

动物微生物生态学实验

主讲教师：倪学勤

实验一 生境调查：直接镜检

生境的概念

生境是指正常微生物在进化过程中，一定生态组织层次与环境相互适应，相互影响所形成的统一体的空间侧面。

- ❖ 生境是一个相对的概念。
- ❖ 一般从定性、定量、定位三方面来反映生境内微生物群落的情况。

生境调查常用的检测方法

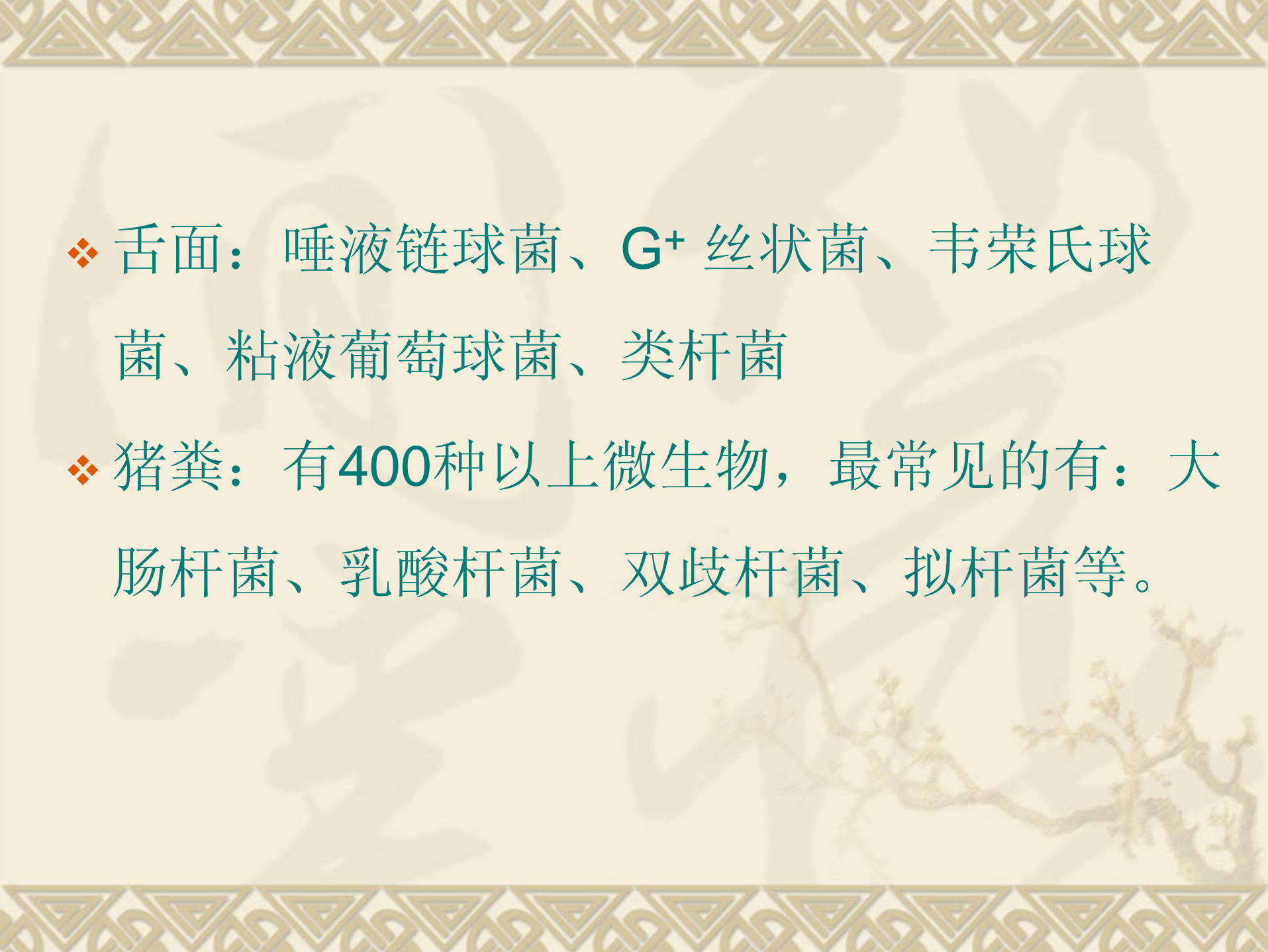
- ❖ 直接镜检法——较为简单、快速的方法
- ❖ 活菌计数法——定量评估
- ❖ 分子生物学方法——目前研究的热点

实验目的

- ❖ 通过直接镜检来了解生境内正常或异常微生物群或群落的结构与分布状态
- ❖ 掌握革兰氏染色的方法，对微生物形态进行观察

二 实验原理

- ❖ 正常生境内一般有稳定的微生物群分布
- ❖ 皮肤：表皮葡萄球菌、白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、链球菌、类白喉杆菌、厌氧丙酸杆菌、芽孢杆菌、绿脓杆菌

- 
- ❖ 舌面：唾液链球菌、G⁺ 丝状菌、韦荣氏球菌、粘液葡萄球菌、类杆菌
 - ❖ 猪粪：有400种以上微生物，最常见的有：大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、拟杆菌等。

革兰氏染色原理

- ❖ 细菌学上最常用的鉴别染色方法，根据细菌细胞壁的结构、成分不同将细菌分为G⁺菌和G⁻菌。
- ❖ G⁻菌细胞膜含类脂质多，肽聚糖少——细胞壁通透性增大——首先媒染的结晶紫、碘复合物易于渗出——酒精脱色，溶解类脂质，易于将其洗脱——复红复染成为红色。

❖ **G⁺**菌细胞膜含类脂质少，肽聚糖多——细胞壁通透性减小——初媒染的结晶紫、碘复合物不易于渗出——酒精脱色，细胞壁网孔收缩，不易将其洗脱——复红复染仍为紫色。

三 实验器材

❖ 1 实验仪器

❖ 光学显微镜



❖ 2 实验材料:

- ❖ 试样：皮肤、舌面（人）、粪样（猪粪或鸡粪）
- ❖ 革兰氏染液：结晶紫、碘液、酒精、复红
- ❖ 用具：酒精灯、灭菌生理盐水、显微镜、香柏油、二甲苯、擦镜纸、吸水纸、载玻片、灭菌棉球、废液缸、镊子

四 方法与步骤

1 采样及制片

- ❖ (1) 首先取洁净载玻片，做好标记
- ❖ (2) 采样方法：
 - ❖ 皮肤采样：用沾有少量生理盐水的灭菌棉球用力擦拭采样部位皮肤，反复擦2min，一般取耳根或肘窝部，然后将擦拭后残余液体挤压到载玻片上，待其自然干燥。

- ❖ 舌面采样：将玻片在酒精灯上火焰消毒，待其冷却后将其压于舌面上**1-2min**，力度适宜。
- ❖ 粪样采样：接种环消毒，滴少量生理盐水到载玻片上，取少量粪样，呈同心圆状搅匀、分散，自然干燥。
- ❖ **(3) 固定**：将晾干后的玻片快速通过火焰上方**2-3次**，以不烫手为宜。目的是使样品固定，染色水洗时不易被冲掉。

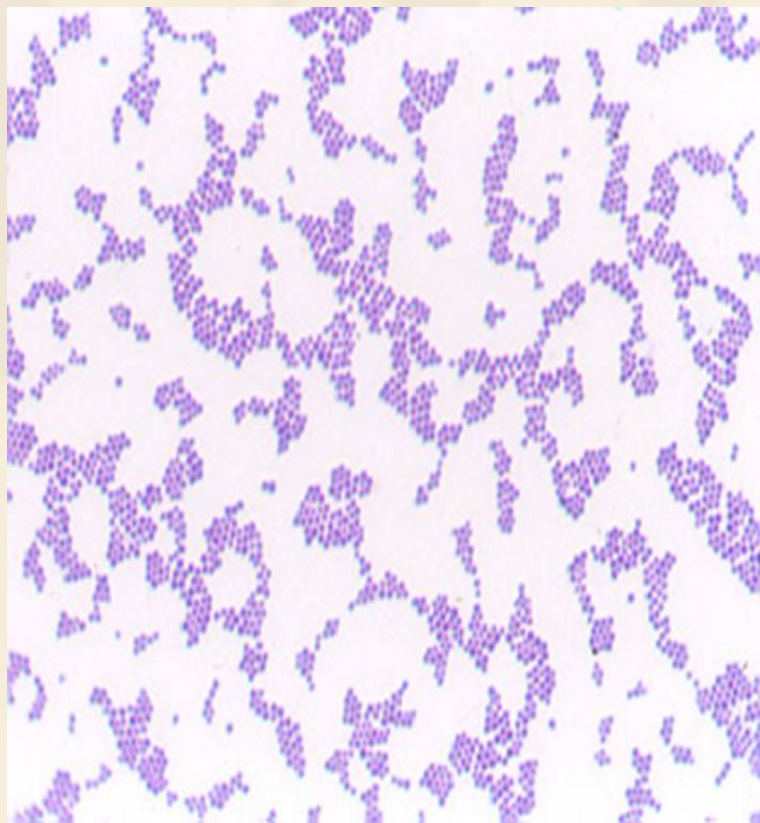
2 染色

- ❖ 将玻片置于废液缸玻片搁架上进行染色
- ❖ 初染：结晶紫，1-2min，水洗
- ❖ 媒染：碘液，1min，水洗
- ❖ 脱色：酒精，0.5-1min，水洗
- ❖ 复染：复红，1min，水洗，滤纸吸干或晾干
以备镜检。

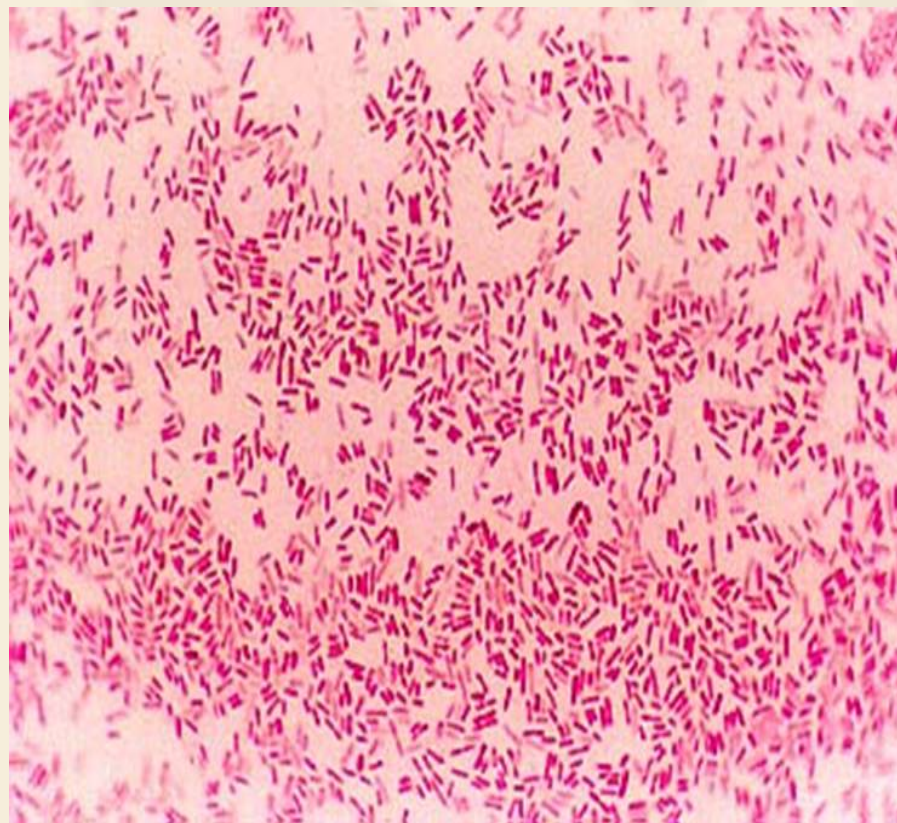
3 镜 检

- ❖ 观察前准备：显微镜的使用，光线合轴，将光线调到视野适宜的亮度。
- ❖ 观察：由低倍到高倍，最后用油镜观察，包括：
 - ❧ 样品中正常微生物染色特性
 - ❧ 正常微生物形态
 - ❧ 各类正常微生物所占比例

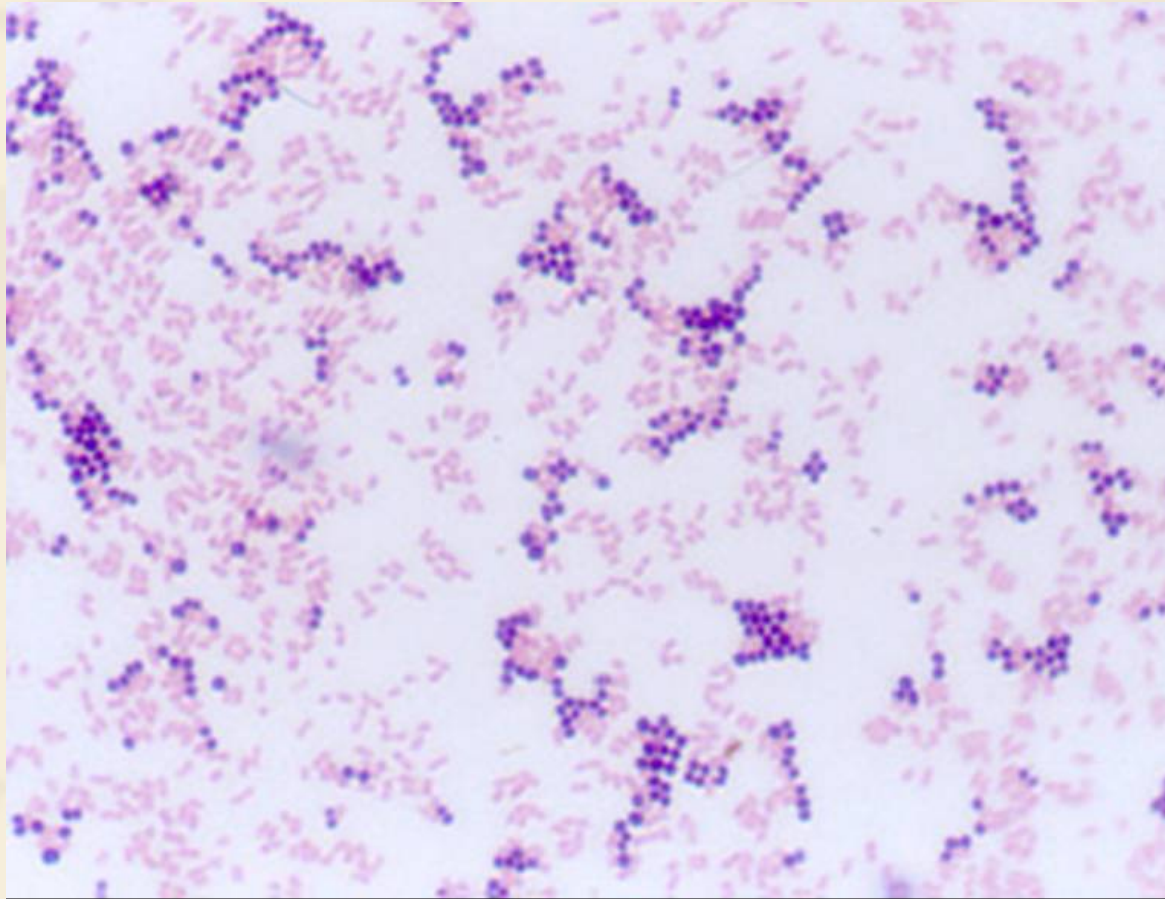
镜检结果



金黄色葡萄球菌



大肠杆菌



革兰氏阴性和阳性菌混合的镜检结果

五 实验报告

- ❖ 1 实验目的、原理、操作步骤
- ❖ 2 结果：绘出镜检结果，包括革兰氏染色反应性，并作简单描述
- ❖ 计算革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌的比例，杆菌与球菌的比例
- ❖ 3 分析：直接镜检的优缺点；实验成败的原因

实验二

生境调查：活菌数的测定

活菌计数的意义

- ❖ 定量评估菌群数量和密度。
- ❖ 确定微生物与微生物、微生物与宿主生态平衡与生态失调。
- ❖ 本方法常用于微生物制品质量检测，食品、水源污染度的检验，土壤含菌量的测定等。

一、实验目的

❖ 掌握活菌计数的方法

二、实验原理

- ❖ 平板菌落计数法是根据微生物在固体培养基上所形成的菌落一般是由单个细胞繁殖而成的原理设计而成的，即一个生成的菌落代表一个活的单细胞。

三、实验器材

1. 材料

- ❖ 带玻璃珠的三角瓶、移液管、试管、滴管、天平、药品匙、酒精灯、铂耳、CO₂培养箱，摇床等。

2. 培养基

- ❖ EMB、MRS平板各1块。
- ❖ EMB为大肠杆菌选择性培养基
- ❖ MRS是乳酸杆菌选择性培养基



3. 试剂

- ❖ 稀释液1：生理盐水（含0.85%氯化钠）
- ❖ 稀释液2：含0.1 %琼脂的生理盐水

4. 标本

- ❖ 取新鲜猪粪10g左右于无菌便盒置4℃冰箱保存备用。
- ❖ 健康动物粪便中含有400种以上的细菌，常见的有大肠杆菌，乳酸杆菌，双歧杆菌，拟杆菌，真杆菌等。

四、方法与步骤

1、标本稀释

(1) 均质化

- 在300ml三角瓶中准确加入49.5ml稀释液和0.50g便样做100倍稀释，然后在室温下，以125rpm速度振荡30分钟，即成为均质化的 10^{-2} 稀释菌液。

(2) 稀 释

- ❖ 取4支试管，各加4.5ml含0.1%琼脂的生理盐水。
- ❖ 10倍稀释样品：从 10^{-2} 稀释菌液中取0.5ml加入含4.5ml稀释液2的试管中，振荡混匀2分钟，即得到 10^{-3} 稀释菌液。按同样方法，从 10^{-3} 依次稀释至 10^{-4} ， 10^{-5} ， 10^{-6} 。



10倍稀释

10⁻²稀释
菌液

0.5ml

0.5ml

0.5ml

0.5ml

10⁻³

10⁻⁴

10⁻⁵

10⁻⁶

各试管内已加4.5ml 稀释液2

2、接种



- (1) 滴种 用带注射针头的滴管从高稀释度菌液开始依次滴种，每个平板4个稀释度，每个稀释度滴3滴。
- (2) 滴种的稀释度选择 EMB选 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} ，MRS选 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 。
- (3) 确定滴管系数 取1ml稀释液，用滴管将其全部移出，确定其准确滴数，即为滴管系数。



常见的细菌接种方法

- ❖ 滴种法——简便，准确，所需培养基较少，但菌群易粘连成片，分散效果不如涂布法。
- ❖ 平板涂布法——结果精确，误差小，但需要大量的培养基。
- ❖ 混悬液法——用于厌氧菌，结果精确，细菌生长均匀，但需要大量的培养基，操作复杂，温度控制要求较高。

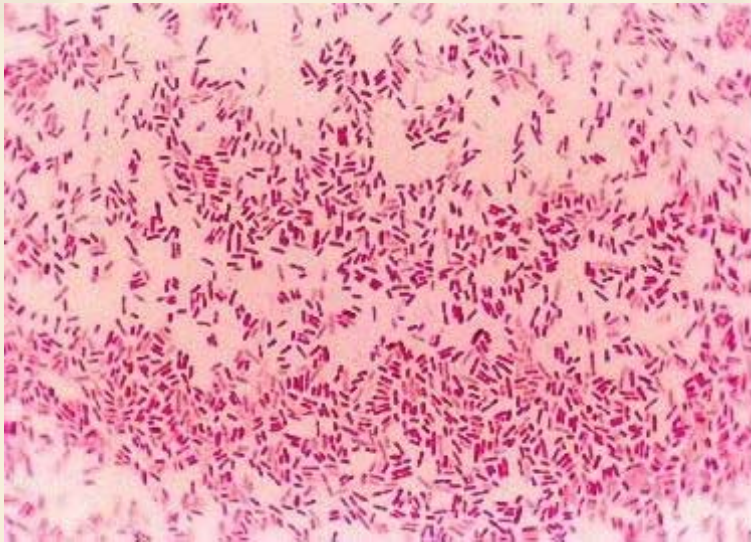
3、培 养

- (1) 需氧培养 将**EMB** 置**37℃**普通温箱内培养**8-10**小时。
- (2) 厌氧培养 将**MRS**置**37℃** 厌氧培养箱内培养**14-18**小时。

4、结果观察和计算

(1) 观察 **EMB**平板上观察大肠杆菌、**MRS**平板上观察乳酸杆菌，先记数，后涂片镜检，排除非目的菌。

❖ 记数原则：取每滴菌落数小于100的稀释度



大肠杆菌镜检结果



乳酸杆菌培养结果

(2) 菌落的计算

- ❖ 根据菌落的可数性，来选择菌落的稀释度，计算每克样品中的活菌数（CFU/g）。
- ❖ $CFU = \text{同一稀释度三个重复平均数} \times \text{稀释倍数} \times \text{滴管系数}$



稀释度的选择

- ① 首选平均菌落数在30-100之间的。
- ② 若有二菌落数符合①，则以高稀释度/低稀释度，若其比值 <2 ，取其平均数；若 >2 ，取其较小的数字。
- ③ 若均 <30 ，则按稀释度最低的计算。
- ④ 若均无菌落生长，则按 $<1 \times$ 最低稀释倍数计算。



五、实验报告

1、实验的目的，原理，操作步骤。

2、实验结果：

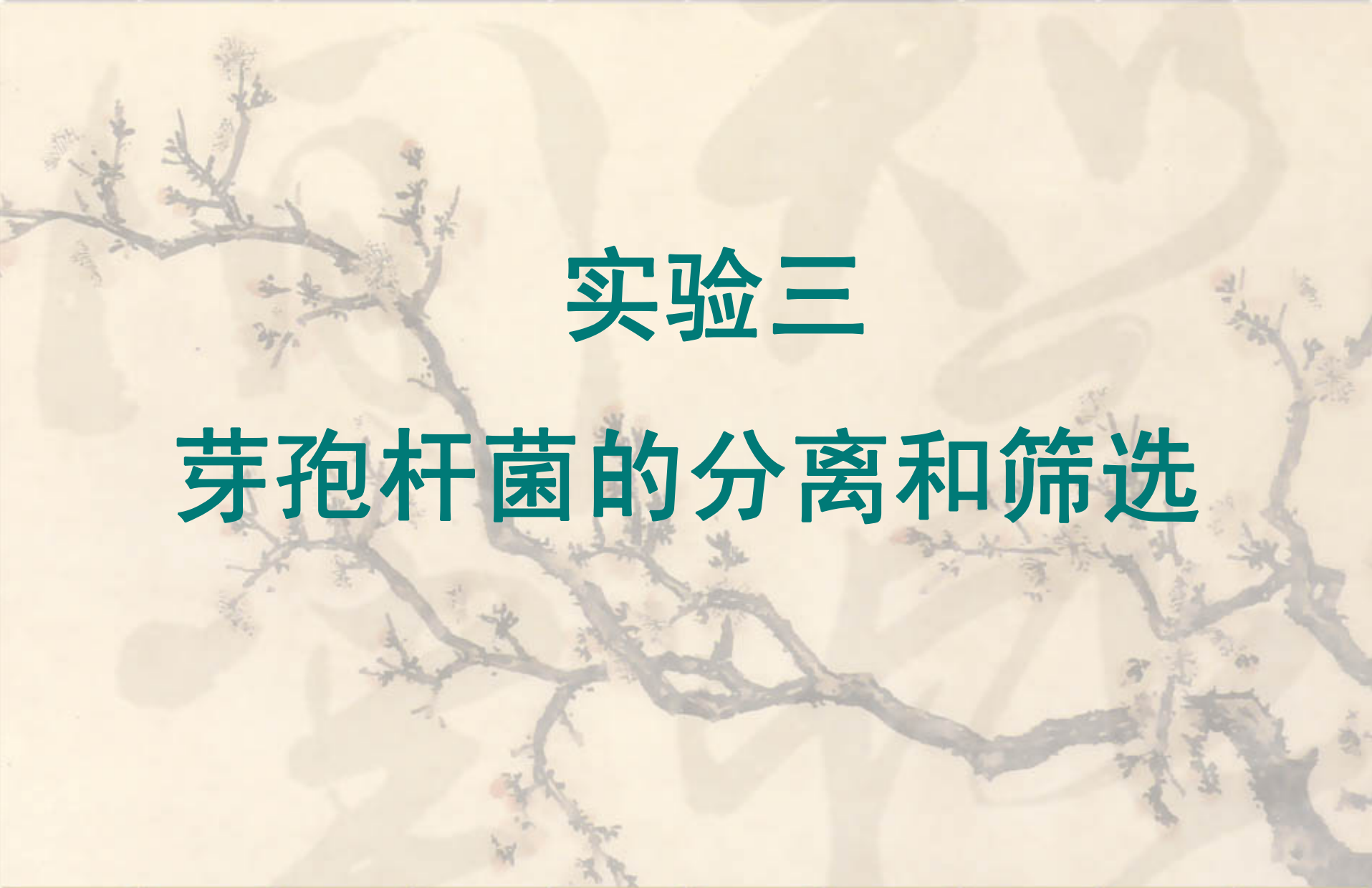

- ❖ 简要描述培养结果以及镜检结果。

- ❖ 计算每克样品中的活菌数。

3、讨论与分析


- ❖ 本实验的关键步骤及所采用的方法的优缺点。

- ❖ 比较活菌计数与直接镜检对生境调查的不同意义。



实验三

芽孢杆菌的分离和筛选



细菌分离的常用方法

❖ 直接划线法

❖ 倾注平板法

❖ 涂布平板法

研究拮抗作用常用的方法

- ❖ 固体法
- ❖ 上清液法（牛津杯法即是此方法的一种）
- ❖ 混合培养法

一. 实验目的

- ❖ 从土壤中分离芽孢杆菌，通过实验掌握芽孢杆菌的分离原理和方法。
- ❖ 筛选对致病性大肠杆菌有抑制作用的芽孢杆菌，通过实验熟悉和掌握牛津杯法检测细菌间拮抗关系的操作和结果判定方法。

二. 实验原理

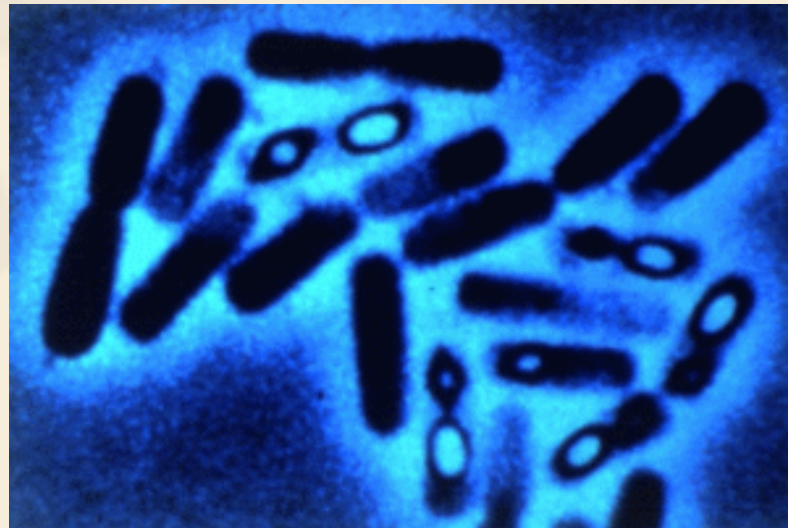
❖ 1. 芽孢杆菌的分离

- ❖ 土壤含丰富腐殖质和有机质，是大多数腐生微生物生活的最好环境。

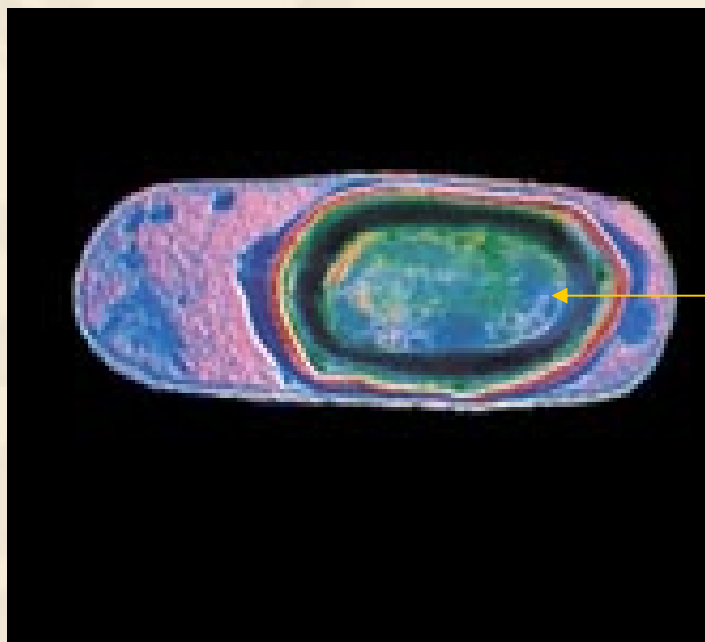
土壤微生物的分布：受土壤深度、来源和日光等因素影响，一般离地表10-20cm土层中细菌含量多。

- ❖ 在微生物生态制剂中，80%都是芽孢杆菌制剂，如地衣芽孢杆菌，枯草芽孢杆菌，蜡样芽孢杆菌等在饲料用已广泛应用，它们通过在宿主肠道内定植耗氧，维持肠道的厌氧菌的定植能力同时降低肠道PH值，从而帮助宿主抵抗病原菌的侵害。
- ❖ 本实验分离筛选芽孢杆菌

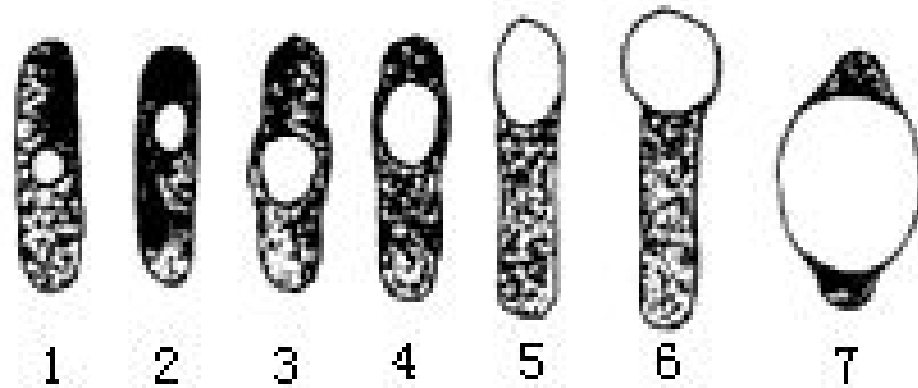
- ❖ 芽孢杆菌呈G⁺，能形成芽孢，具有耐酸，耐盐，耐高温，抗干燥、抗辐射的特点，有鞭毛（炭疽除外）。可分为需氧芽孢杆菌和厌氧芽孢杆菌（梭菌属）。



- ❖ 芽孢的概念：某些菌生长到一定阶段，细胞内形成一个圆形、椭圆形或卵圆形的内生孢子，是对不良环境有较强抵抗力的休眠体。



芽孢



各种芽孢形态和位置

1. 芽孢球形，在菌体中心
2. 卵形，偏离中心不膨大
3. 卵形，近中心，膨大
4. 卵形，偏离中心，稍膨大
5. 卵形，在菌体极端，不膨大
6. 球形，在极端，膨大
7. 球形，在中心，特别膨大

❖ 分离芽孢杆菌原理: 利用芽孢杆菌以芽孢形式存在时具有耐高温的特点, 将样品于80℃高温处理20分钟, 消灭其他菌株, 然后再分离芽孢杆菌。

2. 芽孢杆菌的筛选——对大肠杆菌的拮抗作用

- ❖ 芽孢杆菌及其代谢产物对大肠杆菌有抑制作用，使大肠杆菌不能在芽孢杆菌周围生长，从而形成抑菌圈。从牛津杯中心向外抑菌物浓度逐渐降低，因此抑菌的强度从内向外逐渐减弱。

本实验以枯草芽孢杆菌JS01作对照，该菌对致病大肠杆菌有很好抑制作用。

三. 实验器材

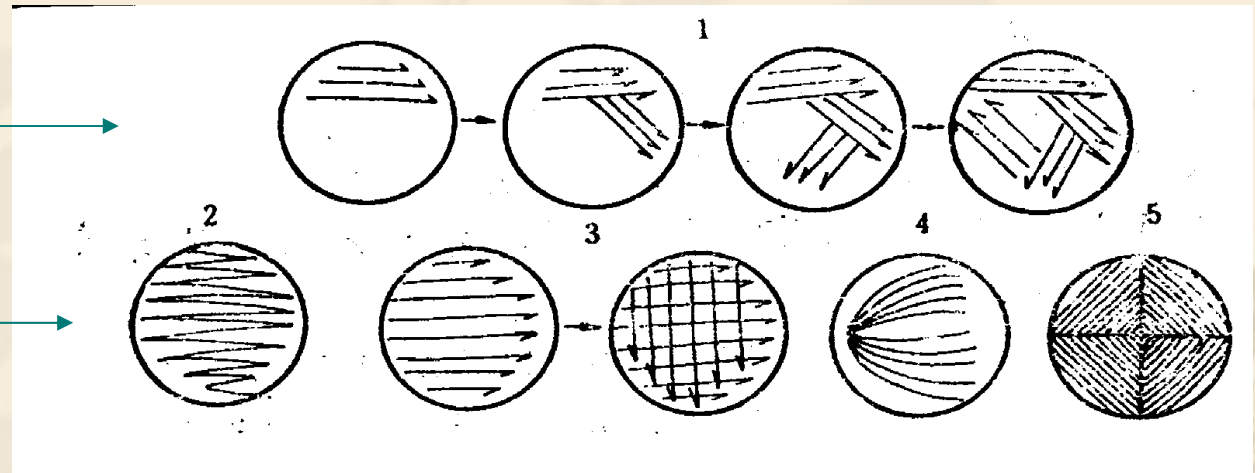
- ❖ 1. 菌株：致病性大肠杆菌ATCC25922，枯草芽孢杆菌JS01（对照）。
- ❖ 2. 仪器：高速离心机，微量加样器，牛津杯，水浴锅。
- ❖ 3. 其他：土壤，营养琼脂平板，三角棒，10mL、1mL移液管，灭菌生理盐水和试管。

四. 实验内容

- ❖ 1. 取0.5g土壤于3mL装有灭菌生理盐水的无菌试管中，振荡混匀。
- ❖ 2. 将样品置80℃水浴锅中处理20min。
- ❖ 3. 取1接种环样品于营养琼脂平板上划线，37℃培养20-24h。

划线步骤

几种划线方法



- ❖ 4. 观察菌落特征，挑取单菌落。涂片、染色、镜检，观察是否形成芽孢。
- ❖ 确认是否是芽孢杆菌。

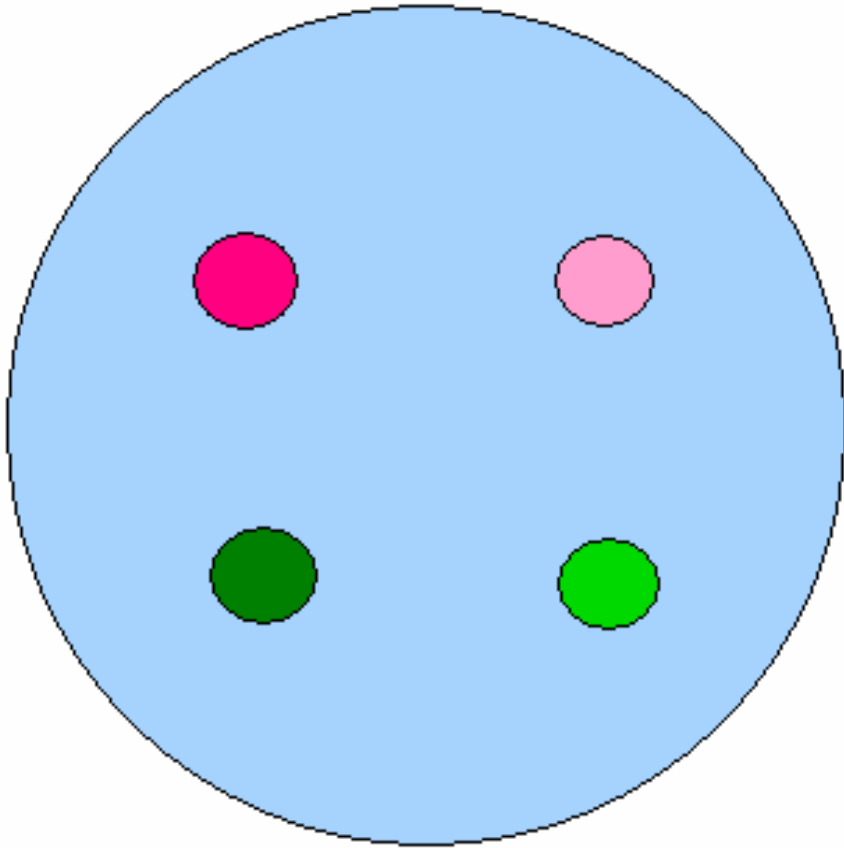


ASM MicrobeLibrary.org © Hedetniemi and Liao

- ❖ 5. 单菌落传代，纯化，保存。为下一步芽孢杆菌的筛选做准备。

- ❖ 6. 准备芽孢杆菌和大肠杆菌24h细菌培养物。
- ❖ 7. 取1.5mL芽孢杆菌培养液15000rpm离心5min，取上清液备用。
- ❖ 8. 大肠杆菌用生理盐水稀释1000倍，备用。
- ❖ 9. 取0.1mL稀释的大肠杆菌菌液涂布营养琼脂平板，37℃放置30min，待吸干后均匀放置4个牛津杯/平板，用微量加样器将从第5步分离纯化的芽孢杆菌和芽孢杆菌JS01全菌液和代谢产物分别加满牛津杯，平置37℃培养10h。

牛津杯的摆放



- 芽孢杆菌全菌液
- 芽孢杆菌上清液
- 芽孢杆菌JS01全菌液
- 芽孢杆菌JS01上清液

10. 结果观察：测量抑菌圈直径(D)，判断拮抗作用的强度。比较芽孢杆菌JS01和本实验组从土壤分离的芽孢杆菌的抑菌效果。

❖ $D < 10\text{mm}$ ：无拮抗作用

❖ $10\text{mm} < D < 15\text{mm}$ ：中等拮抗作用

❖ $D > 15\text{mm}$ ：强拮抗作用

五. 实验报告要求

- ❖ 1. 描述芽孢杆菌菌落特征和镜检特征。
- ❖ 2. 测定抑菌圈直径，并分析影响实验结果的因素。
- ❖ 3. 讨论影响分离筛选结果的因素有哪些？如何保证实验结果的可靠性？