

第六章 微生物的生长及其控制

第一节 微生物纯培养的获得

纯培养：指在实验室条件下，对单细胞来说由一个细胞或一种细胞群繁殖得到的后代称为纯培养。

一. 纯培养获得方法：

(一) 稀释法

1. 用液体培养基分离纯培养：稀释法进行液体分离必须在同一个稀释度的许多平行试管中，大多数（一般应超过 95%）表现为不生长。

2. 稀释平板法分离纯培养：使微生物在固体培养基平板上形成单个菌落的基本方法。

(二) 划线法

(三) 涂布法

(四) 单细胞（孢子）挑取法

(五) 选择培养法：抑制大多数其它微生物的生长；使待分离的微生物生长更快；（没有一种培养基或一种培养条件能够满足自然界中一切生物生长的要求，在一定程度上所有的培养基都是选择性的。）使待分离的微生物生长“突出”。

1. 利用选择平板进行直接分离

高温下培养：分离嗜热细菌；培养基中不含 N：分离固氮菌；培养基加抗生素：分离抗性菌；创造无氧环境下：分离厌氧菌。

2. 富集培养

二. 微生物生长的测定

单细胞微生物的生长不是依据细胞大小，而是依据细胞数目的增加

作为生长测定的指标。

微生物生长：单位时间里微生物数量或生物量（Biomass）的变化

评价培养条件、营养物质等对微生物生长的影响；评价不同的抗菌物质对微生物产生抑制（或杀死）作用的效果；客观地反映微生物生长的规律。

（一）直接计数法（全数法）

1. 涂布计数法

2. 计数器计数法

3. 比例计数法：将已知颗粒浓度的样品（例如血液）与待测细胞浓度的样品混匀后在显微镜下根据二者之间的比例直接推算待测微生物细胞浓度。

4. 电子自动计数器计数法

5. 比浊法：在一定波长下，测定菌悬液的光密度，以光密度（optical density, 即 O.D.）表示菌量。

（二）间接计数法（活菌计数法）

1. 平皿菌落计数法

2. 薄膜过滤计数

3. 稀释法

（三）测定细胞物质

1. 以干重、湿重直接衡量微生物群体的生物量；

2. 通过样品中蛋白质、核酸含量的测定间接推算微生物群体的生物量；

3. 测定某种生理指标法：测定微生物生长的方法较多，各具特点，可根据具体情况选用某种或某几种方法，相互配合使用。

第二节 微生物生长规律

一、细菌的个体生长

细菌个体生长包括细胞结构的复制与再生，细胞的分裂与控制等。

二. 细菌纯培养的群体生长规律（生长曲线）

生长曲线：把一定量单细胞微生物接种于新鲜液体培养基中，在保持培养液体积不变的条件下，随着时间的增长，细胞数目的增长呈现一定的规律，以细胞数目为对数为纵坐标，生长时间为横坐标，绘制所得到的曲线为生长曲线（也叫繁殖曲线）。

生长曲线代表着单细胞微生物从开始到死亡整个过程中的动态变化。

一条典型的生长曲线至少可以分为：迟缓期，对数期，稳定期和衰亡期等四个生长时期。

(一) 延迟期 (Lag phase) : 少量细菌细胞接种到新鲜培养基，一般并不立即进行繁殖，故开始一定时间内，细菌数目几乎不增加，其生长速率近乎为零，这段时间为延迟期。

1. 延迟期产生的原因：调整代谢

2. 延迟期细胞的特征：分裂迟缓、代谢活跃

3. 影响延迟期长短的因素：迟缓期的长短与菌种的遗传性、菌龄以及接种前后所处的环境条件等因素有关，短的只需要几分钟，长的需数小时。

4. 应用：指导发酵工业生产

(二) 对数期 (Log phase) : 又称指数生长期 (Exponential phase)。

以最大的速率生长和分裂，细菌数量以几何级数增加： $1 \rightarrow 2 \rightarrow 4 \rightarrow 8 \rightarrow \dots \dots$ 即 $2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \dots \dots 2^n$ 。细胞数目的对数与时间成直线关系。

① 代数 (n) :

② 生长速率常数 (μ) : 每单位数量的细菌或物质在单位时间 (h) 内增加的世代数。

③ 代时 (G) : 增殖一代的时间

1. 对数期产生的原因：细胞适应了新环境后产生大量酶，代谢旺盛，而大量分裂繁殖。

2. 对数期细胞的特征及应用

3. 影响对数期长短的因素：主要是营养和环境因素。

(三) 稳定期 (Stationary phase) : 稳定生长期又称恒定期或最高生长期，此时培养液中活细菌数最高并维持稳定。

1. 稳定期出现的原因：由于营养物质消耗，代谢产物积累和 PH 等环境变化。

2. 稳定期细胞的特征：细菌代谢活性降低，细菌衰老并出现自溶，产生或释放出一些产物。细胞重要的分化调节阶段

3. 应用：稳定期的微生物在数量上达到了最高水平，产物积累也达到高峰，菌体的总量与消耗营养之间存在着一定的关系： $K = \text{总生长量} / \text{营养物总消耗量}$ ，可进行定量的生物测定。

4. 稳定期时间的长短：取决于菌种与环境条件，可采取补加营养

物、调节 PH、调整温度等措施延长该时期。

(四) 衰亡期 (Decline 或 Death phase) :营养物质耗尽和有毒代谢产物的大量积累,细菌死亡速率超过新生速率,整个群体呈现出负增长。

1. 衰亡期产生的原因:这个时期仍是由于环境变的更劣而形成的。

2. 衰亡期细胞的特征:菌体出现畸形、衰退形,细胞死亡并伴随自溶。

三. 连续培养 (Continuous culture) 在微生物的整个培养期间,通过一定的方式使微生物能以恒定的比生长速率生长并能持续生长下去的一种培养方法。

连续培养所依据的原理:根据单细胞微生物在液体

培养基中生长的特点:培养过程中不断的补充营养物质和以同样的速率移出培养物是实现微生物连续培养的基本原则。

连续培养装置:无菌培养基容器、无菌培养室、自动调节系统。

连续培养的主要参数:

稀释率:培养基每小时流过培养室的体积。

控制连续培养的方法

(一) 恒浊连续培养

(二) 恒化连续培养

四. 同步生长:

同步培养 (Synchronous culture):使群体中的细胞处于比较一致的,生长发育均处于同一阶段上,即大多数细胞能同时进行生长或分裂的培养方法。

同步生长:以同步培养方法使群体细胞能处于同一生长阶段,并同时分裂的生长。通过同步培养方法获得的细胞被称为同步细胞或同步培养物。

同步细胞获得方法:机械方法:离心方法;过滤分离法;硝酸纤维素滤膜法。

环境条件控制技术:温度;培养基成份控制;其他(如光照和黑暗交替培养)

同步培养物常被用来研究在单个细胞上难以研究的生理与遗传特性和作为工业发酵的种子,它是一种理想的材料。

第三节 理化因素对微生物生长与死亡的影响

响

环境中包含有多种理化因素,环境对微生物的影响大致可分三类:

适宜的环境:能促进微生物的生长;

不适宜的环境:使微生物生长发育受到抑制;

恶劣环境:使微生物死亡。

研究环境因素对微生物生长的影响的意义:

有助于了解微生物在自然界的分布及作用;

利用环境理化因素的作用人为的制定,杀死或抑制有害微生物的措施,达到消毒、灭菌的目的。

灭菌:指用物理或化学因子,除去物品上所有生活微生物(包括耐热的芽孢),灭过菌的物体不再有可存活的微生物。

灼烧灭菌法:

干热灭菌法:烘箱内热空气灭菌(160°C , 2小时)

湿热灭菌法:高压蒸汽灭菌(121°C , 15分钟; 115°C , 30分钟)

间歇灭菌

超高温灭菌: $135-150^{\circ}\text{C}$, 5-15秒,工业上发酵培养基;

$135-150^{\circ}\text{C}$, 2-6秒,牛奶或其它液态食品。

湿热比干热灭菌更好:更易于传递热量;更易破坏保持蛋白质稳定性的氢键等结构;

消毒:利用某种方法杀死或清除所有病原微生物的措施,可防止传染病的传播,消过毒的物品并非完全无菌。

方法有:煮沸消毒法;巴氏消毒法;也可用一些化学药物消毒,即消毒剂。

消毒剂:用以进行消毒的药物称为消毒剂。

防腐:指利用某些理化因子防止或抑制微生物生长繁殖的方法,用于防腐的化学药物称为防腐剂。

化疗:利用某些具有选择毒性的化学药物或抗生素,对生物体的深部感染进行治疗,可有效的清除宿主内的病原体,对宿主没有或基本上无损伤。

死亡:对微生物来说就是不可逆的丧失了生长繁殖的能力。即使再放到合适的环境中也不再繁殖。

无菌、无菌操作:不含活菌的物体。接种微生物的过程中防止其它杂菌感染的操作技术。

理化因素(包括:温度、辐射、渗透压、干燥、PH、氧及化学物质等)。

在一定条件下对微生物生长和死亡有很大的影响。

一、温度

(一) . 温度对微生物生长繁殖的影响

温度对微生物繁殖的影响表现在：随着温度的上升，细胞生化反应速率加快，生长速度加快，温度每升高 10℃，生化反应速率增加一倍；细胞重要组成：如蛋白质、核酸等都对温度较敏感，随着温度的继续上升，而遭受不可逆的破坏导致细胞死亡。

(二) . 微生物的生长温度范围

1. 最适生长温度
2. 最高生长温度
3. 最低生长温度：当温度超过微生物生长的最高温度或低于生长的最低温度都会对微生物产生杀灭作用或抑制作用。
4. 致死温度

(三) . 温度对微生物影响的机制

1. 高温对微生物影响的机制
2. 低温对微生物的影响

二. PH:

PH 主要作用于：引起细胞膜电荷的变化，而影响了营养物质的吸收；影响代谢过程中酶的活性；改变了环境中营养物质可给性及有害物质的毒性。

三. 氧

根据微生物生长与分子氧表现出的关系可将其分为：好氧、微好氧、耐氧、兼性厌氧、专性厌氧五种类型。

它们在液体培养中具有一定特征：

氧对不同微生物生长影响的作用：

好氧微生物：必需在有氧环境中生长的一类微生物。以有氧呼吸进行代谢活动，分子氧作为电子受体。如：很多细菌、放线菌、霉菌均属此类。

微量好氧微生物：在氧浓度较低的环境中生长，仍以有氧呼吸进行代谢。如：拟杆菌属个别种。

培养方法：通过摇瓶、通气、搅拌进行培养。

耐氧微生物：一类产能代谢不需氧，但分子氧对它们无害的微生物。如：一些乳酸菌。

兼性厌氧微生物：一类兼有两套酶系，其产能代谢在有氧时进行有氧呼吸，无氧时进行发酵或无氧呼吸。如：一些酵母菌、肠道细菌、硝

酸盐还原细菌。培养方法：通过深层静止培养。

专性厌氧微生物：生长不需要分子氧，分子氧对它们有毒害作用，可以无氧呼吸或发酵进行代谢。如：丙酮丁醇梭菌、硫酸盐还原菌。培养方法：给培养基中添加还原剂，降低培养基中氧化还原电势，或者物理、化学方法除氧，造成无氧环境。

氧对微生物影响的机制：氧对一切微生物都会产生有毒害作用的代谢产物，如超氧基化合物与 H_2O_2 ，这两种代谢产物相互作用产生毒性很强的自由基 $OH\cdot$ ，它是一种强氧化剂，与生物大分子作用产生生物分子自由基，从而对有机体产生损害作用。

四. 辐射

辐射：能量在空间的传播。微生物受辐射影响的主要是电磁辐射：日光、紫外线、X-射线、 γ -射线等。

紫外线致死细胞的主要原因：是细胞中核酸 DNA 形成胸腺嘧啶二聚体或造成核苷酸排序错位，轻则引起突变，重则造成细胞死亡。

五. 干燥：干燥会导致细胞失水，而造成代谢停止以致死亡。不同微生物对干燥抗性不同，如芽孢、孢子较抗干燥。

六. 渗透压：高渗引起细胞质壁分离；低渗细胞吸水膨胀、破裂。

七. 影响微生物生长的化学物质

主要包括：重金属盐类、有机溶剂及染料等。根据其抑制或杀死微生物的作用不同可分为：

(一) 使细胞蛋白变性、凝固或酶失活

重金属盐类，如：Hg、Ag、Cu

氧化剂，如：卤族元素

类醇类、醛类，如：乙醇、甲醛

(二) 改变和破坏质膜透性：醇类、酚类、表面活性剂等。

(三) 干扰细胞代谢：吡啶类染料、结晶紫等。

化学物质的抗微生物能力的测定

八. 消毒剂效力测定

第四节 化学药剂对微生物的作用

化学药剂：能直接干扰病原微生物生长繁殖，也可用于治疗感染性疾病的化学药物。

一、抗代谢物

有些化合物在结构上与生物体所必需的代谢物很相似，以至可以和特定的酶结合，从而阻碍了酶的功能，干扰了代谢的正常进行，这些物质称为抗代谢物(Antimetabolite)。

叶酸对抗物（磺胺）、
嘌呤对抗物（6-巯基嘌呤）、
苯丙氨酸对抗物（对氟苯丙氨酸）、
尿嘧啶对抗物（5-氟尿嘧啶）
胸腺嘧啶对抗物（5-溴胸腺嘧啶）等等

磺胺药物是最早发现，也是最常见的化学疗剂，抗菌谱广，能治疗多种传染性疾。大多数革兰氏阳性细菌某些革兰氏阴性细菌对放线菌也有一定的作用。

作用机理：磺胺是叶酸组成部分对氨基苯甲酸的结构类似物。

二. 抗生素 (Antibiotic)

是由某些生物合成或半合成的一类次级代谢产物或衍生物，它们在很低浓度时就能抑制或影响它种生物的生命活动，如杀死微生物或抑制其生长。

作用机制：抗菌谱

广谱抗生素

窄谱抗生素

根据抗生素作用的机理可将其分为四类：

①抑制细胞壁的合成：主要有：青霉素、头孢霉素、先锋霉素、多氧霉素等。

②破坏细胞膜透性：主要有：多肽类抗生素。

③影响蛋白质合成：主要有：四环类抗生素。

④干扰核酸合成：主要有：利福平、撕裂霉素、争光霉素、更生霉素等。

三. 微生物的抗药性

化学药剂的广泛使用，使一些病原菌对药物产生了耐性，即为抗药性。

产生抗药性的主要原因有：

细菌产生了钝化或分解药物的酶；

细胞质膜的透性降低，使某些药物不易透入细胞或使进入细胞的药物被排出；

细胞内被药物作用的部位发生改变；细菌可改变代谢途径；

细菌可产生变性酶。

避免出现细菌的耐药性的措施：

- (1) 第一次使用的药物剂量要足；
- (2) 避免在一个时期或长期多次使用同种抗生素；
- (3) 不同的抗生素(或与其他药物)混合使用；
- (4) 对现有抗生素进行改造；
- (5) 筛选新的更有效的抗生素。