

Protocols of

Environmental Microbiology

# 环境微生物实验技术

陈坚 刘和 李秀芬 华兆哲 编著

- 环境微生物分子检测技术
- 环境微生物种群多样性检测技术
- 环境微生物生理活性检测技术
- 环境质量检测与评价的微生物技术
- 难降解化合物的微生物降解实验技术
- 废水好氧、厌氧处理实验技术
- 污染场地生物修复实验技术
- 废弃物、废气生物处理实验技术



化学工业出版社  
生物·医药出版分社

X172  
CJ

**Protocols of**

**Environmental Microbiology**

# 环境微生物实验技术

陈坚 刘和 李秀芬 华兆哲 编著



**化学工业出版社**  
生物·医药出版分社

· 北京 ·

本书主要介绍环境生物工程领域内的环境微生物实验技术以及污染物处理和环境生物修复实验技术。在环境微生物实验技术部分,力求体现前沿性和创新性的特点,包括了一些近年来发展的环境微生物实验手段。例如,环境微生物的分子检测技术、环境微生物种群多样性的分子检测技术等,预期将为从事该领域研究的科研工作者提供较好的参考。在污染物处理和环境生物修复实验技术部分,包括了废水的好氧处理、厌氧处理技术,同时也包括了固体废弃物以及污染场地的修复等领域的常见的实验技术,体现了内容的延续和系统性特点。

本书可供从事环境生物工程研究领域的教师、研究生和其他研究者参考。

#### 图书在版编目 (CIP) 数据

环境微生物实验技术/陈坚等编著. —北京: 化学工业出版社, 2008. 5  
(生物实验室系列)  
ISBN 978-7-122-02615-6

I. 环… II. 陈… III. 环境生物学: 微生物学-实验  
IV. X172-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 053238 号

---

责任编辑: 孟 嘉 郎红旗  
责任校对: 凌亚男

装帧设计: 关 飞

---

出版发行: 化学工业出版社 生物·医药出版分社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)  
印 装: 化学工业出版社印刷厂  
787mm×1092mm 1/16 印张 15 字数 369 千字 2008 年 6 月北京第 1 版第 1 次印刷

---

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899  
网 址: <http://www.cip.com.cn>  
凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

---

定 价: 45.00 元

版权所有 违者必究

## 生物实验室系列图书

- 发酵工程实验技术 (第二版) 2008年10月
- 环境微生物实验技术 2008年6月
- 分子免疫学实验技术指南 2008年6月
- 基因表达分析手册【译】 2008年6月
- 蛋白质组学中的蛋白质纯化手册【译】 2008年6月
- 生物实验室数学 2008年2月
- 分子克隆实验指南精编版【译】 2008年1月
- 分子生物学实验技术 2008年1月
- RNA分离与鉴定实验指南——RNA研究方法【译】 2007年11月
- 核酸分子杂交 2007年7月
- 现代实验动物学技术 2007年1月
- 蛋白质与蛋白质组学实验指南【译】 2006年10月
- 生物芯片技术应用详解 2006年9月
- 免疫组织化学实验技术及应用 2006年6月
- 组织工程方法【译】 2006年6月
- 细胞生物学实验技术 2006年6月
- 人肿瘤细胞培养【译】 2006年5月
- 生物安全实验室建设 2006年4月
- 植物细胞工程实验技术 2006年4月
- PCR技术实验指南(第二版)【译】 2006年3月
- 分子生物学与蛋白质化学试验方法【译】 2006年2月
- 植物分子生物技术应用手册 2006年2月
- 小鼠胚胎操作实验手册(第三版)【译】 2006年1月
- 医学微生物学实验技术 2006年1月
- 流式细胞术原理与科研应用简明手册【译】 2005年7月
- DNA分子标记技术在植物研究中的应用 2005年6月
- 分子生物学实验参考手册【译】 2005年6月
- 生物安全柜引用指南 2005年3月
- PCR最新技术原理、方法及应用 2006年10月重印
- RNAi——基因沉默指南【译】 2004年10月
- 转基因动物技术手册【译】 2004年9月
- 现代生物科学仪器分析入门 2007年9月重印
- 拟南芥实验手册【影印】 2004年5月
- 生物化学实验技术 2005年5月重印

## 生物技术相关图书书目

书 名	作 者	出版时间	开本	装订	单价(元)
生物软件选择和使用指南	李军 等	2008	B5	平	29.00
现代生物技术丛书——酶工程(第二版)	罗贵民	2008	16	平	55.00
现代生物技术丛书——纺织生物技术	陈坚 等	2008	16	平	59.00
现代生物技术丛书——生物化学工程	谭天伟	2008	16	平	49.00
实用酶技术丛书——酶制剂技术	罗立新	2008	小16	平	29.00
类胡萝卜素功效与生物技术	姜建国	2008	小16	平	29.00
生物信息学应用技术	王禄山 高培基	2007	16	平	39.00
新型纺织酶制剂的发酵与应用	陈坚 华兆哲 堵国成 著	2007	16	平	59.00
药食用真菌生物技术	陶文沂 等编	2007	小16	平	37.00
蛋白质科学与技术丛书——蛋白质微阵列	M. 谢纳 编 董明庆 等译	2007	16	平	49(估价)
动物细胞培养工程	张元兴	2007	16	平	39.00
生物信息学算法导论	N. C. 琼斯 P. A. 帕夫纳 著 王翼飞 等译	2007	B5	平	39.00
生物信息学 ——智能化算法及其应用(现代生物技术丛书)	王翼飞 史定华 主编	2007	16	平	35.00
现代生物技术丛书—生物传感器	张先恩	2006	16	平	59.00
现代生物技术丛书—生物芯片技术	陈忠斌	2005	16	平	76.00
现代生物技术丛书—生物制药技术	朱宝泉	2004	16	平	60.00
现代生物技术丛书 —生物工程下游技术(第二版)	刘国詮	2003 重印	16	平	45.00
现代生物技术丛书 —农业生物工程(第二版)	莽克强	2004	16	平	40.00
现代生物技术丛书—微生物工程	焦瑞身	2003	16	平	78.00
现代生物技术丛书—动物细胞工程	徐永华	2005 重印	16	平	35.00
现代生物技术丛书—植物细胞工程	朱至清	2005 重印	16	平	30.00
现代生物技术丛书—蛋白质工程	王大成	2003 重印	16	平	36.00
现代生物技术丛书—基因工程	陈永青 陆德如	2003 重印	16	平	30.00
现代生物技术丛书—环境生物工程	伦世仪	2002 重印	16	平	45.00
现代生物技术丛书—酶工程	罗贵民	2004 重印	16	平	50.00
现代生物技术丛书—生物技术与疾病诊断	卢圣栋	2003 重印	16	平	25.00
现代生物技术丛书—组织工程	杨志明	2003 重印	16	平	48.00
纳米生物技术丛书—纳米药理学	张阳德	2006 重印	小16	平	45.00
纳米生物技术丛书 —纳米分析化学及分子生物学	张阳德	2005 重印	小16	平	29.00

续表

书 名	作 者	出版时间	开本	装订	单价(元)
纳米生物技术丛书—纳米生物材料学	张阳德	2005	小 16	平	32.00
现代植物科学系列——植物组织培养导论	M. K. 拉兹丹[印度]编著 肖尊安 译	2006	16	平	45.00
生物信息学与功能基因组学(译著)	孙之荣	2006	16	平	95.00
现代应用生物技术	杨生玉 等	2004	16	精	98.00
生物医学传感器与检测技术	杨玉星	2005	16	平	36.00
制药生物技术(原著第二版)	D. A. Crom melin, D. Sind elar, 吉爱国 等译	2005	16	平	49.00
人胚胎干细胞—科学和治疗潜力概论	A. A. 基斯林, S. C. 安德森, 章静波 等译	2005	16	平	29.00
疾病蛋白质组学		2005	16	平	58.00
感染性疾病免疫学	S. H. E. 考夫曼 等, 朱立平 译	2005	16	平	86.00
医用分子生物学		2005 重印	16	平	58.00
病毒感染的分子生物学	李琦涵	2004	小 16	平	48.00
微生物药理学	陈代杰	2004 重印	16	精	90.00
农业生物技术系列——草坪草生物技术及应用	林志平	2006	小 16	平	30.00
农业生物技术系列——微生物农药研发与应用	周焱 喻子牛 等	2006	小 16	平	38.00
农业生物技术系列 ——现代生物技术与畜禽疾病防治	陈溥言	2005	小 16	平	32.00
农业生物技术系列 ——新型蛋白质饲料开发与利用	计成	2006	小 16	平	27.00
农业生物技术系列 ——新型饲料添加剂开发与利用	石波	2005	16	平	30.00
农业生物技术系列——植物检疫方法与技术	洪霓	2006	16	平	39.00
生物实验室系列 ——植物分子生物技术应用手册	彭学贤	2006	16	平	49.00
植物生物技术导论	H. S. 查拉夫 编著	2005	16	平	68.00
植物生物技术	肖尊安	2005	16	平	38.00
药用植物大规模组织培养	高文远 贾伟	2005	小 16	平	48.00
植物生物活性物质	唐传核	2005	16	精	58.00
植物细胞培养工程	元英进	2004	小 16	平	38.00
植物化学成分	陈业高	2004	16	平	40.00
植物组织培养与工厂化育苗	崔德才 徐培文	2004 重印	大 32	平	28.00
中国生物技术产业发展报告(2007)	中国生物工程学会 编写	2008	大 16	平	98.00
中国生物技术产业发展报告(2006)	中国生物工程学会 编写	2007	大 16	平	98.00
中国生物技术产业发展报告(2005)	中国生物工程学会	2006	大 16	平	98.00
生物技术投资必读 ——如何投资生物技术与生命科学板块	唐马克 著	2005	大 32	平	28.00
汉英生物技术词汇	安利佳 包永明	2003	32	精	60.00
英汉生物技术词汇	安利佳	2003 重印	大 32	精	68.00

邮购电话/传真: 010-64518888 或 010-64518899 E-mail: a64518888@yahoo.. com.cn

如果您需要了解更多信息, 欢迎登录我社网站: www. cip. com. cn

# 出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了“生物实验室系列图书”。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列图书”的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列图书”的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社  
生物·医药出版分社



# 前 言

环境微生物学是一门运用微生物治理污染、修复环境的技术和方法的学科，也是当代环境科学发展的主导方向之一。环境微生物技术在废物生物处理、环保友好材料、清洁可再生能源的开发、废物资源化、环境监测、污染环境的修复和污染严重的工业企业的清洁生产等环境保护的各个方面发挥着极为重要的作用。

近十年来，国内介绍环境生物技术的参考书籍逐渐增多，有关环境微生物学实验方面的书籍和教学参考书也不少，但是这些书籍主要是介绍基础微生物学方面的技术和方法。环境微生物技术体系所涉及的方法主要是研究环境微生物学在环境污染治理、环境生物修复、环境质量的检测等方面的内容。本书不仅包括了常用的微生物生物处理方面的实验技术和方法，同时根据近年来环境生物技术的发展趋势，着重介绍了一些新的环境微生物方面的实验技术，力求反映该领域实验技术和方法的最新进展，同时也适当地体现内容的系统性要求，为从事环境生物工程研究领域的教师、研究生和其他研究者提供参考。

本书主要有以下特点：

- 充分体现前沿性和创新性 分子生物学实验技术已经广泛深入地渗透到生命科学研究的各个领域。本书选用的环境微生物实验技术主要是近几年国内外研究者在环境微生物学领域内较常用的一些新技术、新方法，尤其是一些以分子生物学技术为背景的实验方法。这些新技术基本代表了未来环境微生物学研究技术的发展方向，对于我国从事环境微生物学研究领域的研究人员应该会有比较好的借鉴作用。

- 十分强调可读性和可操作性 作为一本主要面向从事环境生物工程领域内的研究者的实验指导书籍，本书在编制体例上特别强调内容的可读性以及实验的可操作性，特别是在环境微生物实验技术部分，不但对每一种技术的基本原理进行了深入浅出的介绍，而且对实验步骤进行了十分详尽的描述，力求使读者能够比较容易地理解一些比较复杂和晦涩的原理和实验步骤。在某些情况下，还提供了多种备选实验方案，以方便研究人员能够在某些实验条件不能达到的情况下选用。另外，由于分子生物学实验技术的复杂性，很多实验步骤繁多，若有不慎即会陷入困境，因此我们还提供了一些背景知识以及参考文献，使读者能够充分理解并互相比较和验证。

- 充分尊重方法的原创者和革新者 本书引用了许多国内外从事环境生物工程研究同行的方法，也结合了作者自身从事环境生物工程研究多年来积累的一些技术和方法的总结。对于引用的方法，我们尽量在正文的适当位置予以标注和说明，但是由于每一种实验方法的从无到有、从简单到复杂的发展变迁，有时很难追溯其最初的发明者和建立者。在这里，我们的主要职责在于汇编和查证、去粗存精，也希望读者能够结合自身的研究体会，对其中的不足之处给予批评和指正。

本书分上下两篇，共十章。上篇为环境微生物实验技术，下篇为污染物生物处理与环境生物修复实验技术。上篇的作者为刘和，下篇的作者为李秀芬（第五、六和七章），华兆哲（第八、九和十章）。本书部分章节内容来自本研究室近年研究生的论文工作，这些研究生分别为：李光伟、许科伟、刘晓玲、聂艳秋、唐德友、陈艺阳、李艳娜、张黎、孙赛玉和徐

绘霞。

由于编者水平有限，本书内容涉及广泛，书中难免还有遗漏和不当之处，望读者惠予指正。

作者  
2008年3月

# 目 录

第一章 环境微生物分子检测技术 .....	1
第一节 环境样品 DNA 的提取 .....	1
一、概述 .....	1
二、处理焦化废水的活性污泥中微生物总 DNA 的提取 .....	1
三、处理生活污水的活性污泥中微生物总 DNA 的提取 .....	3
四、土壤样品中微生物总 DNA 的提取 .....	3
第二节 环境样品 RNA 提取技术 .....	5
一、概述 .....	5
二、从活性污泥中提取微生物 RNA .....	6
三、从土壤样品中提取微生物 RNA .....	8
四、从水体样品中提取微生物 RNA .....	11
五、试剂盒法 .....	12
六、提取方法总结 .....	12
第三节 荧光原位杂交技术监测环境中微生物 .....	13
一、概述 .....	13
二、荧光原位杂交技术基本操作步骤 .....	15
三、荧光原位杂交法检测活性污泥中硝化细菌 .....	18
四、荧光原位杂交法检测双歧杆菌 .....	19
第四节 荧光定量 PCR 检测技术 .....	20
一、概述 .....	20
二、荧光定量 PCR 的原理 .....	21
三、TaqMan 荧光定量 PCR 检测贾第鞭毛虫和隐孢子虫两种肠道病原菌数量 .....	23
四、荧光定量 PCR 方法检测鼠伤寒沙门菌 .....	24
五、SYBR Green 荧光定量 PCR 检测 RbAp46 基因表达 .....	26
六、结果和讨论 .....	27
第五节 环境污染物降解基因的 PCR 检测技术 .....	30
一、概述 .....	30
二、扑草净降解基因保守序列的 PCR 检测 .....	31
三、芳香烃降解基因的 PCR 检测 .....	32
四、卤代芳香烃降解基因的 PCR 检测 .....	33
第六节 反转录 PCR 检测技术 .....	35
一、概述 .....	35
二、RT-PCR 一般实验方法和步骤 .....	37
三、RT-PCR 其他方法和步骤 .....	43
第七节 原位 PCR 检测技术 .....	44
一、概述 .....	44
二、原位 PCR 技术检测环境中霍乱弧菌 <i>ctxAB</i> 基因 .....	45

三、结合流式细胞仪检测技术的菌体原位 PCR 扩增 .....	46
参考文献 .....	47
<b>第二章 环境微生物种群多样性检测技术 .....</b>	<b>50</b>
第一节 变性梯度凝胶电泳技术分析环境样品中微生物多样性 .....	50
一、概述 .....	50
二、DGGE/TGGE 的发展和原理 .....	50
三、DGGE 技术的关键环节和系统优化 .....	51
四、DGGE 技术在微生物分子生态学中的应用 .....	52
五、DGGE 技术应用的局限性 .....	53
六、DGGE 技术分析活性污泥中微生物群落的多样性 .....	53
第二节 末端限制性片段长度多态性分析技术 .....	58
一、概述 .....	58
二、好氧颗粒污泥中细菌组成的检测 .....	61
三、运用 T-RFLP 技术快速鉴定分枝杆菌 .....	62
第三节 Biolog 方法测定环境微生物群落 .....	64
第四节 环境微生物磷脂脂肪酸谱图分析技术 .....	69
一、概述 .....	69
二、实验方案 .....	71
第五节 稳定性同位素检测技术 .....	73
一、概述 .....	73
二、 <sup>13</sup> C 检测：硫酸盐还原菌 (SRB) 稳定性碳同位素的分馏测定 .....	74
参考文献 .....	76
<b>第三章 环境微生物生理活性检测技术 .....</b>	<b>78</b>
第一节 微生物筛选与驯化实验 .....	78
一、概述 .....	78
二、实验方案 .....	78
第二节 土壤呼吸强度的测定 .....	85
一、概述 .....	85
二、土壤呼吸强度测定实验 .....	87
第三节 天然水体和生活污水中细菌总数及大肠菌群的监测 .....	89
一、概述 .....	89
二、实验方案 .....	90
第四节 硝化及反硝化活性实验 .....	94
一、概述 .....	94
二、实验方案 .....	96
参考文献 .....	101
<b>第四章 环境质量检测与评价的微生物技术 .....</b>	<b>103</b>
第一节 应用 Ames 实验检测河水中致突变污染物 .....	103
一、概述 .....	103
二、实验材料与设备 .....	104
三、操作过程 .....	105

四、结果 .....	107
五、讨论 .....	107
六、注意事项 .....	108
第二节 发光菌对环境污染物的毒性检测实验 .....	108
一、概述 .....	108
二、实验条件 .....	110
三、实验步骤 .....	111
四、实验结果 .....	113
五、实验结果的应用与讨论 .....	113
六、注意事项 .....	114
参考文献 .....	114
<b>第五章 难降解化合物的微生物降解实验技术 .....</b>	<b>116</b>
第一节 概述 .....	116
一、难降解化合物微生物可降解性的影响因素 .....	116
二、微生物降解有机物的潜在能力 .....	117
三、难降解化合物的生物分解与转化 .....	117
四、微生物对难降解有机物的作用方式 .....	118
第二节 难降解化合物生物可降解性测试 .....	119
一、概述 .....	119
二、难降解化合物累积耗氧量或耗氧速率的测定 .....	120
三、难降解化合物降解率的测定 .....	120
第三节 难降解化合物降解菌的筛选技术 .....	121
一、概述 .....	121
二、木质素降解菌的筛选 .....	121
三、芳香烃类化合物降解菌的筛选 .....	122
四、氰(腈)类化合物降解菌的筛选 .....	123
五、合成洗涤剂降解菌的筛选 .....	123
六、增塑剂邻苯二甲酸酯类降解菌的筛选 .....	123
七、有机氯农药降解菌的筛选 .....	124
第四节 难降解化合物的微生物降解实验 .....	125
一、概述 .....	125
二、难降解化合物的降解实验 .....	125
参考文献 .....	126
<b>第六章 废水好氧处理实验技术 .....</b>	<b>127</b>
第一节 概述 .....	127
一、活性污泥的净化反应过程 .....	127
二、活性污泥净化反应的影响因素 .....	129
三、活性污泥性能及数量的评价指标 .....	130
第二节 活性污泥的培养实验方法 .....	131
一、概述 .....	131
二、传统的活性污泥驯化培养方法 .....	132

三、快速培菌法 .....	132
四、活性污泥处理废水的实验方法 .....	133
第三节 微生物除磷实验方法 .....	135
一、概述 .....	135
二、普通聚磷菌的驯化培养 .....	137
三、反硝化除磷菌的驯化培养 .....	138
第四节 微生物脱氮实验方法 .....	139
一、概述 .....	139
二、硝化细菌的筛选 .....	142
三、好氧反硝化菌的筛选 .....	143
参考文献 .....	144
<b>第七章 废水厌氧处理实验技术</b> .....	<b>145</b>
第一节 概述 .....	145
一、厌氧生物处理过程及其特征 .....	145
二、厌氧生物处理的影响因素 .....	146
三、废水厌氧生物处理实验研究的必要性 .....	148
第二节 厌氧颗粒污泥的培养方法 .....	148
一、概述 .....	148
二、厌氧污泥的颗粒化培养 .....	151
第三节 UASB 反应器的启动 .....	152
一、概述 .....	152
二、UASB 反应器的初次启动 .....	155
三、UASB 反应器的二次启动 .....	157
第四节 UASB 反应器处理废水的实验方法 .....	157
一、概述 .....	157
二、甲烷菌的生成活性试验 .....	157
三、生物降解特性及毒性试验 .....	159
四、UASB 反应器处理废水试验 .....	160
第五节 UASB 反应器的评价 .....	163
一、概述 .....	163
二、最大比产 $\text{CH}_4$ 速率和最大比 COD 去除速率的测定方法 .....	164
三、辅酶 $\text{F}_{420}$ 的测定 .....	166
四、氢化酶的测定 .....	168
五、磷酸酯酶的测定 .....	169
六、厌氧污泥的生物相分析 .....	170
七、UASB 中颗粒污泥的生物相分析 .....	172
八、沼气量的测定 .....	172
九、沼气成分的测定 .....	173
十、生物化学甲烷势的测定 .....	174
十一、厌氧毒性测定方法 .....	175
十二、挥发性脂肪酸的测定 .....	175
参考文献 .....	177

<b>第八章 危险性化合物污染场地生物修复实验技术与评价方法</b>	178
<b>第一节 概述</b>	178
一、生物修复的分类	178
二、生物修复的优点	178
三、生物修复的前提条件	178
四、生物修复的基本措施	179
<b>第二节 降解微生物的筛选方法</b>	181
一、降解有机氯农药微生物菌株的分离筛选	181
二、高效降解石油微生物菌株的筛选	182
<b>第三节 污染物生物修复的实验方法</b>	183
一、好氧堆肥反应器处理石油污染	183
二、微生物混合培养处理苯系化合物	184
三、六六六污染土壤的微生物修复	185
四、DDT 污染沉积物的生物修复	187
五、五氯酚污染土壤的厌氧生物修复	188
六、含氮杂环化合物污染土壤的泥浆体系生物修复	189
<b>第四节 野外工程化处理及其评价方法</b>	190
一、石油污染土壤的堆场生物修复模拟实验	190
二、石油污染土壤的泥浆化反应器生物修复模拟实验	191
三、生物修复过程中的评价方法	192
<b>参考文献</b>	193
<b>第九章 废弃物类生物质的生物处理实验技术</b>	195
<b>第一节 概述</b>	195
<b>第二节 废弃物类生物质基本性质与成分测定方法</b>	196
一、样品的采集	196
二、基本性质分析	198
三、有机质含量测定	199
四、有害成分的分析	201
五、淀粉及纤维素含量的测定	202
<b>第三节 废弃物类生物质的好氧堆肥生物处理实验方法</b>	203
一、概述	203
二、工艺流程概述	203
三、实验设计	203
<b>第四节 废弃物类生物质的厌氧生物处理实验方法</b>	208
一、连续流新型厌氧反应器的设计	208
二、厌氧反应器的运行	208
三、结果分析	209
<b>参考文献</b>	209
<b>第十章 废气的生物处理技术</b>	211
<b>第一节 概述</b>	211
一、前言	211

二、废气生物处理原理 .....	211
三、参与废气处理的微生物 .....	211
四、废气生物处理工艺种类 .....	212
第二节 废气的生物滤池处理实验方法 .....	213
一、概述 .....	213
二、实验方法 .....	215
三、结果分析 .....	216
第三节 废气的生物滴滤塔处理实验方法 .....	217
一、概述 .....	217
二、实验方法 .....	218
三、结果分析 .....	219
第四节 废气的生物洗涤器处理实验方法 .....	220
一、概述 .....	220
二、实验方法 .....	221
三、结果分析 .....	222
参考文献 .....	223



# 第一章 环境微生物分子检测技术

## 第一节 环境样品 DNA 的提取

### 一、概述

微生物分子生态学是通过分析样品中 DNA 分子的种类、数量等基因组信息来反映微生物种群结构等信息的。用分子生物学方法对环境微生物多样性、群落结构及变化规律的研究近年来得到快速发展,已成为最富于活力的生态学科前沿领域之一,因此对环境样品中的细菌基因组 DNA 组成状况进行分析评价,必须建立高效、可靠的 DNA 提取方法。由于环境样品中微生物的种类组成复杂且常常混杂有大量有毒物质,如何使所有细胞裂解、充分释放 DNA 并有效去除杂质,得到可以进行分子生物学操作的高纯度 DNA 是研究环境样品中微生物种群结构与功能关系的关键所在。因此,应用分子生物学技术分析复杂的基因组,首先必须制备高纯度的 DNA。环境样品的微生物总 DNA 的提取和纯化方法主要由两部分组成:①温和裂解细胞及溶解 DNA 的技术,包括通过物理、化学或酶解作用裂解细胞,使 DNA 释放出来。常用的物理方法包括煮沸、冻融、微波、超声、研磨等,化学方法包括高盐、表面活性剂 SDS、热酚等,酶解法包括裂解酶、溶菌酶、蛋白酶 K 等。②在环境样品 DNA 得到充分释放后,通常采用几种化学和酶学方法中的任一种来去除杂蛋白、RNA 及其他的大分子。

一般传统的 DNA 制备方法是依赖上述方法裂解细胞,某些情况需要用酶来消化蛋白质或降解一些细胞组分,然后细胞材料用溶剂抽提,通常为酚/氯仿。分离成两相后,核酸存留在水相中。核酸进一步纯化可用乙醇沉淀法,再重新溶解在适宜的缓冲液中。用这些技术得到的 DNA 是高纯度的,并适用于大部分分子生物学操作。近年来,色谱技术在 DNA 提取中的应用打破了传统方法的统治地位,这些新的方法主要有螯合树脂/纯化柱法、玻璃粉吸附法、磁珠吸附法、免疫亲和法等。

实际上分子生物学的所有方法从某种程度上都需要进行核酸的分级分离(表 1-1)。色谱技术对于某些应用是合适的,比如分离双链核酸和单链核酸、分离质粒与基因组 DNA 以及从细胞裂解物碎片中分离基因组 DNA。然而,凝胶电泳法比其他方法具有更高的分辨率,因而成为一般情况下首选的分离方法。凝胶电泳分离法既可以是分析型的,也可以是制备型的,分离片段的分子质量范围在  $1000\sim 10^8$  Da 之间。

### 二、处理焦化废水的活性污泥中微生物总 DNA 的提取

由于污泥样品中存在许多干扰物质,如腐殖酸、类腐殖酸化合物、重金属等,它们会严重干扰 DNA 的提取率以及 DNA 的纯度。从活性污泥中提取微生物总 DNA,一般包括裂解细胞、抽提核酸和纯化核酸三个阶段。首先,采用物理的(剧烈振荡)、化学的(SDS)以及生物的(溶菌酶)方法,使微生物细胞破碎,释放胞内的 DNA。然后,采用乙酸钾对 DNA 进行沉淀,得到核酸粗提液。由于核酸粗提液中含有较多的腐殖酸等杂质,需要进一步采取氯化铯密度梯度离心、凝胶电泳等方法纯化 DNA,以得到纯度较高的 DNA 样品。