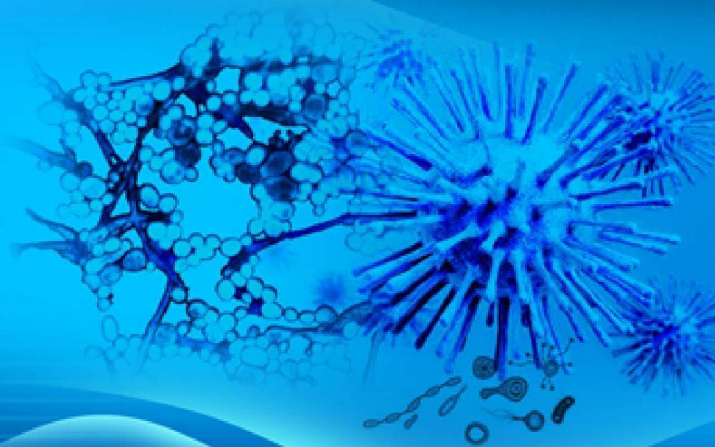


环境工程微生物 实验教程

主编 龙建友 阎佳



 北京理工大学出版社
BEIJING INSTITUTE OF TECHNOLOGY PRESS

环境工程微生物实验教程

龙建友 阎 佳 主编

 **北京理工大学出版社**
BEIJING INSTITUTE OF TECHNOLOGY PRESS

版权专有 侵权必究

图书在版编目 (CIP) 数据

环境工程微生物实验教程/龙建友, 阎佳主编. —北京: 北京理工大学出版社, 2019. 1

ISBN 978-7-5682-6602-4

I. ①环… II. ①龙…②阎… III. ①环境微生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①X172-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2019) 第 004041 号

出版发行 / 北京理工大学出版社有限责任公司

社 址 / 北京市海淀区中关村南大街 5 号

邮 编 / 100081

电 话 / (010) 68914775 (总编室)

(010) 82562903 (教材售后服务热线)

(010) 68948351 (其他图书服务热线)

网 址 / <http://www.bitpress.com.cn>

经 销 / 全国各地新华书店

印 刷 /

开 本 / 710 毫米×1000 毫米 1/16

印 张 / 8.75

字 数 / 150 千字

版 次 / 2019 年 1 月第 1 版 2019 年 1 月第 1 次印刷

定 价 / 36.00 元



责任编辑 / 多海鹏

文案编辑 / 郭贵娟

责任校对 / 周瑞红

责任印制 / 李志强

图书出现印装质量问题, 请拨打售后服务热线, 本社负责调换

编委会

主 编 龙建友 阎 佳

副主编 王筱虹 夏建荣

编 委 (以拼音字母先后为序)

陈迪云 陈镇新 崔明超 孔令军

李伙生 龙建友 庞 博 苏敏华

王伟彤 王筱虹 吴颖娟 夏建荣

肖唐付 阎 佳 张发根



前 言

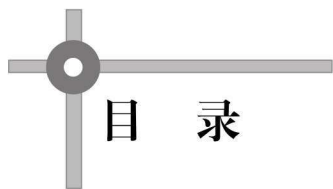
环境工程微生物学与微生物学、环境科学、环境工程学等紧密交叉，是运用环境工程和微生物相结合的手段和方法处理生态环境中的污染物和实现资源稳定再生利用、最大限度地降低污染物对环境造成的影响的一门交叉学科。其实验课程是环境科学和环境工程专业学生必修的一门理论与实践相结合的课程。鉴于此，本实验课程注重该学科实践的实用性和前沿性，通过开设本实验课程，加强了学生对相关理论基础知识的掌握和对专业技能的理解，在训练学生基本操作的基础上，锻炼了学生的科研能力和综合能力。而且，随着工农业的迅速发展及全球人口的快速增长，污染引起的环境日趋恶化问题，突显了环境工程微生物学在污染治理和改善环境的应用中的作用，因此掌握必要的环境工程微生物学实验基本操作技能对于加深了解和巩固环境工程微生物学的相关理论，从事环境工程及相关专业的技术研究工作具有重要的指导意义。全书的实验大致可以分为三类：第一类为基础性实验，目的是加强学生对微生物概念及基本理论知识的掌握和理解，如普通光学显微镜的使用、培养基的制备与灭菌等；第二类为综合性实验，目的是提高学生的实际操作能力，培养学生理论联系实际及发现问题、分析问题和解决问题的能力，如空气微生物检测、水中细菌总数的测定、土壤微生物的分离及计数等；第三类为研究性实验，目的是培养学生的主动创新和解决实际科学问题的能力，如污染土壤环境中功能微生物的分离、筛选及驯化，功能微生物菌株对镉的吸附，实验室酸牛乳发酵及指标检测等。

2 环境工程微生物实验教程

本书可作为高等院校环境工程、环境监测、资源与环境等专业的学生教材，也可供相关专业研究人员及实验技术人员参考。


由于编者学识有限，书中纰漏之处在所难免，恳请业内同行和广大读者批评指正，以便修订再版时使之更加完善。

编 者



目 录

实验一 普通光学显微镜的使用	1
实验二 培养基的制备与灭菌	11
实验三 空气微生物检测	18
实验四 水中细菌总数的测定	21
实验五 芽孢杆菌生长曲线的测定	26
实验六 土壤微生物的分离及计数	32
实验七 细菌、放线菌、真菌菌落形态的显微观察与计数	37
实验八 微生物纯种的分离、接种及培养	42
实验九 超积累植物内生真菌的分离及抗性测定	51
实验十 芽孢杆菌的制片及革兰氏染色	55
实验十一 环境因子对微生物生长的影响	59
实验十二 富营养水体中藻类叶绿素 a 含量的测定	66
实验十三 淀粉酶和过氧化氢酶活性的测定	71
实验十四 污染土壤环境中功能微生物的分离、筛选及驯化	75
实验十五 功能微生物菌株对镉的吸附	79
实验十六 水样中 BOD ₅ 的测定	82
实验十七 紫外线杀菌效果的检测	87
实验十八 实验室酸牛乳发酵及指标检测	93
实验十九 CTAB 法提取 DNA	100

2  环境工程微生物实验教程

实验二十 DNA 和 RNA 浓度检测	103
实验二十一 蛋白质浓度测定 (双缩脲法)	106
实验二十二 EPS 提取与测定	109
附录一 常用玻璃器皿的洗涤、干燥与包扎	112
附录二 常用培养基的配方	116
附录三 常用试剂和溶液的配制	123
附录四 常用菌种的保藏方法	126

实验一 普通光学显微镜的使用

普通光学显微镜（Light Microscope）是利用光学原理，把人眼所不能分辨的微小物体放大成像，以供人们提取微细结构信息的光学仪器。普通光学显微镜通常以自然光或灯光为光源，普通光学显微镜的最大分辨率为波长的一半，即 $0.25\ \mu\text{m}$ ，而肉眼所能看到的最小形象为 $0.2\ \text{mm}$ ，故在普通光学显微镜下用油浸物镜（以下简称“油镜”）放大 1 000 倍，可将 $0.25\ \mu\text{m}$ 的微粒放大到 $0.25\ \text{mm}$ ，这样肉眼便可以看清。一般的细菌均大于 $0.25\ \mu\text{m}$ ，故用普通光学显微镜即可看清楚。由于许多细菌的大小与普通光学显微镜的分辨率处于同一个数量级，故为了看清细菌的形态与结构，经常使用油镜来提高普通光学显微镜的分辨率。在普通光学显微镜的使用中，油镜的使用是一项十分重要的操作技术。

一、实验目的

- (1) 认识和了解普通光学显微镜的基本结构及工作原理。
- (2) 理解和掌握普通光学显微镜，重点是油镜的使用说明和维护技巧。
- (3) 在油镜下观察细菌的几种基本形态。
- (4) 采用悬滴法在高倍镜下观察细菌运动。

二、基本原理

(一) 普通光学显微镜的构造

普通光学显微镜的组成为两部分：机械系统和光学系统。如图 1-1 所示，为普通光学显微镜的基本结构。

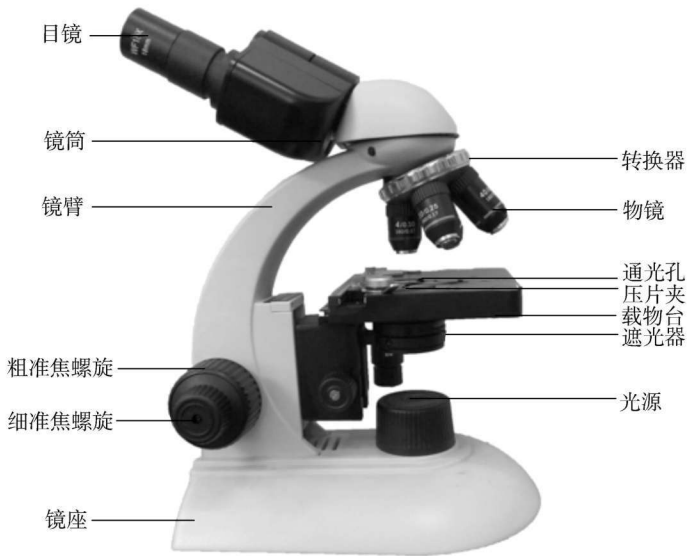


图 1-1 普通光学显微镜的基本结构

1. 机械系统

机械系统包括镜座、镜臂、镜筒、转换器、载物台、调节器等。

(1) 镜座 (Base)：位于普通光学显微镜最底端，呈马蹄形，支持全镜。

(2) 镜臂 (Arm)：有固定式和活动式两种。其中，活动式的镜臂可改变角度以支持镜筒。

(3) 镜筒 (Body Tube)：镜筒分单筒和双筒两种，是连接普通光学显微镜物镜和目镜的金属圆筒。单筒显微镜又可分为直立式和倾斜式两种，而双筒显微镜的镜筒都是倾斜结构，倾斜角度大多为 45° 。双筒显微镜其中的一

个目镜具有屈光度调节装置，可供两眼视力不同时调节使用。镜筒上端的圆孔可插入目镜，下端与物镜转换器相连。镜筒长度一般是固定的，通常为 160 mm，但有些显微镜的镜筒长度可以调节。

(4) 转换器 (Nosepiece)：位于镜筒的下端，是用于安装物镜的一个圆盘，表面上通常装有 4 个放大倍数 (5×、10×、20×和 40×) 的物镜。为了方便，物镜倍数的大小一般由低倍到高倍进行安装。可通过转动物镜转换器来选择不同倍数的物镜。注意，在转换物镜时，必须用手缓慢转动圆盘，切勿用手推拉物镜，以免导致物镜松动或脱落而损坏物镜。

(5) 载物台 (Stage)：又称镜台，一般为方形和圆形，是用于放置标本并与显微镜光轴垂直的平台。平台上通常装有移动装置，用以固定和移动标本，同时所有光学显微镜载物台中央有一个圆孔。载物台上的刻度可以标示玻片的坐标位置，另还装有两个金属夹片，用于固定标本；有的装有标本推动器，将标本固定后，能向前后左右推动。有的推动器上还有刻度，能确定标本的位置，便于找到变换的视野。

(6) 调节器：也称调节螺旋，位于显微镜右下端，为镜壁上两种可转动的螺旋 (即粗准焦螺旋和细准焦螺旋)，其可使镜筒上下移动，以调节焦距。其中，粗准焦螺旋位于镜臂的上方，可以转动，以使镜筒上下移动，从而调节焦距。粗准焦螺旋的镜筒升降较快，一般用于初步对焦；细准焦螺旋，位于镜臂的下方，它的移动范围较粗准焦螺旋小，镜筒升降较慢，可以细调焦距。

2. 光学系统

光学系统包括目镜、物镜、聚光器、反光镜等。

(1) 目镜 (Ocular Lens)：一般由两块透镜组成，装于镜筒上端，其功能是把由物镜放大的物像再次放大。目镜一般由两个凸透镜构成，它除了进一步扩大物镜所形成的实像之外，也限制了眼睛所观察的视野。按放大率分，目镜上刻有 5×、10×、15×、20×等放大倍数。可按需选用。我们所观察到的标本的物像，其放大倍数是物镜和目镜放大倍数的乘积。如物镜是 40×，目镜是 10×，其物像的放大倍数是 $40 \times 10 = 400$ 倍。

(2) 物镜 (Objective Lens)：物镜一般位于显微镜筒的下方，接近所观察的标本。其作用是将所观察物体作第一次放大，由 8~10 片透镜组成。其主要起 3 个方面的作用：一是放大标本物体的实像；二是确保物体成像的质量；三是提高清晰度。常用物镜可按放大率分为低倍 (4×)、中倍 (10×或 20×)、高倍 (40×) 和油镜 (100×)。多个物镜共同镶在换镜转盘上，可以按需转动

转盘以选择不同倍数的物镜。一般油镜上刻有“OI”（Oil Immersion）或“HI”（Homogeneous Immersion）字样，有的刻有一圈红线或黑线，以示区别。物镜上通常标有放大倍数、数值孔径（Numerical Aperture, NA）、工作距离（物镜下端至盖玻片的距离，单位为 mm）及盖玻片厚度等参数。以油镜为例，100/1.25 表示放大倍数为 100 倍，数值直径为 1.25；160/0.17 表示镜筒长度为 160 mm，盖玻片厚度等于或小于 0.17 mm。

(3) 聚光器 (Condenser)：由聚光镜和虹彩光圈组成。其中，聚光镜由透镜组成，其作用是将光源射出的光线汇集成光锥并照射被观察标本，使标本照明度增加，形成合适的光锥角度，提高物镜的分辨力。聚光镜数值孔径可大于 1.00，当使用数值孔径大于 1.00 的聚光镜时，需在聚光镜和载玻片之间滴加香柏油，目的是改变折射率，取代中间的空气，从而让射入高倍镜头的光线增多，看得更加清晰，否则折射率只能达到 1.00。虹彩光圈由薄金属片构成，中心形成圆孔状，可推动把手调整透过光线的强弱。调整聚光镜的高度和虹彩光圈的大小，可得到合适的光照强度和较为清晰的图像。当使用低倍物镜时应适当调低聚光器高度，使用油镜时则相应增加聚光器高度。在观察透明物体时，应适当调小光圈，增强光照在标本上的汇集反应，以便看清标本。

(4) 反光镜 (Reflector)：是光学显微镜的取光装置，作用是采集外源光线，并将完成汇集射向聚光器。反光镜位于聚光器下方的镜座上，可水平和垂直旋转。反光镜的一面是凹面镜，另一面是平面镜。一般情况下选用平面镜，光线不足时使用凹面镜。

(二) 普通光学显微镜的性能

1. 数值孔径

数值孔径在光学系统中是一个无量纲常数，用于衡量光学系统里收集光的角度范围。数值孔径的含义因在光学的不同领域而不同。在光学显微镜领域（普通光学显微镜系统成像原理如图 1-2 所示），数值孔径描绘的是物镜收光锥角的大小，而收光锥角又决定了光学显微镜收光能力和空间分辨率的大小。

在光学显微镜领域，光学系统的数值孔径可定义为

$$NA = n \sin \theta \quad (1-1)$$

式中， n 表示介质折射率（空气的折射率为 1.00，纯水的折射率为 1.33，油类的折射率为 1.56）； θ 表示光线进出透镜时最大锥角的一半，也可表示为被

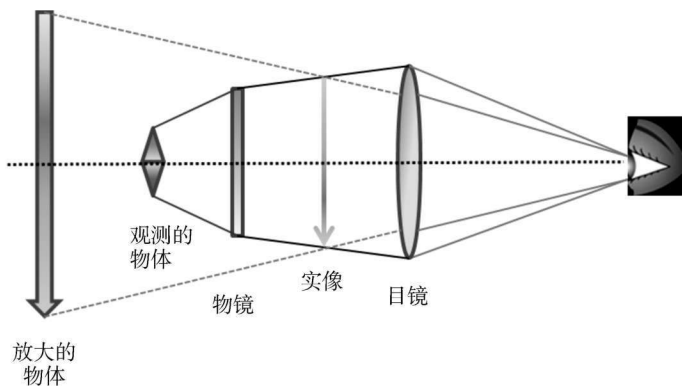


图 1-2 普通光学显微镜系统成像原理

观察物体在光轴上一点到光阑边缘的光线与光轴之间的夹角（即镜口角）。

由于数值孔径在定义中考虑了折射率因素的影响，因而当光线通过平面由一种介质进入另一种介质时，数值孔径仍是一个常量。在光学显微镜领域中，由于透镜的数值孔径决定了其空间分辨率的大小，因而数值孔径是非常重要的参数。光学显微镜的最高分辨能力与 $\lambda/2NA$ 成正比，其中 λ 表示光的波长。高数值孔径的透镜比低数值孔径的透镜具有更高的分辨空间细节的能力。同时，物镜的数值孔径还与物镜的性能相关，数值孔径越大，说明物镜的性能越强。由公式 (1-1) 可推断，要提高数值孔径，一个直接有效的途径就是提高被观察标本与物镜间的介质折射率，如图 1-3 所示。以空气为介

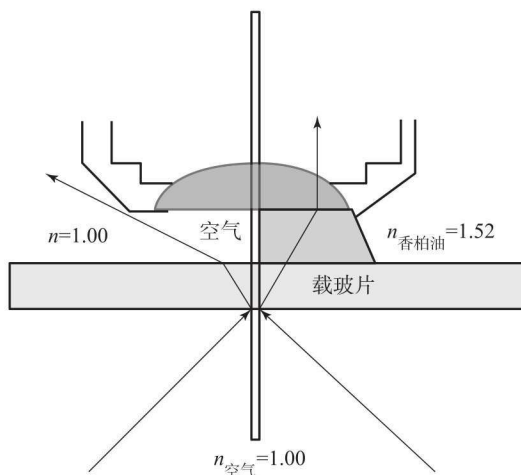


图 1-3 物镜与标本之间的介质的折射率

质时： $NA=1\times 0.87=0.87$ ；以水为介质时： $NA=1.33\times 0.87=1.15$ ；以香柏油为介质时： $NA=1.52\times 0.87=1.32$ 。

2. 分辨率

分辨率就是分辨物像细微结构的能力，用能被普通光学显微镜清晰区分的两个物点间的最小距离 D 表示。其计算公式为

$$D=\frac{\lambda}{2NA} \quad (1-2)$$

式中， λ 表示光波波长； D 表示分辨率， D 值越小，分辨率越高。

由式 (1-2) 可以看出，在保持物镜数值孔径不变的情况下，分辨率的大小与光波波长成正比。因此，要提高物镜分辨率，下列两个途径可以采取：

(1) 利用短波光源。在普通光学显微镜领域中，照明光源一般为可见光，其波长范围为 400~700 nm，而短波波长范围为 300~470 nm，因此缩短照明光源的波长可以降低 D 值，从而提高物镜分辨率。

(2) 增加物镜数值孔径。增加镜口角 α 或提高介质折射率 n ，都可以提高物镜分辨率。若用可见光作光源（波长范围为 380~760 nm），并利用油镜（数值孔径为 1.25）对标本进行观察，则能分辨出的两点距离约为 0.22 μm 。

3. 放大率

普通光学显微镜利用物镜和目镜两组透镜来放大成像，被观察标本先被物镜放大成像，然后被目镜放大成像，因而又被称作复式显微镜。所谓放大率，是指目视普通光学显微镜时所形成虚像的角放大率。因此，普通光学显微镜的放大率 (V) 是物镜放大倍数 (V_1) 和目镜放大倍数 (V_2) 的乘积，可用下列公式计算，即

$$V=V_1\times V_2 \quad (1-3)$$

如果物镜放大成像 40 倍，目镜放大成像 20 倍，则标本在该显微镜下的放大倍数是 800 倍。在一般常见的普通光学显微镜中，物镜的最大放大倍数为 100 倍，目镜的最大放大倍数为 15 倍，此时该显微镜的最大放大倍数是 1 500 倍。

4. 焦点深度

焦点深度简称焦深。当焦点聚焦某一观测标本时，此平面上的各点都可以观测清楚，而且在该平面的上下一定厚度内，也能观察清楚，这个清楚部

分的厚度就是焦深。物镜的焦深与放大率、数值孔径均成反比。放大率越小，焦深越大；数值孔径越小，焦深越大。

三、实验器材

- (1) 菌种：培养 24 h 的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus Subtilis*) 斜面培养物 3~4 支。
- (2) 标本片：具有杆状、球状形态的细菌染色标本。
- (3) 仪器及相关用品：显微镜、香柏油、二甲苯（或 1:1 乙醚酒精溶液）、擦镜纸。
- (4) 其他用品：载玻片、盖玻片、凹玻片、擦镜纸、酒精灯、接种针、凡士林等。

四、实验步骤

(一) 显微镜操作

(1) 领取并检查显微镜。实验指导教师向各小组发放显微镜，各小组在领取显微镜时，左手托住镜座底部，右手握紧镜臂，然后轻轻置显微镜于小组实验台上，并仔细检查显微镜各组成是否齐全，镜头是否擦拭洁净。若检查出部件问题，则应及时上报实验指导教师并进行更换。领取的显微镜应置于身体的左前方，身体的右侧则放置绘图本对标本进行绘图记录。

(2) 调节光源。优良的光源是保证良好显微效果的重要参数。无光源装置的显微镜，可以通过反光镜利用自然光或灯光来调节光照，在自然光线较强条件下可以使用平面镜；在自然光线很弱或在人工光源情况下用凹面镜。由于直射阳光会影响标本成像的清晰度并容易刺激眼睛，因而此种情况下不适宜进行观察操作。将 10×物镜对准圆盘光孔，并将聚光器上的金属光圈打开到最大位置，用左眼观察目镜中视野的亮度，转动反光镜，使视野的光照达到最明亮均匀为止。具有光源装置的显微镜，则可利用旋钮装置进行电流调节。当镜检染色物体时，应增强光线强度；当镜检未染色物体时，应当降

低光线强度。

(3) 低倍物镜观察。当使用物镜观察标本时，光圈具较大的视野角度，且焦距很大，在此视野下，所观察标本更容易被找到，所以，在观察标本时，应先从低倍物镜开始。此时，将所观察标本置于载玻片上，并用压片夹将其固定，通过旋钮调整载玻片至载物台正中央，使物镜和所观察标本保持 10~15 mm 的距离；然后，调整目镜之间的距离并用双眼进行观察，同时，右手缓慢调整粗准焦螺旋并使物镜缓慢升高至视野内出现所观察标本；之后调节细准焦螺旋，当视野中央的标本呈现较为清晰的图像时，再转换为中倍或高倍物镜进行观察。

(4) 中倍或高倍物镜观察。在使用低倍物镜镜检清晰的基础上，使用中倍或高倍物镜进行观察。当由低倍物镜转化为中倍或高倍物镜时，注意从侧面观察物镜与载物台之间的距离，以防止物镜的镜头与载玻片发生碰撞而损坏镜头。然后适当调节光照强度，用目镜进行观察，如所观察标本成像模糊，则此时应轻轻调节粗准焦螺旋，使载物台缓慢上升直至载玻片中央视野内出现物象后，再缓慢调节细准焦螺旋，使所观察标本呈现至目镜视野的正中央。

(5) 油镜观察。将粗准焦螺旋调节至距载物台大约 3 cm，并将油镜转化至正下方；将一滴香柏油滴加在标本所需观察的位置；然后，用粗准焦螺旋将镜筒缓慢降低，并注意观察使油镜完全浸入香柏油。此时，油镜的镜头几乎与所观察标本相连，但不能使镜头接触到标本。如果调节粗准焦螺旋的力量过大，就会使镜头压碎载玻片，同时，油镜的镜头也会损坏；从目镜内观察，并增加光线强度，当光线合适后，再使用粗准焦螺旋慢慢升高镜筒，直至目镜视野内呈现物像为止；最后改用细准焦螺旋调整焦距。如油镜离开油面后仍未观察到标本的成像，则必须从侧面进行观察，并将油镜缓慢降低。反复操作该步骤，直至能清晰观察到标本为止。

(6) 调换标本。若要观察不同的标本，则必须重新滴加香柏油并从步骤 (3) 开始重新调节。

(7) 用后复原。当标本观察完毕后，轻轻转动粗准焦螺旋使镜头缓慢上升，取走载物台上的载玻片，用擦镜纸轻轻擦去镜头上的香柏油，并用擦镜纸蘸取少许二甲苯或 1:1 乙醚酒精溶液。反复擦拭多次，再用干净的擦镜纸擦去残留的溶液，之后用细软的毛巾去除残留在机械零部件上的冷凝水和灰尘。缓慢降低镜筒，将物镜置于载物台上，缓慢降低聚光器，避免物镜与聚光器发生碰撞。为防受损，要使反光镜垂直于镜座上。最后，将所用显微镜

放置于专用显微镜箱中，锁好后，置于实验室规定的显微镜柜内。

（二）细菌形态观察

- (1) 在熟悉油镜的使用后，练习观察球状细菌和杆状的染色形态。
- (2) 在普通光学显微镜下观察酵母菌和霉菌的形态，并绘图。

（三）细菌运动性观察

许多革兰氏细菌具有鞭毛，并能在水环境中自由运动。通常用悬滴法和水浸片法在普通光学显微镜下观察细菌的运动。

1. 悬滴法

准备一个清洁的盖玻片，用接种针挑取少量凡士林，涂布在盖玻片表面；在无菌操作间内，用无菌移液枪吸取培养好的枯草芽孢杆菌菌悬液 100 μL 于盖玻片中央；然后取洁净的凹玻片一块，凹窝向下并完全覆盖在含有孢子悬浮液的盖玻片上；将凹玻片倒置，使菌悬液悬挂于盖玻片表面。当制成悬滴片后，按照相关操作步骤，首先用低倍物镜（10 \times ）找到悬滴液，然后转换成高倍物镜进行观察，并调节细准焦螺旋，便可以观察到目镜视野内的细菌运动情况。

2. 水浸片法

用无菌移液枪吸取培养了 24 h 的枯草芽孢杆菌菌悬液 100 μL ，并将该菌悬液置于洁净的载玻片中央，为避免气泡产生，缓慢盖上盖玻片。之后，在用低倍物镜搜寻到观察物体后，转换为中高倍物镜进行观察。

五、注意事项

- (1) 切勿主动拆卸普通光学显微镜的机械零部件，以免将其损坏。
- (2) 为了保持显微镜镜面的清洁，请务必用擦镜纸擦拭镜面；勿用纸巾或毛巾进行擦拭或清洗。
- (3) 在对标本进行观察时，请按照上述提及的步骤先用低倍物镜观察，