

产品使用说明书 Product Manual

无机盐基础培养基（有机磷农药降解菌）

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN230442
中文名称	无机盐基础培养基（有机磷农药降解菌）
英文名称	Inorganic Salt Basic Medium (Organophosphorus Pesticide Degrading Bacteria)
产品别名	无机盐基础培养基（用于有机磷农药降解菌）、有机磷农药降解菌无机盐基础培养基
用途	用于土壤中有机磷农药降解菌的分离及其性能测定
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
成分 (g/L) :	
硝酸铵 NH_4NO_3	0.5
六水氯化钙 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1
磷酸氢二钾 K_2HPO_4	0.5
磷酸二氢钾 KH_2PO_4	0.5
葡萄糖 Dextrose	5.0
七水硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
氯化钠 NaCl	0.2
pH	7.0
用法:	
称取本品 7.0g, 加入 1000mL 蒸馏水中溶解, 根据实验需求加入适量甲胺磷, 分装, 115°C 高压灭菌 20 分钟。	
相关产品:	
LB 肉汤(Lennox) 无机盐基础培养基（有机磷农药降解菌）	
实验步骤与方法（供参考）:	
实验名称：土壤中有机磷农药降解菌的分离及其性能测定	
实验器材:	

1. 样品:

取自农田的土壤(深度 5~15cm), 去除杂质。

2. 培养基:

LB 肉汤(Lennox)、无机盐基础培养基 (有机磷农药降解菌)、富集培养基(无机盐培养基灭菌后加入适量的甲胺磷, 用于驯化及筛选分离菌株)。

3. 仪器:

分光光度计振荡培养箱、离心机、天平、烧杯、容量瓶、锥形瓶。

4. 试剂:

甲胺磷(MAP)标准品、0.5%氯化钼显色剂、盐酸、甲醇、0.3mg/mL 的甲胺磷工作液(甲胺磷用甲醇溶解并配成 3.0mg/mL 的储备液, 然后用甲醇稀释, 配成 0.3mg/mL 的工作液)

实验方法:

1. 降解菌的驯化、富集筛选

(1)取土壤 10g 于 250mL 锥形瓶中,加入含 0.4g/L 甲胺磷的无机盐培养基 100mL30°C, 180r/min 振荡培养 7d, 之后按 10%的接种量进行驯化、富集培养, 每次 7d、共 6 次, 并逐步提高甲胺磷含量至 0.8g/L、1.5g/L、2.0g/L、3.0g/L。

(2) 取最后一次富集波梯度稀释至 10, 取稀释液涂布于无机盐固体培养基平板上(不加甲胺磷的无机盐培养基作对照), 挑取含甲胺磷的无机盐培养基上生长较好的菌株、用 1B 培养基纯化后保藏备用。

2. 标准曲线绘制

利用甲胺磷和钼离子形成稳定黄色络合物的性质, 采用分光光度法测定。

具体操作如下: 分别吸取甲胺磷工作液 0mL、0.25mL、0.50mL、0.75 mL、1.00 mL、1.25 mL,依次放入 6 个 10mL 容量瓶中, 加入 1.0mL 氯化钼显色剂溶液, 用盐酸定容至刻度, 在 311.8nm 波长处测定吸光度以甲胺磷浓度为横坐标, 以吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

(2) 菌株降解性能测定

取 LB 肉汤(Lennox) (LB 液体培养基), 50mL 于 250mL 锥形瓶中, 接种分离到的菌株, 35°C、120r/min 振荡培养过夜作为种子液, 取无机盐基础培养基 (有机磷农药降解菌) 50mL 于 250mL 锥形瓶中, 灭菌后在无菌条件下加入甲胺磷, 浓度为 1.0g/L。按 5%的接种量接种种子液, 以不接菌为对照, 35°C、120r/min 振荡培养 7d, 取培养液, 4500r/min 离心 10min, 取上清液, 测定甲胺磷浓度, 并根据以下公式计算降解率:

$$\rho = (C1 - C2) / C1 \times 100\%$$

式中:

ρ ——降解率 %

C1 ——甲胺磷原始浓度 g/L

C1 ——根据标准曲线的线性回归方程计算所得的甲胺磷原始浓度 g/L

注意事项:

- 1.甲胺磷的中文商品名为多灭灵, 毒性强, 操作时需戴防护手套, 严禁直接接触皮肤。
- 2.使用过的玻璃器皿要在 121°C 高压灭菌 20min 后, 才能洗净、烘干, 供下次使用。

实验报告:

- 1.降解菌的形态观察。
- 2.标准曲线的绘制。
- 3.降解性能的测定。

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°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。