

## 产品使用说明书 Product Manual

# 苯酚降解菌富集培养基

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN230444
中文名称	苯酚降解菌富集培养基
英文名称	Phenol Degrading Bacteria Enrichment Medium
产品别名	苯酚降解菌富集液体培养基、富集培养基、富集培养基 (苯酚降解菌)
用途	用于芳香环化合物降解菌的分离及其性能测定
配方出处	张小凡 袁海平.2021.环境微生物学实验.北京: 化学工业出版社
<b>成分 (g/L) :</b>	
蛋白胨 Peptone	5.0
磷酸氢二钾 $K_2HPO_4$	1.0
七水硫酸镁 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
二水氯化钙 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.126
pH	7.2~7.4
<b>用法:</b>	
称取本品 6.63g, 加入 1000mL 蒸馏水中溶解, 分装, 121°C 高压灭菌 20 分钟。视实验需要, 无菌操作增加适量的苯酚。	
<b>相关产品:</b>	
苯酚降解菌富集培养基 苯酚降解菌分离培养基 苯酚降解菌基础培养基	
<b>实验方法与步骤 (供参考) :</b>	
实验名称: 芳香环化合物降解菌的分离及其性能测定	
实验器材:	
1. 样品: 实验土样来自化工园区污水处理厂	
2. 培养基: 苯酚降解菌富集培养基、苯酚降解菌分离培养基、苯酚降解菌基础培养基。	

### 3. 试剂:

葡萄糖、牛肉膏、蛋白胨、苯酚、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 、4-氨基安替比林、 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、琼脂粉。

### 4. 器材:

恒温培养箱、恒温摇床、分光光度计、比色皿、试管、250mL 锥形瓶、100mL 容量瓶、培养皿、涂棒、量筒、天平、高压灭菌锅、酒精灯、接种环、pH 试纸、锡

#### 1. 富集培养和驯化

将采集的土样接种于装有 100mL 富集培养基和玻璃珠的锥形瓶中，加适量苯酚 (50mg/L) 30°C 振荡培养。待菌生长后，用移液枪吸取 1mL 培养液转至另一个装有 100mL 富集培养基和玻璃珠的锥形瓶中，加一定量的苯酚，30°C 振荡培养。如此连续转接 2~3 次，每次所加的苯酚量适当增加，最后可得酚降解菌占绝对优势的混合培养物。

#### 2. 平板分离和纯化

(1) 用移液枪吸取经富集培养的菌液 10mL，注入 90mL 无菌水中，充分混匀，并继续稀释到适当浓度。

(2) 取适当浓度的稀释菌液，加 1 滴于**苯酚降解菌分离培养基**(由富集培养基加入 2% 的琼脂制成，倒平板时添加适量的苯酚，浓度达到 200mg/L) 中央，用无菌玻璃涂布棒把滴加在平板上的菌液涂抹均匀，盖好皿盖，每个稀释度做 2~3 个重复。

(3) 室温放置一段时间，待接种菌悬液被培养基吸收后，倒置于 30°C 恒温培养箱中培养 2~3d。

(4) 挑选不同形态的菌落，在含适量苯酚的固体平板上划线纯化。平板倒置于 30°C 恒温培养箱中培养 2~3d。

#### 3. 转接斜面

将纯化后的单菌落转接至补加适量苯酚的试管斜面中，于 30°C 恒温培养箱中培养 2~3d。

#### 4. 降解实验

用接种环取适量斜面菌苔，接种于 100mL 基础培养基中，添加适量的苯酚，30°C 振荡培养 2~3d。

#### 5. 苯酚含量的测定

##### (1) 标准曲线的绘制

取 100mL 容量瓶 7 只，分别加入 100mg/L 苯酚标准溶液 0mL、0.5mL、1.0mL、2.0mL、3.0mL、4.0mL、5.0mL，并于每只容量瓶中分别加入  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  饱和溶液 10mL、3% 4-氨基安替比林溶液 1mL，再加入 2%  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  1mL，然后用蒸馏水稀释至刻度摇匀。放置 10min 后将溶液转至比色皿中，在 520nm 处测定吸光度，根据吸光度和苯酚的量绘制标准曲线。

##### (2) 培养液中苯酚含量的测定

取振荡培养 2~3d 的培养液 30mL，离心，取上清液 10mL 于 100mL 容量瓶中，加入  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  饱和溶液 10mL，3% 4-氨基安替比林溶液 1mL，再加入 2%  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  1mL

然后用蒸馏水稀释至刻度，摇匀。

放置 10min 后将溶液转至比色皿中，在 520nm 处测定吸光度，从标准曲线上查得苯酚的量。

#### 注意事项：

1. 苯酚对皮肤、黏膜有强烈的腐蚀作用，可抑制中枢神经或损害肝、肾功能，操作时需注意个人防护。
2.  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  毒性较高，操作时需注意个人防护。
4. 使用过的玻璃器皿要在  $121^\circ\text{C}$  高压灭菌 20 分钟后，才能洗净、烘干，供下次使用。

#### 实验报告：

将分离到的酚降解菌菌株编号，菌株形态及苯酚去除率填入下表

菌株编号	菌株形态	苯酚去除率/%

#### 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  $121^\circ\text{C}$  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℃ 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。