

# 产品使用说明书

## Product Manual

### 高矿物盐基础培养基 (MSM)

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN260048
中文名称	高矿物盐基础培养基 (MSM)
英文名称	High Mineral Salt Base Medium (MSM)
产品别名	高矿物盐基础培养基 (MSM)
用途	用于石油污染土壤的固定化微生物处理
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
<b>成分 (g/L) :</b>	
磷酸氢二钾 $K_2HPO_4$	1.0
磷酸二氢钾 $KH_2PO_4$	1.0
硫酸铵 $(NH_4)_2SO_4$	1.0
氯化钠 NaCl	15.0
硫酸镁 $MgSO_4$	0.2
氯化钙 $CaCl_2$	0.02
氯化铁 $FeCl_3$	0.001
<b>用法:</b>	
称取本品 18.22 g, 加入 1000mL 蒸馏水中溶解, 分装, 121°C高压灭菌 15 分钟。	
<b>实验步骤与方法 (供参考) :</b>	
<b>实验名称:</b> 石油污染土壤的固定化微生物处理	
<b>实验用品:</b>	
<b>1.实验器材</b>	
恒温培养箱、恒温振荡培养箱、灭菌锅、分光光度计、超声波、离心机、注射器、磁性搅拌器、通风装置、冰箱、土筛、分液漏斗、96 微孔板等。	
<b>2.试剂</b>	
海藻酸钠、硅藻土、 $CaCl_2$ 、正己烷、 $Na_2SO_4$ 、磷酸盐缓冲液(pH 8.0,无菌)、无菌生理盐水、无菌蒸馏水。	
<b>3.石油污染土壤</b>	
受石油污染时间较长的土壤,自然风干后破碎、除杂、混匀、过 2 mm 筛。	
<b>4.培养基</b>	

## 高矿物盐基础培养基 (MSM)

### 5.微生物

从石油污染土壤中分离、驯化的高效石油烃降解混合菌系。

#### 操作步骤:

##### 1. 菌悬液的制备

将石油烃降解菌系在添加石油的 MSM 培养基中振荡培养至指数生长期, 4500r/min 离心 5min, 弃上清液, 用无菌生理盐水洗涤菌体 3 次, 制成菌悬液(浓度约为  $10^8$  个/毫升), 利用荧光显微镜计数菌悬液的准确浓度。

##### 2. 固定化微生物的制备

配制含 4%海藻酸钠和 2%硅藻土的混合溶液, 高压灭菌后, 按 1:1 的比例与制备好的菌悬液混合均匀, 按照微生物固定化技术的相关方法制备固定化微生物。

##### 3. 石油污染土壤的固定化微生物修复

在修复系统中固定好通风装置, 将固定化微生物以  $1 \times 10^5$  个/千克的剂量接种到石油污染土壤中。同时设置不加固定化微生物的空白对照组。每个处理设置 5 个平行。然后向各个处理系统中加入营养液, 调整 C:N:P 为 100:10:1, 含水量为最大持水率的 60%。每天早晚 2 次进行通风供, 并定期补水保持土壤湿度。每 7 天取样一次, 去掉样品中的固定化小球, 测定土壤中石油烃含量和降解菌数量。

#### 样品分析测定:

##### 1. 土壤含油量的测定和降解率计算

将土样置阴凉处风干, 磨碎过 2mm 筛, 取 2g 土加入 10 mL 正己烷, 超声萃取 1h, 取上清液, 重复萃取一次, 合并上清液, 用饱和  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  溶液洗涤 2 次, 去除水分和土壤颗粒, 然后用分光光度计测定 225nm 下的吸光值。同时, 按照以上步骤制作标准曲线, 按下式计算土壤中石油烃的降解率。

$$w = \frac{C_0 - C_n - V_n}{C_0} \times 100\%$$

式中: w --土壤中石油烃降解率(%);

$C_0$  --土壤初始含油量(mg/kg);

$C_n$  --样品土壤含油量(mg/kg);

$V_n$  --空白对照组石油烃的减少量(mg/kg)。

##### 2. 土壤中石油烃降解菌数量的测定

石油烃降解菌数量测定以添加石油的 MSM 作为培养基, 采用 MPN 法进行。

#### 实验报告:

1. 计算不同处理时间土壤中石油烃的降解率, 并绘制降解率随处理时间的变化曲线。
2. 计算不同处理时间土壤样品中石油烃降解菌的数量, 并绘制石油烃降解菌随处理时间的变化曲线。

#### 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五十五度至六十度，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。