

秦翠丽 李松彪 主编

微生物学实验技术

WEISHENGWUXUE
SHIYANJISHU

兵器工业出版社

微生物学实验技术

秦翠丽 李松彪 主编

兵器工业出版社

内 容 简 介

本书全面介绍了微生物学实验基本原理与操作技术。全书共 14 章 79 个实验,内容涵盖显微镜使用技术、微生物染色技术、培养基制备技术、消毒、灭菌与除菌技术、微生物接种与分离培养技术、微生物的生长与环境条件、微生物的生理生化试验、微生物菌种选育技术、菌种保藏技术、病毒的分离与培养、常用血清学实验技术、动物实验技术、生产实践中常用微生物分离与性能鉴定、食品微生物指标检测技术等。书后附录部分列出了微生物学实验常用染色液、指示剂、试剂、溶液、缓冲液、培养基的配制方法,以及微生物学实验中一些常用数据表。本书在编写过程中,注重实验内容的基础性、系统性、应用性与科学性,可作为从事生物与食品等相关工作人员的参考书和工具书。

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学实验技术/秦翠丽,李松彪主编. —北京:兵器工业出版社,2008.4

ISBN 978-7-80248-030-8

I. 微… II. ①秦…②李… 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 (2008) 第 034476 号

出版发行:兵器工业出版社

发行电话:010-68962596, 68962591

邮 编:100089

社 址:北京市海淀区车道沟 10 号

经 销:各地新华书店

印 刷:北京市登峰印刷厂

版 次:2008 年 4 月第 1 版第 1 次印刷

责任编辑:常小虹

封面设计:李 晖

责任校对:郭 芳

责任印制:赵春云

开 本:787×1092 1/16

印 张:13

字 数:330 千字

定 价:29.00 元

(版权所有 翻印必究 印装有误 负责调换)

《微生物学实验技术》 编委会

主 编 秦翠丽 李松彪

副 主 编 李市场 张 敏 赵君峰 龚明贵 伍家发
张红梅 刘风云

主 审 秦翠丽

前 言

微生物学实验技术是微生物学的重要组成部分，其内容丰富、应用面广、实践性强、技术综合。加强微生物学实验教学，对培养同学们观察能力、动手能力、提高辩证思维能力和创新能力具有重要作用，并可为日后从事微生物学相关的教学、科研和生产实践打下坚实基础。

本书是在结合我们河南科技大学生物工程、食品科学与工程、食品质量与安全等专业多年微生物学实验教学内容和教学经验基础上，参考兄弟院校的实验教材及相关资料编写而成。本书以大量单个实验的形式对研究微生物的各种实验技术和操作技能进行了较系统的论述，一方面，着重提高学生微生物学基本实验技能和操作能力；另一方面，着重提高学生对于微生物学实验技术重要性的认识和应用能力。全书的内容编排分成三个层次：

一、微生物学实验的基本操作和技能训练：如无菌操作技术、显微镜技术、涂片染色技术、培养基制备技术、消毒、灭菌与除菌技术、微生物接种与分离培养技术、微生物细胞大小的测量和数目的测定技术等。

二、为加深学生对理论知识的理解而设计的实验，如各类微生物形态观察、微生物生理生化测定、微生物生长曲线的测定、环境因素对微生物生长的影响、微生物菌种的选育及免疫学技术等。

三、考虑微生物学本身广泛的应用性及学生毕业后可能从事与微生物学有关的教学、科研或与食品、农业、环境保护等有关工作的需要，本书编写了大量生产实践中常用微生物的分离与性能鉴定实验及动物实验技术、食品微生物指标检测技术等实验内容等。

参加本书编写的人员有：秦翠丽、侯颖编写第一章、第八章、第十四章、附录三，李松彪、李市场编写第五章、第六章、第十一章、第十三章，赵君峰、伍家发编写第二章、第三章、第四章、第十三章、附录二、附录三，张敏、龚明贵、编写第七章、第九章、第十三章、附录一、附录四；张红梅、刘风云编写第十章、第十二章、附录一、附录三。

本书参编人员均为我校中青年骨干教师，他们在微生物学实验教学中既坚持传统的、经典的微生物学实验方法，又不断创新、不断改良，积累了大量经验，该书是他们集体智慧的结晶。但由于编写水平有限，书中难免有疏漏和不当之处，敬请读者批评指正。

编 者

2008年2月8日

目 录

63	附录 培养基配方	章六第
42	附录 常用培养基配方	一第页
32	附录 常用培养基配方	二第页
70	附录 常用培养基配方	三第页
82	附录 常用培养基配方	四第页
83	附录 常用培养基配方	五第页
1	第一章 显微镜使用技术	1
1	实验一 普通光学显微镜的使用	1
6	实验二 暗视野显微镜的使用	6
7	实验三 相差显微镜的使用	7
8	实验四 荧光显微镜的使用	8
12	实验五 电子显微镜的使用	12
17	第二章 微生物染色技术	17
17	实验一 单染色法	17
18	实验二 复染色法	18
21	实验三 特殊染色法	21
24	实验四 负染色法	24
25	实验五 微生物细胞内贮藏物质的染色	25
26	实验六 霉菌菌丝染色	26
28	第三章 培养基制备技术	28
28	实验一 细菌用培养基的配制	28
29	实验二 真菌用培养基的配制	29
31	第四章 消毒、灭菌与除菌技术	31
31	实验一 加热及紫外线消毒与灭菌	31
34	实验二 过滤除菌	34
36	实验三 化学药物消毒与灭菌	36
38	实验四 玻璃器皿的洗涤、包扎与灭菌	38
40	第五章 微生物的接种与分离培养	40
40	实验一 微生物的接种	40
43	实验二 微生物的分离纯化方法	43
46	实验三 微生物的培养方法	46
50	实验四 微生物培养特征的观察	50

第六章 微生物的生长与环境条件	54
实验一 微生物细胞大小的测量	54
实验二 微生物数量的测定——血球计数板法	55
实验三 细菌生长曲线的测定	57
实验四 酵母菌死活细胞的鉴别	58
实验五 环境因素对微生物生长的影响	59
第七章 微生物的生理生化试验	63
实验一 细菌的生理生化试验	63
实验二 酵母菌的生理生化反应	68
实验三 霉菌生理生化试验	72
第八章 微生物菌种选育技术	74
实验一 诱变育种的基本程序及操作要点	74
实验二 紫外线诱变最适剂量的测定	80
实验三 高产蛋白酶曲霉的选育	82
实验四 营养缺陷型突变株的筛选	84
实验五 抗噬菌体菌株的选育	85
实验六 酵母菌细胞原生质体融合	87
实验七 电诱导酵母菌与短梗霉属间的融合	89
第九章 菌种保藏技术	92
实验一 常用简易保藏法	92
实验二 冷冻真空干燥保藏法	94
实验三 液氮超低温冷冻保藏法	96
实验四 厌氧性细菌保藏法	97
实验五 噬菌体保藏法	98
实验六 食用菌菌种保藏法	99
实验七 蒸馏水或其他溶液保藏法	101
第十章 病毒的分离与培养	103
实验一 噬菌体的分离与纯化	103
实验二 噬菌体效价的测定	104
实验三 病毒的鸡胚接种	106
实验四 病毒的细胞分离培养法	108
实验五 鸡胚成纤维细胞培养及病毒接种	113

第十一章 常用血清学实验技术	116
实验一 免疫血清的制备	116
实验二 凝集反应	118
实验三 沉淀反应	120
实验四 补体结合反应	121
实验五 血凝试验与血凝抑制试验	125
实验六 免疫酶测定法(ELISA)	127
第十二章 动物实验技术	130
实验一 实验动物保定法	131
实验二 实验动物接种法	132
实验三 实验动物采血法	135
实验四 感染动物观察	138
第十三章 生产实践中常用微生物分离与性能鉴定	140
实验一 乳酸菌的分离与性能鉴定	140
实验二 醋酸菌的分离与性能鉴定	142
实验三 谷氨酸产生菌的分离与性能鉴定	143
实验四 枯草芽孢杆菌的分离及初筛	144
实验五 酒曲中酵母菌的分离	145
实验六 啤酒酵母的分离	146
实验七 根霉的分离	147
实验八 柠檬酸产生菌的分离	147
实验九 黑曲霉糖化酶菌株的分离	148
实验十 米曲霉的分离	149
实验十一 土壤中自生固氮菌的分离	149
实验十二 豆科植物根瘤中根瘤菌的分离	150
实验十三 土壤中苏云金杆菌的分离	151
实验十四 土壤中放线菌的分离及其抑菌活性的测定	152
实验十五 光合细菌的分离	153
实验十六 产甲烷细菌的富集与分离	155
实验十七 香菇纯种的分离	157
第十四章 食品微生物指标检测技术	159
实验一 食品中菌落总数的测定	159
实验二 食品中大肠菌群最近似数的测定	161
实验三 食品中沙门氏菌的检验	165
实验四 食品中副溶血性弧菌的检验	172

附录	本书附录索引表	章一十	176
附录一	常用染色液、指示剂及试剂的配制	一	176
附录二	溶液与缓冲液的配制	二	179
附录三	常用培养基配制	三	184
附录四	微生物学实验中常用数据表	四	196
参考文献		五	198

130	本书附录索引表	章二十	196
131	常用染色液、指示剂及试剂的配制	一	196
132	溶液与缓冲液的配制	二	199
133	常用培养基配制	三	204
134	微生物学实验中常用数据表	四	216

140	本书附录索引表	章三十	216
141	常用染色液、指示剂及试剂的配制	一	216
142	溶液与缓冲液的配制	二	219
143	常用培养基配制	三	224
144	微生物学实验中常用数据表	四	236
145	常用染色液、指示剂及试剂的配制	五	236
146	溶液与缓冲液的配制	六	239
147	常用培养基配制	七	244
148	微生物学实验中常用数据表	八	256
149	常用染色液、指示剂及试剂的配制	九	256
150	溶液与缓冲液的配制	十	259
151	常用培养基配制	十一	264
152	微生物学实验中常用数据表	十二	276
153	常用染色液、指示剂及试剂的配制	十三	276
154	溶液与缓冲液的配制	十四	279
155	常用培养基配制	十五	284
156	微生物学实验中常用数据表	十六	296

160	本书附录索引表	章四十	296
161	常用染色液、指示剂及试剂的配制	一	296
162	溶液与缓冲液的配制	二	299
163	常用培养基配制	三	304
164	微生物学实验中常用数据表	四	316

第一章 显微镜使用技术

显微镜是微生物学研究中必不可少的工具。正确掌握显微镜使用技术,对于从事微生物有关的科学研究和生产实践是十分重要的。

显微镜种类繁多,有普通光学显微镜、相差显微镜、暗视野显微镜、荧光显微镜、倒置显微镜、偏光显微镜和电子显微镜等。

本章重点学习普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜和荧光显微镜的结构、原理和使用方法。

实验一 普通光学显微镜的使用

一、目的要求

1. 了解普通光学显微镜的构造和油浸镜的工作原理。
2. 掌握普通光学显微镜的使用与维护方法。
3. 掌握细菌形态的观察方法。

二、实验说明

1. 普通光学显微镜的构造

普通光学显微镜是一种最常用的明视野显微镜,它的构造主要包括机械和光学两部分,其各部分构件名称如图 1-1 所示。

(1) 机械部分 机械部分包括镜座、镜臂、载物台、镜筒、转换器、粗调螺旋、细调螺旋、推进器、聚光器升降螺旋等部件。

① 镜座是显微镜的底座,用以支撑整个显微镜。

② 镜臂是携带或移动的把手,上连镜筒,下连镜座,用以支撑镜筒;与镜座连接处为一关节,可使镜身倾斜。

③ 镜筒是由金属制成的中空圆筒,上端放置目镜,下端连接转换器,形成目镜与物镜间的暗室。

④ 物镜转换器是由两个金属碟所合成的一个转

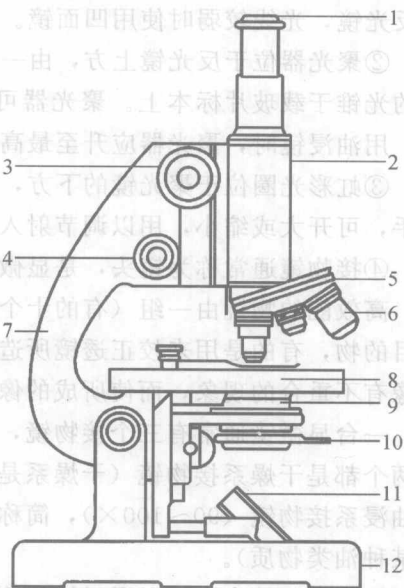


图 1-1 普通光学显微镜

- 1-目镜; 2-镜筒; 3-粗调螺旋; 4-细调螺旋;
5-物镜转换器; 6-物镜; 7-镜臂; 8-镜台;
9-聚光器; 10-可变光阑; 11-反光镜; 12-镜座

换装置。它有 3~4 个安装物镜的螺旋口，可依物镜放大倍数高低，顺序安装 3~4 个物镜。根据需要，可转动转换器将其中的某一物镜和镜筒接通，与镜筒上方的接目镜配合，构成一个放大系统。转换器的两个金属圆盘中，上面那个圆盘的正后方装有一个弹簧舌片，下面那个圆盘侧面与每个物镜相应的位置各有一个小凹缝。转换物镜时，必须使弹簧舌片嵌入此凹缝中，才是达到了正确位置。

⑤载物台位于镜筒下方，呈方形或圆形，用以载放被检物体标本。台面中央有一圆孔，为光线通路，台面上还装有推进器，用以固定或移动标本的位置，使镜检标本正好位于视野中央。有些显微镜无推进器而用弹簧夹固定标本。

⑥粗调螺旋及细调螺旋在镜筒的两旁（或载物台下）用以移动镜筒上下升降，目的是使被观察物与物镜的距离恰好等于物镜的工作距离。要使镜筒做较大幅度的升降，可用粗调螺旋；要使工作甚微的升降，则用细调螺旋。

细调螺旋每转一圈，镜筒升降 $100\ \mu\text{m}$ 。很多显微镜的细调螺旋上附有刻度，每转动一小格相当于升降 $2\ \mu\text{m}$ 。当细调螺旋旋转到极限时，则不应继续用力旋转，而应重新调节粗调螺旋，使物镜与标本距离稍微拉开一些，然后反拧细调螺旋便可将物镜调至最适高度。

⑦聚光器升降螺旋是装在载物台下的一个可使聚光器升降的部件，用它可以调节反光镜反射出来的光线。

(2) 光学部分

光学部分又可分为照明和放大两个系统，前者包括反光镜、聚光器和虹彩光圈，有的还有特殊的光源部件；后者包括接物镜和接目镜。

①反光镜位于显微镜的最下方，有平、凹两面，可以自由转动方向，其作用是将投射到它上面的光线反射到聚光器透镜的中央，穿过透镜，照明标本。当外源光线较强时应使用平面反光镜，光线较弱时使用凹面镜。

②聚光器位于反光镜上方，由一组透镜组成。其作用是将反光镜反射来的光线聚为一束强的光锥于载玻片标本上。聚光器可根据需要上下移动调节，一般用低倍镜时应降低聚光器；用油浸镜时，聚光器应升至最高。

③虹彩光圈位于聚光镜的下方，由十几张金属薄片组成，中心部分形成圆孔，推动光圈把手，可开大或缩小，用以调节射入聚光镜光线的多少，使照明恰到好处。

④接物镜通常称为镜头，是显微镜的重要部件，它不仅放大标本，而且具有辨析性能，高效能的物镜由一组（有的十个以上）特殊的透镜组成。这些透镜有的是用来辨析和放大目的物，有的是用来校正透镜所造成的像差（光线通过透镜时，通过中轴的像和边缘部分的像有不重合的现象，而使所成的像不清楚而与真像有差别）。因此，它决定着显微镜的性能。一台显微镜通常有三个接物镜，一个是低倍镜（ $8\sim 10\times$ ），一个是高倍镜（ $40\sim 60\times$ ），这两个都是干燥系接物镜（干燥系是指接物镜与被检物之间的介质是空气），第三个接物镜为油浸系接物镜（ $90\sim 100\times$ ），简称油浸镜或油镜（油浸系是指接物镜与被检物之间的介质是某种油类物质）。

接物镜的放大率可以通过镜头侧面刻有的放大倍数来辨认，也可以由其外形来辨认，一般低倍物镜较短，高倍物镜较长，油浸镜也较长。另外，不同接物镜上面带有不同颜色的线作为标记，使用时一定要识别清楚。

各种物镜上都刻有放大倍数，数值孔径（Numerical Aperture, NA）及所要求盖玻片

厚度等主要参数,如图 1-2 所示。

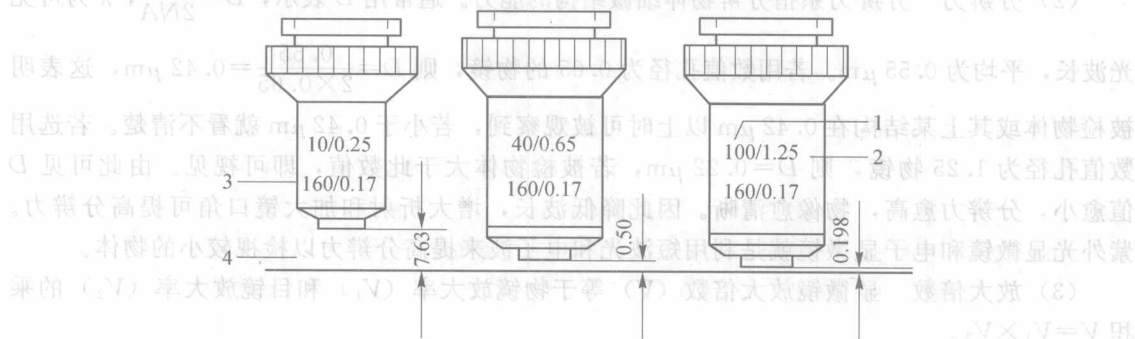


图 1-2 XSP-16A 型显微镜的主要参数

1-放大倍数; 2-数值孔径; 3-镜筒长及指定盖玻片厚度; 4-工作距离

⑤接目镜通常称为目镜,位于镜筒的上端,由两块透镜组成。它只能将物镜所造成的实像进一步放大形成虚像映入眼部,不具有辨析性能。通常每台显微镜都备有几种不同放大倍数的接目镜,如 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $16\times$,可根据需要选择其中一种使用。有的接目镜为便于指标物像,镜中装有黑色细丝一条作为指针。

2. 显微镜的性能

(1) 数值孔径 显微镜分辨能力的高低决定于光学部分的各种条件,但起决定性影响的是物镜。物镜的性能可用数值孔径 (NA) 来表示。数值孔径又叫开口率,它与显微镜的分辨力成正比,与焦深成反比,与镜像亮度平方根成正比。

$$NA = n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}$$

式中 n ——物镜与标本间的介质折射率。

α ——物镜的镜口角,即光源投射到透镜上的光线与光轴之间的最大夹角,如图 1-3 所示。

事实上, α 总是小于 180° , 所以 $\sin \frac{\alpha}{2}$ 的最大值小于 1。由于空气的折射率为 1, 所以干燥物镜的数值孔径总是小于 1, 一般为 $0.05 \sim 0.95$, 油镜物镜如用香柏油 (折射率为 1.515) 作介质, 则数值孔径最大可接近 1.5。虽然理论上数值孔径的极限等于所用介质的折射率, 但实际上从透镜的制造技术看是达不到的。通常在实用范围内, 高级油镜的最大数值孔径为 1.414 (见图 1-4)。

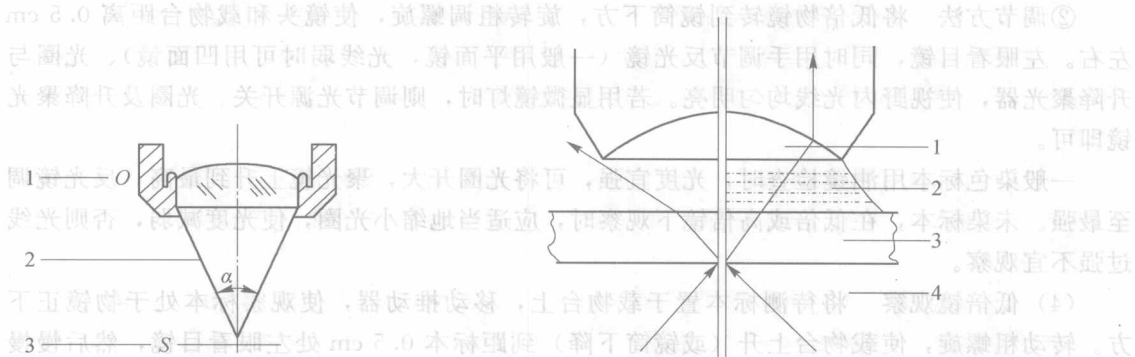


图 1-3 物镜的镜口角

图 1-4 油浸镜的作用

1-物镜; 2-镜口角; 3-标本面 1-油镜头, $n \approx 1.52$; 2-香柏油, $n \approx 1.52$; 3-载玻片, $n \approx 1.52$; 4-空气, $n=1$

(2) 分辨力 分辨力系指分辨物体细微结构的能力。通常用 D 表示, $D = \frac{\lambda}{2NA}$, λ 为可见光波长, 平均为 $0.55 \mu\text{m}$ 。若用数值孔径为 0.65 的物镜, 则 $D = \frac{0.55}{2 \times 0.65} = 0.42 \mu\text{m}$, 这表明被检物体或其上某结构在 $0.42 \mu\text{m}$ 以上时可被观察到, 若小于 $0.42 \mu\text{m}$ 就看不清楚。若选用数值孔径为 1.25 物镜, 则 $D = 0.22 \mu\text{m}$, 若被检物体大于此数值, 即可可见。由此可见 D 值愈小, 分辨力愈高, 物像愈清晰。因此降低波长, 增大折射和加大镜口角可提高分辨力。紫外光显微镜和电子显微镜就是利用短波光 and 电子波来提高分辨力以检视较小的物体。

(3) 放大倍数 显微镜放大倍数 (V) 等于物镜放大率 (V_1) 和目镜放大率 (V_2) 的乘积 $V = V_1 \times V_2$ 。

(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, 这个像面为目的面。在视野内除目的面外, 还能在目的面的上面和下面看见物像, 这两个面之间的距离称为焦深。物镜的焦深和开口率及放大率成反比, 即开口率和放大率愈大, 焦深愈小。因此调节高倍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。

三、实验器材

1. 菌种及标本 培养 24~36 h 的枯草芽孢杆菌斜面菌种、酵母菌标本片、细菌标本片。
2. 器材及其他 显微镜、载玻片、盖玻片、酒精灯、接种环、凹玻片、香柏油、二甲苯。

四、方法步骤

1. 普通光学显微镜的使用

(1) 取镜 打开镜箱、右手握住镜臂, 取出显微镜, 用左手托住镜座, 放于平稳的实验台上。

(2) 姿势 镜检者姿势应端正, 一般用左眼观察, 右眼进行绘图和记录, 两眼应同时睁开, 以减少疲劳。

(3) 对光

①正确选用光源 在实验室内一般可采用 20~30W 的日光灯或特制的显微镜灯做光源, 还可用晴天对着窗户的自然光, 但不能用直射光。普通灯泡的光有黄色光影响观察, 需在聚光镜下加一块滤光片滤去黄光。

②调节方法 将低倍物镜转到镜筒下方, 旋转粗调螺旋, 使镜头和载物台距离 0.5 cm 左右。左眼看目镜, 同时用手调节反光镜 (一般用平面镜, 光线弱时可用凹面镜)、光圈与升降聚光器, 使视野内光线均匀明亮。若用显微镜灯时, 则调节光源开关、光圈及升降聚光镜即可。

一般染色标本用油镜检查时, 光度宜强, 可将光圈开大, 聚光镜上升到最高, 反光镜调至最强。未染标本, 在低倍或高倍镜下观察时, 应适当地缩小光圈, 使光度减弱, 否则光线过强不宜观察。

(4) 低倍镜观察 将待测标本置于载物台上, 移动推动器, 使观察标本处于物镜正下方。转动粗螺旋, 使载物台上升 (或镜筒下降) 到距标本 0.5 cm 处左眼看目镜, 然后慢慢地下降载物台 (或上升镜筒) 直至出现模糊像后, 用细调螺旋调至物像清晰为止。

(5) 高倍镜观察 将高倍物镜 (40~60 $\times$) 转至镜筒正下方, 调节光圈和聚光器, 使光

亮度适中，再转动细调螺旋，获得清晰的物像，仔细观察染色标本片，再移动推进器，选择满意的检查部位，进行观察或转换油镜观察。

(6) 油浸镜的观察 细菌或其他标本的细微结构，都需要用油浸镜观察，由于油浸镜的工作距离很短(0.19 mm左右)，故使用时必须特别小心。

①转换油镜 用粗调螺旋将镜筒提升(或载物台下降)约2 cm，再转油镜至中央。

②加香柏油 往标本的镜检部位滴1~2滴香柏油，然后从侧面注视并转动粗调螺旋使镜筒慢慢地下降(或载物台慢慢上升)，使油镜浸入香柏油中，镜头几乎与标本相接触(注意切勿压在标本上，以免压碎玻片，甚至损坏油镜头)。

③调焦 由目镜观察，打开光圈，调整聚光器和光源使视野光线达到最亮。然后，慢慢转动粗调螺旋使镜筒徐徐上升(或载物台慢慢下降)。当视野出现模糊物像时，改用细调螺旋调至物像最清晰为止。

④观察 观察时要多观察几个视野，视野内的菌体呈均匀分布时，再仔细观察菌体的形态及排列方式。

(7) 镜检后显微镜的保养

①擦油镜 使用完毕后，提升镜筒(或下降载物台)，转动物镜转换器，使油镜头偏位，先用擦镜纸擦去镜头上的油，再用擦镜纸蘸少许乙醚酒精混合液(乙醚3份+无水乙醇7份)或二甲苯，擦去镜头上残留油迹，最后再用擦镜纸擦拭干镜头即可(切忌用手或其他纸擦镜头)。

②还原各部位 下降聚光器，打开虹彩光圈，使反光镜镜面垂直于镜座，以免积聚灰尘。转动转换器，使物镜呈“八”字形叉开置于载物台上，并转动粗调螺旋将镜筒(或载物台)降至最低，然后将显微镜送回箱中。

③存放 显微镜应放在干燥阴凉的地方，不能放在强烈的日光下暴晒，梅雨季节应在显微镜箱内放置干燥剂(硅胶)，如长期不用，则光学部分应卸下放在干燥箱中，以免受潮发霉。

2. 活细菌观察

活的细菌在显微镜下是透明的，不易观察。因此观察时应减弱光照，增加反差，才能获得较好的效果。如果光照很强，细菌和周围液体的差别就难以辨别。观察活细菌常用下面两种方法。

(1) 取凹玻片一块放在实验台上，用尖头镊子夹盖玻片一块平放桌上，滴一小滴蒸馏水于盖玻片中央，用无菌操作方法取少许菌体放在水滴中，小心地把盖玻片翻转过来，使水滴悬在盖玻片底下，再把它放在凹玻片的凹窝上，轻轻地按一下，使其和凡士林粘紧使水滴刚好悬在凹窝上(见图1-5)。



图1-5 悬滴制片法

镜检时，先用低倍镜对着水滴的边沿，用粗螺旋慢慢下降载物台(台提升镜筒)。由于水滴与玻片的折光率不同，这样就容易调节好焦距，便于找到菌体。然后转高倍镜，用微调螺旋仔细调节焦距，观察活细菌的运动和形态。

(2) 取载玻片一块，加灭菌生理盐水一滴，按无菌操作技术取少许菌在水滴中蘸几下，当水滴微浑时即将接种环在酒精灯火焰上灼烧去多余菌体，然后盖上盖玻片。镜检是先用低倍镜调焦，然后转高倍镜观察。

实验二 暗视野显微镜的使用

一、目的要求

1. 了解暗视野显微镜的工作原理。
2. 掌握暗视野显微镜的使用方法。

二、实验说明

1. 工作原理

暗视野显微镜是使用一种特殊的暗视野聚光镜或暗视野聚光器，不让光线直接照射被检物体并进入物镜，而是使光线只能从周缘进入并汇聚在被检物体的表面，利用被检物体表面的反射光线来观察物体的轮廓。暗视野显微镜适合于观察在明视野中不易观察的折射率很强的物体，以及普通明视野显微镜看不到的微小颗粒（ $0.02\sim 0.04\ \mu\text{m}$ ），如细菌的运动或鞭毛等。

2. 暗视野显微镜的类型

暗视野显微镜主要有两种类型，一种是折射型，即在普通光学显微镜放置滤光片的地方放上一个中心有光挡的小铁环就成为一个暗视野聚光镜。另一种是反射型，有不同形式的产品。

三、实验器材

1. 菌种 枯草芽孢杆菌或大肠杆菌。
2. 仪器及其他 普通光学显微镜、暗视野聚光器、显微镜灯，盖玻片（厚度 $<0.17\ \text{mm}$ ）、载玻片（厚度 $1.0\sim 1.2\ \text{mm}$ ）、香柏油、二甲苯、擦镜纸等。

四、方法步骤

1. 安装暗视野聚光器 取下普通聚光器，换上暗视野聚光器，上升聚光器使其透镜顶端与载物台平齐。

2. 调节光源 光源宜强，将光源开到最大，聚光器光圈调至1.4。如显微镜本身不带光源，可用显微镜灯，调整好光源和反光镜，使强光束正好落在反光镜中央并反射入聚光器。

3. 制片 取载玻片一块，加一滴幼龄菌液，盖上盖玻片（注意不要有气泡，载玻片和盖玻片应非常清洁，无油脂、无划痕、以免反射光线）。

4. 置片 加香柏油于聚光器透镜的顶部，下降聚光器，然后把制片放置在载物台上，把标本移至镜下，升高聚光器，使镜油与载玻片背面相接触（应避免产生气泡）。

5. 调焦和调中 用低倍镜进行。调节聚光器的高低，最初可出现一个中间有一黑点的光环，再调至成为一个光点，光点愈小愈好。然后用聚光器的调中螺丝进行调节，使光点位于视野中心，如图1-6所示。



图1-6 暗视野聚光器的中心调节及调焦

6. 用油镜观察 操作方法见本章实验一，并可进一步微调聚光器和反光镜使暗视野照明

但聚光器焦点与被检物不一致；c) 焦点与被检物一致

处于最佳状态，并仔细调节粗、细调螺旋，使菌体更清晰。

五、实验结果

描述所观察菌体的运动情况。

实验三 相差显微镜的使用

一、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。

二、实验说明

1. 构造与工作原理

相差显微镜的外形和成像原理与普通显微镜相似，不同的是相差显微镜有相差聚光器（内有环状光阑）和相差物镜（内装相板）及调节环状光阑和相板合轴的调整望远镜。

相差聚光器有一个转盘，内有大小不同的环状光阑，在边上刻有 0、10、20、40、100 等字样，“0”表示没有环状光阑，其他数字表示环状光阑的不同大小，应和相应（10×、20×、40×、100×）相差物镜配合使用。环状光阑是一透明的亮环，光线通过环状光阑形成一个圆筒的光柱。

相差物镜上有“ph”或一个红圈作为标志。相差物镜的内焦平面上装有一个相板，相板上有一层金属物质及一个暗环，不同放大倍数的相差物镜其暗环的大小不同。

相差显微镜利用环状光阑和相板，使通过反差很小的活细胞的光形成直射光和衍射光，直射光波相对地提前或延后 $1/4$ 波长，并发生干涉，使通过活细胞的光波由相位差变为振幅（亮度）差，活细胞的不同构造就表现出明暗差异，使人们能观察到活细胞的细微结构。

2. 类型与用途

相差显微镜可分为正反差（标本比背景暗）和负反差（标本比背景明亮）两类。正反差特别适用于活细胞内部细微结构的观察。

三、实验器材

1. 菌种 酿酒酵母。
2. 器材及其他 普通光学显微镜、相差聚光器、相差物镜、合轴调整望远镜、载玻片（厚约 1 mm）、盖玻片（厚度 0.17~0.18 mm）香柏油、二甲苯、擦镜纸等。

四、方法步骤

1. 安装相差装置 取下普通光学显微镜的聚光器和物镜，分别装上相差聚光器和相差物镜。

2. 制片 在洁净的载玻片中央加一滴无菌水，从斜面上取一环酵母置水滴中轻轻混合，盖上盖玻片；若是液体培养物，则可先将其摇匀，然后用滴管吸取，加一滴于载玻片中央，

盖上盖玻片，勿产生气泡。将此水浸片放在载物台上。

3. 放置滤色镜 在光源前放置蓝色或黄绿色滤色镜。

4. 视场光阑的调中

(1) 将相差聚光器转盘转到“0”位，用 $10\times$ 相差物镜观察，将视场光阑开至最小。

(2) 转动旋钮上下移动聚光器，使观察到清晰的视场光阑的多边影像。

(3) 转动调中旋钮使视场光阑影像调中。

(4) 将视场光阑开大，进一步调中使视场光阑多角形与视场圆内接，再稍开大视场光阑至各边与视场圈外切。

5. 环状光阑与相板合轴调节

(1) 取下目镜，换上合轴调整望远镜。将相差聚光器转盘转于“10”位（与 $10\times$ 物镜相配）。

(2) 调整望远镜的焦距至清晰地观察到聚光器的环状光阑（亮环）和相差物镜的相板（暗环）的像。

(3) 调节聚光器的环状光阑的合轴调整旋钮，使亮环完全进入暗环并与暗环同轴。

6. 相差观察

(1) 取下合轴调整望远镜，装上目镜即可进行观察。若改用不同放大倍数的相差物镜，如 $20\times$ 、 $40\times$ 时，应重新进行合轴调整。若用 $100\times$ 相差物镜时标本和物镜间应加入镜油，然后进行合轴调整。

(2) 用 $40\times$ 、 $100\times$ 相差物镜对酿酒酵母细胞结构进行观察，绘制酿酒酵母细胞的结构，特别是核结构。

实验四 荧光显微镜的使用

一、实验目的

1. 了解荧光显微镜的构造与工作原理。

2. 掌握荧光显微镜的使用方法。

二、实验说明

1. 荧光显微镜的构造和工作原理

荧光显微镜不同于普通光学显微镜，其构造和光路如图1-7所示。主要由光源、滤板、不吸收紫外光的滤光器和镜头等部件组成。

(1) 光源

为可产生紫外线的光源，常用的有超高压汞灯（如HBO 200）和轻便光源（又称高色温溴钨灯）两种。

①超高压汞灯 能发射丰富的紫外光，蓝紫光及绿光，适用于 FITC 及罗丹明类荧光素的激

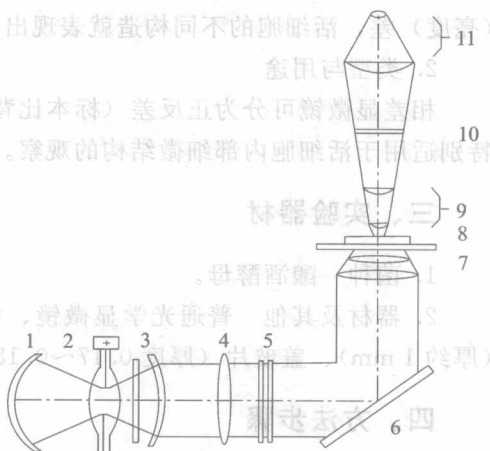


图1-7 荧光显微镜的构造和光路

1-高压汞灯；2-反射镜；3-吸（阻）热滤板；

4-凸透镜；5-激发滤板；6-反射镜；7-聚光器；

8-标本；9-接物镜；10-二次滤片；11-接目镜