

1.

试对光学显微镜和透射电镜、扫描电镜、扫描隧道显微镜在原理、样品制备和观察方面的异、同进行分析、比较

基本原理：光学显微镜和透射电镜都是将光源透过样品后会聚成像，其中光学显微镜使用可见光，而透射电镜使用电子束作为光源。扫描电镜和扫描隧道显微镜是通过对样品表面进行扫描后成像，其中扫描电镜使用电子束轰击样品表面并激发产生二次电子，二次电子的信息被收集、处理后形成物像。而扫描隧道显微镜是用很细的针尖在样品表面扫描，收集、处理样品和针尖间的隧道效应电流信息后形成物像。样品制备：光学显微镜和扫描隧道显微镜可以对处于生理状态下的样品进行直接观察，光学显微镜也可以将样品进行染色后观察。电子显微镜的工作环境要求真空，因此样品必须经过干燥、固定，无法观察处于生理状态下的样品。光学显微镜和透射电镜对样品的厚度有要求，制备的样品应允许光源透过，不能太厚。透射电镜的观察样品一般需要进行超薄切片制样。扫描电镜和扫描隧道显微镜对样品的厚度没有特别要求。观察：光学显微镜可以用肉眼从目镜中直接观察，而电子显微镜和扫描隧道显微镜都只能通过荧光屏观察形成的物像，无法直接观察。

2 你认为样品制备和显微观察中（光镜和电镜）应通过哪些方法改变样品的反差以改善观察效果？

光学显微镜：对样品染色后改善反差；更换聚光器和物镜，使用暗视野显微镜、相差显微镜 使用荧光显微镜时针对不同的目标选用不同的荧光染料 在相同条件下适当降低照明亮度  
电子显微镜：扫描电镜在进行样品制备时喷金 透射电镜对样品进行负染、正染 透射电镜用投影法制样

## 无菌技术

器具和培养基不含任何微生物；在转接、培养时防止其它微生物的**污染**，被操作的微生物培养物自身也不污染环境；

## 二元培养物

培养物中只含有二种微生物，而且**有意识地保持二者之间的特定关系**，例如**寄生或捕食**（或直接举病毒—细胞等的例子），是微生物**纯培养的一种方式**

## 荧光显微镜

用**紫外线等短波长光**作为激发光源，使被用**荧光染料**染色的样品发出**可见光（荧光）**成像的显微镜

## 为什么无菌技术和纯培养技术是微生物学建立与发展的基石？

微生物个体微小，对微生物的研究和利用多以群体为对象，群体需通过培养获得

通常情况下微生物纯培养物才能保证结果的可重复性

自然界中微生物混杂存在，无菌技术才能保证培养物始终是由相同的微生物组成

## 2. 试分析比较用固体培养基获得微生物纯培养各方法的特点。

稀释倒平板法，细菌分离效果好，但相对操作麻烦，不利于热敏感菌和好氧菌的生长

涂布平板法，方便，但有时涂布不均匀

平板划线法，方便，但无法进行计数

稀释摇管，对厌氧菌进行纯培养分离，操作和观察均相对麻烦

选择平板，利用选择性培养条件（例如加抗生素，或用牛奶平板）较快地分离获得目的菌

## 为什么使用 100×物镜时需要在镜头和载玻片间滴加香柏油？

香柏油的较空气的介质折射率为高，因此使用香柏油可以提高显微镜的分辨率，

写出分辨率与波长、介质折射率、镜口角关系的公式

分辨率（最小可分辨距离）= ———

100 倍物镜需要的照明亮度很高，香柏油和玻璃的介质折射率相近，使用时可以减少光线的折射和反射，使更多的光线进入视野，提高照明亮度。如果使用 100 倍物镜时不滴加香柏油，则光线很暗，无法看清物像

试分析大肠杆菌、粘细菌、蛭弧菌、放线菌、霉菌、酵母在个体形态、繁殖方式上各有什么特点？

**大肠杆菌：单细胞，杆状（1分），二分裂方式繁殖（1分）**

**粘细菌：营养细胞为单细胞杆状（1分），可形成多个细胞聚集成子实体（1分）、其中有粘孢子，以二分裂方式繁殖（1分），粘孢子只是休眠结构（1分），子实体结构则有利于粘孢子的传播**

**蛭弧菌：**细胞杆状，呈不足一圈的弯曲（弧状）（1分），鞭毛偏端生，多为单根鞭毛（偏端单生），行寄生生活时以复分裂方式繁殖（1分）。

**放线菌：**单细胞，多由分枝发达的菌丝组成（1分），有基内菌丝（营养菌丝）、气生菌丝、孢子丝（繁殖菌丝）三种（1分），以无性孢子和菌丝短片方式繁殖（1分）

**霉菌：**分枝发达的菌丝组成（1分），有基内菌丝（营养菌丝）、气生菌丝、孢子丝（繁殖菌丝）三种（1分），有些霉菌的菌丝会可形成特化结构（1分），以无性孢子、有性孢子、和菌丝短片方式繁殖（1分）

**酵母菌：**单细胞，圆形或椭圆形（1分），也有可形如丝状的酵母（丝状酵母）（1分），以芽殖、裂殖二种方式进行无性繁殖（1分），以形成子囊和子囊孢子的形式进行有性繁殖（1分）：

支原体有何基本特点？为什么对一般细菌无作用的多烯类抗生素却可以选择性地抑制支原体？该如何检测支原体的存在？

**支原体基本特点：**

进化中形成没有细胞壁的细菌（1分），形态呈多形态（1分），可以通过细菌过滤器（1分）

营养要求苛刻，但可在人工培养基平板上形成菌落（1分）

有些是人、动植物的致病菌（1分）

支原体常造成细胞培养的污染（1分）

支原体在生长时需要从环境中摄取胆固醇类甾醇（4 C 环）（1分），以稳定细胞膜的结构（1分），而其他细菌细胞膜内起稳定细胞膜结构的多为hopanoid（藿烷类化合物或类何帕烷，5C 环）（1分），而多烯类抗生素的作用靶点是细胞膜中的胆固醇类甾醇（1分），对hopanoid无作用，因此多烯类抗生素可抑制支原体而对一般细菌无作用

**支原体检测：**

1) 将样品通过细菌过滤器后在平板上进行培养，看是否形成支原体特征性的“油煎荷包蛋”状的微小菌落（2分）

2) 用特异的荧光染料（Hoechst33258）进行染色后观察细胞外是否有荧光颗粒出现（2分）

3) 针对细菌的特异性DNA序列（例如16S rDNA）进行分子生物学检测（1分）

观察、判断某个细菌是否具有鞭毛有些什么方法？请设计实验证实鞭毛与细菌运动能力以及细菌趋化性之间的关系

观察、判断某个细菌是否具有鞭毛的方法

电子显微镜观察（1分）

鞭毛染色观察（1分）

显微镜下观察细菌的运动方式进行判断（1分）

半固体穿刺观察细菌菌落沿穿刺线分布情况进行判断，或将菌点种在半固体平板上观察菌落的扩散情况（2分）

基因组测序，分析是否存在鞭毛相关基因（1分）。

### 设计实验证实鞭毛与细菌运动能力以及细菌趋化性之间的关系

将鞭毛相关基因敲除（1分）分别得到突变株和野生型菌株，

后用上述显微镜和半固体培养基比较突变株和野生菌的运动能力改变（2分）

用栓菌实验（将鞭毛固定在载玻片）证实鞭毛通过旋转推动细菌前进（1分）

将鞭毛固定在小球上后观察鞭毛旋转方向对其运动性的影响（1分）

将分别含有中性物质，引诱剂、趋避剂的毛细管插入三个细胞浓度相同的野生型菌株培养液中，一段时间后比较毛细管中和原培养液中细菌浓度的差异（3分）

上述实验用鞭毛缺失突变株进行同样实验，比较结果的差异（1分）。

## Archaea

古生菌，根据 16 S rRNA（1分）序列建立的与细菌和真核生物（1分）并列的一种微生物分类单元。如果不写古生菌或古菌则本题为 0 分

### 周质空间

细胞膜和细胞壁间的狭小空间（1分），多见于革兰氏染色阴性细菌（1分），也有人认为革兰氏染色阴性和阳性菌均有（1分）

### 原生质球

革兰氏阴性菌（1分），通过溶菌酶等处理去掉细胞壁中的肽聚糖层，但细胞膜外仍保留有外膜（1分），呈球形

### 假酵母

真核生物的单细胞真菌，即酵母菌（1分），但目前尚未发现有性生殖过程（1分）

请结合细胞壁结构分析革兰氏染色阳性和革兰氏染色阴性细菌的特点

阳性菌的细胞壁成分简单，肽聚糖层厚（1分），阴性菌的细胞壁成分复杂，肽聚糖层薄，同时有以脂多糖为主要成分的外膜（1分）

1) 革兰氏染色阳性菌的机械强度高于阴性菌（1分）

2) 阳性菌对青霉素的敏感性大于阴性菌（1分）

3) 阳性菌对溶菌酶的敏感性大于阴性菌（1分）

4) 阴性菌产生内毒素，而阳性菌一般无内毒素，有些产生外毒素（1分）

请列举并简要分析至少 6 个有助于细菌适应环境的细胞结构

鞭毛—驱避运动

菌毛—粘附作用帮助细菌定殖在特定部位

糖被—提供保护以及粘附作用帮助细菌定殖在特定部位

细胞壁—提供机械保护

细胞膜—膜成分（例如磷脂的不饱和脂肪酸含量）的多样性反映了细菌对不同环境的适应

颗粒状储藏物—储藏营养、调节细胞内环境

气泡—帮助水生细菌调节在水中的位置

细菌和古生菌细胞壁在结构上有何异同？

相同：细胞壁的功能类似，即为细胞提供保护（1分），且均可通过革兰氏染色分成阳性菌和阴性菌（1分）

革兰氏染色阳性细菌和古生菌的细胞壁结构类似（1分），均具有结构类似的肽聚糖，即由双糖单位和短肽构成（1分）

不同：古生菌的肽聚糖为假肽聚糖，双糖单位之间的连接是 $\alpha$ -1,3糖苷键（1分），而细菌的肽聚糖双糖单位间是 $\alpha$ -1,4糖苷键（1分）

革兰氏染色阴性细菌的细胞壁含有外膜（1分），革兰氏阴性古生菌细胞壁仅由S层蛋白构成（S层蛋白直接连在细胞膜表面）（1分）

试结合微生物学实验课的内容，谈谈在选择、配制和使用培养基时应注意哪些方面的内容。你们在实验中是如何做的？有何体会？

培养基：人工配制的，适合微生物生长繁殖或产生代谢产物的营养基质。任何培养基在配置时都应该考虑微生物生长所需要六大营养要素：碳源、氮源、无机盐、能源、生长因子、水（1分）任何培养基一旦配成，必须立即进行灭菌处理（2分），主要的灭菌方法：整体常规高压蒸汽灭菌（1分），相关成分分开灭菌（1分），有些成分或整个培养基过滤灭菌（1分），分开灭菌的成分在临用前混合。在微生物学研究和生产实践中，配制合适的培养基是一项最基本的要求。应从下列三个方面进行考虑：1、选择适宜的营养物质（1分）2、营养物的浓度及配比合适（1分）3、物理、化学条件适宜（1分）4、经济节约（1分）5、精心设计、试验比较（1分）

化能自养微生物是如何被发现的？试从代谢角度分析化能营养菌对人类生活的影响。

通过对硫细菌和氨氧化菌的研究发现的 通过观察硫细菌胞内硫粒的消失和重新出现，以及检测水中硫酸的产生（2分）通过观察土壤灭菌前后氧化氨产生硝酸盐的差别（2分）化能异养： 有氧呼吸：在有氧情况产生能量的主要方式，产生能量效率高，我们日常生活中遇到的很多细菌都是以这种方式生活（2分） 无氧呼吸：在无氧情况下依然通过氧化磷酸化过程产生能量，有较高的产能效率（1分）。对人类生活有正反二方面的影响，例如反硝化作用以硝酸盐作为最终电子受体进行厌氧呼吸，该过程可将农田中的硝酸盐变成氮气减

少土壤肥力，一般可通过松土、排除多余水分等方式减低影响（1分）。另一方面，硝酸盐容易溶于水，常通过雨水流入水体，反硝化作用可使水中的硝酸盐以氮气的方式重返大气，使地球上N的循环不致中断，并保证水质。（1分）发酵：在对物质氧化产生能量的过程中没有外源电子受体，产能效率较低（1分），但可产生很多有用的产品，例如酒精（1分）。不同的发酵产物也可作为分类鉴定的指标，例如VP试验、甲基红试验，产酸产气试验等（1分）化能自养 通过对无机物的氧化来获得能量，产能效率总体较低，菌体生长较慢（1分）。这类菌对我们的生活也有正反二方面的影响。例如：铁细菌以二价铁为能源物质生长，会造成铁质水管产生大量铁锈，影响水质甚至堵塞管道，氧化亚铁硫杆菌以煤矿中常见的黄铁矿（硫化亚铁）为能源物质生长，产生大量的酸和三价铁，造成环境污染（1分）。同时，该菌可用于生物冶金，从尾矿、贫矿中提炼贵金属。（1分）

一般可采用哪些方法对细菌的生长进行测量？从细菌的生长曲线中能获得什么信息？假设对某细菌在进行培养时在某时间每毫升培养液中有10万个细胞，经过3小时后该培养液中细胞数量增加到每毫升1亿个，试推算出该菌在此条件下的生长代时。（提示： $\log 2 = 0.301$ ）

细菌的生长是群体生长，因此对细菌生长测量的都是细菌群体的生长（1分），包括数量和生物量，主要方法有：菌落计数（1分）血球板计数（显微镜直接计数）（1分）比浊法（分光光度计测定光密度值）测定生物量（1分）重量法测定生物量（1分）生理指标法测定生物量（1分）如果液体样品中细菌数量少，可以用膜过滤浓缩后再测定菌数（1分）生长曲线画图（1分）从生长曲线获得的信息：将细菌接种到一个固定体积的液体培养基中后，通过对细菌生长情况的测定得知细菌在生长过程中会经历4个时期1、迟缓期（适应期）：细菌倒了一个新的生长环境后需要一定时间来对生长环境进行适应（1分）2、对数生长期：以最快的速度生长，菌数成指数增加（1分）3、稳定期：随着营养的消耗和代谢产物的积累，环境条件逐步变得不适合细菌的生长，生长速率下降直到0（新增菌数与死亡菌数相当），此时培养液中活菌数最高，代谢产物积累量最大（1分）4、衰亡期：环境进一步不适合细菌生长，死亡菌数超过新增菌数，群体为负增长（1分）以上若仅仅列出各生长时期的名称而没有评论，则给一半分数10万个细胞：100000，10<sup>5</sup> 经过3小时后该培养液中细胞数量增加到每毫升1亿：100000000，10<sup>8</sup>  $10^8 = 10^5 \times 2^n$   $n = (\log 10^8 - \log 10^5) / \log 2 = 8 - 5 / 0.301 = 10$   $G = 3 / 10 = 0.3$  小时 也就是18分钟 以上一共3分，如果有推导过程则为满分（3分），如果没有推导或者推导不正确，则为1分

### 完全培养基

在一定条件下含有某种微生物所有营养缺陷突变菌株（2分）生长繁殖所需的所有营养物质的培养基，可用于维持该菌所有营养缺陷型菌株生长的需要。

### 呼吸

生物氧化过程中对底物进行彻底氧化，释放的电子交给最终电子受体（外源电子受体）（1分），产生能量和还原性产物。有有氧呼吸和无氧呼吸二种（1分）

### 生长限制因子

处于较低浓度范围内（1分），可影响细菌生长速率的营养物成分（1分）

### Generation time

代时（不写中文扣一分），细菌（微生物）分裂繁殖一代所需要的时间（2分），代表细菌（微生物）的生长速率

为什么说培养基培养基几乎是一切对微生物进行研究和利用工作的基础？能否找到一种培养基，使所有的微生物都能良好地生长？为什么？

不行（2分）举例说明（4分）

在产能代谢中微生物可通过哪几种方式形成 ATP？

底物水平磷酸化（2分）氧化磷酸化（2分）光合磷酸化（2分）仅写出名称给1分，适当解释、分析给另1分

试分析液态饮料生产时可采取哪些措施防止微生物对产品品质的影响？

过滤除菌（1分）2）巴士德消毒（1分）3）超高温瞬时灭菌（1分）4）添加防腐剂（1分）5）密封包装（1分）6）辐照灭菌（1分）7）冷藏（1分）8）热储（1分） 本题8个得分点，

与细菌相比病毒的生长规律有何特点？试设计实验测定噬菌体的生命周期，请绘图并分析讨论通过实验可能获得有关噬菌体生活规律的哪些数据。

病毒的生长规律：复制，而细菌为二分裂（2分），包括吸附、侵入、脱壳、大分子的生物合成、装配、释放，所以与细菌等细胞生物的生长明显不同的5个阶段（5分）。实验操作（7分）1、用噬菌体的稀释液感染高浓度的宿主细胞；2、数分钟后，加入抗噬菌体的抗血清（中和未吸附的噬菌体）；3、将上述混合物大量稀释，终止抗血清的作用和防止新释放的噬菌体感染其它细胞；4、保温培养并定期检测培养物中的噬菌体效价（对噬菌体含量进行计数）；5、以感染时间为横坐标，病毒的感染效价为纵坐标，绘制出病毒特征性的繁殖曲线；一般用一步生长曲线表示、在画图中应注明：吸附期、潜伏期、隐蔽期、裂解期，并指明裂解量（6分）

何为营养缺陷型？应如何得到 X 菌的某种营养缺陷型（例如 his<sub>-</sub>）菌株？简述并分析应采取的实验步骤和原理。

营养缺陷型：由于突变失去合成某种必须生长因子的能力（2分），必须从培养基中添加相应的生长因子才能生长（2分）的微生物 实验设计：1）用基本培养基培养 x 菌株，然后用紫外线等进行诱变处理（2分）2）将诱变后的菌液稀释涂布到完全培养基平板表面，长出分散的单个菌落（2分）3）将完全培养基平板表面的菌影印到基本培养基和完全培养基平板表面（2分）4）从完全培养基平板表面挑取在对应的基本培养基表面不长的菌落，用完全培养基培养，获得培养物（2分）5）将得到的微生物培养物点种到基本培养基以及加有 His（组氨酸）的基本培养基平板表面，在后者生长的细菌应为 his<sub>-</sub> 菌株（2分）6）将获得的 his<sub>-</sub> 菌株进行进一步验证，该菌应在基本培养基中不长，而在加有 His（组氨酸）的基本培养基中生长（1分）

一个质粒载体需要哪些基本的遗传学元件？请通过查阅文献举例（除了书上列的 pBR322 外）怎样的质粒载体才有利于基因的克隆和重组子的筛选？

质粒载体所需要的基本遗传原件 1）复制起始区 2）酶切位点 3）遗传标记 上述每点 2 分



（仅提到名词而没有解释和说明的给一半的分数），举例：9分（

### Prophage

原噬菌体，或者前噬菌体。温和噬菌体侵入其宿主的细胞后，它在选择走溶源化道路时，其基因组可整合到宿主的染色体上或者以质粒的形式存在于宿主的细胞质中，这时的噬菌体基因组核酸就被称为原噬菌体。

### 转染

病毒基因组通过遗传转化而非正常感染的途径（1分）进入宿主细胞并产生病毒子代的过程（1分）

### 细菌素

由质粒编码的一种蛋白（1分），能够抑制或杀死近缘、甚至同种不同株的细菌（1分）

### Shuttle vector

穿梭载体，拥有2个复制起始区的质粒（1分），在不同属种的宿主细胞中具有自我复制能力（1分），方便对基因的克隆与操作。

### 何为毒粒？试结合功能讨论其结构特点。

也称病毒颗粒：病毒的细胞外颗粒形式，也是病毒的感染性形式。（1分）结构：基因组，DNA或RNA，是病毒的遗传物质。（2分）蛋白质外壳：包围着病毒核酸的蛋白质外壳，由蛋白质亚基按对称的形式、有规律地排列而成，是病毒毒粒的基本结构。起保护作用（1分），并通过识别宿主细胞上的特异性受体启动感染（决定感染的特异性）（1分）有些在蛋白质外壳外还有外膜（1分）

### 自然遗传转化与人工转化之间有什么关系？为什么在一般情况下它们转化质粒的成功率有如此大的差别？

自然转化：感受态的建立受基因控制，是细菌自身的生理形状（1分）人工转化：用外在干预的方法使细菌细胞建立人工感受态，处于可吸收外源DNA的状态，与细菌自身的基因控制无关（1分）质粒一般是双链环状的具有自主复制能力的染色体外DNA分子，和染色体一般不具有同源性，不容易和染色体发生同源重组（1分）自然转化时，双链DNA被感受态细胞吸附后，细胞水解其中一条链，只有一条链进入细胞，这样质粒的结构被破坏只有通过多个质粒分子DNA片段的重组才能重新恢复到可自主复制的状态，效率相对较低（2分）人工转化时，进入细胞的质粒DNA结构未被破坏，因此效率相对高（1分）

### 为什么说微生物学不仅为基因工程提供了理论基础，同时也提供了操作技术？

基因工程所用克隆载体主要是用病毒、噬菌体和质粒等来自微生物的材料改造而成（1分）；②基因工程所用千余种工具酶绝大多数是从微生物中分离纯化得到的（1分）；③微生物细胞是基因克隆的宿主，即使植物基因工程和动物基因工程也要先构建穿梭载体，使外源基因或重组体DNA在大肠杆菌中得到克隆并进行拼接和改造，才能再转移到植物和动物细胞中（1分）；④为大规模表达各种基因产物（基因表达的宿主），从事商品化生产，通常都是将外源基因表达载体导入大肠杆菌或是酵母菌中以构建成工程菌，利用工厂发酵来实现的（1分）；⑤微生物的多样性，尤其是抗高温、高盐、高碱、低温等基因，为基因工程提供了极其丰富而独特的基因资源；（1分）⑥有关基因结构、性质和表达调控的理论主要也是来自对微生物的研究中取得的，或者是将动、植物基因转移到微生物中后进行研



究而取得的，此外基因工程是在细菌自然遗传转化、人工转化的基础上发展起来的。因此微生物学不仅为基因工程提供了操作技术，同时也提供了理论指导。（提到上述任何一个方面给1分）

**为什么能用生物大分子作为衡量生物进化的标尺？有哪些选用原则？建立 16S rRNA 系统发育树的意义何在？**

为什么能用生物大分子作为衡量生物进化的标尺？大量的研究表明：蛋白质、RNA 和 DNA 序列进化变化的显著特点是进化速率相对恒定，也就是说，分子序列进化的改变量(氨基酸或核苷酸替换数或替换百分率)与分子进化的时间成正比。因此，这些生物大分子被看作是分子计时器(molecular chronometers)或进化钟(evolutionary clock)，它们真实地记录了各种生物的进化过程。因此，我们可以通过比较不同类群的生物大分子序列的改变量来确定它们彼此系统发育相关性或进化距离。在两群生物中，如果同一种分子的序列差异很大时，表示它们进化距离远，这两群生物在进化过程中很早就分支了。如果两群生物同一起来源的大分子的序列相同，说明它们处在同一进化水平上。假设在进化的过程中进化速率相对恒定，则分子序列进化的改变量(氨基酸或核苷酸替换数或替换百分率)与分子进化的时间成正比

a) 在两群生物中，如果同一种分子的序列差异很大时，-----进化距离远，进化过程中很早就分支了。b) 如果两群生物同一起来源的大分子的序列基本相同，-----处在同一进化水平上。

有哪些选用原则？

- 1) 在所需研究的种群范围内，它必须是普遍存在的。
- 2) 在所有物种中该分子的功能是相同的。
- 3) 为了鉴定大分子序列的同源位置或同源区，要求所选择的分子序列必须能严格线性排列，以便进行进一步的比较。
- 4) 分子上序列的改变（突变）频率应与进化的测量尺度相适应。

大量的资料表明：功能重要的大分子、或者大分子中功能重要的区域，比功能不重要的分子或分子区域进化变化速度低。16S rRNA 是一个好的分子标尺的原因

- 1) rRNA 具有重要且恒定的生理功能，且在生物中普遍存在；（1分）
- 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；（1分）
- 3) 16SrRNA 分子量大小适中，便于序列分析；（1分）
- 4) rRNA 在细胞中含量大(约占细胞中 RNA 的 90%)，也易于提取；（1分）

建立 16S rRNA 系统发育树的意义

- 1) 提出了一种全新的正确衡量生物间系统发育关系的方法，使生物进化的研究范围真正覆盖所有生物类群；（1分）
- 2) 对探索生命起源及原始生命的发育进程提供了线索和理论依据；（1分）
- 3) 突破了细菌分类仅靠形态学和生理生化特性的限制，建立了全新的微生物分类、鉴定理论；（1分）
- 4) 为微生物生物多样性和微生物生态学研究建立了全新的研究理论和研究方法，特别是不经培养直接对生态环境中的微生物进行研究。（1分）

**病原菌进入人体时会有怎样的遭遇？它们有哪些反制措施？造成怎样的后果？请结合细菌细胞结构及组分进行讨论和分析。**

病原体面对的宿主免疫防御（进入人体的遭遇）：非特异性免疫：生理屏障皮肤和组织的机械阻挡作用，阻止其进入机体内部（1分），包括血脑屏障、血胎屏障（1分）体内和体表共生菌群的排阻作用（1分）特定结构及分泌液的抗菌、抑菌作用（10分，提到下面任何一点给1分）：包括：各种分泌液（汗腺、皮肤腺分泌物等）、分泌性体液（唾液、泪水、乳汁、鼻涕、痰等）中的杀菌、抑菌成分；呼吸道、消化道、泌尿生殖道表面粘膜所分泌的粘液的化学性屏障作用。机体的机械方式如纤毛运动、咳嗽和喷嚏排除异物；眼泪、唾液和尿液的清洗作用；体液因素补体系统的攻击（1分）溶菌酶的攻击（1分）细胞因素各类吞噬细胞、自然杀伤细胞的攻击（1分）综合作用炎症反应对病原菌的杀伤作用（1分）10

个得分点，但最高不超过 7 分 特异性免疫：细胞成分刺激机体产生特异性免疫反应，T 细胞分化成熟后成为致敏淋巴细胞对的杀伤作用（1 分），B 细胞分化成熟后分泌抗体的杀伤作用（1 分） 本部分 2 个得分点 细菌的反制措施：通过菌毛（1 分）、糖被（1 分）等粘附在病灶，以定植通过产生水解酶（1 分）类使组织疏松，便于扩散有些菌通过荚膜（1 分），有些菌通过分泌血浆凝固酶（1 分）抵抗吞噬细胞的攻击分泌溶血素等活性物质抑制白细胞的趋化作用（1 分）通过 LPS 等抗原成分的多变逃避宿主特异性免疫系统（1 分） 7 个得分点，但本部分最高得分为 4 分 造成的后果 通过生长繁殖损害机体造成疾病（1 分）通过产生内毒素、外毒素等危害机体健康（1 分）

**为什么说巴士德和科赫是微生物学的奠基人？请设计实验证明某种动物疾病确是微生物引起的。在此基础上，应如何揭示其传染途径，并建立对该病进行快速诊断、预防，和治疗的技术？（请注意实验对照的设置）**

巴士德：(1) 发现并证实发酵是由微生物引起的；（1 分）(2) 彻底否定了“自然发生”学说；（1 分）(3) 免疫学——预防接种（1 分）(4) 建立巴斯德消毒法（1 分） 上述得分最高：3 分 科赫：1) 细菌纯培养方法的建立（1 分）2) 设计使用培养基培养各种微生物（1 分）3) 建立流动蒸汽灭菌技术（1 分）4) 对显微技术的改进——染色观察和显微摄影（1 分）5) 证实微生物（细菌）是传染病的原因，包括具体证实了炭疽杆菌是炭疽病的病原菌（1 分）；发现了肺结核病的病原菌（1 分）6) 提出了证明某种微生物是否为某种疾病病原体的基本原则——著名的柯赫原则（1 分） 上述得分最高 5 分 实验设计：1) 病灶取样，分离微生物并获得纯培养（1 分）2) 用纯的微生物感染健康个体，看是否发生相同的疾病（1 分）3) 从发病的个体中应该能分离到到相同的微生物（1 分）4) 对照：健康个体的相同部位不能分离得到这种微生物（1 分） 应如何揭示其传染途径：用纯种感染健康个体的不同部位，观察得病情况（1 分） 建立对该病进行快速诊断、预防，和治疗的技术：1) 用灭活、减毒的微生物制备疫苗，接种预防（1 分）2) 进行抗生素敏感实验，对得病个体选用特定的抗生素进行治疗。（1 分）3) 对该菌进行分类鉴定，同特定的核酸探针或 PCR 进行快速检测（1 分）

### **VBNC state**

（viable but nonculturable state），微生物活的非可培养状态（1 分），一些原本可以培养微生物处于不良环境条件下时产生的一种特殊的生存方式或“休眠”状态，是在常规培养条件下培养时不能生长繁殖，但仍然是具有代谢活性的活菌。一般表现为细胞保持完整，胞内酶维持活性，染色体及质粒 DNA 均保持稳定，而用显微镜观察，其细胞会表现为缩小成球状，细胞表面产生皱折等。

### **核酸探针**

一段与被测定的核苷酸序列（靶序列）互补的带标记的核苷酸（DNA 或者 RNA）单链（1 分），长度通常是十几～数千个碱基。核酸探针应是一段特异的已知片段（1 分），通常是一个基因序列或基因序列片段，其核苷酸序列可以是已知的或未知。

### **外毒素**

病原细菌，主要是一些革兰氏阳性菌，在生长过程中合成并分泌到胞外的毒蛋白（2 分），如破伤风痉挛毒素、白喉毒素等；也有存于胞内当细菌溶解后才释放的如痢疾志贺菌的肠毒素。由基因直接编码。

### 非特异免疫

机体的一般生理防卫功能，又称天然免疫(innate immunity)；是在种系发育过程中形成的，由先天遗传而来（1分），防卫任何外界异物对机体的侵入而不需要特殊的刺激或诱导。主要包括生理屏障、细胞因素和体液因素（1分）。

### 请分析水环境中存在的微生物的特点及对人类生活的影响

分布特点：数量和种类与接触的土壤及人类活动有密切关系（1分）分布上更多的是吸附在悬浮在水中的有机物上及水底（1分）真正的海洋细菌为嗜盐菌，在缺少氯化钠的情况下是不能生长的（1分）多能运动，有些具有很异常的形态（0.5分）生活在深海的为耐压菌（0.5分）海水中发现的细菌多为嗜冷菌（0.5分）在水体中有些菌会进入 VBNC（活的非可培养状态）状态（0.5分）进入水体的致病菌可因水体的自我净化作用而减少和被清除（0.5分）对人类生活的影响富营养化的水体可通过水花或者赤潮影响水质（1分）致病菌可以水为渠道威胁人类的健康（1分）从水环境中可以分离得到重要的微生物资源（0.5分）

### 哪些分子生物学技术被用于对细菌的分类、鉴定？

16S rRNA 序列绘制的分子进化树，其他有分类学价值的生物大分子（2分）； GC%含量（1分）基因组 DNA 序列的相似程度（同源杂交、电子杂交）（2分）核酸探针或特异性 PCR：对微生物的快速鉴定（1分）

### 对细菌内毒素和细菌外毒素的免疫应答有何不同？若遇到刚产生深口外伤的病人你认为应如何处理？

外毒素是蛋白质，抗原性强，特异性强（1分），内毒素是脂多糖，抗原性弱且结构多变（1分）。外毒素为蛋白质类的完全抗原，因此机体可以对其产生特异性免疫，即能产生针对外毒素的抗体，我们可以通过注射疫苗（脱毒的毒素）进行预防或通过注射抗毒素（免疫动物得到的抗血清）进行治疗。而内毒素抗原性弱，一般产生是非特异性免疫。（2分）。遇到外伤病人，应立即注射破伤风针（抗毒素）以预防破伤风菌的感染，因为破伤风梭菌是一种厌氧菌，可能通过伤口而感染，并在伤口中的厌氧环境中生长并可以产生破伤风毒素，该外毒素毒性很强，只要很少的量（在细菌生长尚未引起机体产生免疫反应时）即可致命（通过与神经的结合），只能预防，不能治疗。因此，哪怕通过外伤感染破伤风菌的几率很低，也必须立即注射抗毒素（2分）。