

产品使用说明书

Product Manual

PTYG 培养基套装

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN261101
中文名称	PTYG 培养基套装
英文名称	PTYG Medium Kit
产品别名	PTYG 琼脂培养基
用途	用于厌氧微生物的培养技术实验、厌氧双歧杆菌的培养等相关实验
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

培养基基础成分(g/L):

胰蛋白胍 Tryptone	5.0
大豆蛋白胍 Soybean peptone	5.0
酵母浸出粉 Yeast Extract Powder	10.0
葡萄糖 Dextrose	10.0
吐温 80 Tween 80	1.0
L-半胱氨酸盐酸盐 L-Cysteine Hydrochloride	0.05
琼脂 Agar	20.0
pH	6.8-7.0

无机盐溶液成分(g/L):

无水氯化钙 CaCl_2	0.2
磷酸氢二钾 K_2HPO_4	1.0
七水硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.48
碳酸钠 Na_2CO_3	10.0
氯化钠 NaCl	2.0

用法:

称取培养基基础 51.05g, 量取配置好的无机盐溶液 4mL, 加入 996mL 蒸馏水, 加热煮沸, 搅拌至完全溶解, 115°C 高压灭菌 20 分钟。

无机盐溶液配置方法:

称取无机盐粉剂 13.68g, 加入 1000mL 蒸馏水, 混匀, 备用。

产品组成:

本品包含独立包装的培养基基础 250g、无机盐溶液粉剂 70g。

相关产品:

改良乳酸菌 (MRS) 培养基

PTYG 培养基/ PTYG 培养基套装

PTYG 液体培养基/PTYG 液体培养基套装

实验方法与步骤 (供参考) :

实验名称: 厌氧微生物的培养技术

实验器材:

1. 样品:

双歧酸奶(液体)、双歧杆菌制剂(体)

2. 培养基:

改良乳酸菌 (MRS) 培养基、PTYG 培养基/ PTYG 培养基套装、PTYG 液体培养基/PTYG 液体培养基套装

3. 试剂及溶液:

CaCl₂ 0.2g、K₂HPO₄ 1.0g、KH₂PO₄ 1.0g、MgSO₄·7H₂O 0.48g、Na₂CO₃ 10g、NaCl 2g、蒸馏水 1000mL、0.1%的刃天青(还原指示剂)1mL。

4. 仪器和设备:

亨盖特厌氧滚管装置一套、厌氧管、厌氧瓶、厌氧手套箱、注射器滚管机、移液枪、记号笔、水浴锅、振荡器、恒温培养箱。

1. 铜柱系统除氧

铜柱是一个内部装有铜丝或铜屑的硬质玻璃管。玻璃管的大小为 40~400mm, 两端被加工成漏斗状, 外壁绕有加热带, 并与变压器相连来控制电压和稳定铜柱的温度。铜柱两端连接胶管, 一端连接气钢瓶, 一端连接出气管口。由于从气钢瓶出来的气体如 N₂、CO₂、及 H₂ 等通常都混有 O₂, 故当这些气体通过温度约 360°C的铜柱时, 铜和气体中的微量

O₂, 化合生成 CuO, 铜柱则由明亮的黄色变为黑色。当向氧化状态的铜柱通入 H₂ 时, H₂ 与 CuO 中的氧结合形成 H₂O, 而 CuO 又被还原成了铜, 铜柱则又呈现明亮的黄色。此铜柱可以复使用, 并不断起到除氧的目的。除复氢气钢瓶外, 也可用氢气发生器提供 H₂ 源。

2. 预还原培养基及稀释液的制备

制作预还原培养基及稀释液时, 需在无无菌的超净厌氧手套箱中操作。将配制好的培养基和稀释液煮沸除氧, 而后移液枪趁热分装到螺口厌氧试管中, 一般琼脂培养基装 4.5~5mL, 稀释液装 9mL, 并插入通 N₂ 的长针头以排除 O₂。此时可以清楚地看到培养基内加入的氧化还原指示剂——树脂刃天青由蓝到红最后变成无色, 说明试管内已为无氧状态, 然后盖上螺口的丁烯胶塞及螺盖, 灭菌备用。

3. 双歧杆菌样品不同稀释度的制备

在无氧条件下准确称取 1g 固体或用无菌注射器吸取 1mL 混合均匀的液体样品, 而后加入装有预还原生理盐水的厌氧试管中, 用振荡器将其振荡均匀, 制成 10⁻¹ 稀释液。用无菌注射器吸取 1mL 10⁻¹ 稀释液至另一支装有 9mL 生理盐水的试管中, 制成 10⁻² 稀释液。此操作方法依次进行 10 倍系列稀释至 10⁻⁷, 制成不同浓度的样品稀释液。通常选 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 三个稀释度进行滚管培养计数。

4. 厌氧滚管培养法

将盛有熔化的无菌无氧琼脂培养基试管放置于 50°C 左右的恒温水浴锅中, 用 1mL 无菌注射器分别吸取 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 三个稀释度的稀释液各 0.1mL 于融化了的琼脂培养基试管中, 而后将其平放于盛有冰块的盘中或特制的滚管机上迅速滚动, 这样带菌的融化培养基在试管内壁立即凝固成一薄层。每个稀释度重复 3 次, 而后置于 37°C (酸奶样品 42°C) 恒温培养箱中培养。一般培养 24~48h 后, 即可在厌氧管的琼脂层内或表面长出肉眼可见的菌落。

5. 双歧杆菌活菌(分离)计数

选择分散均匀, 数量在几十到几百个菌落的厌氧试管进行活菌计数, 即可得出每克或每毫升样品中含有的双歧杆菌数量。

6. 计算

每克或每毫升样品中双歧杆菌的活菌数量(cfu)=0.1mL 滚管计数的实际平均值 X10X 稀释倍数。

注意事项:

1. 注射器在使用前必须经过 121°C, 20min 灭菌。
2. 注意无菌操作, 保持手和培养管的清洁。每次接种前每次接种前需用酒精棉球将厌氧

管盖子擦一遍。

3. 用注射器吸取菌悬液注入固体培养基后，如需再次吸取，应快速将注射器插入厌氧管中，以防止针头污染。

4. 刃天青既是还原剂又是指示剂，它可以把培养基中残留的溶解氧去除。刃天青在无氧条件下呈无色；在有氧条件下，其颜色与溶液的 pH 相关（中性呈紫色，碱性呈蓝色，酸性呈红色）；在微量氧条件下呈粉红色。

5. 注射器在使用前必须先用培养基上面的气体冲洗、填充，然后插入培养基的下层以保证当培养基移入试管时，就处于无氧气体层的下面。

实验报告：

1. 观察双歧杆菌形态，描述其形态特征。

2. 计算每克或每毫升样品中含有双歧杆菌的数量，记录结果。

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. 配好的剩余无机盐溶液，若想长期保存，可 121℃ 高压灭菌 20 分钟，2-8℃ 无菌保存，请在 1-2 个月内用完；若不想保存，可弃之不用，本品配套的无机盐溶液粉剂足够。

2. 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。

3. 干粉培养基使用后应立即旋紧瓶盖，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°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℃ 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。