



HUANJIANG WEISHENGWU GONGCHENG SHIYAN

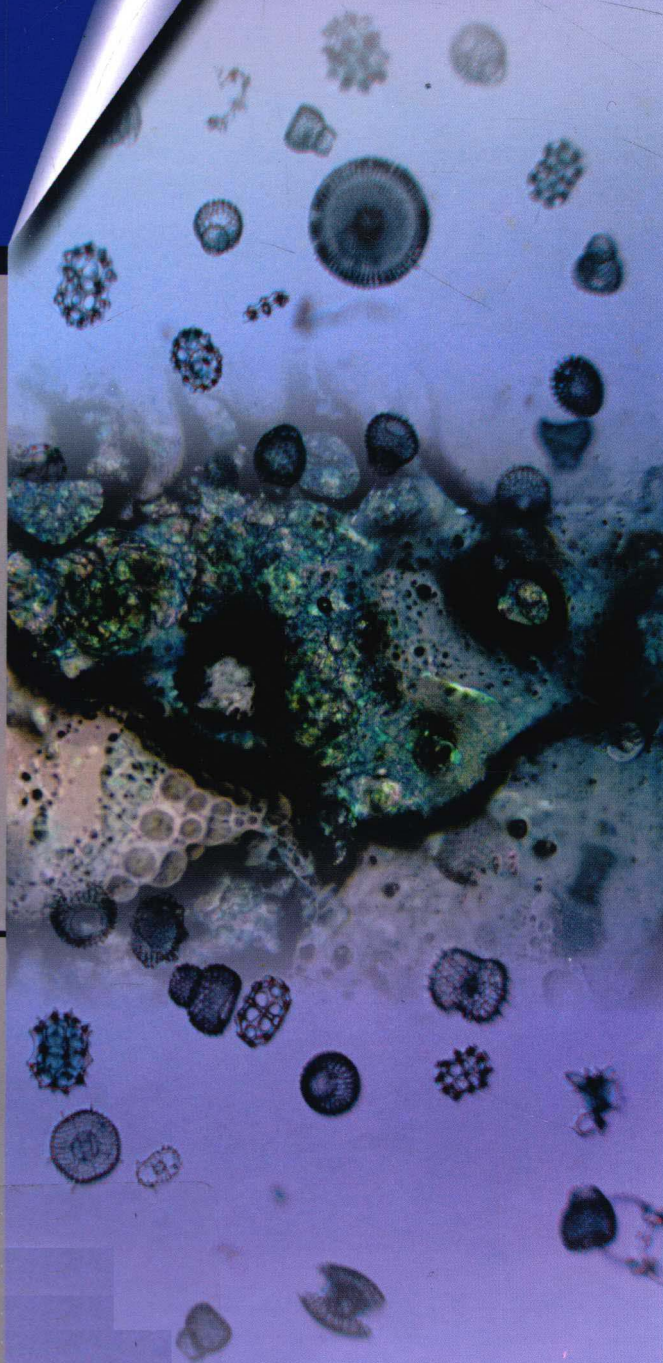
环境微生物工程实验

主编

赵山山

李永峰

杨传平



 东北林业大学出版社

环境微生物工程实验

主编 赵山山 李永峰 杨传平

东北林业大学出版社

图书在版编目 (C I P) 数据

环境微生物工程实验 / 赵山山, 李永峰, 杨传平主
编. -- 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2011. 2
ISBN 978-7-81131-783-1

I. ①环… II. ①赵… ②李… ③杨… III. ①环境生
物学: 微生物学—实验 IV. ①X172-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 025849 号

《环境微生物工程实验》编委会

主编 赵山山 李永峰 杨传平
主审 赵庆良 王爱杰

责任编辑: 姜俊清

封面设计: 彭宇



NEFUP

环境微生物工程实验

Huanjing Weishengwu Gongcheng Shiyan

主编 赵山山 李永峰 杨传平

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

东北林业大学印刷厂印装

开本 787 × 1092 1/16 印张 11.75 字数 273 千字

2011 年 2 月第 1 版 2011 年 2 月第 1 次印刷

印数 1—1 000 册

ISBN 978-7-81131-783-1

定价: 23.00 元

内容提要

本书以环境微生物为基础，简要阐明了环境工程微生物学的基础知识、微生物相关学科及相互作用的关系、微生物在环境污染治理方面的重要作用及使用现代科技手段对微生物的处理方法等。本书涉及的知识面较为广泛，所以重点阐述了实验部分，重视操作技能与手段。本教材可作为高等学校环境科学、环境工程、市政工程、生物学等专业的本科生、研究生及博士生的教学和研究的参考资料，也可以作为环境生物技术原理与应用、环境工程微生物学的配套教材，也可供其他环境事业的科研和工作人员参考使用。

前 言

环境科学是一门综合性学科，涉及自然科学、人文社会科学、工业技术等广泛领域。环境微生物工程则是在此基础上发展起来的一门边缘性学科。由于环境污染日趋严重，科学家们用生命科学的理论和方法，探寻环境问题的实质并寻找解决环境问题的途径。在这个过程中，微生物运用其独特的生理生化特征在解决环境污染及危害中显现出得天独厚的优势。

微生物是地球上不可缺少的生物成员，虽然个体微小，但种类及数量则相当之多，它们在自然界的分布也是相当之广泛，并在物质循环和能量流动中起到非常重要的作用。

明确环境污染物与微生物之间的关系，便于人们合理地运用该关系来解决环境问题，有的微生物技术还能同时提供清洁能源，实现人类可持续发展的目的。本书在环境科学、环境工程学、微生物学、分子生物学、微生物技术等知识的基础上进行编写，综合性、概括性地对环境微生物实验及当前的主要研究技术进行内容编排。理论与实践相结合，又尽可能地介绍了目前的一些研究热点问题和前沿领域的最新进展。为环境微生物的基础研究技术和应用实践提供了技术思路和方法。

环境工程微生物学是对日常生活中常见的微生物应用研究类型进行介绍，并对能源型微生物进行探索，主要介绍了当今的热门能源，醇类、氢能、燃料电池和微生物饲料等，都具有很好的研究前景。

基础性实验是经过精选的最基本、最具代表学科特点的实验方法和技术，如微生物实验仪器的使用，培养基的配制，微生物分离，微生物形态观察及染色技术，微生物的生长和培养。通过学习使学生掌握相应学科的基本知识与基本技能，为综合性实验奠定基础。

环境工程微生物实验综合了多种实验手段与技术对环境中的微生物进行探究，空气中微生物的检测，废物、废水处理中的相关微生物实验。综合了大气、废物、废水中的微生物，并使用相关的微生物技术对环境中的污物的去污能力问题进行探索性研究，提高学生动手和科研能力，增强学生创新能力，为解决环境污染问题提供了新的研究思路。

本书共十章，第一章、第二章由杨传平编写，第三章至第五章和附录由赵山山编写，第六章至第十章由李永峰编写。全书由赵山山、李永峰统稿。

由于编者水平有限，本书难免存在疏漏和不足，诚恳地希望老师、同学和读者朋友们给予批评指正，在此表示衷心的感谢。

编者

2010年9月

微生物学实验要求

教学实验是不断提高学生动手能力及操作技能的主要教学形式。环境工程微生物学实验是一门操作技能较强的课程，通过实验，掌握微生物学实验的一套基本技术，树立严谨、求学的科学态度，以此提高观察、分析和解决问题的能力。

为了更好地进行实验，并保证实验教学质量和实验室的安全，特别制定如下要求：

1. 预习

每次实验前必须对实验内容进行充分的预习，以了解实验目的、原理和实验方法，并初步熟悉实验的最主要环节，做好各项准备工作。

2. 记录

实验课开始，教师对实验内容的安排及注意问题进行讲解，学生必须认真听讲并做好实验记录。在整个实验过程中学生必须穿上实验服，留长发者，需将头发挽在背后。试验台上除记录用的笔和本外，不允许堆放任何其他物品。实验记录很必要，是完成实验报告的重要依据。对于当时不能得到结果而需要连续观察的实验，则需记下每次观察现象和结果，以便于分析。

3. 操作与观察

学生应按要求独立操作与观察，实验时仔细小心，全部操作应按操作规程进行，必须做到规范操作。微生物学最重要的实验环节之一就是无菌操作，必须严格要求，反复练习，以达到一定的熟练程度。万一遇有试管或瓶不慎打破、皮肤破伤等意外情况发生时，应立即报告指导教师，即时处理，切勿隐瞒。

4. 收拾仪器

每次实验完毕后，必须把所用仪器抹净放妥，将实验室收拾整齐，擦净桌面，若有菌液污染桌面或其他地方时，可用3%的苏尔液覆盖30 min后擦去。凡带菌之工具，如吸管、玻璃刮棒等在洗涤前必须在3%苏尔液中进行消毒。

5. 实验报告

实验结束后，把实验的结果以实事求是的态度填入表格中，整理现场记录的有关内容，力求简明准确，完成综合实验报告，并即交教师进行批阅。

6. 安全检查

离开实验室前将手洗净，注意关闭门、窗、灯、火、煤气等。

目 录

第一章 绪 论	(1)
第一节 环境问题	(1)
第二节 环境工程微生物	(3)
第三节 环境工程微生物涉及的学科	(4)
第四节 环境工程微生物的研究进展	(4)
第二章 微生物实验仪器的使用	(6)
实验 1 普通光学显微镜的使用	(6)
实验 2 生物显微镜的使用	(9)
实验 3 高压蒸汽灭菌器	(14)
实验 4 恒温生化培养箱的使用	(17)
第三章 培养基的配制	(20)
实验 5 玻璃器皿的灭菌	(20)
实验 6 普通培养基的配制	(22)
实验 7 选择性培养基的配制	(25)
实验 8 鉴别性培养基的配制	(26)
实验 9 干燥培养基的配制	(27)
第四章 微生物分离与计数	(29)
实验 10 微生物分离与计数	(29)
实验 11 细菌的试管斜面接种	(34)
实验 12 显微镜直接计数法和悬滴观察法	(36)
实验 13 微生物大小的测定	(39)
第五章 微生物形态观察及染色技术	(42)
实验 14 四大类微生物菌落形态的识别	(42)
实验 15 细菌、放线菌、酵母菌和霉菌的制片和简单染色	(44)
实验 16 细菌芽孢、荚膜和鞭毛染色实验	(49)
实验 17 革兰氏染色法	(52)
实验 18 真菌若干特殊构造的观察	(54)
第六章 微生物的生长和培养	(66)
实验 19 大肠杆菌生长曲线的制作实验	(66)
实验 20 环境因素对微生物生长的影响实验	(68)
实验 21 厌氧微生物的培养实验	(74)
实验 22 病毒的培养实验	(77)
实验 23 食用真菌的栽培技术	(81)
实验 24 纯培养菌种的菌体、菌落形态的观察	(85)

实验 25	用生长谱法测定微生物的营养要求	(87)
实验 26	氧和氧化还原电位	(87)
实验 27	菌种退化与防治措施	(91)
第七章	空气中微生物的检测	(100)
实验 28	空气卫生细菌实验	(100)
实验 29	常见霉菌的检测及形态观察	(103)
实验 30	尘螨的检测	(104)
第八章	废物、废水处理中的相关微生物实验	(106)
实验 31	水中细菌菌落总数的测定	(106)
实验 32	活性污泥培养液中菌胶团的观察	(108)
实验 33	循环水冷却系统中有关的微生物检验	(108)
实验 34	多管发酵法测定自来水中总大肠杆菌群	(111)
实验 35	粪大肠杆菌的测定	(113)
实验 36	废水硝化 - 反硝化生物脱氮	(115)
实验 37	微生物吸附法去除重金属	(117)
实验 38	富营养化水体中藻类的测定(叶绿素 a 法)	(118)
实验 39	活性污泥培菌方法与培菌过程中生物相的演替	(120)
实验 40	活性污泥的培养与驯化	(122)
实验 41	影响活性污泥培养驯化的因素	(126)
实验 42	根据消化细菌的相对代谢率检测环境污染物的综合生物毒性	(128)
第九章	生物技术综合应用介绍	(132)
实验 43	餐厨垃圾厌氧制氢实验	(132)
实验 44	UCT 生物脱氮除磷技术	(134)
实验 45	UASB 高效厌氧生物处理	(137)
第十章	探索性实验技术	(142)
实验 46	检测发酵和食品工业用水微生物的数量	(142)
实验 47	微生物技术在食品保鲜中的应用	(143)
实验 48	检测几种常见消毒剂的杀菌效果	(143)
实验 49	研究牛乳在酸败过程中细菌的生态学演变	(144)
实验 50	微生物之间相互作用的研究	(144)
实验 51	微生物酶制剂的合成受多水平调控	(145)
实验 52	研究青霉素发酵过程中糖的变化	(146)
实验 53	微生物菌肥生产与质量控制	(146)
实验 54	Nisin 产生菌的筛选、鉴定及其应用	(147)
附录	(149)
附录 I	中国微生物菌种保藏管理条例	(149)
附录 II	国际确认的专利菌种保藏机构	(151)
附录 III	常用微生物名称	(152)
附录 IV	染色液的配制	(153)

附录V	培养基的配制	(157)
附录VI	试剂和溶液的配制	(168)
附录VII	常用的计量单位	(172)
附录VIII	洗涤液的配制与使用	(173)
附录IX	稀释法测数统计表	(174)
参考文献	(177)

第一章 绪论

第一节 环境问题

随着人类的生活水平日益提高,相应地产生了越来越多的城市生活污水、人类的粪便;有机固体废物(包括厨余);生活用品废物,如废纸张、废布、废塑料袋等生活垃圾;集约化的养殖场产生大量禽、畜粪便。

各种新兴工业生产的飞速发展,也能产生各种工业废水,如造纸废水、石油炼厂废水、石油化工废水、印染废水、毛纺厂和毛条厂废水、豆制品废水、屠宰废水、罐头食品废水、油脂废水,啤酒、制药、谷氨酸、赖氨酸等发酵工业的废水等。废水源源不断地排入到江、河、湖、海,严重污染水体。各种类型的工厂和汽车产生大量废气,废气中通常含有 CO 、 CO_2 、 NO_x 、 SO_2 、 H_2S 、 NH_3 、 CH_4 、酚、氟、粉尘及附着在其上的各种微生物,甚至致病的微生物。大气因大量废气排入而受污染,人体健康受到了极大损害。 SO_2 和 NO_x 导致酸雨产生。大量 CO_2 排入大气引起世界性气候变化异常、全球性的温室效应和厄尔尼诺现象。氮氧化物和碳氢化合物在阳光下反应形成光化学烟雾,其中含有的有害物质如 NO 、 O_3 和过氧乙酰硝酸酯(PAN)等,会造成大气二次污染,引起人类许多疾病。由于长期的污(废)水浇灌农作物或用于废水土地处理,有机固体废物的填埋处置,污(废)水及固体废物渗滤液渗漏到地下水,造成土壤和地下水污染。总而言之,废水、废气、固体废物这三大公害严重污染了人类的生存环境。

自西方工业革命起,世界各国面临严重的环境污染问题,并日趋严重,环境质量急剧恶化。20世纪50年代后,公害问题也相继发生。美国洛杉矶的光化学烟雾,英国伦敦烟雾,日本四日市的哮喘病,日本熊本由于汞引起的水俣病及神通川骨痛病,均对人类造成极大伤害。我国也不例外,一些地区,例如上海黄浦江、苏州河、太湖、巢湖、淮河、海河、昆明滇池、东北嫩江、松花江等,都有不同程度的污染,甚至污染严重。20世纪80年代后,随着改革开放的到来,乡镇企业的兴起,由于忽视环境保护,乡镇的河流也不例外地受到污染。全球性污染范围更加扩大,酸雨、臭氧层耗损、全球变暖、生物多样性锐减、土地荒漠化、海洋污染、危险物越境转移、大气污染物越境转移等环境问题,逐渐引起了全球性的关注。

早在20世纪50年代,一些发达国家就开始治理环境,经过一二十年的努力治理,有些河流已见成效。如泰晤士河河水变清,有鱼类生长。我国于60年代末开始认识到环境污染的危害,首先在一些大城市,如上海、北京、天津等地开始不同程度地处理废水。继而也广泛开展环境保护、环境污染的治理工作。因此,各地出现了可喜的景象,如上海的城市规划、工业产业的调整与合理布局;自2000年起对苏州河加大治理力度,经过几年的整治,河水已开始变清,出现水生生物,现在苏州河两岸已成了人们的居住、休闲场所。现在,环境保护意识虽已深入人心,但全国乃至全球的环境保护工作,

仍然需持之以恒。

20世纪70年代,围绕环境危机和石油危机有人提出“增长极限”的观点,全球展开一场关于“停止增长还是继续发展”的争论。联合国世界环境发展委员会(WCED)主席、挪威前首相布伦特兰夫人受联合国的委托,于1987年发表长篇报告《我们共同的未来》,首次提出可持续发展的观点:可持续发展是既满足当代人的需求,又不对后代人满足其自身需求的能力构成危害的发展。1992年在巴西里约热内卢召开的第一次联合国环境与发展会议(UNCED),会上通过了《里约宣言》、《21世纪议程》、《森林问题原则声明》,签署了2个国际公约:《联合国气候变化框架公约》和《生物多样性公约》。自此以后,可持续发展的新思想广为各国接收和重视。

我国“九五”期间推出了两项重大举措,即“全国主要污染物排放总量控制”和“中国跨世纪绿色工程规划”。在“全国主要污染物排放总量控制”中规定烟尘、粉尘、二氧化硫、石油类、重金属、化学需氧量(COD)和工业固体废物等12种主要污染物的排放量,到2000年要控制在国家批准的水平内。在“十一五”期间国家又对化学需氧量、二氧化硫两种主要污染物实行排放总量控制计划管理,排放基数按照2005年环境统计结果确定。计划到2010年,全国主要污染物排放总量比2005年减少10%,具体是:化学需氧量由 $1\,414 \times 10^4 \text{ t}$ 减少到 $1\,273 \times 10^4 \text{ t}$;二氧化硫由 $2\,549 \times 10^4 \text{ t}$ 减少到 $2\,294 \times 10^4 \text{ t}$ 。在国家确定的水污染防治重点流域、海域专项规划中,还要控制氨氮(总氮)、总磷等污染物的排放总量。由此可以看出:摆在环境科学与环境工程工作者面前的任务是艰巨的。我们需要用先进的科学技术治理好各种污染物,使其达到排放标准,并改善生活环境,提高人类的生活质量。

微生物在环境保护和环境治理中,在保持生态平衡等方面与其他生物一样,起着举足轻重的作用。由于微生物具有容易发生变异的特点,随着新污染物的产生和数量的增多,微生物的种类可随之相应增多,呈现出更加丰富的多样性。这就使得它有别于其他生物,在环境污染中,微生物的作用更是独树一帜。随着微生物学中各个分支学科相互渗透,尤其是分子生物学、分子遗传学的发展,促进了微生物分类学的完善,也促进微生物应用技术的进步,推动了生物工程的发展,酶学和基因工程等在各个领域得到应用和长足的发展。在环境工程中也是如此,如固定化酶、固定化微生物细胞处理工业废水,筛选优势菌,筛选处理特种废水的菌种,甚至在探索用基因工程技术构建超级菌,用于环境工程事业。这方面已有分解石油烃类的超级菌的实例。

自20世纪70年代以后,许多在极端环境生活的微生物都引起了人们的极大兴趣和关注。在极端环境生活的微生物有专性厌氧的产甲烷菌、极端嗜热菌、极端嗜酸菌、极端嗜碱菌和极端嗜盐菌等古菌,它们是一类可供研究生命起源的好材料。一些科学家追溯地球的历史,考证到:最早地球岩层极热,是无氧环境,推论那时只有极端嗜热菌、厌氧菌才能够生长,从而认为当今古菌中的极端嗜热菌可能源于古时的嗜热菌。最早地球是无氧环境,由于蓝细菌的作用,使地球变成有氧环境,才有好氧生物存在。

环境工程遇到的废水不少是极端条件下存在的。如北方的寒冷,南方的炎热,稠油废水、焦化废水和化肥废水,一般为 $70 \sim 80 \text{ }^\circ\text{C}$ 。味精废水的温度极低($2 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$),pH值极低,在 $2 \sim 3$,盐度也高。还有其他的酸性废水,如矿山酸性废水。还有碱性废水和高盐有机废水等。实际上,环境工程面临此类废水越来越多,处理难度越来越大。因

此,开发极端环境微生物资源处理废水有着广阔的前景,但任重而道远。

第二节 环境工程微生物

环境工程微生物学是在环境保护和环境工程事业蓬勃发展的基础上应运而生的一门微生物学的新的分支学科,微生物工程又称发酵工程。

环境工程微生物介绍的是如何利用微生物分类的生理生态、细胞结构及其功能特性,包括微生物的营养、呼吸、物质代谢、生长、繁殖、遗传与变异等基础知识,进行对城市生活污水、工业废水、城市有机固体废弃物等生物处理。

随着分子生物学、分子遗传学的发展,微生物学在各个分支学科中都相互渗透,促进了微生物分类的完善和应用技术的进步。固定化酶、固定化微生物细胞处理工业废水,筛选优势菌,筛选处理特种废水的菌种,甚至在探索用基因工程技术构建超级菌,如分解石油烃类的超级菌,用于环境工程事业。

微生物在环境保护和治理、保持生态平衡等方面有着非常重要的作用。微生物因具有个体微小、容易发生变异的特点,可随着污染物的变化在种类和数量上都可随之发生变化,显现出更加多样性。这使微生物在环境污染治理中脱颖而出。

微生物工程是研究微生物与环境之间的相互关系,以及对不同物质转化的作用规律并加以利用,进而考察微生物对环境质量的影响;研究微生物对污染物质的降解与转化,修复、改善环境的作用和规律。自然界有着丰富的微生物资源,它们的种类呈多样性,在自然界物质循环和转化中起着巨大的生物降解作用,使陆地和水生系统中C, O, N和S的循环成为可能。它们也是所有生态食物链和食物网的根本营养来源,是整个生物圈维持生态平衡不可缺少的、重要的组成部分。因此,环境微生物工程是研究利用微生物开展污染废物处理及现代生物工程技术在污染控制工程中的应用。

环境微生物既有有利的一面,也有不利的一面。对人和生物有害的微生物污染大气、水体、土壤和食品,可影响生物的产量和质量,危害人类健康,这种污染称为微生物污染。随着工业生产的发展,工业废水含各种新的有机污染物、无机污染物和一些营养物质源源不断地排入水体、大气和土壤。微生物受环境中多种因素的长期诱导而发生变异,产生新的微生物,使微生物种群和群落的数量变得更加多样性。由自然选择出能适合以新产生的有机污染物为底物的微生物新品种,扩大微生物资源。

现在,城市生活污水、医院污水、各种有机工业废水,甚至有毒废水、城市有机固体废物和工业产品废弃物都可用微生物方法来处理。

当然有些微生物也会对人类的生产、生活造成不利影响,如病原微生物等。在1347年,黑死病侵袭欧洲,仅仅4年的时间,便夺去了1/3欧洲人的生命,随后的80年里,这种病吞噬了欧洲人口的75%。细菌、病毒、霉菌、变形虫等能引起人的肝炎、沙眼、肠道病、伤风、感冒等疾病;黄曲霉能产生致癌的黄曲霉毒素。还有的微生物能引起作物病害及动物疾病,蓝藻、绿藻和金藻能引起湖泊“水华”和海洋的“赤潮”等现象。

环境监测是了解环境现状的重要手段,它包括化学分析、物理测定和生物监测3个部分。生物监测是利用生物对环境污染所发出的各种信息来判断环境污染状况的过程。

生物长期生活于自然环境中,不仅能够对多种污染作出综合反应,还能反映污染状况。因此,生物监测取得的结果具有重要的参考价值。微生物监测是生物监测的重要组成部分,具有其独特的作用。

第三节 环境工程微生物涉及的学科

根据环境微生物的基础研究和应用层次分析,相关工程所涉及的学科范围可概述如下。微生物学、细胞学、生理生化学、分子生物学、遗传学等应用于对微生物进行基础研究;基因工程、细胞工程、酶工程、分子遗传学等用于构建环境微生物工程中的新菌株;环境微生物工程中污染物的降解转化及评价要涉及环境化学、环境生物学、环境地学、环境毒理学、环境监测与评价等;环境微生物修复工程要涉及土壤学、水力学、气象学、生态学等内容。

上面只简要叙述了所涉及学科其中的一少部分,在各个应用的层次中,还需要众多学科知识的相互配合形成网络知识结构。各门学科知识之间既相互渗透,又相互配合,紧紧地围绕环境微生物工程的目标,发挥多学科的综合效应

第四节 环境工程微生物的研究进展

微生物在整个生态系统中扮演着重要角色,它们是物质的主要分解者,在自然界物质和能量转化中占有特殊的地位,发挥着不可替代的作用。环境微生物技术在去除污染的同时,实现废物资源化等,已取得了显著的成就。微生物细胞分泌的各种酶所催化的反应完成降解污染物,使其转化成无机物。自然界存在着大量的去除污染物的微生物菌株资源,人们可以从中筛选并经驯化得到高效微生物菌株,用于环境微生物工程;微生物学的研究大大地推动了污染控制工程的发展,特别是当代生物技术的快速发展对解决日趋严重的环境问题提供了技术保障,且已取得显著成效。

污染环境中的微生物往往是环境微生物工程获取菌株的重要场所。从农药污染的水体或土壤中筛选出的微生物加以驯化形成理想的群落结构和优势种群,可以处理由农药污染产生的废水。还可以获取石油污染的处理细菌,印染废水和尾矿废水的处理菌株等,这些方法是目前广泛应用的获取菌种的途径。

当从自然界筛选驯化获得的微生物不能满足治理工程需要时,人们利用基因工程技术手段将其编码降解特定污染物的生物酶基因转入繁殖速度快、适应能力强的受体菌细胞内,则可能构建出兼具多种优势的新型工程菌。目前,科学家已成功构建出基因工程菌用于环境微生物工程处理石油污染、化学农药污染、降解塑料等。

微生物降解代谢途径及降解酶系的研究也随之展开。通过对降解酶进行分离和纯化,并进一步了解其降解特性,人们已在分子水平上对降解酶的蛋白质组成、相对分子质量大小以及影响酶活性的因子都了如指掌。因此,人们已构建出降解不同物质的基因工程菌。

基因工程菌就是采用基因工程技术手段,将多种微生物的降解基因组装到一个细胞中,使该菌株集多种微生物的降解性能于一体。这样,基因工程菌既有混合菌的功能,

又有纯培养菌株的特点。

生物修复是近几年兴起的生物治理技术，特别是 20 世纪 90 年代以来。其主要目的是利用微生物清除土壤和水体中的污染。环境微生物在生物修复工程中占据中心位置，多以菌体的固体或液体；或以微生物的其他生物制品的形式投放于目标环境之中，达到清除污染的目的。

在经济发达国家，废物资源化已建立产业并纳入国家生物能源资源开发的长远战略目标之中。环境微生物工程构建污染物资源化及清洁生产工艺已取得一定的成功。成熟的技术有应用酵母和光合细菌净化高浓度有机无毒废水生产单细胞蛋白，在净化废水的同时生产饲料和饵料，利用有机废物生产甲烷，利用废纤维素生产乙醇等，已成为废物资源化的有效途径，其中生物制浆造纸工艺是环境微生物工程在清洁生产工艺中一个最新而醒目的例证，它既避免了传统工艺所造成的严重污染，又提高了纸张的质量，降低了生产成本。

从环境微生物中分离鉴定出降解特定污染物的基因，并应用该基因构建高效降解污染物的基因工程菌已成为环境微生物工程中高新技术的前沿课题目标之一。利用环境微生物分子遗传学指标和生理生化指标作为生物标志去反映环境污染状况，已成为环境污染生物监测的重要技术手段。

第二章 微生物实验仪器的使用

实验 1 普通光学显微镜的使用

在微生物学实验中，必不可少的工具就是显微镜，用来观察微生物的形态、大小等。显微镜的种类很多，有普通的光学显微镜，还有较高级的相差显微镜、荧光显微镜、暗视野显微镜以及高级的电子显微镜和原子力显微镜。但是，无论是普通的，还是高级的显微镜。它们的基本原理都是相同的，只要清楚普通光学显微镜的结构、原理，熟练掌握其操作方法，那么在使用较复杂的显微镜时也不会感到困难。一般而言，实验室所采用的均是普通光学显微镜。

一、显微镜的结构

图 2.1 为单筒显微镜，图 2.2 为双筒显微镜，二者构造基本相同。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，故又常被称为复式显微镜。它们由机械装置和光学系统两大部分组成。

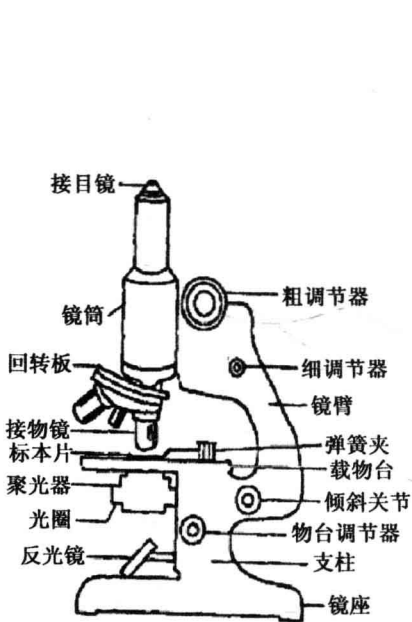


图 2.1 单筒显微镜

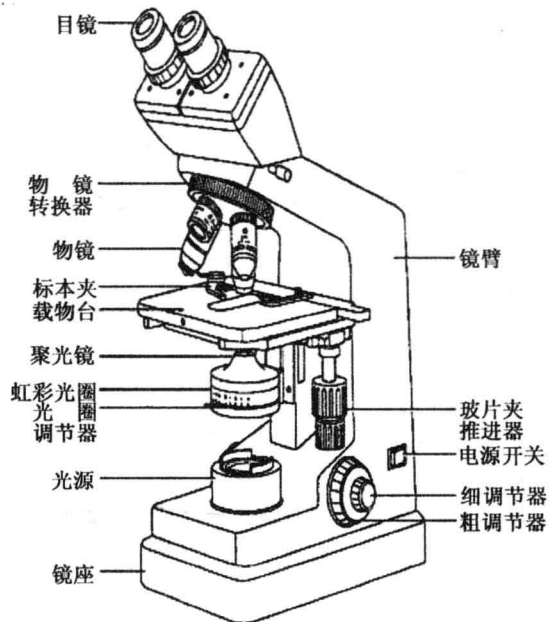


图 2.2 双筒显微镜

机械装置的主要作用是使整个光学系统坚固在一个光轴直线上，而且能精确地调节各光学部件之间的距离，使显微镜能产生清晰的物像。其组成包括镜座和镜臂；镜筒；物镜转换台；载物台；调焦装置的粗调节器和细调节器。

光学系统是显微镜最主要的部分，起分辨和放大目的物的作用。其组成包括接目镜；接物镜；聚光器；反光镜；光源。

二、普通光学显微镜的结构和基本原理

在显微镜的光学系统中，物镜的性能最为关键，它直接影响着显微镜的分辨率。而普通光学显微镜通常配置的放大倍数较大的几种油镜，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

油镜放大倍数可达 $100\times$ ，放大倍数大的镜头，焦距很短，直径很小，所需要的光照强度却很大。从承载标本的玻片透过来的光线，因介质密度不同（从玻片进入空气，再进入镜头），有些光线会因折射或全反射，不能进入镜头，致使在使用油镜时会因射入的光线较少，物像显示不清。所以为了不使通过的光线有所损失，在使用油镜时应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 $n = 1.52$ ）。

2. 增加显微镜的分辨率

显微镜的分辨率或分辨力是指显微镜能够分辨两点之间的最小距离的能力。从物理学的角度看，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

$$\text{分辨率} = \lambda / 2\gamma_{\text{NA}}$$

式中： λ ——光波波长；

γ_{NA} ——物镜的数值孔径值。

光学显微镜的光源不可能超过可见光的波长范围（ $0.4 \sim 0.7 \mu\text{m}$ ），而数值孔径值则取决于物镜的镜口角及玻片和镜头之间的介质和折射率。

三、实验器材

1. 菌种

金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌染色玻片标本。链霉菌及青霉的水封片。

2. 溶液或试剂

香柏油、二甲苯。

3. 仪器或其他用具

显微镜、擦镜纸、载玻片、盖玻片、纱布等。

四、操作步骤

1. 观察前的准备

（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 $3 \sim 4 \text{ cm}$ 。镜检时姿势要端正。在取、放显微镜时应一手握住镜臂，一手托住底座，使显微镜保持直立、平稳。切忌用单手提拎；且不论使用单筒显微镜或双筒显微镜均应双眼同时睁开观察，以减少眼睛疲劳，也便于边观察边绘图或记录。

（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，而

使用反光镜采集自然光源或灯光作为照明光源时,应根据光源的强度及使用物镜的放大倍数选用凹面或凸面反光镜并调节其角度,能使视野内的光线均匀、亮度适宜。

(3) 目镜间距调节根据使用者的情况,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,而左目镜上一般还配有屈光度调节环,可以适应眼距不同或两眼视力有差异的不同观察者。

(4) 聚光器数值孔径的调节调节聚光器虹彩光圈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。在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该进行这种调节。

在聚光器的数值孔径值确定后,若需要改变光照强度,可通过升降聚光器或改变光源的亮度来实现,原则上不应再通过虹彩光圈的调节。当然,有虹彩光圈聚光器高度及照明光圈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,有时也可以根据不同的具体情况灵活运用,不是拘泥不变的。

2. 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,特别是对于初学者,进行显微观察时应遵循从低倍到高倍再到油镜的观察程序,因为低倍数物镜视野相对大,易发现目标及确定检查的位置。

(1) 低倍镜观察将金黄色葡萄球菌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正下方。向下移动10倍物镜,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到图像清晰。通过玻片夹推进器慢慢移动玻片,认真观察标本各部分,找到合适的目的物,仔细观察并记录所观察到的结果。

在任何时候使用粗调节器聚焦物像时,必须养成先从侧面注视小心调节物镜靠近标本,然后用目镜观察,慢慢调节物镜离开标本进行准焦的习惯,以免因一时的误操作而损坏镜头及玻片。

(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观察到的结果。

在一般情况下,当物像在一种物镜中已经清晰聚焦后,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错误操作而损坏镜头及玻片。

(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加滴香柏油,从侧面注视,用粗调节器小心地将镜筒降下,使油镜浸在镜油中并几乎与标本相接。将聚光器升至最高位置并开足光圈,若使用聚光器的数值孔径值超过1.0,还应在聚光器与载玻片之间加滴香柏油,保证其达到最大的效能。调节照明使视野的亮度合适,用粗调节器将镜筒徐徐