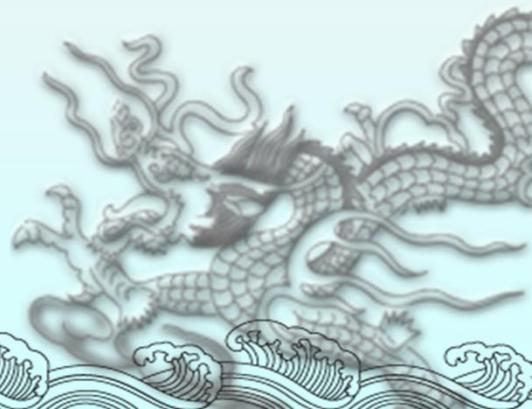




第五章 微生物的生长及控制

- ◇ 第一节 微生物的生长规律
- ◇ 第二节 微生物培养法
- ◇ 第三节 环境对生长的影响及生长的测定
- ◇ 第四节 微生物生长繁殖的控制





第一节 微生物的生长规律

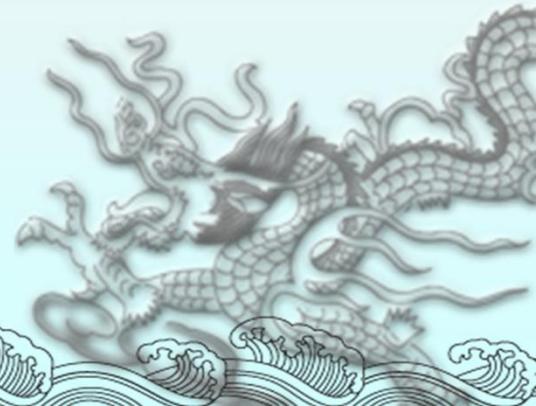
----细菌的生长

个体生长——微生物细胞个体吸收营养物质，进行新陈代谢，原生质与细胞组分的增加。

群体生长——在一定时间和条件下细胞数量的增加称为微生物的群体生长。可用重量、体积、密度或浓度来衡量。

由于微生物个体极小，所以常用群体生长来反映个体生长的状况

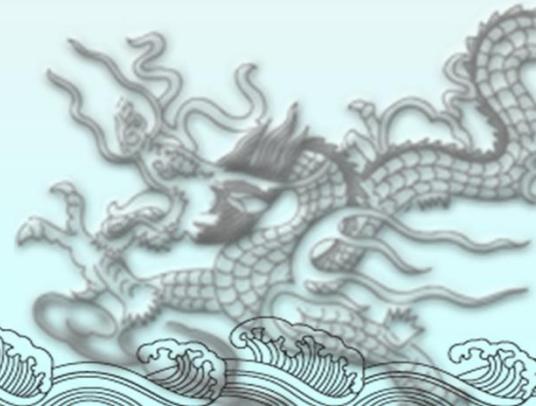
群体生长 = 个体生长 + 个体繁殖





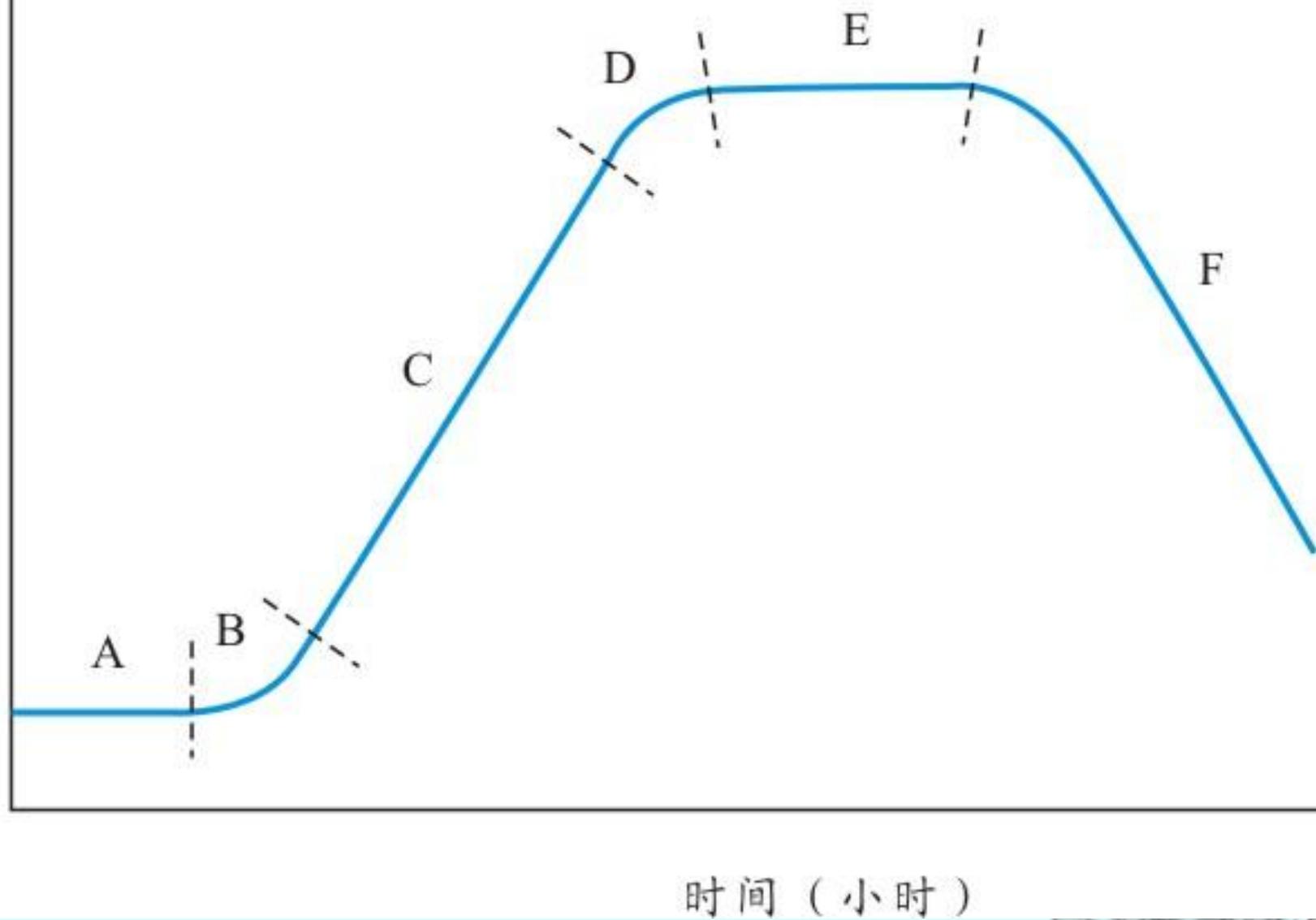
一， 细菌群体生长规律

- ◆ 反映细菌在整个培养期间菌数变化规律的曲线称为生长曲线。一条典型的生长曲线可分为迟缓期、对数期、稳定期和衰亡期四个生长时期。





细菌数的对数



迟缓期、对数期、稳定期和衰亡期



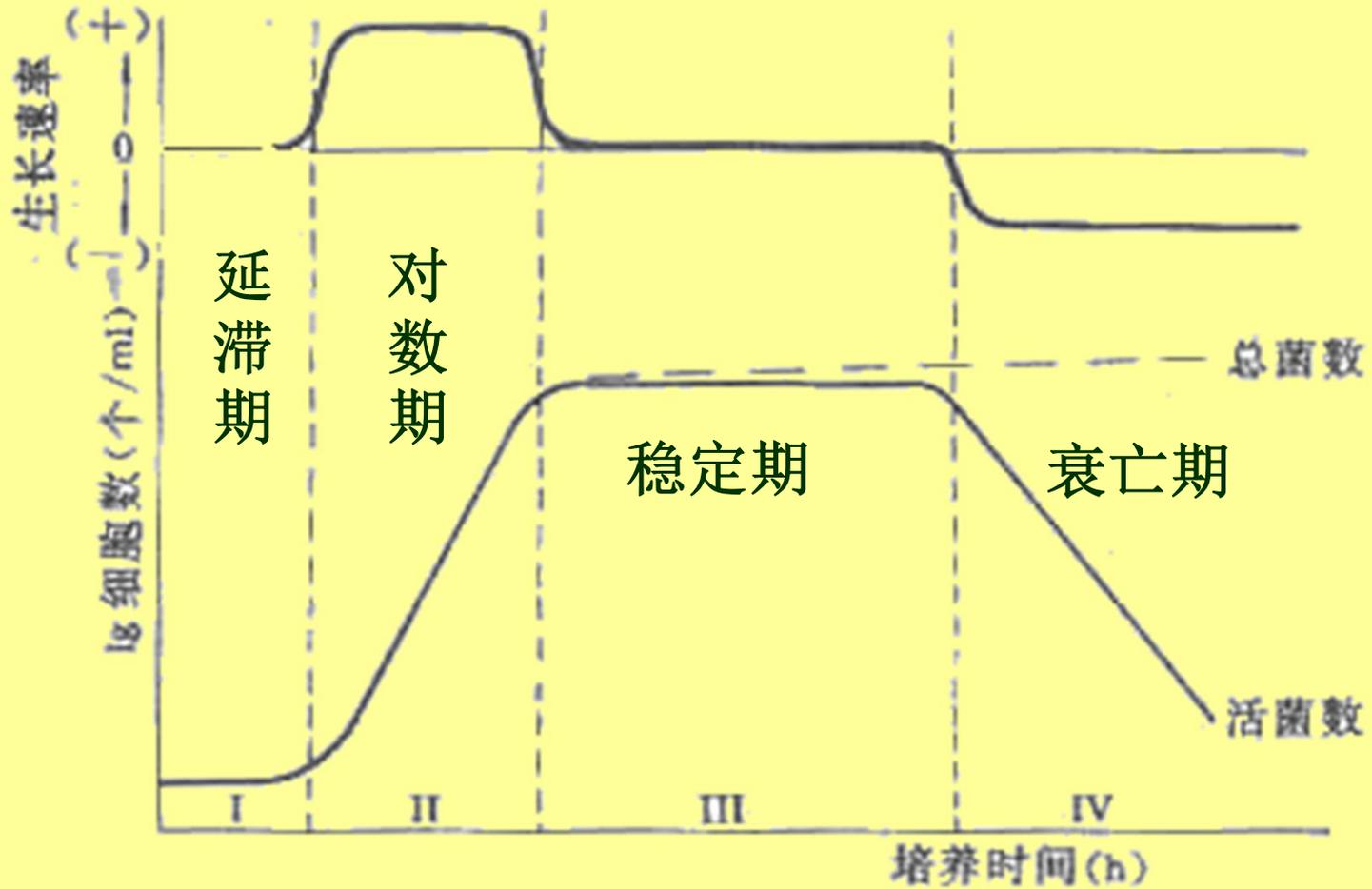


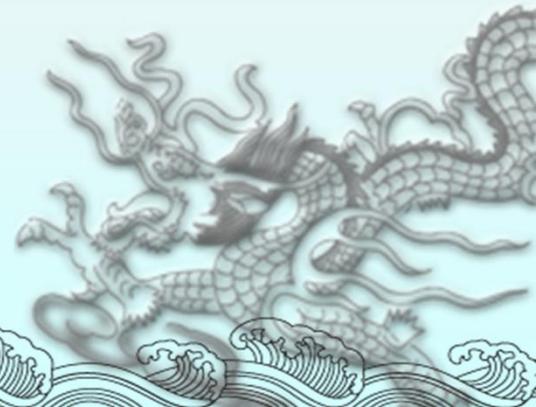
图 7-4 典型生长曲线

(I. 延滞期, II. 指数期, III. 稳定期, IV. 衰亡期)



1, 迟缓期(Lag phase)

指少量单细胞微生物接种到新鲜培养液中后，再开始培养的一段时间内，因代谢系统适应新环境的需要，细胞数目没有增加的一段时期。



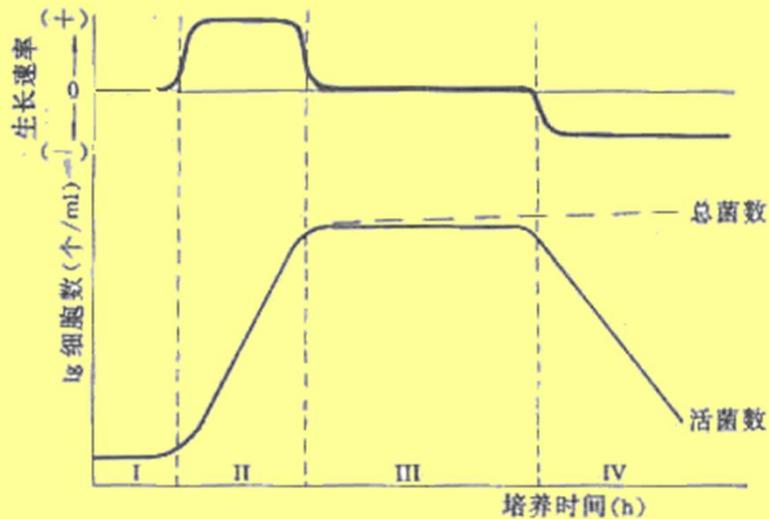
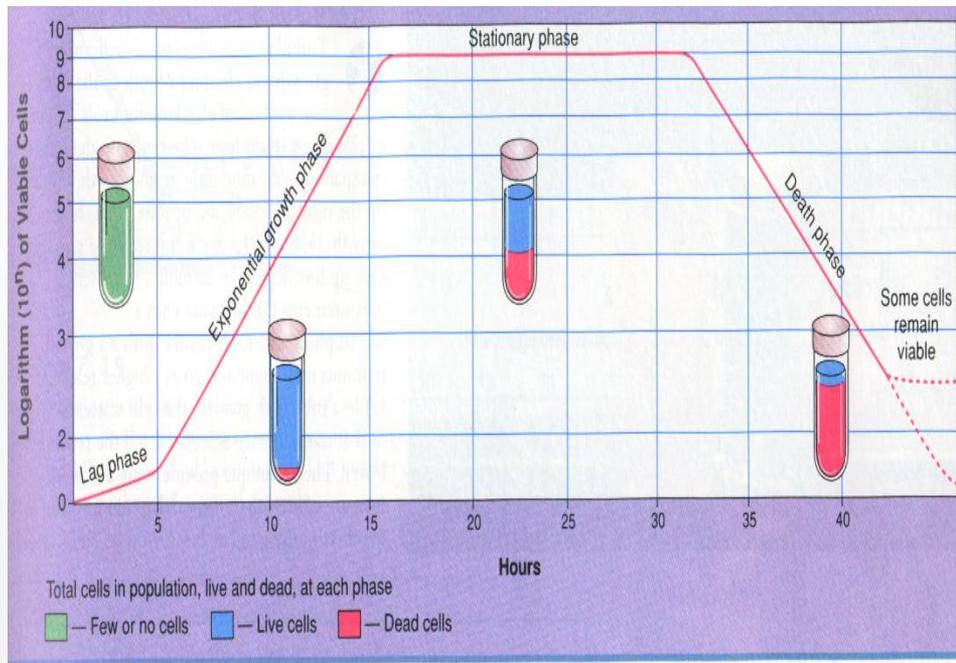


图 7-4 典型生长曲线

(I. 延滞期, II. 指数期, III. 稳定期, IV. 衰亡期)



延迟期的长短与菌种的遗传性、菌龄以及移接到新培养基上前后的环境条件是否相同等因素有关。



缩短延迟期的措施：

增加接种量；用对数生长期的菌种；在种子培养基中加入发酵培养基的某些成分等。





2, 对数期即指数期(Log phase)

- ◇ 细菌在对数期每分裂一次所需时间称为世代时间 (G) 。
- ◇ $G = t/3.3(\lg N_t - \lg N_0) = 0.301t/(\lg N_t - \lg N_0)$
- ◇ 此期菌体代谢活跃，消耗营养多，生长速率高，个体数目明显增加。群体中的细胞化学组成及形态、生理特性等比较一致。



E. Coli 在不同温度下的代时

温度 (°C)	代时 (分)	温度 (°C)	代时 (分)
10	860	35	22
15	120	37	17
20	90	40	17.5
25	40	45	20
30	29	47.5	77

生长限制因子 (growth-limited factor)

凡是处于较低浓度范围内，可影响生长速率和菌体产量的营养物就称生长限制因子

0.1 mg/ml

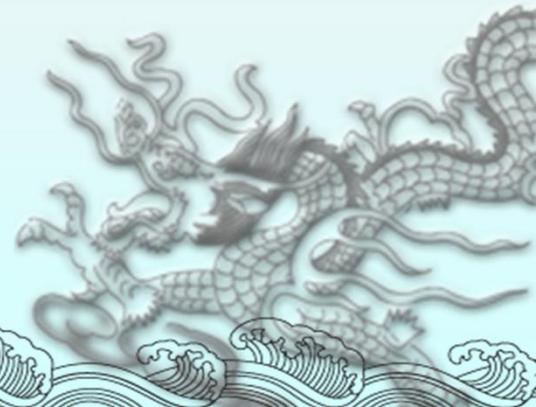
超微型细菌

100年



3, 稳定期 (Stationary phase)

- ◆ 此期细胞生活力逐渐减弱，开始大量贮存代谢产物，活菌数达到最大水平。收获菌体或提取代谢产物多在此期。





4, 衰亡期 (Decline或Death phase)

特点:

- a. R为负值
- b. 细胞的形态发生变化, 不规则.
- c. 释放次生代谢产物, 芽孢等
- d. 菌体开始自溶

产生原因:

生长条件的进一步恶化, 使细胞内的分解代谢大大超过合成代谢, 继而导致菌体的死亡

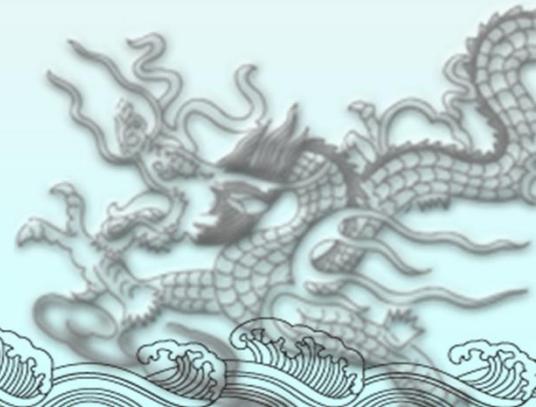




二，主要生长参数

1，迟缓时间：

微生物在生长过程中，在实际条件下达到对数生长期所需时间与理想条件（即无迟缓期）下达到对数生长期所需时间之差。





2, 比生长速率

- ◇ 比生长速率：每单位数量的细菌在单位时间内增加的量。
- ◇ 比生长速率与微生物生长的基质浓度密切相关。莫诺 (Monod) 经验公式：

$$U = U_m \cdot S / (K_s + S)$$

U_m ：最大比生长速率 **S** ：基质浓度

K_s ： **$U / U_m = 1/2$** 时的基质浓度，同一种基质它是一个常数，通常很小。





3, 总生长量

- ◆ 总生长量：在某一时间里通过培养所获得的微生物总量与原来接种的微生物量之差。其大小客观上反映了培养基与培养条件是否适合菌的生长。
- ◆ 产量常数 (K) = 总生长量 / 所消耗基质的总量
K值大小代表了微生物对基质同化的效率，反映了微生物利用某种基质生长的效果。





三，同步培养

同步培养：能使群体中不同步的细胞转变为处于同一生长阶段，并同时进行的培养方法称为同步培养。





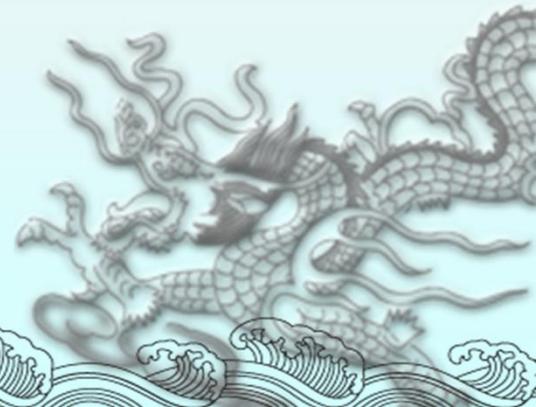
同步培养方法：

1，机械法

- ◆ (1) 离心法
- ◆ (2) 过滤分离法
- ◆ (3) 硝酸纤维素滤膜法

2，环境条件控制技术

- (1) 温度
- ◆ (2) 培养基成分控制
- ◆ (3) 其它 如光照、加热等

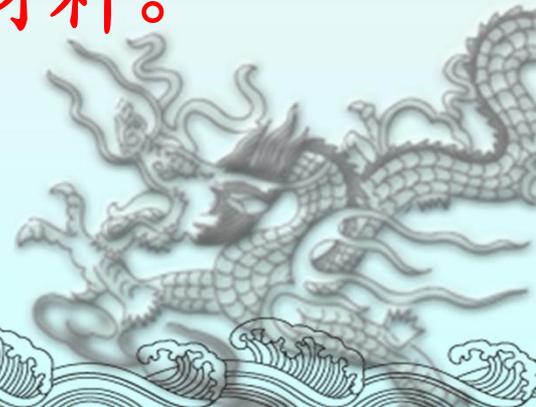




3,解除抑制法

采用喋呤、氯霉素等代谢抑制剂,阻断DNA、蛋白质的合成,使细胞停留在同一生长阶段,然后用大量稀释等方法解除抑制。

- ◆ 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。



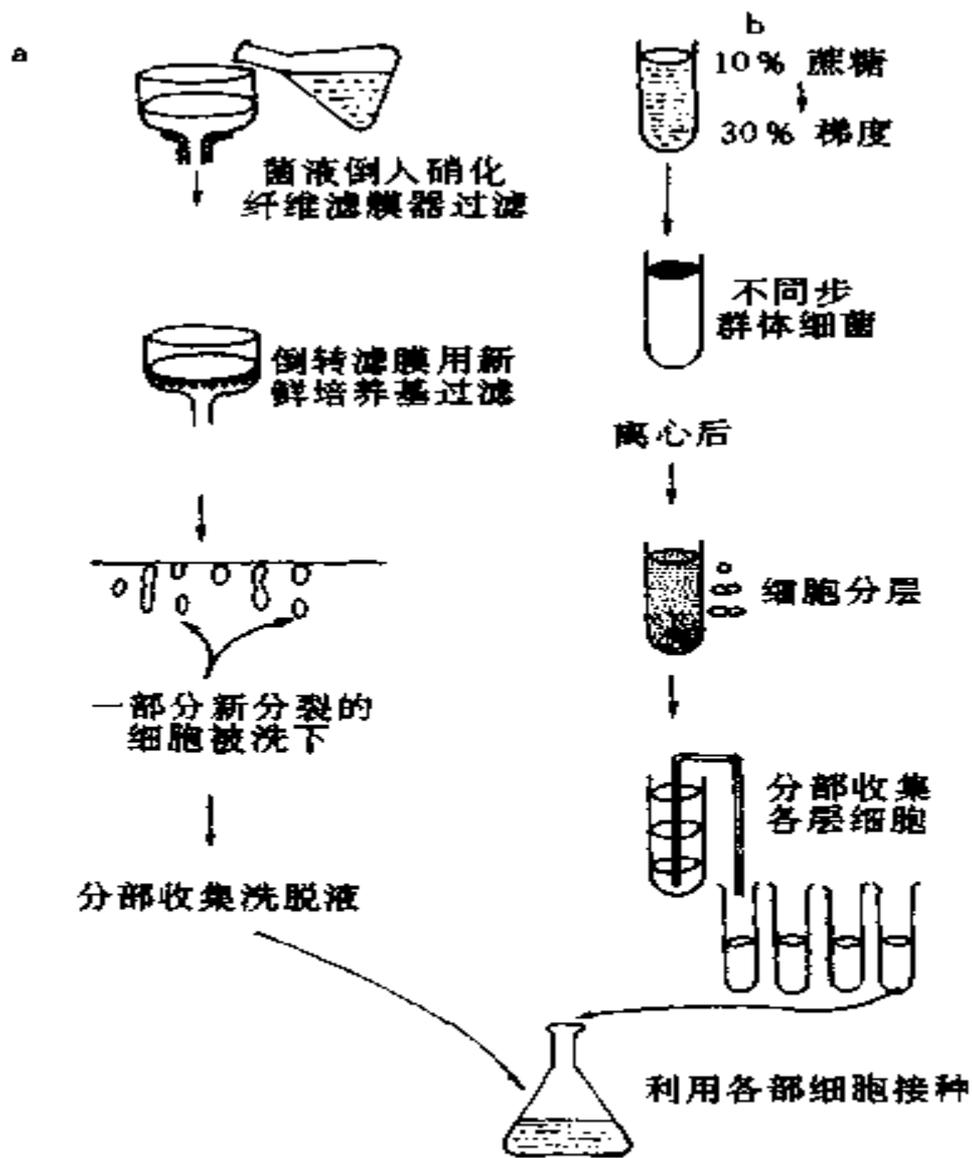


图 6-4 同步培养方法
a. 膜洗脱法 b. 密度梯度离心法





四，连续培养

- ◆ 连续培养是指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持续下去的一种培养方法。实现微生物连续培养的基本原则：在微生物培养过程中不断地补充营养物质和以同样的速率移出培养物。
- ◆ 连续培养有恒化器连续培养和恒浊器连续培养两种类型。



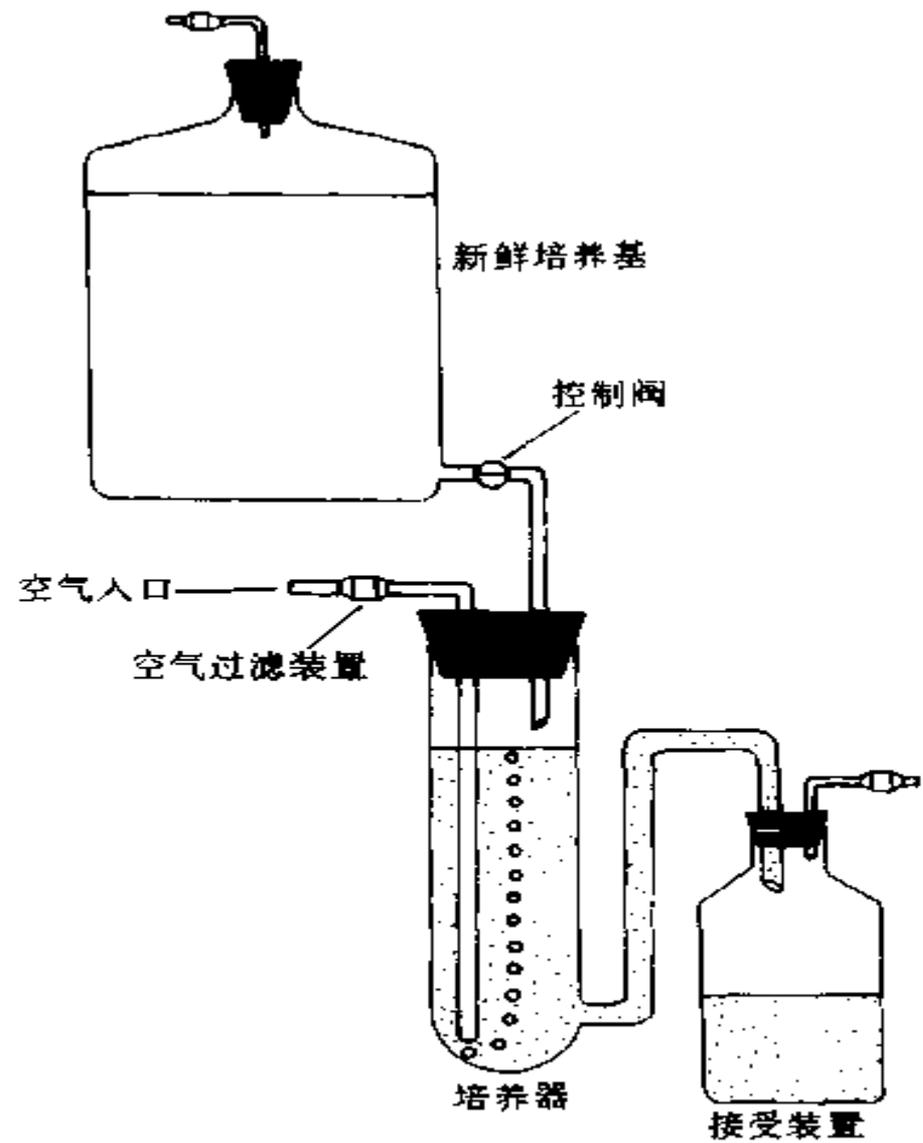
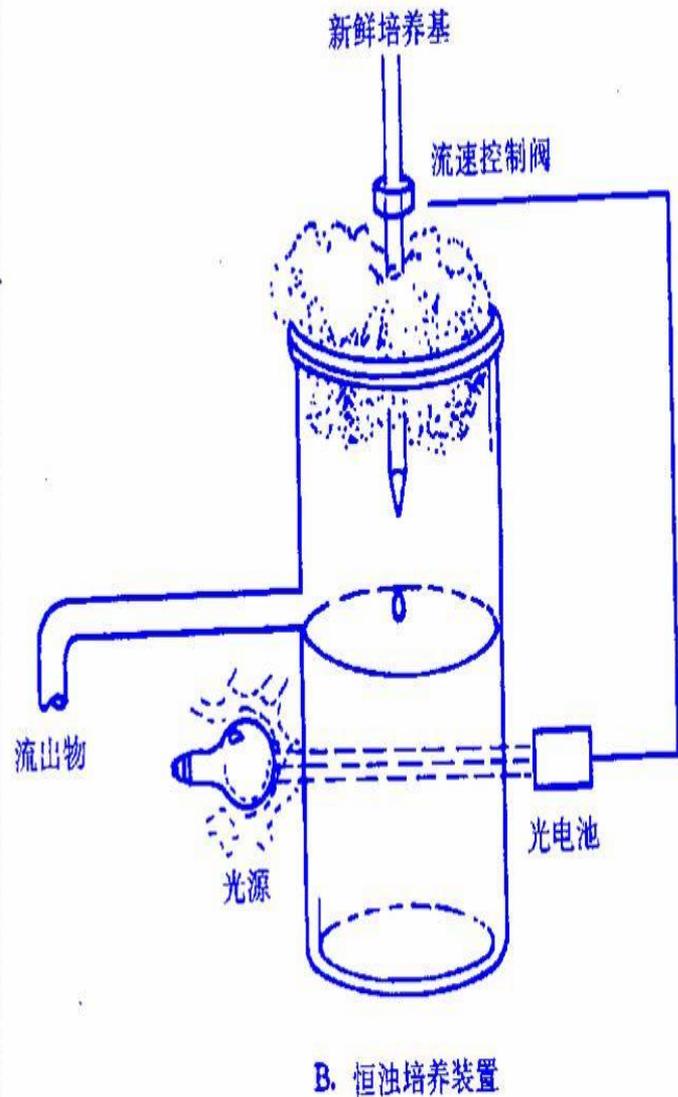


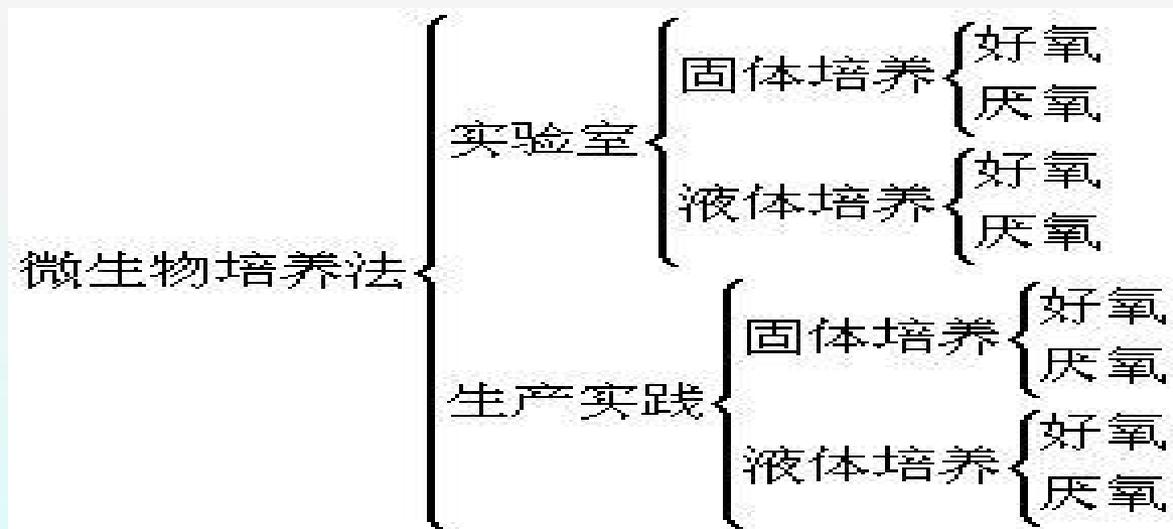
图 6-5 连续培养系统





第二节 微生物培养法

- ◆ 一、实验室培养法
- ◆ 二、生产实践





一、实验室培养法

（一）固体培养

1. 好氧菌的培养

- ◇ 试管斜面
- ◇ 培养皿平板
- ◇ 较大型的克氏扁平、茄子瓶

2. 厌氧菌的培养

- ◇ 高层琼脂柱
- ◇ 亨盖特(Hungate)滚管技术
- ◇ 厌氧培养皿
- ◇ 厌氧罐 (anaerobic jar)
- ◇ 厌氧手套箱 (anaerobic glove box)

（二）液体培养

1. 好氧菌的培养

- ☞ 试管液体培养
- ☞ 三角瓶浅层培养
- ☞ 摇瓶培养
- ☞ 台式发酵罐

2. 厌氧菌的培养

- ☞ 厌氧罐或厌氧手套箱
- ☞ 加有机还原剂（如巯基乙酸、半胱氨酸、维生素C或庖肉等）或无机还原剂（铁丝等）的深层液体培养基，并在其上封以凡士林-石蜡层，





箱

（巯基乙酸、半胱
氨酸等）或无机
的深层液体培养

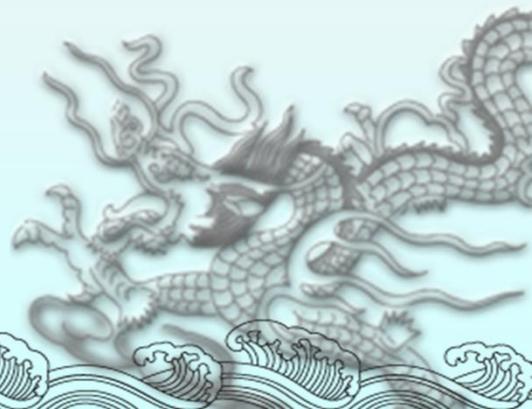
基，并在其上封以凡士林-石蜡层，





二、生产实践

- ◆ (一) 固体培养
 - ◆ 1. 好氧菌的曲法培养
 - ◆ 2. 厌氧的堆积培养法





二、生产实践

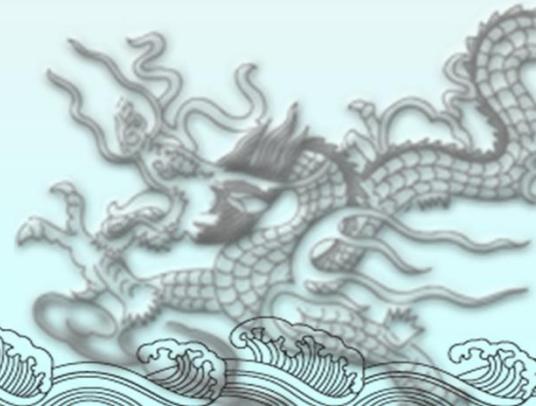
- ◆ (一) 固体
- ◆ 1. 好氧菌
- ◆ 2. 厌氧的





(二) 液体培养

- ◇ 1.好氧菌的培养
 - ◇ (1) 浅盘培养 (shallow pan cultivation)
 - ◇ (2) 利用发酵罐作深层液体培养
- ◇ 2.厌氧菌大规模的液体培养装置





世界工厂
GongChang.com

alibaba.com.cn





第三节 环境对生长的影响及生长的测定

一，微生物生长的测定

微生物生长表示方式：

单位时间里微生物数量或生物量（Biomass）的变化

微生物生长的测定：

个体计数

群体重量测定

群体生理指标测定

测定微生物生长的意义：

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；





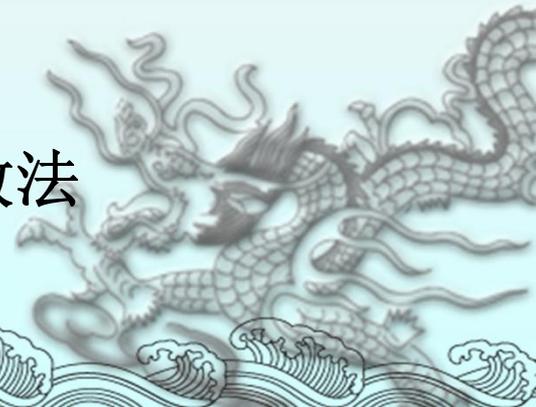
测定方法

测生长量

- 直接法 测体积
称干重
- 间接法 比浊法
生理指标法

测繁殖数

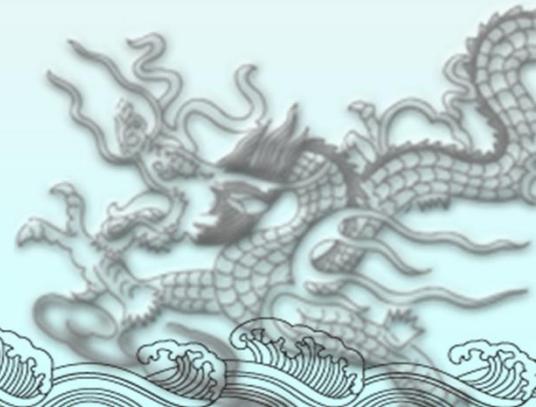
- 直接法 比例计数法
血球计数法
- 间接法 液体稀释法
平板菌落计数法





(一) 计数法

- ◆ 计数法 此法通常用来测定样品中所含细菌、孢子、酵母菌等单细胞微生物的数量。
- ◆ 计数法又分为直接计数和间接计数两类。





1, 直接计数 (显微镜直接计数)

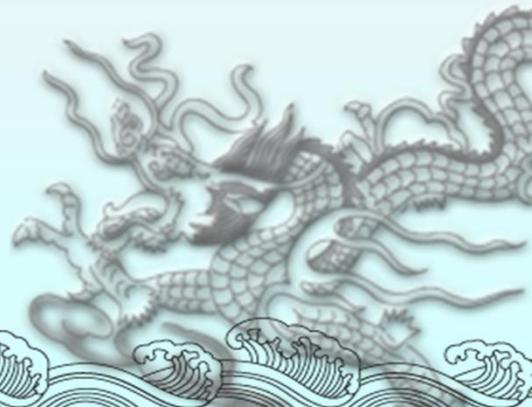
• 直接计数

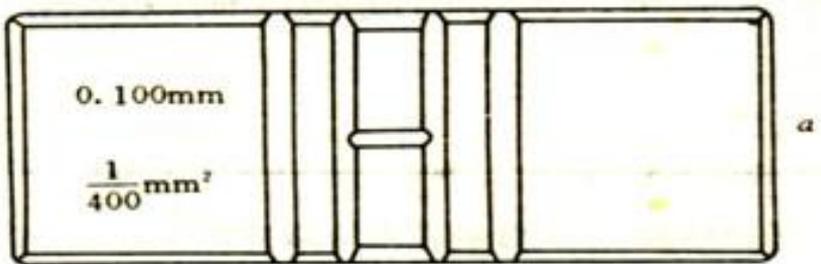
这类方法是利用特定的细菌计数板或血细胞计数板，在显微镜下计算一定容积里样品中微生物的数量。此法的缺点不能区分死菌与活菌。

每毫升原液所含细菌数

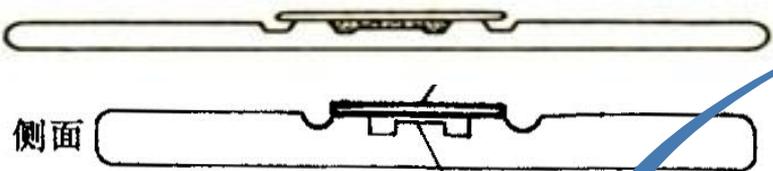
= 每小格平均细菌数

× 400 × 10000 × 稀释倍数

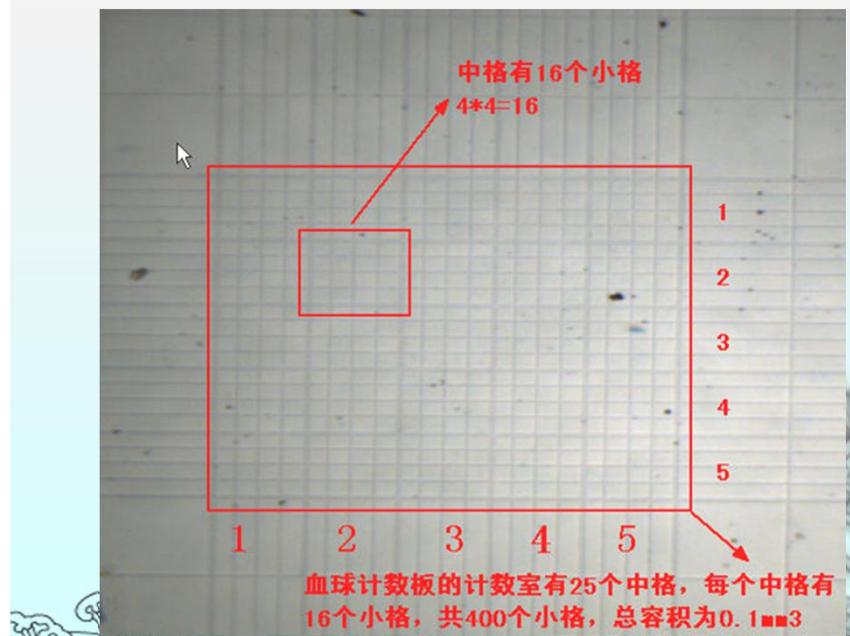
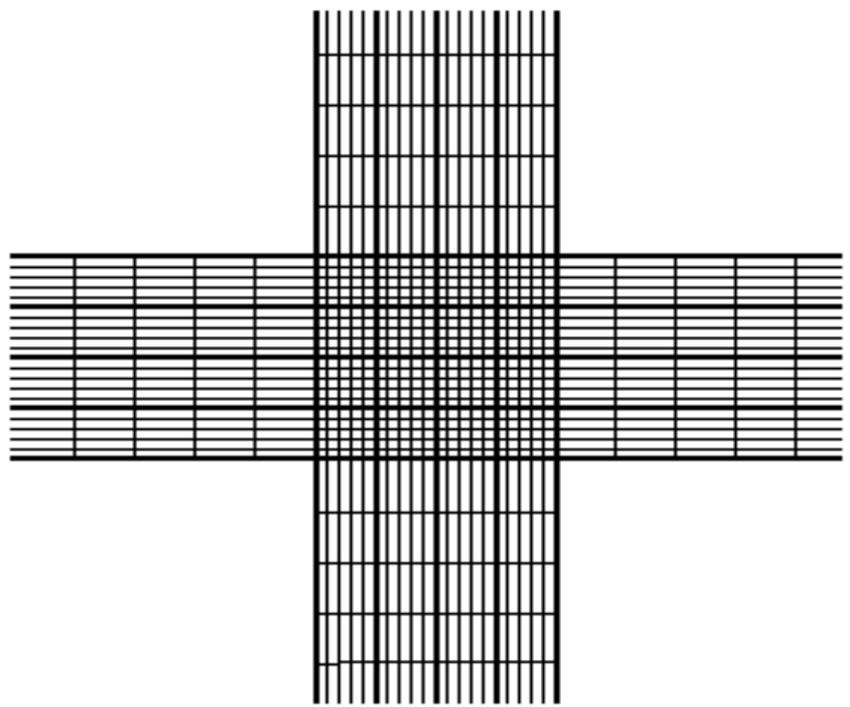
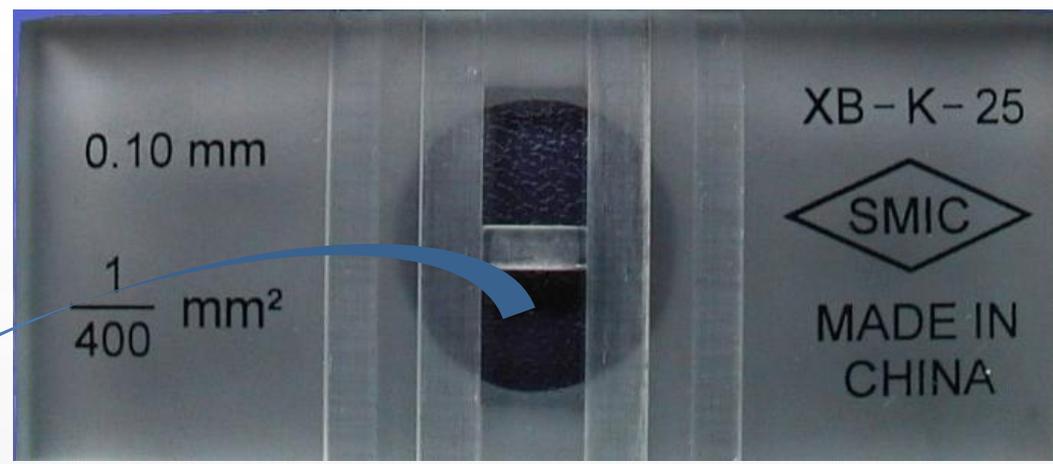




a



计数室

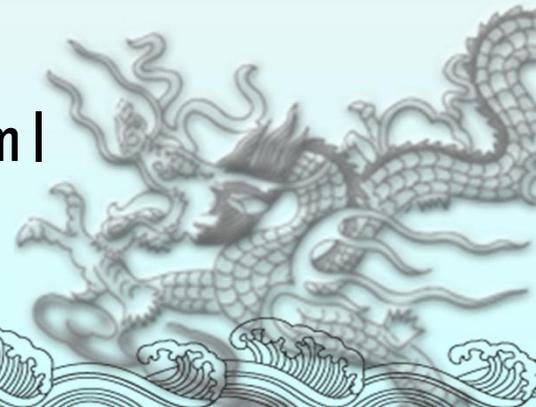


图IV-3 血球计数板计数网的分区和分格



显微镜直接计数法

- ◆ 本法仅适用于细菌等单细胞的微生物类群
 - ◆ 细菌计数器-细菌
 - ◆ 血球计数板-酵母、真菌孢子
- ◆ 计算一定容积里样品中微生物的数量
- ◆ 浓度控制
 - ◆ 细菌数控制在 10^7 个/ml
 - ◆ 酵母菌和真菌孢子应为 10^5 - 10^6 个/ml



5个中方格中的总菌数为A，
菌液稀释倍数为B，如果是
25个中方格的计数板，
则1ml菌液中的总菌数

小方格

中方格

$$=A/5 \times 25 \times 10^4 \times B = 50000$$

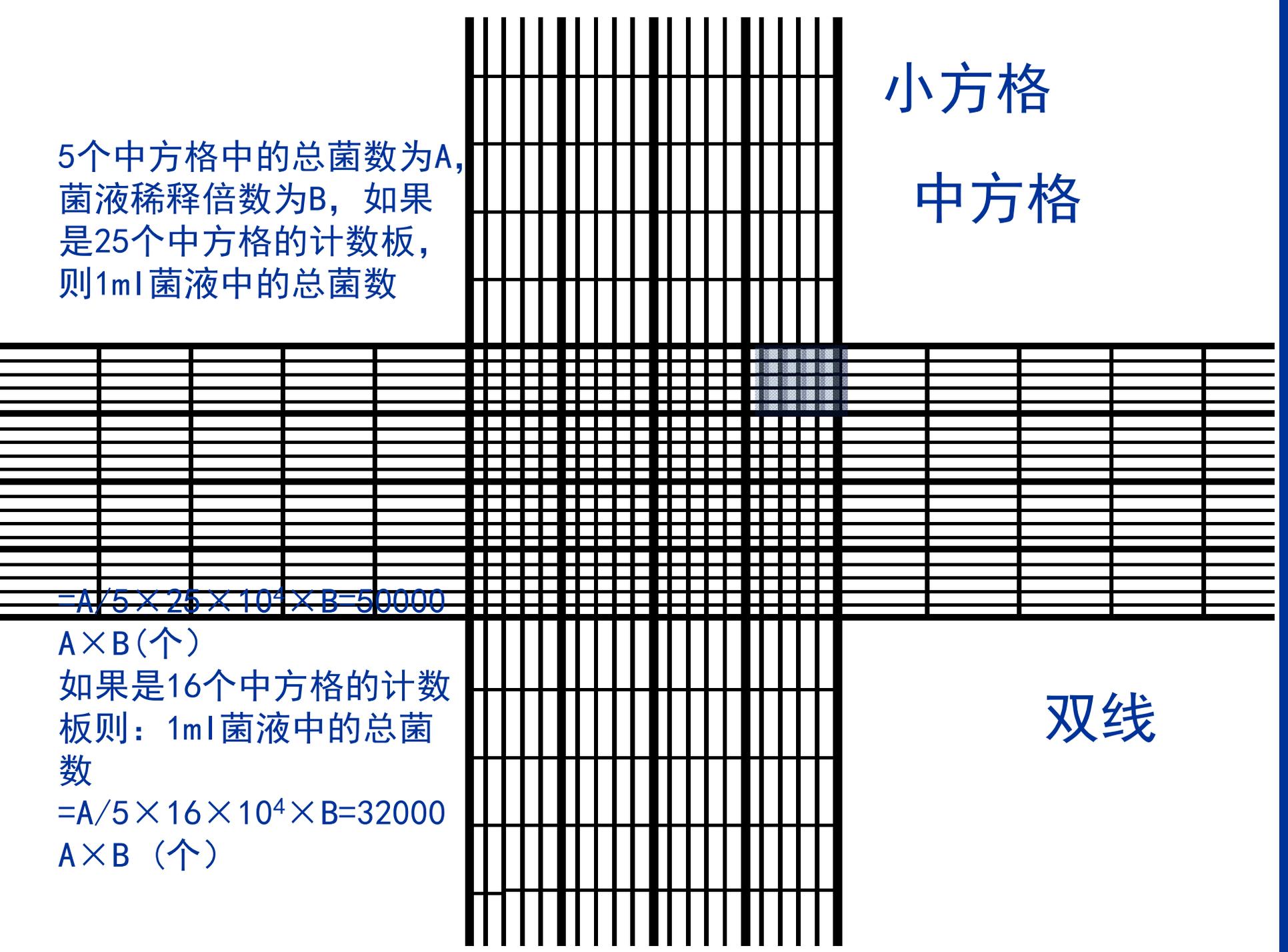
$A \times B$ (个)

如果是16个中方格的计数
板则：1ml菌液中的总菌
数

$$=A/5 \times 16 \times 10^4 \times B = 32000$$

$A \times B$ (个)

双线





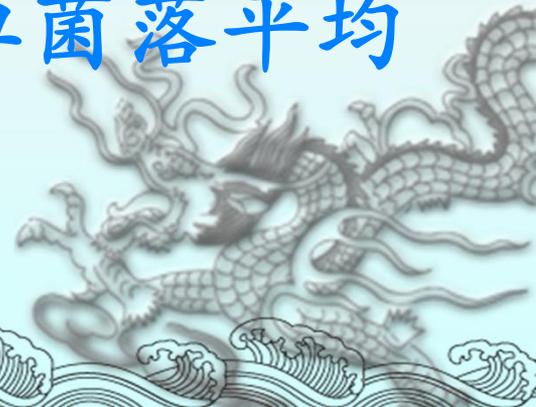
2, 间接计数

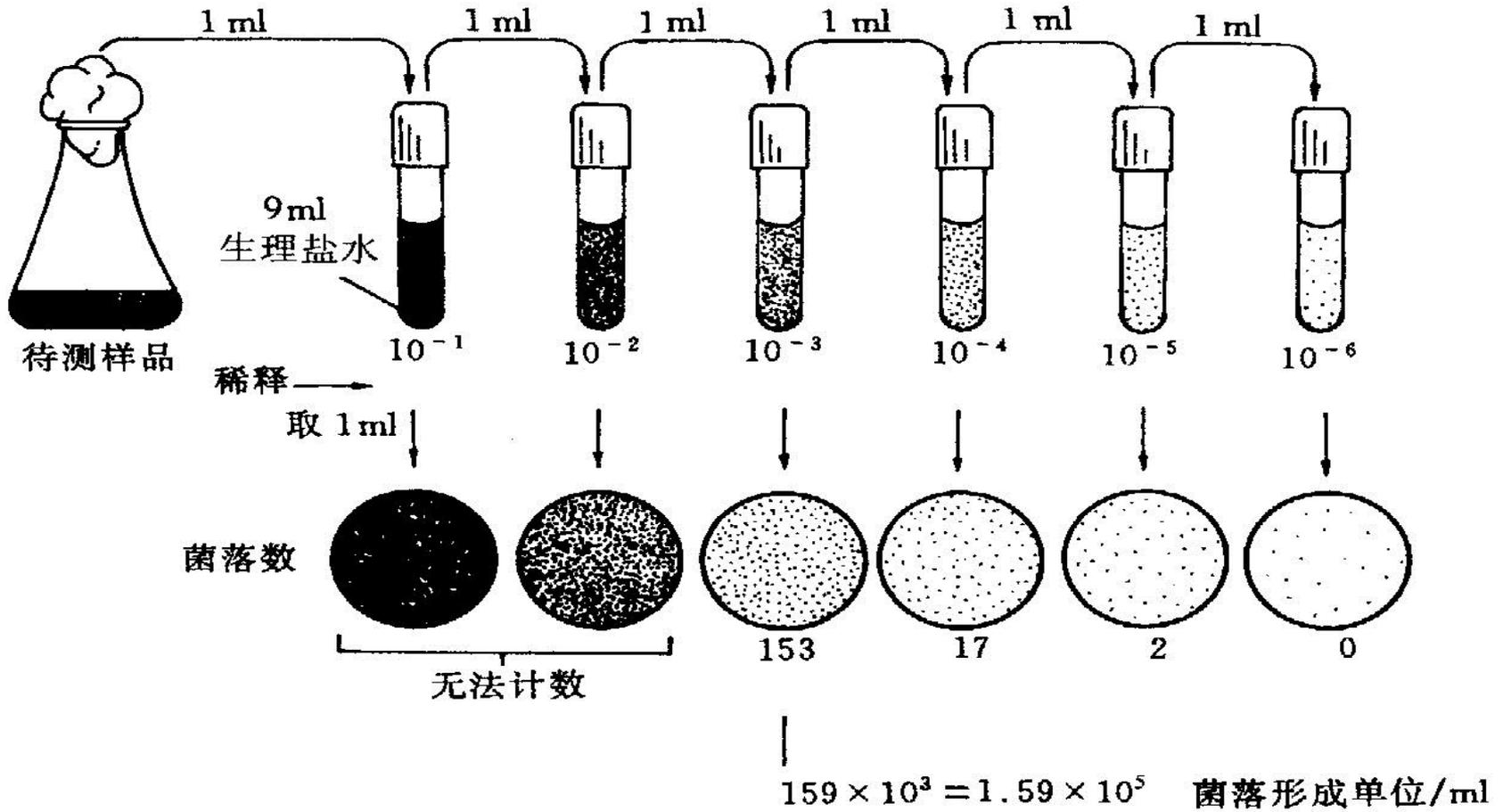
(活菌计数—稀释平皿测数法、最大概率法)

- 其原理是每个活细菌在适宜的培养基和良好的生长条件下可以通过生长形成菌落。

每毫升原菌液活菌数 =

同一稀释度三个以上重复平皿菌落平均
数 × 稀释倍数





活菌计数的一般步骤

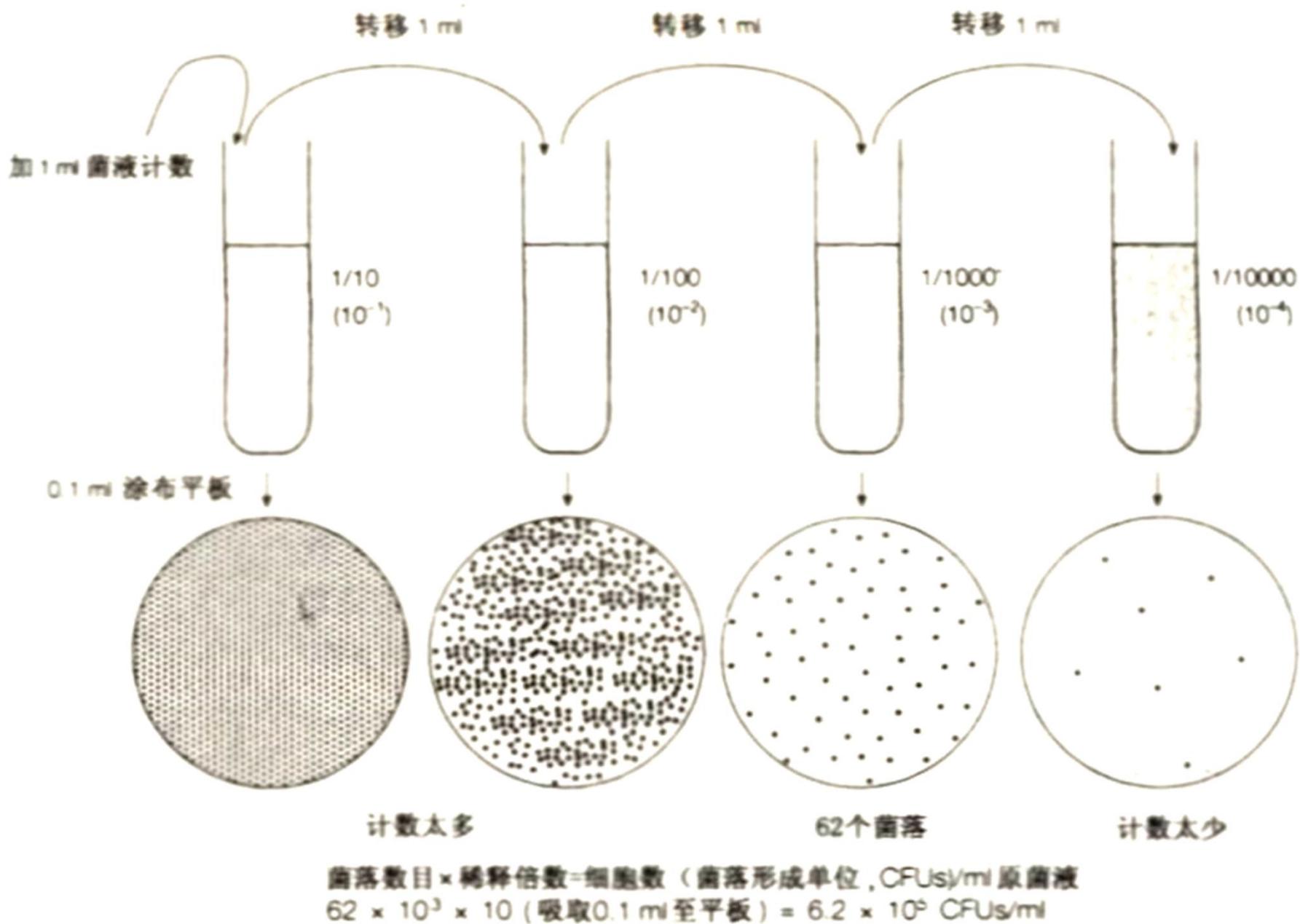


图 D9.2 稀释分离菌落计数法示意图



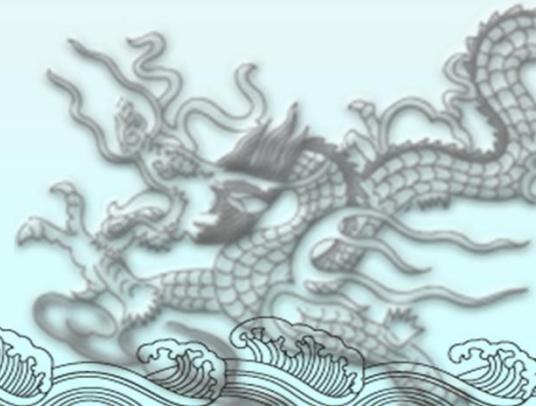
计数原则

以出现 20~300 个细菌菌落数的稀释度的平板为计数标准，丝状真菌为 10~150 个菌落数。

- 当只有一个稀释度，其平均菌落数在 20 ~ 300 之间时，则以平均菌落数计算。
- 若有两个稀释度，其平均菌落数均在 20 ~ 300 之间时，应按两者菌落总数之比值决定：
 - ✓ 若其比值小于等于 2 应计算两者的平均数；
 - ✓ 若大于 2 则以稀释倍数小的菌落平均数计算。

最大概率法

- ◆ 待测菌液经十倍系列稀释，每稀释度做3-5个重复，经培养后，检查细菌的生长，以有细菌生长的最后三个稀释度的管数作数量指标，由数理统计表查出近似值，再乘以数量指标第一位的稀释倍数，即为原菌液中的菌数。





最大概率法

(the most probable number method, MPN)

稀释度	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
重复数						
出现生长的管数	5	5	5	4	1	0

最大概率法

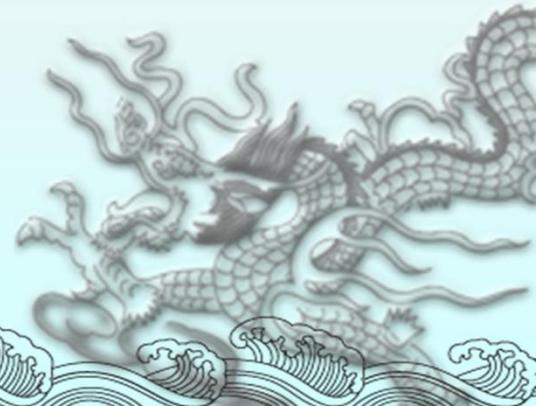
某细菌在稀释培养法中生长情况如下：

稀释度：	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
重复数：	5	5	5	5	5	5
有菌生长管数：	5	5	5	4	1	0

根据上述结果，数量指标为“541”查表得近似值为17，乘17以第一位数的稀释倍数，得出原始培养物的活菌数= 17×10^5 个。

优点：活菌计数，适用于特殊细菌。

缺点：计数结果为概率值。

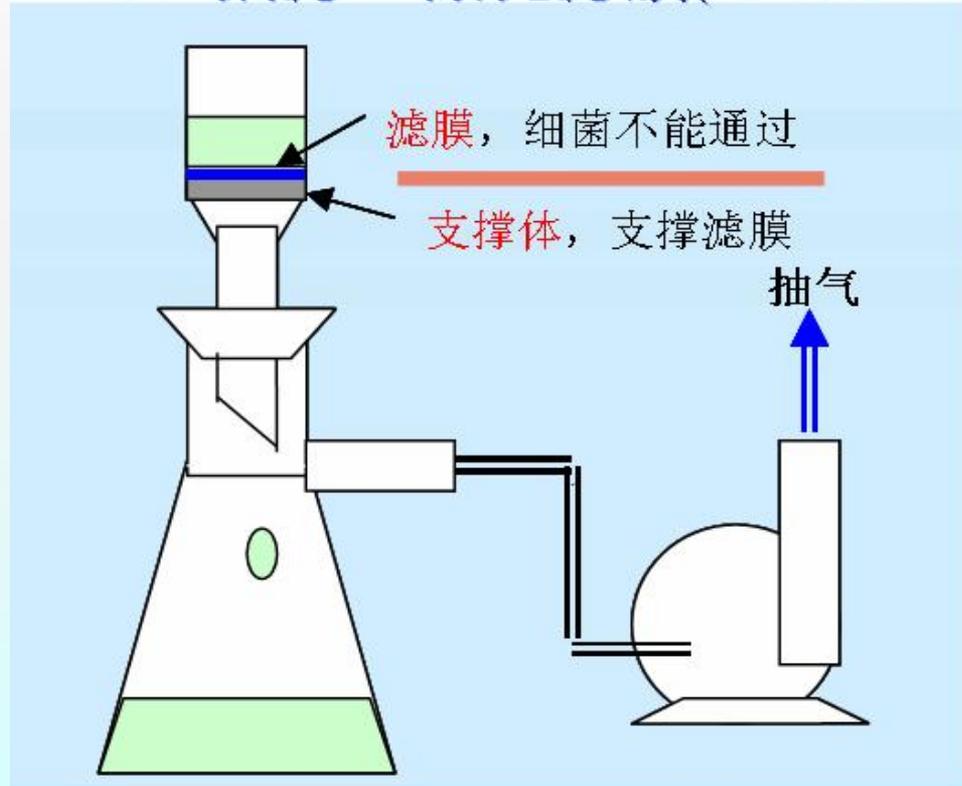




3, 膜过滤法

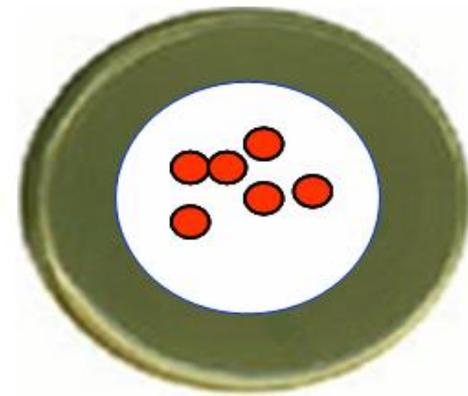
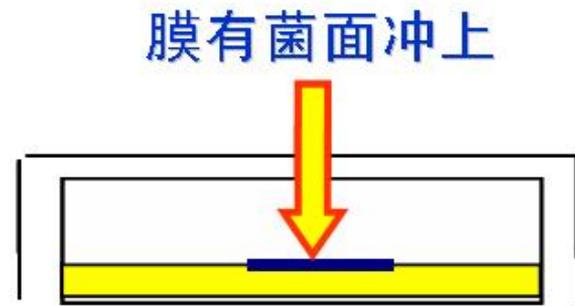
原理——膜抽滤（细菌浓缩）+ 膜平板培养 + 计数

(1) 抽滤——微孔滤膜($\phi 0.45\mu\text{m}$)



(滤器及膜预先灭菌)

(2) 滤膜培养





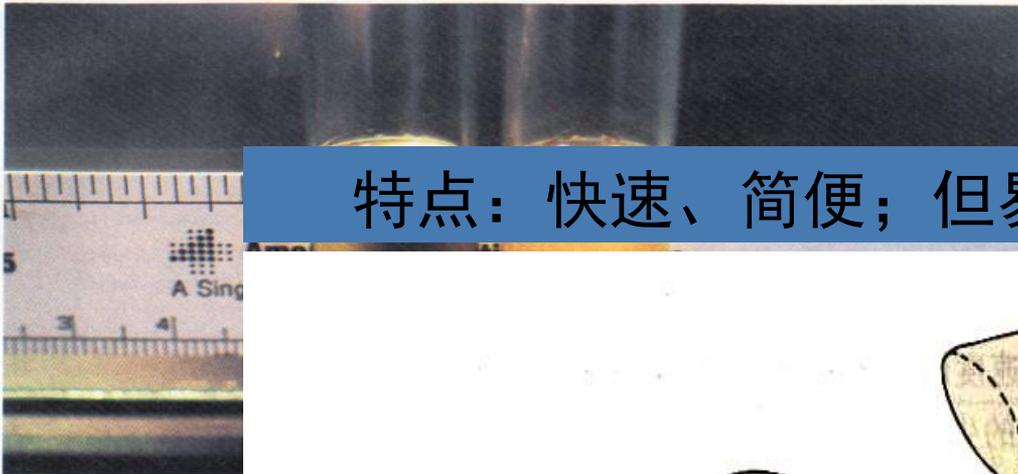
4. 比浊法

◆ 原理

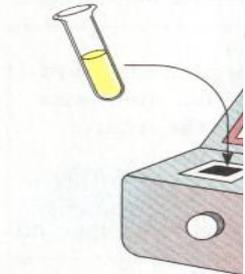
- ◆ 在一定范围内，菌悬液中的细胞浓度与混浊度成正比，即与光密度成正比，菌数越多，光密度越大。因此，借助于分光光度计，在一定波长下测定菌悬液的光密度，就可反应出菌液的浓度。
- ◆ 在一定波长下，测定菌悬液的光密度，以光密度(optical density, 即OD)表示菌量。
- ◆ 实验测量时应控制在菌浓度与光密度成正比的线性范围内，否则不准确。



4. 比浊法



(a)



(b)

特点：快速、简便；但易受干扰。

Figure 7.18



Turbidity measurements as indicators of growth. (a) Holding a broth to the light is one method of checking for gross differences in cloudiness (turbidity). The broth on the left is

for no growth; the broth on the right is opaque, indicating heavy growth. This method is not sensitive enough to pick up fine degrees in turbidity, more sensitive

with a spectrophotometer. A reading with a spectrophotometer with no growth is 0. A higher reading indicates a higher number of cells scatter the light. The reading is only a relative measure to determine actual number of cells between dead and live cells.

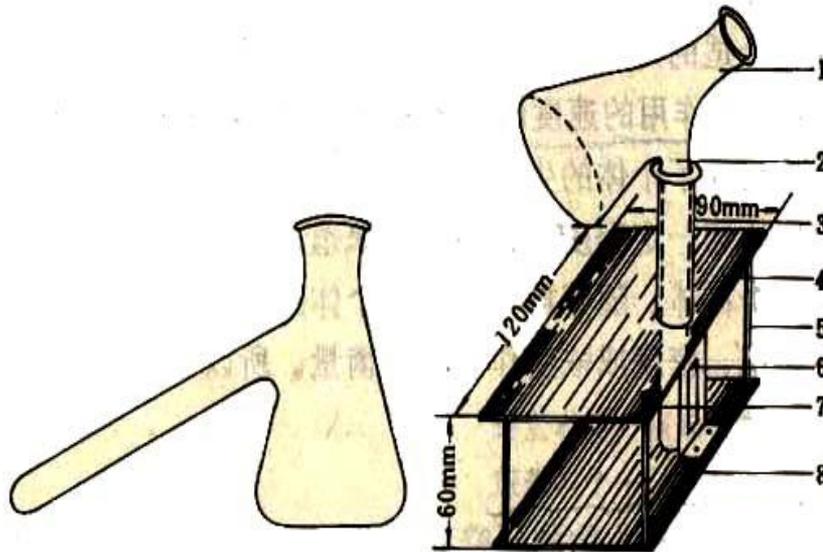
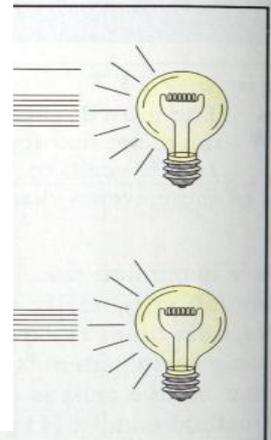


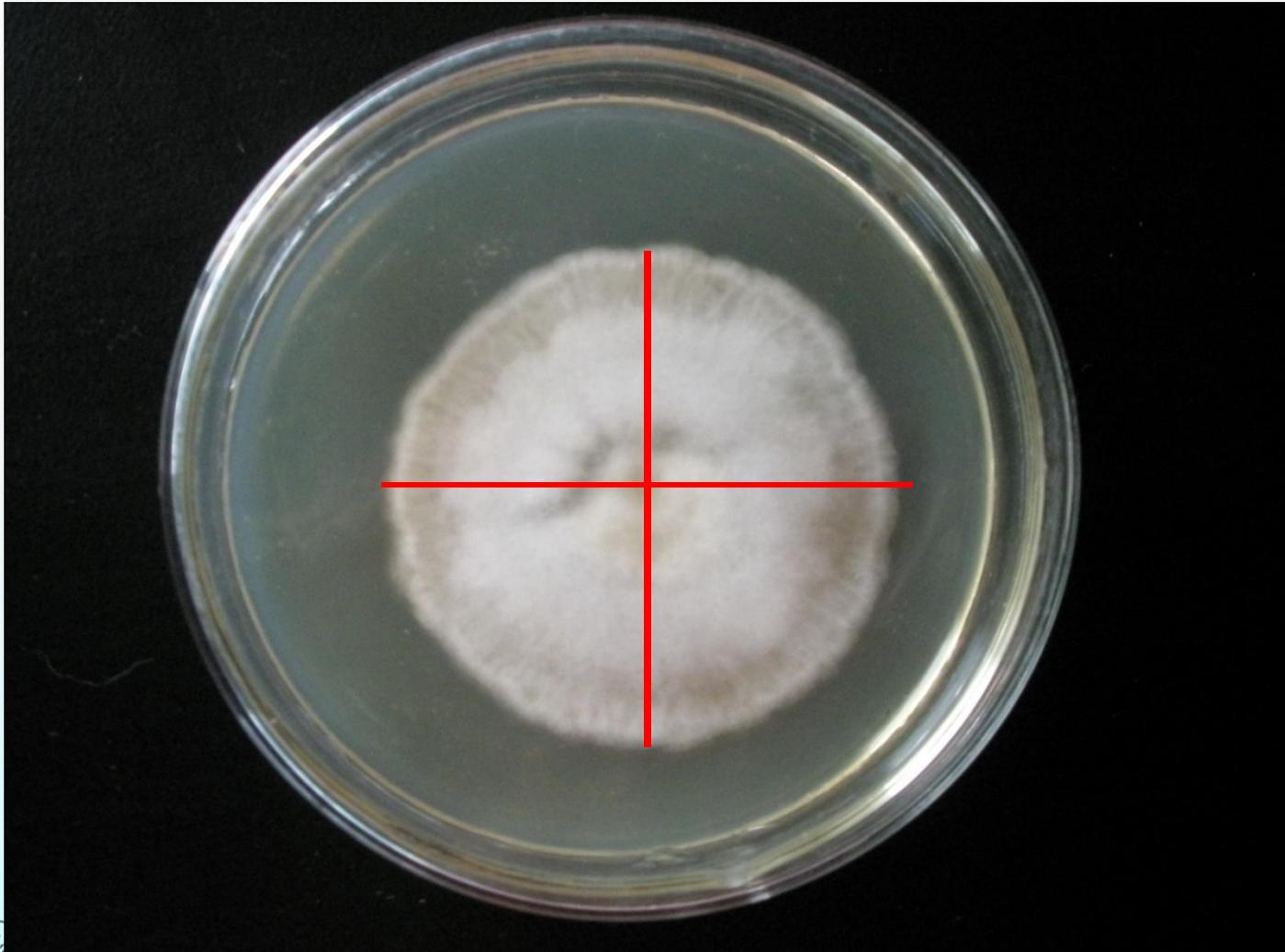
图 7-1 测定生长用的侧臂三角瓶（左）和比色管架（右，自制，适用于“721”型分光光度计）

1. 侧臂试管三角烧瓶；2. 侧臂试管；3. 侧臂试管插座；4. 比色架面板；5. 连接螺丝；





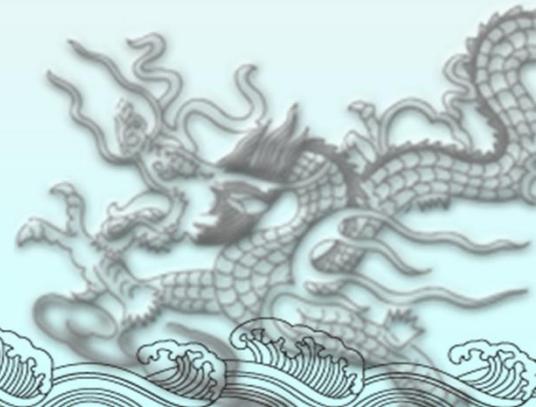
5, 霉菌的菌落直径或面积测定





(二) 重量法

- 此法的原理是根据每个细胞有一定的重量而设计的。它可以用于单细胞、多细胞以及丝状体微生物生长的测定。
- 微生物湿重
- 微生物干重
- 蛋白质总量
- DNA含量





◆ 蛋白质总量

✓ 蛋白质总量 = 含氮量 \times 6.25

✓ 细胞总量 = 蛋白质总量 \div (50% ~ 80% (或65%)) \approx 蛋白质总量 \times 1.54

◆ DNA含量

✓ 核酸DNA是微生物的重要遗传物质，每个细菌的DNA含量相当恒定，平均为 8.4×10^{-5} ng.





(三) 生理指标法

- ▶ 生理指标包括微生物的呼吸强度、耗氧量、酶活性、生物热等。
- ▶ 这是根据微生物在生长过程中伴随出现的这些指标，样品中微生物数量多或生长旺盛，这些指标愈明显，因此可以借助特定的仪器如瓦勃氏呼吸仪、微量量热计等设备来测定相应的指标。



二，环境对生长的影响

◇ 作用的三种反应

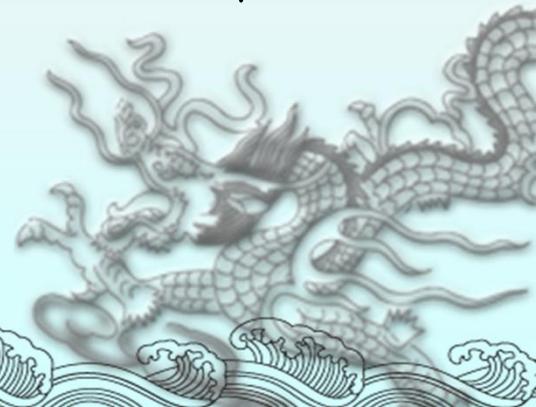
- ◇ 1，外界环境条件适宜时，微生物生长旺盛，代谢作用加速进行。
- 2，外界环境条件不太适宜时，微生物生长缓慢，代谢作用受到一定程度的抑制。
- 3，外界环境条件不适宜达到微生物难以忍受的程度，微生物生命活动受到严重影响，可能发生变异或死亡。





1, 温度

- ◆ 温度系数(Q_{10}): 在适宜的生长温度范围内, 温度上升 10°C 时微生物的生长速度与未升温前的生长速度之比。
- ◆ 热死时间 (TDT) : 在一定温度下杀死样品中全部细胞所需的最短时间。
- ◆ 热死温度 (TDP) : 在一定时间内 (一般为10分钟) 杀死样品中全部细胞所需的最低温度。





温度

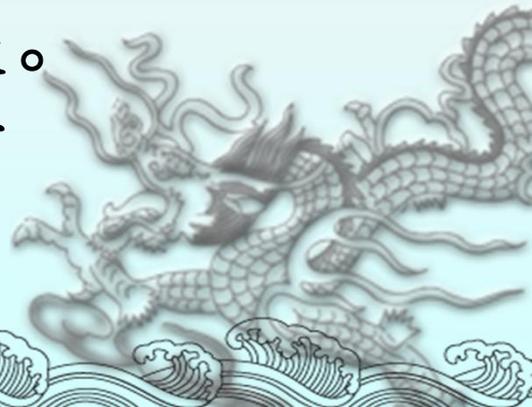
◇ 1.1, 微生物的最适温度类型

高温型、中温型、低温型

◇ 1.2, 高温对微生物的影响和利用

主要影响：原生质胶体变性，酶结构受损，细胞机能失调，生长发育停止直至死亡。微生物对高温的耐受力与微生物种类、发育阶段、基质等有关。

◇ 利用：干热灭菌和湿热灭菌



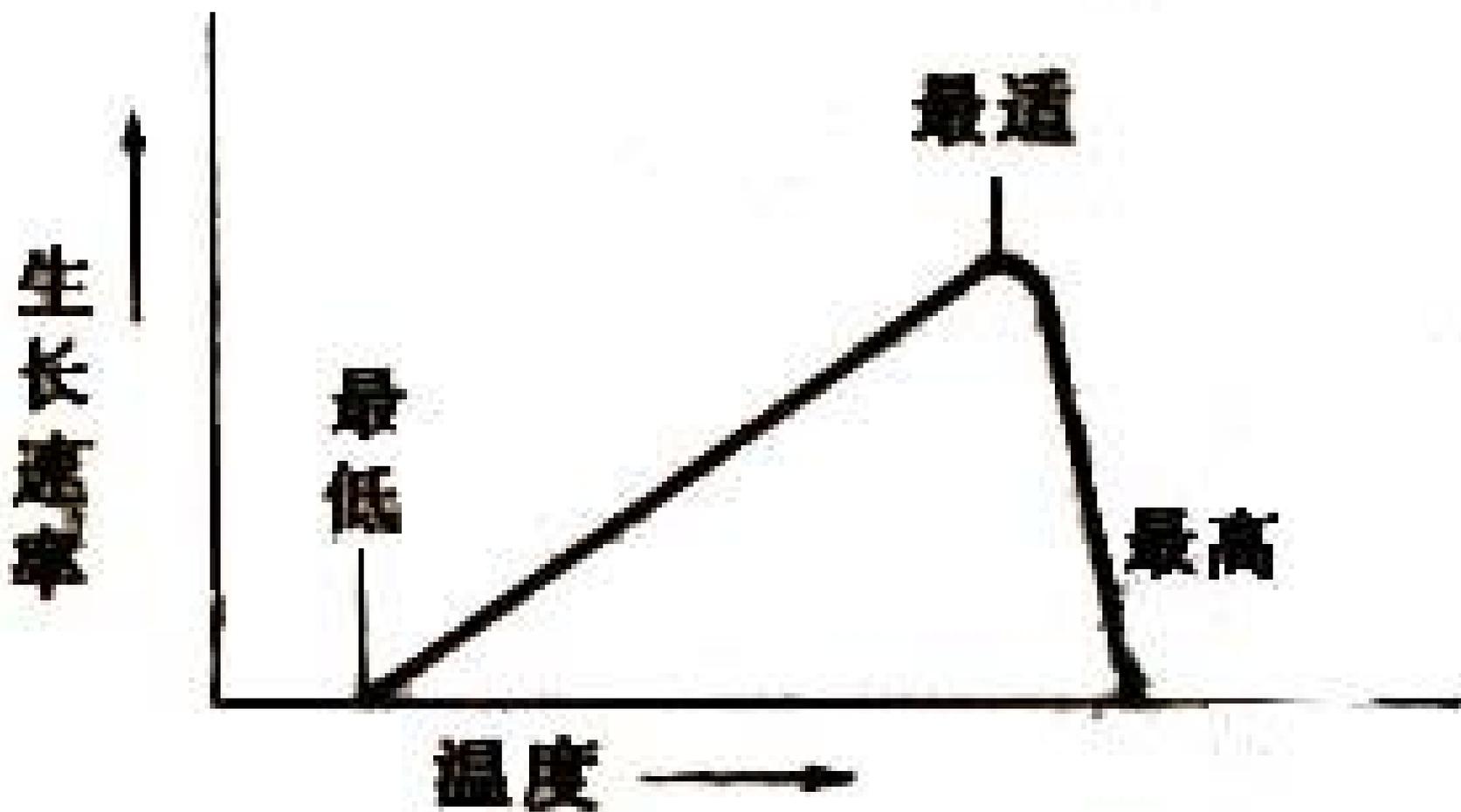
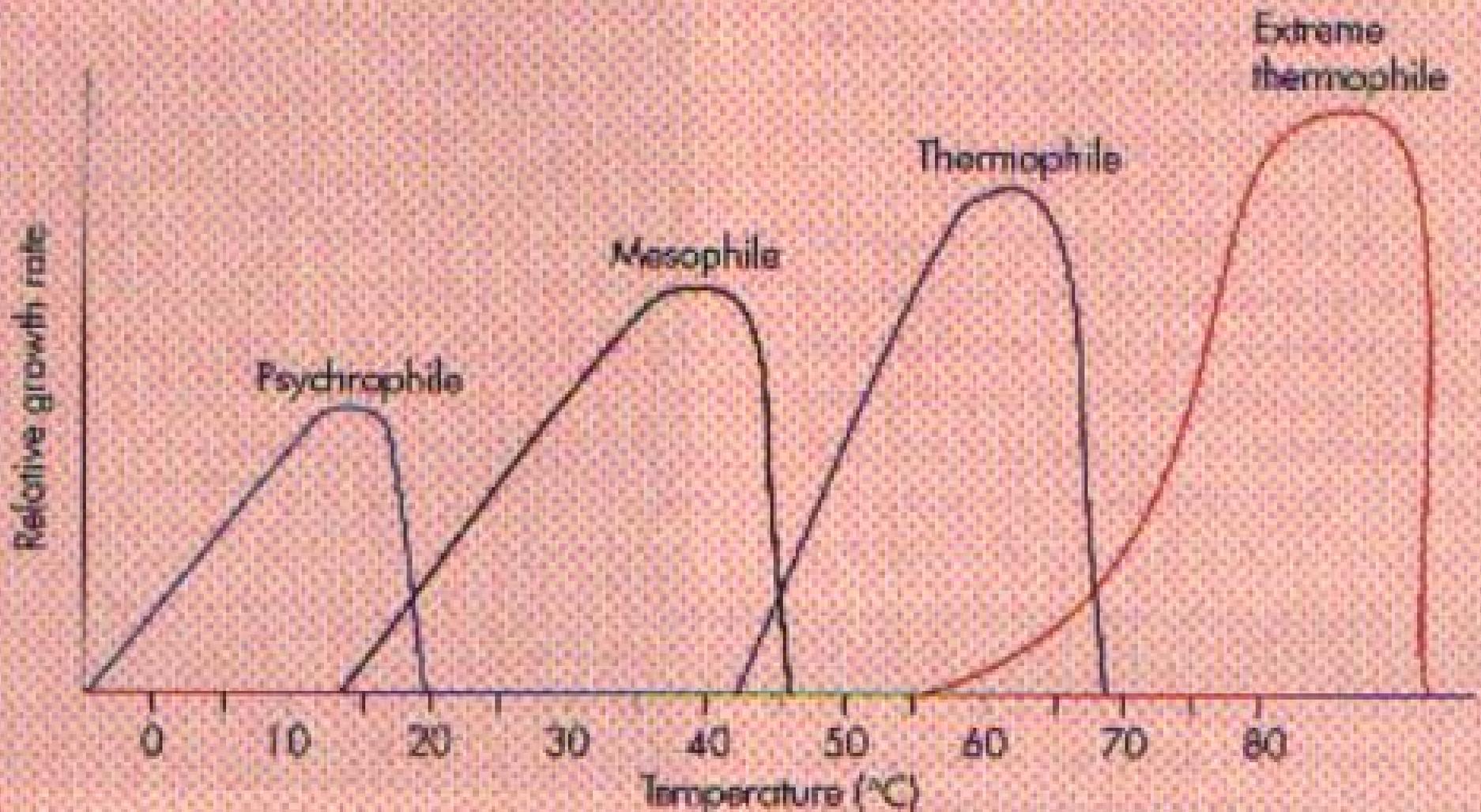


图 6-11 温度对生长速率的影响

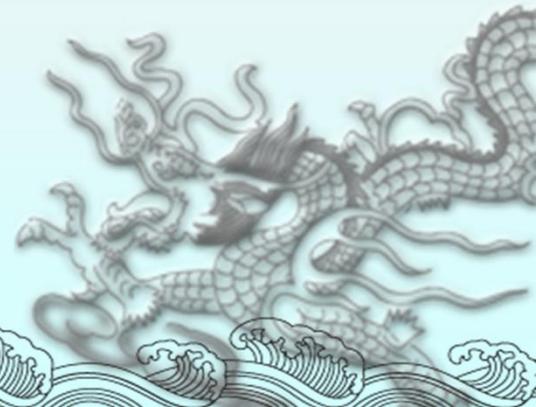




温度

◆ 1.3，低温对微生物的影响

微生物代谢活性降低。当遭受冰冻时，游离水形成冰晶，冰晶对细胞有机械损伤作用，细胞失去可利用的水造成生理干旱，代谢受阻，甚至蛋白质变性，细胞死亡。



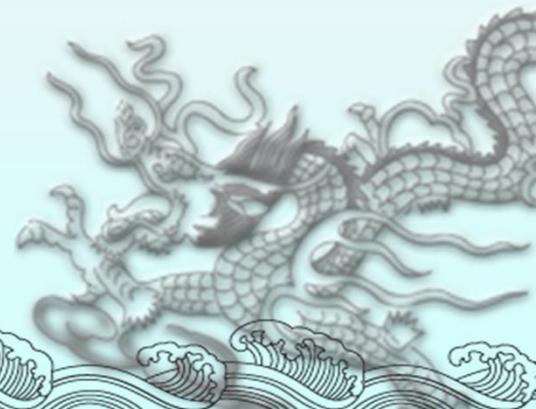


2, 水的活性

水的活性：水活度，渗透压。

蛋白质变性和盐类浓度增高。

高渗溶液、等渗溶液、低渗溶液





3, pH值

影响微生物对营养物质的吸收，影响酶的活性，从而影响微生物的生命活动。

4, 氧和氧化还原电位

好氧的微生物需要较高的Eh，厌氧的微生物需要较低的Eh。



(a) Obligate aerobes



(b) Facultative anaerobes



(c) Obligate anaerobes



(d) Aerotolerant anaerobes



(e) Microaerophiles





5, 辐射

因波长的不同而异，紫外线有很强杀菌能力。

超声波（频率在9—20kHz/s以上），对细胞内含物有强烈的震荡作用，并产生过氧化氢。

微波（频率在915—2450MHz/s之间），热效应。



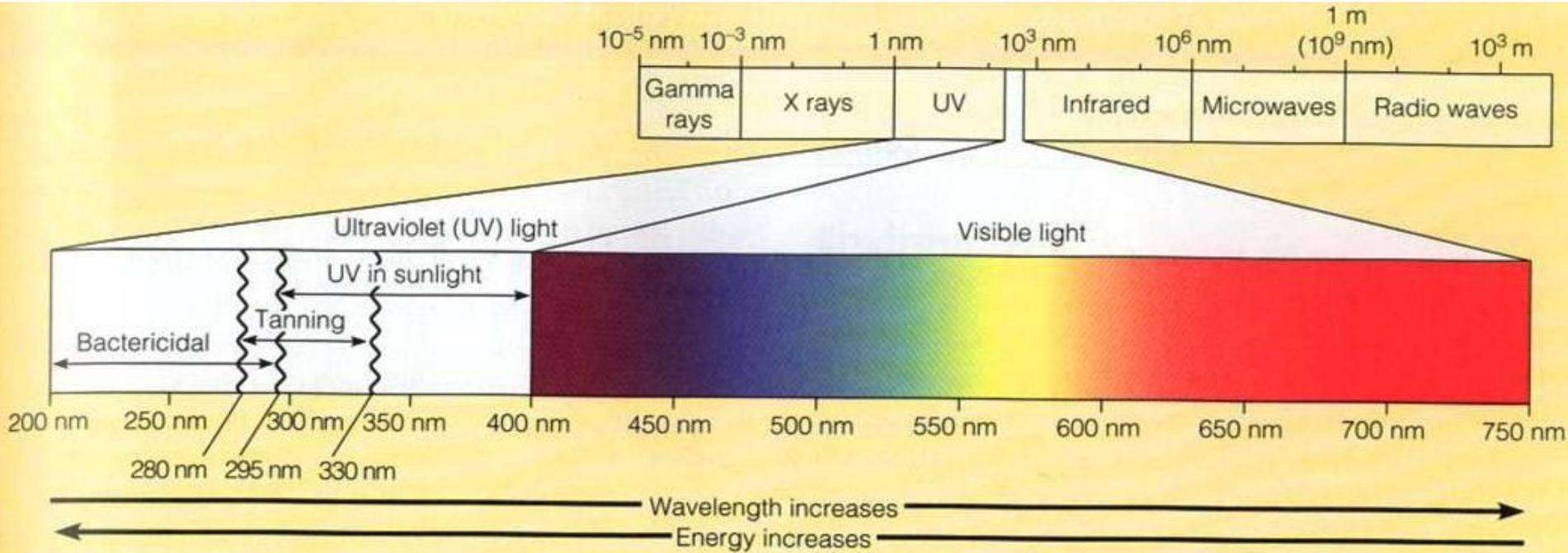


Figure 7.4 The radiant energy spectrum Visible light and other forms of radiant energy radiate through space as waves of various lengths. Ionizing radiation, such as gamma rays and X rays, has a wavelength shorter than 1 nm. Nonionizing radiation, such as ultraviolet (UV) light, has a wavelength between 1 nm and about 380 nm, where the visible spectrum begins.

If the bactericidal effect of UV light is due to absorption damage to DNA, is there evidence here that skin cell DNA could be damaged by tanning?

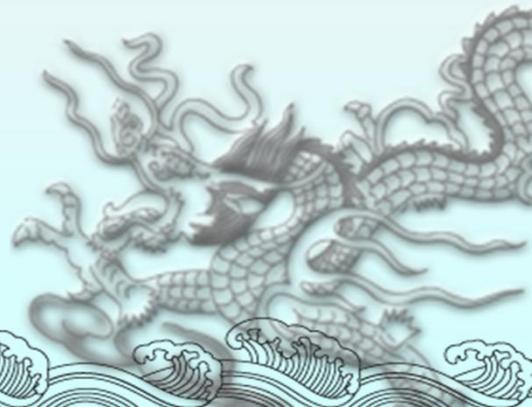




6, 化学杀菌剂和抑菌剂

灭菌作用：杀死一切微生物及其孢子。消毒作用：杀死或消除所有病原微生物。防腐作用：是一种抑菌作用，而不是杀死它们。

7, 营养物质





第四节 微生物生长繁殖的控制

一、控制微生物的化学物质

1, 抗代谢物：是一类结构上与生物体内的必须代谢物相似并能以竞争方式取代它，以干扰病原菌正常代谢过程的化学药物。如生长因子等结构类似物。

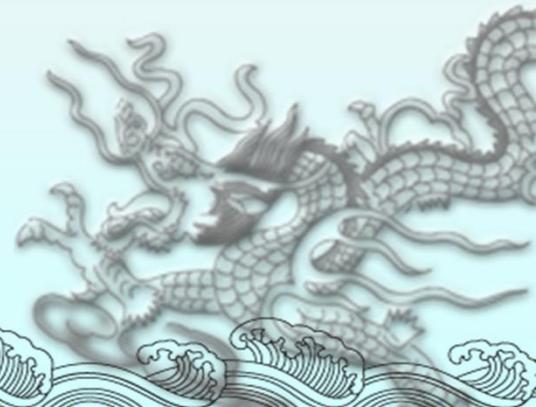
(生长因子的结构类似物又称为抗代谢物
(antimetabolite))





抗代谢物种类

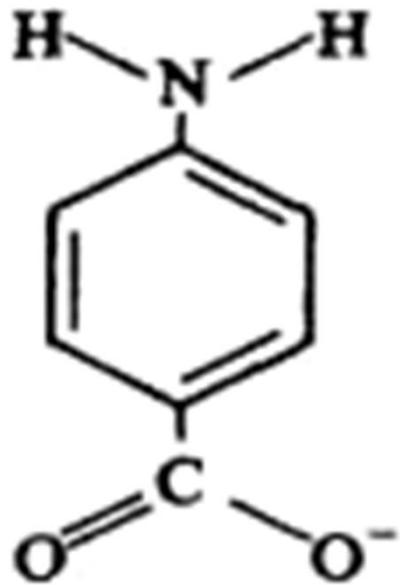
- ◇ 磺胺药——对氨基苯甲酸；
- ◇ 6-巯基嘌呤——嘌呤；
- ◇ 5-甲基色氨酸——氨基酸；
- ◇ 异烟肼——吡哆醇。





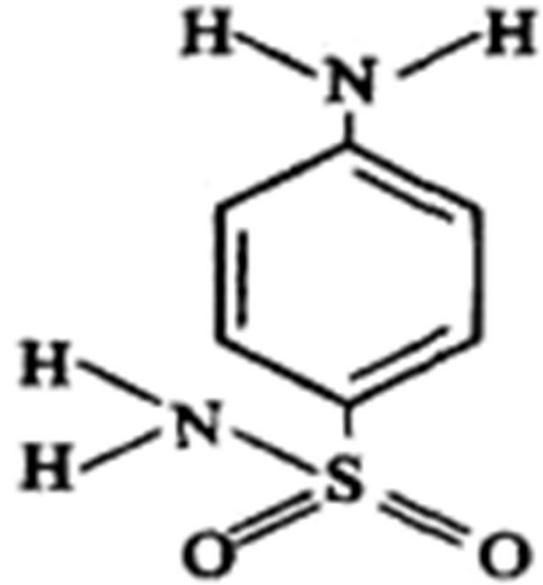
例：

磺胺类药物是叶酸组成部分对氨基苯甲酸的结构类似物，对氟苯丙氨酸、5-氟尿嘧啶和5-溴胸腺嘧啶，分别是苯丙氨酸、尿嘧啶和胸腺嘧啶的结构类似物，由这些结构类似物取代正常成分之后造成代谢紊乱，以抑制机体的生长。



对氨基苯甲酸

(二氢蝶酸合成酶的正常底物)



磺胺

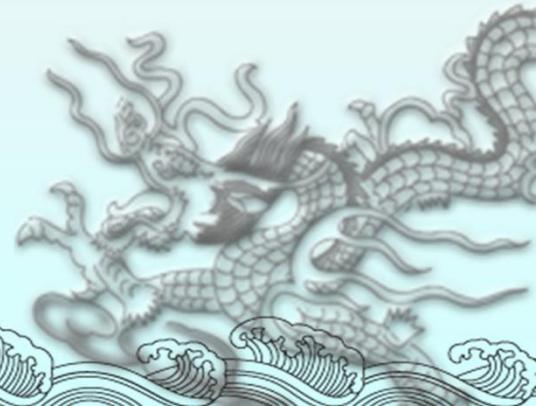
(代谢类似物)





2, 抗生素

- ◆ 抗生素：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，它们是能够抑制或杀死其他微生物的化合物。



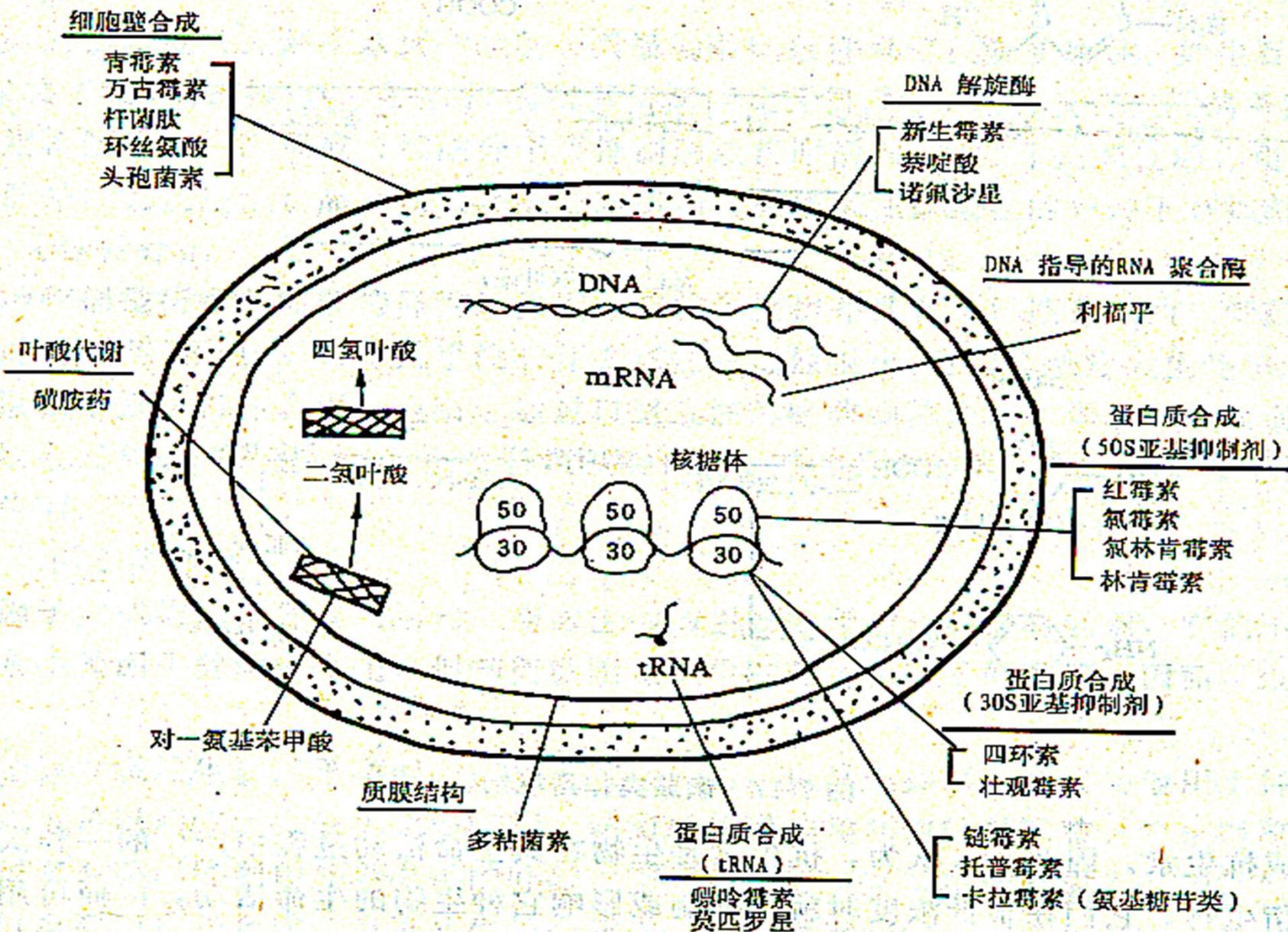


图 7-18 主要抗生素和化学治疗剂的作用模型



3, 表面消毒剂

类型	名称及使用浓度	作用机制	应用范围
重金属盐	0.05-0.1%升汞 0.1-1%AgNO ₃	使蛋白质变性	非金属物品, 器皿 皮肤, 滴新生儿眼睛
酚类	3-5%石炭酸 2%煤酚皂 (来苏儿)	蛋白质变性, 损伤细胞膜	地面、家具、器皿 皮肤
醇类	70-75%乙醇	蛋白变性、脱水、溶脂	皮肤、器械
醛类	0.5-10%甲醛	蛋白质变性	物品消毒、接种室熏蒸
氧化剂	0.1%KMnO ₄	蛋白质变性	皮肤、尿道、水果蔬菜
卤素及其化合物	0.2-0.5mg/L氯气 10-20%漂白粉 0.5-1%漂白粉 2.5%碘酒	破坏细胞膜、酶、蛋白质 蛋白质变性	饮水、游泳池水 地面、厕所 饮水、空气、体表 皮肤
表面活性剂	0.05-0.1%新洁尔灭	破坏膜及蛋白质、	皮肤、黏膜、手术器械
染料	2-4%龙胆紫	蛋白质变性	皮肤、伤口



杀菌能力

各种化学制剂杀菌能力的比较标准：
在临床上最早使用的消毒剂----石炭酸
石炭酸系数：

指在一定时间内被试药剂能杀死全部供试菌的最高稀释度和达到同效的石炭酸的最高稀释度的比率。一般规定处理时间为10分钟，而供试菌定为*Salmonella typhi*（伤寒沙门氏菌）。





其他相关概念

- ◆ 防腐：又称抑菌，是指防止或抑制微生物的生长繁殖。
- ◆ 消毒：是指杀死病原微生物的措施。
- ◆ 灭菌：是指杀死物体上的所有微生物。
- ◆ 商业灭菌：又称杀菌，是从商品的需要出发对食品进行灭菌，是指食品经过杀菌处理后，按照所规定的微生物检验方法检不出活的微生物或者仅能检出极少数的非致病微生物，而且它们在一定保存期内不致引起食品变质腐败。

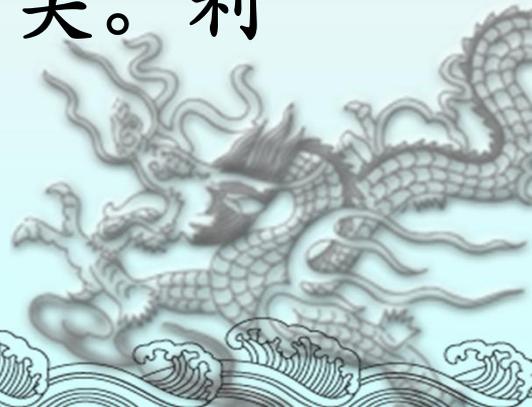




二、控制微生物的物理因素

1, 高温灭菌

主要影响：原生质胶体变性，酶结构受损，细胞机能失调，生长发育停止直至死亡。微生物对高温的耐受力与微生物种类、发育阶段、基质等有关。利用：干热灭菌和湿热灭菌





2, 辐射灭菌

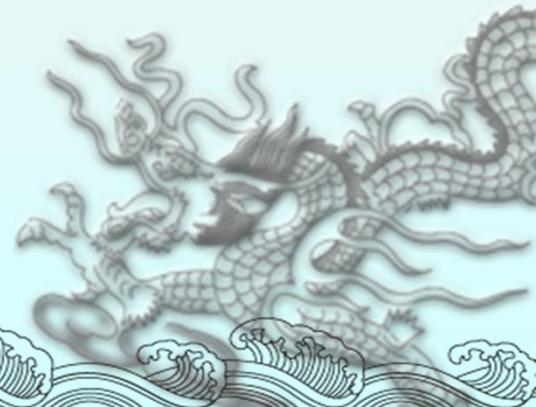
因波长的不同而异，紫外线有很强杀菌能力。

微波(频率在915—2450MHz/s之间)，热效应。

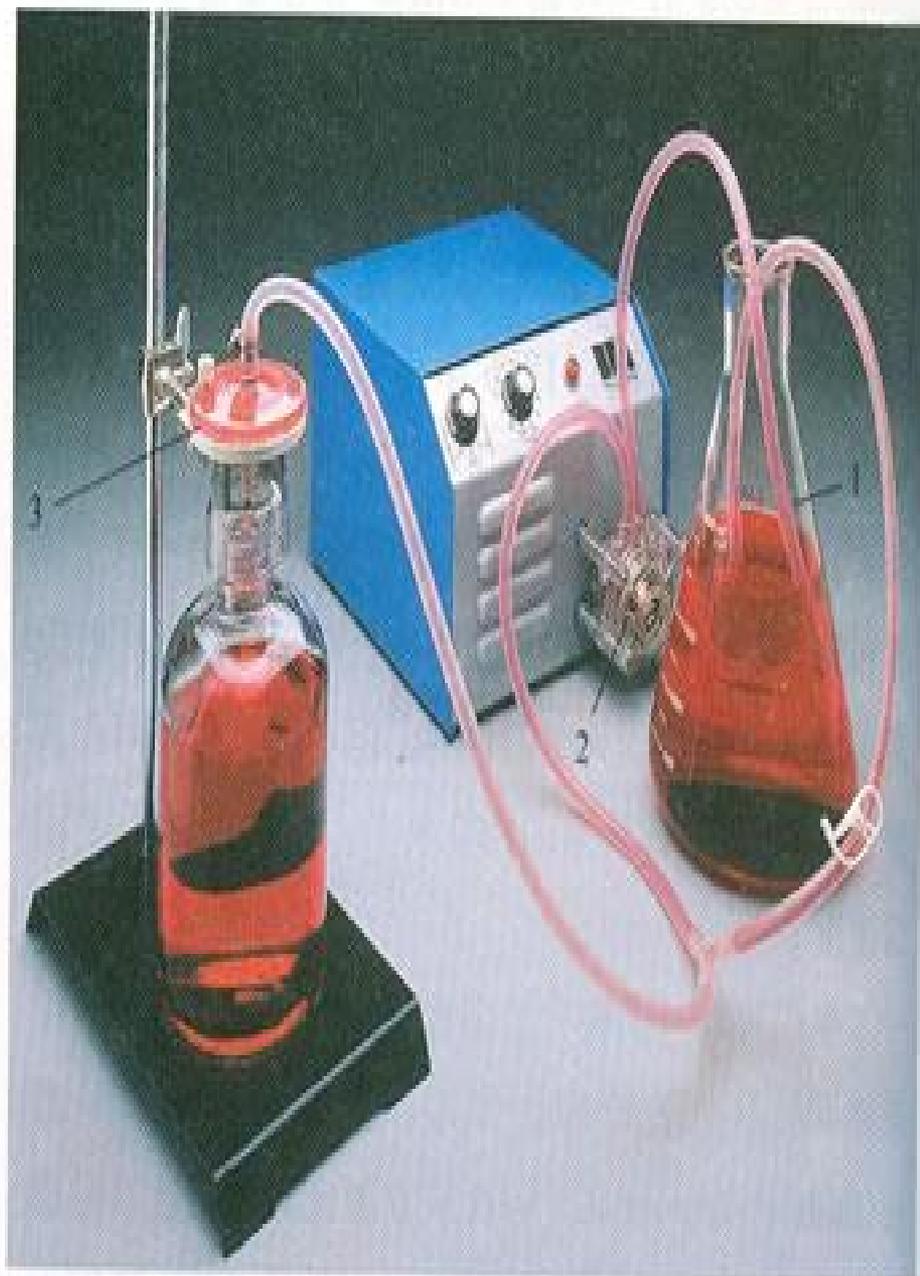
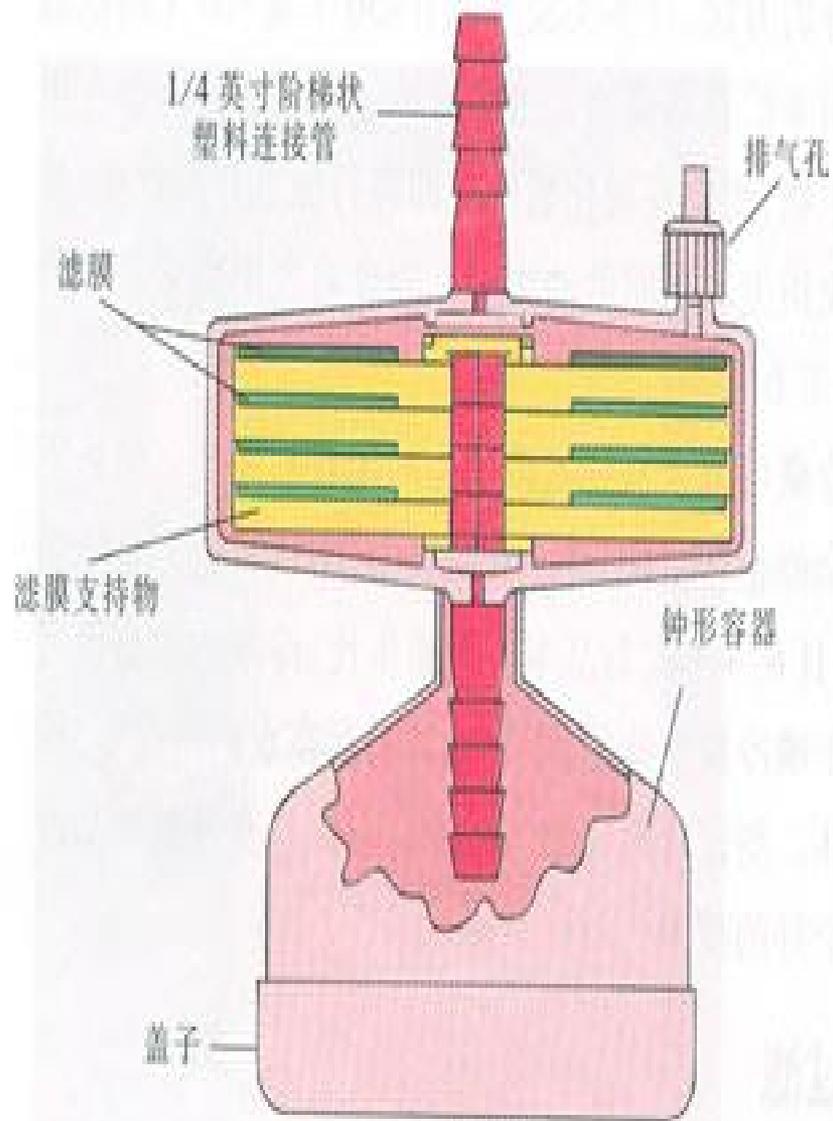
3, 过滤灭菌

4, 高渗作用

5, 干燥

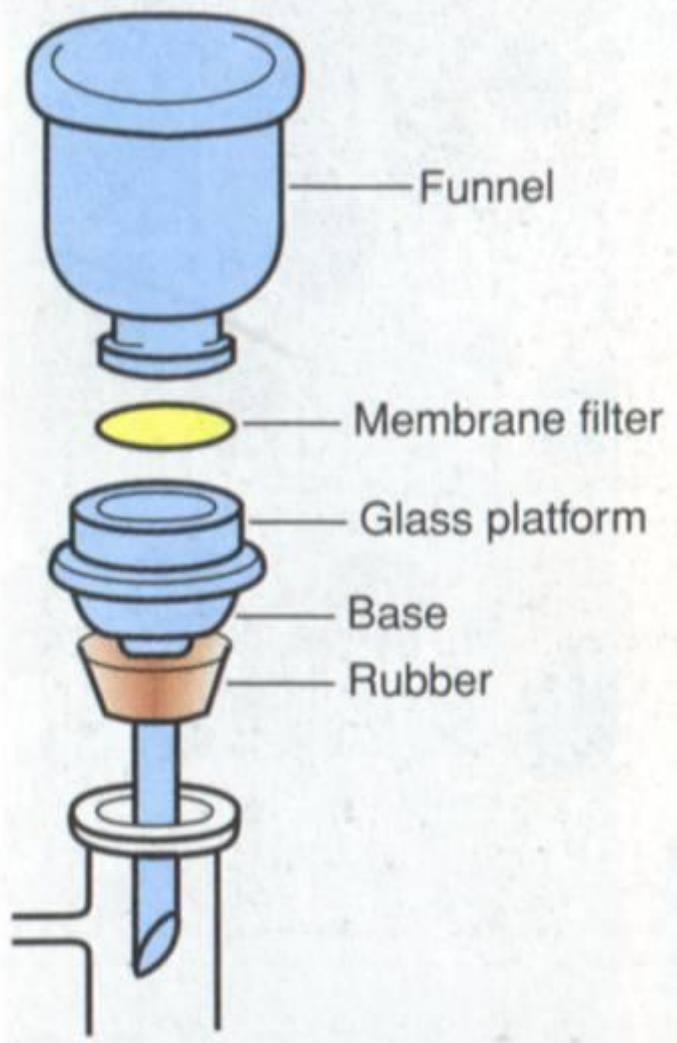




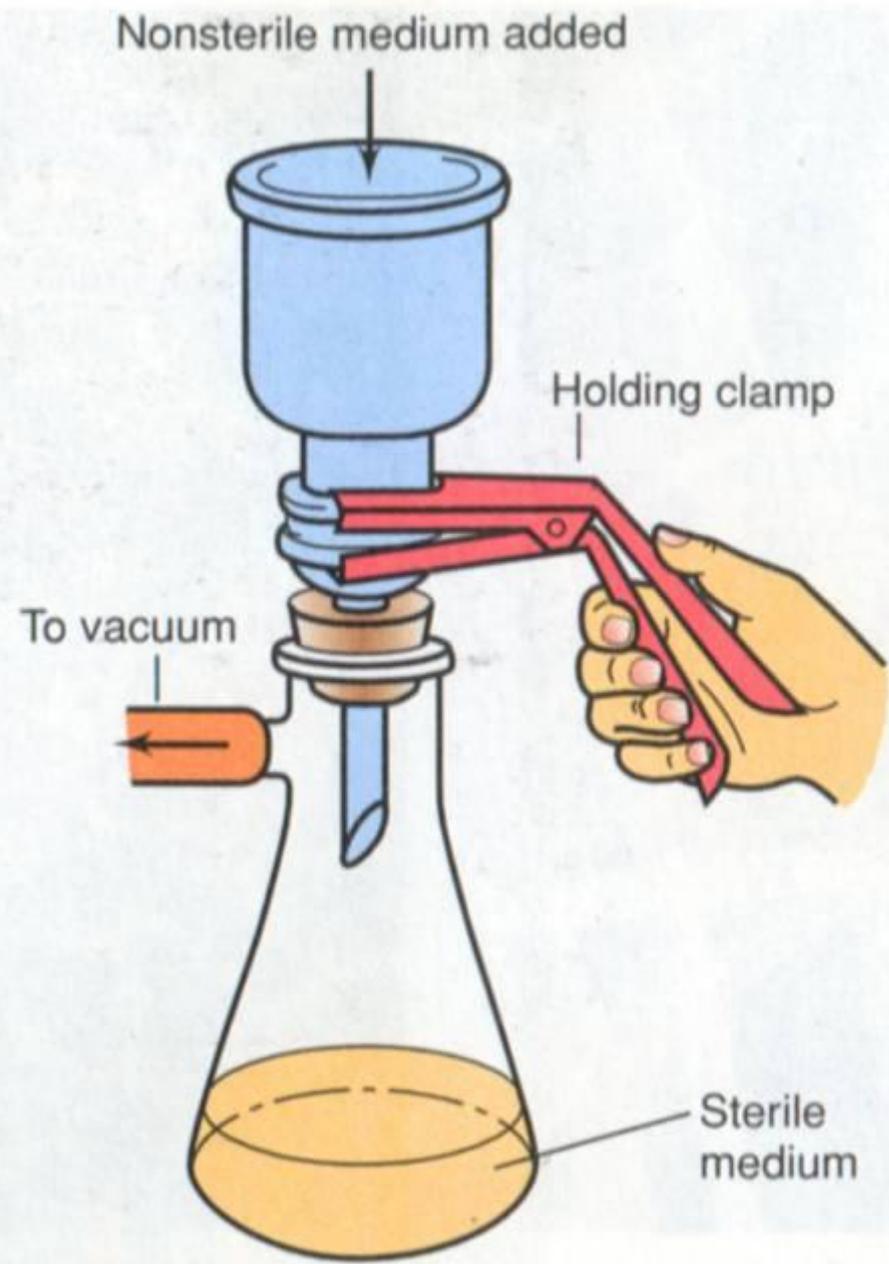


过滤除菌

Millipak-40
过滤器剖面图



(a)





6, 超声波

超声波（频率在9—20kHz/s以上），对细胞内含物有强烈的震荡作用，并产生过氧化氢。





思考题：

- ◇ 1. 测定微生物生长的常用方法？
- ◇ 2. 细菌生长曲线各个时期的特点及其理论指导意义？
- ◇ 3. 影响微生物生长繁殖的理化因素有哪些？

