

产品使用说明书

Product Manual

反硝化菌培养基 (富营养水体中氮循环菌特征分析)

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN260015
中文名称	反硝化菌培养基 (富营养水体中氮循环菌特征分析)
英文名称	Denitrifying Bacteria Medium
产品别名	反硝化菌培养基
用途	用于富营养化水体中氮循环菌的特征分析
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

成分 (g/L) :

柠檬酸钠 $C_6H_5Na_3O_7$	5.0
硝酸钾 KNO_3	2.0
磷酸氢二钾 K_2HPO_4	1.0
磷酸二氢钾 KH_2PO_4	1.0
七水硫酸镁 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
pH	7.2~7.5

用法:

称取本品 9.2g, 加入 1000mL 蒸馏水中溶解, 分装于试管中, 每管 9mL, 需另加一杜氏小管, 121°C 高压灭菌 20 分钟。

相关产品:

蛋白胨氯化培养基(氨化细菌)

改良斯蒂芬逊培养基/改良的斯蒂芬逊 (Stephenson) 培养基 A(氨氧化细菌)

改良斯蒂芬逊培养基 B

反硝化菌培养基(富营养水体中氮循环菌特征分析)

实验方法与步骤(供参考):

实验名称: 富营养化水体中氮循环菌的特征分析

实验用品:

1.实验器材

灭菌锅、超净台、恒温培养箱、振荡器、培养皿、试管、锥形器、涂布棒、移液器、混合器、酒精灯等。

2.培养基

蛋白胨氯化培养基(氨化细菌)、改良斯蒂芬逊培养基/改良的斯蒂芬逊(Stephenson)培养基 A(氨氧化细菌)、改良斯蒂芬逊培养基 B、反硝化菌培养基(富营养水体中氮循环菌特征分析)

3.试剂

(1)奈氏试剂(Nessler's reagent)

甲液:

2g KI 溶于 5 mL 蒸馏水中,再加入 HgI_2 至饱和(约需 32g);

乙液:

将 12.4g KOH 溶于约 40 mL 蒸馏水中。

将两者混合,加水至 100mL,保存于棕色瓶中备用。

(2)格利斯试剂(Griess reagent)

甲液:

对氨基苯磺酸 0.5 g

醋酸(200 g/L,10%左右) 150 mL

乙液:

a-萘胺 0.1 g

蒸馏水 20 mL

醋酸(200 g/L,10%左右) 150 mL

(3)二苯胺试剂

0.5g 二苯胺(Diphenylamine)溶于 100 mL 浓 H_2SO_4 中,再加入 20mL 蒸馏水稀释,保存于棕色瓶中备用。

4. 其他

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。

操作步骤:

1.样品采集

按照水样采集方法采集富营养化水体样品,置无菌样品中带回实验室

2.样品接种

按照 MPN 计数法的要求,将样品进行 10 倍系列梯度稀释,选择适宜稀释度的菌悬液,分别接种于各类细菌培养基中,同时接种无菌水作为对照。

3.培养及结果判定

(1)氨化细菌氨化细菌

28°C培养 7d,观察各培养管中菌膜、混浊度、沉淀、气味、颜色等的变化,并用奈氏试剂检测有无氨的产生。从各试管中吸取 1~2 滴培养液至白瓷比色板中,再分别加入 1~2 滴奈氏试剂,如出现棕红色或浅褐色沉淀,即证明培养液中有氨化细菌存在。

(2)氨氧化细菌

氨氧化细菌 28°C培养 10~14.d,分别从各试管中吸取 3~5 滴培养液至白瓷比色板中,分别加入格利斯试剂甲液和乙液各 1~2 滴,亚硝酸盐与格利斯试剂中的对氨基苯磺酸反应生成的重氮苯磺酸,再与 a-萘胺反应,生成 N-a-萘胺偶氮苯磺酸,该产物为一种红色化合物,使培养液呈现红色,即证明培养液中有氨氧化细菌存在。

(3)亚硝酸氧化细菌

亚硝酸氧化细菌 28°C培养 10~14d,用二苯胺试剂检测硝酸(NO_3^-)的产生。从各试管中吸取 3~5 滴培养液至白瓷比色板中,分别加入二苯胺试剂 1~2 滴,二苯胺在酸性条件下,可被硝酸氧化成氧化态,该产物为一种蓝色的醌式结构化合物,使培养液呈现蓝色,表示已有亚硝酸氧化成硝酸,即证明培养液中有亚硝酸氧化细菌存在。

注意:

用二苯胺试剂检测硝酸(NO_3^-)时,若培养液内有亚硝酸存在,会干扰显色反应。可在测试之前,先用格利斯试剂检测培养液中 NO_2^- 的情况,如果 NO_2^- 含量较多,应先从培养液中去除,方法是:在培养液中加入 5~8 滴醋酸使之酸化,再加入几粒磺胺酸(对氨基苯磺酸),有气体逸出,当产气停止时,再加入一粒磺胺酸,使 NO_2^- 全部转化为 N_2 再加入格利斯试剂检测,如不呈现红色,说明培养液中已经无 NO_2^- 存在。

(4)反硝化细菌

反硝化细菌 28°C培养 14d,观察细菌生长情况。由于反硝化菌还原硝酸盐的产物可能是氨、亚硝酸、硝酸以及气态氮化物(N_2O 、 N_2),可以分别利用奈氏试剂、格利斯试剂、二苯胺试剂检测培养液中各物质的生成情况以及利用杜氏小管观察气体的产生情况,从而判断样品中是否含有反硝化菌,并可分析硝酸盐的还原途径。

实验报告:

根据氨化细菌、硝化细菌和反硝化细菌的阳性管数,查 MPN 表,分别计算样品中各类群微生物的数量。

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°C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。