

产品使用说明书 Product Manual

产甲烷菌分离培养基

品牌	Chinook 钦诺克	
货号	CN261035	
中文名称	产甲烷菌分离培养基	
英文名称	Methanogenic Bacteria Isolation Medium	
产品别名	产甲烷菌分离培养基	
用途	用于湿地土壤中产甲烷菌的测定	
配方出处	高冬梅 洪波 李锋民.2014.环境微生物实验.青岛: 中国海洋大学出版社	
成分 (mg/L) :		
氯化铵 NH ₄ Cl		1000.0
氯化镁 MgCl ₂		1000.0
磷酸氢二钾 K ₂ HPO ₄		400.0
磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄		400.0
胰酶解酪蛋白 Trypticase		2000.0
酵母浸粉 Yeast Extract Powder		1000.0
磷酸氢二钾 K ₂ HPO ₄		300.0
磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄		300.0
硫酸铵 (NH ₄) ₂ SO ₄		300.0
氯化钠 NaCl		600.0
硫酸镁 MgSO ₄ ·7H ₂ O		130.0
二水氯化钙 CaCl ₂ ·2H ₂ O		8.0
刃天青 Resazurin		2.0
氨基三乙酸 C ₆ H ₉ NO ₆		15.0
二水硫酸锰 MnSO ₄ ·2H ₂ O		5.0
七水硫酸镁 MgSO ₄ ·7H ₂ O		30.0
七水硫酸亚铁 FeSO ₄ ·7H ₂ O		1.0
氯化钠 NaCl		10.0
六水氯化钴 CoCl ₂ ·6H ₂ O		1.0
二水氯化钙 CaCl ₂ ·2H ₂ O		1.0

五水硫酸铜 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1
七水硫酸锌 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0
硼酸 H_3BO_3	0.1
硫酸铝钾 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$	0.1
六水氯化镍 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2
钼酸钠 Na_2MoO_4	0.1
生物素 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	0.02
叶酸 $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$	0.02
维生素 B_6 $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_5\text{P}$	0.1
维生素 B_2 $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$	0.05
维生素 B_1 $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS}$	0.05
烟酸 $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0.05
泛酸钙 $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{10}\text{N}_2\text{Ca}$	0.05
维生素 B_{12} $\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{CoN}_{14}\text{O}_{14}\text{P}$	0.001
对氨基苯甲酸 $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2$	0.05
硫辛酸 $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2\text{S}_2$	0.05
pH	6.8~7.0
用法:	
<p>称取本品 7.51g(7.505041), 加入 1000mL 蒸馏水溶解, 并盛装到一圆底烧瓶中, 加热 10 分钟 (目的是消除部分溶解氧), 然后通入氮气驱氧 10 分钟, 再加入 L-半胱氨酸盐 0.5g, 培养基颜色逐渐由紫色或粉红色变为淡黄色, 再加入 15g 琼脂。将待分装的滚管用氮气驱氧 1-2 分钟, 每管分装 4.5mL 配置好的预还原无氧培养基, 便加盖 (丁基橡胶塞) 边抽出氮气针头。(若发现培养基颜色变红, 则说明操作不合格。) 用压力夹加紧, 151°C 高压灭菌 20 分钟。</p>	
产品组成:	
本品包含培养基 250g、L-半胱氨酸盐酸盐一水物 10g。	
相关产品:	
<p>产甲烷菌分离培养基套装</p> <p>产甲烷菌分离培养基</p> <p>备注: 产甲烷菌分离培养基与产甲烷菌分离培养基套装在成分和功效上相同, 不同之处在于: 产甲烷菌分离培养基包含微量元素、维生素等成分, 配制时直接溶解即可使用, 产甲烷菌分离培养基套装则是培养基基础、微量元素、维生素等成分分别包装, 配制时需分别溶解, 按比例混合。</p>	

实验方法与步骤(供参考):

实验名称: 湿地土壤中产甲烷菌的测定

实验用品:

1. 实验器材

灭菌锅、滚管机、水浴锅、注射器、滚管、血清瓶、圆底烧瓶、混合器、天平等。

2. 培养基

产甲烷菌分离培养基套装/产甲烷菌分离培养基

3. 无氧试剂(过滤除菌)

(1)1%硫化钠和 5%碳酸氢钠混合液。

(2)2.5%乙酸钠。

(3)25%甲酸钠。

(4)50%甲醇。

(5)青霉素液。

4. 其他

(1)L-半胱氨酸盐。

(2)琼脂。

(3)高纯氮、二氧化碳和氢气钢瓶。

操作步骤:

1. 预还原无氧培养基和稀释液的制备

按配方溶解产甲烷细菌培养基各成分,微量元素液、维生素溶液暂不加入,将该溶液转移至一小口径容器中,如圆底烧瓶等,加热煮沸 10min 后(消除部分溶解氧)通入无氧氮气驱氧 10 min,再加入 L-半胱氨酸盐 0.5g,并继续通入氮气,培养基颜色逐渐由紫色或粉红色变为淡黄色,再加入 15%~20%的琼脂。(注意:L-半胱氨酸盐作为还原剂,用于消除培养基中的溶解氧。刃天青作为氧化还原指示剂, 有氧时呈现紫色或粉红色,无氧时变成无色, 呈现培养基的颜色。)将待分装的滚管用氮气驱氧 1~2min,每管分装 4.5mL 预还原无氧培养基,边加盖(丁基橡胶塞)边抽出氮气针头。(若发现培养基颜色变红,则说明操作不合格。用压力架夹紧瓶盖,121℃灭菌 20min,备用。

预还原无氧稀释液的制备方法同培养基,将生理盐水加热煮沸后通入氮气驱氧,厌氧分装于血清瓶或滚管中,丁基橡胶塞密封,灭菌

2. 样品采集

样品采集前, 将广口瓶等样品瓶充满氮气, 采集湿地上土壤样品, 立即放入样品瓶中, 并同事插入氮气针头驱氧, 盖紧瓶盖后, 将样品瓶装入充满氮气的样品袋内, 带回实验室。

3. 菌悬液的制备

将装有预还原无氧稀释液的血清瓶放在天平上, 边打开瓶塞边将氮气针头插入瓶内驱氧, 在

同样条件下打开样品瓶塞，快速取一定量的样品放入血浆瓶中，记录样品量。将血浆瓶密封，振荡，使样品均匀分散，静止片刻，取上层悬浮液接种滚管。

4. 样品接种

将灭菌后的滚管培养基溶化，冷却至 50°C 左右，水浴保温。使用前用无菌注射器分别加入 1% 硫化钠和 5% 碳酸氢钠混合液、青霉素溶液、2.5% 乙酸钠、25% 甲酸钠、50% 甲醇各 0.1 mL。将无菌注射器用氮气除氧后，吸取 0.5 mL 菌悬液，迅速注入装有 4.5 mL 预还原无氧稀释液的滚管中，立即混匀，然后换一只注射器依次进行梯度稀释，稀释程度视样品中产甲烷菌的数量而定。按照 MPN 计数法的要求，分别取 0.5 mL 适宜稀释度的菌悬液接种于装有 4.5 mL 预还原无氧培养基的滚管中，立即混匀。

5. 滚管

在滚管机水槽中加入冰块和水（试管壁浸入水中 2-3 mm 为宜，而且水位要高出冰块 3 mm），启动滚管机（60-80 r/min），使滚管匀速转动，琼脂培养基迅速均匀地凝固在滚管内壁上。然后用 H₂ : CO₂ = 5:1（体积比）的混合气体置换氮气。如果没有混合气体，可先用氢气置换氮气，再注入 6 mL CO₂（30 mL 的滚管中）。

6. 培养及观察记录

将上述滚管放置于 37°C 培养 10-15 天，观察滚管壁上的小菌落，可用解剖镜、放大镜或荧光显微镜观察。如在荧光显微镜下，产甲烷菌会发出蓝绿色荧光。记录各稀释度产甲烷菌的生长情况，查 MPN 表，计算样品中产甲烷菌的浓度。

特别注意：

因为该实验操作过程中需要高压气体钢瓶，必须严格遵守操作规程，小心使用。而且氢气属于易逸易爆气体，应放置于通风良好的房间内。

本实验方法参考自《环境微生物实验》，中国海洋大学出版社，2020 年 9 月，实验方法略有改进，供客户参考。

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°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。