

实验5-7 土壤微生物的稀释 分离与计数

实验1：培养基的配制

实验2：从土壤中稀释分离微生物

实验3：结果观察

一、分离微生物纯培养的背景知识

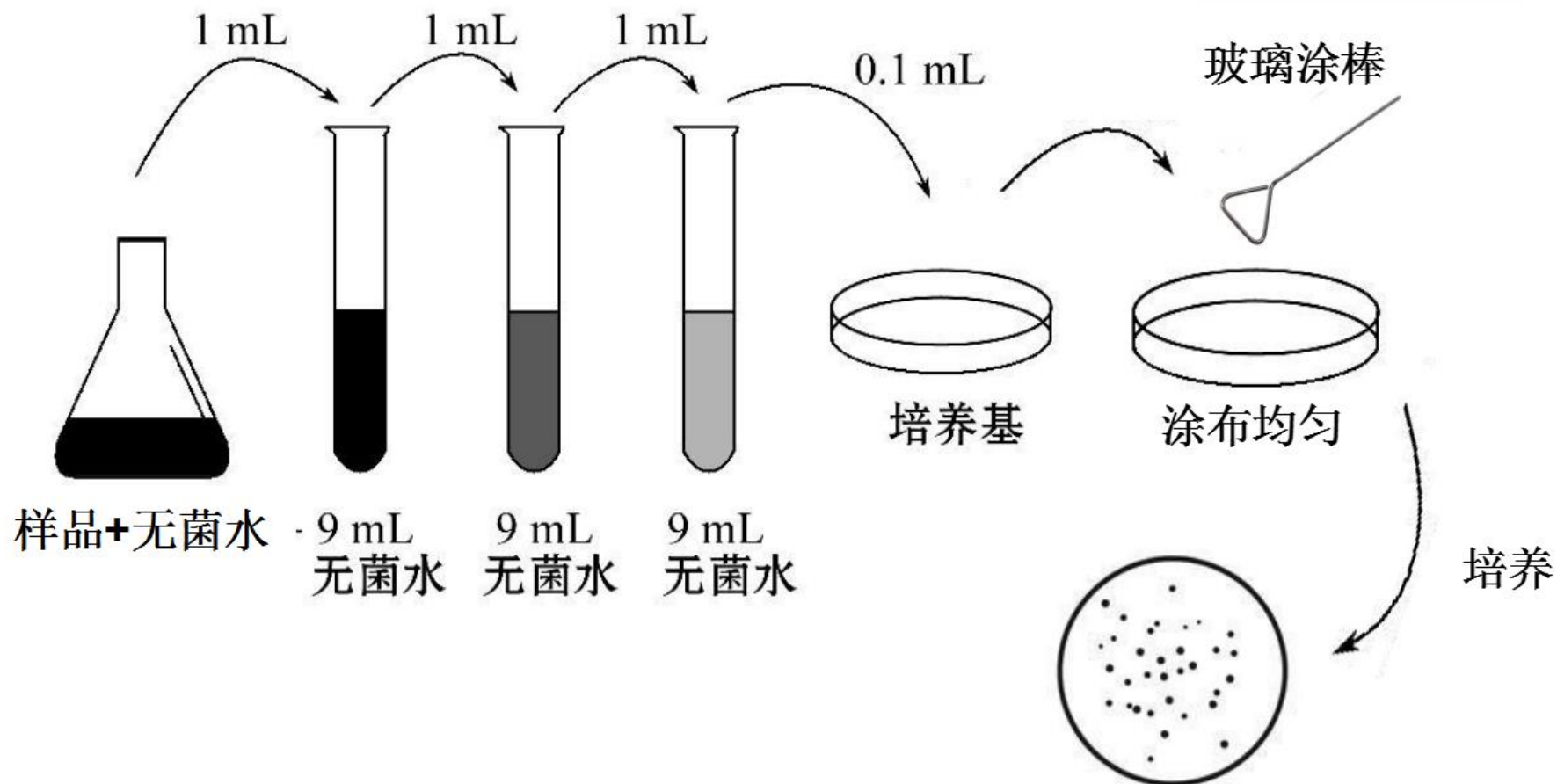
1、微生物纯培养的概念：

- 自然环境中的微生物一般混杂群居；
- 要对微生物进行科学研究，则要从自然混居的多种微生物中把要研究的物种分离出来，单独考察；
- 微生物形体微小，需要特殊的分离技术才能得到纯培养。

纯培养： 在实验条件下，从一个细胞或一种细胞群繁殖得到的后代称为纯培养（pure culture）。

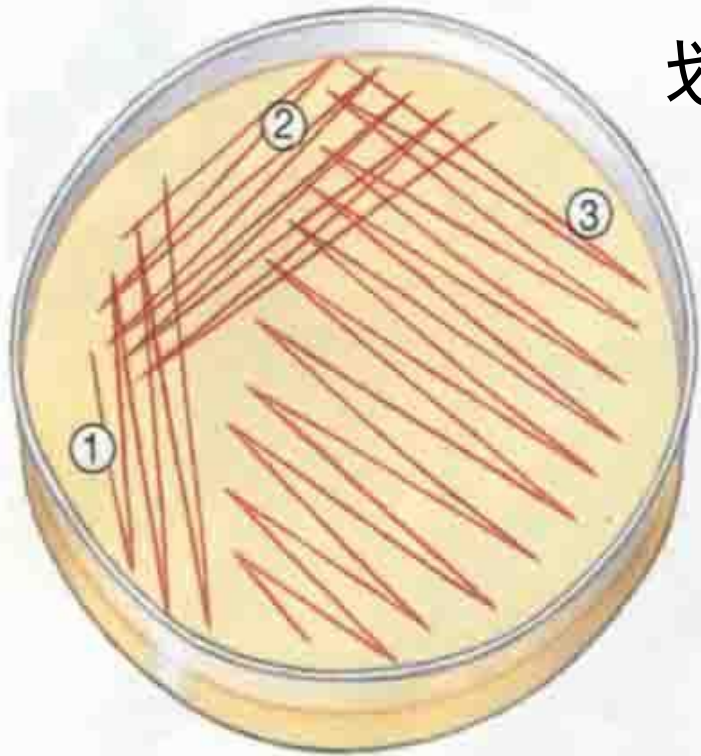
2、获得微生物纯培养的方法

➤ 稀释涂平板法分离:



平板划线分离:

划线分离



- 接种环挑取要分离的样品→在固体培养基表面划线 →
→ 多次涂划后, 将微生物稀释成单个细胞 → 培养 →
→ 挑取单个细胞长成的菌落即为纯培养.

根据所要分离的菌种特性选用合适培养基：

真菌：马丁-孟加拉红培养基（加链霉素抑制细菌生长，加孟加拉红抑制霉菌菌丝的延长，也能抑制细菌的生长）；

放线菌：高氏1号（加入10%的酚，抑制细菌和真菌的生长）

细菌：牛肉膏蛋白胨

本次实验主要从土壤中稀释分离细菌和真菌

实验五：配制培养基、准备实验材料

全班分为8个组，每组4-5人，准备如下物品：

一、培养基：

1、2、3、4组：牛肉膏蛋白胨培养基 (固体)， 每组1000 mL。

5、6、7、8组：马丁孟加拉红培养基 (固体) ， 每组1000 mL。

牛肉膏蛋白胨培养基：

牛肉膏： 5.0 g

蛋白胨： 10.0 g

NaCl： 10.0 g

调pH至7.2-7.4，

最后定容至1L

琼脂粉含量1.5%

马丁氏培养基：

葡萄糖： 10.0 g

蛋白胨： 5.0 g

磷酸二氢钾： 1.0 g

硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) : 0.5 g

孟加拉红母液： 10 mL

不用调pH，加水定容至1L

配制方法:

(1) 称药品 (先称无机盐, 后称有机物)于瓷量杯中, 加自来水约900 mL;

(2) 搅拌溶解(可稍微加热)后, 牛肉膏培养基调pH至7.2-7.4 ;

马丁氏培养基每杯加孟加拉红 10 mL(此次不加链霉素), 不调pH, 最后统一定容至1000 mL。

(3) 琼脂粉先称至各个三角瓶中, 3克 / 瓶 (1.5%) 。

(4) 用量筒取液体培养基灌入三角瓶, 200mL / 瓶, 5瓶 / 组。塞瓶塞, 用废书页包瓶口。

二、灭菌水：

- 向250mL大蓝盖瓶加自来水90mL，并加玻璃珠8-10粒，1瓶 / 组。
 - 向80 mL小瓶加水 50mL，不加玻璃珠，1 瓶 / 组。
- (注意：瓶盖都不要旋得太紧)

三、塑料耗材：

- 每组用朔料袋装 1.5mL塑料离心管12-14只，封口机封口。
- 每组用塑料盒装 1mL 塑料吸头 (1mL tip) 1盒, 橡皮筋捆扎。

四、培养皿：

- 每人用报纸包 1筒培养皿，11皿 / 筒。

以上物品放入大铁丝筐，送至 1楼东侧A120灭菌室。

提醒：记得下次课自带土样，每组10-20g
微生物较多的土壤：菜园或树林中靠近植物根系、背阴、潮湿的土壤，去掉表层土1-2 cm，去掉石块等杂质。

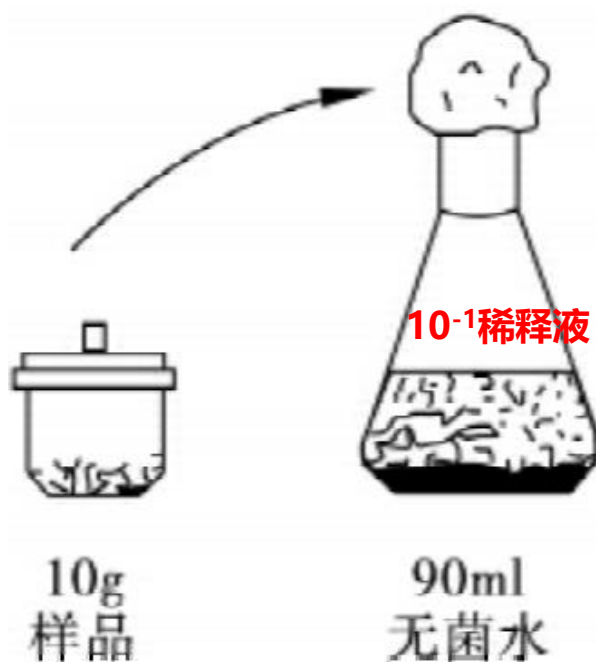
实验六： 从土壤等环境中稀释分离微生物

一、熔化固体培养基，倒平板：

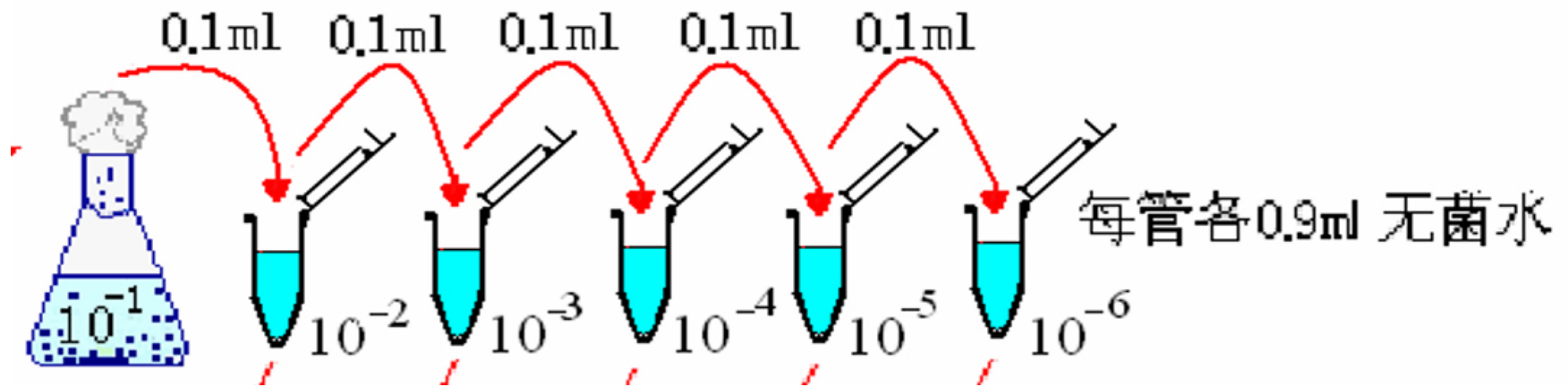
- 2个同学1组，其中1人取牛肉膏1瓶，1人取马丁孟加拉红1瓶，微波炉内熔化。
- 待培养基冷却至约55℃（以不烫手为宜），马丁孟加拉红培养基每瓶加入链霉素2 mL，牛肉膏蛋白胨不需要加链霉素，每瓶倒11个平皿。

二、土壤悬液制备

每大组(4人)准备1瓶土壤悬液：称10 g土壤放入带玻璃珠的90 mL 瓶装无菌水中，振荡器振荡15 min，使土样分散。

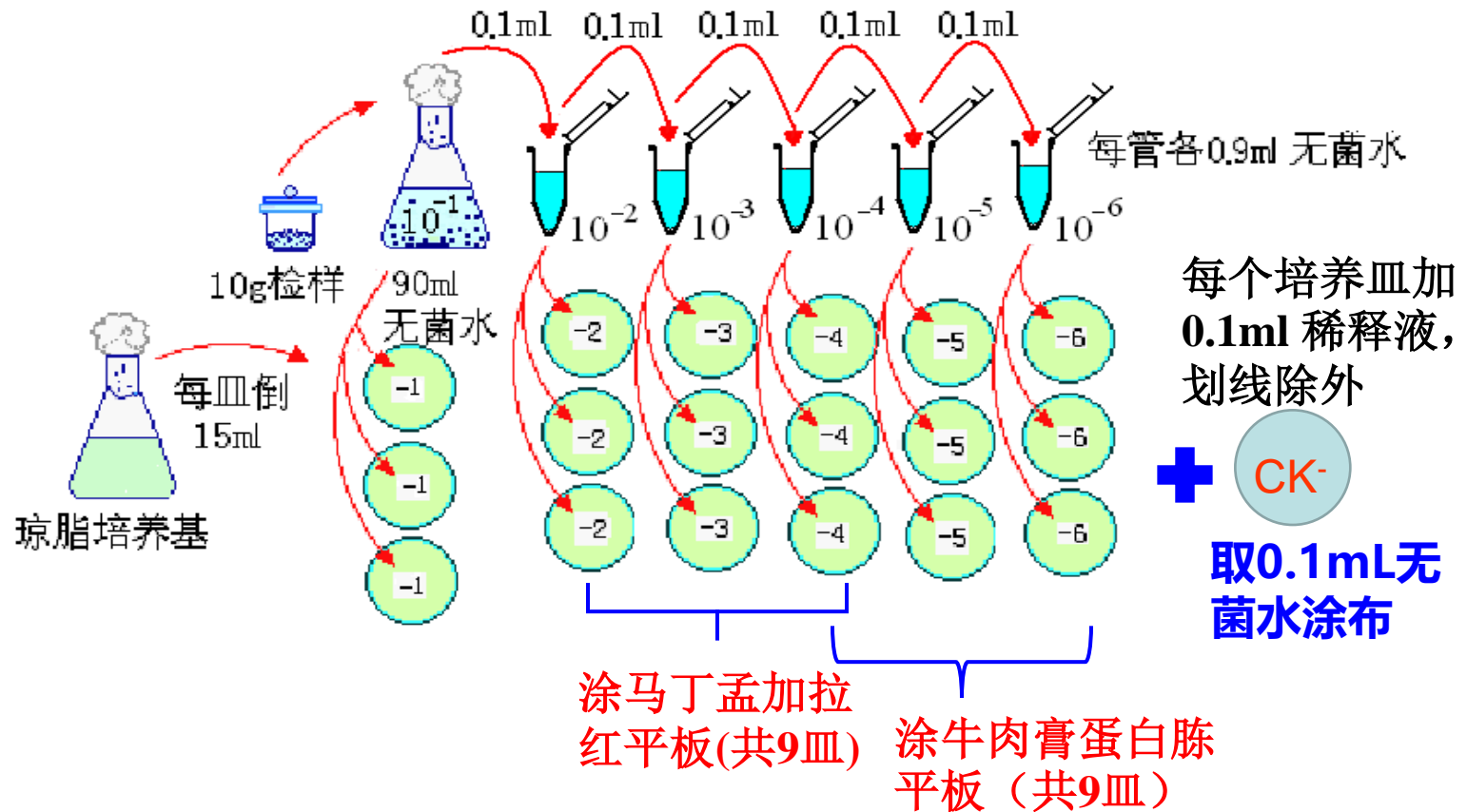


三、悬液稀释：每2个同学做一套土样的系列稀释液



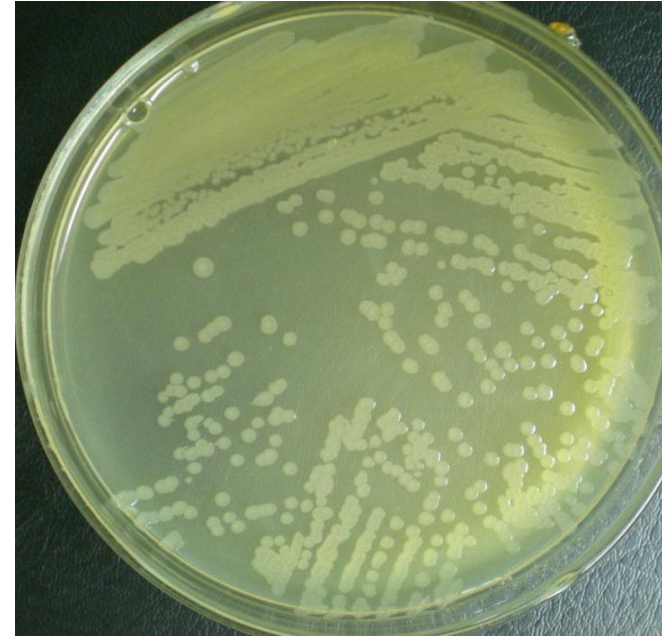
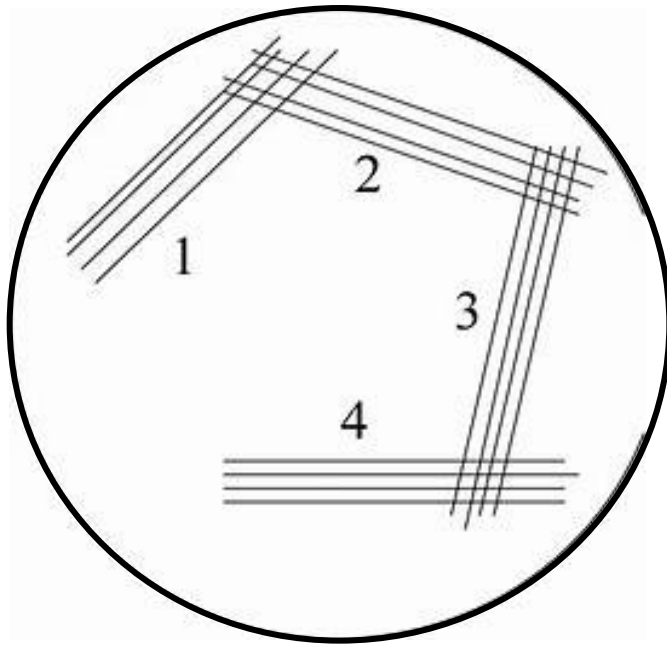
四、悬液涂布

每2个同学按图示取0.1 mL菌悬液于相应培养皿内，每稀释度3皿，3个稀释度，共9皿。另取一平皿取0.1mL无菌水涂布，作为负对照，再取一平皿作划线分离（ $3 \times 3 + 1 + 1 = 11$ 皿）



接种环取一环菌液作划线分离

划线分离微生物示意图



注意：划线分离不需要用移液器吸菌液，而是用接种环取一环 10^{-1} 菌液如上图所示划线（马丁氏和牛肉膏均一样）。

五、培养：

- 每个同学将培养皿用报纸包好（培养皿方向一致），写上班级和姓名，皿底朝上，放入铁丝筐，28℃培养，下周看结果。每2个同学共用1组数据。

注意事项:

- 1、实验结束后，请把涂布好的**培养皿用报纸包好**，倒置放在教室后面的推车上；
- 2、请把土壤悬液倒在过滤筛上，再将固体残渣倒入垃圾桶，最后将大小**蓝盖瓶**洗干净，放回105教室后面的柜子；
- 3、**三角瓶**洗干净放回教室过道的铁丝框中，**瓶塞**放在塑料筐中；
- 4、**蓝色枪头盒**放回柜子（A105在教室中间，A107在教室后面）
- 5、**移液器**调至1000毫升。
- 6、做卫生的同学将台面、边台、水池等地清理干净，地面打扫干净，登记完即可离开。

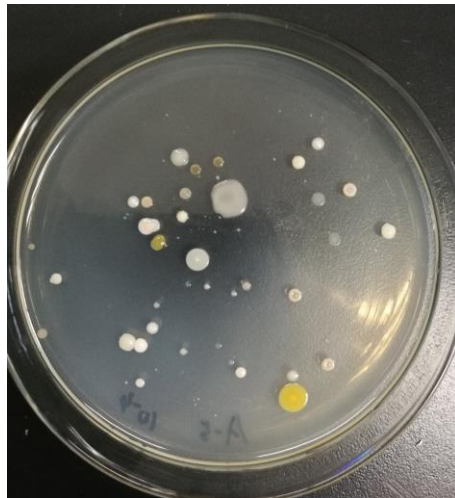
实验七 结果观察

1, 我所涂平板种类: _____ (牛肉膏或马丁氏)

2, 计数: 牛肉膏平板取单菌落数目在30~300个左右的稀释度来计数, 马丁氏平板取单菌落数目在10~100个左右的稀释度来计数。

我所计数的平板稀释度是: _____, 单菌落目: __、__、__。

3, 计算: 活菌数目/每克土 = $\frac{A}{0.1 \times \text{稀释倍数}}$ (计算过程)
= _____ cfu/每克土 (科学计数法表示)



实验报告统一格式

1. 实验目的
2. 实验原理
3. 实验材料
4. 实验方法和步骤
5. 实验结果和分析

三次实验写成一个综合性的实验报告。