

## 产品使用说明书 Product Manual

# 亚硝化菌固体培养基

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN260049
中文名称	亚硝化菌固体培养基
英文名称	Nitrosobacteria Agar Medium
产品别名	亚硝化菌培养基、亚硝化菌琼脂培养基
用途	用于硝化-反硝化菌的筛选及其性能测定
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>成分 (g/L) :</b>	
硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5
氯化钠 NaCl	0.3
七水硫酸亚铁 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.03
磷酸氢二钾 $\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.0
硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.03
氯化钙 $\text{CaCl}_2$	7.5
琼脂 Agar	20.0
<b>用法:</b>	
称取本品 29.36g, 加入 1000mL 蒸馏水, 加热煮沸, 搅拌至完全溶解, 分装, 121°C 高压灭菌 20 分钟。 <b>注意: 本品含钙盐和硫酸盐, 溶解时可能会出现些许沉淀, 属正常现象。</b>	
<b>相关产品:</b>	
亚硝化菌液体培养基 亚硝化菌固体培养基 硝化菌液体培养基 硝化菌固体培养基 反硝化菌液体培养基 反硝化菌固体培养基 Giltay 培养基	
<b>实验方法与步骤 (供参考) :</b>	

## 实验器材:

### 1. 培养基:

亚硝化菌液体培养基、亚硝化菌固体培养基、硝化菌液体培养基、硝化菌固体培养基、反硝化菌液体培养基、反硝化菌固体培养基、Giltay 培养基

### 2. 样品:

实验用水样或土样。

### 3. 仪器:

培养箱、灭菌锅、天平、摇床、摇瓶、锥形瓶、分光光度计。培养基。

## 实验方法:

### 1. 硝化细菌的分离筛选

将采集到的样品分别加入含有**亚硝化菌液体培养基**和**硝化菌液体培养基**的摇瓶中,在 37°C 的摇床中培养 5d, 然后取出培养液在相应的**固体培养基**上划线, 得到单菌落, 重复操作, 直至获得单一菌落。

### 2. 硝化性能测定:

#### (1) 标准曲线的绘制:

称取 4.5g 分析纯亚硝酸钠于干燥小烧杯中, 加蒸馏水溶解后移入 100mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容, 摇匀, 溶液中的亚硝酸根浓度为 30mg/mL, 用时稀释至 0.03mg/mL。吸取亚硝酸钠标准液 0ml、1mL、2mL、3mL、4mL、5mL; 分别加入 50mL 容量瓶中, 每个容量瓶中亚硝酸钠浓度为 0 $\mu$ g/mL、0.6 $\mu$ g/mL、1.2 $\mu$ g/mL、1.8 $\mu$ g/mL、2.4 $\mu$ g/mL、3.0 $\mu$ g/mL; 加入 1mL **Giltay 培养基 A 溶液**, 放置 10min, 再加入 1mL **Giltay 培养基 B 溶液**和 1mL 2% 醋酸钠溶液, 显色后稀释至刻度。用分光光度计于 520nm 处比色, 以浓度为横坐标, 以吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。

#### (2) 亚硝化菌氨转化作用测定:

取 1mL 培养液于 50mL 容量瓶中, 重复上述操作, 用分光光度计于 520nm 处比色。

#### (3) 硝化菌硝化作用强度测定:

取 1mL 培养液稀释 100 倍(视培养液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度而定), 重复上述操作, 用分光光度计于 520nm 处比色。

#### ④ 结果计算:

标准曲线以浓度为横坐标, 以光密度值为纵坐标绘制标准曲线。得到回归方程:

$$A = aC + b$$

式中

A—吸光度值;

C—浓度,  $\mu$ g/mL;

a—斜率;

b—截距。

### 3. 反硝化菌的分离筛选

- (1) 取 1.0g 反硝化菌样品于装有 99mL 无菌水并带有玻璃珠的锥形瓶中振荡，得悬液。
- (2) 用移液枪吸取 5mL 悬液于 100mL 灭菌后的**反硝化菌固体培养基**中，30℃恒温密闭培养 3d 并扩大培养 3 次。
- (3) 经平板划线分离数次，得纯菌。将其接种于灭菌后的**反硝化菌液体培养基**富集培养，至菌液浑浊，即为菌悬液。
- (4) 将缠有细线的小试管( $\phi$ 12mmx75mm)倒扣于装有 Giltay 培养液的大试管( $\phi$ 20mmx200mm)中，并将小试管中的气体排净，塞住大试管，留部分细线在外，便于小试管的拉升，灭菌后待用。
- (5) 将活化后的菌株接种于 Giltay 培养液中，拉伸细线，使小试管提升一小段距离，以便收集气体。
- (6) 30℃恒温密闭培养 10d，每天观察培养液的变色情况及小试管中的气泡。根据产气量及培养基变色情况筛选出反硝化性能较强的菌株，并接种于**反硝化菌液体培养基**中，一定时间后检测 TN(总氮)去除率。

#### 注意事项:

硝化菌为好氧微生物，反硝化菌为厌氧微生物，培养时注意培养条件控制。

#### 实验报告:

1. 绘制标准曲线。
2. 测定不同培养基中亚硝酸根含量的变化，计算硝酸盐的去除率。
3. 观察亚硝化菌、硝化菌和反硝化菌的形态特征。

#### 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°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。