

环境微生物学 实验方法与技术

王 兰 主编 王 忠 副主编



化学工业出版社

环境微生物学 实验方法与技术

王 兰 主编 王 忠 副主编



化学工业出版社

· 北 京 ·

本书系统地介绍了环境微生物实验研究中所涉及的基本原理和技术,内容注重基础性和实用性。

全书分四部分共十六章,包括基础微生物实验部分、微生物生态学实验部分、环境微生物监测与评价实验部分、污染物微生物处理与资源化实验部分。基础微生物实验部分介绍了显微技术、微生物制片和染色技术、培养基制作和消毒灭菌、微生物接种和培养技术及分离和鉴定技术、菌种保藏技术等;微生物生态学实验部分介绍了环境因素对微生物生长与死亡的影响、土壤微生物生物量的测定技术、土壤微生物群落及其多样性的研究方法等;环境微生物监测与评价实验部分介绍了土壤、水体、空气中微生物的监测方法,微生物毒理学监测方法等;污染物微生物处理与资源化实验部分介绍了废水处理中微生物的测定、废水处理中活性污泥的培养与驯化、微生物对有机物降解性能的研究、固体废物处理及废物的资源化方法技术等。

本书是从事环境微生物教学、科研及工程人员的必备参考用书,也可作为高等院校生物、环境等相关专业的微生物实验教材。

图书在版编目(CIP)数据

环境微生物学实验方法与技术/王兰主编. —北京:化学工业出版社, 2009.3
ISBN 978-7-122-04305-4

I. 环… II. 王… III. 环境生物学-微生物学-实验
IV. X172-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 192114 号

责任编辑: 满悦芝
责任校对: 周梦华

文字编辑: 荣世芳
装帧设计: 尹琳琳

出版发行: 化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)
印 装: 化学工业出版社印刷厂
787mm×1092mm 1/16 印张 14¼ 字数 361 千字 2009 年 3 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888(传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899
网 址: <http://www.cip.com.cn>
凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 38.00 元

版权所有 违者必究

前言

人类利用微生物已有几千年,利用微生物处理由人类产生的各类污染物也有一百多年的历史,随着生物技术的不断发展和人们对环境质量的日益重视,环境微生物学应运而生。环境微生物学是环境科学的一个重要分支,是20世纪60年代末兴起的一门边缘学科,它主要以微生物学的理论与技术为基础,研究有关环境现象、环境质量及环境问题,与其他学科如土壤微生物学、水及污水处理微生物学、环境化学、环境地学、环境工程学等学科互相影响、互相渗透、互为补充。面对当今严峻的资源环境形势,环境微生物学作为一门研究生物与环境相互作用的系统学科,承担着艰巨的历史任务。

随着环境微生物学研究突飞猛进的发展,其科学研究的深度和广度日益得到扩展,与其他学科的交叉渗透也十分频繁,逐渐形成了一个横跨多学科、多方面的庞大的学科体系。由于该学科的综合性、系统性和复杂性,对当前环境微生物学的科学研究和人才培养也提出了严峻的挑战。

一个学科的整体发展水平在很大程度上体现在其基础理论和方法论的发展水平上,近几十年来,环境微生物学无论在理论上还是在方法论上均有长足的进展。然而,目前就其研究方法尚缺乏一些较为系统的著作或教材,大部分的实验教材在不同的研究领域均有所偏重,或者基础性实验占比例过重。目前较为先进的实验研究方法大多仍分散在不同的分支研究领域或其相应的著作和论文中,这给现代环境微生物学科学研究和实验方法的教学带来了很多困难。

本书是一本关于环境微生物学实验与技术方法的综合性教材,编者在阅读了大量国内外实验技术与方法的基础上,汲取众家之长,同时增补了多年科研中的实践经验,突出综合、系统、先进等特点。因此,所选择的内容注重基础性和实用性,目的是使读者掌握环境微生物相关实验的基本技能,在此基础上,还增加了与科研有关的研究性实验。

全书共分四部分,包括基础微生物实验部分、微生物生态学实验部分、环境微生物监测与评价实验部分、污染物微生物处理与资源化实验部分。在基础实验中,突出了基础微生物实验的特点,首先学会制作培养基和消毒灭菌,然后逐渐掌握培养、分离、纯化、观察和检测微生物的基本技能,如各类微生物的形态观察,微生物大小的测定、计数、生理生化测定和鉴定等;在微生物生态学实验部分,集中介绍了微生物培养技术、土壤微生物生物量的测定技术、土壤酶活性的测定方法、土壤微生物群落及其多样性的研究方法等;在环境微生物监测与评价实验部分,介绍了土壤、水体、空气中微生物的监测方法,微生物毒理学监测方法,另外还增加了微生物基因和功能基因组的监测实验方法,如PCR、PLFA、PCR-DGGE等方面的实验原理与实验技术;在污染物微生物处理与资源化实验部分,介绍了废水处理中微生物的测定、废水处理中活性污泥的培养与驯化、微生物对有机物降解性能的研究等。

为进一步巩固提高读者科学研究的技能和水平,对每个实验的内容,都力求较详细地介绍每种方法的技术特点和基本操作要求,涉及了注意事项、问题和思考题等项目,以提示读者要特别注意的操作步骤和注意思考的问题。

本书具有覆盖面广、系统及实用性强的特点，并注意突出对读者独立工作能力的训练和培养。其结构科学合理，体系新颖有特色，取材广泛，内容丰富充实，联系我国实际，反映本学科的当代发展水平。使之既适合作为高等院校环境科学与工程、生物工程专业的教材，也可作为相关专业工程技术人员的参考用书。

由于时间和编者的水平有限，书中疏漏之处在所难免，希望读者能提出宝贵意见，以便我们在今后工作中进一步改正、提高。

编者于南开园

2008年12月

目 录

第一部分 基础微生物实验方法与技术

第一章 显微技术	1
第一节 常用显微镜的构造	1
一、普通光学显微镜 (general microscope)	1
二、暗视野显微镜 (暗场显微镜) (dark-field microscope)	4
三、相差显微镜 (phase microscope)	5
四、荧光显微镜 (Fluorescence Microscope)	6
五、电子显微镜	8
第二节 常用显微镜的使用方法及注意事项	11
一、普通光学显微镜的使用方法及注意事项	11
二、暗视野显微镜的使用方法及注意事项	13
三、相差显微镜的使用方法及注意事项	14
四、荧光显微镜的使用方法及注意事项	14
第二章 微生物制片及染色技术	15
第一节 微生物的制片方法	15
一、压滴标本制作无菌操作制片	15
二、悬滴标本制作	15
三、涂片法	16
四、插片法	16
五、搭片法	16
六、玻璃纸法	17
七、压片法 (也称印片法)	17
八、透明薄膜培养法	17
九、单细胞菌块	17
十、其他方法	17
第二节 微生物染色技术及形态观察	17
一、染色基本原理及染料种类的选择	17
实验 2.1 细菌单染色法及形态的观察	18
实验 2.2 细菌的革兰染色法	20
实验 2.3 细菌鞭毛染色及运动的观察	22
实验 2.4 细菌芽孢、荚膜的染色及观察	24
实验 2.5 放线菌活体染色及形态观察	26
实验 2.6 霉菌的活体染色及形态观察	27

第三章 灭菌与除菌	29
第一节 实验室常用灭菌方法	29
一、热灭菌	29
二、过滤除菌	33
三、紫外线杀菌	35
四、化学药剂消毒与杀菌	35
第二节 各类培养基常采用的灭菌方法及注意事项	37
一、各类培养基的灭菌法	37
二、培养基灭菌的注意事项	37
第四章 培养基的配制	39
第一节 培养基的配制原则	39
一、选择适宜的营养物质	39
二、营养物质浓度及配比合适	39
三、控制 pH 值条件	40
第二节 培养基的种类及配置过程	40
一、培养基的种类	40
二、培养基的配制方法	43
实验 4.1 常用培养基的配置	45
第五章 微生物接种与培养技术	48
第一节 微生物的接种技术	48
实验 5.1 微生物的各种接种方法	48
第二节 微生物的培养技术	51
一、微生物培养的一般问题	51
二、好气性微生物培养法	52
三、厌气性微生物培养法	55
实验 5.2 用厌氧袋法培养丙酮丁醇梭状芽孢杆菌	59
第六章 微生物的分离及鉴定技术	62
第一节 微生物的纯种分离方法	62
一、稀释混合倒平板法	62
二、稀释涂布平板法	62
三、平板划线分离法	63
实验 6.1 土壤微生物的分离技术	63
第二节 微生物生长的测定技术	66
一、生长测定	66
二、繁殖测定	67
三、群体生长规律——生长曲线测定	67
实验 6.2 微生物菌体大小的测定方法	68
实验 6.3 微生物数量的测定	70
实验 6.4 微生物生长曲线的测定	72

第三节 微生物生理特征测定技术	73
实验 6.5 微生物需氧性的测定	73
实验 6.6 微生物最适生长温度的测定	74
实验 6.7 微生物生长 pH 值范围的测定	74
实验 6.8 固氮能力的检测	75
第四节 微生物生化特征测定技术	75
实验 6.9 糖类发酵实验	75
实验 6.10 甲基红试验	76
实验 6.11 淀粉水解试验	77
实验 6.12 纤维素水解试验	77
实验 6.13 果胶水解试验	78
实验 6.14 细胞色素氧化酶试验	79
实验 6.15 过氧化氢酶试验	80
实验 6.16 TTC 试验	80
实验 6.17 硝酸盐还原试验	81
实验 6.18 α 淀粉酶活力的测定方法	82
实验 6.19 蛋白酶活力的测定方法	83
第七章 菌种保藏技术	86
实验 7.1 菌种的保藏方法	86

第二部分 环境微生物生态学实验方法与技术

第八章 环境因素对微生物生长与死亡的影响	93
第一节 营养和氧气对微生物生长发育的影响	93
实验 8.1 营养元素对微生物生长的影响	93
实验 8.2 氧和 CO_2 浓度对微生物生长的影响	95
第二节 物理和化学因素对微生物生长发育的影响	97
实验 8.3 温度对微生物生长的影响	97
实验 8.4 渗透压对微生物生长的影响	98
实验 8.5 氢离子浓度对微生物生长的影响	99
实验 8.6 化学药剂对微生物生长的影响	100
第九章 土壤微生物的生物量的测定方法	102
实验 9.1 土壤微生物生物量碳的测定	102
实验 9.2 土壤微生物生物量氮的测定	104
实验 9.3 土壤微生物生物量磷的测定	105
实验 9.4 土壤微生物生物量硫的测定	107
第十章 微生物多样性的测定方法	109
第一节 PCR 技术的基本原理与方法	109
实验 10.1 PCR 扩增技术与方法	110
实验 10.2 微生物总 DNA 中的 16SrDNA PCR 扩增技术	112

实验 10.3 凝胶中 DNA 的回收、测序及系统发育树的构建	113
第二节 微生物多样性的测定方法	114
实验 10.4 Biolog 分析方法	115
实验 10.5 PLFA 分析方法	117
实验 10.6 PCR-DGGE 分析方法	120

第三部分 环境微生物监测与评价技术

第十一章 水中微生物监测	123
第一节 水样的采集和保存	123
一、采样	123
二、样品保存	125
第二节 水体中微生物数量的监测	125
实验 11.1 水中细菌总数的监测	125
实验 11.2 水中大肠菌群 (<i>Coliform group</i>) 的监测	127
实验 11.3 水中粪链球菌的监测	136
实验 11.4 水中病毒的监测	139
实验 11.5 水体沉积物中的 H_2S 产生菌的测定	141
实验 11.6 循环水冷却系统中有关的微生物监测	142
实验 11.7 应用 PCR 与基因 DNA 分子探针监测污染水体大肠杆菌	146
实验 11.8 富营养化湖泊中藻类的监测 (叶绿素 a 法)	149
实验 11.9 PFU 微型生物群落监测法	151
第十二章 土壤中微生物的监测	155
第一节 土样的采集及保存	155
一、土壤环境样品采集	155
二、样品的处理与保存	157
第二节 土壤中微生物数量及组成的监测	158
实验 12.1 土壤中微生物数量的监测	158
实验 12.2 微生物在自然界氮素循环中的作用	159
实验 12.3 利用 16SrDNA 方法分析不同污染土壤中微生物种群的变化	161
第十三章 空气中微生物的监测	164
第一节 空气的采样方法及保存	164
一、样品的采集方法	164
第二节 空气中微生物数量的监测	166
实验 13.1 空气中细菌数量的监测	166
第十四章 生物毒理学检测与评价	168
实验 14.1 发光菌的生物毒性测试方法	168
实验 14.2 根据硝化细菌的相对代谢率检测环境污染物的综合生物毒性实验	171
实验 14.3 采用细菌脱氢酶检测化合物毒性——水质毒性快速测定仪法	173
实验 14.4 用 Ames 法检测环境中致癌物	176

第四部分 污染物微生物处理与资源化技术

第十五章 污染物微生物处理技术	180
第一节 废水生物处理中的活性污泥	180
实验 15.1 活性污泥微生物的显微镜观察及微型动物的计数	180
实验 15.2 活性污泥中丝状微生物的鉴别	186
实验 15.3 活性污泥脱氢酶活性的测定	190
实验 15.4 活性污泥耗氧速率、废水可生化性及毒性的测定	193
第二节 微生物在污染物降解中的应用	195
实验 15.5 光合细菌的培养及其对高浓度有机废水的净化作用	195
实验 15.6 酚降解微生物的分离和解酚能力的测定	196
实验 15.7 微生物对有机磷农药的降解	198
实验 15.8 微生物对表面活性剂的降解	200
实验 15.9 微生物细胞的固定化及其在废水生物处理中的应用	202
实验 15.10 微生物吸附法去除重金属	203
实验 15.11 生物过滤法对含氨废气的处理	205
第十六章 固体废物处理与资源化方法	207
实验 16.1 垃圾堆肥中纤维素分解菌的计数和分离	207
实验 16.2 利用酒精废液生产单细胞蛋白	208
实验 16.3 固体废物的固体发酵	212
参考文献	214

第一部分 基础微生物实验方法与技术

通常人们把一切肉眼看不见或看不清楚的微小生物称为微生物 (microbe, microorganism), 因此, 它不是生物分类学上的专门名词, 而是一些个体微小、构造简单的低等生物的总称。原核生物类的细菌、真核生物类的真菌 (酵母、霉菌等), 原生动物和单细胞藻类等, 非细胞型生物类的病毒和亚病毒都是微生物学研究的范围。

微生物的类型多样, 但是它们有一定的共性, 因此, 把它们放在一起研究。它们的五大共性为: 体积小, 比表面积大; 对营养物质吸收多, 转化快; 生长旺盛, 繁殖速度快; 对环境适应能力强, 易发生变异; 分布广泛, 种类繁多。为了更好地掌握微生物技术, 掌握基础微生物学实验方法与技术是很有必要的。

第一章 显微技术

第一节 常用显微镜的构造

17 世纪荷兰人列文·虎克制造了第一台显微镜, 首次把微生物世界展现在人类面前, 至今已经历 300 余年。显微镜的问世对微生物学的奠基和发展起到了不可估量的作用。在长期的实践中, 显微镜不断推陈出新, 已成为微生物学研究的重要工具。

在微生物实验中, 常用的显微镜主要有普通光学显微镜、相差显微镜、荧光显微镜和电子显微镜等。

一、普通光学显微镜 (general microscope)

普通光学显微镜由机械系统和光学装置两部分组成 (图 1-1)。

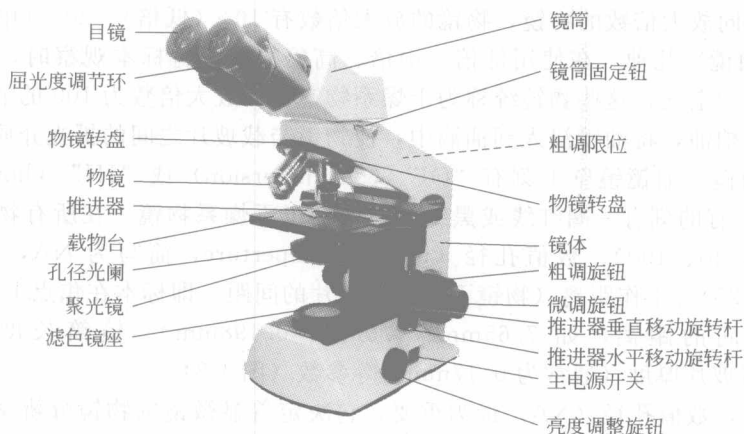


图 1-1 普通光学显微镜

1. 机械装置

机械装置是显微镜的主体框架, 包括镜座、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台、调节

器等。

(1) 镜座 它是显微镜的基座,可使显微镜平稳地放置在平台上。

(2) 镜臂 用以支持镜筒,也是移动显微镜时手握的部位。

(3) 镜筒 它是连接接目镜(简称目镜)和接物镜(简称物镜)的金属圆筒。镜筒上端插入目镜,下端与物镜转换器相接。镜筒长度一般固定,通常是160mm,有些显微镜的镜筒长度可以调节。

(4) 物镜转换器 它是一个用于安装物镜的圆盘,位于镜筒下端,其上装有3~5个不同放大倍数的物镜。为了使用方便,物镜一般按由低倍到高倍的顺序安装。转动物镜转换器可以选用合适的物镜。转换物镜时,必须用手旋转圆盘,切勿用手推动物镜,以免松脱物镜而招致损坏。

(5) 载物台 载物台又称镜台,是放置标本的地方,呈方形或圆形。载物台上装有压片夹,可以固定被检标本,装有标本移动器(推进器),转动螺旋可以使标本前后和左右移动。有些标本移动器上刻有标尺,可指示标本的位置,便于重复观察。

(6) 调节器 调节器又称调焦装置,由粗调螺旋和细调螺旋组成,用于调节物镜与标本间的距离,使物像更清晰。

2. 光学系统

光学系统是显微镜的核心,物镜的光学参数直接影响显微镜的性能,包括目镜、物镜、聚光器、光源等。

(1) 目镜 安装在显微镜镜筒上,供实验者用双眼进行标本观察。它的功能是把物镜放大的物像再次放大。目镜一般由两块透镜组成。上端(近目端)为接目透镜,下端为聚透镜。在两块透镜之间或在物镜下方有一空心圆形光阑。由于光阑空心圆的面积大小决定着视野的大小,光阑的边缘即为视野的边缘,故又称为视野光阑。标本成像于光阑限定的范围之内,在光阑的边缘上固定一小段细发丝可用作指针,指示视野中标本的位置。在进行显微测量时,目镜测微尺被安装在视野光阑上。目镜上刻有5×、10×、15×、20×等放大倍数,不同放大倍数的目镜,其口径统一,与镜筒的口径也一致,可互换使用。

(2) 物镜 在显微镜的光学系统中,物镜是最重要的部件,其性能直接影响显微镜的分辨率,它的功能是把标本放大,产生物像。物镜安装在能手动的物镜转换器上,供实验者观察标本时选用不同放大倍数的物镜,物镜的放大倍数有10×(低倍)、20×(中倍)、40×(高倍)和100×(油镜)几种。在使用低倍、中倍、高倍物镜进行标本观察时,物镜与载玻片之间的折光介质为空气,这些物镜统称为干燥系物镜,而放大倍数为100的油镜在使用时须在玻片上滴加香柏油,将油镜浸入到油滴中,使物镜与载玻片之间的折光介质为油,故油镜被称为油浸系物镜,油镜镜壁上刻有“OI”(oil immersion)或“HI”(homogeneous immersion)字样,有的刻有一圈红线或黑线,以区别于干燥系物镜。在所有物镜上均标有放大倍数(如10、40、100)、数值孔径(numerical aperture,简称为NA,又称镜口率如0.35、0.65、1.25)、工作距离(物镜下端至盖玻片的间距,即标本在焦点上看得最清晰时,物镜与样品之间的距离,如7.65mm、0.5mm、0.198mm)、镜筒长度(如100mm、160mm)以及盖玻片厚度(通常为0.17mm)等参数(图1-2)

这些参数中,数值孔径(NA)最为重要,它决定着显微镜的物镜分辨率,而分辨率的大小是显微镜性能优劣的标志,所谓分辨率是显微镜工作时能分辨出的物体两点间最大距离(D)的能力, D 值愈小表明分辨率愈高,用公式(1-1)来表示 D 值:

$$D = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1-1)$$

式中 λ ——可见光的波长, 可见光的波长范围约为 $400\sim 700\text{nm}$, 平均为 $550\text{nm}(0.5\mu\text{m})$;
NA——数值孔径。

NA (数值孔径) 是指介质的折射率与镜口角 $1/2$ 正弦的乘积, 用公式(1-2) 表示:

$$\text{NA} = n \times \sin \frac{\alpha}{2} \quad (1-2)$$

式中 n ——物镜与标本间介质的折射率;

α ——镜口角 (通过标本的光线延伸到物镜前透镜边缘所形成的夹角, 见图 1-3)。

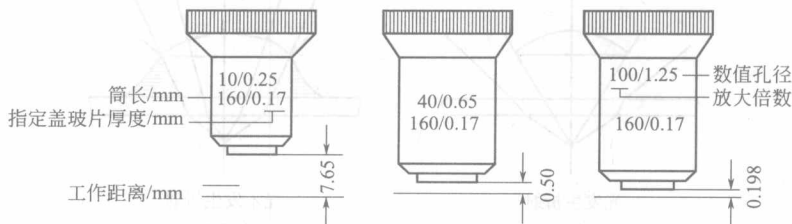


图 1-2 显微镜物镜参数示意

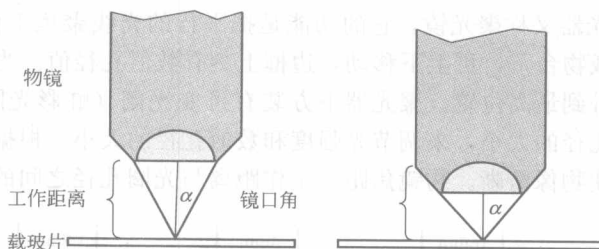


图 1-3 物镜的镜口角

有两条途径可提高物镜的分辨率。a. 缩短光的波长。普通光学显微镜早期的产品利用镜座上凹凸两面的反光镜获得自然光, 现代产品改用内置照明, 但这两种光源的波长均不可能小于可见光波长 $400\sim 700\text{nm}$ 的范围, 无法缩短光的波长是提高光学显微镜分辨率不可逾越的障碍, 而电子显微镜以波长仅 $0.01\sim 0.9\text{nm}$ 的高压电子束来替代照明光源, 使分辨率得以大幅度提高, 可达到 $0.15\sim 0.3\text{nm}$ 。b. 增大物镜的数值孔径。由公式(1-1) 可以看出, 要使 D 值小, 在 λ 为定值时, NA 值必须要大。

影响 NA 值的第一个因素是镜口角 α , 当 $\sin\alpha$ 增大为最大时, $\alpha=180^\circ$, 这意味着进入透镜的光线与光轴呈 90° 角, 但这是不可能的, 因为由于介质密度的不同 (光从载物台上的样品玻片进入空气, 再进入镜头), 光线会由于折射或全反射, 不能成 90° 角进入镜头, 目前所用的油镜其 $\frac{\alpha}{2}$ 为 60° 左右, 所以 $\sin\alpha$ 的最大值总是小于 1。

影响 NA 的第二个因素是折射率 n , 不同介质的折射率有所不同, 如 $n_{\text{空气}}=1.0$ 、 $n_{\text{水}}=1.33$ 、 $n_{\text{玻璃}}=1.52$ 、 $n_{\text{香柏油}}=1.515$, 显微镜中以空气、水、玻璃 (水封片标本) 作为折光介质的低倍物镜 ($10\times$) 和高倍物镜 ($40\times$), 其 NA 值分别为 $0.35(10\times, \text{低倍镜头})$ 和 $0.65(40\times, \text{高倍镜头})$, 而 D 值则分别为 $0.78\mu\text{m}(10\times, \text{低倍镜头})$ 和 $0.42\mu\text{m}(40\times, \text{高倍镜头})$, 也就是说在这两组物镜下其分辨率不小于 $0.42\sim 0.78\mu\text{m}$, 因此, 可用 $10\times$ 的低倍和 $40\times$ 的高倍物镜对微生物中个体较大的霉菌 (菌丝直径 $2\sim 10\mu\text{m}$)、酵母菌 [$(1\sim 5)\times (5\sim 30)\mu\text{m}$] 进行观察。但对于大多数细菌来说, 其直径为 $0.5\sim 1\mu\text{m}$, 低倍和高倍镜的分辨率显然不能满足要求, 观察实验表明, 在低倍和高倍镜可以看到细菌, 但细节不清楚, 需

要加大放大倍数并提高分辨率。显微镜物镜中的油镜，其镜面很小，标本与镜面间的距离仅为 $0.14\sim 0.19\text{mm}$ 左右，进入镜头的光线较少，视野的照明度低，标本样品暗，不易观察，为克服由于空气与载玻片密度的不同致使光线受到折射，发生散射现象，在镜头与载玻片之间滴加折射率为 1.515 (与玻璃折射率 1.52 相近似) 的香柏油，则光线通过载玻片后直接经过香柏油进入物镜而几乎不发生折射，其 D 值为 $0.22\mu\text{m}$ ，这样，在油镜下可以清晰地观察到细菌的形态及某些结构 (如细胞壁、核质、鞭毛、芽孢、荚膜等) (图 1-4)。

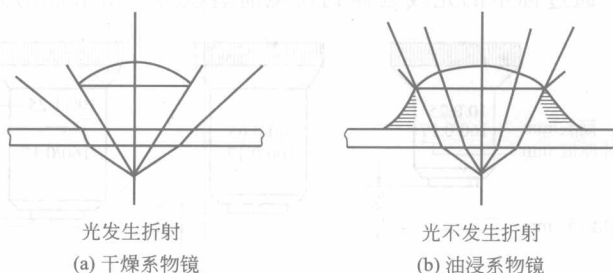


图 1-4 干燥系物镜与油浸系物镜光线通路

(3) 聚光器 聚光器又称聚光镜，它的功能是把平行的光线聚焦于标本上，增强照明度。聚光器安装在显微镜载物台下，可上下移动，边框上刻有数值孔径值。当用低倍镜时聚光器应下降，用油镜时需上升到最高位置。聚光器下方装有可变光阑 (虹彩光圈)，由若干金属薄片组成，通过调节光阑孔径的大小，来调节光强度和数值孔径的大小。根据水封片和染色涂片的不同，调节光圈，以使物像清晰。物镜焦距、工作距离与光圈孔径之间的关系见图 1-5。

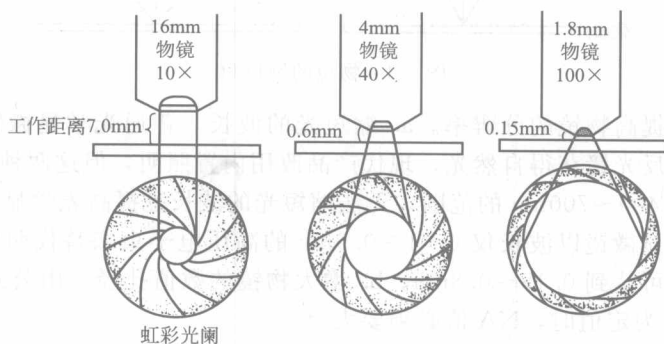


图 1-5 物镜焦距、工作距离与光圈孔径之间的关系

(4) 光源 现代显微镜均以内置电光源替代采撷自然光的反光镜。镜座电源开关的前方，设有亮度调整旋钮，可调节光强度，选择观察时的最佳亮度。

二、暗视野显微镜 (暗场显微镜) (dark-field microscope)

将不经染料染色的活细胞 (水封片) 在普通光学显微镜 (明视野) 下进行观察，当光线通过透明的标本时，由于细胞内物质的折光率与水相近，明亮的视野背景与明亮的菌体不易分辨，如果将背景变暗，使标本与背景形成强烈的明暗反差，则菌体在暗背景中会成为明亮的亮点。这正如在暗室中从一狭缝射进一束强光，可明显地看到空气中的尘埃一样。

暗视野显微镜以丁达尔效应为基础，利用特殊的聚光器，不使照射被检物体的光线直接射入物镜。暗视野聚光器具有将视野背景变暗的功能。常用的暗视野聚光器分为抛物面型和心型两种 (图 1-6)。抛物面型聚光器的顶部平滑，心型聚光器的反射部分呈心脏形。两种聚光器底部的中央均有一块遮光板，其作用是使进入反光镜的中央光柱不能直接射入物镜，

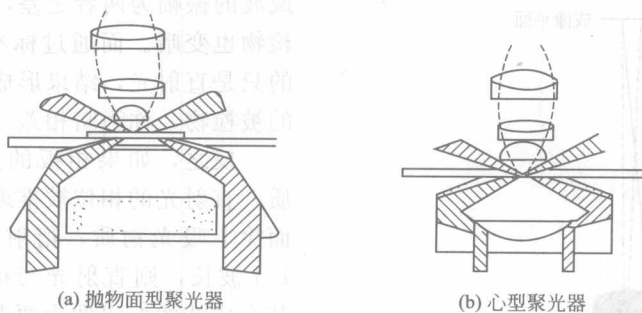


图 1-6 暗视野聚光

而仅允许光线从聚光器的边缘部位斜射到标本上。这样只有经物体反射和衍射的光线才能进入物镜成像。因此，视野背景黑暗，需观察的菌体细胞呈明亮的亮点。用暗视野显微镜观察微生物细胞由于背景与菌体的明暗反差大，其细胞轮廓清楚，但内部结构不明。

主要用于观察细菌、螺旋体及其运动。

三、相差显微镜 (phase microscope)

用暗视野显微镜可以进行微生物活细胞的形态及其运动性的观察，但不能清晰地观察到细胞内部结构的细节。这是因为当光线通过透明的活细胞后，由于微生物细胞内各类物质密度的差异（从光学角度看为折射率不同），直射光和衍射光的光程就会有差别，随着光程的增加或减少，加快或落后的光波的相位会发生变化，产生相位差。人的视觉只能分辨出可见光谱内不同的波长（颜色）（在可见光光谱 399~800nm 范围内，其颜色依次为紫、蓝、青、绿、黄、橙、红）和振幅（明暗），而不能分辨出光波产生的相位差异。

相差显微镜根据光波干涉原理，将透过反差极小的标本的光分解成相位不同的直射光和衍射光，使这两种光相互干涉。借助于环状光阑和相板两个特殊部件的作用，把相位转变为人眼可分辨的振幅差（明暗差），从而使原来透明的微生物细胞表现出明显的明暗差异，对比度增强，能够比较清楚地观察到活细胞及细胞内的某些细微结构。

相差显微镜与普通光学显微镜基本结构是相同的，所不同的是它有四部分特殊结构：环状光阑、相板、合轴调节望远镜和滤光片。

(1) 环状光阑 在相差显微镜聚光器内的环状光阑转盘上镶有宽窄不同的环状光阑。环状光阑上有一透明的亮环，使来自照明光源的直射光只能从透明的环状部分通过，形成一个空心圆筒状的光柱，光柱进入聚光镜再斜射到标本玻片上，产生直射光和衍射光，两部分光经物镜内相板的作用进而改变光的相位和振幅。不同的光阑刻有 10×、20× 和 40× 等标志，表示当用不同放大倍数的物镜时，必须匹配相应的环状光阑。

(2) 相板 相板安装在物镜后焦平面上，带有相板的物镜称为相差物镜，镜头上刻有 PC 或 PH 标识字样。

相板上暗灰色的环状圈，称为共轭面。其上涂有吸光物质，当直射光通过时，可吸收约 80% 的直射光，以降低透光度。在共轭面的内外侧部分称为补偿面，面上涂有减速物质，使衍射光的相位发生改变，两者相结合可以分别改变直射光和衍射光的振幅和相位（图 1-7）。

在被检物（微生物菌体）的折射率大于介质（如空气、水、玻璃等）的情况下，来自照明光源经环状光阑照射到被检物标本（玻璃载片）后产生的直射光透过共轭面时，被吸收 80% 后，亮度变暗，而同时产生的衍射光在通过被检物标本后其相位已推迟 $1/4$ 波长，再通过相板的补偿面时，相位又推迟了 $1/4$ 波长。由于这两束光的相位不同，差 $1/2$ 波长，其合

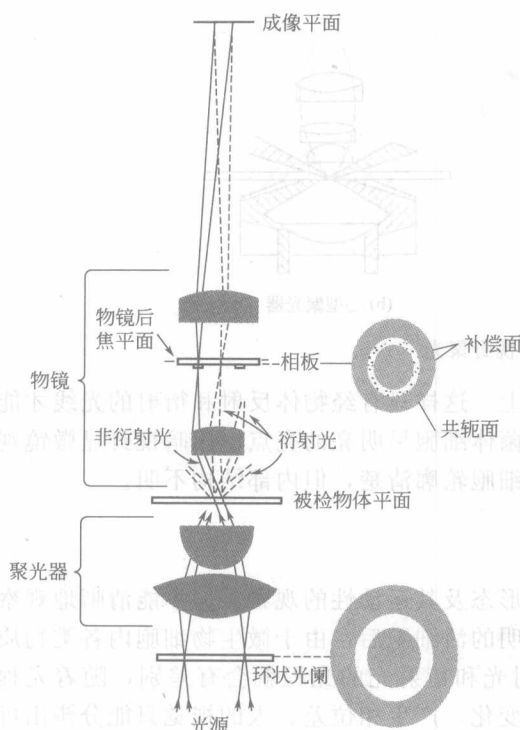


图 1-7 相差显微镜成像图和相板

红、蓝光），对活体观察有利。

四、荧光显微镜 (Fluorescence Microscope)

当用紫外线照射自然界中的某些物质如萤石、铀玻璃、某些生物体、一些天然色素和某些染料后，紫外线被吸收并放出一部分光波较长的可见荧光，用紫外线作为光源的荧光显微镜可以对带有荧光物质的微小物体或经荧光染料染色后的微生物（如细菌）、抗体进行观察研究（图 1-10）。

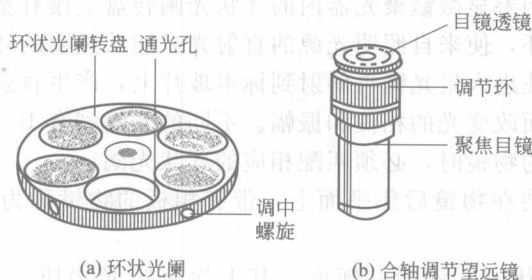


图 1-8 环状光阑和合轴调节望远镜

荧光显微镜与普通显微镜不同之处主要有以下几个方面。

(1) 独特的光源系统 现在多采用 200W 的超高压汞灯作光源，它是用石英玻璃制作，中间呈球形，内充一定数量的汞，工作时由两个电极间放电，引起水银蒸发，球内气压迅速升高，当水银完全蒸发时，可达 50~70 个标准大气压 ($1\text{atm}=1.01325\times 10^5\text{Pa}$)，这一过程一般约需 5~15min。超高压汞灯的发光是电极间放电使水银分子不断解离和还原过程中

成波的振幅为两者之差，所以光线变暗，被检物也变暗。而通过标本介质（玻璃载片）的只是直射光，结果形成明亮的背景和黑暗的被检物，称为暗相差（亦称正相差）。

反之，如果相板的共轭面涂以减速物质，直射光的相位被推迟 $1/4$ 波长，而补偿面涂上吸光物质，衍射光的相位也被推迟 $1/4$ 波长，则直射光与衍射光的相位相同，其合成波的振幅即为两者之和，结果形成明亮的被检物和黑暗的背景，称明相差（亦即负相差）。

(3) 合轴调节望远镜 由于环状光阑的光环和相差物镜中相板上的环状圈很小，为使两环的环孔相吻合，在合轴调节中必须使用特制的合轴低倍调节望远镜进行调节，使光轴完全一致（图 1-8、图 1-9）。

(4) 滤光片 相差显微镜的相差物镜为消色差物镜，只纠正黄、绿光的球差而不纠正红、蓝光的球差，在使用相差显微镜进行微生物活细胞观察时，用绿色滤光片效果最好，此外，绿色滤光片具有吸热作用（吸收

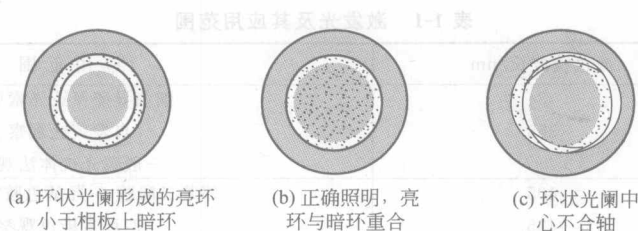


图 1-9 相差显微镜照明合轴调节

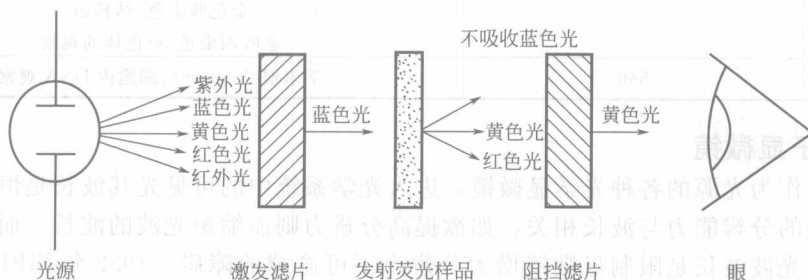


图 1-10 荧光显微镜的光路图解

(蓝色光激发, 发出黄色光)

发射光量子的结果。它发射很强的紫外和蓝紫光, 足以激发各类荧光物质, 因此, 为荧光显微镜普遍采用。

(2) 激发荧光滤光片 滤色系统是荧光显微镜的重要部位, 由激发滤片和阻挡滤片组成。滤片一般都以基本色调命名, 后面字母代表玻璃, 数字代表型号特点。它安装在显微镜台下的聚光镜与光源之间, 主要有两种: 一种是紫外光滤片 (UG), 主要透过 275~400nm 波段的光; 另一种蓝紫光滤片 (BG), 主要透过 330~480nm 波段的光, 适用于观察细菌标本, 但不适用于观察有自发荧光的组织标本。此外尚有一套吸收滤片, 放在接目镜的前面或后面, 其作用是不让紫外线、蓝紫光通过而允许荧光通过, 使标本在暗的背景上出现荧光。吸收滤片有 OG(橙黄色) 和 GG(淡绿色) 型, 透光波段范围是 410~650nm。

(3) 荧光显微镜具备明视野及暗视野两种聚光器 专为荧光显微镜设计制作的聚光器是用石英玻璃或其他透紫外光的玻璃制成。明视野聚光器透度大, 背景较亮, 对比较差, 故主要适用于低放大倍数的组织切片; 使用暗视野聚光器则背景暗, 反差大, 高放大倍数的荧光物像清晰, 因此放大倍数较高、荧光弱的标本也可观察。聚光器又分为干燥系和油浸系, 干燥系不需滴油, 使用方便, 用于低倍及中倍放大标本的观察, 油浸系用于细微结构的高倍观察。

高压汞灯光源发出的光波通过激发滤片后, 形成的单色光线透射到分光镜上, 经过分光有一部分光线打到载玻片上, 另一部分则分到阻挡滤片上, 滤掉对人眼有害的光线。样品被激发出的荧光通过黄色滤光片, 反射到双目镜, 就可以看到有荧光反应的物体。

除观察少数发光和用发光基因标记的微生物外, 微生物细胞需用荧光染料或荧光抗体染色后才能进行荧光观察。常用于荧光显微镜检验的荧光染料有金胺 (auromine)、中性红、品红、硫代黄素 (thioflavines)、吖啶黄、桑色素 (morin)、樱草素 (primuline) 等。

微生物细胞的不同结构对激发光的要求不同, 需采用合适的荧光染料和激发滤色镜 (表 1-1)。