产品使用说明书
Product Manual

羧甲基纤维素琼脂培养基

品牌	**Chinook　钦诺克**
货号	**CN261105**
中文名称	**羧甲基纤维素琼脂培养基**
英文名称	**Carboxymethylcellulose Sodium Agar Medium**
产品别名	**羧甲基纤维素琼脂**
用途	**用于土壤中纤维素降解菌的纯化（环境中纤维素降解菌的分离实验）**
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**

成分（g/L）：

硫酸铵$(NH_4)_2SO_4$	2.0
七水硫酸镁 $MgSO_4·7H_2O$	0.5
三氯化铁 $FeCl_3$	0.01
氯化钙 $CaCl_2$	0.1
磷酸氢二钾 K_2HPO_4	1.0
羧甲基纤维素钠 CMC-Na	2.0
琼脂 Agar	15.0
pH	7.2-7.4

用法：

称取本品 20.61g，加入 1000mL 蒸馏水中，加热煮沸，搅拌至溶解，分装，115°C 高压火菌 15 分钟。**注意：本品溶解时会有少许黑褐色沉淀，属正常现象。**

相关产品：

营养琼脂/牛肉膏蛋白胨琼脂培养基
PDA 培养基
纤维素降解菌滤纸液体培养基（赫奇逊液体培养基）
纤维素降解菌基础琼脂培养基（赫奇逊琼脂培养基）
羧甲基纤维素琼脂培养基

实验方法与步骤（供参考）：

实验名称：环境中纤维素分解菌的分离

材料和器皿：

1. 微生物样品

纤维素丰富的土壤(如林地土、稻田土等)，37℃烘干备用。

2. 培养基

营养琼脂/牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、PDA 培养基、纤维素降解菌滤纸液体培养基（赫奇逊液体培养基）、纤维素降解菌基础琼脂培养基（赫奇逊琼脂培养基）

羧甲基纤维素琼脂培养基

3. 试剂

草酸铵结晶紫染色液，乳酸苯酚液，刚果红溶液(1g/L)，NaCl 溶液(1mol/L)，三角瓶(内置玻璃珠和 49.5mL 生理水)等。

4. 仪器设备

恒温培养箱，显微镜，灭菌锅，天平等。

5. 器皿和其他材料

香柏油，镜头清洁液，煤气灯，电子点火器，擦镜纸，培养皿，圆形滤纸，镊子，载玻片，移液管(1mL 和 5mL)，助吸器，试管和不锈钢等。

方法和步骤：

1. 土壤中纤维素降解菌的计数

采用 MPN 法计数土壤中的纤维素降解菌。

(1)准备土壤稀释液

干燥土壤在无菌研体中研细成粉末，取 0.5g 干燥土壤样品，加入内置玻璃珠和 49.5mL 生理盐水的无菌三角瓶中，充分振荡，混匀，得到 10^{-2} 稀释液。取 2 支无菌试管，每管加无菌生理盐水 4.5mL。采用十倍稀释法，将土壤稀释至 10^{-4}。

(2)接种

将 10^{-2}~10^{-4} 稀释度的土壤稀释液接种在**纤维素降解菌滤纸液体培养基**试管中，每个稀释度重复接种 5 支试管，每管接种 0.5mL 稀释液，混匀，28℃培养 14d。

(3)观察和统计

检查各管中滤纸，观察滤纸上是否出现菌落、滤纸是否断裂及其变色情况，出现菌落、滤纸断裂或变色记作阳性(+)，未出现记作阴性(-)。记录各个稀释度的阳性管数。查阅 MPN 检索表，计算每克干燥土样品中纤维素降解菌的数量。

2. 纤维素降解菌的富集

(1)准备滤纸平板

将**纤维素降解菌基础琼脂培养基**融化，倒平板，每皿 15mL。冷凝后在平板表面铺一张比平板内径略小的无菌滤纸，加少量无菌水湿润滤纸，得到滤纸平板。

(2)接种和培养

在滤纸上等距放置 7 个土粒(土粒直径 1~2mm)。接种后把培养皿放在盛水的加盖托盘中，28℃培养 14d。

(3)观察

多次观察，注意土粒周围滤纸变色情况，当出现黄或棕绿色斑迹时，表明纤维素已经被降解。

3. 纤维素降解菌的纯化

(1)准备平板

融化羧甲基纤维素琼脂培养基，冷却至 50℃后倒平板，每皿 15mL，冷凝彻底，得到 CMC 平板。

(2)分离和培养

从本实验方法 1 或 2 的烂滤纸上取菌，在 CMC 平板上划线，28℃培养 3d。期间经常观察、如有霉菌快速生长，雷要及时分商。

(3)获得纯培养

挑菌落，在 CMC 平板上重复划线分离 1-2 次，得到纯培养。

(4)形志特征观察

根据 CMC 平板上的限落特征、判断获得的纤维降解菌是细菌还是真菌。如果是细菌，接种牛肉膏蛋白胨琼脂培养基平板；如果是真菌，接种 PDA 平板培养。描述菌落特征。细菌用草酸铵结晶紫染色液单染色后镜检，真菌用乳酸液制片视察、记录个体形态特征。

4. 降解纤维素活性的观察

(1)接种和培养

将获得的纤维素降解菌点接在 CMC 平板表面，每个平板接种 4 栋菌，28℃培养 3d

(2)染色

在培养皿中加入刚果红溶液(1g/L)，染色 30 min。

(3)脱色

弃去刚果红溶液，加入 NaCl 溶液(1mol/L)脱色 1h，中间更换 NaCl 溶液数次。

(4)观察

CMC 与刚果红结合，形成红色的平板。CMC 降解后形成无色或浅色透明圈，测定透明圈和菌落直径，计算两者比值。

结果记录：

1. 土壤中纤维素降解菌的计数

记录 MPN 法测定时各梯度的阳性管数，根据 MPN 检索表，计算每克干燥土壤纤维素降解菌的 MPN，注意按照接种量进行换算。

2. 记录分离到的纤维素降解菌的特征

判断分离到的纤维素降解菌是细菌还是真菌，记录菌落特征、个体形态、透明圈大小、茵落直径、透明圈和菌落直径比值。

注意事项：

1.在土粒法筛选中，铺展滤纸的平板宜湿润些，并保湿培养。

2.为了更容易分离到降解速度快的微生物，可以把快速降解的试管中的少许液体加入另外

一支液体培养基试管中培养，待滤纸降解后再进行分离。
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°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，再打开杀菌锅。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。