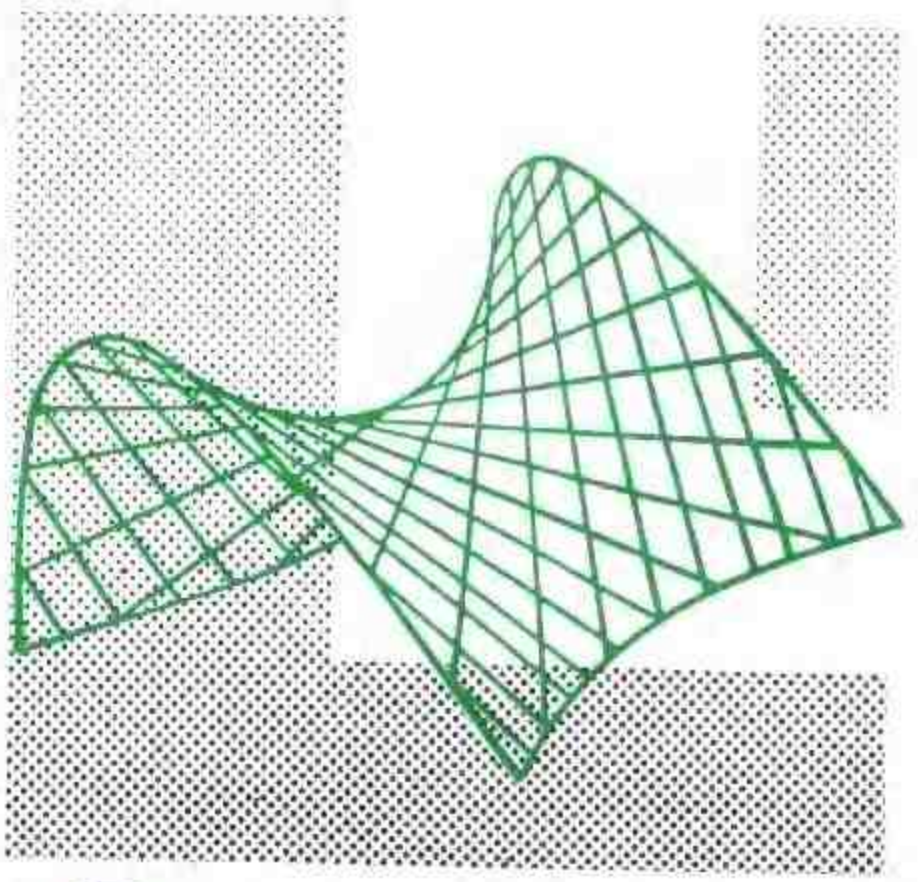
国家级“九五”重点教材　　高等学校教材

水处理微生物学

（第三版）

顾夏声　李献文　竺建荣　编

● 中国建筑工业出版社



国家级“九五”重点教材

高等学校教材

水处理微生物学

（第三版）

顾夏声　李献文　竺建荣　编

中国建筑工业出版社

（京）新登字 035 号

图书在版编目(CIP)数据

水处理微生物学/顾夏声等编. -3 版. -北京：中国建筑工业出版社，1998
国家级“九五”重点教材　高等学校教材
ISBN 7-112-00421-7

Ⅰ. 水… Ⅱ. 顾… Ⅲ. 水处理-微生物学-高等学校-教材 Ⅳ. TU991.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(97)第 20917 号

本书是高等院校给水排水工程专业本科教材，也可供给水排水和环境保护的科技人员参考。主要内容包括：微生物的形态、结构、生理特性、生长与遗传变异，水的卫生细菌学，废水生物处理中的微生物和水体污染的指示生物，微生物的研究方法以及微生物实验等。

本教材已列为国家级“九五”重点教材。

国家级“九五”重点教材
高等学校教材
水处理微生物学
（第三版）
顾夏声　李献文　竺建荣　编
*
中国建筑工业出版社出版（北京西郊百万庄）
新华书店总店科技发行所发行
北京市彩桥印刷厂印刷
*
开本：787×1092 毫米　1/16　印张：12　字数：292 千字
1998 年 6 月第三版　1998 年 6 月第八次印刷
印数：58706—64705 册　　定价：10.00 元
ISBN 7-112-00421-7
X・10（8579）
版权所有　翻印必究
如有印装质量问题，可寄本社退换
（邮政编码 100037）

第 三 版 前 言

本书的第一版由顾夏声和李献文编写。1980年出版以后，许多高等院校给水排水专业和部分环境工程专业广泛选作本科生的教科书，本专业的科技人员也选本书作为参考书。1988年，本书由原编者和俞毓馨修订出第二版。因该书需要量较多，曾多次重印。在使用过程中，有些兄弟院校曾对本书提出了一些宝贵意见。

本书已列为国家级“九·五”重点教材。现根据全国高等学校给水排水工程学科专业指导委员会的要求，进行修订。此次修订由顾夏声、李献文和竺建荣3人完成，俞毓馨则参加了修订前的准备工作并提供了一些有关资料。主审仍由同济大学朱锦福和陈世和两教授担任。

这次修订基本上保留了原有的章节和顺序，但在内容上作了一些增删和修改，主要有：针对细菌在水处理中的重要作用，增加了有关细菌结构和代谢反应方面的内容；根据微生物学的发展，对书中部分概念和解释进行了修改；对废水生物处理中微生物学部分作了重写和补充，等等。李献文主要负责第六章的修改和补充；竺建荣主要负责除第六章外其余各章的修改和补充；顾夏声负责全书的审定和校核。

由于编者水平有限，仍不免有错误、不妥之处，望广大读者批评指正。

编者

1997年3月

第 二 版 前 言

本书的第一版由清华大学顾夏声和北京建筑工程学院李献文编写。1980年4月出版以后，许多高等院校的给水排水专业和部份环境工程专业广泛选用作本科学生的教科书，部分本专业的技术人员也选本书作为参考书，因而需要量较多，曾3次重印。在此期间有些兄弟院校曾提出了一些宝贵意见并鼓励我们进行修订再版。

1986年4月"城乡建设环境保护部给水排水及环境工程类专业教材编审委员会"决定，此书由原编者修订再版，增补清华大学俞毓馨参加修订工作。此次修订于1986年9月开始由顾夏声、李献文、俞毓馨3人共同完成。主审仍由同济大学朱锦福和陈世和两同志担任。

此次修订仍保持了原有的章节及顺序。但作了以下一些修改：(1) 根据1984年所颁布的《中华人民共和国法定计量单位》，做了必要的改动；(2) 更改了部分微生物的名称；(3) 对下列章节做了较多的增补和修改：引言；第二章：第二节、第三节；第三章：第二节；第四章：第一节、第六节；第五章：第三节；第八章：实验一至九等。

由于编者水平及时间所限，仍不免有不妥之处，务望广大读者批评指正。

编者

1987年8月

第一版前言

本书是根据1978年4月高等院校建筑类教材编写会议所制订的《水处理微生物学基础》教材编写大纲编写的，供给水排水工程专业学生使用。在编写过程中得到兄弟院校和有关单位的热情帮助，提出了宝贵的意见，在此表示感谢。

参加编写的有清华大学顾夏声（编写第一、二、三、七、八章及第六章第二、三、四、五、六节与附录）和北京建筑工程学院李献文（编写引言、第四、五章及第六章第一节）。参加审稿的有同济大学、重庆建筑工程学院、哈尔滨建筑工程学院、湖北建筑工业学院、湖南大学、北京工业大学、河北化工学院、北京建筑工程学院、清华大学等院校，同济大学朱锦福、陈世和同志担任主审。

由于我们水平有限，深入实际不够，时间也较仓促，书中定有不少错误之处，请读者批评指正。

编者

1979年5月

目　录

引言 …… 1
第一章　细菌的形态和结构 …… 4
　第一节　细菌的外形和大小 …… 4
　第二节　细菌细胞的结构 …… 4
　第三节　细菌的生长繁殖和命名 …… 11
第二章　细菌的生理特性 …… 13
　第一节　细菌的营养 …… 13
　第二节　酶及其作用 …… 18
　第三节　细菌的呼吸 …… 27
　第四节　其它环境因素对细菌生长的影响 …… 35
第三章　细菌的生长和遗传变异 …… 39
　第一节　细菌的生长及其特性 …… 39
　第二节　细菌的遗传与变异 …… 44
第四章　其它微生物 …… 60
　第一节　放线菌和丝状细菌 …… 60
　第二节　真菌 …… 63
　第三节　藻类 …… 66
　第四节　原生动物 …… 69
　第五节　后生动物 …… 75
　第六节　病毒和噬菌体 …… 77
　第七节　微生物之间的关系 …… 79
第五章　水的卫生细菌学 …… 83
　第一节　水中的细菌及其分布 …… 83
　第二节　水中的病原细菌 …… 83
　第三节　大肠菌群和生活饮用水的细菌标准 …… 85
　第四节　水的卫生细菌学检验 …… 86
　第五节　水中微生物的控制方法 …… 88
　第六节　水中的病毒及其检验 …… 93
第六章　废水生物处理中的微生物及水体污染的指示生物 …… 95
　第一节　废水中的污染物在微生物作用下的降解与转化 …… 95
　第二节　不含氮有机物质的分解 …… 96
　第三节　含氮有机物质的分解 …… 102
　第四节　无机元素的转化 …… 105
　第五节　废水生物处理中的微生物 …… 107
　第六节　水体污染与自净的指示生物及监测方法 …… 129

第七章　微生物的研究方法 …… 136
第一节　微生物的观察 …… 136
第二节　微生物的培养和纯种分离 …… 137
第三节　微生物的保藏与复壮 …… 141
第四节　灭菌 …… 142
第五节　无菌操作 …… 143
第八章　微生物学实验 …… 144
实验一　显微镜的使用及微生物形态的观察 …… 144
实验二　微型动物的计数 …… 147
实验三　细菌、霉菌、酵母菌、放线菌形态的观察 …… 149
实验四　微生物的染色 …… 150
实验五　培养基的制备及灭菌 …… 152
实验六　微生物纯种分离、培养及接种技术 …… 155
实验七　纯培养菌种的菌体、菌落形态观察 …… 158
实验八　微生物的生理生化特性 …… 159
实验九　大肠杆菌生长曲线的测定 …… 170
附录 …… 172
甲、活性污泥混合液耗氧速率的测定 …… 172
乙、鱼类毒性试验 …… 173
丙、废水生物处理过程中常见的微生物 …… 176
主要参考书 …… 183

引　言

一、水处理微生物学的研究对象

微生物都是个体很小的生物，其大小要用 μm（微米）❶ 来量测，因此一般用肉眼都看不见，只有在显微镜下把它们放大后，才能看到。

研究微生物的科学称为微生物学。微生物学研究微生物的形态、分类和生理等特性，研究它们生活的环境条件和它们在自然界物质转化中所起的作用以及控制它们生命活动的方法。由于微生物的种类很多，应用很广泛，因而在医学、农业、环境保护和某些工业生产等领域中，对微生物的研究各有侧重。本书是在研究微生物的一般形态和生理特性的基础上，着重讨论与水处理有关的问题。

二、水中常见微生物的类型及其特点

自然界中各种生物的种类繁多，生物学家以客观存在的生物属性为依据，将生物分门别类。目前多按界、门、纲、目、科、属、种来分类。有时在种以下还要进行更细致的区分。由于目前国内外在分类学方面还不统一，所以本书暂不深究这些分类方法，需要时可查阅专门的书籍。根据一般概念，给水排水工程中常见的微生物如下：

- 水中的微生物
  - 非细胞形态的微生物——病毒（包括噬菌体）
  - 细胞形态的微生物
    - 原核生物
      - 细　　菌
      - 放 线 菌
      - 蓝藻（又称蓝细菌）
    - 真核生物
      - 藻类（除蓝藻外）
      - 真　　菌
        - 酵母菌
        - 霉　　菌
      - 原生动物
        - 肉足类
        - 鞭毛类
        - 纤毛类
      - 后生动物

上述微生物中，大部分是单细胞的，其中藻类在生物学中属于植物学讲授范围，原生动物及后生动物属于无脊椎动物范围。严格地说，其中个体较大者，不属于微生物范围内。

此外，还须注意一种用光学显微镜看不见的生物，例如病毒。一般光学显微镜无法辨

---

❶ 1mm（毫米）$=10^3\mu$m（微米）$=10^6$nm（纳米）

认小于 0.2μm 的物体，而病毒个体一般小于 0.2μm，可称为超显微镜微生物。

微生物除具有个体非常微小这个特点外，还具有下列几个特点：

1. 种类繁多。由于微生物种类繁多，因而对营养物质的要求也不相同。它们可以分别利用自然界中的各种有机物和无机物作为营养，使各种有机物分解成无机物（所谓无机化或矿质化），或使各种无机物合成复杂的碳水化合物、蛋白质等有机物。所以微生物在自然界的物质转化过程中起着重要的作用。

2. 分布广。微生物个体小而轻，可随着灰尘四处飞扬，因而广泛分布于土壤、空气和水体等自然环境中。因土壤中含有丰富的微生物所需要的营养物质，所以土壤中微生物的种类和数量特别多。

3. 繁殖快。大多数微生物在几十分钟内可繁殖一代，即由一个分裂为两个。如果条件适宜，经过 10 小时就可繁殖为数亿个。

4. 容易发生变异。这一特点使微生物较能适应外界环境条件的变化。

微生物的生理特性，以及上面列举的四个特点，是废水生物处理法的依据。废水和微生物群体在处理构筑物中充分接触时，能作为养料的物质（大部分的有机化合物和某些含硫、磷、氮等的无机化合物）即被微生物利用、转化，从而使废水的水质得到改善。当然，在废水排入水体之前，还必须除去其中的微生物，因微生物本身也是一种有机杂质。

在各类微生物中，细菌与水处理的关系最密切，所以本书将着重讨论细菌的形态结构和生理特性以及它们在水处理过程中所起的作用。

三、微生物在给水排水工程中的作用

建国以来，党和政府一向关怀人民的健康，重视环境保护工作。五届人大通过的新宪法第十一条中就规定：国家保护环境和自然资源，防治污染和其它公害。给水排水工作的任务就是要供给人民合乎标准的生活用水、生产用水和消防用水，还需要解决生活污水、工业废水和雨水的排除、处理和利用的问题，也就是要解决水的污染和公害的防治问题。要供应人民合乎卫生标准的生活用水，首先就要知道水中有哪些微生物，哪些微生物是致病的，并在给水净化工作中设法去除这些病原微生物❶，以防止传染病的蔓延。水的物理、化学性质也影响它的使用。当有大量藻类存在于水中时，会使水变浑浊，并产生颜色或发出不良气味，有些藻类大量繁殖时，甚至对牲畜有毒害作用。大量微生物也可能阻塞滤池，影响水厂的正常运行。在工业用水中若含有大量微生物，就有可能使冷却器、凝结器等设备和管道堵塞，而有些微生物还会影响一些工业产品的质量。但是，微生物也有对人类有益的一面，除了人们所熟知的，如利用微生物酿酒、酿醋、发面做馒头、生产各种抗菌素等用途之外，如上所述，还可以利用微生物处理废水（生物处理），把废水中的有机污染杂质转化为无害的矿物质。水体的自净也要依靠微生物的作用。由此可见，微生物在给水排水工程中也起着很重要的作用。给水排水和环境保护的工程技术人员，必须掌握水处理微生物学的基本知识，了解水微生物的形态、生理特性和控制它们的方法，基本掌握微生物在水处理中的作用机理和规律，以便有效地去除水中有害的微生物，或者为有益的微生物创

❶ 能引起人或动植物疾病的微生物，叫做病原微生物。

造适宜的繁殖条件，而提高废水处理的效率。同时还必须掌握水中微生物的检验方法，以确定水和废水的生物学性质；在环境保护工作中还必须根据水微生物的检验结果，判定水体污染和自净的程度，从而保护环境、造福人民。总而言之，《水处理微生物学》是给水排水和环境保护工作者必须掌握的重要技术基础知识。

第一章　细菌的形态和结构

第一节　细菌的外形和大小

细菌是微小的、单细胞的、没有真正细胞核的原核生物。其大小一般只有几个 μm 大。一滴水里，可以含有好几千万个细菌。所以要观察细菌的形状，必须要有一架可以放大一千倍或倍数更高的显微镜。但是由于细菌本身是无色半透明的，即使放在显微镜下看起来还是比较模糊，不容易看清楚。为了要清楚地观察细菌，目前已使用了各种细菌的染色法(染色原理见第七章)，把细菌染成红的、紫的或其它一些颜色。这样，在显微镜下看起来，细菌的轮廓就很清楚。

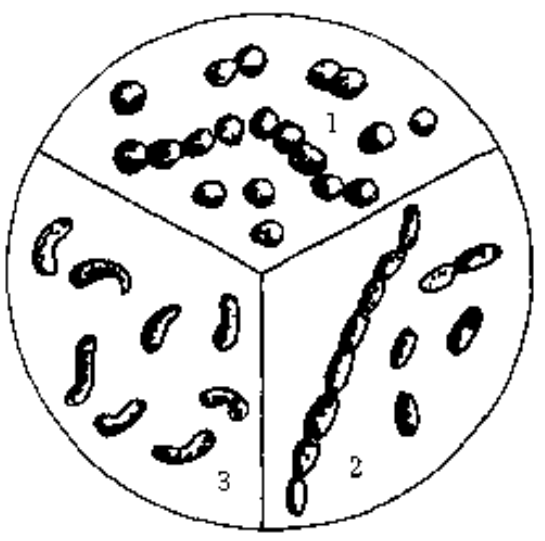


图 1-1　细菌的各种形态
1—球菌；2—杆菌；3—螺旋菌

就菌体的外形来看，细菌可分作三大类型——球菌、杆菌和螺旋菌，见图 1-1。

球菌按其排列的形式，又可分为数种。例如：细菌分裂后各自分散单独存在的，称单球菌；成双存在的，称双球菌；成串状的，称链球菌；四个联在一起的，称四联球菌，八个叠在一起的，称八叠球菌；积聚成葡萄状的，称葡萄球菌。肺炎球菌、脑膜炎球菌、尿小球菌、产甲烷八叠球菌等都是球状细菌。球菌直径一般为 0.5～2μm。

杆菌 一般长 1～5μm，宽 0.5～1μm。大肠杆菌、伤寒杆菌、假单胞菌和布氏产甲烷杆菌都属于这一类细菌。

螺旋菌的宽度常在 0.5～5μm 之间，长度则因种类的不同而有很大差异(约 5～15μm)。只有一个弯曲的螺旋状细菌称为弧菌，如霍乱弧菌，纤维弧菌等。

以上三种形态（球状、杆状和螺旋状）是细菌的基本形态。各种细菌在其初生时期或适宜的生活条件下，呈现它的典型形态。这些形态特征是鉴别菌种的依据之一。

第二节　细菌细胞的结构

细菌虽然微小，但是它们的内部构造却相当复杂。一般说，细菌的构造可分为基本结构和特殊结构两种；特殊构造只为一部分细菌所具有。细菌细胞的典型结构见图 1-2。

一、基本结构

细菌的基本结构包括细胞壁和原生质体两部分。原生质体位于细胞壁内，包括细胞膜(细胞质膜)、细胞质、核质和内含物。

1. 细胞壁　细胞壁是包围在细菌细胞最外面的一层富有弹性的结构，是细胞中很重要的结构单元，也是细菌分类中最重要的依据之一。1884 年丹麦病理学家 Hans Christian

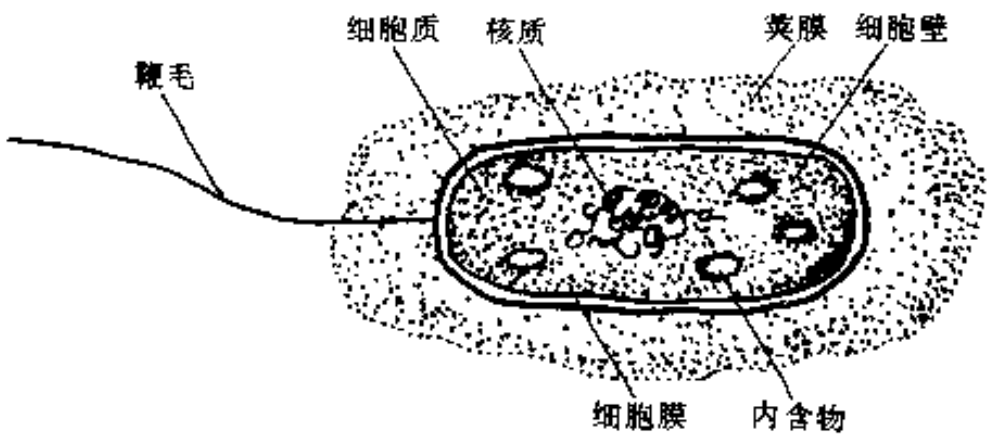


图 1-2　细菌细胞构造的模式图

Gram 提出了一个经验染色法，用于细菌的形态观察和分类。其操作过程是：结晶紫初染，碘液媒染，然后酒精脱色，最后用蕃红或沙黄复染。这就是现在最普遍采用的革兰氏(Gram，简写为 G）染色法。根据染色反应特征，可以把细菌分成两大类：G 阳性（G^+）和 G 阴性（G^-），前者经过染色后细菌细胞仍然保留初染结晶紫的蓝紫色，后者经过染色后细菌细胞则先脱去了初染结晶紫的颜色，而带上了复染蕃红或沙黄的红色。后来的研究发现革兰氏染色的反应结果主要与细菌细胞壁有关。事实上，革兰氏阳性和阴性细菌具有绝然不同的细胞壁结构（图 1-3）。这二类细胞壁的结构特征具体如下：

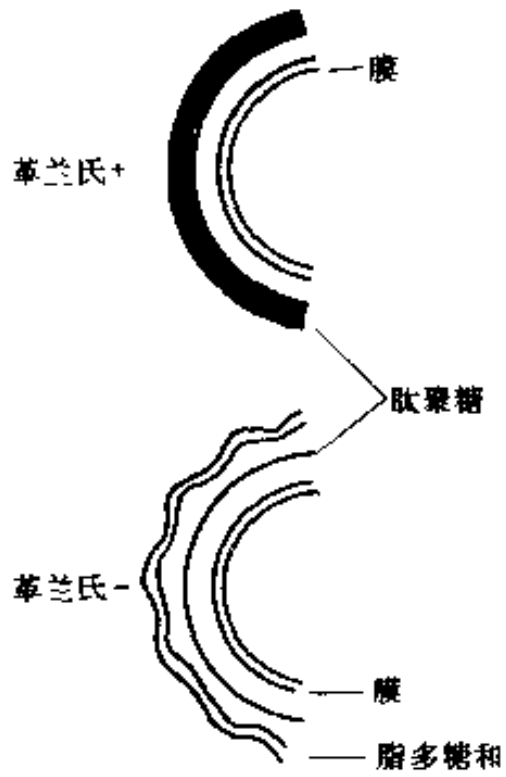


图 1-3　革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌细胞壁的比较

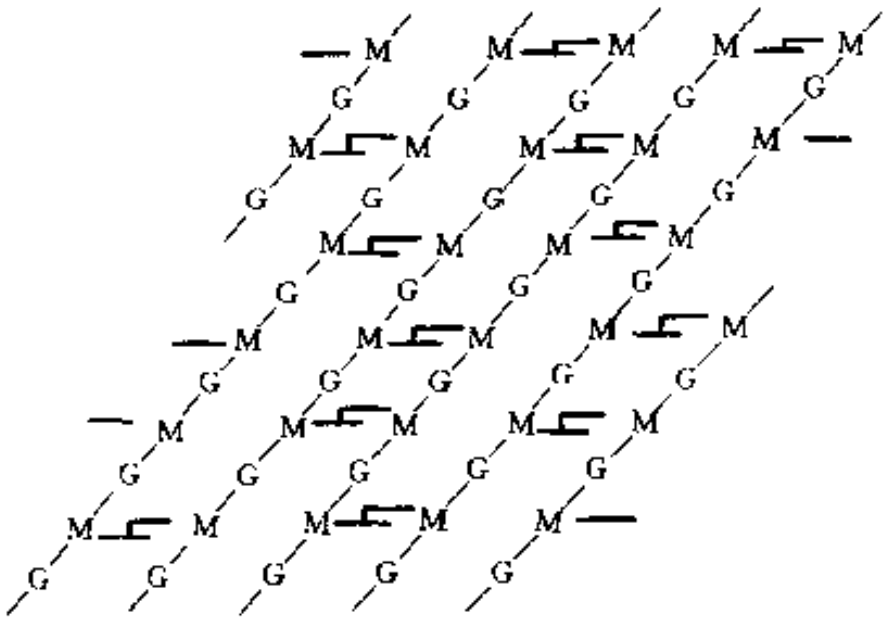


图 1-4　大肠杆菌中肽聚糖单位联结形成肽聚糖片的方式

G：N-乙酰葡萄糖胺；M：N-乙酰胞壁酸；粗线：多肽的交联

概括地说，革兰氏阳性细菌的细胞壁较厚，约为 20～80nm，单层，其组分比较均匀一致，主要由肽聚糖组成，还有一定数量的磷壁酸，脂类组分很少。肽聚糖实质上是 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸这 2 个双糖单位互相连接起来的有机大分子（图 1-4），N-乙酰胞壁酸又连接 4 个氨基酸互连起来的短肽，短肽之间又由 5 个氨基酸组成的肽链相连即所谓的“肽桥”。在短肽中除了生物体普遍具有的 L-型氨基酸外，还含有特征性的 D-型基酸。这样组织起来的网状大分子层层叠加至几十层就构成完整的细菌细胞壁。革兰氏阴性细菌的细胞壁与此不同。它的整个细胞壁可分为两层：细胞壁外层和内层。外层主要是脂多糖和

脂蛋白组分，较厚（8～10nm）。脂类在整个细胞壁中占有的比例很高，可达40%以上。这是与革兰氏阳性细胞明显不同的一个特征。内层的主要结构组分是肽聚糖，但是较薄，只有2～3nm。肽聚糖的结构模式与革兰氏阳性细菌的相同。由于G^+和G^-细菌的细胞壁之间存在着很大差异，因而染色过程中的反应也不同。

经过研究，现在革兰氏染色的机理一般解释为：通过初染和媒染后，在细菌细胞的细胞壁及膜上结合了不溶于水的结晶紫与碘的大分子复合物。革兰氏阳性细菌胞壁较厚、肽聚糖含量较高和分子交联度较紧密，故在酒精脱色时，肽聚糖网孔会因脱水而发生明显收缩，再加上它不含脂类，酒精处理也不能在胞壁上溶出大的空洞或缝隙，因此，结晶紫与碘复合物仍阻留在细胞壁上，使其呈现出蓝紫色。与此相反，革兰氏阴性细菌的细胞壁较薄、肽聚糖位于内层且含量低和交联松散，与酒精反应后其肽聚糖不易收缩，加上它的脂类含量高且位于外层，所以酒精作用时细胞壁上就会出现较大的空洞或缝隙，这样，结晶紫和碘的复合物就很易被溶出细胞壁，脱去了原来初染的颜色。当蕃红或沙黄复染时，细胞就会带上复染染料的红色。

上面介绍的是普通细菌的情况。不管是G^-和G^+细菌，其细胞壁中均含有或多或少的肽聚糖及D-型氨基酸，这是它们的最大特征，这类细菌又叫真细菌。绝大部分细菌都属于真细菌。除了这一共同特征外，G^-和G^+细菌细胞壁的其它异同详见表1-1。另外还有极少部分细菌，如厌氧生物处理的产甲烷细菌，嗜盐细菌等，它们的细胞壁中没有肽聚糖结构，也没有D-型氨基酸，这类细菌称“古细菌”（当然，除了细胞壁的差异外，古细菌和真细菌之间还有其它许多不同）。在古细菌细胞壁中，含有不同于N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸的结构单元，但它们组成类似肽聚糖的结构，因此称为“假胞壁质”。

革兰氏阳性细菌与革兰氏阴性细菌细胞壁结构与组成的比较　　表1-1

性质		革兰氏阳性细菌	革兰氏阴性细菌	
			内壁层	外壁层
结构	厚度（nm）	20～80	2～3	8
	层次	单层	多层	
	肽聚糖结构	多层，75%亚单位交联，网格紧密坚固	单层，30%亚单位交联，网格较疏松	
	与细胞膜的关系	不紧密	紧密	
组成	肽聚糖	占细胞壁干重的40%～90%	5%～10%	无
	磷壁(酸)质	有或无	无	无
	多糖	有	无	无
	蛋白质	有或无	无	有
	脂多糖	1%～4%	无	11%～22%
	脂蛋白	无	有或无	有
对青霉素反应		敏感	不够敏感	

细胞壁在细胞生命活动中的作用主要有：保持细胞具有一定的外观形状；作为鞭毛的支点，实现鞭毛的运动；与细菌的抗原特性、致病性等有关。

2. 细胞膜　细胞膜是一层紧贴着细胞壁而包围着细胞质的薄膜（厚约7～8nm），其化学组成主要是脂类、蛋白质和糖类。这种膜具有选择性吸收的半渗透性，膜上具有与物质

渗透、吸收、转运和代谢等有关的许多蛋白质或酶类。细菌细胞膜中蛋白质是主要成分，约占细胞膜的 70%，比任何一种生物膜都高。这些蛋白质组成与普通蛋白质没有区别。根据在膜上的分布情况，蛋白质可分为两大类：一类是外周蛋白，或称可溶性蛋白质，占膜蛋白含量的 20%～30%，主要分布在膜内外两侧表面。另一类是固有蛋白质，占膜蛋白含量的 70%～80%，它们插入或贯穿于磷脂双分子层中。脂类占细胞膜的 20%～30%，细菌细胞的脂类几乎全部分布在细胞膜中，主要是极性类脂——甘油磷脂，由甘油、脂肪酸、磷酸和含氮碱组成。磷脂都是两性分子，即有一个亲水的头部和疏水的尾部，在水溶液中很容易形成具有高度定向性的双分子层，这样就形成了膜的基本结构。整体细胞膜的结构，目前大家比较公认的是“镶嵌模型”（图 1-5），其要点是：（1）磷脂双分子层组成膜的基本骨架。（2）磷脂分子在细胞膜中以多种方式不断运动，因而膜具有流动性。（3）膜蛋白以不同方式分布于膜的两侧或磷脂层中。

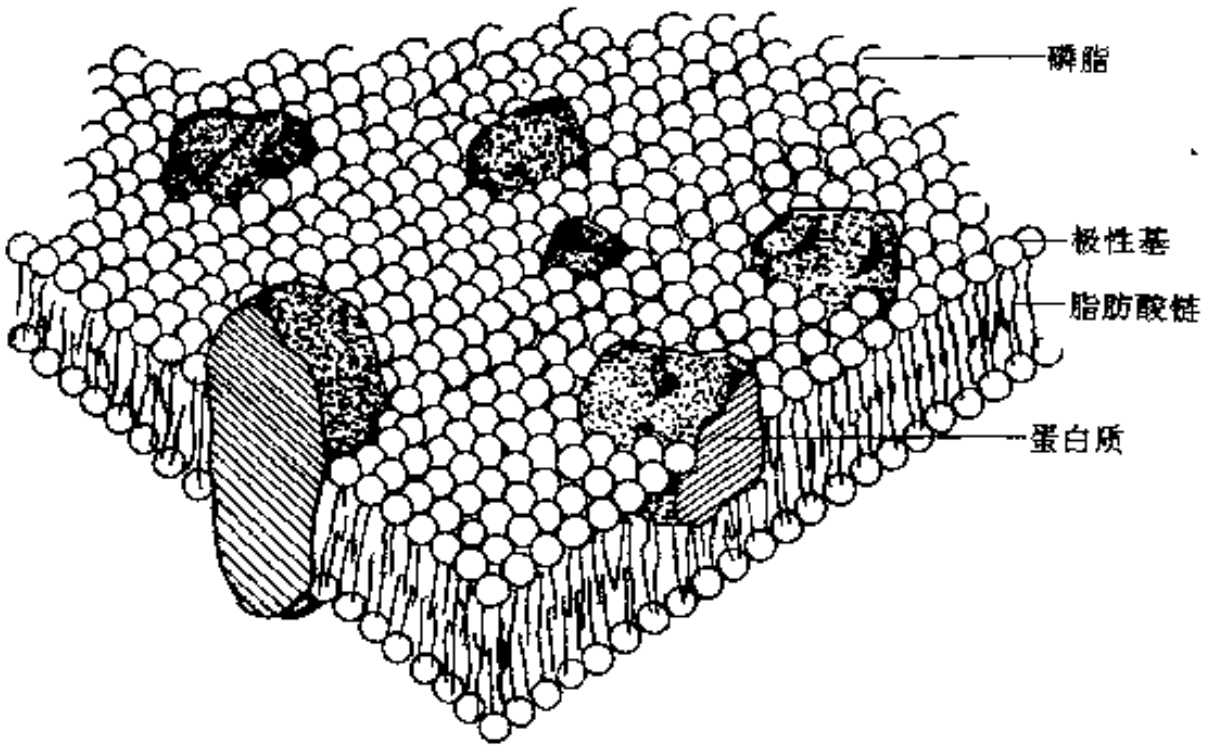


图 1-5　细胞膜的镶嵌结构模型

细胞膜的主要功能为：（1）控制细胞内外物质（营养物质和代谢废物）的运送和交换。（2）维持细胞内正常渗透压。（3）合成细胞壁组分和荚膜的场所。（4）进行氧化磷酸化或光合磷酸化的产能基地。（5）许多代谢酶和运输酶以及电子呼吸链组分的所在地。（6）鞭毛的着生和生长点。

3. 细胞质　细胞质是一种无色透明而粘稠的胶体，其主要成分是水、蛋白质、核酸和脂类等。细胞质内具有各种酶系统，能不断地进行新陈代谢活动（见第二章）。由于富含核糖核酸（RNA），所以是嗜碱性的，即与碱性染料结合能力较强。幼令菌的细胞质非常稠密、均匀、很容易染色。成熟细胞的细胞质内含有不少颗粒状的贮藏物质，又由于细菌的生命活动产生了许多空泡，染色能力较差，因此着色不均匀。根据染色特点，我们可以通过观察染色均匀与否来判断细菌是处子幼龄还是衰老阶段。

4. 核质　一般的细菌仅具有分散而不固定形态的核质。核或核质内几乎集中有全部与遗传变异有密切关系的某些核酸（如脱氧核糖核酸 DNA），所以常称核是决定生物遗传性的主要部分。细菌的核非常简单，没有核膜包围，也没有核仁，它只是一团裸露的且高度折叠缠绕的 DNA 分子，故称细菌是原核生物。这样的核又称拟核体（nucleoid）。细菌的 DNA

因为含有磷酸基，使之带有负电荷。在细菌细胞中，这些负电荷被Mg^{2+}以及有机碱如精胺、亚精胺和腐胺等中和。而真核微生物的DNA，其负电荷则被碱性蛋白质如组蛋白、鱼蛋白等中和。这是原核生物和真核生物的又一区别。通过物理法测定表明，各种原核生物的DNA分子量都很接近，绝大多数都在1— 3×10^4道尔顿（质量单位，1道尔顿为氧原子质量的1/16），蓝细菌（又称蓝藻，见第四章第三节）略高。

5. 内含物　内含物是细菌新陈代谢的产物，或是贮备的营养物质。内含物的种类和量随细菌种类和培养条件的不同而不同。往往在某些物质过剩时，细菌就将其转化成贮藏物质，当营养缺乏时，它们又被分解利用。常见的内含物颗粒主要有以下几种：

（1）异染颗粒　其化学组分是多聚偏磷酸盐，是磷源和能源的贮藏物。当用蓝色染料（如甲苯胺蓝和甲烯蓝）染色后不呈蓝色而呈紫红色，故称异染颗粒。生物除磷中的不动杆菌在好氧条件下，利用有机物分解产生的大量能量，可“过度摄取”周围溶液中的磷酸盐并转化为多聚偏磷酸盐，以异染颗粒的方式贮存于细胞内。

（2）聚β-羟基丁酸盐（PHB）它是细菌所特有的一种碳源和能源贮藏物。实质上是有机物在厌氧代谢过程中形成的代谢产物。如上面提到的不动杆菌，在厌氧条件下可将细胞内贮存的异染颗粒分解释放出能量促进细菌的生长和代谢，使大量有机物分解并转化为PHB颗粒贮存于细胞内。

（3）肝糖和淀粉粒　两者都是碳源和能源的贮藏物。肝糖颗粒较小，如用稀碘液染色呈红褐色，可在光学显微下观察到。有些细菌如大肠杆菌只贮存肝糖原，有些光合细菌则二者都有。

（4）硫粒　它是元素硫的贮藏物，许多硫磺细菌都能在细胞内积累硫粒，如活性污泥中常见的贝氏硫细菌和发硫细菌都能在细胞内贮存硫粒。

二、特殊结构

细菌的特殊结构有荚膜、芽孢和鞭毛三种。

1. 荚膜　在细胞壁外常围绕着一层粘液，厚薄不一。比较薄时称为粘液层，相当厚时，便称为荚膜。细菌的荚膜有保护作用，是一种多糖类物质。当营养缺乏时，细菌可以利用荚膜多糖作为它的碳源和能源物质。荚膜一般厚于200nm，其硬度和弹性远远小于细胞壁。肺炎球菌、炭疽杆菌等都能生成荚膜。

有的细菌，如硫磺细菌、铁细菌和球衣细菌的丝状体周围的粘液层会逐渐硬质化，而形成所谓鞘。

当荚膜物质相融合成一团块，内含许多细菌时，称为菌胶团。并不是所有的细菌都能形成菌胶团，凡是能够形成菌胶团的细菌，则称为菌胶团细菌。不同细菌形成不同形状的菌胶团，有分枝状的、垂丝状的、球形的、椭圆形的、蘑菇形的，片状的以及各种不规则形状的（图1-6）。菌胶团细菌包藏在胶体物质内，一方面对动物的吞噬起保护作用，同时也增强了它对

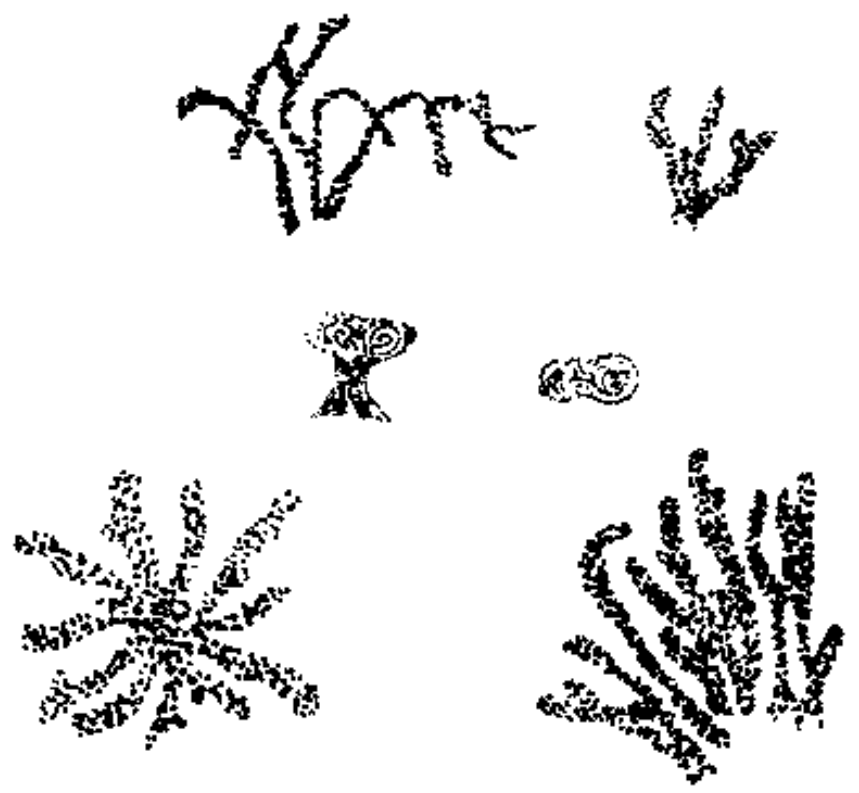


图1-6　几种不同形态的菌胶团

不良环境的抵抗能力。菌胶团是活性污泥(如废水生物处理构筑物曝气池所形成的污泥)中细菌的主要存在形式，有较强的吸附和氧化有机物的能力，在废水生物处理中具有较为重要的作用。一般说，处理生活污水的活性污泥，其性能的好坏，主要可根据所含菌胶团多少、大小及结构的紧密程度来定。新生菌胶团（即新形成的菌胶团）颜色较浅，甚至无色透明，但有旺盛的生命力，氧化分解有机物的能力强。老化了的菌胶团，由于吸附了许多杂质，颜色较深，看不到细菌单体，而象一团烂泥似的，生命力较差。一定种的细菌在适宜环境条件下形成一定形态结构的菌胶团，而当遇到不适宜的环境时，菌胶团就发生松散，甚至呈现单个游离细菌，影响处理效果。因此，为了使废水处理达到较好的效果，要求菌胶团结构紧密，吸附、沉降性能良好。这就必须满足菌胶团细菌对营养及环境的要求。

2. 芽孢　在部分杆菌（如炭疽杆菌、枯草杆菌）和极少数球菌（如尿八联球菌）的菌体内能形成圆形或椭圆形的结构，称为芽孢；其位置可能在菌体的中央，也可能在菌体的一端。芽孢不是繁殖体。芽孢是怎样形成的？一般认为芽孢是某些细菌菌体发育过程中的一个阶段，在一定的环境条件下由于细胞质和核质的浓缩凝集所形成的一种特殊结构。一旦遇到适宜条件可发芽成新的营养体。因此，芽孢是抵抗恶劣环境的一个休眠体。不管芽孢是怎样形成的，但都有这样的特点：其壁厚；水分少，一般在40%左右；不易透水；含有特殊的抗热性物质——2，6-吡啶二羧酸和耐热性酶（图1-7）。芽孢所具有的特殊结构加上代谢活力也较弱，所以能够抵抗极不适宜的环境。

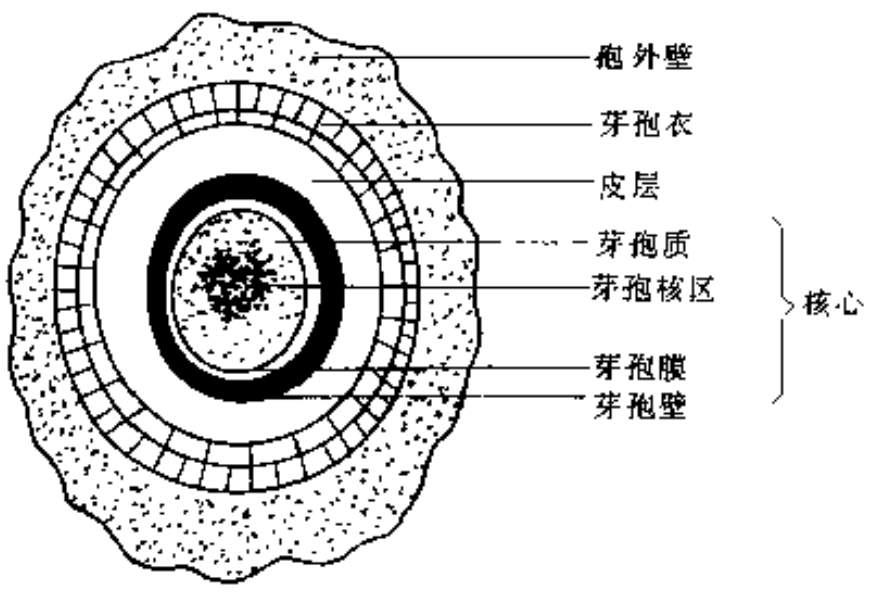


图 1-7　细菌芽孢构造的模式图

一般说，普通细菌在70～80℃时煮10min就死亡，而芽孢在120～140℃时还能生存几小时，又如在5%石炭酸（苯酚）溶液中普通细菌很快死亡，而芽孢能忍耐15d之久。芽孢的休眠力是十分惊人的，一般的芽孢在普通的条件下可保存几年至几十年的活力。芽孢的这一特性对于水和废水所带来的影响，尤其是饮用水的卫生检验过程应予充分注意。在废水生物处理过程中，特别是处理有毒废水时都有芽孢杆菌生长。细菌芽孢和营养细胞的比较详见表1-2。

由于不是所有的细菌都能形成芽孢，芽孢的位置、大小也因菌种不同而不同，所以芽孢是鉴别菌种的形态特征之一（图1-8）。在杆菌中凡能形成芽孢的叫芽孢杆菌，不能形成芽孢的杆菌就称杆菌。能形成芽孢的细菌一般是革兰氏染色阳性的细菌。细菌的芽孢本身着色能力很弱，必须采用特殊的芽孢染色法才能在光学显微镜下观察到。

3. 鞭毛　鞭毛是由细胞质而来的，起源于细胞质的最外层即细胞膜，穿过细胞壁伸出细菌体外。其在菌体上的位置和数目随菌种而有不同，有的在细菌的一端只有一根，如霍乱弧菌，有的细菌的两端各有一根，有的成束，有的则布满菌体周围，如伤寒杆菌、大肠杆菌（图1-9）。鞭毛也不是一切细菌所共有，一般的球菌都无鞭毛。大部分杆菌和所有的螺旋菌则具有鞭毛。具有鞭毛的细菌能真正运动，无鞭毛的细菌在液体中只能呈分子运动。

细菌芽孢和营养细胞的比较　　表 1-2

性　　质	营 养 细 胞	芽　　孢
结　　构	基本结构、特殊结构 （典型革兰氏阴性细菌）	核心、内膜、初生细胞壁 皮层、外膜、外壳层、外孢囊
显微镜观察外形	无折光性	有折光性
化学成分		
钙	低	高
2,6-吡啶二羧酸	无	有
聚-β-羟基丁酸	有	无
多糖	高	低
蛋白质	较低	较高
伴孢晶体		
蛋白质（某些种别）	无	有
含硫氨基酸	低	高
酶促活性	高	低
代谢（氧摄取）	高	低或缺
大分子合成	有	无
mRNA	有	低或无
抗辐射性	低	高
抗热性	低	高
抗化学药物和酸类	低	高
对染料可染性	普通方法可染	只有特殊方法可染
溶菌酶作用	敏感	抗性

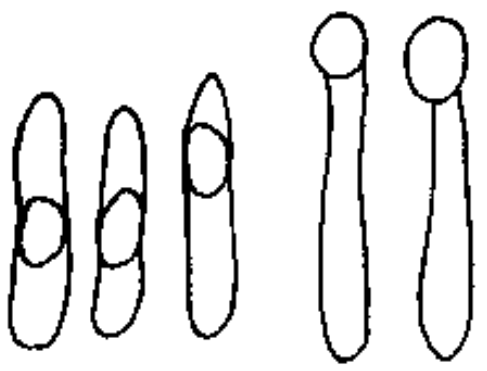


图 1-8　芽孢形状及位置

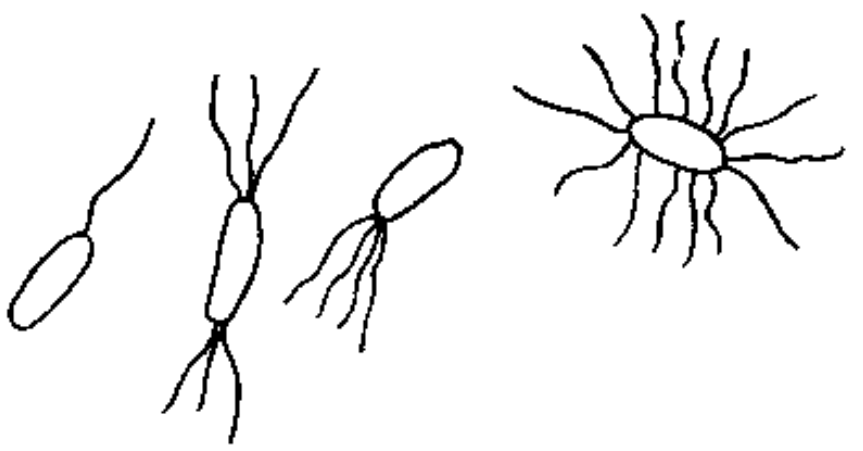


图 1-9　鞭毛

鞭毛的主要成分是蛋白质，有的还含有极少量的多糖和类脂等，如枯草杆菌的鞭毛纯制品中，蛋白质占 99%，碳水化合物在 0.2%以下，类脂少于 0.1%。完整的一根鞭毛从形态上可分三部分：鞭毛丝、鞭毛钩和基体（图 1-10）。鞭毛丝是由鞭毛蛋白组成的伸展在细胞外面的细丝状结构，是进行运动的主体。鞭毛钩是鞭毛丝基部弯曲的筒状部分。基体是指鞭毛与细胞壁、细胞膜相结合的结构体

鞭毛是细菌的运动器官。鞭毛运动引起菌体运动。细菌的运动是惊人的。它们的运动速度每秒可达到自身长度的 10 倍或数十倍，这比世界上最优秀的短跑冠军要快得多。细菌的运动使它能进行趋避运动，以求生存或生长更好。趋避运动分为化学趋避运动和光趋避运动二种。但是，细菌是如何控制它的鞭毛而对刺激性因素起反应的，目前还是个谜。

鞭毛很细很细，一般为 10～20nm。通常采用电子显微镜才能观察到。藉助特殊的鞭毛染色法即使染料沉积在鞭毛上面而人为地加粗以后可以在普通光学显微镜下观察到。

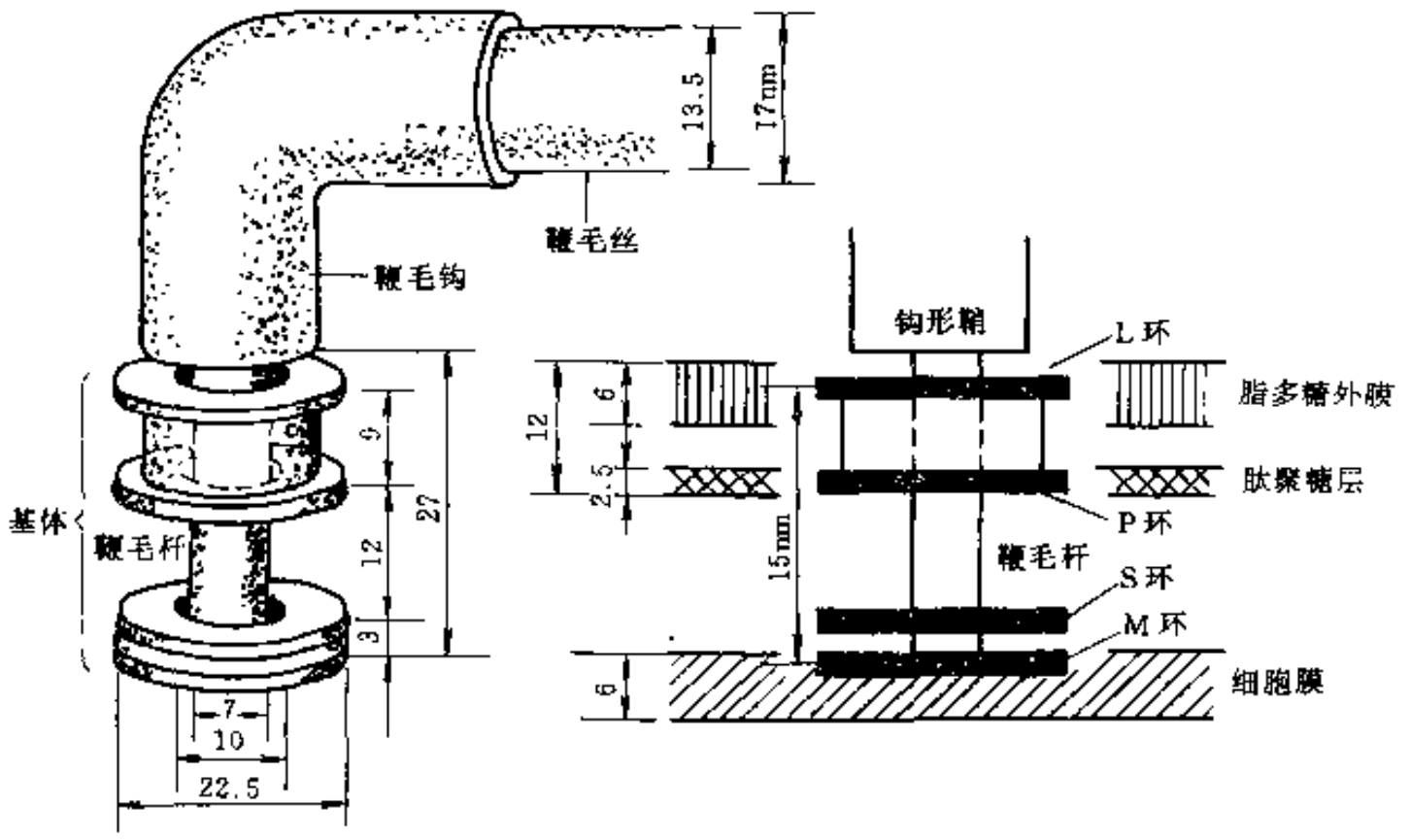


图 1-10　革兰氏阴性细菌鞭毛的细致构造

另外，在许多细菌中还存在着一些比鞭毛更细、较短而直硬的丝状体结构叫“缏毛”。它们的数目很多。缏毛不是细菌的运动器官。有的缏毛在遗传物质传递过程中起作用，这叫性缏毛。某些不具鞭毛的细菌具有缏毛，有些细菌则二者都有。

第三节　细菌的生长繁殖和命名

一、细菌的生长繁殖和菌落特征

细菌虽然很小，但是照样是一个活的生命有机体，因此和其它生命有机体一样具有生长和繁殖的能力。生长是繁殖的基础，繁殖是生长的结果。细菌的繁殖较简单，一般都是二分裂法，即细菌直接分裂，一分为二。细菌没有有性生殖。由于细菌很小，单个细菌的生长和繁殖不能用肉眼直接观察到，所以通常采用群体生长的结果即菌落的特征来描述。把细菌接种到固体培养基中，经过迅速生长繁殖而形成很多很多菌体聚集在一起的并且肉眼可见的细菌集合体，称之为“菌落”。菌落的外观特性与培养条件有关，也与细菌自身的遗传生长特性有关。一定培养条件下它们表现出一定的特征，并且可以作为细菌的分类依据之一。细菌菌落的特征主要从大小、形状，光泽，颜色，硬度，透明程度，边缘形状等几方面进行考察。典型的细菌菌落一般是 1～3mm，圆形或椭圆形，湿润、较光滑、较透明、较粘稠、易挑取、质地均匀及正反面颜色一致等（图 1-11）。

细菌生长的最重要因素是温度和 pH。根据最适生长温度的不同，细菌可分成低温、中温和高温细菌等三大类。一般来说，细菌在 pH 中性（6～8）的条件下生长最好。

二、细菌的命名

为了研究的方便，细菌都必须给予一个名称或名字。细菌的命名（也包括其它所有微生物的命名），与动物和植物的命名一样，都是采用林奈（Linnaeus）双命名法。即一种细菌的名称由二个拉丁文单词组成，第一个是属名，用拉丁文名词表示，词首字母大写，它描述细菌的主要特征；第二个是种名，用拉丁文形容词表示，词首字母不大写，它描述细

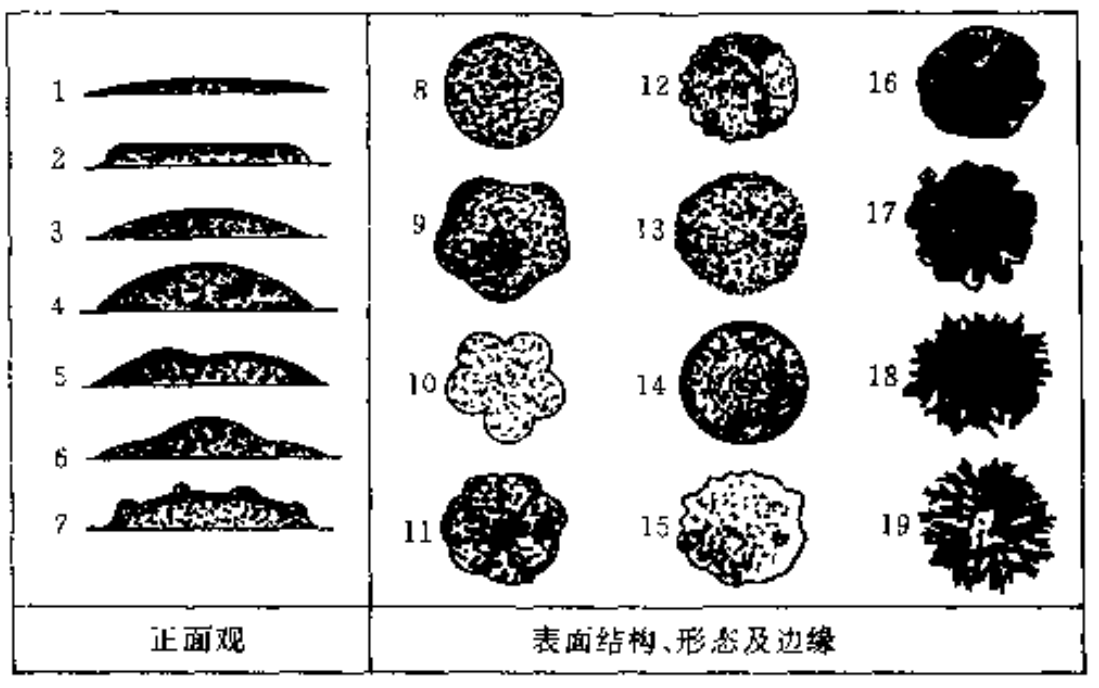


图 1-11　细菌菌落特征

正面观：1　扁平；2- 降起；3－低凸起；4 -高凸起；5- 脐状：6一草帽状；7 -乳头状

表面结构、形态及边缘：8 -圆形、边缘完整；9一不规则、边缘波浪；10　不规则、颗粒状、边缘叶状；11— 规则、放射状、边缘呈叶状；12—规则、边缘呈扇边状；13- 规则、边缘呈齿状；14 -规则、有同心环、边缘完整；15—不规则、似毛毯状；16—规则、似菌丝状；17—不规则、卷发状、边缘波状；18—不规则、呈丝状；19--不规则、根状

菌的次要特征。有时候在前面所述的二个单词之后还会有一个单词，这个单词往往是说明细菌的命名人。如果细菌只鉴定到属，对具体的种的地位还不能肯定，则可以用 sp.（单数）或 spp.（复数）来表示。举例如下：

Escherichia coli　大肠杆菌

Bacillus subtilus　枯草芽孢杆菌

Bacillus sp.　（一种）芽孢杆菌

Staphylococcus aureus　金黄色葡萄球菌

Saccharomyces cerevisiae Hansen　汉逊氏啤酒酵母

复 习 思 考 题

1. 细菌的大小一般是用什么单位来量测的？
2. 以形状来分，细菌可分为哪几类？
3. 简单说明细菌的一般构造。细菌有哪些特殊构造？
4. 什么叫菌胶团？菌胶团在废水生物处理中有何特殊意义？
5. 试述细菌芽孢的特征，为什么具有芽孢的细菌能够抵抗不良的环境？

第二章　细菌的生理特性

细菌的生理特性，主要从三方面来分析：（1）营养；（2）呼吸；（3）其它环境因素对它们生活的影响。

第一节　细 菌 的 营 养

细菌的营养是指吸取生长所需的各种物质并进行代谢生长的过程。营养是代谢的基础，代谢是生命活动的表现。细菌所需的营养物质与细菌细胞的化学组成、营养类型和代谢遗传特性等有关。

一、细菌细胞的化学组分及生理功能

1. 化学组成　细菌细胞中最重要的组分是水，约占细胞总重量的80%，一般为70%～90%，其它10%～20%为干物质。干物质中有机物占90%左右，其主要化学元素是C、H、O、N、P、S；另外约10%为无机盐分（或称灰分）。其化学组成示意图如下（图2-1）。

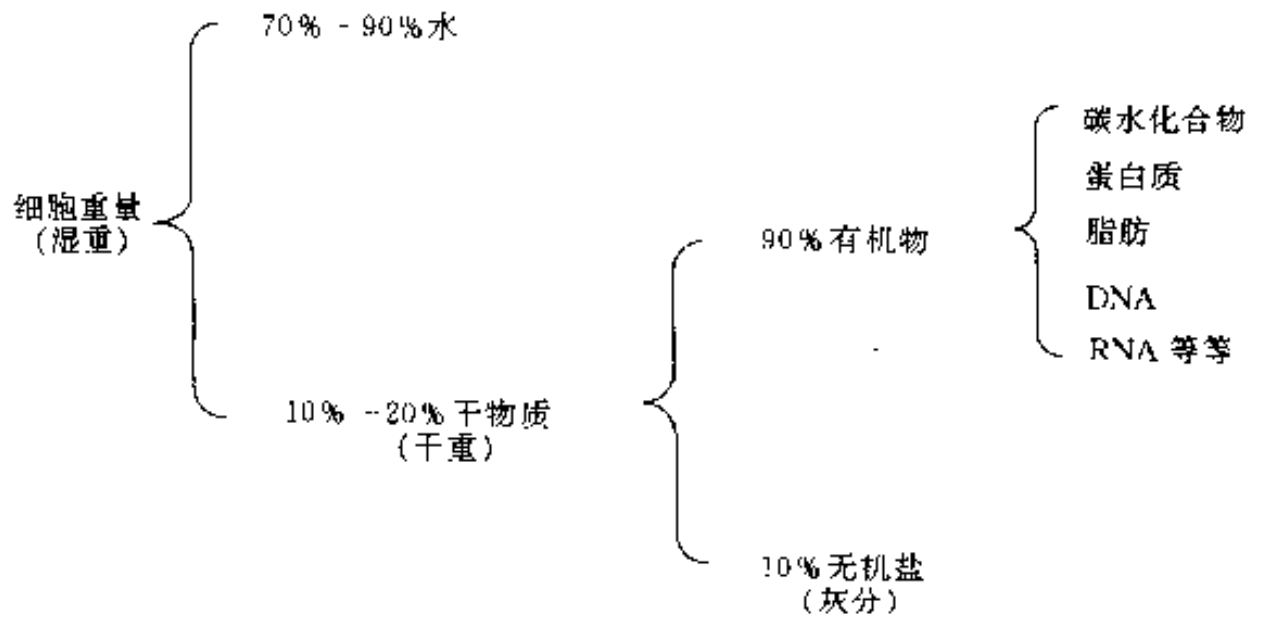


图 2-1　细菌细胞的化学组成

有关细菌细胞的化学组分还应注意以下几个特点：不同的细菌细胞化学组分不同；同一种细菌在不同的生长阶段，其化学组分也有差异。

2. 各化学组分的生理功能

（1）水分

水分是最重要的组分之一，也是不可缺少的化学组分。水在细菌细胞内的存在有两种状态：自由水和结合水。它们的生理作用主要有以下几点：

1）溶剂作用。所有物质都必须先溶解于水，然后才能参与各种生化反应。

2）参与生化反应（如脱水、加水反应）。

3）运输物质的载体

4）维持和调节一定的温度

（2）无机盐

无机盐主要指细胞内存在的一些金属离子盐类。根据含有量的多少可以分成微量金属元素和（大量）金属元素，前者如 Zn、Ni、Co、Mo、Mn 等，后者如 P、S、K、Mg、Na、Fe 等。无机盐类在细胞中的主要作用是：

1）构成细胞的组成成分，如 H_3PO_4 是 DNA 和 RNA 的重要组成成分。

2）酶的组成成分，如蛋白质和氨基酸的 -SH。

3）酶的激活剂，如 Mg^{2-}、K^-。

4）维持适宜的渗透压，如 Na^-、K^-、Cl^-。

5）自养型细菌的能源，如 S，Fe^{2-}。

（3）碳源

凡是提供细胞组分或代谢产物中碳素来源的各种营养物质称之为碳源。它分有机碳源和无机碳源两种，前者包括各种糖类，蛋白质，脂肪，有机酸等等，后者主要指 CO_2（CO_3^{2-} 或 HCO_3^-）。碳源的作用是提供细胞骨架和代谢物质中碳素的来源以及生命活动所需要的能量。碳源的不同是划分细菌营养类型的依据，详见后述。

（4）氮源

凡是提供细胞组分中氮素来源的各种物质称为氮源。氮源也可分为两类：有机氮源（如蛋白质，蛋白胨，氨基酸等）和无机氮源（如 NH_4Cl，NH_4NO_3 等）。氮源的作用是提供细胞新陈代谢中所需的氮素合成材料。极端情况下（如饥饿状态），氮源也可为细胞提供生命活动所需的能量。这是氮源与碳源的很大不同。

前已所述，细胞干物质中有机物的六大元素是 C、H、O、N、P、S。除了 C、H、O、N4 种外，剩下的还有 P 和 S。与碳源和氮源类似，凡是提供磷素或硫素的各种化合物分别称为磷源和硫源。磷源比较单一，主要是无机磷酸盐或偏磷酸盐。硫源则比较广泛，从还原性的 S^{2-} 化合物、元素硫一直到最高氧化态的 SO_4^{2-} 化合物，都可以作为硫源。磷源和硫源的作用是分别提供细胞中核酸和蛋白质的合成原料。

（5）生长因子

某些细菌在含有上述介绍的碳源、氮源、磷源、硫源和无机盐类等组分的一般培养基中培养时，生长极差或不能进行生长。但当加入某种细胞或组织的提取液时生长较好。也就是说这些提取液中含有生长所必需的某种物质。因此，我们把某些细菌在生长过程中不能自身合成的，同时又是生长所必需的须由外界供给的营养物质，叫做“生长因子”。根据化学组分的不同，生长因子可分为 3 类：氨基酸类、嘌呤、嘧啶类、维生素类。

上面介绍了细菌的一般细胞组分和营养要求。在实际应用中还应注意以下几方面问题：

第一，不同的细菌，营养要求不同。

第二，不同的生长条件，同一细菌的营养要求也会不同。

第三、总体来说，细菌的代谢能力很强，可利用的化合物种类很广。

以上所讲的水分、碳素养料、氮素养料、无机盐类和维生素等都是细菌等微生物所需要的，但不同的微生物对每一种营养元素需要的数量不是相同的，并且要求各种营养元素之间有一定的比例关系，主要是指碳氮的比例关系，通常称碳氮比。有人做过试验：根瘤

菌要求碳氮比为 11.5∶1，固氮菌要求碳氮比为 27.6∶1，土壤中许多微生物在一起生活，综合要求的碳氮比约为 25∶1。废水生物处理中，微生物群体对营养物质也有一定的比例要求，详见第六章第五节。

应该指出，细菌往往先利用现成的容易被吸收、利用的有机物质，如果这种现成的有机物质的量已满足它的要求，它就不利用其它的物质了。在工业废水生物处理中，常加生活污水以补充工业废水中某些营养物质的不足。但如工业废水中的各种成分已基本满足细菌的营养要求，则反而会把细菌养“娇”，因在一般情况下生活污水中的有机物比工业废水中的容易被细菌吸收利用，因而影响工业废水的净化程度。

二、细菌的营养类型

细菌种类繁多，各种细菌要求的营养物质不尽相同，自然界中的所有物质几乎都可以被这种或那种细菌所利用，甚至对一般机体有毒害的某些物质，如硫化氢、酚等，也是某些细菌的必需营养物。因此，细菌的营养类型是多种多样的。但就某一种细菌来说，它们对其必需的营养物有特定的要求。

由于细菌种类不同，它们所需要的营养料也不一样。根据碳源的不同，细菌可分成自养型和异养型两大类。有的细菌营养要求简单，能在完全含无机物的环境中生长繁殖，这类细菌叫做自养菌（也称无机营养型细菌）。它们以二氧化碳或碳酸盐为碳素养料的来源（碳源），铵盐或硝酸盐作为氮素养料的来源（氮源），来合成菌体成分。它们生命活动所需的能量则来自无机物或来自阳光。有的细菌需要有机物质方能生长，这类细菌称为异养菌（或有机营养型细菌）。它们主要以有机碳化物，如碳水化合物、有机酸等，作为碳素养料的来源，并利用这类物质分解过程中所产生的能量作为进行生命活动所必需的能源。细菌的氮素养料则是无机的或有机的氮化物。在自然界中，绝大部分细菌都是异养菌。其它各种微生物，根据它们对于营养要求的不同，也可分属于自养和异养这两大类。

根据生活所需能量来源的不同，细菌又分为光能营养和化能营养两类。结合碳源的不同，则一共有光能自养、化能自养、化能异养和光能异养四种营养类型。

1. 光能自养　属于这一类的细菌都含有光合色素，能进行光合作用。例如：绿色细菌（Chlorodium）含有菌绿素（近似有色植物的叶绿素）能利用光能，从二氧化碳合成细胞所需的有机物质。但这种细菌进行光合作用时，除了需要光能以外，还要有硫化氢存在，它们在硫化氢中获得氢，而高等植物则是在水的光解中获得氢以还原二氧化碳。

绿色细菌：

$$CO_2+2H_2S \xrightarrow[\text{菌绿素}]{\text{光能}} [CH_2O]+H_2O+S_2 \qquad (2\text{-}1)$$

高等绿色植物：

$$CO_2+H_2O \xrightarrow[\text{叶绿素}]{\text{光能}} [CH_2O]+O_2 \qquad (2\text{-}2)$$

式中 $[CH_2O]$ 表示最初合成的有机碳化物。

2. 化能自养　有些细菌，如硝化细菌、铁细菌、某些硫磺细菌等，能氧化一定的无机化合物，利用其所产生的化学能，还原二氧化碳，合成有机碳化物，这一作用称为化学合成作用。例如：硝化细菌中的亚硝酸细菌可推进下列反应：

$$2NH_3+2O_2 \longrightarrow 2HNO_2+4H+619.6\ kJ^{①} \quad (2\text{-}3)$$

$$CO_2+4H \rightarrow [CH_2O]+H_2O \quad (2\text{-}4)$$

化能营养细菌的专性强，一种细菌只能氧化某一种无机物质，如上述的亚硝酸细菌就只能氧化铵盐。自然界中化能营养细菌的分布较光能营养细菌普遍，对于自然界中氮、硫、铁等物质的转化具有重大的作用。

3. 化能异养　大部分细菌都以这种营养类型生活和生长，利用有机物作为生长所需的碳源和能源。在异养细菌中，有很多从死的有机残体中获得养料而生活，仅少数生活在活的生物体中，前者称为腐生细菌，后者称为寄生细菌。腐生细菌在自然界的物质转化中起着决定性作用，而很多寄生细菌则是人和动植物的病原细菌。

4. 光能异养　属于这一营养类型的细菌很少，如红螺菌中的一些细菌以这种方式生长。这种营养类型很特殊，它不能以 CO_2 作为主要碳源或唯一碳源，但又利用有机物（如异丙醇）作为供氢体，利用光能将 CO_2 还原成细胞物质。一般来说，光能异养型细菌生长时大多需要生长因子。

上面介绍的是细菌的四种基本营养类型。一种细菌通常以一种营养类型的方式生长。但有些细菌随着生长条件的改变，其营养类型也会由一种向另外一种改变。细菌的营养和营养类型的划分是研究细菌生长的一个重要方面。在应用细菌进行水和废水处理的过程中，应充分注意细菌的营养类型和营养需求，通过控制运行条件，尽可能地提供和满足细菌所需的各种营养物质，最大限度地培养细菌种类和数量，以期实现最佳的工艺处理效能。

三、培养基

1. 培养基的概念和配制原则　培养基是指人工配制的适合不同细菌生长繁殖或积累代谢产物的营养基质。配制培养基过程中，应遵循以下几个原则：

（1）根据不同细菌的营养需要配制不同的培养基。通常，培养细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基，放线菌采用高氏一号培养基，霉菌采用察氏培养基，酵母菌采用麦芽汁培养基。其配方可参见实验指导书的有关内容。

（2）注意各种营养物质的浓度及配比，如水处理中要注意进水中 BOD_5 ∶ N ∶ P 的比值，好氧生物处理中对 BOD_5 ∶ N ∶ P 要求一般为 100 ∶ 5 ∶ 1。

（3）调节适宜的 pH 值。

（4）考虑加生长因子。

（5）培养基应物美价廉。

2. 培养基的分类　培养基种类很多，组分和形态各异、应用很广。一般根据不同的考察角度可以作如下的具体分类：

（1）物理状态

依据物理状态的不同，培养基可分为固体、半固体和液体培养基三大类。

外观呈固体状的培养基叫固体培养基，一般是在液体培养基中加入 2%左右的琼脂作

① 1kcal（千卡）＝4.1868kJ（千焦耳）

为凝固剂。由天然固体状基质直接制成的培养基，如马铃薯片、大米、米糠、木屑、纤维等也属于这一类。固体培养基主要用于普通的细菌学研究，酿造或食用菌培养等。液体培养基指呈液体状态的培养基。这类培养基在细菌学研究及发酵工业中用途广泛。水处理中被处理的对象——废水也可看作是一种广义的液体培养基。介于固体和液体之间的是半固体培养基，它是液体培养基中加入0.5%～1.0%的琼脂作凝固剂。其用途主要是用作细菌运动特性的观察。

(2) 培养基组分

根据化学组分的不同，培养基可以分成以下3类：天然培养基，合成培养基和半合成培养基。天然培养基是指利用动物、植物或细菌体或其提取液制成的培养基，其最大特点是培养基的确切化学组分不知道。这种培养基的优点是取材方便，营养丰富，种类多样，配制容易。缺点是组分不清楚，故配制的不同批次的培养基容易造成成分不稳定，对试验结果带来不利影响。合成培养基正好与此相反。它的特点是成分精确，重复性好，利于保持培养基组分的一致。其缺点是价格较贵，配制繁杂。往往多用于细菌的营养、代谢、生理生化、遗传育种等等方面的研究。既含有天然组分又含有纯化学试剂的培养基叫做半合成培养基。如培养真菌的马铃薯加蔗糖培养基。半合成培养基的特性及价格介于天然培养基和合成培养基两者之间。

(3) 培养基用途

根据培养基用途的不同，培养基可分成以下3类：选择性培养基，鉴别培养基和加富培养基。选择性培养基是按照某种或某些细菌的特殊营养要求而专门设计的培养基。其特点是可使分离样品中的细菌得到选择性的生长和分离，同时可使待分离的目的细菌由劣势菌变为优势菌，从而提高细菌的分离效果。例如欲分离降解纤维素的细菌可以设计只投加纤维素作为基质的选择性培养基培养，这样只有分解纤维素的细菌才能生长，藉此就很容易分离得到分解纤维素的细菌。鉴别培养基是根据对化学和物理因素的反应特性而设计的可藉助肉眼直接判断细菌的培养基。水处理中常用的伊红美蓝培养基（Eosin Methylene Blue，EMB培养基）就是典型的鉴别培养基。加富培养基是根据细菌的营养要求人为地强化投加多种营养物质，从而可大量促进细菌生长的培养基。这种培养基往往用于细菌等细菌分离前的富集。

3. 培养基的配制方法　培养基的配制方法及过程大致如下：适量水分——→加入各营养组分、无机盐——→加入凝固剂——→调节pH值——→加入生长因子或指示剂等——→高压蒸汽灭菌——→冷却放置备用。一般最好现配现用。

四、营养物质的吸收和运输

由于细胞膜及其半渗透性的存在，各种营养物质并不能自由地透过和进出细菌细胞，它们必需通过特殊的吸收和运输途径才能进入到细胞内部参与生化代谢反应，因此，营养物质的吸收和运输是很重要的一个环节。概括地说，营养物质的吸收和运输主要有下述四种途径。

1. 被动扩散　扩散是最简单的方式，也是细菌吸收水分及一些小分子有机物的运输方式。它的特点是物质的转运顺着浓度差进行，运输过程不需消耗能量，物质的分子结构不发生变化。水、气体和甘油等依靠这种方式进行吸收。但这种方式不是主要的吸收途径。

2. 促进扩散、促进扩散的特点基本与被动扩散相似，但是它须藉助细胞膜上的一种蛋

白质载体进行，因此对转运的物质有选择性，即立体专一性。除了细胞内外的浓度差外，影响物质转运的另一重要因素是与载体亲合力的大小。这种方式存在于真核微生物，如厌氧酵母菌对某些物质的吸收和代谢产物的分泌。

3. 主动运输　主动运输是细菌吸收营养物质的最主要方式。它的最大特点是吸收运输过程中需要消耗能量，因此可以逆浓度差进行。其余特点与促进扩散相似，也就是说需要载体蛋白的参与，通过载体蛋白的构象及亲合力的改变完成物质的吸收运输过程。细菌的绝大部分营养物质都是通过这种方式进行吸收而进入细胞内部。

4. 基团转位　基团转位与主动运输非常相似，但有一个不同，即基团转位过程中被吸收的营养物质与载体蛋白之间发生化学反应，因此物质结构有所改变。通常是营养物质与高能磷酸键结合，从而处于“活化”状态，进入细胞以后有利于物质的代谢反应。高能磷酸则来自其它的蛋白质或含有高能键的代谢物，如磷酸烯醇式丙酮酸等（图 2-2）。

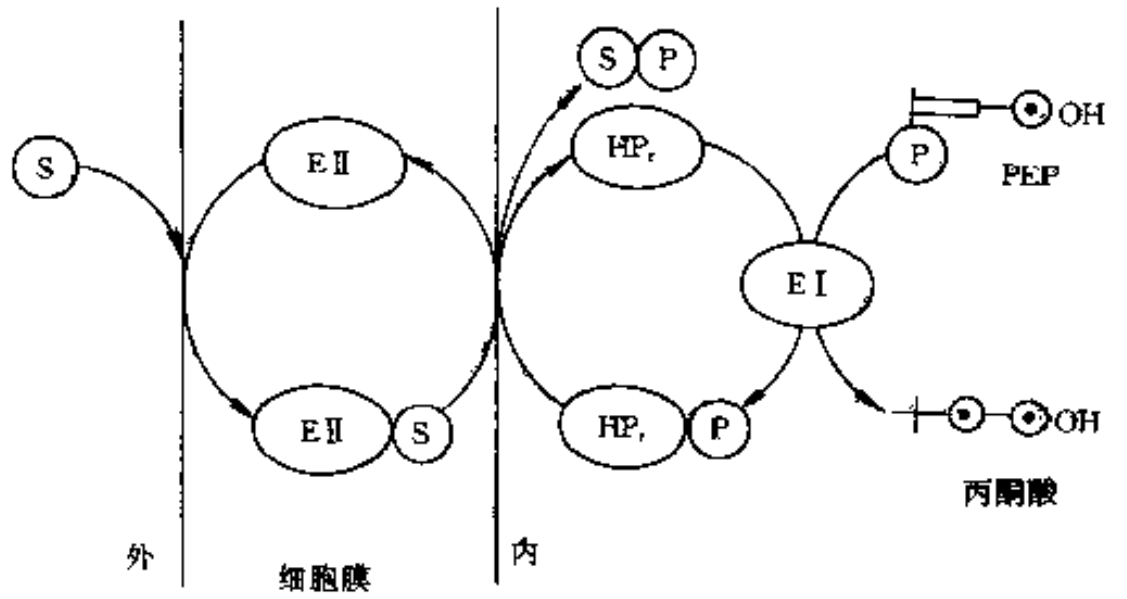


图 2-2　*E. coli* 糖的基团转移模示图

S：糖，P：磷酸，EI：酶 I，EII：酶 II，HPr：热稳定蛋白，PEP：磷酸烯醇式丙酮酸

第二节　酶及其作用

一、酶及其命名和分类

酶是生物细胞中自己制成的一种催化剂（生物催化剂），其基本成分是蛋白质，催化效率比一般的无机催化剂高得多，一般高达千、万倍，乃至千万倍。

酶具有高度的专一性，一种酶只能催化一种反应或一类相似的反应。酶不仅能推动分解作用，而且也可以推动相应的合成作用，也就是说，酶的作用是可逆的。但在实际情况下，作用常趋向一个方向。热力学条件是影响反应方向的重要因素。

酶的名称，可根据它的作用性质或它的作用物（即基质）而命名。例如，促进水解作用的各种酶统称水解酶，促进氧化还原作用的各种酶统称氧化还原酶，水解蛋白质的酶称为蛋白酶，水解脂肪的酶称为脂肪酶等。这是习惯命名法。这种命名法比较直观和简单，但缺乏系统性，有时会出现一酶数名和一名数酶的情况。

为了适应酶学研究的发展，避免命名的重复，国际酶学委员会于 1961 年提出了一个系统命名法和系统分类法。系统命名法的原则是：每一种酶有一个系统名称。系统名称应明确标明酶的底物和催化反应的性质。若有两个底物，则应将两个底物同时列出，中间用冒

号“：”将它们隔开。如果底物之一是水时，可将水略去不写。举例来说，习惯名称为谷丙转氨酶，则系统名称是丙氨酸：α-酮戊二酸氨基转移酶。在科学文献中，为严格起见，一般使用酶的系统名称。但系统名称往往太长，也不利于记忆。为了方便起见，有时仍用酶的习惯名称。

系统分类法是对酶进行分类编号的规定。每个酶都有一个特定的编号。系统分类编号的原则是每一种酶都用四个数字来表示，数字间用圆点号“·”隔开。第一个数字指明该酶属于哪一大类，第二个数字指出属于大类中的哪一个亚类，第三个数字说明该酶属于哪一个亚-亚类，第四个数字表示亚-亚类中的序号。每个数字都用阿拉伯数字编序1，2，3……等来表示。大类是根据酶促反应的性质来分，一共分成六大类。亚类和亚亚类则分别根据底物中被作用的基团和键的特点来分类。下面重点介绍根据酶促反应性质来区分的六大类酶类。

1. 水解酶　这类酶能促进基质的水解作用及其逆行反应。

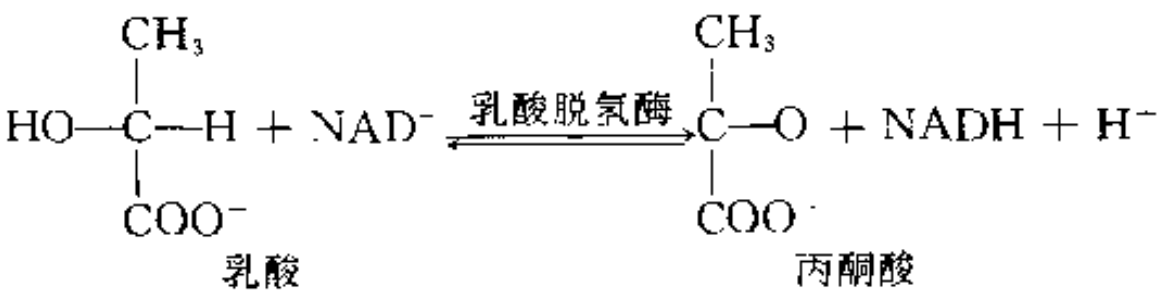
$$A|B+H|OH \rightleftharpoons AOH+BH \tag{2-5}$$

2. 氧化还原酶　这类酶能引起基质的脱氢或受氢作用，产生氧化还原反应。

（1）脱氢酶　脱氢酶能活化基质上的氢并转移到另一物质，使基质因脱氢而氧化。不同的基质将由不同的脱氢酶进行脱氢作用。

$$\underset{\text{基质}}{A-H_2}+B \underset{\text{还原酶}}{\overset{\text{脱氢酶}}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{氧化了的基质}}{A}+B-H_2 \tag{2-6}$$

如：



（2）氧化酶　氧化酶能活化分子氧（空气中的氧）作为电子受体而形成水，或使过氧化氢中的氧转移到另一物质而使前者还原，后者氧化。

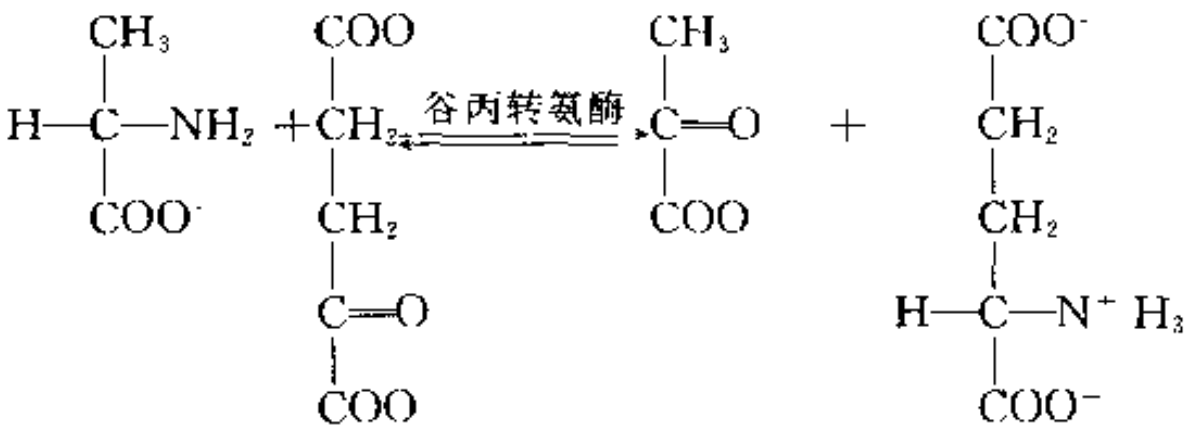
$$A-H_2+\frac{1}{2}O_2 \longrightarrow A+H_2O \tag{2-7}$$

$$A-H_2+H_2O_2 \longrightarrow A+2H_2O \tag{2-8}$$

3. 转移酶　这类酶能催化一种化合物分子上的基团转移到另一种化合物分子上。

$$A+B-x \rightleftharpoons A-x+B \tag{2-9}$$

如：

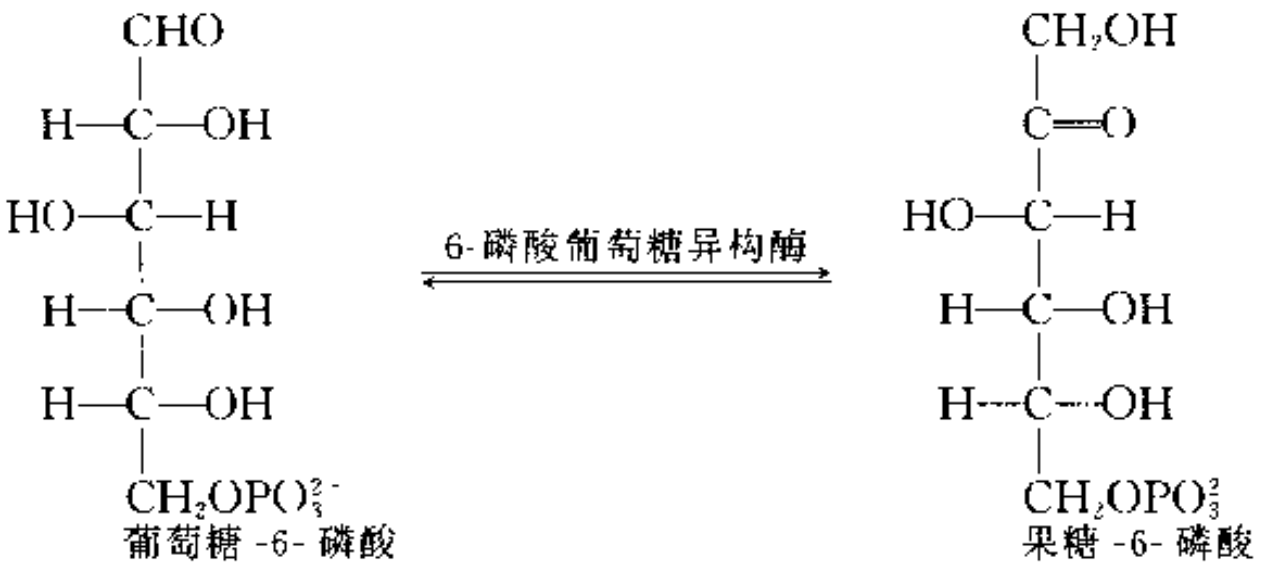


丙氨酸　　α-酮戊二酸　　丙酮酸　　谷氨酸

4. 同分异构酶　这类酶能推动化合物分子内的变化，形成同分异构体。

$$A \cdots \blacktriangleright A' \tag{2-10}$$

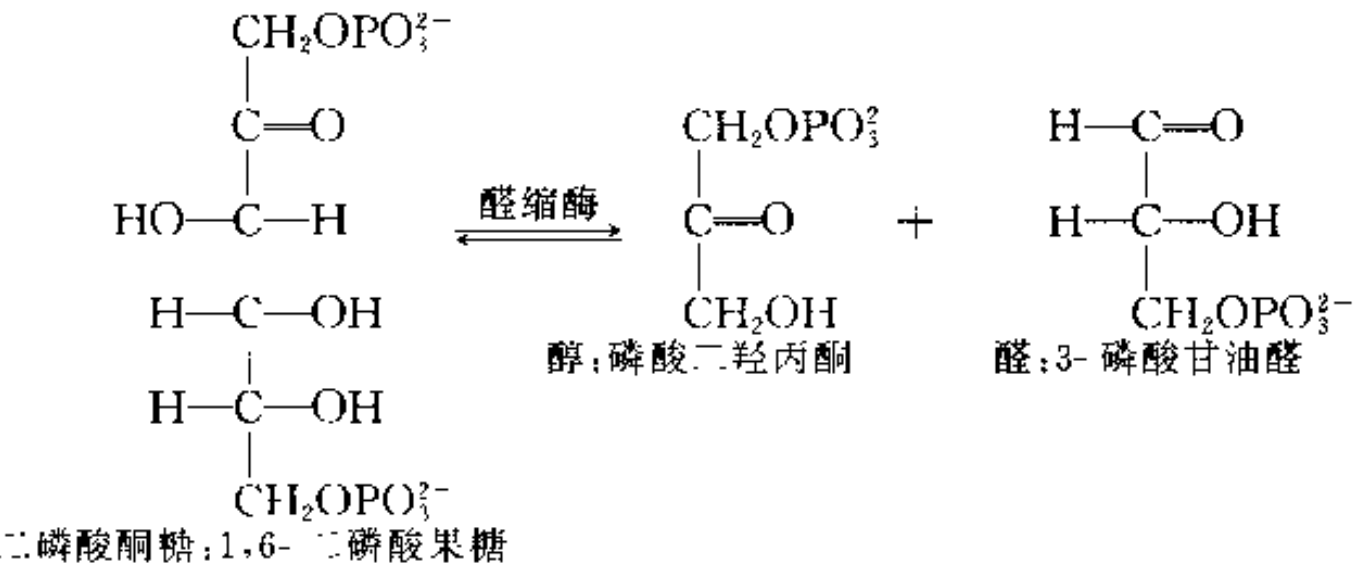
如：



5. 裂解酶　这类酶能催化有机物碳链的断裂，产生碳链较短的产物。

$$A \longrightarrow B + C \tag{2-11}$$

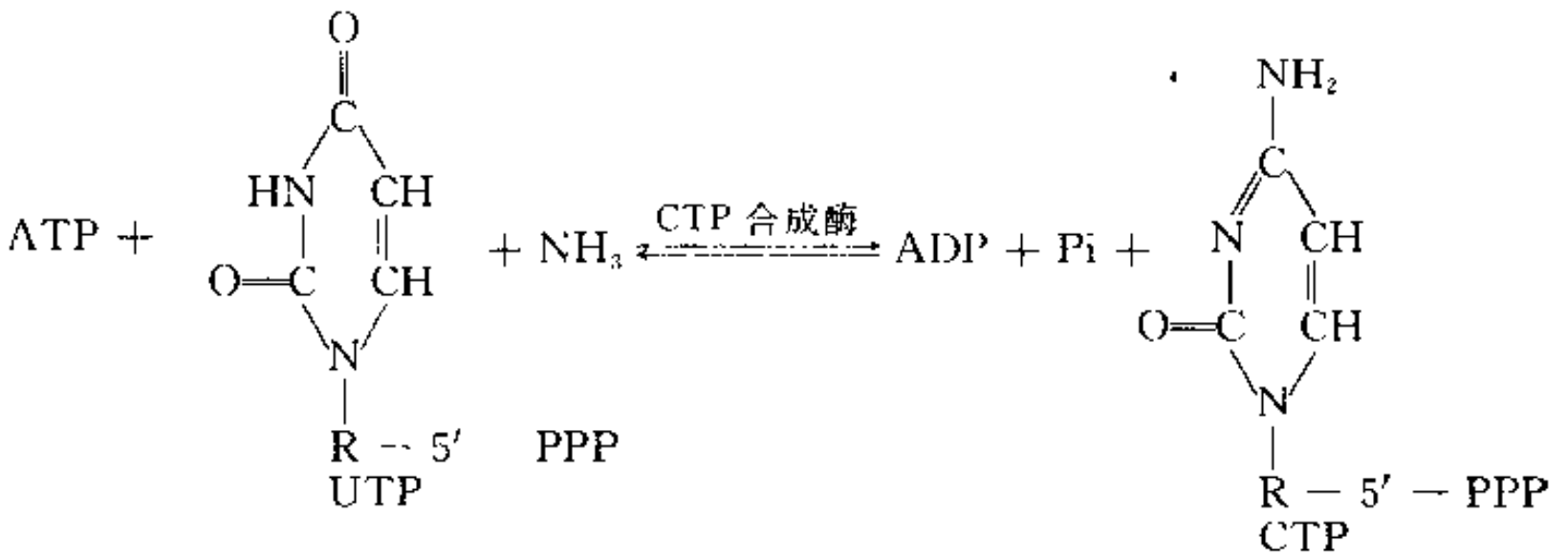
如：



6. 合成酶　这类酶能催化合成反应。

$$A + B + ATP \cdots \blacktriangleright A \cdots B + ADP + Pi \tag{2-12}$$

如：



另外，酶还有其它许多分类方法。例如，根据酶的存在部位即在细胞内外的不同，可分为胞外酶和胞内酶两类。胞外酶能透过细胞，作用于细胞外面的物质，它们都是起催化水解作用的。胞内酶在细胞内部起作用，主要起催化细胞的合成和呼吸的作用。

还需指出，大多数微生物的酶的产生与基质存在与否无关，在微生物体内都存在着相当的数量。这些酶称为组成酶。在某些情况下，例如受到了各种持续的物理、化学影响，微生物会在其体内产生出适应新环境的酶。这种酶则称为诱导酶。诱导酶的产生在废水生物处理中具有重要意义。这是根据存在方式进行的酶分类。

此外，酶还有所谓单成分酶和双成分酶之分。单成分酶完全由蛋白质组成，这类酶蛋白质本身就具有催化活性，多半可以分泌到细胞体外，催化水解作用，所以是胞外酶。双成分酶不但具有蛋白质部分，还具有非蛋白质部分。蛋白质部分为主酶，非蛋白质部分为辅助因子，主酶和辅助因子组成全酶。主酶和辅助因子都不能单独起催化作用，只有两者结合成全酶才能起作用。酶的专一性决定于它的蛋白质部分，故对双成分酶来说，它们的专一性决定于主酶部分，而辅助因子与反应过程中基团或电子传递有关。双成分酶（又称全酶）常保留在细胞内部，所以是胞内酶。

细菌没有摄食器官，而且细菌的细胞膜有半渗透性。如果细菌碰到的营养物质是比较简单的、溶解的物质，那末这些物质就通过营养物质运输途径很快被吸入细胞，再通过胞内酶的作用，迅速完成氧化、合成第一系列生化反应。如果细菌碰到的是复杂的或固体物质，它们就利用分泌的胞外酶将吸附在细胞周围的这类复杂的大分子水解为简单的小分子。例如，常见的淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶……等，再在细胞膜表面的吸收及传递营养物质的酶类作用下，透过细胞膜进入细胞，在相应的胞内酶的作用下，进行氧化及合成反应，形成细胞需要的各种成分。

二、酶的作用特性

1. 酶的作用特点　酶是细菌细胞体内生成的一种生物催化剂。由于其基本成分是蛋白质，所以也具有蛋白质所有的各种特性，例如，具有很大的分子量，呈胶体状态而存在，为两性化合物有等电点，不耐高热并易被各种毒物所钝化或破坏，有其作用的最适、最高、最低的温度和酸碱度等。酶的两性化合物特性说明如下：

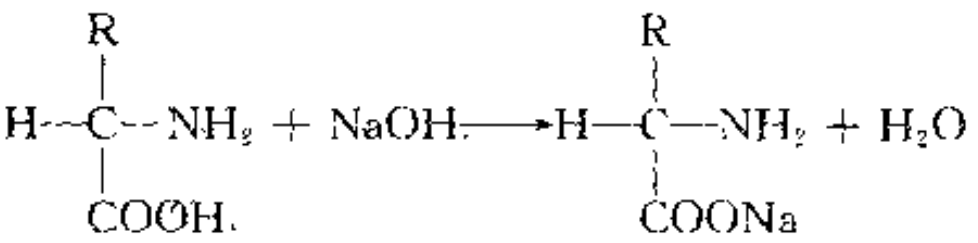
与酸反应，

$$\begin{array}{l} R \\ | \\ H-C-NH_2 \\ | \\ COOH \end{array} + HCl \longrightarrow \begin{array}{l} R \\ | \\ H-C-NH_3Cl \\ | \\ COOH \end{array} \qquad (2\text{-}13)$$

解离，

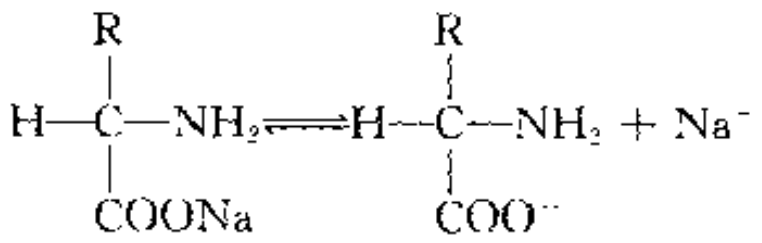
$$\begin{array}{l} R \\ | \\ H-C- \\ | \\ COOH \end{array} -NH_3Cl \rightleftharpoons \begin{array}{l} R \\ | \\ H-C-NH_3^+ \\ | \\ COOH \end{array} + Cl^- \qquad (2\text{-}14)$$

与碱反应，



(2-15)

解离，



(2-16)

酶是一种催化剂，因此它的作用特点具有一般催化剂的共性：用量少而催化效率高；加快化学反应速度，不改变化学反应的平衡点，可降低反应活化能。但是酶是特殊的生物催化剂，所以它又有普通催化剂没有的作用特点。除了前面提到的高度的催化效率、专一性和可逆性等3点外，还有反应的温和性，就是说酶作用一般要求比较温和的条件．如常温、常压、接近中性的酸碱度等即可发挥酶的催化能力，高温、高压、强酸或强碱条件反而易使酶活性破坏甚至丧失。最后一点是酶活力的可调节性。酶活力受许多因素的影响和调控，如抑制剂、激活剂，须与辅酶或辅基结合才发挥作用等。

2．酶的活性与活性中心　酶活性也称酶活力，是指酶催化一定化学反应的能力。酶的催化能力大小与酶含量有关。因为酶含量很小很小，所以不能直接用重量或体积来表示。这也是采用酶活性概念的缘由。酶活性大小可以用在一定条件下，它所催化的化学反应的速度来表示，即酶催化的反应速度越快，酶活性就越高；反之则越小。酶反应速度可用单位时间、单位体积中底物的减少量或产物的增加量来表示，通常用酶活性单位来描述。因为酶活性单位与时间单位和底物单位有关．所以，国际酶学会议1961条规定：1酶活性单位是指在25 C最适pH及底物浓度等条件下，在1min内转化1μmol底物的酶量。这是一个统一的标准，但使用起来不太方便。现在使用较多的是习惯酶活性单位，即人为确定的酶活性单位定义，如α-淀粉酶，可用每小时催化1ml2%可溶性淀粉液化所需要的酶量作为一个酶活性单位。但这种方法不太严格，也不便对酶活性进行比较。另外，有时候还使用比酶活性描述和讨论酶的变化。比酶活性是指单位重量酶蛋白所具有的酶活性单位数。这一指标往往用于酶提纯过程中各操作步骤有效性的判断。在水处理中，也经常采用比酶活性来判断不同来源污泥的活性大小，或者用于监测同一处理反应器在不同运行阶段污泥的活性提高或变化。

酶的活性中心是指酶蛋白肽链中由少数几个氨基酸残基组成的、具有一定空间构象的与催化作用密切相关的区域。它从结构上说明了酶的作用特点。酶分子中组成活性中心的氨基酸残基或基团是关键的，必不可少的。其它部位的作用对于酶的催化来说是次要的，它们为活性中心的形成提供结构基础。酶的活性中心分二个功能部位：第一是结合部位，底物靠此部位结合到酶分子上；第二是催化部位，底物的键在此处被打断或形成新的键，从而发生一定的化学变化。

酶与底物作用的反应假说，目前比较广泛接受的是“诱导契合”假说。其要点是：当酶分子与底物分子接近时，酶蛋白受底物分子的诱导，构象发生有利于底物结合的变化，并

形成酶 -底物中间复合物，在此基础上互补楔合进行反应，最终生成反应产物。近年来 X 射线衍射分析等实验结果支持这一假说。

三、酶促反应的影响因素及动力学

温度和 pH 值常是影响酶活力比较重要的两个因素。

要发挥酶最大的催化效率，必须保证酶有它最适宜的温度条件。高温会破坏酶蛋白，而低温又会使酶作用降低或停止。一般讲，动物组织中的各种酶的最适温度为 37～40 C，微生物各种酶的最适温度在 30～60 C 范围内，有的酶的最适温度则可达 60 C 以上，如黑曲糖化酶的最适温度为 62～64 C。在适宜温度范围内，温度每增高 10 C，酶催化的化学反应速度约可提高 1～2 倍。

图 2-3 为温度、pH 值和基质浓度对酶活力的影响。

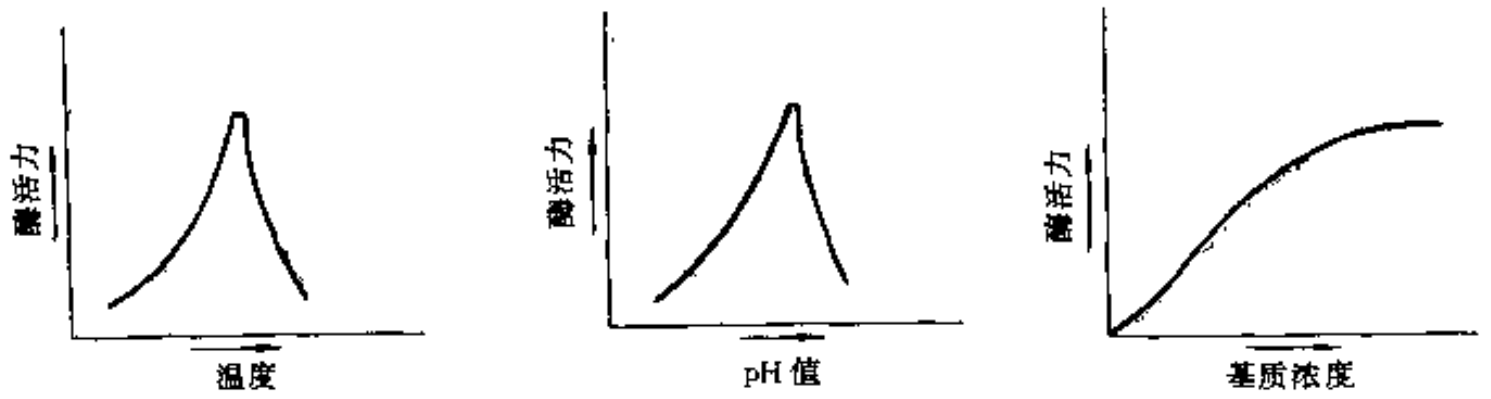


图 2-3　温度、pH 值和基质浓度对酶活力的影响

表 2-1 和表 2-2 分别表示温度对某些酶和活性污泥与污泥消化的影响。

在废水处理的污泥消化中，人们早就认识到控制温度的重要性。在生物滤池的设计中，也考虑了对于不同气候条件选择不同的设计数据。但对于活性污泥法曝气池的设计，温度因素还未加以考虑，这是因为它们的影响因素十分复杂，难于用数学方法来处理，其中与温度有关的主要因素有：(1) 所需曝气的时间；(2) 单位时间单位体积所需的氧气；(3) 溶解氧的变化。

温度对酶活力的影响　　表 2 1

酶	温　度（C）	Q_{10}
淀粉酶	10～20	1.34
	15～25	1.59
	20～30	1.44
	25～35	1.27
	30～40	1.17
胃蛋白酶	0～10	2.60
	10～20	2.00
	20～30	1.80
	30～40	1.60
胰脂酶	0～10	1.50
	10～20	1.34
	20～30	1.26

注：温度系数 $Q_{10}=\frac{\text{在 } (t\text{C}+10\text{C}) \text{ 时的作用速度}}{\text{在 } t\text{C 时的作用速度}}$

温度对活性污泥和污泥消化的影响

表 2-2

	温　度（C）	Q_{10}
活性污泥	10～20	2.85
	15～25	2.22
	20～30	1.89
污泥消化	10～20	1.67
	15～25	1.73
	20～30	1.67
	25～35	1.48
	30～40	1.0

至于 pH 值，对于不同的酶要求也不同。大多数酶的最适 pH 值在 6～7 左右。废水生

物处理主要利用土壤微生物的混合群，应保持pH在6～9之间。为什么pH影响酶的活力？酶的基本成分是蛋白质，是具有离解基团的两性电解质。它们的离解与pH有关，电离形式不同，催化性质也就不同。例如，蔗糖酶只有处于等电状态时才具有酶活性，在酸或碱溶液中酶的活性都要减弱或丧失。此外，酶的作用还决定于基质的电离状况。例如，胃蛋白酶只能作用于蛋白质正离子，而胰蛋白酶则只能分解蛋白质负离子，所以胃蛋白酶和胰蛋白酶作用的最适pH分别在比等电点偏酸或偏碱的一边。

现在我们来研究一下在酶催化反应中基质的浓度对反应速度的影响。这也是酶促反应动力学的重要内容。酶催化的过程是一个两步过程，可用下式表达：

$$E + S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{K_4}{\overset{K_3}{\rightleftharpoons}} E + P \qquad (2\text{-}17)$$

其中E是酶，S是基质，ES是酶与基质的复合物，P是产物，K_1、K_2、K_3及K_4分别是各步反应的速度常数。在这个两步反应中，后一步的速度显然是受前一步达到平衡时的速度所制约的，亦即后一步的速度必然小于前一步的速度，而且大量实验证实，前一步反应形成ES的反应速度远远大于后一步反应ES生成产物的速度。另外，产物P与E结合生成ES的速率很小，也就是$K_4 \ll K_3$，故可忽略。根据后一步反应的速度，酶促反应生成产物的最终速度v为：

$$v = K_3[ES] \qquad (2\text{-}18)$$

在上式中，由于ES是酶反应中间复合物，它的浓度往往是不知道的，因此，重要的是在弄清基质的浓度、酶浓度与ES的关系。

设：$[E_0]$ =酶的总浓度；

$[S]$ =基质的浓度；

$[ES]$ =酶与基质的复合物的浓度；

则 $[E_0] - [ES]$ =游离态酶的浓度。

根据质量作用定律，

式（2-17）反应中，

ES生成反应的速度$= K_1\{[E_0] - [ES]\}[S]$

ES分解反应的速度$= K_2[KS] + K_3[ES]$

在平衡时，可得出：

$$\frac{K_2 + K_3}{K_1} = K_m = \frac{\{[E_0] - [ES]\}[S]}{[ES]}$$

或

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_m + [S]} \qquad (2\text{-}19)$$

将此式与式（2-18）合并，可得：

$$v = \frac{K_3[E_0][S]}{K_m + [S]} \qquad (2\text{-}20)$$

或

$$\frac{v}{[E_0]} = \frac{K_3[S]}{K_m + [S]} \qquad (2\text{-}21)$$

$[E_0]$是$[ES]$所能达到的最大极限，也就是说在$[E_0]=[ES]$时，所有的酶分子都被利用起来与基质形成了结合状态，显然也是酶促反应可以发挥出最大的催化潜力的状况。因此，若设$V=K_3[E_0]$，则V就是酶促反应的最大速度，从而式（2-20）又可改写成（为了方便起见把表示浓度$[S]$的括弧除去）：

$$v=\frac{VS}{K_m+S} \tag{2-22}$$

这是研究酶反应动力学的一个最基本的公式，常称米-门公式（Michaelis-Menten 公式），它显示了反应速度与基质浓度之间的关系。

式中 v——反应速度；

S——基质浓度；

V——最大反应速度；

K_m——酶催化反应中中间复合物ES分解速度与生成速度常数之比，常称米氏常数。

当$K_m=S$时，由式（2-22），可得：

$$v=\frac{V}{2} \tag{2-23}$$

即当基质浓度等于米氏常数时，酶促反应速度正好为最大反应速度的一半（图 2-4），故K_m又称半饱和常数。

K_m是酶的特征性常数。它只与酶的种类和性质有关，而与酶浓度无关。K_m值受 pH 及温度的影响。如果同一种酶有几种底物就有几个K_m值，其中K_m值最小的底物一般称为该酶的最适底物或天然底物。K_m值可近似地表示酶对底物亲和力的大小。如果K_m小，说明ES的生成趋势大于分解趋势，即酶与底物结合的亲和力高，不需很高的底物浓度就能达到最大反应速度V；反之，K_m值大，说明酶与底物结合的亲和力小。这里要特别注意K_m和K_s的异同。许多文献中经常把K_m和K_s混用，这是不严格的。K_s实际上是$E+S$生成ES的解离平衡常数，也就是：

$$K_s=\frac{k_2}{k_1}$$

K_s称底物常数。因此确切地说，描述酶与底物亲和力的应该是K_s。在特殊的情况下即$K_3\ll K_2$时，K_m与K_s才有共同的含义。前面已经提到，酶促反应过程中第一步反应确实远远快于第二步反应，也就是K_1及$K_2\gg K_3$，所以一般情况下可以简化理解为K_m等于K_s。

如果$S\ll K_m$，则米-门方程可简化为$v=\frac{V}{K_mS}$，酶促反应为一级反应。

如果$S\gg K_m$，则米-门方程又可简化为$v=V$，反应呈零级反应（图 2-4）。

从图 2-4 中，可以看到，在一定范围内反应速度随基质浓度的提高而加快，但当基质浓度很大时，就与基质浓度无关。这是因为酶促反应是分两步进行

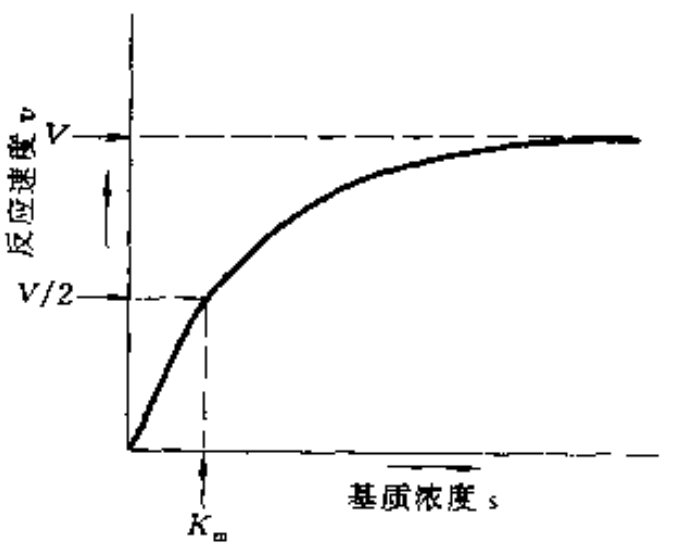


图 2-4 米-门公式图示

的，如式（2-17）所示。假如酶在反应进行过程中的浓度不变，当基质浓度很小时，则所有的基质都可与酶结合成复合物 ES，同时还有过剩的酶未与基质结合，此时再加基质，则可增加 ES 的浓度（亦即增加 ES 的分解速度），反应速度因而增加。若基质浓度很大，所有的酶都与基质结合成 ES，此时再加基质也不能增加 ES 的浓度，所以也就不能再提高反应的速度。

由式 2-20 表明，酶促反应速度与酶浓度 E_0 有关。酶浓度影响米-门方程中 V 的大小。因此，在水处理中为了加快反应速度，往往需培养尽可能多的细菌，提高酶浓度，从而增加反应器处理能力和速率。

求解 K_m 和 V 时，可以把式（2-22）取倒数变为以下形式：

$$\frac{1}{v}=\frac{K_m}{V}\cdot\frac{1}{S}+\frac{1}{V} \tag{2-24}$$

这是一个直线方程。很明显，可以利用基质浓度 S 与反应速度 v 的一些实验数据去估计最大反应速度 V 与米氏常数 K_m。这就是所谓的双倒数作图法。

米-门公式是从酶促反应中推导得出的，但它也适用于细菌生长的描述。1942 年莫诺特（Monod）用实验得出基质浓度与微生物比增长速度的关系：

$$\mu=\frac{\mu_{max}S}{S+K_3} \tag{2-25}$$

式中 μ——微生物比增长速度；

μ_{max}——微生物最大比增长速度；

S——基质浓度；

K_s——饱和常数。

又于 1949 年用连续投料实验得出同一关系式。

1970 年劳伦斯（Lawrence）和麦卡蒂（McCarty）将 $\frac{dS}{dt}$ 与反应器中微生物量及周围基质浓度联系起来，得出：

$$\frac{\mathrm{d}S}{\mathrm{d}t}=\frac{KXS}{K_3+S} \tag{2-26}$$

式中 $\frac{\mathrm{d}S}{\mathrm{d}t}$——总的基质利用速度；

K——最大比基质利用速度；

S——基质浓度；

K_s——饱和常数；

X——微生物浓度。

由此可见，上两式比米-门公式更直接地把微生物与废水中有机物浓度联系了起来，故目前已较广泛地用于废水生物处理的计算中。

某些毒物或化学抑制剂也影响酶的活力。抑制剂一般可分为可逆与不可逆两类，前者又分为竞争性与非竞争性两类。不可逆抑制剂能与蛋白质化合形成不溶性盐类而沉淀，从

而破坏酶的作用，如一些重金属盐类（Fe^{+++}、Hg^{++}、Ag^{+}等），由于它们带正电而使酶蛋白沉淀。竞争性抑制剂是由于它的化学构造与基质很相似，因而争先与酶结合，以致减少了酶与正式基质结合的机会。应当指出，有些酶却与上述情况刚刚相反，即在自然状况下它们是被抑制着的，要在一定条件下改变了其分子构造，才能发挥活性。酶的这种无活性的前身，称之为酶原。例如，胰蛋白酶原在肠激酶的作用下可被活化为胰蛋白酶，胃朊酶原在盐酸作用下可转变成胃朊酶。

酶与人类、动植物、微生物机体本身有着密切的关系，如果机体内的酶被破坏就不能生存，如果缺乏某种生存所必需的酶，就会使某一方面的代谢受到阻碍。酶与工农业生产，酶与废水生物处理都有密切关系。所以我们必须具备一定的酶知识。但往往在初学时不容易体会，并容易把微生物和酶两者混淆。微生物的酶是微生物机体合成的。一个微生物可以合成多种酶类以适应它本身的生活需要。至于酶的催化作用，在我们日常生活中也可看到很多例子，例如，细嚼馒头感到甜味，就是淀粉在唾液中的淀粉酶的作用下转化为糖的结果。

为了更好地利用酶，人们已经设法把一部分酶从生物体中分离出来制成所谓酶制剂，用于工农业生产中。过去，酶制剂一般都是溶解于水中再使用的。近年来研制成功了一种不溶解的固相酶（又称水不溶酶），它是水溶性酶通过物理的或化学的方法，使之与载体相结合而形成的一种不再溶解的酶。固相酶仍具有酶的催化特性，但稳定性大大增加，可以反复使用多次，使用寿命可长达数月之久。如将固相酶制成酶柱，让原料由一端流入，则可以从另一端流出产品，使酶反应连续化和自动化。

目前，酶制剂已经被开始应用于三废治理方面，例如，利用脂肪酶来净化生活污水，利用多酚氧化酶来检出酚并进而除去酚，利用一些酶制剂来分解污泥浮渣等等。同时现还正在大力寻找和研制能够分解氰化物、有机汞、多氯联苯、塑料、环状有机化合物等的酶。而且试验利用固定化微生物细胞处理废水的新技术亦在进行。利用固定化微生物细胞，实质上也是利用微生物体内的酶的作用。所谓固定化微生物细胞就是把微生物细胞直接固定在载体上，这样，可以免去酶分离提纯的工艺，而最大限度地提高酶的收率。

第三节　细菌的呼吸

细菌要维持其生命必须进行新陈代谢。

新陈代谢是维持生命的各种活动（如生长、繁殖、运动等）过程中，生物化学变化（包括物质的分解合成）的总称。细菌的新陈代谢，是细菌不断地从外界环境摄取其生长与繁殖所必需的营养物质，同时又不断地将自身产生的代谢产物（废物）排泄到外界环境中去的过程。新陈代谢包括两个作用，即同化作用和异化作用。

新陈代谢
- 同化作用——吸收能量，进行合成反应，将吸收的营养物质转变为细胞物质。
- 异化作用——分解反应，放出能量，是将自身细胞物质和细胞内的营养物质分解的过程。

异化作用和同化作用是密切配合的；异化作用为同化作用提供物质基础及能量来源，同化作用又为异化作用提供基质。同化作用又称合成代谢，异化作用又称分解代谢。细菌的呼吸讨论的是分解代谢。

一、呼吸作用的本质

高等动物的呼吸作用是吸进氧气，氧化体内有机物产生二氧化碳和水，并放出热能。细菌的呼吸作用与高等动物的呼吸作用有相同点，也有不同点。有的细菌和高等动物一样进行好氧（需氧或好气）呼吸，也有的细菌在没有氧气的情况下进行厌氧（厌气）呼吸。呼吸作用的本质是什么呢？呼吸作用是生物的氧化和还原的统一过程。在这一过程中释放出一部分热能。因此，有以下几方面的生物学现象：

1. 通过呼吸作用使复杂的有机物变成二氧化碳、水和其它简单的物质。

2. 在呼吸作用的过程中，发生能量的转换。一部分能量供给合成作用，另一部分供维持生命活动，还有一部分能量变成热能释放出来。

3. 在呼吸作用的一系列化学变化中，产生了许多中间产物。这些中间产物一部分继续分解，一部分作合成机体物质的原料。

4. 在进行呼吸作用的过程中，吸收和同化各种营养。

以上各项反应都是在细胞内由酶催化下进行的。

二、细菌的呼吸类型

根据与氧气的关系，细菌的呼吸作用，分为好氧呼吸和厌氧呼吸两大类。由于呼吸类型的不同，细菌也就分为好氧菌（需氧菌或好气菌）、厌氧菌（厌气菌）和兼性（兼气）菌三类。好氧菌生活时需要氧气，没有氧气就无法生存。它们在有氧的条件下，可以将有机物分解成二氧化碳和水。这个物质分解的过程叫好氧分解。厌氧菌只有在没有氧气的环境中才能生长，甚至有了氧气对它还有毒害作用。它们在无氧条件下，可以将复杂的有机物分解成较简单的有机物和二氧化碳等。这个过程称为厌氧分解。兼性菌则既可在有氧环境中生活，也可在无氧环境中生长。在自然界中，大部分细菌属于这一类。

对于其它微生物来说，都可以根据它们生活时是否需要氧气分别列入好氧、厌氧和兼性这三大类中。

研究表明，当水中溶解氧高于 0.2～0.3mg/L 时，兼性菌利用氧气进行新陈代谢；而当溶解氧低于上述数字时，它们就同厌氧菌一样，生活时不需要氧气。另外，好氧微生物包括好氧菌以及下面将提到的球衣细菌、真菌等，能在微氧环境（溶解氧接近零）中生长。因此，在微氧环境中占优势的常是真菌、球衣细菌等好氧微生物。

应当指出，根据细菌与氧气的关系来划分它们的类型是不够全面、不够确切的。前面已经讲过，呼吸作用是生物氧化和还原的统一过程，即电子、原子或化学基团转移的过程，而在有机物分解和合成过程中都有电子的转移。电子需要某一物质来接受。接受电子的物体叫电子受体。所以，以电子受体的不同来划分类型较好。大多数细菌的代谢过程中电子的来源往往来自于脱氢反应，因此电子受体又称受氢体。

好氧呼吸和厌氧呼吸在废水生物处理中都有应用，如活性污泥法就是应用好氧呼吸的原理来处理有机废水，而无氧消化则是应用厌氧呼吸的原理来处理高浓度有机废水和剩余污泥。

为了便于理解好氧呼吸和厌氧呼吸的实质，下面用图式加以说明。

1. 好氧细菌呼吸作用　好氧呼吸作用过程是当营养物质进入好氧细菌细胞后，通过一系列氧化还原反应获得能量的过程。这个过程是氧化酶、脱氢酶、细胞色素（电子递体）和氧气参加下进行的。首先是营养物质（基质）中的氢被脱氢酶脱下，从基质中脱下的电子

交给辅酶或辅基，再通过电子呼吸链（或称传递链）的传递与氧结合。氧化酶活化分子氧并与电子结合成水。因此好氧呼吸的最终电子受体是游离的氧。在这个过程中放出能量。

图 2-5*a* 就是这个呼吸过程的反应图式。

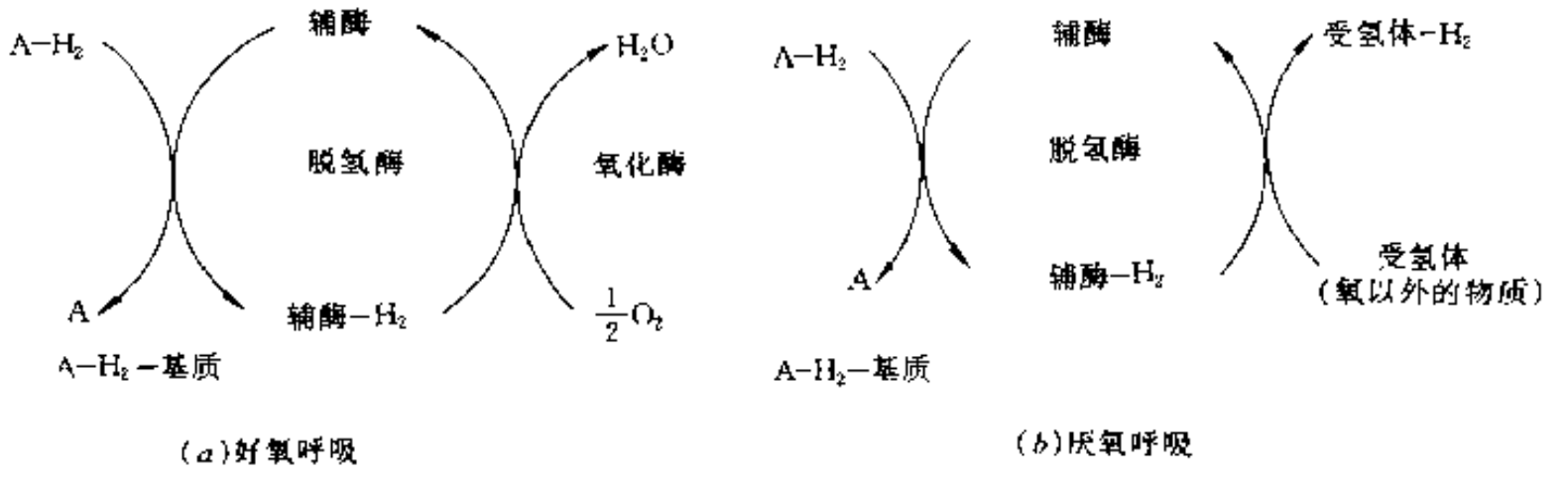


图 2-5　细菌呼吸过程反应图式

图 2-5*a* 所示图式也适用于细菌外的其它好氧微生物。

各种好氧微生物在呼吸过程中，由于基质不同，因而氧化产物也多种多样。例如，好氧异养微生物以葡萄糖作为基质彻底氧化时，最后形成二氧化碳、水，并放出大量能量。

$$C_6H_{12}O_6+6O_2 \longrightarrow 6CO_2+6H_2O+2872KJ \qquad (2\text{-}27)$$

葡萄糖是细菌吸收利用的常见营养物质，在代谢过程中具有特别重要的地位。它的好氧分解分二个阶段：第一阶段通过糖酵解途径，又称 EMP 途径（Embden-Meyerhof-Parnas 三人姓氏的简写）由 1 个六碳糖变成 2 个三碳糖丙酮酸（图 2-6）；第二阶段经三羧酸（TCA）循环，丙酮酸彻底氧化分解变成 CO_2 和 H_2O（图 2-7）。

从图 2-6 可以看出，EMP 途径中只发生一步脱氢氧化反应，共产生 2 分子 NADH+H^+，其余能量通过底物水平磷酸化生成 ATP，共形成 4 个 ATP。若以葡萄糖作为起始物，活化过程中要消耗 2 个 ATP，因此 1 分子葡萄糖净产生 2 个 ATP。丙酮酸经 TCA 循环彻底分解为 CO_2，在这一氧化过程中发生多步脱氢反应，脱下的氢和电子再经电子呼吸链的传递最终与分子氧结合生成水，同时产生大量 ATP，仅有一步反应通过底物水平磷酸化生成 ATP。所以可以说，好氧呼吸中有机物的最终氧化分解并提供大量能量的是 TCA 循环。

好氧性自养微生物在呼吸过程中可以氧化硫化氢、铁等，从中获得能量。

$$H_2S+2O_2 \longrightarrow H_2SO_4+能量 \qquad (2\text{-}27)$$

$$4Fe(OH)_2+O_2+2H_2O \longrightarrow 4Fe(OH)_3+能量 \qquad (2\text{-}28)$$

$$4NH_3+9O_2 \longrightarrow 4NO_2^-+6H_2O+能量 \qquad (2\text{-}29)$$

2. 厌氧细菌呼吸作用　厌氧呼吸在无氧的条件下进行，氧对厌氧细菌的呼吸有抑制作用。厌氧细菌只具有脱氢酶系统，没有氧化酶系统。在呼吸过程中，基质中的氢被脱氢酶活化，从基质中脱下来的氢经辅酶传递给氧以外的有机物或无机物，使其还原。于是一个物质被氧化，一个物质被还原，在这个过程中也释放出能量。整个过程如图 2-5*b*。

图 2-5*b* 所示图式同样也适用于细菌外的其它厌氧微生物。

厌氧呼吸可分成二种类型：分子内无氧呼吸和分子外无氧呼吸。

（1）分子内无氧呼吸

在厌氧呼吸过程中，大多数情况是基质失去氢被氧化，其产物接受氢被还原。所以有

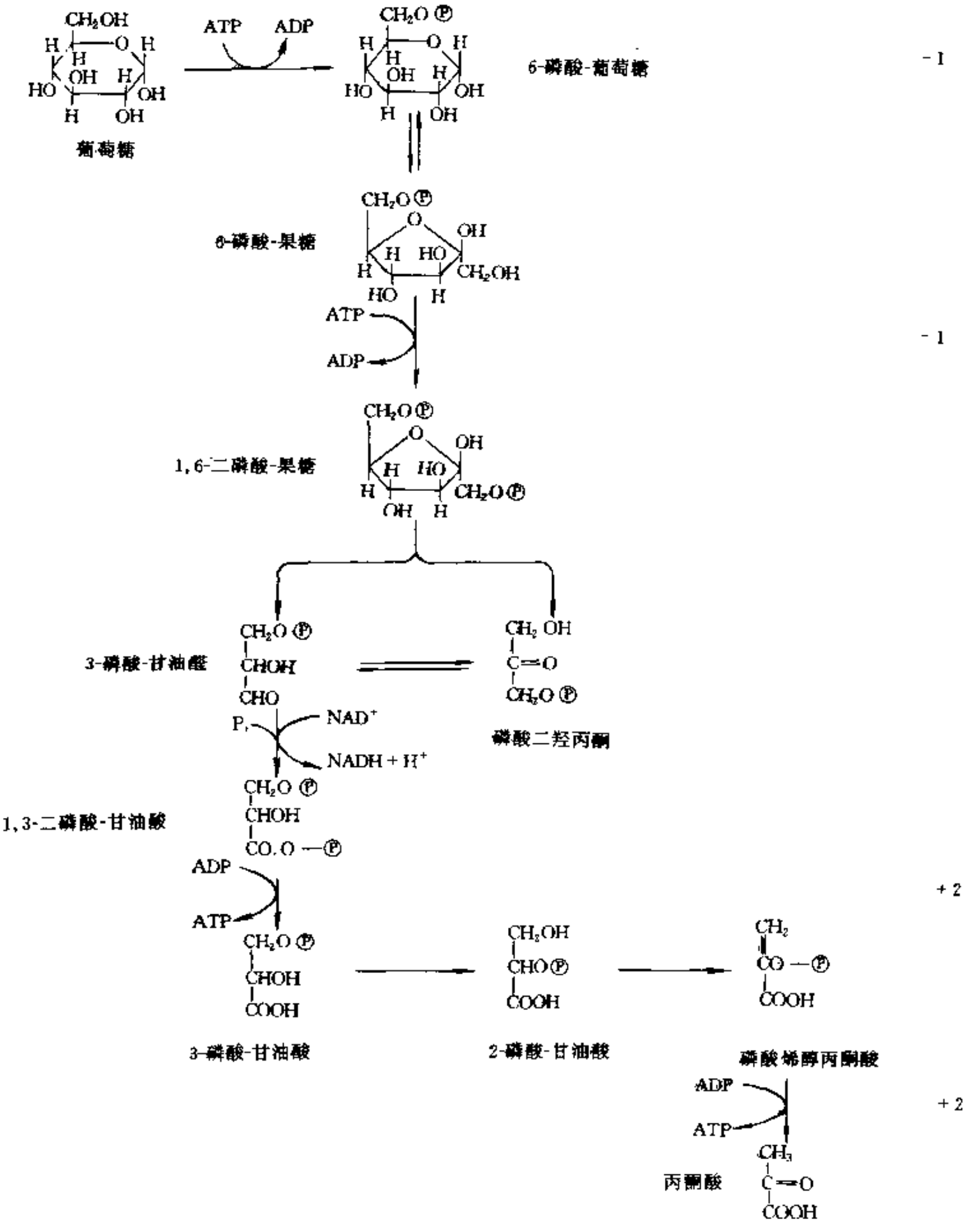


图 2-6　EMP 途径的反应细节

分子内呼吸之称。这种分子内的无氧呼吸也称为发酵。其代谢反应就是 EMP 途径。在整个过程中基质氧化不彻底，在其最终代谢产物中有的还可以燃烧，还含有相当的能量，故释放出的能量较少（有氧氧化的最终产物是含能量最低的二氧化碳和水，故释放的能量多）。

乳酸菌在无氧情况下，利用糖生成乳酸是典型的分子内无氧呼吸，其作用过程如下：

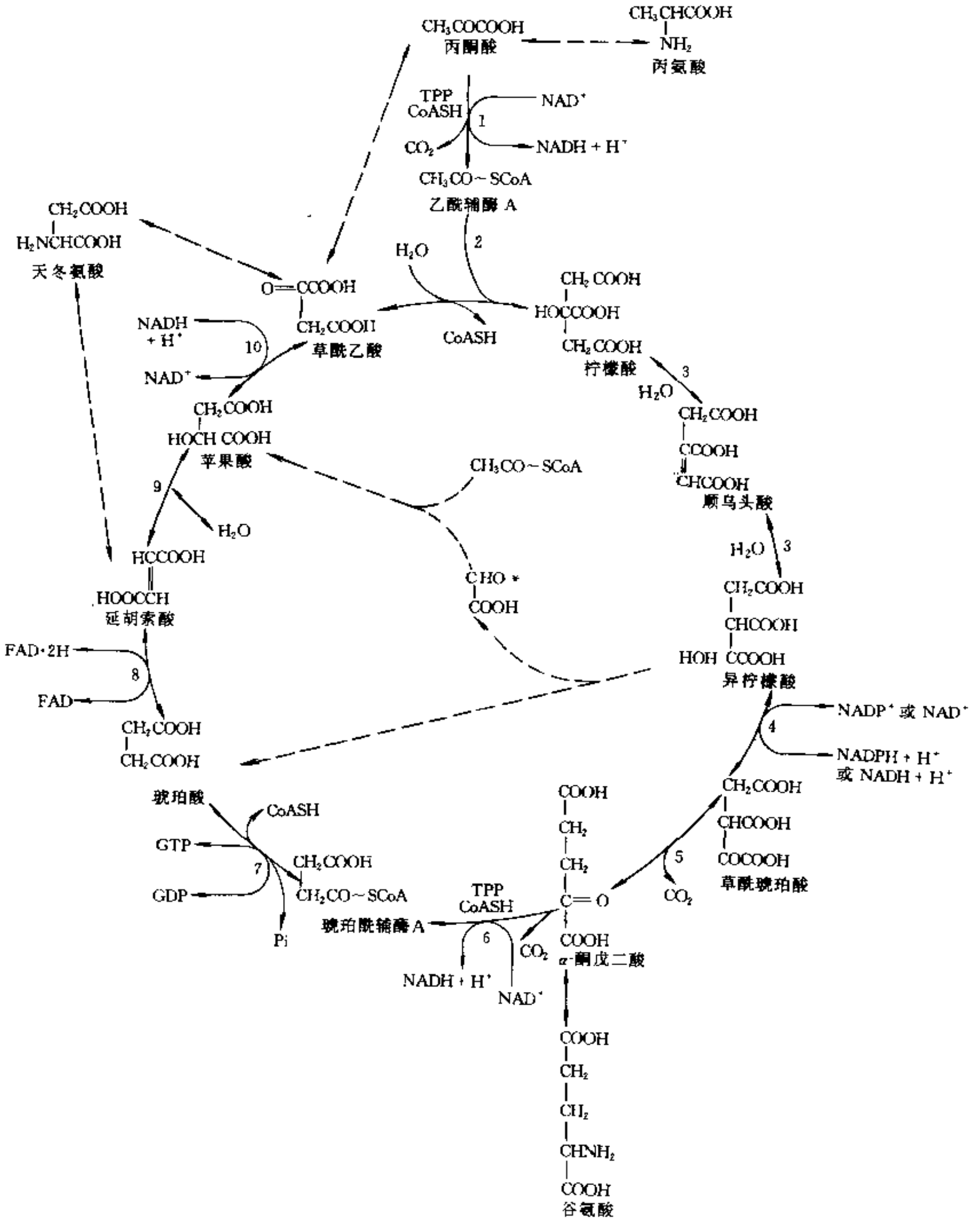


图 2-7　三羧酸循环

1—丙酮酸脱氢酶　2—柠檬酸合成酶　3—顺乌头酸酶　4、5—异柠檬酸脱氢酶　6—α-酮戊二酸脱氢酶
7—琥珀酸硫激酶　8—琥珀酸脱氢酶　9—延胡索酸酶　10—苹果酸脱氢酶
*　中间线条所示为乙醛酸循环

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_3H_6O_3 \tag{2-30}$$

$$2C_3H_6O_3 \underset{\text{脱氢酶-}H_2}{\overset{\text{脱氢酶}}{\rightleftharpoons}} 2\underset{\text{丙酮酸}}{CH_3COCOOH} \tag{2-31}$$

$$2CH_3COCOOH \underset{\text{脱氢酶}}{\overset{\text{脱氢酶 } H_2}{\rightleftharpoons}} 2\underset{\text{乳酸}}{CH_3CHOHCOOH} \tag{2-32}$$

总反应式：$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CHOHCOOH + 94KJ$ (2 33)

在这个反应中，产物是乳酸，氧化不彻底，所以释放的能量少。由此可见，厌氧微生物在进行生命活动的过程中，为了满足能量的需要，消耗的基质要比好氧微生物多。但它们在厌氧呼吸过程中能积累大量中间产物。我们在生产上正是利用厌氧微生物这一特性以获得各种代谢产物。

厌氧微生物对氧气很敏感，当有氧存在时，它们就无法生长。这是因在有氧存在的环境中，由脱氢酶活化的氢将和氧结合成过氧化氢，而这类微生物不象好氧微生物和兼性微生物缺乏分解过氧化氢的酶，故所形成的过氧化氢将逐渐累积起来，对细胞发生毒害作用。

(2) 分子外无氧呼吸类型

某些特殊营养和代谢类型的细菌在无氧时，由于它们具有特殊的氧化酶，能使某些无机氧化物如硝酸盐、亚硝酸盐、硫酸盐等中的氧活化而作为电子受体，接受基质中被脱下的电子。例如反硝化细菌可以利用硝酸中的氧作为受氢体。

$$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \longrightarrow 6CO_2 + 24H^- \tag{2-34}$$

$$24H^+ + 4NO_3^- \longrightarrow 12H_2O + 2N_2 \tag{2-35}$$

总反应式：$C_6H_{12}O_6 + 4NO_3^- \longrightarrow 6CO_2 + 2N_2 + 6H_2O + 1758KJ$ (2-36)

又如产甲烷细菌：

$$CO_2 + 4H_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O + 135.6\ KJ \tag{2-37}$$

式 2-37 是氢营养型产甲烷细菌的代谢反应。除此之外，产甲烷细菌还可以利用乙酸生成甲烷，即乙酸营养型产甲烷细菌。产甲烷细菌的分子外无氧呼吸加上其它细菌的分子内无氧呼吸是废水厌氧生物处理的微生物学基础。

3. 兼性细菌呼吸作用　兼性细菌或兼性微生物在有氧和无氧条件下都能生活，在有氧时同好氧微生物一样进行好氧呼吸，在无氧时进行厌氧呼吸。

例如，酵母菌对葡萄糖的作用：

在有氧条件下

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 2872KJ \tag{2-38}$$

在无氧条件下

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\underset{\text{酒精}}{C_2H_5OH} + 2CO_2 + 109KJ \tag{2-39}$$

在无氧环境中，释放的能量较少。

综上所述，根据微生物与氧气的关系不同，我们把微生物分为好氧、厌氧和兼性 3 个基本类型，但从它们呼吸机理来看，主要是好氧呼吸和厌氧呼吸。好氧呼吸在基质氧化过程中脱下的氢是以氧作为受氢体；厌氧呼吸在基质氧化过程中脱下的氢是以氧以外的物质作为受氢体。这两个作用也可用图 2-8 表示。

现在我们来简单介绍一下微生物呼吸过程中的能量问题。

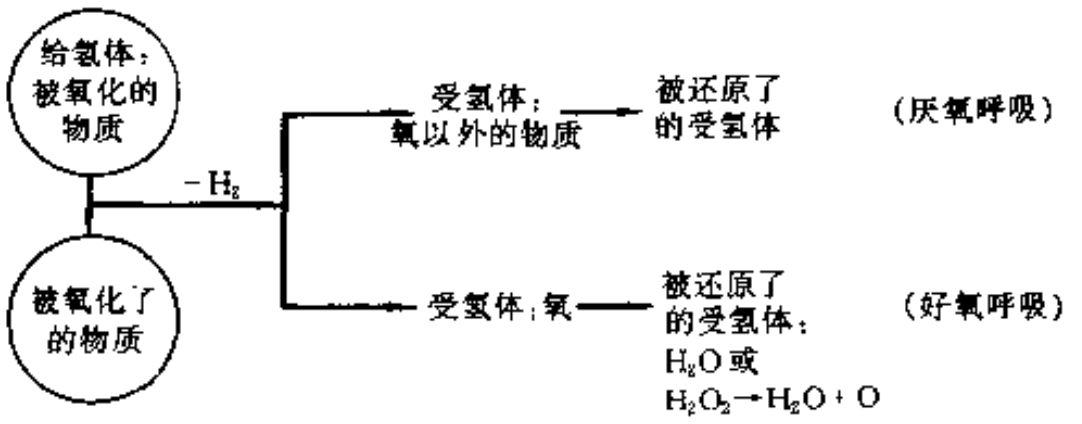


图 2-8　好氧呼吸与厌氧呼吸

微生物进行生命活动需要的能量都是通过菌体的酶类催化分解、氧化各种营养物质取得的。从前面的化学反应式可以看到微生物呼吸过程中分解、氧化各种营养物都是放能反应。微生物体内各种物质的合成过程则是需能反应。

化能自养微生物通过呼吸作用，氧化各种无机物质获得能量。而异养微生物通过呼吸作用，氧化各种有机物质获得能量。一种物质产生能量多少与微生物呼吸类型和氧的供应有关。一般讲，物质完全氧化时，放出的能量多，氧化不完全时，放出的能量少。

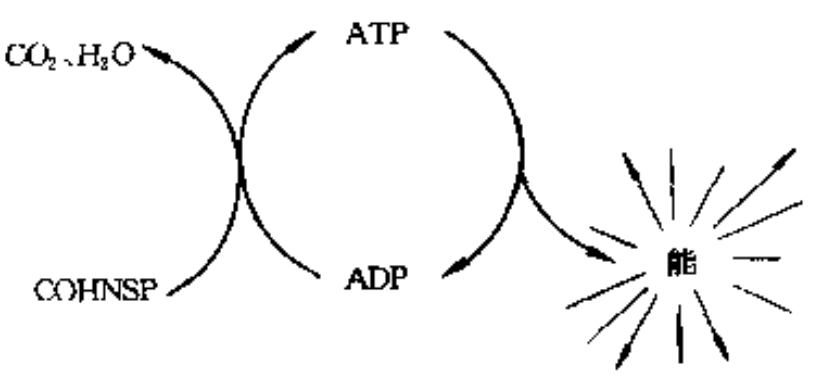


图 2-9　ATP 循环（异养微生物）

微生物在呼吸过程中，氧化各种物质时产生的能量能不能全部被微生物利用呢？不能。但它们的利用率是相当高的（一般在 40%～60%），而一般机器的能量利用率只有 20% 左右。为什么微生物有这样高的能量利用率呢？这是因为微生物体内有一套完善的能量转移系统，即在微生物体内有一种联结放能反应和需能反应的物质，其中常见的是含有高能磷酸化合物的腺三磷（即三磷酸腺苷，Adenosine triphosphate，可用 ATP 表示）。微生物在呼吸过程中氧化营养物质所产生的能量先以腺三磷的形式贮存于细胞内。然后利用所合成的腺三磷分解转化成腺二磷（即二磷酸腺苷，Adenosine Diphosphate，可用 ADP 表示）时所放出的能量从事各种生理活动。腺二磷获得营养物质被氧化分解所释放的能量后，又形成腺三磷。这就是所谓 ATP 循环（图 2-9）。腺三磷合成代谢的方式，由于微生物的种类、条件和营养物质的种类等不同而有所不同。大多数微生物主要都是利用氧化淀粉、蔗糖和葡萄糖等有机营养物质所产生的能量来合成腺三磷的，对于光能营养微生物则利用光能，化能营养微生物则利用氧化无机物所产生的能量来合成腺三磷。通过腺二磷——腺三磷的转换，大大提高了微生物的能量利用率。在这里也可看到磷酸盐对于生物的重要性。

ATP 的形成途径，在好氧呼吸过程中主要是通过氧化磷酸化，在分子内无氧呼吸中主要是底物水平磷酸化，分子外无氧呼吸的途径尚不清楚。氧化磷酸化指的是脱下的氢和电子通过电子呼吸链的传递生成 ATP 和水，这种方式是产生 ATP 的主要途径。电子呼吸链的组成见图 2-10。一般来说，辅酶 $NADH+H^-$ 可生成 3 个 ATP，而黄素蛋白（FAD. 2H）生成 2 个 ATP。至于电子传递是如何生成 ATP 的（即 ATP 的形成机理），目前较为接受的是“化学渗透假说”。

图 2-11 是异养微生物新陈代谢过程中能量释放和利用的示意图。呼吸过程中所释放的

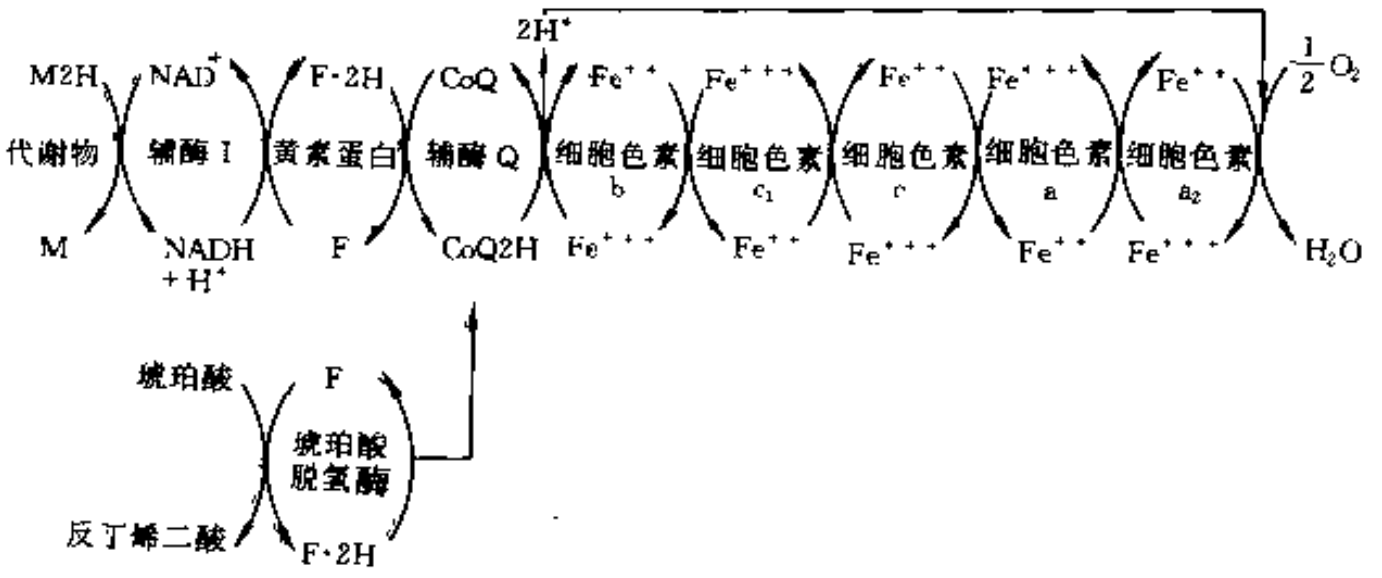


图 2-10　电子呼吸链的组成

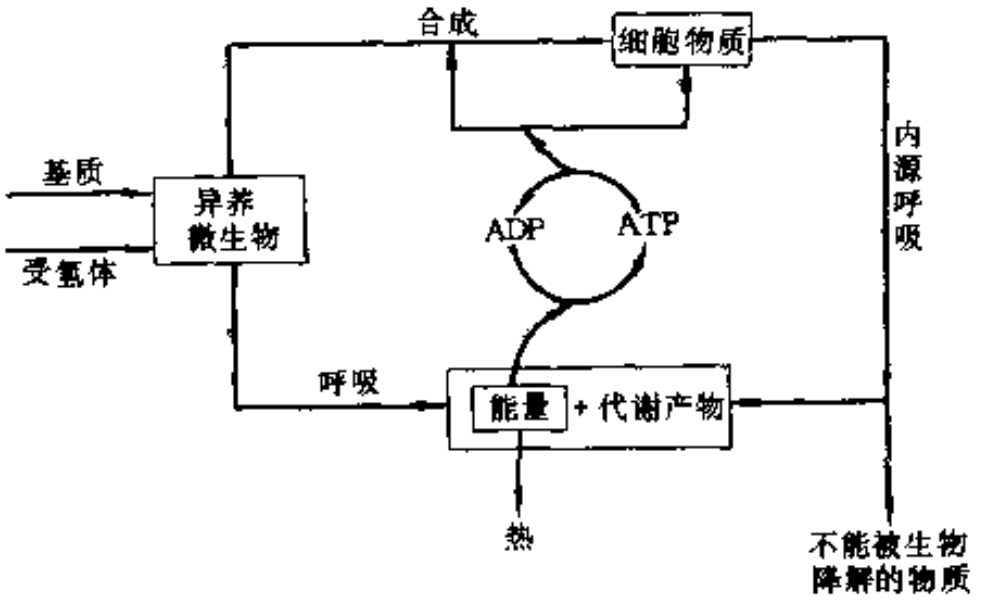


图 2-11　异养微生物新陈代谢中能量的释放与利用

能量，除用于合成细胞物质和维持生命活动外，还有一部分以热的方式散失掉。

三、代谢产物

微生物从环境中吸收了营养物质，获得了能量，在细胞中借酶的作用起了种种变化，结果使得一部分养料同化为细胞物质或贮存在体内的养料，另外它又将一些无用的或多余的物质排泄到体外环境中去。这些代谢产物大致有下列几种：

1. 气体状态　如二氧化碳、氢、甲烷、硫化氢、氨及一些挥发酸等。前面一些多为糖类发酵的产物，后者则多为蛋白质的分解产物。

2. 有机代谢产物　有机代谢产物可分为简单的有机代谢产物和复杂的有机代谢产物两类。糖类、酮类、有机酸类和胺类物质都是所谓简单的有机代谢产物，但事实上，它们还是比较复杂的，许多微生物能将这些物质作为碳源和能源，故也可称之为中间产物。复杂的有机产物包括维生素、抗菌素、毒素及色素等，它们在微生物体内产生的情况还不大清楚。维生素是微生物生长所需要的，但有些微生物所制造出来的却远远超过它所需要的，因此就大量的排到体外而累积起来。

3. 分解产物　复杂的有机物质，如蛋白质，纤维素等需先经胞外酶分解为较简单的物质后才能被吸收利用。但经酶分解出来的物质有时超过被微生物所吸收利用的，因而在基质上可以找到这些所谓分解产物，如蛋白胨、氨基酸、纤维二糖等。

细菌的呼吸类型的比较　　表 2-3

呼吸类型		电子受体	参加酶类	产物	产生能量的比较
好氧呼吸		O_2	细胞色素氧化酶 脱氢酶 脱羧酶 过氧化氢酶等	H_2O，CO_2 NO_3^-，SO_4^{2-} PO_4^{3-}	最　多
厌氧呼吸	分子内无氧呼吸（又称发酵）	基质氧化后的中间产物	脱氢酶 脱羧酶 还原酶等	CO_2，CO，CH_4，RCOOH，ROH NH_3，胺化物 H_2S， PO_4^{3-}	最　少
	分子外无氧呼吸	无机氧化物中的氧原子（如 NO_3^-，NO_2^-，SO_4^{2-} 等氧化物中的氧原子）	脱氢酶 脱羧酶 特殊的氧化酶 还原酶等	CO_2，CH_4，N_2 H_2S 等	中　间

4. 其它　有不少自养微生物可以在它们生长过程中产生氢、亚硝酸盐、硝酸盐和硫酸盐等。

四、细菌的呼吸类型在废水生物处理中的应用

前面已经提到细菌等微生物的好氧呼吸和厌氧呼吸在废水生物处理中都有应用，如活性污泥法和生物滤池是利用好氧微生物或兼性微生物进行好氧分解，厌氧消化法是利用厌氧和兼性微生物对剩余污泥和高浓度有机废水进行发酵。好氧微生物分解有机物的速度远快于厌氧微生物，氧化分解物质比较彻底，其产物为没有异臭的物质，不破坏正常环境，但需要有氧的供应。厌氧法处理废水和污泥，设备比较简单，但需时较长，且有臭气产生。有关这方面较详细的讨论见第六章。

第四节　其它环境因素对细菌生长的影响

细菌除了需要必须的营养物质和对氧的要求外，还需要其它适宜的生活条件，如温度、酸碱度、无毒环境等，才能很好地生长繁殖。细菌的细胞物质是由多种物质组成的，在细胞生活的时期由于有适宜的环境因素，因此各种细胞物质保持平衡状态。如果环境因素发生变化，这种平衡就会受到干扰，细菌就不能维持其正常的生命活动，或者死亡，或者发生变异。

关于细菌的营养物质及其对氧的要求，已在前面提到，下面就几个与细菌生长繁殖关系较为密切的其它一些环境因素作简单介绍。

1. 温度　温度对细菌有广泛的影响。大多数细菌生长适宜的温度在 20～40 C 之间，但有的细菌喜欢高温，适宜的繁殖温度是 50～60 C，有机污泥的高温厌氧处理就是利用这一类细菌来完成的。按照温度的不同，可将微生物（主要是细菌）分为低温、中温和高温三类，如下表所示：

微生物对于温度的适应性　　表 2-4

类　别	生长温度（℃）			备　注
	最　低	最　适	最　高	
低温性微生物	−5～0	10～20	25～30	水生微生物
中温性微生物	5～10	20～40	45～50	大多数腐生性微生物及所有寄生性微生物
高温性微生物	25～45	50～60	70～80	土壤、堆肥、温泉中的微生物

图 2-12 示温度对于细菌活力的影响。

高温能使细菌死亡，只要加热超过细菌致死的最高温度，细菌就不能活了，温度愈高，死得愈快。此外，细菌细胞内所含水分愈少，使细菌死亡所需的温度愈高。例如，许多没有芽孢的细菌在水中加热到 70℃经 10～15min 就死亡，而 100℃时很快就死去，但有芽孢的细菌细胞由于其含水量较少，在 100℃沸水中需煮几十分钟，有时甚至 1～2h 才会死去。在干热的情况下，细菌不容易被杀死。一般细菌在 100℃左右干热，要 1～2h 才死去，而芽孢即使被加热到 140℃，还需 2～3h 才能被杀死。

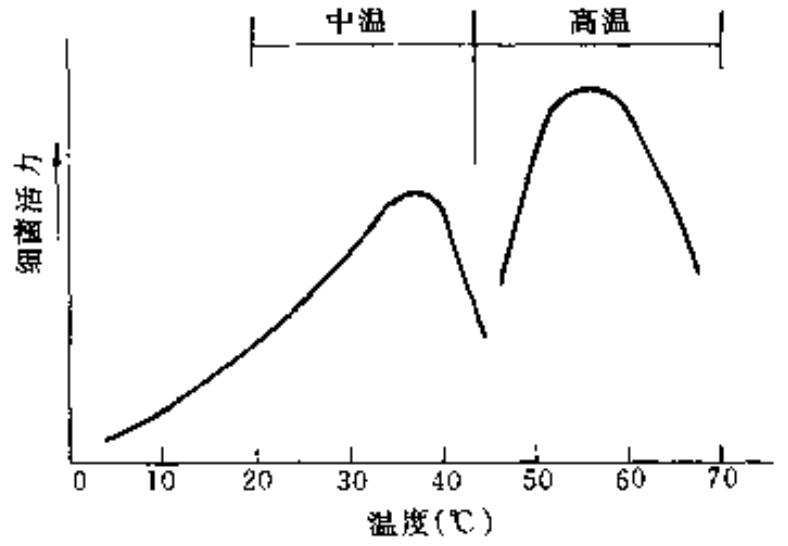


图 2-12　温度对细菌活力的影响

高温为什么会杀死细菌呢？

细菌细胞的基本组成是蛋白质。蛋白质对高温有不耐热性。而细菌营养与呼吸过程中必不可少的生物催化剂——酶也是蛋白质，也具有不耐热性。蛋白质一旦受到高温，其结构会受到严重破坏发生凝固，细菌就死去了。

为什么湿热比干热容易杀死细菌呢？

这是因为蛋白质的含水量愈多，加热时愈容易凝固，而且湿热所用的水蒸汽的传导力与穿透力都比较强，更容易破坏蛋白质，因此更容易杀死细菌。

至于低温，当低到零度，细菌也不致死亡，只有在频繁的反复结冰和解冻，才会使细胞受到破坏而死去。但是低温将降低细菌的代谢活力，通常在 5℃以下，细菌的代谢作用就大大受阻，成休眠状态，只能维持生命而不发育，所以在实验室中常利用冰箱保存菌种，一般以 4℃左右为保存菌种的适宜温度。

2. 氢离子浓度　各种细菌都有它们所适宜的氢离子浓度。在酸性太强或碱性太强的环境里，它们一般不能生活。大多数细菌适宜于繁殖的 pH 范围在 6～8 之间，而 pH 在 4～10 之间也能生存。

pH 和温度的控制，在工业废水的生物处理过程中具有重要的意义。工业废水的 pH 值如太高或太低，应加以中和，作适当的调整。如温度太高，应采取冷却等措施。

3. 氧化还原电位　各种细菌生活时要求的氧化还原条件不同。氧化还原条件的高低可用氧化还原电位 E 来表示。

一般好氧细菌要求 E 在 +0.3～0.4V 左右，而 E 值在 +0.1V 以上均可生长；厌氧细菌则需要 E 值在 +0.1V 以下才能生活；对于兼性细菌来说，E 值在 +0.1V 以上，进行好氧呼吸，E 值在 +0.1V 以下，进行无氧呼吸。

氧化还原电位这个指标也已开始应用于给水排水工程的科学研究和运转工作中，例如用来探测有毒物质和工业废水之存在与否，观察生物处理构筑物的工作情况等。在一般运转情况下，对于好氧分解系统，如活性污泥法系统，E 值常在+200～+600mV 之间，对于厌氧分解处理构筑物，如污泥消化池，E 值常应保持在－100～－200mV 的范围内。在某高负荷生物滤池污水厂中，曾发现滤池出水的氧化还原电位随着滤池处理效率的降低而下降，自+311mV 降至－39mV，二次沉淀池出水的 E 值甚至更低，曾达－89mV 并含有大量硫化氢。

4. 干燥　水是生物生存的必要条件，没有水--切生命都不能存在。前已提到，细菌细胞中含有大量水分。细菌基本上是生活在水中的生物。因此环境中过于干燥，细菌就不能生长。不同的细菌对于干燥的抵抗力有强有弱。一般没有荚膜、芽孢的细菌对环境的干燥比较敏感。细菌的芽孢和其它微生物的孢子耐旱性较强，在干燥环境中可以保持几十年，以后遇到适宜的生活条件，仍会发芽繁殖。

由于细菌等微生物在干燥环境中不能生长发育，因而人们广泛用干燥法来保存食品，防止食品腐败。

5. 渗透压　什么叫渗透压？不同浓度的溶液用半透膜分隔时，稀溶液中的水分通过半透膜渗到浓溶液中，浓溶液中的水分通过半透膜渗到稀溶液中，但从稀溶液中渗到浓溶液中的水分比从浓溶液中渗到稀溶液中的水分多，浓溶液一边的水面就逐渐升高。此时由于浓溶液一边液面升高产生了外加静压，使稀溶液中水分渗到浓溶液中的速度减慢。当液面升高到一定程度后，两边的水分子渗透速度相等，两边溶液达到了动态平衡，这时半透膜两边的液面高差就是这个溶液的渗透压。溶液的浓差愈大，渗透压愈大。

细菌细胞的细胞膜是半透性的，在不同渗透压的溶液中呈现不同的反应。当细菌周围的水溶液的渗透压同其细胞内液体的渗透压相等时，细菌生活得最好。细菌生活在高渗透压溶液中，细菌细胞就要失水，发生质壁分离，影响细菌的生命活动，甚至死亡。因此，应用高渗透压溶液可以保藏食物，常用的盐腌或蜜饯就是突出的例子。细菌在低渗透压溶液中，细菌细胞容易膨胀，甚至破裂。因此，培养细菌时，除了注意其必需的无机盐的种类外，还要注意其浓度。在微生物实验室中稀释菌液，一般用 0.85%的食盐（NaCl）溶液维持细菌等微生物的正常生活，这种浓度的盐水称为生理盐水。培养细菌的培养基中无机盐的渗透压为 0.5～1atm（≈0.1MPa），加入糖以后可产生总的渗透压约 0.35～0.7MPa。工业废水生物处理时废水中的渗透压问题是否需考虑有待在实践中解决。

6. 光线　除光合细菌外，一般细菌都不喜欢光线。许多微生物在日光直接照射下容易死亡，特别是病原微生物。日光中具有杀菌作用的主要成分是紫外线。紫外线杀菌效力的大小与其光波的长度和被吸收的量有关，波长在 260nm 左右者杀菌力最强。细菌细胞吸收紫外线后，蛋白质和核酸发生了变化而引起死亡。

紫外线的杀菌力虽强，但穿透性很弱，因此只有表面杀菌能力。一般细菌在紫外线下照射 5min 即能被杀死，芽孢则需 10min。

由于紫外线不能透过普通玻璃，所以一般紫外线常用在杀死空气中的微生物，如在无菌室或无菌箱中用得较多。

7. 化学药剂　某些化学药物对细菌生活的影响也大。强氧化剂可氧化细菌的细胞物质而使细菌的正常代谢受到阻碍，甚至死亡。各种细菌对高锰酸钾的抵抗力基本相同，0.1%

的高锰酸钾溶液常用于消毒公用茶具和水果。漂白粉和液氯常用于饮水或游泳池水的消毒。生石灰也是一种杀菌效力较好的消毒剂。生石灰1份加水4～8份制成的石灰乳，可有效地消毒粪便和其它排泄物。

细菌营养需微量的锰、锌、铜等。但有的工业废水含有有毒的重金属比较多，则就成了细菌的抑制剂或杀菌剂。

有机物一般讲是细菌的营养物质，但有的有机物在一定浓度范围内对细菌是有毒害作用的。如石炭酸（苯酚）浓度为0.1%时就大大抑制细菌生长，1%的溶液在20min内杀死细菌，3%～5%的溶液几分钟内就可杀死细菌。来苏儿是甲酚和肥皂的混合物，3%～6%的溶液用来消毒器械，2%的用于洗手。纯酒精没有杀菌能力，60%～75%的酒精杀菌力最强，这是因为高浓度酒精遇到细菌细胞时，会很快使细胞表面脱水而致硬化，阻止了酒精继续渗入细胞，因此蛋白质也不会凝固。许多染料都有杀菌作用。一般碱性染料比酸性染料的杀菌力强，这是因为碱性染料的显色基团带正电，而一般细菌的细胞常带负电，碱性染料与细菌的蛋白质结合，所以起抑制作用。染料也要达到一定浓度时才具有对细菌抑制和杀死的作用。常用的皮肤消毒剂紫药水就是1%浓度的龙胆紫溶液。细菌染色用的染料浓度一般在0.1%～5%范围内。

应该指出，如果缓慢地提高有毒物质的浓度，使细菌等微生物逐渐适应，则它们都有可能承受比一般的允许浓度高的浓度。

此外，除上述物理、化学因素外，还有生物因素，将在第四章中叙述。

复习思考题

1. 细菌细胞中主要含有哪些成分？细菌需要哪些营养？当我们供给细菌营养时应注意什么？为什么？

2. 试区别自养微生物和异养微生物。

3. 什么叫酶？酶是怎样命名和分类的？酶的作用有什么特性？影响酶活力的主要因素有哪些？试讨论之。细菌是怎样吸收和消化营养物质的？

4. 细菌呼吸作用有哪几种类型？各有什么特点？根据微生物生活时是否需要氧气，微生物可分为哪几类？这样的分类在废水生物处理中有何重要意义？

5. 微生物活动所需的能量是怎样获得的？

6. 试扼要讨论细菌与温度和氢离子浓度的关系。为什么常以4℃左右的温度作为保存菌种的适宜温度？

7. 细菌有机质的主要元素分析结果如下：

C	50.98%（干重）
H	6.2%（干重）
O	30.52%（干重）
N	12.3%（干重）

试计算细菌的化学组成实验式（微生物的化学组成实验式并不是它的分子式，而仅说明组成有机体的各种主要元素的比例关系）。

第三章　细菌的生长和遗传变异

第一节　细菌的生长及其特性

细菌吸收营养物质以后，在酶的催化下进行各种新陈代射反应，如果同化作用大于异化作用，则细胞质的量不断增加，表现在细胞自身就是体积或重量的不断增加。这种现象叫生长。生长到一定阶段，细菌以二分裂的方式形成二个子细胞，这就是繁殖，其特征是细菌个体数增加。细菌的生长繁殖很快，适宜的环境下每隔 20～30min 分裂一次。

细菌有没有年轻、年老之分呢？回答是肯定的，但是细菌的所谓菌龄和人的老年、中年、幼年的概念不同。人是按出生之时算起，年纪越小越年轻，越大就越老，细菌则不然。细菌是以分裂法进行繁殖的，一般繁殖一代的时间，只要 20～30min，而且在一大群细菌中也无法区分每个细菌的年老年轻。因此细菌的所谓年龄是指一群细菌在一定的环境条件下生长而表现出来的特征。换句话说，描述细菌的生长往往用群体繁殖和生长所表现出来的特征来代表。在介绍细菌的生长特性之前，先介绍细菌的生长测定方法。

一、细菌生长测定方法

（一）直接测定

直接测定是常用的细菌生长测定方法，其特点是测定过程快速，但不能区分细菌的死活。根据不同的测定方法原理，可以分成以下几类：

1. 显微镜直接计数法　显微镜直接计数法又称全数法。它又分成下述几种：

（1）涂片染色法　将已知体积的待测样品，均匀地涂布在载玻片的已知面积内，经固定染色后计数菌数。一般藉助目测微尺的直径标准来计算细菌的数量。

（2）计数器测定法　采用特殊的细菌或血球计数器进行测定。操作过程是取一定体积的待测细菌样品放于计数器的测定小室与载玻片之间，由于测定小室的体积是已知的，因此根据得到的计数值就可以计算出细菌含量。

（3）比例计数法　将待测样品溶液与等体积的血液混合，然后涂片，在显微镜下测定细菌与红血球数的比例，因血液中的红血球数已知（男性 400～500 万个/mL，女性 350～450 万个/mL），由此可以测得细菌数量。

2. 比浊计数法　这是测定悬浮细胞的快速方法。其原理是细菌细胞是不透光的，光束通过悬浮液时会引起光的散射或吸收，降低透光度，在一定范围内透光度与溶液的混浊度即细胞浓度成正比，藉此可以测定细菌浓度。采用这种方法时，为了得到实际的细胞绝对含量，通常须将已知细胞浓度的样品按上述测定程序制成标准曲线，然后根据透光度或光密度值从标准曲线中直接查得细菌含量。

（二）间接计数法

间接计数法又称活菌计数法。它是通过测定样品中活的细菌数量来间接地表示细菌的含量。因此，这种方法不含死的细菌细胞，而且测定所需的时间也较长。它分下述几种方

法：

1. 平板计数法　将待测细菌样品先作 10 倍梯度稀释，然后取相应稀释度的样品涂布到平板中，或与未经融化的固体培养基混合、摇匀，培养一定时间后观察并计数生长的细菌数，最终根据细菌数和取样量计算出细菌浓度。一般计数平板的细菌生长菌落数以 30～300 个为宜。菌落数太多，计数时费时费力；菌落数太少，则计数结果误差太大。平板计数法是采用最广的一种活菌计数法。

2. 液体计数法　液体计数法是根据统计学原理设计的一种方法。具体做法是：先将待测细菌样品作 10 倍梯度稀释，然后取相应稀释度的样品分别接种到 3 管或 5 管一组的数组液体培养基中，培养一定时间后，观察各管及各组中细菌是否生长，记录结果，再查已专门处理好的最可能数（most probable number，MPN）表，得出细菌的最终含量。因此，这种方法又叫最可能数法或 MPN 法。

3. 薄膜计数法　对于某些细菌含量较低的测定样品（如空气或饮用水），可采用薄膜计数法。将待测样品通过带有许多小孔但又不让细菌流出的微孔滤膜，藉助膜的作用将细菌截留和浓缩，再将膜放于固体培养基表面培养，然后类似平板计数那样计算结果。这种方法的要求是样品中不得含有过多的悬浮性固体或小颗粒。

上述各种活菌计数法中，除了已所述的特点以外，还有一个共同的要求，即测定的样品中细菌必须呈均匀分散的悬浮状态。对于本身为絮体或颗粒状的细菌样品，如好氧生物处理中的活性污泥，在测定计数之前要采取预处理方法（如匀浆器捣碎等）进行强化分散。

（三）重量法

细菌细胞尽管很微小，但是仍然具有一定的体积和重量，因此藉助群体生长后的细胞重量，可以采用测定重量的方法直接来表示细菌生长的多少或快慢。

1. 测定细胞干重　可采用离心法或过滤法测定。取经过培养一段时间的待测细菌样品，用离心机收集生长后的细菌细胞，或用滤纸、滤膜过滤截取生长后的细菌细胞，然后在 105～110℃下进行干燥，称取干燥后的重量，以此代表细菌生长量的多少。一般，从细菌细胞的化学组分可知，干重约为湿重的 10%～20%。原核细菌的细胞重量是 10^{-13}～10^{-11} g/细胞，真核单细胞微生物重量为 10^{-11}～10^{-7}g/细胞。

水处理中构筑物内细菌生长量通常采用这种细胞干重测定法。在活性污泥法中采用的指标是混合液悬浮固体（MLSS）。具体做法是：取一定体积的待测污泥样品，放于蒸发皿中干燥，然后称重。但是这种方法有个缺陷，即混合液中含有的无机悬浮物或颗粒也包含在测定的重量之中，可是这些重量并不能真正反映细菌的实际生长情况。因此，为了更确切地得到细菌生长量的结果，必须采用另外一个指标——挥发性悬浮固体（MLVSS）。其测定过程是：将已测得干重（W_0）的污泥样品，放于马福炉内 550℃下灼烧 2h，在这样的高温下细菌中含有的各种有机物就被分解变成 CO_2 和 H_2O 并蒸发掉。冷却后放入干燥器中保温至恒重并称量（W）。污泥干重 W_0 减去最终重量 W 的差值就是挥发性悬浮固体重量。当然，限于测定方法的精度这仅能约略表示微生物的数量。

2. 细胞含氮量　细菌细胞蛋白质中氮的含量比较稳定，一般在 15%～17%，平均为 16%。根据氮含量的测定结果，反过来可以求出细菌生长量的多少。

3. DNA 含量　不同的细菌细胞其含有的 DNA 含量是不同的，但同一种细菌所含有的 DNA 含量却是基本一致。利用这一特性，可以通过测定 DNA 的含量来表示细菌的生长量。

这后二种方法在细菌的生理生化研究种应用较多。

（四）其它生理生化指标法

细菌的生长生命活动过程中，不可避免地要吸收和消耗一些物质，同时产生和分泌另一些物质。测定这些物质的变化就可以间接地来表示细菌生长的情况。水处理中通常采用的生理生化指标有：营养物质（COD）的消耗，溶解氧的消耗（如好氧细菌的瓦呼仪测定法），有机酸的产生，H_2 和 CH_4 的产生（如厌氧细菌的生长及活性测定）。

二、细菌生长特性

1. 间歇培养和生长曲线　将少量细菌接种于一定量的液体培养基内，在适宜的温度下培养，并定时取样测定活细菌数目或重量的变化，这就是间歇培养。如以活细菌个数或细菌重量为纵坐标，培养时间为横坐标，即可画得一曲线，此曲线称为细菌的生长曲线。一般说，细菌重量的变化比个数的变化更能在本质上反映出生长的过程，因为细菌个数的变化只反映了细菌分裂的数目，而重量则包括细菌个数的增加和每个菌体的增长。图 3-1 就是按细菌重量绘制的生长曲线。整个曲线可分为 3 个阶段（或 3 个时期）：生长率上升阶段（对数生长阶段），生长率下降阶段及内源呼吸阶段。在生长率上升阶段初期，细菌是在适应新的环境，一般不进行分裂，故菌数不增加，但菌体则在逐渐增大，以后很快例进入迅速繁殖的阶段。在上升阶段，食料（营养物）的供应超过细菌的需要，细菌的生长不受食料数量的影响，只受自身生理机能的限制。到这一阶段的后期，生长率达到最高，这时它们分解培养基中有机物的速率也最高。科学试验说明，在这一阶段中细菌数目的对数同培养的时间呈直线关系，所以又称对数生长阶段。经过一定时间后，由于食料的减少（食料逐渐被细菌吸收掉）和对细菌有毒的代谢产物的积累，环境逐渐不利于细菌的生长，因而进入生长率下降阶段。此时的细菌生长率主要已不是受自身生理机能的限制，而是食料不足起着抑制细菌生长的主导作用了。在内源代谢阶段，培养基中的食料已经很少，菌体内的贮藏物质，甚至体内的酶都被当作营养物质来利用，也就是说，细菌这时所合成的新细胞质已不足以补充因内源呼吸（即菌体内贮藏物质、酶等一部分细胞物质的氧化）而耗去的细胞质，因此细菌重量逐渐减少。所以在这一阶段细菌重量的减少一方面是由于细菌的死亡，另一方面是由于内源呼吸。

在以上 3 个阶段中，处于第一阶段的细菌可说是细菌的年轻阶段，到第三个阶段是细菌的衰老阶段。在年轻阶段时整个群体都是年轻的，到了衰老阶段尽管也有新分裂的细菌，但仍然属于衰老的。

图 3-2 是按细菌数目的对数绘制的生长曲线图。曲线可分为缓慢期、对数期、稳定期和

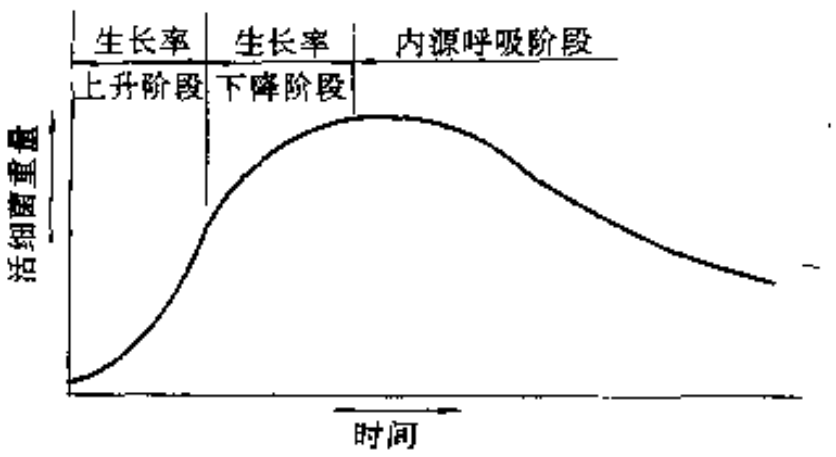


图 3-1　细菌生长曲线（按活细菌重量绘制）

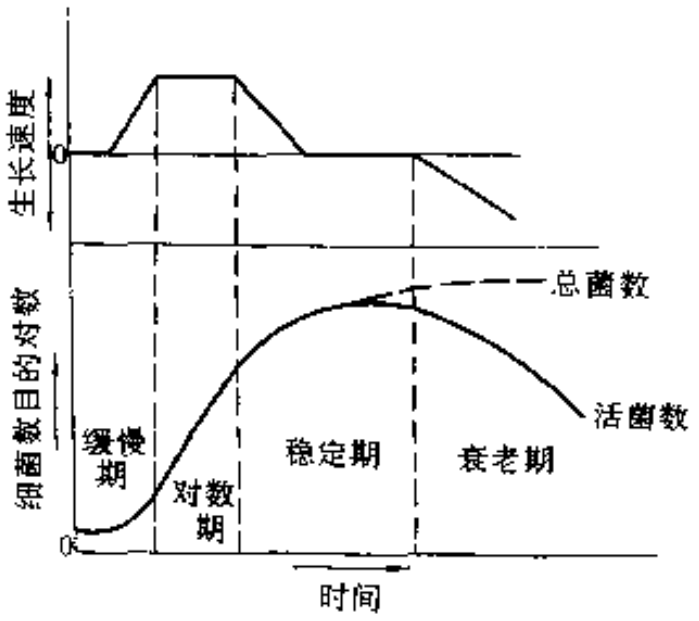


图 3-2　细菌生长曲线（按细菌数目的对数绘制）

衰老期四个阶段。在开始一段细菌并不繁殖，数目不增加，但细胞生理活性很活跃，菌体体积增长很快，而在其后期只有个别菌体繁殖，故称这阶段为缓慢期。经过一段缓慢期后，细菌分裂速度迅速增加，进入对数期。在稳定期中，菌体生长繁殖速度逐渐下降，同时菌体死亡数目逐渐上升，最后达到新增殖的细菌数与死亡数基本相等。稳定期的活菌数保持相对平衡并处于最大值。稳定期的出现是由于食料的减少和有毒代谢产物的积累。在衰老期，细菌死亡速度大大增加，超过其繁殖速度，只有少数菌体进行繁殖，细菌进行内源呼吸，所以活细菌曲线显著下降。

在对数期，微生物的增长过程一般可用下式表示：

$$\frac{dX}{dt} = K_1 X \tag{3-1}$$

式中 X—— 某一时间 t 时微生物的重量或浓度；

K_1—— 微生物增长率。

积分，得：

$$\ln \frac{X}{X_0} = K_1 t \tag{3-2}$$

式中 X_0——微生物的起始重量或浓度。

对于废水生物处理中的活性污泥来说，微生物的重量或浓度可以粗略地用挥发性污泥的重量或浓度来表示，而 K_1 则表示挥发性污泥的增长率（在实际工作中也可用污泥总量代表挥发性污泥）。

在对数期，对于纯培养的细菌来说有一个很重要的概念——世代时间，或称倍增时间。它指的是细菌繁殖一代即个体数目增加一倍的时间。对数期的细菌细胞代谢活性最强，组成新细胞物质最快，细菌数目呈几何级数增加，代时稳定。因此世代时间的测定必须以对数期的生长细胞作为最佳和最快生长的对象。其测定计算如下：

设时间 t_0 时细菌浓度为 X_0，到时间 t 时细菌浓度为 X，其间细菌共繁殖分裂了 n 代，则：

$$X = X_0 \cdot 2^n \tag{3-3}$$

$$n = \frac{\lg X \quad \lg X_0}{\lg 2} = 3.3 \lg \frac{X}{X_0} \tag{3-4}$$

$$G = \frac{t - t_0}{n} \tag{3-5}$$

式中 G—— 世代时间。

细菌的浓度 X_0、X 可通过生长测定方法得到，时间 t_0、t 是确定的，这样就可以测定计算得出细菌的世代时间。

一般来说，细菌生长繁殖极快。多数种 20～30min 繁殖一代，最快的世代时间仅 9.8min，有的则长达几十小时。好氧细菌比厌氧细菌的世代时间短，单细胞比多细胞微生物的世代时间短，原核比真核微生物的世代时间短。同一种细菌。世代时间受培养基组成和培养条件的影响，如培养温度、pH、营养物浓度和性质等等。但是，在一定条件下，各

种细菌的世代时间是一定的。

在生长率下降阶段，食料或有机物浓度较低，其量已大大影响微生物的生活。科学实验表明，有机物的去除率与存在的有机物浓度成正比：

$$-\frac{dS}{dt}=K_2S \tag{3-6}$$

式中 S——某一时间 t 时的有机物（基质）浓度；

K_2——常数。

积分，得：

$$\ln\frac{S}{S_0}=-K_2t \tag{3-7}$$

式中 S_0——有机物的起始浓度。

在内源代谢阶段，微生物的增长过程则可用下式表示：

$$\frac{dX}{dt}=K_3X \tag{3-8}$$

式中 X——某一时间 t 时微生物的重量或浓度；

K_3——微生物自身氧化速度常数。

积分，得：

$$\ln\frac{X}{X_0}=-K_3t \tag{3-9}$$

式中 X_0——微生物的起始重量或浓度。

缓慢期的出现是为了调整代谢。当细胞接种到新的环境后，需要重新合成必需的酶、辅酶或某些中间代谢产物以适应新的环境。在水处理中为了避免缓慢期的出现，可考虑采用处于对数生长期或代谢速率旺盛的污泥进行接种。另外增加接种量及采用同类型反应器的污泥接种也可达到缩短缓慢期的效果。

在废水生物处理过程中，如果维持微生物在生长率上升阶段（对数期）生长，则此时微生物繁殖很快，活力很强，处理废水的能力必然较高；但必须看到，此时的处理效果并不一定最好，因为微生物活力强大就不易凝聚和沉淀，并且要使微生物生长在对数期，则需有充分的食料，就是说，废水中的有机物必须有较高的浓度，在这种情形下，相对地说，处理过的废水所含有机物浓度就要比较高些，所以利用此阶段进行废水的生物处理实际上难于得到较好的出水。稳定期的细菌生长速率下降，细胞内开始积累贮藏物和异染颗粒、肝糖等，芽孢细菌也在此阶段形成芽孢，若产生抗生素的放线菌也在此时期大量形成。处于稳定期的污泥代谢活性和絮凝沉降性能均较好，传统活性污泥法普遍运行在这一范围。衰老期阶段只出现在某些特殊的水处理场合，如延时曝气及污泥消化。图 3-3 示微生物的代谢速率与食料和微生物重量或浓度之比（食料/微生物）的关系。在活性污泥法的推流式曝气池进口附近，食料与微生物之比一般总是比较高的，但随着水流向出口处流动，此

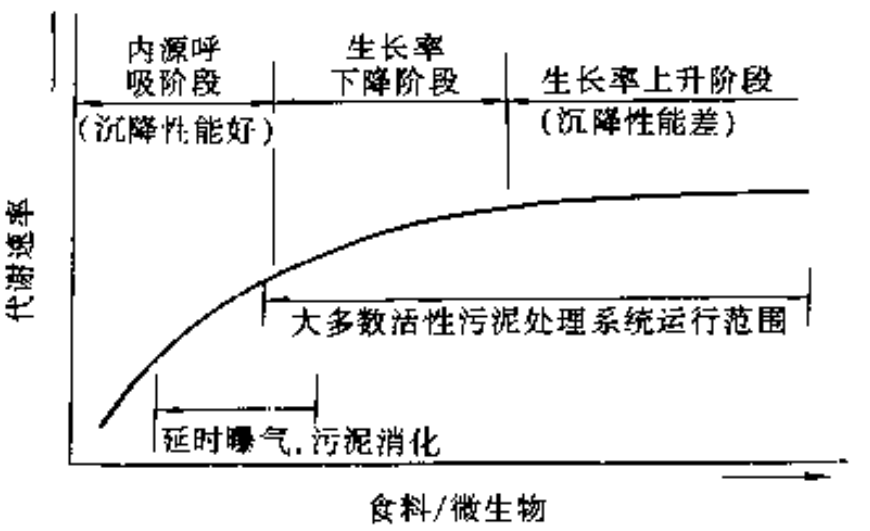


图 3-3 微生物代谢速率与食料/微生物的关系

值将逐渐减小。

上面所讨论的都是指纯种培养而言的，而且接种的细菌是不习惯于新环境的。废水中微生物的种类繁多，生长情况也复杂得多，但总的说来，生长曲线的形态基本上是相似的，因为存在着优势细菌种群。应予特别指出的是，上述这些讨论都是针对细菌的间歇培养。在实际水处理中，反应器的运行多为连续进料方式，两者存在着很大的不同，细菌生长特性的表现也有很大差异。但是，间歇培养的许多概念仍有借鉴意义，例如各生长时期细菌的生长特征及其在水处理中的应用，详见上述。

2. 连续培养　连续培养与间歇培养不同，它的特点是一方面连续进料，另一方面又连续出料的培养方式。它又分为两种：恒浊连续培养和恒化连续培养。

（1）恒浊连续培养　培养基提供足够量的营养元素，细菌保持最大速率生长。通过控制进料流速使装置内细菌浊度保持一定，保持理论上的对数生长期，可获得大量菌体或与菌体代谢相平衡的代谢产物。这种方式往往用于细菌的生理生化研究。

（2）恒化连续培养　这种方式与水处理装置的运行方式比较相似。固定恒定的进料流速，又以同样的速率排出，进水组分及反应器中营养物浓度基本不变。这种方式往往有一种限制性营养生长因子控制生长。实际情况也确实如此。

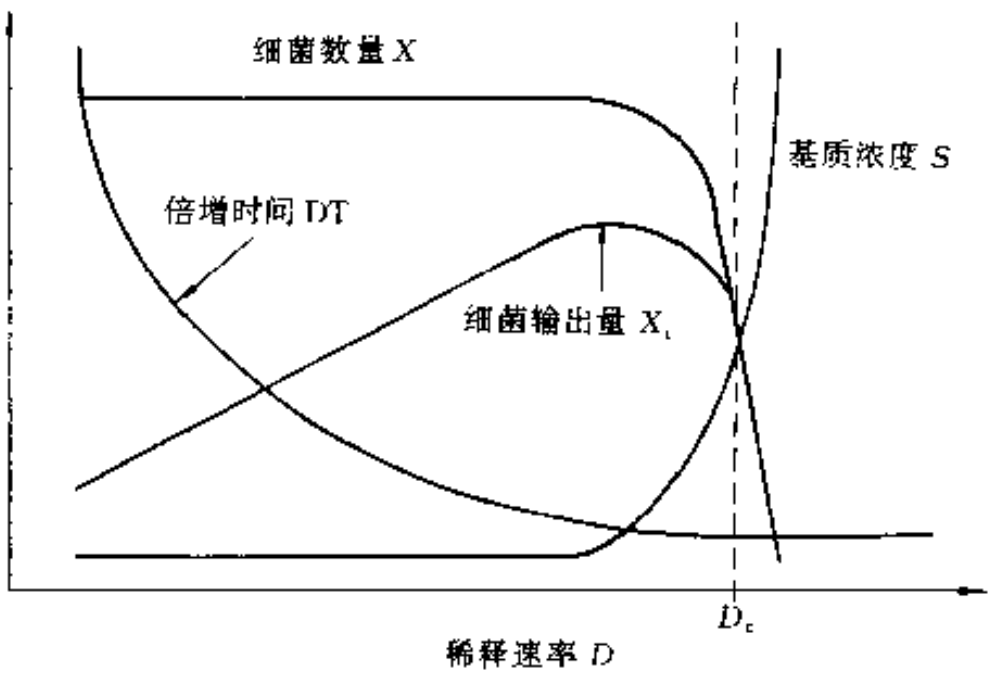


图 3-4　恒化连续培养中细菌的生长特性曲线

恒化连续培养装置中描述与控制细菌生长的最重要参数是稀释速率 D，其含义如下：

$$\text{稀释速率 } D = \frac{F}{V}$$

式中　F——进料流速；

V——培养装置体积。

稀释速率 D 与停留时间（retention time，RT）互为倒数，后者指一定流量的进料在反应器中的滞留时间。运行控制中 D 的大小须与细菌的生长相联系，即与细菌的倍增时间（double time，DT）有关。为了保证细菌在反应器内能很好生长，稀释速率 D 必须小于倍增时间 DT，也就是说停留时间 RT 必须大于倍增时间 DT，这样细菌才能滞留在反应器内，细菌越来越多。反之，稀释速率大于 DT，细菌就会被冲出（wash-out）反应器，细菌越来越少。因此，D 等于 DT 时的数值特称为临界稀释速率（D_c）。D，D_c，DT 及基质浓度 S 等之间的关系曲线详见图 3-4。

第二节　细菌的遗传与变异

细菌同其它生物一样，有其固有的遗传性。所谓细菌的遗传性是指每种细菌所具备的亲代性状在子代重现，使其子代的性状与亲代基本上一致的现象。例如，大肠杆菌是短杆菌，生活条件要求 pH 为 7.2，温度 37 C，在糖类物质存在的条件下产酸、产气。大肠杆菌的亲代将这些特性传给子代，这就是大肠杆菌的遗传性。一旦大肠杆菌的营养和其它外界

条件剧烈变化，它就会因不适应而受抑制或死亡。在工业废水的生物处理中应特别注意这种情况，例如，进水的 pH 值必须控制在适当范围内，否则将影响处理效果。细菌遗传是在系统发育过程中形成的。系统发育愈久的细菌，其遗传的保守程度就愈大，愈不容易受外界环境条件的影响。不同种的细菌遗传保守程度不同，菌龄不同的同种细菌遗传保守程度也不同。一般地，老龄菌遗传保守程度比幼龄菌大，高等生物遗传保守程度比低等生物大。

任何一种生物的亲代和子代以及个体之间，在形态结构和生理机能方面都有所差异，这一现象叫做变异。由于细菌繁殖迅速，体积小，与外界环境联系密切，所以环境条件在短时期内能对菌体产生多次影响，细菌受到物理、化学因素影响后，就会较容易地在机体内产生适应新环境的酶（叫诱导酶），从而改变原有的特性，即产生了变异。

遗传与变异是生物最基本的属性，两者相辅相成，相互依存，遗传中有变异，变异中有遗传，遗传是相对的，变异是绝对的，有些变异了的形态或性状，又会以相对稳定的形式遗传下去，但是并非一切变异都具有遗传性。细菌的遗传变异性是比较普遍的，常见的变异现象有个体形态的变异、菌落形态（光滑型、粗糙型）的变异、毒力的变异、生理生化特性的变异及代谢产物的变异等等。

定向培育即通过有计划、有目的地控制微生物生长条件，使微生物遗传性向人类需要的方向发展。在水的生物处理中，这种定向培育过程称为驯化。在工业废水生物处理中，常利用微生物对营养要求，温度，pH 值以及耐毒能力的变异，改善处理方法。例如，在含酚废水的生物处理过程中，可以通过逐渐提高进水的含酚量，增强细菌氧化酚的能力，则可在一定程度上提高进水浓度，而不影响或维持满意的处理效果。另外利用生活污水活性污泥接种，加速培养工业废水活性污泥的方法，也利用了细菌的变异特性。

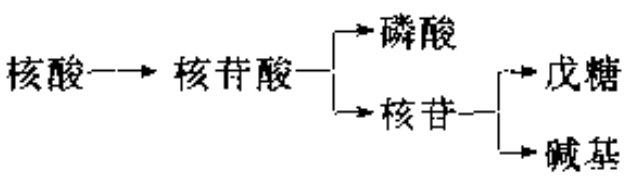
一、细菌的遗传

（一）细菌遗传的物质基础

遗传学的研究表明，一切生物遗传变异的物质基础是核酸。含有 DNA 的微生物中遗传物质是 DNA。不含有 DNA，只含有 RNA（核糖核酸）的微生物中，遗传物质是 RNA。

（二）核酸的结构

核酸是一种多聚核苷酸（polynucleotide），水解过程如下：



核苷的戊糖和碱基的差异又分为 DNA 及 RNA，如表 3-1。

DNA 和 RNA 组成成分比较 表 3-1

组　分	DNA（脱氧核糖核酸）	RNA（核糖核酸）
磷　酸	H_3PO_4	H_3PO_4
戊　糖	D-2-脱氧核糖	D-核糖
碱　基	腺嘌呤（Adenine，简称 A）	腺嘌呤（A）
	鸟嘌呤（Guanine，简称 G）	鸟嘧啶（G）
	胞嘧啶（Cytosine，简称 C）	胞嘧啶（C）
	胸腺嘧啶（Thymine，简称 T）	尿嘧啶（Uracil，简称 U）

1. DNA 的双螺旋结构　1953 年华生（Watson）和克里克（Crick）通过 X 射线衍射法观察 DNA 结构，提出了 DNA 双螺旋结构模型：

（1）两条走向相反的多核苷酸链，以右手方向沿同一轴心平行盘绕成双螺旋，螺旋直径为 2nm。如图 3-5。

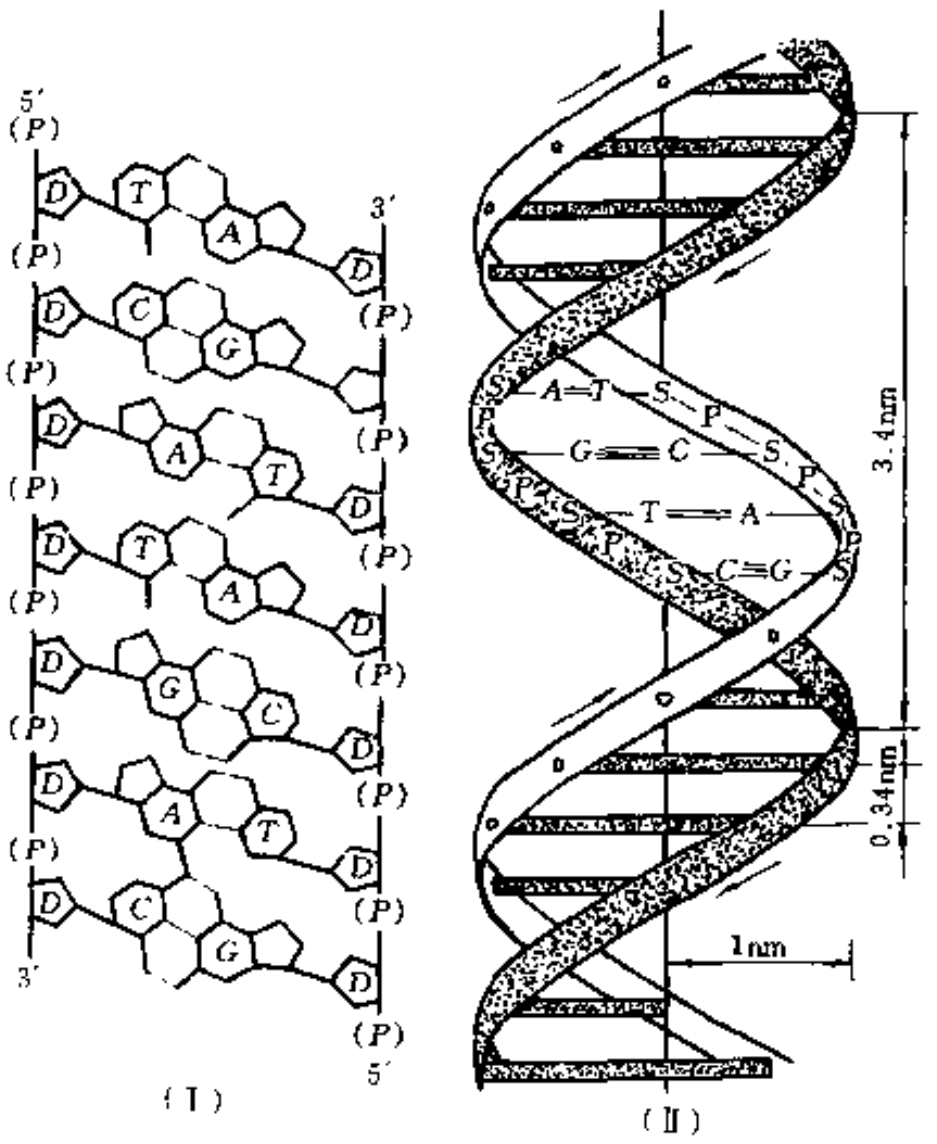


图 3-5　DNA 的二维结构

（Ⅰ）由两条多核苷酸链组成的分子，各向相反的方向极化，由弱的氢键把成对的互补碱基结合在一起（以点线代表）。*D*—脱氧核糖；*A*—腺嘌呤；*T*—胸腺嘧啶；*P*—磷酸；*G*—鸟嘌呤；*C*—胞嘧啶

（Ⅰ）DNA 双螺旋结构。一对条带代表糖-磷酸链

（2）两条链间借碱基对的氢键相连。*A* 与 *T* 之间有 2 个氢键，*G* 与 *C* 之间有 3 个氢键（RNA 链中 *A* 与 *U* 之间为 2 个氢键，*G* 与 *C* 之间为 3 个氢键）。这种碱基相配的关系称为碱基互补或碱基配对。

（3）一个 DNA 分子可含几十万或几百万个碱基对，两个相邻的碱基对之间的距离为 0.34nm，每个螺旋的距离为 3.4nm。

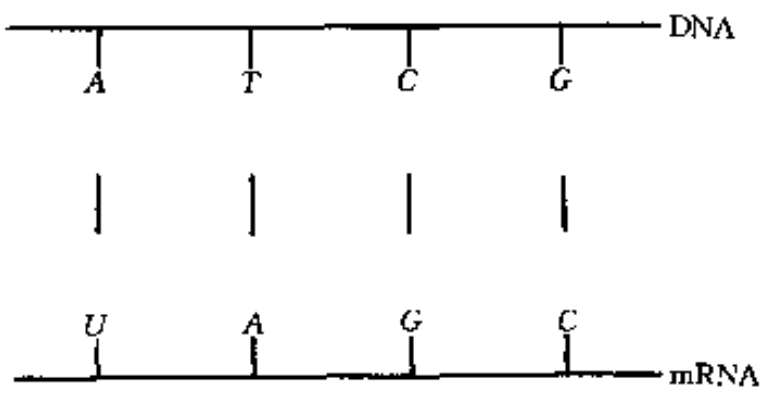


图 3-6　DNA 和 RNA 间遗传信息的转录

2. RNA 在细胞里的三种类型

（1）信使 RNA（mRNA）　它是以 DNA 的一条单链为模板，在 RNA 聚合酶的催化下，按碱基互补原则合成的（见图 3-6）。由于传达了 DNA 的遗传信息，故称信使 RNA。

（2）转移 RNA（tRNA）　它存在于细胞质里，在蛋白质合成过程中起转移氨基酸

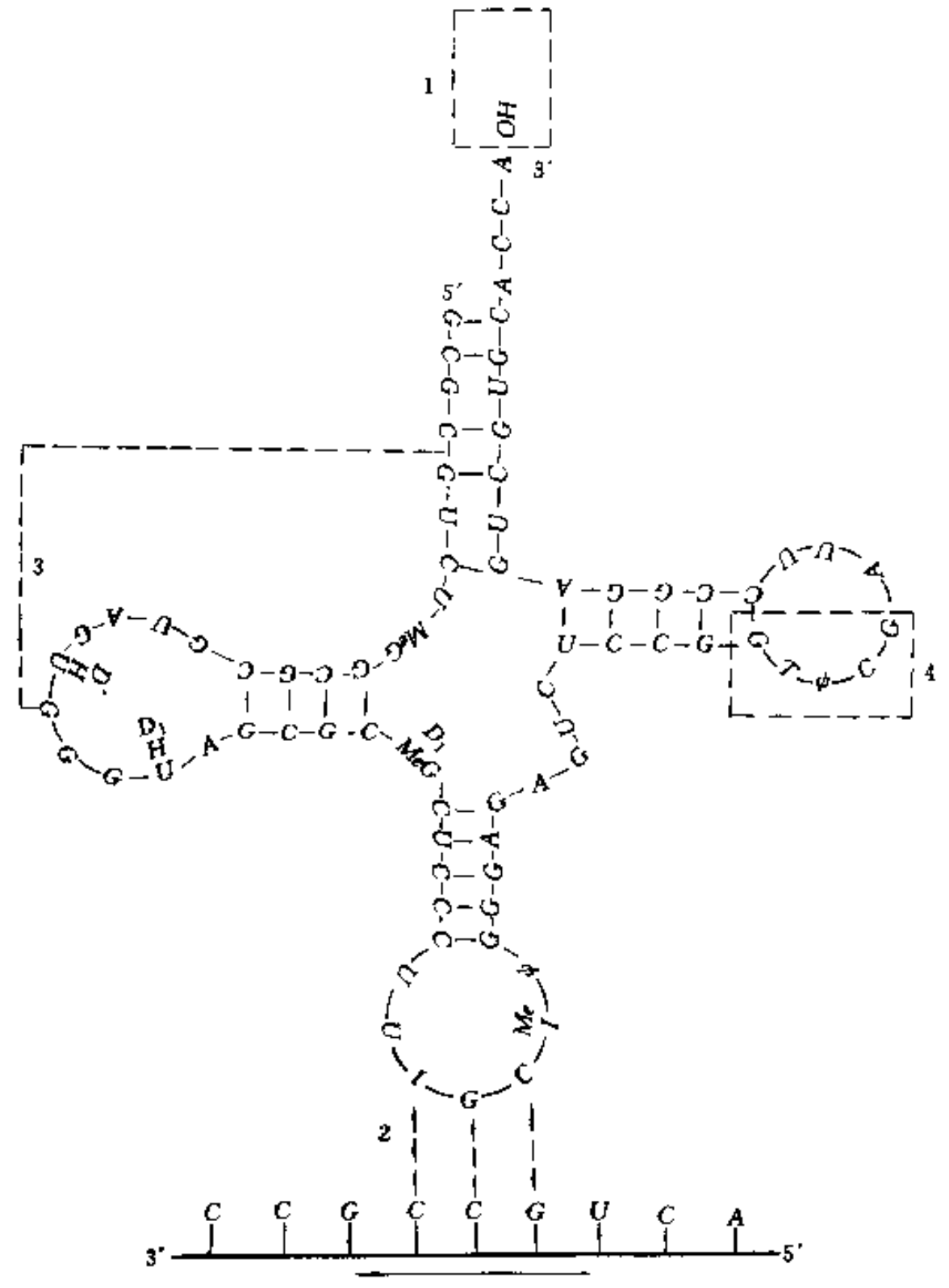


图 3-7　大肠杆菌丙氨酸 tRNA 图解（三叶草平面结构）

1—氨基酸环；2—反密码环；3—双氢尿嘧啶环；4　*TΨC* 环

的作用（图 3-7 和图 3-8）。

（3）核糖体 RNA　它的主要成分是核糖体核酸（rRNA）和蛋白质。一个核糖体包含有大小两个亚基，它是蛋白质合成的主要场所。

（三）DNA 的复制

DNA 的复制过程包括解旋和复制。首先 DNA 双螺旋分子在解旋酶的作用下，两条多核苷酸链的碱基对之间的氢键断裂，分离成两条单链，然后各自以原有的多核苷酸链，按照碱基排列顺序，合成一条互补的新链，复制后的 DNA 双链，由一条新链和一条旧链构成。新链的碱基与旧链的碱基以氢键相连接成新的双螺旋结构，称为半保留复制，整个复制过程是边解旋边复制的，如图 3-9。

（四）微生物中的 DNA

1. 原核微生物中的 DNA　原核微生物中的 DNA 不与蛋白质结合，也没有核膜，而是以单独裸露状态存在，通常也称染色体，绝大多数微生物的 DNA 是双链的（有的呈环状，

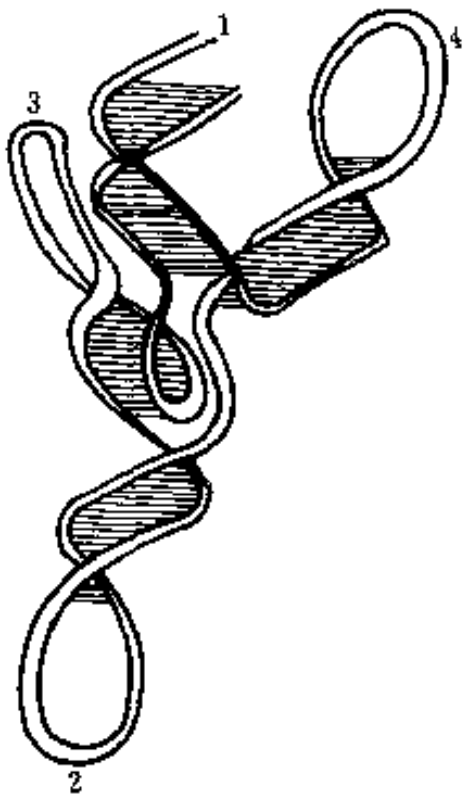


图 3-8　tRNA 的空间结构
（倒 L 型图式）
1—氨基酸环；2—反密码环；
3、4—三叶草旁边的二叶

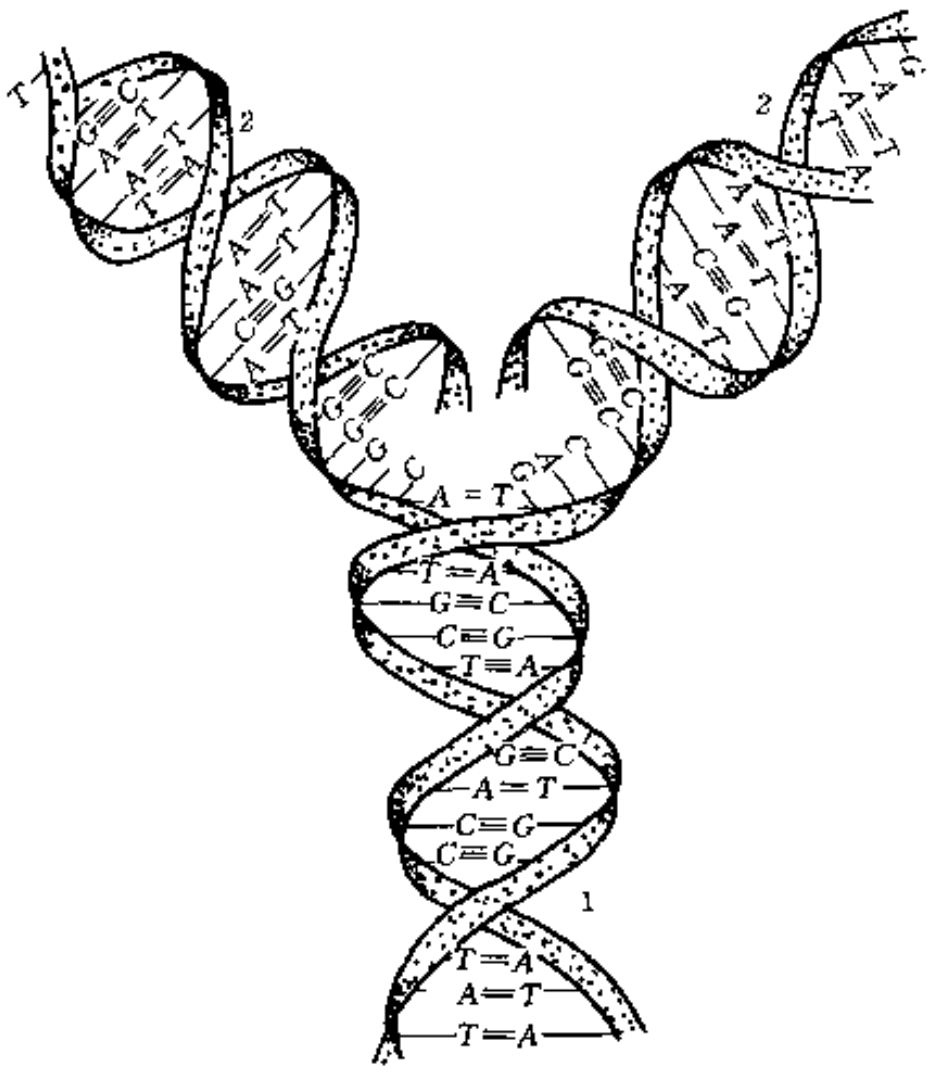


图 3-9　DNA 半保留复制
1—为旧链；2—为一条旧链与各自合成出的
一条新链组成新的双螺旋结构

有的呈线状），只有少数微生物的 DNA 是单链的。细菌的 DNA 拉直时比细胞长许多倍，如大肠杆菌的长度为 2μm，其 DNA 长度为 1100μm 至 1400μm，它在细胞中央，高度折叠形成具有空间结构的一个核区。由于含有磷酸根，而带有很高的负电荷。

此外，还有少量的 DNA（约占细胞中总 DNA1%）存在于细胞质中，称为质粒（plasmid）。

2. 真核微生物中的 DNA　真核微生物的 DNA 与蛋白质结合，主要存在于细胞核的染色体上，在普通显微镜下可看到真核微生物染色体，外面包有核膜，构成真正的细胞核，真核微生物细胞核中 DNA 的量大于原核微生物核区中 DNA 的量，DNA 也存在于真核微生物的叶绿体、线粒体等细胞器中，但是量很少，一般不超过细胞核 DNA 的 1%，并且不与蛋白质相结合。

DNA 几乎全部集中在染色体上，每种生物的染色体数目是一定的，如细菌只有一个环状染色体。染色体上含有大量不同的基因，基因数目为几个到几百甚至几千个不等，染色体是遗传信息主要贮藏场所。除染色体外另有一类较小环状 DNA 分子独立存在于染色体外，也携带少数基因，这就是质粒，在细胞分裂中也能进行复制，传给后代，并表现一定的遗传特性。质粒一般只存在于细菌。质粒存在与否不影响微生物细胞的生存，只有当宿主细胞表现某种特性时才能被检出。丧失质粒仅丧失由其决定的某些特性。常见的质粒有 *F* 因子，*R* 因子，产细菌素因子及降解质粒等等。有的质粒能通过细胞和细胞的接触而转移，使受体细胞获得该质粒决定的遗传性状。最近发现某些酵母菌也有质粒。

（五）遗传信息的传递和表达

生物体的遗传信息大多都贮存在 DNA 上，只有少数病毒的遗传信息贮存在 RNA 上。遗传信息的传递和表达可概括为 3 个步骤，以 DNA 为例说明如下：

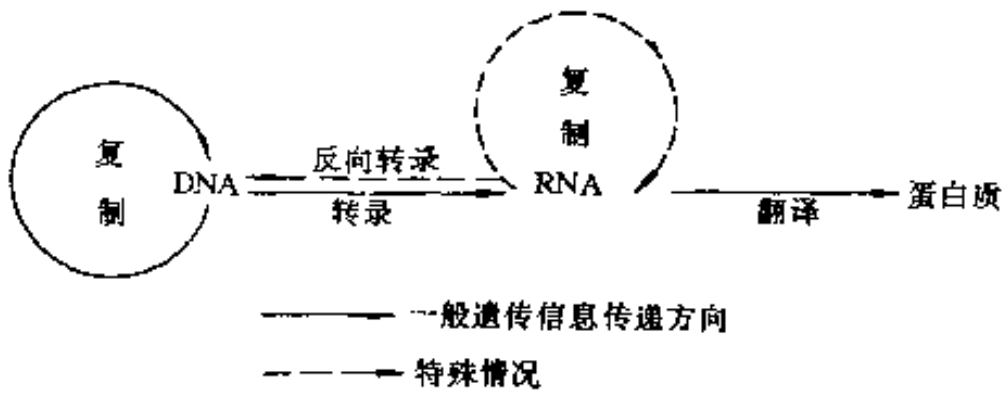


图 3-10　遗传信息传递和表达

1. 将携带遗传信息的 DNA 复制；2. 将 DNA 携带的遗传信息转录到 RNA 上；3. 将 RNA 获得的信息翻译成蛋白质。这 3 个步骤在分子遗传学中称为中心法则。一些致癌的 RNA 病毒，侵入宿主后，在一种逆转录酶的作用下，以 RNA 为模板合成 DNA。DNA、RNA 和蛋白质的关系非常复杂，比较完善的中心法则如图 3 10 所示。

DNA 贮存的信息通过碱基排列的序列传给后代，以 DNA 一条链为模板以碱基互补原则合成 mRNA 的过程称为转录，转录必须忠实无误。mRNA 包括四种碱基 A、G、C、U，而蛋白质中含有 20 种氨基酸，根据实验证明 3 个碱基序列决定一个氨基酸的遗传密码，共有 64 个密码，编码字典见表 3-2。其中 61 个密码分别代表 20 种氨基酸。每一种氨基酸，有 1 个到 6 个密码不等，另外 3 个密码 UAA、UAG、UGA 为肽链终止信号，不代表任何氨基酸。密码 AUG 代表蛋氨酸，也是肽链合成的起动信号。

20 种氨基酸的遗传密码的编码字典　　表 3-2

第一碱基	第二碱基				第三碱基
	U	C	A	G	
U	苯丙氨酸	丝氨酸	酪氨酸	半胱氨酸	U
	苯丙氨酸	丝氨酸	酪氨酸	半胱氨酸	C
	亮氨酸	丝氨酸	O	O	A
	亮氨酸	丝氨酸	O	色氨酸	G
C	亮氨酸	脯氨酸	组氨酸	精氨酸	U
	亮氨酸	脯氨酸	组氨酸	精氨酸	C
	亮氨酸	脯氨酸	谷氨酰胺	精氨酸	A
	亮氨酸	脯氨酸	谷氨酰胺	精氨酸	G
A	异亮氨酸	苏氨酸	天冬酰胺	丝氨酸	U
	异亮氨酸	苏氨酸	天冬酰胺	丝氨酸	C
	异亮氨酸	苏氨酸	赖氨酸	精氨酸	A
	甲硫氨酸[1]	苏氨酸	赖氨酸	精氨酸	G
G	缬氨酸	丙氨酸	天冬氨酸	甘氨酸	U
	缬氨酸	丙氨酸	天冬氨酸	甘氨酸	C
	缬氨酸	丙氨酸	谷氨酸	甘氨酸	A
	缬氨酸[1]	丙氨酸	谷氨酸	甘氨酸	G

① 代表起始信号

mRNA 携带着由 DNA 转录来的遗传信息。这些信息蕴藏在 mRNA 的 3 字密码上，密码的序列决定了蛋白质中氨基酸的序列。在蛋白质合成中，核糖体的小亚基主要识别 mRNA 的起动密码子 *AUG*，并搭到 mRNA 的链上移动，直到遇到 mRNA 的终止信号 *UAA*、*UAG*、*UGA* 时，合成工作终止。

tRNA 按 mRNA 密码的指示，依赖一种强特异性的氨基酰 tRNA 合成酶，将不同的氨基酸活化，活化后的氨基酸被特异的 tRNA 携带，按排列顺序结合到核糖体的大亚基上，缩合成肽链，如图 3-11。蛋白质或者多肽链是各种遗传性状的物质基础。

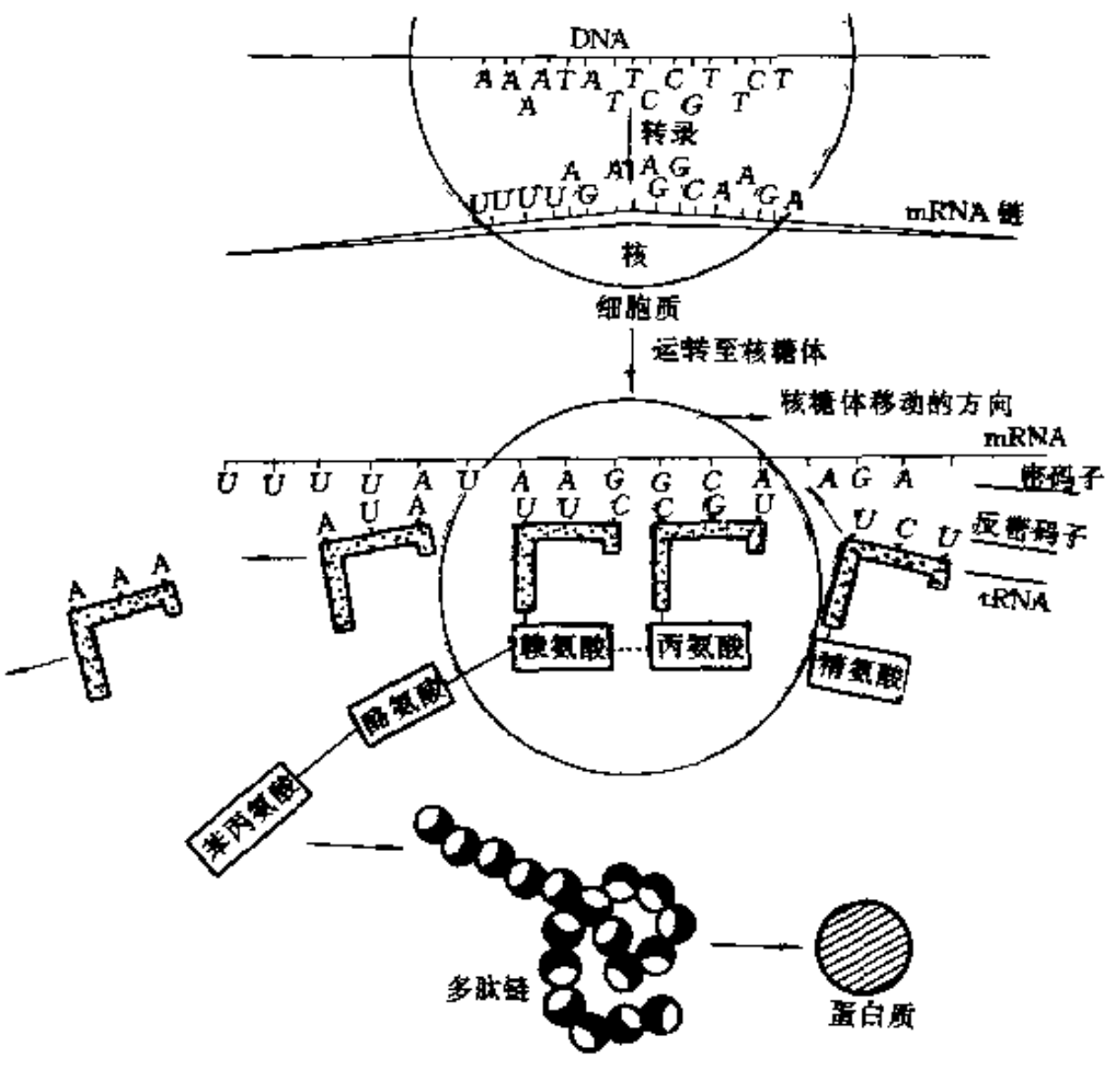


图 3-11　遗传信息的表达和特定蛋白质的合成

（六）基因表达的调控

基因是具有遗传功能的 DNA 分子上的片段，平均含有 1000 个碱基对。一个 DNA 分子中含有许多基因，不同基因分子含碱基对的数量和排列序列不同，并具有自我复制能力。各种基因在染色体上均有其特定的位置称为位点，如果染色体上基因缺失、重复、或在新的位置上和别的基因相邻，改变了原有的排列序列，都会引起某些性状的变异。由于基因的功能差异，又可分为结构基因，调节基因和操纵基因。

结构基因　决定某一种蛋白质分子结构相应的一段 DNA，可将携带的特定遗传信息转录给 mRNA，再以 mRNA 为模板合成特定氨基酸序列的蛋白质。

调节基因　调节基因带有阻遏蛋白，控制结构基因的活性。平时阻遏蛋白与操纵基因结合，结构基因无活性，不能合成酶或蛋白质，当有诱导物与阻遏蛋白结合时，操纵基因负责打开控制结构基因的开关，于是结构基因就能合成相应的酶或蛋白质。

操纵基因　操纵基因 O 位于结构基因的一端，与一系列结构基因合起来形成一个操纵子。

例如大肠杆菌中降解乳糖的酶由 3 个蛋白质 Z、Y 和 A 所组成，受结构基因 z、y 及 a 控制，当培养基中不存在乳糖时，调节基因 I 的阻遏蛋白与操纵基因结合，结构基因就不能表达出来，当培养基中除乳糖外无其它碳源时，乳糖是诱导物，与调节基因 I 的阻遏蛋白结合，使阻遏蛋白丧失与操纵基因结合的能力，此时操纵基因“开动”，结构基因 z、y 和 a 合成蛋白质 Z、Y 和 A，从而形成分解乳糖的酶（如图 3-12 所示），培养基中乳糖就被大肠杆菌分解利用，当乳糖全部被利用后，阻遏蛋白就与操纵基因结合，操纵基因“关闭”，酶的合成停止。遗传性状的表现是在基因控制下个体发育的结果，即从基因到表现型必需通过酶催化的代谢活力来实现，而酶的合成直接受基因控制，一个基因控制一种酶，或者说一种蛋白质的合成控制一个生化步骤，从而控制新陈代谢决定遗传性状的表现。

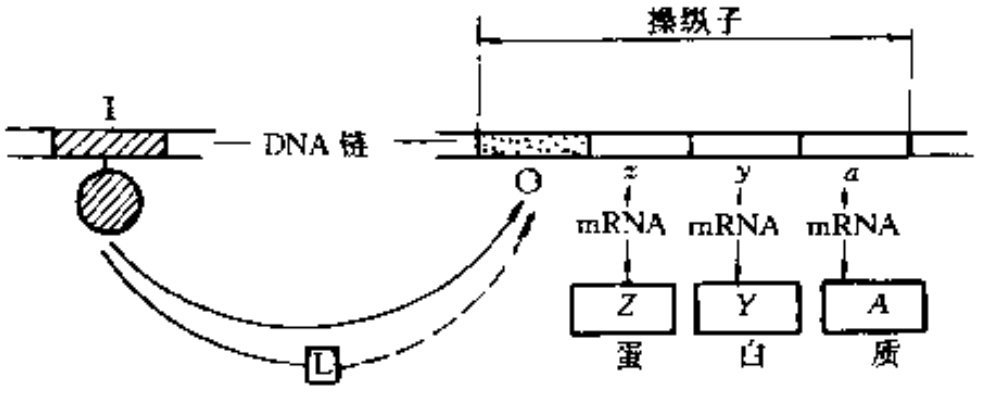


图 3-12　大肠杆菌乳糖操纵子示意

O—操纵基因；z、y、a—结构基因；I—调节基因；L—乳糖

乳糖操纵子的上述调控方式称负控制，也就是说，调节基因的阻遏蛋白的操纵基因结合，它存在时操纵基因关闭，酶合成停止。若与诱导物结合而从操纵基因消失后，则操纵子开启，酶活性得到翻译和表达。据实验测定，大肠杆菌不接触乳糖时，每一细胞中大约有 5 个分子的 β-半乳糖苷酶（结构基因 z），接触诱导物 2～3min 后就能测得酶的大量合成，直到达到每一细胞 5000 个分子。另外，乳糖操纵子还存在着正控制作用，即某种物质的存在使某种细胞功能能够实现，而这一组分的消失或失活使这一功能不能实现。这一现象最初是从葡萄糖和山梨糖共基质培养时发现的。大肠杆菌首先利用葡萄糖作为碳源生长，葡萄糖消耗完后才开始利用山梨糖作为碳源，在这之前出现一个短短的生长停顿时期。这种现象称为二度生长。后来发现，不仅山梨糖这样，凡是必须通过诱导才能利用的糖（包括乳糖）和葡萄糖同时存在时都呈现这种二度生长现象。这种现象又称葡萄糖效应。以后发现实际上是葡萄糖的降解物在起作用，故又称降解阻遏效应。经过研究知道细胞中存在着一种 cAMP 受体蛋白（CAP），cAMP 与 CAP 结合后作用于启动基因 P（位于操纵基因前面），转录才能进行。大肠杆菌细胞中一般含有一定量的 cAMP，在含有葡萄糖的培养液中 cAMP 则大大降低，其机理是葡萄糖的降解物抑制腺苷酸环化酶，或者促进磷酸二酯酶的作用（图 3-13）。乳糖操纵子中 CAP 的正控制和阻遏蛋白的负控制双重调控机制有利于大肠杆菌的生存。这是因为一方面乳糖不存在时没有必要合成分解乳糖的酶；另一方面葡萄糖代谢中的酶都是组成酶，所以葡萄糖和乳糖共存时分解乳糖的酶的诱导合成也就成为多余，这时葡萄糖的降解物对于分解乳糖的相关酶的合成阻遏便成为有利于生存了。

二、细菌的变异

细菌的遗传性状发生变化称为细菌的变异，主要是由基因突变和基因重组造成的（图 3-14）。

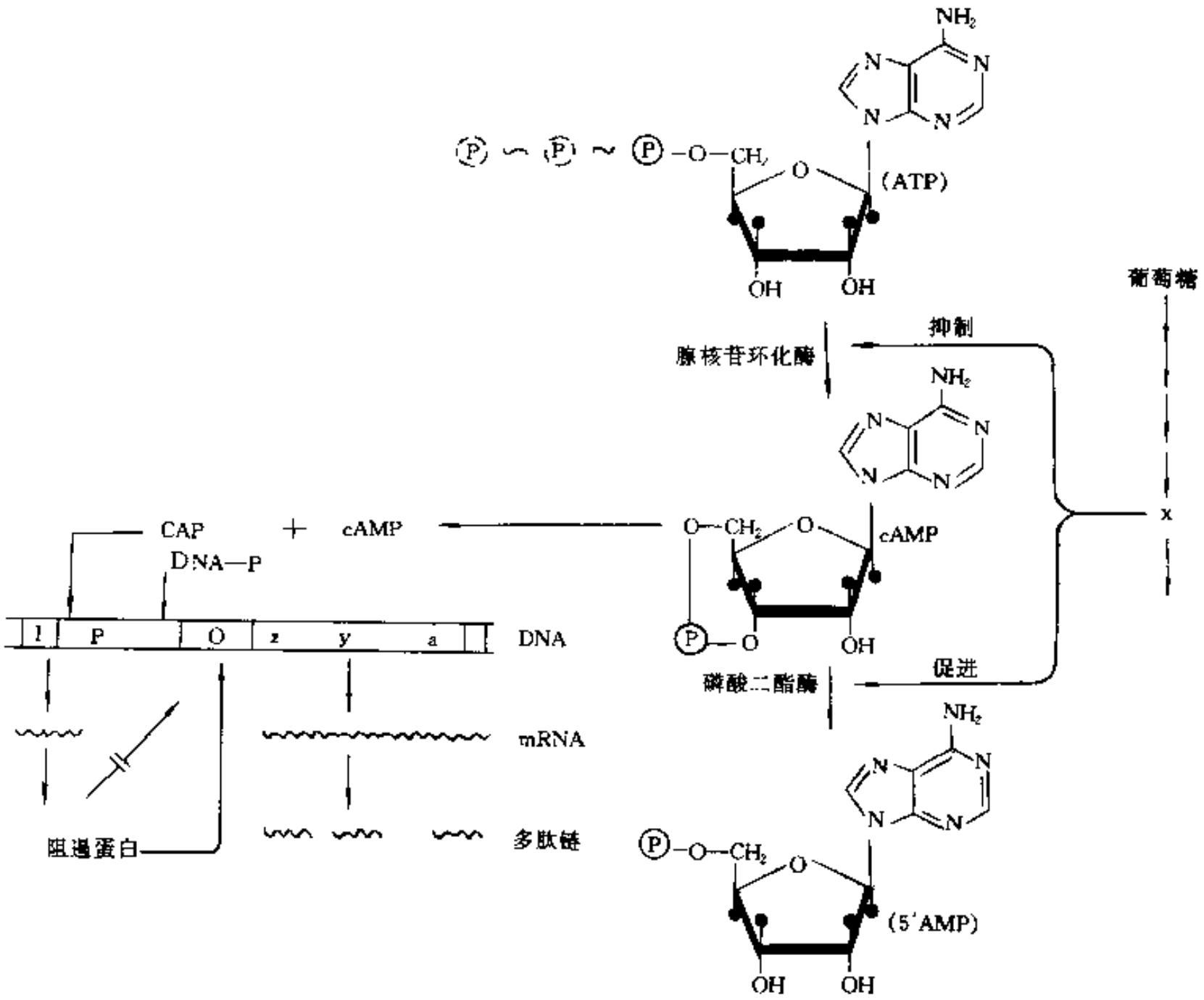


图 3-13　CAP 蛋白、cAMP 和葡萄糖代谢降解物之间的关系

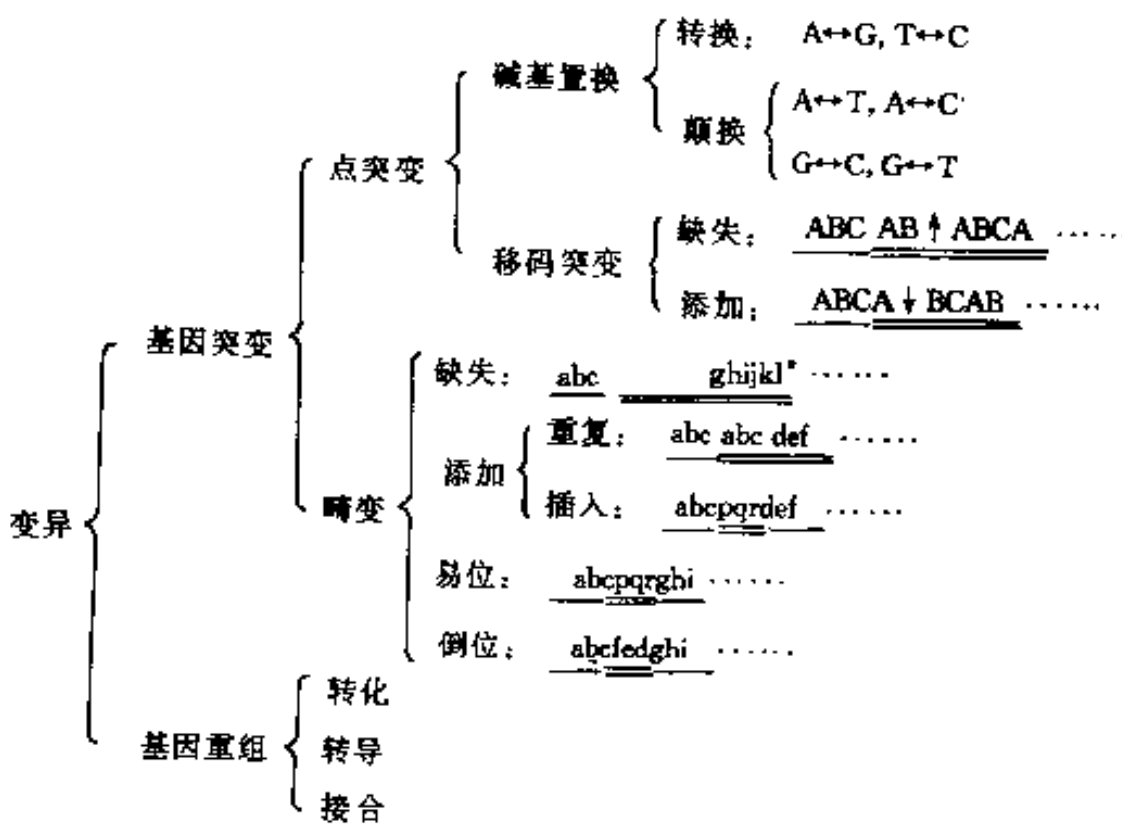


图 3-14　细菌变异的发生途径

(一) 基因突变

微生物群体中偶而会出现个别在形态或生理方面有所不同的个体，个体的变异性能够遗传，产生变株。这是由于某些原因，引起生物体内的 DNA 链上碱基的缺乏、置换或插入，改变了基因内部原有的碱基排列顺序（基因型的改变），引起表现型突然发生了可遗传的变化。当后代突然表现和亲代显然不同的遗传的表现型时，这样的变异称为突变。突变的主要特点有：(1) 突变的发生是无定向的。微生物的生活条件对于突变的发生并无明显的制约关系。突变体发生后，能否生长、繁殖则决定于生活条件是否能够满足突变体的要求。(2) 突变发生的频率很低，即稀有性。突变率是指每一细胞在每一世代中发生某一性状突变的机率，通常为 $10^{-5}\sim10^{-10}$。(3) 自发性。各种性状的突变可以在没有人为诱变因素的处理下自发发生。(4) 独立性。各基因性状的突变可以独立随机地发生。(5) 稳定性。发生突变的新性状是稳定的、可遗传的。(6) 可逆性。突变可以由原始的野生型向突变型方向进行，一般称此为正向突变。反过来，突变也可以发生在突变型向野生型的转变，此称回复突变。(7) 诱变性。自发突变的发生频率很低，但是通过人为施加诱变剂处理后突变率可大大提高，一般可提高 10～10^3 倍。

根据突变发生机理，突变可分为点突变和染色体畸变两大类。前者指 DNA 中一个或数个碱基对发生改变引起的突变，后者指一小段碱基对片段引起的突变。点突变又分碱基置换和移码突变，前者指碱基对发生的改变，包括一种嘌呤或嘧啶被另外一种嘌呤或嘧啶所取代（转换）和一种嘌呤或嘧啶被另外一种嘧啶或嘌呤所取代（颠换）。突变发生的具体途径与所采用的诱变剂及反应条件密切相关。

根据突变发生过程是否受人为诱变剂影响可分为自发突变和诱发突变两大类。

1. 自发突变　凡是在没有特设的诱变条件下，由外界环境的自然作用如辐射或微生物体内的生理和生化变化(如代谢产物 H_2O_2 等)而发生的基因突变称为自发突变。微生物在生长繁殖过程中，个别基因自发突变机率极低，如细菌的突变率是 $10^{-7}\sim10^{-10}$，即 1 万到 100 亿次繁殖中，才出现一个个别基因的突变体。作为遗传物质 DNA，一般说来是十分稳定的，但是在一定的情况下也会发生改变，从野生型产生一些不同种的突变体，例如色素突变，细胞形态突变(丧失芽孢、荚膜或鞭毛的特性)，营养型突变(丧失合成某种营养物质的能力)，发酵突变和抗性突变(包括抗药性、抗噬菌体、抗染料、抗辐射等)及致病力突变等。

当突变体回复野生表型时称回复突变。例如大肠杆菌组氨酸营养缺陷型 (his^-) 的菌株在无组氨酸的培养上应当无菌落生长。假如发现长出少数菌落，表现出有合成组氨酸能力的野生型菌株表型 (his^+)，这少数菌落称为回复突变。即突变体 (his^-) 回复野生表型 (his^+)。饮用水致突活性的检测就是根据这一回复突变频率的大小来确定是否含有致突物质。

自发突变是在自然条件下无定向的，有时会对人类有益，有时对人类无益，甚至有害。如果任其自然发展，往往导致菌种退化。

2. 诱发突变或称诱变　人为地利用物理化学因素，引起细胞 DNA 分子中碱基对发生变化叫诱变。所利用的物理化学因素称为诱变剂。常用的诱变剂有紫外线、5-溴尿嘧啶、亚硝酸、吖啶类染料等。

废水处理驯化活性污泥及生物膜的方法，一般是把培养、选择、淘汰结合在一起，在特定废水中有些菌种不能适应被淘汰，有的菌株能产生诱导酶来降解此类废水，并能在这

种培养条件下生存而被保留下来，同时大量繁殖，使废水达到预期的排放标准。国外目前正在研究针对某种废水用人工诱变方法筛选大量具有很强分解能力及絮凝能力的菌株，并把它们做成干粉状变异菌成品。这时，细菌处于休眠状态。当工厂处理此类废水时，可把干粉状菌种置于 30℃水中溶解 30min，使细菌恢复活性，不必再驯化，对所需处理的废水有较好效果。

（二）基因重组

两个不同性状的个体细胞，其中一个细胞（供体细胞）的 DNA 与另一个细胞（受体细胞）的 DNA 融合，使基因重新排列，遗传给后代，产生新品种或表达新的遗传性状，称为基因重组。

在基因重组时，不发生任何碱基对结构上的变化。重组后的生物体表现出重组后的新的遗传性状。微生物中基因重组的形式很多。在真核微生物中，基因重组是通过二个配子相互融合的有性繁殖的过程中发生的，故称为杂交。在原核微生物中通常只是部分遗传物质的转移和重组，如转化、转导和接合等都是基因重组在细胞水平上的反映。

1. 转化　转化（Transformation）是供体细胞研碎物中的 DNA 片段直接吸收进入活的受体细胞的基因重组方式。受体细胞获得了供体细胞的部分遗传性状。

1928 年英国细菌学家格里菲斯（Griffth）发现肺炎双球菌中 S Ⅲ 型菌株，菌落光滑，产生荚膜，当它感染人、小白鼠或家兔等时均可致病。其中 R Ⅰ 型菌株菌落粗糙，不产生荚膜物质，感染人、小白鼠或家兔均不致病。当将 R Ⅱ 型活菌注射小白鼠、小白鼠健康不致病，并可分离到 R Ⅱ 型肺炎双球菌菌落；将 S Ⅲ 型的肺炎双球菌加热杀死后注射小白鼠，小白鼠健康不致病，从健康的鼠体分离不出肺炎球菌；但将加热杀死的 S Ⅲ 型细菌与 R Ⅱ 型活细菌混合后注射小白鼠，小白鼠死亡，并可从死鼠体内分离到 S Ⅲ 型活细菌，见图 3-15。

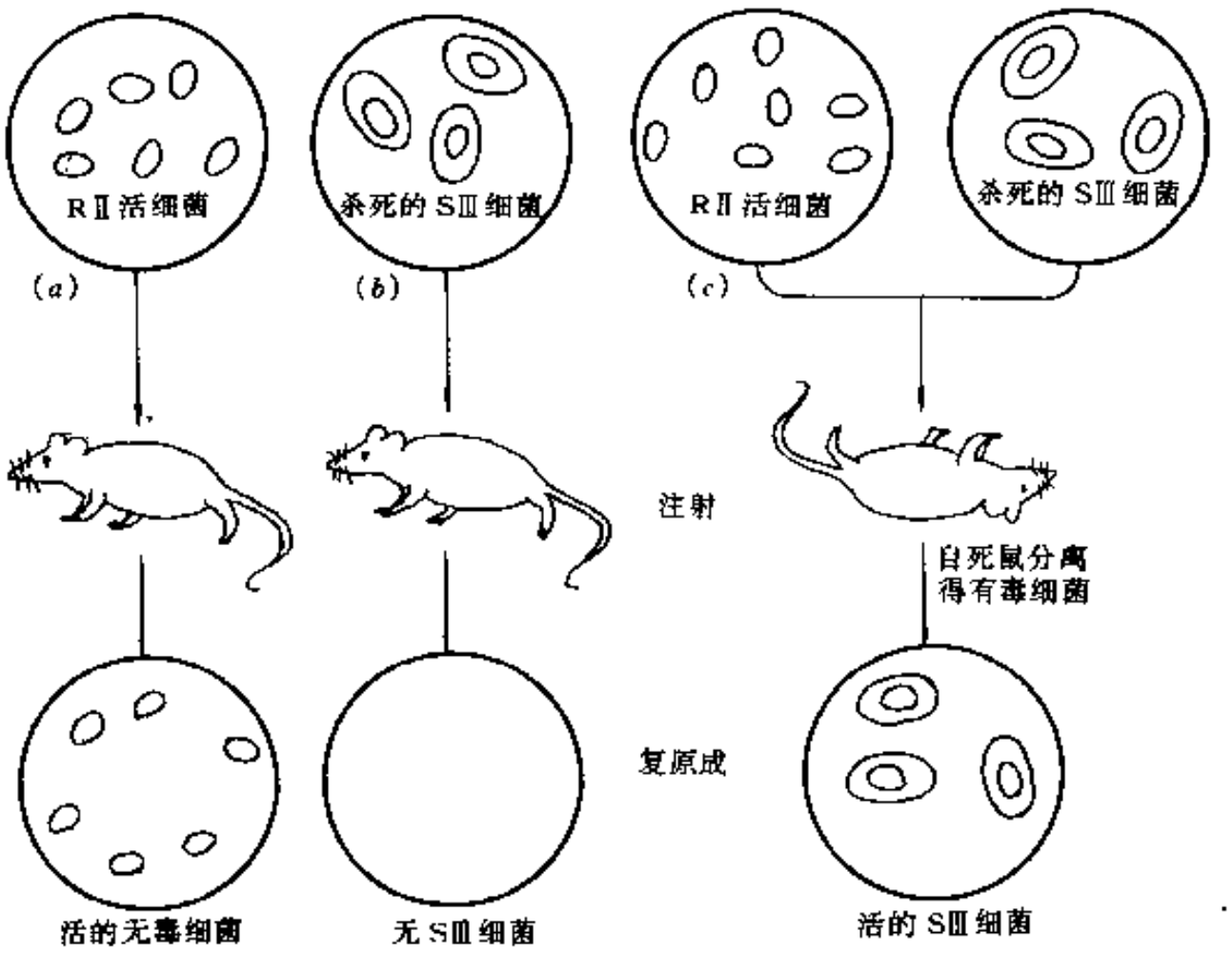


图 3-15　Griffth 试验图解

（a）无毒菌系 R Ⅱ 不使白鼠死亡，从鼠体内分离仍得无毒细菌；（b）将 S Ⅲ 加热杀死，不使白鼠死亡，鼠体内无有毒细菌；（c）混合活无毒的 R Ⅱ 和加热杀死的 S Ⅲ，使白鼠死亡，鼠体内发现活的 S Ⅲ 细菌

其后在体外进行转化试验。将死的S Ⅲ型细菌研碎，提取出其中的DNA与R Ⅱ型活菌混合培养，后代产生两种类型的菌落，大部分是R Ⅱ型细胞，但少数（百万分之一）是有毒的S Ⅲ型细胞，如图3-16所示，加DNA酶破坏S Ⅲ型DNA，可阻止转化作用。1944年Avery等证明所谓转化物质就是DNA，S Ⅲ型的DNA进入R Ⅱ型受体细胞内，发生了基因重组，使R Ⅱ型转化成S Ⅲ型。试验发现受体细胞必须在感受态（Competence）阶段。在感受态阶段的受体细胞叫感受态细胞。感受态细胞是由细胞的遗传性以及细胞的生理状态、菌龄和培养条件等决定的，如肺炎双球菌的感受态阶段处于对数生长期的中期。

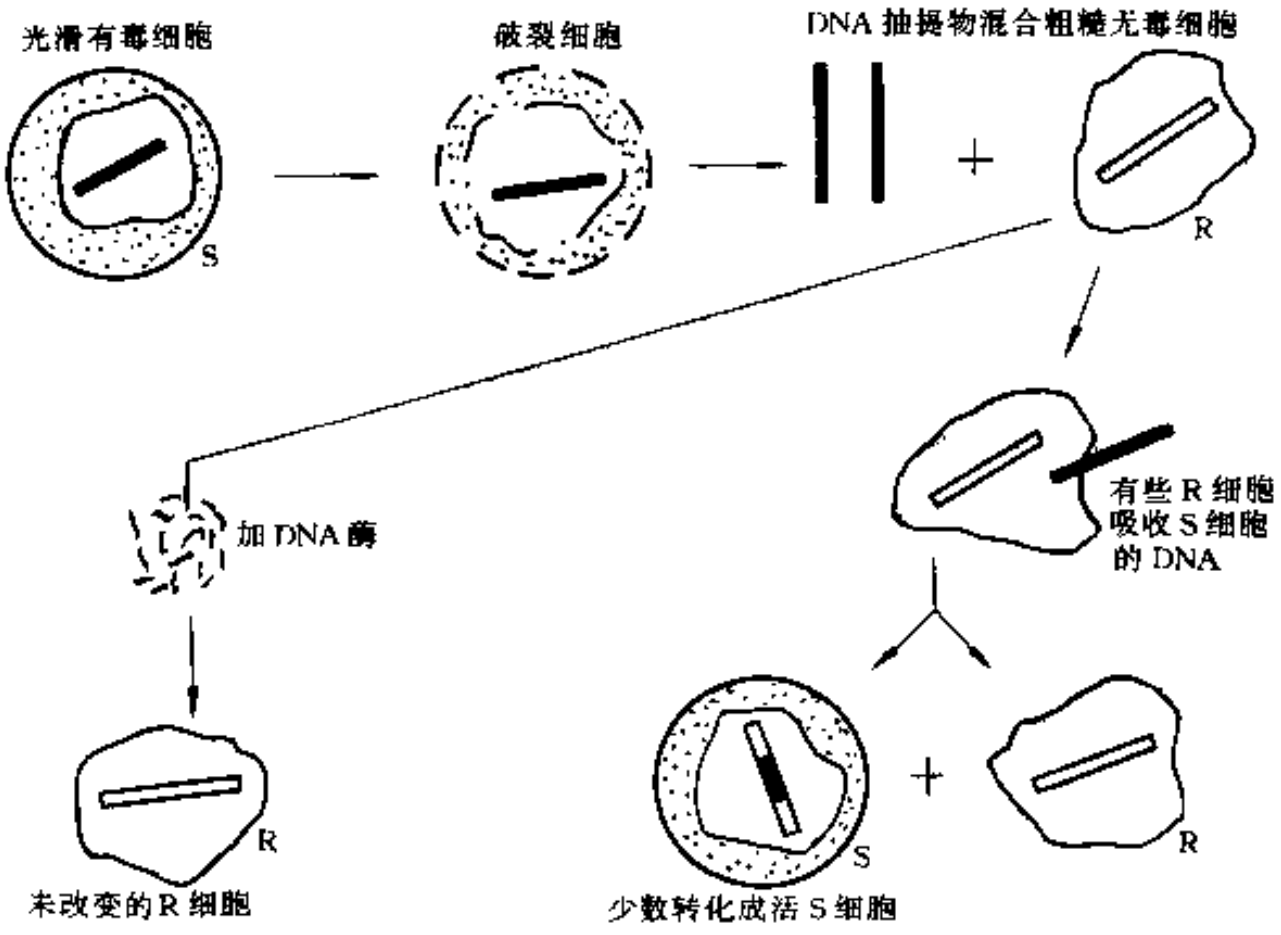


图 3-16　肺炎球菌体外转化试验图解

白菌系S Ⅲ抽提的DNA与活R菌系细菌混和，少数R细胞转化成S细胞。

加脱氧核糖核酸酶可阻止转化作用

转化因子是游离的DNA片段，在自然条件下，转化因子可由细菌细胞的解体产生。在实验室，可通过提取获得有转化能力的DNA片段，一般是双链DNA。单链DNA片段转化力很弱或没有转化能力。只有感受态细胞可以接受转化因子，转化频率很低，通常0.1%～1%。

目前发现许多其它细菌、放线菌、真菌和高等动植物中也有转化现象。

2. 接合　细胞的接合（conjugation）是遗传物质通过细胞与细胞的直接接触而进行的转移和重组。1946年美国科学家莱德柏格（Lederberg）和塔图姆（Tatum）采用大肠杆菌的两类营养缺陷型❶作试验。其中一类大肠杆菌没有合成生物素（B）和甲硫氨酸（M）能力，但能合成苏氨酸（T）和亮氨酸（L），基因型为$B^{+}\ M^{-}\ T^{+}\ L^{+}$。另一类大肠杆菌没有合成苏氨酸（T）和亮氨酸（L）能力，但能合成生物素（B）和甲硫氨酸（M），基因型为$B^{-}\ M^{+}\ T^{-}\ L^{-}$。分别从两个菌株取$10^{4}$个幼龄细胞混合，涂在不含上述四种成分的培养基

❶ 不具备合成生长素（如维生素或氨基酸）能力的微生物称为营养缺陷型。培养时必须人工供给此类生长素才能生长。将原来有合成生长素能力的微生物称为原养型或野生型。能合成某生长素用"+"表示，不能合成某生长素用"−"表示。

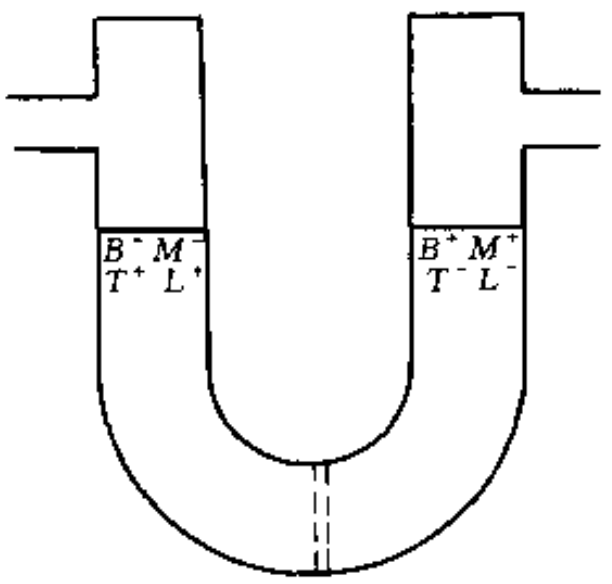


图 3-17　U 形管试验

上，结果竟然长出一些菌落。经分析基因型为 $B^-M^-T^-L^-$ 野生型菌株，这是两类营养缺陷型菌株通过交配进行了基因重组的结果。为了排除转化作用，设计了一种 U 形管见图 3-17，管的中间装有超微烧结玻璃过滤板，把管两端隔开、每端各接种一种营养缺陷型的大肠杆菌，由于中间滤板隔开，细胞无法直接接触，游离的 DNA 片段可以通过，使两端溶液来回流动，经过一段时间培养，从 U 形管两端取出细菌，分别涂于不含上述四种成分的培养基上，培养后无菌生长，证明接合重组细菌必须直接接触，遗传物质才能转移，排除了转化现象。从电镜照片可看到大肠杆菌的接合实际上是通过性纤毛进行的，性纤毛是中空的，遗传物质可以通过性纤毛转移。带有 F 因子的大肠杆菌才有性纤毛。图 3-18 为一个具有 F 因子的大肠杆菌（用 F^+ 表示），当与不具有 F 因子的大肠杆菌（用 F^- 表示）接合时，F^+ 菌株先自我复制一个 F 因子通过性纤毛进入 F 受体细胞，这样使原来不具有 F 因子的 F^- 菌株变成 F^+ 菌株了。

除 F 因子外尚有 R 因子、产细菌素因子及降解质粒等，可通过细胞接触而进行转移和重组。

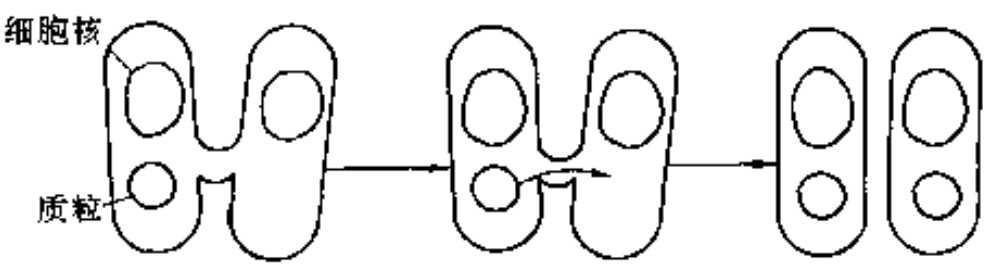


图 3-18　F^+ 菌株和 F^- 菌株接合

R 因子可具有抗药性（如对抗生素及磺胺类药物的抗性）或抗某些重金属离子（如汞、镉、铅、铋等离子）。1955 年首先在日本的志贺氏菌的一个菌株中发现，此菌株具有抗氯霉素、链霉素、四环素和磺胺类药物等多种抗性，其后其他国家又发现有抗药性的沙门氏伤寒杆菌，病人用常规药物治疗无效，死亡率高。科学工作者发现人类和家畜肠道内都可能存在有许多抗药性的大肠杆菌，并可能把抗药因子转移给病原细菌如志贺氏痢疾杆菌和沙门氏伤寒杆菌，从而引起重现。

3. 转导　遗传物质通过噬菌体的携带而转移的基因重组称为转导（transduction）。1951 年辛德尔（Zinder）和莱德贝尔格（Lederberg）在研究鼠沙门氏伤寒杆菌重组时发现的。把一个具有合成色氨酸（Try^+）能力，而无合成组氨酸（his^-）的营养缺陷型 LA-2 供体，接种在 U 形管的左端；而在管的另一端（右端）接种噬菌体溶源性的 LT22-A 的营养缺陷型受体（Try^-，his^+）。U 形管中间用超微烧结玻璃过滤板把两端隔开，管中溶液能通过滤板来回流动，但阻止细菌通过或接触（如图 3-19）即排除接合。经过一定时间培养后，在右端 L-22 受体细胞中获得色氨酸（Try^-）野生型的细菌。研究发现 LA-22 在培养过程释放温和

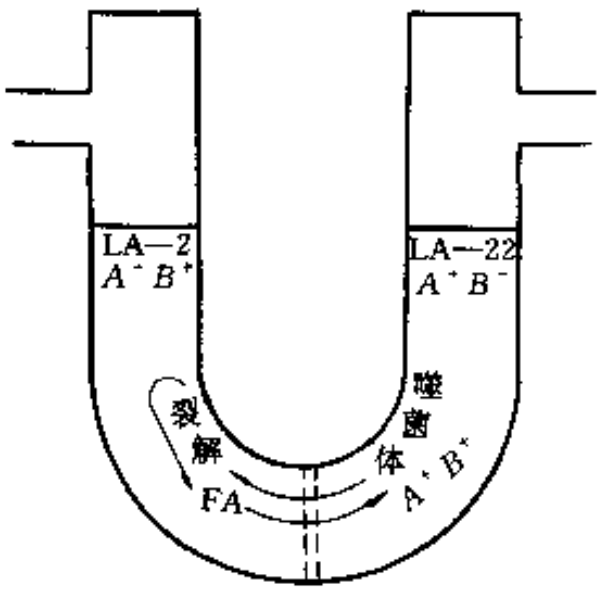


图 3-19　转导试验中的 U 形管试验

噬菌体 P-22，P-22 通过滤板侵染供体 LA-2，当 LA-2 裂解后，产生“滤过因子”大部分是 P-22，其中极少数在成熟过程包裹了 LA-2 的 DNA 片段（含合成 Try 基因），并通过滤板再度感染 LA-22，使 LA-22 获得合成 Tru⁻能力，由噬菌体携带来的 DNA 片段与受体细胞的基因重组，这个现象称为转导作用（有关烈性噬菌体增殖在第四章病毒中介绍）。

基因重组的 3 种形式，其中细菌的接合必需两个细胞直接接触，而转化和转导无需细胞直接接触，转化没有噬菌体作媒介，转导必须通过噬菌体转移遗传物质。基因重组率均很低。

三、遗传工程

遗传工程是 70 年代初发展起来的生物技术。按照人们预先设计的生物蓝图，通过对遗传物质的直接操纵、改组、重建，实现对遗传性状的定向改造。目前采用的基本方法是：把遗传物质从一种生物细胞中提取出来，在体外施行“外科手术”，然后再把它导入另一种生物细胞中，改变其遗传结构，使之产生符合人类需要的新遗传特性，定向地创造新生物类型。由于它采用了对遗传物质体外施工，类似工程设计那样，具有很高的预见性、精确性与严密性，因此称为遗传工程。

遗传工程包括两个水平的研究：一是细胞水平；另一是基因水平。所以，又可把它分为细胞工程和基因工程。实际上目前研究的主要内容是基因工程，因此，狭义的讲，遗传工程就是基因工程。

基因工程是 70 年代初发展起来，在分子水平上剪接 DNA 片段，与同种、同属或异种、甚至异界的基因连接成为一个新的遗传整体，再感染受体细胞，复制出新的遗传特性的机体。具体过程简述于下：

1. 选择合适的供体细胞，将其 DNA 取出，一般选择性地获取目的基因的 DNA 片段。

2. 选择合适外切酶或限制性内切酶，它能专一地切断目的基因 DNA 分子的特定部位，并在切断处形成具有粘着活性的末端单链（又称粘接末端，如图 3-20）。使 DNA 分子在体外进行剪接、重组的“外科手术”有了可能性。目前，这类酶已陆续发现几十种，它们的切点各不相同，可以分别选用，并已制成商品出售。

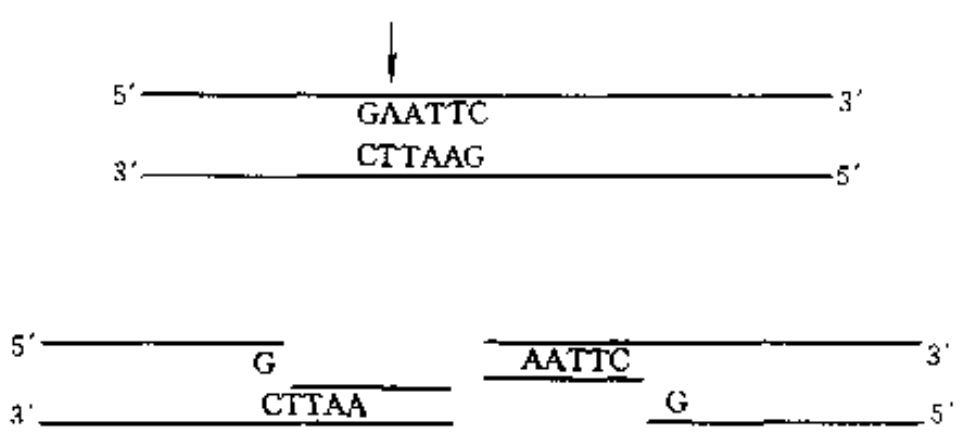


图 3-20　DNA 切断后形成的粘着末端

3. 基因的运载和复制　大部分 DNA 片段在细胞内无自发复制能力，所以要选择有自体复制的质粒（如 *R* 因子、降解质粒等）或病毒（如 λ 噬菌体，SV40 病毒等），从载体细胞取出质粒等载体的 DNA，也用内切酶将其切断并形成粘性末端如图 3-21 所示。

4. 在 DNA 连接酶的作用下，将目的基因 DNA 粘性末端与载体 DNA 粘性末端粘着起来，相应的互补碱基对以氢键相联，形成一个新的重组载体 DNA 分子。

5. 将重组载体 DNA 分子加入受体细胞培养液中，受体细胞吸入载体，载体在细胞内复制，使受体细胞以及后代获得原供体细胞的基因和相应的属性。

四、遗传工程在环境工程中的应用

由于新的化学物质的不断发现，难降解污染物的增多，废水处理情况日趋复杂。带有

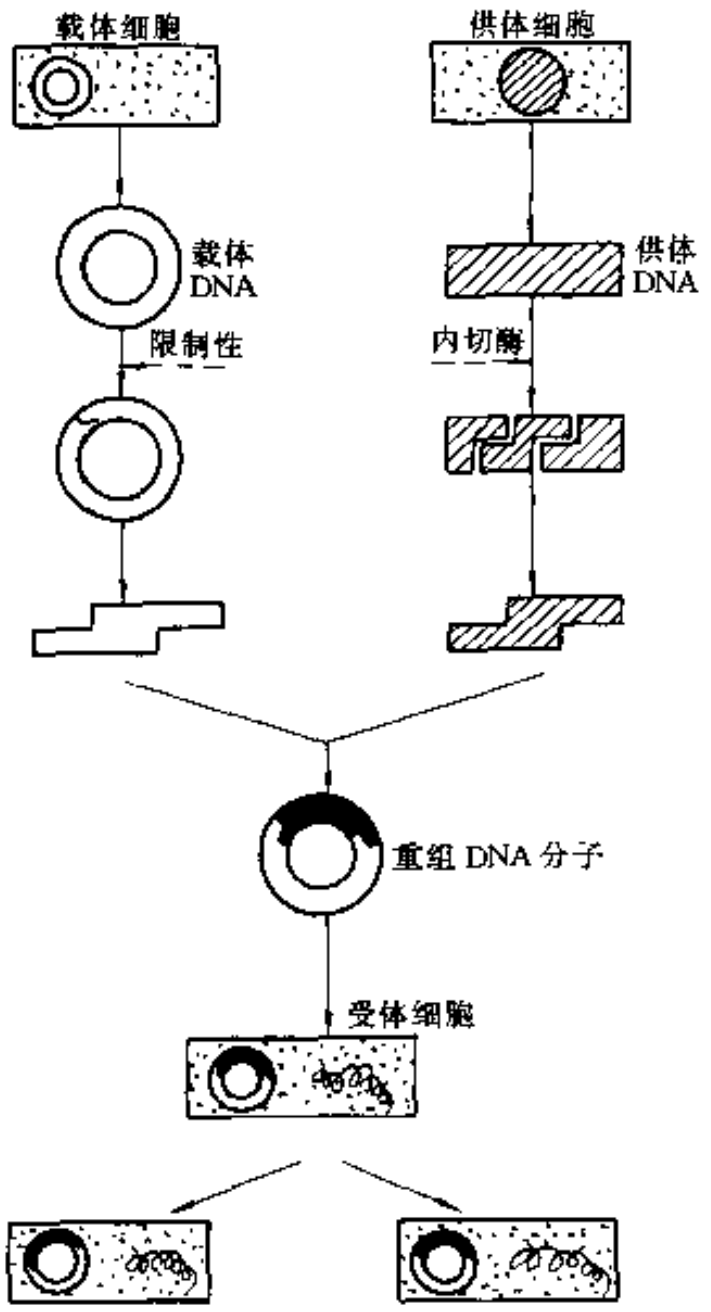


图 3-21　基因工程示意图

降解某些物质的质粒的微生物往往不一定能在某一废水环境中生存，而能在此种废水条件下生存的细菌又不一定具有降解其中某些物质的质粒，因而各国科学家正试图利用遗传工程，把具有降解某些特殊物质的质粒剪切后，连接到受体细胞中，使之带有一种或多种功能用以处理废水，这种用人工方法选出的多质粒、多功能的新菌种称“超级细菌”。这方面研究工作较多，目前已有较为成功的实例，如：

1. 降解石油的超级细菌　70 年代美国生物学家查克拉巴蒂（Chakrabarty）针对海洋输油，造成浮油污染，影响海洋生态等问题进行了研究。石油成分复杂，是由饱和、不饱和、直链、支链、芳香……烃类组成，不溶于水。而海水含盐量高，虽发现 90 多种微生物有不同程度降解烃类的能力，但不一定能在海水中大量繁殖生存，而且降解速率也较慢，查氏将能降解脂（含质粒 *A*）的一种假单胞菌作受体细胞，分别将能降解芳烃（质粒 *B*）、萜烃（质粒 *C*）和多环芳烃（质粒 *D*）的质粒，用遗传工程方法人工转入受体细胞，获得多质粒“超级细菌”，可除去原油中 2/3 的烃。浮油在一般条件下降解需一年以上时间，用“超级细菌”只需几小时即可把浮油去除，速度快效率高，见图 3-22。

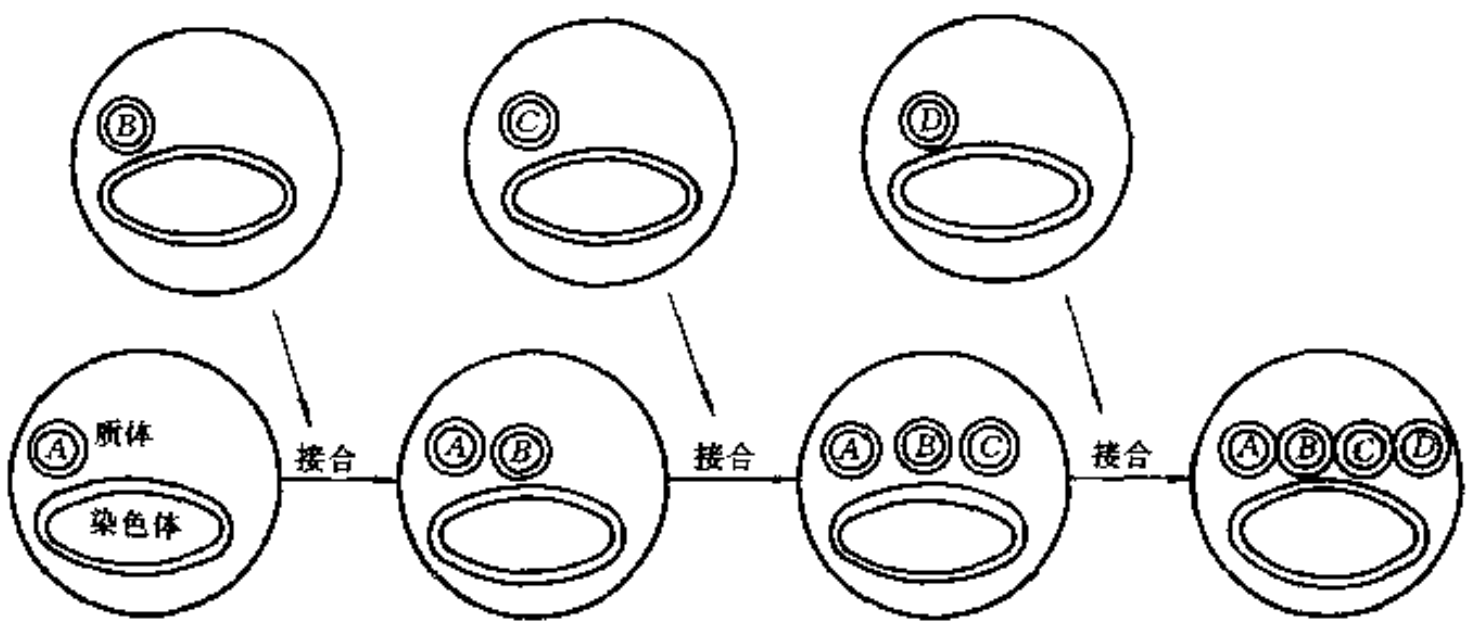


图 3-22　4 种不同降解质粒接合在同一受体假单胞菌中的模式

2. 耐汞质粒　日本水俣事件及瑞典鸟类汞中毒事件后，日本和瑞典对汞在自然界转化做了大量研究工作，提出了汞化合物转化的途径，主要是某些微生物使水体汞元素甲基化形成甲基汞，使人及生物中毒。另一面自然界中存在一些耐汞的微生物，它们的耐汞基因

在 R 因子上。例如，恶臭假单胞菌一般在超过 2μg/mL 汞浓度中即将中毒死，查克拉巴蒂用质粒转移技术，把嗜油假单胞菌的耐汞质粒（MER 质粒）转移到恶臭假单胞菌中去，后者获得 MER 质粒，可在 50～70μg/mL 氯化汞中生长。

3. 降解染料的质粒　1983 年瑞士科学家 Kulla 发现有两种假单胞菌分别具有降解纺织废水中两种染料的能力；其一为假单胞菌 K24 具有降解 1 号橙偶氮染料的质粒，其二为假单胞菌 K46 具有降解 2 号橙偶氮染料的质粒，他把两个菌株的两种质粒接合到一个菌株内，可获得具有降解两种染料的新菌种。

复 习 思 考 题

1. 细菌是怎样繁殖的？
2. 怎样利用细菌的生长曲线来控制生物处理构筑物的运行？
3. 试区别遗传性与变异性。
4. 怎样利用细菌的变异来定向进行工业废水的生物处理？
5. 试以大肠杆菌降解乳糖来说明操纵子学说。
6. 简述蛋白质合成过程三种 RNA 的功能。
7. 基因重组有几种形式，各有什么特点。
8. 试述质粒与“超级细菌”。
9. 什么叫基因突变，可分为几类？
10. 什么叫遗传工程？在废水生物处理中如何应用？

第四章　其它微生物

第一节　放线菌和丝状细菌

在自然界中，还有一些单细胞而有细长分枝的放线菌。此外，铁细菌、硫细菌和球衣细菌又常称为丝状细菌。这类细菌的菌丝体外面有的包着一个圆筒状的粘性皮鞘❶，组成鞘的物质相当于普通细菌的荚膜，由多糖类物质组成。工程上常把菌体细胞能相连而形成丝状的微生物统称丝状菌，如丝状细菌、放线菌、丝状真菌和丝状藻类（如蓝细菌）等。

一、放线菌

放线菌是一种有细长分枝的单细胞菌丝体，它的菌体由不同长短的纤细的菌丝组成。菌丝相当长，约在50～600μm之间，直径与细菌的大小较接近，一般约0.5～1μm，最大不超过1.5μm，内部相通，一般无隔膜。菌丝分两部分：伸入营养物质内或漫生于营养物表面吸取养料的菌丝，称为营养菌丝。当营养菌丝发育到一定程度，就会在它上面生长出伸向空中的菌丝，这部分菌丝叫做气生菌丝。气生菌丝的顶端能形成孢子丝，产生孢子，叫分生孢子（也叫气生孢子），见图4-1。孢子对于不良的外界环境有较强的抵抗力。散落的孢子遇到适宜条件就萌发长出菌丝，菌丝分枝再分枝，最后形成网状的菌丝体。放线菌容易在培养基上生长，固体培养基上的菌落通常由一个孢子或一小块营养菌丝形成一团有分枝的细丝。菌落表面常呈粉末状或皱褶状，有的则呈紧密干硬的圆形，有些属的菌落为糊状。不同的放线菌的菌落呈不同的颜色，如无色、白、黑、红、褐、灰、黄、绿等颜色。菌落的正面和背面的颜色往往不同，正面是孢子的颜色，背面是营养菌丝及它所分泌的色素的颜色。放线菌菌落不易用接种环挑起。这些特征都是菌种鉴定的重要依据。



图4-1　放线菌气生菌丝及孢子丝

大多数放线菌是好氧性的。一般生长最适宜的pH值为7～8，也就是中性偏碱。最适宜的温度为25～30℃。放线菌多数是腐生性的，也有寄生性的，有些寄生种能使动植物致病。不少抗菌素（约占目前已知抗菌素的2/3）是由放线菌产生的，其中有链霉素、氯霉素、土霉素、四环素等。

---

❶ 细胞外有皮鞘包围的细菌，又称衣细菌，"伯杰细菌鉴定手册"称鞘细菌。

近年来发现某些放线菌有氧化分解无机氰化物（CN^-）的能力，这对于含氰废水的生物处理有重要意义，但必须注意所选用的菌种对人类和动植物有无不良影响。

二、铁细菌

水中常见的铁细菌有多孢泉发菌（*Crenothrix polyspora*）、赭色纤发菌（*L. ochracea*）和含铁嘉利翁氏菌（*Gallionella ferruginea*）等。铁细菌一般都是自养的丝状细菌（见图 4-2）。

多孢泉发菌的丝状体不分枝，附着在坚固的基质上，基部和顶端有差别。鞘清楚可见，顶端薄而无色，基部厚并被铁所包围。细胞有圆筒形的和球形的，可产生球形的分生孢子。

赭色纤发菌的丝状体有鞘，呈黄色或褐色，被氢氧化铁所包围。在地面水中广泛分布。

含铁嘉利翁氏菌是有柄的细菌，绞绳状对生分枝，没有证明有鞘存在。因为还没有发现其它细菌有这种形状，所以这种扭曲的丝状体很容易鉴定。当卷曲的环被附着的铁所包围时，其丝状体就好象一串念珠。这种细菌也广泛地分布于自然界中。

铁细菌一般能生活在含氧少但溶有较多铁质和二氧化碳的水中。它们能将其细胞内所吸收的亚铁氧化为高铁，从而获得能量，其反应如下：

$$4FeCO_3 + O_2 + 6H_2O \longrightarrow 4Fe(OH)_3 + 4CO_2 + 167.5J \qquad (4\text{-}1)$$

式中以碳酸盐为碳素来源，亚铁的氧化为能量来源，但反应产生的能量很小。它们为了满足对能量的需要，必须要有大量的高铁，如 $Fe(OH)_3$ 的形成。这种不溶性的铁化合物排出菌体后就沉淀下来。这说明了为什么在含有自养铁细菌的水中会发现大量 $Fe(OH)_3$ 的沉淀。当水管中有大量氢氧化铁沉淀时，就会降低水管的输水能力，例如，某地水厂有一使用 30a 的铸铁管，由于铁细菌的作用，沉积物占了管子容积的 37.33%，通过的流量降低到新管流量的 44.70%。水管中的氢氧化铁沉积物还能使水发生浑浊并呈现颜色。此外，铁细菌吸收水中的亚铁盐后，促使组成水管的铁质更多地溶入水中，因而加速了钢管和铸铁管的腐蚀。

三、硫磺细菌

硫磺细菌一般也都是自养的丝状细菌。它们能氧化硫化氢、硫磺和其它硫化物为硫酸，从而得到能量。在给水排水工作中比较常见的硫磺细菌有贝日阿托氏菌（又称白硫磺菌 *Beggiatoa*）和发硫细菌（*Thiothrix*）等。

贝日阿托氏菌是一类漂浮在池沼上的硫磺细菌，其丝状体是由一串细胞相联接并为共

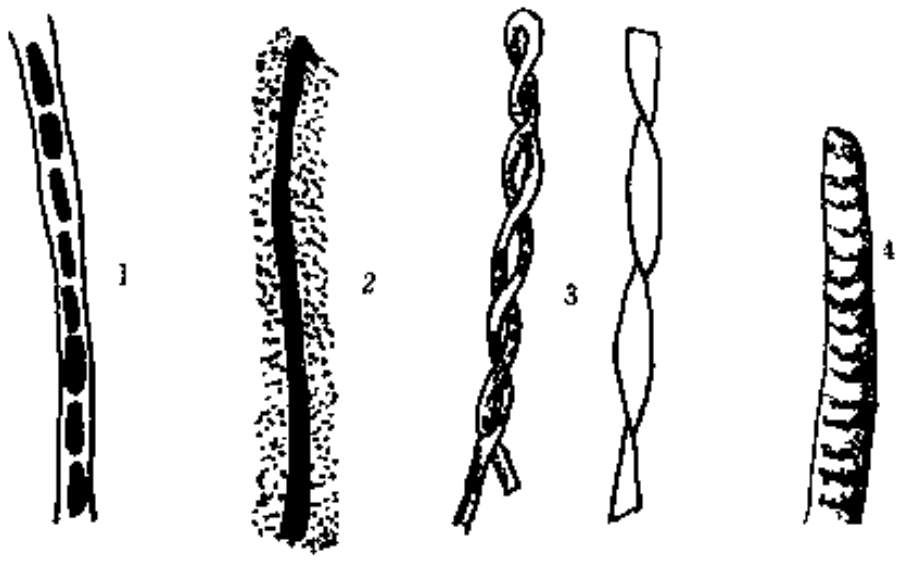


图 4-2　铁细菌

1—多孢泉发菌；2—赭色纤发菌；
3—含铁嘉利翁氏菌

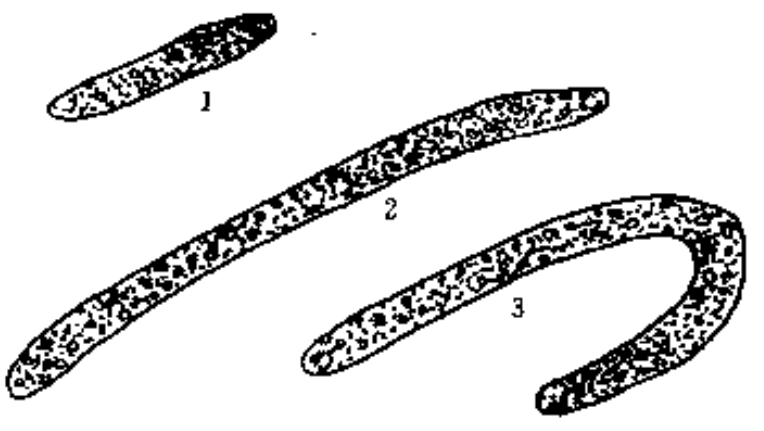


图 4-3　贝日阿托氏菌

1、2、3—体内含有明显的硫粒；4　表示菌体的一端，体内不含硫粒

同的衣鞘所包围，细菌的细胞内一般含有很多硫磺颗粒（图 4-3）。它们的丝状体不分枝，单个分散，不固着于其它物体上生长，能进行匍匐运动，或呈直线或呈曲线，并经常改变行动方向。有些贝日阿托氏菌的个体很大，如奇异贝日阿托氏菌（*Beggiatoa mirabilis*）的丝状体的宽度可达 16～45μm；有些种，如最小贝日阿托氏菌（*Beggiatoa minima*）的丝状体则只有 1μm 宽。

发硫细菌也是一种不分枝的丝状细菌，可固着在其它物体上生长（图 4-4）。

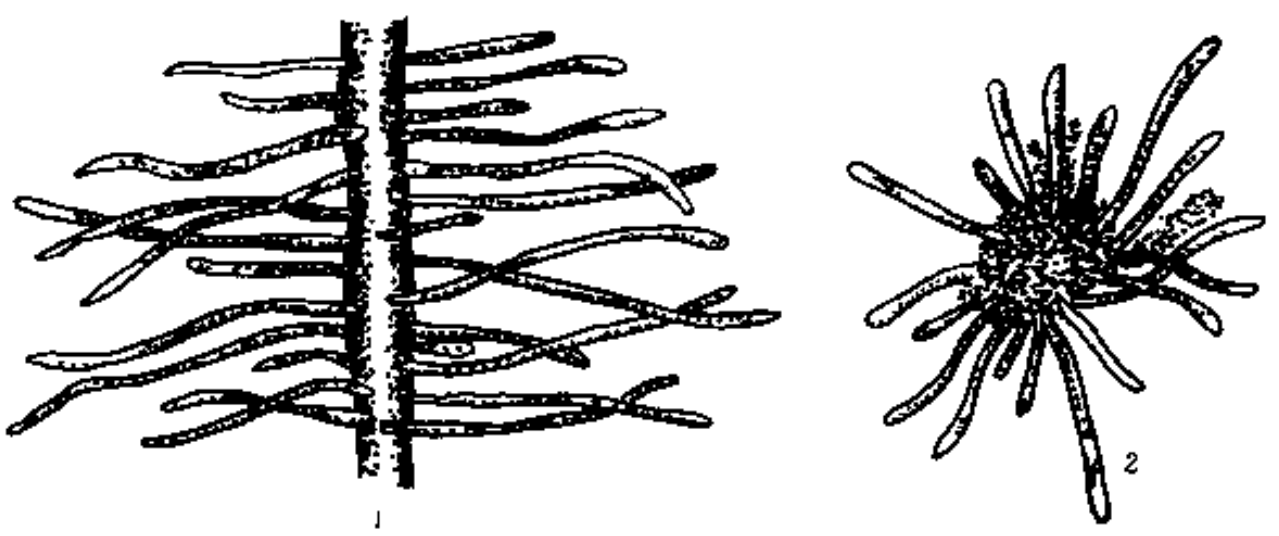


图 4-4　发硫细菌

1—菌丝一端吸附在植物残片或纤维上；2—从活性污泥菌胶团中伸展出的菌丝

硫磺细菌氧化硫化氢或硫磺为硫酸，同时同化 CO_2，合成有机成分。

$$2H_2S+O_2 \longrightarrow 2H_2O+2S+343kJ \tag{4-2}$$

$$2S+3O_2+2H_2O \longrightarrow 2H_2SO_4+494kJ \tag{4-3}$$

$$CO_2+H_2O \longrightarrow [CH_2O]+O_2 \tag{4-4}$$

如果环境中硫化氢充足，则形成硫磺的作用大于硫磺被氧化的作用，其结果是在菌体内累积了很多硫粒。当硫化氢缺少时，硫磺被氧化的作用就大于硫磺形成的作用，这时体内硫粒逐渐消失。完全消失后，硫磺细菌死亡或进入休眠状态，停止生长。

根据上海某污水处理厂的观察，污水中溶解氧超过 1mg/L 时，硫化氢大大减少，几乎就不能在贝日阿托氏菌体内找到硫粒。

硫磺细菌在水管中大量繁殖时，因有强酸产生，对于管道有腐蚀作用。

此外，还有一类所谓硫化细菌。它们能氧化硫化氢、硫或硫代硫酸盐为硫酸，但不积存硫粒于细胞中。

关于硫磺细菌和硫化细菌的作用还将在第六章中讨论。

四、球衣细菌

球衣细菌大多具有假分枝。当皮鞘内的一个细菌细胞从皮鞘的一端游出，吸附在另一个球衣细菌的菌丝体上，并发育成菌丝体，即形成假分枝。假分枝看来好象是分枝，实际上与旁边的菌丝体并无关系（图 4-5）。

球衣细菌是好氧细菌，在溶解氧低于 0.1mg/L 的微氧环境中仍能较好地生长（也有资

料介绍，球衣细菌在微氧环境中生长得最好，若氧量过大，反而影响它的生长），其生长适宜的 pH 范围约为 6～8，适宜的生长温度在 30 C 左右，在 15 C 以下生长不良。球衣细菌在营养方面对碳素的要求较高，反应灵敏，所以大量的碳水化合物能加速球衣细菌的繁殖。此外，球衣细菌对某些杀虫剂、如液氯、漂白粉等的抵抗力不及菌胶团。这些生理上的特性，都是生产上控制球衣细菌的重要依据。

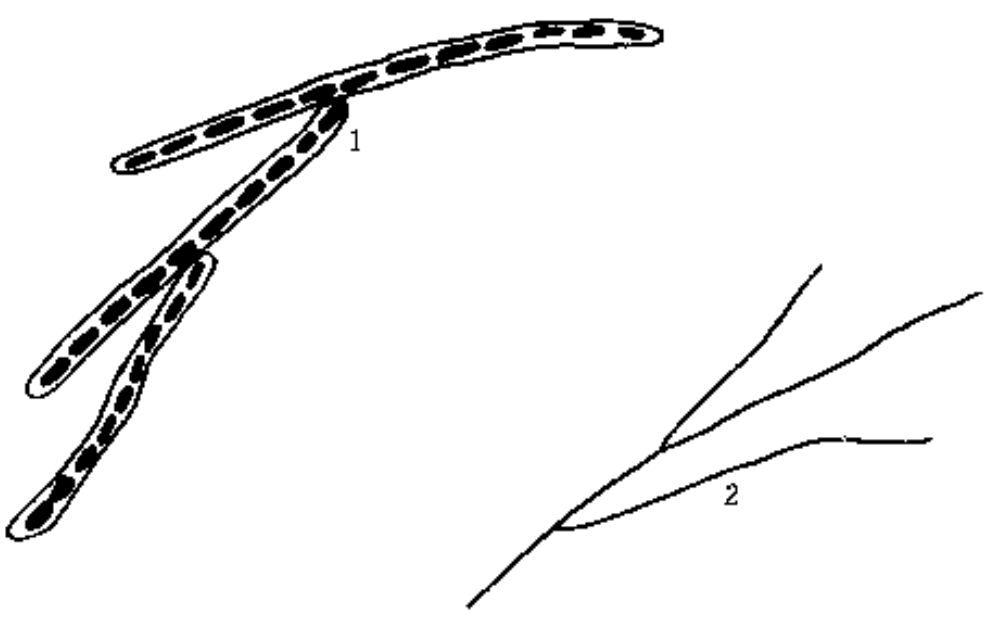


图 4-5　球衣细菌

1　高倍镜放大；2—低倍镜放大

球衣细菌分解有机物的能力很强。在废水处理设备正常运转中有一定数量的球衣细菌，对有机物的去除是有利的。上海某加速曝气池的生产试验表明，只要污泥不随水流出，即使球衣细菌多一些，有机物的去除率仍是很高的。

但是，丝状细菌，特别是球衣细菌，在废水处理的活性污泥中大量繁殖后，会使污泥结构极度松散，使污泥因浮力增加而上浮，引起所谓污泥膨胀，而影响出水水质。在上海某加速曝气池的生产试验中还发现，丝硫细菌对污泥膨胀的影响也很大。

应当指出，近年来还发现枯草杆菌和大肠杆菌也能引起污泥膨胀。为什么杆菌也能引起污泥膨胀？原来，枯草杆菌的发育过程并不象普通细菌那样简单，而是有比较复杂的生活史，在其生长的某一阶段能形成链条状的形态。大肠杆菌的生活史虽简单，但它的个体形态不是固定不变的，它虽是杆菌，但有时短似球形，有时则呈链条状。当这两种细菌的链条状形态大量存在时，就能引起污泥膨胀，不利于污泥的沉淀。

第二节　真　　菌

真菌是低等的真核微生物，其构造比细菌复杂。它的种类繁多，包括单细胞的酵母菌和呈丝状的多细胞霉菌（包括各种蕈子，如可食用的蘑菇、香菇等）。它们都具有明显的真正细胞核。没有叶绿素，不能进行光合作用，是腐生的或寄生的。真菌的形态有单细胞和多细胞两种形式。与废水生物处理有关的是单细胞的酵母菌和多细胞的霉菌（霉菌也有单细胞的）。

一、酵母菌

酵母菌是单细胞的真菌（也有多个细胞相互连接成菌丝体的，我们称之为假菌丝。见图 4-6）。其细胞形态为圆形、卵圆形或圆柱形，内含有细胞核，核呈圆形或卵形，直径约 1μm，外围有明显的细胞壁。其菌体比细菌大几倍至几十倍，一般长 8～10μm，宽约 1～5μm。

将酵母菌接种在固体培养基上，在适宜的温度下培养一定时间，可形成圆形菌落，通常呈白色或红色，大小约与细菌菌落相同，其表面湿润有光泽，带粘性，培养时间较长的菌落呈皱缩状，较干燥。酵母菌的生长在中性偏酸（pH4.5～6.5）的条件下较好。

大多数酵母菌都是以出芽的方式进行无性繁殖，先在细胞一端长出突起，接着细胞核

分裂出一部分并进入突起部分。突起部分逐渐长大成芽体。由于细胞壁的收缩，使芽体与母细胞相隔离。成长的芽体可能暂时与母细胞联合在一起，也可能立即与母细胞分离（图4-7）。有些酵母具有有性生殖，它们以子囊孢子进行繁殖。

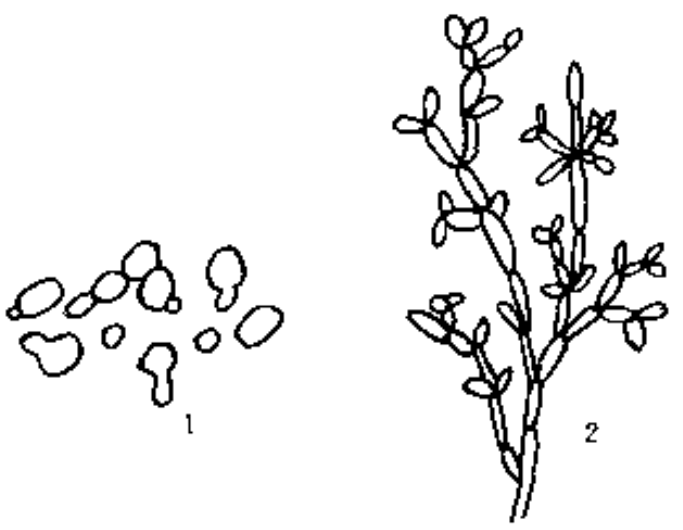


图 4-6　酵母菌

1—酵母；2—假丝酵母

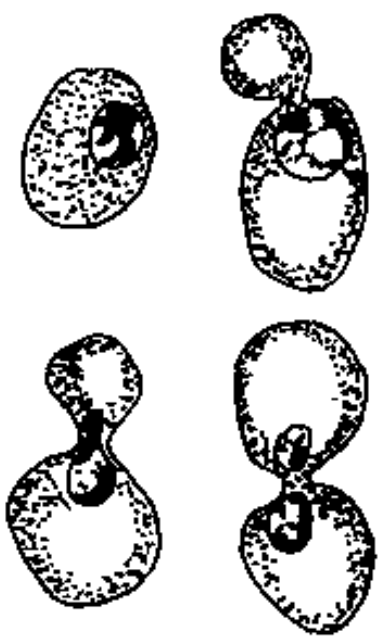


图 4-7　啤酒酵母菌的芽殖

我国劳动人民早在几千年前就已用酵母菌酿酒或发面。这类酵母菌能分解碳水化合物为酒精和二氧化碳，称为发酵型酵母菌。近十几年来，国内外正在加强研究氧化能力强而发酵能力弱或无发酵力的酵母菌。这类酵母菌称为氧化型酵母菌，它能生产多种产品，为酵母菌的应用开拓新的广阔天地。在我国废水处理及综合利用方面也已开始应用。此外，酵母菌具有能将美蓝（蓝色的碱性染料）还原为无色的特点，所以能否将酵母菌应用于印染废水的生物处理，也是值得研究的。

二、霉菌

霉菌是多细胞的腐生或寄生的丝状菌，具有一种由分枝的、丝状的菌丝所组成的叶状体。这种菌丝比放线菌的菌丝粗几倍到几十倍，与放线菌相象，也分为两部分：一部分是营养菌丝，伸入营养物质内摄取营养；另一部分是气生菌丝，伸入空气中形成孢子和释放孢子。大多数霉菌菌丝的内部有隔膜，把菌丝分成若干小段，每个小段就是一个细胞，菌丝中的隔膜是细胞的细胞壁，如青霉、曲霉等都属于这种多细胞的类型。由一个细胞组成的没有隔膜的菌丝，称为单细胞菌丝体，如毛霉、根霉等（图4-8）。霉菌的细胞壁与细菌不同，它主要由几丁质或纤维素组成。除少数水生低等真菌含纤维素外，大部分霉菌细胞壁由几丁质组成。

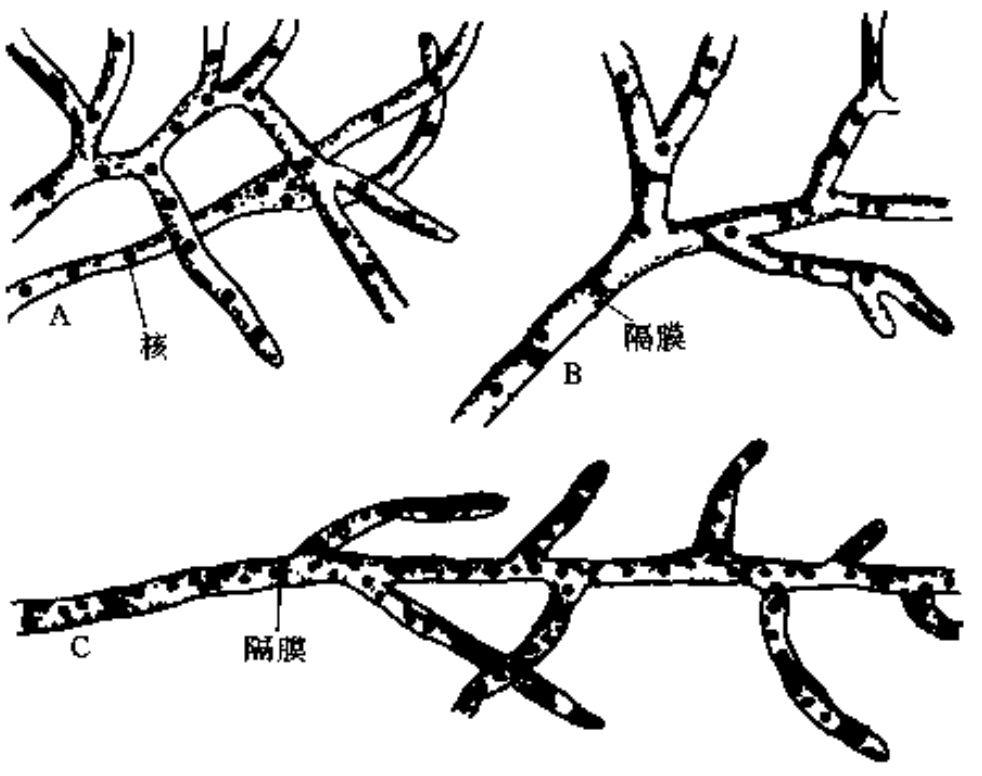
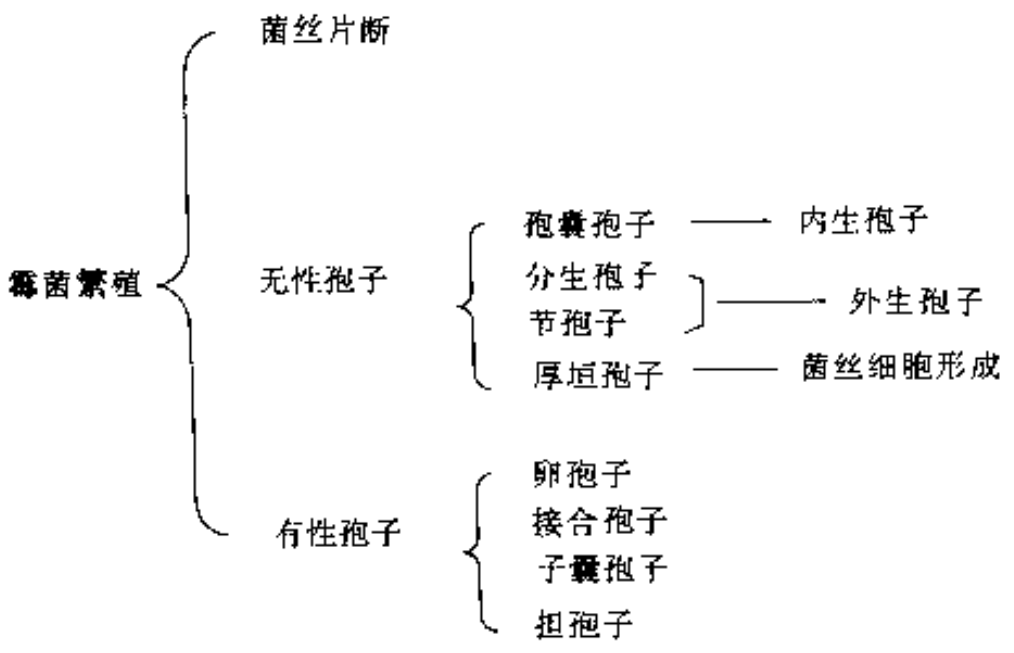


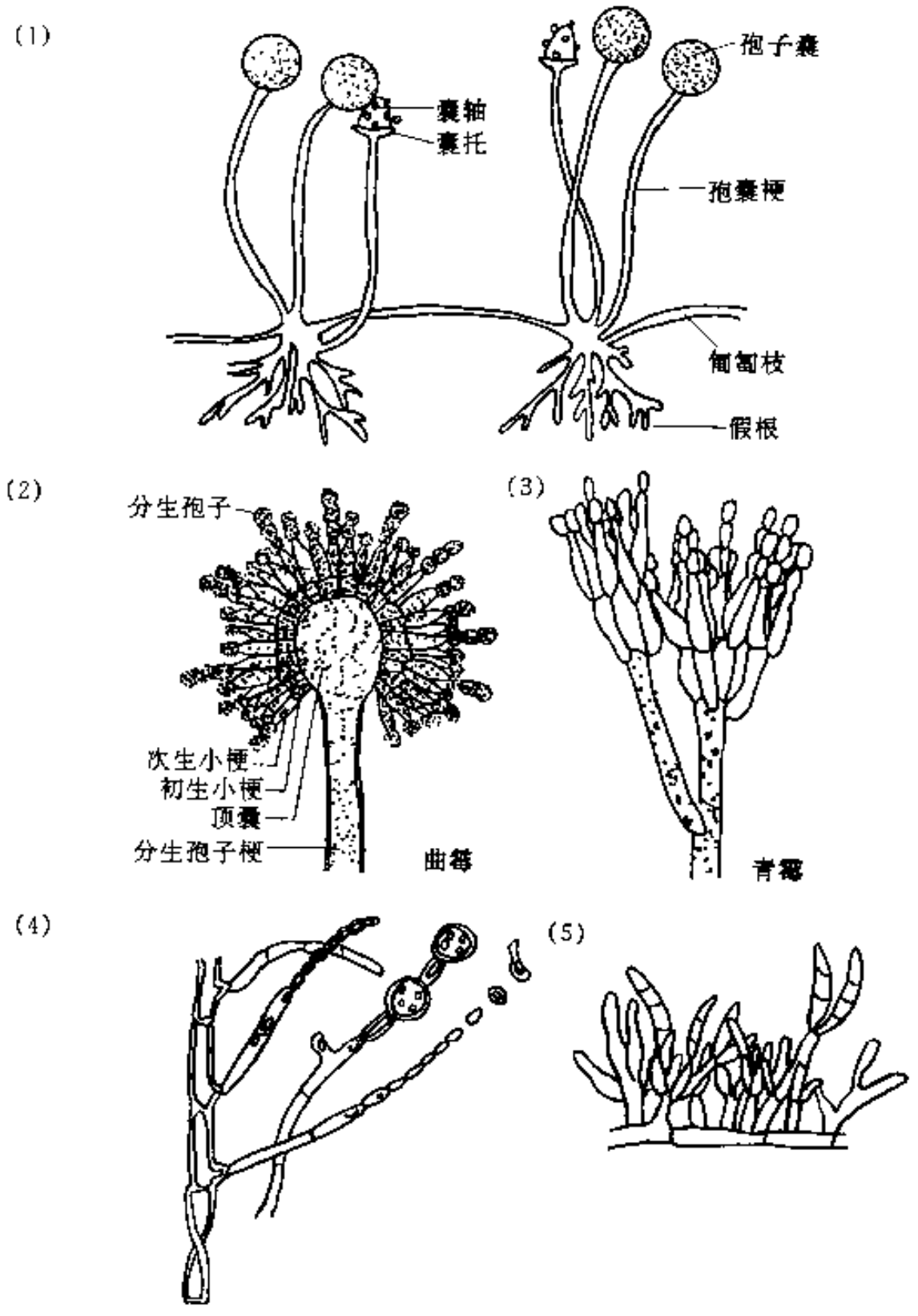
图 4-8　霉菌菌丝

A—无隔多核菌丝；B—有隔单核菌丝；C—有隔多核菌丝

霉菌的繁殖能力很强，而且方式多样，分无性繁殖和有性繁殖二大类。无性繁殖是许多霉菌的主要



(a)霉菌繁殖方式图解



(b)部分代表霉菌的无性生殖

图 4-9　霉菌的繁殖

(1) 根霉菌丝及孢囊孢子 (2) 曲霉分生孢子 (3) 青霉分生孢子 (4) 地霉厚垣孢子 (5) 赤霉节孢子

繁殖方式，产生孢囊孢子、分生孢子、节孢子和厚垣孢子等无性孢子。有些霉菌在菌丝生长后期以有性繁殖方式形成有性孢子进行繁殖（图 4-9）。有性繁殖方式是真菌系统分类的依据。由于霉菌产生的无性孢子数量多，体积小而轻，因此可随气流或水流到处散布。当温度、水分、养分等条件适宜时，便萌发成菌丝。因为霉菌的代谢能力很强，特别是对复杂有机物（如纤维素、木质素等）具有很强的分解能力，所以霉菌在固体废弃物的资源化及处理过程中具有重要作用。

将霉菌接种到固体培养基上，在一定温度条件下，经过一定时间的培养，可在培养基上长出绒毛状或絮状的圆形菌落，其菌落比其它微生物的大，有的可无限制地扩展。

霉菌都是依靠有机物生活的微生物，能分解碳水化合物、脂肪、蛋白质及其它含氮有机化合物。大多数霉菌生活时需要氧气。适宜的生活温度在 20～30 C之间，适宜的 pH 范围为 4.5～6.5。因为它们既能产生有机酸，也能产生氨去调整酸碱度，所以某些种类可以生存于 pH 值 1～10 之间的环境中。这对工业废水的生物处理有着重要的意义。

未受污染的天然水，一般很少含有真菌。如河道受到严重污染，就可在河底的灰白色沉积物中发现真菌。污水中霉菌的种类相当多，例如节水霉。

在活性污泥法的废水处理构筑物内，真菌的种类和数目一般没有细菌和原生动物多，其菌丝常能用肉眼看到，形如灰白色的棉花丝，粘着在沟渠或水池的内壁（粘着的丝状物中，除真菌外，还可能有一些丝状细菌）。在生物滤池的生物膜内，真菌形成广大的网状物，可能起着结合生物膜的作用。在活性污泥中，若繁殖了大量的霉菌，也会引起污泥膨胀。

近年来也发现某些霉菌如镰刀霉等能有效地氧化分解无机氰化物（CN^-），去除率可达 90%以上，对有机氰化物（腈）的处理效果则差些。因此，国内外都在进行利用霉菌处理含氰等废水的研究。另外，由于某些霉菌的蛋白质含量较高，可利用这些霉菌进行废水的单细胞蛋白处理。

第三节　藻　　类

一、藻类的形态及生理特性

藻类是一种低等植物，它们的种类很多，有单细胞的，也有多细胞的，按照其形态构造、色素组成等特点，藻类可分为十纲，主要的有蓝藻、绿藻、硅藻、褐藻和金藻等。近年来发现蓝藻是原核生物，故又称蓝细菌。为方便起见仍在本节中讨论。

藻类一般是无机营养的，其细胞内含有叶绿素及其它辅助色素，能进行光合作用。在有光照时，能利用光能，吸收二氧化碳合成细胞物质，同时放出氧气。在夜间无阳光时，则通过呼吸作用取得能量，吸收氧气同时放出二氧化碳。在藻类很多的池塘中，昼间水中的溶解氧往往很高，甚至过饱和；夜间溶解氧会急骤下降。

藻类在 pH 值 4～10 之间可以生长，适宜的 pH 值则为 6～8。

蓝藻是单细胞或丝状的群体（由许多个体聚集而成），其细胞中除含有叶绿素等色素外，还含有多量的藻蓝素，因此藻体呈蓝绿色，有时带黄褐色甚至红色。在水池、湖泊中生长茂盛时，能使水色变蓝或其它颜色，有的蓝藻并能发出草腥气味或霉味。蓝藻能适应的温度范围很广，在温度高达 85 C的温泉中能大量繁殖，在多年不融化的冰上也能生长，但一般喜欢生长于较温暖的地区或一年中温暖的季节。湖泊中常见的蓝藻有铜色微囊藻（*Micro-*

cystis aeruginosa）、曲鱼腥藻（*Anabaena contorta*）等。在污水中或潮湿土地上常见的有灰颤藻（*Oscillatoria limosa*）和大颤藻（*O. princeps*），见图 4-10。蓝藻是引起水体富养化的主要藻类之一。

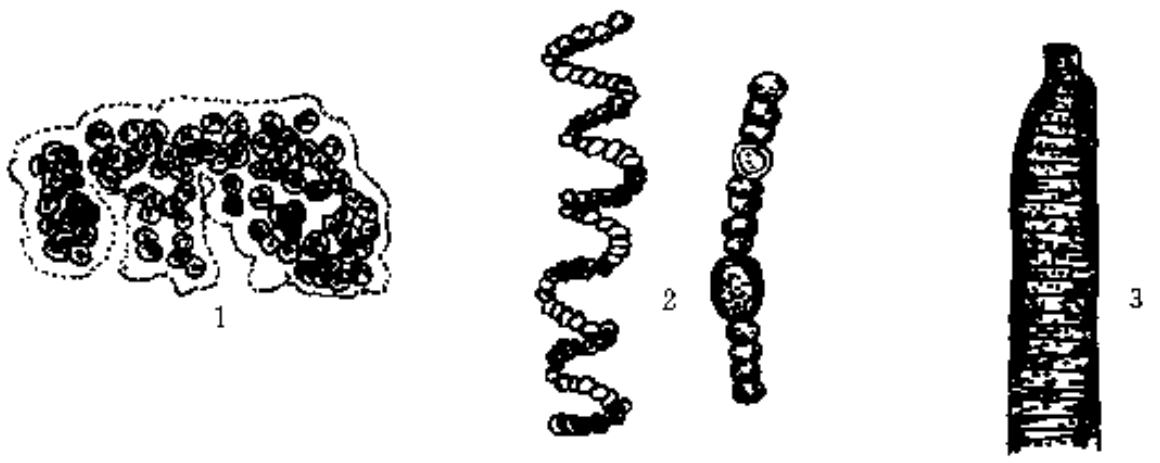


图 4-10　几种蓝藻

1—铜色微囊藻，2—曲鱼腥藻；3—大颤藻

有些蓝藻大量繁殖时，对牲畜有毒害作用。

绿藻是一种单细胞或多细胞的绿色植物。有些绿藻的个体较大，如水绵、水网藻等，有些则很小，必须用显微镜才能看到，如小球藻等。其细胞中的色素以叶绿素为主，并含有叶黄素和胡萝卜素。有的绿藻有鱼腥或青草的气味。绿藻的大部分种类适宜在微碱性环境中生长。常见的绿藻有小球藻（*Chlorella*）、栅藻（*Scenedesmus*）、衣藻（*Chlamydomonas*）、空球藻（*Eudorina*）和团藻（*Volvox*）等（图 4-11）。大部分绿藻在春夏之交和秋季生长得最旺盛。绿藻也是引起水体富营养化的主要藻类之一。

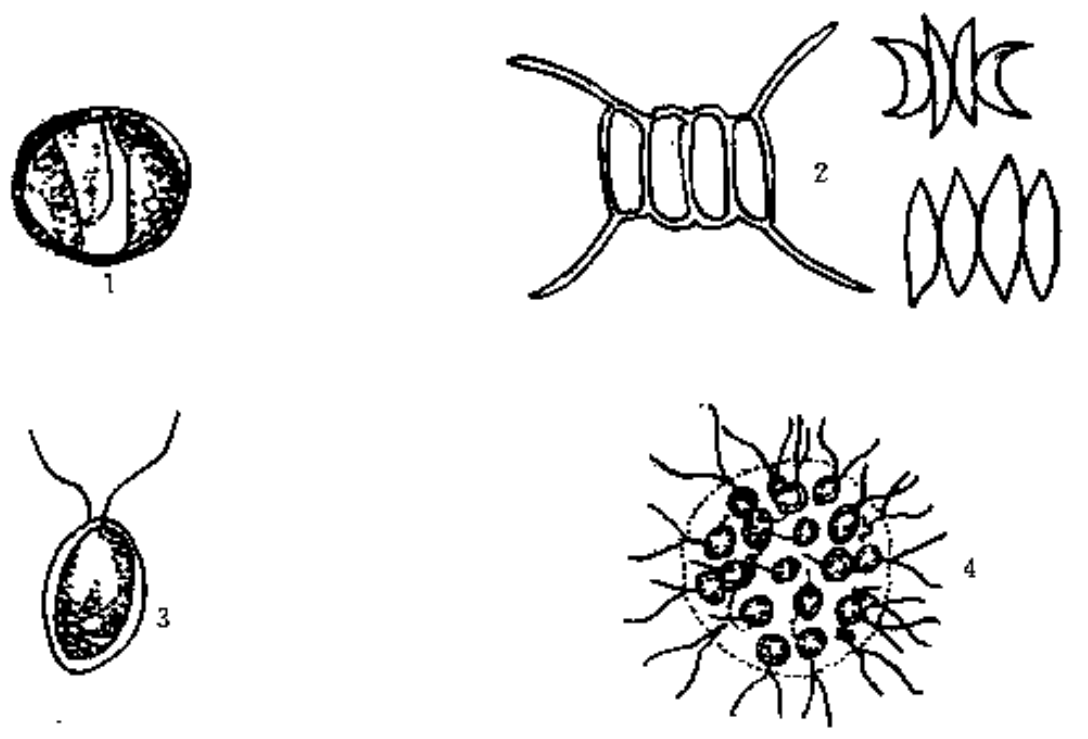


图 4-11　四种绿藻

1—小球藻；2—栅藻、3—衣藻；4—空球藻

硅藻为单细胞或单细胞的群体，细胞内含有黄色素、胡萝卜素和叶绿素等。它的主要特点是细胞壁中含有大量的硅质，形成一个由两片合成的硅藻壳体。

硅藻适宜在较低温度中生长，在春秋两季和冬初生长最好。一般硅藻产生香气，也有发出鱼腥气的。

水中常见的硅藻有纺锤硅藻（*Navicula*）、丝状硅藻（*Melosira*）、旋星硅藻

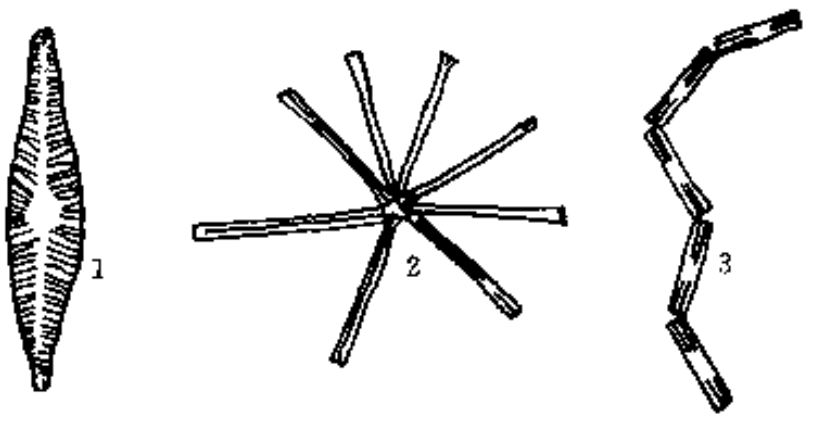


图 4-12　三种硅藻

1—纺梭硅藻；2—旋星硅藻；3- 隔板硅藻

（*Asterionella*）和隔板硅藻（*Tabellaria*）等（图 4-12）。

金藻中有一种称为黄群藻（*Synura*）的，能发出强烈的臭味，并使水味变苦。水中含量即使极少（1/250 万），人们也能觉察出来（图 4-13）。

二、藻类在给水排水工程中的作用

藻类对给水工程有一定的危害性。当它们在水库、湖泊中大量繁殖时，会使水带有臭味，有些种类还会产生颜色。水中有大量藻类时还可能影响水厂的过滤工作。各种藻类产生的臭味种类可见表 5-2。

由于细菌以外的各种微生物的大小有时相差较大，如果象细菌那样计算单位体积水内的菌数，意义不大，所以一般以其所占面积来衡量水受污染的程度，单位常用“标准面积单位”/mL，1 个“标准面积单位”等于 400μm^2。水源水中藻类每毫升达到 500～1000 标准面积单位时，自来水用户中个别人就会有意见；达到 1000～2000 标准面积单位时，一般都会有一些意见；超过 2000 标准面积单位时，就有较明显的臭味了。而如水中含有黄群藻，则即使数量极少，也能产生强烈的气味而使水不适于饮用。

在排水工程中可利用污水养殖藻类。藻类光合作用放出的氧气则可被好氧微生物利用，去氧化分解水中的有机污染物。这样一方面可收获大量有营养价值的藻类，另一方面也净化了污水。废水处理中使用的氧化塘主要就是利用藻类来供应氧气的。藻类在氧化塘中的作用如图 4-14。天然水体自净过程中，藻类也起着一定的作用。

氮和磷是藻类生长所需要的两种关键性元素。用传统的二级处理法处理废水不能有效地去除它们。当前，由于大量洗涤剂的使用和工业、农业废水的排放，废水中常含有较多的磷和氮，因此可能使受纳水体中的藻类大量繁殖，产生所谓富营养化污染，造成多种危

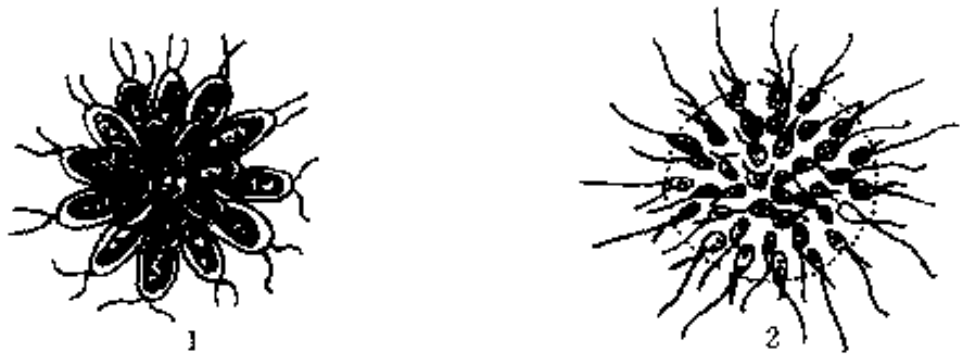


图 4-13　两种金藻

1- 黄群藻；2—拟黄团藻

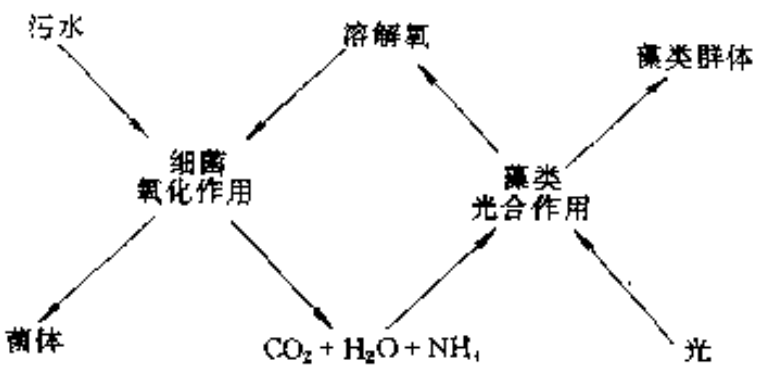


图 4-14　藻类在氧化塘中的作用

害，例如，使净化水质的工作发生困难；在夜间或藻类死亡后消耗大量氧气，因而可能危及水生生物（鱼类等）的生存；严重时，甚至使湖泊变为沼泽或旱地。遇有这种情况，就需对废水进行深度处理。

第四节　原 生 动 物

一、原生动物的形态及生理特性

原生动物是动物界中最低等的单细胞动物。它们的个体都很小，长度一般在100～300μm之间（少数大的种类的长度可达几个mm，而个别小的种类的长度则只有几个μm）。每个细胞常只有一个细胞核，少数种类也有两个或两个以上细胞核的。原生动物在形态上虽然只有一个细胞，但在生理上却是一个完善的有机体，能和多细胞动物一样行使营养、呼吸、排泄、生殖等机能。其细胞体内各部分有不同的分工，形成机能不同的“胞器”，例如：

行动胞器——伪足、鞭毛和纤毛等；

消化、营养胞器——废水生物处理中原生动物的营养方式有以下几类：（1）动物性营养：以吞食细菌、真菌、藻类或有机颗粒为主，大部分原生动物采取这种营养方式；（2）植物性营养：与植物的营养方式一样，在有阳光的条件下，可利用二氧化碳和水合成碳水化合物，只有少数的原生动物采取这种营养方式，如植物性鞭毛虫；（3）腐生性营养：以死的机体、腐烂的物质为主。有些动物性营养的原生动物具有胞口、胞咽等；

排泄胞器——大多数原生动物具有专门的排泄胞器——伸缩泡。伸缩泡一伸一缩，即可将原生动物体内多余的水分及积累在细胞内的代谢产物排出体外；

感觉胞器——一般原生动物的行动胞器就是它的感觉胞器。个别的原生动物有专门的感觉器官——眼点。

水处理中常见的原生动物有三类：肉足类、鞭毛类和纤毛类。

（一）肉足类

肉足类原生动物（*Sarcodina*）只有细胞质本身形成的一层薄膜。它们大多数没有固定的形状，少数种类为球形。细胞质可伸缩变动而形成伪足，作为运动和摄食的胞器。绝大部分肉足类都是动物性营养。肉足类原生动物没有专门的胞口，完全靠伪足摄食，以细菌、藻类、有机颗粒和比它本身小的原生动物为食物。

可以任意改变形状的肉足类为根足变形虫，一般就叫做变形虫（*Amoeba*）。还有一些体形不变的肉足类，呈球形，它的伪足呈针状，如辐射变形虫（*Amoeba radiosa*）和太阳虫（*Actinophrys*）等（图4-15）。

肉足类在自然界分布很广，土壤和水体中都有。中污带水体（见第六章第六节）是多数种类的最适宜的生活环境，在污水中和废水处理构筑物中也有发现。就卫生方面来说，重要的水传染病阿米巴痢疾（赤痢）就是由于寄生的变形虫赤痢阿米巴（*Endamoebahistolytica*）所引起的。

（二）鞭毛类

这类原生动物因为具有一根或一根以上的鞭毛，所以统称鞭毛虫或鞭毛类原生动物（*Mastigophora*）。鞭毛长度大致与其体长相等或更长些，是运动器官。鞭毛虫又可分为植物性鞭毛虫和动物性鞭毛虫。

1. 植物性鞭毛虫　多数有绿的色素体，是仅有的进行植物性营养的原生动物。此外，有少数无色的植物性鞭毛虫，它们没有绿的色素体，但具有植物性鞭毛虫所专有的某些物质，如坚硬的表膜和副淀粉粒等，形体一般都很小，它们也会进行动物性营养。在自然界中绿色的种类较多，在活性污泥中则无色的植物性鞭毛虫较多。

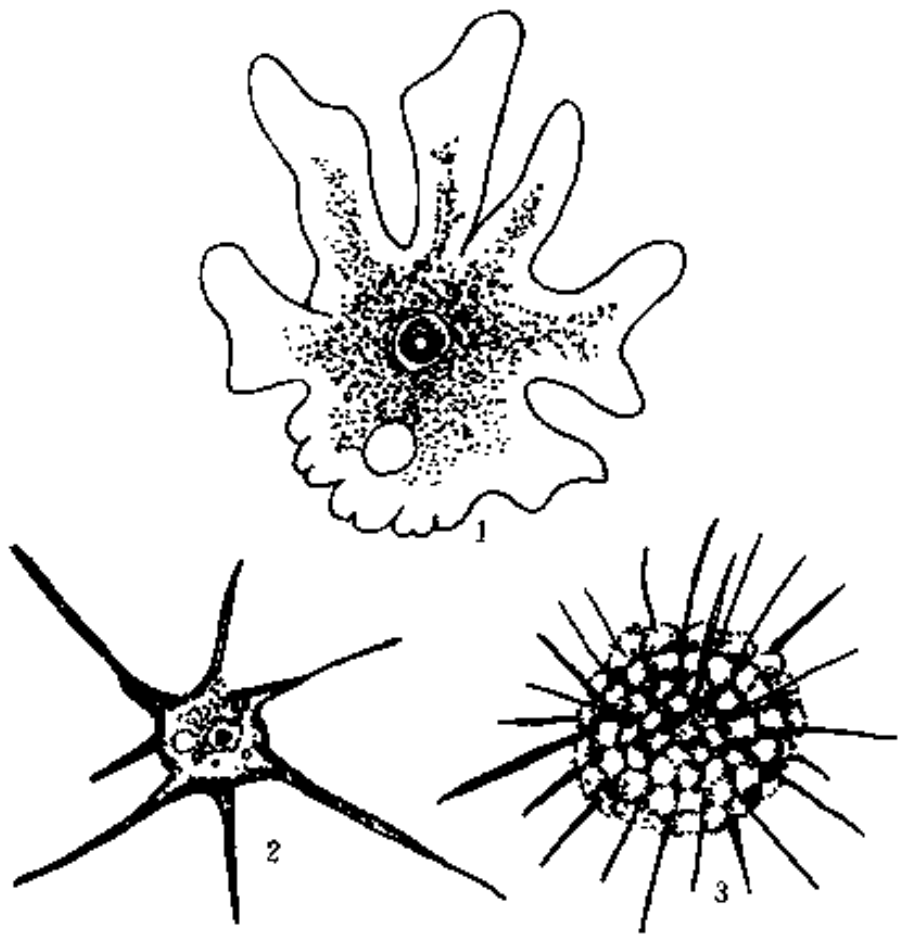


图 4-15　几种肉足类原生动物

1—变形虫；2—辐射变形虫；3—太阳虫

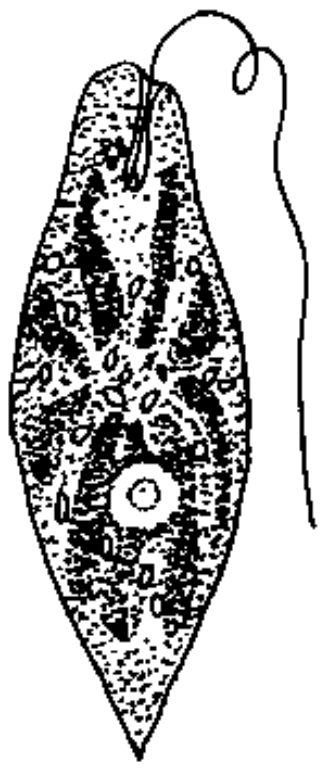


图 4-16　绿眼虫

最普通的植物性鞭毛虫为绿眼虫（*Euglena viridis*）。它是植物性营养型，有时能进行植物式腐生性营养。最适宜的环境是 α——中污性小水体，同时也能适应多污性水体。在生活污水中较多，在寡污性的静水或流水中极少。在活性污泥中和生物滤池表层滤料的生物膜上均有发现，但为数不多。此外还有杆囊虫（*Peranema trichophorum*），它的鞭毛比眼虫粗，利用溶解于水中的有机物进行腐生性营养；还有一种衣滴虫，有两根鞭毛和两个伸缩泡（图 4-16）。

有些能进行光合作用的鞭毛类原生动物常被划分在藻类植物中，如本章第三节内所提到的黄群藻和拟黄团藻等。

2. 动物性鞭毛虫　这类鞭毛虫体内无绿色的色素体，也没有表膜、副淀粉粒等植物性鞭毛虫所特有的物质。一般体形很小。它们是靠吞食细菌等微生物和其它固体食物生存的，有些还兼有动物式腐生性营养。在自然界中，动物性鞭毛虫生活在腐化有机物较多的水体内。在废水处理厂曝气池运行的初期阶段，往往出现动物性鞭毛虫。

常见的动物性鞭毛虫有梨波豆虫

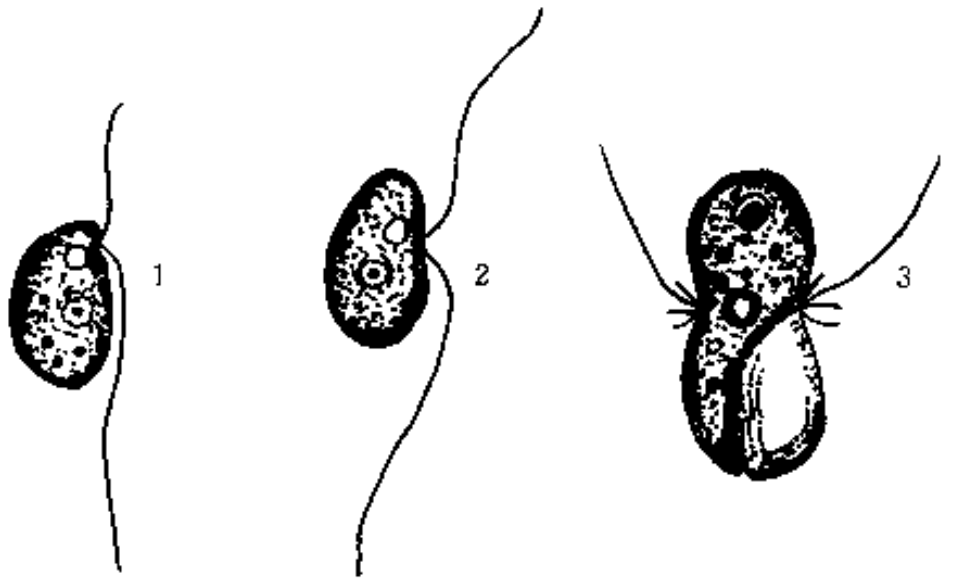


图 4-17　动物性鞭毛虫

1—梨波豆虫；2—跳侧滴虫；3—活泼锥滴虫

(*Bodo*) 和跳侧滴虫 (*Pleuromonas jaculans*) 等 (图 4 17)。

(三) 纤毛类

纤毛类原生动物或纤毛虫 (Ciliata) 的特点是周身表面或部分表面具有纤毛，作为行动或摄食的工具。纤毛虫是原生动物中构造最复杂的，不仅有比较明显的胞口，还有口围、口前庭和胞咽等司吞食和消化的细胞器官。它的细胞核有大核（营养核）和小核（生殖核）两种，通常大核只有一个，小核则有一个以上。纤毛类可分为游泳型和固着型两种。前者能自由游动，如周身有纤毛的草履虫，后者则固着在其它物体上生活，如钟虫等。固着型的纤毛虫可形成群体。

纤毛虫喜吃细菌及有机颗粒，竞争能力也较强，所以与废水生物处理的关系较为密切。

在废水生物处理中常见的游泳型纤毛虫有草履虫 (*Paramecium caudatum*)、肾形虫 (*Colpoda*)、豆形虫 (*Colpidium*)、漫游虫 (*Lionotus*)、裂口虫 (*Amphileptus*)、楯纤虫 (*Aspidisca*) 等 (图 4-18)。

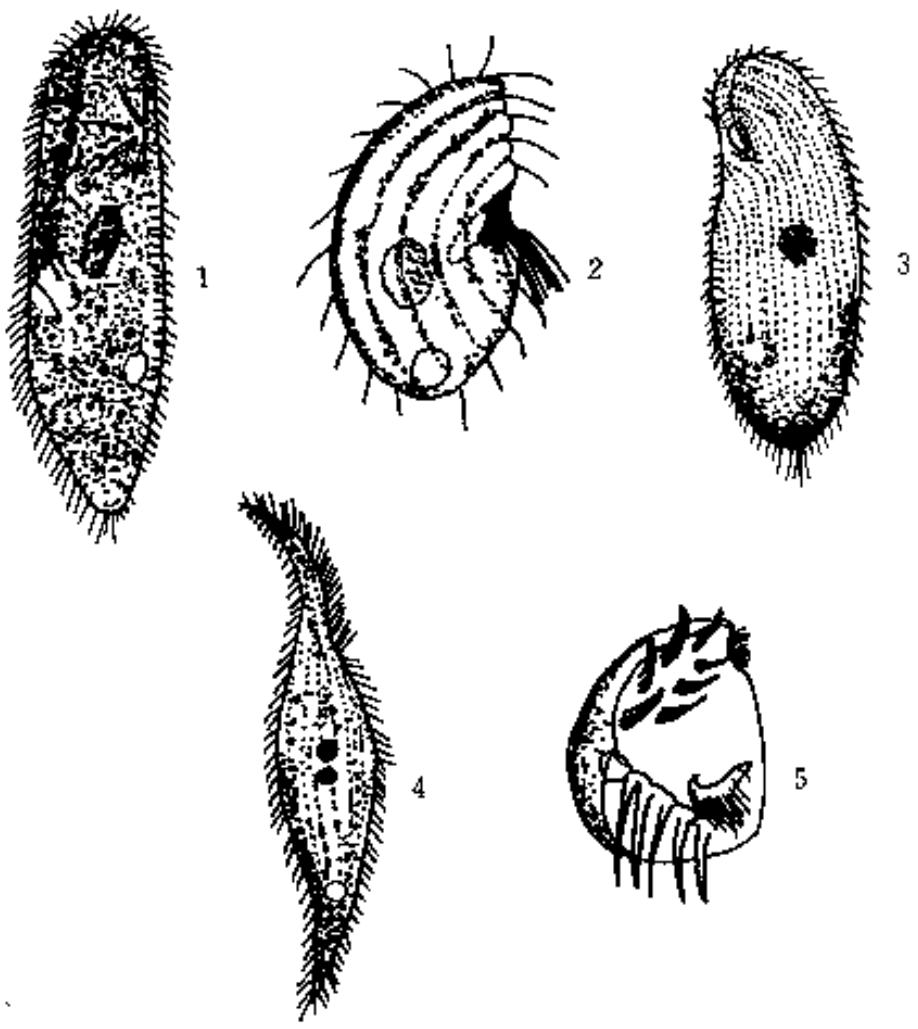


图 4-18 游泳型纤毛虫

1 草履虫；2－肾形虫；3 豆形虫；4—漫游虫；5—楯纤虫

常见的固着型纤毛虫主要是钟虫类。钟虫类因外形象敲的钟而得名。钟虫前端有环形纤毛丛构成的纤毛带，形成似波动膜的构造。纤毛摆动时使水形成漩涡，把水中的细菌、有机颗粒引进胞口。食物在虫体内形成食物泡。当泡内食物逐渐被消化和吸收后，泡亦消失，剩下的残渣和水分渗入较大的伸缩泡。伸缩泡逐渐胀大，到一定程度即收缩，把泡内废物排出体外。伸缩泡只有一个，而食物泡的个数则随钟虫活力的旺盛程度而增减（图 4-19）。

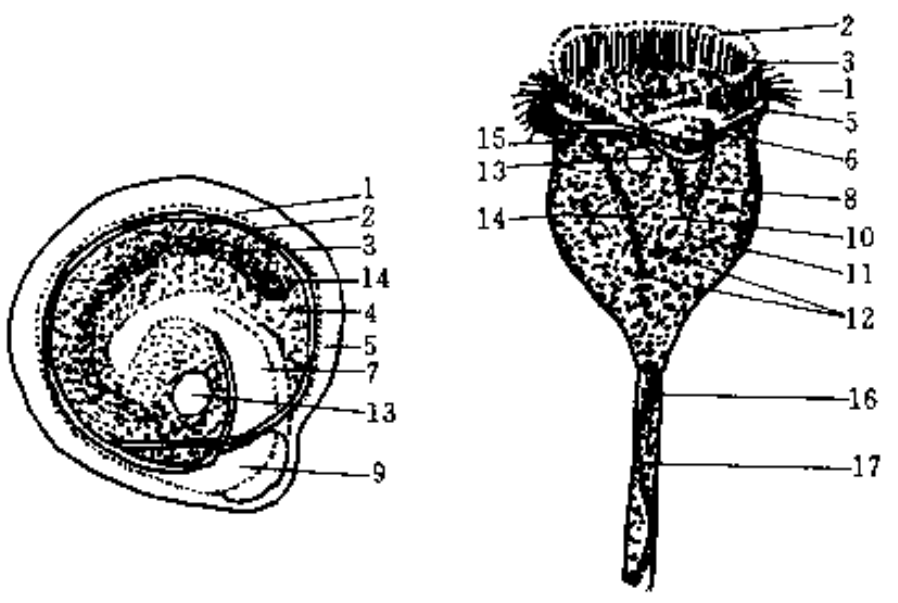


图 4-19 钟虫的构造

右图：模式图；左图：口围区顶观图解

1—外膜；2—中膜；3—内膜；4—口围区；5—口围边缘；6—口围边缘进入漏斗状口前庭；7—口前庭；8—漏斗状口前庭的纤毛列；9－口前庭的波动膜；10—胞口；11—形成食泡；12—食泡；13—伸缩泡；14—大核；15—小核；16—柄；17—肌丝

大多数钟虫在后端有尾柄，它们靠尾柄附着在其它物质（如活性污泥、生物滤池的生物膜）上。也有无尾柄的钟虫，它可在水中自由游动。有时有尾柄的钟虫也可离开原来的附着物，靠前端纤毛的摆动而移到另一固体物质上。大多数钟虫类进行裂殖。有尾柄的钟虫的幼体刚从母体分裂出来，尚未形成尾柄时，靠后端纤毛带

摆动而自由游动。

常见的单个个体的钟虫类有小口钟虫、沟钟虫、领钟虫等．见图 4-20。这种单个个体的钟虫统称为钟虫（*Vorticella*）或普通钟虫。

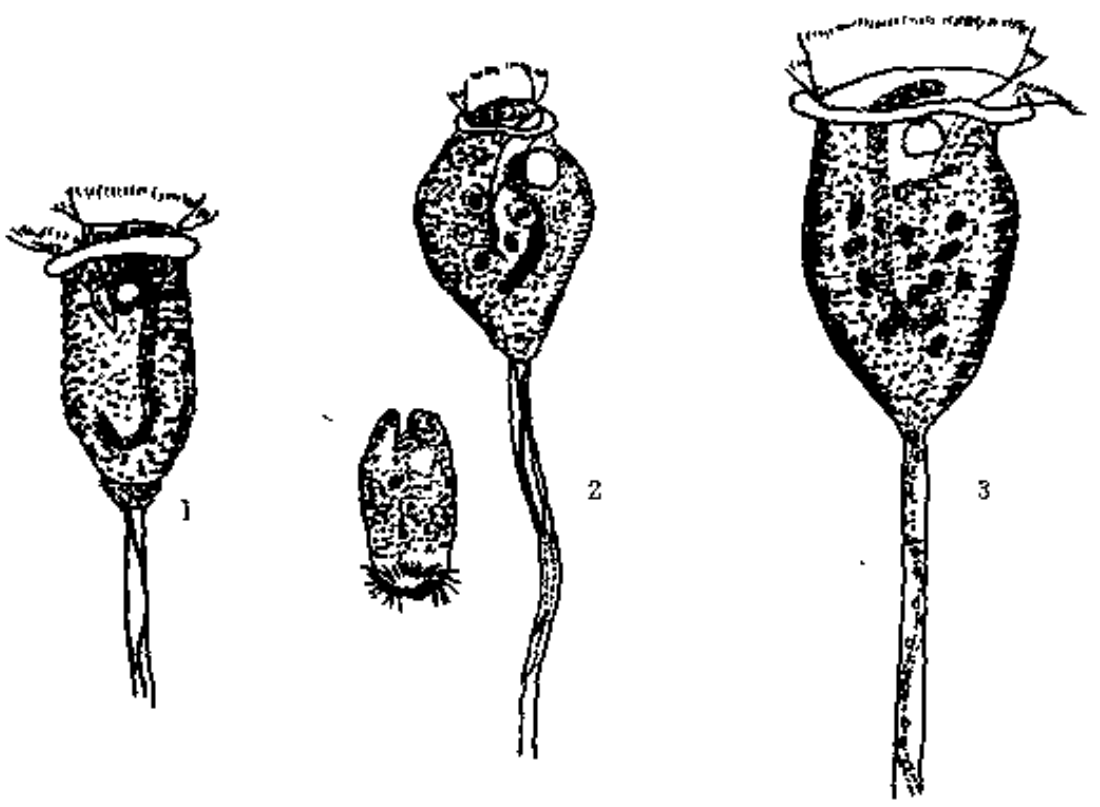


图 4-20　几种单个个体的钟虫

1—领钟虫；2—小口钟虫；3—沟钟虫

常见的群体钟虫类有等枝虫（累枝虫，*Epistylis*）和盖纤虫（盖虫，*Opercularia*）等。常见的等枝虫有瓶累枝虫等，盖纤虫有集盖虫、彩盖虫等（图 4-21）。等枝虫的各个钟形体的尾柄一般互相连接呈等枝状，也有不分枝而个体单独生活的。盖纤虫的虫体的尾柄在顶端互相连接，虫口波动膜处生有“小柄”。集盖虫的虫体一般为卵圆形或近似犁形，中部显著地膨大，前端口围远较最宽阔的中部为小，尾柄细而柔弱，群体不大，常不超过 16 个个体。彩盖虫的虫体伸直时近似纺棰形，体长约为体宽的 3 倍，收缩时类似卵圆形，尾柄较粗而坚实，群体较小，一般由 2～8 个个体组成。等枝虫和盖纤虫的尾柄内，不象普通钟虫，都没有肌丝，所以尾柄不能伸缩，当受到刺激后只有虫体收缩。

群体钟虫和普通钟虫都经常出现于活性污泥和生物膜中，可作为处理效果较好的指示生物❶。

水中原生动物除上述 3 类外，还有吸管虫类原生动物（*Suctoria*）和孢子类原生动物（*Sporozoa*）。吸管类成虫具有吸管，并也长有柄，固着在固体物质上，吸管用来诱捕食物（图 4-22）。吸管虫在废水处理中的作用还没有很好地研究。孢子虫是寄生性的，其生活史较复杂，能产生孢子，主要在卫生医疗方面有重要性，间日疟原虫就属于这一类原生动物。

二、原生动物在废水生物处理中的作用

细菌数量多，分解有机物的能力强，并且繁殖迅速，所以对废水生物处理起作用的主要是细菌。其次则是原生动物，这是因为原生动物在污水中的数量也不少，常占微型动物总数的 95%以上，并且也有一定的净化能力和可作为指示生物，用以反映活性污泥和生物膜的质量以及废水净化的程度。

---

❶ 一种生物只在某一环境中生长，这种生物就是这一环境的指示生物。

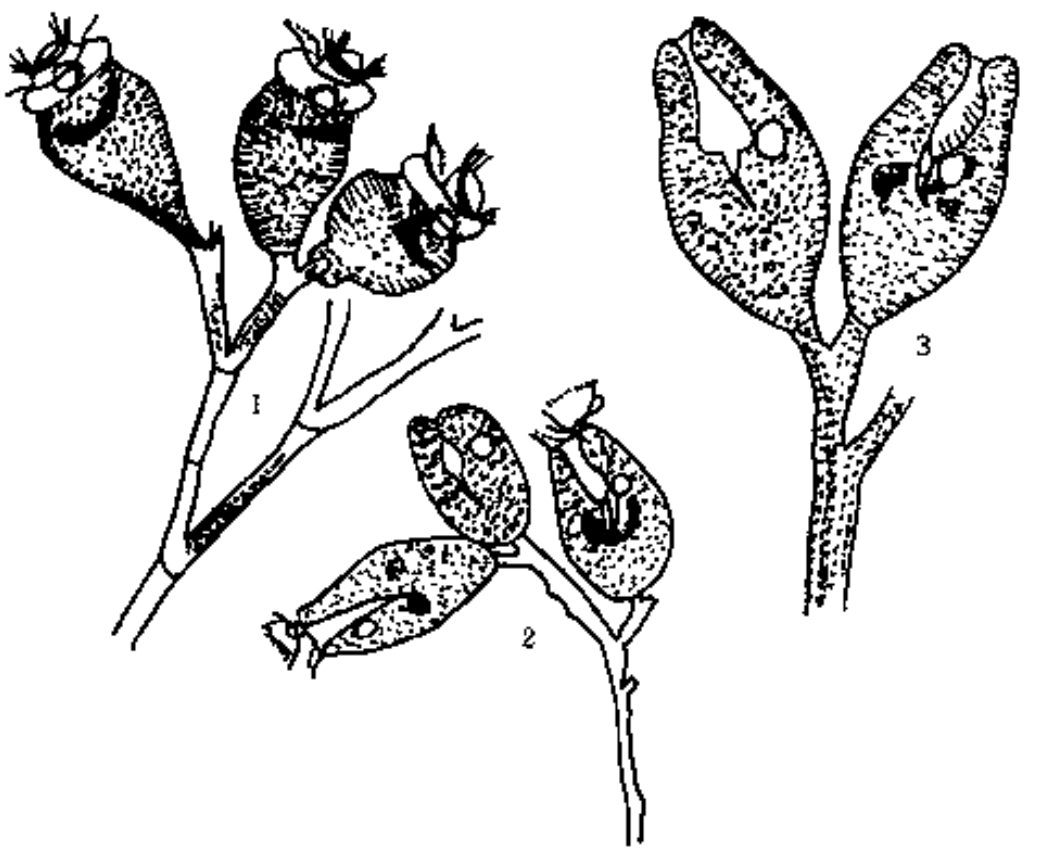


图 4-21　群体钟虫

1—瓶累枝虫；2- 集盖虫；3—彩盖虫

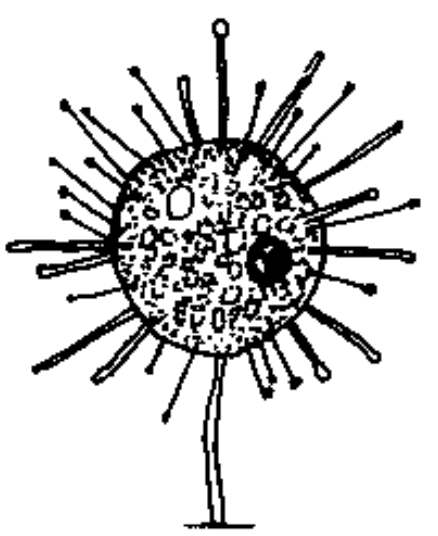


图 4-22　吸管虫

在氧化塘一类的构筑物中，藻类的作用则比原生动物更重要，当然细菌还是起最主要的作用。

（一）原生动物对废水净化的影响

动物性营养型的原生动物，如动物性鞭毛虫、变形虫、纤毛虫等能直接利用水中的有机物质，对水中有机物的净化起一定的积极作用。但是这些原生动物是以吃细菌为主的，它们直接提高有机物去除率的作用，还需进一步研究。

在活性污泥法中，纤毛虫可促进生物絮凝作用。活性污泥凝聚得好，就会在二次沉淀池中沉降得好，从而改善出水水质。细菌本身也有生物凝聚作用，但纤毛虫能促进凝聚。科兹（Curds）在 1963 年通过实验，证明小口钟虫、褶累枝虫和尾草履虫等纤毛虫能分泌一些促进凝聚的糖类和粘朊。他甚至认为在生物凝聚过程中纤毛虫比细菌起的作用更大些。

纤毛虫能大量吞食细食，特别是游离细菌❶，因此可改善生物处理法出水的水质。科兹等人在实验室条件下进行实验，发现曝气池在没有纤毛虫条件下运转 70d，出水中游离细菌平均为 100～160 百万个/mL，出水很浑浊；当接种了纤毛虫（节盖虫、苔藓伪瞬目虫和贪食织毛虫），出水中游离细菌立刻降至 1～8 百万个/mL，出水很清澈。同时，加入纤毛虫后出水的其它指标也有改善（见表 4-1）。他们认为纤毛虫除掠食细菌外，还有一定程度的净化作用。

纤毛虫在废水净化中的作用　　表 4-1

项　　目	未 加 纤 毛 虫	加 入 纤 毛 虫
出水平均 BOD_5（mg/L）	54～70	7～24
过滤后 BOD_5（mg/L）	30～35	3～9
平均有机氮（mg/L）	31～50	14～25

❶ 游离在水中的细菌。

续表

项　　目	未 加 纤 毛 虫	加 入 纤 毛 虫
悬浮物（mg/L）	50～73	17～58
沉降 30min 的悬浮物（mg/L）	37～56	10～36
100nm 时的光密度	0.340～0.517	0.051～0.219

（二）以原生动物为指示生物

由于不同种类的原生动物对环境条件的要求不同，对环境变化的敏感程度也不同，所以可以利用原生动物种群的生长情况，判断生物处理构筑物的运转情况及废水净化的效果。原生动物的形体比细菌大得多，以低倍显微镜即可观察，因此以原生动物为指示生物是较为方便的。

对废水处理构筑物中的原生动物进行镜检时，需注意以下几方面：（1）原生动物种类的组成；（2）种类的数量变化；（3）各种群的代谢活力。

在生物处理构筑物中会有一些常见种类。根据湖北省水生生物研究所的观察和分析，在我国一些污水处理厂的活性污泥中，最常见的纤毛虫是小口钟虫、沟钟虫、八钟虫、领钟虫、瓶累（等）枝虫、褶累（等）枝虫、关节累（等）枝虫、集盖虫、微盘盖虫、彩盖虫、螅状独缩虫、有肋楯纤虫、盘状游仆虫、卑怯管叶虫；肉足类虫是蛞蝓变形虫、点滴简变虫、小螺足虫；鞭毛虫是尾波豆虫、梨波豆虫、粗袋鞭虫等。

由于大多数原生动物是广栖性的，即能忍受很宽的环境范围，所以某些种类的少量出现并不能完全说明构筑物的处理效果。必须注意各种类的数量变化。研究表明，当活性污泥法曝气池的有机负荷、曝气时间、有机物去除率等大幅度变化时，种类组成差别相当小，而各主要种类的数量变化则是很大的。这说明原生动物对环境的忍受幅度虽然很宽，但大量生长的最适宜环境的范围还是窄的，例如，某些原生动物对溶解氧的有无很敏感，特别是普通的钟虫，当水中溶解氧含量适中时，很活跃；当溶解氧少于 1mg/L 时，就很不活跃，前端会出现一个大气泡（也有人发现氧过多时钟虫前端也会有大气泡）。所以，钟虫前端出现气泡，往往说明充氧不正常，水质将变坏。此外，环境条件恶劣时，也发现钟虫尾柄脱落，虫体变形，甚至变成圆柱形，如果环境不改善，则虫体越变越长，以致死亡。等枝虫对恶劣环境的耐受力一般比普通钟虫强。根据有些废水处理站的运转经验，在处理含硫废水时，当含硫量提高到 100mg/L，其它原生动物均不出现了，普通钟虫大大减少，而等枝虫仍正常生活。原生动物生长适宜的 pH 范围与细菌和藻类的相仿，但很多原生动物对于毒物的影响比细菌为敏感，所以在废水生物处理系统中根据原生动物的变化情况，常可在细菌受到影响之前采取适当的措施。

一般情况下，在活性污泥的培养和驯化阶段中，原生动物种类的出现和数量的变化往往按一定的顺序进行。在运行初期曝气池中常出现鞭毛虫和肉足虫。若钟虫出现且数量较多，则说明活性污泥已成熟，充氧正常。例如，湖北省水生生物研究所在武汉印染厂的活性污泥中观察到，当有柄纤毛虫数量最多时，溶解氧为 1～3mg/L，污泥的性能良好。在正常运行的曝气池中，如果固着型纤毛虫减少，游泳型纤毛虫突然增加，表明处理效果将变坏。

除原生动物的种类和数量外，还应注意各种群的代谢活力。例如，纤毛虫在环境适宜

时，用裂殖方式进行生殖；当食物不足，或溶解氧、温度、pH 值不适宜、或者有毒物质超过其忍受限度时，就变为接合生殖，甚至形成孢囊以保卫其身体。所以，当观察到纤毛虫活动力差，钟虫类口盘缩进、伸缩泡很大，细胞质空泡化、活动力差、畸形、接合生殖、有大量孢囊形成等现象时，即使虫数较多，也说明处理效果不好。

根据以上叙述可知，在废水的生物处理厂（站）中应对原生动物进行长期的显微镜观察，以掌握本厂正常运转时常见的而且数量多的种类。然后根据日常的镜检结果，就可对废水处理的效果进行判断。如果发现偶然见到的种突然猛增或其它不正常现象，就说明运转出现了问题，应及时采取补救措施，以保证处理工作的正常运行。

应当指出，无论用原生动物或下节将要提到的其它微型动物作为指示生物，使用时都要谨慎，因为它们虽然可以直接在显微境下观察，但作为指示生物都还没有正确的定型方法，目前只能起辅助理化分析的作用。

第五节　后　生　动　物

后生动物也称多细胞动物，其机体不象原生动物，是由多细胞组成。在水处理工作中常见的后生动物主要是多细胞的无脊椎动物，包括轮虫、甲壳类动物和昆虫及其幼虫等。

一、轮虫

轮虫（*Rotifers*）是多细胞动物中比较简单的一种。其身体前端有一个头冠，头冠上有一列、二列或多列纤毛形成纤毛环。纤毛环经常摆动，将细菌和有机颗粒等引入口部，纤毛环还是轮虫的行动工具（图 4-23）。轮虫就是因其纤毛环摆动时状如旋转的轮盘而得名。轮虫有透明的壳，两侧对称，体后多数有尾状物。

轮虫以细菌、小的原生动物和有机颗粒等为食物，所以在废水的生物处理中有一定的净化作用。

在废水的生物处理过程中，轮虫也可作为指示生物。当活性污泥中出现轮虫时，往往表明处理效果良好，但如数量太多，则有可能破坏污泥的结构，使污泥松散而上浮。活性污泥中常见的轮虫有转轮虫、红眼旋轮虫等。

轮虫在水源水中大量繁殖时，有可能阻塞水厂的砂滤池。

二、甲壳类动物

通常提到甲壳类动物就会使人想到虾类。水处理中遇到的多为微型甲壳类动物，这类生物的主要特点是具有坚硬的甲壳。在给水排水工程中常见的甲壳类动物有水蚤（*Daphnia*）和剑水蚤（*Cyclops*）（图 4-24）。它们以细菌和藻类为食料。它们若大量繁殖，可能影响水厂滤池的正常运行。氧化塘出水中往往含有较多藻类，可以利用甲壳类动物去净化这种出水。

三、其它小动物

水中有机淤泥和生物粘膜上常生活着一些其它小动物，如线虫和昆虫（包括其幼虫）等。在废水生物处理的活性污泥和生物膜中都可发现线虫（*Nematode*）。线虫的虫体为长线形，在水中的一般长 0.25～2mm，断面为圆形（图 4-25）。有些线虫是寄生性的，在废水处理中遇到的是独立生活的。线虫可同化其它微生物不易降解的固体有机物。

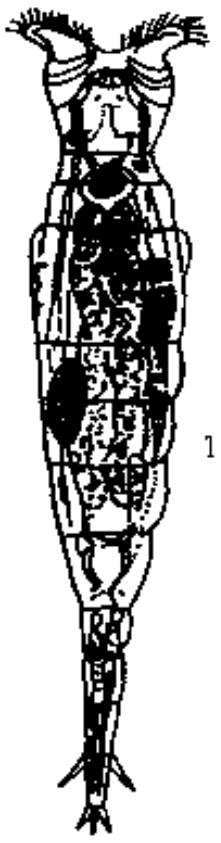


图 4-23　轮虫

1--转轮虫；2--红眼旋轮虫

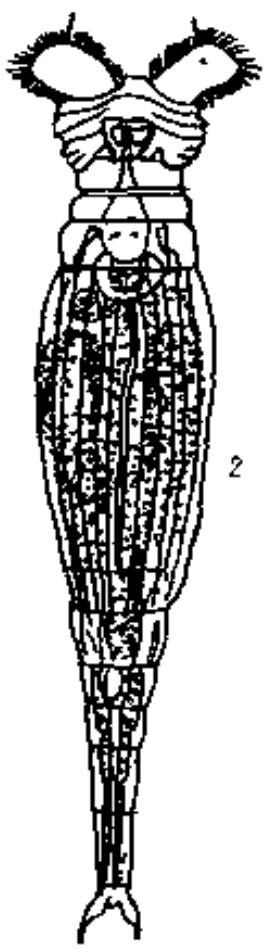


图 4-24　甲壳类动物

1—大型水蚤；2—刘氏中剑水蚤

在水中可被发现的小虫或其幼虫还有摇蚊幼虫（*Chironomus gr. plumosus*）、蜂蝇（*Eristalis tenax*）幼虫和颤蚯蚓（*Tubifex tubifex*）等，这些生物都可用作研究河川污染的指示生物（见图 4 26 及第六章第六节）。

动物生活时需要氧气，但微型动物在缺氧的环境里也能数小时不死。一般说，在无毒



图 4-25　线虫

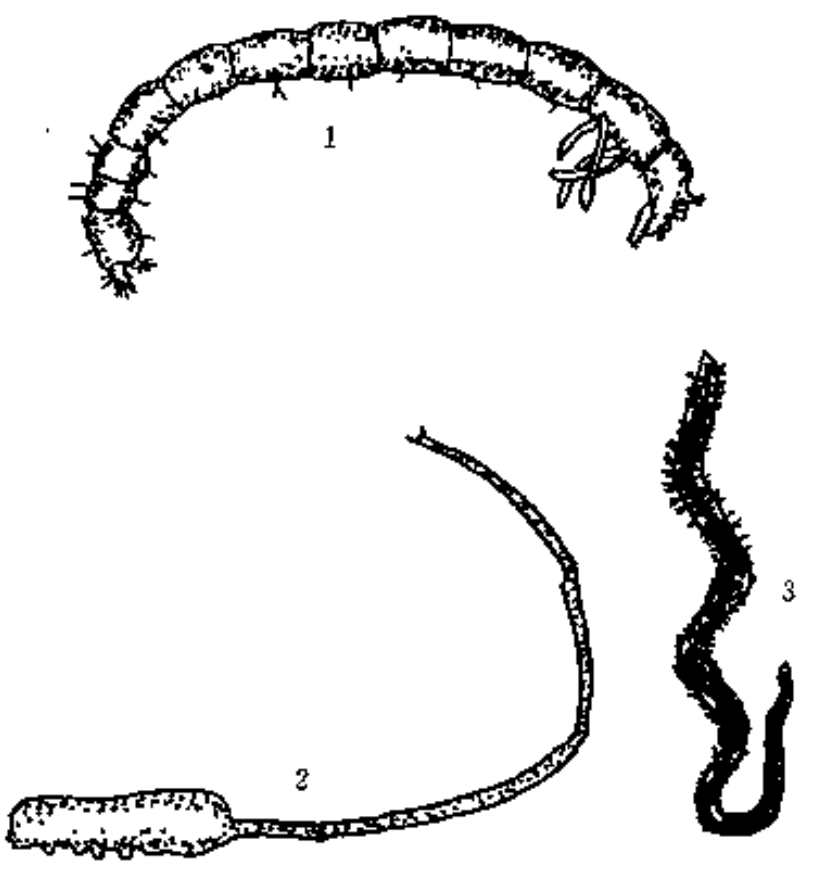


图 4-26　几种小生物

1--摇蚊幼虫；2- 蜂蝇幼虫；3- 颤蚯蚓

废水的生物处理过程中，如无动物生长，往往说明溶解氧不足。

第六节　病毒和噬菌体

病毒和噬菌体个体都很小，一般已无法用普通光学显微镜辨认（普通光学显微镜只能辨别 0.2μm 以上的物体）。这种无法用光学显微镜辨认的微生物常称为超显微镜微生物。近年来使用电子显微镜观察病毒则可以看得较清楚。

病毒不象其它微生物，没有细胞结构。其组成成分只有核酸和蛋白质。蛋白质组成病毒的衣壳，包在核酸外部，每种病毒只含一种核酸，或为核糖核酸（RNA），或为脱氧核糖核酸（DNA）。有些动物病毒的衣壳外面还有一层薄膜，称囊膜。没有囊膜的病毒则为裸露的病毒颗粒。大多数可由水传染疾病的病毒都没有囊膜。囊膜由蛋白质、多糖类等物质组成。破坏病毒的囊膜往往也会破坏它的传染性能。病毒能生长繁殖，并有一定的遗传性和变异性。

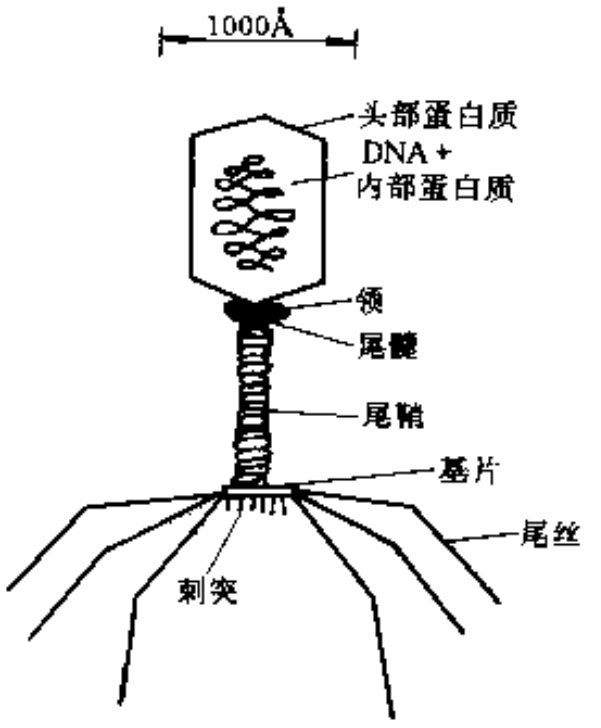


图 4-27　大肠杆菌 T 偶数噬菌体结构示意

各种病毒形状不一，有的是球形（如脊髓灰质炎病毒），有的是杆状（如烟草花叶病毒），有的是椭圆形，还有呈立方体和六面体的。噬菌体大部分都是蝌蚪状的，头部为对称的廿面体，还具有螺旋对称的尾，尾的长短不等，有的尾部僵硬。有的噬菌体具有能收缩的尾鞘，如大肠杆菌 T 偶数噬菌体，见图 4-27。

病毒的大小也相差悬殊，大的直径超过 200nm，而小的仅 10nm 左右（见表 4-2）。

病毒的大小和其它物体的对比　　**表 4-2**

病毒或其它物体	长×宽（或直径）(nm)	病毒或其它物体	长×宽（或直径）(nm)
红 血 球	7500	大肠杆菌噬菌体 T_2	60×80
炭 杆 菌	600～1000×300～500	烟草花叶病病毒	15×280
牛　　痘	210×260	血清蛋白分子	22
天花病毒	225	日本 B 型脑炎病毒	18
胸膜 肺炎菌	150	口蹄疫病毒	10
流行性感冒病毒	115	卵白蛋白分子	2.5×10

病毒是寄生性的，寄生在人、动物、植物及微生物等的活细胞内。传染病如天花、肝炎、小儿麻痹等都是由病毒引起的。

脊髓灰质炎病毒（可引起小儿麻痹症）和传染性肝炎病毒可由患者粪便中排泄出。脊髓灰质炎病毒可因直接接触患者或因食物和水而传播。虽然病毒性肝炎主要是因与患者接触而传染；但也发生过由于饮水而传播并爆发肝炎的例子，故在进行水处理工作时，也应注意防止传染性病毒对水的污染。

噬菌体是寄生在细菌或放线菌细胞内的微生物，可称为细菌的病毒。噬菌体的寄生性具有高度的专一性，即一种噬菌体只能侵染某一种细菌。因此可以利用已知的噬菌体来鉴定细菌的种类。噬菌体的平均大小约为 30～100nm。当它侵入细菌的细胞后，迅速繁殖，引起细菌细胞的裂解和死亡。

1. 病毒的繁殖　病毒缺乏完整的酶系统，不能单独进行物质代谢，必须由宿主细胞提供合成的原料、能量与场所，而且只能在易感的活细胞中才能繁殖。病毒不是二分裂繁殖，而是以复制方式繁殖。繁殖过程分为吸附、侵入与脱壳、复制与合成、装配与释放四个步骤。以大肠杆菌 T 偶数噬菌体为例叙述病毒的繁殖过程如下：

（1）吸附　病毒与易感细胞接触时，由于细胞膜表面有特异的受体，与病毒表面相互结合而使病毒吸附于细胞表面，非易感细胞没有这种受体，故病毒不能吸附。

（2）侵入和脱壳　大肠杆菌 T 偶数噬菌体尾部末端附着在大肠杆菌的细胞壁上，分泌一种能水解细胞壁的酶，使细菌细胞壁产生一个小孔，尾鞘收缩，此时头部的 DNA 注入宿主细胞内，蛋白质的衣壳留在细胞外，称为脱壳。见图 4-28。

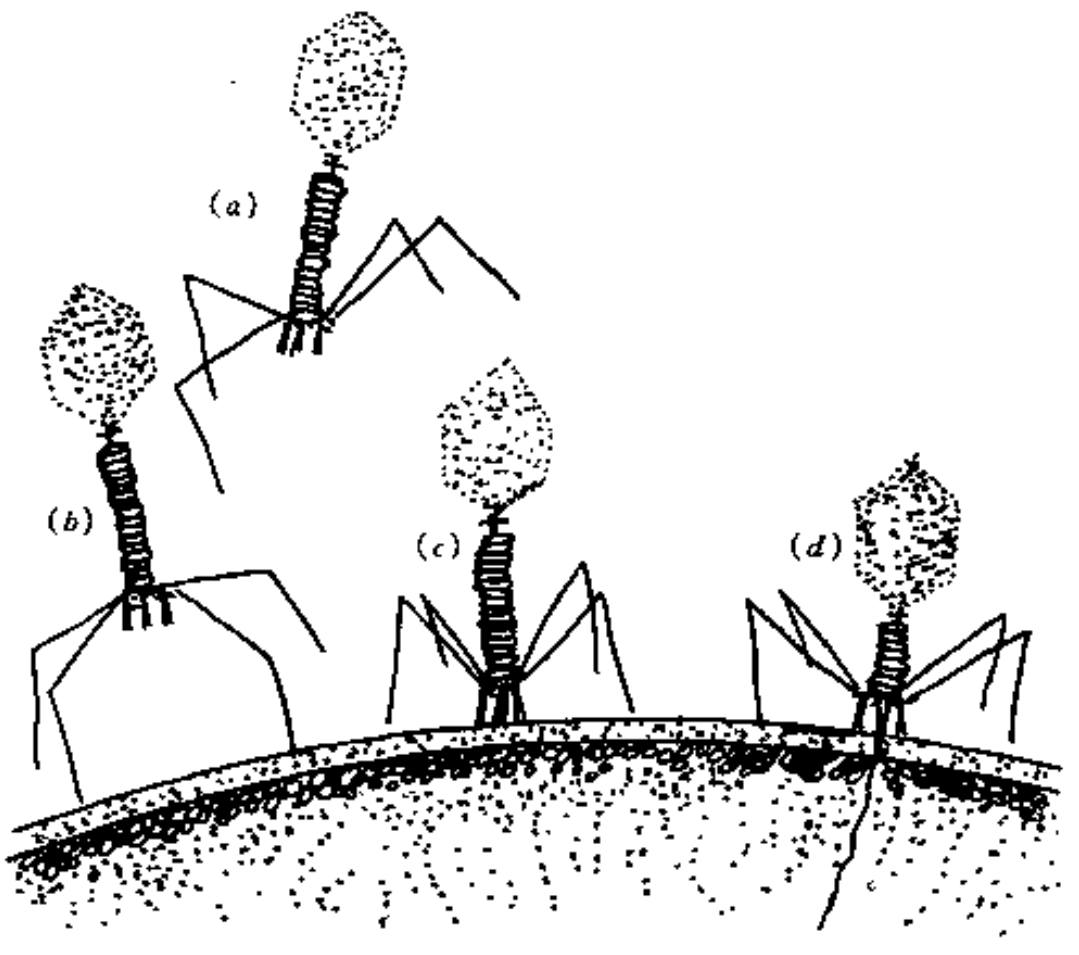


图 4-28　大肠杆菌 T 偶数噬菌体对大肠杆菌细胞壁的附着和 DNA 的注入
（a）未附着的噬菌体；（b）用长的尾丝附着在细胞壁上；（c）用尾针接触细胞壁；
（d）尾鞘收缩和 DNA 注入

（3）复制与合成　侵入宿主细胞的噬菌体 DNA，迅速支配宿主细胞的代谢机构，大量复制与合成新噬菌体的核酸与蛋白质。

（4）装配和释放　当噬菌体的 DNA 和蛋白质分子复制到一定数量后，装配成子代新的大肠杆菌 T 偶数噬菌体。此时溶解宿主细胞壁的溶菌酶迅速增加，促使宿主细胞裂解，噬菌体释放出来，又侵入新的细胞，如此反复进行，往往进入宿主细胞的 1 个噬菌体增殖后可释放 10～1000 个左右新的噬菌体。

能使细菌细胞裂解的噬菌体，称为烈性噬菌体。被侵染的细菌，称为敏感细菌。固体培养基上的细菌，由于噬菌体侵染后出现的透明空斑，叫蚀菌斑。不同噬菌体的蚀菌斑不

同，有圆形、椭圆形等不同形状，可作为鉴别噬菌体的依据。

2. 温和噬菌体和溶源性细菌　有一些噬菌体侵入宿主细胞后，其核酸整合到宿主细胞的核酸上同步复制，并随宿主细胞分裂而带到子代宿主细胞内，宿主细胞不裂解。这些噬菌体，称为温和噬菌体。这一现象称为溶源现象。被温和噬菌体侵染的细菌，称为溶源性细菌。溶源性细菌在细胞分裂中有时也可失去噬菌体的核酸成为非溶源性细菌，但出现机率很低，约为0.1%～0.0001%。细胞中噬菌体的核酸可自发脱离细菌的核酸，导致细胞裂解、释放成熟的噬菌体。当有物理、化学因素如紫外线、X射线、氮芥、乙烯亚胺等诱导，可使整个群体细胞裂解，并释放出大量的噬菌体，如图4-29。感染后，或者是病毒DNA整合进宿主DNA（溶源化），或者是进行复制并释放成熟病毒（裂解），溶源性细胞也能被诱导而产生成熟病毒并且裂解。

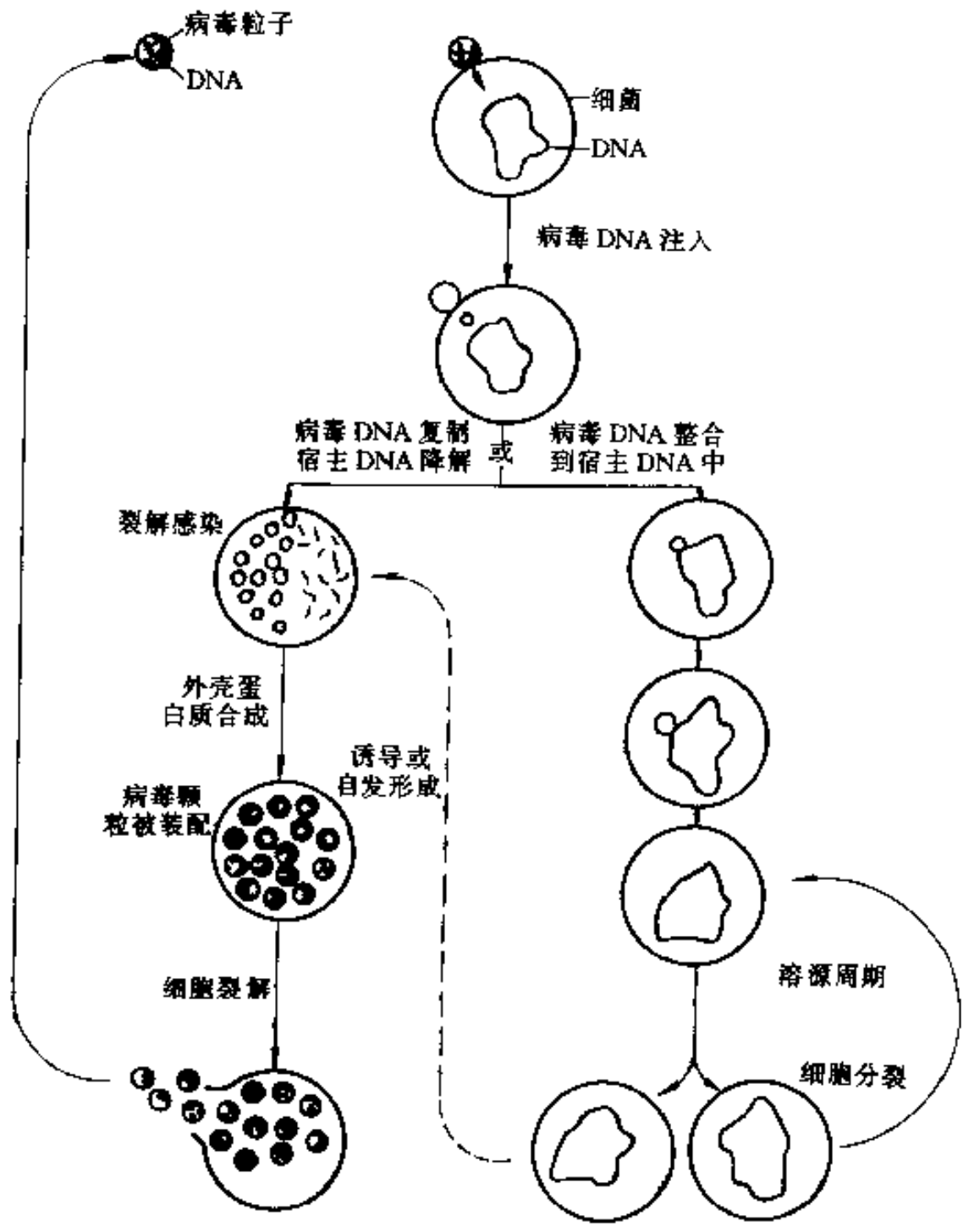


图4-29　温和噬菌体感染细菌的结果

第七节　微生物之间的关系

在自然界中，微生物种与种之间，微生物与高等动物、植物之间的关系都是非常复杂而多样化的，它们彼此相互制约，相互影响，共同促进了整个生物界的发展和进化。它们之间的相互关系，归纳起来基本上可分为互生、共生、拮抗（对抗）和寄生4种。下面着

重讨论有关微生物之间的这 4 种关系。

一、互生关系

两种不同种的生物，当其生活在一起时，可以由一方为另一方提供或创造有利的生活条件，这种关系称为互生关系。

在废水生物处理过程中，普遍存在着互生关系。例如，石油炼油厂的废水中含有硫、硫化氢、氨、酚等。硫化氢对一般微生物是有毒的。当采用生物法去处理酚时，分解酚的细菌为什么不会中毒呢?这一方面是因为分解酚的细菌经过驯化能耐受一定限度的硫化氢，另一方面因为处理系统中的硫磺细菌能将硫化氢氧化分解成对一般细菌非但无毒，而且是细菌营养元素的硫。又例如，天然水体或生物处理构筑物中的氨化细菌、亚硝酸细菌和硝酸细菌之间也存在着互生关系。水中溶解的有机物会抑制亚硝酸细菌的发育，甚至可能导致亚硝酸细菌死亡。由于与亚硝酸细菌生活在一起的氨化细菌能将溶解的有机氮化物分解成氨或铵盐，这样既为亚硝酸菌解了毒，又为亚硝酸菌提供了氮素养料。氨对硝酸细菌有抑制作用，可是由于亚硝酸细菌能把氨氧化成亚硝酸，就为硝酸细菌解了毒，还提供了养料。以上都是单方面有利的互生关系。

互生关系除了单方面有利作用以外，有时也可以是双方面的。图 4-14 所示的氧化塘中藻类与细菌之间的关系就是双方面互利的例子。藻类利用光能，并以水中二氧化碳为碳源进行光合作用，放出氧气。它既移除了对好氧菌有害的二氧化碳，又将它的代谢产物（氧）供给好氧菌。好氧菌利用氧去氧化分解有机污染物质，同时放出二氧化碳供给藻类做营养。这种互生关系在自然界也大量存在。

二、共生关系

两种不同种的生物共同生活在一起，互相依赖并彼此取得一定利益。有的时候，它们甚至相互依存，不能分开独自生活，形成了一定的分工。生物的这种关系称为共生关系。地衣就是藻类和真菌所形成的一种共生体。微生物之间的共生关系并不普遍。

三、拮抗（对抗）关系

一种微生物可以产生不利于另一种微生物生存的代谢产物，这些代谢产物能改变微生物的生长环境条件，如改变 pH 值等，造成某些微生物不适合生长的环境。这些代谢产物也可能是毒素或其它物质，能干扰其它生物的代谢作用，以致抑制其生长和繁殖或造成死亡。此外，一种微生物还可以另一种微生物为食料。微生物之间的这种关系称为拮抗或对抗关系。拮抗作用的结果，有产生有利的一面，也有产生不利的一面。

在生物处理系统中，动物性营养的原生动物主要以细菌和真菌等为食料，它们能吃掉一部分细菌等微生物和一些有机颗粒，并促进生物的凝聚作用，从而使出水更加澄清。这是由于拮抗作用而产生的有利一面。但对废水净化起主要作用的毕竟是细菌，如细菌被吃掉过多或活性污泥的结构被破坏过大，就会产生不利影响。

不仅原生动物和细菌之间，原生动物和原生动物之间以及后生动物和原生动物之间也存在着拮抗关系。但是，这种拮抗是无选择性的，是强的吃弱的，大的吃小的，是非特异性的。拮抗的另一种形式则是特异性的，即一种微生物在生活过程中，产生一种特殊物质去抑制别种微生物的生长，杀死它们，甚至使它们的细胞溶解。这种特殊物质就叫做抗菌素。医药上用的青霉素、链霉素都是抗菌素，分别是真菌中的青霉菌和放线菌中的灰链霉菌的分泌物。这些微生物在其生命活动过程中，分泌抗菌素都是为了抑制或杀死其它微生

物而使它自己得以优势发展。这种特异性的拮抗关系在废水生物处理过程中尚未很好地研究。

在天然水体对有机污染物质的净化（无机化）过程中，各种微生物的相互关系也在交替演变着。优势种的发展总是遵循一个固定的规律。当水体刚受到污染，细菌数目开始增多，但数量还不大，这时可发现较多的鞭毛虫。在一般天然情况下，清洁的水中不可能发现数目很大的鞭毛虫。新污染的水中则可发现一定数量的肉足虫。植物性鞭毛虫常与细菌争夺溶解的有机物，但是它们竞争不过细菌。动物性鞭毛虫较植物性鞭毛虫的条件优越，因为它们以细菌为食料。但是，动物性鞭毛虫捕食细菌的能力又不如游泳型纤毛虫，因此它也只得让位给游泳型纤毛虫。游泳型纤毛虫的数目随着细菌数目的变化而变化。只要细菌数目多，游泳型纤毛虫就占优势。当水体中有机物逐渐被氧化分解，细菌数目逐渐减少，这时游泳型纤毛虫也逐渐减少，而让位给固着型的纤毛虫，如各种钟虫。固着型纤毛虫只需要较低的能量，所以它们可以生存于细菌很少的环境中。水中细菌等物质愈来愈少，最后固着型纤毛虫也得不到必需的能量。这时，水中生存的微型生物主要是轮虫等后生动物了。它们都是以有机残渣、死的细菌等为食料的。这种现象不但在被污染的水体的净化过程中如此，在生物处理构筑物中废水的无机化过程也遵循着与此相似的规律（图 4-30）。

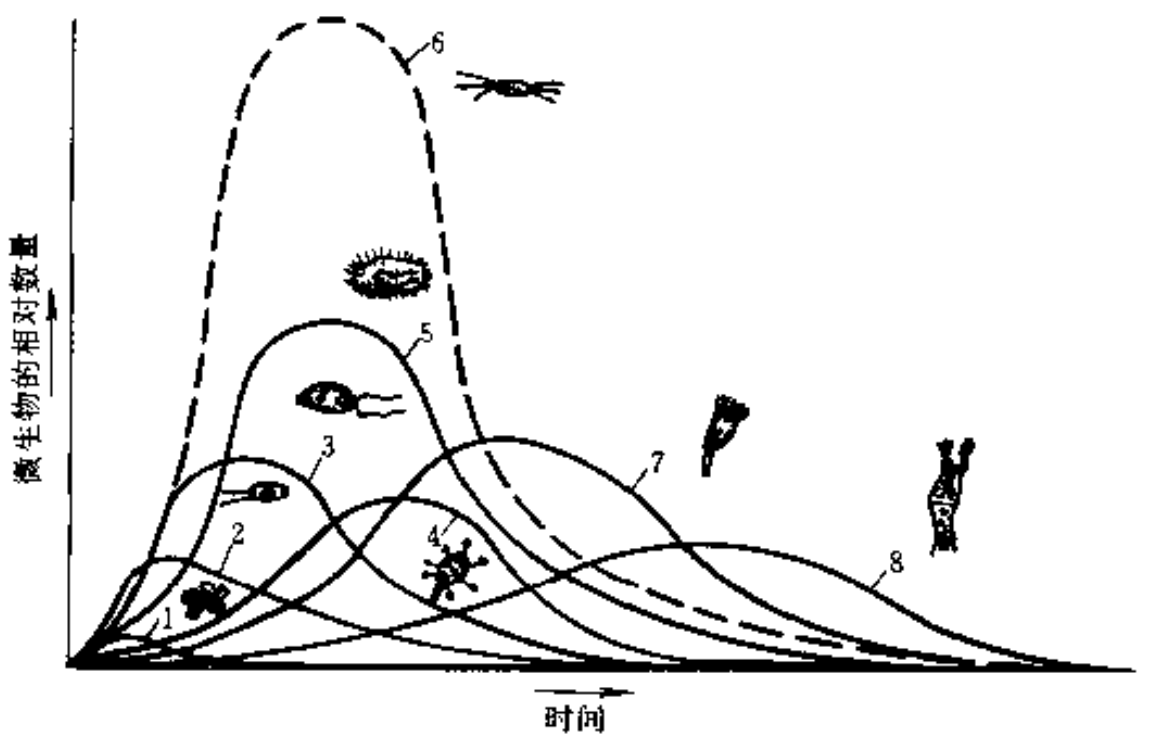


图 4-30　有机废液无机化过程中微生物的生长关系

1—肉足类原生动物；2—植物性鞭毛虫；3—动物性鞭毛虫；4—吸管虫；5—游泳型纤毛类原生动物；6—细菌（游离细菌）；7—固着型纤毛类原生动物；8—轮虫

湖北省水生生物研究所对某石油化工厂活性污泥曝气池中的微型动物进行观察，得出出水的 5 天 20℃生化需氧量（BOD_5）与微型动物之间的关系，见表 4-3。从表中可看出，出水的水质愈好，有柄纤毛虫（即固着型纤毛虫）的数量愈多。

应当指出，在有些有毒废水的活性污泥中有时原生动物会很少的，主要是游离细菌和细菌菌胶团。大量游离细菌的存在会使水质不易澄清，呈现浑浊。

四、寄生关系

一个生物生活在另一个生物体内，摄取营养以生长和繁殖，使后者受到损害，这种关系称为寄生关系，前者称为寄生物，后者称为寄主。噬菌体和细菌就存在着寄生的关系。寄生关系在微生物之间并不普遍。

某石油化工厂曝气池试验微型动物及其有柄纤毛虫与出水 BOD_5 数量的关系　表 4-3

出水 BOD_5（mg/L）		微型动物（个/mL）		有柄纤毛虫（个/mL）	
			平均		平均
0～10	6	16896	12696	13480	11712
	8	7656		6624	
	8	13536		13008	
11～20	11	6720	9336	4704	8016
	12	8448		8130	
	15	8232		6312	
	18	14016		12912	
21～25	22	8712	8496	6432	4752
	22	12768		11256	
	22	6768		4416	
	23	5256		3168	
	25	5688		2328	
	25	4632		3288	

复习思考题

1. 除细菌外，水中微生物主要还有哪些？
2. 丝状细菌在给排水工程中的作用，它们在代谢过程中有什么特征？
3. 霉菌和放线菌有什么区别？什么叫营养菌丝，什么叫气生菌丝？
4. 什么叫藻类？为什么说藻类都是自养型（无机营养型）的？
5. 活性污泥中主要含有哪些微生物？原生动物的观察在废水生物处理中有什么重要意义？
6. 试分别讨论各类微生物生长的适宜条件和它们在给排水工程中所起的作用。
7. 试区别微生物的拮抗关系和互生关系及其在废水生物处理中的应用。

第五章　水的卫生细菌学

在供给人民生活饮用水时，必须保证水中没有病原微生物。为此，我们需要知道水中有哪些常见的病原微生物，并学习检验它们的方法。

第一节　水中的细菌及其分布

水中所含细菌来源于空气、土壤、污水、垃圾、死的动物和植物等，所以水中细菌的种类是多种多样的。

雨或雪中所含的细菌有时较多，有时很少。空气新鲜的高山或乡村所下的雨、雪中细菌很少，每毫升往往只有几个。若当地空气中尘土和细菌很多，雨、雪中细菌含量将会显著增加。工业区或城市的雨、雪水中细菌较多，每毫升可达数百或成千个。

当雨点或雪片落地后，随即被土壤中的微生物所污染。污染的程度取决于土壤中细菌的数目，也决定于土壤中能被水溶解出的营养物的种类和数量。细菌靠水中的有机物而生长繁殖。有机物含量多，细菌的数量相对地也多。当水被废水、垃圾、粪便污染时，水中细菌的种类和数量将大大增加。一般说，在远离工厂和居民区的清洁河、湖中，细菌的种类主要包括通常生活在清洁水中的和土壤中的细菌。在工业区或城市附近，河水受到污染，不但含有大量腐生细菌，还可能含有病原细菌。河水下游离城镇愈远，受清洁支流冲淡和生化自净作用的影响越大，细菌数目也就逐渐下降。

在静止的湖泊中，细菌分布有一定规律。一般在湖岸附近细菌数目较多，湖水表面和深水区比较少。雨前比雨后少。湖底淤泥中的细菌比湖水中多。海水中细菌的分布也有类似的情况。

地下水经过土壤过滤，逐渐渗入地下。由于渗滤作用和缺少有机物质，所以地下水中所含细菌远远少于地面水，在深层的地下水中甚至会没有细菌。

第二节　水中的病原细菌

水中细菌虽然很多，但大部分都不是病原微生物。经水传播的疾病主要是肠道传染病，如伤寒、痢疾、霍乱以及马鼻疽、钩端螺旋体病、肠炎等。此外，还有一些由病毒引起的疾病也可经水传播。

一、伤寒杆菌

伤寒杆菌有三种：伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhosa*）、副伤寒沙门氏菌（*Salmonella paratyphi*）和乙型副伤寒沙门氏菌（*Salmonella schottmuelleri*）。它们的大小约为 0.6～0.7×2.0～4.0μm，不生芽孢和荚膜，借周生鞭毛运动，革蓝氏阴性反应，加热到 60℃，30min 可以杀死，对 5%的石炭酸，可抵抗 5min（图 5-1）。

伤寒和副伤寒是一种急性的传染病，特征是持续发烧，牵涉到淋巴样组织，脾脏肿大，躯干上出现红斑，使胃肠壁形成溃疡以及产生腹泻。

感染来源为被感染者或带菌者的尿及粪便，一般是由于与病人直接接触或与病人排泄物所污染的物品、食物、水等接触而被传染着的。

二、痢疾杆菌

痢疾杆菌可引起细菌性痢疾（与阿米巴痢疾不同），它有两种，分述如下：

1. 痢疾杆菌（痢疾志贺氏菌 *Shigella dysenteriae*）痢疾杆菌的大小为 0.4～0.6×1.0～3.0μm。所引起的痢疾在夏季最为流行，特征是急性发作，伴以腹泻。有时在某些病例中有发烧，里急后重，通常大便中有血及粘液。

2. 副痢疾杆菌（副痢疾志贺氏菌 *Shigella parodysenteriae*）这种杆菌的大小约为 0.5×1.0～1.5μm。所引起疾病的症状与痢疾杆菌引起的急性发作类似，但症状一般较轻。

痢疾杆菌不生芽孢和荚膜，一般无鞭毛，革兰氏染色阴性，加热到 60℃能耐 10min，对 1%的石炭酸，可抵抗半小时。它们的传播方式主要由于取食污染的食物和饮用污染的水，以及由于蝇类而传播。痢疾杆菌见图 5-2。

三、霍乱弧菌

霍乱弧菌（*Vibrio comma*）的细胞呈微弯曲的杆状，大小约 0.3～0.6×1.0～5.0μm。细胞可以变得细长而纤弱，或短而粗，具有一根较粗的鞭毛，能运动，革兰氏阴性反应，不生荚膜与芽孢。在 60℃下能耐 10min，在 1%的石炭酸中能抵抗 5min，能耐受较高的碱度。

在霍乱的轻型病例中，只造成腹泻。在较严重或较典型的病例中，除腹泻外，症状还包括呕吐、“米汤样”大便、腹疼和昏迷等。此病病程发展短，严重的常常在症状出现后 12h 内死亡。

霍乱弧菌可借水及食物传播，与病人或带菌者接触也可能传染，也可由蝇类传播。霍乱弧菌见图 5-3

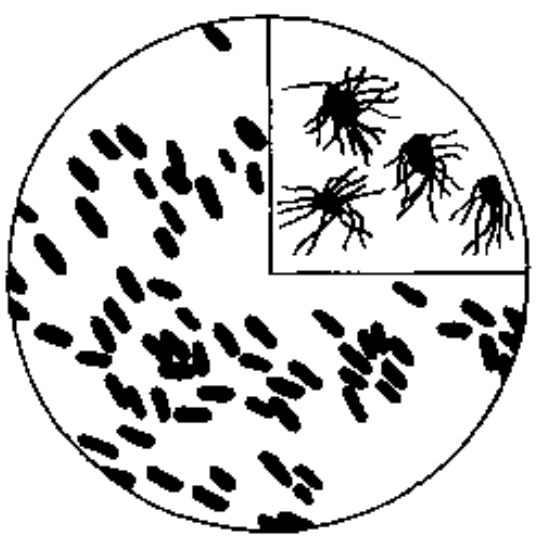


图 5-1 伤寒杆菌

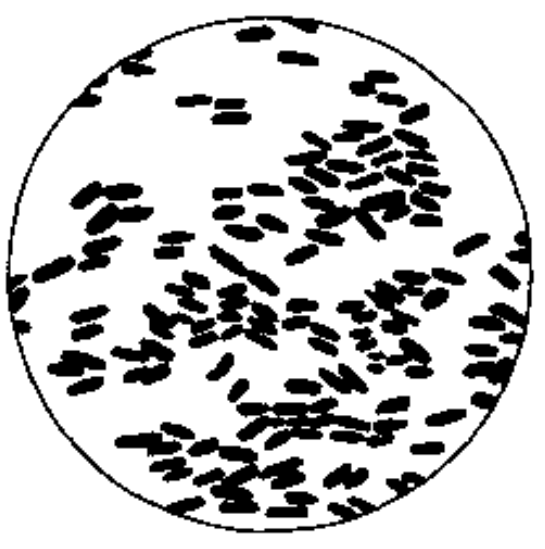


图 5-2 痢疾杆菌

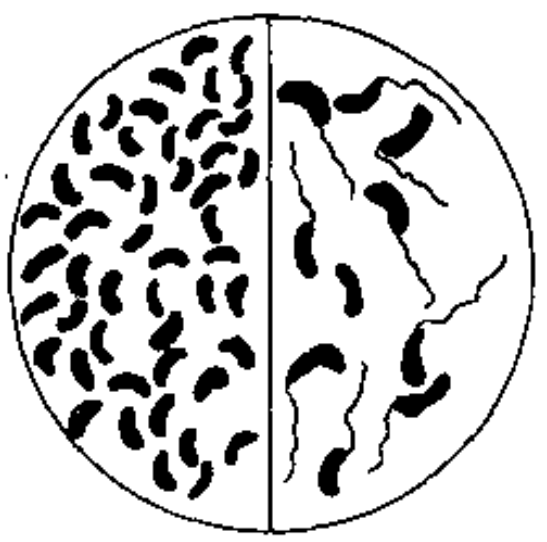


图 5-3 霍乱弧菌

以上 3 种肠道传染病菌对于氯的抵抗力都不大，用一般的加氯消毒法都可除去。赤痢阿米巴对氯的抵抗力较强，前已述及，需游离性余氯 3～10mg/L 左右，接触时间 30min 才能杀灭，但因虫体较大，可在过滤时除去。杀死炭疽菌则需更多的氯量。目前一般水厂的加氯量只能杀死肠道传染病菌。

除传染病菌外，还有一些借水传播的寄生虫病，例如，蛔虫、血吸虫等。防止传播的重要措施是改善粪便管理工作，在用人粪施肥前，应经过曝晒或堆肥。在用城市生活污水

灌溉前，应经过沉淀等处理，将多数虫卵除去。在水厂中经过砂滤和消毒，可将水中的寄生虫卵完全消灭。对于分散的给水，应加强水源保护，以防止寄生虫卵的污染。

第三节　大肠菌群和生活饮用水的细菌标准

一、大肠菌群作为卫生指标的意义

从卫生上来看，天然水的细菌性污染主要是由于粪便污水的排入而引起的，也就是说，水中的病原菌很可能是肠道传染病菌。所以对生活饮用水进行卫生细菌学检验的目的，是为了保证水中不存在肠道传染病的病原菌。水中存在病原菌的可能性很小，而水中各种细菌的种类却很多，要排除一切细菌而单独检出某种病原菌来，在培养分离技术上较为复杂，需较多的人力和较长的时间。因此，一般不直接检验水中的病原菌，而是测定水中是否有肠道正常细菌的存在。若检出有肠道细菌，则表明水被粪便所污染，也说明有被病原菌污染的可能性。只有在特殊情况下，才直接检验水中的病原菌。

肠道正常细菌有3类：大肠菌群、肠球菌和产气荚膜杆菌。选作卫生指标的必须符合下列要求：(1) 该细菌生理习性与肠道病原菌类似，因而它们在外界的生存时间基本一致；(2) 该种细菌在粪便中的数量较多；(3) 检验技术较简单。根据上述要求，长期来选定了大肠菌群作为检验水的卫生指标，因为大肠菌群的生理习性与伤寒杆菌、副伤寒杆菌和痢疾杆菌等病原菌的生理特性较为相似，在外界生存时间也与上述病原菌基本一致。而肠球菌的抵抗力弱，生存时间比病原菌短，水中若未检出肠球菌，也不能说明未受粪便污染。产气荚膜杆菌因为有芽孢，能在自然环境中长期生存，它的存在不足以说明水是最近被粪便污染的。大肠菌群在人的粪便中数量很大。健康人每克粪便中平均含5000万个以上；每毫升生活污水中含有大肠菌群3万个以上。检验大肠菌群的技术并不复杂。根据上述理由将大肠菌群作为水的卫生细菌学检验指标确是比较合理的。

二、大肠菌群的形态和生理特性

大肠菌群一般包括大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*，简写 *E. coli*)、产气杆菌(*Aerobacter aerogenes*)、柯橼酸盐杆菌 (*Coli citrovorum*) 和副大肠杆菌 (*Paracoli*)。

大肠埃希氏杆菌有时也称为普通大肠杆菌或大肠杆菌。它是人和温血动物肠道中的正常的寄生细菌。一般情况下大肠杆菌不会使人致病。在个别情况下，发现此菌能战胜人体的防卫机制而产生毒血症、腹膜炎、膀胱炎及其它感染。从上壤或冷血动物肠道中分离出来的大肠菌群大多是枸橼酸盐杆菌和产气杆菌；另外，也往往发现副大肠杆菌。副大肠杆菌主要存在于外界环境或冷血动物体内，但也常在痢疾或伤寒病人粪便中出现。因此，如水中含有副大肠杆菌，可认为受到病人粪便的污染。

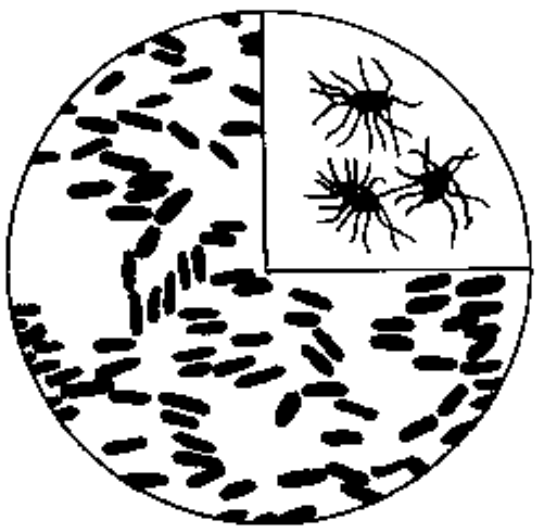


图 5-1　大肠埃希氏杆菌

大肠埃希氏杆菌是好氧及兼性的革兰氏染色阴性，无芽孢，大小约 0.5～0.8×2.0～3.0μm，两端钝圆的杆菌（图 5-4），生长温度 10～46℃，适宜温度 37℃，生长 pH 范围 4.5～9.0，适宜的 pH 值为中性，能分解葡萄糖、甘露醇、乳糖等多种碳水化合物，并产酸产气，所产生的 CO_2 和 H_2 之比为 1∶1，即 $CO_2/H_2=1$，而产气杆菌的 $CO_2/H_2=2$。大肠菌

群的各类细菌的生理习性都相似，只是副大肠杆菌分解乳糖缓慢，甚至不能分解乳糖，并且它们在品红亚硫酸钠固体培养基（远藤氏培养基）上所形成的菌落❶不同；大肠埃希氏杆菌菌落呈紫红色带金属光泽❷，直径约2～3mm；枸橼酸盐杆菌菌落呈紫红或深红色；产气杆菌菌落呈淡红色中心较深，直径较大，一般约4～6mm；副大肠杆菌的菌落则无色透明。

目前国际上检验水中大肠菌群的方法不完全相同。有的国家用葡萄糖或甘露醇作发酵试验，用43～45℃的温度培养。在此温度下，冷血动物和水、土壤中的枸橼酸盐杆菌和产气杆菌多不能生长，培养分离出来的是寄生在人和温血动物体内的大肠菌群。因为副大肠杆菌分解乳糖缓慢或不能分解乳糖，采用葡萄糖或甘露醇而不用乳糖则可检出副大肠杆菌，而且在43～45℃下培养出来的副大肠杆菌，常可代表肠道传染病细菌的污染。还有的国家检验水中大肠菌群时，不考虑副大肠杆菌。因为人类粪便中存在着大量大肠埃希氏杆菌，在水中检出大肠埃希氏杆菌，他们认为就足以说明此水已受到粪便的污染，因此采用乳糖作培养基。由于大肠埃希氏杆菌的适宜温度是37℃，所以培养温度也不采用43℃而采用37℃。这样可顺利地检验出寄生于人体内的大肠埃希氏杆菌和产气杆菌。生产实践表明，这种检验方法一般可保证饮用水水质的安全可靠。

我国各地水厂检验大肠菌群的方法也还没有统一。有的采用含有葡萄糖的培养基，培养温度43～45℃；有的采用含乳糖的培养基，培养温度37℃。最近中国预防医学中心卫生研究所负责制订了《生活饮用水标准检验法》，该书是与《生活饮用水卫生标准》GB 5749－85相配套的。书中采用含乳糖的培养基，也就是在大肠菌群中不包括副大肠杆菌。第八章有关大肠菌群的实验是根据该书编写的。

三、生活饮用水细菌卫生标准

长期实践表明，只要每升水中大肠菌群细菌不超过3个，细菌总数（腐生性细菌总数）每毫升不超过100个，用水者感染肠道传染病的可能性就极小。所以有些国家就用这个数字作为生活饮用水的细菌标准。我国《生活饮用水卫生标准》GB 5749—85中关于生活饮用水的细菌标准的具体规定如下：

1. 细菌总数1mL水中不超过100个；

2. 大肠菌群数1L水中不超过3个；

3. 若只经过加氯消毒即供作生活饮用水的水源水，大肠菌群数平均每升不得超过1000个；经过净化处理及加氯消毒后供作生活饮用的水源水，大肠菌群数平均每升不得超过10000个。

第四节　水的卫生细菌学检验

一、细菌总数的测定

将定量水样接种于营养琼脂培养基中，在37℃温度下培养24h后，数出生长的细菌菌

---

❶ 许多细菌堆积在一起形成能为肉眼见到的细菌集团。

❷ 远藤氏培养基中的碱性品红已事先用亚硫酸钠褪色。为什么大肠埃希氏杆菌菌落会呈紫红色并带有金属光泽呢？原因是大肠埃希氏杆菌能发酵乳糖，产生出中间化合物——乙醛，乙醛能与亚硫酸钠产生加合产物，于是染料由加合作用中释放出来，结果恢复了它的红色。菌落中金黄色光泽是由于释放出的染料被有机酸（例如乳酸）沉淀所致。

落数，然后根据接种的水样数量即可算出每毫升水中所含的菌数。

在37℃营养琼脂培养基中能生长的细菌代表在人体温度下能繁殖的腐生细菌，细菌总数愈大，说明水被污染得也愈严重。因此这项测定有一定的卫生意义，但其重要性不如大肠菌群的测定大。对于检查水厂中各个处理设备的处理效率，细菌总数的测定则有一定的实用意义，因为如果设备的运转稍有失误，立刻就会影响到水中细菌的数量。

二、大肠菌群的测定

常用的检验大肠菌群的方法有两种：(1) 发酵法；(2) 滤膜法。

(一) 发酵法

发酵法是测定大肠菌群的基本方法。此法按三个步骤进行。

1. 初步发酵试验　本试验是将水样置于糖类液体培养基中，在一定温度下，经一定时间培养后，观察有无酸和气体产生，即有无发酵，而初步确定有无大肠菌群存在。如采用含有葡萄糖或甘露醇的培养基，则包括副大肠杆菌；如不考虑副大肠杆菌，则用乳糖培养基。由于水中除大肠菌群外，还可能存在其它发酵糖类物质的细菌，所以培养后如发现气体和酸并不一定能肯定水中含有大肠菌群，还需根据这类细菌的其它特性进行下两阶段的检验。水中能使糖类发酵的细菌除大肠菌群外，最常见的有各种厌氧和好氧的芽孢杆菌。在被粪便严重污染的水中，这类细菌的数量比大肠菌群的数量要少得多。在此情形下，本阶段的发酵一般即可被认为确有大肠菌群存在。在比较清洁的或加氯的水中，由于芽孢的抵抗力较大，其数量可能相对地比较多，所以本试验即使产酸产气，还不能肯定是由于大肠菌群引起的，必须继续进行试验。

2. 平板分离　这一阶段的检验主要是根据大肠菌群在固体培养基上可以在空气中生长，革兰氏染色呈阴性和不生芽孢的特性来进行的。在此阶段，可先将上一试验产酸产气的菌种移植于品红亚硫酸钠培养基（远藤氏培养基）或伊红美蓝培养基表面，这一步骤可以阻止厌氧芽孢杆菌的生长，而上述培养基所含染料物质也有抑制许多其它细菌生长繁殖的作用。经过培养，如果出现典型的大肠菌群菌落，则可认为有此类细菌存在。但为了作进一步的肯定，应进行革兰氏染色检验。由于芽孢杆菌经革兰氏染色后一般呈阳性，所以根据染色结果，又可将大肠菌群与好氧芽孢杆菌区别开来。如果革兰氏染色检验发现有阴性无芽孢杆菌存在，则为了更进一步的验证，可作复发酵试验。

3. 复发酵试验　本试验是将可疑的菌落再移植于糖类培养基中，观察其是否发酵，是否产酸产气而最后肯定有无大肠菌群存在。

对于自来水厂出水，初步发酵试验一般都在10个小发酵管和2个大发酵管（或发酵瓶）内进行，复发酵试验则在小发酵管内进行。具体操作见第八章。

根据肯定有大肠菌群存在的初步发酵试验的发酵管或瓶的数目及试验所用的水样量，即可利用数理统计原理，算出每升水样中大肠菌群的最可能数目（MPN），下面是计算的近似公式：

$$MPN = \frac{1000 \times \text{得阳性结果的发酵管(瓶)的数目}}{\sqrt{(\text{得阴性结果的水样体积毫升数})(\text{全部水样体积毫升数})}} \qquad (5\text{-}1)$$

【例题】　今用300mL水样进行初步发酵试验，其100mL的水样两份，10mL的水样十份。试验结果肯定在这一阶段试验中，100mL的两份水样中都没有大肠菌群存在，在

10mL 的水样中有三份存在大肠菌群。计算大肠菌群的最可能数。

【解】 $$MPN = \frac{100 \times 3}{\sqrt{270 \times 300}} = 10.6 \text{ 个 /L} \approx 11 \text{ 个 /L}。$$

上列计算结果有专用图表可以查阅，见第八章实验。

（二）滤膜法

用发酵法完成全部检验需 72h。为了缩短检验时间，可以采用滤膜法。用这种方法检验大肠菌群，有可能在 30h 左右完成。

滤膜法中用的滤膜常是一种多孔性硝化纤维薄膜。圆形滤膜直径一般为 35mm，厚 0.1mm。滤膜中小孔的直径平均为 0.2μm。

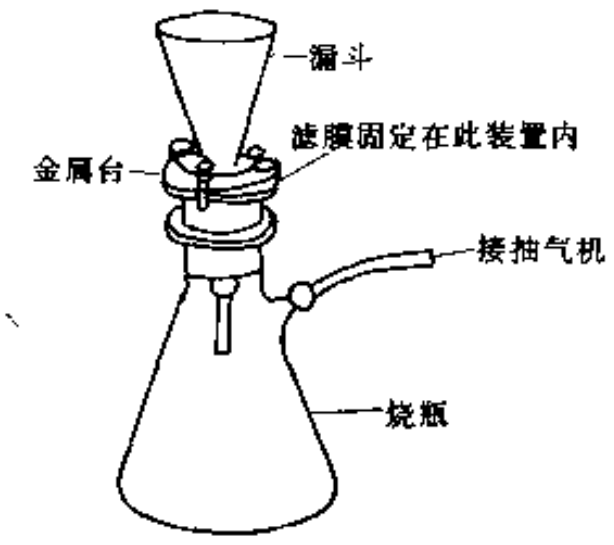


图 5-5　滤器

滤膜法的主要步骤如下：

1. 将滤膜装在滤器上（图 5-5）。用抽滤法过滤定量水样，将细菌截留在滤膜表面。

2. 将此滤膜的没有细菌的一面贴在品红亚硫酸钠培养基或伊红美蓝固体培养基上，以培育和获得单个菌落。

3. 将滤膜上符合大肠菌群菌落特征的菌落进行革兰氏染色、镜检。

4. 将革兰氏染色阴性无芽孢杆菌的菌落，接种到含糖培养基中，根据产气与否来判断有无大肠菌群存在。

5. 根据滤膜上生长的大肠菌群菌落数和过滤的水样体积，即可算出每升水样中的大肠菌群数。

现在北京、天津、上海等水厂已先后采用滤膜检验法。

滤膜法比发酵法的检验时间短，但仍不能及时指导生产。当发现水质有问题时，这种不符合标准的水已进入管网一段时间了。此外，当水样中悬浮物较多时，悬浮物会沉积在滤膜上，影响细菌的发育，使测定结果不准确。

为了保证给水水质符合卫生标准，有必要研究快速而准确的检验大肠菌群的方法。国外曾研究用示踪原子法，例如用放射性同位素 C^{14} 的乳糖做培养基，可在一小时内初步确定水中有无大肠杆菌。国外大型水厂还有使用电子显微镜直接观察大肠杆菌的。

目前以大肠菌群作为检验指标，只间接反映出生活饮用水被肠道病原菌污染的情况，而不能反映出水中是否有传染性病毒以及除肠道病原菌外的其它病原菌（如炭疽杆菌）。因此为了保证人民的健康，必须加强检验水中病原微生物的研究工作。

第五节　水中微生物的控制方法

水中微生物的种类很多，其中有些对水的净化起积极作用，有些则影响水的物理、化学和生物学的性质。对人体健康来说，病原微生物是特别重要的，而影响天然水物理、化学性质的主要是藻类。下面将谈一谈病原微生物和藻类的去除。

一、病原微生物的去除

通常把水中病原微生物的去除称为水的消毒。饮用水的消毒方法很多。把水煮沸就是家庭中常用的消毒方法。集中供水不能使用这种方法。自来水厂常用的方法有（1）加氯消毒；（2）臭氧消毒；（3）紫外线消毒。目前最常用的是加氯消毒。

加氯消毒可使用液氯，也可以使用漂白粉（漂白粉中约含有25%～35%的有效氯）。水中加氯后，生成次氯酸（HOCl）和次氯酸根（OCl^-）。

$$Cl_2+H_2O \rightleftharpoons HOCl+H^++Cl^- \tag{5-2}$$

$$HOCl \rightleftharpoons H^++OCl^- \tag{5-3}$$

HOCl和OCl^-都有氧化能力。但HOCl是中性分子，可以扩散到带负电的细菌表面，并渗入细菌体内，借氯原子的氧化使用破坏菌体内的酶，而使细菌死亡，而OCl^-带负电，难于靠近带负电的细菌，所以虽有氧化能力，也很难起消毒作用。

消毒水体所投加的氯量一般都以有效氯计算。

什么叫有效氯？各种氯化物都含有一定量的氯，但对消毒或氧化来说，氯化物中的氯不一定全部起作用，甚至有完全没有氧化能力的，如NaCl，因NaCl中的Cl是－1价，不能再接受电子了。在各种氯化物中，氯的价有高到＋7价的，如过氯酸钠$NaClO_4$，或低到－1价的，如上面提到的NaCl。凡是价高于－1的氯化物都有氧化能力。有效氯即表示氯化物的氧化能力。

为什么漂白粉中的有效氯最多仅35%左右？在漂白粉（$Ca^{-2}O^{-2}Cl^{-1}Cl^{-1}$）中，具有－1价的氯原子不能再接受电子，故无氧化力，而具有＋1价的氯原子，还可接受2个电子，而使其价从＋1降到－1，故有氧化能力。在氯气（Cl_2^0）中，1个氯原子可接受1个电子（从0价降到－1价），现有2个氯原子，故可有2个电子的转移。因此，以CaOClCl与Cl_2比较，1克分子（摩尔❶）的CaOClCl氧化能力相当于1克分子的Cl_2，所以漂白粉（CaOClCl，其分子量为127）中的有效氯为：

$$\frac{2\times 35.5}{127}\times 100\%=56\%$$

但一般漂白粉含CaOClCl最多62.5%左右，所以它所含有效氯最多为：

$$0.56\times 0.625\times 100\%=35\%\text{左右}$$

表5-1中给出了一些其它氯化物所含氯原子的化合价。

这里，应该指出，除OCl^-外，有些氧化剂由于某些原因也不一定都有消毒能力，例如，过氧化氢（H_2O_2）虽是一种强氧化剂，但其消毒能力相对地说是比较差的，这可能是因为很多细菌具有分解过氧化氢的酶，可以使过氧化氢分解成水和氧的缘故。

式（5-2）和式（5-3）中的Cl_2、HOCl和OCl^-量的多少主要取决于水的pH值，水温也有一点关系，对于Cl_2来说，水中氯离子Cl 的量也有影响。

氯化物中氯原子的化合价　表5-1

过氯酸钠	$Na^{+1}Cl^{+7}O_4^{-2}$
氯酸钠	$Na^{+1}Cl^{+5}O_3^{-2}$
二氧化氯	$Cl^{+4}O_2^{-2}$
次氯酸钠	$Na^{+1}O^{-2}Cl^{+1}$
次氯酸	$H^{+}O^{-2}Cl^{+1}$
盐酸	$H^{+1}Cl^{-1}$
一氯胺	$N^{-3}H_2^{+1}Cl^{+1}$
二氯胺	$N^{-3}H^{+1}Cl_2^{+1}$
三氯化氮	$N^{-3}Cl_3^{+1}$

❶ 1971年10月第十四届国际计量大会决定增加第七个基本单位——摩尔。摩尔即相当于旧单位中的克分子量。

一般说，当水的 pH≥3 和 Cl^-<1000mg/L 时，式（5-2）中的 Cl_2 基本上全部转化为 HOCl 和 HCl，因为：

由式（5-2），得：

$$\frac{[H^-][Cl^-][HOCl]}{[Cl_2]}=K \tag{5-4}$$

式中 K—— 离解常数，当水温为 25℃，$K=4\times10^{-4}$。如水中溶氯 1000mg/L，则

$$Cl^-=\frac{1000}{2}=500mg/L,$$

$$\therefore\quad [Cl^-]=\frac{500}{1000\times35.5}=0.0141g\ 离子/L$$

当 pH=3 时，$[H^-]=10^{-3}$，

以 $[Cl^-]=0.0141g$ 离子/L 和 $[H^-]=10^{-3}$ 代入式（5-4）得：

$$\frac{[Cl_2]}{[HOCl]}=\frac{10^{-3}\times0.0141}{K}$$

如水温为 25℃，则

$$\frac{[Cl_2]}{[HOCl]}=\frac{10^{-3}\times0.0141}{4\times10^{-4}}=0.035$$

∴HOCl 占：

$$\frac{[HOCl]}{[Cl_2]+[HOCl]}\times100\%=\frac{[HOCl]/[HOCl]}{[Cl_2]/[HOCl]+[HOCl]/[HOCl]}\times100\%$$

$$=\frac{1}{[Cl_2]/[HOCl]+1}\times100\%$$

$$=\frac{1}{0.035+1}\times100\%$$

$$=97\%$$

Cl_2 占：

$$100\%-97\%=3\%$$

如水中溶氯为 100mg/L，则在水温为 25℃，pH 为 3 时，Cl_2 仅占 0.4%。

由此可见，在一般的天然水中，所投入的氯可几乎全部转化为次氯酸和次氯酸根，而所产生的 H^- 离子则可为水中的碱度中和。

关于水中的 HOCl 和 OCl^-，当 pH 值比较小时，主要是 HOCl，pH 值比较高时，主要是 OCl^-。例如，水温为 25℃，pH 为 7 时，HOCl 约占 73%，OCl^- 约占 27%，而 pH<5 时，几乎全是 HOCl，pH>10 时，几乎全是 OCl^-。如果水温降低，则 HOCl 所占比值增大。

怎样求得 HOCl 和 OCl^- 所占的百分数？

HOCl 占：

$$\frac{[HOCl]}{[HOCl]+[OCl^-]}\times100\%=\frac{1}{1+\dfrac{[OCl^-]}{[HOCl]}}\times100\% \tag{5-5}$$

由式（5-3），可得：

$$\frac{[H^-][OCl^-]}{[HOCl]}=K,$$

式中 K——离解常数，当水温为 25℃时，$K=3.7\times10^{-8}$

移项，得：

$$\frac{[OCl^-]}{[HOCl]} = \frac{K}{[H^-]} \tag{5-6}$$

∴当水温为 25℃，pH 为 7 时，HOCl 占：

$$\frac{1}{1+\frac{K}{[H^-]}} \times 100\% = \frac{1}{1+\frac{3.7\times10^{-8}}{10^{-7}}} \times 100\% = 73\%$$

OCl^- 占：

$$100\% - 73\% = 27\%$$

由此可见，水的 pH 值稍低一些、所含的 HOCl 就较多，这有利于氯的消毒作用。

氯加入水中后，一部分被能与氯化合的杂质消耗掉，剩余的部分称为余氯。我国生活饮用水卫生标准（TJ 20—76）规定，加氯接触 30min 后，游离性余氯不应低于 0.3mg/L，集中式给水除水厂的出厂水应符合上述要求外，管网末梢水的游离性余氯不应低于 0.05 mg/L。保留一定数量余氯的目的是为了保证自来水出厂后还具有持续的杀菌能力。0.05mg/L 余氯这个数字大致相当于 5 万个细菌重量的 1000 倍，所以即使每升水重新繁殖出 5 万个细菌，0.05mg/L 的余氯还足以杀死它们。上述规定只能保证杀死肠道传染病菌，即伤寒、霍乱和细菌性痢疾等几种病菌。一般说，当水的 pH 值为 7 左右时，钝化❶病毒所需的游离性余氯量约为杀死一般细菌的 2～20 倍，其用量随病毒的种类而异，并与水温成反比。杀死赤痢阿米巴需游离性余氯 3～10mg/L 左右，接触时间 30min，而杀死炭疽杆菌可能需投加更多的氯，赤痢阿米巴的个体较大（可长达 10～50μm），一般不能通过砂滤池的砂层，故可在过滤中除去。

近年来，发现氯与某些有机物质化合可能形成致癌性的有机氯化合物，因此，国内外都在探索新的消毒药剂，以保证人民的身体健康。

二、藻类的去除

除病原微生物之外，其它微生物对于水质的影响主要表现在物理性质方面。当它们大量繁殖时会使水发生浑浊、呈现颜色或发出不良气味，因而影响工业和生活上的应用。这类微生物包括藻类、原生动物等，其中以藻类更为重要，这是因为一般天然水所含有机物较少，往往不适于异养微生物的繁殖，但却含有足量的无机养料，可供自养型的藻类很好地利用。一般说，当藻类或较高等的植物生长较好，能提供足够的有机养料时，异养型的生物才能比较旺盛地繁殖起来。因此，对于天然水来说，病原微生物以外的各种微生物的控制主要是消除藻类。

藻类问题主要发生于水库、湖泊中，因为在这些水体中的水速小，有利于藻类的繁殖。

杀藻常用的药剂有硫酸铜和漂白粉（氯）。对水库、湖泊投加时，可把药剂放在布袋中，系在船尾上，浸泡在水里，然后在水中按一定路线航行。投药量随藻的种类和数量以及其它有关条件而定，表 5-2 及表 5-3 所列数字可资参考。一般说，硫酸铜效果好，药效长，每升水投加 0.3～0.5mg，在几天之内就能杀死大多数产生气味的藻类植物，但往往不能破坏死藻放出的致臭物质。漂白粉或氯能去除这种放出的致臭物质，但投量要多些，如 0.5～1mg。应当注意，加氯不应过多，否则反面又会增加水的气味。药剂的正确用量可借试验确

❶ 杀死病毒称为钝化或抑活。

定。硫酸铜和氯也被用来防止水管和取水构筑物内某些较大生物如饰贝等软体动物的孳生，这时，硫酸铜用量往往要几个 mg/L。

几种致臭微生物和杀藻（虫）剂用量 **表 5-2**

微生物	臭味	杀藻（虫）剂用量（mg/L）	
		硫酸铜	氯
一、蓝藻			
鱼腥藻（*Anabaena*）	鱼腥、霉、草、猪圈	0.12～0.5	0.5～1.0
颤藻（*Aphanizomenon*）	草、猪圈	0.12～0.5	0.5～1.0
腔球藻（*Coeeosphaerium*）	甜草香	0.2～0.33	0.5～1.0
囊胞藻（*Clathrocystis*）	草、猪圈	0.12～0.25	0.5～1.0
二、绿藻			
空球藻（*Eudorina*）	鱼腥	2.0～10.0	—
实球藻（*Pandorina*）	鱼腥	2.0～10.0	—
团藻（*Volvox*）	鱼腥	0.25	0.3～1.0
网球藻（*Dictyosphaerium*）	草、鱼腥	—	0.5～1.0
三、硅藻			
旋星硅藻（*Asterionela*）	芳香、天竺葵、鱼腥	0.12～0.2	0.5～1.0
隔板硅藻（*Tabellaria*）	芳香、天竺葵、鱼腥	0.12～0.5	0.5～1.0
扇形硅藻（*Meridion*）	芳香	—	--
斜杆硅藻（*Synedra*）	土臭	0.36～0.5	1.0
小环硅藻（*Cyclotella*）	微香	—	1.0
四、金藻			
黄群藻（*Synura*）	南瓜、甜瓜、鱼腥（并有苦味）	0.12～0.25	0.3～1.0
辐尾藻（*Uroglena*）	鱼腥（有鱼肝油味）	0.05～0.20	0.3～1.0
五、原生动物			
隐滴虫（*Cryptomonas*）	紫罗兰	0.5	--
刺滴虫（*Mallomanas*）	芳香、紫罗兰、鱼腥	0.5	
袋形虫（*Bursaria*）	沼泽、鱼腥	--	—
六、其它			
铁细菌	药腥（加氯后）	—	0.5
球衣细菌		0.33～0.5	0.5

藻种和藻量与杀藻剂用量和效果的关系 **表 5-3**

藻类	数量（标准面积单位/mL）	氯（mg/L）		功效	
		用量	余量	杀藻	去臭
黄群藻	1～25	0.3	0.05～0.1	成功	成功
	50～100	0.5～0.7	0.2	成功	成功
	200	0.7～0.9	0.3	成功	成功
辐尾藻	2000	0.5	0.1	成功	成功
	6000	0.5	0.1	成功	失败
钟罩藻	500	0.5	0.1	成功	成功
尾杆藻	1350	0.7	0.2	50%	失败
颤藻	1500	0.7--0.8	0.2～0.25	50%	失败

如水源水中存在着由于死藻而产生的致臭物质，则可在水厂的一级泵房投加一定量（如1～2mg/L）的氯，以消除臭味。

硫酸铜对于鱼类也有毒性，其致命剂量随鱼的种类而异，约自0.15～2.0mg/L（见表5-4）。这个数字在灭藻所需剂量范围的附近，但由于计算加药量时一般是根据水库、湖泊上层水（距水面1.5～3m的深度范围）容积计算的，而非总容积，因此，鱼类可以在施加药剂时躲藏到药量不太多的水体部分。有时在灭藻以后，也会发现水中鱼类大量死亡，这往往是由于死藻的分解，耗尽了水中的溶解氧所致。对于用水者来说，水中硫酸铜量高达12mg/L时，尚不致发生铜中毒。

对鱼类安全的硫酸铜用量 **表5-4**

鱼类	安全量（mg/L）	鱼类	安全量（mg/L）
鳟鱼	0.14	金鱼	0.30
鲤鱼	0.33	鲈鱼	0.67
鲫鱼	0.33	翻车鱼	1.35
鲶鱼	0.40	石首鱼	2.00
梭子鱼	0.40		

第六节 水中的病毒及其检验

一、水中的病毒

在第四章第六节中已谈到，现在已知的可由饮水传染的病毒性疾病主要是脊髓灰质炎（小儿麻痹症）和病毒性肝炎。此外，柯萨奇病毒（*Coxsackie virus*）和埃可病毒（ECHO）也是肠道病毒。

（一）脊髓灰质炎病毒

这种病毒是一种圆形的微小病毒，直径为8～30nm，属肠道病毒。脊髓灰质炎是一种急性传染病。染病后常发热和肢体疼痛，主要病变在神经系统，尤以脊髓灰质损害显著，部分病人可发生麻痹，严重者可留有瘫痪后遗症。此病多见于小儿，故又名小儿麻痹症。

感染者的鼻咽分泌物及粪便内均可排出此病毒。食物和水有可能被粪便污染，所以经口摄入是主要的传播途径。如水源被污染了，可促成较大的流行。

此病毒在人体外生活力很强，可在水中及粪便中存活数月，低温下可长期保存，但对高温及干燥较敏感。加热至60℃及紫外线照射均可在0.5～1h内灭活。各种氧化剂、2%碘酒、甲醛、升汞等都能有一定的消毒作用。用0.3～0.5mg/L的余氯进行消毒，接触1h，可灭活此病毒。

（二）肝炎病毒

病毒性肝炎一般可分为甲型肝炎（传染性肝炎或短潜伏期肝炎）和乙型肝炎（血清性肝炎或长潜伏期肝炎），两者病理变化和临床表现基本相同。主要临床症状有食欲减退、恶心、上腹部不适（或肝区痛）、乏力等，部分病人有黄疸和发热，多数肝脏肿大，伴有肝功能损害。

甲型肝炎病毒主要从粪便中排出体外，经口传染。水源或食物被污染后，可能引起爆

发性流行。

肝炎病毒对一般化学消毒剂的抵抗力强，在干燥或冰冻环境下能生存数月至数年。以紫外线照射 1h 或煮沸 30min 以上可灭活。加氯消毒有一定的灭活作用。

（三）其它肠道病毒

除脊髓灰质炎病毒和肝炎病毒外，肠道病毒还有柯萨奇病毒和埃可病毒。后两种病毒在世界上传布也极广，主要侵犯小儿。一般夏秋季易流行。它们都具有暂时寄居人类肠道的特点。病毒都较小，一般直径小于 30nm，抵抗力较强，能抗乙醚、70%乙醇和 5%煤酚皂液，但对氧化剂很敏感。

这两种病毒引起的临床表现复杂多变，同型病毒可引起不同的症候，而不同型的病毒又可引起相似的临床表现。一般症候有以下几种：无菌性脑膜炎、脑炎；急性心肌炎和心包炎；流行性胸痛；疱疹性咽峡炎；出疹性疾病；呼吸道感染；小儿腹泻等。

二、水中病毒的检验

使人致病的病毒都是动物性病毒。动物性病毒的专性寄生性很强。检验这类病毒可采用组织培养法。所选择的组织细胞必须适宜于这类病毒的分离、生长和检验。目前在水质检验中使用的方法是“蚀斑检验法”。

蚀斑法大致的步骤如下：将猴子肾脏用 pH7.4～8.0 的胰蛋白酶溶液处理。胰蛋白酶的作用是能使肾脏组织的胞间质发生解聚作用，因而使细胞彼此分离。用营养培养基洗这些分散悬浮的细胞。将细胞沉积在 40mm×110mm 的细胞瓶（鲁氏瓶）的平面上，并形成一层连续的膜。将水样接种到这层膜上，再用营养琼脂覆盖。

水样中若有肠道病毒，病毒就会破坏组织细胞，增殖的病毒紧接着破坏邻接的细胞。在 24～48h 内，这种效果就可以用肉眼看清。病毒群体形成的斑点称为蚀斑。实验表明，蚀斑数和水样中病毒浓度间具有线性关系。根据接种的水样数，可求出病毒的浓度。

每升水中无 1 个病毒蚀斑（Plaque-forming unit 简称 PFU），饮用才安全[1]。

复 习 思 考 题

1. 常见的水传染病细菌有哪几种？它们有什么特性？主要的肠道病毒有哪几种？一般的氯消毒能灭活病毒吗？

2. 为什么大肠菌群可作为水受粪便污染的指标？用大肠菌群作为肠道病菌的指示微生物，有什么缺点？

3. 大肠菌群包括哪些种类的细菌？它们的习性如何？

4. 大肠菌群的发酵检验法是根据怎样的原理来进行的？这种检验法有什么缺点？滤膜检验法有什么优点，有什么缺点？

5. 我国饮用水水质标准所规定的大肠菌群数是每升多少？

6. 测定水中细菌总数的意义如何？营养琼脂固体培养基上的菌落数目是否能代表水样中实际存在的细菌数目？

7. 简单讨论控制水中微生物的方法。

---

[1] 见 “International Standards for Drinking-water” 1971，World Health Organization，Geneva.

第六章　废水生物处理中的微生物及水体污染的指示生物

第一节　废水中的污染物在微生物作用下的降解与转化

废水中的有机物质受微生物❶作用的影响而分解。在有氧情况下进行的分解，叫做好氧分解，是好氧微生物❷（主要是好氧细菌）活动的结果。在无氧情况下进行的分解，叫厌氧分解，是厌氧微生物（主要是厌氧细菌）活动的结果。

工业废水的成分随工业性质的不同而有很大差异，其中可能存在的有机物有碳水化合物、蛋白质、油脂、有机酸、醇类、醛类、酮类、酚类、胺类、腈、异腈等化合物。生活污水中的有机物则主要是碳水化合物、蛋白质和脂肪。这些有机物主要是由碳、氢、氧、氮、硫、磷等几种元素构成的。它们好氧分解的最终产物是稳定而无臭的物质包括二氧化碳、水、硝酸盐、硫酸盐、磷酸盐等，其分解反应可以概括地表示如下：

$$C \rightarrow CO_2 + \text{碳酸盐和重碳酸盐} \tag{6-1}$$

$$H \rightarrow H_2O \tag{6-2}$$

$$N \rightarrow NH_3 \rightarrow HNO_2 \rightarrow HNO_3 \tag{6-3}$$

$$S \rightarrow H_2SO_4 \tag{6-4}$$

$$P \rightarrow H_3PO_4 \tag{6-5}$$

式（6-3）、（6-4）和式（6-5）中的亚硝酸、硝酸、硫酸和磷酸可与水中的碱性物质作用，形成相应的盐类。

有机物厌氧分解的最终产物主要是甲烷、二氧化碳、氨、硫化氢等。由于散发了硫化氢等物质，所以废水会产生臭气，由于硫化氢与铁作用（废水中往往含有一些铁质）形成硫化铁，所以通过厌氧分解的水呈现黑色。缺氧情况下的氧化还原反应可用下列各式表示：

$$C \rightarrow RCOOH\ （有机酸）\rightarrow CH_4 + CO_2 \tag{6-6}$$

$$N \rightarrow RCHNH_2COOH\ （氨基酸）\rightarrow NH_3 + \text{有机酸} \tag{6-7}$$

$$S \rightarrow H_2S \tag{6-8}$$

$$P \rightarrow PO_4^{3-} \tag{6-9}$$

上而概括地介绍了有机物的好氧分解和厌氧分解及其分解产物，下面我们来较详细地分别讨论不含氮和含氮有机物在微生物作用下的分解。

---

❶ 一般说，原生动物和其它浮游生物的生长率远较细菌为低，所以它们对于有机物分解的影响较小。病原细菌虽也常存在于污水中，但和其它细菌比较，它们往往很少。所以自然界中有机物的分解主要是靠腐生细菌的作用。

❷ 这里的好氧和厌氧的微生物（或细菌）都分别包括兼性的微生物（或细菌）。

第二节　不含氮有机物质的分解

废水中可能含有的不含氮有机物质有酚类、醛类、酮类、醇类及某些有机酸等化合物以及碳水化合物和油脂等。无论在有氧或无氧的情况下，它们在自然界中的分解，都不是一两步就可完成的，而是包括一系列的反应，有着各种酶的参加。

一、纤维素、半纤维素、木质素的转化

1. 纤维素的转化　纤维素隶属于碳水化合物。碳水化合物是由碳、氢和氧3种元素所组成，它是动植物能量的主要来源。含碳水化合物的工业废水主要来自食品、造纸、纺织、医药等工业企业。在生活污水中，碳水化合物是不含氮有机物质的主要成分，其量约占污水中有机物总量的40%～50%。

碳水化合物可分为3类，其通式为$C_x(H_2O)_y$。单糖是最简单的一类碳水化合物，葡萄糖（$C_6H_{12}O_6$）就是单糖的1种。双糖是水解后能生成2个分子单糖的碳水化合物，属于这一类的糖有蔗糖、乳糖和麦芽糖等，它们的分子式都是$C_{12}H_{22}O_{11}$。多糖是水解后能生成很多个分子单糖的碳水化合物，淀粉、纤维素等都是属于这一类的糖，它们的分子式可用$(C_6H_{10}O_5)_n$来表示，其中n代表一个很大的数字，例如淀粉的n约为22～28，纤维素的n约为100～200。

在树木、农作物中都含有大量纤维素。印染工业由于洗布和上浆，造纸工业由于用木材等做原料，因此在它们排出的废水中含有较多的纤维素。

自然界中，分子结构复杂的有机物质如纤维素必须经微生物（主要是细菌）胞外酶的作用水解成可溶性的较简单物质如葡萄糖后，才能被菌体吸收。由于水解作用是在微生物体外进行的，产物可被微生物自己吸收，也可以被其它微生物利用。这些物质进入菌体细胞后，除一部分被组成菌体的成分外，其余部分则在呼吸作用中进行着不同的转化过程（发酵和氧化❶），形成不同的产物。

下列两式表示纤维素在微生物作用下的水解过程：

$$\underset{\text{纤维素}}{2\ (C_6H_{10}O_5)_n} + nH_2O \xrightarrow{\text{纤维酶}} \underset{\text{纤维二糖}}{nC_{12}H_{22}O_{11}} \tag{6-10}$$

$$\underset{\text{纤维二糖}}{nC_{12}H_{22}O_{11}} + nH_2O \xrightarrow{\text{纤维二糖酶}} \underset{\text{葡萄糖}}{2nC_6H_{12}O_6} \tag{6-11}$$

葡萄糖是溶解性的较简单的有机物质，能被微生物吸收。它进入菌体后，借胞内酶的作用，除一部分用于组成细胞物质外，另一部分则根据环境中是否有氧气存在而进行不同过程的转化，所形成的中间产物最后可完全被分解或部分地被分解。一种能使葡萄糖生成某一中间产物的微生物不一定能使此中间产物继续分解。所以就这方面来看不同种类的微生物混合群对于废水中有机物的稳定化（无机化）也会比某一纯种的微生物的效率高。

在有充分氧气的情况下，葡萄糖的氧化可以进行到底，产生二氧化碳和水。

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 2872kJ \tag{6-12}$$

---

❶ 在生理学上，一般将不含氮有机物在无氧条件下被微生物分解的作用称作发酵或无氧呼吸，在有氧条件下被微生物分解的作用称作氧化或有氧呼吸。在工农业生产上，则无论用好氧微生物或厌氧微生物进行生产，统称发酵。

如果缺乏氧气，葡萄糖就在不同种类的厌氧微生物的作用下产生多种有机酸和醇类物质。例如：

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow \underset{\text{乙醇}}{2CH_3CH_2OH} + 2CO_2 + 109kJ \tag{6-13}$$

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow \underset{\text{乳酸}}{2CH_3CHOHCOOH} + 94kJ \tag{6-14}$$

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow \underset{\text{丁酸}}{CH_3CH_2CH_2COOH} + 2CO_2 + 2H_2 + 75kJ \tag{6-15}$$

醇类和有机酸（如上面的乳酸、丁酸）在缺氧环境中又可被产甲烷细菌分解而产生甲烷。这一过程称为甲烷发酵。例如：

$$2CH_3CH_2OH + CO_2 \longrightarrow 2CH_3COOH + CH_4 + xkJ \tag{6-16}$$

$$CH_3COOH \longrightarrow CH_4 + CO_2 + xkJ \tag{6-17}$$

$$2CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \longrightarrow 5CH_4 + 3CO_2 + xkJ \tag{6-18}$$

在缺氧情况下，有许多微生物还可将一些简单的有机酸分解，生成二氧化碳和氢气等。

在有氧情况下，丁醇，醋酸等化合物又可被一些好氧微生物作用氧化成二氧化碳和水。例如：

$$CH_3CH_2OH + O_2 \longrightarrow CH_3COOH + H_2O + 490kJ \tag{6-19}$$

$$2CH_3COOH + 4O_2 \longrightarrow 4CO_2 + 4H_2O + 1742kJ \tag{6-20}$$

在自然界中，大部分微生物（主要是细菌和酵母菌）能够分解葡萄糖，而只有一些特殊的微生物才能分解纤维素，其中以霉菌和细菌研究较多。主要有纤维粘菌、生孢纤维粘菌、纤维杆菌、纤维弧菌、链霉菌、曲霉、毛壳霉、芽枝霉、镰刀霉、青霉和木霉等。

2. 半纤维素的转化　半纤维素存在于植物的细胞壁中，它在植物组织中含量很高，在一年生植物中常占植物残体重量的 25%～80%，半纤维素由聚戊糖（阿拉伯糖和木糖）、聚已糖（半乳糖、甘露糖）及聚糖醛酸构成。除土壤中含半纤维素外，在某些工业废水中，如人造纤维工业废水、造纸工业废水，也含半纤维素。

半纤维素易被土壤中微生物分解，能分解纤维素的微生物大多数能分解半纤维素。许多芽孢杆菌、假单胞菌和放线菌能分解半纤维素。霉菌中的根霉、青霉、镰刀霉和曲霉等也能分解半纤维素。参与水解半纤维素的酶有 3 类：内切酶、外切酶和糖苷酶。半纤维素分解的简化过程如下：

$$\text{半纤维素} \xrightarrow[H_2O]{\text{各种酶}} \text{单糖} + \text{糖醛酸} \begin{cases} \xrightarrow{\text{好氧分解}} CO_2 + H_2O \\ \xrightarrow[\text{厌氧分解}]{} \text{发酵的产物} \end{cases} \tag{6-21}$$

3. 木质素及其转化　木质素在植物性有机废物中的含量仅次于纤维素和半纤维素。成年树木的木质素含量为 20%～40%。发现木质素已经有 100 年左右，但是对它的结构、合成与降解机理还远远没有弄清。其原因是木质素在物理上和化学上与纤维素、半纤维素和果胶类的细胞壁成分结合紧密，难以萃取出一种化学上稳定的木质素组分。木质素酸解生成芳香族单体的混合物，如原儿茶酸［Ⅶ］、对羟基酸［Ⅷ］、香草酸［Ⅸ］和香草醛［Ⅹ］。较彻底的处理方法是用乙醇和盐酸加热回流、生成物质为“赫伯尔脱（Hibbort）氏单体”，即 α-乙氧基丙酰愈疮木酮（α-ethoxypropionguaiacone）、香草酰甲基甲酮等。

研究发现，真菌、放线菌、细菌与木质素的全部降解过程有关。有些学者在研究木质

素降解的生物化学过程中，发现担子菌纲，特别是“白腐病”真菌在木质素衰变中有明显作用。还有层孔菌属（*Fomes*），密环菌属、多孔菌属（*Polyporus*）和侧耳属（*Pleurotus*）等也在降解木质素中起作用。

因为污水处理厂的废水中碳水化合物和蛋白质的含量较高，在这种环境中，木质素的衰变必然是由于细菌、放线菌和微小真菌的作用。很多水解生成的芳香族产物，是细菌和真菌的合适的基质。木质素降解初期的可能途径如下：首先是芳醚键的断裂，从而解聚和增溶苯丙烷大分子。最初生成的产物是愈疮木丙三醇-β-松柏醚等，再脱甲基而生成适宜于细胞内降解的水溶性单体和二聚物，最终那些环状结构（尿黑酸、龙胆酸、原儿茶酸）才可以分裂。多种胞外酶都参与木质素的初期分解，参与最多的是酚氧化酶（漆酶）。

木质素的结构、合成和降解至今还没有完全弄清楚。

二、淀粉的转化

淀粉质的原料（如米、高粱等）常用来做酒，而在淀粉工业上广泛应用，如在纺织工业中用于上浆、印染工业中用于调制印花浆料等，因此在纺织、印染等工业废水中含有淀粉。淀粉在微生物作用下先形成葡萄糖，参加的微生物主要有曲霉、根霉等霉菌。

淀粉→糊精→麦芽糖→葡萄糖

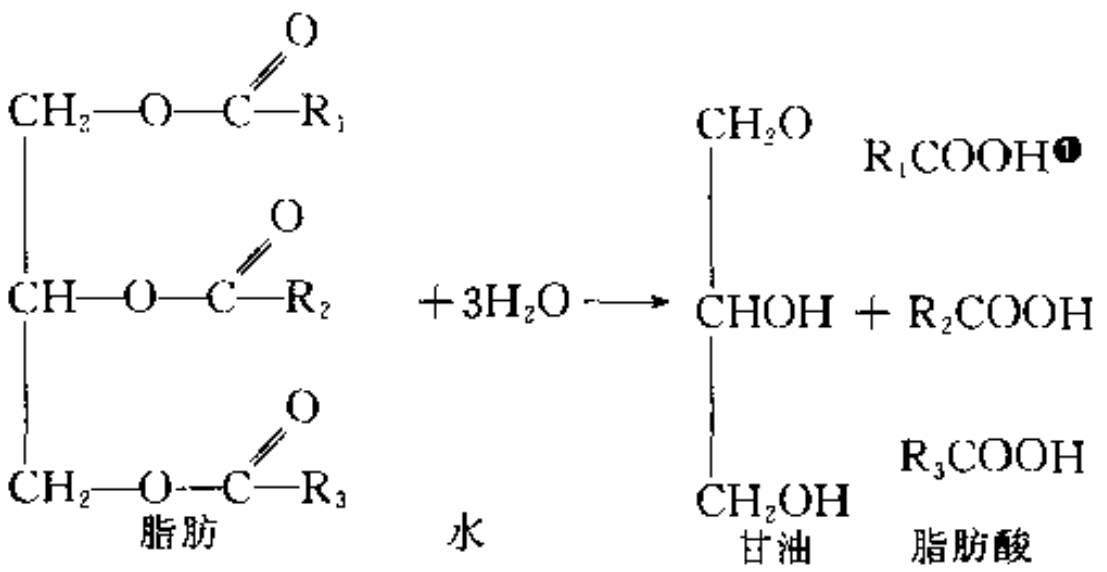
葡萄糖的分解，如前所述，则可由另外一些微生物如细菌和酵母菌来完成。

三、脂肪的转化

脂肪也是由碳、氢、氧几种元素所构成，它的来源主要是动植物体。通常把来自动物体的称作脂肪、来自植物体的称作油。洗毛、肉类加工等工业废水和生活污水中都含有油脂。

脂肪是比较稳定的有机物质，但也能被某些微生物分解，其中最活跃的有荧光杆菌、绿脓杆菌和灵杆菌等；此外，有些放线菌和分枝杆菌以及真菌中的青霉、曲霉和乳霉等也有分解脂肪的能力，它们从中取得营养物质和能源。

不论在有氧或缺氧环境中，脂肪分解的第一阶段都是在脂肪酶的作用下水解为甘油和脂肪酸。



(6-22)

甘油和脂肪酸在有氧的环境中最后可被分解氧化成二氧化碳和水或合成微生物的细胞物质。

在缺氧情况下，发酵细菌和产甲烷细菌可以分解较复杂的脂肪酸成为较简单的酸，所

---

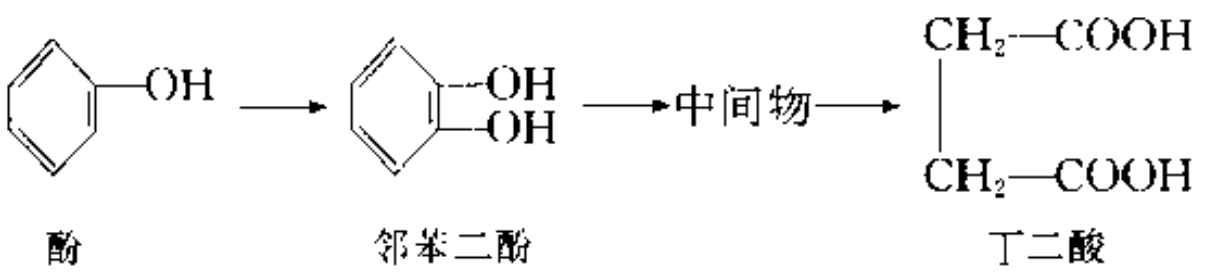
❶ 式中R_1、R_2和R_3代表脂肪酸中的各个烃基，R_1、R_2和R_3可能相同，也可能不同，可能是饱和的，也可能是不饱和的。脂肪中饱和的R较多，如果不饱和的R较多，则称油。

形成的醋酸则通过直接代谢作用被转化成为二氧化碳和甲烷。

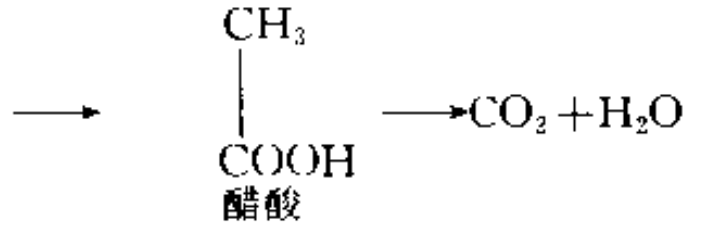
$$2RCH_2CH_2COOH+CO_2+2H_2O \longrightarrow 2RCOOH+2CH_3COOH+CH_4 \qquad (6\text{-}23)$$

四、芳香族化合物的转化

芳香族化合物也可被微生物分解。芳香族化合物都是六碳环（苯）的衍生物，其中酚类化合物是比较重要的一种。酚类化合物存在于炼焦、石油、煤气等多种工业的生产废水中。酚对于微生物有一定的毒害作用，但在适当的条件下仍能被微生物分解破坏。目前已经发现，在污水、粪便和土壤中存在着能分解酚类物质的细菌。它们在有氧情况下可氧化酚成二氧化碳和水，其化学反应大致如下：



酚　　邻苯二酚　　丁二酸



醋酸　　(6-24)

酚对人体、牲畜、水生生物都有毒害作用，所以含酚废水必须经过处理后才可排放出去。

由于微生物能分解酚，因此含酚废水也可利用微生物来处理。目前生物法已被广泛应用于含酚工业废水的处理。

对酚起作用的主要是细菌。武汉微生物研究所曾分离出两种解酚能力强的细菌：食酚假单胞菌（*Pseudomonas phenolphagum*）和解酚假单胞菌（*Pseudomonas phenolicum*）。前者在 20h 内可以分解 0.1%浓度的酚，后者稍差。两者都能在 0.2%的酚溶液中生长。

五、烃类化合物的分解与转化

烃类物质也能被微生物氧化分解。引起烃类氧化的微生物很有价值。可以利用它们的特殊生理性质来勘探可燃性气体和石油。微生物还可应用于石油生产上，如石油脱蜡。引起石油烃类物质转化的有酵母菌和细菌。目前国内外正在大力研究以石油烃类为碳源培养菌体蛋白。

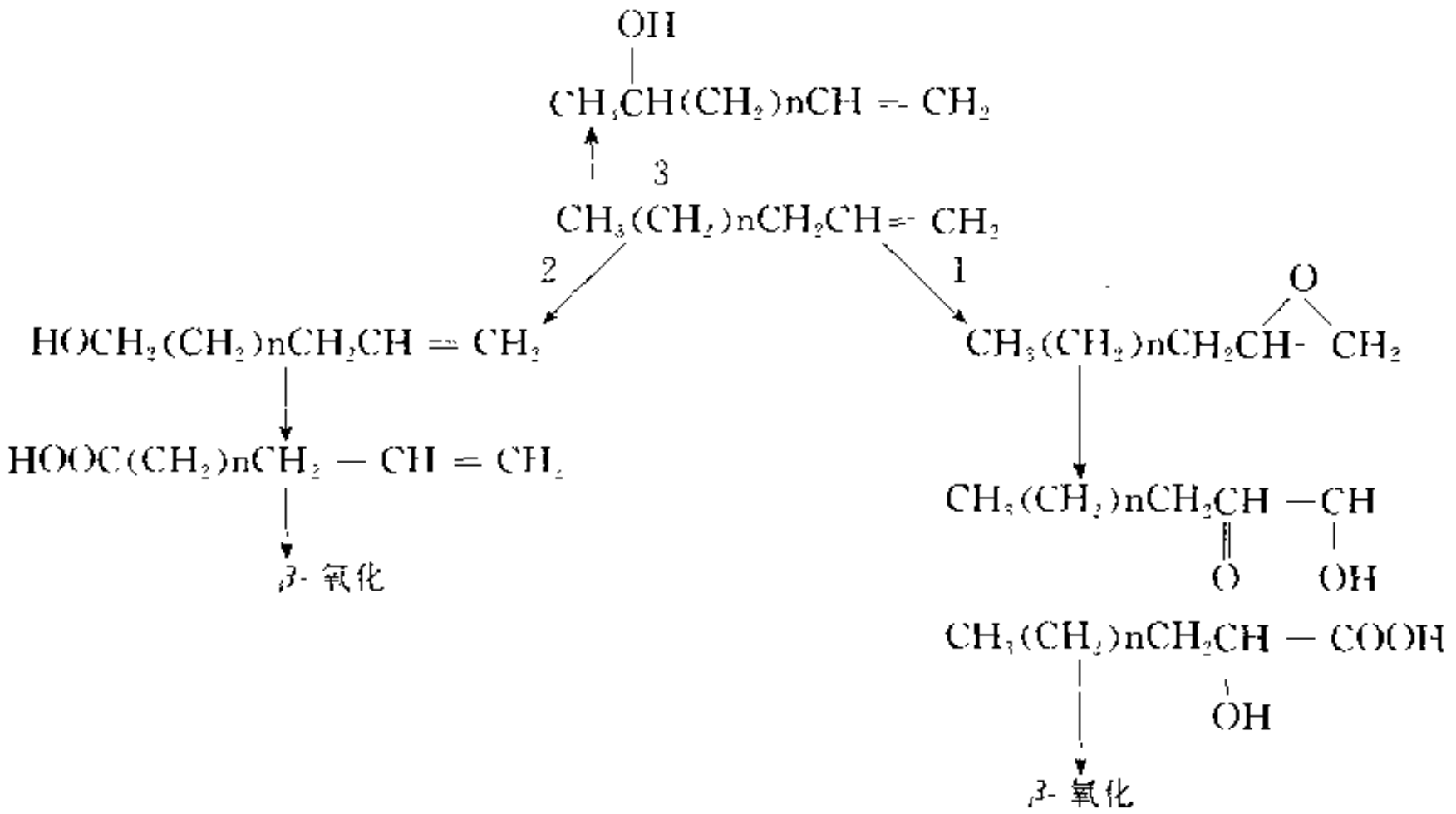
1. 烷烃类化合物的降解　　烷烃的通式为 C_nH_{2n+2}，可被有关微生物降解。该类微生物有甲烷假单胞菌、分枝杆菌、头孢霉、青霉等。

烃类物质除甲烷、乙烷、丙烷外，还有含碳较多的高级烃类。

引起甲烷氧化的有甲烷极毛杆菌。它是一种无芽孢的小杆菌。当空气中含甲烷和氧时，它们可以在无机培养基上生长，利用空气中的氧使甲烷氧化，从中取得生活所需的能量，并且可以利用甲烷中的碳作为碳源，组成机体的有机物。

$$CH_4+2O_2 \rightarrow CO_2+2H_2O+\text{能量} \qquad (6\text{-}25)$$

2. 烯烃化合物的降解　　大部分烯烃类化合物比烷烃、芳香烃容易降解。烯烃的代谢产物主要是具有双链的加氧化合物，最终形成饱和或不饱和的脂肪酸，再经 β-氧化进入 TCA 循环，最终被分解。最终产物是 CO_2 和 H_2O。烯烃的降解途径如下：



六、合成洗涤剂的分解

合成洗涤剂是人工合成的高分子聚合物，主要成分是表面活性剂。表面活性剂的组成分子具有亲水性和疏水性两种性质，故它们易于聚集在空气-水界面和油-水界面上、降低表面张力、促进乳化作用。因此，这类化合物广泛用做清洁剂。商品洗涤剂含有效表面活性剂 10%～30%，其它成分为聚磷酸盐等。按照合成洗涤剂在水中的电离形式及性状可分为：阴离子型、阳离子型、非离子型和混合型四大类。阴离子型合成洗涤剂包括烷基磺酸盐、烷基硫酸酯、烷基苯磺酸盐、合成脂肪酸衍生物等；阳离子型主要是带有氨基或季铵盐的脂肪链缩合物等等。我国目前生产的洗涤剂属阴离子型烷基苯磺酸钠，对环境污染较严重。

难降解的合成洗涤剂是其分子结构带有碳氢侧链的 ABS 型洗涤剂。为了使洗涤剂易为生物降解，人们研制了直链型烷基苯磺酸盐（LAS）。这种洗涤剂由于减少了支链，使其直链部分易于分解，而且在一定范围内碳原子数愈多，其分解速度愈快。

合成洗涤剂易于在曝气池和天然水体中起大量泡沫，阻断大气向水中复氧。合成洗涤剂的表面活性剂对环境并不形成严重的威胁，因为它在低浓度时对动物、植物无毒。表面活性剂能被微生物吸附。研究表明、离子型表面活性剂对细菌有毒。由于 pH 值的变化反映了分子的离解、故阳离子型表面活性剂的毒性随 pH 值升高而加强，当 pH 为中性时，毒性最强；阴离子型表面活性剂的毒性则随 pH 值的降低而增强。各种表面活性剂杀细菌的效力，除受 pH 值影响外，尚与其它因素有关。

合成表面活性剂能很快在环境中消失。1950 年以来，全世界合成表面活性剂的年产量从 3.5 万吨增至 900 万吨以上，但在天然水体、土壤、动物和植物体内皆无明显的增加。合成表面活性剂的消失主要是被细菌所降解的。

研究表明，阴离子型烷基苯磺酸盐类合成表面活性剂降解的途径见图 6-1。

可以靠烷基苯磺酸盐类生长的细菌中，某些只能降解烷基侧链，但大多数纯培养细菌和混合培养细菌也可以降解芳香环。能降解烷基苯磺酸盐类的细菌如芽孢杆菌属细菌等，及最近研究发现的有很好发展前景的恶臭假单胞菌（*Pseudomonas putida*）。但相对来说，直

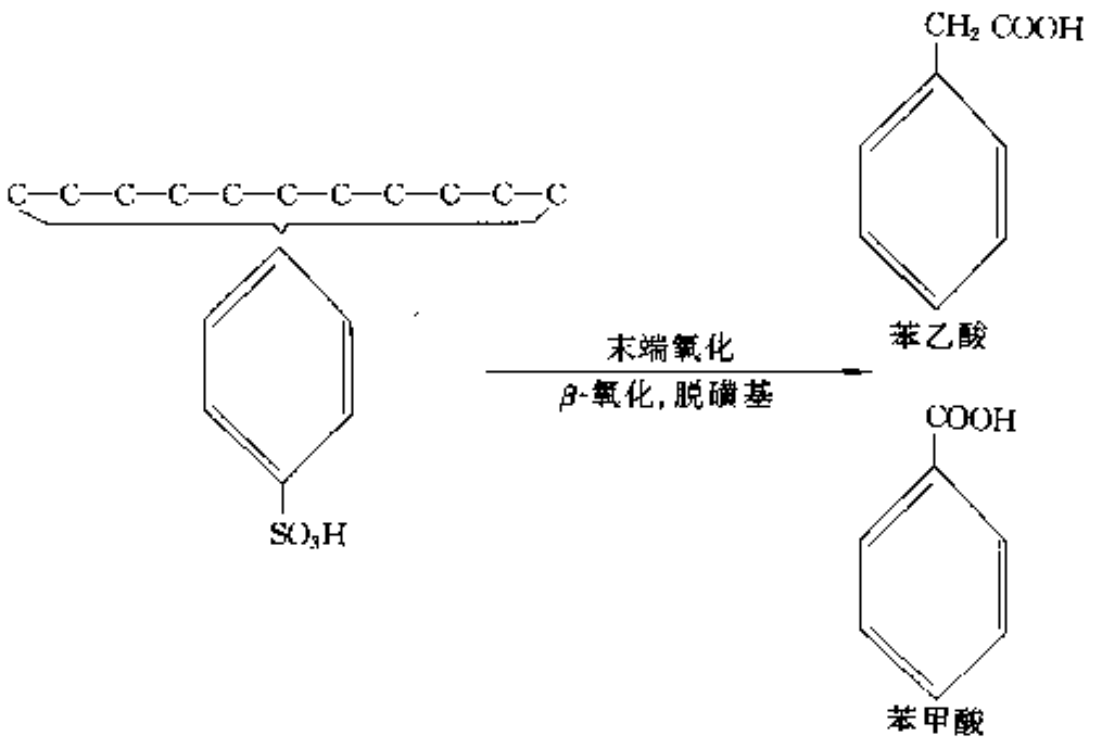


图 6-1　烷基苯磺酸盐类的微生物降解

链的 LAS 的降解速度高于早期由四丙烯制造的 TBS 等。采用直链烷基苯磺酸盐类（LAS）以后，形成泡沫问题已缓解。

虽然合成表面活性剂对环境威胁不大，且易被微生物降解，但合成洗涤剂中的某些非表面活性剂组分却值得重视，特别是添加做软水剂的聚磷酸盐，可在天然水体中蓄积，并可能使藻类大量繁殖而引起水体的富营养化。

上面扼要地介绍了不含氮有机物质在微生物作用下的分解过程。这里可以清楚地看出，它们好氧分解的最终产物是二氧化碳和水，而厌氧分解的结果主要是甲烷和二氧化碳。此外，好氧分解所放出的能量远远超过厌氧分解所放出的。比较式（6-12）和式（6-13），可以清楚地看出这方面的差别。

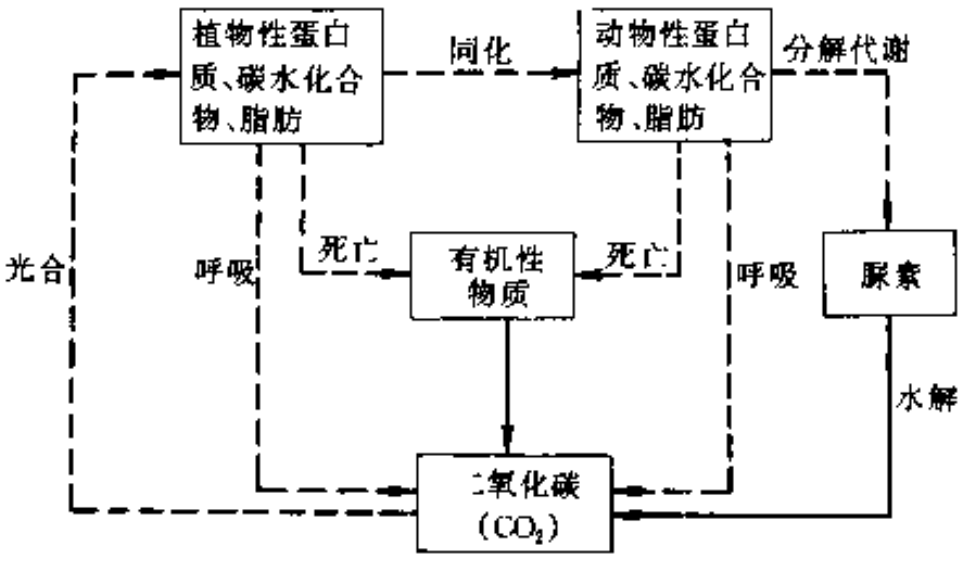


图 6-2　自然界中碳的循环

最后，应当指出，自然界中可以用来组成生物体物质的碳素并不多，主要都储藏在空气中，大致有 6000 亿 t 左右。据估计，地球上的植物每年要用二氧化碳至少 600 亿 t，折合成碳素，大约是 200 亿 t。所以如果没有细菌等微生物转化碳素的巨大力量，如果不是它们在改变地球表面的各种碳素状态，并且补充空气中消耗的二氧化碳，数十年后空气中的二氧化碳含量就将无法维持生物界旺盛发展的需要。图 6-2 示自然界中碳素转化的基本情况（碳循环）。从图中可以看出，有机物中的碳由于微生物的呼吸作用先被氧化分解成二氧化碳，然后通过光合作用成为植物性蛋白质，碳水化合物和脂肪。动物吃了植物产生动物性蛋白质、碳水化合物和脂肪。动物的排泄物又分解产生二氧化碳。动植物通过呼吸也都产生二氧化碳，而它们死亡后的残体又都是有机性物质。这些物质又开始分解，如此进入了第二次循环。在自然界中含碳物质就是这样的循环不已。图中直线表示废水生物处理过程中碳素的转化情况。

第三节　含氮有机物质的分解

废水中可能存在的含氮有机物质主要有蛋白质、氨基酸、尿素、胺类、腈化物、硝基化合物等。生活污水中所含的氮主要是以铵离子或尿素的形式存在的；此外，在全部化合氮中约有10%是更为复杂的有机化合物包括蛋白质和氨基酸。蛋白质不仅存在于生活污水中，也存在于多处工业废水中，例如，食品加工、屠宰场、制革工业等生产废水中都含有蛋白质，而尿素有时也存在于印染等工业废水中。尿素的分解比较简单，易于分解成氨与二氧化碳和水。蛋白质是一类组成极其复杂的化合物，其分解也复杂得多。下面将着重讨论它的生物氧化过程。

一、氮的循环

自然界中，蕴藏着大量的氮。首先，在空气中就有80%左右的氮气。其次，一切生物体中也都含有氮（以有机氮化物，主要是以蛋白质的形态存在）。这些氮都不能被植物直接吸收利用。第三，土壤中有硝酸盐和铵盐，这些无机氮化物是高等植物所能吸收的有效氮，但是在土壤中的储量不多，不能满足逐年植物营养的需要。然而，在自然界中这三种基本类型的氮由于微生物的作用在不断地进行转化，由一种形态转化为另一种形态，或由一种组合中分解出来参加到另一种组合中去，使有效氮能继续供应。所以，如果没有微生物的作用，植物既不能生长，人和动物也就无法生活。图6-3示自然界中的氮循环。从图中可以看出，有机物中的氮在微生物作用下先被转化成氨，氨被氧化成为亚硝酸盐及硝酸盐。氨和硝酸盐可被植物吸收而变成植物性蛋白质。动物吃了植物产生动物性蛋白质，而动物的排泄物又能被分解氧化成氨，亚硝酸盐和硝酸盐。动植物死亡后的残体又都是有机性物质。由于反硝化作用硝酸盐又可转化成亚硝酸盐和自由氮，而自由氮在氮固定作用下又可产生植物性蛋白质。图中直线示废水生物处理过程中氮素的转化情况。

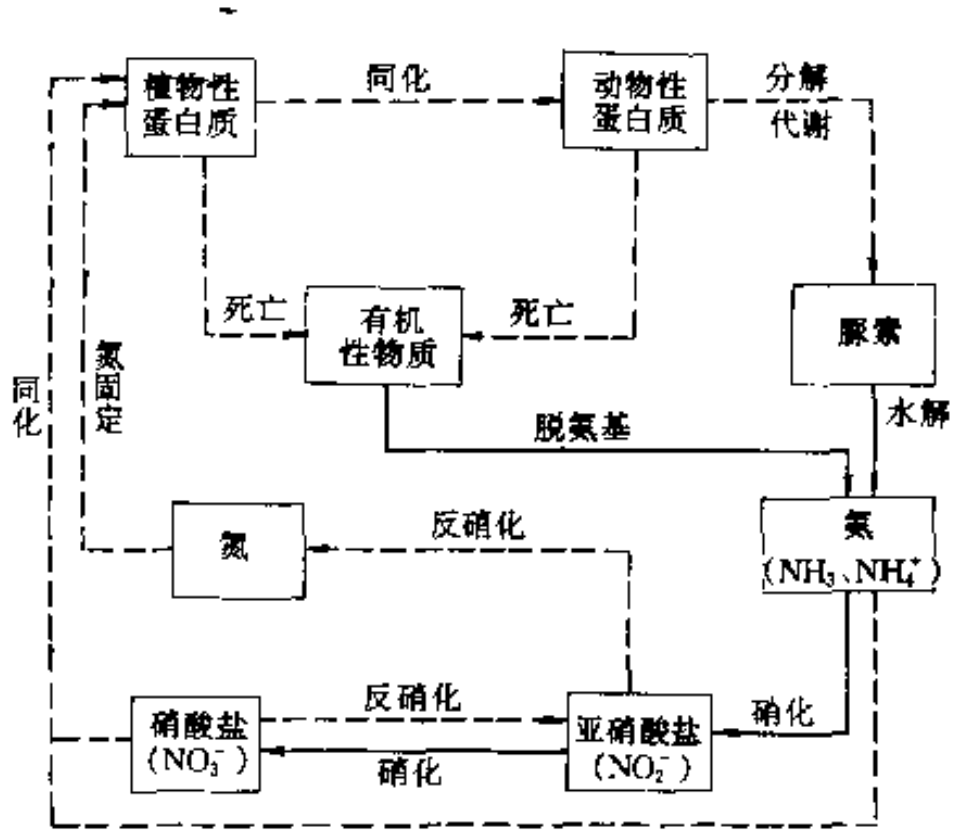


图6-3　自然界中的氮循环

二、蛋白质的转化

蛋白质是由许多氨基酸分子所组成。氨基酸可用通式$RCHNH_2COOH$表示（R代表不同的基团）。构成蛋白质的天然氨基酸有20余种，这些氨基酸以各种配合构成蛋白质，所以蛋白质种类也很多。蛋白质除含有碳、氢、氧和氮四种元素外，有时还含有硫等，其中氮的含量平均约为16%。蛋白质的分子量高达几万到几百万。

1. 氨化作用　蛋白质生物化学变化的第一步是水解。能产生蛋白酶的微生物，可以把蛋白质逐渐水解成简单的产物，最后形成氨基酸。

$$\text{蛋白质} \longrightarrow \text{胨} \longrightarrow \text{肽} \longrightarrow \text{氨基酸} \qquad (6\text{-}26)$$

蛋白质必须水解至氨基酸，才能渗入细菌的细胞内。在细胞内氨基酸可以再合成菌体的蛋白质，也可能转变成另一种氨基酸，或者进行脱氨基作用。

脱氨基作用能在有氧条件下进行，也能在缺氧条件下进行，例如：

（1）在有氧条件下

$$RCHNH_2COOH+O_2 \cdots\rightarrow RCOOH+CO_2+NH_3 \qquad (6\text{-}27)$$

（2）在缺氧条件下

$$RCHNH_2COOH+H_2 \longrightarrow RCH_2COOH+NH_3 \qquad (6\text{-}28)$$

从上两式中，可以看出，不论在有氧还是缺氧情况下，氨基酸的分解结果都产生氨和一种不含氮的有机化合物，如 RCOOH、RCH_2COOH。这些不含氮的有机化合物可再按上节所讨论的不含氮有机物质转化的规律变化，或者参与合成作用变成细胞的碳水化合物、蛋白质或脂类物质的一部分，氨则能作为微生物所需氮的来源。这种由有机氮化物转化为氨态氮的过程，叫做氨化作用。

参与氨化作用的细菌称为氨化细菌（Ammonifier）（图 6-4）。在自然界中，它们的种类很多，主要有好氧性的荧光假单胞菌和灵杆菌，兼性的变形杆菌和厌氧的腐败梭菌等。除细菌外，有些真菌在有氧条件下也能分解蛋白质，但产生氨的能力则很不一致，有的比较活跃，不过大部分真菌在分解蛋白质过程中只能产生少量的氨。

氨基酸的分解过程，除脱氨基产生氨外，含硫的氨基酸同时还可以脱去硫，产生有臭气的硫化氢。如果通气不畅，还会有一此硫醇等产生。但是这些化合物的大部分仅在缺氧的环境中才会累积到一定程度而影响环境卫生，在有充分氧气存在时，一般都会被氧化成无臭的物质。这说明了为什么在活性污泥法曝气池中废水的分解虽进行得比较快，但并无臭气发生。

2. 硝化作用　氨和硫化氢的进一步转化都需要氧气。氨在硝化细菌（Nifrifier）的呼吸过程中先氧化成亚硝酸再氧化成硝酸。在此氧化过程中，硝化细菌获得了生活所需的能量。

$$2NH_3+3O_2 \longrightarrow 2HNO_2+2H_2O+619.6kJ \qquad (6\text{-}29)$$

$$2HNO_2+O_2 \longrightarrow 2HNO_3+201kJ \qquad (6\text{-}30)$$

这种由氨氧化成硝酸的过程称为硝化作用。硝化作用是由两类不同的硝化细菌分工进行的（图 6-5）。亚硝酸细菌（Nitrite bacteria）负责氧化氨为亚硝酸，硝酸细菌（Nitrate bacteria）负责氧化亚硝酸为硝酸。这两类细菌都是革蓝氏染色阴性，不生芽孢的球状或短杆状



图 6-4　几种氨化细菌

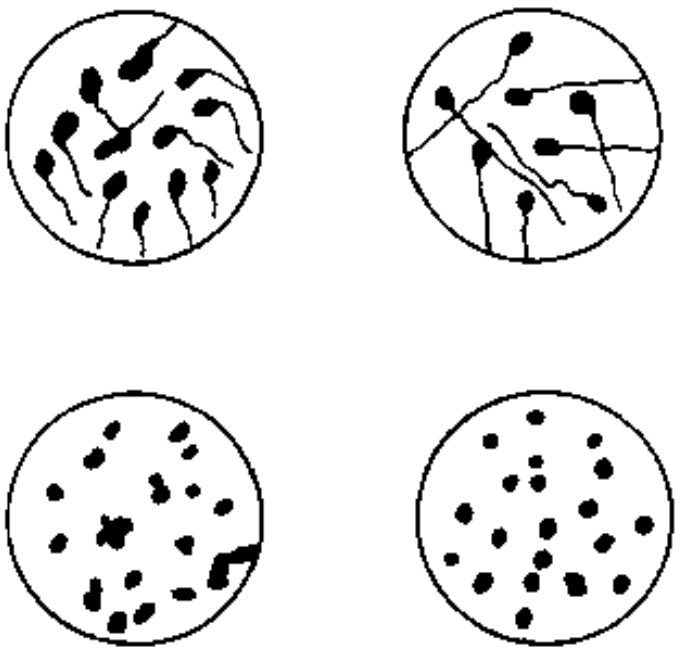


图 6-5　几种硝化细菌

的细菌，有强烈的好氧性，适宜于中性或碱性环境，不能在强酸性条件下生长，生活时不需要有机养料，是自养菌，亚硝酸细菌具有单生鞭毛，硝酸细菌则不生有鞭毛。硝化细菌对毒质十分敏感。很少的铁质能促进其生长，但锰即使量很少也对它们有害。

硝化作用的进行，除必须有氧和氨的存在外，还要有细菌生活所需营养的磷素和某些碱性物质以中和所产生的亚硝酸和硝酸，而有机物质，已如上述，却是不必要的。

与硝化作用相类似，硫化氢氧化成硫磺和硫酸的过程称为硫化作用。硫化作用的进行也需要氧气。参与硫化作用的细菌主要是硫磺细菌和硫化细菌。它们也都是自养菌，在有氧的环境里通过代谢作用会有硫酸产生。

根据上面的讨论，可以看出，在有氧的情况下，蛋白质最后被氧化成二氧化碳、水、硝酸、硫酸（如蛋白质中也含有硫的话）等产物。所产生的酸与水中的碱性物质作用可形成相应的盐。

3. 反硝化作用　硝酸盐在缺氧的情况下可被厌氧菌作用而还原成亚硝酸盐和氮气等，这一过程称为反硝化。参与反硝化作用的细菌叫反硝化细菌（Denitrifying bacteria）。它们的种类很多，多数是异养或兼性的，如反硝化杆菌、荧光假单胞菌等。它们在厌氧条件下利用硝酸中的氧，氧化有机物，借以获得能量，如：

$$C_6H_{12}O_6+4NO_3 \longrightarrow 6CO_2+6H_2O+2N_2+能量 \qquad (6\text{-}31)$$

所以，一般说，反硝化作用是在硝酸盐与有机物同时存在，而氧气又不足（溶解氧低于0.5mg/L）的情况下发生的。

但反硝化细菌也有自养的，如反硝化硫杆菌可以利用硝酸盐中的氧把硫氧化成硫酸，以所得到的能量用来同化二氧化碳。如：

$$6KNO_3+5S+2CaCO_3 \longrightarrow 3K_2SO_4+2CaSO_4+2CO_2+3N_2+能量 \qquad (6\text{-}32)$$

反硝化在废水处理过程中也有着重要的意义。在活性污泥法曝气池的出水中含有硝酸盐。如果硝酸盐含量高，则在二次沉淀池（曝气池后面的沉淀池）污泥中可以由于反硝化作用产生大量氮气，气体的上升将促使污泥杂质浮起而影响沉淀效果。此外，还应注意，生物处理二次沉淀池出水中亚硝酸盐的测定并不能正确反映废水硝化的程度，因为所测得的亚硝酸盐可能是通过反硝化而形成的。

在缺氧情况下，也可能发生反硫化作用，这是硫酸盐经硫酸盐还原菌的作用形成硫化氢的过程。

关于硫化和反硫化作用将于本章第四节中再讨论。

三、尿素的转化

尿素含氮47%，是人畜尿中的主要含氮有机物。每人一昼夜排出的尿素约达30g。尿酸也是尿的组成成分，尿酸水解时产生大量尿素。

尿素的分解过程很简单，先由尿素酶把尿素水解成碳酸铵，后者很不稳定，易分解成氨与二氧化碳和水。

$$CO(NH_2)_2+2H_2O \longrightarrow (NH_4)_2CO_3 \qquad (6\text{-}33)$$

$$(NH_4)_2CO_3 \longrightarrow 2NH_3+CO_2+H_2O \qquad (6\text{-}34)$$

引起尿素水解的细菌称尿素细菌，尿素细菌可分成球状与杆状的两大类。一般说，它们都是好氧的，但对氧的需要量不大，并且有若干菌种即使在无氧条件下也能生长。

第四节　无机元素的转化

前面讲的是不含氮有机物和含氮有机物的无机化过程，这一节将介绍一些无机元素的转化过程。

一、硫的转化

除上节所提到的含硫氨基酸在微生物作用下同时会有硫化氢产生外，化学等工业的生产过程中也会有硫化氢产生，如在石油炼厂生产中就产生硫化氢。硫化氢是有毒物质，对人体有毒害作用。硫化氢也极易使铁管腐蚀。

关于硫化氢被氧化成硫磺和硫酸的过程（硫化作用）和硫酸盐被还原成硫化氢的过程（反硫化作用）已在上节中提到。现将自然界中硫的循环示于图 6-6 中。在水体污染和废水处理的研究中，硫循环也具有重要意义。

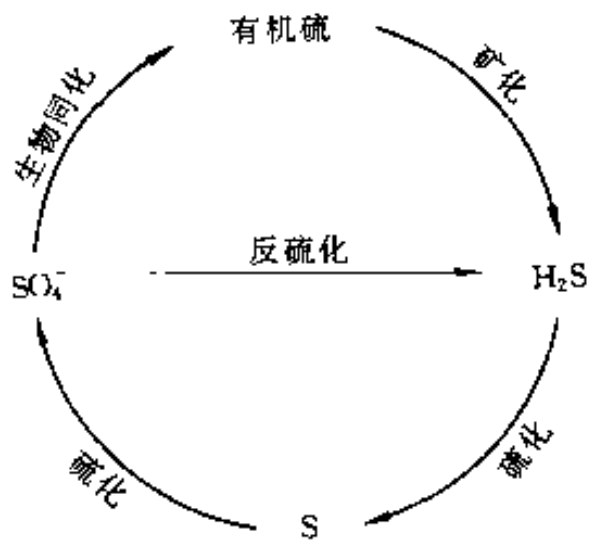


图 6 6　硫循环

硫化作用主要是由硫磺细菌和硫化细菌引起的。

硫磺细菌能氧化硫化氢成硫磺颗粒贮存于细胞内。当环境中缺乏硫化氢时，则细胞内的硫磺颗粒则继续被氧化而成硫酸。

在硫磺细菌中，根据有无颜色又可分为两群：一群是无色的，所谓无色硫磺细菌，如贝日阿托氏菌、发硫菌等；另一群具有菌紫色，称紫色硫磺细菌，如紫硫菌、八叠硫菌等。

无色硫磺菌大多是化能自养菌，从氧化硫化氢和元素硫过程中取得能量。

$$2H_2S+O_2 \longrightarrow 2H_2O+S_2+\text{能量} \tag{6-35}$$

$$S_2+3O_2+2H_2O \longrightarrow 2H_2SO_4+\text{能量} \tag{6-36}$$

$$CO_2+H_2O+\text{能量} \longrightarrow [CH_2O]+O_2 \tag{6-37}$$

所产生的硫酸，排出菌体后可与环境中的盐类作用，形成硫酸盐。

紫色硫磺细菌细胞内也含有硫磺粒，它们有两种方式进行有机碳化物的合成作用，光合作用和化学合成作用：

$$CO_2+H_2O \xrightarrow[\text{菌紫素}]{\text{日光}} [CH_2O]+O_2 \quad \text{（光合作用）} \tag{6-38}$$

$$4H_2S+O_2 \longrightarrow 2S_2+2H_2O+4H+\text{能量} \quad \text{（硫化作用）} \tag{6-39}$$

$$CO_2+4H \longrightarrow [CH_2O]+H_2O \quad \text{（化学合成作用）} \tag{6-40}$$

硫化细菌主要有排硫杆菌、氧化硫杆菌和脱氮硫杆菌。它们除脱氮硫杆菌外都是好氧性的。

排硫杆菌能氧化硫化氢或硫代硫酸盐为硫酸，同时形成硫，积留于细胞体外，这同硫磺细菌有显著的差别。

$$5Na_2S_2O_3+H_2O+4O_2 \longrightarrow 5Na_2SO_4+H_2SO_4+4S+\text{能量} \tag{6-41}$$

$$Na_2S_4O_6+O_2 \longrightarrow Na_2SO_4+H_2SO_4+2S+能量 \quad (6\text{-}42)$$

氧化硫杆菌氧化硫或硫代硫酸盐为硫酸。

$$S_2+3O_2+2H_2O \longrightarrow 2H_2SO_4+能量 \quad (6\text{-}43)$$

$$Na_2S_2O_3+2O_2+H_2O \longrightarrow Na_2SO_4+H_2SO_4+能量 \quad (6\text{-}44)$$

脱氮硫杆菌在缺氧情况下能利用还原硝酸时获得的氧氧化硫或硫代硫酸盐成硫酸，如式（6-32）及下式所示。

$$5Na_2S_2O_3+8KNO_3+2NaHCO_3 \longrightarrow 6Na_2SO_4+4K_2SO_4+4N_2+2CO_2+H_2O \quad (6\text{-}45)$$

上述细菌氧化硫时都产生相当量的硫酸，特别是氧化硫杆菌可以抵抗强酸，5%的硫酸对它们的生命活动没有什么影响，适宜的 pH 值约为 2～4。

反硫化作用则主要是由于硫酸盐还原菌的存在，常见的有去硫弧菌。在缺乏氧气和有有机物存在的情况下，它们使硫酸盐转化成硫化氢。

$$CH_3COOH+Na_2SO_4 \longrightarrow Na_2CO_3+H_2S+CO_2+H_2O \quad (6\text{-}46)$$

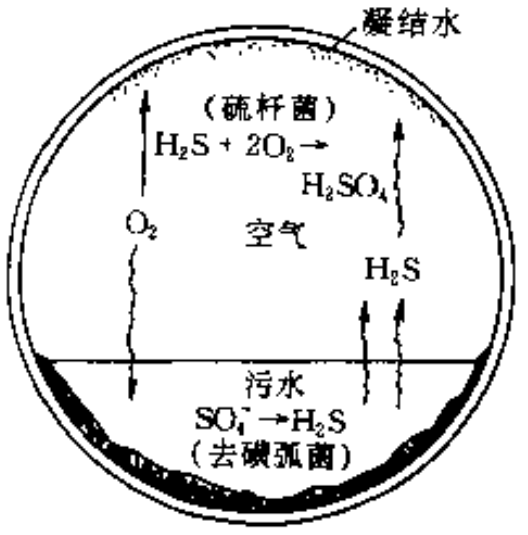


图 6-7　H_2S 对混凝土管的腐蚀

在混凝土沟渠中，硫酸盐还原所形成的硫化氢，为硫磺细菌等氧化成硫酸后，可使混凝土由于腐蚀而受到损坏（图 6-7）。一般说，废水中硫酸盐还原菌是不多的，它们比较集中在沟渠沉淀物中。所以，为了减少沟渠中可能产生的硫化氢，也要求沟渠有适当的坡度和加强渠道的维护工作。

二、磷的转化

磷的转化较为简单。不溶性无机磷酸盐可借微生物分解有机物时所产生的有机酸和二氧化碳或由于硝化细菌及硫化细菌所形成的硝酸和硫酸的作用转化成可溶性磷酸盐。

$$Ca_3(PO_4)_2+2CO_2+2H_2O \longrightarrow 2CaHPO_4+Ca(HCO_3)_2 \quad (6\text{-}47)$$

$$Ca_3(PO_4)_2+2HNO_3 \longrightarrow 2CaHPO_4+Ca(NO_3)_2 \quad (6\text{-}48)$$

$$Ca_3(PO_4)_2+H_2SO_4 \longrightarrow 2CaHPO_4+CaSO_4 \quad (6\text{-}49)$$

可溶性磷盐能被微生物或植物吸收，组成有机化合物中的含磷有机物，如卵磷脂、核酸以及各种糖的磷酸脂等。微生物体内含磷量较其它生物为高，以 P_2O_5 计，约为干重的 4%～5%，占全部灰分的一半以上，其中 80%的磷存在于核酸中。

有机磷化物在有氧条件下也可被很多微生物，如解磷大芽孢杆菌、蜡质芽孢杆菌、霉状芽孢杆菌等，分解产生磷酸，从而形成磷酸盐。

在缺氧的条件下，磷酸盐可以因梭状芽孢杆菌、大肠杆菌等微生物的作用而被还原，与硝酸还原（反硝化）和硫酸还原（反硫化）类似：

$$H_3PO_4 \longrightarrow H_3PO_3 \longrightarrow H_3PO_2 \longrightarrow PH_3 \quad (6\text{-}50)$$

近年来，随着含磷洗涤剂的广泛采用，污水中磷的含量增多了。湖泊水体中如有大量氮、磷排入，如前所述，将促使藻类等植物十分旺盛地生长繁殖，形成所谓富营养化污染，影响环境卫生。上述氮、磷的来源主要是生活污水、工业废水和农业排水。

三、铁的转化

微生物对铁的转化方式，有氧化、还原以及有机铁的溶解或铁的沉淀等几个方面的作用。一般说，在碱性环境中溶于水中的铁量很少，而在酸性环境中则有较多游离的铁。

1. 铁化物的氧化和沉淀　在适当的条件下，低价的铁能被微生物氧化成高价铁，呈氢氧化铁的状态而被排出并沉淀下来。引起这种作用的微生物，统称为铁细菌。它们从氧化低铁为高铁的变化中获得能量。

在含有低铁的工业废水中，如铁被沉淀下来，则废水就得到净化。这是对我们有利的一面。但当这些微生物生活在水中含铁较多的水管中时，排出菌体的氢氧化铁沉积物将在管壁上积成锈块，以致阻塞管道。这种沉淀物还将影响水质。

2. 铁化物的还原与溶解　沉淀的铁化物可由于微生物在生命活动中所产生的碳酸等无机酸及各种有机酸而溶解；另外，还可由于微生物分解有机物的过程中，降低了环境中氧化还原电位势，使高价铁化物还原成亚铁化合物而溶解，这种现象特别是在氧不足的情况下容易发生。

3. 有机铁化物的形成与溶解　溶解性的铁可以被动植物及微生物吸收利用形成有机结合的状态，或与有机酸结合成有机酸铁盐。这种有机态结合铁又可被微生物分解而无机化，再形成溶解性的铁为微生物等利用。

应当指出，在自然界中，各种元素的循环彼此有关，并非单独进行，而且是通过各种微生物起作用的。

第五节　废水生物处理中的微生物

自然界中很多微生物有氧化分解有机物的能力。生产实践表明，利用微生物氧化分解废水中的有机物是十分有效的。这种利用微生物处理废水的方法叫做生物处理法。目前生物处理法主要是用来除去废水中溶解的和胶体的有机污染物质。

由于微生物生活时有的需要氧气，有的不需要氧气，所以根据在处理过程中起作用的微生物对氧气要求的不同，废水的生物处理可分为好氧生物处理和厌氧生物处理两类。

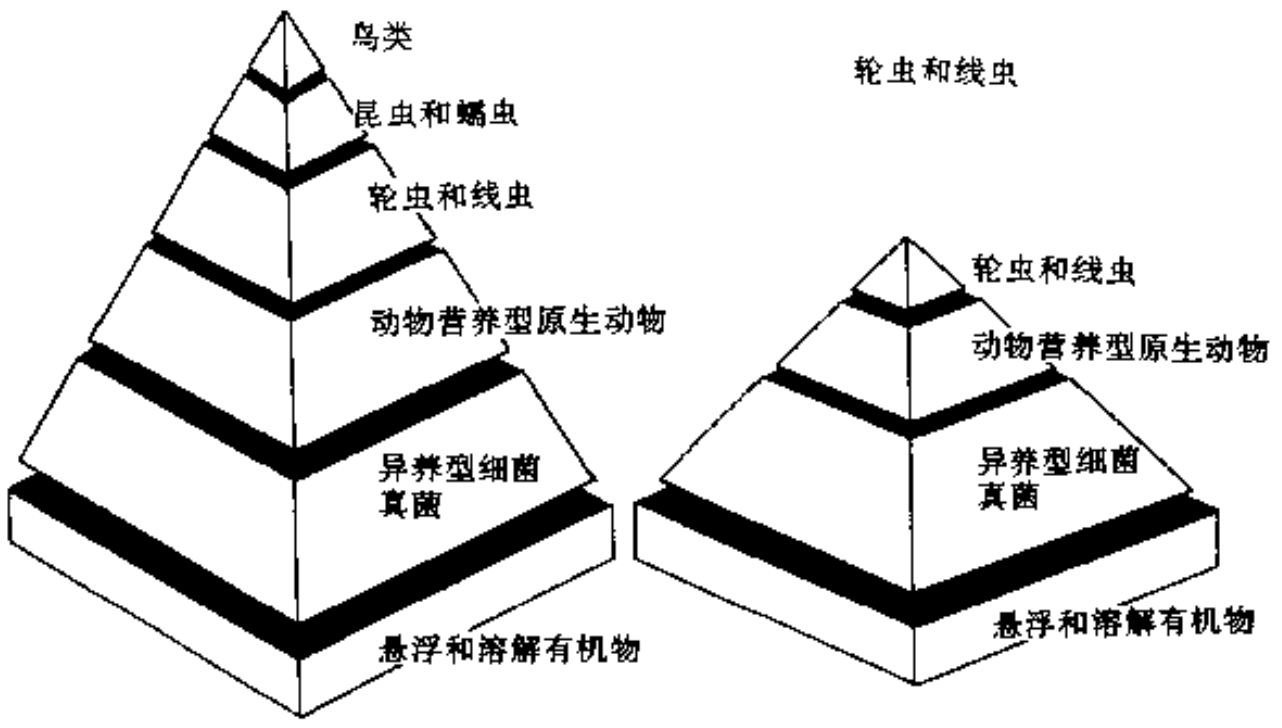
生物处理单元基本上可分为附着生长型和悬浮生长型两类。在好氧处理中附着型所用反应器可以生物滤池为代表，而悬浮型则可以活性污泥法中的曝气池为代表。

各类处理系统中的微生物皆为混合培养微生物系统。从“生物处理生态学”角度看，生物处理构筑物中包含一个完整的生态系统。各类生物构成一个食物网。可以画成一个食物金字塔。在这种食物网金字塔中具有不同层次的营养水平。由于反应器的特性不同，悬浮生长反应器系统中的营养水平就比附着生长反应器系统要少。图 6-8 是 1985 年 Wheatley 提出的生物滤池和活性污泥法的食物金字塔的对比。这类人工生态系统完全受运行方式的控制，并受食物（有机负荷）和供氧的限制。

一、废水的好氧生物处理及处理构筑物内的微生物

1. 废水的好氧生物处理　好氧生物处理（或称好气生物处理）是在有氧的情况下，借好氧微生物❶（主要是好氧菌❷）的作用来进行的。在处理过程中，废水中的溶解性有机物质透过细菌的细胞壁和细胞膜而为细菌所吸收；固体的和胶体的有机物先附着在细菌体外，由细菌所分泌的胞外酶分解为溶解性物质，再渗入细胞。细菌通过自身的生命活动——氧

❶ 包括兼性微生物。
❷ 包括兼性菌。



(a)生物滤池　　(b)活性污泥

图 6-8　生物滤池和活性污泥法的食物金字塔的对比

化、还原、合成等过程，把一部分被吸收的有机物氧化成简单的无机物，并放出细菌生长、活动所需要的能量，而把另一部分有机物转化为生物体所必需的营养物质，组成新的细胞物质，于是细菌逐渐生长繁殖、产生更多的细菌。其它微生物摄取营养后，在它们体内也发生相同的生物化学反应。图 6-9 可以简单地说明这个过程。

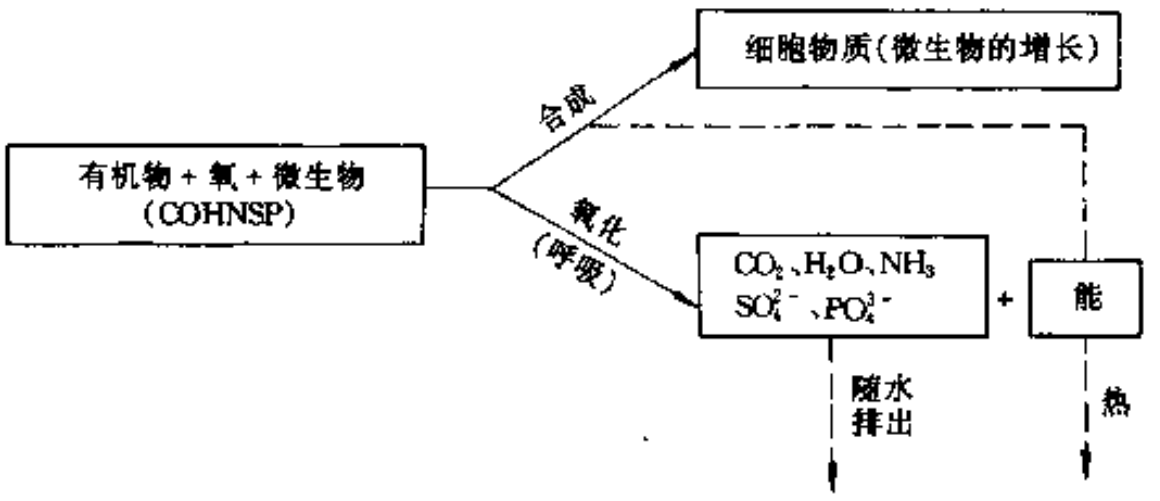


图 6-9　有机物的好氧分解

应当指出，在细菌的生长过程中，除吸收入体内的一部分有机物被氧化并放出能量外，还有一部分细菌的细胞物质也在进行氧化，同时放出能量。这种细胞质的氧化称为自身氧化或内源呼吸。当有机物（食料）充足时，细胞质大量合成，内源呼吸是不显著的，所以在图中未表出细胞质的氧化过程。但当有机物几乎耗尽时，内源呼吸就会成为供应能量的主要方式，最后细菌将由于缺乏能量而死亡。

下列方程式表示有机物（以 $C_xH_yO_z$ 表示）氧化和合成的反应：

(1) 有机物的氧化

$$C_xH_yO_z + \left(x + \frac{1}{4}y - \frac{1}{2}z\right)O_2 \longrightarrow xCO_2 + \frac{1}{2}yH_2O + \text{能量} \qquad (6\text{-}51)$$

(2) 细胞物质的合成（包括有机物的氧化，并以 NH_3 作氮源）

$$n(C_xH_yO_z) + NH_3 + \left(nx + \frac{ny}{4} - \frac{n}{2}z - 5\right)O_2$$

$$\longrightarrow \underset{\text{细胞物质(细菌)}}{C_5H_7NO_2}\text{❶} + (nx-5)CO_2 + \frac{1}{2}(ny-4)H_2O + \text{能量} \qquad (6\text{-}52)$$

(3) 细胞物质的氧化

$$C_5H_7NO_2 + 5O_2 \longrightarrow 5CO_2 + 2H_2O + NH_3 + \text{能量} \qquad (6\text{-}53)$$

如在式 (6-51) 中的有机物含有氮、磷或硫，则氮、磷或硫将分别被氧化并与水中碱性物质作用而成相应的盐类。式 (6-52) 中的 NH_3 可以是细菌所吸入的含氮有机物的分解产物或是吸入的铵盐。如果没有含氮物质被吸入，则不可能有细胞物质合成。

废水中所含各种有机物氧化和合成的比例随有机物的性质和微生物的种类、活动等而有不同。一般情况下，生物处理构筑物内新生长 (增加) 的细胞物质等于所合成的细胞物质减去由于内源呼吸而耗去的细胞物质，可用下列算式表示：

$$\triangle S = aL_r - bS_a \qquad (6\text{-}54)$$

式中 $\triangle S$——新生长的细胞物质 (kg/d)；

L_r——所利用的食料，即去除的 BOD_5 (kg/d)；

S_a——构筑物内原有的细胞物质 (kg)；

a——合成系数 [合成的细胞物质 (kg) /去除的 BOD_5 (kg)]；

b——细胞自身氧化率或衰减系数 (1/d)。

a 和 b 的值可通过试验确定如下：

将式 (6-54) 两侧各除去 S_a，得：

$$\frac{\triangle S}{S_a} = \frac{aL_r}{S_a} - b \qquad (6\text{-}55)$$

以 $\frac{L_r}{S_a}$ 为横坐标，$\frac{\triangle S}{S_a}$ 为纵坐标作图，可得一直线，其斜率即 a，纵轴上的截距即 b。

就活性污泥来说，可以其挥发性部分代表微生物，曝气池内挥发性污泥量可作为 S_a 代入式中；此外，池中所增加的微生物细胞的量可假定大致等于所排放的剩余污泥挥发性部分的量。

图 6-10 是某染厂漂染废水活性污泥法处理试验求 a、b 值的实例。

对于生活污水和性质与之接近的工业废水，a 一般可取 0.5～0.7，b 可取 0.05～0.1；污泥泥龄长，a 值取小，b 值取大；污泥泥龄短，a 值取大，b 值取小。表 6-1 示几种工业废水的 a、b 值。

生物处理构筑物内所增加的细胞物质也可约略地以投入的有机物 (以 BOD_5 计) 的 50%左右

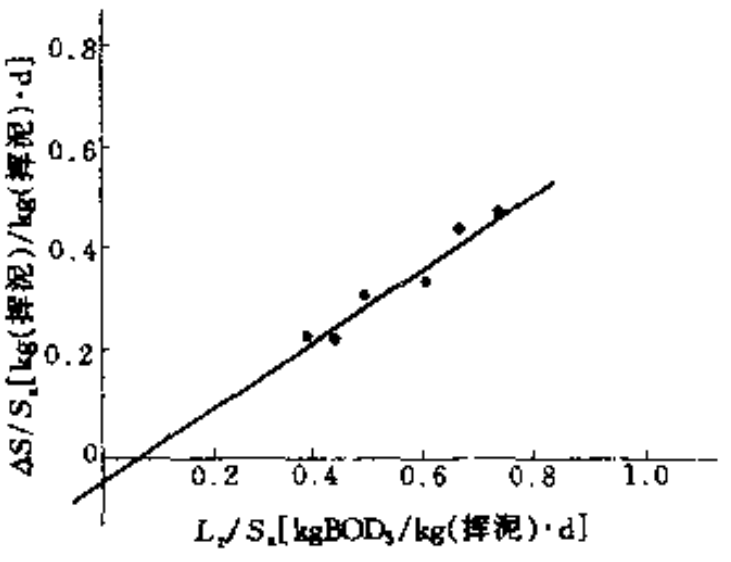


图 6-10 漂染废水 $\frac{\triangle S}{S_a}$ 与 $\frac{L_r}{S_a}$ 的关系

❶ 在正常情况下，各类微生物细胞物质的成分是相当稳定的，一般可用下列实验式表示：细菌 $C_5H_7NO_2$；真菌 $C_{16}H_{17}NO_6$；藻类 $C_5H_8NO_2$；原生动物 $C_7H_{14}NO_3$。

估算。

几种工业废水的 a、b 值　　表 6-1

废　　水	a	b	废　　水	a	b
合成纤维废水	0.38	0.10	纸浆和造纸废水	0.76	0.065
亚硫酸盐废水	0.55	0.13	制药废水	0.77	—
含酚废水	0.70	—	酿造废水	0.93	—

【例题】 某城市混合废水用活性污泥法处理。其曝气池的有效容积为 340m³，进水流量为 150m³/h，进水 BOD_5 为 200mg/L，出水 BOD_5 为 20mg/L，曝气池内污泥浓度为4g/L（其中挥发份占 75%）。计算剩余污泥量。

【解】 按式（6-54）

$$\triangle S = aL_r - bS_a,$$

$$L_r = (200 - 20) \times 150 \times \frac{24}{1000} = 648\text{kg/d}$$

$$S_a = 4 \times 75\% \times 340 = 1020\text{kg}$$

取 $a = 0.6, b = 0.075$，

$$\therefore \triangle S = 0.6 \times 648 - 0.075 \times 1020 = 312.3\text{kg/d}$$

∴剩余污泥量为：

$$\triangle S' = \frac{\triangle S}{75\%} = \frac{312.8}{75\%} = 416\text{kg/d}$$

如果剩余污泥的含水率（P）为 99.2%，则剩余污泥体积为：

$$\triangle S'' = \left(1 \times \frac{100 - 0}{100 - P}\right) \times \frac{1}{1000} \times \triangle S'$$

$$= \frac{100}{100 - 99.2} \times \frac{1}{1000} \times 416 = 52\text{m}^3/\text{d}$$

有机物生物氧化所需要的氧量则包括微生物生长活动和自身氧化过程中所需的全部氧量，可用下列关系式表示：

$$O_2 = a'L_r + b'S_a \qquad (6\text{-}56)$$

式中 O_2——微生物需氧量（kg/d）；

L_r——所去除的 BOD_5（kg/d）；

S_a——微生物重量（kg）；

a'——去除单位 BOD_5 所需的氧量（kg/kg）；

b'——微生物自身氧化需氧率（1/d）。

就活性污泥来说，已如上述，可以其挥发性部分代表微生物，曝气池内挥发性污泥量可作为 S_a 代入上式中，在选择鼓风系统或曝气装置时，应留有一定余地。

a'和b'的值可通过试验确定如下：

将式（6-56）两侧各除以S_a，得：

$$\frac{O_2}{S_a}=\frac{a'L_r}{S_a}+b' \tag{6-57}$$

以$\frac{L_r}{S_a}$为横坐标，$\frac{O_2}{S_a}$为纵坐标作图，可得一直线，其斜率即a'，纵轴上的截距即b'。对于生活污水或性质与之相近的工业废水，a'常在0.4～0.55，b'常在0.2～0.1之间。上海某活性污泥污水厂生活污水运转资料，a'为0.42，b'为0.188。表6-2示几种工业废水的a'、b'值。

几种工业废水的a'、b'值 **表6-2**

废　　水	a'	b'	废　　水	a'	b'
石油化工废水	0.75	0.160	酿造废水	0.44	—
含酚废水	0.56	—	制药废水	0.35	0.354
合成纤维废水	0.55	0.142	亚硫酸浆粕废水	0.40	0.185
漂染废水	0.5～0.6	0.065	制浆造纸废水	0.38	0.092
炼油废水	0.50	0.120			

在进行活性污泥法曝气系统设计时，如果缺乏资料，有机物生物氧化所需的氧量可按去除1kgBOD_5需氧1kg，并留一定余地进行估计。

于是根据氧的重量为1.43kg/m³，空气中含氧21%（体积比），即可算出所需的空气量。

除少数物质外，几乎所有的有机物都能被相应的微生物氧化分解，所以目前生物处理法被广泛地用于处理各种含有有机物的废水。

通过好氧处理，废水中一部分有机物的确无机化了，一部分有机物则被合成为微生物的细胞物质。当废水中有机物较多时（超过微生物生活所需时），合成部分增大，微生物总量增加较快；当废水中有机物不足时，一部分微生物就会因饥饿而死亡，它们的尸体将成为另一部分微生物的“食料”，微生物的总量将减少。微生物的细胞物质虽然也是有机物质，但微生物是以悬浮的状态存在于水中的，相对地说，个体比较大也比较容易凝聚，可以同废水中的其它一些物质（包括一些被吸附的有机物和某些无机的氧化产物以及菌体的排泄物等）通过物理凝聚作用在沉淀池中一起沉淀下来。由此可见，好氧生物处理法特别适用于处理溶解的和胶体的有机物，因为这部分有机物不能直接利用沉淀法把它们除去，而利用生物法则可把它们的一部分转化成无机物，另一部分转化成微生物的细胞物质从而与废水分离。但必须注意，沉淀下来的污泥（其中含有大量微生物）在缺氧的情况下容易腐化，应作适当的处置。

用好氧法处理废水，基本上没有臭气，处理所需的时间比较短，如果条件适宜，一般可除去20℃5天生化需氧量80%～90%左右，有时甚至可达95%以上。

除上面所提到的活性污泥法外，生物滤池、生物转盘、污水灌溉和生物塘等也都是废水好氧处理的方法。

习惯上，把废水的好氧生物处理即称为生物处理。

2. 好氧生物处理构筑物内的微生物

(1) 活性污泥法中的微生物

1) 活性污泥生态学及常见微生物

活性污泥中的微生物主要有假单胞菌、无色杆菌、黄杆菌、硝化细菌、球衣细菌，贝日阿托氏菌、发硫菌、地霉等；此外，还有钟虫、盖纤虫、等枝虫、草履虫等原生动物；以及轮虫等后生动物。

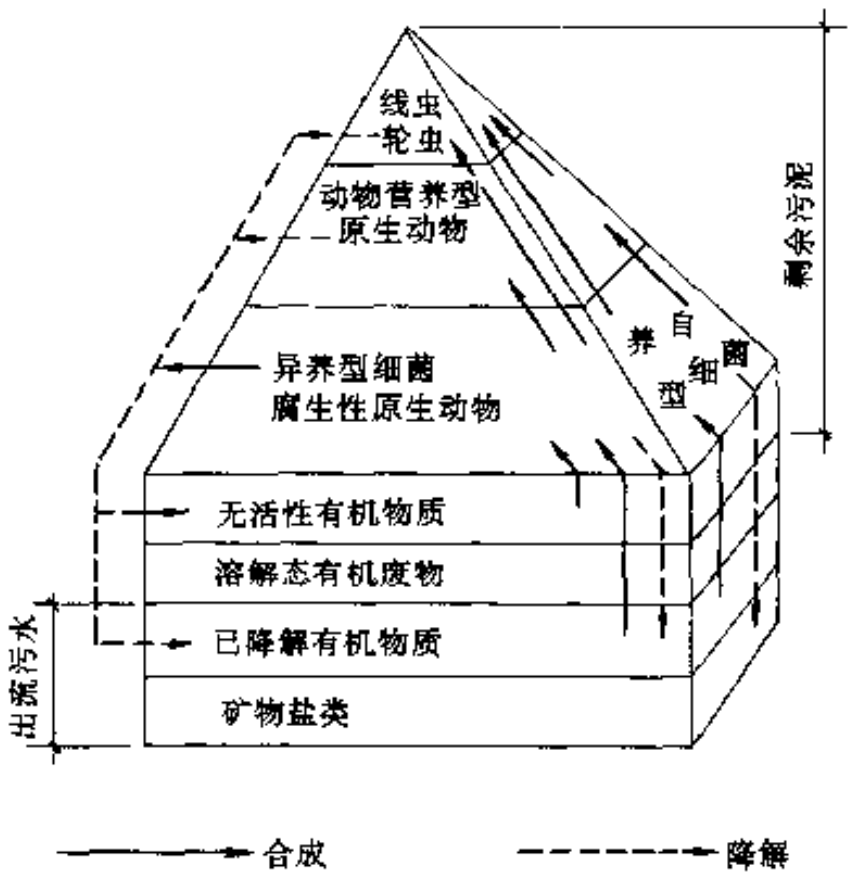


图 6-11 活性污泥法过程的食物金字塔

与所有生物处理过程一样，活性污泥系统具有混合培养的、主要起氧化有机物作用的细菌和其它较高级的水微生物，形成了一个具有不同营养水平的完整的生态系统。由于不断的人工充氧和污泥回流，使曝气池不适于某些水生生物生存，特别是那些比轮虫和线虫（*Nematodes*）更大型的种群和那些长生命周期的微生物。活性污泥反应器中主要生物种群是细菌、原生动物和线虫（*Nematodes*）。其它种群如剑水蚤属（*Cyclops*）、（*Aelosoma*），甚至某些双翅目（*dipterans*）的幼虫也偶尔可见。在混合液中也可见藻类，但很难生长。传统活性污泥法过程的食物金字塔较详细地示于图 6-11 中。

曝气池中的异养型细菌形成了池中生物絮体的主体，它们是个体细菌的凝聚或者由丝状菌促使它们聚集在一起。絮体的生物条件决定了基质的去除率，其物理结构又确定了它们在二次沉淀池中的沉降效果。国外有人对其实验室中的活性污泥及某生产性活性污泥厂污泥进行了检验，结果如表 6-3 所示。

活性污泥中的一些好氧异养菌 **表 6-3**

种　　类	实验室活性污泥	某生产性活性污泥厂污泥
不动杆菌属（*Acinetobacter*）	9①	4①
产碱杆菌属（*Alcaligenes*）	4	2
芽孢杆菌属（*Bacillus*）	0	5
短杆菌属（*Brevibacterium*）	17	7
柄杆菌属（*Caulobacter*）	2	0
卡玛单胞菌属（*Comomonas*）	7	5
噬纤维菌属（*Cytophaga*）	1	8
Debaromyces	0	4
黄杆菌属（*Flavobacterium*）	7	1
生丝微菌属（*Hyphomicrobium*）	0	2
假单胞杆菌属（*Pseudomonas*）	8	16
球衣菌属（*Sphaerotilus*）	0	33②
未知的	2	12③

①游离的数量；

②只采集到 3 个种群；

③不能在 Difco 培养基中生长，或不能归类。

原生动物是活性污泥的经常组成部分，其个数可达 5000 个/mL，可占混合液干重的 5%～12%。表 6-4 列出了活性污泥污水处理厂中最常见的原生动物。

采用活性污泥法的污水处理厂中最常见的原生动物 **表 6-4**

研究者	分类		
	植鞭毛纲 (*Phytomastigophorea*)	根足亚纲 (*Rhizopodea*)	纤毛纲 (*Ciliatea*)
Brown (1965)		蜂巢鳞壳虫 (*Euglypha alveolata*)	有肋术纤虫 (*Aspidisca costata*) 锐利术纤虫 (*Aspidisca lynceus*) 壮术纤虫 (*Aspidisca robusta*) 僧帽斜管 (*Chilodonella cucullulus*) 褶累枝虫 (*Epistylis plicatilis*) 小腔游仆虫 (*Euplotes aediculatus*) 片状漫游虫 (*Litonotus fasciola*) 钟钟虫 (*Vorticel la campanula*) 沟钟虫 (*Vorticella convallaria*) 小口钟虫 (*Vorticella microstoma*) 似星云钟虫 (*Vorticella nobulifora var smilis*) 八条纹钟虫 (*Vorticella striata var. octava*)
Curds & Cockburn (1970)	粗袋鞭虫 (*Peraneina Trichophorum*)	小变形虫 (*small amoebae*) 普通表壳虫 (*Arcella vulgaris*) 鳞壳虫 (*Euglypha sp.*) (*Euglypha sp.*)	有肋术纤虫 (*Aspidisca costata*) 蛔状独缩虫 (*Carchesium polypinum*) 四棘多 7 污游仆虫 (*Euplotes moebiusi*) 集盖虫 (*Opercularia coarctata*) 卑怯管叶 (*Trachelophyllum pusillum*) 白钟虫 (*Vorticella alba*) 沟钟虫 (*Vorticella convallaria*) 法帽钟虫 (*Vorticella fromenteli*) 小口钟虫 (*Vorticella microstoma*)
Schofield (1971)		变形虫（未定种）(*Amoeba sp.*) 螺足虫属（未定种）(*Cochilopodium sp.*)	有肋术纤虫 (*Aspidisca costata*) 钩刺斜管 (*Chilodonella uncinata*) 单鳔虫属（未定种）(*Drepanomonas sp.*) 累枝虫属（未定种）(*Epistylis sp.*) 半眉虫（未定种）(*Hemiophrys sp.*) 沟钟虫 (*Vorticella convallaria*) 小口钟虫 (*Vorticella microstoma*)

完全混合活性污泥曝气池内的原生动物的种类在空间上观察不到有什么差别（在生物滤池中纵向是有差别的）。随着活性污泥的逐步成熟，混合液中的原生动物的优势种类也会顺序变化，从肉足类、鞭毛类优势动物开始，依次出现游动型纤毛虫、爬行型纤毛虫、附着型纤毛虫。爬行型纤毛虫和附着型纤毛虫与活性污泥絮体紧密连接，一旦达到一定密度就会随着二沉池中沉淀的回流活性污泥返回曝气池，而被冲洗（wash out）掉的大部分是鞭

毛类优势动物和游泳型纤毛虫。当活性污泥达到成熟期，其原生动物发展到一定数量后，出水水质则明显改善。新运行的曝气池或运行得不好的曝气池，池中主要含鞭毛类原生动物和根足虫类（*Rhizopods*），只有少量纤毛虫；相反的，出水水质好的曝气池混合液中，主要含纤毛虫，只有少量鞭毛型原生动物和变形虫。纤毛虫成为优势种，常见的例如斜管虫属（*Chilodonella spp.*）、豆形虫属（*Colpidium spp.*）、术纤毛虫属（*Aspidisca spp.*）、和某些独缩虫属（*Carchesium spp.*）以及钟虫属（*Vorticella spp.*）。假如活性污泥污水厂出水是已经硝化的优质出水，则含有很少的鞭毛类原生动物或变形虫，其优势类纤毛虫为独缩虫属（*Carchosium spp.*）、钟虫属（*Vorticolla spp.*）、术纤毛虫属（*Aspidisca spp.*）、斜叶虫属（*Loxophyllum spp.*）和纤（露）口虫属（*Chaenea spp.*）等。这种污泥状态和出水水质和微生物种类的连带关系导致了用原生动物去指示活性污泥处理厂的出水水质。Curds 和 Cockburn 根据大量实测数据，找出了原生动物种类与出水水质的相关关系。他们根据出水 BOD_5 判定水质优劣，将出水水质分为 4 档：优（0～10mg/L）、良（11～20mg/L）、中（21～30mg/L）、和差（>30mg/L），各个种类在活性污泥污水厂采样中出现的频率（以百分数表示）都记录下来，求出在 4 个档次中出现频率的记录的总合，设这一总合共得 10 分，再根据个别种在每个档次中出现的比例给予“得分值”。表 6-5 为活性污泥处理厂中某些常见原生动物与出水水质及在 4 个 BOD_5 档次中得分值的关系。表中的数字为在某一档次的出现频率记录数，括弧中为该档次的得分值。

活性污泥处理厂某些常见原生动物出现频率与出水水质的关系　　表 6-5

原　生　动　物	出现频率（%）及增加点数（在括号内）			
	BOD_5（mg/L）			
	0～10	11～20	21～30	>30
沟钟虫（*Vorticella convallaria*）	63（3）	73（4）	37（2）	22（1）
法帽钟虫（*Vorticella fromentelt*）	38（5）	33（4）	12（1）	0（0）
螅状独缩虫（*Carchesium polypinum*）	19（3）	47（5）	12（2）	0（0）
有肋术纤虫（*Aspidisca costata*）	75（3）	80（3）	50（2）	56（2）
盘状游仆虫（*Euplotes patella*）	38（4）	25（3）	24（3）	0（0）
有鞭毛的原生动物	0（0）	0（0）	37（4）	45（6）

表 6-6 中列出 Curds 和 Cockburn 研究的结果。表中纵向数字代表得分数。例如：当出水 BOD_5 为 11～20 时，各种类得分之和为 46，得分愈高，出水水质愈好。

活性污泥污水处理厂的出水质量与原生动物种类及其得分数的关系　　表 6-6

污　泥　中　原　生　动　物	出水 BOD_5（mg/L）			
	0～10	11～20	21～30	>30
卑怯管叶虫（*Trachelophyllum pusillum*）	3	3	3	1
纺锤半眉虫（*Hemiophrys fusidens*）	3	4	3	0
僧帽斜管虫（*Chilodonelle cuocullnlns*）	4	4	1	1
旋毛草履虫（*Paramecium trichium*）	4	3	2	1

续表

污泥中原生动物	出水 BOD_5（mg L）			
	0～10	11～20	21～30	>30
社钟虫（*Vorticella communis*）	10	0	0	0
沟钟虫（*Vorticella convallaria*）	3	4	2	1
法帽钟虫（*Vorticella fromenteli*）	5	4	1	0
小口钟虫（*Vorticella microstoma*）	2	1	2	2
集盖虫（*Opercularia coarctata*）	2	2	3	2
蜘状独缩虫（*Carchesium polypinum*）	3	5	2	0
霉聚缩虫（*Zoothamnium mucedo*）	10	0	0	0
有肋水纤虫（*Aspidisca costata*）	3	3	2	2
亲游仆虫（*Euplotes affinis*）	6	4	0	0
盘状游仆虫（*Euplotes patella*）	4	3	3	0
总分值	65	46	28	11

可以根据低倍显微镜观察到的原生动物的类群与得分数去判断处理厂出水的水质。Curbs 和 Cockburn 又用另外的 34 个污水处理厂的实测值去验证他们的研究结果。根据观察原生动物去判断出水水质时，有 85%是正确的。后续研究发现有时判断出水水质的成功率较低。但是，通过按照个别种的混合液中出现的规律而权衡其得分数，会提高判断的成功率。例如，在质量很好的活性污泥中观察到的代表优质出水的指示生物的种应该比观察到少量代表较差水质的指示生物更重要。（应忽略代表较差水质的指示微生物）。以上方法操作方便，可节省时间。但也有两点局限性：首先是鉴别纤毛虫种类的技术要求较高，检验人员必需有较高的业务水平；其次是这种方法的检验结果只能是估计出水的 BOD 值。

2）活性污泥法运行中微生物造成的问题

活性污泥在运行中最常见的故障是在二次沉淀池中泥水的分离问题。造成污泥沉降问题的原因是污泥膨胀、不絮凝、微小絮体、起泡沫和反硝化。这只是从效果上分类，实际上不是很精确，而且有些重叠。所有的活性污泥沉降性问题，其起因皆为污泥絮体的结构不正常造成的。活性污泥颗粒的尺寸的差别很大，其幅度从游离的个体细菌的 0.5～5.0μm，直到直径超过 1000μm（1mm）的絮体。絮体最大尺寸取决于它的粘聚强度和曝气池中紊流剪切作用的大小。

絮体结构被分为两类：微结构与宏结构（Sezqin et al. 1978）。微结构是较小絮体（直径＜75μm），球形，较密实但相对地较易破裂。此类絮体多由“絮体形成菌”（*floc-forming*）组成。在曝气池紊流条件下易被剪切成小颗粒。虽然这种絮体能很快沉淀，但从大凝聚体被剪切下的小颗粒需较长的沉淀时间，可能随沉淀池出水排出，使最终出水的 BOD_5 值上升，并使浊度大幅度上升。当丝状微生物出现时，即出现宏结构絮体，微生物凝聚在丝状微生物周围，形成较大的不规则絮体，这种絮体具有较强的抗剪切强度。

下面将重点说明污泥膨胀的形成及对策，并简要说明其它造成污泥沉降问题的原因：

A）不凝聚

不凝聚是一种微结构絮体造成的现象。这是因为絮体变得不稳定而碎裂，或者因过度

曝气形成的紊流将絮体剪切成碎块而造成的运行问题。也可能是细菌不能凝聚成絮体，微生物成为游离个体或非常小的丛生块。它们在沉淀池中呈悬浮态，并随出水连续流出。一般认为不凝聚是由于溶解氧浓度低、pH 值低或冲击负荷（Pipes，1979）。污泥负荷应大于 0.4kg/kg·d，否则将发生不凝聚问题。若污泥为微结构型，则高污泥负荷时可能出现不凝聚。某些有毒废水也可形成微小凝聚体。自由游泳型原生动物，如肾形虫属（未定种）（*Colpoda sp.*）和草履虫属（未定种）（*Paramecium sp.*），数量很多时，虽未影响污泥沉降性能，但也可使最终出水出现混浊。

B）微小絮体（Pin-point floc）

前已述及，微结构絮体的形成原因及造成的运行问题。含微小絮体的污泥不会在出水中形成高浓度，因为其颗粒比不凝聚污泥要大得多。用肉眼在出水中可观察到离散的絮体。微小絮体往往由于长泥龄（>5～6d）和低有机负荷（<0.2kg/kg·d）而形成的（Pipes，1979）。因此这种问题往往发生在延时曝气系统。

C）起泡沫

自从使用了不降解的“硬”洗涤剂以来，常常在曝气池中出现很厚的白色泡沫。微生物造成的泡沫是另外一种很密实的、棕色的泡沫，有时在曝气池中出现。这种类型的泡沫是由于某些诺卡氏菌属（*Nocardia*）的丝状微生物超量生长，曝气系统的气泡又进入其群体而形成的。这种泡沫以一种密实稳定的泡沫或者一层厚浮渣的形成浮在池面上。气泡使污泥上浮还可能是反硝化造成的。气泡附着于诺卡氏菌属的机理是相当复杂的。在有些情况下，虽然这种丝状微生物在混合液中的种群密度也很高，但却不会造成污泥沉降质量问题。其原因是诺卡氏菌属产生许多分枝（见图 6-12），使絮体成为很坚固的宏结构，生成一种大而牢固、很容易沉降的絮体。

在某污水厂泡沫中诺卡氏菌属的群体密度曾升高至 1012 个/mL，而在混合液中仅为

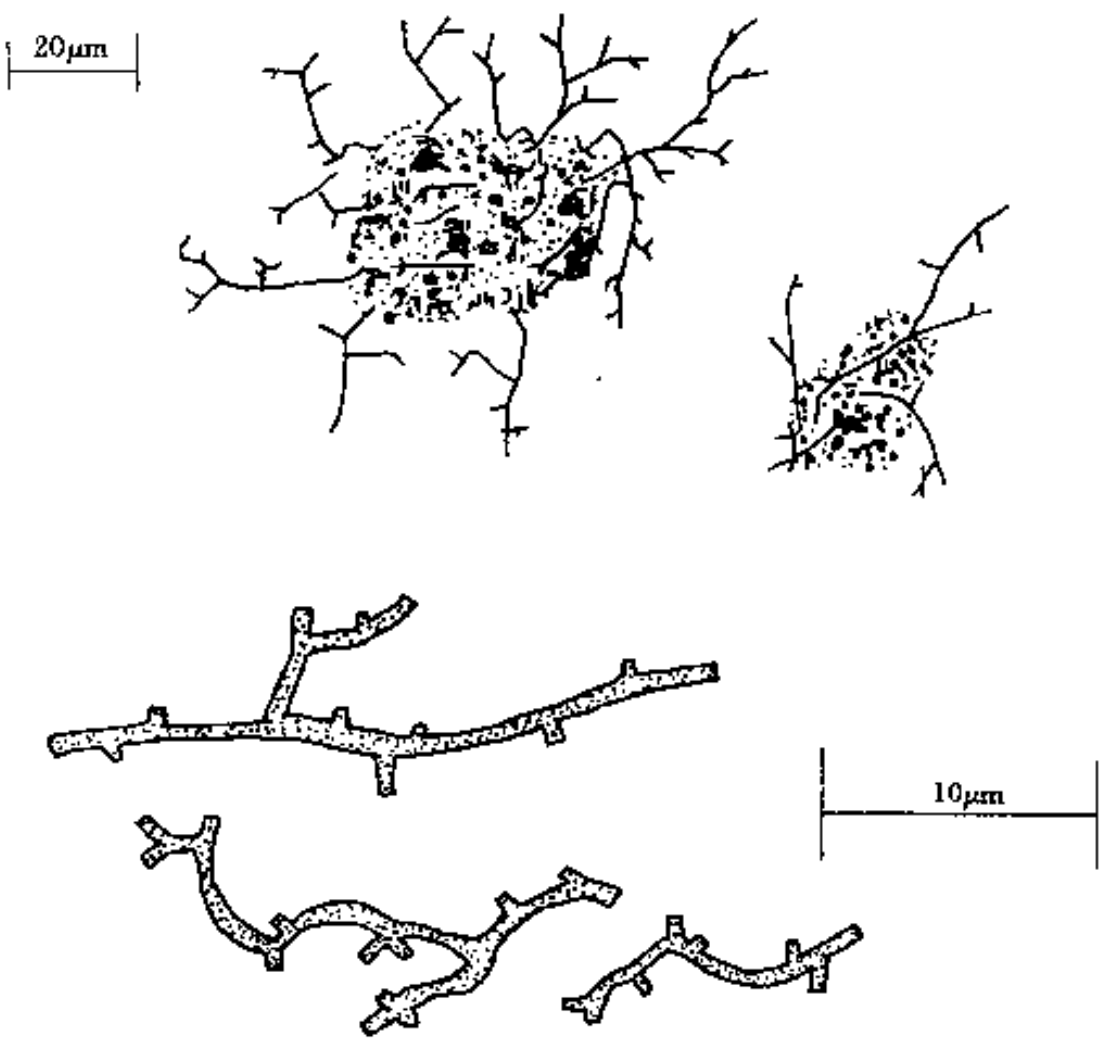


图 6-12　丝状菌诺卡氏菌属（未定种）（*Nocardia sp.*）

106 个/mL (Wheeler and Rule 1980)。其它问题还包括夏季产生臭气；假如污泥需消化，诺卡氏菌属会随之在消化池中产生泡沫 (Jenkins et al. 1984)。

促使诺卡氏菌属生长的原因尚不甚清楚。有利于它生长的因素有温度 (>18℃)；负荷高和长泥龄 (>9d)。在活性污泥法处理厂中广泛应用的控制诺卡氏菌属生长的方法是减少泥龄。用增加剩余污泥量的方法去将诺卡氏菌属冲洗 (wash-out) 出处理系统。泥龄是温度的函数，水温愈高则要求泥龄愈低。

D) 丝状菌污泥膨胀

污泥膨胀是一种丝状菌在絮体中大量生长以致影响沉降的现象。开始时，尽管膨胀污泥比正常活性污泥的沉速慢，但出水水质仍然很好。即使污泥膨胀已较严重，仍能有清澈的上清液，因为延伸的丝状菌会过滤掉形成浊度的细小颗粒。只有当沉降性很差，泥面上升，以致大的絮体也溢出沉淀池，最终出水中 SS 和 BOD 升高。主要问题是污泥膨胀使污泥压缩性能变差，其结构是很多稀薄污泥回流到曝气池，使池中 MLSS 下降，进而造成出水水质达不到要求而使曝气池运行失败。

从污泥结构角度看，膨胀是由于絮体具有坚固的宏结构，以致于丝状微生物的数量猛增。理想的絮体的沉降性能好；最终出水中 SS 和浊度极低；丝状菌与絮体形成菌保持平衡；丝状菌都留在絮体中，从而使絮体强度增加并保护固定的结构。即使有少数丝状菌伸出污泥絮体，它们皆使长度缩得足够的短小而不会影响污泥沉降。与此相反，膨胀污泥有大量丝状菌伸出絮体。可辨别的膨胀污泥絮体有两种类型：第一类是具有长丝状菌从絮体中伸出，此类丝状菌将各个絮体联接 (或称搭桥)，形成丝状菌和絮体网；第二类是具有更开放 (或扩散) 的结构，由细菌沿丝状菌凝聚，形成相当细长的絮体。絮体形成，对沉淀的影响等皆取决于丝状微生物的种类。搭桥型絮体如 021N 型、*Schaerotilus natans*、0961 型、0803 型、*Thiothrix sp.*、0041 型和 *Haliscomenobacter hydrossis* 等。开放型结构有 1701 型、0041 型、0675 型。*Nostocoida limicola* 和 *Microthrix parvicella* 形成 (Anon 1979)。

已知大约有 25 种丝状细菌可造成活性污泥膨胀。尚未发现在活性污泥中藻类能造成污泥膨胀。根据美国、南非、荷兰和德国已检测的结果，可排出最常见的 10 种丝状微生物，见表 6-7。

南非、美国、荷兰和德国的活性污泥法处理厂
常见的 10 种形成污泥膨胀的丝状微生物 表 6-7

排序	南非	美国	荷兰	德国
1	021N 型	0092 型	*Nocardia*	*M. parvicella*
2	*M. parvicella*	0041 型	1701 型	021N 型
3	0041 型	0675 型	021N 型	*H. hydrossis*
4	*S. natans*	*Nocardia*	0041 型	0092 型
5	*Nocardia*	*M. parvicella*	*Thiothrix*	1701 型
6	*H. hydrossis*	1851 型	*S. natans*	0041 型
7	*N. limicola*	0914 型	*M. parvicella*	*S. natans*
8	1701 型	0803 型	0092 型	0581 型
9	0961 型	*N. limicola*	*H. hydrossis*	0803 型
10	0803 型	021N 型	0675 型	0961 型

造成膨胀的主要原因是 *DO* 浓度低、污泥负荷率低、曝气池进水含较多化粪池出水、营养不足和低 pH 值（<6.5）。Strom 和 Uenkins 研究了污泥膨胀原因与微生物的相关关系。这些关系的拟合结果非常好，见表 6-8。

以形成污泥膨胀的微生物优势种为条件的指示生物 **表 6-8**

形成条件	指示性丝状菌类型
低 DO	1701 型，*S. natans*，*H. hydrossis*
低 F/M	*M. parvicella*，*H. hydrossis*，*Nocardia sp.*，021N、0041、0675、0092、0581、0961 和 0803 型
化粪池出水 硫化物	*Thiothrix sp.*，*Beggiatoa*，021N 型
营养不足	*Thiothrix sp.*，*S. natans*，021N 型，并可能有 *H. hydrossis*，和 0041、0675 型
低 pH	真菌

即使已知丝状微生物的种属，目前也找不到控制优势种的实用方法。所以，操作人员需根据指示性丝状微生物的出现，采用控制运行条件的方法，去运转曝气池，直至问题消失。主要的方法如下：

a. 控制污泥负荷率　污水厂的一般处理系统的正常负荷为 0.2～0.45kg/（kg·d），发生污泥膨胀时可能超出此范围。为防止膨胀，应经常将污泥负荷率控制在正常负荷范围内。

b. 控制营养比例　一般曝气池正常的碳（以 BOD_5 表示），氮和磷的比例为 BOD：N：P=100：5：1。当 BOD：P 偏高时，丝状微生物能将多余部分储存在体内。当营养浓度不足时，丝状微生物仍有储存，这就增强了丝状微生物对絮体形成细菌的竞争性。

c. 控制 *DO* 浓度　为防止丝状微生物的猛增，一般应将池中 *DO* 控制在 2.0mg/L 以上。因为防止污泥膨胀的最低 *DO* 浓度是污泥负荷 *F/M* 的函数（Palm et al.），所以当 *F/M* 增加时，应相应地增加最低 *DO* 浓度，见图 6-13。

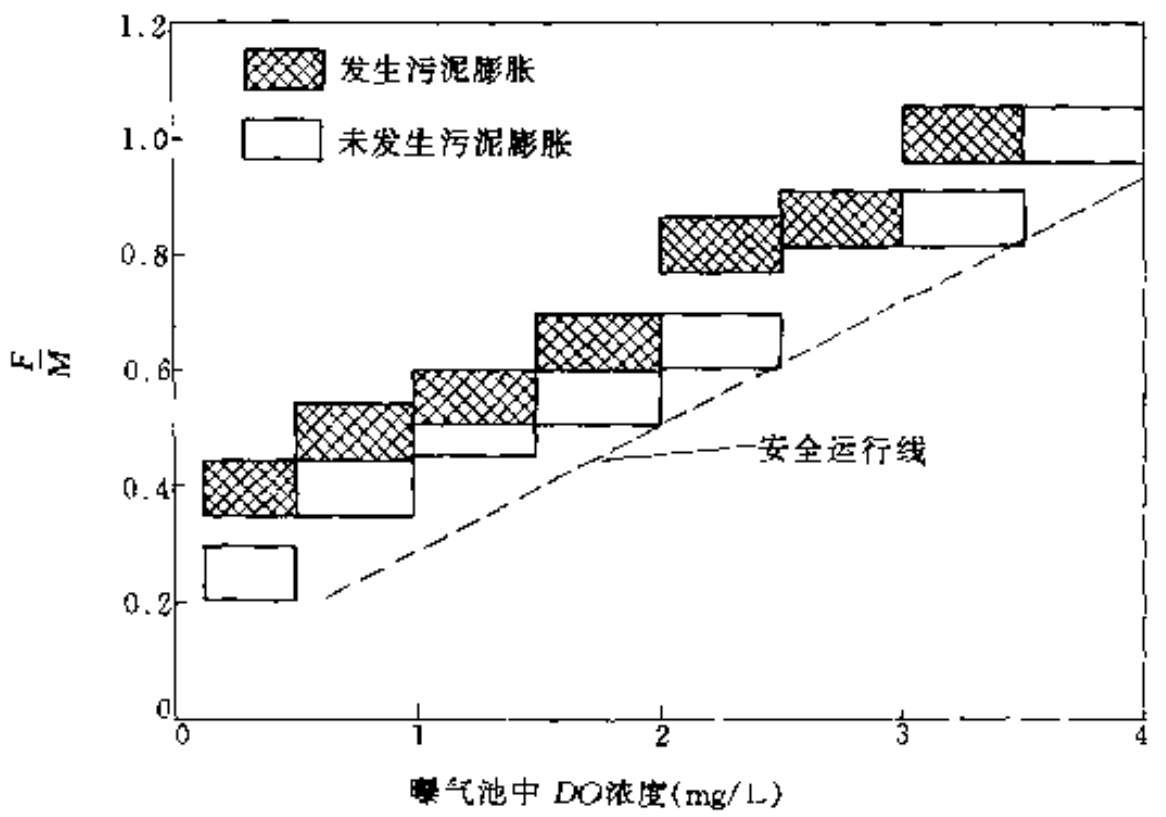


图 6-13　控制活性污泥膨胀的最低 *DO* 浓度与 *F/M* 的关系

d. 加氯、臭氧或过氧化氢　这些化学剂是用于有选择地控制丝状微生物的过量增长。

e. 投加混凝剂　可投加石灰、三氯化铁或高分子絮凝剂以改善污泥的絮凝，同时也会增加絮体的强度。

E）非丝状菌引起的污泥膨胀

有时在不出现丝状微生物时也会出现污泥膨胀。这种膨胀与散凝作用（deflocculation）有关，当游离细菌产生菌胶团基质（zoogloeal matrix）时就会导致污泥膨胀，人们称这种膨胀为菌胶团（zoogloeal）或粘性膨胀。这种失败是由于絮体微结构中产生了大量胞外多聚物（ECP，extra-cellular polymer），它具有糊状或果冻样的外观。可以用印度墨水反染色法清楚地区别它与正常絮体的不同。正常絮体染色后、墨水会深深贯入絮体、而具有胞外多聚物的絮体则能抗拒浸染贯穿。

（2）生物滤池中的微生物

生物滤池（滴滤池）为附着型或固定膜型反应器。在这种反应器内微生物形成了生物膜附着在滤料上，用以处理废水。早期的生物滤池的处理负荷低，即所谓低负荷生物滤池。后来提高了负荷就称为高负荷生物滤池，也简称生物滤池。近年来又发展了若干改进型固定膜反应器，例如生物转盘、生物流化床等。各种固定膜反应器在微生物的种类及作用方面有类似之处。下面以生物滤池为代表，说明各种微生物的作用及生物滤池的生态学。

1）生物滤池中的微生物及其作用

生物滤池建成后，就开始进水，不需要接种，因为污水中含有滤池生物膜需要的各种微生物。在夏天约3～4周就可在滤料上长成正常的生物膜；冬天约需2个月。生物膜上生长着一个复杂的生物群体。

一般说，生长在生物滤池中的细菌大多是革兰氏阴性菌，例如，无色杆菌、黄杆菌、极毛杆菌、产碱杆菌等。其中很多都能形成菌胶团。丝状细菌则有球衣细菌、贝氏硫细菌等。在生物滤池下层，主要是硝化细菌。真菌有镰刀霉、青霉、毛霉、地霉、分枝孢属等以及多种酵母菌。藻类仅生长在滤池表面，主要有小球藻、席（蓝）藻、丝（绿）藻等。原生动物最常见的有钟虫、盖纤虫、等枝虫和草履虫等纤毛类原生动物。此外，还有一些其它种类的有机物如轮虫、蠕虫、昆虫的幼虫，甚至灰蝇等小动物也会在滤池（特别是低负荷滤池）内生长繁殖。灰蝇很小，能穿过纱窗、不咬人，但能飞进人或动物的耳、鼻、眼和口。它们飞行距离不超过数百米，有风时则可被带至较远地区。

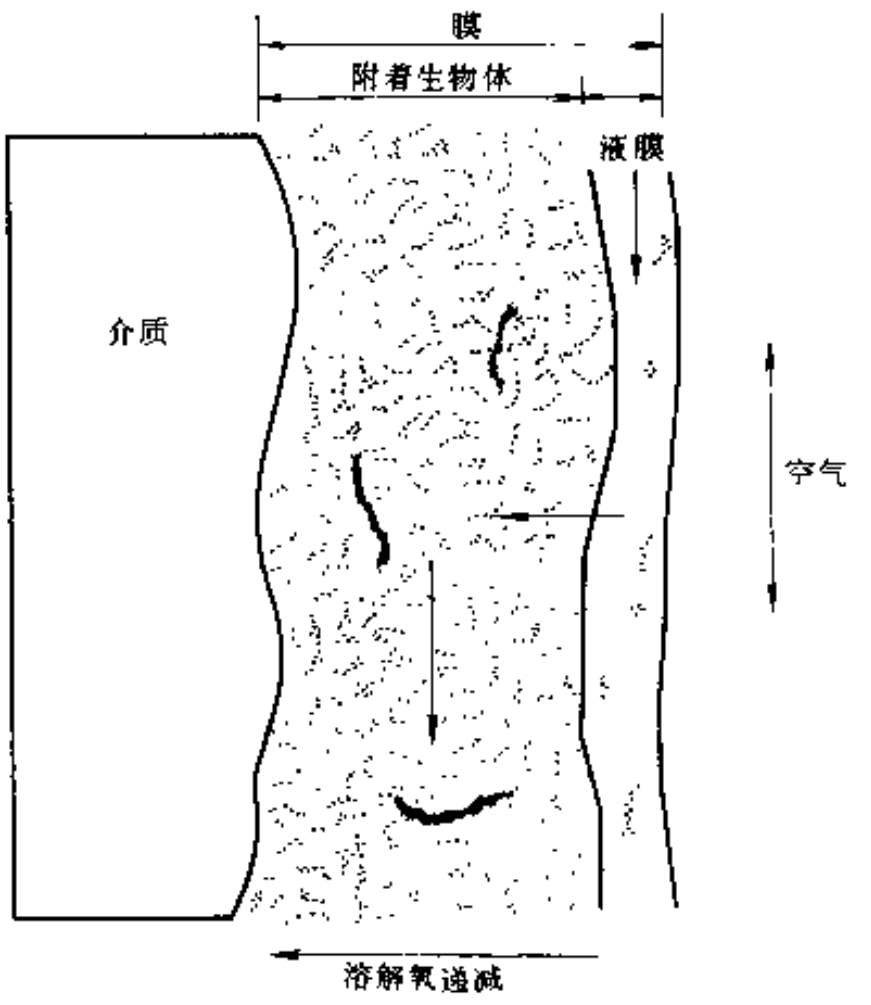


图 6-11　膜结构示意图

废水中的有机物主要被好氧的异养微生物所降解。生物膜的结构似海绵状，很象活性污泥的絮体，生物膜被生长在膜内的驯养动物（grazing fauna）连续不停地挖洞，使膜变得更加多孔（见图6-14），废水可穿过膜表面直至相当的深度，其穿透限度取决于膜厚和滤池的水力负荷。

图6-14中左侧为滤料；右侧为生物膜，它由两部分组成：接触滤料的附着生物体和最右侧吸附在生物体上的液膜，最外侧是空气。外部空气中的氧气穿过液膜传递给生物体部

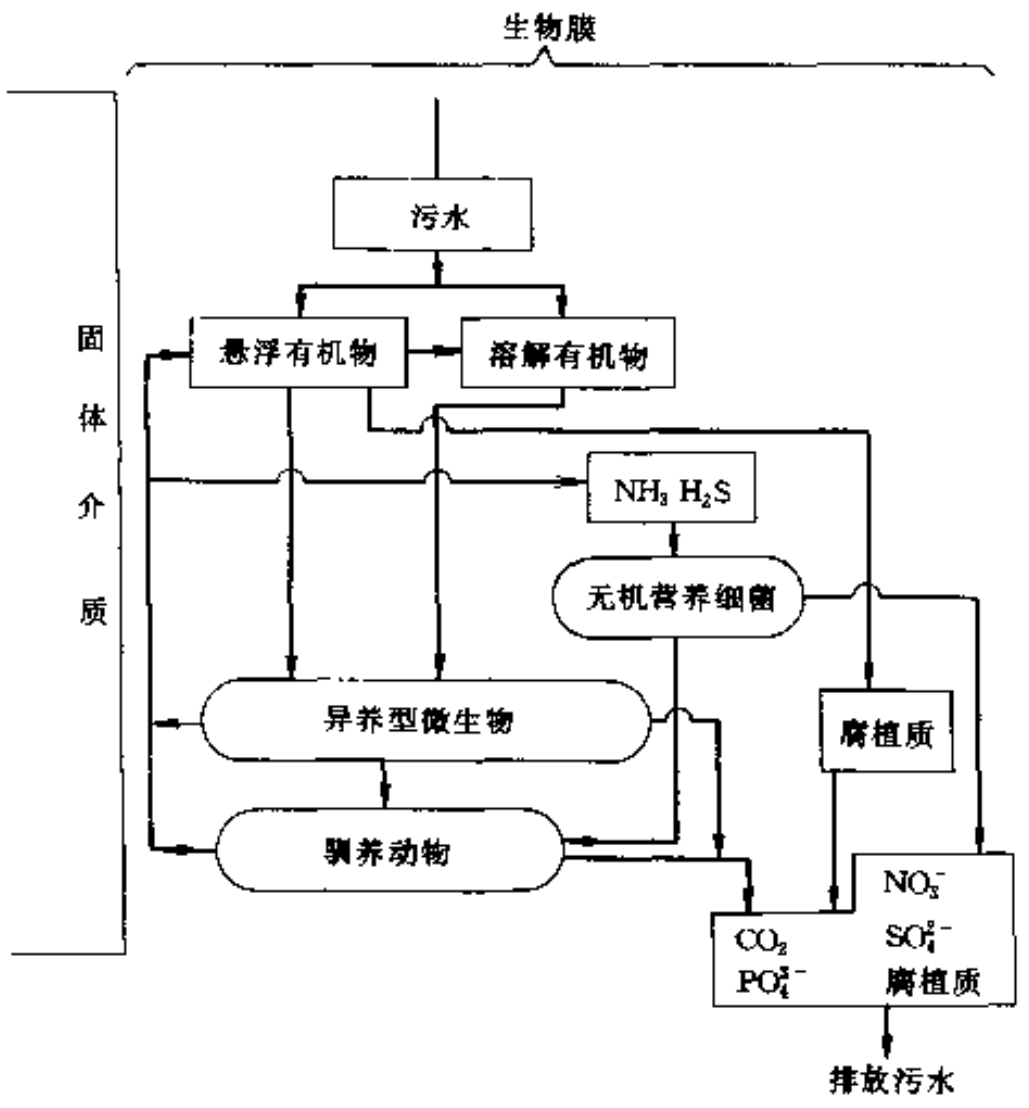


图 6-13　生物滤池的生物膜食物网

分，愈往里传，氧的浓度愈低，甚至有时靠近滤料处会出现厌氧状态。

2）滤池微生物的生态学

活性污泥提供了纯水生生物的生长环境，而生物滤池中的生物生境既有水生的也有陆生生物的生长环境；既有水生的微生物，又有陆生的驯养动物。

生物滤池的食物链比活性污泥的多几种营养水平。水质净化的最基本部分是异养性膜，它将进水中溶解的和悬浮的有机物转化成细菌和菌类生物膜。动物性原生动物主要居留在膜上，有些与游离细菌在一起，还有一些靠捕食其它原生动物或腐生植物（saprophytes）生存。其它生活在膜上的还有轮虫和线虫。驯养动物主要是真蝇类的幼虫和寡毛纲蠕虫，其关系见图 6-15。

表 6-9 列出了生物滤池中典型的生物种群。

单级生物滤池典型微生物　　**表 6-9**

细菌（Bacteria）

菌胶团型（zoogloeal forms）主要是生枝动胶菌（*zoogloeal ramigera*）

球衣菌属（未定种）（*Sphaerotilus sp.*）

红发菌属（未定种）（*Leptothrix sp.*）

贝氏硫细菌属（未定种）（*Beggiatoa sp.*）

真菌（Fungi）

Subbaromyces splendens Hesseltine

瘤孢属（未定种）（*Sepedonium sp.*）

镰刀属（*Fusarium aguaeductuum*）（*Radlmacher & Rabenhorst*）*Saccardo*

白地霉（*Geotrichum candidum*）*Link*

藻类（Algae）

小球藻（未定种）（*Chlorella sp.*）

栅藻属（未定种）（*Scenedesmus sp.*）

毛枝藻属（未定种）（*Stigeoclonium sp.*）

原生动物（*Protozoa*）：肉鞭门（*Sarcomastigophora*）

波豆虫属（未定种）（*Bodo sp.*）

变形虫属（未定种）（*Amoeba sp.*）主要是辐射变形虫（*Amoeba radiosa*）*Ehrenberg*

续表

眼虫藻（未定种）（*Euglena sp.*）

原生动物（*Protozoa*）：纤毛亚门（*Ciliophora*）

（全毛亚纲）（*Holotrichia*）

卑怯管叶虫（*Trachelophyllum pusillum*）*Perty-Claparede & Lachmann*

纺锤半眉虫（*Hemiophrys fusidens*）*Kahl*

肋状半眉虫（*Hemiophrys pleurosigma*）*Stokes*

僧帽斜管虫（*Chilodonella cucullulus*）（*Muller*）

钩刺斜管虫（*Chilodonella uncinata*）*Ehrenberg*

僧帽肾形虫（*Colpoda cucullus*）*Muller*

暗尾丝虫（*Uronema nigricans*）（*Muller*）*Florentin*

闪烁甘虫（*Glaucoma scintillans*）*Ehrenberg*

肾形豆形虫（*Colpidium colpoda*）*Stein*

弯豆形虫（*Colpidium campylum*）（*Stokes*）

从核草履虫（*Paramecium aurelia*）*Ehrenberg*

尾草履虫（*Paramecium caudatum*）*Ehrenberg*

缘毛亚纲（*Peritrichia*）

小口钟虫（*Vorticella microstoma*）*Ehrenberg*

沟钟虫（*Vorticella convallaria*）*Linnaeus*

春钟虫（*Vorticella vernalis*）*Strokes*

小盖虫（*Opercularia minima*）*Kahl*

微盘盖虫（*Opercularia microdiscum*）*Faure-Fremiet*

集盖虫（*Opercularia coarctata*）*Claparede & Lachmann*

浮游累枝虫（*Epistylis rotans*）*Swe*

旋毛亚纲（*Spirotrichia*）

带核喇叭虫（*Stentor roeseli*）*Ehrenbong*

有肋术纤虫（*Aspidisca costata*）（*Dujardin*）=*cicada*

皮急纤虫（*Tachysoma pellionella*）（*Muller Stein*）

游溢尖毛虫（*Oxytricha fallax*）*Stokes*

吸管纲（*Suctoria*）

尖壳吸管虫（*Acineta cuspidata*）*Strokes*

粗壮壳吸管虫（*Acineta foetida*）*Maupas*

胶衣足吸管虫（*Podophrya maupasi*）*Butschli*

卡氏足吸管虫（*Podophrya carchesii*）*Claparede & Lachmann Podophrya mollis Butschli*

大球吸管虫（*Sphaerophrya magna*）*Maupas*

二、废水厌氧生物处理微生物学及常用的处理构筑物

1. 废水的厌氧生物处理　厌氧生物处理是在无氧条件下，借厌氧微生物（包括兼性微生物），主要是厌氧菌（包括兼性菌）的作用来进行的。这种方法主要用于污水处理及高浓

度有机废水的处理。

图 6-16 简单地说明了有机物的厌氧分解过程。从图中可看出，当有机物进行厌氧分解时，有机废水或污泥的分解是分阶段完成的，早期将厌氧分解分为两个阶段（酸性发酵阶段和碱性发酵或产甲烷阶段）。70 年代以来有人提出了厌氧消化的 3 阶段理论和 4 类群理论，见图 6-17（简单示意图）。

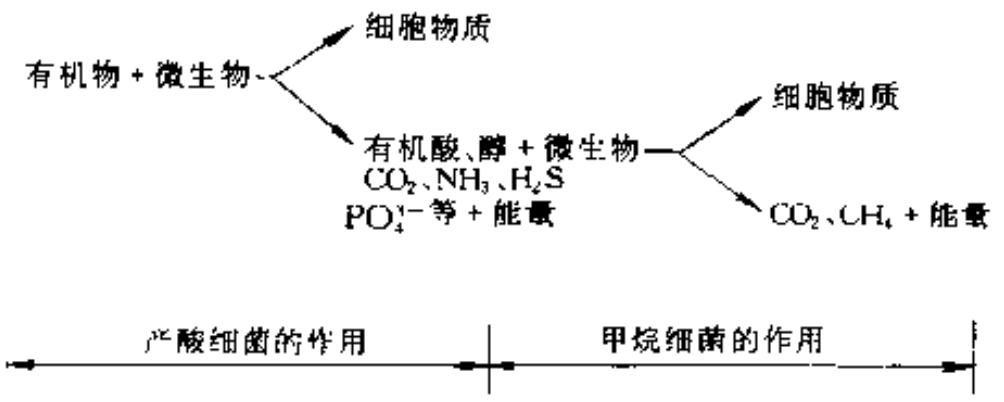


图 6-16　有机物的厌氧分解

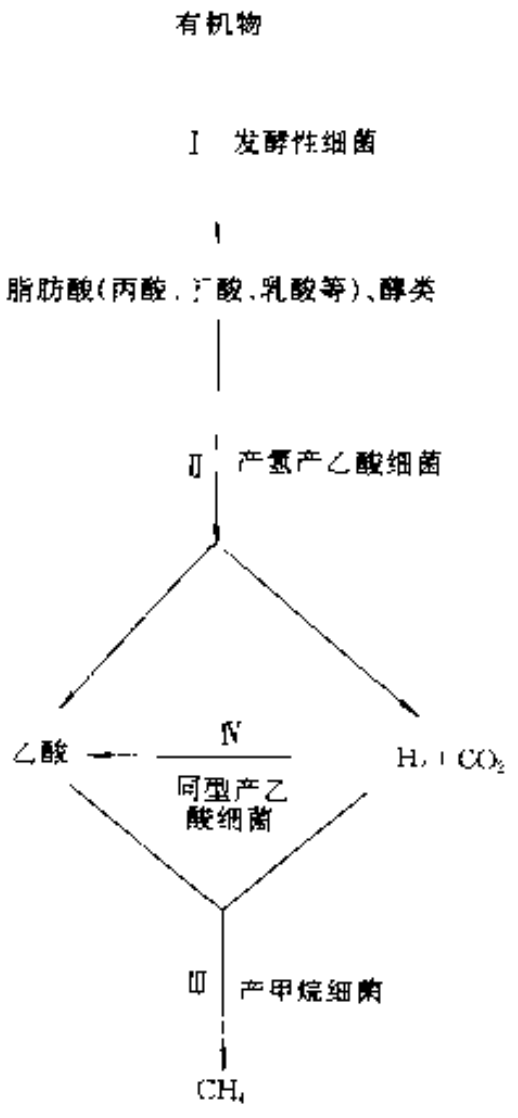


图 6-17　厌氧消化三阶段、四阶段过程

注：(1) Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ阶段为 Bryant 的三阶段理论，Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ阶段为 Zeikus 的四类群理论。

(2) 对含 N 有机物还会有 H_2S 等产生。

(3) 所产细胞物质未示于图中。

厌氧消化所产生的气体中，甲烷约占 50%～75%，二氧化碳约占 20%～30%。这种气体的发热量高，一般为 20900～25080kcal/m^3，是一种很好的燃料。

应当指出，对于不溶性有机物，先要通过胞外酶的作用，成为溶解性有机物后，才能被细菌吸收。而胞外酶的水解作用是比较缓慢的，因此固体物质在进行厌氧处理之前应尽量使其粉碎或打成小块。

发酵性细菌有兼性的，也有厌氧的，在自然界中数量较多，而产甲烷菌则是严格的厌氧菌，它专性很强。

产甲烷细菌对于温度和酸碱度的反应都相当敏感。几度的温度变化或环境中的 pH 值稍超过适宜的范围时，就会在较大程度上影响有机物的分解。一般的产甲烷细菌都是中温性的、最适宜的温度在 25～40 C 之间，高温性产甲烷细菌的适宜温度则在 50～60 C 之间。在废水厌氧分解处理构筑物内，如果要保持较高的温度，则需增加燃料费用，且高温细菌对于温度的变化更为敏感，故常采用 30～35 C 的发酵温度，但完成高温发酵所需的时间较短，杀菌效果也较好。产甲烷细菌生长最适宜的 pH 范围约在 6.8～7.2 之间。如 pH 值低于 6 或高于 8，细菌的生长繁殖将受到极大影响。产酸细菌对酸碱度不及产甲烷细菌敏感，其适宜的 pH 范围也较广，在 4.5～8 之间。所以在用厌氧法处理废水的应用中，由于有机物的酸性发酵和碱性发酵在同一构筑物内进行，故为了维持产生的酸和形成的甲烷之间的平衡，避免产生过多的有机酸，常保持处理构筑物内的 pH 值在 6.5～7.5（最好在 6.8～7.2）的范围内。在实际运转中，有机酸的控制较 pH 值更为重要，因当酸量积累至足以降低 pH 值时，厌氧处理的效果已经显著下降，甚至停止产气。有机酸本身不毒害产甲烷菌，而 pH 的下降则会抑制产甲烷菌的生长。

好氧法处理有机物所需的时间一般比用厌氧法处理短，基本上没有臭气，但需要有氧的供应和比较复杂的处理设备，且当废水中有机物浓度太高时，一般不可能供应好氧分解

所需要的充足的氧。用厌氧法处理废水，所产生的甲烷气体可以利用；但由于有硫化氢等气体产生，所以臭气大；同时，由于存在硫化铁等黑色物质，使处理后的废水颜色深，并且所含有机物也较多，如果要使有机物完全稳定，需时甚长，当废水量大时，所需设备的容量也将很大。由此，处理废水一般都用好氧法，处理污泥则用厌氧法。若处理高浓度有机废水，则往往先采用厌氧生物处理，将有机污染降至一定浓度后，再采用好氧法处理至达到排放标准。厌氧处理还有可能使难以好氧生物降解的有机物转化为较易好氧降解的物质。

生物处理的主要对象是有机物质，但由于某些微生物也能氧化分解无机物，例如，有些霉菌、放线菌等在一定条件下都能较好地氧化分解无机氰化物，这对于有毒无机物的处理具有相当重要的意义。所以，目前国内外都在进行利用微生物处理某些无机物的试验研究。

2. 参与厌氧生物处理的微生物　厌氧生物处理中有各种微生物参与，一般分为两大类：

(1) 不产甲烷微生物 (non-mothanogens)　不产甲烷微生物包括厌氧菌和兼性厌氧菌，其种类很多，具体种类及数量随发酵原料和发酵工艺而定。此外，还有真菌和原生动物。细菌除厌氧菌和兼性厌氧菌之外，在厌氧设备中还有一定数量的好氧细菌。好氧细菌在厌氧发酵过程中的作用，目前尚研究得不够。

常见的不产甲烷细菌可分为三类：

A) 发酵细菌　梭菌属 (*Clostridim*)，例如丁酸梭菌等；枝杆菌属 (*Ramibaclerium*)；乳杆菌属 (*Loclobacillus*) 等。

B) 产氢产乙酸细菌　大多为发酵细菌，也有专性产氢产乙酸菌。这类细菌有脱硫弧菌、沃尔非互营单胞菌 (*Syntrophomonas wolfei*)、沃林互营杆菌等；

C) 同型产乙酸细菌群　乙酸梭菌、甲酸乙酸化梭菌、乌氏梭菌、伍迪乙酸杆菌等。

此外，在厌氧发酵中能经常见到原生动物，但数量不多，大约有 18 种，如鞭毛虫、纤毛虫和变形虫等，其生存条件目前尚不清楚。

(2) 产甲烷细菌 (*methanogen*)　产甲烷细菌有多种形态，有球形、杆形、螺旋形和八叠球形。过去在《伯杰氏细菌鉴定手册》中产甲烷细菌只有一个甲烷细菌科，共有 9 个种。近十余年来又发现了一些产甲烷细菌的新种，总共有 40 多种。厌氧生物处理中常见的产甲烷菌及其特性见表 6-10。

常见的产甲烷菌及其特性　　**表 6-10**

菌　　种	适宜温度 (℃)	适宜 pH 值
产甲烷杆菌属		
甲酸产甲烷杆菌 (*M. formicicum*)	37	7.0
布氏产甲烷杆菌 (*M. bryantu*)	38	7.0
武氏产甲烷杆菌 (*M. wolfei*)	55～65	7.0～7.5
嗜热自养产甲烷杆菌 (*M. thermoautotrophicum*)	66～65	7.2～7.6
产甲烷短杆菌属		
反刍产甲烷短杆菌 (*M. ruminantium*)	38	7.2

续表

菌　　种	适宜温度（℃）	适宜 pH 值	
史氏产甲烷短杆菌（*M. smithii*）	38	6.9～7.4	
产甲烷球菌属			
方尼氏产甲烷球菌（*M. vannielii*）	36～40	7.0～9.0	
沃氏产甲烷球菌（*M. voltae*）	32～40	6.7～7.4	
产甲烷微菌属			
运动产甲烷微菌（*M. mobile*）	40	6.1～6.9	
产甲烷菌属			
卡列阿科产甲烷菌（*M. carlaci*）	20～25	6.8～7.3	
黑海产甲烷菌（*M. marisnigri*）	20～25	6.2～6.6	
产甲烷螺菌属			
亨氏产甲烷螺菌（*M. hungatei*）	30～37	6.6～7.4	45
产甲烷八叠球菌属			
巴氏产甲烷八叠球菌（*M. barkeri*）	35	7.0	39
马氏产甲烷八叠球菌（*M. mazei*）	40	6.0～7.0	42
产甲烷丝菌属			
索氏产甲烷丝菌（*M. soehngenii*）	37	7.4～7.8	51.9

3. 厌氧处理的各种反应器（处理构筑物）概述　厌氧处理有多种不同过程，虽然各种过程的反应器中的微生物种群在总体上是相同的，但由于运行条件的不同，各类微生物在数量上会有不同。反应器若不是完全混合式的，反应器微生物在垂直方向的生态分布也会不同。

当前应用得最普遍的是“消化池”。消化池从运行温度上又分中温（35℃）和高温（55℃）两种。消化池可以是单级的；也有两级的，第一级设置搅拌装置，第二级不设搅拌装置。还有一种两阶段厌氧消化池（也称两相厌氧消化池），第一阶段是酸性阶段；第二阶段是产甲烷阶段。

近年来新型厌氧反应器不断出现，如具有污泥回流的接触消化池、厌氧生物滤池、厌氧流化床和升流式厌氧污泥层（UASB）反应器等。在这些新型反应器中从微生物角度值得特别说明的是 UASB 反应器。运行良好的 UASB 反应器中的污泥是“颗粒污泥”，其直径约 1～4mm。这种颗粒污泥有较好的产甲烷活性和良好的沉降性能。它是一种团粒结构，由许多种类的细菌组成。这些细菌之间存在互营共生关系。大部分细菌是专性厌氧细菌，只有小部分发酵细菌是兼性厌氧菌。各类细菌在颗粒污泥中的分布是有规律的。分布在颗粒外层的主要是发酵细菌和氢营养型产甲烷细菌；内层则主要是乙酸营养型产甲烷细菌及产氢产乙酸细菌。

三、生物脱氮除磷中的微生物

1. 水体的富营养化　地表污染，尤其是因耕作施肥，形成的径流有可能污染地表水；二级处理厂的出水中无机氮和无机磷（硝酸盐和磷酸盐）超标也会污染地表水，导致湖泊、河

流甚至海湾的富营养化。水体中的磷只要超过 0.01mg/L 就可使水体开始富营养化。但是，水中可溶性磷酸盐的"本底值"往往会超过 0.01mg/L，有不少水体的本底值会达到 0.5mg/L。因此，至少在富营养化的初期阶段，氮也许是富营养化的主要因素（N：P～15：1）。水体中的氮主要以 NH_4^+、NO_3^-、NO_2^- 和有机氮的形式出现。这些养分的相对比例不仅取决于流入水体的水，也取决于生物转化作用。

2. 富营养化中微生物的作用　水体中原核藻类和真核藻类刚毛藻属能以一定速度消耗 CO_2 而使水体的碱性提高，pH 值＞8，碱性提高会使蓝绿藻增长。当氮成为限制性养料时，蓝绿藻又有竞相固定氮的优点。蓝绿藻大量繁殖，不利于其它浮游植物的生长，会导致某些鱼类从生态系统中消失。在藻类大量生长时，食草甲壳纲水蚤属往往可以延缓富营养化过程。当藻类生长达到某种密度时，二氧化碳和光化学二氧化物就成为限制性因素，浮游植物迅速死亡，会消耗大量的氧，致使鱼类无法生存。在水体富营养化过程中，需氧的和兼性厌氧的革兰氏阴性杆菌占优势，其中包括多种菌属，如产碱杆菌属、假单胞菌属、无色杆菌属及产黄菌属。

为防止水体富营养化，需控制点源和非点源的污染。

3. 脱氮除磷中的微生物

（1）生物脱氮及参与的微生物　某些工业废水和生活污水中的有机氮经微生物降解为无机的 NH_3。在好氧条件下 NH_3 会被亚硝酸菌和硝酸菌氧化成亚硝酸盐和硝酸盐。大量 NO_3^- 排入水体就会形成富营养化，也就污染了给水水源。

目前常采用的生物脱氮的流程是首先经过硝化过程，然后利用反硝化细菌进行反硝化，将 NO_2^- 和 NO_3^- 转化为 N_2。N_2 逸入大气，完成脱氮过程。能进行反硝化作用的细菌绝大多数是异养的厌氧菌，它们需利用有机物作为反硝化过程中的电子供体。

（2）生物除磷及参与的微生物　70 年代末，有些学者，如 Fuks 和 Chen，发现多种有明显除磷能力的细菌，统称除磷菌，如不动杆菌（*Acinetobacter*）。它们在有氧环境中，能超量摄取（*Luxury uptake*）磷。根据一般细菌的分子式估算，其细胞中磷占 2.3%，而除磷菌可摄取约为正常需要 10 倍以上的磷。

图 6-18 示在厌氧与好氧条件下除磷菌所起的作用。在厌氧环境中，因废水中没有溶解

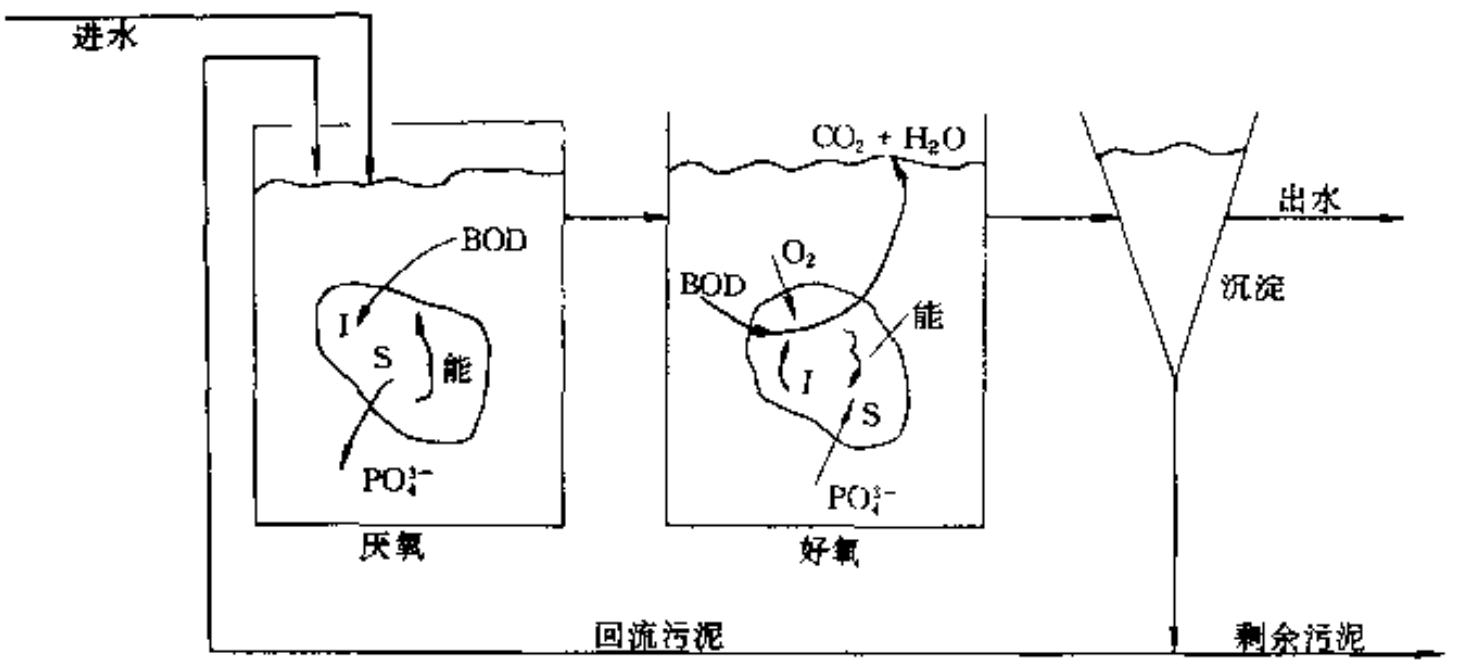


图 6-18　厌氧 · 好氧系统生物除磷过程图

I--贮存的食料（以 PHB 等有机颗粒形式存在于细胞内）

S　贮存的磷（聚磷酸盐）

氧和缺乏氧化态氮（NO_x），一般无聚磷能力的好氧菌和脱氮菌不能产生 ATP，故这类细菌不能摄取细胞外的有机物。但在厌氧环境中除磷菌却能分解细胞内的聚磷酸盐和产生 ATP，并利用 ATP 将废水中的脂肪酸等有机物摄入细胞，以 PHB（聚-β-羟基丁酸盐）及糖原等有机颗粒的形式贮存于细胞内，同时还将分解聚磷酸盐所产生的磷酸排出体外。此时细胞内还会诱导产生相当量的聚磷酸盐激酶。一旦进入好氧环境，除磷菌又可利用聚-β-羟基于酸盐氧化分解所释放的能量来摄取废水中的磷，并把所摄取的磷合成聚磷酸盐而贮存于细胞内。一般地说，细菌增殖过程中，在好氧环境中所摄取的磷比在厌氧环境中所释放的磷多，废水生物除磷正是利用了微生物的这一过程，多余的污泥作为剩余污泥排走。此外，在好氧条件下，当细菌生长环境中缺乏一些基本的其它营养元素（如 S、N）时，它们的生长和核酸的合成虽被抑制，但仍能摄取水中的磷以聚磷酸盐的形式贮存起来。

四、用生物法处理废水对水质的要求

为了有效地进行生物处理，在处理过程中，除应根据所采用的处理是好氧处理还是厌氧处理控制氧气的供应外，对于废水水质主要还有下列几点要求：

1. 酸碱度　一般说，对于好氧生物处理，pH 值应在 6～9 之间，对于厌氧生物处理，pH 值应保持在 6.5～7.5 的范围内。

2. 温度　温度❶ 也是影响微生物生活的重要因素。对于大多数细菌讲，适宜的温度在 20～40℃之间，而有些高温细菌可耐较高的温度，它们生长的适宜温度在 50～60℃之间。在废水处理中，这两类细菌都可利用。据观察，好氧法处理废水，水温低至 10℃或高至 40℃，还可有相当的处理效果，水温在 20～40℃时，则可获得较好的处理效果。有些工业废水温度太高，在生物处理前应设法降温。高温也要影响废水中的溶解氧含量。

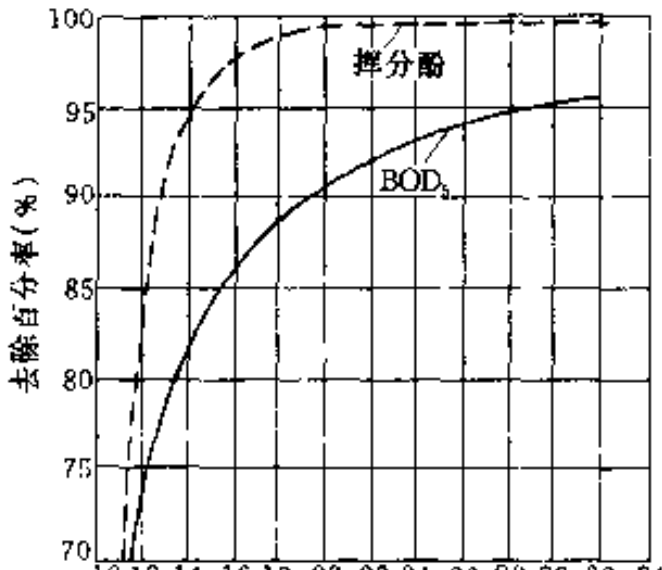


图 6-19　BOD_5、挥发酚的去除率与水温的关系

某研究所曾对焦化厂含酚废水进行了在不同温度下活性污泥生物吸附法处理效果的观察，结果见图 6-19。从图中可以看出，当水温在 20℃左右时，挥发酚和五天 20℃生化需氧量的去除率可分别达到 99%和 90%以上，但如继续增高水温，则去除率提高不多，而当水温低于 15℃左右时，去除率便迅速下降（水质和其它试验条件不同，所得结果会有一定差异。图 6-28 仅作为一个例子来说明水温对处理效率的影响）。

3. 有毒物质　废水中不能含过多的有毒物质。多数重金属，如锌、铜、铅、铬等离子有毒性。某些非金属物质，如酚、甲醛、氰化物、硫化物等也有毒性，能抑制其它物质的生物氧化作用，但它们本身却能被某些微生物分解氧化。废水中也不应含有过多的油类物质。

毒物毒性的强弱随废水的酸碱度、溶解氧、温度和有无其它毒物的存在以及微生物的数量等的不同可有很大差异。细菌愈多，每单位重量的细胞所吸附的毒质愈少，因此细菌受到的毒性就比较少。毒物的毒性也可由于毒物的沉淀而减弱。在碱性溶液中，铜离子和

❶ 在废水生物处理系统中，温度不仅影响微生物的活力，而且还影响氧的转移率和生物悬浮颗粒的沉降性能等。

锌离子容易沉淀，所以细菌在碱性溶液中承受铜和锌的能力比在酸性溶液中大。当工业废水与生活污水混合时，工业废水中金属离子的毒性也可由于这些离子和污水中的蛋白质形成某些络合物而降低。另外，不同种类的微生物对毒性的容忍能力也不同。例如，重金属离子的容许浓度一般规定在几个毫克/升以下，而根据某些报导，铜离子浓度高达 100mg/L 时还没有影响炼油厂含酚废水的生物处理。所以，从已有的资料来看，各种毒物的容许浓度范围较广。对某一种废水来说，必须根据具体情况，作具体的分析，必要时通过试验，以确定生物处理对水中毒物的容许浓度。

我们曾经提到细菌的适应能力比较强，当环境变化时能慢慢适应新环境。所以在处理过程中，如果逐渐提高毒物的浓度，则在一定程度上有可能使微生物适应这种环境而有效地完成其处理废水的任务。例如，用生物法处理含酚废水，进水中酚的容许浓度可以从每升几十至 100mg 逐渐提高到每升 500、600 甚至 1000mg；又如重金属离子的容许浓度可以从每升几个毫克提高到每升 70、80mg。微生物对于 pH 的适应也是可以逐渐改变的，经过调整适应后，适宜的范围可能离中性很远，但瞬间的剧烈变化则会带来较大影响。表 6-11、表 6-12 所列数字仅供参考。

废水中抑制生物处理的有毒物质的容许浓度 **表 6 11**

有毒物质	容许浓度 (mg/L)	有毒物质	容许浓度 (mg/L)	有毒物质	容许浓度 (mg/L)	有毒物质	容许浓度 (mg/L)
三 价 铬	10	硫化物（以 S^{-} 计）	40	己内酰胺	100	氰 化 钾	8～9
铜	1	氯 化 钠	10000	苯 酸	150	醋 酸 铵	500
锌	5	六 价 铬	2～5	丁 酸	500	吡 啶	400
镍	2	铁	100	戊 酸	3	硬 脂 酸	300
铅	1	镉	1～3	甲 醇	200	氯 苯	10
锑	0.2	氰（以 CN^{-} 计）	2	甲 苯	7	间苯二酚	100
砷	0.2	苯 胺	100	三硝基甲苯	12	邻苯二酚	100
石油和焦油	50	苯	100	酚	100	苯 二 酚	15
烷基苯磺酸盐	15	甘 油	5	甲 醛	160		
拉 开 粉	100	二 甲 苯	7	硫氰酸铵	500		

注：(1) 表中浓度一般按日平均浓度考虑。

(2) 废水中含有两种或两种以上毒物时，单项物质容许浓度应低于表列数字，重金属容许浓度则为表列数字的 50%～70%。

(3) 表内数字一般是指排入城市污水厂的抑制浓度。对于专门的工业废水处理，微生物经驯化后，可提高浓度。

此外，用好氧法处理废水，生物处理构筑物进水的 5 天 20 C 生化需氧量一般不宜超过 500～1000mg/L 左右（视处理设备而异），因为进水的浓度高了，将增加生化反应所需的氧量，但废水的吸氧量有一定的限度，并且目前的空气扩散设备也不够理想，因而容易造成缺氧情况，影响生化作用，而且当进水浓度高时，相对地说，出水的浓度也将增高，另外还可能产生其它方面的影响，如生物滤池容易发生堵塞等问题。但是，进水的浓度也不是越低越好。有机物浓度太低，微生物生长所需的养料也就少，这就有可能影响微生物的生长繁殖，因而降低处理效果。一般说，进水的 5 天 20 C 生化需氧量不宜低于 50～100mg/L

左右。

4. 养料　微生物的生长繁殖必须要有各种养料，其中包括碳、氮、磷、硫，微量的钾、钙、镁、铁等和维生素。但不同的微生物对每一种营养元素数量的要求是不同的，并且对于这些营养元素之间，要求一定的比例关系。生活污水具有以上所列的全部养料，而有些工业废水如含酚废水、造纸废水则可能缺乏某些养料，特别是氮和磷❶，这些废水进行生物处理时，需投加生活污水或氮、磷化合物（如硫酸铵、磷酸氢二钠等）。据研究，为了能够有效地处理废水，废水中碳（C）、氮（N）与磷（P）之间的含量应满足一定的比例关系。对于好氧生物处理，下列比值可资参考（氮、磷的正确投加量应通过试验确定）：

污水污泥厌氧发酵中有毒物质的容许浓度　　**表 6-12**

有毒物质	表示方式	容许浓度
盐酸、磷酸、硝酸、硫酸	pH	6.8
乳酸	pH	5.0
丁酸	pH	5.0
草酸	pH	5.0
酒石酸	pH	5.0
甲醇	CH_3OH	800mg L
丁醇	C_4H_9OH	800mg·L
异戊醇	$C_5H_{11}OH$	800mg·L
甲苯	$C_6H_5CH_3$	400mg·L
二甲苯	$C_6H_4(CH_3)_2$	<870mg/L
甲醛	HCHO	<100mg/L
丙酮	CH_3COCH_3	>4g/L
乙醚	$(C_2H_5)_2O$	>3.6g/L
汽油	—	400mg/L
马达油	—	25g/L
氯化钠	NaCl	5～10g/L
氟化钠	NaF	>11mg/L
硫代硫酸钠	$Na_2S_2O_3$	>2.5g/L
亚硫酸钠	Na_2SO_3	<200mg/L
硫氰酸钠、硫氰酸钾	SCN	>180mg/L
氢氰酸钠、氰化物—钾	氰化物 CN	2～10mg/L
苛性苏打、苛性钠		*25mg/L
苏打、苛性石灰	pH	7～8
铜化合物	Cu	约 100mg·L
镍化合物	Ni	200～500mg/L
铬酸盐、铬酸、硫酸铬	Cr	200mg/L
硫化氢铬、硫化物	S^{2}	70～200mg/L
盐浓度、钾矿废物	Cl	2g/L
四氯化碳	Cl_4	1.6g·L
去垢剂-阳离子的	有效物质	100mg/L
去垢剂-非离子的	有效物质	500mg/L

注：用驯化污泥的容许浓度。

❶ 因为不论在自然的有机界或人造的有机界，不含氮的有机物多于含氮的有机物，所以废水中的碳源往往是多于氮源，也就是说，在废水处理中一般不存在碳源不足的问题。除碳、氮等元素外，磷和硫也是合成核酸和某些蛋白质的必要元素。但硫广泛存在于自然界中，废水中通常不会缺少硫。至于其它营养元素，如钾、钙、镁等，所需的量极少，一般水中都有。因此，工业废水生物处理中可能缺少的元素主要是氮和磷。当然，对于某些特殊的废水来说，也许不仅仅要补充氮和磷，究竟要补充些什么，量多少，都须通过试验确定。氮和磷少影响微生物的生长，加入过多则不但增加处理费用，且不利于活性污泥絮状结构的形成，因这时碳素营养相应地减少，影响菌胶团胶质的增长。大量的氮和磷还会造成所谓营养污染的问题或产生其它不良影响。

$$BOD : N : P = 100 : 5 : 1 \tag{6-58}$$

最后还须指出，生物处理是借微生物的作用完成的，因此废水中必须含有足量的和适宜的微生物才能有效地进行处理。如工业废水中缺少微生物，可用生活污水、粪便或采取其它措施接种培养。投加生活污水或粪便还可供应微生物生长所需的养料。

以上所讨论的水质要求，主要是对活性污泥法和生物膜法（生物滤池、生物转盘等）来讲的。如果把废水排入农田，还应考虑废水所含成分对农作物和土壤以及地下水源的影响。当将废水引入养鱼塘时，则应考虑废水对鱼类和水生作物有无毒害作用。

用生物法处理生活污水已有一套比较完整的经验。近年来，它们虽也被广泛地用于工业废水，但由于工业废水水质复杂，累积的经验还比较少，所以为了经济合理地设计处理构筑物，除了与生活污水性质相近的废水可参考生活污水的设计数据进行设计外，其它各种废水如无成熟的参考资料，则必须通过试验得出比较可靠的设计数据。

第六节　水体污染与自净的指示生物及监测方法

一、水生物监测的意义与方法

为了保护水环境，需要进行监测。监测方法有物理方法、化学方法和生物方法。化学监测可测出痕量毒物浓度，但无法测定毒物的毒性强度。由于污染物种类极多，若全部进行监测，不但技术上有困难，在经济上也不容许。加之多种污染物共存时的各种复杂反应，以及各种污染物与环境因子间的作用，会使生态毒理效应发生各种变化。这就使理化监测在一定程度上具有局限性。生物监测与理化监测同时进行，可弥补理化监测的不足，因为当水体被污染后，会影响生物个体、种群、群落及整个生态系统，使生态系统发生变化，这些变化代表水污染（包括理化监测项目及未知因素）对生态系统的综合影响。

生物监测是系统地根据生物反应而评价环境的质量。在进行水环境生物监测时，首先遇到的问题是对哪些生物进行重点监测。我国的监测部门最初用的试验生物是鱼类。后来逐渐认识到用微型生物或大型无脊椎动物进行监测更为合理。微型生物群落包括藻类、原生动物、细菌、真菌等。为什么利用微型生物进行水体生物监测是科学的、合理的，而且具有许多优点？因为微型生物类群是组成水生态系统生物生产力的主要部分；微型生物容易获得；可在合成培养基中生存；可多次重复试验；其世代时间短，短期内可完成数个世代周期；大多数微型生物在世界上分布很广泛，在不同国家有相同的种类，易于对比等。由子以上种种优点，以微型生物进行生物监测就具有试验方便、研究周期短、成本低等优点。图6-20表示在水污染监测中，按种类数统计的各种常用指示生物被采用的百分数。

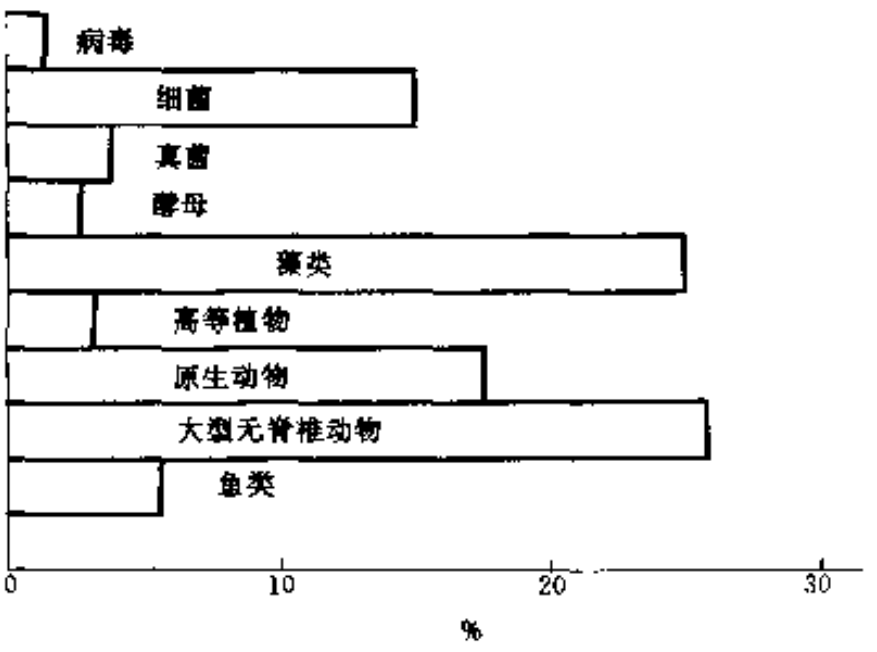


图 6-20　各种指示生物在水处理中采用的百分数

由上图可见，藻类约占 25%，原生动物约占 17%。为什么在水生物监测中采用藻类和

原生动物的较多？分别说明如下：

1. 以藻类为指示生物的原因

(1) 藻类与水污染的关系密切，进入水体的N、P负荷增多，会引起某些藻类的过量增多，甚至形成“水华”、形成“富营养化”，所以监测水体富营养化趋势时，需要监测藻类。

(2) 在水体自净或某些水处理过程中，藻类的光合作用可放出氧气，并利用CO_2作为碳源，与细菌形成共生关系。所以藻类也是监测水的净化过程所不可忽视的指标之一。

(3) 藻类对水体中毒物的耐受力不同。因毒物种类及浓度不同，会引起藻类在种类、形态、生理、数量方面的变化，所以监测藻类的变化，可反映出水质的变化。在利用藻类进行水质监测时采用各种指标和标准，例如：指示生物或指示种类；优势种群；藻类污染种指数；藻类多样性；……等。其中指示生物是过去广泛采用的生物监测方法。其先驱是Kolkwitz和Marrson。他们于本世纪初提出不同“污染带”的划分和各污染带的指示生物。指示生物包括藻类、原生动物、微型后生动物等。这种评价标准和方法已在国内外广泛采用。数十年来有不少学者做了大量研究，发表了许多论文。当然，近年来研究发现这种方法有一定缺陷，但仍被公认为一种经典方法。

2. 以原生动物为指示生物的原因　除了原生动物具有微型生物进行监测的一般优势外，还因为原生动物对环境的变化十分敏感。而且原生动物本身就是一个群落。它具有群落级的结构和功能特点，很适于做监测生物。

用水中微型生物进行水污染监测有一个由初级向高级逐步发展的过程。本世纪初开始以指示生物的种类去评价水质；约60年以后，开始将水中微型生物视为群落，所以逐渐发展为用水中微型生物的群落结构来评价水质；最近又逐渐发展为以水中微型生物的群落结构和群落功能来评价水质。水中微型生物的群落结构可反映出不同种类及其数量的差别，而水中微型生物的群落功能则可反映出微型生物生命活动的特点。将结构与功能结合起来分析，可更全面地了解水质污染的状况和变化趋势。

采样水生生物的生物监测方法很多。下面将介绍“污化指示生物”和“PFU法”两种方法。

二、污化指示生物及污化系统

在水体中是否可找到一些能指示水体污染程度的水生生物？以这些指示生物去预测水体的污染，在实用上是有一定价值的。国内外对此进行了大量的研究工作。已提出几种关于污化指示生物的分类系统，但还没有建立一种完善的、普遍采用的系统。目前，采用观测污化指示生物并配合化学分析的方法，可以比较全面地评价或预测水体的污染程度。

一种称为污化系统的分类法在欧洲大陆应用得较广泛。在美国、英国等国家应用得还不普遍，这可能是因为这种系统在观测时较繁琐的缘故。污化系统（也可称为有机污染系统）一般根据以下原理分区：当有机污染物质排入河流后，在其下游的河段中发生正常的自净过程，在自净中形成了一系列连续的“带”。因为各种水生生物需要不同的生存条件（物理、化学环境，营养物的种类和数量等），对各种有害物质也有不同的耐力。所以，随着水体自净程度的变化，各个带中都可找到一些有代表性的动植物。污化指示生物包括细菌、真菌、原生动物、藻类、底栖动物、鱼类等。常用来指示污染的底栖动物有颤蚓类、寡

毛类、软体动物以及一些水生昆虫。底栖动物个体较大，生命周期较长，在其生境❶中相对位移较小，便于缺少专门仪器的非专业人员采集和观察，所以在开展群众环保工作中有较大的价值。

污化系统中各个带的划分及其特点如下：

（1）多污带　此带在靠近污水出水口的下游，水色一般呈暗灰色，很浑浊，含有大量有机物，如碳水化合物、蛋白质和多肽（缩多氨酸）等，但溶解氧极少，甚至完全没有。在有机物分解过程中，则产生 H_2S、SO_2 和 CH_4 等气体。由于环境恶劣，所以多污带水生生物的种类很少，几乎全部是异养性生物，无显花植物，鱼类绝迹。

多污带有代表性的指示生物是细菌。细菌的种类很多，数量也很大，有时每毫升水中有几亿个细菌。其中有一部分硫磺细菌，能分解水中的 H_2S。多污带的水底被沉降下来的悬浮物所覆盖，在沉积淤泥中有大量寡毛类蠕虫。

多污带有代表性的指示生物举例如下：贝日阿托氏菌、球衣细菌、颤蚯蚓、摇蚊幼虫、蜂蝇幼虫，见图 4-26。

（2）α-中污带　中污带在多污带下游，可分为两个亚带，α-中污带和 β-中污带。前者污染得更严重些。

α-中污带的水色仍为灰色；溶解氧仍很少，为半厌氧状态，有氨和氨基酸等存在。这里，含硫化合物已开始氧化，但还有 H_2S 存在，BOD 已有减少，有时水面上有泡沫和浮泥。

生物种类比多污带稍多。细菌含量仍高，每毫升约几千万个。水中有蓝藻和绿色鞭毛藻，出现了纤毛虫和轮虫，在已经部分无机化的水底淤泥中，滋生了很多颤蚯蚓。

α-中污带有代表性的指示生物举例如下：天蓝喇叭虫，见图 6-21；美观单缩虫；椎尾水轮虫，见图 6-22；臂尾水轮虫；大颤藻；菱形藻；小球藻；栉虾，见图 6-23。



图 6-21　天蓝喇叭虫

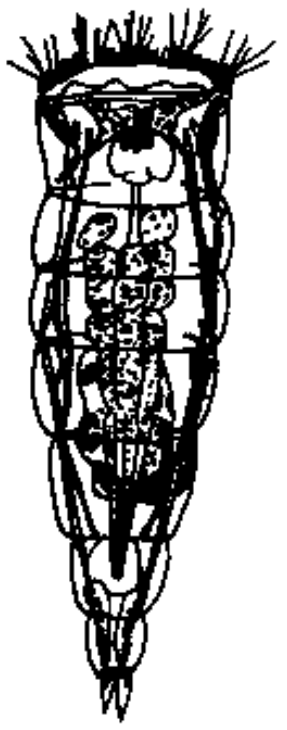


图 6-22　椎尾水轮虫

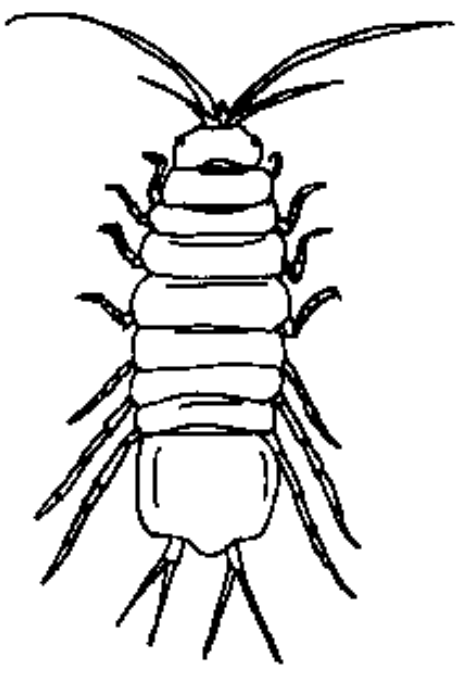


图 6-23　栉虾

（3）β-中污带　在 β-中污带中绿色植物大量出现，水中溶解氧升高，有机物质含量已很少，BOD 和悬浮物的含量都较低，蛋白质的分解产物氨基酸和氨进一步氧化，转变成铵盐、亚硝酸盐和硝酸盐，水中 CO_2 和 H_2S 含量很少。

---

❶ 生物的个体、种群或群落所在的具体地段环境。生境内包含生物所必需的生存条件以及其它的生态因素。

这里，生物种类变得多种多样。由于环境不利于细菌生长，故细菌的数量明显减少，每毫升水中有几万个，藻类大量繁殖，轮虫、甲壳动物和昆虫也很多，可发现生根的植物，也可看到泥鳅、鲫鱼和鲤鱼等鱼类。

β-中污带有代表性的生物举例如下：水花束丝藻，见图 6-24；梭裸藻，见图 6-25；变异直链硅藻，见图 6-26，短棘盘星藻，见图 6-27；前节晶囊轮虫，见图 6-28；腔轮虫；卵形鞍甲轮虫；蚤状水蚤，见图 6-29；大型水蚤，见图 6-30；绿草履虫；帆口虫；鼻栉毛虫；聚缩虫；隐端舟形硅藻；卵形龙骨硅藻；静水椎实螺；肿胀珠蚌；蚤状钩虾



图 6-26　变异直链硅藻



图 6-24　水花束丝藻



图 6-25　梭裸藻

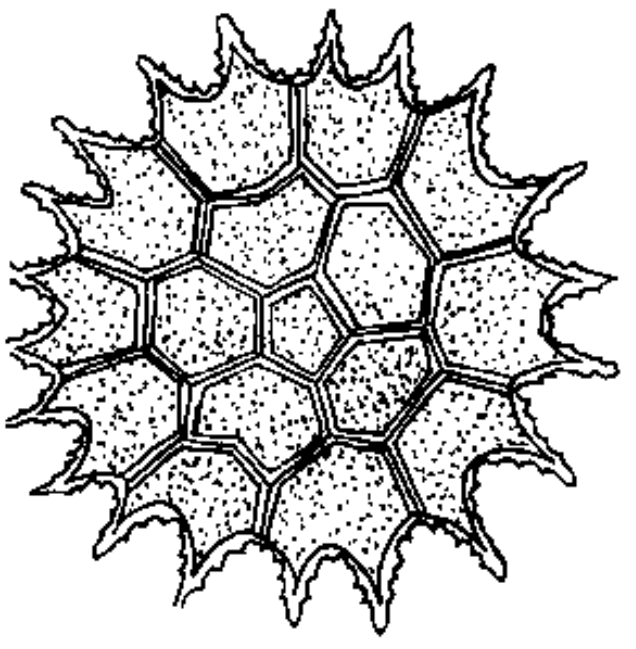


图 6-27　短棘盘星藻

(4) 寡污带　在寡污带，河流的自净作用已经完成，溶解氧已恢复到正常含量，无机化作用彻底，有机污染物质已完全分解，CO_2 含量很少，H_2S 几乎消失，蛋白质已分解成硝酸盐类，BOD 和悬浮物含量都极低。

寡污带的生物种类很多，但细菌数量很少，有大量浮游植物，显花植物也大量出现，鱼类种类也很多。

寡污带的代表性指示生物举例如下：水花鱼腥藻，见图 6-31；玫瑰旋轮虫，见图 6-32；平突船卵水蚤；窗格纵隔硅藻；圆钵砂壳；黄团藻；大变形虫。

应当注意，上述的污化系统只能反映有机污染的程度，不能反映有毒工业废水的污染。

这种根据水生生物种类的更迭来评价水体污染程度的方法也缺乏定量的概念。所以又有根据水生生物的数量求出某种“指数”，并用以评价水体污染程度的研究。下面介绍一种水污染的生物指数（Biological Index of Water Pollution，BIP）。这种指数是根据水中单细胞生物的种类和数量来计算的。

$$\mathrm{BIP} = \frac{B}{A+B} \times 100 \tag{6-59}$$

式中　A——有叶绿素的微生物数；

B——无叶绿素的微生物数。



图 6-28　前节晶囊轮虫

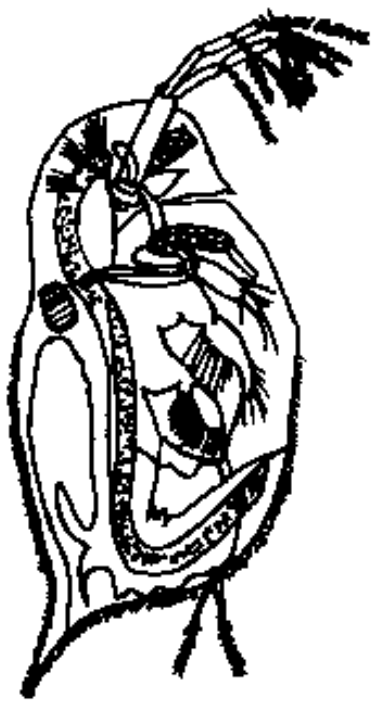


图 6-29　垂状水盏

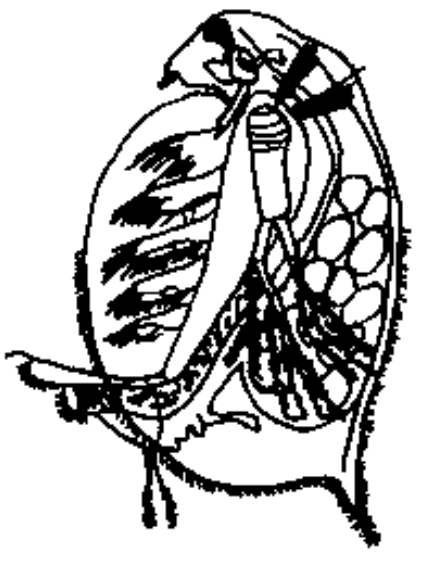


图 6 30　大型水蚤

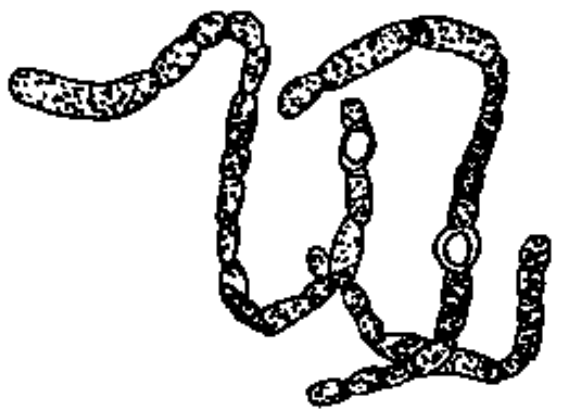


图 6-31　水花鱼腥藻



图 6-32　玫瑰旋轮虫

污染程度可按表 6-13 判断。

利用 BIP 值判断水体的污染程度　　表 6-13

污染程度	清洁水	轻微污染水	中等污染水	严重污染水
BIP 值	0～8	8～20	20～60	60～100

三、微型生物群落监测　—PFU（Polyurethane Foam Unit）法

1. 与 PFU 法有关的基本知识

（1）岛屿生物平衡模型　1963 年 Mac Arthur 和 Wilson 首次提出岛屿生物群集模型（Colonization Model）的理论。他们认为，岛屿各有不同的，独立的地理环境，其动植物区系也有不同。当物种由外部迁入，又称群集（Colonization）的初期各种物种间没有相互影响，群集速度只受迁入物种的扩散能力和迁出规律的影响。只有当迁入物种的群集速度与消失速度相同时，种数就达到了平衡点。此时群落内就会产生捕食、被捕食、竞争等种间的相互作用，这种作用决定岛屿的生物组成，就显出群落的统一性。岛屿生物群落的这一

特性就是 MacArthur-Wilson 岛屿生物平衡模型（Equilibrium Model of Island Biography）的要点。该模型在群集过程初期可用下式表示：

$$S_t = S_{eq}\ (1-e^{-Gt}) \tag{6-60}$$

式中 S_t——时间为 t 时的种数；

S_{eq}——估计的平衡时的种数；

G—— 常数。

用式（9-61）可得出 $T_{90\%}$，即达到 90%S_{eq}所需时间。

（2）PFU 根据岛屿生物平衡模型，学者们认为相同生境中若有孤立的，有机体难超越的小生境，也可以认为这类小生境是“岛”。所以各种水体中的石头、沉水的木块，甚至某些人工基质（如载玻片）等也可从生态学角度认为是一个“岛”。1969 年美国 Cairns 提出用 PFU 做为采集微型生物群落的“岛”。PFU 是 Polyurethane Foam Unit 聚氨酯泡沫塑料块的缩写。试验研究表明，空白 PFU 挂在水中，对水中的生物来源，它象块小岛。由于 PFU 孔径只有 150μm 左右，故只有超微型浮游生物、微型浮游生物、小型浮游生物才能迁入或迁出 PFU 块。研究表明，最优的 PFU 的尺寸为 50mm×65mm×75mm。

可收集到细菌、真菌、藻类、原生动物和小型轮虫，有自养者、分解者、异养者，构成了微型生物群落。对原生动物而言，可收集到 85%种类。具有环境真实性。

2. 微型生物群落监测——PFU 法 1969 年 Cairns 发表微型生物在 PFU 上的群集过程后，证实了这种人工基质群集特性符合 MacArthur-Wilson 岛屿生物平衡模型；其后 Cairns 及合作者继续用 PFU 法对水体进行野外监测和室内毒性试验。1981～1982 年中国科学院武汉水生生物所沈韫芳研究员赴美与 Cairns 合作研究应用微型生物群落预报污染物的环境效应。1983 年 PFU 法在我国应用与研究。我国学者对此方法进行了改进、验证和推广。主要的改进如下：

（1）将 PFU 悬挂水中 1～3d，可获满意结果。能反映出 1～3d 内水质的连续变化（沈韫芬等，1985，1989）。

（2）将多样性指标引入参数中（沈韫芬等，1988）。

（3）根据水体中有无环境干扰，对 MacArthur-Wilson 平衡模型进行了修正，修正后的公式如下：

$$S_t = S_{eq}\ (1-e^{-GT}) \ /\ (1+He^{-Gt}) \tag{6-61}$$

式中引入了污染强度 H。若 PFU 群集过程中没有受到环境干扰，则 H=0。（王继忠等，1989）。

（4）引入植鞭毛虫种数占原生动物总种数的百分比，可反映出水体中自养型微生物的演替，从而能更客观地评价水质。

经我国学者的努力，已将 PFU 法发展成一种快速、经济、准确的用微生物监测水质的方法，并得到国内外的认可。我国 1992 年 4 月公布该方法为国家标准《水质微型生物群落监测—PFU 法》（GB/T 12990- -91）。

复 习 思 考 题

1. 好氧分解和厌氧分解有什么区别？

2. 自然界中的碳循环和氮循环有何重要意义？

3. 试简单说明下列各个作用：

（1）氨化作用　　（2）硝化作用

（3）硫化作用　　（4）反硝化作用

4. 影响生物处理的主要因素有哪些？

5. 试简单讨论活性污泥的膨胀问题。

6. 什么是水体的正常生物循环？向水体中排放的污染物质过多为什么能破坏水体的正常生物循环？

7. 什么叫水体的自净？为什么说溶解氧是河流自净中最有力的生态因素之一？其变化规律如何？研究水体自净在水污染控制工程中有何重要意义？

8. 什么是指示生物？怎样用指示生物来评价水体的污染程度？

第七章　微生物的研究方法

为了便于更好地认识微生物、控制微生物、改造微生物，从而利用有益的，消灭有害的，使微生物更好地为工农业生产服务，需要有一套研究微生物的方法和设备。

针对上述目的，首先需要掌握在实验室条件下，研究微生物的方法，然后才能对其作进一步的探讨。下面介绍一些在实验室中研究微生物的基本方法。

第一节　微生物的观察

微生物都很小，须用显微镜放大后才能看到。显微镜有普通光学显微镜、电子显微镜等。观察微生物的一般形态，以普通光学显微镜（常简称显微镜）最为常用。

普通光学显微镜最大能将物体放大2000倍左右。通常观察霉菌和酵母菌时，采用100～400倍的放大率已足够，而观察细菌时，往往需要放大900～1500倍左右。

显微镜的分辨力与光波长短有关。物体小于0.2μm时，普通光学显微镜就无法辨别。一般病毒都在此限度以下，所以看不见。电子显微镜以电子代替普通光作光源，电子波长极短，仅为可见光波波长的1/10万，因而辨别力也就大大增强。目前电子显微镜的放大倍数常达几十万倍，过去无法看到的病毒以及细菌内部的微细结构，都可以看清楚。用电子显微镜检查的物体须在真空和干燥状态下进行，因而无法用来进行活菌的观察。

细菌不但个体很小，而且都是无色半透明的，用普通显微镜放大，只能粗略地看到其大小和形态。要观察清楚，必须进行染色。染色后还有可能识别细菌的各种不同结构，有时并可协助鉴别细菌。

细菌染色常用的染料有美蓝、结晶紫、沙黄等碱性染料，因为这些染料电离时染料离子带正电，容易与带负电的细菌相结合。前已述及，细菌细胞内含有大量蛋白质，其等电点较低，约在pH2～5之间，所以在中性、碱性或弱酸性溶液中，细菌都是带负电的。

一般染色可分为单染色法和复染色法两种。前者只用一种染料使细菌着色，主要用来帮助观察细菌的形状和大小，鉴别作用不大，常用的染液有美蓝液和石炭酸品红液。后者使用两种染料，有鉴别细菌的作用，所以又称鉴别染色法。水细菌检验常用的革兰氏染色法便是鉴别染色法，革兰氏染色法也可用来帮助观察难染色的细菌。在此法中，先用碱性染料（结晶紫或龙胆紫）使细菌着色，次加媒染剂（碘液），再用酒精脱色，最后用沙黄复染。凡能保留结晶紫和碘的化合物，而不被酒精脱色、染成紫色的细菌，称为革兰氏阳性菌。凡被酒精脱色，再被复染液染成红色的细菌，称为革兰氏阴性菌。

关于革兰氏染色的原理已基本清楚。早期认为：革兰氏阳性菌的等电点（pH2～3）比阴性菌（pH4～5）为低，故在同一pH值下阳性菌所含的负电荷较多，因之摄取碱性染料的能力较强。碘进入菌体后，与染料（结晶紫）和阳性菌体内的核糖核酸盐结合成不溶于酒精的化合物，故经革兰氏染色法处理后菌体呈明显的染色。而革兰氏阴性菌体内不含核

糖核酸盐。在第一次染色时染上的染料与碘结合后仍能溶于酒精中而被褪色，故经革兰氏染色后显出的是复染后的红色。现在认为：革兰氏阳性细菌细胞壁较厚，呈网状分子结构包在细胞外部，虽然其本身并未被染料着色，但起着渗透障碍作用，使染料-碘复合物分子保留在细胞内，不能被酒精洗脱，而革兰氏阴性菌的细胞壁则不能保留此复合物。全部芽孢杆菌及大多数球菌均呈革兰氏染色阳性反应，而无芽孢杆菌中的多数及少数球菌为革兰氏染色阴性反应。

此外，还有一些复杂的染色法用于细菌芽孢、荚膜、鞭毛等的观察，详细可参阅微生物专书。

按上述各种染色法所做成的标本虽然颜色鲜明，轮廓清楚，易于观察，但经过一系列染色处理后，微生物早已被杀死。如果要观察活的微生物，必须用另外的方法处置。

一般常用的活菌检查法有两种（图 7-1）：

1. 压滴法　取一小滴菌液，放在洁净的载玻片中央，用盖玻片覆盖后，即可进行观察。观察废水生物处理过程中所产生的生物膜或活性污泥，常采用此法。

2. 悬滴法　取一小滴菌液放在洁净的盖玻片中心，然后把盖玻片翻转放置在凹面玻片的中央，使菌液正好悬在凹窝正中，在凹窝的边缘先涂一层凡士林，这样可使悬滴密封在一个潮湿的小空间中，不致很快地干燥，于是可在显微镜上直接观察。

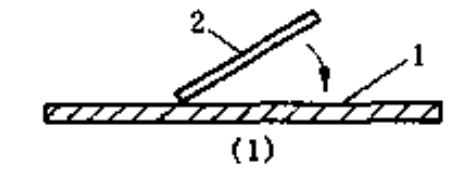


图 7-1　压滴法和悬滴法

（1）压滴法　1—载玻片；2—盖玻片

（2）悬滴法　1—凹玻片；2—凹窝；3—盖玻片；4—液滴

第二节　微生物的培养和纯种分离

一、微生物的培养及培养基

在鉴别不同种类的微生物时，显微镜下观察到的各种形态、微细结构和染色的反应，都是很重要的指标。但是因为微生物的形态类型比较单纯，微细结构也不多，不足以区别各种各样的菌种，因此，要区别各种不同的菌种，在形态特性之外还必须研究其培养特性，即当微生物在培养基上生长时能观察到的一切特性。此外，在进行增殖培养时，也须采用合适的培养基，以培养繁殖大量微生物，供工业农业医学及科学研究等方面的需要。

按照培养基制成的形式，可分为液体培养基和固体培养基两种。

在液体培养基中不但可以把少数微生物培养成无数微生物，并且可以借微生物对于培养基中某些物质的化学作用来进行菌种的鉴别。例如，普通大肠杆菌能分解乳糖产生酸和气体，所以可以用含有乳糖的培养基，根据是否产生酸和气体来初步确定大肠杆菌存在与否。

采用液体培养基培养微生物，操作比较简单，但有时为了分离和保藏菌种及鉴定微生物等的需要，在液体培养基中加一定量的凝固剂，这样便成为固体培养基。常用的凝固剂是琼脂（洋菜），当加入 1.5%～3%时就形成固体，而加入 0.5%～0.8%时，则成半固体。琼脂是从一种海藻中提炼出来的多糖类物质，不被一般微生物所分解，而且具有 100℃熔解和 40℃凝固的特性。有时也有用明胶或硅胶等作凝固剂的。

固体培养基可制成平板和斜面培养基。所谓平板或平板培养基是指融化的固体培养基

（或连同培养物）在培养皿内冷后凝成的平面，其制备方法见图 7-2。

斜面培养基或斜面的制备如图 7-3 所示，可将溶化的固体培养基倒入试管，使冷后凝成一定斜度的斜面以增加与空气接触的面积。一般说，平板培养基适于分离菌种，因平板表面积大，容易进行分离得到纯菌种（怎样分离菌种见后面）；斜面培养基宜于培养和保藏菌种，因斜面底部可保存一些冷凝水，微生物不容易死亡，并且斜面做在试管内，表面积较小，不容易受到污染。



图 7-2　培养皿（平皿）及平板的制备

(1) 培养皿（一般用直径 9cm）；

(2) 制备平板

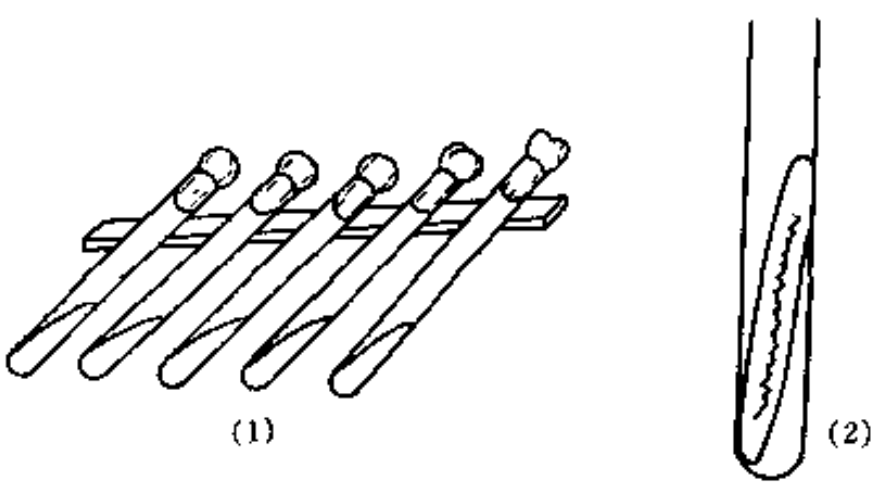


图 7-3　斜面培养基

(1) 斜面培养基的制备（一般用 15×150mm 的试管内盛 3～5mL 培养基）；(2) 斜面培养基上的划线

二、微生物纯种的分离

微生物在自然界中都是好多种混杂在一起生活的。微生物很小，看不见，摸不着，如何把它们一个一个地分离开，从中取出我们所需要的菌来观察和研究呢？这就是纯种分离的工作。

近年来，为了要提高废水生物处理的处理效率，国内外都在进行分离和培养纯菌种处理废水的试验研究。前已述及，已经发现某些霉菌和放线菌可以有效地分解氰化物；另外，食酚假单胞菌和解酚假单胞菌分解酚类化合物的能力也都很强。怎样分离出这些纯的菌种呢？下面我们就来介绍一些分离菌种的方法。

在进行纯种分离以前，先要寻找生活着我们所需要的微生物（菌种）的样品。从什么地方能够找到我们所需要的样品呢？这要按照实际情况决定工作方针，对具体情况要作具体分析。例如：要筛选分解氰化物能力强的菌种，可以从有含氰废水排出的工厂附近的水沟、土壤中或含氰废水生物处理的污泥杂质里去寻找，因为在这些东西里能分解氰化物的微生物一定比别处多。如果我们得不到合适的样品，那末，可以从一般土壤里去寻找，因为土壤是微生物的大本营，一克土壤中含有几十万到若干亿微生物，而且总的来说，土壤中各种微生物应有尽有，所以许多微生物的分离筛选工作常从收集土壤样品开始。

收集到的样品有两种情况：一种是样品中含有所需要的微生物较多，可直接进行纯种分离；一种是含所需要的微生物较少，在分离之前需要进行增殖培养处理，目的在于设法使我们需要的微生物大量生长起来，而我们不需要的微生物不发展或发展很少，以利筛选。例如：在分离分解氰化物的微生物时，如果样品中这类微生物不多，就应把样品加到含有氰化物的培养基中，使它们经过一段时间的培养后大量繁殖，再进行分离。通过这样的培养，也可以使不适于在有氰化物环境中生长的微生物不发展或少发展。

怎样从样品中分离出微生物的纯种？纯种分离一般用培养皿来进行。我们可以将样品或经增殖培养后的样品中的微生物用灭菌过的水进行稀释后倒入培养皿，然后再倒入融化的固体培养基溶液，摇动均匀，使菌体分散在培养基内。培养基冷凝成平板时分散的菌体就被固定，于是经一定时间的培养后，这种被固定的单个菌体便繁殖形成一个个能被肉眼看到的菌落。这种由单个菌体发展成的菌落就是我们所需要的纯种。这种分离微生物的方法称为稀释平板法。

分离也可以采用划线的方式来完成。可以用接种环蘸取样品稀释液，以图 7-4 的形式轻轻地在平板培养基上顺序划线。由于蘸到接种环上的微生物多，在开始的一些线段上，微生物可能分离不开，但逐渐就可以分离出单个的菌落。这种在平板上划线的方法称为平板划线法。

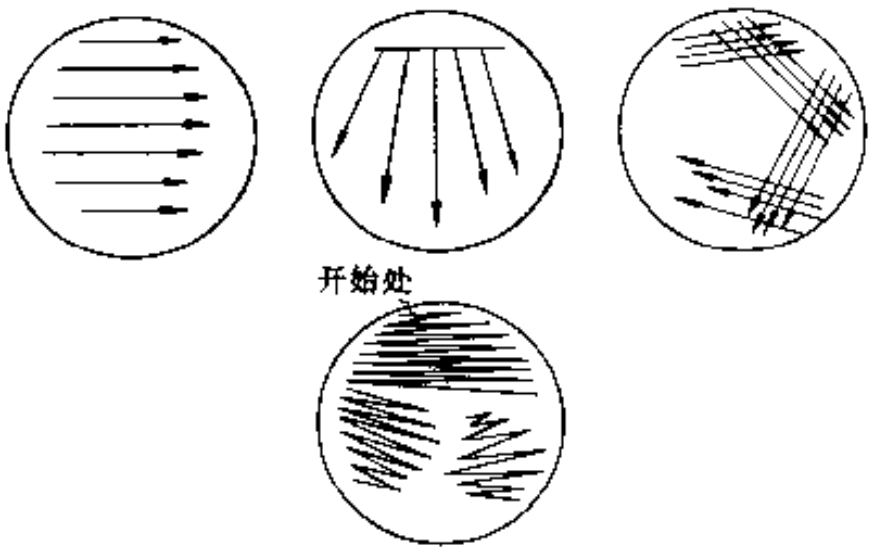


图 7-4　划线

上述样品稀释的目的是为了使培养皿上形成的菌落不过于密集，影响菌种的分离。如果样品中含微生物不多，可以不作稀释。

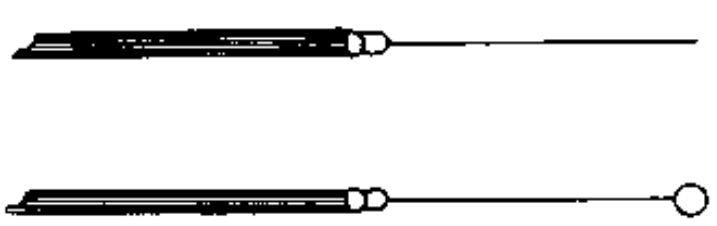


图 7-5　接种针和接种环

接种针或接种环的材料要求烧灼时很快烧红，而离开火焰后又能很快冷却，且不易氧化和没有毒性；一般用白金丝或电热丝制造（图 7-5）。

根据上述操作获得单个菌落后，就可以挑选单纯的、不同类型的菌落，用接种环接种到斜面培养基，进行再培养，并进行性能测定，以确定符合生产要求的纯种。对于废水处理来说，就是要选出对于某种特定废水具有强大氧化分解能力的菌种，以便有效地处理废水。

培养、分离微生物常用的培养基　　表 7-1

微　生　物	培　　养　　基
异养细菌	肉汁培养基
放 线 菌	淀粉培养基
酵 母 菌	麦芽汁培养基
霉　　菌	土豆培养基、麦芽汁培养基

注：制备固体培养基时，可用琼脂做凝固剂。

表 7-1 示培养、分离微生物常用的培养基。

图 7-6 所示，是分离菌种的主要步骤。

在操作中，所用器皿，培养基等在使用前都须进行灭菌。

这里，应当指出，培养条件的选择，是筛选中使目标集中的有效措施。根据具体要求，常用的方法主要有以下几种：

1. 控制温度　温度是最便于控制的培养条件。一般微生物最适于生长的温度在 20～40℃之间，在 50℃以上一般微生物就停止生长。耐高温的微生物的最适温度为 50～60℃。所以要分离耐高温的微生物就要把培养皿放在 50～60℃的温度中去培养，一方面有利于这

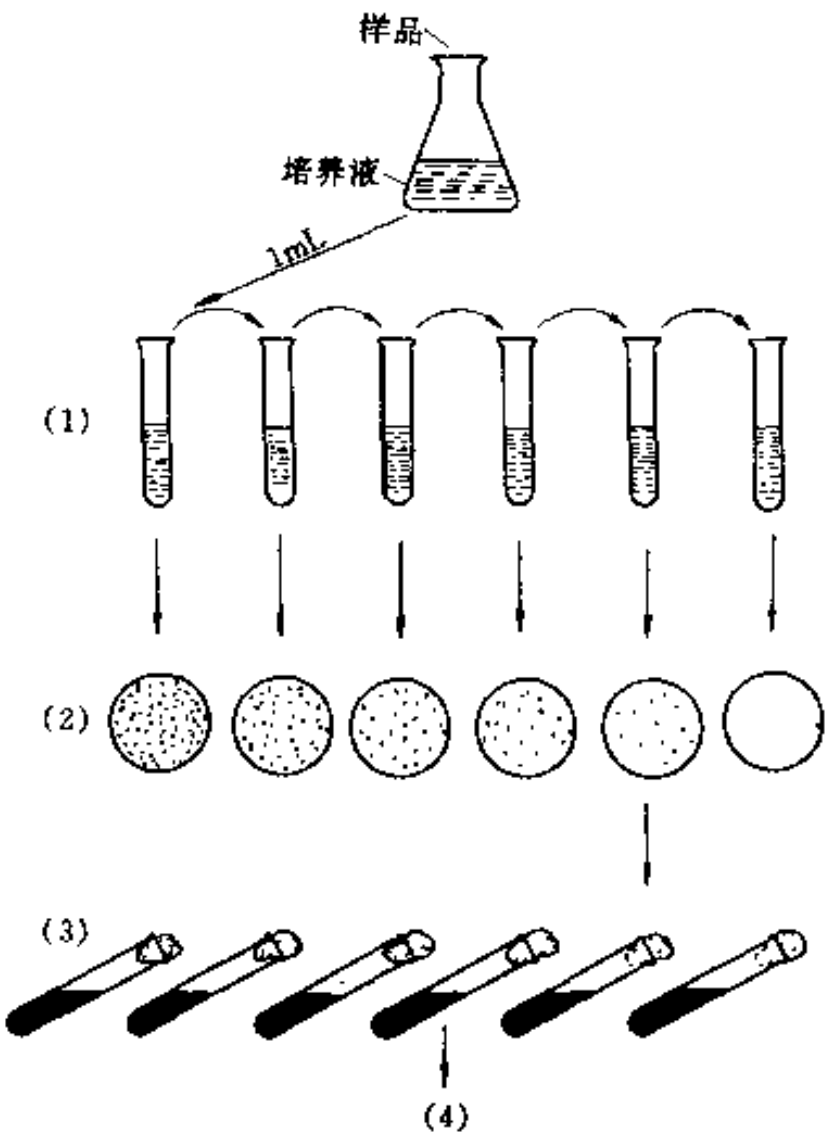


图 7-6　菌种分离的主要步骤

(1) 稀释培养液以使下一步中的平板上能够长出分离良好的单独菌落（每个试管中盛 9mL 无菌水，左面第一试管中加 1mL 培养液经充分摇匀后即稀释 10 倍，再从此试管取 1mL 混合液加到邻近的 1 个试管，此时即稀释 100 倍，余类推，稀释至平板上长出的菌落很稀少为止）；

(2) 一定量（如 0.1 或 0.5mL）的菌液接种在平板上培养后的菌落；

(3) 从分离良好、菌落数在 10 个左右的培养皿上挑选不同菌落接种于斜面上；

(4) 进一步用液体培养基培养并进行性能测定。

些微生物的生长，另一方面又可以排除其它微生物的干扰。

2. 控制空气　如果是培养喜欢氧气的好氧微生物，培养容器内所装液体培养基的深度应当浅些，可以让空气比较容易透入下部。如采用固体培养基，就可照前面所介绍的那样，把培养基装在培养皿内，凝成较大的平面，制成所谓平板，或把培养基装在试管中，凝成斜面。如有条件，还可采用一种能够振荡的摇床，把装有液体培养基和菌种的培养瓶固定在摇床上，利用电动机的带动，不停地振荡，使瓶内的培养基不断搅拌，充分接触空气。摇床室应控制一定的温度。

培养厌气微生物时，要设法把培养环境中的氧气排除。我们可以把培养容器放在密闭的器皿内，用真空泵把空气抽出，或利用吸收氧气的某些化学物质，把容器中的氧气除掉。

3. 控制培养基成分　对于一般依靠有机物生长的细菌，最常用的培养基是用牛肉膏、蛋白胨等调配而成。酵母和霉菌比较喜爱吃素，象土豆汁、豆芽汁和麦芽汁都是它们嗜好的"素菜"。放线菌可用淀粉进行培养。如果其它条件控制合适，同一含菌样品的稀释液在含有上述物质的培养基上发育起来的，绝大部分是属于该类群的微生物。另外，我们还可以控制培养基的碳源来分离某些微生物。例如，纤维素和石蜡都是一般微生物所不能利用的碳源，如果筛选所用培养基只加纤维素作为碳源时，只有能够分解纤维素的细菌方可生长。分离石油脱蜡的微生物时，如果用石蜡作碳源，那别的微生物就不能生长了。于是在这个基础上通过划线等方法进行分离。

4. 控制培养基的酸碱度（pH）一般说来，细菌和放线菌在偏碱性的环境中生长得好；而酵母菌和霉菌在偏酸性的环境中生长得好。因此，如果要得到霉菌、酵母菌，把培养基的 pH 调到 3～6 即可抑制细菌、放线菌的生长；如果要筛选放线菌、细菌，应把培养基的 pH 调到 7 或 7 以上一些。但这不是绝对的，各种微生物中也有例外。

5. 使用抑制剂　利用控制 pH 的方法来筛选菌种，效果不一定很好，因为有些霉菌也可在中性环境中生长，有的细菌也可在酸性环境中生长。更有效的办法是在培养基中加入作用更具有专性的抑制剂。抑制霉菌和酵母菌生长的抗菌素，如灰黄霉素，对于细菌和放

线菌没有抑制作用；抑制细菌和放线菌生长的抗菌素，如青霉素、链霉素，对于霉菌和酵母菌没有抑制作用。在细菌中革兰氏染色阳性和阴性的细菌对于某些抗菌素的反应也不同。例如青霉素在一定浓度时对于革兰氏阳性细菌具有抑制作用，而对于阴性细菌则没有作用。所以按照具体需要，在培养基中加入某些抗菌素等抑制剂，对于筛选工作是很有帮助的。

关于控制培养条件的方法，除上述一些外，还可能有很多方法可以采用，全靠我们根据需要和工作条件，发挥主观能动性，大胆实验，大胆创造。

最后，还应指出，将纯菌种直接投入生物处理构筑物内以处理废水目前还存在着一些问题。主要是：如果把大量分离出的适宜于分解某种物质的菌种投入，则这一类微生物在短时期内确能在处理构筑物内取得优势地位，从而提高该物质的去除效率，但是，废水中一般不仅仅含有 1、2 种杂质，生物处理构筑物内的微生物也是多种多样的，并且随时受到空气和土壤的污染，而自然界中微生物的生长则不但受到环境的影响，同时它们互相之间也发生着影响，所以处理构筑物内的优势菌种会随着条件的改变而发生变化。因此，菌种投入后经一定时间，处理效果有可能下降。土壤内生长着各种各样的微生物，几乎可以提供废水生物处理所需的全部微生物。所以菌种分离工作的工作量虽然很大，但从土壤或其它一些样品中分离出适用于某种工业废水处理的菌种还不是太困难的。更重要的问题是在于如何把分离出的菌种有效地用到生产实践中去。此外，还须注意避免利用病原微生物来处理废水。顺便再提一提，最近在研制固相酶的基础上所发展的一种把分离出的菌种固定起来的新技术（固定化微生物细胞），有可能较好地用来处理废水。

第三节　微生物的保藏与复壮

要选得一个合乎生产上需要的菌种是一件艰苦的工作。虽然在选种工作中进行了分离纯化，但是，由于微生物具有较易变异这一特性，因此在生产过程中和保藏过程中菌种仍会不断地发生变异，使原来的菌种变得不纯，甚至可能引起菌种的衰退，而不利于生产。所以，我们必须在未发现衰退现象之前妥善保藏菌种；在出现衰退现象之后，就应设法加以复壮。通过复壮恢复正常生产性能的菌种又会再次衰退，又必须再度复壮。复壮的过程是一个不断解决矛盾的过程，以便使菌种在生产中保持相对的稳定。

一、菌种的保藏

菌种的保藏首先要注意不至造成死亡绝种，另一方面要尽量使菌种保持优良的生产性能。

不论何种保藏方法，原则上就是使微生物的代谢作用相对地处于不活泼状态。一般主要是采用低温、干燥和真空这 3 个方法。

斜面冰箱保藏法是最简便的一种。它是将菌种接种在斜面固体培养基上，待菌充分生长后，放在约 4 C 的冰箱中，每隔一定时间转接到新鲜的培养基上以免死亡。一般的菌种均可用此方法，但保存时间较短，一般仅 1～3 个月。关于其它的一些方法，可参阅微生物专书。

二、菌种的衰退与复壮

菌种衰退的原因主要有两种：一种是由于变异而引起的；另一种是由于“衰老”而引

起的。变异一般是从细胞核开始的。由于每个核的性质不是绝对一样的，所以它们的变异有先有后，必须当变异的核增加到一定数量后，才会发生质的变化，而使微生物的形态和生理性能改变。例如，丝状的霉菌，其菌丝体内含有许多核，其中如果有一个核发生变异，不会使整个菌丝体的形态和生理性能发生变化，而当变异的核逐渐增加到一定数量后，它们的形态和生理特性就都改变了。细菌和酵母菌的菌体都是单个细胞，但在多数正常菌体中，也是先开始发生个别菌体的变异，以后，逐渐地变异的菌体增多，最后使整个群体性质改变。由此可见，由变异引起的衰退是逐步发生的。自然“衰老”现象，原因还不很清楚，似乎并不是从核变化开始，而可能是由于营养物质的减少和细胞内所不断排出的一些不利于生长的废物的累积而引起的。所以群体培养愈久，愈容易发生退化现象。这种“衰老”有时导致菌种不可挽救的死亡，有时也使孢子逐渐减少。

了解了衰退的原因，就可为复壮采取有效措施。例如，由于因为变异引起的衰退是逐步发生的，所以采用稀释分离的方法，往往就可将尚未变异的个体分离出来，获得原有特性的菌种，但自然“衰老”的菌分离后一般得不到复壮的效果；如果衰退是由于培养条件不太适宜，则就应改变条件以适应菌种的生长，而达到复壮的目的。

第四节　灭　　菌

消毒指只杀死一部分微生物，主要是病原微生物。一般消毒剂常用的浓度只能杀死普通的微生物，而不能杀死其芽孢和孢子。而灭菌则指杀死一切微生物包括芽孢和孢子。所有培养基和微生物工作中的用具在使用前必须经过严格的灭菌，以避免原来生活在这些器材上的微生物干扰我们的工作。

高温灭菌法是微生物实验中常用的灭菌法，其中包括烧灼、干热烘烤和高压蒸汽灭菌等方法。

前已提及，湿热穿透力比干热的穿透力大，湿热时微生物吸收了高温水分，较易使菌体蛋白质凝固，湿度越大，杀菌力越强，而在干燥的环境中微生物抵抗高温的能力较强，芽孢则更强。因此在同一温度下，湿热灭菌法比干热灭菌法的效力大。一般湿热灭菌在 115～120 C左右只需 15～30min，而干热灭菌则需在 160 C灭菌 2h 才能达到与湿热相同的效果。

高压蒸汽灭菌法是湿热灭菌法的一种，灭菌效率特高。在常压下将水加热煮沸，只能得到 100 C的蒸汽，不能一次把所有的微生物及其芽孢杀死，要反复多次才能达到灭菌的目的，这叫做间歇灭菌。而高压蒸汽灭菌则不同。它是利用密闭的容器蒸煮，所以蒸汽的压力可以高于大气压，蒸汽温度也随着升高，当容器内的蒸汽压达到一个大气压时，水的沸点提高到 121 C，在这个温度下只需很短的时间就可杀死一切微生物的细胞及其芽孢或孢子。表 7-2 所列是高压灭菌器中温度与压力的关系。

高压灭菌器中温度与压力的关系　　表 7-2

压力		温度
(lb/in^2)	(kg/cm^2)	(C)
0	0	100
5	0.35	108
10	0.7	115
15	1.05	121
20	1.41	126

高压灭菌器有立式和卧式两种，图 7-7

是卧式的一种。

普通培养基、耐热药品、玻璃器皿等都可用高压灭菌器灭菌。一般采用一个大气压(121℃)持续15～20min。对于容易被高温破坏的物质，如含葡萄糖、乳糖的培养基，则应降低温度至115℃（必要时可适当地延长灭菌时间）。有些则只能用过滤法除菌（如维生素等）。

干热烘烤是在烘箱内利用热空气进行灭菌的方法。一般在160℃温度下烘烤2h，温度不应超过170℃以避免包装器皿的纸被烧焦。此法适用于金属或玻璃器皿的灭菌。

烧灼是利用火焰直接把微生物烧死，同烘烤一样，也是一种干热的灭菌法。此法灭菌很彻底、迅速，但使用范围有限，适用于接种针、接种环、载玻片、试管口等及不能再用的污染物品的灭菌。

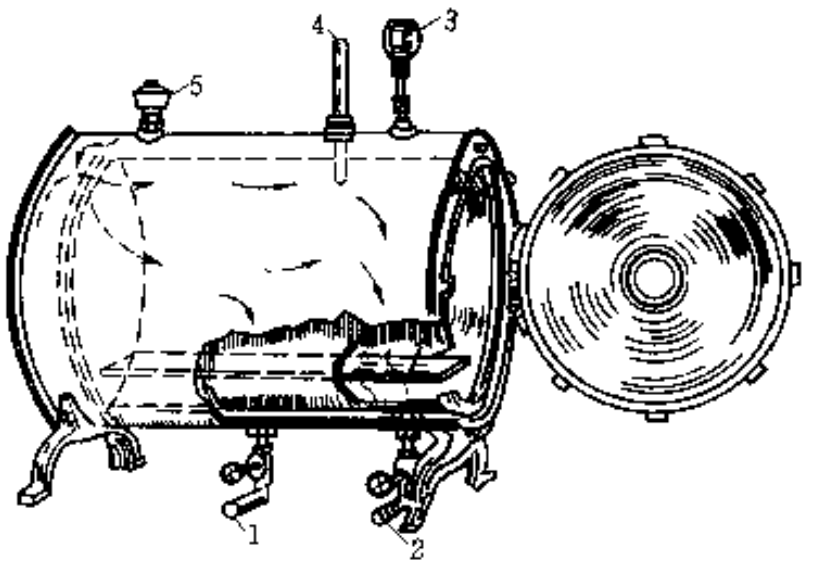


图 7-7　高压蒸气灭菌器

1—蒸气入口；2 -出汽口；3—压力表；4—温度计；5—安全阀

第五节　无　菌　操　作

微生物的分离、接种等实验最好在经紫外线灭菌的无菌室或无菌箱内进行，要严格注意无菌操作。在没有无菌室或无菌箱的情况下，实验精确度又要求不高时，则可在一般的实验室内进行，但要特别注意无菌操作。在实验四中将举例说明制备染色标本涂片的无菌操作过程。

复 习 思 考 题

1. 为什么观察细菌的形态时，常需进行染色处理？
2. 什么叫单染色，什么叫复染色？
3. 什么是革兰氏染色法？这种染色法在细菌的鉴定上有何重要意义？
4. 普通显微镜最大可放大多少倍？在普通显微镜下最小可以看到怎样大小的物体？
5. 什么叫培养基？液体培养基和固体培养基在细菌检验中的应用如何？
6. 固体培养基是怎样配制的？为什么固体培养基上的每一个菌落可以代表原来的一个细菌？
7. 怎样进行菌种的分离？
8. 利用纯菌种处理废水目前还存在着什么问题？
9. 什么叫灭菌？灭菌和消毒有什么区别？采用高压蒸汽灭菌法时，常用多少压力，多少温度？

第八章　微生物学实验

实验一　显微镜的使用及微生物形态的观察

一、目的

1. 学习普通光学显微镜的使用方法❶。

2. 结合生物滤池生物膜及曝气池活性污泥的观察，认识原生动物、菌胶团等微生物的形态，并学习测量微生物大小的方法。

二、实验器材

1. 生物滤池滤料、活性污泥法曝气池混合液。

2. 显微镜、目测微尺、物测微尺、载玻片、盖玻片等。

三、实验步骤

（一）显微镜的结构和各部分的作用

图 8-1 所示，是微生物检验常用的显微镜，其构造分机械和光学两部分。

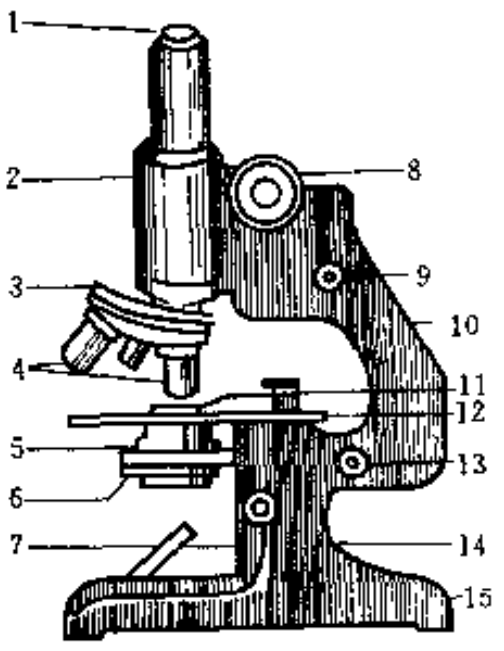


图 8-1　显微镜

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

机械部分主要包括：

1. 镜筒　镜筒长度一般是 160mm。它的上端装有接目镜，下端有回转板。回转板上一般装有 3 个接物镜。

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　镜筒内旁有两个螺旋，大的叫粗调节器，小的叫细调节器，用以升降镜筒，调节接物镜与所需观察的物体之间的距离。

光学部分主要包括：

1. 接目镜　一般使用的显微镜具有 2～3 个接目镜，其上常刻有“5×”、“10×”或“15×”等数字及符号，意即使用时可放大 5 倍、10 倍或 15 倍。观察微生物时常用放大 10 倍或 15 倍的接目镜。

2. 接物镜　接物镜装在回转板上，可分低倍镜、高倍镜和油镜 3 种，其相应的放大倍数常是 10、40（或 45）100（或 90）。通常显微镜的放大倍数等于接物镜与接目镜放大倍数的乘积。例如，用放大 40 倍的接物镜（高倍镜）与放大 10 倍的接目镜时所得的物象的放大倍数为 40×10＝400，如果用放大 15 倍的接目镜则放大倍数为 40×15＝600。接目

❶ 本实验先学习低倍镜和高倍镜的使用，关于油镜，在实验三中学习。

镜装在镜筒上端，在使用过程中并不经常变动，所以通常所谓的低倍镜、高倍镜或油镜的观察主要是指使用不同的接物镜而言的。

油镜的放大倍数最大（90 或 100）。放大倍数这样大的镜头，焦距就很短，直径就很小，所以自标本玻片透过的光线，因介质密度（从玻片至空气，再进入油镜）不同，有些光线因折射或全反射，就不能进入镜头，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和玻璃折射率（$n=1.52$）相仿的镜油（香柏油，$n=1.515$）。因为这种接物镜使用时须加镜油，所以我们称它为油镜（图 8-2）。一般的低倍或高倍镜使用时不加油，所以也称干镜。

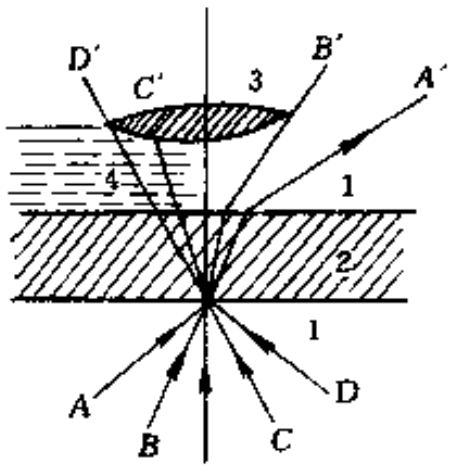


图 8-2　油镜加镜油的原理

1—空气；2　玻片；3—油镜透镜；4—镜油

使用低倍镜和高倍镜时，一般作活体的观察，不进行染色。在观察细小动物时，低倍镜主要用来区别动物的种类和看出它们的活动状态，而高倍镜则可看清动物的结构特征，低倍镜容易看到标本的全貌，油镜在大多数情况下是用来观察染色的涂片。

3. 集光器　集光器在载物台的下面，用来集合由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，可自由转动方向，以反射光线至集光器。

（二）显微镜使用和保护的方法

1. 低倍镜的使用法

（1）置显微镜于固定的桌几上，窗外不宜有障碍视线之物。

（2）拨动回转板，把低倍镜移到镜筒正下方，和镜筒连接而对直。

（3）拨动反光镜向着光线的来源处。同时用眼对准接目镜（选用适当放大倍数的接目镜）仔细观察，使视野完全成为白色，这是光线已经通到镜里的表示。

（4）把载玻片放到载物台上，要观察的标本放到圆孔的正中央。

（5）将粗调节器向下旋转，同时眼睛注视接物镜，以防接物镜和载玻片相碰。当接物镜的尖端距载玻片约 0.5cm 时即停止旋转。

（6）把粗调节器向上旋转，同时左眼向接目镜里观察。如标本显出，但不十分清楚，可用细调节器调节，至标本完全清晰为止。

（7）假如因旋转粗调节器太快，致使超过焦点，标本不能出现时，不应在眼睛注视接目镜的同时向下旋转粗调节器，必须从第（5）步作起，以防因没有把握的旋转，使接物镜与载玻片碰触。

（8）在观察时，最好两眼都能同时睁开。如用左眼看显微镜，右眼看桌上纸张，便可一面看一面画出所看到的物象。

2. 高倍镜的使用法

（1）使用高倍镜以前，先用低倍镜检查，把要观察的标本放到视野正中。

（2）拨动回转板使高倍和低倍两镜头互相对换。当高倍镜移动到载玻片时，往往镜

头十分靠近载玻片。这时必须注意是否因高倍镜靠近的缘故而使载玻片也随着移动。如果载玻片有移动的现象，则应立刻停止推动回转板，把高倍镜退回原处，再按照使用低倍镜的方法，校正标本的位置，然后旋动调节器，使镜筒稍微向上，再对换高倍镜。

(3) 当高倍镜已被推到镜筒下面时，向镜内观察所显现的标本，往往不很清楚，这时可旋转细调节器，上下移动，但不要过分移动。

3. 油镜的使用法（此节在实验三中学习）

(1) 如用高倍镜放大，倍数还不够，则须采用油镜。用油镜以前，先用高倍镜检查，把要观察的标本放到视野正中。

(2) 用油镜时，在载玻片上加一滴镜油，然后拨动回转板对换高倍镜和油镜，使油镜头尖端和油接触，而后向接目镜观察。假如不清晰，可稍微转动调节器，但切记不要用粗调节器。

(3) 用过油镜后，必须用擦镜纸或软绸将载玻片和油镜所粘着的油拭净。必要时，可略蘸二甲苯少许，揩拭镜头，最后用擦镜纸或软绸擦干。

4. 显微镜的保护法

(1) 显微镜应放置在干燥的地方，使用时须避免强烈的日光照射。

(2) 接物镜或接目镜不清洁时，应当用擦镜纸或软绸揩擦。

(3) 用完显微镜后，应当立即放到镜匣中。

(三) 目测微尺和物测微尺及其使用的方法

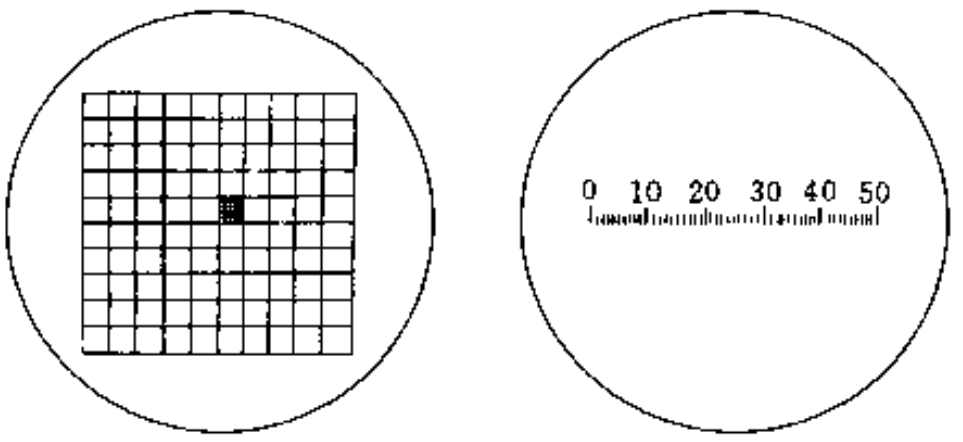


图 8-3 目测微尺

1. 目测微尺 目测微尺是一圆形玻片，其中央刻有精确的刻度（图 8-3）。刻度的大小，随使用的接目镜和接物镜放大的倍数以及镜筒的长度而改变。使用前，应先利用物测微尺进行标定。

2. 物测微尺 物测微尺系一厚玻片，中央有一圆形盖玻片（图 8-4）。上有 100 等分刻度，每等分的长度为 1/100mm，即 10μm。使用时，先将目测微尺装入接目镜的隔板上，使刻度朝下；把物测微尺放在载物台上，使刻度朝上，用平常观察标本的方法，先找得物测微尺的刻度，再移动物测微尺与目测微尺使两者的第一线相合，然后计算物测微尺的每一小格内有目测微尺的小格若干个，于是计算后者刻度所表示的长度。如物测微尺的一小格相当于 5 个目测微尺的小格，则目测微尺在此种条件下，其每格的长度即等于 10/5 或 2μm。如在同样条件下测量物体，而物体之长适为目测微尺的两小格，宽为半小格，则可知此物体的大小为 1μm×4μm。

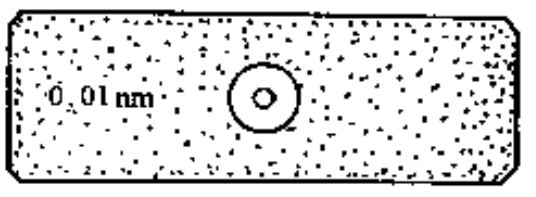


图 8-4 物测微尺

(四) 活性污泥和生物膜的观察

活性污泥法曝气池中的活性污泥和生物膜法构筑物中的生物膜是生物法处理废水的工

作主体。它们是由细菌、霉菌、酵母菌、放线菌、原生动物等微生物，以及后生动物如轮虫、线虫等与废水中的固体物质所组成。本实验主要是观察活性污泥和生物膜的结构及菌胶团的形状和辨认活性污泥与生物膜的组成之一——原生动物的形态特征和运动方式等。

1. 标本的制备

(1) 活性污泥

1) 取活性污泥法曝气池混合液一小滴，放在洁净的载玻片的中央（如混合液中污泥较少，可待其沉淀后，取沉淀污泥一小滴加到载玻片上；如混合液中污泥较多，则应稀释后进行观察）。

2) 小心地用洗净的盖玻片覆盖。这样，就制成了活性污泥的标本。加盖玻片时应使其中央已接触到水滴后才放下，否则会在片内形成气泡，影响观察。

(2) 生物膜

1) 从生物膜法的构筑物内刮取生物膜一小块，用蒸馏水稀释，制成供显微镜观察用的菌液。对于用石子作滤料的生物滤池，也可取石子一小块，置于冲洗干净的烧杯中，加蒸馏水少许和干净的玻璃珠，摇荡数分钟，使滤料上的生物膜脱落在水中，去掉滤料，再摇荡数分钟，做成菌液（如太浓、不易在显微镜下观察，可进行稀释）。

2) 取菌液一小滴，置于洁净载玻片的中央，用洗净的盖玻片覆盖（注意不要有气泡）以备显微镜观察之用。

2. 显微镜观察

(1) 低倍镜观察

1) 在选定的接目镜下，利用低倍镜，确定目测微尺一格的长度（单位以 μm 计）。

2) 观察所制备的微生物标本玻片，画出所见原生动物、菌胶团等微生物的形态草图。选择一个原生动物，量出其尺寸。

3) 记下观察所用接目镜和接物镜的放大倍数和算出显微镜的放大倍数。

(2) 高倍镜观察

1) 改用高倍镜观察，画出微生物的形态草图，并与用低倍镜所看到的比较，注意其不同点。

2) 记下显微镜的放大倍数。

四、思考题

1. 使用显微镜时，哪些地方须特别注意？

2. 使用低倍镜时，显微镜的放大倍数一般最大可达多少？使用高倍镜时显微镜的放大倍数是怎样呢？在什么时候才需要使用油镜？

3. 为什么目测微尺必须用物测微尺标定？在某一放大倍数下，标定了目测微尺，如果放大倍数改变，它还需重新标定否？

实验二　微型动物的计数

一、目的

测定活性污泥法曝气池混合液中微型动物的数目。

二、实验器材

1. 活性污泥法曝气池混合液。

2. 显微镜、小量筒、滴管等。

3. 计数板　如果没有微型动物计数的计数板（微型动物，即使是原生动物，也比细菌大得多，一般的细菌或血球计数板都不适用），则可按照上海织袜四厂和上海师范大学生物系所介绍的微型动物计数板制作方法制备如下：

采用厚质玻璃割成 9cm 长、4cm 宽的长方块，玻璃厚度以 0.3～0.4cm 为宜。利用氢氟酸腐蚀法，使玻板中央刻上 10×10＝100 个小方格，小方格的大小没有严格规定，只要一片大号盖玻片能盖满格子有余和便于在显微镜下计数就可以了。用大号盖玻片切成宽约 0.7cm 的玻条，用阿拉伯树胶粘在计数用的小方格的四周，使呈一圈凸起的边框。这样，总制成了一块微型动物计数板，如图 8-5 所示。

关于氢氟酸腐蚀法划方格的方法是先将玻璃表面涂一层薄而均匀的石蜡，然后用尖针在石蜡层上刻出所要求的方格，再以氢氟酸蒸汽进行重蒸。

三、计数方法及步骤

1. 将活性污泥法曝气池混合液轻轻搅拌均匀；如混合液较浓，则可稀释成 1：1 的液体（稀释方法：取 10mL 量筒一个，加混合液 5mL，再加蒸馏水 5mL，轻轻搅拌均匀，即成1：1 稀释液）。

2. 取洗净的滴管一支（滴管每滴水的体积应预先标定，一般每一滴水的体积约为 1/20mL），吸取摇匀的混合液或已稀释的混合液加一滴到计数板的中央方格内，然后加上一块洁净的大号盖玻片，使玻片的四周正好搁在计数板四周凸起的边框上，侧视如图 8-6 所示。

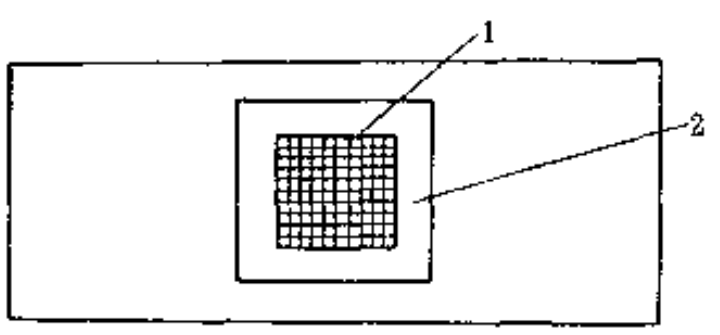


图 8-5　微型动物计数板
1—小方格；2—凸起的边框



图 8-6　微型动物计数板（侧视）
1—盖玻片；2—计数板；3—凸起的边框；4—稀释液

3. 用低倍显微镜进行计数　注意所滴加的液体不一定布满整个 100 格小方格，在显微镜下计数时只要把充有液体的小方格，挨着次序一行行的计算即可。同时，记录各种动物的活动能力、形态结构等。

原生动物中有不少种类是群体，须将群体和群体上的个体分别计数。

4. 计算　设在一滴水中测得钟虫 30 只，则每 mL 混合液中含有钟虫 30×2×20＝1200 只，如测得轮虫 10 只，则每毫升混合液含轮虫 10×2×20＝400 只（如滴管每一滴体积为 1/20mL，所观察的液体是 1：1 稀释的曝气池混合液）。

动物名称	每滴稀释液中的虫数	每毫升混合液中的虫数	状态描述

注：（1）如无计数板，则可用下法进行计数：

1）取洗净的滴管1支（其每一滴水的体积应预先标定）吸取混合均匀的曝气池混合液或已稀释的混合液，滴1滴在载玻片的中央，以盖玻片（以方形为好）轻轻盖好水滴，要避免盖玻片内形成气泡。

2）将标本放在显微镜低倍镜下计数，计数时，先将视野放在盖玻片的右上角（可根据各人的习惯，也可放在另一角），然后移动玻片，视野即可随之从上向下，从右到左通过，当前一个视野数完，并作好记录后，再换第二个视野，如此往复将整个盖玻片下面的动物全部计数完毕，注意在调换视野时，不可使相邻的视野重叠或遗漏。然后换算成1mL混合液中的动物数。

3）生物滤池和生物转盘上的生物膜形成胶状，浓度大，一般都须稀释后计数，其适当的稀释比可在实践中摸索。

4）上述计数方法主要仅适用于原生动物和轮虫，对个体较大的微型动物和线虫等，则须加大计数容量，以免造成误差。

（2）为了避免微生物游动而影响计数，可用接种环加一环氯化汞（$HgCl_2$）饱和溶液以杀死微生物。

实验三　细菌、霉菌、酵母菌、放线菌形态的观察

一、目的

1. 进一步掌握显微镜的使用方法。

2. 观察几个典型细菌的形态（示范片）。

3. 观察几个典型细菌的构造（示范片）。

4. 观察霉菌、酵母菌、放线菌的形态和构造，以便找出它们之间及与细菌之间的区别点。

二、实验器材

1. 显微镜、擦镜纸、镜油（香柏油）、二甲苯等。

2. 示范片

（1）金黄色葡萄球菌、肺炎双球菌、四联球菌、尿八联球菌、链球菌、球衣细菌、大肠杆菌、霍乱弧菌等。

（2）枯草杆菌芽孢、假单孢杆菌鞭毛、固氮菌荚膜等。

（3）酵母菌、霉菌、放线菌。

三、实验内容和方法

1. 复习显微镜的使用方法，重点放在油镜的使用部分。

2. 严格按照显微镜的使用方法，依次逐个观察细菌的形态、构造及酵母菌、霉菌、放线菌的形态。分别绘出其形态、构造图。

实验四　微生物的染色

一、目的

学习微生物涂片染色的操作技术，掌握微生物的普通染色法（单染色法）和革兰氏染色法。

二、实验器材

1. 菌种（由实验室提供）。

2. 显微镜、载玻片、接种环、酒精灯等。

3. 染料

（1）单染色染色剂

1）美蓝染色液

甲液	美蓝	0.3g
	95%酒精	30mL
乙液	氢氧化钾（KOH）	0.01g
	蒸馏水	100mL

分别配制溶液甲及乙，配好后混合即可。

2）石炭酸品红染色液

甲液	碱性品红	0.3g
	95%酒精	10mL
乙液	石炭酸	5g
	蒸馏水	95mL

将碱性品红在研钵中研磨后，逐渐加入95%的酒精，继续研磨使之溶解，配成甲液。

将石炭酸溶解于水中配成乙液。混合甲、乙两液即成所谓原液。使用时可将此原液稀释5～10倍，稀释液易变质失效。一次不宜多配。

此外，也可用医用龙胆紫（俗称紫药水），经滤纸过滤杂质后，用水冲淡一倍，作为染色剂。

（2）革兰氏染色剂

1）草酸铵结晶紫染色液

甲液	结晶紫	2.5g
	95%酒精	25mL
乙液	草酸铵	1g
	蒸馏水	100mL

混合甲、乙两液即成。

2）碘液

碘	1g
碘化钾	2g
蒸馏水	300mL

先将碘化钾溶解在一小部分水中，再将碘溶解在碘化钾溶液中，然后加入其余的水即成。

3）沙黄染色液

沙黄（蕃红）	2.5g
95%酒精	100mL

取上述配好的沙黄酒精溶液 10mL 与 90mL 蒸馏水混匀，即成沙黄稀释液，作革兰氏染色用。

三、操作方法及步骤

（一）单染色

1. 涂片　在洁净的载玻片上先作一记号，以免弄错正反面，于是在其中央滴 1 滴无菌水或生理盐水（0.85%NaCl），用烧灼冷却过的接种环取少量菌体至玻片水滴中，和匀后涂成薄片，片面积不宜过大。对于活性污泥，可用滴管取其 1 滴，置于玻片上铺成一薄层即可。图 8-7 说明从试管中采取菌体制备涂片的无菌操作过程。接种环用后必须再度烧灼灭菌。

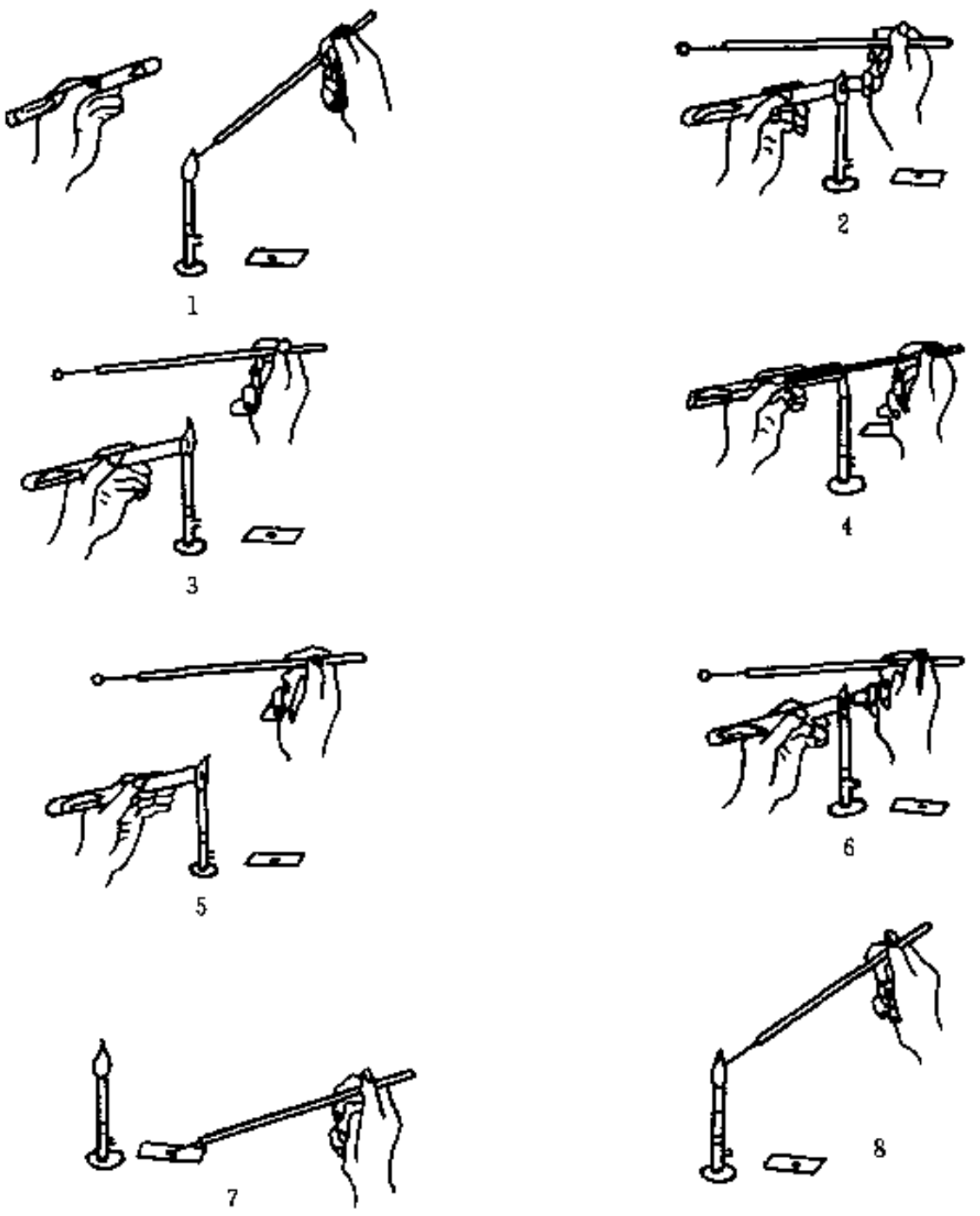


图 8-7　无菌操作过程

1—烧灼接种环；2—拔去棉塞；3—烘烤试管口；4—挑取小量菌体；5—再烘烤试管口；6—将棉塞塞好；7—做涂片；8—烧去残留的菌体

2. 干燥　在空气中自然干燥，使菌体的位置不再移动（也可将玻片置酒精灯火焰高处稍稍加热以干燥之，涂抹面应向上）。

3. 固定　于酒精灯火焰中通过 3～4 次（以玻片与手接触面感到稍微烫手为度），使菌体固定于玻片上而不易脱落。固定也可使标本容易着色。

4. 染色　放标本于水平位置，在上面滴加美蓝或石炭酸品红染色液。染色时间长短，随不同染色液而定（美蓝约染 3～5min，石炭酸品红约 1～2min）。

5. 水洗　染色达到需要的时间后，倾去染色液，并以水冲洗，至冲下的水无色时为止，注意使水柱由玻片上端流下，避免直接冲在涂片处。

6. 吸干　在空气中自然干燥，或用吸水纸吸干后，用油镜观察。

（二）革兰氏染色

1. 将实验所供菌种按单染色法作涂片、干燥并固定。

2. 在涂面上，加草酸铵结晶紫染色液一滴约 1min 后，水洗。

3. 加碘液 1min 后，水洗。

4. 斜置载玻片于一烧杯之上，滴加 95%酒精脱色，并轻轻摇动玻片，至流出的酒精不现紫色时立即停止滴加（约滴加 0.5～1min），随即水洗。为了节约酒精，也可将酒精滴至涂片上，静置 0.5～1min 后水洗。酒精脱色程度必须严加掌握。如脱色过度，则阳性菌会被误染为阴性菌，而脱色不够时，阴性菌将被误染为阳性菌。

5. 加沙黄复染液 0.5min，水洗。

6. 吸干，置于油镜下观察，阳性者为紫色，阴性者为红色。

四、思考题

1. 微生物的染色原理是什么？

2. 你用单染法染色后看到的微生物是什么颜色？什么形状？画出所观察到的微生物的草图。

3. 你用革兰氏染色法染色后看到的细菌是什么颜色，属于革兰氏阴性还是阳性？革兰氏染色法在微生物学中有何重要意义？

4. 革兰氏染色法中若只做 1～4 的步骤而不用沙黄复染液复染，是否能分出革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌，为什么？

5. 微生物经固定后，是死了呢还是仍活着？

实验五　培养基的制备及灭菌

本次实验可为下次实验作准备。实验内容主要包括玻璃器皿的洗刷、包装和培养基的制备以及灭菌技术等。在作微生物学实验时，所用培养基及玻璃器皿等均须进行灭菌。

一、目的

1. 学会玻璃器皿的洗涤和灭菌前的准备工作。

2. 掌握培养基配制和无菌水制备的方法。

3. 学会高压蒸汽灭菌技术。

二、实验器材

1. 培养皿（又称平皿，直径 90mm）、试管、吸管、锥形瓶、烧杯等。

2. 纱布、棉花、报纸、牛皮纸。

3. pH 试纸 6～8.4（或 pH 电位计或氢离子浓度比色计）、洗液、10%HCl、10%NaOH。

4. 牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、琼脂、蒸馏水。

5. 高压蒸气灭菌器、烘箱、冰箱、电炉等。

三、实验内容

（一）玻璃器皿的洗刷与包装

1. 洗刷　玻璃器皿在使用前必须洗刷干净。培养皿、试管、锥形瓶等可先用去污粉或肥皂洗刷，然后用自来水冲洗。吸管则先用洗液浸泡，再用水冲洗。洗刷干净的玻璃器皿应放在烘箱中烘干。

2. 包装

（1）培养皿由一底一盖组成一套，按实验所需的套数一起用牛皮纸包装。

（2）吸管应在吸端用铁丝塞入少许棉花，构成 1～1.5cm 长的棉塞，以防止细菌吸入口中，并避免将口中细菌吹入管内。棉花要塞得松紧适宜，吸时既能通气，又不致使棉花滑入管内。将塞好棉花的吸管的尖端，放在 4～5cm 宽的长纸条的一端，吸管与纸条约成 45° 交角，折叠包装纸包住尖端（图 8-8），用左手将吸管压紧，在桌面上向前搓转，纸条即螺旋式地包在管子外面，余下纸头折叠打结，按照实验需要，可单支包装或多支包装，以备灭菌。

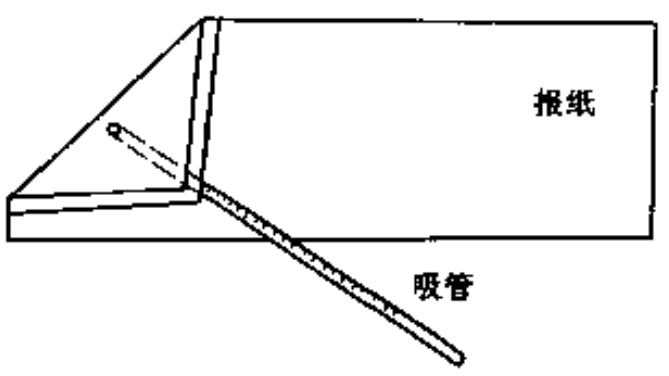


图 8-8　吸管的包扎

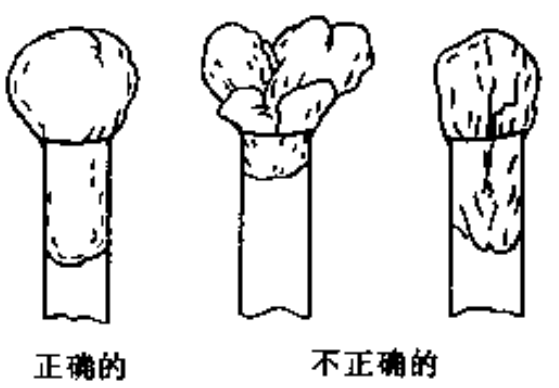


图 8-9　棉塞

培养皿和吸管也有放在特制容器内进行灭菌的。

（3）试管和锥形瓶等的管口或瓶口均需用棉花塞堵塞。

做好的棉塞，四周应紧贴管壁和瓶口，不留缝隙，以防空气中微生物会沿棉塞皱折浸入。棉塞不宜过松或过紧，以手提棉塞，管、瓶不掉下为准。棉塞的 2/3 应在管内或瓶口内，上端露出少许，以便拔塞。棉塞的大小及形状应如图 8-9 所示。在制作培养基的过程中，如不慎将棉塞沾上培养基时，应用清洁棉花重做。

待灭菌的试管和瓶子的口都要用牛皮纸包裹，并用线绳捆扎后存放在铁丝篓内（用纸包裹是为了避免灭菌时冷凝水淋湿棉塞），以备灭菌。

（二）培养基的制备

1. 步骤

（1）配制溶液　按培养基的配方，称取各种原料。取适量的烧杯盛所需水量，依次将各种原料加入、溶解。难溶的原料如蛋白胨、肉膏、琼脂等需加热溶解，这时，当原料全部溶解后应加水补充因蒸发损失的水量。加热时应不断搅拌以防原料在杯底烧焦。

(2) 调整 pH 值　用 pH 试纸（或 pH 电位计或氢离子浓度比色计）测定培养基溶液的 pH 值。按要求以 10%HCl 或 10%NaOH 调整至所需的 pH 值。

(3) 过滤　用纱布、滤纸或棉花过滤均可。如培养基内杂质很少，可省略过滤。

(4) 分装　将培养基分装在试管和锥形瓶内。要使培养基直接流入管内或瓶内，注意防止沾污上段管壁或瓶壁，并避免浸湿棉塞。

装入试管或锥形瓶的培养基量，视试管或瓶子的大小及需要而定。一般制备斜面培养基时，每支试管装入的量约为试管高度的 1/4～1/3。

(5) 斜面培养基的制作　将装含有琼脂的培养基的试管经灭菌后，趁热搁置在木条或木棒上，使试管呈适当的斜度（切勿倾斜过小，以免培养基沾污棉塞）。待培养基凝固后，即成斜面（图 7-3）。

2. 营养琼脂培养基（肉膏、蛋白胨、琼脂培养基）营养琼脂培养基是一种固体培养基，本实验制备后可供活性污泥纯种分离和细菌总数测定之用。

(1) 成分

蛋白胨	2.5g
牛肉膏	0.75g
氯化钠	1.25g
琼　脂	2.5～5g
蒸馏水	250mL

(2) 制法

1) 将上列成分混合后，煮沸至琼脂完全溶解。在加热过程中，应不断搅拌。

2) 用蒸馏水补充因蒸发而损失的水量。

3) 调整溶液的 pH 值为 7.4～7.6。

4) 乘热用纱布或脱脂棉过滤（最好用保温漏斗），并分装于试管中，每管约装 10～15mL。如装在锥形瓶中，则 250mL 的锥形瓶，以装 100mL 左右为宜。管口或瓶口均以棉花塞住。

5) 置高压蒸汽灭菌器中，以 121℃（1kg/cm^2）灭菌 20min，然后贮存于冷暗处备用。

(三) 无菌水的制备

在试管或瓶内先盛以适量的自来水（不用蒸馏水，管口或瓶口用塞子塞好，并用牛皮纸扎紧），使其灭菌后，其水量恰为 9mL（用管）或 99mL（用瓶）。此种适量的水体积可在灭菌器内由实验求得。也可以先将管或瓶灭菌，再用灭菌的吸管（所谓无菌吸管）取灭菌的自来水 9mL 或 99mL 加入管或瓶中。无菌水常用来稀释水样。

(四) 高压蒸汽灭菌

上面所准备好的一切玻璃器皿、培养基等均需进行灭菌。本实验用高压蒸汽灭菌器灭菌，其操作和注意事项如下：

1. 加水　热源为煤气灯或电炉者，需先加水至器内底层隔板以下 1/3 处。有加水口的，水由加水口加入，由玻璃管看水位至止水线即停止加水。若热源为蒸汽，则不必加水。

2. 把需要灭菌的器物放入灭菌器内，关严灭菌器盖，勿使漏气。

3. 打开出气口。

4. 点火。如热源为蒸汽，则应慢慢打开蒸汽进口，不要让蒸汽过猛地冲入灭菌器内。

5. 器内水沸腾以后，蒸汽逐渐驱除器内原有的冷空气。如灭菌器装有温度计，当指针指到读数100℃时，证明器内已经充满蒸汽，可以关闭出气口。如没有温度计，则当出气口排出的蒸汽相当猛烈时，可以认为灭菌器内冷空气已经全部被蒸汽驱尽，可以关闭出气口，这一点应特别注意，因为如果冷空气没有排尽，器内虽然达到了一定的压力，但并不会达到相应所需的温度。

6. 关闭出气口后，器内蒸汽将不断增多，压力和温度随着升高。当蒸汽压达到所需的压力时，即为灭菌开始时间，这时要调节火力大小，以维持所需的压力。灭菌时间的长短由灭菌物品决定。玻璃器皿、无菌水、营养琼脂培养基可用1kg/cm²（121℃）的压力灭菌20min，含糖的培养基用0.7kg/cm²（115℃）的压力20min。

7. 灭菌时间到达后，停止加热。

8. 待压力计指针降到“0”时，打开出气口。如过早打开，管内和瓶内的培养基会因压力骤降，而温度并不同时很快下降，以致培养基翻腾，沾污棉塞。

9. 揭开器盖，取出灭菌的物品，将器内剩余的水放掉。

10. 待已灭菌的物品冷却后，置阴凉处。

本实验，除学习培养基制备和高压灭菌法外，还要为下次实验作好准备。所以所用培养皿、吸管、试管、锥形瓶、烧杯等玻璃器皿以及无菌水、培养基等的量均须根据下次实验所需准备。

四、思考题

1. 培养基是根据什么原理配制的？营养琼脂培养基中的成分各起什么作用？

2. 为什么湿热灭菌比干热灭菌优越？

实验六　微生物纯种分离、培养及接种技术

本实验的对象是活性污泥的纯种分离和培养。通常，在处理不同水质的废水时，起作用的微生物群和种类也不同。我们除可用显微镜直接观察微生物形态，大致了解其中的微生物种群外，更重要的还必须研究是哪些种类的微生物对该种废水起生物氧化作用、其作用原理是什么、产生什么产物等等，以便提高处理效果。此外，有时我们还需从土壤环境中分离和培养纯菌种来处理工业废水。因此，为了从事以上这些研究工作，就必须学习微生物纯种分离、培养及接种的技术，进而再学会做微生物生理生化反应的实验，为废水处理服务。在给水处理的细菌检查中，细菌的分离、培养和接种也是一个重要环节。

微生物纯种分离的方法，已在第七章第二节中提到，有两种：稀释平板法和平板划线法。在本实验中仍要学习这两种方法。

一、实验器材

1. 无菌培养皿（直径90mm）、无菌吸管、无菌锥形瓶、无菌试管、5管无菌水（每管有9mL灭菌过的自来水）。

2. 营养琼脂培养基（已灭菌的）、活性污泥。

3. 接种环、酒精灯（或煤气灯）、恒温箱（培养箱）等。

以上器材，除活性污泥、接种环、恒温箱等外，均在实验五中准备好。

二、操作方法及步骤

（一）活性污泥的纯种分离与培养

1. 稀释平板分离

（1）取样　从活性污泥法曝气池中取活性污泥若干．于无菌试管、无菌锥形瓶或无菌烧杯中（须取用有代表性的样品）。

（2）稀释水样

1）将5支装有9mL无菌水的试管以0.1、0.01、0.001、0.0001、0.00001（或10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}）依次编号。

2）以无菌操作．用1mL的无菌吸管吸取1mL活性污泥于第一管无菌水中．将吸管吸洗3次，摇匀．即为稀释10倍的菌液。再从此0.1浓度的菌液中吸取1mL于第二管中．将吸管吸洗3次．摇匀．即为稀释100倍的菌液．以同样方法．依次类推．分别得到稀释10^{3}倍、10^{4}倍及10^{5}倍的菌液．所得菌液分别为0.1、0.01、0.001、0.0001及0.00001（即10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}及10^{-5}）等浓度。稀释过程可参阅图7-6。

（3）平板的制作

1）将无菌培养皿编号为0.1、0.01、……0.00001（10^{-1}、10^{-2}……10^{-5}）。

2）另取一支1mL的无菌吸管从浓度小的10^{-5}的菌液开始，依次分别取0.5mL菌液于相应编号的培养皿内（每个浓度做3个平板）。每次吸取时，吸管都应在菌液中反复吸洗几次。

3）在稀释菌液的同时，就要将营养琼脂培养基加热融化，待融化的培养基冷到40～50℃左右（温度不可过高，否则微生物容易被烫死；温度过低，培养基容易凝固，平板不平）时，倾注10～15mL入上述盛有菌液的培养皿内（每一培养皿内应加入的培养基量须根据皿的大小决定，以能使培养皿底部铺满培养基而形成厚约2～3mm的薄层为适当，在直径为90mm的培养皿内注入10～15mL，可满足此要求），如图7-2所示。在倾注前，应先将盛有培养基的管子的管口或瓶子的瓶口在火焰上微烧一周。培养基倾入后迅速盖上皿盖，平放桌上，轻轻转动，使培养基和稀释菌液充分混合均匀．冷却后，即成平板。将培养皿倒置于30℃的恒温箱中培养24h，观察有无菌落长出。培养皿所以要倒置是为了防止培养基内水分蒸发到皿盖上而使培养基变干。

2. 平板划线分离。

（1）取样　同前。

（2）制备平板培养基　将融化的营养琼脂培养基以无菌操作倒入无菌的空培养皿内（操作方法同前，但培养皿内未注入菌液）。加盖，在平桌上转动，凝固后即成所需的平板。

（3）划线　以无菌操作，右手持经烧灼灭菌冷却的接种环从装有活性污泥的器皿中取一环活性污泥。同时左手持培养皿，以中指、无名指和小指托住皿底，拇指和食指夹住皿盖稍倾斜，左手拇指和食指将皿盖掀起一些，右手把接种环伸入培养皿，将一环活性污泥在平板表面轻轻地划线（千万不要戳破培养基平板），可作平行划线、扇形划线，或其它连续划线，如图7-4所示。划线后，将皿盖盖好。倒置培养皿于30℃恒温箱内培养24h，则平板上即长出菌落。接种环用过后即再烧灼灭菌。

（二）其它一些接种的操作技术

微生物的接种方法，除前面所提到的外，随着所用的培养基、实验目的等的不同，还

有好几种，但是它们的基本操作都是类似的，并且都要严格注意无菌操作。

1. 斜面接种技术　这是将微生物从一个斜面培养基（或平板培养基）上接种到另一个斜面培养基上的方法，见图8-10。斜面培养基可用小试管（15mm×150mm）制备，每管约装3～5mL（1/4～1/3试管高度），见图7-3。

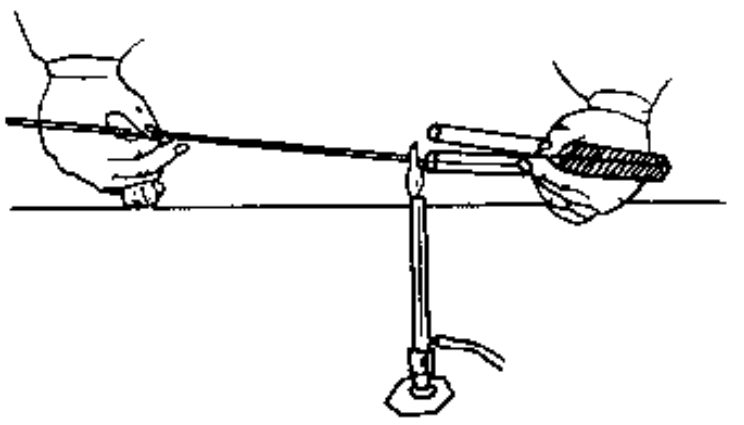


图 8-10　斜面接种

（1）将试管贴上标签、注明菌名、接种日期等。

（2）将培养好的菌种和斜面培养基的两支试管用大拇指和其它4指握在左手中，使中指位于两试管之间的部分。斜面向上，管口齐平，并使它们位于水平位置。

（3）将棉塞用右手拧转松动，以利接种时拔出。

（4）右手拿接种环，在火焰上将环烧灼灭菌，环上凡是在接种时可能进入试管的部分都应用火烧灼。

（5）在火焰旁，用右手拔掉棉塞。

（6）以火焰微烧试管口一周，烧灼时应不断地转动管口，使管口上可能沾污的少量菌或带菌尘埃得以烧去。

（7）将烧过的接种环伸入菌种管内，先将环接触没有长菌的培养基部分（如斜面的顶端），使其冷却，以免烫死被接种的菌种。然后轻轻挑取少许菌种，抽出接种环并迅速将接种环伸进另一试管，在培养基上轻轻划线（由底部向顶部划线）。

（8）接种完后，将接种环取出，将试管塞好棉塞。

2. 液体接种　这是由斜面培养基（或平板培养基）接种到液体培养基中的方法。

（1）操作方法与前同，试管可略向上斜，以免培养基流出。

（2）将取有菌种的接种环送入液体培养基时，可使环在液体表面与管壁接触的部分轻轻摩擦，接种后，塞上棉塞。将试管在手掌内轻轻转动，使菌体在培养基中均匀分散。

3. 由液体培养基接种液体培养基　接种用具常用无菌吸管或无菌滴管。无菌操作注意事项与前同，吸管或滴管要预先经干热或湿热法灭菌，不能在火焰上烧灼。具体操作较简单，只要用无菌吸管或滴管从有菌的试管吸取一定量的培养液到另一管液体培养基中，塞好棉塞即可。

4. 穿刺接种　这是由斜面菌种接种到固体深层培养基的方法。培养基可装于大试管（20mm×220mm）内，每管约装12～15mL。

（1）如前斜面接种操作，但用接种针（必须很挺直）取出少许菌种。

（2）用左手斜握盛有固体深层培养基的试管，用右手将接种针移入培养基，自中心刺入，直到接近管底，但不要穿透。然后沿穿刺途径慢慢将针拔出。这样，接种线整齐，易于观察。

将以上分离、接种的培养物置于恒温箱中在一定温度下培养一定时间后观察结果。

接种环和接种针用毕后均应再烧灼灭菌。

微生物的分离、培养、接种等操作，前已述及，最好在经紫外线灭菌的无菌室内或无菌箱内进行，要严格注意无菌操作。在没有无菌室或无菌箱的情况下，实验精度又要求不

高时，则可在一般的实验室内进行，但必须特别注意无菌操作。

三、思考题

1. 分离活性污泥为什么要稀释水样？你考虑怎样来进行生物膜法生物膜的纯种分离和培养？

2. 用一根无菌吸管取几种浓度的水样时，应从哪一个浓度开始？为什么？

实验七　纯培养菌种的菌体、菌落形态观察

本实验是将实验六中从活性污泥分离出来的几种微生物为材料，进行菌体形态、菌落形态特征的观察，并通过革兰氏染色，以了解活性污泥中大体由哪些类群的微生物所组成。

一、实验器材

1. 显微镜、载玻片、接种环、酒精灯（或煤气灯）、恒温箱等。

2. 革兰氏染色液全套。

3. 实验六培养出来的各种菌种。

二、实验内容和方法

1. 接种斜面培养基　将前一天从活性污泥分离培养出来的几种不同形态特征的菌落在无菌操作条件下，用接种环分别挑取少许菌种接种到各个斜面培养基上，塞好棉塞，放在试管架上，置于 30℃恒温箱中培养 36h 后，进行观察。

2. 菌落形态特征的观察　由于微生物个体的表面结构、分裂方式、运动能力、生理特性以及产生色素的能力等各不相同，因而个体在固体培养基上的情况各有特点。按照微生物在固体培养基上形成的菌落的特征，可粗略地辨别是何种类型的微生物。应注意菌落的形态、结构、大小、菌落高度、颜色、透明度、气味及粘滞性等。一般来说，细菌和酵母菌的菌落比较光滑湿润，用接种环容易将菌体挑起。放线菌的菌落硬度较大，干燥致密，且与基质紧密结合，不易被针或环挑起。霉菌菌落常长成绒状或棉絮状。

如果要鉴定菌种，则对微生物在斜面培养基上及液体培养基中生长的特征都应比较详细地观察。在斜面培养基上观察菌落生长旺盛程度、形状、颜色及光泽等。在液体培养基中则观察浑浊度、有无沉淀、液体表面生膜与否、膜的形状等。在穿刺接种时则观察菌落在基质表面的情况、菌落的延伸情况以及是否液化培养基和液化的情况等。观察时绘出菌落形态特征图。

本实验只学习观察一般微生物菌落形态特征，不作菌种鉴定。所以，只做琼脂平板和琼脂斜面的观察，并同时结合微生物个体形态观察，以达到了解和熟悉几种微生物的菌落形态和个体形态特征。

3. 微生物个体形态观察　在观察了已培养好的各种微生物菌落形态以后，用革兰氏染色法染色，进行显微镜油镜的观察，并绘制形态图。

三、思考题

你从活性污泥中分离出几种微生物？其菌落形态和个体形态是怎样的？革兰氏染色呈什么反应？

实验八　微生物的生理生化特性

微生物的代谢与呼吸，主要依赖于酶的活动。各种微生物具有不同的酶类，因此，它们对某些含碳化合物及含氮化合物的分解利用情况不同，代谢产物也有所不同。所以，我们可以利用各种微生物生理生化反应的特点来作为鉴别它们的一种依据。本实验以大肠菌群为例子。

一、实验目的

在水处理工程中，水源水要经过处理后才能供给用户。饮用水要求清澈、无色、无臭，更重要的是没有病原菌。因此，自来水在出厂以前要作水质的物理化学分析和细菌检验。本实验结合给水净化工程中的细菌检验，作细菌总数和大肠菌群的测定。通过大肠菌群的测定，了解大肠杆菌的生理生化特性。

大肠菌群数系指每升水样中所含有的大肠菌群的数目。大肠菌数一般包括大肠埃希氏杆菌、产气杆菌、枸橼酸盐杆菌和副大肠杆菌。本实验的发酵试验采用含有乳糖的培养基，故测定结果不包括副大肠杆菌。

细菌总数是指 1mL 水样在营养琼脂培养基中，于 37℃经 24h 培养后，所生长的细菌菌落的总数（实际上所表示的是腐生细菌的数目。腐生细菌在营养琼脂培养基上所形成的菌落呈白色细点状）。

我国现行生活饮用水卫生标准 GB5749—85 规定：细菌总数 1mL 水中不得超过 100 个，大肠菌群 1L 水中不得超过 3 个。

二、实验用具

1. 水样瓶　任何具有玻璃塞、质量良好的玻璃瓶都可用。

2. 吸管、试管、锥形瓶等。

3. 稀释瓶　稀释水样所用的玻璃瓶最好为瘦长形，并具有严密的玻璃塞，其容量要比实际用的水量大二倍，有时可在普通试管上加塞，作为稀释管。瓶口或管端须以纸或纱布包好扎紧。

4. 培养皿（平皿）　一般采用直径 90mm，高 15mm 的。

5. 发酵管和发酵瓶(图 8-11)　发酵管有大小之别，小发酵管可用 15mm×150mm 的试管，大发酵管和发酵瓶须有 200mL 以上的容量。管和瓶内都须装倒置的小试管（直径一般 5～10mm，长 20～40mm，小发酵管取用较小的小试管，大发酵管和发酵瓶取用较大的小试管），这种小试管常称为倒管，用以聚集气体。

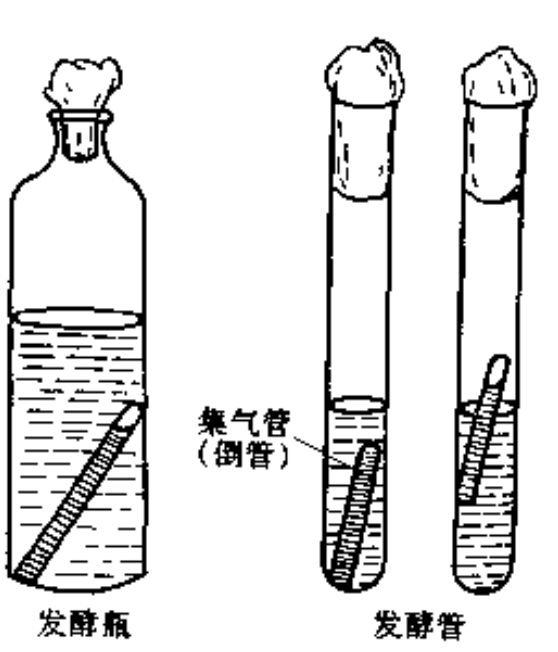


图 8-11　发酵瓶和发酵管

6. 接种环。

7. 细菌滤器。

8. 滤膜。

9. 高压蒸汽灭菌器。

10. 恒温箱（培养箱）。

11. 电冰箱。

12. 显微镜。

13. 镜油（香柏油）、二甲苯、擦镜纸等。

14. 普通放大镜　能放大五倍以上。

15. pH 电位计（或氢离子浓度比色计或 pH 精密试纸）。

以上是一些主要的实验用具。测定细菌总数时需要 1、2、3、4、9、10、11、14、15 等用具；发酵法检验大肠菌群时需要 1、2、3、4、5、6、9、10、11、12、13、15 等用具；滤膜法检验大肠菌群则基本上需要上述全部用具。

三、培养基及染色试剂

本实验所需培养基及染色试剂有如下几种：

营养琼脂培养基	供细菌总数测定用
乳糖蛋白胨培养基	供大肠菌群检验“发酵法”用
浓乳糖蛋白胨培养基	同上
品红亚硫酸钠培养基（甲）	同上
品红亚硫酸钠培养基（乙）	供大肠菌群检验“滤膜法”用
伊红美蓝培养基	供大肠菌群检验“发酵法”用
乳糖蛋白胨半固体培养基	供大肠菌群检验“滤膜法”用
革兰氏染色剂	供大肠菌群检验用

上述各种培养基及染色剂的成分与配制方法如下：

（一）营养琼脂培养基

成分及制法见实验五。

（二）乳糖蛋白胨培养基

1. 成分

蛋白胨	10g
牛肉膏	3g
乳糖	5g
氯化钠	5g
1.6%溴甲酚紫乙醇溶液	1mL
蒸馏水	1000mL

2. 制法

（1）将蛋白胨、牛肉膏、乳糖及氯化钠加热溶解于 1000mL 蒸馏水中，调整 pH 为 7.2～7.4。

（2）加入 1.6%溴甲酚紫乙醇溶液 1mL，充分混匀，分装于小发酵管（内有倒管）中，每管装 10mL。

（3）置高压蒸汽灭菌器中，以 115℃（0.7kg/cm²）灭菌 20min。

（4）贮存于冷暗处备用。

（三）浓乳糖蛋白胨培养基

按上述“乳糖蛋白胨培养基”浓缩 3 倍配制。分装于发酵瓶或发酵管（内有倒管）中。每个发酵瓶或大发酵管装 50mL，每个小发酵管装 5mL。

（四）品红亚硫酸钠培养基（甲）

1. 成分

蛋白胨	10g
乳糖	10g
磷酸氢二钾	3.5g
琼脂	20～30g
蒸馏水	1000mL
无水亚硫酸钠	5g 左右
5%碱性品红乙醇溶液	20mL

2. 储备培养基的制备

（1）先将琼脂加至 900mL 蒸馏水中，加热溶解，然后加入磷酸氢二钾及蛋白胨，混匀使溶解，再以蒸馏水补足至 1000mL，调整 pH 为 7.2～7.4。

（2）趁热用脱脂棉或纱布过滤（最好用保温漏斗），再加入乳糖，混匀后定量分装于锥形瓶内，置高压蒸汽灭菌器中以 115℃（0.7kg/cm²）灭菌 20min，贮存于冷暗处备用。

3. 平板的制备

（1）将上法制备的储备培养基加热融化。

（2）根据锥形瓶内培养基的量，用无菌吸管按比例吸取一定量的 5%碱性品红乙醇溶液置于无菌空试管中。

（3）根据锥形瓶内培养基的量，按比例称取所需的无水亚硫酸钠置于无菌空试管内，加无菌水少许使其溶解，再置于沸水浴中煮沸 10min 以灭菌。

（4）用无菌吸管吸取已灭菌的亚硫酸钠溶液，滴加于碱性品红乙醇溶液中至深红色褪成淡粉红色为止。

（5）将此亚硫酸钠与碱性品红的混合液全部加于已融化的储备培养基内，并充分混匀（防止产生气泡）。

（6）立即将此种培养基适量倾入已灭菌的培养皿内（90mm 直径的培养皿约需培养基 10～15mL），待其冷却凝固后置冰箱内备用。此种已制成的培养基于冰箱内保存亦不宜超过二周。如培养基已由淡红色变成深红色，则不能再用。

（五）品红亚硫酸钠培养基（乙）

1. 成分

蛋白胨	10g
酵母浸膏	5g
牛肉膏	5g
乳糖	10g
琼脂	20g
磷酸氢二钾	3.5g
无水亚硫酸钠	5g 左右
5%碱性品红乙醇溶液	20mL
蒸馏水	1000mL

2. 培养基及平板的制备方法与“品红亚硫酸钠培养基（甲）”的制备法相同，但须加酵

母浸膏和牛肉膏。

（六）伊红美蓝培养基

1. 成分

蛋白胨	10g
乳糖	10g
磷酸氢二钾	2g
琼脂	20～30g
蒸馏水	1000mL
2%伊红水溶液	20mL
0.5 美蓝水溶液	13mL

2. 储备培养基的制备

（1）先将琼脂加入 900mL 蒸馏水中，加热溶解，然后加入磷酸氢二钾及蛋白胨，混匀使溶解，再以蒸馏水补足至 1000mL，调整 pH 为 7.2～7.4。

（2）趁热用脱脂棉或纱布过滤（最好用保温漏斗），再加入乳糖，混匀后定量分装于锥形瓶中，置高压蒸汽灭菌器内以 115℃（0.7kg/cm²）灭菌 20min。贮存于冷暗处备用。

3. 平板的制备

（1）将上法制备的储备培养基加热融化。

（2）根据锥形瓶内培养基的量，用无菌吸管按比例分别吸取一定量已灭菌的 2%伊红水溶液及一定量已灭菌的 0.5%美蓝水溶液加入已融化的储备培养基内，并充分混匀（防止产生气泡）。

（3）立即将此种培养基适量倾入已灭菌的培养皿内（对于 90mm 直径的培养皿，约需 10～15mL），待其冷却凝固后，置冰箱内备用。

（七）乳糖蛋白胨半固体培养基

1. 成分

蛋白胨	10g
牛肉膏	5g
酵母浸膏	5g
乳糖	10g
琼脂	5g 左右
蒸馏水	1000mL

2. 制法

（1）将上述成分加热溶解于 800mL 蒸馏水中，调整 pH 为 7.2～7.4，再用蒸馏水补充至 1000mL，过滤。

（2）分装于试管中，每管装入的培养基量均为试管容积的 1/3。

（3）在 115℃（0.7kg/cm²）高压蒸汽灭菌器内灭菌 20min，冷却后置于冰箱内保存。此培养基存放不宜过久，以不超过 2 周为宜。

（4）此培养基制成后，需用已知大肠菌群菌株进行鉴定，应在 6～8h 产生明显气泡。

（八）革兰氏染色剂

成分及配制方法见实验四。

四、水样的采集和保存

用于细菌检验之水样较化学分析所用的尤应谨慎采取。所取水样必须要保证其代表性，并在收集和保存时不得有所污染，瓶中水样不应完全装满，以便于检验前能彻底摇匀。采集水样的容器，可用清洁硬质玻璃瓶。容器必须经高压灭菌，保证无菌，并需保证水样在运送、保存过程中不受污染。

如要从河湖或井水中取水，可用特制的采样器。图 8-12 所示的采样器系一金属框，内装有玻璃瓶，器的底部有重量，可随意坠入所需的深度，瓶盖上扎有绳索，拉起绳索即可打开瓶盖，松放绳索，瓶盖即自行盖上。取样前应对玻璃瓶先作灭菌❶处理。采集时将采样器浸入水中，使采样瓶口位于水面下 10～15cm 深处。然后拉开瓶塞，使水进入瓶中。水样采集后，应将水样瓶中水样倒入无菌储样玻璃瓶中，或将水样瓶取出，立即用无菌棉塞塞好瓶口，以备检查。

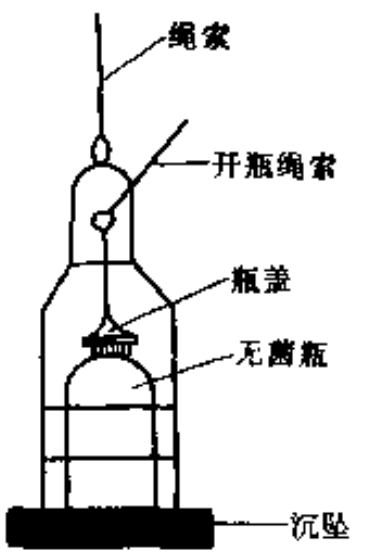


图 8-12　细菌采样器

采取自来水水样时，须先冲洗龙头，再用酒精棉烧灼灭菌，然后放水 5～10min，接着将瓶移上取水。

采取含有余氯的水样时，应在水样瓶未检验前按 500mL 水样加入 1.5%硫代硫酸钠溶液 2mL，以消除氯的作用。

水样采集和分析的间隔时间应尽可能缩短。水样采取与检验相隔时间应在 4h 内。

取样时要将取样日期、温度、水的来源、环境状况、水的用途等注明。

五、实验方法及步骤

（一）大肠菌群的检验

甲、发酵法

发酵法是根据大肠菌群能发酵某些糖类而产酸产气等特性来进行检验的。

1. 生活饮用水

按下列 3 个步骤进行检验：

（1）初步发酵试验　在 2 个各装有已灭菌的 50mL 浓乳糖蛋白胨培养基的发酵瓶或大发酵管（内有倒管）中，以无菌操作各加入水样 100mL；在 10 支装有已灭菌的 5mL 浓乳糖蛋白胨培养基的小发酵管（内有倒管）中，以无菌操作各加入水样 10mL。混匀后置于 37℃恒温箱中培养 24h。观察其产气产酸的情况。

1）如无气体和酸产生，则为阴性反应，表示无大肠菌群存在。

2）如有气体和酸产生，或虽无气体产生，但有酸形成，则为阳性反应，表示此水可能为粪便污染，需作进一步的检验。

3）如有气体形成，但没有产酸，溶液也不浑浊，则操作技术上有问题，须重作检验。

（2）平板分离　用无菌接种环，从前一阶段所需进一步检验的发酵瓶或发酵管中沾取菌液，分别在品红亚硫酸钠培养基（甲）或伊红美蓝培养基上划线。然后将培养皿倒置于 37℃恒温箱内培养 18～24h，记其结果如下：

1）如无细菌增殖现象，可认为是阴性反应，无大肠菌群存在。

---

❶ 经过灭菌的物品和器械统称“无菌”。

2）如仅发现芒状、霉状或其它无关菌属的菌落，则表示无粪便性的污染。

3）如发现有下列特征的菌落，则应取菌落的一小部分进行涂片、革兰氏染色、镜检。如涂片中没有革兰氏阴性的杆菌，则表示无大肠菌群存在；如涂片中有革兰氏阴性无芽孢的杆菌时，则进行复发酵试验。

品红亚硫酸钠培养基上的菌落：

1）紫红色，具有金属光泽的菌落。

2）深红色，不带或略带金属光泽的菌落。

3）淡红，中心色较深的菌落。

伊红美蓝培养基上的菌落：

1）深紫黑色，具有金属光泽的菌落。

2）紫黑色，不带或略带金属光泽的菌落。

3）淡紫红色，中心色较深的菌落。

(3) 复发酵试验　用无菌接种环挑取上述涂片镜检显示革兰氏阴性无芽孢杆菌的菌落的另一部分接种于已灭菌的装有10mL普通浓度乳糖蛋白胨培养基的小发酵管（内有倒管）中，每管可接种分离自同一初发酵管或发酵瓶的最典型的菌落1～3个，然后置于37℃恒温箱中培养24h，有产酸产气者（不论倒管内气体多少皆作为产气论），即证实大肠菌群存在。

根据证实有大肠菌群存在的阳性管数或瓶数，查表8-1，报告每升水样中的大肠菌群数。

大肠菌群检数表（一）　　**表8-1**

10mL水量的阳性管数	100mL水量的阳性管（瓶）数			10mL水量的阳性管数	100mL水量的阳性管（瓶）数		
	0	1	2		0	1	2
	每升水样中大肠菌群数				每升水样中大肠菌群数		
0	<3	4	11	6	22	36	92
1	3	8	18	7	27	43	120
2	7	13	27	8	31	51	161
3	11	18	38	9	36	60	230
4	14	24	52	10	40	69	>230
5	18	30	70				

注：水样总量300mL（2份100mL，10份10mL）。

2. 水源水

(1) 将水样作1∶10稀释。稀释的方法：在用来稀释的试管（稀释管）内先盛以适量的自来水，使其灭菌后，其水量恰为9mL。此种适量的水体积可在灭菌器内由实验求得。

(2) 于各装有5mL 3倍浓缩乳糖蛋白胨培养基的5个试管中（内有倒管），各加入10mL水样；于各装有10mL普通浓度乳糖蛋白胨培养基的5个试管中（内有倒管），各加入1mL水样；于各装有10mL普通浓度乳糖蛋白胨培养基的5个试管中（内有倒管），各加入1mL 1∶10稀释水样，共计15管，3个稀释度。以后的检验步骤同上述生活饮用水的检验方法。

(3) 根据证实有大肠菌群存在的阳性管数查表8-2报告每升水样中的大肠菌群数。

乙、滤膜法

滤膜法是先将水样注入已灭菌的放有滤膜（一种微孔薄膜）的滤器中，抽滤后细菌即被截留在膜上，然后将此滤膜贴于品红亚硫酸钠培养基上，进行培养，并计数与鉴定滤膜上生长的大肠菌群菌落，最后算出每升水样中含有的大肠菌群数。

大肠菌群检数表（二）

表 8 2

（总接种量 55.5mL，其中 5 份 10mL 水样，5 份 1mL 水样，5 份 0.1mL 水样）

接种量 mL			每 100mL 水样中大肠菌群近似数	接种量 mL			每 100mL 水样中大肠菌群近似数
10	1	0.1		10	1	0.1	
0	0	0	0	1	0	0	2
0	0	1	2	1	0	1	4
0	0	2	4	1	0	2	6
0	0	3	5	1	0	3	8
0	0	4	7	1	0	4	10
0	0	5	9	1	0	5	12
0	1	0	2	1	1	0	4
0	1	1	4	1	1	1	6
0	1	2	6	1	1	2	8
0	1	3	7	1	1	3	10
0	1	4	9	1	1	4	12
0	1	5	11	1	1	5	14
0	2	0	4	1	2	0	6
0	2	1	6	1	2	1	8
0	2	2	7	1	2	2	10
0	2	3	9	1	2	3	12
0	2	4	11	1	2	4	15
0	2	5	13	1	2	5	17
0	3	0	6	1	3	0	8
0	3	1	7	1	3	1	10
0	3	2	9	1	3	2	12
0	3	3	11	1	3	3	15
0	3	4	13	1	3	4	17
0	3	5	15	1	3	5	19
0	4	0	8	1	4	0	11
0	4	1	9	1	4	1	13
0	4	2	11	1	4	2	15
0	4	3	13	1	4	3	17
0	4	4	15	1	4	4	19
0	4	5	17	1	4	5	22
0	5	0	9	1	5	0	13
0	5	1	11	1	5	1	15
0	5	2	13	1	5	2	17
0	5	3	15	1	5	3	19
0	5	4	17	1	5	4	22
0	5	5	19	1	5	5	24

续表

接种量 mL			每100mL水样中大肠菌群近似数	接种量 mL			每100mL水样中大肠菌群近似数
10	1	0.1		10	1	0.1	
2	0	0	5	3	0	0	8
2	0	1	7	3	0	1	11
2	0	2	9	3	0	2	13
2	0	3	12	3	0	3	16
2	0	4	14	3	0	4	20
2	0	5	16	3	0	5	23
2	1	0	7	3	1	0	11
2	1	1	9	3	1	1	14
2	1	2	12	3	1	2	17
2	1	3	11	3	1	3	20
2	1	4	17	3	1	4	23
2	1	5	19	3	1	5	27
2	2	0	9	3	2	0	14
2	2	1	12	3	2	1	17
2	2	2	14	3	2	2	20
2	2	3	17	3	2	3	24
2	2	4	19	3	2	4	27
2	2	5	22	3	2	5	31
2	3	0	12	3	3	0	17
2	3	1	12	3	3	1	21
2	3	2	17	3	3	2	24
2	3	3	20	3	3	3	28
2	3	4	22	3	3	4	32
2	3	5	25	3	3	5	36
2	4	0	15	3	4	0	21
2	4	1	17	3	4	1	24
2	4	2	20	3	4	2	28
2	4	3	23	3	4	3	32
2	4	4	25	3	4	4	36
2	4	5	28	3	4	5	40
2	5	0	17	3	5	0	25
2	5	1	20	3	5	1	29
2	5	2	23	3	5	2	32
2	5	3	26	3	5	3	37
2	5	4	29	3	5	4	41
2	5	5	32	3	5	5	45

续表

接种量 mL			每100mL水样中大肠菌群近似数	接种量 mL			每100mL水样中大肠菌群近似数
10	1	0.1		10	1	0.1	
4	0	0	13	5	0	0	23
4	0	1	17	5	0	1	31
4	0	2	21	5	0	2	13
4	0	3	25	5	0	3	58
4	0	4	30	5	0	1	76
1	0	5	36	5	0	5	95
4	1	0	17	5	1	0	33
4	1	1	21	5	1	1	46
4	1	2	26	5	1	2	63
4	1	3	31	5	1	3	84
4	1	4	36	5	1	4	110
4	1	5	42	5	1	5	130
4	2	0	22	5	2	0	49
4	2	1	26	5	2	1	70
4	2	2	32	5	2	2	94
4	2	3	38	5	2	3	120
4	2	4	44	5	2	4	150
4	2	5	50	5	2	5	180
4	3	0	27	5	3	0	79
4	3	1	33	5	3	1	110
4	3	2	39	5	3	2	140
4	3	3	45	5	3	3	180
4	3	4	52	5	3	4	210
4	3	5	59	5	3	5	250
4	4	0	34	5	4	0	130
4	4	1	40	5	4	1	170
4	4	2	47	5	4	2	220
4	4	3	54	5	4	3	280
4	4	4	62	5	4	4	350
4	4	5	69	5	4	5	430
4	5	0	41	5	5	0	240
4	5	1	48	5	5	1	350
4	5	2	56	5	5	2	540
4	5	3	64	5	5	3	920
4	5	4	72	5	5	4	1600
4	5	5	81	5	5	5	>1600

本法特别适用于低浊度水样中大肠菌群数的测定

1. 准备工作

（1）滤膜灭菌　将滤膜放入烧杯中，加入蒸馏水，置于沸水浴中煮沸灭菌 3 次，每次 15min。前二次煮沸后需更换水洗涤 2～3 次，以除去残留溶剂。

（2）滤器灭菌　用点燃的酒精棉球，火焰灭菌。也可用 121℃（1kg/cm²）高压蒸汽灭菌 20min。

2. 过滤水样

（1）用烧灼冷却的镊子夹取灭菌滤膜边缘部分，将粗糙面向上，贴放在已灭菌的滤床上，稳妥地固定好滤器。将 333mL 水样（如水样含菌数较多，可减少过滤水样量）注入滤器中，加盖，打开滤器阀门，在负 0.5 大气压下进行抽滤（一般直径 30mm 左右的滤膜过滤的水量，应按培养后滤膜上长出的菌落不多于 50 个的原则来确定）。

（2）水样滤完后，再抽气约 5s。关上滤器阀门，取下滤器，用灭菌镊子夹取滤膜边缘部分，移放在品红亚硫酸钠培养基（乙）上。滤膜截留细菌的面应向上。滤膜与培养基应完全贴紧，两者间不得留有气泡。然后将培养皿倒置于 37℃恒温箱中培养 22～24h。

3. 观察结果

（1）培养皿经 22～24h 培养后，挑选具有大肠菌群特征的菌落（菌落特征见上述“发酵法”）进行革兰氏染色、镜检。如无革兰氏阴性的杆菌，则可认为该体积水中无大肠菌群存在。当发现有革兰氏阴性无芽孢杆菌时，作下一步检验。

（2）从镜检过的菌落中，取材料再接种至乳糖蛋白胨培养基或穿刺接种至乳糖蛋白胨半固体培养基（接种前应将此培养基放入水浴中煮沸排气冷却凝固后方能使用），经 37℃培养，前者于 24h 产酸产气者，或后者经 6～8h 培养后产气者，则可判定为大肠菌群阳性。乳糖蛋白胨半固体培养基产生气体后，将使其内部形成龟裂状，有时甚至会有部分培养基上浮，见图 8-13。

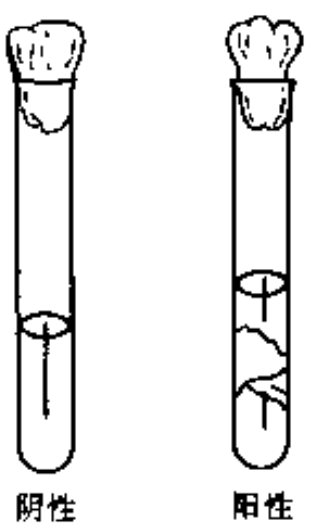


图 8-13　产气作用

（3）将检得的大肠菌群菌落数换算成 1L 水中所含的菌数，即得大肠菌群数。

（二）细菌总数的测定

1. 生活饮用水

（1）以无菌操作方法用灭菌吸管吸取 1mL 充分混匀的水样，注入灭菌平皿中，倾注约 15mL 已融化并冷却到 45℃左右的营养琼脂培养基，并立即旋摇平皿，使水样与培养基充分混匀。每次检验时应作一平行接种，同时另用一个平皿只倾注营养琼脂培养基作为空白对照。

（2）待冷却凝固后，翻转平皿，使底面向上，置于 37℃恒温箱内培养 24h，进行菌落计数，即为水样 1mL 中的细菌总数。

2. 水源水

（1）以无菌操作方法吸取 1mL 充分混匀的水样，注入盛有 9mL 灭菌水的试管中，混匀成 1∶10 的稀释液。

（2）吸取 1∶10 的稀释液 1mL 注入盛有 9mL 灭菌水的试管中，混匀成 1∶100 稀释液。

按同法依次稀释成 1∶1000，1∶10000 稀释液等备用。吸取不同浓度的稀释液时必须更换吸管。

(3) 用灭菌吸管取 2～3 个适宜浓度的稀释液 1mL，分别注入灭菌平皿内。以下操作同生活饮用水的检验步骤。

3. 菌落计数及报告方法

作平皿菌落计数时，可用眼睛直接观察，必要时用放大镜检查，以防遗漏。在记下各平皿的菌落数后，应求出同稀释度的平均菌落数，供下一步计算时应用。在求同稀释度的平均数时，若其中一个平皿有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平皿作为该稀释度的平均菌落数。若片状菌落不到平皿的一半，而其余一半中菌落数分布又很均匀，则可将此半皿计数后乘 2 以代表全皿菌落数。

4. 各种不同情况的计算方法

(1) 首先选择平均菌群数在 30～300 之间者进行计算。当只有一个稀释度的平均菌落符合此范围时，则即以该平均菌落数乘其稀释倍数报告之（见表 8-3 例 1）。

(2) 若有两个稀释度，其平均菌落数均在 30～300 之间，则应按两者菌落总数之比值来决定。若其比值小于 2 应报告两者的平均数，若大于 2 则报告其中较小的菌落总数（见表 8-3 例 2 及 3）。

(3) 若所有稀释度的平均菌落数均大于 300，则应按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数报告之（见表 8-3 例 4）。

(4) 若所有稀释度的平均菌落数均小于 30，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告之（见表 8-3 例 5）。

(5) 若所有稀释度的平均菌落数均不在 30～300 之间，则以最接近 300 或 30 的平均菌落数乘以稀释倍数报告之（见表 8-3 例 6）。

稀释度选择及菌落总数报告方式 **表 8-3**

例 次	不同稀释度的平均菌落数			两个稀释度菌落数之比值	菌落总数（个/mL）	报告方式（个/mL）
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}			
1	1365	164	20	—	16400	16000 或 1.6×10^4
2	2760	295	46	1.6	37750	38000 或 3.8×10^4
3	2890	271	60	2.2	27100	27000 或 2.7×10^4
4	无法计数	1650	513	—	513000	510000 或 5.1×10^5
5	27	11	5	—	270	270 或 2.7×10^2
6	无法计数	305	12	—	30500	31000 或 3.1×10^4

(6) 菌落计数的报告　菌落数在 100 以内时按实有数报告，大于 100 时，采用二位有效数字，在二位有效数字后面的数值，以四舍五入方法计算。为了缩短数字后面的零数也可用 10 的指数来表示（见表 8-3 “报告方式” 栏）。在报告菌落数为 “无法计数” 时，应注明水样的稀释倍数。

上列实验方法是参照中华人民共和国卫生部《生活饮用水标准检验法》GB5750　85（送审稿）编写的。

四、思考题

1. 测定大肠菌群数说明什么问题？为什么要用大肠菌群作检验指标？
2. 测定细菌总数说明些什么？
3. 为什么乳糖蛋白胨培养基用 0.7kg/cm^2 火菌 20min，而不用 1kg/cm^{2}20min？
4. 作了细菌检验，为什么自来水厂还要经常进行余氯的测定？
5. 根据我国饮用水水质标准，讨论你这次检验的结果？

实验九　大肠杆菌生长曲线的测定

一、实验器材

1. 培养基及大肠菌液

(1) 营养琼脂斜面培养基　可根据实验五中的配方，配制营养琼脂培养基后，再制成斜面。

(2) 肉膏蛋白胨液体培养基　配制方法同实验五中的营养琼脂培养基，但不加琼脂。

(3) 浓肉膏蛋白胨液体培养基　配制方法同肉膏蛋白胨液体培养基，但浓度高 5 倍。

(4) 大肠杆菌培养液　将大肠杆菌接种于营养琼脂斜面培养基上，在 37℃下培养 18 小时后，用无菌水加在斜面上，将菌洗下，作成一定浓度的细菌悬液，直接供实验接种用。或吸取 0.3mL 细菌悬液，接种到装有 20mL 肉膏蛋白胨液体培养基的大试管（20×220mm）内，在 37℃下，振荡培养 18h。

2. 吸管、烧杯等。

3. 光电比色计、高压蒸汽灭菌器、电冰箱、振荡器或摇床等。

二、实验内容

1. 实验处理　以一定浓度的细菌悬液，分别等量地接种在 12 支液体培养基中，在培养后隔不同时间取出，放入冰箱保存。最后，用比浊法测定菌体生长情况。

测量微生物生长的方法有多种。活菌数可用平板计数（菌落计数）法或稀释计数法。总菌数（包括活菌和死菌的个数）可在显微镜下直接计数而求得，由于细菌悬液的浓度与其浑浊度成正比，因此也可利用光电比色计测定细菌悬液的光密度，从而推知菌液的浓度，本实验就是利用光电比色计进行量测❶。

为阐明生长曲线形成的原因，做 3 个实验处理：(1) 正常生长曲线；(2) 追加营养液处理；(3) 加酸处理。

2. 实验步骤

(1) 接种　取 12 支装有灭菌过的肉膏蛋白胨液体培养基试管（每管装 20mL 培养基），贴上标签（注明菌名、培养时间等）。然后，用 1 支 1mL 无菌吸管，每次准确地吸取 0.2mL 培养 18h 的大肠杆菌培养液，接种到肉膏蛋白胨液体培养基内。接种后，轻轻摇荡，使菌体均匀分布。

(2) 培养　将接种后的 12 支液体培养基，置于振荡器或摇床上。37℃振荡培养。其中

---

❶ 用平板计数法或稀释计数法可测出活菌数，从而得出不包括死菌的生长曲线。若教学时间和设备条件容许，宜采用平板计数法或稀释计数法。

9 支，分别在培养 0、1.5、3、4、6、8、10、12、14h 后取出，放冰箱中贮存，最后一起比浊测定。

酸处理的 1 支试管，在培养 4h 后，取出，加 1mL 无菌酸溶液（甲酸：乙酸：乳酸＝＝3：1：1的体积比），然后继续振荡培养，在培养 14h 后取出，放入冰箱贮存，最后一起比浊测定。

追加营养的两支试管，在培养 6h 后，取出，各加入无菌浓肉膏蛋白胨液体培养基 1mL，然后继续振荡培养，在培养 8、14h 后取出，放入冰箱贮存，最后一起比浊测定。

（3）比浊　把培养不同时间而形成不同浓度的细菌培养液，置于光电比色计中进行比浊。用浑浊度的大小来代表细菌的生长量。

在比色计中应插入适当波长的滤光片，以未接种的肉膏蛋白胨液体培养基为空白对照，从最稀浓度的细菌悬液开始，依次测定。细菌悬液如果太浓，应适当稀释，使光密度降至 0.0～0.4 范围内。

液体的浑浊度也可用比浊计测定。

三、报告要求

1. 记录培养 0、1.5、3、4、6、8、10、12、14h 之后细菌悬液的光密度值，以及 4h 加酸和 6h 追加营养液后，这三管菌液在所要求的培养时间时的光密度值。

2. 以细菌悬液光密度为纵坐标，培养时间为横坐标，绘出大肠杆菌正常、加酸和追加营养的 3 条生长曲线，并加以比较，标出正常生长曲线中对数期的大致位置。

四、思考题

1. 常用的测定微生物生长的方法有哪几种？试略加讨论。

2. 利用浑浊度所表示的细菌生长量是否包括死细菌？

3. 你认为活性污泥的增长曲线应怎样测定才比较合适？

附　录

甲、活性污泥混合液耗氧速率的测定

一、目的

学习测定活性污泥法曝气池混合液耗氧速率的方法。耗氧速率可用华氏呼吸仪测得；测定方法可参阅仪器使用说明书。下面介绍一种用一般化学法进行测定的方法。

二、试验器材

1. 玻璃器皿（包括大口玻璃瓶、滴定管、吸管等）。

2. 试剂

（1）10%硫酸铜溶液。

（2）溶解氧测定（叠氮化钠法）的全部试剂（如有溶解氧测定仪，就不需此项试剂）。

三、操作步骤

1. 取1000mL具有橡皮塞的大口瓶两个，进行编号（如1号瓶，2号瓶），并在其半满处作一记号。

2. 用虹吸法把曝气过的自来水（如曾加氯消毒，则应将氯先消去，以免影响微生物的活动）注入两瓶中至半满处。注意不带入气泡。

3. 将此两瓶同时放入曝气池，让混合液流入瓶内，避免产生气泡，瓶口须相互靠近，以能取得尽可能相同的试样。

4. 瓶装满后，立即取出。

5. 于1号瓶中，迅速加10%硫酸铜溶液10mL，盖紧瓶塞，瓶塞下不可留有气泡，颠倒混合3次，静置。

6. 同时，把2号瓶盖紧，瓶内不可留有气泡，不停地颠倒瓶子，将瓶内试样混合一段时间（如5min，混合期间务使瓶内颗粒保持在悬浮的状态）。混合的时间须正确记下。此时间即瓶内微生物吸收氧的时间，故也称吸氧时间。混合后，立即加10%硫酸铜溶液10mL。再盖紧瓶塞，颠倒混合3次，静置让污泥下沉。

7. 从上两瓶中，虹吸上层清液，用叠氮化钠溶解氧测定法（也可用溶解氧测定仪）测定其溶解氧。

注意：（1）两瓶内的溶解氧之差不得小于2mg/L，而2号瓶内的溶解氧至少须有1mg/L。如不能满足此要求，则可改变2号瓶的混合时间或吸氧时间。

（2）耗氧速率一般用mg/L时表示。

计算举例：

1号瓶	溶解氧	5.0mg/L
2号瓶	溶解氧	1.5mg/L
	溶液氧之差	3.5mg/L

混合时间	5min
稀释倍数	1/2

$$\therefore \quad \text{耗氧速率} = 3.5 \times \frac{60}{5} \times 2 = 84\text{mg/L} \cdot \text{h}$$

乙、鱼类毒性试验

一、目的

工业废水性质复杂，其中有不少有毒物质常不易用化学方法测得，且这些物质单独存在的有毒程度和混合后的有毒程度也往往难于弄清楚。废水的毒性，在很大程度上受到它们各成分之间的相互影响和存在于水中的某些无机盐类的影响。因此，工业废水对鱼类的毒性有时常须通过生物试验来确定。本实验的目的就是学习检验工业废水对鱼类毒性的基本方法。

二、试验器材和试验条件

（一）试验器材

1. 试验容器　试验容器应用玻璃制成，其大小依试样的体积而定，而试样体积又应根据在每次试验中鱼的大小和数目而定，但容器的深度必须大于 15cm，以限制试样中的气体或挥发成分的散失速度。此速度随暴露面积与液体的体积比而变化。如用普通大小 5～7cm 长的鱼作试验，则用直径 25～30cm，高 30cm 或大于 30cm，容积 20L 左右的广口瓶可养鱼约 10 条。一般每个试验需要 6～12 个试验容器。

2. 驯养箱　可用容积约 50～200L 的玻璃箱。驯养时的水温须与试验温度接近，因此，该箱应置于适宜的恒温室内或具有恒温设备。为了保证水中有足够的溶解氧，须有曝气装置，在近箱底处由几个曝气板或扩散器将压缩空气扩散入水中。空气的扩散率不应太大。

3. 试验鱼　不同的鱼类对毒物的敏感性不一样，所以，如有条件，应采用废水所排入的水体的地方鱼种进行试验，否则可采用白鲢、鲤鱼和金鱼等。试验鱼应大小一致，鱼体健康。最大鱼的体长应不超过最小鱼的 1.5 倍，平均体长一般可在 5～7cm 之间，不宜大于 7cm❶。

试验鱼应至少在试验相似的条件下（特别是水温）驯养一星期，最好 10d 以上。在驯养期间至少一星期给食 3 次，最好每天 1 次。但在试验前的两天时间内不要给食。

在试验前 4 天，试验鱼在驯养箱中的死亡或发生严重疾病事故不应超过 10%，否则此试验鱼组即认为不适于应用，须等疾病事故和死亡率充分降低后再用。试验鱼移入试验容器时必须没有疾病症状，外观和行动上没有反常现象。

1. 实验用水（即稀释水）　用作稀释废水或驯养的实验用水应取自废水排出口上游未受到污染的河段。如条件不许可，则可从别的水源采取水质和溶解氧与排放水体相似的水作实验用水，或将一般天然水根据情况用蒸馏水稀释或加入适量的化学药物配制而成。代用水中的钙、镁、硫酸盐及溶解固体的含量与接受废水的水体中相应物质的含量之差别不得超过 25%。最好将代用水的 pH 值、碱度及硬度调节至与接受废水的水体尽量相同。

---

❶ 金鱼体短，身宽，一般以体长 3cm 以下较合适。鱼的体长是指其全长减去尾鳍的长度。

（二）试验条件

1. 水温　养鱼的水温一般可取 20～28℃（温水鱼）。

2. 溶解氧　试样中的溶解氧含量不应低于 4～5mg/L。稀释水可预先进行曝气以提高溶解氧含量，但不要过饱和。试验过程中，如需要曝气，则可用纯氧或压缩空气通过 5mm 直径的玻璃管口慢慢通入试样，以免挥发性有毒物质过多地损失，并避免影响鱼类的生活。

3. 试验鱼数目及重量　一般至少用 10 条鱼进行试验，可平均放在两个或多个盛有同样浓度的废水或稀释试样的容器中。每个试验最好平行做两组。在初步探索性试验中，试验鱼数可少于 10 条，但至少要 2 条。

鱼在容器中的重量不应超过 2g/L（试样），最好 1g/L 或少于 1g/L。一般说，对于平均大小为 5～7cm 的鱼，每条至少需用 1L。

三、试验步骤

1. 稀释废水　用稀释水对废水进行不同程度的稀释，一般宜作 5 个稀释比。

2. 对于原废水及每一稀释试样各养鱼 10 条。另外，应在同样条件下，单独用稀释水作为试验溶液，放入试验鱼，与废水对照作控制试验。在任一控制试验中，不应有超过 10% 的死亡率，至少应有 90%试验鱼保持外观健康，否则试验结果不能认为可靠。

试验鱼应用柔软材料制的细网或湿手小心移放。

试验鱼在试验期间不要给食，但如试验延续时间超过 10d 时，则可以给食。

3. 试样的更换　容器内的试样可每 24h（或较短间隔）更换 1 次。更换时可将试验鱼用湿网很快地移入盛有新鲜试样的试验容器内。一般说，如能每 24h 或不到 24h 换水 1 次，常可不必进行人工曝气。

为了测定试样中的溶解氧（可用虹吸法直接从试验容器内采取试样）而取出水样后，应用与取出的试样同时制备而放在另一容器中的试样补充。溶解氧也可用溶解氧测定仪直接测定。

4. 观察　在试验鱼放入试验容器 24、48h[1] 时，观察鱼的死亡数字并作记录，鱼在起初 4～8h 内的反应也应仔细观察和记录作为继续试验的指导。在观察中，如鱼的呼吸及其它动作——自然的或由轻微机械刺激（针刺或用玻棒压鱼尾部）而生的反应在 5min 内不能测出，则该试验鱼可被认为已死亡，死鱼应立即移走。

5. 物理及化学分析　物理及化学分析主要包括水温、溶解氧及 pH 值等几项，其它如碱度、酸度及硬度，则根据废水的性质，需要时也应作测定。溶解氧的测定是为了了解鱼的死亡是否由于缺氧而引起。

水的理化测定，一般在放入鱼之前及鱼死亡以后或在毒性试验完毕以后进行。但某些项目如溶解氧需要经常进行测定。

另外，如有可能，也应测定水中毒物含量。

6. 计算　在半对数纸上，以对数坐标标出试验浓度，以数学坐标标出试验鱼成活率，连接各点（基本上可成一直线），然后用内插法求出 24h 及 48h50%成活率的废水浓度。此 50% 试验鱼能成活的浓度称为半忍受限，可用 TL_m 表示。半忍受限只可用来相对地比较毒物的毒性，显然不能代表毒物的安全浓度。如果要从半忍受限推算安全浓度，必须采用适当的

---

[1] 也有把试验继续至 96h 的，一般说在 96h 内不引起鱼死亡时，可以认为毒性不显著，但不能得到无毒的结论。

安全系数，下面是一个较为常用的计算公式，式中 0.3 和指数 2 都是安全系数，可作参考：

$$\text{安全浓度} = \frac{48TL_m \times 0.3}{\left(\frac{24TL_m}{48TL_m}\right)^2}(\text{mg/L})$$

式中 $48TL_m$——48h 半忍受限（mg/L）；

$24TL_m$——24h 半忍受限（mg/L）。

【例题】 下表表示某次毒性试验结果。求废水中毒物的安全浓度。

废水浓度体积（%）	试验鱼数目	试验鱼成活数	
		24h	48h
10.0	10	0	0
7.5	10	3	0
5.6	10	8	1
4.2	10	10	6
3.2	10	10	9

注：废水所含毒物的浓度为 10mg/L。

【解】 把上表所列试验结果转化后点在半对数纸上，如图附-1 所示，并由此求得：

$$24TL_m = 6.7\%$$

$$48TL_m = 4.4\%$$

∵ 废水毒物浓度＝10mg/L

$$24TL_m = \frac{6.7 \times 10}{100} = 0.67\text{mg/L}$$

$$48TL_m = \frac{4.4 \times 10}{100} = 0.44\text{mg/L}$$

按安全浓度公式，得：

$$\text{毒物安全浓度} = \frac{0.44 \times 0.3}{\left(\frac{0.67}{0.44}\right)^2} = 0.06\text{mg/L}$$

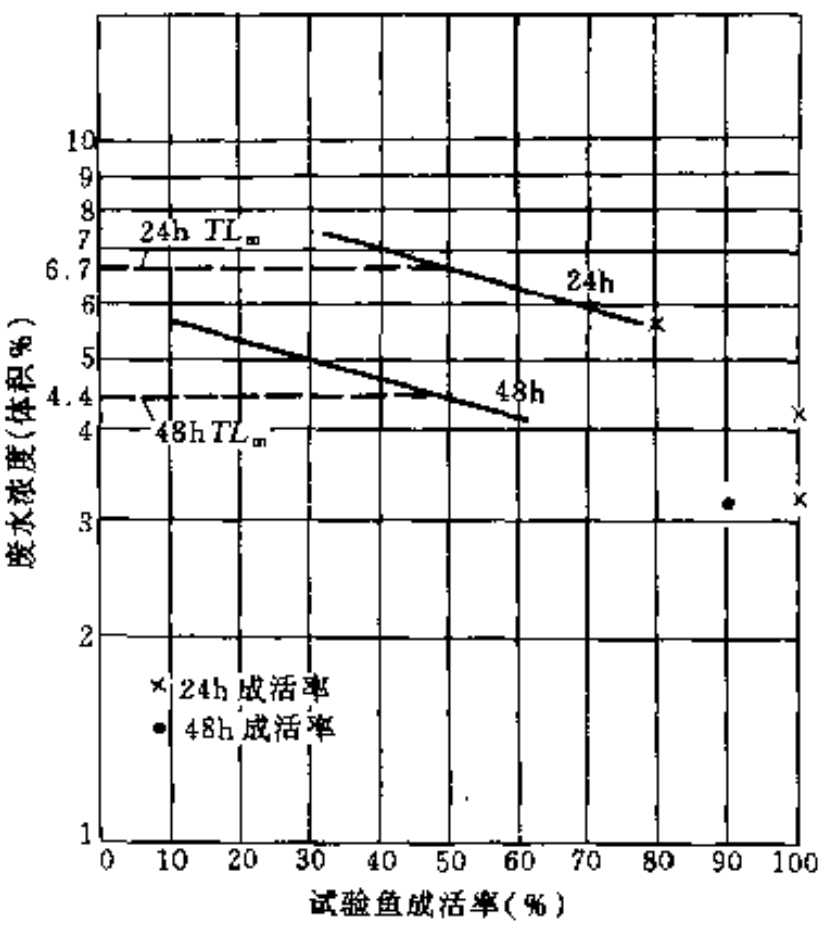


图 附-1 半忍受限计算图

应用公式求出安全浓度后，最好再进一步进行验证试验，特别是当废水是挥发性的或含不稳定性毒物时。验证试验一般用 10 条以上的鱼，在较大容器中用计算所得的安全浓度进行一个月或几个月的动水试验，并设对照组作比较。如有中毒症状发生，则应降低浓度再试验。验证试验中证明确实某浓度对鱼类是安全时，可定为鱼的安全浓度。在验证试验中须投喂饵料，并保证鱼的适宜环境，进行溶解氧、pH 等测定。

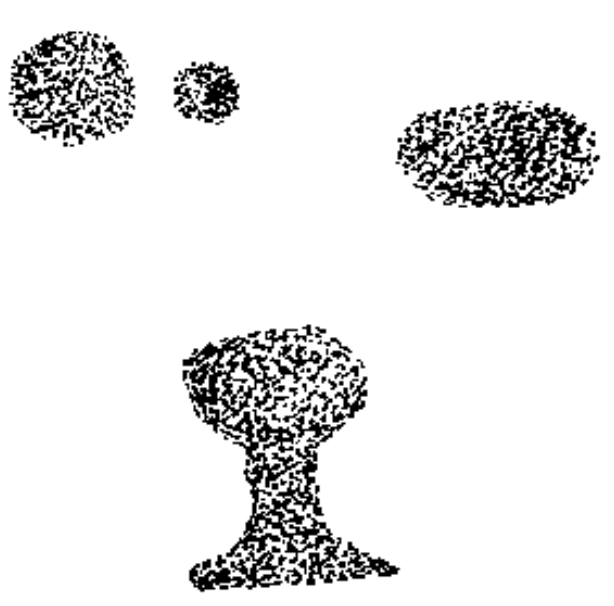
丙、废水生物处理过程中常见的微生物

废水生物处理中常见的微生物 一

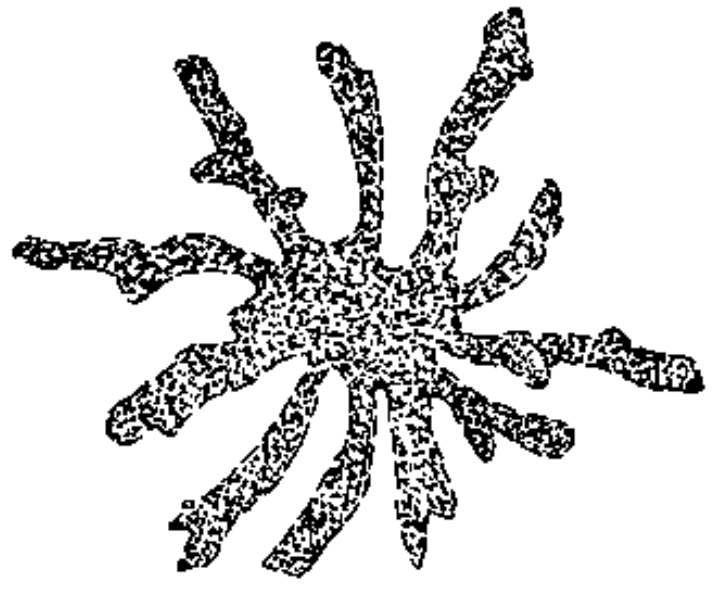
(一)细菌

1.菌胶团

(1)球状、椭球状和蘑菇状菌胶团



(2)分枝状菌胶团



(3)其它菌胶团

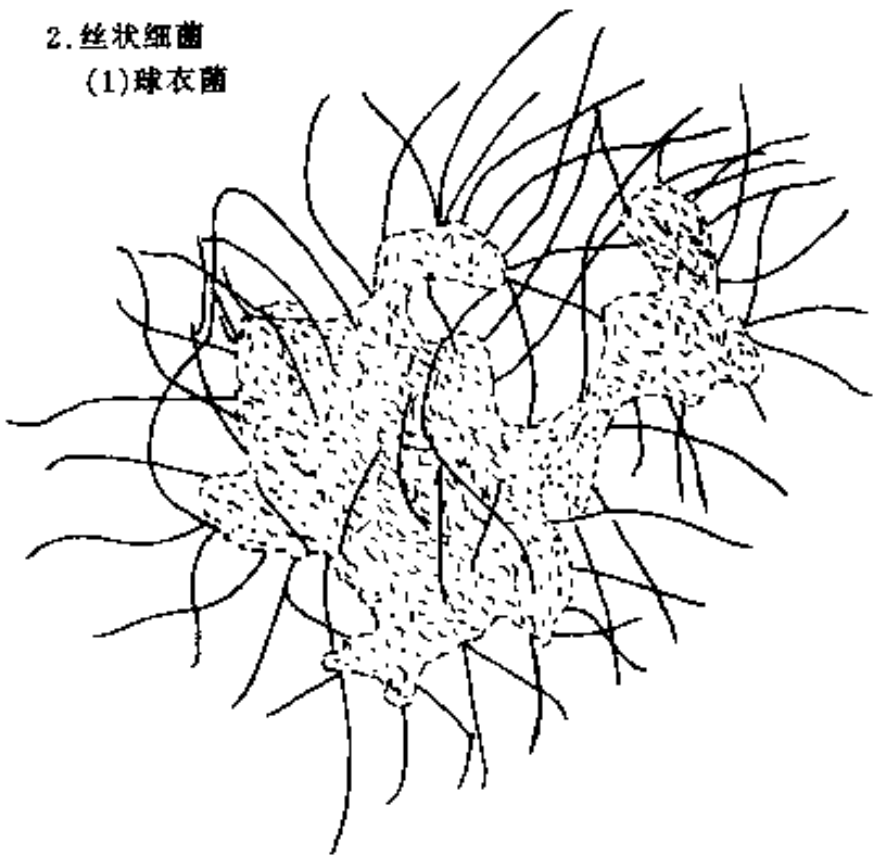






2.丝状细菌

(1)球衣菌



低倍镜下的球衣菌



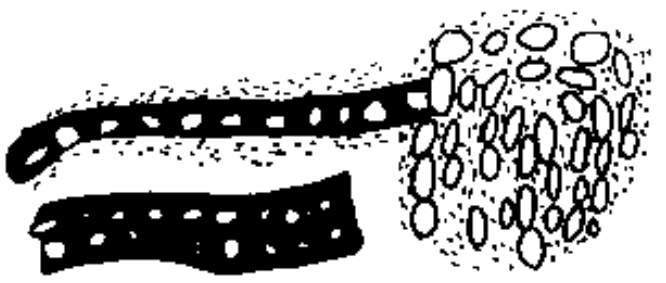
高倍显微镜下的球衣菌(假分枝)



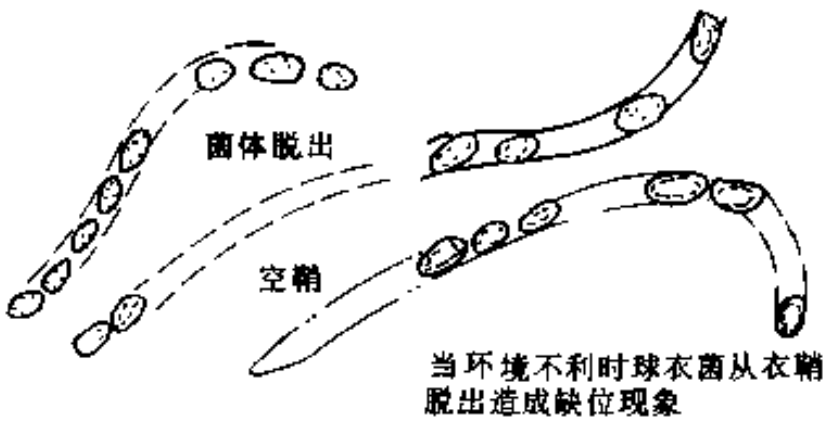
高倍显微镜下无数杆菌粘附于丝状体上使丝状体轮廓变粗



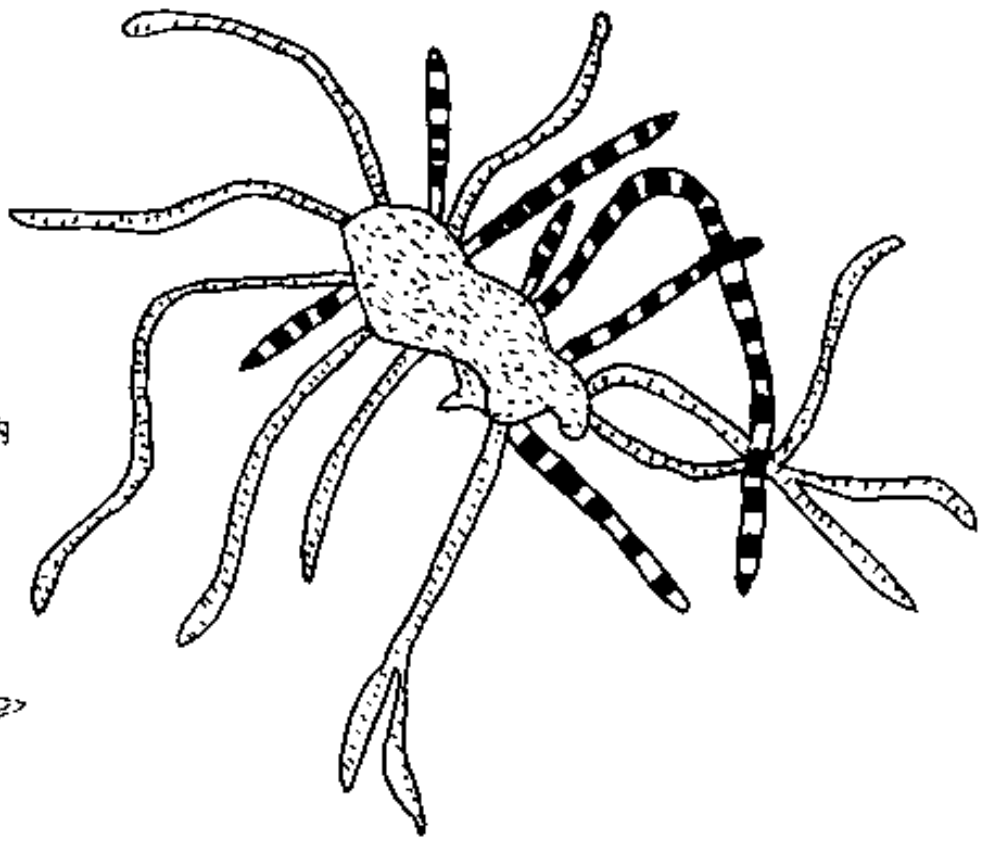
油镜下从衣鞘内脱出的球衣菌菌体附于丝状体上



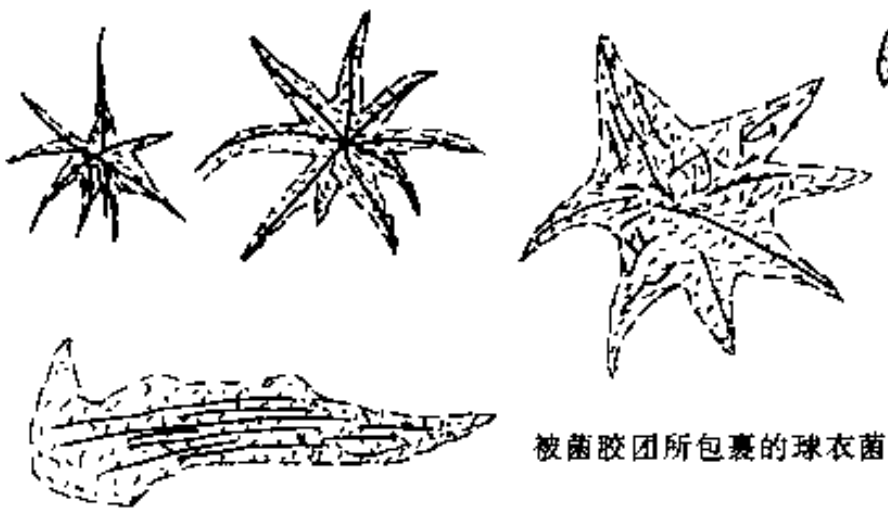
碳素高时菌体粗状排列紧密



当环境不利时球衣菌从衣鞘内脱出造成缺位现象

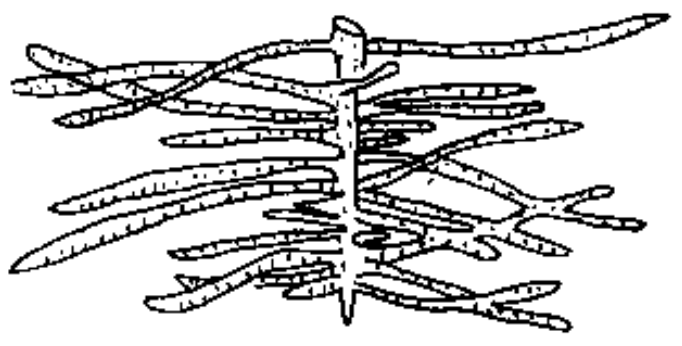


一种球衣菌染色后菌体没有明显分界
一种球衣菌染色后菌体有明显分界

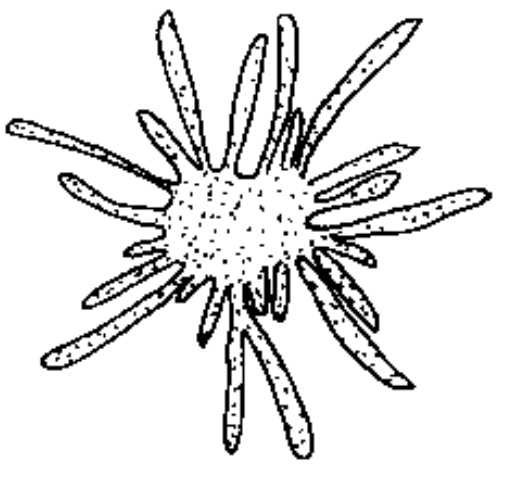


被菌胶团所包裹的球衣菌

(2)丝硫菌



丝硫菌生长在杂质纤维上



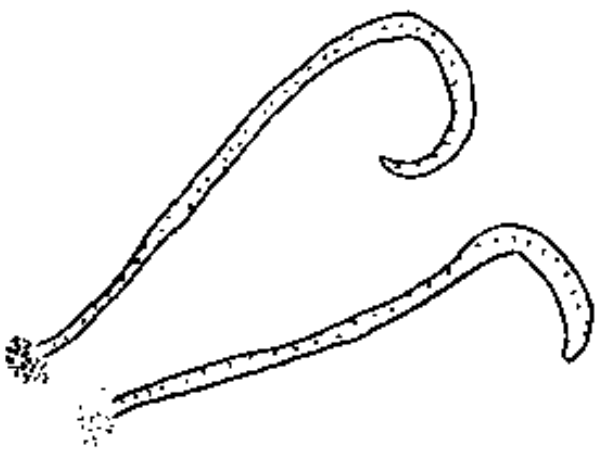
丝硫菌在污泥小块上
生长形成刺毛球



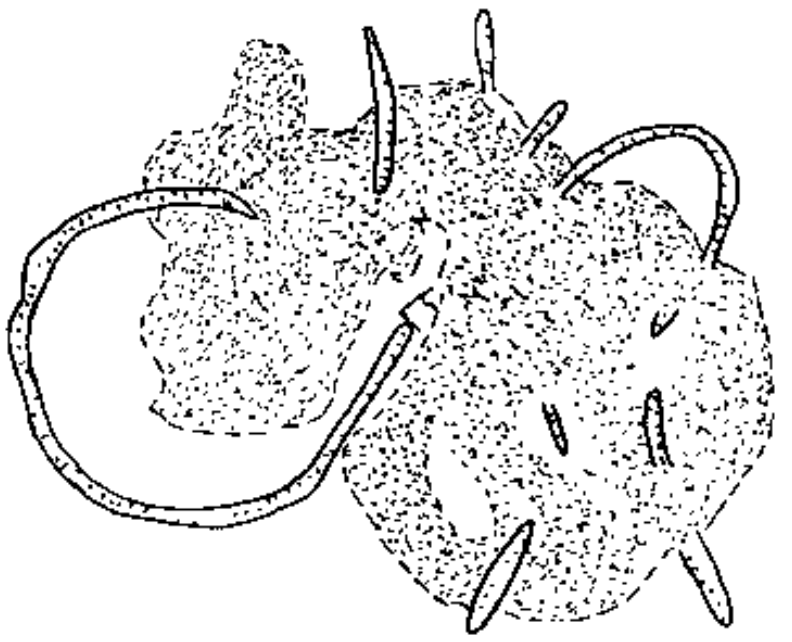
当大量的刺毛球形成时
使污泥膨胀、结构松散



衣鞘内的丝硫菌

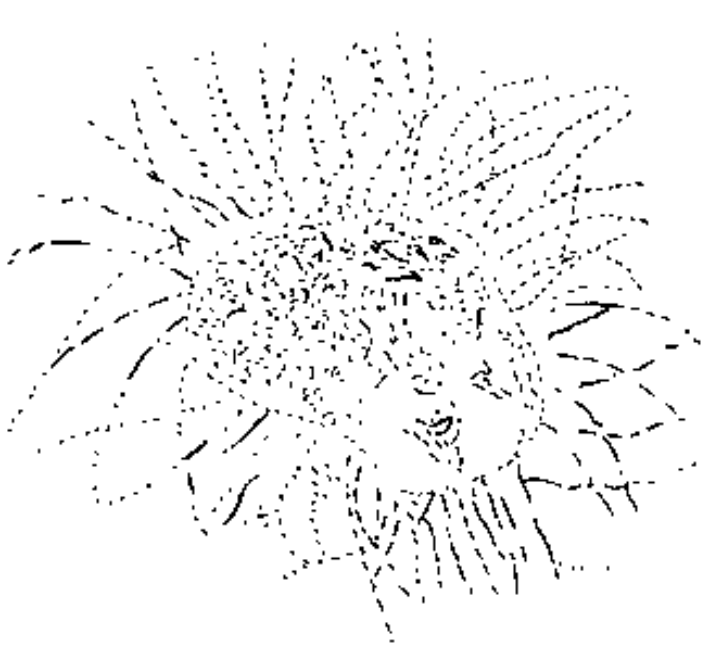


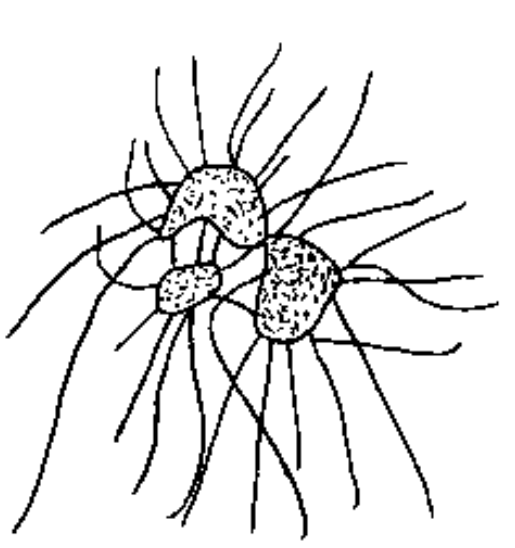
成熟的丝状体带着基部的吸盘
从污泥中脱出、游离于污泥中



长短粗细不等的丝硫菌在污泥中游动

(3)其它丝状菌

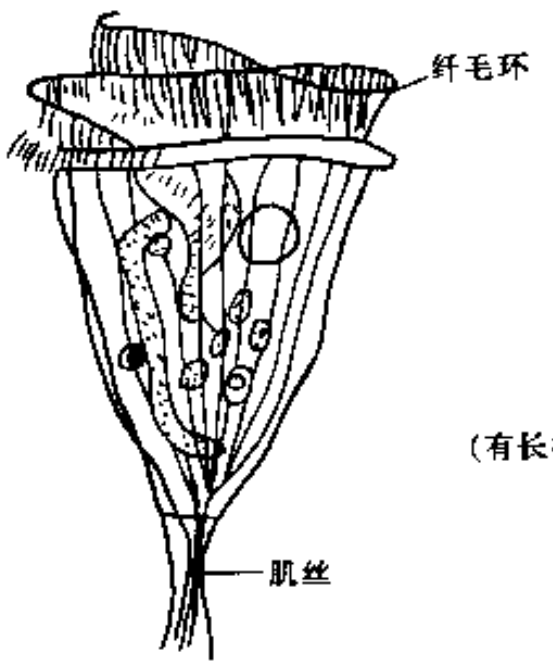




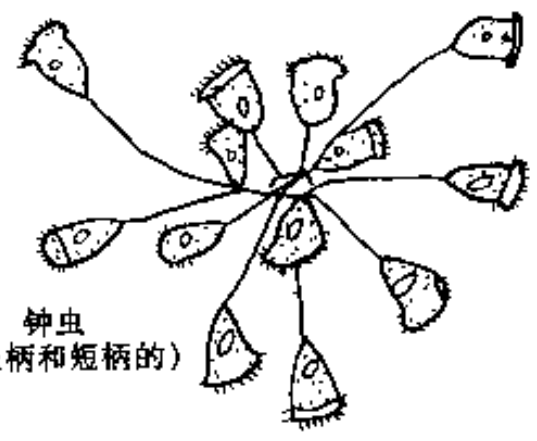
(二)原生动物

1.纤毛类

(1)纤毛目



钟虫放大


钟虫
(有长柄和短柄的)


短柄钟虫
带泥游泳


钟虫收缩


钟虫头顶气泡
(缺氧或氧过高)


钟虫裂殖

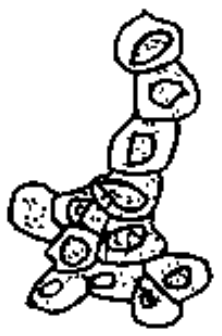

钟虫无性繁殖

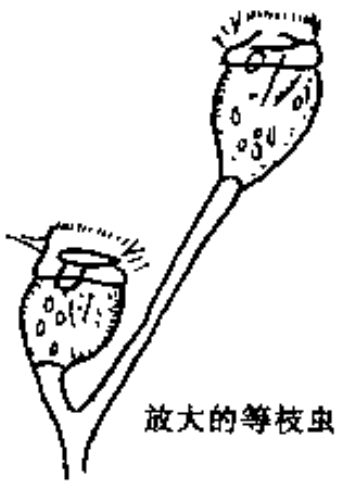


钟虫有性繁殖

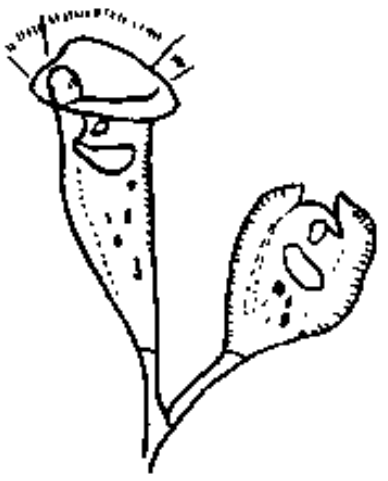

游泳钟虫变为固定型


固定钟虫变为游泳型


钟虫尸块


放大的等枝虫


等枝虫(累枝虫)


栉约累枝虫


盖纤虫

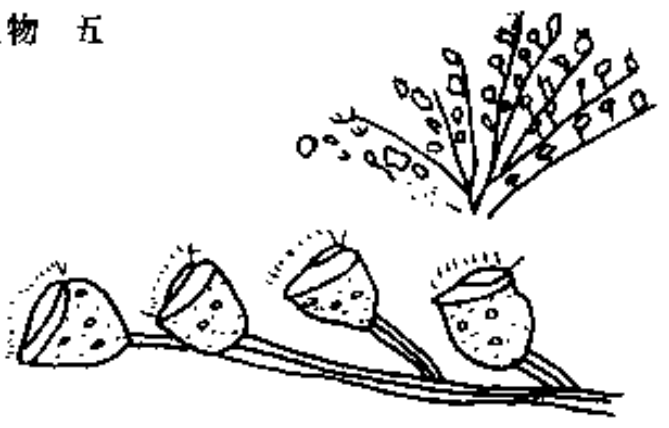

盖纤虫



小口盖纤虫



有盖虫(无肌丝)



独缩虫(尾柄内有肌丝但不相连)

(2)全毛目



漫游虫



裂口虫



长颈虫



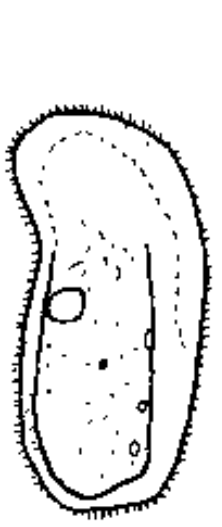
长颈虫



长吻虫



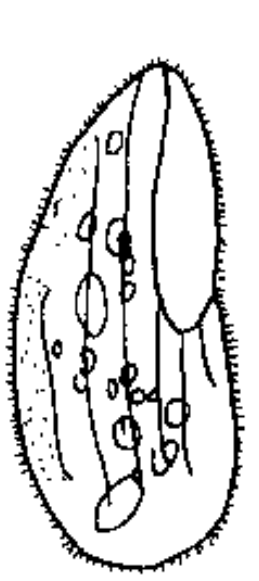
漠口虫



隐咽虫



草履虫



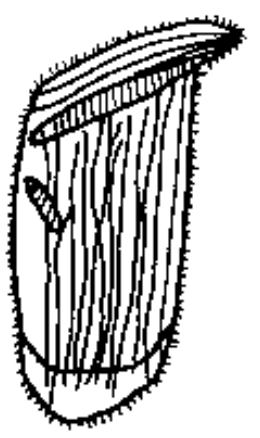
小康氏纤虫



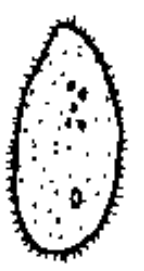
叙管虫



正面　侧面　爬行时



扭头虫



裸口虫



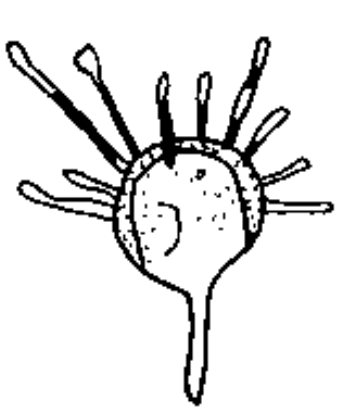
板壳虫



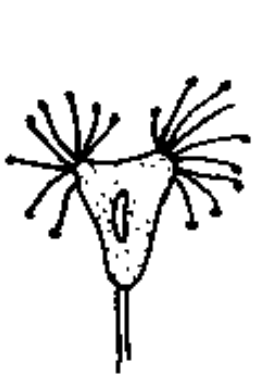
齿纤毛虫



前口虫



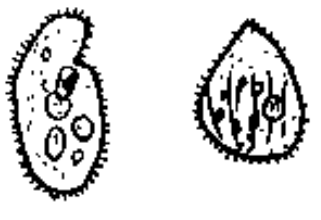
足吸管虫



壳吸管虫



肾形虫



豆形虫



锤吸管虫

(3)腹毛目



楯纤虫



尖毛虫



棘尾虫

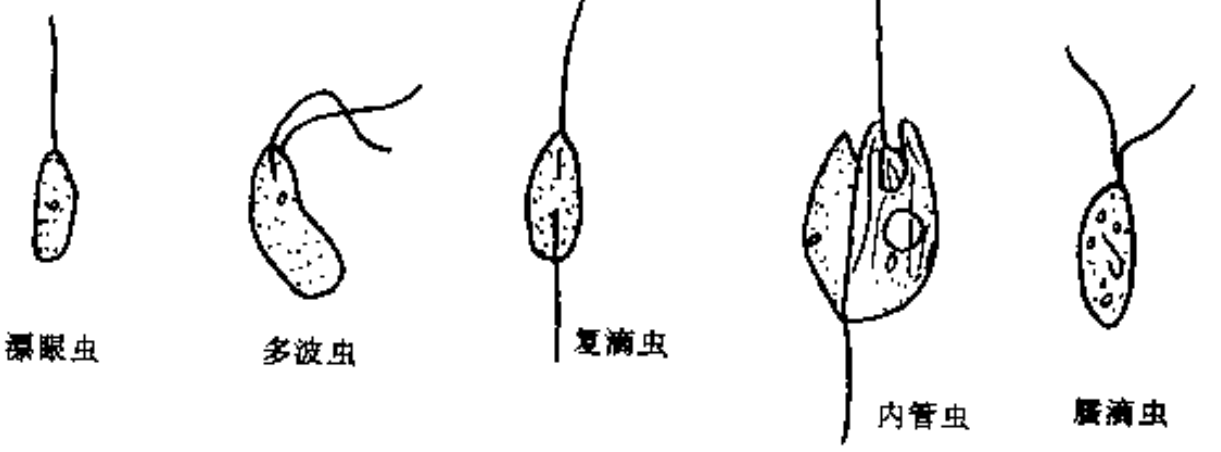


游仆虫

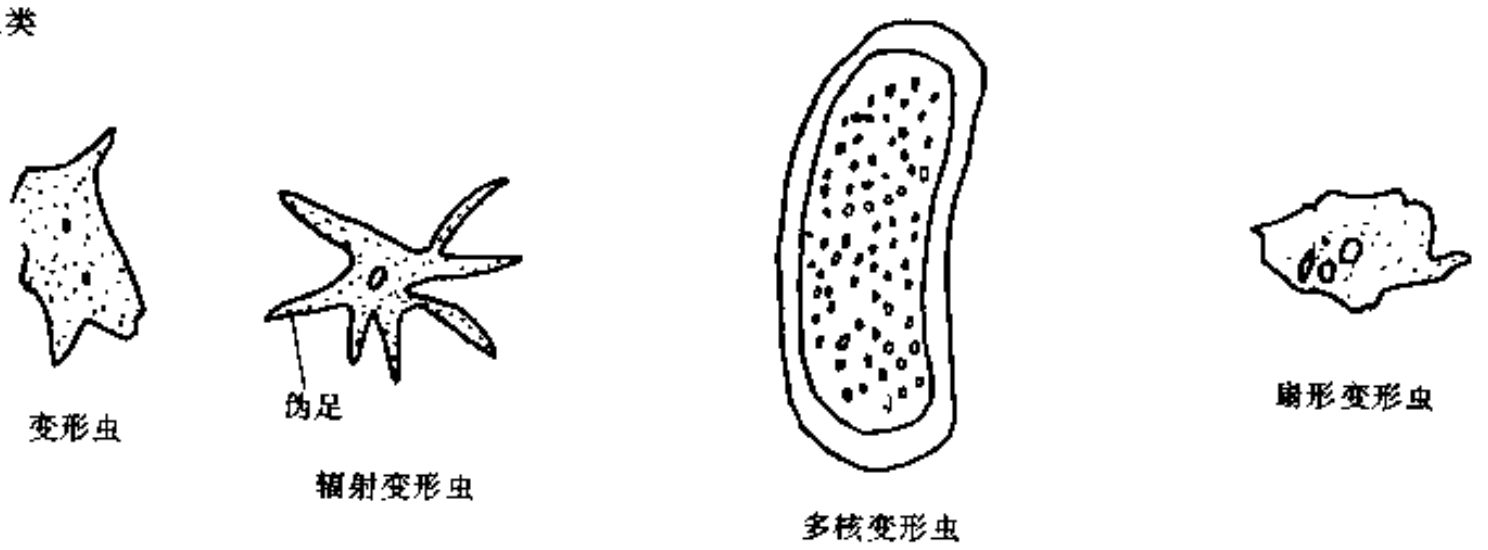


腹毛虫裂殖

2 鞭毛类

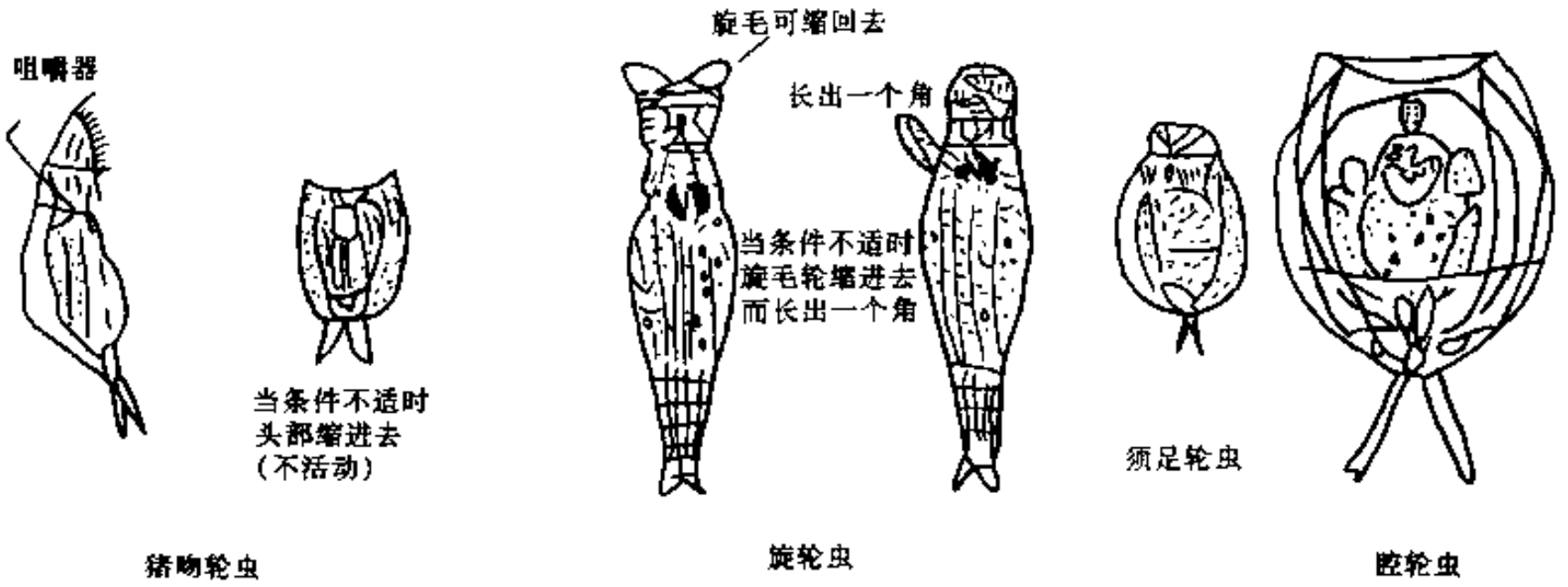


3 肉足类



(三)后生动物

1.轮虫



2.线虫



3.颗体虫



主 要 参 考 书

[1] 清华大学给水排水教研组. 水处理微生物学基础. (第二版). 清华大学, 1978

[2] 沈韫芬、冯伟松等. 河流的污染监测. 中国建筑工业出版社, 1991

[3] 胡家骏、周群英. 环境工程微生物学. 高等教育出版社, 1988

[4] 钱存柔、董碧虹. 微生物学基础知识与实验指导. 科学出版社, 1979

[5] 高桥俊三等著, 张自杰译. 活性污泥生物学. 中国建筑工业出版社, 1978

[6] 四川大学生物系. 生物学. (上册). 人民教育出版社, 1978

[7] 武汉大学
复旦大学 生物系微生物教研室. 微生物学. (第二版). 高等教育出版社, 1987

[8] 周德庆. 微生物学教程. 高等教育出版社, 1994

[9] 湖北省水生物研究所第四研究室. 废水生物处理微型动物图志. 中国建筑工业出版社, 1976

[10] 南开大学生物系. 基础微生物学. 人民教育出版社, 1975

[11] 沈同、王镜岩主编. 生物化学. (第二版). 高等教育出版社, 1993

[12] 翁稣颖等. 环境微生物学. 科学出版社, 1985

[13] 李季伦等. 微生物生理学. 北京农业大学出版社, 1993

[14] 陈华癸. 微生物学. 农业出版社, 1985

[15] 杨颐康主编. 微生物学. 高等教育出版社, 1986

[16] 俞大绂、李季伦编. 微生物学. (第二版). 科学出版社, 1985

[17] R.E. 布坎南
N.E. 吉本斯 等编. 伯杰细菌鉴定手册. (第八版). 科学出版社, 1984

[18] 余源. 医学微生物学及卫生细菌学. 人民卫生出版社, 1959

[19] 王祖农. 土壤微生物学. 科学出版社, 1955

[20] 五十嵐彦仁. 污水化学总论 (上). 内田老鶴圃新社 (日本), 1971

[21] T.D. 布洛克著. 微生物生物学. 翻译组译. 微生物生物学. 人民教育出版社, 1981

[22] 盛祖嘉. 微生物遗传学. (第二版). 科学出版社, 1987

[23] Sawyer. Chemistry for Environmental Engineering. Mc Graw-Hill Book 1978

[24] Bergmeyer. Principles of Enzymatic Analysis. Weinheim Verlag Chemie, 1978

[25] Schroeder. Water and Wastewater Treatment. McGraw-Hill Book 1977

[26] Stanier, Adelberg, Ingraham. The Microbial World. Prentice-Hall, Inc., 1976

[27] Higgins, Burns. The Chemistry and Microbiology of Pollution. Academic Press, 1975

[28] APHA, AWWA, WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, 1989

[29] Kendeigh. Ecology. Prentice-Hall, 1974

[30] Mitchell. Water Pollution Microbiology. John Wiley & Sons, 1972

[31] Finstein. Pollution Microbiology. a Laboratory Manual. Marcel Dekker, 1972

[32] Dugan. Biochemical Ecology of Water Pollution. Plenum Press, 1972

[33] Thomas. Indicators of Environmental Quality. Plenum Press. 1972

[34] Goodman. Design Handbook of Wastewater System. Technomic Publishing Co., 1971

[35] Zajic. Water Pollution Disposal and Reuse. Vol. 1, Marcel Dekker, 1971
[36] U. S. Dept. of the Interior. The Practice of Water Pollution Biology. U. S. Government Printing Office, 1969
[37] McKinney. Microbiology for Sanitary Engineers. McGraw-Hill Book 1962
[38] Hawkes. The Ecology of Waste Water Treatment. Pergamon Press, 1963
[39] A. F. Gaudy, Jr. & E. T. Gaudy. Microbiology for Environmental Scientists and Engineers, McGraw-Hill, 1989
[40] T. D. Brock & M. T. Madigan. Biology of Microorganisms (Sixth Edition), Prentice Hall, 1991
[41] Whipple. Microscopy of Drinking Water. John wiley & Sons, 1927