产品使用说明书
Product Manual

水体中大肠埃希菌噬菌体测定培养基

品牌	**Chinook　钦诺克**
货号	**CN261120**
中文名称	**水体中大肠埃希菌噬菌体测定培养基**
英文名称	**Escherichia Coli Phage In Water Detection Medium**
产品别名	**水体中大肠埃希菌噬菌体测定培养基套装**
用途	**用于水体中大肠埃希菌噬菌体的测定(双层琼脂法)**
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**

成分（g/L）：

胰蛋白胨 Tryptone	10.0
酵母浸出粉 Yeast Extract Powder	3.0
牛肉浸粉 Beef Extract Powder	12.0
氯化钠 NaCl	3.0
碳酸钠 Na_2CO_3	0.75
氯化镁 $MgCl_2$	0.6
氯化钙 $CaCl_2$	0.88
pH	7.2

用法：

1.配置液体培养基：
称取本品 30.23 g，加入 1000mL 蒸馏水中溶解，分装，121℃灭菌 15 分钟。
2.配置底层琼脂培养基：
称取本品 30.23 g，另称取琼脂 16.0g，加入 1000mL 蒸馏水，加热煮沸，搅拌至完全溶解，分装，121℃灭菌 15 分钟。
3.配置上层半固体培养基
称取本品 30.23 g，另称取琼脂 6.0g，加入 1000mL 蒸馏水，加热煮沸，搅拌至完全溶解，分装试管，每管 4mL，121℃灭菌 15 分钟。

产品组成：

本品含独立包装的培养基 250g、琼脂 200g。

实验方法与步骤（供参考）：

材料和器皿：

1. 菌种和样品

大肠埃希氏菌(Escherichiacoli)WG5 菌株，地表水。

2. 培养基

液体培养基

底层琼脂培养基：液体培养基中加琼脂 16g，121℃灭菌 15min。

上层半固体培养基：液体培养基中加琼脂 6g，加热使琼脂融化后分装于试管中，每管 4 mL，121℃灭菌 15 min。

3. 试剂

NaOH 溶液(1mol/L)，HCl 溶液(1mol/L)

4. 仪器设备

离心机，恒温水浴锅，灭菌锅，恒温振荡培养箱，恒温培养箱等

5. 器皿和其他材料

离心管，培养皿，移液管(1mL 和 5mL)，助吸器，试管，煤气灯，电子点火器，不锈钢锅，三角瓶，一次性水相针头式滤器(孔径 0.45μm)等。

实验方法：

1. 培养宿主菌

在装有 2mL 液体培养基的试管中接种大肠埃希氏菌 WG5 菌株，37℃ 220r/min 培养过夜。取 250μL 培养物接种于装有 25mL 液体培养基的三角瓶中，继续培养 3h，得到对数期宿主菌。

2. 倒底层平板

倒底层琼脂培养基平板 10 块，凝固彻底，分别标记为 10^{-1}、10^{-2}和 10^{-3}各 3 块，空白 1 块。

3. 融化半固体培养基

融化试管中的上层半固体培养基，置于 50℃水浴中保温备用。

4. 样品的除菌

取待测的地表水样品 20mL，4℃ 3000g 离心 15min。上清液调 pH 至 7.2，用一次性水相针头式滤器过滤除菌。用无菌试管收集滤液，得到样品原液，备用。

5. 样品的稀释

取 3 支无菌试管，分别标记为 10^{-1}、10^{-2}和 10^{-3}，各加入 45mL 液体培养基。取 0.5mL 样品原液，加入 10^{-1}试管，混匀得到 10^{-1}样品稀释液。然后从 10^{-1}试管取 0.5mL 稀释液加入 10^{-2}试管中，混匀得到 10^{-2}样品稀释液，同样稀释至 10^{-3}。稀释液置于 37℃恒温水浴锅中保温。

6. 吸附和侵入

取 1 支上层半固体培养基试管，马上加入对数期宿主菌 0.2mL 和 10^{-3}样品稀释液 10mL，迅速轻搓试管，混匀后立即倒在一块标记为 10^{-3}的底层平板上，马上轻轻播动，半固体培养基铺满底层平板，平置台面待凝固，重复 3 皿。同样测定其他稀释度样品，记为空白的底层平板加对数期宿主菌 0.2mL 和液体培养基 1mL。

7. 培养和计数

待上层半固体培养基彻底凝固后，37℃倒置培养 16~18h，观察并计数形成的菌。

8. 消毒和清洗

将平板和染菌试管放入沸水中煮 20min 消毒，器皿清洗、晾干。

结果记录：

1.观察双层平板上噬菌斑的形态特征，拍照记录。

2.计算样品中噬菌体的效价。

将各平板上的噬菌斑数记录于表。根据菌斑数的平均值为 20~200 的稀释度计算噬菌体样品的效价。

水样中大肠埃希氏菌 WG5 菌株噬菌体效价的测定结果

稀释度（d）	10^{-1}			10^{-2}			10^{-3}			空白对照
嗜菌斑数										
平均值（C）										

若只有 1 组平板的噬菌斑数为 20~200，按如下公式计算:

$$N = C/d$$

式中，N--样品的噬菌体效价(PFU/mL);

C--噬菌斑平均值;

d--相应的稀释度。

若有 2 组平板的噬菌斑数为 20~200，按如下公式计算:

$$N=\frac{C1+C2}{1.1xd1}$$

式中，N--样品的噬菌体效价(PFU/mL);

C_1—较浓样品中噬菌斑平均值;

C_2—较稀样品中噬菌斑平均值;

d_1--较浓样品对应的稀释度。

注意事项:

1.本实验操作步骤较多，操作前应熟悉操作流程。

2.本实验中注意无菌操作，特别是防止过滤除菌时发生污染。如果时间允许，最好把过滤的样品原液加入多种培养基中，过夜培养来进行无菌检测。

3.要避免上层平板中产生颗粒或气泡，或上层没有铺满平板，以免干扰观察和计数。因此，上层半固体培养基应置于 50℃水浴中保温，同时菌悬液、样品稀释液和底层平板在使用前最好都放在 37℃保温。宿主菌和噬菌体加入上层半固体培养基试管后，应迅速混，马上倒在底层平板上，铺满后水平放置，凝固彻底后再放入恒温培养箱中进行培养。

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°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，再打开杀菌锅。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。