

分离嗜热脂肪芽孢杆菌单个菌落的方法

刘军 陈向东 彭珍荣

(武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

摘要 本文研究了平板培养基的量、培养温度、培养湿度、培养基类型、培养时间对运动性较强的嗜热脂肪芽孢杆菌 WF-146 平板分离的影响。结果表明,控制好上述因素,嗜热脂肪芽孢杆菌 WF-146 在平板上培养可较好形成单菌落。

关键词 嗜热脂肪芽孢杆菌, 平板分离

分类号 Q93-335

嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) WF-146 是一株高产高温蛋白酶的优良菌株,在 Fd 培养基中平均产酶达 $600\text{u/ml}^{[1]}$ 。故该菌株有较大的潜在应用价值,同时它也可以作为研究嗜热菌的嗜热机制、起源、进化等的一种实验材料。由于该菌株运动性强,培养温度高,在平板上生长扩散快,很难形成单菌落。为此,对该菌的单个菌落分离方法进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

嗜热脂肪芽孢杆菌 WF-146 本实验室筛选和鉴定^[1]。

1.2 培养基

1.2.1 PYS 培养基 (%): 酵母膏 0.4, 蛋白胨 0.8, NaCl 0.3, 琼脂 2, pH7.2, $1 \times 10^5\text{Pa}$, 20min 灭菌。

1.2.2 酪素培养基 (%): 蛋白胨 1, 葡萄糖 1, 酪素 0.5, NaCl 0.5, CaCl_2 0.01, L-Tyr 0.01, 琼脂 2, pH7.4, 113°C , 30min 灭菌。

1.2.3 牛奶培养基 (%): 蛋白胨 0.05, 酵母膏 0.025, 脱脂牛奶 1, 琼脂 2, pH7.2, $0.55 \times 10^5\text{Pa}$, 30min 灭菌。

1.2.4 Md 培养基 (%): 蛋白胨 1, 葡萄糖 0.1, 脱脂牛奶 1, NaCl 0.5, CaCl_2 0.01, L-Tyr 0.01, 琼脂 2, pH7.2, 113°C , 30min 灭菌。

1.3 方法

嗜热脂肪芽孢杆菌 WF-146 在 PYS 斜面上 60°C 活化 24h, 用生理盐水进行十倍稀释, 取适当稀释度的菌悬液 0.1ml 涂布 PYS、酪素、牛奶、Md 平板, 置不同条件下培养。

2 结果与讨论

2.1 平板培养基的量

由于培养温度高, 水分蒸发快, 每皿 (直径 9cm) 盛培养基 15ml, 则平板太薄, 培养基易干裂, 以每皿加培养基 20~25ml 为宜。

2.2 培养湿度

WF-146 在高温下培养, 若培养湿度过大, 菌落扩散很快, 会分布整个平板, 很难形成单菌落。但湿度太小, 平板易干裂。实验中我们采取了以下措施: 平板倒好后在 37°C 放 2、3d, 蒸发掉琼脂平板表面水分; 在培养箱中放一盛水瓷盘以调节湿度; 或将平板放入塑料袋中密封培养, 以调节培养湿度。

2.3 培养基类型

WF-146 在不同培养基上培养生长情况差异较大。实验中选用了 PYS、酪素、牛奶、Md 培养基, 在其它培养条件 (温度、湿度、平板厚度、培养时间、涂布量) 相同的情况下, WF-146

国家教委重点资助项目

1997-10-22 收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

在 PYS 平板上较易形成单菌落,其次是酪素平板,在牛奶平板和 Md 平板上较难形成单菌落。

2.4 培养温度

WF-146 在不同温度下培养扩散性差异大,对 PYS 平板,55℃ 培养,可较好形成单菌落,60℃ 和 60℃ 以上培养形成单菌落较难。对酪素平板,先在 55℃ 培养 12h,再在 60℃ 以上(不超过生长上线温度 70℃)培养,则可较好形成单菌落。60℃ 是 WF-146 分泌蛋白酶的最适温度,控制好湿度和培养基的量,在酪素平板的菌落周围可形成蛋白质水解透明圈,其直径与菌落直径之比可作为筛选优良菌株的初步指标^[2,3]。

2.5 培养时间

WF-146 PYS 平板培养,一般培养 12h 开始出现单菌落,培养 24h 单个菌落分离情况最好,随着时间延长,菌落扩大,同时菌落开始扩散,在 32~34h 扩散至整个平板。

嗜热细菌的培养,由于培养温度高,水分蒸

发快,应注意控制培养湿度^[4],适当增加琼脂百分比、平板厚度,以防平板干裂。对运动性较强的嗜热细菌,应根据不同类群的特性,选择合适的培养基、培养温度、培养湿度、培养时间,使其在平板上培养扩散性减弱以得到单菌落。另外,由于培养温度高,单个菌落不一定来自单一细胞,故应进行多次分离、纯化,直至菌落在平板上呈现单一大小、形态。

参 考 文 献

- [1] 戴玄,唐兵,陈向东等. 微生物学杂志, 1997, 17: (3): 25~29.
- [2] 美美珍,胡锦涛,李农昌等. 微生物学通报, 1994, 12(4): 202~206.
- [3] 邱宝秀,程秀兰,袁影. 微生物学通报. 1988, 15(3): 101~104.
- [4] Kanasawud P W. J Microbiol Biotechnolo, 1992, 8: 137~140.