



# 微生物分离与筛选的 4 种“圈法”

张 潇<sup>1</sup> 贺楚楚<sup>2</sup> 苗 茵<sup>3</sup> 喻娟娟<sup>2,\*</sup>

1. 河南省教育考试院 河南郑州(450018)

2. 河南师范大学生命科学学院 河南新乡(453007)

3. 洛阳市教师发展中心 河南洛阳(471000)

**摘 要** 探讨了微生物分离与筛选的 4 种重要方法:抑菌圈法、透明圈法、变色圈法及生长圈法。这些方法通过不同的机制形成独特的圈状结构,实现对目标微生物的有效分离与筛选。比较分析了各方法的原理、应用场景及优势,并探讨了它们在教材和试题中的应用情况,旨在为相关教与学提供参考。

**关键词** 微生物分离和筛选;抑菌圈法;透明圈法;变色圈法;生长圈法

**文章编号** 1005-2259(2024)7-0047-03

“微生物的培养技术及应用”是不同版本高中生物学教材选择性必修 3 中的重要主题,而“微生物的分离与筛选”则是该主题的关键知识。为了从复杂的微生物群落中有效分离和筛选所需的具有特定功能的微生物种类,我们可以依据目标微生物独特的生理特征或其代谢产物特性,设计并配制分离培养基。然后,通过观察在固体培养基上因微生物生长或生化反应后出现的独特圈状结构,如抑菌圈、透明圈、变色圈或生长圈等,实现目标微生物的分离与筛选。值得注意的是,不同版本教材在描述这些“圈法”时存在显著差异,可能会造成教学上的混淆。此外,试题中频繁考查的“微生物分离与筛选”所使用的“圈法”,往往与教材内容并不完全一致,这无疑给学生增添了额外的困惑和挑战。鉴于此,本文深入对比分析这些“圈法”,旨在为相关教学提供更为清晰和实用的参考,从而帮助学生更好地掌握这一知识点。

## 1 抑菌圈法

抑菌圈法在抗生素产生菌的分离筛选中有着广泛的应用(表 1,表 2)。由于抗生素能够杀死或抑制细菌的生长,因此当待测菌能分泌某些抑制工具菌生长的物质(如抗生素)时,便会在待测菌落周围形成工具菌不能生长的抑菌圈。通过观察和测量这些抑菌圈的大小,可以初步筛选出具有潜在抗菌活性的抗生素产生菌。例如,卓平清等人应用

抑菌圈法从多个地区的核桃根际土壤中分离和筛选出一株具有高效抑菌活性的放线菌,这一发现为防菌剂的研发提供了新的可能<sup>[1]</sup>。

此外,抑菌圈法还可以用于评估待测药物(如抗生素)的抗菌效能。其基本原理是利用待测药物在琼脂平板中的扩散作用,抑制周围细菌的生长,从而形成一个清晰的圆形抑菌区域。抑菌圈直径的大小直观地体现了药物抑制细菌生长效力的强弱:直径越大,抑菌作用越强;直径越小,则效果越弱。此外,需要特别注意的是,透明圈内可能存在对该药物具有抗性的耐药菌,从而实现耐药菌的筛选。常用的抑菌圈法主要包括纸片扩散法(或称 K-B 法)、牛津杯法(或称杯碟法)以及打孔法 3 种<sup>[2]</sup>。这 3 种抑菌圈法的主要区别仅在于加药方式:纸片扩散法用含药纸片贴附于细菌平板,牛津杯法通过特制钢管将药物注入细菌平板,打孔法则在平板打孔后滴入药物。

在人教版“遗传与进化”P. 115 的《探究实践》栏目中,详尽地介绍了采用纸片扩散法的抑菌圈实验,旨在深入探究抗生素对细菌所产生的选择作用(表 2)。与此相关的是,2023 年河北省学业水平选择性考试生物学试题第 3 题,描述了在使用抗生素对大肠杆菌进行逐代选择培养的过程中,由于抗生素的选择作用,大肠杆菌的抗药性逐渐增强,在实验平板上表现为抑菌圈逐渐缩小的现象。

\* 通讯作者:喻娟娟(1986—),女,博士研究生学历,讲师,E-mail:yujuan8186@163.com

表1 抑菌圈法、透明圈法、变色圈法与生长圈法的原理、应用及特点比较

| 方法 | 抑菌圈法                 | 透明圈法               | 变色圈法                  | 生长圈法                       |
|----|----------------------|--------------------|-----------------------|----------------------------|
| 原理 | 利用抗生素抑制细菌生长,形成清晰的抑菌圈 | 菌落分解底物形成透明圈        | 菌落代谢产物发生特定的颜色变化,形成变色圈 | 利用营养缺陷型菌株在待测菌落周围生长形成浑浊的生长圈 |
| 应用 | 筛选抗生素产生菌和评估待测药物的抗菌效能 | 筛选水解酶产生菌           | 筛选特定酶或代谢产物产生菌         | 筛选特定营养物质产生菌                |
| 特点 | 抑菌圈大小与抗生素活性成正比       | 透明圈大小与菌株分解底物的能力成正比 | 变色圈的颜色和大小与代谢产物种类和产量相关 | 生长圈大小与待测菌落产生营养物质的能力成正比     |

表2 抑菌圈法、透明圈法、变色圈法与生长圈法的应用实例

| 方法   | 抑菌圈法                                                                              | 透明圈法                                                                              | 变色圈法                                                                               | 生长圈法                                                                                |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 应用实例 | 采用抑菌圈法探究抗生素对细菌产生的选择作用                                                             | 纤维素分解菌在含有刚果红染料的培养基上形成透明圈                                                          | 尿素分解菌在含有酚红指示剂的培养基上呈现红色圈                                                            | 应用生长圈法筛选L-异亮氨酸高产菌                                                                   |
| 结果呈现 |  |  |  |  |
| 实例来源 | 人教版“遗传与进化”<br>P. 115                                                              | 人教版“生物技术与工程”<br>P. 20                                                             | 浙科版“生物技术与工程”<br>P. 19 ~ 22                                                         | 李宗伟等的研究 <sup>[3]</sup>                                                              |

## 2 透明圈法

透明圈法作为一种快速的初步筛选手段,可用于分离具备水解酶产生能力的微生物,如纤维素酶、脂肪酶、淀粉酶、蛋白酶、核酸酶等的产生菌。该方法的实施依赖在固体培养基中掺入难溶或能与显色剂发生颜色反应的相应底物(多为营养成分),从而创建浑浊不透明或带有特定颜色的培养基背景。当水解酶产生菌在培养基上生长繁殖时,它们会分泌相应的酶来分解培养基中的底物,从而在菌落周围形成明显的透明区域,即透明圈<sup>[4]</sup>。透明圈的大小直观反映了菌落对该底物的分解能力。因此,透明圈也被称为“水解圈”“分解圈”或“降解圈”。

在人教版“生物技术与工程”P. 20 的习题中,描述了利用含有纤维素成分的培养基,并添加刚果红试剂来分离和筛选纤维素分解菌的透明圈法。在实验过程中,刚果红与培养基中的纤维素结合,形成红色复合物。然而,当纤维素分解菌释放纤维素酶对纤维素进行有效分解时,红色复合物便无法形成。由此,培养基上便会出现一个以纤维素分解菌为中心的清晰透明圈(表 2)。正是基于这一现象,从而实现纤维素分解菌的分离与筛选。此外,在苏教版“生物技术与工程”P. 8 正文中,简述了将

样品微生物接种于添加了可溶性淀粉的培养基中进行筛选的方法。当观察到菌落周围形成了明显的淀粉“水解圈”时,即表明这些微生物是能够产生胞外淀粉酶的菌株。

在近年来的高考试卷中,多次出现了以透明圈法为背景的题目。例如,2019年北京理综卷第3题考查了利用透明圈法初步筛选淀粉分解菌的实验过程。在该实验情境中,细菌被培养在以淀粉为唯一碳源的培养基上,随后通过添加稀碘液进行处理。由于淀粉与碘反应会呈现蓝色,因此,如果细菌能够分解淀粉,其菌落周围便会出现明显的透明圈。通过观察这些菌落周围透明圈直径的大小,可以有效辨别和评估不同产酶菌株的活力水平。与此类似,2015年江苏理综卷第31题也涉及纤维素分解菌在刚果红培养基上的相关现象,不过在该题中,这种透明圈被表述为“降解圈”,体现了对同一现象的不同表述方式。

需要注意的是,2013 年新课标全国 II 卷第 39 题中提到的“透明圈”与上述情境有所不同。该题中的“透明圈”指的是在检测致病菌对抗生素敏感性的实验中,含抗生素的滤纸片周围出现的无菌圈。这里的无菌圈是由于抗生素抑制了细菌的生长而形成的,与透明圈法中通过微生物利用底物形



成的透明圈有本质区别。因此,在解答此类试题时,建议将该无菌圈理解为抑菌圈,以避免与透明圈法相混淆。

### 3 变色圈法

变色圈法常被用于分离和筛选那些具有特定酶活性、不易形成透明圈但与指示剂有颜色反应的微生物。该方法的实施涉及以下关键步骤:首先,潜在的目标微生物样本被接种到含有特定底物的固体培养基上。随着微生物在培养基上的生长和繁殖,它们会分泌相应的酶来分解这些底物。底物分解的过程会产生可溶性小分子化合物,这些化合物在培养基中的扩散会引起特定区域的颜色变化。与透明圈法相比,变色圈法通过引入指示剂使反应结果更加直观,变色圈的大小成为评估微生物酶活性的重要指标。通常,变色圈越大,表明微生物的酶活性越高,对底物的分解能力也越强<sup>[5]</sup>。

在北师大版“生物技术与工程”P. 14~15和浙科版“生物技术与工程”P. 19~22的实验活动中,均详细描述了采用变色圈法分离并筛选土壤中的尿素分解细菌。在实验中,培养基被特别设计为只含有尿素作为唯一的氮源。因此,只有那些能够分泌脲酶的微生物才能在该培养基中生长和繁殖。这些尿素分解细菌利用脲酶将尿素分解为氨,作为其生长所需的氮源。同时,分解过程中产生的氨会改变培养基的酸碱度,使其碱性增强。为了便于观察这一变化,培养基中加入了在酸性条件下呈黄色、碱性条件下呈红色的酚红指示剂。因此,通过观察菌落周围是否出现“红色圈”,可以准确地筛选出尿素分解菌(表2)。在相同的培养条件下,“红色圈”的大小直观反映了细菌利用尿素的能力强弱。此外,在苏教版“生物技术与工程”P. 8正文中,简述了将样品微生物接种于添加了溴甲酚紫的培养基中筛选产酸微生物的方法。当观察到菌落周围由紫色转为“黄色圈”时,即表明分离出产酸微生物。尽管尚未有高考试题涉及变色圈法,但它已在多份模拟试题中出现,如2023年河北省高三4月大联考和江苏省泰州市2021—2022学年高三首次调研测试。

### 4 生长圈法

生长圈法是一种高效筛选特定营养物质(如氨基酸、核苷酸和维生素)产生菌的方法。该方法的

核心在于选用适当的营养缺陷型菌株作为指示菌,这类菌株因缺乏某种关键营养物质而无法在缺乏该营养物质的培养基上生长。实验时,将待测菌株涂布于含有高浓度指示菌且缺少特定营养物质的平板上,若待测菌能合成并释放该缺失营养物,则指示菌会在该待测菌周围生长,形成明显的混浊生长圈。生长圈的直径大小,可以初步判断待测菌落合成和释放指示菌所需营养物质的能力。例如,李宗伟等人应用生长圈法筛选L-异亮氨酸高产菌(表2)<sup>[3]</sup>。尽管生长圈法尚未正式出现在高考试卷中,但它已多次作为模拟卷试题情境,如2023年山东省菏泽市高三二模联考卷以及2021年河北唐山统考模拟预测卷中均融入了生长圈法的实验内容,旨在检验学生的相关知识和实验技能的掌握情况。

抑菌圈法、透明圈法、变色圈法和生长圈法作为微生物分离与筛选的4种重要方法,在高中生物学教学中具有重要地位,尤其是在发酵工程部分。这些方法广泛应用于微生物筛选、鉴定、药敏测试和代谢研究,为科学研究和实际应用提供了有力支持。在教学过程中,教师若能有效结合这4种方法的原理、特点及实际应用案例,设计出综合性、探究性的实验项目,将极大地促进学生对微生物分离和筛选相关知识的深度理解。这种教学方式不仅能够提升学生动手操作的实验技能,还能够培养他们解决实际问题的能力和科学思维,同时也为培养未来的科研人才和应用型人才奠定坚实的基础。

#### 参考文献

- [1] 卓平清,王瀚,赵淑玲,等. 核桃根际土壤一株农用抗生素产生菌的筛选和鉴定[J]. 宁夏师范学院学报, 2022,43(7):44-51.
- [2] 谭才邓,朱美娟,杜淑霞,等. 抑菌试验中抑菌圈法的比较研究[J]. 食品工业,2016,37(11):122-125.
- [3] 李宗伟,苏明杰,谈重芳,等. 生长圈法应用于选育L-异亮氨酸菌株的条件优化[J]. 食品工业科技,2012,33(18):202-204.
- [4] 李雪艳,张涛,杨红梅,等. 棉花黄萎病拮抗细菌胞外酶检测及其酶活测定[J]. 新疆农业科学,2018,55(9):1663-1673.
- [5] 王晓玲,万芳芳,刘高强. 湘江河岸土壤中高产甲壳素脱乙酰酶菌株的筛选及鉴定[J]. 微生物学通报,2016,43(5):1019-1026. ▲