

微生物学 拓展性实验的 技术与方法

闫淑珍 陈双林 编著

Microbiology



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

高中数学 拓展性课程 校本与教法

——以《三角》为例



微生物学 拓展性实验的 技术与方法

闫淑珍 陈双林 编著

WEISHENGWUXUE
TUOZHANXING SHIYAN DE
JISHU YU FANGFA

国家理科基础科学人才培养基金（J1103507）资助
江苏高校优势学科建设工程项目资助

内容提要

本书是作者在“微生物技术综合实验”课程教学内容和教学经验基础上总结编写而成。在学生已经掌握和具备微生物学基本实验技能的基础上,培养学生综合运用实验技术能力和科研创新能力。

本书着重在反映微生物学综合性实验的先进性、启发性和应用性等方面进行了尝试,以微生物学实验为主线,与其他学科交叉,提供了在微生物研究工作中普遍涉及的分离和筛选、生长和代谢、遗传和育种、多样性和鉴定等方面具有代表性和系统性的实验技术。

本书共归纳为功能微生物的分离和筛选、微生物的培养和发酵、微生物的代谢产物、微生物的遗传和育种、病毒的研究和检测以及微生物菌种鉴定和多样性研究 6 章内容,设计了 55 个实验,每一实验后均附有思考题和参考文献。

本书可作为综合性大学、师范院校和其他高校的生物科学、生物技术、生物工程、环境科学以及农林类和食品工程等相关专业本科生的微生物学拓展性实验的指导教材和研究生教学的参考教材。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学拓展性实验的技术与方法 / 闫淑珍, 陈双

林编著. —北京:高等教育出版社, 2012. 2

ISBN 978 - 7 - 04 - 034483 - 7

I. ①微… II. ①闫…②陈… III. ①微生物学—实验—高等学校—教学参考资料 IV. ①Q93 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 003743 号

策划编辑 潘 超

责任编辑 高新景

封面设计 张志奇

责任印制 田 甜

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街 4 号
邮政编码 100120
印 刷 北京宏伟双华印刷有限公司
开 本 787 × 1092 1/16
印 张 12
字 数 280 000
购书热线 010 - 58581118

咨询电话 400 - 810 - 0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landracom.com>
<http://www.landracom.com.cn>
版 次 2012 年 2 月第 1 版
印 次 2012 年 2 月第 1 次印刷
定 价 21.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换

版权所有 侵权必究

物 料 号 34483 - 00

前言

微生物学是现代生命科学的支柱学科之一,微生物学实验方法和技术对于现代生命科学非常重要。一方面,直接以微生物作为研究或者利用对象的工作,不论是以微生物为材料还是以微生物为模式生物,都必然要具备微生物学实验和研究能力;另一方面,微生物学技术具有广泛的应用性,正如周德庆教授(2002)所指出的“微生物学实验室使用的一整套独特研究方法、技术,急剧向生命科学和生物工程各领域发生横向扩散,从而对整个生命科学的发展,作出了方法学上的贡献”。因此,微生物学实验技术对于生物学相关专业的学生培养具有特别重要的意义。

我们从2000年开始为南京师范大学生物学国家理科基础人才培养“基地班”开设“微生物技术综合实验”课程,至今已经超过十年。从最初的探索到现在已经形成了完整的教学体系,使“基地班”学生的实验能力和科研能力得到了提升,取得了良好的效果,受到了广泛的赞誉。为了推广我们的教学模式和经验,我们抛砖引玉,对该课程的教学内容进行了系统的总结,编著成本教材,希望能够为有关专业的实践教学和人才培养提供帮助和借鉴,使更多的学生从中受益。本书可作为综合性大学、师范院校和其他高校的生物科学、生物技术、生物工程、环境科学以及农林类和食品工程等相关专业本科生的微生物学拓展性实验的指导教材和研究生教学的参考教材,用于在学生已经掌握微生物学基本理论和微生物学基本实验技能的基础上,拓展性地进行综合性和设计性实验。

本教材编写的宗旨是:实用性、综合性、提高性和先进性。“实用性”就是要使实验内容具有可操作性,避免购买特殊和昂贵的仪器和材料,就地取材、联系实际,实现教学目的。“综合性”就是要使每个实验都将要求学生综合运用多种微生物学基本技能,从而使这些知识得到融会贯通,同时要使学生根据研究目的选择每章的相应内容进行整合,设计成为一个系统的大实验。“提高性”就是每一实验小组所设计的大实验实际就接近一个小的科研项目,而不再是前面基础实验技能的再训练,学生在实验中通过思考、设计、实施、分析和讨论,培养和树立科研能力与创新能力。“先进性”就是要使实验内容与其他学科交叉,要运用新的技术方法,例如,微生物的鉴定不仅要进行表观特征研究,还要进行分子特征的研究。

本教材共设计了55个实验内容,总结成6章。第一章为功能微生物的分离和筛选实验;第二章为微生物的培养和发酵实验;第三章为微生物的代谢产物研究实验;第四章为微生物的遗传和育种实验;第五章为病毒的研究和检测实验;第六章为微生物菌种鉴定和多样性研究实验。我们在实际教学工作中针对不同年级和不同实验小组的教学内容是不完全一致的,主要是根据学科发展的实际选择各章相应的代表性

实验。建议使用本教材时一方面可根据不同的授课需要把学生分成若干个实验小组,每个实验小组根据兴趣选择各章中相应的实验科目,设计成一个系统性的综合性大实验;另一方面也可根据具体学时、师生情况和各自学科的特点选择开展教学工作,但都应涉及所有的章为宜。各章之间的知识是上下关联、前后呼应的,可以组合成若干个大实验,供不同的单位根据实际情况选用。

由于所有的实验内容都是在微生物学基础实验上的拓展,因此每个实验内容后都给出了实验的预期结果和参考文献,供分析和讨论之用。每个实验内容后还给出了思考题,希望对于这些实验技术在相关研究工作中的进一步应用和拓展起到启示作用。

感谢高等教育出版社吴雪梅、潘超和高新景等同志对本书的出版所给予的鼎力支持和付出的辛勤劳动。

本书主要是根据我们自己所熟悉的研究工作探索实施的教学内容,受我们的知识范围和水平所限,难免存在缺点与错误,敬希专家和读者提出宝贵意见。

编者
2011. 10

目 录

第一章 功能微生物的分离和筛选实验	1
实验一 酸乳制品中乳酸细菌的分离和菌株纯化	2
实验二 环境中产纤维素分解酶细菌的筛选	5
实验三 苯酚降解菌的富集筛选	8
实验四 西瓜枯萎病原真菌的分离和回接	12
实验五 西瓜枯萎病菌的植物根际拮抗放线菌筛选及产抗生素菌株的测定	15
实验六 植物内生细菌的分离和定殖实验	18
实验七 水体中富集重金属铬的酵母菌株筛选	21
实验八 高产谷胱甘肽酵母菌种的筛选	24
实验九 利用纸层析法筛选高产 L-谷氨酸生产菌种	27
实验十 红曲霉菌株的分离和初步鉴定	29
第二章 微生物的培养和发酵实验	31
实验一 细菌、放线菌和真菌生长量的测定	32
实验二 细菌生长对数期和生长曲线的测定	35
实验三 微生物对酚类衍生物的营养利用测定(生长谱法)	38
实验四 放线菌产抗生素发酵条件优化研究(正交实验)	40
实验五 采用乳酸杆菌和乳酸链球菌生产酸奶	44
实验六 酵母菌株富集铬离子环境影响因素的测定	47
实验七 酵母发酵生产谷胱甘肽的培养基优化	50
实验八 采用发酵罐补料法扩大生产谷胱甘肽的技术	54
实验九 L-谷氨酸生产菌培养基最优配比设计实验	57
实验十 红曲霉菌种的固体发酵生产红曲	60
第三章 微生物的代谢产物研究实验	63
实验一 乳酸细菌产乳酸和乳酸菌素的测定	64
实验二 微生物产纤维素酶酶活的测定	67
实验三 真菌产黄曲霉毒素的测定(HPLC法)	71
实验四 放线菌产抗真菌抗生素粗提物的制备和最低抑制浓度的测定	74
实验五 细菌降解苯酚活性的测定	76
实验六 酵母菌对水体中重金属铬富集活性的测定	79

实验七 酵母菌发酵生产谷胱甘肽含量的测定	81
实验八 红曲霉液态发酵生产色素的分析和测定	84
实验九 红曲霉产生的 Monacolin K 的测定	86
实验十 红曲霉产麦角固醇的研究	89
第四章 微生物的遗传和育种实验	93
实验一 细菌的绿色荧光蛋白标记实验	94
实验二 细菌的抗利福平标记实验(化学诱变)	98
实验三 抗生素产生菌的诱变育种(紫外诱变)	101
实验四 富集铬酵母菌株的固定化和应用	104
实验五 酵母双杂交系统的应用	107
实验六 红曲霉和土曲霉属间原生质体融合	115
实验七 农杆菌介导的红曲霉遗传转化体系的建立和优化	118
实验八 转座子标签法突变苯酚降解细菌菌株	122
第五章 病毒的研究和检测实验	125
实验一 环境中细菌噬菌体的筛选和纯化	126
实验二 大肠杆菌噬菌体效价的测定	128
实验三 植物病毒(TMV 或 CMV)的单斑分离和接种	130
实验四 植物病毒的提取和电镜观察	133
实验五 鸡新城疫病毒的分离和鸡胚培养	135
实验六 鸡新城疫病毒 HN 蛋白球状头部在 T4 噬菌体衣壳表面的展示	138
实验七 运用噬菌体展示随机肽库筛选与内毒素结合的高亲和性多肽	142
实验八 植物病毒(TMV 或 CMV) RT-PCR 检测	146
第六章 微生物菌种鉴定和多样性研究实验	149
实验一 尖孢镰刀菌的鉴定	150
实验二 酵母菌的快速鉴定	153
实验三 放线菌的纯化和形态鉴定	156
实验四 放线菌细胞化学成分的分析	158
实验五 高效液相层析法测定放线菌 DNA(G + C) mol%	162
实验六 细菌的 Biolog 鉴定和 16S rDNA 分子鉴定	165
实验七 以 RAPD 分子标记分析不同地区尖孢镰刀菌分离株的 遗传多样性	168
实验八 应用 PCR-DGGE 分析土壤微生物的多样性	173
实验九 小单胞菌属探针设计和荧光原位杂交的应用	178

第一章

功能微生物的分离和筛选实验

在自然界中微生物是所有生物类群中物质资源最丰富的,根据实验的目的不同可以用不同的方法获得所需的微生物种类。得到微生物的目的可以概括为两个方面:一方面是为了认识和了解某种微生物而获得目标微生物,如病原微生物的分离,它的目标是获得特定的微生物种类,这种特定微生物种类的获得方法叫分离;另一方面是为了得到有特殊功能的微生物菌种,如拮抗微生物或者各种酶活微生物及产各种代谢产物的微生物菌种等,目标是得到具有某种功能的微生物(微生物的种类是不确定的),这种以特定功能为目标的微生物的获得方法叫筛选。上述两方面由于获得微生物的目的不同,所以获得方法也不同。根据这两方面微生物的获得目的,本章在众多的分离和筛选方法上挑选了部分实验内容来实践。

实验一 酸乳制品中乳酸细菌的分离和菌株纯化

【实验原理】

乳酸细菌(lactic acid bacteria)是指一群利用糖类发酵产生大量乳酸、乙醇及挥发性有机酸的一类细菌总称,从形态上可分为球菌和杆菌,并且均为革兰氏染色阳性、在缺少氧气的环境中生长良好的兼性厌氧或厌氧细菌。这一类细菌在自然界分布极广,并且在食品工业、农业和医药等与人类密切相关的领域里应用价值很高。目前,对乳酸细菌的应用研究,着重于食品(如:发酵乳制品、发酵肉制品和泡菜等)和医药工业等与人类生活密切相关的领域。在这方面,乳酸细菌的保健胃肠道功能、降低血清胆固醇和增强免疫力等一系列的有效生理保健作用被充分利用,并且逐渐被广大消费者所认识。

在我国市场上,生产销售的各类酸奶制品中,作为发酵剂使用的乳酸细菌,通常为保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)两种菌株。乳酸细菌在乳中发酵,使蛋白质、脂肪、乳糖等降解,直接提高乳的营养价值和适口性。酸乳发酵剂一般以保加利亚乳杆菌与嗜热链球菌按比例混合,其数量、形态及特性与酸乳产品质量的优劣有着直接联系。因各地不同厂家应用的菌种来源不同,其发酵特性、产品的组织状态和风味则各不相同。因此,对酸乳中乳酸细菌的分离及检测其发酵性能,对于保持产品质量,开发新产品以及更新和复壮优良菌株等具有一定的现实意义。

【实验目的】

1. 掌握乳酸细菌的分离方法和纯化方法。
2. 了解乳酸细菌的用途和种类。

【材料和方法】

1. 样品
市售酸乳。
2. 培养基

(1) 分离用培养基:选用改良 BCP 培养基(酵母膏 25 g,蛋白胨 5 g,葡萄糖 5 g,1% CaCO_3 , CaCO_3 单独灭菌后加入,琼脂 15 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.0),121℃灭菌 15 min,备用。

(2) 液体培养基:MRS 培养基(蛋白胨 10.00 g,牛肉膏 10.00 g,酵母膏 5.00 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2.00 g,乙酸钠 5.00 g,葡萄糖 20.00 g,Tween-80 1.00 g,柠檬酸二铵 2.00 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.58 g,

MnSO₄ · 4H₂O 0.25 g, 蒸馏水 1 000 mL), 用于纯菌株增殖培养。调 pH 至 7.0 和 5.5, 分别培养乳酸球菌和乳酸杆菌。

(3) 酸乳发酵培养基: MRS 培养基按 12% 比例, 将脱脂乳(新鲜牛乳离心去掉上层乳脂)加入蒸馏水中, 搅匀, 分装, 105 ℃ 灭菌 20 min, 冷却后即制成脱脂乳培养基, 供活化菌株、测试发酵性能使用。

3. 无氧装置

用于厌氧培养。在干燥器中按 100 mL 体积加 1 g 焦性没食子酸的比例, 加入适量 2.5 mol/L 氢氧化钠溶液, 使其接触发生吸氧反应。同时放入事先准备好的厌氧度指示剂(刃天青等), 若指示剂无色, 则表示为厌氧状态。

4. 实验步骤

(1) 乳酸菌的分离及纯化培养: 首先, 将酸牛奶样品进行涂片、美兰染色镜检观察, 确定样品中发酵剂菌种的菌体形态。然后, 用接种环沾取样品划线接种于改良 BCP 培养基(或在稀释分离时, 每个稀释度至少接种 4 个平板)。置于 37 ℃, 厌氧培养 24 h, 挑取生长的疑似菌落(菌落周围有透明圈, 是溶解培养基中 CaCO₃ 的现象), 制片做革兰氏染色, 观察菌体的显微形态。转接斜面的菌种在改良 BCP 培养基划线纯化 2~3 次, 接种于脱脂乳培养基中, 置于 37 ℃, 培养 36 h, 凝乳后确定为乳酸细菌。再按上述方法提纯分离培养, 得到分离株纯培养物。将这些分离株接种于脱脂乳培养基中, 传代培养保存或接种 MRS 琼脂培养基中保存。

(2) 凝乳试验: 将分离纯化的每个菌株接种到 10 mL 的脱脂乳培养中, 置于 37 ℃ 培养 36 h, 再以 10% 的接种量接种到消毒牛奶中做单菌株的发酵试验和双菌株的混合发酵试验, 将分离株以不同的比例配对, 接种到经 95 ℃ 水浴 5~10 min 杀菌、冷却至 45 ℃ 以下的牛奶中, 置 43 ℃ 发酵, 待酸度达 pH 4~5 时, 停止发酵, 冷却到 5 ℃ 以下, 再进行检测。观察每株菌的凝乳状态, 并品尝和评价双菌株组合的效果。

(3) 乳酸菌复筛: 对初筛菌株进行革兰氏染色, 保留革兰氏阳性菌株, 并对其产乳酸能力进行定性、定量分析(乳酸的测定方法见第三章实验一), 筛选出高产乳酸的菌株保存, 经脱脂乳培养基的凝乳试验进一步选择产酸高、口味纯正的菌株保存于 MRS 斜面中, 用于鉴定。

(4) 菌株活力的测定

① 酸度测定法: 在 9 mL 灭菌脱脂乳中接种菌悬液 1 mL(菌悬液是每只试管加无菌水 10 mL, 振荡均匀), 在适宜温度下(37~42 ℃)培养 2~3 h, pH ≤ 5 为活力较好菌株。

② 刃天青还原法: 将 1 mL 菌悬液加入 9 mL 灭菌脱脂乳中, 并加 0.005% 刃天青溶液 1 mL, 36.7 ℃ 保温 30 min 后开始检查, 其后每 5 min 观察一次结果, 淡粉红色为终点。活力好的菌株应在 35 min 内还原刃天青。50~60 min 还原的菌株不宜使用, 对照的不接种菌悬液空白灭菌脱脂乳的还原时间不应少于 4 h。

【预期结果】

描述分离的乳酸细菌菌株的培养特征, 菌落形态及菌体的显微形态, 菌体大小。评价每个菌株在脱脂乳培养基的凝乳试验中的凝乳状况、状态及风味。

【思考题】

1. 乳酸细菌分离有何重要意义？工业发酵中主要应用到哪些菌种类型？
2. 比较试验中采用的培养基的优缺点？列举出在分离各种乳酸细菌的试验中采用的各种培养基及生产中应用的培养基类型。
3. 发酵剂是如何组成的？如何筛选出优良的发酵剂？

【参考文献】

- [1] 孟和毕力格,李少英,双杰. 酸奶制品中乳酸菌的分离鉴定与发酵性能的研究[J]. 中国乳业,2001,10:15~16.
- [2] 周家春. 乳酸菌菌种的简便分离和培养[J]. 食品科学,1998,217(19):39~41.
- [3] 李青青,陈启和,何国庆. 我国传统食品中乳酸菌资源的开发[J]. 食品科学,2009,30(23):516~520.
- [4] 李艾黎,高学军,刘丽波. 酸奶菌株分批发酵放大研究——从2.5 L到15 L发酵罐[J]. 食品科学,2009,30(11):147~150.

实验二 环境中产纤维素分解酶细菌的筛选

【实验原理】

纤维素是植物细胞壁的主要成分,是地球上最大的可再生性有机资源和最丰富的多糖物质。我国每年有 10 亿吨纤维素物质产生(包括秸秆、林业采伐剩余物等),目前利用率还很低,除一小部分用于纺织、造纸、饲料和燃料加工外,大部分作为废弃物被丢弃,不但带来了严重的环境问题,也浪费了宝贵的物质资源。

纤维素酶是使纤维素分解生成葡萄糖的一组酶的总称,其最大的潜在用途是把纤维类物质酶法水解成葡萄糖等大分子物质。纤维素酶的生产菌株和酶活的研究报道,主要以木霉属(*Trichoderma*)和曲霉属(*Aspergillus*)为最多。但环境中产纤维素酶的微生物种类很多,除真菌外,细菌和放线菌中也有许多产不同种类的纤维素酶。

微生物生长繁殖过程中,需从外界环境吸取营养物质。外界环境中的小分子有机物可以直接被微生物吸收;而大分子有机物如淀粉、蛋白质、脂肪、纤维素等则需经过微生物分泌胞外酶,如淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶等,将其分解为小分子有机物如糖、肽、氨基酸、脂肪酸等之后,才能被微生物吸收和利用。不同的微生物对生物大分子的水解能力各有不同。只有那些能够产生并分泌胞外酶的化能异养型的微生物才能利用大分子有机物。所以可以在以纤维素作碳源的条件,根据微生物能否分泌纤维素酶从而分解利用纤维素进行生长的特点来筛选产纤维素酶的微生物。

【实验目的】

1. 学习环境中酶活微生物的筛选方法。
2. 了解微生物对生物大分子物质水解的实验原理和方法。

【材料和方法】

1. 实验材料

从竹林、松树林等落叶堆积处采集土壤。去掉表层土,采集 5 ~ 15 cm 处土壤,混合后按四分法保留 10 ~ 20 g 土壤装于无菌袋中,记录并编号。

2. 制备培养基

(1) 纤维素刚果红培养基: K_2HPO_4 0.50 g, $MgSO_4$ 0.25 g, 纤维素粉 1.88 g, 刚果红 0.20 g, 琼脂 14.00 g, 明胶 2.00 g, 土壤浸汁 100 mL, 水 900 mL, pH 7.0。

(2) 液体发酵培养基:蛋白胨 3.0 g,酵母膏 0.5 g,麸皮 5.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g, K_2HPO_4 4.0 g, CaCl_2 0.3 g, MgSO_4 0.3 g, Tween-80 0.2 g, 蒸馏水 1 000 mL。

(3) 羧甲基纤维素培养基:CMCNa 15.0 g, NH_4NO_3 1.0 g, 酵母膏 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KH_2PO_4 1.0 g, 琼脂 14.0 g, 蒸馏水 1 000 mL。

(4) 牛肉膏蛋白胨培养基(NA):牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 17.0 g, 水 1 000 mL, pH 7.0 ~ 7.2。

3. 制备土壤悬液

称取土样 5 g, 迅速倒入带玻璃珠的 45 mL 无菌水瓶中, 振荡 5 ~ 10 min, 使土样充分打散, 即成为 10^{-1} 的土壤悬液。用无菌移液管吸取 10^{-1} 的土壤悬液 1 mL, 放入 9 mL 无菌水中即为 10^{-2} 稀释液, 依次制成 10^{-3} ~ 10^{-6} 稀释液。

4. 菌种的筛选

将稀释倍数分别为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的样品溶液, 在无菌条件下每个溶液取 0.2 mL 涂布到纤维素刚果红培养基上, 28 °C 培养 4 ~ 6 d, 选择四周有透明水解圈的菌株再接种于纤维素刚果红培养基上划线分离, 得到纯培养。将纯化后的菌株点接种到纤维素刚果红培养基上, 28 °C 培养 4 d。根据水解圈直径(H)与菌落直径(C)比值的大小进行初选。将初选纤维素分解菌株的菌悬液 1 mL 分别接种到液体发酵培养基中, 30 °C 下 160 r/min 条件下恒温振荡培养 3 d, 测定其酶活力, 进行复选。

5. 粗酶液的制备

50 mL 液体培养基中接种 1 mL 菌悬液(菌体数为 1×10^9 个), 30 °C、160 r/min 条件下恒温振荡培养 3 d, 将液体发酵液定容至 50 mL 后在 3 000 r/min 条件下离心分离 15 min, 上清液即为粗酶液, 用于纤维素酶酶活的测定。

6. 酶活力的检测方法

DNS 比色法测定酶活力(见第三章实验二)。一个酶活力单位(U)定义为:每分钟由底物生成 1 μmol 葡萄糖所需要的酶量。

7. 用紫外分光光度法测定粗酶液的浓度, 并计算酶的含量。

8. 将筛选到的产酶能力高的菌株接种到羧甲基纤维素培养基斜面上, 进行保藏。

【预期结果】

环境中具有纤维素酶的微生物种类较多, 一般在植物落叶腐殖土中分离到芽孢杆菌或产纤维素酶真菌的可能较大。在纤维素刚果红培养基上水解圈较大, 则微生物菌落的产酶能力较高, 产酶越多, 透明圈越大; 产酶越快, 透明圈出现越早。根据透明圈的大小和产生时间及得到的微生物种类来挑选菌株。虽然透明圈大小直接反映了酶浓度的高低, 但不能完全代表菌株产酶能力; 因此要多挑选几株微生物菌株, 再通过酶活力测定来确定产酶能力强的菌株。

【思考题】

1. 纤维素、淀粉等生物大分子能否不经水解而直接被细菌吸收? 为什么?

2. 在粗酶液的制备过程中,为何要将发酵液定容至 50 mL 后再离心? 如果不定容将会对酶活的测定产生什么影响?
3. 粗酶液中的酶量是不是该纤维素分解酶微生物所产生酶总量? 为什么?

【参考文献】

- [1] 吕静琳,黄爱玲,郑蓉,等. 一株产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及产酶条件优化[J]. 生物技术,2009,19(6):26~29.
- [2] 张毅民,吕学斌,万先凯,等. 一株纤维素分解菌的分离及其粗酶性质研究[J]. 华南农业大学学报,2005,26(2):69~72.
- [3] 李振红,陆貽通. 高效纤维素降解菌的筛选[J]. 环境污染与防治,2003,25(3):133~135.
- [4] 吴敏峰,耿秀蓉,祝小,等. 产纤维素酶芽孢杆菌的分离鉴定[J]. 饲料工业,2006,27(20):21~24.
- [5] 包衍,王晓辉,张伟琼,等. 纤维素分解菌的选育及酶活测定[J]. 生物学杂志,2007,24(2):56~58.
- [6] 蒋加拉,刘素纯,关美玲,等. 纤维素降解的菌株筛选及其运用[J]. 现代生物医学进展,2009,9(18):3451~3454.
- [7] 李荣杰. 纤维素酶高产菌的分离筛选与培养基优化[J]. 畜牧与饲料科学,2009,30(6):9~11.

实验三 苯酚降解菌的富集筛选

【实验原理】

随着农药、化工、石油等现代工业的发展,人类开发出了一大批有机高分子化合物,其中大多数是人工合成的,这些化学物质在自然环境中是没有存在或很少量存在的,是人类释放到环境中的,因此环境中很少有降解这些化学物质的酶类。这些有害物质在环境中的大量存在,严重危及各种生物的生存和人类的健康。在环境中降解大分子化合物的酶类一般都是由微生物产生,如果微生物长期与这些化合物接触就会产生降解这些化学物的酶类。人类为了不断地修复被工业化污染的环境,要尽快把这些化学物质从环境中清除。在工业污染物的生物处理中,一般针对某些特殊的污染物分离、选育高效的降解菌,再接种到活性污泥或生物膜中,使处理效果明显提高,这是当前环境微生物的研究重点。

苯酚及其衍生物是造纸、炼油、塑料、纺织等工业废水的主要污染物,含酚废水通常污染源,毒死鱼虾,危害庄稼,严重威胁人类健康。经过驯化的某些微生物有较强的降解苯酚能力。苯酚在微生物体内经苯酚羟化酶氧化为邻苯二酚,细菌中大多数具有沿邻位裂解途径,生成 β -酮己二酸,最后转化为乙酰 CoA 和琥珀酸,再通过三羧酸循环,氧化成 CO_2 和 H_2O 。降解菌是以苯酚为唯一碳源和能源,因此可以利用培养液中苯酚浓度降低对样品中微生物降解苯酚的活性进行检测。

为了得到高活性降解苯酚的微生物菌株,除了从长期存在苯酚的环境中选取样品筛选外,还可以采用富集筛选法进行降解菌的筛选,富集筛选法的方法和原理是在一定的小环境内(如试管和三角瓶等)创造一些条件只允许所需的微生物生长,在这些条件下,所需要的微生物能有效地与其他微生物进行竞争,在生长能力方面远远超过其他微生物。所创造的条件包括选择最适的碳源、能源、温度、光、pH、渗透压和氢受体等。在相同的培养基和培养条件下,经过多次重复移种,最后富集的菌株很容易在固体培养基上长出单菌落。

一般微生物在含酚浓度高的培养基上无法生长,但苯酚耐受菌则可以生长,这些耐受微生物在长期与培养基中加入的药物(如苯酚)接触过程中,不断地变异,使一些菌体产生了代谢这种药物的酶类,产生代谢酶的菌体细胞被称为抗性细胞,用单纯药物为能源的平板筛选富集筛选的微生物群体,就使这些群体中大量细胞中的少数抗性菌细胞在平板上能够正常生长,即长成了抗性菌落。

【实验目的】

1. 学习从含酚的工业废水、活性污泥中筛选苯酚分解菌。

2. 学习用富集筛选技术筛选功能微生物菌株。

【材料和方法】

1. 样品

含酚工业污水或工厂废水曝气池中的活性污泥。

2. 培养基

(1) 耐酚真菌培养基(固体、液体、斜面):葡萄糖 2.0 g,酵母膏 0.5 g,马铃薯汁 20 mL,微量元素溶液 10 mL,苯酚 75 ~ 100 mg,蒸馏水 70 mL,pH 5 ~ 6,121 °C 灭菌 20 min(微量元素溶液成分: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, KH_2PO_4 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, CaCl_2 0.005 g, H_2O :1 000 mL)。

(2) 耐酚细菌培养基(固体、液体、斜面)

① 斜面固体培养基:牛肉膏蛋白胨固体培养基,每支斜面中加入 0.4 mL 苯酚溶液(6 g/L)。

② 液体培养基:在一个 500 mL 锥形瓶中装 166.6 mL 的牛肉膏蛋白胨培养液,灭菌后加入 5 mL 苯酚溶液(26 ~ 35 mg/mL)。

(3) 苯酚无机培养液:苯酚 75 ~ 100 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, KH_2PO_4 0.3 g,蒸馏水 100 mL,pH 7.0 ~ 7.2,121 °C 灭菌 20 min。

(4) 苯酚碳源对照培养液 A:葡萄糖 75 ~ 100 mg,尿素 0.1 g,微量元素溶液 10 mL(同耐酚真菌培养基),蒸馏水 90 mL,pH 7.0 ~ 7.2,121 °C 灭菌 20 min。

(5) 苯酚培养液 B:苯酚 75 ~ 100 mg,尿素 0.1 g,微量元素溶液 10 mL,蒸馏水 90 mL(同耐酚真菌培养基),pH 7.0 ~ 7.2,121 °C 灭菌 20 min。

3. 试剂和溶液

酚标准液,2% 4-氨基安替比林溶液,8% 铁氰化钾溶液,氯仿,20% 氨性氯化铵缓冲液,0.1 mol/L 溴酸钾-溴化钾溶液,0.1 mol/L 硫代硫酸钠溶液,1% 淀粉溶液。

4. 仪器和其他物品

分光光度计,稀释分离所用的无菌水、无菌培养皿、无菌移液管等,测定苯酚所用的移液管、容量瓶、试剂瓶、酸式滴定管等。

5. 实验方法

(1) 采样:自焦化厂、钢铁公司化工厂处理含酚工业污水的曝气池中用无菌方法采取活性污泥和含酚污水,装于无菌锥形瓶中带回实验室,记录采样日期、地点等。采回的样品应迅速稀释分离。

(2) 富集培养:取 10 g 样品,加 100 mL 无菌水搅拌均匀,制成菌悬液,静置片刻,取 1 mL 菌悬液接于富集培养基(耐酚真菌或细菌培养基)中,30 °C、120 r/min 培养 10 ~ 15 d。每隔 5 d 用无菌移液管取一定量的培养液测定培养液中苯酚的减少量,富集培养 15 d。在培养过程中每测一次酚的减少量后,再添加一次酚的标准液,补充至原浓度。

(3) 分离纯化

① 稀释分离方法:分别取富集培养液稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三个稀释度,分别吸取培养物 1 ~ 2 滴接种到 10 ~ 20 个盛有 20 mL 耐酚真菌培养液和耐酚细菌培养液的 250 mL 锥形瓶中,30 °C 恒温培养 3 ~ 4 周。之后检测苯酚减少量。然后取苯酚减少量较大的培养液稀释后,涂布