

# 产品使用说明书

## Product Manual

### DSMZ 培养基 120

品牌	Chinook 钦诺克	
货号	CN260981	
中文名称	DSMZ 培养基 120	
英文名称	Methanosarcina Medium	
产品别名	DSMZ 培养基 120、甲烷八叠球菌培养基	
用途	用于 Methanosarcina 菌培养	
<b>培养基基础成分(g/L):</b>		
磷酸氢二钾 $K_2HPO_4$	0.35	
磷酸二氢钾 $KH_2PO_4$	0.23	
氯化铵 $NH_4Cl$	0.50	
七水硫酸镁 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.50	
二水氯化钙 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.25	
氯化钠 $NaCl$	2.25	
七水硫酸亚铁 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.002	
酵母浸粉 Yeast Extract	2.00	
酪蛋白胨 Casitone	2.00	
乙酸钠 Sodium Acetate	2.5	
刃天青 Sodium Resazurin	0.0005	
<b>用法:</b>		
<p>1.称取培养基基础成分 10.58g (精确数值 10.5825g) , 另量取 1mL 配置好的微量元素溶液 SL-10, 加入 1000mL 蒸馏水溶解, 通入混合气体 (80%的 <math>N_2</math>和 20%的 <math>CO_2</math>) 30-45 分钟, 然后加入碳酸氢钠 2g 并使之溶解, 将 pH 调节至 6.5, 并在混合气体 (80%的 <math>N_2</math>和 20%的 <math>CO_2</math>) 的环境下将培养基分装到到缺氧的亨盖特厌氧滚管 (Hungate-type Tubes) 或血清小瓶中, 使培养基溶液达到亨盖特厌氧滚管或血清小瓶 30%的体积, 高压灭菌;</p> <p>2.用无菌注射器抽取 50%甲醇溶液 20mL, 按比例注入到含有灭菌培养基的厌氧滚管中, 混匀;</p> <p>3. 用无菌注射器抽取还原剂溶液 (含 0.3g/L-半胱氨酸盐酸盐一水物、0.3g 九水硫化钠)、</p>		

按比例注入到含有灭菌培养基的厌氧滚管中，混匀；

4. 用无菌注射器抽取 Wolin 氏维生素溶液(10x)1mL，按比例注入到含有灭菌培养基的厌氧滚管中，混匀；

5.如有必要，将整个培养基的 pH 调节至 6.8-7.0。

6.各添加溶液配制方法参照下表

### 微量元素溶液 SL-10 成分 (g/L) :

四水氯化亚铁 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.5
氯化锌 $\text{ZnCl}_2$	0.07
四水氯化锰 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1
硼酸 $\text{H}_3\text{BO}_3$	0.006
六水氯化钴 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.19
二水氯化铜 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.002
六水氯化镍 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.024
二水钼酸钠 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.036

### 配置方法:

量取蒸馏水 990mL，加入 25%稀盐酸 10mL，混匀，另称取微量元素溶液 SL-10 粉剂 2.144g，加入并混匀。

### 50%甲醇溶液成分:

甲醇 Methanol	10mL
蒸馏水 Distilled Water	10mL

### 配置方法:

量取 10mL 蒸馏水，另量取 10mL 甲醇，加入混匀，放入密闭管，通入氮气，高压灭菌。

### 还原剂溶液 (含 0.3g L-半胱氨酸盐酸盐一水物、0.3g 九水硫化钠) 成分 (g) :

L-半胱氨酸盐酸盐一水物 L-Cysteine HCl·H <sub>2</sub> O	0.3
九水硫化钠 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.3

### 配置方法:

量取适量蒸馏水，分别称取 0.3g L-半胱氨酸盐酸盐一水物、0.3g 九水硫化钠，加入混匀，放入密闭管，通入氮气，高压灭菌。

### Wolin 氏维生素溶液(10x)成分 (mg/100mL) :

生物素 Biotin	2.0
叶酸 Folic Acid	2.0



盐酸吡多醇 Pyridoxine-HCl	10.0
盐酸硫胺素 Thiamine-HCl	5.0
核黄素 Riboflavin	5.0
烟酸 Nicotinic Acid	5.0
泛酸钙 Ca-D-pantothenate	5.0
维生素 B12 Vitamin B12	0.1
对氨基苯甲酸 p-Aminobenzoic Acid	5.0
硫辛酸(±)- $\alpha$ -Lipoic Acid	5.0
<b>配置方法:</b>	
称取本品 0.441g Wolin 氏维生素溶液(10x)粉剂, 加入 1000mL 蒸馏水, 通入 100%的氮气 30 分钟, 过滤除菌, 分装到密闭管中, 通入氮气。	
<b>产品组成:</b>	
本品包含独立包装的培养基基础 250g、碳酸氢钠 50g、微量元素溶液 SL-10 粉剂 100g、L-半胱氨酸盐酸盐一水物 10g、九水硫化钠 10g、Wolin 氏维生素溶液(10x)粉剂 50g, 甲醇需用户自行准备。	
<b>备注:</b>	
原英文文献中未标明微量元素溶液 SL-10、Wolin 氏维生素溶液(10x)的成分, 未标明还原剂溶液 (含 0.3g L-半胱氨酸盐酸盐一水物、0.3g 九水硫化钠) 的具体配置方法与高压灭菌时间, 未标明 50%甲醇溶液的高压灭菌时间。附原英文文献: Dissolve ingredients (except bicarbonate, vitamins, methanol, cysteine and sulfide) and sparge medium with 80% N <sub>2</sub> and 20% CO <sub>2</sub> gas mixture for 30 - 45 min to make it anoxic. Then add and dissolve bicarbonate, adjust pH to 6.5 and dispense medium under 80% N <sub>2</sub> and 20% CO <sub>2</sub> gas atmosphere into anoxic Hungate-type tubes or serum vials to 30% of their volume and autoclave. Methanol (50% v/v stock solution) and the reducing agents are each autoclaved separately under 100% N <sub>2</sub> gas atmosphere as concentrated solutions in tightly closed tubes. Vitamins are prepared under 100% N <sub>2</sub> gas atmosphere and sterilized by filtration. Appropriate volumes of the stock solutions are injected into the sterile medium with hypodermic syringes. Adjust pH of the complete medium to 6.8 - 7.0 if necessary.	
<b>储存方式:</b>	
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°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。