

产品使用说明书 Product Manual

孟加拉红琼脂培养基

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN261136
中文名称	孟加拉红琼脂培养基
英文名称	Rose Bengal Medium
产品别名	虎红培养基、孟加拉红培养基、虎红琼脂、孟加拉红琼脂
用途	用于真菌计数（土壤中常见异养微生物的计数和分离）
配方出处	王英明 徐德强.2019.环境微生物学实验教程.北京：高等教育出版社
成分（g/L）：	
葡萄糖 Dextrose	10.0
蛋白胨 Peptone	5.0
磷酸二氢钾 KH_2PO_4	1.0
七水硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
孟加拉红 Rose Bengal	0.05
琼脂 Agar	20.0
用法：	
称取本品 36.55g，加入 1000mL 蒸馏水，加热煮沸，搅拌至完全溶解，分装，115℃高压灭菌 15 分钟。倒平板前待培养基冷却至 50℃后再加入链霉素贮备液至终含量为 50μg/mL。	
产品组成：	
本品包含独立包装的培养基 250g、氯霉素 1g。	
相关产品：	
营养琼脂（牛肉膏蛋白胨琼脂培养基） 高氏 I 号培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA) 酵母富集培养基 孟加拉红琼脂培养基	
实验方法与步骤（供参考）：	
实验名称：土壤中常见异养微生物的计数和分离	

材料和器皿：

1. 微生物样品

菜园土、果园土或林地土。

2. 培养基

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基，高氏 1 号培养基，PDA 培养基。

酵母母富集培养基：每试管 5mL。

孟加拉红琼脂培养基：

倒平板前待培养基冷却至 50℃后再加入链霉素贮备液至终含量为 50μg/mL。

3. 试剂

链霉素贮备液(50mg/mL)，重铬酸钾溶液(5mg/mL)，生理盐水。

4. 仪器设备

恒温培养箱，微波炉，灭菌锅等。

5. 器皿和其他材料

三角瓶，培养皿，试管，移液管(1m 和 5mL)，助吸器，量筒，天平，研钵，玻璃珠，棉塞，线绳，电子点火器，煤气灯，不锈钢锅等。

实验方法：

1. 采集土壤样品

采集菜园土、果园土或林地土样品，去除枝叶、石头等杂物，在无菌研钵中研磨成粉末，混合均匀。

2. 土壤稀释液制备

先在三角瓶中制备 10^{-2} 土壤稀释液，然后用十倍稀释法进行土壤样品的稀释。

(1) 10^{-2} 土壤稀释液的制备

称取 0.5g 研磨的湿土壤，加入盛有 49.5mL 生理盐水的无菌三角瓶中，瓶中预先加小玻璃珠。振荡 10min，混，得到 10^{-2} 土壤稀释液。

(2) 逐级稀释

混匀三角瓶中的 10^{-2} 稀释液，取 4 支试管，用无菌生理盐水将 10^{-2} 的土壤稀释液逐级稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} ，备用。

3. 细菌的计数和分离

采用平板菌落计数法计土壤样品中的细菌总数。

(1) 融化培养基

彻底融化牛肉膏蛋白胨琼脂培养基，冷却至 50℃，备用。

(2) 标记培养皿

取 10 块无菌培养皿，分别标记为细菌 10^{-4} 、细菌 10^{-5} 和细菌 10^{-6} 各 3 皿，另设空白对照 1 皿。

(3) 混合平板

取 10^{-6} 稀释液试管，混匀，取 1mL 稀释液加入到相应标记的培养皿中。马上倒入冷却至 50℃的融化状态牛肉膏蛋白胨琼脂培养基约 15mL，迅速晃动混匀，立刻平放台面至彻底凝固。同样操作下，混合其他稀释液和空白对照的测定平板。空白对照平板加入无菌生理盐水 1mL。

(4) 培养和计数

28℃倒置培养 2d，计各皿的菌落数。按照每皿平均菌落数在 30~300 之间的稀释度计算每克湿土壤样品

的细菌活菌数(CFU/g 湿土壤)。可以在菌落较稀疏的平板上挑取感兴趣的菌落进一步分离、纯化。

4. 放线菌的计数

(1)融化培养基

彻底融化高氏 1 号培养基, 冷却至 50℃, 加入重铬酸钾溶液至终含量为 50μg/mL, 轻轻摇动, 混匀备用。

(2)标记培养皿

取 10 块无菌培养皿, 分别标记为放线菌 10^{-3} 、放线菌 10^{-4} 和放线菌 10^{-5} 各 3 皿, 另设空白对照 1 皿。

(3)混合平板

取 10^{-5} 稀释液, 混匀, 用无菌移液管移取 1mL 加入到相应标记的培养皿中。马上倒入冷却至 50℃的融化状态高氏 I 号培养基约 15mL, 迅速晃动混匀, 立刻平放台面至彻底凝固。同样操作下, 混合其他梯度稀释液和空白的放线菌测定平板。空白对照平板加入无菌生理盐水 1mL。

(4)培养和计数

28℃倒置培养 7d, 计各皿的菌落数。按照每皿平均菌落数在 30~300 之间的稀释度计算每克湿土壤样品中的放线菌活菌数(CFU/g 湿土壤)。可以在落较稀疏的平板上挑取感兴趣的菌落进行研究。

5. 真菌的计数

(1)融化培养基

彻底融化孟加拉红琼脂培养基, 冷却至 50℃加入链霉素贮备液至终含量为 50μg/mL, 混匀备用。

(2)标记培养皿

取 10 块无菌培养皿, 分别标记为真菌 10^{-2} 、真菌 10^{-3} 和真菌 10^{-4} 各 3 皿, 另设空白对照 1 皿。

(3)混合平板

取 10^{-4} 稀释液, 混匀, 移取 1mL 稀释液加入到相应标记的培养皿中。马上倒入冷却至 50℃的融化状态孟加拉红琼脂培养基约 15mL, 立刻轻摇混匀, 平放于台面, 待彻底凝固。同样操作下, 混合其他梯度稀释液和空白对照的测定平板。

(4)培养和计数

28℃倒置培养 5d, 计各皿的菌落数。如真菌数量较多, 培养 3d 时计数一次, 培养 5d 时再计数一次。按照每皿菌落数在 10~100 之间的稀释度计算每克湿土壤样品中的真菌活菌数(CFU/g 湿土壤)。可以在菌落较稀疏的平板上, 用无菌小刀切下感兴趣的菌落, 放在 PDA 等培养基上继续培养至产生孢子, 然后进一步纯化, 但这种方法不易分离到酵母。

6. 酵母的分离

(1)富集培养

取 2 支酵母富集培养基试管, 每管中加入土壤样品 0.3g, 置于恒温振荡培养箱中, 28℃220min 振荡培养 3d。如培养过程中出现菌丝团(霉菌), 用接种环或接种钩挑出后继续培养。

(2)划线分离

彻底融化 PDA 培养基, 冷却至 50℃, 加入链霉素贮备液至终含量为 50μg/mL, 混匀后倒 PDA 平板。彻底冷却后取富集培养的菌悬液, 划线分离。28℃培养 3d。

(3)酵母的纯化:

挑取感兴趣的菌落, 继续在 PDA 平板上分离, 直至得到纯培养。察菌落特征和个体形态特征。

结果记录:

1.土壤样品的细菌计数结果

计各个稀释度土壤样品在牛肉膏蛋白胨琼脂培养基平板上形成的菌落数，填写表格，并计算每克湿土壤样品中的细菌活菌数(CFU/g 湿土壤)。

土壤样品的细菌计数

稀释度	10^{-4}			10^{-5}			10^{-6}		
菌落数									
平均菌落数 (N)									

每克湿土壤样品的细菌活菌数:

2.土壤样品的放线菌计数结果

计土壤样品各个稀释度在高氏 I 号培养基平板上形成的菌落数，填写表格，并计算每克湿土壤样品中的放线菌活菌数(CFU/g 湿土壤)。

土壤样品的放线菌计数

稀释度	10^{-3}			10^{-4}			10^{-5}		
菌落数									
平均菌落数 (N)									

每克湿土壤样品的放线菌活菌数:

3.土壤样品的真菌计数结果

计土壤样品各个稀释度在 PDA 平板上形成的菌落数，填写表格，并计算每克湿土壤样品中的真菌活菌数(CFU/g 湿土壤)。

土壤样品的真菌计数

稀释度	10^{-2}			10^{-3}			10^{-4}		
菌落数									
平均菌落数 (N)									

每克湿土壤样品的真菌活菌数:

4. 酵母特征

描述分离得到的酵母菌落特征和个体形态。

注意事项:

- 1.细菌计数时，如果加入放线菌酮可以抑制真菌的生长，结果更准确。但放线菌的影响难以完全避免。放线菌计数时，重铬酸钾的选择性不够高，难以避免其他微生物的影响计数结果偏高。真菌计数时，快速生长的一些霉菌影响准确计数，需要计数 2 次，以免最后一次计数时部分霉菌菌落过大，不易区别。
- 2.土壤中微生物种类多样，选择的计数培养基能够得到较多种类和数量，对于特定类群微生物，如硝化细菌等，应选择专门的培养基。
- 3.平板菌落计数法计数细菌和放线菌，一般选择每平板内平均菌落数在 30~300 的稀释度进行计算。由于霉菌菌落较大，土壤真菌计数选择 10~100 的梯度进行。如果希望得到更准确的结果，真菌计数应该选



择每平板平均菌落数在 30~100 的稀释度计算结果，测定时选择 1/100、1/300、1/1000、1/3000 和 1/10000 等稀释度。

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℃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。