

产品使用说明书 Product Manual

范尼尔氏液体培养基

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN230432
中文名称	范尼尔氏液体培养基
英文名称	Van Niel' s Yeast Medium
产品别名	Van Niel' s 培养基、范尼尔氏肉汤培养基、光合细菌富集培养基
用途	用于光合细菌的富集、筛选及有机物的降解实验
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
培养基基础成分 (g/L) :	
酵母膏 Yeast Extract Powder	1.5
氯化铵 NH_4Cl	1.0
七水硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
磷酸氢二钾 K_2HPO_4	0.5
氯化钠 NaCl	0.5
pH	7.0-7.2
碳酸氢钠添加剂成分 (g/L) :	
碳酸氢钠 NaHCO_3	2.0
用法:	
称取培养基基础 3.7g, 加入 960mL 蒸馏水中溶解, 分装, 115°C 高压灭菌 15 分钟, 待冷却至室温, 无菌操作, 将过滤除菌的 5% 碳酸氢钠溶液 40mL 平均加到分装的培养基中。	
5%碳酸氢钠溶液的配置方法:	
称取碳酸氢钠 5.0g, 加入 100mL 蒸馏水中溶解 (或者称取 2.0g 碳酸氢钠溶于 40mL 蒸馏水中), 过滤除菌。	
产品组成:	
本品包含独立包装的培养基 250g、碳酸氢钠 150g。	
实验方法与步骤 (供参考) :	
实验名称: 光合细菌的筛选及有机物的降解实验	

实验器材:

1. 培养基:

范尼尔氏液体培养基(Van Niel's 培养基)。

2. 溶液及试剂:

NH₄Cl、MgSO₄·7H₂O、K₂HPO₄、NaCl、NaHCO₃，高纯度苯酚

3. 仪器及其他用具:

高压灭菌锅、光照恒温培养箱、恒温摇床、紫外分光光度计、比色杯、容量瓶、接种环、无菌具塞锥形瓶、烧杯、量筒。

实验方法:

1. 富集培养

称取底泥 2g 装入 100mL 具塞锥形瓶内，加范尼尔液体培养基（富集培养基）至瓶颈口，用橡胶塞轻轻盖紧，使多余培养液溢出(注意加塞时不要使瓶内留有气泡)，30℃、4000lx 光照强度厌氧培养 7d。

当整瓶液体颜色变成红色，并且在瓶底淤泥表面有深红色沉积物时，用移液管将红色液体及沉积物吸出 5mL，转移到 100mL 无菌具塞锥形瓶内，加入范尼尔液体培养基（富集培养基），塞上橡皮塞，继续光照，厌氧培养时保持 30℃，至锥形瓶中菌液的颜色变红。

待生长良好后，再按上述同样步骤转接富集 2 次，至锥形中菌液呈棕红色，光合细菌占优势。

2. 驯化培养

吸取上述 5mL 培养液，转移到 500mL 无菌具塞锥形瓶内，加入 95mL 含苯酚(300mg/L)的范尼尔液体培养基（富集培养基），塞上透气硅胶塞，30℃、180r/min 振荡培养 5d;5d 后再取 5mL 培养液转接入 95mL 苯酚浓度为 400mg/L 的范尼尔液体培养基（富集培养基）中，30℃、180r/min 振荡培养 5d;5d 后再重复操作一次，使培养基中的苯酚浓度从 300mg/L 提高到 500mg/L。

3. 苯酚降解实验

(1) 将上述培养液置于 60mL 离心管中，4000r/min，离心，弃上清液。

(2) 将菌体沉淀用无菌生理盐水离心洗涤 2-3 次(4000r/min，每次 5min)，再用无菌生理盐水将菌体配成菌悬液(A₆₈₀=1.2)，备用；

(3) 取 2 个 100mL 无菌具塞锥形瓶，分别加入 5mL 菌悬液，并加入 95mL 含苯酚(500mg/L)的富集培养基(加满至瓶颈口)，用橡胶塞轻轻盖紧，混匀，30℃、4000lx 光照强度，厌氧培养 3d[对照组加 5mL 无菌生理盐水和 95mL 含苯酚(500mg/L) 范尼尔液体培养基（富集培养基）]；

(4) 取 2 个 500mL 无菌具塞锥形瓶，分别加入 5mL 菌悬液，并加入 95mL 含苯酚(500mg/L)的富集培养基，用透气硅胶塞轻轻盖紧，混匀，30℃、180r/min 振荡培养 3d[对照组加 5mL 无菌生理盐水和 95mL 含苯酚(500mg/L) 范尼尔液体培养基(富集培养基)];

(5)培养 3d 后, 分别取样, 用紫外分光光度计在 270nm 波长下测其吸收值, 然后在标准曲线上对应找到其浓度。

4. 苯酚含量的测定

采用紫外吸收光谱法测定各培养瓶内苯酚的含量, 根据苯酚标准曲线计算苯酚去除率。

(1) 标准曲线的制作

取 5 个 25mL 的容量瓶, 分别加入 2.0mL、4.0mL、6.0mL、8.0mL、10.0L 的苯酚 (100mg/L), 补加去离子水到刻度, 摇匀。用 1cm 石英比色管, 加去离子水作参比, 但 270nm 波长下, 分别测定各溶液的吸光度, 以吸光度对浓度作图, 作出标准曲线

(2) 定量测定废水中的苯酚含量

准确移取未知液 10mL 于 25mL 比色管中, 用去离子水稀释到刻度, 摇匀。在同样条件下测定其吸光度, 根据吸光度在工作曲线上对应出苯酚待测液的浓度, 并计算出未知液中苯酚的含量。

苯酚降解率计算如下式:

$$\eta = [1 - (C_1 + C_2) / C_0]$$

式中:

η —苯酚降解率, %;

C_0 —苯酚起始浓度, mg/L;

C_1 —反应后苯酚浓度, mg/L;

C_2 —挥发的苯酚浓度, mg/L。

注意事项:

紫外吸收光谱法在浓度范围 10~250mg/L 内, 吸光度与浓度成良好的线性关系, 因在测定高浓度有机物时, 应适当予以稀释。

实验报告

1.将测定结果填入下表。

苯酚的量 (mg/L)	8.000	16.000	24.000	32.000	40.000	未知液体浓度
吸光度						

2.比较光合细菌在光照厌氧的环境中和在黑暗通气环境下的份降解效果。

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五十五度至六十度，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。