

生物工程
生物技术
系列

普通高等教育“十三五”规划教材



发酵工程实验指导

范延辉 王君 | 主编

学工业出版社

生物工程
生物技术
系列

普通高等教育“十三五”规划教材

发酵工程实验指导

范延辉 王君 | 主编



化学工业出版社

·北京·

本书分为基础实验和应用实验两部分，实验内容涵盖发酵工程上游、中游和下游技术，包括菌种筛选、菌种改良、培养基优化、发酵罐操作、发酵产物提取等内容。本书可供从事发酵工程、生化工程、生物工程、环境工程和制药工程的高校师生作为实验教材使用，也可供上述领域的企业生产、技术和管理人员参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

发酵工程实验指导 / 范延辉, 王君主编. —北京:
化学工业出版社, 2018. 5
普通高等教育“十三五”规划教材
ISBN 978-7-122-31969-2

I. ①发… II. ①范… ②王… III. ①发酵工程 - 实
验 - 高等学校 - 教材 IV. ①TQ92-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 077296 号

责任编辑: 魏巍 王岩 赵玉清
责任校对: 吴静

装帧设计: 关飞

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印刷: 北京京华铭诚工贸有限公司

装订: 北京瑞隆泰达装订有限公司

710mm × 1000mm 1/16 印张 6¼ 字数 108 千字 2018 年 8 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 28.50 元

版权所有 违者必究

前言

生命科学是当今发展最快、最活跃的学科，也是 21 世纪各高等学校重点发展的学科之一。发酵工程是利用微生物的特定性状和功能，通过现代工程技术来生产有用物质或将生物直接用于工业化生产的技术体系，是建立在发酵工业基础上，与化学工程相结合而发展起来的一门学科，它是连接生命科学研究与应用的桥梁。发酵工程从在传统发酵食品中的应用，到抗生素工业的建立及其基因工程产品大规模产业化的实施，已经在人类经济活动中占据了重要地位。发酵产品在医药领域已被用作抗生素、抗癌药和免疫抑制剂，在食品加工和农业领域被用作生物杀虫剂，在化工领域被用来生产氨基酸、有机酸、维生素、表面活性剂和生物催化剂。此外，微生物在环境修复，如石油降解、污水处理、重金属修复等方面，也发挥了重要作用。随着微生物学、基因组学、蛋白质组学、代谢组学的不断发展，以及过程控制技术和生物化工技术与装备的不断进步，发酵工程必将焕发出更强大的生机。通过发酵工程课程的学习，不仅能够掌握发酵工程的原理及发酵控制过程优化，而且对系统地了解生物技术及其工业化应用具有重要意义。

作为一门实践性很强的学科，发酵工程取得的每一个进步都和实验技术的发展密切相关。因此学习发酵工程，不仅要掌握坚实的基础理论知识，更要熟练地掌握实验操作技能，从而在实验中发现并解决问题，促进理论与实践的紧密结合。发酵工程实验对于培养学生的专业技能和动手能力，提高专业素质都有举足轻重的地位。

本实验指导涵盖发酵工程上游、中游和下游技术，包括菌种筛选、菌种改良、摇瓶发酵条件优化、发酵罐操作、发酵产物提取、定性和定量分析等内容，还包括了啤酒酿造、蘑菇栽培等应用性实验，以便于学生全面、系统地掌握发酵工程的基本操作，提高动手能力。

在编写本书的过程中，我们参考了许多国内外相关的教材和文献资

料，借鉴了一些重要的实验案例，在此向各位前辈和同行致以衷心的感谢。本教材还得到了学校、出版社的大力支持和帮助，谨在此一并表示衷心感谢。

限于编者的水平，加之时间仓促，不足之处在所难免，敬请专家和同行以及广大读者批评指正。

编者

2018年1月

目录

第一部分 基础实验	1
实验一 耐盐解磷菌的分离、鉴定及特性分析	1
实验二 抗真菌放线菌的分离	6
实验三 纤维素分解菌的分离	10
实验四 泡菜中乳酸菌的分离及初步鉴定	12
实验五 细菌鉴定中常用的生理生化反应	15
实验六 大肠杆菌 Str (链霉素) 抗性突变株的筛选	19
实验七 大肠杆菌营养缺陷型菌株的诱变和筛选鉴定	22
实验八 微生物菌种保藏方法	27
第二部分 应用实验	33
实验九 发酵培养基优化	33
实验十 柠檬酸产生菌的分离及柠檬酸的固体发酵	38
实验十一 细菌生长曲线测定	41
实验十二 制霉菌素发酵、提取及效价测定	44
实验十三 青霉素效价的生物测定	49
实验十四 淀粉酶的初步分离纯化	54
实验十五 实验室发酵生产啤酒	57
实验十六 酸奶的酿造及乳酸的快速测定	65
实验十七 水中溶解氧 (DO) 的测定	68

实验十八 发酵过程中还原糖的测定	71
实验十九 小型发酵罐的使用	74
实验二十 噬菌体的分离、纯化及效价测定	80
实验二十一 金针菇的栽培	83
附录	87
附录一 实验室须知	87
附录二 常用试剂及指示剂的配制	88
附录三 常用正交表	91
参考文献	93

第一部分 基础实验

实验一

耐盐解磷菌的分离、鉴定及特性分析

一、实验目的

- (1) 学习并掌握采用透明圈法分离解磷菌。
- (2) 了解解磷菌溶磷水平的测定方法。

二、实验原理

磷是植物体内有机化合物的重要组成成分，是植物生长所必需的含量仅次于氮的元素，然而由于土壤的固定作用，施入的化学磷肥大部分都与土壤中的 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 结合形成难溶性的磷酸盐，导致土壤有效磷的缺乏，使磷成为制约作物生产的主要限制因素。为了满足作物的生长，人们往往会通过施加大量磷肥来提高作物产量，这导致磷酸盐迅速在土壤中积累，不仅造成磷素资源的浪费，而且对水体环境安全构成一定的威胁。因此，提高土壤中难溶性磷的利用效率对于农业生态系统的健康发展具有重要意义。研究表明土壤存在着大量的溶磷微生物，溶磷微生物能够将土壤中难溶性的磷酸盐转化为易于被植物吸收利用的水溶性磷，提高了土壤的供磷水平，从而增加作物产量。另外，溶磷微生物还能分泌生长调节物质，促进农作物植物根系对锌、铜等其他营养元素的吸收，增强植物抗病能力，并减少环境污染。

解磷微生物的溶磷机理主要有：有机酸的分泌、质子的释放、 CO_2 作用、 H_2S 作用和产生磷酸酶。其中产生低分子量有机酸是溶磷微生物具有显

著溶解难溶磷作用的主要机理，难溶性磷酸盐能够在酸性条件下溶解；另外，有机酸能与 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等金属离子发生络合作用，从而将与之结合的磷酸根释放出来。因此，溶磷微生物的溶磷能力往往与培养液的 pH 存在一定的负相关性。

黄河三角洲是我国最大的三角洲，地域辽阔，自然资源丰富，然而，近年来黄河断流影响了黄河三角洲地区淡水水源的补给，破坏了土壤中水盐的平衡，致使土壤含盐量上升，土壤盐碱化现象严重，盐碱地面积已达 $4.43 \times 10^5 \text{hm}^2$ ，占全区耕地总面积的 52.5%。盐碱化土壤由于其特殊的理化性质可能会导致传统的非土著解磷菌定殖能力差、竞争力较弱、溶磷能力退化快、菌种淘汰率高等劣势，因此，筛选土著耐盐解磷菌对于开发微生物肥料、提高盐碱土壤磷素利用率具有重要意义。解磷菌在无机磷培养基上形成的透明圈如图 1-1 所示。



图 1-1 解磷菌在无机磷培养基上形成的透明圈

三、实验材料

1. 土壤

本实验所用土壤样品取自滨州市沾化县冬枣园枣树根系周围，土壤类型属轻度盐碱土，采集深度为 5~20cm。

2. 培养基

①改良蒙金娜无机磷培养基：葡萄糖 10g， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g，NaCl 0.3g，KCl 0.3g， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03g， $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g， $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 10g，酵母膏 0.4g，蒸馏水 1000mL，pH 7.0~7.5。

②牛肉膏蛋白胨培养基：牛肉膏 3g，蛋白胨 10g，氯化钠 5g，琼脂 20g，蒸馏水 1000mL，pH 7.0。

③PDA 培养基：马铃薯 200g，蔗糖 20g，琼脂 20g，蒸馏水 1000mL，pH 自然。

3. 主要试剂和仪器

①试剂：磷酸二氢钾、钼酸铵、酒石酸锑钾、抗坏血酸、浓硫酸、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 均为分析纯。

②仪器：高速低温离心机（Beckman Coulter 的 Allegra X-22R），分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司的 TU-1810 系列），细菌 DNA 提取试剂盒和真菌 DNA 提取试剂盒（北京三博远志生物技术有限公司），引物 27F 和引物 1492R（北京三博远志生物技术有限公司），PCR 扩增试剂盒（上海生工生物工程有限公司），PCR 仪（美国 ABI 公司 2720 型 PCR 扩增仪 Applied Biosystems 2720 Thermal cycler）。

四、实验步骤

1. 解磷微生物的初筛及纯化

称取 10g 土壤样品置于 90mL 无菌水中，高速振荡制成土壤悬液，土壤悬液梯度稀释后涂布在改良蒙金娜无机磷固体培养基上，涂好的平板用封口膜封口倒置于生化培养箱中 30℃ 培养 7d 左右。通过观察平板上所长菌落产生的透明圈（测量其透明圈直径 D 、菌落直径 d ， $D/d > 1.4$ ）来初步筛选解磷菌。挑取具有较明显透明圈的单菌落纯化多次，直至通过平板和镜检观察确定其为纯培养物后，挑取细菌单菌落转至牛肉膏蛋白胨培养基平板上培养 24h 左右，分离得到的菌株均置于 4℃ 冰箱保存。

2. 解磷微生物的复筛

挑取各初筛细菌菌株的单菌落，放于牛肉膏蛋白胨液体培养基中 30℃ 振荡培养至发酵液变浑浊后离心，用无菌水重悬，即制备成菌悬液（菌数约为 1×10^9 CFU/mL）。按 5% 的接种量将菌悬液接入 100mL 蒙金娜无机磷液体培养基中，30℃ 摇床培养 7d。培养完毕，发酵液 10000r/min 离心 5min，采用钼蓝比色法定量测定上清液中可溶性磷的含量（使用光程为 10mm 的比色皿，波长采用 700nm），以不接菌作为空白对照。对比各菌株发酵液中溶磷量的大小，筛选出高效解磷菌。

3. 高效解磷菌的耐盐性实验

细菌的耐盐性实验选用牛肉膏蛋白胨液体培养基，培养基中加入不同含量的 NaCl：0.5%（牛肉膏蛋白胨液体培养基中固有的 NaCl 含量）、1.5%、2.5%、3.5%、4.5%；30℃ 振荡培养 24h 后，各发酵液适当稀释后在 600nm 波长下测定其吸光度 Abs，比较各高效解磷菌株的耐盐情况，从中筛选出耐盐性较好的高效解磷菌。

真菌的耐盐性实验采用 PDA 固体培养基作为基本培养基，培养基中加入不同含量的 NaCl：0、2.5%、5.0%、7.5%、10%、12.5%；用灭过菌的打孔器在长满真菌菌丝的 PDA 平板上打孔，然后用镊子夹取琼脂片倒扣在耐盐实验用培养基平板的中心位置（菌丝面贴在新鲜培养基上），30℃ 恒温培养，分别在第 1d、第 2d、第 3d、第 4d、第 5d 观察并记录菌丝在不同 NaCl 含量的 PDA 平板上的蔓延情况。

4. 菌落形态的观察

将筛选出的耐盐高效解磷细菌菌株在牛肉膏蛋白胨固体培养基上单菌落划线，观察其生长情况及菌落特征，包括菌落颜色、润泽与否、菌落形状、菌落隆起还是平整、边缘是否圆整、表面光滑与否、是否透明、是否容易挑起等。

真菌接种到 PDA 培养基上，观察菌落的形成及蔓延状况。

5. 生长曲线的绘制

将耐盐高效解磷菌株接入牛肉膏蛋白胨液体培养基中制备其菌悬液，按 5% 的接菌量接入新鲜牛肉膏蛋白胨培养液中，混匀后，分装到灭菌的试管中，每支试管装 5mL，用灭过菌的棉塞封口；分别在 0、2h、4h、6h、8h、10h、12h、14h、16h、18h、20h、23h、26h、30h、38h 取样，每次取三支试管，放于 4℃ 冰箱中，最后一起在 600nm 下测定发酵液适当稀释后的光密度值 Abs。

6. 水溶性磷、pH 和菌体生长量的测定

将菌株的菌悬液按 1% 的量接入改良蒙金娜液体培养基，30℃，150r/min 恒温振荡培养。每隔 24h 在无菌操作下从培养液中吸取 5mL 培养液，取 2mL 菌液低速（1500r/min）离心 3min，然后用等体积 1mol/L HCl 稀释，以去除上清液中残留的磷酸钙颗粒，600nm 波长下测定细菌悬液的吸光度值 Abs；将剩余的 3mL 菌液再经 10000r/min 离心 10min，取上清液用钼蓝比色法测定水溶性磷含量，并测定其 pH 值。

7. 耐盐高效解磷菌的分子生物学鉴定

利用牛肉膏蛋白胨液体培养基培养细菌，离心后弃上清。菌株采用细菌总 DNA 提取试剂提取基因组 DNA。利用 16S rDNA 的 PCR 反应通用引物（上游引物为 27F：5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'；下游引物为 1492R：5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'）进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件为：先 94℃ 预变性 5min；再 94℃ 变性 30s，55℃ 退火 30s，72℃ 延伸 1min，30 个循环后再 72℃ 终延伸 10min。PCR 纯化产物送北京三博远志生物技术公司利用引物 27F 和 1492R 进行双向测序。两引物测出的序列利用 Contig1 进行拼接。拼接后的序列信息输入 NCBI 数据库进行 BLAST 分析，获得同源性数值，运用 ClustalX 软件进行分析，形成一个多重复匹配阵列，利用 MEGA4.1 中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

利用 PDA 固体培养基培养真菌，刮取平皿表面的菌丝体放入研钵中用液氮研磨。研磨好的菌丝体采用真菌总 DNA 提取试剂盒提取其基因组 DNA。利用真菌 ITS 序列的 PCR 通用引物（上游引物为 ITS1：5'-TCCGTAG-GTGAACCTGCGG-3'；下游引物为 ITS4：5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'）进行 PCR 扩增。反应体系与扩增条件同细菌。测序后对解磷真菌进行同源性分析。

五、 结果与讨论

- (1) 分离得到的解磷菌解磷性及耐盐性如何？
- (2) 如何验证分离菌株在盐碱土壤中的实际溶磷能力？

实验二

抗真菌放线菌的分离

一、实验目的

- (1) 了解采集土样的要求和方法。
- (2) 掌握由土壤中分离稀有放线菌的基本原理和操作技术。
- (3) 掌握土壤稀释法和微生物的纯培养技术。
- (4) 掌握拮抗菌的筛选方法。

二、实验原理

植物病原真菌引起的植物病害是植物的第一大病害，每年给粮食生产造成巨大的损失。化学农药在植物病害防治上发挥了作用，但其残留与污染环境等问题直接危害了人类的健康及生存。随着绿色农业和有机果蔬的兴起，寻找新的环境友好型病害防治措施开始受到人们的广泛关注。

生物间的相互关系复杂且多样。其中的拮抗关系是微生物病害的生物防治基础。拮抗又称抗生，是指由某种生物所产生的特定代谢产物可抑制他种生物的生长发育甚至杀死它们的一种相互关系。由拮抗性微生物产生的抑制或杀死他种生物的抗生素，是典型并且与人类关系均密切的拮抗作用。在众多的拮抗性微生物产生的抗生素中，有一部分属于农用抗生素，它们具有高效、安全、廉价和可降解等优点，是农药发展的重要方向。井冈霉素、阿维菌素、春日霉素、庆丰霉素和灭瘟素等已在农作物和森林病虫害防治中发挥了较好的作用。

放线菌是一类具有高(G+C) mol%含量的革兰氏阳性细菌，广泛分布在土壤、海洋、动植物体等多种生境，相较于其他微生物它能够产生更为丰富的生物活性物质。据统计，从放线菌发现的生物活性物质已经超过13700余种，占已发现天然活性物质(33500种)的40%以上；目前临床和农业上使用的150多种抗生素，2/3来自放线菌。因此，筛选新放线菌是发现新药的重要途径。放线菌是介于细菌与丝状真菌之间而又接近于细菌的一类丝状原核生物，多为腐生，少数寄生。放线菌主要存在于土壤中，并在土壤中占有相当大的比例。一般地，放线菌在比较干燥、偏碱性、含有机质丰富的土壤中数量居多。通常，随着地理分布、植被及土壤性质的不同，放线菌的种

类、数量和拮抗性也各不相同。土壤是微生物的大本营，其中的放线菌多以链霉菌为主，因此人们通常将除链霉菌以外的其他放线菌统称为稀有放线菌。若以常规方法进行分离，得到的几乎全部是链霉菌。当采用加热处理土样、选用特殊培养基或添加某种抗生素等方法时，均可提高稀有放线菌的获得率。

从土壤中分离放线菌的方法很多，其中包括稀释法、弹土法、混土法和喷土法等，本实验主要采用稀释法。初步分离出的放线菌需进一步鉴别是否为需要的拮抗菌。首先应根据筛选目的确定实验模型，然后利用培养基平板进行拮抗性测定。常用的方法有琼脂块法和滤纸片法。其主要依据是扩散原理，即观察在抗菌菌周围是否会出现明显的抑菌圈（图 2-1）。抑菌圈的大小和透明度则表明了该菌株抗菌活性的强弱。

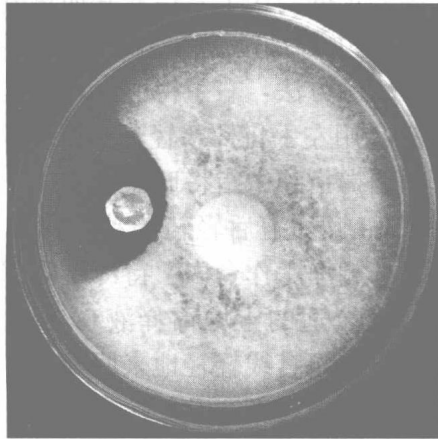


图 2-1 放线菌对病原真菌的拮抗作用

三、实验材料

黄瓜枯萎病菌、培养皿、三角瓶、吸管、滤纸片直径 1cm、土样，镊子，无菌玻璃平盘，无菌玻棒，玻璃刮铲。

高氏 1 号培养基（用于分离放线菌）：可溶性淀粉 20g， KNO_3 1g， K_2HPO_4 0.5g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g， NaCl 0.5g， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g，琼脂 20g， $\text{pH}7.4 \sim 7.6$ 。

配制时，先用少量冷水将淀粉调成糊状，倒入少于所需水量的沸水中，在火上加热，边搅拌边依次逐一溶化其他成分，溶化后，补足水分到 100mL，调 pH， 121°C 灭菌 20min。

四、实验步骤

1. 采集土样

铲去表层土，用取样器取规定深度（5~20cm）的土样，装入无菌封口塑料袋中，再装入防水纸袋中，注明采集时间、地点、周边植被及土质特点等，带回实验室自然风干后分离。

2. 制备土壤稀释液

称取 10g 研磨好的土样至 250mL 三角烧瓶中，加入 90mL 无菌水和适量玻璃珠，振荡 15min，充分混匀，做成 10^{-1} 倍悬浊液，经梯度稀释后备用。

3. 涂布

将事先配置并经灭菌处理的高氏 1 号培养基加热溶化，于超净工作台内倒平板。倒平板前在培养基中添加适量 $K_2Cr_2O_7$ （50~100 μ g/mL）以抑制真菌及细菌的生长。倒平板的方法：右手持盛有培养基的试管或三角瓶置酒精灯火焰上方 5~10cm 处，用左手将棉塞轻轻地拔出，试管或瓶口保持对着火焰。左手拿培养皿，利用拇指和中指将皿盖在火焰上方 5~10cm 处打开一缝，迅速倒入培养基约 15mL，加盖后轻轻摇动培养皿，使培养基均匀分布在培养皿底部。然后平置于超净工作台内，待冷凝后即为平板。

用无菌移液管分别选取合适的土壤稀释液 0.1mL 加入平板中，右手拿无菌玻璃涂棒，将稀释液沿一条直线轻轻地来回推动，使之分布均匀。加盖后将培养皿沿一个方向旋转一定角度，重复涂布动作。如此反复几次。平板内边缘处可用玻璃涂棒改变方向再涂布几次。涂布后，需静置 30min，使菌液吸附进培养基。在每个平板底部用记号笔做好标记以便区分。

4. 放线菌分离

将高氏 1 号培养基平板倒置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 7~21d。根据放线菌菌落形态差异，将培养后长出的单个放线菌菌落分别挑取少许细胞接种到高氏 1 号培养基的斜面上，并进行编号。待斜面上长出菌苔后，镜检确定是否为单一微生物。若发现有杂菌，需采用平板划线法进行菌株纯化分离，直到获得纯培养。平板划线方法：在近火焰处，左手拿培养皿，右手拿接种环，挑取待纯化的单菌落一环，先在平板培养基的一边做第一次平行划线 3~4 条，再转动培养皿约 70 $^{\circ}$ 角，并将接种环于火焰上灼烧灭菌，待冷却后通过第一次划线部分做第二次平行划线，如此重复 2~3 次。将样品在平板上进行稀释，盖上培养皿盖，倒置培养。挑取单个菌落进行纯种鉴定。

5. 抑菌活性筛选

将实验室保存的植物病原真菌（黄瓜枯萎病菌）接种至 PDA 培养基平板上，倒置于 30℃ 恒温培养箱中培养 3~5d。用灭过菌的打孔器，制成直径为 5mm 的菌饼备用。采用平板对峙生长法对分离纯化后的放线菌菌株进行拮抗性筛选。在 PDA 培养基平板中央放置黄瓜枯萎病菌饼，同时在与菌饼相距 25mm 的 4 个角处分别点接 4 个分离纯化后待测的细菌菌株，对照平板只接病原真菌菌饼，不点接筛选菌。将做好的平板置于 28℃ 培养箱中培养 3~5d，观察待测菌株对油菜菌核病菌有无拮抗作用，选出对病原真菌生长有抑制作用的菌株进行进一步研究。

五、 结果与讨论

- (1) 一共获得了几株拮抗真菌，占总放线菌数的比例大约为多少？
- (2) 分离放线菌过程中除了 $K_2Cr_2O_7$ ，还有那些常用的抑制剂。

实验三 纤维素分解菌的分离

一、实验目的

- (1) 掌握纤维素降解菌的分离和筛选的方法。
- (2) 掌握配制培养基的原则和方法。

二、实验原理

纤维素是一种由葡萄糖首尾相连而成的高分子化合物，是植物细胞壁主要成分，属于多糖类物质，是地球上数量最大的可再生资源。土壤中某些微生物能够产生纤维素酶，把纤维素分解为葡萄糖，后再利用。如能利用微生物将其转化为生物产品或生物能源，既可缓解能源短缺又能解决环境污染。因此分离和筛选高酶活性的菌株是有效利用纤维素物质的关键。

纤维素酶是一种复合酶，一般认为它至少包括三种组分： C_1 酶（外切酶）、 C_x 酶（内切酶）和葡萄糖苷酶，前两种酶使纤维素分解成纤维二糖，第三种酶将纤维二糖分解成葡萄糖。

刚果红可以与纤维素形成红色复合物，当纤维素被纤维素酶分解后，红色复合物无法形成，出现以纤维素分解菌为中心的透明圈，可以通过是否产生透明圈来筛选纤维素分解菌。

三、实验材料

1. 培养基

羧甲基纤维素钠培养基（初筛培养基）：CMC-Na 3.0g, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0g, K_2HPO_4 1.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, 胰蛋白胨 1.0g, 琼脂 20g。

刚果红培养基（复筛培养基）：CMC-Na 3.0g, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0g, K_2HPO_4 1.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, 胰蛋白胨 1.0g, 琼脂 20g, 刚果红 2g, 蒸馏水 1000mL PH7.0。

2. 土壤样品

校园中落叶覆盖下的腐殖土。