

# 第七章 微生物的生长

**[教学目标]** 本章主要对微生物的生长与繁殖规律；微生物生长的测定；纯培养的分离；理化因素对微生物生长的影响等。

**[教学的重点和难点]** 微生物的群体生长规律；纯培养的分离与测定；理化因素对微生物生长的影响。

**[教学方法和手段]** 主要以讲授为主，应用多媒体课件进行形象生动的课堂教学。

**[教学内容]**

## § 1 微生物的分离和纯培养

在微生物学中，在人为规定的条件下培养、繁殖得到的微生物群体称为培养物(culture)，而只有一种微生物的培养物称为纯培养物(pure culture)。由于在通常情况下纯培养物能较好地被研究、利用和重复结果，因此把特定的微生物从自然界混杂存在的状态中分离、纯化出来的纯培养技术是进行微生物学研究的基础。

### 一、 无菌技术

微生物通常是肉眼看不到的微小生物，而且无处不在。因此，在微生物的研究及应用中，不仅需要通过分离纯化技术从混杂的天然微生物群中分离出特定的微生物，而且还必须随时注意保持微生物纯培养物的“纯洁”，防止其他微生物的混入。在分离、转接及培养纯培养物时防止其被其他微生物污染的技术被称为无菌技术(aseptic technique)，它是保证微生物学研究正常进行的关键。

#### 1、 微生物培养的常用器具及其灭菌

试管、玻璃烧瓶、平皿(culture dish, petri dish)等是最为常用的培养微生物的器具，在使用前必须先行灭菌，使容器中不含任何生物。培养微生物的营养物质[称为培养基(culture medium)]可以加到器皿中后一起灭菌，也可在单独灭菌后加到无菌的器具中。最常用的灭菌方法是高压蒸汽灭菌，它可以杀灭所有的生物，包括最耐热的某些微生物的休眠体，同时可以基本保持培养基的营养成分不被破坏。有些玻璃器皿也可采用高温干热灭菌。为了防止杂菌，特别是空气中的杂菌污染，试管及玻璃烧瓶都需采用适宜的塞子塞口，通常采用棉花塞，也可采用各种金属、塑料及硅胶帽，它们只可让空气通过，而空气中的其他微生物不能通过。而平皿是由正反两平面板互扣而成，这种器具是专为防止空气中微生物的污染而设计的。

#### 2、 接种操作

用接种环或接种针分离微生物，或在无菌条件下把微生物由一个培养器皿转接到另一个培养容器进行培养，是微生物学研究中最常用的基本操作。由于打开器皿就可能引起器皿内部被环境中的其他微生物污染，因此微生物实验的所有操作均应在无菌条件下进行，其要点是在火焰附近进行熟练的无菌操作，或在无菌箱或操作室内无菌的环境下进行操作。操作箱或操作室内的空气可在使用前一段时间内用紫外灯或化学药剂灭菌。有的无菌室通无菌空气维持无菌状态。

用以挑取和转接微生物材料的接种环及接种针，一般采用易于迅速加热和冷却的镍铬合金等金属制备，使用时用火焰灼烧灭菌。而转移液体培养物可采用无菌吸管或移液枪。

### 二、 用固体培养基分离纯培养

不同微生物在特定培养基上生长形成的菌落或菌苔一般都具有稳定的特征，可以成为对该微生物进行分类、鉴定的重要依据。大多数细菌、酵母菌，以及许多真菌和单细胞藻类能在固体培养基上形成孤立的菌落，采用适宜的平板分离法很容易得到纯培养。所谓平板，即培养平板(culture plate)的简称，它是指熔化的固体培养基倒入无菌平皿，冷却凝固后，盛有固体培养基的平皿。这方法包括将单个微生物分离和固定在固体培养基表面或里面。固体培养基是用琼脂或其他凝胶物质固化的培养基，每个孤立的话微生物体生长、繁殖形成菌落，形成的菌落便于移植。最常用的分离、培养微生物的固体培养基是琼脂固体培养基平板。这种由 Koch 建立的采用平板分离微生物纯培养的技术简便易行，

100 多年来一直是各种菌种分离的最常用手段。

#### 1、 稀释倒平板法(pour plate method)

先将待分离的材料用无菌水作一系列的稀释(如 1:10、1:100、1:1000、1:10000...), 然后分别取不同稀释液少许, 与已熔化并冷却至 50℃左右的琼脂培养基混合, 摇匀后, 倾入灭过菌的培养皿中, 待琼脂凝固后, 制成可能含菌的琼脂平板, 保温培养一定时间即可出现菌落。如果稀释得当, 在乎板表面或琼脂培养基中就可出现分散的单个菌落, 这个菌落可能就是由一个细菌细胞繁殖形成的。随后挑取该单个菌落, 或重复以上操作数次, 便可得到纯培养。

#### 2、 涂布平板法(spread plate method)

由于将含菌材料先加到还较烫的培养基中再倒平板易造成某些热敏感菌的死亡, 而且采用稀释倒平板法也会使一些严格好氧菌因被固定在琼脂中间缺乏氧气而影响其生长, 因此在微生物学研究中更常用的纯种分离方法是涂布平板法。其做法是先将已熔化的培养基倒入无菌平皿, 制成无菌平板, 冷却凝固后, 将一定量的某一稀释度的样品悬液滴加在平板表面, 再用无菌玻璃涂棒将菌液均匀分散至整个平板表面, 经培养后挑取单个菌落

#### 3、 平板划线分离法(streak plate method)

用接种环以无菌操作沾取少许待分离的材料, 在无菌平板表面进行平行划线、扇形划线或其他形式的连续划线, 微生物细胞数量将随着划线次数的增加而减少, 并逐步分散开来, 如果划线适宜的话, 微生物能一一分散, 经培养后, 可在平板表面得到单菌落。

#### 4、 稀释摇管法(dilution shake culture method)

用固体培养基分离严格厌氧菌有它特殊的地方。如果该微生物暴露于空气中不立即死亡, 可以用来用通常的方法制备平板, 然后置放在封闭的容器中培养, 容器中的氧气可采用化学、物理或生物的方法清除。对于那些对氧气更为敏感的厌氧性微生物, 纯培养的分离则可采用稀释摇管培养法进行, 它是稀释倒平板法的一种变通形式。先将一系列盛无菌琼脂培养基的试管加热使琼脂熔化后冷却并保持在 50℃左右, 将待分离的材料用这些试管进行梯度稀释, 试管迅速摇动均匀, 冷凝后, 在琼脂柱表面倾倒一层灭菌液体石蜡和固体石蜡的混合物, 将培养基和空气隔开。培养后, 菌落形成在琼脂柱的中间。进行单菌落的挑取和移植, 需先用一只灭菌针将液体石蜡—石蜡盖取出, 再用一只毛细管插入琼脂和管壁之间, 吹入无菌无氧气体, 将琼脂柱吸出, 置放在培养皿中, 用无菌刀将琼脂柱切成薄片进行观察和菌落的移植。

### 三、 用液体培养基分离纯培养

对于大多数细菌和真菌, 用平板法分离通常是满意的, 因为它们的大多数种类在固体培养基上长得很好。然而迄今为止并不是所有的微生物都能在固体培养基上生长, 例如一些细胞大的细菌、许多原生动物和藻类等, 这些微生物仍需要用液体培养基分离来获得纯培养。

通常采用的液体培养基分离纯化法是稀释法。接种物在液体培养基中进行顺序稀释, 以得到高度稀释的效果, 使一支试管中分配不到一个微生物。如果经稀释后的大多数试管中没有微生物生长, 那么有微生物生长的试管得到的培养物可能就是纯培养物。如果经稀释后的试管中有微生物生长的比例提高了, 得到纯培养物的概率就会急剧下降。因此, 采用稀释法进行液体分离, 必须在同一个稀释度的许多平行试管中, 大多数(一般应超过 95%)表现为不生长。

### 四、 单细胞(单孢子)分离

稀释法有一个重要缺点, 它只能分离出混杂微生物群体中占数量优势的种类, 而在自然界, 很多微生物在混杂群体中都是少数。这时, 可以采取显微分离法从混杂群体中直接分离单个细胞或单个个体进行培养以获得纯培养, 称为单细胞(单孢子)分离法。单细胞分离法的难度与细胞或个体的大小成反比, 较大的微生物如藻类、原生动物较容易, 个体很小的细菌则较难。

对于较大的微生物, 可采用毛细管提取单个个体, 并在大量的灭菌培养基中转移清洗几次, 除去较小微生物的污染。这项操作可在低倍显微镜, 如解剖显微镜下进行。对于个体相对较小的微生物, 需采用显微操作仪, 在显微镜下进行。目前, 市场上有售的显微操作仪种类很多, 一般是通过机械、

空气或油压传动装置来减小手的动作幅度，在显微镜下用毛细管或显微针、钩、环等挑取单个微生物细胞或孢子以获得纯培养。在没有显微操作仪时，也可采用一些变通的方法在显微镜下进行单细胞分离，例如将经适当稀释后的样品制备成小液滴在显微镜下观察，选取只含一个细胞的液滴来进行纯培养物的分离。单细胞分离法对操作技术有比较高的要求，多限于高度专业化的科学研究中采用。

## 五、选择培养分离

没有一种培养基或一种培养条件能够满足自然界中一切生物生长的要求，在一定程度上所有的培养基都是选择性的。在一种培养基上接种多种微生物，只有能生长的才生长，其他被抑制。如果某种微生物的生长需要是已知的，也可以设计一套特定环境使之特别适合这种微生物的生长，因而能够从自然界混杂的微生物群体中把这种微生物选择培养出来，即使在混杂的微生物群体中这种微生物可能只占少数。这种通过选择培养进行微生物纯培养分离的技术称为选择培养分离，是十分重要的，特别对于从自然界中分离、寻找有用的微生物。在自然界中，除了极特殊的情况外，在大多数场合下微生物群落是由多种微生物组成的。因此，要从中分离出所需的特定微生物是十分困难的，尤其当某一种微生物所存在的数量与其他微生物相比非常少时，单采用一般的平板稀释方法几乎是不可能分离到该微生物的。例如，若某处的土壤中的微生物数量在  $10^8$  时，必须稀释到  $10^{-6}$  才有可能在平板上分离到单菌落，而如果所需的微生物的数量仅为  $10^2$ - $10^3$ ，显然不可能在一般通用的平板上得到该微生物的单菌落。要分离这种微生物，必须根据该微生物的特点，包括营养、生理、生长条件等，采用选择培养分离的方法。或抑制使大多数微生物不能生长，或造成有利于该菌生长的环境，经过一定时间培养后使该菌在群落中的数量上升，再通过平板稀释等方法对它进行纯培养分离。

### 1、利用选择培养基进行直接分离

主要根据待分离微生物的特点选择不同的培养条件，有多种方法可以采用。例如在从土壤中筛选蛋白酶产生菌时，可以在培养基中添加牛奶或酪素制备培养基平板，微生物生长时若产生蛋白酶则会水解牛奶或酪素，在平板上形成透明的蛋白质水解圈。通过菌株培养时产生的蛋白质水解圈对产酶菌株进行筛选，可以减少工作量，将那些大量的非产蛋白酶菌株淘汰；再如，要分离高温菌，可在高温条件进行培养；要分离某种抗生素抗性菌株，可在加有抗生素的平板上进行分离；有些微生物如螺旋体、粘细菌、蓝细菌等能在琼脂平板表面或里面滑行，可以利用它们的滑动特点进行分离纯化，因为滑行能使它们自己和其他不能移动的微生物分开，可将微生物群落点种到平板上，让微生物滑行，从滑行前沿挑取接种物接种，反复进行，得到纯培养物。

### 2、富集培养

主要是指利用不同微生物间生命活动特点的不同，制定特定的环境条件，使仅适应于该条件的微生物旺盛生长，从而使其在群落中的数量大大增加，人们能够更容易地从自然界中分离到所需的特定微生物。富集条件可根据所需分离的微生物的特点从物理、化学、生物及综合多个方面进行选择，如温度、pH、紫外线、高压、光照、氧气、营养等等许多方面。例，采用富集方法从土壤中分离能降解酚类化合物对羟基苯甲酸(p-hydroxybenzoic acid)的微生物的实验过程：首先配制以对羟基苯甲酸为唯一碳源的液体培养基并分装于烧瓶中，灭菌后将少量的土壤样品接种于该液体培养基中，培养一定时间，原来透明的培养液会变得浑浊，说明已有大量微生物生长。取少量上述培养液转移至新鲜培养液中重新培养，该过程经数次重复后能利用对羟基苯甲酸的微生物的比例在培养物中特大大提高，将培养液涂布于以对羟基苯甲酸为唯一碳源的琼脂平板，得到的微生物菌落中的大部分都是能降解对羟基苯甲酸的微生物。挑取一部分单菌落分别接种到含有及缺乏对羟基苯甲酸的液体培养基中进行培养，其中大部分在含有对羟基苯甲酸的培养基中生长，而在没有对羟基苯甲酸的培养基中表现为没有生长，说明通过该富集程序的确得到了欲分离的目标微生物。

通过富集培养使原本在自然环境中占少数的微生物的数量大大提高后，可以通过稀释倒平板或平板划线等操作得到纯培养物。

富集培养是微生物学家最强有力的技术手段之一。营养和生理条件的几乎无穷尽的组合形式可应用于从自然界选择出特定微生物的需要。富集培养方法提供了按照意愿从自然界分离出特定已知微生物

物种的有力手段，只要掌握这种微生物的特殊要求就行。富集培养法也可用来分离培养出由科学家设计的特定环境中能生长的微生物，尽管我们并不知道什么微生物能在这种特定的环境中生长。

## 六、二元培养物

分离的目的通常是要得到纯培养。然而，在有些情况下这是做不到的或是很难做到的。但可用二元培养物作为纯化培养的替代物。只有一种微生物的培养物称为纯培养物，含有二种以上微生物的培养物称为混合培养物，而如果培养物中只含有二种微生物，而且是有意识地保持二者之间的特定关系的培养物称为二元培养物。例如二元培养物是保存病毒的最有效途径，因为病毒是细胞生物的严格的细胞内寄生物。有一些具有细胞的微生物也是严格的其他生物的细胞内寄生物，或特殊的共生关系。对于这些生物，二元培养物是在实验室控制条件下可能达到的最接近于纯培养的培养方法。

在自然环境中，猎食细小微生物的原生动物也很容易用二元培养法在实验室培养，培养物由原生动物和它猎食的微生物二者组成，例如，纤毛虫、变形虫和粘菌。对这些生物，二者的关系可能并不是严格的。这些生物中有些能够纯培养，但是其营养要求往往极端复杂，制备纯培养的培养基很困难、很费事。

## 七、微生物的保藏技术

通过分离纯化得到的微生物纯培养物，还必须通过各种保藏技术使其在一定时间内不死亡，不会被其他微生物污染，不会因发生变异而丢失重要的生物学性状，否则就无法真正保证微生物研究和应用工作的顺利进行。菌种或培养物保藏是一项最重要的微生物学基础工作，微生物菌种是珍贵的自然资源，具有重要意义。许多国家都设有相应的菌种保藏机构，例如，中国微生物菌种保藏委员会(CCCCM)，中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，美国典型菌种保藏中心(ATCC)，美国的北部地区研究实验室(NRRL)，荷兰的霉菌中心保藏所(CBS)。英国的国家典型菌种保藏中心(NCTC)以及日本的大阪发酵研究所(IFO)等。国际微生物学联合会(IAMS)还专门设立了世界菌种保藏联合会(WFGC)，用计算机储存世界上各保藏机构提供的菌种数据资料，可以通过国际互联网查询和索取，进行微生物菌种的交流、研究和使用的。

生物的生长一般都需要一定的水分，适宜的温度和合适的营养，微生物也不例外。菌种保藏就是根据菌种特性及保藏目的的不同，给微生物菌株以特定的条件，使其存活而得以延续。例如利用培养基或宿主对微生物菌株进行连续移种，或改变其所处的环境条件，例如干燥、低温、缺氧、避光、缺乏营养等，令菌株的代谢水平降低，乃至完全停止，达到半休眠或完全休眠的状态，而在一定时间内得到保存，有的可保藏几十年或更长时间。在需要时再通过提供适宜的生长条件使保藏物恢复活力。

### 1、传代培养保藏

传代培养与培养物的直接使用密切相关，是进行微生物保藏的基本方法。常用的有琼脂斜面、半固体琼脂柱及液体培养等。采用传代法保藏微生物应注意针对不同的菌种而选择使用适宜的培养基，并在规定的时间内进行移种，以免由于菌株接种后不生长或超过时间不能接活，丧失微生物菌种。在琼脂斜面上保藏微生物的时间因菌种的不同而有较大差异，有些可保存数年，而有些仅数周。一般来说，通过降低培养物的代谢或防止培养基干燥，可延长传代保藏的保存时间。例如在菌株生长良好后，改用橡皮塞封口或在培养基表面覆盖液体石蜡，并放置低温保存；将一些菌的菌苔直接刮入蒸馏水或其他缓冲液后，密封置 4℃ 保存，也可以大大提高某些菌的保藏时间及保藏效果，这种方法有时也被称为悬液保藏法。

由于菌种进行长期传代十分繁琐，容易污染，特别是会由于菌株的自发突变而导致菌种衰退，使菌株的形态、生理特性、代谢物的产量等发生变化，因此在一般情况下。在实验室里除了采用传代法对常用的菌种进行保存外，还必须根据条件采用其他方法，特别是对那些需要长期保存的菌种更是如此。

### 2、冷冻保藏

将微生物处于冷冻状态，使其代谢作用停止以达到保藏的目的。大多数微生物都能通过冷冻进行保存，细胞体积大者要比小者对低温更敏感，而无细胞壁者则比有细胞壁者敏感。其原因是低温会使

细胞内的水分形成冰晶，从而引起细胞，尤其是细胞膜的损伤。进行冷冻时，适当采取速冻的方法。可因产生的冰晶小而减少对细胞的损伤。当从低温下移出并开始升温时，冰晶又会长大，故快速升温也可减少对细胞的损伤。冷冻时的介质对细胞的损伤也有显著的影响。例如，0.5mol/L 左右的甘油或二甲亚砜可透入细胞，并通过降低强烈的脱水作用而保护细胞；大分子物质如糊精、血清蛋白、脱脂牛奶或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)虽不能透入细胞，但可通过与细胞表面结合的方式而防止细胞膜受冻伤。因此，在采用冷冻法保藏菌种时，一般应加入各种保护剂以提高培养物的存活率。

一般来说，保藏温度越低，保藏效果越好。在常用的冷冻保藏方法中，液氮保藏可达到-196℃。因此，从适用的微生物范围、存活期限、性状的稳定性等方面来看，该方法在迄今使用的各种微生物保藏方法中是较理想的一种。但液氮保藏需使用专用器具，一般仅适合一些专业保藏机构采用。与此相应，冰箱保藏使用更为普遍。在各种基因工程手册中，一般都推荐在-70℃低温冰箱中保存菌株或细胞的某些特殊生理状态(添加甘油做保护剂)，例如经诱导建立了感受态的细胞。在没有低温冰箱的条件下，也可利用-20—30℃的普通冰箱冷冻室保存菌种。但应注意加有保护剂的细胞混合物的共融点处在这个温度范围内，常会由于冰箱可能产生的微小温度变化引起培养物的反复融化和再结晶，而对菌体形成强烈的损伤。因此采用普通冰箱冷冻保存菌种的效果往往远低于低温冰箱，应注意经常检查保藏物的存活情况，随时转种。

### 3、干燥保藏法

水分对各种生化反应和一切生命活动至关重要，因此，干燥，尤其是深度干燥是微生物保藏技术中另一项经常采用的手段。

沙土管保存和冷冻真空干燥保藏是最常用的二项微生物干燥保藏技术。前者主要适用于产孢子的微生物，如芽孢杆菌、放线菌等。一般将菌种接种至斜面，培养至长出大量的孢子后，洗下孢子制备孢子悬液，加入无菌的沙土试管中，减压干燥，直至将水分拍干，最后用石蜡、胶塞等封闭管口，置冰箱保存。此法简便易行，并可以将微生物保藏较长时间，适合一般实验室及以放线菌等为菌种的发酵工厂采用。

冷冻真空干燥保藏是将加有保护剂的细胞样品预先冷冻，使其冻结，然后在真空下通过冰的升华作用除去水分。达到干燥的样品可在真空或惰性气体的密闭环境中置低温保存，从而使微生物处于干燥、缺氧及低温的状态，生命活动处于休眠，可以达到长期保藏的目的。用冰升华的方式除去水分，手段比较温和，细胞受损伤的程度相对较小，存活率及保藏效果均不错，而且经抽真空封闭的菌种安瓿管的保存、邮寄、使用均很方便。因此冷冻真空干燥保藏是目前使用最普遍，也是最重要的微生物保藏方法，大多数专业的菌种保藏机构均采用此法作为主要的微生物保存手段。

除上述方法外，各种微生物菌种保藏的方法还有很多，如纸片保藏、薄膜保藏、寄主保藏等。由于微生物的多样性，不同的微生物往往对不同的保藏方法有不同的适应性，迄今为止尚没有一种方法能被证明对所有的微生物均适宜。因此，在具体选择保藏方法时必须对被保藏菌株的特性、保藏物的使用特点及现有条件等进行综合考虑。对于一些比较重要的微生物菌株，则要尽可能多的采用各种不同的手段进行保藏，以免因某种方法的失败而导致菌种的丧失。

### 菌种保藏机构简介

中国微生物菌种保藏管理委员会 CCCC

#### 1、普通微生物菌种保藏管理中心

中科院北微所(AS)：真菌、细菌

武汉病毒所(AS-IV)：病毒

#### 2、农业微生物菌种

农科院土肥所(ISF)

#### 3、工业微生物菌种

食品发酵所(IFFI)

#### 4、医学微生物菌种

医科院皮研所 (ID)：真菌  
卫生部检定所 (NICBP)：细菌  
医科院病毒所 (IV)：病毒  
5、抗生素菌种  
医科院医药生物技术所 (IA)  
四川抗研所 (SIA)：新抗菌种  
华药抗研所 (IANP)：生产菌种

#### 6、兽医微生物菌种

农业部兽医药品监察所 (CIVBP)  
中国典型培养物收藏中心 (武汉大学)  
国外  
美国典型菌种收藏所 (ATCC)  
美国农业部北方地区研究室 (NRRL)  
日本大阪发酵研究所 (IFO)  
荷兰真菌中心收藏所 (CBS)  
法国里昂巴斯德研究所 (IPL)  
西德柯赫研究所 (RKI)  
苏联科学院微生物研究所 (IM)

## § 2 微生物的生长繁殖

### 一、微生物生长繁殖

微生物生长是细胞物质有规律地、不可逆增加，导致细胞体积扩大的生物学过程，这是个体生长的定义。繁殖是微生物生长到一定阶段，由于细胞结构的复制与重建并通过特定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。可以看出微生物的生长与繁殖是两个不同，但又相互联系的概念。生长是一个逐步发生的量变过程，繁殖是一个产生新的生命个体的质变过程。在高等生物里这两个过程可以明显分开，但在低等特别是在单细胞的生物里，由于个体微小，这两个过程是紧密联系很难划分的过程。因此在讨论微生物生长时，往往将这两个过程放在一起讨论，这样微生物生长又可以定义为在一定时间和条件下细胞数量的增加，这是微生物群体生长的定义。

#### 1、细菌的个体生长

细菌的个体生长包括细胞结构的复制与再生、细胞的分裂与控制，染色体 DNA 的复制和分离。细菌在个体生长过程中通过染色体 DNA 的复制，使其遗传特性保持高度的连续性和稳定性。

**细胞壁扩增：**细胞壁是细胞外的一种“硬”性结构。细菌在生长过程中，细胞壁只有通过扩增，才能使细胞体积扩大。

**细菌的分裂：**当细菌的各种结构复制完成之后就进入分裂时期。此时在细菌长度的中间位置，通过细胞质膜内陷并伴随新合成的肽聚糖插入，导致横隔壁向心生长，最后在中心会合，完成一次分裂，将一个细菌分裂成两个大小相等的子细菌。

#### 2、细菌的群体生长繁殖

除某些真菌外，我们肉眼看到或接触到的微生物已不是单个，而是成千上万个单个的微生物组成的群体。微生物接种是群体接种，接种后的生长是微生物群体繁殖生长。

细菌接种到均匀的液体培养基后，当细菌以二分裂法繁殖，分裂后的子细胞都具有生活能力。在不补充营养物质或移去培养物，保持整个培养液体积不变条件下，以时间为横坐标，以菌数为纵坐标，根据不同培养时间里细菌数量的变化，可以作出一条反映细菌在整个培养期间菌数变化规律的曲线，这种曲线称为生长曲线(growth curve)。一条典型的生长曲线至少可以分为迟缓期、对数期、稳定期和衰亡期等四个生长时期。

### ①延迟期 lag phase(停滞期、调整期)

表现：不立即繁殖，生长速率近于 0，菌数几乎不变，细胞形态变大。

特点：分裂迟缓，合成代谢活跃，体积增长快，对外界不良环境敏感。

原因：调整代谢，合成新的酶系和中间代谢产物以适应新环境。

消除：增加接种量；采用最适菌龄接种；培养基成分（种子、发酵）

### ②对数期 log phase

表现：代谢活性最强，几何级数增加，代时最短，生长速率最大。

特点：细菌数目增加与原生质总量增加，与菌液浊度增加呈正相关性。

代时（generation time）：单个细胞完成一次分裂所需时间，亦即增加一代所需时间。

$$G = t_1 - t_0 / n$$

$$y = x_0 \times 2^n$$

$$n = \lg y - \lg x / \lg 2$$

$$\text{导出 } G = t_1 - t_0 / 3.3(\lg y - \lg x)$$

影响 G 因素：菌种、营养成分、营养物浓度（很低时影响）、培养温度。

### ③稳定期 stationary phase(最高生长期、静止期)

表现：新增殖细胞数与老细胞的死亡数几乎相等，活菌数动态平衡。

特点：生长速率又趋于 0，细胞总数最高。

原因：养分减少；有毒代谢物产生。

稳定期细胞内开始积累贮存物，此阶段收获菌体，也是发酵过程积累代谢产物的重要阶段。

延长：补料，调 pH、温度等。此时，菌体总数量与所消耗的营养物之间有一定关系，称为产量常数（生长效率）。 $Y = X - X_0 / C$

其中 X-稳定期细胞干重/ml， $X_0$ -接种时干重/ml，C-限制性营养物浓度。

根据这一原理，可进行生物测定。

将未知混合物加到只缺乏特定限制性营养物的完全培养基中，测定培养基所能达到的生长量，就可以计算出原混合物中特定限制性营养物的浓度。

### ④衰亡期 decline phase

表现：出现“负生长”，有些细胞开始自溶。

对于丝状真菌，细胞数目不呈几何级数增加，无对数生长期，一般有调整期，最高生长期，衰退期。

### 迟缓期(lag phase)

细菌接种到新鲜培养基而处于一个新的生长环境，因此在一段时间里并不马上分裂，细菌的数量维持恒定，或增加很少。此时胞内的 RNA、蛋白质等物质含量有所增加，相对地此时的细胞体积最大，说明细菌并不是处于完全静止的状态。产生迟缓期的原因，认为是微生物接种到一个新的环境，暂时缺乏足够的能量和必需的生长因子，“种子”老化(即处于非对数生长期)或未充分活化，接种时造成的损伤等。

在工业发酵和科研中迟缓期会增加生产周期而产生不利的影响，但是迟缓期无疑也是必需的，因为细胞分裂之前，细胞各成分的复制与装配等也需要时间，因此应该采取一定的措施：①通过遗传学方法改变种的遗传特性使迟缓期缩短；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不要相差太大；④适当扩大接种量等方式缩短迟缓期，克服不良的影响。

### ②对数生长期(log Phase)

又称指数生长期(exponential phase)。细菌经过迟缓期进入对数生长期，并以最大的速率生长和分裂，导致细菌数量呈对数增加，而且细菌内各成分按比例有规律地增加，很明显，此时期内的细菌生长是平衡生长。对数生长期细菌的代谢活性、酶活性高而稳定，大小比较一致，生活力强，因而它广泛地在生产上用作“种子”和在科研上作为理想的实验材料。

### ③稳定生长期(stationary phase)

由于营养物质消耗, 代谢产物积累和 pH 等环境变化, 逐步不适宜于细菌生长, 导致生长速率降低直至零(即细菌分裂增加的数量等于细菌死亡数量), 结束对数生长期, 进入稳定生长期。稳定生长期的活细菌数最高并维持稳定。如果及时采取措施, 补充营养物质或取走代谢产物或改善培养条件, 如对好氧菌进行通气、搅拌或振荡等可以延长稳定生长期, 获得更多的菌体物质或代谢产物。

### ④衰亡期(decline 或 death phase)

营养物质耗尽和有毒代谢产物的大量积累, 细菌死亡速率逐步增加和活细菌逐步减少, 标志进入衰亡期。该时期细菌代谢活性降低, 细菌衰老并出现自溶。该时期死亡的细菌以对数方式增加, 但在衰亡期的后期, 由于部分细菌产生抗性也会使细菌死亡的速率降低。

此外, 不同的微生物, 甚至同一种微生物对不同物质的利用能力是不同的。有的物质可直接被利用(例如葡萄糖或 Nkf 等); 有的需要经过一定的适应期后才能获得利用能力(例如乳糖或 N03—等)。前者通常称为速效碳源(或氮源), 后者称为迟效碳源(或氮源)。当培养基中同时含有这两类碳源(或氮源)时, 微生物在生长过程中会产生二次生长现象。

#### 连续培养

连续培养(continuous culture of microorganisms)是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。根据生长曲线, 营养物质的消耗和代谢产物的积累是导致微生物生长停止的主要原因。因此在微生物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。

## 二、微生物生长的测定

微生物生长情况可以通过测定单位时间里微生物数量或生物量(biomass)的变化来评价。通过微生物生长的测定可以客观地评价培养条件、营养物质等对微生物生长的影响, 或评价不同的抗菌物质对微生物产生抑制(或杀死)作用的效果, 或客观地反映微生物生长的规律。因此微生物生长的测量在理论上和实践上有着重要的意义。微生物生长的测定有计数、重量和生理指标等方法。

### 1、计数法

此法通常用来测定样品中所含细菌、孢子、酵母菌等单细胞微生物的数量。计数法又分为直接计数和间接计数两类。

#### 直接计数

这类方法是利用特定的细菌计数板或血细胞计数板, 在显微镜下计算一定容积里样品中微生物的数量。此法的缺点不能区分死菌与活菌。计数板是一块特制的载玻片, 上面有一个特定的面积  $1\text{mm}^2$  和高  $0.1\text{mm}$  的计数室, 在  $1\text{mm}^2$  的面积里又被刻划成 25 个(或 16 个)中格, 每个中格进一步划分成 16 个(或 25 个)小格, 但计数室都是由 400 个小格组成。

将稀释的样品滴在计数板上, 盖上盖玻片, 然后在显微镜下计算 4-5 个中格的细菌数, 并求出每个小格所含细菌的平均数, 再按下面公式求出每毫升样品所含的细菌数。

每毫升原液所含细菌数 = 每小格平均细菌数  $\times 400 \times 1000 \times$  稀释倍数

#### 间接计数法

此法又称活菌计数法, 其原理是每个活细菌在适宜的培养基和良好的生长条件下可以通过生长形成菌落。将待测样品经一系列 10 倍稀释, 然后选择三个稀释度的菌液, 分别取  $0.2\text{ml}$  加入无菌平皿, 再倒入适量的已融化并冷至  $45^\circ\text{C}$  左右的培养基, 与菌液混匀, 冷却、待凝固后, 放入适宜温度的培养箱或温室培养, 长出菌落后, 计数, 按下面公式计算出原菌液的含菌数:

每毫升原菌液活菌数 = 同一稀释度三个以上重复平皿菌落平均数  $\times$  稀释倍数  $\times 5$

此法可因操作不熟练造成污染, 或因培养基温度过高损伤细胞等原因造成结果不稳定。尽管如此, 由于该方法能测出样品中微量的菌数, 仍是教学、科研和生产上常用的一种测定细菌数的有效方法。土壤、水、牛奶、食品和其他材料中所含细菌、酵母、芽孢与孢子等的数量均可用此法测定。但不适于测定样品中丝状体微生物, 例如放线菌或丝状真菌或丝状蓝细菌等的营养体等。

除上述两种常用的计数方法外,还有膜过滤法、比浊法。膜过滤法是当样品中菌数很低时,可以将一定体积的潮水、海水或饮用水等样品通过膜过滤器。然后将滤膜干燥、染色,并经处理使膜透明,再在显微镜下计算膜上(或一定面积中)的细菌数;比浊法原理是在一定范围内,菌的悬液中细胞浓度与混浊度成正比,即与光密度成正比,菌越多,光密度越大。因此可以借助于分光光度计,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。实验测量时一定要控制在菌浓度与光密度成正比的线性范围内,否则不准确。微生物计数法,发展迅速,现有多种多样的快速、简易、自动化的仪器和装置等方法。

## 2、重量法

此法的原理是根据每个细胞有一定的重量而设计的。它可以用于单细胞、多细胞以及丝状体微生物生长的测定。将一定体积的样品通过离心或过滤将菌体分离出来,经洗涤,再离心后直接称重,求出湿重,如果是丝状体微生物,过滤后用滤纸吸去菌丝之间的自由水,再称重求出湿重。不论是细菌样品还是丝状菌样品,可以将它们放在已知重量的平皿或烧杯内,于 105℃烘干至恒重,取出放入干燥器内冷却,再称量,求出微生物干重。

如果要测定固体培养基上生长的放线菌或丝状真菌,可先加热至 50℃,使琼脂熔化,过滤得菌丝体,再用 50℃的生理盐水洗涤菌丝,然后按上述方法求出菌丝体的湿重或干重。

除了干重、湿重反映细胞物质重量外,还可以通过测定细胞中蛋白质或 DNA 的含量反映细胞物质的量。蛋白质是细胞的主要成分,含量也比较稳定,其中氮是蛋白质的重要组成元素。从一定体积的样品中分离出细胞,洗涤后,按凯氏定氮法测出总氮量。蛋白质含氮量为 16%,细菌中蛋白质含量占细菌因形物的 50%—80%,一般以 65%为代表,有些细菌则只占 13%—14%,这种变化是由菌龄和培养条件不同所产生的。因此总含氮量与蛋白质总量之间的关系可按下列公式计算:

$$\text{蛋白质总量} = \text{含氮量} \times 6.25$$

$$\text{细胞总量} = \text{蛋白质总量} \div (50\% \sim 80\% \text{ (或 } 65\%)) \approx \text{蛋白质总量} \times 1.54$$

核酸 DNA 是微生物的重要遗传物质,每个细菌的 DNA 含量相当恒定,平均为  $8.4 \times 10^{-5} \text{ng}$ 。因此从一定体积的细菌悬液中所含的细菌中提取 DNA,求得 DNA 含量,再计算出这一定体积的细菌悬液所含的细菌总数。

## 3、生理指标法

对于一些非真溶液的样品,要测定微生物数量除了用活菌计数法外,还可以用生理指标测定法进行测定。生理指标包括微生物的呼吸强度、耗氧量、酶活性、生物热等。这是根据微生物在生长过程中伴随出现的这些指标,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。这类测定方法主要用于科学研究,分析微生物生理活性等。

# § 3 影响微生物生长的主要因素

生长是微生物与外界环境因素共同作用的结果。环境条件的改变,在一定限度内,可引起微生物形态、生理、生长、繁殖等特征的改变;或者抵抗、适应环境条件的某些改变;当环境条件的变化超过一定极限,则导致微生物的死亡。

### 一、温度

温度是有机体生长与存活的最重要的因素之一。一方面随着温度的上升,细胞中的生物化学反应速率和生长速率加快;另一方面,机体的重要组成如蛋白质、核酸等对温度都较敏感,随着温度的升高而可能遭受不可逆的破坏。每一种微生物都有它最低生长温度、最适生长温度、最高生长温度和致死温度。其中最适生长温度是指某微生物群体生长繁殖速度最快的温度。但不一定是最快繁殖速度和最快发酵温度。

表 7-1 微生物的生长温度类型

| 微生物类型 | 生长温度范围 | 分布的主要处所 |
|-------|--------|---------|
|-------|--------|---------|

|     |      | 最低     | 最适     | 最高     |               |
|-----|------|--------|--------|--------|---------------|
| 温型  | 专性嗜冷 | -12℃   | 5—15℃  | 15—20℃ | 两极地区          |
|     | 兼性嗜冷 | -5—0℃  | 10—20℃ | 25—30℃ | 海水及冷藏食品上      |
| 温型  | 室温   | 10—20℃ | 20—35℃ | 40—45℃ | 腐生菌           |
|     | 体温   |        | 35—40℃ |        | 寄生菌           |
| 高温型 |      | 25—45℃ | 50—60℃ | 70—95℃ | 温泉、堆肥堆、热水加热器等 |

对不同生理、代谢过程各有其相应最适温度的研究，有着重要的实践意义。例如，国外曾报道在产黄青霉 165 小时的青霉素发酵过程中，运用了有关规律，即根据不同生理代谢过程的温度特点分四段控制其培养温度，即：0 小时（30℃）→5 小时（25℃）→40 小时（20℃）→125 小时（25℃）→165 小时。结果，其青霉素产量比自始至终进行 30℃ 恒温培养的对照提高了 14.7%。

## 二、氧气

按照微生物与氧的关系，可把它们分成好氧菌和厌氧菌两大类，并可继续细分为五类。

1、专性好氧菌 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，细胞含超氧化物歧化酶和过氧化氢酶。绝大多数真菌和许多细菌都是专性好氧菌。

2、兼性厌氧菌 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；在有氧时靠呼吸产能，无氧时借发酵或无氧呼吸产能；细胞含 SOD 和过氧化氢酶。许多酵母菌和许多细菌都是兼性厌氧菌。

3、微好氧菌 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。也通过呼吸链并以氧为最终氢受体而产能。如霍乱弧菌、一些氢单胞菌属以及少数拟杆菌等。

4、耐氧菌 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，分子氧对它也无害。它们不具有呼吸链，仅依靠专性发酵获得能量。细胞内存在超氧化物歧化酶和过氧化物酶，但缺乏过氧化氢酶。一般的乳酸菌多数是耐氧菌。

5、厌氧菌 厌氧菌有以下几个特点：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死亡；在空气或含 10%CO<sub>2</sub> 的空气中，它们在固体或半固体培养基的表面上不能生长，只有在其深层的无氧或低氧化还原势的环境下才能生长；其生命活动所需能量是通过发酵、无氧呼吸、循环光合磷酸化或甲烷发酵等提供；细胞内 SOD 和细胞色素氧化酶，大多数还缺乏过氧化氢酶。

在微生物世界中，绝大多数种类都是好氧菌或兼性厌氧菌。厌氧菌的种类相对较少。但近年来已找到越来越多的厌氧菌。

关于厌氧菌的氧毒机制从本世纪已陆续有人提出，但直到 1971 年在 McCord 和 Fridovich 提出 SOD 的学说后，才有了进一步的认识。他们认为，厌氧菌因缺乏 SOD，故易产生的超氧化物阴离子自由基而毒害致死。

## 三、氢离子浓度(pH)

微生物作为一个总体来说，其生长的 pH 范围很广（pH<2~>8），有少数种类还可超出这一范围，事实上，绝大多数种类都生长在 pH5~9 之间。每种微生物都有其最适 pH 和一定的 pH 范围。在最适范围内酶活性最高，如果其他条件适合，微生物的生长速率也最高。大多数细菌、藻类和原生动物的最适 pH 为 6.5—7.5，在 pH4—10 之间也可生长；放线菌一般在微碱性即 pH7.5—8 最合适；酵母菌、霉菌则适合于 pH5—6 的酸性环境，但生存范围在 pH1.5—10 之间。

虽然微生物的外环境中的 pH 变化很大，但其内环境的 pH 却相当稳定，一般都接近中性。

微生物在生命活动过程中，会改变外界环境的 pH，这就是通常遇到的培养基的原始 pH 在培养微生物过程中时时发生改变的原因。既然在微生物培养过程中培养基的 pH 回发生变化，而对发酵来说，这种变化往往对生产不利，因此，在微生物培养过程中，如何及时调节合适的 pH 就成了发酵生产中的一项重要措施。调节 pH 的措施分“治标”和“治本”两大类。“治标”是在培养基 pH 发生变酸或变碱后，用相应的碱或酸进行调节；“治本”是在过酸时增加氮源和提高通气量的方式进行调节，培

培养基过碱时用增加适当碳源和降低通气量的方式进行调节。

## § 4 有害微生物的控制

### 一、几个基本概念

**防腐** 它是一种抑菌作用。利用某些理化因子，使物体内外的微生物暂时处于不生长、繁殖但又未死亡的状态。这是一种防止食品腐败和其他物质霉变的技术措施。如低温、缺氧、干燥、高渗、盐腌、糖渍、防腐剂等等。

**消毒** 是指杀死或消除所有病原微生物的措施，可以达到传染病传播的目的。如巴氏消毒，皮肤表面消毒等等。

**灭菌** 是指用物理或化学因子，使存在于物体中的所有生活微生物，永久地丧失其生活力，包括最耐热的细菌芽孢。这是一种彻底的杀菌方式。

**化疗** 是指利用某些具有选择毒性的化学药物或抗生素，对生物体的深部感染进行治疗，可以有效地消除宿主体内的病原体，但对宿主却没有或基本上没有损害。

**死亡** 对微生物来说，就是不可逆丧失了生长繁殖的能力，即使再放到合适的环境中也不再繁殖。

### 二、物理杀菌因素的代表——高温

#### (一) 高温杀菌作用的种类

具有杀菌效应的温度范围较广。高温的致死作用，主要是由于它使微生物的蛋白质和核酸等重要生物高分子发生变性、破坏，例如它可使核酸发生脱氨、脱嘌呤或降解，以及破坏细胞膜上的类脂成分等。湿热灭菌要比干热灭菌更有效，这一方面是由于湿热易于传递热量，另一方面是由于湿热更易破坏保持蛋白质稳定性的氢键等结构，从而加速其变性。

#### 1、干热灭菌法

A、火焰灼烧法 只能用于接种环、接种针等少数对象的灭菌

B、电热恒温干燥灭菌法 将金属制品或清洁玻璃器皿放入电热恒温干燥箱内，在 160~180℃ 维持 1~2 小时后，即可达到彻底灭菌的目的。

#### 2、湿热灭菌法

(1) 常压法 A 巴氏消毒法 B 煮沸消毒法 C 间歇灭菌法 (丁达尔灭菌法)

(2) 加压法 这是一种应用最为广泛的灭菌方法。其原理十分简单：将待灭菌的物件放置在盛有适量水的加压蒸汽灭菌锅内。把锅内的水加热煮沸，并把其中所有的空气彻底驱尽后将锅密闭。再继续加热就会使锅内的蒸汽压逐渐上升，从而温度也上升到 100℃ 以上。为达到良好的灭菌效果，一般要求温度达到 121℃，时间维持 15~20 分钟，也可采用在较低温度 115℃ 下维持 5 分钟的方法。此法适合于一切微生物学实验室、医疗保健机构或发酵工厂中对培养基及多种器材、物料的灭菌。

#### (二) 影响加压蒸汽灭菌效果的因素

1、灭菌物体含菌量的影响

2、灭菌锅内空气排除程度的影响

3、灭菌对象 pH 的影响

4、灭菌对象的体积

5、加热与散热的速度

#### (三) 高温对培养基成分的有害影响及其防止

高温的有害影响主要包括：形成沉淀物、破坏营养成分、改变培养基的 pH、降低培养基的浓度等等。

消除以上有害影响的措施有：1、采用特殊加热灭菌法；2、过滤除菌法；3、其他方法。

### 三、化学杀菌剂或抑菌剂

表 7-2 几类常用化学消毒剂对微生物的相对药效

| 消毒剂                                    | 细菌和真菌营养体 | 结核分枝杆菌 | 细菌芽孢 | 病毒  |
|--|----------|--------|------|-----|
| 卤素 (I <sub>2</sub> , Cl <sub>2</sub> ) | +++      | ++     | +    | ++  |
| 酚类                                     | +++      | ++     | —    | ++  |
| 去污剂                                    | +++      | ±      | —    | ++  |
| 70%乙醇                                  | +++      | +++    | —    | ++  |
| 甲醛                                     | ++++     | ++++   | +++  | +++ |

### 1、表面消毒剂

表面消毒剂是指对一切或细胞都有毒性，不能用作活细胞内的化学治疗用的化学剂。它们的种类很多。为比较各种表面消毒剂的相对杀菌强度，常采用在临床上最早使用的消毒剂——石炭酸作为比较的标准，并提出了石炭酸系数这一指标。所谓的石炭酸系数，指在一定时间内被试药剂能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的比率。一般规定处理时间为十分钟，而供试菌定为伤寒沙门氏菌。例如，某甲药剂以 1:300 的稀释度在 10 分钟内杀死所有供试菌，而达到同效的石炭酸的最高稀释度为 1:100，则该药的石炭酸系数等于 3，即： $p.c=300/100=3$ 。

7-3 表 若干重要表面消毒剂及其应用

| 类型     | 名称及使用浓度                         | 作用机制            | 应用范围            |
|--------|---------------------------------|-----------------|-----------------|
| 重金属盐类  | 0.05~0.1%升汞                     | 与蛋白质的巯基结合使失活    | 非金属物品，器皿        |
|        | 2%红汞                            | 与蛋白质的巯基结合使失活    | 皮肤、粘膜，小伤口       |
|        | 0.01~0.1%硫柳汞                    | 与蛋白质的巯基结合使失活    | 皮肤、手术部位，生物制品防腐  |
|        | 0.1~1%AgNO <sub>3</sub>         | 沉淀蛋白质使其变性       | 皮肤，滴新生儿眼睛       |
|        | 0.1~0.5%CuSO <sub>4</sub>       | 与蛋白质的巯基结合使失活    | 杀植病真菌与藻类        |
| 酚类     | 3~5%石炭酸                         | 蛋白质变性，损伤细胞膜     | 地面，家具，器皿        |
|        | 2%来苏儿                           | 蛋白质变性，损伤细胞膜     | 皮肤              |
| 醇类     | 70~75%乙醇                        | 蛋白质变性，损伤细胞膜，脱水等 | 皮肤，器械           |
| 酸类     | 5~10%醋酸/m <sup>3</sup>          | 破坏细胞膜和蛋白质       | 房间消毒            |
| 醛类     | 0.5~10%甲醛                       | 破坏蛋白质氢键及氨基      | 物品消毒，接种箱、接种室的熏蒸 |
|        | 2%戊二醛                           | 破坏蛋白质氢键及氨基      | 精密仪器等消毒         |
| 气体     | 600 mg/L 环氧乙烷                   | 有机物烷化，酶失活       | 手术器械，毛皮，食品，药物   |
| 氧化剂    | 0.1%KMnO <sub>4</sub>           | 氧化蛋白质的活性基团      | 皮肤、尿道、水果、蔬菜     |
|        | 3%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 氧化蛋白质的活性基团      | 污染物件的表面         |
|        | 0.2~0.5%过氧乙酸                    | 氧化蛋白质的活性基团      | 皮肤，塑料，玻璃，人造纤维   |
| 卤素及化合物 | 0.2~0.5 mg/L 氯气                 | 破坏细胞膜、酶、蛋白质     | 饮水，游泳池水         |
|        | 10~20%漂白粉                       | 破坏细胞膜、酶、蛋白质     | 地面，厕所           |
|        | 0.5~1%漂白粉                       | 破坏细胞膜、酶、蛋白质     | 饮水，空气（喷雾），体表    |
|        | 0.2~0.5%氯胺                      | 破坏细胞膜、酶、蛋白质     | 室内空气，表面消毒       |
|        | 4mg/L 二氯异氰尿酸钠                   | 破坏细胞膜、酶、蛋白质     | 饮水              |
|        | 3%二氯异氰尿酸钠                       | 破坏细胞膜、酶、蛋白质     | 空气（喷雾），排泄物，分泌物  |
| 表面活性剂  | 0.05~0.1%“新洁尔灭”                 | 蛋白质变性，破坏膜       | 皮肤粘膜，手术器械       |
|        | 0.05~0.1%“杜米芬”                  | 蛋白质变性，破坏膜       | 皮肤，金属，棉织品，塑料    |
| 染料     | 2~4%龙胆紫                         | 与蛋白质的羧基结合       | 皮肤，伤口           |

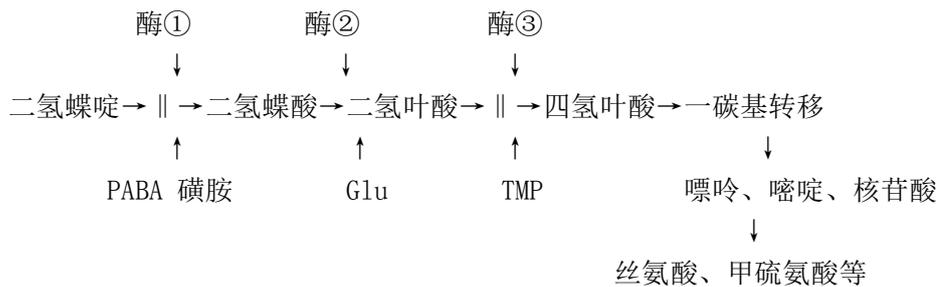
### 2、抗代谢药物的代表——磺胺类药物

有些化合物在结构上与生物体所必需的代谢物很相似，以至可以和特定的酶结合，从而阻碍了酶的功能，干扰了代谢的正常进行，这些物质称为抗代谢物。抗代谢物如果与正常代谢物同时存在，能产生一种竞争性拮抗作用，即竞争性地与相应的酶结合，只有当正常代谢物的量少或不存在时，抗代

谢物才有效。

抗代谢物的种类较多，如叶酸对抗物（磺胺类药物）、嘌呤对抗物（6-巯基嘌呤）、氨基酸对抗物（5-甲基色氨酸）、吡哆醇对抗物（异烟肼）等。

1940年，Wood和Fildes研究了磺胺的作用机制，并阐明因为它的结构与细菌的生长因子——对氨基苯甲酸（PABA）高度相似，因而两者发生了竞争性拮抗作用。最后，美国的Lederle实验室的学者PABA是叶酸的一部分。不少细菌要求外界PABA作为生长因子以合成代谢中必不可少的重要辅酶——转移一碳基的四氢叶酸（THFA）。现将其合成过程及代谢拮抗物磺胺和磺胺增效剂三甲基苄二氮嘧啶（TMP）的作用部位简示如下：



从上式可以看出，磺胺与PABA竞争酶①即二氢蝶酸合成酶，使生物体合成二氢蝶酸受阻；增效磺胺TMP阻断四氢叶酸合成酶，从而二者双重阻断合成嘌呤、嘧啶、核苷酸、丝氨酸、甲硫氨酸等的生物合成前体物质——四氢叶酸的合成，这就阻断了细菌的生物合成。如果在磺胺作用的同时，加入大量PABA、二氢蝶酸、二氢叶酸、四氢叶酸或嘌呤、嘧啶、核苷酸、丝氨酸、甲硫氨酸等一碳基转移产物，也可解除其抑制。

磺胺衍生物与磺胺相比，化学治疗特性更优良，因为它们对细菌的毒性大而对人及动物的毒性较弱。

3、抗生素 抗生素是生物在其生命过程中产生的一种次生代谢产物或其人工衍生物，它们在很低浓度时就能抑制或影响它种生物的生命活动，因而可用作优良的化学治疗剂。

抗生素的种类很多，其作用机制和制菌谱各异，应用范围广泛。作用机制分为：①抑制细胞壁的合成如青霉素、杆菌肽和环丝氨酸等；②影响细胞膜的功能如多粘菌素、短杆菌素和制霉菌素、两性霉素等；③干扰蛋白质的合成如卡那霉素、链霉素、红霉素、林可霉素等；④阻碍核酸的合成如丝裂霉素、争光霉素等。