



## 微生物生长谱法实验技术的改进与探析

辜建平\* 张庆 刘邦芳 方德华

(西南农业大学资环学院 重庆 400716)

**摘要:** 在合成培养基平板上, 接种同一种菌, 再置入不同的糖浸片进行微生物生长谱法实验, 并与传统的糖粒法相比较。结果表明, 采用糖浸片法来鉴定微生物对不同糖类的利用程度, 比传统的糖粒法效果更好; 且更利于操作和定性研究。

**关键词:** 微生物, 生长谱法, 糖粒, 糖片

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0090-04

### Improvement and Analysis in Experimental Technology of Microorganic Auxanography

GU Jian-Ping ZHANG Qing LIU Bang-Fang FANG De-Hua

(College of Resources and Environment in Southwest Agricultural University, Chongqing, 400716)

**Abstract:** inoculant the examine-needed germ on a flat panel of synthetic medium, and placed paper slices, which had being saturated by different kinds of sugar, on the medium to carry out the experiment of microorganic auxanography. Its result was compared with that of the traditional method, the sugar-grain method. The comparison showed that the former was better than the latter for its more definite result and more convenient operation.

**Key words:** Microorganic auxanography, Sugar-saturated paper, Sugar-grain

生长谱法是鉴定微生物对营养元素需求程度的主要实验技术之一。传统方法是在混菌平板上, 点置不同种类的糖粒 (小米粒大), 经培养一定时间后观察同一种菌对不同糖的变色反应范围, 即生长谱大小来鉴别其利用程度。但是, 此法在实际操作过程中存在着供试糖粒大小难以控制、变色反应范围模糊、结果不准确等缺点。为了使生长谱法实验更具科学性、准确性和可行性, 特在教学实践中将传统的糖粒法 (亦称“挑糖法”) 改进为糖浸片法。结果表明, 效果很好, 深受任课教师和学生的好评。现将改进后的生长谱法实验技术简介如下, 仅供参考。

### 1 实验原理

微生物在其生长繁殖过程中对碳源的利用一直是一个值得关注的问题, 如需要鉴定某一种微生物对不同含碳有机物质的利用程度, 则可在缺乏某种或某几种糖的含有指示剂的合成培养基平板上, 采用混菌法接入某种微生物, 再在接菌平板上置入某种或某几种糖, 经一定条件培养后, 即可通过糖粒/糖片周围指示剂变黄范围的大小, 即微生物对不同糖的利用效率的高低, 来鉴别某种微生物对不同糖的需求和利用程度。

\* 联系人 Tel: 13110225976, E-mail: gwping80@sohu.com

收稿日期: 2004-04-02, 修回日期: 2004-06-03

## 2 实验器材

菌种：采用 4 种不同的细菌，编号为 a-大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、b-枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、c-普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*)、d-金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 斜面菌种。

培养基配方：(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, KCl 0.2 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g, 豆芽汁 10 mL, 琼脂 20 g, 蒸馏水定容至 1 L pH 7.0。培养基配好后，加入 12 mL 0.04% 的溴甲酚紫作指示剂 (pH5.2 ~ 6.8)，将颜色由黄色调为紫色。1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。

糖类：选用 6 种不同的糖，编号为 A—葡萄糖、B—乳糖、C—麦芽糖、D—蔗糖、E—甘露糖、F—半乳糖及其圆形滤纸糖浸片。

器具：无菌培养皿、吸管、镊子、牙签、酒精灯、接种环等，另备试管无菌水 6 支。

## 3 实验方法

(1) 制作糖浸片：将圆形打孔器 (φ0.8 cm) 打下的滤纸片，置入不同糖的饱和溶液中浸泡 10 min 后，取出置 28℃ 培养箱中烘干备用 (最好置紫外灯下灭菌 20 ~ 30 min)。

(2) 制备菌悬液：将已培养 24h 的大肠杆菌 (*E. coli*) 等 4 种斜面菌种，分别用无菌水制成菌悬液。

(3) 做混菌平板：以 *E. coli* 为例，取合成培养基 2 支 (10 ~ 15 mL/支)，热水浴融化并冷却至 50℃ 左右时，各加入大肠杆菌悬液 1 mL 混菌后，分别倾注于无菌平皿中，制成混菌平板，等其充分冷凝后备用。

(4) 分小区植糖：在冷凝后的甲、乙 2 个混菌平皿背面，用记号笔画出 6 个均匀的植糖区域 (图 1)，先用 6 根牙签或接种环分别挑取 A、B、C、D、E、F 6 种糖粒对号点植于甲平板的对应区域中；再用无菌镊子分别取代号为 A、B、C、D、E、F 的 6 种糖浸片各 1 张对号放入乙平板的对应区域中，并轻轻按压，以免在进行倒置培养时糖片脱离培养基平板。

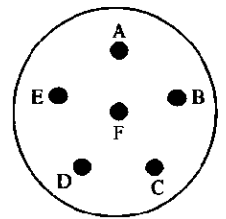


图 1 平板分区示意图

(5) 培养及观察：将已点植糖粒或放置糖浸片后的平皿置于 37℃ 条件下，培养 18 ~ 24 h 后，分别观察挑糖法和糖片法的实验效果。如用其它供试菌种，也照上法进行实验。

## 4 实验结果

采用传统的挑糖粒法与改进后的糖浸片法鉴定大肠杆菌等 4 种微生物的生长谱实验，其效果记录见表 1、图 2。

表 1 不同微生物对不同糖类的利用程度

菌种	大肠杆菌		枯草杆菌		变形杆菌		金黄色葡萄球菌	
	(a)	(a)	(b)	(b)	(c)	(c)	(d)	(d)
糖类	糖粒法	糖片法	糖粒法	糖片法	糖粒法	糖片法	糖粒法	糖片法

续表 1

葡萄糖 (A)	#	+++	+++	+++	+++
乳糖 (B)	+	++	++	+++	+
麦芽糖 (C)	++	++	++	++	++
蔗糖 (D)	+	+	++	+	+++
甘露糖 (E)	++	++	-	++	-
半乳糖 (F)	+	+	+	+	+

注: +++ 最能利用, ++ 能利用, + 较能利用, - 不能利用, # 营养图模糊或重叠

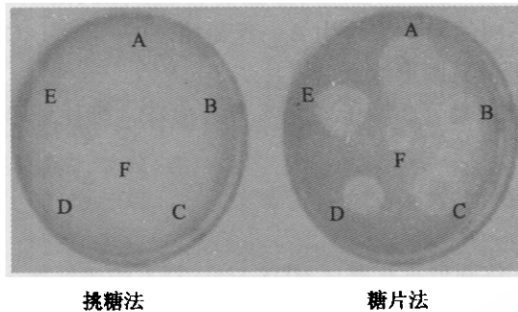


图 2 大肠杆菌生长谱实验效果比较示意图

从表 1、图 2 可以看出: (1) 采用传统的糖粒法鉴定大肠杆菌 (*E. coli*) 对不同糖类 (碳源) 的利用程度, 其效果很不好判断, 糖粒周围的显色 (淡黄色) 范围, 像云团一样没有规则, 各种糖粒变色圈相互交叉、重叠, 很难分辨做出结果分析统计; 另外, 采用糖粒法的培养时间很难控制。在合成培养基上的大肠杆菌 (*E. coli*) 生长正常, 整个培养皿内紫色指示剂均变为黄色, 很难进行量化来区别 *E. coli* 对不同糖类的利用程度。(2) 采用改进后的糖片法鉴定 *E. coli* 对不同糖类的利用程度则可进行一定程度的量化, 在 *E. coli* 生长谱 (指示剂变色区) 呈圆形包围在糖浸片的周围, 而且不同糖浸片周围的营养圈大小区别显著, 这对于实验结果的观察与分析很有帮助。若从感性角度鉴定 *E. coli* 对不同糖类的利用程度, 只要分别量取不同糖呈淡黄色反应圈的直径, 即可做出初步判断。

## 5 采用糖浸片实验法鉴定微生物生长谱的探析

通过本实验的效果对比表明, 采用改进后的糖浸片法具有如下优点:

(1) 操作方法简易: 虽然挑糖法仅需要简单的设备和用具, 对实验人员的技术水平要求也不高, 对初学者是一讲便懂, 一看就会, 但在具体操作过程中却很不好掌握, 很难做到使挑糖量相等、糖的植入点准确, 即使很小心也常伴有零星的糖粒散落在平板植入点的周围, 导致混菌平板植入点上的糖量分布不均匀, 深浅不一致。而采用糖浸片法则克服了挑糖法存在的上述缺点, 操作极为简便, 只要用无菌镊子将糖片放入分区平板上, 轻轻按压一下即可。

(2) 实验结果准确: 采用挑糖法的混菌平板上有多种糖类, 但因植入点的糖量不等, 分散不均, 其变色反应圈模糊不清, 很难区分出同一种菌对不同糖类的利用程度, 即使是同一种糖粒在重复试验平板上的变色反应范围也不一致, 根本无法进行量化比较其差异。而采用糖浸片法则可做到: 一种糖片一种糖, 且糖片的形状和大小一致;

不同种类的糖片,其数量和浓度也相同,可使糖分均匀地分散在混菌培养基的表面,克服了糖粒法的糖分浓度不同而造成的误差;实验效果是不同糖片周围的变异反应圈清晰可见,界线分明,大小不等,即可区分出同种微生物对不同糖类的利用程度。因此,实验结果比较准确。

(3) 便于培养观察:糖片法所采用的糖浸片浓度均匀,反应是先经溶解再浸润,糖分浓度相对降低,微生物对其利用也较温和,反应速度比较缓慢,有利于控制培养时间及进行观察鉴定。

(4) 实验成功率高:在对比实验过程中发现,采用糖粒法被感染的情况较为严重,而采用糖浸片法则有利于进行严格的无菌操作,大大降低了因糖分本身而引起的感染机会,从经济学的角度考虑,糖浸片法还有助于降低实验成本。

前述内容,仅以 *E. coli* 对葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘露糖、半乳糖等 6 种糖的利用实验为例。若需测定其它微生物的生长谱,均可按上述方法进行。最后需要提及的是,以上仅为笔者在教学实验中对生长谱法实验技术的改进尝试。目前,在缺乏先进挑取糖粒用具的情况下,选用改进后的糖浸片法是替代传统糖粒法的一种方便、快捷、准确的实验方法。

### 参 考 文 献

- [1] 沈 萍主编. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1999. 6.  
[2] 方德华主编. 微生物实验技术(第三版). 重庆: 西南农业大学自编教材, 2002. 8.