

第七章 微生物的生长及其控制



微生物生长？ 微生物繁殖？



第一节 细菌的群体生长规律

微生物群体生长的测定方法

1、数量测定

显微直接计数法（血球计数器法）、菌落计数法等

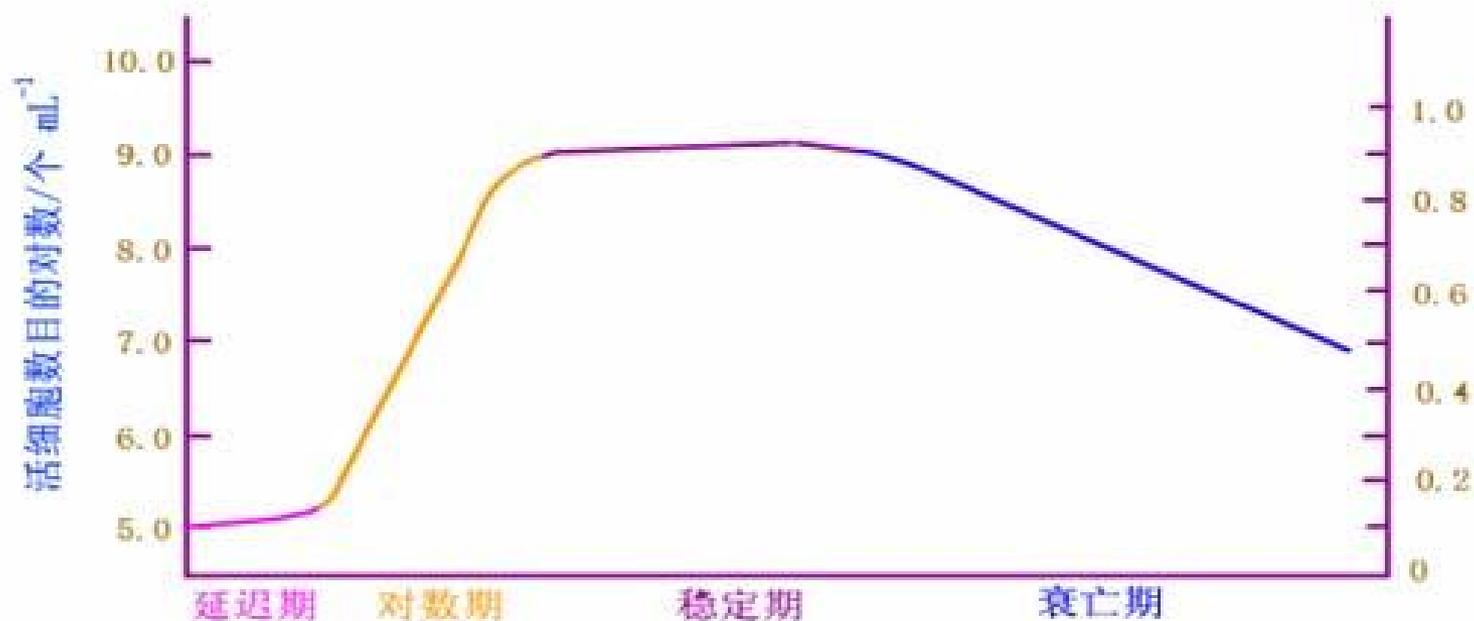
2、重量测定

称重法（干重法）

微生物的生长及其控制

华南师范大学

生命科学学院



细菌生长曲线

细菌生长曲线？

将少量细菌接种到一个恒定容积的新鲜液体培养基中，在适宜的条件下培养，定时取样测定细菌含量，如果以培养时间为横坐标，以细菌数目的对数或生长速度为纵坐标作图，可以得到曲线，这称为**生长曲线**。

生长曲线可以分为延迟期、对数期、稳定期与衰亡期。

细菌生长曲线各时期特点

一、延迟期 (lag phase)

少量细菌接种到新鲜培养基后，一般不立即进行繁殖，生长速度近于零，细胞数目保持不变，甚至稍有减少，这段时间被称为延迟期，又称为迟缓期、调整期或滞留适应期。

特点：分裂迟缓、代谢活跃。

延迟期出现的原因：主要是为了调整代谢。当细胞接种到新的环境（如从固体培养基接种到液体培养基）后，需要重新合成必需量的酶、辅酶或某些中间代谢产物，以适应新的环境。

在实际生产中用哪些方法来缩短或消除迟缓期？

二、对数期

又称为指数期 (exponential phase) 细胞数目以几何级数增加, 故称对数期。

特点:

1. 细胞分裂速度最快, 代时最短, 细胞代谢最强, 组成新物质最快。
2. 细菌数以几何级数增加。

在对数期细胞数按几何级数增加:1, 2, 4, 8, ... , 若以乘方的形式则表示为: $2^0, 2^1, \dots, 2^n$ 。 “ n ” 是细菌分裂的次数或增殖代数。

若1个细菌繁殖 n 代可产生 2^n 个细菌。在时间 t_0 时菌数为 x , 经过一段时间到 t_1 时, 繁殖 n 代后, 菌数为 y , 则可计算“代时”(即单个细胞完成一次分裂所需的时间, 又称增代时间或世代时间, 用 G 表示)。

$$G = (t_1 - t_0) / n$$

公式:

$$G = (t_1 - t_0) / n$$

由于 $y = x * 2^n$

$$\lg y = \lg x + n \lg 2$$

$$n = (\lg y - \lg x) / \lg 2 \quad (\lg 2 = 0.3010)$$

$$n = 3.3 \lg y / x$$

所以 $G = (t_1 - t_0) / 3.3 \lg y / x$

$$= (t_1 - t_0) / 3.3 (\lg y - \lg x)$$

例题：设大肠杆菌在接种时的细胞浓度为100个/mL，经400分钟的培养，细胞浓度增至10亿个/mL，求该菌的世代时间和繁殖代数。

解： t_0 为接种时间 $x = 100$

t_1 为培养时间（400分钟） $y = 1,000,000,000$

$$n = 3.3 (\lg y - \lg x) = 3.3 (\lg 10^9 - \lg 10^2) = 23.1$$

$$G = (t_1 - t_0) / n = (400 - 0) / 23.1 = 17.3$$

即大肠杆菌的世代时间为17.3分钟，在400分钟内共繁殖23.1代。

三、稳定期 (stationary phase)

又称恒定期或最高生长期。处于稳定期的微生物，新增殖的细胞数与老细胞的死亡数几乎相等，整个培养物中二者处于动态平衡，此时的增长速度又逐渐趋向零。

特点:

1. 培养物中细胞总数最高。如果为了获得大量菌体就应在此阶段收获。
2. 细胞内开始积累储藏物，如肝糖、异染颗粒、脂肪粒等。
3. 大量积累代谢产物，如放线菌发酵形成大量抗生素。在生产上可通过补料，调节pH与温度等措施，延长稳定期，以积累更多的代谢产物。
4. 大多数芽孢细菌在此阶段形成芽孢。

四、衰亡期 (decline phase)

细菌死亡率逐渐增加，以致死亡数大大超过新生数，群体中活细菌的数目急剧下降，出现“负生长”，此阶段叫衰亡期，又称死亡期。

特点:

1. 死亡期中有一段时间，活菌数按几何级数下降，称为“对数死亡阶段”。
2. 菌体细胞产生或释放出一些产物。如氨基酸、转化酶、抗生素等。
3. 菌体细胞有的开始自溶，有的呈现多种形态，有的产生畸形，细胞大小悬殊，有的细胞内多液泡，有的细胞革兰氏反应阳性变成阴性反应等。

第二节 连续培养



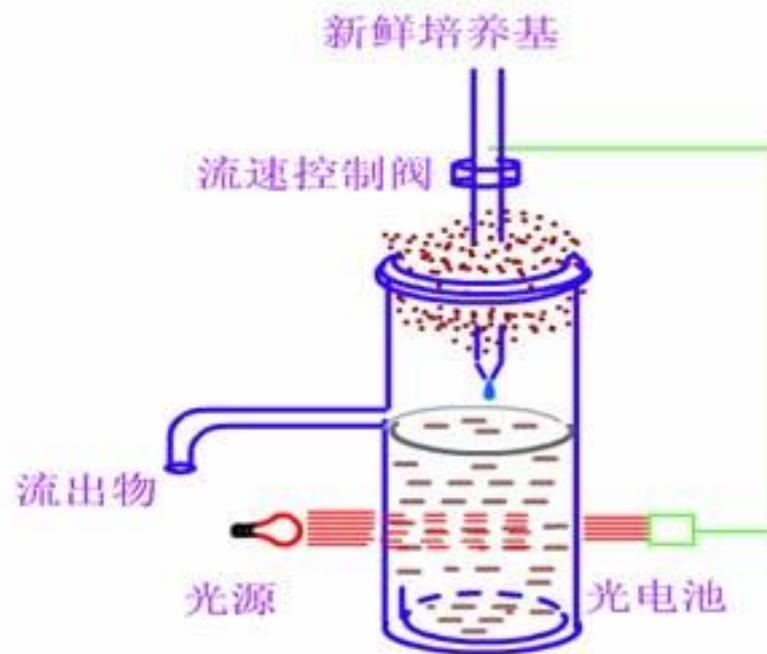
连续培养（continuous cultivation）是指在一个恒定容积的流动系统中培养微生物，一方面以一定速率不断地加入新的培养基，另一方面又以相同的速率流出培养物（菌体和代谢产物），以使培养系统中的细胞数量和营养状态保持恒定，即处于稳态。

连续培养可分为：恒浊连续培养和恒化连续培养。

恒浊连续培养

不断调节培养基流入或排出的速率以使培养液中微生物细胞密度保持恒定（恒浊）。

在恒浊培养装置中需要浊度计。借光电池检测培养室中的浊度，并由光电效应产生的电信号强弱变化，来自动调节新鲜培养基流入和培养物流出培养室的流速。培养室中浓度超过预期值时，流速加快，浊度降低；反之，流速减慢，浊度增加，以此来维持培养物的某一恒定浊度。

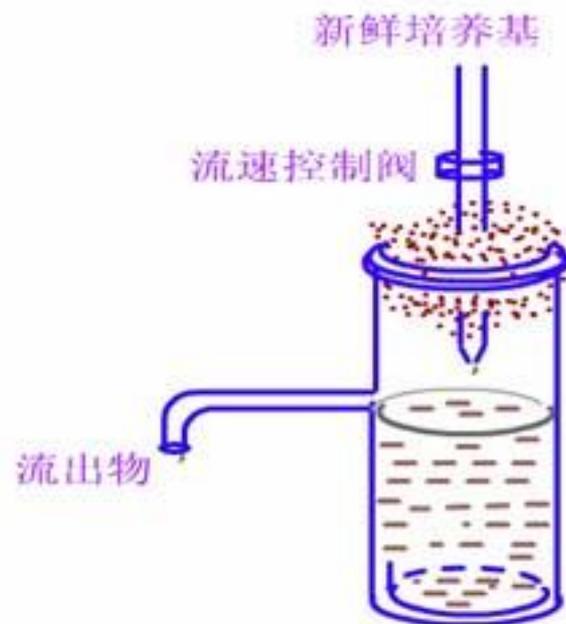


恒浊连续培养

恒化连续培养

随着细菌的生长，限制性因子的浓度降低，致使细菌生长速率受限，但同时通过自动控制系统来保持限制因子的恒定流速，不断予以补充，就能使细菌保持恒定的生长速率。

常见的限制性营养物质有作为氮源的氨、氨基酸；作为碳源的葡萄糖、乳酸及生长因子，无机盐等。



恒化连续培养

第三节 同步培养



同步培养法 (synchronous cultivation) 能使培养物中所有微生物都处于相同的生长阶段的培养方法。

同步培养法通常分为选择法和诱导法。

硝酸纤维素薄膜法

- ① 将菌液通过硝酸纤维素薄膜，由于细菌与滤膜带有不同的电荷，所以不同生长阶段的细菌均能附着于膜上。
- ② 翻转薄膜，用新鲜培养液滤过培养。
- ③ 附在膜上之细菌分裂，分裂后的子细胞不与薄膜直接接触，由于其本身的质量，加上所带的培养液的质量，便会落到收集器内。
- ④ 收集器在短时间内收集的细菌处于同一分裂阶段。用此细菌接种培养，便可获得同步培养物。

离心沉降分离法

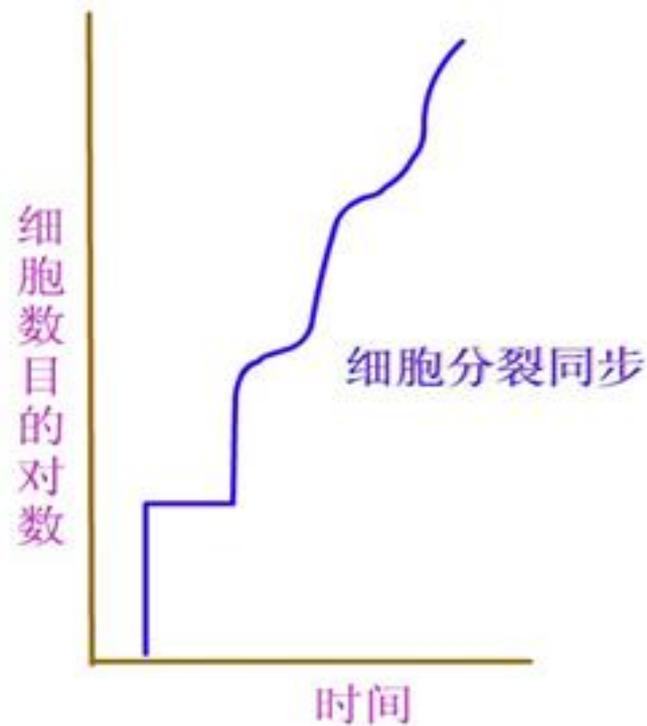
处于同一生长阶段的同步细胞，其体积和质量大致相等，处于不同生理阶段的细胞，体积和质量大小不等，子细胞与成熟细胞大小差别较大，通过离心沉降，易于分开。然后用相同大小的细胞进行培养便可获得同步培养物。

诱导法

采用物理、化学因子使微生物细胞进行到某个生长阶段而停下来，然后再去除该因子，以达到诱导微生物细胞同步生长的目的。主要通过控制环境条件如温度、营养物质等来诱导同步生长。

同步生长能否无限的维持下去？

由于同步群体内细胞个体之间的差异，同步生长不能无限的维持，往往会逐渐破坏，最多能维持2~3个世代后，群体内的各个细胞个体就会因为生长周期的代时差异而处于不同的生长阶段，出现非同步生长。



细菌的同步生长与非同步生长

第四节 环境因素对微生物生长的影响

微生物的生长受到它们所处环境理化因素的极大影响。了解环境因素对微生物生长的影响，有助于说明微生物在自然界的分布，还可帮助我们采用相应的方法控制微生物的活动。

温度

温度是影响微生物生长的一个重要因子。

每种微生物都有3种基本温度。

最低生长温度：低于这个温度以下不再生长。

最适生长温度：在此温度时生长速度最快。

最高生长温度：在此温度以上不可能生长。

微生物按其生长温度范围可分为三类：
低温微生物、中温微生物、高温微生物。

微生物类型		生长温度范围/℃			分布的主要处所
		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	-5~0	10~20	25~30	海水以及冷藏食品上
中温型	室温	10~20	20~35	40~45	腐生菌
	体温		35~40		寄生菌
高温型		25~45	50~60	70~95	温泉 堆肥堆 土壤表层 热水加热器



微生物的三种类型(温度)

低温的应用？

- 1、低温对微生物具有抑制或杀死作用，故常用低温保藏食品。
- 2、处于低温状态的微生物，代谢活动降低，生长繁殖停滞，但仍维持存活状态，一旦遇到适合的生活环境就可生长繁殖。因此，常用低温保存微生物菌种。

高温的应用？

高温可引起微生物蛋白质和核酸不可逆的变性，产生致死作用，故广泛用于消毒灭菌。

高温灭菌方法?

1、干热灭菌

(1) 焚烧灭菌法 (incineration) : 用火焰焚烧。

(2) 烘箱热空气法: 常用烘箱 160°C 处理2小时以上。

2、湿热灭菌

(1) 水煮沸法: 水煮沸 100°C , 15分钟以上。

(2) 高压蒸汽锅法 (autoclaving) : 高压锅

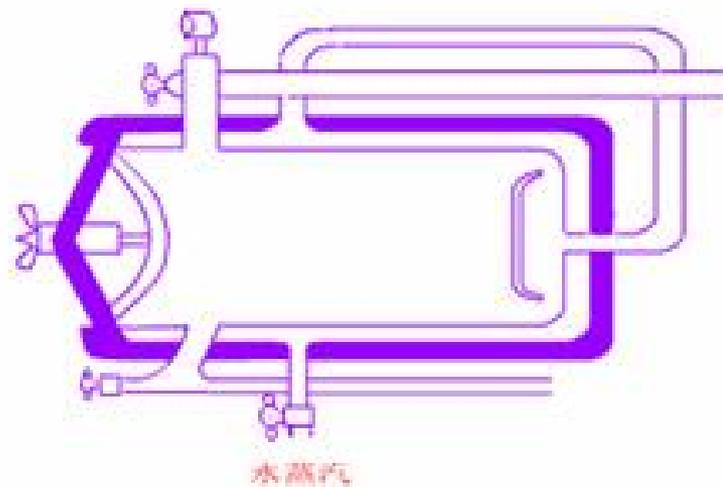
(0.1013MPa 或 $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$ 或 $15\text{磅}/\text{英寸}^2$) 121°C 处理15~30分钟 。

(3) 间歇灭菌法 (tyndallization) : 100°C 处理15-30分钟, 再置于 $28\sim 37^{\circ}\text{C}$ 下, 如此反复三次。

(4) 巴斯德消毒法 (pasteurization): 71.6°C 处理15分钟或 62.9°C 处理30分钟。

高压锅如何使用？

高压蒸汽锅法是实验室及生产中最常用的灭菌方法。使用高压锅时，要注意完全排除锅内的冷空气，使之充满饱和蒸汽，否则会因蒸汽中混有空气而比相应纯蒸汽的温度降低，影响灭菌效果。



pH

pH影响微生物的生长。每种微生物都有最适pH和一定的pH范围。

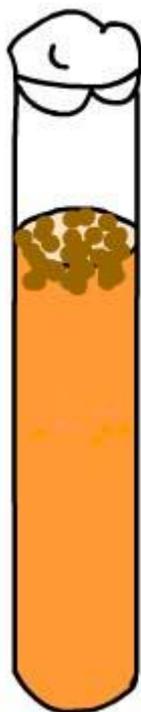
- 1、大多数细菌最适pH为6.5~7.5。
- 2、放线菌最适pH为7.5~8。
- 3、酵母、霉菌最适pH为5~6

微生物的生长及其控制

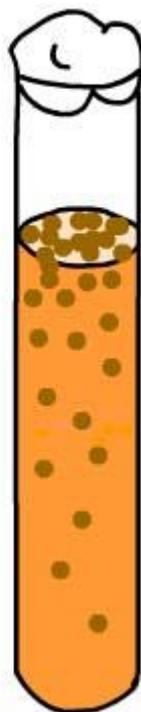
华南师范大学

生命科学学院

氧



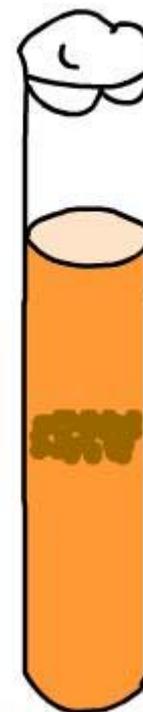
专性好氧微生物



兼性好氧微生物



专性厌氧微生物



微需氧微生物

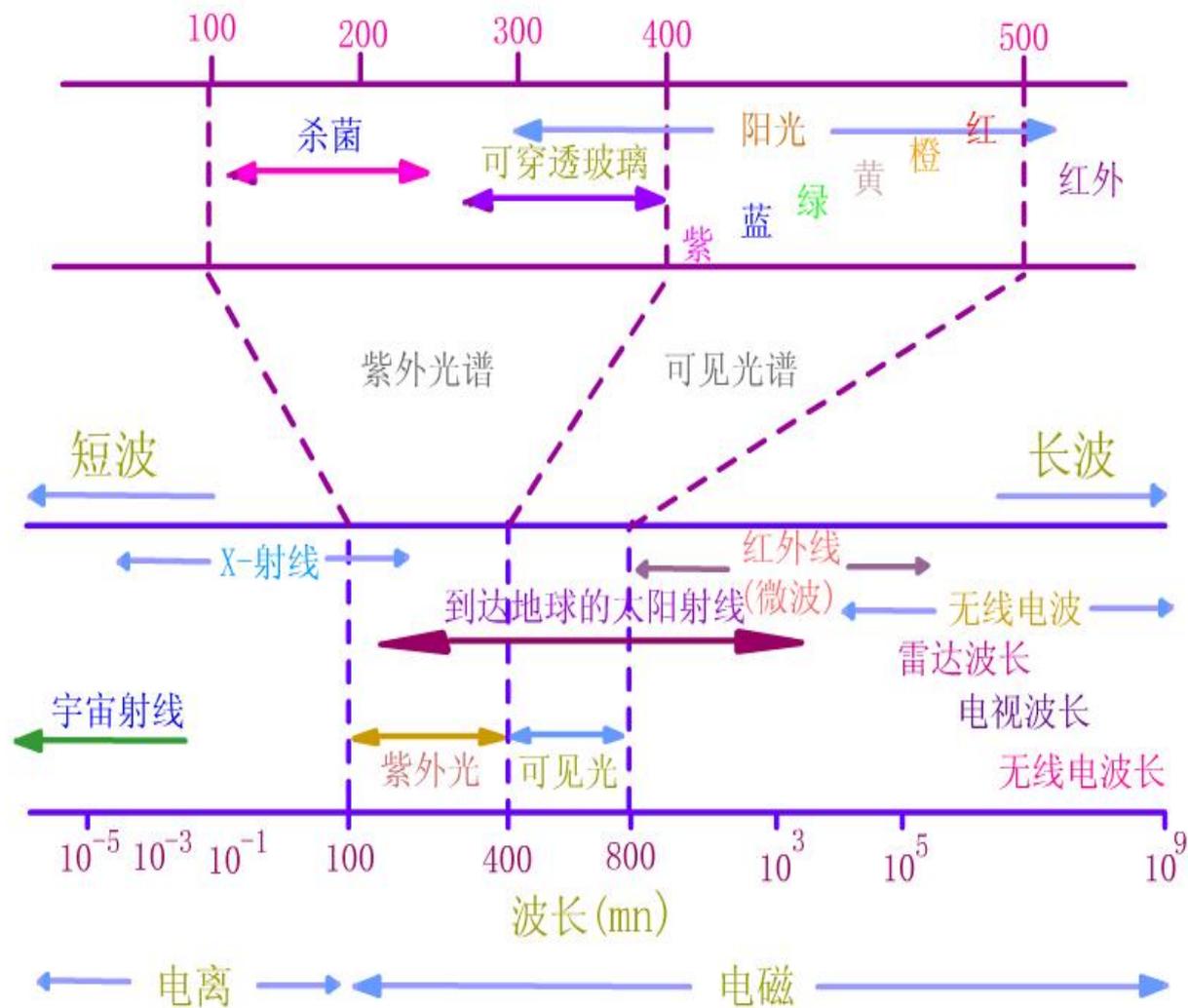
根据微生物与氧的关系分为：

- 1、好氧微生物：需要氧才能生长的微生物，包含专性好氧微生物和微好氧微生物。
- 2、兼性好氧微生物：在有氧或无氧条件下均可生长的微生物。
- 3、厌氧微生物：可分为耐氧厌氧微生物和严格厌氧微生物，前者尽管不需要氧，但可耐受氧，并在氧存在下仍能生长，而后者指对氧敏感，有氧时即被杀死的微生物。

微生物的生长及其控制

华南师范大学

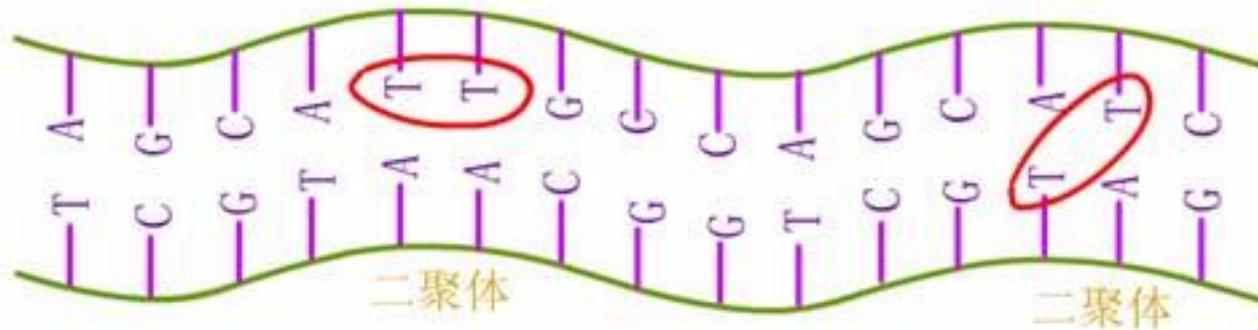
生命科学学院



电离和电磁能谱

(一) 紫外线

紫外辐射能作用于核酸，引起致死突变。紫外线穿透能力很差，不能穿过玻璃、衣物、纸张等，但能够在空气中传播，可用作物体表面或室内空气的灭菌。经紫外辐射处理后，受损伤的微生物细胞若再暴露于可见光中，一部分可恢复正常，这称为光复活现象。



紫外辐射对核酸的影响

紫外线常作用于核酸形成胸腺嘧啶二聚体。

(二) 电离辐射

X射线、 α 射线、 β 射线和 γ 射线均为电离辐射。电离辐射的杀菌作用主要是间接地通过射线本身引起环境中水分子和细胞中水分子在吸收能量后导致电离所产生的自由基起作用，如 H_2O^- 、 $\text{OH}\cdot$ 、 OH^- 等，上述离子常与液体内存在的氧分子作用，产生一些具强氧化性的过氧化物，如 H_2O_2 与 HO_2 等使细胞内某些重要的蛋白质和酶发生变化，如使酶蛋白的-SH基氧化，从而使细胞受到损伤或死亡。

干燥

水分子可维持微生物的正常生命活动。干燥会导致细胞失水而造成代谢停止以致死亡。

化学药剂

许多化学药剂可抑制或杀死微生物，可用作消毒剂、防腐剂、化学治疗剂。

一、消毒剂和防腐剂

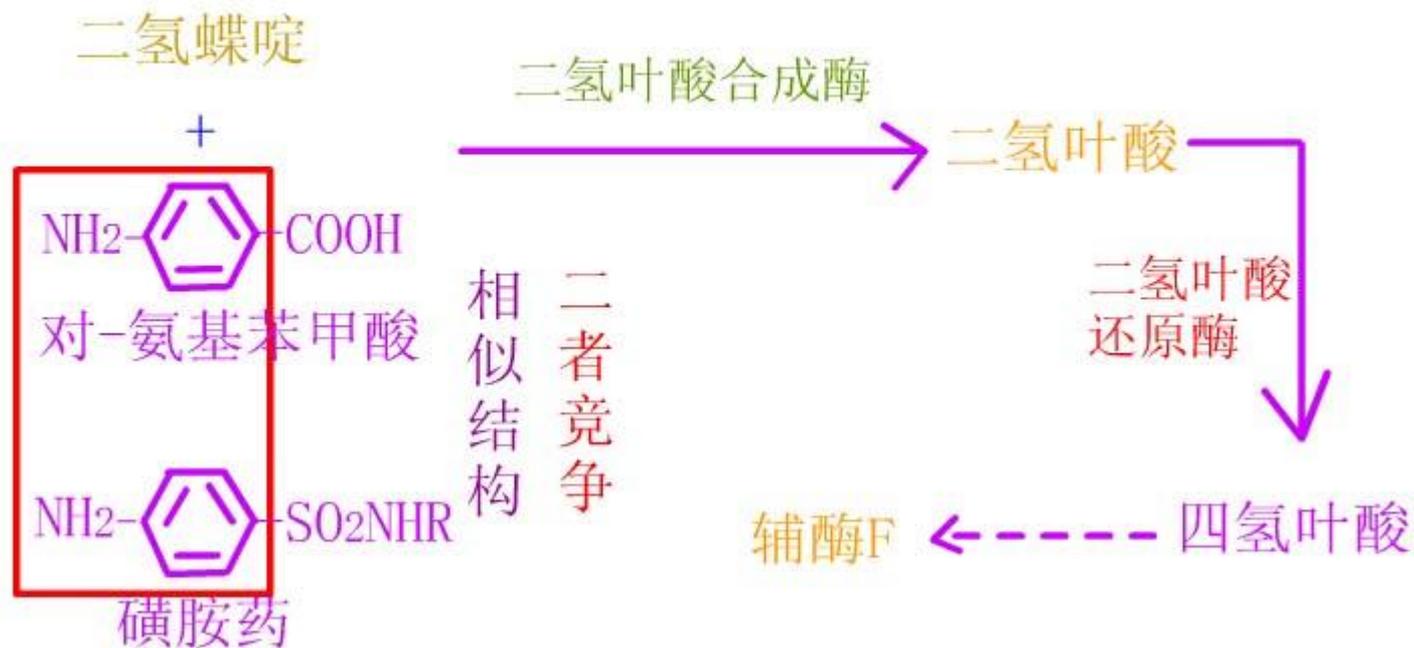
如3%~5%石炭酸、75%乙醇、0.25%新洁尔灭等。

二、化学治疗剂

能直接干扰病原微生物的生长繁殖并可用于治疗感染性疾病的化学药物称为化学治疗剂。它能选择性地作用于病原微生物新陈代谢的某个环节，使其生长受到抑制或致死。

(一) 抗代谢物 (antimetabolites)

在结构上与生物体所必需的代谢产物很相似, 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。磺胺类药物_是最常用的化学治疗剂, 它可抑制大多数革兰氏阳性细菌和某些革兰氏阴性细菌的生长繁殖, 能治疗多种疾病。

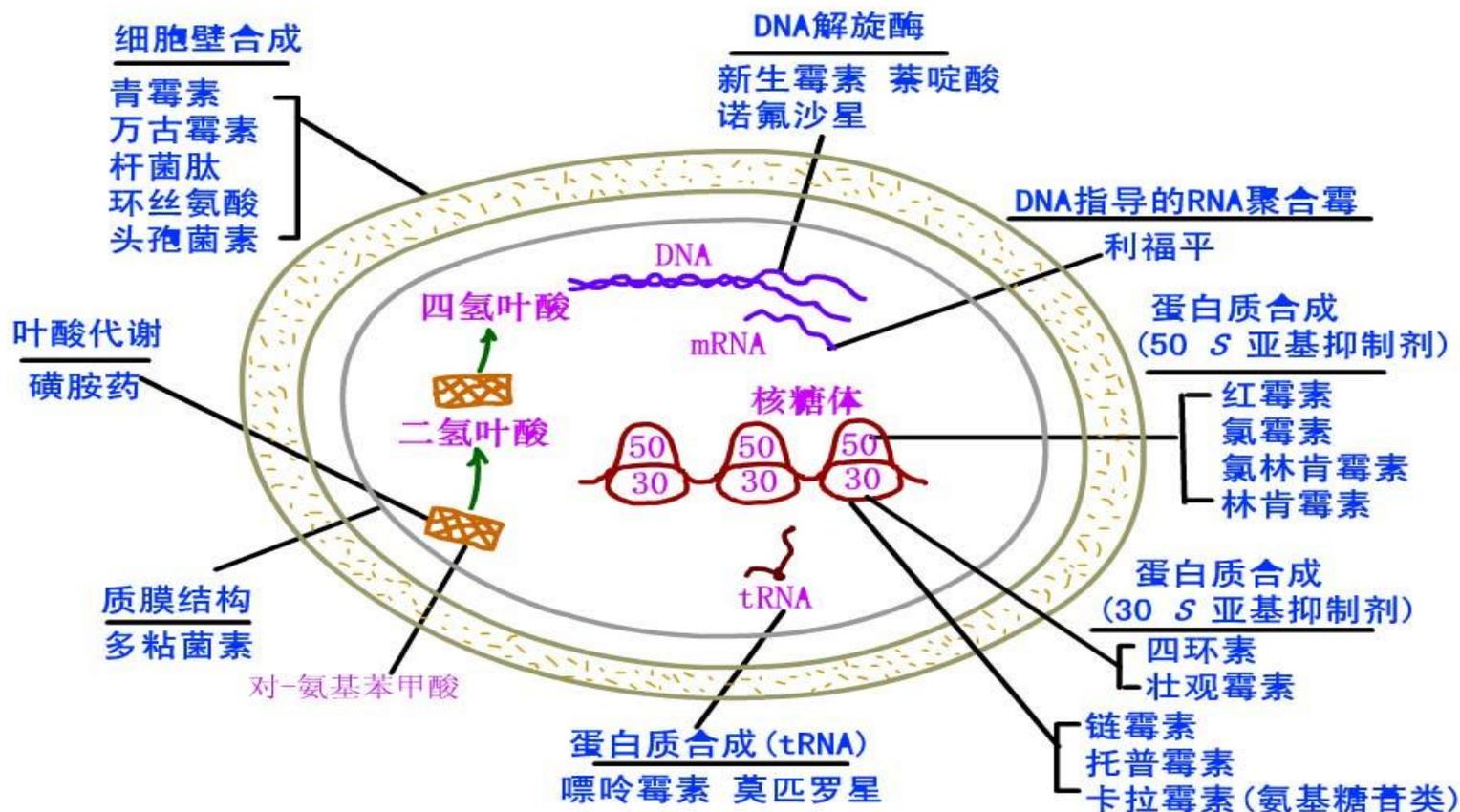


磺胺类药物的作用机制

微生物的生长及其控制

华南师范大学

生命科学学院



抗生素的作用机制

抗生素的作用机制

1. 抑制细胞壁的合成：如青霉素含有 β -内酰胺环，可特异地结合在细菌细胞壁肽聚糖上，抑制细胞壁的合成，因而只作用于细菌特别是肽聚糖成分丰富的G⁺菌。
2. 破坏细胞膜的功能：如多黏菌素可作用于膜磷脂使膜溶解，而G⁻菌细胞膜磷脂特别丰富，所以可特异性地抑制G⁻细菌的生长。
3. 抑制蛋白质的合成：由于原核微生物蛋白质合成所需的核糖体为30 S以及50 S亚基，与真核细胞明显不同，氯霉素是50 S亚基的抑制剂。链霉素，四环素，卡那霉素等是30 S亚基的抑制剂，因而它们都可特异地抑制原核微生物的生长。
4. 抑制核酸的合成：利福霉素可特异地结合到与真核细胞明显不同的细菌RNA聚合酶上，新生霉素则作用于细菌DNA酶，因而抑制细菌生长。



谢谢!