

环境微生物应用实验指导

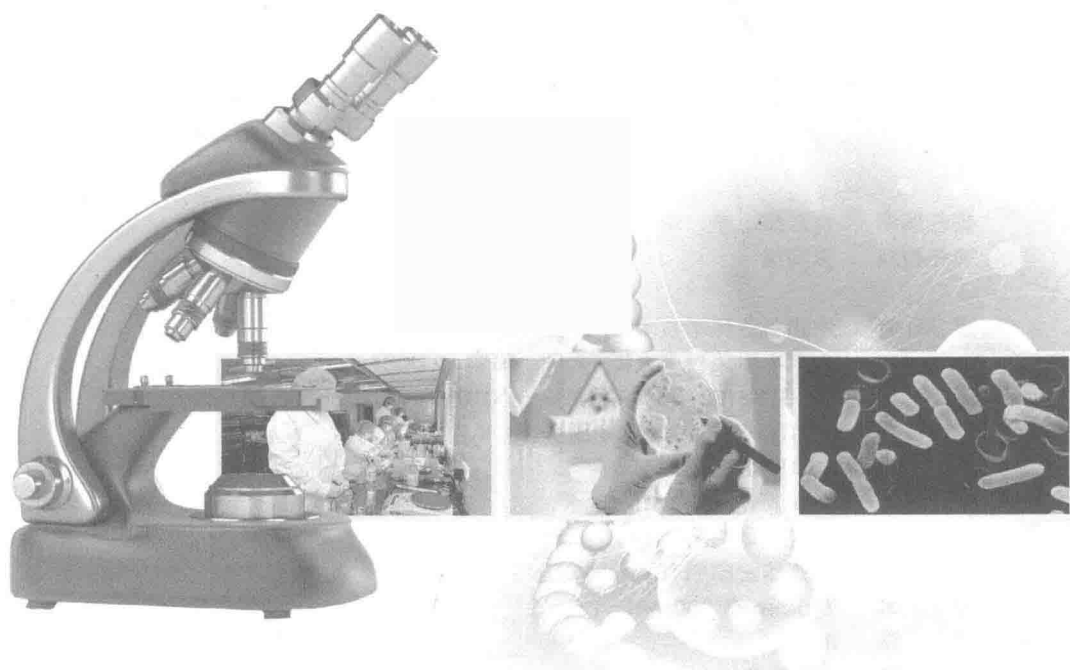
刘萍 谢文军 夏江宝 主编



中国农业科学技术出版社

环境微生物应用实验指导

刘萍 谢文军 夏江宝 主编



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

环境微生物应用实验指导 / 刘萍, 谢文军, 夏江宝主编. —北京:
中国农业科学技术出版社, 2017. 12
ISBN 978-7-5116-3355-2

I. ①环… II. ①刘…②谢…③夏… III. ①环境微生物学-实验-
高等学校-教学参考资料 IV. ①X172-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 271491 号

责任编辑 崔改泵 李 华
责任校对 贾海霞

出版者 中国农业科学技术出版社
北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081
电 话 (010) 82109708 (编辑室) (010) 82109702 (发行部)
(010) 82109709 (读者服务部)
传 真 (010) 82106650
网 址 <http://www.castp.cn>
经销者 各地新华书店
印刷者 北京建宏印刷有限公司
开 本 710mm×1 000mm 1/16
印 张 8
字 数 140 千字
版 次 2017 年 12 月第 1 版 2017 年 12 月第 1 次印刷
定 价 36.00 元

— 版权所有 · 翻印必究 —

《环境微生物应用实验指导》

编 委 会

主 编：刘 萍 谢文军 夏江宝

副 主 编：李甲亮 王 君

参编人员：王宝琴 张 琼

前 言

环境微生物是存在于土壤、水体及大气中各类微生物的总称，其中某些微生物由于具有某些独特性能，可利用它们改善人类环境，包括有害物质的降解、重金属的富集、水污染治理及污染土壤的修复等，这一类微生物我们可称为环境资源微生物。环境资源微生物是一个跨界的多类生物集群，包括原核生物界的细菌、放线菌、蓝细菌等，原生物界的原生动物和藻类，真菌界的真菌，动物界的微型动物，以及非细胞形态的病毒。目前，环境资源微生物的研究范围主要集中在原核生物界、原生生物界及真菌界。

环境资源微生物是生态系统中重要的组成成员，在生物降解与转化过程中发挥着关键作用。从对环境的影响来看，主要体现在对有机物质的生物降解，尤其是对环境中的污染物质，微生物占有着不可或缺的地位。环境污染物能严重造成土壤及水体损失，这些污染物从进入环境的那一瞬间开始，即在空间上不断扩散、转移、沉积，通过吸附、氧化、水解、电离等物理化学作用在形态结构上不断发生变化，而这些物质的降解往往与环境中的微生物存在某种联系，尤其是有机污染物质的生物降解更离不开微生物的参与，甚至某些内生细菌与植物共同作用彻底降解土壤中的污染物。微生物修复具有高效、成本低、二次污染风险度低等特点，越来越受到人们的重视。如何从环境中筛选分离资源微生物，进而研究这些微生物的基本功能是本书编写的初衷。

本书在编写过程中，围绕微生物培养基的制作、不同生境资源微生物的分离筛选技术、微生物的形态观察、生长控制及菌种保藏等几个内容展开，主要针对环境工程、环境科学、生态学及生物学专业的学生编写而成，除了设置微生物操作技能的基础实验，还有研究性实验，重在培养学生对环境资源微生物分离筛选的操作技能，继而提高大学生科研素养。

编 者

2017年9月

目 录

第一章 纯培养技术	(1)
实验 1 培养基的配制、分装和灭菌	(1)
实验 2 鉴别性培养基的配制	(6)
实验 3 选择性培养基的配制	(9)
实验 4 器皿的干热灭菌技术	(11)
实验 5 微生物接种技术简介	(12)
第二章 微生物纯种分离技术与应用	(17)
实验 6 平板接种法纯种分离技术基本操作	(17)
实验 7 真菌单孢分离技术	(20)
实验 8 真菌菌丝尖端切割分离法	(23)
实验 9 土壤细菌的分离、培养与计数	(24)
实验 10 平板划线法分离菌种	(27)
实验 11 水中细菌总数的测定	(29)
实验 12 环境中微生物的检测及菌落观察	(32)
实验 13 土壤中解磷细菌的分离	(34)
实验 14 高效脱酚菌的分离筛选	(36)
实验 15 溶藻细菌的分离与筛选	(38)
实验 16 好氧纤维素降解细菌的分离与纯化	(41)
实验 17 石油烃降解菌的分离、筛选与驯化	(43)
实验 18 蓝藻的分离、培养与保存	(45)
实验 19 蘑菇菌种分离与培养技术	(47)
实验 20 拮抗性放线菌的筛选法	(49)
实验 21 高活性絮凝菌的分离及复合菌种选育	(53)
实验 22 聚磷菌的选育	(55)
实验 23 外生菌根真菌的分离与纯化	(58)
实验 24 丁醇发酵产芽孢细菌初选菌株的分离筛选	(59)
第三章 微生物形态结构观察	(63)
实验 25 细菌革兰氏染色技术	(63)

实验 26	细菌芽孢、荚膜染色与观察	(65)
实验 27	细菌鞭毛染色法	(67)
实验 28	细菌异染粒染色技术	(70)
实验 29	放线菌的插片、搭片培养及观察	(71)
实验 30	真菌载片培养和形态观察	(74)
第四章	微生物生长测定及控制	(76)
实验 31	平板菌落计数法	(76)
实验 32	显微镜直接计数法	(79)
实验 33	大肠杆菌细胞大小的测定	(81)
实验 34	光密度法测定大肠杆菌生长曲线	(84)
实验 35	紫外线的杀菌作用	(86)
实验 36	紫外线对细菌的诱变作用	(88)
实验 37	温度、pH 值、盐度对细菌生长的影响	(91)
实验 38	微生物与氧关系的检测	(93)
第五章	菌种保藏技术	(96)
实验 39	常用的简易保藏法	(96)
实验 40	液氮超低温保藏法	(99)
实验 41	冷冻真空干燥保藏法	(101)
附录		(104)
附录 1	常用培养基成分	(104)
附录 2	厌氧环境微生物分离方法简介	(109)
附录 3	细菌分类鉴定中常用的生理生化实验	(110)
附录 4	微生物常用玻璃器皿洗涤	(117)
参考文献		(119)

第一章 纯培养技术

实验 1 培养基的配制、分装和灭菌

【实验目的】

1. 了解培养基种类及用途。
2. 学习和掌握通用培养基配制的一般步骤。
3. 掌握高压蒸汽灭菌技术。

【实验内容】

1. 牛肉膏蛋白胨培养基的配制。
2. 利用高压灭菌锅对培养基进行灭菌。

【概述】

培养基是培养微生物生长繁殖、累积代谢产物的混合养料。在营养要素水平上包括碳源、氮源、能源、生长因子、无机盐和水。细菌通用培养基常用牛肉膏蛋白胨培养基，放线菌则采用高氏一号培养基，真菌可采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基。各类培养基配制程序大致相同，首先按照配方称取药品，用少量的水溶解各组分，待完全溶解后补足水至所需量，最后调节 pH 值。然后将培养基分装于三角瓶或试管内，灭菌后确定无杂菌后收藏备用。其相应固体培养基通常添加琼脂作为凝固剂，添加量为 1.5%~2.0%。厌氧菌生长的培养基，在配制时需在培养基中加入适量的还原剂如巯基乙醇、维生素 C 或半胱氨酸等物质，以降低其氧化电位，利于厌氧菌生长。

培养基配制后应及时灭菌，常采用加压蒸汽灭菌法进行灭菌。而对培养基中一些不耐热的组分，通常用滤器进行过滤除菌，但该法无法滤除培养液中的病毒和噬菌体。

【材料和器皿】

1. 试剂

牛肉膏、蛋白胨、NaCl、琼脂、1mol/L NaOH、1mol/L HCl。

2. 器皿

试管、三角瓶、玻璃烧杯、量筒、玻璃棒、牛角匙、漏斗、漏斗架、胶管、止水夹、培养皿、吸管、玻璃棒。

3. 其他

pH 计、棉花、牛皮纸、记号笔、皮筋、纱布、高压蒸汽灭菌锅、电子天平。

【操作步骤】

一、牛肉膏蛋白胨培养基的配制

牛肉膏蛋白胨培养基是进行细菌培养及相关研究的一种通用培养基。其配方如下：牛肉膏 3g、蛋白胨 10g、NaCl 5g、琼脂 15~20g、水 1 000ml，pH 值 7.2~7.4。

1. 称取药品

按配方称取各种药品（琼脂粉除外）放入大烧杯中。牛肉膏可直接置于称量纸上称量，随后放入烧杯中，待加热后牛肉膏与称量纸分离，立即取出纸片即可。药品称取后及时拧紧瓶盖，以防止蛋白胨等试剂吸水变潮。

2. 加热溶解

在烧杯中加入少量自来水，加热，同时用玻璃棒搅拌，待药品完全溶解后再补充水分至所需量。

3. 调节 pH 值

刚配好的牛肉膏蛋白胨培养液呈微酸性，可滴加 1mol/L NaOH 溶液调节，边滴加边搅拌，并随时检测，调节 pH 值 7.2~7.4。注意 pH 值不要调过头，以免反复回调而影响培养基内各离子的浓度。

4. 过滤

液体培养基用滤纸过滤，即可获得清澈透明的液体培养基，以利培养的观察。固体培养基可用 4 层纱布趁热过滤去除杂质。但若所培养微生物无特殊要求，这步可省略。

5. 分装

依据实验目的不同,可将配制好的培养基分装入试管或三角瓶内,如试管一般用于斜面培养,装入三角瓶培养基用于平板制作或液体发酵等。分装时可用漏斗以免培养基沾在管口或瓶口上造成污染。

(1) 分装三角瓶。将上述培养基 150ml 分装于 250ml 三角瓶内,然后每瓶加入琼脂粉 2.25~3g。三角瓶内配培养基的装量以不超过总容量的 $1/2 \sim 3/5$ 为宜。

(2) 分装试管。将融化好琼脂的固体培养基趁热倒入分装漏斗(图 1-1)。分装时左手并排拿数支试管,右手控制弹簧夹按钮,让培养基依次流入各试管,注意培养基尽量不要污染试管口。用于制作斜面培养基时,装量不应超过试管高度(15mm×150mm)的 $1/5$ (装量 3~4ml)。灭菌后制成斜面。半固体培养基(琼脂量在 1%左右)以试管高度的 $1/3$ 为宜,灭菌后垂直待凝。

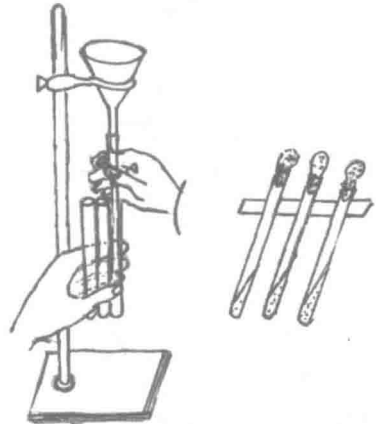


图 1-1 分装试管的装置示意图

6. 加棉塞

试管口和三角瓶口塞上棉塞,主要是防止杂菌侵入和有利通气。棉塞的形状、大小和松紧度要合适,四周紧贴管壁,不留缝隙。要使棉塞总长约 $3/5$ 塞入试管口或瓶口内,以防棉塞脱落。亦可用封口膜、透气试管帽或塑料塞代替棉塞。

7. 包扎

在棉塞外包上一层牛皮纸或双层报纸,以防灭菌时冷凝水直接沾湿棉塞,贮存时也可防止尘埃污染。若培养基分装于试管中,则应以 5~7 支在一起,再于棉塞外包双层报纸,用皮筋或线绳扎好,然后注明培养基名称及制作日期。

8. 灭菌

将上述培养基放入加压灭菌锅内,于 121°C 湿热灭菌 20min。

9. 摆斜面

灭菌后,如需制作斜面,可趁热将试管口端搁在一根长条上,并调整斜度,使斜面的长度不超过试管总长的 $1/2$ 。

10. 贮存

经无菌实验（将灭菌的培养基放入 37℃ 温箱中培养 24~48h，无菌生长证实培养基已灭菌彻底）后即可使用，或贮存于冰箱或橱内备用。

二、灭菌——高压蒸汽灭菌法

（一）基本原理

微生物操作要求在严格无菌条件下进行。所需器皿、材料及培养基等都需包装后并经灭菌方可使用。目前灭菌方法较多，包括干热灭菌、高压蒸汽灭菌、间歇灭菌、气体灭菌以及过滤除菌等多种方法。常规加压蒸汽灭菌是实验室最常用的灭菌方法。高压蒸汽灭菌锅包括立式、卧式、台式及手提式多种规格，目前实验室多采用全自动高压蒸汽灭菌锅（图 1-2）。

高压蒸汽灭菌是将待灭菌的物品通过加热，使灭菌锅隔套间的水沸腾而产生蒸汽。待锅内空气排尽后，关闭排气阀，继续加热。此时由于大量蒸汽产生从而增加了灭菌锅内的压力，使沸点增高，得到高于 100℃ 的温度，致使菌体蛋白凝固变性而达到灭菌目的。在同一温度下，湿热杀菌效力比干热大。主要是湿热的穿透力比干热大，产生的蒸汽有潜热效应。同时，湿热条件下细菌菌体吸收水分，蛋白质更容易凝固，由于蛋白质含水量增加，所需凝固温度降低。

高压蒸汽灭菌是依据水的沸点随水蒸气气压的增加而上升，加压提高了水蒸气的温度。蒸汽压力与蒸汽温度关系及常用的灭菌时间关系见表 1-1。



图 1-2 全自动高压蒸汽灭菌锅

表 1-1 高压蒸汽灭菌时常用的灭菌压力、温度与时间

MPa	蒸汽压力		蒸汽温度 (℃)	灭菌时间 (min)
	kgf/cm ²	lbf/in ²		
0.056	0.56	8.00	112.6	30
0.070	0.70	10.00	115.2	20
0.103	1.00	15.00	121.0	20

(二) 操作步骤

1. 加蒸馏水

灭菌前,取出内层筐,检查锅内水位是否合格,若过低,则向外层锅内加入适量的蒸馏水,使水面与三角搁架相平为宜。切勿忘记加水或水量过少,以防灭菌锅烧干而引起炸裂事故。

2. 装料

将待灭菌物品放入内层筐内,注意不要装得太挤,以免阻碍蒸汽流通而影响灭菌效果。三角烧瓶瓶口及试管口皆不要与锅壁接触,以免冷凝水透入棉塞。

3. 加盖,设置灭菌条件

拧紧封盖,勿使漏气。参照全自动灭菌锅操作要求规范操作。常用灭菌条件设置 121°C , 0.1Mpa , 20min 。

4. 排气、升压、保压及降压

待冷空气完全排尽后,关上排气阀,以增加锅内压力及温度。当锅内压力升到所需压力时维持压力至所需时间。注意须完全排尽锅内空气,才能关上排气阀,全自动高压灭菌锅可忽略此步骤。灭菌结束后,令其温度自然下降,当压力表显示降至“0”时,方可打开排气阀,旋松螺栓,打开盖子,取出灭菌物品。注意:压力一定要降到“0”时,才能打开排气阀,开盖取物,否则会因锅内压力突然下降,使容器内的培养基由于内外压力不平衡而冲出烧瓶口或试管口,造成棉塞沾染培养基而发生污染。

5. 无菌检查

灭菌后的培养基,需摆斜面的则摆成斜面,冷凝后放入 37°C 温箱培养 $24\sim 48\text{h}$,经检查若无杂菌生长,即可放入储物柜内备用。

【注意事项】

1. 制作培养基时, pH 值调节要小心操作,避免回调。
2. 使用灭菌锅应严格按照操作程序进行,避免发生事故;灭菌时,操作者切勿擅自离开;务必待压力下降至 0 后,方可打开锅盖。
3. 若使用全自动高压蒸汽灭菌锅,加盖后打开电源设置好灭菌温度、灭菌时间即可进行灭菌,无需排气,但要检查箱体内的水位线。

【问题和思考】

1. 配制培养基有哪几个步骤? 在操作过程中应注意哪些问题? 为什么?

2. 培养基配制完成后,为什么必须立即灭菌?已灭菌的培养基如何进行无菌检查?

3. 高压蒸汽灭菌操作应注意哪些问题?

实验 2 鉴别性培养基的配制

【实验目的】

了解鉴别性培养基的原理,并掌握配制鉴别性培养基的方法和步骤。

【实验内容】

1. 伊红美蓝(EMB)培养基的配制。
2. 乳糖胆盐发酵培养基的配制。
3. 亚硫酸铋琼脂(BS)培养基的配制。

【概述】

鉴别性培养基是一类在成分中加入有能与目的菌的无色代谢产物发生显色反应的指示剂,从而达到只需用肉眼辨别颜色就能方便地从相似菌落中找出目的菌落的培养基。严格来讲,鉴别培养基是通过颜色反应来区分目的菌与非目的菌,如常用的伊红美蓝乳糖培养基,即 EMB (Eosin Methylene Blue) 培养基,它在饮用水、牛奶的大肠菌群的细菌学检查及遗传研究工作中有着重要的作用。EMB 培养基配方中含有乳糖、伊红和美蓝,用以鉴别肠道病原菌及其他杂菌。其中伊红、美蓝作指示剂,伊红属酸性染料,当大肠埃希氏菌或产气肠杆菌分解乳糖产酸时,由于细菌带正电荷,所以被伊红着色。在大肠埃希氏菌中因为伊红和美蓝结合,使菌落呈现蓝紫黑色,且具有绿色金属光泽;菌落呈棕色者为产气肠杆菌。不分解乳糖的肠道病原菌则不着色,有时因产生碱性物质较多,细菌带负电荷,被美蓝着色后,菌落呈现淡紫色。通过不同颜色即可区别不同类别的细菌种类。

乳糖胆盐发酵培养基,主要用于食品卫生中大肠菌群的检测。该培养基中含有胆盐,能抑制大部分非肠道细菌的生长,而不能抑制大肠菌群的生长。大肠菌群发酵乳糖产酸产气,引起 pH 值变化,溴甲酚紫溶液颜色由紫色变成黄色,以此来初步判断大肠菌群的存在。

亚硫酸铋琼脂培养基常用于分离伤寒和副伤寒沙门氏菌,在此培养基培养

中含有葡萄糖、亚硫酸钠、柠檬酸铋铵和煌绿，它们既是抑菌剂，又是指示剂。煌绿、亚硫酸铋能抑制革兰氏阳性菌和大肠埃希氏菌的生长。两种抑菌剂对伤寒和副伤寒沙门氏菌均无影响，而且由于伤寒沙门氏菌能发酵葡萄糖，可将亚硫酸铋还原成硫酸铋，形成黑色菌落，其周围有黑色环，对光观察可见有金属光泽，以此达到鉴别沙门氏菌的目的。

【材料和器皿】

1. 试剂

蛋白胨、牛肉膏、葡萄糖、乳糖、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 Na_2SO_3 、柠檬酸铋铵、猪胆盐、伊红 Y、美蓝、溴甲酚紫、煌绿、琼脂、1mol/L NaOH、1mol/L HCl。

2. 器皿

电子天平、烧杯、三角烧杯、量筒、漏斗、试管、玻璃棒、加压蒸汽灭菌锅等。

3. 其他

药匙、pH 计、称量纸、记号笔、棉花塞、纱布、线绳、牛皮纸、报纸。

【操作步骤】

一、伊红美蓝培养基的配制

1. 培养基成分

乳糖 10.0g、蛋白胨 10.0g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2.0g、2%伊红 Y 溶液 20ml、0.65%美蓝溶液 10ml、琼脂 15~20g、蒸馏水 1 000ml，pH 值 7.2。

2. 配制方法

(1) 物品的称量与溶解。称取培养基各个成分所需量，将其置入适当的烧杯中，加入 1/2~2/3 所需水量，溶化各营养成分，并定容。

(2) 调 pH 值。调节 pH 值至 7.2 ± 0.1 。

(3) 加入染料。按每 1 000ml 培养基加入 20ml 2%伊红 Y 溶液和 10ml 0.65%美蓝溶液。

(4) 分装并加入适量琼脂，加棉塞进行包扎，高压蒸汽 115°C (0.07MPa) 灭菌 20min。

二、乳糖胆盐发酵培养基配制

1. 培养基成分

蛋白胨 20g、猪胆盐 5g、乳糖 10g、0.04%溴甲酚紫水溶液 25ml、蒸馏水

1 000ml, pH 值 7.3~7.4。

2. 配制方法

(1) 称量与溶解。称取培养基各个成分所需量, 将其置入适当的烧杯中, 加入 1/2~2/3 所需水量, 溶化各营养成分, 并定容。

(2) 调 pH 值。调节 pH 值至 7.3~7.4。

(3) 按每 1 000ml 培养基加入 25ml 0.042% 溴甲酚蓝溶液。

(4) 分装、加塞、包扎后, 加压蒸汽灭菌, 115℃ (0.07MPa) 灭菌 20min。

三、亚硫酸铋琼脂培养基配制

1. 培养基成分

蛋白胨 10.0g、牛肉膏 5.0g、葡萄糖 5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.0g、0.5% 煌绿溶液 5ml、柠檬酸铋铵 2.0g、 Na_2SO_3 6.0g、琼脂 18g、蒸馏水 1 000ml、pH 值 7.5。

2. 配制方法

(1) 将蛋白胨 10.0g、牛肉膏 5.0g、葡萄糖 5g 溶于 300ml 水中作基础液; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.0g 分别溶于 20ml 和 30ml 水中, 混合均匀; 再将柠檬酸铋铵 2g 和 Na_2SO_3 6.0g 分别溶于 20ml 和 30ml 水中, 混合均匀。琼脂则用 600ml 水煮沸至完全溶化, 补足水分, 冷至约 80℃ 待用。

(2) 先将 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 与 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 混合溶液倾入基础液中, 混匀, 再将柠檬酸铋铵和 Na_2SO_3 混合溶液倾入基础液中, 混匀。

(3) 调节 pH 值至 7.5 ± 0.1 。随即倾入琼脂液中, 混合均匀, 冷至 50~55℃, 加入 0.5% 煌绿水溶液 5ml, 充分混匀, 并立即倾入平皿, 每皿 20ml。平板呈淡绿色。

【注意事项】

亚硫酸铋琼脂培养基无需加压灭菌。在制备过程中不宜过分加热, 应严格按上述进行操作以避免降低其选择性功能。该培养基若一次用不完, 可存放于冰箱, 但不宜超过 48h, 以免降低其选择性, 最好使用前 1d 配制。

【问题和思考】

1. 乳糖胆盐发酵培养基中胆盐起什么作用?

2. 亚硫酸铋琼脂培养基为什么不用加压灭菌锅? 在亚硫酸铋琼脂中煌绿、亚硫酸铋起什么作用?

实验3 选择性培养基的配制

【实验目的】

了解选择性培养基的原理，并掌握配制选择性培养基的方法和步骤。

【实验内容】

1. 马丁氏 (Martin) 培养基的配制。
2. Ashby 无氮培养基的配制。

【概述】

选择性培养基是 19 世纪末由荷兰 M. W. Beijerinck 和俄国 S. N. Vinogradsky 发明，是一类根据微生物特殊营养要求而设计的培养基，可使目的微生物在混合菌群中转变为优势菌，从而利于分离筛选。选择性培养基均含有增菌剂或抑菌剂。用于加富的营养物主要是一些特殊碳源或氮源，如甘露醇可富集自生固氮菌，石蜡油可富集分解石油烃的微生物，较浓的糖液可富集酵母菌等。而抑菌剂的选择性抑制作用，能够使所要分离的目的微生物得到较好的繁殖，同时对其他菌具有抑制作用。抑菌剂种类较多，包括染料、亚硒酸钠、去氧胆酸钠、胆盐、叠氮化钠、四硫磺酸钠或抗生素等。可结合鉴定培养基或其他生理生化指标，提高目的菌株的分离阳性率。

Martin 氏培养基常用于富集土壤真菌，培养基中有两种非营养物质，分别是去氧胆酸钠和链霉素，去氧胆酸钠属于表面活性剂，不仅可以防止霉菌菌丝蔓延，还可抑制 G^+ 细菌的生长，而链霉素对多数 G^- 细菌具有抑制生长作用，故这两种成分可抑制细菌和放线菌等原核微生物的生长，而对真菌的生长则没有影响，从而达到分离真菌的目的。

Ashby 无氮培养基常用于固氮菌的分离。培养基中仅含有基本碳源和无机盐，但缺少氮源。一般的细菌不能在此培养基上生长，一些固氮的细菌可以利用空气中的氮气作为氮源，故可在此培养基上生长，从而达到分离固氮菌的目的。

【材料和器皿】

1. 试剂
蛋白胨、葡萄糖、甘露醇、孟加拉红、链霉素、去氧胆酸钠、 KH_2PO_4 、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NaCl 、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCO_3 、琼脂。

2. 器皿

电子天平、烧杯、三角烧瓶（250ml 容量）、量筒、漏斗、试管、玻璃棒、高压蒸汽灭菌锅等。

3. 其他

药匙、pH 试纸、称量纸、记号笔、透气封口膜、牛皮纸、报纸、试管帽。

【操作步骤】

一、马丁氏培养基的配制

1. 成分

葡萄糖 10g、蛋白胨 5g、 K_2HPO_4 1.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、1%孟加拉红溶液 3.3ml、琼脂 16~20g、蒸馏水 1 000ml、pH 值自然。2%去氧胆酸钠溶液 20ml 与链霉素溶液（10 000IU/ml）3.3ml（预先灭菌，临用前加入）。

2. 配制方法

（1）试剂称量及溶化。称取培养基各成分的所需量，在烧杯中加入 300ml 蒸馏水，然后依次加入培养基各成分并搅拌，融化后再按 1 000ml 培养基加入 3.3ml 的 0.1%孟加拉红溶液。

（2）溶化琼脂，定容。烧杯中加入约 700ml 水，放入琼脂加热至融化后，与溶化的试剂溶液混合，稍作加热并补足失水水分至 1 000ml。

（3）分装至三角烧瓶，每瓶装约 150ml，用封口膜包扎或加棉塞包扎。121℃灭菌 20min。

（4）临用前，加热溶化培养基，待冷却至 55℃左右，按照每 1 000ml 培养基加入 20ml 2%去氧胆酸钠溶液及 3.3ml 链霉素溶液（10 000IU/ml），迅速混匀后倒平板。

二、Ashby 无氮培养基的配制

1. 培养基成分

甘露醇 10g、 KH_2PO_4 0.2g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 NaCl 0.2g、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、 CaCO_3 5g、琼脂 15~20g、蒸馏水 1 000ml，pH 值 7.2~7.4。

2. 配制方法

（1）称量药品并溶化。称取培养基各成分的所需量。在烧杯中加入约 600ml 水，依次加入培养基各成分溶化，调 pH 值至 7.2~7.4。

（2）溶化琼脂。在烧杯中加入约 400ml 水，放入琼脂加热至溶化，与溶化的试剂溶液混合，稍作加热并补足失水水分至 1 000ml。