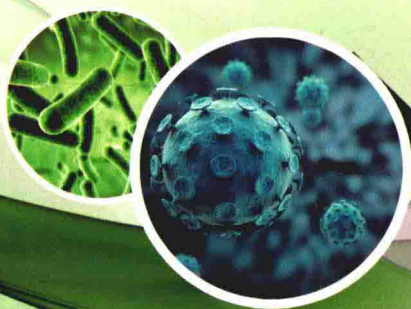


Huanjing Weishengwuxue Shiyang Jiaocheng

环境微生物学 实验教程

主编 温洪宇 李 萌 王秀颖



矿业大学出版社

University of Mining and Technology Press

环境微生物学实验教程

温洪宇 李 萌 王秀颖 主编

中国矿业大学出版社

内 容 简 介

本书内容包括三部分,即环境微生物学基础实验、环境微生物学综合实验和分子生物学实验技术。

本书结合微生物学、环境科学、环境工程等专业的特点,从学生的角度出发,力图帮助读者理解环境微生物学的相关理论知识,熟悉环境微生物学的实验设计和研究思路,掌握环境微生物学基础实验操作,并在此基础上进行综合性实验。本书结合学科发展现状,紧跟前沿,重点增强了环境微生物分子生物学实验技术的内容,从而使本书内容更为全面,可为读者提供相关环境微生物学实验的研究方法和研究技术。此外,书中对相关实验操作进行图示,使实验操作更直观、简洁,方便读者理解和掌握,实用性强。

本书可作为高等院校环境科学、环境工程以及生物科学等专业的教材,也可以为环境微生物学专业相关的研究人员和技术人员提供参考。

图书在版编目(CIP)数据

环境微生物学实验教程/温洪宇,李萌,王秀颖主编. —徐州:中国矿业大学出版社,2017.8

ISBN 978 - 7 - 5646 - 3492 - 6

I. ①微… II. ①温…②李…③王… III. ①微生物学—实验—高等学校—教材 IV. ①Q93—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 072629 号

- 书 名 环境微生物学实验教程
主 编 温洪宇 李 萌 王秀颖
责任编辑 周 红
出版发行 中国矿业大学出版社有限责任公司
(江苏省徐州市解放南路 邮编 221008)
营销热线 (0516)83885307 83884995
出版服务 (0516)83885767 83884920
网 址 <http://www.cumtp.com> E-mail: cumtpvip@cumtp.com
印 刷 江苏凤凰数码印务有限公司
开 本 787×960 1/16 印张 14.5 字数 245 千字
版次印次 2017年8月第1版 2017年8月第1次印刷
定 价 28.00 元

(图书出现印装质量问题,本社负责调换)

前 言

环境微生物学是在微生物学、环境科学及环境监测等学科的基础上发展形成的一门边缘学科,在微生物学、环境科学及环境工程中有重要地位,在改善环境和消除污染方面发挥着重要作用。环境微生物学实验技术是一门实践性较强的专业课程,掌握环境微生物学相关理论和基础实验技能,对于开展相关实验研究具有重要的指导意义。但是,由于传统的限制,环境微生物学实验技术在教学方面还存在内容繁琐、操作性不强、缺乏专业性等问题,因此,环境微生物学实验技术教学要进行不断的完善。

本书按照实验之间的逻辑关系、专业特色和教学规律等,将实验内容主要分为以下三大部分:环境微生物学基础实验、环境微生物学综合实验和环境微生物学分子生物学实验技术。这三大部分既有其各自的特色,又有其内在关联。三部分内容,从前至后,由浅入深,由易到难,实验的综合水平、研究水平、技术层次和应用水平逐渐提高。

本书结合专业特点,以学生为出发点,取材广泛,紧跟学科发展步伐,内容详实,结构合理,专业性、针对性和实用性强,注重对学生实验技能和研究能力的培养。

本书由江苏师范大学资助。通过本书可以让学生更好地理解环境微生物学实验相关理论知识,掌握环境微生物学实验操作技能,明确环境微生物学的专业特色,从而培养学生对科学研究的兴趣和创新思维,提高学生的专业能力和实践能力。

由于编者理论和实践水平有限,本书存在不妥之处在所难免,敬请广大读者批评指正。

编 者

2017年2月

目 录

第一章 环境微生物学实验常用仪器及其使用	1
第二章 环境微生物学基础实验	13
实验一 常用玻璃器皿的清洗和包装	13
实验二 培养基的种类、配制及灭菌	21
实验三 灭菌技术	30
实验四 接种技术和无菌操作	35
实验五 微生物的分离纯化技术	43
I 平板划线法分离菌种	44
II 涂布平板法和浇注平板法分离菌种	47
III 真菌的单孢子分离法	50
实验六 微生物显微技术	52
I 普通光学显微镜	53
II 相差显微镜	57
III 荧光显微镜	60
IV 扫描电子显微镜	62
实验七 微生物的制片和染色	64
I 微生物制片技术	65
II 细菌的简单染色	66
III 革兰氏染色法	69

IV	细菌的芽孢染色法	73
V	细菌的荚膜染色法	76
VI	细菌的鞭毛染色法	79
VII	酵母菌和霉菌的染色法	84
实验八	微生物的形态观察	86
I	四大微生物菌落的识别	86
II	细菌的形态观察	88
III	放线菌的形态观察	90
IV	真菌的形态观察	92
实验九	微生物的计数及大小测定	95
I	酵母菌和细菌的直接计数	96
II	平板菌落计数法	100
III	微生物细胞大小的测定	103
实验十	菌种保藏	106
I	简易的菌种保藏法	107
II	干燥保藏法	110
III	冷冻真空干燥保藏法	112
IV	液氮超低温冷冻保藏法	116
第三章	环境微生物学综合实验	120
实验十一	土壤中微生物的检测和分离	121
实验十二	空气中微生物的检测和分离	125
实验十三	水体中细菌总数的检测	127
实验十四	水体中大肠杆菌的检测	131
实验十五	人体表面微生物的检测和分离	135
实验十六	纤维素降解菌的分离纯化和活性测定	138
实验十七	酚降解菌的分离纯化和活性测定	142
实验十八	石油降解菌的分离纯化和活性测定	146
实验十九	活性污泥微生物的观察分析	150

第四章 环境微生物学分子生物学实验技术	154
实验二十 细菌总 DNA 的制备	154
实验二十一 真菌总 DNA 的制备	156
实验二十二 微生物总 DNA 的 PCR 扩增	159
实验二十三 DGGE 分析微生物多样性	162
实验二十四 蓝白斑筛选技术	165
实验二十五 限制性片段长度多态性(RFLP)分析	168
实验二十六 随机引物扩增多态性 DNA(RAPD)分析	171
实验二十七 扩增片段长度多态性(AFLP)分析	174
实验二十八 16SrRNA 基因序列鉴定细菌	180
实验二十九 利用 ITS 序列鉴定真菌	184
实验三十 环境中微生物多样性分析	188
附录	193
附录一 常用培养基的配方	193
附录二 常用染色液的配制	205
附录三 常用试剂的配制	207
附录四 常用酸碱指示剂的配制	208
附录五 常用缓冲液的配制	209
附录六 常用的消毒剂	212
附录七 蒸汽压力与温度的关系	213
附录八 常用干燥剂	213
附录九 常用计量单位	214
附录十 常用的菌种保藏方法	214
附录十一 MPN 表	215
参考文献	220

第一章 环境微生物学实验常用的仪器及其使用

一、超净工作台

(一) 简介

超净工作台(clean bench)是实验室内提供无菌操作的设施,是针对局部工作区有高洁净度要求设计而成的,其外观如图 1-1 所示。超净工作台由工作台、送风机、过滤器、紫外灯、支撑体和静压箱等部分组成。超净工作台根据气流方向分为垂直流超净工作台和水平流超净工作台;根据操作结构分为单边操作和双边操作两种形式。超净工作台的工作原理是通过



图 1-1 超净工作台

送风机将空气吸入预过滤器,经静压箱进入高效过滤器后的空气以垂直或水平的空气流送出,由于空气没有涡流,所以杂菌能被排出,不易扩散,使操作台保持无菌状态。

(二) 使用方法

使用前先打开紫外灯,处理工作台和表面附着微生物,30 min 后关闭紫外灯,开启送风机,清除附着微生物的尘粒,10~20 min 后,可在工作台进行操作。操作结束后,关闭送风机,整理工作台,拉下防尘窗。

(三) 注意事项

(1) 超净工作台宜安置在无阳光直射、清洁无尘的室内,如果置于无菌操作间更好,能延长过滤器的使用寿命。

(2) 对新购置的或长期未使用的超净工作台,使用前必须彻底清洁灭菌。用真空吸尘器除去过滤器的灰尘,用 75% 的酒精擦拭工作台。若长时间不使用,应用防尘套套好,防止灰尘积累。

(3) 不允许在工作区存放不必要的物品,使工作区洁净气流不受干扰。

(4) 根据环境的洁净程度,定期将滤布拆卸清洗或更换。同时,用蘸有酒精的纱布擦拭紫外灯的表面,保持其洁净,以免影响其杀菌效果。

(5) 当加大风机电压不能使风速达到 0.32 m/s 时,需要更换高效过滤器。更换后,需使用尘埃粒子计数器检查周围边框是否密封,再用尘埃粒子计数器检查洁净度。

二、高压蒸汽灭菌锅

(一) 简介

高压蒸汽灭菌锅 (high-pressure steam sterilization pot) 是一个密闭的、可以承受一定压力的双层金属锅,外形如图 1-2 所示,常用于微生物实验过程中玻璃器皿、培养基等的灭菌。其工作原理是当锅体夹层内的水沸腾后,因蒸汽不能逸出,通过密封锅体内的水和水蒸气的压力来提高锅体内蒸汽温度而达到对物品灭菌的目的。

高压蒸汽灭菌锅锅盖上装有压力表、安全阀、排气阀等,锅内配有搁架、装料桶,锅底侧面装有排水口和排气阀。高压蒸汽灭菌锅可分为手提式、立式、卧式等类型,如图 1-3 所示。



图 1-2 高压蒸汽灭菌锅

图 1-3 常见的高压灭菌锅类型
(a) 卧式; (b) 手提式; (c) 立式

(二) 使用方法

1. 加水

取出装料桶,往锅内加水至与搁架圈同样高度为止。

2. 装料

放回装料桶,装入需灭菌的物品,注意物品不要放得太过拥挤,以免阻碍蒸汽流通,影响灭菌效果。放置装有培养基或溶液的器皿时,防止其倾

倒或溢出。瓶塞不能贴近料桶内壁,防止降压时产生冷凝水沾湿棉塞,或冷凝水浸入棉塞从而进入灭菌物质中。

3. 加盖

将锅盖上与排气孔相连的金属软管插入装料桶的排气槽内,移正锅盖使螺口对准螺栓,以两两对称的方式拧紧螺栓,松紧一致,使锅体处于完全密封状态。

4. 排气

打开高压蒸汽灭菌锅开关,同时打开排气阀,加热沸腾后利用蒸汽排尽锅内的空气。当排气阀急速放出蒸汽并伴有吱吱作响时或锅内温度达到 100 ℃ 时,表明锅体内空气排尽,此时关闭排气阀。

5. 升压

当锅内空气排尽,关闭排气阀后,继续加热使锅内的蒸汽压缓慢上升,压力表指示压力逐渐增大。

6. 保压

当锅内压力达到所需压力时,调节热源,维持所需压力,同时计算灭菌时间。不同的物品所需的压力和灭菌时间均不相同。

7. 降压

达到规定的灭菌时间后,立即关闭热源,使锅内压力自然降至零压,即指针指向“0”时,方可打开排气阀,消除锅体内外的压力差。

8. 取料

打开锅盖,取出灭菌物品,此时锅体温度依然很高,蒸汽很烫,因此取物料时,可以戴上手套以防烫伤。

9. 后处理

灭菌后,倒掉锅内剩余水并擦干,防止料桶被腐蚀。

(三) 注意事项

(1) 灭菌过程中,操作者不能擅自离开,尤其是保压和升压期间更要注意压力表的动态,避免因压力过高或安全阀故障等诱发事故。

(2) 根据待灭菌物质选择合适的灭菌温度和时间。

(3) 必须等到锅体压力自然降至零压后再打开排气阀,否则因为锅体压力突降,使锅内液体复沸腾而溢出造成危险事故。

(4) 灭菌放入物料前,必须仔细检查是否往锅内添加适量的水,如果锅内无足够的水或无水,在灭菌过程中均会引发重大事故。

三、恒温培养箱

(一) 简介

恒温培养箱主要用于实验室微生物的培养和恒温实验,如图 1-4 所示。其结构因种类不同而有所不同,加热方式也各异,有些用热空气升温,有些用水浴升温。

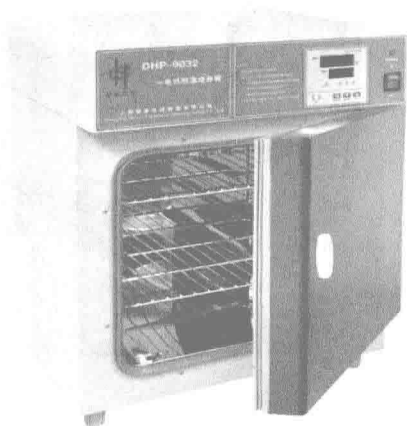


图 1-4 恒温培养箱

(二) 使用方法

(1) 打开外门与玻璃门,将实验物品放入培养箱,依次关上玻璃门与外门。

(2) 接通电源,打开开关。

(3) 使用相关按键,设定所需温度。

(三) 注意事项

(1) 易燃和腐蚀性物品禁止放入培养箱,以免发生爆炸。

(2) 使用培养箱时,电压要与培养箱额定电压一致,以免减少其使用寿命。

(3) 切勿把培养箱置于强酸强碱等腐蚀性环境,防止损坏相应器件。

四、恒温干燥箱

(一) 简介

恒温干燥箱(图 1-5),又称烘箱,其主要作用是对玻璃器皿等耐高温物品进行灭菌处理或是对清洗后的器皿进行干燥。

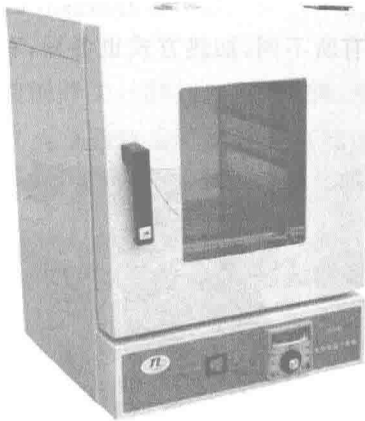


图 1-5 恒温干燥箱

(二) 使用方法

- (1) 打开烘箱,放入包装好的待灭菌或待烘干的物品,关闭烘箱。
- (2) 接通电源,打开开关,调节旋钮至所需灭菌温度,使温度逐渐上升至设定温度。
- (3) 当温度达到 $160\sim 170\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,恒温调节器会自动调节控制温度,保持此温度 $1\sim 2\text{ h}$ 。

(4) 切断电源,自然降温。

(5) 待温度降至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下,打开烘箱,取出灭菌物品。

(三) 注意事项

(1) 烘箱温度未降到 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下时,不可打开箱门以免温度骤降导致玻璃器皿爆裂。

(2) 灭菌温度不可超过 $180\text{ }^{\circ}\text{C}$,否则纸或棉线等易燃物质易焦化起火而出现事故。

(3) 待灭菌的器皿要洗净干燥,包装好后置于烘箱中,不可将含水的玻璃器皿进行干热灭菌,否则易导致器皿局部灭菌不彻底,影响实验结果。

(4) 烘箱内不宜放置过多物品,否则妨碍空气流通,导致灭菌效果不佳。

五、摇床

(一) 简介

摇床是培养好氧性微生物的小型实验设备,如图 1-6 所示,可用于种子扩大培养。常用的摇床分为往复式和旋转式。

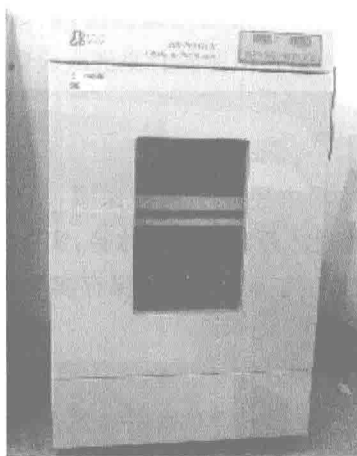


图 1-6 摇床

往复式摇床利用曲柄原理带动摇床进行往复运动,机身为矩形框,带有托盘,托盘上有圆孔用于放置培养瓶和试管等,孔内有一个凸起的三角形橡皮,有固定作用。传动机构利用二级皮带轮减速,通过调整皮带轮改变往复频率。偏心轮上有偏心孔,可调节偏心距。偏心距和频率对于培养物吸收氧有明显影响。

旋转式摇床利用旋转的偏心轴使托盘摆动,托盘由不锈钢、铝等制造,在偏心轴上装有螺栓以便上下调节,使托盘处于水平状态。

(二) 使用方法

(1) 将培养瓶放在摇床上,培养液所需氧气由空气经棉塞进入。

- (2) 接通电源,打开开关,根据培养物需求,设定相关参数,启动摇床。
- (3) 培养完毕后,关闭开关,取出培养物。

(三) 注意事项

- (1) 一般情况下,摇瓶的氧吸收率取决于摇床的特性和培养瓶的装量。
- (2) 使用往复式摇床时,如果培养瓶装量过多、摇床频率过快或冲程过大,将会导致培养液沾到棉塞上,引起污染,影响后续实验。
- (3) 旋转式摇床结构复杂,但传氧效果好,培养液一般不会沾到培养瓶瓶塞上。
- (4) 使用摇床的过程中,氧的传递效果与培养瓶瓶口大小、棉塞紧实与否有关。

六、冰箱

(一) 简介

微生物实验室中冰箱主要用于菌种保藏、培养基和试剂的保存等,如图 1-7 所示。其分为普通冰箱和超低温冰箱,实验过程中,根据需求选择相应的冰箱类型。普通冰箱用于短时间内保存实验物品,超低温冰箱用于长时间保存菌种和细胞。

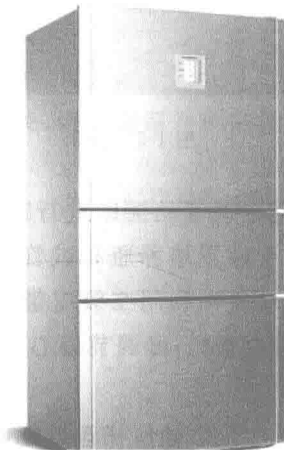


图 1-7 冰箱

(二) 注意事项

- (1) 冰箱应置于阴凉干燥处,并与墙壁保持一定距离,远离热源。
- (2) 使用前,检查冰箱电压是否与供应电压一致。
- (3) 打开冰箱门时,要尽快放入或取出物品,操作迅速,温度过高的物品不可放入冰箱。
- (4) 冰箱应定期进行清洁整理,防止杂菌污染。

七、分光光度计

(一) 简介

分光光度计常用于核酸、蛋白质及细菌浓度的定量分析,如图 1-8 所示。下文简要介绍 721 型分光光度计的使用方法。

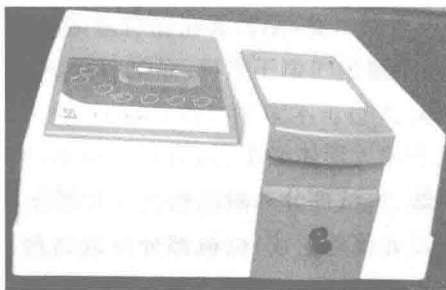


图 1-8 分光光度计

(二) 使用方法

(1) 检查零刻度线:在仪器通电之前,使用校正螺丝让指针指向“0”刻度线。

(2) 校准仪器:接通电源,打开比色皿箱盖,把装有参比溶液的比色皿放入比色皿架内,选择波长,灵敏度调为“1”,并让透光率旋钮指向“0”,盖上暗箱盖,拉动比色皿架拉杆,使比色皿位于光路中,调节透光率旋钮指向“100%”。

(3) 预热 20 min。

(4) 测定标准溶液的吸光度:将标准溶液移入比色皿中,在透光率稳定的条件下,选定测定波长,拉动拉杆,让溶液位于光路中,测定其吸光度。

(5) 绘制标准吸收曲线:以标准溶液浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,

绘制标准曲线。

(6) 测定待测溶液的吸光度:测定待测溶液的吸光度,将其在标准曲线上标注出来,找出对应的浓度,即为待测溶液的浓度。

(三) 注意事项

(1) 比色皿的清洁与否直接影响测得的实验数据,因此,使用前必须保证比色皿的洁净。使用后的比色皿应立即用自来水冲洗,然后用蒸馏水冲洗,倒置于滤纸上,控干水分后收纳于相应的比色盒中。

(2) 实验过程中,不可用手碰触比色皿的光面。

(3) 倒入比色皿的溶液不可过多,防止其溢出影响比色结果。

(4) 分光光度计应和与其配套的比色皿一同使用。

(5) 预热是使用分光光度计的重要步骤。

八、光学显微镜

(一) 简介

光学显微镜用于放大形体微小、结构较为简单、肉眼看不到的微生物。其结构包括光学系统、机械部分和附加构造三大部分,如图 1-9 所示。光学系统由目镜、物镜、反光镜等组成;机械部分由载物台、物镜转换器、粗准焦螺旋、细准焦螺旋、底座、镜筒、镜臂等组成。



图 1-9 光学显微镜