

环境工程 微生物检验手册

俞疏馨 吴国庆 孟宪庭 主编
杨惠芳 主审



中国环境科学出版社

环境工程微生物检验手册

俞毓馨 吴国庆 孟宪庭 主编

杨惠芳 主审

中国环境科学出版社

1990

内 容 简 介

本书详细介绍了环境微生物检验实验室常用的设备和基本操作, 环境及环境工程中各种微生物的取样、分离、检验方法和步骤, 环境中微生物生物量与生理生化检测, 活性污泥微生物酶活性测定等。着重对环境卫生细菌学检验、环境的生物监测和细胞与活性污泥固定化等近年来国内外微生物学检验的新技术进行了专门论述。并附有常用仪器的使用方法、培养基及试剂的配制方法、水质排放标准等。书中内容充实具体, 每项检验均有理论阐述。文字叙述简明扼要, 是一本较好的环境及环境微生物检验工具书。本书可供环境保护与监测、环境工程、给排水工程及卫生防疫等部门从事微生物检验的化验、科技管理、工程技术人员及高等院校教师、研究生和本科生参考。

环境工程微生物检验手册

俞毓馨 吴国庆 孟宪庭 主编

杨惠芳 主审

责任编辑 杨吉林

*

中国环境科学出版社出版

北京崇文区北岗子街8号

三河县艺苑印刷厂印刷

新华书店总店科技发行所发行 各地新华书店经售

*

1990年12月 第一版 开本 850×1168 1/32

1990年12月 第一次印刷 印张 14 3/8

印数 1—4 500 字数 371千字

ISBN 7-80010-656-X/X·349

定价: 6.90元

前 言

保护环境和合理利用自然资源，防治环境污染，特别是对城市污水和固体废物的无害化、资源化，微生物起着重要作用。微生物是分解者、转化者，在生物圈中使有机物质无机化，使碳、氮、硫、磷等元素循环转化，是生物圈能量流动及物质循环的主要参与者，因而没有微生物就没有人类生存的基本环境。微生物在一定条件下能产生毒素及致病，对人们的健康造成极大的危害。环境工程微生物检验是环境监测和环境微生物学的重要内容，也是保护环境的重要监测手段之一。

《环境工程微生物检验手册》是一本提供生物技术的工具书，一方面检验污染环境状况下的微生物及其影响，以保障人体健康；另一方面研究在水、空气和土壤中以及在废水、废气、废渣处理过程中微生物的生态条件、生命活动，选育优良菌种，从而提高处理效率。它的系统性和实用性都较强，主要特点是：

一、内容丰富，既有常规检验又有新技术，理论与实际结合得较好，操作技术介绍较详细。

二、反映了国内外一些新的成果，如生物监测 Ames 氏试验、R⁺因子检查、发光菌对毒性废水监测、固定化活性污泥技术及固体废物用蚯蚓处理等。

鉴于以上特点，相信这本手册的出版能成为从事环境保护、环境生物监测、环境微生物学、给水工程和排水工程方面的工程技术人员、科研人员、研究生及大专院校师生作为解决实际问题的的一本重要工具参考书。

编写者为环境工程微生物检验付出了辛勤的劳动，感谢他们为我国环境保护事业做了一件非常有益的工作。

曲格平

1989年9月28日

编者的话

本书是为检验环境污染的状况和研究控制工程中微生物的生态条件,生命活动,选育优良菌种,提高处理效率所提供的一本微生物技术的工具书。

手册分九章,包括四方面内容:一、系统地介绍了微生物的基本操作技术;二、环境卫生细菌学检验法——水、游泳池、空气、土壤及粪便的卫生细菌学检验法;三、废水控制工程中的微生物学检验法,如水样的采集与保存、微生物量及其活性测定,活性污泥的固定化技术及各种酶活性的测定等;四、环境生物学监测。本书除介绍标准及传统检验法外,还吸收了国内外最新成果并介绍较新的快速检验法。

手册是在国家环保局曲格平局长、张坤民副局长,中科院微生物研究所杨惠芳,清华大学顾夏声、井文涌教授等的关怀和支持下编写的。

参加手册编写工作的有:中国科学院南京土壤研究所顾宗濂、应用生态研究所刘期松、微生物研究所刘志培,天津大学田淑媛,武汉工业大学万品珍,天津城建学院罗志腾,太原工业大学吴国庆,北京工业大学孟宪庭,清华大学徐本源、胡秀仁、祝万鹏、周中平、严月根、秦竹、俞毓馨、文湘华、竺建荣、李彤等。

在手册编写过程中还得到北京市环境卫生研究所,北京市泵站管理所,中国预防医学科学院环境卫生监测所、环境卫生与卫生工程研究所和清华大学李敬同志的热情帮助,在此致谢。

由于手册的编写者较多、涉及的检验方法较广,难免存在错误与不妥之处,欢迎读者批评指正。

编者

1989年12月12日

iii

目 录

第一章 环境微生物检验的准备	(1)
一、环境微生物检验常用设备	(1)
(一) 显微镜	(1)
(二) 其它仪器设备	(16)
二、实验的准备工作	(17)
(一) 实验室的消毒	(17)
(二) 无菌室	(21)
(三) 器皿的洗涤	(22)
(四) 棉塞的准备	(24)
三、样品的采集与处理	(25)
(一) 水样的采集与保存	(25)
(二) 垃圾的采集	(34)
(三) 土样的采集	(37)
(四) 气样的采集	(39)
第二章 环境工程微生物的基本操作技术	(47)
一、光学显微镜使用方法	(47)
二、光学显微镜的测微技术	(49)
三、电子显微镜生物样品的制片技术	(51)
四、培养基的制备	(58)
五、灭菌	(63)
(一) 加热灭菌	(63)
(二) 过滤除菌	(68)
六、接种技术	(71)
七、制片技术	(76)
八、染色技术	(78)

(一) 染色目的及其基本原理	(78)
(二) 各种染色方法	(78)
九、生物的菌种保存法	(90)
(一) 低温保藏法	(90)
(二) 液体石蜡保藏法(矿油保存法)	(91)
(三) 蒸馏水保存法	(92)
(四) 砂土管保藏法	(92)
(五) 冷冻干燥保存法	(93)
第三章 环境微生物分离的基本操作方法	(95)
一、活性污泥或生物膜中微生物的分离方法	(95)
二、水处理中主要微生物的分离培养	(100)
(一) 细菌的分离培养	(100)
(二) 放线菌的分离培养	(117)
(三) 酵母菌的分离培养	(118)
(四) 丝状真菌的分离培养	(119)
(五) 藻类的培养	(121)
(六) 浮游动物的培养	(126)
第四章 环境中微生物生物量的测定	(129)
一、细菌总数的测定	(129)
(一) 直接计数法——血球计数板计数	(129)
(二) 染色涂片计数法	(131)
(三) 比浊度法	(132)
(四) 微生物细胞的重量测定法	(133)
(五) 自养菌数量的测定	(135)
二、细菌活菌数的测定	(136)
(一) 平板菌落计数法	(136)
(二) 液体稀释法(MPN法)	(138)
(三) 滤膜过滤计数法	(143)
三、应用分光光度计测定细菌数量	(144)
四、测总氮量计算微生物量	(145)
五、DNA含量的测定	(148)

第五章 活性污泥中微生物酶活性的测定	(152)
一、蛋白质水解酶活性的测定	(152)
(一) 福林-酚试剂法	(152)
(二) 重氮法	(154)
二、脂肪水解酶活性的测定	(156)
三、淀粉水解酶活性的测定	(158)
(一) 活性污泥中液化型淀粉水解酶活力测定	(158)
(二) 活性污泥中糖化型淀粉酶活力测定	(159)
四、纤维素水解酶活性的测定	(160)
(一) 3,5二硝基水杨酸法	(161)
(二) 塞氏比色定糖法	(162)
五、脱氢酶活性的测定	(163)
(一) TF 定量分析法	(163)
(二) MB · 2 H定性分析法	(165)
六、微生物呼吸率的测定	(166)
(一) 瓦勃氏呼吸仪的工作原理	(167)
(二) 呼吸仪的主要构件和装置	(167)
(三) 反应瓶的常数计算	(168)
(四) 反应瓶体积的测定法	(168)
(五) 活性污泥悬浮液或微生物体止细胞的制备	(171)
(六) 检验方法	(172)
(七) 实验结果的计算	(174)
(八) 瓦氏呼吸仪的洗涤方法	(175)
(九) 汞的洗涤及保存	(177)
七、ATP 的测定	(178)
(一) 荧光素-荧光素酶测定 ATP	(179)
(二) 含磷量测 ATP	(180)
八、厌氧污泥活性指标的测定	(182)
(一) 最大比产 CH_4 速率和最大比 COD 去除速率	(182)
(二) 辅酶 F_{420} 的测定	(186)
(三) 氢化酶	(189)

(四) 磷酸酯酶	(192)
九、生物传感器测定微生物活性	(193)
(一) 固定化微生物膜的制备	(194)
(二) 生物传感器的安装	(195)
(三) BOD 的测定	(195)
十、活性污泥泥龄及其控制	(196)
(一) 活性污泥泥龄的概念	(196)
(二) 活性污泥泥龄对系统运行特性的影响	(199)
(三) 活性污泥泥龄的测定	(202)
(四) 活性污泥泥龄的控制	(202)
第六章 环境工程微生物主要生理生化检测	(204)
一、糖的氧化发酵	(204)
二、淀粉水解的检验	(205)
三、油脂水解的检验	(206)
四、甲基红试验 (M-R)	(207)
五、乙酰甲基甲醇 (V-P) 试验	(207)
六、柠檬酸盐利用试验	(209)
七、含碳化合物的利用	(209)
八、含氮有机化合物分解产氨试验	(211)
九、硝酸盐和亚硝酸盐的还原	(211)
十、明胶水解试验	(213)
十一、脲素酶试验	(214)
十二、石蕊牛奶试验	(215)
十三、吲哚试验	(216)
十四、硫化氢的产生	(217)
第七章 环境卫生学检验	(219)
一、水的卫生细菌学检验	(219)
(一) 总大肠菌群的检验	(219)
(二) 细菌总数测定	(232)
(三) 粪大肠菌的检验	(233)

(四) 粪链球菌的检验	(235)
(五) 沙门氏菌的检验	(237)
(六) 志贺氏菌的检验	(240)
(七) 结核杆菌的检验	(242)
二、游泳池水的卫生细菌学的检验	(243)
(一) 金黄色葡萄球菌的检验	(244)
(二) 绿脓杆菌的检验	(245)
三、土壤卫生细菌学检验	(246)
四、空气卫生细菌学检验	(248)
(一) 沉降法	(248)
(二) 滤过法	(249)
(三) 简易定量测定法	(250)
五、肠道病毒——脊髓灰质炎病毒检验	(250)
六、寄生虫学检验	(261)
(一) 寄生虫虫卵检查	(262)
(二) 寄生虫幼虫的检查	(265)
(三) 常见寄生虫卵及幼虫形态	(267)
第八章 环境的生物监测	(271)
一、致突变物检测——Ames 氏试验	(271)
二、粪大肠菌抗生素敏感性分析和 R-因子在细菌 间转移检验	(282)
三、发光菌对毒性废水检测法(MICROTOX法)	(290)
四、水污染与净化中指示生物监测	(296)
(一) 采样	(297)
(二) 水样的浓缩	(301)
(三) 浮游生物的检测	(302)
五、水体污染与自净中叶绿素 a 的检测	(307)
六、藻类固碳量的测定	(311)
七、蚯蚓对重金属元素吸收转化能力的检验	(313)
八、硝化细菌对水及土壤中有毒物质的检测	(320)

第九章 微生物细胞及其酶的固定化	(325)
一、微生物酶一般的提取及固定方法	(327)
(一) 酶提取的一般方法	(328)
(二) 微生物酶的一般固定化技术	(328)
二、微生物细胞的固定化技术	(331)
(一) 微生物细胞的一般固定方法	(332)
(二) 活性污泥固定化	(334)
(三) 微生物酶与细胞共固定化	(337)
附 录	(338)
一、常用仪器的使用方法	(338)
(一) 气相色谱仪	(338)
(二) 721型分光光度计的使用方法	(343)
(三) 180-80塞曼效应原子吸收分光光度计	(345)
二、培养基配制	(353)
(一) 基础培养基	(353)
(二) 选择性培养基	(355)
(三) 鉴别培养基	(364)
(四) 特殊培养基	(374)
三、常用试剂的配制	(389)
(一) 染色液的配制	(389)
(二) 常用洗涤液的配制	(393)
(三) 常用固定剂(保存剂)的配制	(394)
(四) 其它试剂的配制	(394)
(五) 指示剂	(398)
(六) 缓冲液	(401)
四、实验室常用酸碱的比重和浓度的关系	(407)
五、常用固态化合物当量浓度(或克分子浓度)配 制参考表	(408)
六、比重糖度换算表	(409)
七、标准筛孔对照表	(410)

八、饱和水汽压力与温度关系	(411)
九、灭菌压力与灭菌器内温度关系	(412)
十、各类水体的国家标准	(412)
(一) 地面水环境质量标准 (GB3838—88)	(412)
(二) 生活饮用水水质标准 (GB5749—85)	(416)
(三) 污水综合排放标准 (GB8978—88)	(417)
(四) 粪便无害化卫生标准 (GB7959—87)	(420)
(五) 医院污水排放标准 (GBJ48—83)	(421)
十一、参考标准	(422)
(一) 水质评价项目选择表	(422)
(二) 与各类水质标准比较表	(424)
(三) 北京市有关标准	(430)
(四) 其他标准	(431)
(五) 国外参考标准	(432)
主要参考文献	(441)

第一章 环境微生物检验的准备

一、环境微生物检验常用设备

(一) 显微镜

显微镜是研究微生物的重要工具之一，它的种类随着科学技术的发展逐渐增加。经常使用的除普通光学显微镜外，还有暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜及电子显微镜。最近发展的有扫描离子显微镜、扫描隧道显微镜及声显微镜。

1. 普通光学显微镜

图1-1是通常观察微生物用的光学生物显微镜。其机械部分主要包括：

1) 镜筒 镜筒长度一般是160cm。它的上端装目镜，下端装物镜回转板。回转板上一般有三个物镜。

2) 载物台 载物台是放置标本的平台，中央有一圆孔，使下面的光线可以通过。两旁有弹簧夹，用以固定标本或载玻片。有的载物台上装有自动推物器。

3) 调节器 镜筒旁有两个螺旋，大的叫粗调节器，小的叫细调节器，用以升降镜筒，调节物镜与被观察物体之间的距离。

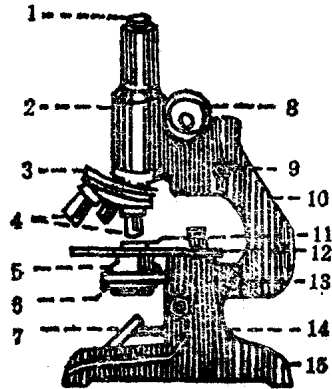


图1-1 普通光学显微镜

1. 接目镜；
2. 镜筒；
3. 回转板；
4. 接物镜；
5. 集光器；
6. 光圈；
7. 反光镜；
8. 粗调节器；
9. 细调节器；
10. 镜臂；
11. 弹簧夹；
12. 载物台；
13. 倾斜关节；
14. 支柱；
15. 镜座

光学部分主要包括：

1) 目镜 一般使用的显微镜具有2~3个目镜,其上刻有“5×”、“10×”、“15×”(或“16×”)等数字及符号,意即放大5倍、10倍、15倍(或16倍)。这三种透镜的焦距分别为50mm、25mm、15mm,线视场分别为20mm、14mm、10mm。

2) 物镜 物镜装在回转板上,可分低倍镜、高倍镜和油镜三种,它们的放大倍数分别是10×(或5×)、40×(或50×)、100×(或90×),相应的工作距离是7.63mm、0.5mm、0.198mm。物镜上常标注数值孔径(N.A.),它的意义下面将解释。显微镜的总放大倍数等于物镜与目镜放大倍数的乘积。观察微生物时,常用放大10倍或15倍的目镜。目镜装在镜筒上端,在使用过程中并不经常变动,通常所谓的低倍镜、高倍镜或油镜的观察,主要是指使用不同物镜而言。例如用10×目镜和40×物镜(高倍镜)所得物象的放大倍数是400倍。

油镜的放大倍数最大(90倍或100倍)。放大倍数这样大的镜头,焦距就很短,直径很小。从标本玻片透过来的光线,因介质密度不同(从玻片进入空气,再进入油镜),有些光线因折射或全反射,不能进入镜头,致使射入的光线较少,物象显现不清。所以为了不使通过的光线有所损失,须在油镜与玻片中间加入

与玻璃折射率($n=1.52$)相仿的镜油(香柏油, $n=1.55$)。因为这种物镜使用时须加镜油,故称为油镜(图1-2)。一般的低倍镜或高倍镜使用时不加油,所以也称干镜。

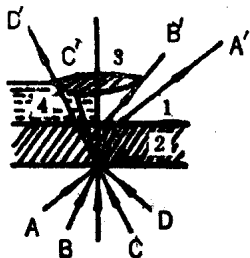


图1-2 油镜加油后折射

1.空气; 2.玻片; 3.
油镜透镜; 4.镜油

使用低倍和高倍镜时,一般作活体的观察,不进行染色。在观察原生动物时,低倍镜主要用来区别原生动物的种类和观察它的活动状态,而高倍镜则以观察微生物的结构特征。油镜在大多

数情况下是用来观察细菌活体及染色涂片。

3) 集光器 集光器在载物台的下面, 用来集合反光镜反射来的光线。集光器可以上下调整, 中央装有光圈, 用以调节光线的强弱。当光线过强时, 应缩小光圈或把集光器向下移动。

4) 反光镜 反光镜装在显微镜的最下方, 有平凹两面可自由选择及转动方向, 以反射光线至集光器。一般在低放大倍数时用平面反光镜, 在高放大倍数时用凹面反光镜。

光学显微镜的光路见图1-3。

光学显微镜的分辨率

显微镜的分辨率指显微镜能够辨别两点之间最小距离的能力。光学显微镜的分辨率受光干涉现象的限制。按物理光学原理: 分辨率(最小可分辨距离)

$$= \frac{\frac{1}{2} \text{光波波长}}{\text{数值孔径}}$$

所谓数值孔径等于光线投射到物镜上的最大角度(镜口角)的一半的正弦乘以玻片与物镜间介质的折射率所得的乘积, 即

$$NA = n \sin \alpha$$

其中 NA ——数值孔径;
 n ——介质折射率;
 α ——最大入射角的一半。

该角度决定于物镜的直径和焦距, 如图1-4。

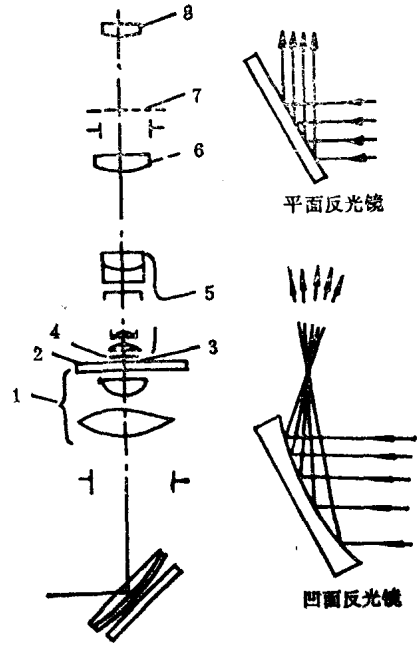


图1-3 光学显微镜光路图

1. 聚光镜; 2. 载玻片; 3. 标本; 4. 盖玻片;
 5. 物镜; 6. 场镜; 7. 像平面; 8. 目镜

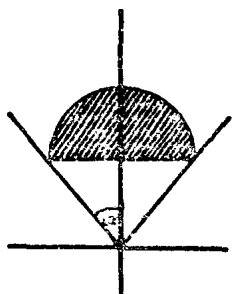


图1-4 物镜的光线入射角

如最大入射角为 120° ，其半角的正弦为 $\sin 60^\circ = 0.87$ ，以空气为介质时 $NA = 1 \times 0.87 = 0.87$ ；以水为介质时，为 $NA = 1.33 \times 0.87 = 1.15$ ；以香柏油介质时， $NA = 1.51 \times 0.87 = 1.31$ 。

肉眼所能感受光波的波长从 200nm （紫光）到 700nm （红光）。设感受光波的平均长度为 550nm （ $0.55\mu\text{m}$ ），

$NA = 1.25$ ，则分辨率 $= \frac{\frac{1}{2} \times 0.55}{1.25} = 0.22\mu\text{m}$ ，而细菌大小从

$0.5 \sim 2\mu\text{m}$ ，故正好看到细菌。用紫光作光源效果更好。

2. 暗视野显微镜

生物显微镜的一般方式是透射照明，照明光直接进入视场，属明视野方式。如果利用斜射光照射物体，使照明光线不直接进入物镜，只有经物体散射或衍射的光才进入物镜，这样可在暗视场中见到明亮的物象，这就是暗视野工作状态。暗视野显微镜和一般明视野显微镜的不同在于聚光镜。图1-5a、b给出两种型式的聚光镜。在一般生物显微镜的聚光镜后面的滤光片位置加一个星形挡板（图1-5c），也可以起暗视场的效果。

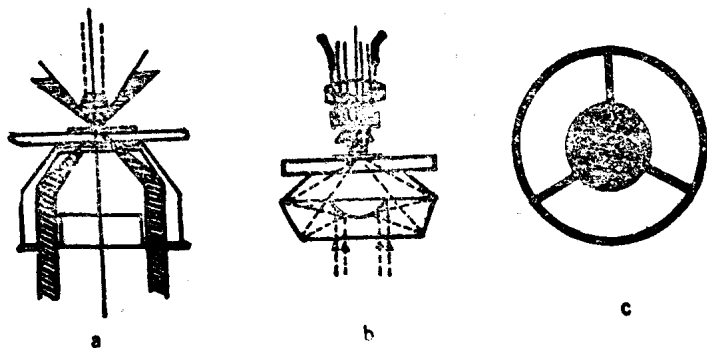


图1-5 暗视野聚光镜和挡板

a. 抛物面型聚光镜；b. 心型聚光镜；c. 星形挡板

暗视野显微镜所形成象的边缘效应比较显著，如果物体反光的话，图象的边缘很亮并带衍射条纹。用暗视野显微镜有时可观察到很薄、透明的细胞外形及内部细微构造，有时则整个中间部分似乎空洞无物，因此在解释图象时要注意。

暗视野显微镜可以区分某些样品的活细胞和死细胞，前者更亮一些，暗视野显微镜还可以检查是否有小微粒存在，即使微粒的尺寸小于显微镜的分辨率，仍然可以见到它们散射的光，例如观察很细的密螺旋体及细菌鞭毛的运动等。

此外，暗视野显微镜由于要用强光光源，它对观察活的物体有一定的影响。

3. 相差显微镜

在第二次世界大战后，光学显微观察技术有很大进步，就是利用相差技术可以观察很薄的活样品而不需要致死的染色术，并可得到很清晰、对比度较强的细胞内部微细构造的象，如细胞核、核仁、线粒体等。为此，F.Zernike 获得1953年诺贝尔奖金。

按显微镜成象原理，显微镜观察的物可分两大类：第一类是带色的或暗的物，它们吸收一部分入射光，因而改变光的强度和颜色；另一类是无色物体，它们通常很薄，当光线通过这类物体时只发生相位的变化，即被物衍射的光的相位与直射光相位有所不同。如果在物的焦面上加一“相板”补偿或扩大这相差，将使物象显得比周围更加明亮或阴暗，于是透明的样品不用染色就显出明暗的对比度了。

相差显微镜的光路如图1-6，它与一般显微镜的不同在于：

- (1) 在光源和聚光镜之间有一环状光栏，光线只能从光栏通过，环状光的大小可由聚光镜调节或通过更换光栏加以改变；
- (2) 在物镜的后焦面上有一相板，其上淀积环形薄膜，可以改变透过光线的相位。有时这层薄膜也使直射光的强度有所衰减；
- (3) 相板上的直射光和散射光合轴成象在望远镜上。在调整相