

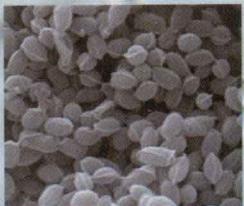
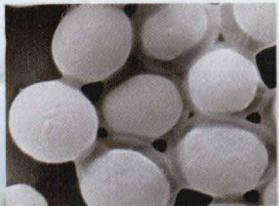


普通高等教育“十二五”规划教材

PUTONG GAODENG JIAOYU "12·5" GUIHUA JIAOCAI

环境工程微生物学 实验指导

姜彬慧 李亮 方萍 编著



冶金工业出版社

Metallurgical Industry Press

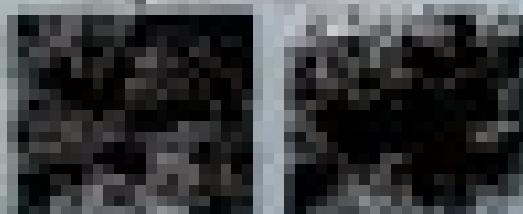
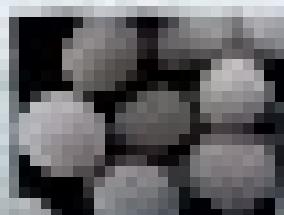


清华大学环境工程系“十一五”规划教材

环境工程微生物学实验指导

环境工程微生物学 实验指导

第三版 第三册



清华大学出版社



普通高等教育“十二五”规划教材

环境工程微生物学实验指导

姜彬慧 李亮 方萍 编著

北京
冶金工业出版社
2011

内 容 简 介

环境工程微生物学实验是环境工程微生物学的重要组成部分，通过实验可以使学生深入理解课堂讲授的内容，掌握有关微生物的基本特征，培养学生分析和解决实际问题的能力，提高学生的动手能力。全书包括环境工程微生物学基本理论要点、微生物实验基础知识及环境工程微生物学实验等三章。

本书可作为环境科学与环境工程学科的本科生、研究生专业实验教材，也可供相关专业科研和工程技术人员参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

环境工程微生物学实验指导 / 姜彬慧，李亮，方萍
编著. —北京：冶金工业出版社，2011. 12

普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-5024-5818-8

I. ①环… II. ①姜… ②李… ③方… III. ①环境
生物学：微生物学—实验—高等学校—教学参考资料
IV. ①X172-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 282467 号

出 版 人 曹胜利

地 址 北京北河沿大街嵩祝院北巷 39 号，邮编 100009

电 话 (010) 64027926 电子信箱 yjcb@cnmip.com.cn

责 任 编辑 杨秋奎 谢冠伦 美术编辑 李 新 版式设计 孙跃红

责 任 校 对 禹 蕊 责任印制 李玉山

ISBN 978-7-5024-5818-8

北京百善印刷厂印刷；冶金工业出版社出版发行；各地新华书店经销
2011 年 12 月第 1 版，2011 年 12 月第 1 次印刷

148mm × 210mm；6.375 印张；1 彩页；190 千字；198 页

20.00 元

冶金工业出版社投稿电话：(010) 64027932 投稿信箱：tougao@cnmip.com.cn

冶金工业出版社发行部 电话：(010) 64044283 传真：(010) 64027893

冶金书店 地址：北京东四西大街 46 号(100010) 电话：(010) 65289081(兼传真)
(本书如有印装质量问题，本社发行部负责退换)

前　　言

环境工程微生物学是环境科学的一个分支，是环境科学、环境化学及环境工程学等学科的专业基础课。环境工程微生物学是一门实践性很强的课程，要求学生在学习时除了要掌握环境工程微生物学实验的基本操作技能外，还要安排充分时间有选择地进行环境工程微生物学的应用性、探究性实验技能训练。

环境工程微生物学实验是环境工程微生物教学中的重要组成部分，通过环境工程微生物学实验，培养学生独立思考、观察、分析问题和解决问题的能力以及独立完成实验内容的能力，既可以将理论与实验相结合，又可以使学生熟练掌握实验技术，以提高学生实验设计水平，树立实事求是的工作作风。

本书是根据多年教学实践并参考其他高等院校的实验指导书编写而成的。全书包括环境工程微生物学基本理论要点、微生物实验基础知识及环境工程微生物学实验等三章内容。第1章介绍了与环境工程微生物学相关的基本理论，包括微生物的基本形态特征、微生物的生理和代谢活性特性及微生物在环境工程中应用的作用机理。第2章介绍了与微生物培养、分离纯化技术、菌种保存等有关的内容，包括各实验所需的染色液、培养基的配制，常用的灭菌方法、微生物菌种保藏方法以及透光度与光密度的换算表等，以方便读者查阅与参考。第3章是关于环境工程微生物学的实验技能训练指导，其中3.1节为基本实验技巧训练内容，目的是使学生掌握微生物实验操作的基本技能，包括光学显微镜的操作及细菌形态观察、微生物染色、微生物细胞计数以及培养基的制备及灭菌与细菌纯种分离及培养；3.2节为实验技能提高

训练内容，是开放性实验，目的是激发学生参与实验设计的热情并提高其解决实际问题的能力，包括水中细菌菌落总数测定、光合细菌的分离与筛选、细菌生长曲线的测定、影响微生物生长的条件实验、微生物对污染物的酶促反应速率的测定、富营养化湖中藻类的测定（叶绿素a法）、淡水绿藻对重金属的吸附实验以及细菌对有机磷农药的降解实验。

本书原为东北大学资源与土木工程学院环境工程专业学生的实验教材，现经过补充与修改献给广大读者，希望对大家有所帮助。本书的第1章由姜彬慧编写，第2章、第3.1节由李亮编写，第3.2节由方萍编写。本书还参考了淮阴师范学院生物实验指导中心王新风等编著的《微生物学实验指导》及华南师范大学生命科学学院黄文芳等编著的《微生物学实验指导》，在此表示感谢。

由于编著者水平所限，书中不足之处，敬请读者批评指正。

编著者

2011年10月

目 录

1 环境工程微生物学基本理论要点	1
1.1 概述	1
1.2 病毒	6
1.3 原核微生物	8
1.4 真核微生物	27
1.5 微生物的生理	34
1.6 微生物的生长繁殖与生存因子	44
1.7 微生物对污染物的转化与降解	52
1.8 微生物在环境工程中的应用	56
1.9 生物技术及微生物新技术在环境工程中的应用	65
2 微生物实验基础知识	86
2.1 微生物实验常用培养基	86
2.2 教学用染色液的配制	94
2.3 微生物染色常用的染料	95
2.4 物理灭菌方式介绍	96
2.5 微生物实验室常用消毒灭菌的化学药剂	101
2.6 微生物菌株的分离纯化和培养技术介绍	104
2.7 微生物菌种的退化与复壮	114
2.8 微生物菌种的诱变育种	118
2.9 微生物菌种的保藏	120
2.10 透光率和光密度换算	127
3 环境工程微生物学实验	129
3.1 基础性实验	129
实验 1 光学显微镜的操作及细菌形态观察	129

实验 2 微生物染色.....	137
实验 3 微生物细胞计数.....	142
实验 4 培养基的制备及灭菌与细菌纯种分离及培养.....	145
3.2 应用性实验	154
实验 5 水中细菌菌落总数 (CFU) 的测定.....	154
实验 6 光合细菌的分离与纯化.....	158
实验 7 细菌生长曲线的测定.....	164
实验 8 影响微生物生长的条件实验.....	168
实验 9 微生物对污染物的酶促反应速率的测定.....	172
实验 10 富营养化湖中藻类的测定 (叶绿素 a 法)	176
实验 11 淡水绿藻对重金属的吸附实验	181
实验 12 土壤中农药降解菌的分离及性能测定	187
参考文献	197

附录 微生物生理生化实验结果图片

1 环境工程微生物学基本理论要点

1.1 概 述

1.1.1 微生物在环境保护和治理中的作用

由于微生物具有特殊的生理特性及易发生变异的特点，因此微生物在环境保护与环境治理及保持生态平衡等方面与其他生物一样起着重要的作用，主要体现为微生物对污染物的降解，污染环境的微生物指示作用，固定化酶、固定化微生物在环境污染治理中的应用，污染物高效降解优势微生物菌种的筛选及利用基因工程构建超级菌处理废水等。

1.1.2 环境工程微生物学的研究对象与任务

环境工程微生物学的研究对象是：在研究微生物一般特性的基础上，重点研究环境预防与环境治理中的微生物形态与生态、饮用水卫生学、自然环境中物质的循环与转化。

环境工程微生物学的研究任务是：充分利用有益的微生物资源解决环境污染问题，包括环境工程微生物净化的原理与方法等研究。

1.1.3 极端环境生活的微生物在环境污染治理工程中的作用

极端环境生活的微生物主要类群包括：专性厌氧的产甲烷菌、极端嗜热菌、极端嗜盐菌、极端嗜碱菌和极端嗜酸菌等，它们生长在特殊的环境中，必然具有特殊的生理功能。而环境污染治理工程遇到的废水基本是在极端条件下的，如北方的严寒、南方的炎热；稠油废水、焦化废水和化肥废水（70~80℃）；味精废水的温度极低（2~4℃），pH值为2~3；还有其他酸性废水、碱性废水。因此，开发极端环境的微生物资源处理废水具有广阔前景。

1.1.4 微生物与微生物学

微生物 (microorganism) 是广泛存在于自然界中的一群肉眼看不见，必须借助光学显微镜或电子显微镜放大数百倍、数千倍甚至数万倍才能观察到的微小生物的总称。其主要特征为：个体微小、结构简单，分布广泛、种类繁多，繁殖迅速、生长快，容易变异、适应性强。

微生物学 (microbiology) 是生物学的一个分支，是研究微生物的进化、分类，在一定条件下的形态、结构、生命活动规律及其与人类、动物、植物、自然界相互关系等问题的科学。

1.1.5 微生物的分类系统

微生物分类就是将各种各样的微生物按照亲缘关系分群归类、命名，并编排成系统，它包括：鉴定 (identification)、分类 (classification) 与命名 (nomenclature)。微生物的主要分类单位依次为界 (kingdom)、门 (phylum 或 division)、纲 (class)、目 (order)、科 (family)、属 (genus)、种 (species)。其中，种是最基本的分类单位，“株”不是分类单位。

具有完全或极多相同特点的有机体构成同种；相互有关的各种组成属，相近似的属合并为科，近似的科合并为目，近似的目归纳为纲，综合各纲成为门。

目前，有三个比较全面的分类系统：苏联克拉西尼科夫（1969年）所著的《细菌与放线菌鉴定》、法国普雷沃（1961年）所著的《细菌分类学》和美国细菌学家协会所属伯杰氏鉴定手册董事会组织各有关学者编写的《伯杰氏鉴定细菌学手册》。

1.1.6 微生物的分类鉴定方法

微生物分类鉴定方法分为传统分类鉴定方法，又称经典分类法；现代分类鉴定方法，包括遗传分类法、化学分类法和数值分类法。

(1) 经典分类法主要以微生物的形态学、生理生化特征作为分类与鉴定的重要依据之一，其特点是人为地选择几种形态、生理生

化特征进行分类，并在分类中将表型特征分为主、次。一般在科以上分类单位以形态特征加以区别，在科以下分类单位以形态结合生理生化特征加以区别。其工作步骤：首先要获得微生物的纯培养，然后测定一系列必要的鉴定指标，最后再查找权威性的菌种鉴定手册。

经典分类方法中采用常规的经典鉴定指标，包括微生物的形态特征（个体形态和群体形态）、营养要求、生理生化反应特征、生态学特性、生活史及有性生殖情况、血清学反应、对噬菌体的敏感性等。

微生物工作者通过长期艰苦的工作，对经典分类鉴定方法进行了改革，创造了多种简便、快速、微量或是自动化的技术。较有代表性的如鉴定各种细菌用的 API 系统（analytica products INC 的简称），“Enterotube”系统和“Biolog”全自动和手动系统等。这些系统不但有利于普及菌种鉴定技术，而且还大大提高了工作效率。

1) API 系统（微量多项试验鉴定系统），又称简易诊检技术或数码分类鉴定法，由法国 Bio-梅里埃公司生产，包括 20 种不同的生化反应，可鉴定 700 多种细菌。该系统的基本原理是根据微生物生理生化鉴定的结果而进行的数码分类鉴定。鉴定系统是一长形卡片，长 24cm，宽 4.5cm，其上排列着 20 个小管，能同时测定 20 项生化指标。针对微生物的生理生化特征，各小管内分别加有适量（约 0.1mL）配制好的培养基、反应底物、反应产物的显色试剂等干粉。试验时，加入待测微生物的菌液，经 24~48h 的保温培养，观察鉴定小管中的各种显色反应，再加上包括细胞形态、大小、运动性、溶血性、产色素、过氧化氢酶、芽孢有无和革兰氏反应等补充指标，就可按判定并对结果进行编码，查检索表，最后获得该菌种的鉴定结果。

2) “Enterotube” 系统又称肠管系统。其鉴定卡是一带有 12 个分隔壁的塑料管，每个分隔壁中灌有能鉴别不同生化反应的固体培养基（琼脂斜面）。所有小室间都有 1 孔，有 1 根接种丝贯穿其中，接种丝的两端突出在塑料管外，被两个塑料帽覆盖。鉴定未知菌时，先旋下两端塑料帽，用接种丝的一端蘸取待检菌落，接着在另一端

拉出接种丝，通过全部分隔室，然后再回复原状，以使每个小室的培养基都接上菌种。培养后，按“API”系统类似的步骤，观察、记录、编码、判断和鉴定菌种。

3) Biolog 全自动和手动细菌鉴定系统是一块有 96 孔的细菌培养板，横排 12 孔，纵向 8 孔。其中 95 孔内加有 95 种不同碳源的培养基缓冲液、营养盐和四唑类氧化还原指示剂，另 1 孔为无碳源的缓冲液对照。鉴定系统可检测某菌株对不同单一碳源的利用情况，以判断该菌株的分类地位。该方法由美国的 Biolog 公司于 1989 年开发成功，至今已经能够鉴定包括细菌、酵母菌和霉菌等 2000 多种微生物。鉴定前，先将待测菌种制成适当浓度的菌悬液，然后用接种器吸入定量的菌液接种，定温培养。每日定时读取 Biolog 系统中计算机上各碳源利用情况，一般为 1 周，系统即可鉴定出待检微生物为何种菌，Biolog 系统可将被鉴定菌株鉴定到属。

Biolog 方法用于微生物群落研究，具有如下特点：不用分离培养纯种微生物、最大限度地保留微生物群落原有的代谢特征；灵敏度高、分辨力强；测定简单、效率高，数据的读取与记录可以由计算机完成，微生物对不同碳源代谢能力的测定同时在 1 块平板上完成。

(2) 遗传分类法从遗传学角度估计微生物间的系统关系，就是以微生物的遗传型（基因型）特征为依据，判断微生物之间的亲缘关系，排出一个个的分类群。目前，较为常用的方法有：DNA 碱基组成中 ($G + C$) 摩尔分数分析、核酸分子杂交技术、rRNA 寡核苷酸序列分析以及 DNA 芯片技术等。

(3) 化学分类法利用电泳、色谱和质谱等分析技术，根据微生物细胞的特征性化学组分来分析比较不同微生物细胞组分、代谢产物的组成等，并对微生物进行分类鉴定的方法称化学分类法 (chemotaxonomy)。近 20 年来，采用化学与物理技术研究细菌细胞的化学组成，已经获得很有价值的分类和鉴定结果。例如对细菌、放线菌细胞壁化学成分的测定，对磷酸类脂成分的分析，对分枝杆菌的枝菌酸的分析，对原核生物甲基萘醌的分析，对厌氧菌鉴定中运用气相色谱技术来分析微生物细胞和代谢产物中的脂肪和醇类成分等。

(4) 数值分类法又称统计分类法，是一种依据数值分析的原理借助现代计算机技术对拟分类的微生物对象按大量表型性状的相似程度进行统计、归类的方法，是最近 20 年才发展起来的细菌分类学理论。应用大量已知菌对相关生物化学试验反应出现的频率得出数据进行分析，优化组合数 10 项生理生化指标集合成套试剂，根据相似系数大小判断细菌种间的亲源性。通常是从形态、生理生化特性，对环境的反应和忍受性以及生态特性为依据，最后将所测的菌株两两进行比较，并借用电子计算机计算出菌株间的总类似值，列出相似值矩阵。为了便于观察，应将矩阵重新排列，使相似度高的菌株列在一起，然后将矩阵图转换成树状谱 (dendrogram)。

1.1.7 微生物的主要类群

微生物按其结构、化学组成及生活习性等差异可分成三大类群：

(1) 非细胞型微生物：没有典型的细胞结构，也无产生能量的酶系统，只能在活细胞内生长繁殖。病毒属于此类型微生物。

(2) 原核细胞型微生物：细胞核分化程度低，仅有原始核质，没有核膜与核仁；细胞器不完善，无有丝分裂。这类微生物种类众多，有古菌（古细菌）、真细菌、放线菌、蓝藻、支原体、衣原体、螺旋体和立克次体。

(3) 真核细胞型微生物：细胞核的分化程度较高，有核膜、核仁和染色体；胞质内有完整的细胞器（如内质网、核糖体及线粒体等），进行有丝分裂。真菌（霉菌、酵母菌）、除蓝藻以外的藻类、原生动物及微型后生动物属于此类微生物。

1.1.8 微生物的命名

微生物的命名采用生物学中的二名法：属名 + 种名 + 命名人（拉丁斜体字母表达）。

(1) 属名：名词，首字母大写，用以描述微生物的主要特征。

(2) 种名：形容词，首字母小写，为微生物的来源、形状、色素、引起传染病名等，代表某种微生物的次要特征。如大肠埃希氏杆菌的名称是 *Escherichia coli*。

1.2 病 毒

1.2.1 病毒的基本特征及分类

病毒是超显微的、无细胞结构的、只含一种核酸（DNA或RNA）、只能在活细胞内存活的寄生物。主要有以下基本特征：

- (1) 个体微小，其大小在 $0.2\mu\text{m}$ 以下，可通过除菌滤器，大多数病毒须用电镜才能看见。
- (2) 仅具有一种类型的核酸，或DNA或RNA。
- (3) 严格的活细胞（真核或原核细胞）内复制增殖。
- (4) 具有受体联结蛋白（receptor binding protein），与敏感细胞表面的病毒受体联结，进而感染细胞。

病毒的分类有两种方法：

- (1) 根据专性宿主分类。动物病毒、植物病毒、细菌病毒（噬菌体）、放线菌病度（噬放线菌体）、藻类病毒（噬藻体）和真菌病毒（噬真菌体）。
- (2) 按核酸分类。DNA病毒和RNA病毒。

1.2.2 病毒的形态

- (1) 球形：大多数人类和动物病毒为球形，如脊髓灰质炎病毒、疱疹病毒及腺病毒等。
- (2) 丝形：多见于植物病毒，如烟草花叶病病毒等。人类某些病毒（如流感病毒）有时也可形成丝形。
- (3) 弹形：形似子弹头，如狂犬病病毒等，其他多为植物病毒。
- (4) 砖形：如痘病毒（天花病毒、牛痘苗病毒等）。其实大多数呈卵圆形或“菠萝形”。
- (5) 蝌蚪形：由一卵圆形的头及一条细长的尾组成，如噬菌体。

1.2.3 病毒的结构与功能

病毒的结构有两种，一种是基本结构，为所有病毒所必备；另

一种是辅助结构，为某些病毒所特有，它们具有特殊的生物学功能。

1.2.3.1 病毒的基本结构

A 核酸

核酸 (nucleic acid) 位于病毒体的中心，由一种类型的核酸构成，含 DNA 的称为 DNA 病毒，含 RNA 的称为 RNA 病毒。DNA 病毒核酸多为双股 (除微小病毒外)，RNA 病毒核酸多为单股 (除呼肠孤病毒外)。

核酸的功能：核酸蕴藏着病毒的遗传信息，主导病毒的生命活动、形态发生、遗传变异和感染性。若用酚或其他蛋白酶降解剂去除病毒的蛋白质衣壳，提取核酸并转染或导入宿主细胞，可产生与亲代病毒生物学性质一致的子代病毒，从而证实核酸的功能是遗传信息的储藏所。

B 衣壳

在核酸的外面紧密包绕着一层蛋白质外衣，即病毒的“衣壳 (capsid)”。衣壳是由许多“壳微粒 (capsomere)”按一定几何构型集结而成，壳微粒在电镜下可见，是病毒衣壳的形态学亚单位，它由一至数条结构多肽构成。

蛋白质衣壳的功能：

(1) 致密稳定的衣壳结构除赋予病毒固有的形状外，还可保护内部核酸免遭外部环境 (如血流) 中核酸酶的破坏。

(2) 衣壳蛋白质是病毒基因产物，具有病毒特异的抗原性，可刺激机体产生抗原病毒免疫应答。

(3) 具有辅助感染作用，病毒表面的特异性受体联结蛋白与细胞表面相应受体有特殊的亲和力，是病毒选择性吸附宿主细胞并建立感染灶的首要步骤。

1.2.3.2 病毒的特殊结构——被膜 (囊膜)

痘病毒、腮腺炎病毒等除了含有蛋白质和核酸外，还有类脂质的被膜包裹在衣壳外面，其中 50% ~ 60% 为磷脂，其余为胆固醇。

1.2.4 病毒的化学组成

病毒的化学组成主要为蛋白质和核酸，有的还有类脂质和多糖。

1.2.5 病毒的增殖

病毒体在细胞外是处于静止状态的，基本上与无生命的物质相似，当病毒进入活细胞后便发挥其生物活性。由于病毒缺少完整的酶系统，不具有合成自身成分的原料和能量，也没有核糖体，因此决定了它的专性寄生性，必须侵入易感的宿主细胞，依靠宿主细胞的酶系统、原料和能量复制病毒的核酸，借助宿主细胞的核糖体翻译病毒的蛋白质。病毒这种增殖的方式称为“复制”。

病毒复制的过程（复制周期）分为五个步骤，即吸附、穿入、脱壳、生物合成和装配与释放。

1.3 原核微生物

1.3.1 生命三域

生命三域即细菌域（bacteria）、古菌域（archaea）、真核生物域（eucarya）。

1977年Woese等对代表性细菌类群的16SrRNA碱基序列进行研究比较后提出：古菌是在系统发育上与细菌和真核生物均不同的一群原核生物，古菌、细菌和真核生物分属于生物界中三个发育不同的基因系统。

1.3.2 细菌及其形态

细菌（bacterium）是属于原核型细胞的一种单胞生物，形体微小，结构简单，无成形细胞核、也无核仁和核膜，除核蛋白体外无其他细胞器。在适宜的条件下其具有相对稳定的形态与结构。一般将细菌染色后用光学显微镜观察，可识别各种细菌的形态特点，而其内部的超微结构须用电子显微镜才能看到。细菌按其外形主要分为三类：球菌、杆菌、螺旋菌（图1.1）。

1.3.2.1 球菌

细胞呈圆球形或近似圆球形，有的呈矛头状或肾状。单个球菌

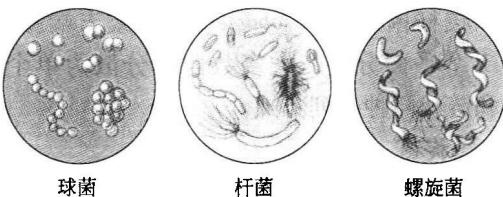


图 1.1 细菌的三种基本形态

的直径为 $0.8 \sim 1.2\text{ }\mu\text{m}$ 左右。由于繁殖时细菌细胞分裂方向和分裂后细菌粘连程度及排列方式不同可分为六种主要类型。

- (1) 单球菌 (*Micrococcus*)：细胞在一个平面上分裂，分裂后产生的两个细胞立即分开，如尿素微球菌 (*Micrococcus ureae*)。
- (2) 双球菌 (*Diplococcus*)：细胞在一个平面上分裂，分裂后产生的两个细胞成双排列，如肺炎双球菌 (*Diplococcus pneumoniae*)。
- (3) 链球菌 (*Streptococcus*)：细胞在一个平面上多次分裂，分裂后产生的细胞成链状排列，如乳链球菌 (*Streptococcus lactis*)。
- (4) 四联球菌 (*Micrococcus tetragenus*)：细胞在两个相互垂直的平面上分裂，两次分裂后的细胞以 4 个球菌呈方形排列，如四联微球菌 (*Micrococcus tetragenus*)。
- (5) 八叠球菌 (*Sarcina*)：细胞在三个互相垂直的平面上分裂，3 次连续分裂后 8 个菌体重叠呈立方体状排列，如甲烷八叠球菌。
- (6) 葡萄球菌 (*Staphylococcus*)：细胞在几个不规则的平面上分裂，分裂后的多个细胞堆积在一起，呈葡萄状排列，如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。

1.3.2.2 杆菌

细菌中种类最多的是杆菌，细胞呈杆状或圆柱状，各种杆菌的大小、长短、弯度、粗细差异较大。短杆菌近似球状，长的杆菌近似丝状。大多数杆菌中等大小长 $2 \sim 5\text{ }\mu\text{m}$ ，宽 $0.3 \sim 1\text{ }\mu\text{m}$ 。大的杆菌如炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) ($3 \sim 5$) $\mu\text{m} \times (1.0 \sim 1.3)$ μm ，小的如野兔热杆菌 ($0.3 \sim 0.7$) $\mu\text{m} \times 0.2\text{ }\mu\text{m}$ 。菌体的形态多数呈直杆状，也有的菌体微弯。菌体两端多呈钝圆形，如维氏固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*)；少数两端平齐，如炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*)；也