

# 第五章 微生物的营养和培养基

**[教学目标]**通过本章的教学,使学生掌握微生物的营养方式和营养要素构成;微生物的营养类型;培养基的组成与功能等。

**[教学的重点和难点]**微生物的营养要素;培养基和种类与功能;特殊培养基的组成和食品科学相关专业领域的应用等。

**[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。设计微生物营养学综合实验,从培养基的制造、自然环境和食品中微生物的分离和纯化、微生物的培养特征等多方面进行实验教学。

## [教学内容]

微生物要不断地生长繁殖,这就要从它的生活的外部环境中吸取所需要的各种营养物质,合成本身的细胞物质,提供机体进行各种生理活动所需要的能量,保证机体进行正常的生长与繁殖,保证其生命能维持和延续同时将代谢活动产生的废弃物排出体外。

那些能够满足微生物机体生长、繁殖和完成各种生理活动所需的物质称为营养物质(nutrient)。而微生物获得和利用营养物质的过程称为营养(nutrition)。

## § 1 微生物的六大营养要素

### 一、微生物细胞的化学组成

微生物细胞的化学成分以有机物和无机物两种状态存在。有机物包含各种大分子,它们是蛋白质、核酸、类脂和糖类,占细胞干重的 99%。无机成分包括小分子无机物和各种离子,占细胞干重的 1%。

微生物细胞的元素构成由 C、H、O、N、P、S、K、Na、Mg、Ca、Fe、Mn、Cu、Co、Zn、Mo 等组成。其中 C、H、O、N、P、S 六种元素占微生物细胞干重的 97%;其他为微量元素。微生物细胞的化学元素组成的比例常因微生物种类的不同而各异。

组成微生物细胞的化学元素分别来自微生物生长所需要的营养物质,即微生物生长所需的营养物质应该包含有组成细胞的各种化学元素。这些物质概括为提供构成细胞物质的碳素来源的碳源物质,构成细胞物质的氮素来源的氮源物质和一些含有 K、Na、Mg、Ca、Fe、Mn、Cu、Co、Zn、Mo 元素的无机盐。

### 二、微生物的营养物质及其生理功能

微生物生长所需要的营养物质主要是以的有机物和无机物的形式提供的,小部分由气体物质供给。微生物的营养物质按其在机体中的生理作用可区分为:碳源、氮源、无机盐、生长因子和水五大类。

#### 1、碳源 (carbon source)

在微生物生长过程中为微生物提供碳素来源的物质称为碳源(source of carbon)。

从简单的无机含碳化合物如 CO<sub>2</sub> 和碳酸盐到各种各样的天然有机化合物都可以作为微生物的碳源,但不同的微生物利用含碳物质具有选择性,利用能力有差异。(见表 5.1)

碳源的生理作用主要有:碳源物质通过复杂的化学变化来构成微生物自身的细胞物质和代谢产物;同时多数碳源物质在细胞内生化反应过程中还能为机体提供维持生命活动的能量,但有些以又 CO<sub>2</sub> 为唯一或主要碳源的微生物生长所需的能源则不是来自 CO<sub>2</sub>。

表 5.1 微生物利用的碳源物质

种类	碳源物质	备注
糖	葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉、半乳糖、乳糖、甘露糖、纤维二糖、纤维素、半纤维素、甲壳素、木质素等	单糖优于双糖,己糖优于戊糖,淀粉优于纤维素,纯多糖优于杂多糖。
有机酸	糖酸、乳酸、柠檬酸、延胡索酸、低级脂肪酸、	与糖类比效果较差,有机酸较难进入细胞,进

	高级脂肪酸、氨基酸等	入细胞后会导致 pH 下降。当环境中缺乏碳源物质时，氨基酸可被微生物作为碳源利用。
醇	乙醇	在低浓度条件下被某些酵母菌和醋酸菌利用。
脂	脂肪、磷脂	主要利用脂肪，在特定条件下将磷脂分解为甘油和脂肪酸而加以利用。
烃	天然气、石油、石油馏分、石蜡油等	利用烃的微生物细胞表面有一种由糖脂组成的特殊吸收系统，可将难溶的烃充分乳化后吸收利用。
CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	为自养微生物所利用。
碳酸盐	NaHCO <sub>3</sub> 、CaCO <sub>3</sub> 、白垩等	为自养微生物所利用。
其他	芳香族化合物、氰化物 蛋白质、朊、核酸等	利用这些物质的微生物在环境保护方面有重要作用。当环境中缺乏碳源物质时，可被微生物作为碳源而降解利用。

## 2、氮源 (nitrogen source)

凡是可以被微生物用来构成细胞物质的或代谢产物中氮素来源的营养物质通称为氮源(source of nitrogen)物质。

能被微生物所利用的氮源物质有蛋白质及其各类降解产物、铵盐、硝酸盐、亚硝酸盐、分子态氮、嘌呤、嘧啶、脲、酰胺、氰化物(见表 5.2)。

氮源物质常被微生物用来合成细胞中含氮物质，少数情况下可作能源物质，如某些厌氧微生物在厌氧条件下可利用某些氨基酸作为能源。

微生物对氮源的利用具有选择性，如玉米浆相对于豆饼粉，NH<sub>4</sub><sup>+</sup>相对于 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>为速效氮源。铵盐作为氮源时会导致培养基 pH 值下降，称为生理酸性盐，而以硝酸盐作为氮源时培养基 pH 值会升高，称为生理碱性盐。

**表 5.2 微生物利用的氮源物质**

种类	氮源物质	备注
蛋白质类	蛋白质及其不同程度降解产物(脲、肽、氨基酸等)	大分子蛋白质难进入细胞，一些真菌和少数细菌能分泌胞外蛋白酶，将大分子蛋白质降解利用，而多数细菌只能利用相对分子质量较小其降解产物
氨及铵盐	NH <sub>3</sub> 、(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 等	容易被微生物吸收利用
硝酸盐	KNO <sub>3</sub> 等	容易被微生物吸收利用
分子氮	N <sub>2</sub>	固氮微生物可利用，但当环境中存在化合态氮源时，固氮微生物就失去固氮能力
其他	嘌呤、嘧啶、脲、酰胺、氰化物	大肠杆菌不能以嘧啶作为唯一氮源，在氮限量的葡萄糖培养基上生长时，可通过诱导作用先合成分解嘧啶的酶，然后再分解并利用嘧啶可不同程度地被微生物作为氮源加以利用

## 3、能源

能为微生物生命活动提供最初能量来源的营养物或辐射能，称为能源 (energy source)。由于各种异养微生物的能源就是其碳源，因此，它们的能源谱就显得十分简单。

化能自养微生物的能源十分独特，它们都是一些还原态的无机物质，例如 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、S、H<sub>2</sub>S、H<sub>2</sub> 和 Fe<sup>2+</sup>等。能利用这种能源的微生物都是一些原核生物，包括亚硝酸细菌、硝酸细菌、硫化细菌、硫细菌、氢细菌和铁细菌等。

一部分微生物能够利用辐射能 (光能) 进行光合作用获得能源，称为光能营养型。

在能源中,更容易理解的是某一具体营养物质可同时兼有几种营养要素功能。例如光辐射能是单功能营养物(能源);还原态的  $\text{NH}_4^+$  是双功能营养物(能源和氮源);而氨基酸是三功能的营养物(碳源、能源和氮源)。

#### 4、无机盐

无机盐(inorganic salt)是微生物生长必不可少的一类营养物质,它们在机体中的生理功能主要是作为酶活性中心的组成部分、维持生物大分子和细胞结构的稳定性、调节并维持细胞的渗透压平衡、控制细胞的氧化还原电位和作为某些微生物生长的能源物质等(表 5.3)。

**表 5.3 无机盐及其生理功能**

元素	化合物形式(常用)	生理功能
磷	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$	核酸、核蛋白、磷脂、辅酶及 ATP 等高能分子的成分, 作为缓冲系统调节培养基 pH
硫	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , $\text{MgSO}_4$	含硫氨基酸(半胱氨酸、甲硫氨酸等)、维生素的成分, 谷胱甘肽可调节胞内氧化还原电位
镁	$\text{MgSO}_4$	己糖磷酸化酶、异柠檬酸脱氢酶、核酸聚合酶等活性中心组分, 叶绿素和细菌叶绿素成分
钙	$\text{CaCl}_2$ , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	某些酶的辅因子, 维持酶(如蛋白酶)的稳定性, 芽孢和某些孢子形成所需, 建立细菌感受态所需
钠	$\text{NaCl}$	细胞运输系统组分, 维持细胞渗透压, 维持某些酶的稳定性
钾	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$	某些酶的辅因子, 维持细胞渗透压, 某些嗜盐细菌核糖体的稳定因子
铁	$\text{FeSO}_4$	细胞色素及某些酶的组分, 某些铁细菌的能源物质, 合成叶绿素、白喉毒素所需

微生物生长所需的无机盐一般有磷酸盐、硫酸盐、氯化物以及含有钠、钾、钙、镁、铁等金属元素的化合物。

在微生物的生长过程中还需要一些微量元素, 微量元素是指那些在微生物生长过程中起重要作用, 而机体对这些元素的需要量极其微小的元素, 通常需要量在  $10^{-6} \sim 10^{-8} \text{mol/L}$  (培养基中含量)。微量元素一般参与酶的组成或使酶活化(表 5.4)。

如果微生物在生长过程中缺乏微量元素, 会导致细胞生理活性降低甚至停止生长。由于不同微生物对营养物质的需求不尽相同, 微量元素这个概念也是相对的。微量元素通常混杂在天然有机营养物、无机化学试剂、自来水、蒸馏水、普通玻璃器皿中, 如果没有特殊原因, 在配制培养基时没有必要另外加入微量元素。值得注意的是, 许多微量元素是重金属, 如果它们过量, 就会对机体产生毒害作用, 而且单独一种微量元素过量产生的毒害作用更大, 因此有必要将培养基中微量元素的量控制在正常范围内, 并注意各种微量元素之间保持恰当比例。

**表 5.4 微量元素与生理功能**

元素	生理功能
锌	存在于乙醇脱氢酶、乳酸脱氢酶、碱性磷酸酶、醛缩酶、RNA 与 DNA 聚合酶中
锰	存在于过氧化物歧化酶、柠檬酸合成酶中
钼	存在于硝酸盐还原酶、固氮酶、甲酸脱氢酶中
硒	存在于甘氨酸还原酶、甲酸脱氢酶中
钴	存在于谷氨酸变位酶中
铜	存在于细胞色素氧化酶中
钨	存在于甲酸脱氢酶中
镍	存在于脲酶中, 为氢细菌生长所必需

#### 5、生长因子

生长因子(growth factor)通常指那些微生物生长所必需而且需要量很小, 但微生物自身不能合成

或合成量不足以满足机体生长需要的有机化合物。

根据生长因子的化学结构和它们在机体中的生理功能的不同，可将生长因子分为维生素(vitamin)、氨基酸与嘌呤与嘧啶三大类(见表 5.5)。维生素在机体中所起的作用主要是作为酶的辅基或辅酶参与新陈代谢；有些微生物自身缺乏合成某些氨基酸的能力，因此必须在培养基中补充这些氨基酸或含有这些氨基酸的小肽类物质，微生物才能正常生长；嘌呤与嘧啶作为生长因子在微生物机体内的作用主要是作为酶的辅酶或辅基，以及用来合成核苷、核苷酸和核酸。

表 5.5 维生素及其在代谢中的作用

化合物	代谢中的作用
对氨基苯甲酸	四氢叶酸的前体，一碳单位转移的辅酶
生物素	催化羧化反应的酶的辅酶
辅酶 M	甲烷形成中的辅酶
叶酸	四氢叶酸包括在一碳单位转移辅酶中
泛酸	辅酶 A 的前体
硫辛酸	丙酮酸脱氢酶复合物的辅基
尼克酸	NAD、NADP 的前体，它们是一些脱氢酶的辅酶
吡哆素(B6)	参与氨基酸和酮酶的转化
核黄素(B2)	黄素单磷酸(FMN)和 FAD 的前体，它们是黄素蛋白的辅基
钴胺素(B12)	辅酶 B12 包括在重排反应里(为谷氨酸变位酶)
硫胺素(B1)	硫胺素焦磷酸脱羧酶、转醛醇酶和转酮醇酶的辅基
维生素 K	甲基酮类的前体，起电子载体作用(如延胡索酸还原酶)
氧卟酸	促进铁的溶解性和向细胞中的转移

## 6、水

水是微生物生长所必不可少的。水在细胞中的生理功能主要有：

①起到溶剂与运输介质的作用，营养物质的吸收与代谢产物的分泌必须以水为介质才能完成；②参与细胞内一系列化学反应；③维持蛋白质、核酸等生物大分子稳定的天然构象；④因为水的比热高，是热的良好导体，能有效地吸收代谢过程中产生的热并及时地将热迅速散发到体外，从而有效地控制细胞内温度的变化；⑤保持充足的水分是细胞维持自身正常形态的重要因素；⑥微生物通过水合作用与脱水作用控制由多亚基组成的结构，如酶、微管、鞭毛及病毒颗粒的组装与解离。

微生物生长的环境中水的有效性常以水活度值(wateractivity,  $A_w$ )表示，水活度值是指在一定的温度和压力条件下，溶液的蒸气压力与同样条件下纯水蒸气压力之比，即  $A_w = P_w / P_{0w}$  式中  $P_w$  代表溶液蒸气压力， $P_{0w}$  代表纯水蒸气压力。纯水  $A_w$  为 1.00，溶液中溶质越多， $A_w$  越小。微生物一般在  $A_w$  为 0.60-0.99 的条件下生长， $A_w$  过低时，微生物生长的迟缓期延长，比生长速率和总生长量减少。微生物不同，其生长的最适  $A_w$  不同(表 5.6)。一般而言，细菌生长最适  $A_w$  较酵母菌和霉菌高，而嗜盐微生物生长最适  $A_w$  则较低。

表 5.6 几类微生物生长最适  $A_w$

微生物	$A_w$
一般细菌	0.91
酵母菌	0.88
霉菌	0.80
嗜盐细菌	0.76
嗜盐真菌	0.65
嗜高渗酵母	0.60

## § 2 微生物的营养类型

由于微生物种类繁多，其营养类型(nutritional types)比较复杂，人们常在不同层次和侧重点上对微生物营养类型进行划分(表 5.7)。根据碳源、能源及电子供体性质的不同，可将绝大部分微生物分为光能无机自养型(photolithoautotrophy)、光能有机异养型(photoorganoheterotrophy)、化能无机自养型(chemolithoautotrophy)及化能有机异养型(chemoorganoheterotrophy)四种类型(表 5.8)。

表 5.7 微生物营养类型(I)

划分依据	营养类型	特点
碳源	自养型(autotrophs)	以 CO <sub>2</sub> 为唯一或主要碳源
	异养型(heterotrophs)	以有机物为碳源
能源	光能营养型(phototrophs)	以光为能源
	化能营养型(chemotrophs)	以有机物氧化释放的化学能为能源
电子供体	无机营养型(lithotrophs)	以还原性无机物为电子供体
	有机营养型(organotrophs)	以有机物为电子供体

表 5.8 微生物的营养类型(II)

营养类型	电子供体	碳源	能源	举例
光能无机自养型	H <sub>2</sub> 、H <sub>2</sub> S、S、或 H <sub>2</sub> O	CO <sub>2</sub>	光能	着色细菌、蓝细菌、藻类
光能有机异养型	有机物	有机物	光能	红螺细菌
化能无机自养型	H <sub>2</sub> 、H <sub>2</sub> S、Fe <sup>2+</sup> 、NH <sub>3</sub> 、或 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>2</sub>	化学能	氢细菌、硫杆菌、亚硝化单胞菌属
化能有机异养型	有机物	有机物	化学能	假单胞菌属、真菌、原生动物

光能无机自养型和光能有机异养型微生物可利用光能生长，在地球早期生态环境的演化过程中起重要作用；化能无机自养型微生物广泛分布于土壤及水环境中，参与地球物质循环；对化能有机异养型微生物而言，有机物通常既是碳源也是能源。目前已知的大多数细菌、真菌、原生动物都是化能有机异养型微生物。值得注意的是，已知的所有致病微生物都属于此种类型。根据化能有机异养型微生物利用的有机物性质的不同，又可将它们分为腐生型(metatroph)和寄生型(paratroph)两类，前者可利用无生命的有机物(如动植物尸体和残体)作为碳源，后者则寄生在活的寄主体内吸取营养物质，离开寄主就不能生存。在腐生型和寄生型之间还存在一些中间类型，如兼性腐生型(facultive metatroph)和兼性寄生型(facultive paratroph)。

某些菌株发生突变(自然突变或人工诱变)后，失去合成某种(或某些)对该菌株生长必不可少的物质(通常是生长因子如氨基酸、维生素)的能力，必须从外界环境获得该物质才能生长繁殖，这种突变型菌株称为营养缺陷型(auxotroph)，相应的野生型菌株称为原养型(prototroph)。营养缺陷型菌株经常用来进行微生物遗传学方面的研究。

必须明确，无论那种分类方式，不同营养类型之间的界限并非绝对的，异养型微生物并非绝对不能利用，只是不能以 CO<sub>2</sub> 为唯一或主要碳源进行生长，而且在有机物存在的情况下也可将 CO<sub>2</sub> 同化为细胞物质。同样，自养型微生物也并非不能利用有机物进行生长。另外，有些微生物在不同生长条件下生长时，其营养类型也会发生改变，例如紫色非硫细菌(purple nonsulphur bacteria)在没有有机物时可以同化 CO<sub>2</sub>，为自养型微生物，而当有机物存在时，它又可以利用有机物进行生长，此时它为异养型微生物。再如，紫色非硫细菌在光照和厌氧条件下可利用光能生长，为光能营养型微生物，而在黑暗与好氧条件下，依靠有机物氧化产生的化学能生长，则为化能营养型微生物。微生物营养类型的可变性无疑有利于提高微生物对环境条件变化的适应能力。

#### 一、光能无机自养型

光能无机自养型 也称光能自养型，这是一类能以 CO<sub>2</sub> 为唯一碳源或主要碳源并利用光能进行生长的微生物，它们能无机物如水、硫化氢、硫代硫酸钠或其他无机化合物使 CO<sub>2</sub> 固定还原成细胞物质，并且伴随元素氧(硫)的释放。

藻类、蓝细菌和光合细菌属于这一类营养类型。

藻类和蓝细菌：
$$CO_2 + H_2O \xrightarrow[\text{叶绿素}]{\text{光能}} [CH_2O] + O_2 \uparrow$$

这与高等植物光合作用是一致的。

光合细菌：
$$CO_2 + 2H_2S \xrightarrow[\text{菌绿素}]{\text{光能}} [CH_2O] + H_2O + 2S$$

这与藻类、蓝细菌和高等植物是不同的。

## 二、化能无机自养型

化能无机自养型 或称化能自养型，这类微生物利用无机物氧化过程中放出的化学能作为它们生长所需的能量，以  $CO_2$  或碳酸盐作为的唯一或主要碳源进行生长，利用电子供体如氢气、硫化氢、二价铁离子或亚硝酸盐等使  $CO_2$  还原成细胞物质。

属于这类微生物的类群有硫化细菌、硝化细菌、氢细菌与铁细菌等（参见微生物的产能方式）

例如氢细菌：
$$H_2 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O + 56.7 \text{ 千卡}$$

## 三、光能有机异养型

光能有机营养型 或称光能异养型，这类微生物不能以  $CO_2$  作为唯一碳源或主要碳源，需以有机物作为供氢体，利用光能将  $CO_2$  还原为细胞物质。

红螺属的一些细菌就是这一营养类型的代表：

$$2(CH_3)_2CHOH + CO_2 \xrightarrow[\text{光合色素}]{\text{光能}} 2CH_3COCH_3 + [CH_2O] + H_2O$$

光能有机营养型细菌在生长时通常需要外源的生长因子。

## 四、化能有机异养型

化能有机营养型 或称化能异养营养型，这类微生物生长所需的能量来自有机物氧化过程放出的化学能，生长所需要的碳源主要是一些有机化合物，如淀粉、糖类、纤维素、有机酸等，也即化能有机营养型微生物里的有机物通常既是它们生长的碳源物质又是能源物质。

目前在已知的微生物中大多数属于化能有机营养型：绝大多数的细菌、全部真菌、原生动动物以及病毒。

如果化能有机营养型微生物利用的有机物不具有生命活性，则是腐生型；若是生活在生活细胞内从寄生体内获得营养物质，则是寄生型。

# § 3 营养物质进入细胞

营养物质能否被微生物利用的一个决定性因素是这些营养物质能否进入微生物细胞。只有营养物质进入细胞后才能被微生物细胞内的新陈代谢系统分解利用，进而使微生物正常生长繁殖。

影响营养物质进入细胞的因素主要有三个：

其一是营养物质本身的性质。相对分子质量、溶解性、电负性、极性等都影响营养物质进入细胞的难易程度。

其二是微生物所处的环境。温度通过影响营养物质的溶解度、细胞膜的流动性及运输系统的活性来影响微生物的吸收能力；pH 和离子强度通过影响营养物质的电离程度来影响其进入细胞的能力。例如，当环境 pH 比细胞内 pH 高时，弱碱性的甲胺进入大肠杆菌后以带正电荷的形式存在，而这种状态的甲胺不容易分泌而导致细胞内甲胺浓度升高，当环境 pH 比细胞内 pH 低时，甲胺以带正电荷的形式存在于环境中而难以进入细胞，导致细胞内甲胺浓度降低；当环境中存在诱导物质运输系统形成的物质时，有利于微生物吸收营养物质；而环境中存在的代谢过程抑制剂、解偶联剂以及能与原生质膜上的蛋白质或脂类物质等成分发生作用的物质(如巯基试剂、重金属离子等)都可以在不同程度上影响物质的运输速率。另外，环境中被运输物质的结构类似物也影响微生物细胞吸收被运输物质的速率，例如 L-刀豆氨酸、L-赖氨酸或 D-精氨酸都能降低酿酒酵母吸收 L-精氨酸的能力。

其三是微生物细胞的透过屏障(permeability barrier)。所有微生物都具有一种保护机体完整性且能限制物质进出细胞的透过屏障, 渗透屏障主要由原生质膜、细胞壁、荚膜及粘液层等组成的结构。荚膜与粘液层的结构较为疏松, 对细胞吸收营养物质影响较小。革兰氏阳性细菌由于细胞壁结构较为紧密, 对营养物质的吸收有一定的影响, 相对分子质量大于 10000 的葡聚糖难以通过这类细菌的细胞壁。真菌和酵母菌细胞壁只能允许相对分子质量较小的物质通过。与细胞壁相比, 原生质膜在控制物质进入细胞的过程中起着更为重要的作用, 它对跨膜运输(transport across membrane)的物质具有选择性, 营养物质的跨膜运输是本节着重探讨的问题。根据物质运输过程的特点, 可将物质的运输方式分为扩散、促进扩散、主动运输与膜泡运输。

## 一、扩散 (diffusion)

### 1、扩散

原生质膜是一种半透膜, 营养物质通过原生质膜上的含水小孔, 由高浓度的胞外(外)环境向低浓度的胞内(内)进行扩散(diffusion)。扩散是非特异性的, 但原生质膜上的含水小孔的大小和形状对参与扩散的营养物质分子有一定的选择性。物质在扩散过程中, 既不与膜上的各类分子发生反应, 自身分子结构也不发生变化。

### 2、扩散的特点

扩散是一种最简单的物质跨膜运输方式, 为纯粹的物理学过程, 在扩散过程中不消耗能量, 物质扩散的动力来自参与扩散的物质在膜内外的浓度差, 营养物质不能逆浓度运输。物质扩散的速率随原生质膜内外营养物质浓度差的降低而减小, 直到膜内外营养物质浓度相同时才达到一个动态平衡。

由于原生质膜主要由磷脂双分子层和蛋白质组成, 而且膜上分布有含水小孔, 膜内外表面为极性表面, 中间为疏水层, 因而物质跨膜扩散的能力和速率与该物质的性质有关, 相对分子质量小、脂溶性、极性小的物质易通过扩散进出细胞。另外, 温度高时, 原生质膜的流动性增加, 有利于物质通过扩散进出细胞, 而 pH 与离子强度通过影响物质的电离程度而影响物质的扩散速率。

### 3、通过扩散运输的营养物质

扩散并不是微生物细胞吸收营养物质的主要方式, 水是唯一可以通过扩散自由通过原生质膜的分子, 脂肪酸、乙醇、甘油、苯、一些气体分子( $O_2$ 、 $CO_2$ )及某些氨基酸在一定程度上也可通过扩散进出细胞。

## 二、促进扩散 (facilitated diffusion)

### 1、促进扩散

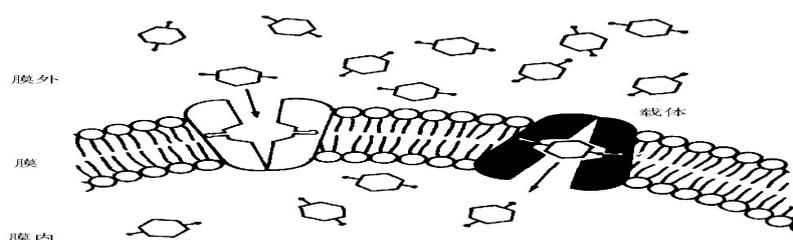


图 3.1 促进扩散示意图

与扩散一样, 促进扩散(facilitated diffusion)也是一种被动的物质跨膜运输方式, 在这个过程中不消耗能量, 参与运输的物质本身的分子结构不发生变化, 不能进行逆浓度运输, 运输速率与膜内外物质的浓度差成正比。

### 2、促进扩散的特点

促进扩散与扩散的主要区别在于通过促进扩散进行跨膜运输的物质需要借助于载体(carrier)的作用力才能进入细胞(图 3.1), 而且每种载体只运输相应的物质, 具有较高的专一性。被运输物质与相应载体之间存在一种亲和力, 而且这种亲和力在原生质膜内外的大小不同, 当物质与相应载体在胞外亲和力大而在胞内亲和力小时, 通过被运输物质与相应载体之间亲和力的大小变化, 使该物质与载体发生可逆性的结合与分离, 导致物质穿过原生质膜进入细胞。被运输物质与载体之间亲和力大小变化是

通过载体分子的构象变化而实现的。参与促进扩散的载体主要是一些蛋白质，这些蛋白质能促进物质进行跨膜运输，自身在这个过程中不发生化学变化，而且在促进扩散中载体只影响物质的运输速率，并不改变该物质在膜内外形成的动态平衡状态，被运输物质在膜内外浓度差越大，促进扩散的速率越快，但是当被运输物质浓度过高而使载体蛋白饱和时，运输速率就不再增加，这些性质都类似于酶的作用特征，因此载体蛋白也称为透过酶(permease)。透过酶大多是诱导酶，只有在环境中存在机体生长所需的营养物质时，相应的透过酶才合成。

### 3、 通过促进扩散运输的营养物质

通过促进扩散进入细胞的营养物质主要有氨基酸、单糖、维生素及无机盐等。一般微生物通过专一的载体蛋白运输相应的物质，但也有微生物对同一物质的运输由一种以上的载体蛋白来完成，例如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 利用四种不同载体蛋白运输组氨酸，酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 有三种不同的载体蛋白来完成葡萄糖的运输。另外，某些载体蛋白可同时完成几种物质的运输，例如大肠杆菌可通过一种载体蛋白完成亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的运输，但这种载体蛋白对这三种氨基酸的运输能力有差别。

除蛋白质载体介导的促进扩散外，一些抗菌素可以通过提高膜的离子通透性而促进离子进行跨膜运输。短杆菌肽 A 是由 15 个 L 型和 D 型氨基酸交替连接而成的短肽，两个短杆菌肽 A 分子可在膜上形成含水通道，离子可以穿过此通道进行跨膜运输；缬氨霉素是一种环状分子， $K^+$  可结合在环状分子中心，而环状分子外周的碳氢链使得该复合物能穿过膜的疏水性中心，从而促进  $K^+$  的跨膜运输，在这个过程中，缬氨霉素实际上起到载体的作用。

### 三、 主动运输 (active transport)

主动运输 (active transport) 是广泛存在于微生物中的一种主要的物质运输方式。与扩散及促进扩散这两种被动运输 (passive transport) 方式相比，主动运输的一个重要特点是在物质运输过程中需要消耗能量，而且可以进行逆浓度运输。在主动运输过程中，运输物质所需能量来源因微生物不同而不同，好氧型微生物与兼性厌氧微生物直接利用呼吸能，厌氧型微生物利用化学能 (ATP)，光合微生物利用光能，嗜盐细菌通过紫膜 (purple membrane) 利用光能。主动运输与促进扩散类似之处在于物质运输过程中同样需要载体蛋白，载体蛋白通过构象变化而改变与被运输物质之间的亲和力大小，使两者之间发生可逆性结合与分离，从而完成相应物质的跨膜运输，区别在于主动运输过程中的载体蛋白构象变化需要消耗能量。主动运输的具体方式有多种，主要有初级主动运输、次级主动运输、基团转位、 $Na^+$ 、 $K^+$ -ATP 酶 ( $Na^+$ 、 $K^+$ -ATPase) 系统及 ATP 偶联主动运输等。

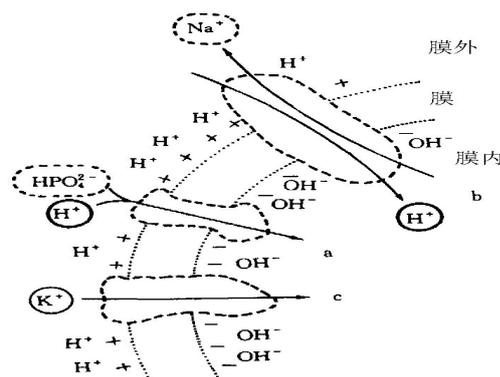


图 3.2 主动运输示意图

#### 1、 初级主动运输 (primary active transport)

初级主动运输指由电子传递系统、ATP 酶或细菌嗜紫红质引起的质子运输方式，从物质运输的角度考虑是一种质子的主动运输方式。呼吸能、化学能和光能的消耗，引起胞内质子 (或其他离子) 外排，导致原生质膜内外建立质子浓度差 (或电势差)，使膜处于充能状态 (图 3.2)，即形成能化膜 (energized membrane)。不同微生物的初级主动运输方式不同，好氧型微生物和兼性厌氧微生物在有氧条件下生

长时，物质在胞内氧化释放的电子在位于原生质膜上的电子传递链上传递的过程中伴随质子外排；厌氧型微生物利用发酵过程中产生的 ATP，在位于原生质膜上的 ATP 酶的作用下，ATP 水解生成 ADP 和磷酸，同时伴随质子向胞外分泌；光合微生物吸收光能后，光能激发产生的电子在电子传递过程中也伴随质子外排；嗜盐细菌紫膜上的细菌嗜紫红质吸收光能后，引起蛋白质分子中某些化学基团 pK 值发生变化，导致质子迅速转移，在膜内外建立质子浓度差。

### 2、次级主动运输(secondary active transport)

通过初级主动运输建立的能化膜在质子浓度差(或电势差)消失的过程中，往往偶联其他物质的运输，包括以下三种方式：同向运输(symport)是指某种物质与质子通过同一载体按同一方向运输(图 3.2a)。除质子外，其他带电荷离子(如钠离子)建立起来的电势差也可引起同向运输。在大肠杆菌中，通过这种方式运输的物质主要有丙氨酸、丝氨酸、甘氨酸、谷氨酸、半乳糖、岩藻糖、蜜二糖、阿拉伯糖、乳酸、葡萄糖醛酸及某些阴离子(如  $\text{HPO}_4^{2-}$ 、 $\text{HSO}_4^-$ )等；逆向运输(antiport)是指某种物质(如  $\text{Na}^+$ )与质子通过同一载体按相反方向进行运输(图 3.2b)；单向运输(uniport)是指质子浓度差在消失过程中，可促使某些物质通过载体进出细胞(图 3.2c)，运输结果通常导致胞内阳离子(如  $\text{K}^+$ )积累或阴离子浓度降低。

### 3、基团转位(group translocation)

基团转位与其他主动运输方式的不同之处在于它有一个复杂的运输系统来完成物质的运输，而物质在起输过程中发生化学变化。基团转位主要存在于厌氧型和兼性厌氧型细菌中，主要用于糖的运输，脂肪酸、核苷、碱基等也可通过这种方式运输。目前尚未在好氧型细菌及真核生物中发现这种运输方式，也未发现氨基酸通过这种方式进行运输。

在研究大肠杆菌对葡萄糖和金黄色葡萄球菌对乳糖的吸收过程中，发现这些糖进入细胞后以磷酸糖的形式存在于细胞质中，表明这些糖在运输过程中发生了磷酸化作用，其中的磷酸基团来源于胞内的磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)，因此也将基团转位称为磷酸烯醇式丙酮酸—磷酸糖转移酶运输系统(PTS)，简称磷酸转移酶系统(图 3.3)。PTS 通常由五种蛋白质组成，包括酶 I、酶 II(包括 a、b 和 c 三个亚基)和一种低相对分子质量的热稳定蛋白质(HPr)。酶 I 和 HPr 是非特异性的细胞质蛋白，酶 II a 也是可溶性细胞质蛋白，亲水性酶 II b 与位于细胞膜上的酶 II c 相结合。在糖的运输过程中，PEP 上的磷酸基团逐步通过酶 I、HPr 的磷酸化与去磷酸化作用，最终在酶 H 的作用下转移到糖，生成磷酸糖释放于细胞质中。

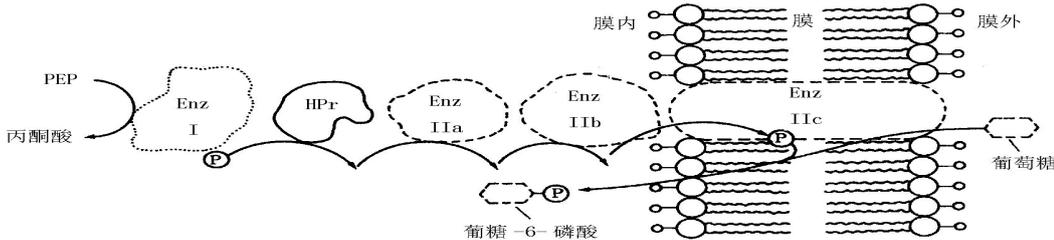


图 3.3 大肠杆菌 PTS 运输系统

### 4、 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATP 酶( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase)系统

丹麦学者斯克(J.C.Skou)在 1957 年发现了存在于原生质膜上的一种重要的离子通道蛋白—— $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase)，时隔 40 年后，他与其他两位学者分享了 1997 年诺贝尔化学奖。 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶的功能是利用 ATP 的能量将  $\text{Na}^+$  由细胞内“泵”出胞外，并将  $\text{K}^+$  “泵”入胞内。该酶由大小两个亚基组成，大亚基可被磷酸化，其作用机制见图 3.4。

E 为非磷酸化酶，与  $\text{Na}^+$  的结合位点朝向膜内，与  $\text{Na}^+$  有较高的亲和力，而与  $\text{K}^+$  的亲和力低。当 E 与  $\text{Na}^+$  结合后，在  $\text{Mg}^{2+}$  存在的情况下，ATP 水解使 E 磷酸化，促使 E 构象发生变化而转变成  $\text{E}'$ ，

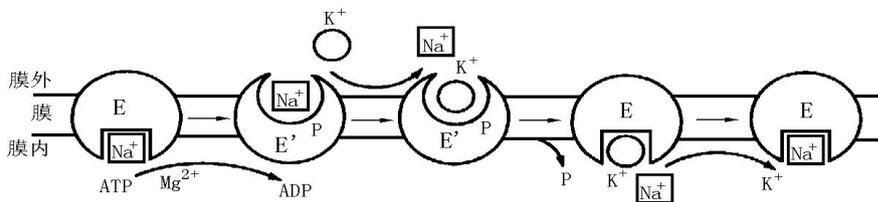


图 3.4  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶系统示意图

并导致与  $\text{Na}^+$  的结合位点朝向膜外， $\text{E}'$  与  $\text{Na}^+$  的亲合力降低，而与  $\text{K}^+$  的亲合力高，此时胞外的  $\text{K}^+$  将  $\text{Na}^+$  置换下来， $\text{E}'$  与  $\text{K}^+$  结合后， $\text{K}^+$  的结合位点朝向膜内， $\text{E}'$  去磷酸化，该酶构象再次发生变化，转变成  $\text{E}$ ， $\text{Na}^+$  将  $\text{K}^+$  置换下来。 $\text{Na}^+$ ， $\text{K}^+$ -ATP 酶作用的结果是使细胞内  $\text{Na}^+$  浓度低而  $\text{K}^+$  浓度高，这种状况并不因环境中  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  浓度高低而改变，例如大肠杆菌  $\text{K}_{12}$  在培养基中  $\text{K}^+$  浓度非常低(0.1mmol/L)时，仍然可以从环境中吸收  $\text{K}^+$ ，导致胞内  $\text{K}^+$  浓度达到 100mmol/L。细胞内维持高浓度  $\text{K}^+$  是保证许多酶的活性和蛋白质的合成所必需的。由于  $\text{Na}^+$ ， $\text{K}^+$ -ATP 酶将  $\text{Na}^+$  由细胞内“泵”出胞外，并将  $\text{K}^+$  “泵”入胞内，因此常将该酶称为  $\text{Na}^+$ ， $\text{K}^+$  泵。

#### 5、其他的主动运输方式

除上述四种主要的主动运输方式外，在微生物中还存在一些其他的主动运输方式。其中有一种是 ATP 水解不建立膜内外质子浓度差，而是直接偶联物质的运输，L-谷氨酰胺、L-鸟氨酰胺、L-鸟氨酸和 D-核糖可以通过这种方式运输；在大肠杆菌中，能量的消耗可以导致柠檬酸透过酶的构象变化而使之活化，促进柠檬酸进入细胞；在金黄色葡萄球菌中，在脱氢酶作用下，乳酸氧化偶联着载体蛋白分子构象变化，促使物质进入细胞。

#### 四、膜泡运输 (membrane vesicle transport)

膜泡运输(membrane vesicle transport)主要存在于原生动动物特别是变形虫(amoeba)中，是这类微生物的一种营养物质的运输方式(图 3.5)。变形虫通过趋向性运动靠近营养物质，并将该物质吸附到膜表面，然后在该物质附近的细胞膜开始内陷，逐步将营养物质包围，最后形成一个含有该营养物质的膜泡，之后膜泡离开细胞膜而游离于细胞质中，营养物质通过这种运输方式由胞外进入胞内。如果膜泡中包含的是固体营养物质，则将这种营养物质运输方式称为胞吞作用(phaocytosis)；如果膜泡中包含的是液体，则称之为胞饮作用(pinocytosis)。通过胞吞作用(或胞饮作用)进行的营养物质膜泡运输一般分为五个时期(图 3.5)，即吸附期、膜伸展期、膜泡迅速形成期、附着膜泡形成期和膜泡释放期。

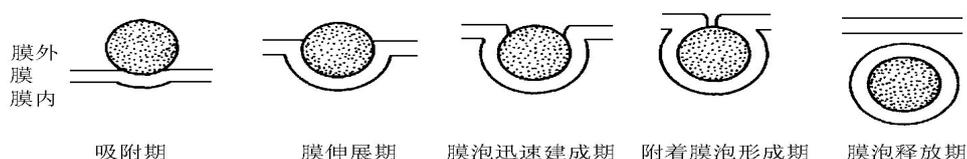


图 3.5 膜泡运输示意图

## § 4 培养基 (culture medium)

### 一、什么是培养基

培养基 (culture medium) 是人工配制的，适合微生物生长繁殖或产生代谢产物的营养基质。无论是以微生物为材料的研究，还是利用微生物生产生物制品，都必须进行培养基的配制，它是微生物学研究和微生物发酵生产的基础。

培养基中应含满足微生物生长发育的：水分、碳源、氮源、生长因子以及基本的离子，磷、硫、钠、钙、镁、钾和铁及各种微量元素。

此外，培养基还应具有适宜的酸碱度(pH 值)和一定缓冲能力及一定的氧化还原电位和合适的渗透压。

### 二、配制培养基的原则

#### 1、选择适宜的营养物质

总体而言，所有微生物生长繁殖均需要培养基含有碳源、氮源、无机盐、生长因子、水及能源，但由于微生物营养类型复杂，不同微生物对营养物质的需求是不一样的，因此首先要根据不同微生物的营养需求配制针对性强的培养基。自养型微生物能从简单的无机物合成自身需要的糖类、脂类、蛋白质、核酸、维生素等复杂的有机物，因此培养自养型微生物的培养基完全可以(或应该)由简单的无

机物组成。例如，培养化能自养型的氧化硫硫杆菌(*Thiobacillus thiooxidans*)的培养基组成见表 3.9。在该培养基配制过程中并未专门加入其他碳源物质，而是依靠空气中和溶于水中的 CO<sub>2</sub> 为氧化硫硫杆菌提供碳源。

就微生物主要类型而言，有细菌、放线菌、酵母菌、霉菌、原生动物、藻类及病毒之分，培养它们所需的培养基各不相同。在实验室中常用牛肉膏蛋白胨培养基(或简称普通肉汤培养基)培养细菌，用高氏 I 号合成培养基培养放线菌，培养酵母菌一般用麦芽汁培养基，培养霉菌则一般用查氏合成培养基。

## 2、营养物质浓度及配比合适

培养基中营养物质浓度合适时微生物才能生长良好，营养物质浓度过低时不能满足微生物正常生长所需，浓度过高时则可能对微生物生长起抑制作用，例如高浓度糖类物质、无机盐、重金属离子等不仅不能维持和促进微生物的生长，反而起到抑菌或杀菌作用。另外，培养基中各营养物质之间的浓度配比也直接影响微生物的生长繁殖和(或)代谢产物的形成和积累，其中碳氮比(C/N)的影响较大。严格地讲，碳氮比指培养基中碳元素与氮元素的物质的量比值，有时也指培养基中还原糖与粗蛋白之比。例如，在利用微生物发酵生产谷氨酸的过程中，培养基碳氮比为 4/1 时，菌体大量繁殖，谷氨酸积累少；当培养基碳氮比为 3/1 时，菌体繁殖受到抑制，谷氨酸产量则大量增加。再如，在抗生素发酵生产过程中，可以通过控制培养基中速效氮(或碳)源与迟效氮(或碳)源之间的比例来控制菌体生长与抗生素的合成协调。

表 5.9 几种类型培养基组成

成分	氧化硫硫杆菌	大肠杆菌	营养琼脂	高氏 I 号	查氏合成	LB	主要作用
牛肉膏			5				碳源(能源)、氮源无机盐、生长因子
蛋白胨			10			10	氮源、碳源(能源)、生长因子
酵母浸膏		5					生长因子、氮源、碳源(能源)
葡萄糖		5					碳源(能源)
蔗糖					30		碳源(能源)
可溶性淀粉				20			碳源(能源)
CO <sub>2</sub>	(来自空气)						碳源
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4						氮源、无机盐
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		1					氮源、无机盐
KNO <sub>3</sub>				1			氮源、无机盐
NaNO <sub>3</sub>					3		氮源、无机盐
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5	0.2		0.5	0.5		无机盐
FeSO <sub>4</sub>	0.01			0.01	0.01		无机盐
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4						无机盐
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		1		0.5	1		无机盐
NaCl		5	5	0.5			无机盐
KCl					0.5		无机盐
CaCl <sub>2</sub>	0.25						无机盐
S	10						无机盐
H <sub>2</sub> O	1000	1000	1000	1000	1000	1000	溶剂
pH	7.0	7.0~7.2	7.0~7.2	7.2~7.4	自然	7.0	

灭菌条件	121℃20	112℃30	121℃20	121℃20	121℃20	121℃20	
------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--

### 3、控制 pH 条件

培养基的 pH 必须控制在一定的范围内，以满足不同类型微生物的生长繁殖或产生代谢产物。各类微生物生长繁殖或产生代谢产物的最适 pH 条件各不相同，一般来讲，细菌与放线菌适于在 pH7~7.5 范围内生长，酵母菌和霉菌通常在 pH4.5~6 范围内生长。值得注意的是，在微生物生长繁殖和代谢过程中，由于营养物质被分解利用和代谢产物的形成与积累，会导致培养基 pH 发生变化，若不对培养基 pH 条件进行控制，往往导致微生物生长速度下降或(和)代谢产物产量下降。因此，为了维持培养基 pH 的相对恒定，通常在培养基中加入 pH 缓冲剂，常用的缓冲剂是一氢和二氢磷酸盐(如  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )组成的混合物。 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  溶液呈碱性， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液呈酸性，两种物质的等量混合溶液的 pH 为 6.8。当培养基中酸性物质积累导致  $\text{H}^+$  浓度增加时， $\text{H}^+$  与弱碱性盐结合形成弱酸性化合物，培养基 pH 不会过度降低；如果培养基中  $\text{OH}^-$  浓度增加， $\text{OH}^-$  则与弱酸性盐结合形成弱碱性化合物，培养基 pH 也不会过度升高。

但  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  缓冲系统只能在一定的 pH 范围(pH6.4~7.2)内起调节作用。有些微生物，如乳酸菌能大量产酸，上述缓冲系统就难以起到缓冲作用，此时可在培养基中添加难溶的碳酸盐(如  $\text{CaCO}_3$ )来进行调节， $\text{CaCO}_3$  难溶于水，不会使培养基 pH 过度升高，但它可以不断中和微生物产生的酸，同时释放出  $\text{CO}_2$ ，将培养基 pH 控制在一定范围内。

在培养基中还存在一些天然的缓冲系统，如氨基酸、肽、蛋白质都属于两性电解质，也可起到缓冲剂的作用。

### 4、控制氧化还原电位(redox potential)

不同类型微生物生长对氧化还原电位( $\Phi$ )的要求不一样，一般好氧性微生物在  $\Phi$  值为 +0.1V 以上时可正常生长，一般以 +0.3 ~ +0.4V 为宜，厌氧性微生物只能在  $\Phi$  值低于 +0.1V 条件下生长，兼性厌氧微生物在  $\Phi$  值为 +0.1V 以上时进行好氧呼吸，在 +0.1V 以下时进行发酵。 $\Phi$  值与氧分压和 pH 有关，也受某些微生物代谢产物的影响。在 pH 相对稳定的条件下，可通过增加通气量(如振荡培养、搅拌)提高培养基的氧分压，或加入氧化剂，从而增加  $\Phi$  值；在培养基中加入抗坏血酸、硫化氢、半胱氨酸、谷胱甘肽、二硫苏糖醇等还原性物质可降低  $\Phi$  值。

### 5、原料来源的选择

在配制培养基时应尽量利用廉价且易于获得的原料作为培养基成分，特别是在发酵工业中，培养基用量很大，利用低成本的原料更体现出其经济价值。例如，在微生物单细胞蛋白的工业生产过程中，常常利用糖蜜(制糖工业中含有蔗糖的废液)、乳清(乳制品工业中含有乳糖的废液)、豆制品工业废液及黑废液(造纸工业中含有戊糖和己糖的亚硫酸纸浆)等都可作为培养基的原料。再如，工业上的甲烷发酵主要利用废水、废渣作原料，而在我国农村，已推广利用人畜粪便及禾草为原料发酵生产甲烷作为燃料。另外，大量的农副产品或制品，如鼓皮、米糠、玉米浆、酵母浸膏、酒糟、豆饼、花生饼、蛋白胨等都是常用的发酵工业原料。

### 6、灭菌处理

要获得微生物纯培养，必须避免杂菌污染，因此对所用器材及工作场所进行消毒与灭菌。对培养基而言，更是要进行严格的灭菌。对培养基一般采取高压蒸汽灭菌，一般培养基用  $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$ ,  $121.3^\circ\text{C}$  条件下维持 15~30min 可达到灭菌目的。在高压蒸汽灭菌过程中，长时间高温会使某些不耐热物质遭到破坏，如使糖类物质形成氨基糖、焦糖，因此含糖培养基常在  $0.56\text{kg}/\text{cm}^2$ ,  $112.6^\circ\text{C}$  15~30min 进行灭菌，某些对糖类要求较高的培养基，可先将糖进行过滤除菌或间歇灭菌，再与其他已灭菌的成分混合；长时间高温还会引起磷酸盐、碳酸盐与某些阳离子(特别是钙、镁、铁离子)结合形成难溶性复合物而产生沉淀，因此，在配制用于观察和定量测定微生物生长状况的合成培养基时，常需在培养基中加入少量螯合剂，避免培养基中产生沉淀，常用的螯合剂为乙二胺四乙酸(EDTA)。还可以将含钙、镁、铁等离子的成分与磷酸盐、碳酸盐分别进行灭菌，然后再混合，避免形成沉淀；高压蒸汽灭菌后，培养基 pH 会发生改变(一般使 pH 降低)，可根据所培养微生物的要求，在培养基灭菌前后加以调整。

在配制培养基过程中，泡沫的存在对灭菌处理极不利，因为泡沫中的空气形成隔热层，使泡沫中微生物难以被杀死。因而有时需要在培养基中加入消泡沫剂以减少泡沫的产生，或适当提高灭。

### 三、培养基的类型以及应用

培养基种类繁多，根据其成分、物理状态和用途可将培养基分成多种类型。

#### (一) 按成分不同划分

1、天然培养基(**complex medium**) 这类培养基含有化学成分还不清楚或化学成分不恒定的天然有机物，也称非化学限定培养基(**chemically undefined medium**)。牛肉膏蛋白胨培养基和麦芽汁培养基就属于此类。基因克隆技术中常用的 LB(Luria—Bertani)培养基也是一种天然培养基，其组成见表 5.9。

**表 5.10 牛肉浸膏、蛋白胨及酵母浸膏的来源及主要成分**

营养物质	来源	主要成分
牛肉浸膏	瘦牛肉组织浸出汁浓缩而成的膏状物质	富含水溶性糖类、有机氮化合物、维生素、盐等
蛋白胨	将肉、酪素或明胶用酸或蛋白酶水解后干燥而成	富含有机氮化合物、也含有一些维生素和糖类的粉末状物质
酵母浸膏	酵母细胞的水溶性提取物浓缩而成的膏状物质	富含 B 类维生素，也含有有机氮化合物和糖类

常用的天然有机营养物质包括牛肉浸膏、蛋白胨、酵母浸膏(表 5.10)、豆芽汁、玉米粉、土壤浸液、麸皮、牛奶、血清、稻草浸汁、羽毛浸汁、胡萝卜汁、椰子汁等，嗜粪微生物(**coprophilous microorganisms**)可以利用粪水作为营养物质。天然培养基成本较低，除在实验室经常使用外，也适于用来进行工业上大规模的微生物发酵生产。

2、合成培养基(**synthc medium**)是由化学成分完全了解的物质配制而成的培养基，也称化学限定培养基(**chemically defined medium**)，高氏 I 号培养基和查氏培养基就属于此种类型。配制合成培养基时重复性强，但与天然培养基相比其成本较高，微生物在其中生长速度较慢，一般适于在实验室用来进行有关微生物营养需求、代谢、分类鉴定、生物量测定、菌种选育及遗传分析等方面的研究工作。

#### (二) 根据物理状态划分

根据培养基中凝固剂的有无及含量的多少，可将培养基划分为固体培养基、半固体培养基和液体培养基三种类型。

#### 1、固体培养基(**solid medium**)

在液体培养基中加入一定量凝固剂，使其成为固体状态即为固体培养基。理想的凝固剂应具备以下条件：①不被所培养的微生物分解利用；②在微生物生长的温度范围内保持固体状态，在培养嗜热细菌时，由于高温容易引起培养基液化，通常在培养基中适当增加凝固剂来解决这一问题；③凝固剂凝固点温度不能太低，否则将不利于微生物的生长；④凝固剂对所培养的微生物无毒害作用；⑤凝固剂在灭菌过程中不会被破坏；⑥透明度好，粘着力强；⑦配制方便且价格低廉。常用的凝固剂有琼脂(**agar**)、明胶(**gelatin**)和硅胶(**silica gel**)。表 5.11 列出琼脂和明胶的一些主要特征。

对绝大多数微生物而言，琼脂是最理想的凝固剂，琼脂是由藻类(海产石花菜)中提取的一种高度分支的复杂多糖；明胶是由胶原蛋白制备得到的产物，是最早用来作为凝固剂的物质，但由于其凝固点太低，而且某些细菌和许多真菌产生的非特异性胞外蛋白酶以及梭菌产生的特异性胶原酶都能液化明胶，目前已较少作为凝固剂；硅胶是由无机的硅酸钠(**Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>**)及硅酸钾(**K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>**)被盐酸及硫酸中和时凝聚而成的胶体，它不含有有机物，适合配制分离与培养自养型微生物的培养基。

**表 5.11 琼脂与明胶主要特征比较**

内容	琼脂	明胶
常用浓度(%)	1.5~2	5~12
熔点(°C)	96	25
凝固点(°C)	40	20
pH	微酸	酸性

灰分(%)	16	14~15
氧化钙(%)	1.15	0
氧化镁(%)	0.77	0
氮(%)	0.4	18.3
微生物利用能力	绝大多数微生物不能利用	许多微生物能利用

除在液体培养基中加入凝固剂制备的固体培养基外，一些由天然固体基质制成的培养基也属于固体培养基。例如，由马铃薯块、胡萝卜条、小米、麸皮及米糠等制成固体状态的培养基就属于此类。又如生产酒的酒曲，生产食用菌的棉子壳培养基。

在实验室中，固体培养基一般是加入平皿或试管中，制成培养微生物的平板或斜面。固体培养基为微生物提供一个营养表面，单个微生物细胞在这个营养表面进行生长繁殖，可以形成单个菌落。固体培养基常用来进行微生物的分离、鉴定、活菌计数及菌种保藏等。

### 2、半固体培养基(semisolid medium)

半固体培养基中凝固剂的含量比固体培养基少，培养基中琼脂含量一般为 0.2%~0.7%。半固体培养基常用来观察微生物的运动特征、分类鉴定及噬菌体效价滴定等。

3、液体培养基(liquid medium) 液体培养基中未加任何凝固剂。在用液体培养基培养微生物时，通过振荡或搅拌可以增加培养基的通气量，同时使营养物质分布均匀。液体培养基常用于大规模工业生产以及在实验室进行微生物的基础理论和应用方面的研究。

## (三) 按用途划分

### 1、基础培养基(minimum medium)

尽管不同微生物的营养需求各不相同，但大多数微生物所需的基本营养物质是相同的。基础培养基是含有一般微生物生长繁殖所需的基本营养物质的培养基。牛肉膏蛋白胨培养基是最常用的基础培养基。基础培养基也可以作为一些特殊培养基的基础成分，再根据某种微生物的特殊营养需求，在基础培养基中加入所需营养物质。

### 2、加富培养基(enrichment medium)

加富培养基也称营养培养基，即在基础培养基中加入某些特殊营养物质制成的一类营养丰富的培养基，这些特殊营养物质包括血液、血清、酵母浸膏、动植物组织液等。加富培养基一般用来培养营养要求比较苛刻的异养型微生物，如培养百日咳博德氏菌(败 ydd6c6jj6 加 rzM55Z5)需要含有血液的加富培养基。加富培养基还可以用来富集和分离某种微生物，这是因为加富培养基含有某种微生物所需的特殊营养物质，该种微生物在这种培养基中较其他微生物生长速度快，并逐渐富集而占优势，逐步淘汰其他微生物，从而容易达到分离该种微生物的目的。从某种意义上讲，加富培养基类似选择培养基，两者区别在于，加富培养基是用来增加所要分离的微生物的数量，使其形成生长优势，从而分离到该种微生物；选择培养基则一般是抑制不需要的微生物的生长，使所需要的微生物增殖，从而达到分离所需微生物的目的。

### 3、鉴别培养基(differential medium)

鉴别培养基是用于鉴别不同类型微生物的培养基。在培养基中加入某种特殊化学物质，某种微生物在培养基中生长后能产生某种代谢产物，而这种代谢产物可以与培养基中的特殊化学物质发生特定的化学反应，产生明显的特征性变化，根据这种特征性变化，可将该种微生物与其他微生物区分开来。鉴别培养基主要用于微生物的快速分类鉴定，以及分离和筛选产生某种代谢产物的微生物菌种。常用的一些鉴别培养基参见表 5.12。

表 5.12 一些鉴别培养基

培养基名称	加入化学物质	微生物代谢产物	培养基特征性变化	主要用途
酪素培养基	酪素	胞外蛋白酶	蛋白水解圈	鉴别产蛋白酶菌株
明胶培养基	明胶	胞外蛋白酶	明胶液化	鉴别产蛋白酶菌株
油脂培养基	食用油、吐温	胞外脂肪酶	由淡红色变成深红色	鉴别产脂肪酶菌株

	中性红指示剂			
淀粉培养基	可溶性淀粉	胞外淀粉酶	淀粉水解圈	鉴别产淀粉酶菌株
H <sub>2</sub> S 试验培养基	醋酸铅	H <sub>2</sub> S	产生黑色沉淀	鉴别产 H <sub>2</sub> S 菌株
糖发酵培养基	溴甲酚紫	乳酸、醋酸、丙酸等	由紫色变成黄色	鉴别肠道细菌
远藤氏培养基	碱性复红亚硫酸钠	酸、乙醛	带金属光泽深红色菌落	鉴别水中大肠菌群
伊红美蓝培养基	伊红、美蓝	酸	带金属光泽深紫色菌落	鉴别水中大肠菌群

#### 4、选择培养基(selective medium)

选择培养基是用来将某种或某类微生物从混杂的微生物群体中分离出来的培养基。根据不同种类微生物的特殊营养需求或对某种化学物质的敏感性不同，在培养基中加入相应的特殊营养物质或化学物质，抑制不需要的微生物的生长，有利于所需微生物的生长。

一种类型选择培养基是依据某些微生物的特殊营养需求设计的，例如，利用以纤维素或石蜡油作为唯一碳源的选择培养基，可以从混杂的微生物群体中分离出能分解纤维素或石蜡油的微生物；利用以蛋白质作为唯一氮源的选择培养基，可以分离产胞外蛋白酶的微生物；缺乏氮源的选择培养基可以用来分离固氮微生物。另一类选择培养基是在培养基中加入某种化学物质，这种化学物质没有营养作用，对所需分离的微生物无害，但可以抑制或杀死其他微生物，例如，在培养基中加入数滴 10%酚可以抑制细菌和霉菌的生长，从而由混杂的微生物群体中分离出放线菌；在培养基中加入亚硫酸铵，可以抑制革兰氏阳性细菌和绝大多数革兰氏阴性细菌的生长，而革兰氏阴性的伤寒沙门氏菌(*Salmomnella typhi*)可以在这种培养基上生长；在培养基中加入染料亮绿(brilliant green)或结晶紫(crystal violet)，可以抑制革兰氏阳性细菌的生长，从而达到分离革兰氏阴性细菌的目的；在培养基中加入青霉素、四环素或链霉素，可以抑制细菌和放线菌生长，而将酵母菌和霉菌分离出来。现代基因克隆技术中也常用选择培养基，在筛选含有重组质粒的基因工程菌株过程中，利用质粒上具有的对某种(些)抗生素的抗性选择标记，在培养基中加入相应抗生素，就能比较方便地淘汰非重组菌株，以减少筛选目标菌株的工作量。

#### 5、其他

除上述四种主要类型外，培养基按用途划分还有很多种，比如：分析培养基(assay medium)常用来分析某些化学物质(抗生素、维生素)的浓度，还可用来分析微生物的营养需求；还原性培养基(reduced medium)专门用来培养厌氧型微生物；组织培养物培养基(tissue-culture midium)含有动、植物细胞，用来培养病毒、衣原体(chlamydia)、立克次氏体(rickettsia)及某些螺旋体(spirochete)等专性活细胞寄生的微生物。尽管如此，有些病毒和立克次氏体目前还不能利用人工培养基来培养，需要接种在动植物体内、动植物组织中才能增殖。常用的培养病毒与立克次氏体的动物有小白鼠、家鼠和豚鼠，鸡胚也是培养某些病毒与立克次氏体的良好营养基质，鸡瘟病毒、牛痘病毒、天花病毒、狂犬病毒等十几种病毒也可用鸡胚培养。