

实验七 培养基的制备和灭菌

孔召玉

kongzhaoyu@hotmail.com

南昌大学生命学院

一、目的要求

- * 了解培养基的配制原理和方法，掌握其配制过程。
- * 了解高压蒸汽灭菌的基本原理，学习其操作方法。

二、基本原理

- * 培养基是按照微生物生长繁殖或积累代谢产物所需要的各种营养物质，用人工方法配制而成的营养基质。其中含有**碳源**、**氮源**、**无机盐**、**生长因子**以及**水分**等。微生物在培养基上生长繁殖还必须在最适酸碱度范围内才能表现它们最大生命力，因此不同种类的微生物应将培养基调到一定**pH**值范围。

培养基种类很多，不同的微生物所需培养基不同。

- * 按其成分：天然培养基、合成培养基、半合成培养基
- * 按其物理状态：固体培养基、液体培养基和半固体培养基
- * 按其用途：加富培养基、选择培养基、鉴别培养基

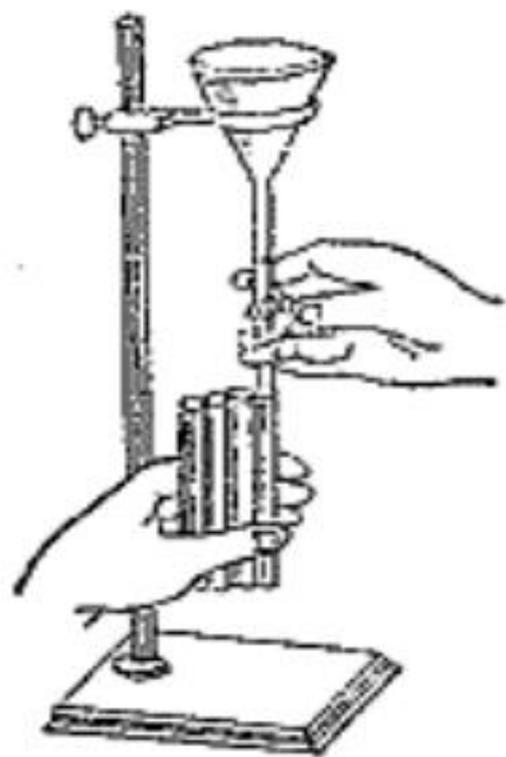
高压蒸汽灭菌

- * 培养基配制后还必须进行灭菌。高压蒸汽灭菌法是在密闭的加压容器内进行，加热使器内的水产生蒸汽，由于密闭，增加了器内的压力，使水的沸点升高，从而获得高于 100°C 的蒸汽温度，导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。

三、实验分组与任务

每一排6人为一组，全班共分5个组

- **第1组：** 配制500ml淀粉培养基，分装于2个三角瓶（500ml）； 包装90个培养皿；
- **第2组：** 配制200ml明胶培养基，分装成25支试管，每支试管装量为试管高度的四分之一；
- **第3组：** 配制200ml葡萄糖发酵培养基，分装成20支试管，每支试管装液量为试管高度的四分之一（每支试管内要加小倒管，葡萄糖按照1%直接加入培养基中）
- **第4组：** 配制200ml乳糖发酵培养基，分装成20支试管，每支试管装液量为试管高度的四分之一（其它同上）
- **第5组：** 配制2 L牛肉膏蛋白胨培养基，分装到500ml三角瓶； 包装10个涂布器，⁵一盒大枪头，写明班级。



分装培养基



摆斜面

注意事项

- ◆在配制培养基时一定要注意调溶液的pH。
- ◆称药品时**严防药品混杂**，一把药匙用于一种药品，或称取一种药品后，洗净，擦干，再取另一种药品。瓶盖也不要盖错。
- ◆在烧杯融化琼脂的过程中，人要在电炉旁看着，**以免培养基因沸腾而溢出烧杯**。同时，需不断搅拌，**以防琼脂糊底烧焦**。注意带上棉纱手套**防止烫伤**。
- ◆分装过程中，注意**不要使培养基沾在管口上**，以免沾污棉塞而引起污染。
- ◆培养基配方是配制1000ml的量，要根据**实际配制的量**按比例增减。
- ◆调好pH后，**再加入指示剂**（如溴甲酚紫）。

(二) 培养基灭菌

培养基分装好后，塞上棉塞，外面再包一牛皮纸，便可灭菌。灭菌的时间和温度按各培养基规定进行，以保证灭菌效果和不损坏培养基的必要成分。培养基经灭菌后，可放在37恒温箱培养24小时，无菌者方可使用。

在实验室里用得最多的加热灭菌法是**高压蒸汽灭菌**和干热灭菌。一般培养基和水等用高压蒸汽灭菌，而玻璃器皿常用干热灭菌。蒸汽灭菌为105-121℃，15-20分钟，干热灭菌为160-170℃，1-2小时。目的都是使细菌体内蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。

- * 在同一温度下，湿热杀菌效力比干热大，因为在湿热情况下，菌体吸收水分，使蛋白质易于凝固，同时湿热穿透力强，而且当蒸汽与被灭菌物体接触凝成水分时，又可放出热量，使温度迅速增高，从而增加灭菌效力。

高压蒸汽灭菌步骤如下：

1. 灭菌器内加入一定量的水，将包扎好的物品放入内锅中。
2. 接通电源，进行加热。
3. 排除高压锅内的空气，可将排气阀打开，待排出大气后关闭排气阀；或关闭排气阀，待压力上升到 $0.5\text{kg}/\text{cm}^2$ 时再打开排气阀，待压力回复到0时再关闭排气阀。
4. 当压力达 $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$ 时，此时灭菌器内的温度为 121°C ，维持 20min 。对热不稳定的培养基如含有葡萄糖、氨基酸等物时，应适当降低压力，延长时间。
5. 灭菌时间一到，切断电源，待压力降至零时，才能打开排气阀，然后打开灭菌器盖，取出物品。

注意：将糖发酵培养基放在一起灭菌，其他培养基放在一起灭菌。

1. 淀粉培养基

蛋白胨10克，NaCl 5克，牛肉膏5克，可溶性淀粉2克，琼脂20克，水1000ml

2. 明胶培养基

牛肉膏3克，蛋白胨10克，NaCl 5克，明胶120-180克，水1000ml ， pH 7.2~7.4

加热将上述成分溶化，不断搅拌。溶化后调pH 7.2-7.4

3. 糖发酵培养基

蛋白胨10克，NaCl 5克，葡萄糖（或乳糖）10克，1.6% 溴甲酚紫乙醇溶液1ml，水1000ml ， pH 7.2~7.4 〈调好pH后，再加入指示剂溴甲酚紫〉

4. 牛肉膏蛋白胨培养基

牛肉膏3克，蛋白胨10克，NaCl 5克，琼脂20克，水1000ml， pH 7.0~7.2

1. 6%溴甲酚紫乙醇溶液 配制:

溴甲酚紫 1.6克

95%乙醇 50ml

蒸馏水 50ml

五、实验报告

思考题：

1. 培养基配好后，为什么必须立即灭菌？如何检查灭菌后的培养基是无菌的？
2. 在配制培养基的操作过程中应注意些什么问题，为什么？