



ENVIRONMENTAL SCIENCES

高等院校环境科学系列教材

# 环境微生物实验技术

肖琳 杨柳燕 尹大强 张敏跃 主编

中国环境科学出版社

# 环境微生物实验技术

肖琳 杨柳燕 尹大强 张敏跃 主编

中国环境科学出版社·北京

## 图书在版编目(CIP)数据

环境微生物实验技术 / 肖琳等主编. —北京: 中国环境科学出版社, 2004.7

ISBN 7-80163-926-X

I. 环… II. 肖… III. 环境科学: 微生物学—实验—高等学校—教材 IV. X172-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 069587 号

责任编辑: 顾 莉

装帧设计: 陆 臻

---

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>  
电子信箱: [sanyecao@cesp.cn](mailto:sanyecao@cesp.cn)  
电话(传真): 010-67112735

印 刷 北京市联华印刷厂  
经 销 各地新华书店  
版 次 2004 年 7 月第一版 2004 年 7 月第一次印刷  
印 数 1—5 000  
开 本 787×960 1/16  
印 张 19.5  
字 数 400 千字  
定 价 28.00 元

---

【版权所有, 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, 请寄回本中心更换

## 前 言

人类利用微生物已有几千年的历史，利用微生物处理人类的各种污染物也有 100 多年的历史。随着生物技术的不断发展和人们对环境质量的日益重视，环境微生物技术在处理环境中的污染物，检测环境的质量，分析污染物对人类可能产生的危害等方面得到了越来越广泛的应用，广大的环境科学学生和科研工作者在学习和科研中需要一本环境微生物实验技术的指导书。

本书包括微生物实验技术基础和在环境科学及环境工程中应用技术的内容，除介绍传统的环境微生物实验技术外，考虑到科学发展和拓宽专业适应面的需要，增加了现代微生物学实验技术、微生物在环境监测中的应用技术和在污染物治理和资源化上的应用技术等有关内容。

本书分四个部分，第一部分基础微生物学技术、第二部分现代微生物学技术、第三部分环境微生物监测与评价技术及第四部分污染物微生物处理与资源化技术，共 45 个实验。对每个实验的内容，力求较详细的介绍每种方法的技术特点和基本操作要求，反映现代环境微生物学最新的实验技术，同时兼具实用性和可操作性，使之不仅适合作为大中专学校环境科学和环境工程方面的实验教材，也适合作为相关专业的学生、科研人员和技术管理人员的参考用书。

在这里特别要感谢马文滴老师，正是马老师多年的环境微生物学实验教学讲义和经验成就了本书的框架内容，还要感谢吴剑绘制了本书的插图。在本书的编写过程中，还得到了南京大学出版基金的资助，在此表示衷心的感谢。

在本书的编写过程中，由于编者水平和编写时间的限制，难免有遗漏和错误之处，希望广大读者和同行批评指正，以利于以后进一步修改提高。

编者

2003 年 9 月

## 实验注意事项

环境微生物学实验是一门操作技能较强的课程。通过本课程学习,要求学生能牢固地建立无菌概念,掌握环境微生物实验的一套基本操作技术;树立严谨、求实的科学态度,提高观察、分析问题和解决问题的能力;树立勤俭节约、爱护公物、相互协作的优良作风。

为了提高教学效果,保证实验的质量和实验室的安全,实验注意事项如下:

1. 每次实验前必须充分预习实验教材,以了解实验的目的、原理和方法。初步熟悉实验操作中的主要步骤和环节,对整个实验的安排做到先后有序、有条不紊和避免差错。

2. 非必要的物品不要带进实验室,必须带进的物品(包括帽子、围巾等)应放在不影响实验操作的地方。

3. 每次实验前须用湿布擦净台面,必要时可用“新洁尔灭”溶液(0.1%浓度)。实验前要洗手,以减少染菌的几率。

4. 微生物实验中最重要的一环,就是要严格地进行无菌操作、防止杂菌污染。为此,在实验过程中,每个人要严格做到以下几点:

- ◆ 在进行接种操作时,要关闭门窗,以防止空气对流。
- ◆ 接种时尽量不要走动和讲话,以免因尘埃飞扬和唾沫四溅,而导致杂菌污染。
- ◆ 用过的带菌移液管、滴管或涂布棒等,在实验后应立即投入5%石炭酸或其他消毒液中浸泡20min,然后再取出清洗,以免污染环境。
- ◆ 在清洗带菌的培养皿、三角烧瓶或试管等之前,应先煮沸半小时或进行蒸汽灭菌。

5. 凡需进行培养的材料,都应注明菌名、接种日期及操作者姓名(或组别),放在指定的温箱中进行培养,按时观察并如实地记录实验结果和按时交实验报告。

6. 实验室内严禁吸烟,不准吃东西,以免感染。

7. 节约药品和水、电、煤气。
8. 各种仪器应按要求操作，用毕按原样放置。
9. 实验完毕，立即关闭煤气，整理和擦净台面，离开实验室之前要用肥皂洗手。值日生负责打扫实验室及进行安全检查（门窗、水、电、煤气等）。
10. 意外事故的处理：
  - ◆ 如因玻璃器皿打碎而使菌液洒到桌面或地上时，应立即以 5% 石炭酸液或 0.1% 新洁尔灭溶液覆盖其上，半小时后再擦去。
  - ◆ 如菌液污染手部时，应先用 70% 乙醇棉花拭去，再用肥皂水洗刷干净。如污染致病菌时，应将手浸于 2%~4% 来苏尔或 0.1% 新洁尔灭溶液中，10min~20min 后用自来水刷洗干净。
  - ◆ 如不慎将菌液吸入口中，应立即吐出，并用大量自来水漱口。

# 目 录

实验注意事项 .....	v
--------------	---

## 实 验

第一部分 基础微生物学技术 .....	2
1 微生物的形态结构观察 .....	3
2 藻类及活性污泥中微型动物形态观察 .....	11
3 微生物的染色（包括革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色、鞭毛染色） .....	19
4 显微镜测微技术和微生物显微镜直接计数 .....	26
5 细菌的纯种分离、培养和接种 .....	31
6 微生物的稀释平皿计数 .....	34
7 细菌生长曲线的测定（比浊法） .....	37
8 菌种保藏 .....	40
9 微生物的生理生化反应 .....	49
10 从自然环境中分离和纯化噬菌体及噬菌体效价测定 .....	60
第二部分 现代微生物学技术 .....	65
11 质粒 DNA 的分离纯化和鉴定 .....	66
12 细菌基因组 DNA 的提取 .....	71
13 PCR 扩增 $\beta$ -actin .....	73
14 感受态细菌的制备及细菌的转化 .....	77
15 重组质粒的定向克隆 .....	81
16 原生质体融合 .....	84
17 微生物的固定化技术 .....	88
18 酶的固定化技术 .....	95

<b>第三部分 环境微生物监测与评价技术</b> .....	102
19 表面荧光法直接计数水体中的细菌.....	103
20 水的细菌学检查.....	108
21 水体中碱性磷酸酶活性的测定.....	116
22 富营养化湖泊中藻类的检测(叶绿素 a 法).....	120
23 土壤中生理类群微生物(氨化细菌)的检测.....	124
24 PFU 微型生物群落监测法.....	126
25 鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物肝微粒体致突变性试验.....	132
26 发光菌的生物毒性测试方法.....	140
27 根据硝化细菌的相对代谢率检测环境污染物的综合生物毒性.....	146
28 采用细菌脱氢酶检测化合物毒性——水质毒性快速测定仪法.....	151
29 应用 PCR 与基因 DNA 分子探针监测污染水体大肠杆菌.....	157
30 PCR 方法检测水中肠道病毒.....	165
31 利用 16S rDNA 方法分析不同污染土壤中微生物种群的变化.....	174
<b>第四部分 污染物微生物处理与资源化技术</b> .....	180
32 活性污泥床法处理生活污水.....	181
33 生物膜法(生物流化床)处理生活污水.....	187
34 废水厌氧消化.....	193
35 废水生物除磷.....	198
36 废水硝化—反硝化生物脱氮.....	202
37 利用酒精废液生产单细胞蛋白.....	207
38 固体废弃物的固体发酵.....	214
39 生物过滤箱法对含氨废气的处理.....	217
40 微生物吸附法去除重金属.....	221
41 有机污染物的微生物降解——高效脱酚菌的分离和筛选.....	225
42 利用微生物对石油污染土壤的生物修复.....	229
43 甲基对硫磷降解基因的克隆和基因工程菌的构建.....	234
44 SDS-PAGE 检测基因工程菌甲基对硫磷降解酶的诱导表达.....	239
45 基因工程菌的连续培养和降解效率测定.....	242



## 附录

附录一 玻璃器皿的清洁与灭菌 .....	246
附录二 培养基的配制和灭菌 .....	249
附录三 常用培养基 .....	253
附录四 染色液的配制 .....	262
附录五 大肠菌群法检索表 .....	264
附录六 实验用试剂的配制 .....	266
附录七 实验室常用洗涤剂及消毒剂的配制 .....	271
附录八 常用微生物菌种名称 .....	273
附录九 微生物接种技术 .....	274
附录十 BOD 的测定方法 .....	278
附录十一 化学需氧量的测定——重铬酸钾法 (COD <sub>Cr</sub> ) .....	280
附录十二 碘量法测定水中溶解氧 .....	282
附录十三 氨氮的测定 .....	284
附录十四 石油烃含量测定 .....	286
附录十五 活性污泥性质测定 .....	292
附录十六 分子生物学常用试剂 .....	293
附录十七 蛋白 SDS-PAGE 电泳分析 .....	299

# 实 验

第一部分 基础微生物学技术

## 1

## 微生物的形态结构观察

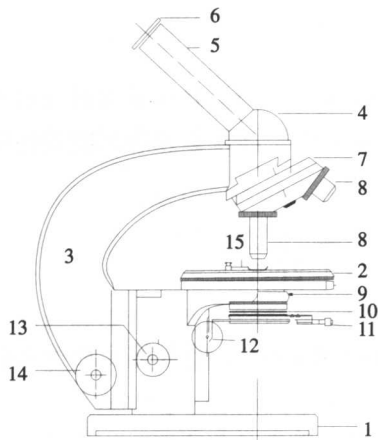
## 一、目的要求

- (1) 学习并掌握台式显微镜的原理和使用方法;
- (2) 学习微生物涂片、染色的基本技术, 掌握简单染色法;
- (3) 初步认识微生物的形态特征。

## 二、基本原理

## (一) 显微镜

微生物个体微小, 必须借助显微镜才能观察到它们的个体形态和细胞结构, 熟悉显微镜和掌握其操作技术是研究微生物不可缺少的手段。现代普通光学显微镜利用目镜和物镜两组透镜系统来放大成像, 故又称为复式显微镜。它们由机械装置和光学系统两大部分组成 (图 1-1)。



1. 镜座; 2. 载物台; 3. 镜臂; 4. 棱镜套;
5. 镜筒; 6. 接目镜; 7. 转换器;
8. 接物镜; 9. 聚光器; 10. 虹彩光圈;
11. 光圈固定器; 12. 聚光器升降螺旋;
13. 细调节器; 14. 粗调节器; 15. 标本夹

图 1-1 显微镜构造示意图

在显微镜的光学系统中，物镜的性能直接影响着显微镜的分辨率。而在普通光学显微镜通常配置的几种物镜中，油镜的放大倍数最大，对微生物学研究最为重要。与其他物镜相比，油镜的使用比较特殊，需在载玻片与镜头之间加滴镜油，这主要有如下两方面的原因：

### 1. 增加照明亮度

油镜的放大倍数可达  $100\times$ ，焦距很短，直径很小，但所需要的光照强度却很大（图 1-2）。从载玻片透过来的光线，从玻片进入空气，再进入镜头，因介质密度不同，有些光线会因折射或反射，不能进入镜头（图 1-3），致使在使用油镜时会因射入的光线较少，物像显现不清。所以为了不损失通过的光线，在使用油镜时须在油镜与玻片之间加入与玻璃的折射率（ $n=1.55$ ）相仿的镜油（通常用香柏油，其折射率  $n=1.52$ ）。

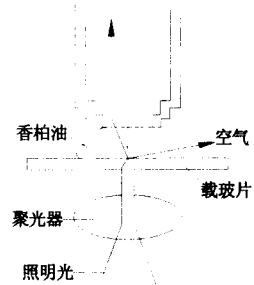
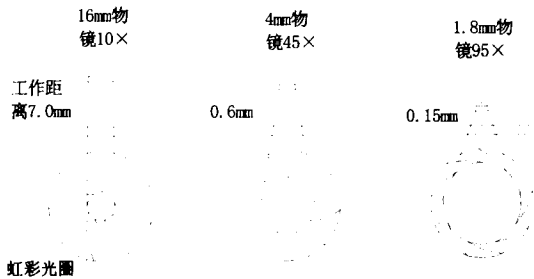


图 1-2 物镜的焦距、工作距离和虹彩光圈的关系 图 1-3 介质折射率对物镜照明光路的影响

### 2. 增加显微镜的分辨率

显微镜的分辨率或分辨力（resolution or resolving power）是指显微镜能辨别两点之间的最小距离的能力。光学显微镜的分辨率受光的干涉现象及所用物镜性能的限制，可表示为：

$$\text{分辨率（最大可分辨距离）} = \frac{\lambda}{2NA}$$

式中， $\lambda$ ——光波波长； $NA$ ——物镜的数值孔径值。

光学显微镜的光源在可见光的波长范围（ $0.4\sim 0.7\mu\text{m}$ ），而数值孔径值则取决于物镜的镜口角和玻片与镜头间介质的折射率，可表示为： $NA=n\cdot\sin\alpha$ 。

式中  $\alpha$  为光线最大入射角的半数。它取决于物镜的直径和焦距，一般来说在实际应用中最大只能达到  $120^\circ$ ，而  $n$  为介质折射率。由于香柏油的折射率（1.52）

比空气及水的折射率（分别为 1.0 和 1.33）要高，因此以香柏油作为镜头与玻片之间介质的油镜所能达到的数值孔径值（ $NA$  一般在 1.2~1.4）要高于低倍镜、高倍镜等干镜（ $NA$  都低于 1.0）。若以可见光的平均波长  $0.55\mu\text{m}$  来计算，数值孔径通常在 0.65 左右的高倍镜只能分辨出直径不小于  $0.4\mu\text{m}$  的物体，而油镜的分辨率却可达到  $0.2\mu\text{m}$  左右。

## （二）染色

通常细菌要染色后才能用显微镜观察，这是因为微生物（尤其是细菌）细胞小而透明。用普通光学显微镜观察时，由于菌体和背景没有显著的明暗差，因而难以看清它们的形态，更不易识别其结构。所以，用普通光学显微镜观察细菌时，往往要先将细菌进行染色，借助于颜色的反衬作用，观察细菌的形状及某些细胞结构。因此，为了研究微生物的形态特征和鉴别不同类群的微生物，微生物的染色及形态结构的观察是十分重要的基本技术。

细菌简单染色法是利用单一染料对细菌进行染色的一种方法。此法操作简便，适用于菌体一般形状和细菌排列形态的观察。常用碱性染料（如美蓝、结晶紫、碱性复红等）对菌体进行简单染色。因为在中性、碱性或弱酸性溶液中，细菌细胞通常带负电荷，而碱性染料在电离时，其分子的染色部分带正电荷（酸性染料电离时，其分子的染色部分带负电荷），因此碱性染料的染色部分很容易与细菌结合使细菌着色。经染色后的细菌细胞与背景形成鲜明的对比，在显微镜下更易于识别。当细菌分解糖类产酸使培养基  $\text{pH}$  下降时，细菌所带正电荷增加，此时可用伊红、酸性复红或刚果红等酸性染料染色。

## 三、材料和器材

### 1. 菌种

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 12~18h 营养琼脂斜面培养物，藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 约 24h 营养琼脂斜面培养物，大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 营养琼脂斜面培养物。链霉菌 (*Streptomyces* sp.)、青霉 (*Penicillium* sp.)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的斜面培养物。铜绿囊蓝细菌 (*Microcystis aureginosa*) 液体培养物。

### 2. 染色剂

草酸铵结晶紫染液（或吕氏碱性美蓝染液），石炭酸复红染液。

### 3. 仪器或其他用具

显微镜，酒精灯，载玻片，接种环，香柏油，镜头擦拭液（70%乙醇、30%乙

醚混合液), 擦镜纸, 生理盐水等。

#### 四、实验步骤

##### (一) 涂片

取两块载玻片, 各滴一小滴 (或用接种环挑取 1~2 环) 生理盐水 (或蒸馏水) 于玻片中央, 用接种环以无菌操作 (图 1-5) 分别从枯草芽孢杆菌和藤黄微球菌斜面上挑取少许菌苔于水滴中, 混匀并涂成薄膜。若用菌悬液 (或液体培养物) 涂片, 可用接种环挑取 2~3 环直接涂于载玻片上。

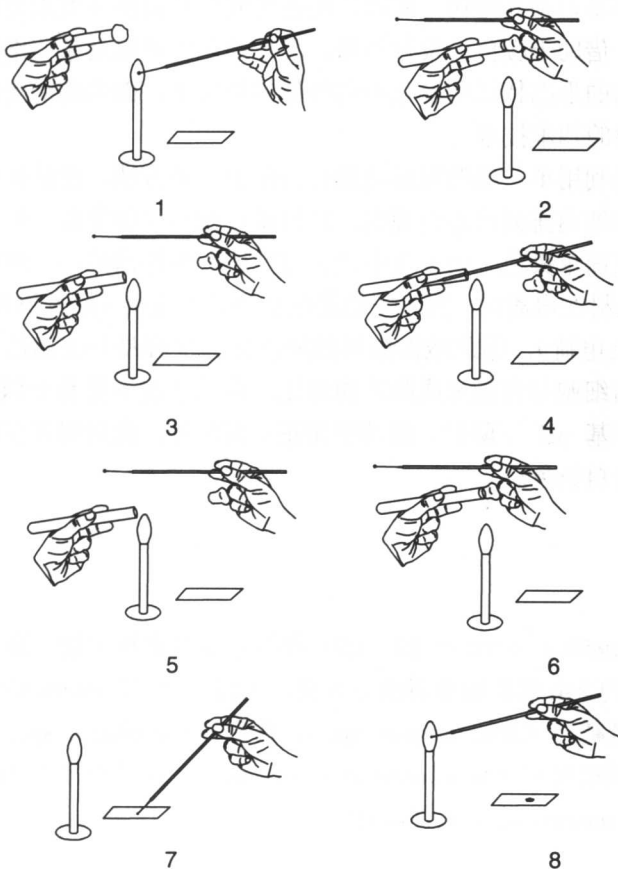


图 1-5 微生物涂片制作过程

## (二) 干燥

室温自然干燥。

## (三) 固定

涂面朝上, 通过火焰 2~3 次。此操作过程称热固定, 使细胞质凝固, 以固定细胞形态, 并使之牢固附着在载玻片上。热固定温度不宜过高(以玻片背面不烫手为宜), 否则会改变甚至破坏细胞形态。通常在涂片后直接在酒精灯火焰上干燥固定。

## (四) 染色

将玻片平放, 滴加染色液于涂片上(染色液刚好覆盖涂片薄膜为宜)。吕氏碱性美蓝染色 1~2min, 石炭酸复红(或草酸铵结晶紫)染色约 1min。

## (五) 水洗

倒去染色液, 用自来水冲洗, 直至涂片上流下的水无色为止。

## (六) 干燥

自然干燥, 或用电风吹干, 也可用吸水纸吸干。

## (七) 镜检

涂片干后镜检。涂片必须完全干燥后才能用油镜观察。

## (八) 显微镜的准备

### 1. 显微镜的安置

置显微镜于平整的实验台上, 镜座距实验台边缘约 3~4cm。

### 2. 光源调节

安装在镜座内的光源灯可通过调节电压以获得适当的照明亮度, 使视野内的光线均匀, 亮度适宜。

### 3. 调节双筒显微镜的目镜

双筒显微镜的目镜间距可以适当调节, 左目镜上一般还配有曲光度调节环, 可以适应眼距不同或两眼视力有差异的不同观察者。



#### 4. 聚光器数值孔径值的调节

调节聚光器虹彩光圈值与物镜的数值孔径值相符或略低。有些显微镜的聚光器只标有最大数值孔径值，而没有具体的光圈数刻度。使用这种显微镜时可在样品聚焦后取下一目镜，从镜筒中一边看着视野，一边缩放光圈，调整光圈的边缘与物镜边缘黑圈相切或略小于其边缘。因为各物镜的数值孔径值不同，所以每转换一次物镜都应进行这种调节。

在聚光器的数值孔径值确定后，若需改变光照强度，可通过升降聚光器或改变光源的亮度来实现，原则上不应再进行虹彩光圈的调节。当然，有关虹彩光圈、聚光器高度及照明光源强度的使用原则也不是固定不变的，只要能获得良好的观察效果，有时也可根据不同的具体情况灵活应用，不一定拘泥不变。

### (九) 显微观察

在目镜保持不变的情况下，使用不同放大倍数的物镜所能达到的分辨率及放大率都是不同的。一般情况下，特别是初学者，进行显微观察时应遵守从低倍镜到高倍镜再到油镜的观察程序，因为低倍数物镜视野相对较大，易发现目标及确定观察的位置。

#### 1. 低倍镜观察

将染色标本玻片置于载物台上，用标本夹夹住，移动推进器使观察对象处在物镜的正下方。下降 10×物镜，使其接近标本，用粗调节器慢慢升起镜筒，使标本在视野中初步聚焦，再使用细调节器调节图像清晰。通过玻片夹推进器慢慢移动玻片，认真观察标本各部位，找到合适的目的物，仔细观察并记录所观察到的结果。

#### 2. 高倍镜观察

在低倍镜下找到合适的观察目标并将其移至视野中心后，轻轻转动物镜转换器将高倍镜移至工作位置。对聚光器光圈及视野亮度进行适当调节后微调细调节器使物像清晰，利用推进器移动标本仔细观察并记录所观察到的结果。

在一般情况下，当物像在一种物镜中已清晰聚焦后，转动物镜转换器将其他物镜转到工作位置进行观察时，物像将保持基本准焦的状态，这种现象称为物镜的同焦。利用这种同焦现象，可以保证在使用高倍镜或油镜等放大倍数高、工作距离短的物镜时仅用细调节器即可对物像清晰聚焦，从而避免由于使用粗调节器时可能的误操作而损坏镜头或载玻片。

#### 3. 油镜观察

在高倍镜或低倍镜下找到要观察的样品区域后，用粗调节器将镜筒升高，然后将油镜转到工作位置。在待观察的样品区域滴加香柏油，从侧面注视，用粗调节器将镜