

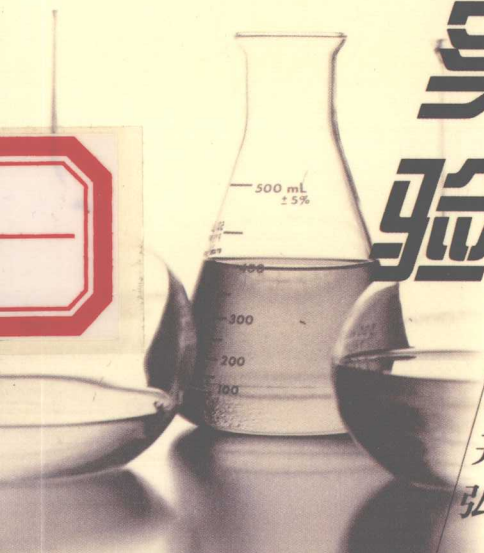
Huanjing Shengwu Jishu Shiyan

环境生物 技术 实验

周明

董金荣

赵开弘



武汉理工大学出版社

赠书

环境生物技术实验

周明 著

江苏工业学院图书馆
藏书章

武汉理工大学出版社

(封面印刷承印直印, 翻印必究)

图书在版编目(CIP)数据

环境生物技术实验/周 明,董金荣,赵开弘. —武汉:武汉理工大学出版社,2002.5

ISBN 7-5629-1798-1

I.环… II.①周… ②董… ③赵… III.环境生物技术—实验 IV.Q2

武汉理工大学出版社出版发行

(武昌珞狮路122号 邮编:430070)

荆州鸿盛印刷厂印刷

*

开本:850×1168 1/32 印张:9.75 字数:260千

2002年5月第1版 2002年5月第1次印刷

印数:1—500册 定价:26.00元

(本书如有印装质量问题,可直接向承印厂调换)

前 言

工业革命正以空前的速度推动着社会物质文明的发展,与此同时也带来了前所未有的环境污染、生态破坏和资源危机问题,并呈愈演愈烈之势,因此环境保护与可再生资源开发已经提高到事关人类社会可持续发展战略高度而备受世人关注。但是传统的环境治理与资源开发技术,已越来越难以胜任日益复杂的生态环境问题,而新兴的环境生物技术在解决复杂棘手的环境与资源问题方面表现出无比的优越性。

环境生物技术是现代生物技术,如基因工程、蛋白质工程、酶工程、细胞工程、生物代谢工程等与环境科学和技术相结合而形成的新兴综合学科,其核心指导思想是实现生物与环境的和谐共存,即将环境生物技术与其它方法相结合,在生物与环境相和谐、人与环境相统一的基础上解决环境问题。现代生物技术是一门实践性极强的学科,实验是该学科教学中不可缺少的重要一环。环境生物技术实验是通过实验操作以及教师提纲挈领讲解实验原理,使学生在掌握现代环境生物实验技术的基础上,拓展视野,启迪思维。

环境生物技术是现代生物技术、环境科学、环境工程等形成的交叉学科,鉴于环境生物技术在解决环境问题中的重要地位,现在该学科日益引起人们的重视。根据近年来华中科技大学环境科学与工程学院招收研究生的情况,大多数研究生在环境生物技术方面的专业训练有所欠缺,所以必须加强这方面的训练。教学实践证明,在导师指导的基础上,通过系统的专业理论学习与实验训练,在短时间内是能够切实掌握环境生物技术实验方法的。遗憾

的是,目前国内尚缺少系统阐述现代环境生物技术实验方法的令人满意的教材。基于上述原因,我们编写了《环境生物技术实验》一书。

言 前

本书分六章。即:第一章 环境生物技术基础实验;第二章 环境污染治理生物技术;第三章 环境基因工程;第四章 环境污染和毒理的生物检测;第五章 环境生物监测自动化技术;第六章 废物资源化与清洁生产生物技术。每章实验编排从浅到深,从简单到复杂,尽可能包括环境生物技术的重要方面以及该学科的最基本及最新技术方法。每个实验用稍长的篇幅讲解实验原理,以便学生把实验和理论知识结合起来学习和掌握,这有利于他们系统掌握环境生物技术的实验技术,并能把所掌握的技术方法用以解决实际环境问题。本书以主要篇幅阐述现代生物技术,如基因工程、蛋白质工程、酶工程、细胞工程、生物代谢工程等,在环境科学和工程中的应用和发展,并兼及描述相关的其它现代新技术,如现代分析检测技术、现代化学技术、现代物理技术等与环境生物技术的结合与相互补充。总之,本书力求内容新颖、覆盖面广、概念清晰、逻辑严密、深入浅出、操作性强,以实验的方式反映现代环境生物技术的总体面貌、最新成就和发展方向。本书可供环境科学与工程专业和相关专业的研究生、本科生作为环境生物技术实验教材之用。

在环境生物技术实验中,涉及到物理的、化学的和生物的各种危险物品和危险实验操作,读者务必严格遵守相应的实验安全规则,以确保自身、他人和社会的安全。本书在编写过程中参考了国内外许多优秀教材,具体书目列于本书参考文献中;在每个实验中,列出了与该实验密切相关的最新科学研究论文,以便读者查阅。对于上述所参考的文献资料,在此向其作者谨致谢忱。此外,在附录六列出了环境生物技术有关的重要基本英文单词,这两方面的目的:一是要求学生掌握这些

基本词汇,从而有利于他们查阅相关文献,特别是英文文献;二是有不少专业词汇还没有统一,同时给出这些词汇的中英文,有助于读者更准确地把握这些词汇的含义。

由于编者水平有限,书中不足之处在所难免,恳望读者批评指正。来信请寄:武汉(邮编:430074) 华中科技大学环境科学与工程学院,周明老师收。

周 明 董金荣 赵开弘

2002年1月

于喻家山

目 录

第一章 环境生物技术基础实验	(1)
实验 1-1 常规培养基的配制和普通细菌接种与培养	(1)
实验 1-2 环境中微生物的形态观察	(8)
实验 1-3 微生物数量的测定	(15)
实验 1-4 细菌菌落总数(CFU)的测定	(23)
实验 1-5 大肠菌群数的测定	(26)
实验 1-6 土壤中四大类微生物的分离与纯化	(33)
实验 1-7 化能自养菌的分离与纯化	(43)
实验 1-8 非放氧光合细菌的分离与纯化	(49)
实验 1-9 厌氧微生物的培养	(55)
实验 1-10 产甲烷菌的分离纯化	(60)
第二章 环境污染治理生物技术	(68)
实验 2-1 苯酚降解菌的选育	(69)
实验 2-2 高效原油降解菌的选育	(75)
实验 2-3 有机氯农药降解菌的筛选	(82)
实验 2-4 有机磷农药的生物降解	(89)
实验 2-5 垃圾堆肥中纤维素分解菌的分离	(94)
实验 2-6 生物降解塑料的生物降解实验	(100)
实验 2-7 光合细菌净化高浓度有机废水	(104)
实验 2-8 污水生物处理的模型实验	(109)

第三章 环境基因工程	(115)
实验 3-1 质粒提取	(116)
实验 3-2 PCR 技术	(123)
实验 3-3 基因克隆	(130)
实验 3-4 环境基因芯片	(138)
实验 3-5 原生质体融合法构建有机氯高效降解工程菌	(142)
实验 3-6 全 DNA 转化法构建多功能石油降解工程菌	(150)
第四章 环境污染和毒理的生物检测	(159)
实验 4-1 鱼类毒性试验	(161)
实验 4-2 艾姆氏(Ames)试验	(166)
实验 4-3 发光细菌的微毒检测	(173)
实验 4-4 藻类毒性试验	(179)
实验 4-5 枯草杆菌重组修复试验	(184)
实验 4-6 微囊藻毒素的酶联免疫吸附测定(ELISA)	(191)
第五章 环境生物监测自动化技术	(198)
实验 5-1 湖泊富营养化程度的监测(叶绿素 a 法)	(199)
实验 5-2 细菌的裂解气相色谱鉴定	(204)
实验 5-3 环境生物传感器测定 BOD	(208)
实验 5-4 伏安型生物传感器测定细菌总数	(211)
实验 5-5 多项微生物简易鉴别技术	(214)
第六章 废物资源化和清洁生产生物技术	(219)
实验 6-1 沼气发酵	(220)

实验 6-2	酒精废水用于单细胞蛋白制备	(225)
实验 6-3	生物合成聚- β -羟基烷酸(PHAs).....	(229)
实验 6-4	微生物杀虫毒素的分离、纯化和生物测定	(237)
实验 6-5	微生物制氢	(242)
附录:		
附录一	环境检测样品的采集.....	(253)
附录二	环境生物技术实验所用培养基.....	(257)
附录三	环境生物技术实验所用特殊溶液和试剂.....	(273)
附录四	常用环境指标的测定方法.....	(274)
附录五	大肠菌群检验表(MPN 法)	(291)
附录六	环境生物技术实验中英文词汇.....	(294)
参考文献	(300)

第一章 环境生物技术基础实验

基因工程、蛋白质(酶)工程、细胞工程和代谢工程等生物技术
 在环境领域已得到日益重视和发展,其中基因工程是这些生物技
 术的基础。环境生物技术多种多样,但如何培养生物物种特别是
 微生物是研究和应用环境生物技术的基础。因此,本章从最基本
 的如何配制培养基和如何使用培养基培养微生物开始。

实验 1-1 常规培养基的配制和普通

细菌接种与培养

一、目的要求

- (一)掌握常规培养基的配制。
- (二)了解培养基配制过程各环节的要求和注意事项。
- (三)掌握高压蒸汽灭菌技术。
- (四)掌握普通微生物接种与培养。

二、基本原理

正确掌握培养基的配制是从事环境生物技术工作的重要基
 础。培养基由所培养生物体生长所需营养成分与基质(如水、琼脂
 等)按特定比例组成。由于生物种类和代谢类型的多样性,每种生
 物体生长所需营养成分不一样,所以用于培养生物所需的培养基
 种类也很多。尽管各种培养基配方和配制方法各有差异,但一般
 培养基的配制程序却大致相同,例如器皿的准备、培养基的配制与
 分装、棉塞的制作、培养基的灭菌、斜面与平板(plates)的制作和培
 养基的无菌检查等大致相同。

使用培养基培养生物的目的是分离提纯、培养和保存所培养的生物物种,这就要求培养基既要具有培养物正常生长繁殖所需组分,同时要求培养基中不存在其它活的生物体。因此,培养基配好后,一定要杀死其中的生物体,最常用的方法是高压蒸汽灭菌 (autoclaving)和超微过滤 (ultrafiltration)除菌。对于耐高温高压稳定性强的物质都可以采用高温蒸汽技术杀死其中活生物体,而对于不耐高温高压、稳定性不高的物质,采用超微过滤除菌技术。

三、试剂与器材

(一) 药品
待配各种培养基的组成成分、生物体所需营养成分、蒸馏水、琼脂、1mol/L NaOH 溶液、1mol/L HCl 溶液。

(二) 仪器

天平、pH 计(或用 pH 试纸代替)、磁力搅拌器、高压蒸汽灭菌锅。

(三) 玻璃器皿

移液管、试管、烧杯、量筒、锥形瓶、培养皿、玻璃漏斗等。

(四) 其它物品

药匙、称量纸、pH 试纸、滤纸、记号笔、棉花、纱布、线绳、塑料试管盖、牛皮纸、报纸等。在条件好时,可以使用一次性锡纸代替报纸。

四、实验内容

(一) 玻璃器皿的洗涤和包装

1. 玻璃器皿的洗涤

玻璃器皿在使用前必须洗刷干净。将锥形瓶、试管、培养皿、量筒等浸入含有洗涤剂的水中,用毛刷清洗,然后用自来水和蒸馏水冲净。移液管先用含有洗涤剂的水浸泡,再用自来水和蒸馏水冲洗。洗刷干净的玻璃器皿置于烘箱中烘干后备用。在条件好时,可使用一次性器皿(比如塑料培养皿),这些器皿开封前是密封

包装,完全达到实验要求,不需要洗涤、干燥等处理。

2. 灭菌前玻璃器皿的包装

(1)培养皿的包装:培养皿由一盖一底组成一套。可用报纸或一次性锡纸将几套培养皿包成一包,或者将几套培养皿直接置于特制的不锈钢圆筒内,加盖灭菌。包装后的培养皿须经灭菌之后才能使用。使用一次性塑料培养皿时,不需要该步骤。

(2)移液管的包装:在移液管的上端塞入一小段棉花(勿用脱脂棉),它的作用是避免外界及口中杂菌吹入管内,并防止菌液等吸入口中。塞入的此小段棉花应距管口约0.5cm左右,棉花自身长度约1~1.5cm。塞棉花时,可用一外圈拉直的曲别针,将少许棉花塞入管口内,棉花要塞得松紧适中,以吹时能通气而又不使棉花滑下为准。使用一次性移液管时,移液管内已配有适当的滤芯,不需要该步骤。

将报纸(或一次性锡纸)裁成宽约5cm左右的长纸条,把已塞好棉花的移液管尖端放在长条报纸的一端,约成45°角,折叠纸条包住尖端。用左手握住移液管身,右手将移液管压紧,在桌面上向前搓转,以螺旋式包扎起来,上端剩余纸条用来折叠打结。也可以将移液管直接置于特制的不锈钢圆筒内,加盖灭菌。

(二)培养基的配制

1. 液体培养基配制

(1)称量:按培养基配方计算各成分的用量,然后用天平称量配制培养基所需的各种固体药品。

(2)溶化:将称好的药品置于烧杯中,先加入适量水(根据实验需要可用自来水),用玻璃棒搅动溶解,也可以用磁力搅拌器搅拌。

(3)定容:等全部药品溶解后,加水至所需体积。如某种药品用量太少时,如微量元素(trace element),可预先配制较浓的母液,然后按比例吸取一定体积溶液,加入至培养基中。

(4)调pH:一般用pH试纸测定培养基的pH,也可以用pH计。

如果培养基偏酸,用 1mol/L NaOH 调节,如果培养基偏碱,用 1mol/L HCl 溶液调节。调节 pH 时,要逐渐加入 NaOH 或 HCl 溶液,边加边搅拌,并及时检测 pH,直到所需 pH 为止。

(5) 过滤:用滤纸或多层纱布过滤培养基。一般无特殊要求时,可省略此步骤。

2. 固体培养基的配制

配制固体培养基时,先配好相应的液体培养基,然后加入适量的琼脂(agar)(如按琼脂质量百分比浓度 $1\% \sim 1.5\%$ 添加),用玻璃棒搅拌混匀,灭菌。

培养基配好后,要马上灭菌,否则会生长微生物,消耗培养基。有些营养成分如维生素、抗生素等,要等到培养基冷到适当温度时,在无菌条件下加入,否则会因温度高破坏这些活性成分。

(三) 培养基的分装

根据不同需要,可将已配好的培养基分装入试管或锥形瓶内。

1. 培养基分装于试管

用移液管取适量的培养基转移到各试管中。装入试管培养基的量依目的而定,一般液体培养基可分装至试管体积的 $1/4$ 左右。对于从大肠杆菌提取质粒的实验,可以把液体培养基等分分装于 $1.5 \sim 2\text{mL}$ 的一次性小塑料离心管中,在接种了细菌后,盖好这些小塑料离心管,置于锥形瓶中摇荡,以培养这些细菌。分装固体或半固体培养基时,对于琼脂培养基,水浴加热至琼脂全部融化,在不少实验室,加热用微波炉完成。在琼脂完全融化后,应趁热(约 45°C 时)分装于试管中。一般用于制作斜面的固体培养基分装量为试管体积的 $1/5$,半固体培养基分装量为试管体积的 $1/3$ 。

2. 培养基分装于锥形瓶

用于摇荡培养微生物用时,一般在锥形瓶中加入 $1/5$ 体积的液体培养基。用于制作平板培养基用时,在 250mL 锥形瓶中加入 150mL 培养基,然后再加入 2.2g 琼脂粉(按质量百分比 1.5% 计

算)。灭菌时琼脂粉被融化,灭菌后琼脂培养基适当冷却,趁热(约45℃时)分装于需要的容器(如培养皿)。

(四)棉塞的制作及试管、锥形瓶的包扎

为了培养好气性微生物,需提供优良的通气条件,同时为防止其它微生物污染,应该让进入试管或锥形瓶内的空气通过一道过滤屏障,通常方法是在试管及锥形瓶口加上棉塞等。当用一次性锡纸时,由于锡纸具有良好的成形性,所以用二层锡纸包住瓶口(或管口)即可。

1. 试管棉塞制作

制作棉塞时,取适当大小的纱布铺展于左手拇指和食指扣成的圆孔上,把适量普通棉花置于纱布上,用右手食指将棉花从中央压入圆孔中制成棉塞。制作的棉塞应紧贴管壁,不留缝隙,以防外界微生物沿缝隙侵入。棉塞不宜过紧或过松,棉塞的2/3在试管内,1/3在试管外。目前也有采用金属或塑料试管帽代替棉塞,使用时盖在试管口上即可。

将装好培养基并塞好棉塞或盖好试管帽的试管捆成一捆,外面包上一层牛皮纸。用铅笔注明培养基名称及配制日期,灭菌待用。现在已有一种带灭菌标示的纸胶带,用来把这些试管捆好,灭菌后纸条上出现黑色斜条,表示已灭好菌。

2. 锥形瓶棉塞制作

锥形瓶棉塞制作与试管棉塞制作相同。有时为了使液体振荡培养通气量更大,可用八层纱布代替棉塞包在瓶口上。目前也有采用无菌培养容器封口膜直接盖在瓶口上,这样既能保证良好通气状况,又能阻止微生物进入。在装好培养基并塞好棉塞或包上八层纱布后,包上一层牛皮纸并用线绳捆好,灭菌待用。

(五)培养基灭菌

1. 灭菌原理及方法

一般实验室采用高压蒸汽灭菌法。这时湿热水蒸汽穿透能力

和热传导能力比干热强,湿热时微生物吸收高温水分,菌体蛋白很容易凝固变性,所以湿热灭菌效果好。湿热灭菌一般在 121°C , 灭菌 $15 \sim 30\text{min}$ 。干热灭菌温度在 160°C , 灭菌 2h , 才能达到 121°C 湿热灭菌 20min 的同样效果。

高压蒸汽灭菌使用高压蒸汽灭菌锅。环境生物技术实验所用的一切玻璃器皿、耐高温的培养基或耐高温的培养基组分等都可用该方法灭菌。高压蒸汽灭菌锅是能耐受一定压力的密闭金属锅,有立式和卧式两种。现在已有程序控制的自动化高温蒸汽灭菌锅,灭菌前注意先向锅内加入适量水,按下开始按钮,以下所有过程自动控制进行。

2. 灭菌过程

(1)加水:灭菌前必须检查锅中水是否适量,如果水没有到标示线,加入适量蒸馏水。加水步骤非常重要,如果锅中水太少而使用灭菌锅,会烧坏灭菌锅,严重时会造成事故。

(2)装锅:把需灭菌的器物放入锅内,锅中器物不要装得太满,否则灭菌将不彻底。关严锅盖,按对角方式均匀拧紧螺旋,打开排气阀。

(3)启动:用电源的则启动开关。热源为蒸汽的则慢慢打开蒸汽口,应避免蒸汽进入过猛。

(4)关闭排气阀:锅内水沸腾后,产生的蒸汽将锅内冷空气驱净,当温度计指针指向 100°C 时,锅内已充满蒸汽,这时关闭排气阀。

(5)升压、升温:关闭排气阀以后,锅内成为密闭系统,蒸汽不断增多,锅中压力和温度上升。当压力达到 0.105MPa (此时温度为 121°C) 时,灭菌开始。维持压力在 0.105MPa 共 $15 \sim 30\text{min}$, 以保证灭菌彻底。除含糖培养基用 0.056MPa (112°C) 压力灭菌外,一般用 0.105MPa 压力灭菌。

(6)灭菌停止:当灭菌完成后,停止加热,任其自然降压,当指

针回到零时,打开排气阀。特别注意的是,排气阀不能过早打开,否则因压力突然下降,温度还没有及时下降,培养基会沸腾,从而有可能损失培养基,并玷污棉塞、器皿、灭菌锅等。

(7)保存:培养基冷却后,放入冰箱或阴凉处保存备用。

湿热灭菌除高压蒸汽灭菌外,还可以在常压下灭菌,即间歇灭菌,该方法适用于某些易受高温破坏培养基的灭菌。间歇灭菌一般在 100°C 煮 $30 \sim 60\text{min}$ 后冷却,置于 37°C 培养 24h ,重复三次。为确保无菌, 37°C 培养 24h 后,检查是否已灭菌彻底。

(六)斜面和平板的制作

1. 斜面的制作

将已灭菌装有琼脂培养基的试管,趁热按适当角度置于木棒上,凝固后即成斜面。斜面长度以不超过试管长度 $1/2$ 为宜。如果制作半固体或固体深层培养基,则灭菌后趁热垂直放置,冷却凝固后保存。

2. 平板的制作

将锥形瓶中灭菌的琼脂培养基适当冷却,约冷至 45°C ,在无菌操作下,加入所需抗生素和(或)维生素,摇匀。倒平板时左手大拇指将培养皿盖打开一缝,瓶口正好伸入,倒入适量培养基于无菌培养皿中。然后迅速盖好皿盖,置于桌上,轻轻旋转平皿,使培养基均匀分布于整个平皿中,冷凝后即成平板。这里必须控制好温度,温度过高时,会破坏加入的抗生素和(或)维生素,也会造成皿盖上的冷凝水太多;温度过低,培养基会凝固而无法制作平板。

(七)培养基的无菌检查

灭菌后的培养基,一般需进行无菌检查,确定无菌后方可使用。现在已有一种带灭菌标示的纸胶带,取一小段贴在盛培养基的器皿外壁,灭菌后该纸条出现黑色斜条,表示已灭好菌。

(八)无菌水的制备

在锥形瓶中装入 $1/3$ 体积的蒸馏水,塞上棉塞,或用二层锡纸

包好瓶口。或者在每支试管内装入 1/3 体积蒸馏水,塞上棉塞,或盖上塑料试管盖,再在棉塞上包上一张牛皮纸。按上述高压蒸汽灭菌方法灭菌。

五、实验报告

(一) 简述配制液体培养基的简单步骤。

(二) 简述高温蒸汽灭菌过程。

(三) 简述斜面和平板培养基的制作过程。

六、思考题

(一) 配制培养基为什么要调节 pH?

(二) 制固体培养基时,需在液体培养基内加多少量的琼脂?

(三) 将含琼脂的培养基分装至试管中应如何操作? 注意事项是什么?

(四) 制作斜面培养基时,其斜面长度应相当于试管长度的多少为宜?

(五) 制作平板培养基的注意事项是什么?

(六) 培养基配制好后,为什么要马上进行高压蒸汽灭菌?

实验 1-2 环境中微生物的形态观察

一、目的要求

(一) 学习应用各种适当方法观察环境中细菌、放线菌和霉菌等微生物的形态特征,加深理论课中对微生物形态结构与功能描述的认识与理解。

(二) 掌握简单染色法、革兰氏染色法等方法的基本原理及操作步骤,通过染色法了解微生物分类的结构基础和科学意义。

(三) 掌握光学显微镜使用方法。

二、基本原理

微生物的形态观察主要包括个体形态和群体形态(菌落形态)