

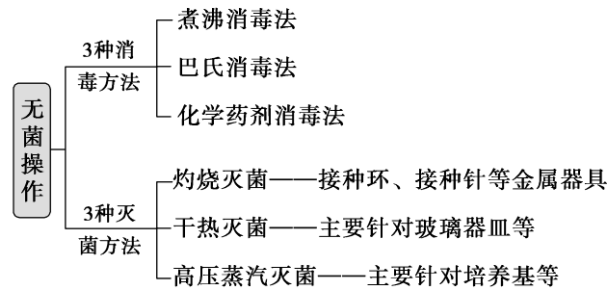
专题十二 选修一专题（微生物分离、培养与计数、发酵工程）

编制人：周金露

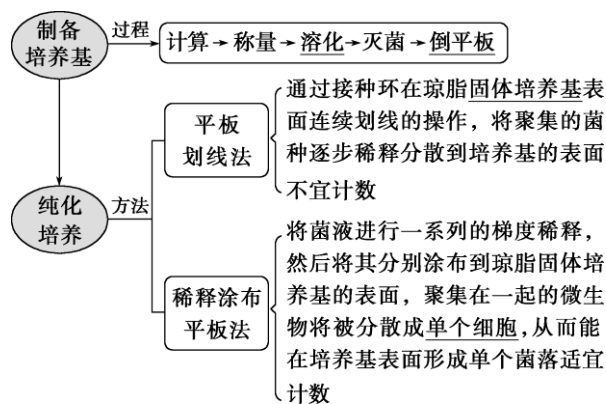
微生物的培养、分离与计数

【必备知识讲解】

1. 微生物培养中的无菌操作技术



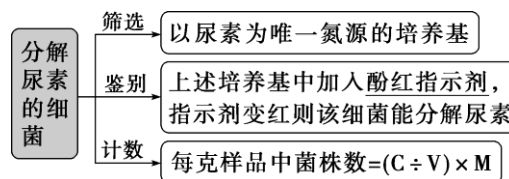
2. 培养基制备与微生物纯化技术



3. 筛选目的微生物的原理与实例

(1) 原理：人为提供有利于目的菌株生长的条件(包括营养、温度、pH 等)，同时抑制或阻止其他微生物的生长。因此，可以通过配制选择培养基、控制培养条件等选择目的微生物。

(2) 实例



[提醒] (1) 用稀释涂布平板法统计的菌落数往往比活菌的实际数目低，这是因为当两个或多个细胞连在一起时，共同发展为一个菌落。

(2) 关注两种对照组与一种重复组

- ① 将一未接种的选择培养基与接种的选择培养基一起培养——用于确认培养基灭菌是否彻底(制备是否合格)。
- ② 将一接种的普通培养基与接种的选择培养基一起培养——用于确认选择培养基是否起到“筛选”作用。
- ③ 进行微生物计数时，每一稀释度下涂布三个平板，即设置重复组，是为了求平均值，提高计数准确度。

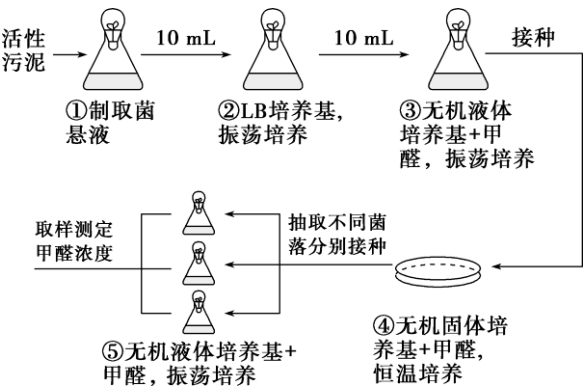
【典型例题训练】

1. (2020·江苏卷)为纯化菌种，在鉴别培养基上划线接种纤维素降解细菌，培养结果如右图所示。下列叙述正确的是()

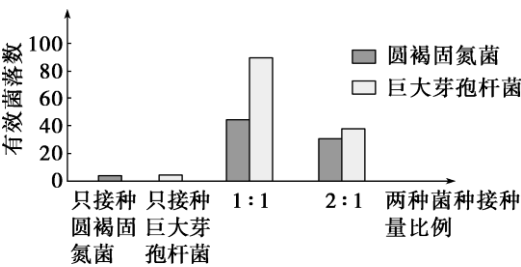
- A. 倒平板后需间歇晃动，以保证表面平整
- B. 图中 I、II 区的细菌数量均太多，应从 III 区挑取单菌落
- C. 该实验结果因单菌落太多，不能达到菌种纯化的目的
- D. 菌落周围的纤维素被降解后，可被刚果红染成红色

2. (2019·江苏卷)下列关于微生物实验操作的叙述,错误的是()

- A. 培养微生物的试剂和器具都要进行高压蒸汽灭菌 B. 接种前后,接种环都要在酒精灯火焰上进行灼烧
C. 接种后的培养皿要倒置,以防培养污染 D. 菌种分离和菌落计数都可以使用固体培养基
3. (多选)为分离和纯化分解甲醛的细菌,实验小组进行如下图所示实验,其中 LB 培养基能使菌种成倍扩增,下列说法不正确的是()



- A. 需要对活性污泥做灭菌处理 B. ②中 LB 培养基应以甲醛为唯一碳源
C. 杂菌不能在③④过程中繁殖 D. 经⑤处理后, 应选择瓶中甲醛浓度最低的一组进一步纯化培养
4. (多选)厨余垃圾是指居民日常生活及食品加工、餐饮服务、单位供餐等活动中产生的垃圾。废液中的淀粉、蛋白质、脂肪等微溶性物质, 易腐烂、变质, 滋生病原微生物等。若处理不当, 可能造成严重的污染。圆褐固氮菌和巨大芽孢杆菌组合可以将有机厨余垃圾迅速分解成水和二氧化碳, 减轻环境污染。为制备分解有机厨余垃圾的微生物菌剂, 某科研小组对两菌种进行了最佳接种量比的探究实验, 并得出下图的实验结果。下列叙述错误的是()



- A. 巨大芽孢杆菌生长过程中需要氮源, 圆褐固氮菌生长过程中不需要氮源
B. 要统计活菌数目可采用平板划线法和稀释涂布平板法
C. 将 1 mL 菌液稀释 100 倍, 在 3 个平板上分别接入 0.1 mL 稀释液; 经适当培养后, 3 个平板上的菌落数分别为 42、39 和 36。据此可得出每升菌液中的活菌数为 3.9×10^7
D. 处理该类厨余垃圾废液, 两菌种的最佳接种量比为 1:1
5. (2020·江苏卷)产脂肪酶酵母可用于含油废水处理。为筛选产脂肪酶酵母菌株, 科研人员开展了相关研究。请回答下列问题:

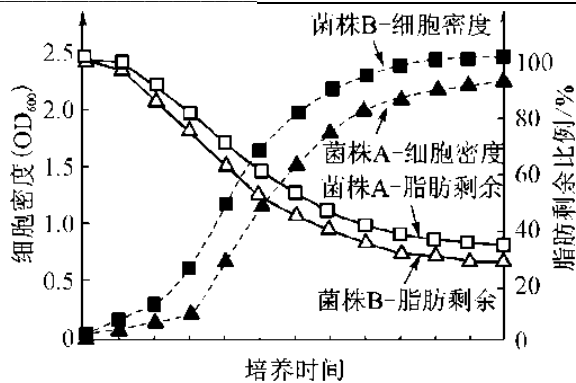
(1) 常规微生物实验中, 下列物品及其灭菌方法错误的是_____ (填编号)。

编号	①	②	③	④
物品	培养基	接种环	培养皿	涂布器
灭菌方法	高压蒸汽	火焰灼烧	干热	臭氧

(2) 称取 1.0 g 某土壤样品, 转入 99 mL 无菌水中, 制备成菌悬液, 经_____后, 获得细胞密度不同的菌悬液。分别取 0.1 mL 菌悬液涂布在固体培养基上, 其中 10 倍稀释的菌悬液培养后平均长出了 46 个酵母菌落, 则该样本中每克土壤约含酵母菌_____个。

(3) 为了进一步提高酵母菌产酶能力, 对分离所得的菌株, 采用射线辐照进行_____育种。将辐照处理后的酵母菌涂布在以_____为唯一碳源的固体培养基上, 培养一段时间后, 按照菌落直径大小进行初筛, 选择直径_____的菌落, 纯化后获得 A、B 两突变菌株。

(4) 在处理含油废水的同时, 可获得单细胞蛋白, 实现污染物资源化。为评价 A、B 两菌株的相关性能, 进行了培养研究, 结果如下图所示。据图分析, 应选择菌株___进行后续相关研究, 理由是_____。



6. (2020·苏州一模) 某养鸡场出现大量疑似沙门氏菌(SM)病, 利用氨苄西林、强力霉素等常用抗生素治疗后, 鸡的死亡率没有明显降低。为此, 研究人员开展了下列实验。请分析回答下列问题:

病死鸡^①→肉汤培养液^②→麦康凯琼脂平板^③→检测鉴定^④→药敏实验

- (1) 过程①中, 须将接种环进行_____处理后, 从病死鸡的肝脏、小肠、盲肠等处采集内容物, 接种到肉汤培养液培养 24 h。
- (2) 过程②中, 将蘸取肉汤培养液利用_____法接种、培养 24 h 后, 根据_____的颜色、大小、形状等特征进行初步鉴定, 挑选出基本符合沙门氏菌特征的单个菌落再接种培养备用。
- (3) 研究人员取定性滤纸, 用打孔机打成 6 mm 直径的圆形小纸片; 分别选用多种抗生素, 按照不同抗生素治疗量的比例配制药液, 浸泡等量小纸片, 干燥后备用; 取沙门氏菌, 用生理盐水制备成悬液后, 取适量菌悬液均匀涂布在平皿上; 取不同抗生素处理的小纸片贴在平皿上, 培养 24 h 后, 测量每种小纸片周围出现的透明圈直径(mm), 如下表所示:

药物名称	林可霉素	强力霉素	阿奇霉素	恩诺沙星	氨苄西林	头孢克洛	阿米卡星
小纸片 1	6	9	7	22.5	10	15.5	20
小纸片 2	11	7	5.5	19	7	10	18
小纸片 3	8	8	6	26.5	9	19	21

在治疗沙门氏菌病时, 应首选_____两种药物。

(4) 为了探索治疗沙门氏菌病的新途径, 研究人员选用健康的 3 日龄鸡, 每组 10 只, 尝试利用 SDZ 噬菌体进行实验, 研究方案如下表所示:

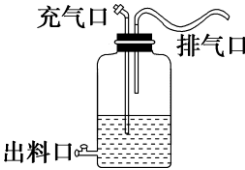
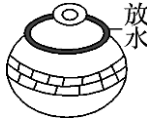
组别	A	B	C	D
注射生理盐水/ μL	200	100		
注射 SDZ 噬菌体/ μL		100		100
注射沙门氏菌液/ μL				100

一段时间后检测各组鸡的存活数依次为 10 只、10 只、4 只、9 只。请分析回答下列问题:

- ① 设置 B 组的目的主要是为了说明_____, C 组应注射_____。
- ② 本实验说明_____, 且可以避免因长期使用抗生素而产生_____。

【必备知识讲解】

1. 果酒、果醋和泡菜制作的比较

项目 内容	果酒和果醋的制作	制作泡菜并检测亚硝酸盐含量
作用菌种	果酒：酵母菌；果醋：醋酸菌	乳酸菌
原理	(1)酵母菌在无氧条件下将葡萄糖转化成乙醇； (2)醋酸菌在有氧条件下将乙醇变为乙醛，再将乙醛变为醋酸	乳酸菌在无氧条件下，将葡萄糖分解成乳酸
原料选择	新鲜葡萄(或苹果等)	大白菜、花椰菜等新鲜干净的蔬菜
实验流程	挑选葡萄 ↓ 冲洗 ↓ 酒精发酵 → 醋酸发酵 ↓ ↓ 果酒 果醋	选材 配制盐水 ↓ 加调味料,装坛 ↓ 发酵 ↓ 成品 测定亚硝酸盐含量
制作装置		

[提醒]

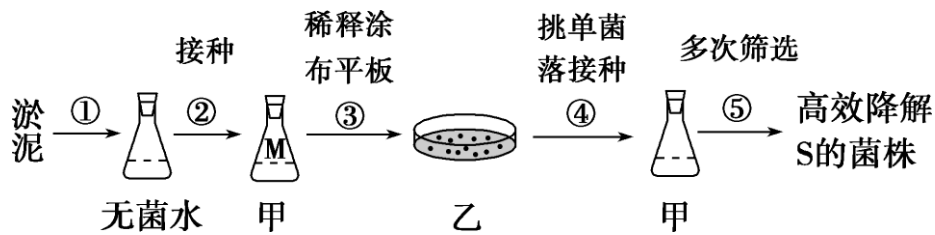
果酒与果醋制作中原料的消毒

微生物发酵过程应该从原料、装置和实验过程三个层次进行无菌操作。

- (1)榨汁前葡萄应先冲洗再去枝梗，因为若先去枝梗则会使一些微生物侵入果实内部，影响果酒的制作。
- (2)体积分数为 70%的酒精杀菌效果最强，若酒精浓度过低，杀菌效果弱，而浓度过高，又会使菌体表面蛋白质凝固形成一层保护膜，乙醇分子不能渗入其中，从而使杀菌效果受到影响。

【典型例题训练】

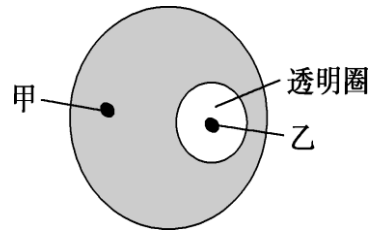
1. (2020·江苏卷)某同学在线提交了在家用带盖玻璃瓶制作果酒和果醋的实验报告，他的做法错误的是()
- A. 选择新鲜的葡萄略加冲洗，除去枝梗后榨汁 B. 将玻璃瓶用酒精消毒后，装满葡萄汁
- C. 酒精发酵期间，根据发酵进程适时拧松瓶盖放气
- D. 酒精发酵后去除瓶盖，盖一层纱布，再进行醋酸发酵
2. (2019·江苏卷)下列关于传统发酵技术应用的叙述，正确的是()
- A. 利用乳酸菌制作酸奶过程中，先通气培养，后密封发酵
- B. 家庭制作果酒、果醋和腐乳通常都不是纯种发酵
- C. 果醋制作过程中发酵液 pH 逐渐降低，果酒制作过程中情况相反
- D. 毛霉主要通过产生脂肪酶、蛋白酶和纤维素酶参与腐乳发酵
3. (2020·高考全国卷 I)某种物质 S(一种含有 C、H、N 的有机物)难以降解，会对环境造成污染，只有某些细菌能降解 S。研究人员按照下图所示流程从淤泥中分离得到能高效降解 S 的细菌菌株。实验过程中需要甲、乙两种培养基，甲的组分为无机盐、水和 S，乙的组分为无机盐、水、S 和 Y。请回答下列问题：



- (1) 实验时，盛有水或培养基的摇瓶通常采用_____的方法进行灭菌。乙培养基中的 Y 物质是_____。甲、乙培养基均属于_____培养基。
- (2) 实验中初步估测摇瓶 M 中细菌细胞数为 2×10^7 个/mL，若要在每个平板上涂布 100 μL 稀释后的菌液，且保证每个平板上长出的菌落数不超过 200 个，则至少应将摇瓶 M 中的菌液稀释_____倍。
- (3) 在步骤⑤的筛选过程中，发现当培养基中的 S 超过某一浓度时，某菌株对 S 的降解量反而下降，其原因可能是_____ (答出 1 点即可)。
- (4) 若要测定淤泥中能降解 S 的细菌细胞数，请写出主要实验步骤：_____。
- (5) 上述实验中，甲、乙两种培养基所含有的组分虽然不同，但都能为细菌的生长提供 4 类营养物质，即_____。

4. (2019 • 高考全国卷 II) 物质 W 是一种含氮有机物，会污染土壤。W 在培养基中达到一定量时培养基表现为不透明。某研究小组欲从土壤中筛选出能降解 W 的细菌(目标菌)。请回答下列问题：

- (1) 要从土壤中分离目标菌，所用选择培养基中的氮源应该是_____。
- (2) 在从土壤中分离目标菌的过程中，发现培养基上甲、乙两种细菌都能生长并形成菌落(如右图所示)。如果要得到目标菌，应该选择_____菌落进一步纯化，选择的依据是_____。
- (3) 土壤中的某些微生物可以利用空气中的氮气作为氮源。若要设计实验进一步确定甲、乙菌能否利用空气中的氮气作为氮源，请简要写出实验思路、预期结果和结论，即_____。



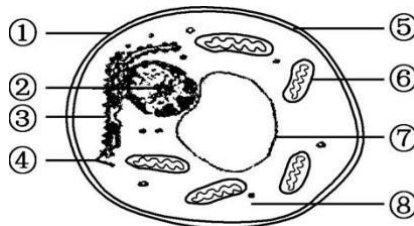
(4) 该小组将人工合成的一段 DNA 转入大肠杆菌，使大肠杆菌产生能降解 W 的酶(酶 E)。为了比较酶 E 与天然酶降解 W 能力的差异，该小组拟进行如下实验，请完善相关内容。

① 在含有一定浓度 W 的固体培养基上，A 处滴加含有酶 E 的缓冲液，B 处滴加含有相同浓度天然酶的缓冲液，C 处滴加_____，三处滴加量相同。

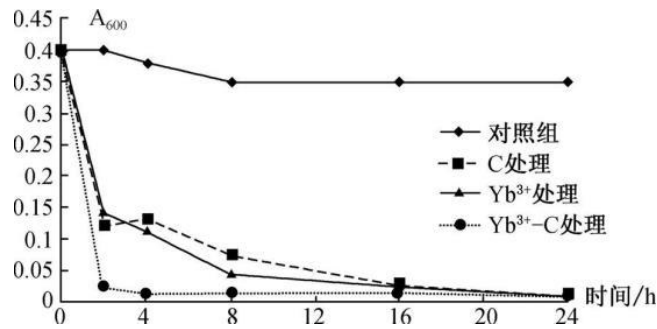
② 一段时间后，测量透明圈的直径。若 C 处没有出现透明圈，说明_____；若 A、B 处形成的透明圈直径大小相近，说明_____。

5. (2020 • 南京、盐城二模) “渥堆”是普洱茶生产过程中的一道特殊工序，是形成普洱茶品质特征最关键的一步。在“渥堆”过程中，曲霉、青霉、酵母菌、细菌等微生物的活动使茶叶所含茶多酚等成分发生了一系列复杂的物理、化学变化，促使了普洱茶甘滑、醇厚和陈香等良好品质特征的形成。请回答下列问题：

- (1) 牛肉膏蛋白胨培养基可用于“渥堆”茶样中细菌的分离，其中的牛肉膏、蛋白胨主要可为细菌生长提供_____。配好的培养基常用_____法灭菌。接种培养后可根据_____颜色、形态、大小等特征及菌体革兰染色情况、细胞形态特征等进行初步鉴定。
- (2) 下图为“渥堆”茶样分离出的某种微生物亚显微结构示意图，可根据图中_____ (填标号) 结构判断其肯定不是细菌。



(3) 茶多酚中的儿茶素(C)有一定的抗菌作用，但作用较弱。研究人员用稀土离子 Yb^{3+} 对儿茶素(C)进行化学修饰，形成配合物 $\text{Yb}^{3+}\text{-C}$ ，并探究其抗菌效果。将金黄色葡萄球菌制成菌悬液。分别加入等量的 C、 Yb^{3+} 和一定浓度的 $\text{Yb}^{3+}\text{-C}$ ，测定 24 h 内金黄色葡萄球菌存活数量变化(用 A_{600} 值表示，数值越大，表示细菌数量越多)，结果如下图：



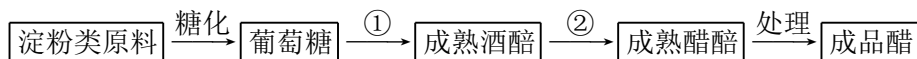
由图可以看出, _____能最有效缩短灭菌时间。

研究人员利用透射电镜观察了各组金黄色葡萄球菌细胞内的超微结构, 结果显示:

- (a) 未加抗菌剂: 细菌菌体较小, 其细胞质分布均匀;
- (b) C 处理: 细胞壁和细胞膜等结构不光滑, 略显粗糙;
- (c) Yb³⁺处理: 细胞质出现较明显的固缩及空泡化现象;
- (d) Yb³⁺-C 处理: 细胞壁及细胞膜等结构发生破裂, 细胞质出现了严重的固缩及空泡化现象。

由此可见, 儿茶素 (C) 作用的主要位点是 _____, 推测 Yb³⁺-C 具有更强抗菌作用的机理是 _____。

6. 某品牌优质食用醋的生产工艺流程如下图所示。请回答与果酒和果醋的制作有关的问题:



(1) 果酒和果醋的制作所用菌种一般是科研人员从众多菌种中筛选的, 通常用于筛选高表达量菌株的最简便方法是 _____。用于扩大培养该菌种的培养基是 _____培养基。一般家庭作坊制果酒和果醋没有纯净的菌种, 在果醋制作时可用 _____代替。

(2) 该优质食用醋风味独特的重要原因是发酵过程中乳酸的含量较高, 说明发酵过程中进行了 _____。

(3) 通过①获得的酒中乙醇浓度不超过 15%, 其主要原因是当发酵液中的乙醇浓度接近 15%时, _____。

- A. 乙醇氧化逐渐加快直至平衡
- B. 葡萄糖分解逐渐加快直至平衡
- C. 乙醇氧化逐渐减弱直至停止
- D. 葡萄糖分解逐渐减慢直至停止

7. 某罐装泡菜制造厂希望通过改良现有的乳酸菌菌种提高泡菜中的乳酸含量。请回答下列相关问题:

(1) 微生物培养过程中, 获得纯净培养物的关键是 _____。

(2) 要改良现有的乳酸菌菌种, 所用的育种方式的原理是 _____。菌种经过处理后, 再接种于经过 _____法灭菌处理的 _____(填“固体”或“液体”)培养基中, 振荡扩大培养。

(3) 已知“改良 MC 琼脂培养基”中含有碳酸钙, 遇酸溶解而使培养基变得透明; “孟加拉红琼脂培养基”中含氯霉素, 可抑制绝大多数细菌的生长。对乳酸菌进行计数时应选择上述 _____培养基, 用 _____法接种, 挑选出具有透明圈的菌落进行计数。如果每个平板均接种了 0.1 mL 样品并培养, 接种的 4 个平板菌落数分别是 210、230、470、190, 则样品中菌种的数量为 _____个/mL。平板划线法一般不用于活菌计数的原因是 _____。

8. (2020·浙江 1 月选考) 请回答与泡菜制作有关的问题:

(1) 用萝卜等根菜类蔬菜制作泡菜, 用热水短时处理, 可抑制某些微生物产生 _____, 从而使成品泡菜口感较脆。同时, 该处理也会使泡菜发酵时间缩短, 其原因是 _____。

(2) 泡菜发酵初期, 由于泡菜罐加盖并水封, 会使 _____菌被逐渐抑制。发酵中期, 乳酸菌大量繁殖, 会使 _____菌受到抑制。发酵后期, 乳酸生产过多, 会使乳酸菌受到抑制。

(3) 从泡菜汁中可分离制作酸奶的乳酸菌, 首先对经多次发酵的泡菜汁进行过滤, 然后取滤液进行 _____, 再用 _____的方法在某种含牛乳的专用的培养基中进行初步筛选。该培养基必须含有 _____, 以便于观察是否产酸。