

# 产品使用说明书

## Product Manual

### 硫酸盐还原菌培养基套装

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN260045
中文名称	硫酸盐还原菌培养基套装
英文名称	Sulfate-reducing Bacteria Medium Kit
产品别名	硫酸盐还原菌培养基
用途	用于海洋工程结构的主要腐蚀微生物的检测
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

#### 培养基基本成分 (g/L) :

磷酸氢二钾 $K_2HPO_4$	0.5
氯化铵 $NH_4Cl$	1.0
硫酸镁 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0
硫酸钠 $Na_2SO_4$	0.5
二水氯化钙 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1
酵母浸出粉 Yeast Extract Powder	1.0
pH	7.2

#### 70%乳酸钠溶液添加成分 (/L) :

70%乳酸钠溶液 70% Sodium Lactate Solution	4mL
--------------------------------------	-----

#### 硫酸亚铁铵、抗坏血酸无菌混合溶液成分 (g/10mL) :

硫酸亚铁铵 $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	0.3
抗坏血酸 (维生素 C) Vitamin C	0.1

#### 用法:

称取本品 5.1g, 加入 986mL 陈海水, 滴入 70%乳酸钠溶液 4mL,分装, 121°C高压灭菌 15 分钟。冷却至室温后, 于无菌条件下再加入配置好的用硫酸亚铁铵、抗坏血酸混合溶液 10mL。

#### 硫酸亚铁铵、抗坏血酸混合溶液 10mL 配制方法:

称取硫酸亚铁铵 0.3g、抗坏血酸 0.1g, 紫外灭菌 30 分钟 (30cm 处), 加入无菌水 10mL。

#### 产品组成:

本品包含独立包装的培养基基础 250g、硫酸亚铁铵 15g、维生素 C (抗坏血酸) 5g、70%乳酸钠溶液

200mL。

## 相关产品：

硫酸盐还原菌培养基套装

柠檬酸铁铵培养基(铁细菌培养基)

硫代硫酸钠培养基(硫细菌培养基)

## 实验方法与步骤（供参考）：

**实验名称：**海洋工程结构主要腐蚀微生物的检测

**实验用品：**

### 1.实验器材

灭菌锅、超净工作台、恒温培养箱、振荡器、样品瓶、试管、锥形瓶、移液器等。

### 2.培养基

硫酸盐还原菌培养基套装、柠檬酸铁铵培养基(铁细菌培养基)、硫代硫酸钠培养基(硫细菌培养基)。

### 3.其他

(1)无菌海水:取样品采样点的海水,分装于锥形瓶中,每瓶 90mL,或分装于试管中,每管 9mL,高压灭菌后备用。

(2)液体石蜡。

(3)1%的  $\text{BaCl}_2$  溶液。

**操作步骤：**

#### 1. 样品采集及预处理

分别使用采水器和采泥器采集海水样品和表层沉积物样品,将样品置无菌样品瓶中,立即带回实验室。水样直接进行以下实验,沉积物样品使用无菌海水制备成菌悬液,进行以下实验。

#### 2. 样品接种和培养

按照 MPN 法的要求,选择适宜稀释度的海水样品或沉积物样品,分别接种于硫酸盐还原菌培养基、柠檬酸铁铵培养基、硫代硫酸钠培养基中,同时接种无菌海水作头对照。其中硫酸盐还原菌培养基接种后,向各管中分别加入无菌的液体石蜡以保持厌氧状态。各接种管置  $29^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养。酸盐还原菌培养 7~10d,铁细菌培养 10~14 d,硫细菌培养 7~10 d,观察记录结果。

#### 3. 结果观察计数

硫酸盐还原菌在厌氧条件下,将硫酸盐还原产生  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  与培养基中的  $\text{Fe}^{2+}$  反应将产生黑色沉淀,因此,硫酸盐还原菌培养基试管中如有黑色沉淀,并有硫化氢臭味的,表明有硫酸盐还原菌生长。

柠檬酸铁铵培养基试管中棕色消失,且培养基中产生褐色或黑色沉淀的,表明有铁细菌生长。但有时铁细菌的量很少,以上现象不明显,只要试管内壁出现黄色菌痕的就认为有铁细菌的存在。

硫代硫酸钠培养基试管中如有混浊现象,而且当加入两滴 1%的  $\text{BaCl}_2$  溶液即产生白色沉淀的,证明培养基内有  $\text{SO}_4^{2-}$  存在,表明有硫细菌生长。

**实验报告：**

分别记录硫酸盐还原菌、铁细菌和硫细菌各培养管中的阳性试管数,查 MPN 表,分别计算样品中硫酸盐还原菌、铁细菌和硫细菌的浓度。

### 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。