

# 产品使用说明书

## Product Manual

### LAS 降解菌富集液体培养基

品牌	Chinook 钦诺克	
货号	CN260056	
中文名称	LAS 降解菌富集液体培养基	
英文名称	LAS Degrading Bacteria Enrichment Broth	
产品别名	LAS 降解菌富集液体培养基套装、LAS 降解菌富集肉汤培养基	
用途	用于表面活性剂降解菌的富集培养(阴离子表面活性剂烷基苯磺酸盐降解菌的分离及其性能测定)	
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	
<b>培养基基础成分 (g/L) :</b>		
七水硫酸镁 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$		0.14
七水硫酸亚铁 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$		0.0005
磷酸氢二钾 $K_2HPO_4$		0.33
氯化钾 KCl		0.06
酵母粉 Yeast Extract Powder		1.2
pH		7.0
<b>LAS 添加成分 (g/L) :</b>		
直链烷基苯磺酸钠 (十二烷基苯磺酸钠) Sodium Linear Alkylbenzene Sulfonate(LAS)		0.05 (或 0.1g)
<b>用法:</b>		
称取本品 1.73g, 另称取十二烷基苯磺酸钠 (LAS) 0.05g (配置更高 LAS 含量的富集培养基可提高用量, 比如 0.1g), 加入 1000mL 蒸馏水中溶解, 分装于 250mL 三角瓶, 每瓶 25mL, 包扎, 121°C 高压灭菌 20 分钟。		
<b>产品组成:</b>		
本品包含独立包装的培养基基础 250g、十二烷基苯磺酸钠 (LAS) 20g。		
<b>相关产品:</b>		
营养琼脂 (牛肉膏蛋白胨琼脂培养基)		
营养肉汤 (牛肉膏蛋白胨液体培养基)		

LAS 降解菌富集液体培养基

LAS 降解菌分离琼脂培养基

LAS 液体培养基

## 实验方法与步骤(供参考):

实验名称: 表面活性剂降解菌的分离

材料和器皿:

### 1. 微生物样品

洗涤剂厂或污水处理厂活性污泥

### 2. 培养基

营养琼脂 (牛肉膏蛋白胨琼脂培养基)

营养肉汤 (牛肉膏蛋白胨液体培养基): 装于 250mL 三角瓶, 每瓶 50 mL, 加通气塞, 包扎, 灭菌。

LAS 降解菌富集液体培养基

LAS 降解菌分离琼脂培养基

LAS 液体培养基

### 3. 试剂

CHCl<sub>3</sub>, 异丙醇, 生理盐水, NaOH 溶液(1mol/L), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液(0.5 mol/L), 草酸铵结晶紫染色液, 沙黄染色液, 路哥尔氏碘液, 95%乙醇等。

LAS 贮备液(1g/L):

0.100g LAS 溶解于蒸馏水中, 定容至 100 mL, 4°C保存, 可用 1 周。

LAS 标准液(10mg/L):

LAS 贮备液用蒸馏水稀释 100 倍, 使用前配制。

洗涤液:

50g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 加 900mL 蒸馏水溶解, 加入浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6.8 mL, 定容至 1000mL。

美蓝溶液:

洗涤液 1000mL, 加 30mg 美蓝, 溶解后保存于棕色瓶中。

酚酞指示剂:

1g 酚酞溶解于 100 mL 50%乙醇中, 过滤后备用。

### 4. 仪器设备

分光光度计(722 型或 752 型), 恒温培养箱, 显微镜, 恒温振荡培养箱, 离心机(配 50 mL 离心管转头), 天平等。

### 5. 器皿和其他材料

培养皿, 移液管(1mL、5mL 和 10mL), 10mL 定量移液管, 助吸器, 试管, 分液斗(250 mL), 三角瓶(250mL 和 1000mL), 脱脂棉, 煤气灯, 电子点火器, 不锈钢锅, 容量瓶(50mL、100mL 和 1000mL), 离心管(50mL), 镜头纸等。

## 实验方法:

### 1. 样品采集

用无菌瓶采集活性污泥样品, 带回实验室备用。

### 2. LAS 降解菌的富集

在装有 25 mL LAS 降解菌富集液体培养基(含 LAS 50mg/L)的三角瓶中加入 2mL 活性污泥, 28°C 220r/min 培养 4-5d。为了容易分离到降解菌, 可以多次培养, 每次提高富集培养基中 LAS 含量。以低含量 LAS 富集液体培养基三角瓶中取 0.2mL 培养物, 加入高含量 LAS 富集液体培养基中继续培养。

### 3. LAS 降解菌的分离

#### (1) 准备分离平板

融化 LAS 降解菌分离琼脂培养基, 冷却至 50°C 后倒平板, 每皿 15mL。冷凝备用。

#### (2) 分离和培养

从 LAS 降解菌的富集培养物中取菌, 在分离平板上划线, 28°C 培养

(3) 获得纯培养挑取分离平板上出现的菌落, 再重复划线分离 1 次, 得到可以利用 3 ~5 d。LAS 作为唯一碳源的细菌纯培养, 观察、记录菌落特征。

### 4. 斜面培养和个体形态的观察

将分离到的 LAS 降解菌接种牛肉膏蛋白胨琼脂培养基斜面, 28°C 培养 20~24h, 经革兰氏染色, 镜检, 观察染色结果、个体形态和菌体的排列方式。

### 5. 扩大培养用

斜面菌种接种三角瓶中的牛肉膏蛋白胨液体培养基, 28°C 220r/min 振荡培养 24h, 5000g 离心 10min, 弃上清液, 菌体用无菌生理盐水洗涤 1 次, 再次离心, 收集菌体沉淀, 称量菌体的湿重, 用无菌生理盐水把菌体沉淀配制成 20mg/mL 的菌悬液。

### 6. LAS 的降解实验

于每瓶 LAS 液体培养基中接种 5mL 菌悬液(20 mg/mL), 混匀后取样 100 mL 置于 4°C 保存, 装有剩余菌样的三角瓶置于 28°C 220r/min 振荡培养 1d。

### 7. LAS 含量的测定

采用美蓝法测定每瓶培养前(4°C 保存)和培养后(1d)的 LAS 含量。

#### (1) 标准曲线的绘制

①取 250mL 分液漏斗 5 个, 分别加入 100mL、95 mL、90 mL、85 mL 和 80 mL 蒸馏水, 再分别移入 0、5mL、10mL、15mL 和 20mL LAS 标准液(10 mg), 摇匀。此时各瓶中 LAS 含量分别为 0、50 $\mu$ g、100  $\mu$ g、150  $\mu$ g 和 200  $\mu$ g。

②在漏斗中加几滴酚酞指示剂, 然后滴加 NaOH 溶液至溶液呈紫红色, 再滴加 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 至紫红色刚好消失。

③在漏斗中加 25 mL 美蓝溶液, 摇匀, 加入 10mL CHCl<sub>3</sub>, 剧烈振摇 30s, 注意放气。可能会发生乳化现象, 必要时可在 5 个分液漏斗中各加入等体积的异丙醇(小于 10mL)以破乳。慢慢旋转分液漏斗, 使滞留在内壁上的 CHCl<sub>3</sub> 液珠降落, 静置分层。

将下层的  $\text{CHCl}_3$  放入预先盛有 50mL 洗涤液的第二个分液漏斗内，用数滴  $\text{CHCl}_3$  淋洗第一个分液漏斗的颈管。重复萃取 3 次，每次用 10mL  $\text{CHCl}_3$ 。合并所有  $\text{CHCl}_3$  萃取液至第二个分液漏斗中，剧烈振摇 30s，静置分层。将  $\text{CHCl}_3$  层通过脱脂棉放入 50mL 容量瓶中，再用  $\text{CHCl}_3$  萃取两次(每次用量 5mL)，此  $\text{CHCl}_3$  层也并入容量瓶中，加  $\text{CHCl}_3$  到标线，摇匀。以  $\text{CHCl}_3$  为参比，测定各瓶在 652nm 处的吸光度( $A_{652\text{nm}}$ )，以吸光度减去空白对照(LAS 含量为 0)的吸光度为纵坐标，以 LAS 含量为横坐标，绘制标准曲线。

(2)样品的测定将待测样品 5000g 离心 10min，上清液按估计的 LAS 含量用蒸馏水适当稀释。取 100mL 稀释上清液移入分液漏斗，其余同上。最后测定该样品经反应后  $\text{CHCl}_3$  萃取液的  $A_{652\text{nm}}$  值，从标准曲线上查得稀释上清液中 LAS 的含量，并计算待测样品 LAS 含量及 LAS 降解比例。

### 8. 实验后处理

将所有培养物和染菌器皿消毒或灭菌，再清洗晾干。

#### 结果记录：

- 1.记录所分离降解菌在 LAS 分离平板上的菌落特征和斜面培养物的个体形态特征。
- 2.测定不同含量 LAS 时  $\text{CHCl}_3$  层的吸光度  $A_{652\text{nm}}$ ，并减去空白对照的吸光度进行校正。以 LAS 含量为横坐标，以校正  $A_{652\text{nm}}$  为纵坐标绘制标准曲线。

**美蓝法测定不同含量 LAS 的  $A_{652\text{nm}}$**

	LAS 含量/(mg·L <sup>-1</sup> )				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
$A_{652\text{nm}}$					
校正 $A_{652\text{nm}}$					

3.根据 LAS 降解实验前和实验后上清液测定的  $A_{652\text{nm}}$ ，查阅标准曲线，得到对应的 LAS 含量，根据稀释倍数，计算样品的 LAS 含量，并计算 LAS 降解比例。

#### 注意事项：

- 1.如条件允许，可以用高含量 LAS 富集培养基培养数次，一方面有利于 LAS 降解菌的富集，另一方面降解菌经驯化后具有更高的降解 LAS 活性。
2.  $\text{CHCl}_3$  有毒，应该在通风橱中进行 LAS 含量的测定。

#### 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。