

## 产品使用说明书 Product Manual

# 麦芽汁琼脂培养基（环境微生物）

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN230429
中文名称	麦芽汁琼脂培养基（环境微生物）
英文名称	Malt Extract Agar Medium
产品别名	麦芽汁琼脂培养基 麦芽汁琼脂培养基
用途	用于酵母菌子囊孢子的观察、微生物数量的测量等相关实验
配方出处	张小凡 袁海平.2021.环境微生物学实验.北京：化学工业出版社
<b>培养基成分（g/L）：</b>	
麦芽汁粉 Malt Extract Powder	130.0
琼脂 Agar	20.0
pH	6.0-6.4
<b>抗生素成分（g/L）：</b>	
氯霉素 Chloramphenicol	0.1
<b>用法：</b>	
称取本品 150.0g, 加入 1000mL 蒸馏水, 加热煮沸, 搅拌至完全溶解, 分装三角瓶, 115℃ 高压灭菌 15 分钟, 待冷却至 55℃, 每 1L 培养基加入 0.1g 氯霉素。	
<b>产品组成：</b>	
本品包含独立包装的培养基 250g、氯霉素 1g。	
<b>相关产品：</b>	
营养琼脂(NA)/牛肉膏蛋白胨培养基 麦芽汁琼脂培养基(环境微生物) 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA) LB 肉汤(Lennox)	
<b>实验方法与步骤（供参考）：</b>	
实验名称：酵母菌的形态和结构观察及死活细胞的鉴别 实验器材：	

### 1. 菌种:

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或卡尔酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*), 热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)斜面菌种。

### 2. 培养基:

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、麦氏琼脂培养基(葡萄糖醋酸钠培养基)、麦芽汁琼脂培养基(环境微生物)等。

### 3. 溶液及试剂:

0.05%美蓝染色液(以 pH6.0 的 0.02mol/l 磷酸缓冲液配制)、碘液、5%孔雀绿、0.5%番红染液、95%乙醇、40%甲醛水溶液、石炭酸复红染液、3%酸性乙醇、0.1%吕氏碱性美蓝染液、50%乙醇、20%的甘油等。

### 4. 仪器及其他用具:

显微镜、载玻片、盖玻片、香柏油、二甲苯、吸水纸、酒精灯火柴、接种环、镊子、移液枪、擦镜纸等。

## 实验方法

### 1. 酵母菌的活体染色观察及死亡率的测定(美蓝浸片的观察)

(1) 将酿酒酵母先移种到新鲜麦芽汁琼脂斜面培养基上, 25°C培养 24h 左右。重复活化两次后, 备用。

(2) 用无菌水洗下 PDA 培养基斜面培养的酿酒酵母菌苔, 制成菌悬液。

(3) 用接种环取一环酵母菌悬液, 置载玻片中央, 并取 1 滴 0.1%吕氏碱性美蓝染色液与悬液均匀混合、染色 2~3min、加盖玻片。加盖玻片时, 先将其一边接触菌液, 再轻轻放进免产生气泡。先用低倍镜观察, 然后用高倍镜观察母细胞的形态和出芽情况, 并极据颜色来区别死、活细胞。死细胞呈蓝色, 活细胞无色。

(4) 染色约 30min 后, 再次进行观察, 注意死细胞数量是否增加。

(5) 在一个视野里计数死细胞和活细胞, 共计数 5~6 个视野。酵母菌死亡率一般用百分数来表示, 可通过下式计算:

死亡率(%)=死细胞总数/细胞总数

### 2. 酵母菌子囊孢子的观察

(1) 活化酿酒酵母:将酿酒酵母接种至新鲜的麦氏琼脂培养基(葡萄糖醋酸钠培养基)斜面培养基上, 置于 28°C恒温培养箱培养 2~3d, 然后再移植 2~3 次, 备用。

(2) 转接产孢培养:将活化的酿酒酵母转接至葡麦氏琼脂培养基(葡萄糖醋酸钠培养基)上, 置于 30°C恒温培养箱培养 14d。

(3) 染色:挑取少许产孢菌苔于载玻片的水滴上, 经涂片、热固定后, 用两种方法进行染色。一种方法是加石炭酸复红染液于固定涂片处, 在火焰上加热 5~10min(不能沸腾), 用酸性乙醇冲洗 30~60s, 再用水洗去乙醇, 加 0.1%吕氏碱性美蓝染液数滴, 数秒钟后用水洗去风干。另一种方法是加数滴孔雀绿染液(无须加热), 染色 1min 后水洗, 加 95%乙醇静置 30s。再水洗, 最后用 0.5%番红染液复染 30s, 水洗去染色液, 最后用吸水纸

吸干。

(4) 观察:干燥后,用油镜观察。前一种染色方法的结果是孢子为赤色,菌体为青色后一种方法的染色结果是子囊孢子呈绿色,菌体和子囊为粉红色。注意观察子囊孢子的数目、形状和子囊的形成率。

⑤计算子囊形成率:计数时随机取3个视野,分别计数形成子囊的细胞总数和未形成子囊的细胞总数,然后按下列公式计算:

子囊形成率=3个视野中形成子囊的细胞总数/3个视野中(形成子囊的细胞总数+未形成子囊的细胞总数)

### 3. 酵母菌假菌丝的观察

取一无菌载玻片浸于熔化的PDA培养基中,取出放在湿室培养的支架上、待培养基凝固后,进行酵母菌划线接种,然后将无菌盖玻片盖在接菌线上,28℃培养2~3d后,取出载玻片,擦去载玻片下面的培养基,在显微镜下直接观察。可见到芽殖酵母形成的藕节状假菌丝,裂殖酵母则形成竹节状假菌丝。

#### 注意事项:

1. 活化酵母菌的麦芽汁琼脂斜面培养基要新鲜、表面要湿润
2. 产孢培养基上加大接种量,可提高子囊形成率。
3. 微加热可增加酵母的死亡率,易于观察死亡细胞。
4. 取菌量不宜太多,否则会影响观察。
5. 观察酵母菌个体时,应注意细胞形态。对于无性繁殖(芽殖或裂殖),应关注芽体在母体细胞上的位置、有无假菌丝等特征;对于有性繁殖,应关注所形成的子囊与子囊孢子的形态和数目。

#### 储存方式:

贮存于避光、干燥处,用后立即旋紧瓶盖;贮存期三年。

#### 注意事项:

- 1.称量时注意粉尘,佩戴口罩操作以避免引起呼吸道系统不适。
- 2.干粉培养基使用后立即旋紧瓶盖,避免吸潮结块。贮存于避光、干燥处。未开封产品保质期三年。开封后根据存放条件的不同保质时间存在一定的差异。

#### 废物处理:

检测之后带菌物品置于121℃下高压灭菌30分钟后处理。

## 附录：

# 微生物培养基正确配置方法及注意事项

### 步骤一：称量

根据配方和使用说明上所标注的重量，用 1/100 的电子天平准确称出所需的培养基（称量时可以使用称量纸）**注意：称量一定要准确**，称量不准，则会影响使用效果。

### 步骤二：溶解

#### 1. 搅拌：

将培养基纳入烧杯容器中，加小适量的水，缓慢加水**并用玻璃棒小幅度搅拌**。

**注意：**一定要搅拌。特别是在溶解含有琼脂的培养基，在加热的同时一定要进行搅拌。

#### 2. 加热：

倘若培养基中**不含琼脂**，一般**不需要对培养基进行加热**；相反**含有琼脂**，需要用**本生灯/电磁炉加热煮沸**。

#### 注意：

##### **(1) 琼脂只有煮沸，且不断搅拌才能溶解充分。**

不要把未经加热及搅拌煮沸的培养基溶液直接高压灭菌，这样很容易使琼脂溶解不充分，且粘在容器底部。

##### **(2) 不建议使用水浴加热或微波炉加热，特别是微波炉。**

水浴加热：一般需要时间长，也很可能会发生琼脂溶解不充分的情况。

微波炉加热：一般没法进行搅拌，也会容易使琼脂溶解不充分。

**(3) 琼脂溶解不充分导致非常严重的后果**，会严重影响后续的铺平板、划线以及培养效果等，会导致实验无法完成。

3.待培养基完全溶解后，再加入适量的水搅拌均匀。如准备的培养基较多，在不锈钢锅中融化加热，是可以使用温水加热的，还需不停搅拌，**防止焦化**。

如果不小心出现焦化现象，则表面制备好的培养基将无法使用，必须重新配制培养基。

**4.推荐使用玻璃、搪瓷材质的容器来溶解培养基。**

**注意：一定不要使用铜或铁容器来溶解制备培养基。**

因为铜或铁容器可能会导致容器内培养基中铜、铁超标，影响实验结果。

①其中培养基中铜含量大于 0.3 毫克每升，细菌不适宜生长。铁含量超过 0.14 毫克每升，会防止细菌产生毒素。

②实验中，容易发生反应和沉淀的药物应单独溶解，然后加入培养基中，如磷酸氢二钾和硫酸镁。

### **步骤三：调培养基 pH**

1.培养基中一般都已调好 pH 值，不需额外再次调节 pH 值。但如果是配制的培养基达不到实验的要求，则必须要进行调整。

(1) 如果有校准过的 **pH 计**，则可以使用 **pH 计**。如果没有，可以使用精确的 **pH 试纸**。

(2) 然后根据调节需要，使用 **1mol/L 氢氧化钠**或 **1mol/L 盐酸**进行微调，直到调节到配方所需要的 pH 值为止。

培养基有酸性或碱性，pH 值一般为 7.4 ~ 7.6。对于需要用氢氧化钠调节的培养基，需将 pH 调至比要求值高 0.1 ~ 0.2 个单位，因为用氢氧化钠调节时，高压灭菌后培养基的 pH 值会降低 0.1 ~ 0.2。如果微生物培养基中含有碳酸钙，一般无需调整 pH 值。

### **步骤四：培养基过滤**

1.如果对配制的培养基没有特殊要求，这一步可以省略。

2.培养基如有浑浊和沉淀现象，可将需要澄清的液体培养基进行油纸过滤。固体介质可以用双层纱布过滤，中间有一层薄薄的脱脂棉。

如果过滤法不能满足澄清要求，可以采用蛋清澄清法，即将培养基加热后冷却至五十度至六十度，不超过三角瓶一半的容量。每一千毫升放入 1~2 个蛋清，用力摇晃三至五分钟，用 121°C 高压蒸汽灭菌二十分钟，之后趁热取出过滤。

## 步骤五：培养基分装

1. 准备好的培养基根据用途不同，分为烧瓶、试管等容器。

①分装试管量大则采用-自动分液器。

②分装试管量小则采用-漏斗分液。

2. 分液量不超过容器体积的三分之二，三角瓶不要超过体积的二分之一，琼脂斜面不要超过试管长度的五分之一。

灭菌后斜面应为培养基量的三分之一，底层应为培养基量的三分之二，半固态琼脂的体积为三分之一。

用于接种或保护细菌的高级琼脂，分装试管长度的三分之一和四分之一，接种厌氧菌的量应达到三分之二；琼脂平板 90 毫米内径 13~15 毫升，内径 70 毫米 8~10 毫升。

3. 如果琼脂平板表面有较多水，可将平板倒置，置于 37°C 培养箱中三十分钟，晾干后使用。每批培养基分装在二十毫升左右的小玻璃瓶中，与该批培养基同时灭菌，在以确定这批培养基的最终 pH 值。

## 步骤六：培养基灭菌处理

分装完成的培养基应马上进行灭菌。其杀毒灭菌方式主要有三种类型：

(1) 高压蒸汽灭菌方式

此方法可用于大多数耐热培养基。

①对于小份：121°C 十五分钟

②对于大份：121°C 三十分钟

③对于含糖类（碳水化合物）的培养基：则需要进行 113~115°C/15min 灭菌，以避免糖分的破坏，**避免焦化。**

## (2) 煮沸灭菌法方式

此方法可用于含有不耐高温物质的培养基。

## (3) 过滤除菌方式

此方法可用于当培养基中含有不耐热物质时。采用无菌技术来定量添加培养基。血液和抗生素可以用无菌技术抽取，并加入已经冷却至约五十度的培养基中。

对 LST 培养基进行灭菌时，发酵管内可能存在气泡。为了防止发酵管内形成气泡，可以采取以下措施：

(1) 倒置的小管内充满培养基，不留气泡，然后加入含有 LST 的试管中。

(2) 在关闭灭菌锅的排气阀之前，将锅内的气体排空。灭菌锅内空气是否排净，这个是影响灭菌是温度和压力比例关系的要点，同样达到了相同的压力的情况下，如果空气未能排净，也就是说不是纯蒸汽灭菌，此时的温度不一定能达到目的要求，会严重影响灭菌效果。

(3) 试管塞不要塞得太紧。使用硅胶塞时，请勿使用橡胶塞。

(4) 不可过早打开灭菌锅，等灭菌锅内的气压和温度降到与室温相同或相差不大时，再打开灭菌锅。如果按照以上方法操作还有气泡，可以用水作为培养基组的对照试验。如果培养基组依旧有气泡，对照组没有气泡，可以确定是培养基本身原因。

## 步骤七：培养基倒入平板

1. 将灭菌溶化的培养基冷却至五十度后，倒入无菌干燥的培养皿中。

微生物培养基制备的温度不能太高, 否则培养皿内盖容易形成过多的冷凝水; 温度太低, 培养基容易凝固成块状, 不能做成平板。

2.倒平板时, 要靠近酒精的火焰 (以此防止外来细菌落入盘中)。左手托住培养皿, 右手托住三角瓶底部。用小指和手掌拉出锥形瓶的棉塞, 烧灼烧瓶口, 用拇指和食指在培养皿盖上打开一条缝, 直到烧瓶口刚好伸进去, 倒入培养基, 直到底部被覆盖。

3.不要超过培养皿高度的三分之一, 迅速盖上盖子, 放在桌上后轻轻旋转培养皿, 使培养基分布均匀, 凝结后即可。24 小时后检查, 如培养基未长杂菌, 即可用来培养微生物。

### **步骤八：培养基摆斜面**

灭菌完成后, 将试管中的琼脂培养基放在木架或玻璃架上, 并且要有适当的坡度。冷却后使琼脂凝固并变成斜面。(斜面长度不超过试管的二分之一)

### **步骤九：微生物培养基质检**

1. 检验培养基灭菌后, 若发现有破损, 浸水, 颜色异常, 棉塞被培养基污染。所有这些问题, 都必须丢弃, 不能重复使用, 并确定其最终 pH 值。

2.无菌检查和效果检查也是必需的。

(1) 无菌检查是取 1~2 瓶无菌培养基, 37°C 孵育一两天, 确认无细菌生长。

(2) 效果检查是将标准菌株接种到相关培养基上进行细菌检查。菌种的生长、形态和生化条件与已知条件一致。

若两个条件都检查合格, 准备好的培养基就可以使用了。