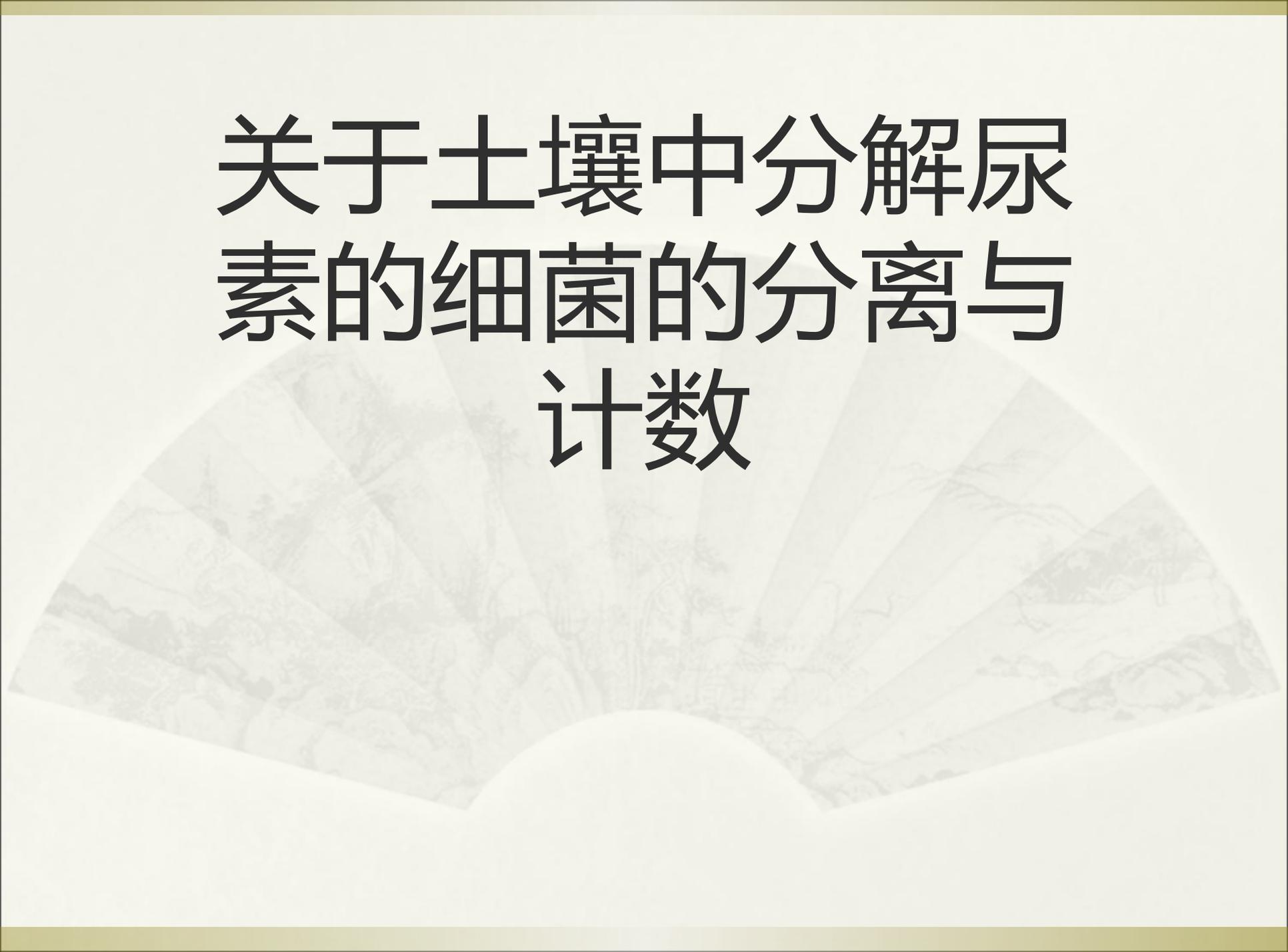
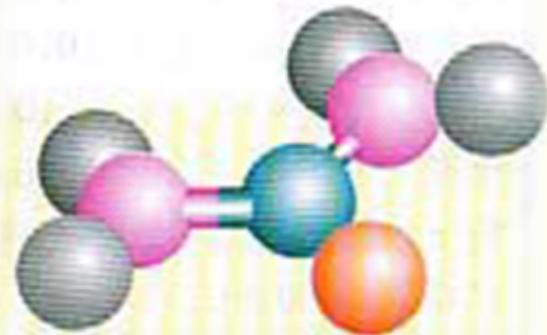


# 关于土壤中分解尿素的细菌的分离与计数

The background features a traditional Chinese landscape painting, likely a 'shanshui' style, rendered in a light, monochromatic tone. The painting is shaped like a fan, with the top edge curved and the bottom edge straight. It depicts a mountainous landscape with trees, a winding path, and a small structure, all set against a light background. The overall aesthetic is classic and scholarly.

# 课题背景:



## 1、尿素的利用

尿素是一种重要的**农业氮肥**。尿素**不能直接**被农作物**吸收**。土壤中的细菌将尿素**分解成氨**之后才能被植物利用。

## 2、细菌利用尿素的原因



### 3、常见的分解尿素的微生物

芽孢杆菌、小球菌、假单胞杆菌、克氏杆菌、棒状杆菌、梭状芽孢杆菌，某些真菌和放线菌也能分解尿素。

### 4、课题目的

①从土壤中分离出能够分解尿素的细菌

②统计每克土壤样品中究竟含有多少这样的细菌

#### 一.研究思路

(一).筛选菌株

(二).统计菌落数目

(三).设置对照

# 1、实例：

**DNA多聚酶链式反应**是一种在体外将**少量DNA大量复制**的技术，此项技术要求使用**耐高温**（**93<sup>0</sup>C**）的**DNA聚合酶**。



**美国微生物学家布鲁克于1996年在美国黄石国家公园的一个热泉中发现的Taq细菌中分离到耐高温的TaqDNA聚合酶**

# 为什么Taq细菌能从热泉中被筛选出来呢？

**原因：因为热泉温度70 ~ 80<sup>0</sup>C，淘汰了绝大多数微生物只有Taq细菌被筛选出来。**

**β 启示：寻找目的菌种时要根据它对生存环境的要求，到相应的环境中去寻找。**

## 2、实验室中微生物的筛选原理：

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生长。

### 3、土壤中分解尿素的细菌的分离与计数所需培养基:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.4g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	2.1g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2g
葡萄糖	10.0g
尿素	1.0g
琼脂	15.0g

①从物理性质看此培养基属于哪类?

**固体培养基**

②在此培养基中哪些作为碳源、氮源？

碳源：**葡萄糖**      氮源：**尿素**

5、请你分析该培养基的配方，想一想这种培养基对微生物是否具有选择作用？如具有，是如何进行选择的？

**有**，只有能合成**脲酶**的微生物才能分解尿素，以尿素作为氮源，才能在该培养基上生长。

## (二).统计菌落数目:

### 1、显微镜直接计数:

利用**血球计数板**，在显微镜下计算一定容积里样品中微生物的数量。

### 缺点

**不能区分死菌与活菌;**

**不适于对运动细菌的计数;**

**需要相对高的细菌浓度;**

**个体小的细菌在显微镜下难以观察;**

公式：

观察到的红细胞平均数

观察到的细菌平均数

$$= \frac{\text{红细胞含量}}{\text{细菌含量}}$$

## 2. 间接计数法（**活菌计数法**）

**(1)原理：**在稀释度足够高时，微生物在固体培养基上所形成的一个菌落是由一个单细胞繁殖而成的，即一个菌落代表原先的一个单细胞。

**(2)常用方法：**稀释涂布平板法。

$$\text{每克样品中的菌落数} = (C \div V) \times M$$

其中，C代表某一稀释度下平板上生长的平均菌落数，V代表涂布平板时所用的稀释液的体积(ml)，M代表稀释倍数。

两位同学用稀释涂布平板法测定同一土壤样品中的细菌数。在对应稀释倍数为  $10^6$  的培养基中，得到以下两种统计结果。

1. 第一位同学在该浓度下涂布了一个平板，统计的菌落数为 230。

2. 第二位同学在该浓度下涂布了三个平板，统计的菌落数分别为 21、212 和 256，该同学以这三个平板上菌落数的平均值 163 作为统计结果。

你认为哪位同学的结果接近真实值？你认为这两位同学的实验需要改进吗？如果需要，如何改进？

## 设置重复组的重要性：

第一位同学只涂布了一个平板，没有设置重复组，因此结果不具有说服力。第二位同学考虑到设置重复组的问题，涂布了3个平板，但是，其中1个平板的计数结果与另2个相差太远，说明在操作过程中可能出现了错误，因此，不能简单地将3个平板的计数值用来求平均值。这个实例启示学生，在设计实验时，一定要涂布至少3个平板，作为重复组，才能增强实验的说服力与准确性。在分析实验结果时，一定要考虑所设置的重复组的结果是否一致，结果不一致，意味着操作有误，需要重新实验。

# 注意事项

- ①为了保证结果准确，一般选择菌落数在30—300的平板上进行计数。
- ②为使结果接近真实值可将同一稀释度加到三个或三个以上的平板中，经涂布，培养计算出菌落平均数。
- ③统计的菌落往往比活菌的实际数目低。

β 1. 想一想，如何从平板上的菌落数推测出每克样品中的菌落数？

β 答：统计某一稀释度下平板上的菌落数，最好能统计3个平板，计算出平板菌落数的平均值，然后按课本旁栏的公式进行计算。

### (三) 设置对照

在做本课题的实验时，A同学从对应 $10^6$ 倍稀释的培养基中筛选出大约150个菌落。但是，其他同学在同样的稀释度下只选择出大约50个菌落。

其他同学认为A同学的结果有问题。他们分析可能是A同学的培养基被杂菌污染了，或者培养基中混入了其他含氮物质，因而导致不能分解尿素的细菌也能在该培养基上生长。

但是，A同学确信自己的实验操作准确无误，与其他同学的结果之所以不相同，是因为自己所选用的土壤样品不同。但是，A同学在设计实验的时候并没有设置对照，因而此时也拿不出令同学们信服的证据。

你能通过设置对照，帮助A同学排除上述两个可能影响实验结果的因素吗？

**方案一：**其他同学用与A同学相同土样进行实验

**结果预测：**如果结果与A同学一致，则证明A无误；如果结果不同，则证明A同学的培养基被杂菌污染了或培养基中混入了其他含氮物质。

**方案二：**将A同学配制的培养基在不加土样的情况下进行培养，作为空白对照，以证明培养基是否受到污染。

**方案三：**培养基灭菌后接种不能分解尿素的微生物，观察有无菌落生成，如有，说明培养基中混入了其他含氮物质

**小结：**通过这个事例可以看出，实验结果要有说服力，对照的设置是必不可少的。

## 二. 实验设计

### (一). 土壤取样

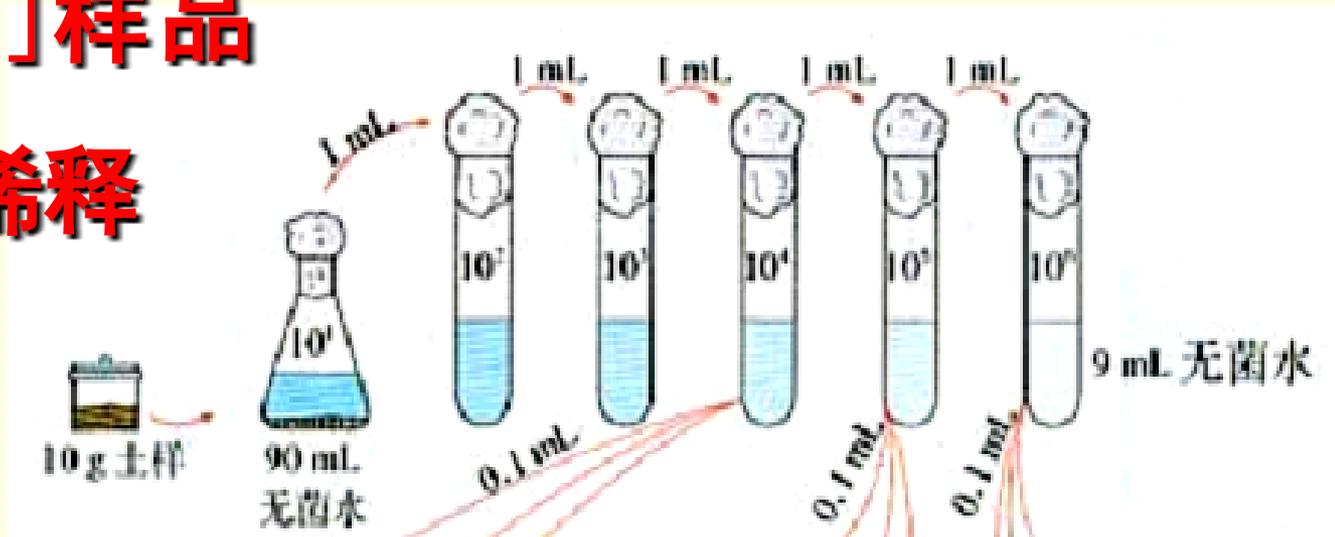
土壤微生物种类繁多的原因之一是土壤  
? 土壤中营养物质含量丰富, 环境条件适宜  
3cm左右, 再取样, 将样品装入事先准备好的信封中。

◆取土样用的小铁铲和盛土样的的信封在使用前都要灭菌。

### (二). 制备培养基:

制备以尿素为唯一氮源的选择培养基。

# [三]样品的 稀释



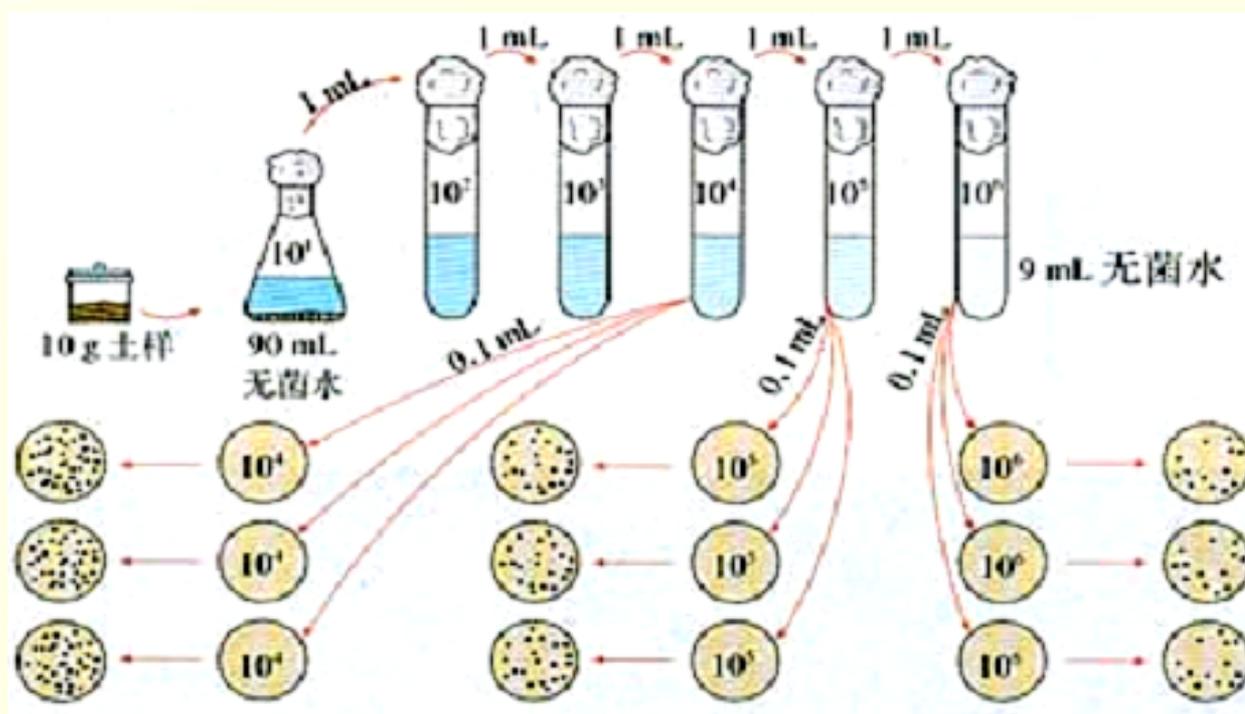
- ◆应在火焰旁称取土壤10g。
- ◆在稀释土壤溶液的过程中，每一步都要在火焰旁进行

为什么分离不同的微生物要采用不同的稀释度？测定土壤中细菌的总量和测定土壤中能分解尿素的细菌的数量，选用的稀释范围相同吗？

**原因：**土壤中各类微生物的数量（单位：株/kg）是不同的。例如在干旱土壤中的上层样本中：好氧及兼性厌氧细菌数约为2 185万，放线菌数约为477万，霉菌数约为23.1万。

**结论：**为获得不同类型的微生物，就需要按不同的稀释度进行分离，同时还应当有针对性地提供选择培养的条件。

## (四). 取样涂布



◆实验时要对培养皿作好标记。注明培养基类型、培养时间、稀释度、培养物等。

◆如果得到了2个或2个以上菌落数目在30——300的平板，则说明稀释操作比较成功，并能够进行菌落的计数，如果同一稀释倍数的三个重复的菌落数相差较大，表明试验不精确，需要重新实验。

## (五). 微生物的培养与观察

培养不同微生物往往需要不同培养温度。

细菌：30~37℃培养1~2d

放线菌：25~28℃培养5~7d

霉菌：25~28℃的温度下培养3~4d。

在菌落计数时，每隔24h统计一次菌落数目。

选取菌落数目稳定时的记录作为结果，以防止因培养时间不足而导致遗漏菌落的数目。

菌落的特征包括形状、大小、隆起程度、颜色等方面

# 微生物的培养



形态



点状



圆形



线状



不规则



假根状



纺锤形

隆起



扁平



拱起



凸透镜状



枕状



脐突状

边缘



完整



波状



裂中状



锯齿状



丝状



卷曲

## 操作提示



### [一] 无菌操作

- 1、取土用的小铁铲的盛土样的信封在使用前都需要灭菌。
- 2、应在火焰旁称取土壤。在火焰附近将称好的土样倒入锥形瓶中，塞好棉塞。
- 3、在稀释土壤溶液的过程中，每一步都要在火焰旁操作。

### [二] 做好标记

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/205300013134011202>