

实验 11 土壤中微生物的分离

1、实验目的

- 掌握培养基的配制原理以及配制培养基的一般方法和步骤
- 学习微生物纯培养的基本操作技术
- 了解不同微生物（细菌、放线菌、酵母和霉菌）的主要菌落特征

2、实验原理

土壤是微生物生活的大本营，是寻找和发现有重要应用潜力的微生物的主要菌源。不同土样中各类微生物数量不同，一般土壤中细菌数量最多；其次为放线菌和霉菌。一般在较干燥、偏碱性、有机质丰富的土壤中放线菌数量较多；酵母菌多分布在水果表皮和果园土中。

为了获得某种微生物的单菌落，首先要考虑制备不同稀释度的菌悬液。其次，应考虑各类微生物的不同特性，避免菌源中各类微生物的相互干扰。要想获得某种微生物的纯培养，还需提供有利于该微生物生长繁殖的最适培养基及培养条件。培养基是人工的将多种物质按各种微生物生长的需要配制而成的一种混合营养基质，用以培养或分离各种微生物，因此，培养基质应当有微生物所能利用的营养成分（包括碳源，氮源，能源，无机盐，生长因素）和水，根据微生物的种类和实验目的地不同，培养基也有不同的种类。

在土壤，水，空气及动、植物体中，不同种类的微生物绝大多数都是混杂生活在一起，当我们希望获得某一种微生物时，就必须从混杂的微生物类群中分离它，以得到只含有这一种微生物的纯培养，这种从混杂微生物群体中获得只含某一种或某一株微生物的过程称为微生物的分离与纯化。为了获得某种微生物的纯培养，一般是根据该微生物对营养，酸碱度，氧等条件的要求不同，而供给它适宜的培养条件，或加入某种抑制剂造成只利于此菌生长而抑制其他菌生长的环境，从而淘汰其他一些不需要的微生物，再用稀释涂布平板法（涂布法）或稀释混合平板法（倾注法）或平板划线分离法等分离纯化微生物，直至得到纯菌株。本实验采用涂布法和倾注法对土壤中各种微生物进行分离培养。

- 细菌

细菌一般是单细胞，细胞结构简单，属于原核生物，工业上多用杆菌（图 1）。细菌广泛分布于土壤和水中，或者与其他生物共生，也有部分种类分布在极端的环境中。细菌的营养方式有自养及异养，其中异养的腐生细菌是生态系中重要的分解者，使碳循环能顺利进行。部分细菌会进行固氮作用，使氮元素得以转换为生物能利用的形式。细菌对人类活动有很大的影响。一方面，细菌是许多疾病的病原体，另一方面，人类也时常利用细菌的生理代谢活动为人类服务，例如乳酪及酸奶的制作、废水的处理等。

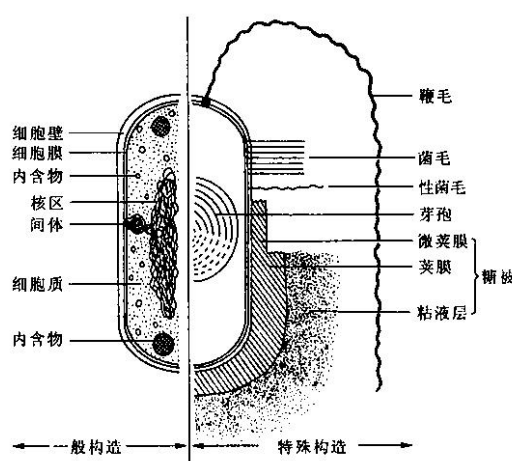


图 1 细菌的典型构造

细菌具有许多不同的代谢方式。一些细菌只需要二氧化碳作为它们的碳源，被称作自养生物。另外一些细菌依靠有机物形式的碳作为碳源，称为异养生物。根据细菌对氧气的利用，大部分细菌可以被分为以下三类：一些只能在氧气存在的情况下生长，称为需氧菌；另一些只能在没有氧气存在的情况下生长，称为厌氧菌；还有一些无论为兼性厌氧菌。还有一些细菌能在极端环境中生长，如嗜热细菌、嗜盐细菌、嗜酸细菌、嗜碱细菌以及嗜冷细菌等。

➤ 放线菌

放线菌是一类主要呈菌丝状生长和以孢子繁殖的陆生性较强的原核微生物，因在固体培养基上呈辐射状生长而得名（大多数有发达的分枝菌丝，图 2）。放线菌的菌落由菌丝体组成，一般圆形、光平或有许多皱褶，光学显微镜下观察，菌落周围具辐射状菌。放线菌在自然界中分布很广，放线菌在自然界分布广泛，主要以孢子或菌丝状态存在于土壤、空气和水中，尤其是含水量低、有机物丰富、呈中性或微碱性的土壤中数量最多。土壤特有的泥腥味，主要是放线菌的代谢产物所致。

放线菌与人类的生产和生活关系极为密切，在医药工业上有重要意义。目前人类应用的抗生素 70%以上是由各种放线菌所产生。一些放线菌还能产生各种酶制剂（蛋白酶、淀粉酶、和纤维素酶等）、维生素（和有机酸等。此外，放线菌还可用于甾体转化、烃类发酵、石油脱蜡和污水处理等方面。少数放线菌也会对人类构成危害，引起人和动植物病害。

大多数放线菌是好氧的。因此，工业化发酵生产抗生素过程中必须保证足够的通气量。对放线菌的培养主要采用液体培养和固体培养两种方式。固体培养可以积累大量的孢子；液体培养则可获得大量的菌丝体及代谢产物。在抗生素生产中，一般采用液体培养，并在发酵罐中通入无菌空气，以增加发酵液的溶氧度。

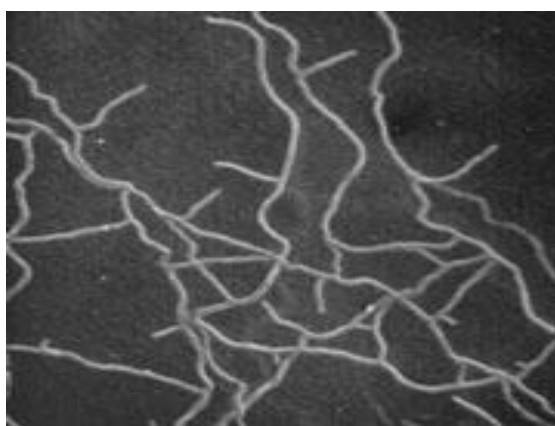


图 2 放线菌菌丝

➤ 霉菌

霉菌是丝状真菌的俗称，意即“发霉的真菌”，它们往往能形成分枝繁茂的菌丝体。在潮湿温暖的地方，很多物品上长出一些肉眼可见的绒毛状、絮状或蛛网状的霉菌菌落（图 3）。霉菌菌落主要有一下特征：形态较大，质地疏松，外观干燥，不透明，呈现或松或紧的形状；菌落和培养基间的连接紧密，不易挑取，菌落正面与反面的颜色、构造，以及边缘与中心的颜色、构造常不一致（不同微生物形态特征比较见表 1）。霉菌在工业上可用来生产多种酶制剂、有机酸等。

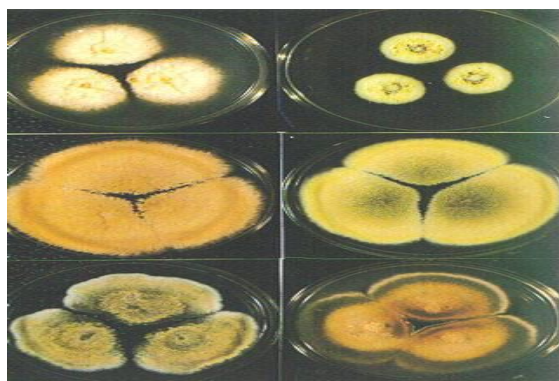


图 3 霉菌菌落形态

➤ 酵母菌

酵母是一种肉眼看不见的微小单细胞微生物，广泛分布于自然界，主要生长在偏酸性的潮湿的含糖环境。酵母菌在有氧和无氧的环境中都能生长，即酵母菌是兼性厌氧菌，在有氧的情况下，它把糖分解成二氧化碳和水，在缺氧的情况下，酵母菌把糖分解成酒精和二氧化碳。酵母常存在于一些富含糖类的环境中，比如一些水果（葡萄、苹果、桃等）或者植物分泌物（如仙人掌的汁）中。

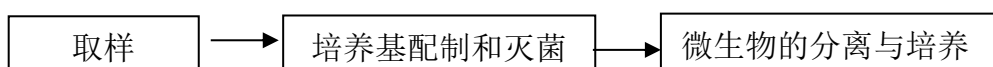
酵母菌是单细胞真核微生物，形态通常有球形、卵圆形、腊肠形、椭圆形、柠檬形或藕节形等，比细菌的单细胞个体大。大多数酵母菌的菌落特征与细菌相似，但比细菌菌落大而厚，菌落表面光滑、湿润、粘稠，容易挑起，菌落质地均匀，正反面和边缘、中央部位的颜色都很均一，菌落多为乳白色，少数为红色，个别为黑色。最常提到的酵母为酿酒酵母（也称面包酵母）（*Saccharomyces cerevisiae*），自从几千年前人类就用其发酵面包和酒类。因酵母属于简单的单细胞真核生物，易于培养，且生长迅速，已被广泛用于现代生物学研究中。如酿酒酵母作为重要的模式生物，已成为遗传学和分子生物学的重要研究材料。

3、实验方法和步骤

1) 实验材料

无菌水，酒精灯，玻璃涂布棒，灭菌培养皿，灭菌三角烧瓶，灭菌试管，移液枪，枪头，玻璃珠等。

2) 实验流程



3) 实验方法

i. 取样

建议取样地点如表 1 所示。选定采土地点后（比如荷塘，树根），铲去表土层 2-3cm，取 3-10cm 深层土壤 20g，装入袋内。土样采集后应保存在低温干燥的条件下，尽量减少其中菌相的变化。从中分离细菌，放线菌，霉菌；建议从葡萄表皮中分离酵母菌。

ii. 培养基的配制及灭菌

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基：

牛肉膏 3g，蛋白胨 10g，氯化钠 5g，琼脂 15-20g，水 1000mL，pH 值 7.0-7.2（用 1mol/L 的 HCl 或 NaOH 调）。

高氏 1 号合成培养基：

可溶性淀粉 20g，KNO₃ 1g，NaCl 0.5g，K₂HPO₄ 0.5g，MgSO₄ 0.5g，FeSO₄ 0.01g，琼脂 20g，水 1000mL，pH 值 7.0-7.2（用 1mol/L 的 HCl 或 NaOH 调）。配制时，先用少量冷水将淀粉调成糊状，再在火上加热，边搅拌边加水及其他成分，待溶化后，补足水分至 1000mL。

马丁培养基：

孟加拉红培养基 17.5g，水 400mL。121℃灭菌 20min，用前加入 0.015%链霉素稀释液 100mL（使每毫升培养基中含链霉素 30μg）。

马铃薯葡萄糖培养基：

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 38g，水 1000mL，氯霉素 0.05g。

将配制好的培养基、培养皿、试管、锥形瓶及烧杯等放到高压灭菌锅进行高温蒸汽灭菌，121℃灭菌 20min。。

iii. 微生物的分离与培养

(一) 细菌的分离

(1) 制备土壤稀释液

称取土壤 1g，放入装有 9mL 无菌水的离心管中，振荡 5-10min，即为稀释度为 10⁻¹ 的土壤悬液。另取装有 9mL 无菌水试管 5 支，用记号笔编上 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴。以无菌操作法吸取 1mL 已稀释成 10⁻¹ 的土壤悬液加入 10⁻² 的无菌水的试管中，并在试管内轻轻吹吸数次，使之充分混匀，即成土壤 10⁻² 稀释液。同法依次连续稀释至 10⁻³、10⁻⁴。

(2) 倾注法分离

- 吸取稀释液：以无菌操作法分别吸取 10^{-3} 、 10^{-4} 土壤稀释液 0.1mL，加在空培养皿中。
- 倒入牛肉膏蛋白胨培养基
- 混匀：水平轻轻转动培养皿，使菌液、培养基充分混匀铺平，待平板完全冷凝后，将平板倒置于恒温培养箱 30°C 培养，1-2 天后观察结果。

(二) 放线菌的分离

(1) 制备土壤稀释液

称取土壤 1g，放入装有 9mL 无菌水的离心管中，并加入 2 滴 10% 的苯酚溶液（抑制细菌生长），振荡 5-10min，即为稀释 10^{-1} 的土壤悬液。同上依次连续稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 土壤稀释液。

(2) 倾注法分离

- 吸取稀释液：以无菌操作法分别吸取 10^{-3} 、 10^{-4} 土壤稀释液 0.1mL，加在空培养皿中
- 倒入高氏 1 号合成培养基
- 混匀：水平轻轻转动培养皿，使菌液、培养基充分混匀铺平，待平板完全冷凝后，将平板倒置于恒温培养箱 30°C 培养，5-8 天后观察结果。

(三) 霉菌的分离

(1) 制备土壤稀释液

称取土壤 1g，放入装有 9mL 无菌水的离心管中，振荡 5-10min，即为稀释 10^{-1} 的土壤悬液。同上依次连续稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 土壤稀释液。

(2) 倾注法分离

- 吸取稀释液：以无菌操作法分别吸取 10^{-3} 、 10^{-4} 土壤稀释液 0.1mL，加在空培养皿中
- 倒入马丁培养基（培养基中已提前加入孟加拉红和链霉素，抑制细菌生长和降低菌丝蔓延速度）
- 混匀：水平轻轻转动培养皿，使菌液、培养基充分混匀铺平，待平板完全冷凝后，将平板倒置于恒温培养箱 30°C 培养，3-5 天后观察结果。

(四) 酵母菌的分离

(1) 制备土壤稀释液

称取葡萄皮 1g，放入装有 9mL 无菌水的离心管中，振荡 5-10min，即为稀释

10^{-1} 的悬液，在此基础上再稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 。

(2) 倾注法分离

- 以无菌操作法分别吸取 10^{-3} 、 10^{-4} 稀释液 0.1mL，加在空培养皿中
- 倒入马铃薯固体培养基（培养基中已加入氯霉素）
- 混匀：水平轻轻转动培养皿，使菌液、培养基充分混匀铺平，待平板完全冷凝后，将平板倒置于恒温培养箱 30°C 培养，2-3 天后观察结果。

(五) 涂布法分离土壤中微生物

- 以无菌操作法分别吸取 10^{-3} 、 10^{-4} 稀释液 0.1mL，加入到已制备好的 4 种培养基平板中。
- 用涂布棒将稀释液在培养基上充分混匀铺平，倒置于恒温箱中 30°C 培养，一段时间后观察结果。

注意事项

- 在接种时，需要在酒精灯旁操作，以维持一个相对无菌的环境。接种环与试管口不得任意放在桌上或与其他物品相接触。
- 平板或斜面的划线需要迅速、轻捷，不要划破培养基。
- 接种完毕后将接种环抽出，灼烧一下管口，塞上硅胶塞，塞硅胶塞时请勿用试管口去迎硅胶塞，以免试管在流动空气中纳入不洁空气。
- 所有的培养器皿均需要严格灭菌。
- 菌落是由单个或少数细胞在固体培养基表面或里面生长繁殖所形成的肉眼可见的子细胞群体。菌落形态会因菌种不同或菌种相同但所用的培养基、培养温度、pH 值和时间等条件不同而存在不同程度的差异。若所用的培养基、培养温度和时间条件相同，则同一种菌所形成的菌落形态具有相对的稳定性和统一性。
- 纯培养的确立除了观察其菌落特征外，还要结合显微镜检测个体形态特征后才能决定，有些微生物的纯培养要经过一系列的分离与纯化过程和多样性特征鉴定才能确定。

思考题

- 1、分析实验结果
- 2、阐述涂布法和浇注法各自的优缺点。
- 3、根据哪些菌落特征可区分细菌、放线菌、霉菌和酵母菌？