

产品使用说明书 Product Manual

土壤磷素转化作用实验培养基

品牌	Chinook 钦诺克		
货号	CN261019		
中文名称	土壤磷素转化作用实验培养基		
英文名称	Soil Phosphorus Transformation Experimental Medium		
产品别名	土壤磷素转化作用实验培养基基础		
用途	用于土壤磷素的转化作用测定实验		
配方出处	李振高 骆永明 滕应. 2008.土壤与环境微生物研究法.北京：科学出版社		
成分（g/L）：			
硫酸铵 (NH ₄) ₂ SO ₄	0.5		
七水硫酸镁 MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3		
碳酸钙 CaCO ₃	5.0		
氯化钾 KCl	0.3		
氯化钠 NaCl	0.3		
葡萄糖 Dextrose	10.0		
四水硫酸锰 MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.03		
七水硫酸亚铁 FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.03		
用法：			
称取本品 16.46g，加入 1000mL 蒸馏水中溶解，分装，115℃ 高压灭菌 15 分钟。 注意：本品含碳酸钙，溶解时有些许沉淀。属正常现象。			
备注：			
1.本品仅为培养基，后续实验所需的卵磷脂、磷灰石粉、无磷活性炭需自行购买，或者选购本司所提供的包含以上成分的 CN261020 土壤磷素转化作用实验培养基套装。			
2. 卵磷脂溶液配制方法： 称取卵磷脂（蛋黄）0.7g（0.7g 的用量是参照蒙金娜有机磷培养基配方，用户也可根据自己的实验，确定用量，建议用量为 0.7g-2.0g），加入无水乙醇 50mL，溶解后加入 50mL 蒸馏水中溶解，混匀。（备注：本配方直接采用卵磷脂（蛋黄）成品，客户无需用蛋黄自行制备卵磷脂，操作更加便捷。）			
3.实验操作步骤：			

(1) 置 35mL 培养基于 200mL 三角瓶中 (测定有机磷转化强度时, 加入卵磷脂酒精溶液 1mL; 测定无机磷转化强度时, 加入磷灰石粉 35mg), 于 100°C 灭菌 30min。

(2) 灭菌后的培养基中接种 1/10 土壤悬浮液 1mL, 置 30°C 恒温培养。

(3) 培养 21 天后, 取出过滤, 滤液中加入 0.1mol/L HCl 15mL, 然后振荡 15min, 再加无磷活性炭 1g (测无机磷的转化可以不加), 充分摇匀, 抽滤至滤液清亮为止。

(4) 用比色法测定滤液中的有效磷量:

a. 取滤液 5-10mL (视滤液中磷含量而定), 置于 50mL 容量瓶中, 加 1.25mol/L 硫酸钼锑抗混合显色剂 5mL, 加水定容至刻度, 充分摇匀, 静置 30min。

b. 30min 后在光电计上用红色滤光板比色, 或用 72 型分光光度计比色 (波长 660nm)。比色时需同时做空白测定。

c. 与此同时, 绘制磷标准曲线, 分别吸取 5mg/L 磷标准溶液 0、1mL、2mL、3mL、4mL、5mL 于 50mL 容量瓶中, 每一量瓶磷的浓度, 即为 0、0.1mg/L、0.2mg/L、0.3mg/L、0.4mg/L、0.5mg/L, 再逐个加入 1.25mol/L 硫酸钼锑抗混合显色剂 5mL, 然后与待测液一样进行比色。在半对数纸上绘制成曲线。

d. 计算结果:

$$P \text{ (mg/100 磷源)} = \frac{\text{有效磷的浓度} \times \text{比色体积} \times \text{稀释倍数}}{\text{培养液中加入磷化合物克数}} \times 100$$

式中, 有效磷的浓度从标准曲线查得 (mg/L)。

(5) 卵磷脂全磷测定:

a. 取上述卵磷脂乙醇溶液 1mL, 放入 50mL 凯式分解瓶中, 加入相对密度 1.84 浓硫酸 7mL, 硫酸铜硫酸钾混合物 (1:9) 0.2g, 加热分解, 至溶液变为淡绿色为止。

b. 上液冷却后用蒸馏水洗至 250mL 容量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀。用上述比色法测定该溶液中磷量。

(6) 磷灰石全磷测定:

a. 准确称取磷灰石样品 0.1g (精确至 0.0001g), 放入 50mL 三角瓶中, 加蒸馏水 2~3mL, 再用注射器加 9mL 浓盐酸和 3mL 浓硝酸, 立即在瓶口插入小漏斗。

b. 将瓶移至电炉上, 用低温加热至糊状, 再加浓硝酸 5mL, 再蒸发至糊状, 除去剩余的氯离子, 然后加 2% 硼酸 2mL 以络合氟离子, 最后用注射器加 2mL 浓硝酸及蒸馏水 15mL, 继续煮沸溶液残渣。冷却。

c. 将三角瓶中消化液连同不溶残渣洗入 250mL 量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度, 摇匀。用上述比色法测定溶液中全磷量。

(7) 结果计算:

$$\text{磷转化强度} = \frac{\text{有效磷量}}{\text{培养基中全磷量}} \times 100$$

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℃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℃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℃ 十五分钟

②对于大份：121℃ 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℃/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℃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。