

产品使用说明书 Product Manual

甲醛降解菌固体培养基

品牌	Chinook 钦诺克		
货号	CN261146		
中文名称	甲醛降解菌固体培养基		
英文名称	Formaldehyde Degrading Bacteria Agar		
产品别名	甲醛降解菌分离培养基 、 甲醛降解菌纯化培养基、 甲醛降解菌琼脂培养基		
配方出处	徐爱玲 宋志文等.2017.环境工程微实验技术.北京：中国电力出版社		
用途	用于甲醛降解菌的分离纯化培养(室内甲醛的微生物去除)		
成分 (g/L)：			
磷酸氢二钾 K ₂ HPO ₄	2.16		
磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄	0.85		
硝酸铵 NH ₄ Cl	1.05		
硫酸镁 MgSO ₄	0.1		
一水硫酸锰 MnSO ₄ ·H ₂ O	0.05		
七水硫酸亚铁 FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01		
二水氯化钙 CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.03		
琼脂 Agar	10.0		
pH	7.0		
用法：			
称取本品 14.25g，加入 1000mL 蒸馏水，加热煮沸，搅拌至完全溶解，分装，121℃ 高压灭菌 20 分钟。根据实验需要，无菌操作，加入适量过滤除菌的甲醛。			
相关产品：			
甲醛降解菌液体培养基			
甲醛降解菌固体培养基			
实验方法与步骤（供参考）：			
实验名称：室内甲醛的微生物去除			
实验材料：			
1.材料			

采集:在污水处理厂生物池进水口和出水口采集印染废水。

2.溶液与试剂

甲醛 37%~40%、葡萄糖、麦芽糖、淀粉、木糖、乳糖、蔗糖、甲苯、四氯化碳、无水乙醇、乙酸铵、冰乙酸、乙酰丙酮等, 均为分析纯。

AxyPrep 细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒, Axygen, AP-MN-BT-GDNA-50DNA 凝胶回收试剂盒、Taq DNA 聚合酶、DNA marker、琼脂糖、缓冲液、EB 溶液、Loading Buffer、Marker(分为 500bp 和 2000bp 两种)、双蒸水、无菌水、Mix(分为进口和国产两种)、多种引物、TE buffer、溶菌酶 lysozyme(-20℃保存)、Buffer BTL、玻璃珠、蛋白酶 K Proteinase K、RNase A(-20℃保存)、Buffer BDL、无水乙醇(96%~100%)、Buffer HB、DNA 洗涤缓冲液 DNA Wash Buffer、洗脱液 Elution Buffer(65℃预热)。

乙酰丙酮溶液:50g 乙酸铵, 6mL 冰乙酸及 0.5mL 乙酰丙酮试剂溶于 100mL 水中。此溶液储存于冰箱, 4℃冷藏可保持一月。

甲醛标准使用液:在容量瓶中将甲醛逐级用蒸馏水稀释成每毫升含 10ug 甲醛的标准使用溶液。临用时现用现配。

3.培养基

甲醛降解菌液体培养基、甲醛降解菌固体培养基

4.仪器或其他用具

锥形瓶、刻度比色管、培养皿、容量瓶、移液枪、紫外分光光度计、恒温摇床、生化培养箱、高倍显微镜、盖玻片、载玻片、无菌操作台、水浴锅、无菌枪头、离心管、2mL 收集管、PCR 仪、离心机、凝胶成像系统。

实验步骤:

1.实验方法

甲醛的化学性质十分活泼。因此, 可采用多种定量分析方法测定甲醛。目前, 空气中甲醛的测定方法有滴定分析法、分光光度法、色谱法、比色法和电化学法等。电化学分析法存在干扰多、不稳定等问题, 所以使用的相对较少。游离甲醛浓度较高时采用滴定分析法进行定量分析, 而微量甲醛的分析一般则采用分光光度法、色谱法等。尤以分光光度法方便实用。本实验参照国标《GB/T13197-1991 的乙酰丙酮分光光度法》对甲浓度进行测定。

(1)甲醛标准曲线的绘制

分别取 0、0.50、1.00、3.00、5.00、8.00mL 的 10μg/mL 甲醛标准使用溶液加到 6 个 50mL 的比色管中, 然后加蒸馏水定容至 25mL。在所有比色管中分别加入 2.50mL 乙酰丙酮溶液, 颠倒数次摇匀。再于 60℃的恒温水浴锅中浴热 15min 取出后用冷水冷却至室温。在紫外 414nm 下测定其吸光度。根据浓度对应的吸光度绘制标准曲线。

(2)样品中甲醛浓度的测定

参照国标《GB/T13197-1991 的乙酰丙酮分光光度法》测定。原理是利用了甲醛与乙酰丙酮以及氨生成黄色物质--3,5-二乙酰基-1, 4-二氢卢剔啶后, 进行分光光度测定。

取数支 2mL 的离心管，分别加入 2mL 的样品菌液，于离心机中进行固液分离，然后分别取 1.50mL 样品溶液上清液加入数支 50mL 具塞比色管中，加蒸馏水定容至 25mL。然后在所有比色管中分别加入 2.50mL 乙酰丙酮溶液，颠倒数次摇匀。再于 60℃ 的恒温水浴锅中浴热 15min，取出后用冷水冷却至室温。用 10mm 比色皿，在波长 414nm 处，以蒸馏水为参比测量吸光度。

然后从校准曲线上查出试样中甲醛的含量。根据测量降解前后甲醛浓度值，考察菌株降解溶液中甲醛的性能：

$$\text{降解率}(\%) = (1 - A_1 / A_0) \times 100$$

式中 A_0 、 A_1 ——降解前后的甲醛浓度值。

2. 甲醛降解菌的富集

用移液枪分别从 3 个源菌种液中各取 3mL 菌液接种于含 100mL 基本培养基（**甲醛降解菌液体培养基**）的 250mL 锥形瓶中，每个源菌种各做一个平行样，并取未接种细菌的培养基作为对照，用以考察甲醛自然挥发所造成的误差。用甲醛作为唯一碳源进行甲醛降解菌的筛选富集，然后将锥形瓶置于恒温摇床上，条件为 30℃、150r/min。每 24h 根据《乙酰丙酮分光光度》定品中的剩余的甲醛浓度，甲醛起始浓度为 600mg/L，当甲醛降解菌为降解效率稳定后，据甲醛的降解情况对样品内甲醛的起始浓度进行提高，将甲浓度从 600mg/L 逐步提高到 2100mg/L。反复多次。

3. 甲醛降解菌的分离纯化

在菌种的富集基础上，选择长势较好菌液试样，取 100μL 的菌液于 1.5mL 的离心管中稀释为 $10^{-2} \sim 10^{-5}$ 一的梯度，然后用移液枪移取 200μL 菌液，将其均匀涂布于以甲醛作为唯一碳源的固体培养平板（**甲醛降解菌固体培养基**）上，并用无菌水做对照。灭菌后加入甲醛溶液，使培养基中的甲醛浓度为 600mg/L，然后将其倒入培养皿，待培养基凝固后，在固体培养基表面上涂抹浓度为 600mg 的甲醛溶液约 200μL。正面培养 2h 后，将平板倒置于 30℃ 的生化培养箱中，培养约 72h。然后将长势较好的菌落接种于基本培养基中，重复分离多次。记录其菌落颜色，形态，大小，光滑程度。然后做单菌培养研究。

4. 甲醛降解菌降解条件的优化

(1) C/N 比对细菌的影响

细菌筛选过程中前期为了使得细菌迅速增长，并且数量增多，加入外加碳源--葡萄糖，这个过程中仍然加入 600mg/L 浓度的甲醛。碳氮比对细菌的生长增殖有一定影响。将碳氮比划分为几个梯度：1:4、1:8、1:12、1:24。氮源暂时用基本培养基中的 NH_4Cl 。葡萄糖的加入量固定为 0.1g，然后测定甲醛降解率。从而选出最合适的碳氮比，为后面的外加碳源的选取提供依据。

(2) 外加碳源对甲醛降解菌生长增殖的影响

选取常见的碳源为外加碳源，观察分析主要有葡萄糖、蔗糖、乳糖、木糖、淀粉、麦芽糖。在 250mL 锥形瓶中加入 100mL 基本培养基（**甲醛降解菌液体培养基**），称量相同质量的碳源，以 1g/L 葡萄糖为标准，并按照最适的碳氮比量加入 NH_4Cl ，用封口膜和

橡皮筋将其封好，121℃高压灭菌。用移液枪移取 3mL 菌液加入，并加入 600mg/L 的甲醛，将培养基放置于恒温摇床振荡培养。每 24h 测定其甲醛剩余浓度的吸光度，以选择较佳的外加碳源。

(3)外加碳源的浓度对甲醛降解的影响

在选择较佳外加碳源的基础上，再考察外加碳源添加量对甲醛降解细菌降解甲醛的影响，外加碳源浓度分别设定成 0g/L、0.5g/L、1.0g/L、1.5g/L、2.0g/L、2.5g/L，用移液枪移取 3mL 新鲜的菌液，并取未接种细菌的培养基作为对照，用以考察甲醛自然挥发所造成的误差。分别在每个锥形瓶中加入等量的甲醛溶液，培养基甲醛浓度为 600mg/L，用封口膜和橡皮筋将锥形瓶封闭好，然后将锥形瓶置 30℃ 150r/min 恒温摇床培养，24h 后测定培养基中甲醛浓度，从而计算甲醛降解率，以选择较佳的外加碳源量。

5.菌种观察与鉴定

(1)高信显微镜下初步观察

用移液枪移取少量菌液在载玻片上，盖上盖玻片，在 100 倍油镜下观察细菌的形态。初步认识甲醛降解菌的形态，以及细菌的大概存活状况，以便后续试验。

(2)分子生物学鉴定

1)DNA 的提取。

- a.用 2mL 离心管收集 1.0×10^9 (1 mL 菌液 OD_{600} 为 1~1.5) 的细菌培养物，12 000r/min 离心 30 s，弃尽上清。用 150 μ L 已加入 RNase A 的 Buffer S 悬浮沉淀。
- b.加入 20 μ L 溶菌酶储存液，混合均匀，室温静置 5min。
- c.加入 30 μ L 0.25mol/L EDTA(pH 8.0)，混合均匀，冰浴 5 min。
- d.加入 450 μ L Buffer G-A，旋涡震荡 15s，65℃水浴 10 min。
- e.加入 400 μ L Buffer G-B 和 1mL Buffer DV(4℃预冷)，用力混合，12 000 r/min 离心 2min。
- f.尽可能丢弃上相，保留相间沉淀和下相。加入 1mL 4℃预冷 Buffer DV，用力混合：12 000 r/min 离心 2min。
- g.丢弃上相，将下相转移至滤器(滤器置于 2mL 离心管中)。12000 r/min 离心 1min。
- h.弃滤器，在滤液中加入 400 μ L Buffer BV，混合均匀。
- i.将制备管置于 2mL 离心管中，将步骤 8 中的混合液移入制备管中，12000r/min 离心 1min。
- j.弃滤液，将制备管置回到原 2mL 离心管中，加入 500 μ L Buffer W1，12 000 r/min 离心 1min。
- k.弃滤液，将制备管置回到原 2mL 离心管中，加入 700 μ L Buffer W2，12000 r/min 离心 1min。
- l.以同样的方法再用 700 μ L Buffer W2 洗涤一次。
- m.弃滤液，将制备管置回到原 2mL 离心管中，12000r/min 离心 1min。
- n.将制备管置于另一洁净的 1.5mL 离心管中，在 silica 膜中央加 100~200 μ L Eluent 或



去离子水，室温静置 1min。12000r/min 离心 1min 洗脱 DNA。

2)16S rDNA 序列的 PCR 扩增。

3)PCR 产物测序。

4)通过 NCBI 数据库进行 BLAST 比对，找出菌株的种属。

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℃ 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°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。