

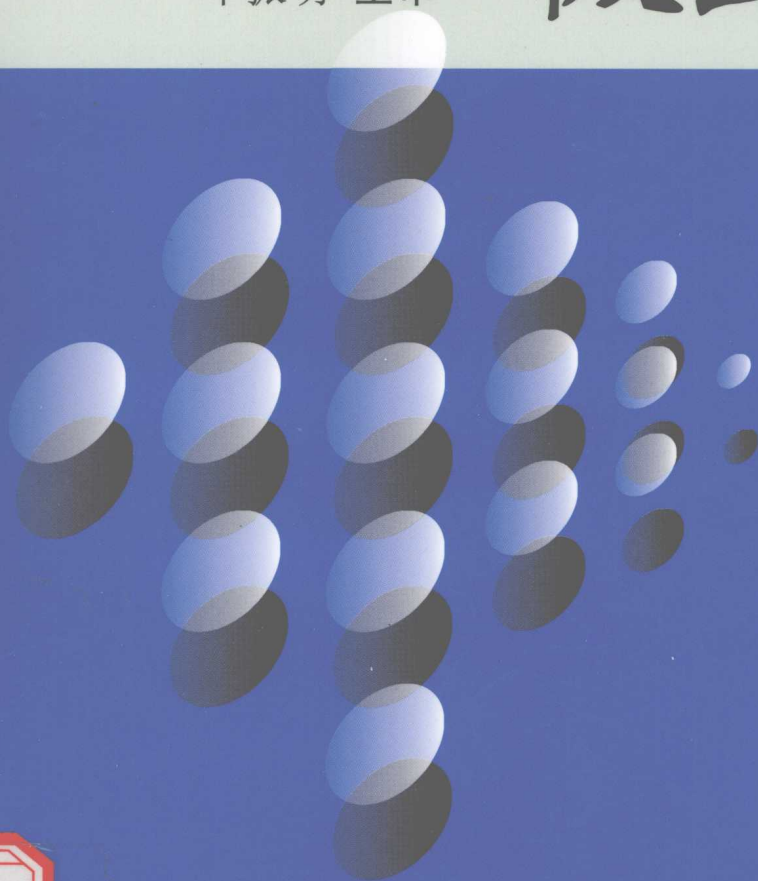
四川省精品课程教材

工科 微生物学

李玉锋 唐 洁 主编
车振明 主审

实验

GONGKE
WEISHENGWUXUE
SHIYAN



33
8



西南交通大学出版社
[Http://press.swjtu.edu.cn](http://press.swjtu.edu.cn)

四川省精品课程教材

工科微生物学实验

主编 李玉锋 唐 洁

主审 车振明

编委 (按姓氏笔画为序)

李玉锋 张大凤

唐 洁 焦士蓉

西南交通大学出版社

· 成 都 ·

图书在版编目 (C I P) 数据

工科微生物学实验 / 李玉锋, 唐洁主编. —成都: 西南交通大学出版社, 2007.8

ISBN 978-7-81104-427-0

I. 工… II. ①李…②唐… III. 微生物学—实验—高等学校—教材 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 128663 号

工 科 微 生 物 学 实 验

主 编 李 玉 锋 唐 洁

*

责任编辑 王 旻

封面设计 本格设计

西南交通大学出版社出版发行

(成都二环路北一段 111 号 邮政编码: 610031 发行部电话: 028-87600564)

<http://press.swjtu.edu.cn>

成都蓉军广告印务有限责任公司印刷

*

成品尺寸: 185 mm × 260 mm 印张: 8.125

字数: 200 千字

2007 年 8 月第 1 版 2007 年 8 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-81104-427-0

定价: 13.80 元

图书如有印装问题 本社负责退换
版权所有 盗版必究 举报电话: 028-87600562

前 言

本书是车振明教授主编的四川省精品课程教材《工科微生物学教程》的配套实验教材。

微生物学实验是微生物学课程教学的重要组成部分，也是一门实践性极强的科学，掌握微生物学实验的基本原理和操作技术，不仅对于学好微生物学课程是必不可少的，而且对于培养学生的科学精神、科研及实际工作能力、分析问题与解决问题的能力等都是非常重要的。

本书在精选实验项目上体现了以下教学目的：

第一，验证、巩固微生物学的基础知识。如微生物形态的观察、革兰氏染色、生长曲线的测定等。通过这些实验，使学生加深对课堂知识的理解，进一步掌握微生物特点、生命活动规律以及在工业生产中的应用。

第二，微生物学基本操作技能的训练。如培养基的制作、接种、培养、微生物计数与测量等。通过这些实验，使学生掌握微生物学的基本操作技术，为后续课程的实验、毕业论文以及将来的科研和实际工作打好基础。

第三，综合运用知识能力的培养。为适应素质教育、创新教育的需要，本书在传统微生物学实验的基础上，增加了综合性、探索性实验的内容，在教师的指导下，由学生根据已有知识，自己设计实验方案，自己分析实验结果，以培养学生综合运用所学知识的能力。

本书由西华大学李玉锋、唐洁两位老师担任了主要的编写任务，焦士蓉、张大凤编写了部分内容，全书由车振明教授审查定稿。西华大学生物工程学院领导对本书的出版给予了大力支持，在本书编写过程中，参考了一些经典实验，在此亦对原书作者深表感谢。

本书作为本科微生物学实验课教材，可供生物工程、食品科学与工程、环境工程、轻化工程等工科专业使用，也可供其它专业的学生、相关专业的研究生和工程技术人员参考。

由于作者水平有限，书中错误和缺点在所难免，欢迎广大读者提出宝贵意见。

编 者

二〇〇七年六月于西华大学

目 录

第 1 章 微生物学实验基础技术	1
1.1 验室常用器皿、仪器简介	1
1.1.1 微生物实验室常用的器皿	1
1.1.2 常用仪器及其使用要求	5
1.2 显微镜的构造、性能和使用方法	6
1.2.1 实验一 普通光学显微镜的使用	6
1.2.2 实验二 相差显微镜的使用	10
1.3 消毒与灭菌	11
1.3.1 基本概念	11
1.3.2 实验三 灭菌及消毒方法	12
1.3.3 实验四 干热灭菌技术	14
1.3.4 实验五 高压蒸气灭菌	15
1.3.5 实验六 紫外线灭菌	18
1.3.6 实验七 微孔滤膜过滤除菌	19
1.4 培养基的配制	20
1.4.1 实验八 培养基的常规配制程序	20
1.4.2 实验九 细菌、放线菌常用培养基的配制	23
1.4.3 实验十 酵母菌、霉菌常用培养基的配制	26
1.4.4 实验十一 几种常用鉴别和选择培养基的配制	28
1.5 微生物的接种与培养	30
1.5.1 实验十二 微生物的接种与培养	30
第 2 章 微生物染色与形态观察	34
2.1 微生物染色概述	34
2.2 实验十三 细菌的简单染色法	36
2.3 实验十四 革兰氏染色法	37
2.4 实验十五 细菌的芽孢染色法	39
第 3 章 微生物的分离与纯化	41
3.1 实验十六 噬菌体的分离和纯化	41
3.2 实验十七 厌氧菌的分离与培养	43

第 4 章 微生物的代谢	45
4.1 实验十八 微生物对生物大分子的分解利用	45
4.2 实验十九 微生物对含碳化合物的分解利用	47
4.3 实验二十 微生物对含氮化合物的分解利用	50
第 5 章 微生物的生长	54
5.1 实验二十一 微生物大小的测定	54
5.2 实验二十二 平板菌落计数法	56
5.3 实验二十三 显微镜直接计数法	58
5.4 实验二十四 大肠杆菌生长曲线的测定	60
第 6 章 微生物的遗传与变异	63
6.1 实验二十五 紫外线对枯草芽孢杆菌产生淀粉酶的诱变效应	63
6.2 实验二十六 电场诱导酵母菌原生质体融合	65
6.3 实验二十七 抗药性突变菌株的分离	67
第 7 章 菌种的保藏	70
7.1 实验二十八 常用简易保藏法	70
7.2 实验二十九 冷冻真空干燥保藏法	73
第 8 章 综合性、设计性微生物实验	76
8.1 综合性微生物实验	76
8.1.1 实验三十 土壤微生物的分离、纯化	76
8.1.2 食品中细菌总数及大肠菌群数的测定	80
8.1.2.1 实验三十一 食品中细菌总数的测定	80
8.1.2.2 实验三十二 食品中大肠菌群数的测定	82
8.1.3 实验三十三 沼气发酵	85
8.1.4 有机废水的 BOD 和 COD 的测定	87
8.1.4.1 实验三十四 微生物传感器测定 BOD	87
8.1.4.2 实验三十五 化学需氧量的测定（重铬酸钾法）	88
8.1.5 实验三十六 光合细菌处理高浓度有机废水	90
8.1.6 实验三十七 抗生素效价的生物测定（管碟法）	91
8.1.7 实验三十八 大肠杆菌质粒 DNA 的快速提取	94
8.1.8 实验三十九 试管凝集反应	95
8.1.9 实验四十 酶联免疫吸附试验（ELISA）	97
8.1.10 实验四十一 酿酒酵母细胞固定化与酒精发酵	99
8.2 设计性实验	103
8.2.1 实验四十二 中温 α -淀粉酶高产菌株的筛选	103

8.2.2 实验四十三 高产油脂酵母的筛选 104

8.2.3 实验四十四 平菇的紫外线诱变育种 105

8.2.4 实验四十五 富铁酵母的选育 105

8.2.5 实验四十六 微生物固定化技术处理污水..... 106

附录 I 染色液的配制 108

附录 II 培养基的配制 110

附录 III 试剂和溶液的配制 118

参考文献 121

第 1 章 微生物学实验基础技术

1.1 实验室常用器皿、仪器简介

1.1.1 微生物实验室常用的器皿

微生物学实验室所使用的玻璃器皿主要用于微生物的培养（培养皿、锥形瓶）、微生物的保存（试管）、吸取菌液（吸管，亦称移液管）等。使用前需经洗涤、包装、灭菌（干热或湿热），因此，对其质量、洗涤和包装方法均有一定的要求。一般选用硬质玻璃方可耐高温（121℃）、高压（0.1 MPa）、火焰灼烧。另外，新购置的玻璃器皿中含有游离碱，长期使用后会在内壁析出，呈乳白色碱膜，器皿变得不透明，因此，会影响观察，同时也会影响培养基的酸碱度。不同玻璃器皿的洗涤方法、高温灭菌前的包装方式、灭菌彻底与否均会影响实验结果，下面介绍实验用玻璃器皿和接种工具的分类、洗涤方法、包装和灭菌方式。

1. 玻璃器皿的分类、规格和使用

（1）试管（test tube）。微生物学实验所用的试管为直口，加盖棉塞或塑料帽、铝帽、硅胶泡沫塑料塞（见图 1.1）。

① 大试管（约 18 mm×180 mm）：可用于盛装制平板的固体培养基、制备琼脂斜面、盛装液体培养基进行微生物的振荡培养。

② 中试管〔约（13~15）mm×（100~150）mm〕：可用于制备琼脂斜面、盛装液体培养基，或用于菌液、病毒悬液的稀释及血清学试验。

③ 小试管〔（10~12）mm×100 mm〕：一般用于细菌或酵母菌的糖发酵试验或血清学试验。

（2）德汉氏小管（durham tube）〔见图 1.2（a）〕。是一种用于观察细菌在糖发酵培养基内产气情况的套管，倒置于盛有液体培养基的试管或三角烧瓶内。

（3）Eppendorf 管。Eppendorf 管亦即小塑料离心管〔见图 1.2（b）〕，分 1.5 mL 和 0.5 mL 两种型号。主要用于微生物分子生物学实验中小量菌体的离心以及 DNA、RNA 的提取等。

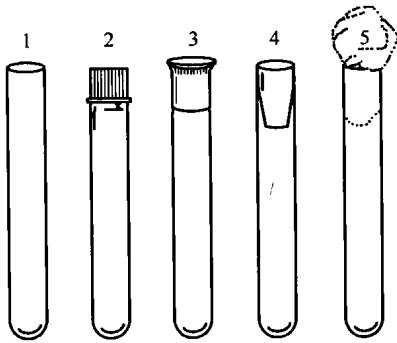
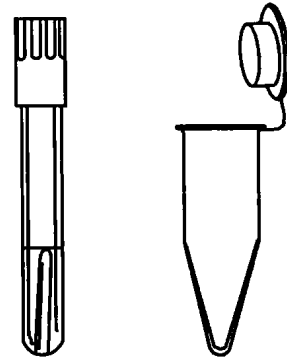


图 1.1 试管与试管帽（塞）

1—细菌学试管；2—螺帽；3—塑料帽；
4—硅胶泡沫塞；5—棉塞



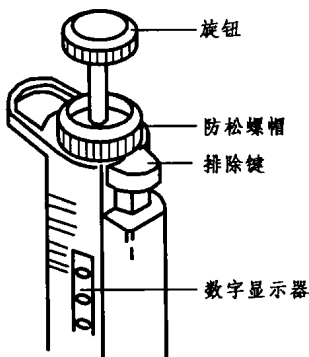
(a) 德汉式小管 (b) Eppendorf 管

图 1.2 德汉式小管和 Eppendorf 管

(4) 吸管 (pipette)。可分为以下几种类型：

① 玻璃吸管 (glass pipette)：微生物学实验室常用的刻度玻璃吸管为：0.1 mL，1 mL，2 mL，5 mL 和 10 mL，用于吸取溶液和菌悬液，或吸取不计量的液体，如染色液，离心上清液，无菌水，少量抗原、抗体，酸、碱溶液等。

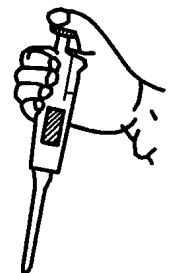
② 微量加样器 (micropipette)：又称微量吸管，用于吸取微量液体，规格型号较多，每种在一定范围内可调节几个体积，并标有使用范围，如 1~10 μL ，2~20 μL ，20~100 μL 等。使用时，将合适的塑料吸嘴牢固地套在微量加样器的下端，旋动调节键，使数字显示器显示出所需吸取的体积；用大拇指按下调节键并将吸嘴插入液体中，缓慢放松调节键，使液体进入吸嘴，并将其移至接收试管中，按下调节键，使液体进入接收管，按下排除键，将吸嘴脱卸，如图 1.3 所示。



(a) 结构示意图

吸管大小	0.5~10 μL	10~100 μL	10~1000 μL
1	1	1	1
0	0	5	0
0	0	0	0
0	0	0	0
体积	10 μL	50 μL	1000 μL

(b) 刻度显示器



(c) 操作示意图

图 1.3 微量加样器

(5) 培养皿 (petri dish)。常用培养皿如图 1.4 所示，皿底直径为 90 mm，高为 15 mm，皿底、皿盖均为玻璃制成。有特殊需要时，可使用陶器皿盖，因其能吸收水分，可使培养基表面干燥。如测定抗生素效价时，培养皿不能倒置培养，则用陶器皿盖为好。

在培养皿内倒入适量固体培养基制成平板，可用于分离、纯化、鉴定菌种或细胞计数，以及测定抗生素、噬菌体的效价。

(6) 三角烧瓶 (erlenmeyer flash) 与烧杯 (beaker)。多用于储存培养基和生理盐水, 有 50 mL, 100 mL, 150 mL, 200 mL, 250 mL, 500 mL, 1 000 mL, 2 000 mL 等多种规格, 其底大口小, 便于加塞, 放置平稳。常用烧杯有 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL 和 1 000 mL 等, 用于配置培养基与各种溶液。

(7) 注射器 (injector)。注射器的容量有 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL, 25 mL, 通常用于免疫实验、薄层层析、电泳点样、色谱进样。

(8) 试剂瓶 (reagent bottle)。该瓶磨口分为广口和小口, 根据需储存试剂的量选用不同大小的试剂瓶。有棕色和无色两种, 棕色主要用来装避光试剂。

(9) 玻璃缸 (glass vat)。用于盛放石炭酸或来苏水等消毒液, 以备浸泡用过的载玻片、盖载玻片等。

(10) 载玻片 (slide) 和盖载玻片 (cover slip)。普通为长方形, 常用于微生物涂片、染色形态观察等。凹载玻片是在中央有一个圆形凹窝的载玻片, 用于制作悬滴片进行细菌运动的观察 (见图 1.5)。

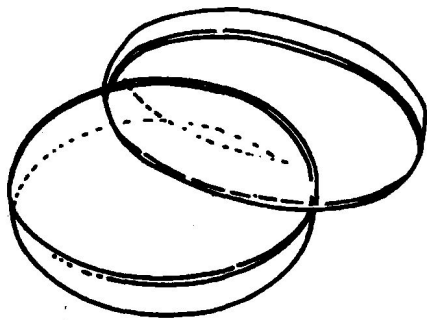


图 1.4 培养皿

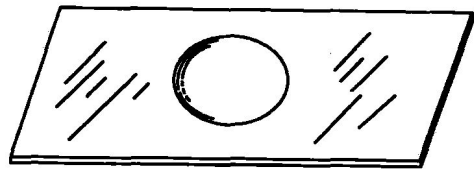
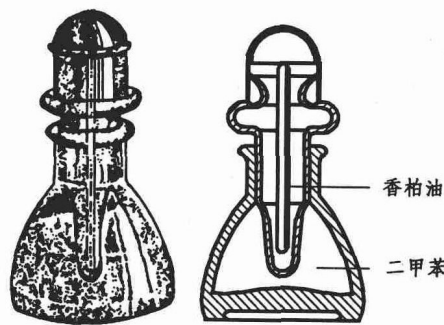


图 1.5 凹载玻片

(11) 双层瓶 (double bottle)。该瓶由内外两个玻璃瓶组成, 内层小锥形瓶装装有香柏油, 外层瓶装二甲苯 [见图 1.6 (a)]。

(12) 滴瓶 (dropper bottle)。该瓶用来盛装各种染液和无菌水等 [见图 1.6 (b)]。



(a) 双层瓶

(b) 滴瓶

图 1.6 双层瓶与滴瓶

(13) 接种工具。该工具有接种环、接种针、接种钩、接种铲几种, 它们都是用金属铂或镍制成。涂布器是用玻璃灼烧后弯曲或压扁制成的, 有三角形和勺形之分 (见图 1.7)。

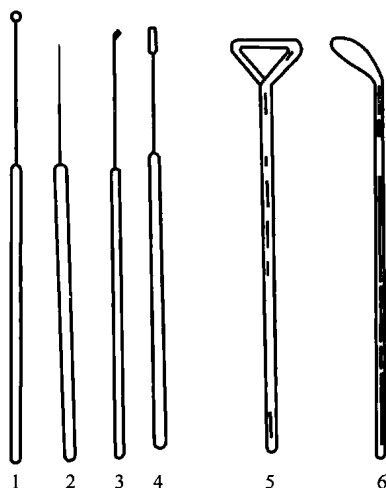


图 1.7 接种工具

1—接种环；2—接种针；3—接种钩；4—接种铲；5、6—玻璃涂布器

2. 玻璃仪器的清洗

(1) 新玻璃仪器的洗涤方法。新玻璃器皿通常含有游离碱，应先在酸溶液（2% HCl）中浸泡数小时，以中和游离碱，然后用自来水冲洗。

(2) 已使用过的玻璃器皿的洗涤方法。不同类型玻璃器皿的洗涤方法不同。

① 试管、培养皿、三角瓶：一般可用试管刷沾上洗涤剂刷洗，然后用自来水冲洗干净，再用蒸馏水冲一遍，倒置晾干或置于烘箱中烘干。经固体培养基培养后带菌的培养皿、斜面、试管等应先在 2% 的来苏水或消毒液中浸泡 24 h 或者开水煮沸 30 min 后，再洗；带病原菌的培养物先进行高温灭菌后，再洗。

② 玻璃吸管。吸过糖溶液、染液、血液、血清、菌液（非致病菌）的玻璃吸管和毛细吸管，使用后应立即投入底部垫有玻璃棉、盛有自来水的量筒或标本瓶内，以免干燥后难以冲洗干净。吸管顶部塞有棉花，应先用牙签拔出或用尖嘴自来水龙头的急速水流将棉花冲出（水龙头尖端与吸管尖端接触），再洗涤，风干或烘干备用。吸过菌液的玻璃吸管或塑料吸嘴用消毒液浸泡，或开水煮沸，或用超声波清洗器超声洗涤 10~20 min，特别是吸取过核酸、抗原、抗体的塑料吸管必须经超声波清洗器清洗方可使用。

③ 载玻片与盖载玻片。用过的载玻片与盖载玻片，如滴有香柏油，应先用卫生纸掇去油面再用浸有二甲苯的脱脂棉擦拭溶解油垢。在湿热的含洗洁精的水中用纱布或脱脂棉擦拭洗涤，自来水冲洗，沥干水分后再于洗液中浸泡 1~2 h，自来水冲洗，蒸馏水冲洗后，经目测，载玻片或盖载玻片上无残留水珠，可视为洗涤干净。风干后于 95% 酒精中保存备用，使用时用镊子取出，烧去残留酒精即可。

涂有活菌和致病菌的载玻片或盖载玻片应经消毒液处理 24 h 后，方可进行洗涤，以避免致病菌可能对实验者造成感染。

3. 玻璃器皿的包装和灭菌

(1) 培养皿的包装和灭菌主要有以下几种方式：

① 筒装：将洗涤干净并风干的培养皿按顺序放入金属（铜或不锈钢）圆筒内的带底框架中，加盖，置烘箱内干热灭菌（ $130\sim 140^{\circ}\text{C}$ ，4 h，或 $150\sim 170^{\circ}\text{C}$ ，1~2 h），或高压蒸汽灭菌 20~30 min，冷却后备用（见图 1.8）。

② 纸包装：用旧报纸将 5 套培养皿卷成一排，第 1 套和第 5 套的血盖朝外，卷筒两端的报纸折叠后压紧，置于 $130\sim 140^{\circ}\text{C}$ 烘箱内干热灭菌 3~4 h 后，待温度自然冷却至 40°C 以下，方可取出。烘箱温度高于 100°C 时，切勿打开烘箱，以免冷空气进入烘箱内，引起培养皿爆裂，包装纸自燃。

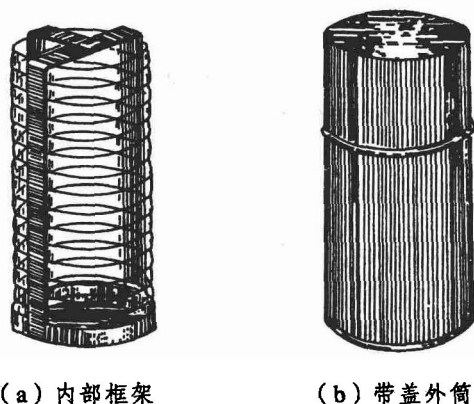


图 1.8 装培养皿的金属筒

(2) 吸管的包装和灭菌主要有以下几种方式：

① 筒装：灭菌用的金属筒有长方形和圆柱形两种，筒底垫放干净的玻璃棉，每支吸管的粗头端塞一段棉花。灭菌方式和培养皿的相同。

② 纸包装：将塞好棉花的吸管放在旧报纸的近左端，并将旧报纸多余的一段折在吸管上，左手按住吸管尖端的纸，右手转动吸管，右端多余的报纸打一个小结。灭菌方式同上。

③ 试管和三角烧瓶的包装和灭菌：试管用棉花或橡皮帽塞好，外面再用一层牛皮纸包好，棉线扎紧；用纱布包裹的棉塞塞住三角瓶的口，外面再用牛皮纸包上，棉线扎紧，高压蒸汽灭菌。

1.1.2 常用仪器及其使用要求

1. 培养箱

(1) 主要构造。培养箱是培养微生物的重要仪器，以铁皮喷漆制成外壳，铝板做内壁，用石棉或玻璃棉等绝缘材料填充夹层，内层底下安装电阻丝用来加热，利用空气对流，使箱内温度均匀；箱内设有金属孔架数层，用来搁置培养标本，箱门为双层，内为玻璃门，便于观察，外为金属板门，箱壁装有温度调节钮。常见的有电热恒温培养箱、生化培养箱和调温调湿培养箱等。

(2) 使用和维护。主要内容包括箱内不易放过冷或过热的物体，取放物体时要迅速，并把箱门关好；箱内培养物不能放得过挤，培养箱底层温度较高，培养物不能与之直接接触；

培养箱内可以放上一个装有水的容器，以维持箱内湿度，避免培养物中的水分大量蒸发；定期给内箱消毒，先用 3% 的来苏水涂布消毒，再用清水擦净。

2. 水浴箱

是由金属制成的长方形箱，内装有水，箱底装有电热丝。水浴箱箱盖成斜面，以便水蒸气凝结的水沿斜面流下，箱内的水要定期更换，并注意清洗箱内沉积物。

3. 超净工作台

其工作原理是借助箱内鼓风机将外界空气强行通过一组过滤器，净化的空气能够连续不断地进入操作台面，并且台内设有紫外线杀菌灯，可以对台内进行杀菌，保证了无菌状态。超净工作台操作的注意事项包括：

- (1) 使用前 30 min 要打开紫外灯杀菌。
- (2) 使用前 10 min 将通风机开启，并且用白纱布将台面擦干净。
- (3) 物品的放置不能妨碍气流的正常流动。
- (4) 超净工作台的安装要远离有振动及噪音大的地方。
- (5) 定期检查超净工作台的工作性能。

1.2 显微镜的构造、性能和使用方法

微生物最显著的特点就是个体微小，肉眼观察不到，必须借助显微镜才能观察到微生物的形态，所以熟悉并掌握显微镜的使用技术是研究微生物最基本的手段之一。下面分别介绍常用普通光学显微镜、相差显微镜和电子显微镜的使用技术。

1.2.1 实验一 普通光学显微镜的使用

1. 目的要求

- (1) 学习并掌握油镜的原理和使用方法
- (2) 复习普通台式显微镜的结构、各部分的功能和使用方法

2. 普通光学显微镜的构造

普通光学显微镜由机械部分和光学部分组成，其结构如图 1.9 所示。

(1) 机械部分主要包括以下几部分：

- ① 镜座：镜座是显微镜的基本支架，由底座和镜臂两部分组成。
- ② 镜筒：镜筒上接目镜，下接转换器，形成接目镜与接物镜（装在转换器下）间的暗室。从镜筒的上缘到物镜转换器螺旋口之间的距离称为机械筒长。因为物镜的放大率是对

一定的镜筒长度而言的，镜筒长度的变化，不仅放大倍率随之变化，而且成像质量也受到影 响。因此，使用显微镜时，不能任意改变镜筒长度，国际上将显微镜的标准筒长定为 160 mm。

③ 物镜转换器：物镜转换器上可以装 3~4 个物镜，分别是低倍镜、高倍镜和油镜。

④ 载物台：盛放标本，中间有一个小孔，光可以通过，并且载物台上还装有弹簧标本夹和推动器。

⑤ 推动器：用来移动标本。

⑥ 粗调螺旋：粗调螺旋用于粗调物镜和标本的距离。

⑦ 微调螺旋：用来调节以便看到清晰的图像。

(2) 光学部分包括以下部分：

① 反光镜：由一平面和另一凹的镜子组成，可以将投射在它上面的光线反射到聚光器透 镜的中央，照明标本。

② 聚光器：由聚光透镜、虹彩光圈和升降螺旋组成，起调节和集中光线的作用。

③ 物镜：装在物镜转化器上，其性能取决于物镜的数值孔径 (NA)，NA 越大，其性能 越好。

④ 目镜：装在镜筒上端，具有把放大的物镜实像二次放大的作用。

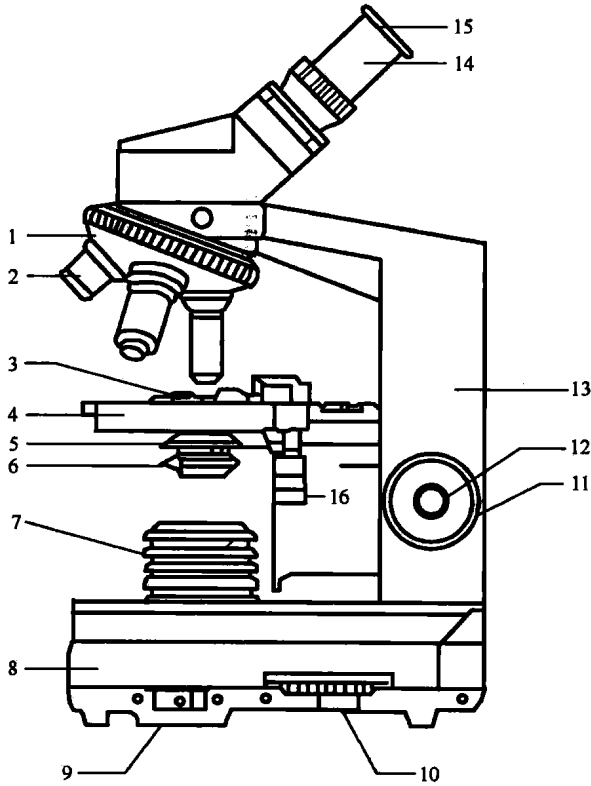


图 1.9 光学显微镜的结构

1—物镜转换台；2—物镜；3—游标卡尺；4—载物台；5—聚光器；6—虹彩光圈；
7—光源；8—镜座；9—电源开关；10—光源滑动变阻器；11—粗调螺旋；
12—微调螺旋；13—镜臂；14—镜筒；15—目镜；16—标本移动螺旋

3. 光学显微镜的成像原理

光学显微镜是利用目镜和物镜两组透镜系统来放大成像的。这组透镜相当于一个放大镜，跟单透镜相比，它可以消除部分相差或色差，所以放大效果更好。图 1.10 所示为显微镜的成像原理图， $A''B''$ 和眼睛的距离为显微镜的明视距离，标本 AB 的像经过 L_o (物镜) 后到 $A'B'$ 处成为一个放大倒立的实像 (中间像)， F 为 L_o 的后焦点。当光线传到 L_e (目镜) 时， $A'B'$ 被放大成一个直立的虚像，然后传递到视网膜 $A'''B'''$ 上，标本 AB 就被放大，人眼看到的是 AB 被放大后的图像， $A'''B'''$ 与原样品的方向是相反的。

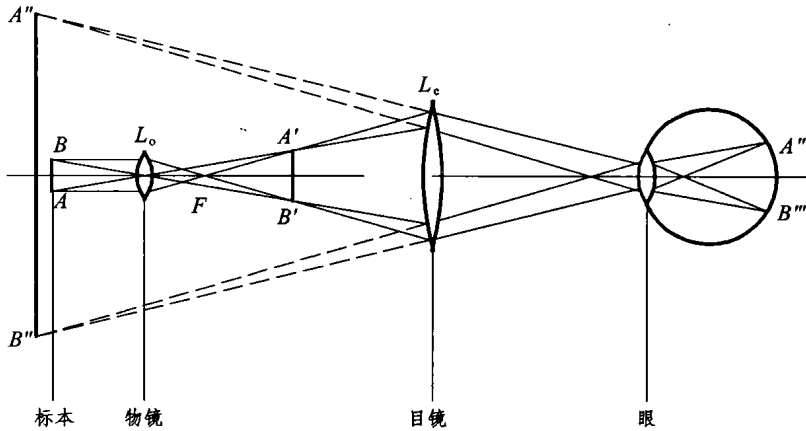


图 1.10 显微镜的成像原理图

光学系统各部件的质量直接影响到显微镜的分辨能力，其中物镜的性能最重要，其次是目镜和聚光器。

(1) 数值孔径 (NA)。数值孔径是物镜和聚光器的主要参数，是判断它们性能的重要指标，它与显微镜的分辨率成正比，与焦深成反比，与镜像亮度的平方根成正比，即

$$NA = n \sin \alpha / 2$$

式中 n ——物镜与标本之间的介质折射率；

α ——物镜的镜口角。

物镜的镜口角是指从物镜光轴上像点发出的光线与物镜前透镜有效直径的边缘所张的角度 (总是小于 180°)，故 $\sin \alpha / 2$ 总是小于 1；又因为空气折射率为 1，所以干燥物镜的 NA 总是小于 1，一般为 $0.05 \sim 0.95$ ；使用油镜 (如香柏油) 时， NA 一般不超过 1.4。

(2) 分辨率。分辨率是指分辨物象细微结构的能力，常以可分辨出物像两点间的最短距离 D ($D = \lambda / 2NA$) 表示。如果某个物体小于 $\lambda / 2$ ，则光可以绕过物体而不能成像，分辨率越高，成像越清晰。

(3) 放大率。放大率就是放大物像和原物体大小之比。显微镜的放大率 ν 等于物镜放大率 ν_1 和目镜放大率 ν_2 的乘积，其较精确的计算可用下式求得：

$$M = (\Delta / F_1) \cdot (S / F_2)$$

式中 M ——显微镜的放大倍数；

F_1 ——物镜焦距；

F_2 ——目镜焦距;

S ——明视距离 (250 mm);

Δ ——光学筒长。

(4) 焦深。在显微镜下观察一个标本, 焦点对在某一像面时, 物像最清晰, 该像面为焦平面。在视野内除目的面外, 还能在焦平面的上面和下面看见物像。这两个面之间的距离称为焦深, 物镜的焦深和数值孔径及放大率成反比, 即数值孔径和放大率愈大, 焦深愈小。因此, 调节油镜比调节低倍镜要更加仔细, 否则容易使物像滑过而找不到。

4. 显微镜的使用

(1) 观察前的准备。拿显微镜时, 要用右手紧握镜臂, 左手托住镜座, 平稳地将显微镜搬运到实验桌上。将显微镜放在自己身体的左前方, 离案或边缘约 10 cm 左右, 右侧可放记录本或绘图纸。对于不带光源的显微镜, 可利用灯光或自然光通过反光镜来调节光照。不能用直射阳光, 因为直射阳光会影响物像的清晰并刺激眼睛。将 10× 物镜转入通光孔, 将聚光器上的虹彩光圈打开到最大位置, 用左眼观察目镜中视野的亮度, 转动反光镜, 使视野的光照达到最明亮、最均匀为止。光线较强时, 用平面反光镜; 光线较弱时, 用凹面反光镜。对自带光源的显微镜, 可通过调节电阻旋钮来调节光照强弱。显微镜观察时, 其光学系统中的光源、聚光器、物镜和目镜的光轴及光阑的中心必须在显微镜光轴的一条线上。使用带视场光阑的显微镜时, 先将光阑缩小, 用 10× 物镜观察, 在视场内可见到视场光阑圆球多边形的物像。如此像不在视场中央, 可利用聚光器外侧的两个调整旋钮将其调到中央, 然后缓慢地将视场光阑打开, 能看到光束向视场边缘均匀展开直至视场光阑的多边形物像完全与视场边缘内接, 说明光线已经合轴。

(2) 低倍镜观察。因为低倍镜的视野大, 容易发现目标, 所以镜检时要先用低倍镜观察。将标本放在载物台上用标本夹夹住, 移动推动器, 使标本在物镜下方, 转动粗调螺旋, 同时用目镜观察, 当看到物像后, 再调节细调螺旋使物像清晰。

(3) 高倍镜观察。在低倍镜的基础上转换高倍物镜。注意, 在转换时不要碰到载玻片或盖薄片, 观察方法与低倍镜观察相同。

(4) 油镜观察。因为油镜观察时要使物镜浸到油内, 所以使用油镜时要特别小心, 注意调焦时不要把载玻片或物镜损坏。进行油镜观察时, 先在标本的镜检部位滴上一滴香柏油, 调节粗调螺旋, 使得物镜浸到香柏油上, 观察方法与低倍镜、高倍镜相同。观察完毕后, 将物镜旋下来, 先用有机溶剂 (如乙醚) 擦拭镜头, 再用擦镜纸擦拭。

显微镜使用完毕后, 将各部位还原, 最后将显微镜放回镜箱中。

5. 实验报告

用油镜观察枯草芽孢杆菌的染色标本, 并绘图。

6. 思考题

(1) 油镜用完后, 为什么必须把油镜擦净? 用过多的二甲苯或酒精擦油镜有什么危害?

(2) 使用油镜时，为什么选用香柏油或液体石蜡作为物镜与载玻片之间的介质？用其他液体行吗？

1.2.2 实验二 相差显微镜的使用

相差显微镜是一种能将光线通过透明标本后产生的光程差即相位差转换成光强差的特种显微镜。用普通光学显微镜观察未染色的标本时，其形态和结构难以分辨，但是相差显微镜能通过环状光阑和相板将光的相位差转变成人眼可以感觉到的振幅差，使标本表现出明显的明暗差异，从而观察到细胞的细微结构。

1. 目的要求

- (1) 了解相差显微镜的构造和原理。
- (2) 掌握相差显微镜的使用方法。

2. 相差显微镜的结构

相差显微镜的结构和普通显微镜的基本相同，只是增加了相聚光器、相差物镜、合轴调节望远镜和绿色滤光器。

(1) 相聚光器。位于聚光器的前焦点平面上，光阑的直径和物镜的放大倍数相匹配，有一个明视场光场与聚光器一起构成相聚光器，使用时只需把相应的光阑转到光路上即可。其结构如图 1.11 所示。

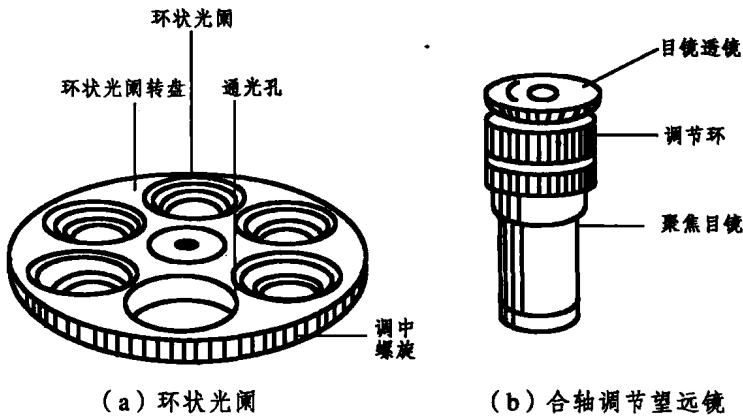


图 1.11 相聚光器的结构图

(2) 相差物镜。是在物镜内部的后焦平面上增加了相板的特殊物镜。相板上镀有两种不同的金属膜：吸收膜和相位膜。吸收膜常为铬、银等金属在真空中蒸发而镀成的薄膜，它能把通过的光线吸收掉 60%~93%。相位膜为氯化镁等在真空中蒸发镀成，它能把通过的光线相位推迟 $\lambda/4$ 波长。

如果吸收膜和相位膜都镀在相反的共轭面上，通过共轭面的直射光不但振幅减弱，而且相位也被推迟 $\lambda/4$ ，衍射光因通过物体时相位也被推迟 $\lambda/4$ ，这样就使得直射光与衍射光维