

菌种的筛选及甘草抑菌性的测定

一、实验目的

1. 明确培养基配制的原理，掌握配制培养基的一般方法和步骤；
2. 了解灭菌的原理，掌握高压蒸汽灭菌的基本原理及操作方法；
3. 掌握斜面和平板的制备方法，学会微生物无菌接种技术；
4. 观察细菌的培养特征，了解细菌在培养基上的生长状况。
5. 学会抑菌圈实验方法，掌握基础的抑菌活性测定。

二、实验原理

1. 培养基

培养基是将微生物生长繁殖所需要的各种营养物质，用人工的方法配制而成的用于培养微生物的营养基质。培养基种类很多，不同的微生物所需培养基不同。就培养基中营养物质的来源可分为天然培养基、合成培养基和半合成培养基。按培养基特殊用途可分加富培养基，选择培养基、鉴别培养基。按培养基制成后的物理状态可分为固体培养基，液体培养基和半固体培养基。固体培养基是在液体培养基中加入 1.5 %-2.0 %琼脂作凝固剂；半固体培养基则加入 0.5 %-0.8 %的琼脂。一般培养基除含有大量水分外还含有碳素、氮素、无机盐类和维生素等。此外，由于微生物生长繁殖必须在最适的酸碱度范围内，才能表现出最大的生命活力，因此应根据不同种类的微生物将培养基调节到一定的 pH 值范围。

由于微生物营养类型复杂，不同微生物对营养物质的需求也不一样，因此，微生物培养基种类繁多。例如，按培养的微生物不同，培养基可分为牛肉膏蛋白胨水培养基（培养细菌）、高氏一号合成培养基（培养放线菌）和马丁氏培养基（培养霉菌）、麦芽汁培养基（培养酵母菌）等。

2. 灭菌

在微生物实验中，需要进行纯培养，不能有任何杂菌污染，因此必须对所用器材、培养基和工作场所进行灭菌和消毒。灭菌是指杀死或消灭一定环境中的所有微生物，包括营养体、孢子和芽孢。灭菌的方法很多，可分为物理方法与化学方法两大类。物理方法包括湿热灭菌、干热灭菌、紫外线灭菌、过滤除菌等；化学方法主要是利用化学药品对接种室空间、用具和其它物体表面进行灭菌与消毒。消毒一般是指消灭有害微生物的营养体和病原菌。

（1）干热灭菌法

干热灭菌是在电热干燥箱内利用高温干燥空气（160℃~170℃）进行灭菌，它是利用高温使微生物细胞内的蛋白质凝固变性而达到灭菌目的。此法适用于玻璃器皿如移液管、试管和培养皿的灭菌。培养基、橡胶制品、塑料制品不能采用干热灭菌。细胞内的蛋白质凝固性与其本身的含水量有关，在菌体受热时，当环境和细胞内含水量越大，则蛋白质凝固就越快，反之含水量越小，凝固越慢。因此，与湿热灭菌相比，干热灭菌所需温度高（160℃~170℃），时间长（1~2h）。但干热灭菌温度不能超过 180℃，否则，包器皿的纸或棉塞就会烧焦，甚至引起燃烧。

（2）过滤除菌

有些物质，如抗生素、血清、维生素、糖溶液等采用加热灭菌法时，容易受热分解而被破坏，因而要采用过滤除菌法。过滤除菌是通过机械作用滤去液体或气体中细菌的方法，该方法最大的优点是不破坏溶液中各种物质的化学成分。过滤除菌法除实验室用于溶液、试剂的除菌外，在微生物工作中使用的净化工作台也是根据过滤除菌的原理设计的，可根据不同的需要来选用不同的滤器和滤板材料。

（3）高压蒸汽灭菌

高压蒸汽灭菌是将物品放在密闭的高压蒸汽灭菌锅内，在一定的压力下保持 15~30 分钟进行灭菌。此法适用于培养基、无菌水、工作服等物品的灭菌，也可用于玻璃器皿的灭菌。

将待灭菌的物品放在一个密闭的加压灭菌锅内，通过加热，使灭菌锅夹套间的水沸腾而产生蒸汽。待水蒸汽急剧地将锅内的冷空气从排气阀中排尽，然后关闭排气阀，继续加热，此时由于蒸汽不能溢出，而增加了灭菌锅内的压力，从而使沸点增高，获得高于 100℃ 的温度，导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。

在相同的温度下，湿热灭菌的效果好于干热灭菌。有三点原因：在湿热灭菌中菌体吸收水分，蛋白质容易凝固变性，蛋白质随着含水量的增加，所需凝固温度降低；湿热灭菌中蒸汽的穿透力比干燥空气大；蒸汽在被灭菌物体表面凝结，释放出大量的汽化潜热，能迅速提高灭菌物体表面的温度，从而增加灭菌效力。

实验室常用的灭菌锅有非自控手提式高压蒸汽灭菌锅和自控式灭菌锅，其结构和工作原理是相同的。本实验介绍的是非自控手提式高压蒸汽灭菌锅，自控式灭菌锅的使用可参考厂家说明书。具体操作步骤如下：

加水：首先将内层锅取出，再向外层锅内加入适量的水，使水面没过加热蛇管，与三角搁架相平为宜。切勿忘记检查水位，加水量过少，灭菌锅会发生烧干引起炸裂事故。

装料：放回内层锅，并装入待灭菌的物品。注意不要装得太挤，以免妨碍蒸汽流通而影响灭菌效果。装有培养基的容器放置时要防止液体溢出，三角瓶与试管口端均不要与桶壁接触，以免冷凝水淋湿包扎的纸而透入棉塞。

加盖：将盖上与排气孔相连的排气软管插入内层锅的排气槽内，摆正锅盖，对齐螺口，然后以对称方式同时旋紧相对的两个螺栓，使螺栓松紧一致，勿使漏气，并打开排气阀。

排气：打开电源加热灭菌锅，将水煮沸，使锅内的冷空气和水蒸汽一起从排气孔中排出。一般认为当排出的气流很强并有嘘声时，表明锅内的空气已排尽，沸腾后约需 5 分钟。

升压：冷空气完全排尽后，关闭排气阀，继续加热，锅内压力开始上升。

保压：当压力表指针达到所需压力时，控制电源，开始计时并维持压力至所需的时间。如本实验中采用 0.1Mpa，121.5℃，20 分钟灭菌。

灭菌的主要因素是温度而不是压力，因此锅内的冷空气必须完全排尽后，才能关闭排气阀，维持所需压力。

降压：达到灭菌所需的时间后，切断电源，让灭菌锅温度自然下降，当压力表的压力降至“0”后，方可打开排气阀，排尽余下的蒸汽，旋松螺栓，打开锅盖，取出灭菌物品，倒掉锅内剩水。压力一定要降到“0”后，才能打开排气阀，开盖取物。否则就会因锅内压力突然下降，使容器内的培养基或试剂由于内外压力不平衡而冲出容器口，造成瓶口被污染，甚至灼伤操作者。

无菌检查：将已灭菌的培养基放入 37℃ 恒温培养箱培养 24h，检查无杂菌生长后，即可使用。

3. 无菌接种技术

无菌接种技术是微生物研究中最基本的操作技术之一。所谓接种即把微生物

纯菌种在无菌条件下移植到适宜的培养基上，经过培养获得纯培养物。因此，接种一般要求在无菌室、超净工作台或实验室火焰旁严格按无菌操作进行。根据实验目的的不同，采用的接种方法也不同，一般可分为作斜面接种、平板接种、液体接种、穿刺接种等。

4. 细菌培养特征观察

培养特征是指微生物的培养基上所表现的群体形态和生长情况。在一定的培养条件下，不同的微生物培养特征各不相同，这是鉴别各种微生物的依据之一。

正确掌握培养基的配制方法是从事微生物学实验工作的重要基础。由于微生物种类及代谢类型的多样性，因而用于培养微生物的培养基的种类也很多，它们的配方及配制方法各有差异。但一般培养基的配制程序却大致相同。例如器皿的准备，培养基的配制与分装，棉塞的制作，培养基的灭菌，斜面与平板的制作以及培养基的无菌检查等基本环节大致相同。

5. 抑菌活性测定

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)也称“金葡菌”，隶属于葡萄球菌属，是革兰氏阳性菌代表，为一种常见的食源性致病微生物。大肠杆菌 (*Escherichia coli*)，又叫大肠埃希氏菌，是革兰氏阴性菌代表。两种菌均可在牛肉膏琼脂培养基上涂布培育，肉眼可见金黄色葡萄球菌形态为球形，在培养基中菌落特征表现为圆形，菌落表面光滑，颜色为无色或者金黄色，大肠杆菌是短杆菌，两端呈钝圆形，两者菌状不同，在同一平板上可清晰分辨。

甘草是豆科植物，属多年生草本，含量较高的有效成分主要分为皂苷类、黄酮类、异黄酮类、查耳酮类和香豆素类化合物，表现为抗菌、抗感染、抗溃疡及抗肿瘤等活性。甘草对革兰氏阳性菌有较强的抑菌性，对革兰氏阴性菌抑制效果弱。

三、 实验材料

1. 试剂：牛肉膏、蛋白胨、酵母粉、氯化钠、琼脂粉、1mol/L 的 NaOH 和 HCl 溶液、去离子水。甘草，购于康美药业股份有限公司，产自内蒙古；
2. 仪器及玻璃器皿：天平（0.01g）、高压蒸汽灭菌锅、培养箱、电热恒温水浴锅、超净工作台、烘箱、酒精灯、玻棒、试管、烧杯、量筒、三角烧瓶、培养皿、玻璃漏斗、接种针等。
3. 其他物品：药匙、称量纸、pH 试纸、记号笔、硅胶塞、牛皮纸、纱布、棉绳，

75%酒精棉球。

- 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA, ATCC6538), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, EC, ATCC8739), 均购自 Microbiologics 公司。

四、实验方法

(一) 玻璃器皿的洗涤和包装

1. 玻璃器皿的洗涤

玻璃器皿在使用前必须洗刷干净。将三角瓶、试管、培养皿、量筒等浸入含有洗涤剂的水中。用毛刷刷洗, 然后用自来水及蒸馏水冲净。移液管先用含有洗涤剂的水浸泡, 再用自来水及蒸馏水冲洗。洗刷干净的玻璃器皿置于烘箱中烘干后备用。

2. 灭菌前玻璃器皿的包装

培养皿的包扎: 培养皿由一盖一底组成一套, 可用牛皮纸或报纸将几套培养皿包成一包, 或者将几套培养皿直接置于特制的铁皮圆筒内, 加盖灭菌。包装后的培养皿须经灭菌之后才能使用。

(二) 培养基的配制

- 肉汤培养基配方: 蛋白胨 2.0g, 牛肉膏 2.0g, 酵母粉 1.2g, 氯化钠 1.0g, 4g 琼脂粉, 加自来水 200mL, 搅拌均匀, 盖好硅胶塞。

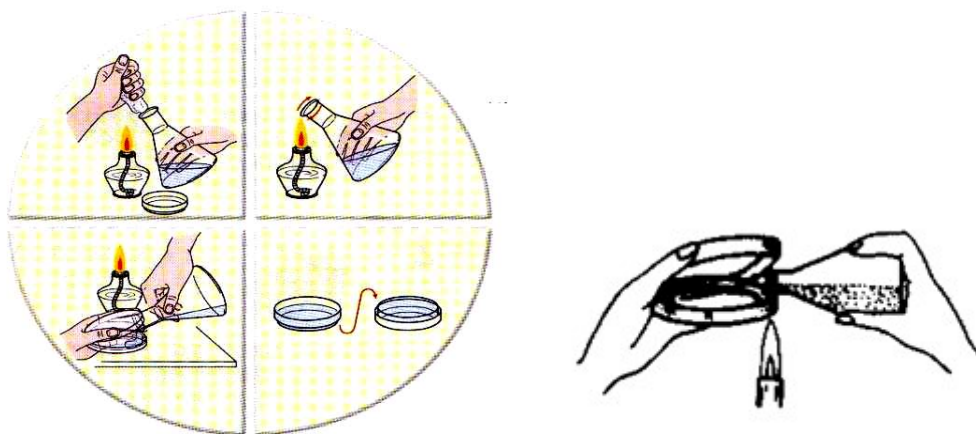
(三) 培养基的灭菌

将上述培养基和培养皿置于高压蒸汽灭菌锅内, 在 0.103MPa、121℃下灭菌 15-30min。

(四) 平板的制作

将装在三角瓶或试管中已灭菌的琼脂培养基融化后, 待冷至 50℃左右倾入无菌培养皿中。温度过高时, 皿盖上的冷凝水太多; 温度低于 50℃, 培养基易于凝固而无法制作平板。

平板的制作应在火旁进行, 左手拿培养皿, 右手拿三角瓶的底部或试管, 左手同时用小指和手掌将棉塞打开, 灼烧瓶口, 用左手大拇指将培养皿盖打开一缝, 至瓶口正好伸入, 倾入 10~15mL 培养基, 迅速盖好皿盖, 置于桌上, 轻轻旋转平皿, 使培养基均匀分布于整个平皿中, 冷凝后即成平板。



（五）平板划线

1. 贴标签：接种前在皿盖贴上标签，注明菌名、接种日起等；
2. 点燃酒精灯
3. 接种环灭菌：用火焰将接种环烧红，然后将接种环来回通过火焰数次；
4. 拔管塞：用小指、无名指和手掌拔下试管塞，并夹在手中。试管口缓缓过火灭菌，切勿烧得过烫；

5. 取菌种：将烧过的接种环伸入菌种管中，先将环接触一下没有长菌的培养基部分，使其冷却，再轻轻沾取少量菌体或孢子，然后将接种环移除菌种管；

注意：不要使接种环的部分碰到管壁，取出后不可使接种环通过火焰。

6. 接种：在近火焰处，左手拿皿底，右手拿接种环，挑取菌悬液一环在平板上划过，划线完毕后，盖上皿盖，倒置于培养箱下 28 度培养，24 小时后观察生长情况。

注意：从第 2 次开始，接种环没接触平板之前需灼烧，并待凉后再操作；控制好适当的力道，不要将琼脂面划破。

7. 辨认菌落：通过平板划线，可在相应的平板上获得各种微生物的菌落，观察这些菌落的形态特征，并记录结果。

（六）甘草提取物的制备

甘草药材在 40℃ 烘干，过 60 目筛子。称取 20 g 中草药粉（过 40 目筛），按料液比为 1:8（g/ml）加入甲醇，经 55℃、1.5 h 水浴回流提取，趁热过滤，再按相同料液比加入提取剂，在 100 Hz、55℃ 条件下超声 20 min，过滤合并两次滤液，旋蒸浓缩冷冻干燥，得到甘草提取物，置于 4℃ 冰箱中备用。

（七）菌悬液的制备

取保存于-80℃的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌菌株适量，均匀涂布在胰蛋白胨大豆琼脂固体培养基上，在 35℃下培养 24 h，待平板上长出淡黄色链球菌和乳白色大肠杆菌，即得活化菌株。取少量已活化的金黄色普通球菌和大肠杆菌于已灭菌的装有生理盐水的试管中，充分混匀，制成菌悬液，其浓度控制在 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL，备用。

（八）抑菌活性测定

采用牛津杯法测定提取物的抑菌活性。取金黄色普通球菌和大肠杆菌菌悬液分别加至已灭菌的 45℃左右的胰蛋白胨大豆琼脂固体培养基中并摇匀，使最终菌浓度约为 10^6 CFU/mL，将培养基倒入培养皿中，在超净台中冷却至完全凝固，放置适量直径为 9 mm 的牛津杯，往里加入不同浓度（0 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L、2 g/L）的甘草甲醇溶液 200 μ L，在 35℃下培养 24 h，用十字交叉法测定抑菌圈直径，以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示数据。以溶剂为空白对照，重复 2 次平行实验。

五、实验结果

1. 观察菌落的生长情况及菌苔形态；
2. 平板划线培养后得到了多少单菌落？试根据菌落的形态分析其可能的分类。
3. 甘草提取液的抑菌效果和原因分析

六、注意事项

- 1) 活化和涂布平板时要均匀，确保菌株分散适宜，同时忌用力过大戳破固体平板，影响菌株生长和分布；
- 2) 将金黄色普通球菌和大肠杆菌菌悬液加至已灭菌的固体培养基中时要注意温度，以防培养基温度过高菌株部分失活，影响菌悬液浓度精确性；
- 3) 空白对照组与样本实验组需在同一块平板上进行试验，保证培养环境一致性；
- 4) 将待测样品注入牛津杯时操作需小心谨慎，勿将样本溅出，影响抑菌圈大小。

七、思考题

1. 简述移液管和培养皿的包扎注意事项。
2. 简述配制培养基的基本步骤及注意事项。
3. 灭菌在微生物实验操作中有何重要意义？如何灭菌？
4. 平板划线时，为什么每次都需将接种环上的剩余物烧掉？

5. 为什么要将培养皿倒置培养?
6. 微生物抑菌活性测定有哪几种方法?