

第六章

微生物的生长与控制

GROWTH AND CONTROL OF MICROOGNISMS

内容

第一节 测定生长繁殖的方法

第二节 微生物的生长规律

第三节 影响微生物生长的主要因素

第四节 微生物培养法概论

微生物的生长

■ 细胞生长(Growth)

吸收环境营养物质，跨膜，新陈代谢合成细胞成分，使原生质的总量（重量、体积、大小）不断增加

■ 繁殖(Reproduction)

菌体重量增加到一定程度，细胞开始分裂进入分裂阶段

■ 生长是繁殖的基础，繁殖是生长的结果

个体生长→个体繁殖→群体繁殖

群体生长=个体生长+个体繁殖

■ 研究目标：群体的生长

第一节 测定微生物生长繁殖的方法

生长量的测定

繁殖量的测定

一、测生长量（细胞量）

- 适合于所有微生物

- 直接法

- ✓ 测体积法：离心，测体积

- ✓ 干重法：离心或过滤，干燥称重

10^{12} *E. coli*约1g, 只适合菌体浓度高且不含杂质

■间接法

✓ 光密度 $OD_{450-650nm}$

✓ 生理指标法

测定与微生物生长平行的生理指标。指标有，含N，C量，P量，DNA，RNA，ATP，DAP，几丁质或N-乙酰胞壁酸等含量，产酸，产气，耗氧，和产热等指标。

二、测繁殖数

- 适合于单细胞或丝菌的孢子

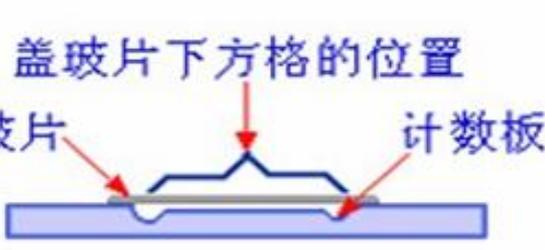
- 直接法

 - ✓ 血球记数板

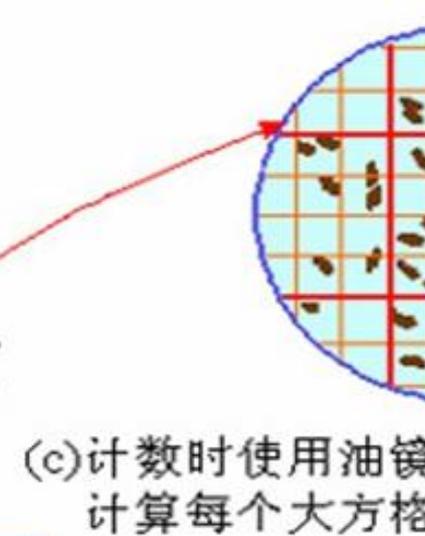
 - ✓ 活菌染色：美蓝、吡啶橙、TTC

- 间接法

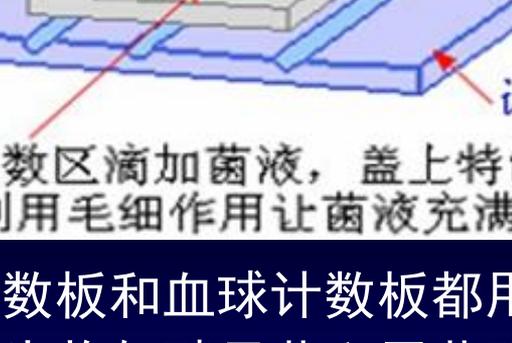
直接法—血球记数板

盖玻片下方格的位置
盖玻片 计数板

(a)细菌计数器面积为 1mm^2 ，划分为25个大方格，每个大方格又分为16个小方格，计数区的深度为 0.02mm

盖玻片 计数板

(b)在计数区滴加菌液，盖上特制盖玻片，利用毛细作用让菌液充满计数区。



(c)计数时使用油镜，数5个大方格的菌数，计算每个大方格的平均菌数。

(d)每个大方格的体积是 $1/1250000\text{ml}$ ($1/25\text{mm}^2 \times 0.02\text{mm}$)，用每个大方格的平均菌数 $\times 1250000$ ，即为每毫升菌液含菌数。

细菌计数板和血球计数板都用来测微生物的总菌数。血球计数板用来测较大微生物如酵母菌和霉菌孢子的总数，细菌计数板用来测细菌的总菌数。两种计数板的构造相似，不同的是细菌计数板的深度仅为血球计数板深度的 $1/5$ 。请访问www.kaoyancas.net 科大科院考研网，专注于中科大、中科院考研

间接法

■ 平板菌落计数法(Colony-counting Methods)

一个活菌在合适的培养基表面，逐渐生长成一个肉眼可见的菌落（菌落形成单位，colony forming unit, CFU），从而得知原始活菌含量。

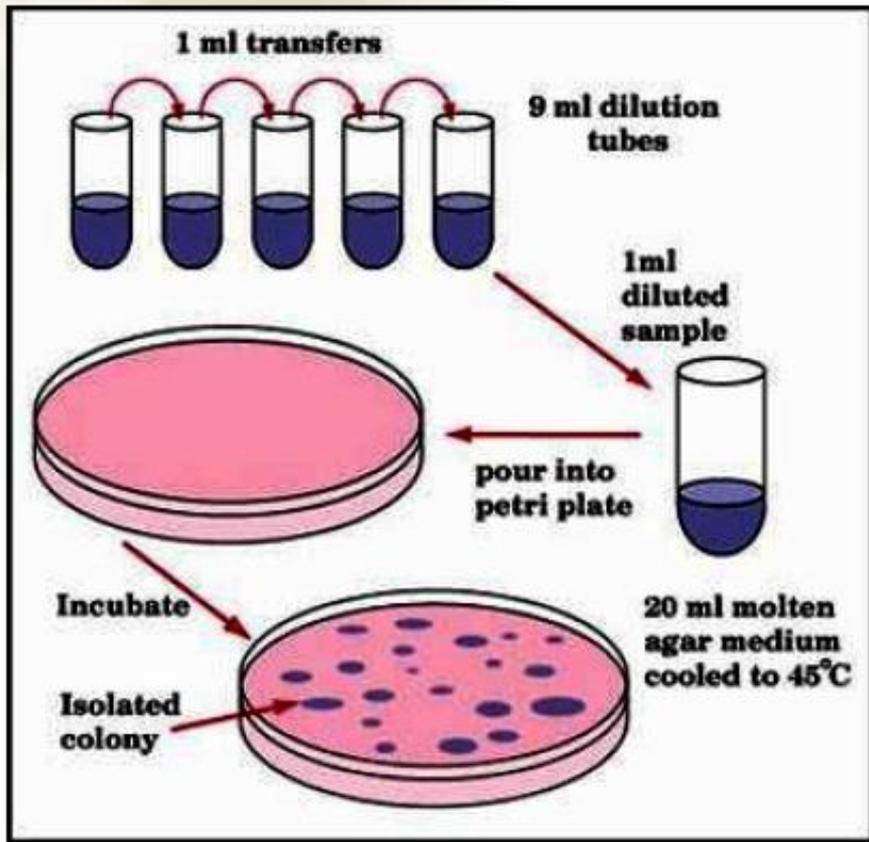
✓ 涂布平板法 Spread Plate

✓ 浇注平板法 Pour Plate

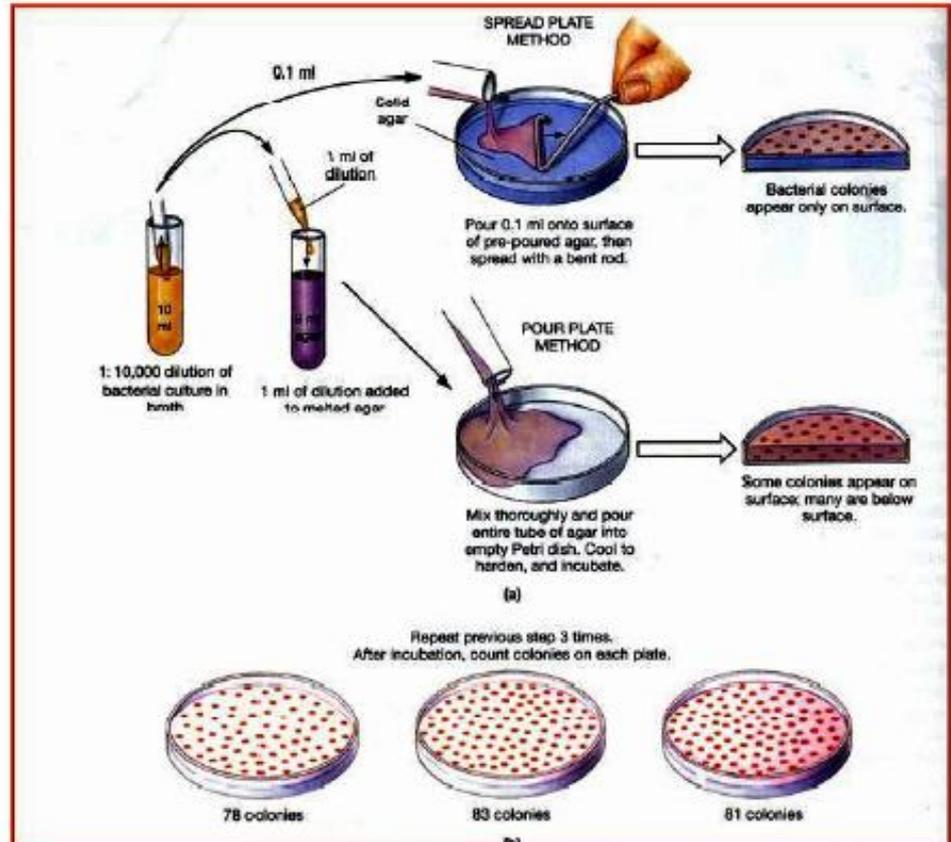
■ 微型、快速、商品化的菌落计数的小型纸片或密封琼脂板

高参考价值真题 答案 学长笔记 辅导班课程 访问 www.kaoyancas.net

间接法——平板菌落计数法



浇注平板法



涂布平板法



Photo by T

厌氧菌的菌落计数法

- Hungate滚管培养法
- 半固体深层琼脂法

第二节 微生物的生长规律

- ◆ 微生物的个体生长与同步生长
- ◆ 单细胞微生物的生长曲线
- ◆ 微生物的连续培养
- ◆ 微生物的高密度培养

一、微生物的个体生长和同步生长

■研究微生物个体生长的方法

✓电子显微镜观察细胞超薄切片

✓同步培养技术(Synchronous Culture)

设法使某一群体中的所有个体细胞尽可能都处于同样的细胞生长和分裂周期中，通过分析群体在各阶段的生物化学特性变化，来间接了解单个细胞的相应变化规律。

同步生长Synchronous Growth:

通过同步培养使细胞群体处于分裂步调一致的状态。
同步生长只能维持2-3个分裂周期(细胞个体差异)。

获得同步生长的方法

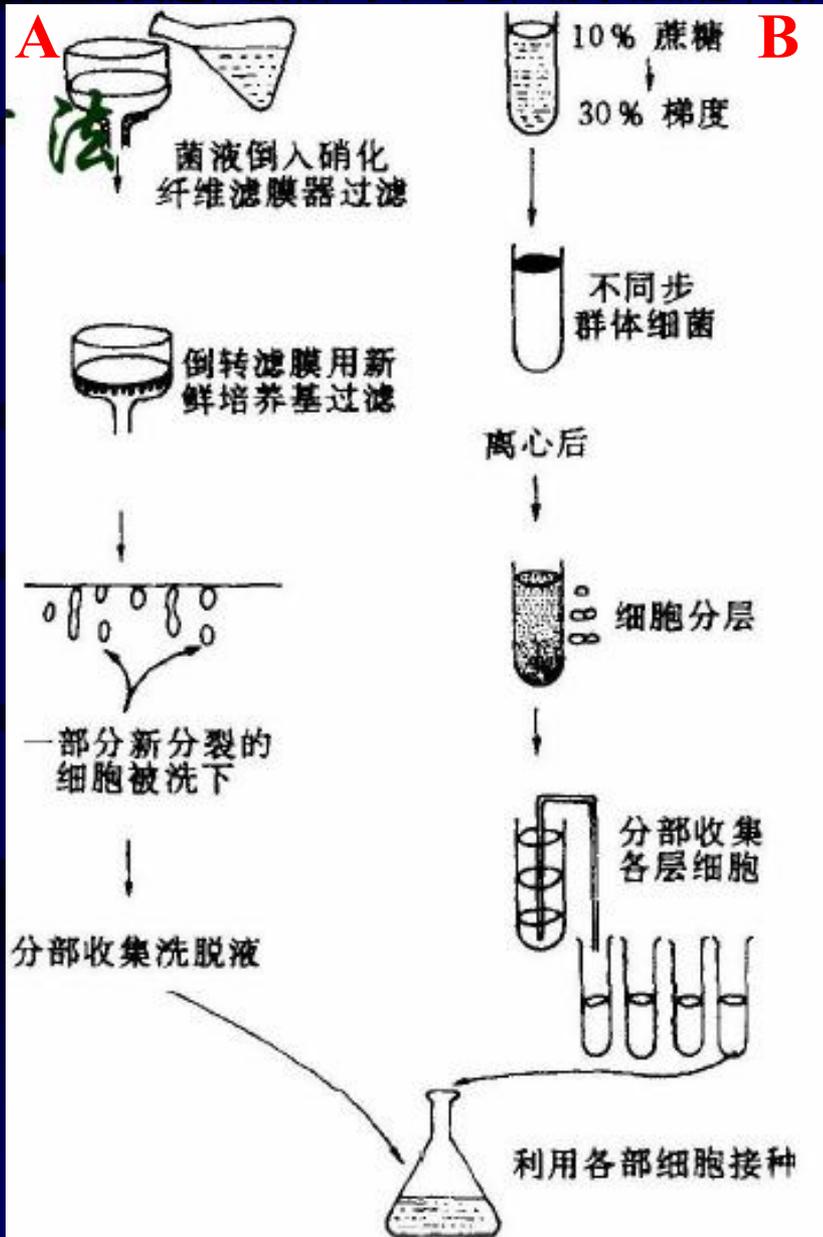
■机械筛选法

- ✓ 利用处于同一生长阶段细胞体积、大小的一致性
- ✓ 过滤法
- ✓ 密度梯度离心
- ✓ 膜洗脱法：硝酸纤维薄膜

■环境条件诱导法

氯霉素抑制蛋白合成；细菌芽孢发芽；藻类细胞光照黑暗控制；EDTA或离子载体处理酵母菌；短期热休克(40度)

同步培养方法



A: 膜洗脱法

B: 密度梯度离心

二、单细胞微生物典型生长曲线

■定量描绘液体培养基中微生物群体生长规律的实验曲线。

■典型生长曲线

将少量纯种的单细胞微生物接种于一定量液体培养基中，隔一定时间取样，测菌数。以培养时间为横坐标，以菌数的对数为纵坐标，可以得到一条有规律的曲线，即单细胞微生物典型的生长曲线。

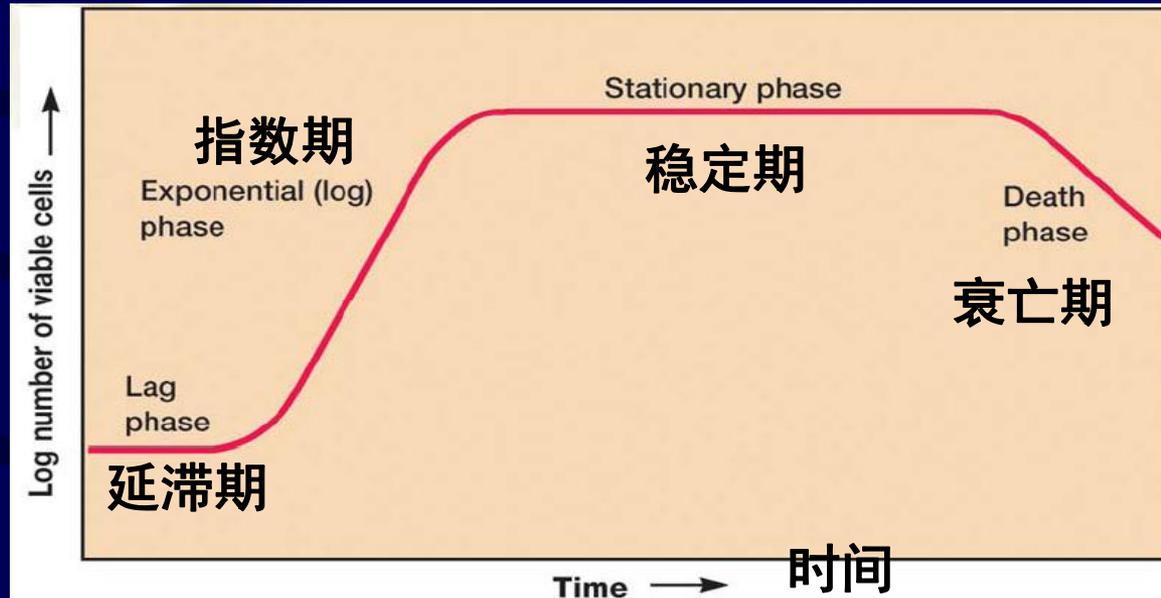
■适用对象

单细胞微生物：细菌、酵母

不适合丝状生长的真菌或放线菌

典型生长曲线及不同时期

- 延滞期lag phase
- 指数期exponential phase
- 稳定期stationary phase
- 衰亡期decline phase



1、延滞期lag phase

■ 停滞期、调整期、适应期

指少数单细胞微生物接种到新鲜培养基中后，细胞数目没有增加的一段时间。

■ 延滞期的特点

- ✓ 生长速率=0，细胞数目几乎保持不变，甚至减少
- ✓ 细胞形态变化：变大或增长
- ✓ 细胞内RNA尤其是rRNA含量增高
- ✓ 合成代谢十分活跃
- ✓ 对外界不良条件反应敏感

影响延滞期长短的因素

■菌种

细菌、酵母菌延滞期较短，霉菌次之，放线菌最长

■接种龄

■接种量大小

■培养基成分

2、指数期exponential phase

高参考价值真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问 www.kaoyancas.net

■特点

- ✓ 生长速率常数 R 最大，代时或倍增时间最短
- ✓ 细胞平衡生长，菌体内各部分成分均匀
- ✓ 酶系活跃，代谢旺盛

■指数期细胞高速生长的原因

养分、生长空间丰裕，代谢产物还不足以影响生长

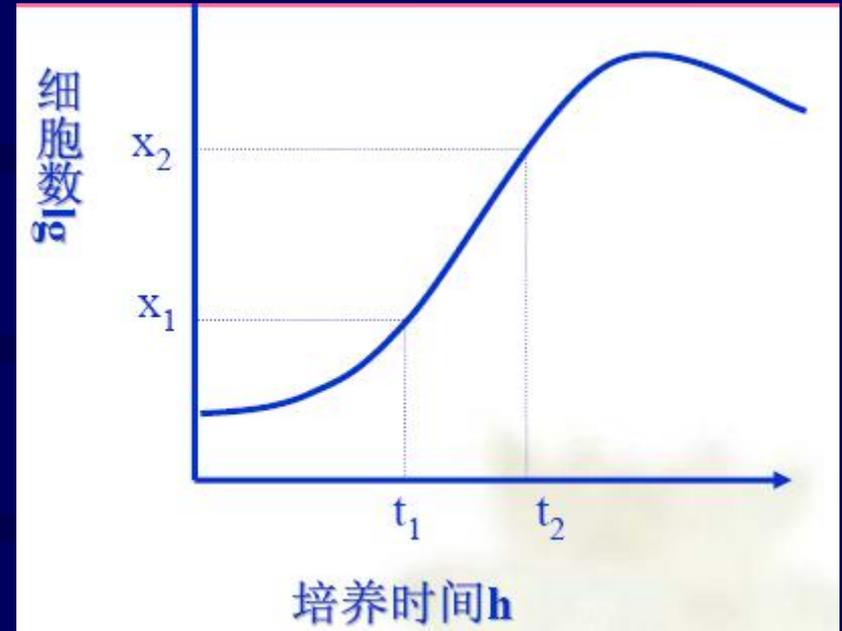
■指数期细胞的应用

- ✓ 生理、代谢、遗传研究的良好材料
- ✓ 发酵种子的最佳菌龄
- ✓ 增殖噬菌体的最佳宿主

三个参数

1、繁殖代数(n):

$$\because x_2 = x_1 \cdot 2^n \rightarrow \lg x_2 = \lg x_1 + n \lg 2$$
$$\therefore n = \frac{\lg x_2 - \lg x_1}{\lg 2} = 3.322(\lg x_2 - \lg x_1)$$



2、生长速率(R):

$$R = \frac{n}{t_2 - t_1} = \frac{3.322(\lg x_2 - \lg x_1)}{t_2 - t_1}$$

3、代时(G):

$$G = \frac{1}{R} = \frac{t_2 - t_1}{3.322(\lg x_2 - \lg x_1)}$$

- 在对数生长期内，细菌数目的增加是按指数级数增加的，即：

$$2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \dots \dots 2^n$$

这里的指数n为细菌分裂的次数或者增殖的代数，也就是一个细菌繁殖n代产生 2^n 个细菌

- 如果在对数期开始时间 t_1 的菌数为 X_1 ，繁殖n代后对数期后期 t_2 的菌数为 X_2 ，则代时(Generation time, G)(即每增加一代所需要的时间)应为：

$$G=(t_2-t_1)/n$$

先求代数n

$$\text{由于 } x_2 = x_1 \cdot 2^n$$

$$\lg x_2 = \lg x_1 + n \lg 2$$

$$n = (\lg x_2 - \lg x_1) / \lg 2$$

$$n = 3.3 \cdot \lg(x_2/x_1)$$

$$\text{即 } G = (t_1 - t_2) / 3.3 \cdot \lg(x_2/x_1)$$

例如：在一细菌培养液中第一次测得的细菌数为 $10^4/\text{ml}$ ，经过培养4h后，又测得菌液中的细菌数为 $10^8/\text{ml}$ ，求此菌的世代时间G和在此时间内繁殖的代数n。

根据公式： $G=(t_2-t_1)/3.3 \cdot \lg(x_2/x_1)$

$$t_2-t_1=(4-0) \times 60\text{min}=240\text{min}$$

$$x_2=10^8 \quad x_1=10^4$$

$$\lg(x_2/x_1)=\lg 10^8-\lg 10^4=8-4=4$$

$$\text{代入上式 } G=240/(3.3 \times 4)=240/13.2=18\text{min}$$

$$\text{细菌繁殖代数 } n=(t_2-t_1)/G=240/18=13.3 \text{ 繁代}$$

影响微生物代时长短的因素

高年级专业课真题、答案、考后笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyanccas.net

■菌种

不同菌种差别很大

■营养成分

同种不同培养基差别很大

■营养物浓度

影响生长速率和总生长量

生长限制因子

■培养温度

影响极大

发酵实践、食品包藏和防止事物变质和中毒

完整版，请访问：www.kaoyanccas.net 科大科院考研网，专注于中科大、中科院考研

3、稳定期(平稳期)

■特点

- ✓ $R=0$ ，生长与死亡细胞相等(动态平衡)
- ✓ 菌体产量达到最高，菌体产量与营养物质消耗呈现规律性关系
- ✓ 积累细胞贮存物
- ✓ 产生芽孢
- ✓ 次生代谢产物合成

生长产量常数Y

■生长得率Growth Yield

✓ X —稳定期细胞干重，g/ml培养液

✓ X_0 —刚接种时的细胞干重

✓ C_0 —限制性营养物的最初浓度，g/ml

✓ C —稳定时的限制性营养物的浓度

$$Y=(x-x_0)/(C_0-C)=(x-x_0)/C_0$$

■ Y_{subst} —每摩尔底物产生的克菌体干重

■ Y_{ATP} —每摩尔ATP所产生的克菌体干重

生长的稳定期

- 稳定期的长短因菌种和培养条件而异，若生产需要，可在菌种或工艺上采取措施（补料、调pH、调整温）设法延长稳定期，以积累更多代谢产物
- 如果需要收获菌体（如SCP），应在此阶段收获，因此阶段菌体细胞数量最多
- 放线菌的抗生素等次生代谢产物在此阶段大量形成

出现稳定期的原因

- 营养物质尤其是生长限制因子的耗尽
- 营养物的比例失调，如碳氮比等
- 酸、醇、毒素、过氧化氢等有害物质的积累
- pH、氧化还原电势等物化条件越来越不适宜

4、衰亡期

■特点

- ✓ $R < 0$ ，死亡超过生长，活菌数明显下降
- ✓ 细胞形态多形化
- ✓ 自溶 Autolysis
- ✓ 合成与释放次级代谢产物
- ✓ 芽孢开始释放
- ✓ 低温、隔绝空气（对好氧菌）均能延长此时期
- ✓ 有的 G^+ 出现 G^- 的特征

原因

- ✓ 外部环境生长不利，分解代谢超过合成代谢

三、微生物的连续培养

■分批培养Batch/Closed Culture

将微生物置于一定容器的培养基中，经培养生长，最后一次收获的培养方式

■连续培养Continuous/Open Culture

在培养容器中不断补充新鲜营养物质，并及时不断地以同样的速度排出菌体以及代谢产物的培养方式

连续培养的分类

■按控制方式

- ✓恒浊器（密度）
- ✓恒化器（培养液流速）

■按培养器的级数

- ✓单级
- ✓多级

■按细胞状态

- ✓一般
- ✓固定化细胞

■按用途

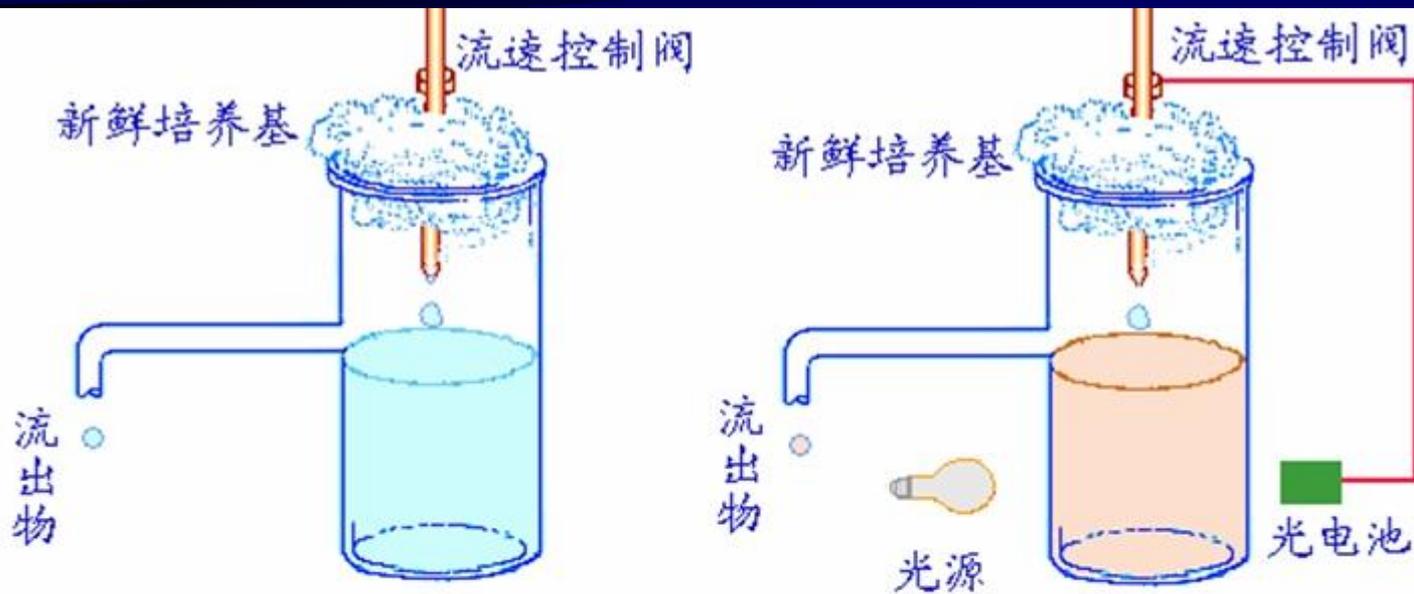
- ✓连续培养器（实验室）
- ✓发酵罐（工厂）

恒浊器—内控制式连续培养装置

- ◆不断调节流速而使细菌培养物浊度保持恒定的连续培养叫恒浊连续培养。
- ◆由光电装置检测培养容器中的浊度，根据浊度变化控制新鲜培养液流入和旧培养液流出速度，使容器内菌液浓度恒定。
- ◆工业发酵中用此方法可获得大量菌体及代谢产物

恒化器——外控制式连续培养装置

- ◆控制恒定流速，使由于细菌生长而耗去的营养物质及时得到补充，又叫恒组成连续培养。这样，细菌的生长速率将取决于限制性因子的浓度。
- ◆恒化连续培养多用于微生物的研究工作中。



A. 恒化培养装置

B. 恒浊培养装置

在一个恒定容积的流动系统中，一方面以一定的速度不断地加入新的培养基，另一方面又以相同的速度流出培养物，这样就可以使容器中微生物的数量和营养状态保持恒定，使微生物长期处于旺盛生长阶段。

连续培养的方法：A. 恒浊连续培养；B. 恒化连续培养

按培养器级数

■ 单级连续培养器

某微生物的代谢产物的产生速率与菌体生长速率相平行时，可采用单级恒浊式连续发酵罐

■ 多级连续培养器

产物形成与菌体生长不平行，如丙酮、丁醇或某些次生代谢产物，应采用多级连续培养装置

四、微生物的高密度培养

• High Cell-density Culture

一般是指微生物在液体培养中细胞群体密度超过常规培养10倍以上的生长状态或培养技术

• 高密度培养的方法

- 最佳培养成分及相应最佳含量
- 补料
- 溶解氧的浓度
- 防止有害代谢产物生成

第三节 影响微生物生长的主要因素

营养条件

物理因素

化学因素

生物因素

温度

pH

氧气

1、温度对微生物生长的影响

• 三个基本温度 Cardinal temperatures

❖ 最低生长温度 Minimum

❖ 最适生长温度 optimum

❖ 最高生长温度 Maximum

• 不同微生物的基本生长温度差异很大。根据微生物的最适生长温度，可将微生物分成三类

❖ 嗜冷性微生物 < 20度

❖ 嗜温性微生物 < 20~40度

❖ 嗜热性微生物 > 45度

微生物生长的温度范围

微生物类型	生长温度/℃		
	最低	最适	最高
嗜冷微生物(psychrophiles)	0 以下	15	20
兼性嗜冷微生物(psychrotrophs)	0	20~30	35
嗜温微生物(mesophiles)	15~20	20~45	45 以上
嗜热微生物(thermophiles)	45	55~65	80
超嗜热或嗜高温微生物(hyperthermophiles)	65	80~90	100 以上

不同微生物生长的三种温度

细菌和古生菌

嗜冷芽孢菌 (<i>Bacillus psychrophilus</i>)	-10	23~24	28~30
嗜冷微球菌 (<i>Micrococcus cryophilus</i>)	-4	10	24
粪肠球菌 (<i>Enterococcus faecalis</i>)	0	37	44
大肠埃希氏菌 (<i>Escherichia coli</i>)	10	37	45
嗜酸热原体 (<i>Thermoplasma acidophilum</i>)	45	59	62
水生栖热菌 (<i>Thermus aquaticus</i>)	40	70-72	79
隐蔽热网菌 (<i>Pyrodictium occultum</i>)	82	105	110
热叶菌 (<i>Pyrolobus fumarii</i>)	90	106	113
卓越聚球蓝细菌 (<i>Synechococcus eximius</i>)	70	79	84

真菌:

斯考特假丝酵母 (<i>Candida scottii</i>)	0	4~15	15
酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	1~3	28	40
微小毛霉 (<i>Mucor pusillus</i>)	21~23	45~50	50~58

藻类:

雪衣藻 (<i>Chlamydomonas nivalis</i>)	-36	3	4
骨条藻 (<i>Skeletonema costatum</i>)	6	16~26	>28
<i>Cyanidium caldarium</i>	30~34	45~50	56

原生动物:

变形虫 (<i>Amoeba proteus</i>)	4~6	22	35
-------------------------------	-----	----	----

最适生长温度并非一切生理活动的最适温度

例如：

青霉素生产的四阶段控制，根据不同生理代谢过程的温度特点，比30度恒温提高14.7%

0hr-5hr(30度)

5hr-40hr(25度)

40hr-125hr(20度)

125hr-165hr(25度)

2、氧气与微生物之间的关系

给氧问题。根据微生物和氧的关系将微生物分为五类

- 专性好氧微生物
- 兼性好氧微生物
- 微好氧微生物
- 专性厌氧微生物
- 耐氧性微生物

2.1 专性好氧微生物

- 必须在较高分子氧浓度下才能生长，具有完整的呼吸链、以分子氧为最终氢受体，具有SOD和过氧化氢酶活力。
- 绝大多数真菌和许多细菌
- 实验室通过震荡摇瓶给氧，工厂采用通入无菌空气和搅拌等供氧

2.2 兼性厌氧菌

■ Facultative anaerobe

以在有氧条件下的生长为主但可以在厌氧条件下生长的微生物，在有氧时靠呼吸产能、在无氧时借发酵或无氧呼吸产能，细胞含有SOD和过氧化氢酶。

■ 兼性好氧微生物

肠道细菌、人和动物致病菌、酵母和少数真菌

2.3 微好氧微生物

只能在较低的氧气分压 (0.01–0.03Bar) 才能正常生长的微生物，通过呼吸链并以氧为最终氢受体而产能

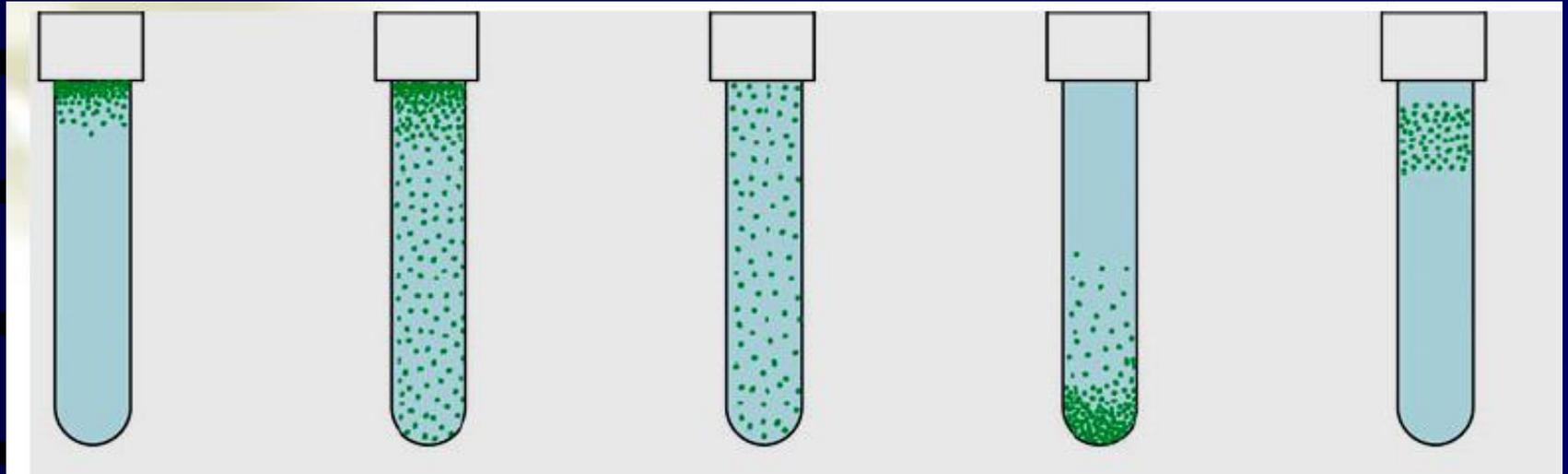
2.4 耐氧菌

- 一类可以在分子氧存在下进行发酵性厌氧生活的厌氧菌，它们的生长不需要任何氧，但分子氧对它们无害，不具备呼吸链，仅依靠专性发酵和底物水平磷酸化而获得能量
- 耐氧机制
SOD和过氧化物酶，但缺乏过氧化氢酶
- 主要是乳酸菌

2.5 厌氧性微生物

1. 分子氧对它们有毒，即使短期接触也会抑制甚至死亡
2. 只能在深层无氧处或在低氧化还原电势的环境下才能生长
3. 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
4. 细胞缺乏SOD和细胞色素氧化酶，大多数还缺乏过氧化氢酶

氧气与微生物的生长



3、pH值

■每种微生物生长繁殖所适应的pH值有一定的范围

■pH范围可分为

◆最低pH值

◆最高pH值

◆最适pH值，指微生物最适合生长繁殖的pH值。

最低、最高pH值环境中微生物能生存但生长非常缓慢且容易死亡

不同微生物生长的pH

- 一般细菌生长最适pH范围6.5~7.5，4~7可以生长
- 放线菌7.5~8
- 酵母菌生长最适pH范围4.0~5.8，2.5~8.0可生长
- 霉菌生长最适pH范围3.8~6.0，1.5~10可以生长

pH与微生物的生长与代谢

■不同微生物有最适合生长pH，即使是同一种微生物在不同生长阶段和不同的生理、生化过程都有不同的pH要求

■实例

●*Aspergillus niger*（黑曲酶）

2.0-2.5：有利于合成柠檬酸

2.5-6.5：菌体生长

7：合成草酸

●*Clostridium acetobutylicun*（丙酮丁酸梭菌）

5.5-7.0：菌体生长繁殖

4.3-5.3：丙酮丁醇发酵

pH值对微生物的影响

■微生物外环境的pH和细胞内环境的pH

■微生物对pH的适应

■pH对微生物的影响

◆直接影响细胞

◆间接影响

✓培养基中培养物质的离子化程度

✓影响营养物质的吸收

✓影响环境中有毒物质对细胞的毒性

✓影响代谢反应中各种酶的活性

微生物生命活动改变环境的pH

培养基内中性成分

■有机物

- 糖类 → → → → 有机酸 (变酸)
- 脂类 → → → → → 有机酸 (变酸)
- 蛋白质 → → → → 胺类 (变碱)

■无机盐

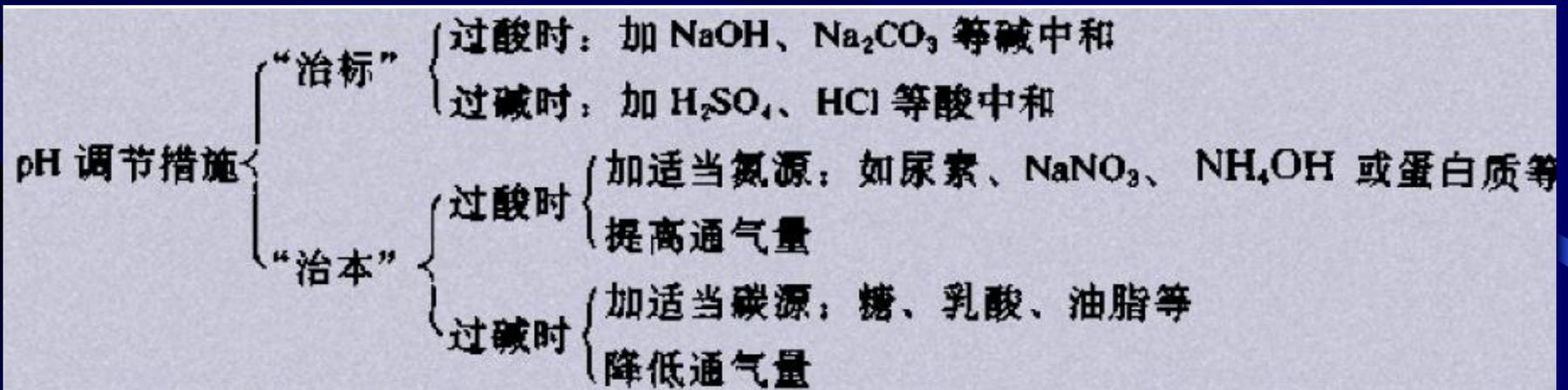
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ → → → → H_2SO_4 (变酸)
- NaNO_3 → → → → → NaOH (变碱)

微生物培养发酵过程中pH的控制

■为什么要对pH进行控制？

pH变化影响菌体生长和发酵产物生产

■控制pH的方法



第四节 微生物培养法概论

良好微生物培养装置的基本条件

- 设计基础：微生物的生长规律
- 基础：营养物质丰富而均匀
- 环境条件
 - 温度
 - 通气条件
 - 物理化学因素
- 有效防止杂菌污染

培养规模、培养形式：从柯赫到现代微生物工业

微生物培养技术的发展轨迹

- 少量培养到大规模培养
- 浅层培养到厚层或深层液体培养
- 固体培养到液体培养
- 静止培养到通气搅拌液体培养
- 单批培养到连续培养到多级培养
- 分散到固定化细胞
- 微生物细胞到动植物细胞培养
- 野生菌种到突变、遗传工程菌种
- 单菌发酵到混菌发酵
- 低密度到高密度
- 人工控制发酵罐到多传感器、计算机在线控制的自动发酵

一、实验室培养方法

◆ 固体培养

◆ 液体培养

好氧菌的固体培养

固 体 培 养

试管斜面 Test-tube slant

琼脂平板 Agar Plate

克氏扁瓶 Kolle Flask

茄子瓶

厌氧菌的固体培养

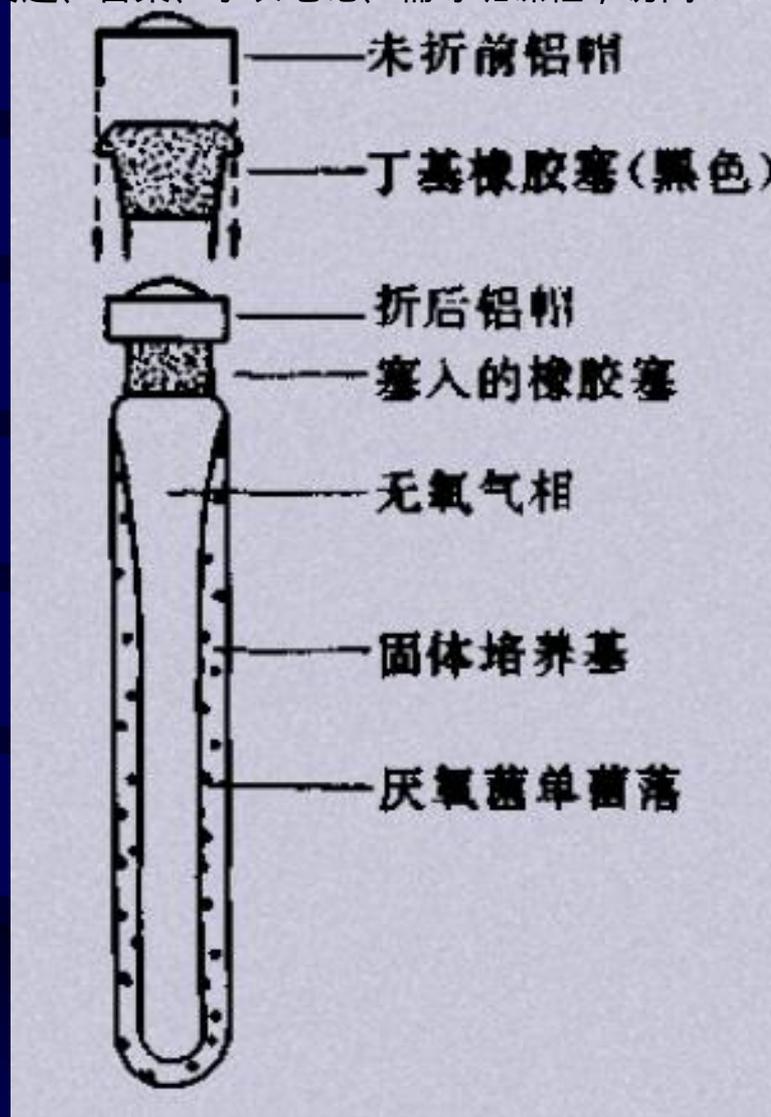
高层琼脂柱：Veillon tube

厌氧培养皿：Brewer皿、Bray皿、Spray皿

亨盖特滚管技术 Hungate roll-tube technique

厌氧罐 Anaerobic Jar 技术

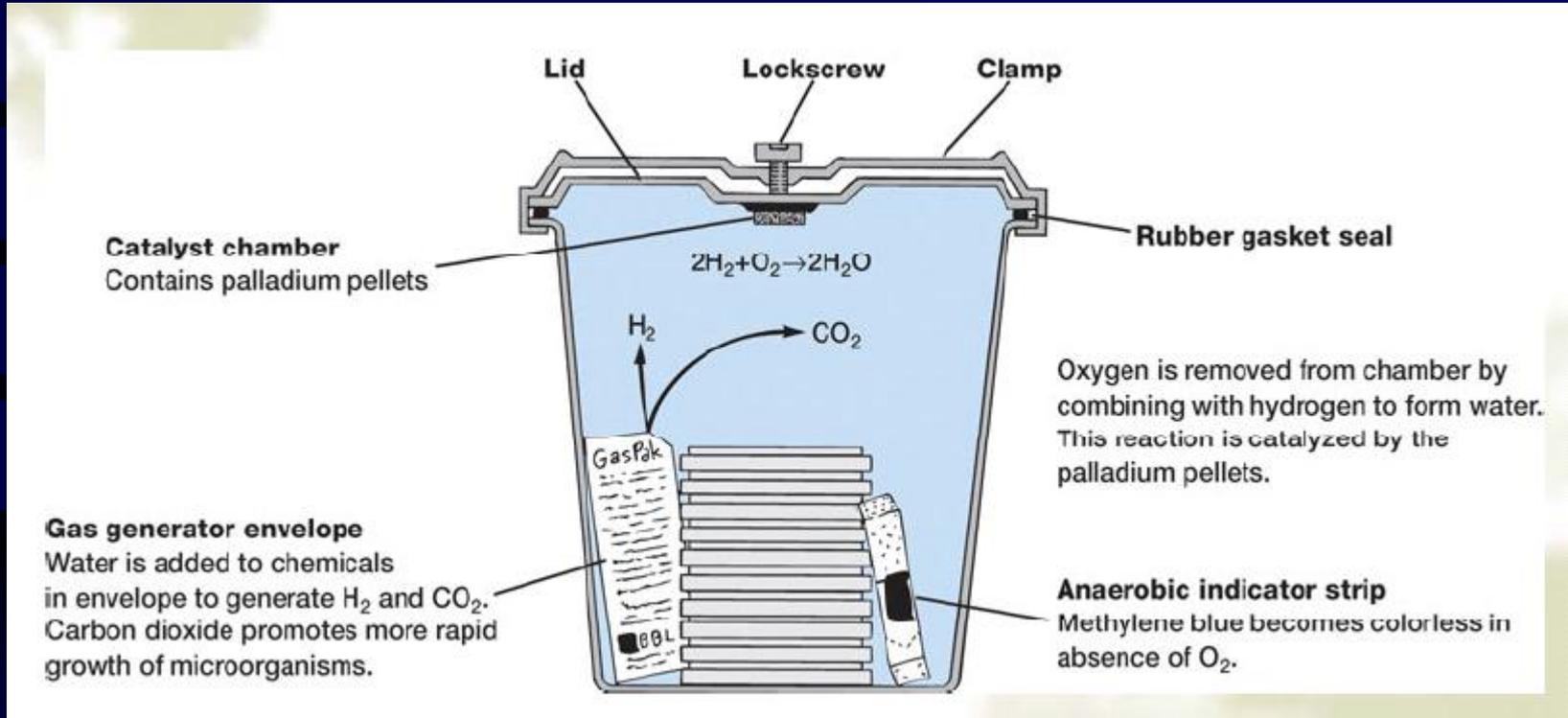
厌氧手套箱 Anaerobic glove box 技术



用于Hungate滚管技术中的厌氧试管剖面图

完整版，请访问www.kaoyancas.net 科大科院考研网，专注于中科大、中科院考研

厌氧罐



厌氧手套箱



2、液体培养法

◆好氧菌的液体培养

为什么氧气是好氧菌生长繁殖限制因子？如何解决？

- 试管液体培养
- 三角瓶浅层液体培养
- 摇瓶培养
- 台式发酵罐

◆厌氧菌的液体培养

- 有机还原剂：巯基乙酸、半胱氨酸、维生素C
- 无机还原剂：Fe丝
- 氧气隔离措施：石蜡油、凡士林-石蜡油

二、生产实践中培养微生物装置

◆ 固体培养法

- 好氧菌的曲法培养
- 厌氧菌的堆积培养

◆ 液体培养方法

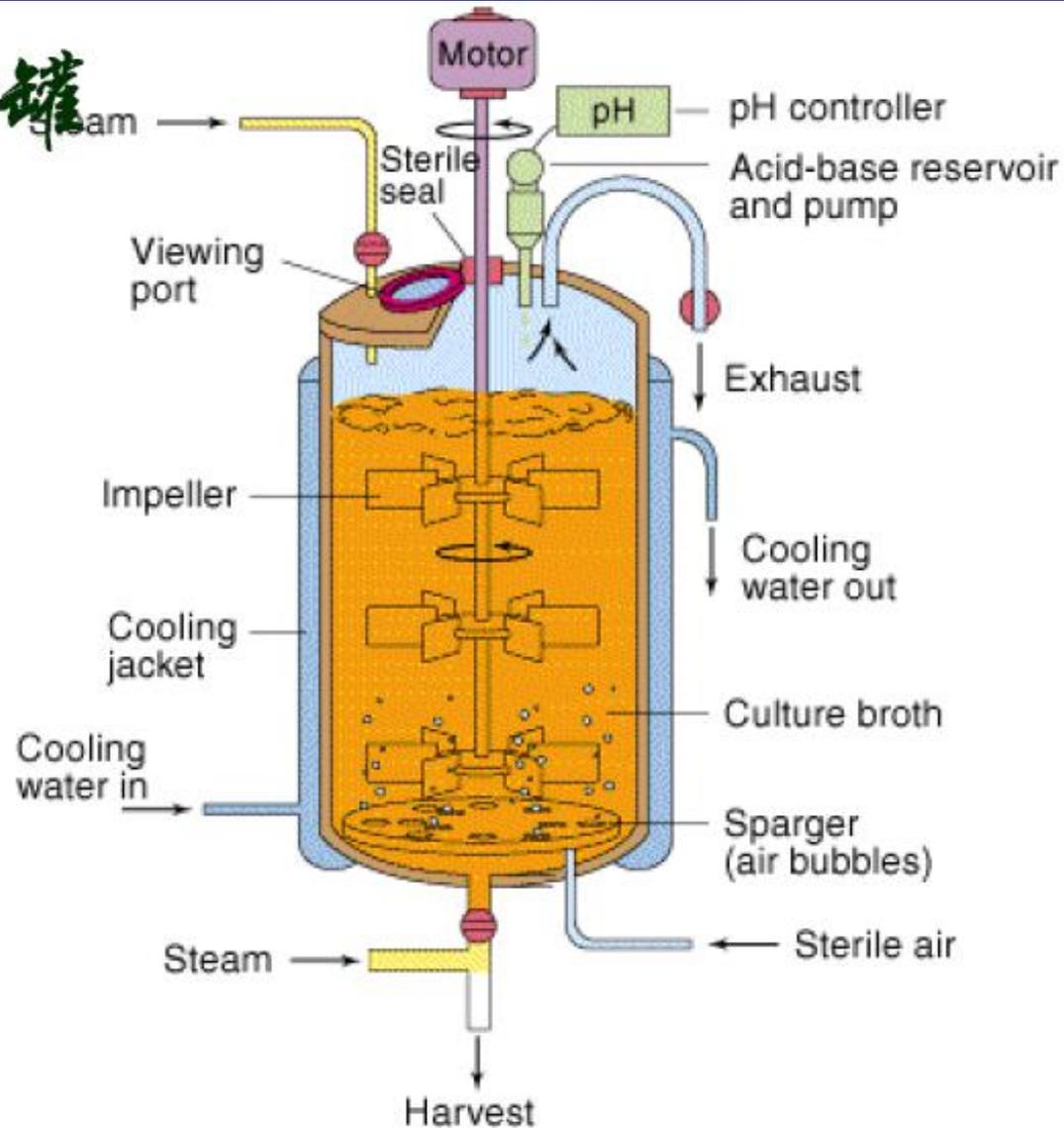
- 好氧菌的培养

- 浅盘培养

- 深层液体通气培养

发酵罐

发酵罐



瑞士比欧公司小型发酵罐



中式发酵罐



第五节 有害微生物的控制

微生物会造成那些危害？

◆ Why to control harmful microorganisms?

● Spoilage

食品与农业产品的腐败变质

● Contamination

实验室微生物、动植物组织或细胞纯培养物培养基、生化试剂、药物

● Disease

致病菌

一、控制有害微生物的基本概念

◆ 杀灭

- 灭菌：杀菌和溶菌
- 消毒：仅杀死病原菌

◆ 抑制

- 防腐：抑制霉菌微生物
- 化疗：抑制宿主内的病原菌

1、灭菌Sterilization

◆ 灭菌

采用任何强烈理化因素使物体内外部的一切微生物永远丧失生长繁殖能力的措施

- 杀菌Bacteriocidation

菌体虽死，形体尚存

- 溶菌Bacteriolysis

菌体被杀死以后，细胞自溶、裂解而消失

2、消毒Disinfection

◆概念：

采用较温和的理化因素，仅杀死物体表面或内部一部分的病原菌，而对被消毒的对象基本无害

◆实例

- 皮肤、水果和饮用水药剂消毒
- 巴氏消毒法

3、防腐Antisepsis

◆概念：

采用某种理化因素完全抑制微生物的生长繁殖（制菌作用）

◆防腐方法及其在食品工业中的应用

- 低温：4摄氏度以下
- 缺氧：抽真空、充氮或二氧化碳、除氧剂
- 干燥：晒干、烘干或红外线干燥
- 高渗：盐腌
- 高酸度：泡菜发酵
- 高醇度
- 防腐剂：苯甲酸、对羟基苯甲酸甲酯等

4、化疗Chemotherapy

◆化学治疗

指具有高度选择力（对病原菌具高度选择力而对其宿主基本无毒）的化学物质来抑制宿主体内的病原微生物的生长繁殖，达到治疗宿主疾病的目的的一种措施

◆化学治疗剂

磺胺药物、抗生素、生物药物素、中草药有效成分

二、物理灭菌

- ◆ 高温
- ◆ 辐射
- ◆ 超声波
- ◆ 微波
- ◆ 激光
- ◆ 静高压
- ◆ 稀释
- ◆ 过滤

高温灭菌的种类

◆干热灭菌法:火焰烧灼法、烘箱内热空气灭菌法

◆湿热灭菌/消毒法

●常压法

♠巴氏消毒法: LTH、HTST

♠煮沸消毒法: 100下煮沸几分钟, 饮用水消毒

♠间歇灭菌法

●加压法

♪ 常规加压蒸汽灭菌法

♪ 连续加压蒸汽灭菌法

1、干热灭菌法Dry Heat Sterilization

◆电热烘箱，150-170摄氏度1-2小时

◆干热灭菌机理：细胞膜破坏、蛋白质变性和原生质干燥。

◆灼烧Incineration、combustion

接种针/环、病原菌材料、动物尸体烧毁

2、湿热灭菌法Moist heat sterilization

◆100度以上的加压蒸汽进行灭菌

◆湿热温度对微生物的作用

●细菌与真菌营养细胞：~60度处理5~10min

●酵母菌细胞和霉菌孢子：~80度

●细菌芽孢：~120度15min

◆湿热灭菌条件是怎么确定的？

2.1 巴氏消毒法

- ◆发明人：巴斯德
- ◆杀死不耐热的病原菌
- ◆巴氏消毒的两种类型

♪低温维持法LTH：65度-30min

♪高温瞬时法HTST：72度-15sec

2.2 间歇灭菌法

◆分段灭菌或丁达尔灭菌法

适用于不耐热培养基的灭菌

◆操作程序

- 保温蒸煮：80-100度15-60min
- 保温过夜：室温或37度
- 如此重复三次

◆实例

硫细菌含硫培养物的灭菌（S 121度溶化）

2.3 加压蒸汽灭菌 Normal autoclaving

◆ 灭菌原理

◆ 灭菌条件的不同表示单位

- 121度 = 1 kg/cm² = 15磅/英寸² 15-20min
- 115度 = 0.7 kg/cm² = 10磅/英寸² ~35min

◆ 应用

- 微生物学实验室
- 医疗保健机构
- 发酵工厂

3、利用温度杀菌的定量指标

◆热死时间

◆热死温度

4、影响蒸汽加压灭菌效果的因素

- ◆ 灭菌物体含菌量
- ◆ 灭菌锅内空气排除程度
- ◆ 灭菌对象的pH
- ◆ 灭菌对象的体积
- ◆ 加热与散热速度

5、高温对培养基成分的有害影响及防治

◆有害影响

●沉淀

有机物（多肽类）、无机物（磷酸盐、碳酸盐）

●营养破坏

梅拉特反应（Maillard）反应、毒性

●pH值改变

●培养基浓度降低

防止法

防止方法

◆特殊加热灭菌法

♠分别单独灭菌

♠低压灭菌

◆过滤除菌法：各种滤器

缺点：无法去除病毒

◆其他方法

♠EDTA（乙二胺四乙酸）

♠NTA（氮川三乙酸）

♠气体灭菌剂

三、化学杀菌剂、消毒剂和抑制剂

◆控制微生物的化学因素

●表面消毒剂

♪ 溶液状态

♪ 气体状态

●化学治疗剂

♪ 抗代谢物：磺胺类

♪ 抗生素

♪ 生物药物素