

产品使用说明书 Product Manual

耐酚细菌琼脂培养基

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN260059
中文名称	耐酚细菌琼脂培养基
英文名称	Phenol Resistant Bacteria Agar Medium
产品别名	耐酚细菌琼脂培养基
用途	用于梯度平板法分离纯化含酚废水中的苯酚耐受细菌（含酚废水中苯酚降解细菌的分离和筛选实验）
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) :	
牛肉浸粉 Beef Extract Powder	5.0
蛋白胨 Peptone	10.0
氯化钠 NaCl	5.0
琼脂 Agar	16.0
pH	7.2
用法:	
称取本品 36.0g, 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。倒平板或分装斜面前, 在融化并冷却至 50°C 的培养基中加入所需的苯酚, 斜面按照 500mg/L 加入苯酚。	
相关产品:	
耐酚细菌琼脂培养基 耐酚细菌液体培养基 苯酚无机液体培养基 碳源对照液体培养基 A 苯酚液体培养基 B	
实验方法与步骤 (供参考) :	
实验名称: 含酚废水中苯酚降解菌的分离和筛选 材料和器皿: 1. 微生物样品	

含酚工业废水和含酚废水曝气池中的活性污泥。

2. 培养基

耐酚细菌琼脂培养基、耐酚细菌液体培养基、苯酚无机液体培养基、碳源对照液体培养基 A、苯酚液体培养基 B

3. 试剂

生理盐水，草酸铵结晶紫染色液，沙黄染色液，路哥尔氏液，95%乙醇。

(1) 酚标准使用液的制备

酚标准贮备液的配制:

先精确称取精制酚 1.00g，溶于无酚蒸馏水中，然后稀释定容至 1000mL，并贮存于棕色瓶中，置冷暗处保存。此液 1mL 相当于 1mg 酚的标准酚液。由于保存过程中酚的含量易改变，因而可采用下述方法标定其含量。

吸取 20mL 上述标准酚贮备液于 250mL 碘量瓶中，加无酚蒸馏水稀释至 100mL，加 20mL 0.1mol/L 溴酸钾-溴化钾溶液及 7mL 浓盐酸，混合均匀。10min 后加入 1g 碘化钾晶体，放置 5min 后、用 0.10mol/L 硫代硫酸钠液滴定至浅黄色，加入 10g/L 淀粉溶液 1mL，滴定至溶液蓝色消失为止。同时做空白试验(即用无酚蒸馏水取代酚标准贮备液，其他相同)，分别记录用量。

$$\text{贮备液酚含量(mg/mL)} = \frac{(V_1 - V_2) \times c}{V} \times \frac{94.11}{6}$$

式中，

V_1 和 V_2 ——滴定空白和酚标准贮备液时所用的 0.10mol/L Na_2SO_3 溶液的体积(mL)；

94.11——滴苯酚的摩尔质量；

6——1 mol 苯酚消耗的 Br_2 减少 6mol Na_2SO_3 消耗；

C—— Na_2SO_3 标准液的浓度；

V——标准酚贮备液的体积(mL)。

酚标准使用液的配制:

吸取上述酚标准贮备液 10.0ml，用无酚蒸馏水稀释定容至 1000mL，即得 1mL=0.01mg 酚，此液临用时配制。

无酚蒸馏水的配制:

取普通蒸馏水 1L，加入 10~20mg 的粉末状活性炭，充分摇后用定性滤纸过滤即得。

(2)4-氨基安替比林溶液(20g/L)

称取 2g 4-氨基安替比林溶于蒸馏水中，用蒸馏水定容至 100mL，贮存于棕色瓶中，此液宜临用时配制(若需保存，则不能超过 1 周)。

(3)氨性氯化铵缓冲液(200g/L)

称取 20g NH_4Cl ，溶于浓氨水(NH_4OH)中，用浓氨水定容于 100mL，此液 pH9.8，贮存在具橡皮塞的瓶中，在冰箱内保存备用。

(4) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液(80g/L)

称取 8g $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ，溶于蒸馏水并定容至 100mL，贮存于棕色瓶中，此液最好临用时配制(配制液仅能保存 1 周)。

(5)0.10mol/L KBrO_3 - KBr 溶液

称取 2.784g 干燥的 KBrO_3 及 10g KBr ，溶于蒸馏水并定容至 1000 mL。

(6) 0.10 mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液

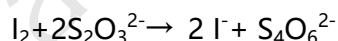
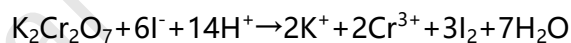
配制:

精确称取 24.8g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ，溶于煮沸并冷却的蒸馏水中，并定容至 1000 mL。贮于棕色瓶中，用 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 标定。

标定:

称取已在 105°C 干燥过的 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0.10~0.15g 3 份(每份质量应消耗 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20~30 mL)，分别置于 250mL 碘量瓶中，加入 20~30mL 蒸馏水使其溶解。然后在上述瓶中加入 1g 固体碘化钾和 2mol/L HCl 溶液 15mL，加塞，充分混匀后，将此瓶置于暗处 5 min，最后加入 100mL 蒸馏水。用 0.10mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液滴定，当溶液由棕色变为浅黄绿色后，加入 2mL 10g/L 淀粉溶液，续滴定至溶液刚刚转变为亮绿色为止。记录 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液用量，并重复滴定第 2、3 份溶液。

滴定的反应:



$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的浓度按以下公式计算:

$$c = \frac{m \times 6 \times 1000}{M \times V}$$

式中,

C—— $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的浓度(mol/L);

m—— $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 的质量(g);

M—— $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 的摩尔质量(g/mol);

6——1 mol $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 消耗 6 mol $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;

V——滴定时所用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的体积(mL)。

x1000——转换为 mol/L。

(7) 10g/L 淀粉溶液

称取可溶性淀粉 1g，先用蒸馏水调成糊状，后将此液倾入煮沸的蒸馏水中，并定容至 100mL。

4. 仪器设备

分光光度计，灭菌锅，显微镜，恒温培养箱，恒温振荡培养箱，离心机。

5. 器皿和其他材料

培养皿，移液管，助吸器，试管，煤气灯，电子点火器，采样瓶(500mL)，涂布棒容量瓶，三角瓶，通气塞，试剂瓶，酸式滴定管和离心管等。

实验方法:

1. 采样

从焦化厂或钢铁公司化工厂处理含酚废水的曝气池中取活性污泥和含酚废水，装于无菌采样瓶中，迅速带回实验室进行菌种分离。记录采样日期、地点、曝气池的水质分析(如挥发酚、溴化物、 BOD_5 、 COD_{Cr} 、焦油、硫化物、氰化物、总氮、氨态氮、磷、pH、水温等)。

2. 梯度平板法分离纯化含酚废水中的苯酚耐受细菌

苯酚是一种杀菌剂，一般微生物不能在含有苯酚的培养基上生长。苯酚耐受细菌具有抗一定剂量苯酚的能

力,因而它们可在一定剂量苯酚的平板上生长繁殖并形成菌落。所以可采用梯度平板法进行耐酚菌株的筛选。

(1)梯度平板的制备

将 12mL 不含苯酚的无菌耐酚细菌琼脂培养基倾于一直径 9cm 的培养皿中,立即将此培养皿斜放,使皿中的培养基成斜面,且刚好完全盖住培养皿底部待凝固后将此培养皿平放,再加入 12mL 无菌的含苯酚(苯酚终含量为 75mg/100mL)耐酚细菌琼脂培养基,使培养基完全盖住下层斜面。注意在皿底作一个“↑”符号标记,以示苯酚含量由低到高的方向。(注:由于苯酚的扩散作用,上层培养基薄的部分苯酚含量较低,造成上层培养基由厚到薄苯酚含量递减的梯度)。

(2)涂布法分离

①样品液稀释 将采集的含酚废水样品作十倍系列稀释(至 10^{-3})。

②样品液涂布平板 用无菌 1mL 移液管分别吸取上述 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 稀释液和原液 4 种样品液各 0.2mL,依次滴加于上述相应编号的梯度平板上,并用无菌涂布棒将样品液自平板中央均匀向四周涂布,每种梯度液作 2 个重复。

③培养

将上述涂布了样品液的平板倒置于 30°C 恒温培养箱中培养 2d。

④涂布法分离结果观察

从 30°C 恒温培养箱中取出分离平板,肉眼观察平板上耐酚细菌生长情况。一般地,平板上生长的菌落也形成密度梯度,即上层培养基薄的部分(即苯酚低含量区)形成菌苔较多,反之则出现较少的菌落。

⑤耐酚细菌纯化

用无菌接种环挑取苯酚高含量区菌落,在含苯酚的耐酚细菌琼脂培养基平板(50mg/100mL)上划线纯化,培养后挑取菌落接种到耐酚细菌琼脂培养基斜面上 30°C 培养 3d。

3. 耐酚细菌的增殖及分离纯化

(1)活性污泥中耐酚细菌的增殖

将采集的 1-2g 含酚废水曝气池中的活性污泥加入含 30mL 苯酚无机液体培养基的三角瓶中(终含量苯酚 25mg/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3g/L, KH_2PO_4 3g/L), 30°C 振荡培养 6~10d(220 r/min),以增殖苯酚降解细菌,淘汰对苯酚敏感的微生物,后分别添加 3 次苯酚无机液体培养基:第 1 次使苯酚终含量增加至 100mg/L, 30°C 振荡培养 4~6d;第 2 次使苯酚终含量增加至 200 mg/L;最后再添加苯酚无机液体培养基使苯酚终含量增加至 250 mg/L, 30°C 振荡培养 4d 后,从中选出对苯酚耐受力强的苯酚降解细菌。

(2)活性污泥中耐酚细菌的分离纯化同含酚废水。

4. 性能测定

(1)初筛

①不同含量苯酚 B 平板制备

按常规方法制备,苯酚终含量分别为 25mg/100mL、45mg/100mL、60 mg/100mL 和 75 mg/100mL。

②接种、培养和结果观察

将分离纯化的苯酚耐受力强的菌株分别划线接种于上述制备的平板上,经 30°C 培养 3~4d,观察各菌种的生长情况。含量较高的平板上长出的细菌菌落,初步可认为是苯酚降解能力强的菌株。

(2)复筛

①菌种培养及菌悬液制备

用无菌接种环挑取一环经初筛获得的菌种菌苔转接于含 30m1 不含苯酚的耐酚细菌液体培养基的三角瓶中, 30°C 220 rmin 振荡培养 20~24h 后将液体培养物 4000g 离心 5min, 弃去上清液, 用无菌生理盐水离心洗涤 1 次(400085 min), 再弃去上清液(并将此离心管倒置于一无菌滤纸上 5min), 然后称取该菌的湿菌体量, 最后用无菌生理盐水制备一定浓度的菌悬液。

②接种及生长曲线测定

将上述菌悬液分别接种入含 30mL 碳源对照液体培养基 A 和苯酚液体培养基 B 的三角瓶中(接种量为每 100mL 液体培养基接种 50mg 湿菌体), 30°C振荡(220 r/min)培养 48 h。期间分别于发酵的 0、12 h、24 h、36 h、48h 取样, 测定 A_{600nm} , 并绘制在上述不同液体培养基中的生长曲线。在 25mg/100mL 苯酚液体培养基中生长速度下降不明显者为耐酚菌株。

③苯酚降解率的测定

以高浓度苯酚液体培养基中生长速度下降不明显者为出发菌株按上述接种量接入含苯酚液体培养基 B 的三角瓶中, 振荡培养 48h, 并分别于 0 和 48h(发酵终止时)测定发酵液苯酚含量, 计算苯酚降解率。

$$\text{未接种前发酵液苯酚含量} = \frac{\text{未接种前发酵液苯酚含量} - \text{发酵终止时发酵液苯酚含量}}{\text{未接种前发酵液苯酚含量}} \times 100\%$$

发酵液中苯酚具有在氨性氯化铵缓冲液中游离出来的特点, 当游离出的苯酚与 4-氨基安替比林混合时, 两者可发生缩合反应, 在氧化剂 $K_3[Fe(CN)_6]$ 作用下, 酚被氧化成醌, 并与 4-氨基安替比林偶合而显色。将适量发酵液(含酚量 > 10 μ g)加入到 50mL 容量瓶中, 同时分别吸取酚标准使用液(0.01mg/mL)和 0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL 和 5.0 mL 各于 50 mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至 50mL, 然后向标准酚溶液和发酵的稀释液中依次各加入 0.25mL 氨性氯化铵缓冲液(200g/L)、0.5mL 4-氨基安替比林溶液(20g/L)和 0.5 mL $K_3[Fe(CN)_6]$ (80g/L)溶液, 每次加入试剂后需混匀, 放置 15 min 后在 510nm 处测定吸光度。以苯酚标准液的体积为横坐标, 以 A_{510nm} 为纵坐标, 绘制苯酚标准曲线, 查出测定的发酵液吸光度对应的标准酚溶液体积(mL), 进而计算该发酵液的苯酚含量。

$$\text{苯酚含量(mg/L)} = \frac{V_1}{V} \times 1000$$

式中, V_1 --标准酚溶液的体积[mL, 数值等于标准酚溶液中的酚含量(mg)];

V --发酵液的体积(L)。

5.苯酚降解细菌个体形态和菌落特征的观察

将上述分离到的数株苯酚降解细菌划线接种于不含苯酚的耐酚细菌琼脂培养基平板上,于 30°C培养 1d, 用显微镜观察各菌株的个体形态、革兰氏染色反应结果;3d 后用肉眼观察各菌株菌落的特征(包括形状、大小、颜色、隆起情况、表面状况、质地、透明度、光泽、边缘及是否产生水溶性色素等特征)。

结果记录:

1.将分离到的各苯酚降解细菌菌株在不同苯酚含量平板上生长情况及苯酚降解率测定结果记录于表格。

苯酚降解细菌在不同本分含量平板上的生长情况及苯酚降解率测定结果

菌源	菌株号	不同苯酚含量平板上的生长情况/ (mg · 100mL ⁻¹)				苯酚降解率			
		25	45	60	75	<70%	71%-80%	81%-90%	91%-100%

2. 根据复筛耐酚试验结果绘制对照组与试验组菌株的生长曲线。
3. 将不含苯酚的耐酚细菌琼脂培养基平板上苯酚降解细菌的菌落特征、个体形态特征及苯酚降解能力等特征记录在表格中。

苯酚降解细菌的形态与苯酚降解能力的特征

菌株号	菌落特征	个体形态特征	苯酚降解能力

注意事项:

在测定各样品中苯酚含量时, 应注意不能颠倒加试剂的顺序, 否则将导致实验失败。

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°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℃ 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。