

## 第六章 微生物生长与环境条件

### 第一节 微生物纯培养

### 第二节 微生物培养的群体生长规律

### 第三节 微生物的生活环境

## 第一节 微生物纯培养

### ➤ 纯培养

从单个细胞繁殖形成的培养体（群体）。

### ➤ 纯培养基本步骤

- 1) 分离（得到单个微生物细胞或单个孢子）
- 2) 培养



分离方法 {  
稀释平皿法  
划线法  
单细胞挑取法

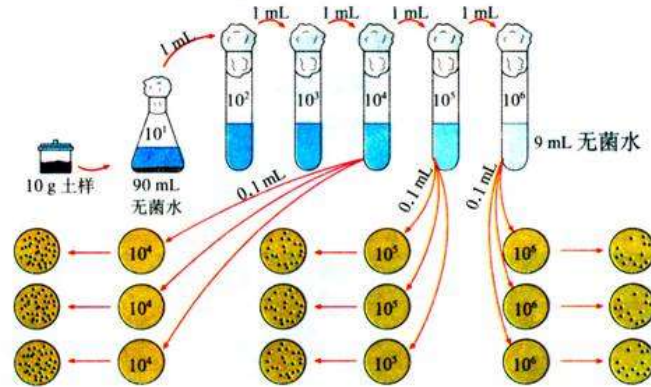


## 第一节 微生物纯培养

## 微生物分离

### ➤ 稀释平皿分离法

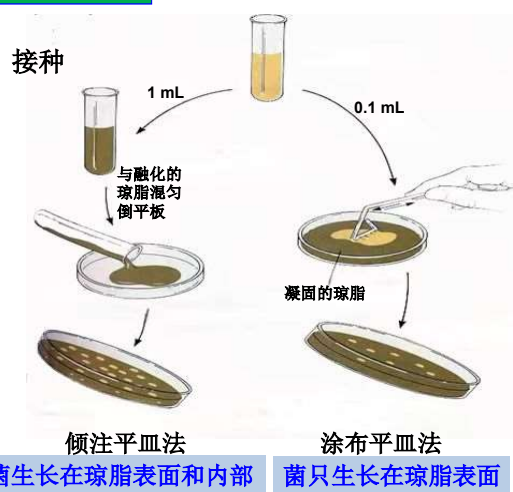
基本过程: (A) 梯度稀释      (B) 分离培养



## 第一节 微生物纯培养

## 微生物分离

## 稀释平皿分离法



## 第一节 微生物纯培养

### 微生物分离

#### ➤ 稀释平皿分离法

稀释平皿分离法操作过程中的几个问题

##### 1) 梯度稀释度的确定

需分离微生物在样品中的数量

##### 2) 选择菌落接种的依据

菌落特征

##### 3) 微生物纯培养的标准

菌落特征一致性

##### 4) 操作要点

无菌操作

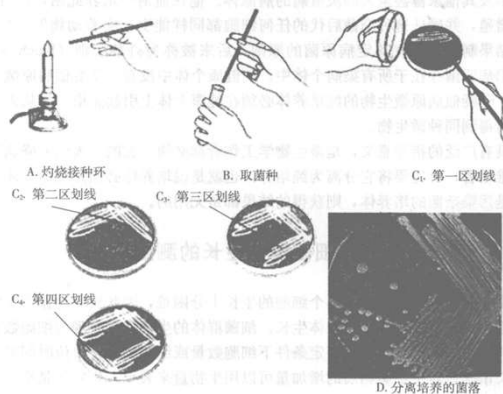


## 第一节 微生物纯培养

### 微生物分离

#### ➤ 平皿划线法

用无菌接种环挑取少许待分离的材料，在培养基表面进行多次平行划线，使微生物细胞分开生长以获得微生物纯培养的过程。



## 第一节 微生物纯培养

### 微生物分离

常用于真菌单孢子分离

#### ➤ 单细胞挑取法

将样品充分稀释 → 毛细吸管吸取单孢子（单细胞） → 培养



## 第一节 微生物纯培养

### 纯培养的保藏

#### 原理

根据微生物生理生化特性，人为创造低温、干燥、缺氧、缺乏营养等环境条件，使微生物的代谢活动和生长繁殖处于受抑制的休眠状态，但又不致使微生物死亡，从而达到保藏的目的。

#### 保藏原则

- 挑选优良纯种
- 选择生长期为幼龄的培养物
- 浓菌液保存

#### 保藏要求

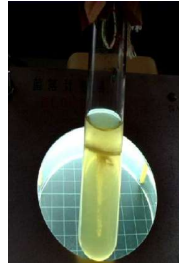
长期保存后菌种能正常存活，表型、基因型不变，代谢产物及高产能力不变。



## 第一节 微生物纯培养

### 纯培养的保藏

斜面低温保藏法  
液体石蜡保藏法  
砂土管保藏法  
甘油悬液保藏法  
冷冻干燥保藏法



## 第一节 微生物纯培养

### 纯培养的保藏

#### 常用菌种保藏方法比较

保藏方法	采取措施	适宜微生物	有效保藏时间
斜面低温	低温4℃	各类微生物	1~6个月
液体石蜡	缺氧	各类微生物（除石油微生物）	1年以上
砂土管	干燥、无营养	产孢子或芽孢微生物	1~10年
甘油悬液	-80℃ 保护剂（甘油）	各类微生物	~10年
冷冻干燥	低温、干燥、无氧、 保护剂（脱脂奶）	各类微生物	10年以上

## 第二节 微生物培养群体生长规律

### 微生物群体的测量

- **微生物生长**：细胞从环境中吸取营养物质，经代谢作用合成新的细胞成分，细胞各组分有规律地增长，导致**细胞体积增大和重量增加**。
- **微生物繁殖**：产生新一代的过程，导致**细胞数目增多**。
- 生长是量变的过程，是繁殖的基础；而繁殖是个质变的过程，是生长的结果。

从**群体水平**上衡量  
(间接的测定方法)

微生物生长量指标 {

- 细胞群体数量
- 细胞群体总重量

## 第二节 微生物培养群体生长规律

### 微生物群体的测量



## 第二节 微生物培养群体生长规律

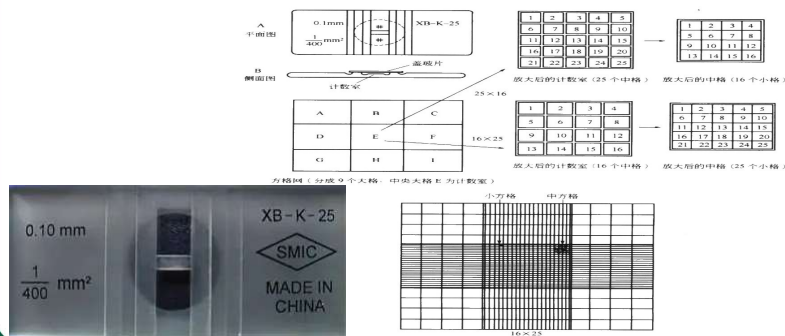
### 微生物群体的测量

#### (一) 微生物数量的测定

##### 1、显微镜直接计数法

使用细菌计数板或血球计数板在显微镜下直接计数。

优点：操作简便，计数直观。

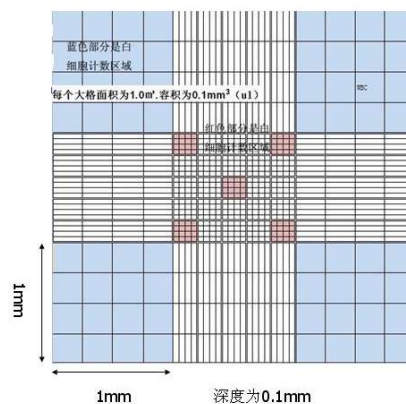


## 第二节 微生物培养群体生长规律

### 微生物群体的测量

#### (一) 微生物数量的测定

##### 1、显微镜直接计数法



缺点：

不能区分死菌与活菌；

不适于对运动细菌的计数；

需要相对高的细菌浓度(>10<sup>6</sup>)；

个体小的细菌在显微镜下难以观察；

细胞数(个/mL) = 每一大格的中细胞数量 × 10 × 10<sup>3</sup> × 稀释倍数

## 第二节 微生物培养群体生长规律

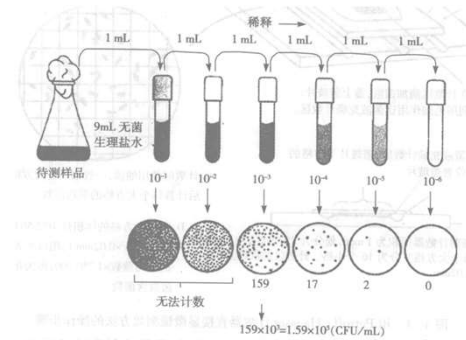
### 微生物群体的测量

#### (一) 微生物数量的测定

##### 2、稀释平板计数法

对样品稀释培养，据形成的菌落数计数。

**优点：**传统计数方法。对设备要求不高。



## 第二节 微生物培养群体生长规律

### 微生物群体的测量

#### (二) 微生物重量的测定

##### 1、称重法

离心或过滤将菌体从培养基中分离、洗净，称湿重或干重。

■ **优点：**简单可靠

##### 2、含氮量测定法

根据样品中菌体蛋白质含量计算微生物重量的方法。

**原理：**（1）微生物细胞蛋白质含量稳定。

（2）氮是蛋白质中稳定的主要成分。

（蛋白质质量 =  $6.25 \times$  总含N量）■

**优点：**测定准确

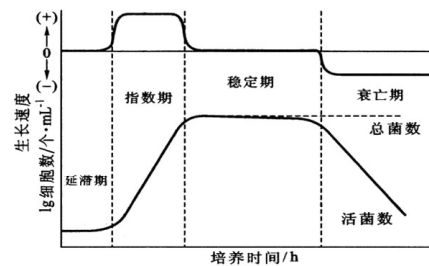


## 第二节 微生物培养群体生长规律

### 微生物分批培养

**分批培养：**将少量的细菌接种到一定体积的液体培养基中，在适宜的条件下培养，最后一次性收获的过程。

**生长曲线：**细菌在新的适宜的环境中生长、繁殖、衰老、死亡的动态变化。



微生物的典型生长曲线

## 第二节 微生物培养群体生长规律

### 微生物分批培养

**延滞期、滞留适应期**（延迟期、迟滞期、调整期）

**特点：**分裂迟缓、代谢活跃。

**产生原因：**

- 1、接种时的机械损伤
- 2、细胞分裂必需因子的缺乏

**影响滞留适应期长短的因素**

- 1、培养基成分
- 2、接种物菌龄
- 3、接种量 ■
- 4、菌株的遗传性

## 第二节 微生物培养群体生长规律

### 微生物分批培养

**对数生长期**（指数生长期）**细胞数目表示公式：**

**特点：**

- (1) 代谢活性强
- (2) 世代时短而稳定
- (3) 细胞数量成倍增长

$$N_t = 2^n N_0$$

$$n = 3.33(\lg N_t - \lg N_0)$$

$$G = t/n = 0.301t/(\lg N_t - \lg N_0) \blacksquare$$

n——繁殖代数

G——世代时(每繁殖一代所需的时间)

$N_0$ ——对数生长期开始微生物数量

$N_t$ ——对数生长期经过时间t后微生物数量



研究微生物基本代谢的良好**材料**；  
常在生产上用作**种子**，可使微生物发酵的迟滞期缩短，提高经济效益。

## 第二节 微生物培养群体生长规律

### 微生物分批培养

#### **稳定期、最高生长量期**

**特点：**细菌数量增加率为0  
部分细菌大量**积累代谢产物**

**稳定期到来的原因：**

营养物(生长限制因子)的耗尽；

营养物的比例失调；

酸、醇、毒素等有害代谢产物的累积；

pH等物化条件越来越不适宜。

#### **衰亡期**

**特点：**菌体大量死亡  
细菌的代谢活性降低，出现细胞自溶现象  
形态发生畸变  
革兰氏染色反应不稳定 ■

## 第二节 微生物培养群体生长规律

### 微生物分批培养

#### 小 结

什么时期细菌细胞生长速度最快 ■	对数生长期
什么时期世代时间短而稳定	对数生长期
什么时期细菌细胞代谢活性最强	对数生长期
什么时候细菌细胞总数最多	稳定期
什么时期菌体代谢产物最多	稳定期

## 第二节 微生物培养群体生长规律

### 微生物连续培养

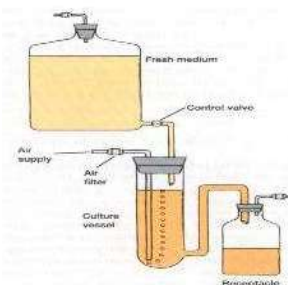
在培养进入对数生长期，以一定流速输入新鲜培养液，同时以相同速度流出培养物，确保流出的老菌数等于新增殖数，使培养时间稳定在对数生长期。

**优点：**可随时为微生物研究提供一定生理状态的实验材料  
提高生产效益和自动化水平

**缺点：**菌种易退化；易污染杂菌；  
营养物质的利用率低

**方式：**

恒化培养 控制培养液的添补速度  
恒浊培养 控制培养基浊度



## 第二节 微生物培养群体生长规律

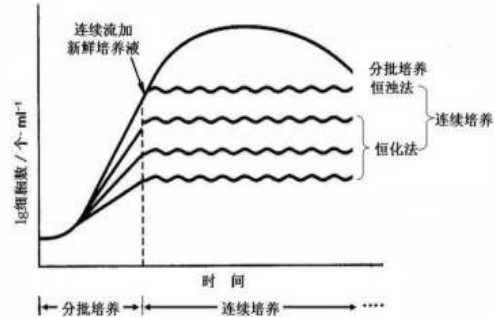
### 微生物连续培养

#### 分批培养与连续培养特征的比较

**不同点：**分批培养：经历四个时期

连续培养：理论上可以一直处于对数生长期

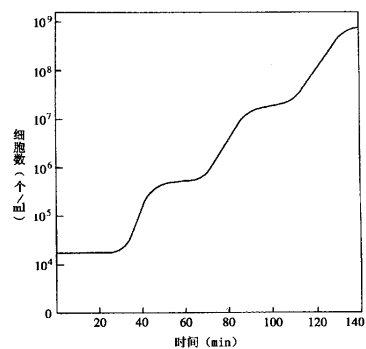
**相同点：**群体培养特征不能反映各个体的生长状况



## 第二节 微生物培养群体生长规律

### 微生物同步培养

通过条件控制使培养物群体中不同步的细胞转变成能够同时生长或分裂的细胞，这种处于相同的生长阶段并保持同时分裂的生长方式，称之为同步生长。



同步培养生长曲线



## 第二节 微生物培养群体生长规律

### 微生物同步培养

#### 获得同步培养的方法

##### 1、环境条件控制：

通过控制温度、培养基成分等条件来诱导细菌同步生长。

##### 2、机械法：

细胞体积和质量不同——密度梯度离心法  
细胞大小——过滤分离法

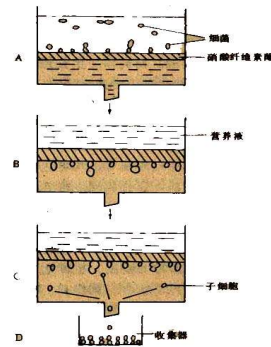


图 6-10 硝酸纤维素薄膜法

硝酸纤维素薄膜法

## 第三节 微生物的生活环境

生长是微生物与周围环境因素共同作用的结果。

环境条件一定范围的变化，影响

- 形态
- 生理
- 生长
- 繁殖

影响微生物生长的主要环境因子

- 温度
- 氧气/氧化还原电位
- 水分
- 辐射
- 化学药物
- pH

### 第三节 微生物的生活环境

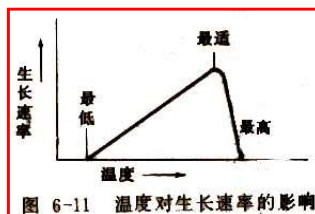
#### 温度

微生物的三种基本温度

最低生长温度  
最高生长温度  
最适生长温度 ■

微生物的生长温度类型

低温型（嗜冷型）  
中温型  
高温型（嗜热型）



微生物类型	最低温度 (°C)		最适温度 (°C)			最高温度 (°C)	
	一般	极限	一般	室温菌	体温菌	一般	极限
嗜热型	30	-	45~58	-	-	60~95	105~150
嗜温型	5	-	25~43	~25	~37	45~50	-
嗜冷型	-10~-5	-30	10~18	-	-	20~30	-

### 第三节 微生物的生活环境

#### 温度

温度对微生物生长的影响

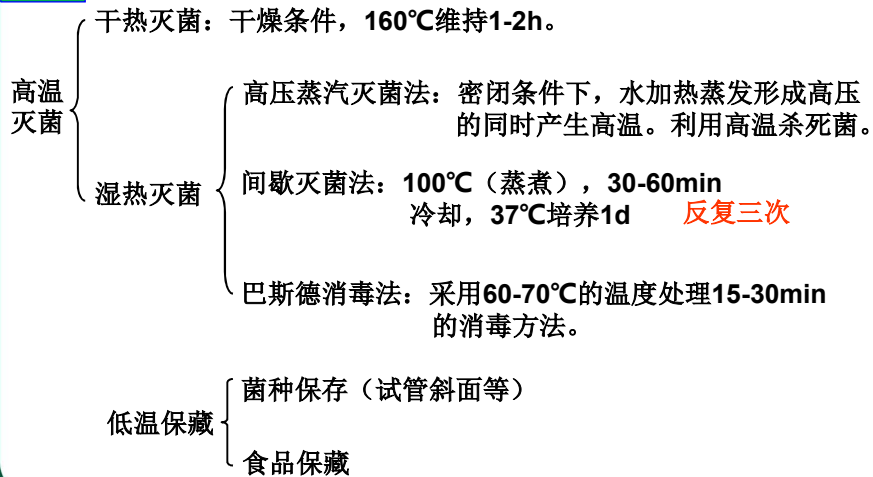
高温：使蛋白质变性、酶失活、核糖体解体  
致死时间、致死温度  
低温：酶活性下降、新陈代谢缓慢

各种细菌的芽孢在湿热中的致死温度和致死时间

菌种	致死时间 (分)				
	100°C	105°C	110°C	115°C	121°C
炭疽芽孢杆菌	5-10	-	-	-	-
枯草芽孢杆菌	6-17	-	-	-	-
嗜热脂肪芽孢杆菌	-	-	-	-	12
肉毒梭状芽孢杆菌	330	100	32	10	4
破伤风梭状芽孢杆菌	5-15	5-10	-	-	-

### 第三节 微生物的生活环境

#### 温度



### 第三节 微生物的生活环境

#### 氧气和氧化还原电位

氧气与微生物的生长

需氧性微生物

厌氧性微生物

兼性微生物

氧化还原电位与微生物生长

好氧微生物： $+0.3\sim+0.4\text{V}$

厌氧微生物： $<+0.1\text{V}$

兼性厌氧微生物： $>+0.1\text{V}$  进行好氧呼吸、 $<+0.1\text{V}$  进行发酵

### 第三节 微生物的生活环境

#### 水分

##### 1、水分对微生物生长的影响：

细菌最适水活度值：0.93-0.99

酵母菌最适水活度值：0.88-0.91

霉菌最适水活度值：0.80

水的活度小于0.60-0.70时

多数微生物：休眠、部分出现细胞脱水、蛋白质变性 ■

##### 2、应用：干燥法保存物品

食品的冷冻干燥

### 第三节 微生物的生活环境

#### pH

不同微生物对pH值的要求不尽相同

##### pH对微生物的作用机制

1、影响细胞膜的电荷

2、影响酶的活性（蛋白质变性）

3、改变环境中养料的有效性 一些微生物生长的pH值范围

4、有害物质的毒性

微生物种类	最低pH	最适pH	最高pH
大肠杆菌	4.3	6.0—8.0	9.5
枯草芽孢杆菌	4.5	6.0—7.5	8.5
金黄色葡萄球菌	4.2	7.0—7.5	9.3
黑曲霉	1.5	5.0—6.0	9.0
一般放线菌	5.0	7.0—8.0	10
一般酵母菌	3.0	5.0—6.0	8.0



### 第三节 微生物的生活环境

#### 辐射

辐射：能量通过空间传递的一种物理现象。

##### 1、可见光：（400nm—800nm）

对微生物的作用：（1）能源

（2）刺激担子菌子实体形成

（3）光氧化作用：有氧条件下，光线被胞内色素吸收，使酶或其它敏感成分失活引起的微生物死亡。

##### 2、紫外线：（200nm—400nm）

杀菌波长范围：240—300nm

杀菌力最强范围：255—265nm

杀菌特点：穿透力弱，用作表面消毒或空气灭菌

### 第三节 微生物的生活环境

#### 辐射

##### 3、电离辐射

特点：波长短、能量大、穿透力强

作用机理：高能电离辐射（X射线、γ射线等）使细胞内水分发生电离作用产生游离基，使酶蛋白失活。

电离辐射对微生物的作用：

低剂量(500伦琴)：促进生长、诱发变异

高剂量（10万伦琴）：杀菌作用

实际应用：

粮食、果蔬、畜禽产品、饮料以及卫生材料杀菌处理

### 第三节 微生物的生活环境

#### 化学药物

控制或消灭有害微生物的化学制剂。

**杀菌剂**：杀死一切微生物的化学物质；

**消毒剂**：杀死或消除病原微生物的化学物质；

**抑制剂**：抑制微生物的生长的化学物质。

### 第三节 微生物的生活环境

#### 化学药物

##### 1、有机化合物（醇、醛、酚等）

杀菌机理：损伤细胞壁和膜

抑制或破坏某些酶系统(脱氢酶、氧化酶等)

蛋白质变性

70%~75%酒精；福尔马林（35%~40%甲醛水溶液）等

##### 2、表面活性剂（新洁尔灭、消毒宁等）

具有降低表面张力的效应。

杀菌机理：与**膜蛋白**发生相互作用，改变**细胞膜**的稳定性和通透性，导致细胞内的物质溢出。

### 第三节 微生物的生活环境

#### 化学药物

##### 3、卤素 (Cl、I 等)

漂白粉[Ca(OCl)<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、Ca(OH)<sub>2</sub>]及氯气 (Cl<sub>2</sub>、HOCl、OCl<sup>-</sup>、Cl<sup>-</sup>、H<sup>+</sup>): 强氧化剂, 能破坏细胞膜的结构; 与酶蛋白中-NH<sub>2</sub>、-SH反应使蛋白质变性。

碘 (I): 与酶蛋白分子中的酪氨酸结合, 使蛋白质变性。

##### 4、重金属盐类

杀菌机理: 与带负电荷的菌体蛋白质结合, 导致蛋白质变性。

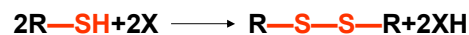
(0.2%Hg盐, 与细菌酶蛋白的巯基结合)

### 第三节 微生物的生活环境

#### 化学药物

##### 5、强氧化剂 (高锰酸钾、过氧化氢、过氧乙酸等)

杀菌机理: 能使菌体酶蛋白质中的巯基氧化成二硫基, 使酶失活



##### 6、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。 (选择性的杀菌或抑菌)

杀菌机理:

抑制叶酸合成

如: 磺胺类药物等。

抑制肽聚糖合成

如: 青霉素, 万古霉素等。

抑制蛋白质合成

如: 链霉素, 红霉素、四环素、氯霉素等

### 第三节 微生物的生活环境

化学药物	类别	实例	常用浓度	应用范围
一些常用的表面消毒剂	醇	乙醇	70-75%	皮肤
	酸	食醋	3-5 mL/m <sup>3</sup>	熏蒸空气
	碱	石灰水	1-3%	粪便
	酚	石炭酸	5%	空气(喷雾)
	醛	福尔马林(原液)	6-10 mL/m <sup>3</sup>	接种箱、厂房熏蒸
	重金属盐	升汞	0.1%	植物组织等外表面
		AgNO <sub>3</sub>	0.1-1%	新生儿眼药水等
		红溴汞	2%	皮肤小创伤
	氧化剂	KMnO <sub>4</sub>	0.1-3%	皮肤、水果、茶杯
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3%	清洗伤口
		氯气	0.2-1 μg/L	自来水
	表面活性剂	新洁尔灭	0.25%	皮肤
	染料	龙胆紫(紫药水)	2-4%	外用药水