

2. 微生物的生长

第3章 微生物的营养与生长

2.3 微生物的群体生长规律

2.3.1 微生物的典型生长曲线

2.3.2 微生物的连续培养

2.3.2 微生物的连续培养

分批培养(batch culture)：将微生物置于一定容积的培养基中，经过培养生长，最后一次收获的培养；

特点：培养基一次加入，不予补充，微生物的对数生长期不可能长时间维持。

第3章 微生物的营养与生长

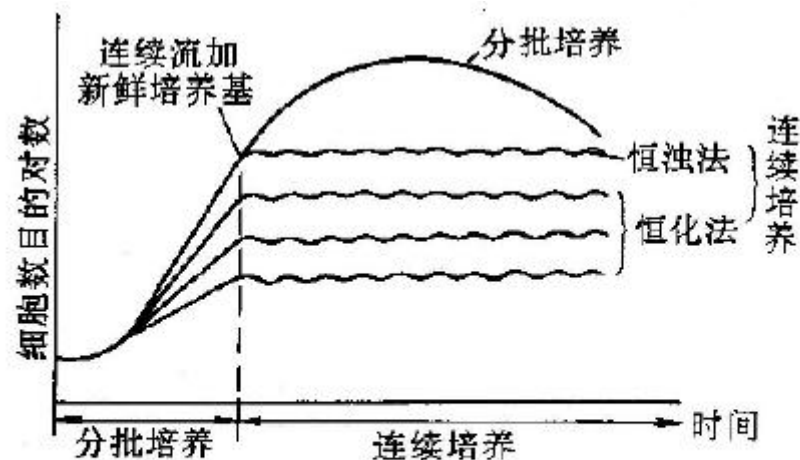
2.3 微生物的群体生长规律

2.3.1 微生物的典型生长曲线

2.3.2 微生物的连续培养

连续培养法：在培养器中不断补充新鲜营养物质，并及时不断地以同样速度排出培养物(包括菌体及代谢产物)，理论上讲，对数生长期就可无限延长的培养方法；

意义：不仅可随时为微生物的研究工作提供一定生理状态的实验材料，而且可提高发酵工业的生产效益和自动化水平。



分批培养与连续培养的关系

第3章 微生物的营养与生长

2.3 微生物的群体生长规律

2.3.1 微生物的典型生长曲线

2.3.2 微生物的连续培养

(1) 恒浊连续培养

不断调节流速而使细菌培养液**浊度保持恒定**的连续培养方法。

在恒浊连续培养中装有浊度计，借光电池检测培养室中的浊度（即菌液浓度），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。

第3章 微生物的营养与生长

2.3 微生物的群体生长规律

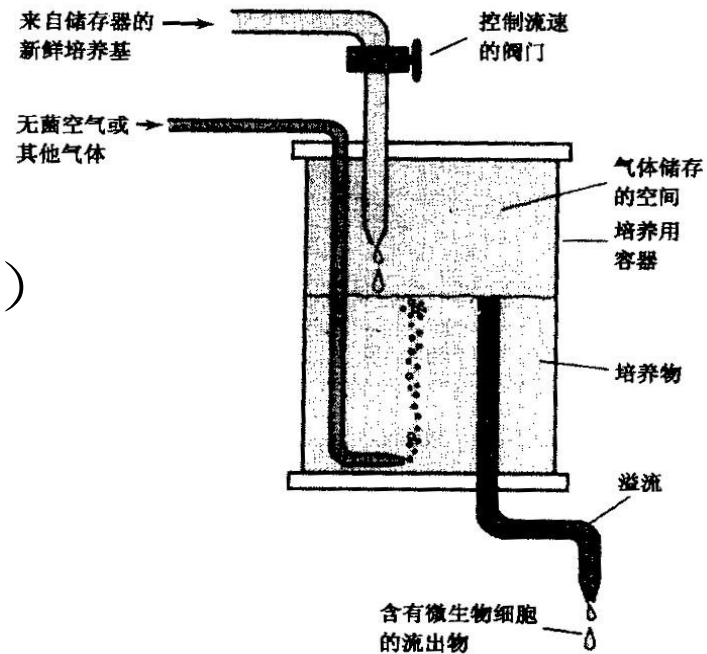
2.3.1 微生物的典型生长曲线

2.3.2 微生物的连续培养

(2) 恒化连续培养

控制恒定的流速，使由于微生物生长低于最高生长速率下进行生长繁殖的培养方法

(恒化器)



第3章 微生物的营养与生长

2.3 微生物的群体生长规律

2.3.1微生物的典型生长曲线

2.3.2微生物的连续培养

恒浊器与恒化器的比较

装置	控制对象	培养基	培养液流速	生长速率	产物	应用范围
恒浊器	菌体密度 (内控制)	无限制生长因子	不恒定	最高速率	大量菌体或与菌体相平行的代谢产物	生产为主
恒化器	培养液流速 (外控制)	有限制生长因子	恒定	低于最高速率	不同生长速率的菌体	实验室为主

优点：缩短发酵周期；便于自动控制；
产物质量均一；

缺点：菌种易退化；易染杂菌；

第3章 微生物的营养与生长

2.3 微生物的群体生长规律

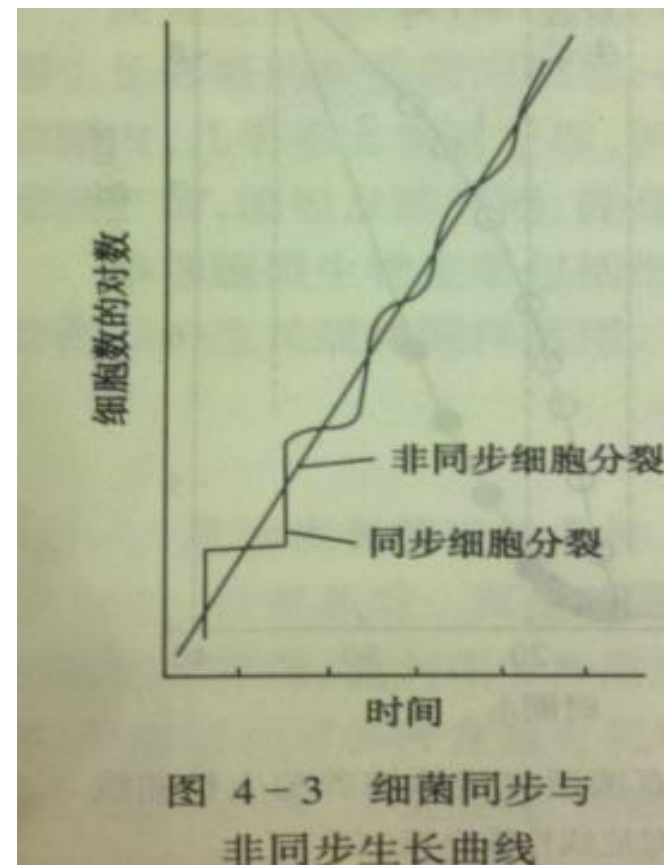
2.3.1 微生物的典型生长曲线

2.3.2 微生物的连续培养

2.3.3 微生物的同步培养

2.3.3 微生物的同步培养

- 同步培养技术：是指设法使某一群体中的所有个体细胞尽可能都处于同样细胞生长和分裂周期的一种培养方式。
- 同步生长：通过同步培养的手段而使细胞群体中各个体处于分裂步调一致的生长状态的一种生长方式。



获得微生物同步生长的方法

- 诱导法
 - { 控制温度
 - { 控制培养基成分
 - 抑制DNA合成法
- 选择法
 - { 离心分离法
 - { 过滤分离法
 - 膜洗脱法

同步生长的细胞经过2~3个分裂周期后会丧失同步性。

第3章 微生物的营养与生长

2.3 微生物的群体生长规律

2.3.1 微生物的典型生长曲线

2.3.2 微生物的连续培养

2.3.3 微生物的同步培养

诱导法

- 诱导因子：不影响微生物生长，可特异性抑制细胞分裂，消除该抑制后，细胞同时出现分裂。
 - 此法会扰乱细胞的正常代谢
 - 举例：
 - ①温度调整法；
 - ②营养条件调整法；
 - ③抑制DNA合成法（代谢抑制剂：）
- （抑制DNA合成法是利用代谢抑制剂阻碍DNA合成相当一段时间，然后解除其抑制，可达到同步目的。常用的代谢抑制剂：氨甲蝶呤、羟基尿素、5-氟脱氧尿苷、胸腺苷、脱氧腺苷、脱氧鸟苷等。）

第3章 微生物的营养与生长

2.3 微生物的群体生长规律

2.3.1 微生物的典型生长曲线

2.3.2 微生物的连续培养

2.3.3 微生物的同步培养

选择法:

- 又称机械筛选法，是通过物理学方法从随机、不同步群体中选择出同步的群体。
- 此法可在不影响微生物代谢的情况下获得同步培养物。
- 若微生物在相同发育阶段大小不一，则不适宜用此法。
- 举例：膜洗脱（常用）、密度梯度离心法、过滤分离法等。

第3章 微生物的营养与生长

2.3 微生物的群体生长规律

2.3.1 微生物的典型生长曲线

2.3.2 微生物的连续培养

2.3.3 微生物的同步培养

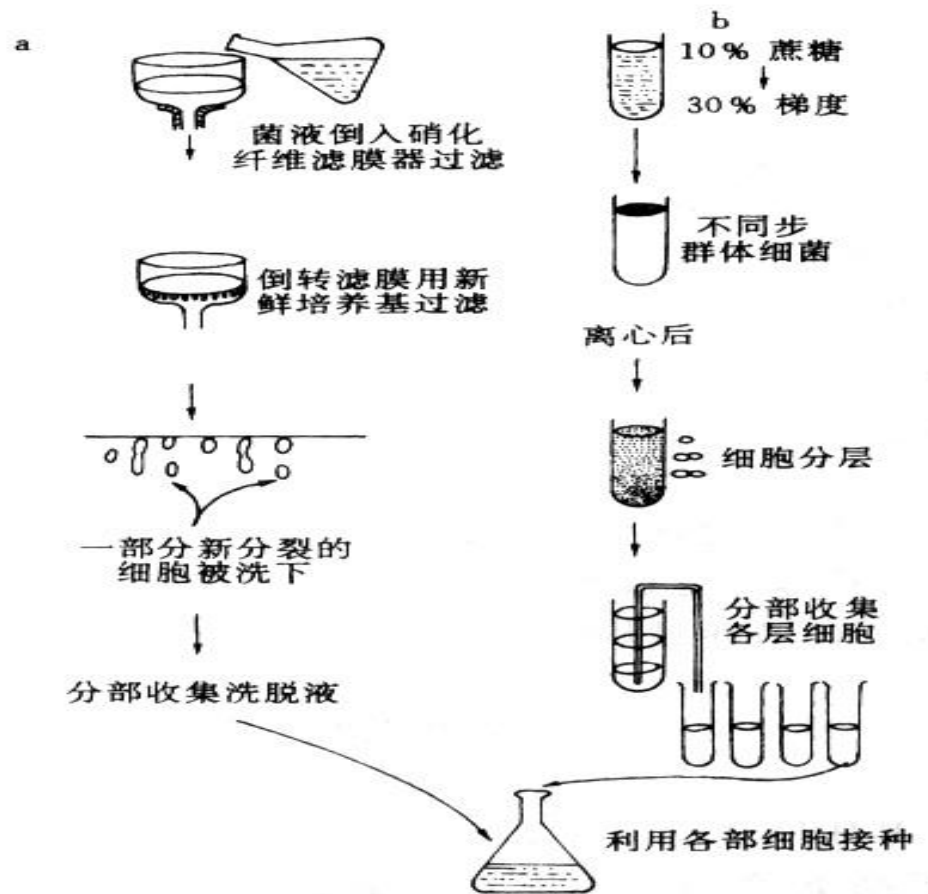


图 6-4 同步培养方法

a. 膜洗脱法 b. 密度梯度离心法

补充1:微生物培养法

微生物培养法

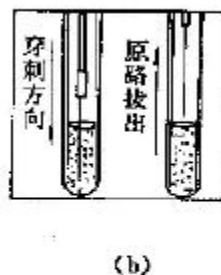
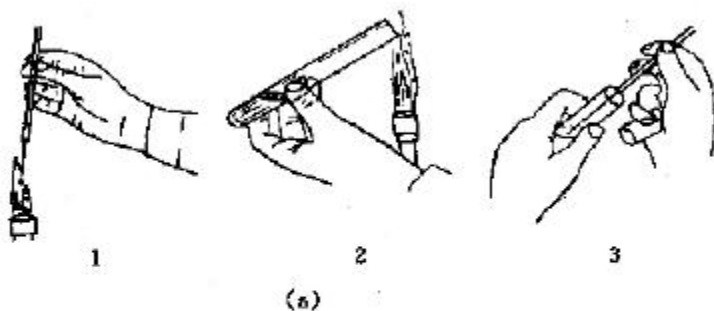
- 一、固体培养
- 二、液体培养
- 三、连续培养
- 四、补料分批培养
- 五、混菌培养

一、固体培养(Solid-state culture)

(一) 实验室常见的固体培养

1. 好氧菌培养

试管斜面(test-tube slant)
培养皿平板
克氏扁瓶(kolle flask)
茄子瓶斜面



斜面接种和穿刺接种培养方法

(a) 斜面接种：1. 接种针火焰灼烧灭菌；2. 管口靠近火焰处；3. 用接种针蘸取菌样后，移到斜面上划线

(b) 穿刺接种：将蘸取菌样的接种针（头部无环）垂直插入固体培养基内，再原路拔出

2. 厌氧菌培养

厌氧装置 + 特殊培养基



六大营养素 + 还原剂

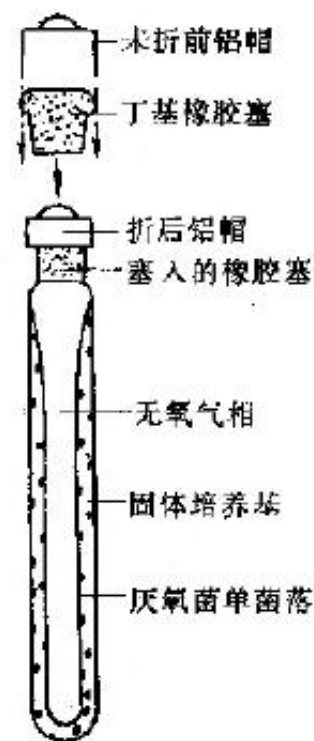
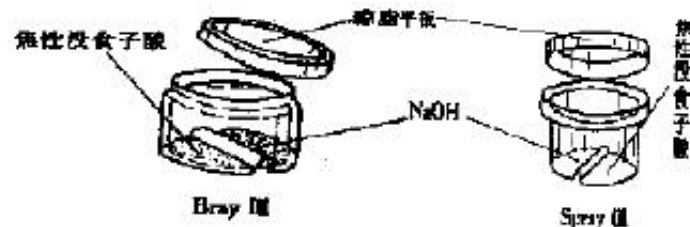
氧化还原势指示剂，
如刃天清(resazurin)

厌氧菌培养的装置:

(1) Hungate滚管技术

1950年美国微生物学家R.E.Hungate设计

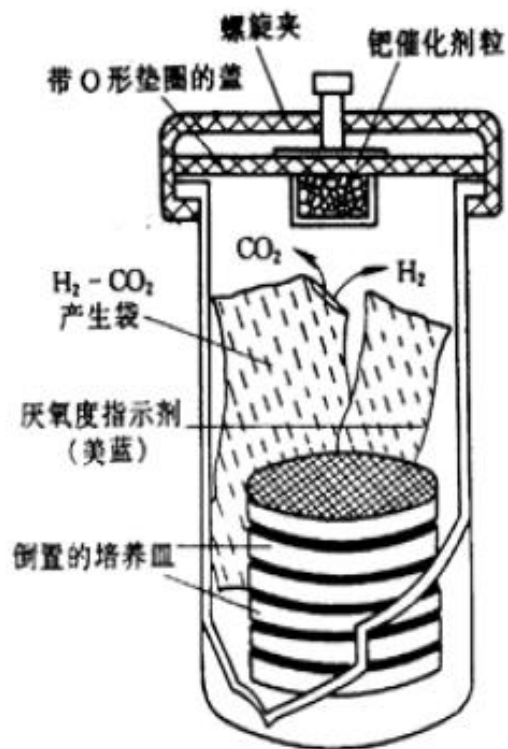
(2) 厌氧培养皿



Hungate 滚管技术
中的厌氧试管的剖面图

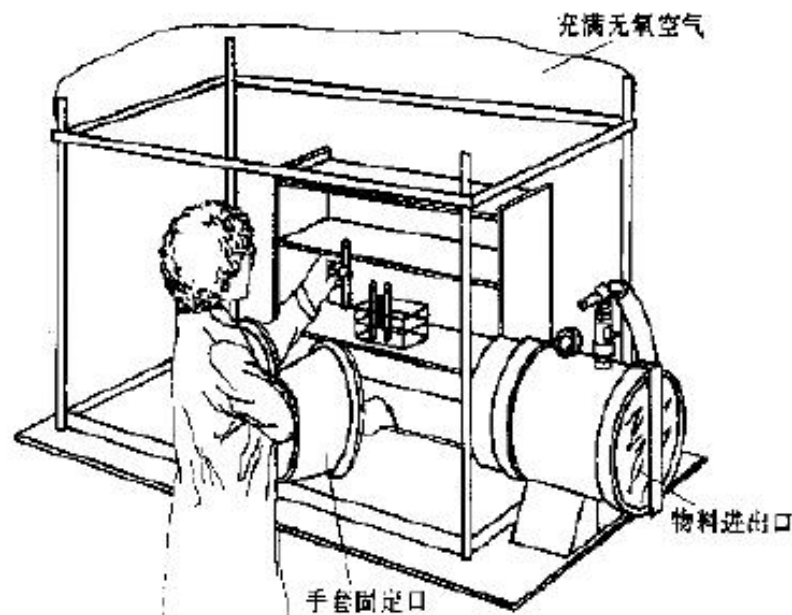
厌氧菌培养的装置：

(3) 厌氧罐



厌氧罐的一般构造

(4) 厌氧手套箱

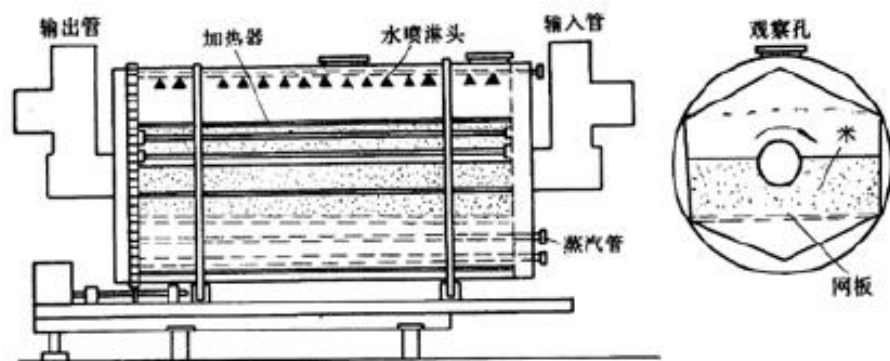


厌氧手套箱的一般构造

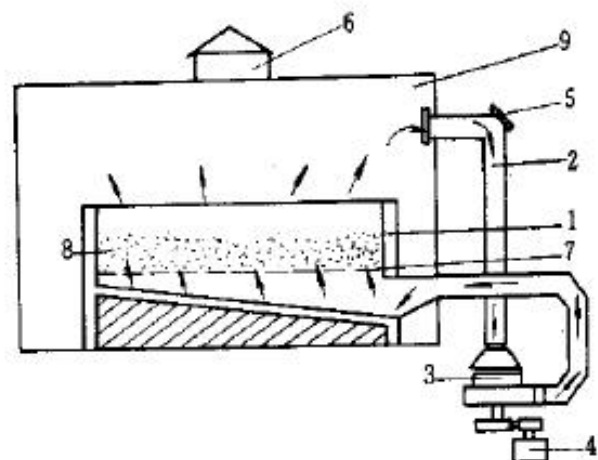
(二) 生产中常见的固体培养

1. 好氧菌的曲法培养

曲盘、转鼓、通风曲槽等



转鼓式自动固体培养装置示意图



通风曲槽结构模式图

1—曲床；2—风道；3—鼓风机；4—电动机；

5—入风口；6—天窗；7—帘子；

8—曲料；9—曲槽罩

2. 厌氧菌的堆积培养法

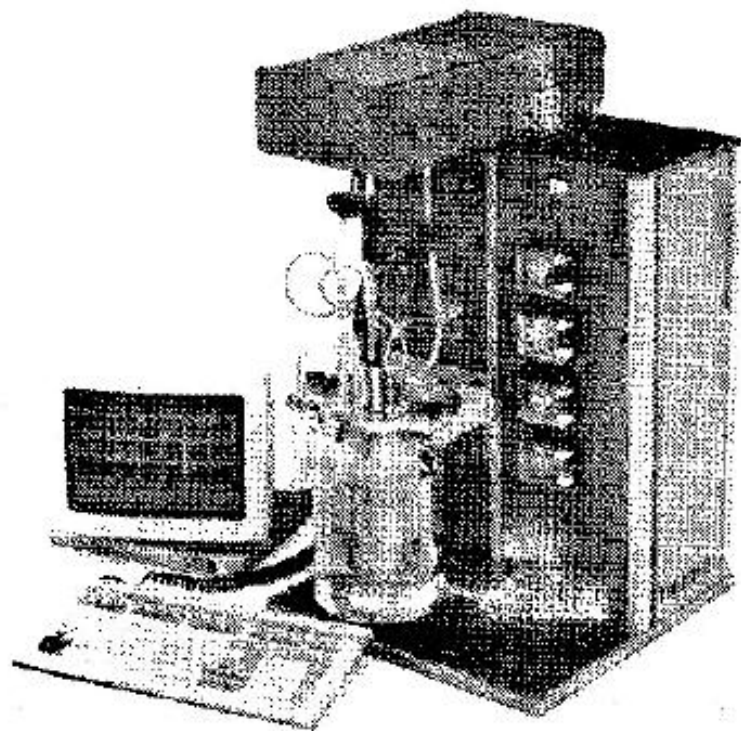
二、液体培养(Liquid-state culture)

液体培养提高溶氧速率的措施:

1. 浅层培养(Shallow liquid culture)
2. 摇床:振荡培养(Shaking flask culture)
3. 深层培养(Submerged culture)
4. 机械搅拌
5. 提高罐压

(一) 实验室常见的液体培养

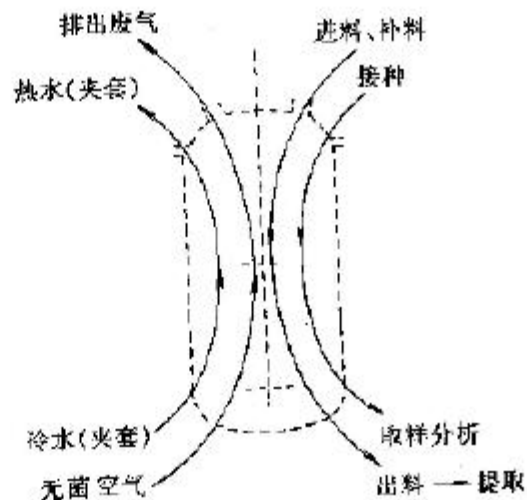
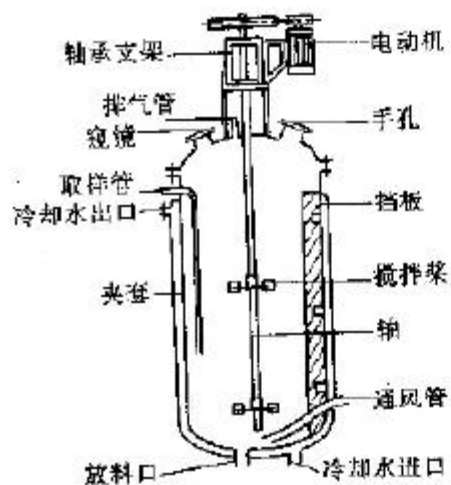
1. 试管液体培养
2. 浅层液体培养
3. 摇瓶培养
4. 台式发酵罐



台式发酵罐

(二) 生产中常见的液体培养

1. 浅盘培养
2. 发酵罐深层培养

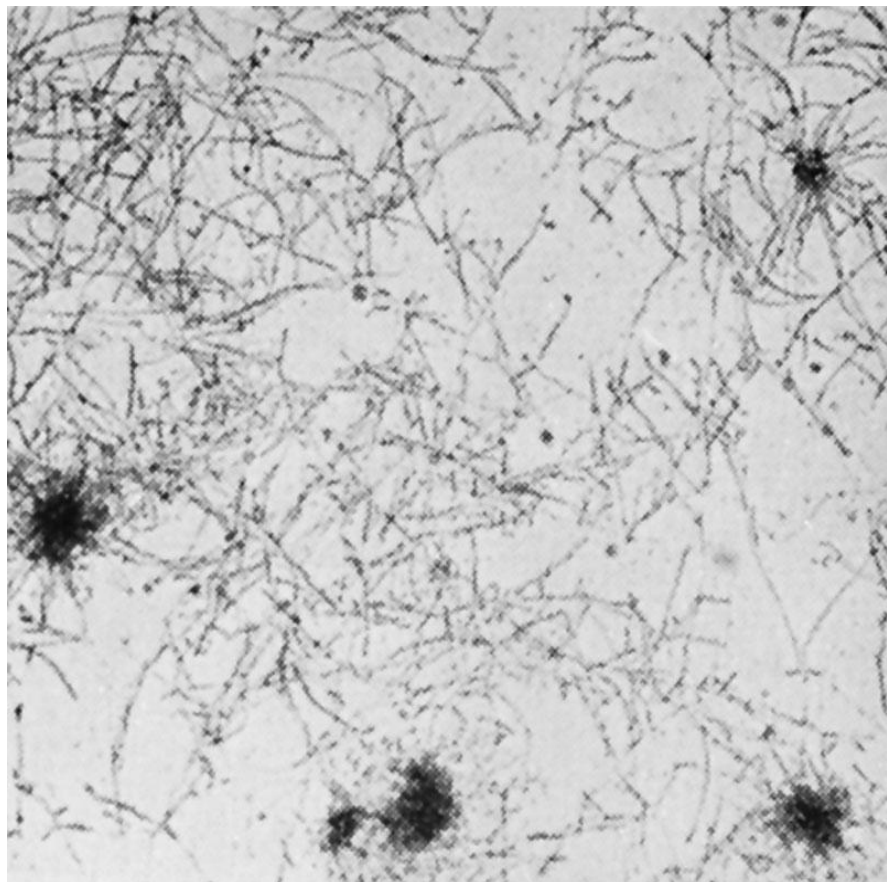


通用式发酵罐的构造及其运行原理

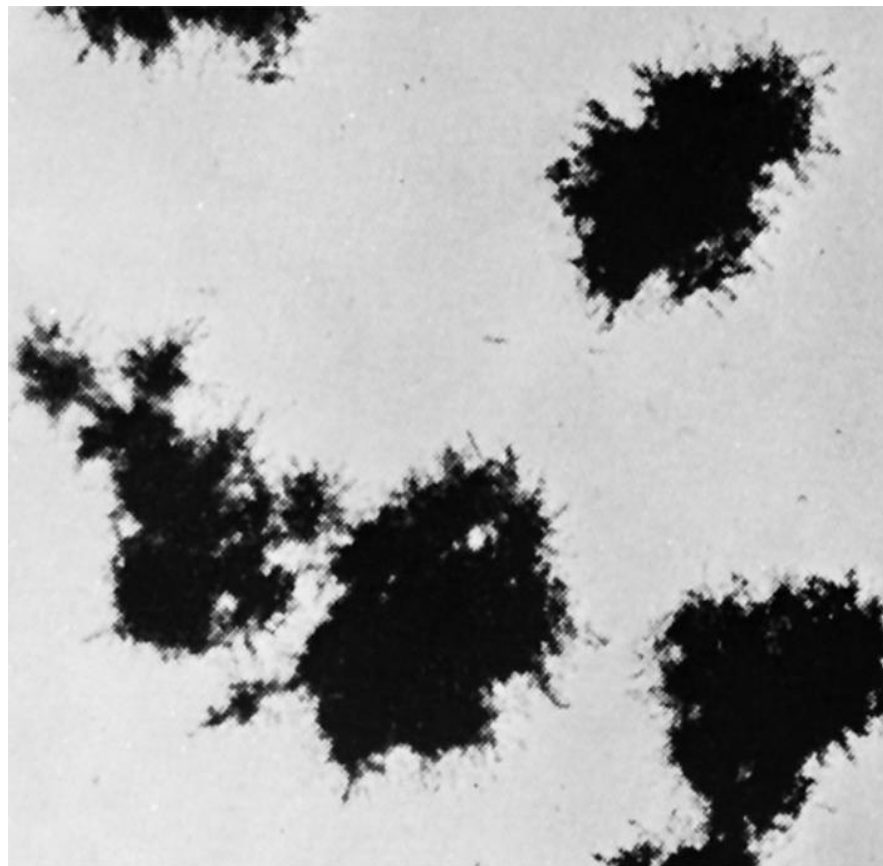
补充2:丝状真菌的群体生长规律(非典型生长曲线):
也适合于放线菌

- 操作过程:将少量丝状真菌纯培养物接种于一定容积的深层通气液体培养基中,在最适条件下培养,定时取样测定菌丝细胞物质的干重。
- 以细胞物质的干重为纵坐标,培养时间为横坐标,就可绘出丝状真菌的非典型生长曲线。

图示 丝状真菌的沉淀生长



起始培养时菌丝体



培养18小时后的菌丝体

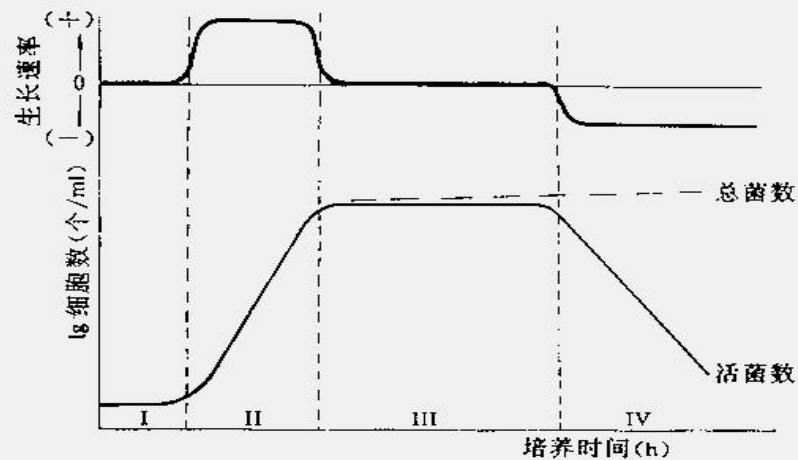


图 7-4 典型生长曲线

(I. 延滞期, II. 指数期, III. 稳定期, IV. 衰亡期)

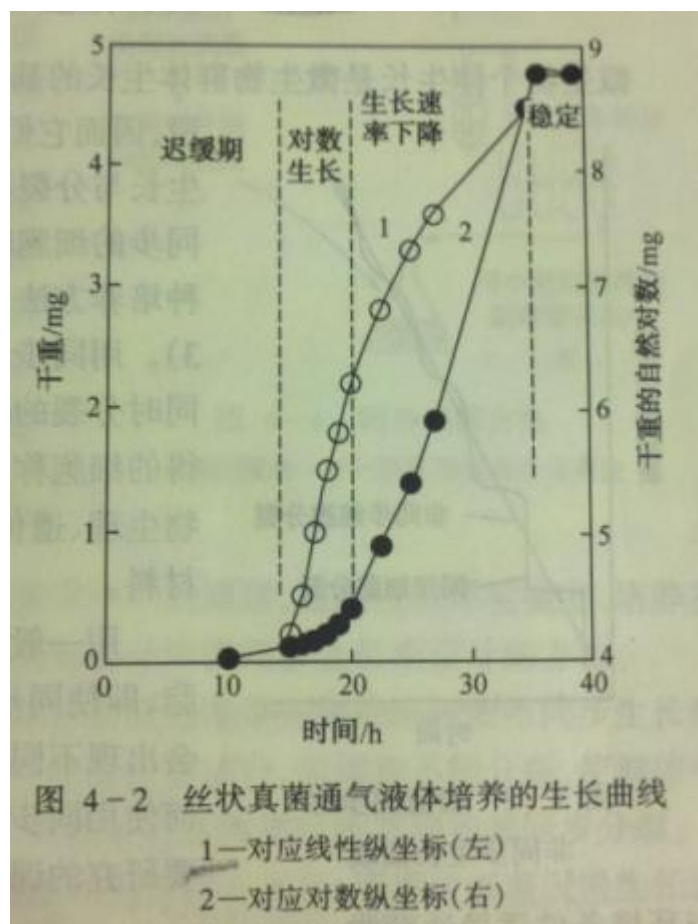


图 4-2 丝状真菌通气液体培养的生长曲线

1—对应线性纵坐标(左)

2—对应数纵坐标(右)

- 根据丝状真菌生长繁殖后的细胞干重不同可将生长曲线分为：迟缓期、快速生长期和生长衰亡期3个阶段
- 出现迟缓期的原因：孢子萌发前的真正的迟缓期；生长已开始但却无法测量；
- 快速生长期：菌丝体干重迅速增加，其立方根与时间呈直线关系；真菌的生长表现为菌丝尖端的伸长和菌丝的分枝，因此受到邻近细胞竞争营养物质的影响；
- 生长衰亡期：菌丝体干重下降。通常短时间内失重很快，以后则不再变化。

- 生长停止的因素：
- 1、高浓度培养基中，可能由有毒代谢产物的积累阻碍真菌生长，如高浓度碳水化合物——有机酸、有机氮——氨、抗生素等；
- 2、对于较稀释的营养物质平衡良好的培养基中，是由于碳水化合物的耗尽。

第3章 微生物的营养与生长

2 微生物的生长

2.1 微生物生长的概念

2.2 微生物生长量的测定

2.3 微生物的群体生长规律

2.4 自然环境中的微生物生长

2.4 自然环境中的微生物生长

自然环境特点：自然环境比人工条件常常要更复杂和更动态。

微生物生长特点：在自然环境中，微生物常常合成一些人工条件下生长时所不产生的结构，如细菌粘掖层。

微生物细胞能够感受自然环境中发现的各种化合物，其直接反应就是合成一些有用的结构和酶以便在特定的环境中生存生长。

大量研究揭示，自然环境条件下的细菌能够生长在复杂的群落中，表现出生长在试管中的纯培养微生物所不曾发生的某些现象。

2.4 自然环境中的微生物生长

2.4.1 多重环境因子影响微生物生长的规律

2.4.1 多重环境因子影响微生物生长的规律

1、Liebig 最低浓度定律：即微生物总生物量由环境中满足于微生物生长所需营养物质的最低浓度所决定。当环境中某种营养物质被消耗殆尽或至一定浓度以下时，可使微生物的生长停止，即使此时培养基中没有任何毒性物质存在，而且其他营养物质仍很丰富，当添加少量这种营养物质时则微生物的生长可以重新开始。

2、Shelford 耐受定律：当环境因子低于或高于某一个微生物不能生存或生长的阈值时，就成为生长限制因子，而与营养物质的供给无关。

上述规律也适用于人工条件下的微生物生长。

3 影响微生物生长的因素

食品的营养成分对微生物生长的影响

微生物对营养物质分解的选择性

食品性质	具有显著分解能力的类群	举例菌种
蛋白质	细菌 霉菌	变形杆菌 沙门柏干酪青霉
碳水化合物	酵母 霉菌	啤酒酵母 黑曲霉
脂肪	霉菌 细菌（少数）	黄曲霉 荧光假单胞菌

1. 温度

- 影响微生物生长繁殖的最重要因素之一。
- 温度以两种相反的方式影响微生物细胞。
- 生长温度三基点：任何微生物的生长温度总有：

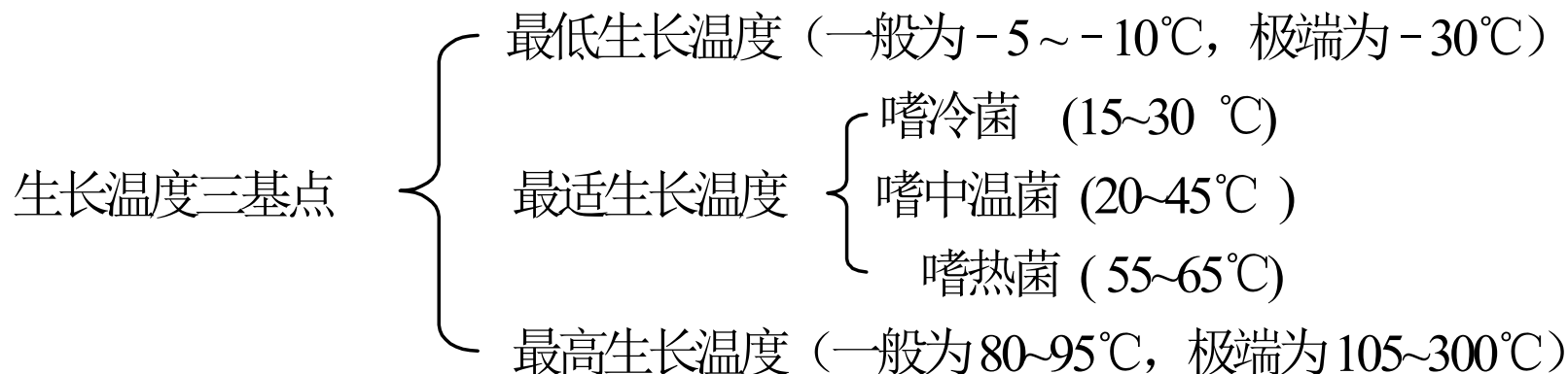
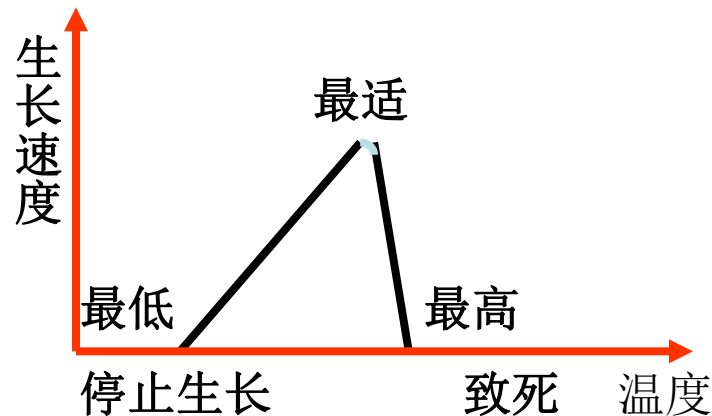
最低生长温度

最适生长温度

最高生长温度

■ 最适生长温度：

即某微生物分裂代时最短或生长速率最高时的培养温度。不同微生物的最适生长温度是不一样的。



■ 致死温度：细菌在10min被完全杀死的最低温度。

根据微生物生长的适宜温度分为三大类

微生物类型	生长温度范围	最适生长温度	分布区域
嗜冷微生物 (Psychrophile)	-10~30	10~20	地球两极、海洋、冷泉、冷藏食品
嗜温微生物 (Mesophile)	10~45	25~40	腐生环境、寄生环境
嗜热微生物 (Thermophile)	25~80	50~55	温泉、堆肥、土壤

不同温距中微生物活动的主要类群

低温 <10 °C

中温25-30°C

高温> 40°C

霉菌
酵母（少数）
细菌（少数）

霉菌
酵母
细菌

细菌（少数）

- 嗜冷菌:其生长温度范围在 $-10\sim 20^{\circ}\text{C}$ ，最适生长温度为 15°C 或以下，它们常分布在地球两极地区的水域和土壤中。

嗜冷机制：①酶系在低温下仍能起催化作用；②细胞膜含较多的不饱和脂肪酸，在低温下仍具有通透性。

常见的产碱杆菌属、假单胞菌属、黄杆菌属、微球菌属等常使冷藏食品腐败变质。

有些肉类上的霉菌在 -10°C 仍能生长，如芽枝霉；荧光极毛菌可在 -4°C 生长，并造成冷冻食品变质腐败。

耐冷菌

- 能在0℃生长，但最适生长温度为20-40 ℃

●嗜温菌 绝大多数微生物属于这一类。分为**室温型**（25℃）和**体温型**（37℃）。

最适生长温度在20~40℃之间

最低生长温度10~20℃

最高生长温度40~45℃。

引起**人和动物疾病的病原微生物**、**发酵工业应用的微生物菌种**以及导致食品原料和成品腐败变质的微生物，都属于**体温型（37℃）**这一类群的微生物。

- 嗜热菌 它们适于在45~50℃以上的温度中生长，在自然界中的分布仅局限制于某些地区，如**温泉、日照充足的土壤表面、堆肥堆、发酵饲料等腐烂有机物中**，**比如堆肥在发酵过程中温度常高达60~70℃。**

- 嗜热机制：

- ①细胞内的酶具强抗热性。

- ②产生的多胺，热亚胺和高温精胺物质对蛋白质等组织结构具有保护作用。

- ③核酸也具有热稳定性的保护结构。

- ④细胞膜含有较多的饱和脂肪酸和直链脂肪酸，使膜具有稳定性。

- 能在55–70℃中生长的微生物有芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bac. stearothermophilus*)、高温放线菌属 (*Thermoactinomyces*)、甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*) 等;
- 温泉中的细菌; 其次是链球菌属和乳杆菌属。
- 有的可在近于100℃的高温中生长, 属嗜高温微生物这类高温型的微生物, 给罐头工业、发酵工业等带来了一定难度。

2干燥

- 微生物代谢离不开水。干燥或提高溶液渗透压降低微生物可利用水的量或活度，从而抑制其生长。

微生物对 a_w 的要求

(1) 每种微生物有特征性的最适和最低 a_w

(2) 霉菌生长的最低 a_w < 酵母 < 细菌

微生物	a_w
一般细菌	0.91
酵母菌	0.88
霉菌	0.80
嗜盐细菌	0.75
干性霉菌	0.65
嗜高渗酵母	0.60

食品的 A_w 与食品保藏期

若干食物 的 a_w 值	新鲜水果：0.97~0.99
	鲜肉（家畜）：0.97
	面包：0.86
	蔗糖饱和液：0.76
	大米、面粉（含水量14%）：0.65
	奶粉：0.2

食品的 A_w 与食品保藏期

(1) 新鲜食品原料

A_w : 0.98~0.99 (1~2天)

(2) 干制食品

A_w : 0.80~0.85 (1~2周)

A_w : 0.70 (3~6月)

A_w : 0.65 (2~3年或更长)

(3) 高渗透食品

A_w : 0.87~0.95

(4) 中间水分食品 (intermediate-moisture foods, IMF)

特征: ①含水量15~50%

② A_w 0.60~0.85

③无需杀菌, 有较稳定的货架期

3 渗透压

渗透压对食品中微生物生长的影响

1. 不同类群微生物对渗透压适应性的比较

2. 引起食品变质的嗜盐微生物、耐盐微生物和耐糖微生物

- (1) 高度嗜盐细菌（最适宜在20~30%食盐浓度的食品中生长）
- (2) 中度嗜盐细菌（最适宜在5~18%食盐浓度的食品中生长）
- (3) 低等嗜盐细菌（最适宜在2~5%食盐浓度的食品中生长）
- (4) 耐盐细菌（能在10%以下的食盐浓度的食品中生长）
- (5) 耐糖微生物（能在高度的含糖的食品中生长）

4 pH

- 作为一个整体来说，微生物生长的pH范围极广（ $>2\sim 10$ ），有少数种类还可超出这一范围。但绝大多数微生物的生长pH都在 $5\sim 9$ 之间。
- 不同微生物的生长pH存在最低、最适与最高三个数值。
- 各类微生物能够生长的pH值较宽，但细胞内部pH值却接近中性。

pH对食品中微生物生长的影响

(一) pH对微生物生长的影响

通常培养条件:

细菌: pH7.0~8.0

放线菌: pH7.5~8.5

酵母菌: pH3.8~6.0

霉菌: pH4.0~5.8

不同微生物对环境pH的适应将微生物分为:

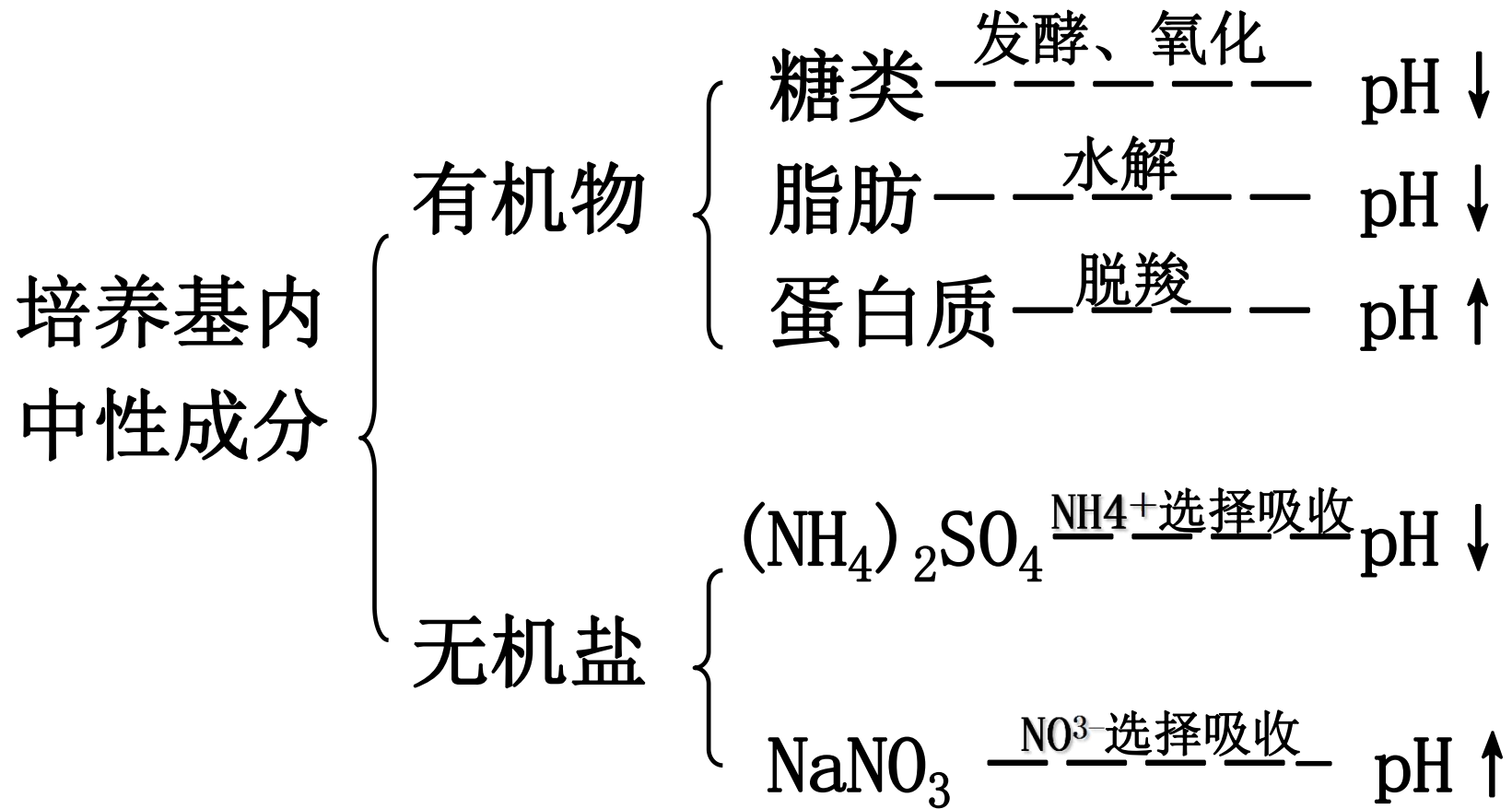
嗜碱微生物 (basophile)

耐碱微生物 (basotolerant microorganism)

嗜酸微生物 (acidophile)

耐酸微生物 (acidotolerant microorganism)

- 微生物生命活动能改变外界环境pH，如



• pH
调节

治标

过酸时： 加NaOH、 Na_2CO_3 等碱液中和

过碱时： 加 H_2SO_4 、HCl等酸液中和

治本

过酸时

加适当氮源： 加尿素、 NaNO_3 、 NH_4OH 或蛋白质等

提高通气量

过碱时

加适当碳源： 加糖、乳酸、醋酸、柠檬酸或油脂

降低通气量

食品pH的分类

1.新鲜食品分类

pH > 4.5

非酸性食品

pH = 4.5

pH < 4.5

酸性食品

2.罐头食品分类

Group1

5.3

低酸罐头

中酸罐头

Group2

4.5

酸性罐头

3.7

高酸罐头

pH

食品pH在食品加工中的重要性

酸性食品与非酸性食品杀菌因素的比较

酸性食品 (pH<4.5)	非酸性食品 (pH>4.5)
<div>低热 ↓ 营养细胞</div> <div>酸 ↓ 芽孢</div>	<div>低热 ↓ 营养细胞</div> <div>高热 ↓ 芽孢</div>

pH值与食品腐败变质

1.腐败菌和常见致病菌生长的适宜pH值

微生物	pH范围	最适pH
细菌	4.5 ~ 9.0	7.0
酵母	2.4 ~ 9.2	4.0 ~ 5.8
霉菌	1.5 ~ 11.0	3.0 ~ 6.0

不同类群微生物对不同pH的适应能力

< pH 4.5
霉菌、酵母

> pH 4.5
细菌、霉菌、酵母

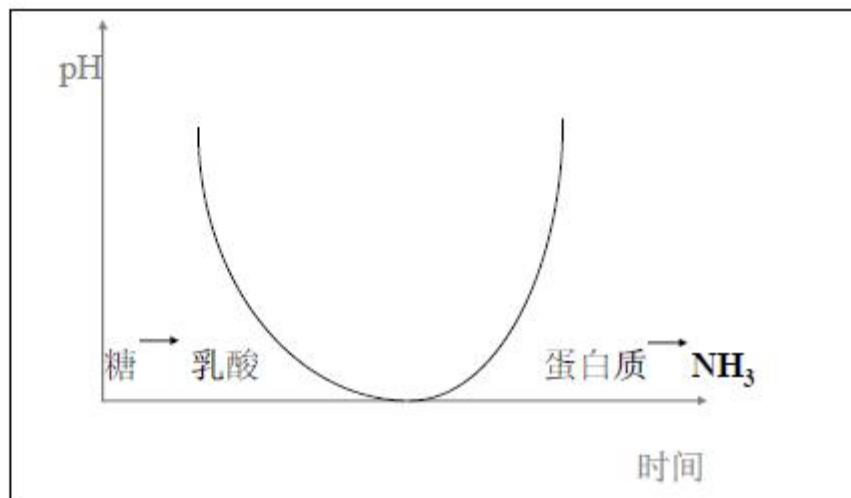
pH值与食品腐败变质

2. 食品的酸化保存

1. 人工加入无机酸
2. 人工加入有机酸
3. 人工接种微生物发酵

微生物在食品基质上生长引起pH值的变化

1.V型变化规律



2.食品缓冲能力

5 氧气

好氧菌

专性好氧菌：需氧，正常大气压下呼吸产能
以呼吸为主，兼营发酵产能

兼性厌氧菌

以呼吸为主，兼营厌氧呼吸产能

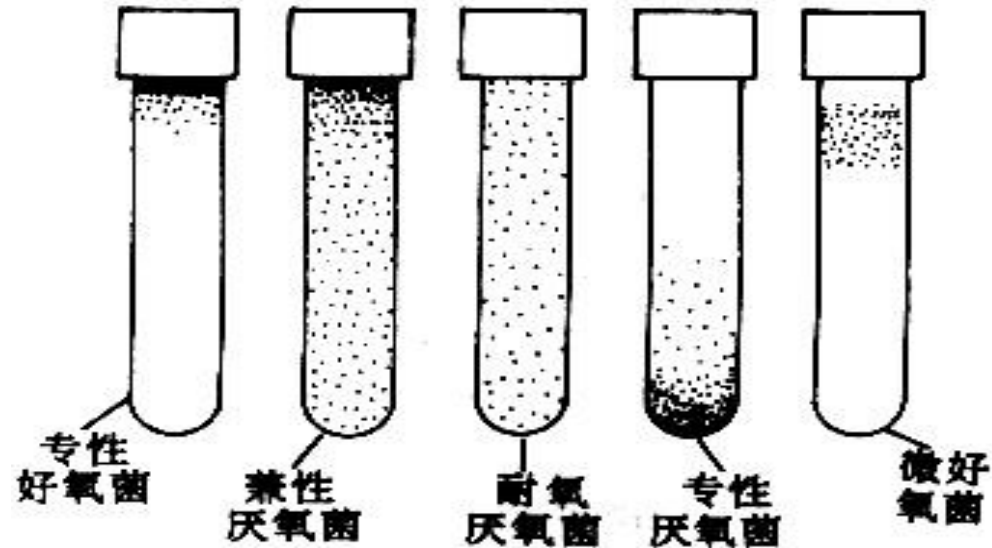
微好氧菌：需要微量氧下生活

厌氧菌

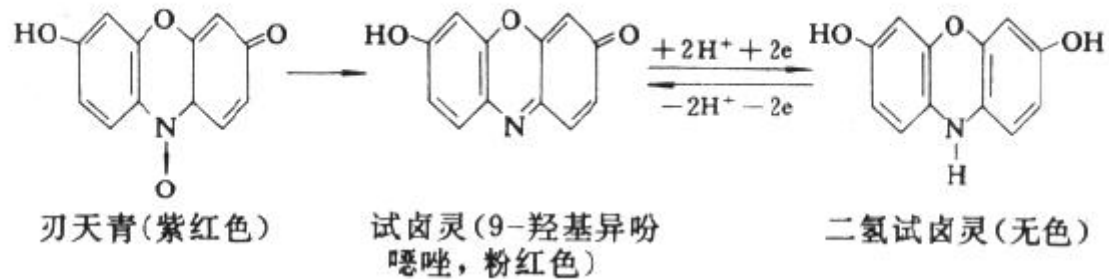
耐氧菌：不需氧，只以发酵产能，氧无毒害

(专性)厌氧菌：氧有害或致死，以发酵或无氧呼吸产能

氧与细菌生长的关系



培养基中加入氧化还原指示剂刃天青可对氧化还原电位进行间接测定



- 专性好氧菌（obligate or strict aerobes）

必须在较高浓度分子氧的条件下才能生长，有完整的呼吸链，以分子氧作最终氢受体，具有超氧化物歧化酶（SOD）和过氧化氢酶（Catalase）。

绝大多数真菌和多数细菌、放线菌都是专性好氧菌。如米曲霉、醋酸杆菌、荧光假单胞菌、枯草芽孢杆菌和蕈状芽孢杆菌等。

- 兼性厌氧菌（facultative anaerobes）

在**有氧条件下生长为主（以呼吸产能）**，兼在厌氧条件下生长（以发酵或无氧呼吸产能）。

细胞内含有SOD和过氧化氢酶。

许多**酵母菌**和许多**细菌**都是兼性厌氧菌。例如酿酒酵母、大肠杆菌和普通变形杆菌等。

- 微好氧菌 (microaerophilic bacteria)

在较低氧分压下 (0.01-0.03巴, 正常大气压为0.2巴) 才能正常生长。通过呼吸链以氧作最终氢受体而产能。

例如霍乱弧菌、一些氢单胞菌、拟杆菌属和发酵单胞菌属。

- 耐氧菌 (aerotolerant anaerobes)

在分子氧存在下进行发酵性厌氧生活。不需要氧，氧对其无害。不具有呼吸链，依靠专性发酵和底物水平磷酸化获得能量。细胞内存在SOD和过氧化物酶（缺乏过氧化氢酶）。

一般**乳酸菌多数是耐氧菌**，如乳链球菌、乳酸乳杆菌、肠膜明串珠菌和粪链球菌等，乳酸菌以外的耐氧菌如雷氏丁酸杆菌。

厌氧菌（anaerobes）

可分为一般厌氧菌和严格厌氧菌。

食品工业中常见的厌氧菌有罐头工业的腐败菌如肉毒梭状芽孢杆菌、嗜热梭状芽孢杆菌、拟杆菌属、双歧杆菌属以及各种光和细菌和产甲烷菌等。

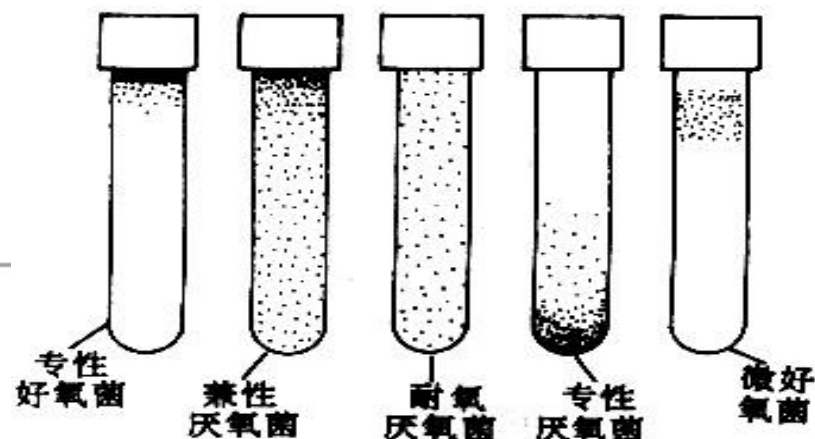
专性厌氧细菌存在于分解甲醇细菌和许多其它古生菌、硫还原细菌中，这些细菌中有许多都生活在动物肠道内。

厌氧菌的特征是：

- 分子氧存在对它们有毒，即使是短期接触空气，也会抑制其生长甚至死亡；
- 在空气或含10%CO₂的空气中，它们在固体或半固体培养基的表面上不能生长，只能在深层无氧或低氧化还原势的环境下才能生长；
- 其生命活动所需能量是通过发酵、无氧呼吸、循环光合磷酸化或甲烷发酵等提供；
- 细胞内缺乏SOD和细胞色素氧化酶，大多数还缺乏过氧化氢酶。

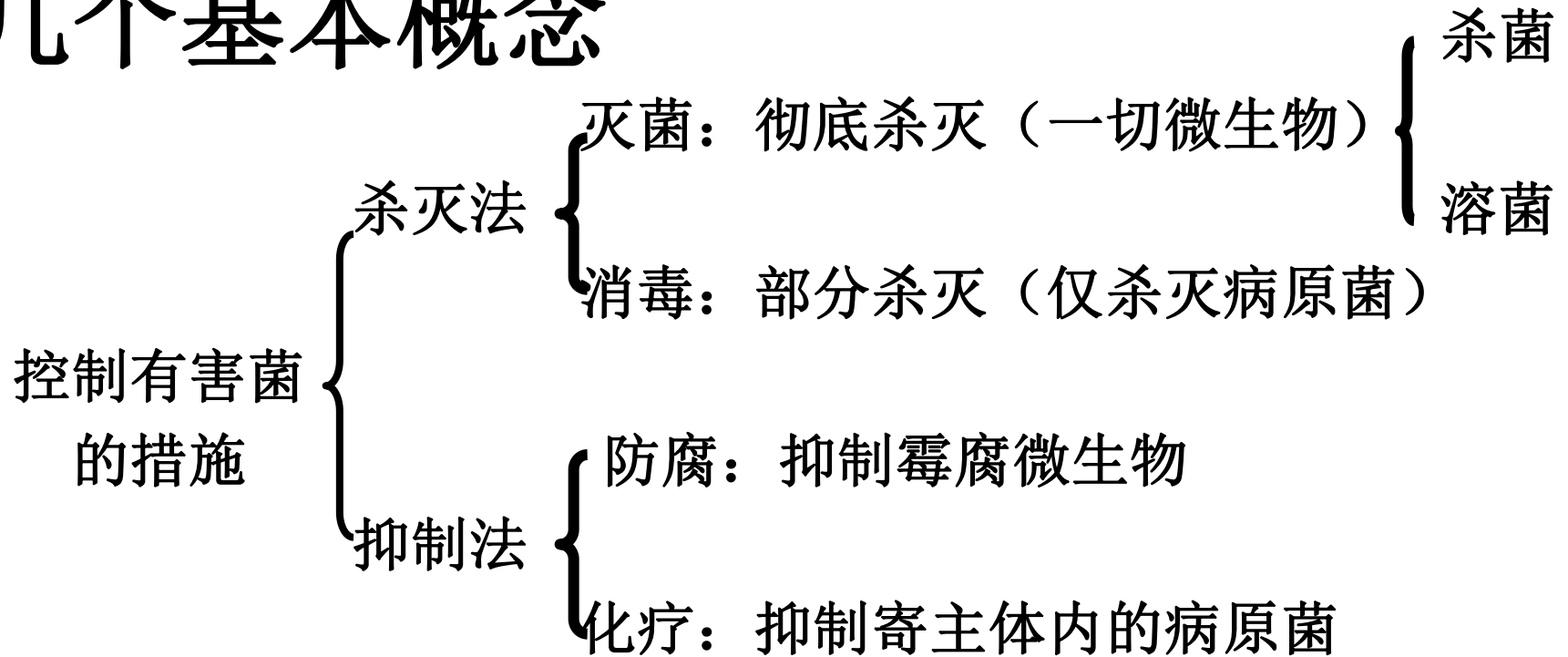
表 微生物分类和氧的需求

分类	专性好氧菌	兼性厌氧菌	微好氧菌	耐氧菌	专性厌氧菌
培养界面	仅培养表面和上层生长	培养表面和内部均有生长，上层更好	培养基表面之下的某一区域	培养下层比表面生长较好	仅培养底部生长
微生物	霉菌 产膜酵母，醋酸菌，假单胞菌，微球菌大部分，需氧芽胞杆菌，八叠球菌，无色杆菌，黄色杆菌，短杆菌属一部分。	大部分酵母 大部分细菌 肠杆菌科，葡萄球菌，气单胞菌，需氧芽胞杆菌一部分	霍乱弧菌、氢单胞菌、发酵单胞菌属	乳酸菌	梭状芽胞杆菌、拟杆菌属、甲烷球菌属



4 有害微生物的控制

几个基本概念



- 灭菌 (sterilization) : 采用强烈的理化因素使任何物体内外部的所有微生物永远丧失其生长繁殖能力的措施。
- 消毒 (disinfection) : 采用较温和的理化因素, 仅杀死物体表面或内部一部分对人体或动、植物有害的病原菌。而对被消毒的对象基本无害的措施。

- 防腐 (antisepsis) : 利用某种理化因素完全抑制霉腐微生物的生长繁殖, 即通过制菌作用防止食品、生物制品等对象发生霉腐的措施。
- 化疗 (chemotherapy) : 利用具有高度选择毒力即对病原菌具高度毒力而对其宿主基本无毒的化学物质来抑制宿主体内病原微生物的生长繁殖, 借以达到治疗该宿主传染病的一种措施。

- 商业灭菌（commercial sterilization）：指食品经过杀菌处理后，按照所规定的微生物检验方法，在所检食品中**无活的微生物检出**，或者仅能**检出极少数的非病原微生物**，并且它们在食品保藏过程中，**是不可能进行生长繁殖的灭菌方法**。

如牛奶的杀菌是指消毒；**罐藏食品的杀菌，是指商业灭菌**。

- 无菌（asepsis）：即没有活的微生物存在的意思。例如，发酵工业中菌种制备的无菌操作技术、食品加工中的无菌罐装技术等。
- 死亡（dead）。是指微生物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。

食品中 微生物控制的两个基本策略

（一）防止和杀死微生物

1. 杀菌

杀灭的物理因素

2. 抑制微生物生长

3. 过滤除菌

4. 保持无菌环境

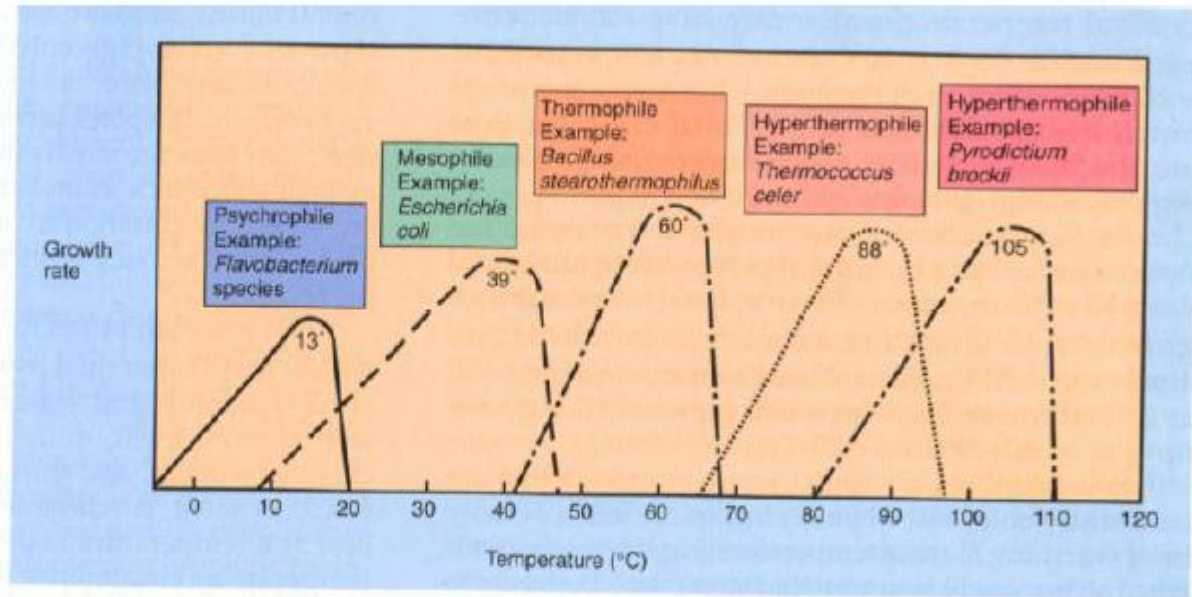
热
辐射作用
微波
超声波等

（二）促进有益微生物生长，使其抑制有害微生物生长

食品的高温杀菌

(一) 微生物的耐热性

Figure 5.13 Relation of temperature to growth rates of a typical psychrophile, a typical mesophile, a typical thermophile, and two different hyperthermophiles. The temperature optima of the example organisms are shown on the graph.

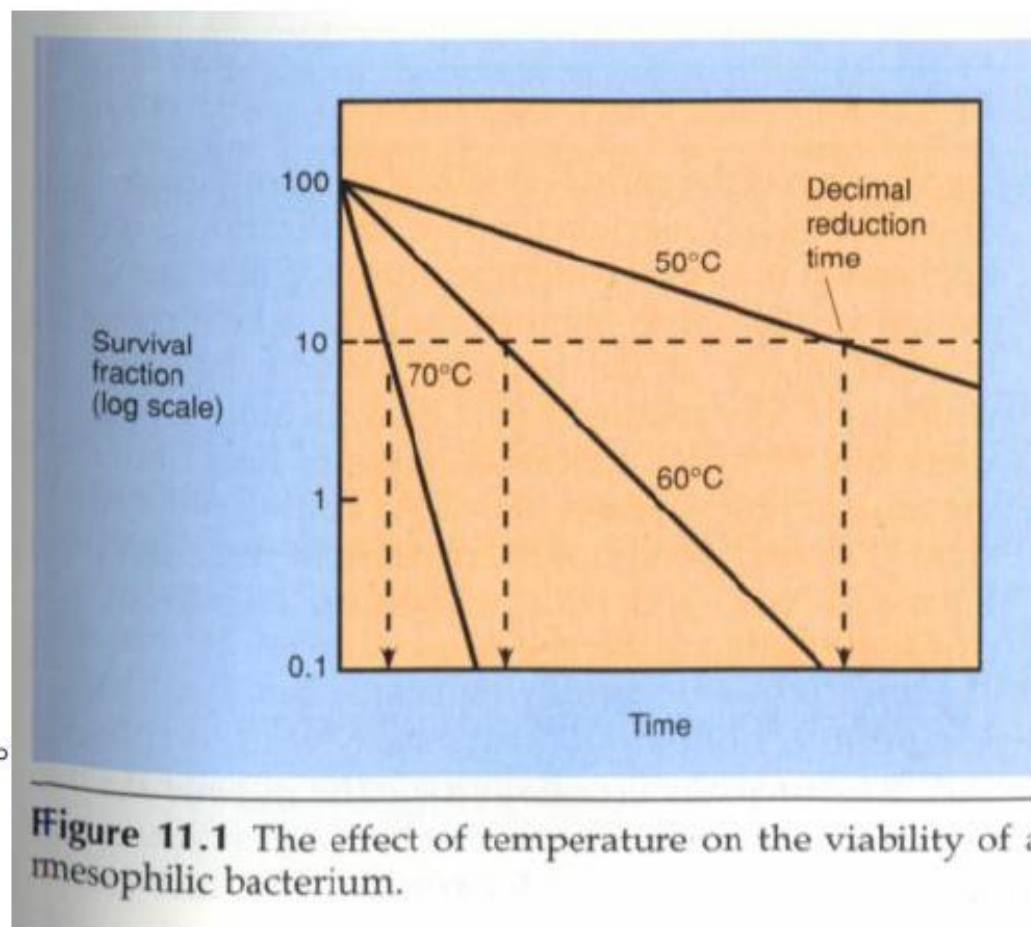


当温度超过微生物生长的最高温度或低于生长的最低温度都会对微生物产生杀灭作用或抑制作用

(二) 热对微生物的致死作用

温度愈高，十倍致死时间愈短

高温使蛋白质、核酸等重要生物大分子发生变性、破坏，以及破坏细胞膜上的类脂成分，导致微生物死亡。



热对微生物的致死作用参数

- 热力致死时间 (thermal death time, TDT): 指在特定的条件和特定的温度下, 杀死一定数量微生物所需要的时间。
- D值 (Decimal reduction time): 在一定温度下加热, 活菌数减少一个对数周期 (90%活菌) 被杀死时所需要的时间。 D_{100} $D_{121.1}$: D_r

- Z值：如果在加热致死曲线中，时间降低一个对数周期（缩短90%的加热时间）所需升高的温度。
- F值：在一定的基质中，其温度为121.1℃，加热杀死一定数量微生物所需要的时间。

影响微生物的对热抵抗力的因素：菌种、菌龄、菌体数量、基质因素、加热时间和温度

(三)影响微生物对热抵抗力的因素

1.菌种

嗜热菌的抗热力大于嗜温菌和嗜冷菌，芽孢大于非芽孢菌，球菌大于非芽孢杆菌，革兰氏阳性菌大于革兰氏阴性菌，霉菌大于酵母菌，霉菌和酵母的孢子大于其菌丝体。

2.菌龄

同样的条件下，对数生长期的菌体抗热力较差，而稳定期的老龄细胞较大，老龄的细菌芽孢较幼龄的细菌芽孢抗热力强。

3. 菌体数量

菌数愈多，抗热力愈强。

(三)影响微生物对热抵抗力的因素

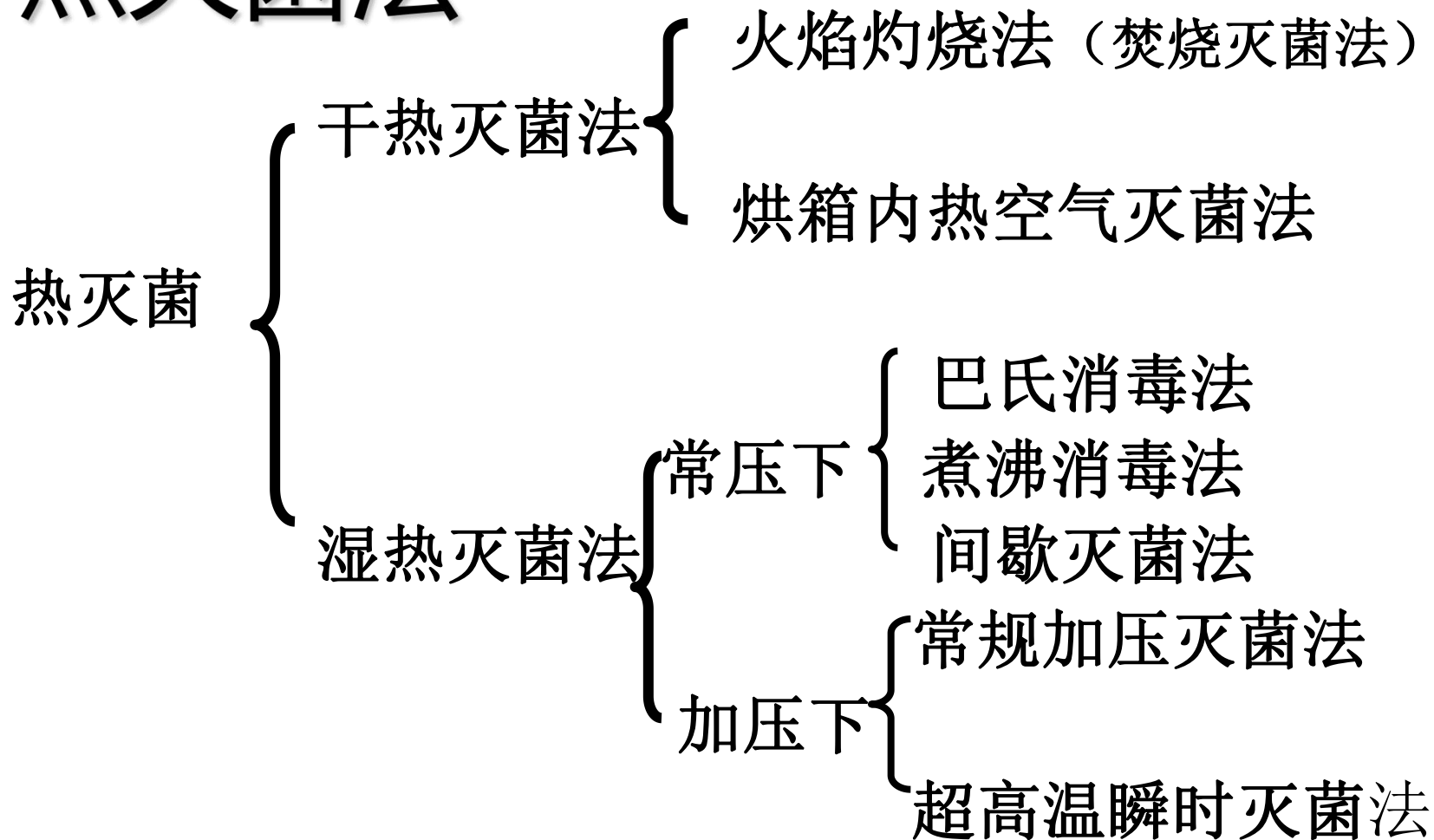
4. 基质的因素

微生物的抗热力随含水量减少而增大；微生物的抗热力随基质中的脂肪、糖、蛋白质等物质的增多而增大；微生物在pH值范围是7左右，抗热力最强。

5. 加热的温度和时间

温度越高，微生物的抗热力越弱，加热的时间越长，热致死作用越大。

热灭菌法



湿热灭菌效果比干热灭菌效果好

- 焚烧灭菌法（火焰灼烧法）

此法灭菌彻底，迅速简便，但使用范围有限。常用于接种工具、污染物品以及实验动物尸体等废弃物的处理。

- 烘烤灭菌法

主要在干燥箱中利用热空气进行灭菌。通常 160°C 处理1~2h便可达到灭菌的目的。如果被处理物传热性差、体积较大或堆积过挤时，需适当延长时间。此法只适用于玻璃器皿、金属用具等耐热物品的灭菌。其优点是可保持物品干燥。

■ 巴氏消毒法 (pasteurization)

是食品（牛奶）酿造（啤酒）工业中常用的方法。

具体做法是 $61.7\sim 62.8^{\circ}\text{C}$ 处理30min或 71.6°C 处理15min。

这样即可杀死病原微生物。又不致损坏营养，可保留食品饮料原有用味。

根据结核杆菌在 62°C 下15min被致死。

过滤除菌是将液体通过某种多孔的材料，使微生物与液体分离，现今大多用膜滤器除菌。此法可用于对热敏感液体的灭菌，如含有酶或维生素的溶液、血清等，还可用于啤酒生产代替巴氏消毒法。

■ 煮沸灭菌法（煮沸消毒法）

物品在水中煮沸 15min，可杀死所有营养细胞和一部分芽孢。在水中加入 1 % 的 Na_2CO_3 或 2 ~ 5 % 的石碳酸效果更好。此法适合注射器和解剖用具的消毒。

■ 间歇灭菌法(fractional sterilization)

◆ 是用常压蒸汽反复几次进行灭菌的方法。

◆ 主要用于不宜高压灭菌的培养基，不耐热的药物和营养物等。

◆ 方法是将待灭菌物品置于蒸锅内加热到沸腾维持15~30min杀死营养细胞，取出冷却后在37℃恒温培养24小时，使芽孢萌发，再用此法灭菌，反复三次，即可达到灭菌目的。

■ 高压蒸汽灭菌 (normal autoclaving)

是湿热灭菌中最好的方法，
通常在 $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$ 的压力下（此
时温度 121°C ）处理 $15\sim 30\text{min}$ 。

要排冷，否则会形成假压，
虽然压力达到要求，温度却达不
到相应高度，而影响灭菌效果。



低温抑菌

- 低温的作用主要是抑菌。它可使微生物的代谢活力降低，生长繁殖停滞，但仍能保持活性。
- 低温法常用于保藏食品和菌种。
- 包括冷藏法和冷冻法

- | | |
|---------|-------------|
| 1. 寒冷温度 | 介于室温和冷藏温度之间 |
| 2. 冷藏温度 | 介于0~7℃之间 |
| 3. 冻藏温度 | <0℃ |

辐射

- 辐射主要有紫外光、电离辐射、强可见光。
- 紫外线：波长265~266nm的紫外线杀菌力最强。
紫外辐射对微生物有明显的致死作用，是强杀菌剂。
紫外线穿透能力差，不易透过不透明的物质，故紫外杀菌灯只适于空气及物体表面消毒。
- 杀菌机制是复杂的，现知主要是由于它对 DNA的作用，最明显的是形成胸腺嘧啶二聚体，妨碍蛋白和酶的合成，导致细胞死亡。
- 光复活现象：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。
- 电离辐射：是指波长短、频率高、能量高的射线。能使受作用物质发生电离现象的辐射，波长<100nm；有带电粒子 α 粒子、 β 粒子和质子，还有不带电的粒子有中子、X射线、 γ 射线。

超声波

- 超声波(频率在20000Hz以上)具有强烈的生物学作用。
- 作用机制：是使**细胞破裂，内含物外溢，从而实现杀灭微生物的目的**。几乎所有的微生物都能受其破坏。
- 科研中常用此法破碎细胞，以研究细胞结构及化学组成、抗原结构和酶的活性等。

化学消毒剂

- 消毒剂和防腐剂
- 抗代谢物
- 抗生素

➤ 化学治疗剂是指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，按其作用和性质又可分为抗代谢物和抗生素。

消毒剂和防腐剂

- 消毒剂是可抑制或杀灭微生物，对人体也可能产生有害作用的化学药剂，主要用于抑制或杀灭非生物体表面、器械、排泄物和环境中的微生物。
- 防腐剂是可以抑制微生物但对人和动物毒性较低的化学药剂，可用于机体表面如皮肤、黏膜、伤口等处防止感染，也可用于食品、饮料、药品的防腐。
- 理想的消毒剂和防腐剂应具有作用快、效力大、渗透强、易配制、价格低、毒性小、无怪味的特点。

(1) 重金属

- 高浓度的重金属及其化合物都是有效的杀菌剂或防腐剂，其作用最强的是Hg、Ag和As。
- 升汞 1 : (500~2000) 液可杀灭大多数细菌，腐蚀金属，对动物有剧毒，常用于组织分离时外表消毒和器皿消毒。
- 红汞 2%红汞水溶液即红药水常消毒皮肤、黏膜及小创伤，不可与碘酒共用。
- 银是温和的消毒剂，0.1%~1%硝酸银可消毒皮肤，1%硝酸银可防治新生儿传染性眼炎。硫酸铜对真菌和藻类有强杀伤力，与石灰配制的波尔多液可防治某些植物病害。

(2) 酚类

低浓度的酚可破坏细胞膜组分，高浓度的酚可凝固菌体蛋白。酚还能破坏结合在膜上的氧化酶与脱氢酶，引起细胞的迅速死亡。

石炭酸 0.5%可消毒皮肤，2%~5%可消毒痰、粪便与器皿，5%可喷雾消毒空气。

甲酚 是酚的衍生物，杀菌效果比苯酚强几倍，但在水中的溶解度较低，可在皂液或碱性溶液中形成乳浊液。市售的消毒剂来苏尔就是甲酚与肥皂的混合液，常用3%~5%的溶液消毒皮肤、桌面及用具。

(3) 醇类

醇类是脱水剂、蛋白质变性剂，也是脂溶剂，可使蛋白质脱水、变性，损害细胞而具杀菌能力。

70%乙醇杀菌效果最好，常用于皮肤及器械的消毒。

醇类物质，随着分子量的增大，杀菌力增强。例如戊醇 > 丁醇 > 丙醇 > 乙醇 > 甲醇。那些高级醇虽杀菌力强于乙醇，由于丙醇以上的醇不易与水相混，故一般不用作消毒剂。

(4) 醛类

醛类的作用主要是使**蛋白质烷基化**，**改变酶或蛋白质的活性**，使微生物的生长受到抑制或死亡。

常用的醛类是甲醛，37%~40%甲醛溶液称福尔马林，因有刺激性和腐蚀性，不宜在人体使用，常以2%甲醛溶液浸泡器械，10%甲醛溶液进行熏蒸以消毒厂房、无菌室或者传染病患者的家具、房屋等。

(5) 表面活性剂

- 主要是破坏菌体细胞膜的结构，造成胞内物质泄漏、蛋白质变性、菌体死亡。
- 肥皂 一种阴离子表面活性剂，对肺炎链球菌或链球菌有效，但对葡萄球菌、结核分枝杆菌无效，0.25%的肥皂溶液对链球菌的作用比0.7%来苏尔或0.1%的升汞还强，但一般认为肥皂的作用主要是机械地移去微生物，微生物附着于肥皂泡沫中被水冲洗掉。
- 新洁尔灭 人工合成的季铵盐阳离子表面活性剂，0.05%~0.1%新洁尔灭溶液用于皮肤、黏膜和器械消毒。

(6) 染料

- 一些碱性染料的阳离子可与菌体的羧基或磷酸基作用，形成弱电离的化合物，妨碍菌体的正常代谢，抑制生长。例如：结晶紫。

(7) 氧化剂类

- 氧化剂作用于蛋白质的**巯基，使蛋白质和酶失活**，强氧化剂还可破坏蛋白质的氨基和酚羟基。
- 常用的氧化剂有 O_3 、卤素（碘酒、氯气漂白粉等）、过氧乙酸、过氧化氢、高锰酸钾。

(8) 酸碱类

- 强酸与强碱具有杀菌力。
- 无机酸如硫酸、盐酸等杀菌力虽强，但腐蚀性大，实际上不宜作消毒剂。某些有机酸如苯甲酸可用作防腐剂。酸菜、饲料青贮则是利用乳酸菌发酵产生的乳酸抑制腐败性微生物的生长，使之得以久贮存。
- 强碱可用作杀菌剂，但由于它们的毒性大，其用途局限于对排泄物及仓库、棚舍等环境的消毒。

控制食品中微生物的化学物质

化学物质的抗微生物能力的测定



液体培养法

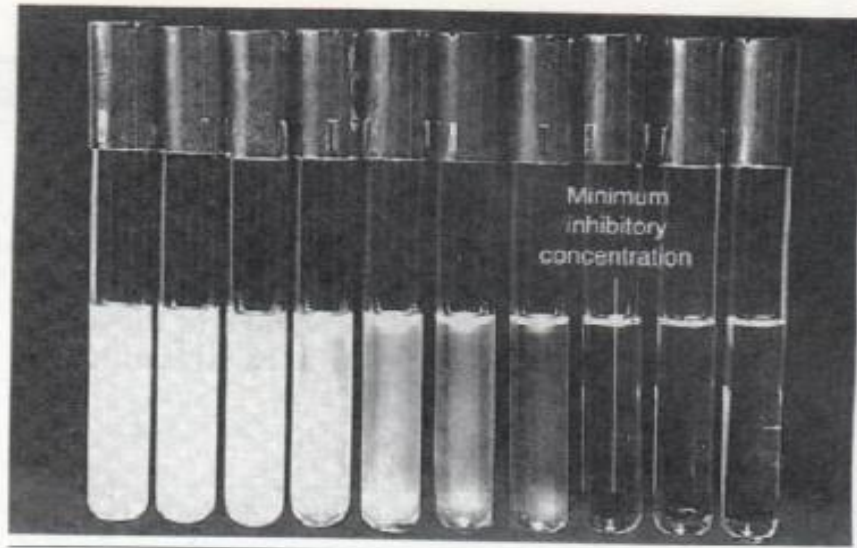
最低抑制浓度 (minimum inhibitory concentration (MIC)) 实验

平板培养法

抑菌圈 (zone of inhibition) 试验

对杀菌或抑菌作用无法区分

最低抑制浓度实验



T. D. Block

Figure 11.11 Antibiotic assay by tube dilution, permitting detection of the *minimum inhibitory concentration* (MIC). A series of increasing concentrations of antibiotic is prepared in the culture medium. Each tube is inoculated, and incubation is allowed to proceed. Growth (turbidity) occurs in those tubes with antibiotic concentrations below the MIC.

抑菌圈试验

