

产品使用说明书 Product Manual

马丁氏琼脂培养基 (环境微生物的分离与纯化)

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN261132
中文名称	马丁氏琼脂培养基 (环境微生物的分离与纯化)
英文名称	Martin Agar Medium
产品别名	马丁氏琼脂培养基、马丁氏培养基 (含孟加拉红)
用途	用于环境微生物的分离和纯化技术实验
配方出处	张小凡 袁海平.2021.环境微生物学实验.北京: 化学工业出版社
成分 (g/L) :	
磷酸氢二钾 K_2HPO_4	1.0
七水硫酸镁 $MgSO_4$	0.5
蛋白胨 Peptone	5.0
葡萄糖 Dextrose	10.0
孟加拉红 Rose Bengal	0.03
琼脂 Agar	20.0
pH	6.4±0.2 (25°C)
用法:	
称取本品 36.53g, 加入 1000mL 蒸馏水, 加热煮沸, 搅拌至溶解, 分装, 115°C 高压灭菌 20 分钟。使用前, 每 1000mL 培养基中加入 1% 链霉素 0.3mL。	
产品组成:	
本品含独立包装的培养基 250g、链霉素 1g。	
相关产品:	
高氏 1 号琼脂培养基 (环境微生物的分离与纯化) 营养琼脂(NA) (牛肉膏蛋白胨琼脂培养基) 马丁氏琼脂培养基 (环境微生物的分离与纯化)	
实验方法与步骤 (供参考) :	
实验名称: 环境微生物的分离与纯化 实验器材:	

1. 土样:取表层以下 5~10cm 处的土样, 放入无菌的纸袋或塑料袋中备用, 或放在 4°C 冰箱中暂存。
2. 培养基: 高氏 1 号琼脂培养基 (环境微生物的分离与纯化)、营养琼脂(NA) (牛肉膏蛋白胨琼脂培养基)、马丁氏琼脂培养基 (环境微生物的分离与纯化)
3. 试剂:10%酚、结晶紫染液、番红染液、碘液、95%乙醇、5%孔雀绿染液、0.5%番红水染液、3%过氧化氢水溶液、链霉素、蒸馏水等。
4. 仪器及其他用具:超净工作台、普通光学显微镜、高压灭菌锅、恒温培养箱、电子天平、酒精灯、烧杯、量筒、移液枪(枪头)、盛 9mL 无菌水的试管、盛 90mL 无菌水并带有玻璃珠的锥形瓶、无菌培养皿、无菌吸管、称量纸、药匙、接种环、接种针、玻璃涂楼载玻片、吸水纸、滤纸、记号笔、pH 试纸等。

实验方法:

1. 稀释倾注平板法(pour-plate method)

(1)制备土壤稀释液

称取土样 10g(或水样 10mL), 放入盛有 90mL 无菌水并带有玻璃珠的锥形瓶中, 振荡 20min, 使土样与水充分混合, 将菌分散。用移液枪从中吸取 1m 土壤悬液注入盛有 9m 无菌水的试管中, 吹吸三次, 使其充分混匀。然后再用移液枪从此试管中吸取 1mL 注入另一盛有 9mL 无菌水的试管中, 以此类推制成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 各种稀释度的土壤溶液。

(2)倒平板

将每种培养基的三个平板底面分别用记号笔标明 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 三种稀释度。移液枪从浓度小的稀释度为 10^{-6} 的菌液开始, 以 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 为序分别吸取 0.5mL 菌液于相应编号的培养皿内(每次吸取前, 用移液枪在菌液中吹泡使菌液充分混匀)。当加热熔化的培养基冷至 45°C 左右时, 右手拿装有培养基的锥形瓶, 左手拿培养皿, 以中指无名指和小指托住皿底, 拇指和食指夹住皿盖, 靠近火焰, 将皿盖掀开, 倒入培养基 15mL(倒入量以铺满皿底为限), 然后将培养皿平放在桌上, 顺时针和逆时针来回转动培养皿, 使培养基和菌液充分混匀, 而又不使培养基荡出皿或溅到皿盖上。

(3)培养

待培养基凝固后, 将牛肉膏蛋白胨平板倒置于 37°C 恒温培养箱中(以免培养过程中皿盖冷凝水滴下, 冲散已分离的菌落), 培养 1~2d, 高氏 1 号琼脂培养基和马丁氏琼脂培养基平板倒置于 28°C 恒温培养箱中培养 3~5d 后, 再挑取单个菌落, 直至获得纯培养

2. 稀释涂布平板法(spread-plate method)

将含菌材料先加到平板中再倒入较烫的培养基, 易造成某些热敏感菌的死亡, 而且采用稀释倾注平板法也会使一些严格好氧微生物因被固定在琼脂中间缺乏氧气而影响其生长, 因此在微生物学研究中更常用的纯种分离方法是稀释涂布平板法。其操作方法如下。

(1)倒平板

分别将牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、高氏 1 号琼脂培养基、马丁氏琼脂培养基熔化, 待冷

至 55~60°C 时, 向高氏 1 号琼脂培养基中加入 10% 酚数滴, 向马丁氏琼脂培养基中加入链霉素溶液, 使链霉素最终浓度为 3 μ g/mL。然后分别倒平板, 每种培养基倒三皿, 其方法是右手持盛培养基的试管或锥形瓶, 置火焰旁边, 左手拿平皿并松动试管塞或瓶塞, 用手掌边缘和小指、无名指夹住拔出, 如果试管内或锥形瓶内的培养基可一次用完, 则试管塞或瓶塞不必夹在手指中。试管(瓶)口在火焰上灭菌, 然后左手将培养皿盖在火焰附近打开一条缝, 迅速倒入培养基约 15mL, 加盖后轻轻摇动培养皿, 使培养基均分布, 平置于桌面上, 待凝固后即成平板。也可将平皿放在火焰附近的桌面上, 用左手的食指和中指夹住管塞并打开培养皿, 再倒入培养基, 播匀后制成平板。最好是将平板室温放置 2~3d, 或 37°C 养 24h, 检查无菌落及皿盖无冷凝水后再使用。

(2) 制备土壤稀释液

将 1 瓶 90mL 和 5 管 9mL 的无菌水排列好, 按 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 及 10⁻⁶ “依次编号。称取土样 10g(或水样 10mL)置于第一瓶 90mL 无菌水(内含玻璃珠)中、用移液枪吹吸三次, 手摇 5~10min, 将颗粒状样品充分打散。即为 10⁻¹ 浓度的菌液。用移液枪吸取 1mL 10⁻¹ 浓度的菌悬液于一管 9mL 无菌水中, 吹吸三次, 摇匀即为 10⁻² 浓度的菌悬液, 同样方法, 依次稀释到 10⁻⁶。

(3) 涂布

将前述每种培养基的三个平板底面分别用记号笔标明 10⁻⁴、10⁻⁵ 和 10⁻⁶ 三种稀释度, 然后用移液枪分别从 10⁻⁴、10⁻⁵ 和 10⁻⁶ 三管土壤稀释液中各吸取 0.2mL, 依次滴加于相应标号平板培养基表面中央位置。在火焰旁左手拿培养皿, 并用食指与中指将皿盖打开缝, 右手持无菌玻璃涂棒(用酒精棉球擦拭并灼烧灭菌)于平板培养基表面上, 将菌悬液自平板中央以同心圆方向轻轻向外涂布扩散, 使之均匀分布。室温下静置 5~10min, 使菌液浸入培养基。注意: 每个稀释度用一个灭菌玻璃涂棒, 在由低向高浓度涂布时, 可不用更换玻璃涂棒。

(4) 培养

将高氏 1 号琼脂培养基平板和马丁氏琼脂培养基平板倒置于 28°C 恒温培养箱中培养 35d, 牛肉膏蛋白胨琼脂平板倒置于 37°C 恒温培养箱中培养 2~3d。观察菌落形态及计数菌落, 并计算出每克土壤中微生物的数量。如果样品稀释适当的话, 微生物能一一分散, 经培养后, 可在平板表面得到单菌落。

3. 平板划线分离法(streak plate method)

(1) 倒平板

按稀释涂布平板法倒平板, 并用记号笔标明培养基名称、土样编号和日期。

(2) 平板划线

在近火焰处, 用接种环挑取上述 10⁻² 的土壤悬液一环, 左手拿培养皿, 中指、无名和小指托住皿底, 拇指和食指夹住皿盖, 将培养皿稍微倾斜, 左手拇指和食指将皿盖半开右手将接种环伸入培养皿内, 在平板上轻轻划线。划线完毕, 将牛肉膏蛋白胨琼脂培养基平板倒置于 37°C 恒温培养箱中培养 1~2d(分离细菌), 高氏 1 号琼脂培养基平板和马丁

氏琼脂培养基平板倒置于 28℃ 恒温培养箱中培养 3~5d(分离放线菌、酵母菌及霉菌)。培养后在划线平板上观察沿划线处长出的菌落形态特征,经涂片、染色和镜检确定为纯种后再接种斜面。平板划线方式很多,但无论采用哪种方式,其目的都是通过划线将样品在平板上进行适当稀释,使之形成单个菌落(即由一个菌体细胞繁殖而形成的孤立菌落)。常用的划线分离方式有以下两种。

①分区划线法:

在无菌条件下,用接种环挑取 10^{-2} 土壤悬液一环,先在平板培养基的一边进行第一次平行划线 3~4 条,再转动培养皿,约 60°角,并将接种环上剩余菌烧掉,待冷却后通过第一次划线部分进行第二次平行划线,再用同样的方法通过第二次划线部分进行第三次划线和通过第三次平行划线部分进行第四次平行划线。划线完毕后,盖上培养皿盖,倒置于恒温培养箱中培养。分区划线法用于较浓的菌样时,分数次划线,每次划线后要烧接种环,然后再划下一区。

②连续划线法:

在无菌条件下,用接种环挑取 10^{-2} 土壤悬液一环,在平板培养基上连续划线,当接种环在培养基表面上往后移动时,接种环上的菌液逐渐稀释,最后在所划的线上分散着单个细胞,经培养,每一个细胞长成一个菌落。

划线后取出接种环,烧死多余菌体。注意接种环勿划破或嵌入培养基,前后两条划线不宜重叠,要疏密适中,以免长成菌苔,并能充分利用平板表面。划线完毕后,盖上皿,倒置于温室中培养。

(3)挑菌

同稀释涂布平板法。

4. 微生物的纯化(挑取单菌落)

采用平板分离培养法长出的菌落肉眼可见,不同菌株的菌落形态特征各异,据此可在一定程度上鉴别微生物。从分离平板中选择目的菌株的菌落,可进一步纯化培养。

将上述培养后长出的单个菌落分别挑取接种到三种培养基上,分别置于 28℃ 和 37℃ 恒温培养箱中培养 1~5d,待菌落长出后,检查其特征是否一致,同时将细胞涂片染色后用显微镜检查是否是单一的微生物,若有其他杂菌,就要再一次进行分离、纯化,直到获得培养。

观察的菌落特征主要有:大小、表面形状、隆起度、边缘性状、菌落形状、表面光泽菌落质地、颜色、透明度等,有时还要结合气味观察。例如,细菌和酵母菌的菌落表面较湿润,细菌菌落薄而小,酵母菌菌落厚而大;放线菌和霉菌的菌落表面较干燥,放线菌菌落密而小、菌丝细,霉菌菌落疏而大、菌丝粗等。

注意事项:

1. 一般土壤中,细菌最多,放线菌及霉菌次之,而酵母菌主要见于果园及菜园土壤中故从土壤中分离细菌时,要取较高的稀释度,否则菌落连成一片不能计数。

2. 微生物的分离操作需在经紫外灯灭菌的无菌操作室、无菌操作箱或超净工作台等环境下

进行。实验台面要求一定光滑、水平。光滑便于用消毒剂擦洗，水平是为了倒琼脂培养基时，培养皿内平板的厚度保持一致。在实验台上方，空气流动应缓慢，其周围杂菌也应越少越好。为此，必须清扫室内，关闭实验室的门窗，并用消毒剂进行空气消毒处理，尽可能地减少杂菌的数量。

3. 平板不能倒的太薄，最好在使用前一天倒好。
4. 为了防止平板表面产生冷凝水，倒平板前培养基温度不能太高(放线菌的培养时间较长，故制平板的培养基用量可适当增多)。
5. 空气中的杂菌在气流小的情况下，会随着灰尘落下，所以接种时，应尽量缩短打形培养皿的时间。
6. 倒平板时需做“对照”，即不含样品，只含培养基的平板。

实验报告：

1. 计算出每克土壤中的细菌、放线菌、霉菌的数量。选择长出菌落数 30~300 之间的培养皿进行计数。按一下公式计算：

总菌数/g=同一稀释度几次重复的菌落平均数/g×稀释倍数

2. 列表比较各种分离方法及注意事项。
3. 实验结果分析。

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℃ 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。