

产品使用说明书

Product Manual

光合细菌分离培养基（土壤、活性污泥、排污口底泥等环境）

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN261148
中文名称	光合细菌分离培养基（土壤、活性污泥、排污口底泥等环境）
英文名称	Photosynthetic Bacteria Isolation Medium (For Environments Such As Soil, Activated Sludge, And Sewage Outlet Sediment)
产品别名	光合细菌分离培养基
用途	用于土壤、活性污泥或排水口底泥中的光合细菌分离培养
配方出处	姜珊慧 李亮 方萍.2019.环境工程微生物实验指导.北京：冶金工业出版社
培养基基础成分（g/L）：	
氯化铵 NH ₄ Cl	1.0
乙酸钠 CH ₃ COONa	3.5
氯化镁 MgCl ₂	0.1
氯化钙 CaCl ₂	0.1
磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄	0.6
磷酸氢二钾 K ₂ HPO ₄	0.4
酵母膏 Yeast Extract Powder	0.1
硼酸 H ₃ BO ₃	0.0015
七水硫酸锌 ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.00006
一水氯化锰 MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0008
五水硫酸铜 CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.0001
七水硫酸钴 CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.00001
四水合钼酸铵 (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.00002
琼脂 Agar	25.0
pH	7.0~7.2
用法：	
称取本品 30.8g（精确值 30.80249g），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。	
相关产品：	

光合细菌富集培养基

光合细菌分离培养基

实验方法与步骤（供参考）：

实验名称：光合细菌的分离与纯化

实验材料：

1.仪器与设备

双入双面洁净工作台 (DL-CJ-2N)、台式高速离心机 (Anke TCL-16CB)、微电脑光照培养箱 (SPX-3001-G)、立式压力蒸汽灭菌锅 (LDZX -50KBS)、高效液相色谱仪(HPLC) (日立 (Hitachi)L-2000)、倒置显微镜 (Motie Type102M)、磁力搅拌器 (78 -1)。

2.玻璃器皿

(1)500mL 锥形瓶、1000mL 棕色容量瓶、250mL 具塞细口瓶、100mL 容量瓶、

(2)0.1mL、1mL、5mL、10mL 无菌移液管。

(3)9cm 培养皿、25mL 具塞比色管。

(4)接种环、酒精灯。

3.实验试剂

(1)焦性没食子酸、液体石蜡

(2)2-氯苯酚储备液的配制:用移液管从棕色试剂瓶中准确吸取 8mL 的纯 2-氯苯酚溶液 ($\rho=1.25\text{g/mL}$), 加入 1000mL 容量瓶中, 加入蒸馏水定容, 得到 1000mg/L 的 2-氧酚储备液, 塞紧瓶塞放入黑暗的柜中保存备用。每次使用时, 用不同量程的移液管和容量瓶稀释至所需的浓度。

3.培养基

光合细菌富集培养基、光合细菌分离培养基

3.其他

(1)生理盐水:0.85%~0.90%的 NaCl 溶液,分装于试管中,每管 9mL,分装于锥形瓶中,每瓶 90 mL, 高压灭菌后备用。

(2)无菌固体石蜡,55°C~60°C保温备用。

实验操作：

1.土壤/底泥样品采集

分别从湖水底泥(A)、河水底泥(B)、树下土壤(C)、受 2-氯苯酚长期污染的水体浅层底泥(D)采集样品。采集时, 用挖土小铲取土壤或底泥表面向下 2~10cm 处的样品, 将碎石及植物的根部去除, 装入无菌瓶中, 盖上瓶塞, 带回试验室, 放入 4°C冰箱中保存, 待用。

2.可降解 2-氯苯酚的光合细菌的分离、纯化

(1)接种

取 A、B、C、D 四种土壤/底泥样品各 0.5g 置于 25mL 无菌具塞比色管中, 添加灭菌后富集分离培养基 25mL(含 2 氯苯酚质量浓度为 25mg/L), 用玻璃棒充分搅拌均匀, 然后液面注入约 1mL

灭菌液体石蜡，盖紧瓶盖，用封口膜封口包扎以隔绝空气。

(2)富集驯化

将比色管置于光照培养箱中，在距离日光灯 15~50cm 处(保证光照度在 3000~5000lx)，温度为 $(30\pm 5)^{\circ}\text{C}$ ，厌氧条件下进行培养，随时观察，当培养液变为红色时，从中取 5mL 转接入 20mL 新鲜无菌富集培养基(含 2-氯苯酚质量浓度为 75mg/L)中，在相同培养条件下厌氧培养至红色为止。逐渐提高富集培养基中 2-氯苯酚的质量浓度，分别为 75mg/L、100mg/L、150mg/L、200mg/L、250mg/L、300mg/L、320mg/L，按照上述方法连续重复培养 7 个周期，2-氯苯酚在富集培养基中的质量浓度也提高到 320mg/L，此时得到富集、驯化后的菌体培养液。

(3)分离纯化

将光合细菌分离培养基(含 2-氯苯酚质量浓度为 100mg/L，加入质量分数为 2.5%的琼脂)，加热溶解后进行灭菌。灭菌后将无菌培养基倒入直径为 9cm 的无菌培养皿中，冷却后制得固体分离培养基平板。将富集、驯化后的菌体培养液稀释至 10^{-6} 浓度，然后取 1mL 滴到固体分离培养基平板上，用无菌三角刮刀涂布，静置 5 min。在培养皿盖内侧放入 0.1g 焦性没食子酸和 1mL 质量分数为 50%的过饱和 NaCO_3 溶液作为吸氧剂，将涂布静置后的固体分离培养基平板倒扣至盖内。用融化的固体石蜡+液体石蜡按配比 1: 1 混合后进行培养皿边缘密封。将密封后的培养皿倒置于暗处 3h 后拿出，再倒置于光照培养箱中，在光照度为 3000~5000lx，温度为 $(30\pm 5)^{\circ}\text{C}$ 条件下光照厌氧培养。随时观察，当平板上长出小型菌落，挑取单个菌落重复划线分离多次，直至镜检观察细胞形态一致此时认为获得纯菌。

(4)降解性能测定

挑取分离得到的各单菌落，接种至装有 25mL 含 2-氯苯酚质量浓度为 100mg/L 的富集培养基的比色管中，对其进行光照厌氧条件下的增殖培养。培养 7 天后，获得各菌株的增殖培养液。测定各个菌株的增殖培养液中 2-氯苯酚的质量浓度，计算 2-氯苯酚降解率 E。选择降解率 E 值高的、遗传性能稳定的增殖培养液中的菌株作为研究对象。

$$E = \frac{(\text{对照培养液中 2-氯苯酚浓度} - \text{菌株培养液中 2-氯苯酚浓度}) \times 100\%}{\text{对照培养液中 2-氯苯酚浓度}}$$

采用高效液相色谱仪(HPLC)测定 2-氯苯酚浓度。其分析条件为:C18 反相柱(4.6mmx200mm)，温 30°C ；紫外检测器检测波长 273 nm；流动相为甲醇 45%，高纯水 55%；流速 1.0mL/min；进样量 25 μL 。采用高速离心机将样品于 10000r/min 高速离心 10min，取上清液经 0.22 μm 微滤膜过滤后进行测定。以不接种菌株的相同浓度的空白培养液作为对照培养液。

其中，2-氯苯酚标准曲线的绘制:取 2-氯苯酚标准使用液($c=1000 \text{ mg/L}$)，用去离子水稀释至梯度浓度:0mg/L、1mg/L、2 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L、80 mg/L、150 mg/L。摇匀后用注射器分别取 2mL，经孔径为 0.22 μm 的针头式微滤膜过滤后注入专用 HPLC 进样瓶中，进行液相色谱仪器测定，测定其在 273nm 波长处的峰面积。每个浓度进行 3 次平行试验。以 2-氯苯酚质量浓度为横坐标，对应峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

3.光合细菌的菌种鉴定

对分离获得的光合细菌进行菌种鉴定，可从菌株的细胞形态特征、活细胞紫外吸收光谱、生理生

化特征、碳源利用情况和 16SrDNA 序列测定等方面进行测定与分析。

实验报告：

- 1.记录分离纯化红螺菌科细菌的培养基及培养条件于表中。
- 2.绘制分离纯化后得到菌株的活细胞紫外扫描光谱图。
- 3.分离纯化得到菌株的菌落特征和镜检特征记录于表中。
- 4.将分离纯化后得到菌株的菌落生理生化特征填入表中。
- 5.描述分离纯化得到的光合细菌对 2-氯苯酚的降解能力。

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。