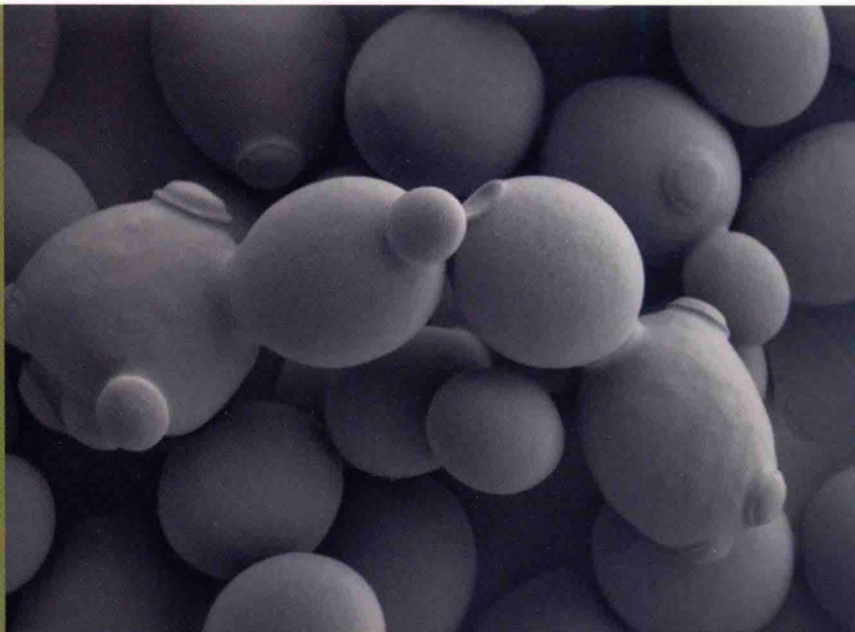




“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材



新形态教材



微生物学教程

第4版

ESSENTIAL MICROBIOLOGY

周德庆 编著

高等教育出版社

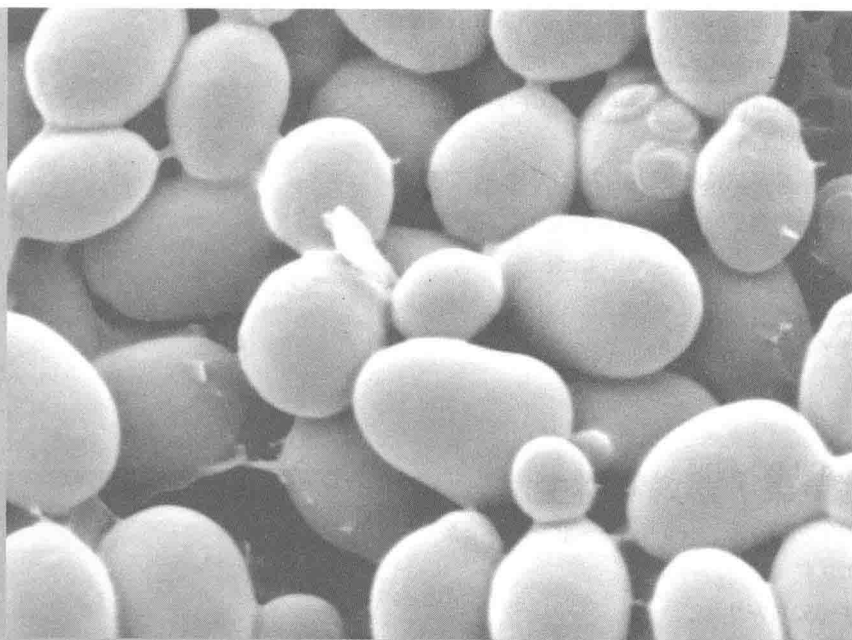
仅供个人科研教学使用



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材



新形态教材



微生物学教程

第4版

WEISHENGWUXUE JIAOCHENG

周德庆 编著

高等教育出版社·北京

仅供个人科研教学使用

内容提要

本书作为“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材,在保持第3版体系的基础上,与时俱进,充实了本学科近年来进展较快的一些前沿热点,如耐药菌、基因编辑、人体微生物组和免疫应答机理等新内容。

全书以微生物的形态构造、生理代谢、遗传变异、生态特性和进化分类五大生物学规律为主线,从细胞、分子和群体水平上,分10章全面、系统地讲清概念、阐明规律、充实知识、联系实际。

本书具有内容丰富、条理清晰、表达简明等特点。书中提供了大量自创的直观、形象的表解和图、表,易读利记。此外,各章后的复习思考题、书后的附录(有关教学评估的八项指标),以及配套的网上数字课程资源等内容,都有利于教学质量和效果的提高。

本书可用作综合性大学、师范院校以及理工、农林、环境、医药等相关专业本科生的教材,也可供从事微生物学研究以及相关管理、生产和应用领域的科技人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学教程 / 周德庆编著. --4版. --北京:
高等教育出版社, 2020.4

ISBN 978-7-04-052197-9

I. ①微… II. ①周… III. ①微生物学 - 高等学校 -
教材 IV. ①Q93

中国版本图书馆CIP数据核字(2019)第133903号

策划编辑 王莉 责任编辑 赵晓玉 王莉 封面设计 张志奇 责任印制 赵义民

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印 刷 北京中科印刷有限公司
开 本 889mm×1194mm 1/16
印 张 24
字 数 750千字
购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.hepmall.com.cn>
<http://www.hepmall.com>
<http://www.hepmall.cn>
版 次 1993年5月第1版
2020年4月第4版
印 次 2020年4月第1次印刷
定 价 52.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物料号 52197-00

仅供个人科研教学使用

数字课程 (基础版)

微生物学教程

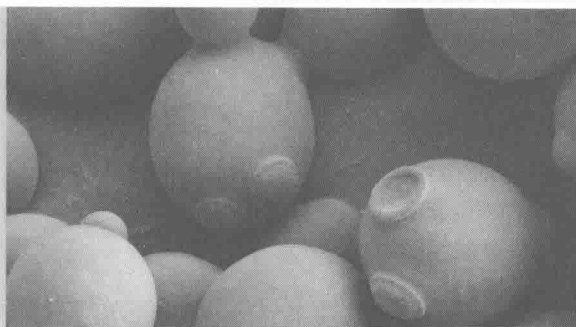
(第4版)

周德庆 编著

登录方法:

1. 电脑访问 <http://abook.hep.com.cn/52197>, 或手机扫描下方二维码、下载并安装 Abook 应用。
2. 注册并登录, 进入“我的课程”。
3. 输入封底数字课程账号 (20 位密码, 刮开涂层可见), 或通过 Abook 应用扫描封底数字课程账号二维码, 完成课程绑定。
4. 点击“进入学习”, 开始本数字课程的学习。

课程绑定后一年为数字课程使用有效期。如有使用问题, 请点击页面右下角的“自动答疑”按钮。



微生物学教程 (第4版)

微生物学教程 (第4版) 数字课程与纸质教材一体化设计, 紧密配合。数字课程内容包括各章小结、重要名词、常见微生物的学名及其音标等, 有利于拓展学习, 为学生提供了思维与探索的空间, 进而提升教学效果。

用户名: 密码: 验证码: 5360 忘记密码?

<http://abook.hep.com.cn/52197>

扫描二维码, 下载 Abook 应用



仅供个人科研教学使用



目录

绪论 微生物与人类 /1

- 一、什么是微生物 /1
- 二、人类对微生物世界的认识史 /1
- 三、微生物学的发展促进了人类的进步 /5
- 四、微生物的五大共性 /7
- 五、微生物学及其分科 /10

复习思考题 /10

第一章 原核生物的形态、构造和功能 /12

第一节 细菌 /12

- 一、细胞的形态、构造及其功能 /13
- 二、细菌的群体形态 /33

第二节 放线菌 /34

- 一、放线菌的形态和构造 /35
- 二、放线菌的繁殖 /36
- 三、放线菌的群体特征 /37

第三节 蓝细菌 /38

第四节 枝原体、立克次氏体和衣原体 /39

- 一、枝原体 /40
- 二、立克次氏体 /40
- 三、衣原体 /41

复习思考题 /42

第二章 真核微生物的形态、构造和功能 /43

第一节 真核微生物概述 /43

- 一、真核生物与原核生物的比较 /44
- 二、真核微生物的主要类群 /45
- 三、真核微生物的细胞构造 /45

第二节 酵母菌 /52

- 一、酵母菌分布及与人类的关系 /52
- 二、酵母菌细胞的形态和构造 /52

三、酵母菌的繁殖方式和生活史 /53

四、酵母菌的菌落 /56

第三节 丝状真菌——霉菌 /56

- 一、霉菌分布及与人类的关系 /56
- 二、霉菌细胞的形态和构造 /56
- 三、真菌的孢子 /60
- 四、霉菌的菌落 /60

第四节 产大型子实体的真菌——蕈菌 /62

复习思考题 /63

第三章 病毒和亚病毒因子 /65

第一节 病毒 /65

- 一、病毒的形态、构造和化学成分 /66
- 二、病毒的分类 /69
- 三、4类病毒及其繁殖方式 /71

第二节 亚病毒因子 /78

- 一、类病毒 /78
- 二、拟病毒 /78
- 三、卫星病毒 /79
- 四、卫星 RNA /79
- 五、朊病毒 /80

第三节 病毒与应用 /81

- 一、噬菌体与发酵工业 /81
- 二、昆虫病毒用于生物防治 /81
- 三、病毒在基因工程中的应用 /82

复习思考题 /83

第四章 微生物的营养和培养基 /84

第一节 微生物的6类营养要素 /84

- 一、碳源 /84
- 二、氮源 /85
- 三、能源 /86

四、生长因子 /87
五、无机盐 /87
六、水 /88
第二节 微生物的营养类型 /88
第三节 营养物质进入细胞的方式 /89
一、单纯扩散 /90
二、促进扩散 /90
三、主动转运 /90
四、基团转位 /90
第四节 培养基 /92
一、选用和设计培养基的原则和方法 /93
二、培养基的种类 /97
复习思考题 /101

第五章 微生物的新陈代谢 /102

第一节 微生物的能量代谢 /102
一、化能异养微生物的生物氧化和产能 /102
二、自养微生物产 ATP 和产还原力 /120
第二节 分解代谢和合成代谢的联系 /126
一、两用代谢途径 /126
二、代谢物回补顺序 /127
第三节 微生物独特合成代谢途径举例 /129
一、自养微生物的 CO ₂ 固定 /129
二、生物固氮 /132
三、微生物结构大分子——肽聚糖的生物合成 /137
四、微生物次生代谢物的合成 /140
第四节 微生物的代谢调节与发酵生产 /142
一、微生物的代谢调节 /142
二、代谢调节在发酵工业中的应用 /142
复习思考题 /144

第六章 微生物的生长及其控制 /146

第一节 测定生长繁殖的方法 /146
一、测生长量 /146
二、计繁殖数 /147
第二节 微生物的生长规律 /148
一、微生物的个体生长和同步生长 /148
二、单细胞微生物的典型生长曲线 /148
三、微生物的连续培养 /152
四、微生物的高密度培养 /154
第三节 影响微生物生长的主要因素 /155
一、温度 /155
二、氧气 /156
三、pH /159

第四节 微生物培养法概论 /161
一、实验室培养法 /161
二、生产实践中培养微生物的装置 /165
第五节 有害微生物的控制 /167
一、几个基本概念 /167
二、物理灭菌因素的代表——高温 /168
三、化学杀菌剂、消毒剂和治疗剂 /172
复习思考题 /180

第七章 微生物的遗传变异和育种 /181

第一节 遗传变异的物质基础 /182
一、3 个经典实验 /182
二、遗传物质在微生物细胞内存在的部位和形式 /184
第二节 基因突变和诱变育种 /193
一、基因突变 /193
二、突变与育种 /203
第三节 基因重组和杂交育种 /212
一、原核生物的基因重组 /213
二、真核微生物的基因重组 /220
第四节 基因工程 /223
一、基因工程的定义 /223
二、基因工程的基本操作 /223
三、基因工程的应用 /225
四、CRISPR 与基因编辑 /226
第五节 菌种的衰退、复壮和保藏 /228
一、菌种的衰退与复壮 /229
二、菌种的保藏 /230
复习思考题 /233

第八章 微生物的生态 /235

第一节 微生物在自然界中的分布与菌种资源的开发 /235
一、微生物在自然界中的分布 /235
二、菌种资源的开发 /248
第二节 微生物与生物环境间的关系 /248
一、互生 /248
二、共生 /250
三、寄生 /252
四、拮抗 /253
五、捕食 /253
第三节 微生物的地球化学作用 /254
一、碳素循环 /254
二、氮素循环 /255
三、硫素循环与细菌沥滤 /257
四、磷素循环 /258

第四节 微生物与环境保护 /259

- 一、水体的污染——富营养化 /259
- 二、用微生物治理污染 /260
- 三、沼气发酵与环境保护 /264
- 四、用微生物监测环境污染 /270

复习思考题 /270

第九章 传染与免疫 /272

第一节 传染 /272

- 一、传染与传染病 /272
- 二、决定传染结局的三大因素 /273
- 三、传染的3种可能结局 /279

第二节 非特异性免疫 /280

- 一、表皮和屏障结构 /280
- 二、吞噬细胞及其吞噬作用 /281
- 三、炎症反应 /284
- 四、正常体液或组织中的抗菌物质 /284

第三节 特异性免疫 /286

- 一、免疫器官 /287
- 二、免疫细胞及其在免疫应答中的作用 /288
- 三、免疫分子及其在体液免疫中的作用 /293

第四节 免疫学方法及其应用 /307

- 一、抗原、抗体反应的一般规律 /308
- 二、抗原、抗体间的主要反应 /309
- 三、免疫标记技术 /313

第五节 生物制品及其应用 /315

- 一、人工自动免疫类生物制品 /316
- 二、人工被动免疫类生物制品 /319

复习思考题 /321

第十章 微生物的分类和鉴定 /323

第一节 通用分类单元 /323

- 一、种以上的系统分类单元 /323
- 二、学名 /325
- 三、种以下的几个分类名词 /327

第二节 微生物在生物界的地位 /328

- 一、生物的界级分类学说 /328
- 二、三域学说及其发展 /330

第三节 各大类微生物的分类系统纲要 /332

- 一、伯杰氏原核生物分类系统纲要 /332
- 二、Ainsworth 等人的菌物分类系统纲要 /339

第四节 微生物分类鉴定的方法 /341

- 一、微生物分类鉴定中的经典方法 /341
- 二、微生物分类鉴定中的现代方法 /344

复习思考题 /350

结束语 微生物学的展望 /353

- 一、微生物在解决人类面临的五大危机中的作用 /353
- 二、现代微生物学的特点及其发展趋势 /355
- 三、微生物在“生命科学世纪”中的作用 /357
- 四、大力开展我国微生物学研究 /359
- 五、学好微生物学，推动人类进步 /359

附录 谈谈“评教八率” /360

参考书目 /363

索引 /365



第六章 微生物的生长及其控制

微生物不论其在自然条件下还是在人为条件下发挥作用,都是通过“以数取胜”或“以量取胜”的。生长和繁殖就是保证微生物获得巨大数量或**生物量**(biomass)的必要前提。可以说,没有一定数量的微生物就等于没有它们的存在。

一个微生物细胞在合适的外界环境条件下,会不断地吸收营养物质,并按其自身的代谢方式不断进行新陈代谢。如果同化(合成)作用的速度超过了异化(分解)作用,则其原生质的总量(质量、体积、大小)就不断增加,于是出现了个体细胞的**生长**(growth);如果这是一种平衡生长,即各种细胞组分是按恰当比例增长时,则达到一定程度后就会引起个体数目的增加,对单细胞的微生物来说,这就是**繁殖**(reproduction),不久,原有的个体已发展成一个群体。随着群体中各个个体的进一步生长、繁殖,就引起了这一群体的生长。群体的生长可用其质量、体积、个体浓度或密度等作指标来测定。所以个体和群体间有以下关系:

个体生长 → 个体繁殖 → 群体生长

群体生长 = 个体生长 + 个体繁殖

除了特定的目的以外,在微生物的研究和应用中,只有群体的生长才有意义,因此,在微生物学中,凡提到“生长”时,一般均指**群体生长**(culture growth, population growth),这一点与研究大型生物时有所不同。

微生物的生长繁殖是其在内外各种环境因素相互作用下生理、代谢等状态的综合反映,因此,有关生长繁殖的数据就可作为研究多种生理、生化和遗传等问题的重要指标;同时,微生物在生产实践上的各种应用或是人类对致病、霉腐等有害微生物的防治,也都与它们的生长繁殖或抑制紧密相关。这就是研究微生物生长繁殖规律的重要意义。

第一节 测定生长繁殖的方法

既然生长意味着原生质含量的增加,所以测定生长的方法也都直接或间接地依此为根据,而测定繁殖则都要建立在计算个体数目这一原理上。

一、测生长量

测定生长量的方法很多,它们适用于一切微生物。

(一) 直接法

有粗放的测体积法(在刻度离心管中测沉降量)和精确的**称干重法**(dry mass weighing)。微生物的干重一般为其湿重的10%~20%。据测定,每个*E. coli*细胞的干重为 2.8×10^{-13} g,故1颗芝麻重(近3 mg)的大肠

数用的良好性能。此法兼有省工、省料、省设备和菌落易辨认等优点。

第二节 微生物的生长规律

一、微生物的个体生长和同步生长

微生物的细胞是极其微小的，但是，它与一切其他细胞和个体(病毒例外)一样，也有一个自小到大的生长过程。在整个生长过程中，微小的细胞内同样发生着阶段性的极其复杂的生物化学变化和细胞学变化。可是，要研究某一细胞的这类变化，在技术上是极为困难的。目前能使用的方法，一是用电子显微镜观察细胞的超薄切片；二是使用**同步培养**(synchronous culture)技术，即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，然后通过分析此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。这种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，称为**同步生长**(synchronous growth)。

获得微生物同步生长的方法主要有两类：①环境条件诱导法——用氯霉素抑制细菌蛋白质合成；细菌芽孢诱导发芽；藻类细胞的光照、黑暗控制；用 EDTA 或离子载体处理酵母菌；以及短期热休克(40℃)法[用于原生动物 *Tetrahymena pyriformis* (梨形四膜虫)]；等等。②机械筛选法——利用处于同一生长阶段细胞的体积、大小的一致性，用过滤法、密度梯度离心法或膜洗脱法收集同步生长的细胞。其中以 Helmstetter-Cummings 的膜洗脱法较有效和常用，此法是根据某些滤膜可吸附与该滤膜(如硝酸纤维素)相反电荷细胞的原理，让非同步细胞的悬液流经此膜，于是一大群细胞被牢牢吸附。然后将滤膜翻转并置于滤器中，其上慢速流下新鲜培养液，最初流出的是未吸附的细胞，不久，吸附的细胞开始分裂，在分裂后的两个子细胞中，一个仍吸附在滤膜上，另一个则被培养液洗脱。若滤膜面积足够大，只要收集刚滴下的子细胞培养液即可获得满意的同步生长的细胞。当然，这种细胞在培养过程中，一般经 2~3 个分裂周期就会很快丧失其同步性。

二、单细胞微生物的典型生长曲线

定量描述液体培养基中微生物群体生长规律的实验曲线，称为**生长曲线**(growth curve)。当把少量纯种单细胞微生物接种到恒容积的液体培养基中进行批式培养(batch culture)后，在适宜的温度、通气等条件下，该群体就会由小到大，发生有规律的增长。如以细胞数目的对数值作纵坐标，以培养时间作横坐标，就可画出一条由延滞期、指数期、稳定期和衰亡期 4 个阶段组成的曲线，这就是微生物的典型生长曲线。说其“典型”，是因为它只适合单细胞微生物如细菌和酵母菌，而对丝状生长的真菌或放线菌而言，只能画出一条非“典型”的生长曲线，例如，真菌的生长曲线大致可分 3 个时期，即生长延滞期、快速生长期和生长衰退期。典型生长曲线与非典型的丝状菌生长曲线两者的差别是后者缺乏指数生长期，与此期相当的只是培养时间与菌丝体干重的立方根成直线关系的一段快速生长时期。

根据微生物的**生长速率常数**(growth rate constant)，即每小时分裂次数(R)的不同，一般可把典型生长曲线粗分为延滞期、指数期、稳定期和衰亡期 4 个时期(图 6-1)。

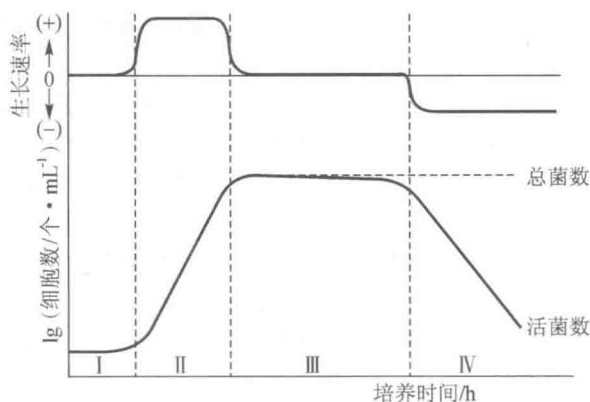


图 6-1 微生物的典型生长曲线

I. 延滞期, II. 指数期, III. 稳定期, IV. 衰亡期

(一) 延滞期(lag phase)

延滞期又称停滞期、调整期或适应期。指少量单细胞微生物接种到新鲜培养液中后,在开始培养的一段时间内,因代谢系统适应新环境的需要,细胞数目没有增加的一段时期。该期的特点为:①生长速率常数为零;②细胞形态变大或增长,许多杆菌可长成丝状,如 *Bacillus megaterium*(巨大芽孢杆菌)在接种时,细胞仅长 $3.4\ \mu\text{m}$,而培养至 3 h 时,其长为 $9.1\ \mu\text{m}$,至 5.5 h 时,竟可达 $19.8\ \mu\text{m}$;③细胞内的 RNA 尤其是 rRNA 含量增高,原生质呈嗜碱性;④合成代谢十分活跃,核糖体、酶类和 ATP 的合成加速,易产生各种诱导酶;⑤对外界不良条件如 NaCl 溶液浓度、温度和抗生素等理化因素反应敏感。

影响延滞期长短的因素很多,除菌种外,主要有 4 种:

(1) **接种龄** 指接种物或种子(inoculum, 复数 inocula)的生长年龄,亦即它生长到生长曲线上哪一阶段时用来作种子的。这是指某一群体的生理年龄。实验证明,如果以指数期接种龄的种子接种,则子代培养物的延滞期就短;反之,如果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;如果以稳定期的种子接种,则延滞期居中。

(2) **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(图 6-2)。因此,在发酵工业上,为缩短延滞期以缩短生产周期,通常都采用较大的接种量(种子:发酵培养基 = 1:10,体积分数)。

(3) **培养基成分** 接种到营养丰富的天然培养基中的微生物,要比接种到营养单一的组合培养基中的微生物延滞期短。所以,一般要求发酵培养基的成分与种子培养基的成分尽量接近,且应适当丰富些。

(4) **种子损伤度** 若用于接种的细胞曾被加热、辐射或被有毒物质损伤过,就会因修复损伤而延长延滞期。

出现延滞期的原因,是由于接种到新鲜培养液的种子细胞中,一时还缺乏分解或催化有关底物的酶或辅酶,或是缺乏充足的中间代谢物。为产生诱导酶或合成有关的中间代谢物,就需要有一段用于适应的时间,此即延滞期。

(二) 指数期(exponential phase)

指数期又称对数期(logarithmic phase, log phase),指在生长曲线中,紧接着延滞期的一段细胞数目以几何级数增长的时期(图 6-3)。

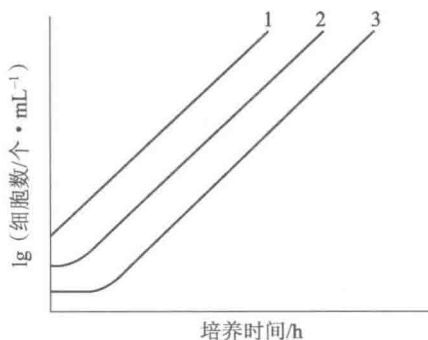


图 6-2 接种量对延滞期的影响

1. 大接种量, 2. 中等接种量, 3. 小接种量

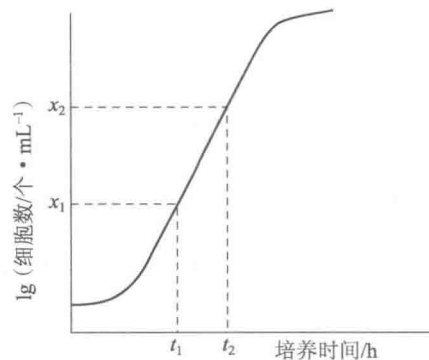


图 6-3 生长曲线中的指数期

指数期的特点是:①生长速率常数 R 最大,因而细胞每分裂一次所需的时间——代时(generation time, G , 又称世代时间或增代时间)或原生质增加一倍所需的倍增时间(doubling time)最短;②细胞进行平衡生长(balanced growth),故菌体各部分的成分十分均匀;③酶系活跃,代谢旺盛。

在指数期中,有 3 个重要参数,其相互关系及计算方法如下。

(1) 繁殖代数(n) 从图 6-3 可以得出:

$$x_2 = x_1 \cdot 2^n$$

以对数表示: $\lg x_2 = \lg x_1 + n \lg 2$

$$\therefore n = \frac{\lg x_2 - \lg x_1}{\lg 2} = 3.322(\lg x_2 - \lg x_1)$$

(2) 生长速率常数(R) 按前述生长速率常数的定义可知:

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

(3) 代时(G) 按前述平均代时的定义可知:

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

影响指数期微生物代时长短的因素很多,主要有以下 4 类。

① 菌种: 不同菌种其代时差别极大。例如,几种最常见的微生物的代时为: *Escherichia coli* (大肠埃希氏菌) 12.5 ~ 17 min, *Bacillus subtilis* (枯草芽孢杆菌) 26 ~ 32 min, *Lactobacillus acidophilus* (嗜酸乳杆菌) 66 ~ 87 min, *Streptococcus lactis* (乳酸链球菌) 26 ~ 48 min, *Staphylococcus aureus* (金黄色葡萄球菌) 27 ~ 30 min, *Mycobacterium tuberculosis* (结核分枝杆菌) 792 ~ 932 min, *Nitrobacter agilis* (活跃硝化杆菌) 1 200 min, *Azotobacter chroococcum* (褐球固氮菌) 240 min, *Rhizobium japonicum* (大豆根瘤菌) 344 ~ 461 min, *Anabaena cylindrica* (柱胞鱼腥蓝细菌) 636 min, *Treponema pallidum* (梅毒密螺旋体) 1980 min, *Saccharomyces cerevisiae* (酿酒酵母) 120 min, 尾状核草履虫 10.4 h, 以及蛋白核小球藻 7.75 h, 等等。

② 营养成分: 同一种微生物,在营养丰富的培养基上生长时,其代时较短,反之则长。例如,同在 37 °C 下, *E. coli* 在牛奶中代时为 12.5 min,而在肉汤培养基中为 17.0 min。

③ 营养物浓度: 营养物的含量既可影响微生物的生长速率,又可影响它的生长总量。如图 6-4 所示,只有在营养物含量很低(0.1 ~ 2.0 mg/mL)时,才会影响微生物的生长速率。随着营养物含量的逐步提高(2.0 ~ 8.0 mg/mL),生长速率不受影响,而仅影响到最终的菌体产量。如进一步提高营养物浓度,则已不再影响生长速率和菌体产量了。凡处于较低浓度范围内可影响生长速率和菌体产量的某营养物,就称生长限制因子(growth-limited factor)。

④ 培养温度: 温度对微生物的生长速率有明显的影响(表 6-1)。这一规律对发酵实践、食品保藏和夏天防止食物变质和食物中毒等都有重要的参考价值。

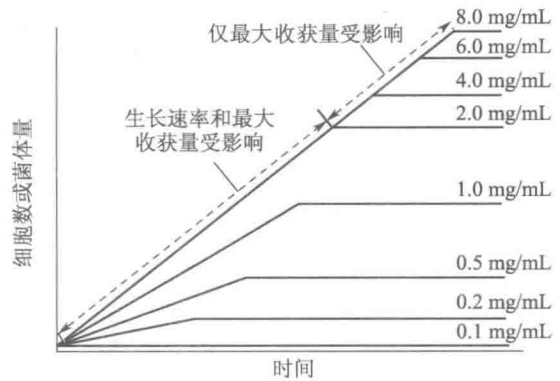


图 6-4 营养物浓度对微生物生长速率和菌体产量的影响

表 6-1 *E. coli* 在不同培养温度下的代时

温度/°C	代时/min	温度/°C	代时/min
10	860	35	22
15	120	40	17.5
20	90	45	20
25	40	47.5	77
30	29		

处于指数期尤其是指数期中期的微生物因其具有整个群体的生理特性较一致、细胞各成分平衡增长和生长速率恒定等优点,故是用作代谢、生理和酶学等研究的良好材料,是增殖噬菌体的最适宿主,也是发

酵工业中用作种子的最佳材料。

(三) 稳定期 (stationary phase)

稳定期又称恒定期或最高生长期。其特点是生长速率常数 R 等于零, 即处于新繁殖的细胞数与衰亡的细胞数相等, 或正生长与负生长相等的动态平衡之中。这时的菌体产量达到了最高点(如细菌含量一般每毫升可达 10^9 个, 原生动物或藻类为 10^6 个), 而且菌体产量与营养物质的消耗间呈现出有规律的比例关系, 这一关系可用**生长产量常数** Y (或称**生长得率**, growth yield)来表示:

$$Y = \frac{x - x_0}{C_0 - C} = \frac{x - x_0}{C_0}$$

上式中, x 为稳定期的细胞干重(g/mL 培养液), x_0 为刚接种时的细胞干重, C_0 为限制性营养物的最初含量(g/mL), C 为稳定期时限制性营养物的含量(由于计算 Y 时必须有一限制性营养物, 所以 C 应等于零)。例如, 据实验和计算, *Penicillium chrysogenum*(产黄青霉)在以葡萄糖为限制性营养物的组合培养基上生长时, 其 Y 值为 1:2.56, 说明这时每 2.56 g 葡萄糖可合成 1 g 菌丝体(干重)。为更精确计算 Y 值, 又提出 Y_{subst} (即每摩尔底物产生的菌体干重)和 Y_{ATP} (即每摩尔 ATP 所产生的菌体干重)等指标(表 6-2)。

表 6-2 某些厌氧菌利用葡萄糖时的摩尔生长产量常数

菌种	Y_{subst}^*	ATP 产率**	Y_{ATP}^{***}
<i>Escherichia coli</i> (大肠埃希氏菌)	26	3	8.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (肺炎克氏杆菌)	29	3	9.6
<i>Enterococcus faecalis</i> (粪肠球菌)	20	2	10.0
<i>Lactobacillus lactis</i> (乳酸乳杆菌)	19.5	2	9.8
<i>Lactobacillus plantarum</i> (植物乳杆菌)	18.8	2	9.4
<i>Zymomonas mobilis</i> (运动发酵单胞菌)	9	1	9.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (酿酒酵母)	18.8	2	9.4

* $Y_{\text{subst}} = \text{g(菌体干重)}/\text{mol 底物}$;

** ATP 产率 = mol ATP/mol 底物(发酵途径理论计算值);

*** $Y_{\text{ATP}} = \text{g(菌体干重)}/\text{mol ATP}$ 。

进入稳定期时, 细胞内开始积聚糖原、异染颗粒和脂肪等内含物; 芽孢杆菌一般在这时开始形成芽孢; 有的微生物在这时开始以**初生代谢物**(primary metabolite)为前体, 通过复杂的次生代谢途径合成抗生素等对人类有用的各种**次生代谢物**(secondary metabolite)。所以, 次生代谢物又称**稳定期产物**(idiolite)。由此还可对生长期进行另一种分类, 即以指数期为主的**菌体生长期**(trophophase)和以稳定期为主的**代谢产物合成期**(idiophase)。

稳定期到来的原因是: 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 比不合适等; ③酸、醇、毒素或 H_2O_2 等有害代谢产物的累积; ④pH、氧化还原电势等物理化学条件越来越不适宜; 等等。

稳定期的生长规律对生产实践有着重要的指导意义, 例如, 对以生产菌体或与菌体生长相平行的代谢产物(SCP、乳酸等)为目的的某些发酵生产来说, 稳定期是产物的最佳收获期; 对维生素、碱基、氨基酸等物质进行**生物测定**(bioassay)来说, 稳定期是最佳测定时期; 此外, 通过对稳定期到来原因的研究, 还促进了连续培养原理的提出和工艺、技术的创建。

(四) 衰亡期 (decline phase 或 death phase)

在**衰亡期**中, 微生物的个体死亡速度超过新生速度, 整个群体呈现负生长状态(R 为负值)。这时, 细胞形态发生多形化, 例如会发生膨大或不规则的退化; 有的微生物因蛋白水解酶活力的增强而发生**自溶**

(autolysis); 有的微生物在此期会进一步合成或释放对人类有益的抗生素等次生代谢物; 而在芽孢杆菌中, 往往在此期释放芽孢; 等等。

产生衰亡期的原因主要是外界环境对微生物继续生长越来越不利, 从而引起细胞内的分解代谢明显超过合成代谢, 继而导致大量菌体死亡。

三、微生物的连续培养

连续培养(continuous culture)是指向培养容器中连续流加新鲜培养液, 使微生物的液体培养物长期维持稳定、高速生长状态的一种溢流培养技术, 故它又称**开放培养**(open culture), 是相对于上述绘制典型生长曲线时所采用的**单批培养**(即批式培养, batch culture)或**密闭培养**(closed culture)而言的。

连续培养是在研究典型生长曲线的基础上, 通过深刻认识稳定期到来的原因, 并采取相应的防止措施而实现的。具体地说, 当微生物以单批培养的方式培养到指数期的后期时, 一方面以一定速度连续流入新鲜培养基和通入无菌空气(厌氧菌例外), 并立即搅拌均匀; 另一方面, 利用溢流的方式, 以同样的流速不断流出培养物。于是容器内的培养物就可达到动态平衡, 其中的微生物可长期保持在指数期的平衡生长状态和恒定的生长速率上, 于是形成了**连续生长**(continuous growth)(图 6-5, 图 6-6)。

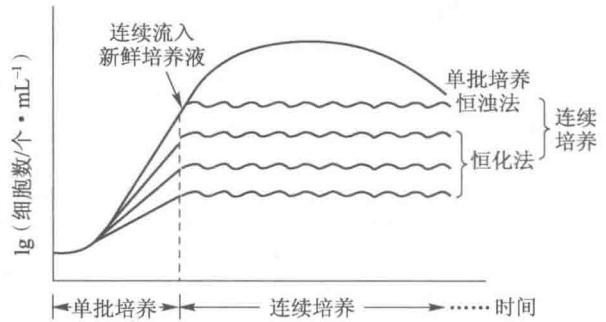


图 6-5 单批培养与连续培养的关系

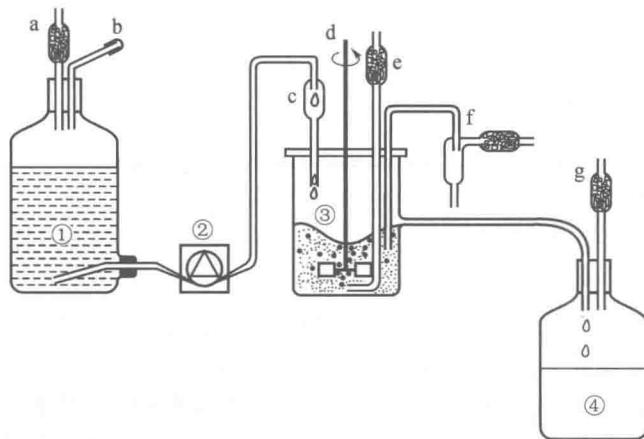
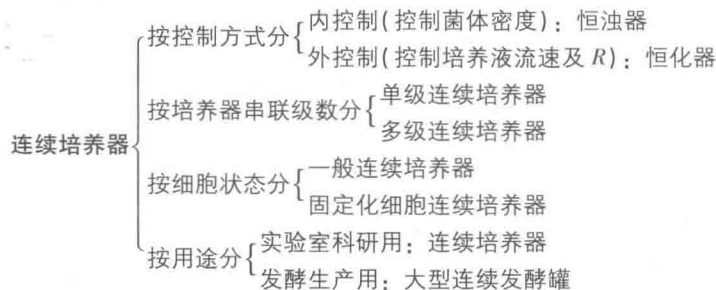


图 6-6 连续培养装置结构示意图

①培养液贮备瓶, 其上有过滤器(a)和培养基进口(b); ②蠕动泵; ③恒化器, 其上有培养基入口(c)、搅拌器(d)、空气过滤装置(e)和取样口(f); ④收集瓶, 其上有过滤器(g)

连续培养器的类型很多, 可用以下表解来说明:



以下仅对控制方式和培养器级数不同的两种连续培养器的原理及应用范围作一简单介绍。

(1) 按控制方式分

① **恒浊器 (turbidostat)**: 这是一种根据培养器内微生物的生长密度, 并借光电控制系统来控制培养液流速, 以取得菌体密度高、生长速率恒定的微生物细胞的连续培养器。在这一系统中, 当培养基的流速低于微生物生长速率时, 菌体密度增高, 这时通过光电控制系统的调节, 可促使培养液流速加快, 反之亦然, 并以此来达到恒密度的目的。因此, 这类培养器的工作精度是由光电控制系统的灵敏度决定的。在恒浊器中的微生物始终能以最高生长速率进行生长, 并可在允许范围内控制不同的菌体密度。在生产实践上, 为了获得大量菌体或与菌体生长相平行的某些代谢产物(如乳酸、乙醇)时, 都可以利用恒浊器类型的连续发酵器。

② **恒化器 (chemostat 或 bactogen)**: 与恒浊器相反, 恒化器是一种设法使培养液的流速保持不变, 并使微生物始终在低于其最高生长速率的条件下进行生长繁殖的连续培养装置。这是一种通过控制某一营养物的浓度, 使其始终成为生长限制因子的条件下达到的, 因而可称为外控制式的连续培养装置。可以设想, 在恒化器中, 一方面菌体密度会随时间的延长而增高; 另一方面, 限制因子的浓度又会随时间的延长而降低, 两者相互作用, 使微生物的生长速率正好与恒速流入的新鲜培养基流速相平衡。这样, 既可获得一定生长速率的均一菌体, 又可获得虽低于最高菌体产量, 却能保持稳定菌体密度的菌体。在恒化器中, 营养物质的更新速度以**稀释率** (dilution rate, D)表示, 即培养基流速(mL/h)与培养器的容积(mL)的比值:

$$D = \frac{f(\text{流速})}{V(\text{容积})}$$

例如, 当流速为 30 mL/h, 培养器容积为 100 mL 时, $D = 0.3/\text{h}$, 即每小时有 30% 的培养液被更新。在恒化器中, 微生物的生长与稀释率之间的关系见图 6-7。恒化器主要用于实验室的科学研究工作中, 尤其适用于与生长速率相关的各种理论研究中。现将恒浊器与恒化器的比较列在表 6-3 中。

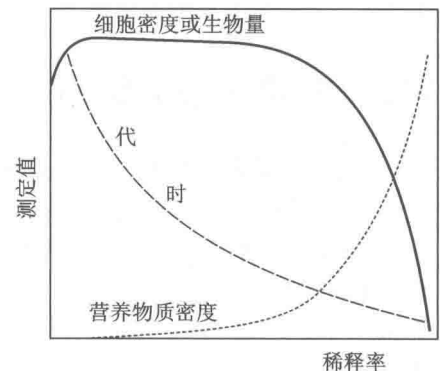


图 6-7 在恒化器中微生物的生长与稀释率的关系

表 6-3 恒浊器与恒化器的比较

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	培养基流速 (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

(2) 按培养器级数分 按此法把连续培养器分成**单级连续培养器 (one-step continuous fermentor)**和**多级连续培养器 (multi-step continuous fermentor)**两类。如上所述, 若某微生物代谢产物的产生速率与菌体生长速率相平行, 就可采用单级恒浊式连续发酵器来进行研究或生产。相反, 若要生产的产物恰与菌体生长不平行, 例如生产丙酮、丁醇或某些次生代谢物时, 就应根据两者的产生规律, 设计与其相适应的多级连续培养装置。

以丙酮、丁醇发酵为例: *Clostridium acetobutylicum* (丙酮丁醇梭菌) 的生长可分两个阶段, 前期较短, 以生产菌体为主, 生长温度以 37 °C 为宜, 是**菌体生长期 (trophophase)**; 后期较长, 以产溶剂(丙酮、丁醇)为主, 温度以 33 °C 为宜, 为**产物合成期 (idiophase)**。根据这种特点, 国外曾有人设计了一个两级连续发酵罐: 第一级罐保持 37 °C、pH 4.3、培养液的**稀释率** D (dilution rate) 为 0.125/h (即控制在 8 h 可以对容器内培养液更换一次的流速), 第二级罐为 33 °C、pH 4.3、稀释率为 0.04/h (即 25 h 才更换培养液一次), 并把第一、二级罐串联起来进行连续培养。这一装置不仅溶剂的产量高, 效益好, 而且可在一年多时间内连

续运转。在我国上海，早在 20 世纪 60 年代就采用多级连续发酵技术大规模地生产丙酮、丁醇等溶剂了。

连续培养如用于生产实践，就称为**连续发酵**(continuous fermentation)。连续发酵与单批发酵相比，有许多优点：①高效，它简化了装料、灭菌、出料、清洗发酵罐等许多单元操作，从而减少了非生产时间并提高了设备的利用率；②自控，即便于利用各种传感器和仪表进行自动控制；③产品质量较稳定；④节约了大量动力、人力、水和蒸汽，且使水、气、电的负荷均衡合理。当然，连续培养也存在着明显的缺点：①菌种易退化——由于长期让微生物处于高速率的细胞分裂中，故即使其自发突变概率极低，仍无法避免突变的发生，尤其当发生比原生产菌株营养要求降低、生长速率增高、代谢产物减少的负变类型时；②易污染杂菌——在长时期连续运转中，存在着因设备渗漏、通气过滤失灵等而造成的污染；③营养物的利用率一般低于单批培养。因此，连续发酵中的“连续”还是有限的，一般可达数月一至两年。

在生产实践上，连续培养技术已较广泛应用于酵母菌**单细胞蛋白**(single cell protein, SCP)的生产，乙醇、乳酸、丙酮和丁醇的发酵，用 *Candida lipolytica*(解脂假丝酵母)等进行**石油脱蜡**，以及用自然菌种或混合菌种进行**污水处理**等各领域。国外还报道了把微生物连续培养的原理运用于提高浮游生物饵料产量的实践中，并收到了良好的效果。

四、微生物的高密度培养

微生物的**高密度培养**(high cell-density culture, HCDC)有时也称高密度发酵，一般是指微生物在液体培养条件下细胞群体密度超过常规培养 10 倍以上时的生长状态或培养技术。现代高密度培养技术主要是在用基因工程菌(尤其是 *E. coli*)生产**多肽类药物**的实践中逐步发展起来的。*E. coli*在生产各种多肽类药物中具有极其重要的地位，其产品都是高价值的贵重药品，例如人生长激素、胰岛素、白细胞介素类和干扰素等。若能提高菌体培养密度，提高产物的**比生产率**(单位体积单位时间内产物的产量)，不仅可减少培养容器的体积、培养基的消耗和提高“**下游工程**”(down-stream processing)中分离、提取的效率，而且还可缩短生产周期、减少设备投入和降低生产成本，因此具有重要的实践价值。

不同菌种和同种不同菌株间，在达到高密度的水平上差别极大。有人曾计算过在理想条件下，*E. coli*的理论高密度值可达 200 g(湿重)/L，还有人甚至认为可达 400 g/L。在前一情况下，几乎 1/4 的发酵液中都充满 *E. coli* 细胞，引起培养液的高黏度，其流动性也几近丧失。至今已报道过的高密度生长的实际最高纪录为 *E. coli* W3110 的 174 g(湿重)/L 和 *E. coli* 用于生产 PHB 的“工程菌”的 175.4 g(湿重)/L。当然，由于微生物高密度生长的研究时间尚短，理论研究还待深入，因此，被研究过的微生物种类还很有限，主要局限于 *E. coli* 和 *Saccharomyces cerevisiae*(酿酒酵母)等少数兼性厌氧菌上。若进一步加强对其他好氧菌和厌氧菌高密度生长的研究，并扩大对各大类、各种生理类型微生物的深入研究，则对微生物学基础理论和有关生产实践都有很大的意义。

进行高密度培养的具体方法很多，应综合考虑和充分运用这些规律，以获得最佳效果。

① 选取最佳培养基成分和各成分含量：以 *E. coli* 为例，每升培养基产 1g 菌体所需无机盐量为 NH_4Cl 0.77 g/L, KH_2PO_4 0.125 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 17.5 mg/L, K_2SO_4 7.5 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.64 mg/L, CaCl_2 0.4 mg/L；而在 *E. coli* 培养基中一些主要营养物的抑制浓度则为葡萄糖 50 g/L, 氨 3 g/L, Fe^{2+} 1.15 g/L, Mg^{2+} 8.7 g/L, PO_4^{3-} 10 g/L, Zn^{2+} 0.038 g/L。此外，合适的 C/N 比也是 *E. coli* 高密度培养的基础。

② 适时补料：是 *E. coli* 工程菌高密度培养的重要手段之一。若在供氧不足时，过量葡萄糖会引起“葡萄糖效应”，并导致有机酸过量积累，从而使生长受到抑制。因此，补料一般应采用逐量流加的方式进行。

③ 提高溶解氧的浓度：实验指出，提高好氧菌和兼性厌氧菌培养时的溶氧量也是进行高密度培养的重要手段之一。大气中仅含 21% 的氧，若提高氧浓度甚至用纯氧或加压氧去培养微生物，就可大大提高高密度培养的水平，例如，有人用纯氧培养酵母菌，就可使菌体密度达到 100 g(湿重)/L。

④ 防止有害代谢产物的生成：乙酸是 *E. coli* 产生的对自身的生长代谢有抑制作用的产物。为防止它的

生成,可采用诸如选用天然培养基,降低培养基的 pH,以甘油代替葡萄糖作碳源,加入甘氨酸、甲硫氨酸,降低培养温度(从 37 °C 下降至 26~30 °C),以及采用透析培养法(dialysis culture)去除乙酸等。

⑤ 保持合适 pH:主要通过使培养液保持良好的缓冲性能来维持合适的 pH。例如,在 *Lactobacillus plantarum* (植物乳杆菌)培养液中,使乙酸钠与 CaCO₃ 的比例保持 1:3 (0.5%:1.5%) 时,就可实现高密度生长(2.75×10^{10} CFU/mL)。

第三节 影响微生物生长的主要因素

影响微生物生长的外界因素很多,除第四章已介绍过的营养条件外,还有许多物理因素。限于篇幅,以下仅阐述其中最主要的温度、氧气和 pH 3 项。

一、温度

由于微生物的生命活动都是由一系列生物化学反应组成的,而这些反应受温度影响又极其明显,同时,温度还影响生物大分子的物理状态,例如,低温可导致细胞膜凝固,引起物质运送困难,而高温则可使蛋白质变性,故温度成了影响微生物生长繁殖的最重要因素之一。这里专门讨论在微生物生长范围内的各种温度(生长范围外的温度影响可见本章第五节,而极端生长温度下的嗜热菌、嗜冷菌则可见第八章第一节)。

与其他生物一样,任何微生物的生长温度尽管有宽有窄,但总有最低生长温度、最适生长温度和最高生长温度这 3 个重要指标,这就是生长温度三基点(three cardinal point)。如果把微生物作为一个整体来看,其温度的三基点是极其宽的,堪称“生物界之最”,这可以从以下表解中看到:

生长温度三基点	{	最低: 一般为 -10 ~ -5 °C, 极端为 -30 °C					
		嗜冷菌: <20 °C (一般为 15 °C)					
		<table style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td rowspan="2" style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">{</td> <td>中温菌(20~45 °C) {</td> <td>室温菌: 约 25 °C</td> </tr> <tr> <td></td> <td>体温菌: 约 37 °C</td> </tr> </table>	{	中温菌(20~45 °C) {	室温菌: 约 25 °C		体温菌: 约 37 °C
		{		中温菌(20~45 °C) {	室温菌: 约 25 °C		
	体温菌: 约 37 °C						
嗜热菌: >45 °C (一般为 50~60 °C)							
最高: 一般为 80~95 °C, 极端为 105~150 °C							

对某一具体微生物而言,其生长温度有的很宽,有的则很窄,这与它们长期进化过程中所处的生存环境温度有关。例如,一些生活在土壤中的芽孢杆菌,它们属宽温微生物(15~65 °C); *E. coli* 既可在人或动植物的肠道中生活,也可在体外环境中生活,故也是宽温微生物(10~47.5 °C); 而专性寄生在人体泌尿生殖道中的致病菌——*Neisseria gonorrhoeae* (淋病奈瑟氏球菌)则是窄温微生物(36~40 °C)。

现将若干微生物的生长温度三基点列在表 6-4 中。

表 6-4 若干微生物的生长温度三基点

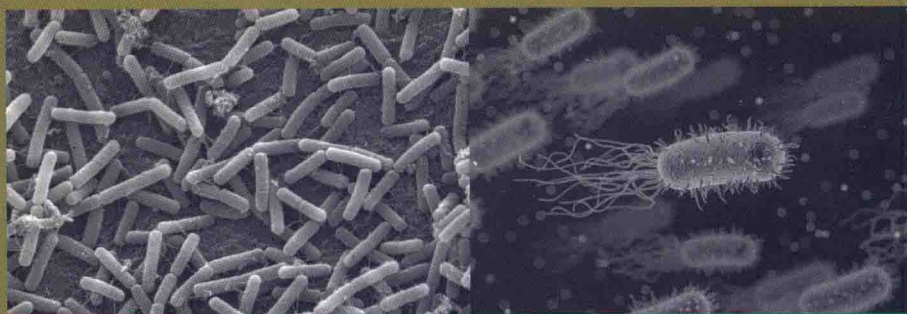
类型	菌名	温度三基点/°C		
		最低	最适	最高
嗜冷菌	<i>Polaromonas vacuolata</i> (液泡极地单胞菌)	-4	4	12
中温菌	<i>Escherichia coli</i> (大肠埃希氏菌)	8	39	48
嗜热菌	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (嗜热脂肪地芽孢杆菌)	42	60	68
超嗜热菌	<i>Thermococcus celer</i> (速生热球菌)	65	88	97
极端超嗜热菌	<i>Pyrolobus fumarii</i> (烟孔火叶菌)	90	106	114

最适生长温度(optimum growth temperature)经常简称为“最适温度”,其含义为某菌分裂代时最短或生

- 第1版 1995年 获国家教委优秀教材一等奖，
1997年 获国家级教学成果奖二等奖，
1998年 获国家教委科学技术进步奖二等奖（著作类）
- 第3版 入选普通高等教育“十一五”国家级规划教材
- 第4版 入选“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材

ESSENTIAL MICROBIOLOGY

Fourth Edition



数字课程网站

网址：<http://abook.hep.com.cn/52197>

<http://abook.hep.edu.cn/52197>

数字课程账号 使用说明详见书内数字课程说明页

仅供个人科研教学使用

ISBN 978-7-04-052197-9



定价 52.00 元