

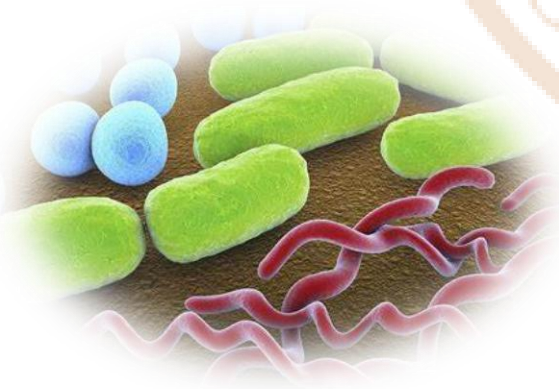


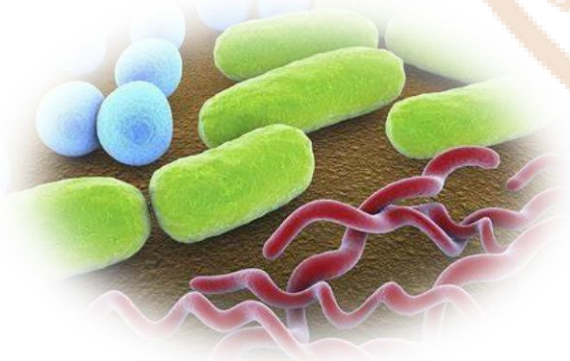
Chapter V

Nutrition of Microbe

张梦杰 生命学院

98061@tongji.edu.cn





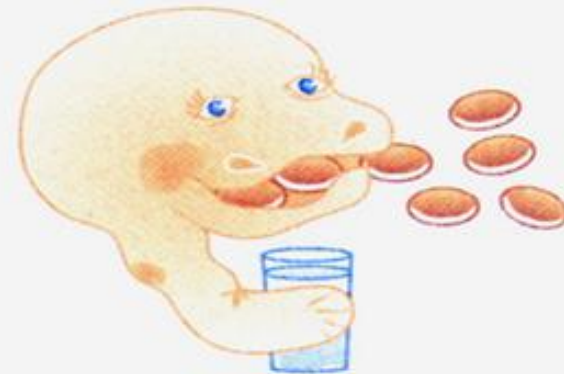
How Microbes Take In Molecules



Passive Transport



Active Transport

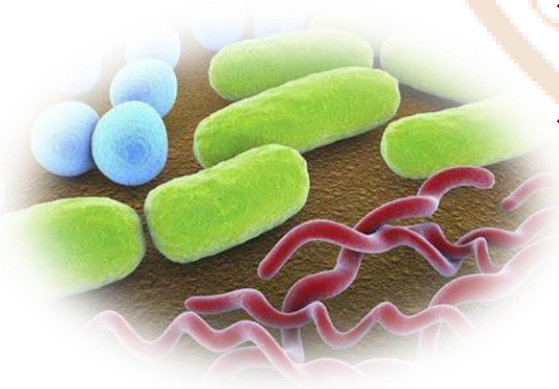


Bulk Transport

- ❖ **Carbon sources:** 提供C的营养源，分有机和无机
- ❖ **Nitrogen sources:** 提供N的营养源，分有机和无机
- ❖ **Energy sources:** (for most microorganisms) equal to carbon sources
- ❖ **Growth factors:** (necessary for fastidious microorganisms 需复杂营养微生物)
缺乏合成生长因子能力的微生物称为“营养缺陷型”

- ❖ **Inorganic salts:** K, Na, Cl, P, S, Ca, etc.

- ❖ **Water**



nutritional types

based on the carbon source

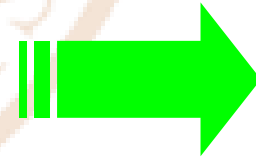
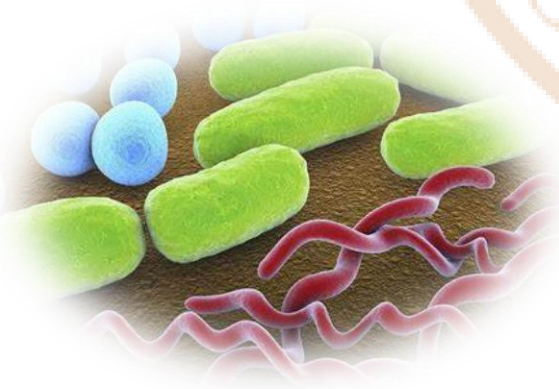
Autotrophs (自养型)

Heterotroph (异养型)

based on the energy source

Phototroph (光能)

Chemotroph (化能)



Photolithoautotrophy (光能无机自养):

light energy, CO₂ carbon source, inorganic H/e- donor

Photoorganoheterotrophy (光能有机异养):

light energy, organic H/e- donor, organic carbon source

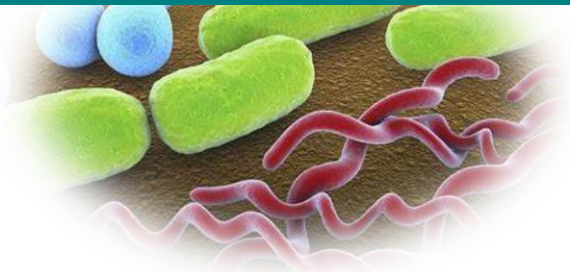
chemolithoautotrophy (化能无机自养):

chemical energy, CO₂ carbon source, inorganic H/e- donor

chemoorganoheterotrophy (化能有机异养):

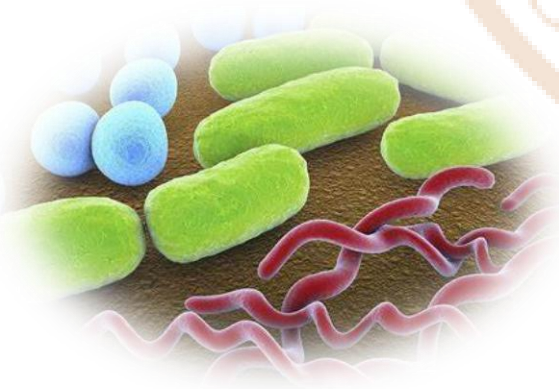
chemical energy, organic H/e- donor, organic carbon source

营养类型	电子供体	碳源	能源	举例
光能无机自养型 (光能自养型)	H_2 、 H_2S 、S或 H_2O	CO_2	光能	着色细菌、蓝细菌、藻类
光能有机异养型 (光能异养型)	有机物	有机物	光能	红螺细菌
化能无机自养型 (化能自养型)	H_2 、 H_2S 、 Fe^{2+} 、 NH_3 或 NO_2^-	CO_2	化学能 (无机物氧化)	氢细菌、硫杆菌、亚硝化单胞菌属(Nitrosomonas)、甲烷杆菌属(Methanobacterium)、醋杆菌属(Acetobacter)
化能有机异养型 (化能异养型)	有机物	有机物	化学能 (有机物氧化)	假单胞菌属、芽孢杆菌属、乳酸菌属、真菌、原生动物



culture medium (培养基)

- **provides nutrition to microorganisms**
- **grow, transport and store microorganisms**
- **select or to help identify a particular species**



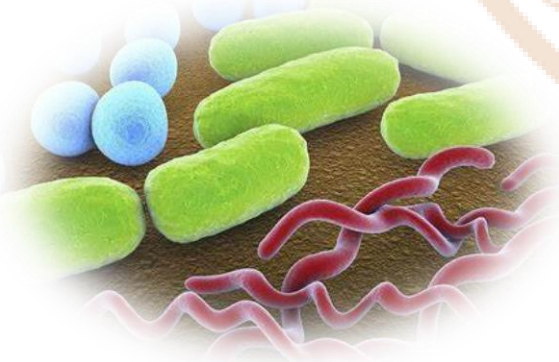
培养基配制原则

- **(1) appropriate nutrition**

Different microorganism require different nutrition.

- **(2) the concentration and ratio of nutrition**

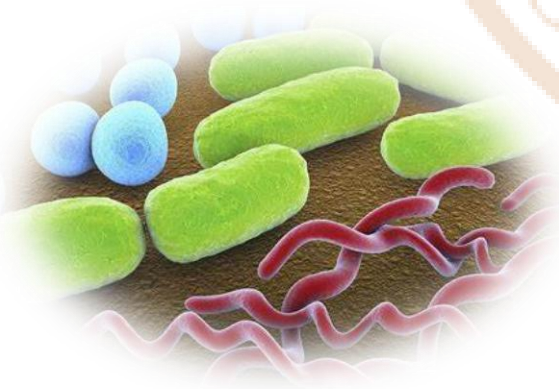
C: N 影响大, 如: $C:N = 4:1$ 菌体大量生长; $3:1$ 时
Glu 大量积累。



(3) pH

- **Bacteria, actinomycete:** pH7~7.5
- **Mold and yeast:** pH4.5~6
- **buffer should be added during the growth of microorganism**

Phosphate buffer 磷酸盐缓冲剂 (pH6.4~7.2) ; carbonate.



(4) redox potential (Φ) (氧化还原电位)

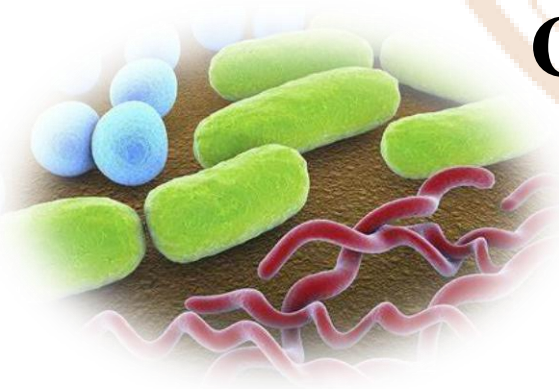
好氧: $\Phi > +0.1V$, $0.3 \sim 0.4V$

厌氧: $< 0.1V$

兼性: $0.1V$ 以上好氧呼吸, 低于 $0.1V$ 发酵

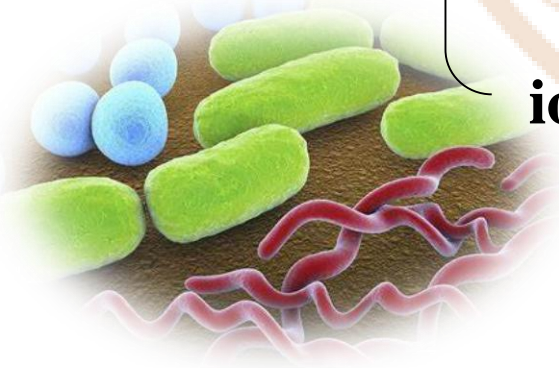
(5) the source of materials

Cheap, easily available, etc.



(6) sterilization (灭菌)

- **Sterilization (灭菌)** are used to kill or to remove all living microorganisms from a specified area.
- **Major sterilization method:**
 - filtration (过滤)
 - high temperature
 - incineration (焚烧)
 - dry heat
 - autoclave sterilization(高压蒸汽)
 - toxic chemical: 甲醛、环氧乙烷
 - ionizing radiation (电离辐射)



2. Types of media:

(1) Divided by composition

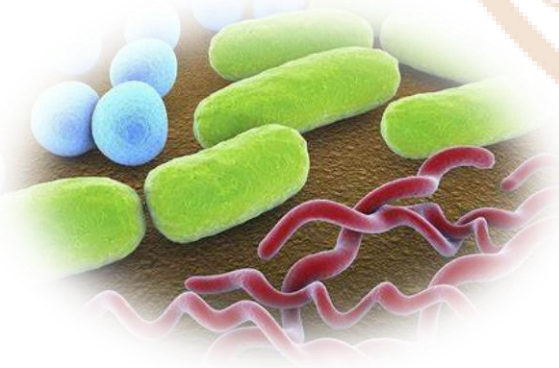
- **complex medium, undefined medium** (天然培养基)

Media that contain some ingredients of unknown chemical composition.

- **synthetic medium, defined medium** (合成培养基)

All components are known is a defined medium.

营养需要、代谢、分类、菌种选育、遗传分析等



细菌培养基——营养肉汤 (nutrient broth):

牛肉膏 3g; 蛋白胨 5g; 水 1000ml; pH 7.2~7.4

放线菌培养基——高氏1号:

可溶性淀粉 20g; KNO_3 1g; K_2HPO_4 1g; NaCl 1g;

MgSO_4 0.5g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g; 水 1000ml; pH

7.2~7.4

霉菌培养基——查氏 (zapek)培养基:

蔗糖 30g; KCl 0.5g; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5g; K_2HPO_4 1g;

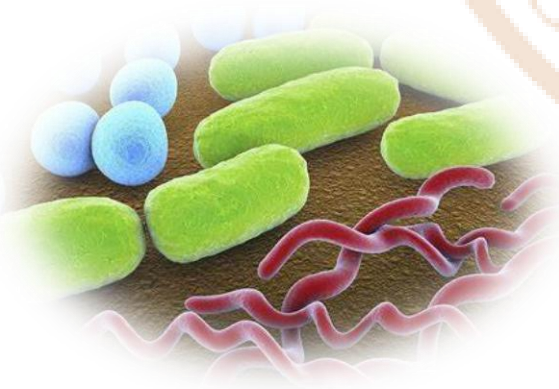
FeSO_4 0.5g; NaNO_3 3g; 水 1000ml; pH 6.7



(2) Divided by physical condition

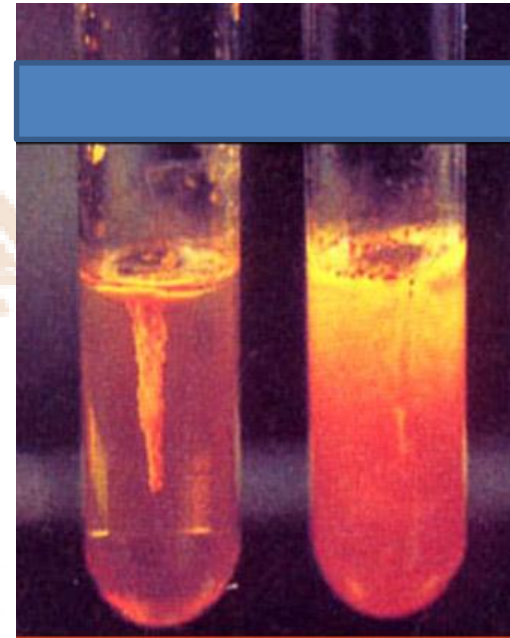
a. solid medium (固体培养基)

- agar: **1.5-2.5%**
- isolation of pure cultures, identifying species, counting or preservation



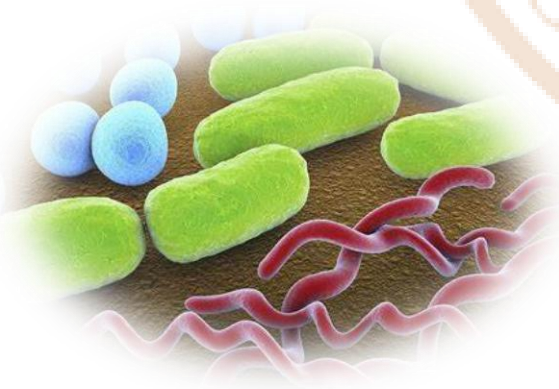
b. semisolid medium (半固体培养基)

- 0.2~0.7% (0.5%) agar
- Identifying species, mobile



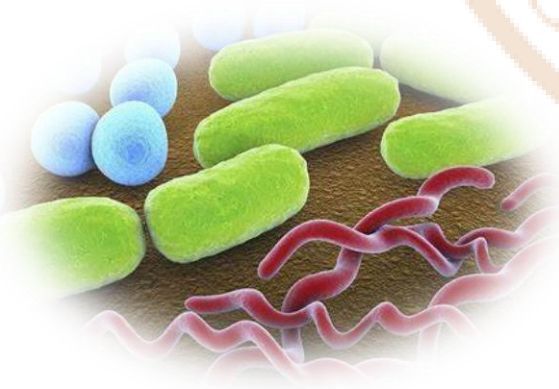
c. liquid medium (液体培养基)

For : industrial fermentation

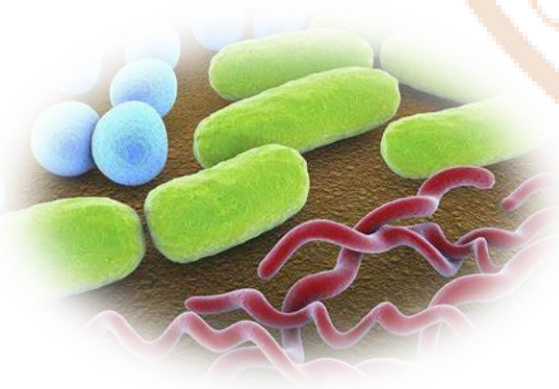


(3) Divided by specific usage

- **minimal media** (基础培养基)
- **enriched media** (加富培养基)
- **selective medium** (选择培养基)
- **differential media** (鉴别培养基)

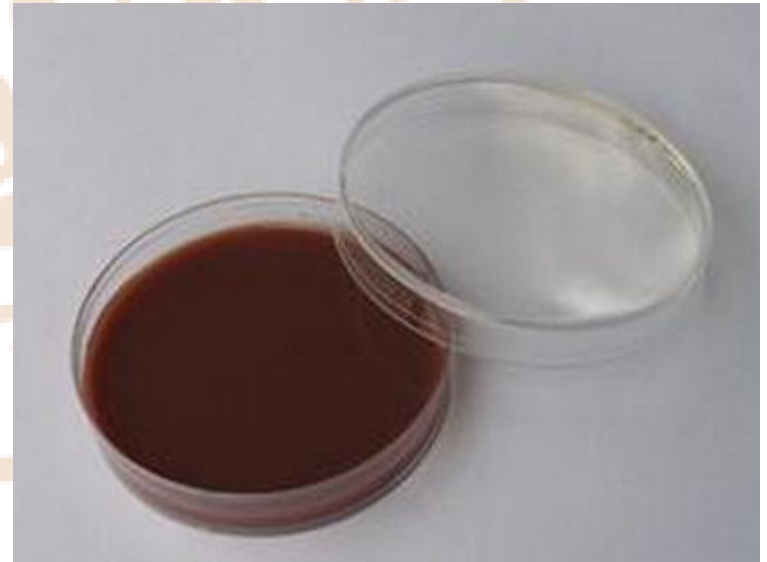


- **minimal media (基础培养基):**
contain the minimum nutrients possible for colony growth, generally without the presence of amino acids, and are often used to grow “wild type” microorganisms.



- **enriched media (加富培养基):**

contain the nutrients required to support the growth of a wide variety of organisms, including fastidious ones.



- **selective medium** (选择培养基) :

Favor the growth of particular microorganisms

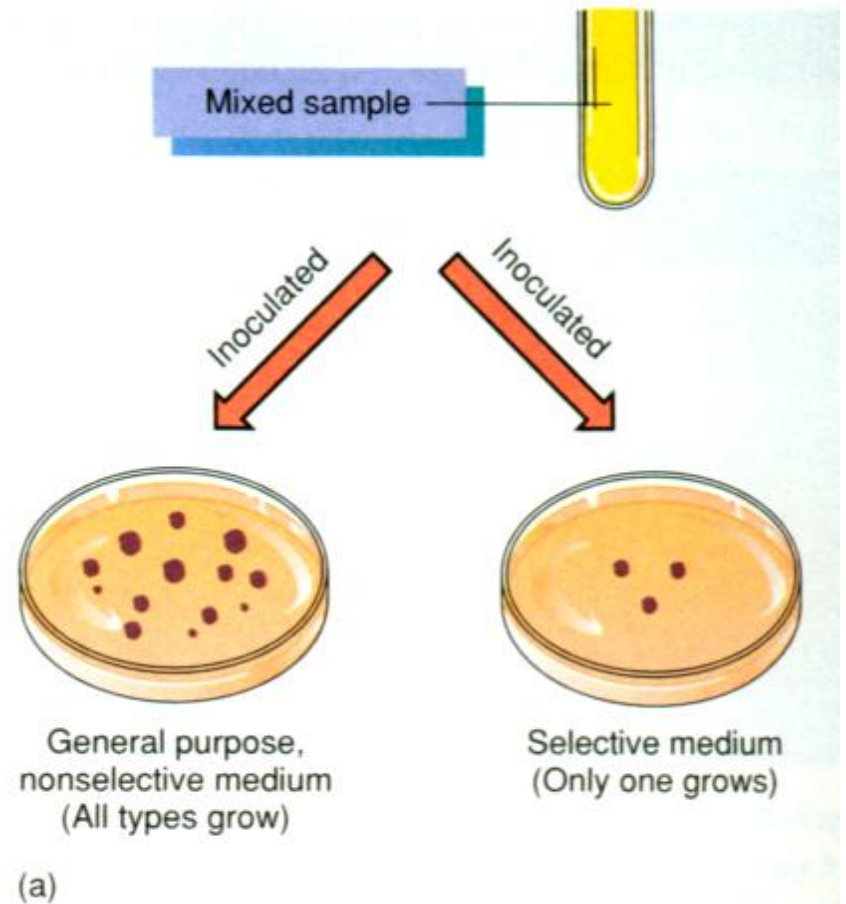
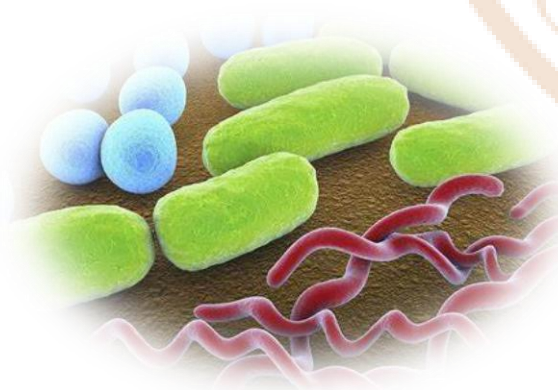


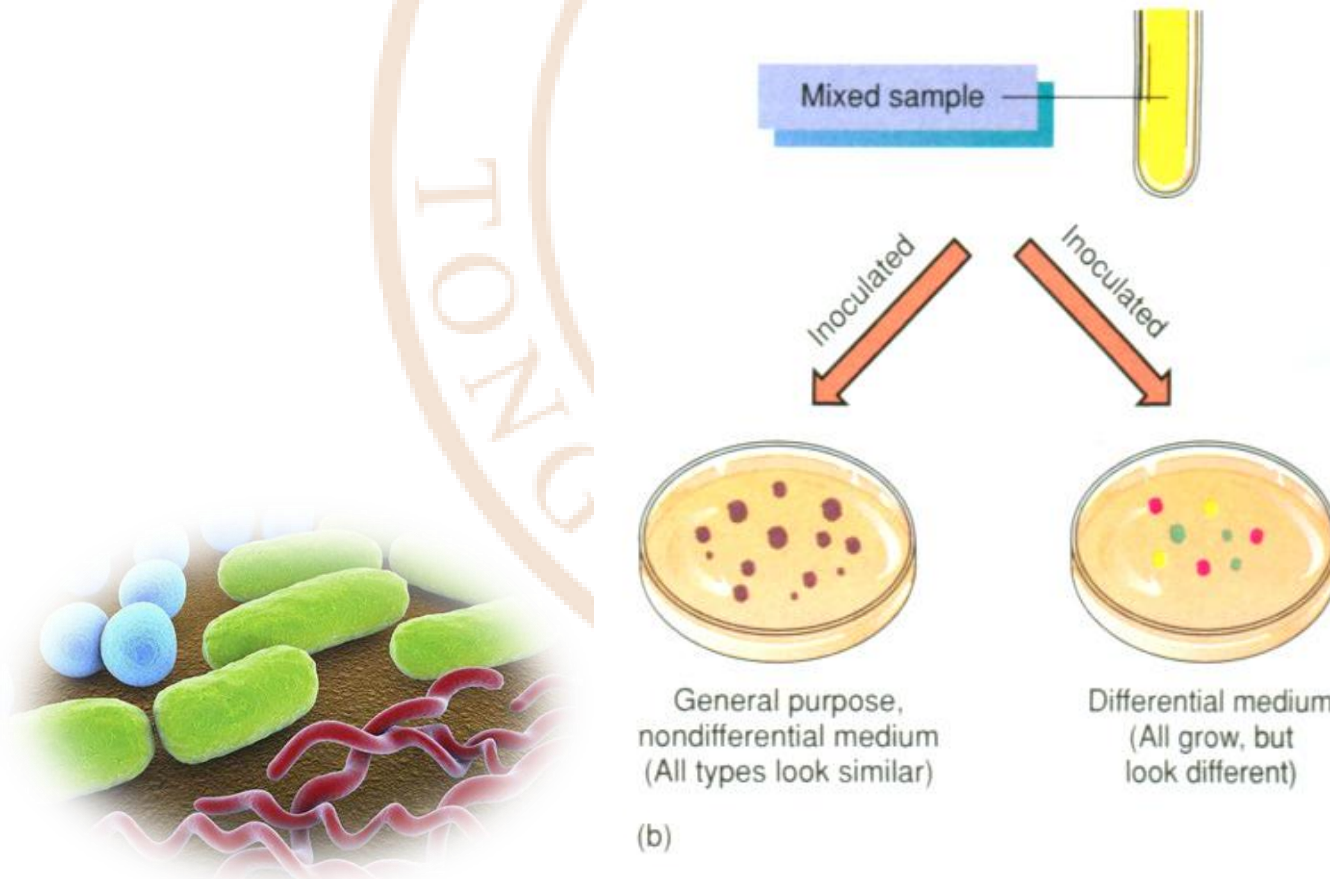
表 5-19 用于选择性培养基的若干抑制剂

选择对象	抑制剂及其用量 ($\mu\text{g/ml}$)	抑 制 对 象
一般细菌	四环素 (200)	黑曲霉, 酵母
	四环素 (100)	酱油曲霉, 根霉
	放线菌酮 (20)	酵母
	放线菌酮 (50)	酱油曲霉
	放线菌酮 (100)	根霉
	放线菌酮 (200)	黑根霉
	真菌素 (Cubicidin) (100)	酱油曲霉, 酵母
G ⁺ 细菌	多粘菌素 B (5)	G ⁻ 细菌
G ⁻ 细菌	青霉素 (1)	G ⁺ 细菌
乳酸菌	山梨酸 (0.2%, pH6)	芽孢杆菌
	叠氮化钠 (Na_3N) (0.005%, pH7)	曲霉
	真菌素 (20)	酵母
肠道细菌	胆汁酸 (1.5~5mg/ml)	G ⁺ 细菌
微球菌	山梨酸 (0.2%)	芽孢杆菌

选择对象	抑制剂及其用量 (μg/ml)	抑 制 对 象
放线菌	放线菌酮 (50) 制霉菌素 (50) 丙酸钠 (4mg/ml)	霉菌 霉菌 霉菌
酵母	丙酸钠 (0.2%) 丙酸钠 (0.1~0.15%) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.05%, pH3.8) 四环素 (50) 氯霉素 (20) 链霉素 (20~100) 青霉素 (50) 金霉素 (100) 真菌素 (200)	曲霉, 根霉, 杆菌 青霉, 微球菌, 醋酸菌 乳酸菌, 乳链球菌 细菌 细菌 细菌 细菌 细菌 细菌
霉菌	氯霉素 (100) 青霉素 (20) 链霉素 (40) 青霉素 (100) 氯霉素 (50) + 放线菌酮 (10)	细菌 细菌 细菌 细菌 细菌, 酵母

- **Differential media (鉴别培养基)**

distinguish **one microorganism type** from another growing on **the same media**.



培养基名称	加入化学物质	微生物代谢产物	培养基特征性变化	主要用途
酪素培养基	酪素	胞外蛋白酶	蛋白水解圈	鉴别产蛋白酶菌株
明胶培养基	明胶	胞外蛋白酶	明胶液化	鉴别产蛋白酶菌株
油脂培养基	食用油、土温、 中性红指示剂	胞外脂肪酶	由淡红色变成深红色	鉴别产脂肪酶菌株
淀粉培养基	可溶性淀粉	胞外淀粉酶	淀粉水解圈	鉴别产淀粉酶菌株
H ₂ S试验培养基	醋酸铅	H ₂ S	产生黑色沉淀	鉴别产H ₂ S菌株
糖发酵培养基	溴甲酚紫	乳酸、醋酸、丙酸等	由紫色变成黄色	鉴别肠道细菌
远藤氏培养基	碱性复红、亚硫酸钠	酸、乙醛	带金属光泽深红色菌落	鉴别水中大肠菌群
伊红美蓝培养基	伊红、美蓝	酸	带金属光泽深紫色菌落	鉴别水中大肠菌群



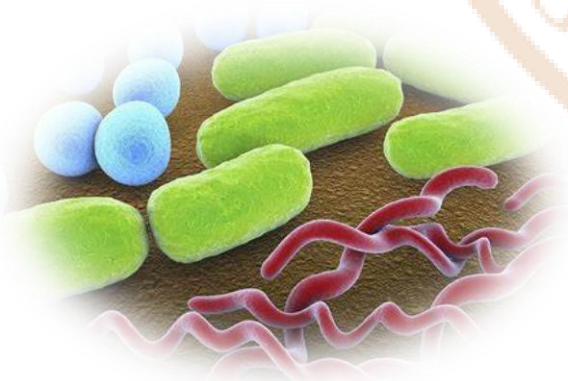
EMB (Eosin Methylene Blue) 培养基 (伊红美蓝培养基)——最常见的鉴别性培养基:

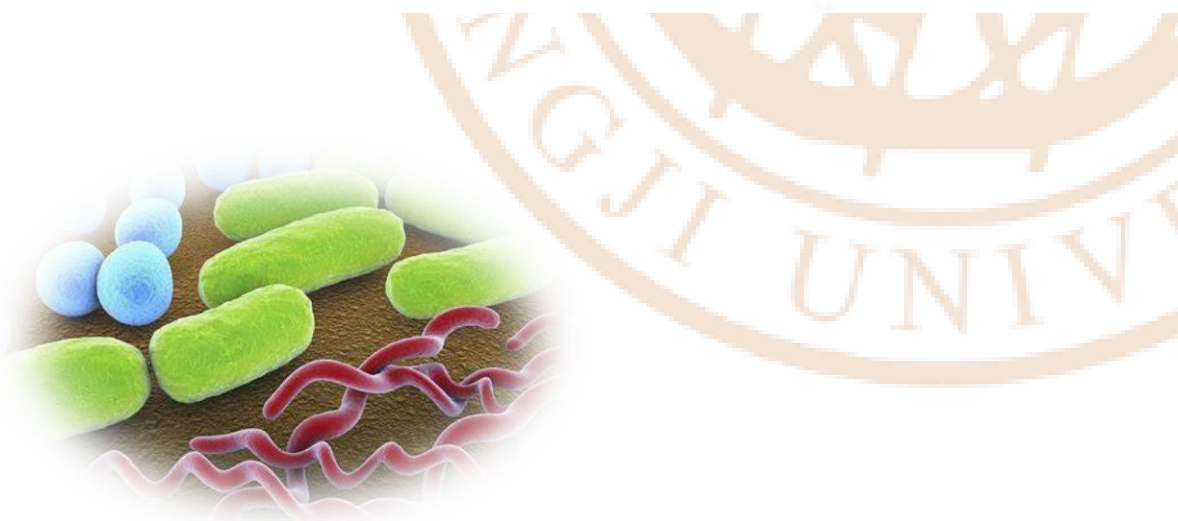
- (1) 培养基碳源和氮源 乳糖、蔗糖、蛋白胨。
- (2) 培养基中的指示剂 伊红、美蓝。

此两种染料可抑制G⁺细菌和一些难培养的G⁻细菌。在低酸度下，这两种染料会结合形成沉淀，起着产酸指示剂的作用。

(3) 用途

在饮用水、牛奶等饮料的大肠菌群 (coliforms) 数等细菌学检查和在E.coli的遗传学研究中有着重要的用途。





Escherichia coli 大肠埃希氏菌 ATCC 25922

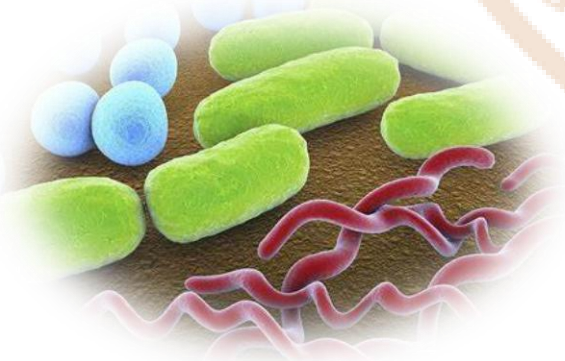
生化实验鉴定

生化试验：利用生物化学的方法测定微生物的代谢产物、代谢方式等鉴别菌种的试验。



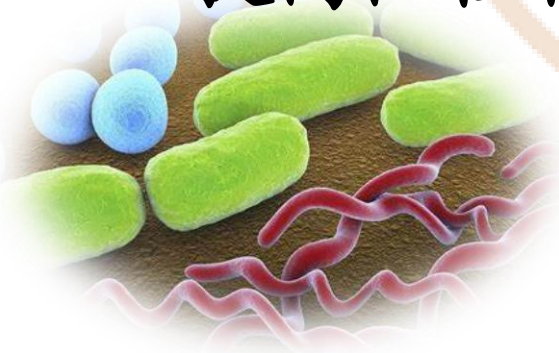
生化试验的方法

1. 培养物中加入某种**底物**与**指示剂**,经接种、培养后,观察培养基的pH值变化。
2. 培养物中加入**试剂**,观察它们**同细菌代谢产物**所生成的颜色反应。
3. 根据**酶**的反应特性,测定酶的存在。
4. 对**理化条件和药品**的敏感性。



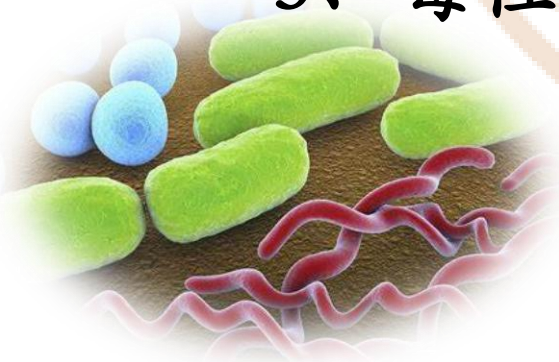
生化试验的注意事项

- 1、待检菌应是新鲜培养物，培养18~24h。
- 2、待检菌应是**纯种培养物**。
- 3、遵守观察反应的时间，一般24或48小时。
- 4、**对照试验**。
- 5、提高阳性检出率，挑取2~3疑似菌落试验。



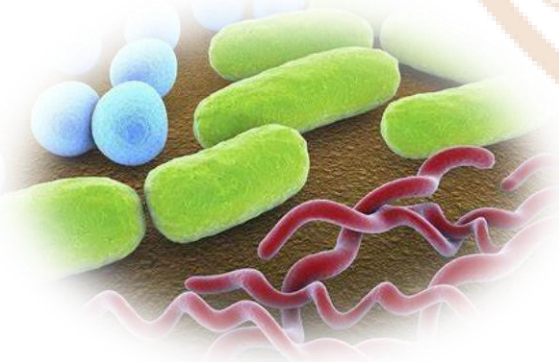
检验细菌的生化试验范围

- 1、糖（醇）类代谢试验
- 2、氨基酸和蛋白质代谢试验
- 3、有机酸盐和铵盐的利用试验
- 4、呼吸酶类试验
- 5、毒性酶类试验



糖醇类代谢试验

- (一) 糖醇类发酵试验
- (二) 葡萄糖氧化发酵 (O/F) 试验
- (三) 甲基红 (Methyl Red) 试验 MR
- (四) V-P试验
- (五) 七叶苷水解试验
- (六) 甘油品红试验



常用的糖醇

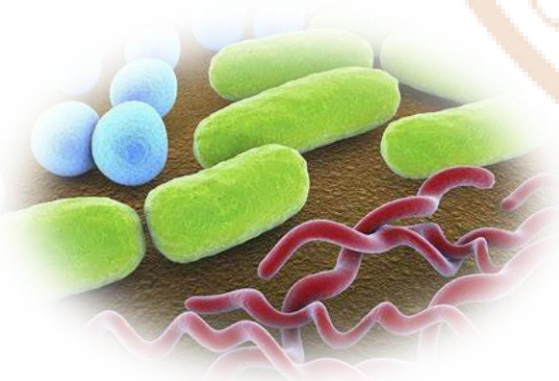
单糖：G、甘露糖醇、木糖、半乳糖、鼠李糖

双糖：乳糖、蔗糖、麦芽糖、蕁糖

三糖：棉子糖

多糖：菊糖、肝糖、淀粉

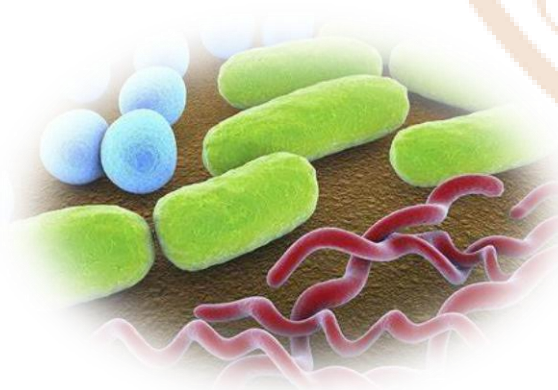
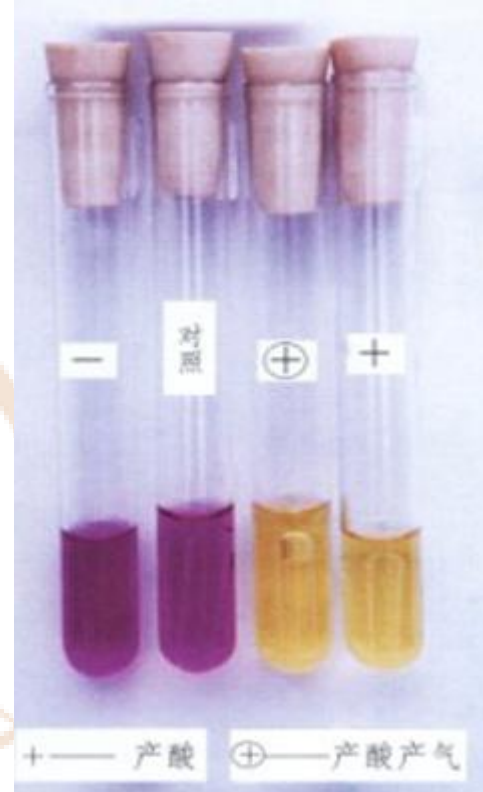
醇类：甘露醇、山梨醇、肌醇、卫茅醇



糖发酵实验

• 原理：

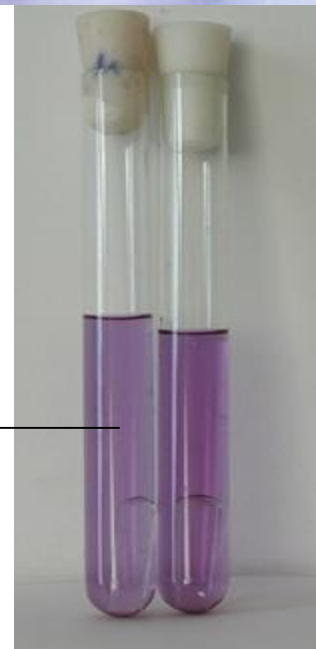
- 丙酮酸裂解生成乙酰CoA与甲酸，甲酸在酸性条件在甲酸氢解酶作用下裂解生成 H_2 和 CO_2 ——产酸产气
- 缺少甲酸氢解酶——产酸不产气



溴甲酚紫指示剂

杜氏小管

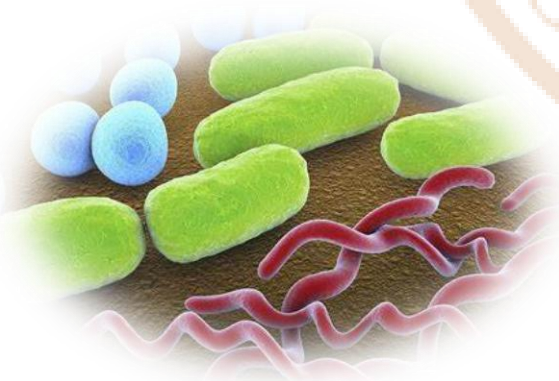
pH5.2(黄色)~6.8(紫色)



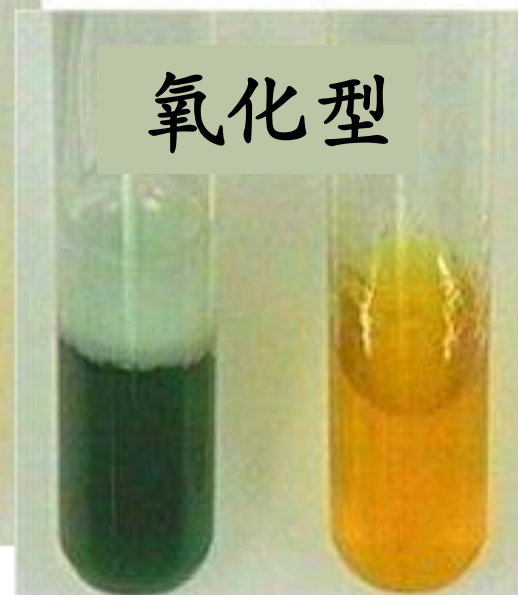
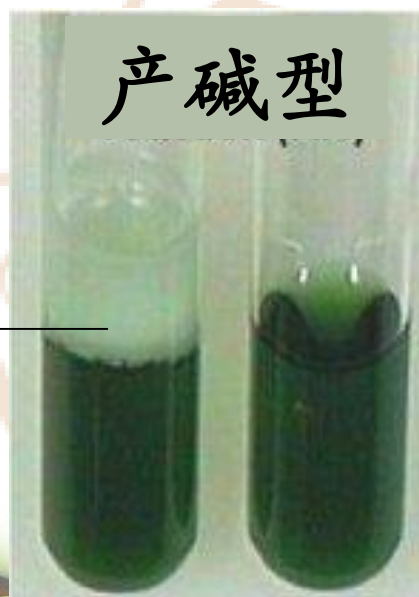
O/F试验

细菌对葡萄糖的分解，分氧化型和发酵型。

- 氧化型细菌有 O_2 分解G，无氧不分解；
- 发酵型细菌有氧无氧均能分解G
- 产碱型：不分解G。

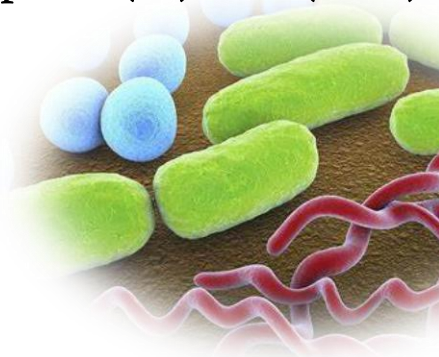


- 取待检菌，**穿刺**接种于**两管**葡萄糖**半固体**培养基上，其中一管加约1cm灭菌的**液体石蜡**以隔绝空气，37℃培养2~4天，每天观察结果。



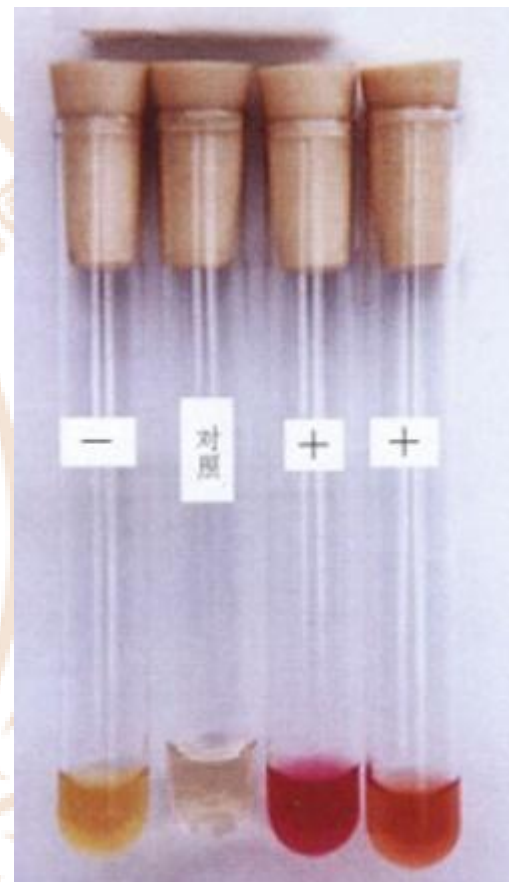
溴麝香草酚蓝

pH6.0(黄)~7.6(蓝绿)

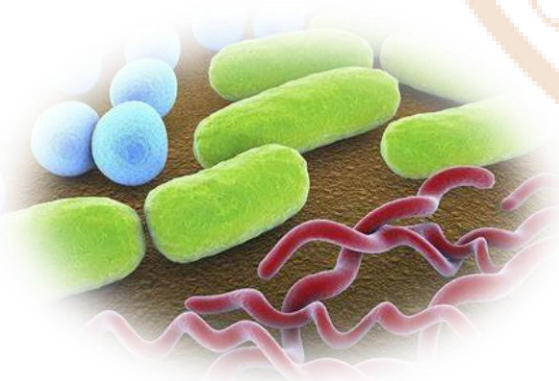


甲基红实验（M.R实验）

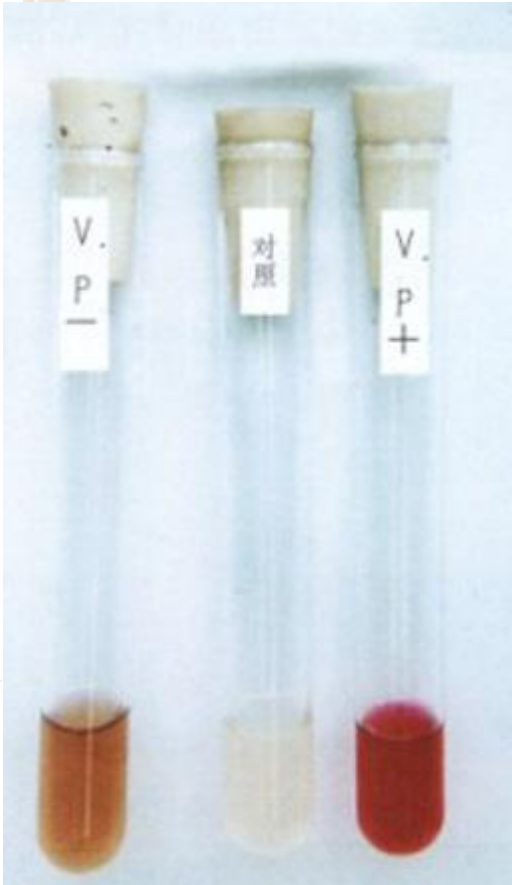
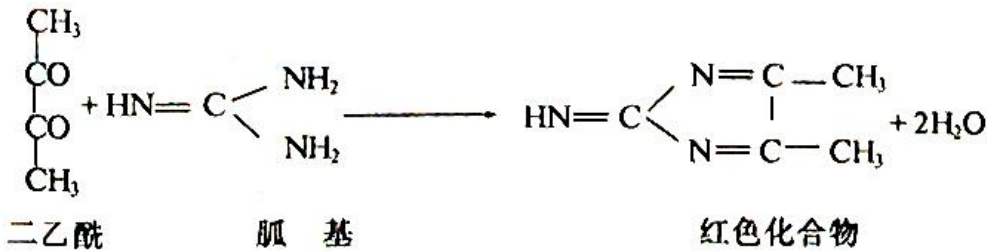
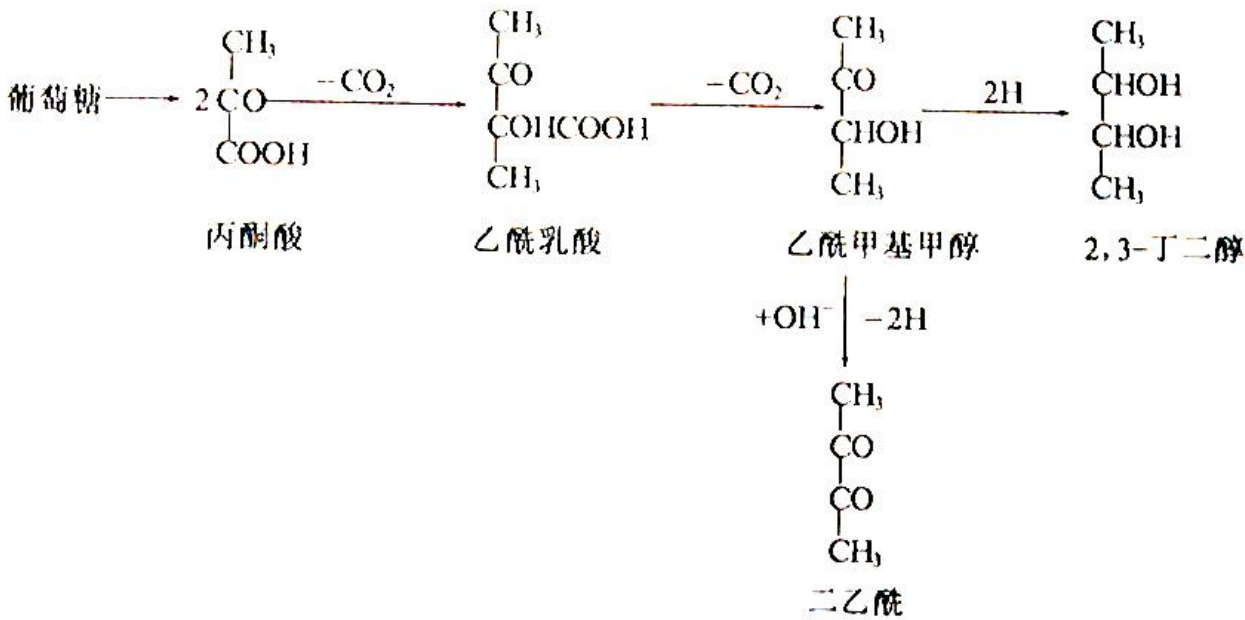
— 微生物混合酸发酵，产生各种有机酸pH下降—加入**甲基红**—红色



pH4.4（红）-6.2（黄）



V.P.实验（乙酰甲基甲醇）



氨基酸和蛋白质代谢试验

(一) 靛基质 (吲哚) 试验

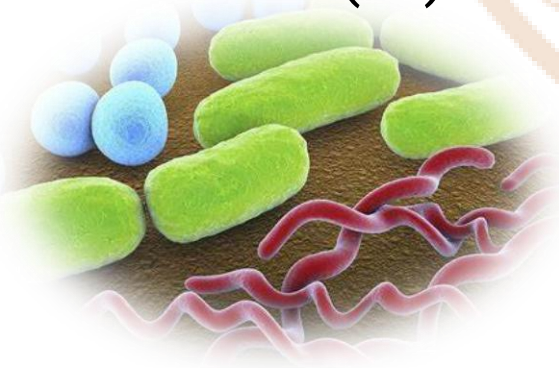
(二) H₂S试验

(三) 尿素酶试验

(四) 氨基酸脱羧酶试验

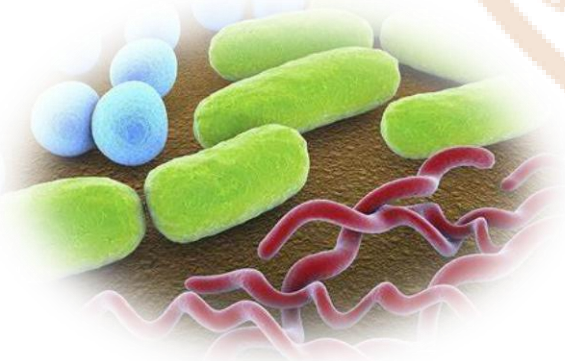
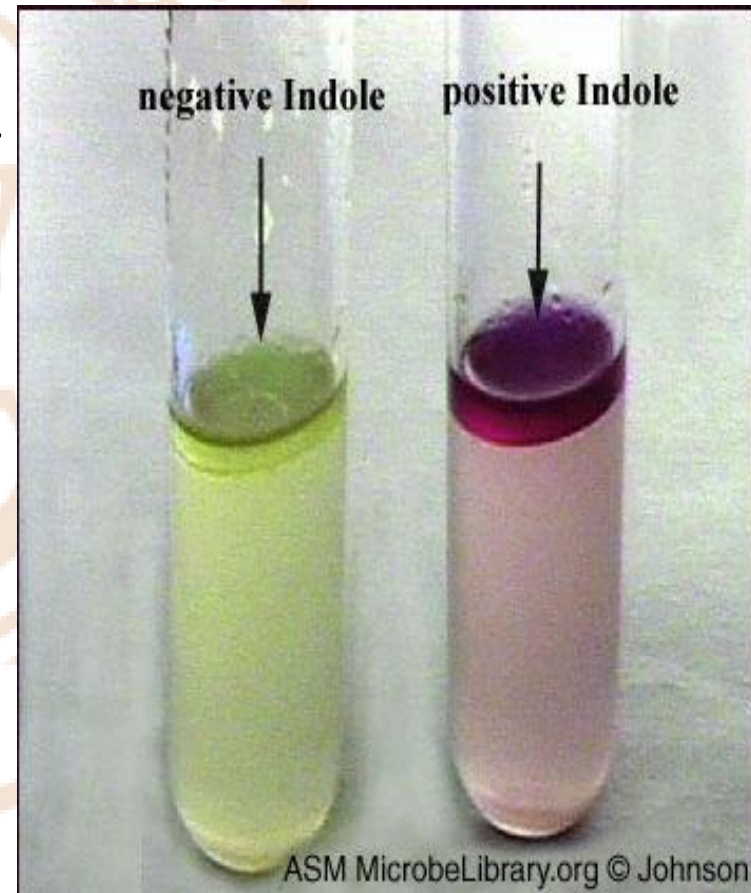
(五) 苯丙氨酸脱氨酶试验

(六) 明胶 (Gelatin) 液化试验



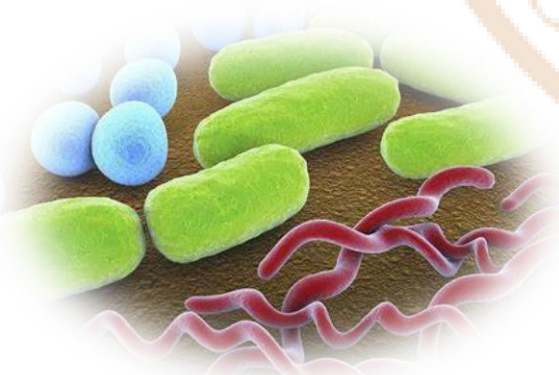
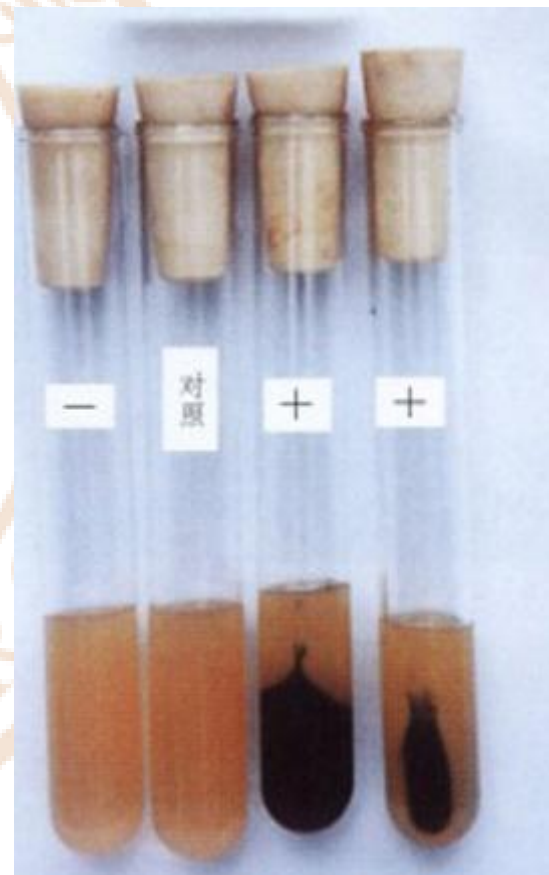
(一) 吲哚试验

- 细菌产**色氨酸酶**，分解Trp，生成靛基质（吲哚）。
- 吲哚与**对二甲氨基苯甲醛**结合，形成红色化合物，即玫瑰吲哚



(二) 硫化氢 (H_2S) 试验

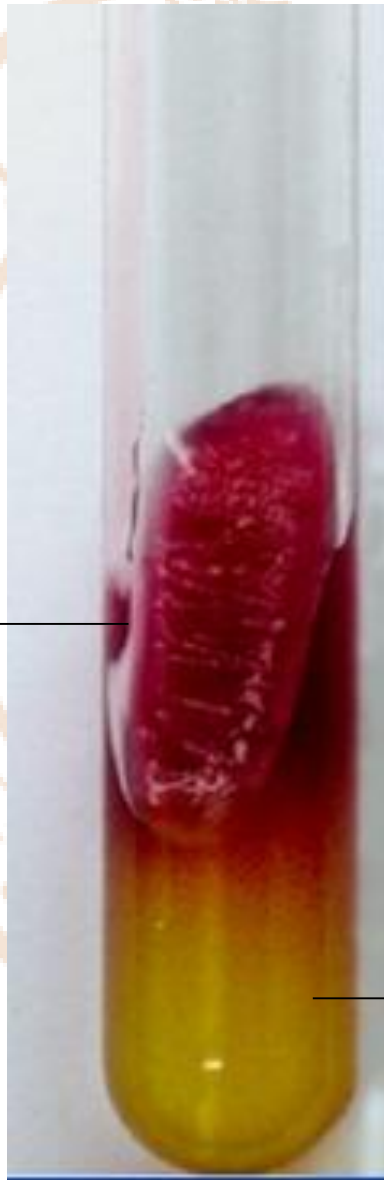
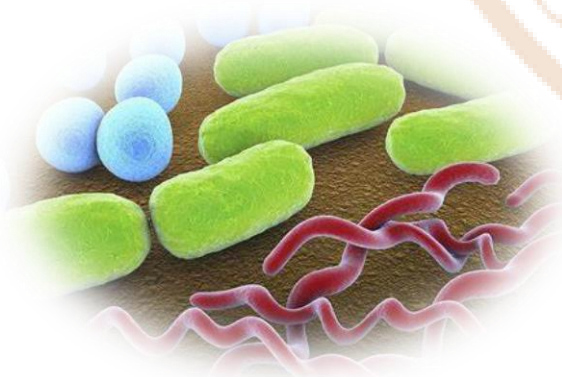
分解培养基的含硫aa或含硫化
合物，产生**硫化氢**，遇铅盐
或铁盐可生成 PbS 或 FeS



双糖铁试验

葡萄糖：乳糖=1:10

固体斜面
乳糖



指示剂：酚红

pH6.6-8.0 橙色

pH低于6.6 黄色

pH高于8.4 红色

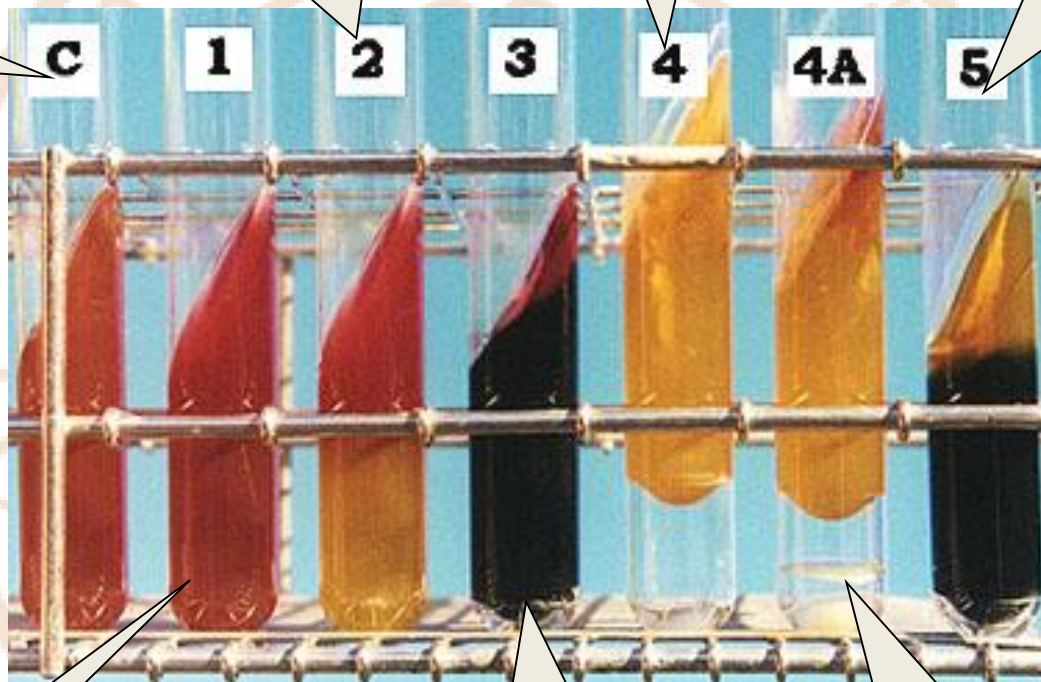
半固体，
葡萄糖， FeSO_4

制好的培养基

斜面红色，
底面黄色

培养基
全黄色

斜面、底部黄
色，产生沉淀



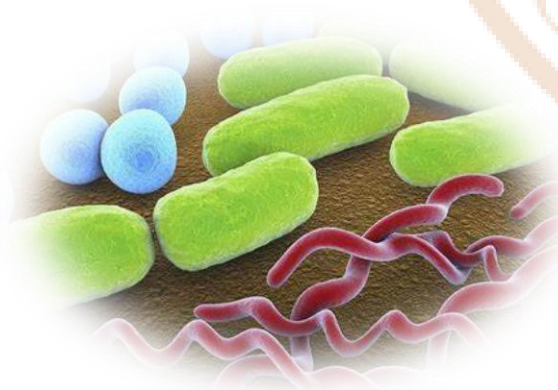
对照管

斜面红色，底部
黄色，黑色沉淀

底面黄色，产
生气体

有机酸盐和铵盐的利用试验

枸橼酸盐利用(citrate utilization)试验



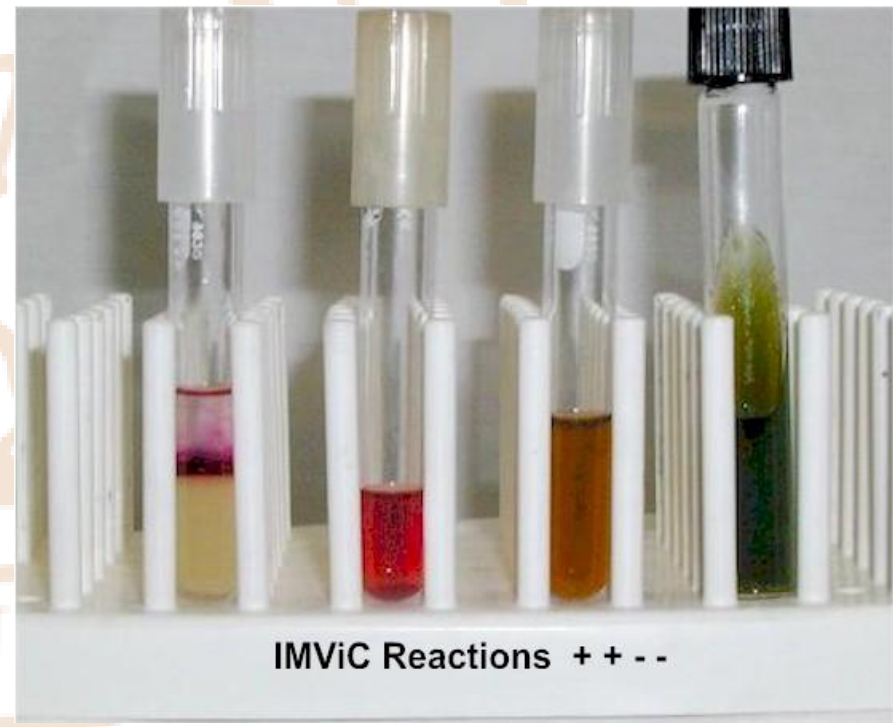
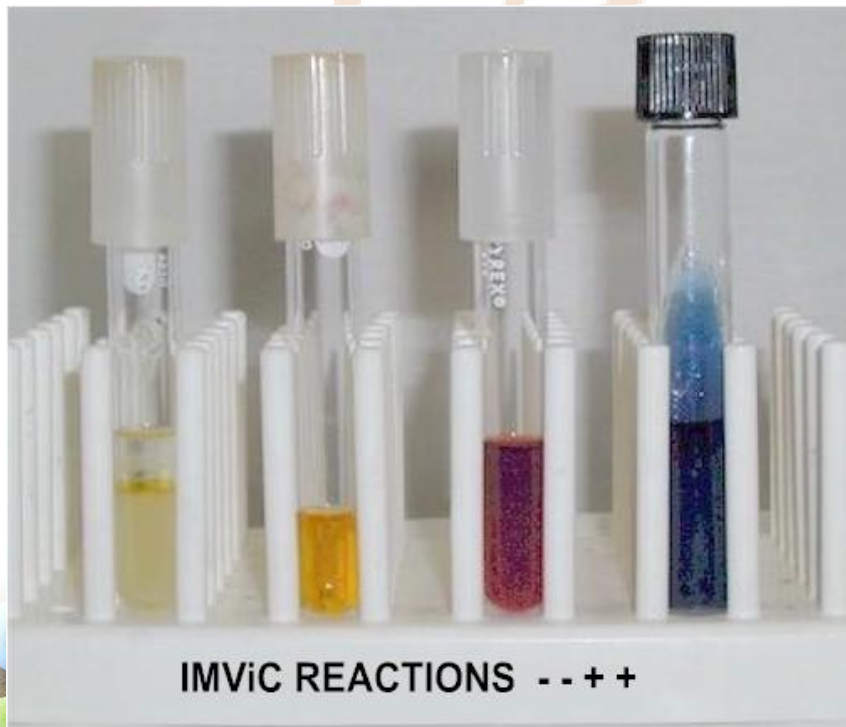
溴麝香草酚蓝

pH6.0(黄)~7.6(蓝)



IMViC试验

- I-吲哚（indol）试验
- VP（Voges-Proskauer）试验
- M - 甲基红（methyl red）实验
- C - 枸橼酸盐利用(citrate utilization)试验



毒性酶类试验

☞ 溶血试验

☞ 链激酶试验

☞ 卵磷脂酶试验

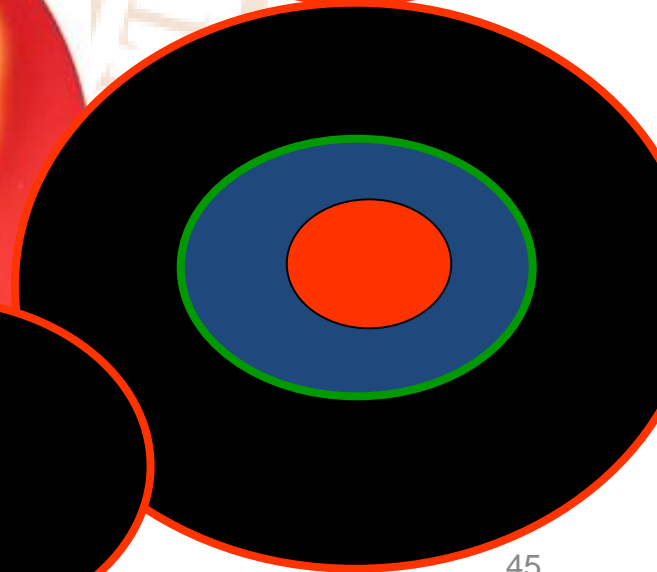
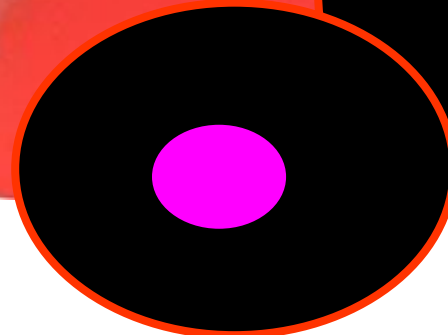
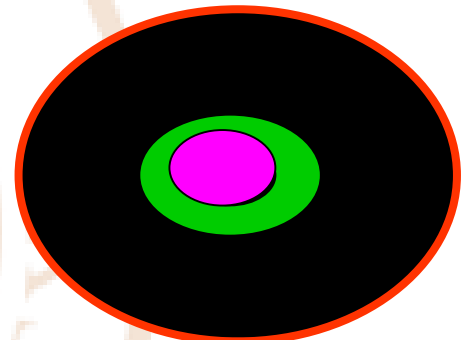
☞ 血浆凝固酶试验

某些细菌在代谢过程中能产生溶血素，溶解红细胞，溶血反应可鉴别细菌。



溶血试验的溶血类型及现象

- (1) α (甲型) 溶血: 较窄的半透明的草绿色溶血环
- (2) β (乙型) 溶血: 较宽的透明溶血环。
- (3) γ (-丙型) 溶血: 无溶血环。



How does substance transport into cells?

Diffusion

(扩散)

Passive diffusion (被动扩散)

Facilitated diffusion (促进扩散)

Active transport (主动运送)

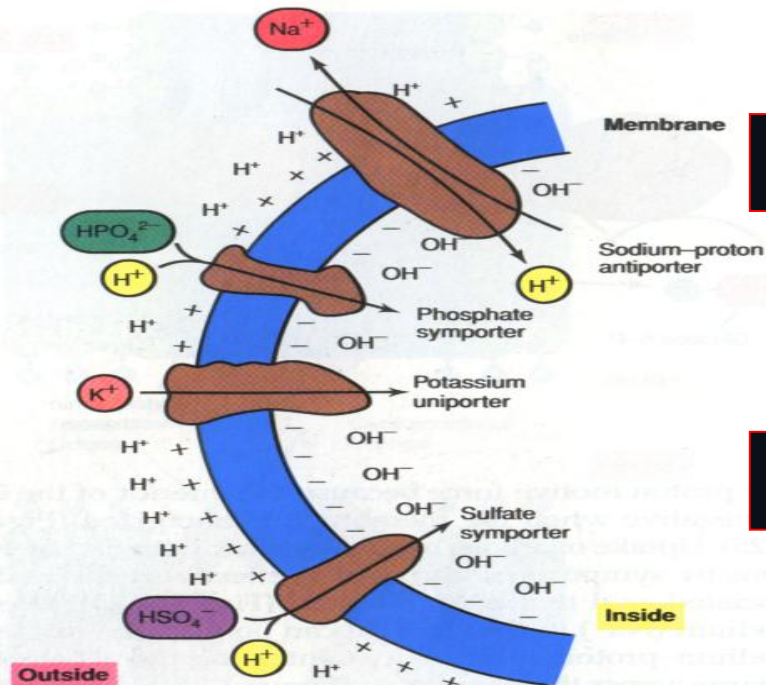
Group translocation (基团移位)

Cytosis (细胞摄入)



Active Transport

- **against** a concentration gradient.
- **energy**



逆向运输

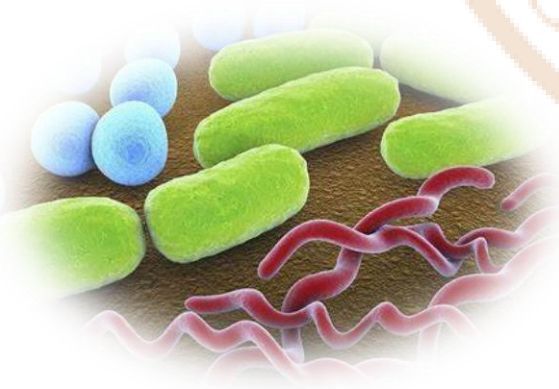
单向运输

同向运输

Figure 3.25 Use of ion separation in the proton in this case the separation of protons from h^+ across the membrane, to transport inorganic ions by specific transport proteins. Note that there is a separation both of protons and of electrical charge.

Group Translocation (基团转位) (1964)

- Against a concentration gradient.
- The substances are **chemically changed**.
- **Energy**
- **Only in bacteria.**



厌氧和兼性厌氧菌

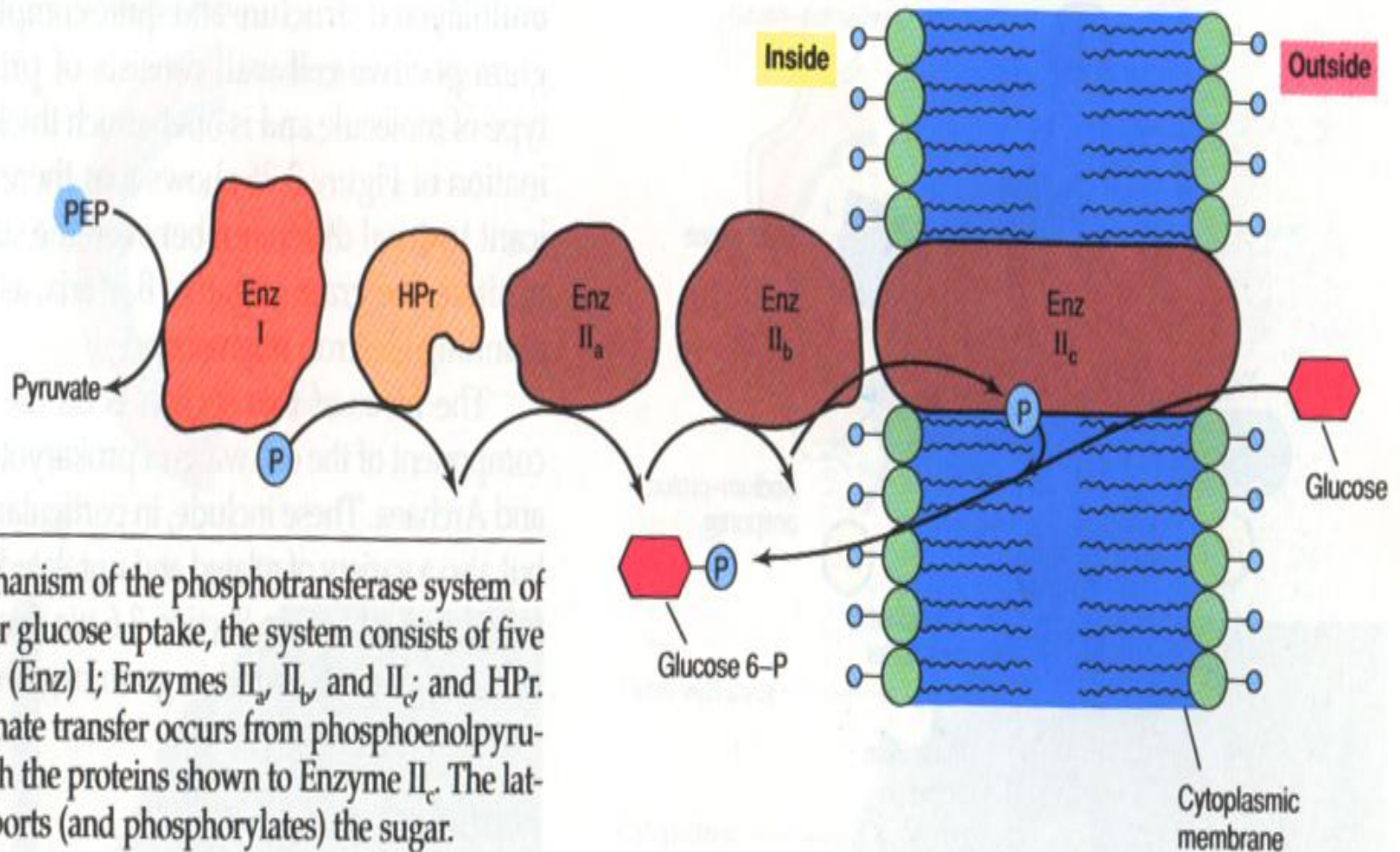
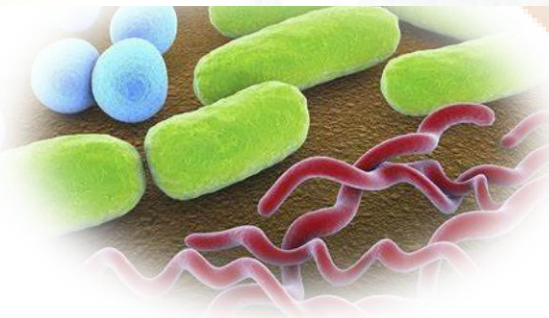


Figure 3.24 Mechanism of the phosphotransferase system of *Escherichia coli*. For glucose uptake, the system consists of five proteins: Enzyme (Enz) I; Enzymes II_a, II_b, and II_c; and HPr. Sequential phosphate transfer occurs from phosphoenolpyruvate (PEP) through the proteins shown to Enzyme II_c. The latter actually transports (and phosphorylates) the sugar.



磷酸转移酶系统 (PTS)

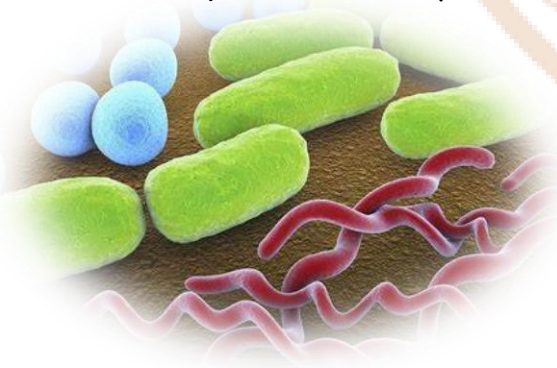
• 磷酸转移酶系统 (PTS) :

PEP-己糖磷酸转移酶系统

1) HPr的激活



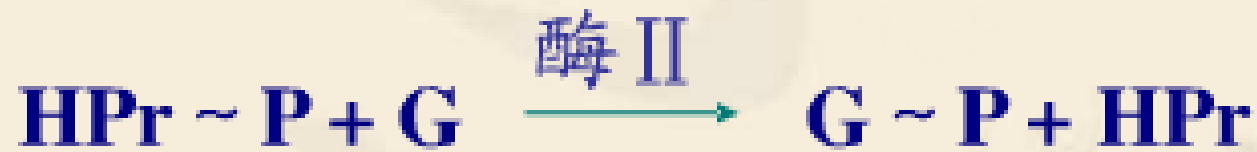
- ▶ EI是可溶性CP蛋白；HPr可溶性蛋白，结合在CM，具有高能磷酸载体作用，两者无底物特异性



2) 糖被Pi后运入膜内

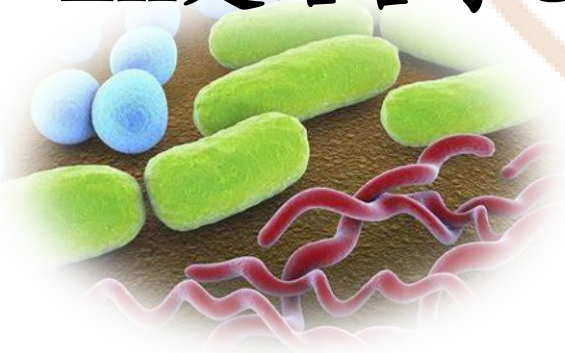
CM外的糖与底物特异性EIIc结合

糖被 P-HP_r→EII_a→EII_b传递的Pi激活



3) 通过EIIc将磷酸化糖释放到CP

EII是结合于CM的蛋白，底物特异性



1. 微生物营养类型有哪些？
2. 配制培养基的原则有哪些？
3. 鉴别培养基、选择培养基、加富培养基
4. 肠道细菌鉴定生化实验都有哪些？M.R.实验、V.P.实验、吲哚实验、葡萄糖发酵实验原理。
5. 肠道菌群在EMB培养基上菌落特点？
6. α -溶血、 β -溶血
7. Group translocation
8. 微生物由于个体微小一般都是以其群体形式进行研究或利用，这必然就要涉及到对微生物的培养。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？

