

高等学校环境类教材

# 环境生物技术实验

Environmental Biotechnology Experiments

刘娜 任何军 张婷娣 编著

清华大学出版社

高等学校环境类教材

# 环境生物技术实验

Environmental Biotechnology Experiments

刘娜 任何军 张婷娣 编著



## 内 容 简 介

本书在汲取国内外众多优秀教材、文献资料的基础上,系统地介绍了当前环境生物技术领域涉及的一些基本实验原理和前沿性研究方法。全书分5部分共28个实验,主要包括环境生物技术的基本实验技术、综合实验技术、研究性实验技术、应用实验及现代分子实验技术。本书内容全面,文字简明,概念清晰,可帮助读者有效地掌握环境生物技术这一新兴学科的基本知识、操作技能及研究思路与方法。

本书可作为高等院校环境工程、环境科学、给水与排水工程、资源与环境等专业的实验课教材,也可供相关专业科技人员参考。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13701121933

### 图书在版编目(CIP)数据

环境生物技术实验/刘娜,任何军,张婷娣编著.--北京:清华大学出版社,2012.12

(高等学校环境类教材)

ISBN 978-7-302-30731-0

I. ①环… II. ①刘… ②任… ③张… III. ①环境生物学—实验—高等学校—教材  
IV. ①X17-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第283551号

责任编辑:柳萍

封面设计:傅瑞学

责任校对:王淑云

责任印制:沈露

出版发行:清华大学出版社

网 址: <http://www.tup.com.cn>, <http://www.wqbook.com>

地 址:北京清华大学学研大厦A座 邮 编:100084

社总机:010-62770175 邮 购:010-62786544

投稿与读者服务:010-62776969, [c-service@tup.tsinghua.edu.cn](mailto:c-service@tup.tsinghua.edu.cn)

质 量 反 馈:010-62772015, [zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn](mailto:zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn)

印 刷 者:三河市君旺印装厂

装 订 者:三河市新茂装订有限公司

经 销:全国新华书店

开 本:170mm×230mm 印 张:8.5 字 数:161千字

版 次:2012年12月第1版 印 次:2012年12月第1次印刷

印 数:1~3000

定 价:19.00元

---

产品编号:025487-01

# 前言

## FOREWORD

现代环境微生物技术涉及众多学科领域,是现代生物技术、现代微生物学、环境科学、环境生态学、工程学、有机化学等多学科交叉的新兴学科。它是由现代微生物技术与环境污染防治工程及其他工程技术紧密结合而形成的,既具有较强的基础理论,又具有鲜明的技术应用特点。

继 2005 年我们的《现代环境微生物技术》(清华大学出版社出版)教材出版之后,编写配套《环境生物技术实验》实验教材,既是环境生物技术这一新兴学科教学与科研发展的需要,也是开拓环境污染治理高新技术途径的需要。本书编写人员并没有按传统的环境处理工艺为出发点,而是以微生物处理技术的基本理论方法为出发点,从环境生物技术领域的各个方面,广泛收集资料,汲取国内外信息,力求反映现代环境生物技术的最新理论和最新应用技术,并注重专业基础理论与实际应用相结合、传统方法与现代技术相结合等方面来编写出本书的特色。

《环境生物技术实验》全书分为 5 个部分。第 1 部分为基础微生物学实验方法与技术,包括微生物的显微观察、菌种保藏技术等实验;第 2 部分为环境污染物降解菌株的分离、鉴定技术,重点介绍典型有机污染物降解菌种的筛选与分离方法等;第 3 部分为微生物分子生物学中基本实验技术,包括 DNA、质粒等生物大分子的提取技术及多聚酶链式扩增技术。第 4 部分介绍了微生物分子生态学的研究方法,重点包括 PCR-DGGE、Biolog、PLFA 等技术。第 5 部分重点介绍了污染物的微生物处理和资源化方面的典型技术。全书共收入 28 个实验。每个实验从国内外应用与发展趋势、实验目的原理、材料方法、操作过程、结果分析和适用范围等方面进行阐述,并提供相当数量的参考信息、便于读者在此基础上进行深入研究。

本书从培养跨世纪的环境生物技术人才角度出发编写了有关的实验,目的



是促进学生对课堂内容的深入理解与吸收。由于环境生物技术层次多,涉及的学科范围广泛,并具有相互交叉渗透、综合性强的特点,对于每一个实验所涉及的内容,均给出详细的描述,几乎是不可能的,只能就实验本身的主要目的,对主体操作技术进行描述,这必然存在错误和不当之处,恳请有关专家和同行给予批评指正。

作者

2012年11月

### 第 1 部分 基础微生物学实验方法与技术

实验 1	光学显微镜的使用方法及注意事项 .....	3
实验 2	细菌染色技术与形态观察 .....	6
实验 3	细菌生长曲线的测定 .....	9
实验 4	细菌鉴定中的生理生化实验 .....	12
实验 5	微生物菌种的保藏 .....	23

### 第 2 部分 环境污染物降解菌株的分离、鉴定

实验 6	微生物絮凝剂菌株筛选及其性能测定 .....	33
实验 7	工业废水苯酚高效降解菌的驯化和筛选 .....	37
实验 8	连续处理系统中紫外诱变菌降解有机污染物 .....	40
实验 9	有机磷农药厌氧降解菌株筛选与鉴定 .....	45
实验 10	农药阿特拉津降解菌的驯化和筛选 .....	48

### 第 3 部分 现代微生物学实验技术

实验 11	细菌总 DNA 的提取 .....	53
实验 12	质粒 DNA 的分离纯化和鉴定 .....	55

实验 13	一种简便、快速的大肠杆菌质粒转化方法 .....	58
实验 14	污染土壤总 DNA 的提取 .....	60
实验 15	微生物总 DNA 中的 16S rDNA PCR 扩增技术 .....	63
实验 16	DNA 琼脂糖凝胶电泳 .....	67
实验 17	琼脂糖凝胶中 DNA 的回收、测序及系统发育树的构建 .....	70
实验 18	微生物的固定化技术 .....	72

#### 第 4 部分 微生物多样性的测定

实验 19	Biolog 分析方法 .....	79
实验 20	PLFA 分析方法 .....	82
实验 21	PCR-DGGE 分析方法 .....	87

#### 第 5 部分 污染物微生物处理与资源化技术

实验 22	固定化微生物处理含脂废水 .....	93
实验 23	壳聚糖固定化真菌漆酶及其用于处理酚类污染物 .....	99
实验 24	废物乙醇化处理实验 .....	102
实验 25	测定废水 BOD 降解生化稳定速率常数和可生化性 .....	106
实验 26	微生物吸附法去除重金属 .....	113
实验 27	含有降解 PCB 基因质粒的菌株治理土壤 PCB 污染 .....	115
实验 28	酶法催化微藻油脂制备生物柴油 .....	124
参考文献	.....	128

# 第1部分

## 基础微生物学实验方法与技术

通常人们把一切肉眼看不见或看不清楚的微小生物称为微生物(microbe, microorganism), 因此, 它不是生物分类学上的专门名词, 而是一些个体微小、构造简单的低等生物的总称。原核生物类的细菌、真核生物类的真菌(酵母、霉菌等)、原生动物和单细胞藻类、非细胞型生物类的病毒和亚病毒等都是微生物学研究的范围。

微生物的类型多样, 但是它们有一定的共性, 因此, 把它们放在一起研究。它们的五大共性为: 体积小, 比表面积大; 对营养物质吸收多, 转化快; 生长旺盛, 繁殖速度快; 对环境适应能力强, 易发生变异; 分布广泛, 种类繁多。为了更好地掌握微生物技术, 掌握基础微生物学实验方法与技术是很有必要的。





## Experiment 1

# 实验1 光学显微镜的使用 方法及注意事项

显微镜是微生物学研究必不可少的工具,正是显微镜的发明使人类揭开了微生物世界的奥秘。随着科学技术的进步及微生物研究的需要,显微镜从实用可见光源的普通光学显微镜发展到使用紫外线光源的荧光显微镜,进一步发展到用电子流代替照明光源的电子显微镜,使放大率和分辨率大大提高,为微生物学的发展提供了保障。此外,根据不同的用途还有暗视野、相差显微镜等。观察细菌的形态和结构时,最常用的是普通光学显微镜。

微生物个体微小,必须借助显微镜才能观察到它们的个体形态和细胞结构,熟悉显微镜和掌握其操作技术是研究微生物不可缺少的手段。现代普通光学显微镜利用目镜和物镜两组系统来放大成像,故又称为复式显微镜。它们由机械装置和光学系统两大部分组成。

### 1. 实验目的

- (1) 了解普通光学显微镜基本结构和用途;
- (2) 初步掌握低倍镜、高倍镜使用方法;
- (3) 了解显微镜维护的基本知识。

### 2. 实验材料

普通光学显微镜、细菌标本片、滴管、香柏油、擦镜纸、二甲苯。

### 3. 操作方法及步骤

#### 1) 取用

将显微镜从镜箱取出,取出时一手握镜臂,一手托底座,将其轻放在离工作台边缘 8~10cm 处,偏左的位置。

## 2) 低倍镜的使用

### (1) 对光

对光前,先安上合适的目镜(一般采用 $10\times$ 目镜),将 $10\times$ 、 $40\times$ 、 $100\times$ 物镜按照顺时针安在物镜转换器上,逆时针转动转换器使 $10\times$ 物镜对准载物台中央的透光孔。从目镜中观察,同时调节反光镜或接通电源,直至视场明亮、均匀为止。

使用双目显微镜对双目镜宽度要进行调节,用推或拉的方法调节两目镜之间的距离,直到在两个目镜上双眼同时观察时,两个图形的视场正好完全重合,此时镜筒刻度盘上所示的数字,就是观察者两眼瞳孔之间的距离。根据物镜的放大倍数调节聚光镜的高度,使用油镜时由于放大倍数大,镜像亮度小,需要较强的照明,需要将聚光镜升至最高处。

调节可变光阑(光圈)使聚光镜的镜口率与物镜的镜口率一致,才能充分发挥物镜的分辨率,方法为:将显微镜调整到工作状态后,从目镜筒中拔出目镜,一边观察(向拔出目镜的目镜筒里看),一边缩小光阑,这时可看到缩小的光阑被物镜成的像,然后逐渐调大光阑,当光阑像的边缘与物镜透光孔黑圈的边缘一致时停止,这时的聚光镜镜口率与物镜镜口率就一致了。如显微镜可变光阑圆框上刻有表示口径的标尺,可调至物镜镜口率的 $80\%$ ,即物镜镜口率为 $0.65$ ,则可变光阑的标尺调至 $0.65\times 80\%=0.52$ 即可。

### (2) 观察

将标本放置在载物台上,使标本对准透光孔正中,下降镜筒或升高载物台,并从侧面观察,使物镜下端和标本逐渐接近,但不能碰到盖玻片。从目镜观察,用粗准焦螺旋慢慢升起镜筒和下降载物台直到看到标本为止,再调节细准焦螺旋至物像清晰。

## 3) 高倍镜的观察

在低倍镜下,找到要进一步观察的部位,移至视野中心,再上升聚光镜,逆时针转动物镜转换器换上高倍镜,合格的显微镜操作距离是由低倍镜转换到高倍镜时刚好合用的,一般稍为调节一下细准焦螺旋即可看到清晰的物像。

### 4) 油镜的观察

在高倍镜下看到标本后,把需要进一步放大的部位移至视野中心。上升镜筒或下降载物台约 $1.5\text{cm}$ 。将物镜转离光轴,在盖玻片所要观察的部位上滴一滴香柏油,把光阑升至最大。换上油镜,小心调节粗准焦螺旋,使油镜慢慢下降或慢慢上升载物台,从侧面观察油镜下端与标本之间的距离,当油镜的下端开始触及油滴时即可停止。从目镜观察,调节细准焦螺旋,直至看清标本物像。观察完毕,上升镜筒或下降载物台,将油镜转离光轴,用干的擦镜纸轻轻地吸掉油镜和盖玻片上的油,再用浸湿二甲苯的擦镜纸擦拭两三次,最后用干净的擦镜纸再擦拭两三次。

### 5) 观察后的处理工作

(1) 清洁: 显微镜上的污物(残物或灰尘), 用擦镜纸擦干净, 若擦不干净可蘸少许二甲苯进行擦拭。

(2) 显微镜各部分的放置: 擦完后, 把物镜转离光轴, 把反光镜转到与载物台垂直的方向, 以减少灰尘粘落上面, 而后罩上镜套, 小心地放回镜箱内, 保存备用。

## 4. 注意事项

(1) 取放时动作一定要轻, 切忌震动和暴力, 否则会造成光轴偏斜而影响观察, 而且光学玻璃也容易损坏。

(2) 由于物镜的螺丝口容易损伤, 安装物镜时要特别小心, 即先向左方倒转一小段, 凹凸双方吻合后再向右方旋转, 不要转的太紧, 轻轻捻到头, 再稍紧即可。

(3) 镜检标本应严格按照操作程序进行, 观察时要从低倍镜开始, 看清标本后再转用高倍镜、油镜。

(4) 使用油镜时一定要在盖玻片上滴油后才能使用。油镜使用完后, 应立即将镜头、盖玻片上的油擦干净, 否则干后不易擦去, 以致损伤镜头和标本。但应注意二甲苯用量不可过多, 否则, 物镜中的树胶溶解, 透镜歪斜甚至脱落, 盖玻片移动甚至连同标本一起融化掉。

(5) 使用时不可用手摸光学玻璃部分, 如需擦拭应严格按照光学部件擦拭办法。

(6) 使用的盖玻片和载玻片不能过厚或过薄。标准的盖玻片厚  $0.17\text{mm} \pm 0.02\text{mm}$ , 载玻片厚  $1.1\text{mm} \pm 0.04\text{mm}$ 。过厚或过薄将会影响显微镜成像及观察。

## 5. 实验报告

描绘你用显微镜所看到的细菌标本片。

## 6. 思考题

(1) 简述普通光学显微镜的构造及工作原理。

(2) 根据工作原理及使用目的不同, 显微镜可以分为哪几种?

## Experiment 2

# 实验2 细菌染色技术与形态观察

细菌个体微小,普通光学显微镜下不易直接观察,故常用染色技术使细菌细胞着色。利用单一染料对细菌进行染色,使经染色后的菌体与背景形成明显的色差,从而能更清楚地观察到其形态和结构。此法操作简便,适用于菌体一般形状和细菌排列的观察。常用碱性染料进行简单染色,这是因为在中性、碱性或弱酸性溶液中,细菌细胞通常带负电荷,而碱性染料在电离时,其分子的染色部分带正电荷,因此碱性染料的染色部分很容易与细菌结合使细菌着色。经染色后的细菌细胞与背景形成鲜明的对比,在显微镜下更易于识别。常用作简单染色的染料有美蓝、结晶紫、碱性复红等。当细菌分解糖类产酸使培养基 pH 下降时,细菌所带正电荷增加,此时可用伊红、酸性复红或刚果红等酸性染料染色。此法仅能显示细胞的外部形态,而不能辨别其内部结构。染色前必须将细胞固定,其目的有二:一是杀死细菌并使菌体粘附于玻片上;二是增加其对染料的亲和力。常用的有加热和化学固定两种方法。无论用哪种方法都应尽量使细菌维持原有的形态,防止细胞膨胀或收缩。

革兰氏染色法是细菌学中广泛使用的一种重要的鉴别染色法。1884年由丹麦医师 Gram 创立。细菌先经碱性染料结晶紫染色,再经碘液媒染(以增加染料与细胞的亲和力)后,用酒精或丙酮脱色,再用复染色剂染色。不被脱色而保持原颜色者为革兰氏阳性菌( $G^+$ );被脱色后又被染上复染剂的颜色者为革兰氏阴性菌( $G^-$ )。此法可将细菌分为两大类。革兰氏染色的机理主要是利用两类细菌的细胞壁成分和结构不同。革兰氏阴性菌的细胞壁中含有较多的类脂质,而肽聚糖的含量较少。当用乙醇或丙酮脱色时,类脂质被溶解,增加了细胞壁的通透性,使初染后的结晶紫和碘的复合物易于渗出,结果细胞被脱色,经复染后,又染上复染液的颜色。而革兰氏阳性菌的细胞壁中肽聚糖的含量多且交联度大,类脂质含量少,经乙醇或丙酮洗脱后,肽聚糖层的孔径变小,通透性降低,因此,细胞仍保留初染时的颜色。也有一些菌种革兰氏染色是可变的。

## 1. 实验目的

了解细菌单染及革兰氏染色原理,学习并掌握细菌单染和革兰氏染色方法。

## 2. 实验材料

### 1) 细菌的单染技术

- (1) 菌种: 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌;
- (2) 染色液: 石炭酸品红染色或结晶紫染色液;
- (3) 无菌水和洗瓶装蒸馏水;
- (4) 洗净的载玻片 5 片;
- (5) 显微镜、香柏油、接种环、酒精灯、擦镜纸、吸水纸、二甲苯。

### 2) 细菌的革兰氏染色技术

- (1) 菌种: 大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌;
- (2) 染液: 草酸铵结晶紫液、革兰氏碘液、95% 的酒精、复红染液;
- (3) 器皿洗净的载玻片 6 片、显微镜、酒精灯、接种环、香柏油、二甲苯、擦镜纸、吸水纸、镊子、玻璃缸、瓶装蒸馏水。

## 3. 操作方法及步骤

### 1) 细菌的单染技术

(1) 涂片: 取一片干净无油载玻片,在中央滴一滴无菌水,然后用接种环以无菌操作方法取少许培养好的大肠杆菌,放在载玻片的水滴中涂匀,注意菌量不宜过多,否则,不易看清单个菌体。

(2) 固定: 将涂好的载玻片在空气中风干或火焰上通过 3~4 次,使水分蒸发,此时细菌菌体紧贴在载玻片上。

(3) 染色: 用石炭酸品红染色或结晶紫染色液染色 30~60s,然后用洗瓶轻轻冲洗染色剂(注意不要直接冲洗染色部位),直至无多余的染液,晾干或用吸水纸从旁边吸干或用微火烘干。

(4) 用同样方法将枯草芽孢杆菌制作一张涂片。

(5) 镜检: 首先在低倍镜下找到物像,然后在涂膜中央滴一滴香柏油,换成油浸镜观察两个菌种的形态和排列。

(6) 去除油镜上的香柏油: 先用干净的擦镜纸擦 2~3 次,再换另一张擦镜纸蘸取少许二甲苯以除去残留的香柏油,最后用擦镜纸擦干。擦镜头时应顺着镜头直径方向擦,不要沿着圆周方向擦。

## 2) 细菌的革兰氏染色技术

(1) 取培养 12~24h 后的大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌分别涂片、固定。

(2) 在已经干燥、固定好的抹片上,滴加草酸铵结晶紫溶液,1~2min,水洗。

(3) 加 95% 酒精于抹片上脱色,约 0.5~1min,水洗。

(4) 加稀释的石炭酸复红(或用沙黄水溶液),复染 10~30s,水洗。

(5) 吸干或自然干燥,镜检。革兰氏阳性菌呈蓝紫色,革兰氏阴性菌呈红色。

## 4. 实验报告

(1) 绘制观察到大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的形态图,并注明放大倍数。

(2) 用文字描述两菌株的细胞形态。

## 5. 思考题

(1) 涂片在染色前为什么要先进行固定? 固定时应注意什么问题?

(2) 制片为什么要完全干燥后才能用油镜观察?

(3) 大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌,哪些属于革兰氏阴性菌? 哪些属于革兰氏阳性菌?

## Experiment 3

# 实验3 细菌生长曲线的测定

一定量的微生物,接种在适合的新鲜液体培养基中,在适宜的温度下培养,以菌数的对数作纵坐标,生长时间作横坐标,做出的曲线叫生长曲线。它反映了细菌生长繁殖,直至衰老死亡的动态变化过程。依据其生长速率的不同,可把细菌的生长曲线划分为延滞期、对数期、稳定期和衰亡期4个时期。这4个时期的长短因菌种的遗传性、接种量和培养条件的不同而有所改变。不同的微生物有不同的生长曲线,同一种微生物在不同的培养条件下,其生长曲线也不一样。因此,测定微生物的生长曲线可了解不同细菌的生长规律。

测定微生物生长曲线的方法很多,有血球计数法、平板菌落计数法、称重法、比浊法等。本实验采用比浊法测定。比浊法是用浊度计或比色计测定培养液中微生物的数量。某一波长的光线,通过浑浊的液体后,其光强度将被减弱。透射光的强度(OD)与样品液的浊度和液体的厚度相关。如果样品厚度一定,OD值与样品的浊度有关,根据此原理,可通过测定样品的OD值来代表培养液中的浊度。由于细菌悬液的浓度与浑浊度成正比,因此,可利用光电比色计测定菌悬液的光密度来推知菌液的浓度,并将所测得的光密度值(OD值)与其对应的培养时间作图,即可绘出该菌在一定条件下的生长曲线。

### 1. 实验目的

了解细菌的生长规律及形成生长曲线的基本原理,掌握用比浊法测定细菌生长曲线的方法。

### 2. 实验材料

培养18~20h的大肠杆菌培养液;盛有5mL牛肉膏蛋白胨液体培养基或葡萄糖铵盐合成培养液的大试管12支;722型或721型分光光度计;自控水浴振荡器或摇床;移液枪及灭菌枪头等。



### 3. 操作方法及步骤

(1) 菌种的培养：取大肠埃希氏菌斜面菌种 1 支，以无菌操作移取 1 环菌苔，接入牛肉膏蛋白胨培养液中，培养 12h 左右。此菌液用作测定时的“种子”培养液。

(2) 分装培养液：用无菌移液管分别移取 25mL 牛肉膏蛋白胨培养液或葡萄糖铵盐合成培养液于 4 只三角瓶中(每种培养液各 2 瓶)。

(3) 校正零点：将未接入菌种液的培养基倾倒入三角瓶的侧臂试管中，选用 640~660nm 波长在分光光度计上调节零点，以作测定时的对照。

(4) 接种：用 5mL 移液管吸取 2.5mL 大肠埃希氏菌种子培养液接入各三角瓶内，每瓶接种量为 10% 左右。

(5) 测零时的 OD 值：将刚接入 2.5mL 种子液的培养液倾倒入三角瓶的侧臂试管中，在校正好零点的分光光度计上测定 OD 值。此时的 OD 值即为接种后大肠埃希氏菌生长曲线中的零时读数(即接种量)。

(6) 振荡培养：将零时测定后的三角瓶放入自控恒温摇床上作振荡培养，温度为 37℃，振荡频率为每分钟 150 次左右。

(7) 生长量测定：在培养过程中，每隔 0.5~1h 从摇床上取下摇瓶试样，取 1mL 培养液于比色皿中，并在分光光度计上读取 OD 值。测定后迅速将测定菌液返回至三角瓶中继续 37℃ 通气培养。记录每次所得数据。在分光光度计测定中需用空白对照试管培养液来校正分光光度计的零点，以消除仪器所引入的误差。

### 4. 实验报告

(1) 将各瓶测定的数据记录在下面表格中。

		培养时间/h																		
		0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	
OD 值	天然 培养基	1																		
		2																		
	合成 培养基	1																		
		2																		

(2) 绘制生长曲线

以上述表格中的时间为横坐标，大肠埃希氏菌的 OD 值为纵坐标，在坐标纸上