

水生微生物学 实验法

(下)



海洋出版社

8-33

WEI SHENG WU WEI SHENG XUE SHI YAN FA

内 容 提 要

《海洋微生物学实验法》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。

责任编辑 胡 笕

责任校对 金玉筠

水生微生物学实验法（下）

郑福寿[✉]陈绍铭 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 星城印刷厂印刷

开本：787×1092mm[✉]1/32 印张：10.125字数：180千字

1990年1月第一版[✉] 1990年1月第一次印刷

印数：1—700册

ISBN 7-5027-0086-2/Q·9 ¥：6.00元

目 录

第五章 水环境因子与水生微生物	(1)
一、测定现场主要理化参数的仪器.....	(1)
二、溶解氧 (DO) 的化学测定.....	(6)
三、生化需氧量 (BOD) 的测定.....	(11)
四、水生微生物生长曲线的测定.....	(16)
五、水体的富营养化测定.....	(18)
六、水的酸碱度对微生物生长的影响.....	(19)
七、水活度对微生物生长的影响.....	(20)
八、水生微生物对磷的转化强度的测定.....	(22)
第六章 水生微生物培养特征的鉴别	(29)
一、海洋、淡水、陆生细菌的鉴别.....	(29)
二、海水、淡水平板培养的细菌菌落形态的鉴定.....	(28)
三、放线菌平板培养特征的观察.....	(32)
四、酵母菌平板培养特征的观察.....	(35)
五、霉菌平板培养特征的观察.....	(38)
六、淡水、海水斜面培养基的培养观察.....	(42)
七、马铃薯斜面培养基的培养观察.....	(43)

八、海水葡萄糖酵母膏斜面培养·····	(45)
九、半固体穿刺培养·····	(45)
十、液体培养·····	(47)

第七章 水生微生物常用的生理生化鉴定····· (51)

一、需氧性的测定·····	(51)
二、氧化酶 (细胞色素氧化酶) 的测定·····	(53)
三、过氧化氢酶 (接触酶) 的三种测定法·····	(56)
四、利用碳源的测定·····	(57)
五、利用酚的测定·····	(60)
六、利用无机氮的测定·····	(62)
七、有机氮源利用的试验·····	(63)
八、生长谱法测定氮源的利用·····	(64)
九、硝酸盐还原试验·····	(66)
十、缺氧利用硝酸盐产气的测定·····	(71)
十一、发酵糖醇类的四种试验法·····	(72)
十二、水解淀粉的试验·····	(77)
十三、水解纤维素试验·····	(79)
十四、甲基红试验 (M.R. 试验) ·····	(81)
十五、乙酰甲基甲醇试验 (V.P. 试验) ·····	(83)
十六、明胶水解检验·····	(85)
十七、石蕊牛乳试验·····	(89)
十八、产生吡啶 (靛基质) 试验·····	(90)
十九、产硫化氢的四种试验法·····	(94)
二十、产氨的测定·····	(98)
二十一、水解七叶苷试验·····	(99)

二十二、精氨酸双水解酶的测定·····	(101)
二十三、分解油酯的三种测定法·····	(102)
二十四、尿素分解菌(尿酶)的三种测定法···	(106)
二十五、苯丙氨酸脱氨酶的三种测定法·····	(109)
二十六、色氨酸脱氨酶的三种测定法·····	(112)
二十七、色素产生的测定·····	(115)
二十八、生长温度的测定·····	(117)
二十九、存活温度的试验·····	(120)
三十、耐盐性的试验·····	(121)
三十一、初始生长 pH 值的测定·····	(123)
三十二、形成芽孢的试验·····	(126)
三十三、固氮能力的检查·····	(127)

第八章 水中致病菌的生理生化鉴定····· (130)

一、柠檬酸(枸橼酸)盐生长试验·····	(130)
二、利用有机酸或有机酸盐的试验·····	(132)
三、利用丙二酸盐的试验·····	(135)
四、利用醋酸盐的试验·····	(136)
五、精氨酸、鸟氨酸、赖氨酸的脱羧酶的二种 测定法·····	(137)
六、溶血试验·····	(139)
七、 β -半乳糖苷酶的检验·····	(140)
八、氰化钾试验·····	(141)
九、甘油品红试验·····	(143)
十、霍乱红试验·····	(144)
十一、含盐与不含盐蛋白胨水试验·····	(146)

十二、脓青素的检验·····	(147)
第九章 免疫学和菌体细胞化学组分的鉴定 ·····	(148)
一、免疫学方法——凝集反应、沉淀反应和免疫荧光鉴定法·····	(148)
二、菌体细胞化学组分的测定·····	(158)
第十章 水生微生物细胞主要成分及代谢产物的提取与测定 ·····	(169)
一、蛋白质的提取与测定·····	(169)
二、核酸和含磷化合物的提取与测定·····	(174)
三、脂类的提取与测定·····	(178)
四、糖类的提取与测定·····	(179)
五、氨基氮和氨氮的测定·····	(184)
六、总磷的测定·····	(186)
七、无机磷的测定·····	(188)
八、亚硝酸盐的测定·····	(189)
九、丙酮酸的测定·····	(191)
十、柠檬酸的测定·····	(192)
第十一章 水产品的细菌学检验法 ·····	(194)
一、鱼类、甲壳类和贝类的细菌卫生检验·····	(194)
二、鱼类传染性病原菌的分离与鉴定·····	(202)
三、水产品中几种人类病原菌的分离与鉴定·····	(209)
四、致病性嗜盐菌的检验·····	(219)

第十二章 微生物的分类新技术及分类检索 ···	(228)
一、新技术在微生物分类中的应用·····	(228)
二、微生物主要类群的检索·····	(237)
 第十三章 遗传诱变与杂交方法和菌种保藏 ···	(260)
一、紫外线诱变法·····	(261)
二、化学物质诱变法·····	(264)
三、营养缺陷型菌株的筛选·····	(271)
四、微生物杂交——大肠杆菌杂交·····	(280)
五、低温保藏法·····	(284)
六、液氮保藏法·····	(285)
七、隔绝空气保藏法·····	(290)
八、干燥保藏法·····	(291)
九、冻结真空干燥保藏法·····	(294)
十、不同保藏方法的效果比较及其保护剂的配 制·····	(297)
培养基索引·····	(304)
主要参考文献·····	(312)

第五章 水环境因子与水生微生物

一、测定现场主要理化参数的仪器

水生态系统的特征不仅包括它的生物组成，而且也应包括水域的理化特性。因此，现场理化参数的测定是必不可少的生态调查工作内容。特别对研究微生物在各种复杂的流动水与海洋环境中如何生存，更为重要。

这些测定仪器主要包括了对水混浊度、pH、溶解氧、盐度和温度等的测定。

(一) 仪器设备

1. 白色透明度板；
2. pH 计；
3. 溶解氧测定仪；
4. 盐度计；
5. 颠倒温度计。

(二) 仪器的原理及使用方法

1. 测定水混浊度的白色透明度板

水混浊度的测定不仅对于估计水微生物的光合作用是重要的，而且对于调查营养物和污染物转移的速率和途径也是

必要的。这种测定是通过现场观测水中悬浮物对太阳光的吸收与反射的可见深度来估计的。白色透明度板是一种简单的测定水混浊度的仪器。

(1) 白色透明度板的结构

通常所用的白色透明度板是一块直径30厘米，厚2—3厘米，漆成白色的木质圆盘。盘中系有一根标志着长度的绳索，盘下方接一个4—5公斤的铅锤。绳索的长度应根据水域透明度值来定，对中国海而言，长度约在20—50米。

(2) 测定方法

站在欲观测的船舷(或岸边)背阴处，将白色透明度板缓慢地放进水中，待放到刚刚见不到时停留5—10秒钟，使白色透明度板稳定在完全消失的深度，记取绳索在水面标记的长度，再缓慢上升，当刚看到上升时又出现的白色透明度板时，再核对绳索在水面的长度标记。如此重复2—3次，求得二者之差的平均值，即为该水域透明度。

2. pH计

水的pH值用以指示水的酸碱度。天然水质受酸碱污染后能破坏水域的自然生态，并导致水生资源的减少或毁灭。pH值是表示水中氢离子浓度的负对数值。

$$\text{pH} = -\lg [\text{H}^+] = \lg \frac{1}{[\text{H}^+]}$$

pH计是利用玻璃电极和甘汞电极对被测水体中不同酸度产生的直流电势，并把它输入到一台高输入阻抗毫伏计，从而显示出pH值。

(1) 试剂的配制

①pH标准液甲：称取10.21克在105°C烘干2小时的苯二

甲酸氢钾 ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$)，溶于蒸馏水1000毫升中，此液在20°C时pH值为4.00。

②pH标准液乙：称取3.4克在105°C烘干2小时的磷酸二氢钾和3.55克磷酸氢二钠，溶于蒸馏水中并稀释至1000毫升，此液在20°C时pH值为6.88。

③pH标准液：称取大3.81克硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)，溶于除去 CO_2 的重蒸馏水1000毫升中，此液在20°C时pH值为9.22。

以上三种标准液的pH值随温度而稍有差异，见表5-1。

表5-1 不同温度时pH标准液的准确值

温度(°C)	pH标准液		
	标准液甲	标准液乙	标准液丙
0	4.00	6.98	9.46
5	4.00	6.95	9.40
10	4.00	6.92	9.33
15	4.00	6.90	9.28
20	4.00	6.88	9.22
25	4.01	6.86	9.18
30	4.02	6.85	9.14
35	4.02	6.84	9.10
40	4.04	6.84	9.07

(2) 测定步骤

按照仪器说明书进行操作。玻璃电极在使用前应放入蒸馏水中浸泡24小时。测定时，先用pH标准液校正仪器刻度，然后用洗瓶以蒸馏水缓缓淋洗两电极，再以水样淋洗6—8次（特别在测定缓冲溶液后再测定水样时，更应注意）然后测

定水样。直接从仪器上读出 pH 值。

3. 溶解氧测定仪

测定溶解氧除了用化学滴定法外，还可用溶解氧测定仪测定。

(1) 原理

传感器通过一覆有薄膜的银铅电极，将溶解氧浓度信号转换成电信号，再经晶体管差分放大器放大后，由电表直接指示出溶解氧浓度读数。因为覆膜电极转换信号时与被测水的温度有关，故仪器设有温度补偿调节装置。

(2) 使用方法（本法系为TH-2型溶解氧测定仪操作法）

①打开仪器后背电池盖板，按电池正负极性接好电源。拧去探头前部盛水罩，换上保护罩（随机附件），然后将探头置于被测溶液之中。

②测定水温：将测试选择开关（右起第二个旋钮）顺时针方向拨至“滴度”档，调节“滴度”旋钮（左起第一个），使指针指到满度，再将测试选择开关拨至“测温”档，即可在表头下行指示出温度测定值。

③测定温度补偿器：将温度补偿器旋钮（右上及右下起第一个旋钮配合使用）拨至所测定的温度值。右上方的大旋钮表示个位数，每档相差 1°C ；右下方的第一个旋钮表示十位数，每档相差 10°C 。

④测定溶解氧值：拨好温度补偿器后，将测试选择开关拨至“调零”档，调节“调零”旋钮（左起第三个旋钮），使指针指示零点。然后，再把测试开关拨至“测氧”档，并将探头放在被测水液中左右往复摆动，摆动速度每分钟30—

40次为宜，待1—2分钟后指示针稳定立即读数（测氧读数表示头上行指示，单位为毫克/升）。

⑤测量完毕，关闭电源，即将测试开关逆时针拨至“关”。并将探头置于无氧水中（饱和的亚硫酸钠溶液）。

4. 盐度计

国内生产的WUS型感应式盐度计可用于测量海水或其它含盐水的盐度。这种盐度计可在实验室和船上进行盐度的测定。

（1）原理

此仪器采用电磁感应原理。把振荡器产生的激励信号加在探头的激励线圈上，通过海水等效电阻将信号耦合至接收线圈上，此时得到一个与盐度和温度均有关的信号输出。平衡该信号使表头指零。感应分压器的指示值即为电导比。经查表后得出盐度值。

（2）测量步骤：按仪器说明书步骤进行。

5. 颠倒温度计

（1）原理

颠倒温度计是用来精确测定现场水温和实际深度的仪器。由闭端颠倒温度表与开端颠倒温度表组成。每个温度表有2根温度计。闭端颠倒温度表由主温度计（即颠倒温度计）和辅助温度计一同装在一个抽空的厚壁玻璃套管内，用以测量和还原校正水温。水温是从主温度计上读出的。每根颠倒温度计（主温度计）由水银贮蓄泡通过一根带有分枝盲枝的毛细管与主毛细管相连，毛细管上有一弯成一圈的圆环。当主温度计颠倒过来时，这一装置就使水银柱断在分枝处，从而指示现场水温。由于密闭在厚玻璃管内，因此使现场读数

不受水压的影响（每100米深度的水压可使实际温度增加约 0.01°C ）。开端颠倒温度表与闭端颠倒温度表在构造上基本相同，不同点仅在它的外套管下端是开口的，其上端有一供水流动的小孔。这种温度表是不防水压的，毛细管里水银柱的长度不仅受到温度的影响，而且也受到水压力的影响，因此，它的功用是用来测量水的深度。

（2）测定步骤

- ①将仪器固定在一根水文绳上的颠倒采水器中。
 - ②沉放到预定深度后至少停留7分钟，使温度表感温。
 - ③沿水文绳投下使锤，使采水器颠倒。
 - ④将仪器提出水面，待水温稳定时（一般在10分钟以后）读出主温度计和辅助温度计的度数。并经误差校正得到现场水温。
 - ⑤计算深度：根据开端颠倒温度表与闭端颠倒温度表的参数，计算出实际深度。
- 计算深度公式为：

$$H = K\alpha_m$$

式中 H 表示仪器所在的深度；

$K = \frac{10\Delta t}{\beta}$ 即根据开端和闭端温度表的温度差 Δt 和检定书中的压力系数 β ，由朱波夫“海洋学常用表”表4查出 K 值； α_m 表示自海面至仪器所在水层的平均比容。

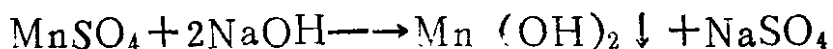
二、溶解氧（DO）的化学测定

溶解于水中的氧称为溶解氧。洁净的水体在正常情况

下，所含的溶解氧接近饱和状态。海水中溶解氧的含量约为淡水的80%左右。水中藻类植物的光合作用能放出氧。如水中有机物浓度高，会促使水生好气异养菌大量活动，消耗大量氧气，致使溶解氧不断减少，甚至接近于零，这时厌氧菌就繁殖并活跃起来，通过微生物的代谢活动将水中的有机物氧化分解为无机物质，产生H₂S或NH₃等气体。H₂S与Fe⁺的作用生成FeS，使水质发臭、变黑。分析水中的溶解氧值不仅是水质污染的重要指标，也是微生物生长活动的一个重要环境因素。溶解氧值除测氧仪外常用化学法测定。

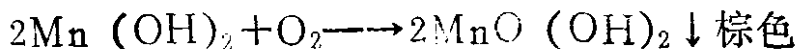
(一) 原理

高锰酸钾在酸性的条件下氧化水中的无机物(NO₂⁻、S²⁻、SO₄²⁻)和有机物，多余的高锰酸钾用草酸钾溶液除去，然后水样加入硫酸锰及碱性碘化钾溶液，使生成氢氧化锰沉淀。

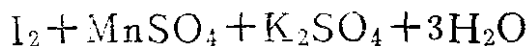
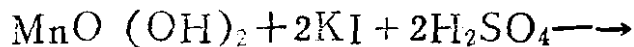


白色

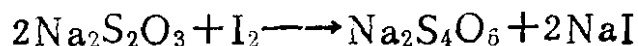
水中如有溶解氧存在，所生成的Mn(OH)₂立即与溶解氧化合，生成棕色亚锰酸MnO(OH)₂沉淀。



使溶液酸化后，MnO(OH)₂氧化I⁻，而放出碘。



析出的游离碘的量，相当于水样中所含的溶解氧含量，再用Na₂S₂O₃滴定后求出氧的含量。



(二) 试剂的配制

(1) 化学纯浓硫酸

比重为1.84。

(2) 4%高锰酸钾溶液

称取4克高锰酸钾溶于100毫升蒸馏水中。

(3) 2%草酸钾溶液

称取2克草酸钾溶于100毫升蒸馏水中

(4) 36%硫酸锰溶液

称取365克硫酸锰，溶于1000毫升蒸馏水中。

(5) 碱性碘化钾

称取500克氢氧化钠，溶于500毫升蒸馏水中，另外溶解150克碘化钾于200毫升蒸馏水中，将两液混合，并以蒸馏水稀释至1000毫升。（如加入叠氮化钠，则称取10克叠氮化钠，以蒸馏水溶解后一起混合稀释至1000毫升）。

(6) 0.5%淀粉溶液

称取2.5克可溶性淀粉，溶于少量蒸馏水，煮沸了3—5分钟，不断搅拌，冷却后稀释至500毫升。

(7) 0.0125 N 硫代硫酸钠

称取化学纯硫代硫酸钠约32克，置于300毫升加有化学纯的无水碳酸钠0.2克的水中，搅动使之溶解，移入1000毫升容量瓶中，用冷沸水稀释至刻度，摇匀，置于密闭棕色瓶内，7—10天后再校准。

①校准：以重铬酸钾标定。以6 N 硫酸、10%碘化钾、0.5%淀粉作指示剂。

②操作：将化学纯的重铬酸钾约2克，放在130°C的烘

箱内烘3小时，精确称取数份，每份重0.2克，分别放在250毫升的定碘瓶中，加水30毫升，摇动并使其溶解，加10%碘化钾20毫升及6 N 硫酸10毫升。摇匀，盖住瓶塞，在暗处放5分钟，加入10毫升水稀释后，以硫代硫酸钠滴至淡黄绿色，然后加0.5%淀粉溶液5毫升，继续滴至蓝色消失而变为三价铬离子的绿色为止（根据碘的挥发性，碘量法的滴定必须在定碘瓶中，在冷的状态下进行）。

③计算：

$$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = \frac{\text{重铬酸钾重量}}{\text{所消耗硫代硫酸钠毫升数} \times \text{重铬酸钾的毫克当量}}$$

取100毫升 0.125N 硫代硫酸钠溶液 稀释 10倍，即成 0.0125N 硫代硫酸钠溶液。

（三）操作步骤

①取被测水样装入溶解氧瓶内，仔细敲赶瓶内气泡，迅速盖好玻璃塞。

②打开瓶塞，将吸管插入液面下，加入0.5毫升浓硫酸（切勿过量）。

③将吸管插入液面下，加入1毫升4%高锰酸钾溶液，盖紧瓶塞，均匀混合，使水样保持淡红色15分钟不褪，以氧化水中的还原物质，如5分钟内红色褪去，应继续以同样方法加4%高锰酸钾均匀混合。

④以同样方法加入1毫升草酸钾溶液，盖紧瓶塞混合均匀，草酸钾的加量要视高锰酸钾褪色情况而定，应使高锰酸钾红色刚好消失，避免草酸钾加过量，因草酸钾能使I₂还原

成I, 影响测定结果。

⑤以同样方法加入1毫升36%硫酸锰及3毫升碱性碘化钾, 盖紧瓶塞, 均匀混合, 待沉淀降至一半时再摇匀, 重复两次。

⑥以同样方法加入1毫升浓硫酸, 盖紧瓶塞, 混合摇匀, 静置5分钟, 至沉淀完全溶解为止。

⑦用100毫升容量瓶, 取上述试液100毫升于250毫升三角烧瓶内, 以0.0125N硫代硫酸钠滴定至淡黄色时, 加入0.5%淀粉液1毫升, 继续滴至蓝色刚消失为止。记录用量。

(四) 计算

$$\text{O}_2\text{毫克/升} = \frac{V \times 8 \times 0.0125 \times 1000}{100}$$

(五) 注意事项

①水样采好后应立即将溶解氧固定。

②加试剂于测氧瓶内时吸管口应插入液面内。

③如测曝气区混合液, 则取样后需加入10%硫酸铜, 每升样品均加10毫升(加量多少与污水浓度成正比), 以抑制微生物活动。

④若水样中有硝酸盐的干扰, 可在碱性碘化钾试液内加入10%叠氮化钠, 以排除干扰。

⑤如果水中不含大量有机物、亚硝酸盐和二价铁盐且有效氯小于3毫升/升时, 操作可从第五步做起。