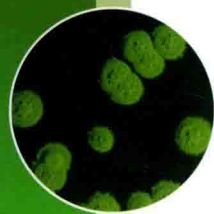


普通高等教育“十三五”规划教材

农业微生物 实验技术

张玉苗 主编



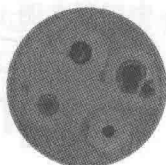
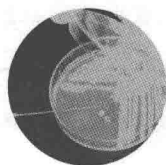
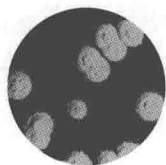
化学工业出版社

普通高等教育“十三五”规划教材

农业微生物 实验技术

张玉苗 主编

张洪勋 范延辉 张韩杰 副主编



化学工业出版社

· 北京 ·

《农业微生物实验技术》涵盖了微生物学教学、基础研究及应用研究必不可少的基本技术。内容包括五部分，分别是微生物的培养技术、微生物纯种分离技术、微生物菌株的形态学特征观察和测定、微生物菌株的鉴定实验以及农业微生物应用实验。

《农业微生物实验技术》可以作为农林院校设施农业、植保、资源环境、园艺等专业的实验教材，也可供微生物学工作者研究中参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

农业微生物实验技术/张玉苗主编. —北京: 化学工业出版社, 2019. 8

ISBN 978-7-122-34369-7

I. ①农… II. ①张… III. ①农业科学-微生物学-实验技术 IV. ①S182-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2019) 第 078789 号

责任编辑: 傅四周
责任校对: 王鹏飞

装帧设计: 史利平

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 装: 河北鹏润印刷有限公司
710mm×1000mm 1/16 印张 9 字数 137 千字 2019 年 9 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888

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: 29.80 元

版权所有 违者必究

前言

农业的本质是开发利用生物资源。传统农业是利用植物、动物资源形成“二维结构”。将传统农业调整为植物、动物和微生物资源组成的“三维结构”新型农业,是实现农业现代化的战略性调整之一。地球上三大生物资源之一的微生物资源是至今尚未充分开发利用的生物资源宝库,应用高科技生物工程技术开发微生物资源,创立微生物产业化利用的工业型农业。这类新型农业是在洁净生产车间内进行生产,人们穿戴白色工作服从事劳动,故有人形象地称之为“白色农业”,与以水土为主的绿色植物生产——“绿色农业”和以海洋为主的水产农业——“蓝色农业”并称为三色农业。

农业微生物资源的开发利用对促进农业生产的变革具有明显的现实意义和深远的历史意义,其必将成为世界各国政府和科技部门研究的重点。在当前研究中,应充分重视基础理论研究,同时利用先进的生物技术手段,开发出优质的菌株与产品,为人类生活水平的提高和人类的可持续发展提供保证。

《农业微生物实验技术》是为微生物学系以外各专业(设施农业、植保、资源环境科学、园艺等)开设的一门介绍微生物学实验技术的课程,涵盖微生物学教学、基础研究及应用研究必不可少的基本技术。其主要任务是使学生得到微生物学实验技术的基本操作和技能的训练,同时,也要使他们初步了解或掌握先进的技术和方法,与迅速发展的学科前沿接轨。

本书由张玉苗(滨州学院)主编,张洪勋(中喜生态产业股份有限公司)、范延辉(滨州学院)和张韩杰(滨州学院)副主编。在本书的编写过程中,我们参考了国内外许多相关的教材和文献资料,借鉴了一些前沿科研

成果，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，在此一并表示衷心的感谢。书中若有不足之处，敬请专家和同行以及广大读者给予批评指正。

编者

2019年4月

目录

农业微生物实验守则	1
-----------------	---

第一章 微生物的培养技术 3

实验一 微生物基础培养基的配制	3
实验二 固氮微生物选择性培养基的配制	7
实验三 微生物鉴别性培养基的配制	8
实验四 无菌操作及微生物接种技术	11
实验五 微生物实验常用消毒与灭菌技术	18

第二章 微生物纯种分离技术 22

实验六 土壤中微生物的分离培养	22
实验七 水中细菌总菌落数的测定	25
实验八 解磷菌和聚磷菌的筛选	29
实验九 双孢蘑菇培养料中纤维素降解菌的分离与纯化	34
实验十 苯酚生物降解菌的筛选	38
实验十一 产表面活性剂菌的筛选	42
实验十二 外生菌根真菌的分离与纯化	44

第三章 微生物菌株的形态学特征观察与测定 47

实验十三 四大类微生物菌落及细胞形态的观察	47
实验十四 细菌的涂片及简单染色法	52
实验十五 细菌的革兰氏染色	54
实验十六 细菌芽孢、荚膜的染色及观察	58
实验十七 比色法测微生物的生长曲线	61

实验十八 微生物数量的测定	63
实验十九 微生物大小的测定	67

第四章 微生物菌株的鉴定实验 71

实验二十 大分子物质的水解实验	71
实验二十一 糖发酵实验	74
实验二十二 IMViC 与硫化氢实验	76
实验二十三 厌氧微生物的培养	80
实验二十四 质粒 DNA 的提取	86
实验二十五 16S rDNA 序列鉴定细菌种类实验	89

第五章 农业微生物应用实验 96

实验二十六 乳酸发酵与乳酸菌饮料制作	96
实验二十七 酒精发酵及糯米甜酒的酿制	100
实验二十八 食用菌栽培技术	103
实验二十九 耐盐碱自生固氮菌的分离与纯化	107
实验三十 植物叶际冰核细菌的分离、筛选	109
实验三十一 常见药用植物内生菌的分离、筛选	112
实验三十二 碱性蛋白酶高产菌株的选育	115
实验三十三 苏云金芽孢杆菌的分离及抑菌、杀虫活性的 鉴定	119
实验三十四 微生物遗传育种实验——氨基酸营养缺陷型 突变株的筛选	123

附录 127

附录 1 微生物实验常用菌种及其学名	127
附录 2 常用培养基成分及其配制	128
附录 3 常用染色液和试剂的配制	131
附录 4 常用缓冲液配制表	135
附录 5 常用消毒剂表	136

参考文献 138

农业微生物实验守则

农业微生物实验课程的目的是：训练学生掌握微生物学最基本的操作技能；了解微生物学的基本知识；加深理解课堂讲授的某些微生物学理论。同时，通过实验，培养学生观察、思考、分析问题、解决问题和提出问题的能力；养成实事求是、严肃认真的科学态度，以及敢于创新的开拓精神；树立勤俭节约、爱护公物的良好作风。

为了提高教学效果，保证实验质量和实验室安全，特提出如下注意事项：

① 每次实验前必须对实验内容进行充分预习，以了解实验的目的、原理和方法，做到心中有数，思路清楚。

② 认真、及时做好实验记录，对于当时不能得到结果而需要连续观察的实验，则须记下每次观察的现象和结果，以便分析。

③ 实验室内应保持整洁，勿高声谈话和随便走动，保持室内安静。

④ 实验时要小心仔细，全部操作应严格按操作规程进行，万一遇有盛菌试管或瓶不慎打破、皮肤破伤或菌液吸入口中等意外情况发生时，应立即报告指导教师，及时处理，切勿隐瞒。

⑤ 实验过程中，切勿使乙醇、乙醚、丙酮等易燃药品接近火焰，如遇火险，应先关掉火源，再用湿布或沙土掩盖灭火，必要时用灭火器。

⑥ 使用显微镜或其他贵重仪器时，要求细心操作，特别爱护，对消耗材料和药品等要力求节约，用毕仍放回原处。

⑦ 每次实验完毕，必须把所用仪器摆放妥当，将实验室收拾整齐，擦净桌面。如有菌液污染桌面或其他地方时，可用3%来苏尔液或5%石炭酸液覆盖0.5h后擦去，如系芽孢杆菌，应适当延长消毒时间。凡带菌工具（如吸管、玻璃刮棒等），在洗涤前须在3%来苏尔液中进行消毒。

⑧ 每次实验须进行培养的材料，应标明组别及处理方法，放于教

师指定的地点进行培养，实验室中的菌种和物品等，未经教师许可，不得带出室外。

⑨ 每次实验的结果，应以实事求是的科学态度填入实验报告中，力求简明准确，认真回答思考题，并按时提交实验报告供教师批阅。

⑩ 离开实验室前将手洗干净，注意关闭仪器、水电、门窗和灯等。

第一章

微生物的培养技术

实验一 微生物基础培养基的配制

一、实验目的

- ① 了解培养基的概念、种类及用途；
- ② 熟悉培养基的配制原理及其常规配制程序；
- ③ 学习和掌握细菌、放线菌、霉菌常用培养基的配制方法。

二、实验原理

培养基是指利用人工方法将适合微生物生长繁殖或积累代谢产物的各种营养物质混合配制而成的营养基质；主要用于微生物的分离、培养、纯化、选择、鉴定、菌种保藏等方面。自然界中微生物种类繁多，营养类型多样，加之实验和研究的目的不同，所以培养基种类很多。不同培养基一般都应含有微生物生长繁殖所需的碳源、氮源、能源、无机盐、生长因子和水等营养成分。此外，为了满足微生物生长繁殖的要求，还必须控制培养基的 pH 值。

牛肉膏蛋白胨培养基是一种用于培养细菌的培养基，属于半合成培养基。高氏 I 号培养基是一种用于培养放线菌的合成培养基。马丁氏培养基用于霉菌的分离培养。

三、试剂与器材

1. 试剂

牛肉膏、蛋白胨、葡萄糖、可溶性淀粉、琼脂、链霉素溶液、

NaCl、KNO₃、K₂HPO₄、MgSO₄、FeSO₄、MgSO₄·7H₂O、NaOH 溶液 (1mol/L)、HCl 溶液 (1mol/L)。

2. 器材

烧杯、量筒、锥形瓶、培养皿、移液管 (移液枪)、试管、pH 试纸、棉花、无菌封口膜、线绳、报纸、天平、高压蒸汽灭菌锅等。

四、实验方法

(一) 牛肉膏蛋白胨培养基的配制

1. 培养基成分

牛肉膏	3g
蛋白胨	10g
NaCl	5g
琼脂	15g
蒸馏水	1000mL

2. 配制方法

(1) 称量及溶化 根据配制量分别计算所需药品量,记录于实验记录本;取一烧杯(烧杯 1),加入所需水量 2/3 的蒸馏水,分别称取蛋白胨和 NaCl,依次逐一加入并溶化;取另一烧杯(烧杯 2),单独称取牛肉膏,然后加入少量蒸馏水于烧杯 2 中,加热溶化后倒入烧杯 1 中。

(2) 定容 将烧杯 1 中溶液倒入量筒中,定容。

(3) 调 pH 待溶液冷至室温后用 1mol/L NaOH 溶液以及 1mol/L HCl 溶液调 pH 值至 7.2~7.4。

(4) 加琼脂 将对应的琼脂先放到锥形瓶中,再将定容后的液体培养基倒入锥形瓶中。

(5) 封口 用无菌封口膜封口、包扎。

(6) 灭菌 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min。

(7) 平板和斜面的制备 待培养基冷却至 60℃ 左右时,在超净工作台中将培养基倒入已灭菌的培养皿中或已灭菌的试管中(注意培养基约倒至试管体积的 1/4~1/3 处,斜面摆好后培养基在试管 1/2 的位置,试管口勿沾培养基),等到培养基完全凝固后,放入 4℃ 冰箱中保存。

(二) 高氏 I 号培养基的配制

1. 培养基成分

可溶性淀粉	20g
KNO ₃	1g
NaCl	0.5g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄	0.5g
FeSO ₄	0.01g
琼脂	20g
蒸馏水	1000mL

2. 配制方法

(1) 称量及溶化 根据配制量分别计算所需药品量,记录于实验记录本;先称量可溶性淀粉,置于烧杯 1 中,加少许冷蒸馏水,将淀粉调成糊状,加热,使淀粉完全溶化。取烧杯 2,分别称量 FeSO₄、KNO₃、NaCl、K₂HPO₄、MgSO₄,依次逐一加入蒸馏水中溶解;将烧杯 2 中溶液加入烧杯 1 中。

(2) 定容 将烧杯 1 中溶液倒入量筒中,定容。

(3) 调 pH 待溶液冷至室温后用 1mol/L NaOH 溶液以及 1mol/L HCl 溶液调 pH 值至 7.2~7.4。

(4) 加琼脂 将对应的琼脂先放到锥形瓶中,再将定容后的液体培养基倒入锥形瓶中。

(5) 封口 用无菌封口膜封口、包扎。

(6) 灭菌 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min。

(7) 平板和斜面的制备 待培养基冷却至 60℃ 左右时,在超净工作台中进行平板和斜面的制备,等到培养基完全凝固后,放入 4℃ 冰箱中保存。

(三) 马丁氏培养基的配制

1. 培养基成分

葡萄糖	10g
蛋白胨	5g
K ₂ HPO ₄	1g

MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g
琼脂	16g
蒸馏水	1000mL
链霉素溶液 (10000U/mL)	3.3mL (临用前加入)

2. 配制方法

(1) 称量及溶化 根据配制量分别计算所需药品量, 记录于实验记录本; 取一烧杯, 加入所需水量 2/3 的蒸馏水, 分别称取葡萄糖、蛋白胨、K₂HPO₄ 和 MgSO₄ · 7H₂O, 依次逐一加入并溶化。

(2) 定容 将烧杯中的溶液倒入量筒中, 定容。

(3) 调 pH 待溶液冷至室温后用 1mol/L NaOH 溶液以及 1mol/L HCl 溶液调 pH 值至 7.2~7.4。

(4) 加琼脂 将对应的琼脂先放到锥形瓶中, 再将定容后的液体培养基倒入锥形瓶中。

(5) 封口 用无菌封口膜封口、包扎。

(6) 灭菌 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min。等到培养基完全凝固后, 放入 4℃ 冰箱中保存。

(7) 倒平板 临用前, 加热熔化培养基, 待冷却至 60℃ 左右, 每 1000mL 培养基以无菌操作加入 3.3mL 的链霉素溶液 (10000U/mL), 迅速混匀, 倒平板。

【注意事项】

- ① 称药品用的牛角匙不要混用, 称完药品应及时盖紧瓶盖。
- ② 培养基配制加热过程中, 须不断搅拌, 以防琼脂糊底或溢出。
- ③ 灭菌锅操作要注意安全。

五、思考题

- ① 制作平板培养基有哪些注意事项?
- ② 培养基配好后, 为什么必须马上进行高压蒸汽灭菌? 如不能及时灭菌时, 应将培养基暂时放置于何处?
- ③ 如何检查灭菌后的培养基是否无菌?
- ④ 在马丁氏培养基的配制中, 链霉素为什么要临用前才加入?
- ⑤ 如果需要配制一种含有某抗生素的牛肉膏蛋白胨培养基, 其抗生素的终浓度 (或工作浓度) 为 50μg/mL, 应如何操作?
- ⑥ 试设计实验对饮料进行无菌检查。

实验二 固氮微生物选择性培养基的配制

一、实验目的

- ① 熟悉选择性培养基的原理；
- ② 掌握配制选择性培养基的方法和步骤。

二、实验原理

选择性培养基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。

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，故可在该培养基上生长，从而达到分离固氮菌的目的。

在农业生产上可以利用分离得到的固氮菌，制作微生物菌肥；基础研究中亦可研究其与植物的相互作用。

三、试剂与器材

1. 试剂

甘露醇、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、 NaCl 、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、无氮琼脂。

2. 器材

电子天平、烧杯、锥形瓶（250mL 容量）、量筒、漏斗、试管、玻璃棒、高压蒸汽灭菌锅等。

四、实验方法

Ashby 无氮培养基的配制

1. 培养基成分

甘露醇 10g、 KH_2PO_4 0.2g、 MgSO_4 0.2g、NaCl 0.2g、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、无氮琼脂 15~20g、蒸馏水 1000mL，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 蒸馏水，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 蒸馏水，放入琼脂加热至溶化，与试剂溶液混合，稍作加热并补足水分至 1000mL。

(3) 分装 将培养基分装，加塞，包扎， 121°C 灭菌 20min。

(4) 倒平板 待培养基凉至 50°C 时，倒平板备用。

【注意事项】

琼脂一定选择无氮琼脂。

五、思考题

- ① 为什么 Ashby 无氮培养基可以分离固氮菌？
- ② 为保证固氮菌的分离效果，配制 Ashby 无氮培养基时应注意哪些事项？

实验三 微生物鉴别性培养基的配制

一、实验目的

- ① 了解鉴别性培养基的原理；
- ② 掌握配制鉴别性培养基的方法和步骤。

二、实验原理

鉴别性培养基是一类在成分中加有能与目的菌的无色代谢产物发生

显色反应的指示剂，从而只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（eosin-methylene blue medium，简称 EMB medium），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。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。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杆菌的生长，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。

三、试剂与器材

1. 试剂

蛋白胨、牛肉膏、葡萄糖、乳糖、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、硫酸亚铁、煌绿、柠檬酸铋铵、亚硫酸钠、猪胆盐、伊红、美蓝、溴甲酚紫、琼脂、NaOH、HCl。

2. 器材

电子天平、烧杯、锥形瓶、量筒、漏斗、试管、玻璃棒、加压蒸汽灭菌锅等。

四、实验方法

（一）伊红美蓝乳糖培养基的配制

1. 培养基成分

蛋白胨	10g
乳糖	10g
磷酸氢二钾	2g
琼脂	20~30g
蒸馏水	1000mL
2%伊红水溶液	20mL

0.5%美蓝水溶液 13mL

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, 将其放入适当的烧杯中, 加入 $1/2 \sim 2/3$ 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 1000mL 培养基加入 20mL 2% 伊红水溶液和 10mL 0.5% 美蓝水溶液。

(4) 分装灭菌 分装到锥形瓶中, 并加入适量琼脂, 加棉塞进行包扎, 高压蒸汽 115°C , 灭菌 20min。

(二) 乳糖胆盐发酵培养基的配制

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	1000mL
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, 将其放入适当的烧杯中, 加入 $1/2 \sim 2/3$ 所需水量, 溶化各营养成分, 并定容。

(2) 调 pH 值 调节 pH 值至 $7.3 \sim 7.4$ 。

(3) 加入染料 按每 1000mL 培养基加入 25mL 0.04% 溴甲酚紫溶液。

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

(三) 亚硫酸铋琼脂培养基配制

1. 培养基成分

蛋白胨	10g
牛肉膏	5g
葡萄糖	5g
磷酸氢二钠	4g