

## 产品使用说明书 Product Manual

# LAS 降解菌分离琼脂培养基

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN260057
中文名称	LAS 降解菌分离琼脂培养基
英文名称	LAS Degrading Bacteria Isolation Agar Medium
产品别名	LAS 降解菌分离琼脂培养基
用途	用于表面活性剂降解菌的分离
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
<b>培养基基础成分 (g/L) :</b>	
七水硫酸镁 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.14
七水硫酸亚铁 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0005
磷酸氢二钾 $K_2HPO_4$	0.33
氯化钾 KCl	0.06
氯化铵 $NH_4Cl$	3.0
直链烷基苯磺酸钠 (十二烷基苯磺酸钠) Sodium Linear Alkylbenzene Sulfonate(LAS)	0.025
琼脂 Agar	15.0
pH	7.0
<b>用法:</b>	
称取本品 18.56g (精确值 18.5555g) , 加入 1000mL 蒸馏水, 加热煮沸, 搅拌至完全溶解, 分装, 121°C 高压灭菌 20 分钟。	
<b>相关产品:</b>	
营养琼脂 (牛肉膏蛋白胨琼脂培养基)	
营养肉汤 (牛肉膏蛋白胨液体培养基)	
LAS 降解菌富集液体培养基	
LAS 降解菌分离琼脂培养基	
LAS 液体培养基	
<b>实验方法与步骤(供参考):</b>	

## 实验名称：表面活性剂降解菌的分离

### 材料和器皿：

#### 1. 微生物样品

洗涤剂厂或污水处理厂活性污泥

#### 2. 培养基

营养琼脂（牛肉膏蛋白胨琼脂培养基）

营养肉汤（牛肉膏蛋白胨液体培养基）：装于 250mL 三角瓶，每瓶 50 mL，加通气塞，包扎，灭菌。

LAS 降解菌富集液体培养基

LAS 降解菌分离琼脂培养基

LAS 液体培养基

#### 3. 试剂

CHCl<sub>3</sub>，异丙醇，生理盐水，NaOH 溶液(1mol/L)，H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液(0.5 mol/L)，草酸铵结晶紫染色液，沙黄染色液，路哥尔氏碘液，95%乙醇等。

LAS 贮备液(1g/L):

0.100g LAS 溶解于蒸馏水中，定容至 100 mL，4℃保存，可用 1 周。

LAS 标准液(10mg/L):

LAS 贮备液用蒸馏水稀释 100 倍，使用前配制。

洗涤液:

50g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 加 900mL 蒸馏水溶解，加入浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6.8 mL，定容至 1000mL。

美蓝溶液:

洗涤液 1000mL，加 30mg 美蓝，溶解后保存于棕色瓶中。

酚酞指示剂:

1g 酚酞溶解于 100 mL 50%乙醇中，过滤后备用。

#### 4. 仪器设备

分光光度计(722 型或 752 型)，恒温培养箱，显微镜，恒温振荡培养箱，离心机(配 50 mL 离心管转头)，天平等。

#### 5. 器皿和其他材料

培养皿，移液管(1mL、5mL 和 10mL)，10mL 定量移液管，助吸器，试管，分液斗(250 mL)，三角瓶(250mL 和 1000mL)，脱脂棉，煤气灯，电子点火器，不锈钢锅，容量瓶(50mL、100mL 和 1000mL)，离心管(50mL)，镜头纸等。

### 实验方法：

#### 1. 样品采集

用无菌瓶采集活性污泥样品，带回实验室备用。

#### 2. LAS 降解菌的富集

在装有 25 mL LAS 降解菌富集液体培养基(含 LAS 50mg/L)的三角瓶中加入 2mL 活性污

泥, 28°C 220r/min 培养 4-5d。为了容易分离到降解菌, 可以多次培养, 每次提高富集培养基中 LAS 含量。以低含量 LAS 富集液体培养基三角瓶中取 0.2mL 培养物, 加入高含量 LAS 富集液体培养基中继续培养。

### 3. LAS 降解菌的分离

#### (1) 准备分离平板

融化 LAS 降解菌分离琼脂培养基, 冷却至 50°C 后倒平板, 每皿 15mL。冷凝备用。

#### (2) 分离和培养

从 LAS 降解菌的富集培养物中取菌, 在分离平板上划线, 28°C 培养

(3) 获得纯培养挑取分离平板上出现的菌落, 再重复划线分离 1 次, 得到可以利用 3 ~ 5 d。LAS 作为唯一碳源的细菌纯培养, 观察、记录菌落特征。

### 4. 斜面培养和个体形态的观察

将分离到的 LAS 降解菌接种牛肉膏蛋白胨琼脂培养基斜面, 28°C 培养 20~24h, 经革兰氏染色, 镜检, 观察染色结果、个体形态和菌体的排列方式。

### 5. 扩大培养用

斜面菌种接种三角瓶中的牛肉膏蛋白胨液体培养基, 28°C 220r/min 振荡培养 24h, 5000g 离心 10min, 弃上清液, 菌体用无菌生理盐水洗涤 1 次, 再次离心, 收集菌体沉淀, 称量菌体的湿重, 用无菌生理盐水把菌体沉淀配制成 20mg/mL 的菌悬液。

### 6. LAS 的降解实验

于每瓶 LAS 液体培养基中接种 5mL 菌悬液(20 mg/mL), 混匀后取样 100 mL 置于 4°C 保存, 装有剩余菌样的三角瓶置于 28°C 220r/min 振荡培养 1d。

### 7. LAS 含量的测定

采用美蓝法测定每瓶培养前(4°C 保存)和培养后(1d)的 LAS 含量。

#### (1) 标准曲线的绘制

①取 250mL 分液漏斗 5 个, 分别加入 100mL、95 mL、90 mL、85 mL 和 80 mL 蒸馏水, 再分别移入 0、5mL、10mL、15mL 和 20mL LAS 标准液(10 mg), 摇匀。此时各瓶中 LAS 含量分别为 0、50 $\mu$ g、100  $\mu$ g、150  $\mu$ g 和 200  $\mu$ g。

②在漏斗中加几滴酚酞指示剂, 然后滴加 NaOH 溶液至溶液呈紫红色, 再滴加 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 至紫红色刚好消失。

③在漏斗中加 25 mL 美蓝溶液, 摇匀, 加入 10mL CHCl<sub>3</sub>, 剧烈振摇 30s, 注意放气。可能会发生乳化现象, 必要时可在 5 个分液漏斗中各加入等体积的异丙醇(小于 10mL)以破乳。慢慢旋转分液漏斗, 使滞留在内壁上的 CHCl<sub>3</sub> 液珠降落, 静置分层。

将下层的 CHCl<sub>3</sub> 放入预先盛有 50mL 洗涤液的第二个分液漏斗内, 用数滴 CHCl<sub>3</sub> 淋洗第一个分液漏斗的颈管。重复萃取 3 次, 每次用 10mL CHCl<sub>3</sub>。合并所有 CHCl<sub>3</sub> 萃取液至第二个分液漏斗中, 剧烈振摇 30s, 静置分层。将 CHCl<sub>3</sub> 层通过脱脂棉放入 50mL 容量瓶中, 再用 CHCl<sub>3</sub> 萃取两次(每次用量 5mL), 此 CHCl<sub>3</sub> 层也并入容量瓶中, 加 CHCl<sub>3</sub> 到标线, 摇匀。以 CHCl<sub>3</sub> 为参比, 测定各瓶在 652nm 处的吸光度(A<sub>652nm</sub>), 以吸光度减去空

白对照(LAS 含量为 0)的吸光度为纵坐标, 以 LAS 含量为横坐标, 绘制标准曲线。  
 (2)样品的测定将待测样品 5000g 离心 10min, 上清液按估计的 LAS 含量用蒸馏水适当稀释。取 100mL 稀释上清液移入分液漏斗, 其余同上。最后测定该样品经反应后  $\text{CHCl}_3$  萃取液的  $A_{652\text{nm}}$  值, 从标准曲线上查得稀释上清液中 LAS 的含量, 并计算待测样品 LAS 含量及 LAS 降解比例。

### 8. 实验后处理

将所有培养物和染菌器皿消毒或灭菌, 再清洗晾干。

#### 结果记录:

- 1.记录所分离降解菌在 LAS 分离平板上的菌落特征和斜面培养物的个体形态特征。
- 2.测定不同含量 LAS 时  $\text{CHCl}_3$  层的吸光度  $A_{652\text{nm}}$ , 并减去空白对照的吸光度进行校正。以 LAS 含量为横坐标, 以校正  $A_{652\text{nm}}$  为纵坐标绘制标准曲线。

美蓝法测定不同含量 LAS 的  $A_{652\text{nm}}$

	LAS 含量/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
$A_{652\text{nm}}$					
校正 $A_{652\text{nm}}$					

- 3.根据 LAS 降解实验前和实验后上清液测定的  $A_{652\text{nm}}$ , 查阅标准曲线, 得到对应的 LAS 含量, 根据稀释倍数, 计算样品的 LAS 含量, 并计算 LAS 降解比例。

#### 注意事项:

- 1.如条件允许, 可以用高含量 LAS 富集培养基培养数次, 一方面有利于 LAS 降解菌的富集, 另一方面降解菌经驯化后具有更高的降解 LAS 活性。
2.  $\text{CHCl}_3$  有毒, 应该在通风橱中进行 LAS 含量的测定。

#### 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.干粉培养基使用后应立即旋紧瓶盖, 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°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。