

现代环境生物学 实验技术与方法

孔志明
杨柳燕
尹大强
程树培

主编



**MODERN TECHNIQUES & METHODS IN
ENVIRONMENTAL BIOLOGICAL
EXPERIMENTS**

中国环境科学出版社

高等院校环境类系列教材

现代环境生物学实验技术与方法

孔志明 杨柳燕 尹大强 程树培 主编

中国环境科学出版社·北京

图书在版编目(CIP)数据

现代环境生物学实验技术与方法 / 孔志明等主编.

北京: 中国环境科学出版社, 2005.12

(高等院校环境类系列教材)

ISBN 7-80209-197-7

I. 现… II. 孔… III. 环境生物学—实验—高等学校—教材 IV. X17—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 078115 号

环境科学与工程出版中心

电话(传真): 010-6711 2735

网 址: www.cesp.cn

电子信箱: sanyecao@cesp.cn

本中心立足于出版环境科学与工程各类专业图书。以服务为宗旨, 以市场为导向。做绿色文明的倡导者, 充当环境文化的传播者。

出版发行 中国环境科学出版社

(100062 北京崇文区广渠门内大街 16 号)

网 址: <http://www.cesp.cn>

联系电话: 010-67112765 (总编室)

发行热线: 010-67125803

印 刷 北京东海印刷有限公司

经 销 各地新华书店

版 次 2005 年 12 月第一版

印 次 2005 年 12 月第一次印刷

开 本 787×960

印 张 16.25

字 数 290 千字

定 价 22.00 元

【版权所有。未经许可, 请勿翻印、转载, 违者必究】

如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

《现代环境生物学实验技术与方法》编委会

主编： 孔志明 杨柳燕 尹大强 程树培

参加编写人员（按姓氏笔画为序）：

孔志明 尹大强 王保忠 王 斌

朱程军 朱增银 曲薨薨 张 浏

杨柳燕 肖 琳 钟 远 顾宇飞

顾 颖 崔益斌 章 敏 程树培

蒋丽娟

前 言

环境生物学是环境科学的一个分支。主要研究生物与受人类干预的环境之间相互作用的规律及其机理。而环境生物学实验技术与方法则是利用生物对环境进行监测与评价,其目的在于为人类合理地利用自然和自然资源,保护和改善人类的生存环境提供科学的实验依据。

本书是在《环境生物学实验技术与方法》基础上改编而成。随着科学技术的发展,诸如生物化学、细胞学、分子生物学及遗传学等相关科学的技术和成就已被广泛用于环境的监测和评价。鉴于上述情况,本书在原书的基础上增加一些新的内容,同时删除了一些目前已不多用的实验方法,力求使本书满足现代科研、教学的需要。

本实验教材适用于综合性大学生态学与环境科学专业本科高年级学生或研究生,包括环境生物学、生态毒理学、环境毒理学、遗传毒理学、污染生态学、生物监测、环境微生物、生物净化等方面的实验技术与方法,可作为修读上述课程时的实验教学参考书,也可供从事环境生物学或有关学科工作的教师 and 科技人员参考。

本书所列实验都是我们历年来在环境生物教学中所采用,编者亲自实践,其中不少是教师在科研中经常使用的方法。大部分实验属大实验性质,一般不可能在一个实验单元时间内做完,而常需连续几天以至一周时间才能完成。这些实验的系统性和连续性较强,因此,教学实施计划及课程教学方案中应注意这一特点,在有限的实验课学时中,精心组织,穿插安排。

本书最后由孔志明教授负责全部书稿的统一编纂和审定。

由于作者的水平和能力有限,书中不足以至错误之处在所难免,恳请读者批评指正。

编者

2005年4月

目 录

第一部分 环境毒理学

1 斑马鱼胚胎发育实验	2
2 鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物肝微粒体致突变性实验	7
3 哺乳动物经口急性毒性实验	16
4 哺乳动物骨髓细胞微核实验	20
5 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变分析	26
6 小鼠睾丸染色体畸变实验	32
7 人体外周血淋巴细胞姐妹染色单体互换实验	37
8 哺乳动物致畸实验	43
9 单细胞凝胶电泳技术	51
10 显性致死突变实验	58

第二部分 环境微生物学

11 降解基因的克隆和表达	62
12 荧光原位杂交测定环境中特定 DNA 序列	68
13 微生物在环境中的存在	72
14 土壤中生理类群微生物的检测	75
15 有机污染物的微生物降解——高效脱酚菌的分离与筛选	77
16 根据苯酚降解菌的相对代谢率检测环境污染物的综合生物毒性	80

第三部分 环境生物技术

17 应用 RT-PCR 技术检测铜对 Ctr1 mRNA 表达的影响	84
18 DGGE 法分析环境中基因的多样性	90
19 有机废水厌氧发酵实验	93
20 活性污泥法处理生活污水的实验	96
21 活性污泥混合液耗氧速率的测定	101

22	生物接触氧化法处理生活污水的实验	103
23	植物组织培养原理与技术	109

第四部分 环境监测

24	发光菌的生物毒性测试方法	115
25	梨形四膜虫 (<i>Tetrahymena pyriformis</i>) 的毒性实验	122
26	水生生物群落监测法	127
27	水的细菌学检验	145
28	重金属在水生生物体内的积累和分布 (原子吸收分光光度法)	155
29	蚕豆 (<i>Vicia faba</i>) 根尖微核测试技术	161
30	紫露草微核试验 (<i>Tradescantia</i> MCN Test)	166
31	紫露草雄蕊毛突变生物测试	170
32	原生动物对水环境中细菌的滤食实验	173
33	植物叶绿素含量的测定	175

第五部分 生态毒理学

34	鸟类经口急性毒性实验	180
35	蚯蚓急性毒性实验	183
36	鱼类的急性毒性实验	188
37	枝角类的急性毒性实验	193
38	水生生态系统藻类毒性实验	198
39	环境内分泌干扰物的筛选——人体乳腺癌细胞 (MCF7) 增殖实验	203

第六部分 生理生化毒理学

40	血清谷丙转氨酶的测定	209
41	生物标志物实验——水生动物谷胱甘肽转移酶活性测定	213
42	有机磷农药对乙酰胆碱酯酶活性的体外抑制实验	218
43	有机磷农药对鱼 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶的影响	222
44	重金属对鱼肝过氧化氢酶的影响	226
45	植物体内超氧化物歧化酶对重金属污染响应	230
46	植物体内过氧化物酶对有机污染物的响应	233
47	林木种子发芽率的快速鉴定 (四唑法、靛蓝法)	236
48	氧电极法测定植物的光合速率和呼吸速率	243
49	胁迫环境植物组织抗逆性的测定	249

环 境 毒 理 学

第一部分

1

斑马鱼胚胎发育实验

一、目的与要求

- (1) 学习和掌握斑马鱼胚胎发育实验的基本原理和方法。
- (2) 初步了解化合物对斑马鱼胚胎不同发育阶段的毒性作用。

二、原理

斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 便于饲养且常年产卵, 鱼卵易收集, OECD 在 1996 年将斑马鱼胚胎发育方法列入测定单一化学品毒性的标准方法之一, 并制定了详细的操作指南。斑马鱼胚胎发育实验与传统的急性实验相比, 具有成本低、影响因素少、可重复性好等优点, 而且生命早期发育阶段通常对毒性作用最敏感。更加重要的是, 不同作用机理的化合物在不同胚胎发育阶段内 (如卵裂、囊胚、原肠胚、成体节阶段) 不仅毒性作用表征不同, 且敏感度也会有所改变。所以研究不同发育阶段的毒性效应可以为化合物毒理评价研究提供特殊的信息。

三、设备与材料

1. 主要器材

- (1) 多孔培养皿 (Nunc Surface, Denmark)。
- (2) 阔口胶头滴管。
- (3) 倒置光学显微镜。
- (4) 光照恒温培养箱。
- (5) 有机玻璃水族缸 [800 mm (L) × 480 mm (W) × 590 mm (H)] (包括水泵、曝气装置等)。

2. 生物材料

斑马鱼受精卵 (*B. rerio*, *Ham. Buchanan, Cyprinidae*)。将 100 多条成年雌雄鱼共同饲养在上述水族缸内。自来水经 24 h 曝气, 活性炭过滤后, 在水泵的作用下鱼缸内形成内循环。氧饱和度 > 80%, 温度 $T = 26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。昼夜光照划分为 14 h : 10 h。

每日喂食 2 次, 饲料是日本红虫。

3. 试剂

(1) 受试物。

(2) 实验用水 (曝气 24 h 以上的自来水或人工培养液)。

四、步骤和方法

1. 预实验与浓度梯度

在正式实验前, 应进行预实验以确定浓度梯度范围。正式实验浓度应包括 100% 致死或致畸和全不致死或致畸的浓度, 按等对数间距至少确定 5 个实验浓度, 并以曝气水为空白对照。

2. 质量控制

空白对照组的个体致死或致畸率不得超过 10%。

3. 鱼卵的收集与染毒

斑马鱼在见光后马上进行交配, 30 min 后完成交配产卵。为了防止成鱼掠食鱼卵, 用不锈钢丝网覆盖收集器。将用做产卵环境的塑料仿植物体固定在丝网上。给光 30 min 后将鱼卵收集器取出。用胶头滴管收集鱼卵并用曝气过的自来水冲洗 2 次, 去除杂质。将鱼卵迅速暴露于受试溶液中并转移至多孔培养皿中, 每个孔放置 1 个卵, 每个浓度 20 个卵。

同时以曝气水为空白对照。

4. 鱼卵甄别

产卵 30 min 后, 可用倒置显微镜识别鱼卵受精与否 (受精 35 min 后, 胚盘发生第一次卵裂)。剔除未受精卵 (不分裂)、分裂时呈明显的不规则 (不平衡, 水肿) 或是卵壳损伤的鱼卵, 并补充新卵, 直至每个孔内都有一枚斑马鱼受精卵。

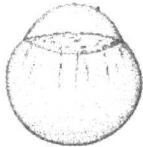
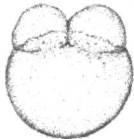
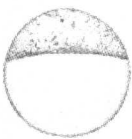
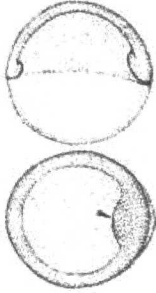
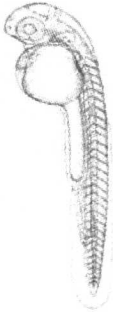
5. 培养

将多孔培养皿放置在恒温光照培养箱中进行斑马鱼胚胎培养, 将培养条件设为 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 光照比为 12h/12h (昼/夜)。

6. 观察与记录

在斑马鱼受精卵发育 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 h 时在倒置显微镜下观察斑马鱼胚胎并记录各种异常发育状况。斑马鱼胚胎正常发育的过程如表 1 所示:

表1 斑马鱼胚胎正常发育过程

				
受精卵 (0.2 h)	二分期 (0.5 h)	囊胚早期 (4 h)	囊胚阶段 (8 h)	原肠胚完成 (12 h)
				
具有体节和眼点的胚胎, 20s 内有主动活动 (24 h)	尾部已从卵黄上分离的胚胎; 有血液循环, 有心跳 (36 h)	具有明显色素的正常发育胚胎, 眼睛变黑 (48 h)	胚胎的黑色素加深, 尾部延长 (60 h)	孵化的幼鱼 (72 h)

在各观察时间点的发育异常见表2。

表2 斑马鱼胚胎发育各观察点的发育异常

发育时间/h	毒理学终点
4	卵凝结, 囊胚发育停止
8	外包活动阶段异常
12	原肠胚终止、胚孔关闭
24	尾部延展、20 s 内主动活动、眼点发育
36	血液循环异常
48	黑素细胞发育异常
72	未孵化、畸形、死亡

五、结果与报告

1. 曝气水常规分析

分析的项目主要有：pH、硬度、电导率、溶解氧等。

2. 实验结果

根据实验结果，采用 TSK (TRIMMED SPEARMAN-KARBER, EPA 推荐) 软件计算 EC_{50} 及置信限。TSK 输出结果示例见实验 35 “蚯蚓急性毒性实验” 中表 2。

实验报告应包括受试物、受试生物基本信息及实验条件等，并对观察到的特殊异常现象进行文字性说明。

(1) 受试物

名 称：_____

来 源：_____

溶 解 度：_____

挥 发 性：_____

(2) 实验条件

温 度：_____

实验时间：_____

光照强度：_____

(3) 实验用水

pH：_____

硬 度：_____

电 导 率：_____

溶 解 氧：_____

曝气方式：_____

曝气时间：_____

(4) 实验结果

(置信限：_____)

发育时间/h	暴露剂量	EC_{50}	温度	胚胎异常数	异常率	备注
4						
8						
12						
24						
36						
48						
60						
72						

六、注意事项

(1) 由于个体差异或实验条件的差异，斑马鱼胚胎发育速度存在个体差异，实

验终止时间可选择 72 h 或 96 h。

(2) 不健康的胚胎应在第一时间剔除, 以避免影响实验结果。

(3) 不同的温度及光照条件对斑马鱼胚胎发育速度的影响明显, 因此, 实验条件(温度、光照等)应严格控制, 保证恒定。

参考文献

- [1] OECD. Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages. OECD guideline for testing of chemicals, OECD TG212, Paris, 1998.
- [2] OECD. OECD guideline for testing of chemicals, 1996: 62-76.

(曲薏薏)

2

鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物肝微粒体致突变性实验

一、目的与要求

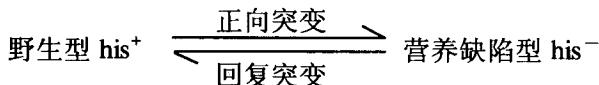
(1) 了解实验的基本原理并能进行实验设计。

(2) 学习并掌握实验操作步骤及实验结果的计算、分析, 据此评定受试物的致突变性。

二、原理

鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物肝微粒体致突变性实验 (Salmonella typhimurium/mammalian microsome test), 简称 Ames 实验, 是美国加利福尼亚大学 Ames 教授经过 12 年的辛勤研究建立的一种致突变测试方法。1975 年 Ames 等人用紫外线照射诱导鼠伤寒沙门氏菌 LT₂ 菌株, 筛选出若干不同的组氨酸营养缺陷型菌株为测试标准菌株。这些菌株缺少合成组氨酸的基因, 只能在含有组氨酸的培养基上才能生长。但是, 致突变污染物质能够改变该类菌株的基因, 导致其发生回复突变, 使其重新成为具有自我合成组氨酸能力的菌株, 在没有组氨酸的培养基中也能够生长, 形成肉眼可见的菌落。

野生型与组氨酸营养缺陷型关系如下式:



通过统计计算发生回变的菌落数, 就可以判断受试物质的致突变性的高低。一般认为, 回变菌落数超过自发回变菌落数的 2 倍, 且具有线性的剂量—反应关系, 就被认为致突变实验呈阳性, 受试物质具有突变特性。目前常用的组氨酸缺陷型沙门氏菌有 TA97、TA98、TA100 及 TA102。其中 TA98 能够检测导致 DNA 移码的致突变物质, 而 TA100 能够检测导致 DNA 为碱基对置换的致突变。在环境检测领域经常采用的菌株是 TA97 及 TA100。

为了增加菌株对化学物质的敏感性, Ames 还给这些菌株附加了几种突变特性

及抗氨苄青霉素 (ampicillin) R 因子。

(1) 紫外线切割修复系统 (excision repair) 缺失突变 ($\Delta uvrB$), 是使细菌失去 DNA 切除修复能力, 因而提高其检测的敏感性。紫外线切割修复系统 (excision repair) 缺失突变, 一直延伸到邻近的生物素基因, 使细菌失去合成生物素的能力, 所以在培养基中要加入微量生物素。

(2) 深粗糙突变 (rough face), 简称 rfa 突变, 可导致细菌细胞壁上脂多糖 (LPS) 屏障缺失, 从而使一些大分子有机物得以透入菌体。

(3) 菌体内组入含 R 因子质粒 (如质粒 pKM101、质粒 pAQ1 等), 这些质粒能增强细胞 DNA 损伤的易误修复, 促使有可能被修复的前突变转变为真正的突变, 以提高菌株的敏感性。

此外, 在实验中加入 S_9 混合液的体外激活系统 (哺乳动物肝微粒体酶系统) 是使一些需要代谢激活的物质得以活化, 表现出致突变性, 以提高检出率。

三、实验条件

1. 器材

恒温水浴箱, 隔水式培养箱, 恒温振荡器, 高压灭菌锅, 低温冰箱 (-80°C), 高速离心机, 显微镜, 15 W 紫外灯, G-6 型漏斗 ($0.2\ \mu\text{m}$), 注射器 (1 mL), 解剖刀, 解剖剪, 解剖盘, 组织匀浆器, 微量加液器 (100、200、500 μm), 培养皿 (直径 9 cm), 试管 (1.5 cm $\times$ 10 cm), 三角瓶 (100 mL、500 mL), 烧杯 (150 mL、500 mL), 滤纸片 (直径 4 mm), 黑色玻璃或黑纸 (12 cm $\times$ 12 cm), 滤纸条 (90 mm $\times$ 2 mm)。

2. 试剂与培养基

(1) 营养肉汤。牛肉膏 0.5 g, 蛋白胨 1.0 g, NaCl 0.5 g, 蒸馏水加至 100 mL。调节 pH 为 7.2~7.5, 分装试管或 100 mL 三角瓶各 5~10 mL。15 磅*20 min 高压湿热灭菌, 冰箱保存供增菌用。

(2) 营养琼脂 (B.R.)。营养琼脂 3.9 g, 蒸馏水加至 100 mL, 分装于三角瓶, 15 磅 20 min 灭菌备用。

(3) 底层 (基本) 培养基 (即最低营养培养基)。

① Vogel-Bonner (V-B) 培养基 E (50 倍的最低营养培养基) 硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1 g, 枸橼酸单水化合物 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 10 g, 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) 50 g, 磷酸氢铵钠 ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 17.5 g, 蒸馏水加至 100 mL, 加热使其全部溶解。可不必校 pH, 不必灭菌, 置 4°C 冰箱保存备用。

* 指 15 磅压力下灭菌, 1 磅=0.4536 千克, 全书同。

② 葡萄糖贮备液。葡萄糖 4 g、蒸馏水加至 100 mL, 9 磅 10 min 高压灭菌, 待冷却后, 4℃ 冰箱保存备用。

(4) 琼脂培养基。琼脂粉 1.5 g, 50×V-B 2.0 mL, 蒸馏水加至 93 mL, 15 磅 20 min 高压灭菌, 待稍凉后, 加入葡萄糖贮备液 5 mL, 使充分混匀。待温度降至 55℃ 左右倒入无菌培养皿中, 每皿为 20 mL。琼脂平板可置室温保存。

(5) 上层培养基。琼脂粉 0.6 g, 氯化钠 0.5 g, 0.5 mmol/L L-组氨酸/D-生物素 10 mL, 蒸馏水加至 100 mL, 加热融化混合均匀后趁热分装于试管 (1.5 cm×10 cm), 每管 2.5 mL, 15 磅压力下灭菌 20 min, 备用。

(6) 素琼脂上层培养基。琼脂粉 0.6 g, 氯化钠 0.5 g, 蒸馏水加至 100 mL, 加热融化混合均匀后趁热分装于试管 (1.5 cm×10 cm), 每管 2.5 mL, 15 磅灭菌 20 min, 冰箱保存备用。

(7) 0.5 mmol/L L-组氨酸/D-生物素。L-组氨酸盐酸盐 (分子量 155.16) 7.758 mg, D-生物素 (分子量 224.1) 11.2 mg, 蒸馏水加至 100 mL。

(8) 细胞生长素 (25 mmol/L L-组氨酸/0.5 mmol/L D-生物素)。L-组氨酸盐酸盐 (分子量 155.16) 38.79 mg, D-生物素 (分子量 224.1) 11.2 mg, 蒸馏水加至 100 mL。

(9) 0.15 mmol/L 氯化钾。15 磅 15 min 高压灭菌后, 置冰箱冷却后备用。

(10) 大鼠肝脏微粒体酶提取液 (即 S_9) 的制备。

① 酶的诱导。成年雄性大白鼠 (体重 100~150 g) 3 只, 按每千克体重腹腔注射诱导物五氯联苯油溶液 2.5 mL (用玉米油配制, 浓度为 200 mg/mL), 诱导酶活力。五天后杀鼠 (杀鼠前禁食 24 h)。

② 肝匀浆和上清液的制备。将大鼠用重棒击昏, 浸泡在消毒水中数分钟, 断头放血, 暴露胸腔, 从肝门静脉处注入冰冷的 0.15 mol/L KCl 溶液洗涤肝脏 2~3 次。取肝脏称重后, 剪碎, 每克肝 (湿重) 加冰冷的 0.15 mol/L KCl 溶液 3 mL, 并用组织捣碎机将肝脏制成匀浆。匀浆液经 9 000×g 离心 10 min, 取上清液分装小管 (每管 1~2 mL), 抽样菌检, 低温 (-20℃) 保存备用。

以上操作需要无菌条件, 并在 4℃ 下进行。

(11) 微粒体酶混合液 (S_9 混合液) 制备方法:

① 0.2 mol/L pH 为 7.4 磷酸缓冲液。取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.16 g, KH_2PO_4 2.72 g, 加蒸馏水至 100 mL, 灭菌后备用。

② 盐溶液。取 MgCl_2 8.1 g, KCl 12.3 g, 加蒸馏水至 100 mL, 灭菌后备用。

③ NADP (辅酶 II) 和葡萄糖-6-磷酸 (G-6-P) 使用液。每 100 mL 使用液含 NADP 297 mg, G-6-P 152 mg, 0.2 mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液 50 mL, 盐溶液 2 mL, 加蒸馏水至 100 mL。细菌过滤器过滤除菌, 分装成 10 mL 小瓶后置于 -20℃ 贮存备用。

④ S_9 混合液。取 2 mL S_9 加入 10 mL NADP 和 G-6-P 使用液即成。混合液置冰浴中, 需现配现用。

(12) 0.1 mol/L L-组氨酸/0.5 mmol/L D-生物素溶液。L-组氨酸 (分子量 155.16) 15.5 mg、D-生物素溶液 (分子量 224.1) 1.12 mg、无菌蒸馏水加至 100 mL, 置 4℃ 冰箱保存备用。

(13) 0.85% 灭菌生理盐水。

(14) 1 mg/mL 结晶紫 (用无菌水配制)。

(15) 8 mg/mL 氨苄青霉素 (用无菌的 0.02 mol/L NaOH 水溶液配制)。

(16) 8 mg/mL 四环素溶液 (用无菌的 0.02 mol/L HCl 水溶液配制)。

(17) 10 mg/mL 环磷酰胺溶液 (用无菌水配制)。

(18) 0.1 mg/mL 正定霉素溶液 (用无菌水配制)。

3. 实验菌株

选用鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 组氨酸营养缺陷型菌株 TA98、TA100。或选用 TA97、TA98、TA100 及 TA102 等一组菌株。实验菌株需经生物学性状鉴定, 符合要求后方可使用。

四、实验步骤与方法

1. 实验用菌液制备

(1) 生长培养。将贮存于 -80℃ 冰箱中的菌液常温融化后, 取 0.2 mL 接种在装有 9.8 mL 营养肉汤的 50 mL 三角瓶中, 置 37℃、振荡培养 10 h。

(2) 活菌计数。取一支内含 1.8 mL 素琼脂上层培养基, 使之融化后保温于 45℃, 加入 0.2 mL 活菌生长液。吸取 0.1 mL 经生长培养并稀释成 1×10^6 : 1.6×10^6 的菌液, 加入软琼脂中混匀后, 倒入硬琼脂平板面上铺匀, 于 37℃ 下培养 24 h。做两个平板, 计数菌落, 活菌数在 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$ /mL, 可供实验之用。

2. 菌株性状鉴定

(1) 组氨酸营养缺陷型鉴定。吸取 0.1 mL 菌液加入装有 2.5 mL 已融化并保温在 45℃ 的素琼脂上层培养基试管中, 混匀后注入底层培养基上平铺均匀, 取浸有 0.1 mol/L L-组氨酸 0.5 mmol/L D-生物素 (TA102 菌株不需加 D-生物素) 的无菌圆滤纸片 (直径 4 mm), 平放于素琼脂平板上, 37℃ 培养 24~48 h, 观察圆滤纸片的周围有无菌落生长。每一菌株至少作两个平皿平行实验。

(2) 深粗糙 (rfa) 突变鉴定。取两个营养肉汤琼脂平板, 用无菌接种环分别取实验菌液和对照 (野生型) 菌液, 于平板上划平行线, 随后用浸有 0.1% 结晶紫的无菌滤纸条 (90 mm × 2 mm) 置于平板上, 且与接种平行划线中央垂直相交。37℃