

产品使用说明书

Product Manual

厌氧菌琼脂培养基

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN260006
中文名称	厌氧菌琼脂培养基
英文名称	Anaerobic Agar Medium
产品别名	厌氧菌琼脂
用途	用于 O ₂ 对微生物的影响验证实验
配方出处	王英明 徐德强.2019.环境微生物学实验教程.北京: 高等教育出版社

成分 (g/L) :

酪蛋白水解物 Casein Hydrolysate	20.0
葡萄糖 Dextrose	10.0
氯化钠 NaCl	5.0
巯基乙酸钠 Sodium Mercaptoacetate	2.0
甲醛次硫酸钠 Sodium Formaldehyde Sulfoxylate	1.0
琼脂 Agar	15.0
pH	7.2

用法:

称取本品 53.0g, 加入 1000mL 蒸馏水, 加热煮沸, 搅拌至完全溶解, 分装试管, 每管 10mL, 115°C 灭菌 15 分钟。

相关产品:

营养琼脂 (牛肉膏蛋白胨琼脂培养基)
营养肉汤 (牛肉膏蛋白胨液体培养基)
营养肉汤 (不含 NaCl)
厌氧琼脂培养基

实验方法和步骤 (供参考) :

实验名称: 温度、pH、渗透压和 O₂ 对微生物的影响

材料和器皿:

1. 菌种

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*), 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

2. 培养基

营养琼脂/牛肉膏蛋白胨琼脂培养基。

营养肉汤/牛肉膏蛋白胨液体培养基

营养肉汤 (不含 NaCl)

不同 pH 的牛肉膏蛋白胨液体培养基:配制牛肉膏蛋白胨液体培养基, 分成 5 份, 分别调 pH 至 3.5、5.5、7.5、9.5 和 11.5,然后分装于试管, 每管 4mL,121°C灭菌 20 min。

不同盐含量的牛肉膏蛋白胨液体培养基:称取营养肉汤 (不含 NaCl) 8g, 加蒸馏水 800mL。分成 5 份, 每份 160mL, 分别加入 NaCl 2g、10g、20g、30g 和 40g, 溶解后加蒸馏水定容至 200mL(即 NaCl 最终含量分别为 10g/L、50 g/L、100 g/L、150 g g/L 和 200 g/L), 分装试管, 每管 4 mL, 121°C 灭菌 20 min。

厌氧琼脂培养基:

每管 10mL。121°C灭菌 20min。灭菌后试管直立凝固。

3. 试剂

pH 标准缓冲液(pH 分别为 1.68、4.00、6.86、9.18 和 12.46), 无菌生理盐水(8.5 g/L NaCl 溶液, 每瓶 100mL, 内装少量玻璃珠)。

4. 仪器设备

天平, 恒温培养箱, 恒温水浴锅, 冰箱, pH 计和可制冷的恒温培养箱等。

5. 器皿和其他材料

培养皿, 试管, 移液管, 助吸器, 接种环, 煤气灯, 电子点火器和不锈钢锅等。

实验方法:

1. 菌悬液的制备

取培养 2d 的大肠埃希氏菌和解淀粉芽孢杆菌菌种斜面各 1 支, 分别用无菌生理盐水制成 100mL 菌悬液, 用三角瓶中玻璃珠打散菌体, 混匀。

2. 温度对细菌的影响

(1)大肠埃希氏菌和解淀粉芽孢杆菌的生长温度范围测定

①标记试管培养基

标记牛肉膏蛋白胨液体培养基试管, 大肠埃希氏菌试管分别标记 4°C、15°C、25°C、37°C、45°C、50°C、55°C和 60°C各 2 支。同样标记解淀粉芽孢杆菌试管, 每个温度各 2 支。

②接种、培养和观察

取大肠埃希氏菌和解淀粉芽孢杆菌的菌悬液 0.1mL 分别接种于相应标记试管, 混匀后置于相应温度下培养。4°C试管置于 4°C冰箱中培养, 37°C及以上置于恒温水浴锅中培养, 15°C、25°C置于恒温水浴锅(气温较低时)或可制冷的恒温培养箱中培养。1 周后观察不同温度下细菌的生长情况, 以“-”表示不生长, “+”表示生长, 记录结果。

(2)大肠埃希氏菌对不同温度处理的耐受力

①接种

取 10 支牛肉膏蛋白胨液体培养基试管, 分别标记为 37°C、50°C、60°C、70°C和 80°C各 2 支。每管接种大肠埃希氏菌悬液 0.1mL, 混匀。

②不同温度热处理

将试管放入相应温度的恒温水浴中，摇动，使试管受热均匀，5min 后取出，立刻放入水中冷却至室温。

③观察和培养

将全部试管置于 37°C 培养 24h，观察不同温度处理后细菌的存活情况，以“-”表示不生长，“+”表示生长，记录结果。

(3)解淀粉芽孢杆菌对 100°C 处理不同时间的耐受力

①接种

取 10 支牛肉膏蛋白胨液体培养基试管，标记为 0min、1min、3 min、5 min 和 10min 各 2 支，分别接种解淀粉芽孢杆菌悬液 0.1mL，混匀。

②不同时间热处理

2 支标记为 0min 的试管不进行热处理。其余 8 支标记为 1min、3 min、5 min 和 10min 的试管同时放入沸水浴中，摇动，使试管受热均匀，按时取出相应标记的 2 支试管，放入水中冷却至室温。至 8 支试管全部取出。

③观察和培养

将 10 支试管置于 37°C 培养 24h。观察各试管中细菌的生长情况，以“-”表示不生长，“+”表示生长，记录结果。

3. pH 对微生物生长的影响

取 pH3.5 的液体培养基试管 4 支，分别接种大肠埃希氏菌和解淀粉芽孢杆菌各 2 支每支接种菌悬液 0.1mL。同样，接种其他 pH 的液体培养基试管。37°C 培养 24h，观察各试管中细菌的生长情况，以“-”表示不生长，“+”表示生长，记录结果。

4. 渗透压对微生物生长的影响

取不同 NaCl 含量(10g/L、50 g/L、100 g/L、150 g/L 和 200 g/L)的液体培养基试管各 2 支，做好标记，每支接种大肠埃希氏菌菌悬液 0.1mL，混匀后 37°C 培养 3d。同样在不同 NaCl 含量的液体培养基试管中接种解淀粉芽孢杆菌，各接种 2 支。观察不同 NaCl 含量试管中细菌的生长情况，以“-”表示不生长，“+”表示生长，记录实验结果。

5. O₂ 对微生物的影响

取 4 支厌氧琼脂培养基试管，标记大肠埃希氏菌和解淀粉芽孢杆菌各 2 支。用圆环直径 2mm 的接种环取菌悬液，穿刺接种到试管底部，37°C 培养 2d，观察直立柱不同位置细菌的生长情况。

6. 实验后处理

将所有培养物置于沸水中煮 20min 消毒，再清洗。

结果记录：

观察不同物理因素对微生物的影响，将实验结果记录于以下相应表格中。

注意事项：

- 1.研究温度对微生物生长的影响时，应确保培养温度稳定、准确，培养基要完全浸入水浴的液面以下。如果某一温度结果不明确，可以提高或降低 1°C 测定生长情况。
- 2.研究 pH 对微生物生长的影响时，需要用 pH 计精确测定。

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°C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，需要将 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。