注入机体后,仍可刺激机体产生抗毒素可作为疫苗进行免疫接种。

多数外毒素不耐热,一般在 $60\sim 80^{\circ}\text{C}$ 经 $10\sim 80\text{min}$ 即可失去毒性,但也有少数例外,如葡萄球菌肠毒素及大肠杆菌热稳定肠毒素(ST)能耐 100°C 30min。

外毒素与酶都是蛋白质,许多性质相似,如易被热、酸及蛋白水解素酶灭活,具有很高的生物学活性,并具特异性。实际上许多外毒素本身具有酶的催化作用,如大肠杆菌热敏肠毒素(LT)、霍乱毒素、肉毒毒素、破伤风毒素等。

组成 大多数外毒素由 A、B 两种亚单位组成,有多种合成和排列形式。A 亚单位为毒素的活性中心,称活性亚单位,决定毒素的毒性效应。B 亚单位称结合单位,能使毒素分子特异性地结合在宿主易感组织的细胞膜受体上,并协助 A 亚单位穿过细胞膜。A、B 亚单位单独均无毒性,A 亚单位必须在 B 亚单位的协助下,结合至受体释放到细胞内,才能发挥毒性作用,因此毒素结构的完整性是其致病的必备条件。B 亚单位可单独与细胞膜受体结合,并阻断完整毒素的结合,B 亚单位可刺激机体产生相应的抗体,从而阻断完整毒素结合细胞,可作为良好的亚单位疫苗。

分类 目前尚未统一,比较简明的是根据其性质分为三类:A-B 型毒素、攻膜毒素以及超抗原毒素。

1. A-B 型毒素(A-B type) 具有典型的 A-B 两个亚单位，多数外毒素均属此类。例如霍乱毒素、志贺毒素、破伤风毒素等。

2. 攻膜毒素(membrane disrupting type) 又名穿孔毒素(pore-forming toxin)。无典型的 A-B 亚单位，其作用机制是在宿主细胞膜上形成小孔，造成胞内液流失而使细胞破坏。一些溶血毒素及磷酸酯酶属于此类，金黄色葡萄球菌的。毒素是其代表。

若干攻膜毒素具有特殊的分子结构，即 9 个串联的氨基酸(Leu/Ile/Phc-X-Gly-/X-X-Gly-Asn/Asp-Asp-X)重复出现，称之为重复子毒素(repeats int oxin, PTX)，例如猪胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)及大肠杆菌的溶血素。

3. 超抗原毒素(super antigen) 缺乏典型的 A-B 亚单位结构，它与 T 细胞结合，释放出细胞因子。金黄色葡萄球菌的毒素休克综合征毒素 1(TSST-1)属于此类。

(二)内毒素(endotoxin) 内毒素特指革兰氏阴性菌外膜中的脂多糖(LPS)成分，细菌在死亡后破裂或用人工方法裂解菌体后才释放。革兰氏阳性菌细胞壁中的脂磷壁酸(LTA)具有 LPS 的绝大多数活性，但无致热功能。螺旋体、衣原体、立克次体亦含有 LPS。

组成 LPS 由 O 特异多糖侧链、非特异核心多糖和类脂 A 三个部分组成。具有毒性的部分是类脂 A，由一个磷酸化的 N 乙酰葡萄糖胺(NAG)双体和 6~7 个饱和脂肪酸组成，它将 LPS 固定在革兰氏阴性菌的外膜上。类脂 A 高度保守，肠杆菌科细菌的类脂 A 结构完全一样，因此所有革兰氏阴性菌内毒素的毒性作用都大致相同，引致发热、血循环中白细胞骤减、弥散性血管内凝血、休克等，严重时亦可致死。

特性 内毒素耐热，加热 100℃经 1h 仍不被破坏，必须加热 160℃经 2~4h，或用强酸、强碱或强氧化剂煮沸 30min 才失活。不能被甲醛脱毒成类毒素。内毒素的抗原性较弱，将内毒素注入机体可产生针对其中多糖抗原的相应抗体，但此抗体并无中和内毒素毒性的作用。

检测 目前通用鲎试验(Limulus assay)。东方鲎(*Tachypleus tridentatus*)或美洲鲎(*Limulus polyphemus*，英文名 horseshoe crab)均是海洋节肢动物，其血液中的有核变形细胞能被内毒素所裂解。商品化的试剂则是用鲎变形细胞溶解物(Limulus amebocyte lysate, LAL)试剂，待检样本中的内毒素与之相遇，激活 LAL 中的凝固酶原成为凝固酶，进而使凝固蛋白凝聚成凝胶状态。此法敏感，可检出 0.01~1ng / ml 的内毒素。

外毒素和内毒素的主要区别参见表 3-1。

表 3-1 细菌外毒素和内毒素的基本特性比较

特征	外毒素	内毒素
化学性质	蛋白质	脂多糖
产生	由某些革兰氏阳性菌或阴性菌分泌	由某些革兰氏阴性菌菌体裂解产生
耐热	通常不耐热	极为耐热
毒性作用	特异性。为细胞毒素、肠毒素或神经毒素，对特定的细胞或组织发挥特定作用	全身性。致发热、腹泻、呕吐
毒性程度	高，往往致死	弱，很少致死
致热性	对宿主不致热	致热性，常致宿主发热
免疫原性	强，刺激机体产生中和抗体(抗毒素)	较弱，免疫应答不足以中和毒性

能否产生类毒素	能，用甲醛处理	不能
---------	---------	----

三、III型分泌系统(Type III secretion system)

细菌的分泌系统的发现是近年为细菌致病机制研究的重要进展，其中的III型分泌系统与动植物的许多革兰氏阴性病原菌的毒力因子的分泌有关。在病原菌与宿主细胞接触后，这一系统得以启动，具有接触介导的特征。启动后细菌分泌与毒力有关的多种蛋白质，与相应的伴侣蛋白结合，从细菌的胞浆直接进入宿主细胞胞浆，发挥毒性作用。

III型分泌系统通常由 30~40kbp 大小的基因组编码，以毒力岛的形式存在于细菌的大质粒或染色体。与细菌基因组的其他部分相比，某些该分泌系统的基因的 DNA 的 G+C 含量较低，可能是可转移的外源插入成分，通过水平传递获得。

已确定具有III型分泌系统的细菌有沙门氏菌(*Salmonella*)、志贺菌(*Shigella*)、耶尔森菌(*Yersinia*)、大肠杆菌、哈夫尼菌(*Hafnia alvei*)、衣原体(*Chlamydia*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等。以肠致病性大肠杆菌(EPEC)为例，置 37℃ 的处于对数生长期的 EPEC 与宿主细胞接触后，III型分泌系统大量分泌蛋白质并进入宿主细胞。EPEC 的 4 型菌毛(BFP)对激活此分泌系统起关键作用，BFP 缺失突变株的此种激活为减弱。III型分泌系统的这种接触激活作用可被氯霉素抑制。

除III型分泌系统之外，革兰氏阴性菌尚有 I 型、II 型与IV型分泌系统。I 型可将细菌分泌物蛋白质直接从胞浆送达细胞表面，如大肠杆菌的溶血素。II 型则是细菌将蛋白质分泌到周质间隙，经切割加工，然后通过微孔蛋白穿越外膜分泌到胞外。大肠杆菌的 BFP 就是通过 II 型分泌系统产生的。III型与 I 型虽都是一步性分泌，且不被加工，但不同点在于，III型需较多蛋白质参与，比 I 型复杂。IV型是一种自主运输系统，其分泌的蛋白质需切割加工，而后形成一个孔道使自身穿过外膜，如淋球菌的 IgA 蛋白酶。革兰氏阳性菌的毒力因子分泌相对较为简单，一个信号片段就足以完成分泌过程。

第三节 细菌致病性和毒力的现代概念

细菌致病性毒力的传统概念的缺陷是仅考虑了病原菌本身，忽视了宿主因素以及宿主与病原菌的相互作用。

就发病机制而言，宿主与病原菌相互作用的结果有两种可能，一是造成宿主损伤，二是无宿主损伤。损伤可波及细胞、组织及器官不同水平，结果导致发生疾病。因此有学者建议用宿主损伤来定义包括细菌在内的微生物的发病机制，可较准确地反映宿主与病原微生物相互作用的变化情况。

在此基础上，Casadevall 和 Pirofski 建议对病原体、致病性、毒力及毒力因子重新定义：病原体为能引致宿主损伤的微生物；微生物的致病性为微生物引致宿主损伤的能力；微生物的毒力为微生物引致宿主损伤的程度；微生物的毒力因子为病原体损伤宿主的某种成分。

根据宿主的免疫应答与病原菌的相互作用的应答—损伤情况，目前可将微生物分为 6 类。

第一类为某些机会致病菌或共生菌，在宿主免疫功能受损时，由宿主和或病原体介导，造成宿主损伤。表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、具有 1 型菌毛的大肠杆菌是此

类的代表。

第二类为某些机会致病菌，在宿主免疫应答弱或正常的情况，由宿主或病原体介导，造成宿主损伤。肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是此类的代表。

第三类为某些病原菌，不论宿主的免疫状态如何，或正常或强或弱，由宿主和病原体介导，均造成宿主损伤。大肠杆菌 O₁₅₇:H₇、荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)是此类的代表。

第四类为某些真菌或病毒，只在宿主免疫应答或者弱、或者强的非正常情况下，由病原体或宿主介导，造成宿主损伤。烟曲霉、痘苗病毒属于此类。

第五类为某些病原菌，在宿主免疫应答正常或弱时，由病原体或宿主介导，造成宿主损伤，志贺菌(*Shigella*)、弯曲菌(*Campylobacter*)是代表。

第六类为可能存在的某种细菌，仅在宿主免疫应答强时，由宿主或病原体介导，造成宿主损伤。幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)可能归入此类。

上述的分类方法强调了宿主损伤的结果，比单纯从微生物角度分类更能解释疾病发生的机制，但仍有待进一步完善。

第四节 细菌毒力的增强与减弱

毒力是病原菌特有的一种生物学性状。在自然条件下，不仅不同菌株的毒力有所不同，就是同一菌株在不同条件下也表现出不同的毒力。在某种传染病的发病初期，从患病动物体内分离出来的菌株毒力较强，然而在流行末期分离到的细菌毒力大为减弱。毒力强的菌株在体外连续传代改变培养条件后，毒力往往减弱，而通过易感动物又能使毒力减弱的菌株恢复毒力。

一、细菌毒力减弱的方法

1. 长时间在体外连续培养传代 病原菌在体外人工培养基上连续多次传代后，毒力一般都能逐渐减弱乃至失去毒力。

2. 在高于最适生长温度条件下培养 例如炭疽 I 型和 II 号疫苗，均是将炭疽杆菌强毒株在 42~43℃ 培养传代育成。

3. 在含有特殊化学物质的培养基中培养 如广为采用的结核病卡介苗(BCG)，系将牛型结核杆菌在含有胆汁的马铃薯培养基上每 15 天传 1 代，持续传代 13 年后育成。

4. 在特殊气体条件下培养 如无荚膜炭疽芽孢苗是半强毒菌株在含 50% 动物血清的培养基上，在 50% CO₂ 的条件下选育的。

5. 通过非易感动物 如猪丹毒弱毒苗(GC₄₂)系将强致病菌株通过豚鼠 370 代后，又通过鸡 42 代选育而成。

6. 通过基因工程的方法 去除毒力基因或用点突变的方法使毒力基因失活，可获得无毒力菌株或弱毒菌株。但对多基因调控的毒力因子较难奏效。

二、细菌毒力增强的方法

在自然条件下，回归易感动物是增强细菌毒力的最佳方法。易感动物既可是本动物，也可是实验动物。特别是回归易感实验动物，已广泛用于增强细菌的毒力，如多杀性巴氏杆菌通过小鼠，猪丹毒杆菌通过鸽子等。

三、细菌毒力因子的调节

许多细菌的毒力因子受环境因素的调节，仅在某些特定的条件下才能表达，对细菌毒力有调节作用的环境条件包括温度、铁离子及钙离子浓度、渗透压、pH、氧含量等(表 3-2)。

表 3-2 某些细菌毒力因子的调节系统

细菌名称	调节基因	环境刺激因素	调节的产物
大肠杆菌(<i>E. coli</i>)	drd X	温度	P 菌毛
	fur	铁离子浓度	类致贺毒素，载铁体
霍乱弧菌(<i>Vibrio cholerae</i>)	tax R	温度，渗透压，PH，氨基酸	霍乱毒素，菌毛，OMP
耶尔森菌(<i>Yersinia</i>)	lcr loci	温度，钙	OMP
	vir F	温度	黏附，侵袭
鼠伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella typhimurium</i>)	pag	PH	毒力，在吞噬细胞内存活
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	agr	PH	α 、 β 溶血素，毒素休克综合征毒素 I，A 蛋白

温度 温度是许多细菌重要的调节信号，特别是对那些自然生存环境的温度低于宿主体温的细菌，如嗜水气单胞菌的毒素、菌毛等在 25℃ 左右表达量最高。耶尔森菌的侵袭素(invasin)在室温条件下表达量最高，而 YadA 及 Ail 蛋白则必须在 37℃ 条件下方能表达。志贺菌在 30℃ 培养时不能侵袭宿主细胞，只有在 37℃ 条件下才内化而致腹泻。

铁 铁不仅是细菌必需的生长因子，而且对细菌毒力因子的表达也起调节作用，它不仅可诱导载铁体、载铁体受体及其他铁结合蛋白受体等与铁代谢有关成分的表达，而且还对某些细菌毒素有调节作用，类志贺毒素(Slt1)、铜绿假单胞菌外毒素 A、菌毛(大肠杆菌)、鞭毛(霍乱弧菌)、蛋白酶(铜绿假单胞菌碱性蛋白酶、弹性蛋白酶)等。

钙 钙对耶尔森菌 Yops 的表达有调节作用，在无钙、37℃ 培养时，耶尔森菌生长停滞，但产生大量的 Yops。Yops 是耶尔森菌的一系列外膜蛋白，与其黏附及内化密切相关，是重要的毒力因子。

渗透压 渗透压对霍乱弧菌的毒力及菌毛的表达有调节作用。在宿主组织相近的生理范围内表达量最高。此外，铜绿假单胞菌某些菌株的荚膜亦受渗透压的调节。

第五节 传染

(一) 传染的概念

传染是指病原微生物在一定条件下侵入易感动物机体，并与之相互作用，使机体呈现出一种病理生理学的过程。也可以说，传染是病原微生物侵入动物机体之后，在其体内生长繁殖，使其表现出的各种现象。它是微生物与机体之间相互作用的一种复杂的病理过程。

感染在一般情况下是传染的同义词，但确切地说，感染是机体传染的第一步，即病原微生物侵入易感动物机体。这是否能引起传染，则必须看机体的抵抗力和病原微生物的毒力如何，如机体抵抗力强，则不引起传染或只引起轻度或局部的传染，反之则引起较为严重的传染。

传染是一个动态过程，它是在进化的过程中，病原微生物与机体相互作用形成的一种关系，即形成某种病原微生物对某种特定的机体的易感性。从横向来看，传染必须是病原微生物从感染动物中的某一个体传染给另一个体，并使后者也出现同样的病症。

(二)引起传染的必要条件

动物能否发生传染，病原微生物的入侵是首要条件，但这不是绝对的，还必须与其他条件配合，才能引起传染。

1. 病原微生物 病原微生物是引起一切传染过程的首要因素，没有病原微生物就没有传染。一种传染是由一定的病原微生物所引起的。就病原而言，引起传染必须具备下列3个条件：

(1)具有一定的毒力：即要有一定的致病性，无致病性的微生物则不能引起传染。

(2)具有适当的入侵门户：病原微生物侵入动物机体的途径与传染的发生有着密切的关系。例如，荧光假单胞菌是经过皮肤伤口感染而引起传染，口服一般不能致病，爱德华氏菌是通过胃肠引起致死性传染。病原微生物的入侵门户对传染的发展也有很大的影响，如鳃弧菌经过胃肠道感染时，首先引起肠炎，然后引起败血症；而经皮肤伤口感染，则常发生皮肤坏死和溃疡。病原微生物侵入门户的特殊性，在某种程度上是一种历史适应的表现。有许多病原微生物，它们的入侵门户不是一个，而是多个。了解病原微生物的入侵门户对于预防传染的发生是很重要的。

(3)病原微生物的数量：病原微生物引起传染的能力固然取决于病原微生物的毒力和入侵门户，但也不可忽视病原微生物的数量。即使病原微生物的毒力很强，入侵门户得当，但如数量过少，也往往不能引起传染。毒力弱一些，如数量多，也可引起传染。

2. 易感动物 不同动物对同一病原微生物的感受性通常不一样，有易感的，有不易感的。就易感动物而言，不同的机体状态对传染的发生发展也有极其重要的影响。

3. 外界环境条件的影响 从有机体与外界环境条件是一个统一体的原则来看，外界环境条件在传染过程中的作用有3方面，①影响动物机体的保护机能状态；②影响病原微生物的生命力与毒力；③影响病原微生物接触与侵入动物体的可能性和程度。外界环境条件主要包括自然环境条件、饲养管理以及社会制度等方面。

(三)传染的类型

病原菌从一个宿主传到另一个宿主的特性，称为传染性。而传染是病原体侵入机体，突破机体的防御机构，在某一部位生长繁殖，并引起不同程度病理变化的过程。机体免疫力强者，能阻止病原菌的入侵或将其消灭，使传染不能成立，如机体抵抗力弱，则病原菌在机体内生长繁殖，造成损害。根据其损害程度，有的可引起明显的临床症状，甚至造成死亡，称为传染病，传染病又有急性、亚急性和慢性之分；有些则不表现出临床症状，称为隐性传染或亚临床传染。应当注意，传染与传染病并不是一回事，传染的范畴要比传染病广泛得多。

传染大多数先由局部开始，进而侵犯全身，重者侵入血液或淋巴液，遍及全身，造成严重危害。传染的结局或者是由机体的免疫系统将病原菌杀死，或者是病原菌战胜机体的免疫抵抗，造成疾病，甚至引起死亡。根据动物发生的临床表现，可将传染分为4种类型：

1. 明显传染 明显传染又称为临床感染或传染病。如侵入机体的病原菌毒力强、数量多，而机体的抵抗力又弱时，则病原菌可在机体内生长繁殖，产生毒素物质，致使机体不能维持其体内环境的相对稳定，便表现出明显的临床症状，叫作明显传染。根据明显传

染的发生范围又可分下面两种:

(1)局部传染:是病原微生物侵入机体后,在一定的部位定居下来,生长繁殖,产生毒素产物,引起局部损害的传染过程。机体发生局部传染时,往往由于入侵的病原菌毒力不大,数量不多,而机体的免疫力又较强,可将入侵的病原微生物限制在局部,阻止它们的扩散蔓延,并将其清除消灭,而维持机体的正常生理状态。

(2)全身传染:由于病原菌的毒力强大,而机体的免疫力又较弱,不能将病原微生物局限于局部,以至其向周围扩散,经淋巴或直接进入血流,散布到全身,引起全身传染。在病原菌向全身扩散传染的过程中,可能出现下列几种情况:

①菌血症。病原菌侵入机体,突破机体防御屏障,进入血流,但由于机体的抵抗力较强,而使病原菌不能在血液中停留,转移到其他位置,这种状态被称为菌血症。见于一些细菌性传染病的初期。

②败血症。在菌血症的同时,由于机体抵抗力较弱,致使侵入的病原菌在血液中大量繁殖,波及全身,造成全身性的损害状态,称为败血症。其主要表现为体温升高,白细胞总数急剧增加,全身皮肤、黏膜及各实质脏器出血等,如弧菌病。

③毒血症。病原菌侵入机体后,在局部生长繁殖,产生毒素,进入血流,引起机体损害,此称为毒血症,如破伤风。

④脓毒败血症。化脓性细菌在引起败血症的同时,又引起脓灶的全身转移,称为脓毒败血症。

2. 隐性传染 又称为无症状感染。当侵入机体的病原菌的毒力不强或数量不多,而机体的免疫力又较强时,则病原菌可迅速被消灭。如不能完全被消灭,则在机体的一定部位生长繁殖,对机体造成一定的损害。但由于机体能维护其体内环境的相对稳定,因而在临床上表现不出明显的症状,所以称为隐性传染。机体可以通过隐性传染而获得对该病的一定的免疫力,以防止同种病原的再传染。如流行性乙型脑炎、结核等都可以通过这种方式使机体获得免疫力。

3. 带菌现象 有些病原菌虽然侵入了动物机体,但不引起传染,只呈现出无害的寄生状态,或者动物发病痊愈后一定时间,病原菌尚未完全被消灭或排出,这两种状态均称为带菌现象。带菌现象在传染病的防治上具有重要意义。因为带菌动物不断地向外排出病原菌或通过媒介向外传播,而动物本身又无临床症状,最易被忽视,因而在传染上可能造成更大的危害。另外,传染病封锁期的制定也要考虑带菌现象,即在最后一头动物痊愈后或被处理后多久可解除封锁,就取决于最后一头痊愈动物的带菌时间。

4. 不传染 是机体对该种病原菌不易感,或是具有坚强的抵抗力,或者是病原菌的毒力低、数量少、侵入途径不当。在这些情况下,病原菌即使侵入机体,也不能生长繁殖,被机体迅速消灭,因而动物不发生传染。

思考题

- 1.什么是柯赫法则?如何从分子水平解释柯赫法则?
- 2.如何确定某种细菌具有致病性?
- 3.试述致病菌侵入宿主细胞的主要过程。
- 4.胞外蛋白酶有何致病作用?举例说明。
- 5.什么是细菌外毒素?其基本特性及组成如何?

- 6.什么是细菌内毒素?其基本特性及组成如何?
- 7.什么是类毒素?有何用途?
- 8.试述内毒素的来源、组成、致病意义及检测方法。
- 9.比较外毒素与内毒素的主要异同点。
- 10.举例说明细菌毒力因子重要的分泌系统的主要特点。
- 11.环境因子如何影响细菌毒力因子的调节?举例说明。
- 12.简述引起传染的必要条件。
- 13.传染的类型包括哪几类?

第四章 细菌的鉴定

第一节 细菌鉴定的步骤

菌种鉴定工作是各类微生物学实验室都经常遇到的基础性工作；不论鉴定对象属哪一类工作步骤都离不开以下 3 步：

1. 获得该菌种的纯种培养物(pureculture) 例如要鉴定水产动物的某种病原菌，首先应从患病动物的脏器以无菌法取样划线接种合适的平板培养基，让其长出单个菌落，取菌落再分离培养确认为一种细菌后进行纯化，将纯化菌种保存用于鉴定。如果要鉴定水体中的某种细菌，则应按上述方法从水体分离获取该细菌的纯培养物。

2. 查找权威性的鉴定手册 鉴定细菌属何分类地位，必须严格在细菌分类鉴定法则的指导下进行检测。目前国际上公认和普遍采用的细菌分类系统是《伯杰氏细菌学鉴定手册》(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)，该书从 1923 年至今已出版第九版(1994)，它将细菌系统学和鉴定学结合起来，采用细菌系统学手册中的分类体系对已定名的细菌按鉴定学的要求来编排。全书主要以细菌的形态和生理类型为依据，也参考系统发育关系，明确的目的是用于细菌的鉴定。第九版(《伯杰氏系统细菌学手册》第一版)共设立 35 个部(section)，全书描写了约 500 个属，对属下各个种没有描述，只是以表格的形式列出了它们之间的差别，以利于检索。35 个部分别归纳为 4 大类(门)：第一类，具细胞壁的革兰氏阴性真细菌，第二类，具细胞壁的革兰氏阳性真细菌；第三类，无细胞壁的真细菌；第四类，古细菌。最近由 George Garrity 主编的《伯杰氏系统细菌学手册》第二版分为 5 卷，全书纳入了研究核糖体 RNA 测序的许多概念，并同常规分类信息结合起来，向《自然系统发育》分类系统迈进了。新的系统分古细菌和真细菌 2 个界，下设 18 个门、27 纲、73 目、186 科，包括 870 余个属和 4900 多个种，分为 30 组对原核生物分类进行了详细描述，5 卷大致的内容如下：

第一卷：1~14 组，为古细菌、蓝细菌、光合细菌和最早分支的属；

第二卷：15~19 组，为变形杆菌(属革兰氏阴性真细菌类)；

第三卷：20~22 组，为低 G+C 含量的革兰氏阳性细菌；

第四卷：23 组，为高 G+C 含量的革兰氏阳性细菌(放线菌类)；

第五卷：24~30 组，为浮霉状菌、螺旋体、丝杆菌、拟杆菌和梭杆菌(属革兰氏阴性真细菌类)。

除了上述著作外，还有一部多卷本的《原核生物》，也是重要的细菌分类书籍。该书第二版(1992)有 4100 多页，并在修订以反映原核生物分类和系统发育研究的内容，定期公布。电子版已于 1999 年发行，可在互联网上查阅。对于一般细菌的分类鉴定，东秀珠等编著的《常见细菌系统鉴定手册》(2001)是目前国内鉴定细菌方面较为系统的专门书籍。

3. 应用合适的鉴定方法确定细菌的分类地位 细菌等微生物由于形体小、类型多，在形态、生理生化、免疫学和遗传学特征上存在着极大的多样性，其分类鉴定远比其他生物复杂，鉴定方法多而繁琐。实际上在现代分类鉴定中，任何能稳定地反映微生物类群特征的方法和资料都可作为其分类鉴定的依据。目前较成熟且应用较多的方法有：经典分类法(测定形态、结构和生理生化特性等)，分子分类法(测定细菌的细胞组分和核酸特征等)，免疫学方法(用已知抗体测定细菌抗原的反应特异性)，半自动和自动检测系统(用微量、快

速方法综合测定某些有分类价值的指标并结合计算机进行分析归类)等。除自动系统检测法外,使用各种方法时都应将测得的系列指标对照权威分类鉴定手册进行检索,确认细菌的分类地位。

至于究竟选用何种方法进行分类鉴定,应根据菌株的来源,鉴定意义的大小,是不是常见种类或新种类,鉴定费用是否够用,鉴定用设备、试剂、资料、技术是否具备,鉴定时间长短等多方面综合考虑。如果是一般的病原菌或菌株,可按照有关病原书籍等所列项目用常规方法或自动鉴定系统即可鉴定。如果根据菌株现有性状资料判断可能是新种类或涉及其他方面的研究价值,则应遵循细菌分类规则,按权威书籍所列项目对其进行系统检测。

第二节 细菌鉴定的主要方法

在细菌鉴定中较为常用的、重要的方法有以下几种。

(一)经典分类方法

1. 形态学特征检测 本法主要是应用涂片、染色和显微镜技术检测细菌的基本形态、大小、染色性、基本构造,特殊构造或超微结构以及群体形态,如菌体排列、菌落特征等。

2. 生理生化特性和生态条件测定 本法主要是应用人工培养技术、生理生化反应测定细菌的培养特性、呼吸类型、温度类型、对盐度、pH 的耐受性以及碳源、氮源等营养物质的利用和代谢等情况。

上述两种方法在一般的微生物实验室均可进行,但实验时间较长,工作繁琐。

(二)分子分类法

1. 氨基酸顺序和蛋白质分析 蛋白质是基因的产物,蛋白质的氨基酸顺序直接反映 mRNA 顺序并与编码基因密切相关。因此,可以通过对某些同源蛋白质氨基酸序列的比较,来分析不同生物系统发育关系。序列相似性越高,其亲缘关系愈近。由此可以根据蛋白质的氨基酸序列资料来构建系统发育树和进行分类。

一般来说,蛋白质氨基酸顺序的进化速率大体上是恒定的,但功能不同的蛋白质常以不同的速率进化。功能重要的分子序列或序列区域往往进化速率变化小。所以,在研究中必须根据所比较的类群注意选择适当的分子。一般来说,细胞色素和其他电子传递蛋白、组蛋白、热休克蛋白、转录和翻译蛋白以及许多代谢酶的序列都可以用于细菌的分类研究。

此外,还可以进行电泳图谱比较。电泳图谱比较进行分类或鉴定的前提是,亲缘关系相近的细菌应具有相似的蛋白质,反之亦然。当把一个菌株所产生的系列蛋白质在标准条件下电泳,就会产生特征性的由电泳区带组成的电泳图谱(或称蛋白质“指纹”图)。亲缘关系相近的菌株,它们的“指纹”也应相似。在细菌分类鉴定研究中,蛋白质电泳图谱可以作为种和种以下分类和鉴定的一个手段。

2. DNA 的碱基组成 $[(G+C)\%]$ DNA 分子含有四种碱基:腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)。DNA 的碱基组成和排列顺序决定生物的遗传性状,所以 DNA 碱基组成是各种生物一个稳定的特征,它不受年(菌)龄以及突变因素以外的外界条件的影响,即使个别基因突变,碱基组成也不会发生明显变化。分类学上,用 G+C 占全部碱基的物质的量的百分数 $[(G+C)\%]$ 来表示各类生物的 DNA 碱基组成特征。

每一种生物都有一定的碱基组成,亲缘关系近的生物,它们应该具有相似的 G+C 含量,若不同生物之间 G+C 含量差别大表明它们关系远,目前,虽然还没有一个统一的界

定各级分类单元的 G+C 含量标准,但大量资料表明:同一个种内的不同菌株 G+C 含量差别应在 4%~5% 以下(测定方法本身的误差可能高达 2%),同属不同种的差别应低于 10%~15%,通常低于 10%。所以 G+C 含量已经作为建立新的微生物分类单元的一项基本特征,它对于种、属甚至科的分类鉴定有重要意义。例如,20 世纪 80 年代以前螺菌属(*Spirillum*)不同种的 G+C 含量范围宽达 38%~66%,后来《伯杰氏细菌鉴定手册》(1984)结合其他特征已将其分成 3 个属:螺菌属、海洋螺菌属(*Oceanospirillum*)和水螺菌属(*Aquaspirillum*),它们的 G+C 含量分别为 38%、42%~51%和 49%~66%。值得强调的是:G+C 含量的分类学意义主要是作为建立新分类单元的一项基本特征和把那些 G+C 含量差别大的种类排除出某一分类单元;但绝不能认为 G+C 含量相似的生物,它们亲缘关系就一定近。因为 G+C 含量并没有反映出碱基在 DNA 分子中的排列顺序,G+C 含量相同只表明它们具有亲缘关系相近的可能性,是否真正同源,还有待碱基排列顺序分析比较或其他特征的进一步证实。

3. 核酸的分子杂交 生物的遗传信息以碱基排序(遗传密码)形式线性地排列在 DNA 分子中,不同生物 DNA 碱基排列顺序的异同直接反映这些生物之间亲缘关系的远近,碱基排列顺序差异越小,它们之间的亲缘关系就越近,反之亦然。由于目前尚难以普遍地直接分析比较 DNA 的碱基排列顺序,所以分类学上主要采用较为间接的比较方法--核酸分子杂交(hybridization),来比较不同细菌 DNA 碱基排列顺序的相似性,从而进行细菌的分类。核酸分子杂交主要包括:DNA-DNA 杂交、DNA-rRNA 杂交以及根据核酸杂交特异性原理制备核酸探针。

(1)DNA-DNA 杂交: DNA-DNA 杂交的基本原理:对双链结构的 DNA 分子进行加热处理时,互补结合的双链可以离解成单链,即 DNA 变性;若将变性的 DNA 分子进行冷却处理时,已离解的单链又可以重新结合成原来的双链 DNA 分子,这一过程叫 DNA 的复性。不仅同一菌株的 DNA 单链可以复性结合成双链,来自不同菌株的 DNA 单链,只要二者具有同源互补的碱基序列,它们也会在同源序列之间互补结合形成双链,这就称之为 DNA-DNA 分子杂交。不同菌株之间, DNA 同源程度越高,其杂交率就越高,若两个菌株 DNA 分子序列完全相同,则应 100%地杂交结合。许多资料表明如 DNA-DNA 杂交同源性在 60%以上的菌株可以认为是同一个种;同源性超过 70%为同一亚种;同源性在 20%~60%是同属不同种的关系。

(2)DNA-rRNA 杂交:研究表明,当两个菌株 DNA 的非配对碱基超过 10%~20%,DNA-DNA 杂交往往不能形成双链,因而限制了 DNA-DNA 杂交应用于种水平以上的分类。为了进一步比较亲缘关系更远的菌株之间的关系,需要用 rRNA 与 DNA 进行杂交。rRNA 是 DNA 转录的产物,在生物进化过程中,其碱基序列的变化比基因组要慢得多,保守得多,它甚至保留了古老祖先的一些碱基序列。因此,当两个菌株的 DNA-DNA 杂交率很低或不能杂交时,用 DNA-rRNA 杂交仍可能出现较高的杂交率,因而可以用来进一步比较关系更远的菌株之间的关系,进行属和属以上等级分类单元的分类。DNA-rRNA 杂交和 DNA-DNA 杂交的原理和方法基本相同,只是在技术细节上有些差异,如 DNA-rRNA 杂交中,用同位素标记的是 rRNA 而不是 DNA 等等。

(3)核酸探针: 所谓核酸探针 (probe)是指能识别特异核苷酸序列的、带标志的一段单链 DNA 或 RNA 分子。换句话说,它是能与被检测的特定核苷酸序列(靶序列)互补结合,而不与其他序列结合的带标记的单链核苷酸片段。因此,一种核苷酸片段能否作为探针用

于细菌鉴定，最根本的条件是它的特异性，即它能与所检测的细菌的核酸杂交而不能与其他细菌的核酸杂交。因此，根据特异性的不同，在微生物鉴定与检测中的作用也不同，有的探针只用于某一菌型的检测，有的可能用于某一种、属、科甚至更大类群范围的微生物的检测或鉴定。例如，由一株淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)隐性质粒制备的 DNA 探针，它具有种的特异性，可用来检测和鉴定这种引起人类性行为传播疾病的细菌。

(三) 血清学试验与噬菌体分型

1. 血清学试验 细菌细胞含有蛋白质、脂蛋白、脂多糖等具有抗原性的物质。由于不同细菌的抗原物质结构不同，因此赋予了它们不同的抗原特征。一种细菌的抗原除了可与它自身的抗体起特异性反应外，若它与其他种类的细菌具有共同的抗原组分，它们的抗原和抗体之间就会发生交叉反应。因此，我们可以在生物体外进行不同细菌之间抗原与抗体反应试验——血清学试验来进行细菌的分类和鉴定。使用的方法除了凝集反应外，还有沉淀反应(凝胶扩散、免疫电泳)、补体结合试验、直接或间接的免疫荧光抗体技术、酶联免疫组织化学等方法。通常是对全细胞或者细胞壁、鞭毛、荚膜或黏液层的抗原性进行分析比较。此外，也可以用纯化的蛋白质(酶)进行分析，以比较不同细菌同源蛋白质之间的结构相似性。

研究表明，血清学试验主要适用于抗原结构同源程度高(蛋白质同源序列 70% 以上)的细菌种内以及个别属内血清型的分类鉴定。血清学反应具有特异性强、灵敏度高、简便快速等优点。

2. 噬菌体分型 噬菌体对宿主的感染和裂解作用常具有高度的特异性，即一种噬菌体往往只能感染和裂解某种细菌，甚至只裂解种内的某些菌株；所以，根据噬菌体的宿主范围可将细菌分为不同的噬菌型，利用噬菌体裂解作用的特异性进行细菌鉴定。这对于追溯传染病来源、流行病学调查以及病原菌的检测鉴定有重要意义。例如，鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)噬菌体已被用于对该菌的快速鉴定。

鉴定噬菌体对细菌的裂解反应的技术并不复杂，只要将烈性噬菌体悬液滴在新鲜的、处在对数生长期的细菌平板培养物上，或者将噬菌体滴入新鲜的细菌液体培养物中，适温培养 16~48h，若平板上出现噬菌斑(透明斑)，或者使液体培养物由混浊变澄清，即说明噬菌体对该菌有裂解作用，否则为阴性结果。

(四) 细菌快速鉴定和自动化分析技术

近 20 多年来，随着微电子、计算机、分子生物学、物理、化学等先进技术向微生物学的渗透和多学科的交叉，这方面已取得了突破性进展，许多快速、准确、敏感、简易、自动化的方法技术，在细菌鉴定中被广为使用。

1. 微量多项试验鉴定系统 该系统的基本原理是根据细菌生理生化特征鉴定的结果而进行的数码分类鉴定。这种技术也称为简易诊检技术，或数码分类鉴定法。它是针对细菌的生理生化特征，配制各种培养基、反应底物、试剂等，分别微量(约 0.1ml)加入各个分隔室中(或用小圆纸片吸收)，冷冻干燥脱水或不干燥脱水，各分隔室在同一塑料条或板上构成检测卡。试验时加入待检测的某一种菌液，培养 2~48h，观察鉴定卡上各项反应，按判定表判定试验结果。用此结果编码，查检索表(根据数码分类鉴定的原理编制而成)，得到鉴定结果，或将编码输入计算机，用根据数码分类鉴定原理编制的软件鉴定，打印出结果。

目前，微量多项试验鉴定系统可鉴定几乎所有常见的细菌，微量多项鉴定技术优点突

出, 不仅能快速、敏感、准确、重复性好地鉴定细菌, 而且简易, 节省人力、物力、时间和空间, 是微生物鉴定技术向快速、简易和自动化发展的重要方向之一。

2. 快速、自动化微生物检测仪器和设备 这方面的仪器和设备可以分为两大类: 一类是物理、化学等领域通常使用的仪器和设备(气相色谱仪、高压液相色谱仪、高压液相质谱仪、X 射线衍射仪、核磁共振波谱仪、激光拉曼光谱仪、激光显微镜等); 另一类是为微生物学领域专用或首先使用的自动化程度很高的仪器和设备(阻抗测定仪、放射测定仪、微量量热仪、生物发光测量仪、药敏自动测定仪、自动微生物检测仪等)。它们包括: 物理、化学、材料、电子信息等科学和技术领域通常使用的分析、测量物质成分、结构、性能和各种信息(热、电、光等)的自动化的精密仪器和设备, 几乎都能用于细菌的快速鉴定和自动化分析。这是基于: 第一, 每种细菌的化学组成都有独特之处, 其结构、性能差别能用这些通用的仪器测量出来; 第二, 由于每种细菌代谢过程不同, 从而产生的特异性的代谢产物, 能量变换和信息传递的差异, 也能用这类精密仪器测量出来, 第三, 不同的细菌对环境有着不同的影响, 包括对环境中物质的降解、能量和信息的变化等的不同。通用的这类仪器都可用于测量分析。上述三方面测量出来的数据, 分别或综合起来就能够获得每种微生物的特征“指纹图”, 用目测法或计算机将未知细菌的特征“指纹图”与已知细菌的“指纹图”比较分析, 能对未知细菌做出快速鉴定。例如用裂解气相色谱法测量嗜麦芽假单胞菌(*P. maltophilia*)的全细胞组分, 获得的特征“指纹图”, 就与完全相同条件下获得的其他细菌如野油菜黄单胞菌(*Anthoronas campestris*)的“指纹图”有显著差别。分析比较“指纹图”的异同, 对待检测的细菌能迅速做出鉴定结果。

通用的和专用的仪器设备, 是现代先进技术的汇成, 绝大多数都装配有计算机加工处理系统, 实现了快速、准确、敏感、自动化检测。就快速而论, 能在几小时或几分钟, 甚至几秒钟内获得结果; 准确性均可达到常规方法的 95% 以上; 敏感性最高可达皮克, 约相当于一个细菌或其产物水平; 自动化可达以半自动直至全自动的程度, 有的从进样、检测、分析, 一直到打印出可观性强的准确结果, 都是自动操作。有的仪器对细菌的检测, 绕过了繁琐的分离过程和纯培养操作, 直接用样品进行鉴定或测量: 有的仪器一机多用, 具有对细菌鉴定、计数、药敏等功能。总之, 这些仪器各具特色, 主要用途各有侧重。

由于上述快速鉴定系统主要是针对人类病原微生物而设计的, 在水产病原菌检测方面尚有局限性, 实际应用也较少。随着分子生物学和免疫学及其技术的发展, 各种各样的 DNA 探针、聚合酶链式反应(PCR)技术、DNA 芯片(基因芯片)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、免疫荧光(immunofluorescence)技术、放射免疫(radioimmunoassay)和全自动鉴定系统等方法的不断研究、完善, 并在微生物领域日益广泛采用, 使许多鉴定微生物的技术和方法更加准确、简便、快速, 适用于水产微生物鉴定的特异、快速鉴定技术和系统必将有更大进展。

思考题

1. 简述细菌鉴定的主要步骤。
2. 细菌鉴定包括的主要方法有哪些?

第五章 真菌概述

真菌(fungus)是一大类真核微生物,不含叶绿素,无根、茎、叶,营腐生或寄生生活,仅少数类群为单细胞,其余为多细胞,大多数呈分支或不分支的丝状体,能进行有性和无性繁殖。从形态上分为酵母菌、霉菌和担子菌。

真菌不仅种类多、数量大,而且分布极为广泛,与人类生产与生活有着极密切的利害关系。绝大多数对人和动物有益,如利用某些真菌及代谢产物生产化工、医药、轻工产品,如青霉素由青霉产生;某些真菌菌体可直接入药或食用,如多种食用菌;某些类群可感染人或动物致病,有的则可引致食品、谷物、农副产品发霉变质,甚至产生毒素直接或间接的危害人和动物的健康。

第一节 真菌的分类及生物学特性

真菌在生物界中的地位随着生物界的划分不断变化,在古老的林奈两界系统(1735年)中,真菌属于植物界的真菌门,这种划分法一直沿用了二百多年。1959年Wittaker采用四界分类法,第一次将真菌单列为界,即原生生物界、真菌界、植物界和动物界。1969年他又将四界发展为六界,即原核生物界、原生生物界、植物界、真菌界、动物界以及病毒界,这一系统得到了生物学和真菌学同行的认同,被生物学和真菌学教科书普遍采用。

一、真菌的分类

真菌学发展迅速,分类较复杂多,根据第8版《真菌字典》(Ainsworth等,1995),目前将真菌界分为5个门。

壶菌门(Chytridiomycota) 无中隔丝状或单细胞,大多数生于水中,少数两栖(土壤)和陆生,无性繁殖产生有鞭毛的游动孢子;有性繁殖产生卵孢子。能寄生于植物。

接合菌门(Zygomycota) 多数腐生,少数为寄生,多为无隔菌丝。无性繁殖产生孢子囊孢子;有性繁殖产生接合孢子。极少数偶致动物疾病。

子囊菌门(Ascomycota) 腐生或寄生。寄生于植物上可引起多种植物病害,少数寄生人、动物体上。类群较大,多数为有隔菌丝,少数为单细胞。无性繁殖为出芽或形成分生孢子,有性繁殖形成子囊孢子。

担子菌门(Basidiomycota) 为大型腐生真菌,由有隔菌丝组成各种子实体,多数不存在无性繁殖,有性繁殖产生担孢子。有植物病原菌,草食动物食后可中毒。

半知菌门(Deuteromycota) 菌丝有中隔,只知其无性繁殖,产生分生孢子,不知其有性繁殖,故称“半知”。有的能引起人和动物病害。

半知菌中,一经发现其有性代,分类上即转入子囊菌或担子菌,例如病原菌中的:

发癣菌属(*Trichophyton*),发现其有性代的子囊孢子,即为子囊菌中的节皮癣菌属(*Arthroderma*);

小芽胞癣菌属(*Microsporum*)的有性孢子也是子囊孢子,即为子囊菌中的南氏癣菌属(*Nannizzia*);

荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulifum*)有性孢子也是子囊孢子,即为子囊菌中的荚膜埃氏霉菌(*Emmonsia capsulifum*),新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)的有性代被发现是担孢子,共分类便属于担子菌的新型线黑粉菌(*Filobasidiella neoformans*)等等。虽然如此,但人医、兽医仍一直沿用老的半知菌门的名称。

过去的真菌界又称菌物(裘维藩, 1993), 还包括卵菌门(*Oomycota*)及黏菌门(*Myxomycota*)等, 现已分出, 但习惯上卵菌与黏菌仍由真菌学家研究。卵菌中的水霉目(*Saprolegniales*)某些成员是鱼类水霉病的病原。

酵母菌、霉菌、担子菌不是分类学名称, 而是形态群的俗称, 它们分属于真菌的各门, 如霉菌分属于壶菌门、接合菌门或子囊菌门中。

(一) 酵母菌

酵母菌(yeast)是一类单细胞的真核微生物, 该名称是五分类学意义的习惯名称。这类微生物现知的有 370 多种。它们主要分布在含糖较高的偏酸性环境中, 果实表面以及菜园和果园的土壤中存在较多, 空气和一般土壤中分布较少, 油田和炼油厂附近的土层中往往生长着能利用烃类的酵母菌。

酵母菌菌体较大, 细胞内含有丰富的蛋白质、氨基酸和维生素, 在酿造、食品、医药、石油工业和饲料工业等方面有着广泛用途, 如球拟酵母、白色假丝酵母、类酵母的阿氏囊霉屑、短梗霉属在石油脱蜡和降低石油凝固点方面有重要作用; 酿酒酵母、假丝酵母、红酵母等是良好的单细胞蛋白(single-cell protein, SCP)生产菌; 假丝酵母和黏红酵母在处理炼油厂含油含酚废水中起积极作用; 酵母菌还可用于监测重金属。当然, 酵母菌也有有害作用, 腐生型酵母菌能使食品、纺织品和其他原料腐败变质; 鲁氏酵母、蜂蜜酵母可使蜂蜜、果酱败坏。有的酵母菌还能引起人和动植物的疾病, 如白色假丝酵母可造成人皮肤、黏膜、消化系统的疾病, 新型隐球酵母还引起人的慢性脑膜炎和肺炎等。

1. 形态与结构 一般为圆形、椭圆形、腊肠形, 少数为瓶形; 比细菌大, 约 $1\sim 5\mu\text{m}$ $\times 5\sim 30\mu\text{m}$ 。即使在纯培养中, 各个细胞的形状、大小也有差别。有些酵母菌如热带假丝酵母在无性繁殖过程中子细胞与母细胞连接成链状, 相连面积积极狭小, 菌链呈藕节状, 称之为假菌丝(图 5-1)。真菌丝的细胞相连横截面与细胞横截面一致, 菌链呈竹节状。

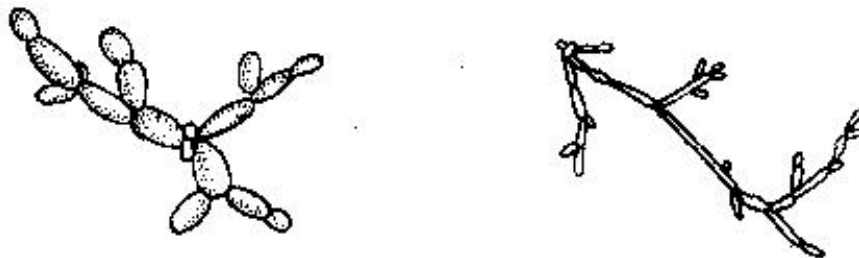


图 5-1 酵母菌的假菌丝

酵母菌具有典型的细胞结构, 包括细胞壁、细胞膜、细胞浆、细胞核和内含物。细胞壁厚度因菌龄而异, 一般为 $100\sim 300\text{nm}$, 占细胞干物质的 10% 左右, 主要由甘露聚糖、葡聚糖、几丁质(chitin)组成。细胞膜与所有生物膜一样, 具有典型的三层结构, 呈液态镶嵌模型, 碳水化合物高于其他细胞膜。细胞膜包裹着细胞浆, 内含细胞核、线粒体、核蛋白体、内质网、高尔基体和纺锤体; 幼龄菌细胞浆均匀, 随菌龄增长可出现 1~2 个液泡、肝糖和异染颗粒; 细胞核外有核膜, 核中有核仁和染色体, 纺锤体在核附近呈球状结构, 包括中心染色质和中心体, 中心体为球状, 内含 1~2 个中心粒(图 5-2)。

2. 生长与繁殖 酵母菌以芽殖为主, 酵母菌是单细胞微生物, 其生长量的测定法与细菌相同。在液体培养基中, 酵母菌的生长繁殖规律与细菌基本相同。如以时间为横坐标,

菌体的干重为纵坐标，可以划出一个与细菌生长曲线相同的生长曲线。此曲线亦可分为四期，即适应期(或称延迟期)、对数生长期(或称指数期)、平衡期(或称稳定期)、衰老期(或称衰亡期)。每期活菌数与总数菌变化规律与细菌生长曲线相同。

酵母菌可进行无性繁殖和有性繁殖，一般以无性繁殖为主。无性繁殖主要为芽殖、裂殖和产生掷孢子。

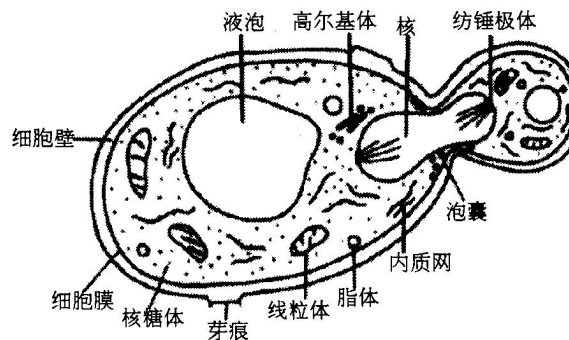


图 5-2 酵母菌的细胞结构

芽殖(budding) 芽殖是酵母菌最常见的繁殖方式。酿酒酵母在营养较好和适宜的条件下生长时，母细胞上长出一个称为芽体的突起。随后，细胞核分裂成两个核，一个留在母细胞内，一个与其他细胞物质一起进入芽体。芽体逐步长大，最后在芽体与母细胞之间形成横隔壁，并与母细胞分离，产生一个新的母细胞。此时，原来的母细胞表面留下一个圆形突起，叫芽痕，新的母细胞上相应地留下一个。母细胞继续生长可再次形成芽体，但新的芽决不会在芽痕上产生。用扫描电镜观察可见到母细胞上有多达 23 个以上的芽体。按母细胞平均表面积计算，每个细胞表面可容纳 100 个左右的芽体，但一个酵母细胞不可能无限制的芽殖，因此可通过细胞表面芽痕的数量大致估计酵母细胞的菌龄。如果经芽殖产生的子细胞不与母细胞分离，则形成假菌丝。根据酵母菌每次芽殖的部位与数量不同，又有单极、双极和多极芽殖之分。单极芽殖是酵母菌在细胞的一端形成一个芽，其代表是瓶球酵母；双极芽殖是酵母菌在细胞的两极各形成一个芽，如汉逊氏酵母；多极芽殖则是能在细胞的多个位点上产生多个芽，如酿酒酵母。

裂殖(fission)为少数酵母菌的繁殖方式，其过程与细胞分裂方式相似。母细胞伸长，核分裂，细胞中央出现横隔将细胞分为两个具有单核的子细胞。

掷孢子(ballistospore)是在营养细胞生出的小梗上形成的无性孢子，成熟后通过一种特有的喷射机制将孢子射出。如掷孢酵母属(*Sporobolomyces*)。

有性繁殖是由两个性别不同的单倍体营养细胞接近，各伸出一根管状突出物而后相互接触，接触处的细胞壁溶解，形成一个通道，称为结合桥。两细胞质融合，形成一个二倍体的细胞核。随即进行 1~3 次分裂，其中一次为减数分裂，形成 2 个、4 个或 8 个子核，每个子核与其周围的细胞质形成孢子，即子囊孢子，原来的细胞壁成为子囊。子囊破裂后孢子散出，在适宜环境下可萌发形成新的酵母菌。酵母菌产生的子囊和子囊孢子有不同形状，是酵母菌分类的重要依据。

3. 酵母菌的培养

(1)酵母菌的培养条件

酵母菌的营养类型属化能异养型，可将很多有机物作为碳源和氮源。实验室常用马铃薯、麦芽汁、玉米粉、豆芽汁、葡萄糖、蔗糖，酵母膏等制成的培养基培养酵母菌。其中最好的碳源是单糖和双糖，含量应在 10% 以下，超过 30% 则不能生长，不能直接利用淀粉。最好的氮源是蛋白胨、酵母膏、尿素，氨盐和硝酸盐等无机氮也可利用，但含量超过 0.2% 时生长受到抑制。酵母菌绝大多数为嗜中温型生物，培养温度常采用 25~28℃。酵母菌的呼吸类型大多为兼性厌氧型，有氧时生长迅速，少氧或无氧时产生酒精，对酒精的耐受浓度为 3%~6%，酿酒酵母的耐受浓度达 24%。酵母菌的最适 pH 范围为 3~6，其

生长 pH 范围在 2.5~8 之间。酵母菌对湿度和渗透压的耐受比一般微生物要强些,大多数微生物在 a_w 为 0.95~0.99 时生长最好,在 a_w 为 0.60~0.65 时停止生长,但有些酵母菌在 a_w 为 0.60~0.70 时仍能生长。 a_w 是水的活度,它表示在一定温度(如 25℃)下,某溶液或物质在与一定空间空气相平衡时的含水量与空气饱和水量的比值,用小数表示。它代表水被吸附和溶液因子对水可利用性的影响的一种指征,与相对湿度相对应。相对湿度是气象学概念,表示在一定温度下空气的含水量对空气饱和水量的比值,用百分率表示。可用测定蒸汽相中相对湿度的方法得到溶液或物质的 a_w 。如空气的相对湿度为 75%,此刻溶液或物质的 a_w 为 0.75。酵母菌能耐受较高的渗透压,它们在高渗环境下,不仅不会死亡,有些还能生长繁殖。

(2) 酵母菌的培养特征

酵母菌在固体培养基表面能形成菌落,菌落较大且厚,表面光滑、湿润,有黏性,用接种环易挑起。其颜色常为乳白色或红色(如黏红酵母)。培养时间过久,菌落转为干燥,出现皱褶。酵母菌在液体培养基中的培养特征因菌种不同而有差别,有的在液面上形成菌膜,有的在培养基中均匀生长,有的在底部形成沉淀,发酵型的酵母菌产生二氧化碳气体可使培养基表面充满泡沫。

4. 酵母菌的形态观察

(1) 细胞形态观察 将酵母菌接种在麦芽汁或葡萄糖蛋白胨液体培养液中(或两者的固体斜面上),25~28℃下培养 13d。挑取液体培养物置于载玻片上,盖上盖玻片,用高倍镜观察细胞形状、大小以及芽殖或裂殖等现象。如为固体培养物,则应先用无菌水做成水浸片后再行观察。

(2) 假菌丝的观察 酵母菌在液体培养基或人为缺氧条件下培养,细胞本身可延长,向一端出芽再继续延长,形成假菌丝。可用新培养菌种划线接种(23 条线)于马铃薯平板培养基上,在划线上盖上灭菌盖片(75%酒精浸泡,火焰烧去酒精,冷却后盖上),25~28℃培养 35d,用低倍镜观察划线两旁是否有假菌丝及其类型。

(3) 掷孢子的观察 产生掷孢子的酵母菌有在玻璃壁上形成镜像的特性,它们的细胞上先形成小梗,再由小梗上产生孢子,在一定时候通过泌滴作用(drop-excretion),随小梗上分泌的液滴而射出。在测定镜像时,可将酵母菌接种于麦芽汁固体斜面或平板上,25~28℃下培养 37d,观察斜面相对的管壁或皿盖是否形成和菌落形状相同的镜像,并用显微镜观察掷孢子的形状和大小。

(4) 子囊孢子的观察 将酵母菌种在麦芽汁斜面上传代 23 代,再将培养物接种于 Gorod-kowa 培养基、Kleyn 培养基或马铃薯块斜面上,25~28℃培养 35d,按常规涂片、干燥固定,用细菌芽孢染色法染色,观察子囊孢子的形状、大小、子囊内孢子数。23 周后,如不生孢子则改用石膏块培养基。

(5) 酵母菌死活细胞的鉴别 在载玻片上加 0.1%美蓝液 1 滴,取少量酵母菌与染液混匀,盖上盖片后镜检。活细胞新陈代谢旺盛,还原能力强,美蓝液进入细胞后便还原成无色,死细胞无新陈代谢能力,被染成蓝色。实验中应防止染液浓度过大和作用时间过长。

(二) 霉菌

霉菌(Molds) 不是分类学上的名词,而是丝状真菌的通俗名称,通常是指在基质上长出的肉眼可见的绒毛状、棉絮状或蜘蛛网状的丝状真菌。霉菌分布极广,土壤、水域、空气和动植物体内外都有其存在。在自然界,霉菌作为分解者,使淀粉、纤维素、半纤维素

和木质素等复杂的大分子物质分解,从而保证了生态系统中物质得以不断循环。霉菌能产生很多有用产物,被广泛应用于工、农业,为人类造福。如用霉菌制酱、酿酒,生产有机酸(如柠檬酸、葡萄糖酸、延胡索酸等)、酶制剂(淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶等)、抗生素(青霉素、头孢霉素、灰黄霉素等)、维生素(核黄素等)、生物碱(麦角碱等)、多糖(真菌多糖)和植物生长激素(赤霉素)等。有些霉菌还可处理含硝基(-NO₂)化合物的废水,镰刀霉分解无机氰化物的能力强,可使废水中氰化物的除去率达90%以上。霉菌也有很多有害作用,能使农产品霉变,纤维制品腐烂,橡胶老化、脆裂,造成漏气、漏水、漏电。霉菌还能使人和动植物发生疾病,能产生100多种真菌毒素,人畜食用后发生中毒,黄曲霉毒素有很强的致癌作用。很多霉菌引起人和动物的浅部病变(如人的各种癣病、水产动物肤霉病等)和深部感染(如人的肺曲菌病和毛霉菌病等)。植物的很多病害也是霉菌引起的,如水稻稻瘟病、小麦麦锈病等。

1. 形态与结构 霉菌的菌丝(hypha)是由孢子萌发而产生的,菌丝顶端延长,旁侧分支,互相交错成团,形成菌丝体(mycelium),称为霉菌的菌落。菌落大而蓬松,呈绒毛状、絮状等。当菌丝上生长出孢子后,菌落可呈黄、绿、青、蓝等颜色。霉菌菌丝在功能上有了分化,一部分菌丝伸入基质中,起吸收营养作用的称营养菌丝(vegetative mycelium)或基质菌丝。另一部分伸向空气的称气生菌丝(aerial mycelium),一部分气生菌丝发育到能形成绒毛状、蛛网状或絮状菌丝体的真菌,一定阶段,分化成能产生孢子的繁殖器官称繁殖菌丝(reproductive mycelium)。

霉菌菌丝分无隔与有隔两种:无隔膜菌丝呈长管状分支,呈多核单细胞状态。有隔菌丝(septate hypha)是由分支成串的多细胞组成,菌丝中间有隔,隔中央有小孔,细胞核及原生质可流动(图5-3)。霉菌还可形成一些特殊的结构和组织,如菌索、菌核和吸器等,并有一定的功能。菌索是由大量菌丝平行聚集并高度分化成的根状特殊组织,主要起吸收营养和蔓延作用。菌核是由菌丝聚集并分化成的团块结构,是一种休眠体,在不良条件下可保存数年生命力。吸器是某些寄生性真菌菌丝上产生的旁枝,侵入寄主细胞内形成指状、球状或丛枝状的结构,用以吸收寄主细胞中的养料。

菌丝的细胞结构基本与酵母菌相似,细胞壁厚度为100~300μm,成分各有差别,但均含有几丁质,占干重的2%~26%。幼龄菌丝胞浆均匀,老龄时出现液泡。

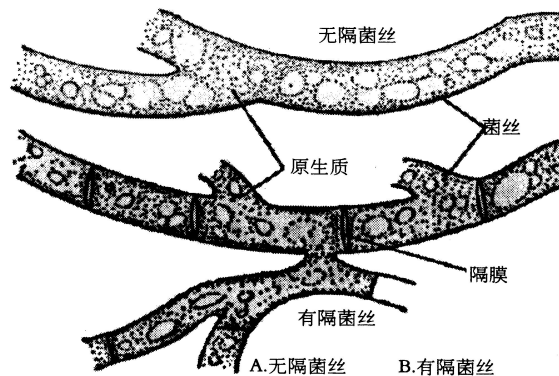


图 5-3 霉菌的两种菌丝

2. 生长与繁殖 霉菌的繁殖能力强,方式多样,可借助菌丝的片断长成新的菌丝体,但主要以形成无性或性孢子进行繁殖。各种孢子在适宜的条件下均可萌发成菌丝。孢子的类型、大小、形状和颜色多种多样,是霉菌分类的重要依据之一。

(1) 无性孢子繁殖

无性孢子繁殖主要形成4种类型无性孢子(图5-4)。

节孢子(anthrospore) 菌丝长到一定阶段,形成很多横隔,然后横隔处断裂,产生很多短杆状的孢子,称为节孢子或粉孢子。白地霉可形成粉孢子。

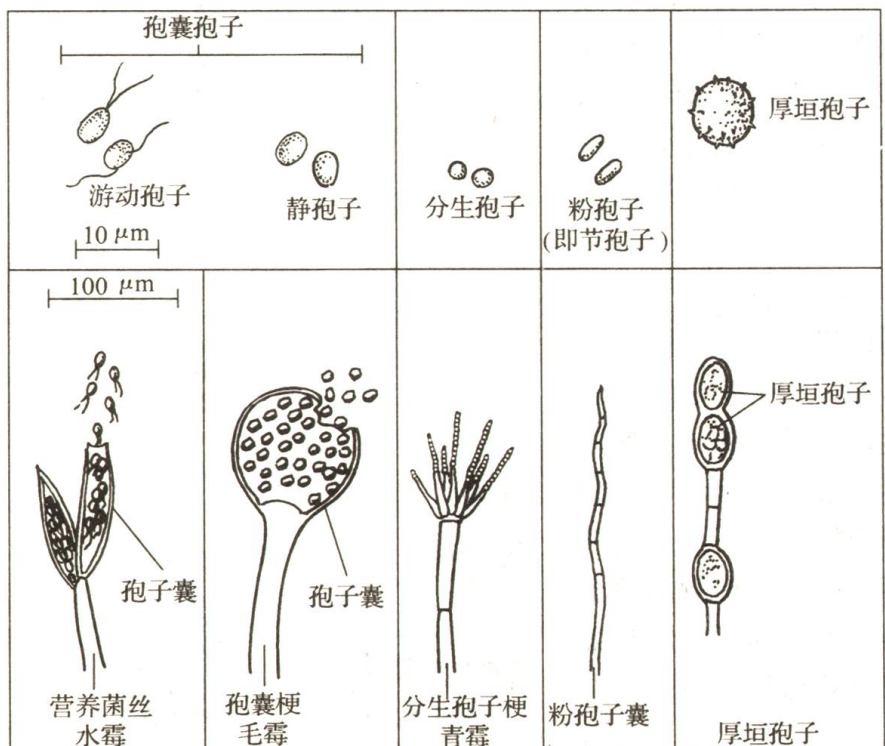


图 5-4 霉菌的无性孢子

孢囊孢子(sporangiospore) 气生菌丝顶端膨大，下方生隔与菌丝隔断，形成孢子囊。孢子囊逐渐长大，囊中形成很多核，每个核包以原生质并产生孢子囊壁，即成孢囊孢子，这种孢子为内生孢子。原来膨大的细胞壁就成为孢囊壁。带有孢子囊的梗叫孢囊梗。孢囊梗伸入到孢子囊中的部分叫囊轴。孢囊孢子成熟后，从破裂的孢子囊散出，或从孢子囊上管或孔口溢出。孢囊孢子有 2 根鞭毛的称为游动孢子，无鞭毛的称不动孢子。水霉、毛霉和根霉能产生此种孢子。

分生孢子(conidium) 菌丝顶端或分生孢子梗顶端细胞分割或缢缩而形成单个或成簇的孢子。这种孢子为外生孢子。青霉和曲霉可形成此类孢子。

厚垣孢子(chlamydospore) 菌丝的顶端或中间的个别细胞膨大，原生质浓缩，细胞壁变厚形成孢子，又称厚壁孢子。它是霉菌度过不良环境的一种休眠体细胞，菌体死亡后，这种孢子还可存活，待条件适宜即可萌发菌丝。

(2)有性孢子繁殖

霉菌的有性繁殖可分为质配、核配和减数分裂 3 个阶段。霉菌的有性繁殖没有无性繁殖普遍，在一般培养基上不常出现。有的霉菌两条营养菌丝就直接结合。多数霉菌则由配子囊(菌丝形成的性细胞)或配子(配子囊产生)相互交配，形成有性孢子，其类型有 3 种(图 5-5)。

卵孢子(oospore) 由两个大小不同的配子囊结合发育而成。小型配子囊称为雄器，大型配子囊称为藏卵器。藏卵器中的原生质与雄器配合之前，收缩成一个或数个原生质团，称卵球。当雄器与藏卵器配合时，雄器中的细胞质和细胞核通过受精管而进入藏卵器与卵球配合，此后卵球生出外壁即成为卵孢子。

接合孢子(zygospore) 由菌丝生出的形态相同或略有不同的配子囊接合而成。首先，

两个相邻的菌丝相遇，各自向对方生出极短的侧枝，称原配子囊。原配子囊接触后，顶端各自膨大并形成横隔，即为配子囊。配子囊下面的部分称配囊柄。最后相接触的两个配子囊之间的横隔消失，其细胞质与细胞核互相配合，同时外部形成厚壁，即为接合孢子。

子囊孢子(ascospore) 先是同一菌丝或相邻的两菌丝上两个大小和形状不同的性细胞互相接触并缠绕。接着两个性细胞经过受精作用后形成分枝的菌丝，称为造囊丝。造囊丝经过减数分裂，产生子囊，每个子囊产生 28 个子囊孢子。在子囊和子囊孢子发育过程中，原来的雄器和藏卵器下面的细胞生出许多菌丝，并有规律地将产囊丝包围，形成子囊果。子囊果有 3 种类型：完全封闭型，称闭囊壳；有孔，称子囊壳；呈盘状，称子囊盘。子囊孢子的形状、大小、颜色、纹饰等有很大差别，是子囊菌的分类依据。

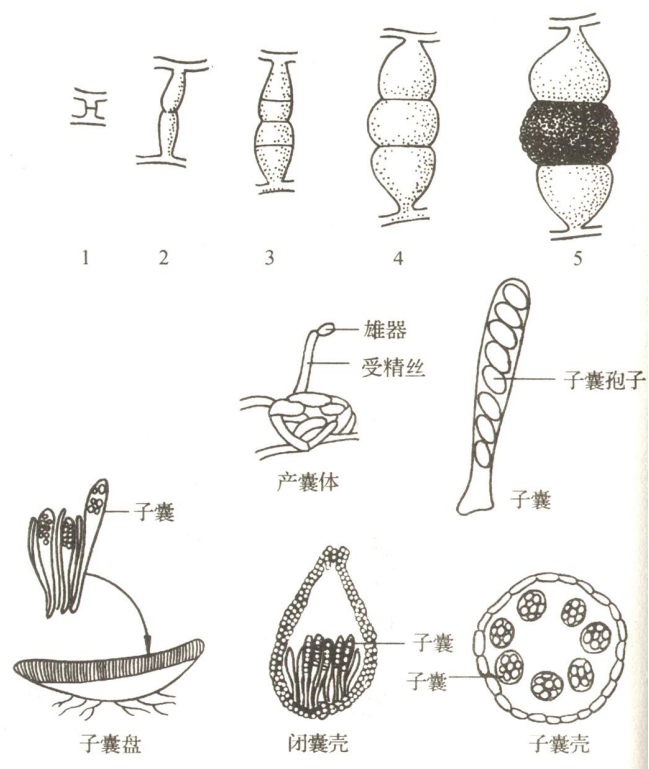


图 5-5 霉菌的有性孢子

(上为接合孢子形成过程，中、下为子囊孢子)

3. 霉菌的培养

(1)霉菌生长繁殖的条件

霉菌绝大多数为化能异养型，对营养物质要求不高，单糖、双糖、糊精、淀粉均可作为碳源，黑曲霉、米曲霉、灰绿青霉、蜡叶芽枝霉、大毛霉等能分解果胶；曲霉属、青霉属、毛霉属和镰刀霉属中的许多种能利用某些简单有机酸或醇类；绿色木霉、灰腐质霉、黑曲霉、土曲霉、烟曲霉、桔青霉和淡黄青霉等能分解纤维素。许多霉菌都有分解蛋白质的能力，它们比细菌更能利用天然蛋白质，如青霉属、曲霉属、根霉、毛霉、木霉和复端孢霉等分解蛋白质的能力很强。氨基酸、蛋白胨、铵盐、硝酸盐、亚硝酸盐、尿素等均可作为霉菌培养的氮源。因此，培养霉菌时，一般只要提供碳水化合物、无机或有机氮就可很好地生长繁殖。但有少数真菌在生长繁殖过程中，还需要少量的生长因子或微量元素。霉菌生长 pH 范围为 1.5~8.5，最适 pH 范围为 4.5~5.5。霉菌生长繁殖的温度一般比细菌低，大多数最适生长温度范围为 20~30℃，但不同种类的霉菌对温度要求也不同，青霉菌的最适温度为 20~25℃，曲霉菌的为 28~30℃，食性链孢霉的为 36℃，哺乳动物组织内的真菌为 37℃。少数霉菌属于嗜热菌，如烟曲霉的适宜生长温度为 40~42℃。还有少数真菌在 0℃ 以下可生长繁殖，引起冷藏食品腐败。多数霉菌是需氧菌，培养时需要充足的氧气。霉菌可在含水量较广泛的范围内生长，比其他微生物更能耐受干燥，但绝大部分要求在湿度较高的空气环境中形成繁殖器官，所以空气湿度大，有利于霉菌生长繁殖。

(2)霉菌的培养特征

霉菌在固体培养基上能形成菌落，第一天内生长较慢，此后生长很快。霉菌菌落比其他微生物的大，呈圆形，绒毛状、絮状或蜘蛛网状，很快可蔓延至整个平板。营养菌丝伸

入培养基内，使菌落不易挑起，有的霉菌菌落有局限性。菌落最初往往是浅色或白色，当长出各种颜色的孢子后，菌落便随种类不同相应地呈现黄、绿、青、黑、橙等各种颜色。由于菌龄不同，菌落中心地周边的色彩深。有的霉菌可产生水溶性和非水溶性(脂溶性)色素，特别是气生菌丝比营养菌丝的色彩深，因而使菌落正反面呈现不同颜色。但是各种霉菌在一定的培养基上形成的菌落形状、大小、颜色等特征是稳定的，因此菌落特征是鉴定霉菌的重要依据之一。霉菌在液体培养基中，往往生长在液面，培养基不呈现混浊。

4. 霉菌的形态观察

(1)菌落形态观察

观察霉菌的菌落形态往往采用点植培养法，用接种针蘸取极少量孢子，点植于平板培养基上，然后将培养皿倒置，于适温下培养 4d、7d、10d。及时观察和描述菌落在各天的特征。

(2)直接取菌法

本法是将固体培养物制成水浸片进行观察。简便易行，可观察霉菌的基本形态或测量大小。方法是在载玻片上加一滴乳酸石炭酸棉蓝染液，用解剖针或接种钩取少量带孢子的菌丝置于染液中，将菌丝体摊开，勿使成团，盖上盖玻片，分别用低倍镜和高倍镜观察菌丝的构造和孢子类型。

(3)玻璃纸透析培养观察法

玻璃纸可允许营养物质透过。最好用透析袋纸，也可收集商品包装用的玻璃纸，加水煮沸，再用冷开水冲洗，变硬的不能用，只有软的可用。将合格的剪成适当大小，浸湿后夹于报纸中高压灭菌。用无菌镊子夹取此纸贴附于平板培养基表面，再用接种环蘸取少许孢子，轻轻抖落于纸上，将平板置 28~30℃ 下培养 35d。剪取小块长有菌丝和孢子的纸片平贴于载玻片上，滴加 12 滴乳酸石炭酸棉蓝液，加盖盖玻片后用显微镜观察。此法可观察到菌丝、孢子及其他构造。

(4)载玻片培养观察法

在平皿皿底铺一张圆形滤纸片，再放一 U 形玻棒，其上放上一洁净载玻片和两块盖玻片，盖上皿盖，包扎后高压灭菌、干燥。取已灭菌的马铃薯琼脂培养基或察氏培养基 67ml 注入另一灭菌平皿中成一薄层，凝固后用解剖刀切两块如盖玻片大小的琼脂块，分别置于 U 形玻棒上载玻片的适当位置，接种少量孢子，再加盖灭菌盖玻片。皿底滤纸上加 20% 甘油，盖上皿盖，置 28℃ 下培养，待长出菌丝后用显微镜观察。该法可观察霉菌生长全过程及完整的霉菌形态结构。

二、生物学特性

真菌与细菌的大小、形态、结构及化学组成差异很大，单细胞个体比细菌大几倍至几十倍。具有细胞壁，但不含细菌细胞壁的肽聚糖。有些真菌因环境条件的改变而改变形态，称之为真菌双相性(dimorphic)，如假皮炎组织胞浆菌在动物机体呈酵母菌样，而在人工培养基上呈丝状。

三、外界因素对真菌生长繁殖的影响

外界因素对真菌生长繁殖的影响很大，在适宜条件下，生长繁殖旺盛；在不利的条件下会受到抑制或死亡。

(一)温度 多数真菌属嗜温菌，生长温度的范围为 10~40℃，最适温度为 25~35℃。寄生在哺乳动物体内的真菌在 37℃ 时生长最好，多数真菌在室温下生长旺盛，少数嗜热真

菌生长温度为 20~50℃，适宜温度为 40~42℃。少数为嗜冷真菌，在 0℃ 以下也能生长繁殖。霉菌的菌丝及酵母菌对热的耐受力与不产生芽孢的细菌相同，在 60℃ 中 10min 即被杀死。而酵母与霉菌的孢子较菌体耐热力高出 5~10℃。

(二) 氢离子浓度 真菌在 pH 1.5~11 范围内可生长繁殖，最适 pH 为 5~10。皮肤病原性真菌的适应范围为 pH 4~10。pH 浓度可影响某些金属离子的溶解，如在酸性条件下， Mg^{2+} 呈游离状态，当 pH 升高时，形成真菌不能利用的不溶复合物。铁离子也有类似情况。外界 pH 能影响真菌细胞内 pH，从而影响酶的活性。但某些真菌可借助自身的活性改变环境的 pH，使其在不同的 pH 中生长繁殖。如动物胃中的酵母菌可耐受 pH 2 环境，而在体外最适 pH 为 5.5~6.0。

(三) 湿度 真菌需在高湿条件下才能生长，多数在相对湿度 95%~100% 条件下生长良好，在 80%~85% 相对湿度中生长不良或停滞；少数真菌可在高渗透压的基质上生长繁殖，依靠酶和质膜调整对盐离子及糖进入细胞内的速度，是其保护正常的代谢活动的关键。

(四) 光线 380~750nm 波长的可见光对真菌生长没有显著的影响，但对孢子的形成和释放有重要作用，因为孢子及产孢结构具有绝对的向光性。紫外光可使真菌发生变异和损伤，妨碍 DNA 的复制。菌丝是否带有色素对紫外光的敏感性有明显差别，暗色色素有保护作用，具有暗色色素的孢子可不受紫外光的影响。

(五) 气体 多数真菌为需氧菌，少数为兼性厌氧菌，个别为严格厌氧菌。环境中二氧化碳的浓度对真菌的生长有明显影响，在 pH 值高的环境中，二氧化碳对真菌呈现毒性作用。

第二节 真菌的致病性

真菌通过不同的形式可引起各种动物的不同疾病，有些真菌呈寄生性致病作用，有些真菌呈条件性致病作用，有些则产生毒素使动物中毒。

(一) 致病性真菌感染 主要是一些外源性真菌感染，可造成皮肤、皮下和全身性感染。目前对其致病机制尚不完全明了。皮肤癣菌感染具有嗜角质性，在皮肤局部大量繁殖后，通过机械刺激和代谢产物的作用，引起局部的炎症和病变。深部感染的真菌遭吞噬细胞吞噬后，不被杀死而能在细胞内繁殖，引起组织慢性肉芽肿性炎症和组织坏死溃疡形成。

(二) 条件致病性真菌感染 一些内源性真菌如念珠菌、曲霉菌、毛霉菌等，致病性不强，只有在机体免疫力降低或长期应用广谱抗生素、激素或放射治疗后，发生机会感染。

(三) 真菌变态反应性疾病 一部分真菌能引起变态反应阳性，但并不致病。但交链孢霉、曲霉、青霉、镰刀菌等污染空气时，引起接触性皮炎等疾病。

(四) 真菌性中毒 在饲料中生长的真菌，动物食后可导致急性或慢性中毒。引起中毒的主要是真菌产生的毒素：如镰刀菌毒素引起的中毒可使肾、肝、心肌、脑组织发生病变；黄曲霉的黄曲霉毒素、杂色霉的杂色霉素、岛青霉的岛青霉素等可引起肝损害；桔青霉的桔青霉素可引起肾小球损害，导致急性或慢性肾病；拟丝孢镰刀菌的毒素可引起动物消化道中毒白细胞缺乏症，死亡率很高。

(五) 致肿瘤 某些真菌产物与肿瘤的发生有着密切关系，黄曲霉毒素毒性很强，小剂量即有致癌作用。自然界中，除黄曲霉外，黑曲霉、赤曲霉等也可以产生黄曲霉毒素。

(六) 真菌的免疫原性 大部分动物对真菌感染有一定的抵抗力。一般认为真菌感染的康复主要靠细胞免疫，血清中抗真菌抗体滴度虽然很高，可用于血清学诊断，但不能抑制

真菌的生长。在真菌的细胞免疫中，T 细胞起主导作用，如 T 细胞受损，机体易发生念珠菌病、曲霉菌病。

第三节 真菌病的诊断与防治

一、真菌病的诊断

真菌病的诊断与细菌病的诊断有相似之处，但真菌的形态往往具有特征性，检查其菌丝或孢子即可作出诊断。

(一)显微镜检查 可作抹片或湿标本片检查。

1. 抹片检查 组织、体液、脓汁以及离心沉淀材料等，均可做成抹片，以姬姆萨染色法或其他适宜方法染色，检查真菌细胞、菌丝、孢子等结构。

2. 湿标本片检查

氢氧化钾片：用于脓汁、痰液、毛发、角质等需要处理以使其透明清晰的材料。于材料上加 10%~20% 氢氧化钾溶液，加盖玻片，微热处理后检查。

乳酸石炭酸棉蓝(lactophenol cotton blue)液片：为真菌实验室最常用的方法之一，具有着色、杀真菌及防腐的作用。可于材料上滴加染液，或将培养物置于染色液滴中，必要时以细针梳理，再加盖玻片后检查。

印度墨汁片：常用以检查某些真菌(例如新型隐球菌)的荚膜。

(二)分离培养 将病料接种于沙堡(Sabouraud)葡萄糖琼脂，某些深部感染的病料，还需接种血液琼脂，分别培养于室温及 37℃，培养后逐日观察。真菌一般生长较慢，往往需培养数日甚至数周。为了防止或减少细菌污染，可于培养基中加入适量抗生素，一般每毫升培养基加 20~100IU 青霉素和 40~200μg 链霉素。

为了能观察真菌的某些特殊结构，还可将分离物接种培养于特殊培养基，例如用玉米粉琼脂培养基来检查白色念珠菌的厚垣孢子等。

培养生长后，可作抹片染色或乳酸石炭酸棉蓝液片，进行真菌形态结构的观察。

为了便于观察真菌的形态结构特征，可作玻片培养。开始生长后，可逐日在显微镜下进行观察，可清晰了解其发育情况。

(三)变态反应诊断 有些真菌病，例如假皮炎组织胞菌引致的马流行性淋巴管炎，可用变态反应进行诊断。

(四)真菌毒素检测 在真菌毒素中毒性疾病，一般应对可疑的饲草、饲料进行真菌毒素检查和产毒真菌的检查。真菌毒素的检测可用免疫学检测或提取后用薄层层析、气相液相色谱分析手段，或接种动物作生物试验。

二、真菌病的防治

在真菌感染中，环境及其他因素起着重要作用。真菌的繁殖要有一定的湿度，所以保持环境、用具、饲料、垫料的干燥，并进行有效的消毒是防止真菌感染的先决条件。动物体表要保持清洁，防止皮肤外伤是预防皮肤真菌感染的重要措施。

霉菌是饲料中的常在菌，在自然条件下，某一类饲料只有一种优势霉菌，其生长繁殖与环境因素有关，如贮藏不当就很容易污染有害真菌，引起变质，不仅丧失营养价值，而且可能引起动物中毒。

霉变的饲料应尽可能废弃，如要利用，应检查毒素并采取解毒措施。含黄曲霉毒素的霉玉米可用生石灰处理破坏毒素；小麦污染 DON(又名呕吐毒素)可用某种厌氧菌解毒，是

一种无公害的可取方法。

引起机体深部感染的真菌大多数是一些致病菌，自然环境中广泛存在，只有当动物机体抵抗力降低时才能引起疾病。所以预防的有效措施是提高畜禽机体的抵抗力和免疫功能，避免长期使用抗生素及射线照射。

碘化物对孢子丝菌病、毛霉菌病有一定疗效，硫酸铜对体外霉菌生长有一定的抑制作用。目前，用于畜禽真菌感染预防和治疗的有效药物不多，而且价格较高。

思考题

1. 什么叫真菌?其主要特性是什么?
2. 酵母菌、霉菌和细菌在形态结构上主要有哪些异同?
3. 酵母菌的构造有哪些?有哪几种繁殖方式?
4. 霉菌有哪几种繁殖方式?产生哪些孢子?
5. 外界条件对真菌生长繁殖影响的因素有哪些?
6. 酵母菌和霉菌各有何主要作用?试述如何利用这些作用服务于水产养殖业。
7. 真菌对动物的致病作用表现在哪几个方面?

第六章 病毒概述

病毒(Virus)一词原义泛指一切有毒的物质,目前指一类微生物的专用术语。病毒的发现由烟草花叶病毒开始。同年德国科学家 Loeffler 和 Frosch 发现家畜口蹄疫的病原体为病毒,揭开了动物病毒学的篇章。

病毒在自然界分布广泛,人与动物、植物、藻类、真菌和细菌都有病毒感染。其中动物病毒种类繁多,多数对宿主有致病作用,引发疫病流行,造成重大损失。例如口蹄疫、流行性感、狂犬病等。有的则可引致肿瘤,例如鸡马立克病病毒、禽白血病病毒等。随着时间的推移和技术的进步,不断有新的病毒被发现,例如引致艾滋病(AIDS)的人与动物的免疫缺陷病毒、致人和猪脑炎并死亡的尼帕(Nipah)病毒等。对脊椎动物病毒的研究是整个病毒学研究中涉及面最广、进展最快、最为深入的一个分支。

第一节 病毒的结构特征

病毒一般以病毒颗粒或病毒子(viral particle 或 virion)的形式存在,具有一定的形态、结构以及传染性。病毒颗粒极其微小,测量单位用 nm(1/1 000 μ m),用电子显微镜(电镜)才观察到。最大的病毒为痘病毒(poxvirus),约 300nm,最小的圆环病毒(circovirus)仅 17nm。病毒颗粒的形态有多种,多数为球状,少数杆状、丝状或子弹状。有的则表现为多形性,如副黏病毒(paramyxovirus)和冠状病毒(coronavirus)等。痘病毒为砖状,某些噬菌体为蝌蚪状。

一、结构

完整的病毒颗粒主要由核酸和蛋白质组成。核酸构成病毒的基因组(genome),为病毒复制、遗传和变异等功能提供遗传信息。由核酸组成的芯髓(core)被衣壳(capsid)包裹,衣壳与芯髓在一起组成核衣壳(nucleocapsid)。衣壳的成分是蛋白质,其功能是保护病毒的核酸免受环境中核酸酶或其他影响因素的破坏,并能介导病毒核酸进入宿主细胞。衣壳蛋白具有抗原性,是病毒颗粒的主要抗原成分。衣壳系由一定数量的壳粒(capsomere)组成。每个壳粒又由一个或多个多肽分子组成。不同种类的病毒衣壳所含的壳粒数目不同,是病毒鉴别和分类的依据之一。

有些病毒在核衣壳外面尚有囊膜(envelope)。囊膜是病毒在成熟过程中从宿主细胞获得的,含有宿主细胞膜或核膜的化学成分。有的囊膜表面有突起,称为纤突

(spike)或膜粒(peplomer)。囊膜与纤突构成病毒颗粒的表面抗原,与宿主细胞嗜性、致病性和免疫原性有密切关系。有囊膜的病毒称为囊膜病毒(enveloped virus),无囊膜的病毒称裸露病毒(naked virus)。病毒的结构模式见图 6-1。

病毒的结构主要是通过电镜观察了解的。近年来,应用 X 衍射、氨基酸测序结合电脑空间构象模拟技术等,发现了某些在电镜下未曾发现的细微结构,例如微 RNA 病毒(picornavirus)颗粒表面的沟槽(canyon)或环突(loop)。

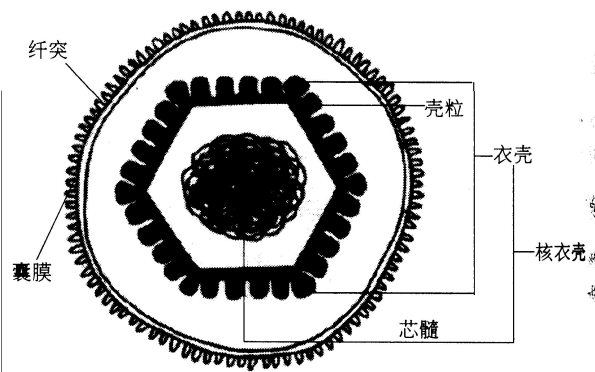


图 6-1 病毒颗粒结构模式图

根据壳粒数目和排列不同，病毒衣壳主要有螺旋状与 20 面体两种对称类型，少数为复合对称。

螺旋对称型(helical symmetry) 病毒核酸呈盘状，壳粒沿核酸走向呈螺旋对称排列，见于黏病毒、弹状病毒及杆状的对虾病毒等。

20 面体立体对称型(icosahedral cubic symmetry) 由于病毒核酸浓集在一起形成球形，外被衣壳的壳粒聚成 20 个等边三角形的面，彼此相连形成 20 面体立体对称的球形，具有 12 个顶角和 30 条棱边。在棱边、三角形面和顶角上皆有对称排列的壳粒。不同病毒的壳粒数目不同，如腺病毒有 252 个，疱疹病毒有 162 个，小 RNA 病毒仅有 32 个。

复合对称型(complex symmetry) 是既有螺旋对称又有立体对称的病毒，如呈砖形的痘类病毒和呈蝌蚪形的噬菌体，结构较为复杂。

衣壳包绕着核酸，具有保护核酸免受核酸酶及其他理化因素破坏的功能，而且表面具有能与宿主细胞受体特异结合的结构。另外，衣壳蛋白具有良好的抗原性，病毒侵入机体后能诱发特异性抗体及细胞免疫等，这些免疫应答不仅有免疫防御作用，而且有的还能引起免疫病理损害，参与病毒的致病机制。

某些病毒除核酸与衣壳等基本结构外，还有包膜或衣壳外面的结构，统称辅助结构。

(1)包膜(envelope): 某些病毒在细胞内成熟过程中以出芽方式穿过核膜和(或)胞质膜、空泡膜等释放至细胞外时，获得包围在衣壳外的宿主细胞成分，此病毒称包膜病毒。病毒包膜并非正常细胞膜成分，此时胞膜上已嵌入病毒编码的糖蛋白，具有病毒的特异性。包膜赋予病毒一定的特性。有些包膜表面有钉状突起，称为包膜粒子(peplomere)或刺突(spike)，构成病毒表面抗原，与病毒的分型、致病性和免疫性等有关。如流感病毒包膜上有血凝素和神经氨酸酶等刺突，是甲型流感病毒划分亚型的主要依据。血凝素对呼吸道上皮细胞和红细胞有特殊的亲和力，神经氨酸酶破坏易感细胞表面的受体，利于病毒的释放。病毒包膜与宿主细胞膜具一定同源性，彼此易于亲和及融合，辅助病毒的感染作用。因包膜系脂质，对脂溶剂(如乙醚、氯仿和胆汁等)敏感，易被溶解破坏，可作为鉴定病毒(耐乙醚、耐酸试验)的一个指标。由于胃酸、胆汁的灭活作用，包膜病毒一般不能经消化道感染。

(2)其他辅助结构: 有些无包膜的病毒衣壳上也有些突出物，如腺病毒衣壳呈 20 面体立体对称，在 20 面体各顶角上有触须样纤维(anlennalfiber)，前端膨大呈球形，与包膜刺突相似，也具有凝集某些动物红细胞和毒害宿主细胞的作用。

第二节 病毒的化学组成

病毒的化学组成包括三类物质：核酸、蛋白质及脂类与糖，前两种是最主要的成分。

一、核酸

病毒的核酸分两大类，DNA 或 RNA，二者不同时存在。核酸可分单股(single stranded)或双股(double stranded)、线状(linear)或环状(circular)、分节段(segmented)或不分节段，分节段可称为多分子，不分节段则为单分子。DNA 病毒多数为双股线状，少数为双股环状，如多瘤病毒(polyomavirus)和乳头瘤病毒(papillomavirus)，或单股线状，如细小病毒(parvovirus)，或单股环状，如圆环病毒。RNA 病毒多数为单股线状，不分节段；少数分节段，如正黏病毒(orthomyxovirus)、布尼病毒(bunyavirus)、砂粒病毒(arenavirus)。少数 RNA 病毒为双股线状，分节段，如呼肠孤病毒(reovirus)和双 RNA 病毒(birnavirus)。

按病毒学的惯例，把 mRNA 的碱基序列作为标准，凡与此相同的核酸称为正股(positive

sense), 与其互补的则为负股(negative sense)。在单股 RNA 病毒中, 冠状病毒、微 RNA 病毒、嵌杯病毒(calicivirus)、披膜病毒(togavirus)等均为正股, 而副黏病毒(paramyxovirus)、弹状病毒(rhabdovirus)、丝状病毒(filovirus)、波纳病毒(bornavirus)等为负股。某些 RNA 病毒如布尼病毒及砂粒病毒, 其单股 RNA 部分节段为负股, 部分为正、负股, 称之为双向(ambisense)。

为了维持核酸的稳定性, 病毒核酸往往具有特殊的结构形式, 如痘病毒的两股 DNA 分子共价交联成发夹样末端(hairpin ends)。腺病毒及细小病毒的 DNA 分子有倒置末端重复序列(inverted terminal repeats), 这些病核酸分子的 5' 端还与病毒的蛋白质(Vp)共价结合, 以起保护作用, 微 RNA 病毒、嵌杯病毒也是如此。病毒如是正股单股 RNA, 其 3' 端一般有聚 A 尾(polyadenylated), 如微 RNA 病毒、嵌杯病毒; 或 5' 端加帽(capped), 如黄病毒(flavivirus); 或二者兼有, 如冠状病毒、披膜病毒。

病毒的基因组大小有很大差异, 最小的 DNA 病毒圆环病毒的基因组仅 1.7kb, 而最大 DNA 病毒疱疹病毒(herpesvirus)及痘病毒大于 200kb。与 DNA 病毒相比, 一般 RNA 病毒基因组较小。双股 RNA 病毒为 16~27kb。单股 RNA 病毒中冠状病毒最大, 为 20~32kb; 小的丁型肝炎病毒(deltavirus)为 1.7kb, 是一种基因组缺损的卫星病毒(satellite virus), 需辅助病毒(helper virus)的存在, 才能复制。与其他生物相比, 病毒的基因组无疑是最小之列。

以 1kb 的 DNA 才足以编码一个平均大小的蛋白质分子计算, 病毒要具有 2~200 个基因, 才能编码 2~200 个蛋白质, 事实并非如此, 病毒能以不同形式最大限度地利用其基因组的编码能力。像单股 RNA 的病毒, 小小的基因组具有若干阅读框, 以及重叠的(overlapping)阅读框, 阅读框能在相反方向编码, 并能通过移码(frameshifting)阅读或变换转录的 mRNA 的剪接(splicing)模式组成阅读框。较大的双股 DNA 病毒能够利用其重复序列及其他复杂的程序, 提高其编码蛋白能力。

传染性核酸 如把噬菌体或某些植物病毒的核酸注入易感细胞内即能引起感染, 并产生完整的病毒颗粒。部分动物病毒也有这种现象, 去除其囊膜和衣壳, 裸露的 DNA 或 RNA 也能感染细胞, 这样的核酸称为传染性核酸(infectious nucleic acid)。传染性核酸不分节段, 其本身能作为 mRNA, 或者能利用宿主细胞的 RNA 聚合酶转录病毒的 mRNA。病毒核酸具有传染性这一事实证明, 它贮藏病毒的全部遗传信息。冠状病毒、微 RNA 病毒、疱疹病毒等都具有传染性核酸。

二、蛋白质

组成病毒的蛋白称为结构蛋白(structural protein), 约占病毒总重量的 70%, 少数低至 30%~40%。病毒蛋白质构成全部衣壳成分和囊膜的主要成分, 具有保护病毒核酸的功能。衣壳蛋白、囊膜蛋白或纤突蛋白可特异地吸附至易感细胞受体并促使病毒穿入细胞, 是决定病毒对宿主细胞嗜型的重要因素。病毒蛋白质是良好的抗原, 可激发机体发生免疫应答。

非结构蛋白(nonstructural protein) 是指病毒组分之外的蛋白, 在病毒复制过程中的某些中间产物, 具有酶的活性或其他功能。非结构蛋白的作用近年来已逐步被了解。

三、脂质与糖

均来自宿主细胞。脂质主要存在于囊膜, 主要是磷脂(约 50%~60%), 其次是胆固醇(约 20%~30%)。用脂溶剂可去除囊膜中的脂质, 使病毒失活。因此常用乙醚或氯仿处理病毒, 再检测其活性, 以确定该病毒是否具有囊膜结构。

糖类一般以糖蛋白的形式存在, 是某些病毒纤突的成分。如流感病毒的血凝素(H)、

神经氨酸酶(N)等，与病毒吸附细胞受体有关。

能破坏病毒囊膜的尚有脱氧胆酸钠、非离子去垢剂如 Triton X100、阴离子去垢剂如十二烷基磺酸钠(SDS)等，SDS 还能将衣壳解离为多肽。

第三节 病毒的复制

病毒增殖(multiplication)只在活细胞内进行，其方式有别于其他微生物，是以病毒基因为模板，在酶的作用下，分别合成其基因及蛋白质，再组装成完整的病毒颗粒，这种方式称为复制(replication)。

病毒的一步生长曲线(one-step growth curve) 感染比(multiplicity of infection, MOI)是指在一个系统中感染病毒的细胞数与细胞总数之比。在人工培养的细胞中，接种高 MOI 的病毒，使所有细胞几乎同时受到病毒感染，如分析该培养系统中的单个细胞，就可以代表病毒在整个体系中所有细胞生长的情况。应用这一方法，可获得病毒一步生长曲线试验的结果(图 6-2)，观察到病毒具有复制周期(replication cycle)。一个完整的复制周期包括吸附、穿入与脱壳、生物合成、组装与释放等步骤(图 6-3)。

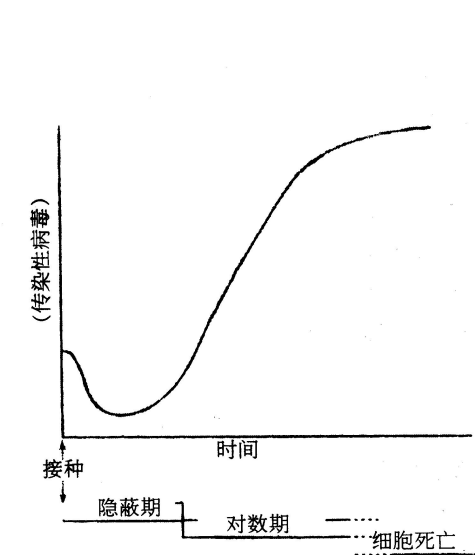


图 6-2 病毒的一步生长曲线

在病毒感染细胞之后的一个短时间内，病毒完全消失，甚至在细胞内也找不到传染性的病毒颗粒，直至感染数小时后子代病毒出现为止，这阶段称为隐蔽期(eclipse period)，一般持续 2~12h。

一、吸附、穿入与脱壳吸附

吸附(adsorption)敏感的宿主细胞是病毒复制的第一步。这过程包含静电吸附及特异性受体吸附两阶段。细胞及病毒颗粒表面都带负电荷， Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等阳离子能降低负电荷，促进静电吸附。吸附是可逆的，非特异的。

特异性吸附对于病毒感染细胞至关重要。病毒表面的分子如纤突等吸附敏感细胞表面

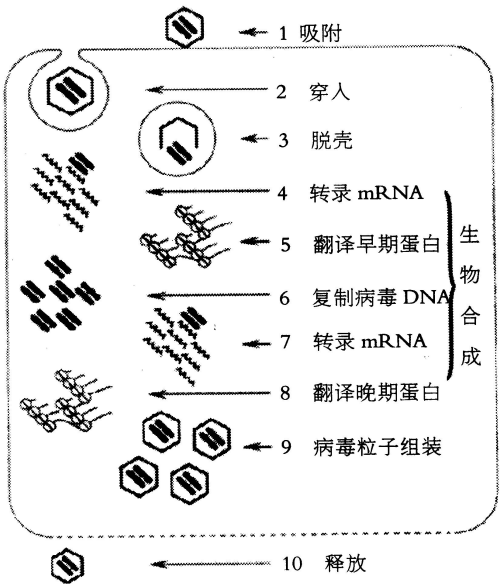


图 6-3 病毒的复制周期

的受体,这种结合是特异的。病毒受体(virus receptor)是宿主细胞表面的特殊结构,多为糖蛋白。例如硫酸乙酰肝素(heparan sulfate)是伪狂犬病病毒的受体,CD9是犬瘟热病毒的受体等。有些病毒颗粒吸附除需受体外还需辅受体(coreceptor),如腺病毒除了纤丝受体外,还需要整合素(integrin)作为辅受体,与病毒五邻体壳粒结合。病毒与受体的特异结合反映了病毒的细胞嗜性(cell tropism)。

某些病毒能凝集红细胞,称为病毒的血凝作用(haemagglutination, HA),其本质也是病毒与细胞受体的结合。研究最充分的有流感病毒,该病毒表面有两种纤突,一种为血凝素(H),能与红细胞表面的唾液酸受体结合;另一种为神经氨酸酶(N),是受体破坏酶,使病毒从吸附的红细胞解脱。病毒的特异抗体可抑制其血凝作用,称为血凝抑制作用(haemagglutination-inhibition, HI)。将 HA 与 HI 二者结合可用于病毒的快速检测。血吸附(haemadsorption)是一种特殊形式的血凝作用,是将红细胞吸附于病毒感染的宿主细胞表面,也可用于病毒的检测,例如非洲猪瘟病毒。

二、穿入与脱壳

最早了解的是某些噬菌体的穿入(penetration)与脱壳(uncoating),它们依靠尾端的溶菌酶在细菌细胞壁开一小孔,尾鞘收缩,尾髓刺入,注入头部的核酸,衣壳则留在细胞外。动物病毒穿入宿主细胞并脱壳的过程有所不同,可发生在胞浆膜、内吞小体及核膜。

(一)在胞浆膜穿入并脱壳 病毒吸附宿主细胞后,在中性 pH 条件下,其表面的融合蛋白(F)的前体 F₀被宿主细胞的酶裂解为 F₁和 F₂两个亚单位,F₁亚单位的 N 端具高度疏水性,为融合多肽区,该区段插入宿主细胞膜,导致病毒颗粒囊膜与细胞膜融合,核衣壳逸出,进入胞浆。新城疫病毒等副黏病毒属于此种类型。

(二)在内吞小体脱壳 某些病毒在吸附细胞后,细胞将其吞饮(pinocytosis),又称病毒胞饮(Viropexis),形成内吞小体(endosome)。此时 H⁺离子(低 pH)作为脱壳信号进入内吞小体,病毒血凝素发生构型变化,暴露融合多肽,贴近内吞小体的细胞膜,融合发生。H⁺离子进而注入病毒颗粒,使核衣壳与病毒膜蛋白解离,释放到胞浆内。流感病毒等属于此种类型。

(三)在核膜脱壳 某些无囊膜的病毒在吸附细胞后,被细胞吞饮,形成内吞小体。此时 H⁺离子进入内吞小体,当 pH<6.5 时,病毒颗粒从内吞小体中释放,进入胞浆,进而向细胞核膜的核孔复合物(pore complex)贴近,病毒基因组及部分衣壳蛋白从衣壳中逸出,通过核孔复合物进入核内。腺病毒等属于此种类型。

三、生物合成

病毒的生物合成(biosynthesis)发生在隐蔽期,非常活跃,包括 mRNA 的转录、蛋白质及 DNA 或 RNA 的合成等。

病毒基因组转录 mRNA 是复制过程的关键步骤。DNA 病毒特别是双股 DNA 病毒的复制机制与真核细胞有相似之处,但 RNA 病毒差别较大。如果是单股正股 RNA 病毒,其 RNA 基因组本身即可作为 mRNA,单股负股或双股 RNA 病毒则必须携带 RNA 依赖的 RNA 聚合酶,以供转录 mRNA 之用。

尽管各种病毒的复制过程千差万别,但其基因组的组成及转录 mRNA 的途径有一定的相似性。有鉴于此,Baltimore (1978)归纳了动物病毒合成 mRNA 的 6 种方式,此后发展为 7 种(图 6-4),尽管比较粗略,但有助于对复杂的病毒复制概念性地理解。

病毒的 mRNA 是多顺反子 mRNA (polycistronic mRNA),通过各种方式翻译产生各种

蛋白质。DNA 病毒将其多顺子 mRNA 转录产物裂解或剪接为单顺反子 mRNA 分子。RNA 病毒大多数在胞浆内复制，没有 RNA 加工通道及剪接酶，因此只能通过其他途径，或是基因组分节段，一般每个节段分子即为一个基因；或是其多顺反子基因组通过转录的终止及再起始，产生单顺反子 RNA 转录物；或者是采用重叠的套式系列(nested set) RNA，每个转录分子再翻译为单个蛋白分子；或者是多顺反子病毒 RNA 翻译为多聚蛋白，然后裂解为所需要的多个蛋白分子。

(一) 转录

大多数正股 RNA 病毒的 RNA 分子直接与核糖体结合，全长或部分进行翻译，无需任何事先转录步骤。但除此之外的其他病毒基因组均需转录为 mRNA，然后再进行蛋白表达。

在细胞核内复制的 DNA 病毒通过细胞的 DNA 依赖的 RNA 聚合酶 II 执行转录功能，其他病毒则需由病毒编码独特的酶，作为病毒的中间产物。在胞浆复制的双股 DNA 病毒携带 DNA 依赖的 RNA 聚合酶，而双股 RNA 病毒有双股 RNA 依赖的 RNA 聚合酶，负股 RNA 病毒则有单股 RNA 依赖的 RNA 聚合酶。

转录的调控 目前倾向于采用转录单位(transcription unit)这一术语，用以描述基因及基因产物之间的关系，它是基因组的某个区段，包括开始转录的起始部位及延伸转录的终止部位以及其间的内含子及外显子，由特定的启动子调控进行表达。由此衍生出两个术语：简单(simple)转录单位及复杂(complex)转录单位，前者仅指编码单个蛋白质，后者编码一个以上的蛋白质分子。

腺病毒是病毒基因组表达调控机制研究的范例。某些腺病毒的转录调控有两个特点，一是其转录单位分早期(E)、中期及晚期(L)转录单位，在复制周期的不同阶段按时序序列(temporal sequence)转录，早期转录单位 E1A 编码的蛋白质诱导 E1B 等其他早期转录单位相继转录。另一个关键是调控转录的终止位点，在感染早期产生具有某个当初终止位点的转录物，在感染晚期则可产生一组具有不同的聚腺苷酸化终止位点的转录物。这一机制再次表明，病毒基因组的核苷酸序列虽然极为有限，但能得到最有效地利用。

RNA 病毒的转录的调控一般没有 DNA 病毒那么复杂，特别是按时序列划分的早期基因、晚期基因并不很明确。

不分节段的负股 RNA 病毒的调控机制为，一旦病毒在感染细胞浆中脱壳，其 RNA 聚合酶即从基因组的 3' 端开始转录，由于只有一个启动子，因此只获得全长正股转录物。

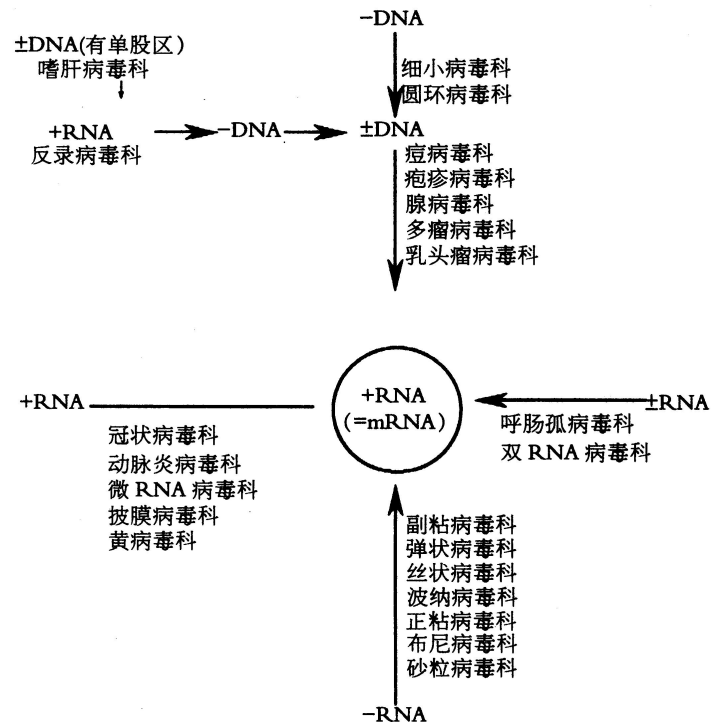


图 6-4 动物病毒转录 mRNA 的基本模式

每个基因的 mRNA 分割成具有相同序列的若干片段，此种序列包括终止信号及起始信号以及具有 U 残基的短的基因间序列，后者可通过转录酶使每个 mRNA 产生一个长的聚 A 尾，机制是通过一个重复拷贝即停-开转录(stop-start transcription)过程，又名打滑(strattering)。

副黏病毒的转录涉及一个称为编辑(editing)的过程。其 P 基因编码 P 及 V 两种蛋白质，二者具有共同的 N 端氨基酸序列，但 C 端序列完全不同，因为在转录酶打滑转录过程中，在转录物中插入了两个不编码的 G 残基，致使阅读框移位。

病毒基因组的某些非编码区具有恒定的序列，在转录过程中起调控作用。病毒基因的每个转录单位在 3' 端附近有一个 mRNA 转录起始部位，在此上游具有启动子(promoter)。在起始部位的上游或下游具有一个若干重复子的序列，称之为增强子(enhancer)，可增强转录。病毒或细胞的 DNA 结合蛋白与启动子或增强子结合，使之激活。病毒的这些调控基因可以转移。

转录后加工(posttranscriptional processing) 真核 DNA 的原始的 RNA 转录物作为 mRNA 运送至胞浆之前，在细胞核内将发生一系列转最后的变化，称之为加工。首先是由 7-甲基鸟苷(m⁷Gppp)的帽加到原始转录物的 5' 端，从而与 40S 核糖体亚单位形成稳定的复合物。第二，50~200 个腺苷残基加到 3' 端，这个聚 A 尾可作为加工及 mRNA 转运的识别信号，并增加 mRNA 在胞浆的稳定性。第三，甲基化，即约 1% 的腺苷酸加上甲基。第四，剪接，即原始转录物的内含子移去，外显子连到一起。对细胞核内增殖 DNA 病毒而言，剪接是调控基因表达的重要机制。某个 RNA 转录物具有多个剪接位点，从而产生多种 mRNA 编码多种蛋白。

有一种非常特别的现象称之为“夺帽”(cap snatching)，流感病毒的转录酶具有内切酶活性，它从细胞核中新合成的细胞 RNA 转录物夺取 5' 端甲基帽，并以此为引物启动病毒基因组的转录。mRNA 的降解率也是一种调控，不仅不同种类的 mRNA 有不同的半衰期，即使同一种 mRNA，在复制的不同阶段，其半衰期也会改变。

(二)翻译

经加工的病毒单顺反子 mRNA 与细胞核糖体结合，然后采用与细胞 mRNA 同样的方式翻译蛋白质。对呼肠孤病毒的这一过程研究最为充分，首先是每个单顺反子 mRNA 分子通过加帽的 5' 端与 40S 核糖体亚单位结合，后者沿 mRNA 分子读码直至起始密码。接着与 60S 核糖体亚单位结合完成翻译过程。

除少数例外，哺乳动物细胞的 mRNA 分子是单顺反子，仅能编码一种蛋白，并且在 5' 端起始密码开始翻译。但是感染细胞的某些病毒如反转录病毒，其多顺反子能翻译多种蛋白，在中间的 AUG 密码能够起始或再起始。

为了选择翻译起始的中间 AUG，可发生移码。当核糖体沿 RNA 分子向前或向后滑行一个核苷酸时，产生一种核糖体移码机制。编码反转录酶就利用了这种机制。

一般而言，病毒早期的转录翻译病毒复制需要的蛋白，包括聚合酶等。晚期的病毒蛋白为子代病毒的结构蛋白。除此之外，还有某些病毒蛋白作为调控蛋白，调控细胞基因或早期病毒基因的转录和翻译。痘病毒编码名为病毒因子的一种大蛋白，它并不调节自身的复制，而是抑制宿主细胞对感染的应答。

大多数病毒蛋白需要各种翻译后加工，诸如磷酸化(以便与核酸结合)、脂肪酸酰化(以便膜插入)、糖基化、十四烷基化或溶蛋白裂解。刚合成的病毒蛋白必须转运到细胞相应的

部位，转运的信号是一些有多肽链的蛋白(分子伴侣)，它们调控蛋白的折叠、转运以及组装。

囊膜蛋白的糖基化 蛋白从粗面内质网向高尔基体复合物及空泡转运，最后运出胞浆膜，在此过程中发生糖基化。病毒囊膜的糖蛋白侧链通常含有简单的低聚糖如高聚甘露糖(high mannose)以及复杂的低聚糖。低聚糖的组分不仅取决于相关蛋白的氨基酸序列及空间结构，而且在更大程度上取决于病毒增殖时细胞中的哪些糖基转移酶占优势。

蛋白的翻译后裂解 微RNA病毒及黄病毒的多顺反子RNA可直接翻译获得一个多聚蛋白。首先将其从核糖体转运出来，然后通过蛋白酶识别特定的位点，将其裂解为若干小蛋白分子。披膜病毒、嵌杯病毒等大部分基因组编码的也是多聚蛋白，也需要翻译后裂解。某些病毒本身编码若干种类的蛋白酶，其中大多数是类胰酶(丝氨酸或半胱氨酸酶)、类胃蛋白酶(天冬氨酰蛋白酶)，或是类木瓜蛋白酶(硫蛋白酶)。

在高尔基体或转运泡(transport vesicle)等细胞器中的细胞蛋白酶，对某些病毒的成熟与组装至关重要。如正黏病毒血凝素糖蛋白及副黏病毒的融合蛋白，只有经细胞蛋白酶的加工，病毒才具有传染性。

四、生物合成的各种途径

(一)DNA 病毒

痘病毒、非洲猪瘟病毒及虹彩病毒等在胞浆复制，它们不仅携带自备的转录酶DNA依赖的RNA聚合酶，而且基因组较大，不依赖细胞核能编码多种酶，病毒DNA直接转录单顺反子mRNA。

疱疹病毒、腺病毒、多瘤病毒及乳头瘤病毒的复制方式最为直接，病毒DNA在细胞核内在细胞的DNA依赖的RNA聚合酶II的催化下转录，具有两个转录方式。一种是转录单位由一个既定的时间模板序列转录；另一种是亚基因组多顺反子RNA移去内含子，裂解剪接成多个单顺反子mRNA。

细小病毒及圆环病毒为单股DNA，利用细胞的DNA聚合酶合成双股DNA，然后在细胞核内的DNA依赖的RNA聚合酶II的催化下转录，再经剪接产生mRNA(图6-5)。

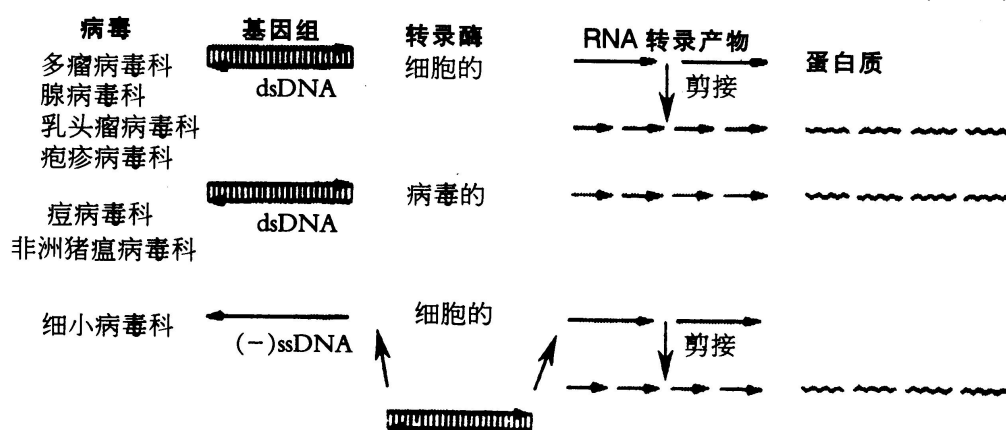


图 6-5 DNA 病毒的生物合成过程示意图

(二)具有反转录过程的病毒

嗜肝病毒基因组部分为双股DNA，部分为单股。首先在病毒依赖的DNA聚合酶的作用下合成互补链，形成一个完整的超螺旋双股DNA结构。在细胞的RNA聚合酶II的催化

下转录，产生的全长的正股 RNA 翻译病毒转录酶并作为负股 DNA 的模板，后者则作为合成双股 DNA 的模板，而后双股 DNA 转录 mRNA(图 6-6)。

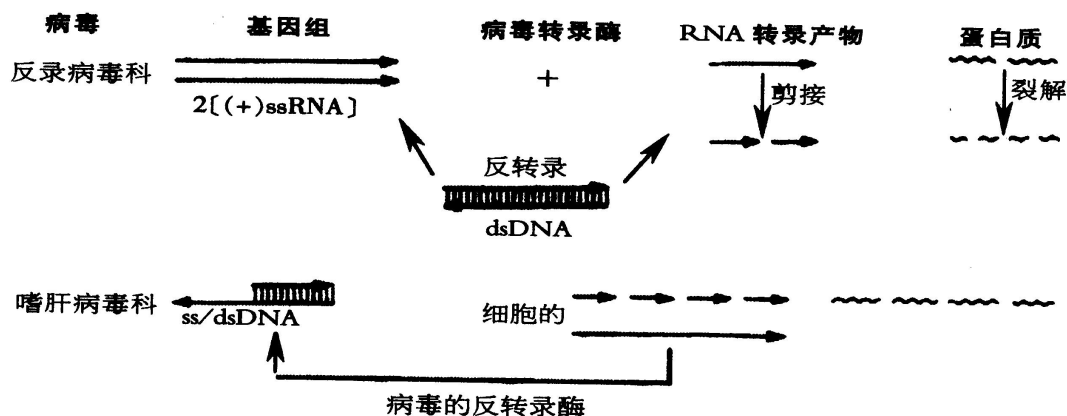


图 6-6 具有反转录过程病毒的生物合成过程示意图

反录病毒具有正股 RNA，但不具备 mRNA 的功能，它在病毒 RNA 依赖的 DNA 聚合酶(反转录酶)的作用下转录，首先产生一个 RNA-DNA 杂交分子，然后在同一酶的作用下形成双股 DNA，并插入细胞 DNA 基因组。此种插入的病毒 DNA 称为前病毒(provirus)，在细胞的 RNA 聚合酶 II 的作用下转录，产物经剪接后进行翻译，所获蛋白质裂解成为病毒蛋白。另外转录的某些全长正股 RNA 两两结合，形成子代病毒颗粒的二倍体基因组(图 6-6)。

(三)RNA 病毒

呼肠孤病毒及双 RNA 病毒具有分节段的双股 RNA 基因组，在病毒相关的转录酶的作用下，每个节段的负股链在胞浆内各自转录产生 mRNA。每个节段正股 RNA 同时也作为合成互补链的模板，进而产生双股 RNA。子代双股 RNA 又供继续转录 mRNA 之用。

副黏病毒、弹状病毒、丝状病毒及波纳病毒均具有单股、负股不分节段的 RNA，携带 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(转录酶)，可转录 5 个或更多的亚基因组正股 RNA 作为单顺反子 mRNA。聚合酶又可作为复制酶，转录产生全长正股 RNA，它作为模板合成子代病毒负股 RNA。

正黏病毒、布尼病毒及砂粒病毒具有分节段的负股 RNA，在病毒携带的转录酶的作用下，每个节段各自进行转录。各节段的转录的 mRNA 可翻译一个或多个蛋白。此外，砂粒病毒的 S 节段及某些布尼病毒是双向节段，具有双向节段的 RNA 病毒的复制是复合式的，同时具有正股及负股 RNA 病毒的性质。

冠状病毒及动脉炎病毒表现出一种独特的转录方式。一开始，病毒部分 RNA 作为 mRNA，并翻译产生 RNA 聚合酶，在此酶的作用下合成基因组全长负股 RNA。再由此 RNA 转录产生重叠的亚基因组 mRNA 套式系列，它们具有共同的 3' 端，但这个系列的每个亚基因组只有 5' 端序列才进行翻译。

微 RNA 病毒、嵌杯病毒、星状病毒、披膜病毒及黄病毒均为正股单股 RNA 病毒，复制的方式是其基因组直接作为 mRNA 之用。微 RNA 病毒及黄病毒基因组作为单个多顺反子 mRNA，翻译为单个多聚蛋白，然后再裂解为病毒结构与非结构蛋白，包括 RNA 依赖

的 RNA 聚合酶。在该酶作用下获得病毒 RNA 的互补链，后者又可作为合成子代正股 RNA 的模板。披膜病毒约 2/3 的病毒 RNA(从 5' 端起)进行翻译，产生的多聚蛋白裂解为非结构蛋白，供 RNA 转录及复制之用。病毒的 RNA 聚合酶催化合成一个全长负股 RNA，由此再复制两个正股拷贝；全长病毒 RNA 及 1/3 长病毒 RNA，后者 3' 端与全长 RNA 共价结合，它翻译多聚蛋白，进而裂解获得病毒结构蛋白。嵌杯病毒既产生基因组全长 mRNA，又产生亚基因组 mRNA(图 6-7)。

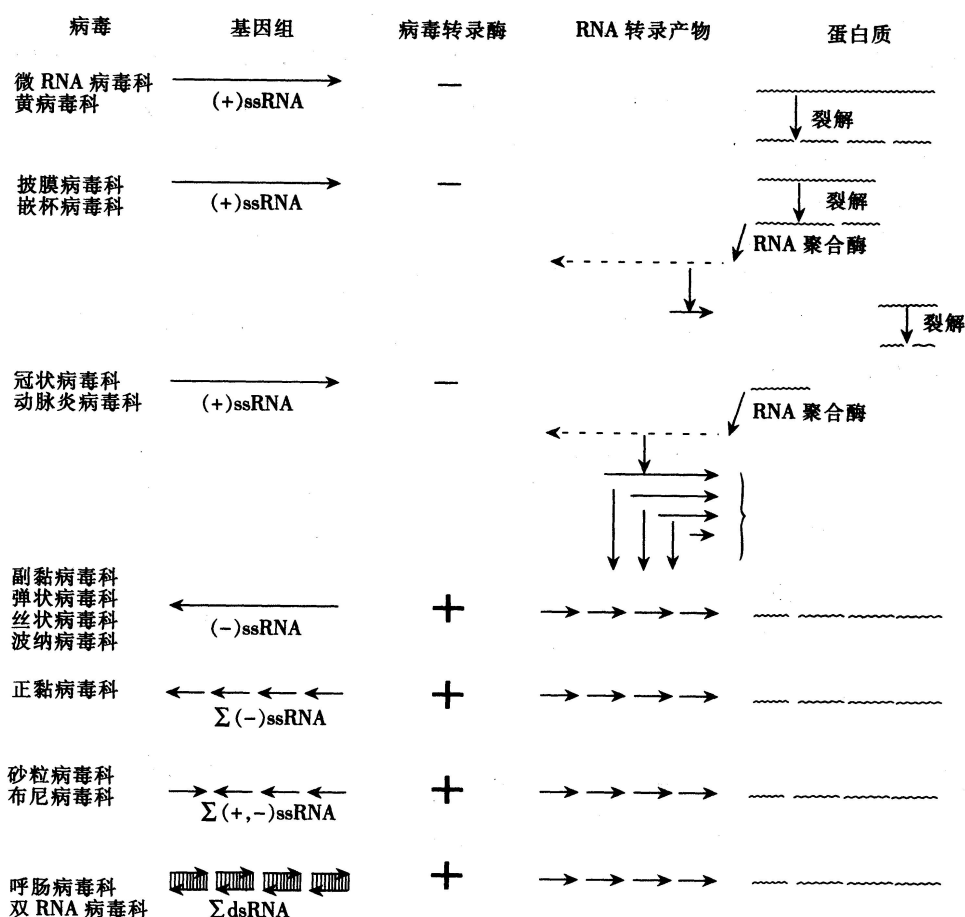


图 6-7 RNA 病毒的生物合成过程示意图

五、组装与释放

(一)无囊膜病毒 无囊膜结构的、简单的 20 面体病毒产生的壳粒可自我组装(self-assembly)，形成衣壳，进而包装核酸形成核衣壳，如微 RNA 病毒、乳头瘤病毒和多瘤病毒等。微 RNA 病毒等的壳粒在自我组装前要经过酶的加工。

腺病毒是由一种蛋白与病毒 DNA 一端的包装序列(packaging sequence)与某种蛋白质结合，从而使 DNA 进入事先装配好的空衣壳内，衣壳蛋白再经酶的加工，产生成熟的病毒颗粒。

大多数无囊膜的病毒蓄积在胞浆或核内，当细胞完全裂解时，释放出病毒颗粒。

(二)有囊膜病毒 有囊膜的病毒以出芽(budding)的方式成熟，有细胞膜出芽及外吐两

种形式。

病毒可从胞浆膜、胞质内膜或核膜出芽。病毒糖蛋白的单体分子连成寡聚体，呈典型的杆状的膜粒，其亲水的外表面突出于胞浆膜，疏水的跨膜区固定于膜内，另一个亲水短区微微凸入胞浆膜。出芽的过程因病毒的种类而异。披膜病毒的核衣壳每个蛋白质分子可直接与膜粒的胞浆膜区结合，从而围绕核衣壳形成囊膜结构。具有螺旋形对称的病毒通常是，其基质蛋白黏附到膜粒的浆膜区结合，而后核衣壳蛋白再识别基质蛋白，进而完成出芽过程。有囊膜的病毒颗粒可在数小时或数天内通过出芽大量释放，对细胞膜并无明显损害。许多从胞浆膜出芽的病毒通常无细胞病变，而且往往与持续性感染有关。

黄病毒、冠状病毒、动脉炎病毒及布尼病毒是穿越高尔基体复合物或粗面内质网的膜出芽，病毒颗粒而后进入空泡，再移入胞浆膜，与之融合，以胞吐(exocytosis)的方式释放。疱疹病毒的出芽比较特殊，它穿越细胞核膜的内薄层(inner lamella)出芽，获得囊膜的病毒颗粒而后直接从两薄层之间，经内质网的储泡(cisternae)排出细胞外。

第四节 病毒的致病机理

病毒与宿主细胞相互作用的结果可引致宿主的临床和病理变化。病毒对动物的致病机理包括：病毒如何侵入宿主防御系统和宿主如何反侵入；病毒感染如何对宿主组织、器官和整体造成损伤以及宿主如何补偿；病毒感染如何对免疫系统造成损伤以及宿主如何补偿。了解病毒对动物个体的致病机理是理解动物群体乃至生态系统中病毒致病本质的基础。本节着重介绍病毒对组织器官，包括免疫器官及机体如何造成损伤，以及宿主的相应变化。

一、病毒感染对宿主组织和器官的损伤

病毒致病的严重程度与该病毒在组织细胞引致的病变程度并无直接关系。许多肠病毒能引起组织细胞病变，但不产生临床症状；反之，反录病毒和狂犬病病毒能引起动物的致死性疾病，但并不产生细胞病变。病毒引起的细胞和组织损伤是否会产生临床疾病因器官而异，损害肌肉或皮下组织等的功能与损害心脏或脑等组织器官的功能，两者显然不同。

(一)对宿主组织和器官的直接损伤

某些杀细胞性病毒对细胞的直接损伤引致机体的临床症状和病理变化。例如，给小鼠静脉注射大剂量裂谷热病毒，小鼠 4h 内发生肝坏死；因为病毒颗粒快速突破肝枯否氏细胞的防御屏障感染肝细胞，发生致死性损伤。

1. 对呼吸道上皮的损伤 呼吸道病毒最初入侵并损伤上皮细胞，逐步损坏呼吸道黏膜的保护层，暴露出越来越多的上皮细胞。病毒感染早期，呼吸道纤毛摆动实际上有助于子代病毒沿着呼吸道扩散。感染后期当上皮细胞损坏时，纤毛停止摆动。

呼吸道表面上皮的退化性变化非常迅速，但能迅速再生。雪貂感染流感病毒后，其移行上皮细胞增生为新的柱状上皮细胞只需几天时间。移行上皮及其新分化的柱状上皮能抵抗感染，原因可能是这些细胞分泌干扰素或缺乏病毒受体。

2. 对消化道上皮的损伤 病毒的消化道感染多数潜伏期短，没有任何前驱症状。引起动物腹泻的病毒主要为轮状病毒，其他还有冠状病毒、凸隆病毒、细小病毒、嵌杯病毒、星状病毒、某些腺病毒。轮状病毒感染肠绒毛顶端的细胞，感染细胞明显变短。相邻肠绒毛有时发生融合，肠道吸收面积减少，导致肠腔中黏液积累并腹泻。细小病毒则感染并损伤分化中的肠腺上皮，切断了肠绒毛上皮细胞的来源。

病毒感染常发生在小肠近端，并逐步向空肠和回肠或结肠扩展。感染扩展程度与摄入病毒量、病毒毒力以及宿主的免疫状况有关。随着感染的发展，肠绒毛的吸收细胞被不成熟的立方上皮细胞代替，后者的吸收能力和酶活性大为下降，但较能抵抗病毒感染，腹泻引致的脱水如果不致死，这种病毒感染常常是自限性的(self-limiting)。机体可很快恢复，如果只感染肠腺尤其如此。

(二)无组织器官损伤时所致的病理变化

某些病毒感染引起的损伤不明显，感染细胞仍能低效地执行正常细胞功能，不表现临床症状，但此时丧失了系统自身平衡必需的特定功能。例如感染淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒的小鼠，其体内生长激素和甲状腺激素由于分泌细胞感染而低于正常水平，导致感染鼠的侏儒综合征。淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒或脑心肌炎病毒(微 RNA 病毒)持续感染胰岛细胞时，会导致胰岛素的终生减少和血糖浓度增高，发生糖尿病。

(三)易致细胞继发感染的组织和器官损伤

某些病毒感染除造成直接损伤外，还易使动物发生继发感染。副流感病毒 3 型或其他呼吸道病毒感染奶牛时，损伤纤毛上皮，引起体液渗出到呼吸道中，使曼氏杆菌(旧名溶血巴氏杆菌)和其他细菌侵入肺，引发继发细菌性肺炎(运输热)。马发生流感时，使链球菌和其他细菌侵入肺，引发肺炎。另一方面，细菌分泌的蛋白酶又能裂解病毒的血凝素，激活病毒的感染。轮状病毒和冠状病毒感染易使肠道发生大肠杆菌的继发感染，导致严重的腹泻。

二、病毒的持续性感染

急性自限性感染对动物而言并不是一般规律。除多数腹泻和呼吸道病毒感染外，多数病毒感染都有程度不等的慢性症状。例如，犬瘟热病毒感染的某些犬在急性疾病阶段结束后，病毒在体内能数月或数年持续存在，引起某些器官的迟发性病理变化。病毒的持续感染在急性症状转轻或转化为亚临床后，还可引起轻微的慢性疾病。

持续性感染的类型

持续性感染可以再次激活，引起宿主的疾病复发，并能引致免疫病理疾病，还与肿瘤的形成有关。病毒能在经免疫的动物体内以持续性感染的方式存活，成为传染源，具有流行病学上的重要性。

病毒持续性感染可分为以下四种类型。

1. 持续性感染 (persistent infections) 不论是否发病，感染性病毒始终存在。可能很迟才发生免疫病理病或肿瘤病。例如引致人汉坦病毒肺综合征的 Sin Nombre 病毒，在带毒鹿鼠(*Peromyscus maniculatus*)的尿液、唾液和粪便中终生排放，即使产生中和抗体也不受影响。

2. 潜伏感染(latent infections) 又名隐性感染，除非激活，一般并不能发现感染性病毒。例如，牛疱疹病毒 1 型引致的奶牛传染性鼻气管炎，如果不发病，在潜伏感染的奶牛体内不能分离到病毒。

3. 慢性感染(slow infections) 传染性病毒在一个很长的临床前阶段逐渐增多，最终导致缓慢的、渐进性致死疾病。例如引致绵羊痒病的朊病毒，在感染神经组织若干年后才能检出，直至动物死亡时，在脑部才达到较高滴度。

4. 迟发性临床症状的急性感染(acute infection with late clinical manifestations) 此类病毒的持续性复制与疾病的进程无关。例如猫全白细胞减少症病毒，胎猫已受感染，直至青

年猫才表现小脑综合征，在神经损伤出现时，并不能分离出病毒，因此这种小脑综合征多年来一直误认为是一种先天性的小脑畸形。

上述分类主要依据持续性感染期间病毒复制的程度和连续性，其次才考虑病毒排放和疾病是否发生。某些病毒的持续性感染同时拥有以上多种类型。例如所有反录病毒都是持续性感染，多数又具有潜伏感染特性，但它们引起的疾病为亚急性迟发性临床症状或者为缓慢的渐进性疾病。

三、病毒感染对免疫系统的损伤

病毒可感染免疫系统的细胞，感染细胞的类型因病毒的种类而异。病毒感染免疫细胞导致免疫系统的损伤，从而加重疾病，或使宿主易于再感染另一种病毒，后者称为双重感染(superinfections)。宿主还会因此出现获得性免疫缺陷和普遍的免疫抑制。

(一) 损伤所致的表现

传染性囊病毒感染鸡的法氏囊，导致囊萎缩和严重的 B 淋巴细胞缺失，宿主因此对沙门氏菌和大肠杆菌等细菌的易感性增加以及发生马立克病毒、新城疫病毒、传染性支气管炎病毒或传染性喉气管炎病毒的双重感染。同时，猫白血病病毒和猫免疫缺陷病毒也能引发多种继发感染。

在发现人类获得性免疫缺陷综合征(AIDS)(1980)及其病原人类免疫缺陷病毒(HIV1 和 HIV2)(1983)之后，相继发现了猴的猴免疫缺陷病毒(SIV)，牛的牛免疫缺陷病毒(BIV)和猫免疫缺陷病毒(FIV)等。这些病毒主要损伤特定的免疫系统细胞，但损伤的免疫细胞不一，引致免疫抑制程度也有差异。部分 SIV 和所有的 BIV 的免疫抑制可能不明显，而 FIV 则可能生长时间感染后导致宿主死于机会感染。

诸如猪瘟病毒、牛病毒性腹泻病毒、犬瘟热病毒、猫和犬细小病毒感染能暂时抑制宿主体液及细胞免疫应答，与子宫内感染病毒形成的免疫耐受不同，它们只是对无关抗原的免疫应答减弱或消失。这种免疫抑制的机理还不完全清楚，可能与病毒在淋巴细胞及巨噬细胞内复制有关。

病毒感染引起的免疫抑制反过来可以增强病毒复制。免疫系统被抑制时，潜在的疱疹病毒、腺病毒或乳头瘤病毒感染会被激活。在人类器官移植使用细胞毒药物或化疗时，常会出现这种情况 AIDS 也是如此。动物不明原因的免疫抑制与疱疹病毒的激活有关。

(二) 病毒病的免疫病理学

免疫应答在疾病的致病机理中起正反两方面作用，对机体既有保护作用也有损伤作用。某些病毒感染，如貂阿留申病毒、禽白血病毒、马传染性贫血病毒、猫免疫缺陷病毒等诱导的免疫应答的后果是致病。

(三) 分子模拟引起的自身免疫损伤

分子模拟(molecular mimicry) 是指宿主细胞成分与病毒蛋白质之间存在分子结构的线性或构象同源性。如果病毒及宿主的抗原决定簇既相似又不相同，即二者的相似的程度足以引起交叉反应，但差异的程度又能突破正常的免疫耐受，这样的分子模拟就会导致自身免疫病。用单克隆抗体可以验证分子模拟这一概念。实际上病毒及宿主蛋白的共同抗原决定簇普遍存在：大约 4% 的抗病毒单克隆抗体与宿主细胞组分反应。通过测序证实了这些共同决定簇的分子基础，如用与共同决定簇序列一致的合成肽注射实验动物，就会引起既抗病毒又抗自身的免疫应答。

例如识别柯赛奇 B4 病毒上中和位点的一种单克隆抗体，也可以与心肌发生反应，此

病毒作用于肌肉组织，包括人和鼠的心肌，可引起人的心肌炎。正常人的髓磷脂基质蛋白与乙肝病毒蛋白、腺病毒、EB 病毒、乳头瘤病毒以及人的疱疹病毒 6 型之间都存在序列的同源性。这些病毒和麻疹病毒、犬瘟热病毒及人的冠状病毒都可能激发人的多发型硬化症和自身免疫神经疾病等。

病毒激发自身免疫病的概念从来没有得到证实；但是可以用病毒与髓磷脂基质蛋白共有多肽免疫动物，诱导出与多种硬化症病理变化相似的自身免疫性脑脊髓炎。这些多肽作为髓磷脂基质蛋白上的分子模拟表位，具有与 MHC 复合物的凹槽相匹配的立体化学结构。宿主 T 细胞在感染部位被激活，激活的 T 细胞穿越血脑屏障，损伤脑组织中的自体抗原。梅迪 / 维斯纳病毒和羊关节炎脑炎病毒感染引起的神经紊乱，同样也与分子模拟机制有关。

第五节 病毒的感染与免疫

病毒的感染是指感染性的病毒通过黏膜(包括呼吸道、消化道、眼、泌尿道等处的黏膜表面)或破损皮肤(如被昆虫或寄生虫叮咬、外伤及动物咬伤等)等途径侵入宿主机体，在局部或全身的易感细胞内复制增殖，造成机体不同程度的病理过程。但感染并不等于传染，后者是指病原体进入机体后，引起机体产生疾病的现象。病毒的增殖和生理活动均与宿主细胞有密切联系，病毒与宿主两方面互相作用的结果直接影响疾病的发生和发展。

(一)细胞对病毒感染的反应

细胞对病毒感染的反应大致有：①发生细胞病变，抑制蛋白、RNA 和 DNA 合成，引起细胞死亡；②无明显变化，病毒虽在细胞内繁殖，而宿主细胞仍继续分裂繁殖，此为稳定状态的非杀细胞性感染；③整合感染，引起细胞转化；④调节细胞凋亡。细胞对病毒的易感性取决于病毒的吸附及向细胞内释放核酸，病毒吸附蛋白以及靶细胞上的特异病毒受体则起着重要作用(表 6-1)。

1. 杀细胞感染

病毒在细胞内增殖造成细胞死亡称为(致)细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)。这种使感染细胞发生明显病理变化，最终导致细胞死亡的病毒感染称为杀细胞感染，多见于无包膜病毒，如腺病毒、肠病毒等。

(1)细胞病变 病毒在体外细胞培养中可以引起细胞病变，大多数细胞培养能看到的细胞反应在机体内也同样存在。病毒核酸编码的早期蛋白和病毒颗粒的大量聚积，特别是病

表 6-1 病毒的宿主细胞受体

病 毒	受 体
脊髓灰质炎病毒	免疫球蛋白超家族成员，一种完整的膜蛋白
鼻病毒	细胞间黏附因子-1
狂犬病毒	乙酰胆碱受体
甲型流感病毒	唾液酸
人免疫缺陷病毒（HIV）	CD4
EB 病毒	淋巴细胞及人咽上皮细胞上的 CR ₂ （补体 C _{3d} 受体）
牛痘病毒	表皮生长因子受体
乙型肝炎病毒	肝细胞 IgA 受体

毒衣壳蛋白对细胞的毒性,可能是引起细胞病变的主要原因。感染细胞可发生显著的肿胀,胞膜通透性也随之发生改变,细胞本身溶酶体酶活化,溶酶体膜的通透性增加,酶逸出而导致最后发生细胞溶解。一些病毒在细胞培养中发生的细胞病变如表 6-2,对病毒鉴定有帮助。

表 6-2 常见病毒引起的细胞病变

病 毒	培养细胞	细胞病变
腺病毒	HeLa 细胞、人胚肾细胞	细胞肿胀变圆,聚集成团呈葡萄串状
脊髓灰质炎病毒	猴肾细胞	细胞变圆、坏死
流感病毒	猴肾细胞	缓慢变圆
副流感病毒	猴肾细胞	细胞膜融合、合胞体形成
单纯疱疹病毒	HeLa 细胞	细胞变圆、形成融合细胞
风疹病毒	人羊膜细胞	缓慢增大、变圆
ECHO 病毒	猴肾细胞	变圆、堆积
流行性乙型脑炎病毒	地鼠肾	细胞变圆、颗粒增多
巨细胞病毒	人成纤维细胞	巨细胞性细胞、核肿大

(2)包涵体形成 病毒感染宿主细胞后,细胞的胞核或胞质内有病毒颗粒或未装配的病毒成分组成的在光学显微镜下可见到的团块,称为包涵体(inclusion body)。根据病毒种类不同,其形成包涵体的大小、形状、数目、存在部位(胞核内、胞质内)及染色性(嗜酸性或嗜碱性)也各异(表 6-3)。因此,包涵体在病毒的实验诊断中具有一定的意义。包涵体成分对宿主细胞的结构和功能均有破坏作用,最终可导致细胞死亡。

表 6-3 某些病毒的包涵体特性

部位	染色性	病毒
细胞核	嗜碱性	腺病毒
	嗜酸性	单纯疱疹病毒、乳多空病毒
细胞质	嗜酸性	副黏病毒、呼肠病毒、狂犬病毒、痘病毒(披膜病毒)
胞核及胞质	嗜酸性	麻疹病毒、巨细胞病毒(正黏病毒)

注:括号内病毒在许多细胞中不产生明显包涵体;* 偶尔为嗜碱性。

(3)细胞融合如将高浓度的或紫外线照射的副黏病毒接种于细胞,能迅速引起培养细胞的融合(或红细胞溶解)。某些病毒感染人体可导致感染细胞与邻近没有感染细胞的融合,形成多核巨细胞的合胞体,并借此促成病毒的扩散。麻疹病毒、副流感病毒、疱疹病毒、呼吸道合胞病毒和 HIV 等感染宿主细胞后,能使细胞膜融合,形成多核巨细胞病变。

2. 稳定状态感染

多见于自宿主细胞膜和以出芽方式增殖的 RNA 病毒。病毒可不断从感染细胞释放,但细胞的新陈代谢和分裂不受影响,也不改变溶酶体膜的通透性,因而不会使细胞溶解死亡。有时受染细胞尚可增殖,甚至还可再受其他病毒的感染。但是,这些稳定状态感染的病毒常在增殖过程中引起宿主细胞膜组分的改变,使细胞出现新的自身抗原,诱发自身免疫应答,也可造成宿主细胞的损害和破坏。在正黏病毒、副黏病毒等感染的细胞膜上的新抗原成分为血凝素,能吸附脊椎动物的红细胞,可用于病毒的检测。

3. 整合感染

有些病毒(如腺病毒、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、人乳头瘤病毒等)DNA 和人类 T 细胞白血病病毒经逆转录产生的 DNA 整合在宿主细胞染色体上, 可通过其编码蛋白引起细胞转化, 发生细胞形态学变化, 丧失其接触抑制的特性, 导致细胞增生, 并在细胞膜上出现新的(病毒特异的)肿瘤移植抗原。整合感染病毒可引起部分细胞转化, 产生肿瘤细胞, 如鲤疱疹病毒和淋巴囊肿病毒感染后形成的病变。虽然病毒的致肿瘤性与肿瘤常有密切关系, 但病毒的转化能力并不等于一定能致肿瘤。这些病毒在恶性变化过程中起激发始动作用, 其致肿瘤作用尚需其他多种因素的参与, 特别是原癌基因激活、抗癌基因的突变失活以及整合感染病毒的 DNA 片断编码蛋白与抗癌蛋白结合后所致的抗癌蛋白失活、降解等。

4. 细胞凋亡

细胞凋亡以细胞质收缩、核染色体裂解和凋亡小体形成为特征。病毒感染细胞后, 通过其自身基因表达或激活宿主细胞凋亡相关基因, 启动或抑制细胞凋亡, 以维持细胞增殖和死亡之间的必要平衡。其影响不仅与病毒感染的发病有关, 而且也是肿瘤形成的一个重要因素。许多病毒感染不只是转化细胞, 而且还阻止细胞的凋亡, 延长了细胞的半衰期, 增加基因突变的机会。

(二) 病毒的感染类型与传播

1. 构成机体病毒感染的因素

相对于细胞水平的病毒感染, 机体的病毒感染是一个复杂且变化着的生物学和病理学过程, 其表现形式和结果取决于病毒、机体和环境条件三者的综合作用。

(1)病毒 病毒的致病性和毒力直接影响病毒感染的表现与结果。致病性是特定的病毒种引起感染过程的潜在能力, 是病毒种的特征。毒力则是特定的病毒株致病性的强弱, 是病毒株的特征。同一种病毒的不同毒株间的致病性可能存在着较大的差异。一般来说, 病毒的毒力越强, 引起机体感染的所需的病毒剂量越低, 机体对病毒的抵抗力越强, 引起感染所需的病毒剂量越高。

(2)机体 病毒入侵机体后, 其在细胞内的活性和在体内的传播与结局, 不仅取决于病毒的性质, 同时也取决于机体的防御结构和防御功能状态。对病毒感染的免疫和抵抗是完整机体的一种生理功能, 以保护机体免受感染或严重感染。除此以外, 机体的年龄、生理状态、营养状况等都影响着机体的病毒感染过程。

(3)环境条件 机体生存所处的地理环境、气候条件中所可能存在的各种理化因子, 以及诸如人的生活方式、动物的饲养管理方式和植物的栽培方式等因素也影响着病毒的感染过程。

2. 感染类型

病毒的感染同细菌感染一样, 可根据不同的形式进行分类。在感染性疾病中, 依据感染症状的明显程度可分为显性感染和隐性感染; 依据病原体传播特点可分为传染性感染和非传染性感染; 依据病原体来源分为外源性感染和内源性感染; 依据感染过程、症状和病理变化发生的主要部位, 可分为局部感染和系统感染, 依据病毒在体内存留时间的长短及其与宿主相互作用的方式可分为急性感染和持续性感染。无论何种感染均可表现为若干类型。

3. 病毒侵入途径及其在体内的传播

(1)侵入途径 病毒必须首先吸附和感染机体表面的易感细胞才能引起疾病;这些表面屏障即鳃、眼结膜、皮肤以及呼吸道、消化道、泌尿生殖道等处的黏膜。习惯上,人的病毒依病毒侵入途径的不同分为呼吸道病毒(包括正黏病毒科、副黏病毒科、疱疹病毒科、小核糖核酸病毒科等侵犯呼吸道的病毒)和肠道病毒(小核糖核酸科)等。还有一大群是由吸血节肢动物为媒介,通过叮咬吸血,在脊椎动物间传播的虫媒病毒(如披膜病毒科、布尼安病毒科)。有些病毒在侵入局部引起症状,有些则无症状,而传播至其他器官造成损害才表观症状。病毒的靶器官及所致的疾病,往往与病毒的分类学地位无关。如流感病毒和腺病毒在分类上不相关(前者为 RNA 病毒,后者为 DNA 病毒),但临床症状非常相似;而副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒虽均属副黏病毒科,却产生完全不同的临床综合征。

病毒通过空气、食物、水、昆虫、寄生虫等媒介经呼吸道、消化道、泌尿生殖道、皮肤等途径在人群或水生动物中不同个体间传播,称为水平传播(horizontal transmission)。大多数的水生动物病毒和人的有些病毒如麻疹病毒、风疹病毒、疱疹病毒、巨细胞病毒、乙型肝炎病毒、HIV 病毒大都经此种方式传播。病毒可经胎盘或产道如水产动物的精、卵直接由亲代传至子代,称为垂直传播(vertical transmission)。

(2)体内传播

上皮表面传播:许多病毒在上皮细胞内生长,在上皮局部散布,并直接播散到外界。如流感病毒、副流感病毒、冠状病毒、鼻病毒等引起的感染,可能破坏上皮细胞,产生炎症反应。但病毒不感染其他细胞,没有或极少侵入上皮下组织。这可能因为它们的受体局限在上皮细胞表面的缘故。

侵入上皮下组织:由于炎症或上皮细胞损伤,破坏了上皮细胞层有过滤作用的基底膜,病毒得以穿入上皮下组织。有些病毒进入淋巴毛细管,并很快进入区域淋巴结,被巨噬细胞吞噬。某些病毒(如麻疹病毒、疱疹病毒、腺病毒和 HIV 等)可在巨噬细胞内增殖,并被其携带而散布于全身。

通过血流进入全身:许多病毒在淋巴结内被滤出及灭活,有些病毒(麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、腺病毒)从淋巴结中滤出后仍具有复制能力而不被消灭。病毒由机体上皮表面经淋巴管或淋巴结进入血流,或者直接进入上皮下血管,游离于血浆或血液组成成分内。分别被带至全身,通常无任何症状和体征。血液中病毒量很少,称之为原发性病毒血症;由于靶器官如脑、肝、肺或肌肉受到侵犯,病毒在内增殖后,大量病毒再次进入血流,形成继发性病毒血症,可发生新的组织感染。例如麻疹病毒由呼吸道侵入体内在局部小量增殖,入血至淋巴组织和单核吞噬细胞系统内繁殖,发生继发性病毒血症,皮肤、黏膜受感染,引起皮疹和黏膜疹。有时病毒还侵入中枢神经系统。

(3)其他途径 孕妇感染风疹病毒、巨细胞病毒后,病毒可越过胎盘屏障感染胎儿,引起流产或胎儿畸形。脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、ECHO、腮腺炎病毒、流行性乙型脑炎病毒等可通过血脑屏障侵入脑组织内增殖,引起脑实质及脑膜病变。有些病毒(如狂犬病病毒、单纯疱疹病毒)可从周围神经纤维传播到中枢神经系统。

(三)抗病毒免疫

机体对病毒感染的基本防御能力与抗菌抵抗力相似,但巨噬细胞、自然杀伤(NK)细胞、干扰素和补体具有较为特殊的作用。巨噬细胞可吞噬病毒,在抗病毒血症中的保护作用较为显著,能阻止病毒在体内扩散。激活后的巨噬细胞这种作用明显增强。NK 细胞能杀死许多病毒感染的靶细胞,其作用虽无病毒特异性,但对病毒感染细胞具有一定的识别作用;

可能与病毒诱发干扰素的调节与协同而增强 NK 细胞的活性有关。

干扰素(interferon, IFN)是一组非特异抑制病毒生长的蛋白质,由病毒感染细胞合成或其他非病毒因子如细胞内毒素、人工合成的聚肌胞(poly I: C)等诱生,分 α (来源于白细胞)、 β (由成纤维细胞产生)和 γ (T 细胞产物)3 种类型。它们抗原性不同,理化性质亦有差异。目前采用重组 DNA 技术,已获得克隆化的均一性 α 、 β 、 γ -IFN。干扰素的抗病毒作用并非直接对病毒的灭活,而是作用于未感染的细胞,使这些细胞处于抑制状态的抗病毒蛋白(AVP)基因去抑制而表达 AVP 以发挥抗病毒作用。抗病毒蛋白包括蛋白激酶、2' ~5' A 合成酶和 2-磷酸二酯酶,可抑制病毒蛋白质的生物合成,亦可影响病毒的组装和释放,从而使病毒不能增殖。受染细胞在病毒复制的同时即合成或释放干扰素,早于特异性免疫的产生,并能很快渗入邻近细胞诱发抗病毒蛋白,限制病毒的扩散。

抗病毒特异性免疫包括体液免疫和细胞免疫两方面。病毒为严格细胞内寄生微生物,以细胞免疫为主,但体液免疫作用于体液中存在的病毒,使其丧失感染力,在抗病毒免疫中也占重要地位。IgG 和 IgM 在血流中直接中和病毒。这种能中和病毒的抗体(中和抗体)与病毒结合,使病毒丧失其对宿主细胞的吸附和穿入。病毒与抗体形成的复合物易被巨噬细胞吞噬、降解。补体也参与中和反应并增强中和作用。有包膜的病毒表面抗原与中和抗体结合后,可激活补体导致病毒溶解。IgA 抗体也可中和病毒的感染性,分泌型 IgA 能在黏膜局部阻止病毒入侵,对再感染有保护作用。细胞免疫主要起清除病毒感染、促使疾病痊愈的重要作用。除 NK 细胞和抗体介导的杀伤细胞因素外,特异的细胞毒 T 细胞(CTL)发挥重要作用。CTL 必须与靶细胞接触才发生杀伤,其效应受 MHC 分子的限制,即 CTL 除了病毒抗原识别外,还需识别细胞膜上 MHC 抗原才能杀伤靶细胞。

第六节 病毒性感染的检测

病毒感染十分常见,70%~80%的人类传染病由病毒感染所引起。迄今为止已证实 500 多种病毒对人有致病性,其中不少病毒危害极大。对鱼类危害的病毒也达 70 余种。因此,病毒学检验对病毒性疾病的诊断、防治及流行病学调查等具有十分重要的意义。病毒感染的检查主要依靠经典的方法和近年来发展起来的分子生物学等方法,主要包括病毒分离纯化、测定、鉴定等。

(一)病毒的分离培养

分离病毒首先要采集到含有足够活病毒的标本,经处理后,接种到敏感的宿主、鸡胚(水生动物病毒不用)和组织培养细胞,使其生长增加,再加以检查以确定可疑病毒的存在。

1. 标本的采集、运送及处理

(1)标本采集 要从病理材料中,成功地分离出病毒,很大程度上取决于标本的恰当采样和处理。为了保证标本质量,应注意以下问题:

采样的时间:标本采集尽可能在发病的初期,越早越好。一般这个时期标本含病毒量多,病毒的检出率高。疾病后期体内产生免疫力(如抗体),病毒减少或消失。

采集标本的容器:应收集于无菌容器中。

标本选择:根据症状及流行病学资料进行,临床初步诊断为哪种病毒感染,对于决定采集何种标本和选择最敏感的试验系统很重要。一般应从感染的部位采取。

(2)标本的运送和处理 大多数病毒抵抗力较弱,在室温中很容易灭活。因此,对于分离培养病毒的标本要快速送到实验室,并立即处理和接种,否则必须冷藏。如耽误时间仅

为数小时，可在 4℃ 冷藏。对于需要较长时间冻存的标本，最好置于一 70℃。对于在冻融过程中易失去感染性的标本，冻存时可加入适当的保护剂如甘油或二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)等。如长途运送标本，需将标本置于装有干冰的可靠的密封容器内。为避免细菌污染，一般标本中应加入抗生素除菌。为使细胞内病毒充分释放，还常经研磨等方法处理以破碎细胞。

(3) 检样接种与感染表现 根据待分离病毒的宿主范围与组织嗜性，同时考虑操作简单、易培养、所产生的感染结果易判定等要求，将处理好的标本以适当途径接种于合适宿主、鸡胚(水生动物病毒不用)或培养细胞。一般来说，噬菌体标本可接种于生长在培养液或营养琼脂平板中的细菌培养物，其存在则表现为细菌培养液变清亮或菌苔上形成噬菌斑(plaque)。动物病毒标本可接种于实验动物和各种培养细胞。接种于培养细胞的标本主要以细胞病变作为病毒感染的指标。大多数动物病毒感染敏感细胞都能产生致细胞病变效应(CPE)，表现为细胞聚集成团、肿大、圆缩、脱落，形成多核细胞，出现包涵体及细胞裂解等。控制接种比例并染色，病毒可在培养的单层细胞上形成肉眼可见的局部病损区，称为空斑。植物病毒接种在敏感的植物叶片上，则可产生坏死斑或枯斑。

一般来说，经第一次接种未出现上述表现时，都需要进行重复接种，即盲传(blind passase)。若盲传后仍无表现，便可判定标本为阴性。

2. 培养方法

制作好的标本接种哪一种组织、细胞或动物，以及选择哪一种途径接种动物，主要取决于宿主细胞对病毒的敏感性和病毒的嗜性。病毒分离培养的方法和鉴定，各实验室可有所不同。它与各专门的实验室的物质设备等条件有关。其中，细胞培养是大多数实验室诊断病毒病最常用的方法。

(1) 组织培养 将人或动物离体活组织或分散的活细胞，模拟体内的生理条件在试管或培养瓶内加以培养，使之生存和生长，称为组织培养。广义上的组织培养技术包括器官培养、组织块培养、单层细胞培养等。目前一般所指的组织培养多指单层细胞培养。器官培养不是常规技术，但因其保持原来的结构与功能，可用于分离某些有高度器官特异性的病毒。例如用单层细胞难以分离出冠状病毒，而用正常小块器官培养容易分离出。组织块培养现已很少使用。

细胞培养根据细胞的来源、染色体特性及传代次数，主要分为 3 种类型：

原代和次代细胞培养：采用机械和胰蛋白酶等处理离体的新鲜组织器官，制成分散的单个细胞悬液，加入营养液(生长液)后，分装于培养管(瓶)中培养。活细胞将贴壁并开始生长繁殖，当与邻近细胞接触时，生长繁殖即停止(即接触性抑制)，数天后形成单层细胞，称为原代细胞培养。将原代细胞培养物用胰蛋白酶或 EDTA 等轻微消化后，再洗下分装至含新鲜培养液的培养管中继续培养，即为次代培养。

二倍体细胞株：原代细胞经过多次传代仍能保持二倍体特性，称之为二倍体细胞株，广泛地用于病毒分离和疫苗生产。但这种细胞有一定寿命(一般只能传 40~50 代)，可在早期传代时制备成冷冻细胞，取出复苏后可传 10 代左右而不明显改变对病毒的敏感性。

传代细胞系：这是能在体外无限期传代的细胞系，来源于肿瘤细胞或细胞株传代过程中变异的细胞系。这类细胞染色体和增殖特征均类似于恶性肿瘤细胞，可以有选择地用来分离和鉴定病毒及其他研究，但有部分病毒不能在此类细胞内生长。由于接种动物有引起肿瘤的潜在危险，也不能用于疫苗生产。常用的传代细胞系有 HeLa(人子宫颈癌)细胞、

Hep-2(人喉上皮癌)细胞、Detroit-6(骨髓瘤)细胞、A549(肺癌细胞)、KB(鼻咽上皮癌)细胞、FL(传代人羊膜)细胞、BHK₂₁ (传代地鼠肾)细胞、Vero(传代非洲绿猴肾)细胞、鲤鱼上皮瘤细胞(EPC)等。

组织培养对很多病毒敏感，数百种对人致病的病毒都先后被分离出来。不同病毒的复制，需要不同的宿主细胞。现仍没有一个细胞系对所有感染的病毒都敏感。因此，恰当地选择细胞以分离标本中的病毒是非常重要的。至今用于水生动物病毒分离的细胞株已达数十种，表 6-4 列出了部分常用细胞株。

细胞培养的方式主要有静置培养和转管培养。静置培养细胞贴附在瓶壁上生长，最后长成单层细胞。转管培养是贴壁细胞不始终浸泡于培养液中，有利细胞呼吸和物质交换，促进病毒复制，增加病毒数量，多用于疫苗生产。

表 6-4 常用的鱼类细胞株

细胞株	来源	适温 (℃)	易感病毒
AS	大西洋蛙心、肝、肾、脾	20	IHNV, IPNV
BB	云斑鲮尾柄	25~30	CCV, IPNV
BF-2	铜吻鳞鳃太阳鱼尾柄	25	HINV, IPNV
CAR	金鱼鳍	25	IPNV
CCO	斑点叉尾鲴性腺	25	CRV, LSV
CF	草鱼鳍条细胞	26~28	GCHV
CHSE-114	大鳞大马哈鱼胚	21	IHNV, IPNV
CHSE-214	大鳞大马哈鱼胚	21	IHNV, IPNV, VHSV
CLK	草鱼肾脏细胞	26~28	GCHV
CO	草鱼性腺细胞	26~28	GCHV
EO	日本鳗鲡性腺	32~36	EVEV, EVAV, EVEX
EPC	鲤鱼上皮瘤	15~30	SVC, PFR, IHNV
FHM	黑头软口鲮尾柄	34	VHSV, SVCV, IPNV
GE-4	食蚊鱼全胚	22	IPNV, IHNV
PG	白斑狗鱼性腺	20	IPNV, PFRV, SVCV, VHSV
RF	虹鳟性腺	20	IPNV, SVCV, VHSV
RTG-2	虹鳟性腺	20	HINV, IPNV, VHSV
RSBF	真鲷稚鱼	20	IPNV
SBV	真鲈肾脏	20	IPNV, IHNV
SE	大马哈鱼胚	15~20	IPNV, IHNV
SSE-5	红大马哈鱼胚	20	IHNV
STE-137	虹鳟胚	21	IHNV, IPNV
YNK	大马哈鱼胚	18~23	IHNV
ZC-7901	草鱼吻端细胞	26~28	GCHV

(2)鸡胚接种 鸡胚常用于恒温动物的病毒如黏液病毒、疱疹病毒、痘类病毒等原代分离。根据病毒种类的不同,接种鸡胚的部位也各异。对于分离流感病毒和腮腺炎病毒以羊膜囊和尿囊途径接种较好,而绒毛尿囊膜接种对于某些疱疹病毒和痘类病毒形成痘泡是高度敏感的,乙型脑炎病毒以卵黄囊接种为好。

(3)动物接种 医学和兽医学实验室常用于分离病毒的实验动物是新生小鼠或乳鼠。如分离各种脑炎病毒、疱疹病毒、登革热病毒等,可选用新生小鼠;肠道病毒中的柯萨奇病毒,最好选用鼠龄在24~48h之内的乳鼠。根据病毒种类不同,除选择敏感动物,还需选择合适的接种部位(鼻内、皮下、脑内、腹腔内、静脉等)。例如嗜神经病毒(流行性乙型脑炎病毒)可接种于小鼠脑内,柯萨奇病毒可接种于小鼠腹腔或脑内。接种后每日观察和记录动物发病情况。如动物死亡,则取病变组织,剪碎、研磨制成悬液后继续传代与鉴定。猴、家兔、豚鼠等也常用于病毒分离。黑猩猩和绒猴等灵长类动物常用作建立动物模型。在分离水生动物病毒时采用的实验动物主要是敏感的本动物,如某种鱼类或蛙、甲鱼等动物。接种途径有注射、浸浴、口服、涂抹等。此外,还应根据病毒的最适增殖温度控制水温。

(二)病毒的感染性测定

对病毒进行定量的分析,确定在所研究的系统中病毒的含量或浓度,即为病毒的测定,包括理化测定和感染性测定两种。前者可借电镜和血细胞凝集试验等测得颗粒数目,后者则指能引起宿主或宿主细胞一定特异性反应的病毒最小剂量,即病毒的感染单位。而待测病毒样品悬液所含的病毒数量,通常就以单位体积(毫升)悬液中的感染单位的数目来表示,称为病毒的感染效价。

1. 噬斑计数

用于噬菌体的感染性测定,一般采用将经系列稀释的噬菌体悬液,与高浓度的细菌悬液以及半固体营养琼脂均匀混合后,倾注在已铺有较高浓度营养琼脂的平板上,成为上层,经孵育后,即在细菌菌苔上出现分散的单个噬斑。统计噬斑数目可计算出噬菌体的效价。

2. 蚀斑测定

将适当浓度的病毒悬液加入单层细胞中,于病毒吸附于细胞上后,再覆盖一层琼脂,经孵育后,病毒在细胞内复制,产生局限性病灶,以活性染料进行染色,,可测蚀斑数。

有些病毒虽不能引起细胞损伤、死亡,但能引起受感染细胞与相邻的未受感染细胞融合,形成合胞体,在显微镜下检查合胞体蚀斑数目,可测定病毒的效价。而能在单层细胞培养中产生增生性病灶的肿瘤病毒,则可根据病灶的数目进行定量,也称转化测定。

有些有包膜的动物病毒,虽不产生明显的致细胞病变效应,但它们在受感染细胞内复制时所合成的具有血细胞凝集活性的表面蛋白,可插入受感染细胞的质膜中,使受感染细胞获得吸附红血球细胞的能力。因此,可利用血细胞吸附蚀斑来进行相应病毒的感染性测定。

3. 坏死斑测定

以能破碎植物细胞壁的粉末状物质和植物病毒的混合物摩擦植物叶片,则产生坏死斑的数目可用来测定植物病毒样品的效价。

4. 终点法

对于那些不能用蚀斑法或坏死斑法测定的动植物病毒,可用终点法定量。

终点法的方法是:将病毒系列稀释,取等体积的各个稀释度的病毒悬液分别接种许多同样的试验单元(如某种实验动植物、鸡胚、细胞等),经过一段时间孵育,依据实验动植

物或鸡胚的患病或死亡，细胞出现病变，病毒繁殖所产生子代病毒的体外识别(如血细胞凝集试验、免疫学反应检查)等，计算试验单元群体中的半数个体出现某一感染反应所需的病毒剂量来确定病毒样品的效价，也称半数效应剂量，如半数致死剂量(LD₅₀)、半数感染剂量(ID₅₀)、半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)。

半数效应剂量是以使 50% 的试验单元出现感染反应的病毒稀释液的稀释度倒数的对数值表示。常用 Reed 和 Muench 最初描述的方法计算半数效应剂量(LD₅₀、ID₅₀、TCID₅₀)。

(三)病毒的纯化与鉴定

自细胞培养、鸡胚或动物中新分离出能稳定传代的病原，并确证无细菌，霉形体等污染，就可以认为已分离到病毒。但究竟是哪一种病毒，必须进行纯化、鉴定。

1. 纯化

将病毒感染的宿主机体组织、体液、分泌物，或病毒感染的细胞经破碎后的抽提物等起始材料中除去非病毒成分的过程称为病毒的纯化。鉴于病毒的性质不同，病毒纯化的标准需遵循纯化的病毒制备物应保持感染性和具有均一性这两个原则。前者可通过病毒的感染性测定进行定量分析，后者可借以下方法检查：

电镜观察 纯化的病毒制备物在电镜下表现为大小、形态均一的颗粒。

超速离心 纯化的病毒制备物在超速离心时，所有颗粒的沉降速率和密度应表现一致，只出现一条沉降带。

电泳 纯化的病毒制备物中的颗粒大小及表面电荷应当均一，在一定强度的电场中只形成一条电泳带。

免疫学方法 纯化的病毒制备物应有特异性的抗原表现，用免疫学方法检测不含有非病毒的抗原成分。

不同的病毒有不同的纯化方法，即使同一种病毒，在不同的宿主系统中纯化的方法也可能有区别。但无论哪种提纯方法，都要依据病毒的理化性质确定：首先，病毒体外表面的主要化学组成是蛋白质，鉴于病毒的高蛋白含量，故可利用蛋白质提纯的方法纯化病毒。其次，病毒体具有一定大小、形状和密度，一般可在 40 000~100 000g 的离心场中，1~2h 沉降。由于病毒制备物必须考虑保持其感染性，所以提纯时要特别注意严格控制温度、pH 及各种试剂。用于病毒纯化的起始材料要选用无其他病毒或毒株的污染，含有大量的病毒体，少含杂质并易于处理的适宜材料。而提纯方法要综合考虑所分离纯化病毒的性质、起始材料的特点、纯化病毒进行研究工作目的以及实验室条件等具体情况，通过大量的预备性试验，再来选择适宜的纯化方法。为了得到最好的纯化效果，保持病毒的感染性，必须建立灵敏的病毒鉴定和测定方法，并在纯化过程的始终，对病毒进行定性和定量的检测。

2. 鉴定

根据症状、流行病学特点、标本来源、易感动物范围、细胞病变特征及生物学特性、理化性质等，可初步确定病毒属于何科或何属。

(1)动物感染范围及潜伏期 根据症状、流行病毒的感染范围，可以初步推断是哪种病毒。动物发病的潜伏期，在初步鉴定上也很重要。如草鱼出血病病毒的感染对象主要是草鱼，只有草鱼发病且症状典型，应采用草鱼作为接种动物或接种草鱼的细胞株。该病的潜伏期一般是 4~7d，若接种草鱼于 2d 内死亡，应怀疑为细菌感染或针刺创伤所致。

(2)细胞培养的表现 病毒在细胞内增殖后，可以引起不同的结果；有的细胞完全被破

坏,有的只有轻微的病变或无可见的变化。各种细胞病变往往随病毒种类和所用细胞类型的不同而异。这些变化在一定条件下比较恒定。常见的细胞形态学变化可归纳为6种类型:①细胞圆缩、分散、不聚集、全部细胞受破坏,如肠道病毒。②细胞肿大、颗粒增多,病变细胞聚集成葡萄状,如腺病毒。③细胞融合形成多核巨细胞,如副黏病毒、疱疹病毒。④轻微病变,如正黏病毒、狂犬病病毒。⑤胞质中有空泡形成,如SV₄₀病毒。⑥有些病毒能使细胞形成嗜酸性或嗜碱性包涵体,位于细胞浆或核内,一个至数个不等。根据病变特点,可做出初步判断,以缩小鉴定范围。

(3)红细胞吸附 有些病毒在组织培养细胞内可以繁殖,不产生细胞病变,但有红细胞吸附现象,如副流感病毒。该现象的产生,是由于病毒在细胞膜成熟释放时,将其血凝素插入细胞膜,使受染细胞能吸附红细胞,是病毒的增殖指标。该现象可被相应的病毒特异性抗体所抑制,称为红细胞吸附抑制试验,可以用来鉴定病毒。

(4)干扰现象 一种病毒感染细胞后,可以干扰以后进入的病毒增殖。可利用此现象鉴定不引起形态学变化的病毒。例如某些型的鼻病毒能干扰以后进入的副流感病毒的增殖,从而阻抑后者的红细胞(血)吸附作用。

(5)血凝性质 许多病毒能吸附于人或一定的哺乳动物和禽类红细胞的表面产生血凝现象。病毒发生血凝反应一般要求一定的pH和温度,这些性质对病毒鉴定有重要意义。血凝现象还可被相应血凝素抗体所抑制,即为血凝抑制试验,具有型别鉴定意义。部分病毒的血凝特性见表6-5。

表 6-5 病毒凝集红细胞的特性

病毒	红细胞	反应条件
正黏病毒	鸡、人、豚鼠	4~37℃, 最适 22℃
副黏病毒	鸡、豚鼠、人或猴	4~37℃
瘟病毒	30%~50%的鸡呈阳性	22~37℃, 最适 37℃
披膜病毒	鹅、鸡, 母绵羊	一定的 pH 和温度
黄病毒	鸡, 人	4℃或 37℃, pH6.4~7.0
腺病毒	大鼠、猴	39℃
呼肠孤病毒	豚鼠	4℃、20℃、37℃
布氏病毒	鹅	37℃
弹状病毒	鹅	4℃
冠状病毒	鸡、大鼠、小鼠	4℃
呼肠孤病毒	人、牛	4℃
小 RNA 病毒	人	
细小病毒	豚鼠、猪、1 日龄雏鸡	4℃
杯状病毒(兔出血症病毒)	人	4~37℃

(6)理化性质

核酸类型测定;可用几种方法测定。最普通的方法是用5-氟-脱氧尿苷测定,其具有抑制DNA病毒增殖而不影响RNA病毒增殖的能力。例如在细胞培养(特别是传代细胞)中含有该化合物时,能完全抑制由单纯疱疹病毒(DNA)引起的细胞病变,而对肠道病毒(RNA病毒)引起的细胞病则无影响。

大小和形态：可用电镜测定病毒的大小和形态，或用超微过滤法估计病毒颗粒的大小。

乙醚敏感试验：可测知病毒外周是否含有类脂的包膜。无包膜的病毒对乙醚处理有抵抗性。如加入乙醚于未稀释的病毒悬液中做病毒感染性丧失试验，有包膜病毒能被脂溶剂所破坏，病毒感染的效价明显改变。对乙醚敏感，则认为被测病毒有包膜。也可用氯仿或脱氧胆酸钠代替乙醚以同样的方法测定病毒类脂成分。

耐酸试验：肠道病毒和鼻病毒皆为小 RNA 病毒，但肠道病毒对酸有抵抗性，而鼻病毒对酸敏感(在 pH 3.0 以下，后者病毒感染效价降低 2~4 个对数)，可以加以区别。

在初步鉴定的基础上，对出现阳性结果的需选择适当的血清学方法和分子生物学方法对病毒分离株做最后鉴定。

(四) 免疫学诊断

虽然近年来随着分子生物学和免疫学技术的发展而出现了一些能直接检测病毒早期感染的诊断方法，但一些传统的病毒血清学诊断方法仍具有较高的应用价值，特别是对于尚无法分离培养和增殖缓慢的病毒所致感染的诊断甚为有用。即便是易于培养的一些病毒感染，血清学方法也具有鉴定病毒的重要意义。血清学诊断方法很多，此处主要简述常用的中和试验、补体结合试验、血凝抑制试验、免疫荧光试验、酶免疫试验。

1. 补体结合试验

补体结合试验是应用抗原和抗体特异性结合后，能激活补体的原理而设计的试验方法。试验中有 5 个成分，包括 2 个抗原-抗体系统和补体。这 2 个系统是病毒特异性抗原-抗体系统和绵羊红细胞-溶血素系统，后者为试验中的识别系统。试验中，当病毒抗原与抗体相对应时形成抗原抗体复合物，所加入的定量补体被结合。溶血系统因无补体而不发生溶血，是为阳性结果。当试验中病毒抗原与抗体不相对应时，加入的定量补体便与溶血系统结合而发生溶血，是为阴性结果。本试验只要变换抑制病毒抗原就能测定许多具有临床意义的相应抗体，即补体结合抗体。该抗体出现早，消失快，可用于早期诊断。该试验需要仔细滴定所有反应成分并使之标准化，步骤比较繁琐。但它不需要在活细胞中进行，比以下所述中和试验简单，得出结果相对较快，并能用已知抗体鉴定分离的病毒及其型别。因此，仍是实验室常用的方法。

2. 中和试验

中和试验是病毒在细胞培养中或在活体内被特异性抗体中和，使病毒失去感染性的一种试验。可用来检查患病后或人工免疫后，机体血清中抗体的增长情况，也可用来鉴定病毒。这一试验表现出质和量的关系，即中和一定量病毒的感染力必须有一定量的特异性抗体。一般是用不同稀释度的血清和定量病毒(100TCID_{50})混合，放置一定时间，然后接种细胞管。每天观察细胞病变，阳性结果判断是以能保护细胞管中的半数细胞不被 100TCID_{50} 病毒所攻击的血清稀释度作为终点效价。该试验也可用鸡胚和易感动物进行，方法基本与上述方法相同。但以细胞培养中和试验最为敏感和准确，而且较活体试验经济方便，常被认为是标准的血清学方法。中和抗体是 IgG，出现时间较补体结合性抗体晚，特异性高，维持时间长，因此流行病学调查常用此法。

3. 血凝抑制试验

病毒的血凝现象能被特异性抗体所抑制，称血凝抑制。其原理是相应的抗体与病毒结合后，阻抑了病毒表面的血凝素与红细胞结合的能力。试验方法简便、快捷、特异性高，常用于有血凝特性病毒感染的诊断、病毒亚型鉴定及抗原变异的检测。

4. 间接免疫荧光检测

应用免疫荧光技术,不但能检测病毒抗原,而且还能检测病毒特异性抗体。方法有直接法和间接法等,临床血清学诊断常用间接法。其主要步骤是将患者血清与玻片载体上相应病毒抗原结合,再加荧光素标记的抗抗体(抗人 IgG 或抗人 IgA 或 IgM),然后用荧光显微镜观察。

5. 酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附试验(ELISA)在病毒血清学诊断中是常用的技术。常用辣根过氧化物酶(HRP)及碱性磷酸酶(AP)标记第二抗体(抗抗体),进行间接测定,或用酶标记抗体,进行夹心法测定。以检测抗 HCV(丙型肝炎病毒抗体)为例,间接法 ELISA 是将稀释的待测血清加入已包被 HCV 抗原(HCV 结构区和非结构区的结合蛋白)的微量反应板中;温育、洗涤后,加入 HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体;温育、洗涤后,加底物(四甲基联苯胺-TMB 及 H_2O_2)反应一定时间,加终止液($2MH_2SO_4$),最后用酶标仪测 OD_{450nm} 值。试验同时设有阴性血清、阳性血清及空白对照。凡样本 OD 值 $\geq$ 临界值者,初步判为有反应(阳性);再将该样本做双孔复测,如果 OD 值仍大于临界值者,判为抗 HCV 阳性;OD 值 $<$ 临界值为阴性。ELISA 在人的肝炎病毒血清学诊断中还常用来检测特异性 HCV-IgM、HDV-IgM、HDV-IgG、抗-Hbe 和抗-HBc 等抗体。我国对草鱼出血病的诊断也应用了此方法。

第七节 噬菌体

噬菌体(bacteriophage, phage)是指以细菌、霉形体、螺旋体、放线菌和真菌等为宿主,侵袭其中并能引起细菌等裂解的病毒。1915 年, Twort 首次发现葡萄球菌噬菌体后,陆续发现噬菌体分布极广,几乎凡有细菌存在的场所,都可能找到相应的噬菌体。噬菌体具有严格的宿主特异性,由于其与细菌的关系较动物病毒与宿主的关系简单,因此至今仍借用噬菌体的模型和理论以及噬菌体的研究技术与手段,来研究生物的复制和探索生命现象的本质,尤其在分子生物学、基因工程的研究和应用中,噬菌体已成为重要的工具。

(一)生物学性状

1. 形态结构

噬菌体的体积微小,需用电子显微镜观察。有蝌蚪状、微球状和细杆状等 3 种外形,大多数噬菌体呈蝌蚪状,由 20 面体的头部及管状的尾部组成。头部直径为 80~100nm,尾部短者长为 10~40nm,长者 100~200nm。头部衣壳排列为立体对称,中心为核酸,多为双股 DNA,也有单股 DNA、双股 RNA 和单股 RNA。尾部髓鞘的壳粒呈螺旋对称,尾领与头部相接,中空的尾髓与头部相通并开口于尾板底部,尾板上有短直的尾刺与细长的尾丝,其末端结构能与细菌表面的受体(如性菌毛、革兰阴性菌外膜蛋白等)结合。有尾噬菌体的核酸为双股 DNA;无尾噬菌体呈微球状,核酸为单股 DNA 或单股 RNA;少数噬菌体为细杆状,核酸为单股 DNA。

噬菌体的尾部是感染细菌的吸附器,具有识别细菌表面特异受体的功能,这种特异性是极为严格的,故可用噬菌体进行细菌的鉴定与分型。根据噬菌体的形态与结构,Bradley 将噬菌分为 6 个基本形态群(表 6-6):A 群是长尾噬菌体,尾鞘收缩使尾髓远端露出,有利于头部的 DNA 注入菌体内;B 群为长尾噬菌体,尾长大于头部的长径,但不具有能收缩的尾鞘;C 群为短尾噬菌体,尾的长度远远短于头部长径,有的极短,甚至难以辨认;D 群呈微球状,而且在 20 面体形成的 12 个顶端上有球状的壳微粒,并附有钉状刺突,可吸

附于细菌表面特异受体，E 群也是微球状，但顶端无球形结构，可吸附于特异细菌的性菌毛侧面；F 群为细杆状噬菌体，不分头尾，以细杆状顶端吸附于细菌性菌毛顶端而完成感染。

表 6-6 噬菌体基本形态群的特征

群	形态	头部	尾部	核酸类型	噬菌体举例
A	蝌蚪状	20 面体	长尾、有尾鞘	dsDNA	大肠杆菌 T ₂ 、T ₄ 、T ₆ ，枯草杆菌 SP50、PBS1
B	蝌蚪状	20 面体	长尾、有尾鞘	dsDNA	大肠杆菌 T1、T5、λ、β、γ，白喉杆菌噬菌体
C	蝌蚪状	20 面体	短尾、有尾鞘	dsDNA	大肠杆菌 T ₃ 、T ₇ ，枯草杆菌 Φ 29、Nf
D	微球状	20 面体	无尾	ssDNA	大肠杆菌噬菌体 Φ x174、Φ R、S13
E	微球状	20 面体顶端有球状壳微粒	无尾	dsRNA	大肠杆菌 f2、MS2、M12、Q β、fr
F	细杆状		不分头尾	ssDNA	大肠杆菌 f1、fd、M13，铜绿假单胞菌 pf1、pf2

2. 化学组成

噬菌体主要是由核酸和蛋白质组成。蛋白质构成噬菌体的头部衣壳及尾部，头部衣壳包裹噬菌体的核酸。大多数噬菌体的 DNA 是由腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)和胞嘧啶(C)组成，其 DNA 结构符合 Watson-Crick 所规定的 A=T、C=G 的当量关系。但有些噬菌体的碱基与上述不同，如大肠杆菌 T 偶数噬菌体 DNA 中由羟甲基胞嘧啶代替胞嘧啶；有些枯草芽孢杆菌噬菌体的 DNA 中，由羟甲基尿嘧啶或尿嘧啶取代胸腺嘧啶。这些 DNA 替代部位的生物学功能尚不清楚，但对这些噬菌体 DNA 复制的研究提供了方便条件，因为宿主菌的 DNA 中不含这些碱基，以此作为天然标记很容易区别出噬菌体或宿主菌的 DNA。尾部蛋白依其部位和构成，至少有 3 种功能：①尾刺与尾丝可对细菌表面特异识别与吸附；②尾板与细菌表面接触后能分泌溶菌酶类，具有酶解作用；③当细胞壁上被酶解形成小洞后，尾部蛋白有收缩作用，可产生压力，以帮助噬菌体头部将核酸注入细菌体内。噬菌体的头尾部蛋白质均具有抗原性，抗噬菌体免疫血清能阻止噬菌体对宿主菌的吸附，但对已吸附的噬菌体不起作用。

3. 抵抗力

噬菌体对理化因素的抵抗力比一般细菌的繁殖体强，加热 70~80℃ 经 30min 仍不失活（多数细菌于 60℃ 30min 则被杀死）。噬菌体在低温下能长期存活，经反复冻融并不减弱其裂解能力。大多数噬菌体能抵抗乙醚、氯仿和乙醇。消毒剂需作用较长时间才能使其失活，如在 0.5% 升汞、0.5% 苯酚中经 3~7d 不丧失活性。但对紫外线和 X 线较敏感，一般经紫外线照射 10~15min，即变为无活性的噬菌体，此特点与一般动物病毒不同。

(二) 噬菌体与宿主细菌的相互关系

噬菌体感染细菌后产生两种后果，一是噬菌体增殖并裂解细菌，建立溶菌周期；二是噬菌体在细菌内不增殖，其核酸整合于细菌染色体内，并可随细菌分裂而将噬菌体核酸传至子代细菌中，建立溶原状态。

1. 噬菌体的溶菌过程

噬菌体感染宿主菌后进行大量增殖并最终裂解细菌，完成其溶菌周期。这种能使细菌裂解的噬菌体称烈(毒)性噬菌体(virulent phage)。其溶菌过程大致分 3 个阶段进行，速度快，完成一次溶菌周期只需要 20~30min。

(1)吸附阶段 噬菌体吸附于敏感细菌是具有高度特异性的，有尾噬菌体首先借助尾刺和尾丝吸附于细菌细胞的特异受体部位。受体可分布在细胞壁的不同层内或细胞膜上，位于深层的受体可能是通过菌体表面孔隙与噬菌体结合。微球状噬菌体依赖其表面结构与细菌性菌毛侧面吸附；细杆状噬菌体以其顶端吸附于性菌毛的顶端。细菌的受体多由脂多糖或脂蛋白构成，一个细菌可吸附约 200 个噬菌体。

当噬菌体吸附于细菌后，由尾刺或吸附部的顶端分泌溶菌酶类物质，将细菌的胞壁溶一小孔，使其尾髓或吸附顶插入，将衣壳中的核酸通过尾部管腔注入细菌体内，将蛋白质外壳留在菌细胞外。

(2)增殖阶段 噬菌体核酸注入细菌体内，以其遗传信息转录 mRNA，在菌体的核蛋白体上转译噬菌体的结构蛋白和功能蛋白等；同时以噬菌体核酸为模板进行自身核酸的复制；这些材料合成后，在细菌细胞质内按一定程序组装成完整成熟的噬菌体。

(3)释放阶段 噬菌体在宿主菌内复制达一定数量(20~1000 个不等)时，细菌细胞突然被裂解。原因可能是噬菌体大量增殖在细菌体内产生的压力，另一方面时噬菌体合成酶类的溶解作用。细菌的裂解释放出大量成熟的噬菌体，烈(毒)性噬菌体的溶菌周期完成。

由于噬菌体裂解细菌，在液体培养基中可使浑浊的菌液变为澄清，在固体培养基中，在长满细菌的平皿表面可出现无菌的空白区域，称为噬斑(plaque)。不同噬菌体产生的噬斑，其大小、形状、透亮度等性状均不同，对噬菌体的鉴定有意义。每一个噬斑是由一个噬菌体增殖并裂解噬斑内的细菌后形成的。实验时噬菌体是经一定倍数稀释，通过噬斑计数，可测知一定容积中噬菌体的数量，称为噬斑形成单位数(plaque forming units, PFU)。

2. 宿主菌的溶原状态

有些噬菌体感染敏感细菌后并不繁殖，而是以其基因组整合于细菌染色体 DNA 上，成为细菌染色体的一部分，并随着细菌基因组的复制而复制。当细菌分裂时，噬菌体基因组也能随之分配至两个子代细菌基因中，这种状态称溶原状态(lysogeny)。感染细菌后引起溶原状态的噬菌体称为溶原性噬菌体(lysogenic phage)或称温和噬菌体(temperate phage)。整合在细菌染色体上的噬菌体核酸称为前噬菌体(prophage)。染色体上带有前噬菌体的细菌称为溶原性细菌(lysogenic bacterium)。

溶原性细菌具有以下特征：①能正常进行分裂繁殖，并将前噬菌体传至子代菌体中。②某些细菌转变为溶原细菌后，由于染色体上获得了噬菌体的基因组，可改变细菌的某些生物学性状。如白喉棒状杆菌感染了 β -棒状杆菌噬菌体后能产生白喉毒素；溶血性链球菌感染噬菌体后能产生红疹毒素等。③溶原性细菌对其本身有关的噬菌体具有“免疫性”。溶原性细菌由于带有前噬菌体，其基因编码一种阻遏蛋白(repressor protein)，可阻抑噬菌体大部分基因功能的表达。尽管噬菌体核酸进入细菌体内，但其核酸复制和结构蛋白的合成受到阻抑，噬菌体不能增殖。溶原性细菌受到这种免疫性保护，使细菌免遭烈性噬菌体的裂解，而且这种免疫保护是具有特异性的。④溶原性细菌可自发地转变为溶菌状态。因少数细菌所携带的前噬菌体可从染色体上脱离，进行如同烈性噬菌体的复制增殖，转入溶菌周期。这种自发终止溶原状态的频率为 $10^{-5} \sim 10^{-2}$ ，许多理化因子可诱导大部分甚至几乎

全部溶原性细菌转入溶菌周期。如用紫外线照射和丝裂霉素 C 诱导,可使近 90%溶原性细菌释放出前噬菌体进行复制。因此,温和噬菌体既有溶原周期,又有溶菌周期,而烈性噬菌体只有裂解周期。

(三)噬菌体的应用

1. 噬菌体的分离与测定

凡有细菌存在的场所都可分离出噬菌体。先将欲分离的材料经过滤菌器过滤,在滤液中加入待分离噬菌体的相应幼龄细菌培养物,在合适的培养基中做适温孵育一段时间后,若出现溶菌现象说明检材中可能有相应的噬菌体。再将含有噬菌体的材料,用肉汤或生理盐水做 10 倍的连续稀释(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、……、 10^{-9}),加入敏感菌液中一起孵育,经一段时间后观察溶菌结果。凡能引起溶菌的最高稀释度,即为噬菌体的效价。此测定也可在平板上进行,经培养后,根据形成噬斑数量和所加一定量检材的稀释度,计算出噬菌体的效价。

2. 用来检测标本中的未知细菌

(1)在某检材中分离出一种噬菌体,常提示该标本种有相应的细菌存在;

(2)利用噬菌体效价增长试验检测标本中的相应细菌,如将标本与一定数量的已知噬菌体混合,孵育 6~8h 后,进行噬菌体效价的测定。若噬菌体效价比混合培养前有明显增长,说明标本中有相应细菌存在,使噬菌体数量明显增加,即使该标本的细菌培养呈阴性,也不能排除标本中确有相应细菌存在。

3. 用于细菌的鉴定与分型

由于噬菌体裂解细菌有种与型的特异性,故噬菌体可用于细菌的鉴定与分型。如利用已知噬菌体鉴定未知的霍乱弧菌、耶尔森鼠疫杆菌、枯草芽孢杆菌等。也可用已知型的噬菌体对某细菌进行分型,如用金黄色葡萄球菌分型噬菌体可将金黄色葡萄球菌分为 5 个噬菌体群,23 个噬菌体型;用伤寒沙门菌 Vi 标准型噬菌体,已发现含 Vi 抗原的伤寒沙门菌有 96 个噬菌体型。这种利用噬菌体对细菌进行分型的方法,在流行病学调查上,特别在追查传染源、判定传播途径上有重要作用。

4. 是分子生物学的重要试验工具

噬菌体作为病毒,取材和培养方便,增殖迅速,数小时就可得到大量后代,其研究工作大大推动了分子生物学和遗传学的发展。同时,噬菌体在基因工程上可作为外源性基因的载体,温和噬菌体最为常用,如大肠杆菌 K_{12} λ 噬菌体,含有双股 DNA,与外源性基因重组后转入大肠杆菌,能在菌细胞内扩增外源性基因或表达外源性基因产物。目前利用噬菌体作载体,不仅是遗传工程的重要研究手段,而且已用于基因工程抗体及某些生物活性制剂的生产实践。

5. 控制病原体

在人医和兽医曾有人用噬菌体来治疗绿脓杆菌感染和动物的沙门氏杆菌病。在水产上,美、印、日、英、以色列和前苏联先后从不同的生境分离到裂解藻类的病毒(噬藻体),用于控制赤生物,并有大量应用实例。用噬菌体作为生物防治方法具有良好的发展前景。

第八节 亚病毒

亚病毒(subvirus)是病毒学的一个新分支,突破了原先以核衣壳为病毒体基本结构的传统认识。目前,将仅具有病毒核酸或仅有蛋白质的感染性活体,称为亚病毒。亚病毒属于

非典型病毒，包括类病毒、拟病毒和朊病毒(感染性蛋白质)等。这类微生物在水生动物中尚未发现，但也应予以密切关注。

(一)朊病毒

1982 年 Prusiner 证明羊瘙痒病是由一种相对分子质量为 3.0×10^4 的蛋白质引起，他称这类感染性蛋白质为蛋白侵染颗粒(prion)，或称为朊病毒(Prino)。研究表明，朊病毒是动物与人传染性海绵状脑病(TSE)的病原，其致病性是细胞正常蛋白经变构后而获得的。朊病毒蛋白(prion protein, PrP)相对分子质量为 27 000~35 000，是构成朊病毒的基本单位。PrP^c(可溶性)是相对分子质量为 33 000~35 000 的 PrP 前体蛋白，当其发生变构后成为引起羊瘙痒病(scrapie)的侵染性蛋白，称为 PrP^{sc} (不溶性)。PrP^{27~30} 是指 PrP^c 在蛋白酶 K 的作用下水解成相对分子质量为 27 000~30 000 的淀粉样蛋白。单个 PrP 无感染性，由 3 个 PrP 构成侵染子单位则具有极强感染性，聚合 1 000 个 PrP 的构成体在电子显微镜下成为直径 25nm，长 100~200nm 的杆状体。

朊病毒在动物中可引起羊瘙痒病、貂脑病、牛海绵样脑病、北海黑尾鹿消瘦病等。朊病毒还可引起人的震颤病(Kuru disease)、克雅病(Creutzfeldt-Jacob disease, CJD)、格-斯综合征(Gerstmann-Straussler-Scheinker Syndrome, GSS)、致死性家族性不眠症(fetal familial insomnia, FFI)等，某些动物的朊病毒感染也可传染给人。另外，人类慢性退化性功能紊乱病，如老年性痴呆、多发性硬化症等可能与朊病毒有关。朊病毒感染的病变部位不伴有炎症反应和免疫反应，但均有脑组织的海绵状淀粉样变。

(二)拟病毒

拟病毒(virusoid)是引起苜蓿、绒毛烟等植物病害的一种亚病毒，实质是一类包裹在真病毒颗粒中的有缺陷的类病毒，又称类类病毒。拟病毒极其微小，仅有 300~400 个核苷酸。被拟病毒“寄生”的真病毒又称辅助病毒，而拟病毒则成了辅助病毒的“卫星”。拟病毒不能直接在宿主中复制，其复制必须依赖相应的、特异的辅助病毒的协助。同时拟病毒也可干扰辅助病毒的复制，改变其对宿主的病害症状。

拟病毒首次在绒毛烟的斑驳病毒(velvet tobacco mottle virus, VTMoV)中分离到(1981 年)。VTMoV 是一种直径为 30nm 的 20 面体病毒，在其核心除含有大分子线状 ssRNA(RNA-1)外，还含有环状 ssRNA(RNA-2)及其线状形式 ssRNA(RNA-3)，后者即为拟病毒。只有当 RNA-1(辅助病毒)与 RNA-2 或 RNA-3(拟病毒)合在一起时才能感染宿主。除在植物病毒中陆续发现的如苜蓿暂时性条斑病毒(LTSV)、莴苣斑驳病毒(SNMV)、地下三叶草斑驳病毒(SCMoV)等，在动物病毒中也发现了拟病毒，如丁型肝炎病毒(HDV)，其辅助病毒是乙型肝炎病毒(HBV)。

(三)类病毒

1971 年 Diener 首次发现马铃薯纺锤形块茎病是由一种比病毒更为简单的感染因子引起，仅由单股共价闭合环形 RNA 分子组成，无蛋白质衣壳，称为类病毒(viroid)。类病毒的大小仅为最小病毒的 1 / 20 左右，相对分子质量为 $(0.7 \sim 1.2) \times 10^5$ ，含有 246~375 个核苷酸，由一系列短的双链区和不配对的单链区相间排列而成，其正、负股中均含合成蛋白质的起始密码(AUG)。类病毒本身不具编码自身核酸复制的酶，该酶来自宿主细胞核内依赖 DNA 的 RNA 多聚酶，它指导类病毒的复制，并直接干扰宿主细胞的核酸代谢。目前已发现的类病毒达 20 种以上，依据是否含有中央保守区和核酶结构分为马铃薯纺锤形块茎类病毒科和鳄梨白斑类病毒科两科。类病毒主要使植物致病，如使马铃薯、番茄、柑橘、

椰子等经济作物发生缩叶病、矮化病等。

思考题

- 1.什么是真病毒?什么是亚病毒?
- 2.何谓病毒的持续性感染?分哪些类型?各有何特点?
- 3.急性感染与持续性感染对病毒的增殖与传播有何意义?
- 4.举例说明病毒感染造成的免疫系统损伤。
- 5.病毒的核衣壳的对称型有哪些?各有什么特点?
- 6.病毒的复制周期包括哪几个阶段,各阶段的主要过程如何?
- 7.怎样分离和鉴定病毒?
- 8.细胞对病毒感染的反应主要有哪些?
- 9.何为干扰素?
- 10.病毒的感染性测定主要有哪些方法?
- 11.噬菌体是如何感染宿主细胞的?试述它与宿主细胞间的相互关系。
- 12.亚病毒有哪几类?各自有何特点?
- 13.什么是类病毒、拟病毒和朊病毒?

第七章 其他类型微生物

第一节 放线菌

放线菌(actinomycetes)是一大群介于丝状真菌与细菌之间的一类原核生物。因其生长呈辐射状而得名。放线菌广泛分布于自然界,尤多见于土壤中。在医药、农业和工业上广泛应用的抗菌素,大部分是放线菌的发酵产品。

放线菌的分类由于分类学家观点不同,科的标准和科内分属的依据也各异,长期难以统一,故国际放线菌分类委员会,取消了科的分类等级。在放线菌目下依菌丝体断裂与否及孢子着生方式将放线菌目中近 60 个属分成若干“群”。《伯杰系统细菌学手册》1984 年版将其分列在第二分卷和第四分卷内。种的鉴定较为复杂,一般按其形态、培养、生理生化等特征的综合指标来确定。目前中国放线菌工作者是以形态、培养特征为主,生理生化为辅的原则来定种。国际上已经描述和发表过的放线菌已达 2 000 多种。

(一)放线菌的形态与结构

放线菌的菌体为单细胞,内部构造与细菌相似,没有被核膜包绕的细胞核。最简单的放线菌为杆状,或有原始菌丝,似分支杆菌。大部分放线菌由分支发达的菌丝组成,菌丝直径约为 $1\mu\text{m}$,仅为霉菌菌丝的 $1/10$ 。细胞壁含有原核生物所特有的胞壁酸和二氨基庚二酸,没有几丁质或纤维素。革兰氏染色大多为阳性,极少为阴性。抗酸染色大多数呈阳性反应。

放线菌与细菌的最大区别在于放线菌能够形成菌丝和孢子。孢子为真菌和放线菌的繁殖器官,菌丝为由孢子萌发并逐渐延长而成的丝状物。根据菌丝的形态和功能的不同,菌丝可分为营养菌丝、气生菌丝和孢子丝 3 种。

1. 营养菌丝(基内菌丝) 伸入到培养基内的菌丝称营养菌丝,也称初级菌丝体或一级菌丝体。主要功能是吸收营养物质。营养菌丝一般无隔膜,直径 $0.2\sim 0.8\mu\text{m}$,长度一般为 $100\sim 600\mu\text{m}$ 。有些菌种可产生黄、橙、红、紫、蓝、绿、褐、灰、黑等水溶性或脂溶性色素,它是鉴定菌种的重要依据之一。

2. 气生菌丝 营养菌丝发育到一定时期,长出培养基外并伸向空间的菌丝为气生菌丝,又称二级菌丝体。它叠生于营养菌丝之上,颜色较深,比营养菌丝粗,直径 $1\sim 1.4\mu\text{m}$,长度差异悬殊,直形或弯曲而分支,有些菌种产生色素。

3. 孢子丝 气生菌丝生长发育到一定阶段,一部分菌丝分化成可形成孢子的菌丝称孢子丝。孢子丝着生方式有互生、丛生和轮生 3 种,形状有直形、波曲、螺旋等形。孢子丝长到一定阶段分化产生孢子,孢子可呈白、黄、绿、淡紫、粉红、蓝、褐、灰等颜色,形态可呈球形、椭圆形、杆状、瓜子形等,单个、成双或成串状排列。有的光滑,有的有小疣刺或毛状物,有些孢子带有鞭毛。孢子丝在气生菌丝上的排列方式和形状是鉴别菌种的重要依据。

(二)放线菌的菌落特征

放线菌的菌落由菌丝组成。菌落特征因不同的菌丝类型而异,一般可分为两类:一类是由产生大量分支气生菌丝的菌种所形成的菌落,这类菌丝生长缓慢,在气生菌丝尚未分化成孢子丝以前的幼龄菌落,光滑如发状缠结;此时菌落与细菌菌落相似。但当孢子丝产生大量孢子并布满整个菌落表面后,形成絮状、粉状或颗粒状的典型的放线菌菌落;营养

菌丝长在培养基内，故菌落与培养基结合较紧，不易挑起或挑起后不易破碎。由于菌丝和孢子常具有各种色素，可使菌落表面和背面呈现不同颜色，水溶性色素还可扩散使培养基着色。另一类菌落由不产生大量菌丝体的种类形成，其黏着力差，结构呈粉质状，用针挑起则粉碎，如诺卡氏放线菌便形成此类菌落。

将放线菌置于液体培养基内静置培养，能在瓶壁液面处形成斑状或膜状菌落，或沉降于瓶底而不使培养基浑浊；如震荡培养，常形成由短菌丝体所构成的球状颗粒。

(三)放线菌的繁殖方式

放线菌主要通过形成无性孢子方式进行繁殖，此外也可借菌丝体断裂片段繁殖，此方式常见于液体培养基中。无性孢子形成的方式主要有以下几种。

1. 凝聚分裂形成凝聚孢子 多数放线菌按此种方式形成孢子。其过程是当孢子丝生长到一定阶段，从顶端向基部，细胞质分段围绕核物质，逐渐凝聚成一串大小相似的小段，然后各小段收缩，并产生新的孢子壁，形成圆形或椭圆形的孢子，孢子成熟后，孢子丝壁破裂，释放凝孢子。

2. 横隔分裂形成横隔孢子 诺卡氏菌等是按此方式形成孢子。其过程是孢子丝长到一定阶段，其中产生很多横隔膜，然后在横隔膜处断裂形成孢子，一般呈杆状或圆柱形，大小相似。

3. 孢囊孢子 有些放线菌在菌丝上形成孢子囊，孢子囊内形成孢囊孢子，孢子囊成熟后破裂，释放出大量的孢囊孢子。游动放线菌属和链孢囊菌属等以此方式形成孢子。

成熟的放线菌孢子在适宜条件下，膨大而伸出一根至数根芽管，由此长成新菌丝。

(四)放线菌的生理

放线菌绝大多数为需氧菌，少数为厌氧菌，生长最适温度为 30~32℃，绝大多数放线菌适于在中性偏碱的 pH 环境中生长。

放线菌可广泛利用各种碳水化合物及碳氢化合物作为碳源及能源，利用有机氮、无机氮作为氮源。发酵碳水化合物产酸不产气，发酵葡萄糖的终产物有醋酸、甲酸、乳酸和琥珀酸，但无丙酸。不形成靛基质，尿素酶试验阴性，接触酶试验阴性或阳性。兼性厌氧，CO₂可能促进其丰茂生长。许多种类能产生抗生素、维生素及各种酶类，以产抗生素著称，据统计已发现的抗生素 85%来自放线菌。放线菌产生的抗生素虽多达数千种，但经系统研究，应用于医学临床和农业生物防治的仅数十种，如链霉素、土霉素、金霉素、卡那霉素、争光霉素、春雷霉素、灭瘟素等。它们在人类保健和动植物病害的防治等方面正在发挥愈来愈大的作用。某些放线菌对人畜及植物有致病性，如人畜的放线菌病和马铃薯疮痂病等。

(五)放线菌的抵抗力

放线菌对干燥、高热和寒冷的抵抗力均很弱，80℃加热 5min 即可被杀死。一般消毒药均可将其杀死，如 0.1%升汞可在 5min 内将其杀死，但对石炭酸的抵抗力较强。放线菌对青霉素、链霉素、四环素、头孢霉素、林可霉素等抗生素以及锥黄素、碘和磺胺类药物等敏感，但由于药物不易渗透到脓灶中，因此常不易达到杀菌目的。

(六)放线菌在工农业生产中的意义

除极少数放线菌为致病菌外，大多数放线菌是无害或是有益的。除部分放线菌可用于生产抗生素外，放线菌分解的物质容易被有益微生物或藻类吸收，创造出其他有益微生物增殖的生存环境，因此被广泛用于生产微生态制剂。放线菌和光合细菌混合制成的微生态制剂，具有改善水质的净菌作用，长期使用能使水质达到良性循环。放线菌中的弗兰克氏

菌属能与非豆科植物共生结瘤固氮，在绿化、植树造林、改良土壤、改善生态环境等方面有重要作用。

本属对动物具有病原性的种有牛放线菌(*A. boris*)、化脓放线菌(*A. pyogenes*)和以色列放线菌(*A. israelii*)，但对水产动物的致病性尚无报道。

第二节 黏细菌

黏细菌(*Myxobacteria*)，是一类菌体杆状、柔软易弯曲能在固体表面滑行的原核微生物。黏球菌属在《伯吉氏细菌鉴定手册》第八版(1974)中归属于“滑动细菌”部分的黏细菌目、黏球菌科。

黏细菌是最高等的原核生物类群，具有复杂得多细胞行为和形态发生，在细胞分化、发育和生物进化研究中占有重要地位。因其多数能形成子实体，故又名子实黏细菌。

黏球菌是专性需氧菌，有两个生理亚群：溶细菌生物亚群和溶纤维生物亚群。大多数属于溶细菌亚群，摄食活的或死的细菌和其他微生物而生长。

此属细菌为化能异养菌。可溶解细菌，能水解蛋白质、核酸和各种脂肪酸，能在以混合氨基酸作为碳源、氮源和能源的人工培养基上生长，不能利用碳水化合物。40℃以上不生长。

(一) 黏细菌的形态与结构

黏细菌有一定的生活史，其过程可分为2个阶段，即营养细胞阶段和休眠细胞阶段。黏球菌的营养细胞为杆状，大小为 $0.4\sim 0.7\mu\text{m}\times 2.0\sim 10.0\mu\text{m}$ ，柔软。除缺乏坚硬的细胞壁外，其余均类似于细菌，革兰氏染色阴性，无鞭毛。菌体形态有的为两端钝而粗的杆状细胞，有的为细长的丝状体或梭状细胞，也有的为圆形、椭圆形。DNA的G+C含量因种类不同而异，黏细菌目高达67~71mol%，而纤维黏细菌目含量为35~50mol%。

(二) 黏细菌的菌落特征

在固体基质上，黏细菌形成低平而扩散的菌落，由向前推进的许多细胞小群组成不规则的边缘。迁移的细胞下面形成很黏的黏液层，将细菌黏着在基质上。在适宜条件下，菌落内的营养细胞进行多点团聚。随后，这些细胞团聚体分化形成子实体。

(三) 黏细菌的繁殖方式

营养细胞以二分裂方式繁殖。当环境中营养不足时，发育到一定阶段的营养细胞，则可能借趋化反应，彼此向对方移动，在一定的位点聚积成各种形状的堆团，形成肉眼可见的子实体。子实体随菌种不同而有区别，有的子实体具有红、黄等鲜艳色彩；有的仅仅是一团松散的黏液和黏孢子的球状物；有的子实体则是由具有一定形状的孢子囊柄和子实体壁构成的复杂形体。因此，子实体的形状、体积和颜色可作为区分黏细菌的指标。子实体中含有由营养细胞转化而来的休眠细胞，叫黏孢子。单个子实体中可能含 10^9 个或更多个的黏孢子，黏孢子的形状和营养细胞相似，只是较短较粗，呈圆形或椭圆形，其直径最大可达 $2.3\mu\text{m}$ 。有些黏孢子折光性强，并包有荚膜，有时称为微孢囊或小孢子囊。黏孢子在适宜的环境条件下又转化成营养体，每个黏孢子产生一个杆状营养体。

第三节 鞘细菌

鞘细菌(*Sheathed bacteria*)是指许多细胞呈丝状排列而被包围在同一鞘内的细菌。这些细菌栖居在淡水和海洋环境中，其中主要分布在污染河流、滤水池、活性污泥等含有机质

丰富的流动淡水中，因而在活性污泥法处理污水中有重要作用。

鞘是由细胞分泌物质而形成的，初期薄而透明，随之加厚。鞘的组分为蛋白质、多糖和类脂等复杂有机化合物。球衣菌属的衣鞘由蛋白质、多糖、脂类复合物组成，有的还有锰和铁的沉积物，犹如革兰氏阴性细菌的荚膜。不过它形成的是紧贴在杆菌链外围的线形结构，故称鞘细菌或鞘膜细菌。用1%结晶紫染色，在光学显微镜下，菌体呈紫色，鞘呈淡紫色。而 *Haliscomenobacter* 属的鞘，必须借助电镜才能看见。鞘形成的初期较薄，随之加厚，这是细菌分泌的有机化合物沉积并掺入组成中所致。由于氢氧化铁或氧化锰的沉积，鞘随着菌龄的增加而变硬。鞘的形成具有生态学和营养学的重要意义。它能防御原生动物和某些细菌的攻击，例如未形成鞘的游离细胞，可被原生动物捕食，水中蛭弧菌的分泌物也可将其消解。同时，鞘上一般有固着器，可附着于固形物上，当水中营养不足时，鞘可随水流动而富集营养。

分类地位因为鞘细菌是不同类群的细菌，其系统发育还不很清楚，所以对于它们的分类地位，还有待于商榷。以伯杰分类系统为例，第七版(1957)曾把鞘细菌归至裂殖菌纲鞘细菌目，第八版(1974)没有从纲至种的分类系统，而着重于对鞘细菌属、种的描述和比较，并将鞘细菌归在原核生物界细菌的第三部分。目前，第九版(1994)把鞘细菌归在第14群，包括7个属，由球衣菌属、纤发菌属、软发菌属、利斯克氏菌属、栅发菌属、泉发菌属和细枝发菌属组成，属是这一类群的最高分类单位。球衣菌属可作为其代表属。

(一) 鞘细菌的形态与结构

单个鞘细菌为杆状，两端钝圆，大小为 $1\sim 2\mu\text{m}\times 3\sim 8\mu\text{m}$ 。革兰氏染色阴性。偏端丛生鞭毛，每丛通常8~10根，直径约 $0.2\mu\text{m}$ ，长达 $80\sim 90\mu\text{m}$ ，能活跃运动。细胞中DNA的G+C含量为60~70mol%，是已知革兰氏阴性细菌中含量最高者。这些细菌个体在鞘内往往呈链状排列成一行，有时两行或三行。鞘内细胞以裂殖方式繁殖。由于新产生的细胞往往被推向菌丝顶端，并不断合成新的衣鞘材料，因而衣鞘总是在丝状体末端形成。虽然细菌个体与鞘接触较紧密，但它仍能移出鞘外，间或可见空鞘或鞘中空位。游离出鞘的单个细菌在固着后便开始生长，形成新的带鞘菌丝体。

(二) 鞘细菌的营养及繁殖方式

鞘细菌专性好氧，以适应流水中的生活。能以葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、甘露糖和乳酸钠等很多简单的有机化物作为碳源和能源。若环境中还有还原性铁、锰化合物时，鞘上常裹有一层氢氧化铁和氧化锰的沉积物，鞘细菌可以从这些金属氧化物中获得能量。鞘细菌能以各种氨基酸和某些无机氮化物作为氮源，但不能利用铵态和硝态氮。大多数鞘细菌生长需要维生素B₁₂，这对水生微生物常常是必需的营养物质。鞘细菌能在葡萄糖、蛋白胨浓度很低的培养基上生长，要求中性pH，温度28~30℃，经3d培养便可形成菌落。菌落扁平、昏暗、白色绒毛状，边缘极不规则，有很多卷曲的丝状体长出，很像霉菌尚未产生孢子时的菌落，但较湿润，不粗糙。该类细菌的分离纯化较为困难，一是由于鞘细菌鞘外具有黏液，黏附大量的伴生菌，二是由于鞘细菌各属间生活环境相似，且营养需求相近，所以很难对它们进行分离鉴定。

(三) 鞘细菌在工农业生产中的意义

氧化铁、锰鞘细菌是一类具有催化铁、锰氧化能力的丝状菌。铁、锰氧化微生物在全球和区域元素循环中扮演着主要的角色，因而它常被认为是地质元素循环的推动力。由于该类细菌不仅在环境保护特别是污水处理和城市饮用水净化中起着重要作用，而且可形成

含有微量元素的铁、锰沉积物，对于回收贵金属和有毒金属也有重要的意义，因而对于该类细菌的研究备受重视。

氧化铁、锰鞘细菌的应用：

1. 除铁除锰 含铁含锰过高的水会给饮用及工业带来严重的问题。因此，水中铁、锰的去除一直是给水排水工程的重要研究课题。利用鞘细菌除铁除锰可通过自然或人工途径将铁、锰氧化鞘细菌固定在沙子表面，填装成滤柱、滤罐或滤池，将水过滤以达到除铁、除锰的目的。

2. 生产生物可降解塑料 聚 β 羟基丁酸(PHB)是细菌细胞内积累的一种能被微生物的酶所降解的高分子聚合物，具有生物降解速度快、共聚物弹性高等特点。鞘细菌细胞中含有大量的 PHB 颗粒，高的可达 40%(w / w)左右。

3. 污水处理 鞘细菌是活性污泥中的主要菌群，对于污水中的有机物和毒物有很强的降解作用。活性污泥中常见的鞘细菌有浮游球衣菌、纤发菌和 *Haliscomenobacter*。

第四节 蛭弧菌

蛭弧菌(*Bdellovibrio*)是寄生于其他细菌并能导致其裂解的一类细菌。它比一般细菌小，能通过细菌滤器，但不是病毒。蛭弧菌属于蛭弧菌科。它广泛存在于自然界，土壤、河水、沿海水域及下水道污水中均有其存在，一般土壤中含菌数为 $10^3 \sim 10^5$ 个 / g，污水中含菌数为每毫升上万个，但不存在于干净的井水、泉水中。因其具有特殊的捕食生活方式和广泛的应用价值而受到许多科学工作者的重视。

(一) 蛭弧菌的形态与结构

蛭弧菌有细菌的一切形态特征，单细胞，弧形或逗点状，有时呈螺旋状。革兰氏染色阴性。大小为 $0.3 \sim 0.6 \mu\text{m} \times 0.8 \sim 1.2 \mu\text{m}$ 。一般端生单鞭毛，有的在另一端生有一束纤毛。水生蛭弧菌的鞭毛还具有鞘膜，它是细胞壁的延伸物，并包围着鞭毛，使得它比其他细菌的鞭毛粗 3~4 倍，这是一个很显著的特点。细胞中蛋白质含量较高，占干重 60%~70%。DNA 含量为 5%，G+C 含量为 42~51mol%。有人认为，蛭弧菌 DNA 的 80%来源于宿主细胞的 DNA。

(二) 蛭弧菌的营养及繁殖方式

蛭弧菌生活方式多样，有寄生型和兼性寄生型，极少数营腐生生活。寄生型必须在特异的生活宿主细胞或在有其提取物中得到营养或生长因子时才能生长繁殖。其生长要求 pH 为 6.0~8.5，温度 23~37℃，低于 12℃，高于 42℃均不生长。能稳定分解蛋白质，一般不利用碳水化合物，而以肽、氨基酸作为碳源和能源。液化明胶，严格好氧，在人工培养基上产生黄色色素和细胞色素 a、b、c；还能产生各种酶类，其中的肽聚糖酶、蛋白酶等与其侵入宿主细胞有关。非寄生型蛭弧菌营腐生或兼性腐生生活，可在蛋白胨和酵母提取物培养基上生长繁殖，它们中除一部分外都丧失了寄生性。

蛭弧菌的生活史有两个阶段，既有自由生活的、能运动、不进行增殖的形式，又有在特定宿主细菌的周质空间内进行生长繁殖的形式，这两种形式交替进行。

蛭弧菌与宿主细胞之间有一定的特异性，但有的特异性较差，能侵入多种细菌。被蛭弧菌侵入的细菌均遭受毁灭性裂解。现已发现，在某些人畜病原菌、藻类和农业致病真菌的细胞中存在有溶菌作用的蛭弧菌，这对于控制农业及人畜病原微生物无疑是有价值的。蛭弧菌侵入宿主细菌的方式十分独特，首先它以很高的速度(每秒高达 100 个细胞长度)猛

烈碰撞宿主细胞，无鞭毛端直接附着于宿主细胞壁上。然后，菌体以 100r/s 以上的转速产生一种机械“钻孔”效应，加上菌体入侵时的收缩而进入宿主细胞的周质空间(细胞壁与细胞膜的间隙)。从“钻孔”到进入只需几秒钟便可完成。蛭弧菌侵入周质空间的同时失去鞭毛，被感染的宿主细胞也开始膨胀，变为一个对渗透压并不敏感的球形体，称为“蛭弧体”。此时，“蛭弧体”比原来增长几倍，然后均称地分裂，形成许多带鞭毛的子代细胞。随着细胞的增殖和某些酶的产生，宿主细胞壁进一步瓦解，子代蛭弧菌便释放出来。完成这一生活周期约需 4h。子代细胞遇到敏感宿主又可重新侵染，开始下一个循环。由于蛭弧菌寄生于细菌细胞的周质空间，因而具有生态学优势，首先它可以确保其营养需要。此外，周质空间被一个稳定而坚硬的细胞壁所包围，这为蛭弧菌提供了一个保护性环境。现已发现，蛭弧菌除侵入周质空间外，有的在某种情况下还可进入到宿主细胞质中，立即生长繁殖。不过，这一结果有待进一步证实。

为获得有用的蛭弧菌，常需借用细菌病毒研究中所使用的方法进行分离。方法是将蛭弧菌与敏感菌混合后置于琼脂平板中，在适宜条件下培养 2~3d，平板上会出现类似噬菌体产生的噬菌斑，并逐渐扩大，宿主细胞完全被溶解后形成透明区。从透明区中就可分离到蛭弧菌。利用类似方法，还可计算出蛭弧菌噬菌体的数目。同时可追踪增殖过程、寄生潜伏时间、新产生蛭弧菌的数量及其活性等。如需从土壤中分离蛭弧菌，应将少量样品先制成悬浮液，经滤膜过滤，以截留大的细菌，让小的蛭弧菌通过，取滤液进行分离。

虽然蛭弧菌可使一些细菌裂解，但它本身也同样受到蛭弧菌噬菌体的威胁。蛭弧菌噬菌体对寄生或非寄生的蛭弧菌具有裂解作用，具有严格专一性，只对一定的菌株起作用。

(三) 蛭弧菌在工农业生产中的意义

蛭弧菌的种种特性，使它在理论上和实践中都具有重要的应用价值。人们从研究细菌-蛭弧菌-蛭弧菌噬菌体这个“三位一体”的寄生系统中，对它们之间的相互作用、结果和机制将有深入的了解，以便充分利用“生命之战”的颌颌体系为人类服务。蛭弧菌的溶菌作用，很可能使之成为生物防治有害细菌的一种有力武器。首先，它有可能用于净化水体和清除工、农、医等方面的有害细菌。有人将水生蛭弧菌与引起水叶白叶枯病的黄杆菌混合一起，加入农田灌溉水中，由于蛭弧菌以黄杆菌为“食料”，使水中该致病菌大为减少。在医学上，有人用蛭弧菌有效地防治了由弗氏志贺氏菌引起的角质结膜炎和肠道炎等疾病。已知有的蛭弧菌对伤寒杆菌、副伤寒杆菌、痢疾杆菌等人畜致病菌的裂解作用很强。此外，由于蛭弧菌大量存在于污水中，对大肠杆菌和沙门氏菌属的细菌均有广泛的寄生性，因而有人以蛭弧菌作为水域污染程度的一项最终指标(一般是以大肠杆菌菌数为指标)。在畜牧兽医领域，预防和治疗大肠杆菌、沙门氏菌感染和改良养殖环境的蛭弧菌制剂已形成商品。在水产上也有人将蛭弧菌用于嗜水气单胞菌的控制做了些研究。

第五节 立克次体、衣原体、霉形体、螺旋体

一、立克次体

立克次体(*Rickettsia*)是一类营严格活细胞内寄生的原核细胞型微生物。最初由立克次氏于 1907 年从洛杉矶患者身上发现，为纪念首先发现这种微生物并在研究人的斑点伤寒时不幸感染而牺牲的美国青年医生 Howard Taylor Ricketts 而命名。立克次体大多是人畜共患病原体，它们以节肢动物、(虱、蚤、蜱、螨等)为传播媒介，使人和某些动物感染。在许多情况下，它们是无害的微生物。在患病的虾、贝类体内也发现了此类微生物，其与这

些动物的某些疾病有关。

1. 分类 立克次体属于立克次体目，该目下含立克次体科和巴尔通体科，前者有立克次体属、柯克斯体属、埃里希体属。后者只有巴尔通体属。

2. 形态结构 立克次体的很多特征介于细菌和病毒之间。立克次体为多形性微生物，在不同发育阶段及不同寄主体内可出现不同形态，如小杆状、球状或双球菌状。大小为 $0.3\sim 0.5\mu\text{m}\times 0.3\sim 2.0\mu\text{m}$ 。除贝氏柯克氏体外，均不能通过细菌滤器。在电子显微镜下观察可见有一层薄细胞壁，厚 $7\sim 10\text{nm}$ ，胞浆膜厚 $6\sim 8\text{nm}$ 。不产生芽孢，不运动，具有相似于细菌的细胞结构，含有细胞壁，含蛋白质、多糖、脂类以及 RNA 和 DNA 两种核酸。细胞壁中有胞壁酸、二氨基庚二酸和氨基酸，还含有葡萄糖酸。革兰氏染色阴性，姬姆萨染色呈紫色或蓝色，马基维罗氏法染色呈红色。

3. 生长繁殖 二分裂繁殖。只具有部分酶活性。除罗沙利马体外，均只能在活的真核细胞内生长，因而在人工培养时，通常在敏感的豚鼠、兔、小鼠、大鼠以及猴体内培养，也可进行鸡胚接种和细胞培养，这一特性又与病毒相同。

4. 抵抗力 立克次体对理化因素的抵抗力与细菌繁殖体相仿，除 Q 热立克次体外，一般 56°C 经 30min 死亡。对低温及干燥的抗性较强，在干虱粪中能保持传染性半年左右；在 0.5%石炭酸或来苏儿中，经 5min 即被灭活；对四环素、氯霉素、土霉素、红霉素和金霉素敏感，磺胺类药物不能抑制其生长，反而有促进繁殖的作用。

5. 抗原性 在细胞壁中存在群及种特异性抗原，可利用补体结合反应进行群、种的分类。碱性可溶性和耐热的多糖抗原是立克次体和变形杆菌属某些种的共同抗原，利用这一特性建立了一种交叉凝集反应[外斐氏反应(W-Felix reaction)]检测人和动物血清中的相应抗体。

6. 病原性 节肢动物为媒介，同时它们不仅是载体，而且能在其肠壁上皮细胞、唾液腺、生殖器等特定细胞内增殖，一般不引起节肢动物死亡，但感染普氏立克次体的虱子会发生死亡。立克次体可引起一些人畜共患病，如人的斑点伤寒及猪和牛的附红细胞体病。

二、衣原体

衣原体(*Chlamydia*)是能通过细菌滤器、在宿主细胞内生长繁殖并具有特殊生活周期的原核微生物。由于它具有与立克次体的某些相似性，在分类学上，衣原体目归类于立克次体类群中，将在宿主细胞内呈球状或杆状的列为立克次体目，在细胞内形成包涵体的列为衣原体目。衣原体广泛寄生于人类、哺乳动物及鸟类，仅少数致病。与立克次体不同，衣原体引起疾病不需以节肢动物为媒介。

1. 分类 根据衣原体所致疾病的性质、抗原性和对抗生素的敏感性差异，将其分为两属：其一为沙眼衣原体属，包括沙眼衣原体、性病淋巴肉芽肿衣原体及小鼠肺炎衣原体；另一为鹦鹉热衣原体属，包括人和脊椎动物鹦鹉热衣原体、鸟疫衣原体及多种动物衣原体。两属的主要区别在于前者能形成有致密的并含有糖原的包涵体，能被碘着色，对磺胺药物敏感；而后者只含疏松的无糖原的包涵体，对磺胺药物不敏感。

2. 形态结构 衣原体呈球形或椭圆形，直径 $0.2\sim 0.3\mu\text{m}$ ，革兰氏染色阴性，不易着色，用姬姆萨染色法可染成淡蓝色或紫色，用马基维罗染色法染色则呈红色，在光学显微镜下勉强能够看见。其细胞结构也与细菌相似，细胞壁内含有胞壁酸、二氨基庚二酸；核酸有 DNA 和 RNA 两类；70S 核糖体也由 30S 和 50S 两个亚基组成。

3. 生长繁殖 以二分裂方式进行繁殖。衣原体在宿主细胞内生长繁殖具有独特的生

活周期，即存在原体和始体两种形态。原体细小，呈圆形颗粒状，直径约 300nm。在电子显微镜下，原体中央有致密的类核结构，有高度感染性。当原体吸附于易感细胞表面，经胞饮作用进入细胞后，原体逐渐增大成为始体。始体比原体大，直径 800~1 200nm，圆形，姬姆萨染色呈蓝色。在电子显微镜下无致密类核结构，而呈纤细的网状，外围绕一层致密的颗粒状物质，并有两层囊膜包围。始体无感染性，但能在吞噬泡中以二分裂方式反复繁殖，直至形成大量新的衣原体，积聚于细胞质内，形成各种形状的包涵体，姬姆萨染色呈深紫色。当宿主细胞破裂时释放，重新感染新的易感细胞，开始新的发育周期。每个发育周期需 24~48h。原体和始体的性状比较见表 7-1。

绝大多数衣原体可在 6~8 日龄鸡胚或鸭胚卵黄囊中生长繁殖，并可在卵黄囊膜中找到包涵体以及原体和始体颗粒。此外，衣原体也可接种小鼠、原代或传代细胞进行培养。

表 7-1 原体和始体的性状比较

性 状	原 体	始 体
大小(直径, μm)	0.2~0.4	0.5
细胞壁	+	—
代谢活性	—	++
胞外稳定性	+	—
感染性	+	—
繁殖能力	—	+
RNA: DNA 的比值	1	3~4
毒性	+	—

4. 抵抗力 衣原体对热敏感，56~60℃仅能存活 5~10min。在 -70℃可保存数年。0.1%甲醛液、0.5%石炭酸可将其迅速杀死，75%乙醇 30s 即可使之死亡。四环素、氯霉素、红霉素、青霉素等可抑制其生长，常用于治疗。

5. 病原性 节肢动物不是它的宿主，不依赖节肢动物作为传播媒介。沙眼衣原体的自然宿主主要是人和鼠，解脲衣原体、沙眼衣原体、人型衣原体也是引起人类性病的病原体。鸚鵡热衣原体的自然宿主主要是禽类和哺乳动物，也感染人。

三、霉形体

霉形体(*Mycoplasma*)是一类无细胞壁、能在体外营独立生活的最小的单细胞原核微生物。霉形体又称类菌质体或支原体，它首先从患胸膜肺炎的病牛中发现，曾被称为类胸膜肺炎微生物，1967 年才正式命名为霉形体。在分类学上因其无细胞壁而归属于柔膜体纲的霉形体目。

霉形体在自然界中分布广泛，人类、家畜、家禽、植物甚至土壤、污水中都有发现。霉形体大多为腐生菌或无害的共生菌，极少数是动植物的病原菌。其中主要是引起动物疾病，如鸡败血霉形体引起家禽慢性呼吸道病，猪肺炎霉形体引起猪地方流行性肺炎(气喘病)，无乳霉形体引起牛、羊无乳症等。霉形体对人的致病性较弱，唯一肯定能致人疾病的是肺炎霉形体，可引起霉形体肺炎。水稻、玉米、紫苑的黄枯病也与霉形体感染有关，但至今未见霉形体引起鱼类疾病的报道。此外，由于霉形体可通过除菌滤器，常常造成传代细胞污染，给细胞培养及病毒实验带来困难。为预防此种污染，常需在组织培养中预先加入新霉素或卡那霉素以抑制霉形体生长。

1. 分类 目前已知的霉形体有 80 余种, 因其没有细胞壁故归属于柔膜体纲(Mollicute) 酶霉形体目(Mycoplamatales)。下分 3 个科:

(1)霉形体科(Mycoplasmaeae): 生长时不需要从外界环境中摄取胆固醇。

(2)无胆甾原体科(Acholeplasmataceae): 生长时不需要外源性胆固醇。

(3)螺原体科(Spiroplasma taceae): 虽亦需要胆固醇, 其特点是生长至一定阶段呈螺形。

在霉形体科中又分霉形体(*Mycoplasma*)和脲原体(*Ureaplasma*)2 个属。霉形体属现在知道有 64 个种, 而脲原体属仅 2 个种。按照增殖时对胆固醇或其他固醇的需要、菌体形态及分解尿素等特性进行分类的情况见表 7-2。

表 7-2 几种主要霉形体的特性

I 兼性厌氧或微氧	
A. 要求固醇	
1. 对数生长期菌体呈螺旋状	螺旋原体属(<i>Spiroplasma</i>)
2. 非螺旋状	
a 尿素酶阳性	脲原体(<i>Ureaplasma</i>)
b 尿素酶阴性	霉形体属(<i>Mycoplasma</i>)
B. 不要求固醇	无胆甾原体属(<i>Acholeplasma</i>)
II 专性厌氧	
A. 要求固醇	厌氧原体属(<i>Anaeroplasm</i>)
B. 不要求固醇	星状原体属(<i>Asteroleplasma</i>)

2. 形态结构 霉形体突出的结构特征是不具有细胞壁, 因而常呈多形性。基本形状为球形和丝状, 还有环形、星形、螺旋形等不规则形态。丝状形态的霉形体常高度分支, 形成丝状真菌样形体, 故有霉形体之称。霉形体个体小, 最小的球形颗粒直径约 0.1 μ m, 一般为 0.2~0.25 μ m, 能通过细菌滤器。革兰氏染色阴性, 常不易着色, 姬姆萨染色呈淡紫色。霉形体的细胞膜由 3 层组成, 内、外层为蛋白质和糖类, 中层为磷脂和胆固醇。胞质内含有大量的核糖体, 具有 DNA 和 RNA 两种类核酸。

3. 生长繁殖 大多数霉形体的繁殖方式为二分裂方式, 有些可以以出芽方式或从球状体长出丝状体繁殖, 丝状体破裂成球状而进行生长循环。霉形体可在人工培养基上生长, 但营养要求较高, 需在含 10%~20%人或动物血清、腹水、牛心浸汁、酵母浸汁以至胆固醇培养基上才能生长。腐生株营养要求较低, 在一般培养基上就可培养。多数霉形体在有氧或无氧条件下均能生长, 少数为专性厌氧。个别菌株初次分离时要求 5%CO₂ 和 95%N₂ 的气体环境。最适 pH 为 7.6~8.0, 低于 7.0 则死亡。培养温度在 30℃左右, 寄生型的为 37℃生长较好; 霉形体生长缓慢, 最快的 1~2d, 而缓慢株需 3 个月才形成微小菌落。菌落直径一般为 0.1~1mm, 最小的仅 10~12 μ m。典型菌落像“油煎荷包蛋”模样, 中央较厚, 颜色较深, 边缘较薄而且透明, 颜色较浅。这是因为中央菌体向培养基里生长的结果, 用低倍光学显微镜或解剖镜才能看见。在液体培养基中生长呈轻度浑浊, 有的为颗粒状沉于管底或贴在管壁上。很多霉形体可在鸡胚绒毛尿囊膜上或细胞培养中生长。

4. 抵抗力 霉形体对热及干燥抵抗力弱, 45℃30min 可被杀灭, 对重金属、石炭酸、来苏儿等化学消毒剂、各种表面活性剂、脂溶剂敏感, 对醋酸铊、结晶紫等的抵抗力比细菌强。在分离培养时, 培养基中加入少量醋酸铊、结晶紫等可抑制杂菌生长。由于霉形体

无细胞壁，因而对青霉素等抑制细胞壁合成的抗生素不敏感。红霉素、四环素、卡那霉素、链霉素、氯霉素等有杀伤霉形体的作用。

5. 致病性 许多霉形体可使人、畜和禽发生疾病，如丝状霉形体引起牛、羊传染性胸膜肺炎，猪肺炎霉形体引起猪地方流行性肺炎，鸡败血霉形体引起鸡慢性呼吸道病。

6. 抗原性 应用牛肺疫兔化苗及绵羊适应苗已有效地控制牛肺疫在我国的流行，猪地方性肺炎疫苗也有较好的效果，鸡慢性呼吸道病疫苗已在广泛试用。

一般认为霉形体感染所引起的炎症类似于迟发型皮肤超敏反应，参与的白细胞主要是淋巴细胞。霉形体引起呼吸道疾病与呼吸道上皮细胞的表膜和霉形体侵入上皮纤毛之间有密切关系。尽管有免疫应答，但初次感染后霉形体能长期存留于机体。

综上所述，可知立克次体、衣原体和霉形体三者的性质，均介于细菌与病毒之间。

四、螺旋体

螺旋体(*Spirochaeta*)是一类菌体柔曲、靠轴丝收缩而运动的单细胞原核生物。螺旋体在自然界及动物体内广泛存在，种类很多，有腐生和寄生两大类型。腐生型常存在于污泥、垃圾、海水和淡水中。寄生型寄生于人、畜和软体动物。很多种类的螺旋体能引起人畜疾病，但尚无引起鱼类疾病的报道。

1. 分类 根据螺旋体的生态环境、致病性、形态以及生理学特征，可将螺旋体分为 5 属(表 7-3)，即包柔氏螺旋体属(疏螺旋体属)、密螺旋体属、钩端螺旋体属(细螺旋体属)、脊螺旋体属和螺旋体属，前 3 属能引起人或畜的疾病，后 2 属系非致病的。

表 7-3 螺旋体各属主要特征比较

属名	大小($\mu\text{m} \times \mu\text{m}$)	一般特征	轴丝数	DNA(G + Cmol%)	生存环境	疾病
疏螺旋体属	3~15×0.2~0.5	厌氧，5~7 个螺圈，螺距近 1 μm	不清楚	46	寄生于人或动物	回归热
密螺旋体属	5~15×0.1~0.5	厌氧，螺距达 0.5 μm	2~15	38~41	人或动物体内共生或寄生	梅毒
细螺旋体属	6~20×0.1	需氧，螺旋紧密，末端弯曲或成钩	2	35~39	自由生活或寄生于人或动物	钩端螺旋体病
脊螺旋体属	3~150×0.5~3.0	3~10 个螺旋圈，用相差显微镜可见轴索	>100	—	软体动物消化道	不致病
螺旋体属	5~500×0.2~0.75	厌氧或兼性需氧，螺旋紧密或松散	2~40	56~40	水生、自由生活	不致病

2. 形态结构 菌体柔软细长呈螺旋状或波状，运动活泼。螺旋体具有细菌细胞的基本结构，无鞭毛，革兰氏染色阴性，但不易着色，常用姬姆萨染色法、瑞特氏染色法染色或镀银法染色。用暗视野显微镜观察活的新鲜标本，可看到运动活泼的螺旋体。螺旋体细胞

由圆柱形菌体、轴索和外膜构成。圆柱形菌体是细胞的主要部分，由核区和细胞质构成原质柱，外面再包围类似细菌的细胞膜和细胞壁，细胞壁内含脂多糖和胞壁酸，但不如细菌胞壁坚韧，轴索由轴丝组成，位于细胞壁与细胞膜之间，轴丝多少与螺旋体型别有关，一般每个细胞有 2~100 条以上，其超微结构及化学组成类似于细菌鞭毛，它可能对螺旋体的运动起作用。运动方式有 3 种，即沿螺旋的长轴迅速旋转、细胞做动摇不定的屈曲、沿螺旋或沿如蛇行一般的路径向前运动。螺旋体的形态因螺旋直径的大小、螺旋数及规则程度不同而有差异。

3. 生长繁殖 螺旋体与细菌一样以二等分裂方式繁殖，除细螺旋体营养要求简单能人工培养外，大多数螺旋体因生长条件苛刻难于在人工培养基上培养。

4. 致病性 部分螺旋体可引起人和动物的疾病，如人的性病和猪的痢疾，但未见引起水产动物疾病的报道。

思考题

1. 简述放线菌、黏细菌、蛭弧菌的分类地位。
2. 简述放线菌、黏细菌、蛭弧菌的生物学特性？
3. 试从细胞形态、营养类型、生理特性和系统发育关系等几方面比较细菌、螺旋体、霉形衣原体、立克次体的异同。

第八章 微生物的遗传与变异

第一节 细菌的遗传与变异

细菌与其他生物一样，通过遗传(heredity)与变异(variation)生存与发展。所谓细菌的遗传，系指亲代细菌与子代细菌的相似性，它使细菌的性状保持相对稳定，是各种细菌存在的根据。所谓细菌的变异，指亲代与子代以及子代细菌之间的不相似性，细菌得以发展进化。细菌的遗传和变异特征早已被人们所应用。例如巴斯德发现经高温培养后的炭疽杆菌，其致病力大为减弱而抗原性仍然保持，将此菌注入健康动物，不会致病，但可使动物获得对有毒炭疽杆菌的免疫力。

一、细菌遗传的物质基础

基因组(genome) 细菌的基因组位于核体，是遗传的主要物质基础。核体又称染色体(chromosome)是由两条环状双螺旋 DNA 长链组成，含细菌的遗传基因，控制细菌的遗传与变异。每条 DNA 单链的骨架由磷酸和脱氧核糖组成，支链含有四种碱基，即两种嘌呤：腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)，两种嘧啶：胸腺嘧啶(T)和胞嘧啶(C)。染色体 DNA 在细菌细胞浆中呈螺旋形式缠绕成团，外无核膜包围，故称核质。细菌染色体 DNA 以半保留方式进行复制。新形成的 DNA 双链分子与亲代的完全相同，所携带的遗传信息也与亲代的完全相同，故子代与亲代细菌的性状相同。倘若在 DNA 复制中，子代 DNA 发生改变，便会出现变异。

质粒(plasmid) 质粒是细菌染色体外的遗传物质，多为环状双螺旋 DNA 分子。质粒可以自身复制，随宿主菌分裂传到子代菌体。在一定条件下，质粒可以转移，也可丢失。质粒是自行复制单位，有的需与核质染色体的复制同步，称为严紧型复制(stringent replication)。

质粒编码细菌各种重要的生物学性状。编码性菌毛的质粒称致育质粒或 F 质粒(fertility plasmid)，具有 F 质粒的细菌有性菌毛，为雄性细菌；无 F 质粒的细菌无性菌毛，为雌性细菌，该质粒与细菌的有性结合有关。编码细菌各种毒力因子的质粒统称毒力质粒或 Vi 质粒(virulence plasmid)，如致病性大肠杆菌在黏膜上定居及产生毒素的能力可由不同质粒编码，其中 K 质粒编码对黏膜具有黏附活性的菌毛，ST 质粒与 LT 质粒分别编码耐热肠毒素和不耐热肠毒素。细菌对抗菌药物或重金属盐类的抗性则由 R 质粒(resistance plasmid)所决定。一个质粒可同时具有几种编码功能。

质粒可以自行丢失(频率 $10^{-2} \sim 10^{-8}$)，或经人工处理而消除(curing)。高温、紫外线、吡啶橙、十二烷基硫酸钠、溴化乙锭等处理，可使质粒丢失的频率提高 100~100 000 倍。质粒可以在细菌间转移，当质粒从一个细菌转移至另一个细菌时，携带的性状也随之转移。质粒的转移不仅可以发生在同种、同属的细菌之间，有的甚至还可以在不同种属的细菌间进行。按其转移的特性可将质粒分为二类：接合性质粒(conjugative plasmid)与非接合性质粒(nonconjugative plasmid)。接合性质粒一般使细菌有致育性，并且在细菌之间接触时能从一个细菌转移到另一个细菌中去(如 F 质粒)。非接合性质粒不能在细菌之间转移，但有的可以通过以噬菌体为载体或直接进入另一个细菌而转移。非接合性质粒也可以与接合性质粒结合随接合性质粒转移。有的质粒还可以结合到染色体上，如 F 质粒在变形杆菌内是独立存在的，但在大肠杆菌内则可与染色体结合，这种质粒称为附加体(episome)。

穿梭载体(shuttle vector) 是一类特殊的质粒,可在某种属关系差异较大的微生物中转移,例如在大肠杆菌与酵母之间。利用它可携带原核或真核微生物的外源序列。

转座因子(transposable element) 近年来发现微生物的某些 DNA 片段作为一个独立单位可在染色体上移动,此种移动甚至可发生在不同种细胞之间。这种可移动的 DNA 片段称之为转座因子。细菌的转座因子有三种类型:插入序列(insertion sequence, IS)、转座子(transposon, Tn)以及某些特殊的噬菌体,例如 Mu,是促变噬菌体(mutator phage)的简称。

IS 与 Tn 具有两个共同特点,一是都携带编码转座酶(transposase)的基因,二是在其 DNA 末端都有短的倒置末端重复子。重复子长约 40~1 000bp。IS 分子量较小(0.7~1.4kb),Tn 比 IS 大(2~2.5kb),除转座酶基因外,还含某些具有重要特性例如抗性标记的基因。Tn 是当今遗传学及基因工程研究的有用工具。Mu 分子量约 2~2.5kb,与一般温和噬菌体不同,它可整合到大肠杆菌染色体的任何位置,从而引起插入突变。

毒力岛(pathogenicity island, PAI) 是 20 世纪 90 年代提出的一个新概念。PAI 是指病原菌的某个或某些毒力基因群,分子结构与功能有别于细菌染色体,但位于细菌染色体之内,因此称之为“岛”。PAI 虽然是染色体的 DNA 片段,但两端往往具有重复序列与插入元件,其 G+Cmol%及密码使用与细菌染色体有明显差异,分子量较大,多为 30~40kb,也有达 100kb 者。

一般认为,PAI 不位于质粒或附体,基因编码的产物多为分泌性蛋白或细胞表面蛋白。一种病原菌可以有一个以上的毒力岛。最早报道的是尿道致病性大肠杆菌 536 株的 PAI-I 及 PAI-II,分别为 70kb 及 190kb,两端的重复序列前者为 16bp,后者为 18bp。该菌株如缺失这两个毒力岛则其溶血性、血清抗性、甘露糖抗性血凝、尿道上皮细胞的黏附力以及对小鼠的毒力均大为降低。此后在鼠伤寒沙门氏菌、幽门螺杆菌、鼠疫耶尔森菌等均有所发现。毒力岛的生物学意义尚不清楚,推测其与细菌的毒力变异有关。鉴于毒力岛的结构特点;决定了它可在细菌的不同菌株甚至不同菌种之间进行 DNA 重组。有人指出,在环境中存在着致病菌株与非致病菌株,后者通过基因重组从前者获得了毒力岛,从而具备了致病性,而不是通过自身固有基因的修饰导致的毒力变异。目前一些新致病菌的出现有可能归咎于此。

二、基因突变

基因突变(gene mutation)简称突变,是变异的一种,指生物细胞遗传物质 DNA 分子结构突然发生了稳定的可遗传的变化。它是生物进化的一个重要因素。

细菌与一般生物细胞一样可发生突变,其突变也可按发生改变的范围大小,分为染色体畸变(chromosomal aberration)和点突变(point mutation)。染色体畸变是指染色体的一大段发生了变化,它包括染色体结构上的缺失(deletion)、重复(duplication)、插入(insertion)、易位(translocation)和倒置(inversion)。点突变是相应基因上的 DNA 链中一个或少数几个核苷酸对的改变,包括核苷酸对的置换(replacement),进一步可分为转换(transition)与颠换(transversion)和因缺失或插入而造成的移码(frame shift)。

细菌的突变也可分为自发突变(spontaneous mutation)和人工诱变(induced mutation)。自发突变是在未经人工改变的外界条件下,自然发生的突变,它经常发生,但发生的机率(突变率)很低,通常仅约 $1 / 10^6 \sim 1 / 10^9$ 。例如,在对于药物敏感的原始细菌群体中,发生耐药性突变的仅是群体中极少数的个别细胞。人工诱变是在应用诱变因素的影响下而发生的突变,其突变率常高于自然突变。许多物理和化学因素,如 X 射线、紫外光、亚硝酸、吖

啉橙类染料、烷化剂和碱基结构类似物等均可作为细菌的诱变剂，提高细菌的突变率。

(一)细菌变异的类型 细菌基因突变而表现的变异类型很多，常见有以下几种。

菌落形态变异 属非选择性变异。细菌的菌落可大致分为两种类型，即菌落表面光滑、湿润，边缘整齐的光滑型(smooth type, S 型)和菌落表面粗糙、枯干，边缘不整齐的粗糙型(rough type, R 型)。在一定条件下，光滑型菌落可变为粗糙型，称为 S→R 变异。S→R 变异，经常伴随着 S 型抗原的丧失和病原菌毒力由强变弱等性状的改变(表 8-1)。例如某些革兰氏阴性菌的菌落从 S 型变为 R 型时，其细胞壁脂多糖侧链丢失，同时也丧失致病力。一些革兰氏阳性菌例如肺炎链球菌，编码多糖荚膜的基因发生突变后，菌落也由 S 型转变为 R 型，并丧失荚膜形成能力和毒力。

表 8-1 光滑型与粗糙型菌落的形状改变

性状	光滑型(S 型)	粗糙型(R 型)
菌落形状	光滑、湿润、边缘整齐	粗糙、枯干、边缘不整齐
菌体形态	正常、一致	可异常而不一致
表面抗原	具有特异性表面多糖抗原	丢失特异性表面多糖抗原
毒力	强	弱或完全丧失
对噬菌体的敏感性	敏感	不敏感
生化反应性	强	弱
在生理盐水或 0.2% 的台盼蓝中的悬浮	均匀混悬	自家凝集
肉汤中的培养特性	均匀混浊	颗粒状生长，易于沉淀
对正常血清杀菌作用的敏感性	不敏感	敏感
对吞噬作用的抵抗力	较强	较弱
荚膜细菌的荚膜形成	可形成	不形成

抗原变异 由于细菌基因突变而引起其抗原结构发生改变的变异类型。当编码细菌的抗原结构包括菌体抗原、鞭毛抗原、荚膜抗原等的基因发生突变时，细菌形成相应抗原结构的能力丧失，引起细菌抗原性变异。如常见的细菌细胞壁缺陷变异(细菌 L 型等)、荚膜变异或鞭毛变异等。

抗性变异 是对某种化学药物或致死物理因子抗性的变异。通过自发突变以及抗性遗传因子的传递，而产生大多数抗性。它和化学药物的存在并无关系，细菌获得抗性以后，即使在没有药物的条件下生长繁殖数代，一般也不丧失抗性。但细菌对于青霉素、氯霉素、四环素、红霉素等抗生素可出现由于诱导而产生的耐药性，它并非起源于遗传因子的改变，而类似于诱导酶的产生，系基因所携带的遗传信息在表达过程中发生的诱导现象，例如培养枯草杆菌或蜡样芽孢杆菌于含少量青霉素 G 的培养基中时，可诱导这些细菌产生青霉素酶以破坏青霉素。

营养型变异 主要引起营养缺陷型变异，即细菌丧失合成一种或几种生长因子的能力，无法在基本培养基上正常生长繁殖的变异类型。如变异株丧失对某种糖类、维生素、氨基酸或其他生长因子的合成能力，在补充这些营养物质的培养基上才能生长。这种突变

对研究细菌代谢产物的生物合成途径很有用处。此外，营养型变异菌株可作为杂交、转化、转导和原生质体融合等研究中的标记菌种。

(二) 诱发细菌变异的方法 诱发突变是应用人工方法使细菌增殖和复制 DNA 时出现“错误”，从而育成人类需要的细菌变异品系。如下介绍常用的诱变方法及其致突变的机制。

物理方法 包括温度及各种射线(紫外线、激光等非电离辐射和 X 射线、 α 射线、 β 射线、快中子等电离辐射)。

温度诱发基因突变的机制似乎是专一对 GC 碱基对的作用。包括使 C 脱氨基转换为尿嘧啶(U)，在复制中造成 GC $\rightarrow$ AT 转换；以及引起 G-脱氧核糖键的移动，从而在 DNA 复制过程中出现包括两个 G 的碱基对，在再一次复制中造成 GC $\rightarrow$ CG 颠换。

辐射的诱变作用一般认为有直接作用和间接作用两个方面。前者是指辐射直接作用于染色体，包括引起 DNA 骨架断裂所造成的染色体畸变，和使 DNA 分子上相邻的 T 形成二聚体而引起的复制差错。间接作用是使染色体以外的细胞物质发生变化，再由这些物质作用于染色体引起突变；它包括碱基类似物的形成及其突变诱发作用，和电离辐射引起过氧化氢和游离基的产生以及它们诱发突变。

化学方法 常用的化学诱变剂有 5 溴脱氧尿苷(U_{Br})、5 氟脱氧尿苷、2 氨基嘌呤、8 氮鸟嘌呤、亚硝酸、羟胺、烷化剂(β 丙酸内酯和芥子气等)、亚硝基胍、吖啶类染料(吖啶黄、吖啶橙、原黄素等)、一系列烷化剂和吖啶类结合的化合物(名为 ICR191，是美国某癌症研究所的制品)、溴化乙锭等。它们的作用机制复杂而各有差异，总的说来主要有以下几方面。

1. 取代碱基参入 DNA，从而使 DNA 的某些碱基对发生置换。例如 U_{Br} 是 T 的结构类似物，它通常以酮式出现，能代替 T 与 A 形成氢键而配对。不过在较少的情况下，它也能以烯醇式出现；此烯醇式不能和 A 形成氢键而能和鸟嘌呤(G)形成氢键。因此，当它代替 T 与 A 配对参入 DNA 时，在以后的 DNA 复制中就可能引起 AT 对被 GC 对置换的突变发生；当它首先是代替 C 与 G 配对参入 DNA 时，则在 DNA 复制中就可能出现 GC 对被 AT 对的置换。

2. 使碱基发生化学变构，从而引起 DNA 的某些碱基对发生置换。例如亚硝酸对碱基有氧化脱氨基作用，可以使 C 成为 U 与 A 配对，或 A 成为次黄嘌呤(H)与 C 配对，从而引起 DNA 的某些碱基对发生置换突变。

3. 插入 DNA 相邻的碱基之间，引起移码突变。在邻近的两个嘌呤碱基之间插入吖啶染料分子，可引起 DNA 复制时碱基增添或缺失的错误，造成密码子的移码，出现基因突变。

4. 引起 DNA 分子断裂而诱发染色体畸变。例如许多烷化剂(氮芥、硫芥、环氧乙烷等)除能诱发点突变以外，还能诱发染色体畸变。由于染色体畸变常为辐射所诱发，所以这些物质又称为拟辐射物质。其作用机制据认为是使 DNA 分子上的碱基被烷化以后，能够被核酸内切酶所断裂。不属于拟辐射物质的某些化合物也可以诱发染色体畸变，例如亚硝酸就是一种很有效的诱发缺失的诱变剂。

生物学方法 利用各种生物学的方法可诱使微生物发生变异，使细菌发生毒力等性状的变化，获得性能良好的菌株。

1. 增强毒力 连续通过易感动物，可使病原菌毒力增强。有的细菌与其他微生物共

生,或被温和噬菌体感染,也可增强毒力。例如产气荚膜梭菌与八叠球菌共生时毒力增强;肉毒梭菌当被温和噬菌体感染时,方产生毒素。

2. 减弱毒力 病原菌毒力自发减弱的现象,常见于传染病流行末期所分得的病原菌株。人工减弱病原微生物的毒力通常使用病原菌通过非易感动物、鸡胚等方法。如将禽霍乱强毒菌株通过豚鼠 190 代后,再经鸡胚传 40 代,育成禽霍乱弱毒菌株。无论自然变异弱毒株或人工培育的变异弱毒株,均由于 DNA 上核苷酸碱基顺序的改变的结果。

三、基因的转移与重组

细菌是单细胞生物,以二分裂方式进行无性繁殖,子代只有从一个亲代获得遗传物质,在某种情况下,两个不同性状细菌的基因可以转移到一起,经过基因间的重组(recombination),形成新的遗传型个体。细菌的基因转移和重组的主要形式有转化、转导、接合、原生质体融合和转染。

(一)转化(transformation) 供体菌游离的 DNA 片段直接进入受体菌,使受体菌获得新的性状,称为转化。转化的发生过程,首先是供体的 DNA 片段吸附于受体细菌的细胞膜上。这种吸附起先是可逆的,后来则不可逆,细胞膜上的双链 DNA 分解成单链,与一种特异的蛋白结合,穿入受体菌细胞内,与其 DNA 发生整合,取代一部分原来的 DNA,受体菌由于获得外源的 DNA 而改变了遗传性状。20 世纪 20 年代发现的肺炎链球菌的转化是经典范例,其方法是将致死小鼠肺炎链球菌杀灭后,加入非致死小鼠的肺炎链球菌培养物中,能够使后者变为致死小鼠的肺炎链球菌。

转化现象无论在革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌中都有发生,但不是所有细菌都有转化现象。大多数细菌不能接受外源性 DNA,不能将它整合到染色体之中;另外,细菌还能产生内切酶,能识别并破坏进入细胞的外源性 DNA。是否发生转化与菌株在进化过程中的亲缘关系有着密切的联系。同时受体菌必须处于感受态(competence)才能转化。

(二)转导(transduction) 以温和噬菌体为媒介,把供体菌的 DNA 小片段携带到受体菌中,通过交换与整合,使受体菌获得供体菌的部分遗传性状,称为转导。获得新遗传性状的受体菌细胞,称为转导子(transductant)。

细菌的转导又分普遍性转导和局限性转导,普遍性转导与温和噬菌体的裂解期有关,局限性转导则与温和噬菌体的溶原期有关。

1. 普遍性转导(general transduction) 温和噬菌体在裂解期的后期,其 DNA 已大量复制,与外壳蛋白装备新的噬菌体时,大约 $10^5 \sim 10^7$ 分子之一的新噬菌体装配错误,将细菌 DNA 的裂解片段装入噬菌体外壳蛋白中,成为一个完全缺陷的转导性噬菌体(transducingphage)。误被装入的 DNA 片段可以是供体菌染色体上的任何部分,也可以是质粒 DNA。由这种噬菌体介导的转导,称为普遍性转导。当转导噬菌体侵入另一受体菌时,可将错装的受体菌 DNA 片段带入受体菌,出现两种结果,一种是供体菌 DNA 片段与受体菌的染色体 DNA 整合,使后者成为遗传性状稳定的转导子,称完全转导(complete transduction);另一种情况是,有一些供体菌的 DNA 片段不能与受体菌染色体整合,仍保持游离状态,不自身复制,但能转录、翻译和表达性状,称为顿挫转导(abortive transduction)。

2. 局限性转导(restricted transduction) 为噬菌体所介导的供体菌染色体上个别特定基因的转导。例如 λ 噬菌体进入大肠杆菌,当处于溶源期时,噬菌体 DNA 整合在大肠杆菌染色体的特定部位,即在半乳糖苷酶基因(gal)与生物素基因(bio)之间,细菌受紫外线照

射或化学因素作用后， λ 噬菌体从溶原期进入裂解期，其 DNA 又从细菌染色体上分离，分离时会有 10^{-6} 的噬菌体将其本身 DNA 上的一段留在细菌染色体上，却带走了细菌 DNA 上两侧的 gal 或 bio 基因，这种发生偏差的噬菌体，称为部分缺陷噬菌体，当此噬菌体再次侵入受体菌时，可带入原来供体菌的特定基因 gal 或 bio。

应当注意转导与溶源转换(lysogenic conversion)两者的差别。后者是指温和噬菌体感染其寄主后，噬菌体基因整合于寄主基因组中，寄主的性状发生变异，它是一种表面上与转导相似但本质上却不同的特殊现象。当噬菌体在寄主中消失时，通过噬菌体转换而获得的性状也同时丧失。

(三)接合(coniugatbn) 是两个完整的细菌细胞通过性菌毛直接接触，由供体细菌将质粒 DNA 转移给受体细菌的过程。接合性质粒有 F 质粒、R 质粒、Col 质粒等。

1. F 质粒的接合 F 质粒通过性菌毛从雄性菌(F^+)转移给雌性菌(F^-)的过程，称为 F 质粒的接合。像有性生殖一样，当 F^+ 菌与 F^- 菌接触时， F^+ 菌的性菌毛末端可与 F^- 菌表面上的受体结合，结合后性菌毛渐渐缩短，使二菌紧靠在一起， F^+ 菌中 F 质粒的一股 DNA 链断开，逐渐由细胞连接处伸入 F^- 菌，继而以滚环模式进行复制。所以在受体菌获得 F 质粒时，供体菌并不失去 F 质粒。受体菌在获得 F 质粒后即变为 F^+ 菌，也长出性菌毛。通过接合而转移 F 质粒的频率可达 70%。

大肠杆菌的 F 质粒进入 F^- 菌后，能单独存在，自行复制。但有小部分 F 质粒可整合到受体菌的染色体上，与染色体一起复制。整合后的细菌能以高效率转移染色体上的基因，称为高频重组菌(high frequency recombinant, Hfr)。在 Hfr 中 F 质粒结合在染色体的末端，当 Hfr 与 F^- 菌发生接合时，F 质粒起发动转移的作用，首先 Hfr 染色体 DNA 双链中的一股单链在 F 因子处断裂，该股 DNA 链从环状变为链状，F 因子处于单链 DNA 的末端，前端首先进入 F^- 菌，只有当整个染色体的一股完全转移完毕后，F 因子才能进入 F^- 菌，事实上在转移过程中任何震动都能使 DNA 链断裂，而中断转移，故在 Hfr 转移中，可以有不同长度的供体菌染色体片段进入 F^- 菌进行重组。 F^- 菌获得 F 质粒的机会很少，因它最后进入受体菌。

Hfr 中的 F 质粒有时也会从染色体上脱离下来，终止其 Hfr 状态。从染色体上脱离下的 F 质粒有时可带有染色体上几个邻近的基因，这种质粒称为 F' 质粒。当 F' 质粒转入 F^- 菌时， F^- 菌可同时获得这一部分新的基因。所以 F' 质粒有类似转导中的温和噬菌体，起着基因载体的作用。这种通过 F' 质粒转移基因称为性导(sexduction)。

F^+ 、Hfr、 F' 三种菌都有性菌毛，都为雄性菌。在雄性菌性菌毛表面有一种雄性特异性噬菌体(male specific phage)受体，在电镜下可见相应噬菌体黏附在性菌毛表面。

2. R 质粒的接合 细菌耐药性的产生主要是由于 R 质粒在菌株间的迅速转移和快速生长繁殖所致。R 质粒由两种功能不同的部分组成，一是耐药性转移因子(resistance transferfactor, RTF)，其作用类似 F 因子；另一种是耐药性因子(RF)，它决定耐药性。RTF 和 RF 均能自主复制，但是只有两者一起存在时，这个细菌才能将耐药性转移给另一个细菌。R 质粒的接合方式类似 F 因子的转移方式，先由 RTF 控制，耐药菌(R^+)长出 R 菌毛，和敏感菌(R^-)相接触，RF 即由 R^+ 菌转移至 R^- 菌内。当 RF 与 F 因子一起共存于某个细菌细胞时，有些 RF 可以阻止 F 因子的转移，称为 fi^+ (fertility inhihtion)因子，常见于大肠杆菌和痢疾杆菌；而另一些不阻止 F 因子转移的 RF，称为 fi^- 因子，常见于沙门氏菌。R 质粒不能整合到宿主染色体基因组上，所以它不是附加体，而是一种稳定的质粒。

3. Col 质粒的接合 Col 质粒控制细菌素的合成, 这类质粒很多, 有的可以产生性菌毛, 在细菌间进行接合转移, 称为转移性质粒; 有的不能进行在细菌间接合转移, 称为非转移性质粒; 但当细菌细胞同时具有可转移的质粒如 F 因子时, 则两者可同时发生接合转移。

(四) 原生质体融合(protooplast fusion) 通过人为的方法, 使遗传性状不同的两细菌细胞的原生质体发生融合, 并进而发生遗传重组, 以产生同时带有双亲性状的、遗传性稳定的融合子(fusant)的过程, 称为原生质体融合。原生质体融合技术是继转化、转导和接合之后一种更加有效的转移遗传物质的手段。

原生质体融合的主要步骤是: 选择两个有特殊价值的并带有选择性遗传标记的细菌细胞作为亲本, 在高渗溶液中, 用适当的脱壁酶去除细胞壁, 再将形成的原生质体进行离心聚集, 并加入促融合剂 PEG(聚乙二醇 polyethylene glycol)或通过电脉冲等促进融合, 然后在高渗溶液中稀释, 再涂布于能使其细胞壁再生和分裂繁殖的培养基上, 待形成菌落后, 通过影印接种法, 将其接种到各种选择性培养基上, 鉴定它们是否为融合子, 最后测定其生物学性状。

能进行原生质体融合的细胞是极其广泛的, 不仅包括原核生物中的细菌和放线菌, 而且还包括真核生物的细胞。当前, 有关原生质体融合在育种工作中的研究甚多, 成绩显著, 除不同菌株间或种间进行融合外, 还能做到属间、科间甚至更远缘的微生物细胞间的融合, 关于原生质体融合的遗传机制, 尚未明了, 仍在探索之中。

(五) 转染(transfection) 受体菌获得从噬菌体而非从其他供体菌提取的 DNA 的过程, 称为转染。因为噬菌体基因组较小, 其 DNA 分离比较方便, 因此转染成为研究细菌转化及重组机制的有用工具。另一方面, 转染一词更广泛地用于真核生物细胞, 其含义有差别, 指真核细胞通过病毒感染, 获得某一片段 DNA 或 RNA 的过程。与原生质体融合一样, 转染也是一种人为的手段, 通常多用于哺乳动物细胞, 往往为了获得重组病毒而设计。

四、细菌遗传变异研究的实际意义

用细菌进行的一系列遗传学实验, 不仅揭示了细菌本身许多遗传变异的规律, 而且推动整个分子遗传学的迅速发展。在微生物学领域内, 细菌遗传变异的研究也有助于对其他有关问题的了解和发展, 例如帮助了解微生物的起源和进化, 微生物结构与功能的关系, 原核生物性状的调节控制, 以及推动微生物分类学的深入发展。

在实践方面, 细菌遗传变异的研究在以下若干方面也具有重大的实用意义。

(一) 疾病诊断 在临床细菌学检查工作中, 要作出正确的诊断, 不但要熟悉细菌的典型特性, 还要了解细菌的变异规律。细菌在异常条件下生长发育时, 可以发生形态的改变, 例如炭疽杆菌在猪的咽喉部位多不呈典型的竹节状, 其菌体通常弯曲且粗细不匀; 猪丹毒杆菌在慢性病猪的心脏病变内不呈杆状, 而为长丝形。有鞭毛的细菌也容易发生失去鞭毛的遗传性变异或非遗传性变异, 当将变形杆菌培养于普通琼脂表面时, 可形成鞭毛而呈弥漫性薄膜状生长, 称为 H 型细菌; 将它培养于含 0.1% 石炭酸的琼脂培养基表面时, 则不形成鞭毛而生成局限性的孤立菌落, 称为 O 型细菌, 从这一现象出发, 后来将有鞭毛能运动的细菌丧失其鞭毛形成能力的变异, 称为 H→O 变异。新分离的肠道菌株菌落通常为 S 型, 经人工培养后菌落则变为 R 型(S→R 变异), 也有极少数细菌例如炭疽杆菌、结核分支杆菌, 其新分离菌的菌落正常为 R 型, 在一定条件下则变为 S 型(R→S 变异)。这些变化的认识对临床分离菌的鉴定与疾病诊断都有重要意义。

(二)疾病预防和治疗 由于抗生素的广泛使用,原来对某些药物敏感的细菌,可发生变异而形成对该药物的耐性,有时甚至形成必须有该药物方能生长的赖药性(drug dependence)。所以,在治疗细菌疾病用药时,应选择敏感的抗菌药物,并应防止耐药菌株的扩散。

菌苗接种是使机体建立特异性免疫,预防传染性疾病的有效措施,弱毒菌苗株都是病原菌的减毒变异株,有较好的免疫效果。获得弱毒疫苗菌株,通常通过人工致弱的方法。例如布氏杆菌羊型 5 号菌苗,是将强毒马尔他布氏菌通过鸡育成的弱毒菌株;卡介苗(BCG)是 Calmette 与 Guerin 二人将有毒力的牛分支杆菌在含胆汁、甘油和马铃薯的培养基中反复传代 230 次,历时 13 年,所获得的一株毒力减弱而保有免疫原性的变异株。目前菌苗的研究,进一步应用变异的原理,通过基因工程技术改变决定毒力的基因,获得符合既定目标的变异株,以更有效地制备理想的菌苗。

(三)基因工程 基因工程是用人工方法将所需要的某一供体生物的 DNA 大分子提取出来,在离体的条件下用适当的工具酶切割,把它与作为载体(vector)的 DNA 分子连接起来,然后与载体一起导入某一易生长、繁殖的受体细胞中,让外源遗传物质在其中“安家落户”,进行正常的复制和表达,从而获得新的产物。它的主要操作步骤如下:(1)目的基因分离;(2)目的基因与载体 DNA 的体外重组,形成一个完整的有复制能力的嵌合体(chimaera);(3)重组载体导入受体细胞,通常用转化的方法,导入能容纳外源载体的受体细菌。(4)复制与表达;重组载体在受体细胞内必须自主复制而获得扩增,以表达目的基因特有的遗传性状或产物,使之成为“工程菌”。应用这一技术可使细菌表达出需要的性状或产物。例如将人胰岛素 A、B 两链的人工合成基因组合到大肠杆菌的不同质粒上,然后再转移至菌体内,生产出胰岛素。用同样方法,让大肠杆菌生产生长激素释放因子“SHIR”的动物激素(一种 14 肽,能抑制其他激素的释放和治疗糖尿病等)。近年来,应用微生物的遗传工程获得如脑啡肽、卵清蛋白、干扰素等,极大地改进了这些生物制剂的生产工艺。应用基因工程技术来使细菌表达病毒的抗原成分,用以制备新型诊断试剂或疫苗,或用一种细菌表达出二种细菌的抗原,制备多价菌苗等,均取得实质性进展。

第二节 病毒的遗传与进化

随着 DNA 重组技术、分子克隆(molecular cloning)及 PCR(聚合酶链式反应)等的问世,极大地推动了有关病毒遗传与进化的研究,丰富了对病毒基因组结构与功能的认识,病毒遗传学已成为病毒学的研究热点之一。

一、突 变

在病毒复制的过程中,产生数以亿计的子代病毒颗粒,其中可能出错,称之为突变(mutation)。大多数突变对病毒本身是致命的,不再具有存活和复制的能力,但极少数能够适应环境选择的突变例外。突变的类型可分病毒基因组的变异及表型的变异,后者表现为病毒颗粒的理化特性或复制性质的改变。

(一)基因组变异

最常见的是单个核苷酸的替换,称之为点突变(point mutation)。此外也可能是单个、小段或大段核苷酸缺失或插入。以突变发生的机率而言,点突变最经常,小片段核苷酸缺失或插入次之,大片段核苷酸的缺失很少发生。

突变的核苷酸有可能发生回复突变,也可能因为相同甚至不同基因发生抑制性突变

(suppressor mutation), 使突变逆转, 重新具有与起始毒株相同的表型。以流感病毒为例, 往往由于毫不相关的基因自行发生抑制性突变, 使之失去作为弱毒疫苗的价值。

缺损型干扰(defective interfering, DI)突变株 是突变的一个特例。大多数病毒均能产生 DI 突变株, 这些突变株自身不能复制, 只有在亲本野生株作为辅助病毒(helper virus)存在时才能复制, 但它又干扰亲本病毒的复制, 导致后者数量减少。已知所有 RNA 病毒的 DI 颗粒均为缺失突变株。基因组分节段的流感病毒与呼肠病毒的 DI 颗粒缺失一个或数个大节段, 代之以不完整的编码基因的较小节段。基因组不分节段的病毒 DI 颗粒所含 RNA 较短, 只有正常的 2/3。水泡性口炎病毒的 DI 颗粒(T 颗粒)就是如此, 其形态比正常病毒颗粒(B 颗粒)短一截。基因测序显示, RNA 病毒的 DI 颗粒核苷酸有大段缺失和基因重组。

病毒在细胞培养连续传代的过程中, DI 颗粒大为增加。DI 颗粒基因组较短, 复制耗时少, 不用作 mRNA 转录的模板。DI 颗粒对病毒复制酶的亲和性高, 比全长的基因组更有竞争力。因此 DI 颗粒通常多于正常病毒颗粒。

DNA 病毒的 DI 颗粒是由 DNA 重组所致。乳头瘤病毒的 DI 颗粒通常含有复制的基因组的重复拷贝, 有时还混有宿主细胞的散布 DNA。

有关 DI 颗粒的知识目前多来自于培养的细胞, 在动物体内, DI 颗粒也可能有作用。只有经稀释的病毒才对动物致病, 而高滴度的病毒原液通常毒力弱。许多动物的慢性疾病也可能涉及 DI 的干扰。

(二) 表型变异

有不同方式, 比如空斑变异株(plaque mutants)与抗体逃逸变异株(antibody escape mutants), 前者变异株的空斑形态与原先的野生株不一样, 后者变异株对野生株的抗体的中和作用产生了抵抗。在抗体存在时, 病毒若要复制, 其表面蛋白抗原决定簇就得发生变异。抗原性变异导致持续感染, 绵羊感染梅迪 / 维士纳病毒及马感染马传染性贫血病毒均是如此。猪水泡性口炎病毒及圣明戈海狮病毒也能经常产生抗体逃逸变异株。

条件致死性突变株(conditional lethal mutants) 也是一种表型突变。此种变异株只能在经选择的特定的条件下复制, 此时通常出现若干基因变异株。研究最多的条件致死性突变株是宿主范围突变株(host range mutants)及温度突变株, 后者包括温度敏感(temperature-sensitive)及冷适应(cold-adapted)突变株。筛选这些突变株的条件是改变培育细胞的温度。突变株病毒由温度改变产生了结构非正常的蛋白, 影响其在正常温度下的功能。温度突变被广泛应用于制备弱毒疫苗, 例如流感病毒疫苗。

突变率 真核细胞的 DNA 复制具有校正(proofreading)功能, 在细胞核内复制的 DNA 病毒同样如此, 因此它们与宿主细胞 DNA 的突变率(mutation rate)可能相同, 每个核苷酸(即核苷酸/复制周期)以 $10^{-10} \sim 10^{-11}$ 的频率发生复制错误。密码子的第三个核苷酸的点突变影响不大, 不导致氨基酸的改变。

但是 RNA 的复制缺少校正机制, 病毒 RNA 复制的错误率远远高于病毒 DNA。像水泡性口炎病毒的 11kb 的基因组的核苷酸的替换率为 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 核苷酸 / 复制周期, 以致几乎每个子代基因组都与亲本不同, 子代基因组之间也至少有一个核苷酸的差异, 其核苷酸替换率高于真核细胞 DNA 约 100 万倍。当然大多数的核苷酸替换的基因组被丢弃, 但非致死性突变的 RNA 病毒的基因将迅速蓄积。基因组的突变是不均匀的, 意味着编码不同蛋白的基因以不同速率进化。很可能是由于不均匀的突变率筛选了某种突变株。1978~1979 年间在荷兰、加拿大、英国暴发小儿麻痹症, 从上述国家分离的小儿脊髓灰质炎病毒

在 13 个月的流行期间，基因组的 7441 个核苷酸约改变了 100 个。

病毒在自然界中不断发生自发性突变，往往获得与亲代性质有别的子代病毒，变异的子代病毒如适于生存和进化，必须具有以下一些条件。

首先是迅速复制的能力，大多数毒力强的毒株复制较一般毒株快。但是如果太快，宿主很快死亡，则不易于病毒的传播。

其次是具有较高滴度。病毒在脊椎动物宿主体内造成病毒血症，对虫媒病毒尤为重要，媒介昆虫通过吸血在其唾液腺内产生高滴度的病毒，再经叮咬感染其他易感脊椎动物。禽类的病毒血症多为一过性，但哺乳动物往往导致严重的疾病乃至死亡。

第三，取决于在特定组织内的增殖力。病毒的对宿主细胞的嗜性包括与细胞受体结合的特点，决定了致病表现形式。如能在脑、肾组织或免疫器官的细胞内增殖，则具有更强的生存力。

第四，能否长期排放。慢性排毒有利于病毒的存活和对环境的适应。如能复发(recrudescence)及间歇排毒，病毒存活和进化的机会更多。

第五，在外部环境的生存力。病毒因为其有衣壳能抵抗环境因素的影响，犬细小病毒是典型的例子。该病毒通过人的鞋、衣及笼具等机械传播，在两年内传遍全世界。

第六，对宿主防御的逃避。宿主在进化过程产生了抵御病毒的免疫系统，在此同时，病毒侵袭宿主的机制也随之进化。某些病毒特别是具有大基因组的病毒，能编码干扰宿主抗病毒活性的蛋白，因此造成免疫耐受性感染。牛病毒性腹泻病毒、猫免疫缺陷病毒、鼠的淋巴脉络丛脑膜炎病毒等都具有这种进化的优越性。

第七，能否垂直传递。垂直传递的过程可使病毒免受外环境的影响，也是适应性进化的一种表现。

准种 是指由一种母序列和来自该序列的大量相关突变基因组所组成的病毒群体。Eigen(1993)提出病毒的准种这一概念，用来描述彼此有差异并相互竞争、快速进化的病毒群体。是对病毒“种”的概念的补充。

就某一种病毒而言，它是一个群体，群体内的各病毒颗粒具有保守的表型特性的同时，兼有遗传动态差异，如果病毒核酸复制不发生错误，所产生的子代病毒应该与亲代一模一样，那就不再会有表型的变化。如果错误率太高，将出现各种各样的突变，病毒种群则不再具有完整性。只有在错误率不大不小时，种群才能在变异中保持稳定。由于自然选择的结果，环境适应的突变得以蓄积并发展，从而实现病毒的进化。

冠状病毒是已知 RNA 基因组最大的，具有较高的突变率，可以说是拥有“准种”的典范。例如猫传染性腹膜炎病毒(FIPV)，每只猫都有自己独有的 FIPV 准种，以较低的复制水平在肠道中持续存在。在免疫抑制等情况下，突变的准种大量复制，在巨噬细胞中高滴度增殖，导致宿主发生更严重的免疫抑制及免疫病理变化。

二、诱变

病毒在复制过程中会发生自发的错误，如用紫外线或 X 射线或亚硝基胍等化学试剂处理病毒或它的核酸，可提高其错误的发生率。5 氟尿嘧啶(5-FU)及 5 溴脱氧尿苷(5-BDU)是核苷酸的同类物，病毒复制时前者可掺入 RNA 病毒的核酸，后者可掺入 DNA 病毒的核酸，达到诱变的目的。

定点诱变(site-directed mutagenesis) 可将病毒的随机突变纳入人们的规划之中，这一技术可将 DNA 基因组或 RNA 基因组的 cDNA 任何既定部位的核苷酸替换，或者使之缺

失，或者插入另一段核苷酸。为达到这一目的，一般用分子杂交技术，即将含有特定位点变异的寡核苷酸通过分子杂交，导入载体 DNA，再转化到载体中扩增杂交 DNA，最后根据设计的分子标记，在一定条件下筛选突变株。由于 PCR 及核苷酸测序技术的日益普及，定点诱变在病毒学的应用更为方便，它可用于确定病毒基因的致病作用，也可用于研制具有免疫学标记的弱毒病毒疫苗等，受到普遍重视。许多病毒还可作为定点诱变所需的载体，根据不同目的可选用痘病毒、腺病毒、疱疹病毒、乳头瘤病毒、披膜病毒等。

在事先不了解特定核苷酸序列作用的情况下，通过对定点诱变产物的分析，推测该序列编码的蛋白质性质及其功能，这种利用基因序列资料反过来研究动物体内的遗传学效应的手段，称之为反向遗传学(reverse genetics)。

三、基因重组

两种不同的病毒或同一种病毒的两个不同毒株同时感染同一细胞时，在其核酸复制的过程中，可发生基因重组(genetic recombination)，包括分子内重组、重配或复活。

(一)分子内重组(intramolecular recombination) 是两种不同、通常密切相关的两种病毒的核苷酸片段的交换，DNA 病毒可发生此种现象，RNA 病毒更为普遍。西部马脑脊髓炎病毒(WEEV)就是早期的类仙台病毒与东部马脑脊髓炎病毒(EEEV)分子内重组的产物。在实验条件下，甚至不同科的病毒也可分子内重组，如属于多瘤病毒科的 SV40 与腺病毒重组，SV40 的 DNA 具有腺病毒的衣壳。由于恒河猴肾细胞往往持续感染 SV40，再感染腺病毒时，则会提供上述重组的机会。

在病毒与宿主细胞的基因组之间也会发生分子内重组。在反录病毒基因组内发现有细胞基因，在其前病毒阶段，病毒将宿主细胞的肿瘤基因掺入其基因组，使其变为病毒的肿瘤基因。鸡马立克病病毒的基因组含有肿瘤基因，序列分析表明，该基因来源于禽反录病毒或宿主细胞内的禽反录病毒肿瘤基因的同物。再如流感病毒，其血凝素必须由细胞的蛋白酶裂解，病毒才有传染性。将无毒力的流感病毒毒株接种鸡胚细胞，在传代过程中产生了一个有致病性的适应株，后者含有一个 54 个核苷酸的插入片段，此片段与宿主细胞 28S 核糖体 RNA 互补。病毒因为从细胞获得这一基因片段，产生的血凝素能被蛋白酶裂解，从而具有传染性。牛病毒性腹泻病毒(BVDV)无细胞病变作用的毒株不引致持续性感染，如将细胞的泛素(ubiquitin)基因插入非结构蛋白基因，获得的突变株则对牛胎儿严重致病，并致细胞病变和持续性感染。

(二)重配(reassortment) 发生在基因组分节段的 RNA 病毒，包括砂粒病毒与双 RNA 病毒(均为 2 节段)、布尼病毒(3 节段)、正黏病毒(6~8 节段)以及呼肠孤病毒(10~12 节段)。上述病毒的分类地位相近的两个毒株同时感染某一细胞时，二者可互换其基因组节段，产生稳定的或不稳定的重配毒株。在自然界中，蓝舌病毒即以此种方式呈现其遗传变异性。

(三)复活(reactivation) 又称增殖性复活(multiplicity reactivation)，是指用同一株病毒产生不同程度致死性突变的病毒颗粒同时感染某一细胞时，病毒重新具有传染性(复活)。在理论上，用紫外线照射或化学诱变培育的疫苗可能发生此种复活，因此上述方法不能用于制备病毒疫苗。在有传染性的病毒与灭活的相关病毒或该病毒的 DNA 片段之间，可发生交叉复活(cross-reactivation)、基因组拯救(genome rescue)以及 DNA 片段拯救(DNA fragment rescue)，上述现象在利用病毒作为制备疫苗载体时应予重视。

四、病毒基因产物间的相互作用

不仅是核酸之间，病毒基因的产物蛋白质之间也有相互作用，相互作用产生的产物可

影响病毒的表型。大多数发生在实验室，有的也可在自然界。

补偿作用(complementation) 是指在感染的细胞中，病毒蛋白质之间由于相互作用的结果，拯救了一种或两种病毒或增加了病毒的产量。同一种病毒两个毒株、两种相关甚至不相关的病毒之间，均可有此种作用。一种病毒为另一种病毒提供了后者不能合成的基因产物，使后者在二者混合感染的细胞中也能复制，例如腺病毒与属于细小病毒科的腺联病毒，腺联病毒从腺病毒获得基因产物，得以复制。

表型混合(phenotypic mixing) 是指两种病毒混合细胞后，子代病毒获得二者表型特性。例如用流感病毒鱼副黏病毒共感染(coinfection)细胞时，子代病毒颗粒的囊膜可具有双亲的抗原，但每个病毒颗粒只含双亲之一的基因组。表型混合是囊膜缺失的反录病毒完成其复制周期的重要环节，囊膜缺失的反录病毒颗粒称为假型(pseudotype)，其子代病毒基因组是缺失的，但它们可从辅助的反录病毒获得囊膜。

在实验条件下以及自然界中，某些无囊膜的病毒之间的表型混合可以衣壳转化(transcapsidation)的形式出现，即病毒的衣壳可全部或部分在病毒之间互换。例如脊髓灰质炎病毒的核酸可由柯赛奇病毒(coxsackievirus)的衣壳包裹，或是腺病毒 2 型的核衣壳之内包裹着腺病毒 7 型的基因组。衣壳转化可改变病毒的嗜性。

多倍性(polypoidy) 是病毒成熟过程中，出现数个核衣壳被一个囊膜包裹的现象，在副黏病毒可见。

五、遗传变异与病毒进化

由于病毒之间形态学及理化特性的千差万别，很难设想用一个“进化树”能描述所有病毒的亲缘关系。病毒与宿主彼此从对方获得某些功能基因，某些病毒也从其他病毒获得基因，病毒基因组具有许多功能的及非功能的“基因化石”。

(一) 病毒的系统进化树

虽然不同科之间的病毒的基因组互不相同，但某些不相关的病毒之间又可能有相似的基因次序、结构及复制的方式，甚至编码相似的功能蛋白的共同保守序列。上述的情况表明，绘制病毒的若干套较小的进化树还是可行的。

基于上述考虑，病毒学家近年来提出，在相近的病毒科之上设立“目”，目前已设 3 个目，其中 2 个涉及动物病毒，即“单负股病毒目(Mononegavirales)”及“套式病毒目(Nidovirales)”。前者包括副黏病毒科、弹状病毒科、丝状病毒科及波纳病毒科，该目成员有相似的基因排列、相似的基因产物以及某些的核衣壳基因的共同序列，显示它们有共同的来源。基于同样的理由，将冠状病毒科及动脉炎病毒科归入套式病毒目，二者均有套式(nested-set)转录的特点，尽管两科成员的形态有较大差异。

许多正股单股 RNA 病毒具有相同的基因结构、基因次序及编码酶的决定簇，这些酶包括 RNA 依赖的 RNA 聚合酶、蛋白酶及解旋酶，与宿主细胞的酶高度相似，说明很可能是通过基因重组从宿主获得的。在病毒的进化机制中基因重组发挥的作用最为重要，其次是频率较高的点突变及较低频率的核苷酸插入或缺失，这些突变并不以相同频率在所有基因出现。尽管单股 RNA 病毒数以千计，宿主有很大差异，但它们都具有相似的 5' 端共价连接的多肽、聚 A 尾、一个 5' 端帽，并使用亚基因组 RNA，以确保获得大量的衣壳蛋白。不难发现，微 RNA 病毒、披膜病毒及黄病毒各自的类群，在进化上有亲缘关系。

在病毒进化问题上，令人感兴趣的是，哪一种病毒最古老?哪一种最现代?哪一种最稳定?哪一种最易变?大多数病毒学家认为，病毒颗粒的结构成分最古老，20 面体衣壳累积

的突变可导致病毒失去稳定性而致死。有些病毒学家则认为病毒基因组表达的方式最古老，发生在多基因复制步骤的突变是致死性的。可是目前仅发现病毒的酶有共同的保守序列，而未在病毒结构基因发现，因此尚不足以回答上述进化的有关问题。病毒的基因组是如此之小，对分析基因之间的关系显然缺少余地。

（二）病毒进化的例证

黏液瘤病毒及流感病毒是最典型的例证，前者显示了病毒毒力与宿主抵抗力的共同进化过程，后者则表明病毒在人及多种动物体内，如何避免宿主的免疫应答发生的进化。

黏液瘤病毒的病毒与宿主的共同进化 属于痘病毒科兔痘病毒属的黏液瘤病毒(myxoma virus)原先只存在于南非及美国加州，在自然界通过昆虫叮咬机械传播，引致野兔(白尾棕兔, *Sylvilagus spp.*)温和感染。但是此病毒传到欧洲的实验室以后，对家兔(穴兔, *Oryctolagus cuniculus*)则引起致死性感染。1859年上述欧洲家兔被引入澳大利亚，供运动之用，很快失去控制，成为野生家兔。大量繁殖破坏草场，危害畜牧业。于是在1950年从南非引入黏液瘤病毒对付泛滥的兔群，通过蚊子的叮咬，高毒力的病毒迅速传播，引致兔群高达99%的死亡。但是在没有蚊子的冬季，幸存的兔又繁殖起来，在幸存兔体内的病毒发生变异，毒力减弱，对易感兔的致死率降至70%~90%，病程从原先的数天延长至数周。在3年之内，减毒的突变株在澳大利亚占据了优势。与此同时，在黏液瘤病的疫区，兔群的遗传抗性逐渐上升，致死率在7年之内从90%降至50%。此后某些毒力稍强的毒株在疫区渐占优势，因为它们最适于在有遗传抗性的兔群传播。在澳大利亚，最终形成了黏液瘤病毒与兔群之间的动态平衡。

甲型流感病毒的抗原性转移及漂移 甲型流感病毒感染禽类、多种哺乳动物及人类，引致人及动物的流行性感冒。自1933年首次分离以来，该病毒一直是重要研究对象。甲型流感病毒的囊膜具有两种纤突：血凝素(H)及神经氨酸酶(N)。已发现H有15个亚型。禽类全部存在，人类有3个，猪、马、海豹及鲸各有2个、貂有1个。N有9个亚型，各种动物有相似的分布。该病毒的显著特点是H和N二者的遗传性或抗原性漂移(genetic or antigenic drift)及遗传性或抗原性转移(genetic or antigenic shift)导致的抗原性变异。漂移发生在某个亚型之内，是点突变的积蓄，其中和表位与未突变株稍有差异。转移则骤然获得一个全新的H或N基因，从而产生新的亚型，可能在全世界引致新型流感的暴发流行。

1. 抗原性转移 1890、1900、1918、1957及1968年均曾发生人类的流感大流行。1957年突然出现新亚型A/H2N2(亚洲流感)取代原先的H1N1亚型。1968年又出现取代A/H2N2的新亚型A/H3N2(香港流感)。1977年A/H1N1卷土重来，此后形成A/H1N1与A/H3N2两种亚型共存的局面。分子生物学的研究表明，H1、H2与H3三种亚型的毒株间有密切的关系。采集采自数种动物的若干甲型流感病毒分离株，对其RNA基因组的8个节段进行测序，结果显示，所有甲型流感病毒包括人类分离株都采源于禽流感基因库(gene pool)。在1957年，H1N1亚型的8个节段中的5个被欧亚大陆的禽流感基因替换产生了H2N2新亚型；在1968年，上述H2N2又从禽流感病毒获得包括H在内的两节段，产生了H3N2新亚型。血清学回顾调查进一步证实，1890年的人流感为H2N8亚型，1900年为H3N8亚型，1918年为源于猪流感的H1N1亚型。

源于禽类的甲型流感病毒在人体很难增殖，反之亦然。但是二者均能在猪体内增殖，并在猪体内进行基因重配，猪体是人流感毒株与禽流感毒株的混合器，在猪体内流感病毒产生抗原性转移。每隔10、20年就会在猪体出现一个重配的甲型流感毒株，它具有能编

码在人体复制功能的基因以及禽的 H 基因二在中国南部生活着密集的人群及养殖大量的猪和鸭，彼此密切接触提供了上述的机遇。

但也有例外，1979 年在欧洲流行的 H1N1 猪流感毒株直接来自禽，1989 年中国北方流行的马流感 H3N8 则与世界其他地方的马流感 H3N8 不同，反而与禽的 H3N8 很相似。

2. 抗原性漂移 在基因重组的新亚型甲型流感病毒大流行之后，RNA 各个节段的点突变逐渐积累，开始产生抗原性漂移。编码 H 的基因突变往往改变 H 的抗原性，当针对先前流行株的抗体不再能中和现时流行株时，即意味着出现了新的毒株。H 的改变集中在其分子与抗原性有关的 5 个区，某个重要抗原位点的单个氨基酸的改变也能改变其与抗体结合的能力，不过人及禽的毒株的 H 蛋白的某些区域是保守的。人流感病毒的抗原性漂移的重要特点之一是，在免疫人群中出现的新毒株具有经选择的优势，往往取代先前的流行株，此时还可能同时存在某些次要的变异株。

禽流感病毒的变异与进化 禽流感病毒的变异与进化有时具有特殊性，往往造成严重后果。1983 年 4 月在美国宾州发现低毒力的禽流感 H5N2，致死率低于 10%，它与当时美国东部从野鸟分离的 H5N2 基因极为相似。同年 10 月，H5N2 毒株的致死率突然上升至 80%。将 4 月及 10 月的两毒株比较，发现并非发生抗原性转移，表明毒力的变异是因点突变所致，亦即发生抗原性漂移。表现为 H 基因的 7 个核苷酸二者有差异，从而导致 H 蛋白的 4 个氨基酸改变。改变之一是移动了糖基化的位点，有利 H 的裂解及活化，致使毒力增强。美国因此淘汰 1700 万只鸡，损失 6000 万美元。

1997 年 8 月，在香港发现的 H5N1 不经猪作为中介直接传染人，并致 4 人死亡，扑杀 1200 万只鸡，也造成了巨大经济损失，对此次流行株进行的基因分析表明，人的毒株保留了禽毒株的全部基因。首次证明这种对禽高致病力毒株能感染人，而且还发现了人与人之间可直接感染。近年来又发现 H9N2 也可由禽直接传染人。禽流感病毒的这些进化特点令人关注。

第三节 微生物菌种的保藏

菌种是一个国家拥有的重要生物资源，研究和选择良好的菌种保藏（preservation）具有重要的意义。优良的工业生产菌种，无疑是国家的重要财富。如前所述，有效的菌种保藏方法，是防止菌种退化极其必要的措施。为此，国际上许多发达国家，都设有相应的菌种保藏专门机构。如设在中国科学院微生物所的中国微生物菌种保藏委员会(CCCM)等。

菌种保藏是指在广泛收集实验室和生产菌种、菌株的基础上，将它们妥善保藏，使之达到不死、不衰、不污染以便于研究、交换和使用的目的。而狭义的菌种保藏的目的是防止菌种退化、保持菌种生活能力和优良的生产性能，尽量减少、推迟负变异，防止死亡，并确保不污染杂菌。

菌种保藏的具体方法很多，原理却大同小异。首先，要挑选典型菌种的优良纯种，最好采用它们的休眠体(如分生孢子、芽孢等)；其次，要创造一个适合其长期休眠的环境条件，诸如干燥、低温、缺氧、避光、缺乏营养以及添加保护剂或酸度调节剂等。

水分对生化反应和一切生命活动至关重要，因此干燥尤其是深度干燥，在菌种保藏中占首要地位。五氧化二磷、无水氯化钙和硅胶是良好的干燥剂，当然，高度真空则可以同时达到驱氧和深度干燥的双重目的。

低温是菌种保藏中的另一重要条件。微生物生长的温度低限约为-30℃，可是在水溶

液中能进行酶促反应的温度低限则为 -140°C 左右。

由于各种微生物遗传特性不同，适合采用的保藏方法也不一样。一种良好的有效保藏方法，首先应能保持原菌的优良性状不变，同时还需考虑方法的通用性和操作的简便性。下面介绍几种常用的菌种保藏方法。

一、斜面保藏方法

斜面保藏方法是一种简单常用的方法，即采用斜面菌种结合定期移接，直接在 4°C 下保藏的方法。对科研与教学工作中不要求长期保藏的菌种最是适用方便，特别对那些不宜用冷冻干燥保藏的菌种，斜面保藏是最好的方法。

影响菌种斜面保藏效果的因素有许多，主要是菌种保藏培养基和培养条件。保藏培养基的营养成分贫乏一些，氮源略多，而糖类少，以减少因培养基 pH 下降而对菌种性能的影响。经验表明，保藏斜面在传代过程中，营养贫乏和丰富的培养基交替使用，有利于保持菌种的优良特性。

斜面保藏除选择良好的培养基之外，还要注意保藏条件。经过移接、培养后的斜面，置于 4°C 冰箱保藏。每隔 13 个月移接一次，继续保藏。移接代数最好不超过 34 代。每次移接时，斜面数量可以多一些，以延长使用期。保藏斜面的试管棉塞可以改为橡胶塞，再用石蜡密封，置于 4°C 冰箱保存，不仅可以避免斜面培养基水分蒸发，还可以克服棉塞受潮而被污染。该法对细菌、霉菌、酵母保存 5~10 年后，存活率达 75% 以上。研究中发现，某些蕈菌如姬松茸的斜面菌丝体在 4°C 冰箱保藏易于死亡，一般于 20°C 才能保持其活性。

斜面保藏法也有其不足之处。首先，在保藏期间由于斜面含有营养和水分，菌种生长繁殖还没有完全停止，代谢活动尚可微弱进行，因此还存在自发突变的可能。而且根据菌种不同，一般每 13 个月就要转接一次，移植代数比其他保藏方法要多，这样就易发生变异和引起退化。斜面菌种在保藏期间培养基的水分易于蒸发而收缩、干涸，使其浓度增高，渗透压加大，因而将引起菌种退化甚至死亡。

用石蜡油保藏菌种是由法国的 Lumiere 于 1914 年创造的，也是工业微生物菌种保藏的常用方法。石蜡油保藏法其实是斜面保藏的一种方式，它比斜面保藏的好处是因为在斜面中加入石蜡油，保存期间可以防止培养基水分蒸发并隔绝氧气，克服了斜面保藏的缺点。该法加石蜡油后，置 4°C 低温保存，进一步降低代谢活动，推迟细胞退化，效果比一般斜面保藏好得多。通常菌种保存 2~3 年，甚至 5 年转代移接一次，几乎能够保持其原有活性。

自然界中不少微生物如产孢子的放线菌类、霉菌类和产芽孢的细菌类，因为产生的孢子或芽孢在干燥环境中抵抗力强，不易死亡，干燥能使这些微生物代谢活动水平降低但不会死亡，而处于休眠状态。因此，把菌种接种到一些适宜的载体上，人为创造一个干燥环境，就能达到菌种保藏的目的。可以作为干燥保藏载体材料的有细砂土、滤纸片、麦麸，硅胶等。把接种有菌种的孢子或芽孢的载体置于低温下保藏，或抽真空密封保藏，效果很好。

二、冷冻干燥法

冷冻干燥法通常是用保护剂制备菌悬液，然后将含菌样本快速降至冰冻状态，减压抽真空，使冰升华成水蒸气排出，从而使含菌样脱水干燥。并在真空状态立即密封瓶口隔绝空气，造成无氧的真空环境，然后置于低温下保存。冷冻干燥法是在干燥、缺氧、低温条件下保藏菌种，几乎无化学变化，微生物代谢活动基本停止而处于休眠状态。因此，不易

发生变异，保藏时间长，一般 5~10 年。除一些不产孢子的丝状真菌不宜采用冷冻干燥法保藏外，大多数微生物都可以采用，其中特别对那些不宜多移代保藏的抗生素生产菌种，如春雷霉素、麦迪霉素、头孢霉素、卡那霉素等的生产菌种，采用冷冻干燥保藏法保藏期长、生产性能稳定、保藏效果良好。另外，我国大多数生物制品菌种都是采用该法保藏。

在冰冻和真空干燥过程中保护剂化合物中某些化学结构与细胞稳定地结合，取代了细胞表面束缚水的位置，可以避免冷冻干燥对细胞带来的损伤或死亡。

三、低温保种

指菌种以甘油、二甲基亚砷等作为保护剂，在液氮超低温(−196℃)下保藏的方法。从 20 世纪 70 年代以来，国外已经采用液氮保藏微生物菌种。因为一般微生物在 −130℃ 以下新陈代谢活动就完全停止了，因此比其他任何保藏方法都要优越，被公认为防止菌种退化的最有效方法。该法适用于各种微生物菌种的保藏，甚至连藻类、原生动物、霉形体等都用此法获得有效的保藏。

在低温保藏中，细胞体积较大者比较小者对低温敏感，而无细胞壁者则比有细胞壁者敏感。其原因是低温会使细胞内的水分形成冰晶，从而引起细胞结构尤其是细胞膜的损伤。如果放到 −70℃ 低温下进行冷冻时，适当采取速冻的方法，可使产生的冰晶小而减少对细胞的损伤。当从低温下移出并开始升温时，冰晶又会长大，故此时快速升温也可减少对细胞的损伤。

在实践中，发现用极低的温度进行保藏时效果更为理想，如液氮温度(−196℃)比干冰温度(−70℃)好，−70℃ 又比 −20℃ 好，而 −20℃ 比 4℃ 好。液氮超低温保藏菌种的原理，主要是菌种细胞从常温过渡到低温，并在降到低温之前，使细胞内的自由水通过细胞膜外渗出来，以免膜内因自由水凝结成冰晶而使细胞损伤。美国 ATCC 菌种保藏中心采用该法时，把菌悬液或带菌丝的琼脂块经控制制冷速度，以每分钟下降 1℃ 的速度从 0℃ 直降到 −35℃，然后保藏在 −150~−196℃ 液氮冷箱中。如果降温速度过快，由于细胞内自由水来不及渗出胞外，形成冰晶就会损伤细胞。据研究认为降温的速度控制在每分钟 1~10℃，细胞死亡率低。随着速度加快，死亡率则相应提高。

液氮低温保藏的保护剂，一般是选择甘油、二甲基亚砷、糊精、血清蛋白、聚乙烯氮戊环、吐温 80 等。但最常用的是甘油，因为它可以渗透到细胞内，并且进入和游离出细胞的速度比较慢，通过强烈的脱水作用而保护细胞；二甲基亚砷的作用和甘油相似，糊精、血清蛋白、聚乙烯氮戊环等则是通过和细胞表面结合而避免细胞膜被冰晶损伤。

保藏菌种过程中应注意如下事项：

(1)保藏的菌种要用良好的培养基，采用新鲜培养的菌种，健壮的菌体、丰满的孢子，适宜的菌龄，细胞要求在稳定期，孢子要充分成熟，以便能抵抗保藏过程中的干燥、缺氧、冷冻的环境，以减少死亡。

(2)在各种保藏方法的操作过程中，都要进行严格的无菌操作。而且保藏过程也要防止杂菌污染，要定期做无菌检查。

(3)要注意保藏菌种的制备质量。如果采用冷冻干燥法时，成品冷冻干燥机虽然一次能冻干数百个安瓿瓶，但不能一次就制备这么多数量，要分期分批进行。

(4)为了防止菌种退化，在保藏期间，要为菌种创造最适宜的保藏条件，如选择适合的培养基，严格控制保藏的温度、湿度和氧气等。

(5)严格控制传代次数，这一点对斜面低温保藏的菌种尤为重要。因为该法保存时间短，

移代是不可避免的，但要尽量做到科学、合理。一次移接的斜面数量多一些，一方面减少自发突变，另一方面，最大限度地防止退化细胞扩大繁殖，以维持菌种的优良特性。

(6)保藏菌种恢复培养时，要移接到保藏以前所用的同一培养基上进行培养，以维持优良性能的稳定。

思考题

- 1.何谓细菌遗传?细菌变异?
- 2.概述细菌遗传变异的物质基础。
- 3.质粒有哪些主要特点及类型?
- 4.什么是转座因子?转座因子有何用途?
- 5.试述毒力岛的概念及遗传学意义。
- 6.试述细菌变异的类型及方法。
- 7.在自然条件下细菌的基因转移重组主要方式有哪几种?
- 8.什么叫转化?试述转化的一般过程。
- 9.何谓转导?转导有哪些类型?
- 10.研究细菌遗传变异在理论上有何重要意义及应用价值?
- 11.病毒的基因组变异有哪些类型?发生的机率及后果如何?
- 12.举例说明病毒表型变异的特点及应用价值。
- 13.什么是缺损型干扰突变?有何意义
- 14.试述“准种”的概念。
15. 菌种保藏的主要原理及其方法有哪些?

第九章 微生物的控制

微生物对人类和自然界能产生巨大作用，其作用存在有利和有害两方面。人类认识和研究微生物的主要目的在于采用各种技术与方法挖掘、利用和促进微生物的有利作用，控制、改造和消除微生物的有害作用，对微生物的生命活动、新陈代谢进行人为控制，为人类造福。控制微生物的方法有物理学、化学和生物学的方法，它们的作用程度、机制、应用范围和目的意义等各有特点，人们可根据需要灵活运用各种方法。如培养酵母菌时需产生酒精，可减少氧气，如需获得大量菌体，可增加氧气；如果要消灭环境中的病原微生物，可采用有效的消毒剂对空气、土地和水体进行消毒；如果要防止食品腐败，可对食品采用干燥、低温或高温灭菌等方法处理；如果要消灭人和动物体内病原菌，可口服或注射病原菌敏感的抗生素；如果要利用病原菌做成灭活疫苗，可加热或加灭活剂使之死亡；如需做成弱毒疫苗，可将其在不适宜条件下反复培养使毒力减弱；如做成安全性强的活疫苗，可采用基因工程技术将病原菌的基因进行改造，构建基因工程疫苗。总之，控制微生物是人类不断追求的目标，涉及众多应用领域，意义重大，需要运用多学科理论和技术，不断总结和完善。

第一节 微生物控制的相关名词术语

(一) 抑制或杀死微生物的名词术语

1. 消毒(disinfection) 是指用化学或物理方法杀灭物体上病原微生物的方法。而对非病原微生物并不严格要求全部杀死。它是防止病原传播的重要措施。用于消毒的药物叫消毒剂。消毒方法在水产上广泛应用，如在给动物注射时，应对注射部皮肤先行消毒；鱼种下池时进行鱼体消毒，养殖过程中还有鱼池消毒、用具消毒等。

2. 灭菌(sterilization) 是指杀死物体上所有病原性或非病原性微生物包括细菌的芽孢和霉菌的孢子的方法。灭菌后的物体内外均无活的微生物存在。它比消毒要求更高，常采用高温灭菌方法进行。微生物实验室所用的培养基和培养皿、试管、接种环等用具均需灭菌才能使用。用甲醛制备的死菌苗，叫灭活菌苗，其灭活过程实际上是一种化学灭菌方法。

3. 无菌(asepsis) 不含活菌的意思。

4. 抗菌作用(antibacterial action) 是抑制和杀死微生物作用的总称。

5. 抗菌谱(antibiogram) 是指抗菌药物的抗菌范围。如果某些抗菌药物只对某一类微生物有效，对其他微生物无效，叫窄谱抗菌药物，如异烟肼；如果对多种微生物有抗菌作用，这样的药物叫广谱抗菌药物，如四环素。

6. 抗菌活性(antibacterial activity) 是指抗菌药物抑制或杀灭微生物的能力。一般可用体内(化学实验治疗)或体外两种方法来测定。能够抑制培养基内细菌生长的最低药物浓度称为最低抑菌浓度(MIC)；能够杀灭培养基内细菌的最低药物浓度称为最低杀菌浓度(MBC)。这两个数据对判定药物的抗菌效果和选择治疗药物都有重要意义。

7. 防腐(antisepsis) 是指利用某种理化因素防止或抑制微生物生长繁殖的方法。防腐也称抑菌。用于防腐的药物叫防腐剂。防腐除了采用防腐剂外，还有低温、缺氧、干燥、高渗、高酸度等措施。在水产养殖中，在饲料、水产品及其加工产品中，为防止任何微生物进入人和动物机体以及其他物品而采取方法均叫无菌法，其操作方法叫无菌操作或无菌技术。病原分离、手术过程、微生物接种传代均需无菌操作。保存均需采用防腐措施。

8. 化疗(chemotherapy) 是指利用对病原体有毒性而对动物无毒性或毒性很低的化学药物或抗生素等药物,对生物体的深部感染进行治疗的一种方法。用于化疗的药物称化学治疗剂。化疗可以有效抑制或消除宿主体的病原体,对宿主没有或基本没有损害。

9. 化疗指数(chemotherapeutic index) 是衡量化疗药物的价值指标,一般为动物半数致死量(LD₅₀)和治疗感染动物的半数有效剂量(ED₅₀)之比,或 5%致死量(LD₅)与 95%有效量(ED₉₅)的比。这一比例关系称为化疗指数。化疗指数愈大,表明药物的毒性愈小,疗效愈大。化疗指数高者并不是绝对安全,如几乎无毒性的青霉素仍有引起过敏休克的可能。

(二)促进微生物生长的名词术语

1. 富集培养(enriched culture) 又称增殖培养,是指在培养基中加入欲分离菌所需要的某些营养物和抑制其他微生物生长的抗菌物质,创造利于分离菌而不利其他菌生长繁殖的条件,从而使分离菌快速增殖的培养方法。如果用于这种方法的培养基仅加入特别营养物而不加抗菌物时叫加富培养基,也主要用于样品中细菌少,或营养要求比较苛刻的细菌的分离培养。相反,培养基中不另加特别营养物只加抗菌物时为选择性培养基。

2. 连续培养(continuous culture) 又称开放培养,是指借用连续培养器(恒浊器或恒化器),在微生物生长繁殖处于指数期后期时,一方面以一定速度连续流进新培养基,并搅拌均匀,同时以溢流方式使培养物不断流出,使培养菌长期保持在较好的环境条件下维持指数期生长状态的培养方法。

3. 复壮(rejuvenation) 是指采用适合原种生长的良好培养条件使发生衰退的菌种恢复原来性状的一种培养方法。如将毒力下降的病原菌接种敏感的动植物,再从病体中分离出的原接种菌,可以使其毒力增强,如此反复进行多次,能恢复其原有致病性。

第二节 控制微生物的物理方法

微生物的生长繁殖受很多物理因素的影响,根据各种因素影响的原理和作用程度,可运用一些有效方法对微生物进行有目的的调控。

一、温度

(一)温度对微生物的影响

温度是微生物生存与繁殖的一个重要条件,不同微生物对温度的要求不同,据此可将微生物分为低温、中温和高温 3 大温度类型。低温型微生物(psychrophiles)也称嗜冷微生物,有专性和兼性之分,前者只能在低温下生长,环境温度不能超过 20℃,一般分布在终年冰冻的两极地区。后者分布较广,主要存在于海洋、河流;湖泊及冷藏食品中,包括细菌、真菌等的一些种属,冷藏食品的变质常常是由它们引起的。低温型微生物之所以能在低温条件下生长,主要是它们的酶在低温下活性高,另外其细胞膜中不饱和脂肪酸含量高,使膜在低温下保持半流动状态和较高的生理活性。中温型微生物(mesophiles)适于在 25~40℃ 生长,自然界中多数微生物属于这种类型,它们广泛分布于土壤、水、空气和动植物体及其生活的各种环境。人和动物的病原微生物也属该类型,不过人和恒温动物的病原微生物为体温型,最适生长温度和人工培养温度为 37℃。水产动物等变温动物的病原微生物为室温型,最适生长温度为 18~28℃,最适人工培养温度为 28℃。高温型微生物(thermophiles)又分为嗜热和极端嗜热两种类型,前者存在于堆肥和沼气发酵池等环境中,后者存在于温泉、大洋底火山喷口及高强度太阳辐射的土壤和岩石表面等处。嗜热微生物生物大分子蛋白质、核酸、类脂的热稳定结构、热稳定因子、质粒携带与热抗性相关的遗传信息是它们

能抗热的主要原因。嗜热微生物在高温发酵、污水处理中有很好的应用前景。上述各型微生物都有其最低、最高和最适生长温度。最低生长温度是指微生物生长的温度下限，微生物在此温度下生长速度非常缓慢。最高生长温度是微生物生长的温度上限，在此温度下，微生物也能缓慢生长。在超出上、下限温度下，微生物即停止生长或死亡。最适生长温度是微生物生长的最适合温度，在这个温度下，微生物迅速生长，但该温度不一定是微生物代谢的最适温度。例如，青霉素产生菌产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)，在 30℃ 时生长最快，而产生青霉素的最适温度则在 20~25℃。因此，生产青霉素时应采用各阶段变温培养的方法以提高产量。微生物的生长温度范围见表 9-1。

表 9-1 微生物的生长温度类型

类型		生长温度范围(℃)			分布主要处所
		最低	最适	最高	
低温型	专性嗜冷	-12	5~15	15~20	两极地区
	兼性嗜冷	-50	10~20	25~30	海水及食品冷藏处
中温型	嗜室温	10~20	18~28	40~45	水生生物、植物及其环境
	嗜体温	10~20	37	40	恒温动物
高温型	嗜热	30	45~60	70	堆肥和沼气发酵地等
	极端嗜热	30	70~90	100 以上	温泉和海洋底火山口

各型微生物都有其适应的温度范围，在此温度范围以外，过低或过高的温度都会对微生物产生影响。当环境温度低于微生物生长的下限时，其酶活性降低，新陈代谢缓慢，甚至生命活动停止，呈休眠状态，但仍维持生命。当温度回升到适宜范围，微生物又处于良好的营养环境下，可以恢复生长繁殖。因而低温有抑菌作用，被广泛用于保存食品、菌种和毒种。在-15~-20℃ 以下，食品能保存一定时间，风味也基本不会改变。许多菌种在 4~10℃ 冰箱内保存可达数月，有的在-50~-70℃ 能生存更长时间；若采用冷冻真空干燥法保存，微生物的活力可维持数年之久，其毒力与抗原性等基本不变。但冷冻也能造成部分微生物死亡，这是因为低温使环境中水分形成冰晶，细胞内水分外溢，引起电解质浓缩和蛋白质变性。另外，菌体内的冰晶可破坏原生质的胶体状态和机械地损伤细胞膜，造成菌内物质外漏，致使微生物死亡。冰冻和融化交替作用，对微生物更具有破坏力，应用此种处理方法，可以制备菌体裂解液，供研究菌体的化学组成、代谢和变异等。但迅速冷冻，原生质内水分形成一片均一的玻璃结晶，对微生物不造成损害。此法配合干燥法形成的冷冻真空干燥法，由于水分在高度真空下升华干燥，加之在细胞悬液中预先加有血清、脱脂牛乳或甘油等保护剂，对微生物更无损害。一般来说，低温和冰冻对微生物的影响程度取决于微生物本身的特性。例如，球菌比革兰氏阴性杆菌的抗冰冻能力强；红酵母的一个种在-34℃ 下仍能生长；荧光假单胞菌在-1~-7℃ 低温中保存 15d，菌体的死亡率达 98%；脑膜炎双球菌和流感嗜血杆菌在低温(不是超低温)保存比在室温中死亡更快。此外，冰冻对微生物的影响还与其所处条件有关，如基质的成分、浓度、pH 等。例如，微生物所处基质的酸度高，水分多，冰冻时会加速死亡，基质中有糖、盐、蛋白质、脂肪和胶体等物质存在时，对微生物都有一定的保护作用。

当环境温度超过微生物生长的最高温度时可引起其酶变性失活，代谢停滞，DNA 断裂，核糖体解体和蛋白质变性或凝固，导致微生物死亡。通常我们把能在 10min 内杀死某

种微生物的高温界限称为致死温度或热毙点(thermal death point)。而在某一温度下杀死细胞所需的最短时间称为致死时间或热毙时(thermal death time)。如大多数细菌、病毒、酵母菌和丝状真菌营养体的热毙点为 50~65℃, 放线菌和真菌孢子的热毙点为 75~80℃, 细菌芽孢的抗热力极强, 能耐 100℃ 以上数分钟。高温对微生物的影响依其种类、菌龄及发育阶段、所处环境以及作用时间而异。一般来说, 嗜热菌的抗热力大于嗜温菌和嗜冷菌, 芽孢菌大于非芽孢菌, 球菌大于非芽孢杆菌, 革兰氏阳性菌大于革兰氏阴性杆菌, 霉菌大于酵母菌, 放线菌、霉菌和酵母菌的孢子大于其菌丝体, 细菌的芽孢和霉菌的菌核抗热力特别大。同一菌种因菌龄和发育阶段不同, 耐热性也有差别。同样条件下, 老龄菌比幼龄菌和对数生长期细菌的抗热力强。菌数多比菌数少时抗热力强, 这是因为菌体能分泌一些有保护作用的蛋白质, 菌数多时分泌的保护性物质也多。此外, 微生物的抗热力也受基质的影响, 如水是良好的介质, 可促进蛋白质凝固, 微生物在干热环境中比湿热环境中的抗热力大。在加有糖类和某些盐类的溶液中, 微生物细胞因脱水则对热的抵抗力增强, 但钙盐、镁盐可使水活性增大, 从而使抗热力下降。基质中含有二氧化硫、亚硝酸、石炭酸等抗菌物质, 可使微生物的抗热力降低。脂肪、蛋白质等有保护作用, 可使其抗热力增加。中性条件下, 微生物的抗热性大于碱性和酸性时的抗热性。温度越高, 微生物的致死时间越短。

(二) 低温控制微生物的方法

低温常用于保存水产品、肉类、蛋、奶等食品。菌(毒)种、疫苗、免疫血清及生物制品等也采用低温方法保存。水产动物发病需进行病料送检时, 应将病料置低温条件下(常用冰瓶或保温盒内加冰块)运送。在冬季, 水产动物的很多疾病不发生, 这主要是病原生物被低温抑制的结果。

(三) 常用的高温消毒灭菌法

1. 干热灭菌

(1) 焚烧灭菌法: 本法是将待灭菌物品直接用火焰烧灼进行灭菌的方法。该方法灭菌彻底而迅速, 但应用范围有限, 常用于接种环、试管口、三角瓶口、镊子等耐烧物品以及污染纸张、实验动物尸体等废弃物的灭菌。涂布平板用的玻棒也可在蘸有乙醇后灼烧灭菌。

(2) 热空气灭菌法, 是将物品放在干燥箱中利用热空气进行灭菌的方法。在干热情况下, 一般微生物在 100℃ 经 1.5h 即被杀死, 芽孢和孢子则需 140℃ 3h 才能被杀死。因此, 灭菌时通常是将物品洗净、晾干后用报纸或锡箔纸包装好或放入铝盒内, 再放入干燥箱内升温至 160~170℃ 恒温 12h 即可。不要超过 180℃, 否则棉花、纸张会烧焦甚至燃烧。灭菌前玻璃器皿未干或灭菌后未降温至 60℃ 以下就打开箱门, 均可导致玻璃器皿炸裂。此法适应于玻璃器皿、注射器、针头、滑石粉、凡士林、液体石蜡等耐热物品的灭菌, 培养基、橡胶制品、塑料制品不能用该法灭菌。本法的优点是可保持物品干燥。

2. 湿热灭菌 湿热灭菌是利用热蒸汽或直接在水中加热对物体进行消毒或灭菌。在同一温度下, 湿热灭菌的效果比干热的好, 其原因是湿热条件下蛋白质更易变性和凝固; 热蒸汽比热空气穿透力强, 能迅速提高灭菌物品内部的温度; 蒸汽有潜热存在, 当每克水在 100℃ 时, 由气态变为液态可放出 2.25kJ 热量, 因而潜热能提高灭菌物体的温度。湿热消毒灭菌的主要方法有以下几种:

(1) 煮沸法: 在 100℃ 下煮沸 5min, 可杀死细菌的繁殖体, 但不能杀死其芽孢, 芽孢菌需煮沸 56h 才死亡。在水中加入 1%~2% 碳酸钠, 可提高沸点达 105℃, 又可使溶液 pH

偏碱性，增强杀菌效力和防止金属器皿生锈。本法简单易行，适用于饮水、动物实验时所用注射器和解剖用具的消毒。人用注射器和手术器械均采用高压蒸汽灭菌或干热灭菌。

(2)巴氏消毒法：是巴斯德提出的低温消毒牛奶、酒类和酱油等不耐热物质的方法。因为这些物质在高温下容易被破坏，而采用这种方法既能杀死病原菌，又能保持其营养风味不变。其方法有两种：一种是加热至 63℃保持 30min，因为结核杆菌的致死温度为 62℃ 15min；另一种称为高温快速法，只要将牛乳在 72℃下保持 15s 即可。目前对大量牛乳、果汁、豆乳、茶、酒及矿泉水等饮料的消毒，常采用一定的装置升温到 135~150℃维持 28s，就可杀死微生物，产品无需冷藏且可保持风味。这种方法叫超高温杀菌，自 20 世纪 80 年代以来在国内外广泛使用。

(3)常压蒸汽灭菌法，此法是用蒸笼或流通蒸汽灭菌器(阿诺氏流通蒸汽灭菌器)进行灭菌。一般是在 100℃加热 30min。这种方法不破坏营养结构，但只能杀死繁殖体，不能杀死芽孢和孢子，较少应用。如果要对含硫培养基或含明胶、牛乳、糖类培养基灭菌，可采用间歇灭菌法，该法是将培养基放入灭菌器内，加热 100℃维持 30min，每天 1 次，连续 3d，每次加热后将物品置室温或 20~30℃下保温过夜，使未被杀死的芽孢或孢子萌发成繁殖体，经 3 次如此处理后，可达灭菌目的。如果用土法生产微生物制品或制备食用菌种时，可将物品置较大的蒸锅中，从蒸汽大量产生开始，加大火力保持充足蒸汽，持续加热 36h，也可杀死全部繁殖体和绝大部分芽孢，达到灭菌目的。

(4)高压蒸汽灭菌法：本法是利用密闭的高压蒸汽灭菌锅进行增压升温灭菌的方法。水在常压下的沸点不超过 100℃，但高压灭菌锅内连续加热，蒸汽不能外溢，锅内压力逐渐增大，温度也随之升高，可以迅速杀死所有繁殖体和芽孢，因而是灭菌效果最好、实验室和生产中最常用的一种灭菌方法。本法适用于耐高温、耐潮湿的物品的灭菌，如一般培养基、生理盐水、注射液、橡胶手套、工作服、剖检器械和实验动物尸体等均用该方法灭菌。在加热过程中，当水沸腾后，应打开放气阀将冷空气彻底驱尽再关阀，然后继续升温至规定标准，否则由于空气的存在会影响温度升高，因为空气的膨胀压大于水蒸气的膨胀压，压力表表示的是两种压力之和，不是水蒸气的实际压力，此时的温度也低于排除空气时的实际温度。一般培养基等物品灭菌用 0.1MPa(相当于 151b / in² 或 1.05kg / cm² 或 121.3℃) 经 15~30min 可达到彻底灭菌的目的；但含糖培养基因易被高温破坏，可用 0.06MPa(81b / in² 0.59kg / cm² 或 112.6℃)灭菌 15min。灭菌锅的压力、温度与空气排除量的关系见表 9-2。

表 9-2 灭菌锅空气排出量与压力和温度的关系

压力		全部空气 排出时的 温度(℃)	2/3 空气排 出时的温 度(℃)	1/2 空气排 出时的温 度(℃)	1/3 空气排 出时的温 度(℃)	不排空气 的温度(℃)
MPa	lb / in ²					
0.03	(5)	108.8	100	94	90	72
0.07	(10)	155.6	109	105	100	90
0.10	(15)	121.3	115	112	109	100
0.14	(20)	126.2	121	118	115	109
0.17	(25)	130.0	126	124	121	115
0.21	(30)	134.6	130	128	126	121

二、干燥

(一)干燥对微生物的影响

水分是微生物生命活动中的基本物质之一，具有溶剂和运输介质的作用，参与机体内水解、缩合、氧化与还原等反应在内的整个化学反应，并在维持蛋白质等大分子物质的稳定的天然状态中起着重要作用。在缺水环境中，会导致细胞脱水，代谢停止，进而引起细胞内蛋白质变性和盐类浓度增高而逐渐死亡。如果干燥的细胞未死亡，在不受热和其他外界因素干扰时，干燥细胞则处于休眠状态，当遇到适宜的环境条件便会复活。各种微生物对干燥的抵抗力是不一样的，淋球菌对干燥很敏感，葡萄球菌、链球菌、结核分支杆菌和酵母菌有相当强的耐干燥力。细菌的芽孢和霉菌孢子的耐力更大，腐败梭菌和破伤风梭菌的芽孢在干燥的环境中可存活几年或几十年。同一种类微生物对干燥的抵抗力因所处环境不同而有差异，在含蛋白质等营养物质的基质上，耐干燥力强，在真空或惰性气体中比有氧时更抗干燥，菌数多、干燥时温度低、干燥速度快，微生物对干燥的抵抗力更强，反之则抵抗力差。

(二)干燥控制微生物的实际应用

1. 物品的干燥保存 将饲料、水产品以及肉类食品等晒干、风干、烘干或以其他方法脱水，再密封防潮或置低温干燥环境保存，可避免因微生物引起的霉变和腐败变质。

2. 菌种的干燥保存 产芽孢的细菌、产孢子的放线菌和霉菌常用干燥的沙土管保存。菌(毒)种常用冷冻真空干燥法保存。

三、辐射

辐射是能量以电磁波的方式进行空间传播或传递的一种物理现象。电磁波携带的能量与波长有关，波长愈短，能量愈高。辐射有两种，一种为非电离辐射，其光波长、能量弱，不引起物体的原子构造变化，如可见光、日光、紫外线、微波。另一种为电离辐射，其光波短、能量强，物体吸收后使原子核电离，如 α 射线、 β 射线、 γ 射线、X射线、中子、质子等。不同的辐射对微生物的影响不同，但都必须被微生物吸收才能产生影响。

(一)辐射对微生物的影响

1. 可见光 可见光的波长为400~800nm，它对微生物的影响是多方面的。首先可见光是光能自养和光能异养型微生物的唯一或主要能源，有些微生物虽不是光合生物，如闪光须霉(*Phycomyces nitens*)也表现一定的趋旋光性，其向光部位比背光部位生长更快、更好。蘑菇和灵芝等一些真菌在子实体和色素形成时也需要一定的散射光刺激。强烈的可见光对微生物有伤害作用，这是由于光氧化作用所致。当光线被细胞内的色素吸收后，在有氧时引起一些酶或其他敏感成分失去活性，例如细胞色素能由可见光诱发光氧化作用。有些微生物则具有特殊的成分，如类胡萝卜素一类的保护色素以防止光氧化作用，它们分布在细胞质膜内，可以吸收光，以阻止光达到细胞光敏感区域。所以，强烈可见光只有在有氧时对不含色素的细菌起伤害作用。

2. 日光和紫外线 强烈日光有杀菌作用，其中起杀菌作用的主要是紫外线。紫外线的波长范围是136~400nm，波长200~300nm的紫外线对微生物有致死效应。实验室用的紫外线杀菌灯的波长为253.7nm，它是将水银置于石英玻璃灯管中，通电后水银化为气体，灯管放出紫外线。紫外线最强杀菌作用的波长为265~266nm，这是核酸的最大吸收波长。日光中极端致死性短波长的紫外线不能透过地球大气层，只有飘到极高处的微生物或被火箭带到太空去的微生物才会很快被这种紫外线杀死。通过大气层到达地球表面的紫外线波

长为 287~390nm，因此散射日光的杀菌力较弱。不同种类的微生物对紫外线的抵抗力不同。一般说来，革兰氏阴性菌比革兰氏阳性菌敏感，病毒和霉菌的抵抗力较大，芽孢比营养细胞的抵抗力高几倍。酵母菌在对数期的抵抗力最强，在长期缺氮的情况下，抵抗力最弱，此时若供给酵母浸出液，可增强其对紫外线的抵抗力。日光和紫外线的杀菌作用受很多因素的影响，如将美蓝、伊红、汞溴红、沙黄等染料加入培养基中，能增强可见光的杀菌作用，这一现象称为光感作用。光感作用对某些细菌、病毒和毒素有灭活作用，可使其毒性消失但抗原性不变。实验证明革兰氏阳性菌光感作用比革兰氏阴性菌敏感。美蓝、伊红、汞溴红仅作用于革兰氏阳性菌，沙黄作用于革兰氏阴性菌。紫外线穿透力差，尘埃、有机物、玻璃等物质都可降低或阻挡对微生物的杀伤力。

紫外线对细胞的致死作用是由于细胞中的核酸、嘌呤、嘧啶及蛋白质对紫外线有很强的吸收能力，DNA 和 RNA 的吸收峰为 260nm，蛋白质的吸收峰为 280nm。紫外线能引起 DNA 链上两个相邻近的胸腺嘧啶分子产生二聚体，从而干扰了 DNA 的复制，轻则发生突变，重则导致死亡。此外，紫外线还可使空气中的分子氧变为臭氧(O₃)，臭氧易分解，放出氧化能力强的新生态氧也有杀菌作用。经紫外线照射损伤的微生物细胞，在可见光照射一定时间后，其中一部分细胞又可恢复正常生长，这一现象称为光复活现象。光复活作用最有效的可见光的波长为 510nm。复活的原因是由于光使 DNA 中产生的二聚体恢复成正常状态。DNA 的恢复还可在黑暗的条件下进行暗复活。因此，在紫外线杀菌剂量不够时，微生物没有被灭活。只有在某一剂量的紫外线对 DNA 的损伤力大大超过恢复酶对损伤 DNA 的恢复力时，才能真正导致微生物死亡。紫外线的杀菌力取决于其应用剂量，剂量大，杀菌力强。照射剂量是照射强度与照射时间的乘积。如果紫外线的功率和照射距离不变，则照射时间就表示相对剂量。

3. 电离辐射 α 射线、 β 射线、 γ 射线和 X 射线均能使被照射的物质产生电离作用，它们的波长短，都是高能电磁波。射线波长范围为 0.1~0.01nm，生物学上所用的 X 射线由 X 光机产生，主要用于疾病诊断。其他几种射线由钴、镭、氢等放射性元素产生，其辐射源为 ⁶⁰Co- γ 射线源或粒子加速器。电离辐射对微生物生命活动的影响表现为：低剂量(0.93×4.65Gy)照射有促进微生物生长的作用，或引起微生物发生变异；高剂量(9.3×10²Gy 以上)对微生物有致死作用。Gy 是指射线吸收剂量，简称戈瑞，1Gy=1J / kg。其作用目前主要是诱变育种和不耐热食品、药品、塑料制品的消毒灭菌。电离辐射对微生物的致死作用主要在于能使被照射物中水分子发生电离产生游离基，这些游离基能与细胞中的敏感蛋白分子作用使其失活，导致细胞损伤或死亡。培养基中氧浓度高，微生物易被破坏，如用惰性气体代替氧气，或在培养基中加入含巯基化合物，可减轻辐射对细胞的损伤作用。蛋白质、醇、葡萄糖也有一定的保护作用。

4. 微波 是一种波长短而频率较高的电磁波。一般来说，从几百兆赫兹至几十万兆赫兹的无线电波都称为微波。微波源一般是由磁控管和调速管组成的特殊电子管。磁控管是一个自激振荡器，能产生微波能，但输出功率小，如需较大功率时，就要用调速管。

微波灭菌主要是利用微波的加热作用完成的。当把灭菌的物品放在微波照射的交变电场中时，物品内部的分子随着电场的变化而相应地旋转振动起来，电场变化快，分子振动也跟着快。但是，由于分子间有相互作用力即摩擦力产生，因此产生热量，整个物品就热起来，起到了摩擦加热灭菌的作用。微波加热与介质性质密切相关，微波通过某种介质时，介质能吸收微波能量，其能量就能在该介质中转化为热能。很少吸收微波的介质称为良介

质，这些物质用微波加热时，其热效应甚微，如石英、聚四氟乙烯等。能明显地吸收微波而产热的介质称为微波的吸收介质，如水是微波的强吸收介质。因此，灭菌时只有在有水存在的条件下，微生物才失去活性，干燥条件下，即使延长作用时间，微生物的活性也不受微波影响。微波加热的特点是：所需时间短，脱水时间快，加热均匀。

(二) 辐射控制微生物的实际应用

1. 微生物的培养 培养光合微生物时应置于有光环境下进行，以供给能量。培养非光能微生物时应置于暗处。

2. 物品及环境的消毒灭菌 利用日光对物品进行消毒既方便又不花费成本，在日常生活和实际工作中经常应用，如晒衣、晒被、干池晒塘、晒用具等。利用紫外灯对无菌室、无菌箱、手术室等进行空气消毒和物体表面消毒，此外也可用于胶质离心管，塑料、玻璃纸及不耐热物体和不便于高温灭菌物体的灭菌，由于穿透力差，很少用于培养基的灭菌。 γ 射线等可用于粮食、果蔬、胶管、一次性注射器等不耐热物品的消毒灭菌，食物经此处理后可延长保存期，因设备投资大，未广泛应用。微波可用于医药用品等物体的灭菌，还可用于某些物质的脱水。

3. 微生物的诱变 利用紫外线和辐射处理微生物细胞，可提高基因的随机突变频率，获得变异的优良菌株。用紫外线诱变前，先用紫外灯预热 20min，使光波稳定，然后将 35ml 细胞悬浮液置 6cm 培养皿中，置于诱变箱内的电磁搅拌器上，照射 35min 进行表面杀菌。打开培养皿盖，开启电磁搅拌器，边照射边搅拌。处理一定时间后，在红光灯下，吸取一定量菌液经稀释后，取 0.2ml 涂平板，或经暗箱培养一定时间后再涂平板。

四、超声波

人耳能听见的声波频率一般在 20 000Hz 以下，这种声波对微生物没有影响。频率为 20 000~200 000Hz 的声波人听不见，称为超声波，超过 200 000Hz 的声波叫限外声波。这两种声波都有强烈的生物学作用，可裂解细菌。8 900Hz 的声波在 40~60min 可使悬液中的活菌数减少 99%。超声波杀菌的主要机制是，超声波探头的高频率振动，引起探头周围水溶液的高频率振动，当探头和水溶液的振动不同步时能在溶液内产生空当(空穴)，空穴内处于真空状态，只要悬液内的细菌接近或进入空穴区，由于细胞内外压力差，可导致细菌裂解，超声波的这种作用的叫空穴作用。另外，超声波的作用，可使机械能变成热能，使细胞产生热变性，也是微生物死亡的一个原因。几乎所有微生物都能被超声波破坏，但灭菌效果与超声波的频率、处理时间及微生物的种类、大小、形状、数量等都有关系。一般来说，革兰氏阴性菌最敏感，杆菌比球菌敏感，体积大比体积小的敏感，病毒的抗性较强，细菌芽孢一般不受影响。用超声波处理微生物往往有残存者，因此这种方法在消毒灭菌方面无实用价值。

超声波主要用于裂解菌体和细胞，研究其细菌结构、化学组成、酶活性，也可应用超声波处理含病毒的组织悬液，提取病毒。

五、渗透压

纯水具有通过半透膜的渗透作用(osmosis)。当膜两边溶质浓度不同时，产生渗透压差，水分子从溶质浓度低的一边流向浓度高的一边。正常情况下，微生物细胞内溶质的浓度高于细胞外的浓度，水分能够进入细胞内，由于细胞壁的保护作用使得微生物细胞对渗透压的适应能力较一般细胞强，但所承受的压力不能超过一定的范围。当微生物接种在渗透压低的培养基里时，细胞吸水膨胀，在细胞壁的保护作用下一般不会影响正常生理作用。但

如果将细菌置于低渗溶液(0.01%NaCl)或蒸馏水中,大量水分进入会使细胞过度膨胀,胞浆压出,造成细菌死亡。如果培养基或溶液的渗透压过高,由于细胞脱水可造成微生物质壁分离、生长停止甚至死亡。大多数微生物能通过胞内积累某些能调整胞内渗透压的兼容溶质来适应培养基的渗透压的变化,这类兼容溶质被称为渗透压保护剂或渗透压调节剂或稳定剂。它们可以是某些阳离子如 K^+ , 氨基酸如谷氨酸、脯氨酸,氨基酸衍生物如甜菜碱(甘氨酸的衍生物),糖如海藻糖等。有些微生物有耐受高渗环境的能力,甚至适宜在这种条件下生活,称为嗜盐菌或嗜渗菌,如一些海洋微生物,培养它们时要加入 3.5%NaCl。很多酵母菌和霉菌也有较强的耐高渗能力。极端嗜盐菌能在 15%~30%盐浓度下生活。

应用渗透压调控微生物的方法主要用于保存肉类、水产品、蔬菜、水果等等,通常用 10%~15%食盐或 50%~70%的糖来腌渍食品,使微生物不能生长,防止食品腐败。由于盐的分子质量小,其保存效果好于糖。此外,也有人将细菌置于蒸馏水中,离心后取沉淀,如此几次反复处理,可使菌体和鞭毛膨胀,经此法获得的细菌更容易检查鞭毛。

六、过滤除菌

过滤除菌是利用细菌滤器机械地除去液体或空气中细菌的方法。该法是将液体或气体通过微孔滤板将其中的微生物阻挡在外来达到移走微生物的目的,被除菌的物质成分一般不会发生变化,因而可用于不耐热物质的除菌。由于滤板或滤膜的孔径过小,液体不能自行滤出,无论采用何种滤器都必须借助人工加压或抽滤装置(滤液瓶、抽滤瓶、厚壁胶管和真空泵)形成负压后液体才能流出。本法常用于不耐热物品如毒素、抗血清、病毒液、维生素、氨基酸、糖类、酶类、抗生素等液体的除菌。滤膜法还可适用于药品检样和水检样的细菌计数,杂质少的水体(如井水、自来水等)的细菌计数,可直接将过滤检样的滤膜无菌的一面贴于适宜的培养基表面上,经培养后在膜上形成菌落即可计数。污染水则需在过滤前先进行适当稀释,再取滤膜同上培养计数。空气的过滤除菌主要用于超净工作台、无菌室和手术室的除菌。一般是在工作台内或墙壁的一侧安装高效微粒滤菌器,它是由醋酸纤维制成,除去空气中直径 $0.3\mu m$ 微粒的效率达 97.7%。经此过滤的流动空气是新鲜和无菌的。超净工作台的气流可阻止外界微生物进入操作箱内,气流一般有垂直和水平两种,微生物学实验室以垂直式为宜。在移液管和其他管口塞入棉花,在试管口和三角瓶口加塞棉塞也是一种过滤除菌法,纵横交织的棉花纤维能截留空气中的灰尘和细菌,还能进行有限量的气体交换。在微生物学试验中常用的细菌滤器主要有以下几种:

1. 贝克菲(Berkefeld)滤器 该滤器用硅藻土加压制成。按滤孔大小分为 3 型:V 型可除去大部分细菌;N 型能除去所有细菌;W 型孔径最小,能阻止衣原体通过。该滤器因其带有静电荷,易造成某些成分丧失,现已很少应用。

2. 蔡氏(Seitz)滤器 滤板由石棉板制成,用于大量样品除菌。依滤孔大小分为 3 型:K 型滤孔最大,用于去除较大的颗粒和杂质;EK 型孔径较小,用于除菌;EK-S 型孔径更小,可阻止衣原体通过。一般是先用 K 型滤过澄清液体,后用 EK 型滤过除菌,以免堵塞滤板。所有滤板均需光面向下装在专用的金属筒中,包装灭菌后连接抽滤装置方可应用。用过的滤板不能重复利用。

3. 玻璃滤器(sintered glass filter) 该滤器是用均一的玻璃粉末烧结而成的多孔性滤板。国内产品有 G₁、G₂、G₃、G₄、G₅、G₆ 几型,孔径为 $0.15\sim 200\mu m$ 。通常用 G₁~G₄ 型作为初滤澄清之用,G₅ 型可部分除菌,G₆ 型作过滤除菌用。新购置玻璃滤器应先用清水洗净。待干后滤斗内装满硫酸-重铬酸钾清洗液,下接滤瓶,让其滴落至尽,随后再加入 1mol/L

的 NaOH 液，也任其自然滴落。此后用蒸馏水充分冲洗，再装满蒸馏水，用抽滤装置抽滤，随时补加蒸馏水，约 56 次。最后加三馏水或去离子水抽滤，测定滤液的 pH 与加入的蒸馏水 pH 相同时，即可晾干、包装、灭菌备用。用过的玻璃滤器应用含 1%~2% 硝酸钠相对密度为 1.84 的浓硫酸溶液抽洗数分钟，再用蒸馏水抽洗，然后用 1:1 氨水溶液抽洗，以中和其酸性，最后用蒸馏水彻底抽洗。当滤器粘有较多蛋白质时，应在清洗前先置于 pH 为 8.5 的胰蛋白酶溶液中浸泡，在 37℃ 下消化 24h，再行抽洗。

4. 膜滤器(membrane filter) 该滤器是用醋酸纤维酯和硝酸纤维酯的混合物制成的薄膜，又称微孔滤膜。上海新亚净化器械厂已生产孔径为 0.2μm、0.3μm、0.45μm、0.65μm、0.8μm、1.2μm 等多种型号滤膜，其滤膜直径有 25~180mm 多种规格。除菌过滤可用 0.2μm 的滤膜。应用时应将滤膜安装在相同大小的金属过滤器中，然后进行抽滤。少量液体的除菌过滤，可用滤膜过滤器，该滤器是由上下两个分别具有出口和入口连接装置的塑料盖盒组成，出口处可连接针头，入口处可连接针筒，使用时将滤膜装入两塑料盖盒之间，旋紧盖盒当溶液注入滤器时，此滤器将微生物阻留在微孔滤膜上面，从而达到除菌的目的。膜滤器的最大优点是滤膜本身不带电荷，液体滤过后，有效成分丧失少。对于不耐热和被辐射破坏的物质，过滤除菌就成了唯一可供选择的灭菌方法。

第三节 控制微生物的化学方法

本节介绍的调控微生物的化学方法主要是采用化学药物抑制或杀灭微生物的方法，这类化学药物包括化学药剂和化学治疗剂。化学药剂可分为杀菌剂、消毒剂、防腐剂。杀菌剂是指能杀死一切微生物及其孢子的药物，消毒剂是指能迅速杀死病原微生物的药物，防腐剂是指能抑制微生物生长繁殖的药物。它们之间没有本质的区别。通常十种化学物质在高浓度下是杀菌剂，在低浓度下是防腐剂，但都只限于某些用具和环境有害微生物的控制，故此有人统称之为表面消毒剂。化学治疗剂则是一类能选择性地杀死或抑制人和动物体内病原微生物并可经口服或注射给药的特殊化学药品，主要用于人和动物疾病的预防或治疗。

一、化学药剂

(一) 常用种类

抑制和杀死微生物的化学药剂很多，主要有以下种类：

1. 酚类 主要有石炭醌(苯酚)、来苏儿(煤酚皂)等。它们对细菌繁殖体有杀灭作用，后者比前者的作用大 4 倍。真菌孢子和大多数病毒对酚有抗性，故酚不能作为真菌和病毒的灭菌剂。酚类有特殊气味，对皮肤有刺激性，常用 3%~5% 的溶液作为地面、家具和器皿的消毒剂。0.5% 苯酚作为某些血清学试验的防腐剂。酚类消毒剂被卤化后能增强杀菌作用，如对氯苯酚等。苯酚常用作比较其他消毒剂药效的标准物质，即把被测消毒剂做一系列稀释，使其在一定的时间内杀死微生物(常用鼠伤寒沙门氏杆菌和金黄色葡萄球菌)，与在同样条件下达到同样效果的酚的稀释度比较。用被测消毒剂的稀释度除以酚的稀释度，所得出的值称为酚系数。如某一消毒剂在 150 倍的杀菌效果与酚稀释几倍时效果相同，其酚系数为 $150 / 90 = 1.6$ ，则此消毒剂的效力比酚的高 0.6 倍。由于各种消毒剂的性质和抗菌机理不同，故酚系数仅有一定的参考价值。

2. 醇类 醇类是脱水剂、脂溶剂和蛋白质变性剂，主要包括甲醇、乙醇、丙醇和丁醇等。甲醇杀菌力差，毒性大，不宜作为杀菌剂。乙醇是常用的消毒剂，用于皮肤和用具

表面消毒，其杀菌力比甲醇强，但对芽孢和包膜病毒的效果差。乙醇的杀菌力受浓度影响，75%的乙醇杀菌力最强，超过此浓度至无水乙醇的效果差，因为高浓度时可使菌体迅速脱水，表面蛋白凝固，形成了保护膜，阻止了乙醇分子进入菌体，影响杀菌作用。丙醇以上醇类的杀菌力均比乙醇强，但不溶于水，不能作为杀菌剂。

3. 醛类 主要是甲醛和戊二醛。其液体和气体均有强大的杀微生物作用。甲醛的腐蚀性和刺激性强，多用作房间的空气消毒和衣物、用具等物品的消毒，不能用作食物消毒。10%甲醛溶液可作为组织固定剂。0.3%~0.4%甲醛可杀菌、杀病毒，并可使细菌外毒素脱毒，但保持抗原性，是制备类毒素和疫苗的灭活剂。在水产养殖中常用低浓度甲醛防治细菌和真菌等引起的疾病，但美国等国已禁止使用。戊二醛毒性稍小，杀菌作用较强，但价格贵，主要用作电镜观察的组织材料的固定剂。

4. 酸类 酸类主要有乳酸、醋酸、硼酸、水杨酸、山梨酸、苯甲酸、柠檬酸、丙酸、富马酸等。它们都有一定的杀菌和杀真菌的作用，但作用较弱，乳酸和醋酸多用于室内熏蒸或喷雾，作空气消毒。硼酸无刺激性，3%~4%水溶液用于皮肤、黏膜伤口冲洗或口腔含漱。山梨酸和苯甲酸常用作加工食品和饮料的防腐剂。丙酸和富马酸类常用作饲料防霉剂。

5. 碱类 主要是生石灰和氢氧化钠。生石灰有一定的杀菌作用，常用于消毒地面，养鱼业中常用于清塘、消毒和调节水质。氢氧化钠对病毒、细菌及其芽孢都有很强的杀伤作用，但腐蚀性大，多用1%~4%溶液消毒用具和地面。

6. 表面活性剂 凡能降低溶液界面的表面张力的药物，都称为表面活性剂。按亲水基的电离作用分为阳离子型、阴离子型和非离子型(中性型)。阳离子型有较强的杀菌作用，毒性小，但不能杀死结核杆菌、细菌芽孢和亲脂性病毒，属低效消毒剂。这类消毒剂按其效力大小排序依次为洗必泰、消毒净、杜米芬和新洁尔灭(季铵盐)。主要用于皮肤、手和某些机械的消毒，不能和阴离子型表面活性剂(如肥皂、合成洗涤剂)混用，否则因中和而失效。阳离子型洗涤剂 ABS(丙烯四聚物型烷基苯磺酸盐)，不可生物降解，国内外已禁止生产。阴离子型杀菌作用比阳离子型的弱，但离解后也带电荷，对阳性菌也有杀菌作用。这类药物有烷基苯磺酸盐、十二烷基磺酸钠、磺基磷酸盐等，它们可被微生物降解。非离子型对细菌无毒性，有些反而利于细菌生长，吐温 80 对结核杆菌有刺激生长和使细菌分散的作用。

7. 卤化物 这类药物很多，按杀菌力高低排列的顺序是：氟、氯、溴、碘。其中以碘和氯最常用，它们对细菌、真菌、病毒及细菌芽孢均有较好的杀菌效果。漂白粉、氯气、次氯酸钙(漂粉精)、二氧化氯、氯胺 T、二氯异氰尿酸钠、三氯异氰尿酸都是常用于饮用水和养殖水体的含氯毒剂。它们都有强烈的氯气味，对纤维和金属的腐蚀性大，其作用机制均是产生次氯酸和原子氧具有杀菌作用。除漂白粉外，性质均较稳定。常用的含碘消毒剂有游离碘、碘得复、碘仿和聚维酮碘(碘络酮、聚乙烯吡咯烷酮碘、PVP-I)等，后者也常用于鱼卵和鱼体消毒。

8. 重金属盐类 包括汞、银、铜、锌、铋、铅、铝等的化合物。所有的重金属盐对微生物和动物机体都有毒性，似汞、银、铜的毒性最强。升汞 (HgCl_2)、硫柳汞、硫酸铜、氯化铜、螯合铜是常用的重金属盐类。升汞有很强的杀菌和杀芽孢作用，仅用于地面和桌面消毒。硫柳汞主要用于某些血清和生物制品防腐。硫酸铜等铜制剂在水产上应用较多，除用于杀藻杀虫外，也有一定的杀菌和杀霉菌作用。

9. 氧化剂 这类药物有高锰酸钾、过氧化氢、过氧乙酸和臭氧等。它们的抗微生物作用较强、为高效消毒剂，在鱼病防治上均有应用。臭氧(O₃)是很强的氧化剂，有可能取代氯气用作饮水消毒，目前需解决的问题是成本过高和有效期短的问题。

10. 染料 染料有碱性染料和阳性染料两大类。其中碱性染料如亚甲蓝(美蓝、次甲基蓝)、龙胆紫、结晶紫、吖啶黄、利凡诺的抗菌作用较阳性染料强，对革兰氏阳性菌的作用比对阴性菌的更好。亚甲蓝、吖啶黄、利凡诺(雷夫奴尔)在水产动物疾病防治中已有应用。

(二)化学药剂的主要作用机制

1. 损伤细胞膜 表面活性剂、酚类、醇类、卤化物这些物质作用于菌体后，能使胞浆膜结构紊乱并干扰其正常功能，导致胞内小分子物质溢出，影响细胞的传递活性和能量代谢。例如，醇类可损害胞浆膜上的脂类结构，破坏膜的完整性；表面活性剂可吸附在细胞表面，改变细胞膜的稳定性和通透性，使胞内物质溢出，引起微生物的生长停滞或死亡。

2. 引起菌体蛋白变性 酸、碱、醇类等有机溶剂可改变蛋白质的构型而扰乱多肽键的折叠方式，造成蛋白质变性。醛类能与蛋白质氨基酸中的多种基团共价结合而使之变性。表面活性剂，酚类也能使菌体蛋白变性。

3. 改变菌体蛋白与核酸功能 重金属盐类、氧化剂、染料、卤化物等都有这种功能。例如重金属盐类中的汞、银、砷等可溶性盐类能与细菌细胞内酶中的半胱氨酸的SH基结合形成硫醇盐而抑制酶活性；卤素和过氧化氢可将菌体酶的SH基氧化为S-S基，抑制了酶活性；碱性染料的阳离子基团能与细菌蛋白质氨基酸上的羧基或核酸上的磷酸基结合，呈现抗菌作用。

(三)影响化学药剂抗菌作用的主要因素

1. 化学药剂的特异性 不同药物的杀菌力是不同的，有的作用强，有的作用较弱。某些消毒剂只对某一部分微生物有抑制或杀灭作用，而对另一部微生物效力很差。例如甲醛、卤化物的效力强，能杀灭细菌、真菌、病毒和细菌的芽孢，而乙醇、酚类效力较弱，没有杀芽孢作用。季胺盐类消毒剂对革兰氏阴性菌的杀菌效力差，但革兰氏阳性菌则容易被其灭活。无机酸类杀菌力的大小，决定于在水中的离解度，氢离子浓度越高，杀菌力越大。因此，在选择和应用消毒剂时必须慎重考虑，择优选用。

2. 化学药剂的浓度 一般认为，化学药剂浓度愈大，其抗菌作用愈强。但也并非全部如此，75%酒精比无水酒精的抗菌强。不同的药物受浓度影响的程度不同，在配制药液时，要选择既有效又安全的杀菌或抑菌浓度。

3. 微生物的种类及其特性 细菌、病毒、真菌、细菌芽孢对化学药剂的敏感性是不同的，革兰氏阳性菌与阴性菌的敏感性也不同，即使是同一细菌在生长期和静止期的敏感性亦有差别。如一般消毒剂对革兰氏阳性菌效果好。酚类、季胺盐类等不能杀死芽孢。甲醛、戊二醛、环氧乙烷、过氧乙酸有良好的杀真菌作用。碘、氯、戊二醛、甲醛、环氧乙烷、过氧乙酸等有强大的杀真菌作用。此外，微生物数量多可降低杀菌作用。

4. 作用时间与其他环境条件 一般认为，化学药剂的浓度在一定范围内增大，在无不良因素影响时，随温度增高，杀菌所需时间会缩短。重金属盐类的杀菌效力因温度增高10℃而增加25倍。这是因为化学药剂的活性随温度升高而增强。环境中有机物增多，药物将会与有机物结合，其抗菌作用会大大下降，此时应提高药剂浓度和延长作用时间。含氯消毒剂、表面活性剂、过氧化物类受有机物影响大，环氧乙烷、戊二醛、碘制剂受有机物影响小。环境pH对化学药剂的抗菌作用也有影响，酚、次氯酸、苯甲酸、山梨酸和阴

离子表面活性剂在酸性条件下杀菌作用增强，阳离子表面活性剂、戊二醛在碱性条件下作用增强。在养殖水体中，由于病原微生物和水产动物处于同一水体中，水温、水质复杂多变，在进行消毒时，应充分考虑各种影响因素，做到既安全又有效。

二、化学治疗剂

(一)磺胺类

磺胺类药是人工合成的氨基磺胺衍生物。该类药物抗菌谱较广，对大多数革兰氏阳性菌和少数革兰氏阴性菌有抗菌作用，对放线菌、少数真菌、衣原体和原虫也有效，多数经口服易吸收，且性质稳定，便于储存和应用。自 1936 年问世以来，合成的磺胺类药物达万余种，曾有 20 余种广泛应用于疾病治疗。由于易产生抗药性，出现皮疹、溶血性贫血、粒细胞减少和肝肾损害等不良反应，现在实际应用的不多，大部分被抗生素和喹诺酮类药物取代。目前常用种类主要有抗菌力较强的短效类(药物半衰期小于 10h)和中效类药物(半衰期 10~24h)，长效类磺胺(半衰期大于 24h)抗菌力弱，血药浓度低，易出现过敏反应，多数被淘汰，只有少数还在使用。短效磺胺有磺胺异恶唑(SIZ)，中效磺胺有磺胺嘧啶(SD)、磺胺甲恶唑(新诺明, SMZ)，长效磺胺有磺胺甲氧嘧啶等。在水产养殖中，常用磺胺类药物拌料投喂治疗细菌性疾病，剂量一般为每千克体重 100~200mg。

磺胺类是抑菌药，其机理在于这类药物与敏感细菌生长所必需的代谢物对氨基苯甲酸(PABA)具有类似的化学结构，从而通过竞争性抑制作用抑制细菌的生长繁殖。PABA 是某些微生物合成叶酸的原料，由于磺胺类与 PABA 具有相似性，从而取代 PABA 与细菌的二氢叶酸合成酶相结合，细菌就无法利用 PABA 作为合成叶酸的原料，叶酸合成被阻断。而叶酸是合成氨基酸、核酸所必需的一种辅酶，细菌缺乏叶酸，其生长繁殖就受到抑制。由于人和动物可利用现成的叶酸，因此磺胺类并不干扰人和动物的细胞。磺胺类与磺胺增效剂如甲氧苄氨嘧啶合用，可产生协同作用而加强抗菌效果，使磺胺类的作用增强很多倍，抗菌作用和治疗范围都有所增加，对某些细菌还可由抑菌转为杀菌。

(二)抗菌增效剂

抗菌增效剂为广谱抗菌剂，常用药物为三甲氧苄二氨嘧啶(甲氧苄氨嘧啶, trimethoprim, TMP)和二甲氧苄氨嘧啶(敌菌净, diaveridine, DVD)，其抗菌谱与 SMZ 等磺胺类相似，而抗菌作用比 SMZ 强 20 倍，对多数革兰氏阳性菌和阴性菌有效。单独应用，易使细菌产生耐药性。与磺胺类合用(配合比例一般为 1:5)，可使磺胺类药物抑菌作用增强数倍至数十倍，且可减少耐药性产生，故又称之为磺胺增效剂。其机制是合用能使细菌的叶酸代谢受到双重阻断，即磺胺类抑制二氢叶酸合成酶，二氢叶酸不能合成，而抗菌增效剂则抑制二氢叶酸还原酶，使二氢叶酸不能还原为四氢叶酸以致阻碍核糖核酸的合成，抑制细菌生长。抗菌增效剂还可增加四环素、青霉素、红霉素和庆大霉素的抗菌作用。水产养殖中已将该类药物单用或与其他抗菌药合用治疗疾病，口服剂量为每千克体重：TMP 510mg，DVD 20~25mg。

(三)呋喃类

呋喃类药物是在呋喃环上引入不同基团而形成的一类化合物。主要种类有呋喃唑酮(痢特灵)、呋喃坦啶(呋喃妥因)、呋喃西林(呋喃新)、呋喃那斯等。本类药抗菌谱广，低浓度(5~10μg / ml)能抑制一般革兰氏阳性菌和阴性菌，20~50μg / ml 浓度有杀菌作用，一般在酸性条件下抗菌活性增强。药物性质稳定，受有机物影响小，不易产生耐药性。但可引起溶血性贫血、多发性神经炎、眼部损害和急性肝坏死等不良反应，大多数呋喃类药物

物已被淘汰或禁止在食用动物使用。呋喃妥因和呋喃那斯仍有少量应用，在水产上主要用于细菌病治疗。呋喃类药物的抗菌机理在于抑制了乙酰辅酶 A 而干扰了细菌糖代谢的早期阶段。

(四) 喹诺酮类

喹诺酮类是人工合成的一类抗菌药，能抑制细菌 DNA 和 RNA 的合成，对革兰氏阳性菌和绝大多数革兰氏阴性菌有显著的抗菌作用。本类药物更新快，至今已开发多代产品，第一代产品为上世纪 60 年代开发，对革兰氏阳菌效果差，对中枢神经副作用大，主要有萘啶酸、恶喹酸、吡咯酸。第二代产品为上世纪 70 年代开发，抗菌作用强于第一代，但对肝功能和胃肠有一定副作用，主要产品有新恶酸、噻喹酸、恶噻喹酸、吡喹酸、吡哌酸等。第三代产品为上世纪 80 年代开发，抗菌谱比第一、二代更广、抗菌活性更强，副作用也有所下降，但对幼龄动物会引起骨软化，主要药物有诺氟沙星(氟哌酸)、培氟沙星(甲氟哌酸)、依诺沙星(氟啶酸)、氧氟沙星(氟嗪酸)、环丙沙星(丙氟哌酸)、氨氟沙星(氨氟哌酸)、多氟沙星(多氟哌酸)、氟甲喹、妥苏沙星等。萘啶酸、氟啶酸、环丙沙星等在水产动物疾病防治中曾有一定应用，为防止耐药菌产生和对人类造成公共卫生问题，应慎用或不用。

(五) 咪唑类抗真菌药

咪唑类(imidazoles)是人工合成的一类抗真菌药，如克霉唑、咪康唑、酮康唑和氟康唑。主要用于治疗真菌引起的人的深部感染，低浓度能抑真菌，高浓度有杀真菌作用。该类药能选择性抑制真菌细胞色素 P-450 依赖性的 14- α -去甲基酶，使 14- α -甲基固醇蓄积，细胞膜麦角固醇不能合成，使细胞膜通透性改变，导致胞内重要物质丢失而使真菌死亡。给药方法为口服或外用。但该类药有一定毒性，能引起贫血、胃肠道反应和皮疹等。目前尚未用于水产动物疾病治疗。

第四节 控制微生物的生物学方法

生物因素对微生物的生命活动具有重要影响，如有些微生物能产生抗菌素、细菌素等，动植物也能产生很多抗菌物质，它们具有抑菌或杀菌作用。此外，微生物与微生物、微生物与动植物之间存在寄生、颉颃等现象，应用这些物质和关系均可以对有害微生物进行有效控制。

(一) 抗生素

抗生素(antibiotic)是某些微生物合成或半合成的能抑制或杀死另外一些微生物的一类化合物。它主要来源于放线菌，少数来源于某些真菌和细菌等。有些抗生素还能抑制或杀死癌细胞。目前已发现了数千种抗生素，但大多数对人和动物有毒性，只有少部分可实际应用于疾病治疗。抗生素的抗菌作用主要是通过抑制细胞壁合成、破坏细胞膜通透性、抑制蛋白质合成和干扰核酸合成等方式实现的。表 9-3 列出了人用抗生素的主要种类及其抗菌机制。其中有部分抗生素在水产动物疫病防治中也有应用，但在使用种类和用药方法上应严格控制，不能把人用的所有抗生素尤其是新型抗生素用于水产动物，更不能用全池泼洒等方式大规模用药，以避免产生耐药菌、产品污染等一系列公共卫生问题。

(二) 竞争性和颉颃性微生物

微生物生存在同一个环境中，可以通过对营养物质、氧气等的竞争使竞争力弱的一方受到抑制，也可以产生某些代谢产物如酸类、细菌素等而抑制其他微生物。如在好氧生物

表 9-3 抗生素的抗菌谱和抗菌机制

分 类	主要药物	特 性	抗菌谱	作用机制
β - 内酰胺类	天然青霉素	青霉素 G	不耐酸和青霉素酶，口服吸收极少	G ⁺ 菌
	半合成青霉素	青霉素 V	耐酸、不耐青霉素酶，口服吸收极少	G ⁺ 菌
		苯唑西林	耐酸、耐青霉素酶，口服可吸收	G ⁺ 菌
		氯唑西林		
		双氯西林		
		甲氧西林		
		氨苄西林	耐酸、不耐青霉素酶，口服可吸收	G ⁺ 菌 G ⁻ 菌
		阿莫西林		
		羧苄西林		
		替卡西林		
		美洛西林		
		哌拉西林		
	头孢菌素类	头孢唑林	第一代头孢菌素，耐酸，口服可吸收	G ⁺ 菌
		头孢噻酚		
		头孢氨苄		
		头孢羟氨苄		
		头孢孟多	第二代头孢菌素，可口服，过敏反应少	G ⁺ 菌 G ⁻ 菌
		头孢西丁		
		头孢克洛		
		头孢呋辛		
		头孢尼西		
		头孢噻肟	第三代头孢菌素，可口服，副反应少	抑制细胞壁合成
		头孢唑肟		
		头孢曲松		
		头孢哌酮		
		头孢他啶		
		头孢吡肟	第四代头孢菌素，抗菌作用较第三强	
	碳青霉烯类	亚胺培南 (亚胺硫霉素)	耐酶，广谱高效	G ⁺ 菌 G ⁻ 菌
	单环 β - 内酰胺类	氨曲南	氨基甙素替代药，低毒	G ⁻ 菌 G ⁺ 菌
	β - 内酰胺酶抑制剂	克拉维酸舒巴坦	抗菌活性低，与 β - 内酰胺类合用可增效，口服可吸收	G ⁻ 菌 G ⁺ 菌
	氧头孢烯类	拉氧头孢	作用与头孢噻肟相似，易致出血	G ⁻ 菌 G ⁺ 菌

分 类		主要药物	特 性	抗菌谱	作用机制	
多肽类		万古霉素 去甲万古霉素	口服不吸收	G ⁺ 菌	抑制细胞壁合成	
大环内脂类	红霉素类	红霉素	口服可吸收	G ⁺ 菌 G ⁻ 菌 衣原体 霉形体		
		甲红霉素				
		罗红霉素				
		阿齐霉素				
	其他大环内脂类	乙酰螺旋霉素	口服易吸收	同红霉素类		
		麦迪霉素				
		交沙霉素				
		吉他霉素				
林可霉素类		克林霉素	口服易吸收	G ⁺ 菌	抑制蛋白质合成	
氨基甙类		链霉素	水溶性好, 口服吸收差, 可导致听力下降或耳聋, 发生率排序: 新>卡>阿>西>庆>妥>链	G ⁻ 菌 部分 G ⁺ 菌		
		庆大霉素				
		卡那霉素				
		妥布霉素				
		阿米卡星				
		西索米星				
		新霉素				
四环素类		四环素	口服吸收不完全, 能沉积于骨、牙	G ⁺ 菌 G ⁻ 菌 立克次体 衣原体 霉形体 螺旋体	抑制蛋白质合成	
		土霉素				
		强力霉素				
		二甲胺四环素				
氯霉素		氯霉素	口服可吸收, 抑制造血功能	G ⁺ 菌 G ⁻ 菌 立克次体		
		琥珀氯霉素				
抑制 DNA 合成的抗生素		溶肉瘤素	溶于水, 可致血细胞下降	抗肿瘤 G ⁺ 菌	抑制核酸合成	
		新生霉素				
多黏菌素		多黏菌素 B	口服不吸收, 肾毒性强	部分 G ⁻ 菌	损伤细胞膜 (通透性)	
		多黏菌素 E				
全身抗真菌药		两性霉素 B	口服, 肌注难吸收, 出现贫血	广谱抗真菌		
局部抗真菌药		制霉素	口服不吸收, 毒性大于两性霉素 B			

处理中，溶解氧或营养成为菌胶团和丝状细菌的竞争对象，最终双方均受到抑制。乳酸菌产生乳酸使 pH 下降，抑制非耐酸菌生长。乳酸菌类和芽孢杆菌还可产生细菌素，细菌素对革兰氏阳性细菌都有抑制作用，如果与整合剂结合其作用可扩展到革兰氏阴性菌。嗜杀酵母产生的嗜杀毒素可杀死其他酵母。因此，可以用这类微生物制成微生态制剂用于人和鱼类等动物的某些疾病防治，这一工作已取得了一定进展。

(三) 寄生性微生物

寄生性微生物种类很多，如噬菌体、蛭弧菌等，被寄生的微生物往往受损或死亡。因此，用这类寄生性微生物可制成生物防病剂或进行微生物种型鉴别。有人在实验室条件下研究了蛭弧菌裂解鱼类病原菌(嗜水气单胞菌)的作用，效果确实而迅速，具有实用潜力。在医学上，已应用特异性噬菌体治疗绿脓杆菌引起的烧伤感染，效果良好。

(四) 溶菌酶

溶菌酶(lysozymum)产品是从鲜鸡蛋清中提取的一种能分解黏多糖的多肽酶，具有溶解细菌细胞壁和杀菌的作用，主要用于人的慢性鼻炎、急慢性咽喉炎、口腔溃疡等疾病的治疗。在微生物学上主要用于去除细胞壁，制备原生质体。

(五) 抗体和疫苗

抗体是由人和动物浆细胞合成和分泌的一类抗微生物的球蛋白。含有抗体的血清为免疫血清或抗血清。抗体多用于血清学试验以及人和动物的疾病防治。有人用抗血清治疗鳖细菌病已获得良好效果。用微生物制成的疫苗或类毒素进入机体后可刺激机体产生特异性抗体等抗病原微生物物质，具有预防传染性疾病的效果。

(六) 干扰素

干扰素是一类具有多种生物活性的糖蛋白，无抗原性，为广谱抗病毒药。主要抑制病毒蛋白合成、转录、装配和释放。此外，还具有抗肿瘤和免疫调节作用，小剂量可增强免疫，大剂量则有抑制作用。目前医学上大量应用的多为基因重组技术生产的 α -干扰素，本品口服无效，需注射给药，主要用于病毒性肝炎和恶性肿瘤等疾病的治疗。已知草鱼等鱼类也能产生干扰素，我国对草鱼干扰素的特性和人 α -干扰素用于草鱼出血病的防治效果进行了初步研究。

(七) 吞食微生物的生物

吞食微生物的生物种类繁多，如水域中的假单胞菌等土著菌可捕食大肠杆菌等外来菌；泰氏游仆虫等原生动物可捕食细菌；轮虫、涡虫、水蚤、红虫等底栖后生动物均可捕食细菌；贝类和鲢、鳙等滤食性鱼类均能滤食微生物。这些吞食微生物的生物均可用于养殖水体微生物的控制。

(八) 抗微生物的中草药

中草药是中药和草药的总称。我国是对中草药最早进行研究和应用的国家，历史悠久，形成了完整的理论与应用体系，创立了中医学、中药学、方剂学等。中草药具有化学合成药物无可比拟的优点，如具有多种医药效能、纯天然、毒副残留性少、无抗药性等，目前备受重视。在使用方法上，中医和中兽医一般是将不同性能的多种中草药按主、辅、佐、使原则配合使用。水产上也应用较多，多采用药末或煮汁拌饵投喂或就地取新鲜中草药在养殖水体浸泡方法施药。现在已用大蒜素、杜仲粉等作为饲料添加剂，既可促生长，还有较好的抗菌作用。现代医学表明，很多中草药有抗微生物作用，表 9-4 列出了这些药物的

主要性能和抗菌谱。

表 9-4 主要抗微生物中草药的性能

药名	功能	成分	抗菌谱
十大功劳	清热解毒	生物碱	细菌、部分病毒和真菌
大黄	泻热毒，破积滞	蒽醌类	细菌、部分真菌和病毒
大叶桉	疏风解热、防腐止痒	桉油精、百里香酚	细菌、某些病毒
大蒜	健胃、驱虫、止痢	大蒜辣素	细菌、部分真菌
大青叶	清热凉血、解毒	靛甙，大青素	细菌
乌柏	有小毒，利尿解毒	酚基有机酸	细菌
地锦草	清热凉血止血、消肿	黄酮类、没食子酸	细菌
马齿苋	清热利湿、凉血解毒	左旋去甲肾上腺素、儿茶酚等	细菌
五倍子	止泻、止血	鞣质、没食子酸	细菌
鱼腥草	清热解毒、利水消肿	甲基正壬酮、月桂烯等	细菌
金银花	清热解毒	黄酮类、肌醇、皂甙	细菌
金樱子	解表消肿	鞣质、糖分、维生素 C	细菌、某些病毒
四季青	清热解毒、活血止血	四季青素、鞣质、儿茶酸等	细菌
地榆	止血收敛	皂甙、鞣质	细菌和部分真菌
知母	抗菌和调节功能	皂甙、糖类、黏液质和烟酸	细菌和部分真菌
穿心莲	消肿止痛、清热解毒	穿心莲内酯、黄酮类	细菌、促进白细胞吞食细菌
厚朴	温中燥湿、益气健脾	含笑花醇、酚类、鞣质	细菌、部分真菌和病毒
儿茶	收敛止血	儿茶鞣酸、儿茶酚等	细菌和部分真菌
梨头刺	清热解毒、消肿	靛甙、糖、鞣质、酚等	细菌
老鹳草	清热止泻	挥发油、有机酸、鞣质	细菌、某些病毒
小檗	清热解毒	生物碱	细菌、部分真菌和病毒
吴茱萸	温中散寒、下气开郁	生物碱、挥发油吴茱萸烯等	细菌、部分真菌
黄连	清热解毒	黄连素等多种生物碱、有机酸	细菌、部分病毒
黄柏	清热解毒	多种生物碱	细菌
黄芩	清热解毒、止血	黄酮、黄芩甙、汉黄芩素	细菌、部分病毒
风尾草	清热解毒、止血杀虫	绵马素、三萜类、挥发油	细菌和病毒
接骨木	清热解毒	挥发油、酚类有机质、鞣质	细菌
辣蓼	解毒消肿	挥发油、黄酮、鞣质	G ⁻ 菌
马兜铃	清热	马兜铃酸、次酸、马兜铃碱	真菌、细菌
牛蒡	清热解毒	牛蒡甙、脂肪酸、维生素 A、维生素 B、维生素 C、菊糖	真菌、G ⁺ 菌
白头翁	清热解毒	白头翁素、翁灵、糖等	真菌、细菌
白鲜皮	清热解毒	白鲜碱、黄柏酮、白鲜内脂等	真菌
地肤子	清湿热	三萜皂甙、脂肪油、生物碱	真菌
百部	止咳定喘，杀虱灭虫	百部碱等生物碱	真菌、部分病毒

血竭	活血、止血	黄酮类、苯甲醛及酯类	真菌
苦参	清热杀虫	多种生物碱、黄酮类	真菌
青蒿	清热解毒	挥发油、蒿酮、酯类、醛类	真菌
茵陈	清热解毒	挥发油、有机酸、茵陈烯酮	某些病毒、细菌和真菌
蛇床子	杀虫、壮阳补肾	香豆精类	病毒、真菌
藁本	解表散寒、祛风胜湿	挥发油、内酯类、甲基丁香酚	真菌
漏芦	清热解毒	挥发油、生物碱	真菌、诺卡氏菌
七叶一枝 花	清热解毒	甾体皂甙、生物碱、氨基酸	病毒、真菌和螺旋体
板蓝根	清热解毒	靛甙	病毒、细菌和钩端螺旋 体
苦地丁	清热解毒	多种生物碱、香豆精、内酯	某些病毒、细菌
虎杖	清热解毒、散瘀活血	蒽醌衍生物、蓼甙、草酸	病毒、细菌
佩兰	凉血止血	挥发油、香豆精	某些病毒
射干	清热解毒、活血化痰	射干甙等多种甙类	某些病毒、真菌
柴胡	解表和里	皂甙、挥发油、脂肪酸	某些病毒
野菊花	清热解毒	挥发油、香豆精和多糖	多种病毒、细菌
菊花	清热解毒	挥发油、菊甙、腺嘌呤胆碱等	某些病毒、细菌

思考题

- 1.举例说明消毒、防腐、灭菌、抗菌、化疗等名词的涵义、应用实例和实际意义。
- 2.控制微生物的物理方法及其原理有哪些？
- 3.控制微生物的化学方法及其原理有哪些？
- 4.比较物理、化学和生物学方法控制微生物的主要优缺点。
- 5.化学药剂、化学治疗剂各有哪些主要种类?应用范围和作用机制如何？
- 6.为什么水产养殖中应慎用或不用某些化学治疗剂和抗生素?如果既要控制水产动物病害，又要保护环境，应采用哪些对策为好？

第十章 微生物的分类和命名

第一节 细菌的分类与命名

细菌作为自然界中的生物广泛存在，而且不断进化和发展，种类繁多，性质各异。人类出于认识自然的需要，对包括细菌在内的各种生物进行了分类和命名，并已形成了既定的体系和公认的准则。

一、细菌的分类地位

细菌过去归属植物界，自 1974 年以来，其分类地位得以调整，划为原核生物(Procaryote)反映了人类对生物界认识的深化。在原核生物中，细菌(Bacteria，又称真细菌 Eubacteria)和古细菌(Archaea)是性质有别的两大类。古细菌是一个独特的系统进化类别，其成员产甲烷、极端耐盐、高度嗜热，其细胞壁组成与细菌不同。这些极端微生物被认为是生物进化过程中的早期产物，因此称之为古细菌。

细菌作为另一个系统进化类别的原核生物，它包括对动物和人具有致病作用的衣原体、立克次氏体、霉形体、螺旋体、放线菌等，此外还涉及蓝细菌、紫色光合细菌等。

与动植物一样，细菌的分类单位为界(Kingdom)、门(Phylum)、纲(Class)、目(Order)、科(Family)、属(Genus)、种(Species)，种以下有变种(Variety)、型(Forma; Type)、品系(Strain)等。但是最重要、最基本的单元是种，其次是属。

1. 种 在上述分类单位中，种是生物界客观存在的独立单位，也是生物分类中的基本单位。伯吉(Bergey)氏认为：凡是与典型培养菌(typeculture)密切相同的其他培养菌统一起来，区分成细菌的一个“种”。

种是指起源于一个共同祖先，在遗传上是相同的细胞群体或克隆，在形态特征和生理生化特性上差别微小，能适应一定的环境的一群个体。这个群体中的个体彼此显示出高度的相似性，而与另一种的个体在许多独立的特征方面又表现不同。

在自然界，种有相对的稳定性，但同种细菌的不同个体或产生的后代，总会出现一些变异，所以种是可变的。这种变异由量变到质变，就形成了一个新种。这种变异在没有发生质变时是种内变异，种内变异是种存在的表现形式，也是形成新种的前奏。这样，既有种内变异，又有种间区别，就给细菌的分类鉴定工作增加了许多困难。目前，细菌分类中所确定的种或多或少都带有人为的成分，从生物进化的观点看，有待进一步修改和完善。

2. 变种 有时从自然界分离到的纯种只有某一特性与典型种不同，其余特征与典型种记载的特征完全符合，而这种特性又是稳定的，我们就把这种微生物称为典型种的变种。例如《伯吉氏鉴定细菌学手册》第八版在描述蜡样芽孢杆菌时，提到了这种细菌有 3 个变种，其中蜡样芽孢杆菌荧光变种除产生黄绿色荧光色素这一特征不同于模式种外，其余特征均与模式种相同。

3. 小种与亚种 实验室获得的稳定变异菌种称为小种或亚种(subspecies)。例如大肠杆菌野生型的一个品系叫“K₁₂”，通过诱变可以从野生型“K₁₂”得到 E. coli K₁₂ gal⁻ 突变株，这是一种半乳糖基因缺陷型，目前被广泛用于基因工程研究。人们将这种实验室获得的变异菌株称为亚种小种。

4. 型 型是同种之间在某些特殊性质上有区别的细菌。它们之间的区别不像变种那样显著，所以“型”常用于变种以下的细分。按抗原结构的不同，可将细菌分成多种不同

的血清型(serotype); 根据对噬菌体和细菌素的敏感性不同, 可将细菌分成不同的噬菌体型(phagetype)和细菌素型(bacteriocine type)。根据生化反应, 又可将细菌分成不同的生化型(biochemical type)。

5. 菌株或品系 菌株或品系(strain)是指同种微生物不同来源的纯培养。为了方便, 菌株常用编号或字母表示, 具有典型特征的菌株称为标准株, 例如金黄色葡萄球菌 209P 为筛选青霉素的标准株, H37RV 为结核杆菌强毒标准株。一般说来, 标准株为国际上所公认, 可供生物制品、药品生产或科学研究采用, 以免造成混乱。同一种细菌可有许多菌株, 其主要性状应完全相同, 其次要性状可稍有差异。菌株的名称没有一定的规定, 通常用地名或动物名的缩写加编号作菌株名。某些具有特殊性状的菌株用于细菌基因工程等研究的需要, 这些菌株的名称已为同行熟知。

6. 群 生物在进化过程中不断发生变异, 这些变异逐渐使生物产生质的差别, 最后形成新种。一个物种变成另一个物种, 必然经过一系列过渡类型, 因此在两个不同微生物之间, 常常出现一些介于两个菌种之间的类群。通常把这两种微生物和介于它们之间的微生物类型统称为群(group, series)。例如大肠杆菌和产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)两个菌种之间的区分是十分明显的, 但自然界还存在着一些介于这两种细菌之间的中间类型, 它们在亲缘关系上都比较相近, 这样在分类学上就把大肠杆菌、产气杆菌以及介于它们之间的中间类型的细菌称为大肠菌群。

7. 属(genus, 复数 genera) 是具有共性的若干种的组合, 应与其他属有明显的差异。不同属之间的 16S rRNA 序列有较大的差异, 但尚未提出差异的量化标准。

二、细菌的命名

细菌的命名依据“国际细菌命名法规”(The International Code of Nomenclature of Bacteria)的规定, 学名用拉丁文, 遵循“双名法”。所谓“双名法”就是每一种细菌的拉丁文名称由属名和种名两部分构成, 属名第一个字母必须大写, 其余均应小写, 即使种名是以人名或地名命名的, 种名头一个字母也用小写。整个属名及种名在出版物中应排成斜体。例如肺结核病原菌的学名是 *Mycobacterium tuberculosis*(Koch) *Lehman et Neumann*(结核分支杆菌)。*Mycobacterium* 是属名, *tuberculosis* 是种名。属名通常是一个描述生物形态的名词或发现该生物的人名。如 *Mycobacterium* 是一个名词, Myco- 的意义为真菌状, -bacterium 的意义为杆状细菌, 所以 *Mycobacterium* 的意义为真菌状的杆菌。种名一般表示该菌种的某种特征, 如颜色、形状、来源、生理特性、寄主等。种名是形容词, 如肺结核菌的种名 *tuberculosis* 的意义为结核的。为便于在国内流通, 细菌的拉丁文名称一般都译为汉语, 中文译名与拉丁名正好相反, 将种名在前, 属名在后。如大肠杆菌, 大肠为种名, 埃希菌为属名。

出现在分类学文献中的细菌拉丁文学名, 在属名和种名之后, 往往还要加上首次定名人(加括号)、现名定名人和现名定名年份, 这些均用正体排字。但在一般医学微生物学文献中, 属名和种名之后的部分均予省略。例如大肠埃希菌的学名全名是: *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers 1919, 指的是 Migula 于 1895 年命名此菌为 *Bacillus coli*, Castellani 及 Chalmers 于 1919 年改为现名。

拉丁文学名应按拉丁文字的发音规则读念, 但由于英语的影响较大, 不少人是按英语的读法来读细菌拉丁文名, 在国际学术交流中常常遭遇。

属名重复出现时, 拉丁文可缩写, 用第一个字母, 为避免混淆, 也可用 2 个字母。只

确定属名、未确定种名的某一株细菌，其拉丁文学名可在属名之后加 sp. (正体字)；如果同属未定种名的若干菌株，则用 spp. 取代 sp.，spp. 为 species 复数的简写。

如果是新种，在新种的拉丁文学名之后还要加上 “sp. nov.”，nov 是 novel 的缩写，新的意思。例如 *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., 译为：胞内劳森菌，新属新种。

亚种用 subsp. (正体字)表示，这是 subspecies 的缩写，例如 *Pasteurella multocida* subsp. *septica*，中译名为多杀性巴氏杆菌败血症亚种。过去还用 var. (variety)表示变种，现已废止，用亚种取代。

值得注意的是，少数拉丁文学名会因研究的进展等原因而改变，比如 *Clostridium welchii* (魏氏梭菌)、*Aeromonas punctata* (斑点气单胞菌)等是曾用名，现今的国外文献已不再沿用，分别改为 *Clostridium perfringens* (产气荚膜梭菌)和 *Aeromonas caviae* (豚鼠气单胞菌)。

细菌的拉丁文学名在翻译为中文时，由于译者不同，往往同物异名，造成不必要的混乱。为此应尽可能采用公认的译名，一般教科书的名称均比较规范，此外可查阅《细菌名称》第二版(蔡妙英等编，科学出版社，1998)。

译名应尽可能准确，例如 *Edwardsiella tarda*，应译为迟缓爱德华菌，*tarda* 有迟缓或迟钝之意，该菌有运动力，并不迟钝，但生长缓慢。

按照国家出版局的规定，细菌名称中涉及外国人名译为汉语时，除极少数特别著名、沿用已久者外，均省略“氏”字，除非取词头字母发音。例如 *Brucella* 译为布氏杆菌属，*Yersinia* 译为耶尔森菌属；*Pasteurella* 译为巴氏杆菌属，*Listeria* 译为李氏杆菌属。按照国际细菌命名法规，属以下(包括属)无统一词尾，属以上有，例如目的词尾是 -ales，螺旋体目是 *Spirochaetales*；科的词尾是 -aceae，肠杆菌科是 *Enterobacteriaceae*，假单胞菌科是 *Pseudomonadaceae*。

一个种的典型菌株，或一个学名要有分类和鉴定的实物根据，研究者们选定一个活菌株的培养物作为这个种的典型菌株。细菌分类的性状根据既包括形态，也包括功能，因此典型菌株必须是活的，同时要保持活的典型菌株不因为繁殖传代而发生变异，活的典型株需要保持在不繁殖的状态。干燥处理的孢子和冷冻干燥处理的营养细胞，可以保持数十年不丧失活力，也不发生变异。

三、细菌分类鉴定的标准

长期以来，细菌分类鉴定的主要依据是其表型(phenotype)特征，即形态、染色、培养、细胞壁结构、生理生化及抗原性的特征。这些表型特征对细菌的鉴定和分类具有很重要的作用，尤其是在临床微生物学的实践中，至今仍有应用价值。

(一)分类的依据

1. 形态特征

在一定培养条件下的个体形状，细菌包括形状及大小、细胞排列情况、能否运动、附属结构、有无鞭毛和鞭毛类型、有无芽孢和荚膜、芽孢的大小、革兰氏染色及其他染色特征等。真菌和放线菌还要考察其菌丝体和有性繁殖情况，如繁殖器官的形状、构造，孢子的数目、形状、大小、颜色及表面特征，酵母菌还要考虑假菌丝形成情况等等。

在一定培养条件下的群体形状，包括固体培养基上的群体形态，即菌落的外形、色泽、光泽、大小、状态、边缘、质地、移动性、气味等特征以及菌苔特征；液体培养基中的菌

膜、菌环、沉淀、浑浊度等特征。

2. 生理特征

即能够或不能够利用哪些能源、氮源以及代谢途径和代谢产物的特点等。例如是否为光合细菌；如果是化能无机营养细菌，能够利用什么无机能源；如果是化能有机营养细菌，能够利用什么碳源，是否产酸、产气，氮源的特征是什么，能否利用 N_2 ，等等。

3. 生态环境

在什么培养条件(培养基成分、温度、对 O_2 的反应等)下能够生长、繁殖。在自然界的生活环境中腐生还是寄生及生活史，在自然界中分布及和其他生物的寄生和共生关系。

4. 血清学反应

血清反应的基本原理，是用已知菌株制成抗血清，根据它是否与待鉴定的对象发生特异性的血清反应来鉴定菌株的种或型。

5. 遗传学特征

不同微生物的 DNA 分子和 RNA 分子的碱基组成和序列不同，如 DNA 分子中的 G+C 含量，核酸之间的同源性等，据此可以对其进行归类。

6. 红外吸收光谱

每种物质的化学结构都有特定的红外光谱，若两个样品的吸收光谱完全相同，可以初步认为它们是同一种物质。因此，可以利用红外光谱技术测定微生物细胞的化学成分来进行微生物的分类。这种技术适于“属”的分类，而不适用于同一属内不同种或菌株之间的区分。这种方法的优点简便快速，用少量的样品（菌体或提取物）可以得到满意的结果。

7. 其他

不同细菌细胞壁的结构和组成不同。如霉菌的细胞壁主要含有几丁质，而细菌的主要成分是黏肽。革兰氏阳性菌黏肽含量较高，达细胞壁干重的 40%~90%，革兰氏阴性菌黏肽含量仅为 10%~20%。此外，细胞壁的糖类、氨基酸等的组成和含量也有较大差异。

微生物的脂类分析已用于细菌的分类和鉴定，如棒状杆菌属、诺比氏菌属、分支杆菌都存在特征性的分支菌酸。

(二)分类方法

1. 条目分类法

也称之为传统分类法。它是采用植物的系统发生分类法，根据细菌所表现出来的各种特征，按界、门、纲、目、科、属、种来进行归类。

用此方法对一个未知菌株进行分类或鉴定，往往需要测定上述的许多性状，然后和标准株的性状进行比较。即按照分类系统的条目逐条对照，逐级查找，直到在分类系统中找到它的“座位”，即确定是它的命名。

顺便指出，比较两个菌株的几十个表现型性状，如果完全相同，自然可以认为是同一个种。但是，我们知道一个表现型性状的明显不同，往往是个别基因变异的结果；那么，两个菌株在个别或少数性状上的差异能不能归纳为一个种，或者区别为两个种，这是分类和鉴定学中长期争论着的问题。如果我们把一个基因突变产生的一个表现型差别作为分种的根据，那么在实验室内，通过人工诱变，可以从一个种产生许多个种，这实际上也就从基本上否定了种这个科学概念的实验意义。另一方面，在表现型性状有差别，才能被认为是属于两个不同的种，同样也得不到理性的解答。

在实际工作中，对于细菌的分类鉴定，主要采取的是“约定俗成”的观念，即遵守

已经发表的分类、鉴定工作，只有认为必须修订时，才提出修订意见。

条目分类的优点是简明清晰、易掌握、具有实用性。但是它的不足是在分类系统中，仅以少数菌株的少数性状作为分类依据，来决定各种细菌间的隶属关系，因而存在一定局限性和片面性。

2. 数值分类法

数值分类是以生物性状的比较相似性为依据的一种分类方法，此法也称聚类分类法或 Adonson 分类法。其原则是 18 世纪 Adonson 首先提出的，它采取两条基本原则，即一个种是许多相似性很高、但并不完全相同的菌株的聚类群(或称是聚群)，一个属是或多或少的有相似性的种的聚类群；一个生物的各种被检验的性状都具有同等的分类价值。

聚类分类(数字分类)首先应用于细菌分类(Sneath, 1956)，当前其他的微生物和高等生物均在采用这个分类方法。为阐明微生物的系统发育和较正确的鉴定属和种，宜采用数字分类法。这个分类方法虽然比较复杂，但累积有大量的工作后，将逐渐阐明微生物的自然类群和进化的过程，无论在理论方面和实用方面都能起作用。在一些类群中应用聚类分类法的实践表明，细菌学几十年累积的现行分类和聚类分类大体一致。当前的趋势是更多地应用聚类分类法来修订现行的细菌分类。然而数字分类法随着对微生物的生理、化学组分、遗传物质、生态习性、血清关系等方面的知识扩大和深入，将不断地增加供作分类的性状，这就需要电子计算机进行分析。

3. 遗传分类法

(1)DNA 中 G+C 含量测定 尽管现在还不能建立以系统发育为基础的微生物分类法，但研究者们还是企图在科、属、种的水平上反映出微生物进化的亲缘性，在这个意义上 DNA 的 $[G(\text{鸟嘌呤})+C(\text{胞嘧啶})]\text{mol}\%$ 的测定提供了很有价值的评价。

各种不同的生物种，其 DNA 中碱基对的排列顺序是不同的，亲缘关系题远的种，其碱基对的排列差别就越大。虽然不同种的生物其 DNA 的碱基对的数量和比例可能相同，但碱基对数量或比例不同的肯定不是同一个生物种。而且 DNA 碱基对的顺序、数量和比例在细胞中是稳定的，不受菌龄和一般外界因素的影响。

根据 DNA 碱基组分(G+C)mol% 平均值，可指示微生物的分类群及其纯度的亲缘关系。例如真菌中担子菌的平均值跨度在 44%~59%之间，而藻菌的在 37%~61%之间，说明藻菌中的类群差异较大，即较庞杂。真细菌的在 24%~78%之间，跨度最大，指示真细菌是一个庞杂的类群。细菌属内特种的 G+C 含量大都差别不大，如 Mandel(1966)测定假单孢杆菌的 G+C 含量，其平均(G+C)mol% 为 61.8%~69.5%。

在 DNA 的碱基中，(G+C)mol% 的测定是 4 种碱基的比例的一种测定方法，比较简单易行。根据(G+C)mol% 测定的结果，将现行的同一种、属或科中(G+C)mol% 相差很大的部分剔除出去，能使现行的分类实现更接近于按照系统发育的分类法体系。

(2)核酸杂交测定法 即 DNA-DNA 的分子杂交。这种方法在细菌和病毒的分类鉴定中应用得比较多，其原理是将受热变性的 DNA 溶解迅速冷却，DNA 便以单链存在。如果溶解在变性温度 T_m 值以下 10~30℃ 冷却，则互补单链进行专性重组(退火)，从而又形成双链分子，碱基顺序相同或有一定程度相同的两个单链在退火时互补形成双链分子是随机的。因此，可以用核酸杂交方法，考查两菌株的 DNA 相互形成双链分子的程度(同源性)，反映出它们亲缘关系的远近。用放射性元素标记一个菌株作为参考菌株，与其他菌株(同种或不同种菌株)过热变性退火，测定重新形成的双链分子同质程度，能够半定量的反映两菌

株或两菌种间的亲缘关系程度。

(3)限制性片段多态性分析 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析,其原理是用限制性内切酶将细胞基因组 DNA 进行切割,之后在琼脂糖凝胶上电泳分离,以显示不同群基因组 DNA 的限制性片段长度多态性。大多数限制性内切酶可识别 4 个或 6 个具有回文结构的碱基序列,但是 RFLP 产生的十分复杂的指纹图谱造成了应用上的困难。因而人们选用切割频率低的内切酶消化基因组 DNA,但产生的大片段 DNA 难以在传统的琼脂糖凝胶上电泳分离,只能通过脉冲场凝胶电泳分离。目前,此技术被认为是 DNA 指纹图谱中最有效的分型方法。

(4)扩增片段长度多态性分析 扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)的基本原理是通过 PCR 选择性地扩增整个基因组 DNA 的内切酶片段,在分辨率高的聚丙烯酰胺凝胶上电泳,产生一组特异的 DNA 限制性片段的指纹图。此技术分为 3 步:①用两个切割频率不同的限制性内切酶消化基因组 DNA,之后连接到含相同内切酶位点的寡核苷酸“连接器”上;②PCR 选择性地扩增一套限制性 DNA 片段;③聚丙烯酰胺凝胶电泳分析扩增片段的带谱。AFLP 不仅是个简单的指纹技术,而且可作为连接遗传图谱与物理图谱间的桥梁而用于基因组的研究。

(5)随机扩增 DNA 多态性分析 随机扩增 DNA 多态性分析(random amplified polymorphic DNA, RAPD)又称为随意引物 PCR(arbitrary primed PCR, AP-PCR),是一种 DNA 指纹多态性分析技术。其理论依据是不同的基因组中与随意引物匹配的碱基序列的位点和数目可能不同,因而用一组人为设计的核苷酸作为引物,通过 PCR 随机扩增可产生物种特异性的 DNA 带谱。因此 RAPD 技术可用于细菌种间、亚种间乃至株间的亲缘关系分析,未知菌株的快速鉴定和流行病学调查等。此外, RAPD 的 PCR 产物还可作为探针,与 Southern 杂交技术结合,用于基因组或菌落杂交,可以填补基因组的遗传图谱和物理图谱间的空缺。

(6)16S rRNA 序列分析 虽然蛋白质、RNA 和 DNA 等生物大分子都可以提供生物进化的信息,但并不等于所有各类大分子都广泛适用于生物系统发育的研究。大量的实验研究表明:在众多的生物大分子中,最适合于揭示各类生物亲缘关系的是 rRNA,尤其是 16S rRNA。16S rRNA 所以被普遍公认是一把好的谱系分析的“分子尺”,是因为:①rRNA 参与生物蛋白质的合成过程,其功能在任何生物都必不可少的,而且在生物进化的漫长历程中,其功能保持不变;②在 16SrRNA 分子中,既含有高度保守的序列区域,又有中度保守和高度变化的序列区域,因而它适用于进化距离不同的各类生物亲缘关系的研究;③16S rRNA 相对分子质量大小适中,便于序列分析;④16S rRNA 普遍存在于真核生物和原核生物中(真核生物中其同源分子是 18S rRNA)。因此,它可以作为测量各类生物进化的工具。

序列差异的数值构建的系统树称为分子系统树。分枝的末端和分枝的连接点称为结,代表生物类群,分枝末端的结代表仍生存的种类。系统树可能有时间比例,或者用两个结之间的分枝长度变化来表示分子序列的差异数值。

构建分子系统树,是在进行序列测定获得原始序列资料后,由计算机排序,使各分子的序列同源位点一一对应,然后计算相似性或进化距离。在此基础上,使用适当的计算机软件根据各微生物分子序列的相似性或进化距离构建系统树。计算机分析系统发育相关性构建系统树时,可以采用各种方法,其中常用的是最节省分析法或称简约法。这种方法推断谱系的原则是:在所有可能的谱系关系中,涉及进化改变的序列特征数最少的谱系是最

可信的。因此，在比较过程中要找到比较决定性的序列。这种分析方法是基于这样一种假定：进化变化的发生，是沿着最短的途径、发生最少的变化，从祖先进化成今天所比较的生物种类。

四、细菌的分类体系

目前公认的细菌分类体系是“伯吉氏系统细菌学手册”(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)，由美国细菌学家 Holt 主编，共 4 卷，第 1 卷于 1984 年出版，记载了医学及工业有重要性的革兰氏阴性细菌。第 2 卷 1986 年出版，记载了医学与工业有重要性的革兰氏阳性细菌。第 3、4 卷 1989 年出版，前者收录了古细菌和蓝细菌，后者描述了放线菌。该书的姐妹篇是“伯吉氏细菌鉴定手册”(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)，简要地描述了各个属的性状及属内各种的简明比较。自 1923 年出版第一版以来，不断充实修改再版，1994 年面世第九版。

伯吉氏手册虽然采纳了种系发生的分子生物学内容，但主要仍是依据经典的分类手段，未能充分体现分子序列研究对细菌分类的影响。Balows 等编著的“原核生物”(The Prokaryotes)第二版(1992)，可弥补伯吉手册的不足，该书有 4 卷 4100 页，得到微生物学界的高度重视。

国际系统与进化微生物学杂志(International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, USEM)原名国际系统细菌学杂志(International Journal of Systematic Bacteriology, USB)是细菌分类命名的世界公认的权威期刊，英文，由国际微生物学会联合会(International Union of Microbiological Societies)于 1901 年创刊出版。任何分离鉴定的新细菌的有关论文应在该杂志发表，如果在其他杂志发表，必须提交论文副本给该杂志公布，两年后无异议，所提出的新细菌名称方才生效。

与动物、植物不同，微生物的新种鉴定必须依据活的典型菌株(living type strain)，而不能依据死的标本，模式菌株通常冷冻或冻干保存，并送交有关机构保藏。国际公认的菌种保藏权威机构是美国典型培养物保藏中心(ATCC)以及德国微生物及细胞保藏中心(DSM)等。我国的菌种保存机构在逐步发展和完善之。

第二节 病毒的分类与命名

病毒的种类多达数千种，为了研究及应用的方便，对病毒必须进行分类。20 世纪 50 年代以前，由于对病毒的基本特性了解很少，主要根据病毒所致的疾病及组织或器官嗜性分类，未能反映病毒的本质。1961 年 Looper 建议，以病毒核酸作为病毒分类的首要标准，从此病毒分类开始形成较合理的框架。

一、分类的机构及标准

1966 年建立了国际病毒命名委员会(ICNV)，1973 年更名为国际病毒分类委员会(International committee, on taxonomy of viruses, ICTV)，作为国际公认的病毒分类与命名的权威机构。

ICTV 的病毒分类工作有一套较严密的程序。首先是由专家提出新的分类建议，经专家小组讨论后，报 ICTV 有关分会讨论。分会讨论通过后再报 ICTV 执委会，如获同意，最后提交病毒学会大会评议，评议通过，分类的报告才能确定。有关病毒分类的论文及信息在 ICTV 的官方期刊“Archives of Virology”发表。1990 年以前“Intervirology”是其官方期刊。

迄今为止, ICTV 共出版 7 次分类报告, 第 6 次报告由动物病毒学家 Murphy 主编, 载有病毒形态及基因组结构的大量插图, 反映了病毒分类已趋于完善。对第 6 次报告的内容稍作调整后, 2000 年出版了第 7 次分类报告。第 1、2 及 4 次分类报告由廖延雄教授主译出版了中文本, 确定许多病毒的汉语名称, 有关术语沿用至今。

1996 年, 国际病毒分类委员会(ICTV)在第 10 届国际病毒大会上提出了 38 条病毒的命名规则, 主要内容是: 病毒分类系统仍采用目(order)、科(family)、属(genus)、种(species)的分类等级, 在未设立目的情况下, 科为最高的病毒分类等级。病毒“种”构成一个复制系, 占据特定的生态环境并具有多原则分类特征(包括基因组、毒粒结构、理化特性和血清学性质等)的病毒。病毒种的命名应用少而有实意的词组成。种名与病毒株名一起应有明确含义, 不涉及属或科名。已经广泛使用的数字、字母及其组合可以作为种名的形容词, 但新提出的数字、字母及其组合不再被接受。病毒“属”是一群具有某些共同特征的种, 承认一个新属必须同时承认一个代表种。病毒“科”是一群具有某些共同特征的属, 承认一个新科必须同时承认一个代表属。科与属之间可设或不设亚科。病毒目是一群具有某些共同特征的科。病毒命名与细菌不同, 不再采用拉丁文双名法, 而是采用英文或英语化的拉丁文, 只用单名, 也不用斜体书写。但是目、科、亚科、属分别用拉丁文后缀“-virales”(类病毒的为 viroid)、“-viridae”(类病毒的为 viroidae)、“-virinae”及“-virus”。

病毒分类根据形态与结构、核酸与多肽、复制以及对理化因素的稳定性等诸多方面。随着分子生物学技术的发展, 至 1998 年 4 月, 已完成包括 76 种人类病毒在内的 572 株病毒的基因组全序列测定, 病毒基因组的特征对分类愈来愈显得重要。例如动脉炎病毒属原为披膜病毒科的一个属, 现已独立为动脉炎病毒科(Arteriviridae), 因其具有套式系列 mRNA, 与披膜病毒全然不同, 尽管形态有相似之处。

二、分类的现状

根据 ICTV 的分类报告, 目前可把所有已知病毒分为 233 个属。其中 204 个属归于 64 个科, 脊椎动物病毒为主的有 27 科, 无脊椎动物为主的有 5 科, 其余分别为植物病毒、细菌、病毒(噬菌体)、真菌病毒, 藻类和霉形体病毒。科下设属, 有的科还分亚科, 科和属是病毒分类的最主要单位。

从第 6 次分类报告开始, 把病毒分为 3 大类: DNA 病毒类、DNA 反转录与 RNA 反转录病毒类、RNA 病毒类。根据病毒进化的系统发生学的关系, 第 7 次分类报告在部分科之上建立了 3 个目, 其中 1 个尾病毒目(Caudovirales)涉及噬菌体, 2 个涉及动物病毒, 分别是单负股病毒目“Mononegavirales”以及套式病毒目“Nidovirales”。

病毒的种是一个不确定的分类单位。1990 年 ICTV 将其定义为具有一定世代关系并占据一定生境(niche)的病毒群。也就是在具有科和属的特征的前提下, 把某些次要特征大致但不完全相同的病毒归为同一种病毒。该定义既符合病毒的易变性, 又符合病毒学者的工作传统。

尚有某些病毒由于掌握的资料所限, 分类地位不能确定, 在分类报告中暂列入未分类的病毒, 如棕榈独角仙病毒(Oryctes rhinoceros virus, OrV)等, 1982 年以前列在杆状病毒科之下, 但因其不产生包埋体, 因此划为未分类的病毒, OrV 与引致养殖对虾暴发性死亡的对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)在分类地位上相近。有的病毒原先作为未分类的病毒, 现在则有了归属, 例如马的波纳病病毒, 现已单列为波纳病毒科(Bornaviridae)。

亚病毒(Subvirus)是比病毒结构更为简单的微生物，其分类及有关介绍一般均附于病毒学之内。最重要的亚病毒有类病毒(Viroid)及朊病毒(Prion)，前者只含核酸不含蛋白质，仅感染植物；后者只有传染性蛋白质无核酸，对动物和人有致病性。

思考题

- 1.什么是细菌分类，地位如何？
- 2.简述种、属、变种、型、菌株的概念？
- 3.举例说明细菌的拉丁文名的命名规则及中文译名特点。
- 4.细菌命名原则及依据是什么？
- 5.细菌分类依据有哪些？
- 6 病毒的分类标准是什么？
- 7.简述病毒的命名原则。
- 8.简述病毒分类的机构和标准。

第十一章 水生微生物学

地球上所有生命活动的部分称为生物圈。生物圈是地球表面全部生物与其环境相互作用的统一体。作为生物界的一部分，微生物与环境的关系极为密切。水生微生物学就是研究水生微生物与水体环境的相互关系的科学。生物圈中含有大量由微生物发挥着重要作用的生态系统，海洋、河流、泉流、湖泊、池塘是典型的水生生态系统。

生态系统是生物群落和生境的总和。地球上生命世界的存在，主要取决于生态系统中的能量流动(energy flow)和物质循环(biogeochemical cycle)，二者影响到生物有机体的活动和生态系统结构的复杂性。微生物在水生态系统中的分布情况都有一定的规律，而且其分布、生长都受环境因子的影响。因此，研究水生微生物的生态，具有重大的理论和实践意义。

第一节 水体中微生物的分布

虽然在几乎所有水体中都有细菌和真菌等微生物发生，但是关于数量和种类的分布却存在很大差异。不同水体中微生物的种类和数量可能没有确切的对应关系。微生物是特定生物群落的组分，其成分和大小依次取决于各种理化条件。异养细菌和真菌仅在含有一定程度的有机质的水中发育，以有机质作为营养，而且微生物之间及与其他生物(无色素藻类、原生动物和后生动物)之间还竞争营养物质。就其本身而言，异养微生物是原生动物和滤食性动物的重要食物。虽然营养因子最关键，但是与生物环境相关联的其他因子的影响也很大。例如，有利或抑制物的生产造成 pH 改变，以及氧气缺乏等。水体中诸如光、温度、压力、化学反应等理化因子也很重要。水体中微生物的分布总是所有生物和非生物因子相互作用的结果。既然如此，它总是处于不断的变化之中。然而，在通常情况下，支配作用一定归因于一种因子或一小部分因子。这些可能随水的类型不同而不同。因此，在河流、湖泊和海洋中微生物的分布具有特征性差异。

细菌和动孢子借助于鞭毛运动而传播的程度，受其自身规格小而导致的相对空间变小的限制。由于鞭毛菌稍大，其细胞能获得较高的速度。弧菌能在短时间内达到 12mm/min 以上的速度，这一距离相当于弧菌体长的 3 000 倍左右。然而，在大面积水域中微生物自身的运动不是影响其分布的显著因素。包括水中自由发生细菌的下沉速度，该速度为 0.5~3.2mm/d。微生物之所以能迅速分布的另一个原因是水流。水流能引起腐屑和浮游植物的沉积作用，也能使动物扩播于数米乃至几千米之遥。

总之，水体中微生物的分布有其规律性，了解其特点，可便于更好地利用水资源和水生生物资源。

在江河湖海等各种淡水与咸水水域中都生存着相应的微生物。由于不同水域中的有机物和无机物的种类和含量、光照强度、温度、pH、碱度、渗透压、含氧量和有毒物质的含量等差异很大，因而使各种水域中微生物种类和数量呈现明显的差异。水生微生物的区系可分为以下几类：

(1)清水型水生微生物：在洁净的湖泊和水库蓄水中，因有机物含量低，故微生物数量很少(10~1000 个 / ml)。典型的清水型微生物以化能自养微生物和光能自养微生物为主，如硫细菌、铁细菌和衣细菌等，以及含有光合色素的蓝细菌、绿硫细菌和紫细菌等。也有部分腐生性细菌，如 *Chromobacterium*(色杆菌属)、*Achromobacter*(无色杆菌属)和 *Micrococcus*(微球菌属)的一些种就能在低含量营养物的清水中生长。霉菌中也有一些水生

性种类，例如 *Saprolegnia*(水霉属)和 *Achlye*(绵霉属)的一些种可生长于腐烂的有机残体上。单细胞和丝状的藻类以及一些原生动物常在水面生长，它们的数量一般不大。

根据微生物尤其细菌对周围水生环境中营养物质浓度的要求，可把微生物分成3类：

①贫营养细菌(oligotrophic bacteria)：指一些能在 $1\sim 15\text{mgC/L}$ 的低含量有机质培养基中生长的细菌；②兼性贫营养细菌：指一些在富营养培养基中经反复培养后也能适应并生长的贫营养细菌；③富营养细菌：指一些能生长在营养物质浓度很高(10gC/L)的培养基中的细菌，它们在贫营养培养基中反复培养后即行死亡。由于淡水中溶解态和悬浮态有机物碳的含量一般在 $1\sim 26\text{mgC/L}$ 间，故清水型的腐生微生物，很多都是一些贫营养细菌。某水样中贫营养细菌与总菌数(包括贫营养和富营养菌)的百分比，称为贫营养指数或OI值(oligotrophic index)。

(2)腐败型水生微生物：上述清水型的微生物可认为是水体环境中“土生土长”的土居微生物或土著种(native species)。流经城市的河水、港口附近的海水、滞留的池水以及下水道的沟水中，由于流入了大量的人畜排泄物、生活污水和工业废水等，因此有机物的含量大增，同时也夹入了大量外来的腐生细菌，使腐败型水生微生物尤其是细菌和原生动物大量繁殖，每毫升污水的微生物含量可达到 $10^7\sim 10^8$ 个。其中数量最多的是无芽孢革兰氏阴性细菌，如变形杆菌属、*E. coli*、*Enterobacter*(产气肠杆菌)和 *Alcaligenes*(产碱杆菌属)等，还有各种芽孢杆菌属、*Vibrio*(弧菌属)和 *Spirillum*(螺菌属)等的一些种，原生动物有纤毛虫类、鞭毛虫类和根足虫类。这些微生物在污水环境中大量繁殖，逐渐把水中的有机物分解成简单的无机物，同时它们的数量随之减少，污水也就逐步净化变清。还有一类是随着人畜排泄物或病体污物而进入水体的动植物致病菌，通常因水体环境中的营养等条件不能满足其生长繁殖的要求，加上周围其他微生物的竞争和拮抗关系，一般难以长期生存。但由于水体的流动，也会造成病原菌的传播甚至疾病的流行。

一、内陆水体中微生物的分布

内陆水体的自然环境多靠近陆地。内陆水体大多是淡水，淡水中的微生物主要来源于土壤、空气、污水、人和动植物排泄物以及动植物尸体等。特别是土壤中的微生物，常随土壤被雨水冲刷进入江河湖泊。因此，土壤中所有细菌、放线菌和真菌的大部分，在内陆水体中几乎都能找到。然而，水体中的微生物种类和数量，一般要比土壤中的少得多。

微生物在淡水中的分布常受许多环境因子影响，其中最重要的一个因子是营养物质，此外还有温度、溶解氧等。一般的规律是，水体内有机质的含量高，则微生物的数量大；中温水体内的微生物数量比低温水体内的多；深水层内的好氧微生物较少，厌氧微生物较多，而表层水恰好与之相反，好氧微生物多于厌氧微生物。内陆水体中微生物的种类和数量，常随水体类型的不同而异。

(一) 河流和泉水中微生物的分布

1. 河流 河流中微生物的种类和生物量变化很大。细菌总数约从每毫升几百个到每毫升几千万至几亿个。受污染河流一般腐生菌较多，常见的细菌有变形杆菌、大肠杆菌、粪链球菌和生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)等各种芽孢杆菌。此外，还有弧菌和螺菌等。真菌以水生藻状菌为主，另外还有相当大数量的酵母菌。

在流动的水体中，水的上层只有单细胞藻类和细菌生长。在水流缓慢的浅水处，常有丝状藻类和丝状细菌和真菌生长。由于藻类可以积累有机质，形成有机质丰富的微环境，因而腐生菌和原生动物也随之大量繁殖。

河流中细菌种类和数量受枯水期和丰水期的影响，一般丰水期多于枯水期，这是因为丰水期毒物得以稀释之故。生长在石面上的细菌在山溪中所起的作用要大于水中自由发生的细菌。在石面藻类的软泥中经常发现有石面细菌，显然它们能广泛摄取光合作用的产物。有时，河流的清洁断面的细菌总数大于污染断面，这是该河段受毒物污染所致。

河流中微生物的数量和生物量随季节不同而变化。稍受污染的瑞典北部的翁厄兰河细菌总数和细菌生物量两项指标都显示出明显的夏季高峰。此外，在受污染相对较重的德国北部易北河口湾显示出明显的冬季最大值和夏季相对较低值。这种周年规律可被极端的水文状况，特别是被丰水期和枯水期所破坏。若考虑污水量，即使在这种情况下，仍能检测到细菌含量的季节变动。特别是对较小型河流而言，不规则的负载(如大雨冲刷土壤和森林落叶入河)或污水的暂时流入都破坏着这种周年变化规律。细菌的生物量对河流的生物学具有重要意义。在温带的冬季，若浮游植物量急降，细菌含量增大，以此为食的原生动物(纤毛虫和鞭毛虫)量亦增大。

河流中的腐生菌数一般每毫升水含有几百至数万个。同样，受污染河段腐生菌数大于清洁河段；远离污染河段的下游腐生数逐渐减少，这是河流的自净作用的结果。另一方面，在污水负载较小的河流中，一般不会出现冬季细菌数最大而夏季细菌数最小的季节性变动。细菌总数和腐生菌数更多地依赖于河流本身产生的营养物质，特别是浮游植物产生的营养物质。因此，与清洁湖泊一样，受污染河流细菌数量的最大值不会发生于冬季，而在春、秋或夏初季节时有发生；即发生在最大生产量时期。在热带河流，光照和温度适宜，全年内生产量亦无明显波动；因此，不会出现细菌数量上的季节变动。在游离水中只发现一部分细菌种群；其余的细菌在固体物质表面生活繁衍，通常生活在漂浮颗粒上。细菌一般栖于较老的浮游植物种群，而不是年轻的种群，浮游动物体内和体表细菌分布较多。高等动物体内也有细菌的分布，随着高等动物逆水流方向的运动细菌能被带到上游河段。

迄今为止，关于河水中真菌的数量和分布所知甚少。易北河各河段酵母菌的数量年平均值为 38~111 个 / ml，夏季平均值为 16~42 个 / ml，冬季平均值为 46~70 个 / ml。有污水流入的河流区域，酵母菌的数量通常相当大。易北河断面内的最高值总是固定地出现于大汉堡河区，因为该处位于城市附近，污水排放较多。而在清洁河流，很难检测到酵母菌。

河水含有丰富的真菌的孢子，特别是在有污水流入的区域数量众多。不过，它们大多来自于陆地。在未受污染的瑞典北部河流中，丝孢菌的分生孢子数在一年过程中变化于 100~1 100 个 / L 之间，最高值出现于 3 月和 10 月，最低值出现于 7 月和 12 月；而细菌总数呈现出明显的夏季最大值。低等真菌的种类组成和数量随有机质含量不同而异。在容纳污水河段，一些污水真菌可大量繁殖，发育成大型菌丝体漂浮物。

2. 泉水 在泉水中仅有少量细菌，这是因为泉水中营养物质来源缺乏的缘故。每毫升泉水中细菌总数在几千到数十万个之间，而腐生菌数一般在十到几百个之间。由于营养物质含量低，所以较小型球菌和短杆菌经常占优势。大多数情况下，经荧光染色后用光学显微镜只能检出这些小型细菌。

在大多数泉水，尤其是在泉盆的边缘，有蓝细菌的存在。它们可在水底和边缘形成很厚的覆盖膜。其种类组成既取决于温度，又取决于矿物质组成。

在温度超过 50℃ 的温泉中，除了蓝细菌之外，一般仅有细菌生长。因此，温泉是一种原核生物单独栖息的环境。有些温泉中还含有酵母菌。由于泉水中营养缺乏，所以泉水中

酵母菌很少，几乎都属于隐球酵母属(*Cryptococcus*)。80℃温泉中也有酵母菌存在，主要是栖息于沉积物中，如假丝酵母属(*Candida*)、红酵母属(*Rhodotorula*)和隐球酵母属，这些属的菌株较多。

(二)湖泊、水库中微生物的分布

天然湖泊中，细菌总数范围为每毫升几十至几百万个。一般在清洁湖泊和水库中，有机物含量少，微生物也少，每毫升水中含有几十至几百个细菌，并以自养细菌为主，常见的种类有硫细菌、铁细菌和含有光合色素的绿细菌、紫细菌以及蓝细菌。此外，还有五色杆菌属、色杆菌属等腐生菌。在有机物较丰富的湖泊中，微生物较多。不同深度的水体中，微生物的种类有所不同。上层水中(从水面到水面下 10m 处)氧含量高，主要有假单胞菌属、柄杆菌属、噬纤维菌属和浮游球衣菌(*Sphaerotilis natans*)等好氧细菌、真菌和藻类；在中层水中(水深 20~30m)，主要有着色菌属(*Chromatium*)和绿菌属(*Chlorobium*)等光合细菌；在底层水中(30m 以下及湖底泥)，主要有脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)和甲烷球菌(*Methanococcus*)等厌氧细菌、原生动物和一些鞘细菌。在富营养型水库中，细菌总数特别高。

与细菌总数相比，腐生菌的含量较低，在富营养湖中为每毫升几百至几十万个，而在贫营养型湖泊中此数经常低于 100 个。例如，武昌东湖的腐生菌数为 232~927 个 / ml，而贫营养的贝加尔湖中仅为 7 个 / ml。中营养型湖泊中腐生菌数居于二者之间，如科罗曼湖为 31 个 / ml。湖泊中细菌总数和腐生菌数存在着季节变化。在清洁湖泊中，春季、秋初或夏末时，浮游植物产生的营养物质最多，因而细菌数最高。受污水污染的湖泊腐生菌数通常在冬季显著增大。武昌东湖水中腐生菌数，每年在春秋两季出现两个高峰；少数情况下，夏季比秋季多，一般总是春季数量最大，冬季最少，一年四季中腐生菌数量的顺序是春>秋>夏>冬。

新建成的水库中的细菌数量，起初几年明显增加，尔后则随即下降。

一些突发的自然事件对湖泊的微生物学状况具有强烈影响。如火山爆发地区的湖泊，火山爆发后，湖水中的细菌总数和腐生菌数均以成倍数量级速率增大，由于接纳了来自被破坏森林的有机质，原是贫营养型湖泊会短时期内转变为富营养型湖泊。

温带湖泊中细菌的垂直分布也呈现出很大的季节变动。在夏秋分层期间，水中特有的热分层和化学分层一旦形成，紧接着就是藻类和细菌种群的分层发育。不但这些成层带中细菌总数极其不同，而且其种类组成也各异。特别引人注意的是富营养湖中带的区分，在湖下层，氧气完全消失，且有硫化氢产生。

在温跃层存在异养细菌的一个数量高峰，水底层异养细菌数量呈现第二个高峰。不过，它们由不同的细菌种群组成，在第一个高峰中，优势种为蛋白水解菌，在第二个高峰中，优势种则为甲烷产生菌和硫酸盐还原菌。温跃层仍然有光照，但往往含有 H_2S 。紧贴在温跃层下方，有数目众多的光能自养菌(主要是绿菌科)，而在无光层，无色素的硫细菌占优势。在湖泊的较深水层中，只要有氧存在，就有很多甲烷氧化菌，它们可消耗大量的氧。由于厌氧带向上延伸，甲烷氧化菌升至较高的水层。

根据 Gorlenko(1977)的资料，在富营养的盐湖中，光能自养菌的含量远远高于贫营养的淡水湖。Oren(1983)发现死海的 10~25m 深处有大量嗜盐菌属(*Halobacterium*)的原始细菌(极端嗜盐菌)生长繁殖，夏天时其数量达 1.9×10^8 个 / ml，且造成该水体呈红色。在秋季，菌数下降，并稳定在 5×10^6 个 / ml 的水平。

湖水中的微生物还存在水平分布，与陆地相邻的水域，由于受地表径流以及人为因素的影响，有机物质含量丰富，有利于腐生菌的生长繁殖，微生物的数量较湖心水域多。

在没有明显温跃层的湖泊中，藻类繁殖旺盛的湖区，细菌含量也较高，湖底层有大量细菌生长繁殖。秋季和春季循环期，湖水涡动，造成细菌广泛分布。此时，可利用增氧，使厌氧硫细菌锐减。在较大的湖泊中，纵横剖面都呈现出细菌数量上的很大变动。流入湖泊中的溪流和河流水在一定程度上也影响细菌数量，不过，离岸越远，这种影响越小。大雨过后，细菌数量和真菌的孢子数急剧增加，尤其是小型湖泊，但这只是暂时现象。在无风的天气，水的表面薄膜内繁殖着特有的漂浮微生物群。除了一些藻类之外，这一群落主要由细菌组成。

蓝细菌广泛分布于内陆湖泊中。在贫营养湖中，蓝细菌在浮游植物中所占的比例一般很小，但随着富营养化的加剧，其数量增多。在富营养湖中，夏季经常发生蓝藻水华，并使水呈现明显的淡绿色。它们通常先聚集在水体的1~2m的表层，然后扩散于整个湖水上层。在有机质丰富的湖泊和池塘中，蓝细菌常大量繁殖。富营养化的加剧也导致蓝细菌种群的变化，如富营养化导致血红颤藻(*O. rubescens*)的大量发生。在这一过程中，所有其他浮游植物种类几乎都能发生。在过去几十年间，由于很多水体都发生了严重的富营养化，世界各地的湖泊中蓝藻水华出现得越来越普遍。蓝细菌的种群经常存在显著的变动，因为水华几乎以与其形成一样快的速度被破碎和分解。因此，蓝细菌起着重要作用。

关于低等真菌在湖泊中的分布，英国和波兰做过一些湖泊的研究。在温德米尔湖(Lake windermere)边缘的表层水中的孢子数远远大于湖心孢子数。当大雨过后水位升高时，湖的沿岸水域中的孢子数也迅速增多。最常见的是水霉属(*Saprolegnia*)，其次是绵菌属(*Achyla*)和丝囊霉属(*Aphanomyces*)，网囊霉属(*Dictyuchus*)和细囊霉属(*Leptolegnia*)比较少见。波兰北部，严重污染的水体中酵母菌数是轻度污染水体的几十倍，并且酵母菌主要分布于富营养型湖泊中(Niewolak, 1977)。

(三)池塘及其他水体中微生物的分布

池塘中细菌、真菌等微生物的种类和数量一般与富营养型湖泊相近。池塘受人为因素影响很大。养鱼池施肥和投饵可以大幅度提高细菌种类、生物量和生产量。据报道，未施肥的鱼池以杆菌为主，形态单调，另外还有部分球菌和少量的固氮细菌、铁细菌等，在施肥鱼池杆菌数量激增，形态多样化，球菌和杆菌的种类、数量都增多。一般来说，未施肥鱼池细菌总数为 $(2\sim6)\times10^5$ 个/ml，生物量为2~6mg/L；施肥鱼池细菌数达到 $(5\sim20)\times10^5$ 个/ml，生物量达到5~25mg/L。无锡地区池塘细菌总数在 $(73\sim235)\times10^4$ 个/ml之间，以施鸡粪的池塘为最高，施猪粪的池塘与之相近，而施牛粪的池塘和未施肥的对照池则低得多(郭贤桢, 1984)。在组成上球菌占多数，杆菌和丝状菌则依次占少数。鱼的生命活动加快了水中的物质循环，因此养鱼可促进细菌的繁殖，如鲤的放养密度与腐生菌数呈正相关。

鱼池投饵对细菌种类组成的影响很大。饵料不能被鱼类完全利用，残饵则起到鱼池施肥的作用。饵料在投入后10~20d内能被降解(Sugita, 1989)，在降解的最初阶段，弧菌科、肠杆菌科和假单胞菌属细菌迅速增加。在第二阶段，梭菌属(*Clostridium*)细菌也成为优势种类。但当所有的饵料被分解和消耗殆尽后，除假单胞菌属以外的其他细菌，大都被不动杆菌属(*Acinetobacter*)和摩拉克氏菌属(*Moraxella*)细菌所代替。由此可见，养鱼池中有机物降解期间，细菌相互间的连续更替存在一定的方向性。

在富营养水体中细菌繁殖极快，其世代时间仅为 1.8~57.5h，日 P / B 值在 0.22~0.65 之间，能够补偿被摄食的损耗。因而，捕食者的存在反而对其数量起了调节作用。如鲢、鳙等滤食性鱼类的存在，可以起到调节细菌数量和改善水质的作用。仅放养草鱼和鲤的鱼池，细菌数量波动剧烈；而放养鲢的鱼池，细菌数量长期稳定在 $(18\sim25)\times 10^5$ 个 / ml 之间。池塘细菌总数可高达每毫升几亿个。

池塘中还含有大量的蓝细菌，我国养鱼池中有一大类是以蓝细菌占优势的池塘，称为蓝藻塘。池塘中最常见的蓝细菌隶属于颤藻属、蓝纤维藻属、鱼腥藻属、微囊藻属、席藻属等。除蓝细菌外，池塘中还分布有真菌和原生动物等其他微生物。

池塘中的微生物存在季节变动以及水平分布和垂直分布。鱼池浮游细菌生物量高峰出现于秋季，冬季最低。鱼池浮游细菌生物量变化的季节顺序是秋>夏>春>冬。在有风天气，浮游细菌的水平分布明显，一般沿岸涨水处细菌增多，而上风处和沿岸消水处则相对较少。浮游细菌的垂直分布受季节影响，因为不同季节水温和浮游植物生物量不同，浮游细菌的分布逐渐由底层上升到表层，总的趋势是，春季底层多，夏季底层、中层多，秋季中层、表层多。

雨水中微生物较少，主要是空气中尘埃所带入的细菌、放线菌孢子和一些霉菌孢子。

地下水因为经过深厚的土层过滤，几乎大部分微生物被阻留在土壤中。同时，深层土壤中又缺乏可以利用的有机物。因此，地下水中所含微生物的数量和种类都较少，常见的种类有五色杆菌属和黄杆菌属(*Flavobacterium*)。在含有大量铁离子的矿泉中，仅有嘉利翁氏菌属(*Gallionella*)和纤发菌属(*Leptothrix*)中的种类生长。

二、海洋水体中微生物的分布

海水与淡水最大的差别在于其中的含盐量。含盐量越高，则渗透压越大，反之则越小。因此，海洋微生物与淡水中的微生物在耐渗透压能力方面有很大的差别。此外，在深海中的微生物还能耐很高的静水压。尽管海水中有有机质的含量低，盐度较高，温度亦较低，而且在深海处有很高的静水压等造成的特殊水环境，使在其中生长繁殖的微生物受到一定限制。但因海洋中有丰富的动植物资源，从海面到海底，从近陆到远洋都有微生物存在。同时，海水体积大，占地球上总水量的 99% 左右。因此，海水内微生物的种类和数量都较多，远远超过陆地微生物的总量。

海水中常见的细菌主要有假单胞菌属、枝动菌属(*Mycoplana*)、弧菌属、螺菌属、梭菌属、变形菌属、硫细菌、硝化细菌和蓝细菌的一些种类。常见的酵母菌有色串孢属(*Torula*)和酵母菌属。此外，还有噬菌体、霉菌、藻类和原生动物等。一般霉菌比细菌少，主要是陆地中常见的种类。海洋中藻类繁多，原生动物数量极大。

由于大部分开阔海区缺乏营养物质，因此这里的细菌区系中常以极小型细菌占优势。因此，进行细菌总数的测定很困难。只有采用荧光显微镜法，才可能得到可靠的菌值。

一般来说，表面区细菌总数最高，随着水的深度增大，细菌总数减少。西比斯卡亚的垂直剖面就是一例。此处的细菌总数从表面区的 804 300 个 / ml 降至 1 000m 水深处的 100 900 个 / ml，细菌生物量表现出类似变化，从 14.21 μ g / L 降至 0.73 μ g / L。然而，在 500~1 000m 深处，细菌总数和细菌生物量偶尔也有再增加的情况，但增加的量相对很小。

不同的海水水体，其细菌含量不同。即使是同一水体，细菌的含量也存在明显的水平分布和垂直分布。在太平洋东南部的南极水域，细菌总数为 10 万~100 万 / ml。在深海细菌的含量一般较低，细菌总数通常可能低于 10 万 / ml。然而，在太平洋加拉帕戈斯群

岛附近的热火山口区,测得的细菌总数高达每毫升五百万至十亿个,其中主要的是化能自养的硫细菌,此外还有铁氧化菌、锰氧化菌和异养细菌。这些细菌都是火山口边缘大批贻贝、大型蠕虫和其他动物的营养来源。在北海和波罗的海,细菌总数一般在每毫升几十万到几百万之间。

腐生菌的水平分布和季节变化较大。一般来说,沿岸水域的腐生菌数总是高于开阔海区,并且随着离岸距离增大而迅速减少。除了严重污染的海港和海湾之外,在分解带通常也存在腐生菌高峰,因为此处有大量有机物质被分解。在北海和波罗的海,在分解带测得的腐生菌数每毫升在一万至几十万之间;在其相连区域,腐生菌数每毫升在一千至几万个之间,而在离沿岸稍远距离处(几海里)则只有一百至几千。在大洋中腐生菌数较少,每毫升水中少于1~100个。

微生物的垂直分布,在生产性真光带中分布有大量细菌。这些细菌不是在水表层(忽略漂浮生物),而是在10~50m深处。并且,细菌数量高峰通常略低于浮游植物数量高峰。在200m以下深度,细菌数减少,1000m深度下,腐生菌数几乎无变化。但是,在海底之上区域它们又立即增加。在垂直剖面上,腐生菌数与微生物总数密切相关,但是腐生菌所占的比例很小,仅占总菌数的1/1000。

微生物的垂直分布因海区不同而有所差异。微生物在逐渐远离海岸情况下的垂直分布,微生物总数的特点是显著成层,在温跃层和较温跃层低些的水层中,微生物的密度比其他水层高得多,微生物的最大密度是在浮游植物数量最大的水层之下,包含其死亡个体和浮游动物。随着远离陆地,在接近温跃层的水层中,由于外海中动植物的普遍减少,微生物的密度也相应减小,但是在这些水层中,微生物的密度仍然比氧气带的深层高得多。在温跃层和盐度急剧变化的水层,细菌数量较多,不同密度水团之间阻碍细菌和腐屑的沉积作用,而使细菌在此处积累,这同样会使营养条件趋于适宜,因此细菌在此处繁殖旺盛。在较浅的沿岸水域,分层常被强风所破坏,然后高速湍流造成相对单调的细菌垂直分布。当风平浪静时,原来的分层逐渐恢复起来;狂风偶尔会搅起沉积物,造成水中细菌含量暂时大量升高。潮汐在很大程度上影响着细菌的分布。在靠近库克斯港的易北河口和布龙斯比特尔的研究中表明,因为很强的潮流,细菌、浮游生物和腐屑的分布从表面到海底都相对地单一化。当潮流减弱时,特别是在低潮时,表层水中微生物数量沉积作用而减少,深水层中却显著增多;随着潮流的继续增强,细菌被搅起,湍流使细菌数量在整个水柱中均匀分布。海湾和海峡水中细菌含量受海流的影响也很大,这是风作用的缘故。在陆封海中尤为如此,因为此处潮汐的作用意义不大。

在基尔海峡和弗伦斯堡海峡中,水中细菌含量在短期内可以以10倍甚至100倍的幅度变化,这主要取决于气候条件。在平静天气,腐生菌数迅速上升,海峡中心尤为如此,这是污染加剧之故,而在有风暴的天气,微生物贫乏的波罗的海海水流入该海峡,导致腐生菌数大大降低。

在温带,海洋中细菌数存在季节变动。因此,西波罗的海的腐生菌数具有两个高峰,一个在春季(4~5月),另一个在秋季(10~11月)。然而,只有在浮游植物生产量高峰之后,且其大部分死亡时,才出现腐生菌数的高峰。在严重污染的海湾和海港,由于水的交换量很小,可观察到冬季高峰明显减小。

腐生菌数较微生物总数的变动大。例如,从相对营养丰富的基尔海峡到较清洁的基尔湾中部,微生物总数减少1/2,而腐生菌数则减少到1/50。在自净试验中,加入少量的

营养物质，微生物区系中腐生菌比例明显升高，尔后又较迅速地下降。

轮廓清楚的漂浮细菌也能在海洋中发育，在 150 μm 的表水层偶尔会发现很高的腐生菌数，泡沫溅向空气的水滴常含有大量细菌而落下。瑞典西海岸表层水脂肪膜中的腐生菌数为 $(7.4\sim 13)\times 10^3$ 个 / ml，该值比深水中的大 2~4 个数量级。

在蓝细菌中，聚球藻型的小型单细胞蓝藻分布广泛。其细胞呈棒状，大小为 0.6、0.8 μm $\times$ 0.9~1.5 μm ，具有橙黄色荧光而易于与细菌相区别，且能分别计数。海洋中真菌的分布也很广泛。在北海和东北大西洋中藻状菌类高达 2000 个 / ml，近岸的密度高于开阔海区 (1~12 个 / L)。海洋酵母菌大多数是来源于陆地的兼性海洋种类。因此，在有污水流入的沿岸海区酵母菌数量相对较高，随着纵深发展而迅速减少。开阔海区仍有一些耐盐酵母菌。沿岸水域每升水含有数千个酵母菌细胞，在严重污染的海区可能更高。

三、沉积物中微生物的分布

(一) 内陆水体沉积物中微生物的分布

湖泥表层有机营养物质含量高，因此栖息了大量的微生物。湖泥中异养菌数量大大超过湖水中的数量。

沿岸带沉积物中的微生物状况一般不同于深底带。沿岸带沉积物中腐生菌数大大超过深底带。但有时深底带表层沉积物间质水中的蛋白质、碳水化合物和氨基酸含量较高，使其细菌总数和微生物活性高于沿岸带。

每克湿泥中的腐生菌数一般为几万至几十万个，但在污染水体通常能达数百万个。而在有污水流入水域，湖泥中腐生菌数更高。在几厘米深处，底泥细菌含量随有机物含量减小而下降，随着深度的增加腐生菌数比细菌总数下降得快。在 1m 深处的细菌数只不过是表层沉积物的一小部分，兼性厌氧菌和厌氧菌各半。

在大多数湖泊沉积物中，除了真细菌外还含有放线菌和真菌，二者的数量也随底泥深度增加而减少。真菌区系主要由藻状菌类和半知菌类构成，在近岸浅水区底泥中特别丰富。真菌在底泥中及其表面上生长。沉水叶和桠枝上经常附着藻状菌类的特征菌丛。

湖泊沉积物中的不同菌群存在季节变动，几乎都呈现冬季最小值。在 6~7 月甲烷产生菌具有明显的数量高峰，而硫酸盐还原菌数量高峰则出现于 7 月。根据 Suzuki(1961)的材料，在日本的霞浦湖底泥真菌呈现夏季高峰，而冬季出现低谷，这与氧的含量相关。Pythium 终年出现，在冬季出现高峰。Achlya flagellata、A. racemosa、Dictyuchus sp.、Aphanomyces sp. 和水霉仅出现于循环期和冬季停滞期，这时底层水中仍含有氧。

(二) 海洋沉积物中微生物的分布

海洋沉积物中栖息着细菌和真菌。沉积物颗粒表面吸附有很多微生物，但确定其数量相当困难。此处的微生物对有机物矿化作用特别重要，并且也可能作为海底动物的食物。沉积物表层细菌总数取决于沉积物种类和水深，其含量在每立方厘米几十万至几十亿个之间。在基尔湾中部的砂质沉积物中，12~14m 水深处的细菌总数为 68.2 亿~230 亿个 / cm^3 。其中 49%~64% 生长于沙粒上，36%~51% 在间隙水中自由生活。扫描电镜观察的结果表明，砂粒沟槽处微生物最多，这样可大大避免沙子运动所导致的机械影响，而暴露区域和砂粒边缘则不然。生活于物体表面的细菌在某种程度上具有很有效的吸附机制，例如扁平的细胞、胶鞘和纤毛等，它们能牢固地附着于沉积物基质之上。

海湾泥质沉积物最表层细菌数量和生物量都很大，腐生菌数一般在一千至几百万之间。其中，沿岸浅海水域中的数量最大，越远离海岸其数量越低。粗砂质沉积物细菌较淤

泥细菌要少。沉积物粒径和细菌含量有关。在经常搅动的砂质中有机质不能积累，因此腐生菌数特别低。随着水深增大，沉积物中腐生菌和低等真菌的数量减少。因为有机质在向海底沉降的过程中因时间较长已被分解，导致底部营养状况不良。在几厘米厚的沉积物表层，细菌和真菌数量总是最高，且大多数集中于其表面。在沉积物表面下 10cm 处，细菌数量已降至沉积物表面的百分之几；在 100cm 以下至数米处细菌总数和腐生菌数趋于恒定。尽管富含营养的沉积物中具有相当高的细菌数量，但是它在总生物量中的比例通常相对较小。海洋沉积物中还含有一定量的放线菌，低等真菌和酵母菌，其分布规律与细菌相似。

四、水生生物体上微生物的分布

在正常情况下，生活于水中的动植物组织内部是无菌的，但在其体表和消化道内部定居着各种类型的微生物，其组成和数量常因所生活的环境而有所差异。它们与宿主的关系较为多样化，有些和陆地动物的正常菌群一样比较恒定，有些则是暂时性停留。在正常情况下，它们与宿主共生，从宿主食物或代谢产物中获取养料的同时，也能帮助宿主降解某些有机物质，或分泌维生素等供宿主利用。在某些异常情况下，如饲养管理不善、环境条件改变、鱼体抵抗力下降等，一些微生物可引起鱼的病害(鱼类多数病原菌都属于这种条件致病性微生物)。部分水生动物体表和消化道的细菌可引起水产品的腐败或人的食物中毒。因此，对水生动物正常微生物群的研究，在水生动物疾病的预防、水生动物的营养生理和饲养管理以及水产品的卫生学上均具有重要意义。

(一)水生动物体表微生物的分布

鱼类和水生无脊椎动物等水生动物都可作为微生物的自然基底，但能产生抗生物活性物质的其他动物体表没有微生物栖息。

硬骨鱼类的体表常有细菌附着。对生活在太平洋的 19 种脊椎动物和 14 种无脊椎动物体表微生物的调查中发现，其体表主要附着革兰氏阴性无芽孢杆菌，在所有动物体表面上，假单胞菌属和节杆菌属的种类数量最多。与同一海区的脊椎动物相比，固着于无脊椎动物体表上的微球菌属和黄细菌属的比例稍大一些。太平洋热带区动物体表上的微球菌和肠细菌数比北太平洋动物的大，其生理生化特性亦有差异。在热带嗜温菌和蛋白分解菌占优势，而在较冷海区则是嗜冷菌和分解碳水化合物化合物的细菌占优势。总之，脊椎动物体上的细菌，其生化活性比无脊椎动物的大。此外，很多鱼体上也有真菌附着。

很多低等动物体表上有细菌和真菌栖息，如淡水桡足类通常携带有很多细菌，其他甲壳动物和蠕虫也存在类似情况。一般来说，这对细菌的传播作用不大。许多海洋细菌，如弧菌能分泌甲壳质分解酶，这类细菌易在甲壳动物体表附着。养殖对虾的细菌性病害主要是弧菌病，可能与弧菌具有甲壳质分解酶，并易于附着在对虾的外壳表面有关，一旦对虾受到外伤或因甲壳质分解酶的作用，弧菌立即侵入到对虾体内而引起疾病。

海洋附着细菌与大型无脊椎动物附着有着密切关系。大多数种类海洋细菌有利于无脊椎动物幼虫的附着，并可作为幼虫的饵料。因此，海洋附着细菌的研究与水产养殖业的发展密切相关。

(二)鱼类消化道中的微生物

陆地哺乳动物消化道内栖居着大量的多种类型的微生物(一般有 100~400 个种群，每克内容物含 10^{11} 个活菌体)，在其营养生理和防御感染方面起着重要作用。鱼类消化道较短，呈直线和发夹状，其结构和机能多未分化。摄饵 10~16h，内容物全部排尽。这些情况不

利于专性厌氧菌的繁殖，其微生物种群组成也易受水环境等因素的影响。但由于鱼类胃肠道的 pH 为 2~5，处于酸性环境，且富含胆汁，对水环境的许多微生物具有抑制作用，因此形成了与体表和水环境不同的微生物群落。

一般淡水鱼类消化道中的微生物以嗜水气单胞菌、A 型拟杆菌、假单胞菌属和肠杆菌科的细菌占优势。此外，还有黄杆菌属、不动杆菌属、莫拉氏菌属、*Coryne forme*、链球菌属、微球菌属和 B 型拟杆菌，每克内容物含 $10^7 \sim 10^8$ 个细菌。其具体组成因鱼种类、发育阶段、饲养条件、温度等而有差异。

海水鱼类消化道菌群则以弧菌属细菌为主，每克肠内容物含 $10^4 \sim 10^7$ 个。其次是假单胞菌属、莫拉氏菌属、不动杆菌属、拟杆菌科的细菌，其含量为 $10^2 \sim 10^6$ 个 / g。此外，还有芽孢杆菌属、黄杆菌属、微球菌属、梭状芽孢杆菌属、*Coryneforme*、葡萄球菌属、着色球菌属的细菌。

降河鱼类和溯河鱼类在迁移期间，其消化道的微生物群落随水环境的改变而变化。降河鱼类在向海水迁移过程中，消化道优势细菌由陆型的气单胞菌逐渐转变为嗜盐性的假单胞菌，最后以嗜盐性的弧菌为主。而溯河鱼类消化道的优势菌群则由嗜盐性的弧菌和假单胞菌逐渐被陆型的假单胞菌和气单胞菌所代替。

鱼类消化道的兼性厌氧菌一般多于专性厌氧菌，但罗非鱼、六带刺蝶鱼等一些热带淡水鱼消化道的厌氧菌总数高于兼性厌氧菌(TaziSakata 等, 1989)。在兼性厌氧菌中，肠杆菌科细菌常见的是弗氏柠檬酸菌，弧菌属中则以溶藻弧菌、弗氏弧菌和副溶血弧菌较为多见。溶藻弧菌在红鳍东方纯肠道内容物中的含量为 $10^4 \sim 10^6$ 个 / g。高桥(1984)从鲤鱼消化道分离的气单胞菌中，有 50% 对鱼有致病性。

在鱼类消化道的专性厌氧菌，以含新霉素、牛磺胆酸的 NBGT-1 / 3S 培养基分离的 A 型和 B 型拟杆菌对卡那霉素、链霉素、庆大霉素等均具有耐药性。A 型拟杆菌菌体较为短粗，能分解葡萄糖、甘露醇、蔗糖、果糖等。分解葡萄糖时，产生乙酸。对竹桃霉素、红霉素等大环内酯群抗生素不敏感。B 型拟杆菌菌体细长，分解葡萄糖、甘露醇、乳糖、半乳糖。分解葡萄糖时产生乙酸和琥珀酸。对黏菌素、多黏菌素不敏感。在罗非鱼孵化后的第 20 天可检出 A 型拟杆菌。2~4 个月后，A 型拟杆菌成为罗非鱼成鱼消化道的主要菌群。在淡水鱼类初期成长阶段，以兼性厌氧菌为主，由于厌氧菌、兼性厌氧菌的大量繁殖，造成一定的厌氧状态，从而使 A 型拟杆菌得以定居，并逐渐成为淡水鱼类胃肠道的优势菌之一。

梭状芽孢杆菌属的细菌是陆地动物和底栖水生动物消化道常见的厌氧菌。梭状芽孢杆菌的芽孢在沉积物中或湖底层能存活较长时间，随鱼的摄食而进入胃肠道。鱼类消化道中常见的有生孢梭菌、双酶梭菌(*D. bifermentans*)、产气荚膜梭菌和肉毒梭菌等。这些梭菌虽然不是肠道的优势菌种，但能在其中进行正常的生长繁殖。其中有些梭菌能产生毒素，引起鱼、人和其他动物中毒，有的腐败性较强，因此在水产品卫生学上具有重要意义。E 型肉毒梭菌能在低温(3.3℃)下生长，经常从水环境和鱼类分离到，可引起鲑科鱼类(尤其是稚鱼)的肉毒素中毒症。发病鱼平衡失调，游动缓慢，最后死亡。从死亡鱼体的消化道和肉中可检测到肉毒毒素。健康鱼摄食中毒死亡的鱼后，E 型肉毒梭菌进入其消化道繁殖，在 1~25d 后引起发病死亡，如此循环往复。此病一般发生在水温较高的 8~11 月，当水温在 10℃ 以下时发病减缓，5℃ 以下时停止发病。

(三) 虾类消化道中的微生物

由于虾类大部分时间行底栖生活,属杂食性水生动物,因而其肠道菌落与底栖细菌和沉积物中的菌群有关。其中以假单胞菌属和弧菌科的细菌为主,常见的还有不动杆菌属、肠杆菌科、黄杆菌属、噬纤维菌属、莫拉氏菌属和发光杆菌属的细菌。Yasuda(1980)研究了对虾从孵化后的无节幼体到成体的发育过程中,其消化道和饲养用海水菌群的变化。饲养对虾的海水在对虾孵化后第4天,也就是对虾的蚤状幼体期,活菌总数达到高峰,随后急剧减少。而对虾消化道的细菌数变化也与之相同,这可能与对虾在蚤状幼体期捕食细菌,而幼体后期则转为捕食大型微生物有关。蚤状幼体期以弧菌占优势,达到成体期(孵化后, 126d)则转为以假单胞菌为主。天然繁殖对虾消化道的细菌种群与人工饲养的成体对虾相同。发育不良的成体对虾则以气单胞菌居多。

(四)藻体上微生物的分布

细菌和真菌至少可暂时地或较长时间定居在很多动植物体表上,并产生生长的表面层。浮游藻类体上常有细菌生长,但在休斯敦湖东部蓝细菌或硅藻体上很少有细菌生长,而在波罗的海泡沫节球藻和水华束丝藻的螺旋化藻丝上却栖息着大量细菌。首先柄细菌栖息其上,而后形成球菌的小菌落,最后更多样化的种群开始生长,杆菌成为优势类群。长度为75Pm的藻丝上平均生长着45个细菌。自蓝细菌形成水华后,这些表面生长细菌就成比例增加。

各种海藻上附生着特有的霉亮发菌(*Leucothrix rnucor*)。该菌是一种嗜盐种类,其藻丝含有众多细胞,并形成丛生而滑动的生殖胞(gonidia)。在日本海海域,礁膜(*Monostroma nititium*)和缘管浒苔(*Enteromorpha linza*)等绿藻体上的腐生菌数为 $10^4 \sim 10^6$ 个/cm²,圆紫菜(*Porphyra suborbiculata*)等红藻为 $10^3 \sim 10^4$ 个/cm²,而一种褐藻 *Eisenia bicyclis* 则为 $10^1 \sim 10^4$ 个/cm²。绿藻和红藻体上的优势细菌是具有黄、橙色素的黄细菌属和噬纤维菌属的细菌,而褐藻体上的细菌则不然。缘管浒苔的胞外产物能促进这类细菌和假单胞菌的生长,弧菌的生长则受到抑制。

在藻类胶鞘上常发现有大量微生物,微生物以此黏液作为营养。藻胶被上常栖息着真菌。旺盛生长的藻类表面通常没有细菌生长,当形成浮游植物水华时,更找不到有细菌存在。而当藻类种群处于停滞期或下降期时,细菌便成倍增加。类似的情况是,在底栖藻类新藻枝(即顶部)上没有细菌,而在该藻体较老的原植体藻枝上生长有细菌和真菌。离顶部越远微生物数量越大。有时,一些水生植物体上形成的菌膜很厚,以致能被原生动物和轮虫摄食,并成为其主要的饵料。

附生细菌主要是从植物分泌物中吸收营养。旺盛生长藻类(或藻体一部分)表面缺乏细菌的原因一定程度上归咎于该植物释放的抑菌或杀菌物质,藻体表面的酸反应也可排斥细菌。如环境海水pH为8时,藻体表面的pH可下降为5。来自弱碱性环境的细菌一进入酸性环境,就会立即离开藻体表面。

在海水物体表面附着,是海洋细菌的重要生理特性之一。近十几年来,海洋细菌附着机理研究取得了较大进展,端生鞭毛是细菌在水体或液体培养基中生活的运动器官,也是细菌在附着过程中,与物体表面连接的桥梁,即端生鞭毛首先黏附在表面上,侧生鞭毛则是细菌接触表面之后诱导产生的,结果是使菌体牢固地附着。

硅藻能主动地抑制细菌在其表面附着,即硅藻表面没有细菌附着,细菌只附着在硅藻个体之间的间隙内,而多管藻及石莼表面有大量细菌附着。硅藻表面没有细菌附着的机理目前尚不十分清楚。

绿藻与附着细菌有互利关系。绿藻为细菌的生活提供有机营养物质，附着细菌分泌某些物质使绿藻的形态发生得以正常进行。如无菌条件下进行绿藻组织培养时，其形态发生畸形，而当接触到细菌后，又可恢复正常形态。

第二节 环境因素对水生微生物的影响

各种环境因素影响水生微生物的生命特征。环境条件的改变，在一定限度内，可引起微生物群落的组成、大小、生长、繁殖、形态和生理等特征的改变。当环境条件的变化超过一定极限，则会导致微生物死亡。

水体中环境因素可分为物理因素(光照、温度、压力、浑浊度等)、化学因素(pH、盐度、无机质、有机质、溶解气体等)和生物因素(竞争、捕食和寄生等)3 大类。此外，还有人为因素。研究环境因素与水生微生物之间的相互关系，有助于了解水体中微生物的分布与作用，也使人们有可能实施增进或降低，甚至完全破坏水生微生物生命活动的有效措施。

一、物理因素

(一)光

光是水体中一种重要的生态因子。然而，光的强度随透入水层的加深而迅速减弱。水体中的光强取决于水的浑浊度大小。在 10~100m 以上的水层，光强也受生物的影响。由于水中光强随深度的增加而递减，因此水层中光合作用速率也随深度的增加而逐渐减弱，到了某一深度，光强已减弱到使绿色植物同化和呼吸彼此抵消的程度，这时的光强称为该种绿色植物的补偿点(compensation level)，补偿点所存在的深度称为补偿深度。在补偿点时，植物光合作用所产生的氧量，仅能满足本身呼吸作用中的消耗，亦即氧含量和二氧化碳含量保持稳定。补偿深度则是植物向深层分布的界限。绿色植物在补偿点之上的水层顺利生活，在补偿点的光照下植物尚能生存，但不能繁殖。实际上，如果忽略化能自养菌生产的有机物质，几乎所有的有机物质都是在补偿点之上水层中产生的。

就相对少数的光能营养菌(如绿细菌和紫硫细菌)而言，光提供能量，还原 CO_2 。然而，因为它们是厌氧微生物，没有解离水的能力，不能利用水而必须利用 H_2S 或各种有机化合物作为供氢体。因此，这类细菌能在所有厌氧水体中生长，在此处仍具有足够的光照用于正向的同化平衡。在夏季分层期间，富营养湖中紫硫细菌和绿细菌大量生长繁殖，这种情况见于湖下层的上层区，即紧邻于温跃层下。这些细菌也常生长于含有 H_2S 的半咸水池塘水中及沉积物表面。如果光辐射很强的话，那么绿细菌和紫硫细菌占据的区域为稍深点的水层，因为其生命过程，特别是光合作用一般受强光抑制。大多数其他浮游生物种类也是这样，在夏季它们有其最适水深，不是在表层，而是在水面几米之下。

光能自养菌在极少量光照下就可旺盛生长。因此，紫硫细菌在 50 lx 下仍能发育，绿细菌在 5 lx 下也能繁殖。在分层湖泊中，最适的光照条件为 500~3000 lx。

某些蓝细菌也能利用相当少量的光照进行同化作用。随着水深增大，光质改变，诱导出色素适应，而能较好地利用可见光进行光合作用。

较强的光照对无色素细菌具有破坏作用，这是光谱的紫外线和可见光作用的结果。波长在 366~436nm 范围内的蓝光能抑制维氏硝化杆菌(*Nitrobacter winogradskyi*)对亚硝酸盐的氧化作用，抑制的低限为 200~300 lx。相反，红光则无任何抑制作用。脱氮微球菌(*Micrococcus denitrificans*)等异养细菌可被光所灭活。欧洲亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas europaea*)和维氏硝化杆菌细胞色素能被光所破坏，最终导致细胞死亡。硝化杆菌在 54 000

lx 的光照下, 4h 后被杀死, 亚硝化单胞菌需 24h。在 58 000 lx 的光照度下, 24h 后脱氮微球菌的静止细胞的脱氮作用显著减弱, 减弱到无光照平行培养组的 1 / 3。日光对细菌的氨基酸吸收具有抑制作用, 太阳辐射增强会导致细菌的氨基酸吸收和存活率降低。

含有类胡萝卜素的有色素细菌对光有很强的耐受性, 不受正常强度光的抑制。空气中主要含具有红、黄或橙色色素的微生物, 如藤黄八叠球菌(*Sarcina lutea*)、*Sarcina aurantiaca* 和各种含色素的微球菌属的细菌。这些微生物对紫外线的抗性大于五色素细菌。水表层细菌生命的抑制性效应一般发生在强日光辐射处, 尤其是漂浮生物受影响。在浑浊水体中, 这种抑制作用仅限于水表至数厘米处; 而在清澈湖泊和海区, 可伸展到数米之下。表水层细菌数较低主要归咎于强辐射通量的影响。辐射通量与黄细菌数量之间存在明显的相关性。含橙色色素的微生物在太阳辐射最强时繁殖最旺盛, 而含黄色色素的则在太阳辐射最弱时生长速度最快。日光对无色素的黄色或橙色黄细菌的纯培养影响很大, 该细菌的死亡率是日光所致, 且随色素沉着增强而减小。

光也能抑制某些水生真菌。蓝、绿光的抑制作用大于光谱中的红光。例如, 蓝、绿光抑制水霉(*Saprolegnia ferax*)卵原细胞原基的形成, 红光则仅起部分抑制作用。光对小芽枝菌属的霉菌(*Blastocladiella emersonii* 和 *B. britannica*)的生长和休眠孢子形成具有类似影响。在光照下培养 *Rhizophlyctis rosea*, 其所产生的色素大大多于在黑暗下的培养组; 光也能减弱该真菌对葡萄糖的分解。但尚未发现光对其他各种低等真菌的抑制作用。

日光能抑制湖泊和海洋表水层内的无色素细菌和某些真菌, 受抑制的水层深度取决于水中光辐射强度和浑浊度。干旱地区的清澈水体该影响大于低光照的极浑浊水体。但光效应能被诸如温度之类的其他因素所改变。光谱中的紫外光只能穿透很小一段距离(至多 1m); 蓝光穿透力较强, 但其强度在数米水层内迅速减弱, 在较深水层光不可能对微生物产生影响。

(二)温度

温度是水体中极为重要的环境因素之一。所有微生物的生命过程都受温度的影响。细菌、蓝细菌和真菌等微生物只能在一定的温度范围内生长, 这个温度范围一般在 -10℃ 和 90℃ 之间。在此范围内, 温度不仅影响生长率, 在一定程度上也影响营养需要量、细胞内酶和化学组成。

各种微生物都有其生长繁殖的最低温度、最适温度、最高温度和致死温度, 根据微生物的温度需要可将其分为低温型、中温型和高温型 3 大类。然而, 区分这些类别的界限很模糊。在压力增加时, 一些细菌甚至能在 100℃ 以上的温度时发育。当然, 这也受诸如营养源、盐度、pH、代谢产物等其他因素的影响。

在温度常低于 5℃ 的绝大部分广阔的海洋和寒带的内陆水体中, 嗜冷菌数量极其惊人。其最适温度一般在 10~15℃。通常, 它们的最高温度为 20℃ 或更低。有些菌株的最高生长温度为 13℃。嗜冷菌也能在温带水体中生长, 25℃ 以上的温度通常是其致死温度。但一些嗜冷菌在 18~20℃ 的温度下只存活数小时。因此, 很难分离到专性嗜冷菌。新近的研究表明, 随着水深度的增加, 温度相应地降低, 嗜冷菌的比例明显增加。嗜冷菌的繁殖速度较慢。如海洋弧菌(*Vibrio marinus*)的世代时间在 15℃ 时为 80.7min, 3℃ 时则为 226 min。该弧菌的最适温度为 15~16℃, 在 20℃ 时不能生长, 在 30℃ 以上的温度下, 迅速(1.5h 后)死亡。

在温带的内陆水体和表层海水中, 嗜冷菌很少, 以中温型细菌和真菌占优势, 但是在

温带的海湾，当冬季水变冷时，中温型微生物比例下降，而低温型微生物数量相对增加。

水体中高温型微生物(也称嗜热微生物)并无多大意义，它们只能在温泉中积聚。这里的温度在 50℃ 以上，仅有少数几种细菌和蓝细菌存在。例如，在温度为 65~93℃ 的热硫酸中，球形硫杆菌、酸热硫化叶菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)仍能发育，其生活的最适温度为 75℃。

嗜冷微生物能在低温下生长，主要是由于嗜冷微生物的酶在低温下能更有效地起催化作用，而温度达 30~40℃ 时，会使酶很快失去活性，另一方面，嗜冷微生物的细胞膜含不饱和脂肪酸较高，能在低温下保持膜的半流动性，有利于微生物的生长。

中温型微生物(也称嗜温微生物)的最适生长温度为 20~40℃。此类微生物的生长速率高于嗜冷微生物，其最低生长温度为 10℃ 左右，低于 10℃ 便不能生长，蛋白质合成受阻，许多酶的功能受到抑制。当温度升高时，抑制可以解除，功能又可以恢复，所以可在低温下保存菌种。

嗜热微生物的酶比别的蛋白质具有更强的抗热性；它们产生多胺、热亚胺和高温精胺，可以稳定细胞中与蛋白质合成有关的结构和保护大分子免受高温的损害。嗜热菌的核酸也有保证热稳定性的结构，其鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)的变化很大，tRNA 在特定的碱基对区含有较多的 G+C，可以提供较多的氢键和增加热稳定性。嗜热菌的细胞膜中含有较多的饱和脂肪酸和直链脂肪酸，使膜具有热稳定性，能在高温下调节膜的流动性而维持膜的功能，保证了嗜热微生物在高温下生长。嗜热菌的生长速率也较快，合成大分子迅速，可以及时弥补由于热所造成的大分子的破坏。

冷冻在一定程度上可引起细菌、蓝细菌和真菌等死亡，但其致死原因并不完全清楚，一般认为这是在细胞内形成细冰晶之故。这一过程在真菌特别明显，而在细菌却缺乏肯定证据。显微镜观察揭示其原因既不是冰晶，也不是细胞内的机制损害，而是绝大多数细菌中缺乏液泡。快速冷冻法解释了由于冷冻悬浮液的渗透压升高所致的冷冻致死。当温度下降到结冰温度之下时，可用来解释结冰水体冰层细菌含量变化相当迅速的原因，-40℃ 以下几乎没有任何进一步死亡发生。快速升温与缓慢升温一样，都不会造成微生物数量的锐减。

单种微生物存活温度范围变化很大，其幅度可在 15℃ 或多至 50℃ 以上，即微生物能够存活的最低和最高温度的间距变化很大。在此温度范围内，生物的活性及生化反应一般随温度的升高而增强。在一定范围内温度每上升 10℃，代谢作用的速度将增大 2~3 倍。温度对细菌世代时间的影响也是这样。

接近于最低或最高温度时会引起各种微生物形态的改变。如大肠杆菌在 7℃ 时产生丝状细胞，土壤杆菌(*Agrobacterium luteum*)在 25℃ 时生长最快，在 30℃ 时则呈现丝状生长。节杆菌属(*Arthrobacter*)具有温度依赖型生活周期，低于 20℃ 时处于革兰氏阴性的菌丝体阶段，在 20~26℃ 时为革兰氏阳性的节孢子阶段，而在 26℃ 以上则为革兰氏阳性棒状形阶段。

在最适条件下的纯培养中，温度对试管内细菌的生物学反应的影响较明显，在天然水体很难观察到这样的反应。由于天然水体中存在生命过程相互作用的各种各样的生物，因此输入的竞争因素并非总能允许特定种类表现其自己的温度效应特点。此外，不同的温度效应可能彼此相叠加；这在污水负载过多的水体中特别明显。温度上升导致活性增强，世代时间缩短，但是毒性效应增强，自溶作用加剧。在特定水体中生活的微生物，在夏季高

温时快速增殖。但是，与在污水中所观察到的很多细菌一样，夏季高温也引起其他微生物的快速死亡，如淡水或土壤微生物一进入半咸水或海水中就发生上述情况。另一方面；冬季低温时，所有反应缓慢下来，因此这些细菌在不利环境中的存活时间延长。这就是有污水流入湖泊、河流和沿海水域冬季细菌总数高于夏季的缘故。但是，数目众多的其他微生物在夏季高温时旺盛繁殖。在污染严重水体中，冬季的细菌总数通常随水温下降而上升，而在清洁水体则下降。因此，温度对湖泊、河流和海洋微生物区系的影响，也与其他因素有关。

(三)压力

水深每增加 10m，水的静压力上升约 $1.01 \times 10^5 \text{Pa}$ (1 个标准大气压)。因此，在海洋和湖泊的深层存在特别高的压力。在太平洋深海沟，压力可达 $1.1 \times 10^8 \text{Pa}$ 以上。世界上约有 90% 的海洋深于 1000m，因而具有 $1.01 \times 10^7 \text{Pa}$ 以上的静水压力，24.5% 的海甚至超过 $5.05 \times 10^7 \text{Pa}$ 。深海中的高压是重要的生态因子之一，它严重影响着微生物的生命活动。

深水(甚至 10000m)中仍生活有很多细菌。菲律宾海沟底部沉积物中，每克湿重含 1 万~100 万个微生物。某些深海细菌的最适压力在 $5.05 \times 10^7 \text{Pa}$ 以上，它在常压下根本不能生长或生长不良，可称之为嗜压微生物。此外，这类微生物中也有一些能在 $1.01 \times 10^5 \text{Pa}$ 的压力下良好生长的，称为耐压微生物(barotolerant)。绝大多数土壤和淡水中的细菌在超过 $2.02 \times 10^7 \text{Pa}$ 的压力下不能生长。从海洋浅水区分离到的海洋细菌和低等真菌也是这样，因此它们被称为恐压微生物(barophobic)。

深海嗜压菌通常也是嗜冷菌，在高压低温(3~5℃)时生长得最好，即它们对其栖息的环境条件具有很大的适应性。绝大多数嗜压菌生长极其缓慢。很多嗜压菌在压力减到 $1.01 \times 10^5 \text{Pa}$ 时仍能存活。然而，用通常的采样设备，不能保持一些对压力敏感微生物的存活。

在极高压力下，一些对压力敏感的细菌表现出形态变化。黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*) 在 $1.01 \times 10^5 \text{Pa}$ 的压力下，呈能动的短棒状。在 $6.06 \times 10^7 \text{Pa}$ 下它只以极缓慢的速率生长，丧失其运动性，并产生长达 100μm 的丝状体。芽孢杆菌属和弧菌属的细菌以及大肠杆菌都呈现类似变化。如果再放回到常压下继续培养，那么在几小时或几天之后，这些细胞的大小和形状就恢复如初。由此看来，高压能干扰繁殖的正常机制，此时细菌继续生长，但不能分裂。这种现象与 DNA 分子容量的改变相关联，高压干扰了 DNA 的复制，因此细胞分裂停止。在急剧增压下生物体中的 DNA 含量小于大气压力组，其 RNA 含量增加，且蛋白质与核酸的相对比例保持不变。

嗜压的深海细菌即使在很高压力下也能合成 DNA，进而能在极深水层处正常繁殖。其中的运动性细菌只在高压时形成鞭毛，而在标准大气压力下则丧失其鞭毛。

静水压力对细菌和真菌的影响是多方面的，而且是变化的。发光细菌的发光就是一个典型例子，发光杆菌属的一些种类(*Photobacterium fischeri*、*P.harveyi* 和 *P.phosphoreum*)，在压力超过 $5.05 \times 10^7 \text{Pa}$ 时，几天内就死亡。在 $5.05 \times 10^6 \sim 5.05 \times 10^7 \text{Pa}$ 的压力下，比最适温度高几度的温度可促进发光，而低于最适条件的温度则抑制发光，这对深海温泉区的微生物较为重要。

压力对细菌的酶系统具有较大影响。在 $1.01 \times 10^8 \text{Pa}$ 下大肠杆菌的琥珀酸脱氢酶完全不可逆地失活，尿素酶活性减弱。除了海洋最深层的一些专性嗜压菌外，压力也影响细菌的硝酸盐还原作用。该作用随压力增大而减慢，其原因就是硝酸盐还原酶失活，从而降低了反应速度。它在 10℃ 时的失活率比在 40℃ 大。高压也能减弱其他代谢过程(如甲烷和氢

的形成、硫酸盐还原和磷酸酶的活性)。在耐压的原核微生物中,蛋白质合成对静水压的升高特别敏感,这会导致相应的生长抑制。压力也影响细菌对氨基酸混合物的吸收和呼吸。

静水压对微生物生理生化反应的影响,决定了它们在水体中的分布,即它们只能生活于上层,或只能生活于深层,抑或两者兼有。

(四) 浑浊度

水的浑浊度也影响水生微生物的生活。浑浊度是浮游物所致,它可定义为水中悬浮的活物质和死物质的总和,这些物质最终导致沉积物的形成。浮游物由3种成分组成,即起源于陆地和由陆地移入水体的矿物质细粒、由无机物和占优势的有机物构成的腐屑、浮游生物(在水中行浮游生活的小型动植物)。由于矿质细粒和腐屑的区分较为困难,因此有时这两种成分合称为水中非生物性悬浮物(thpton)。

各个水体的浑浊度差异极大。在清洁溪流、贫营养湖和开阔海区,浑浊度一般都很低,但在一些河口处却很高。温带的很多水体的混浊度存在明显的季节变动,非生物性悬浮物和浮游生物的比例也是如此。浮游物中有机质的比例也急剧变化,在泉水和某些河流中它只占有百分之几,但在一些湖泊和海区则几乎达100%。

浮游物作为很多微生物的基质起着重要作用。特别是腐屑颗粒上经常携带着大量的细菌和真菌等表面微生物群。有些腐屑是有机成分,可直接作为动物的食物,微生物也可移栖其中;有些是无机颗粒。无论是有机还是矿质起源的悬浮颗粒,都能将存在于水中的很高稀释度的营养物质吸附到表面,从而有利于微生物生长繁殖。这一过程越显著,周围水中的营养物质越匮乏。

近年来,人们对微生物附着于固体基质的物理化学因素有了一些了解。嗜水菌和耐水菌之间存在着不同的附着行为。在附着过程中表面活性分子明显地起作用。细胞被聚合物膜(如脂多糖)所包围,同时也免遭不利条件,尤其是化学条件的影响。因而,附着细菌的活性与水中自由生活的微生物不同。

通过对腐屑颗粒的吸收可将一些抑制剂和毒物变成无害。悬浮物对细菌的生长繁殖具有促进作用,除提供营养物质外,还能避免光的有害影响。不同河流的河口区富含腐屑的浑浊带尤为如此。

浑浊度较大的水域(如易北河口)透明度只有几厘米,只有紧贴水面的生物,才能得到一点点光照。这里悬浮物数量依潮汐而变动。落潮期间发生沉积作用,而高低潮水又将沉积物搅起,这些波动也影响细菌的垂直分布,且造成河流中浑浊度和细菌含量之间的明显平行关系,在温跃层处特别明显。但在较少变动的水体中,只要营养状况保持稳定,浑浊度上的差异并非总是影响细菌数。当悬浮物中富含有机物质时,细菌的总数随浑浊度增大而增加;但若悬浮物为无机颗粒时,浑浊度的变化不影响细菌总数的变动。因此,比较浑浊度测定值和微生物总数,可初步了解浑浊度的物质组成情况。

生长在腐屑上的微生物占水中总的微生物区系的比例因水体而异。一般清澈水体中该比例较小,只占百分之几,而浑浊水体中则很大,可达50%~94%。

浑浊度也影响水体中微生物区系的组成。例如污水池塘附着细菌的比例明显大于自由生活细菌。腐屑上几丁质分解菌也比浮游生物或游离水中的多,纤维素降解微生物亦然。相反,其他细菌则喜好游离水或生长在浮游藻类的黏质中。总之,浑浊度因素的作用主要是通过通过对营养和光照状况的影响而间接发挥的。

二、化学因素

(一)氢离子浓度(pH)

微生物的生长和繁殖受其介质中氢离子浓度(即 pH)的影响很大。天然水体中 pH 大多数在 4~10 之间,特殊情况可达到 0.9~12 之间。一般的情况是,海水的 pH 最稳定,而内陆水体的 pH 则变化幅度较大。pH 对微生物生命活动的主要作用在于引起细胞膜电荷的变化,从而影响了微生物对营养物质的吸收;影响代谢过程中酶的活性;改变生长环境中营养物质的可给性以及有害物质的毒性。

每种微生物都有其最适 pH 和适应范围。在最适范围内酶活性最高,若其他条件适合,微生物的生长速率也最高。绝大多数细菌只能在 pH 为 4~9 的范围内生长。仅有极少数细菌在 pH 为 3 或更低时生长,例如氧化硫硫杆菌(*Thiobacillus thiooxydans*)和氧化亚铁硫杆菌(*T. ferrooxydans*)能耐受 pH 为 1 的作用。在 pH 为 1.6~3 的热硫泉中,也存在嗜热的酸热硫化叶菌,其 pH 范围在 0.9~5.8 之间,最适 pH 在 2~3 之间。绝大多数水生细菌的最适 pH 在 6.5~8.5 之间,这与多数大型水体的 pH 范围相对应。如海水 pH 一般在 8~8.5 之间,淡水水体 pH 多在 6~9 之间。富营养湖或近海水表层由于出现浮游植物水华而 pH 变化很大, pH 在一定时候(如午后)可达 9~10 以上。

pH 也影响细菌和真菌的种群组成。在太平洋水域,除了耐碱菌在 pH 为 7.3~10.6 范围内生长外,也有只在 pH 为 10.0~10.6 范围内发育的嗜碱菌。嗜酸真菌多于嗜酸菌,和土壤中一样,在酸性水体和沉积物的微生物区系中,真菌的比例较大,而在中性或微碱性介质中真菌的比例较小。大多数水生真菌能在相对较广的 pH 范围内生长。然而,淡水真菌在 pH 为 7.0 或以下较常见,而海洋真菌则喜好弱碱性介质,最适 pH 为 7.5~8.0。

明显偏离最适氢离子浓度,不仅导致微生物的生理变化,而且也经常产生形态变化。某些微生物细胞趋于退化型,通常呈越来越大的棒状,并呈现出不规则的隆起和分支。

绝大多数微生物细胞内的 pH 接近于中性,即微生物细胞具有保持内环境接近中性的能力。同一种微生物由于某介质中 pH 不同,可积累不同的代谢产物。因此,在发酵过程中,根据不同目的,常采用变动 pH 的方法提高生产效率。此外,还可利用微生物对 pH 的要求不同,采用适当的 pH 促进有益微生物的生长或控制杂菌的污染。

(二)氧化还原电位

水体和沉积物中的氧化还原电位(redox potential, Eh) also 具有重要的生态意义。环境中 Eh 值与氧分压有关,也受 pH 的影响。pH 低时,氧化还原电位高, pH 高时,氧化还原电位低。氧化还原电位表示介质和氢电极之间的电位差,通常以毫伏(mV)为单位。在自然环境中, Eh 的上限是+820mV,这时环境中氧含量很高,其下限是-420mV,是富含 H₂ 的环境。水体和沉积物中的 Eh 往往变化很大。

氧化还原电位影响微生物细胞内许多酶类的活性,也影响细胞的呼吸作用。各种微生物所要求的 Eh 值不一样。限定生理类型的微生物一般只能在特定的 Eh 范围内生长,并有其最适的 Eh 值。好氧细菌比厌氧细菌需要更高的 Eh 值。一般来说,好氧微生物在 Eh 值为+100mV 以上均可生长,以 Eh 值在+300mV 到+400mV 之间为宜。厌氧微生物只能在 Eh 值低于+100mV 下生长。兼性厌氧微生物在+100mV 以上时进行好氧呼吸,在+100mV 以下时则进行发酵。

微生物活动在不同程度上改变着氧化还原电位。细菌耗氧会导致 Eh 值降低。若有 H₂S 产生时,这种变化特别明显。另一方面,氧气增多会引起 Eh 值的上升。

(三)盐度

盐度的高低在较大程度上决定着水体中的生物群落。海水中 NaCl 含量相对较高，导致淡水生物和海洋生物出现生理学的发育差异。只有少数生物既能在淡水又能在海水中繁衍。正如盐度抑制绿色植物和动物那样，盐度也抑制细菌和真菌。因而，清洁湖泊和河流中的大多数微生物或多或少都是恐盐的，在自然条件下不能在盐度超过 10 的水体中生长。只有较少的种类是耐盐的，能在较高盐度下旺盛生长。多数的海洋细菌和真菌都是嗜盐的微生物，即它们需要一定量的盐用于其生长，因此在淡水生境中不能正常发育。在开阔海区，嗜盐的海洋细菌占腐生菌数的 95%，而耐盐菌的比例仅占 5% 或更低。相同的水样在用淡水配制的培养基中生长的细菌数不到海水培养基中的 1%。在近海岸或污染海区的耐盐细菌比例较大，但一般不超过 20%。在北大西洋水深超过 1000m 以上的海底沉积物中，耐盐的芽孢杆菌属的细菌较多，这些细菌在淡水培养液中发育良好。

所有内陆水体中或多或少都存在耐盐菌，其中城市污水和严重污染的河流和湖泊中居多。在污染水域也存在嗜高渗细菌，它们适合于在高渗下生长。在半咸水和海水中也有一些嗜高渗细菌。大多数嗜盐的细菌和真菌的最适盐度在 25~40 之间。这一范围包含了海洋的天然含盐量，在开阔海区，平均盐度为 35。但半咸水水域，嗜盐生物的最适盐度一般为 5~20。

盐度在某种程度上偏离其最适度时，会导致细菌和真菌的世代时间延长，并出现形态学和生理学变化。如一些海洋细菌，在其最适盐度时呈棒状或逗号状，而在含盐量超过 50 时大大变长，最后形成丝状。采自阿拉伯海的发光细菌，在盐度为 30 时生长得最好，呈微曲的棒状，长 1~2 μm 但在盐度为 10 时呈球状，在盐度 75 时呈长达 100 μm 以上的丝状。正如压力上升一样，盐度的升高也干扰正常的繁殖机制，细胞仍能生长，但不能分裂。

盐度的生理效应是多方面的。发光细菌在盐度超过 50 的海水中就丧失发光能力。若进一步稀释，这种情况就不可逆转，最后导致细胞溶解。NaCl 对发光的这种影响应归咎于荧光素醇含量的变化，在仅含 1%NaCl 的培养液中，发光细菌只含极少的荧光素酶，但是将之转移到 3%NaCl 的培养液中时，该酶则开始旺盛合成。微生物体内的许多代谢活动均与盐度有关，如有机酸和糖类的氧化、吡啶的产生需在一定盐度下进行，顺乌头酸酶和异柠檬酸脱氢酶等需要较高的渗透压，Na⁺可促进三羧酸循环中间产物的氧化以及物质在细胞膜上的转运等。

很多海洋细菌在转入淡水中时发生溶解。降低盐度能破坏海洋假单胞菌细胞壁的黏肽层，这会使细胞壁变薄，使细胞内的渗透压胀破残存的细胞壁层。少数细菌生长需要较高盐度，Larsen(1962)把它们细分为温和嗜盐生物(最适盐度 50~200)和极端嗜盐生物(最适盐度为 200~300)，它在喷溅池和晒盐池等沿海水体和内陆盐湖中较多。

细菌的耐盐范围在其最适生长温度下最宽广，但是较高或较低温度使该范围不同程度地变窄。超过最适温度导致 NaCl 需要量增加，低于最适温度时则减少。

在低等真菌(藻状菌纲)中，海洋皮囊菌(*Dermocystidium marinum*)和嗜盐霉菌(*Haliphthoros milfordensis*)以及与水霉目近缘的脆壶菌科等是专性海洋微生物。它们的最适盐度为 20~35，生长至少需要 0.8% 的 NaCl。

此外，从海洋分离的水霉科中的两个种在盐度超过 10 时形成性器官，而在盐度低于 10 时仅产生动孢子。几种腐霉属的霉菌也能在较广的盐度范围内完全发育。

陆地或海洋起源的高等真菌(子囊菌纲和半知菌纲)能在比上面所提到的低等真菌宽得多的盐度范围内繁殖。陆地真菌的最适盐度与淡水或半咸水(盐度在 10 以上)真菌的相似，

而从海区分离的真菌一般在含盐量较高时发育良好。

(四)无机物

除 NaCl 之外的其他无机物也影响水中微生物的生长繁殖。其中较为重要的是无机氮和无机磷化合物，在很多水体的生产带中，它们代表了植物生活的限制因素。在贫营养湖和营养缺乏的海区，几乎检测不到氨、亚硝酸盐、硝酸盐和磷酸盐，它们一旦被释放出来，就被浮游植物迅速利用。这种条件加剧了细菌和浮游植物之间对无机营养物质的竞争。但在大型湖泊和海洋的深层，异养微生物常造成硝酸盐和磷酸盐的富集。因此，当富含营养的深层水升至表层时，该表层区呈现很高的生产力，细菌和真菌大量繁殖。

在热带和亚热带海洋的真光层中，含氮和磷的化合物终年短缺，而在温带则存在明显的季节变动。氨和亚硝酸盐在给硝化细菌供能方面起重要作用，且硝酸盐结合的氧能被众多脱氮细菌所利用，在厌氧条件下进行有机物质的氧化作用。微生物生活所必需的其他无机营养物质在多数水体中的含量都较充足，诸如铁和钴之类的微量元素，作为重要酶的组成成分，一般需要量极少。不过在藻类水华期间，可引起某些水体中这类物质短缺。

另一方面，重金属也严重影响着水体中的生命活动，因为一些重金属对很多微生物有毒，即使是较低的含量。重金属或有机重金属复合物具有杀菌作用和对病毒的灭活作用。铜和汞经常通过工业污水和废水进入河流、湖泊和沿海水域，可完全破坏其天然的生物群落。这些金属的毒性效应是与酶的巯基(-SH)结合之故。镍可使海洋节杆菌的细胞大小及其精细结构发生明显变化。在镍含量为 $4 \times 10^{-4} \text{mg} / \text{kg}$ 时，节杆菌由 $2\mu\text{m} \times 4\mu\text{m}$ 大小的棒状变成球状，其直径扩大到 $10 \sim 15\mu\text{m}$ ，引起严重的细胞质溶解。此外，细胞壁内层的黏肽消失。氰化物偶尔也进入水体，毒害植物和动物。-CN 基能与铁结合，从而阻断了细胞色素氧化酶，因此它是一种强效呼吸毒物。

(五)有机物

水中溶解或悬浮的有机物作为异养微生物的食物特别重要。水中细菌和真菌种群的大小和组成，在很大程度上取决于有机物的含量及组成。然而，有机化合物还有其他方面的重要作用，如作为激活和抑制因子。

贫营养湖、清洁河流和宽阔海区的水体只含极少的有机物质。例如，在开阔海区为 $0.3 \sim 2.0 \text{mg} / \text{L}$ ，约 10% 以颗粒形式存在。营养物质的这一含量是大多数细菌和真菌能够吸收利用的低限。在波罗的海，有机物含量的平均值为 $2.7 \sim 6.5 \text{mg} / \text{L}$ ($2 \sim 5 \text{mgC} / \text{L}$)。在污染的海湾河口有机物含量较高，但一般总是低于 $100 \text{mg} / \text{L}$ 。大多数内陆水体也是这样，例如美国湖泊的有机质含量为 $3 \sim 50 \text{mg} / \text{L}$ 。威斯康星州 500 多个湖泊的溶解有机质的平均值为 $15.2 \text{mg} / \text{L}$ ，颗粒物含量为 $1.4 \text{mg} / \text{L}$ ，两者比例为 11:1。溶解有机质由碳水化合物(83.7%)、粗蛋白(15.6%)和脂类(0.7%)组成。此外，溶解有机质还含有游离氨基酸、酚、吡啶、尿素、维生素等。当然不同的水体中溶解有机质和颗粒有机质的比例以及有机物组成各不相同。

在很多水体中，有机物是腐生细菌和真菌生长的限制因素。因此，水体中微生物数量与有机物含量之间通常存在正相关；有机物无论在哪里积累，哪里的细菌总数和腐生物数量都很高。然而，起决定作用的并不是有机物总量，而是其中易于同化的有机化合物部分，这些化合物有蛋白质及其组分、糖、淀粉、有机酸、脂肪等。营养不良的湖泊中有机物总量很大，但除其中可同化部分外，其余的对微生物数量并无作用。在有机物营养短缺的地方，很多细菌达不到其正常细胞大小，而产生球状的退化型。这时细胞继续分裂，但不再

生长。

深海中大部分有机质不能被微生物降解，可同化部分很小，游离氨基酸浓度在每升纳摩尔的范围内变化。一般来说，贫营养介质中的细菌种群能广泛地利用不同有机物质作为营养，而富营养介质中的种群对有机物质的利用较专一。

有机物的组成强烈影响着特定的微生物种群。例如，在富含蛋白质的水体中蛋白水解细菌占优势，而在含有大量纤维素的水体中优势种则是纤维素分解细菌和真菌。水体中的微生物也可受动植物代谢产物的影响。这些代谢产物对单种或整个一类生物可起到促进或抑制作用。

(六)溶解气体

水中的溶解气体主要有氧气、二氧化碳和氮气。此外，在特殊条件下也存在氢气、一氧化碳、硫化氢和烃等其他气体。其溶解度随温度的上升而减小，且淡水比海水稍大一些。空气中的氧气、二氧化碳和氮气连续不断地进入水中，直至达到饱和为止。此外，水中或沉积物中的生物化学过程也产生溶解气体。

1. 氧气 多数植物和动物的呼吸需要氧气。它们通过消耗氧造成很大程度的氧亏。另一方面，在真光层中绿色植物进行光合作用，放出的氧大于它们的消耗量。因此，该处水中氧气可暂时地过饱和。具有明显温跃层的水体通常有氧含量不连续伴随层。

绝大多数水生微生物都是兼性厌氧的，在海水环境中尤为如此。在无氧的湖下层和一些富营养湖的腐殖质淤泥中，绿菌属、脱硫弧菌属(*Desulphovibrio*)和梭菌属之类的专性厌氧菌起着重要作用。

虽然氧气对于专性需氧微生物是至关重要的，但其在一定范围内的变化并不影响水中需氧菌的代谢活动。例如，在 30℃ 下，氧含量从饱和状态降至 1mg / L 时，需氧的欧洲亚硝化单胞(*Nitrosomonas europaea*)硝化过程完全正常；维氏硝化杆菌(*Nitrobacter winogradskyi*)甚可低至 2mg / L，只有在氧气进一步减少时才使氧化作用率降低。海洋硝化球菌(*Nitrococcus oceanus*)把氨氧化成亚硝酸的氧含量低限是 0.08mg / L。专性需氧细菌的发育仅在氧压极低时受损。此外，一些微嗜氧微生物在较高含量氧的环境下生长受到抑制。与富氧水体相比，氧气缺乏水体中较小的氧气波动就可导致重要种群的改变。

2. 二氧化碳 光能自养和化能自养生物需要二氧化碳，异养细菌和真菌也需要少量的二氧化碳。譬如一些细菌利用丙酮酸盐和二氧化碳合成苹果酸盐或二羧酸、三羧酸。水生植物生活取决于二氧化碳-碳酸盐系统，即溶解 CO₂、HCO₃⁻和 CO₃²⁻离子的平衡系统。这一系统依赖于 pH、大气中的二氧化碳分压和温度。二氧化碳-碳酸盐系统在原核生物活动中有其起源，并且在绿色植物发育之前存在很长时间。约 90% 的二氧化碳来源于细菌的活动。

3. 分子态氮 溶于水中的分子态氮可被固氮细菌和蓝细菌所利用。另外，细菌性硝酸盐还原过程中有分子氮释放于水中，但是该气体对水中微生物区系不会有任何影响。

4. 硫化氢 硫化氢仅在无氧环境中稳定存在，并可通过微生物的活动在该处积累。由于它可与呼吸链末端的细胞色素氧化酶中的铁结合，因此它是所有生物的呼吸毒物。硫化氢的出现总是伴随着种群的完全改变。除了少数耐 H₂S 生物外，所有高等生物和大多数微生物逐渐死亡，取而代之的是以 H₂S 作为能源的化能自养硫细菌或以 H₂S 作为供氢体的紫硫细菌、绿细菌等微生物。

5. 其他气体 在纤维素的厌氧分解过程中产生大量甲烷，导致甲烷假单胞菌(*Pseudo*

monas methanica)等甲烷氧化细菌的富集。海洋中的瓣硫菌属(*Thioploca*)作为甲烷氧化菌也起着重要作用。各种假单胞菌和诺卡氏菌能分解其他气体烃。在湖泊气体和沼泽中还含有氢气。产氢单胞菌(*Hydrogenomonas*)能用分子氢作为能源。一氧化碳在细胞色素氧化酶水平上通过与游离氧竞争而抑制呼吸,但也存在耐一氧化碳生物,如羧化单胞菌(*Carboxydomonas*)能把一氧化碳氧化成二氧化碳,且在含一氧化碳环境中富集。

三、生物因素

水生微生物之间、水生微生物与其他水生生物之间存在复杂的相互关系。除营养竞争外,很多低等动物以细菌和真菌作为食物,一些寄生性微生物也可侵袭细菌和真菌,从而影响水中微生物的区系。

(一) 营养竞争

生物之间的营养竞争在每一个生存环境中都起着重要作用,并且严重影响着微生物区系组成。在营养物质充足,环境条件适宜时,多种生物都能正常生长繁殖。但微生物之间的生长速度不同,某些种类的繁殖较快,其产生许多代谢产物(如抗生素、酸类等),而抑制竞争者。大量代谢产物的积累也会影响产生者本身,最后取而代之的是耐受性较大或以之为食的生物。

以相同营养物为食的所有生物未必都是竞争者。如大肠杆菌和普通变形菌(*Proteus vulgaris*)共用乳糖-尿素培养基,前者分解乳糖,后者分解尿素,且各自的分解产物都是另一种生物的补充营养物,因此它们彼此互补。

在极端环境条件下,营养竞争起次要作用,在极端温度、盐度或 pH 的水体中仅少数生物能利用现存的营养物质。在此情形下,很多个体的纯培养均可发育。

在难于利用的物质中也存在类似作用,如木质素、纤维素、几丁质、烃、酚等只被少数生物所利用,不存在竞争关系。

(二) 不同微生物的相互作用

不同微生物之间在营养和生长方面经常是合作的。例如来得基颤藻(*Oscillatoria redekei*)的无菌纯培养只具有很低的增殖率,相反,在含有细菌的培养中却明显增高。蓝藻和异养细菌的生长是同时进行的。在暗处培养时,颤藻的生长受到限制,细菌也不增殖。在正常生长条件下,颤藻释放的物质成为异养细菌的营养。实际上,这些营养物质是诸如蛋白质的含氮化合物和胺化合物。在无菌的颤藻培养液中,营养物质含量占 60% 以上,这与混合培养中异养细菌的氮含量相当。这些高含量的氮化合物对颤藻的生长具有抑制作用。

木质素或纤维素之类难分解物质的降解经常是各种微生物相互作用的结果。具有降解这类物质酶系统的特殊种类发育之后,其他微生物就能利用随后的中间产物。依此方式,特殊生物为后一类生物先创造了前提条件,通过这种活动避免了有害代谢产物的积累。不同微生物的这类合作称为后继共生,且在自然界普遍存在。

总之,不同微生物之间的相互作用主要体现在共生和拮抗两方面。共生(symbiosis)是指不同、种类生物之间的联合关系,如好氧菌和厌氧菌之间的联合,好氧菌通过迅速消耗氧而使环境变为无氧状态,从而使厌氧菌得以生长。另一些例子是微生物分泌出能分解多聚物的酶类,由于这些酶水解了多糖和蛋白质等营养物质,从而不仅向这些微生物自身提供了营养,也给其他微生物供应了养料。拮抗(antagonism)是指在不同微生物之间以及微生物和植物或动物之间的共生中,宿主或多或少地遭受着明显的损害的现象。例如,许多微生物产生的抗菌素对细菌或其他病原微生物具有抑制作用;噬菌体能裂解相应的细菌;某

些细菌产生的细菌素能杀死近缘关系的细菌。

(三)细菌和真菌的滤食者

水或沉积物中的很多动物都以微生物为食。有些动物几乎一生都以高蛋白质食物——细菌和真菌为食。这种情况主要见于微生物含量高的水体，如富营养湖、污水流入的河流和近海水域。在这些水体中，细菌和真菌成为细菌摄食者赖以生存的食物基础。而在贫营养的内陆水体和大部分开阔海区中，微生物很少，它们几乎无任何食物意义。在沉积物中，条件优于开阔水域，细菌和真菌可为底栖动物群提供相当部分的食物，如深海细菌形成底栖生物的主要食物源。

大多数原生动物可部分地摄食细菌。例如，泰氏游仆虫(*Euplotes taylori*)可以以纯培养的细菌饵料为食。随着富营养化的加剧，水体中的细菌总数和原生动物数量及生物量都随之增大。试验表明，细菌含量超过 10^6 个 / ml 时，海洋尾丝虫(*Uronema marinum*)才能增殖。以细菌为食料的翼状游仆虫(*E. vannus*)能将 20% 的细菌生物量转化为纤毛虫生物量。

很多后生动物也摄食细菌和真菌，特别是滤食性动物。海绵能摄取并消化细菌；贻贝、牡等贝类能以纯细菌饵料为食；轮虫、枝角类、桡足类和一些滤食性鱼类等都可以摄食细菌、真菌和蓝细菌；甚至植物中也有以细菌和真菌为食的，如 *Labyrinthula* 属的黏霉能利用奇特的网摄取活的细菌和酵母菌细胞。由此可见，滤食者对水体中的微生物区系具有重大影响，它们可改变水生微生物的群落组成。

(四)噬菌体、细菌和真菌对微生物的侵袭

各类水体中都存在有噬菌体。污水中的噬菌体较多，从中常可分离到大肠杆菌噬菌体和感染致病菌(如沙门氏菌和志贺氏菌)的噬菌体。开阔海区和贫营养水体中的噬菌体较少。不同水体都存在噬蓝细菌体(*Cyanophages*)，它们在富营养湖和池塘的蓝藻水华的消失中起作用。

如在以色列的一些养鱼池中，夏季蓝细菌大量繁殖时，噬蓝细菌体成数百倍地增加。一些蓝细菌(如铜绿微囊藻)的毒素形成可能与噬蓝细菌体侵袭造成的细胞溶解有关。

水体中也存在食菌弧菌(*Bdellovibrio bacteriovorus*)，它是很小的逗号形生物。它用无鞭毛极附着于宿主细胞壁上，并侵入其中。感染的细胞变成球状，此寄生物在宿主内生长，并消化细胞内含物。细菌外膜被破坏后，蛭弧菌细胞便释放出来去感染新的宿主。此类寄生物常见于有污水流入的水体。食菌蛭弧菌有嗜盐型，它可减少污染的近岸海域中大肠菌群的数量。细菌也感染真菌，尤其是在不适宜环境中。

此外，所有寄生性藻状菌类都侵袭其他水生真菌。一部分有高度的宿主特异性，只寄生于单个种或少数近缘种属，另一部分感染不同科的种类，如 *Rozella* 属中的真菌。一些藻状菌类甚至可侵袭其宿主内的寄生真菌，这种现象称为超寄生(hyperparasitism)。例如，*Rozella marina* 可感染寄生于红藻中的 *Chytridium polysiphoniae* 孢子囊。虽然藻状菌类中存在很多寄生于真菌的种属，但是它们很少大量繁殖。

(五)生长和抑制物质

很多藻类不能合成维生素，有些细菌和真菌亦然，因此它们必须从其他生物中获取。维生素的主要来源仍是藻类、细菌和真菌(特别是酵母菌)。最重要的维生素是硫胺素、维生素 B₁₂ 和生物素，其次是核黄素、泛酸、尼克酸和叶酸。4% 的淡水蓝细菌需要维生素，而需维生素的海洋蓝细菌达 50%。其他藻类也有类似情况。如金藻特别需要硫胺素；甲藻需要生物素；蓝藻、硅藻等最需要维生素 B₁₂，其次是硫胺素。某些细菌和藻类能在体内

合成维生素，如假单胞菌属、气单胞菌属、弧菌属、芽孢杆菌属和微球菌属的特殊种类能合成维生素 B₁₂，它们通过代谢产物或死后溶解把维生素释放到水中。总之，细菌、藻类和酵母作为维生素生产者起着重要作用。

水体中也发现有不同的酶，它们同样来源于藻类和微生物。如富含浮游生物池塘水中有磷酸酶、糖酶和淀粉酶，这些酶由浮游生物产生，并随其死体释放于水中。水体中还含有少量的纤维素酶，该酶在水体的纤维素分解中起作用。水中胞外酶活性与细菌数量和生产量密切相关，即细菌总数、生物量和生产量大的水体，胞外酶活性也大。在真光层，酶几乎都是浮游植物分泌的，而无光层和沉积物中的酶是由细菌、真菌、原生动物和后生动物产生的。

在内陆水体及海洋中已发现有各类抗生素。抗生素主要是由藻类产生的，并且在浮游植物水华出现时达到活性浓度。如小三毛金藻(*Prymnesium parvum*)的代谢产物中含有鱼毒素，可使鱼类和其他水生动物中毒死亡。小球藻(*Chlorella vulgaris*)分泌的小球藻素，能抑制大型蚤的滤食活动和生长发育。有些藻类能产生使革兰氏阳性细菌生长呼吸受到抑制的物质，如丙烯酸和多酚等。

细菌也可产生抗生素。例如，纤维弧菌属能产生导致蓝细菌形态改变或细胞溶解的热稳定物质。蓝细菌中有很多有毒种类，有毒蓝藻水华可造成鱼类死亡，如铜绿微囊藻、水华束丝藻和束毛藻属(*Trichodesmium*)。蓝细菌毒素是环状多肽和生物碱。

第三节 水生微生物在生态系统中的主要作用

微生物在水生态系统中具有重要作用。水体中的能量流动、物质循环和自净作用都离不开微生物。了解水生微生物在这些方面的作用特点，可为人类更有效地利用水生微生物资源提供理论依据。

一、微生物与能量流

生态系统是生物群落和生境的总和。池塘、湖泊、河流、海湾、大洋都可看作一个生态系统。研究生态系统的主要目的就是了解相应的能量流，因为生态系统中几乎所有组分都是通过能量传递相联系的。任何一个生态系统所利用的能源，归根结底都是来自太阳能。在一个完整的生态系统中，能量流动始自太阳能。初级生产者借助太阳辐射能把二氧化碳和水合成细胞物质(有机质)，即把部分光能转化为化学能而固定下来。次级生产者直接或间接利用这些有机质，使能量通过食物链而流动。能量流动过程中，越来越多的化学能降解为热量而散失，余下的则以物质形式积累于生态系中。

然而，就目前所知，即使在最适宜的条件下，辐射入水中的太阳能仅有很少一部分被初级生产者转变为化学能。如果假定湖泊中第一位的还原者是细菌的话，那么绿色植物净产量的一半均由细菌直接分解。在食物链的其他营养级能量比例较小，能量贮存的总量在连续的消费者营养级上依次显著地下降，其中一部分是由于呼吸作用消耗的结果，一部分是因为能量的一半以上不能被消费者所利用，而直接地传递给还原者(即分解者)；还有小部分能量作为生态系统的能量输出而丢失。这一例子当然不能直接应用到其他生态系统，但是它指出了重要位点的能流途径，提出了种群大小比例的观点，明确了细菌的突出地位。在富营养型湖泊和海区，尽管细菌在能量传递上会起到较大的作用，但是真菌在此生态系内所起的作用肯定会大于如银泉那样的泉湖中的可能作用。细菌的巨大意义已被越来越多的生态研究结果所证实。

在现有资料中,关于水体能流的可靠数量化信息极少。对基尔湾的大量研究得出相对能流的简况是,水中约 20%浮游植物产生的碳被转变为细菌碳,而 60%以上浮游植物碳沉降到该浅海岸水域(平均水深为 20m)的水底,因为在春季水华出现时,这里不含任何食草性浮游动物。约 15%的初级产量被沉积物中的细菌转化到生物量中。因此在基尔湾内,很大一部分能量流通过细菌进入食物链。

如果有足够的浮游动物存在(例如在夏季出现水华期间),绝大部分的初级产量就直接进入浮游动物的食物链。总之,在这种情况下,细菌在能流中所起的作用可能较小。在温带,春季水华与夏季水华相比,对细菌活性具有不同的影响,并以不同的途径进行能量流动。

二、微生物与食物链

食物链(food chain)是生物群落中各种生物彼此之间由于摄食关系所形成的一种链索关系。食物链在水生态系统内占有重要地位。食物链中的一个营养级向邻近的较高营养级转变过程中,有 80%~95%固定于生物体内的化学能可能损失。鉴于鱼类高质饲料的大量短缺,所以不仅要知道食物链的终端营养级,而且也要保证最早的营养级生物的可能数量,这是极其重要的,因此,若养殖浮游生物食性的鱼类,用以代替捕食性鱼类,那么就可能获得高得多的蛋白质收获量。研究这方面的基本原理,是鱼类生物研究所特别感兴趣的领域,揭示微生物在食物链中的作用意义重大。

在各种水体中,细菌和真菌在食物链中具有重要功能,它们吸收溶解有机物。有机物的大部分是由初级生产者(即浮游植物)释放入水中的。此外,在内陆和沿海水域,特别是河川,它们与含有大量动植物的陆地相邻,有机物很多不是来自初级生产者,而是来自周围陆地上的死叶片、动物粪便以及其他有机物,水体本身含有的动植物尸体及动物粪便和排泄物也是水体有机物来源。这些有机体通常被细菌极其迅速地转化为颗粒物质(即有机碎屑),然后被其他生物所消耗。这类有机物依此方式被引入食物链,否则低浓度有机化合物就不能被利用。细菌和真菌可被多种不同的动物用作食物(图 11-1),这些动物代表了食物链的不同的营养级。首先,细菌和真菌作为初级消费者即草食性浮游动物的食物。而属于次级消费者的肉食性浮游动物,也摄取细菌和真菌作为其通常的食物,在某种意义上,是将其作为营养的补充物。随着动物个体的增大,这种补充物的重要性反而变得越来越小,对终端消费者来说这种作用甚微或几乎没有作用。

在海洋,细菌可利用 10%~50%的初级生产者所固定的碳作为食物(Azam et. al., 1983)水中自由生活的细菌数量可能受隶属于微型浮游生物的异养鞭毛虫的控制,这类鞭毛虫和细菌,连同自养鞭毛虫都是大多数微型浮游动物的食物。这些生物大小为 10~80 μ m,与大多数浮游植物的个体大小相当,且是较大型浮游动物的食物。依此方式,浮游植物通过分泌和溶解释放出的一部分有机物,又重新返回到直流的食物链中。当这类浮游植物占

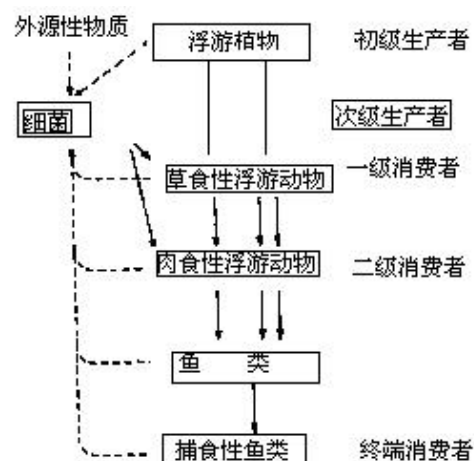


图 11-1 开阔海区细菌的地位

优势而不被浮游动物消耗掉或仅摄食很小的量时，细菌对碳化合物的转化就特别重要。例如，在夏季形成蓝细菌水华的同时，其藻丝上有大量细菌着生，并旺盛繁殖。开始为球菌，随后有杆菌和其他细菌。在絮状物的表面水域也存在数目众多的异养鞭毛虫类、纤毛虫、轮虫和甲壳动物。蓝细菌所固定的二氧化碳就由细菌而传入食物链。Caron 等(1982)在 Sargasso 海的水华和根管藻(*Rhizosolenia*)浮膜处做了类似观察。这里，细菌和摄食细菌的原生动物也大量发生，其种群密度比水中的高 10^4 倍以上。

真菌在溪流和河川中具有重要作用，它参与秋季落叶在水中的降解，它们将这些叶子转化成腐屑，以便无脊椎动物更好地利用。真菌具有降解纤维素、木聚糖和果胶的能力，可使这些物质变得柔软，更利于动物吸收利用。真菌同样可作为动物(如毛翅目昆虫幼虫)的食物。虽然真菌的分解活性低于细菌，但是大量的陆地植物经此种途径进入水体食物链。

细菌和真菌在给浮游植物提供二氧化碳方面也具有一定意义。在藻类水华出现时，环境中二氧化碳成为藻类生长的限制因子，这时由细菌和真菌提供二氧化碳。

当考虑其营养来源时，异养细菌和真菌的特殊地位就变得一目了然。食物链的所有营养级中都有这两类微生物存在，因为所有生物都释放、分泌或排泄有机物质，这些有机物质又优先被细菌所消耗。此外，在湖泊和沿海水域它们也能利用外源性物质。在河流湖泊，特别在人工湖泊(水库)中，外源性物质的比例有时大于这些水体内初级生产者同化作用所产生的物质，它们主要是被异养菌或真菌所利用而进入食物链。

综上所述，细菌在水生动物营养上起着极其重要的作用。不仅原生动物、轮虫、甲壳动物、软体动物等摄食细菌，一些鱼类也食细菌。水中细菌多集聚成絮状、片状和块状等聚合体，许多动物不能吃单个细菌但可吃聚合体。可见细菌是一种营养丰富的食物，目前光合细菌已大量培养，应用到水产养殖中，既能改善水质，防治鱼病，又能作为饲料添加剂，很好地促进水产经济动物的生长。

三、微生物与物质循环

细菌和真菌等微生物在水体的物质循环中起着决定性的作用，它们参与有机物质的初级生产的意义很小，但是它们能大规模地将有机质矿化。在适宜条件下，它们能分解所有天然有机化合物，将其分解成原初成分，即二氧化碳、水及各种无机盐。它们的营养类型极多，生活性强，自然界中的绝大多数物质都能被这些微生物分解和利用，例如荧光假单胞杆菌能利用 200 多种有机物质。以下着重介绍微生物在水体物质转化(即物质循环)中的作用。

(一) 物质循环的基本概念

生态系统的物质循环就是生物地球化学循环，即一切生物将所需的化学元素自非生命物质状态转变成有生命物质状态，然后再从有生命物质状态转变成非生命物质状态，如此循环，以致无穷。物质循环和能量流动是生态系统的功能单位，但二者具有本质上的差别。能量流经生态系统，沿食物链营养级向顶部方向流动，能量以自由能的最大消耗和熵值的增加，以热的形式而损耗，因此能量流动又是单方向的，所以生态系统必须不断地从外界获取能量。物质流动则是循环往复的，各种有机质最终经过还原者分解可被生产者吸收的形式重返环境，进行再循环。

有机体生命过程中需要 30~40 种化学元素，按其作用及需要量可将之分为能量元素、常量元素和微量元素。其中每一种化学元素在生物地球化循环中都有其特性，对生命系统具有特殊的作用。通常用“库(Pools)”来表示物质循环中某些生物和非生物中化学元素的

数量。例如磷在水体中的数量就是一个库，在浮游植物体中的含量又是一个库。化学元素在库与库之间的转移，并彼此连接起来就是物质流动或称物质循环。一般来说，生物地球化学循环中的各种物质，在自然状况下应该是平衡的，即各库之间的输出量应等于输入量。如果物质循环受阻，平衡被打破，后果将不堪设想。

物质循环主要分为两种主要类型，即气体型循环与沉积型循环。前者如碳、氮的循环，其主要贮库是大气和海洋；后者如磷循环，其主要贮库是土壤、沉积物等。

(二) 水中有机物质的生产量

水中有机物质的生产主要归咎于蓝细菌和真核藻类，即在显微镜下才能看到的小型浮游植物尤为重要。高等植物仅分布在沿岸区。

大多数细菌和所有真菌都是异养生物，因此它们不参与有机物质的生产。仅有很少的光能自养细菌和化能自养细菌能称为初级生产者，它们的产量相当小，只有在极其特殊条件下，光能自养细菌和化能自养细菌才能大量繁殖。这些细菌为专性厌氧菌或微需氧菌，在溶解氧丰富的水体不能生长。它们的繁殖，除了需要一定的厌氧条件外，还需要足够的光照和适宜的供氢体。如绿硫细菌和紫硫细菌需要硫化氢，而其他一些光合细菌需要有机酸或其他有机化合物，但这些条件难以满足。在某些水体，如富营养池塘或小型湖泊，以及海岸区的泻湖和水池，可能有光合细菌旺盛生长，并伴随大量有机物质的产生。

化能自养菌在水中有有机物质产量上似乎没有太大意义。如硝化细菌几乎遍布所有的需气水体，并且它们中的绝大多数都能进行硝化作用，合成有机物质。但其数量在几乎所有水体中都相当少，因而只能产生少量的有机物质。硫氧化菌，特别是硫杆菌属的种类，它们偶尔在分别含有氧气和 H_2S 的水体中积累，即在很受限制的环境中生长。自养铁细菌和锰细菌也只是区域性地繁殖，Starkey(1945)指出，铁细菌必需氧化 280g 的亚铁才产生 1g 细胞物质。在富营养湖，氧化氢气、一氧化碳或甲烷的细菌也作为初级生产者起到一定作用。

然而，异养细菌和真菌的次级产量相当可观，有 20%~60% 的有机营养被用于微生物物质的生物合成，而 40%~80% 参与能量代谢。用细菌的世代数乘以存在于水体中的细菌生物量，可计算出细菌年碳生产量。水生细菌的世代时间不同，这取决于其种类、温度、营养物含量及其他因子，一般在 20min 或几天之间。在转暖的富营养水体；世代时间可能平均为几小时，而在较冷的贫营养内陆水体和大部分的开阔海区，这一时间可能需要几天。若每毫升水含 1 000 个细菌、代时间为 24h，那么年生产量为 $7.3\text{mgC} / \text{m}^3$ 。

大量的有机物质，其中大部分可转变为细菌的生物量，在适宜的光照条件下，也被浅水水体的微型底栖植物或大型底栖植物所利用。

(三) 碳素循环

水中的碳素包括 CO_2 、碳酸盐和有机碳。地球大气圈的空气中约含有 0.032% 的 CO_2 ，总计含有 $2.3 \times 10^{12}\text{t}$ 。在海洋中， CO_2 的含量约为空气中的 50 倍，且大部分以碳酸氢盐形式溶解于水中。水体与大气的气体交换量，每年约为 $0.1 \times 10^{12}\text{t}$ 。水中的有机碳化合物包括水生动植物的排泄物及其尸体，以及来自于陆地的多种形式的有机碳。水中的初级生产者(光合细菌、蓝细菌、藻类和水生植物)通过光合作用固定 CO_2 ，将之转化为有机碳化合物，经食物链而被水生动物所利用。水生生物在新陈代谢过程中，分解一些有机碳化合物，产生 CO_2 。水生生物的分泌物及其残体以及外来的有机碳化合物最终又经微生物分解，形成 CO_2 ，重新作为水生自养生物的碳源。在循环中，有一部分无机碳或有机碳由于外流和

升入大气而又离开水生态系。这就是水生态系中发生的碳循环的主要过程(图 11-2)。

碳素是构成所有有机物质的基础,因此碳素循环在水生态系统中具有重要作用。几乎所有生物都参与碳素循环,而碳素循环的中心就是 CO_2 , CO_2 的存在是地球上生命存在的先决条件,在完整的水生态系统中亦是如此。这些需要碳素循环正常运转来保证,哪里碳循环受阻,哪里就可能发生生态系统的混乱。

碳循环受水中氧含量的影响很大。这一循环在有分子氧存在时迅速进行,当缺氧时,碳化合物的分解至少减慢。只要结合氧以亚硝酸盐、硝酸盐或硫酸盐形式仍然可利用,碳循环就会通过硝酸盐和硫酸盐呼吸作用而趋于完成。这一过程也可能受细胞内呼吸影响,然而伴随发酵过程,经常有中间产物积累,只有部分有机物质产物被分解成 CO_2 。依此方式,除了其他化合物之外,还经常累积有机酸,在适宜条件下,使甲烷发酵。在这些过程中也产生少量的一氧化碳。如果氧气能够被利用,那么这些中间产物都能被氧化为 CO_2 。

当然水体的碳循环也依赖于更多的因素,例如依赖于 pH 和现有的氮磷化合物。每当存在不适条件碳循环受到干扰时,中间产物就易于富集,它们能随沉积物而沉降。在地质时代的过程中,这些有机沉降物会占巨大比例,它们可能遭受更多的转化,这样就形成了石油、天然气、褐煤和泥炭矿藏。

大多数天然有机化合物仅由碳、氢和氧 3 种元素构成。陆地上产生的有机物中这三种元素的数量比例大于水中形成物中的比例。然而,在形成腐殖质土壤中有大量氮的富集,因此这里的 C / N 比值由 40:1 变成 10:1。

总之,生物性碳循环不是完全依靠动物或植物的存在,仅有微生物存在,碳循环也照样进行,特别是海洋内,因为海洋含有的大量硅藻和鞭毛虫,光合作用超过陆地植物。

(四)氮素循环

氮是蛋白质和核酸的主要成分,是构成生物体的必要元素。水中的氮包括无机氮和有机氮。无机氮主要以氨、硝酸盐、氮化物和分子氮形式存在。有机氮主要以氨基酸、酰胺氮、嘌呤和嘧啶等形式存在。水中的分子态氮被有固氮作用的细菌和蓝细菌固定成氨基氮,并转化成为有机氮化物,通过食物链进一步转化为动物蛋白。水生生物及其含氮的排泄物等有机氮化物,被各种微生物所分解,再以氨的形式释放出来供水生植物利用,或被进一步氧化成为硝酸盐。硝酸盐可被植物利用,也可被进一步还原为分子态氮。这就是水环境中的氮素循环,整个过程包括固氮作用、氨化作用、硝化作用以及脱氮作用(即反硝化作用)(图 11-3)。

1. 固氮作用 分子态氮被还原成氨和其化合物氮化物的过程称为固氮作用。通过微生物作用的固氮方式称为生物固氮。水中的生物固氮是由水中的各种细菌和蓝细菌所完成的。

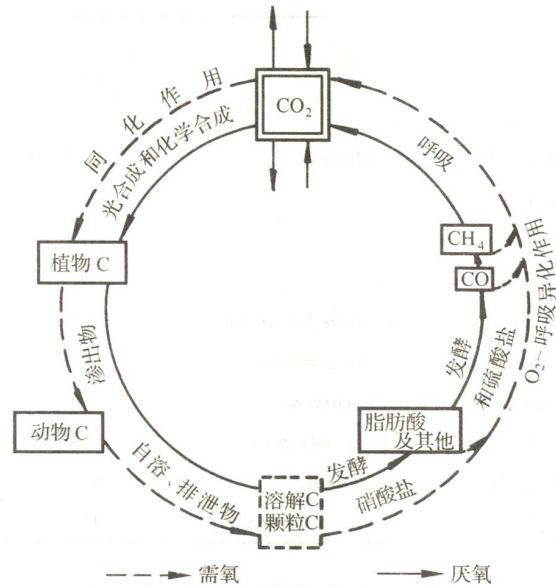


图 11-2 碳素循环

生物固氮作用是固氮生物的一种特殊的生理功能。自从 Beijerinck 于 1888 年第一次分离出固氮微生物后的一百年来，随着研究方法的不断改进，愈来愈多的固氮微生物被发现，对其固氮机理的研究也有了长足的进展。

与土壤中相同，水体也进行着分子氮的固定，它是由水中的各种细菌和蓝藻所完成的。生物固氮即固氮微生物将氮转变为生物能够利用的氨的形式。固氮微生物包括细菌、放线菌和蓝藻，它们均属原核生物。

在细菌中，特别是敏捷固氮菌(*Azotobacter agile*)、*A. chroococcum* 和固氮单胞菌属 *Azomonas* 的种类，在好氧环境中起着重要作用，它们经常在河流和湖泊中出现。*Azomonas agilis* 和 *A. insignis* 迄今为止仅在水体中分离到，而在土壤中尚未出现。

在厌氧沉积物中，巴氏芽孢梭菌(*Clostridium pasteurianum*)和一些相关微生物是重要的氮固定者。新近的研究表明，除固氮菌属和芽孢梭菌属外，脱硫弧菌(*Desulphovibrio*)、假单孢菌、气杆菌、弧菌、五色杆菌、产黄菌(*Flavobacterium*)、棒状杆菌等属也能够固定游离氮。

专性好氧的固氮菌属的种类能利用很多有机物质作为能源，它们大约需要 50g 的葡萄糖才能固定 1g 的氮。固氮菌属对阳光和紫外线辐射具有很强的抗性，因此该菌的数量在内陆湖泊的浅水带下层很丰富，此处的固氮作用大于深水带。在湖泊中，水和积物中的固氮菌的数量，夏季大于冬季。

所有光合细菌都能固定分子氮。富营养湖在夏季分层时，固氮作用明显。这时，在金属跃层(metalimnion)有大量紫硫细菌和绿硫细菌生长繁殖。具有异形胞的蓝藻的固氮作用大于细菌。在好氧环境中，在异形胞处发生固氮作用大致与同化作用平行，且呈现明显的日节律，即使在夜间也不停息。不能形成异形胞的丝状和单细胞形式的蓝细菌也能固氮。在水生态系中，无土壤中的共生性固氮系统，少量的分子态氮由异养菌固定，而大部分由蓝细菌所固定。不过，在富营养水体的沉积物中则以细菌为主。

2. 氨化作用 含氮有机物在微生物作用下释放出氨的过程，称为氨化作用。它对水生生物连续地将氨返回氮循环具有特殊意义。很多蛋白质分解细菌和很多真菌能进行这一作用。当然，在不同水体中其数量不同，在蛋白质能利用的地方，它们就极其迅速地增殖，因为大多数蛋白分解菌的世代时间相对较短。氨化作用的最适温度一般为 30~35℃，而在温带的水体中很少能达到这一温度。但即使在 0℃ 这一作用也不完全停止，在薄冰下仍继续进行氨化作用。在接受污水的水体中，冬季蛋白分解菌的数量远大于夏季，但氨化过程较弱。

氨化作用在好气性和嫌气性条件下均能进行。氨化作用形成的氮首先被细菌利用变成

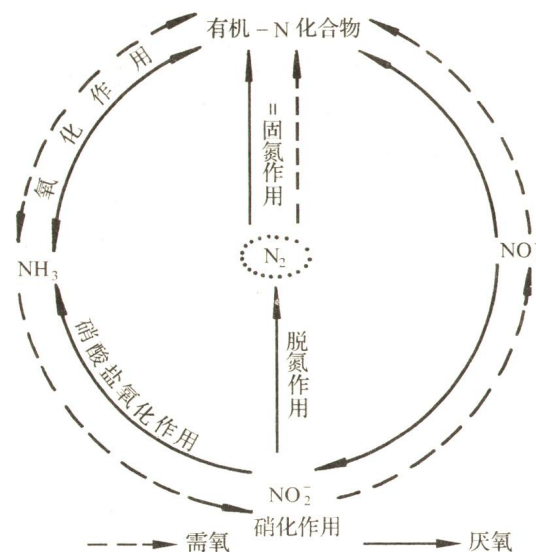


图 11-3 氮素循环

菌体蛋白质等，余下的在水中形成溶解的无机态氮。

3. 硝化作用 在微生物作用下，氨转变为硝酸盐的过程，称为硝化作用。蛋白质分解期间释放的氨可作为自养和异养微生物的氮源，这也可作为硝化细菌提供能量。在氧气存在时，氨氧化为亚硝酸盐，进一步氧化为硝酸盐。

化能自养的硝化细菌需由硝化作用获得能量，还原二氧化碳，形成有机物质。硝酸盐是有机氮化合物矿化作用的最后一步。硝酸盐经由河流入海，成为这里浮游植物极其重要的氮源。

在亚硝化作用中，也形成 N_2O ，在氧含量低时尤为如此。在内陆水体中，发现有与土壤中相同的硝化细菌，即亚硝化细菌、亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas europaea*)和硝化细菌维氏硝化杆菌(*Nitrobacter winogradskyi*)。除化能自养细菌外，异养菌也能进行微弱的硝化作用。

亚硝化细菌和硝化细菌利用硝化作用放出的能量而生活，是自养性细菌，适当的有机质有利于它们的生活。在泉水和极清洁的溪流及湖泊中没有发现硝化细菌，但在富营养湖和河流，已经证明它们能进行旺盛的硝化作用。硝化作用受 pH、光照、离子浓度等因子影响。亚硝化细菌在中性环境中生活最好，对 pH 的适应性强，但以碱性环境为宜。含钙量对硝化作用也有影响，含钙量低于 $20\sim 40\text{mg/L}$ 时，硝化作用受到严重抑制，降到 $10\sim 15\text{mg/L}$ 时，硝化作用则完全停止。在一定温度范围内，硝化作用还随温度的升高而增强。

4. 脱氮作用 微生物利用 NO_3^- 、 NO_2^- 作为呼吸系统的电子受体，生成 N_2 或 N_2O 的过程，称为脱氮作用，亦称反硝化作用。硝化作用仅在氧存在时才可能发生，而在厌氧环境中，如果有机氢供体存在，脱氮作用就在很多兼性厌氧细菌作用下进行，在厌氧条件下，硝酸盐或亚硝酸盐分别作为氢受体，此称为硝酸盐呼吸。在大多数生态环境中，很多生物能将硝酸盐还原成亚硝酸盐，再从亚硝酸盐变为游离氮。因此，哪里有活跃的脱氮作用，哪里就首先产生丰富的亚硝酸盐。细菌具有脱氮作用能力已在所有水体中得到实际证明。一旦缺氧，酶系统开关就转向硝酸盐呼吸。然而，这需要一些时间，因为特殊的硝酸盐还原酶仅在厌氧条件下合成。另一方面，在好气条件下，开关便转向有氧呼吸。这表明硝酸盐呼吸是在没有更多的氧可供利用时才行使作用的一种替代装置，其产能仅比氧作为氢受体的低 10% 左右。

在一些水体中，尽管有氧存在，脱氮作用仍然进行。这种情况主要见于含较多腐屑的水体，微生物在腐屑颗粒表面生长，能制造微缺氧区，在此处发生脱氮作用。在河流的开阔水域，脱氮作用一般很少发生，由于这时水域的氧含量太高。即使有大量腐屑存在，但只有在氧含量降低到 50% 饱和度以下时，才可能发生明显的硝酸盐还原作用。当河流有一段时间被冰覆盖，与大气没有气体交换时，若水体含较多腐屑或溶解有机物质，异养细菌旺盛繁殖，而消耗大量氧气，造成缺氧状态，导致强烈的脱氮作用。但在清洁河流，耗氧量非常小，只有少量氮通过脱氮作用而损失。

在静止水体中，脱氮作用是非常普遍的，例如在夏季和冬季分层期的富营养湖的湖下层就是这样。在海洋的厌氧区可能发生活跃的脱氮作用，硝酸盐含量降低和亚硝酸盐暂时增加。在此处沉积物的表面这一作用也特别强烈。

在静止水体中，也存在硝酸盐氨化作用，即硝酸盐经亚硝酸盐还原成氨。少数的细菌能够进行这一反作用，例如各种杆菌属的细菌和大肠杆菌的一些菌株能进行硝酸盐氨化作用(Denk, 1950)。在池塘和小湖泊的较深层通常含有大量氨，这并非仅由正常的氮化作用

所产生。在污水净化厂，硝酸盐氨化作用非常重要。自然界的硝酸盐氨化作用可能比脱氮作用少得多，但迄今为止，这种作用尚未得到充分证实。

综上所述，氧气对氮循环具有重要影响，它的存在决定着硝酸盐的产生或破坏，也决定着氮平衡偏向正平衡或负平衡。在富含腐屑的水体中，特别是在沉积物中，硝化作用和脱氮作用过程随处都能发生。

(五) 硫循环

微生物需要硫元素，因为其细胞内含物中有许多是有机硫化物，如半胱氨酸、蛋氨酸、生物素、硫胺素等。硫和无机硫化物还提供给自养细菌能源。硫主要以有机硫化物、硫酸盐、硫化氢和元素硫等形式存在。微生物在硫的循环转化中具有重要作用。

在蛋白质降解期间，除氨外，还释放少量硫化氢，这主要起源于含硫氨基酸，如半胱氨酸和蛋氨酸。一些蛋白分解菌也能进行这一反应，借助脱硫酶释放巯基。当然，硫酸盐可被浮游植物及其他水生植物吸收利用，并合成含硫氨基酸，继而合成蛋白质。

在有氧环境中硫化氢并不稳定，被化学作用或被细菌和真菌所氧化。微生物氧化作用经一些中间产物生成硫酸盐，这是有机硫化物矿化作用的末端步骤，并且作为绿色植物硫元素的重要来源，这一过程也称为硫化作用。

一些化能自养细菌能氧化硫化氢及其他可氧化的硫化合物，如硫元素、硫代硫酸盐和亚硫酸盐利用获得的能量来还原二氧化碳。它们中最重要的是硫杆菌属(*Thiobacillus*)的多数种类，也包括白硫菌属(*Beggiatoa*)和丝硫细菌属(*Thiothrix*)等丝状硫细菌。除了专性和兼性化能自养细菌外，很多异养微生物(细菌和真菌)也能氧化含硫化合物。光合自养的紫硫细菌和绿细也能氧化还原含硫化合物生成硫或硫酸盐，以便增加氢来还原二氧化碳。

在水体中硫杆菌属是最重要的硫氧化者，它们分布极广，在绝大多数河流、湖泊和沿海水体都存在。在适当的条件下，它们在产生 H_2S 的地方大量增殖。除需氧种类外，也有兼性厌氧种类，如脱氮硫杆菌，(*T. denitrificans*)。此细菌能进行硝酸盐呼吸，在含硝酸盐的无光层厌氧环境中，氧化硫化物，在厌氧环境中积累。因此，在富营养湖内含 H_2S 和含 O_2 的水域之间，通常具有分明的界面。这一界面如果位于无光层，那么它就是需氧的硫杆菌的主要栖所，如果位于真光层，那么紫硫细菌和(或)绿细菌大量增殖，硫杆菌仅起次要作用。它们能造成水体中硫化氢含量的日波动。河流、海洋、泻湖或沿海湖泊中常含大量光合细菌，而硫杆菌也仅在无光层增殖。在含有硫化氢的沉积物表面，以白硫菌属和丝硫细菌属的细菌为主，它们可形成像蜘蛛网那样的白色覆盖物。具有卵圆形或球形细胞，其内含有硫颗粒和部分 $CaCO_3$ 内含物的五色菌属和卵硫细菌(*Thiovulum*)也起类似作用。

微生物产生硫化氢有两个不同的途径，其一是通过含硫有机化合物的分解，称为腐败作用；其二是通过硫酸盐还原作用。在淡水环境中有机化合物产生 H_2S 是很有意义的，因为淡水中硫酸盐离子浓度通常很低。但硫酸盐还原是海水中形成 H_2S 的主要过程，因为海水的硫酸盐浓度较高。

硫酸盐还原作用需要硫酸盐还原细菌参与。还原的必要条件是缺氧和给还原作用供氢的有机质存在。由细菌还原产生的硫化氢可逸散到空气中，而从基质中损失掉，这一过程也称为脱硫作用。硫酸盐还原菌通常是专性厌氧菌，不能在有氧环境中生长，完全依赖于硫酸盐呼吸。最广泛分布的硫酸盐还原菌为脱硫弧菌(*Desulphovibrio desulphuricans*)，存在于湖泊、池塘的底泥和水层中。在海洋中还有其近缘种 *D. aestuarii*。此外，脱硫肠状杆菌(*Desulphotomaculum*)、致黑梭状芽孢杆菌(*Clostridium nigrificans*)、假单胞菌(*Pseudo-*

monas zelinskii)等也能还原硫酸盐。

水体底泥通常缺氧或无氧，并富含有机物质，因此硫酸盐还原作用较为旺盛。此外，脱硫作用也见于富营养湖泊和池塘以及海湾的低氧区。黑海存在的绝大多数硫化氢也是由脱硫作用产生的。

硫循环(图 11-4)受氧气条件的影响。当在有氧条件下，有机硫化物被矿化成硫酸盐，在无氧环境下，便有 H_2S 产生，并发生硫的损失。

(六) 磷循环

与无机氮化合物一样，磷酸盐也是很多水体植物的限制因子。磷是所有生物生命活动极其重要的元素，是核苷酸的组成成分。此外，磷还存在于磷脂、磷酸己糖和肌醇六磷酸钙镁等化合物中。水体存在的磷形式有溶解无机磷、溶解有机磷和悬浮的颗粒磷。很多细菌能够以多聚磷酸盐的形式将磷酸贮藏在异染粒中。水体中磷的短缺可能限制细菌和真菌对有机物质的分解。因此，磷的周转时间通常很短，在夏季水温范围内，从几分钟到几天不等。很多细菌和真菌通过分解有机磷化合物释放磷酸盐，因此将之返回到物质循环中。

与氧含量相关联的水和沉积物之间的磷交换具有较大意义。在有氧条件下，磷主要参与铁和铝的磷酸盐的形成。在氧气消失之后，例如富营养湖泊在夏季和冬季分层期，铁转变成成为二价形式，形成可溶性的磷酸亚铁，水中磷酸盐浓度增大。因为在无氧环境中经常发生细菌性的硫酸盐还原作用，所以就经常观察到氢形成作用和磷酸盐浓度之间的密切相关，因此硫化铁沉淀下来。这一过程在富含硫酸盐的沿海地区水体(如滩头、池塘和河口)特别易于发生。

水体有时含有大量的固态磷，如骨骼和 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ，但很多细菌能够溶解磷酸钙，最常见的是通过生成有机酸而实现这一过程。铵化合物的形成也有助于磷酸钙的溶解。在湖泊、池塘和水库中，参与磷酸钙分解的常见微生物有假单胞菌、产气单胞菌、埃希氏菌、芽孢杆菌和细球菌等属的种类。一些细菌也可吸收少量的非溶解的磷酸钙。磷循环模式见图 11-5。

(七) 铁和锰循环

铁几乎存在于所有的水体之中，但通常含量很少。它属于生命必需的元素，是细胞色素酶等的组成成分。一部分铁细菌能将铁氧化为亚铁化合物。

铁细菌用获得的能量来还原二氧化碳。有些种类还可利用锰代替铁，且以类似的方式将亚锰化合物氧化为锰化合物。

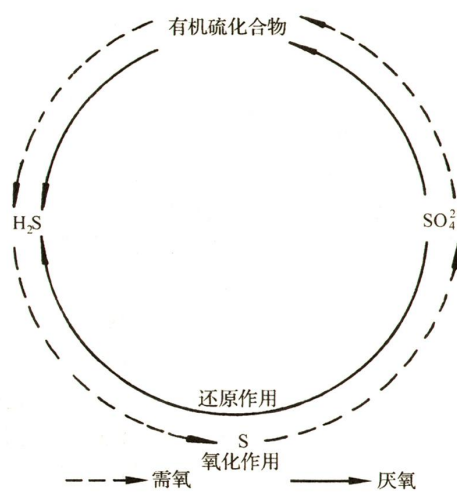


图 11-4 硫循环

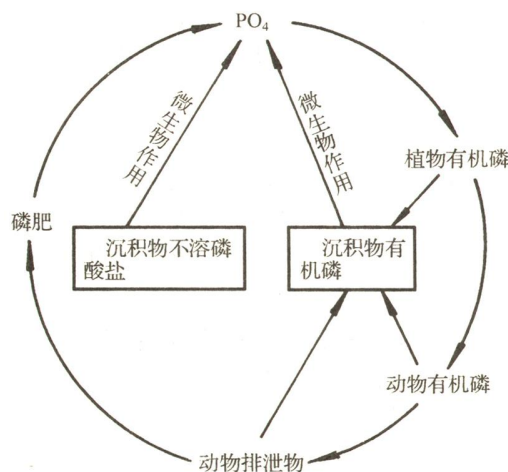


图 11-5 磷循环

大部分铁细菌，如氧化亚铁杆菌(*Ferrobacillus ferrooxidans*)；硫杆菌属、铁锈色披毛菌(*Gallionella ferruginea*)、赭色纤毛菌(*Leptothrix ochracea*)、多孢子铁细菌(*Crenothrix polyspora*)、厚膜菌(*Clonothrix fusca*)等，能够将亚铁离子氧化为高铁离子，利用这个过程所产生的能量同化二氧化碳。这些细菌一般分布在各种类型的水体中，对水体内铁的循环具有重要作用。其中氧化亚铁杆菌、硫杆菌、铁锈色披毛菌是专性化能自养菌；而赭色纤毛菌、多孢子铁细菌是兼性化能自养菌，能利用诸如蛋白胨等有机物质。除了上述铁细菌外，大部分隶属于铁囊菌科(*Siderocapsaceae*)的一些铁氧化细菌也存在于水体中，如铁囊菌(*Siderocapsa geminata*)能利用铁和铁化合物。

铁细菌在淡水中很常见，且在井水和泉水经常大量繁殖，甚至用肉眼经常能看到这些细菌的菌团。在湿地溪流、沼泽和池塘中铁细菌有时数量也很大。它们可能对水力造成危害，如果水体中含有少量的亚铁盐，那么铁细菌就可能在管道中取得立足点，立即不断地沉淀氢氧化铁，直至完全阻塞管道。锰的沉积也能阻塞管道，这在水电站的管理中应引起注意。

铁细菌通常需要亚铁盐、氧气和二氧化碳供其生长，环境呈碱性时，亚铁无机盐氧化为铁时有发生。因此，铁的生物性和化学性氧化作用到处都可见。在水中，铁通常以溶解性的 $\text{Fe}(\text{HCO}_3)_2$ 形式存在。贫营养水体的溶解氧丰富，且呈微碱性，铁大都以氢氧化铁或磷酸铁形式沉淀下来，在泉水及其溪流中经常发现这些铁形成的褐色铁沉淀。在富营养湖的循环期也常形成铁沉淀。

总之，水中铁的沉淀都直接或间接与细菌的生物过程有关。在海洋底泥中， Fe^{3+} 还原为 Fe^+ ，其与硝酸盐还原兼性厌氧细菌有关。在沉积物的表面区， Fe^{3+} 的还原作用主要归咎于微生物。当可利用的硝酸盐很少时，这一过程对矿化作用极为重要。

微生物也能形成有机铁和锰复合物，各种有机金属化合物和复合物又能被微生物分解。这在一些富营养湖泊中特别重要。

(八)各循环的相互作用

在生物界的物质循环中，各种元素的循环常有联系，如碳价的改变常和氧价的改变相联系，因此碳循环内包括氧循环。单个元素的循环是自然界物质大循环的一部分。于是，参与的微生物经常同时转化千差万别的化合物，由此参与一些元素的循环。例如，脱硫菌将硫酸盐还原为硫化氢，其目的是氧化碳化合物。随后，硫杆菌氧化硫化氢获得能量用于还原二氧化碳，因此合成碳化合物。脱氮硫杆菌能依此方式通过硝酸盐还原作用获得氧气。蛋白分解菌能在分解蛋白质过程中释放二氧化碳、硫化氢和氨，在上述元素循环中同样起着重要作用。磷循环或铁循环也可通过微生物的活动与其他元素循环相联系。

由细菌、真菌和涉及的不同元素量的转化，对理解水生态系统中它们的相互关系具有决定性意义。例如，为合成1 g 细胞干物质，氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)要氧化156g Fe^{2+} ，*T. neapolitanus* 要氧化30g $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ，亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)要氧化30g NH_3 ，而富营养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)要氧化0.5g H_2 (Schlegel, 1981)。既然细菌细胞约含有50%碳、20%氧、14%氮、8%氢、3%磷、1%硫、1%钾、0.5%钙、0.5%镁和0.2%铁，那么就能辨别多种多样的转化。例如，在氮循环中，亚硝化单胞菌把氨氧化成亚硝酸。因此，参与细胞结构的所有元素的循环或多或少有牵连。在纯培养的规定生长条件下，反应可以定量化。而在自然环境中是不可能的，这里会发生许多次要的和相反的生化过程。因此，在适当条件下，水和沉积物中可同时进行固氮作用、氨化作用、硝化

作用和脱氮作用，借助于各种同位素，有可能确定氮和碳的流动。但目前这类调查大多数局限于单个元素的循环上，特别是用于氮和磷的循环。阐明各种循环之间的量的关系是未来最重要的课题之一。

总之，各种元素的循环彼此有关，并非单独进行，而且是通过微生物联合起作用。自然界物质循环与微生物生态密切相关。

四、微生物与水污染

水污染是指污染物导致水体的利用范围减小的所有变化。污染既改变了水的理化性质，也变了水生生物的群落特点。垃圾和污水以很多方式影响着水体的微生物区系。特别是随着生活污水的排放，很多微生物进入河流、湖泊和沿海水域，工业废水的排放亦然。因此，水体增加了大量的有机或无机营养物及毒害物质，这会造成细菌和真菌以及藻类等微生物的大量增殖。另一方面，微生物区系经常受到抑制，甚至受到有毒物质的严重破坏。随着污水，病原菌和真菌也进入水体，并可能导致传染病流行。

通过对有机废物的分解，微生物对水体自然自我净化贡献极大。它们在污水净化方面具有类似功能。在这些过程进行期间，随着有机营养物质的含量减少，水体细菌含量也相应降低。微生物在污染监测、污水处理或加速水的净化方面起着极其重要的作用。

(一) 污水的微生物区系

在很多情况下，污水具有特征性的微生物区系。在含有大量粪便、废水和剩余食物的生活污水中细菌特别丰富。所发现的生物大多是腐败细菌，如荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)、阴沟气杆菌(*Aerobacter cloacae*)、生枝动胶菌(*Zoogloea ramigera*)及其他种类。此外，还有数量众多的其他生理型的代表，特别是分解糖、淀粉、脂肪、尿素和纤维素的种类。大肠菌群的比例相对较高，它是含有粪便物质水体污染的重要指示种类。在城市污水中，大肠杆菌的数量一般在每毫升几万到几十万个，甚至更多。产气气杆菌(*A. aerogenes*)也经常被发现，与埃希氏杆菌属一样，它隶属于肠杆菌科。粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)，也是人类肠道的栖息菌。此外，还存在有数量众多的噬菌体。

在富含有机质的污水中，鞘细菌也很重要，特别是浮游球衣细菌(*Sphaerotilus natans*)，常被误称为“污水真菌”。它是典型的污水生物，常覆盖在杂草丛生的强烈污染水体的水底，且肉眼可见。在河流中，菌丝和菌胶团被破碎，常大量漂浮于水中，这称为菌丝体漂浮。如果氧气供应良好，温度 5~20℃，且 pH 为 6~9，浮游球衣细菌就可大量繁殖。它主要利用碳水化合物、一些有机酸、蛋白质及其组成单位作为营养物质。浮游球衣细菌不仅生长于生活污水中，而且也生长于来自纤维素工厂和各种食品工业的废水中。特别在春秋季节，当水温在 10℃左右时，在适度污染的流水水体该菌就大量发生。这一温度范围最适合于浮游球衣菌生长，胜过于污水中的大多数竞争者。它的旺盛生长与大量氧的消耗相关联。因此，如果有大量的球衣细菌定居在静止水体表面，其旺盛生长会引起大量溶解氧的消耗，容易发生缺氧。随后球衣细菌大批死亡，并经受腐败，伴随其他产物的生成。硫化氢的形成作用通常被细菌性硫酸盐还原作用所加强，因为污水中常含有大量的脱硫细菌，尤其是脱硫弧菌(*Desulphovibrio desulphuricans*)，它在营养丰富并且厌氧的条件下容易生长。很多污水水体也含有硫氧化细菌，特别是硫杆菌、丝硫细菌和白硫细菌各属的种类，当硫化氢产生时，它们能极其迅速地繁殖。此外，脱氮硫杆菌和脱氮微球菌等脱氮菌，以

及甲烷产生菌和 *Knallgas* 细菌等其他细菌都大量存在于生活污水和一些工业污水中，也有赭色披毛菌和氧化亚铁硫杆菌等多种铁细菌。在含有石油的污水中有分解碳氢化合物的细菌存在，主要是假单胞菌属和诺卡氏菌属(*Nocardia*)的种类。

在农业废水和污水中，特别是含有家畜排泄物的水体，一般能发现大量的黏细菌，特别是黏球菌(*Myxococcus*)、囊杆菌(*Cystobacter*)和多囊黏菌(*Polyangium*)等属。因此，这些细菌可作为地下水、河流和湖泊相应污染的指示种类。

在有机污染物占优势的污水中，除细菌外还有数目众多的真菌存在。因此，城市污水通常富含酵母和酵母样的真菌。例如，在基尔市的污水中，每升有 4 000~200 000 个酵母，最常见的是酵母属(*Saccharomyces*)的种类，也存在念珠菌属(*Candida*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)、红酵母属(*Rhodotorula*)等酵母。在一些食品和饮料工业污水中也经常发现有极高的酵母计数。

通常，生活污水也含有大量真菌孢子和菌丝，严格意义上的污水真菌是乳酸细丝菌(*Leptomitus lacteus*)和水生镰刀菌(*Fusarium aquaeductuum*)。在污水严重负荷的水体中，它们大量发生，与浮游球衣细菌一样，也能造成菌丝漂浮。这些真菌适宜在受纤维素工业硫化物碱水污染的水体中生长，它们的主要食物是碳水化合物，在 1L 用过的硫化物碱水中含真菌 35~759g。真正的污水真菌能在 pH 为 3~9 时生长。此外，污水中还存在藻类、原生动物和病毒等。藻类大量繁殖时常引起水浑浊、变色和变味。有些藻类对水生动物具有毒害作用。许多病毒由人类的肠道排泄出来，经污水进入饮水水源。核糖核酸病毒是污水中最常见的一种，它包括脊髓灰质炎病毒、考克赛病毒和呼肠孤病毒。由污水和水生贝类动物中分离到的传染肝炎的病毒，也归因于这些水源。

(二) 水体中的致病微生物

人类致病的细菌和真菌主要是随生活污水进入水体的。它们中大部分不能在水体中永久生长，在内陆水和海洋中随即死亡。但是，依赖于水的类型和流行条件，致病菌能生活一段时间，并保留着活性。因此，接受污水的湖泊、河流和海洋区都可能是危险的传染源。在污染水体中特别常见的是伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)和副伤寒沙门氏菌(*S. paratyphi*)等致病的肠道微生物，它们能引起伤寒。不仅污染水体可引起沙门氏菌传染病，食用该水体中的牡蛎和其他贝类也可引起此类传染。较少见的是志贺氏菌(能引起痢疾)。在热带国家，逗号弧菌(*Vibriocomma*)是发生霍乱流行病的病原，它通常经水污染传播。在调节饮用水源之前，欧洲一些城市也发生过霍乱流行。没有粪便污染的沿海水体也发现有霍乱弧菌，并且已经证实它是在半咸水水体自然发生的。结核分支杆菌也常发现。致病性梭状芽孢杆菌，特别是像产气梭状芽孢杆菌(*Clostridium perfringens*)、诺维氏梭状芽孢杆菌(*C. novyi*)和败血梭状芽孢杆菌(*C. septicum*)等引起气性坏疽的芽孢，几乎总存在于接受污水的水体中。它们在底泥中能保持相当长时间的活力，甚至在那里大量繁殖。炭疽杆菌(*B. anthracis*)的芽孢也具有极强的抗性，能在污水净化过程中幸存下来，甚至穿透滤床进入流出水中，偶尔也发生海水嗜盐弧菌的传染，例如，溶藻弧菌能导致中耳炎，副溶血弧菌污染的各种海产品能造成人类肠道疾患。

接受污水水体的贻贝和其他过滤生物体上也发现有致病性细菌，摄食生牡蛎和海贝已反复造成伤寒和霍乱传染病。因此，在有传染危险的地区，生食用的贝类必须在清水中进行自净处理(如果需要的话，还要经由氯化作用灭菌，随后再脱氯)。

在接受污水水体中，存在致病性真菌，如白色念珠酵母(*Candida albicans*)及相关种类。

也经常发现皮肤真菌，并引起皮肤感染。在海水浴场的沙滩里毛癣菌属(*Trichophyton*)的种类也时有发现。

除了真菌和细菌之外，生活污水还含有数目众多的致病性病毒，这些病毒在这种环境中能保持一段时间的活性。据称污染水体能反复引起脊髓灰质炎病毒的传播。

绝大多数致病菌在淡水湖泊和河流的生存时间长于海洋，因为海水是非海洋细菌的杀菌液；在底泥中的生存时间经常长于游离水中的生存时间；在海洋沉积物中致病菌存活时间短于在内陆水域沉积物中的存活时间。因此，传染的危险区通常只在污水入口附近。但传染的危险区可由小块肉或鱼的漂浮颗粒传播相当一段距离，因为在蛋白质中的致病微生物，能在一定程度上抵抗海水的杀菌作用，甚至还可大量繁殖。

在水体中肠道细菌的生存时间与存在于水体中的细菌种群大小有联系。它们一般呈反比例关系，相互竞争水体中的营养物质。水体中的其他生物可分泌一些抗菌物质，蓝细菌还能形成抗病毒物质。如铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)可通过代谢产物使腺病毒失活。水中细菌数量增加也可促进病毒的失活，它们产生一些抗病毒物质，赭赭 RNA 病毒以及 DNA 病毒，在消毒海水中，大肠杆菌的生存时间随加入的海洋细菌的数量增加而缩短。

除人类致病微生物外，污水中也含有动植物的致病微生物。它们不仅能引起水生动物疾病，而且还能导致家畜和野生动物疾病。由布氏杆菌引起的布鲁杆菌病就是这方面的例子。用表面水喷雾时，植物病害就可传播到蔬菜和果实，当用污水灌溉时，致病的危险性也较大。

总之，污染水体存在病毒、细菌、真菌、寄生虫等致病微生物，它们大量繁殖并传播，可导致人和动植物的病害。

(三)微生物在水体自净中的作用

在自然水体尤其是快速流动的水体中，存在着对有机或无机污染物的自净作用。其原因是多方面的，虽有物理性的稀释作用和化学性的氧化作用，但更重要的却是各种生物学和生物化学作用，例如好氧菌对有机物的分解作用，原生动物对细菌等的吞噬作用，噬菌体对宿主的裂解作用，以及微生物产生的凝胶物质对污染物的吸附、沉降作用等，这就是“流水不腐”的重要原因。

进入水体的污染物主要有农药，污水、肥料，烃类、重金属、放射性核素以及病菌和寄生虫等。生物性污染物的危害性前面已经叙述，非生物性污染物种类繁多，对人和环境都有程度不同的危害。微生物具有代谢类型多样性的特点，自然界存在的各种物质，特别是有机化合物，几乎都可找到使之降解或转化的微生物。可见，微生物在对污染物的降解转化中具有巨大潜力。

大多数河流、湖泊和海洋的一些水体，几乎连续地遭受垃圾和污水的污染。因此，水体的天然自净是极其重要的。这种过程是连续不断地除去水中的污染物，使污水入口处下游数公里的河流又重新变得清洁。沉积作用和氧化作用的物理化学过程固然起着重要的作用，但起决定性作用应归属于生物过程。很多生物都参与这一过程，从鸟类和鱼类直至微生物都可参与水体净化。在有生活污水出现的地方，聚集着很多海鸥和其他鸟类，且鱼类也摄食一些块状粗糙物。但它们仅能利用极微小部分的污染物质。低等动物，特别是吸收小颗粒的各种昆虫幼虫、蠕虫和原生动物的意义稍大一些。而微生物能分解固态或液态有机物，在最适条件下，将之降解为二氧化碳、水和一些无机盐等原始构建成分。因此，它

们能引起很多有机污染物的完全矿质化。蛋白质、糖和淀粉可被迅速降解，而蜡质、纤维素、脂肪和木质素的降解较为缓慢，有时不能完全分解。随着自净作用的进行，微生物种群有所改变。蛋白分解菌的比例逐渐减小，分解纤维素的微生物的比例增大。很多研究表明，随着自净作用的进行，不仅污染物含量降低，而且细菌、真菌等微生物的量也减少。另一方面，在每年的温暖季节，除纤维素分解菌外，亚硝化细菌也显著增加。有机氮化合物矿质化的最后一步，即硝化作用，仅当蛋白质类污染物大部分被分解时达到高峰。旺盛硝化作用造成相应的氧气消耗，可使氧气消耗殆尽。转化 1mg 的氨氮生成硝酸盐，需要 4.57mg 氧气。

在未净化的城市污水流入河流后，真细菌的总量通常一开始就减少，鞘细菌数量常常首先连续增多，然后下一个高峰是原生动物，最后是藻类高峰。水体微生物耗氧量测定通常采用生化需氧量(BOD)法。在特定的时间和温度下(通常为 5d, 20℃)，于黑暗条件下培养，微生物氧化有机物所消耗的氧量称为生化需氧量，常以表示 BOD₅。BOD₅ 可用于估计水中需氧性可降解物质的含量，因此它可作为水体有机物污染程度的间接指标，常用于确定水体自净和工厂处理废水的效果。

水体的自净能力变化很大，水体活泼运动造成污水的迅速扩布和其与大气活跃的气体交换，这里自净作用能力最强。只有在氧气存在的条件下，污染物的真正广泛降解作用才能进行，因此氧气必须随时补充。这些条件在溪流、河流和沿海水域一般都能满足，因为这里有明显的潮汐运动或由风引起的剧烈流动。在流动性很小的水体，污水可能滞留一处，并且氧气供应不足，从而导致过早的氧亏，进而减弱自净作用，水体的自净能力也随季节的变化而变化，一般夏季大于冬季，因为夏季较高的温度有助于细菌活动，并且充足的光照使浮游植物提供更多的氧气。大多数微生物的代谢活动在温暖季节增强，因此便使污水提供的营养物质很快被用光。这样就会导致细菌数量减少，达到自净的目的。这也与其他因素有关，例如较高的温度促进了细菌和真菌的自溶，原生动物摄食细菌也很活跃；在一定场合，强烈的日光可能还起到杀菌效果等；因此，热带热水中的自净作用比极地冷水要迅速得多。

即使在温度和氧气供应适宜的条件下，海洋有机污染物的降解也比内陆水体缓慢得多。在这种情况下，细菌性自净进程比生化性自净快得多，即海洋中污水微生物的数量比污染物含量降低得快，这是由于海水对很多非海洋微生物抑制作用的结果。但是，也有相反的情况。

然而，只有在污染物的组成和数量不超过所接受水体的自净能力时，水体才能实现自然净化。即使在最适的条件下，过量的污染物也会引起不良的后果，造成真正的水污染。过度的氧气消耗经常导致完全的缺氧区，在此处净化过程和细菌性硫酸盐还原作用导致硫化氢大量产生，引起较高等动物和很多微生物死亡，余下的少数微生物只能部分地降解有机污染物。硫化铁的形成导致难闻得黑色的腐泥，毒害底栖生物。如果在湖泊、池塘或沿海水域，含有 H₂S 的底层水突然上升至表层，可造成鱼类大批死亡，例如在狂风暴雨过后就易于发生这种情况。

有毒物质的直接引入也会妨碍自净过程，这些有毒物质主要是随工业废水和废渣进入水体，造成参与矿质化过程的微生物死亡；主要毒物有重金属、氰化物和有机毒物。金属汞和汞离子的毒性低于由细菌甲基化砷形成的有机汞化合物。甲基汞是脂溶性的，能渗入人的神经系统。假单胞菌属的一些抗汞种类，能将有机汞转化成无机汞。

水体污染物中存在很多重金属，除汞外还有镉、砷、铅、铜和铬等，它们的生物毒性都很大。重金属对人类的毒害常与它的存在状态密切相关，如上所述的有机汞的毒性大于无机汞。微生物不能降解重金属，只能使它们发生形态间的相互转化及分散和富集过程。因此，微生物作用于重金属，主要是改变金属在水中的存在状态，从而改变它们的毒性。另外，微生物代谢作用形成的大量产物，对金属离子起增溶、沉淀和整合等作用，从而利于水体自净。在沉积物中，微生物也参与重金属的转化。藻类也可还原或积累重金属。

水体污染物中的有机毒物主要是石油及其产品。在石油污染水体的净化中，微生物起着重要作用。现已发现有 200 多种能降解石油的微生物，主要是细菌和真菌，重要的石油降解者有假单胞菌属、诺卡氏菌属、分支杆菌中的一些种类，以及灰绿青霉(*Penicillium glaucum*)和产朊假丝酵母(*Candida utilis*)等。同时，由于石油是多种烃类的混合物，一般是由多种微生物共同作用而使其降解。近年来由于原油或各种精炼石油产品在陆地上就地排放或进入水中，特别是由于油船遇难、战争破坏或海上钻井的操作失控，引起石油的大规模溢漏，因而造成环境污染，给渔业经济和各种水生动植物带来严重危害。因此石油降解微生物的研究取得了很大进展。微生物降解石油的能力受温度、pH、氧含量、盐度等影响。石油的氧化分解程序为：饱和烃→不饱和烃→醇→酮化合物→脂肪酸→二氧化碳和水。

但是石油很少被完全降解，微生物对其降解的中间产物的利用具有特异性。石油降解细菌的数量，可作为水体石油污染程度的指标。

在来自化工厂和医院的含酚废水的净化中，微生物同样起着类似的重要作用，如敏捷固氮单菌(*Azotobacter agile*)、脱氮假单胞菌(*Pseudomonas denitrificans*)和红色诺卡氏菌(*Nocardia rubra*)就能分解酚，且利用它作为碳源，在温暖季节，能使存在于水体中的酚迅速降解。如果来用适当的技术方法，不仅单价酚和多价酚，而且聚酚、甲酚、氰化物；硫氰化物和甲醛都可被微生物分解。

水体也经常受到农药的污染，一般是随地表雨水径流和排水而进入水体，它们主要是植物保护剂、土壤改良剂和无机植物营养物质。DDT 等杀虫剂和 2, 4-D 等除草剂能被水中藻类吸收并积累，在食物链中强烈富集，其结果可引起终极营养级生物的危害。由于农药对粮食生产的重要性，目前全世界农药的总产量已达 200 多万 t，品种很多，常用的有 100 多种。而当前使用的农药多是有机氯制剂、有机磷制剂和有机汞制剂。这些有毒化合物在水中存留的时间较长，所以长期积累，危害严重。幸运的是微生物能分解这些毒物，改变和破坏它们的毒性。微生物以两种方式降解农药，其一是以农药作为生长的唯一碳源和能源，有时还作为唯一的氮源，从而使农药降解。具有这种能力的微生物很多，如假单胞菌属、诺卡氏菌属及曲霉中的一些种类尤为突出。另一种方式是通过共代谢作用，即微生物从其他化合物获得碳源和能源后，才能使农药转化甚至完全降解。例如直肠梭菌(*Clostridium rectum*)降解 666 时，需要有蛋白胨之类的物质提供能量才能使 666 分解。然而有些农药(如 DDT)是相对稳定的，微生物对它们的降解极其缓慢。

总之，微生物通过对有机质的矿质化、生物沉积和对石油及其他烃类、农药、重金属盐类、有害的代谢产物等的解毒作用，在水体自净过程中起着极其重要的作用。

(四)微生物在污水处理中的作用

水是生命活动和工农业生产不可缺少的物质。而地球上水资源的可利用量不到其总数的 1%，并且随着工农业生产的发展，用水量增加，又可因污水和废水的大量排入而污染，因此污水处理和防止水污染是十分重要的。水生微生物系统的自净作用在一定程度上能够

调节环境，抵消污染所引起的变化，但是水体的自净能力是有限的，当进入水体的外来污染物数量，超过了水体的自净能力，并达到破坏水体原有用途的程度，就造成水污染。所以，工业废水和生活污水必须先经过一定程度的净化处理，使水质达到一定标准才能排入江河湖泊等水体。

污水的处理方法可分为物理方法、化学方法和生物方法 3 大类。目前国内外多采用二级处理工艺或三级处理工艺治理污水。一级处理又称预处理，主要是通过滤筛网及沉淀等物理化学方法除去污水中的黏土、淤泥及其他碎屑等污染物。二级处理又称生物处理，主要是利用微生物的作用分解污水中的有机污染物。三级处理主要是除去排放水中的无机盐类及其他悬浮污染物，因为在二级处理后的出水中，含有氮、磷等无机盐类，排入水体后能造成水体富营养化，造成二次污染。在三级处理中，常使用沉淀法去磷，在中性条件下增温使氨氮逸出，也可利用微生物的脱氮作用脱氮，借助藻类的大量繁殖以除氮、磷，同时收获藻体。由此可见，微生物在污水处理中起着非常重要的作用。在饮用水的制备中也借助于微生物。

污水的微生物处理主要有生物过滤法、活性污泥法、氧化塘法、厌氧处理法等。

1. 生物过滤法 生物过滤法也称生物膜法，其主要特点是利用滤池中铺设的滤料上附着的生物膜，对污水中有机质进行吸附和生化作用，达到去除有害物质的目的。根据不同的处理装置，该法可分为普通生物滤池、生物转盘、塔式生物滤池等。生物过滤法已得到广泛应用，净化效果较好，一般可使污水的 BOD_5 减少 75%~90%。

生物膜由污水与载体的接触而形成。由于污水通过载体时，污水中的有机污染物和微生物吸附在载体上，并发生微生物的增殖，在载体表面逐渐形成一层 2mm 厚的生物膜。生物膜在污水处理中不断增厚，最后老化、整块剥落，随废水流入沉淀池中，然后又开始形成新的生物膜。

生物膜主要由菌胶团形成菌和丝状菌组成，此外还有大量细菌、真菌、原生动物、藻类及后生动物。常见的细菌主要有动胶菌、球衣细菌、白硫细菌、无色杆菌、黄杆菌 (*Flarobacter-ium*)、假单胞菌、产碱杆菌等。在生物膜的底层部分，化能自养菌较多。真菌主要有镰孢霉、青霉、毛霉、地霉、分支孢霉和各种酵母。常见的藻类和原生动物主要有席藻、小球藻、丝藻和钟虫等。

在生物膜的表面，由于污水的不断流过，总是吸附一薄层污水。污水流过滤料时，悬浮物质被截住，胶体物质被吸附，污水中的有机污染物就被生物膜中的细菌、真菌吸附并氧化分解，而原生动物又以这些菌为食物，即形成生物膜中的小型食物链。这对有机污染物的去除意义重大，因为在食物链的每一步，都有一部分有机污染物因呼吸作用而被转化为 CO_2 。因此，能将污水中的有机污染物完全降解。

(1)塔式生物滤池：在塔池中填满滤料，滤料一般由纸制成蜂窝状，浸涂树脂，或由塑料制成。污水通过塔顶的布水器淋下进入滤料，其中有机污染物被生物膜吸附。塔上半部滤料上的生物膜较厚，中部滤料上的生物膜较薄，空气由塔的底部向上，除自然通风外，有时还采用人工通风。污水在塔内的停留时间很短，一般为 2min 左右。最后，被处理好的水经格栅流入集水器。此法具有结构简单，占地面积小，对水量和水质变化适应性强等优点；但处理程度较差，易产生堵塞。

(2)生物转盘法：生物转盘是一种较新的污水处理设备，它由许多片较耐腐蚀的圆板作等距离的紧密排列，中心由横轴串联而成。它一半浸没在盛污水的半圆槽中，另一半暴露

在空气中，由电动机的带动使转盘缓慢转动。细菌等微生物在盘片表面生长一层生物膜。附着在盘片表面上的生物膜随盘片不停地旋转，当盘片浸没于半圆形的处理槽时，污水中的有机物和盘片上生物膜相接触并被吸附。当盘片夹带着污水膜离开处理槽时，水膜在空气中吸收氧，生物膜便从污水膜中吸取溶解氧，并对有机物进行氧化分解。如此循环往复，连续不断地完成吸附、充氧、氧化等过程，从而使半圆形槽内污水中的有机物逐渐被氧化分解，最后达到污水净化的目的。

2. 活性污泥法 活性污泥法又称曝气法，是利用曝气池中装填活性污泥使污水净化的生物学方法。活性污泥是由污水中繁殖的大量微生物凝集而成的褐色而呈絮状泥粒组成的，具有较强的吸附和氧化有机物质的能力。活性污泥含有特殊的微生物种群，主要由细菌和原生动物组成，而真菌、藻类和后生动物只起次要作用。

活性污泥中的微生物类群与生物膜中的类似，但是真菌也起较大作用，此外原生动物及诸如蠕虫和昆虫幼虫等后生动物也大量发生。活性污泥颗粒疏松呈丝絮状，表面积大，所以对污水中的悬浮物、胶体物的吸附能力很强。吸附的物质在微生物的作用下进行氧化和分解。一般废水在曝气池中停留 4~10h 就可完成净化过程， BOD_5 的去除率达 90% 以上。

活性污泥可以通过各种途径获得。最简便的方法是，取附近相似废水处理场的活性污泥来接种。大多数情况是采用生活污水和粪便水进行曝气培养，再用待处理的废水驯化。

活性污泥的曝气设备主要由曝气池、搅拌器或压缩空气设备以及净化池等组成。处理的污水经隔栅除去大块杂物，进入一次沉淀池，简单沉淀后，送入曝气池。经过一定时间曝气后，污染物被驯化的活性污泥所吸附，有机物被微生物氧化分解，然后将曝气池内的混合液放入净化池，停留一定时间使污泥沉淀，上层澄清液作处理后的水排放出去。将其中一部分污泥送回曝气池，多余的污泥排出另行处理。

活性污泥法处理污水效果较好，但是也存在一些问题。例如积累大量泥沙难于处理，氮和磷很难除去，处理有毒物质的效果不理想等。因此，现在正在研究用活性污泥和藻类相结合的处理方法。藻类光合作用产氧，可以不需要曝气又可去除营养盐类。方法是向曝气池加以照明，并向活性污泥内投加小球藻等藻类，以便培养形成藻类与细菌的共生绒絮。

3. 氧化塘法 氧化塘是一种大面积敞开式的污水处理塘，是一种与自然水体自净过程极其相近的污水处理法，其基本原理是利用藻菌共生系统来分解污水中的有机污染物，使污水得以净化。即塘内有机污染物被需氧细菌分解为简单的有机物质、无机物质和二氧化碳，而细菌生存所需要的氧气，主要由藻类的光合作用提供，也可通过池塘表面再曝气和机械通气供氧。

4. 厌氧处理法 厌氧处理法是在缺氧情况下；利用厌氧微生物分解污水中有机污染物的方法，又称为厌氧消化法或厌氧发酵法，其净化效率可达 90%。

污水厌氧处理包括一系列复杂的消化和发酵反应。首先，复杂有机污染物如纤维素、蛋白质、脂肪等，被以兼性菌为主的产酸菌分解成为 H_2 和 CO_2 ，以及简单的有机酸和醇等。参与此作用的细菌主要有梭菌、假单胞菌、产气杆菌、大肠杆菌、粪链球菌和变形菌等。随后，由于产甲烷细菌的作用，将有机酸、 H_2 、 CO_2 等转化为甲烷。参与此作用的微生物主要有甲烷杆菌、甲烷球菌、甲烷八叠球菌、甲烷螺菌。

厌氧分解过程在封闭发酵池中进行，污水和污泥定期或连续加入发酵池，处理后的污水和污泥分别由发酵池的上部和底部排出，最终产物 CO_2 和 CH_4 由发酵池的顶部排出，它们分别可作为肥料和沼气。

微生物在从地表水制备饮用水的过程中也起重要作用。自来水管的沙滤池中含有特征性的微生物区系，除藻类和原生动物外，主要是细菌。制备饮用水的主要操作过程是沉淀、过滤和氧化。在大的水池中进行沉淀，水在池中保留一定时间后，大颗粒状物质沉淀到底部。通过加入能产生黏性絮状沉淀物的硫酸铝以增加沉淀作用。当絮状物从水里沉淀到池底时，许多微生物及很细的悬浮物被除去。接着水通入沙滤池过滤，这时能除去 99% 的细菌，一部分是被过滤掉，一部分是被原生动物所消化。当然其他微生物也被滤除，因此大量净化了的水流过沙滤池。随后将水通过氯化等处理保证它的可饮性，同时还要去除异味和保证色度。因为一些放线菌，特别是链霉菌属(*Streptomyces*)，能产生土腥味和讨厌的味道，其他生物的代谢产物也可造成异味和异色。

(五) 水体控制的微生物学参数

水中微生物的含量对该水源的饮用价值影响很大。一般认为，作为良好的饮用水，其细菌含量应在 100 个 / ml 以下，当超过 500 个 / ml 时，即不适合作为饮用水了。对饮用水来说，更重要的指标是其中微生物的种类。因此，在饮用水的微生物学检验中，不仅要检查其总菌数，还要检查其中所含的病原菌数。由于水中病原菌的含量总是较少，难以直接找到，故一般就只能根据病原菌与最常见的但数量很大的细菌——大肠杆菌同样来自动物粪便污染的原理，只要通过检查水样中的指示菌——大肠杆菌数即可知道该水源被粪便污染程度，从而间接推测其他病原菌存在的概率。检验大肠杆菌可用伊红美蓝鉴别培养基(EMB)。根据我国有关部门所规定的饮用水标准，自来水中细菌总数不可超过 100 个 / ml (37℃，培养 24h)，大肠杆菌数不能超过 3 个 / L。

除了物理和化学参数外，生物学参数也已长期用于评价内陆和海洋水体的水质。细菌与植物和动物一样，也已经用作水体状况特征的指示生物。例如，不同的细菌可指示单一腐殖质发育阶段，分枝动胶菌和浮游球衣细菌是多腐殖质区的指示生物。

在水体的卫生评价中，细菌学参数仍然具有重大意义。为此，除测定腐生菌数量或菌落数外，还要测定作为粪便指示物的人类肠道细菌。粪便污染指示菌，一般是指如水体中存在有此种，即表示此水体曾有过粪便污染，有可能存在有人和温血动物的肠道病原微生物，这在水的卫生学检查方面有较重要意义。因为存在于水体中的病原微生物，往往因其数量较少，一般难于检出，即使检出结果为阴性，也不能保证无此病原微生物存在，同时检出的操作也很复杂。所以在实际工作中通常是应用检查水体中有无“指示菌”存在及其数量来判定水质的污染。

一般将大肠菌群、粪链球菌、产气荚膜梭菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等作为粪便污染指示菌，其中以大肠菌群最常使用。大肠菌群主要是埃希氏菌、枸橼杆菌、肠杆菌、克雷伯氏杆菌和大肠杆菌等，当然大肠菌群中以大肠杆菌为主，它们是需氧及兼性厌氧革兰氏阴性无芽孢杆菌，能在 48h 内发酵乳糖并产酸产气。

在水质检测中，常用大肠菌群指数或大肠菌群值表示大肠菌群数目。大肠菌群指数是以 1L 水中含有的大肠菌群数来表示，大肠菌群值是以水样中可检出 1 个大肠菌群数的最小毫升数表示，两者的关系如下：

$$\text{大肠菌群值} = 1000 / \text{大肠菌群指数}$$

在大多数国家，饮用水、洗浴水及其他用水都建立了标准，饮用水不得含有任何致病微生物。如果在 100ml 水中不含大肠菌群，就可认为水体被保护得足够好。我国生活饮用水卫生标准中规定的水质标准为 1L 水中大肠菌群数不得超过 3 个，即大肠菌群指数不得

大于 3，或大肠菌群值不得小于 333ml。在很多国家(欧洲各国)洗浴用水需遵从下列质量标准：总的大肠菌群数尽可能的低于 5 个 / L；在任何情况下都得低于 100 个 / L；而粪便大肠菌群数相应地分别低于 1 / L 或 20 / L，前一数值表示规定值，而后者表示强制值。

作为大肠菌群试验的补充，偶尔也测定粪链球菌的数量，通常它的重要性低于大肠菌群的重要性。较高比例的粪链球菌是新鲜粪便污染的指示生物，沙门氏菌族的质量检验也具有重大的卫生学意义，因为这族细菌是伤寒、副伤寒和肠炎的病原菌，它们不得存在于饮用水或洗浴水中。

另外，还要测定细菌芽孢的数量。随着自净作用增强，通常生长的细菌细胞比例降低，而其芽孢数增多。在一些国家通常测定的产气荚膜梭菌芽孢数具有卫生学意义。如果大肠菌群和链球菌类已经消失，它就可指示粪便早期的污染。

水体的细菌学调查可能只反映水体的现状。尤其在较小水体和受潮汐影响的沿海水体这种变化极其迅速。然而，如果调查者想做出意义深远的污水负载方面的报告，那么沉积物也必须在被调查之列。它们经常可作为前述污水负载程度的一些指标，能较好地鉴定实际的水质。

地面水中生长的水生植物上也附着有微生物，如沙门氏菌族、腐生物、大肠菌群和链球菌，通常的细菌含量远大于水中的细菌含量，因此也被推荐为调查项目之一。水生植物的过滤作用在细菌增殖上起着一定作用，其上条件较为适宜，细菌能存活较长时间。鱼类皮肤、鳃和肠含有存在于水中的细菌，也可帮助了解水体细菌学卫生状况。

污水净化场的效率同样能借助细菌学参数加以检验。在工业废水方面，必须经常进行毒性检验。除各种动物和藻类外，荧光假单胞菌等细菌也经常用作检验生物。但这些细菌对很多毒物的敏感性较低，其结果往往只部分与细菌种群活动有关。而一些水生细菌的敏感性较强，低浓度的毒物就能影响其生长。即使检验的结果呈阴性，在流动的潮汐中参与自净过程的微生物活性减弱也是可能的。因此，应以该水域含有的微生物种群作为常用检验方法的补充。

最近，一种很有前途的发光细菌毒性检验法得到了发展应用。发光细菌发光是菌体健康状况的一种反映，这类菌在生长对数期发光能力极强。但当环境条件不良或有毒物质存在时，发光能力受到影响而减弱，其减弱程度与毒物的毒性大小和浓度成一定的比例关系。通过灵敏的生物发光光度计测定其光密度，可以评价待测物的毒性。因此，常筛选敏感而对人体无害的发光细菌菌株，用以快速监测环境毒物。其中研究和应用最多的为发磷光发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)。美国贝克曼公司专门制造的微量毒性分析器，就是一种发光菌检测仪，其核心部分就是发光菌制剂。在自然水体，腐生菌的数量常与水体中所含的有机物浓度成正比，因此可利用这种关系，以腐生菌数或腐生菌与细菌总数比值来划分污水带或腐生水带。水体污染指示生物带，对判断水体的污染程度有一定意义。一般根据水体中的腐生菌数量，将水体划分为多污带、 α -中污带、 β -中污带和寡污带。多污带腐生菌数为每毫升水中含有数十万至数百万个， α -中污带为数十万个， β -中污带为数万个，而寡污带为数十至数百个。

此外，微生物还可以用来检测环境中的致突变物和致癌物，现已得到实际应用。水生细菌及藻类对重金属、农药及放射性物质具有很强的富集能力，测定这些生物体内毒物含量，如发现超出正常含量时，就可判断水体污染的性质和程度，因此可用于水污染的生物监测。水中微生物群落特点及演替同样可用于水污染的生物监测。

思考题

- 1.解释名词：共生、颞颥、脱氮作用、食物链、物质循环、水污染、大肠杆菌值。
- 2.简述淡水和海洋微生物分布特点。
- 3.简述池塘中微生物分布特点。
- 4.简述水生生物体上微生物分布特点及其与水生生物的关系。
- 5.简述水体微生物的主要作用。
- 6.简述水体中微生物间的相互作用。
- 7.试述环境因素对水生微生物的影响。
- 8.试述水体中的主要的物质循环，举例说明微生物在各循环中的作用。
- 9.试述污水的微生物处理方法及各方法的原理。

第二篇 各论

第一章 病原细菌

一、气单胞菌属

气单胞菌属(*Aeromonas*)细菌广泛存在于淡水、污水及土壤中。某些种类的致病株对人和动物有致病性,有些是环境及动物正常菌群的组成部分。近 20 年来,本属确定了若干新种,种名亦有所改变。16SrRNA 等序列分析表明,本属菌的分类地位实际上介于弧菌科与肠杆菌科之间。

1984 年确定的成员只有 4 种:嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、温和气单胞菌及杀鲑气单胞菌。此后在表型及基因型两方面不断发现新种,目前至少有 13 种。目前仅有专业化的实验室才能准确分类鉴定,一般仅根据表型鉴定的结果往往有差错,加上过去所用名称的改变,造成了气单胞菌命名的紊乱。有鉴于此,多数专家主张,气单胞菌可分为运动性(motile)或嗜温性(mesophilic)及非运动性或嗜冷性两大类,前者以嗜水气单菌为代表,包括温和气单胞菌、豚鼠气单胞菌、凡隆气单胞菌、舒伯特气单胞菌、简达气单胞菌及易损气单胞菌等,它们的致病作用并无明显区别。非运动性气单胞菌主要是对鲑鳟鱼等致病的杀鲑气单胞菌及其亚种(表 1-1、1-2)。

表 1-1 杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)亚种

杀鲑气单胞菌亚种	产棕色色素	葡萄糖产气	触酶	特点
杀鲑亚种 <i>subsp. salmonicida</i>	+	+	+	疳病
新亚种 <i>subsp. nova</i>	—	—	—	鲤红皮炎
无色亚种 <i>eubsp. achromogenes</i>	—	—	+	鲤红皮类
日本鲑亚种 <i>subsp. masoucida</i>	—	+	+	蛙鳟鱼分离的 非典型株

1. 形态及培养特性 细菌形态从具有圆端的直杆菌到细胞接近球状,直径 0.3~1.0 μ m。单个,成对或短链。通常以一根极生鞭毛运动(在固体幼龄时具有周生鞭毛)。革兰氏染色阴性。兼性厌氧。具有呼吸和发酵两种代谢类型,是化能异养菌。最适生长温度 22~28℃;大多数种可在 37℃生长,但有的种在 35℃不生长,而其他一些种最高生长温度为 38~41℃,最低生长温度为 0~5℃。生长 pH 范围为 5.5~9.0。

嗜水气单胞菌及杀鲑气单胞菌与霍乱弧菌一样,存在所谓活的非可培养(viable but nonculturable, VBNC)状态,VBNC 状态实际上是一种休眠状态,其菌体缩小成球状,耐低温及不良环境,接种培养基在常规培养条件下不生长。一旦温度回升且获得生长所需的营养条件,VBNC 状态的细菌又可回复到正常状态,重新具有致病力。

2. 生化特性 对葡萄糖和其他糖类能产酸,常产气。氧化酶阳性,接触酶阳性;通常精氨酸双水解酶阳性,而鸟氨酸脱羧酶阴性;脲酶和苯丙氨酸脱氨酶阴性;明胶酶和 DNA 酶皆阳性。还原硝酸盐。绝大多数种能发酵的糖包括麦芽糖、D-乳糖和海藻糖。

表 1-2 气单胞菌的表型与基因型

基因型	表 型 种 名	O 抗 原 型
1	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	O11, O3, O16, O23
2	动物气单胞菌 <i>A. bestiarum</i> ★	O16, O22, O11, O21 等
3	杀鲑气单胞菌 <i>A. salmonicida</i>	O16, O21, O1, O18 等
4	豚鼠气单胞菌 <i>A. caviae</i>	O16 等
5	中间气单胞菌 <i>A. media</i>	O16, O14, O3, O15 等
6	嗜腺气单胞 <i>A. eucrenophila</i>	O21, O34, O3 等
7	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	
8	凡隆气单胞菌温和生物型 <i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i>	O11
9	简达气单胞菌 <i>A. jandaei</i>	O11, O12, O16, O24 等
10	凡隆气单胞菌凡隆生物型 <i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i>	O3, O 78
11	类凡隆气单胞菌 <i>A. veronii</i> -like	
12	舒伯特气单胞菌 <i>A. schubertii</i>	O11, O25, O9
13	易损气单胞菌 <i>A. trota</i>	O26, O5, O11, O16 等

★Ali A 等(1996)建议名, 其他文献称为嗜水气单胞菌。

3. 致病性及毒力因子 气单胞菌有广泛的致病性, 感染包括冷血动物在内的多种动物如鱼类、禽类及哺乳类, 引致败血症或皮肤溃疡等局部感染, 是水生动物尤其是鱼类最常见的致病菌, 在水温高的夏季可造成暴发流行。人类感染运动性气单胞菌可引起急性胃肠炎等疾病, 目前在国外已将本菌纳入腹泻病原菌的常规检测范围, 是食品卫生检验的对象。

气单胞菌在水环境中普遍存在, 并不都有致病性。愈来愈多的证据表明, 具有毒力因子的菌株才有致病性。其毒力因子有 3 类: ①胞外产物, 如毒素、蛋白酶; ②黏附素, 如 S 蛋白、4 型菌毛、外膜蛋白等; ③铁载体。

嗜水气单胞菌产生的毒素为相对分子质量 52 000 左右的蛋白质, 称为 HEC 毒素或气溶素(aerolysin), 具有溶血性、细胞毒性及肠致病性, 属于穿孔毒素。还发现了一些性质相近的毒素, 应属于同一毒素家族。胞外蛋白酶主要有耐热的金属蛋白酶及不耐热的丝氨酸蛋白酶两种, 前者相对分子质量约为 54 000, 对 EDTA 敏感, 但能耐受 56℃30min。蛋白酶本身对组织可造成直接损伤, 此外还能活化毒素前体, 因此是最重要的毒力因子。

S 蛋白由单一亚单位组成, 亚单位的相对分子质量 50 000~52 000, 具显著疏水性, 自我组装在菌体最外层, 具有抗吞噬、抗补体作用等。此外, 还证实对宿主细胞有黏附作用。S 层覆盖了运动性气单胞菌的 LPS 侧链, 而且 S 层的抗原型为数甚少。运动性气单胞菌的 4 型菌毛有单在及束状两类, 具有血凝及细胞黏附作用, 是公认的毒力因子, 与大肠杆菌等的 4 型菌毛有一定程度的同源性。

嗜水气单胞菌能产生苯盐类及羟基肟盐类两类铁载体, 前者含有 2,3 二羟基苯甲酸(2,3-DHB)及赖氨酸、甘氨酸、色氨酸 / 苯丙氨酸。分泌铁载体的菌体同时还产生相应的 OMP 条带, 作为铁载体的受体。

气单胞菌的 O 抗原复杂, 有数十种, 每个基因型及表型包括多种 O 抗原。人源分离

株常见的是 O11、O34 及 O16，我国鱼源株主要有 O9。O11 型多见于动物和人的败血症及严重的创伤感染，O34 型主要导致胃肠炎和败血症。

4. 微生物学诊断 分离气单胞菌，可用血平板、麦康凯平板或 TSA 培养基等直接分离培养。从动物腹泻粪便中分离则需采用 RS 等选择培养基。分离菌应为革兰氏阴性，氧化酶阳性。同时可凭借关键的生化指标进行判断。亦可采用 API50E 或 API20E 等检测试剂盒进行鉴定。分离株是否有致病性，则还需检测胞外蛋白酶等毒力因子，方法可用脱脂奶平板划线，或用相应抗体建立的 ELISA 试剂盒。

(一) 杀蛙气单胞菌(*A. salmonicida*)

1. 形态与染色特性 此菌无鞭毛，无动力，不形成芽孢和荚膜，为革兰氏阴性的短小杆菌。菌体呈球杆状，长度不到宽度的两倍，大小为 $0.8\sim 1.0\mu\text{m} \times 1.0\sim 1.8\mu\text{m}$ 。通常呈双、短链或丛状排列。

2. 生长要求及培养特性 本属为兼性厌氧菌，生长需要精氨酸和蛋氨酸。在普通琼脂上 22°C 培养 48h 后，形成圆形、隆起、边缘整齐、半透明、松散的菌落，大多数菌株在含酪氨酸(其浓度为 0.1%)在苯丙氨酸的培养基，如 TSA、FA(furunculosis agar, 疖疮病琼脂)上产生水溶性褐色素，但在厌氧条件下不产生色素。也常分离到一些不产生色素的菌株。在血液琼脂上快速溶血，7d 后菌落变成淡绿色。生长适宜温度 $22\sim 25^{\circ}\text{C}$ ，大多数菌株能在 5°C 生长，生长高限温度为 35°C 。生长 pH 范围 6~9，最适 pH 为 7 左右。所需食盐浓度范围为 0~3%。

3. 生化特性 本菌能发酵阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、糊精等，但不能分解山梨糖、山梨醇乳糖、棉籽糖、纤维二糖。在 KCN 肉汤、含 7.5%NaCl 的营养肉汤中不能生长。无脲酶、鸟氨酸脱羧酶(ODC)、连四硫酸盐还原酶。但能水解精氨酸，有氨基甲酰磷酸激酶、氨基甲酰磷酸酯酶、腺嘌呤 3, 2-单磷酸激酶。

4. 抵抗力 本菌在蒸馏水中 4d 至 2 周、在灭菌的河水中 28d ($20\sim 25^{\circ}\text{C}$)、在灭菌湿土中 40d ($20\sim 30^{\circ}\text{C}$) 不死亡。强毒株在含有机物质的淡水中可生存 15 周，在死鱼肾脏内存活 28d (4°C)，在海水中 10d 内死亡。

本菌对土霉素、四环素、氯霉素、萘啶酸、喹啉酮，噁啉酸等敏感。不过许多抗生素只能抑制杀蛙气单胞菌繁殖，而不能将其杀灭。

5. 抗原性 杀蛙气单胞菌各亚种之间都具有共同的 O 抗原。此外，不产色亚种还具有亚种特有抗原。杀蛙气单胞菌与本属的其他种也存在共同的抗原成分。

6. 病原性 本菌的病因与细胞壁表面的 A 层(additinol cell surface layer, A-layer)和细胞外产物(extracellular products, ECPs)有关。有毒菌株的细胞壁都有 A 层，其主要由 50kd 的蛋白质组成，因此又称 A 蛋白层。A 蛋白的氨基酸序列类似于大肠杆菌 K₈₈ 的黏着菌毛和胎儿弯杆菌的微荚膜，可以吸附在宿主细胞上。此外，还可以帮助该菌获取铁离子，避免血液中补体的溶解和吞噬细胞的吞噬。有 A 层的菌球，悬浮在盐溶液中时，往往发生自凝现象。这些菌株可凝集鲑鳟鱼类的红细胞，但不凝集鲤科鱼类和哺乳动物的红细胞。

杀蛙气单胞菌的细胞外产物(ECP)至少由 25 种蛋白质成分构成，包括溶血素、鲑溶解素(salmolysin)、杀白细胞素、细胞性糖蛋白以及酪蛋白酶、骨胶原酶等蛋白酶类。溶血素腹腔注射大西洋鲑的 LD₅₀ 为每克体重 44ng。鲑溶解素肌肉注射到虹鳟幼鱼的 LD₅₀ 为每克体重 152ng。蛋白酶类对大西洋鲑和虹鳟幼鱼的 LD₅₀ 分别为每克体重 2400ng 和每克体重 1 514ng。鲑溶解素和蛋白酶类同时存在时，对鲑科鱼类的淋巴细胞具有杀伤作用。蛋白酶

类单独注射到大西洋鲑幼鱼时，可导致注射部位的组织液化。

本菌主要感染鲑科鱼类，不过不同鱼种的易感性有所差异。大西洋鲑、河鲈等的易感性较强，而某些品系的虹鳟往往具有一定的抵抗力。此外，鲤、金鱼和鳊鲃也可感染发病。

细菌通过患病鱼、带菌鱼和污染水水平传播。虽然也能在鱼的性腺中检出此菌，但尚未证实其能垂直传递。入侵门户主要是受伤的皮肤，也可通过胃肠道和鳃感染。

本菌是鲑科鱼类疔疮病原。

7. 微生物学检查

(1)分离培养：取病鱼肾脏或体表溃疡的病健交界处组织，接种于 TSA 或 FA 平板上，20~28℃培养，检查有无产生褐色色素的菌落，并进行革兰氏染色。

(2)对苯二胺试验：将 1% 对苯二胺溶液倾注在上述平板中经 24h 培养后形成的菌落上，杀鲑气单胞菌形成的菌落在 90s 内，从褐色变成黑色。

(3)血清学检查：玻片凝集反应、间接血凝、荧光抗体技术常应用于分离菌鉴定和本病的诊断。进行玻片凝集反应时，预先用超声波对分离菌做短暂处理，可防止自身凝集。此外，乳胶凝集反应和金黄色葡萄球菌协同凝集试验亦为本病的快速诊断方法。还可采用 ELISA 诊断方法。

(4)带菌鱼的检测，带菌鱼体中病原菌的含量较少，用通常的方法不易检出。应将其转移到高水温环境中饲养，并注射免疫抑制剂，促进病原菌的繁殖，再按上述方法进行诊断。

(二)嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)

此菌是气单胞菌属的模式种，属于嗜温、有动力的气单胞菌群，也称嗜水气单胞菌群。嗜水气单胞菌与液化气单胞菌、蚁酸气单胞菌、斑点气单胞菌属于同义名。本菌存在于淡水、污水、淤泥及土壤中。常自鱼体和人体、两栖类等低等动物以及食物中检出，本菌不但在宿主全身和局部防御功能减退时，作为一种重要致病菌而引起败血症致死，而且可单独引起人和动物的疾病。

1. 形态与染色特性 本菌为两端钝圆、直或略弯的短小杆菌，大小为 $0.3\sim 1.0\mu\text{m}\times 1.0\sim 3.5\mu\text{m}$ ，菌细胞多数单个存在，少数双个排列。通常在菌体的一端有一根鞭毛，也有许多菌株的幼龄培养物在菌体的四周形成鞭毛，但对数生长期过后，该细胞又呈现极生单鞭毛。无荚膜，不形成芽孢，革兰氏染色阴性。

2. 生长要求和培养特性 本菌为兼性厌氧菌。在普通琼脂、TSA、麦康凯琼脂、SS 琼脂上生长良好。在普通琼脂上的菌落呈圆形、边缘整齐、中央隆起、表面光滑、灰白色、半透明状。有些菌株培养物的气味较强。不产生色素。在溴化十六烷基三甲胺琼脂上不生长。在血液琼脂上呈β溶血。在 TYE(弧菌培养基)及肉汁蛋白胨琼脂平板上，经 18~24h、28℃培养，菌落呈淡黄褐色，无水溶性色素。在 TYE 液体中 28℃培养 24h，呈少量薄膜，一摇即散。

最适生长温度 28℃，一些菌株可在 5℃生长。最高生长温度通常为 38~41℃。生长 pH 为 6~11，最适 pH 为 7.2~7.4。生长食盐浓度范围 0~4%，最适浓度为 0.5%。

3. 生化特性 本菌能水解淀粉和精氨酸等。发酵甘露醇、赤藓糖醇、棉籽糖、果胶糖。无色氨酸脱氨酶、苯丙氨酸脱氨酶和鸟氨酸脱羧酶。MR 试验、VP 试验、氧化酶和接触酶试验为阳性。

4. 抵抗力 本菌是水中的常见细菌，一般在夏季较多、冬季减少。同时，也是鱼肠道的菌群之一。从鱼、人和其他动物分离株较环境分离株的蛋白质分解能力强，尤其是对

酪蛋白、纤维蛋白等。本菌对热的抵抗力较差，60~65℃30min 至 1h 死亡。

由于抗生素在水产养殖中的广泛使用，与鳃弧菌一样，许多对抗生素有抵抗力的菌株被筛选出来，如对氯霉素、土霉素、链霉素、四环素、磺胺嘧啶、硝基呋喃等，并从这些耐药性菌株分离到了相应的可转移的抗药性质粒。

5. 抗原性 运动性气单胞菌有 O 抗原、H 抗原和 K 抗原。其中 O 抗原可分成 12 种，H 抗原 9 种。K 抗原能部分抑制 O 抗原的凝集反应，并与鳃弧菌等有交叉反应。此外，运动性气单胞菌与杀鲑气单胞菌以及其他属的细菌也存在着共同的抗原成分。

免疫电泳试验时，嗜水气单胞菌共出现 17 条沉淀线，其中第 7、第 9、第 11 条沉淀线为脂蛋白抗原，第 3、第 6 和第 14 条沉淀线为糖蛋白抗原，以第 10、第 11 和第 12 三条沉淀线出现率最高，为多数菌株所共有。

6. 病理性 本菌产生的毒素具有溶血性、细胞毒性及肠致病性。溶血性毒素分 α 和 β 两种。 α 溶血素能引起家兔注射局部的硬结、毛细血管充血和皮肤坏死，对 HeLa 细胞、绿猴肾细胞、成纤维细胞和 Y₁ 肾上腺细胞具有毒性作用，可导致动物的败血性肠炎。 β 溶血素毒性较强，静脉注射 0.4 μ g 提纯毒素，即可导致小鼠、地鼠死亡，引起家兔的皮肤坏死。肠致病性毒素可以分为 3 种，即霍乱样肠毒素、细胞兴奋型肠毒素和细胞毒肠毒素。

此外，本菌还能产生酪蛋白酶、纤维蛋白酶、胶原酶、葡萄球菌溶解素等，这些均与本菌的毒性有关。用斑点叉尾鲷做攻毒试验时，有毒株的 LD₅₀ 一般为 10⁴~10⁸CFU，而无毒株在 10⁷CFU 时，也不引起死亡。

嗜水气单胞菌对多种鱼类、两栖类以及爬虫类具有致病性，可引起鳊的赤鳍病、鲤鱼和金鱼的真鳞病、鲢鳙鱼的打印病、青鱼和草鱼的细菌性肠炎、青鱼的疔疮病、香鱼的红口病、甲鱼的“红脖子病”、蛙的红腿病、蛇的败血病和口炎。此外，还可导致鲢鳙(硬头鳊、虹鳊、银大麻哈鱼、大鳞大麻哈鱼)等鱼类的败血症，总的统称为运动性气单胞菌败血病。本菌主要通过肠道感染，在鱼体受伤或寄生虫感染的条件下，还可经皮肤和鳃感染，并与水温、水中有机物质的含量、饲养密度等有密切关系。水温为 17~20℃时，死亡率较高，在 9℃以下时鱼很少发病死亡。

7. 微生物学检查

(1)涂片镜检：取病鱼的血液、脏器等涂片，做革兰氏染色，可见革兰氏阴性的短杆菌。

(2)分离培养：将上述病料划线接种于含青霉素的 TSA、Rimmler-Shofst 培养基、McCoy-Pilcher 培养基等选择性培养基上，在 28℃左右进行分离培养。也可采用 ss 琼脂、麦康凯琼脂等肠道细菌选择性培养基进行分离纯化，运动性气单胞菌通常不分解其中的乳糖。对分离菌应进一步做生化鉴定、动物接种试验和血清学检查。

(3)动物接种试验：将病料加适当生理盐水研磨成匀浆，或将本菌的培养物给小鼠、豚鼠或家兔注射，可使试验动物死亡，脏器和接种部位的皮肤等出现坏死性病理变化。

(4)血清学检查：凝集反应、琼脂扩散直接和间接荧光抗体技术可应用于本病的诊断和分离菌的鉴定。

8. 免疫 选择具有代表性的免疫原性好的嗜水气单胞菌菌株，制备灭活疫苗，用于鱼类浸泡或注射免疫，可有 70%的保护力。提取该菌胞外蛋白质及脂多糖制备亚单位偶联疫苗，对小鼠及鲫鱼也显示了较好的免疫效果。

二、弧菌属

弧菌属(*Vibrio*)细菌菌体短小，直或弯杆菌，大小为 0.5~0.8 μ m×1.4~2.6 / μ m。革兰

氏阴性。以一根或几根极生鞭毛运动，鞭毛由细胞壁外膜延伸的鞘所包被。没有荚膜，不形成芽孢。多数在一般营养培养基上生长良好而又迅速。兼性厌氧，具有呼吸和发酵两种代谢类型。最适生长温度范围宽，所有的种可在 25℃ 生长，大多数种在 30℃ 生长。pH 范围 6.0~9.0。氧化酶阳性。不产色或黄色。可代谢 D-葡萄糖和其他碳水化合物，产酸但不产气。还原硝酸盐(产气弧菌、梅氏弧菌和病海鱼弧菌除外)。大多数种发酵麦芽糖、甘露糖和海藻糖。绝大多数种对弧菌抑制剂 0 / 129 敏感。钠离子刺激所有种的生长，并且是大多数种所必需的。发现于各种盐度的水生环境，最常见于海、海岸、海面和海生动物的消化道。有的种在淡水中也有发现。有的种是人的病原菌，有的种对海洋脊椎和无脊椎动物致病。最重要的人的病原菌有：霍乱弧菌(*V. cholerae*)可引起霍乱；副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)污染过的鱼和贝类可引起人食物中毒；创伤弧菌(*V. vulnificus*)可引起高致死的败血症。

鳗弧菌(*V. anguillarum*)是导致鱼类弧菌病的代表。鱼类其他致病弧菌还有奥达利弧菌(*V. ordalii*，又译名病海鱼弧菌、奥氏弧菌)、杀鲑弧菌(*V. salmonicida*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、哈维弧菌(*V. havveyi*)、拟态弧菌(*V. mimicus*)及创伤弧菌(*V. vulnificus*)等。

(一) 鳗弧菌(*V. anguillarum*)

本菌是第一个从海水鱼分离的致病菌，多年来所有鱼类弧菌病(*Vibriosis*)均归于本菌名下，1981 年以来，致病力强的病海鱼弧菌及杀鲑弧菌等相继被确认并定名，近年来还不断有新种发现。尽管如此，本菌仍是具有代表性的鱼类致病弧菌。

1. 形态与培养特性 本菌大小为 0.5~0.7μm×1.0~2.0μm，菌体弯曲，两端钝圆。单在或双在。菌体一端有单鞭毛，无荚膜，不形成芽孢。革兰氏染色阴性。本菌兼性厌氧。能在普通琼脂、碱性蛋白胨水、TCBS(硫代硫酸-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖)琼脂上生长繁殖。在普通琼脂平板上，形成圆形、隆起、半透明或不透明、灰白色或淡黄褐色、边缘整齐、有光泽的菌落。在 TCBS 琼脂平板上形成黄色菌落。血平板培养 48h 生长的菌落小而光滑，有溶血性。生长温度范围为 10~35℃，最适温度为 20~25℃。生长 pH 范围为 6~10，最适 pH 为 8，在 pH 为 5 时不生长。生长所需要食盐浓度为 0.5%~6%，最适浓度为 1% 左右。

2. 抗原结构 本菌有耐热(抵抗 120℃、20min)的 O 抗原和不耐热(120℃20min 敏感)的 K 抗原。O 抗原为特异性抗原，与其他弧菌无交叉反应。已报道有 10 个 O 抗原型，在日本的日本鳗及其他海鱼分离株中至少存在 6 个抗原型，其中 A 型最为常见。O 抗原为相对分子质量 100 000 的大分子，耐热，是细胞壁的组成成分，并可部分释放到培养上清中。提取过程不破坏其抗原性。外膜蛋白(OMP)具有较弱的抗原性，各个 O 抗原型的 OMP 图谱有差异，除 B 型外，各型均有 38000~44 000 的 OMP 主要蛋白带。

鳗弧菌有 3 种 K 抗原。K-1 抗原为所有 O 型菌株的共同抗原，同时也见于嗜水气单胞菌和杀鲑气单胞菌。K-2 抗原存在于奥氏弧菌和 J-0-4 型鳗弧菌，副溶血性弧菌也有 K-2 抗原。K-3 抗原存在于 J-0-4J-0-7 型菌株。此外，鳗弧菌与费氏弧菌、副溶血性弧菌、溶藻弧菌、嗜水气单胞菌、杀鲑气单胞菌、荧光假单胞菌存在共同的沉淀抗原。

3. 致病性 鳗弧菌可引起多种鱼的弧菌病。易感宿主有鲑、大麻哈鱼、细鳞大麻哈鱼、大鳞大麻哈鱼、红大麻哈鱼、小红点鲑、麻苏大麻哈鱼、银大麻哈鱼、虹鳟、河鳟、日本鳗鲡、欧洲鳗鲡、香鱼、鲱鱼、鲷、紫鲷、真鲷、大西洋鳕、太平洋鲱、鲽鱼、白斑

狗鱼、虾等。人工接种可感染泥鳅、黑鲟、金鱼、鲤、鲫等。但不同鱼类的易感性有所差异，如鲑属的鲑比虹鳟更易感。

急性型的患鱼大多贫血，表明本菌的致病机理与溶血性有关。已证实本菌能产生一种溶血素，与嗜水气单胞菌、霍乱弧菌 E1 Tor 型等的溶血素有基因同源性，但鱼类红细胞较哺乳动物红细胞更敏感。溶血素在细菌生长的稳定期产生，从而可以解释为什么在感染之后需要一些时间才发生严重的贫血，除毒素外，还能产生蛋白酶，引致骨骼肌坏死和液化。此外，致病菌株产生铁载体(siderophore)，可从宿主的铁蛋白中获取铁，作为细菌生长之用。

消化道和受伤的皮肤是鳃弧菌的入侵门户。潜伏期一般为 25d。通过皮肤感染时，首先引起感染局部皮肤的坏死和溃疡，然后侵入皮下和肌肉组织，通过其中的血管和结缔组织，迅速向全身其他组织、器官扩散，引起败血症。经胃肠道感染时，首先引起肠炎，尤其是后部肠道。进一步通过肠管进入到全身其他组织器官。败血症症状表现为肝脏、肾脏、脾脏、心脏、生殖腺、肌肉的弥漫状或点状出血，常伴随有肝脏和肾尿细管的坏死。

鳃弧菌可在污染的鱼塘存活较长时间，能通过饵料、饮水、各种器材传播，带菌者和野生鱼在传播上也起着重要作用。鱼群拥挤、缺氧、浑浊等水质变化可促使本病的发生。发病时水温一般在 10℃ 以上。

4. 抵抗力 本菌在海水中可存活 2 周以上，但在淡水中存活时间较短(35h 内死亡)。药物预防和治疗时，可以运用四环素、磺胺、硝基呋喃类、萘啶酸等抗生素和化学药剂。由于许多抗生素常作为饵料添加剂或通过药浴来预防或治疗弧菌病，使得对常用抗生素有耐药性的菌株被筛选出来。从不少菌株中分离到了抗氯霉素、四环素、链霉素、氨基青霉素、磺胺、甲氧苄氨嘧啶等抗生素的耐药性质粒(R 质粒)。因此，治疗前最好做药敏试验。

5. 微生物学诊断 应做细菌分离培养。取病鱼肾或血液、脾、鳃等，接种于含 2% NaCl 的营养琼脂培养基，置 20~25℃ 培养。所获得的细菌再根据染色特性、形态、氧化酶及其他糖发酵试验做初步鉴定。确诊则需做 O/129 敏感试验以及用抗血清做玻片凝集试验等。

6. 免疫 已研制并应用疫苗。福尔马林灭活疫苗用于鱼类浸泡免疫有较好的保护力，此疫苗要求细菌含量较高。目前，国外已有商品化的疫苗，是由本菌与其他弧菌如奥达利弧菌、杀鲑弧菌或杀鲑气单胞菌复合而成。

(二) 奥达利弧菌(*V. ordalii*)

奥达利弧菌是仅次于鳃弧菌的鱼类病原弧菌，在生化性状上与鳃弧菌的相似性可以达到 61%~70%。DNA 杂交试验证明，奥氏弧菌种内 DNA 的同源性为 83%~100%，而与鳃弧菌之间的同源性为 53%~67%。鳃弧菌种内 DNA 的同源性为 70%~100%，而与奥氏弧菌的同源性为 58%~69%。不过奥氏弧菌难以在普通琼脂上生长，在 TSA 和 BHL 培养基上发育缓慢，在 TCBS 培养基上不生长。VP 试验、精氨酸水解、柠檬酸利用、淀粉水解、ONPG 试验、脂酶活性以及纤维二糖、甘油、山梨醇、海藻糖等碳水化合物产酸试验均为阴性。以此与鳃弧菌区别。本菌在海水中的存活时间可达 28d，但在淡水中仅能存活 3d 左右。奥氏弧菌与鳃弧菌有共同的 O 抗原和 K 抗原(K-1 和 K-2)，但奥氏弧菌都属于 J-O-1 型。两者灭活疫苗之间有一定程度的交叉保护性。

奥氏弧菌主要引起鲑科鱼类如麻苏大麻哈鱼、小红点大麻哈鱼、虹鳟等的弧菌病。

(三) 副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)

1. 形态 本菌为 $0.4\sim 0.6\times 13\mu\text{m}$ 大小的革兰氏阴性杆菌或弧菌。在液体培养基中培养的细菌，其菌体一端具有单鞭毛，运动活泼。但在琼脂平板培养基中，幼龄培养菌常具有周身鞭毛。本菌为多形性，呈多种形态。

2. 培养 副溶血性弧菌为兼性厌氧菌。菌落中等大小，培养 24h 时直径约 2mm。在绵羊血平板上不溶血，在弧菌选择培养 TCBS 琼脂上的菌落发绿。利用甘露醇产酸，甘露醇盐培变为黄色。在生长繁殖时的最大特征是必须有钠离子。在不含 NaCl 的培养基中不能生长，具有嗜盐性。本菌可以生长的 NaCl 浓度范围是 0.58%，当 NaCl 浓度达 10% 以上时，本菌也不能生长。最适生长温度是 $30\sim 37^{\circ}\text{C}$ ，但在 42°C 时仍可生长，在 10°C 以下时不能生长。生长最适 pH 为 8.0。生长 pH 范围为 5.6~9.6。在最适条件下，本菌繁殖一代所需时间为 10~20min，其增殖速度是大肠杆菌和志贺氏菌等细菌的 2 倍。大多数菌株对弧菌抑制剂 O / 129 不敏感，是弧菌属中少有的例外。

3. 生化特性 本菌的主要生理生化特性如表 1-3 所示。

表 1-3 副溶血性弧菌的生理生化特性

性状		性状	
氧化酶	+	甘露糖	+
过氧化氢酶	+	枸橼酸盐(Simmon)	+
运动性	+	丙二酸	—
无 NaCl	—	硝酸盐还原	+
3%NaCl	+	尿素酶	—
8%NaCl	+	苯丙氨酸脱氨酶	—
10%NaCl	—	明胶液化	—
42°C	+	几丁质	+
TCBS	+	藻酸	—
吲哚	+	淀粉分解	+
VP	—	酪蛋白分解	+
H_2S	—	赖氨酸脱羧酶	+
七叶苷	—	鸟氨酸脱羧酶	+
碳水化合物发酵		蜜二糖	—
葡萄糖产酸	+	棉子糖	—
葡萄糖产气	—	鼠李糖	—
甘露醇	+	山梨糖	—
乳糖	—	梅藻糖	+
蔗糖	—	木糖	—
阿拉伯糖	D	核糖醇	—
纤维二糖	—	肌醇	—
半乳糖	+	水杨苷	—
果糖	+	赤藓糖醇	—
麦芽糖	+	松三糖	—

注：+：90%以上为阳性，—：90%以上为阴性，D：11%~89%为阳性。

4. 致病性 副溶血弧菌具有嗜盐性，为海产鱼弧菌病的病原菌，一般在 20~28℃引起鱼发病。人食用本菌污染的海鱼、贝类等常引致食物中毒，潜伏期 2~36h，表现为水样腹泻、呕吐及发热，一般能很快康复。近年来，从我国人工养殖发病死亡的海鱼、贝类等也分离到本菌。

本菌的致病株绝大多数能裂解人、兔的红细胞，因此可用溶血反应区分致病株与非致病株，称之为神奈川(Kanagawa)试验。具有溶血性归因于该菌能产生溶血毒素，该毒素名为耐热直接溶血素(thermostable direct haemolysin, TDH)，属于穿孔毒素，为不含糖或脂的蛋白质，相对分子质量 32 000~44 000，与霍乱弧菌非 01 群及拟态弧菌产生的 TDH 大体相同。TDH 家兔肠结扎试验阳性，但致病力不如霍乱肠毒素及大肠杆菌肠毒素。另外，在神奈川试验阴性的菌株中，还发现一种不耐热的毒素——磷酸酯酶 A2，也被认为是本菌的毒力因子。

5. 微生物学诊断 取病变组织接种嗜盐菌选择培养基或 SS 平板。挑取可疑菌落进一步做生化试验，最后检测其毒素做神奈川试验等，也可用 PCR 等技术在基因水平检测毒素。由副溶血弧菌引起的对虾红腿病，可取病变组织 50g，剪碎后加入 50ml 灭菌的氯化钠庆大霉素增菌液的三角烧杯中，增菌 18h，在液面下无菌吸取 3ml 菌液放入灭菌的试管中，加盖 120℃加热 30min 后，进行斑点 ELISA 法快速检测，24h 内可检出结果。如疾病较严重，则不经增菌也可检出，速度更快。与鳃弧菌、溶藻弧菌等无交叉反应。

三、链球菌属

链球菌属(*Streptococcus*)种类很多，在自然界分布甚广，水、尘埃、动物体表、消化道、呼吸道、泌尿生殖道黏膜、乳汁等都有存在，有些是非致病菌，有些构成人和动物的正常菌群，有些可致人或动物的各种化脓性疾病、肺炎、乳膜炎、败血症等。

1. 分类 目前链球菌属共有 30 多种，比较常见的有 10 余种。此外，还可根据抗原结构、溶血特征分类。

(1)根据抗原结构分类：链球菌的抗原构造比较复杂，包括属特异、群特异及型特异 3 种抗原。

①核蛋白抗原。属特异抗原，又称 P 抗原，并与葡萄球菌属有交叉性。

②群特异性抗原，又称 C 抗原。是存在于链球菌细胞壁中的多糖成分，其抗原决定簇为氨基糖类，例如 A 群链球菌是鼠李糖-N-乙酰葡萄糖胺，C 群为鼠李糖 N-乙酰半乳糖胺，而 F 群则为葡萄糖-N-乙酰半乳糖胺。兰氏(Lancefield)分类即以此为基础，根据 C 抗原不同，可将链球菌分成 A、B、C……等 20 个血清群。各血清群进一步按表面抗原进行分型。

③型特异性抗原，又称表面抗原。是位于多糖抗原之外的蛋白质抗原。A 群链球菌具有 M、R、T 等蛋白质抗原。M 抗原(图 1-1)与致病性及免疫原性有关。非 A 群链球菌有的具有类 M 蛋白结构。

(2)按溶血能力分类：根据链球菌在血琼脂平板上的溶血现象分为 α 、 β 、 γ 3 类，在鉴定链球菌的致病性方面有一定的意义。

① α 型溶血链球菌。在菌落周围形成不透明的草绿色溶血环，红细胞未溶解，血红蛋白变成绿色。这种细菌致病力不强，多为条件性致病菌。

② β 型溶血链球菌。菌落周围形成完全透明的溶血环，红细胞完全溶解。这类菌致病力强，从鱼体分离到的多数菌株属于此型。

③ γ 型溶血链球菌。菌落周围无溶血现象，一般为非致病菌。

2. 形态与染色 链球菌呈圆形或卵圆形，直径小于 $2.0\mu\text{m}$ ，常排列成链状或成双。链的长短不一，短者由 4~5 个细菌组成，长者达 20~30 个细菌。链的长短与细菌的种类及生长环境有关，在液体培养基中易形成长链，而在固体培养基上常呈短链。一般致病性链球菌的链较长，非致病性菌株较短。肉汤内对数生长期的链球菌，常呈长链排列。革兰氏阳性，老龄的培养物或被吞噬细胞吞噬的细菌呈现阴性。除个别 D 群菌外，均无鞭毛。A 群等菌的一些菌株有菌毛。A、B、C 群等多数有荚膜。

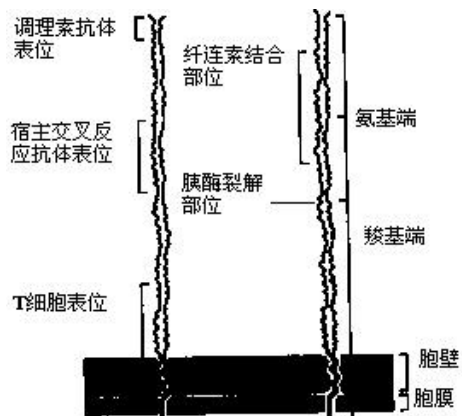


图 1-1 M 抗原结构模式图

3. 培养特性 大多数为兼性厌氧菌，少数为厌氧菌。最适生长温度 37°C ， $\text{pH}7.4\sim7.6$ ，致病菌营养要求较高，普通培养基中生长不良，需添加血液、血清、葡萄糖等。在血液琼脂平板上长成直径 $0.1\sim1.0\text{mm}$ ，灰白色，表面光滑，边缘整齐的小菌落。多数致病菌株具有溶血能力，溶血环的大小和类型因菌株而异。B、D 群的一些菌株可产生橙红或黄色色素。血清肉汤中生长，初呈均匀浑浊，后因细菌形成长链呈颗粒状沉淀管底，上清透明。有些还能在远藤培养基、40%胆汁琼脂平板上生长繁殖。一般生长适宜温度为 $20\sim37^{\circ}\text{C}$ ，少数在 10°C 和 45°C 也能生长。适宜 pH 为 7 左右。生长食盐浓度 $0\sim7\%$ ，最适浓度 $0\sim1\%$ 。

4. 生化特性 本属细菌均能分解葡萄糖，一般不分解菊糖，不被胆汁溶解。从鱼分离的不同的病原性链球菌菌株的生化特性差异较大，少数与典型种的性状基本一致，多数不能归结到种。

5. 抵抗力 本菌在水中的生存能力与水温和水中的营养成分有关。水温越低，水中的营养成分越丰富，则存活的时间越长。在营养成分较少的海水中， 15°C 14d、 25°C 7d、 37°C 3d 不死亡。但在鲷鱼养殖厂附近的表面水中， 15°C 和 25°C 时本菌可存活 42d； 37°C 时存活 14d。在内湾水中， 25°C 时约生存 40d。本菌在海水中的分布随季节而变化，一般在 8~9 月份较多，秋季以后开始减少。底泥中的细菌相对恒定一些，在 11 月份，也可检出许多链球菌。本属细菌对热较敏感，煮沸可很快被杀死。常用浓度的各种消毒药均能将其杀死。对氯霉素、红霉素、强力霉素、螺旋霉素、青霉素、磺胺类药物均很敏感。

6. 致病性 本菌能产生透明质酸、链激酶(溶纤维蛋白酶)、链道酶(脱氧核糖核酸酶)和溶血素等外毒素，帮助细菌在宿主组织中扩散，溶解红细胞和白细胞等。用培养物滤过液制得的粗制外毒素对鲷的半数致死量(LD_{50})为每克体重 7.9mg 。此外，链球菌还可产生内毒素，其毒性高于外毒素，对鲷的半数致死量为每克体重 3.2mg 。致病性链球菌细胞壁上的脂磷壁酸(LTA)等与动物皮肤及黏膜表面的细胞具有高度亲和力，使菌体易吸附于宿主口腔、咽部的黏膜上皮。其荚膜成分、M 蛋白等具有抗吞噬作用，均有利于细菌发挥致病作用。

本菌对多种海水鱼和淡水鱼都具有致病性。易感性较强的鱼有香鱼、鲷、鳗鲡、虹鳟、金体美鳊鱼、罗非鱼、鲷、川鲈、小红点大麻哈鱼等。发病鱼主要表现为败血症，全身各脏器出血，脑、心脏、鳃、尾柄等部位的化脓性炎症或肉芽肿样病变。发病季节主要是 8~

9 月。此外，从许多野生鱼的肠道、肾脏组织中也常分离到链球菌。

7. 微生物学检查

(1)涂片镜检：取病鱼血液或肾脏、脾脏等脏器涂片，革兰氏染色后镜检，可见许多呈链状排列的革兰氏阳性球菌。

(2)分离培养：取病鱼脑、血液或脏器，划线接种于 EF 琼脂或添加 0.5% 葡萄糖的 HI 琼脂平板上，30℃ 培养 24~48h。在 EF 琼脂平板上，链球菌形成鲜红色、紫红色或暗黑色的小菌落；在含有葡萄糖的 HI 琼脂平板上，形成不透明、乳白色的小菌落。若在 EF 琼脂中添加少量的 TTC，更有利于链球菌生长。

(3)血清学检查：取病料涂片或制作切片后，用直接荧光抗体技术检查。此法可以区别。α 型和 β 型链球菌。玻片凝集反应可用于分离菌的鉴定。近几年已将分子生物学手段用于致病性链球菌的检测。

四、爱德华氏菌属

爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)菌体为小直杆菌，直径约 1μm，长 23μm，符合肠杆菌科的一般定义。革兰氏阴性。有周身鞭毛，能运动。兼性厌氧，接触酶阳性，氧化酶阴性，还原硝酸盐为亚硝酸盐。最适温度为 37℃，但鲶鱼爱德华氏菌(*Eictaluri*)喜欢较低的温度。在蛋白胨和类似的琼脂培养基上培养 24h 后出现生长物，菌落小，直径约 0.51mm。生长需要维生素和氨基酸。发酵葡萄糖产酸，并常有可观察到的气体，还能发酵少数其他化合物，但与肠杆菌科的其他许多分类单位相比较，活性相差甚远。鲶鱼爱德华氏菌通常抗黏菌素(colistin)，但对其他许多抗生素包括青霉素敏感，有很大的抑菌圈。常分离自冷血动物和其他环境，特别是淡水。对鳊鳙鱼类致病性较强；对鲶鱼和其他动物致病，有时造成经济损失；对于人类是一个罕见的机会致病菌。DNA 的 G+Cmol% 为 53~59(Tm, Bd)。种间鉴别见表 1-4。

表 1-4 爱德华氏菌属种和生物群的鉴别

特征	爱德华氏菌属		保 科 爱德华氏菌 (<i>E. hoshinae</i>)	鲶鱼 爱德华氏菌 (<i>E. ictaluri</i>)
	野生型 (<i>E. tard</i>)	生物群 I (biogroup I)		
从 D-甘露醇产酸	—	+	+	—
从蔗糖产酸	—	+	+	—
从海藻糖产酸	—	—	+	—
从 L-阿拉伯糖产酸	—	+	—	—
连四硫酸盐还原	+	—	+	
丙二酸盐利用	—	—	+	—
吡啶产生	+	+	—	—
在三糖铁琼脂上产 H ₂ S	+	—	—	—
运动性	+	+	+	—
柠檬酸盐 (Christensen' s)	+	+	+	—

迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)

迟钝爱德华氏菌是鱼类爱德华氏菌病(edwardsiellosis)的病原菌。1962 年日本细菌学家保科发现这种病原菌。

Grimont 等人(1980)分离到利用甘露醇、蔗糖和阿伯糖的菌株,将其命名为迟钝爱德华氏菌生物 I 群(*E. tarda* biogroup I), 而称不利用这 3 种糖类的其他菌株为野生型。但多数分离株属于野生型。

1. 形态与染色特性 本菌为革兰氏阴性的短杆菌,大小为 $0.5\mu\text{m}\times(1\sim3)\mu\text{m}$, 有周身鞭毛,能运动,无荚膜,不形成芽孢。

2. 生长要求及培养特性 本菌为兼性厌氧菌。生长温度范围为 $15\sim42^{\circ}\text{C}$, 最适温度为 37°C , 适宜 pH 为 $5.5\sim9.0$ 。多数菌株能在 $0\sim4\%$ 食盐浓度下生长,少数菌耐盐浓度达 4.5% 。本菌在普通琼脂培养基上 25°C 培养 24h 后,形成正圆形、凸起、灰白色、湿润、有光泽、半透明状的菌落,直径 $0.5\sim1.0\text{mm}$ 。在 ss 琼脂、木糖-赖氨酸-去氧胆酸盐琼脂、DHL 琼脂等选择性培养基上形成中间为黑色的、周边透明的较小的菌落。

3. 生化特性 本菌的接触酶、赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶、硝酸盐还原、MR 试验均为阳性。产生硫化氢和吲哚。氧化酶、苯丙氨酸脱羧酶、脂酶、石蕊牛乳、VP 试验均为阴性。不分解尿素、淀粉,不液化明胶,不能利用酒石酸盐。在 KCN 肉汤中不生长。分解葡萄糖、果糖和半乳糖,但其他多数糖类不能利用。

4. 抵抗力 本菌对噻唑酸、三甲氧苄氨嘧啶、土霉素、氯霉素、痢特灵、磺胺制剂较为敏感。

5. 抗原性 迟钝爱德华氏菌有 O 抗原和 H 抗原。1967 年, Sakazaki 将主要来自于人和爬虫类的 256 株迟钝爱德华氏菌分成 17 种 O 抗原和 11 种 H 抗原,二者组合在一起,构成 54 个血清型。1972 年 Edwards 和 Ewing 又将爱德华氏菌分成 148 个血清型,包括 49 种 O 抗原和 37 种 H 抗原。但目前尚无统一的分型标准。

鱼体内吞噬细胞的活性和凝集抗体的滴度与爱德华氏菌的保护性免疫有关,尤其是前者。菌体细胞壁的多糖成分为爱德华氏菌的一种保护性抗原。粗制的脂多糖(LPS)可增强鱼体内吞噬细胞的活性,刺激鱼体产生高滴度的凝集抗体。但纯的脂质物质(Lipid)有降低吞噬细胞活性、抑制鱼体免疫反应的作用。

6. 病原性 迟钝爱德华氏菌可凝集多种动物的红细胞。其凝集素(附着因子)有两种:一种可被甘露糖抑制,为爱德华氏菌属细菌所共有;另一种不受甘露糖影响,只存在于迟钝爱德华氏菌。本菌菌体表面无纤毛,凝集素可能与其侵袭力有关。加热杀死的菌体也能导致鳃鲶死亡。少数菌株还能产生溶血素。

爱德华氏菌病首次(1962)在日本鳊鲶中发现,后来在多种人工养殖的淡水鱼和海水鱼中流行此病。除日本鳊鲶外,迟钝爱德华氏菌还可感染金鱼、虹鳟、大鳞大麻哈鱼、黑鲈、紫鲈、真鲷、黑鲷、鲷鱼、川鲈。实验条件下可感染鲤鱼和青蛙。迟钝爱德华氏菌栖居的宿主范围十分广泛,也是水中的常在细菌(养鳊池水中一般含 $10^{2-9}\text{CFU}/\text{ml}$)。从蛇、龟、鳄等冷血脊椎动物,以及鸟、臭鼬、猪等温血脊椎动物的肠内分离到此菌,并且是蛇的一种正常的肠道寄生菌。从人的粪便、尿或血液中也分离到迟钝爱德华氏菌,而且把从人的粪便中分离的菌株给鳊鲶注射后,也可引起爱德华氏菌病。因此,本菌被认为是人鱼共患传染病的病原之一。

此菌可通过肠道或皮肤病灶侵入鱼体内,然后在肝脏或肾脏生长繁殖,诱发纤维索性

化脓性炎症。侵害肾脏时，肾脏肿大，肛门突出，肛门周围发红肿胀，肾脏的脓汁通过肛门排出。肝脏受侵时，则前腹部明显发红肿胀，腹壁穿孔。病灶随后转移到其他组织器官，最后导致败血症而死。此外，病鱼的鳍和腹部常充血发红，外观与鳍赤病很相似。一般在水温为 24℃ 以上时发生，流行于春夏两季。病鱼通过尿或皮肤上的病灶向水中排出大量病菌而成为传染源。

7. 微生物学检查

(1) 分离培养：肾脏或血液等，接种在 SS 琼脂、DHL 琼脂、木糖-赖氨酸-去氧胆酸盐琼脂平板上，在 37℃ 培养 24h 后，检查有无中间为黑色的小菌落。另外，也可在上述培养基中加入甘露醇，以便和鱼池中分解甘露醇的细菌相区别。

(2) 血清学检查：常用的方法为荧光抗体技术，ELISA 也开始用于爱德华氏菌病的诊断。

五、假单胞菌属

假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌为直或微弯的杆菌，不呈螺旋状，0.5~1.0μm×1.5~5.0μm。多单在。没有菌柄也没有鞘。不产芽孢。革兰氏阴性，以单极毛或数根极毛运动，罕见不运动者。有的种还具短波浪形的侧毛。需氧，进行严格的呼吸型代谢，以氧为最终电子受体。在某些情况下，以硝酸盐为替代的电子受体进行厌氧呼吸。不产生黄-橙色细胞色素。几乎所有的种都不能在酸性(pH4.5)条件下生长。大多数种不需要有机生长因子。化能营养异养菌，有的种是兼性化能自养，利用 H₂ 或 CO 为能源。氧化酶阳性或阴性，接触酶阳性。在生长过程中产生各种水溶性色素。DNA 的 G+C 为 58~70mol%。

本属细菌在自然界中分布极广，土壤、淡水、海水、污水、动植物体表和黏膜等处均有存在。本属约有 140 余种，引起鱼类假单胞菌病(*pseudomonas disease*)的有荧光假单胞菌、鳃败血假单胞菌、绿针假单胞菌和恶臭假单胞菌等。

(一) 荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)

荧光假单胞菌广泛存在于水、污水和土壤中，是鱼类赤皮病的病原菌，也是引起水产品腐败的腐生菌。伯杰氏分类系统(1984)把本菌分成 I~V 个生物型，鱼类病原性荧光假单胞菌多属于生物 I 型。

1. 形态及染色特性 本菌为杆状，两端钝圆，大小为 0.7~0.8μm×2.3~2.8μm。老龄培养物菌体较短而纤细。单个或成双排列。能运动，有 1~3 根极端鞭毛，个别菌有时失去鞭毛。无芽孢。菌体染色均匀，革兰氏染色阴性。

2. 生长要求及培养特性 在普通琼脂培养基上生长良好，形成表面光滑、湿润、边缘整齐、灰白色或浅黄绿色、半透明、微隆起、直径 1~1.5mm 的菌落。本菌能够产生水溶性的荧光色素(呈黄绿色)，其能渗入培养基内，使培养基变为黄绿色。液体培养生长丰盛，均匀浑浊，有少量絮状沉淀，表面有光泽柔软的菌膜，一摇即散。24h 后，培养液表层产生色素。明胶穿刺 24h 后杯状液化，72h 后层面形液化，液化部分出现色素。用马铃薯培养，中等生长，微凸、光滑、湿润，菌落呈绿色，培养基 2d 后呈绿色。兔血琼脂β型溶血。

本菌为专性需氧菌，生长的适宜温度为 25~30℃，大多数菌株在 4℃ 以下可以生长，41℃ 不生长。生长 pH 范围 5.0~9.7，最适 pH 为 5.7~8.4。

3. 生化特性 本菌能产生氧化酶、脂酶和卵磷脂酶，不产生吲哚和硫化氢。MR 和 VP 试验阴性，枸橼酸盐利用阳性，液化明胶。多数菌株能分解葡萄糖、木糖、草糖、甘油、阿拉伯糖、山梨醇、蔗糖等，产酸不产气；不分解乳糖、甘露醇、麦芽糖。染色体

DNA 中的 G+C 含量为 59.4~61.3mol%。

4. 抵抗力 本菌在淡水中能存活 140d 以上，在半咸水中存活 50d 左右，但在海水中生存的时间较短。本菌对四环素、链霉素、卡那霉素、黏菌素、噁喹酸、萘啶酸、磺胺二甲甲基异噁唑、呋喃唑酮敏感，但对青霉素、氯霉素、红霉素以及弧菌抑制剂 O / 129 和新生霉素不敏感。

5. 病原性 本菌主要感染草鱼和青鱼，也可感染鲢、鲟、虹鳟、红点鲑等其他鱼类，细菌经伤口侵入皮肤组织，引起体表皮肤出血发炎、糜烂和溃疡。受害部位多在躯干两侧和腹部，以及鳍和鳃。鳍条间组织腐烂后形成蛀鳍。有时，鱼的肠道亦充血发炎。不同大小鱼均可感染发病。无明显的流行季节。

6. 微生物学检查

(1)涂片镜检：取病鱼体表病变组织或肾脏、脾脏等脏器涂片，革兰氏染色后镜检，可见许多革兰氏阴性菌。

(2)分离培养：取病料划线接种于普通琼脂平板，小鱼则整尾加 PBS 匀浆后，再涂布于平板上，25℃培养 24~48h，检查有无产生水溶性荧光色素的菌落形成。取可疑菌落进一步做生化鉴定。

(3)血清学检查：常采用直接荧光抗体技术。

(二) 鳃败血假单胞菌(*P. anquilliseptica*)

鳃败血假单胞菌是鳃鱼和香鱼红点病(red spot disease)的病原菌。此病最早于 1971 年发现于日本的人工养殖鳃鲢，后来在台湾、苏格兰等地区也偶有发生。近年来已成为日本香鱼的主要疾病之一。

1. 形态及染色特性 本菌为革兰氏阴性细长杆菌，病鳃血液中的菌，大小为 0.5μm ×(1~3) μm。有极生单鞭毛，能运动，运动性随培养条件而变化，15℃培养时，有动力的菌很多，但温度在 25℃以上时，则运动性减弱。电镜下可见菌体周围有一层厚的荚膜，在光镜下则看不到，不形成芽孢。血液琼脂培养后，显示长丝状的菌增多。有异染小体。

2. 生长要求及培养特性 本菌可在普通琼脂上生长，但速度缓慢，在 20℃培养 2~3d，可形成透明、光泽、黏稠、直径为 1mm 的小菌落。培养基加入血液，生长得较好；麦康凯培养基上发育；提高培养基的营养后，不显示运动性的菌增加。无绿色荧光色素和其它色素。生长温度范围 5~30℃，最适温度 15~20℃，生长食盐范围 0.1%~4%，最适浓度 0.5%~1%。不含 NaCl 的培养基上不发育。生长 pH 范围 5.3~9.7，最适 pH 为 7~9。

3. 生化特性 包括葡萄糖在内的所有糖类，本菌几乎都不利用。氧化酶、接触酶、吐温 80 水解试验为阳性。某些菌株能分解酪素，液化明胶。产生吡啶。VP 试验、O / F 试验、精氨酸水解、水解淀粉等其他许多生化反应也多为阴性。

4. 抵抗力 本菌在淡水中仅能存活 1d，在海水中和稀释海水中可存活 200d 以上。对氯霉素、四环素、卡那霉素、噁喹酸、吡咯酸、呋喃唑酮高度敏感，但对磺胺二甲甲基异噁唑、红霉素、竹桃霉素不敏感。

5. 抗原性 本菌有 O 抗原和 K 抗原。K 抗原能阻止 O 抗原与相应抗血清的凝集反应，其可耐受 100℃30min，但不能抵抗 121℃30min。根据 K 抗原的有无，可将本菌分为 3 个血清型，即 I (K⁺)型、II (K⁻)型、中间(K[±])型。中间型菌株不能与特异性抗 K 血清发生凝集反应，但能吸收血清中的 K 抗体，并且对 O 抗原的凝集反应有一定的抑制作用。I 型菌株和中间型菌株均为有毒株。此外，从香鱼分离的菌株不与鳃鲢分离株发生交叉凝集反应，

二者的 K 抗原有所不同。应用免疫电泳技术分析发现, 本菌含有 14 种(a~n)沉淀抗原。其中沉淀抗原 c 可以耐受 121℃, a、d、i 抗原可以耐受 100℃, 其余抗原对 100℃敏感。无 K 抗原的菌株缺乏 d 种沉淀抗原。

6. 致病性 本菌主要侵害日本鳗鲡和香鱼, 对日本鳗鲡的 LD₅₀ 为每千克体重 10 个。不过, 各分离株对自身宿主的致病性较强。欧洲鳗鲡对本菌有一定的抵抗力。实验性感染表明, 泥鳅、铜吻鳞鲃太阳鱼也具有较强的易感性, 鲤、鲫和金鱼易感性较低, 而虹鳟、小红点大麻哈鱼、红点鲑、红大麻哈鱼、小白鼠等则不易感。

K 抗原与本菌的侵袭力有关, K⁺型菌株对日本鳗鲡血清的杀菌作用具有较强的抵抗力, 但鲤、金鱼、硬头鳟和罗非鱼的血清都能杀死本菌, 欧洲鳗鲡的血清也有一定杀灭作用。

本菌可侵入鱼表皮底层和真皮中繁殖, 使分布在此处的毛细血管充血, 发生渗出性出血或破裂, 从而形成点状出血或块状出血, 因而称之为红点病。出血点主要分布于病鱼的下颚、腹部或肛门周围的皮肤。此外, 腹膜、肝脏等其他组织脏器也可呈现出血或淤血。发病香鱼往往在体表形成溃疡。本病一般在水温为 10~25℃时发生。流行于 2~6 月和 10~11 月。

7. 微生物学检查

(1)分离培养: 取病鱼肝、脾、肾脏或血液, 划线接种于普通琼脂平板上, 20℃培养 2d, 可见露珠状、透明的菌落形成。迟钝爱德华氏菌也可形成相似的菌落, 但利用氧化酶试验可简单地鉴别二者。

(2)血清学检查: 用特异性的抗 O 和 K 血清, 通过玻片凝集反应或微量凝集反应, 可用于分离菌的鉴定。直接荧光抗体技术是本病的快速诊断方法。

六、耶尔森氏菌属

耶尔森氏菌属(*Yersinia*)细菌分布于多种动物体内, 可引起人和动物的败血症或局部感染。直杆菌到球杆菌, 直径 0.5~0.8μm, 长 1~3μm。无芽孢, 不形成荚膜。革兰氏阴性。37℃时不运动, 生长在 30℃以下时以周生鞭毛运动。在普通的营养培养基上生长。在营养琼脂上培养 24h 后, 菌落半透明到不透明, 直径 0.1~1.0mm。最适生长温度 28~29℃。兼性厌氧, 既具有呼吸型代谢又具有发酵型代谢。氧化酶阴性, 接触酶阳性。除了个别的生物变型(biovars)外, 都能还原硝酸盐成亚硝酸盐。发酵葡萄糖和其他碳水化合物, 产酸但不产气或产少量的气。表现特征常常与温度有关, 一般培养在 25~29℃比在 29~37℃能呈现出更多的特征性。所研究过的种具有肠杆菌的常见抗原。生境很广泛(从有生命到无生命), 有些种适应于特异性寄主。DNA 的 G+Cmol% 为 46~50(Tm, Bd)。

鲁克尔耶氏菌(*Yersinia ruckeri*)

鲁克尔耶氏菌属耶尔森氏菌属, 是鲑科鱼类红嘴病(redmouth)也称肠炎红嘴病(enteric redmouth, ERM)的病原菌。此病最早于 1952 年在美国发现, 现在已流行于澳大利亚、南非和西欧等地。1966 年, 分别由 Rucker 和 Ross 从发病的虹鳟分离到病原菌, 当时由于属名难定而取名为红嘴细菌(*Redmouth bacterium*)。1978 年, Ewing 根据此菌的生化特性和 DNA 中 G+Cmol% 含量, 提议归属于耶尔森氏菌属, 并命名为鲁克尔耶氏菌。

1. 形态及染色特性 本菌呈短杆状, 宽 1.0μm, 长 2.0~3.0μm, 老龄培养物(22℃48h)可见有长丝状菌体。22℃时以周身鞭毛运动。20℃培养有动力, 37℃培养无动力, 20℃比 37℃生长旺盛。菌落于 37℃培养 24h, 直径小于 1 mm。无芽孢、荚膜。革兰氏染色阴性。

2. 生长要求及培养特性 本菌在营养琼脂、TSA、FA 和麦康凯琼脂上均生长良好。菌落为圆形、微隆起、淡黄色、光滑、边缘整齐。少数菌株在麦康凯琼脂上生长迟缓或不生长。液体培养物呈均匀混浊。

3. 生化特性 本菌主要生化特性见表 1-5。

表 1-5 鲁克尔耶氏菌主要生化性状

生化性状		生化性状		生化性状		生化性状	
氧化酶	—	果糖	+	精氨酸水解酶	—	纤维二糖	—
接触酶	+	核糖	+	赖氨酸脱羧酶	+	乳糖	—
脲酶	—	甘露糖	+	鸟氨酸脱羧酶	+	木糖	—
H ₂ S	—	麦芽糖	+	苯丙氨酸脱氨酶	—	山梨糖	—
吡啶	—	海藻糖	+	谷氨酰转移酶	+	山梨醇	—
MR, 37℃	+	甘露醇	+	硝酸盐还原	+	甘油	—
VP	—	阿拉伯糖	—	丙二酸盐	—	肌醇	—
枸橼酸盐 (Simmon's) 37℃	d	棉籽糖	—	酒石酸盐	—	七叶苷	—
枸橼酸盐 (Christensen)	+	鼠李糖	—	葡萄糖	+	水杨苷	—
KCN	+(—)	蜜二糖	—	半乳糖	+	卫矛醇	—
明胶液化	+	蔗糖	—				

注：d，菌株间有差异。

4. 抗原性 用凝集反应可将本菌分成 5 个血清型，各型之间有一定的交叉反应。其中最常见的是血清型 I(代表株为 Hagerman 株)，其毒性最强。血清型 II(o' Leary)、血清型 III(澳大利亚)和血清型 V 的毒性较弱或无毒，血清型 IV 的毒性尚不清楚。属于血清型 II 的菌株大多能发酵山梨醇。细胞壁的脂多糖成分(LPS)是该菌的主要免疫保护性抗原。血清型 I、III 和 V 的脂多糖电泳图谱基本相似，但血清型 II 的图谱与之差异较大。

5. 病原性 耶尔森氏菌的最显著的特性是它们具有抵抗巨噬细胞杀伤作用的能力，可在巨噬细胞内存活和繁殖。鲁克尔耶氏菌是专性寄生菌，虽能在沉积物中存活一段时间，但主要在鲑科鱼体内生存。从明显健康的虹鳟的肾脏和下部肠道、粪便中都可分离到。它也存在与白鲑、江鳕、金鱼等非鲑科鱼体内，甚至陆生动物麝鼠也是本菌的贮藏宿主。

红嘴病主要发生在虹鳟、大西洋鲑、银大麻哈鱼、克氏鲑和大鳞大马哈鱼，为亚急性和急性全身性传染病。在水温 15℃时，潜伏期为 5~10d。主要特征是皮下出血，使嘴和鳃盖骨发红，因而称之为红嘴病。此外，上下颌和腭部发炎糜烂，腹鳍、肠道和肌肉也往往出血，因此又称之为肠炎红嘴病。细菌同时也侵入其他脏器，引起炎症。对鲑鳟鱼养殖业可造成严重损失。此菌主要引起淡水鱼细菌性败血症(bacterial septicemia of fresh-water fishes)。

6. 微生物学检查

(1)涂片镜检：取病鱼血液和肾脏涂片，革兰氏染色，检查有无革兰氏阴性的小杆菌。

(2)分离培养：可选用 TSA、FA 进行分离培养，对分离菌应进一步做生化鉴定和血清学检查。

(3)血清学检查：取病鱼肾脏涂片，用间接荧光抗体法检查是诊断此病的一种快速方法。凝集反应可用于分离菌的鉴定。

七、屈挠杆菌属

屈挠杆菌属(*Flexibacter*)细菌呈可屈挠的杆状或丝状，不形成子实体，能滑行运动，革兰氏染色阴性。因有类胡萝卜素色素存在，菌团呈粉色、橙色或黄色。化能有机营养，通常是呼吸代谢，利用分子氧做最终电子受体，不作用于某些多聚物如藻酸、纤维素和几丁质。通常为严格好氧。染色体 DNA 中 G+C 含量为 31.2~42.9mol%。本属中引起鱼病的有柱状嗜纤维菌、海生屈挠杆菌以及嗜冷屈挠杆菌。

(一)柱状嗜纤维菌(*Cytophaga columnaris*)

柱状嗜纤维菌是淡水鱼和半咸水鱼柱状病(columnaris disease)的病原菌。其同义名有柱状杆菌(*Bacillus columnaris*)、柱状软骨球菌(*Chondrococcus columnaris*)和柱状屈挠杆菌(*F. columnaris*)。

1. 形态及染色特性 本菌为革兰氏阴性的细长杆菌。从病鱼病变部直接采集病料或新鲜培养物中的细菌，其形态比较均一，大小 $0.5\sim 0.7\mu\text{m}\times 4\sim 8\mu\text{m}$ ，少数菌体长度达 $15\sim 25\mu\text{m}$ 。随着培养时间的延长，细菌菌体变长，呈极不规则的形态，如长丝状、波状、轮状等。最后成为不规则的颗粒状，老龄培养物常形成圆球体。这些形态的细菌移植到新的培养基上时，也不再发芽，不形成子实体和小孢囊。一般在病灶及固体培养基上的菌体较短，在液体中培养的菌体较长，没有鞭毛，但在湿润固体上可做滑行；或一端固着，另一端缓慢摇动；有团聚的特性。菌落黄绿色，大小不一，扩散型，中央较厚，显色较深，向四周扩散成颜色较浅的假根状。

2. 培养特性 本菌在含 0.5%NaCl 的噬纤维菌培养基(cytophaga agar)、蛋白胨酵母培养基、Chase 培养基、Shieh 培养基、改良 Shieh 培养基以及 Liewes 培养基中均生长良好。在上述琼脂平板上，多数形成黄色、扁平、表面粗糙、中间卷曲、边缘呈树根状的菌落，黏附于琼脂上。少数菌形成表面黏液状或蜂窝状的菌落。在液体培养基中静止培养时，在液体表面形成黄色、有一定韧性的膜；震荡培养时，则浑浊生长。生长温度范围 $5\sim 35^{\circ}\text{C}$ ，少数菌株在 37°C 也能生长， 5°C 以下则不生长，最适温度 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 。生长 pH 范围 6.5~8.3，最适 pH 为 7.5。生长食盐浓度 0~0.5%，在含 1% 以上的 NaCl 的培养基中不生长。专性需氧。好气。

3. 生化特性 本菌氧化酶、细胞色素氧化酶、接触酶试验和刚果红吸收试验均为阳性。产生 H_2S ，液化明胶，分解酪素和酪氨酸。水解吐温 20 和吐温 80，溶解大肠杆菌。赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸脱羧酶试验阴性。不利用淀粉、几丁质、琼脂、纤维素。不利用除葡萄糖外其他碳水化合物。不还原硝酸盐。染色体 DNA 中 G+C 含量为 35.3mol%。

4. 抵抗力 本菌对弧菌抑制剂 O / 129、氨苄青霉素、四环素、链霉素、氯霉素、红霉素、新生霉素、萘啶酸、呋喃、磺胺敏感。对庆大霉素、新霉素、卡那霉素、多黏菌素 B、甲氧苄氨嘧啶、放线菌素 D 不敏感。

5. 抗原性各菌株之间有共同的凝集抗原，但也有自身特异性抗原。

6. 致病性 本菌可感染分属 10 个科的 36 种鱼类。柱状病的特点是在鱼的鳍、吻、鳃瓣尖端或体表形成黄白色的小斑点，并逐渐扩大，病变周围的皮肤发炎。本菌侵入机体

组织后，主要在真皮组织生长繁殖，真皮毛细血管充血，以致破裂出血。真皮坏死，鳞片脱落、形成溃疡，从鳍端开始，鳍条逐渐腐烂。鳃黏液增加，鳃丝腐烂成扫帚状。病鱼内脏往往呈正常外观。此病多在 20℃ 以上时发生，水温在 15℃ 以下时，停止流行。细菌悬液，通过注射、伤口涂布或浸渍等方法都可使试验鱼感染发病。

7. 微生物学检查

(1)涂片镜检：采集病变部位的黏液性物质，涂布在载玻片上，在显微镜下以 400 倍镜检，可见滑行运动的细长杆菌。不久，散在细菌能集成特殊的圆柱状集合体。

(2)分离培养：取病料涂布在噬纤维菌琼脂平板或上述其他琼脂平板上。为防止其他杂菌生长可在培养基中加入多黏菌素 B(终浓度 0.2~0.4mg / ml)或多黏菌素 B(终浓度 0.1mg / ml)与新霉素(终浓度 0.05mg / ml)混合物。25℃ 培养 48h，检查有无特征性菌落出现。进一步生化鉴定，或取可疑菌落与特异性抗血清进行凝集反应。

(3)酶免疫测定法：在载玻片上先涂上少量甘油蛋白，然后用弯头镊子取新鲜病鱼病变部位黏液进行涂片，干后用丙酮固定 5min。再放入内含 0.05%吐温 20 的 0.1mol / L pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS-T)中浸数分钟，用滤纸条吸去玻片上的液体，在涂菌区敷贴小块擦镜纸，加上已用 PBS-T 稀释成 1:100~1:200 的特异抗血清(兔抗柱状嗜纤维菌的抗血清)，置于湿盒内。37℃ 温育 30min，然后镊去擦镜纸，用 PBS-T 搅拌洗涤 3 次，每次 20min。浸入新鲜配置的显色液(40ml 0.05mol / L pH7.6 的 Tris-HCl 缓冲液中加入 20mg 3, 3' 二氨基联苯)中，在 25℃ 的黑暗处放置 10min。取出载玻片，加入 16 滴 H₂O₂(29% H₂O₂ 1 滴与 0.05 mol / L pH7.6 Tris-HCl 缓冲液 28 滴混合液)后，再把载玻片放入，在 25℃ 黑暗处放置 20min。然后流水冲洗 15min，再放入蒸馏水中，按常规脱水封片，用光学显微镜检查，有棕色细长杆菌，即为阳性反应。

(二)鱼害黏球菌(*Myxococcus spiscicola*)

鱼害黏球菌由中国水生生物研究所鱼病研究室于 1972 年从患烂鳃病的草鱼体中分离，并认为是黏球菌属的一个新种(*Myxococcus piscicola* sp. nov.)。但该菌与柱状屈挠杆菌(*F. columnaris*)有很大的相似性，故将其归属于屈挠杆菌属下叙述。

1. 形态及染色特性 本菌菌体细长、柔软而易弯。粗细基本一致，直径约 0.3μm 左右，长短很不一致，一般为 24μm，有的长达 37μm。菌体两端钝圆，较短的菌体通常是直的，长的则稍弯曲，呈半圆形、圆形、U 形、V 形、Y 形等。以横二分裂法繁殖，分裂成两个长度大致相等的个体。本菌无鞭毛，在固体培养基上滑行运动或摇晃颤动。革兰氏染色阴性。

2. 生长要求及培养特性 本菌在胰蛋白胨琼脂平板上生长良好。25℃ 培养 2~3d，出现稀薄的、呈扩散型、平铺在琼脂表面上的菌落。菌落边缘不整齐，呈假根状、中央较厚，菌落大小不一，一般直径在 3mm 左右。在解剖显微镜下观察，单个菌落的轮廓像一朵菊花，中央较厚，边缘像树根一样向四周扩散。菌落最初与琼脂的颜色相似，粗看不易发现。36h 后，逐渐显淡黄色。随着培养日龄的增加，菌落扩大、变厚，颜色变为深黄。一般在 5d 以后就不再生长。若在胰蛋白胨琼脂平板上稀疏地接种，21~25℃ 下培养 48h 左右，在菌落中央处长出单个子实体，肉眼观察，为一个单独的淡黄色小球。在解剖显微镜下观察则为圆锥体，基部宽大、无收缩之柄，表面光滑、折光性强，突出于菌落之中，亦有生长在菌落边缘的，随着培养时间的延长，子实体逐渐扩大，相邻的互相挤成一团。在单独的菌落中，有 7~12 个大小不等的子实体。子实体的直径一般为 130~700μm，由黏液和菌

细胞组成，内含大、中、小 3 种类型的小孢子(也称之为小孢子囊)。将子实体接种至胰蛋白胨液中培养 30h，大多数小孢子萌发，转化为杆状的营养体。

本菌适宜的 pH 为 6.5~7.5，当 pH 在 8.5 以上或 6.0 以下时不生长。生长最适温度为 25℃，40℃ 以上不生长或生长缓慢，4℃ 以下则不生长，65℃ 5min 即死亡，在 33℃ 以上生长的培养物的毒力较弱。此菌专性需氧，故用振荡培养或通气培养法生长旺盛，在厌氧条件下虽能生长，但速度缓慢，而且繁殖率低。

3. 生化特性 多数菌株不利用葡萄糖、淀粉、纤维素、几丁质和其他碳水化合物。能分解酪素、液化明胶。不分解酪氨酸，不利用枸橼酸盐。吲哚和硫化氢试验均为阴性。接触酶试验阳性，硝酸盐还原不定。能溶解大肠杆菌细胞，但不溶解金黄色葡萄球菌。DNA 中 G+C 的含量为 68~71mol%。

4. 抵抗力 本菌对青霉素、红霉素、土霉素、氯霉素、呋喃西林、磺胺噻唑以及中草药大黄、黄柏、乌柏、五倍子敏感。

5. 致病性 本菌是草鱼、青鱼、鳙、鲤烂鳃病的病原菌，此病特点是病鱼鳃丝腐烂，鳃盖骨的内表面往往充血，中间部分的表皮常被腐蚀成一个圆形或不规则的透明小窗。这主要是由于细菌代谢产物中的水解蛋白酶在病变区域组织细胞中进行活跃的水解蛋白作用，导致细胞死亡、崩解。病鱼的外表发黑，特别是头部变得乌黑，故有“乌头瘟”之称。此病在全国各养鱼地区终年出现，水温在 15℃ 以下时，一般少见，20℃ 以上时开始流行，28℃ 左右是最适流行温度。春、夏、秋 3 季均可发生，尤以夏季为多。亦常常与肠炎、出血病、赤皮病并发。

6. 微生物学检查

(1)涂片镜检：取病变鳃组织涂片，革兰氏染色后镜检，可见鳃组织中有许多革兰氏阴性的细长的杆菌。

(2)分离培养：取病料接种于胰蛋白胨琼脂平板上，25℃ 培养 2~3d 后，取可疑菌落进行其他培养特性检查和生化鉴定。

(3)血清学检查：SPA 协同凝集试验和 ELISA 已应用于本病的诊断。

(三)海生屈挠杆菌(*F. maritimus* sp. nov.)

海生屈挠杆菌(*F. maritimus* sp. nov.)是海水鱼类滑动细菌病(gliding bacterial disease)的病原菌。此病早于 1977 年在日本广岛发现，Hirida(1979)、Wakabayasi(1984)分别从病鱼病灶分离到病原菌，并进行了生物学特性鉴定。1986 年 Wakabayasi 根据其生长需要海水的特点，将其命名为海生屈挠杆菌。

1. 形态及染色特性 本菌为革兰氏阴性、细长的屈挠杆菌。大小为 $0.5\mu\text{m} \times 2 \sim 30\mu\text{m}$ ，有时长度达到 $100\mu\text{m}$ 。无鞭毛，但能扩展、滑行运动，在玻片上的运动十分迅速($4 \sim 8\mu\text{m} / \text{min}$)，传代培养物的运动性减弱。随着培养时间的延长，菌体有变短的趋向，但不形成小孢囊，老龄培养物中，可形成直径 $0.5\mu\text{m}$ 左右的圆球体，这种圆球体移植到新鲜培养基中也不再繁殖。

2. 生长要求及培养特性 本菌生长需要 36% 以上的海水，KCl、NaCl、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 可促进生长， SO_4^{2-} 有轻微的抑制作用。在含 70% 海水的噬纤维菌琼脂平板上，25℃ 培养 2~3d 后，形成扁平的、薄膜状的、淡黄色、边缘极不规则、黏附于琼脂上的菌落，菌落直径有时超过 5mm。在液体培养基中静止培养时，在表面形成薄膜。本菌为专性需氧菌。生长温度范围 15~34℃，最适温度 30℃。

3. 生化特性 本菌的接触酶、细胞色素氧化酶、刚果红吸收以及产氨试验均为阳性。不产生 H₂S、吲哚。液化明胶，分解酪素、甘油三丁酸酯、吐温 20 和吐温 80，但不分解琼脂、纤维素、羧甲基纤维素、几丁质和其他碳水化合物。溶解爱德华氏菌和嗜水气单胞菌，但不溶解大肠杆菌。染色体 DNA 中 G+C 含量为 31~33mol%。

4. 抵抗力 本菌对庆大霉素、新霉素、卡那霉素、链霉素、多黏菌素 B、放线菌素 D 和萘啶酸不敏感。对弧菌抑制剂 O / 129、新生霉素、氨苄青霉素、复端孢菌素、四环素、氯霉素、红霉素、磺胺、甲氧苄氨嘧啶、硝基呋喃敏感。

5. 致病性 本菌主要引起真鲷、黑鲷等海水鱼类的滑动细菌病，被感染鱼的口腔、鳍、尾、躯干等部位的皮肤形成灰白色的病灶，继而糜烂，形成浅的溃疡。

6. 微生物学检查

(1)涂片镜检：取皮肤病变组织或肾脏组织涂片，革兰氏染色后镜检，可见组织中有许多细长的革兰氏阴性、屈挠状的杆菌。

(2)分离培养：将病料涂布于含 70%海水的噬纤维菌琼脂上，25℃培养 2~3d，可见扁平的、边缘不规则、淡黄色的菌落形成。应进一步进行生化鉴定，以便与本属其他细菌相区别。

(四)嗜冷屈挠杆菌，(*F. psychrophilus* sp. nov.)

嗜冷屈挠杆菌(*F. psychrophilus* sp. nov.)是鲑科鱼类冷水病(cold-water isease)的病原菌。此病由 Davis 于 1946 年发现。1948 年，Borg 从病鱼首次分离到病原菌，并取名为嗜冷纤维菌(*Cytophaga psychrophilus*)。1989 年，Jean-Francois 等人根据其理化性状和染色体 DNA 与屈挠杆菌属细菌具有较高同源性的特点，重新命名为嗜冷屈挠杆菌。

1. 形态及染色特性 本菌为革兰氏阴性杆菌。48h 液体培养物的大小为 0.3~0.5μm×1~5μm，少数菌体长度达 8~12μm。有些菌体的两端膨大。不形成芽孢，无鞭毛。能滑行运动，但十分缓慢、微弱，少数菌株滑动较快。

2. 生长要求及培养特性 本菌为专性需氧菌。在含 0~0.5%NaCl 的 Anacker-Ordal 肉汤以及含 0.5%蛋白胨的 Anacker-Ordal 琼脂平板上生长良好，形成表面光滑、圆形、边缘整齐、有光泽的菌落，不黏附于琼脂上，也有许多菌株的菌落边缘扩展、不规则。在 TSA 上不生长。生长适宜温度 15~18℃，在 6℃和 22~25℃生长缓慢。

3. 生化特性 本菌产生接触酶和氧化酶。液化明胶，分解酪素，水解甘油三丁酸酯、卵磷脂(蛋黄)、吐温 20 和吐温 80。缓慢水解 DNA。不产生 H₂S。不还原硝酸盐。不分解纤维素、羧甲基纤维素、几丁质、淀粉、七叶苷、琼脂等碳水化合物。在酪氨酸琼脂上，不产生褐色色素。精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸脱羧酶试验阴性。染色体 DNA 中 G+C 含量为 32.5~34mol%。

4. 抵抗力 本菌对弧菌抑制剂 O / 129、新生霉素、氨苄青霉素、复端孢菌素、链霉素、四环素、土霉素、氯霉素、红霉素和呋喃敏感，对庆大霉素、新霉素、多黏菌素 B、甲氧苄氨嘧啶不敏感。

5. 致病性 本菌主要感染鲑科鱼类，对幼鱼和成鱼均具有致病性。症状因鱼种不同而有所差异。虹鳟和大鳞大麻哈鱼幼鱼感染后，一般表现为尾柄的溃疡，因此也称尾柄病。发病的银大麻哈鱼幼鱼则主要在头部，特别是口腔、下颚、鳃盖等部的皮肤形成溃疡，病原菌从皮下侵入到肌肉组织中生长繁殖。此病一般在水温为 5~10℃时发生，因而称之为冷水病或低温病(low temperature disease)。

6. 微生物学检查和防治 参照柱状嗜纤维菌进行。

思考题

1. 试述运动性气单胞菌的概念及其意义。
2. 副溶血弧菌如何检测?它有何致病意义?
3. 试述鱼类弧菌病菌的病原及其主要特点。
4. 阐述链球菌区分血清群的依据。
5. 链球菌各型的溶血表现及在血清肉汤中的生长特征如何?
6. 试述耶尔森菌的分离鉴定程序。
7. 试述荧光假单胞菌与鳃败血假单胞菌的异同点。
8. 简述鱼害黏球菌的主要特点。

第二章 病原真菌

人和大多数动物的真菌病的感染形式多样,包括有真正致病性真菌感染、条件致病性真菌感染、真菌过敏、真菌中毒和真菌毒素致癌等。真正致病性真菌感染主要是一些外源性真菌感染,引起的疾病有各种皮肤癣、皮下和全身性真菌感染。条件致病性真菌感染主要是由一些内源性真菌引起的,这些真菌的致病性不强,常见于各种原因使机体抵抗力降低或菌群失调时发生,如念珠菌、曲霉菌和毛霉菌引起的疾病。变态反应中有些是真菌引起的,如链互隔菌、着色真菌、曲霉菌、青霉菌和镰刀菌等可污染空气环境,引起荨麻疹、过敏性皮炎、哮喘、过敏性鼻炎等。真菌中毒是人和动物食用了某些真菌及其产生的毒素污染的食物和饲料而发生的疾病。真菌毒素危害很大,毒性作用偏重于某些器官,如黄曲霉毒素、岛青霉素等可引起肝损害,这类毒素为肝脏毒,橘青霉素可引起急性或慢性肾病变,称为肾脏毒;黄绿青霉素可造成大脑和中枢神经系统的损害,称为神经毒;镰刀菌毒素主要损害造血系统,称为造血组织毒等。真菌毒素致癌主要见于黄曲霉毒素。

一般认为,对人和动植物有致病性的真菌称为病原真菌。危害水产动物的真菌主要有水霉、绵霉、杀鱼丝囊霉、鳃霉、鱼醉霉、镰刀菌以及链壶菌等。水产动物病原真菌危害较大,危害对象可以是多种水产动物的幼体和成体,也可以危害其卵。传染来源既有外源性的也有内源性的。其发生与否与鱼体的健康状况和温度等环境因素密切相关。水产动物真菌病主要有3种类型:①体表受伤后真菌在受损部位寄生,称为肤霉病。②感染的真菌进入机体使内脏器官产生病变,称为内脏真菌病或全身真菌病。③产毒性真菌污染饲料,造成水产动物中毒,称为中毒性真菌病。由于杀灭真菌的药物对机体有一定的毒副作用,真菌的抗体多数无抗感染作用,因此水产动物真菌病目前尚无十分有效的治疗方法,主要是进行早期预防和治疗。

一、水霉属

水霉属(*Saprolegnia*)属鞭毛菌亚门(Mastigomycotina)卵菌纲(Oomycetes)水霉目(Saprolegniales)水霉科(Saprolegniaceae),大多数是水生,少数是两栖和陆生。营腐生生活或寄生生活;能引起鱼类肤霉病(Dermatomycosis)。

(一)形态及繁殖特征

1. 菌丝形态 菌丝体为管状无横隔的多核体,在培养基或水产动物体上生长的菌丝分为内菌丝和外菌丝。内菌丝分枝纤细繁多,像根一样蔓延附着于鱼体损伤处,可深入至受损的皮肤和肌肉,具有吸收营养的功能,伸出基质外的菌丝为外菌丝,粗壮、分枝少,形成肉眼可见的灰白色棉絮状物。新长出的菌落,外菌丝特别茁壮整齐。

2. 繁殖方式及特征

(1)无性繁殖:菌丝生长到一定程度时,梢端膨大成棒状,其内积聚许多核和稠密的原生质,并生出横膜与下部菌丝隔开,自成一节,形成多核的游动孢子囊(zoo sporangium)。游动孢子囊呈棍棒、纺锤、船形等形状。囊中浓稠的多核原生质数小时后分裂成很多的游动孢子(zoo spores),称为初生游动孢子或第一动孢子。成熟的初生游动孢子包有一层薄膜,呈梨形或核桃形,在尖端具2条等长的鞭毛。从游动孢子囊顶端开口处游出后,在水中自由游动数十秒至数分钟,附在适当地点,失去鞭毛,变圆,停止游动,并分泌出一层细胞壁而静止休眠,称为初生休眠孢子,也称初生孢孢子(cyst spore)或第一孢孢子。初生休眠孢子静休1h左右,原生质从孢壁内钻出,又成为游动孢子,即次生游动孢子或称第二动

孢子。次生游动孢子呈肾形，在侧腰部凹陷处有两条鞭毛，经过一段时间比初生游动孢子长的游动后，次生游动孢子最后又静止下来，分泌出一层孢壁，形成次生休眠孢子，又叫次生孢子或第二孢子。经过一段时期的休眠，这种孢子便萌发成新的菌丝体。这样前后两个形态不同的游动孢子阶段的连续存在称为两游现象。当游动孢子囊内的游动孢子完全放出以后，游动孢子囊的壁并不脱落，而在第一次孢子囊内长出新孢子囊，如此反复增生，这种现象称为屈出或“叠穿”(proliferation)。值得注意的是，当水分和营养不足的情况下，次生休眠孢子不萌发为菌丝，而改变为第三游动孢子，甚至第四游动孢子。另外，如游动孢子囊内的出口受阻塞，动孢子无法游出时，它们也能在囊中直接萌发。

水霉属的菌丝在经过一个时期的游动孢子形成以后，外界环境条件不良的情况下，产生厚垣孢子(chlamydospore)。它是由菌丝梢端积聚稠密的原生质，并生出横隔与下部分隔而形成的。这种厚垣孢子也可在菌丝末端或中部形成，形成一串念珠状或一节节的厚垣孢子。厚垣孢子呈球形或纺锤形等，可抵抗不良环境，寿命较长，一旦环境条件好转，这些厚垣孢子又直接发育成游动孢子囊。

(2)有性繁殖：在鱼体和鱼卵上，水霉通常进行无性繁殖。在无性繁殖衰退以后，或在营养条件差的情况下，则采取有性繁殖，产生藏卵器(oogonium)和雄器(antheridium)。藏卵器内形成有性孢子——卵孢子(oospore)，经雄器受精后可形成游动孢子囊或直接萌发成新菌丝。藏卵器生在主丝或侧枝上，但也有在动孢子囊的基部或在侧枝上的一段，或在老菌丝的某一小段中形成。形成过程首先见到菌丝顶端不断膨大，当膨大到一定程度时产生横隔形成藏卵器，藏卵器呈圆形、腰鼓形或梨形，间生的有时呈纺锤形，壁平滑或有乳突，时常有小凹坑。进入藏卵器内的原生质逐渐变稠，分成一定数量的原生质团，最后每个原生质团的外围包裹一层透明的胞膜而形成卵球。藏卵器内含一个到多个卵球。与藏卵器发生的同时，雄器也由同枝或异枝的菌丝短侧枝上长出，甚至异株的菌丝短侧枝上长出，最后也生出横隔与母菌丝隔开，卷曲缠绕在藏卵器上。雄器中核的分裂与藏卵器中核的分裂约在同时发生。雄核通过芽管穿过藏卵器上的凹孔纹而进入卵球核处，与卵球结合，经过质配、核配和减数分裂3个阶段，形成卵孢子，并分泌双层卵壁包围。卵孢子经过3~4个月的休眠期后，萌发成具有短柄的游动孢子囊或菌丝。水霉藏卵器和雄器的形状、大小、同枝、异枝等特点，在每一个独立种内都较稳定，可作为种分类的重要依据。

3. 水霉属常见致病种的特征

(1)同丝水霉(*Saprolegnia monoica*)：外菌丝挺直，不甚粗大。初生的动孢子囊多为长棍棒状，次生的则有些不规则。第二次再生的动孢子囊多数从老囊中芽生而出，但也有从下侧芽生的。厚垣孢子单独或成串存在，数量很多。藏卵器与雄器同丝，具有直的或弯曲的柄，球形，卵壁光滑，凹坑较大且比较明显。卵孢子1~30个，多数为5~12个，直径18~22μm，中央型。

(2)寄生水霉(*Saprolegnia parasitica*)：外菌丝中等粗壮，基部很少分枝，直径15~36μm。游动孢子囊比菌丝粗大，游动孢子囊大多从老囊基部芽生出来，少数从空的老囊中逸出。动孢子从囊中逸出，游动活泼，显示标准水霉属的两游现象。初生休眠孢子的大小为9~11μm。藏卵器顶生或中间位，呈棒状或梨形，壁薄，无凹坑。卵孢子直径18~24μm，内部结构为亚中心位。雄器呈管状或棒状，与藏卵器同丝或异丝。在老的培养基中，厚垣孢子大量存在，顶生、间生或侧生，单一或成串，形状为球状、梨形和棍棒形。

(3)单性水霉(*Saprolegnia diclina*)：藏卵器和雄器在不同的菌丝上形成。藏卵器数量很

多，呈球状或梨形，其壁间或有凹坑。卵孢子直径 23~26 μm ，内部结构为中心位。单性水霉有 3 个型：1 型寄生于鲑科和河鲈以外的鱼，在 7℃ 时形成藏卵器，20℃ 则不能形成。藏卵器呈细长形，13% 以上的长宽之比 ≥ 2.0 ；2 型寄生于河鲈，藏卵器形成条件与 1 型相同，多呈球形，长宽之比 ≥ 2.0 的占 12% 以上；3 型从水中分离，具有腐生性质，在 7℃ 或是 20℃，均可形成藏卵器，其长宽之比 ≥ 2.0 的不超过 10%。

(4)多子水霉(*Saprolegnia ferax*)：外菌丝中等粗壮，基部有稀疏的分枝。游动孢子囊很多，稍粗于菌丝，呈波浪形的扭曲，直径不等，渐向梢端变细，很少有棍棒形或圆筒形的。游动孢子囊除从老囊中生出外，有的基部芽生。厚垣孢子呈球形或洋梨形，数量不多。藏卵器和雄器位于同一菌丝上，藏卵器壁较薄，有许多明显的凹坑。卵孢子直径 22~26 μm ，内部结构为中心位。不是所有的藏卵器上都具有雄器，缠绕雄器的只有 10%~15%。在鱼体上多子水霉常与同丝水霉生长在一起。

(二)生长特性

水霉生长需要较多的氧气，水中溶氧充足时，菌丝细长，生长茂盛，形成动孢子囊的时间要长些。水中杂质较多，或同时有数个菌落尤其是靠在一起的情况下，其菌丝短细，不易形成动孢子囊。在少水情况下，菌丝能形成动孢子囊，放出动孢子。接触空气的菌丝则多半形成厚垣孢子。此时加水覆盖菌落，可促使菌丝继续生长。水的深浅对水霉的生长繁殖也产生影响，如果使死鱼上的水霉置水下 10~15cm 深处，菌丝则细长，形成的动孢子囊细小，使死鱼上的水霉靠近水面，其菌丝变得粗壮，形成的动孢子囊大得多，且易发生有性生殖，温度对水霉生长也有明显影响，10~32℃ 都能生长，但 15~20℃ 时生长最好，4~7℃ 时生长缓慢，4℃ 以下停止生长，-2~0℃ 处理 3d 菌丝萎缩，动孢子囊和厚垣孢子冻裂瓦解。在水温超过 18℃ 时，鳗鱼的水霉病中止流行。水霉的最适生长 pH 为 7.2~7.4，pH6.4 或 8.0 时可以生长，但较缓慢，pH 为 4.8~5.6 时生长受到完全抑制。强酸强碱可以有效杀死水霉。盐分增高可抑制水霉生长繁殖，自然条件下主要存在于淡水，某些也常见于湿润的土壤中和半咸的河口水域，盐度高于 2.8% 的水域无水霉分布。4 / 10 000 食盐和 20~30mg / L 重铬酸钾可抑制菌丝生长和孢子萌发。用沸水处理过的大麻子仁、大麦粒、小麦粒、糯谷、鸡蛋黄、鱼卵、蛙卵、苍蝇、蟑螂、各种水生昆虫分别置于盛有无菌水的培养皿中均可用作培养水霉等水生真菌的基质，为防止杂菌污染，可在无菌水中加入链霉素，使最终浓度为 20~100 μg / ml。用于纯培养的培养基有玉米粉琼脂(17g 玉米粉与 1000ml 水调匀，60~70℃ 加热 2h，纱布过滤，在滤液中加 15g 琼脂，溶化后补充水分，115℃ 高压灭菌 30 min)和沙保劳培养基等。

(三)病原性

水霉广泛分布于淡水水域中，适温范围广，对水产动物的种类没有选择性，凡是受伤的均可感染，鲑科和鲤科鱼类、黄鳝、河鲈、鳊、河蟹、鳖、蛙等对水霉都具有易感性。当鱼体表皮因理化因素，或细菌、病毒和寄生虫等生物因素感染受损伤时，水霉侵入损伤部位，向内外生长繁殖，入侵上皮及真皮组织，产生内菌丝，引起表皮组织坏死。有时可见到菌丝穿过肠壁入侵腹腔后感染肝脏、脾脏、心脏、鳔等内脏器官，引起病鱼死亡。向外生长的菌丝，形成肉眼可见的白色棉絮状物，俗称“白毛病”。由于寄生于体表的霉菌能分泌大量蛋白质分解酶，机体受刺激后分泌大量黏液，病鱼开始焦躁不安、食欲减退、游动无力，最后死亡。单性水霉可引起鲑科鱼类幼鱼的内脏真菌病，其最初侵入部位是胃的幽门部，随后菌丝在腹腔内大量生长繁殖。其主要原因可能是肠蠕动障碍或肠道堵塞，

饵料滞留胃内，导致孢子发芽或菌丝发育，寄生于胃壁而引起损伤，并向其他脏器扩散。在鱼卵孵化过程中，鱼卵因溶氧低等引起发育停止或死亡时，亦可感染水霉，内菌丝入侵卵膜内，卵膜外长出大量外菌丝，产生“卵丝病”，俗称“太阳籽”。

(四)微生物学检查

1. 肉眼观察和镜检 直接观察鱼体表有无棉毛状的菌丝体，即可做出初步诊断。患内脏真菌病时，应取脏器病料制作压片后镜检。

2. 分离培养 取病灶处组织，接种沙保劳等培养基后培养，镜检分离真菌，根据无性和有性生殖特点，可进一步确定病原体的种类。

(五)防治

1. 预防 主要是注意避免鱼体受伤，改善饲养管理，增强鱼体抗病力。目前尚无防治水霉病的疫苗。但是用细菌疫苗免疫的网箱养殖草鱼，其水霉发生率很低，其机制尚不清楚。

2. 治疗 用食盐和小苏打全池泼洒，使水中最终浓度分别为 400mg / L。也可全池泼洒 3~5mg / L 五倍子溶液，使用时，将五倍子磨碎加 10 倍于药物的水煎汁 30min，加水稀释后泼洒。或用新洁尔灭液全池泼洒，使药物在水体的浓度为 5mg / L。

二、绵霉属

绵霉属(*Achlya*)属水霉目、水霉科，是在水塘中经常出现的附着在鱼类残体上的腐生性真菌，本属中许多真菌也是水产动物肤霉病病原。

(一)形态及繁殖

1. 属的菌丝形态和繁殖特征 绵霉属的外菌丝直而粗壮，二叉状分枝，多核无隔膜，只在形成繁殖器官时才形成隔膜。菌丝很宽，一般宽度为 15~30μm，最宽的达 270μm，是丝状真菌中菌丝最宽的一种。绵霉属产游动孢子囊和游动孢子的情况与水霉属有所不同，主要是初生游动孢子无鞭毛，不能游动，集结在孔口形成花球。游动孢子只有第二游走现象，即在进行无性繁殖时，菌丝先端的原生质和细胞核聚集起来，并形成一横隔膜与菌丝其他部位隔离开，这个隔离开的部分逐渐膨大，形成棒状孢子囊。孢子囊成熟时，顶端开口，自开口处释放没有鞭毛的初生游动孢子，成群地集结在孔口，而不游动，处于静止状态。经过一段时期(15~45min)的休止后，再萌发产生次生游动孢子。次生游动孢子呈肾形，在侧面凹处着生 2 条等长的鞭毛。在水中游动一段时间，再静止后萌发菌丝。与水霉属另有所不同的是，次生的孢子囊都在老孢子囊基部以出芽方式产生，不以屈出方式形成新囊。有性世代形成卵孢子，藏卵器有或无小凹，许多种由单性生殖而来。

2. 常见致病种的形态与繁殖特征

(1)两性绵霉(*Achlya bisexualis*): 外菌丝通常直而粗大，二叉状分枝，雌性菌丝基部直径为 30~70μm。动孢子囊顶生或侧生，纺锤形或线形，直径为 30~50μm，长 220~450μm。新生的游动孢子从囊基部以出芽方式逸出，并在开口处形成空球状的花球。动孢子只有第二游走现象。厚垣孢子数量很多，形状多样，有月牙形、球形或梨形等，顶生或间生，单一或成串存在。藏卵器和雄器位于不同的菌丝上。藏卵器侧生或顶生，数量较多，球形或梨形，直径 50~75μm，卵壁光滑，在藏卵器附着处略现凹坑。藏卵器有柄，柄器粗而直。藏卵器内卵孢子不完全充满，一般 5~12 个，且不是每个卵孢子都能成熟，这是此种绵霉的特点之一。成熟的卵孢子偏中央型，直径 17~20μm。雄性菌丝较雌性菌丝粗壮，分枝较少，基部直径 36~105μm。

(2)美洲绵霉(*Achlya americana*): 外菌丝纤长柔软而弯曲。游动孢子囊呈柱状, 粗于菌丝, 长 25~368 μm , 直径 39~72 μm 。新生的游动孢子囊总在老的游动孢子囊基部侧面芽生而出, 即第一代的基部芽生第二代游动孢子囊, 第二代的基部芽生第三代游动孢子囊。因此, 在一根老的菌丝上通常具 23 个短枝, 多的达到 78 个, 形成总状花序的动孢子囊群。第一代游动孢子囊产生的动孢子数目要比以后各代产生的多很多。藏卵器在动孢子囊的基部菌丝上长出, 藏卵器和雄器同丝。藏卵器数量很多, 具直而细长的柄, 表面光滑, 无明显的凹坑。卵孢子直径 20~22 μm , 偏中央型, 数量 48 个。雄器仅稀疏绕在藏卵器上, 有一芽管通入卵内。

(二)致病性、微生物学检查和防治

绵霉属和水霉属一样能引起鱼类肤霉病, 其最适繁殖温度为 13~18 $^{\circ}\text{C}$, 在此温度下, 鱼类若体表损伤均可感染发病。发育停止的鱼卵也可感染形成“太阳籽”。其微生物学检查和防治与水霉属相同。我国早已用蛋黄粒从斗鱼、草鱼、鲤、鲫的卵上分离到前述致病性绵霉。

三、鳃霉属

鳃霉属(*Branchiomyces*)是鲤科鱼类和其它淡水鱼类鳃霉病的病原。Grimaldi 等人(1973)根据琼脂扩散试验结果, 将其归属为水霉目。最近 Liu K. C. et al 对鳃霉无性繁殖的超微结构观察, 发现其动孢子囊内的动孢子具有两根鞭毛及动孢子囊形成情况, 进一步将其列入水霉科。

(一)形态及繁殖特征

1. 属的形态及繁殖特征 菌丝纤细、无横隔、有分支、弯曲, 菌丝直径 6~25 μm , 因部位不同而变化较大。动孢子囊与菌丝的粗细相当, 菌丝内局部或全部均可形成孢子, 孢子数量很多, 成熟的动孢子呈球形, 具两根等长的鞭毛, 单行或多行在囊内排列。其是否具两游现象, 有性生殖情况如何, 尚无详细报道。

2. 常见致病鳃霉的特征 从我国鲤科鱼类和其它淡水鱼类感染的鳃霉的菌丝形态结构和寄生情况来看, 致病种类主要有血鳃霉和穿移鳃霉两种不同的类型。

(1)血鳃霉(*B. sanguinis*): 寄生在鱼鳃上的菌丝直而粗壮, 分枝少, 通常单枝蔓延生长。只寄生在鳃的血管内, 不向鳃外生长。幼期菌丝粗短, 分枝较多, 直径多数为 13.8~20.7 μm , 有的达 20~25 μm , 动孢子囊由菌丝局部形成, 稍粗于菌丝直径, 其大小、长短变动较大。动孢子较大, 成熟的动孢子一般为圆形, 着两根等长的鞭毛。孢子直径为 7.4~9.6 μm , 平均 8 μm , 细长的菌丝只形成单行的动孢子, 粗的菌丝有 2~3 行或更多行的动孢子。我国已从草鱼、青鱼和鳊鲃鳃上分离此种鳃霉。

(2)穿移鳃霉(*B. demigrans*): 菌丝纤细繁复, 分枝特别多, 常弯曲成网状分枝沿鳃血管伸展或从鳃组织向外生长, 纵横交错, 布满鳃丝和鳃小片。菌丝直径多为 6.6~21.6 μm , 菌丝壁厚 0.5~0.7 μm 。动孢子囊形成后, 几乎占据整个菌丝, 属全菌丝产孢子方式, 即在无性生殖期间生殖菌丝和营养菌丝没有区别。动孢子较小, 直径为 4.8~8.4 μm 。我国从青鱼、鳊、鲮和黄颡鱼鳃上观察到此种鳃霉。

(二)病原性

鳃霉属为寄生菌。草、青、鳊、鲮、黄颡鱼、银鲴等对鳃霉具有易感性, 出现以鳃组织梗塞性坏死为特征的烂鳃病。其中鲮鱼苗最为易感, 发病率高, 死亡率达 70%~90%。我国南方各省均有流行。国外报道, 血鳃霉主要感染鲤科鱼类和鳊鲃等淡水鱼。穿移鳃霉

主要感染白斑狗鱼等。鳃霉通过菌丝产生大量孢子，孢子与鳃直接接触而附着于鳃上，生长为菌丝。菌丝向内不断延伸，钻入鳃血管内生长发育，引起血管堵塞，血流受阻，甚至导致出血和组织坏死；与此同时，菌丝可侵入血管外的鳃瓣上皮组织，引起上皮组织增生，鳃瓣肿大、粘连等。穿移鳃霉的菌丝可在血管内大量繁殖，穿破血管，并向鳃外组织伸展，从而破坏鳃瓣上皮组织。但血鳃霉只在血管内生长，不引起血管和上皮组织的破坏。患鳃霉病鱼鳃呈苍白色，严重时鳃丝溃烂缺损，导致呼吸困难、游动缓慢、失去食欲。该病主要发生于热天，流行高峰季节为5~10月份，往往呈急性病，1~2d内突然暴发，出现大量死亡，尤其在水质不良、池底老化、水中有机质突然增多的养殖池容易发生。

(三) 微生物学检查

取病鱼鳃组织压片，显微镜观察发现鳃丝内具粗大的分枝菌丝，且菌丝内有较多孢子即可诊断。

(四) 防治

本病重在预防，尤其是防止从国外传入，我国将其列为出入境动物检疫的二类传染病。放鱼前清除池中过多淤泥，并用生石灰或漂白粉消毒。在疾病流行季节，定期灌注新水，保持水质清新、溶氧充足、养殖水温20℃以上。发病时应迅速清除死鱼，注入新水可减轻或控制病情。

四、丝囊霉属

丝囊霉属(*Aphanomyces*)属水霉科。广泛存在于水体，腐生生活。其中有些种类能引起水产动物疾病。

(一) 形态与繁殖

1. 属的形态与繁殖特征 丝囊霉属菌丝纤细，分枝较稀疏。动孢子囊由不特化的菌丝形成，通常为长线形，动孢子在囊内呈有规则的单行排列，短杆状。动孢子自囊内逸出不游散开，呈葡萄状堆集在动孢子出口处。动孢子只有第二游走现象。藏卵器在菌丝的基部生出，顶生或侧生，其内只有一个卵孢子。雄器由附近的菌丝产生，很纤细，当与藏卵器接触后缠绕较甚。

2. 常见致病种的特征

(1) 杀鱼丝囊霉(*Aphanomyces pisciicidia*): 动孢子囊的基部都无隔膜，其形态单一，直径相同，纤细，通常长20~40μm。游动孢子为球形，直径一般为8~9μm，在动孢子囊内排成一列，逸出时，在动孢子囊顶口形成长形的休眠孢子，以后变圆。没有发现有性生殖器。在患部组织的菌丝，其直径为11~26μm，无横隔，形态不太整齐，多为波浪形的分枝菌丝。菌丝内很多部分无原生质，呈空洞状。有时在病灶内形成许多小于1mm的菌丝块。

(2) 平滑丝囊霉(*Aphanomyces laevis*): 外菌丝纤细，直径为5~7.5μm，有稀疏分枝。动孢子囊由不经特化的外菌丝形成，一般细长，次生的孢子囊不在老囊中再生，而是在老囊基部芽生出来。动孢子呈单行有规则的排列，短杆状，似节节排列的火车车厢，节数8~46节，每节9.5~26μm，一般为16μm。成熟的动孢子由囊的顶端一个接一个地逸出，不散开，在囊口变圆形成第一孢子，集结在一起成葡萄串状，孢子直径为9~10μm。藏卵器长在侧枝上，亚球形，器壁光滑，无凹孔纹和突起。只有一个卵孢子，直径18~24μm，偏中央型。发达的雄器缠绕在藏卵器上。由同丝或异枝产生。

(二) 生长特性

杀鱼丝囊霉在普通真菌培养基(如沙保劳琼脂、察氏琼脂、Mycosec琼脂和添加了5%

马血清的培养基)上不生长,需用鱼肉浸液琼脂(EME 琼脂)培养基或GY培养基(1%葡萄糖、0.25%酵母浸膏、1.5%琼脂)培养。生长适宜温度 15~30℃, pH5~9。

平滑丝囊霉自然状况下为腐生性的,也可寄生在硅藻和鼓藻的细胞内。人工培养可用死鱼卵。

(三)致病性

杀鱼丝囊霉主要侵害鱼的躯干肌肉。铜吻鳞鳃太阳鱼、鲫鱼、金鱼等均有易感性,但鳊鲢、泥鳅、鲇鱼和鲤鱼不易感。最初,病鱼体表皮肤上一处或多处有出血点,并发生脓肿。不久,隆起的皮肤有出血斑,随后皮肤崩溃,露出下部肌肉形成红色的肉芽肿。其症状与弧菌病的症状相似,但本病患鱼病灶内有菌丝体,做病灶组织压片观察即可区别。其肉芽肿是类上皮细胞的菌丝体侵入肌肉而形成的。

平滑丝囊霉可引起鱼的肤霉病。我国在草鱼、鲢、鳙鱼和金鱼的死卵上和患有水霉病的病鱼的体表均已找到该种霉菌。此外,还发现了涡旋丝囊霉(*Aphanomyces helicoides*)、星芒丝囊霉(*Aphanomyces stellatus*)、粗壁丝囊(*Aphanomyces scaber*)和新种厚壁丝囊霉(*Aphanomyces crassus* sp. nov.)等种类,它们的基本特性与平滑丝囊霉相似。Baranetal 等报道了一种 *Aphanomyces astaci* 在欧洲和土耳其对龙虾的危害较大,可引起斑点(plague)病,几天内造成大批死亡。

(四)微生物学检查

1. 镜检 用患部组织做压片,用显微镜观察霉菌特征。

2. 分离培养 取患部组织接种于添加了大麻籽的GY液体培养基中,25℃培养7d,可见到有缠绕大麻籽的菌丝形成,将其移植到灭菌的自来水中,继续培养2~3d,则有孢子形成,用显微镜检查其菌丝与繁殖特性,即可判定丝囊霉种类。我国有人用小草鱼尾柄作为培养基,观察到平滑丝囊霉菌丝,但未发现有性器官。

3. 致病性检查 用培养的杀鱼丝囊霉菌丝植入易感鱼躯干部肌肉内,可引起与自然发病相同的肉芽肿,但经口感染不形成此病变。

(五)防治

尚无有效的预防和治疗方法。

五、镰刀菌属

镰刀菌属(*Fusarium*)属半知菌亚门(Deuteromycotina)丝孢纲(Hyphomycetes)瘤座孢目(*Tuber culariales*)瘤座孢科(*Tuber culariaceae*)。在自然界广泛分布,种类很多,有些种类是人和动物的病原菌;有些种类可侵染多种作物,引起病害;有些种类存在于粮食和饲料中,使其霉坏变质,产生多种对人和动物健康威胁极大的镰刀菌毒素,引发中毒;一些种类寄生于对虾和鱼类,是对虾、鱼类镰刀菌病的病原。

(一)形态及繁殖特征

菌丝体比较直而少弯曲,具树杈状分枝,半透明,不具横隔,直径2.2~4.5μm。繁殖方法主要以形成分生孢子的方式进行,分为小分生孢子和大分生孢子。小分生孢子呈卵圆形或椭圆形,无横隔或有时有1个横隔,长4~13μm。大分生孢子近镰刀形或新月形,有1~7个横隔,多数为3个横隔,长17~45μm。外界环境不良时,分生孢子还以厚垣孢子的形式出现。厚垣孢子通常位于菌丝的末端,少数在中间,呈圆形或椭圆形,有时四五个连在一起,成串珠状。单个的直径7~12μm。镰刀菌的孢子形态见图2-1。有些镰刀菌具有有性繁殖器官,即产生闭囊壳,其内含有子囊及8个子囊孢子。

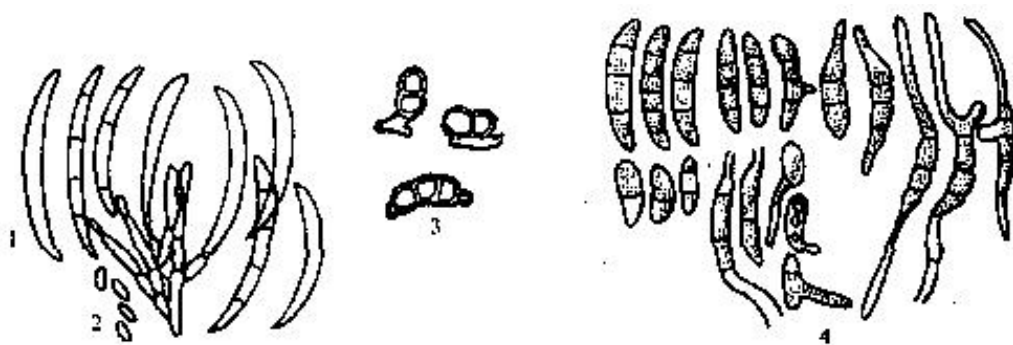


图 2-1 腐皮镰刀菌

1. 大分生孢子 2. 小分生孢子 3. 厚垣孢子 4. 发芽

我国从对虾已分离到镰刀菌的 4 种致病种类，即寄生于各种对虾、美洲龙虾及淡水罗氏沼虾的腐皮镰刀菌(*F. solani*)、三线镰刀菌(*F. tricinctum*)、禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)和尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)。它们的形态特征比较见表 2-1。

表 2-1 虾类 4 种寄生性镰刀菌的形态特征比较

形态特征	腐皮镰刀菌	三线镰刀菌	禾谷镰刀菌	尖孢镰刀菌
大分生孢子隔数	2~5，多数为 3	3~5，多数为 3	3~7，多数为 5	2~3，多数为 3
小分生孢子	椭圆形、卵形	梨形、棒形	无	卵形、纺锤形
颜色	黄褐色	淡橘红色	褐色	紫色
产小孢子梗	单出瓶状小梗	单出瓶状小梗		单出瓶状小梗

黄文芳等(1995 年)报道，在大口黑鲈皮肤溃烂病灶上分离一株镰刀菌，经初步鉴定是一株镰状镰刀菌(*F. fusarioides*)：菌丝为分枝分隔多细胞菌丝，直径为 2.3~5.2 μ m，具大型分生孢子，弯曲呈纺锤形或镰刀形。在气生菌丝的侧生单瓶状小梗上长出大分生孢子，少数长出两个大分生孢子，小型分生孢子呈椭圆形或棍棒形，厚垣孢子出现在菌丝中间或顶端，单生或串生，圆形或椭圆形，表面光滑。在 PSA 培养基上菌丝呈棉絮状，颜色从白色变为淡褐色，培养基的颜色从培养基本色变为黑褐色，在 PDA 培养基上，菌丝颜色从白色变为黄色，培养基的颜色变为黄褐色。在 1%~6%NaCl 浓度和 pH 在 6.4~9.86 的范围中生长发育最好。

(二) 培养特性

镰刀菌的生长适温为 25℃，pH 在 4~11 范围均能生长，最适 pH 为 5~10。最适 NaCl 浓度为 0~5%，增加浓度有抑制作用，NaCl 浓度达 11%时完全不能发育。在 Nycosrl 琼脂(MA)平板上的菌落最初呈浅褐色，以后中央变为深褐色，边缘浅褐色，由于色素扩散，菌落周围及下部的培养基呈深褐色。菌落为圆形，平坦，中部稍隆起，出现白色棉絮状的气生菌丝，在老培养物中，气生菌丝常形成围绕中心的圆环，表面有白色细粉末，这是由于成熟的分生孢子从气生菌丝中产生的缘故。分生孢子对不良环境的抵抗力强，在无菌海水中，-5℃可存活 150d，25℃存活 300d，35℃存活 180d，在室外自然干燥条件下存活 140d。

(三) 病原性

日本对虾、中国对虾、桃仁对虾、罗氏沼虾和龙虾对镰刀菌均具有易感性。镰刀菌主

要寄生在鳃组织内，也寄生在附肢基部、体壁和眼球上。发病初期鳃、附肢、体表等部位出现浅黄色或橘红色斑块。随着病情发展，色斑变为浅褐色，鳃产生黑色素沉积，使鳃的外观呈点状或丝状黑色素条纹，严重时鳃呈黑色并发生溃烂，故称“黑鳃病”。病虾呼吸机能受阻，体色转暗，活力差，游动缓慢、反应迟钝、摄食减少，最后静卧池底而死亡。致死率高达 90% 以上。

(四) 微生物学检查

1. 镜检 取病虾的鳃等病变组织制成水浸片，置于显微镜下观察，看到有大量的镰刀菌的菌丝和分生孢子。有时可见到分生孢子逸在鳃丝的顶端，呈花簇状排列。

2. 分离培养 取病灶材料接种萨氏葡萄糖琼脂或加有双抗(青、链霉素)的其它普通真菌培养基，于适温下培养 3~4d，可见到大或小的分生孢子，同时菌落基部出现可扩散的色素，根据大、小分生孢子的形态、分隔及产生的颜色等对镰刀菌的种类可做出鉴定。

(五) 防治

目前尚无理想治疗方法。主要是在早期进行预防，如池塘放养前用生石灰清塘。起捕、运输及日常管理时应细心操作，尽量避免虾体受到损伤。发病时，可试用三氯异氰尿酸全池泼洒，其最终浓度为 0.3mg/L。

六、霍氏鱼醉菌

霍氏鱼醉菌(*Ichthyophonus hoferi*)属于虫霉目、虫霉科。该菌可引起虹鳟等鱼类的鱼醉菌病(Ichthyophonosis of fishes)。

(一) 形态及繁殖特征

霍氏鱼醉菌的基本形态可分为两种：①厚壁多核球形体(球形合胞体)，直径数微米至 200 μ m，有无结构或层状的膜包围，存在于感染鱼的组织中，内部有数十至数百个小的圆形核和颗粒状原生质，最外面由寄主的结缔组织膜包围，形成白色胞囊。②多核菌丝球形体，胞囊破裂后，厚壁多核球形体发芽伸出短而粗，有时具分枝的菌丝状体，细胞质向菌丝顶端移动，形成大量球形的内生孢子。

霍氏鱼醉菌的生活史在鱼体内和培养基上有所不同。在硬头鳟体内其生活史分为生长期、发芽前期、发芽和丝状体期、繁殖期 4 个阶段。丝状体的孢子壁较薄，多为两个细胞核。在生长期，丝状体孢子内部的核直接进行分裂，核的数目增加，细胞壁增厚，细胞体积变大，发育成具有 10~100 个核的多核球形体。这时，在幼龄病鱼上的多核球形体的直径为 20~125 μ m，在当年病鱼上的为 40~140 μ m，是发育到一定大小的多核球形体进行发芽准备的时期。此期有核增加和细胞质增多等的变化。随后，细胞形态也发生变化；原生质分离，形成伪足等。原生质膜原有的细胞壁，在原生质膜表面分泌形成一薄层新的细胞壁，细胞壁显著增厚。在发芽和丝状体阶段，细胞体突破原有的细胞壁，被新形成的薄的细胞壁所包裹而发芽。发芽的细胞体向外不断伸展，形成分枝状、无隔的菌丝样丝状体。随着丝状体的伸展，细胞体移动到丝状体内，球形体变成中空状态。进入繁殖期阶段，位于丝状体内的细胞体开始分裂，形成具有 2~10 个核、并被薄层细胞壁所包裹的丝状体孢子(也叫内生孢子)。这些丝状体孢子待丝状体尖端破裂，或丝状体全部崩解时，释放到组织内，在 pH 为 9 的 MEM-10 中，厚壁多核球形体发芽，形成直径为 20 μ m 的菌丝体，菌丝体分为 2 个分枝(少数情况形成 4 个分枝)，并逐渐延伸、扩展。当菌丝体的长度达 200~300 μ m 时，细胞质向菌丝顶端移动，不断形成并释放出直径为 2~5 μ m 的单核和多核球形体。每根菌丝可释放出 300 个左右。释放出来的球形体体积逐渐增大，核分裂成多核，变

成厚壁多核球形体。但在 pH 为 7 的 MEM-10 培养基中, 菌丝体形成的单核和多核球形体不释放, 而集中在菌丝体内。在 pH 为 3~5 的 MEM-10 培养基和 pH 为 7 的 TGC-1 培养基中形成的菌丝体较细, 直径为 10~20 μm 。菌丝体可不断分枝生长, 直到环境条件不适宜时停止生长, 在每根分枝上的顶端形成多核菌丝球形体, 并与菌丝体分离。在 pH 为 3~5 的 MEM-10 培养基中形成的多核菌丝球形体, 重新移植到 pH 为 7 和 9 的 MEM-10 培养基中繁殖时, 不形成菌丝体, 而变成能运动的阿米巴样体或疟原虫样体。这两种形式均不能继续繁殖而死亡。

(二)致病性

虹鳟、红点鲑、鲱鱼、鳕鱼、鲭、鲈、各种热带鱼及野生海水鱼等对霍氏鱼醉菌都具有易感性。感染途径, 一种是通过摄食病鱼或病鱼内脏而引起, 另一种为游离的厚壁多核球形体直接或间接地被鱼摄食后而引起感染。霍氏鱼醉菌对组织器官无特殊的选择性, 可寄生在肝、肾、脾、心脏、神经系统、胃、肠、生殖腺、肌肉和骨骼等处。而且, 因寄生部位的不同, 引起的症状也有所不同。其寄生处均形成大小不同、数量很多的灰白色结节。例如, 当鱼类神经系统受侵袭时, 病鱼失去平衡, 游动摇晃, 运动不正常, 因此得名“醉酒病”; 侵袭肝脏, 可引起肝肿大, 肝脏颜色变淡, 并引起周围组织的急剧变化; 侵袭生殖腺, 则会失去生殖能力。

(三)微生物学检查

1. 镜检 取病变各脏器尤其是肾脏, 制作压片, 镜检有无厚壁多核球形体。

2. 培养检查 取小块病变组织, 接种至含 1%~10% 的虹鳟和鲤鱼血清的 TGC 培养基或 MEM 培养基上, 若发现厚壁多核球形体发芽成菌丝, 则可确诊。也可培养于含 1% 牛血清的沙保劳琼脂斜面上, 在 10℃ 的最适温度下培养 7~10d, 可见到有大量菌落, 经镜检发现霍氏鱼醉菌时, 则可确诊。

(四)防治

本病尚无有效治疗方法。主要是进行一般性预防, 如对发病池进行干池、曝晒及消毒处理。及时清除病鱼和死鱼, 加强饲料管理, 不用病鱼和死鱼作为饲料, 防止病从口入。

七、链壶菌属

链壶菌属(*Lagenidium*)是虾、蟹、贝类链壶菌病(*Lagenidialesosis*)的主要病原。此外, 离壶菌属(*Siropidium*)和海壶菌属(*Haliphthoros*)也可引起本病。它们均属链壶菌目。

(一)形态及繁殖特征

链壶菌菌丝分枝, 一般不分隔, 弯曲, 直径 7.5~40 μm 。菌丝成熟后, 从菌丝上长出细长的排放管, 直线形, 穿过虾、蟹外壳, 伸到寄主体外, 菌丝原生质流向末端而膨大, 形成球形或椭圆形顶囊, 在顶囊内形成许多具有 2 根鞭毛的游动孢子。成熟的游动孢子从顶囊逸出后, 在水中游动一段时间, 脱去鞭毛, 形成休眠孢子。休眠孢子呈圆形, 直径约 10 μm , 当遇到寄主后, 就发芽长出新的菌丝。动孢子放出后, 顶囊消失。离壶菌和海壶菌与链壶菌十分相似, 其主要区别在于其游动孢子在菌丝体内形成, 然后通过排放管端开孔直接排放于水中, 不形成顶囊。其次, 海壶菌的动孢子发育成菌丝的过程中具有多次游动、多次休眠及单型性(多次动孢子的形状均相同)的特点。离壶菌的老菌丝的顶端会形成膨大的卵圆形构造, 但不是顶囊。

(二)生长特性

链壶菌在 5~35℃, 含盐 0~6%, pH6~10 时均可生长, 适宜生长温度为 25~35℃,

含盐为 0~2%，pH 为 6~10。离壶菌也与此相似。海壶菌在 2~35℃，含盐 0~10%，pH 为 4~10 时均可生长，适宜生长温度为 15~30℃，含盐为 0~3%，pH 为 6~10。

(三) 病原性

链壶菌等霉菌引起的链壶菌病在国内外均很常见，主要危害对虾、龙虾、蟹和贝类等的卵和幼体，尤以蚤状期和糠虾期最为严重。一旦感染发病，如不及时治疗，13d 内可使全池幼体死亡。受感染的幼体游动不活泼，不摄食，趋光性差，身体逐渐变成灰白色，不透明，体质衰弱，不久便会死亡，死亡后的幼体体表也长出绒毛状的菌丝。被感染的卵，体积变小，不透明，在橘黄色的蟹卵团块上生病的卵呈褐色，在黑色或褐色的蟹卵团块上生病的卵呈浅灰色，受感染的卵粒不能孵化。幼虾和成虾可以带菌而不出现任何症状，从而构成传染源，造成本病发生与发展。

(四) 微生物学检查

1. 镜检 用显微镜检查被感染的卵或幼体，在疾病早期就可观察到有大量分枝弯曲的菌丝寄生，严重时菌丝可穿出体表呈绒毛状。病死后期菌丝充满组织，体表有成熟菌丝向体外伸出的排放管、顶囊等，即可做出初步诊断。再根据菌丝形态、游动孢子形成方式、排放管的形态和顶囊等区别病原种类。

2. 分离培养 用 PYG 琼脂(蛋白胨葡萄糖酵母膏琼脂)或其他类似的霉菌培养基从病体分离培养致病真菌。

(五) 防治

(1)用漂白粉对沉淀池、鱼苗池进行彻底消毒。

(2)由于链壶菌等致病霉菌在死卵或幼体上生长特别快，在有机质多的水中感染率高，因此应及时清除已死的幼体和卵。注意调节水质，加强饲养管理，经常检查产卵亲体，一旦发现本病，立即全池泼洒制霉菌素，使池水浓度为 60mg / L，或遍洒亚甲基蓝，浓度为 10~20mg / L。

思考题

- 1.简述水霉属常见致病种的特征。
- 2.简述绵霉属的繁殖特征及常见致病种的特征。
- 3.试述鳃霉属的病原性及常见致病鳃霉的特征。
- 4.试述镰刀菌属的病原性及繁殖特征。
- 5.简述霍氏鱼醉菌在鱼体内的生活史。
- 6.简述霍氏鱼醉菌的致病性和微生物学检查。
- 7.引起水生动物肤霉病、鳃病、肉芽肿的真菌有哪些?从形态、繁殖、致病性上简述其鉴别内容与方法。
- 8.如何诊断和防治水生动物的真菌病?

第三章 病原病毒

一、疱疹病毒科

疱疹病毒科(*Herpesviridae*)病毒颗粒呈球形,有多层衣壳,呈20面体对称,衣壳外有囊膜。病毒核酸为双链DNA,其中G+C含量为33~74mol%。

疱疹病毒感染后,其核酸可整合到宿主细胞基因中去而潜伏下来,当受到外界因素刺激时被激活,重新开始增殖,引起明显的临床症状。有些病毒能使宿主细胞发生癌变。

本科病毒分为甲、乙、丙3个亚科。从水生动物分离的疱疹病毒尚未划分到亚科,与鱼病有关的主要有以下几种。

(一) 鲑疱疹病毒

鲑疱疹病毒(*Herpesvirus salmonis*, HS)是鲑科鱼疱疹病毒传染病的病原,于1951年在美国产卵后发病的虹鳟亲鱼中发现并分离。1975年Wolf等命名为鲑疱疹病毒。

1. 形态结构 具囊膜,大小150nm,衣壳直径为90nm,由162个质粒组成。病毒核酸为双链DNA,在CsCl中的浮密度是 1.709g/cm^3 ,G+C含量50mol%。无血凝性,不凝集人的O型红细胞。

2. 培养特性 本病毒可在RTG-2、RTT、RTH、RTE、STE、CHSE-214、SE、YNE、CHE-1、HIME、ASE、As-6、KO-6细胞中增殖,但不能在FHM、BB、BF-2、EK-1、EO-2细胞中繁殖。被感染细胞融合,形成多核巨细胞。本病毒在宿主细胞核内形成包涵体。最适增殖温度为 10°C 。

3. 抵抗力 对乙醚敏感,在pH3以下失活。与温血动物的疱疹病毒不同,其对热极为敏感,在 20°C 以上,迅速失活。

4. 抗原性 与麻苏大马哈鱼病毒在血清学上无交叉中和反应。

5. 病原性 虹鳟和红大马哈鱼对本病毒易感,大西洋鲑、河鳟、溪鳟等无感受性。人工浸渍感染尚未成功。腹腔注射虹鳟幼鱼,于 10°C 2~4周后开始发病。其症状表现为厌食、昏睡、体表发黑、眼睛突出。病理剖检可见肝脏、脾脏坏死,肾脏造血组织增生。死亡率达50%~70%。自然发病者见于产卵后的虹鳟亲鱼,其死亡率为30%~50%。

6. 微生物学检查

(1)病毒分离:可采用RTG-2等鲑鳟鱼类细胞培养,其可形成细胞融合等特征性的细胞病变。但在对其他病毒易感的FHM细胞上不增殖。

(2)血清学检查:用特异性抗血清与分离病毒进行中和试验。

7. 防治 消毒鱼卵,把水温提高到 15°C ,可以防止本病爆发。尚无疫苗生产。

(二) 红大马哈鱼疱疹病毒

本病是Sano(1976)从红大马哈鱼幼鱼中分离到的一种疱疹病毒,命名为Nerka virus in Towada Lake, Akita and Aomori,简称NeVTA。

1. 形态结构 囊膜直径为200~250nm,衣壳直径115nm。核酸为双链DNA。

2. 培养特性 本病毒可在CHSE、RTG-2、STE、BTG、BB细胞中增殖,感染可达到 $10^{4.5}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 。细胞病变特点与鲑疱疹病毒相似。在细胞核和细胞质内均可形成包涵体。最适增殖温度为 10°C 。无血凝素。

3. 抵抗力 对乙醚敏感,在pH3以下失活。与温血动物的疱疹病毒不同,其对热极为敏感,在 20°C 以上,迅速失活。

4. 抗原性 本病毒可被抗麻苏大马哈鱼病毒血清中和。

5. 病原性 虹鳟和红大马哈鱼对本病毒易感，其中幼鱼的易感性较强。腹腔注射接种虹鳟幼鱼，于 10℃1 周后，试验鱼发病，死亡率达 57%。病变特点为肝脏水肿和坏死，肾淋巴细胞巨细胞化，并有包涵体形成。

6. 微生物学检查和防治 参照鲑疱疹病毒。

(三)麻苏大马哈鱼病毒

麻苏大马哈鱼病毒(Oncorhynchus masou virus, OMV)由木村等人(1978)从日本北海道的麻苏大马哈鱼亲鱼中分离。

1. 形态结构 本病毒囊膜直径为 200~240nm,衣壳直径为 115nm。核酸为双链 DNA。

2. 培养特性 本病毒可在 RTG-2、RTT、RTH、RTE、STE、CHSE-214、SE、YNE、CHE-1、HIME、ASE、As-6、KO-6 细胞中增殖，但不能在 FHM、BB、EPC、SBK、EK-1、EO-2 细胞中繁殖。细胞病变与鲑疱疹病毒相同，适宜增殖温度为 10~15℃。

3. 抵抗力 在宿主细胞外的麻苏大马哈鱼病毒，于-20℃保存 17d, 99.9%失去活性，在 15℃以上，则完全失活。而在-80℃十分稳定可保存 1 年。Phosphono acetate 和 Aey-cloguanosin 等抗疱疹病毒制剂可抑制其增殖。

4. 抗原性 本病毒与红大马哈鱼疱疹病毒有交叉中和反应。

5. 病原性 本病毒与鱼病的关系尚不清楚，但人工接种可感染虹鳟、红大马哈鱼、麻苏大马哈鱼、鲑、细鳞大马哈鱼、银大马哈鱼等鲑科鱼类。

浸渍感染鲑幼鱼，在 10℃2~3 周后，试验鱼开始发病，3~5 月龄幼鱼的死亡率可达 80%以上。病变表现为肝脏重度坏死，肝细胞巨细胞化，脾脏坏死，心肌水肿。试验耐过鱼在 4 个月 after，以头部为主出现肿瘤病变。到第 8 个月，60%以上试验耐过鱼可见到肿瘤。

6. 微生物学检查和防治 同鲑疱疹病毒。

(四)斑点叉尾鮰病毒

斑点叉尾鮰病毒(Channel catfish virus, CCV)属于疱疹病毒科，可引起斑点叉尾鮰幼鱼群暴发死亡率很高的急性致死性传染病。1968 年，Fijan 首次分离出病原。目前本病还只流行于北美洲。

1. 形态与结构 病毒衣壳呈 20 面体对称，直径 95~105nm,壳粒数 162。在细胞外或细胞质空泡、核膜上的病毒粒子有囊膜包裹，大小为 170~200nm。核酸为 DNA，沉降系数为 53S,相对分子质量为 85×10^6 ,其中 G+C 含量是 50mol%。病毒颗粒的浮密度(CsCl)为 1.7g / cm³。

2. 培养特性 BB 细胞适用于本病毒的培养。病毒在核内增殖，核变成嗜碱性，染色质着边，并在核内形成包涵体，随后细胞核发生退行性变化、崩解。最后，整个细胞也崩解，形成空斑。一般在 30℃培养 40h 左右，形成较明显的空斑。增殖温度 10~33℃，最适温度为 25℃，37℃不增殖，在 RTG-2 细胞、FHM 细胞和 BF-2 细胞中不产生细胞病变，形成不具有感染性的病毒粒子。

3. 抵抗力 不耐热，对脂溶剂敏感。鱼体内的病毒在-20℃或-80℃时感染力长时间不变；而 22℃放置 3d, 则失去活性。不过，在水温为 25℃的清洁水中，病毒的感染力仍可维持数周。

4. 病原性 本病毒只感染斑点叉尾鮰，尤其是 1 周至 6 月龄的幼鱼，8 月龄后则很少发病。野种鱼较人工饲养更易感。白叉尾鮰、长鳍叉尾鮰、短棘鮰等则无易感性。

病毒通过水传播，经口侵入鱼体。人工接种感染时，病毒最初侵害肾脏，然后是肠和肝脏，最后侵害神经系统。病毒在这些脏器中的细胞内增殖后形成包涵体，引起各脏器的出血和坏死。病鱼呈异常的游泳姿势。本病发生于夏季，最适水温 25℃，死亡率可高达 90%~100%。在 20℃时潜伏期为 10d，30℃时可缩短为 2~3d。

5. 微生物学检查

(1)病毒分离：取病料接种于 BB 或 CCO 细胞于 30℃培养。检查细胞病变特点。用中和试验或荧光抗体技术鉴定分离病毒。

(2)血清学检查：在天然情况下受感染鱼群 1 年后都能产生中和抗体，可用免疫荧光抗体技术等进行检测，诊断带毒鱼。

此外，斑点叉尾鮰病毒的特异性 DNA 探针也可用于检测成年斑点叉尾鮰组织中的病毒。

6. 防治 将水温降到 18℃以下，可控制此病发生。使用减毒苗接种，能使 97%的斑点叉尾鮰获得保护性免疫。

(五) 鲤疱疹病毒

鲤疱疹病毒(Herpesvirus carprini)是鲤痘疮病(carp pox disease)的病原。此病发现于 16 世纪，1964 年 Schubert 从病鱼表皮中，经电镜证实病原是一种疱疹病毒。1984 年，Sano 等人用 ECP 细胞分离培养成功。

1. 形态结构 病毒颗粒有囊膜，直径为 190nm。囊膜上有纤突，其长为 20.5nm。衣壳直径 113nm。

2. 培养特性 本病毒可在 FHM、EPC、MCT、CE-1 细胞中增殖。在 FHM 和 MCT 细胞上产生细胞病变。被感染的 FHM 细胞开始出现空泡。5d 后，细胞变圆，最后从瓶壁上脱落。细胞核内可形成形状不规则的 A 型包涵体。在 MCT 细胞中，被感染细胞发暗，细胞变圆，最后萎缩，但不脱壁。

3. 抵抗力 本病毒对酸(pH 为 3)、热(50℃30min)和 IudR 均敏感。

4. 病原性 鲤痘疮病是鲤、拟鲤、红眼鱼等鲤科鱼的一种表皮肿瘤病。肿瘤发生于头部、躯干、尾部等处的皮肤，病初体表出现乳白色小斑点。随着病情发展，白色斑点增厚而成石蜡状增生物，形如痘疮，因此称之为痘疮病。病鱼在清水或者流水中饲养一段时间，体表的增生物会逐渐脱落。一般在秋季至冬初或春季，水温为 10~15℃时出现病例。

将分离病毒人工接种鲤，15℃饲养 5 个月后，试验鱼出现与自然鱼发病相伺的肿瘤症状。

5. 微生物学检查 可采用 FHM 细胞进行病毒分离或用荧光抗体技术进行快速诊断。

6. 防治 目前尚无有效的防治措施。

二、弹状病毒科

本科病毒为圆筒状，一端圆，另一端平，形如子弹。病毒颗粒有脂蛋白囊膜，囊膜上密布有病毒特异的囊膜突起，即纤突。囊膜包含一个由紧密盘绕、螺旋对称的衣壳组成的管状核心。病毒核酸为单链负股 RNA。与鱼病有关的主要有以下几种。

(一) 鲤春病毒血症病毒

鲤春病毒血症病毒(Spring viraemia of carp virus, SVCV)属水泡病毒属，是鲤春病毒血症的病原。此病是一种以出血为主的急性传染病。在春季水温低于 15℃时，鲤鱼尤其容易感染此病。该病已被我国规定为出入境检疫的二类传染病。

1. 形态结构 病毒颗粒呈子弹形,长 180nm,直径 70nm。在 CsCl 中的浮密度为 $1.195 \sim 1.200 \text{ g/cm}^3$ 。含单链 RNA 和依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(最适活性温度为 $20 \sim 22^\circ\text{C}$)。病毒蛋白由 5 种多肽(L、G、N、Ns、M)构成。

2. 培养特性 本病毒能在 FHM、EPC、BF-2PG、CHSE-214、RTG-2 细胞和来自两栖类以及哺乳动物的细胞中增殖,并产生细胞病变。FHM 细胞的易感性最强,在其中生长的温度范围为 $15 \sim 30^\circ\text{C}$,最适生长温度 $20 \sim 22^\circ\text{C}$ 。细胞病变表现为核膜增厚、融解,细胞变圆,最后细胞也融解、消失,形成空斑。空斑在 20°C 下一般于 2~3d 后出现,直径可达 2~3nm。

3. 抵抗力 在鱼体内的病毒或在含 10%胎牛血清培养基中的病毒,于 -70°C 条件下,可存活 20 个月以上。在含 2%血清的培养基中的病毒可以通过冻干保存,但于 4°C 3d 时间,90%的病毒粒子失去感染性。该病毒在 pH 为 3 时不稳定。 45°C 15min 被灭活。对乙醚敏感。

4. 病原性 大小不同的鲤鱼对本病毒均易感,但由于季节的关系,以 9~12 和 21~24 月龄的鲤鱼为主要受害者。此外,狗鱼、草鱼、白鲢、鲫鱼、须鲶也可自然感染发病。人工接种还可以感染铜吻鳞太阳鱼。

病毒主要由水经鳃侵入鱼体。无临床症状的带毒鱼能持续数周不断地排出病毒。在水温很低(10°C)时,病毒能在被感染鱼的血液中保持 11 周之久,即呈现持续性的病毒血症。此时鱼类吸血寄生虫如鲤虱或水蛭能将病毒从带毒鱼传给健康鱼。感染一般发生在秋季选种时,在第二年春季水温上升时($10 \sim 17^\circ\text{C}$)引起发病。水温为 14°C 左右时,发病率和死亡率最高。温度超过 20°C 时,发病自然中止。病鱼表现为眼球突出,腹部膨胀,肛门红肿,鳃、皮肤、肌肉、心脏、肝脏、肾脏、肠、鳔等出血。

5. 微生物学检查 采集病鱼的内脏或鳔制成乳剂接种于 FHM 细胞, $20 \sim 22^\circ\text{C}$ 培养 10d。一般在接种后 3d,被感染的细胞出现圆变、溶解等细胞病变,用中和试验鉴定分离病毒。

6. 防治 除采取一般卫生措施外,应为越冬鲤鱼清除寄生虫(鲤虱和水蛭),并用消毒剂处理空塘。也可利用升高水温防止发病。

(二)传染性造血器官坏死病毒

传染性造血器官坏死病毒(Infection hematopoietic necrosis virus, IHNV)属狂犬病病毒属,是鲑科鱼类传染性造血器官坏死病的病原。该病已被我国规定为出入境检疫的二类传染病。

1. 形态和结构 病毒颗粒长 170nm,直径 70nm,在 CsCl 中的浮密度为 1.16 g/cm^3 。核酸为单链 RNA,相对分子质量 3.57×10^6 。在宿主细胞内合成 5 种病毒蛋白(L、G1 和 G2、N、M1、M2),其相对分子质量分别为 150 000、67 000、65 000、40 500、22 500 和 17 000。其中糖蛋白 G1 可能由 G2 转变而来。

2. 培养特性 RTG-2、CHSE-214、FHM、STE-137、SSE-5 等细胞均可用于本病毒的培养。增殖温度范围 $4 \sim 20^\circ\text{C}$,最适温度为 $13 \sim 18^\circ\text{C}$ 。在适宜温度培养 48h,被感染细胞开始出现细胞病变。6d 后,细胞变圆,成葡萄串状,随后从瓶壁上脱落。一般在感染后第 3 天,50%以上的病毒粒子释放到细胞外,病毒在 RTG-2 细胞中增殖后得到的感染效价最高,为 $10^{4.7} \text{ TCID}_{50} / \text{ml}$ 。

3. 抵抗力 本病毒对热不稳定,在去氯水中 22°C 24h、 12.2°C 5d,约 90%的病毒失去

感染力。在 Hank' s 缓冲液(pH7.0)中,失活更为迅速。在 4℃ 以下低温,病毒相当稳定,在含 10%胎牛血清的 MEM 中, -20℃ 保存 1 年,病毒仍具感染力。pH6~8 时,病毒比较稳定, pH 在 5 以下或 9 以上时。则迅速被灭活。对干燥的抵抗力较弱,对乙醚敏感。在含 50%甘油的 PBS 中保存 1~2 周,病毒即失去感染力。

4. 抗原性 用多价抗体检测时,各毒株在血清学上无多大差异,与鱼类其他弹状病毒如 VHSV、SVCV、PFRV 无交叉反应。但用单抗检测时,至少可分成 3 个血清型。

5. 病原性 本病毒主要侵害红大马哈鱼、大鳞大马哈鱼、虹鳟、麻苏大马哈鱼等鱼苗和鱼种,银大马哈鱼有较强的抵抗力。

病毒可从病鱼和病后耐过鱼的卵巢液和精液中排出,其生殖产物和污染卵是很重要的传染源。污染水和摄食病鱼的野鸟和野生动物也是传播媒介。病毒经过鳃和消化管侵入鱼体。病鱼表现为活动迟缓,回旋运动,死前鱼体发黑,鳍部出血,肛门有不透明的黏液样粪便。病理剖检可见各脏器贫血和脂肪组织出血,病理组织学检查则可发现前肾、脾脏、肠管的变性和坏死,细胞质内常含有包涵体。发病高峰在水温 10℃ 左右的春季和秋季,水温在 15℃ 以上的夏季则发病较少。

本病最早流行于加拿大、美国。于 1972 年日本从美国引进大马哈鱼鱼卵,此病从此传到了日本。近年来,由于我国每年从国外运进大批鲑鱼鱼卵,从 1985 年开始,在我国东北地区养鳟场也陆续发现此病。此外,我国台湾、意大利、法国等国家和地区也有发生。

6. 微生物学检查

(1)病毒分离:无菌采取鱼的病变组织剪碎、匀浆。将病毒悬液接种于 FHM 细胞或 RTG-2 细胞、鲤鱼上皮瘤 EPC 细胞,在 15~18℃ 培养 10d 以上,培养液 pH 维持在 7.0~7.8,观察有无典型的细胞病变产生。初次分离培养阴性的,需盲目传代 1~2 次。

(2)血清学检查:常用中和试验鉴定分离病毒,荧光抗体技术、ELISA 可直接用于病料中病毒的快速检测。荧光抗体检查时,取病鱼血液或腹腔液涂片为宜,此法可检出隐性感染鱼。

7. 防治 把鱼池的水温升到 15℃ 以上是一种有效的防治措施。

目前,国外已研制出减毒疫苗、灭活疫苗和糖蛋白亚单位疫苗。

减毒苗浸渍免疫鱼苗,可使 72%~100% 的接种鱼获得保护力,免疫期限持续 110d。但考虑到活疫苗回复变异的可能,国外仍未在生产中使用。

用 β -丙酸内酯和福尔马林制备的灭活疫苗只能用于注射接种,浸渍免疫效果不理想。

(三)病毒性出血性败血病病毒

病毒性出血性败血病病毒(Viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)属于狂犬病毒属,引起鳟鱼的出血性败血病。各种年龄的鳟鱼均可患病,其死亡率高达 80%。此病最早发现于丹麦的埃格特维格村,因此也称之为埃格特维格病(egtvad diseases)。目前,该病已被我国规定为出入境检疫的二类传染病。

1. 形态结构 病毒颗粒呈子弹形,平均长为 180nm,直径 60~70nm。有囊膜。核酸为单链 RNA,并含依赖 RNA 的 RNA 聚合酶。病毒结构蛋白由 5 种多肽构成。

2. 培养特性 本病毒能在 FHM、RTG-2、CHSE-214、PG、RF 细胞及鲤鱼等温水鱼、爬虫类和人、仓鼠等哺乳动物细胞中增殖。RTG-2 细胞和 FHM 细胞常用于本病毒的培养,细胞病变表现为细胞短缩、变圆。若用 RTG-2 细胞时,一般在 15℃ 培养 3d 后,形成较明显的空斑。空斑中为溶解的细胞碎片,周边清晰。细胞病变的出现受培养基 pH 的影响,

pH7.6 时, 迅速产生, pH7.4 以下时, 则比较弱或不出现。由此, 可与其他病毒区分。FHM 细胞感染本病毒后, 形成葡萄串状。增殖温度 12~14℃, 不能超过 22℃, 但在 6℃, 甚至低于 4℃仍可生长。

3. 抵抗力 对乙醚敏感。在含 50%甘油的 PBS 中, 易失于感染力。对热敏感, 31℃ 5min, 50%的病毒被灭活; 52℃时则迅速失活。pH3.5 时, 5min, 99%的失去感染力。在有氯气(1%漂白粉溶液, 12℃)、0.2%碳酸钠、200mg / kg 季铵溶液和 50mg / kg 碘等药品中 1min, 病毒即被灭活。病毒在鱼体内, -20℃条件下可保存数月。冻干保存 2 年后, 其侵染力仍可达 50%。

4. 抗原性 本病毒可分成 5 个血清型, 以血清型 1 型分布最广, 其次是 2 型和 3 型。

5. 病原性 不同血清型毒株的致病性有所差异。

病毒常通过水机械水平传播, 主要经鳃侵入鱼体。体长为 5cm 的幼鱼到 200~300g 的上市鱼都可受到侵害。鱼苗和亲鱼一般不发病。在水温 14~15℃时潜伏期为 1~2 周。病型可分为急性、慢性和神经型 3 类。在流行初期多呈急型, 以后转为慢性型, 最后以神经型为主。一般症状为全身各组织脏器的出血, 肾脏和脾脏造血组织的广泛坏死, 肝脏、胰脏部分坏死。发病时期为水温在 8℃以下的冬季到春季。水温在 10℃时, 流行减弱, 18℃时, 停止流行, 病鱼自愈或成为不显性感染状态。

6. 微生物学检查

(1)病毒分离: 无菌采集病鱼的肾脏和脾脏作为病料。将病料接种于 FHM 或 RTG-2 细胞, 置 13~15℃培养, 维持 pH7.4~7.8, 观察细胞病变和空斑形成。

(2)血清学检查: 常用中和试验和荧光抗体技术诊断此病。荧光抗体检查时, 以冰冻切片为宜, 对鱼急性病例的检出率较高。

7. 防治 应做好鱼卵的消毒工作。预防本病的疫苗尚处于试验阶段, 有β-丙酸内酯和紫外线灭活苗以及 Reva、F₂₅₍₂₁₎减毒苗。灭活苗注射免疫有效, 浸渍免疫不能引起保护性免疫。Reva 接种宜在低水温(5℃)下进行, 免疫鱼的存活率为 75%。但此疫苗对 3g 重的鳙鱼仍有致病性。F₂₅₍₂₁₎接种鳙鱼后, 在 1~45d 能提供明显的保护力。

(四)狗鱼鱼苗弹状病毒

狗鱼鱼苗弹状病毒(Pike fry rhabdo virus, PFRV)属水泡性口炎病毒属, 引起白斑狗鱼的头部水肿或躯干的红肿以及内脏出血。

1. 形态结构 病毒呈子弹形, 长 125±10nm, 外径 80±8nm, 内径 25±5nm, 病毒突起长 9~2nm。形态大小与 SVCV 相似, 病毒粒子浮密度为 1.16g / cm³。病毒核酸为单链 RNA, 其中鸟嘌呤占 21.6%、腺嘌呤占 25.1%、胞嘧啶占 22.4%、尿嘧啶占 30.9%。

2. 培养特性 FHM 细胞常用于本病毒的培养, 并产生与 SVCV 相同的细胞病变。增殖温度范围为 10~28℃, PFRV 不诱导干扰素产生, 但有自身干扰现象。在 FHM 细胞的收获量可达 10⁹PFU / ml 以上(21℃)。

3. 抵抗力 本病毒对热敏感, 14℃3d, 70%的病毒失去感染力; 45℃30min, 98%的病毒被灭活。在 pH3 2min, 侵染力为 4%。但在含 2%的血清的培养基中 4℃保存, 病毒活性可维持相当长的时间。

4. 抗原性 与鲤春病毒血症病毒在血清学上相关, 可能属于其中的一个血清型。

5. 病原性 本病毒主要侵害狗鱼鱼苗, 患病狗鱼有的表现为头部肿胀, 眼球突出, 称之为水头病(hydrocephalus)。病理剖检可见中脑室浆液滞留, 脑和脊髓出血。有时脾脏

也出血，肾小管呈退行性变性。有的则表现为躯干有红色肿块物，脾脏、脊髓、胰脏、肾造血组织出血，称之为红病(red disease)。

本病于 1971 年在荷兰白斑狗鱼孵化厂的稚鱼发现。后来在德国的草鱼和粗鳞鲷中也分离到这种病原。

6. 微生物学检查 取病料接种于 FHM 和 EPC 细胞，在 20℃左右培养，观察细胞病变，用中和试验鉴定分离的病毒。

7. 防治 尚无疫苗使用，应采用一般防治措施。

(五)牙鲆弹状病毒

牙鲆弹状病毒(Hirame rhabdo virus, HRV)由五利江(1984)从发病的人工养殖牙鲆中分离。1986 年，木村等人根据其生物学特性而命名。

1. 形态结构 病毒颗粒呈子弹状，大小 80nm×(160~180)nm。

2. 培养特性 以 FHM、EPC 和 RTG-2 细胞对本病最易感。此外，其也能在 BF-2、HF-1、BB、CCO、EK-1、YNK、SE 细胞中增殖。细胞病变特点为被感染细胞变圆。增殖适宜温度为 15~20℃。

3. 抵抗力 在海水中比在淡水中稳定。遇热不稳定，60℃2min 失活，25℃开始逐步失活，-20℃稳定。对乙醚和 pH3 敏感。

4. 抗原性 本病毒与 IHNV、VHSV、SVCV、PFRV 等弹状病毒无交叉中和反应。

5. 病原性 主要危害牙鲆，自然发病时，水温一般在 5~10℃，10℃为发病高峰期。人工感染时，以 TCID₅₀ / 尾的剂量腹腔接种 95~265g 的牙鲆，可导致 20%的试验鱼死亡，并出现与自然感染发病鱼相同的症状，如性腺充血和出血，鳍端和肌肉出血。人工感染真鲷、黑鲷稚鱼、虹鳟、银大马哈鱼和鲑也能发病。但香鱼具有抵抗力。

6. 微生物学检查 可进行病毒分离以及用荧光抗体技术诊断。

7. 防治 应加强对鱼卵的消毒，可以碘仿或紫外线照射消毒。养殖水体可用二氧化氯等含氯消毒剂消毒。若提高水温至 15℃以上，可有效防止本病发生。

(六)美洲鳗鲡病毒

美洲鳗鲡病毒(Eel virus of american, EVA)是 Sano 于 1974 年首次从美洲鳗鲡幼鱼中分离到的，目前与鳗鱼感染有关的弹状病毒有 4 个血清型，即 EVA、EVX、B12 和 C16，均属双股 RNA。在 RTG-2 细胞上培养，可出现核膜浓染、核变形，细胞质内有不同规则的嗜碱性颗粒，最后细胞变圆、崩解。该病毒所致疾病主要在欧、美和日本等地流行，多发生在冬季，幼鳗死亡率高。也可感染虹鳟。濒死鳗表现肌肉痉挛或强直，出现间隙性穿游或翻滚。鳃丝肿胀、上皮细胞增生，黏液增加。消化道无食物，肾肿大，有腹水。肾小管细胞玻璃样变性，肾、肝、脾的间隙组织呈局灶性坏死。确诊时应进行电镜检查，观察病毒粒子。也可用培养细胞分离病毒。目前尚无有效治疗方法，提高养殖水温至 24℃以上可避免本病发生。

三、虹彩病毒科

虹彩病毒科(Iridoviridae)病毒颗粒呈球形，直径 130~300nm，呈 20 面体对称，核酸为双链 DNA。有些病毒有囊膜。在细胞内增殖。本病毒分成 5 个属，即虹彩病毒属(Iridovirus)、绿虹彩病毒属(Chloriridovirus)、蛙病毒属(Ranavirus)、淋巴囊肿病毒属(Lymphocystivirus)和类金鱼 I 型病毒属(Goldfishvirus I-like viruses)。虹彩病毒属和绿虹彩病毒属能感染昆虫和甲壳动物，而蛙病毒属、淋巴囊肿病毒属和类金鱼 I 型病毒属能感染

鱼类、两栖类及爬行动物。

(一)淋巴囊肿病毒

淋巴囊肿病毒(*Lymphocystis virus*, LV)是淋巴囊肿病的病原,此病在世界各地的海水鱼或淡水鱼中都有发生。

1. 形态和结构 病毒为正 20 面体立体对称。从不同宿主分离的病毒其大小有些差异,小的 130~150nm,大的 240~260nm,核酸为 DNA。从铜吻鳞鳃太阳鱼分离的 LV 大小平均为 250nm,病毒粒子顶点有宽 4nm、长 200~300nm 的丝状物。

2. 培养特性 从铜吻鳞鳃太阳鱼分离的 LV 能在 BF-2 细胞和 LBF-2 细胞上增殖,最适温度为 25℃,并产生特征性的细胞变异。

3. 抵抗力 本病毒对乙醚、甘油敏感, -20℃冻存可保持较长时间。

4. 病原性 本病毒可引起 33 个科的 100 多种海水鱼和淡水鱼感染发病。主要通过水传播,侵害鱼的皮肤细胞。另外,外部寄生虫也可能是传播媒介。一般在夏季水温高时发病,水温下降时则逐渐消失,在养殖的真鲷中没有季节性。病毒侵入皮肤的结缔组织细胞,使其增大呈水泡样,因此称之为淋巴囊肿细胞(*lymphocystis cell*)。这些淋巴囊肿细胞在头部、躯干、尾部、等处皮肤上散在或堆聚一起,使鱼体呈银白色。鲷的淋巴囊肿细胞多散在,其黑色素细胞又较发达,因此外观呈黑点状,称之为黑点病。本病不影响鱼的活动,数月后鱼可自愈。

5. 微生物学检查 可用 BF-2 细胞做病毒分离或用电镜观察诊断。

6. 防治 尚无有效防治措施。

(二)红细胞坏死性病毒

红细胞坏死性病毒(*Viral erythrocytic necrosis*, VENV)引起鱼的红细胞坏死,以前又称此病为鱼类红细胞坏死病(*piscine erythrocytic necrosis*, PEN)。

1. 形态结构 目前尚未得到本病毒的分离物。病毒存在于感染鱼红细胞的细胞质中,据电镜观察,本病毒的直径为 310~360nm,呈正 20 面体对称,与淋巴囊肿病毒等虹彩病毒非常相似。病毒粒子外侧电子密度较高,其厚度为 35nm,其下面是厚度为 16nm 的电子密度较低的部分,中心部为 204nm 的密度高的部分组成。病毒粒子中央有福尔根染色反应阳性的物质,为病毒的 DNA 分子。

2. 病原性 红细胞坏死性病是世界性海水鱼和溯河鱼的传染病,其中鲑科鱼类比较容易感染。用病鱼脏器制成的乳剂经滤过后,腹腔接种于健康鱼,可以复制出本病。本病的特征为红细胞融解,细胞质内形成包涵体。每个感染细胞内含 3~9 个病毒颗粒。

3. 微生物学检查 采集病鱼血涂片后,用姬姆萨染色,置光学显微镜下检查。被 VENV 感染的红细胞胞质内,可形成 1~4nm 的圆形的嗜碱性包涵体。脾脏和肾脏等血液丰富的组织也可用于涂片检查。确诊则需用电镜观察红细胞的细胞质内有无虹彩病毒样的病毒粒子。

4. 防治 尚无有效防治措施。

(三)蛙病毒 3 型

蛙病毒 3 型(*Frog virus 3*, FV3)最初是从豹蛙(*Rana pipiens*)体内分离到的,属蛙病毒属(*Ranavirus*)。本属病毒是一些从两栖类动物分离的胞浆型 DNA 病毒,除蛙病毒 3 型外,还有分离自牛蛙(*Rana catesbriana*)、蝾螈(*Diemictylus viridescens*)和蟾蜍(*Xenopus laevis*)的许多胞浆型 DNA 病毒,如蛙病毒 1~3 型和 5~24 型,蛙病毒 L2、L4、L5,蝾螈 T6~

20(NV-T6~20), 蝌蚪水肿病毒 LTI~4(TEVLT-1~4)和蟾蜍病毒 T21(XV-T2)。

1. 形态结构 FV3 具有虹彩病毒的典型形态结构, 核衣壳直径 120~130nm, 有外膜包围。成熟病毒粒子含 30% 的 DNA, 56% 的蛋白质和 14% 的脂质。DNA 呈双股线形, 相对分子质量为 130×10^6 。G+C 含量为 53~58mol%。含 16 种多肽, 其中 5 种多肽与 DNA 核心紧密连接。病毒粒子的浮密度为 $1.16 \sim 1.35 \text{ g / m}^3$ 。有一些酶类, 如存在于病毒核心中的核苷酸磷酸水解酶和存在于核心外和衣壳内的蛋白激酶。

2. 培养特性 FV3 可在许多种类的组织培养细胞内增殖, 包括鸡胚细胞、幼仓鼠肾细胞(BHK-21)以及鱼类和两栖类等的细胞。在这些细胞内于 12~32℃ 可以生长, 但具有明显的温度依赖性。最适生长温度为 25℃, 在高于 28~30℃ 的温度时不能形成成熟的病毒粒子, 或者完全停止生物合成。在 30℃ 条件下, 即使能合成大量病毒 DNA, 但 DNA 不被衣壳所包裹, 如果将感染细胞放回到 25℃, 则在 30℃ 温度中合成的 DNA 具有完整功能, 这种 30℃ 温度下不被衣壳包裹的特性即所谓温度缺陷。在宿主细胞中, 病毒 DNA 合成需要两个阶段: 首先在核内合成单位长度的核酸分子, 然后在细胞浆内进行聚合体的合成和病毒粒子的装配, 在经膜出芽时获得囊膜。

3. 病原性 蛙病毒 3 型在自然宿主(成年豹蛙)不引起疾病, 但可能对豹蛙肾癌的发生呈现某种程度的辅助作用, 并可引起蝌蚪的致死性感染。培养细胞在感染病毒后, 其 DNA 和 RNA 合成迅速发生障碍, 细胞核缩小变形, 出现细胞病变。用 γ 射线灭活的蛙病毒 3 型也能呈现类似的细胞毒性作用, 将大量蛙病毒 3 型注入小白鼠腹腔内, 3h 内可见到肝细胞核病变, 小白鼠于 18~36h 死亡。而 37~38℃ 的小白鼠体温对蛙病毒 3 型来说是非允许温度, 病毒在这种温度下不能发生生物合成, 更不能增殖。对蛙病毒 3 型在宿主细胞中生物合成和复制过程的深入研究, 已作为一种研究模型, 用来研究和探索病毒的生物合成及其与宿主细胞之间的相互关系, 也可能对人和动物肿瘤病发生的研究有重要意义。

4. 微生物学检查 将含病毒的蛙组织制成电镜观察标本, 可观察到病毒粒子。制成病毒液接种蛙类等培养细胞, 可检测到细胞病变, 进行病毒分离。

四、呼肠孤病毒科

呼肠孤病毒(Reovirus)是由呼吸道(respiratory)肠道(enteric)和孤儿(orphan)3 个词的词首命名的。本科病毒在人、脊椎动物、无脊椎动物、细菌、高等植物和真菌上均有发现。病毒颗粒呈球形, 有两层衣壳, 内衣壳结构稳定, 含 32 个壳粒, 20 面体对称。病毒粒子有 6~10 种蛋白质, 相对分子质量约为 120×10^6 , 浮密度(CsCl) $1.36 \sim 1.39 \text{ g / cm}^3$, 沉降系数为 630S。病毒核酸为线性双链 RNA, 10~12 个节段。无囊膜。在细胞浆内增殖。

本科病毒分为 8 个属, 即正呼肠孤病毒属、环状病毒属、轮状病毒属、科罗拉多(COLTI)病毒属、水生呼肠孤病毒属、斐济病毒属、植物呼肠孤病毒属及水稻矮缩一条叶枯病毒属。水生呼肠孤病毒属的代表种类有金体美鳊鱼呼肠孤病毒、13p2 呼肠孤病毒、大马哈鱼呼肠孤病毒、鲑鱼呼肠孤病毒、鲤鱼呼肠孤病毒、圆鳍雅罗鱼呼肠孤病毒、银大马哈鱼呼肠孤病毒、文蛤呼肠孤病毒、草鱼呼肠孤病毒、大菱鱼呼肠孤病毒。这些从鱼、贝类发现的呼肠孤病毒有一些共性, 即病毒粒子直径 75nm 左右, 核心约 50nm。在氯化铯中浮密度 1.36 g / cm^3 , 能抵抗乙醚和蛋白酶处理而感染性不受影响。双链 RNA 基因组有 11 个节段, 相对分子质量为 $(0.3 \sim 2.5 \times 10^6)$, 总相对分子质量 15×10^6 。11 个节段按长度分为 3 组, 即 3 个 L(长组, 有 3 个节段, 约 4.5kb), 3 个 M(中组, 有 3 个节段, 约 2.3kb), 5 个 S(短组, 有 4 个节段, 约 1.2kb)。有 5 种主要结构蛋白, 相对分子质量 34~135kb。至少还有 2 种

次要的蛋白存在。在胞浆内复制，能在鱼类细胞中增殖，形成蚀斑或合胞体，病毒呈水平传播，尚未发现生物传播媒介。

(一)草鱼出血病病毒

草鱼出血病病毒(Grass carp hemorrhage virus, GCHV)是草鱼出血病的病原，此病是草鱼饲养阶段危害最严重的疾病，于1970年在湖北黄陂发现。1980年中国科学院水生生物研究所鱼病室在电镜下观察到病毒颗粒，当时命名为草鱼疱疹病毒(Herpes virus of grass carp)。1983年，根据其生物学特性，归属到呼肠孤病毒科，命名为草鱼呼肠孤病毒(Reovirus of grass carp)，现定名为草鱼出血病病毒(Grass carp hemorrhage virus, GCHV)。1988年，江浙等省从草鱼出血病病鱼分离到不同于呼肠孤病毒的类似于小RNA病毒的病毒也是草鱼出血病的病原。

1. 形态结构与理化特性 本病毒为20面体对称，由双层衣壳构成，直径65~70nm。外层衣壳上的壳粒为中空型，内层衣壳直径50nm，其上附着有长7.5nm、内径6.4nm、外径10.7nm的圆柱形钉状物。病毒核酸为分节段的双链RNA，由11个节段组成，总相对分子质量 15×10^6 。聚丙烯酰胺凝胶电泳图形为3:3:3:2。病毒多肽组成成分也有11个，其中内层衣壳由6种多肽构成，外层衣壳由5种多肽组成，32~137kb。蔗糖浮密度 1.30g/cm^3 ，氯化铯中浮密度 1.36g/cm^3 。实验证实，该病毒具有微弱凝集人的O型红细胞的能力，一般需在显微镜下辨认。其抗体与其他哺乳动物的呼肠孤病毒不发生交叉反应。尚未查明本病毒是否有不同的血清型。

2. 培养特性 草鱼出血病毒能够在草鱼鳍条细胞(CF)、草鱼性腺细胞(CO)、草鱼肾脏细胞(CIK)、草鱼吻端细胞(ZC-7901)中增殖。病毒接种细胞后，置26~28℃中培养，一般在72h以后可引起细胞发生一系列相应的病理变化。病变初期细胞核质增多，出现一些颗粒状物，致使细胞间隔不清；中期，细胞继续收缩，整个细胞单层拉成网状；晚期细胞裂解成球状物，常常堆积在一起；最后，从瓶壁脱落，浮在培养基上层。经Selles染色，在细胞质中可见到形状为月牙形或块状，位于细胞核周围的嗜酸性包涵体。增殖温度范围在20~35℃，一般在培养第6天时的病毒感染价最高，可达 $10^{7.2}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 。

3. 抵抗力 本病毒对酸(pH为3)、碱(pH为10)、乙醚和氯仿不敏感，对热(56℃, 30min)稳定，而在65℃1h完全被灭活。病毒的外层衣壳可被胰蛋白酶消化除去，经此处理过的病毒悬液，其感染性提高。反复冻融，毒力下降或完全丧失。用1%洗衣粉或肥皂处理1h可完全失活。聚乙烯戊环酮碘(PVP-1)对病毒有杀灭作用。组织中的病毒(置50%甘油磷酸缓冲液中)在-15~-20℃保存两年仍有活力。

4. 病原性 草鱼、青鱼和麦穗鱼对本病毒易感，从2.6cm的夏花草鱼开始感染，而以6~10cm的当年鱼种最为普遍而严重。1周龄以上的草鱼亦可发病。将感染的细胞培养液注射草鱼，在28℃中饲养，4~6d发病死亡。本病除注射能感染外，浸泡和接触感染亦能使草鱼发病死亡。成熟的草鱼卵也可带毒。而鳙、鲢、鲤、鳊等鱼不管在自然情况下，还是人工接种均不发病，但可成为病毒的携带者。

发病草鱼主要表现为全身各组织器官出血。根据出血部位不同可分为红肌型(肌肉严重充血和出血)、红鳍红鳃盖型(鳃盖、鳃基、头顶、口腔、眼眶明显出血)和肠炎型(肠道全部和部分严重出血)。本病的流行季节很长，通常在4~5月份即开始流行。5月份，2龄草鱼开始发病。6月下旬，当年鱼种出现流行，直至9月底为流行季节。水温在25~30℃时，发病普遍。28℃水温下人工感染，注射的需4~7d可发病，浸泡感染的需7~9d才发病。

5. 微生物学检查

(1)分离病毒：取病料加 PBS 匀浆和再冻融 2 次，离心取上清液加双抗，以 10 倍稀释液接种于 CF-84 细胞单层，置 28℃ 培养 72h 以上，观察细胞病变。对分离病毒可进行草鱼接种试验或用血清学方法进行鉴定。

(2)血清学检查：对流免疫电泳、荧光抗体技术、酶联免疫吸附试验以及 SPA 协同凝集试验均可用于本病的诊断。荧光抗体技术可用于检测细胞培养或病鱼组织冰冷切片中的病毒，双抗体夹心 ELISA 可检测病鱼组织悬液或细胞培养冻融上清液中的病毒。

此外，还可采用 PAGE、电镜等手段检测本病毒。

6. 防治 福尔马林灭活的组织疫苗和细胞疫苗注射免疫草鱼，可刺激鱼体产生较坚强的免疫。其中，组织灭活苗的免疫保护期限可达 14 个月，已被国内普遍采用。此外，植物血凝素、聚乙烯氮戊环酮碘剂用于浸渍、口服或注射草鱼也有一定的预防作用。我国运用杂交育种、转基因技术培育抗草鱼出血病鱼种的工作也取得了一些进展。

(二)其他呼肠孤病毒

1. 金体美鳊鱼病毒(Golden shiner virus, GSV) 由 Plumb 于 1977 年从发病的金体美鳊鱼分离，电镜观察其为 20 面体对称，直径 20nm。可在 FHM 细胞、CHSE-214 和 BB 细胞中增殖。在 CHSE-214 细胞上形成微小空斑。在 FHM 细胞上，空斑形成较为明显。空斑为被感染细胞的融合或坏死。最适宜增殖温度为 30℃，潜伏期 8h。本病毒对乙醚不敏感，对热也有一定的抵抗性，于 pH 为 3、7 和 10 时均稳定。在人工饲养的金体美鳊鱼中感染率较高。

2. 13P₂ 1979 年 Meyers 从美洲牡蛎中分离到一种呼肠孤病毒，并取名为 13P₂。其由双层衣壳组成，含 6 个对称性突起。本病毒可在 BF-2 细胞、CHSE-214 细胞和 CHH-1 细胞中增殖，并形成直径小于 2mm 的空斑。其对氯仿不敏感，在 pH 为 3、9 时稳定，但在 pH 为 2 时，迅速失活。

本病毒可引起牡蛎的组织坏死，人工接种铜吻鳞鳃太阳鱼，可导致死亡，接种虹鳟时，则引起肝脏的网状内皮细胞增生，形成肉芽肿病变。

3. 鲑病毒(Chum salmon virus, CSV) 于 1981 年由 Winton 从鲑分离，病毒直径为 75nm。外层衣壳可见 20 个外周壳粒围绕，其可被 α-胰凝蛋白酶降解，形成只含内层衣壳，直径为 50nm 的亚病毒，亚病毒粒子的感染性更强。本病毒可在 CCO、CHSE-214、CHH-1 细胞中增殖，在 CCO 细胞中产生小的、在 CHH-1 细胞产生中等大小的、在 CHSE-214 细胞中产生较大的空斑。人工接种鲑和大鳞大马哈鱼，可引起低的死亡率，其病变主要为肝脏坏死。

4. 鲟呼肠孤病毒(Catfish rerovirus, CRV) 由 Amend(1984)从斑点叉尾鲟分离。病毒粒子直径 75nm，内层衣壳为 55nm，可在 CCO、BF-2、CHH-1 和 BB 细胞中增殖。

5. 麻苏大马哈鱼病毒(Land locked salmon virus, LSV) 由 Ra-Li(1989)从台湾人工饲养的麻苏大马哈鱼的鳃和肝脏中分离。病毒粒子直径为 28nm，可在 As、BF-2、BB、CCO 和 CHSE-214 细胞中增殖，增殖温度范围为 15~25℃，最适温度为 20℃。

本病毒可引起麻苏大马哈鱼幼鱼死亡，死亡率高达 90%，临床症状为腹鳍和肠道出血。

6. 胡瓜鱼病毒(Smelt virus, SV) 由 Moore 等人于 1988 年从大量发病死亡的胡瓜鱼中分离，当时归属于细小病毒科。1990 年，Marshall 重新分析了本病毒的结构和核酸组成后，认为应归属为呼肠孤病毒科，其直径为 10~80nm，含双层衣壳，可在 CHSE-214 细

胞中增殖，初次分离时，需要培养 13d 才能出现细胞病变。继代后，细胞病变出现时间缩短到 2d。

五、杆状病毒科

杆状病毒科(*Baculoviridae*)病毒的核衣壳均呈杆状，大小为 $40\sim 60\text{nm}\times 200\sim 400\text{nm}$ ，为螺旋对称。浮密度(CsCl)为 $1.47\text{g}/\text{cm}^3$ ，其外有囊膜包裹。病毒粒子的浮密度为 $1.18\sim 1.25\text{g}/\text{cm}^3$ 。病毒核酸为单分子或多分子双链 DNA，相对分子质量 $(58\sim 100)\times 10^6$ ，其中 G+C 含量为 $28\sim 59\text{mol}\%$ 。对乙醚和热敏感。

本科病毒有核型多角形病毒属、颗粒体病毒属和杆状病毒属(*Baculovirus*)，前两属的代表种分别是苜蓿根纹夜蛾核型多角形病毒和印度谷螟颗粒体病毒，杆状病毒属内原分为 A、B、C3 个亚群。A 亚群病毒在细胞核内形成多角形包涵体，其中含有许多病毒粒子；B 亚群在细胞核内形成球形包涵体，C 亚群则不形成包涵体，以上 3 亚群见于节肢动物。国际病毒命名委员会又新设了 D 亚群，其为来源于昆虫的分节段的双链 DNA 病毒。目前发现有 3 种杆状病毒与虾病有关。

(一)对虾杆状病毒

对虾杆状病毒(*Baculovirus penaei*, BP)是最早(1974)发现的虾类杆状病毒，病毒粒子呈杆状，大小 $74\text{nm}\sim 270\text{nm}$ 。在感染的组织细胞核内，形成嗜曙红性多角形包涵体，从底边到顶点的距离为 $0.5\sim 20\mu\text{m}$ ，多为 $8\sim 10\mu\text{m}$ 。溴酚蓝汞染色包涵体呈浅蓝至深蓝，甲基绿-焦宁染色呈鲜红色，PAS 反应阴性，富尔根反应常为阴性。多角形核内包涵体呈晶格构造，这是由圆形的亚基整齐排列组合而成，属于杆状病毒属的 A 亚群。由该病毒引起的对虾杆状病毒病已被我国规定为出入境检疫的二类传染病。

桃红对虾、白对虾和褐对虾对本病毒易感。病虾的肝胰腺和前中肠腺的上皮细胞组织呈坏死性变化，死亡率高达 95% 以上。

微生物学检查时，可采集病虾的病变组织或粪便制作湿标本，置光学显微镜下观察有无多角形包涵体，伊红染色为桃红色。或用电镜检查组织中的杆状病毒粒子。我国已报道了检测对虾杆状病毒的 ELISA 方法。

(二)斑节对虾杆状病毒

斑节对虾杆状病毒(*Monod baculovirus*, MBV)是 Lightner 等人(1981)继对虾杆状病毒之后，在斑节对虾中发现的另一种杆状病毒。此病毒已于 1989 年用对虾淋巴组织细胞分离培养成功。

病毒核衣壳大小为 $246\pm 15\text{nm}\times 42\pm 13\text{nm}$ ，囊膜大小为 $324\pm 33\text{nm}\times 75\pm 4\text{nm}$ 。用斑节对虾淋巴组织细胞培养时，在接种病毒后第 3 天，产生细胞病变。被感染细胞萎缩，最后崩解。培养适宜温度为 28°C 。在细胞核内形成嗜曙红性，大小 $3\sim 8\mu\text{m}$ 的球形包涵体，属于杆状病毒属的 B 亚群。

本病毒主要侵染斑节对虾，后期幼体、仔虾和成虾均具有易感性。感染率高达 85%。发病虾的体色呈蓝灰色或蓝黑色，呈昏睡状。病理剖解，可见肝胰腺及前中肠的上皮组织细胞有不同程度的坏死。该病已被我国规定为出入境检疫的二类传染病。

微生物学检查时，可用光学显微镜检查湿标本中的包涵体，或电镜检查病变组织中的病毒粒子。检查湿标本中的包涵体时，一般需用 0.05% 孔雀绿做短时间(几分钟)染色。

(三)中肠腺坏死杆状病毒

中肠腺坏死杆状病毒(*Baculoviral mid-gut gland necrosis virus*, BMNV)由 Sano 等人

(1981)在日本对虾中发现。病毒粒子呈杆状，核衣壳大小约为 $250\text{nm} \times 36\text{nm}$ 。由内外两层囊膜包裹，其大小约为 $310\text{nm} \times 70\text{nm}$ 。在感染细胞内不形成包涵体，属于杆状病毒属的 C 亚群。

本病毒主要侵害日本对虾，在中肠腺和肠上皮细胞核内增殖。病虾中肠腺呈扩展性乳状坏死。死亡率高达 83%。

微生物学检查时，主要依赖于电镜观察。

六、双 RNA 病毒科

双 RNA 病毒科(*Birnaviridae*)病毒颗粒 20 面体对称，直径约 60nm，核衣壳有 32 个壳粒，92 个形态亚单位。无囊膜，表面无突起，无双层衣壳。核酸为双链 RNA，胞浆内复制。由于形态和某些结构与呼肠孤病毒有相似性，以前都归为呼肠孤病毒科。但其核酸只有 2 个节段，而后者为 10~12 个节段。因此，1991 年 ICTV 将这些病毒新设为一个科，1995 年又将双 RNA 病毒科分设 3 属，即水生双 RNA 病毒属(*Aquabirnavirus*)又称双 RNA 病毒属(*Birnavirus*，代表种为传染性胰脏坏死病毒)、禽双 RNA 病毒属(代表种为传染性法氏囊病毒)以及昆虫双 RNA 病毒属(代表种为果蝇 X 病毒)。该科的成员还有双瓣软体动物的 Tellina 病毒(Tellina virus, TV)和牡蛎病毒(Oyster virus, OV)。

(一)传染性胰脏坏死病毒

传染性胰脏坏死病毒(Infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)引起鲑鳟鱼鱼苗和稚鱼的急性传染病——传染性胰脏坏死病。此病只在人工养殖条件下流行，并引起很高的死亡率，遍及全世界。该病已被我国规定为出入境检疫的二类传染病。

1. 形态结构 病毒颗粒无囊膜，20 面体对称，直径 60nm，在感染细胞的超薄切片中，核心的直径 45nm。在 CsCl 中的浮密度为 $1.60\text{g} / \text{cm}^3$ ，壳粒数为 92，由 4 条多肽(VP₁~VP₄)组成，VP₄可能是 VP₃的降解产物。核酸为双链 RNA，由大小两个节段组成。大节段编码表面蛋白 VP₂和核心蛋白 VP₃，小节段编码核心蛋白 VP₁。RNA 的 3' 末端无 PolyA 结构，不同毒株各多肽和核酸节段的分子质量不同。例如，VR299 4 条多肽的相对分子质量分别为 86 000、56 000、30 000 和 27 000，其大小核酸节段的相对分子质量分别为 2.5×10^6 和 2.3×10^6 。

2. 培养特性 病毒可在 RTG-2、FHM、CHSE-214、CAR、RF、PG、SWT、BB、BF-2 和其它多种鱼类细胞中增殖，并产生细胞病变(Ab 型株在 FHM 中不产生细胞病变)。也可在变温动物的初代细胞中培养，但诊断和病毒分离培养常用 RTG-2 和 FHM 细胞。细胞病变表现为细胞失去纺锤形，核浓缩，细胞质有颗粒，细胞从瓶壁上脱落。不过，也有抵抗力稍强的细胞，即使发生核浓缩，其仍留在原来的位置，形成网状空斑，空斑周围，健全细胞和变性细胞混杂在一起，在 20℃培养时，空斑形成需 2~3d。本病毒的增殖温度范围为 15~25℃，最适温度为 20℃左右。IPNV 在 pH7.2、7.6 时产生细胞病变，而 VHSV 在培养液 pH7.2 时不产生细胞病变，这可作为两者的鉴别点之一。来源于两栖类、鸟类或哺乳动物的细胞均不能用于 IPNV 的培养。

3. 抵抗力 本病毒对乙醚、氯仿、甘油、乙醇均具有抵抗力。在 50%甘油 PBS 中可长时间保存。能耐受 pH4~10，在 pH5.9 的弱酸性环境中一般较为稳定。在水中耐受性较强，河水或井水中 4℃10d、15℃5d，该病毒尚能存活。在海水中 4~10℃时 4~10 周，感染力不变。对高温也具有一定程度的耐受性，50℃15min 不灭活。PBS 中 60℃1h，感染力仍可残留。于 10 倍稀释的 Eagle 培养基中 4℃保存，99.9%的病毒失去活性。大部分毒株

可以耐受-20℃以下的低温。冻干后4℃保存,感染力至少可以维持4年。但有些毒株对冻融极不稳定,冻融一次,99.9%失去感染力。用氯仿(100~200 ml / L)、福尔马林(2%)、烧碱(2%)、紫外线(254nm)和 γ 射线(大于10kGy)处理,可使病毒灭活。

4. 抗原性 最初用多价抗体进行交叉中和试验,将本病毒分成Ai、SP、VR299 3个血清型。Ab和SP是欧洲的参考株,VR299是美洲的参考株。Hi等人(1985)的血清学研究对此做了补充。他把病毒分为A、B2个血清群,A群包括9个血清型,见于硬骨鱼、贝类、甲壳类和圆口动物,B群中有1个血清型,见于贝类和鲤鱼。

5. 病原性 不同毒株的致病力强弱有所差异。人工感染时,在英国人工饲养的鳟鱼中分离的各毒株的致死率为43%~56%。但Ab株的毒力较弱,致死率只有15%左右。一般从非鳟鳟鱼中分离的IPNV的毒力较低(致死率仅6%~10%),但从鲤鱼分离到的毒株的致死率高达60%。人们发现SP株在细胞中传代会发生变异,变成弱毒株,空斑由原来的0.5mm变为2mm,并对正常的鳟鱼血清敏感。而从急性发病的鱼中分离的野毒株则有强的毒性(致死率为75%),在细胞培养中产生小空斑,不被正常虹鳟血清中和。虹鳟、美洲红点鳟、溪鳟、克氏鲑、大马哈鱼、红大马哈鱼、银大马哈鱼、大鳞大马哈鱼、湖红点鲑等对IPNV具有易感性。从鲑科以外的多种鱼类如白斑狗鱼、白亚口鱼、金鲈、七鳃鳗、鳗鲡、大西洋油鲱、鲤鱼、乌鲂以及牡蛎、蛤类、贝类、蟹类、日本对虾等也可分离到本病毒,这些宿主大多都无任何临床症状。

病毒存在于病鱼的各个组织器官,可通过病鱼的粪便、鱼卵、精液及被污染的水、物品而传播,经鳃侵入鱼体,同时也能经口感染。摄饵后2~8周鱼易感性较强,较大的鱼可抵抗感染。病后残存者可数月、数年以至终生带毒。数周龄的幼鱼在12~14℃时潜伏期为1周左右。发病鱼的胰脏呈坏死性炎症变化,常常波及周围的脂肪组织。有时也可引起肝脏的局部坏死、胃肠炎以及肾脏的坏死。

传染性胰脏坏死病是北美鳟鱼类已知病毒病中流行最广的一种,大部分发生在美国和加拿大东南部的产鳟区。本病已传播到法国、丹麦、瑞士、瑞典、德国、英国、日本以及我国。

6. 微生物学检查

(1)病毒分离:直接取整尾病鱼鱼苗或成鱼的体腔液、肾脏、脾脏、肝脏等制成匀浆,用PBS稀释成 10^{-6} ,在4℃以2000r / min离心15min,然后通过0.45 μ m滤膜过滤。取0.2ml接种至RTG-2或FHM细胞培养物,置15~20℃培养,维持pH7.0~7.8,观察细胞病变和空斑形成。一般在接种后3~4d出现病变。带毒鱼也可用其粪便、精液或卵液分离病毒,粪便做1:20~1:50稀释,以降低其毒性。精液或卵液可不作稀释直接接种。

用可疑IPNV病鱼做诊断感染时,细胞必须培养20d。如果尚不能确定病毒存在,应将感染细胞的培养液传代一次,接种新的细胞,再观察细胞病变。有报道,直接将病鱼或带毒鱼的内脏用胰蛋白酶消化,或由带毒鱼分离的白细胞,与RTG-2同步混合培养,其敏感性比直接接种方法高2倍。

(2)血清学检查:常用组织培养中和试验,观察标准的抗血清是否能中和新分离的病毒。用型特异性抗血清与待检病毒进行中和试验,可鉴定分离毒株的血清型。此外,金黄色葡萄球菌协同凝集反应、补体结合反应、荧光抗体技术、酶标抗体技术等也已用于本病的快速诊断。

兔抗VR299血清致敏的SPA仅与VR299毒株起反应,与SP和Ab株无交叉反应现象。

用 SP 和 Ab 株抗血清致敏的 SPA 与 VR299 仅有弱的交叉反应。用病鱼内脏粗提液作为抗原, 协同凝集反应可在 90min 内得出诊断。

IPNV 抗体的检测缺乏实际意义, 这是因为耐过 IPNV 感染的虹鳟血清中的抗体可持续数年。同时, IPNV 带毒者不含或只含滴度很低的抗体。此外, 正常虹鳟血清中存在非特异抗病毒成分, 即使做 1:5 000 稀释仍可中和 IPNV 细胞适应毒, 故而难于判断抗体水平。

7. 防治 养殖场应采用独立的水体产卵和孵化鱼苗。为防止鱼卵污染, 受精卵可采用含碘仿的消毒剂或紫外线照射进行消毒。

用福尔马林灭活疫苗注射接种或使用通过鲑鱼制成的减毒疫苗做浸渍免疫, 接种鱼在 10~12℃ 水温时, 21~23d 后产生中和抗体, 并能抵抗自然感染。但不同亚型间无交叉免疫作用。

(二) 欧洲鳗鲡病毒

鳃肾炎病是人工养殖的日本鳗鲡冬季流行的一种疫病, 它的特征是鳃丝上皮细胞异常增生, 使其呈棍棒状, 肾小球和肾小管变性。1973 年, 从日本静冈县养殖的有鳃肾炎病的欧洲鳗鲡中, 此后又在同一地区的日本鳗鲡中都分离得一种病毒, 取名为欧洲鳗鲡病毒(Eel virus from europeanell, 简称 EVE)。

EVE 的形态、理化特性、细胞病变等与 IPNV 完全一致。病毒颗粒呈多面体, 在 RTG-2 细胞中的直径为 68~77nm。于 20℃, 3~4d 内产生细胞病变, 细胞病变以核浓缩、细胞呈细丝状为特征。本病毒对乙醚、乙醇、氯仿、甘油和 pH3~9 均稳定。

在血清学上, EVE 与 IPNV 的美国株 IR299、Buhl Idaho、Powder—Mill、New Hampshire 等不同, 但与法国分离的 d' Honninchtur 株非常相近, 与 Bonnamy 株也有一定程度相似性。

EVE 主要对幼鳗有致病性, 对虹鳟幼鱼无病原性。在 RTG-2 细胞中继代 3 次的病毒, 接种日本鳗鲡, 可引起其肾小管上皮细胞的变性、坏死, 不过鳃无异常。继代 6 次的病毒, 不能再引起鳗鲡发病。

(三) 鳊腹水症病毒

鳊腹水症病毒(Yellowtail ascites virus, YAV)是鳊幼鱼病毒性肝胰坏死病的病原。此病于 20 世纪 70 年代中期在日本的西部地区发现。1985 年, 反町原从发病的鳊中分离到该病毒。

1. 形态结构 在感染的细胞内, 病毒平面呈六角形, 无囊膜, 大小 62~69nm。核酸属 RNA。

2. 培养特性 本病毒可在 RTG-2、CHSE-214 和来自于日本鳗鲡的 EK-1 细胞以及 FHM 细胞中增殖, 产生与 IPNV 类似的细胞病变, 但不在 EPC 细胞中增殖。在 CHSE-214 和 EK-1 细胞中, 20~30℃ 培养 36h, 或 15℃ 培养 60h, 病毒的感染价达到最高。增殖温度范围为 15~30℃, 最适温度为 20℃。

3. 抵抗力对有机溶剂乙醚和氯仿不敏感。56℃ 30min 失活, 在 pH 为 3、7、11 时均稳定。

4. 抗原性 本病毒与传染性胰脏坏死病毒的 VR299 株、Ab 株、Sd 株有交叉中和反应。

5. 病原性 用病毒浸渍或腹腔注射都可感染鳊, 出现与自然发病相同的症状。鳊的易感性随体重增加而下降。以 $10^{6.6}$ TCID₅₀ / ml 的病毒浸渍感染 lg 左右的鳊幼鱼, 在 20~

50℃时，试验鱼于第3天开始发病，第4天出现腹水症状，第8天死亡率达到高峰。病理剖检可见肝脏出血以及肝脏和胰脏的坏死。

自然发病鱼一般在1g以下。发病季节为5~6月，水温在20℃左右。

6. 微生物学检查 用RTG-2等易感细胞做病毒分离，以中和试验鉴定分离病毒。

7. 防治 尚无有效的防治方法。

思考题

1. 与鱼病有关的疱疹病毒包括那几种？请分别简述其病原性。
2. 简述与鱼病有关的弹状病毒的病原性。
3. 引起水生动物疾病的病毒有哪些？其分类地位、形态特征和疾病情况如何？
4. 试述草鱼出血病的诊断与防治方法。
5. 列入我国出入境检疫的二类传染病有哪些？分别简述其病原性及诊断与防治方法。

第四章 其他病原微生物

此类病原体有立克次体、衣原体和霉形体等，它们主要引起虾、蟹和贝类疾病。由于缺乏系统和深入的研究，很多特性目前并不十分明了，仍需进一步探究。这类微生物大多是专性细胞内寄生，不能在人工培养基上培养，并广泛感染海洋生物，近年来已受到广泛关注。

一、立克次体及类立克次体

立克次体(*Rickettsia*)可以感染多种动物，引起立克次体病。在水产动物，立克次体是对虾和贝类常见的病原体。由于大多数立克次体不能在人工合成的培养基上生长，故对立克次体感染的诊断和归类带来一些困难。贝类中发现的立克次体由于目前尚未确定其具体分类地位，暂称之为类立克次体(*Rickettsia*-like organisms, RLO)。

类立克次体病是珍珠贝最严重的流行病，导致大珠母贝幼虫和幼苗突发性大批死亡，死亡率高达 97%。合浦母贝从幼贝至成贝以慢性方式发病，死亡率达 67%。RLO 病不是通过垂直传播感染的，而是通过外界接触感染的方式感染贝宿主，其中 RLO 的小细胞变异体在疾病传播中起重要作用。

(一)形态结构

RLO 革兰氏染色阴性，投射电子显微镜下为圆形，直径 300~500nm，两层膜包被，外膜不圆滑，内部可见颗粒状包含物。以出芽方式进行的增殖则形成电子密度较高的小球形个体。立克次体在培养细胞中以散在的和包涵体的方式存在，其形态较组织内的立克次体形态更为多样。在感染细胞质内可看到大量包涵体，包涵体的膜可能是细胞膜。包涵体一般个体较大，可达数十微米，在光镜下清晰可见。

现就国内外已报道记载的立克次体病原形态分述如下：

1. 感染对虾的立克次体 在组织切片中可见其寄生于细胞内，大小为 $0.2\sim 0.7\mu\text{m}\times 0.8\sim 1.6\mu\text{m}$ ，为杆状或逗点形，感染边缘对虾、墨吉对虾和蓝对虾的立克次体主要分布于肝胰腺上皮细胞的嗜性胞质内，在其薄壁泡内含有大量多形性立克次体。有包涵体位于胞质内，大小 $7\sim 46\mu\text{m}$ 。感染斑节对虾的立克次体的侵染靶细胞主要是固定吞噬细胞、结缔组织、触角腺和 Y 器官的细胞。

2. 感染大西洋深水扇贝的立克次体 在病贝鳃组织上皮和皱褶等处有细胞内嗜碱性包涵体，直径 $45\mu\text{m}$ ，被侵染细胞明显肿大，细胞核和挤向细胞周边位置。光镜检查包涵体内有革兰氏染色阴性的杆状结构，宿主对这些包涵体产生明显的细胞反应。这些微生物具有明显的真核生物特性：最外层为薄的细胞壁，核糖体颗粒组成电子密度高的外周组织，中央区电子密度稍低，有间体样结构；长径为 $1.9\sim 2.9\mu\text{m}$ ，横径为 $0.5\mu\text{m}$ ，呈稍弯曲的子杆状。

3. 感染海湾扇贝的立克次体 海湾扇贝肾组织切片 H-E 染色的光镜检查，有立克次体样生物(*Rickettsia*-like organisms, RLO)形成的包涵体，可见到其二分裂繁殖方式，RLO 在宿主细胞内占据了大部空间。RLO 因过度充盈而将宿主细胞胀破，而溢出到肾脏的腺管管腔内，呈圆形或椭圆形，在细胞外围有 3 圈 3 层膜包围，周边有高电子密度的核糖体颗粒组成的密集带包绕，中央可看到密度高的颗粒样类核。平均长 $0.5\mu\text{m}$ ($0.4\sim 0.7\mu\text{m}$)，直径为 $0.4\mu\text{m}$ ($0.3\sim 0.6\mu\text{m}$)，常见到二分裂期的细胞。

4. 感染美洲牡蛎的立克次体 在某些成年病牡蛎肠组织上皮细胞浆内有直径达

50 μm 、嗜碱性、由细颗粒组成的大包涵体，此现象也见于美洲牡蛎肠组织内的杯状细胞。有些牡蛎消化腺小管上皮细胞浆内发现直径为10 μm 的小型消化壶腹包涵体周围常有空晕形成，内含明显的杆状小体。脱石蜡的消化腺组织样品经树脂重新包埋的电镜样品中，可见包涵体内的立克次体样生物有3层外膜包围，其中最大的长1.19 μm ，直径0.4 μm 。采自切萨皮克湾的牡蛎消化壶腹内所见的包涵体直径可达100 μm 。

5. 感染大珠母贝的立克次体 组织切片检查，濒死大珠母贝的很多组织的上皮细胞和外套膜及肝胰腺结缔组织内，有嗜酸性的细胞浆内包涵体，重度感染的个体在肝胰腺小淋巴管的内皮细胞和结缔组织内有许多包涵体。不同组织的包涵体形状和大小有多样性：小圆形的包涵体多在上皮细胞内，大的多形态的多在结缔组织细胞内，包涵体内常有一些细小、圆形或椭圆形的嗜酸颗粒，包涵体染色革兰氏阴性，富尔根染色反应阳性，姬姆萨染色为红色。外套膜上皮细胞内的RLO平均大小为 $(0.968 \pm 0.602) \mu\text{m} \times (0.551 \pm 0.19) \mu\text{m}$ 。电镜下包涵体呈球形、椭圆形或杆状。每个RLO具有双层三层膜组成的细胞壁，最外层的膜较厚并呈波纹状，表面还有一层黏液，在内、外三层膜中间尚有电子透明区。RLO的中央为一低电子密度的类核区，常由颗粒或丝状结构组成，外周为个层由高电子密度颗粒组成的核糖体带。透射电镜下可明显看到RLO有两种细胞类型：一种是大细胞类型(large cell variants, LCVs)，另一种为小细胞类型(small cell variants, SCVs)。两者都有原核生物特征，但也有一些区别：SCVs通常为球形或椭球形，细胞浆电子密度很高，中央为电子密度低和狭窄的类核区；而LCVs比SCVs大，呈杆状或肾形，细胞浆电子密度很低，中央类核区疏松，电子密度也很低。两种细胞的繁殖方式也不相同：SCVs在宿主细胞浆内成空泡内以出芽方式繁殖，在细胞端部生成的子细胞，经收缩产生不相等的子细胞，在两细胞间产生横隔后，即形成子细胞，这种繁殖方式常在空泡内进行。LCVs则以二分裂方式进行繁殖，母细胞在中央部位收缩后，即形成两个相等的子细胞，这常在细胞浆内进行。宿主溶酶小体吞噬的RLO由一层三层膜包围，呈圆形或椭圆形，平均大小为 $1.882 \mu\text{m} \times (0.551 \pm 1.671 \mu\text{m})$ ，其中还含有一些类似细胞基质和肌素样(myolin-like)的物质。所含的RLO明显退变，如外膜松弛，胞浆稀疏。一般游离于宿主细胞内的RLO，其胞浆膜较在空泡内者完整。

6. 感染硬壳蛤的立克次体 这类生物在成年和幼年硬壳蛤体内出现的包涵体有4个类型。

(1)第一型包涵体：大都在冬季出现，位于鳃纤毛上皮的外侧，呈圆形或椭圆形，长轴为22~44 μm ，由细颗粒组成，存在于很多蛤鳃组织、外套膜和水管的上皮细胞内。在水管和鳃组织的立克次体样生物呈圆形、椭圆形和肾球形，并有3层外套膜和细胞浆内致密的颗粒，二分裂和出芽生殖，大小为 $2.8 \mu\text{m} \times 1.0 \mu\text{m}$ 。

(2)第二型包涵体：在蛤消化壶腹上皮细胞中查出，长达100 μm ，由嗜碱性的粗颗粒组成。内含立克次体等原核生物。

(3)第三型包涵体：是在冬季采集的两个硬壳蛤消化腺间质结缔组织细胞内发现的，细胞浆内的包涵体呈圆形、紫色，长达27 μm ，由立克次体等原核生物组成。

(4)第四型包涵体：是在春季采集的两个硬壳蛤肾脏的小管上皮细胞浆内发现的，呈圆形和不规则形状，长达23 μm ，粉红色，有明显的颗粒样结构，少数包涵体游离在肾脏管腔内。超微结构呈现立克次体样生物特征，大小和形态很不规则，有的被挤到细胞浆的突出部分，大小为 $1.36 \mu\text{m} \times 0.62 \mu\text{m}$ 。细胞浆内富含核糖体颗粒，排列致密，常有高电子密度

的细胞壁。细胞膜不易看到，这可能与该膜紧贴在高电子密度的细胞壁有关。包涵体内的此类生物由一疏松的纤细基质包绕。

7. 感染黑鲍的立克次体 病鲍的食道、胃、盲肠、消化壶腹和肠道的表面上皮细胞内都有游离的、颗粒状的嗜碱性包涵体。其中充满二分裂、圆形或椭圆形、嗜碱性的菌落。革兰氏染色阴性，电镜观察可发现这类病原体呈杆状、富含核糖体颗粒，无细胞核，外围有 3 层细胞壁，符合立克次体样生物的特征。平均长 $1.8\mu\text{m}$ ，直径 $0.265\mu\text{m}$ 。

8. 感染皱纹盘鲍的立克次体 在皱纹盘鲍的消化道、消化壶腹、鳃、外套膜和腹足的上皮组织固有层的细胞浆内有弥漫状包涵体，细胞明显肿大，胞浆内 RLO 均匀分布，颗粒大小和染色深浅不一，细胞核被挤向一边，细胞膜常被胀破，并散布在组织间隙内。透射电镜下该生物的特征为富尔根反应阳性，形成的菌落很不规则，多数成堆状散落在细胞残体或组织间隙内，偶尔可见完整大菌落被包围在细胞膜内。其中除各期发育阶段的 RLO 外，细胞器几乎全部消失。由于 RLO 发育和分裂期不同，其形态特征有差异，但基本形状为球形和短杆状，共同特征为：①专性细胞内寄生，大小一般为 $0.1\sim 0.6\mu\text{m}\times 0.4\sim 2\mu\text{m}$ 。②呈多形性，除球形外还可见到环形、钩环形、球拍形、哑铃形、棒槌形等。③有明显的细胞壁，有 3 层结构，内外两层为嗜钨酸层，电子密度很高。中间为疏钨酸层，电子密度较低。有的细胞壁不光滑，外被一层放射绒毛状荚膜。④二分裂方式繁殖，有的出芽繁殖。⑤细胞膜内面有密集的核糖体密集带。细胞中央有类核细丝或颗粒。

有人认为 RLO 有 4 种细胞类型：①原体，为体积最小、电子密度最高的球状小体，直径 $0.1\sim 0.25\mu\text{m}$ ，具感染力，能吸附和穿过宿主细胞进入细胞，这与宿主细胞外有立克次体受体或基质有关。②始体，直径 $0.4\sim 0.6\mu\text{m}$ ，是最大的球状体，电子密度较低，由原体发育而来，有贮藏物质和繁殖能力，属非感染型。③中间体，直径 $0.2\sim 0.3\mu\text{m}$ ，是原体向始体发育的过渡类型。④营养体，此期为多形性，以环形、球拍形、棒槌形、马蹄状为多见，这种多形性可能因宿主细胞的反应、不同营养条件、不同的感染周期、不同的繁殖方式所致。在立克次体集落内还常看到散在的圆形、电子密度很高的结晶体样构造，外周常有一层放射状的绒毛状物，电子密度较核心部分稍低，形似荚膜，没有细胞壁，其大小类似中间体，在二分裂后中间有丝状或带状物相连。这种复杂的类结晶构造，被认为由蛋白质组成，可能与代谢障碍有关。

9. 感染日本缢蛏和虾夷扇贝的主克次体 将缢蛏蛤鳃经 Davidson 波固定，进行组织学观察，某些缢蛏上皮细胞内有嗜碱性包涵体，长 $33\sim 55\mu\text{m}$ ，所含立克次体直径为 $0.4\sim 0.6\mu\text{m}$ ，最大长度 $2.4\mu\text{m}$ 。在虾夷扇贝的稚贝和成贝的鳃上皮细胞内有同样的嗜碱性包涵体。

(二) 培养特性

RLO 是一类无独立生活能量代谢系统、专性细胞内寄生的微生物。对虾的立克次体已在对虾淋巴器官培养细胞中繁殖成功。在培养 3d 后感染细胞内出现颗粒，并逐渐增多；培养 2 周左右，部分细胞脱落。电镜下观察，感染细胞中看见大量立克次体。以二分裂方式进行的增殖形成较大的个体，以出芽方式进行增殖的则形成电子密度较高的小球形个体，直径 0.1nm 。被立克次体感染的细胞表现为细胞膨大或变形，细胞器溶解。

(三) 致病性

立克次体的致病机制为：①直接损伤质膜；②直接干扰或破坏正常代谢；③对肝胰腺的广泛破坏；④由于供血障碍而引起营养和呼吸代谢障碍，或(和)由菌体释放的内毒素引起。立克次体感染细胞，造成培养细胞的病变及死亡，表明立克次体具有一定的感染能

力及致病性，可以导致细胞死亡。

国内外对于牡蛎、蛤、贻贝、扇贝、鲍鱼等贝类的感染已有很多报道。其中扇贝中已报道的有大西洋深水扇贝、大扇贝、虾夷扇贝、海湾扇贝、盖栉孔扇贝等。在大西洋深水扇贝、大扇贝和虾夷扇贝上发现 RLO 感染与扇贝死亡有一定的相关性，一般在水温较低时 RLO 感染较严重，扇贝死亡率较高。有关试验还证明 RLO 可使大西洋深水扇贝感染，但不能感染贻贝和海螂。在海洋无脊椎动物中 RLO 感染可导致海蟹的死亡，感染凡纳对虾可发生肝胰腺坏死病并导致死亡。但在海洋双壳贝类中，根据有关的研究结论，RLO 寄生是一较为普遍的现象，一般认为对宿主不形成严重损伤。到目前为止，尚未有确凿证据证明 RLO 感染可导致其大量死亡，相应的感染试验也证明 RLO 可导致宿主的感染，但病理变化不明显，不能明显引起宿主的死亡。对于我国海洋经济双壳贝类、皱纹盘鲍、大珠母贝、海湾扇贝、栉孔扇贝 RLO 感染的研究，国内已有不少报道。

此外，在患“颤抖病”的中华绒螯蟹病蟹鳃上皮细胞、肝胰腺组织细胞以及血淋巴细胞中存在大量的类立克次体，因此有人认为“颤抖病”的病原与立克次体有关。

(四)微生物学诊断

1. 形态学检查 将患病动物的组织器官用 Bouin 氏液和中性甲醛固定后，经系列乙醇脱水，石蜡包埋，切成 5 μ m 厚的组织片，用 Erlich 苏木精和伊红染色，光镜检查可看到组织细胞内的包涵体。如将组织做成电镜样品处理，经超薄切片和负染色，在电子显微镜下可直接观察患病动物组织细胞内有无立克次体样颗粒。

2. 细胞培养 从对虾分离培养立克次体的方法是：将对虾放于消毒海水(其中含有青霉素 1 000IU / ml，链霉素 1000 μ g / ml)中过夜，再用 70% 的酒精浸泡 20~30s，进一步消毒体表，在无菌条件下摘取淋巴器官，放入对虾培养基(MPS)。培养基内含有青霉素 200IU / ml，链霉素 200 μ g / ml。将组织剪碎成 1mm³ 左右的碎块，放入细胞培养瓶中，加入 MPS 生长培养基(含 20% 小牛血清)，在 21℃ 培养箱中培养。每 3~4 天换一次培养液，每天观察细胞生长状况。2 周后将培养瓶内贴壁生长的对虾淋巴组织细胞洗 3 次，用细胞刮刀将培养的细胞刮下，放入 4℃ 的 2.5% 戊二醛固定。用 2.5% 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次后再用 1% 锇酸溶液固定、梯度乙醇脱水，包埋后做成超薄切片，醋酸铀和柠檬酸铅双重染色，样品在透射电镜下观察有无立克次体样颗粒。有资料报道，在患立克次体病的贝类组织内还可分离到病毒、衣原体样颗粒，提示此 3 类微生物可并发感染，导致贝类病情加重，造成大量死亡。应用细胞培养方法，Fryer 等用大鳞大马哈鱼胚胎细胞系 CHSE-214 分离到鱼立克次体。在分离立克次体时应注意，最好不在培养液中加抗生素，因为立克次体可能对抗生素敏感，在取可疑组织剪碎后应直接接种培养细胞，以避免立克次体在匀浆过程中受损。用贝类培养细胞分离立克次体的方法尚无详细报道。

3. 其他方法 Gall 等(1992)将大扇贝鳃组织中的立克次体样生物纯化，制备了单克隆抗体可进行特异性诊断。Kellner-cousin 等(1993)对大扇贝的立克次体基因组 DNA 片进行了克隆及建立了特异性探针，同时还合成了 PCR(聚合酶链反应)引物，建立了一种快速、特异和敏感的诊断技术。

(五)防治

主要是加强饲养管理和环境调控。

二、衣原体

国内外均已报道扇贝可以感染衣原体(*Chlamydia*)，主要是描述病原形态、一般症状和流行情况，未对衣原体进行系统鉴定，故称之为衣原体样性物感染。

(一)病原形态

1. 感染海湾扇贝的衣原体样生物 将 H-E 染色的组织切片镜检，消化壶末端上皮细胞浆空泡中有蓝-紫色包涵体颗粒，大小不一，有时从突出的细胞浆内被挤压到细胞外的管腔中。石蜡包埋的组织块经脱蜡、树脂再包埋后，在电镜下可见到：①原生小体呈深蓝色，长为 280~670nm，平均 380nm，直径为 130~330nm，平均 190nm。典型形态为纺锤状，中央电子密度高的区域由核糖体样颗粒组成，并由一电子透明带将其和周边的 5 层膜结构隔开。②网状小体之间有大小不一的空泡。第一和第二扇贝消化壶腹上皮细胞内的小体，直径可达 3.5 μ m。常见到的二分裂细胞，外周有二圈三层膜包围，膜下有浓集的颗粒状物分布，细丝状结构分散在整个小体内。

2. 感染栉孔扇贝的衣原体样生物 栉孔扇贝消化壶腹组织的印片，经 Wright-Giemsa 染色，可看到深蓝色折光性很强的大颗粒。在腺上皮细胞浆内，颗粒少则几个，多的达 20~40 个。直径 1.2~3.5 μ m，有大小不一的空泡散布其间，细胞常肿大，细胞核被挤向周边，有时数个病变的细胞挤在一起或相互融合。没有破裂的病变上皮细胞内，上述深蓝色颗粒堆积明显的包涵体样结构，大小 20~80 μ m。多数情况下，这些深蓝色颗粒散布于细胞外，重度感染时，一个油镜视野内有数十至数百个颗粒。卢戈(Lugol)染色为棕黄色，马基维罗(Macchivello)染色为红色，细胞内的空泡不着色。

组织切片经 H-E 染色，可看到消化壶腹小管上皮细胞浆内有数个至数十个不等的棕黄色圆形颗粒，大小略有不同。包涵体样结构不如涂片中的明显。

电镜观察上皮细胞浆内有两种大小不同的颗粒。大颗粒呈球形，大小为 1.5~3.5 μ m，细胞壁由内外两层高电子密度的膜和中间一层低电子密度的结构组成；紧贴细胞壁下面的细胞膜不易看到，但膜的内面有一层高电子密度的颗粒样核糖体密集带；中央区为电子密度低的区域，有 DNA 组成的球形或丝状结构，该结构类似拟核，未见的真正的细胞核。另一种小颗粒直径为 0.15~0.3 μ m，多呈圆形或纺锤形，具高电子密度的细胞壁和细胞质，这些特征和原体一致。

(二)致病性

目前认为，单纯感染衣原体样生物的扇贝，常无明显症状，除体形较小、外套膜色素较多并向壳内收缩，肉柱(缩壳肌)小、出柱率低外，几乎无其它表现。而且仔贝一般可正常发育，亲贝的性腺发育和排卵不受明显影响。但在养殖条件较差时，出现严重感染的个体或合并感染弧菌或病毒等其他病原体的情况，可造成扇贝发病死亡，甚至绝产。病贝的早期症状为生长缓慢，甚至停止发育出现个别死亡。合并感染的病贝，外套膜萎缩，甚至脱落，闭壳肌松软、胶化，最后整个软体部分腐烂而脱离贝壳。

在美国和加拿大曾多次报道海湾扇贝有衣原体样生物感染。1992 年以来，我国的山东、辽宁沿海自然生长的和人工养殖的海湾扇贝和栉孔扇贝中普遍发现有衣原体样生物感染。同时从病贝的消化壶腹、消化道、鳃、套膜等器官内发现都存在球状病毒。当水温达 20℃ 以上时，衣原体大量繁殖，并可通过水体呈水体传播。

(三)实验室诊断

1. 涂片镜检 用扇贝消化壶腹印片，Wright-Giemsa 染色，在光镜下查找上皮细胞内外的衣原体样生物的网状体。

2. 切片观察 用病贝组织做成切片，H-E 染色，查找消化壶腹小管上皮细胞浆内的棕黄色、圆形网状体。

3. 电镜观察 将石蜡包埋的组织块经脱蜡、树脂包埋后做成超薄切片，电镜观察原生小体和网状体。

(四)防治

本病重在改善水体环境，防止其他病原体混合感染。目前尚无有效药物治疗。

思考题

1.RLO 能引起哪些水产动物发病?如何诊断?

2.衣原体能引起哪些水产动物发病?如何诊断?

第三篇 水产微生物学应用

第一章 微生物与水产品

在淡水和海水中，都有天然存在的多种微生物，生活在其中的水产品会带有这些微生物。水产品在捕获后和在随后的加工中会受到微生物污染，在一定的条件下会引起变质，只有注意控制才能保证水产品的质量。水体中有时含有能引起人致病的微生物，水产品可能受到污染。另外，水产品捕获后可能受到人和环境的污染而带有致病菌。由于水产品是多种腐败微生物和致病微生物生长的良好基质，所以受到污染的水产品能引起多种细菌性食物中毒。因此，微生物与水产品卫生有密切的关系。

第一节 水产品中的微生物

生活在水中的鱼贝类，在正常情况下其组织内部是无菌的。但是，由于鱼类的体表和鳃部直接与水接触，加之鱼体表面分泌有一层糖蛋白成分的黏质物，是细菌的一种良好培养基。因此，在与外界接触的皮肤黏膜、鳃、消化道等部位，经常定居着各种类型的微生物。其微生物群的组成，常因鱼类所生活的环境而异，其中有些微生物是常久定居的，有些微生物则是暂时性的。当鱼类死亡后，附着在鱼体上的微生物可迅速繁殖，从而引起水产品的腐败。了解捕获后水产品中的微生物及其变化，对于水产品的加工、保鲜与检验，具有十分重要的意义。

一、水产品中的微生物群

水产品中的微生物主要为水体中的微生物，以及在捕获、贮藏、加工过程中污染的微生物。水体中的微生物大部分为革兰氏阴性的无芽孢杆菌。

(一) 水产品附着的微生物

淡水鱼类附着的微生物主要为淡水中正常的细菌，包括假单胞菌(*Pseudomonas*)、节杆菌(*Arthrobacter*)、黏杆菌(*Citrobacter*)、噬胞菌(*Cytophaga*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)、摩氏杆菌(*Moraxella*)、气单胞菌(*Aeromonas*)、链球菌(*Streptococcus*)、克氏杆菌(*Klebsiella*)、产碱杆菌(*Alcaligenes*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)和小球菌(*Micrococcus*)等。肠道病毒(*Enteroviruses*)对污水处理的抵抗力较强，故在供水中有发现。

海水鱼类附着的微生物一部分是常年生活在海洋中的，一部分是随河水、污水等流入海洋的。在海洋中生活的微生物主要是细菌，常见的是一些具有活动能力的杆菌和各种弧菌，如假单胞菌属、弧菌属(*Vibrio*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、不动杆菌属、芽孢杆菌属以及无芽孢杆菌属的细菌。其中有些细菌能够发光，称为发光细菌(*Photogenic bacteria*)。

(二) 水产品中的微生物数量

活的鱼贝类其肌肉是无菌的，但与外界接触的表皮、鳃、眼球的表面、消化器官的内部等，在活体时就附着大量的细菌。水产品中细菌数量的变化，亦受捕获季节、水域环境等的影响。

(三) 水产品中的微生物群

鱼是冷血动物，所以鱼所带的菌群温度特征反映鱼生长区域的水温状况。在北方适宜温度的水中，鱼所带微生物的温度范围通常在-2~12℃之间，适冷菌与嗜冷菌占优势。

大多数适冷菌生长的适宜温度为 18℃。热带鱼很少带适冷菌，因此多数热带鱼在冰中保存的时间要长些。

深海鱼所带的细菌是可以耐海水高盐分的细菌。大多数的微生物在盐分为 2%~3% 时生长最适，但重要的微生物是广盐性的微生物，它们在一定范围的盐度内均可生长。例如鱼表面由于冰融化成水而使盐分降低时，广盐性的微生物仍能生存并继续生长。

海产鱼类在冰冻储存过程中，新鲜干净的冷冻介质十分重要，因为冷冻介质再利用会导致适冷菌的污染并加速新鲜鱼的腐败。对小鱼及近陆地的捕捞区，鱼在冷冻之前先取出内脏的方法并不常用。尽管新鲜鱼切口表面暴露存在快速腐败的危险，但去除内脏确实去除了主要的微生物污染源。由于渔网、鱼钩等对鱼造成伤害，鱼为了保护皮肤而呼吸加剧导致局部的腐败。后续加工过程例如切片、切碎等增大了单位产品的表面积，同样导致腐败速率的加快。

水产品从捕获到消费，要经历一个极为复杂的流通途径，要接触各种器材、设备和人员等，因而细菌污染的机会很多。捕获时附着在体表的细菌，在加工和流通过程中，其数量和种类都会发生一定的变化。新鲜鱼类、冷冻鱼类以及其他水产品的主要微生物群见表 1-1。

表 1-1 水产品的主要微生物群

水产品	主要微生物群	报告者
新鲜鱼类	假单胞菌 I 型、假单胞菌 II 型、假单胞菌 III 型、假单胞菌 III / IV-NH、假单胞菌 III / IV-H、弧菌、摩氏杆菌、不动杆菌、黄杆菌、噬纤维菌、微球菌、葡萄球菌、发光杆菌、节杆菌、弧菌、气单胞菌等	Shewan 和堀江选等
冷冻鱼类	摩氏杆菌、微球菌、葡萄球菌、不动杆菌、弧菌、假单胞菌 II 型等	奥积昌世等
牡蛎	弧菌，假单胞菌 III / IV-H 等	奥积昌世等
鳕鱼片	不动杆菌、假单胞菌 III 型、摩氏杆菌、微球菌、节杆菌、噬纤维菌、气单胞菌等	Mokhele 等
青鱼片	假单胞菌、Altermonas、不动杆菌、摩氏杆菌、噬纤维菌、屈挠杆菌等	Molin 等

二、水产品中的微生物污染

水产品的微生物污染，可分为渔获前的污染(原发性污染)和捕获后的污染(继发性污染)。

(一) 渔获前的污染

鲜活鱼贝类的肌肉、内脏以及体液本来应是无菌的，但皮肤、鳃等部位与淡水或海水直接接触，已沾染了许多水体中的微生物，特别是细菌。渔获前污染的微生物有引起腐败变质的细菌和真菌，如假单胞菌、五色杆菌、黄杆菌等，以及水霉属、绵霉属、丝囊霉属等；也有能引起人致病的细菌和病毒，如沙门氏菌、致病性弧菌以及甲型肝炎病毒、诺伏克病毒等。

(二) 捕获后的污染

主要是指从捕获后到销售过程所遭受的微生物污染。据 Shewan 的调查，鱼被捕获到

船上后，因渔船甲板通常每平方厘米带有 $10^5 \sim 10^6$ 的细菌，所以鱼体表的细菌数增加。分级分类后用干净的海水洗涤，细菌数会减少到洗涤前的 $1/10 \sim 1/3$ 。但之后冻结或加冰装入鱼舱时，鱼箱、鱼舱、碎冰中附着许多细菌，因而鱼的带菌数再次增加。运入销售市场或加工厂，受到人手、容器、市场环境或工厂环境等的污染。受到污染的微生物大部分为腐败微生物，以细菌为主，其次为霉菌和酵母，主要引起水产品的腐败变质。另外，还会污染能引起人食物中毒的细菌，如沙门氏菌、葡萄球菌、大肠杆菌等。

三、水产品的细菌腐败

水产品在微生物的作用下，其中的蛋白质、氨基酸以及其他含氮物质被分解为氨、三甲胺、吲哚、硫化氢、组胺等低级产物，使水产品产生具有腐败特征的臭味，这种过程就是细菌腐败。

(一)新鲜水产品的腐败

当鱼死后，细菌会从肾脏、鳃等循环系统和皮肤、黏膜、腹部等侵入鱼的肌肉，特别当鱼死后僵硬结束后，细菌繁殖迅速。细菌的繁殖可使水产品腐败，发生变质，并可能产生组胺等有毒物质。

鱼贝类的肉组织，比一般畜禽肉容易腐败，据 Schonberg 氏研究其原因是：①鱼贝类含水量多，含脂肪量比较少，正适合细菌繁殖要求。②鱼肉组织脆弱，细菌较易分解。③鱼死后，其肉很快便呈微碱性，正适合细菌繁殖。④鱼肉附着细菌机会多，尤其鳃及内脏所附着的细菌特别多。⑤鱼肉所附细菌大部分是中温细菌，在常温下生长很快。⑥鱼肉所含天然免疫素少。

新鲜鱼的腐败主要表现在鱼的体表、眼球、腮、腹部、肌肉的色泽、组织状态以及气味等方面。鱼体死后的细菌繁殖，从一开始就与死后的生化变化、僵硬以及解僵等同时进行。但是在死后僵硬期中，细菌繁殖处于初期阶段，分解产物增加不多。因为蛋白质中的氮源是大分子，不能透过微生物的细胞膜，因而不能直接被细菌所利用。当微生物从其周围得到低分子含氮化合物，将其作为营养源繁殖到某一程度时，即分泌出蛋白质酶分解蛋白质，这样就可以利用不断产生的低分子成分。另外，由于僵硬期鱼肉的 pH 下降，酸性条件不宜细菌生长繁殖，故对鱼体质量尚无明显影响。当鱼体进入解僵和自溶阶段，随着细菌繁殖数量的增多，各种腐败变质现象即逐步出现。

鱼体所带的腐败细菌主要是水中的细菌，多数为需氧性细菌，有假单胞菌属、无色杆菌属、黄色杆菌属、小球菌属等。鱼贝类的腐败微生物见表 1-2。这些细菌在鱼类生活状态时存在于鱼体表面的黏液、鱼鳃及消化道中。细菌侵入鱼体的途径主要为两条：①体表污染的细菌，温度适宜时在黏液中繁殖，使鱼体表面变得浑浊，并产生难闻的气味。细菌进一步侵入鱼的皮肤，使固着鱼鳞的结缔组织发生蛋白质分解，造成鱼鳞容易脱落。当细菌从体表黏液进入眼部组织时，眼角膜变得混浊，并使固定眼球的结缔组织分解，因而眼球陷入眼窝。鱼鳃在细菌酶的作用下，失去原有的鲜红色而变成褐色乃至灰色，并产生臭味。②腐败细菌在肠内繁殖，并穿过肠壁进入腹腔各脏器组织，在细菌酶的作用下，蛋白质发生分解并产生气体，使腹腔的压力升高，腹腔膨胀甚至破裂，部分鱼肠可能从肛门脱出。

腐败过程向组织深部的推移，是沿着鱼体内结缔组织和骨膜，不断波及新的组织，其结果使鱼体组织的蛋白质、氨基酸以及其它一些含氮物被分解为氨、三甲胺、吲哚、硫化氢、组胺等腐败产物。

表 1-2 鱼贝类的腐败微生物

鱼贝类	腐败微生物
淡水鱼类	假单胞菌、无色杆菌、黄杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌、八叠球菌、沙雷氏菌、梭菌、弧菌、摩氏杆菌、肠杆菌、变形杆菌、气单胞菌、短杆菌、产碱菌、乳杆菌、链球菌等
海水鱼类	假单胞菌、无色杆菌、黄杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌、八叠球菌、沙雷氏菌、梭菌、弧菌、肠杆菌等
贝壳类	黏球菌、红酵母、假丝酵母、球拟酵母、丝孢酵母、Pullutaria、Gaftkya 等，与海水鱼类的相似，并混有土壤细菌

当上述腐败产物积累到一定程度，鱼体即产生具有腐败特征的臭味而进入腐败阶段。与此同时，鱼体肌肉的 pH 升高，并趋向于碱性。当鱼肉腐败后，它就会完全失去食用价值，误食后还会引起食物中毒。例如鲈鱼、鲶鱼等中上层鱼类，死后在细菌的作用下，鱼肉汁液中的主要氨基酸——组氨酸迅速分解，生成组胺，超过一定量后如给人食用，容易发生荨麻疹。

由于鱼的种类不同，鱼体带有腐败特征的产物和数量也有明显差别。例如，三甲胺是海产鱼类腐败臭味的代表物质。因为海产鱼类大多含有氧化三甲胺，在腐败过程中被细菌的氧化三甲胺还原酶作用，还原生成三甲胺，同时还有一定数量的二甲胺和甲醛存在，它是海鱼腥臭味的主要成分；又如鲨鱼、鳐鱼等板鳃鱼类，不仅含有氧化三甲胺，还含有大量尿素，在腐败过程中被细菌的尿素酶作用分解成二氧化碳和氨，因而带有明显的氨臭味。

此外，多脂鱼类因含有大量高度不饱和脂肪酸，容易被空气中的氧氧化，生成过氧化物后进一步分解，其分解产物为低级醛、酮、酸等，使鱼体具有刺激性的酸败味和腥臭味。

(二)水产制品的腐败

1. 冷冻水产品的腐败 水产品冷冻(-25~-30℃)时，一般微生物均不能生长，不发生腐败。但是，在冷冻时，一些耐低温的腐败细菌并未死亡。当解冻后，又开始生长繁殖，引起水产品的腐败。冷冻鱼的腐败细菌，以假单胞菌Ⅲ / IV-H 型、摩氏杆菌以及假单胞菌 I 型和 II 型占优势。

残存于冷冻鱼肉上的细菌，由于冷冻的温度时间和冷冻状态不同，其中大部分发生死亡，特别是病原性细菌在冷冻时易发生死亡。冷冻温度与水产品的腐败具有密切关系。当在-5℃冷冻时，部分嗜冷菌仍可繁殖，在数月的繁殖后，仍可使水产品变成接近腐败的状态而不能食用。在-18℃冷冻时，最初细菌数减少，但经较长时间后仍可从这种状态的鱼中检出微球菌、假单胞菌、黄杆菌和无色杆菌等。但在外观上，鱼体不见异常变化。冷冻鱼的贮藏温度如在-20℃以下时，一般细菌均处于冻结状态，不发生腐败。表 1-3 所示为主要水产品在不同冷冻温度下的保藏期。

2. 水产干燥和腌熏制品的腐败 水产品经过干燥、腌制或熏制得到的制品的共同特点是降低制品中的水分活度而抑制微生物的生长而达到保藏的目的，但由于吸湿或盐度和水分还不能完全抑制微生物的生长，常出现腐败变质的现象。

干制品常因为发霉而变质，一般是由于干燥不够完全或者是干燥完全的干制品在贮藏过程中吸湿而引起的劣变现象。

咸鱼腌制时还不能抑制所有微生物的生长，因此会出现变质。出现腐败变质常有两种现象：①发红，盐渍鱼或盐干鱼的表面会产生红色的黏性物质，产红细菌主要有两种嗜盐

表 1-3 主要水产品在不同冷冻温度下的保藏期

种类	保藏期（月）		
	-18℃	-25℃	-30℃
多脂鱼	4	8	12
中脂鱼	8	18	24
少脂鱼	10	24	>24
蟹	6	12	15
虾	6	12	12
虾(真空包装)	12	15	18
蛤、牡蛎	4	10	12

菌：八叠球菌属(*Sarcina littoralis*)和假单胞菌属(*Pseudomonas salinaria*)。它们都分解蛋白质，而后者则主要使咸鱼产生令人讨厌的气味。②褐变，在盐渍鱼的表面产生褐色的斑点，使制品的品质下降，这是一种嗜盐性霉菌(*Sporendonema epizoum*)的孢子生长在鱼体表面，其网状根进入鱼肉内层。

3. 鱼糜制品的腐败 鱼糜制品是鱼肉擂溃，加入调味料，经煮熟、蒸熟或焙烤而成，例如鱼丸、鱼糕、鱼香肠等。鱼糜制品通过加热杀死了绝大多数的细菌，但还残存耐热的细菌，此外可能由于包装不良或贮存不当而遭受微生物污染，在贮存过程中出现变质现象。

鱼糜制品表面腐败形式，可根据腐败现象分为下列 3 类：

(1)最初在鱼糜制品表面生成透明黏稠性水珠样物质，外观像发汗一般，时间一长，渐渐扩大到全面，但不会发生臭味。应特别注意时，只有一点酸臭味道，初期时可用热水洗涤，仍可食用。其主要原因是由于附着在制品表面的链球菌、明串珠菌和微球菌等具有糖酵解作用的细菌生长繁殖所致。

(2)最初生成像牛油或果酱般点状不透明物，渐渐扩大。扩大后互相连接融合，会发生异臭，到点状物扩大到整个表面时，气味相当恶臭；是由于微球菌、沙雷氏菌、黄杆菌和气杆菌等蛋白质腐败分解菌的作用所致。

(3)表面长霉而不能食用，是霉菌引起的霉变，主要是青霉菌、曲霉菌和毛霉菌等霉菌的生长繁殖所致。

四、水产品中的微生物控制

水产品的腐败变质是由于其本身酶的作用、细菌的作用和以氧化为主的化学作用的综合作用结果。要保持水产品的状态和鲜度，就需抑制酶的活力和细菌的污染与繁殖，使自溶和腐败延缓发生。根据酶、细菌的特征和活动所需条件，有效的保质措施不外乎低温、低水分活性、低氧气含量、使用保鲜剂等方法。微生物引起的腐败既是水产品变质的主要原因，又可能引起食品安全问题，因此微生物的控制对于水产品质量甚为重要，常采用低温、低水分等方法。

(一)低温保鲜贮藏

研究表明，在冷却温度范围内腐败微生物的生长(r)遵循这样一个规律： $r=(1+0.1 \times t)^2$ ，t 为温度(℃)。这表示如果贮藏温度是 10℃，腐败细菌的生长是 0℃时的 4 倍($r=(1+0.1 \times 10)^2$ ， $r=4$)。降低水产品的温度能抑制微生物的生长、发育，还能抑制与变质有关的化学反应、与自溶有关的酶的作用。

1. 冷却保鲜 鱼类的冷却是将鱼体的温度降低到液汁的冰点。鱼类液汁的冰点依鱼的种类和组织液中盐类浓度而不同。在-0.5~-2℃的范围内，鱼体液汁的平均冰点可采用-1℃。冷有利于鱼体鲜度的保持，但不能长期保持全体固有的形状。

(1)碎冰冷却保鲜：碎冰保鲜法是运输途中或在批发、零售时应用最广泛的方法。此法是将冰轧成3~4cm³的方块，按照一层冰一层鱼、薄冰薄鱼的方法装入容器内，以达到短期保鲜贮存的目的。碎冰保鲜应注意将冰一次加足，要尽量与外界热源隔离；使用的天然冰或人造冰应符合国家卫生标准和有关要求；存放地点和容器要清洁干净，鱼体上脏物需清洗干净，腐败变质鱼要及时挑出来。

(2)冷海水冷却保鲜：冷海水保鲜是将刚捕上来的鱼浸渍在混有碎冰的冷海水(冻结点为-2~-3℃)，使鱼遇到冷却即死亡，以减少压挤鱼体的损伤。

另外还有冷空气冷却保鲜、微冻保鲜等冷却保鲜法，此类保鲜温度接近0℃，是短期保鲜使用的主要方法，该温度还不能完全抑制微生物的生长。冰鱼腐败主要是由适冷的革兰氏阴性杆菌引起，这些细菌也出现在肉类的腐败中，尤其是腐败桑瓦拉菌(*Shewanella putrefaciens*)及假单胞菌属。

2. 冻结保鲜 鱼类冻结保鲜是将鱼温从初温降低至中心温度为-15℃或更低温度的贮藏方法。冷却或微冻保鲜一般用于鲜鱼运输和加工、销售前的暂时贮藏，而冻结保鲜可延长贮藏期。冻结加工是目前最佳的保藏手段。

冻结保鲜一般有强制送风冻结、平板冻结和沉浸式冻结3种。

整条鱼的冻结工艺流程为：

新鲜原料鱼→挑选→清洗→理鱼→定量装盘→冻结→脱盘→包冰衣和包装→成品冻藏。在保质操作上关键要求是冻结时经预冷后的鱼体应进行快速冷冻(宜用-25℃以下低温)，这样可使鱼体内形成的冰晶小而均匀，组织内液汁流失就较少，亦利于冷空气进入鱼体中心。冻藏时在-15~-18℃的冷藏条件下，贮存期不应超过6~9个月。

(二)水分活度(Aw)

水产品中的水分对微生物的生长亦具有重要作用。微生物的生长繁殖与水分活度具有直接关系。所谓水分活度是指食品中游离水的比例，即水分活度=食品的水蒸气压力/纯水的水蒸气压力。水分活度越高，说明食品中所含游离水的比例越高，水分活度越低，食品中游离水越少。微生物的生长，一般有其最适水分活度范围。水分活度越低，微生物越不易生长；即使在可生长的水分活度范围内，其生长速度也随着水分活度的降低而减慢。

关于微生物的生长与水分活度的关系以及相应的食盐浓度见表1-4。新鲜水产品的水分活度为0.98或以上，腌制品或干品的水分活度在0.80~0.88之间。

表 1-4 各种微生物生长的最低水分活度与相应的食盐浓度

微生物种类	生长最低水分活度(Aw)	食盐溶液浓度(%)
大多数腐败细菌	0.90	13.0
大多数腐败酵母	0.88	16.2
大多数腐败霉菌	0.80	23.0
嗜盐细菌	0.75	饱和
耐干燥霉菌	0.65	
耐渗透压酵母	0.60	

腌熏水产制品在一定程度上能抑制细菌的发育，但不能完全抑制细菌的作用，有时也会发生腐败分解，腐败的细菌种类与新鲜鱼一样。产生腐败与食盐浓度、食盐种类、盐渍温度以及空气接触等因素有关。高盐、低温、低空气含量有利于产品保存。

干制加工属于脱水性加工，目的在于减少鱼体内所含的水分，使细菌得不到繁殖所必需的水分条件。常用的煮后晒干方法除具有脱水作用外，还能降低酶的活力，并使细菌处于体液外渗状态的不利环境。

(三) 氧浓度

水产品自身携带的微生物和污染的微生物大多数都是需氧的。水产品在贮藏过程中，最初出现的变化是由于细菌的生长，在制品表面出现发黏。但在制品的内部，由于氧浓度很低，细菌尚未繁殖。即制品表面和内部的细菌繁殖速度不一致，表面细菌的繁殖比内部快。这种差异主要是由于制品表面经常与空气接触，氧的供给充足，有利于需氧菌的快速增殖。而内部经常处于厌氧状态，需氧菌难以繁殖。

为了防止氧浸入制品的内部，应对制品进行包装，隔断制品与空气的接触，以防止制品内部氧浓度的上升，维持厌氧状态，阻止需氧性芽孢细菌的生长，从而提高水产制品的贮存性。

鱼类的气调是利用人为控制的不同气体混合物如 N_2 、 O_2 、 CO_2 、 CO 等作为介质，并在冷藏条件下做较长时间的贮藏。

第二节 微生物与水产品卫生

与水产品卫生有关的微生物，即可能引起致病的微生物，主要是一些能引起细菌性食物中毒的细菌和能致病的病毒。鱼类病原细菌和腐败细菌，通常不属于食物中毒性细菌。

水产品含有较多的水分和蛋白质，酶的活性强，极易腐败变质，且影响其安全性的因素复杂，因此水产制品引起的食物中毒事故屡有发生。据统计，我国 1985~1990 年的所有食物中毒事件中有 8.6% 是属水产制品中毒，自然毒素中由河豚毒素、麻痹性贝毒素引起的较多，细菌性食物中毒以鱼贝类的副溶血性弧菌引起的较多。在 1990~1996 年我国由副溶血性弧菌引起的食物中毒有 470 起，引起致病的有 16 720 人。

我国水产制品卫生应控制的病原微生物主要是肠道致病菌和副溶血性弧菌。

来源于水产品中的致病菌通常可分为两类：一类是自身原有的细菌，广泛分布于世界各地的水环境中，并受气温的影响。嗜冷菌如肉毒梭菌(*C. botulinum*)和李斯特菌(*Listeria*)常见于北极和较寒冷气候的地区；嗜热菌如霍乱弧菌(*V. cholerae*)和副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)，代表了部分滨海、港湾的环境或温热带水域中鱼体上细菌的自然种群。有些水产品食品原料也可能被更多种病原体感染，但因污染水平低，生鲜水产品中含有的病原体数量不可能引发疾病。然而其生长作用可使生产的加工食品中浓度很高，造成引起疾病的风险。

另一组致病菌是水产品非自身原有细菌。例如沙门氏菌属(*Salmonella*)，这类嗜温菌可生活在被人或动物粪便污染的环境中。Rhodes 和 Kator(1988)已证实，大肠杆菌(*E. coli*)和沙门氏菌属在港湾环境里可繁殖和存活数周。此外还有志贺氏菌(*Shigella*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等(表 1-5)。

表 1-5 来源于水产品中的致病菌

		作用方式		毒素的热稳定性	最小感染剂量
		感染性	毒素前体		
自身原有细菌	肉毒梭菌(<i>Clostridium botulinum</i>)		+	低	—
	弧菌(<i>Vibrio</i> sp.)	+			高
	霍乱弧菌(<i>V. cholerae</i>)				—
	副溶血弧菌(<i>V. parahaemolyticus</i>)				(>10 ⁶ /g)
	其他弧菌 ^①				—
	嗜水气单胞菌(<i>Aeromonas hydrophila</i>)	+			未知
	类志贺邻单胞菌(<i>plesiomonas higeloides</i>)	+			未知
非自身原有细菌	单核细胞增生李斯特氏菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)	+			未知/可变
	沙门氏菌属(<i>Salmonella</i>)	+			从<10 ² 到>10 ⁶
	志贺氏菌(<i>Shigella</i>)	+			
	大肠杆菌(<i>E. coli</i>)	+			10~10 ³
	金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)		+		

注：①其他弧菌包括：创伤弧菌(*V. vulnificus*)、霍利斯弧菌(*V. hollise*)、佛思西弧菌(*V. furnsii*)、小弧菌(*V. mimicus*)、河弧菌(*V. fluvialis*)。

一、弧 菌

食品中致病弧菌包括副溶血弧菌、河弧菌、霍乱弧菌和副霍乱弧菌。

(一)副溶血弧菌

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)引起的食物中毒，最近 30 年来才被发现和重视。它是沿海地区夏季常见的食物中毒病原菌之一。

1. 生物学特性 副溶血弧菌常呈弧状、杆状、丝状等多种形状，有鞭毛、运动活泼，革兰氏染色阴性。副溶血弧菌需氧，营养要求不高。最适培养温度为 30~37℃，最适 pH 为 7.7~8.0。在肉汤蛋白胨液体培养基中呈现混浊，表面形成菌膜。在固体培养基上的菌落通常隆起、圆形、表面光滑、湿润。

副溶血弧菌是一种嗜盐弧菌。在无盐的蛋白胨水中生长不良，但在含 3%~3.5% 的食

盐培养基内，生长良好。由于它嗜盐，故又称之为致病性嗜盐菌。副溶血弧菌不耐热，加热 75℃5min 或 90℃1min，即可被杀死。对醋酸敏感，1%醋酸处理 1min 即可杀死该菌。

副溶血弧菌具有 3 种抗原：O 抗原(菌体抗原)，即耐热抗原；H 抗原(鞭毛抗原)，即不耐热抗原；K 抗原(荚膜抗原)。不耐热抗原在 100℃加热后，则失掉抗原性；耐热抗原经 100℃加热后仍保持抗原性；“K”抗原只在活菌中存在。目前已知有 12 个菌体的“O”抗原群和 57 个“K”抗原型。

2. 食品中副溶血弧菌的来源

(1)近海海水及海底沉积物中副溶血弧菌对海产食品及海域附近塘、河、井水的污染，除使海产食品副溶血弧菌带菌率较高之外，该区域淡水鱼、虾贝等也可受到副溶血弧菌的污染。

(2)人群带菌者对各种食品的污染。沿海地区饮食从业人员、健康人群及渔民副溶血弧菌带菌率为 0~11.7%，肠道病史者带菌可达 31.6%~34.8%。带菌人群可污染各类食品。

(3)生熟食品交叉污染。食品容器、砧板、切菜刀等处理食物的工具生熟不分时，生食物中的副溶血弧菌可通过上述工具污染熟食物或凉拌菜。引起副溶血弧菌中毒的食物，主要是海产食品和盐渍食品，如海产鱼、虾、蟹、贝、肉、禽、蛋类以及咸菜或凉拌菜等。

副溶血弧菌食物中毒在很多国家都有发生，如日本及我国沿海喜食海产品地区发病率较高。据调查，我国沿海水域、海产品中副溶血弧菌检出率较高，尤其是气温较高的夏秋季节。因此，沿海地区是我国副溶血弧菌食物中毒的多发地区。夏秋季节，尤其是 7~9 月常是副溶血弧菌食物中毒的高发季节。

(二)河弧菌

河弧菌(*Vibrio vulnificus*)在海水环境中广泛存在。它最初是从牡蛎和蚌中被分离到，后来从浮游生物、动物、沉淀物中也分离到。

河弧菌为革兰氏阴性短杆菌，兼性好氧，最适生长温度为 37℃，若低于 5℃或者高于 43℃均不生长，为嗜盐菌。在质量百分数为 6%的食盐的营养肉汤中生长良好，在无盐或高于 10%的食盐的营养肉汤中不生长。河弧菌对热敏感，因此海味食品只要合理烹调，能够将其杀死。

河弧菌是一种重要的病原菌。它能引起两种临床特征的疾病：①爆发性的败血症，其发病原因是由于食用不卫生的海味食品，尤其是生牡蛎而引起。感染的途径是胃肠道。如果患有肝病的人再受到河弧菌的感染，常会引起死亡。②迅速发展的蜂窝组织炎，它起因于伤口与海水的接触，例如在清洗贝类或捕捞牡蛎、蟹时受到河弧菌的感染。

河弧菌引起的食物中毒是 20 世纪 90 年代发现的重要疾病，多发生在 6~10 月。引起河弧菌食物中毒的食品主要是海产品，如鱼、虾、蟹、牡蛎、蛤、蚶、螺等，其次是被海产品或工器具污染的熟食品。近海鱼的带菌率为 1.5%~30%。

食品被污染和中毒发生的原因是食生鱼或海产品加热处理不彻底，未能杀死病菌，或熟海产品又被病菌重复污染，河弧菌大量繁殖，食后引起食物中毒。肉类熟食品受到海产品的污染，或在加工过程中，处理和盛装海产品的工具和容器受到河弧菌污染，未能彻底洗刷消毒，又处理和盛装熟食品而受到交叉感染，均能引起河弧菌食物中毒。

(三)霍乱弧菌和副霍乱弧菌

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)或副霍乱弧菌(*Vibrio cholerae* biotype *eltor*)形状为弧形或逗点状，菌体一端有鞭毛 1 根，运动活泼，无芽孢，为革兰氏阴性菌。其抵抗力较弱，在干燥

情况下,经 2h 即死亡;在 55℃的湿热中,经 10min 即死亡;在水中能存活 2 周,寒冷潮湿环境下的新鲜水果和蔬菜的表面,可以生存 4~7d;对酸很敏感,但能耐受碱性环境,例如能在 pH 为 9.4 的环境中生长不受影响,容易被一般消毒剂杀死。

霍乱和副霍乱传染源主要是病人,其次是带菌者。患病期间的霍乱弧菌随同粪便及呕吐物排出。霍乱的带菌现象有几种,如有潜伏期带菌、恢复期带菌和健康期带菌,虽然这些带菌者排菌量不多,但常造成病菌在某一地区的传播而发生大流行。霍乱和副霍乱病菌传播的途径甚多,也和其他肠道传染病一样,病菌通过水、苍蝇、食品等传播开来,特别是水被污染后造成流行是本病暴发的特征。

二、沙门氏菌

沙门氏菌属(*Salmonella*)属肠杆菌科,为具有鞭毛、能运动的革兰氏阴性杆菌。目前至少有 67 种 O 抗原和 2000 个以上的血清型。我国现已发现有 26 群,161 个血清型。按菌体 O 抗原结构的差异,将沙门氏菌分为 A、B、C、D、E、F、G 7 大组,对人类致病的沙门氏菌 99%属 A 至 E 组。在许多国家,沙门氏菌食物中毒多由鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌和肠炎沙门氏菌引起。沙门氏菌不产生外毒素,主要是食入活菌而引起的食物中毒。食入活菌的数量越多,发生中毒的机会就越大。目前认为沙门氏菌的所有血清型对人都是有害的,因此动物饲料中也不允许含有沙门氏菌。

(一)沙门氏菌属的生物学特性

1. 沙门氏菌属的类群 沙门氏菌属的类群按其传染范围分为 3 个群。

(1) 对哺乳动物及鸟类有致病性,并能引起人类食物中毒。从中毒病人排泄物中分离到的菌种有鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)、猪霍乱沙门氏菌(*S. choleraesuis*)、肠类沙门氏菌(*S. enteritidis*)、德波沙门氏菌(*S. derby*)、纽波特沙门氏菌(*S. newport*)、汤卜逊沙门氏菌(*S. thompson*)、鸭沙门氏菌(*S. anatis*)等菌型,这一类群称为食物中毒菌群。

(2) 专门引起人类发病的,有伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、甲型副伤寒沙门氏菌(*S. paratyphi-A*)、乙型副伤寒沙门氏菌(*S. paratyphi-B*)、丙型副伤寒沙门氏菌(*S. paratyphi-C*)。其中以伤寒沙门氏菌和乙型副伤寒沙门氏菌引起人类的肠热症最为常见,这一类群称为肠热症菌群。

(3) 仅能对动物发病,很少传染于人,但能引起人类致病的菌群也有发现,例如鸡伤寒沙门氏菌和雏白痢沙门氏菌,有时会引起人类发生胃肠炎。

2. 沙门氏菌属的生物学特性 沙门氏菌属生长温度范围为 5~46℃,生长繁殖的最适温度为 20~37℃,人体中(35~37℃)每 25min 繁殖一代。能在水分活度为 0.945~0.999 的环境中生长,pH<4 则不生长,在水中可生存 2~3 周,在粪便和冰水中生存 1~2 个月,在冰冻土壤中可过冬,在含食盐 12%~19%的咸肉中可存活 75d。沙门氏菌属在 100℃时立即死亡,70℃经 5min 或 65℃经 15~20min、60℃经 1h 方可被杀死。水经氯化物处理 5min 可杀死其中的沙门氏菌。

此外,沙门氏菌属不分解蛋白质,不产生鞣基质,食物污染后并无感官性状的变化,应给予注意。现已证实肠炎沙门氏菌在适合的条件下可在牛奶或肉类中产生达到危险水平的肠毒素。该毒素为蛋白质,在 50~70℃时可耐受 8h,不被胰蛋白酶和其他水解酶所破坏,并对酸碱有抵抗力。上述特性在沙门氏菌属引起食物中毒的机理中有重要意义。

(二)食品中沙门氏菌的来源

沙门氏菌属广泛分布于自然界中,在人和动物中有广泛的宿主,如猪、牛、马、羊、

猫、犬、鸡、鸭、鹅等。健康家畜、家禽肠道沙门氏菌检出率为2%~15%，病猪肠道沙门氏菌检出率可高达70%。正常人粪便中沙门氏菌检出率为0.02%~0.2%。因此，食物受到沙门氏菌污染的机会很多，易受污染的食物种类也很多。引起沙门氏菌食物中毒的食品主要是动物性食品，包括肉类、鱼虾、家禽、蛋类和奶类制品。豆制品和糕点等有时也会引起沙门氏菌属食物中毒。沙门氏菌属食物中毒全年皆可发生，但多见于夏、秋两季，即5~10月。该两季发病次数和发病人数可达全年发病总次数和总人数的80%。

沙门氏菌来源主要是来自患病的人、动物以及人和动物的带菌者。家畜肉中的沙门氏菌来源于生前感染和宰后感染。家畜在屠宰前已经感染沙门氏菌，称为生前感染。一般情况下，肠道带菌率较高，但当动物患病或疲劳时，抵抗力降低，肠道中沙门氏菌即可经肠系膜淋巴结和淋巴组织进入血液、肌肉和各个内脏。宰后污染是指家畜被屠宰后，肉被带菌的粪便、容器或污水等污染。

家禽和蛋类也容易感染沙门氏菌。鸭、鹅及其蛋类比鸡的带菌率高。健康鸡的粪便带菌率较低，约为2.3%，而健康鸭的粪便带菌率可高达10%。

水产品有时也带有沙门氏菌，这主要是由于被水源所污染。带菌牛产的奶有时也含有沙门氏菌。

患者或带菌者是重要的传染源。在牧场，通过饲料和饮水，沙门氏菌在牲畜之间进行传播；沙门氏菌可通过人的手、苍蝇、鼠类等作为媒介，接触食品而进行扩散。污染有沙门氏菌的食品在未煮熟、煮透前就食用，细菌会随同食物进入消化道，在小肠和结肠中繁殖，引起食物中毒。

三、葡萄球菌

食品中的致病葡萄球菌主要是金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)。

(一)葡萄球菌的生物学特性

葡萄球菌属(*Staphylococcus*)中的金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)致病力最强，常引起食物中毒。金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性球菌，直径为0.8~1.0μm，呈葡萄状，无芽孢、鞭毛。需氧和兼性厌氧菌，生长温度在6.5~46℃之间，最适温度为30~37℃，产毒素最适温度为21~37℃，能在冰冻环境下生存。能在质量分数为15%NaCl和40%胆汁中生长。在普通肉汤固体培养基上能形成光滑、低凸、闪光、边缘整齐的菌落，菌落色素不稳定，但多数为金黄色。金黄色葡萄球菌对热抵抗力较一般无芽孢细胞强，加热80℃经30min才能被杀死。

金黄色葡萄球菌在20~37℃及适宜的pH和合适的食品条件下能产生肠毒素，吃了这样的食品就会发生食物中毒。如食品被金黄色葡萄球菌污染后，在25~30℃下放置5~10h，就能产生足以引起中毒的肠毒素。在水分、蛋白质和淀粉含量较多的食品中，极易产生较多的毒素。根据其血清学特征的不同，目前已发现肠毒素有A、B、C、D和E 5个类型。A型的毒力最强，摄入1μg即能引起中毒。所有的肠毒素都是由单个无分支的多肽链所组成，含有比较多的赖氨酸、酪氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸，相对分子质量为30 000~35 000，属可溶性蛋白质，耐热，并且不受胰蛋白酶的影响。B型肠毒素，在99℃条件下，经87min才能破坏其毒性。

(二)食品中葡萄球菌的来源

葡萄球菌广泛分布于自然界中，如空气、土壤和水中均有存在，是最常见的化脓性球

菌之一，食品受其污染的机会很多。健康人的鼻腔、咽喉和肠道内的葡萄球菌带菌率约为20%~30%。患乳腺炎的牛所产的奶和有化脓症状的牲畜肉尸常带有致病性金黄色葡萄球菌。北京市卫生防疫站、中国医学科学院卫生研究所曾对牛奶、乳腺炎奶、食品从业人员的葡萄球菌带菌情况进行了初步调查，结果表明在1217件检样中检出298件，检出率为24.5%，其中以生牛奶为最高，占76.3%。

引起葡萄球菌食物中毒的食品主要是肉、奶、蛋、鱼类及其制品等各种动物性食品。另外，凉粉、剩饭和米酒等也曾引起过食物中毒。

金黄色葡萄球菌可通过化脓性炎症的病人或带菌者在接触食品后使食品污染。食品在制造、运输、销售、食用过程中，如不注意卫生操作和管理，也易污染金黄色葡萄球菌。

食物被葡萄球菌污染产生肠毒素与下列因素有关：①食物受葡萄球菌污染的程度。食物中葡萄球菌污染越严重，繁殖越快，越易形成毒素。②食物存放的温度及环境。例如在38℃以下，温度越高，产生肠毒素需要的时间越短，如薯类和谷类食品中污染的葡萄球菌在20~37℃下经4~8h产生毒素，而在5~6℃的温度下经18d方可产生毒素(表1-6)。此外，因葡萄球菌为兼性厌氧菌，当通风不良使氧分压降低时，肠毒素易于形成(如污染葡萄球菌的剩饭在通风不良的条件下存放，极易形成毒素)。③食品的种类及性状。一般而言，含蛋白质丰富，含水分较多，同时含有一定淀粉的食物(如奶油糕点、冰淇淋、冰棒、剩饭、凉糕等)或含油脂较多的食物(如油炸鱼罐头、油煎荷包蛋)受葡萄球菌污染后易形成毒素。需要强调的是淀粉可促进肠毒素的形成，尤其应予以注意。如带葡萄球菌的生肉馅在37℃下经18~19h产生肠毒素，而在肉馅中加入馒头碎屑时，在同样温度下只需8h就能产生毒素(表1-6)。值得注意的是，食品污染葡萄球菌后外观正常，感官性状无变化。

表 1-6 葡萄球菌在不同温度下产生肠毒素所需时间
(朱佳珍等，1992)

食品名称	5~6℃	19~20℃	36~37℃
新鲜马铃薯羹	18d	5h	4h
碎麦粥、小米粥	18d	8h	4h
牛奶	18d 未产生	8h	5h
生肉馅	—	—	18~19h
生肉馅+馒头屑	—	—	8h

四、致病性大肠杆菌

(一)大肠杆菌的生物学特性

大肠杆菌是革兰氏阴性短杆菌，大小为1.1~1.5μm×2.0~6.0μm；无芽孢，微荚膜；周生鞭毛；需氧或兼性厌氧，最适生长温度为37℃。在液体培养基中，混浊生长，形成荚膜，管底有黏性沉淀。在肉汤固体平板上，形成凸起、光滑、湿润、乳白色和边缘整齐的菌落，带有特殊的粪臭味。在伊红美蓝平板上，因发酵乳糖而形成带有金属光泽的紫黑色菌落。大肠杆菌抗原构造较为复杂，主要由菌体(O)抗原、鞭毛(H)抗原和荚膜(K)抗原3部分组成。

我国食品卫生标准中以大肠菌群作为食品的一般卫生指标，反映食品受污染(粪便等)状况。埃希氏菌属(*Escherichia*)，常称大肠杆菌属，包括普通大肠杆菌、类大肠杆菌和致

病性大肠杆菌等。一般情况下，它是肠道中的正常菌群，不产生致病作用。致病性大肠杆菌有产毒素大肠杆菌(ETEC)、肠道致病性大肠杆菌(EPEC)、肠道侵袭性大肠杆菌(EIEC)、肠道出血性大肠杆菌(EHEC)和肠道聚集性大肠杆菌(EaggEC)。引起食物中毒的致病性大肠杆菌免疫血清型有 O111:B4, O55:B5, O26:B6, O124:B17 等。

大肠杆菌 157 全称 O157:H7 出血性大肠杆菌，属埃希氏菌属的一种血清型。O157 一直被看作非致病菌，而且由于较罕见，未被医学界重视。直到 1982 年，美国首次从汉堡包集体食物中毒事件发现由 O157 所致。此后，英国、加拿大、澳大利亚等国相继发现它的危害。自 1982 年美国发现 26 例 O157 患者后，平均每年有 2 万人发病，250~500 人死亡。日本在 1991~1994 年期间，每年约发现 100 例 O157 感染者，其中 13 岁以下儿童占 83%；除幼儿园、学校出现集体性发病外，还发现有家庭的零星发病。1996 年日本发生的 O157 流行，涉及 44 个地区，病人逾万例，死亡 12 人。其流行特点，多呈食物型暴发，也有水型暴发。一般是在某地区先出现分散病例，继而小范围内暴发，然后呈大规模流行。O157 不耐热，75℃时 1min 即被杀死，但它却耐低温。据报道，在家庭的冰霜中也能生存。另外，O157 耐酸，即使在 pH 为 3.5 的条件下也能存活，它在水中生存的时间相当长。O157 主要通过食物，经口感染。摄入被 O157 污染的食物或被患者的粪便污染后直接或间接入口，是唯一的感染途径。大约 100 个细菌即可导致感染，这是迄今为止能引起食物中毒的最小菌量。

(二) 食品中致病性大肠杆菌的来源

致病性大肠杆菌存在于人和动物的肠道中。健康成人和儿童的带菌率为 2%~8%，腹泻病人带菌率可高达 19.5%；猪、牛和羊的带菌率一般在 10%以上；土壤、水源受粪便污染时，也带有该菌。

致病性大肠杆菌在室温下能生存数周，在土壤或水中可生存数月。致病性大肠杆菌可经带菌人的手、食物和生活用品进行传播。该菌也可经空气或水源传播。带菌食品由于加热不彻底或因生熟交叉污染或熟后污染而引起食物中毒。

O157 大肠杆菌可存在于人、牛、羊、猪等的肠内，每克粪便中即含数亿个。它也存在土壤和污水中，一旦污染了食品，而该食品又未烧熟煮透，就可能引起发病。因为人群对 O157 普遍易感染，儿童和老人更易受害，所以其感染发病率高达 50%。

五、肉毒梭菌

肉毒梭菌引起食物中毒是由其产生的外毒素即肉毒毒素引起的。肉毒毒素是一种强烈神经毒素。肉毒梭菌食物中毒不仅是由于食入肉毒毒素污染的食物引起的，而且随同食物摄入的芽孢(或繁殖细胞)在肠道内发芽、繁殖产生毒素亦可引起中毒。

(一) 肉毒梭菌的生物学特性

肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)属于厌氧性的梭状芽孢杆菌属，革兰氏染色阳性。形成芽孢，由于芽孢比营养体宽，故呈梭状。无荚膜，但有鞭毛。

肉毒梭菌属中温菌，生长最适温度为 25~37℃，产毒最适温度为 20~35℃，最适 pH 为 6.0~8.2。当 pH 低于 4.5 或大于 9.0 时，或环境温度低于 15℃或高于 55℃时，肉毒梭菌芽孢不能繁殖，也不产生毒素。各型肉毒梭菌芽孢对热抵抗力有一定差异，但一般而言，对热抵抗力较强，干热 180℃5~15min，或湿热 100℃3h，或高压蒸汽 121℃10min 才能将其杀死。肉毒梭菌是引起食物中毒病原菌中热抵抗力最强的菌种之一，所以罐头杀菌效果如何，一般以该菌作为指示细菌。在厌氧条件下，含水分较多的中性或弱碱性食品适于肉

毒梭菌生长和产生毒素。反之，食物的性质偏酸，水分含量少或食盐质量分数在 8% 以上，可抑制该菌的生长和毒素的形成。

研究表明，肉毒毒素是目前已知化学毒物与生物毒素中毒性最强烈的一种，其对人的致病量为 10^{-9}mg/kg 。肉毒毒素是一种大分子蛋白质，对消化酶、酸和低温很稳定，易受碱和热破坏而失去毒性。根据所产生毒素的抗原性不同，将肉毒毒素分为 A、B、C_α、C_β、D、E、F、G 型，引起人类中毒的有 A、B、E、F 型，其中 A、B 型最为常见。

(二) 食品中肉毒梭菌的来源

肉毒梭菌是一种腐物寄生菌。在自然界广泛分布于土壤、江河湖海淤泥沉积物、尘土及动物粪便中。粮谷、豆类等食品受其污染的机会很多。A 型菌多分布于山区和未开垦的荒地，B 型多分布于草原区耕地；E 型多分布于土壤、湖海淤泥和鱼类肠道中；F 型多分布于欧、亚、美洲海洋沿岸及鱼体。

我国肉毒毒素中毒多发地区——新疆，土壤中该菌检出率为 22.2%，未垦荒地该菌检出率为 28.5%，该地区粮谷、豆类及其发酵制品并有厌氧条件者该菌检出率分别为 12.6% 和 14.88%。该地区菌型分布以 A 型占多数，B 型及 A、B 混合型次之，E 型较少。

肉毒梭菌在食品中生长适宜条件为：pH>4.6，水分活度 ≥ 0.9 ，低盐，缺氧时不冷藏放置一段时间。在食品加工中已采用物理、化学处理以杀死或控制微生物的生长繁殖。另外，由于肉毒毒素不耐热，因而食品中如有毒素存在，加热可使毒素破坏，一般在 80℃ 下加热 30~60min 或使食品内部温度达到 100℃ 并持续 10min 即可破坏肉毒毒素。

我国发生的肉毒梭菌食物中毒，91.48% 由植物性食品所引起，8.52% 由动物性食品所引起。引起中毒的食品以家庭自制的豆酱、臭豆腐为最多，其次为面酱和豆豉等。此外，肉类罐头、腊肉、熟肉等也可引起中毒。肉毒梭菌食物中毒一年四季均可发生，但大部分发生在 3~5 月，其次为 1~2 月。自 1896 年 Van Ermengem 首次报道荷兰因火腿引起肉毒毒素中毒，并分离出肉毒梭菌以来，世界各地陆续报道本病。我国吴朝仁等人 1958 年报道新疆察布查尔县由于食用面酱半成品引起肉毒毒素中毒后，相继又报道了该地区由臭豆腐及其他发酵食品等引起的肉毒毒素中毒事件。

食物中肉毒梭菌主要来源于带菌土壤、尘埃及粪便。尤其是带菌土壤可污染各类食品原料。受肉毒梭菌芽孢污染的食品原料在家庭自制发酵食品、罐头食品或其它加工食品时，加热的温度及压力均不能杀死肉毒梭菌的芽孢。此外，食品在较高温度、密闭环境(厌氧条件)中发酵或装罐，提供了肉毒梭菌芽孢成为繁殖体并产生毒素的条件。食品制成后，一般不经加热而食用，其毒素随食物进入人体，引起中毒的发生。

六、产气荚膜梭菌

产气荚膜梭菌(*Cl. perfringenes*)在自然界分布很广泛，空气、灰尘、土壤、垃圾和污水中都有存在，人和动物的肠道中也经常出现。

(一) 产气荚膜梭菌的生物学特性

产气荚膜梭菌是一种能产生芽孢的革兰氏阳性杆菌，菌体较大，无鞭毛，专性厌氧。生长温度在 10~50℃ 之间，最适宜的生长温度为 43~47℃。生长 pH 范围为 5.5~8.0。繁殖速度快，在营养丰富的培养基上 8~10min 可繁殖一代，是目前已知生长速度最快的细菌。产气荚膜梭菌营养要求严格，生长时需要 14 种氨基酸和 5 种维生素。当在质量分数为 5% 的食盐基质中，生长受到抑制。该菌是气性坏疽的主要病原菌。

根据其产生外毒素的种类不同，将其分为 A、B、C、D、E 5 种类型。A、C 型可对人

类致病，其中 A 型最为常见，引起人类气性坏疽和食物中毒。C 型可导致坏死性肠炎。

引起食物中毒的 A 型产气荚膜梭菌多为耐热的厌氧菌株，100℃下能抵抗 1~4h。在人工培养基上极少形成芽孢，而碱性或缺少可发酵糖类的环境则利于芽孢的生成。因此，A 型产气荚膜梭菌可在小肠内形成芽孢，芽孢形成的同时产生肠毒素。

(二) 食品中产气荚膜梭菌的来源

引起食物中毒的耐热性的 A 型产气荚膜梭菌广泛存在于人和动物粪便、土壤、尘埃和污水中，健康人粪便检出率为 2.2%~22%，肠道病患者粪便检出率为 2.1%~63%，动物粪便检出率为 1.7%~18.4%，土壤、污水的检出率为 50%~56%。因此，食品在生产、加工、储藏、烹调、销售的各个环节均可能受其污染。

产气荚膜梭菌食物中毒以气温较高的夏、秋季节为多见。引起中毒的食品主要是动物性食品如肉、鱼、禽等。在日本也有鱼贝类、面类食品引起中毒的报道。值得注意的是，被产气荚膜梭菌污染的食品不变质。

食品中产气荚膜梭菌的来源主要为人、动物无症状带菌者的粪便、直接或间接污染过该粪便的昆虫、鼠类、土壤、灰尘等。受其污染的食品，虽经一般烹调加热，但其加热温度和时间不能将耐热性产气荚膜梭菌芽孢全部杀死，加热处理后的食品中氧气减少，又多放置于密闭的容器中造成厌氧环境，待在密闭容器中缓慢冷却至 50℃左右时，残存的芽孢得以大量生长繁殖。当食品中该菌增至 10⁶ 个 / g 以上时，即可引起食物中毒。由于不可能防止产气荚膜梭菌对食品原料的污染，因而预防其生长显得十分必要。食品应尽可能远离产气荚膜梭菌生长的危险区域(10~50℃)。

七、蜡状芽孢杆菌

(一) 蜡状芽孢杆菌的生物学特性

蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)，又称蜡样芽孢杆菌，为革兰氏阳性杆菌。菌体大小为 0.9~1.2μm×1.8~4.0μm，两端钝圆，一般呈短链到长链。有芽孢，呈椭圆形，位于中央或近中央；周生鞭毛。蜡状芽孢杆菌需氧或兼性厌氧。生长温度范围为 5~30℃，最适生长温度为 28~35℃。10℃以下停止繁殖。其繁殖体不耐热，100℃经 20min 可被杀死。生长 pH 范围为 4.3~9.0，生长最低水分活性为 0.95。根据蜡状芽孢杆菌鞭毛抗原性将其分为 18 型。产生腹泻毒素的主要为 2、6、8、9、10、12 型，1、3、4、5、8 型可产生呕吐毒素。

蜡状芽孢杆菌为条件致病菌，只有大量食入该菌(10⁷ 个 / g)时才会引起中毒。蜡状芽孢杆菌可产生引起人类食物中毒的肠毒素，包括腹泻毒素和呕吐毒素。几乎所有的蜡状芽孢杆菌均可在多种食品中产生腹泻毒素，但其产生腹泻毒素的量因蜡状芽孢杆菌的型别而异。腹泻毒素为蛋白质，相对分子质量为 55 000~60 000，不耐热，45℃加热 30min 或者 56℃加热 5min 均可使之失去活性。此外，该毒素对蛋白酶及胰蛋白酶敏感。呕吐毒素系低分子肠毒素，因至今仍未获得其纯品，对其性质及活性了解不多。呕吐毒素常在米饭类食品中形成，其相对分子质量小于 5 000，对 pH、胃蛋白酶、胰蛋白酶均不敏感。该毒素耐热，126℃加热 90 min 不被破坏。此外，该毒素不能激活黏膜细胞胞膜上的腺苷酸环化酶。

(二) 食品中蜡状芽孢杆菌的来源

蜡状芽孢杆菌在自然界分布比较广泛。在土壤、灰尘、腐草、空气中都有此菌存在。肉类制品、奶类制品、蔬菜和水果的带菌率为 20%~70%。

引起中毒的食品种类繁多，包括乳及乳制品、肉类制品、蔬菜、马铃薯、甜点心、调味汁、凉拌菜、米粉、米饭等。蜡状芽孢杆菌在米饭中极易繁殖。在我国引起中毒的食品以米饭、米粉最为常见。引起蜡状芽孢杆菌食物中毒的食品，大多数无腐败变质现象，除米饭有时微粘、入口不爽或稍带异味外，大多数食品感官正常。此可能与该菌主要分解糖类的特性有关，

食品在加工、运输、保藏和销售过程中，往往由于不注意卫生操作，通过灰尘和泥土造成该菌的感染。苍蝇、昆虫、鼠类、不洁的用具和容器也可传播该菌。

八、变形杆菌

变形杆菌属(*Proteus*)为革兰氏阴性杆菌，属寄生于人和动物肠道中的肠杆菌科。食品中致病的变形杆菌主要是普通变形杆菌(*P. vulgaris*)、奇异变形杆菌(*P. mirabilis*)和莫根变形杆菌(*P. morganii*)3种。现已发现，普通变形杆菌、奇异变形杆菌分别有100多个血清型，莫根变形杆菌有75个血清型。

(一)变形杆菌的生物学特性

变形杆菌属包括5个群：普通变形菌(*P. vulgaris*)、奇异变形菌(*P. mirabilis*)、莫根变形菌(*P. morganii*)、雷氏变形菌(*P. rettgeri*)和无恒变形菌(*P. inconstans*)。变形杆菌为革兰氏阴性、两端钝圆的小杆菌，有鞭毛，其大小为 $1\sim 3\mu\text{m}\times 0.4\sim 0.6\mu\text{m}$ 。细胞形状有明显的多边形，有周身鞭毛，能活泼运动，常变形为有线形和弯曲状。在培养基中菌落有迅速扩展蔓延生长的特点。需氧或兼性厌氧，营养要求不高。在液体培养基中呈均匀混浊生长，表面有菌膜。在固体培养基上常呈扩散生长，形成一层波纹薄膜。变形杆菌适宜生长温度为 $30\sim 37^{\circ}\text{C}$ ，变形杆菌对热抵抗力亦不强，加热 55°C 持续1h即可将其杀灭。

现已证实，变形杆菌可产生肠毒素。肠毒素是蛋白质和碳水化合物复合物的复合物，具抗原性。

(二)食品中变形杆菌的来源

变形杆菌属为腐败菌，在自然界中分布极广。土壤、污水和动植物中都存在；在人和动物的肠道中，也常有存在。健康人变形杆菌属带菌率为 $1.3\%\sim 10.4\%$ ；腹泻病人带菌率为 $13.3\%\sim 62.7\%$ 。由于变形杆菌属分布广泛，所以食物中的变形杆菌主要来自外界的污染。污染源主要是带菌动物、带菌人和接触过生肉的容器、切肉刀板等。此外，苍蝇和老鼠也有传播作用。食品行业和集体食堂内如果卫生状况不佳，则很容易造成变形杆菌属的污染传播；如果生熟食品不分开或食用剩余食品前未加热，也容易传播变形杆菌属，使其生长、繁殖，引起食物中毒。

引起变形杆菌属食物中毒的食品主要是煮熟的肉类、动物内脏和蛋类等动物性食品。此外，凉拌菜、剩饭菜以及某些豆制品(如“素鸡”)也可引起中毒。组胺中毒由腐败鱼引起的较多，尤其是海产鱼。受变形杆菌污染的熟肉或内脏制品在夏、秋季节的较高温度下存放，造成变形杆菌在食品中大量生长繁殖，食前未回锅加热或加热不彻底，食后即引起食物中毒。变形杆菌和其他细菌共同污染食品后，可使食品发生感官性状的明显变化。

另外，变形杆菌在 $4\sim 7^{\circ}\text{C}$ 下即可繁殖，属于低温菌，因而可在低温贮存的食品上繁殖，应予注意。

九、单核细胞增生李斯特菌

(一)单核细胞增生李斯特菌的生物学特性

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)，简称单增李斯特菌，为较小的球杆菌，

大小为 $1\sim 3\mu\text{m}\times 0.5\mu\text{m}$ ；无芽孢，无荚膜，周生鞭毛，能运动。在涂片中细菌单个分散或呈V形、Y形，有时也呈丝状或短链状。幼龄培养物活泼，呈革兰氏阳性，48h后呈革兰氏阴性。单增李斯特菌不耐酸，生长pH范围为5.0~9.0，在pH为9.6的食盐(10%)溶液中，仍能生长，但在pH为5.6时，仅可生长2~3d。它在4℃温度条件下也能缓慢生长。单增李斯特菌兼性厌氧，营养要求不高，在含有肝浸汁、腹水、血液或葡萄糖中生长更好。菌落初期极小，37℃培养数天后，直径可达2mm。初期光滑、透明，后期变成灰暗。生长温度范围为2~45℃，但在冷冻条件下生长缓慢，厌氧或微好氧(即在体积分数为5%O₂和5%~10%CO₂中生长良好)。

单增李斯特菌能发酵多种糖类，使葡萄糖、麦芽糖、七叶苷、果糖、海藻糖和水杨苷等迅速产酸不产气，使乳糖、蔗糖、阿拉伯糖、鼠李糖、糊精、山梨醇、甘油等在3~10d内发酵；过氧化氢酶阳性，不液化明胶，MR和VP反应阳性；吲哚、尿素阴性，不还原硝酸盐；在血平板上菌落有溶血圈；不利用甘露醇和木糖。

(二)食品中单增李斯特菌的来源

单增李斯特菌广泛存在于自然界，从动物的粪便中，从牛奶中，从发酵不好的青贮饲料中及从土壤中均可分离到。在自然情况下，它可侵染多种动物和人类。它在污水、污泥、土壤、饲料和粪便中的存活率比其它的食物中毒病原菌长得多。此外，在1%正常人的粪便中也能检出该菌。目前认为，动物可能是本菌的重要贮存宿主，人可能是主要的污染源。粪便污染食品经口传播可能是该菌的主要传播途径。胎儿或婴儿的感染多半来自母体中的细菌或带菌的乳制品。

十、志贺氏菌

志贺氏菌属(*Shigella*)是一种常见的食品致病菌。

(一)志贺氏菌属的生物学特性

该菌是革兰氏阴性杆菌，菌体大小均为 $0.5\sim 0.7\mu\text{m}\times 2\sim 3\mu\text{m}$ ；无芽孢，无荚膜，无鞭毛；需氧或兼性厌氧，营养要求不高；最适生长温度为37℃；在液体培养基中呈均匀混浊生长；在肉汤固体培养基上形成无色、半透明、边缘整齐的菌落。

志贺氏菌都能分解葡萄糖，产酸不产气，大多不发酵乳糖。抗原结构由菌体(O)抗原和表面(K)抗原组成。

(二)志贺氏菌属的来源和传播途径

志贺氏菌属包括许多致病菌，其中引起食物中毒的主要是弗氏志贺氏菌(*S. flexneri*)和索氏(宋内氏)志贺氏菌(*S. sonnei*)。

志贺氏菌在潮湿土壤中能存活1个月，在粪便中存活10d左右，在水果、蔬菜或咸菜上能存活10d左右。对外界环境的抵抗力，以索氏志贺氏菌为最强。

病人和带菌者的粪便中含有许多志贺氏菌，向外排出，容易造成污染。沾染污水的食品容易污染志贺氏菌，污染有志贺氏菌的手、苍蝇、用具等接触食品，也易造成食品污染。污染的食品经口侵入消化道，就容易引起食物中毒。

十一、结肠炎耶尔森氏菌

结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)又称小肠结肠炎耶尔森氏菌，为肠杆菌科耶尔森氏菌属中的一种，是新近发现引起食物中毒和结肠炎的重要病原菌之一。

(一)结肠炎耶尔森氏菌的生物学特性

结肠炎耶尔森氏菌为革兰氏阴性杆菌或球杆菌，其大小为 $13.5\mu\text{m}\times 0.5\sim 1\mu\text{m}$ ，单个分

散,有时排列成短链或成堆,有明显的多形态性。无芽孢、荚膜,在 25℃可形成周生鞭毛。需氧或兼性厌氧。耐低温,4~40℃均可生长,最适生长温度为 32~34℃,生长 pH 范围 4.6~9.0。对热(50℃)和盐(>7%)敏感。目前已知该菌有 34 个以上的 O 抗原,20 个 H 抗原和 1 个 K 抗原。根据 O 抗原可分为 17 个 O 群和 48 个血清型。其致病型常见为 O:3, O:8, O:9,其次为 O:5、27, O:6、31, O:7、8, O:13、7, O:16,等。结肠炎耶尔森氏菌具有侵袭性并能产生外毒素,如 O:3, O:8, O:9 具侵袭性, O:3 及 O:8 能产生耐热性肠毒素,大多数产毒株可在 4~35℃的广泛范围内产生毒素。

结肠炎耶尔森氏菌生长温度一般为 30~37℃,但在 22~29℃才能使某些特性出现,在 4℃时也能缓慢生长。在 SS 或麦康凯琼脂上,25℃24h,菌落微小,至 48h 后可长为直径 0.5~3mm 大。菌落圆整、光滑、湿润、扁平或稍隆起、透明或半透明。在麦康凯琼脂上菌落呈淡黄色,在肉汤中生长呈混浊均匀,形成菌膜,或者肉汤上面澄清,下面仍有少量沉淀物。

(二)食品中结肠炎耶尔森氏菌的来源

结肠炎耶尔森氏菌广泛存在于周围环境中。在自然情况下,它可侵染多种动物和人类,因而能从许多动物、食品和水源中分离到。据调查检测,曾从乳及其制品、蛋制品、肉制品、水产品等分离到该菌。我国有关地区也从肉制品中检出了该菌。许多动物如猪、牛、羊、犬、鼠、鸡、鸭、鹅等带菌率很高,特别是猪,是最重要的动物污染源。丹麦的检测结果表明,有 10%~17%的猪污染有该菌。由此可见,猪是该菌的重要贮存宿主。

引起中毒的食物主要是动物性食物,如猪肉、牛肉、羊肉等,其次为生牛奶,尤其是因为结肠炎耶尔森氏菌可在低温中生长繁殖并产生毒素,故其所致食物中毒的发生多在秋冬、冬春季节。

从结肠炎耶尔森氏菌的特性可知,加工后的污染是造成该菌流行的主要原因,由于冷冻不能防止耶尔森氏菌的生长,所以重点应放在食品加工中的卫生操作及预防措施上。

十二、病 毒

(一)贝类与病毒

据报道,已证实的少数种类病毒会引起与水产品有关的疾病,包括甲型肝炎病毒(HAV)(Hepatitis-typeA)、诺伏克病毒(Norwalk virus)、雪山力病毒(Snow mountain agent)、小杯病毒(Calicivirus)、星型病毒(Astrovirus)、非甲非乙型肝炎(Non-A and Non-B)病毒。水产品上出现病毒是由带病毒食品加工者或被污染的水域造成的。

病毒性疾病暴发的食物载体是以双壳软体动物为主。据 Kilgen 和 Cole(1991)报道,所有与水产品有关的病毒感染事件中,除极少数外都是由于食用了生的或未经充分烹调的贝类引起的。特别是滤食性贝类过滤大量的水,如牡蛎过滤水量达 1 500L / (d·只),其体内富集的病毒远远高于周围水域。我国上海市 1988 年发生的甲型肝炎大暴发,其传播源和传播方式就是食用了被甲肝病毒污染的、未经充分烹调的毛蚶。甲型肝炎病毒是一种耐热性很高的病毒,60℃时 10min 后才失去活性,因而用简单的烹调方法处理,病毒仍能存活一部分。

进入贝类水域有壳水生物的病原性病毒能够在那里积聚并能存在数月。它们在冬天和较低温度下能够存活很好,而恰恰是在那时大量捕获贝类供食用。病原性病毒已从“开放”和“关闭”水域中分离到,且已从相应水域捕获的贝类中分离到。一旦病毒进入贝类体内,能存活数月。从未许可的水域内进行不合法的捕获贝类,将加重因贝类引起病毒性疾病这

一问题。

在清洁的水域中，已污染的软体贝类通过正常饮食、消化和排泄将病原体从消化道中自然清除。经污染水域的贝类移到清洁水域，通过滤过食物将其消化系统中的病毒和细菌清除掉。净化过程严格控制，一般需要2~3d，而暂养过程则需要2周或2周以上。一般来说，清除病毒的时间比清除细菌要长，所以清除完细菌不一定表明已清除完病毒。

(二)病毒的控制

流行病学资料已表明，通过食用已蒸煮过的贝类仍能传播病毒性疾病。例如贝类经过58.75℃(133° F)，30min的处理后，甲型肝炎病毒还具有传染性。烹调条件诸如干热、蒸汽加热、烘烤和炖、焖等只能消灭1%的病毒。贝类经完全灭活病毒的热处理，一般将导致产品在感官上不可接受。其他产品在经过85.07℃(180° FT)温度处理后，病毒将失活。

最有效控制病毒的方法是在第一地点防止病毒污染食物。必须从未被污水污染物污染的水域中捕获贝类。不要用被粪便污染的水灌溉庄稼。饮用水必须来自安全地方或被正确处理过。

第三节 水产品的微生物检验

微生物检验主要是检测食品中被污染的细菌数量及是否会有致病细菌，以便对食品进行卫生学评价，确保消费者的安全。水产品的微生物检验，从鲜度及品质管理方面一般进行菌落总数和大肠菌群及大肠杆菌的测定。水产品的致病微生物检验项目要根据样品的来源、加工状态、食用方式及受检季节加以选择。鲜活水产品，在夏秋季节要加强副溶血弧菌的检验；水产制品则应重点进行沙门氏菌、金黄色葡萄球菌及产气荚膜梭菌等的检验，有时还需检验单增李斯特菌；淡水鱼贝类要注意沙门氏菌的检验；鱼糜制品除了沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的检验外，对原料来源的蜡样芽孢杆菌也应予以检验；对鱼肉香肠制品尚应考虑进行肉毒梭菌检验。

目前，国外对我国出口冷冻水产品除要求测定细菌总数、大肠杆菌外，主要检验沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌等。严格进行微生物检验，对提高食品或水产品的卫生质量，保证人体健康、维护我国的政治信誉和经济利益，促进对外贸易的发展都有重要意义。

一、样品的采集与处理

(一)样品的采集

在水产品检验中，所采集的样品必须有代表性。水产品因其加工批号、原料情况(来源、种类、地区、季节等)、加工方法、运输、保藏条件、销售中的各个环节(例如有无防蝇、防污染、防蟑螂及防鼠等设备)及销售人员的责任心和卫生认识水平等无不影响着食品卫生质量，因此必须考虑周密。

1. 样品种类 样品种类可分为大样、中样、小样3种。大样是指一整批，中样是从样品各部分取得的混合样品，小样是指做分析用，称为检样。检样一般以25g为准，中样以200g为准。

2. 采样方法 采样必须在无菌操作下进行。采样用具：如探子、铲子、匙、采样器、试管、广口瓶、剪子和开罐器等，必须是灭菌的。根据样品种类如袋、瓶和罐装者，应取完整的未开封的。如果样品很大，则需用无菌采样器取样；检样是冷冻品，应保持在冷冻状态(可放在冰内、冰箱的冰盒内或低温冰箱内保存)，非冷冻品需保持在0~5℃中保存。

3. 采样数量 鱼，一条；虾，200g；蟹，2只；贝壳类，按检验目的而定；鱼松，1袋，不足200g者加量。

4. 采样标签 采样前或后应立即贴上标签，每件样品必须标记清楚(如品名、来源、数量、采样地点、采样人及采样时间)。

(二)送检

样品送到食品卫生微生物检验室应越快越好，一般应不超过3h。如果路途遥远，可将不需冷冻样品保持在1~5℃环境中(如冰壶)。如需保持冷冻状态，则需保存在泡沫塑料隔热箱内(箱内有干冰可维持在0℃以下)。送检时，必须认真填写申请单，以供检验人员参考。

(三)检验

食品卫生微生物检验室接到送检申请单，应立即登记，填写实验序号，并按检验要求，立即将样品放在冰箱或冰盒中，积极准备条件进行检验。各食品卫生微生物检验室必须备有专用冰箱存放样品。一般阳性样品，发出报告后3d(特殊情况可适当延长)始能处理样品。进口食品的阳性样品，需保存6个月，方能处理。阴性样品可及时处理。

(四)报告

检验完毕，检验人员应及时填写报告单，签名后，送主管人员核实签字，加盖单位印章，以示生效，立即交食品卫生监督人员处理。

二、菌落总数(细菌总数)

(一)概述及卫生学意义

菌落总数，又称细菌总数，主要作为判定食品被污染程度的标志。菌落总数是指食品样品经过处理，在一定条件下培养后所得1g或1ml样品中所含细菌菌落的总数。

细菌数的测定方法很多，当前对食品中细菌数的测定一般多以菌落总数表示，这是由于现行的平板计数法并不能测定出每克样品中的实际活菌数，在琼脂平板上的菌落数不一定就是被检食品中的嗜中温性需氧菌的菌落总数。因此，按平板培养计数法所得结果应报告为每单位体积中的菌落数或菌落形成单位数。

微生物学方法是检测鱼贝类肌肉或鱼体表皮的细菌数作为判断鱼贝类腐败程度的鲜度评定方法。鱼贝类的腐败是由微生物作用引起的，测定细菌数可判断鱼贝类的鲜度。细菌数的检测一般采用琼脂培养基的平板培养法测定菌落总数。表1-7所示是我国常见淡、海水鱼类的鲜度等级标准。

(二)菌落总数的测定方法

1. 样品稀释及培养

(1)以无菌操作将试样剪碎，称取25g(或25ml)剪碎捣细，放于装有225ml灭菌生理盐水或其它稀释液的灭菌玻璃瓶内(瓶内放置适当数量的玻璃珠)或灭菌乳钵内，经充分振摇或研磨做成1:10的均匀稀释液。固体样品在加入稀释液后，最好放置灭菌均质器中，并以8000~10000r/min的速度处理1min，做成1:10的均匀稀释液。

(2)用1ml灭菌吸管，吸取1:10稀释液1ml，注入装有9ml灭菌生理盐水或其它稀释液的试管内，振摇试管混合均匀，做成1:100的稀释液。

(3)另取1ml灭菌吸管，按上项操作顺序做10倍递增稀释液，如此每递增稀释液一次，即换用1支1ml灭菌吸管。

(4)根据食品卫生标准要求或对样品污染情况的估计，选择2~3个适宜稀释度，分别

在做 10 倍递增稀释的同时，即以吸取该稀释度的吸管移 1 ml 稀释液于灭菌平板内，每个稀释度做两个平板。

(5)稀释液移入平板后，应即时将凉至 45℃的营养琼脂培养基(可放置于 45±1℃水浴保温)注入平板约 15ml，并转动平板使混合均匀。同时将营养琼脂培养基倾入不加样品的灭菌平板内做一空白对照。

(6)待琼脂凝固后，翻转平板，置 30℃温箱内培养 48±2h(对其它非水产性食品为 36±1℃培养 48±2h)，取出，计算平板内菌落数目，乘以稀释倍数，即得每克(或毫升)样品所含菌落总数。

表 1-7 鱼类鲜度等级标准
(引自《水产品标准与法规汇编》，1996)

品种	TVB-N(mg/g)		(个/g)	
	一级	二级	一级	二级
黄鱼	≤0.13	≤0.30	≤10 000	≤10 ⁵
带鱼	≤0.18	≤0.25	≤10 000	≤10 ⁶
乌贼	≤0.18	≤0.30		
蓝源鳉	≤0.13	≤0.25	≤30 000	≤10 ⁶
鲱鱼	≤0.15	≤0.30	≤5 000	≤50 000
鳉鱼	≤0.10	≤0.15	≤1 000	≤10 000
青、草、鲢鲤、 鳙鱼	≤0.13	≤0.20	≤10 000	≤10 ⁶
鲑鱼	≤0.15	≤0.30	≤30 000	≤10 ⁶
鲑鱼	≤0.18	≤0.30	≤10 000	≤10 ⁷
鲚鱼	≤0.15	≤0.30	≤5×10 ⁵	≤2×10 ⁷

2. 菌数计数方法 做平板菌落计数时，可用肉眼观察，必要时用放大镜检查，以防遗漏。在记下各平板的菌落后，求出同稀释度的各平板平均菌落数。

3. 菌落计数的报告

(1)平板菌落数的选择：选取菌落数在 30～300 之间的平板作为菌落总数测定标准。一个稀释度使用两个平板采用两个平板平均数。其中一个平板有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数。若片状菌落不到平板的一半而其余一半中菌落分布又很均匀，即可计算半个平板后乘以 2，以代表全平板菌落数。

(2)稀释度的选择：①应选择平均菌落数在 30～300 之间的稀释度，乘以稀释倍数报告之(表 1-8 例 1)。②若有两个稀释度，其生长的菌落数均在 30～300 之间，则视二者之比如何来决定，若其比值小于 2，应报告其平均数，若大于 2，则报告其中较小的数字(表 1-8 例 2 及 3)。③若所有稀释度的平均菌落数均大于 300，则应按稀释最高的平均菌落数乘以稀释倍数报告之(表 1-8 例 4)。④若所有稀释度的平均菌落均小于 30，则应按稀释度最低的平均菌落乘以稀释倍数报告之(表 1-8 例 5)。⑤若所有稀释度均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释度报告之(表 1-8 例 7)。⑥若所有稀释度的平均菌落数均不在 30～300 之间，其中一部分大于 300 或小于 30 时，则以最接近 30 或 300 的平均菌落数乘以稀释倍数报告之(表 1-8 例 7)。

(3)菌落数的报告：菌落数在 100 以内时，按其实有数报告；大于 100 时，采用 2 位有效数字，在 2 位有效数字后面的数值，以四舍五入方法计算，为了缩短数字后面的零数，也可用 10 的指数来表示(表 1-8 “报告方式” 栏)。

表 1-8 稀释度选择及菌落数报告方式

	稀释液及菌落数			两稀释倍数之比	菌落总数 (个/g 或 ml)	报告方式 (个/g 或 ml)
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			
1	多不可计	164	20	—	16 400	16 400
2	多不可计	295	46	1.6	37 750	38 000
3	多不可计	271	60	2.2	27 100	27 000
4	多不可计	多不可计	513	—	513 000	510 000
5	27	11	5	—	270	270
6	0	0	0	—	<1×10	<10
7	多不可计	305	12	—	30 500	31 000

(三) 检验程序示意流程

检验程序示意流程如下：

样品 → 做成几个适宜倍数的稀释液 → 选择 2~3 个适宜稀释度各以 1ml 分别加入灭菌平皿内 → 每平皿内加入适量营养琼脂(30℃，48±2h) → 菌落计数 → 报告

三、大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌

(一)生物学性状和卫生学意义

大肠菌群为肠杆菌科一群需氧、兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌，能在 35~37℃24h 发酵乳糖、产酸产气。包括大肠杆菌属、柠檬酸杆菌属、克雷伯氏菌属、阴沟肠杆菌属。大肠菌群细菌种类繁多，分布较广，在人畜粪便和自然界广泛存在；多存在于人类经常活动的场所和粪便污染的地方，如庭院、街道、菜地、生活污水沟旁及厕所等处。其生存力较强，在土壤、水中可存活数日。因此，本菌群具有重要的食品卫生学意义，现已成为许多国家对食品和水卫生质量鉴定的指标。

粪大肠菌群，现在很多国家常叫做耐热大肠菌群，定义为在 44.5℃培养 24h 内能产酸产气的细菌。作为一种卫生指标，耐热大肠菌群中很可能含有粪源微生物，因此耐热大肠菌群的存在表明可能受到了粪便污染，可能存在大肠杆菌。但是耐热大肠菌群的存在并不代表对人有什么直接的危害。通常情况下，耐热大肠菌群与大肠菌群相比，在人和动物粪便中所占的比例较大，而且由于在自然界容易死亡等原因，耐热大肠菌群的存在可认为食品直接或间接的受到了比较近期的粪便污染。因而，耐热大肠菌群在食品中的检出，与大肠菌群相比，说明食品受到了更为不清洁的加工，肠道致病菌和食物中毒菌的可能性更大。耐热大肠菌群比大肠菌群能更贴切地反映食品受人和动物粪便污染的程度，且检测方法比大肠杆菌简单得多，从而受到重视。

大肠杆菌属于埃希氏菌属，为革兰氏染色阴性、无芽孢、有鞭毛能运动、两端钝圆的短杆菌，约 0.5μm×3μm，有的近似球杆状。在 44±0.5℃、24±2h 内能发酵乳糖、产酸、产气。本菌可用 I、M、Vi、C 试验做进一步鉴定，呈++--或+---。大肠杆菌主要寄居于人和温血动物肠道内，为肠道正常菌群，是粪便中最的一类细菌。在一般情况下，

对人无害，但当人体抵抗力降低或侵入人体非此菌寄居的部位，也可引起发病，为小儿腹泻的主要原因菌之一。有时，可使人患肾盂炎、胆囊炎、阑尾炎等疾病。

在食品中检出大肠杆菌一般可指示受到了粪便的近期污染。如果大肠菌群和大肠杆菌数均高，或大肠杆菌数高而大肠菌群数低或未检出，一般多考虑为近期粪便污染；如果大肠菌群数高而大肠杆菌数低或未检出，则应着重考虑粪便的远期污染。

食品中大肠菌群或大肠杆菌的数量测定，一般均采用相当于 100g 或 100ml 食品中的最可能数(MPN)来表示。不仅能表明样品中有无粪便污染，另外一方面还可根据数量的多少，判定样品受污染的程度。

(二) 检验方法

1. 大肠菌群检验

(1) 试样稀释及接种：以无菌操作将试样剪碎，称取 25g(或 25ml)置于盛有 225ml 灭菌生理盐水玻璃瓶内(瓶内预放数粒玻璃珠)或灭菌乳钵内，经充分振摇或研磨成 1:10 稀释液，用 1ml 灭菌吸管分 3 次，每次吸 1 血稀释液分别接种于 3 管乳糖胆盐发酵管内，即为每管含 0.1g 样品。

仍用原吸管吸取 1:10 稀释液 1ml，注入装有 9ml 灭菌生理盐水试管中，混匀，做成 1:100 稀释液，另取 1 支 1ml 灭菌吸管，同样分 3 次、每次吸 1ml 稀释液，分别接种于 3 管乳糖胆盐发酵管内，即每管内含 0.01g 样品。仍用原吸管吸取 1:100 稀释液 1ml，注入装有 9ml 灭菌生理盐水试管中，混匀，做成 1:1000 稀释液，再取 1 支 1ml 灭菌吸管，同样接种 3 管乳糖胆盐发酵管，即每管内含 0.001g 样品。根据食品卫生标准要求或对检样污染情况的估计，选择 3 个稀释度，接种量在 1ml 以上者，用双料乳糖胆盐发酵管，1ml 及 1ml 以下者用乳糖胆盐发酵管。

(2) 乳糖发酵试验：将已接种的乳糖胆盐发酵管置 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 温箱内培养 $24 \pm 2\text{h}$ ，如所有乳糖胆盐管都不产气，则可报告大肠菌群阴性。如有产气者，按如下程序继续进行。

(3) 分离培养：将产气的发酵管分别转种在伊红美蓝琼脂平板上，置 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 温箱内培养 18~24h，然后取出，观察菌落形态，并做革兰氏染色和证实试验。

(4) 证实试验：挑取可疑大肠菌群菌落 12 个进行革兰氏染色，同时接种乳糖发酵管，置 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 温箱内，培养 $24 \pm 2\text{h}$ ，观察产气情况。若乳糖管产气，革兰氏染色为阴性无芽孢杆菌，即可报告大肠菌群阳性。

(5) 报告：根据证实为大肠菌群阳性的管数，查大肠菌群 MPN 检索表，报告每 100g(或每 100ml)样品大肠菌群的最可能数(MPN 值)。

2. 粪大肠菌群(faecalcoliform)检验

(1) 接种与培养：用接种环将上述所有产气的乳糖胆盐发酵管培养物转种于 EC 肉汤管内，置 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 水浴箱内(水浴箱内的水面应高于 EC 肉汤液面)，培养 $24 \pm 2\text{h}$ ，经培养后，如所有 EC 肉汤管均不产气，则可报告为阴性，如有产气的 EC 肉汤管分别转种于伊红美蓝琼脂平板上，置 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 18~24h，凡平板上有典型菌落者，则证实为粪大肠菌群阳性。

(2) 报告：根据证实为粪大肠菌群的阳性管数，查大肠菌群 MPN 检索表，报告每 100g(或每 100ml)样品粪大肠菌群的 MPN 值。

3. 致泻大肠杆菌检验

(1) 增菌：样品采集后应尽快检验。除了易腐食品在检验之前应予冷藏外，一般不冷藏。

以无菌法称取检样 25g, 加在 225ml 营养肉汤中, 以均质器打碎 1min 或用乳钵加灭菌砂磨碎。取出适量, 接种乳糖胆盐培养基, 以测定大肠菌群 MPN, 其余的移入 500ml 广口瓶内, 于 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 6h。挑取 1 环, 接种于 1 管 30ml 肠道菌增菌肉汤内, 于 42°C 培养 18h。

(2)分离: 将乳糖发酵阳性的乳糖胆盐发酵管和增菌液分别划线接种麦康凯或伊红美蓝琼脂平板; 污染严重的检样, 可以将检样匀液直接划线接种于麦康凯或伊红美蓝平板, 在 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24h, 观察菌落。不但要注意乳糖发酵的菌落, 同时也要注意乳糖不发酵和迟缓发酵的菌落。

(3)证实试验: 制备 O 抗原悬液, 稀释至与 Mac Farland 3 号比浊管相当的浓度。原效价为 1:160、1:320 的 O 血清, 用 0.5% 盐水稀释至 1:40。稀释血清与抗原悬液在 10mm×75mm 试管内等量混合, 做单管凝集试验。混匀后放于 50°C 水浴箱内, 经 16h 后观察结果。如出现凝集, 可证实为该 O 抗原。

(4)肠毒素试验

①酶联免疫吸附试验检测不耐热肠毒素(LT)和耐热肠毒素(ST)。

产毒培养: 将试验菌株和阳、阴性对照菌株分别接种于 0.6ml CAYE 培养基内, 37°C 振荡培养过夜。加入 20000IU / ml 的多黏菌素 B 0.05ml, 于 37°C 1h, 离心 4000r / min 15min, 分离上清液, 加入 0.1% 硫柳汞 0.05ml, 于 4°C 保存待用。

LT 检测方法(双抗体夹心法):

A. 包被: 先在产肠毒素大肠杆菌 LT 和 ST 酶标准诊断试剂盒中取出包被用 LT 抗体管, 加入包被液 0.5ml, 混匀后全部吸出于 3.6ml 包被液中混匀, 以每孔 100 μl 量加入到 40 孔聚苯乙烯硬反应板中, 第一孔留空作为对照, 于 4°C 冰箱湿盒中过夜。

B. 洗板: 将板中溶液甩去, 用洗涤液 I 洗 3 次, 甩尽液体, 翻转反应板, 在吸水纸上拍打, 去尽孔中残留液体。

C. 封闭: 每孔加 100 μl 封闭液, 于 37°C 水浴中 1h。

D. 洗板: 用洗涤液 II 洗 3 次, 操作同上。

E. 加样本: 每孔分别加各种试验菌株产毒培养液 100 μl , 37°C 水浴中 1h。

F. 洗板: 用洗涤液 II 洗 3 次, 操作同上。

G. 加酶标抗体: 先在酶标 LT 抗体管中加 0.5ml 稀释液, 混匀后全部吸出于 3.6ml 稀释液中混匀, 每孔加 100 μl , 37°C 水浴中 1h。

H. 洗板: 用洗涤液 II 洗 3 次, 操作同上。

I. 酶底物反应: 每孔(包括第一孔)各加基质液 100 μl , 室温下避光作用 5~10min, 加入终止液 50 μl 。

J. 结果判定: 以酶标仪在波长 492nm 下测定吸光度 OD 值, 待测标本 OD 值大于阴性对照 3 倍以上为阳性, 目测颜色为橘黄色或明显高于阴性对照为阳性。

ST 检测方法(抗原竞争法):

A. 包被: 先在包被用 ST 抗原管中加 0.5ml 包被液, 混匀后全部吸出于 1.6ml 包被液中混匀, 以每孔 50 μl 加入于 40 孔聚苯乙烯软反应板中。加液后轻轻敲板, 使液体布满孔底, 第一孔留空作为对照, 置 4°C 冰箱湿盒中过夜。

B. 洗板: 用洗涤液 I 洗 3 次, 操作同上。

C. 封闭, 每孔加 100 μl 封闭液, 37°C 水浴 1h。

D. 洗板：用洗涤液Ⅱ洗3次，操作同上。

E. 加样本及ST单克隆抗体：每孔分别加各试验菌株产毒培养液50μl，稀释的ST单克隆抗体50μl(先在ST单克隆抗体管中加0.5ml稀释液，混匀后全部吸出于1.6ml稀释液中，混匀备用)，37℃水浴1h。

F. 洗板：用洗涤液Ⅱ洗3次，操作同上。

G. 加酶标记兔抗鼠Ig复合物：先在酶标记兔抗鼠Ig复合物管中加0.5ml稀释液，混匀后全部吸出于3.6ml稀释液中混匀，每孔加100μl，37℃水浴1h。

H. 洗板：用洗涤液Ⅱ洗3次，操作同上。

I. 酶底物反应：每孔(包括第一孔)各加基质液100μl，室温下避光5~10min，再加入终止液50μl。

J. 结果判定：以酶标仪在波长492nm下测定吸光度(OD)值，OD≥50%者为阴性。目测五色或明显淡于阴性对照者为阳性。

②双向琼脂扩散试验检测LT。将被检菌株按五点环形接种于Elek氏培养基上。以同样操作，共做两份，于36℃培养48h。在每株菌的菌苔上放多黏菌素B纸片，于36℃经56h，使肠毒素渗入琼脂中，在五点环形菌苔各5mm处的中央，挖一个直径4mm的圆孔，并用一滴琼脂垫底。在平板的中央孔内滴加LT抗毒素30μl。用已知产LT和不产毒菌株作对照，于36℃经15~20h观察结果。在菌苔和抗毒素孔之间出现白色沉淀带者为阳性，无沉淀带者为阴性。

③乳鼠灌胃试验检测ST。将被检菌株接种于Honda氏产毒肉汤内，于36℃培养24h，以3000r/min离心30min，取上清液经薄膜滤器过滤，加热60℃30min，每1ml滤液内加入2%伊文思蓝溶液0.02ml。将此滤液用塑料小管注入14日龄的乳鼠胃内0.1ml，同时接种34只，禁食34h后用三氯甲烷麻醉，取出全部肠管，称量肠管(包括积液)重量及剩余体重。肠管重量与剩余体重之比大于0.09为阳性，0.07~0.09为可疑。

(5)结果报告：综合以上生化试验、血清学试验、肠毒素试验做出报告。

四、副溶血弧菌检验

副溶血弧菌是分布极广的海洋细菌，为引起水产品食物中毒的重要病原细菌之一，尤其是在夏秋季的沿海地区，经常由于食用带有大量副溶血弧菌的海产食品，引起爆发性食物中毒。在非沿海地区，食用受此菌污染的食品亦常有中毒发生。副溶血弧菌检验方法如下：

1. 分离培养 首先称取样品25g，加225ml3.5%灭菌盐水，用均质器打碎或用乳钵磨碎，接种氯化钠琼脂平板和嗜盐菌选择性琼脂平板各1个，同时取10ml，加入100ml增菌液中，放37℃8~16h培养后，涂上述平板进行分离，于37℃18~24h培养后取出观察。

挑取上述可疑菌落，转种3.5%氯化钠三糖铁斜面，37℃，24h观察结果。涂片镜检：将三糖铁培养基反应可疑者(底层变黄葡萄糖产酸不产气，斜面不变，乳糖、蔗糖不分解，有动力，不产生硫化氢)进行涂片革兰氏染色镜检形态。

2. 嗜盐性试验 将上述可疑培养物分别接种于不同浓度的盐胨水中，37℃24h培养后观察生长情况，在无盐和10%以上盐的胨水中不生长，在7%盐的胨水中生长良好者进行下列有关试验。

3. 生化试验 分别接种各类生化培养基，37℃培养，除VP、靛基质、甲基红试验培养48h后加试剂观察外，其它均可在24h后观察。

4. 动物试验 将上述各类反应的副溶血弧菌接种 3.5%氯化钠胨水，经 37℃ 16~18h 培养后，小鼠腹腔注射 0.3ml，观察 2~3d，将死亡小鼠进行解剖并做分离培养。

五、葡萄球菌检验

金黄色葡萄球菌检验方法与步骤如下：

1. 增菌培养法

(1)检样处理：称取 25g 固体样品或吸取 25ml 液体样品，加入 225ml 灭菌生理盐水，固体样品研磨或置均质器中制成混悬液。

(2)增菌及分离培养：吸取 5ml 上述混悬液，接种于 7.5%氯化钠肉汤或胰酪胨大豆肉汤 50ml 培养基内，置 36±1℃ 温箱培养 24h，转种血平板和 Baird-Parker 平板，36±1℃ 培养 24h，挑取金黄色葡萄球菌菌落进行革兰氏染色镜检及血浆凝固酶试验。

(3)形态：本菌为革兰氏阳性球菌，排列是葡萄球状，无芽孢，无荚膜，致病性葡萄球菌菌体较小，直径为 0.5~1μm。

(4)培养特性：在肉汤中呈混浊生长，在胰酪胨大豆肉汤内有时液体澄清，菌量多时呈混浊生长，血平板上菌落呈金黄色，也有时为白色，大而突起、圆形、不透明、表面光滑，周围有溶血圈。在 Baird-Parker 平板上为圆形、光滑凸起、湿润，直径为 2~3mm，颜色呈灰色到黑色，边缘为淡色，周围为一混浊带，在其外层有一透明圈。用接种针接触菌落似有奶油树胶的硬度，偶尔会遇到非脂肪溶解的类似菌落，但无混浊带及透明圈。长期保存的冷冻或干燥食品中所分离的菌落比典型菌落所产生的黑色较淡些，外观可能粗糙并干燥。

(5)血浆凝固酶试验：吸取 1:4 新鲜兔血浆 0.5ml，放入小试管中，再加入培养 24h 的金黄色葡萄球菌腐浸液肉汤培养物 0.5ml，振荡摇匀，放 36±1℃ 温箱或水浴内，每 30min 观察 1 次，观察 6h，如呈现凝固，即将试管倾斜或倒置时，呈现凝块者，被认为阳性结果。同时以已知阳性和阴性葡萄球菌株及肉汤作为对照。

2. 直接计数方法

(1)吸取上述 1:10 混悬液，进行 10 倍递次稀释，根据样品污染情况，选择不同浓度的稀释液 1ml，分别加入 3 块 Baird-Parker 平板，每个平板接种量分别为 0.3ml、0.3ml、0.4ml，然后用灭菌 L 棒涂布整个平板。如水分不都吸收，可将平板放在 36±1℃ 温箱 1h，等水分蒸发后反转平皿置 36±1℃ 温箱培养。

(2)在 3 个平板上点数周围有混浊带的黑色菌落，并从中任选 5 个菌落，分别接种血平板，36±1℃ 24h 培养后进行染色镜检、血浆凝固酶试验，步骤同增菌培养法。

(3)菌落计数，将 3 个平板中疑似金黄色葡萄球菌黑色菌落数相加，乘以血浆凝固酶阳性数，除以 5，再乘以稀释倍数，即可求出每克样品中金黄色葡萄球菌数。

六、沙门氏菌检验

在世界各地的食物中毒中，沙门氏菌食物中毒常占首位或第二位。目前，食品中沙门氏菌的检验方法包括 5 个基本步骤：分别为前增菌，用无选择性的培养基使处于濒死状态的沙门氏菌恢复其活力；选择性增菌，使沙门氏菌得以增殖，而大多数的其他细菌受到抑制；选择性平板分离沙门氏菌；生化试验，鉴定到属；血清学分型鉴定。食品中沙门氏菌的检验方法与步骤如下：

1. 前增菌和增菌 对水产加工食品应进行前增菌。称取检样 25g，加在装有 225ml 缓冲蛋白胨水的 500ml 广口瓶内。固体食品可先应用均质器以 8000~10000r / min 打碎

1min, 或用乳钵加灭菌砂磨碎。于 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 4h, 移取 10ml, 转种于 100ml 氯化镁孔雀绿增菌液或四硫酸钠煌绿增菌液内, 于 42°C 培养 18~24h。同时, 另取 10ml, 转种于 100ml 亚硒酸盐胱氨酸增菌液内, 于 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24h。

对新鲜水产品、鲜肉、鲜蛋等或其它未经加工的食品不必进行前增菌。各取 25g(25ml) 加入灭菌生理盐水 25ml, 按前法做成检样匀液; 取 25ml, 接种于 100ml 氯化镁孔雀绿增菌液或四硫酸钠煌绿增菌液内, 于 42°C 培养 24h。另取 25ml 接种于 100ml 亚硒酸盐胱氨酸增菌液内, 于 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24h。

2. 分离 取增菌液 1 环, 划线接种于 1 个亚硫酸铋琼脂平板和 1 个 DHL 琼脂平板(或 HE 琼脂平板、WS 或 SS 琼脂平板)。两种增菌液可同时划线接种在同一个平板上。于 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 分别培养 18~24h(DHL、HE、WS、SS)或 40~48h(BS), 观察各个平板上生长的菌落。

3. 生化试验 自选择性琼脂平板上直接挑取数个可疑菌落, 分别接种三糖铁琼脂。在三糖铁琼脂内, 如果斜面产酸并且硫化氢阴性, 可鉴定为非沙门氏菌。其它的反应结果均有沙门氏菌的可能, 同时也均有不是沙门氏菌的可能。因此, 需做几项最低限度的生化试验。在接种三糖铁琼脂的同时, 再接种蛋白胨水(供做靛基质试验)、尿素琼脂(pH7.2)、氰化钾(KCN)培养基和赖氨酸脱羧酶试验培养基及对照培养基各 1 管, 于 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24h, 必要时可延长至 48h, 参照沙门氏菌的生化性状判定结果。

4. 血清学分型鉴定

(1)抗原的准备: 一般采用 1.5% 琼脂斜面培养物作为玻片凝集试验用的抗原。O 血清不凝集时, 将菌株接种在琼脂量较高的(如 2.5%~3%)培养基上再检查; 如果是由于 Vi 抗原的存在而阻止了 O 凝集反应时, 可挑取菌苔于 1ml 生理盐水中做成浓菌液, 于酒精灯火焰上煮沸后再检查。H 抗原发育不良时, 将菌株接种在 0.7%~0.8% 半固体琼脂平板的中央, 待菌落蔓延生长时, 在其边缘部分取菌检查, 或将菌株通过装有 0.3%~0.4% 半固体琼脂的小玻管 1~2 次, 自远端取菌培养后再检查。

(2)O 抗原的鉴定: 用 A~F 多价 O 血清做玻片凝集试验, 同时用生理盐水做对照。在生理盐水中自凝者为粗糙形菌株, 不能分型。被 A-F 多价 O 血清凝集者, 依次用 O4、O3、O10、O7、O8、O9、O2 和 O11 因子血清做凝集试验。根据试验结果, 判定 O 群。被 O3、O10 血清凝集的菌株, 再用 O10、O15、O34、O19 单因子血清做凝集试验, 判定 E1、E2、E3、E4 各亚群, 每一个 O 抗原成分的最后确定均应根据 O 单因子血清的检查结果, 没有 O 单因子血清的要两个 O 复合因子血清进行核对。

不被 A~F 多价 O 血清凝集者, 先用 57 种或 163 种沙门氏菌因子血清中的 9 种多价 O 血清检查, 如有其中一种血清凝集, 则用这种血清所包括的 O 群血清逐一检查, 以确定 O 群。每种多价 O 血清所包括的 O 因子如下:

O 多价 1: A、B、C、D、E、F 群(并包括 6、14 群);

O 多价 2: 13、16、17、18、21 群;

O 多价 3: 28、30、35、38、39 群;

O 多价 4: 40、41、42、43 群;

O 多价 5: 44、45、47、48 群;

O 多价 6: 50、51、52、53 群;

O 多价 7: 55、56、57、58 群;

O 多价 8: 59、60、61、62 群;

O 多价 9: 63、65、66、67 群;

(3)H 抗原的鉴定: 属于 A~F 各 O 群的常见菌型, 依次用 H 因子血清检查第 1 相和第 2 相的 H 抗原。不常见的菌型, 先用 163 种沙门氏菌因子血清中的 8 种多价 H 血清检查, 如有其中一种或两种血清凝集, 则再用这一种或两种血清所包括的各种 H 因子血清逐一检查, 以确定第 1 相和第 2 相的 H 抗原。每一个 H 抗原成分的最后确定均应根据 H 单因子血清的检查结果, 没有 H 单因子血清的要两个 H 复合因子血清进行核对。

检出第 1 相 H 抗原而未检出第 2 相 H 抗原的或检出第 2 相 H 抗原而未检出第 1 相 H 抗原的, 可在琼脂斜面上移种 1~2 代后再检查。如仍只检出一个相的 H 抗原, 要用位相变异的方法检查其另一个相。单相菌不必做位相变异检查。

(4)Vi 抗原的鉴定: 用 Vi 因子血清检查。已知具有 Vi 抗原的菌型有伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、都柏林沙门氏菌。

(5)菌型的判定和结果报告: 综合以上生化试验和血清学分型鉴定的结果并报告结果。

思考题

- 1.试述水产品中微生物的来源。
- 2.控制水产品中微生物的主要有哪些方法?
- 3.来源于水产品自身的致病菌有哪些?
- 4.如何控制沙门氏菌对于水产品的污染?
- 5.副溶血弧菌有何特点?由于什么原因引起此类中毒?
- 6.细菌总数的测定有何意义?
- 7.举例说明水产品的微生物检验步骤与方法。