

## 产品使用说明书 Product Manual

# 瓦克斯曼 (Waksman) 77 号培养基

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN260017
中文名称	瓦克斯曼 (Waksman) 77 号培养基
英文名称	Waksman No. 77 Medium
产品别名	瓦克斯曼 77 号培养基
用途	用于土壤中好氧自生固氮菌的测定 (平板培养法)
配方出处	林先贵.2008.土壤微生物研究原理与方法.北京: 高等教育出版社 李振高 骆永明 滕应. 2008.土壤与环境微生物研究法.北京: 科学出版社
<b>成分 (g/L) :</b>	
葡萄糖 Dextrose	10.0
磷酸氢二钾 $K_2HPO_4$	0.5
硫酸镁 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
四水硫酸锰 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.001
六水三氯化铁 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.001
氯化钠 NaCl	0.2
刚果红 Congo Red	0.05
琼脂 (精制) Agar	18.0
pH	7.0
<b>用法:</b>	
称取本品 28.95g, 加入 1000mL 蒸馏水, 加热煮沸, 搅拌至完全溶解, 分装, 115°C 高压灭菌 20 分钟。	
<b>相关产品:</b>	
阿须贝氏(Ashby)培养基/瓦克斯曼 (Waksman) 77 号培养基 阿须贝氏(Ashby)液体培养基	
<b>实验方法与步骤(供参考):</b>	
实验名称: 好氧自生固氮菌的测定 (土壤中各生理类群微生物的检测)	
实验器材:	

## 1.培养基

瓦克斯曼(Waksman)77号培养基或阿须贝氏(Ashby)培养基(阿须贝(Ashby)无氮琼脂培养基)、阿须贝氏(Ashby)液体培养基

### 实验操作:

#### 1. 土样的采样

- (1)根据研究设计选择具有代表性的土壤,确定采样地点。
- (2)除去地面植被和枯枝落叶,铲除表面1cm左右的表土,以避免地面微生物与土样混杂。
- (3)多点采取重量大、体相当的土样于塑料布上,剔除石砾和植物残根等杂物,混匀后取一定数量装袋。
- (4)需要保持通气的样品可用聚乙烯袋包装,也可用铝盒、玻璃瓶等其他容器,但要使容器中留有空间;如果样品需要保持嫌气状态,则应用玻璃瓶等可密封的容器包装。
- (5)样品带回实验室后应尽快分析。

#### 2. 好氧自生固氮菌的测定:

##### 平板培养法:

- (1)采用瓦克斯曼(Waksman)77号培养基或阿须贝(Ashby)无氮琼脂培养基。用上述培养基制成平板,取一定稀释度(如 $10^{-3}$ ~ $10^{-1}$ )的土壤悬液0.05mL,滴入琼脂培养基的表面,用玻璃刮刀刮匀后,于28℃条件下培养7d,计算结果。
- (2)此培养基上生长的自生固氮菌的菌落特征是:微微突起,呈粘液状,表面光滑或具有皱纹,有时还呈褐色,不透明、埋藏菌落呈三角形或菱形。镜检细胞肥大,常呈“8”字形、且具荚膜。需要注意的是,必须将它们与微嗜氮的微生物加以识别,并最好用化学方法测定其固氮量。

##### 最大或然数法:

- (1)采用阿须贝氏(Ashby)液体培养基(不加琼脂的阿须贝培养基)。分装培养基,每支试管(1.8cm×18cm)装入5mL,贴管内壁放一条滤纸条,一半浸入培养基内,一半露于空气中,温度为121℃下灭菌30min。
- (2)选取4个稀释度(如 $10^{-4}$ ~ $10^{-1}$ )的土壤悬液,每一稀释度接种4支试管,每管接种1mL,另取4支培养基加无菌水作对照。
- (3)于28℃条件下培养7d,如滤纸出现褐色菌落,则表示有自生固氮菌生长。
- (4)按附录2中《最大或然法测数统计表》得出数量指标和菌的近似值。
- (5)如需对好氧自生固氮菌进一步分离与纯化,可吸取1mL培养物加入新鲜固氮菌培养液中再培养,必要时可反复两次进行富集培养。吸取该培养液0.05mL,加入到平板上,涂匀,28℃条件下培养7d,观察菌落生长情况,并纯化单落。

### 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五十五度至六十度，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。