

产品使用说明书 Product Manual

马丁氏培养基 (根际微生物特征分析)

品牌	Chinook 钦诺克		
货号	CN261116		
中文名称	马丁氏培养基（根际微生物特征分析）		
英文名称	Martin Medium (For Analysis Of Rhizosphere Microorganisms)		
产品别名	马丁氏培养基(含孟加拉红、链霉素)		
用途	用于土壤中根际微生物特征分析等相关实验		
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		
培养基成分（g/L）：			
磷酸氢二钾 K ₂ HPO ₄	1.0		
七水硫酸镁 MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5		
蛋白胨 Peptone	5.0		
葡萄糖 Dextrose	10.0		
孟加拉红 Rose Bengal	0.033		
琼脂 Agar	15.0		
pH	6.4±0.2（25℃）		
链霉素添加成分（/L）：			
1%链霉素溶液 1% Streptomycin Solution	0.3mL		
用法：			
称取本品 31.53g，加入于 1000mL 蒸馏水，加热煮沸，搅拌至溶解，分装，115℃高压灭菌 20 分钟。待冷却至 50℃ 一下，无菌操作，每 1L 培养基加入 0.3mL 1%链霉素溶液。 1%链霉素溶液配制方法： 称取链霉素 0.1g，加入 10mL 蒸馏水中溶解，过滤除菌。			
产品组成：			
本品包含培养基 250g、链霉素 100mg。			
相关产品：			
营养肉汤(牛肉膏蛋白胨培养基)			
马丁氏培养基（根际微生物特征分析）			

高氏 I 号培养基

实验方法与步骤（供参考）：

实验名称：根际微生物特征分析

实验用品：

1. 实验器材

小型铁铲、取样铲、样品瓶、锥形瓶、试管、培养皿、天平、振荡器、取液器、黑色核孔滤膜(孔径 0.22 μm , $\phi 25\text{ mm}$)、抽滤装置、无荧光镜油、镊子、载玻片、盖玻片、荧光显微镜、烘箱、恒温培养箱等。

2. 培养基

营养肉汤(NB)/牛肉膏蛋白胨培养基

马丁氏培养基（根际微生物特征分析）

高氏 I 号培养基

3. 试剂

(1)DAPI 工作液(10 $\mu\text{g/mL}$):将一定量的 DAPI 溶于蒸馏水中,制备成高浓度储备液(200 $\mu\text{g/mL}$),经 0.22 μm 滤膜过滤,分装后-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。使用前将储备液解冻后稀释成 10 $\mu\text{g/mL}$ 的工作液,经 0.22 μm 滤膜过滤后使用。

(2)Tween-80 工作液:将一定量的 Tween-80 溶于蒸馏水中,制备成 0.05%的工作液,高压灭菌后备用。

(3)无颗粒甲醛:经 0.22 μm 滤膜过滤的 37%~40%的甲醛溶液。

(4)生理盐水:0.85~0.90%的 NaCl 溶液,分装于试管(9 毫升/管)和锥形瓶(90 毫升/瓶)中,灭菌后备用。

操作步骤：

1. 样品采集

选择绿化区植被或农作物,在样品采集前,需要先记录采样区的情况,如采样地点、土地利用情况、植被种类、生长期及分布情况等,除去最表层的表土,用取铲挖取带完整根系的土块,用小刀把根外大部分土块除去(如土块太干,可先把土块放在适量无菌水中浸泡数分钟,使其软化后再除去),然后,轻轻抖动(注意力度和时间除去松散地附着在根上的土粒。同时采集同一区域无植被或作物生长的相同深度的土壤作为非根际对照土,剔除石砾、碎片等杂物,置无菌样品瓶或样品袋内,带回实验室。

2. 菌悬液的制备

(1)根际土壤菌悬液的制备

称取带有根际土的根系 10g,置 100mL 无菌生理盐水中,再加入 1%的 Tween- 80 工作液,振荡冲洗 15min,制备成根际土菌悬液,静置 1min,取上层悬浊液进行 10 倍系列梯度稀释,用于根际微生物分析。最后用无菌镊子取出根系,用滤纸吸干、称重,计算根际土的质量。

(2)非根际土壤菌悬液的制备

取一定量的新鲜非根际土壤样品(10g)加入适量的无菌生理盐水(100mL),再加入 1%的 Tween-80 工作液,充分振荡 15min,使土样均匀分散,制备成非根际土菌悬液,静置 1min,使较大颗粒自然沉降,取上层悬浊液进行 10 倍系列梯度稀释。

注意:

土壤中的微生物大多数附着在土壤颗粒表面或土壤团聚体的孔隙中,测定时必须使微生物与土壤颗粒分离,所采用的方法通常是在物理处理(振荡等)的同时加入分散剂(Tween-80 等),以增强土壤的分散效果。

3. 可培养菌(细菌、真菌、放线菌)的测定

根据样品中微生物的数量选择一定稀释倍数的菌悬液,分别涂布牛肉膏蛋白胨培养基、马丁氏培养基(根际微生物特征分析)、高氏一号培养基,每个稀释度至少 3 个重复。细菌置 37℃ 培养 2~3 d,真菌置 27℃ 培养 3~4d,放线菌置 28℃ 培养 3~7d。培养结束后,将平板取出,计数每个平板上的菌落数。细菌和放线菌的计数按照平板计数原则进行,真菌选择菌落数在 10-100 的培养皿计数,如聚平板上扩散性真菌的菌落占据培养皿的 15%以上,则不应采用,因为扩散性生长的菌落可能抑制了其他菌的生长。

4. 微生物总数的测定

用无菌取液器取一定量的菌悬液(3~10mL),加入无颗粒甲醛固定(甲醛终浓度 2%),经 0.22μm、直径 25mm 的黑色核孔滤膜(聚碳酸酯膜)过滤收集菌体(抽滤装置应预先用无菌水清洗)。抽滤至滤膜刚好呈湿润状态,然后在滤膜上加入 1mL DAPI 工作液,使其覆盖滤膜,避光染色 10min,继续将滤膜抽干。取一干净的载玻片,加一滴无荧光镜油,将核孔滤膜用镊子小心地从滤器上取下,贴在载玻片上,将有菌体的一面朝上,再在滤膜上加一滴无荧光镜油,然后盖上盖玻片,将样品置于荧光显微镜载物台上,按照荧光显微镜的使用方法,观察微生物的荧光图像,然后每个样品随机选取 10 个视野进行计数。

注意:

(1)荧光显微镜直接计数时每个视野中的细胞数保持在 30~50 个为宜,(根际)土壤样品中一般含有较多的细胞,如果过滤样品量较少,可预先用无菌生理盐水稀释菌悬液后过滤,以便微生物能够均匀分布在滤膜上。

(2)土壤样品中经常存在黏土、胶体、有机质等非生命颗粒物,由于有些非生命颗粒物能自动发出荧光或非特异性地和荧光染料 DAPI 结合,呈现黄色或黄绿色荧光(彩图 6),而影响微生物细胞的检测或观察。如果 DAPI 与非 DNA 物质结合较多,会有片状的黄色荧光呈现,对结果观察干扰较大,可对样品进行适当稀释或除去较大的非生命颗粒物后再进行测定。

数据处理:

1.利用以下公式计算样品中细菌、真菌、放线菌的浓度:

$$\text{每克样品中的菌数(CFU/g)} = \frac{N \times d \times V}{v \times g}$$

式中:

N--平板上微生物的平均菌落数(CFU);

d--菌悬液的稀释倍数;

V--菌悬液的总体积(mL);

v--接种量(mL);

g--制备菌悬液的样品重量(g)。

2.利用以下公式计算样品中总微生物的浓度:

$$\text{每克样品中的微生物数量(个/克)} = \frac{C \times M \times V}{F \times v \times g}$$

式中:

C--每个视野中微生物数量的平均值(个);

F--显微镜每个视野的面积(mm²);

M--滤膜的有效过滤面积(mm²);

v--过滤菌悬液的体积(mL);

V--菌悬液的总体积(mL);

g--制备菌悬液的样品重量(g)。

实验报告:

将根际土和非根际土中细菌、真菌、放线菌和微生物总数的测定结果记录在下表内,并计算其根际效应。

样品中微生物数量测定结果记录表

	细菌(CFU/g)	真菌(CFU/g)	放线菌(CFU/g)	总微生物(个/克)
根际样品				
非根际样品				
根际效应				

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℃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。