

# 产品使用说明书

## Product Manual

### 纤维素降解菌基础琼脂培养基（赫奇逊琼脂培养基）

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN261104
中文名称	纤维素降解菌基础琼脂培养基（赫奇逊琼脂培养基）
英文名称	Cellulose Degrading Bacteria Agar(Hutchison Agar)
产品别名	纤维素降解菌滤纸琼脂培养基、赫奇逊琼脂培养基
用途	用于土壤中纤维素降解菌的富集培养（环境中纤维素降解菌的分离实验）
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
<b>成分（g/L）：</b>	
硫酸铵(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0
七水硫酸镁 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
三氯化铁 FeCl <sub>3</sub>	0.01
氯化钙 CaCl <sub>2</sub>	0.1
磷酸氢二钾 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
琼脂 Agar	15.0
pH	7.2-7.4
<b>用法：</b>	
称取本品 18.61g，加入 1000mL 蒸馏水，加热煮沸，搅拌至溶解，分装，无需加碳源，121℃ 高压灭菌 20 分钟。	
<b>相关产品：</b>	
营养琼脂/牛肉膏蛋白胨琼脂培养基 PDA 培养基 纤维素降解菌滤纸液体培养基（赫奇逊液体培养基） 纤维素降解菌基础琼脂培养基（赫奇逊琼脂培养基） 羧甲基纤维素琼脂培养基	
<b>实验方法与步骤（供参考）：</b>	
实验名称：环境中纤维素分解菌的分离 材料和器皿： 1. 微生物样品	

纤维素丰富的土壤(如林地土、稻田土等), 37°C烘干备用。

## 2. 培养基

营养琼脂/牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、PDA 培养基、纤维素降解菌滤纸液体培养基(赫奇逊液体培养基)、纤维素降解菌基础琼脂培养基(赫奇逊琼脂培养基)

羧甲基纤维素琼脂培养基

## 3. 试剂

草酸铵结晶紫染色液, 乳酸苯酚液, 刚果红溶液(1g/L), NaCl 溶液(1mol/L), 三角瓶(内置玻璃珠和 49.5mL 生理水)等。

## 4. 仪器设备

恒温培养箱, 显微镜, 灭菌锅, 天平等。

## 5. 器皿和其他材料

香柏油, 镜头清洁液, 煤气灯, 电子点火器, 擦镜纸, 培养皿, 圆形滤纸, 镊子, 载玻片, 移液管(1mL 和 5mL), 助吸器, 试管和不锈钢等。

## 方法和步骤:

### 1. 土壤中纤维素降解菌的计数

采用 MPN 法计数土壤中的纤维素降解菌。

#### (1)准备土壤稀释液

干燥土壤在无菌研钵中研细成粉末, 取 0.5g 干燥土壤样品, 加入内置玻璃珠和 49.5mL 生理盐水的无菌三角瓶中, 充分振荡, 混匀, 得到  $10^{-2}$  稀释液。取 2 支无菌试管, 每管加无菌生理盐水 4.5mL。采用十倍稀释法, 将土壤稀释至  $10^{-4}$ 。

#### (2)接种

将  $10^{-2}$ ~ $10^{-4}$  稀释度的土壤稀释液接种在**纤维素降解菌滤纸液体培养基**试管中, 每个稀释度重复接种 5 支试管, 每管接种 0.5mL 稀释液, 混匀, 28°C培养 14d。

#### (3)观察和统计

检查各管中滤纸, 观察滤纸上是否出现菌落、滤纸是否断裂及其变色情况, 出现菌落、滤纸断裂或变色记作阳性(+), 未出现记作阴性(-)。记录各个稀释度的阳性管数。查阅 MPN 检索表, 计算每克干燥土样品中纤维素降解菌的数量。

### 2. 纤维素降解菌的富集

#### (1)准备滤纸平板

将**纤维素降解菌基础琼脂培养基**融化, 倒平板, 每皿 15mL。冷凝后在平板表面铺一张比平板内径略小的无菌滤纸, 加少量无菌水湿润滤纸, 得到滤纸平板。

#### (2)接种和培养

在滤纸上等距放置 7 个土粒(土粒直径 1~2mm)。接种后把培养皿放在盛水的加盖托盘中, 28°C培养 14d。

#### (3)观察

多次观察, 注意土粒周围滤纸变色情况, 当出现黄或棕绿色斑迹时, 表明纤维素已经被

降解。

### 3. 纤维素降解菌的纯化

#### (1) 准备平板

融化羧甲基纤维素琼脂培养基, 冷却至 50°C 后倒平板, 每皿 15mL, 冷凝彻底, 得到 CMC 平板。

#### (2) 分离和培养

从本实验方法 1 或 2 的烂滤纸上取菌, 在 CMC 平板上划线, 28°C 培养 3d。期间经常观察、如有霉菌快速生长, 需要及时分商。

#### (3) 获得纯培养

挑菌落, 在 CMC 平板上重复划线分离 1-2 次, 得到纯培养。

#### (4) 形态特征观察

根据 CMC 平板上的菌落特征、判断获得的纤维降解菌是细菌还是真菌。如果是细菌, 接种牛肉膏蛋白胨琼脂培养基平板; 如果是真菌, 接种 PDA 平板培养。描述菌落特征。细菌用草酸铵结晶紫染色液单染色后镜检, 真菌用乳酸液制片视察、记录个体形态特征。

### 4. 降解纤维素活性的观察

#### (1) 接种和培养

将获得的纤维素降解菌点接在 CMC 平板表面, 每个平板接种 4 株菌, 28°C 培养 3d

#### (2) 染色

在培养皿中加入刚果红溶液(1g/L), 染色 30 min。

#### (3) 脱色

弃去刚果红溶液, 加入 NaCl 溶液(1mol/L)脱色 1h, 中间更换 NaCl 溶液数次。

#### (4) 观察

CMC 与刚果红结合, 形成红色的平板。CMC 降解后形成无色或浅色透明圈, 测定透明圈和菌落直径, 计算两者比值。

#### 结果记录:

##### 1. 土壤中纤维素降解菌的计数

记录 MPN 法测定时各梯度的阳性管数, 根据 MPN 检索表, 计算每克干燥土壤纤维素降解菌的 MPN, 注意按照接种量进行换算。

##### 2. 记录分离到的纤维素降解菌的特征

判断分离到的纤维素降解菌是细菌还是真菌, 记录菌落特征、个体形态、透明圈大小、菌落直径、透明圈和菌落直径比值。

#### 注意事项:

1. 在土粒法筛选中, 铺展滤纸的平板宜湿润些, 并保湿培养。
2. 为了更容易分离到降解速度快的微生物, 可以把快速降解的试管中的少许液体加入另外一支液体培养基试管中培养, 待滤纸降解后再进行分离。

### 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°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°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。