

极端环境原核微生物 培养、保藏及鉴定技术

宋磊

2024-02-27

极端环境中的微生物



厌氧微生物的常见类群

乳酸细菌

发酵糖类产生乳酸，主要包括乳杆菌、片球菌、链球菌、双歧杆菌和明串珠菌，其中乳杆菌包含多个分类群，2020年被重分类。

梭菌

梭菌属的早期定义为：革兰氏阳性细胞壁、严格厌氧、不能还原硫酸盐的产芽孢细菌。

16S rRNA序列分析发现梭菌包含多个分类群，目前狭义的梭菌属包含157个种。其余的被划分为其他的属。

拟杆菌

革兰氏阴性、不产芽孢、不运动的厌氧杆菌。

属于Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (CFB) 门，现称拟杆菌门，多分离自动物消化道。

产甲烷菌

严格厌氧古菌，能利用简单有机物或氢气/二氧化碳生长并产生甲烷。对氧气极度敏感，多数菌种生长缓慢，生物量低。

厌氧微生物的培养

培养方式

适用范围

培养基

培养条件

操作要求

兼性厌氧培养

乳酸细菌
部分梭菌
部分拟杆菌

固体培养基
(无需除氧)

密闭容器
+厌氧袋

有氧操作
厌氧培养

严格厌氧培养

产甲烷菌
部分梭菌
部分拟杆菌

液体培养基
(预除氧)

密封螺口管/瓶

厌氧操作
厌氧培养

严格厌氧微生物培养常用的设备

培养基制备

氮吹仪

抽换气设备

无氧操作

厌氧工作站

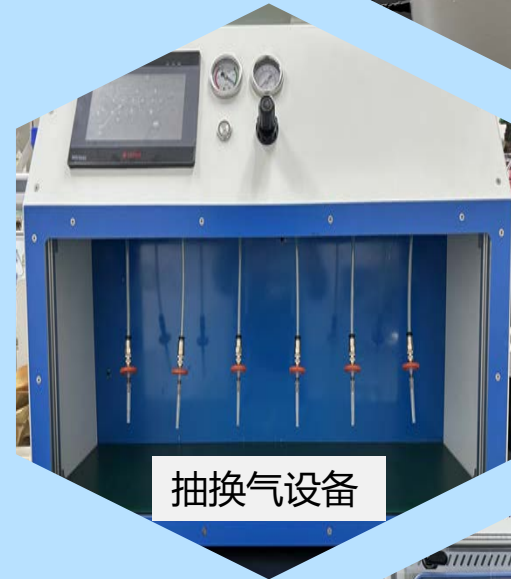
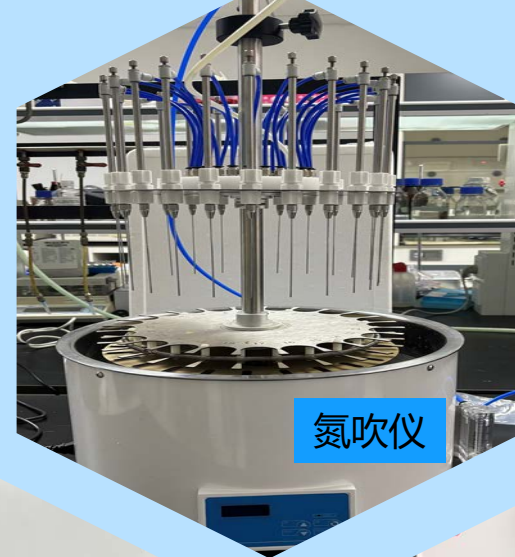
一次性无菌注射器

菌种培养

螺口管/瓶

恒温培养箱

.....



厌氧培养基的制备

厌氧培养基的通用成分

还原剂 巯基乙醇/半胱氨酸/抗坏血酸

氧气指示剂 刃天青

注意事项

不能高温灭菌的培养基成分应制备储液

除氧后在厌氧工作站中过滤除菌

接种前加入培养基

液体培养基除氧方法

加热吹氮

先除氧，后密封

氮气消耗量大

不适合大量制备

难以控制气相成分与比例

真空抽换气

先密封，后除氧

氮气消耗量小

适合大量制备

易于控制气相成分与比例

厌氧微生物的接种与培养

厌氧微生物培养注意事项

- ✓ 接种量一般为10%；
- ✓ 液体培养物转接使用一次性无菌注射器；
- ✓ 接种菌种后置于普通恒温培养箱培养；
- ✓ 获取大量培养物需要逐级放大培养；
- ✓ 实验过程如果不需要打开安瓿或者塞子，则不需要在厌氧工作站中操作。

不正确的严格厌氧培养方式

- ✗ 震荡培养；
- ✗ 增加试管中的培养液体积；
- ✗ 在培养液表面添加石蜡油/凡士林；
- ✗ 未除氧的培养液分装后加盖不透气的塞子。

厌氧微生物的检测鉴定

兼性厌氧细菌

菌种是否存活

菌落/菌苔的形成与变化

菌种是否正确

菌落形态、基因序列

严格厌氧细菌

培养液浑浊度增加

细胞显微形态、基因序列

产甲烷菌

培养液浑浊度增加、气相
中甲烷浓度增加

细胞形态显微观察、基因序列

光合细菌的主要类群

产氧

蓝细菌

不产氧

α -变形细菌

Rhodospirillum group, *Rhodopseudomonas* group,
Rhodobacter group

β -变形细菌

Rhodocyclus, *Rubrivivax*, *Rhodoferax*

γ -变形细菌

Chromatiaceae, *Ectothiorhodospiraceae*

绿菌门

Chlorobiaceae

绿弯菌门

Chloroflexaceae

光合细菌的培养和鉴定

培养方法

厌氧光照培养

适用于所有光合细菌

有氧黑暗培养

适用于多数 α - β -变形菌门的光合细菌和少数 γ -变形菌门的光合细菌

注意事项

不同培养方式使用的培养基成分不同。

光合细菌中不同色素吸收波长不同，培养时应使用自然光或日光灯。
连续有氧培养传代有可能导致菌种产色素能力的减弱或丢失。

鉴定方法

纯度检查：平板划线；显微观察

分类地位确定：保守基因序列

硫酸盐还原细菌

系统学特征

- 利用硫酸盐作为电子受体氧化有机物或氢气支持生长的厌氧细菌；
- 分为3个类群，多数属于 δ -变形细菌。

生理学特征

- 细胞形态多样，有球状、杆状、螺旋状；
- 严格厌氧生长，个别菌种厌氧程度不高；
- 能将硫酸盐转化为硫化物或单质硫。

培养特征

- 菌体生长产生的硫化物与培养基中亚铁离子形成硫化亚铁的黑色颗粒状沉淀；
- 菌体生长产生单质硫沉淀在气-液界面的试管壁上形成白色斑块。

嗜盐菌的培养、鉴定及注意事项

生物学特征

包括嗜盐细菌和嗜盐古菌；
生理类群多样，好氧/厌氧，嗜碱/嗜中性，嗜热/嗜冷；
多数嗜盐古菌生长缓慢，形成肉眼可见的菌落需要7-20天。

菌种鉴定

嗜盐菌的鉴定可通过菌落形态和16S rRNA基因序列；
很多嗜盐古菌的16S rRNA基因多拷贝，需通过PCR产物的克隆测序获得完整序列

注意事项

新鲜培养基有利于嗜盐古菌的复苏和生长；
扩增嗜盐细（古）菌16S rRNA基因使用的引物不同，但两类微生物的属名易混淆。

嗜热微生物

- ✓ 类群多样，细菌/古菌，好氧/厌氧；
- ✓ 通常最适生长温度50-90度；
- ✓ 常用液体培养方式，固体培养多用结冷胶/植物凝胶做凝固剂；
- ✓ 培养液在高温下会产生气泡，容易被误认为菌种生长。

嗜碱微生物

- ✓ 使用碳酸钠或碳酸氢钠制备碱性培养基；
- ✓ 碳酸钠或碳酸氢钠与培养基其他成分分别高温灭菌，冷却至60度左右，混匀后制备平板或斜面培养基。

极端环境微生物的保藏方法

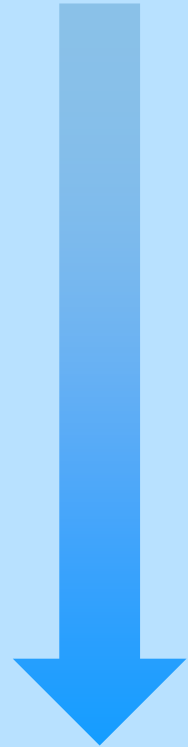
培养物置室温或4度冷藏箱

添加终浓度10%的（无氧）甘油，混匀后置-80度冻存

制备冻干粉（不适用于生物量低的菌种和产甲烷菌）

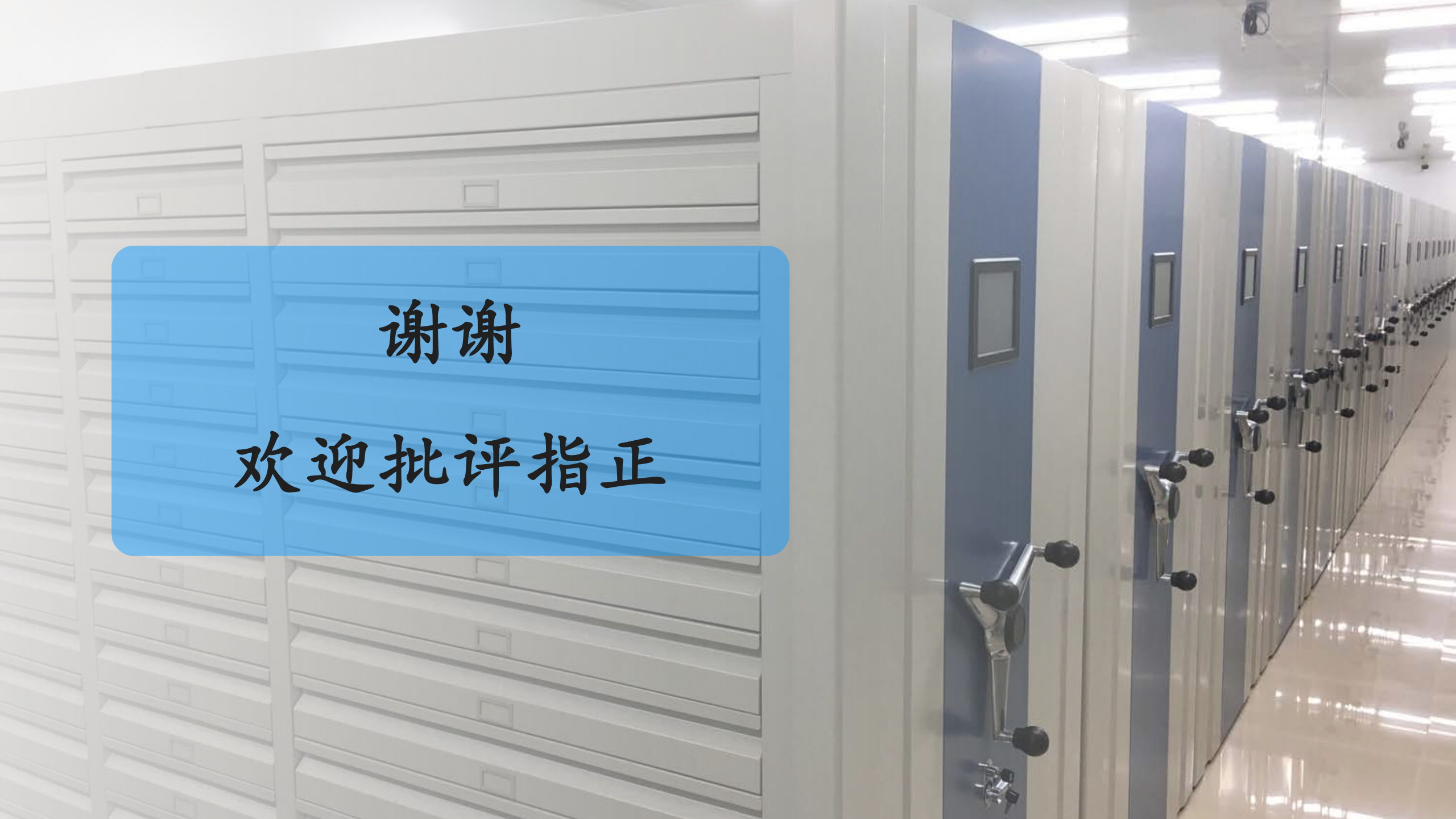
添加终浓度10%的（无氧）甘油，混匀后置液氮冻存

形成芽孢的菌种保藏效果更好



小结

- ✓ 厌氧微生物的常见类群、培养和鉴定
- ✓ 光合细菌的主要类群、培养和鉴定
- ✓ 其他极端环境微生物的培养和注意事项
- ✓ 极端环境微生物的保藏方法



谢谢
欢迎批评指正