

产品使用说明书

Product Manual

紫色非硫培养基套装（水中光合细菌测定）

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN261114
中文名称	紫色非硫培养基套装（水中光合细菌测定）
英文名称	Purple Non-Sulfur Bacteria Medium Kit(For Determination Of Photosynthetic Bacteria In Water)
产品别名	紫色非硫培养基（入工湖中光合细菌（紫色非硫细菌）测定）、紫色非硫培养基
用途	用于入工湖以及其他水域中的光合细菌（紫色非硫细菌）的测定
配方出处	高冬梅 洪波 李锋民.2014.环境微生物实验.青岛：中国海洋大学出版社

培养基基础成分（g/L）：

氯化铵 NH_4Cl	1.0
磷酸二氢钾 KH_2PO_4	0.2
丁二酸钠(琥珀酸钠)Sodium Succinate	1.0
七水硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
碳酸钠 Na_2CO_3	0.2
酵母膏 Yeast Extract Powder	0.1
琼脂 Agar	15.0
pH	7.0

无机盐溶液成分（g/L）：

乙二胺四乙酸 EDTA	0.5
七水硫酸亚铁 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
七水硫酸锌 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
四水氯化锰 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.003
硼酸 H_3BO_3	0.3
二水氯化钙 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02
六水氯化镍 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.002
二水氯化铜 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.001
二水钼酸钠 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.003
pH	3.0

维生素溶液成分 (g/L) :

抗坏血酸钠 (维生素 C 钠) Sodium Ascorbate

0.5

生物素 Biotin

0.002

对氨基苯甲酸 p-aminobenzoic Acid

0.01

维生素 B₆ Vitamin B₆

0.05

pH

7.0

用法:

称取培养基基础 17.7g, 另量取配置好的无机盐溶液 1mL, 加入 1000mL 蒸馏水, 加热煮沸, 搅拌至完全溶解, 分装于试管, 每管 20mL, 121°C 高压灭菌 20 分钟。45°C 保温, 临用前, 无菌操作加入过滤除菌的维生素溶液共 1mL (每 20mL 培养基溶液加入 0.02mL 维生素溶液)。

无机盐溶液配置方法:

称取无机盐溶液粉剂 1.039g, 加入 1000mL 蒸馏水中溶解, 混匀。

维生素溶液配置方法:

称取维生素溶液粉剂 0.562g, 加入 1000mL 蒸馏水中溶解, 混匀, 过滤除菌。

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 20g、维生素溶液粉剂 10g。

实验方法与步骤 (供参考) :

实验名称: 入工湖中光合细菌 (紫色非硫细菌) 的测定

实验用品:

1. 实验器材

灭菌锅、超净台、恒温培养、振荡器、试管、锥形瓶、移液器、混合器、酒精灯等。

2. 培养基

紫色非硫培养基套装 (水中光合细菌测定) 包括: 紫色非硫培养基、无机盐溶液、维生素溶液

3. 其他

(1) 生理盐水: 0.85%~0.90% 的 NaCl 溶液, 分装于试管中, 每管 9mL, 分装于锥形瓶中, 每瓶 90 mL, 高压灭菌后备用。

(2) 无菌固体石蜡, 55°C~60°C 保温备用。

操作步骤:

1. 样品采集

按照水样采集方法, 用无菌样品瓶采集校园入工湖水样品, 带回实验室

2. 接种

将样品进行 10 倍系列梯度稀释, 取一定稀释度的菌悬液 100μL 加入到无菌培养皿中, 按照稀释混合平板法的操作, 再加入 45°C 保温的培养基 20mL, 待培养基凝固后, 再在其上加入 55°C~60°C 保



温的固体石蜡,轻轻摇动后,使其均匀覆盖在固体培养基上面,造成厌氧环境(注意培养皿边缘的密封情况)。每个稀释度至少接种 3 个平板。

3. 培养及结果观察计数

将培养皿倒置于 28℃、2400 lx 光照下培养 7~10 天,观察紫色非硫细菌的生长情况,并记录菌落数量。紫色非硫细菌菌落常呈棕红色、紫色或茶褐色。

实验报告:

根据平板菌落数计算样品中紫色非硫细菌的浓度。

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℃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°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。