

总主编 江文胜 李锋民

“中国海洋大学环境科学与工程国家级实验教学
示范中心”系列教材

EXPERIMENT OF
ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY

环境微生物实验

主编 高冬梅 洪波 李锋民



中国海洋大学出版社
CHINA OCEAN UNIVERSITY PRESS

总主编 江文胜 李锋民

“中国海洋大学环境科学与工程国家级实验教学
示范中心”系列教材

EXPERIMENT OF ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY

环境微生物实验

主编 高冬梅 洪波 李锋民



中国海洋大学出版社

· 青岛 ·

图书在版编目(CIP)数据

环境微生物实验 / 高冬梅, 洪波, 李锋民主编. — 青岛: 中国海洋大学出版社, 2014. 9

“中国海洋大学环境科学与工程国家级实验教学示范中心”系列教材 / 江文胜, 李锋民总主编

ISBN 978-7-5670-0720-8

I. ①环… II. ①高… ②洪… ③李… III. ①环境微生物学—实验—高等学校—教材 IV. ①X172-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 191898 号

出版发行 中国海洋大学出版社
社 址 青岛市香港东路 23 号 邮政编码 266071
出 版 人 杨立敏
网 址 <http://www.ouc-press.com>
电子信箱 zhanghua@ouc-press.com
订购电话 0532-82032573(传真)
责任编辑 张 华 电 话 0532-85902342
印 制 青岛双星华信印刷有限公司
版 次 2014 年 10 月第 1 版
印 次 2014 年 10 月第 1 次印刷
成品尺寸 185 mm×260 mm
印 张 14
字 数 315 千
定 价 30.00 元



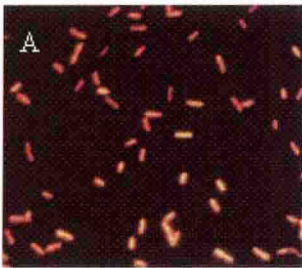
彩图1 平板上生长的菌落



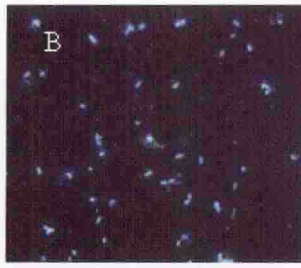
彩图2 平板划线分离的单菌落



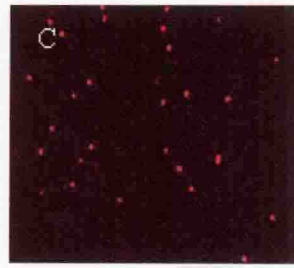
彩图3 试管斜面上生长的细菌



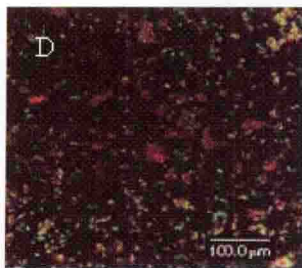
AO
(引自Raina M. Maier等著,
刘和等导读, 2010)



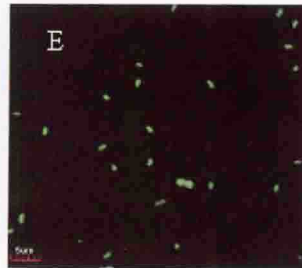
DAPI
(许颖 摄)



PI
(代颜辉 摄)

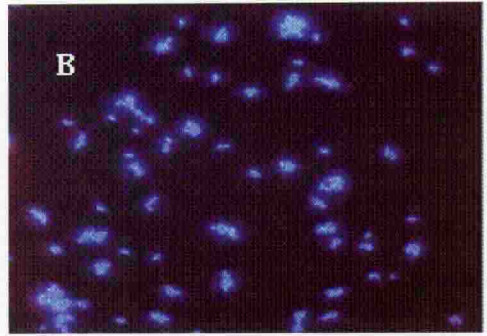
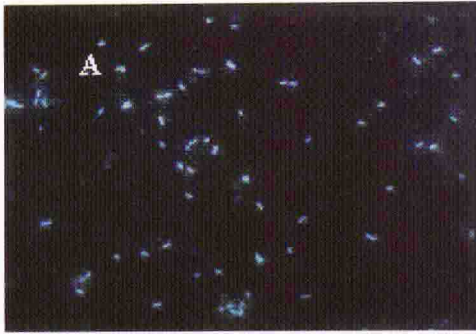


SYTO 9/PI复染
(El-Azizi, *et al.*, 2005)



FDA
(代颜辉 摄)

彩图4 微生物细胞荧光染色的显微图像



A. Tween-80加入后分散的菌体

B. 没有分散开的菌团形成片状的荧光区域

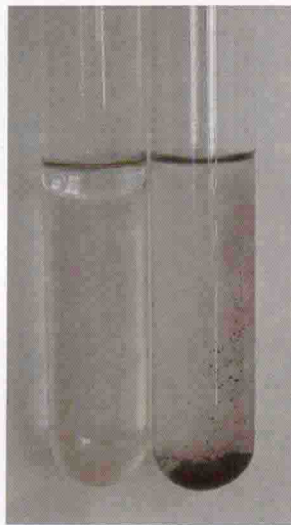
彩图5 Tween-80对土壤样品中微生物的分散效果（荧光图像，许颖 摄）



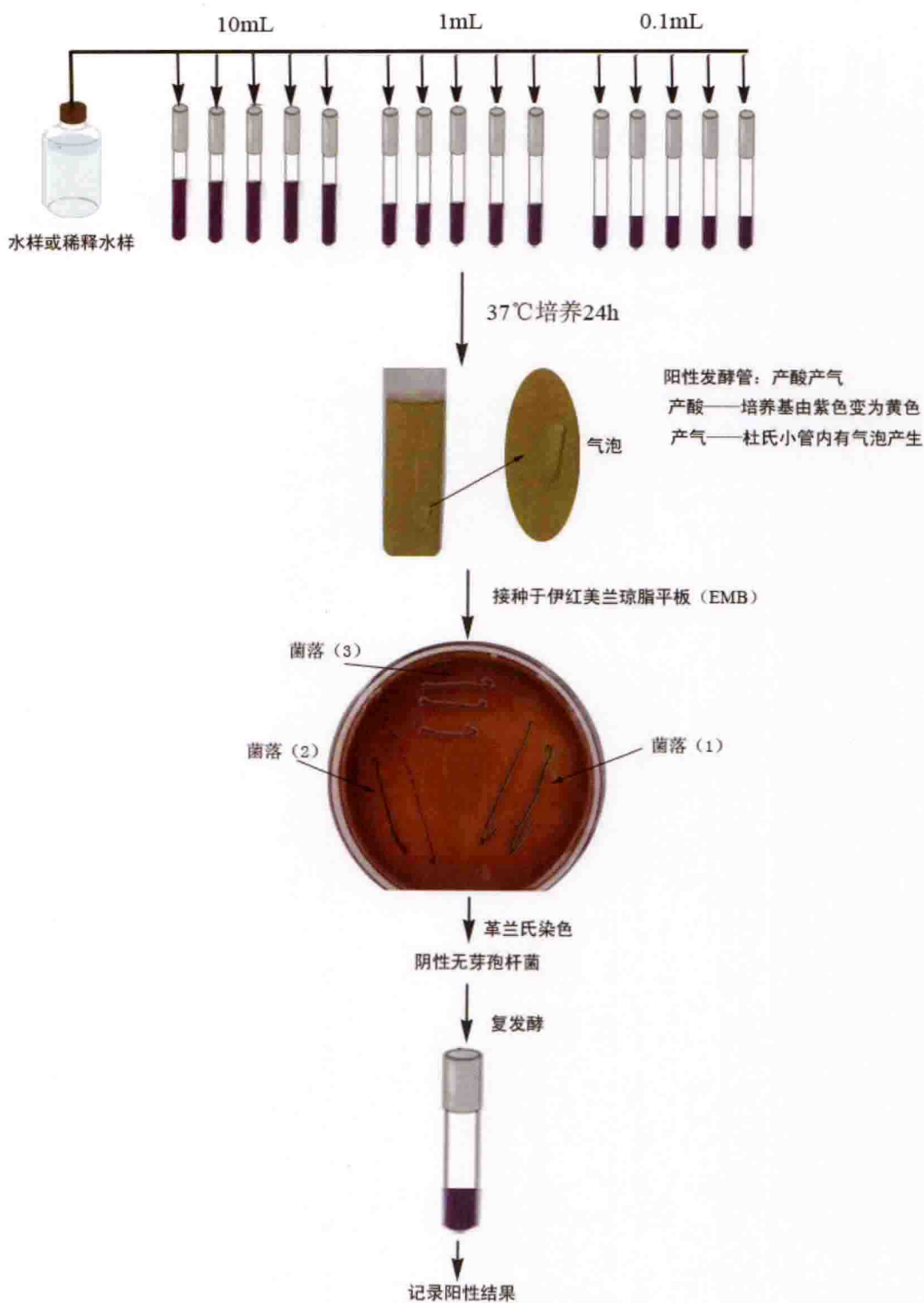
彩图6 非生命颗粒物对菌体DAPI染色荧光的干扰（荧光图像，许颖 摄）



彩图7 酶底物法检测大肠菌群及大肠埃希氏菌
（引自J.P.哈雷著，谢建平等译，2012）



彩图8 硫酸盐还原菌典型的培养特征



彩图9 水样中大肠菌群检测的多管发酵法操作流程

前言

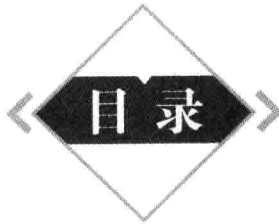
随着环境微生物资源的不断开发和利用以及环境问题的日趋严重,环境微生物实验技术得到迅速发展和广泛应用,为人们认识环境和改造环境提供了重要的技术手段和研究方法。我们在多年的实验教学和科研实践的基础上,充分借鉴和吸收国内外相关实验技术与方法,编写了《环境微生物实验》一书。

本书注重体现教材的“环境”特色和“海洋”特色,注重实用性和可操作性,兼顾先进性和开拓性。对实验的原理及相关知识、常用大型仪器的原理及使用进行了详细介绍,并辅以大量的图片和示意图,以便更好地理解 and 掌握实验技术。

本书共分为五个部分,第一部分为基础实验技术、第二部分为现代环境微生物实验技术、第三部分为环境中的微生物、第四部分为污染物的微生物处理技术、第五部分为设计性实验,共 37 个实验。基础实验技术部分注重实验内容的系统性和连贯性;现代环境微生物实验技术部分注重实验内容的先进性和可操作性,并对环境微生物常用分析检测仪器的原理及使用操作逐一介绍;环境中的微生物部分注重实验内容的开拓性,并涉及不同的环境,体现了教材的“环境”特色,尤其突出“海洋”特色;污染物的微生物处理技术部分注重内容的实用性并兼顾可操作性,使学生能够得到实际应用训练;设计性实验注重实验的实施程序。本书不仅适合作为环境科学与环境工程相关专业本科生的实验教材,而且也可作为研究生或科研人员重要的参考用书。

本书编写过程中引用了国内外学者的相关教学、科研成果及有关的插图和照片,但是,因受篇幅所限,书中仅列举了主要的参考文献和资料来源,在此特向所有著作者表示衷心的感谢!由于本书涵盖内容较广而编者水平有限,难免有疏漏、错误或不妥之处,敬请广大读者批评指正,以便修订时修正和完善。特此感谢!

编者
2014年6月



第一部分 基础实验技术

| | |
|----------------------------------|------|
| 实验 1-1 培养基的制备及灭菌 | (1) |
| 附:微生物的灭菌 | (10) |
| 实验 1-2 环境样品中微生物的分离、纯化及接种技术 | (13) |
| 实验 1-3 环境样品中细菌菌落总数的测定 | (20) |
| 实验 1-4 细菌的染色及形态观察 | (23) |
| 附:普通光学显微镜 | (27) |
| 实验 1-5 微生物细胞大小的测定 | (33) |
| 实验 1-6 微生物的显微镜直接计数法 | (36) |
| 实验 1-7 细菌生长曲线的测定 | (40) |
| 实验 1-8 微生物的 MPN 计数法 | (43) |
| 附:微生物的 MPN 法统计表 | (46) |

第二部分 现代环境微生物实验技术

| | |
|--------------------------------------|------|
| 实验 2-1 细菌总 DNA 的提取、PCR 扩增及电泳分析 | (51) |
| 实验 2-1-1 细菌总 DNA 的提取 | (51) |
| 实验 2-1-2 PCR 扩增 | (56) |
| 实验 2-1-3 琼脂糖凝胶电泳分析 | (60) |
| 实验 2-2 微生物细胞的荧光探针及其检测技术 | (64) |
| 实验 2-2-1 水体中微生物总数的直接计数 | (65) |
| 附:荧光显微镜 | (67) |
| 实验 2-2-2 重金属铜污染对水体中细菌的致毒效应 | (71) |
| 附:流式细胞仪 | (74) |

| | |
|--------------------------------------|-------|
| 实验 2-2-3 荧光原位杂交(FISH)技术检测土壤中的细菌 | (80) |
| 实验 2-3 环境微生物活性检测技术 | (85) |
| 实验 2-3-1 土壤微生物活性的测定 | (87) |
| 附: 荧光分光光度计 | (89) |
| 实验 2-4 环境微生物群落多样性分析技术 | (93) |
| 实验 2-4-1 土壤微生物群落的功能多样性分析(Biolog 分析法) | (94) |
| 附: Biolog 自动读数仪(Microstation) | (99) |
| 实验 2-4-2 土壤微生物群落的遗传多样性分析(DGGE 分析法) | (101) |
| 实验 2-5 微生物的固定化技术 | (106) |
| 实验 2-5-1 海藻酸钠包埋法固定枯草芽孢杆菌 | (107) |
| 实验 2-6 环境污染物毒性的微生物检测技术 | (111) |
| 实验 2-6-1 发光细菌法检测环境污染物的综合生物毒性 | (111) |
| 实验 2-6-2 Ames 实验检测环境污染物的遗传毒性 | (116) |

第三部分 环境中的微生物

| | |
|------------------------------|-------|
| 实验 3-1 土壤环境中的微生物 | (123) |
| 实验 3-1-1 根际微生物特征分析 | (124) |
| 实验 3-1-2 农田土壤中好氧自生固氮菌的测定 | (129) |
| 实验 3-1-3 湿地土壤中产甲烷菌及甲烷氧化菌的测定 | (133) |
| 实验 3-1-4 林地土壤中纤维素分解菌的测定 | (141) |
| 实验 3-2 淡水环境中的微生物 | (145) |
| 实验 3-2-1 地表水及饮用水的微生物状况分析及评价 | (145) |
| 附: 大肠菌群 MPN 检索表 | (155) |
| 实验 3-2-2 人工湖中光合细菌(紫色非硫细菌)的测定 | (160) |
| 实验 3-2-3 富营养化水体中氮循环菌的特征分析 | (163) |
| 实验 3-3 大气中的微生物 | (169) |
| 实验 3-3-1 自然沉降法检测空气中的细菌 | (171) |
| 实验 3-3-2 大气生物气溶胶微生物的组成及粒径分布 | (174) |
| 实验 3-4 海洋环境中的微生物 | (177) |
| 实验 3-4-1 沿岸水域及沉积物微生物污染状况调查 | (177) |
| 实验 3-4-2 海水养殖海域病原菌弧菌的分布 | (182) |
| 实验 3-4-3 海洋发光细菌的检测 | (186) |
| 实验 3-4-4 海洋工程结构物主要腐蚀微生物的检测 | (189) |
| 实验 3-4-5 海洋石油污染降解微生物的分布特征 | (194) |

第四部分 污染物的微生物处理技术

- 实验 4-1 SBR 活性污泥法处理生活污水 (199)
- 实验 4-2 有机固体废弃物的堆肥处理 (203)
- 实验 4-3 石油污染土壤的固定化微生物处理 (206)

第五部分 设计性实验

- 一、设计性实验的实施过程 (213)
- 二、实验考核和成绩评定 (214)
- 三、设计性实验的管理 (214)



第一部分 基础实验技术

- 实验 1-1 培养基的制备及灭菌
- 实验 1-2 环境样品中微生物的分离、纯化及接种技术
- 实验 1-3 环境样品中细菌菌落总数的测定
- 实验 1-4 细菌的染色及形态观察
- 实验 1-5 微生物细胞大小的测定
- 实验 1-6 微生物的显微镜直接计数法
- 实验 1-7 细菌生长曲线的测定
- 实验 1-8 微生物的 MPN 计数法

实验1-1 培养基的制备及灭菌

培养基概述

培养基是按照微生物的营养需要,由人工配制的,适合微生物生长代谢的营养基质。不同种类的培养基一般都含有一定比例的水分、碳源、能源、氮源、生长因子和无机盐等,另外,还必须具备适宜的 pH 和合适的渗透压等条件。培养基主要用于微生物的分离、培养、鉴定、发酵以及菌种保藏等方面。

一、培养基的主要成分及其作用

1. 水

水是微生物细胞生存并进行正常生理代谢活动所必需的基本条件,也是培养基中各成分的优良溶剂,有助于营养物质的溶解及利用。一般情况下,可直接使用自来水配制培养基,因为自来水中含有的微量杂质可以作为微量元素被微生物利用,对微生物往往是有益无害的。但在某些有特殊要求的实验中,自来水中的微量杂质可能会对实验结果造成一定程度的干扰,这时应采用蒸馏水或超纯水来配制培养基。

2. 碳源

碳源用于合成微生物细胞的含碳物质(碳架),并为微生物的生命活动提供所需的能量,所以,碳源是培养基的重要营养成分。微生物所能利用的碳源种类很多,而且不同微生物的最适碳源也不尽相同。在天然培养基中,可由牛肉膏、蛋白胨、酵母膏等为微生物提供碳源,在合成培养基中最常用的碳源是葡萄糖,其他常用的简单碳源还有蔗糖、乳糖、果糖、甘露糖及淀粉等。

3. 氮源

氮源是合成微生物细胞蛋白质的主要原料,也是培养基中的基本成分。在天然培养基中,常用的氮源有蛋白胨、牛肉膏、酵母膏等有机氮源,在合成培养基中常用尿素、铵盐、硝酸盐等提供无机氮源。而对于固氮菌来说,是利用分子态的氮作为氮源。

4. 生长因子

生长因子是微生物细胞中许多酶的组成部分,是调节细胞生理代谢功能所必需的微量物质,主要包括氨基酸、碱基(嘧啶和嘌呤)、维生素(硫胺素、核黄素、烟酰胺、泛酸、叶酸等)3 大类。在制备天然培养基时,由于各天然成分中一般含有这些微量物

质,不需另外加入,而在制备合成培养基时,如果要培养的微生物类群自身不能合成这些生长因子,则必须在培养基中添加。目前已知的大多数种类的异养微生物和自养微生物都有合成生长因子的能力。

5. 无机盐

微生物需要的矿物质元素可分为主要元素和微量元素两大类。主要元素包括磷、钾、钙、镁、硫、钠等,它们参与细胞结构物质的组成、能量转移、物质代谢以及调节细胞原生质的胶体状态和细胞渗透性等。在天然培养基中,一般不必加入这些盐类或只加一部分,在合成培养基中需要添加含有这些元素的盐类。微生物需要的微量元素主要有铁、硼、锰、铜、锌和钼等,它们多是辅酶和辅基的成分或酶的激活剂。微生物对微量元素的需要量很少,在营养物质及自来水中所含有的微量元素已可满足微生物生长的需要,一般在配制培养基时不必另外添加,但培养某些有特殊生理需求的微生物时,仍然需要在培养基中另行加入某些微量元素。

二、培养基的分类

培养基的种类很多(表 1-1-1),按成分可分为天然培养基、合成培养基和半合成培养基;按功能和用途可分为基础培养基、选择培养基、加富培养基和鉴别培养基;按状态可分为固体培养基、半固体培养基和液体培养基。

表 1-1-1 培养基的分类

| 分类依据 | 培养基种类 | 特点及用途 |
|------|--------|--|
| 成分 | 天然培养基 | 利用复杂的天然物质配制而成的营养丰富的培养基,能够同时培养出样品中某个微生物类群中的多数微生物,但是一般难于确切知道天然物质中含有的各种成分及其数量,而且其成分和数量也不稳定。如常用的有牛肉膏蛋白胨培养基、马铃薯培养基等 |
| | 合成培养基 | 用已知成分的化合物或试剂配制的培养基,培养基中各成分和含量已知且稳定。如常用的高氏一号培养基等 |
| | 半合成培养基 | 由天然成分和已知化学试剂混合组成的培养基 |
| 功能 | 基础培养基 | 含有一般微生物生长所需要的营养成分。最常用的如细菌基础培养基——牛肉膏蛋白胨培养基等 |
| | 选择培养基 | 除了含有一般微生物生长所需要的营养成分外,还利用微生物对某些化学物质或营养物质的敏感性不同,在培养基中另外添加这些物质,从而更容易地分离或鉴别目的微生物。如分离真菌常用的马丁氏培养基、大肠杆菌的乳糖蛋白胨培养基等 |

续表

| 分类依据 | 培养基种类 | 特点及用途 |
|------|--------|---|
| 功能 | 加富培养基 | 根据某些微生物特殊的营养需求,在培养基中加入这些营养物质,从而有利于这些微生物快速增殖,达到富集这类微生物的目的。如石油烃降解菌培养基等 |
| | 鉴别培养基 | 某些微生物在生长繁殖过程中产生的代谢产物与某种物质发生特征性的生化反应,产生肉眼可见的现象,如果在培养基中加入这种物质,就可以在培养时将这种微生物与其他微生物区别开来,从而进行微生物鉴定。常用的有伊红美蓝培养基(EMB培养基)等 |
| 状态 | 液体培养基 | 在配制培养基时不加入凝固剂,可呈现液体状态的培养基。主要用于微生物富集培养、发酵生产等 |
| | 固体培养基 | 在配制培养基时加入一定比例的凝固剂(一般用1.5%~2%的琼脂),凝固后呈固体状态的培养基。主要用来制备斜面或平板 琼脂是制备固体培养基时应用最广泛的凝固剂,它是由海洋中红藻门的石花菜、江蓠等提取加工而成,其主要成分为多糖类物质,化学性质较稳定,耐高压灭菌,不能被一般微生物分解利用。琼脂在95℃以上开始熔化,45℃以下开始凝固成透明的胶冻 |
| | 半固体培养基 | 在配制培养基时加入少量凝固剂(一般用0.5%~0.7%的琼脂),冷凝后成为介于固体培养基和液体培养基之间的一种状态,没有流动性,但在剧烈振荡时能够破散。主要用于细菌的运动性观察、趋化性研究等 |

培养基的制备程序

——以牛肉膏蛋白胨培养基为例

由于培养基的种类较多,成分各异,其配制方法也不尽相同,本实验以常用的细菌基础培养基——牛肉膏蛋白胨培养基的配制为例,介绍培养基的一般配制程序。

一、实验目的

- (1) 明确培养基的成分、作用及类型,掌握培养基制备的一般方法和步骤。
- (2) 掌握高压蒸汽灭菌的基本原理、方法和适用范围。

二、实验原理

牛肉膏蛋白胨培养基是广泛应用的细菌基础培养基,是一种天然培养基,主要成分有牛肉膏、蛋白胨和 NaCl,其中牛肉膏和蛋白胨主要为微生物提供碳源、氮源和生长因子,而 NaCl 为微生物提供无机盐。另外,在配制固体培养基时,添加琼脂作为凝固剂,制备成固相介质。

三、实验用品

1. 药品试剂

牛肉膏、蛋白胨、NaCl、琼脂粉、NaOH、pH 试纸。

2. 实验器材

灭菌锅、天平、电炉、试管、锥形瓶、烧杯、量筒、分装器、牛皮纸、线绳等。

四、操作步骤

1. 称量

按培养基的配方比例依次称量除琼脂粉以外的其他成分溶于水中。一般用1/100的粗天平称量即可。

牛肉膏蛋白胨培养基配方:

| | |
|------|----------------------|
| 牛肉膏 | 3.0 g |
| 蛋白胨 | 10.0 g |
| NaCl | 5.0 g |
| 琼脂粉 | 15~20 g(不加琼脂粉为液体培养基) |
| 水 | 1 000 mL |
| pH | 7.4~7.6 |

另外,若有些培养基中含有某些难溶的成分,可先用少量的温水或少量的其他溶剂将其单独溶解后,再加入培养基中;若有些培养基成分需要量非常少,难以称量,可将这种成分单独配制成高浓度的溶液,再按比例取一定体积加入培养基中;若有些培养基成分不能高温高压灭菌,在配制时暂不加入该成分,需将其过滤除菌或通过其他方式除菌,待其他成分灭菌后,培养基使用前再按比例单独加入,混匀后使用。

2. 调节 pH

逐滴加入 1 mol/L 的 NaOH,调节 pH 至 7.4~7.6。要边加边搅拌,防止局部过酸或过碱,破坏培养基营养成分。要注意 pH 的调节不宜太过,以免影响培养基中各离子的浓度。

另外,若在培养基各成分溶解过程中对培养基进行了加热,需待培养基温度降至

室温后再调节 pH。

3. 琼脂溶化

如果要配制固体培养基,则需在液体培养基的基础上按比例加入琼脂作为凝固剂。首先需要将液体培养基加热至即将沸腾(底部有少量的气泡冒出时为宜),然后边搅拌边加入称量好的琼脂,控制好火力,不断搅拌至琼脂完全溶化,立即离开热源。

注意:

琼脂的加入应控制好速度,若加入太快,大量的琼脂来不及溶解,易下沉发生糊底现象,甚至被烧焦;若加入速度太慢,先加入的琼脂溶解后,在加热及搅拌的作用下产生大量气泡,后加入的琼脂因气泡的影响形成琼脂团块,难以再溶解。

4. 分装

配好的培养基根据实验需要进行分装后灭菌。培养基分装过程中,要注意不能沾污管口或瓶口,否则容易造成培养基污染。主要包括以下几种分装情况:

(1) 液体培养基分装

液体培养基一般可使用移液器、量筒等直接量取分装。

① 将液体培养基分装到锥形瓶中

一般根据实验所需培养基的量选择合适的锥形瓶型号,分装量一般不超过锥形瓶容积的 1/2。若分装量过多,高压灭菌时培养基容易溢出,造成污染和浪费。

② 将液体培养基分装到试管中

分装量以不超过试管高度的 1/4 为宜。

(2) 固体或半固体培养基分装

固体培养基或半固体培养基要趁热分装,以防琼脂凝固。分装试管时一般使用连有橡胶管并带夹子的玻璃漏斗或专用分装器进行(图 1-1-1),制作平板用的培养基可直接倒入可密封的玻璃容器中灭菌。

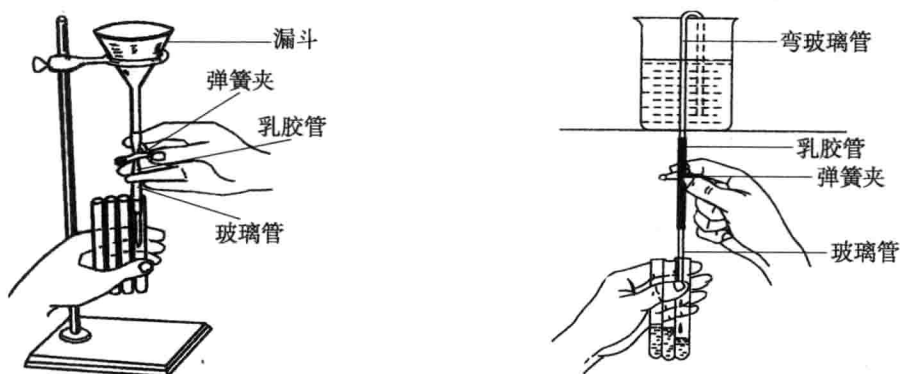


图 1-1-1 培养基分装示意图

(引自钱存柔等,2008;李振高等,2010,适当改动)