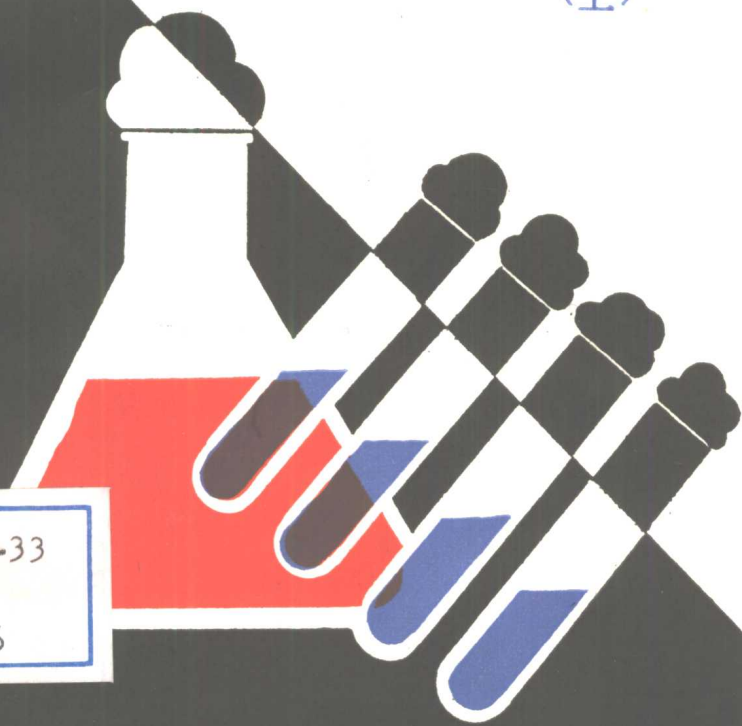


水生微生物学 实验法

(上)



Q938.8-33
CSM

101966

海洋出版社

水生微生物学实验法

上册

陈 绍 铭 编著
郑 福 寿

科学出版社

1985年·北京

内 容 简 介

《水生微生物学实验法》全书分上、下两册。上册内容包括：水生微生物的取样、分离、纯化、微生物形态结构的观察及计算方法；下册内容包括：水环境因素与微生物的关系、水生微生物的培养特征、生理生化鉴定、免疫学测定、微生物细胞的生物化学研究方法基础、水产品中细菌的检验、微生物分类新技术介绍及其检索、微生物遗传学研究和菌种保藏法等。

本书可供从事海洋微生物学、水环境微生物学、水产微生物学和水卫生防疫学等诸方面的教学、科研或生产的工作者参考。

水生微生物学实验法

(上册)

陈绍铭 郑福寿 编著

海洋出版社出版(北京市复兴门外大街1号)

新华书店北京发行所发行

海洋出版社印刷厂印刷

开本：787×1092 1/32 印张：81 字数：170千字

1985年9月第一版 1985年9月第一次印刷

印数：3450

统一书号：13193·0426

定价：1.70元

前 言

随着海洋开发事业的发展,水生微生物学同其他海洋学科一样,也将有个新的发展。由于国内对水生微生物学的全面调查研究起步较晚,目前尚缺系统的水生微生物学实验方法的书籍。为此,作者结合教学和科研工作编写了本书。

本书系作者根据自己编写的《海洋微生物学实验法》讲义(其中部分内容曾作为厦门大学海洋生物专业的实验教材)进行修改、补充,重新编著而成。在内容上力求较全面地介绍海洋、港湾、江河和湖泊等自然水域及其沉积物中的微生物调查基本方法及实验操作基本技术,同时对实验方法有关的基础理论也作了必要的阐述。

全书分上下两册。上册包括:水生微生物的取样、分离、纯化、微生物形态结构的观察及计算方法;下册包括:水环境因素与微生物的关系、水生微生物的培养特征、生理生化鉴定、免疫学测定、微生物细胞的生物化学研究方法基础、水产品中细菌的检验、微生物分类新技术介绍及其检索、微生物遗传学研究和菌种保藏法等。

期望本书能对从事海洋微生物学、水环境微生物学、水产微生物学和水卫生防疫学等诸方面的教学、科研或生产的工作人员有所裨益。

陈 弱

1984年2月25日

目 录

第一章 取 样

一、取样前的准备	(2)
(一) 仪器准备	(2)
(二) 性能检查	(2)
(三) 配制各种培养基和试剂	(2)
(四) 取样前的现场记录	(3)
二、取样地点的选择	(4)
(一) 采淡水(河水、湖泊水等)样品的地点选择	(4)
(二) 海洋、港湾取样地点的选择	(4)
(三) 沉积物取样地点的选择	(5)
三、水样采集	(5)
(一) 采水器	(6)
(二) 自来水样的采集	(11)
四、沉积物的采集	(11)
(一) 曙光(HNM ₁₋₂ 型)采泥器	(12)
(二) 弹簧采泥器	(13)
(三) 柱状采样管	(15)
五、附着样品的采集	(18)

(一) 水中沉降附生玻片法.....	(18)
(二) 底埋玻片法.....	(18)
(三) 毛细管底埋法.....	(19)
六、样品的暂时保存和运输.....	(20)

第二章 水生微生物的分离与纯化

一、培养基的配制.....	(22)
(一) 培养基配制的基本原理.....	(22)
(二) 配制培养基的一般过程及注意事项.....	(29)
(三) 无菌水、无菌海水和陈海水的制作.....	(33)
(四) 平板和斜面培养基制备.....	(33)
(五) 营养琼脂培养基、2216E培养基和特殊 用途培养基的制备.....	(34)
二、灭菌方法.....	(37)
(一) 物理灭菌法.....	(37)
(二) 化学灭菌法.....	(47)
三、无菌操作.....	(48)
(一) 船上微生物实验室、无菌室 及其器具.....	(48)
(二) 基本操作技术.....	(49)
四、分离与纯化培养.....	(53)
(一) 器具及设备.....	(53)
(二) 十倍稀释分离法.....	(56)
(三) 平板划线法.....	(58)
(四) 倒平板法和平板涂布法.....	(60)
(五) 单细胞分离法.....	(62)

(六) 超滤膜分离法·····	(66)
五、不同类型微生物分离方法·····	(68)
(一) 厌氧细菌的分离和无氧装置·····	(68)
(二) 芽孢杆菌的分离·····	(72)
(三) 海洋发光细菌的分离培养·····	(73)
(四) 海洋固氮菌的分离·····	(76)
(五) 硝化细菌的富集培养和分离·····	(80)
(六) 反硝化细菌的富集培养与分离·····	(84)
(七) 硫杆菌的分离培养·····	(86)
(八) 脱硫弧菌的富集、分离、纯化培养·····	(90)
(九) 磷细菌的分离·····	(94)
(十) 石油微生物种群的分离·····	(96)
(十一) 分解油脂细菌的分离·····	(98)
(十二) 几丁质分解菌的分离·····	(99)
(十三) 铁细菌富集分离及形态观察·····	(102)
(十四) 绿菌属 (<i>Chlorobium</i>) 的富集培养 及分离·····	(107)
(十五) 着色菌属 (<i>Chromatium</i>) 或称红硫菌 属的分离与纯氏培养·····	(109)
(十六) 红螺菌属 (<i>Rhodospirillum</i>) 的富集 培养与分离·····	(112)
(十七) 红色假单胞菌属 (<i>Rhodopseudomonas</i>) 的富集培养与分离·····	(114)
(十八) 滤膜法分离检验水中大肠杆菌群·····	(115)
(十九) 水中沙门氏菌的分离·····	(118)
(二十) 水中志贺氏菌的检验和分离·····	(121)

(二十一) 水中葡萄球菌的分离与观察.....	(127)
(二十二) 水中粪链球菌群的增菌培养 与分离.....	(129)
(二十三) 水中霍乱弧菌的分离检验.....	(131)
(二十四) 水中缘腺杆菌的分离检验.....	(136)
(二十五) 从泥样中分离放线菌.....	(138)
(二十六) 从沉积物中分离霉菌.....	(140)
(二十七) 从水、泥和生物体中分离 酵母菌.....	(141)
(二十八) 噬菌体的分离.....	(144)

第三章 水生微生物的细胞形态观察

一、显微镜与显微摄影.....	(148)
(一) 普通光学显微镜.....	(148)
(二) 其他光学显微镜.....	(152)
(三) 电子显微镜.....	(157)
(四) 显微镜摄影法.....	(158)
二、测微尺使用及微生物大小测量.....	(165)
三、细菌运动的观察.....	(166)
(一) 暗视野观察法.....	(167)
(二) 悬滴法.....	(168)
四、应用荧光显微镜辨别死、活菌.....	(168)
五、单染色法.....	(169)
六、革兰氏染色法.....	(171)
七、抗酸染色法.....	(174)
八、鞭毛染色法.....	(175)

(一) 常用法	(176)
(二) 利夫森氏 (Leifson) 法	(178)
(三) 户田法	(178)
(四) 费希尔氏和康恩氏 (Fisher and Conn)	
法	(179)
(五) 卡萨尔 斯 氏 (Casares) 染色法	(179)
(六) 鞭毛染色的成败原因	(180)
九、芽孢染色法	(180)
(一) 孔雀 绿-番红染色法	(180)
(二) 科康氏 (Conkon) 改进沃茨氏 (Wirtz)	
的染色法	(181)
十、荚膜染色法	(181)
(一) 番红染色法	(182)
(二) 结晶紫硫酸铜改良染色法	(182)
(三) 刚果红美蓝染色法	(182)
(四) 结晶紫墨汁染色法	(183)
十一、细胞壁染色法	(183)
(一) 鞣酸结晶紫染色法	(183)
(二) 磷钼酸染色法	(184)
十二、异染粒染色法	(184)
十三、类脂粒染色法	(185)
十四、伴孢晶体染色法	(186)
十五、核染色法	(187)
十六、放线菌形态的观察	(188)
(一) 透明纸培养和观察法	(189)
(二) 印片观察法	(189)

(三) 盖片观察法.....	(190)
十七、酵母菌形态的观察.....	(190)
(一) 水浸法观察酵母菌.....	(191)
(二) 子囊孢子的观察.....	(191)
(三) 假菌丝的观察.....	(192)
(四) 酵母菌死、活细胞的鉴别法.....	(192)
(五) 酵母菌的肝糖染色法.....	(192)
(六) 酵母菌的脂肪粒染色法.....	(193)
十八、霉菌形态的观察.....	(193)
(一) 直接取菌观察法.....	(194)
(二) 载片培养观察法.....	(194)
(三) 染色法鉴别死、活孢子.....	(196)
(四) 玻璃纸培养观察法.....	(197)

第四章 水生微生物的计数

一、普通显微镜的直接计数.....	(198)
(一) 利用血球计数板计数.....	(199)
(二) 应用Peteroff-Hauser计菌器 计数.....	(201)
(三) 采用目镜计数网计算.....	(202)
(四) 以涂片面积与视野面积之比估算.....	(203)
(五) 沉积物中细菌的稀释算法.....	(203)
二、应用超滤膜计数水生细菌.....	(205)
(一) 超滤膜萌发计数法.....	(205)
(二) 超滤膜直接镜检法.....	(206)
三、荧光显微镜的算法.....	(207)

(一) 水样中细菌的荧光计数法.....	(207)
(二) 泥样中细菌的荧光计数法.....	(208)
四、平板计数及大肠杆菌群的检验.....	(209)
(一) 饮用水(自来水、深井水、泉水)的 检验.....	(209)
(二) 游泳池水和海滨游泳场池水的检验.....	(214)
(三) 污水(河水、港湾水等)的检验.....	(216)
(四) 沉积物中的微生物平板计数.....	(219)
(五) 菌落计算原则.....	(220)
五、泥样中厌氧菌的计数法.....	(221)
六、泥样中放线菌、酵母菌和霉菌与总菌数的计数 比较.....	(223)
七、液体稀释法(MPN法).....	(227)
(一) 反硝化细菌的计数.....	(229)
(二) 底泥中氨化细菌数量的测定.....	(238)
(三) 水中附着的纤维分解菌的数量测定.....	(239)
(四) 粪大肠杆菌群的数量测定.....	(241)
八、应用标准比浊管测菌数.....	(247)
九、使用分光光度计测定细菌数量.....	(249)

第一章 取 样

在水生微生物的研究中无论是试图了解水环境中微生物的数量及其变化规律，还是调查其种类组成或分离某种微生物，首先遇到的问题是在什么时间、什么地点和用什么样的设备与方法进行取样。

水生微生物栖息的场所大致可分为水与沉积物两处。由于水和沉积物的物理化学及生物学的环境条件显著不同，在其中生存的微生物种类、数量和活性等也有很大的差异。例如，同样是海水而外洋水、沿岸水和不受海流影响的水域，由于受污染的程度、有机物含量、潮汐变化和水深等因素的不同，使其所含的微生物的种群组成及其功能也就有明显的差异。水底沉积物中微生物的情况也是如此。所以，无论是粗略地调查微生物种群的生态分布，还是结合实验结果来推测水中微生物可能进行的活动，都必须正确掌握现场的各种因素。对水生微生物进行调查研究时一般必须了解水的温度、透明度、pH、盐度、深度、溶解氧、可溶性有机碳、铵态氮、亚硝态氮、硝态氮、磷酸、悬浮有机络合物、藻类及其光合作用活性和其他浮游生物等状况；而对水底沉积物中微生物的调查还要增加底质、泥温、硫化氢、各种金属的浓度以及氧化还原电位等项目。这些环境因素的调查方法在有关水质调查方法的著作中都有详细的论述。另外，近年来还生产有各种水质快速连续测定仪，如温盐连续测定

器，叶绿素浊度连续测定仪等，都可供微生物调查取样时使用。

一、取样前的准备

（一）仪器准备

在取样前必须根据调查计划所规定的调查站数及采样数量做好采样瓶、采水球、移液管、培养皿、水样引出管、水样贮存瓶、过滤器等器具的消毒和灭菌工作。所有的消毒器具应以只能使用一次的原则按所需要的数量备齐。有些器具的数量要比原计划需要量多20—30%，以备用。玻璃器皿用高压蒸气灭菌法灭菌，橡皮球用化学法消毒。消毒灭菌后各种器具要求包装严密，不得中途污染。

（二）性能检查

采样出发前要对各种采集仪器、设备进行一次全面的性能检查。例如，检查真空泵能否正常抽气，采水瓶（球）有无破痕、瓶塞（球塞）是否紧密等。上船后还要做好固定仪器的工作，特别是电炉、酒精灯、抽滤瓶及真空抽气泵等要固定牢。

（三）配制各种培养基和试剂

取样前应配制好所需的各种培养基、染色液、稀释液、试剂，并用水浴锅把固体培养基溶化后存放在45℃的恒温箱

中备用，以防凝固。

(四) 取样前的现场记录

到达采集地点时，首先要核实所在站位的实际位置和水深，以便决定取样层次和数量。将各种现场环境因素（物理化学因素和周围情况）、站位、站号、日期、时间、水层、瓶号填入记录表相应栏，并签上采集者姓名，随同样品带回实验室。

表1-1 水生微生物样品采集记录表 第 页

采集区：	船名：	采样时间：	年	月	日
时 分					
站号：	站位：	纬度：	经度	水深：	
底质：					
样品种类：	采集器型号：	样品号：			
水（泥）层：	米	采样时水（泥）温度：	°C		
气温：	°C	潮汐：			
采样站周围情况：					
现场的物理、化学、生物等因素：					
(如：水色、透明度、水流、					
pH值、溶解氧、氧化还原电位等)					
分析目的：		分析项目：			
采集者（签字）：		校对者（签字）：			

二、取样地点的选择

(一) 采淡水(河水、湖泊水等)样品的地点选择

河流中微生物种类与数量因流速及水深等因素的不同而有明显变化。为了获得有代表性的水样应选择经常在流动的河道中央,水深为20—30厘米的水层取样。若调查垂直分布,则应选择在河流最深处为采集点。

湖泊在夏季通常会形成显著的温跃层,所以一年内最好有季节性的取样。采样地点设在湖泊中心与沿岸的具有代表性的水域。

在判断污水对河流与湖泊的影响时,一般应在污水入口处按一定距离及有代表性的出口地点分别设站取样。同时还要在没有污染的上游水域采样作对照。

(二) 海洋、港湾取样地点的选择

同海洋微生物种群的特点有关的环境因素主要是:温度,盐度,静水压力以及有机物质等。但是这些因素在港湾及沿岸带又往往受潮汐、河水的流入、周围环境污染的影响而有很大的变化。所以取样一方面要根据具体环境设点;另一方面又要考虑不同的调查目的(如基础调查、监测调查、专题调查和应急调查等)而设站取样。

设站的一般原则为:

(1) 近岸较密,远岸较疏。

(2) 重点水域, 如河口、排污口、渔场、养殖场、海滨浴场、旅游区、国防设施区和海上石油开发区等, 应设较密的取样点。对照水域的采样可以疏些。

(3) 取样地点力求纵、横成断面, 如海上断面与岸线垂直、河口区的断面和径流扩散方向一致或垂直、开阔海区纵、横断面成网格状, 港湾地区视地形、潮流、航道的具体情况布设取样断面。

(4) 海洋微生物的取样站位应尽可能与原有海洋调查标准断面站位吻合。

(5) 力求与固定监测站的岸边点衔接。

(三) 沉积物取样地点的选择

水底沉积物中微生物的数量较大而稳定, 可以按照不同的调查研究目的及地质、地形的特征设点取样。

沉积物取样地点通常应着重考虑:

(1) 按底质结构类型设点, 如泥质、沙质、岩石、混合底质等分别设点。

(2) 按地形结构设点, 如平面和斜面、海沟与海滩、航道及岸边以及受潮汐影响的不同深处都应该取代表性的地形沉积物。

(3) 按不同层位设点, 如氧化层、还原层、冲刷层、沉积层、有机物层、矿质层等均可以按不同深度分别取样。

三、水样采集

采集供微生物学检验的水样必须按无菌操作技术进行。

并保证在送检过程中不受外界污染，这样才能反映当时当地的微生物真实情况。

（一）采水器

采集深水样品较复杂，要有专门的取样设备和熟练的取样技术。

采水器种类很多，文献记载的已有一百多种。目前常用的有：击开式采水器，即J-Z式采水器；复背式采水器；尼斯金（Niskin）采水器；颠倒采水器，即南森（Nansen）式采水器；深水细菌取样器；无菌取样瓶等。我国常用的有下列三种。

1. 击开式采水器（J-Z式采水器）

击开式采水器是参考佐贝尔（ZoBell）采水器改制而成的。主件是玻璃水样瓶，不能耐受水深500米以深的静水压力，仅适用于500米以浅的海区。由于采水瓶事先已灭菌，因此所采的水样污染率较低，是一种比较理想的浅水微生物采水器（图1-1）。

击开式采水器包括机架和水样瓶两部分。机架部分呈“V”形，其两翼成 72° 角张开为机架的正面，整个机架是用一块厚6毫米，宽210毫米，高290毫米的黄铜板制成。在机架正面距架脚120毫米处，装有一条半环形的铜带。带的一端绞在机架左翼，另一端由元宝螺母固定在机架右翼上。机架下部两翼间装一半圆形托板撑住采水瓶，并可调高低。入水玻璃管被机架左上角的弹簧夹和右上角敲击杠杆固定住。敲击杠杆下有个直角形的弹簧连接杆，位于机架的中线处。连杆下部呈钩状。