

产品使用说明书 Product Manual

发光细菌毒性实验液体培养基

品牌	Chinook 钦诺克		
货号	CN261138		
中文名称	发光细菌毒性实验液体培养基		
英文名称	Luminescent BacteriaToxicity Determination Broth Medium		
产品别名	发光细菌毒性测定液体培养基、液体培养基		
用途	用于发光细菌的毒性实验		
配方出处	肖亦农 刘灵芝 王新 等.2018.环境微生物学实验基础.北京：中国建材工业出版社		
培养基基础成分（g/L）：			
酵母浸粉 Yeast Extract Powder	5.0		
胰蛋白胨 Tryptone	5.0		
氯化钠 NaCl	30.0		
磷酸二氢钠 NaH ₂ PO ₄	5.0		
磷酸氢二钾 K ₂ HPO ₄	1.0		
pH	7.0±0.5		
甘油添加成分（g/L）：			
甘油 Glycerol	3.0		
用法：			
称取培养基基础 46.0g，另称取甘油 3.0g（约 3mL），加入 1000mL 蒸馏水中溶解，分装，115℃ 高压灭菌 20 分钟。			
产品组成：			
本品包含独立包装的培养基基础 250g、甘油 20mL。			
相关产品：			
发光细菌毒性实验液体培养基 发光细菌毒性实验固体培养基			
实验方法与步骤(供参考)：			
实验名称：发光细菌的毒性实验			

实验器材:

1. 培养基

发光细菌毒性实验液体培养基

发光细菌毒性实验固体培养基

2. 溶液或试剂

(1)2%(3%)的 NaCl 溶液:

称取 2.0(3.0)g NaCl 于 100mL 蒸馏水中, 置于 2-5℃冰箱备用。

(2)2000mg/L 的 HgCl_2 母液:

称取无结晶水 HgCl_2 0.1000g 于 50mL 容量瓶中, 用 3%NaCl 溶液稀释至刻度, 置于 2-5℃冰箱备用, 保存期为 6 个月。

(3)2.0mg/L 的 HgCl_2 工作液:

吸取 HgCl_2 母液 10mL 于 1000mL 容量瓶中, 用 3%NaCl 溶液定容。再吸取 20mg/L HgCl_2 溶液 25mL 于 250mL 容量瓶, 用 3%NaCl 液定容将此液倒入配有半微量滴定管的试液瓶, 用 3%NaCl 溶液将 HgCl_2 液稀释成系列浓(0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16、0.18、0.20、0.22、0.24mg/L)。配制的稀释液保存期不超过 24h。

3. 仪器或其他用具

生物发光光度计、测试管(2mL 或 5mL)、微量移液器、半微量滴定管等。

4. 菌种

明亮发光杆菌 T3 小种(*Photobacterium phosphoreum* T3 spp.)。

实验方法:

1.菌悬液制备:

可选用下列一种方法制备菌悬液。

发光细菌新鲜菌悬液的制备:

(1)斜面菌种培养:

测定前 48h, 取保存菌种接种于新鲜斜面上, (20 ± 0.5)℃培养 24h 后, 再转接于新鲜斜面上, (20 ± 0.5)℃培养 24h 后, 再转接于新鲜斜面上, (20 ± 0.5)℃培养 12h 备用。每次接种量不超过一环。

(2)液体培养:

取上述斜面培养物接种于 50mL 液体培养基内, (20 ± 0.5)℃、184r/min 振荡培养 12~14h。

(3)菌悬液制备:

将上述培养液稀释至每毫升 $10^8 \sim 10^9$ 个细胞。

(4)菌悬液初始发光强度测定:

取 4.9mL 的 3%NaCl 溶液于比色管中, 加入 10μL 新鲜菌悬液, 混匀, 置于生物毒性测定仪上测量发光度。要求发光度不低于 800mV, 置于冰浴备用。

菌悬液复苏:

(1)取发光细菌冻干粉, 置于冰浴中, 加入预冷的 2%NaCl 溶液 0.5mL, 充分摇匀复苏 2min, 使其具有微弱绿光。

(2)菌悬液初始发光强度测定:方法同上。

2. 生物毒性测定:

- (1)水样处理:按 3%比例加入 NaCl。如水样浊度大,需静置后取上清液。
- (2)实验浓度选择:按等对数间距或百分浓度取 3~5 个实验浓度,编号并注明采样点。
- (3)按下将具塞试管排列,注明标记。每个测定试样均配一支试管对照(CK),设 3 次重复。

后排	CK	CK	CK	CK		CK	CK	CK	CK	CK		CK
前 3 排	0.02	0.04	0.06	0.08		0.24	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4		样品 N
前 2 排	0.02	0.04	0.06	0.08		0.24	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4		样品 N
前 1 排	0.02	0.04	0.06	0.08		0.24	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4		样品 N
参比毒物组							样品组					

- (4)在每支 CK 管中加入 2mL 或 5mL 的 3%NaCl 溶液。
- (5)在参比毒物组每支试管(前 1 排~前 3 排)加入 2mL 或 5mL 相应浓度的 HgCl₂ 溶液。
- (6)在样品组每支试管(前 1 排~前 3 排)加入 2mL 或 5mL 的待测样品。
- (7)在各试管中加入菌液并测定发光强度。按照参比毒物管(前)-CK(后)→样品管(前)→CK(后)顺序依次将 10μL 菌液加入到各支试管,盖上试管塞混匀。作用 5min 或 15min,依次测定发光强度。
- (8)计算相对发光率和相对抑光率,公式如下:

$$\text{相对发光率 (\%)} = \frac{\text{HgCl}_2 \text{ 管或样品管发光度}}{\text{对照管发光度}} \times 100\%$$

$$\text{相对抑光率 (\%)} = \frac{\text{对照管发光度} - \text{HgCl}_2 \text{ 管或样品管发光度}}{\text{对照管发光度}} \times 100\%$$

结果记录:

将实验结果记录于下表中:

样品号	加菌液时间	测定时间	发光度/mV	相对发光率/%	平均相对发光率/%	相对抑光率/%

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℃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℃ 十五分钟

②对于大份：121℃ 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℃/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。