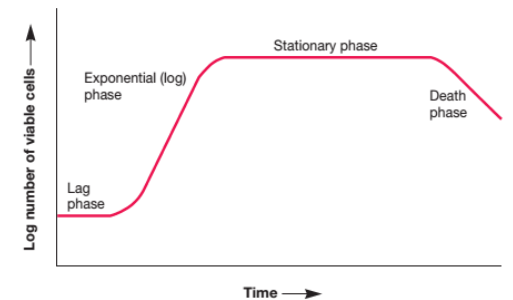




Chapter 5

the growth and control of microorganism

the paramount evolutionary accomplishment of bacteria as a group is rapid, efficient cell growth in many environments —J. L. Ingraham, O. Maaløe, and F. C. Neidhardt





概论

- ◆ 微生物的生长是细胞物质有规律的、不可逆地增加，导致细胞导致细胞体积扩大化的生物学过程，这是个体生长的概念。
- ◆ 繁殖是微生物生长到一定的阶段由于细胞结构的复制和重建并通过特殊的方式产生新的生命个体，即引起生命个体数量增加的生物学过程。
- ◆ 生长是量变的概念，而繁殖是质变的结果。然而微生物个体微小，这种特点决定了研究微生物时，不是研究单个的微生物细胞，而是通过群体来进行。因此，微生物个体生长和繁殖一般是相同的表述。
- ◆ 只有了解微生物生长和繁殖的规律和特点，才能对微生物的生长进行针对性的控制，尤其对病原微生物的控制，构成了对传染性病原的深入研究；而工业发酵的成功，归功于对微生物生长和控制的完美利用。



主要内容

1. 微生物的生长

- ◆ 原核细胞的分裂;
- ◆ 微生物的生长曲线;
- ◆ 微生物培养的方法;
- ◆ 环境因子对微生物生长的影响;
- ◆ 在自然环境中微生物的生长

2. 微生物的控制

- ◆ 重要的常用的概念;
- ◆ 微生物死亡的方式;
- ◆ 不同条件影响抗微生物因子的效果;
- ◆ 理、化因子
- ◆ 抗菌因子的评价



5.1 微生物的生长

细胞分裂是生物自我复制的极端重要的机制，是生命科学最基本的问题之一，认识和解读细胞分裂的奥秘，是生命科学重大的课题。

- ◆ 细菌的分裂有一套精确而严格的机制来提供保障，有严格的时间、空间的时位性，涉及到众多基因的参与和调控，是许多蛋白协调配合、精确合作的结果；
- ◆ 细菌的分裂首先涉及到DNA的复制和肽聚糖合成的引发，涉及到负调控因子的限制和分裂复合体（divisome）的装配，尤其是FtsZ蛋白在细胞中间形成Z环，是细菌分裂的标志性事件；
- ◆ Z环形成后，紧接着在众多蛋白的参与下，分裂复合体（divisome）的装配完成，然后间隔形成，Z环收缩，缢裂痕处肽聚糖水解，细胞分离，成为两个同样大小的子细胞。

大肠杆菌*E. coli*和枯草芽孢杆菌*B. subtilis*是研究细菌分裂的代表菌。



5.1 微生物的生长

◆ 原核细胞的分裂

细胞周期 (cell cycle) :

从产生的新细胞到下一次分裂的开始之间的完整过程。

主要事件

DNA的复制和分配

细胞质的合成与分配

Figure 5.1 Binary Fission.

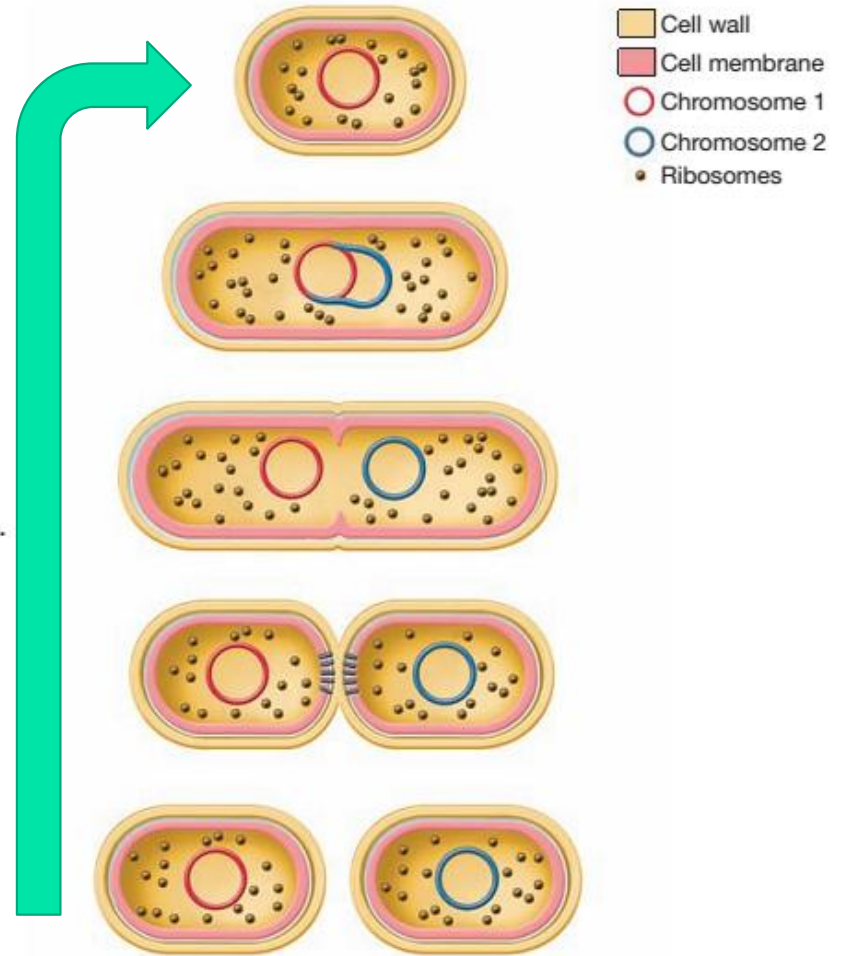
(a) A young cell at early phase of cycle

(b) A parent cell prepares for division by enlarging its cell wall, cell membrane, and overall volume.

(c) The septum begins to grow inward as the chromosomes move toward opposite ends of the cell. Other cytoplasmic components are distributed to the two developing cells.

(d) The septum is synthesized completely through the cell center, and the cell membrane patches itself so that there are two separate cell chambers.

(e) At this point, the daughter cells are divided. Some species separate completely as shown here, while others remain attached, forming chains, doublets, or other cellular arrangements.





5.1 微生物的生长

DNA的复制与分配

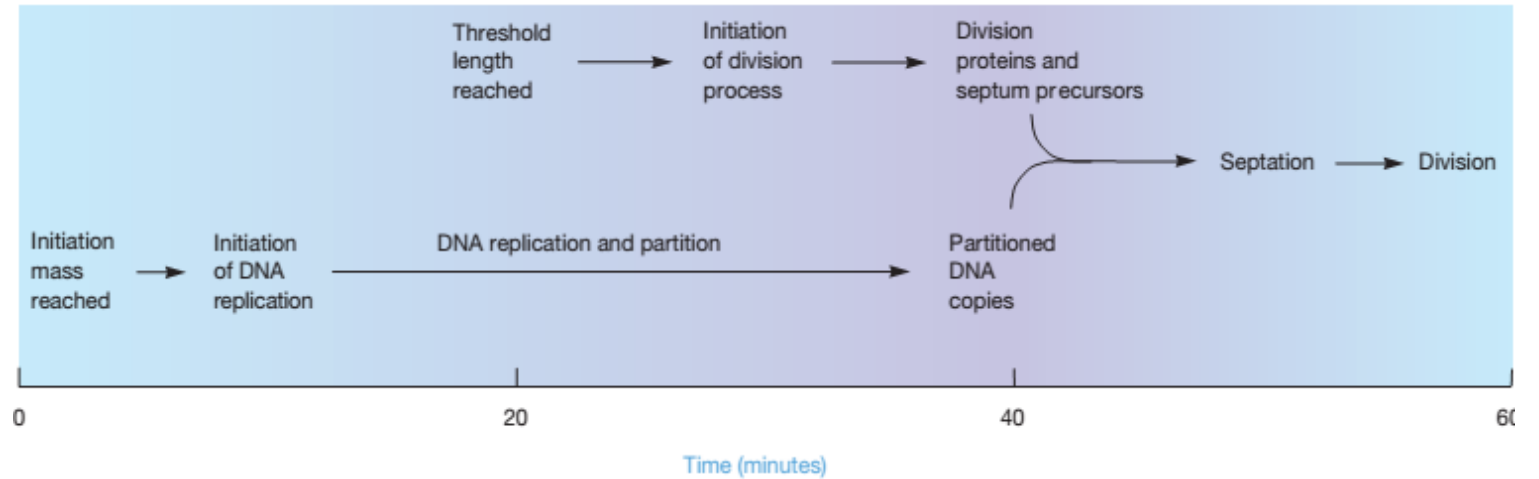
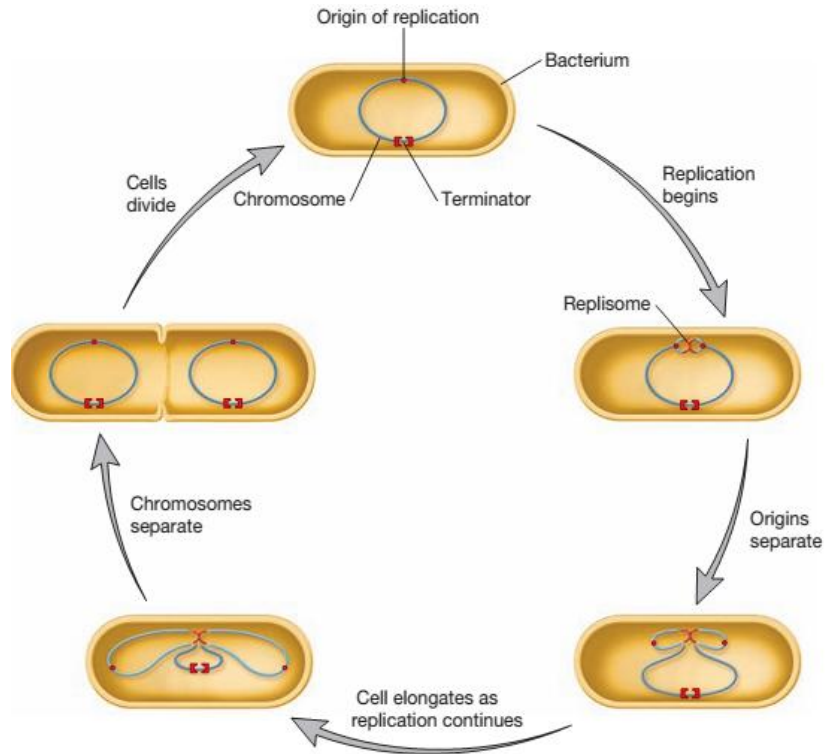


Figure 6.2 The Cell Cycle in *E. coli*. A 60-minute interval between divisions has been assumed for purposes of simplicity (the actual time between cell divisions may be shorter). *E. coli* requires about 40 minutes to replicate its DNA and 20 minutes after termination of replication to prepare for division. The position of events on the time line is approximate and meant to show the general pattern of occurrences.



5.1 微生物的生长

细胞质的复制与分配

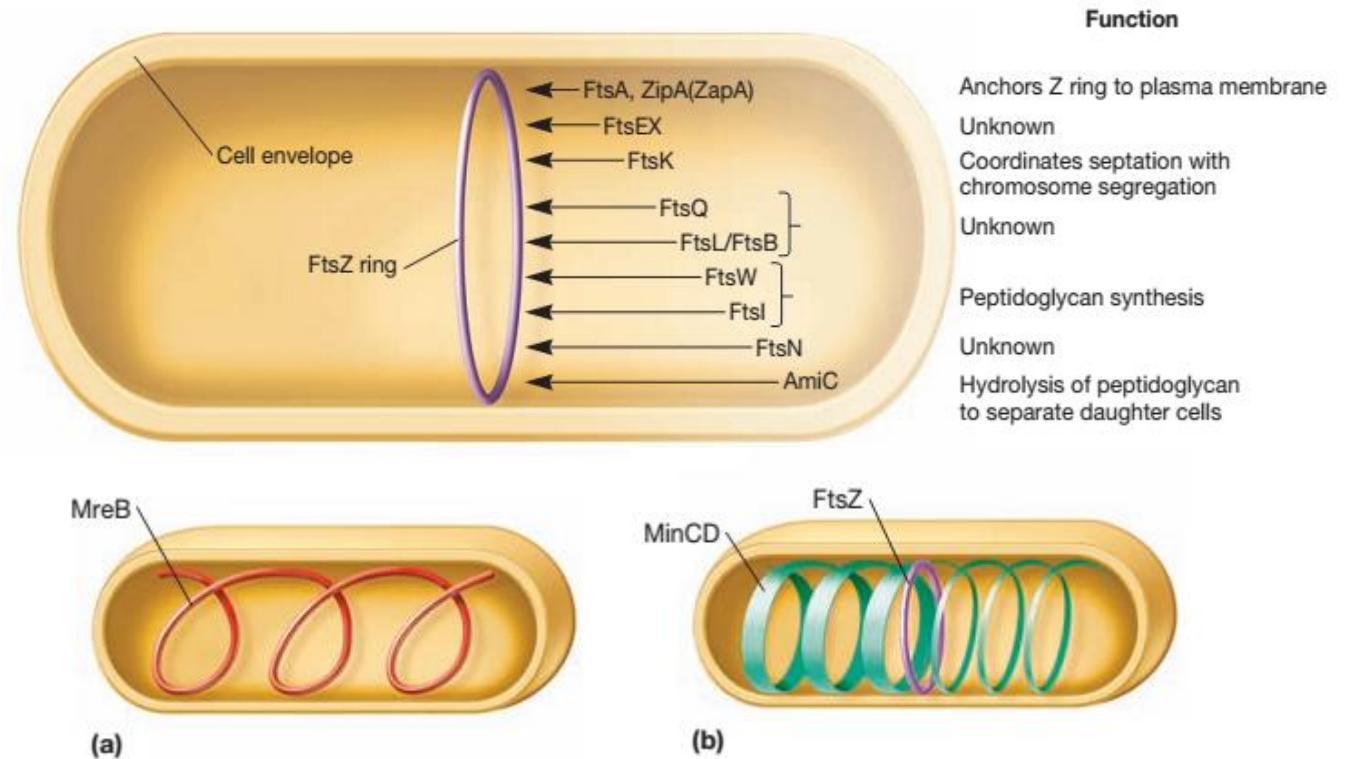
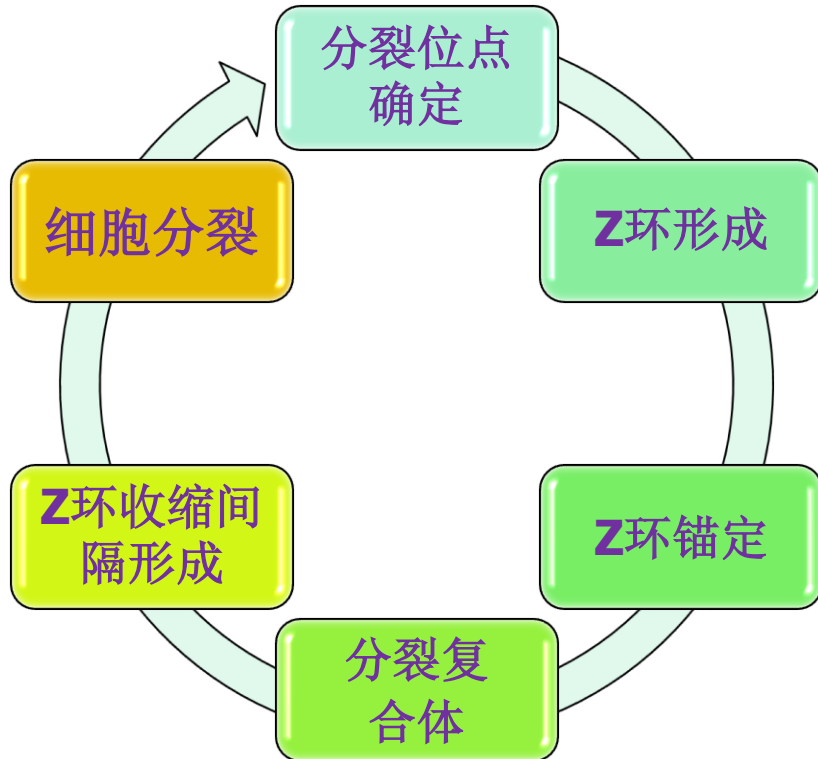


Figure 6.4 Cytoskeletal Proteins Involved in Cytokinesis in Rod-Shaped Bacteria.



1.3 细菌的分裂

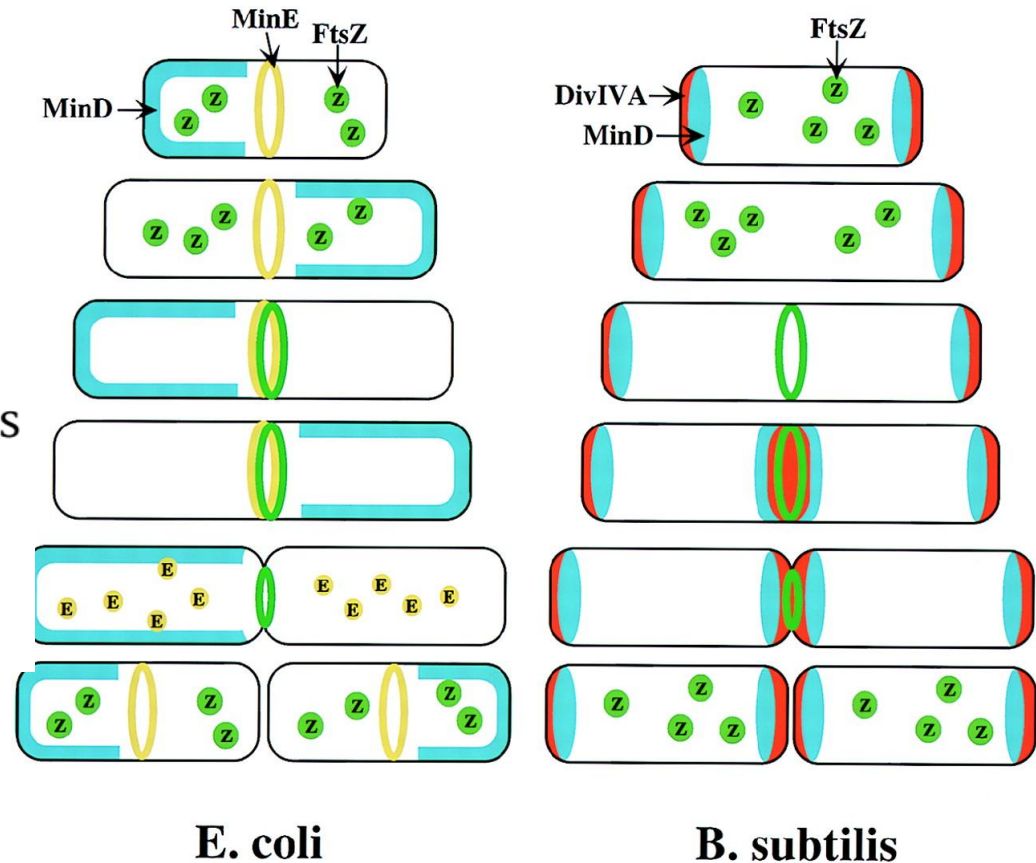
拓展阅读:

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <http://www.researchgate.net/publication/6699522>

Bacterial Cell Division: The Mechanism and Its Precision

ARTICLE in INTERNATIONAL REVIEW OF CYTOLOGY · FEBRUARY 2006

Impact Factor: 9 · DOI: 10.1016/S0074-7696(06)53002-5 · Source: PubMed





5.1 微生物的生长

◆ 微生物的生长曲线

细菌群体生长的规律

- 把少量纯种单细胞微生物接种到恒容积的液体培养基中后，在适宜的条件下【温度、通气（厌氧菌则不通气）等】培养，它们的群体就会有规律地生长起来。
- 在细菌的生长的过程中，细菌菌体吸收营养，开始分裂繁殖，数目逐渐增加，直到达到最高菌体数；随着营养物质的耗尽和代谢废物的积累，细菌的分裂减少，数目稳定下来，逐渐出现细胞死亡；
- 如以细胞数目的对数值作纵坐标，以培养时间作横坐标，就可以画出一条有规律的曲线，这就是微生物的典型生长曲线。



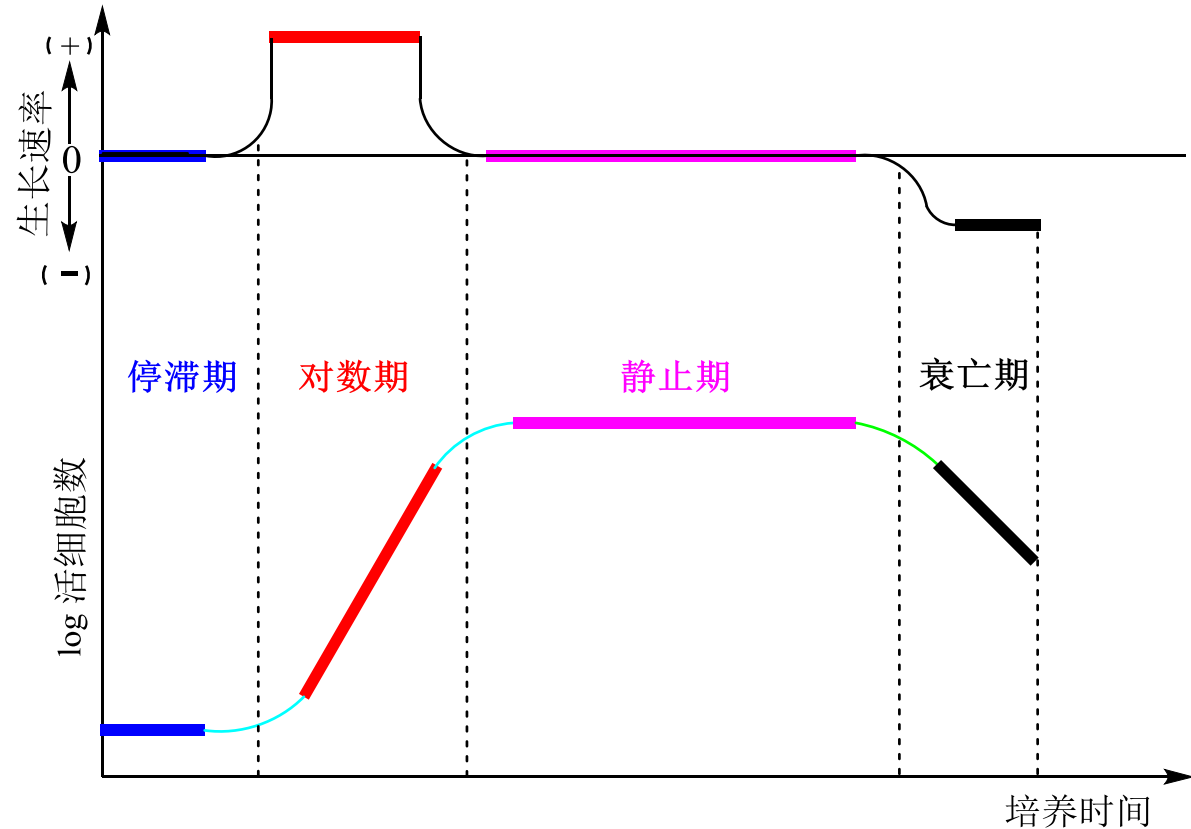
5.1 微生物的生长

◆ 微生物的生长曲线

一般可把典型生长曲线粗分为四个阶段

- ① 延滞期 (lag phase)
- ② 指数期 (exponential phase)
- ③ 稳定期 (stationary phase)
- ④ 衰亡期 (decline phase)

➤ 每个时期微生物都有自身的特点。



封闭系统中的细菌的典型生长曲线



5.1 微生物的生长

1、延滞期：分裂迟缓,代谢活跃

- ①生长速率常数等于零;
- ②细胞形态变大;
- ③细胞内**RNA**尤其是**rRNA**含量增高;
- ④合成代谢活跃,核糖体、酶类、**ATP**合成加快;
- ⑤对外界不良条件,如盐浓度、温度和抗生素等化学药物的反应敏感。

◆ 影响延滞期长短的因素:

- (1) **菌种特性**;
- (2) **接种龄**;

即“种子”的群体生长年龄,亦即它处在生长曲线上的哪一阶段。实验证明,如果以对数期接种龄的“种子”接种,则子代培养物的延滞期就短;反之,如以延滞期或衰亡期的“种子”接种,则子代培养物的延滞期就长;

- (3) **接种量**;

接种量的大小明显影响延滞期的长短。一般说来,接种量大,则延滞期短,反之则长。

- (4) **培养基成分**;

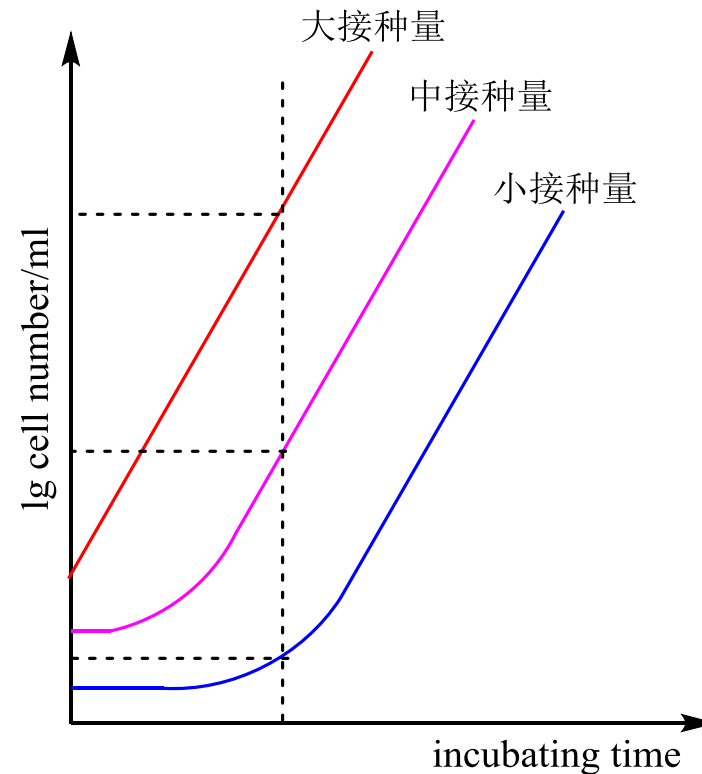
接种到营养丰富的天然培养基中的微生物,要比接种到营养单调的组合培养基中的延滞期短。所以,在发酵生产中,常使发酵培养基的成分与原培养基的成分尽量接近。



5.1 微生物的生长

◆ 缩短迟缓期的措施

- ①通过遗传学方法改变种的遗传特性；
 - ②利用对数生长期的细胞作为“种子”；
 - ③尽量使接种前后所使用的培养基组成差别不大；
 - ④适当扩大接种量；
- ✓ 接种量的大小，通过实验来进一步确定。右图反映了接种量大小对延滞期的一般性的影响趋势。



接种量对延滞期的影响



5.1 微生物的生长

2、对数生长期：菌体数目按几何级增加

特点：

- ①生长速率最大
- ②细胞进行平衡生长，菌体内各种成分最为均匀
- ③酶系活跃，代谢旺盛

应用：

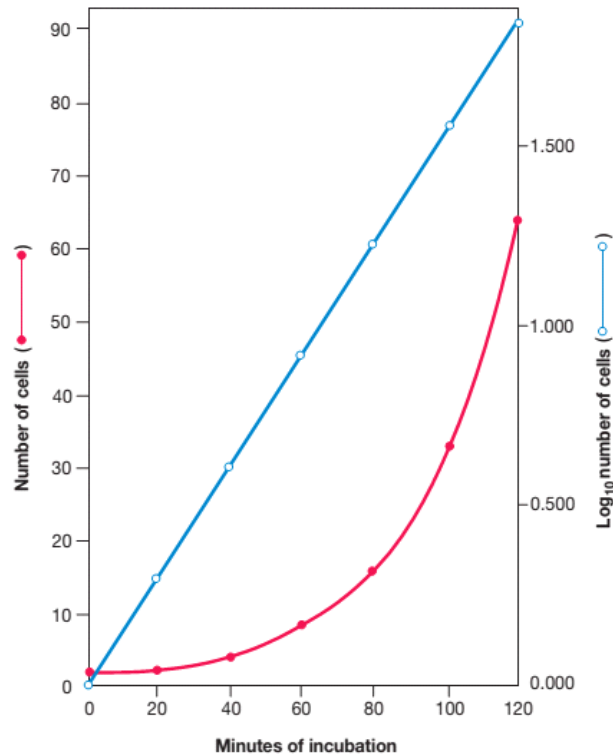
指数期的微生物群体的生理特性较一致，细胞成分平衡发展，生长速率恒定，故：

- ①为代谢、生理等研究的良好材料，
- ②增殖噬菌体的最适宿主菌龄，
- ③发酵生产中用作“种子”的最佳种龄。



5.1 微生物的生长

◆ 指数期菌体生长的数学模型



N_0 = 开始时的细胞数

N_t = 在时间 t 内的细胞总数

n = 在时间 t 内的繁殖代数

R = 生长速率常数

G = 代时

$$N_t = N_0 \times 2^n$$

$$\lg N_t = \lg N_0 + n \lg 2$$

$$n = \frac{\lg N_t - \lg N_0}{\lg 2} = \frac{\lg N_t - \lg N_0}{0.301}$$

$$R = \frac{n}{t} = \frac{\lg N_t - \lg N_0}{0.301t}$$

If $t = G$ then, $N_t = 2N_0$

$$R = \frac{n}{t} = \frac{\lg N_t - \lg N_0}{0.301t}$$

$$= \frac{n \lg 2 + \lg N_0 - \lg N_0}{0.301G}$$

$$R = \frac{1}{G} \implies G = \frac{1}{R}$$



5.1 微生物的生长

Table 6.2 Examples of Generation Times ^a		
Microorganism	Incubation Temperature (°C)	Generation Time (Hours)
Bacteria		
<i>Beneckeia natriegens</i>	37	0.16
<i>Escherichia coli</i>	40	0.35
<i>Bacillus subtilis</i>	40	0.43
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	0.47
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37	0.58
<i>Clostridium botulinum</i>	37	0.58
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	25	4.6–5.3
<i>Anabaena cylindrica</i>	25	10.6
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	37	≈12
<i>Treponema pallidum</i>	37	33

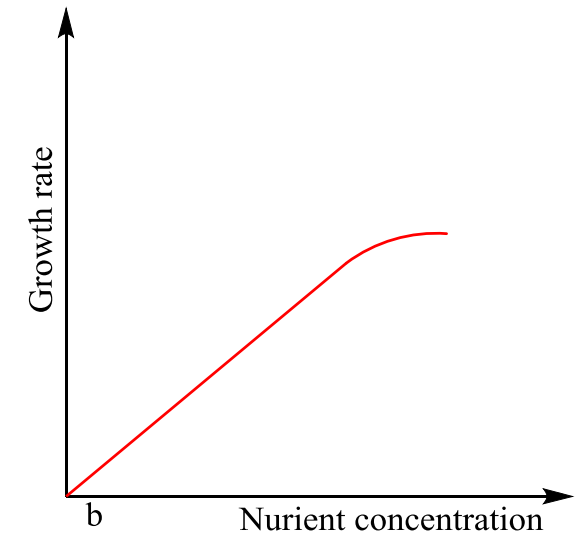
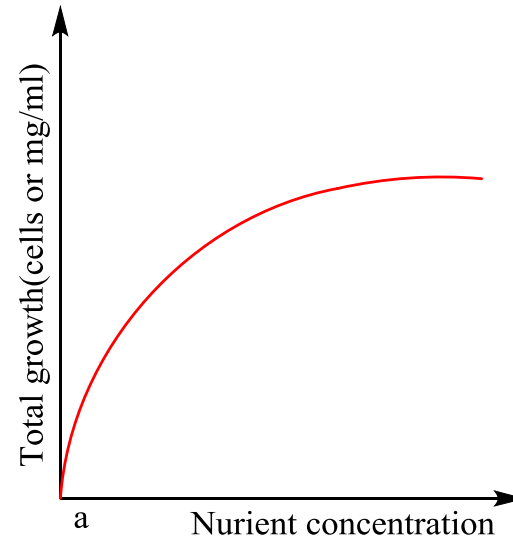
Protists		
<i>Tetrahymena geleii</i>	24	2.2–4.2
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	25	5.9
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	25	7.75
<i>Asterionella formosa</i>	20	9.6
<i>Leishmania donovani</i>	26	10–12
<i>Paramecium caudatum</i>	26	10.4
<i>Euglena gracilis</i>	25	10.9
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30	11–12
<i>Giardia lamblia</i>	37	18
<i>Ceratium tripos</i>	20	82.8
Fungi		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	2
<i>Monilinia fructicola</i>	25	30

^a Generation times differ depending on the growth medium and environmental conditions used.



◆影响对数生长期的因素:

- ① 菌种;
- ② 营养成分;
- ③ 营养物的浓度;
- ④ 培养温度。



营养物质浓度和生长的关系

a图: 限制性的营养物质的浓度对细胞总产量的影响 b图: 限制性的营养物质对生长速率的影响

✓ 生长限制因子 (growth limiting factors): 凡处于较低浓度范围内可影响生长速率和菌体产量的某种营养物, 如上图。



5.1 微生物的生长

3、稳定生长期：菌体产量达到了最高点。

特点：

- 生长速率常数等于0；
- 细胞开始贮存糖原、异染颗粒和脂肪等贮藏物；
- 细胞DNA浓缩，细胞体积缩小，细胞壁交联度提高，更能抵抗饥饿及损伤；
- 多数芽孢杆菌在这时开始形成芽孢；
- 有的微生物在稳定期时还开始合成抗生素等次级代谢产物；
- 一些病原变得更有毒力。

稳定期到来的原因：

- ① 营养物尤其是生长限制因子的耗尽；
- ② 营养物的比例失调，例如C / N比值不合适等
- ③ 酸、醇、毒素或 H_2O_2 等有害代谢产物的累积
- ④ pH、氧化还原势等物化条件越来越不适宜

应用：

稳定期是以生产菌体或与菌体生长相平行的代谢产物，例如单细胞蛋白、乳酸等为目的的一些发酵生产的最佳收获期

此外，由于对稳定期到来的原因进行研究，还促进了连续培养技术的设计和研究。



5.1 微生物的生长

4、衰亡期：整个细胞群体呈现负生长特点：

- ①个体死亡速度超过新生速度；
- ②细胞活力丢失但并没有伴随着菌体消失，有部分细胞自溶；
- ③产生或释放抗生素等次生代谢产物；芽孢释放。

产生衰亡期的原因

主要是外界环境对生长越来越不利，从而引起细胞内的分解代谢大大超过合成代谢，继而导致菌体进入衰亡状态。

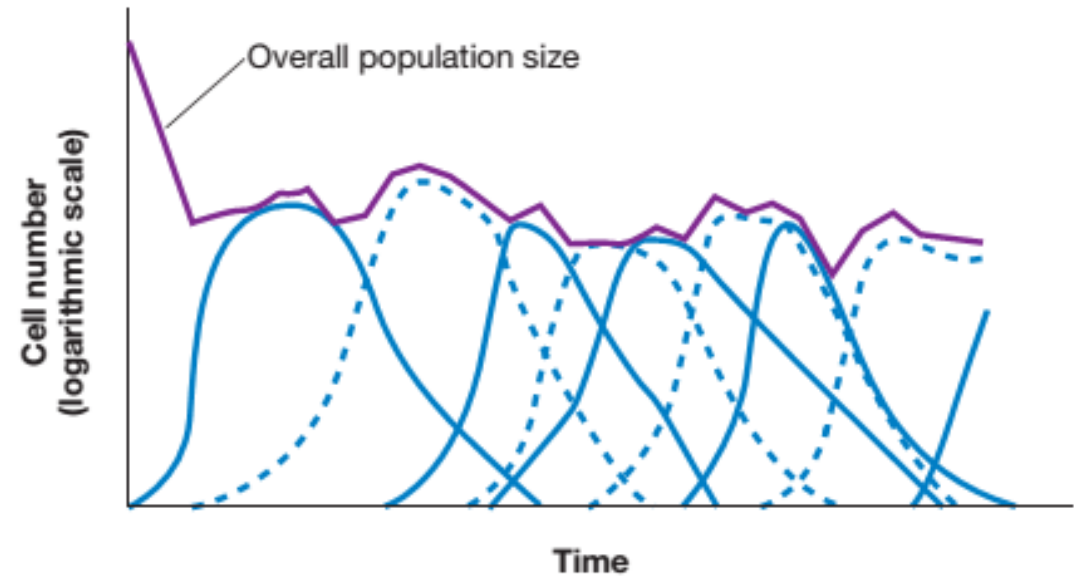


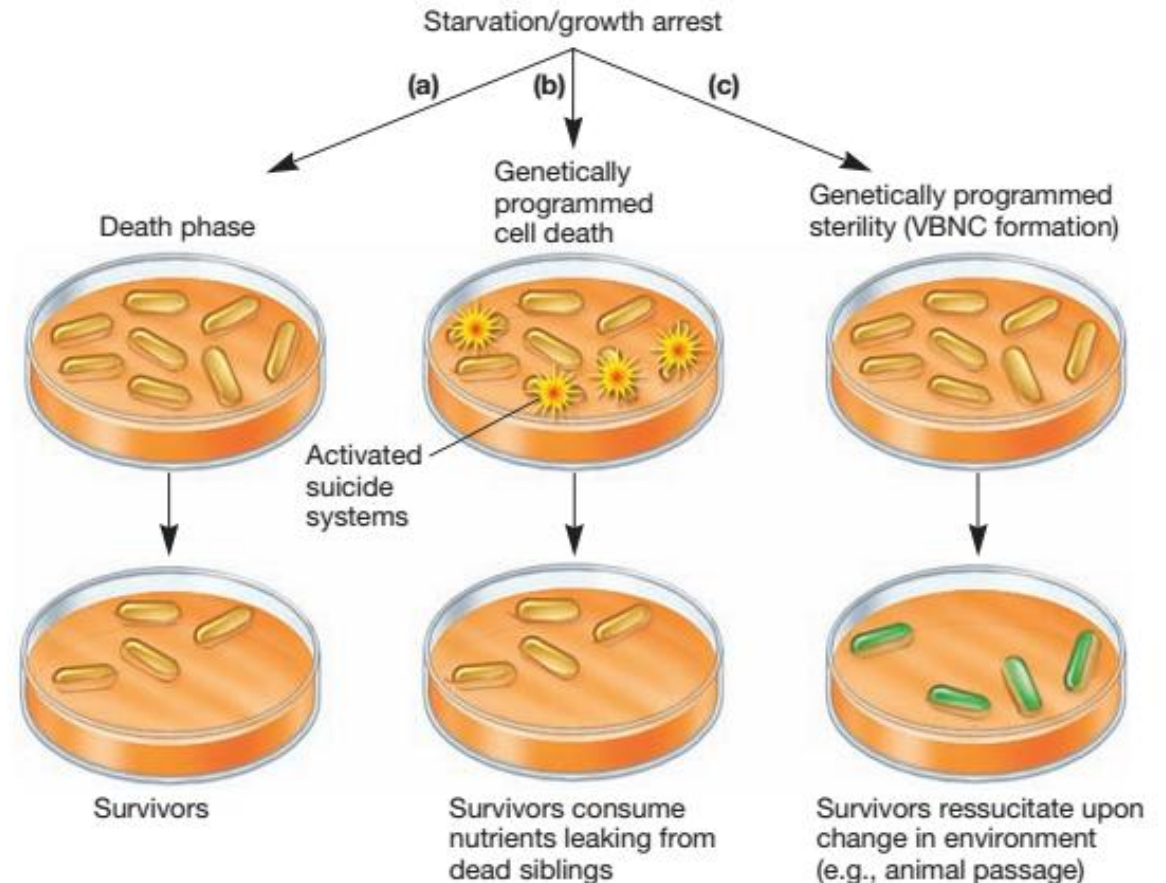
Figure 6.9 Prolonged Decline in Growth. Instead of a distinct death phase, successive waves of genetically distinct subpopulations of microbes better able to use the released nutrients and accumulated toxins survive. Each successive solid or dashed curve represents the growth of a new subpopulation.



5.1 微生物的生长

◆ 关于衰亡期细胞的两种假说:

- **休眠假说:** 在衰亡期, 出现休眠细胞 (viable but nonculturable cell, VBNC)。受饥饿状态的影响, 细胞进入休眠状态, 即不能在实验室培养但保持生命力的状态, 当条件适宜时, 恢复活力;
- **凋亡假说:** 当进入衰亡期, 一部分细胞发扬利他精神 (altruistic), 进入程序性死亡 (programmed cell death)。其细胞完好而内容物泄露, 成为其他细胞的营养物质, 仿佛“舍己为人”。





5.1 微生物的生长

◆ 微生物生长的测量 (measurement of microbial growth)

微生物的生长繁殖的变化主要体现在两个方面：

- 细胞的数量；
- 菌体的密度

针对两方面对微生物的生长进行测量；

- 统计细胞数量：血细胞平板计数法；
倍比稀释涂平板法
- 测量菌体密度：紫外分光光度计

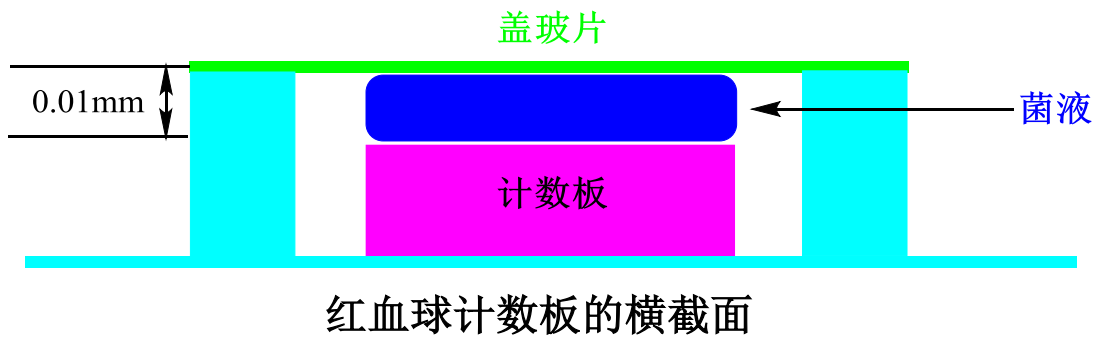
✓ 微生物细胞的测量，每种方法都不可能尽善尽美，实验中应根据实验的目的设计合适的方法



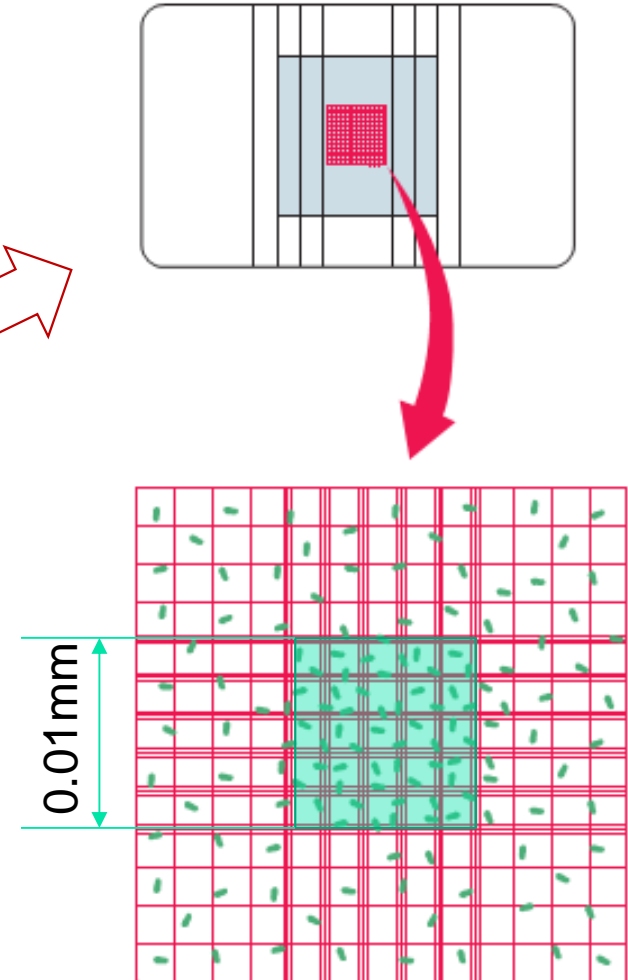
5.1 微生物的生长

1. 显微镜直接计数法

采用细菌计数板或血球计数板，在显微镜下对微生物数量进行直接计数（计算一定容积里样品中微生物的数量）。



- 盖玻片与计数板的距离：0.01mm，5个小格的总长：0.01mm，
则细胞数目/mm³ = 细胞数/小格 x 25 x 100





缺点：

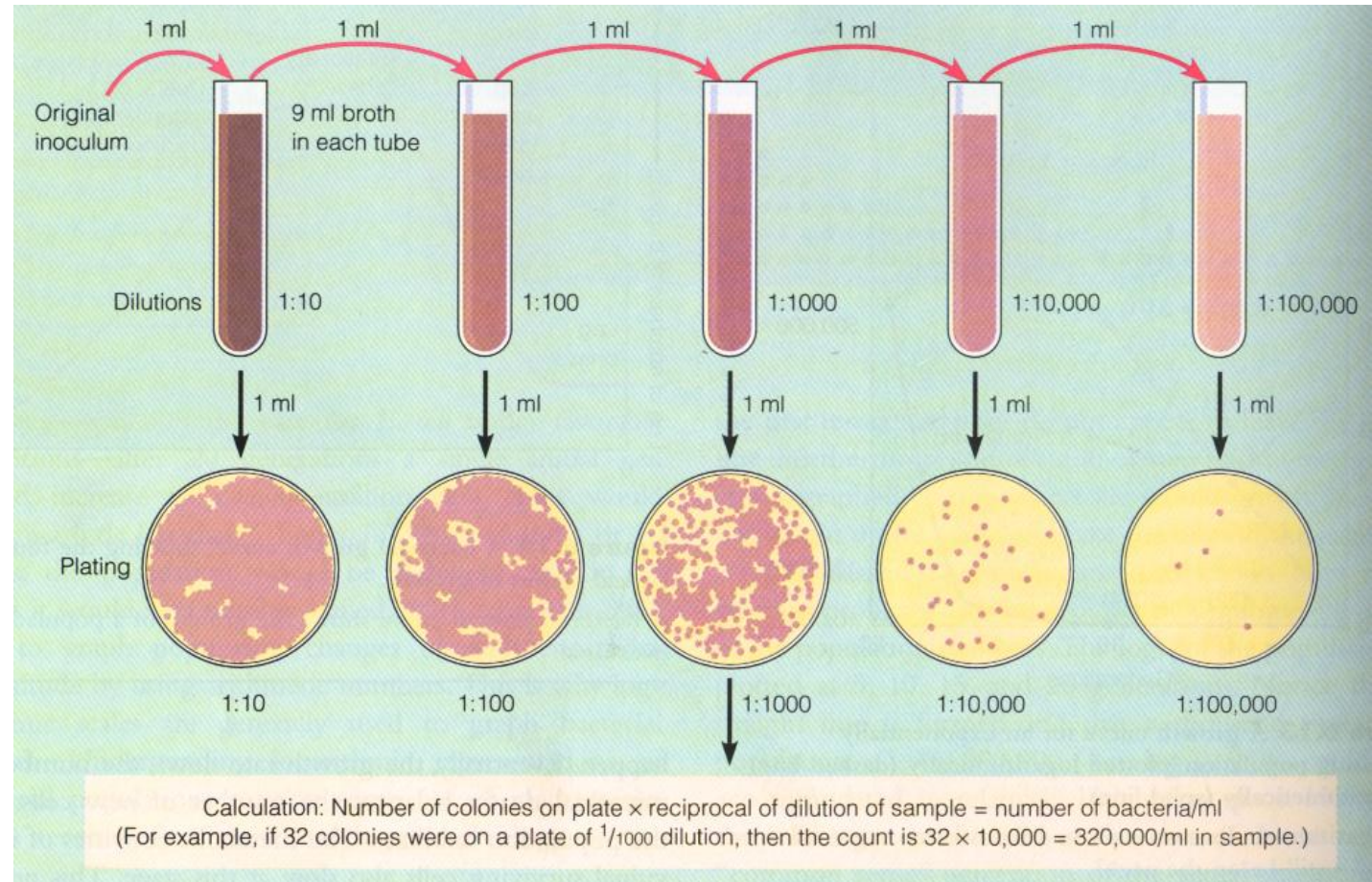
- 不能区分死菌与活菌；
- 不适于对运动细菌的计数；
- 需要相对高的细菌浓度；
- 个体小的细菌在显微镜下难以观察。



5.1 微生物的生长

2. 稀释推平板法:

- 从样品液中取1ml，加入9ml的无菌水，摇匀后，则样品稀释了10倍；再取1ml加入下一管中，如此重复，直至稀释到 10^{-6} ， 10^{-7} ；
- 从每个洗试度管中取1ml，均匀涂布于固体培养平板，每个稀释度做3个平行；
- 培养24小时后，观察菌落进行计数；
- 选择30-300个菌落的平板统计求平均值。





5.1 微生物的生长

采用培养平板计数法要求操作熟练、准确，否则难以得到正确的结果：

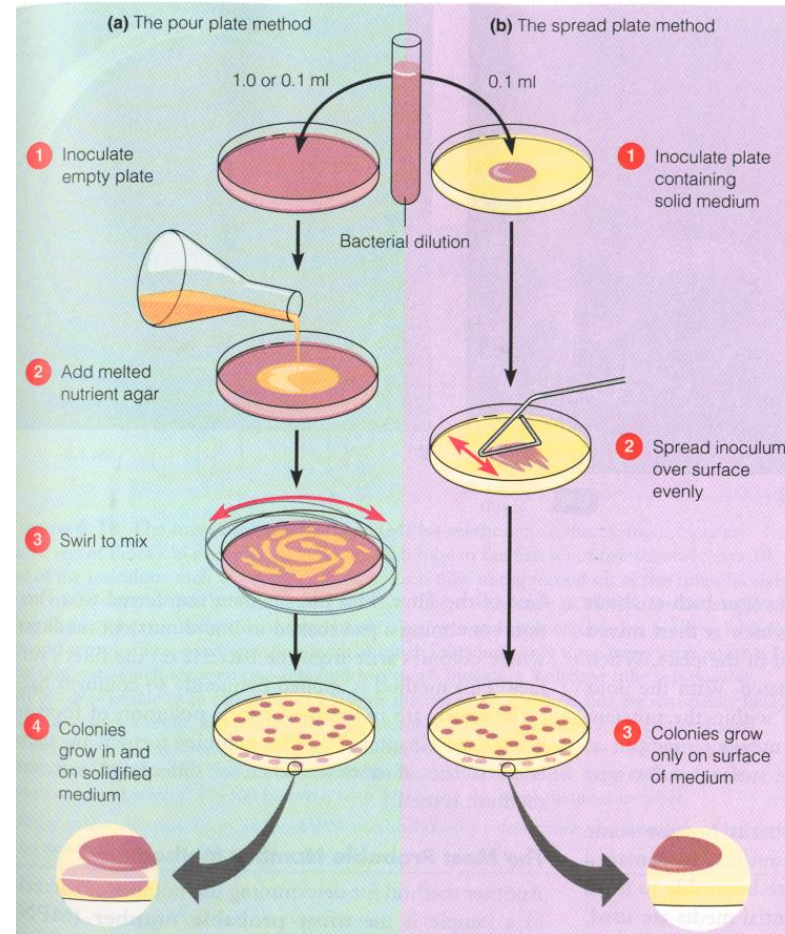
样品充分混匀；

每支移液管及涂布棒只能接触一个稀释度的菌液；

同一稀释度三个以上重复，取平均值；

每个平板上的菌落数目合适，便于准确计数；

一个菌落可能是多个细胞一起形成，所以在科研中一般用菌落形成单位（colony forming units, CFU）表示，而不是直接表示为细胞数。





5.1 微生物的生长





5.1 微生物的生长

3. 膜过滤法

当样品中菌数很低时，可以将一定体积的湖水、海水或饮用水等样品通过膜过滤器。然后将滤膜覆盖在固体平板培养，24小时后统计细菌数；

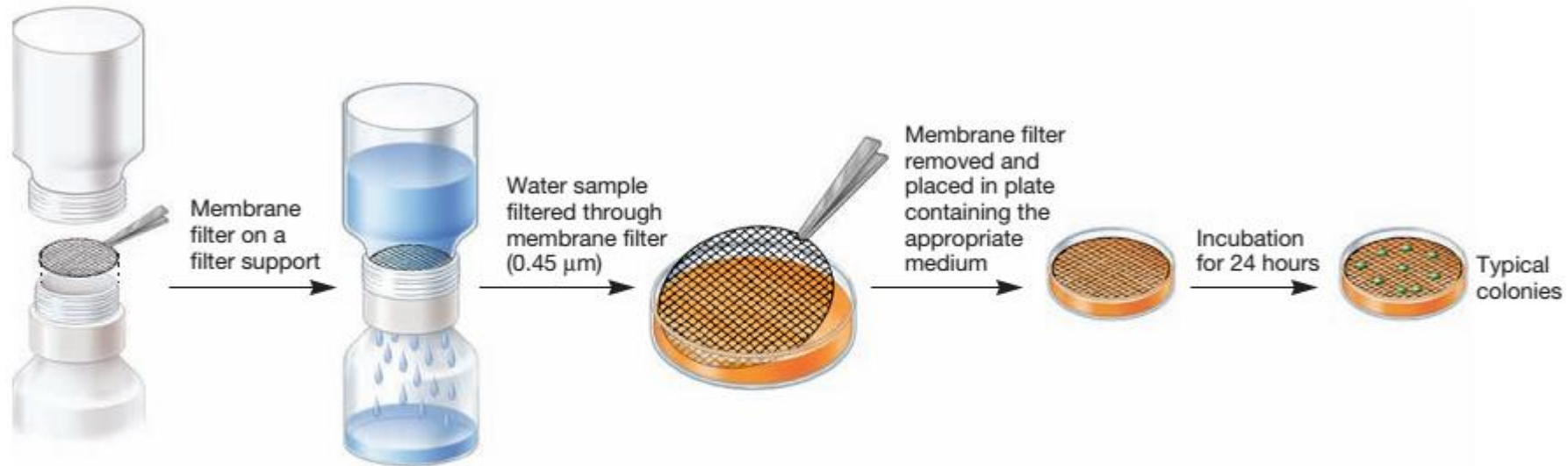
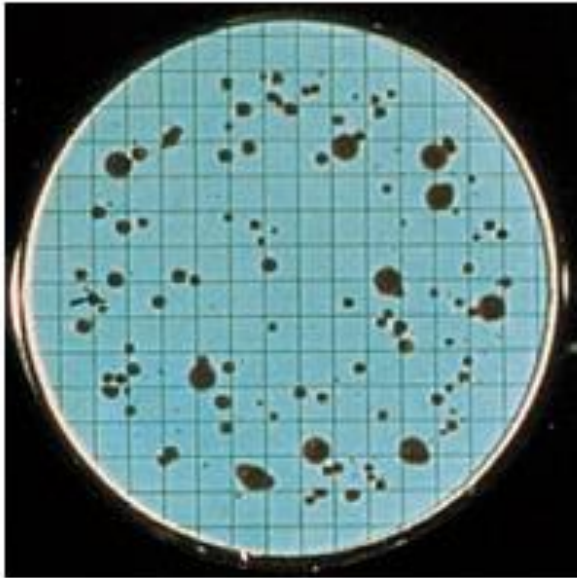


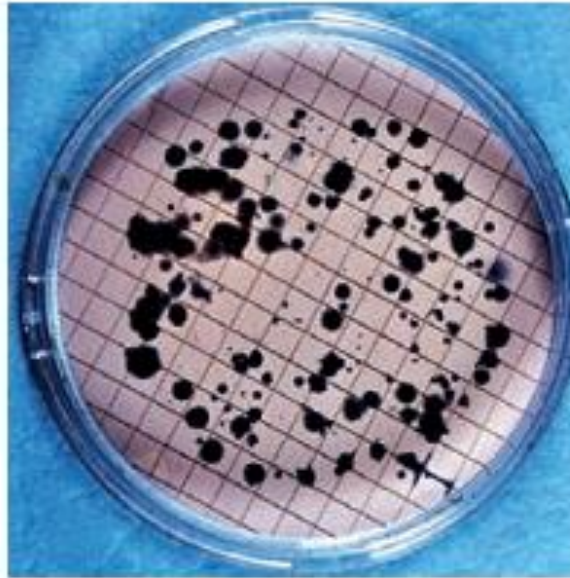
Figure 6.13 The Membrane Filtration Procedure. Membranes with different pore sizes are used to trap different microorganisms. Incubation times for membranes also vary with the medium and microorganism.



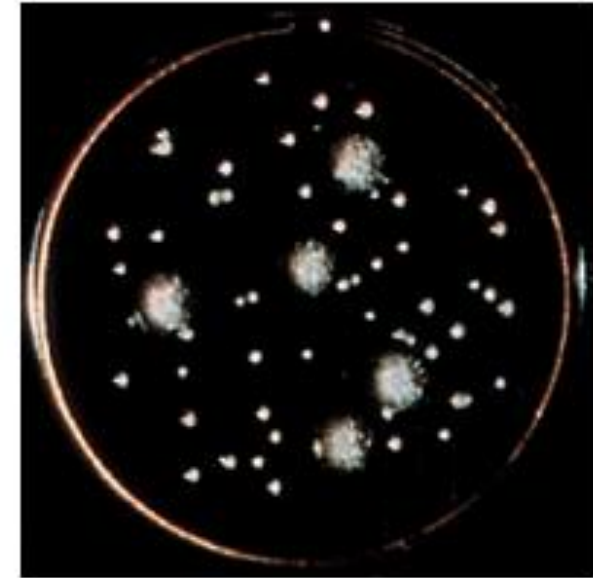
5.1 微生物的生长



(a)



(b)



(c)

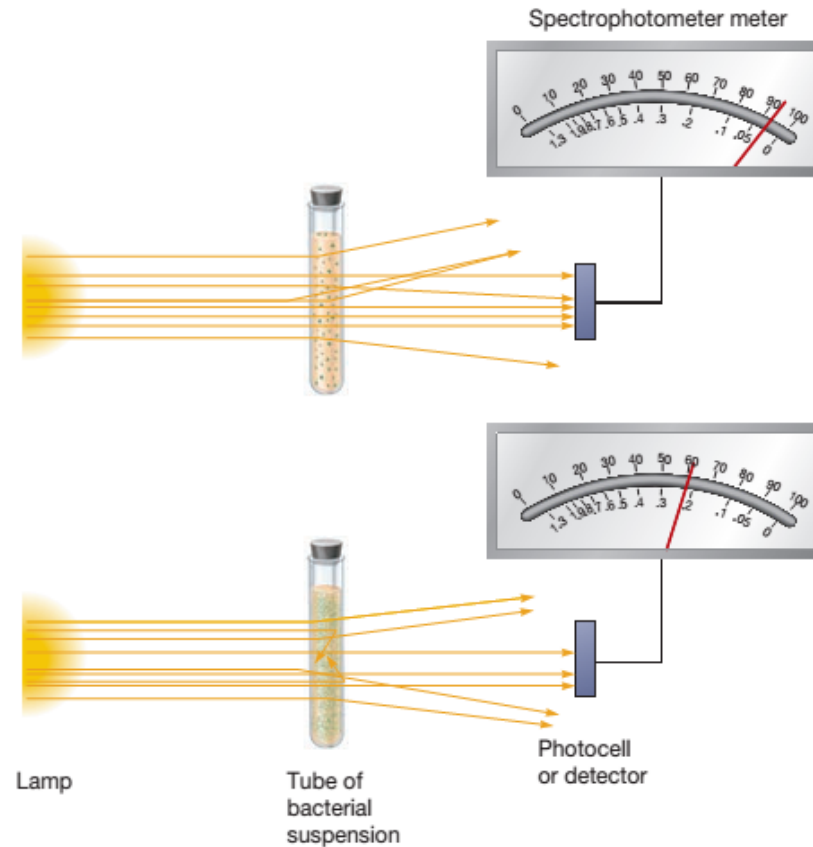
Figure 6.14 Colonies on Membrane Filters. Membrane-filtered samples grown on a variety of media. **(a)** Standard nutrient media for a total bacterial count. An indicator colors colonies red for easy counting. **(b)** Fecal coliform medium for detecting fecal coliforms that form blue colonies. **(c)** Wort agar for the culture of yeasts and molds.



5.1 微生物的生长

4. 比浊法

- 一定范围内，菌悬液浓度与浑浊度成正比，即与光密度成正比，菌越多，光密度越大。
- 在一定波长下，测定菌悬液的光密度，以光密度(optical density, 即O.D.)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。





5.1 微生物的生长

5.其他方法

◆ 重量法

可测定多细胞及丝状真菌

以干重、湿重直接衡量微生物群体的生物量；

通过样品中蛋白质、核酸含量的测定间接推算微生物群体的生物量；

◆ 生理指标法

微生物的生理指标，如呼吸强度，耗氧量、酶活性、生物热等与其群体的规模成正相关。

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。



5.1 微生物的生长

◆连续培养(Continous culture) :

- 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能持续生长下去的一种培养方法。
- 培养过程中不断的补充营养物质和以同样的速率移出培养物是实现微生物连续培养的基本原则。

控制连续培养的方法

恒浊连续培养

Turbidostat

不断调节流速而使细菌
培养液浊度保持恒定

恒化连续培养

Chemostat

保持恒定的流速



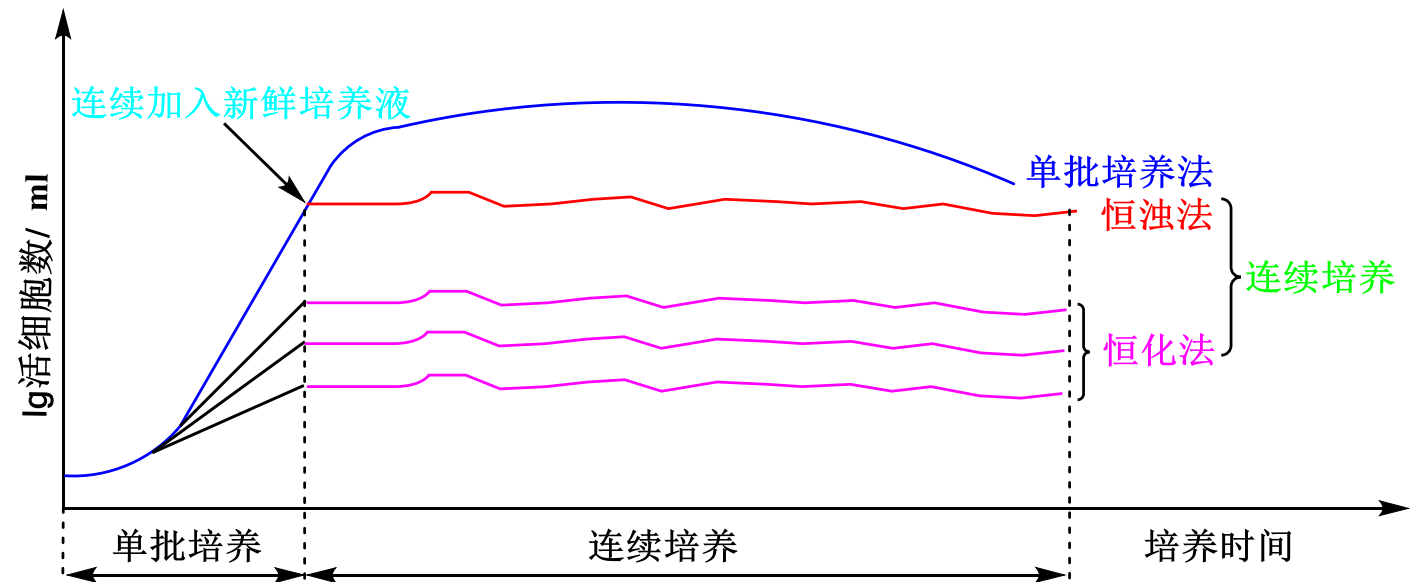
5.1 微生物的生长

连续发酵与单批发酵相比的优点：

一般用于菌体以及与菌体生长平行的代谢产物生产的发酵工业。

- 缩短发酵周期，提高设备利用率；
- 便于自动控制；
- 降低动力消耗及体力劳动强度；
- 产品质量较稳定；

缺点：杂菌污染和菌种退化



单批培养与连续培养的关系



5.1 微生物的生长

1. 恒浊连续培养

测定所培养微生物的光密度值，自动调节新鲜培养基流入和培养物流出培养室的流速使培养物维持在某一恒定浊度。

当培养室中的浊度超过预期数值时，流速加快，使浊度降低；
当培养室中的浊度低于预期数值时，流速减慢，使浊度升高；

恒浊培养器的工作精度是由光电控制系统的灵敏度来决定的

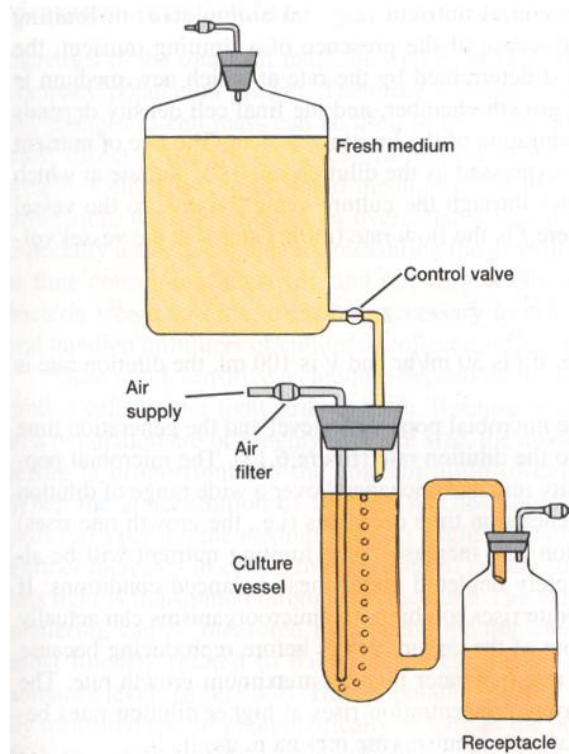
如果所用培养基中有过量的必需营养物，就可以使菌体维持最高的生长速率。



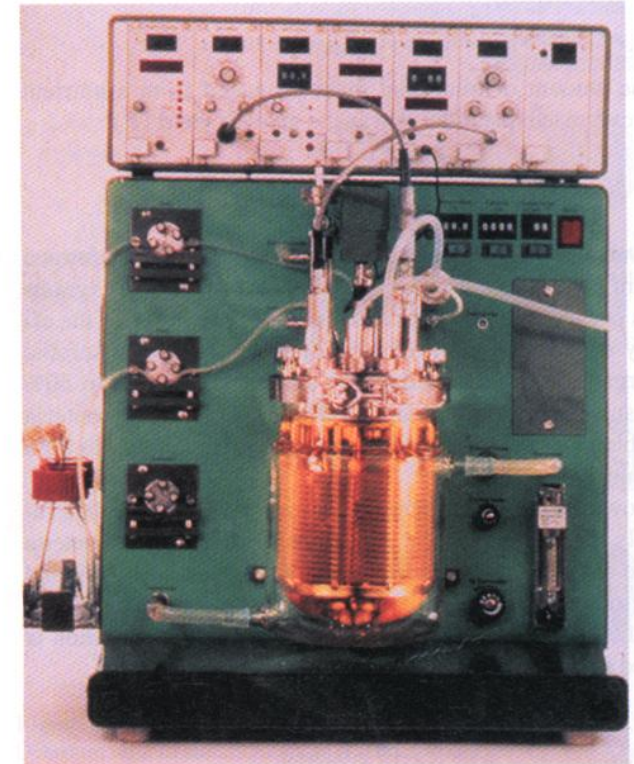
5.1 微生物的生长

2. 恒化连续培养

使培养液流速保持不变，并使微生物始终在低于其最高生长速率下进行生长繁殖。



(a)



(b)

Figure 6.11 A Continuous Culture System: The Chemostat. (a) Schematic diagram of the system. The fresh medium contains a limiting amount of an essential nutrient. Growth rate is determined by the rate of flow of medium through the culture vessel. (b) A commercial fermenter that may be used as a chemostat. The fermenter uses 0.75 to 1.5 liter culture vessels, and factors such as temperature, pH, and oxygen concentration can be regulated during growth.



5.1 微生物的生长

◆ 恒化连续培养的特点

- ▶ 恒化连续培养中，必需将某种必需的营养物质控制在较低的浓度，以作为限制性因子，而其他营养物均过量。；
- ▶ 菌的生长速率取决于限制性因子的浓度，并低于最高生长速率；
- ▶ 限制性因子必须是机体生长所必需的营养物质，因而可在一定浓度范围内能决定该机体生长速率。

多用于科研

遗传学：突变株分离；

生理学：不同条件下的代谢变化；

生态学：模拟自然营养条件建立实验模型；

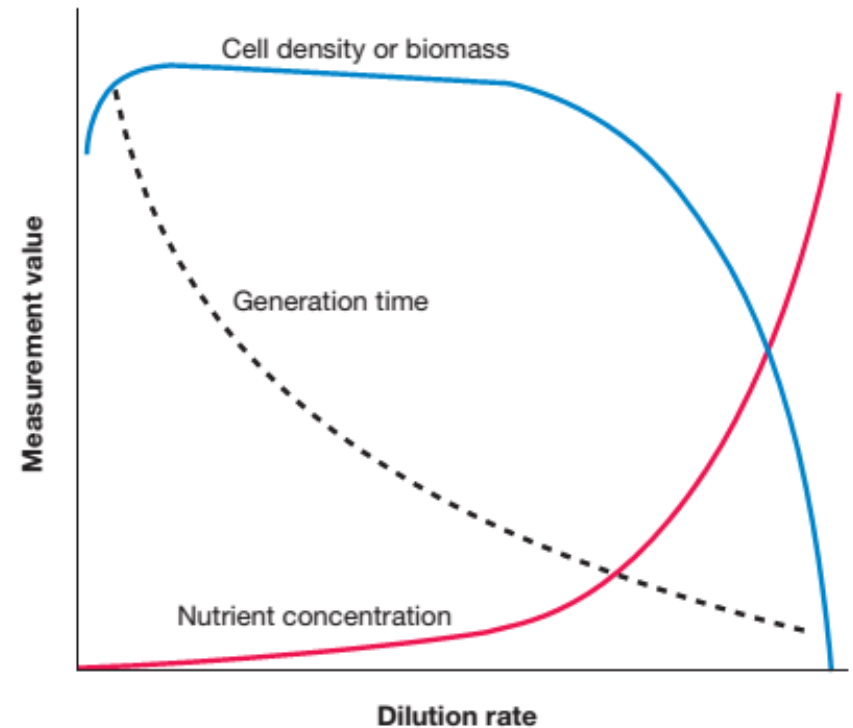


Figure 6.16 A Continuous Culture System: The Chemostat.



5.1 微生物的生长

◆ 恒浊连续培养与恒化连续培养的比较

装置	控制对象	培养基	培养基流速	生长速率	产物	应用范围
恒浊	菌体密度	无限制性生长因子	不恒定	最高速率	大量菌体或于菌体平衡的代谢产物	生产为主
恒化	培养基流速	限制性因子	恒定	低于最高速率	不同生长速率的菌体	实验室为主



5.1 微生物的生长

◆ 微生物的高密度培养 (high cell-density culture)

指微生物在液体培养条件下细胞群体的密度超过正常培养**10倍**以上的生长状态或培养技术。

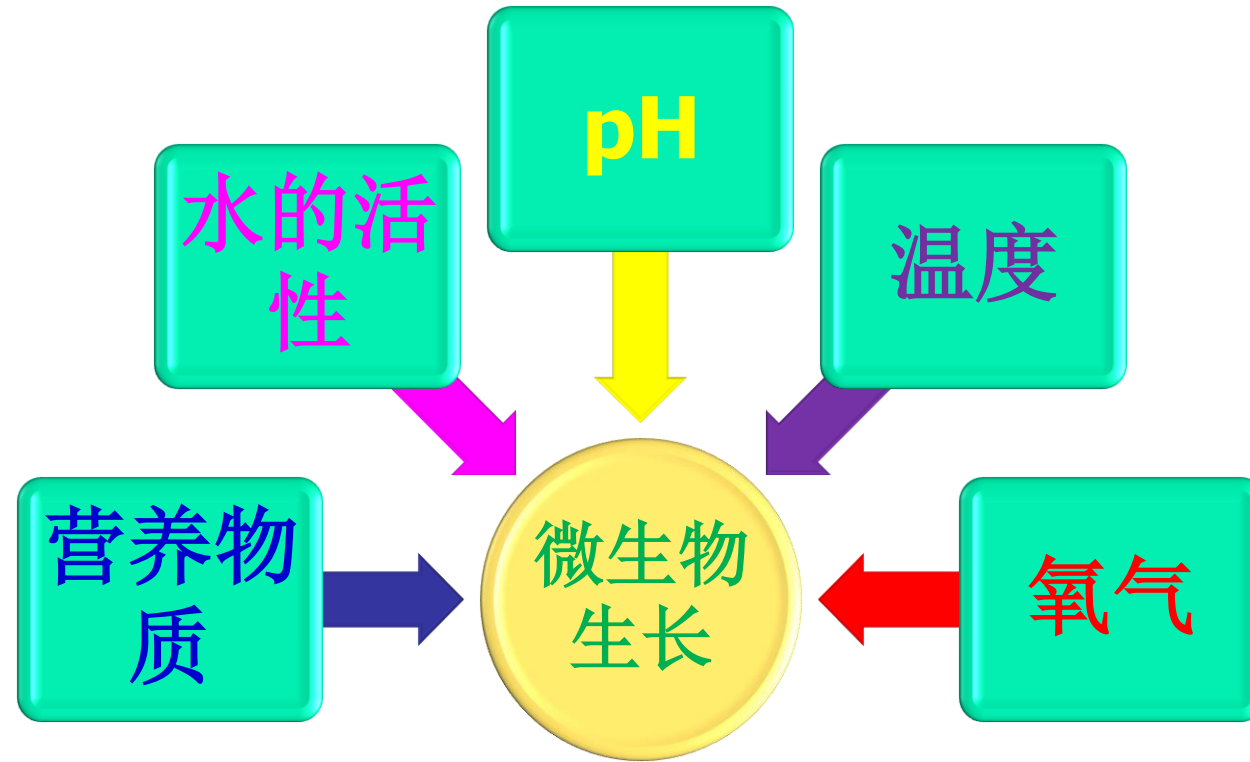
高密度培养
采取的措施

- 选取最佳培养基成分和各成分含量；
- 适时补料；
- 提高溶解氧；
- 防止有害废物的生成。



5.1 微生物的生长

◆ 环境因子对微生物生长的影响





5.1 微生物的生长

Table 6.3 Microbial Responses to Environmental Factors		
Descriptive Term	Definition	Representative Microorganisms
Solute and Water Activity		
Osmotolerant	Able to grow over wide ranges of water activity or osmotic concentration	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Saccharomyces rouxii</i>
Halophile	Requires high levels of sodium chloride, usually above about 0.2 M, to grow	<i>Halobacterium</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Ectothiorhodospira</i>
pH		
Acidophile	Growth optimum between pH 0 and 5.5	<i>Sulfolobus</i> , <i>Picrophilus</i> , <i>Ferroplasma</i> , <i>Acontium</i> , <i>Cyanidium caldarium</i>
Neutrophile	Growth optimum between pH 5.5 and 8.0	<i>Escherichia</i> , <i>Euglena</i> , <i>Paramecium</i>
Alkalophile	Growth optimum between pH 8.0 and 11.5	<i>Bacillus alcalophilus</i> , <i>Natronobacterium</i>
Temperature		
Psychrophile	Grows well at 0°C and has an optimum growth temperature of 15°C or lower	<i>Bacillus psychrophilus</i> , <i>Chlamydomonas nivalis</i>
Psychrotroph	Can grow at 0–7°C; has an optimum between 20 and 30°C and a maximum around 35°C	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>



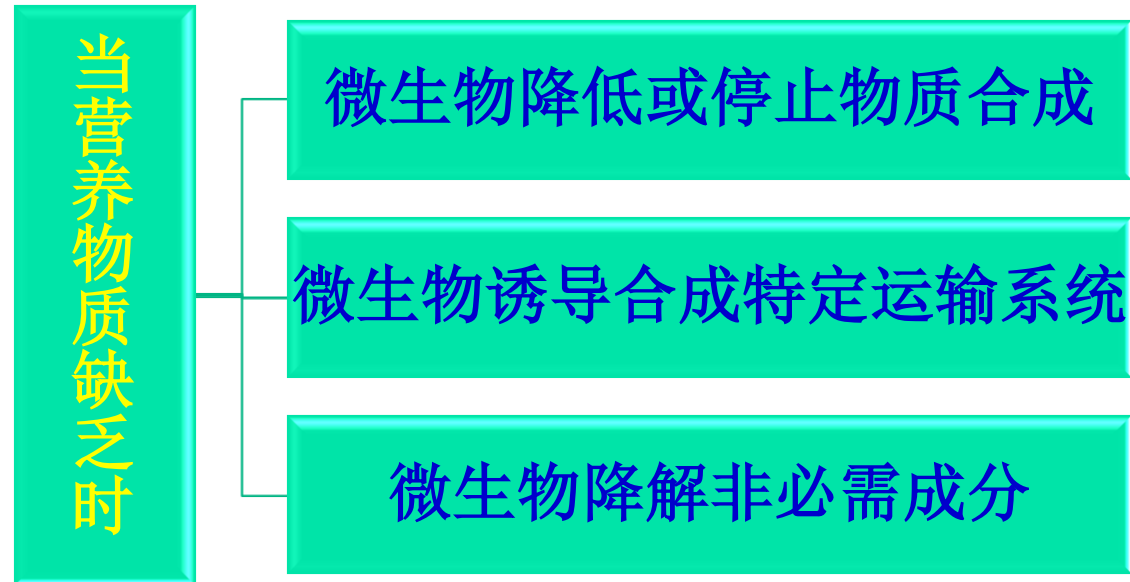
5.1 微生物的生长

Mesophile	Has growth optimum around 20–45°C	<i>Escherichia coli</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i>
Thermophile	Can grow at 55°C or higher; optimum often between 55 and 65°C	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Thermus aquaticus</i> , <i>Cyanidium caldarium</i> , <i>Chaetomium thermophile</i>
Hyperthermophile	Has an optimum between 80 and about 113°C	<i>Sulfolobus</i> , <i>Pyrococcus</i> , <i>Pyrodictium</i>
Oxygen Concentration		
Obligate aerobe	Completely dependent on atmospheric O ₂ for growth	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Mycobacterium</i> ; most protists and fungi
Facultative anaerobe	Does not require O ₂ for growth, but grows better in its presence	<i>Escherichia</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Aerotolerant anaerobe	Grows equally well in presence or absence of O ₂	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Obligate anaerobe	Does not tolerate O ₂ and dies in its presence	<i>Clostridium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Methanobacterium</i> , <i>Trepomonas agilis</i>
Microaerophile	Requires O ₂ levels below 2–10% for growth and is damaged by atmospheric O ₂ levels (20%)	<i>Campylobacter</i> , <i>Spirillum volutans</i> , <i>Treponema pallidum</i>
Pressure		
Barophilic	Growth more rapid at high hydrostatic pressures	<i>Photobacterium profundum</i> , <i>Shewanella benthica</i> , <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>



5.1 微生物的生长

1、营养物质





5.1 微生物的生长

2、水的活度

一定温度和压力下，溶液的蒸气压力与该条件下纯水蒸气压力之比。

$$a_w = \frac{P_{\text{solution}}}{P_{\text{water}}}$$

- 溶液浓度越高， A_w 越低；反之则高；
- A_w 越高，渗透压越低，反之则高；
- 纯水的 A_w 为1，干燥的溶质接近零；

生长最低的 a_w

细菌

- 0.9-0.98
- 0.75

酵母

- 0.87-0.91
- 0.61-0.65
- 0.60

霉菌

- 0.8-0.87
- 0.65-0.75
- 0.6

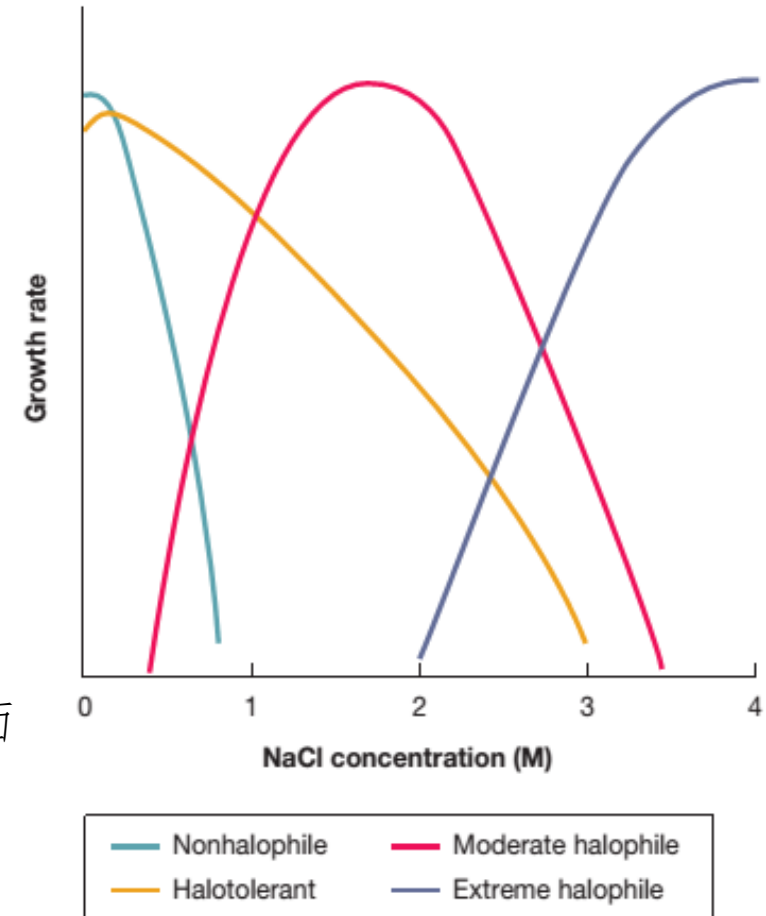
- ◆ 微生物不同，生长所需最适 a_w 不同；若 a_w 过低或过高，会影响培养基的渗透压，从而影响微生物的生长速率。



5.1 微生物的生长

➤ **Aw低的环境**：即高渗透环境，意味着有大量的水分从细胞流失。细胞脱水，造成质壁分离，细胞膜受损，代谢失活。微生物合成或摄入大量的**choline, betaine, proline, glutamic acid, and other amino acids; elevated levels of potassium ions**，酵母和原生动物采取提高胞内的多元醇、蔗糖及氨基酸的浓度，维持代谢正常进行。

- 一般情况下，添加盐分和蔗糖能抑制微生物的生长。
- 嗜盐菌 (Halophiles) 通过提高胞内的 K^+ 的浓度对抗盐浓度，在死海能分离到高度的嗜盐菌。
- 霉菌是高渗耐受性的微生物，能在干燥的食物、衣物表面生长而引发霉变。





5.1 微生物的生长

高渗透环境限制微生物的生长

Table 6.4 Approximate Lower a_w Limits for Microbial Growth

Water Activity	Environment	Procaryotes	Fungi	Photosynthetic protists
1.00—Pure water	Blood Plant wilt Seawater	Most gram-negative bacteria and other nonhalophiles		
	Vegetables, meat, fruit			
0.95	Bread	Most gram-positive rods	<i>Basidiomycetes</i>	Most genera
0.90	Ham	Most cocci, <i>Bacillus</i>	<i>Fusarium</i> <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> Ascomycetous yeasts	
0.85	Salami	<i>Staphylococcus</i>	<i>Saccharomyces rouxii</i> (in salt)	
0.80	Preserves		<i>Penicillium</i>	
0.75	Salt lakes Salted fish	<i>Halobacterium</i> <i>Actinospora</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Dunaliella</i>
0.70	Cereals, candy, dried fruit		<i>Aspergillus</i>	
0.60	Chocolate Honey Dried milk		<i>Saccharomyces rouxii</i> (in sugars) <i>Xeromyces bisporus</i>	
0.55—DNA disordered				

Adapted from A. D. Brown, "Microbial Water Stress," in *Bacteriological Reviews*, 40(4):803–846 1976. Copyright © 1976 by the American Society for Microbiology. Reprinted by permission.



5.1 微生物的生长

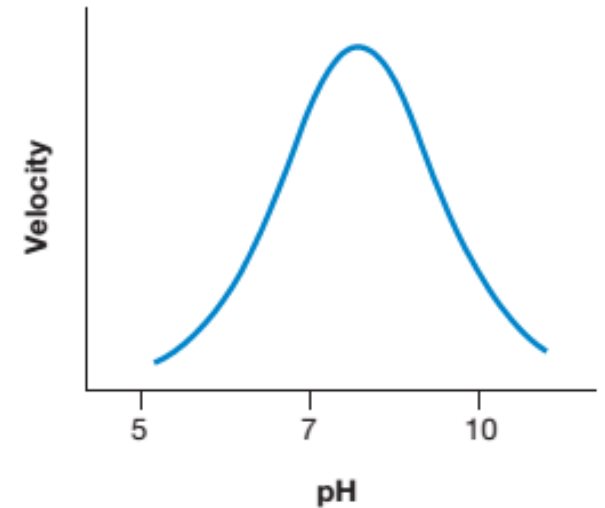
3. pH

影响微生物生长、繁殖，发育；

- 影响各种酶的活性
- 影响细胞膜透性与稳定性；
- 影响物质溶解度；
- 影响细胞表面电荷分布。

微生物适应酸性环境的策略：

- 极端嗜碱菌用内部钠离子交换外部的质子；
- pH在5.0-6时，细菌会启动酸耐受反应：合成一系列的运输蛋白来对抗；
- 当pH低于4.5或更低时，细胞启动蛋白伴侣（chaperone）的合成，如热休克和酸休克蛋白，稳定细胞内环境。

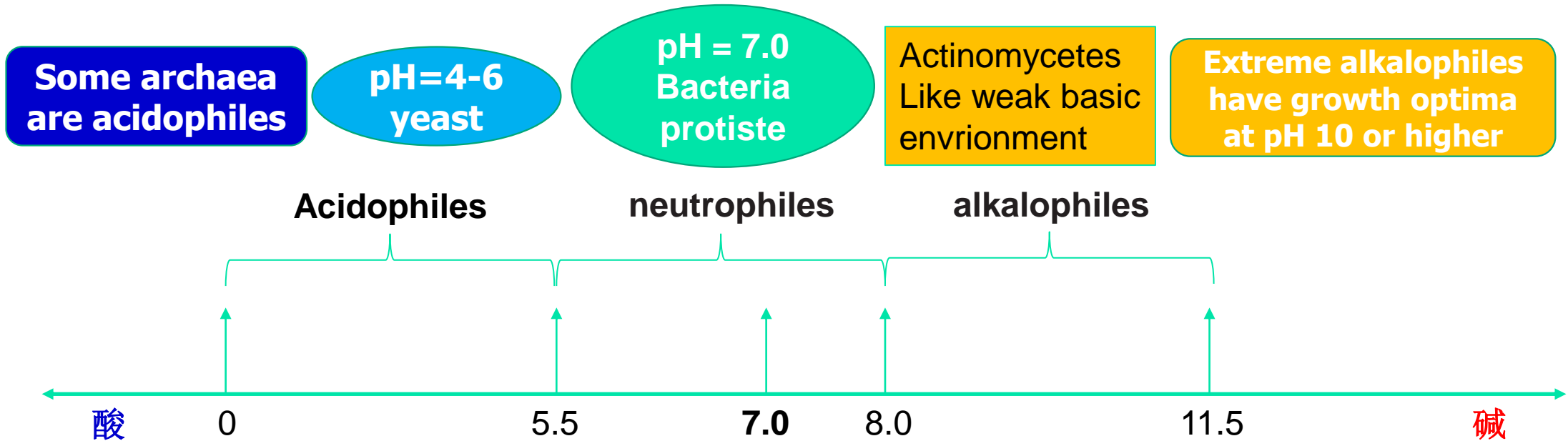


- 各类微生物能够生长的pH值较宽，但细胞内部pH值却接近中性（嗜酸性微生物、嗜碱性微生物）；
- 微生物内部的pH达到5.5左右，微生物将会死亡；
- 微生物的活动也能改变环境中的pH值，通常添加磷酸二氢钾来缓冲。



5.1 微生物的生长

◆ 不同微生物的最适pH





5.1 微生物的生长

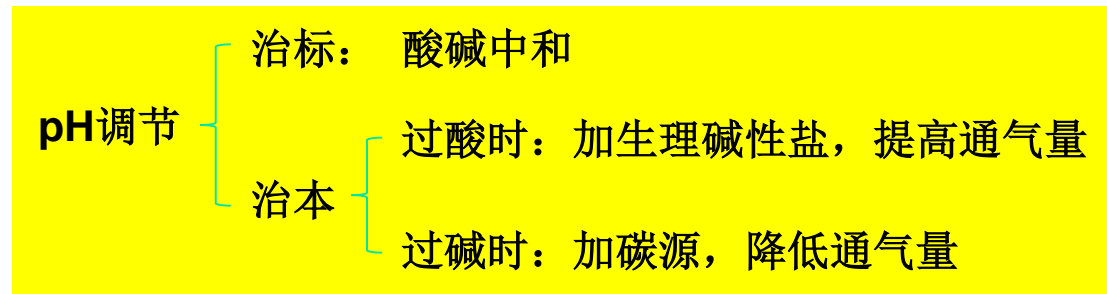
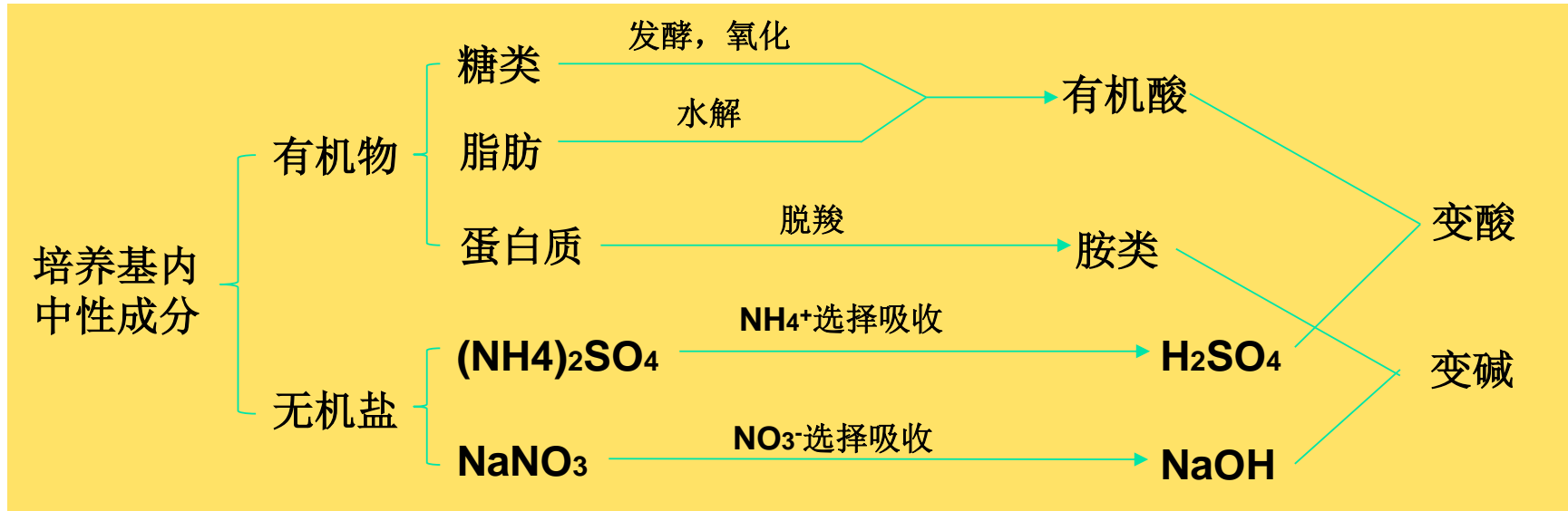
◆ 微生物培养不同阶段的最适pH

抗生素生产菌	生长最适pH	合成抗生素的最适pH
<i>Streptomyces griseus</i> (灰色链霉菌)	6.3-6.9	6.7-7.3
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> (红霉素糖多孢菌)	6.6-7.0	6.8-7.3
<i>Penicillium chrysogenum</i> (产黄青霉菌)	6.5-7.2	6.2-6.8
<i>Streptomyces aureofaciens</i> (金霉素链霉菌)	6.1-6.6	5.9-6.3
<i>Streptomyces rimosus</i> (龟裂链霉菌)	6.0-6.6	5.8-6.1
<i>Penicillium griseofulvum</i> (灰黄青霉)	6.4-7.0	6.2-6.5



5.1 微生物的生长

pH的变化及调节策略





5.1 微生物的生长

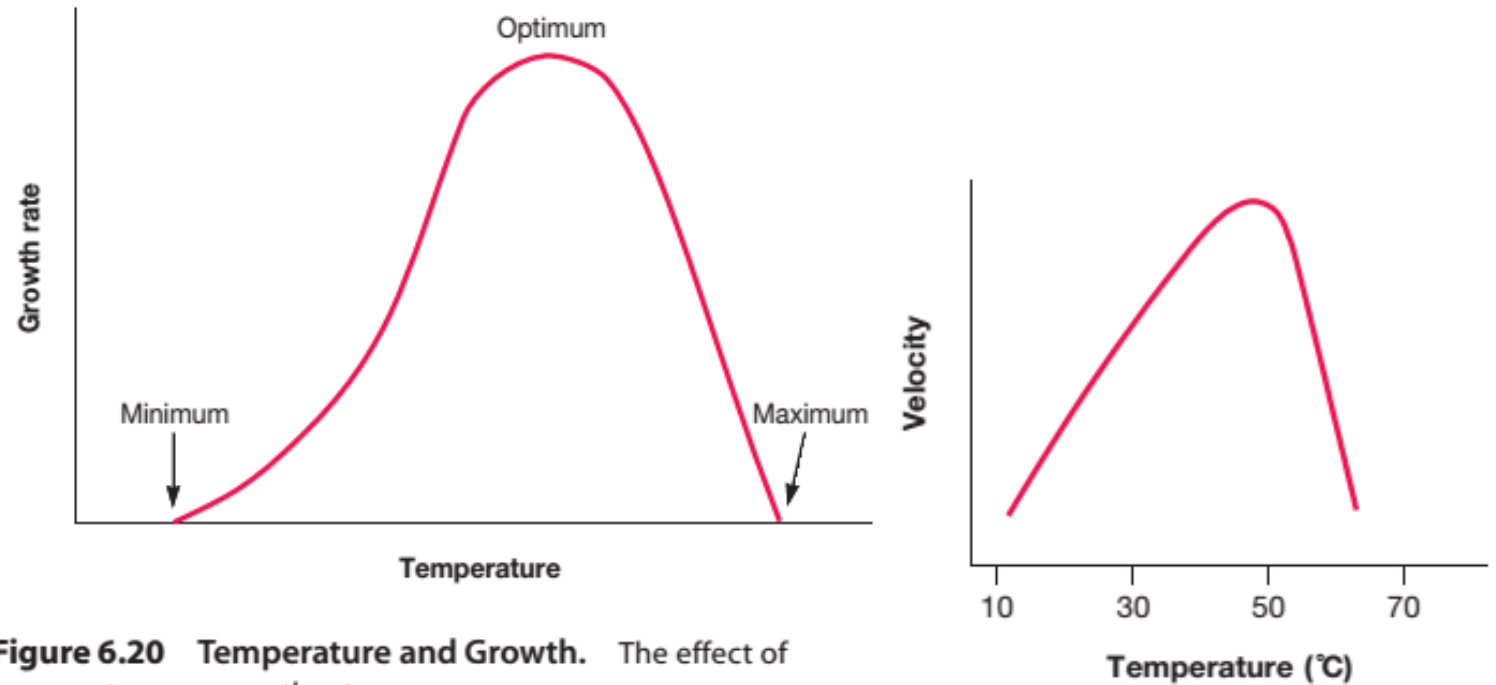
4. 温度

温度对微生物的影响：

- 1) 影响酶活性
- 2) 影响细胞质膜的流动性
- 3) 影响物质的溶解度

根据微生物生长最适温度的不同，可分为嗜冷、兼性嗜冷、嗜温、嗜热、和超嗜热五种不同类型。

✓ 生长温度三基点（cardinal temperatures）：最低（minimum）、最适（optimum）、最高（maximum）





5.1 微生物的生长

Table 6.5 Temperature Ranges for Microbial Growth			
Microorganism	Cardinal Temperatures (°C)		
	Minimum	Optimum	Maximum
Nonphotosynthetic Prokaryotes			
<i>Bacillus psychrophilus</i>	-10	23-24	28-30
<i>Micrococcus cryophilus</i>	-4	10	24
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4	25-30	40
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.5	30-37	46
<i>Enterococcus caecalis</i>	0	37	44
<i>Escherichia coli</i>	10	37	45
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	30	35-36	38
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	45	59	62
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	30	60-65	75
<i>Thermus aquaticus</i>	40	70-72	79
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	60	80	85
<i>Pyrococcus abyssi</i>	67	96	102
<i>Pyrodictium occultum</i>	82	105	110
<i>Pyrolobus fumarii</i>	0	106	113

Photosynthetic Bacteria			
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	ND ^a	30-35	ND
<i>Anabaena variabilis</i>	ND	35	ND
<i>Oscillatoria tenuis</i>	ND	ND	45-47
<i>Synechococcus eximius</i>	70	79	84
Protists			
<i>Chlamydomonas nivalis</i>	-36	0	4
<i>Fragilaria sublinearis</i>	-2	5-6	8-9
<i>Amoeba proteus</i>	4-6	22	35
<i>Euglena gracilis</i>	ND	23	ND
<i>Skeletonema costatum</i>	6	16-26	>28
<i>Naegleria fowleri</i>	20-25	35	40
<i>Trichomonas vaginalis</i>	25	32-39	42
<i>Paramecium caudatum</i>		25	28-30
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	6-7	20-25	33
<i>Cyclidium citrullus</i>	18	43	47
<i>Cyanidium caldarium</i>	30-34	45-50	56
Fungi			
<i>Candida scottii</i>	0	4-15	15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1-3	28	40
<i>Mucor pusillus</i>	21-23	45-50	50-58



5.1 微生物的生长

1. **嗜冷菌 Psychrophiles** grow well at 0° C and have an optimum growth temperature of 15° C or lower; the maximum is around 10° C.
2. Many species can grow at 0 to 7° C even though they have optima between 20 and 30° C, and maxima at about 35° C. These are called **耐冷菌 psychrotrophs or facultative psychrophiles**.
3. **嗜温菌 Mesophiles** are microorganisms with growth optima around 20 to 45° C; they often have a temperature minimum of 15 to 20° C. Their maximum is about 45° C or lower.
4. Some microorganisms are **嗜热菌 thermophiles**; they can grow at temperatures of 55° C or higher. Their growth minimum is usually around 45° C and they often have optima between 55 and 65° C.
5. As mentioned previously, a few thermophiles can grow at 90° C or above and some have maxima above 100° C. Prokaryotes that have growth optima between 80° C and about 113° C are called **超嗜热 hyperthermophiles**. They usually do not grow well below 55° C.

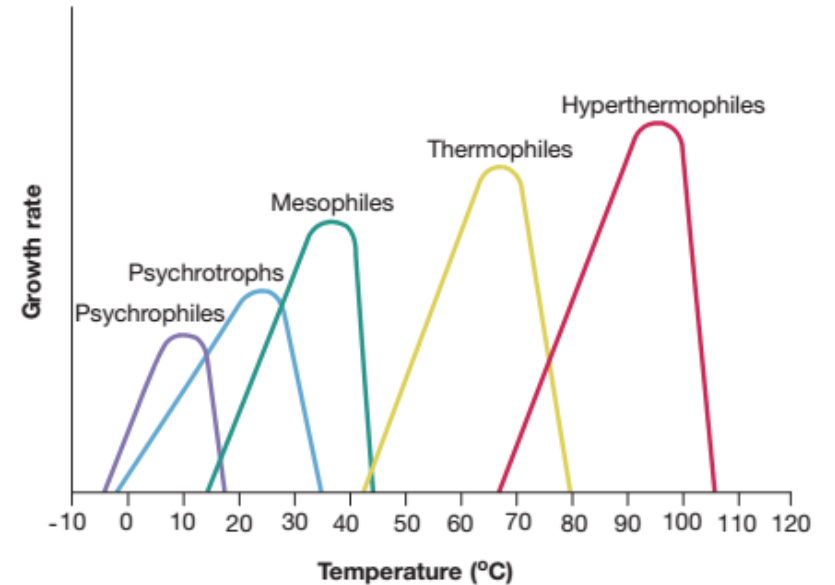


Figure 6.21 Temperature Ranges for Microbial Growth. Microorganisms can be placed in different classes based on their temperature ranges for growth. They are ranked in order of increasing growth temperature range as psychrophiles, psychrotrophs, mesophiles, thermophiles, and hyperthermophiles. Representative ranges and optima for these five types are illustrated here.



5.1 微生物的控制

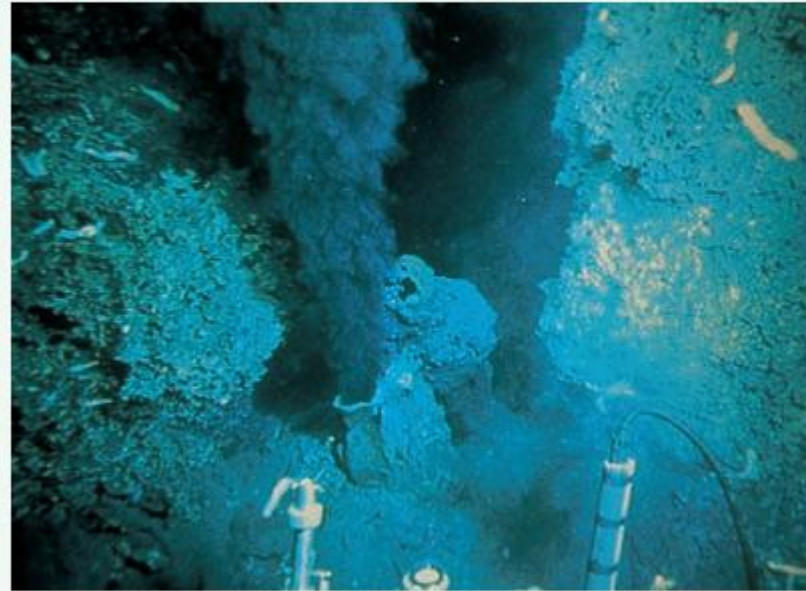


Microbial Diversity & Ecology

6.1 Life above 100°C

Until recently the highest reported temperature for procaryotic growth was 105°C. It seemed that the upper temperature limit for life was about 100°C, the boiling point of water. Now thermophilic procaryotes have been reported growing in sulfide chimneys or “black smokers,” located along rifts and ridges on the ocean floor, that spew sulfide-rich super-heated vent water with temperatures above 350°C (see **Box figure**). Evidence has been presented that these microbes can grow and reproduce at 121°C and can survive temperatures to 130°C for up to 2 hours. The pressure present in their habitat is sufficient to keep water liquid (at 265 atm; seawater doesn’t boil until 460°C).

The implications of this discovery are many. The proteins, membranes, and nucleic acids of these procaryotes are remarkably temperature stable and provide ideal subjects for studying the ways in which macromolecules and membranes are stabilized. In the future it may be possible to design enzymes that can operate at very high temperatures. Some thermostable enzymes from these organisms have important industrial and scientific uses. For example, the Taq polymerase from the thermophile *Thermus aquaticus* is used extensively in the polymerase chain reaction. [The polymerase chain reaction \(section 14.3\)](#)



不可思议的嗜热菌！



5.1 微生物的控制

4. 温度

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。

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。



The Sulfur Cauldron in Yellowstone National Park. The water is at its boiling point and very rich in sulfur. *Sulfolobus* grows well in such habitats



5.1 微生物的控制

微生物各生理温度过程的不同最适温度

菌名	生长温度/°C	发酵温度 /°C	累计产物温度/°C
<i>Streptococcus thermophiles</i>	37	47	37
<i>Streptococcus lactis</i>	34	40	产细胞25-30；产乳酸30
<i>Streptomyces griseus</i>	37	28	—
<i>Corynebacterium pekinense</i>	32	33-35	—
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	37	33	—
<i>Penicillium chrysogenum</i>	30	25	20



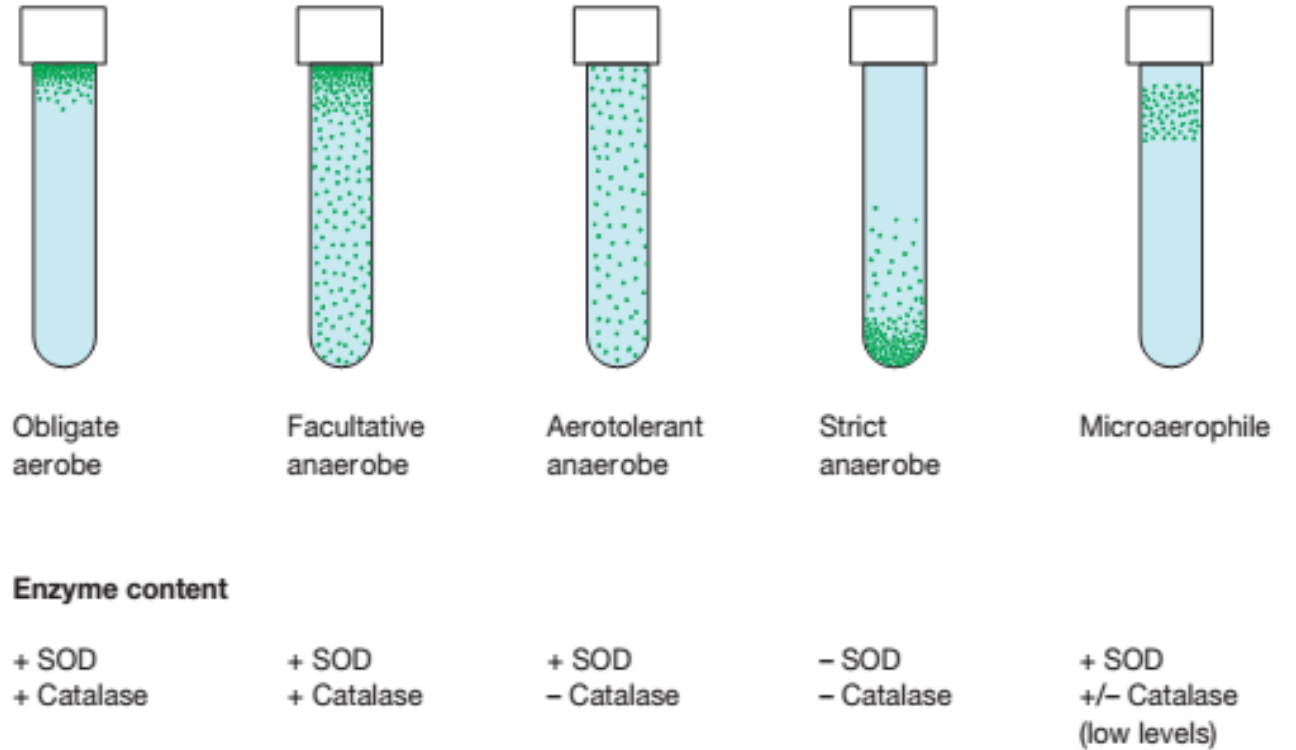
5.1 微生物的控制

5. 氧气

根据与氧的关系，可将微生物分为五种类型：

好氧菌、微好氧菌、耐氧菌、兼性厌氧菌、厌氧菌；

Figure 6.22 Oxygen and Bacterial Growth. Each dot represents an individual bacterial colony within the agar or on its surface. The surface, which is directly exposed to atmospheric oxygen, will be oxitic. The oxygen content of the medium decreases with depth until the medium becomes anoxic toward the bottom of the tube. The presence and absence of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase for each type are shown.





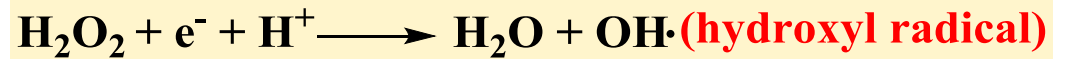
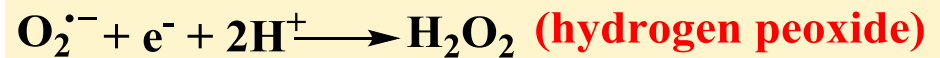
5.1 微生物的控制

1. 专性好氧菌 (obligate aerobe)

必须在有分子氧的条件下才能生长，有完整的呼吸链，以分子氧作为最终氢受体，含有歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (catalase)。

◆ 绝大多数真菌和多数细菌及放线菌都是专性好氧菌：

Ep. Acetobacter (酸杆菌属)，*Azotobacter* (固氮菌属)；*Pseudomonas aeruginosa* (铜绿假单胞菌)；*Corynebacterium diphtheriae* (白喉棒杆菌)



氧自由基的形成途径



专性好氧菌清除自由基的机制



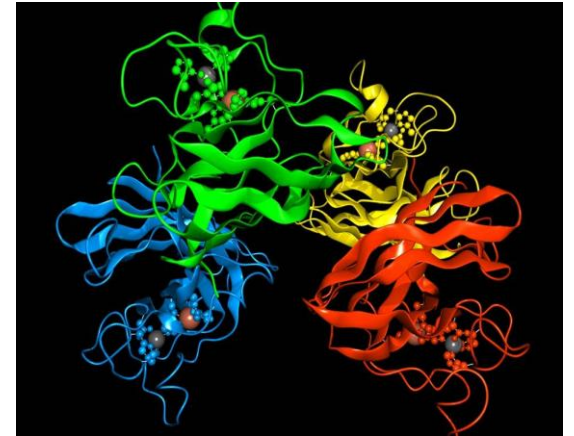
5.1 微生物的控制

2. 微好氧菌 (microaerophilic bacteria)

只能在较低的氧分压 (0.01~0.03巴, 而正常大气中的氧分压为0.2巴) 下才能正常生长的微生物。

霍乱弧菌

SOD

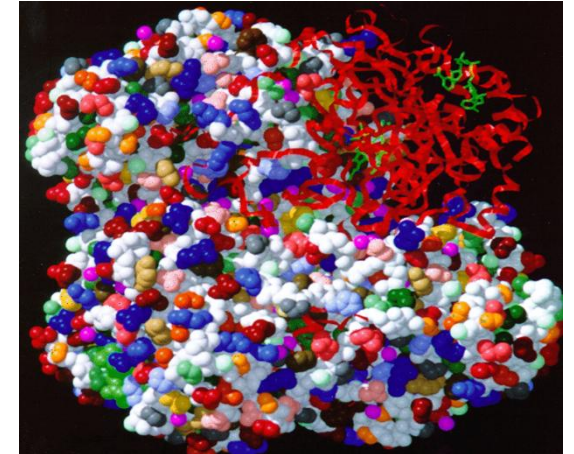


3. 耐氧菌 (aerotolerant anaerobes)

一类可在分子氧存在下进行厌氧生活的厌氧菌, 即它们的生长不需要氧, 分子氧对它也无毒害。

乳酸菌

catalase





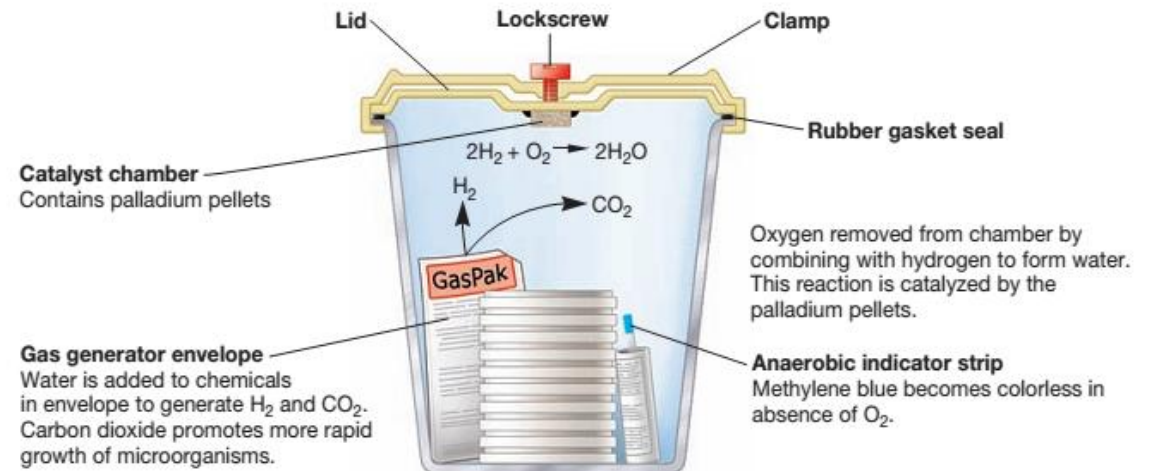
5.1 微生物的控制

4. 兼性厌氧菌 (facultative anaerobes)

在有氧或无氧条件下均能生长，但在有氧情况下生长得更好：
许多酵母菌和产气肠杆菌，大肠杆菌。

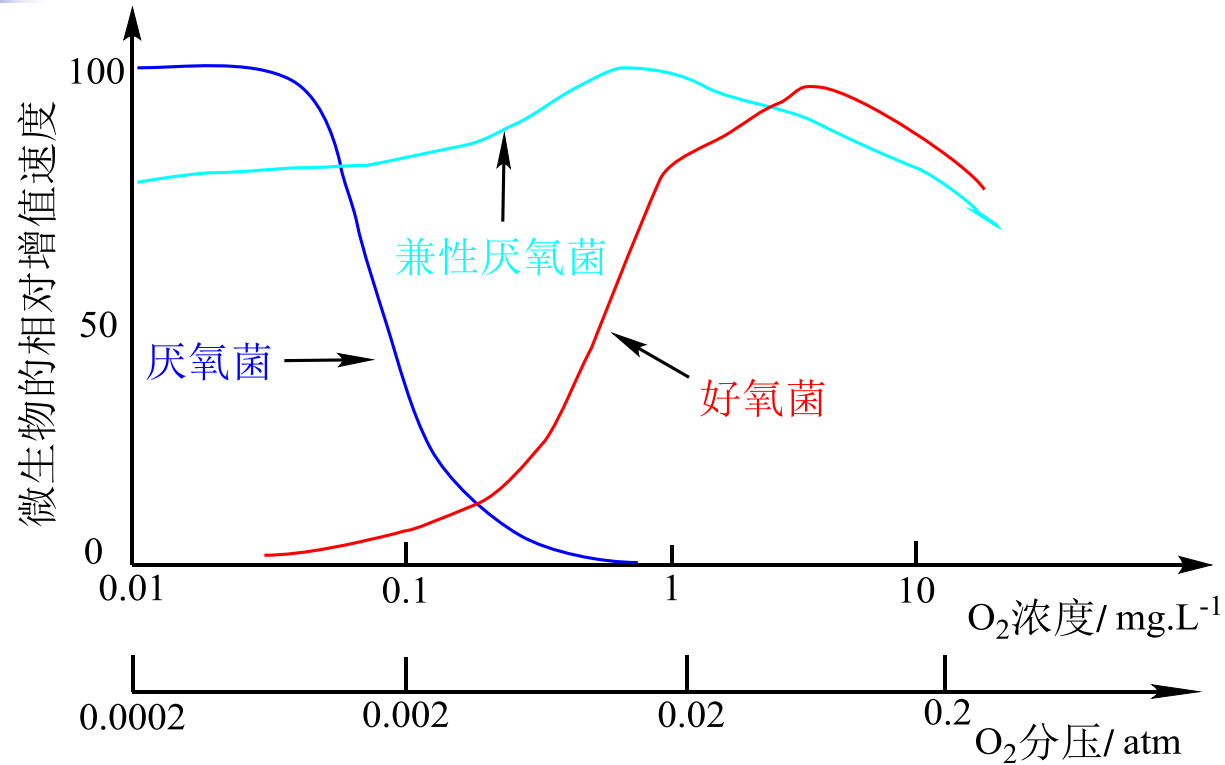
5. 厌氧菌 (anaerobes)

分子氧对它们有毒，即使短期接触空气，
也会抑制其生长甚至致死：
双歧杆菌属





5.1 微生物的控制



分子氧浓度和分压对三类微生物生长的影响



Figure 6.23 An Anaerobic Work Chamber and Incubator.



5.1 微生物的控制

6. 压力 (pressure)

- 在深海的环境中，温度：2-3°C，压力：600-1000大气压，依然有一些微生物生活，他们是耐压的微生物 (barotolerant microbes)，压力的影响是负面的，但没有对非耐压菌那么大；
- 在深海中大量生活的是嗜压微生物 (barophilic microbes)，甚至在菲律宾附近的马里亚纳海沟 (Mariana trench, 10500米) 也有发现。嗜压微生物在高压下才能迅速生长，对深海的营养循环有重要意义。对嗜压的机制了解不多。



5.1 微生物的控制

7. 辐射 (radiation)

大气充满着各种电磁辐射，这些电磁辐射会影响微生物。

- X-rays, gamma-rays等引起电离辐射，诱发突变，高剂量则导致死亡；
- 紫外 (ultraviolet) 通常引起嘧啶二聚体，严重则死亡。

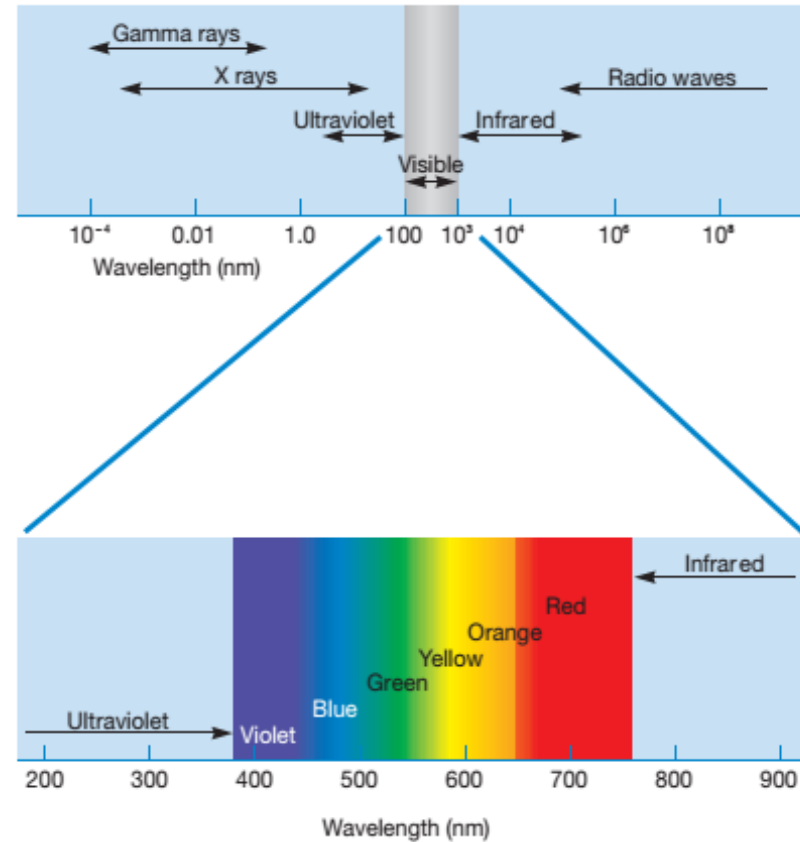


Figure 6.25 The Electromagnetic Spectrum. A portion of the spectrum is expanded at the bottom of the figure.



5.1 微生物的生长

◆ 自然环境中微生物的生长

微生物在环境中的生长

营养物质的限制

最低营养规则 (Liebig's law of the minimum) :

that the total biomass of an organism will be determined by the nutrient present in the lowest concentration relative to the organism's requirements.

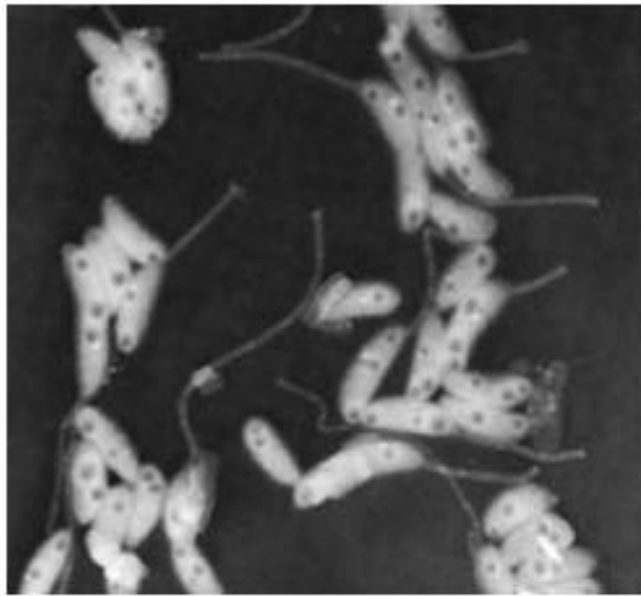
环境条件的限制

环境条件耐受规则 (Shelford's law of tolerance) :

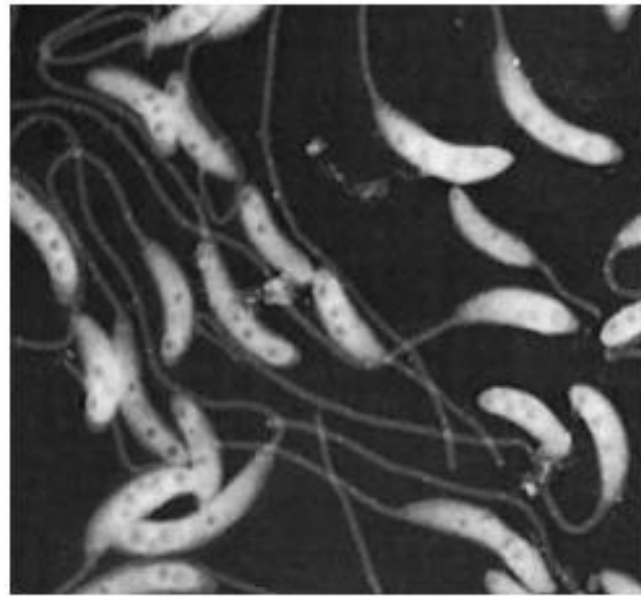
that there are limits to environmental factors below and above which a microorganism cannot survive and grow, regardless of the nutrient supply.



5.1 微生物的生长



(a)



(b)

Figure 6.26 Morphology and Nutrient Absorption. Microorganisms can change their morphology in response to starvation and different limiting factors to improve their ability to survive. **(a)** *Caulobacter* has relatively short stalks when phosphorus is plentiful. **(b)** The stalks are extremely long under phosphorus-limited conditions.



5.1 微生物的生长

◆ 自然环境中的微生物鉴定和计数

- 鉴定：种的数量；
- 计数：细胞的数目。



现代的分子方法、技术的运用逐渐在克服鉴定和培养无法解决的问题

两方面的挑战：

- 1、“众口难调”：“烹饪”不出所有微生物都能生长的“饭菜”，当然就不可能产生菌落；
- 2、“诈死休眠”：饥饿环境中的一些微生物细胞会休眠，导致在实验室培养基上难以“苏醒”及不可培养。在病原菌的研究中有重要价值。

Postgate microviability assay: 将细胞 (viable but nonculturable procaryotes .VBNC) 培养在薄层琼脂培养基，上覆盖玻片，培养前后反复用光镜观察以比较不同。细胞发生的任何变化，包括姿态的变化也可能是生命的征兆。



5.1 微生物的生长

参考P 34

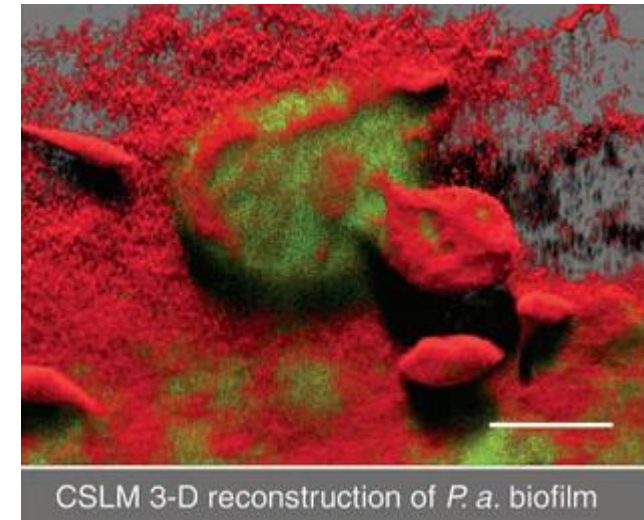
◆ **生物膜 (biofilm)** :在生物或非生物的表面生长的微生物菌群被包裹在自身产生的胞外聚合物基质中, 细胞之间彼此粘连在一起所形成的结构。胞外聚合物为多糖、蛋白质、DNA。是近年来非常活跃的研究领域。

生物膜的生理功能为:

- 生理保护屏障;
- 创造有利生境;
- 促进信息交流;
- 保证营养供应。

生物膜的形成有复杂的机制, 研究表明与细胞间的生物通讯有直接关系。揭开成膜机制, 对于微生物细胞通讯、病原菌的控制和耐药性细菌的治疗有重要的医学价值和科研意义。

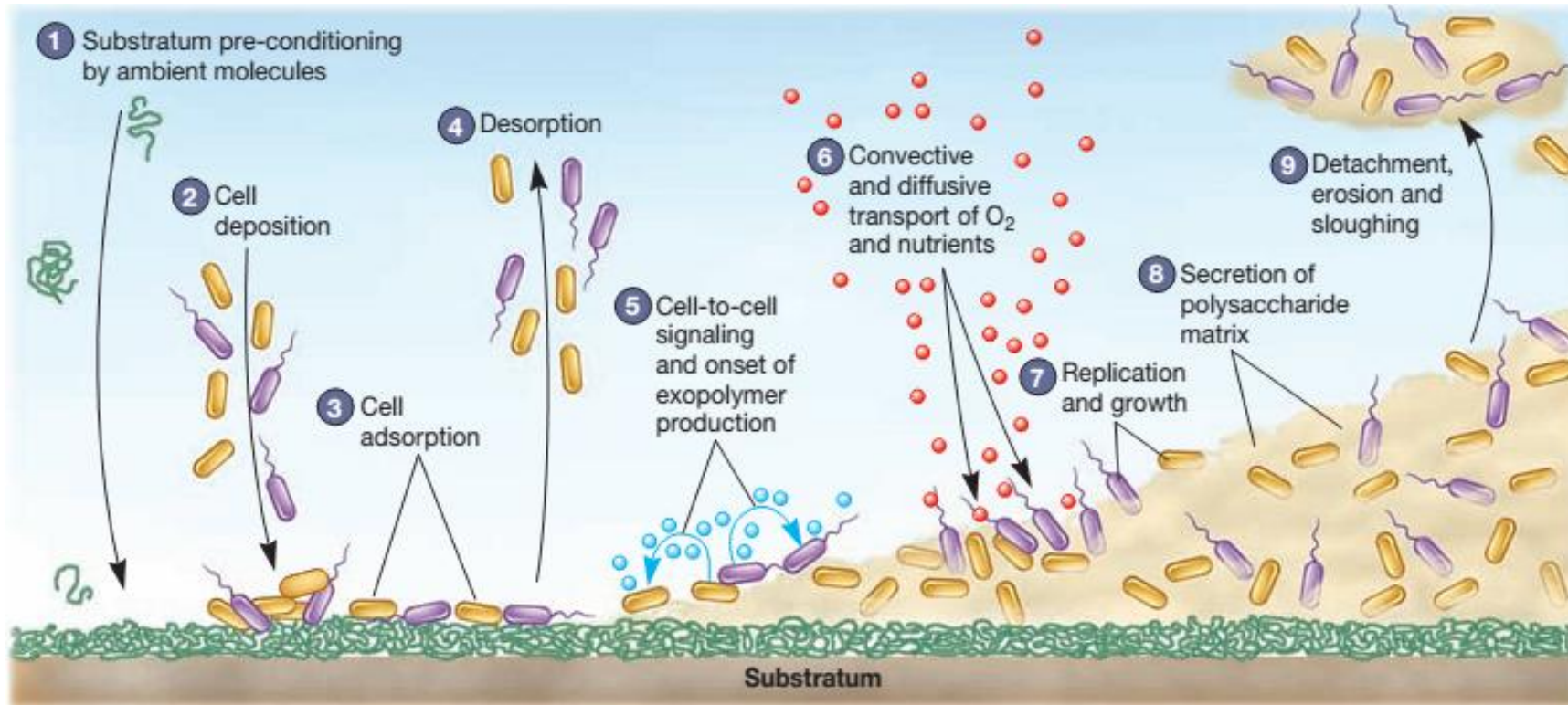
生物膜的形成是微生物细胞间抱团协作、互利共赢的典型例子!



图中红色为死细胞, 绿色为活细胞



5.1 微生物的生长



形成生物膜的示意图

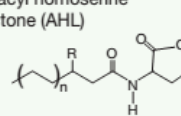
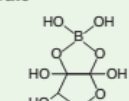
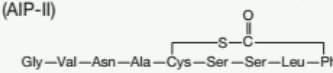


5.1 微生物的生长

◆ 自然环境中微生物的生长：微生物群体内细胞间的通信（Cell-Cell Communication Within Microbial Populations）

***Vibrio fischeri*:**

acylhomoserine lactone (AHL)

Signal and Structure	Representative Organism	Function Regulated
<p><i>N</i>-acyl homoserine lactone (AHL)</p> 	<p><i>Vibrio fischeri</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Erwinia carotovora</i></p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Burkholderia cepacia</i></p>	<p>Bioluminescence Plasmid transfer Virulence and antibiotic production Virulence and biofilm formation Virulence</p>
<p>Furanosylborate (AI-2)</p> 	<i>Vibrio harveyi</i>	Virulence
<p>Cyclic thiolactone (AIP-II)</p>  <p>Gly—Val—Asn—Ala—Cys—Ser—Ser—Leu—Phe</p>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Virulence

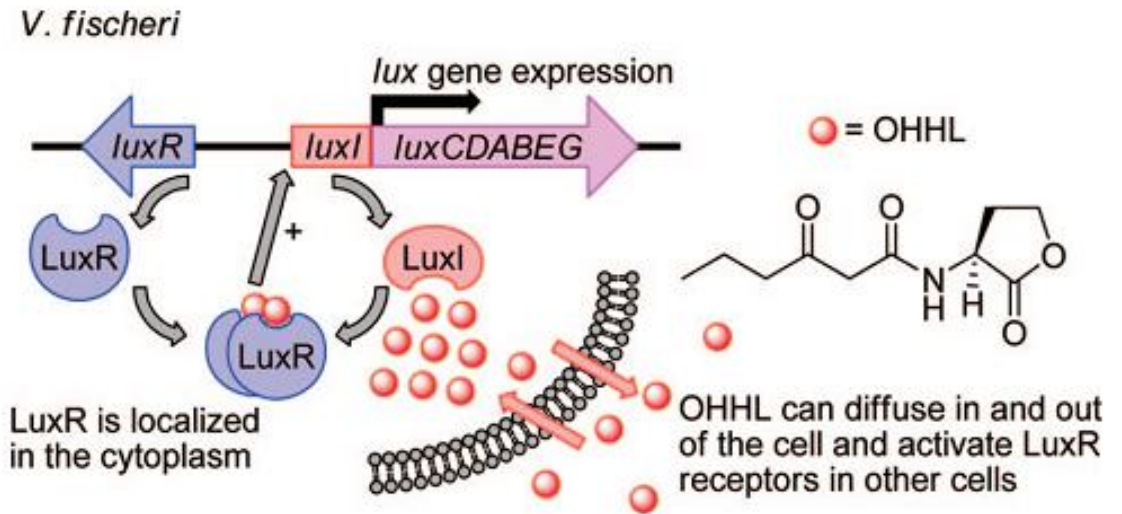


Figure 1. Schematic of the LuxI/LuxR quorum sensing system in *V. fischeri*.³¹



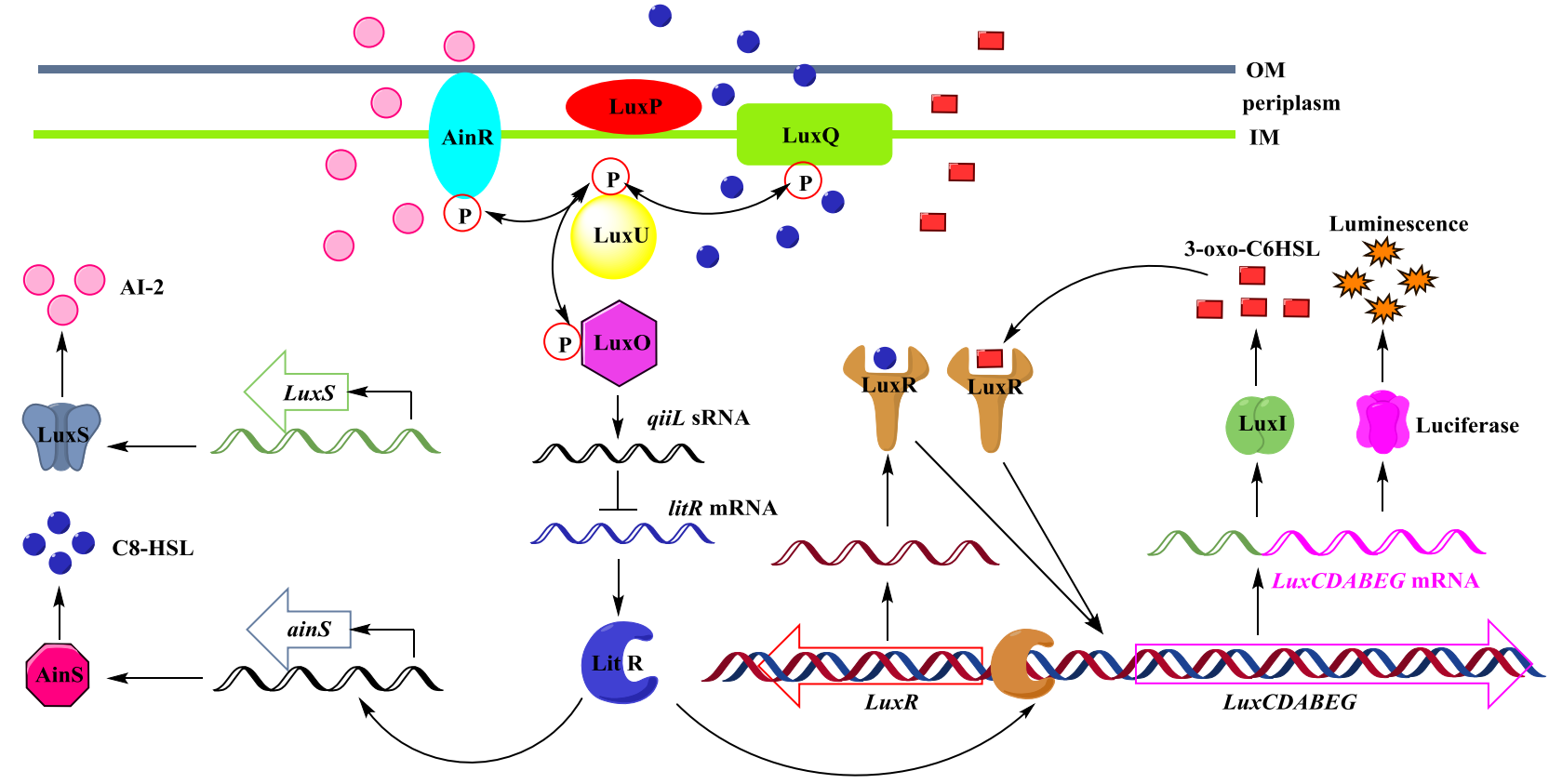
5.1 微生物的生长

群感效应 (quorum sensing)：一般指微生物群体的数量或密度达到某个水平后，由于细胞间的信号交流而诱导细胞内的一群基因表达，最终导致微生物群体行为的转变。

- 群感效应是建立在细胞间的通讯基础上，细胞之间交流的语言：AHL、AI-2、A-factor、gamma-GBL等几十种小分子，称为自分泌信号:autoinducer；
- 群感效应发生的另一个基础是细胞密度或群体数量，只有当群体的数量达到一定水平，信号分子的浓度达到阈值，才开启群感效应；
- 群感效应对于细胞的生长并非必需；
- 群感效应启动后，涉及许多的基因的开关，是一种全局性的细胞调控机制，同一生境中的所有细胞呈现出整体性的、一致性的步调；
- 群感效应的发现，揭示了微生物细胞间的交流现象，改变了人们对微生物的看法：单细胞的微生物是独立的个体，彼此没有交流和协作行为；
- G^+ 、 G^- 细菌都存在群感效应，可以说，群感效应在微生物领域是普遍性的生理现象；
- 群感效应涉及细胞间的通讯、生物膜的形成、细菌毒力的增强、次级代谢的调控等生理效应，是近年来微生物研究的新领域。

费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 群感效应的调控网络

- 缺乏AI-2和C8-HSL时, AinR和LuxQ磷酸化, 然后LuxU磷酸化, 继而LuxO磷酸化后激活, 关闭LitR。
- AI-2和C8-HSL积累导致LuxO去磷酸化, LitR大量表达, 激活LuxR, 上调ainS、LuxR表达, 继而LuxCDABEG表达, 形成正反馈放大, 细胞发光



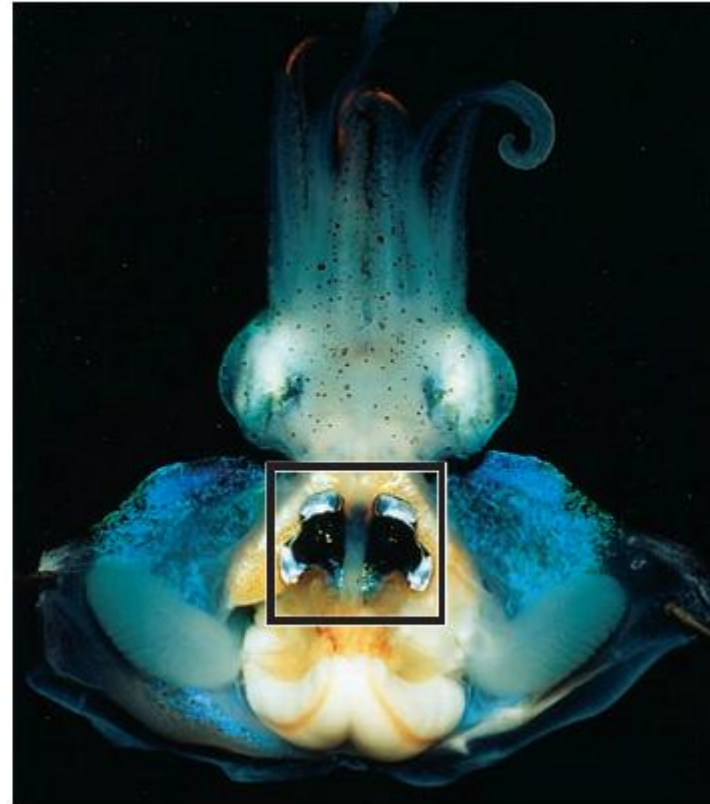
The QS network of *V. fischeri*



5.1 微生物的生长



(a) *E. scolopes*, the bobtail squid



(b) Light organ



拓展阅读

28

Chem. Rev. 2011, 111, 28–67

Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria: Small-Molecule Modulation of AHL and AI-2 Quorum Sensing Pathways

Warren R. J. D. Galloway,[†] James T. Hodgkinson,^{†,‡} Steven D. Bowden,[‡] Martin Welch,[‡] and David R. Spring^{*,†}

Department of Chemistry and Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, CB2 1EW U.K.



5.2 微生物的控制

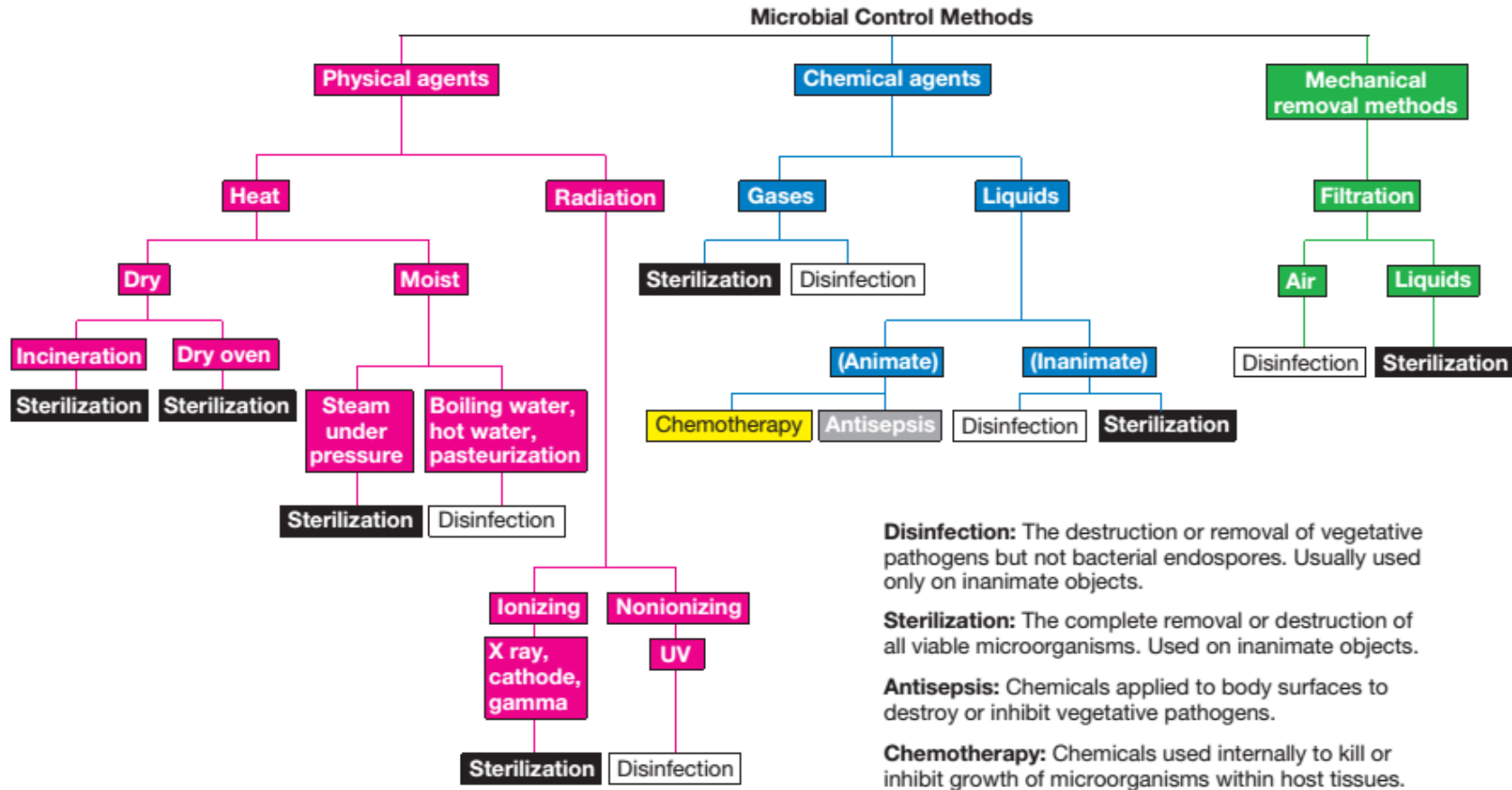


Figure 7.1 Microbial Control Methods.



5.2 微生物的控制

常见术语:

- 抑制 (**inhibition**): 生命的活动受阻但不死亡; 一旦解除, 活力可以恢复
- 死亡 (**death**): 生命不可逆的丧失
- 消毒 (**disinfection**): 杀死、抑制或除去一般环境或医疗器械上的病原菌
- 卫生消毒 (**sanitization**): 杀死、抑制或除去餐厅环境的病原菌
- 灭菌 (**sterilization**): 杀死一切生命形式
- 防腐 (**antisepsis**): 用化学试剂抑制微生物的生长繁殖
- 化疗 (**chemotherapy**): 用高度选择毒力的化学物质靶向性地杀死或抑制宿主体内的微生物的生长繁殖



5.2 微生物的控制

◆ 影响微生物死亡的因素：

- 微生物群体大小：数量大小有直接关系；
- 微生物群体的组成：包括菌龄结构、种类结构、不同形态的结构组成；
- 抗微生物试剂的浓度和毒力：最低抑菌浓度和杀菌的效果；
- 作用的时间：
- 温度：高则杀菌时间短，低则相反；湿热杀菌快，干热杀菌慢；
- 局部环境：环境中的pH和有机物：如低的pH容易灭菌，高则相反；生物膜的形成，使杀死微生物非常困难，尤其在医疗感染当中。



5.2 微生物的控制

◆物理方法控制微生物:

- 1、高温灭菌 2、辐射作用 3、过滤作用
4、高渗作用 5、干燥 6、超声波 7、静高压

1.1 湿热 (heat) :

Table 7.2 Approximate Conditions for Moist Heat Killing		
Organism	Vegetative Cells	Spores
Yeasts	5 minutes at 50–60°C	5 minutes at 70–80°C
Molds	30 minutes at 62°C	30 minutes at 80°C
Bacteria ^a	10 minutes at 60–70°C	2 to over 800 minutes at 100°C 0.5–12 minutes at 121°C
Viruses	30 minutes at 60°C	

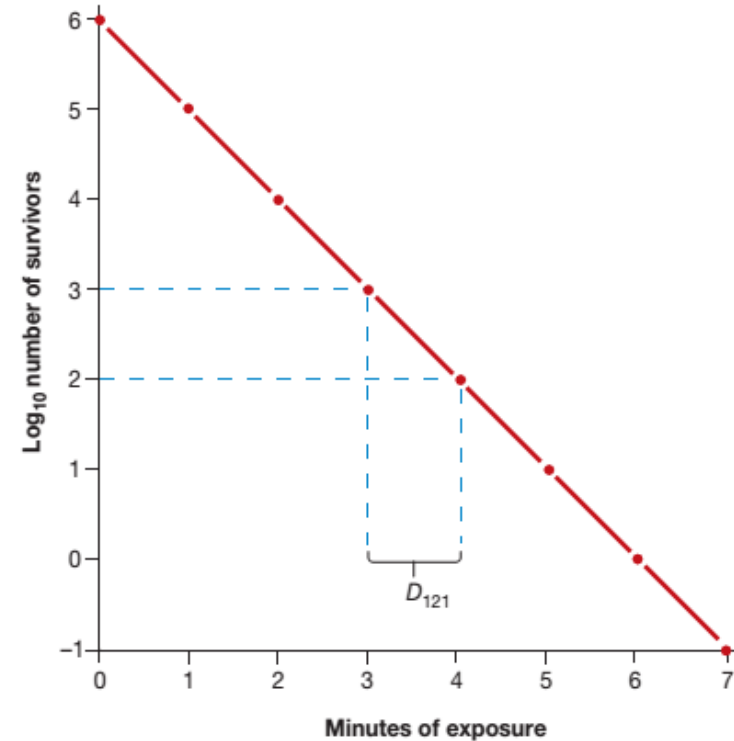


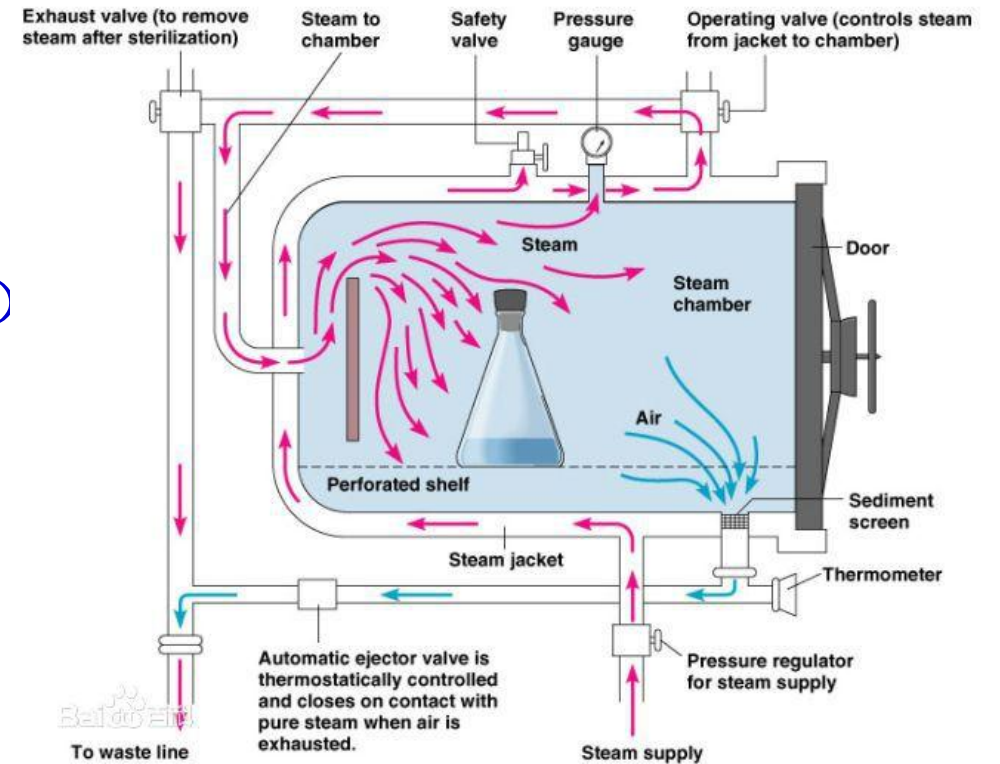
Figure 7.2 The Pattern of Microbial Death. An exponential plot of the survivors versus the minutes of exposure to heating at 121°C. In this example the D_{121} value is 1 minute. The data are from table 7.1.



5.2 微生物的控制

1.1 湿热 (moist heat) :

- 高压蒸汽灭菌 (autoclaving) :
 - 一般的培养基: 121°C、15pounds、30min;
 - 葡萄糖、维生素等: 112°C、8pounds、15min.
- 连续加压蒸汽灭菌法 (continuous autoclaving)
135-140°C, 15s;
- 巴氏消毒法 (pasteurization) :
 - LTH: 63°C, 30min;
 - HTST: 72- 85°C, 15s; 或者120-140°C, 2- 4s
- 煮沸消毒法:
- 间歇灭菌法 (fractional sterilization) :

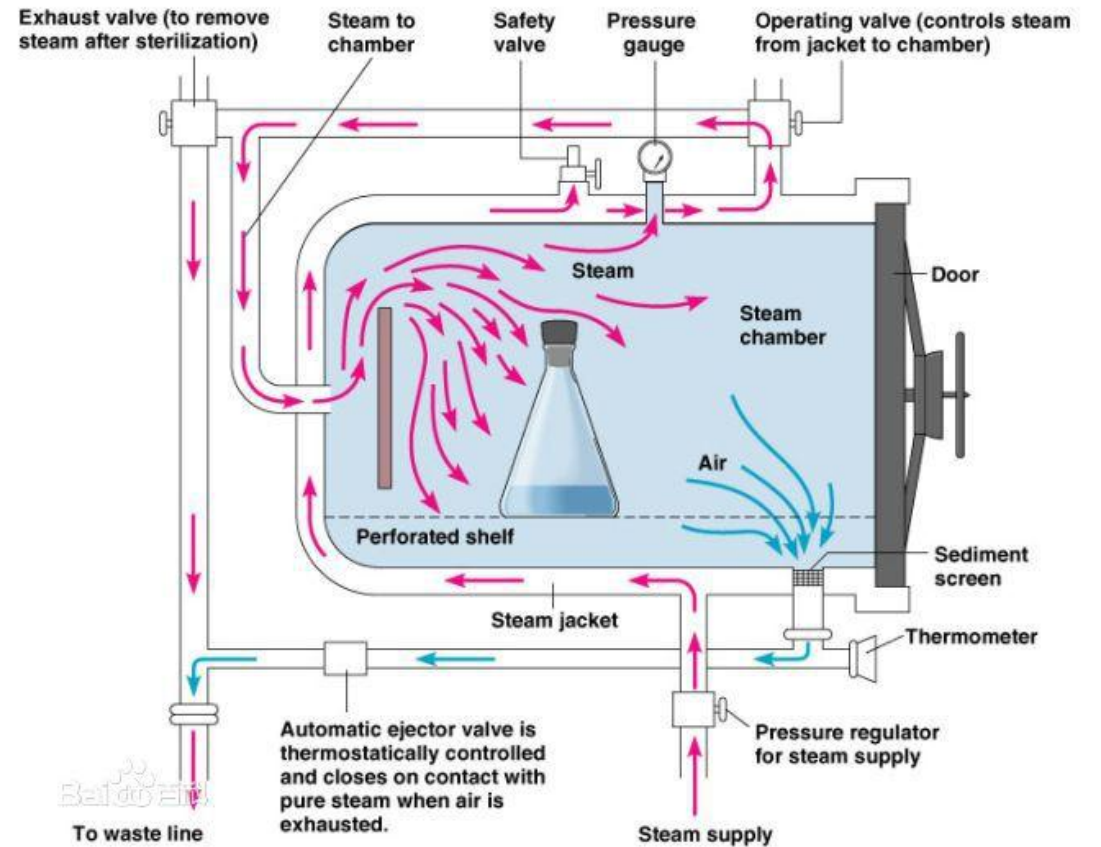




5.2 微生物的控制

◆ 高压蒸汽灭菌注意事项:

- 灭菌包不宜过大过紧（体积不应大于 $30\text{cm} \times 30\text{cm} \times 30\text{cm}$ ），灭菌器内物品的放置总量不应超过灭菌器柜室容积的85%。各包之间留有空隙，以便于蒸汽流通、渗入包裹中央，排气时蒸汽迅速排出，保持物品干燥；
- 盛装物品的容器应有孔，若无孔，应将容器盖打开；
- 布类物品放在金属、搪瓷类物品之上；
- 被灭菌物品应待干燥后才能取出备用；
- 灭菌锅密闭前，应将冷空气充分排空；
- 随时观察压力及温度情况；
- 注意安全操作，每次灭菌前，应检查灭菌器是否处于良好的工作状态；
- 灭菌完毕后减压不要过猛，压力表回归“0”位后才可打开盖或门。





5.2 微生物的控制

1.2 干热

灼烧 (**incineration**)：适合一些金属或玻璃的器皿对表面的微生物的灭菌。

- 干热灭菌的效率低，关键在于干燥的物质传热慢。
- 通常实验室玻璃棒、接种针都采用酒精灯灼烧灭菌；
- 保温箱通常可进行干热灭菌；
- 垃圾焚烧和传染性疾病的衣物的焚烧都属于干热灭菌。

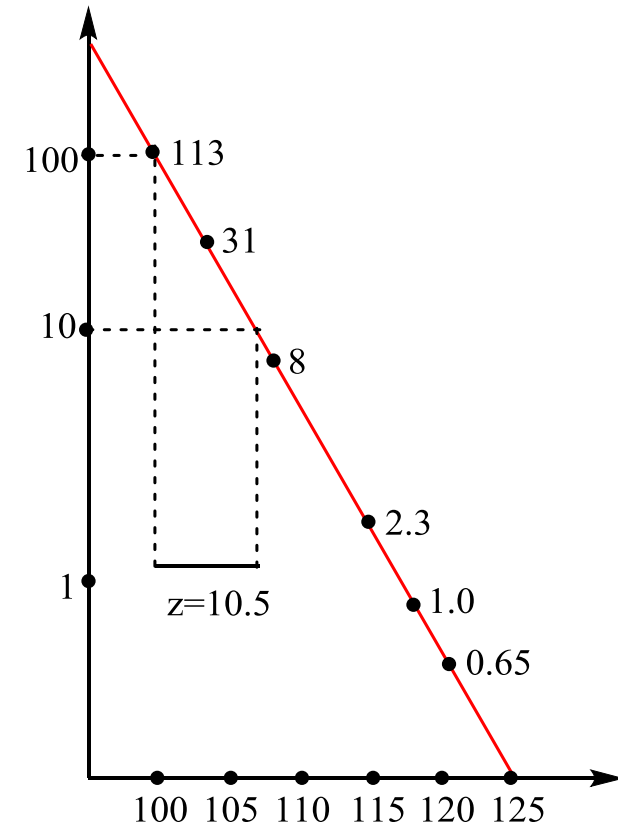


电子焚烧计



5.2 微生物的控制

- ◆ **热死点 (thermal death point , TDP):** 在10分钟内杀死全部悬浮液中的微生物的温度。
- ◆ **热死时间 (thermal death time , TDT):** 指在某一温度下, 杀死全部悬浮液中的微生物所需的时间
- ◆ **十倍减少时间 (decimal reduction time , D):** 在特定的温度下杀死样品中90%的微生物所需的时间。
- ◆ **z value:** 将D值降到1/10需要提高的温度, 反映微生物对温度的抗性;



z值的计算



Table 7.3 D Values and z Values for Some Food-Borne Pathogens			
Organism	Substrate	D Value (°C) in Minutes	z Value (°C)
<i>Clostridium botulinum</i>	Phosphate buffer	$D_{121} = 0.204$	10
<i>Clostridium perfringens</i> (heat-resistant strain)	Culture media	$D_{90} = 3-5$	6-8
<i>Salmonella</i> spp.	Chicken à la king	$D_{60} = 0.39-0.40$	4.9-5.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chicken à la king	$D_{60} = 5.17-5.37$	5.2-5.8
	Turkey stuffing	$D_{60} = 15.4$	6.8
	0.5% NaCl	$D_{60} = 2.0-2.5$	5.6

Values taken from F. L. Bryan, 1979, "Processes That Affect Survival and Growth of Microorganisms," *Time-Temperature Control of Foodborne Pathogens*, Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.



5.2 微生物的控制

1.3 低温

- 低温状态微生物会停止生长，主要是酶活受到抑制；
 - 在零度以下甚至更低，微生物生长受到抑制，主要是缺乏液态水
 - 冷冻形成的冰晶会杀死微生物；
 - 反复冷冻-融化会导致微生物死亡。
- ✓ 微生物的保藏一般处于低温，在20%的甘油管中， -70°C 可保藏1-3年。



5.2 微生物的控制

2. 辐射 (radiation)

◆ **紫外辐射 (Ultraviolet, UV radiation)** :
260nm的紫外会形成DNA的嘧啶二聚体, 导致细胞死亡, 一般照射时间为30分钟左右即可。

- 紫外的穿透力差, 一般用于表面的杀菌;
- 紫外可用于超净台的辐射杀菌;
- 紫外可用来在餐具的杀菌, 也可用于水体的消毒;
- 紫外对皮肤有灼伤作用, 应小心避免;

◆ **电离辐射 (ionization radiation): 产生自由基。**

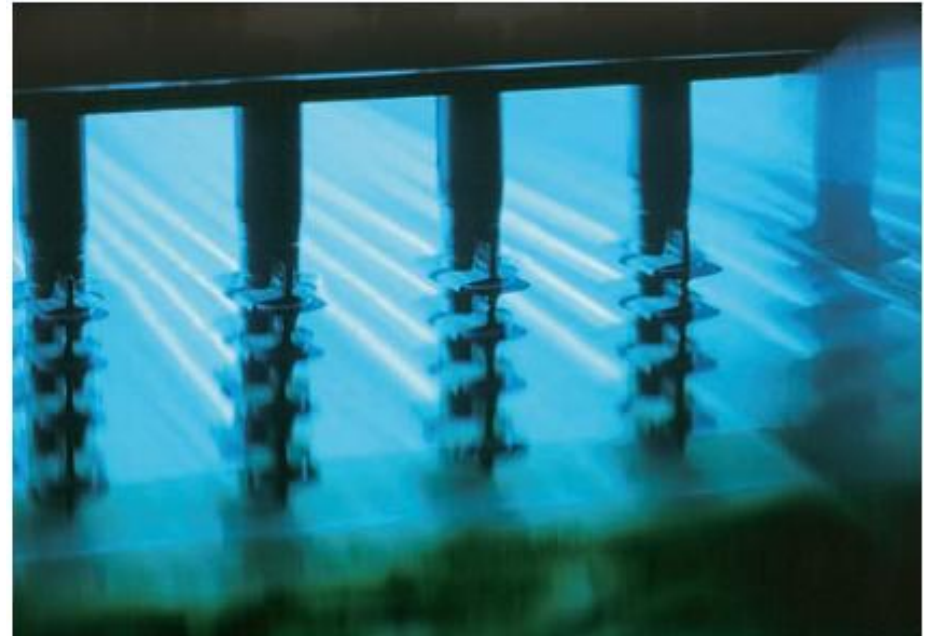


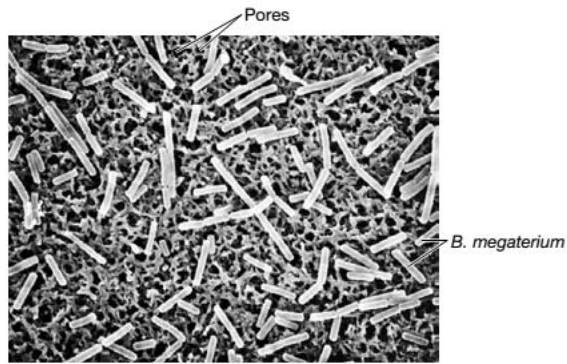
Figure 7.9 Ultraviolet (UV) Treatment System for Disinfection of Water. Water flows through racks of UV lamps and is exposed to 254 nm UV radiation. This system has a capacity of several million gallons per day and can be used as an alternative to chlorination.



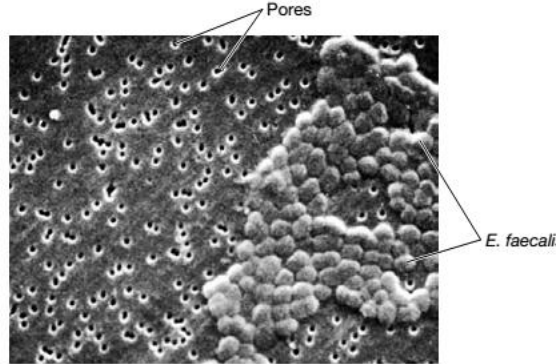
5.2 微生物的控制

3. 过滤 (filtration)

方便且良好的除菌方法，主要针对热敏感的培养基。
膜过滤是常用的方法。超滤膜：孔径：0.2 μm 。

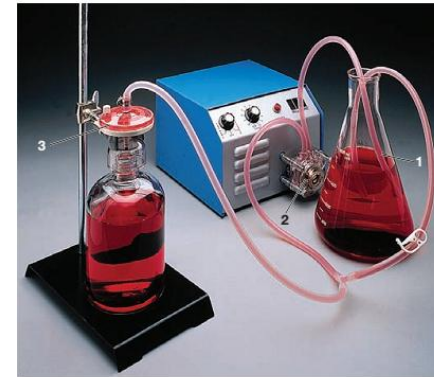


(a) *B. megaterium*

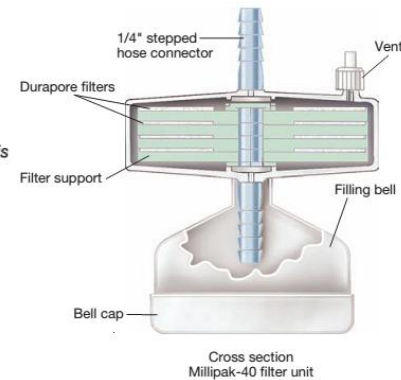


(b) *E. faecalis*

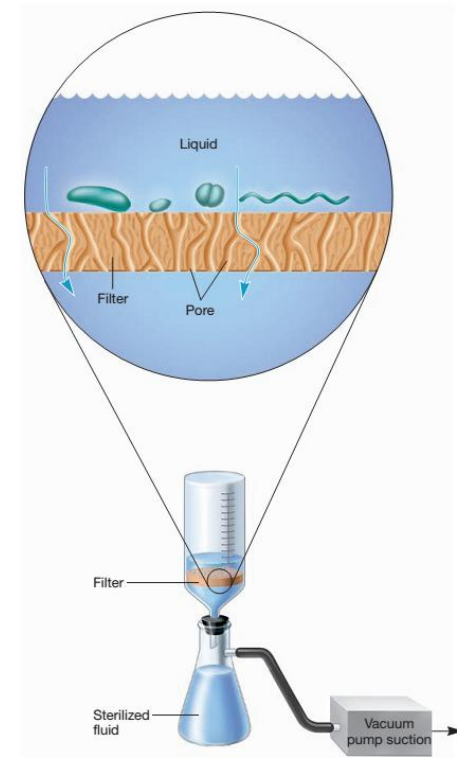
Figure 7.7 Membrane Filter Types. (a) *Bacillus megaterium* on an Ultipor nylon membrane with a bacterial removal rating of 0.2 μm ($\times 2,000$). (b) *Enterococcus faecalis* resting on a polycarbonate membrane filter with 0.4 μm pores ($\times 5,900$).



(a)



(c)



(b)

Figure 7.6 Membrane Filter Sterilization.



5.2 微生物的控制

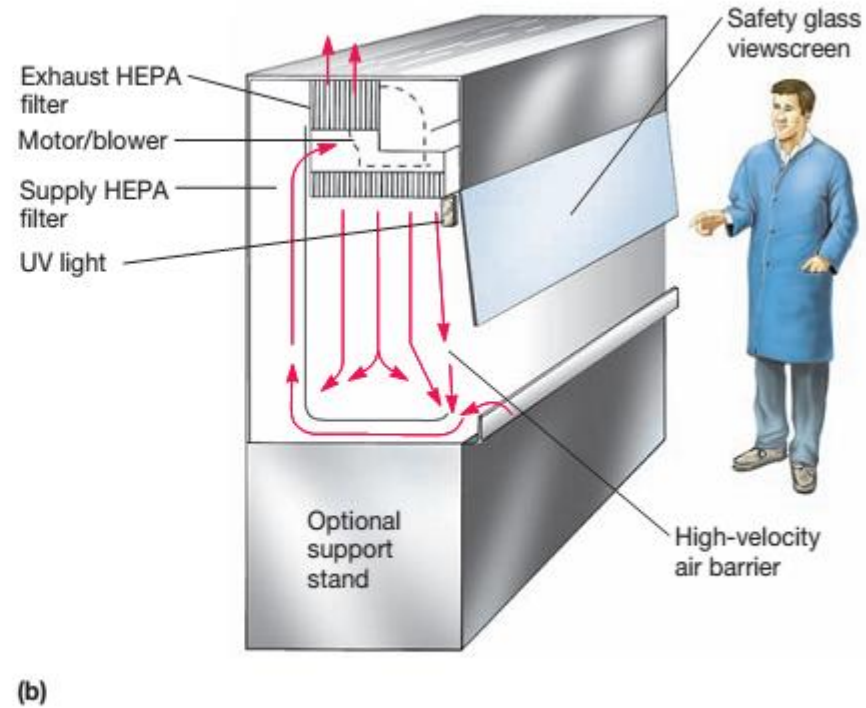


Figure 7.8 A Laminar Flow Biological Safety Cabinet. (a) A technician pipetting potentially hazardous material in a safety cabinet. (b) A schematic diagram showing the airflow pattern.



5.2 微生物的控制

◆ 控制微生物的化学物质

- 1、表面消毒剂
- 2、抗代谢物
- 3、抗生素

➤ 最低抑菌浓度 (minimum inhibition concentration, MIC) 在一定条件下, 某化学试剂抑制全部微生物生长时的最低浓度

➤ 半数致死量 (50% lethal does, LD₅₀) 在一定条件下, 化学药物能使50%的受试动物死亡的计量

➤ 最低致死剂量 (minimum lethal does, MLD): 在一定条件下, 化学药物能使100%的受试动物死亡的计量



5.2 微生物的控制

1. 表面消毒剂

指对一切活细胞、病毒粒和生物大分子都有毒性的，不能做活细胞和机体内治疗的化学试剂

- **石炭酸系数 (phenol coefficient, P.C) :**
指在一定的时间内，被试药剂能全部杀死全部供试菌的最高稀释度与达到同效的石炭酸的最高稀释度之比。

右图不同的石炭酸系数比较:

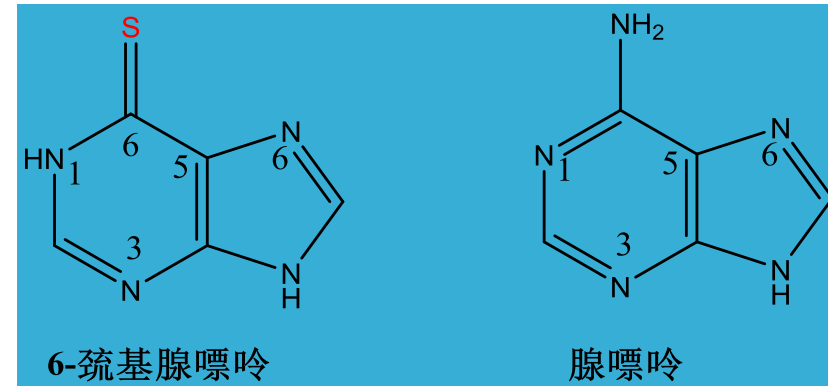
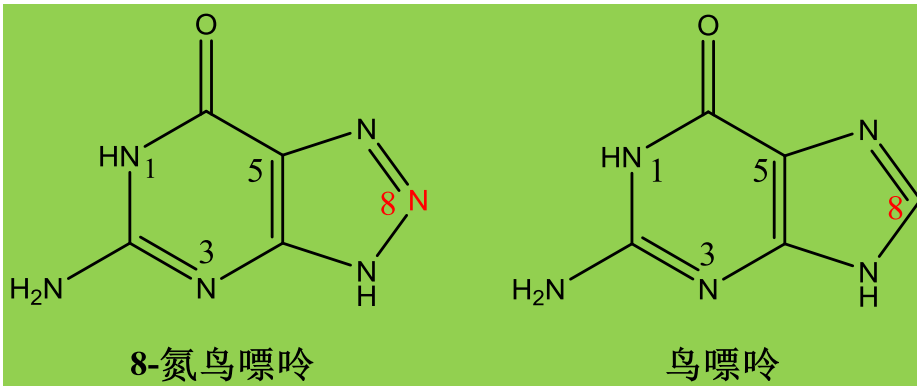
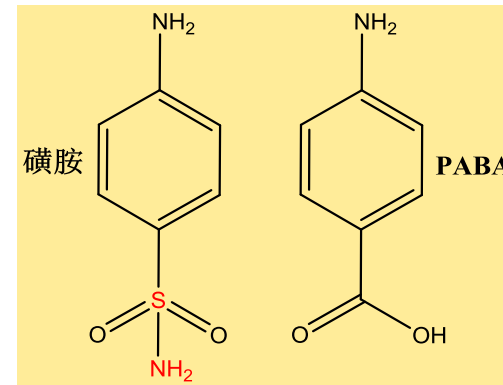
消毒剂名称	伤寒沙门氏菌	金黄色葡萄球菌
硫柳汞	600	62.5
十六烷基氯化吡啶鎓	228	337
六硫氯	5-15	15-40
邻苯酚	5.6	4.0
2%碘酒	4.1-5.2	4.1-5.2
红汞	2.7	5.3
甲酚	2.0-2.3	2.3
来苏尔	1.9	3.5
异丙醇	0.6	0.5
乙醇	0.04	0.04
石炭酸	1	1



5.2 微生物的控制

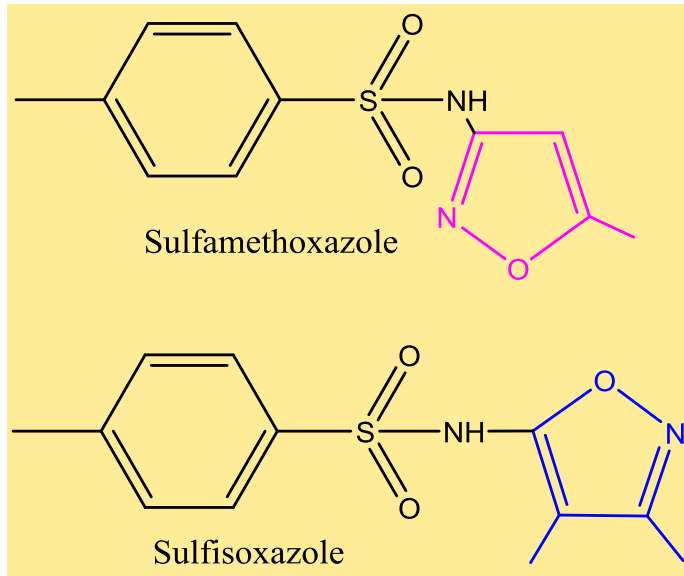
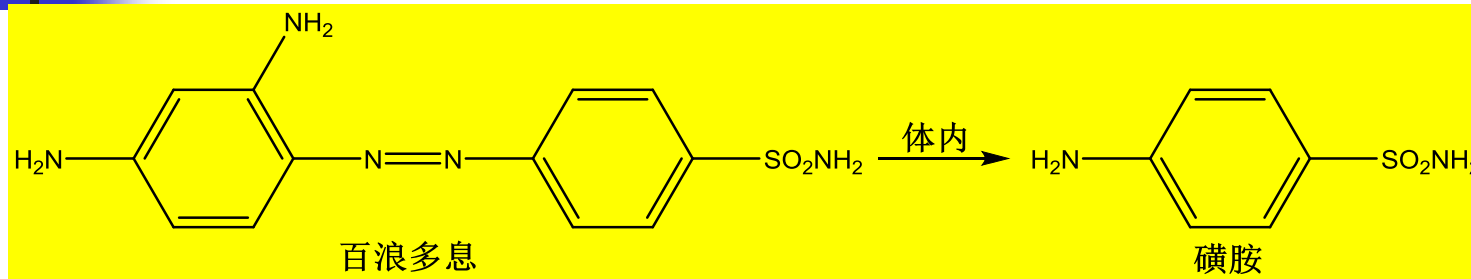
2. 抗代谢药物 (antimetabolite 或metabolite analogue)

- 与正常的代谢物一起竞争酶活中心；磺胺类
- 假冒正常代谢物，使微生物无法合成正常的产物：8-重氮鸟嘌呤取代鸟嘌呤
- 冒充代谢终产物进行反馈性地调节酶活的别构中心，阻断正常的代谢途径：6-巯基腺嘌呤抑制腺嘌呤的合成。

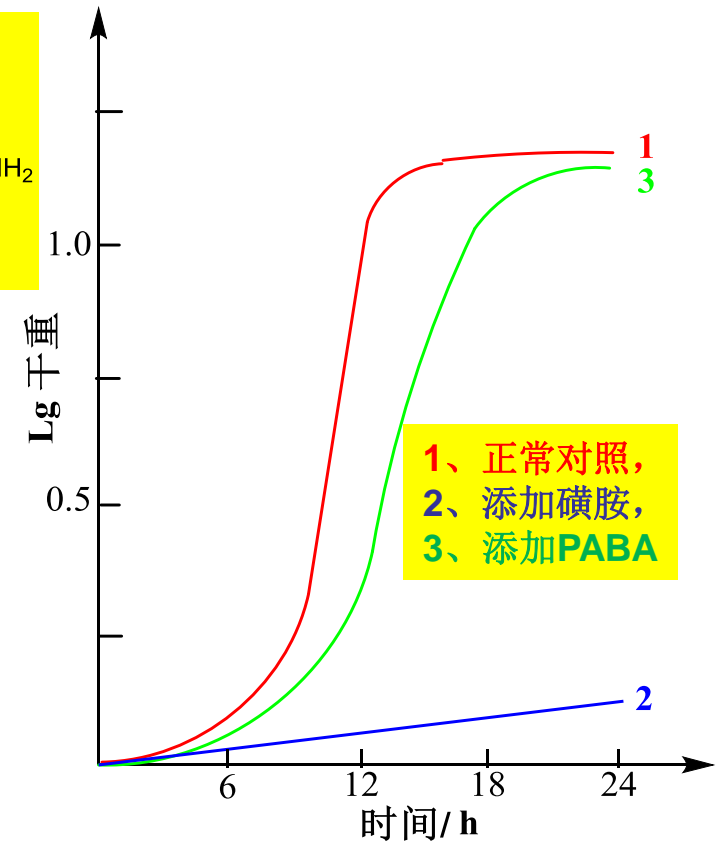




5.2 微生物的控制



- 磺胺产生抑菌效果，其浓度必须高于PABA；
- 增加PABA、二氢蝶呤、二氢叶酸、嘌呤、嘧啶等可解除磺胺的抑制；
- 磺胺抗性突变一般总是变成PABA合成提高的菌株



PABA解除磺胺对 *E. coli* 的抑制



5.2 微生物的控制

3. 抗生素 (antibiotics)

抗生素一词由**Selman Waksman**首创。指一类由微生物或其他生物通过次级代谢途径合成的次级代谢产物，或人工半合成的产物，在低浓度能抑制或杀死其他生物的生物活性物质。简单分为抗菌、抗肿瘤、免疫抑制等类型。

- 第一个抗生素是Fleming1928年发现的青霉素 (Penicillin)，到目前为止人类已经发现15, 000多种不同类型的天然抗生素，其中面市的达300多种；
- 已知75%的抗生素由放线菌所产生，20%来自真菌；
- 全球抗生素的产量比列：头孢菌素 (45 %), 青霉素类的(15 %), 喹诺酮 (11 %), 四环素类(6 %), 大环内酯5%, 其余包括氨基糖苷类, 安莎类糖肽类、脂肽类、多烯类，全球每年生产的抗生素接近20万吨。

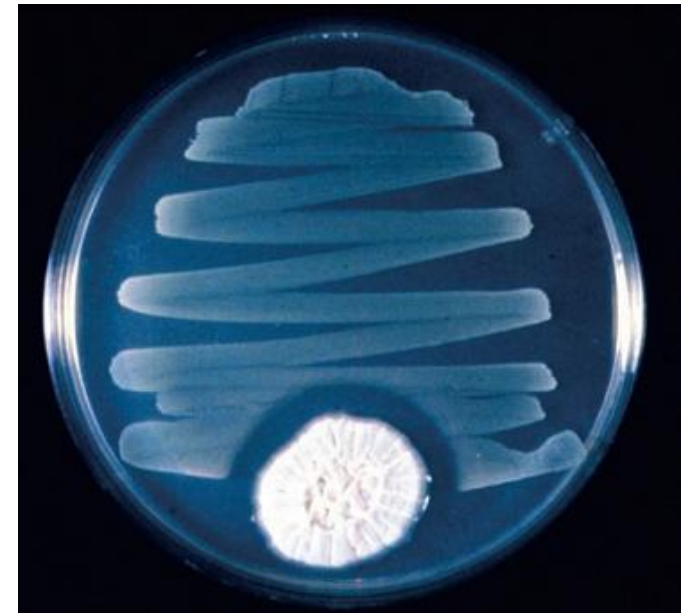
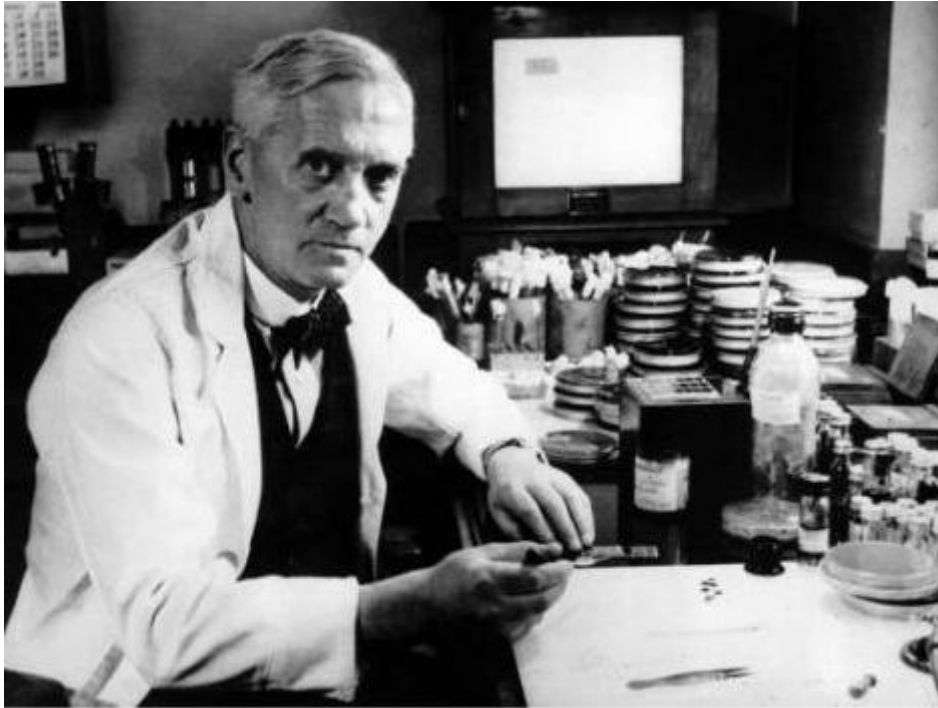


Figure 34.1 Bacteriocidal Action of Penicillin. The *Penicillium* mold colony secretes penicillin that kills *Staphylococcus aureus* that was streaked nearby.



抗生素研究的两位大师

1945 Nobel Prize



Alexander Fleming (1881-1955)

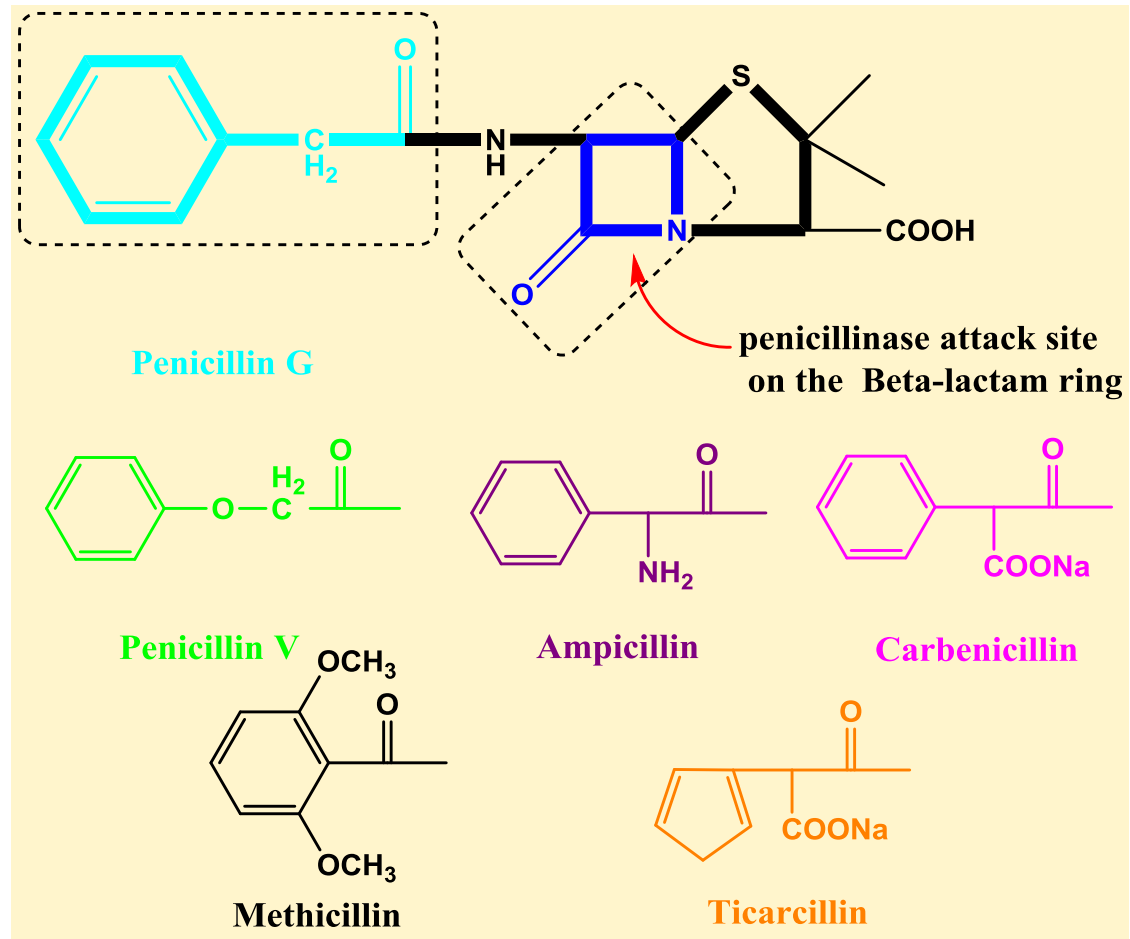
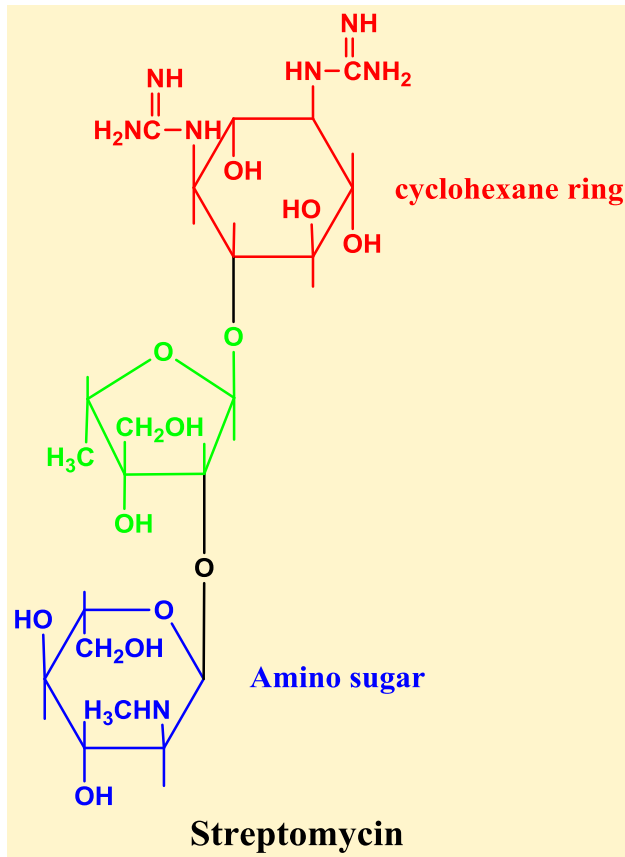


Selman Waksman (1888-1973)

1952 Nobel Prize



链霉素、青霉素及其衍生物的分子结构





5.2 微生物的控制

可根据化学结构特点可划分为10多个系列： β -内酰胺类 (β -lactams)，(其中包括头孢类) 氨基糖苷类 (aminoglycosides)，大环内酯类 (macrolides)，肽类 (peptides)，四环素类 (tetracyclines)，蒽环类 (Anthracyclines)，脂肽类 (lipopeptides)，喹诺酮类 (quinolones/fluoroquinolones)，安莎类 (ansamycins)，核苷类 (nucleosides)，聚醚类 (polyethers)，多烯 (polyenes)，含氧杂环类 (Oxazolidinones)，磺胺类 (sulfonamides) 等，也包括目前还没有归类的抗生素，如 texiobactin。

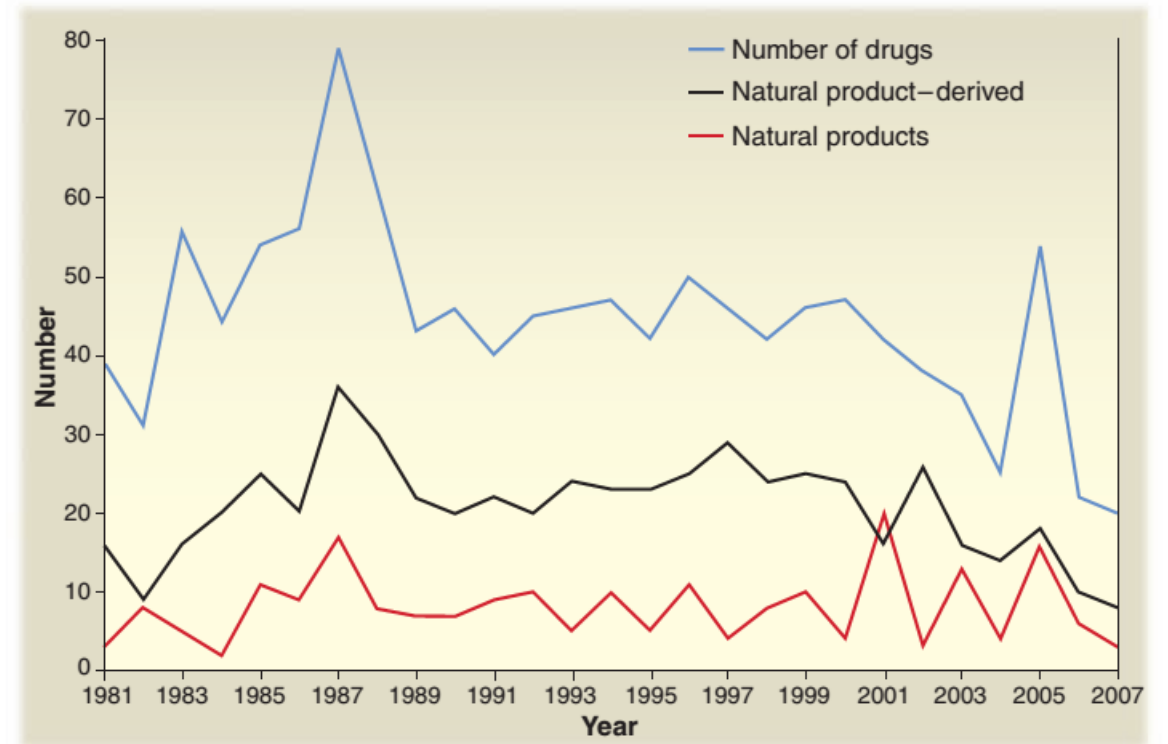


Fig. 1. Number of drugs approved in the United States from 1981 to 2007.



5.2 微生物的控制

J Ind Microbiol Biotechnol (2014) 41:185–201
DOI 10.1007/s10295-013-1325-z

REVIEW

SIMB
Society for Industrial Microbiology
and Biotechnology

**Importance of microbial natural products and the need
to revitalize their discovery**

Arnold L. Demain



5.2 微生物的控制

3. 抗生素 (antibiotics)

◆ 抗生素根据作用的靶点 (target) 类型可以分为五大类:

- 抑制细胞壁合成;
- 破坏细胞膜;
- 阻断DNA、RNA合成;
- 阻断蛋白的合成;
- 抗代谢类。

◆ 根据抗菌效果, 开分为:

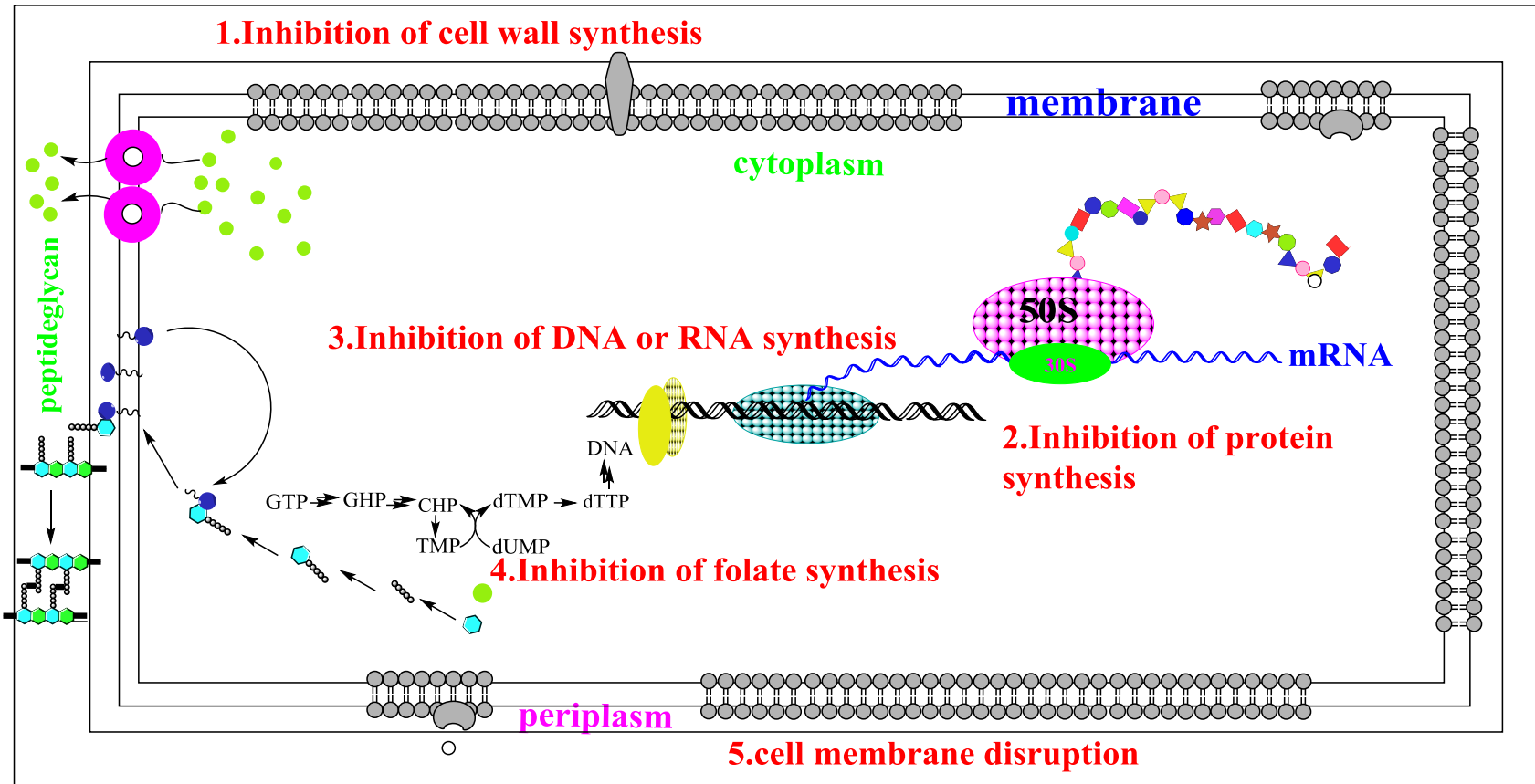
- 杀菌性 (cidal): 杀死细胞, 生命丧失, 不可逆转;
- 抑制性 (static): 暂时抑制细胞生长, 一旦解除, 可以恢复。

无论杀菌还是抑菌, 都是浓度依赖性的。



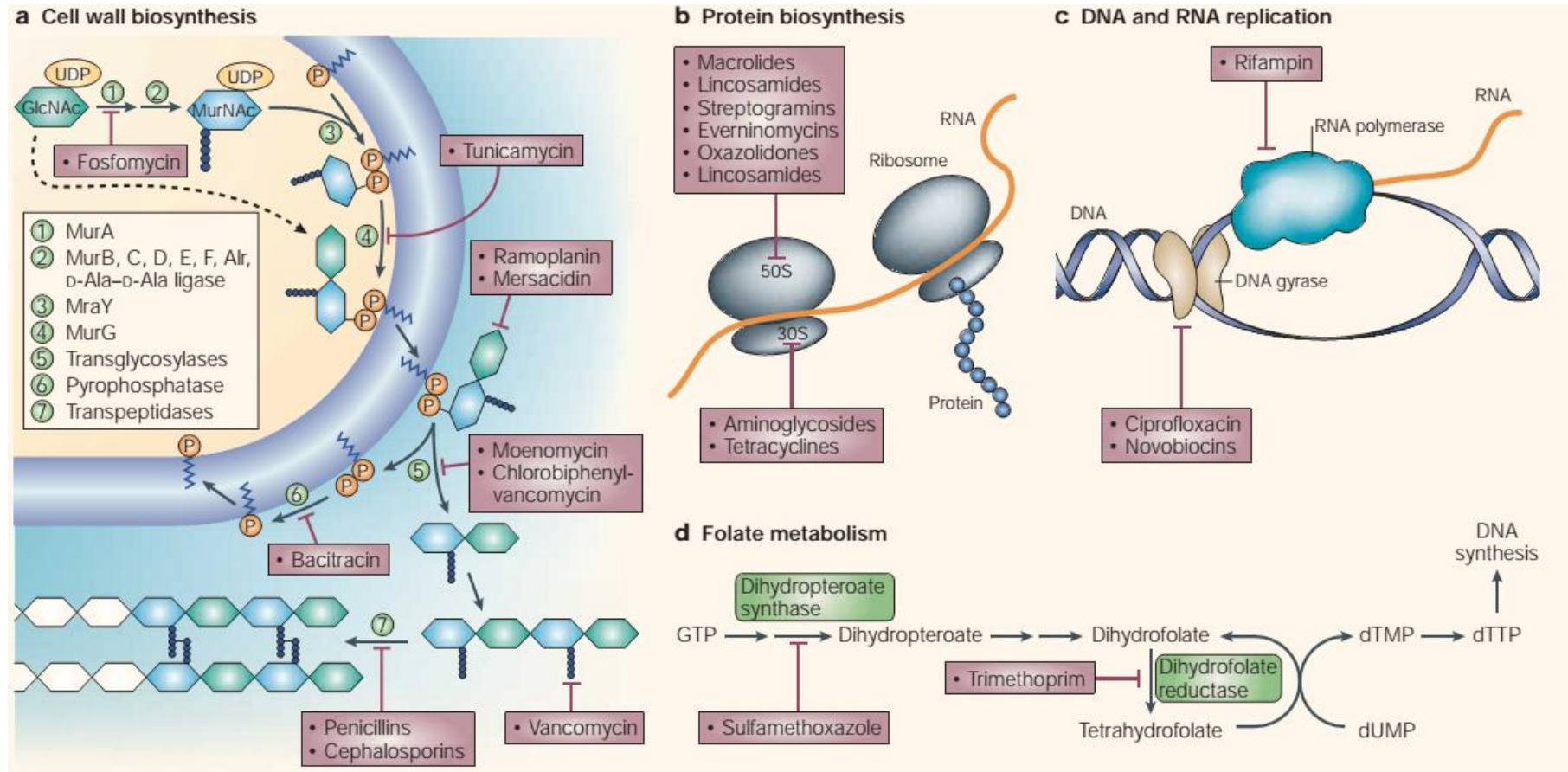
5.2 微生物的控制

抗生素的作用机制示意图





5.2 微生物的控制





5.2 微生物的控制

3. 抗生素 (antibiotics)

Table 34.1 Properties of Some Common Antibacterial Drugs					
Antibiotic Group	Primary Effect	Mechanism of Action	Members	Spectrum	Common Side Effects
Cell Wall Synthesis Inhibition					
Penicillins	Cidal	Inhibit transpeptidation enzymes involved in cross-linking the polysaccharide chains of the bacterial cell wall peptidoglycan. Activate cell wall lytic enzymes.	Penicillin G, penicillin V, methicillin	Narrow (gram-positive)	Allergic responses (diarrhea, anemia, hives, nausea, renal toxicity)
			Ampicillin, carbenicillin	Broad (gram-positive, some gram-negative)	
Cephalosporins	Cidal	Same as above	Cephalothin, cefoxitin, cefaperazone, ceftriaxone	Broad (gram-positive, some gram-negative)	Allergic responses, thrombophlebitis, renal injury
Vancomycin	Cidal	Prevents transpeptidation of peptidoglycan subunits by binding to D-Ala-D-Ala amino acids at the end of peptide cross-bridges. Thus it has a different binding site than that of the penicillins.	Vancomycin	Narrow (gram-positive)	Ototoxic (tinnitus and deafness), nephrotoxic, allergic reactions



5.2 微生物的控制

3. 抗生素 (antibiotics)

Protein Synthesis Inhibition					
Aminoglycosides	Cidal	Bind to small ribosomal subunit (30S) and interfere with protein synthesis by directly inhibiting synthesis and causing misreading of mRNA	Neomycin, kanamycin, gentamicin	Broad (gram-negative, mycobacteria)	Deafness, renal damage, loss of balance, nausea, allergic responses
			Streptomycin	Narrow (aerobic gram-negative)	Same as above
Tetracyclines	Static	Same as above	Oxytetracycline, chlortetracycline	Broad (gram-positive and -negative, rickettsia and chlamydia)	Gastrointestinal upset, teeth discoloration, renal, hepatic injury
Macrolides	Static	Bind to 23S rRNA of large ribosomal subunit (50S) to inhibit peptide chain elongation during protein synthesis	Erythromycin, clindamycin	Broad (aerobic and anaerobic gram-positive, some gram-negative)	Gastrointestinal upset, hepatic injury, anemia, allergic responses
Chloramphenicol	Static	Same as above	Chloramphenicol	Broad (gram-positive and -negative, rickettsia and chlamydia)	Depressed bone marrow function, allergic reactions



5.2 微生物的控制

3. 抗生素 (antibiotics)

Nucleic Acid Synthesis Inhibition					
Quinolones and Fluoroquinolones	Cidal	Inhibit DNA gyrase and topoisomerase IV, thereby blocking DNA replication	Norfloxacin, ciprofloxacin, Levofloxacin	Narrow (gram-negatives better than gram-positives) Broad spectrum	Tendonitis, headache, lightheadedness, convulsions, allergic
Rifampin	Cidal	Inhibits bacterial DNA-dependent RNA polymerase	R-Cin, rifacilin, rifamycin, rimactane, rimpin, siticox	<i>Mycobacterium</i> infections and some gram-negative such as <i>Neisseria meningitidis</i> and <i>Haemophilus influenzae</i> b	Nausea, vomiting, diarrhea, fatigue, anemia, drowsiness, headache, mouth ulceration, liver damage
Cell Membrane Disruption					
Polymyxin B	Cidal	Binds to plasma membrane and disrupts its structure and permeability properties	Polymyxin B, polymyxin topical ointment	Narrow—gram-negatives only	Can cause severe kidney damage, drowsiness, dizziness



5.2 微生物的控制

3. 抗生素 (antibiotics)

Antimetabolites					
Sulfonamides	Static	Inhibits folic acid synthesis by competing with ρ -aminobenzoic acid (PABA)	Silver sulfadiazine, sodium sulfacetamide, sulfamethoxazole, sulfanilamide, sulfasalazine, sulfisoxazole	Broad spectrum	Nausea, vomiting, and diarrhea; hypersensitivity reactions such as rashes, photosensitivity
Trimethoprim	Static	Blocks folic acid synthesis by inhibiting the enzyme tetrahydrofolate reductase	Trimethoprim (in combination with a sulfamethoxazole [1:5])	Broad spectrum	Same as sulfonamides, but less frequent
Dapsone	Static	Thought to interfere with folic acid synthesis	Dapsone	Narrow—mycobacterial infections, principally leprosy	Back, leg, or stomach pains; discolored fingernails, lips, or skin; breathing difficulties fever, loss of appetite, skin rash, fatigue
Isoniazid	Cidal if bacteria are actively growing, static if bacteria are dormant	Exact mechanism is unclear, but it is thought to inhibit lipid synthesis (especially mycolic acid); putative enoyl-reductase inhibitor	Isoniazid	Narrow—mycobacterial infections, principally tuberculosis	Nausea, vomiting, liver damage, seizures, "pins and needles" in extremities (peripheral neuropathy)



5.2 微生物的控制

3. 抗生素 (antibiotics)

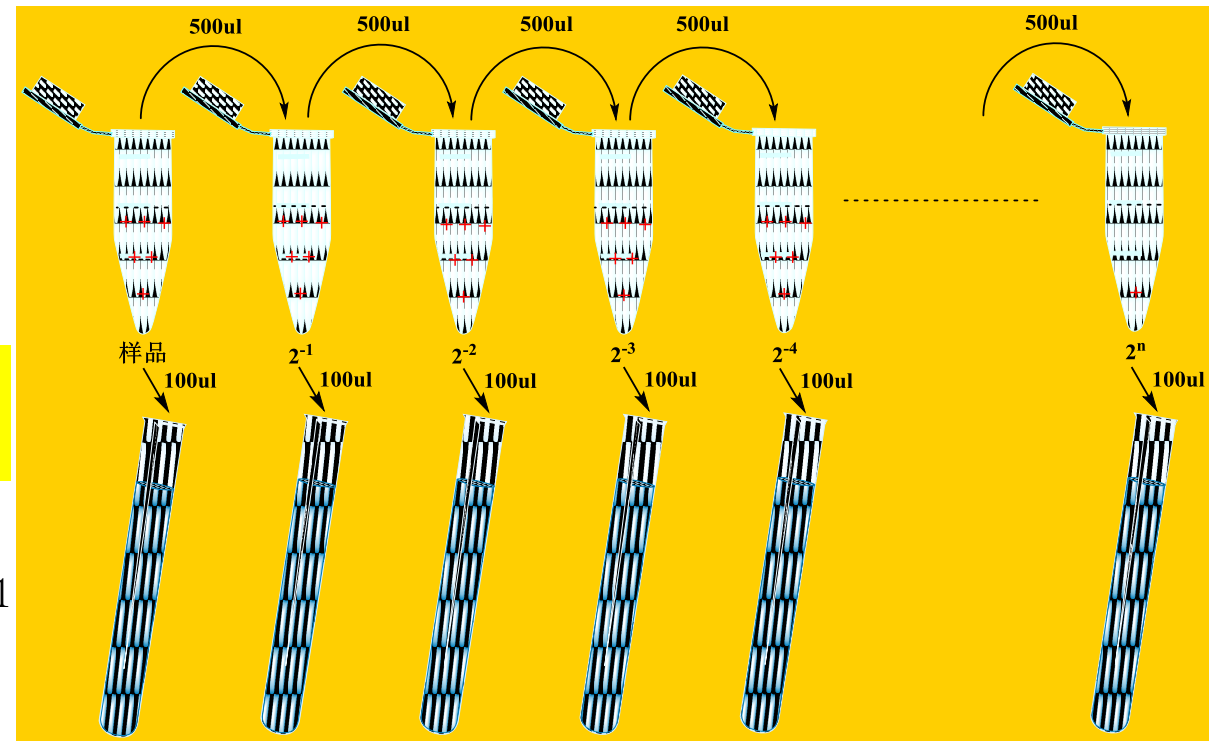
抗生素的效价 (titer) : 单位 (unit)
简言之, 效价就是纯度, 现规定:
 $1\text{mg} = 1000\text{ unit}$, 即 $1\mu\text{g} = 1\text{unit}$.

◆ 最低抑菌浓度 (MIC)

◆ 最低杀菌浓度 (MLC): 不能生长的菌液重新接种到新鲜培养基后无生长的最低浓度。

➤ 稀释敏感性试验

(Dilution Susceptibility Tests): 样品稀释至 0.1 to 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2-fold dilutions) 范围, 取每个稀释加入敏感菌株, 培养 16-20h, 无菌生长的最低抑菌浓度为 MIC。



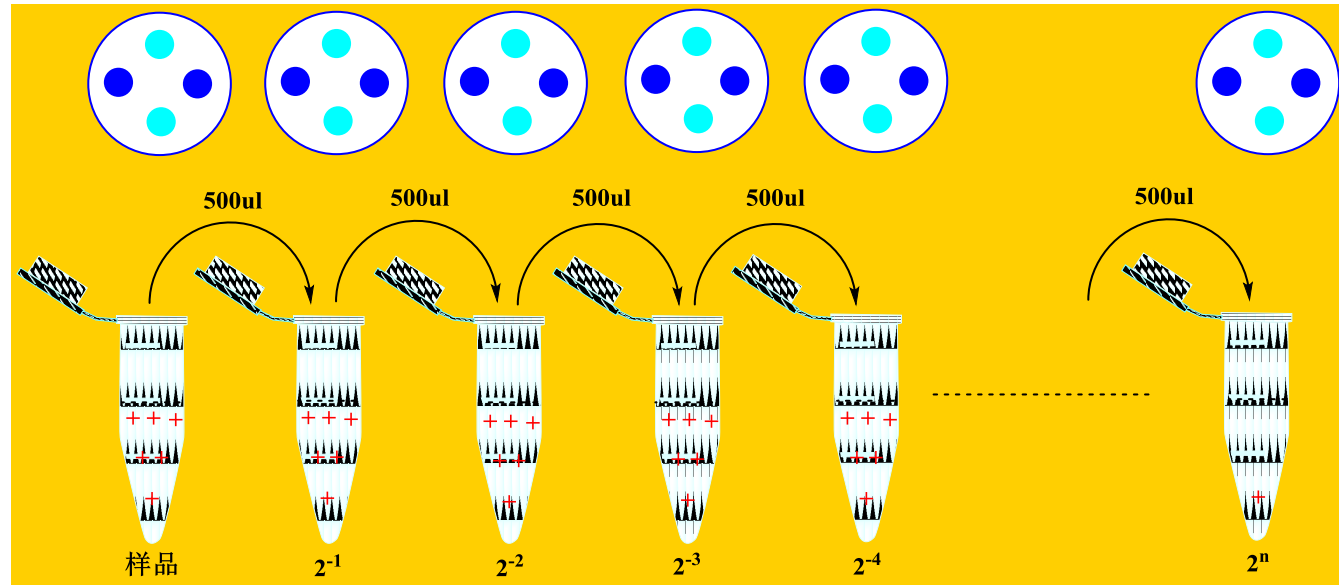
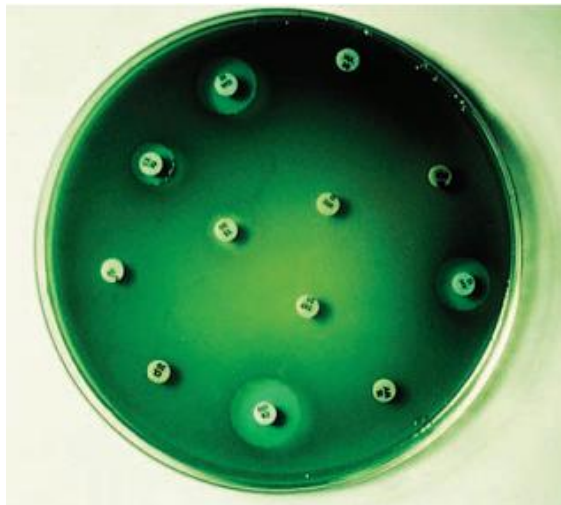


5.2 微生物的控制

3. 抗生素 (antibiotics)

➤ 抑菌圈试验 (Kirby-Bauer method)：用接种环取测试菌4-5单菌落接种培养，几个小时后，菌液稀释至标准的比浊度，用无菌棉签浸入菌液，均匀涂布于培养平板。菌液吸收5分钟后，将无菌圆片贴在涂菌平板，加入不同稀释度的样品液，立即置于35°C培养16-18小时，测量抑菌圈直径，精确到毫米。

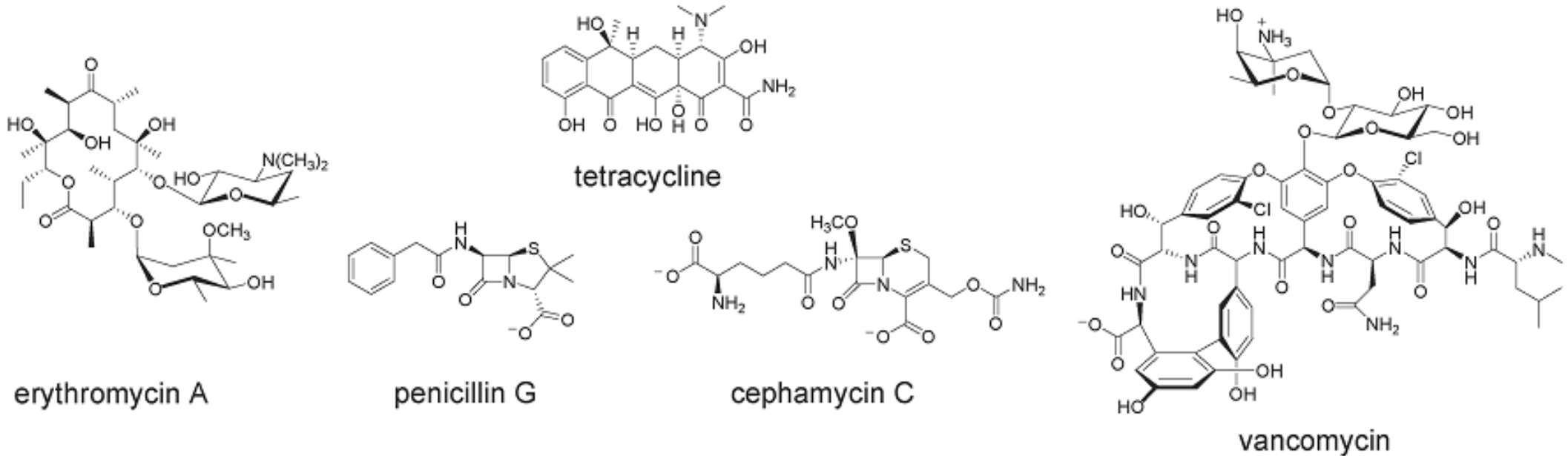
蓝色为标品对照





5.2 微生物的控制

3. 抗生素 (antibiotics)



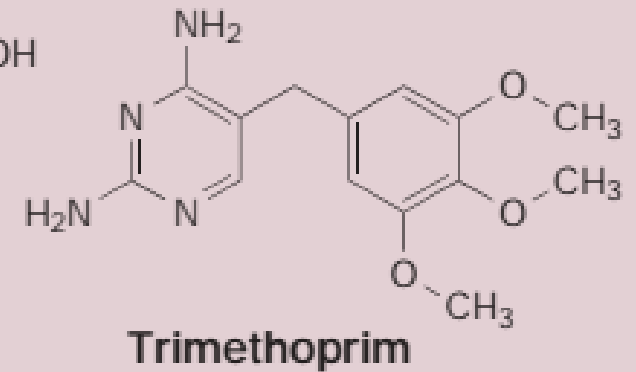
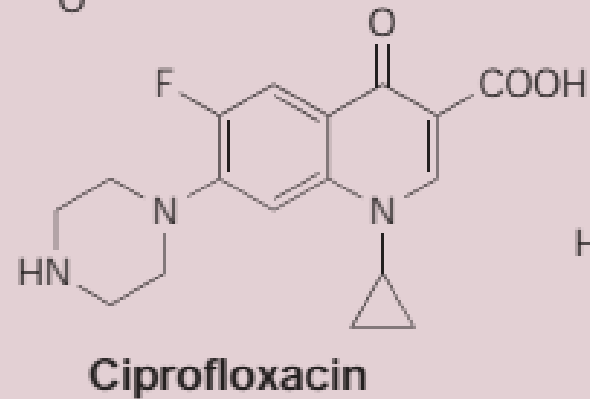
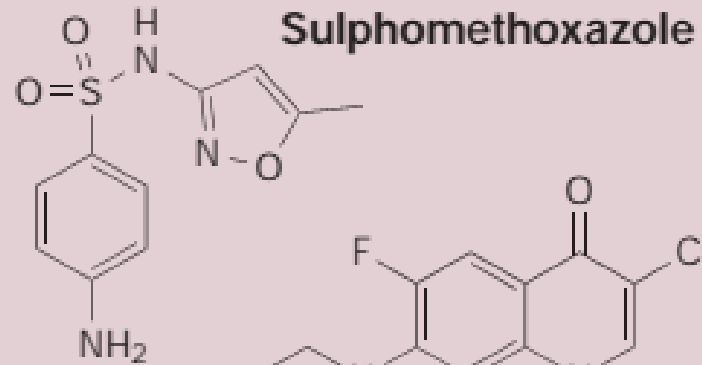
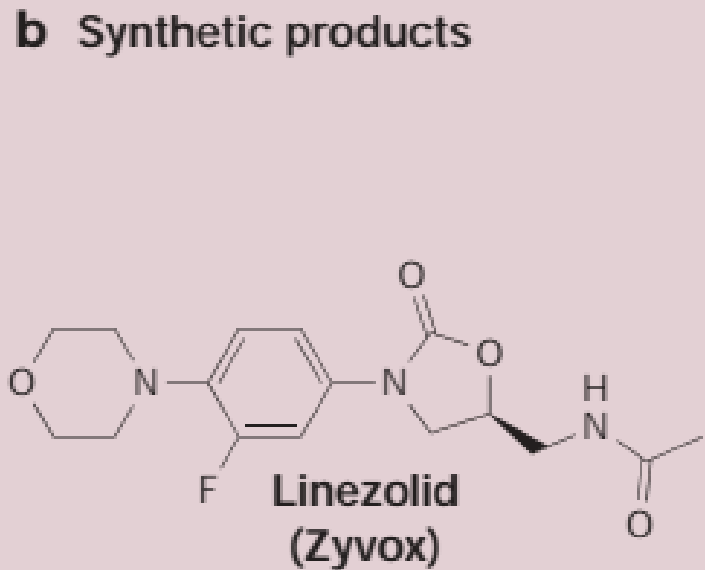
几个天然抗生素分子结构



5.2 微生物的控制

3. 抗生素 (antibiotics)

b Synthetic products

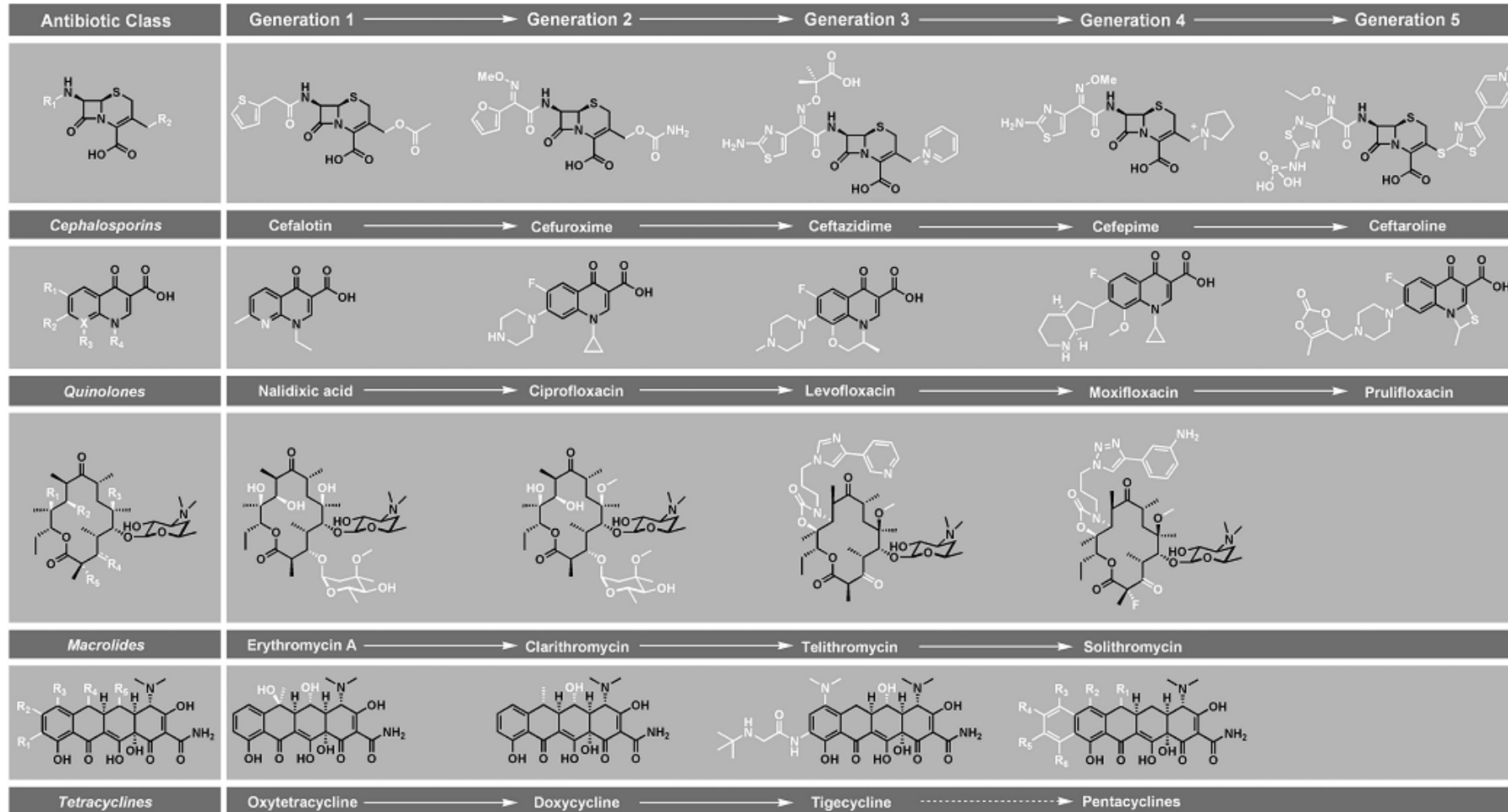




5.2 微生物的控制

3. 抗生素 (antibiotics)

半合成的抗生素





5.2 微生物的控制

◆红霉素的合成路线

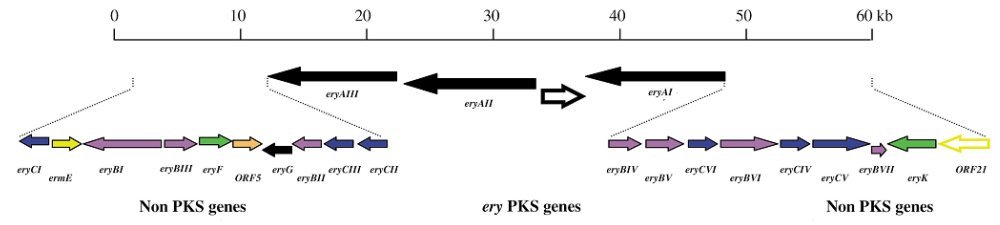
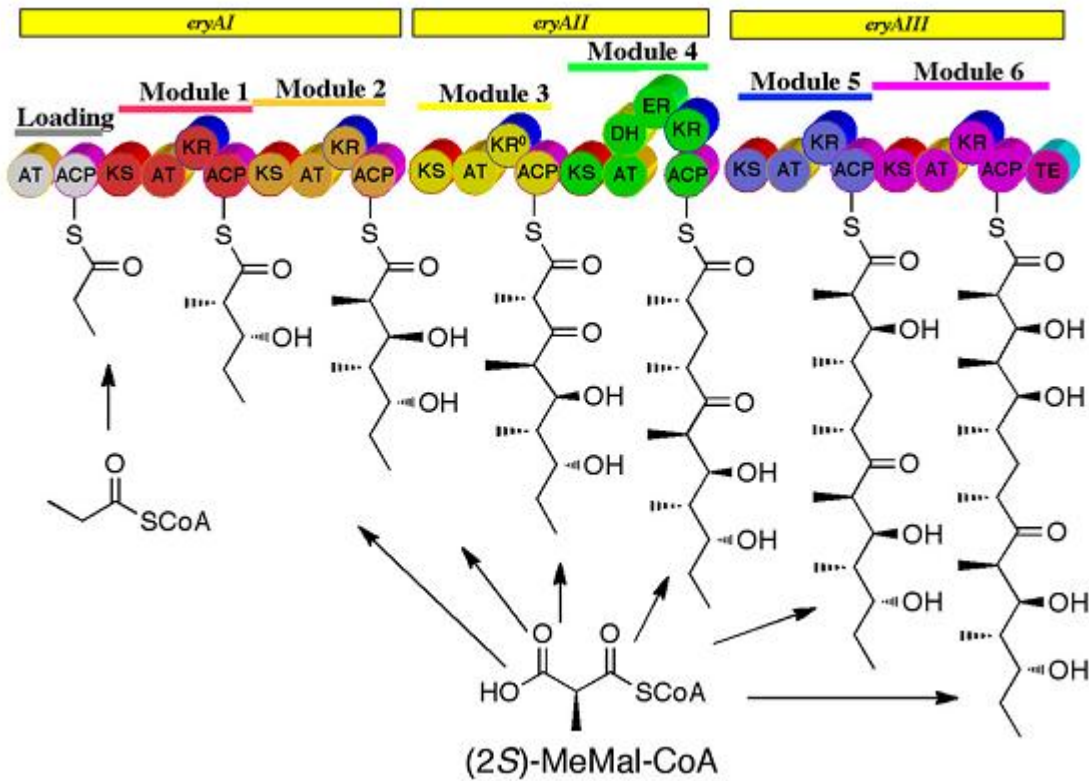
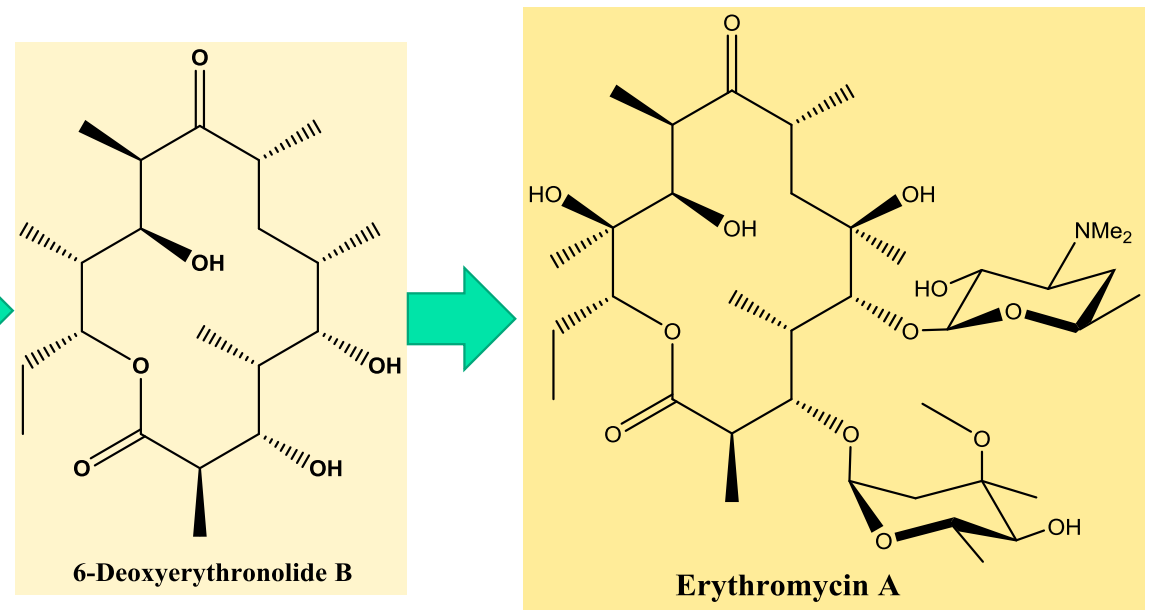


Fig. 16 Map of the regions of the *Saccharopolyspora erythraea* genome containing the genes associated with erythromycin biosynthesis.





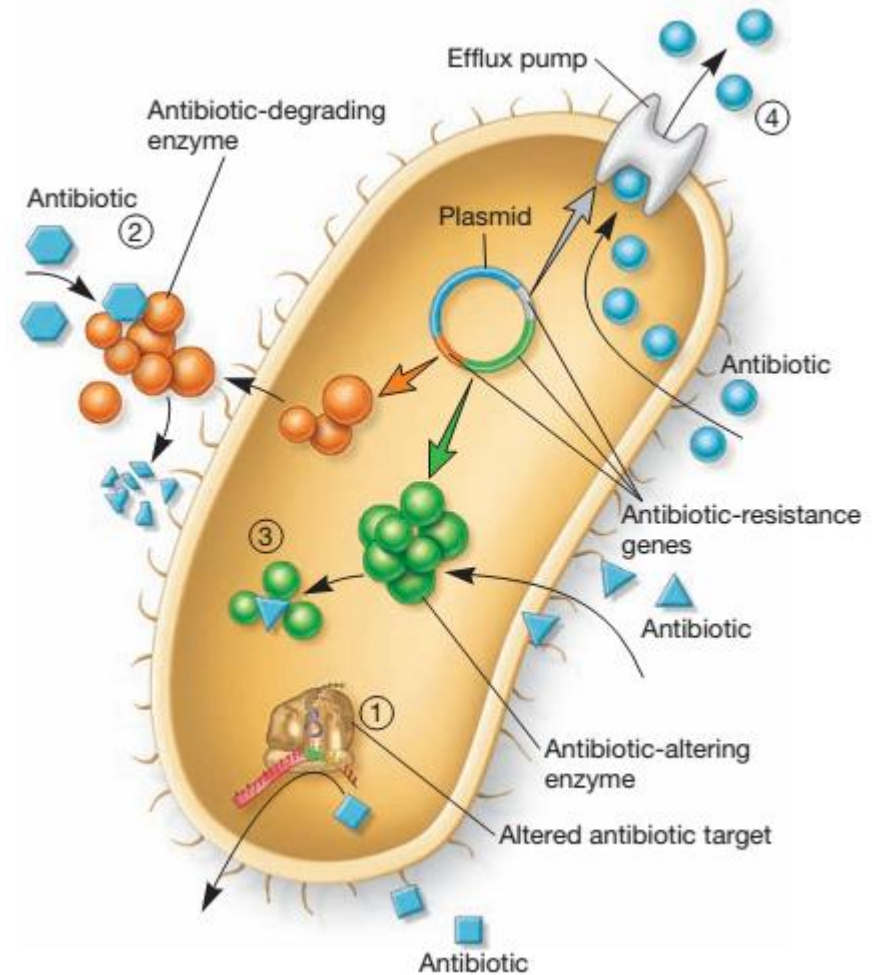
5.2 微生物的控制

3. 抗生素 (antibiotics)

抗生素的抗性也指细菌的耐药性，指细菌通过一系列的变异导致对抗生素的耐受性。

主要机制有：

- 产生对抗生素修饰破坏或降解的酶；
- 对抗生素靶点进行修饰；
- 形成救护途径，重新恢复代谢功能；
- 降低药物进入细胞的通透性；
- 外排泵将抗生素运出细胞。



5.2 微生物的控制

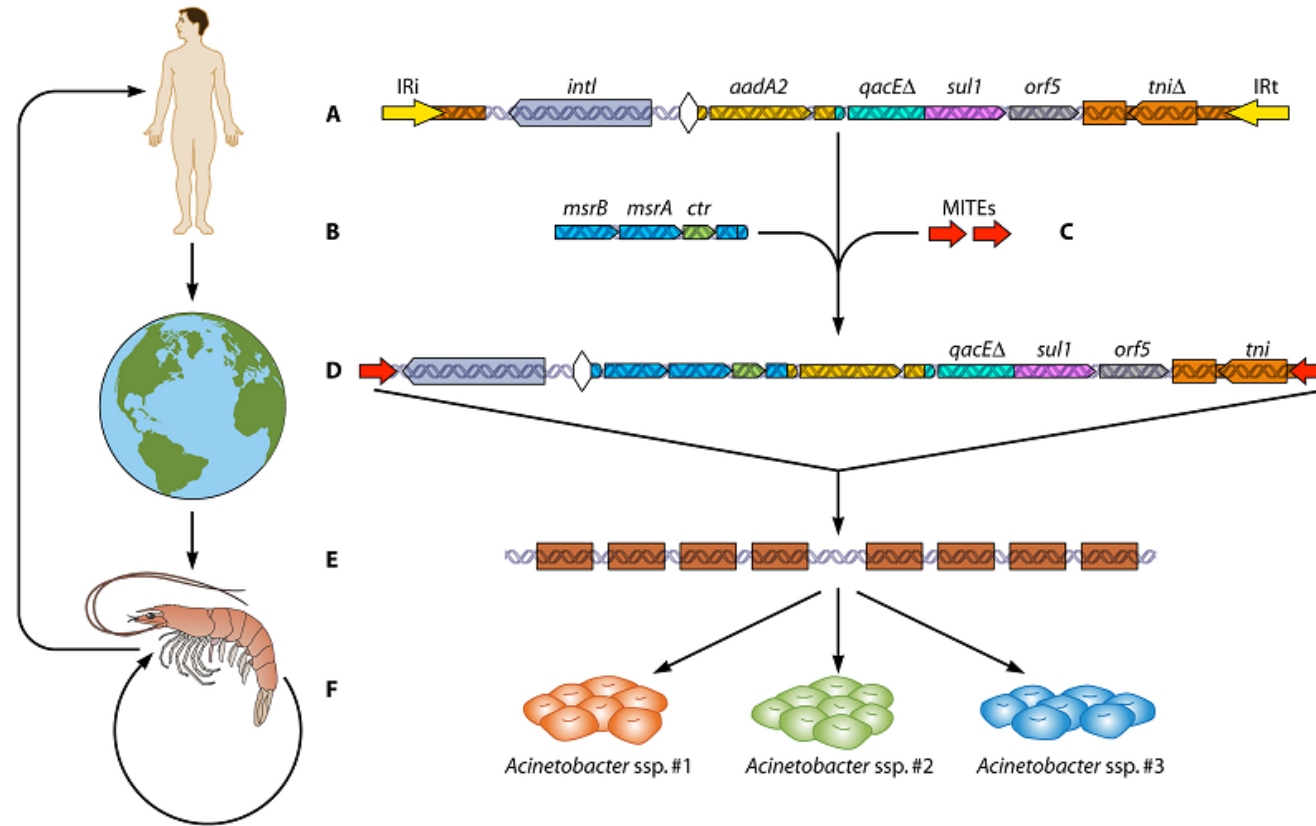


FIG 6 Role of resistance gene pollution in generating novel, complex DNA elements.



5.2 微生物的控制

3. 抗生素 (antibiotics)

抗生素抗性的遗传学本质

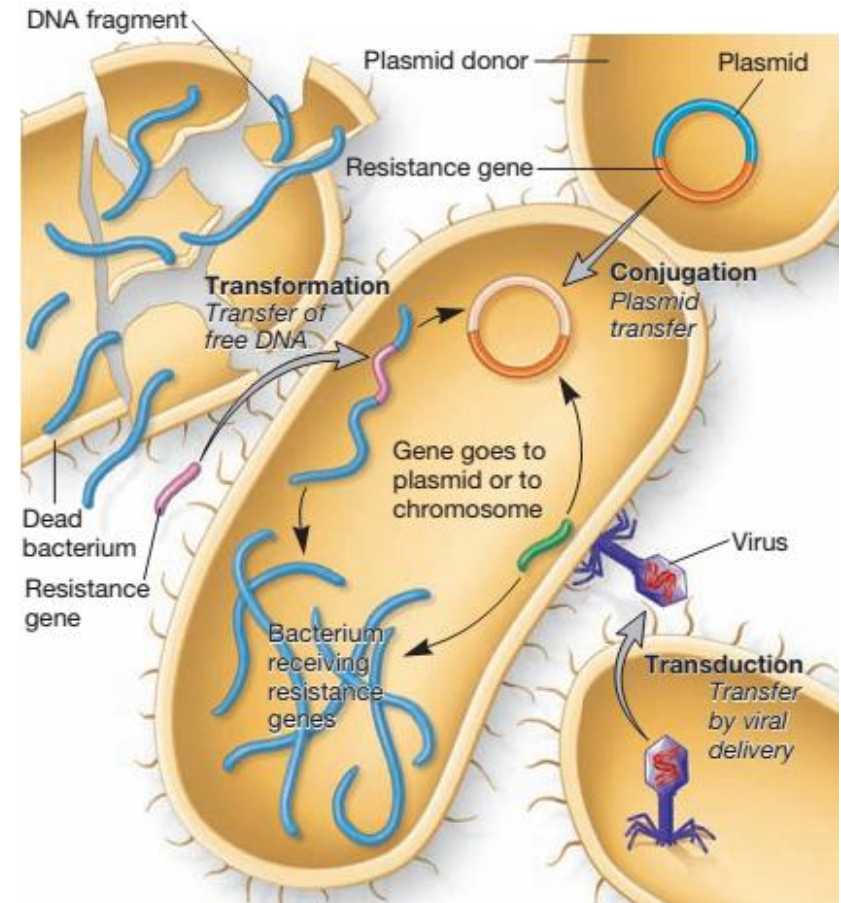
- 基因突变;
- 抗性基因的水平转移, 如右图:

- ① 转化;
- ② 结合;
- ③ 转导。



抗生素的滥用加速了抗性菌株的进化, 产生了“超级细菌”-superbug, 屡屡突破“last resort”, 加剧了抗药性菌株感染的威胁!

Resistance, then, has proven not to be a matter of if, but a matter of when!
- Christopher T Walsh





5.2 微生物的控制

Table 1 Evolution of resistance to clinical antibiotics

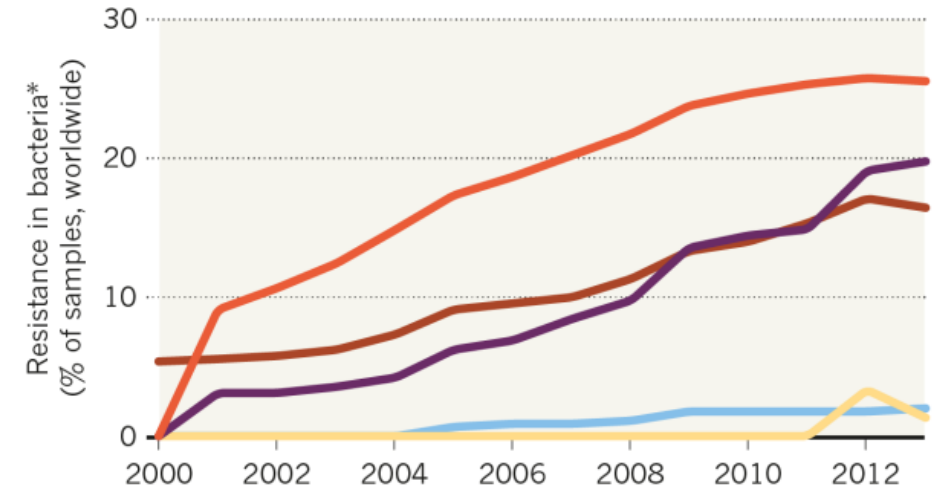
Antibiotic	Year deployed	Clinical resistance observed ^a	Ref.
Sulfonamides	1930s	1940s	38
Penicillin	1943	1946	38
Streptomycin	1943	1959	38
Chloramphenicol	1947	1959	38
Tetracycline	1948	1953	38
Erythromycin	1952	1988	38
Vancomycin	1956	1988	38
Methicillin	1960	1961	38
Ampicillin	1961	1973	38
Cephalosporins	1960s	Late 1960s	38
Nalidixic acid	1962	1962	39
Fluoroquinolones	1980s	1980s	40
Linezolid ^b	1999	1999	41
Daptomycin ^b	2003	2003	42
Retapamulin ^{b,c,d}	2007	2007	43
Fidaxomicin	2011	2011	44
Bedaquiline ^{b,e}	2013	?	45

3. 抗生素 (antibiotics)

THE SPREAD OF ANTIBIOTIC RESISTANCE

An increasing proportion of bacteria display resistance to common antibiotics.

Fluoroquinolones Cephalosporins (3rd gen) Aminoglycosides
Carbapenems Polymyxins



*Enterobacteriaceae, including *Escherichia coli*, *Klebsellia pneumoniae*, *Enterobacter* and *Salmonella*

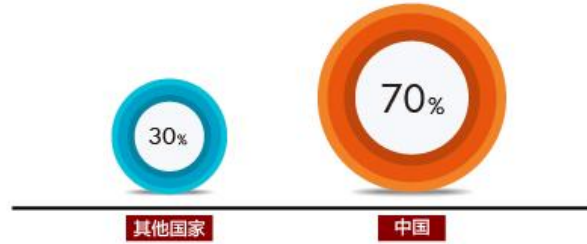


5.2 微生物的控制

抗生素的滥用引起的灾难性的后果

世界卫生组织2011年也曾发出**警示!**

住院患者抗生素使用率(%)



中国的抗生素使用量与发达国家/地区之比较



2013年中国的抗生素使用量 (单位: 吨)

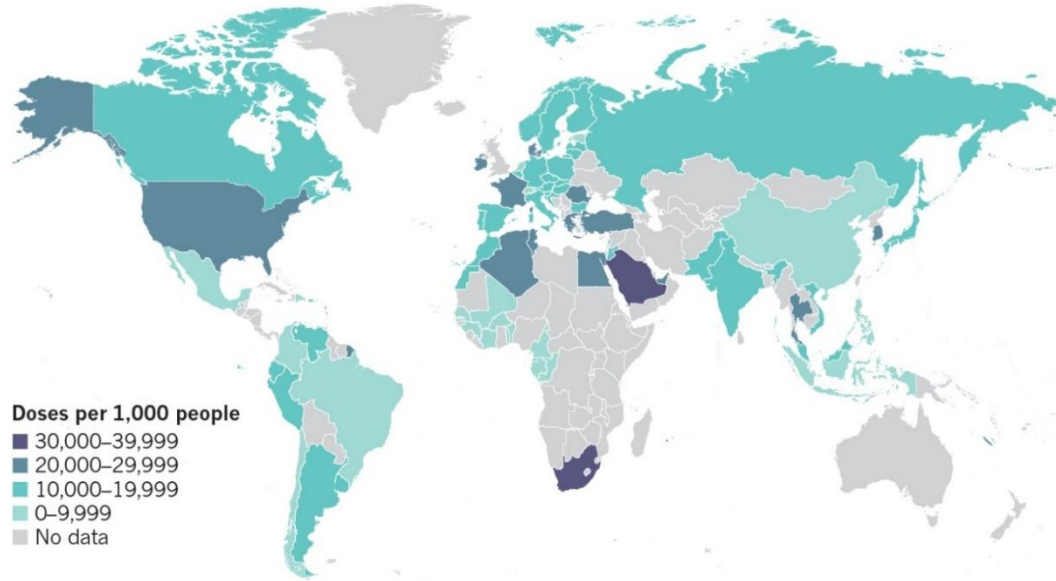




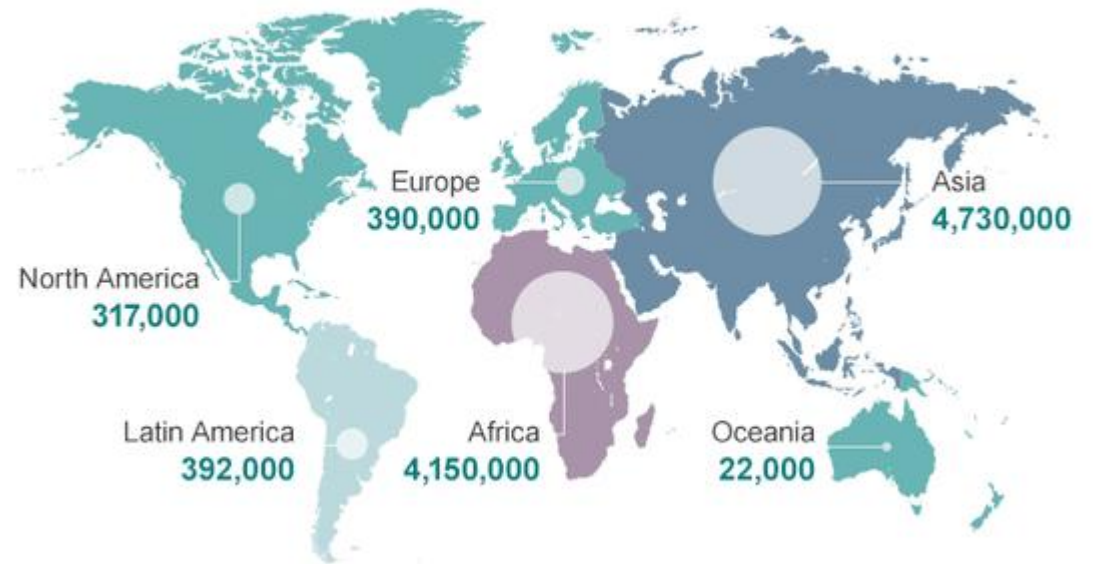
5.2 微生物的控制

TREATMENT TRENDS

The first comprehensive, global report on antibiotic use shows that the drugs are increasingly popular in low- and middle-income countries.



Deaths attributable to antimicrobial resistance every year by 2050



Source: Review on Antimicrobial Resistance 2014

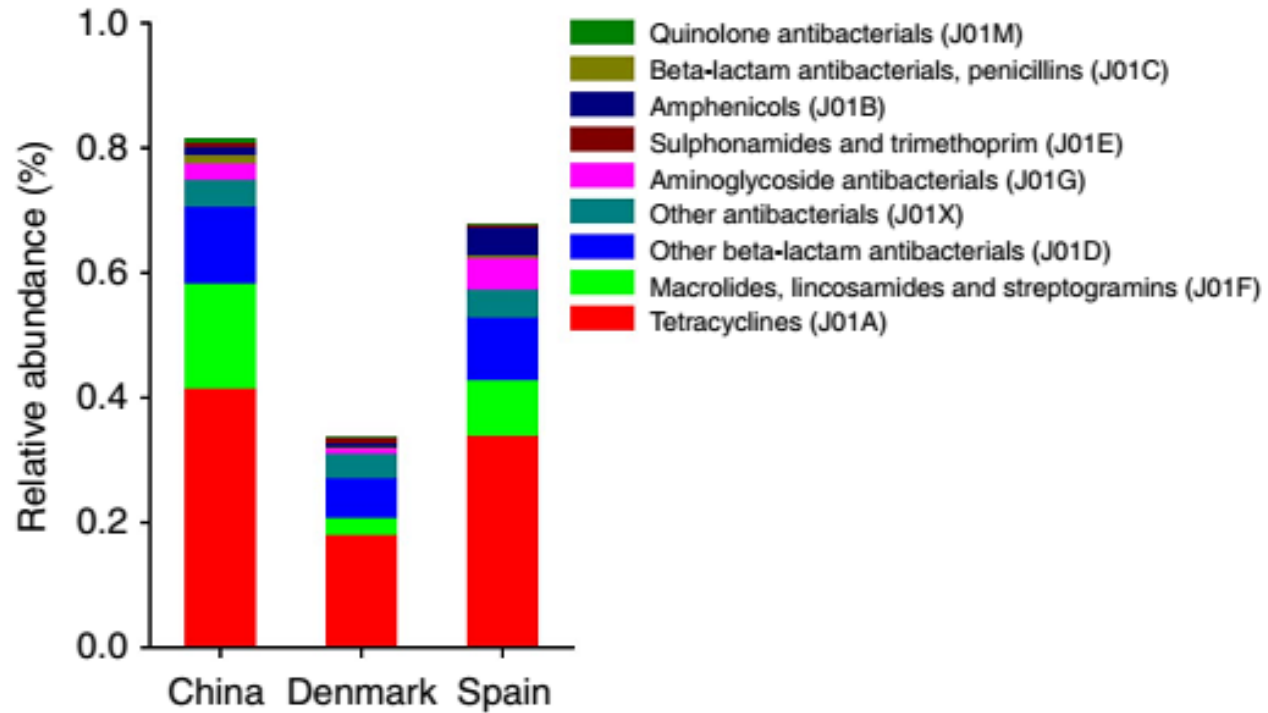


Figure 5 | The relative abundance of antibiotic resistance gene types assigned to each major antibiotic class in the different populations.



ARTICLE

Received 21 Feb 2013 | Accepted 13 Jun 2013 | Published 23 Jul 2013

DOI: 10.1038/ncomms3151

Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota

Yongfei Hu^{1,*}, Xi Yang^{1,*}, Junjie Qin², Na Lu¹, Gong Cheng¹, Na Wu¹, Yuanlong Pan¹, Jing Li¹, Liying Zhu³, Xin Wang³, Zhiqi Meng³, Fangqing Zhao⁴, Di Liu¹, Juncai Ma¹, Nan Qin⁵, Chunsheng Xiang⁵, Yonghong Xiao⁵, Lanjuan Li⁵, Huanming Yang², Jian Wang², Ruifu Yang⁶, George F. Gao^{1,7}, Jun Wang² & Baoli Zhu¹



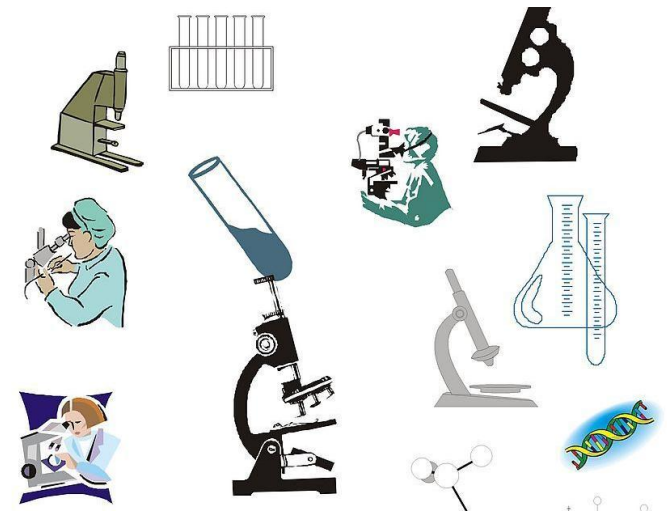
5.2 微生物的控制

◆ 应对抗生素抗性的治疗策略和长远战略：



- “鸡尾酒”疗法：如将beta-lactam类药物与beta-lactamase的抑制剂进行给药；
- 联合用药：将不同的种类的抗生素组合给药，协同杀菌；
- 采用窄谱抗生素进行“精准打击”。

- 深刻认识人体肠道微生物组，激发天然免疫寻求选择；
- 开发疫苗治疗和预防病原微生物感染；
- 控制病原微生物的毒力，破坏生物膜；
- 利用噬菌体消灭感染微生物；
- 改造现有抗生素，大力寻求和研发新的抗生素；
- 政府管理部门：严格管理和控制抗生素的滥用和误用。





本章小结

代时、倍增时间、同步培养、连续培养、恒浊连续培养、恒化连续培养、芽痕、抑制、死亡、防腐、消毒、灭菌、化疗、抗生素、间歇灭菌法、

生长曲线的定义以及各期的特点、应用；

缩短迟缓期的方法；

实现同步培养的方法；

厌氧菌厌氧的原因；

磺氨类药物的作用机制；

细菌对抗生素产生抗性的原因及临床使用如何避免抗性的产生；



Thanks for your
attention!

