

# 产品使用说明书

## Product Manual

### 滤纸培养基

品牌	Chinook 钦诺克	
货号	CN261133	
中文名称	滤纸培养基	
英文名称	Filter Paper Medium	
产品别名	滤纸液体培养基、滤纸培养基（环境微生物）	
用途	用于供试细菌分解纤维素能力的测定（纤维素降解菌的筛选及纤维素降解实验）	
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>		
硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		1.0
磷酸二氢钾 $\text{KH}_2\text{PO}_4$		1.0
氯化钙 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		0.1
七水硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.5
氯化钠 $\text{NaCl}$		0.1
酵母膏 Yeast Extract Powder		0.1
<b>用法：</b>		
称取本品 2.8g，加入 1000mL 蒸馏水中溶解，分装，121°C 高压灭菌 20 分钟。每 50mL 培养基放入 2.6cm×6.2cm 的滤纸条。		
<b>相关产品：</b>		
羧甲基纤维素钠(CMC)固体培养基 羧甲基纤维素钠(CMC)液体培养基 滤纸培养基 营养琼脂 (NA) 营养肉汤 (NB)		
<b>备注：</b>		
实验名称：纤维素降解菌的筛选及纤维素降解实验		
实验器材：		
1. 样品：土壤。		

## 2. 培养基:

甲基纤维素钠(CMC)固体培养基(羧甲基纤维素钠(CMC-Na)平板培养基)、赫奇逊(Hutchinson)液体培养基(滤纸培养基)、营养琼脂(NA)(牛肉膏蛋白胨(NA)培养基)、营养肉汤(NB)。

## 3. 仪器及其他用品:

酒精灯、载玻片、盖玻片、显微镜、滴管、试管、培养皿、锥形瓶、枪头、涂布器、移液枪等。

## 实验方法:

### 1. 具有降解纤维素能力的细菌的分离

称取土样 10g 加入 90ml 无菌水, 振荡 10~15min, 使土壤颗粒均匀分散成为悬液, 静置数分钟, 吸取 1mL 土壤悬液到 9mL 稀释液中, 依次按 10 倍稀释, 稀释到 10, 制成一系列稀释液。

取 1mL 土壤悬液接种于**羧甲基纤维素钠平板培养基**上, 用玻璃刮刀将其均涂抹于培养基表面, 每个稀释度设 3 个重复, 置于 28~30°C 恒温培养箱中培养。待菌落长成后, 按菌落特征归类 and 编号, 然后将菌落特征不同的细菌转入**营养琼脂 (NA)** 斜面培养基培养, 纯化后保存备用。

### 2. 供试细菌分解纤维素能力的测定

#### (1) 对 CMC-Na 分解能力的测定:

取分离的细菌菌落接种到 **CMC-Na 平板培养基**上、于 25°C 避光培养 7d, 用刚果红染色, 记录各菌株的透明大小。

#### (2) 对滤纸分解能力的测定:

将分离得到的具有纤维素分解能力的菌株, 接入**营养肉汤(NB)**中, 20°C 摇床培养 5d 后制成菌悬液。于盛有 50mL **滤纸培养基**的 150mL 锥形瓶中放入 2.6cmX6.2cm 的滤纸条, 接入 1mL 菌悬液, 100r/min 恒温振荡培养 8d, 以滤纸条的断裂程度评价降解效果。

## 注意事项:

1. 土壤中的纤维素降解菌分为好氧菌与厌氧菌, 因此在筛选过程中可根据需求, 设定厌氧或好氧条件进行筛选。
2. 用玻璃涂棒涂抹时, 由中间向四周涂布, 要使微生物分布均匀。
3. 每次用完玻璃涂棒都要用酒精灯灭菌。
4. 从培养皿中挑取菌落时一定要选取单个菌落。

## 实验报告:

### 1. 纤维素分解菌株的 CMC-Na 分解能力测定(下表):

菌株编号	菌落直径/mm	水解圈直径/cm	水解圈直径/菌落直径


2. 培养 8d 后菌株对滤纸的崩解效果照片。

**储存方式:**

贮存于避光、干燥处，用后立即旋紧瓶盖；保质期三年。

**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°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。