



普通高等教育“十一五”国家级规划教材




北京高等教育精品教材

食品微生物学

实验原理与技术

第二版

李平兰 贺稚非 主编

 中国农业出版社

TS 201.3
20115.2

阅 览

普通高等教育“十一五”国家级规划教材
北京高等教育精品教材

食品微生物学实验原理与技术

第二版

李平兰 贺稚非 主编



中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

食品微生物学实验原理与技术/李平兰, 贺稚非主编. —2 版. —北京: 中国农业出版社, 2011. 1
普通高等教育“十一五”国家级规划教材 北京高等教育精品教材
ISBN 978-7-109-15177-2

I. ①食… II. ①李…②贺… III. ①食品微生物—微生物学—实验—高等学校—教材 IV. ①TS201.3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 223685 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100125)

责任编辑 王芳芳

人民教育出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2005 年 8 月第 1 版 2011 年 1 月第 2 版

2011 年 1 月第 2 版北京第 1 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 16.75

字数: 392 千字

定价: 26.50 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

内 容 提 要

本教材针对食品微生物学的特点，在分析总结以往实验课内容、教学效果及相关实验指导的基础上，编写了这本较为系统、连贯、实践性强的实验教材。本教材与以往最大的不同是，增加了一些近年来新出现的与食品加工、保鲜及安全关系较为密切的相关微生物的检测及具有特定益生功能特性微生物菌株的选育实验，同时还适当增加了一些现代分子微生物学的实验方法与新技术。

全书分食品微生物学基础实验技术、食品微生物学安全实验技术及食品微生物学应用实验技术三大部分。内容主要是通过微生物学实验让学生验证理论，巩固与加深理解所学过的知识，熟悉和掌握微生物基本实验操作技能，培养学生理论联系实际、独立分析问题和解决问题的能力。同时，书后还附有附录和主要参考文献。以上内容共78个实验，每个实验相对独立，因而各个院校可根据具体情况酌情选做。

本书取材广泛、涉及面广、内容新颖、结构合理、重点突出，主要是作为高等院校食品科学与工程专业、食品生物工程专业、食品质量与安全专业的主干课程——食品微生物学的实验课教材。当然，此书也可供上述领域从事与食品微生物相关工作的有关教师及科技人员参考。

第二版编审人员

主 编 李平兰 中国农业大学

贺稚非 西南大学

参 编 (按姓名笔画排序)

王成涛 北京工商大学

田洪涛 河北农业大学

刘 慧 北京农学院

江 晓 南京市疾病预防控制中心

许喜林 华南理工大学

杜小兵 西南大学

李丽杰 内蒙古农业大学

时向东 河南农业大学

张晓东 南京农业大学

郑海涛 中国农业大学

高文庚 运城学院

梁志宏 中国农业大学

綦国红 中国药科大学

主 审 江汉湖 南京农业大学

第一版编审人员

主 编 李平兰 (中国农业大学)

贺稚非 (西南大学)

参 编 (按姓名笔画排序)

王成涛 (北京工商大学)

尹源明 (浙江大学)

田洪涛 (河北农业大学)

江 晓 (南京市疾病预防控制中心)

刘 慧 (北京农学院)

许喜林 (华南理工大学)

李 理 (华南理工大学)

李平兰 (中国农业大学)

杜小兵 (西南大学)

陈晓蔚 (南京市疾病预防控制中心)

时向东 (河南农业大学)

张晓东 (南京农业大学)

贺稚非 (西南大学)

郭爱玲 (华中农业大学)

梁志宏 (中国农业大学)

主 审 江汉湖 (南京农业大学)

副主审 牛天贵 (中国农业大学)

第二版前言

微生物学是生命科学研究中最活跃的学科领域，而微生物学实验原理与技术是微生物学建立和发展的基础，曾为整个生命科学技术的发展做出过积极而重要的贡献，同时也是生物工程技术的核心和主体。随着分子生物学的诞生，各学科相互交叉渗透，极大地丰富了微生物学实验原理与技术的内容，并将其推向一个新的发展阶段。而微生物学实验也广泛地渗透到了现代生命科学的各个分支领域，不断发挥着它的独特作用。因此，微生物学实验是一门十分重要的基础实验。

为了适应 21 世纪科学技术更为迅猛发展的需要，迎接微生物学迅速向分子生物学水平和微生物产业化发展的机遇和挑战，为社会培养微生物领域的高素质科技人才，教育部在面向 21 世纪课程教材、普通高等教育“十五”国家级规划教材的基础上，评选出了一批优秀的教材作为“十一五”国家级规划教材来进一步完善和提高，而《食品微生物学实验原理与技术》就是其中的一本。本教材在“十五”期间与江汉湖主编的《食品微生物学》相配套，很好地服务了全国各高校的食品微生物学教学。此次是在第一版的基础上进行的修改与完善。

本教材针对食品微生物学是多学科组成的特点，分析总结了以往开课内容及效果，适当删除了某些已经淘汰、过时或不太重要的实验内容；集中或改变一些原来分别在普通微生物学、微生物生理学、微生物遗传学、食品微生物学、发酵微生物学、卫生微生物学和发酵食品学中单独开设的小实验，编写成系统、连贯、实践性强、教学效果较好的实验系列；同时增加了一些近年来新出现的与食品加工、保鲜及安全关系较为密切的相关微生物的检测以及具有某种益生功能特性微生物菌株选育的内容；此外，还增加了一些现代分子微生物学的实验方法与新技术，力求做到既避免与理论教材脱节，又能启发学生的主动思考能力和创新思维能力。我们希望通过微生物学实验让学生验证理论，巩固和加深理解所学过的知识，熟悉和掌握微生物基本实验操作技能，培养学生理论联系实际、独立分析问题和解决问题的能力，进一步启发和提高学生的创新意识和创新能力。

本教材仍遵循第一版的编写指导思想和基本要求，在第一版基础上进行了内容的调整、补充和修订，加深了内容的广度和深度，努力体现教材的基础性、实用性。在内容上分成三个部分，即食品微生物学基础实验技术、食品微生物学安全实验技术、食品微生物学应用实验技术。第一部分着重介绍微生物学实验的基本操作和技能训练，涵盖了显微镜使用技术，微生物的形态结构观察，微生物的分离、纯化和培养，培养基的配制与灭菌消毒技术，微生物生理生化反应，微生物生长、遗传育种与菌种保藏等实验内

容；第二部分重点介绍了食品中有害微生物检测；第三部分着重介绍了食品中有益微生物的筛选及应用。以上内容共编写 78 个实验，每个实验相对独立，可供各相关专业酌情选做。该教材将基础微生物学和食品微生物学两门课程的实验教学内容有机结合起来，使前后内容融会贯通，目的是使学生更清晰地掌握食品微生物学的基础理论和基本实践技能。为方便教学，并使编排形式紧凑、简练，写作思路统一，书写格式一致，每一实验基本上按照目的要求、基本原理、实验材料、检验程序、实验方法与步骤、实验结果、注意事项、思考题 8 部分进行编写。对每个实验中所列的培养基进行了相应的标注，并在附录中对应列出。

本教材由李平兰、贺稚非任主编，新增实验 14 个，并对第一版中的实验 32、33、35、37、41、42、44、48 内容进行了改动和更新，力求与最新国家标准方法相统一，增加了微生物检验中最新的快速、简易检验方法；对实验 5、6、7、11、13、16、19 的内容进行了调整、合并和补充；对附录 I、II、III 进行了补充，新增了 44 种培养基的配方；删除了实验 9 及实验 51。在第二版教材中实验 1、2、26 由时向东编写；实验 3、4、7、17 由刘慧编写；实验 5、6、8、62 由郑海涛编写；9、10、11、12、13、16、19、20、51 由贺稚非和杜小兵编写；实验 14、34、47、48、49、56、57、61、70、71 由李丽杰编写；实验 15、52、53、54 由梁志宏编写；实验 18、55、64 由许喜林编写；实验 21、58、59、60 由田洪涛编写；实验 22、27、28、45、46、63、69、73、75、76、77、78 由李平兰编写；实验 23、24、25 由张晓东编写；实验 29、30、31、74 由王成涛编写；实验 32、33、35、36、50 由江晓编写；实验 37、38、39、40 由綦国红编写；实验 41、42、43、44、65、66、67、68、72 由高文庚编写；附录部分由李丽杰编写与整理。全书由李平兰负责统编、定稿，并对全书的文字表达及原教材中的概念、名词和语言的运用等进行了审视和校正。南京农业大学江汉湖教授担任主审。

本教材在修订过程中，中国农业大学食品科学与营养工程学院食品微生物组研究生旭日花、赵一楠、崔廷婷、畅晓渊、张金兰、尚楠、王洋等对本书的编排和校阅做了大量具体的工作。在本书出版之际谨向他们表示诚挚的谢意！

由于水平有限，书中难免有不当之处，敬请读者批评指正。

编者

2010 年 5 月

第一版前言

微生物学是生命科学研究中最活跃的学科领域，而微生物学实验原理与技术是微生物学建立和发展的基础，曾为整个生命科学技术的发展做出过积极而重要的贡献，同时也是生物工程技术的核心和主体。随着分子生物学的诞生，各学科相互交叉渗透，极大地丰富了微生物学实验原理与技术的内容，并将其推向一个新的发展阶段。而微生物学实验也广泛地渗透到了现代生命科学的各个分支领域，不断发挥着它的独特作用。因此，微生物学实验是一门十分重要的基础实验。

全国农业院校的食品学科大多建立于 20 世纪 80 年代改革开放的初期，经过 20 年的发展，现已成为我国食品科学人才培养的最为重要的人才基地。在学科发展的起步阶段，食品微生物学课程一直沿用过去轻工院校编写的教材。然而，经过 20 年的发展，这些教材已远远不能适应今天的教学需要。当然，在此期间也陆续出版过几本优秀的食品微生物学教材，为全国农业院校食品微生物学课程的开设起到了积极有效的作用。但一直没有一本与其配套的食品微生物学实验原理与技术的教材。

为了适应 21 世纪科学技术更为迅猛发展的需要，迎接微生物学迅速向分子生物学水平和微生物产业化发展的机遇和挑战，为社会培养微生物领域的高素质科技人才，教育部在面向 21 世纪课程教材的基础上，评选出了一批优秀的教材作为国家“十五”重点规划教材来进一步完善和提高，《食品微生物学》就是其中的一本，而《食品微生物学实验原理与技术》作为《食品微生物学》的配套教材由全国十几所院校教学第一线的教师共同编写。

本教材针对食品微生物学是多学科组成的特点，分析总结了以往开课内容及效果，去除了重复的实验内容，适当删除了某些已经淘汰、过时或不太重要的实验内容；集中或改变某些原来分别在普通微生物学、微生物生理学、微生物遗传学、食品微生物学、发酵微生物学、卫生微生物学和发酵食品学中单独开设的小实验，编写成系统、连贯、实践性强、教学效果较好的实验系列；同时增加了一些近年来新出现的与食品加工、保鲜及安全关系较为密切的相关微生物的检测以及具有某种功能特性微生物菌株选育的内容。此外，还适当增加了一些现代分子微生物学的实验方法与新技术，力求做到既避免与理论教材脱节又能启发学生的主动思考能力和创新思维能力。我们希望通过微生物学实验让学生验证理论，巩固和加深理解所学过的专业知识，熟悉和掌握微生物基本实验操作技能，培养学生理论联系实际，独立分析问题和解决问题的能力，进一步启发和提高学生的创新意识和创新能力。

全书共分三部分。第一部分为基础微生物学实验技术；第二部分为食品微生物学实

验技术；第三部分为与其相关的其他食品微生物学实验技术；书后还有附录和参考文献。以上内容共 66 个实验，每个实验相对独立，因而各个院校可根据具体情况酌情选做。

本书由李平兰、贺稚非任主编，参加编写的还有刘慧、田洪涛、许喜林、李理、时向东、张晓东、王成涛、尹源明、郭爱玲、杜小兵、陈晓蔚、江晓、梁志宏等。实验 1、2、22 由时向东编写；实验 3、4、9、10、11、12、14 由刘慧编写；实验 5、6、7、8、15、16、17、44、57 由贺稚非和杜小兵编写；实验 19、20、21 由张晓东编写；实验 25、26、27、66 由王成涛编写；实验 28、29、43 由江晓编写；实验 30、31 由陈晓蔚编写；实验 32、33、34 由尹源明编写；实验 35、36、37、38 由郭爱珍编写；实验 13、45、46、47 由梁志宏编写；实验 48、49、58 由许喜林编写；实验 50、51、54、55、56 由田洪涛编写；实验 59、60、61、62 由李理编写；实验 18、23、24、39、40、41、42、52、53、63、64、65 由李平兰编写。附录部分由李平兰、王成涛、梁志宏等编写与整理。李平兰负责全书的统编定稿。南京农业大学江汉湖教授担任主审，中国农业大学牛天贵教授担任副主审。

本书在编写过程中，得到了各编委所在单位和领导的支持。中国农业大学食品科学与营养工程学院食品微生物学科研究生吕燕妮、沈清武、江志杰、欧阳清波等在实验试做及编写过程中提供了帮助，研究生周伟、刘子宇、孙成虎、梁锋、傅鹏、靳志强、王玉文等对本书的编排和校阅做了大量具体的工作。在本书出版之际谨向他（她）们表示诚挚的谢意！

编者

2005 年 5 月

食品微生物学实验室守则

微生物学实验课的目的是训练学生掌握最基本的操作技能，了解微生物学的基本知识，加深对微生物学基本概念、基本理论及原理的理解。通过实验，培养学生观察、思考、分析问题和解决问题的能力，树立实事求是、严肃认真的科学态度和良好的合作精神，养成勤俭节约、爱护公物的优良品德。

为了上好食品微生物学实验课，并保证安全，实验时须注意如下事项：

1. 每次实验前需对实验内容进行充分预习，以了解实验目的、原理和方法，做到心中有数。
2. 实验室内要保持安静和整洁，勿高声喧哗，尽量避免随便走动以免染菌。
3. 实验操作应严格按操作规程进行，万一遇有带菌物品洒漏、皮肤破伤或菌液吸入口中等意外情况发生时，应立即报告指导教师，及时处理，切勿隐瞒。
4. 实验操作需认真谨慎，要细心观察并及时做好实验记录，对于当时不能得到结果而需要连续观察的实验，则需在指定时间内观察，并记录每次观察的现象和结果，以便日后分析。
5. 使用仪器、设备时，要认真小心，如有损坏，须做好登记。对耗材和药品的使用要杜绝浪费，用完后放回原处。
6. 实验过程中，切勿使乙醚、丙酮、酒精等易燃药品接近火源，如遇火险，应先关掉火源，再用湿布或沙土掩盖灭火，必要时用灭火器。
7. 每次实验需要培养的材料，应标明自己的组别及处理方法，放于指定地点进行培养。实验室的菌种和物品等，未经教师许可，不得擅自带出实验室。
8. 每次实验结果，应以实事求是的科学态度填入报告表格中，力求简明准确，并连同思考题一起及时交给指导教师批阅。
9. 凡实验用过的菌种以及带有活菌的各种器皿，应先经高压灭菌后才能洗涤。制片上的活菌标本应先浸泡于3%来苏儿溶液或5%石炭酸溶液中，半小时以后再行洗刷。如系芽孢杆菌或有孢子的菌，则应适当延长浸泡时间。
10. 实验完毕，须把所用仪器擦拭干净后放回原处，并将实验室收拾整齐干净。离开实验室前，一定要用肥皂将手洗净，同时要关闭门窗以及水、电、煤气等开关。

目 录

第二版前言

第一版前言

食品微生物学实验室守则

第一部分 食品微生物学基础实验技术

实验 1	普通光学显微镜的使用	1
实验 2	电子显微镜样品的制备及使用	3
实验 3	细菌的简单染色和革兰氏染色	6
实验 4	细菌特殊结构的染色	11
实验 5	放线菌的形态观察	17
实验 6	酵母菌形态的观察及死活细胞的鉴别	20
实验 7	霉菌形态的观察及郝氏霉菌计数法	23
实验 8	微生物的培养特征观察	26
实验 9	微生物细胞大小的测量	29
实验 10	微生物细胞数量的直接计数法	32
实验 11	培养基的制备与灭菌方法	34
实验 12	微生物的分离、纯化与接种技术	38
实验 13	单细胞微生物生长曲线的测定	42
实验 14	用生长谱法测定微生物的营养要求	44
实验 15	实验室环境中的微生物检测	45
实验 16	环境因素对微生物生命活动的影响	46
实验 17	微生物鉴定用生理生化试验	48
实验 18	微生物的微量诊断系统	58
实验 19	微生物的菌种保藏技术	60
实验 20	微生物的人工诱变育种技术	64
实验 21	微生物菌种的复壮技术	67
实验 22	丝状真菌原生质体制备、融合及再生技术	69
实验 23	细菌的凝集实验	71
实验 24	琼脂免疫扩散实验	73
实验 25	荧光抗体技术	74
实验 26	酶联免疫吸附实验 (ELISA)	76
实验 27	质粒转化大肠杆菌及其检测	78

实验 28	细菌 DNA G+C 摩尔百分含量的测定	82
实验 29	聚合酶链反应 (PCR) 技术体外扩增 DNA	84
实验 30	16S rRNA 序列分析及其同源性分析	88
实验 31	脉冲电场凝胶电泳分离大分子 DNA	92

第二部分 食品微生物学安全实验技术

实验 32	食品中细菌菌落总数的测定	96
实验 33	食品中大肠菌群的测定	100
实验 34	食品中粪大肠菌群的测定	106
实验 35	食品中金黄色葡萄球菌的检验	108
实验 36	食品中溶血性链球菌的检验	111
实验 37	食品中沙门氏菌属的检验	113
实验 38	食品中志贺氏菌属的检验	119
实验 39	食品中大肠杆菌 O157: H7 的检验	122
实验 40	食品中蜡样芽孢杆菌的检验	127
实验 41	食品中副溶血性弧菌的检验	129
实验 42	食品中空肠弯曲菌的检验	132
实验 43	食品中肉毒梭状芽孢杆菌及肉毒毒素的检验	137
实验 44	食品中单核细胞增生李斯特菌的检验	140
实验 45	冷却肉中假单胞菌的检验	143
实验 46	真空包装肉及肉制品中热杀索丝菌的检验	145
实验 47	罐头食品中平酸菌的检验	146
实验 48	奶粉中阪崎肠杆菌的检验	147
实验 49	鲜乳中抗生素残留检验	150
实验 50	噬菌体的检测	153
实验 51	食品中霉菌的计数及生物量的测定	155
实验 52	苹果汁中棒曲霉素的检测	157
实验 53	食品中黄曲霉毒素的检测	159
实验 54	化学诱变剂的微生物检测实验——Ames 法	161
实验 55	食品加工过程中微生物的快速检测	164

第三部分 食品微生物学应用实验技术

实验 56	食品中乳酸菌的检验	169
实验 57	双歧杆菌的检验	171
实验 58	厌氧菌的分离、培养及活菌计数	174
实验 59	酸乳中乳酸菌活力的测定	177
实验 60	鲜牛乳自然发酵过程中微生物菌相变化测定	178

目 录

实验 61	还原试剂法对原料乳中细菌总数的测定	180
实验 62	酸乳及泡菜中乳酸杆菌的分离与初步鉴定	181
实验 63	发酵香肠中葡萄球菌和微球菌的分离计数与初步鉴定	183
实验 64	啤酒酵母的固定化及啤酒发酵实验	184
实验 65	糖化曲的制备及其酶活力的测定	186
实验 66	酱油种曲孢子数及发芽率的测定	189
实验 67	酒酿中根霉的分离与甜酒酿的制作	191
实验 68	毛霉的分离与豆腐乳的制作	193
实验 69	细菌素产生菌的筛选及效价测定方法	195
实验 70	淀粉酶产生菌株的筛选	198
实验 71	蛋白酶产生菌株的筛选	200
实验 72	产胞外多糖 (EPS) 乳酸菌菌株的分离与筛选	201
实验 73	耐消化道逆环境乳酸菌菌株的分离与筛选	203
实验 74	降解胆固醇微生物菌株的分离与筛选	205
实验 75	乳酸菌染色体 DNA 的提取和纯化	209
实验 76	用 PCR - ELISA 反应鉴定乳酸菌	210
实验 77	乳酸菌感受态细胞的制备和电击转化的方法	212
实验 78	黏附性双歧杆菌菌株的筛选	215
附录	218
附录 I	微生物常用玻璃器皿清洁法	218
附录 II	常用检索表	220
附录 III	常用培养基配方	222
附录 IV	常用染色液的配制	245
附录 V	常用缓冲液的配制	246
附录 VI	常用试剂和指示剂的配制	247
附录 VII	常用消毒剂和杀菌剂的配制	249
主要参考文献	250

第一部分 食品微生物学基础实验技术

实验 1 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及使用方法。
- (2) 复习光学显微镜的结构、各部分的功能和使用方法。

2 基本原理

现代普通光学显微镜利用目镜和物镜两组透镜系统来放大成像，故也常称为复式显微镜。它们由机械装置和光学系统两大部分组成（图 1-1）。在显微镜的光学系统中，物镜的性能最为关键，它直接影响着显微镜的分辨率。而在普通光学显微镜通常配置的几种物镜中，油镜的放大倍数最大，对微生物学研究最为重要。与其他物镜相比，油镜的使用比较特殊，需要在载玻片与油镜之间滴加香柏油，其主要目的是增加照明亮度和提高显微镜的分辨率。

2.1 增加照明亮度 油镜的放大倍数可达 $100\times$ ，放大倍数这样大的镜头焦距很短，孔径很小，但所需要的光照强度却很大。从承载标本的玻片透过来的光线，因介质密度不同（从玻片进入空气，再进入镜头），有些光线会因折射或全反射，不能进入镜头，致使在使用油镜时会因射入的光线较少，物像显现不清。所以为了不使通过的光线有损失，在使用油镜时必须要在油镜与载玻片之间加入与玻璃的折射率（ $n=1.55$ ）相仿的香柏油（ $n=1.52$ ）。

2.2 提高显微镜的分辨率 显微镜的分辨率或分辨力是指显微镜能辨别两点之间的最小距离的能力。从物理学角度看，光学显微镜的分辨率受光的干涉现象及所用物镜性能的限制，可表示为

$$\text{分辨率(最大可分辨距离)} = \frac{\lambda}{2NA}$$

式中 λ ——光波波长；

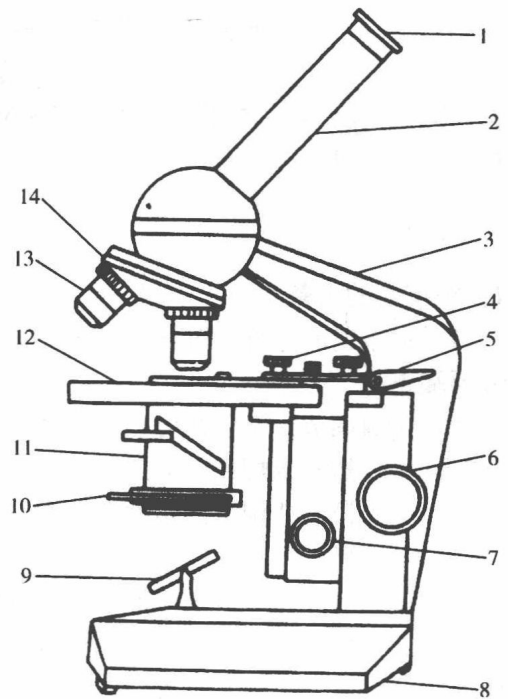


图 1-1 显微镜的结构

1. 目镜 2. 镜筒 3. 镜臂 4. 标本移动器
5. 粗动限位器 6. 粗调节器 7. 细调节器
8. 底座 9. 反光镜 10. 聚光孔径光圈
11. 聚光器 12. 镜台(载物台)
13. 物镜 14. 物镜转换器

NA——物镜的数值孔径值。

光学显微镜的光源不可能超出可见光的波长范围(0.4~0.7 μm),而数值孔径则取决于物镜的镜口角和玻片与镜头间介质的折射率,可表示为 $NA=n \cdot \sin \alpha$,式中 α 为光线最大入射角的半数,它取决于物镜的直径和焦距,一般来说,在实际应用中最大只能达到 120° ; n 为介质折射率。由于香柏油的折射率(1.52)比空气及水的折射率(1.0和1.33)要高,因此,作为镜头与载片之间介质的香柏油所能达到的数值孔径(NA一般在1.2~1.4)要高于低倍镜、高倍镜等干镜(NA都低于1.0)。若以可见光的平均波长0.55 μm 来计算,数值孔径通常在0.65左右的高倍镜只能分辨出距离不小于0.4 μm 的物体,而油镜的分辨率却可达0.2 μm 左右。

3 实验材料

3.1 菌种 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、乳脂链球菌(*Streptococcus cremoris*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、纹膜醋酸杆菌(*Acetobacter aceti*)、啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、脆壁酵母菌(*Saccharomyces fragilis*)、鲁氏毛霉(*Mucor rouxii*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)。

3.2 试剂 香柏油、二甲苯(或乙醚:乙醇=7:3的混合液)。

3.3 仪器及用具 显微镜、擦镜纸。

4 实验方法与步骤

4.1 观察前的准备

(1) 显微镜的安置:置显微镜于平整的实验台上,镜座距实验台边缘3~4cm。镜检时姿势要端正。

(2) 光源调节:安装在镜座内的光源灯可通过调节电压以获得适当的照明亮度,而使用反光镜采集自然光或灯光作为照明光源时,应根据光源的强度及所用物镜的放大倍数选用凹面或平面反光镜,并调节其角度,使视野内的光线均匀,亮度适宜。

(3) 双筒显微镜的目镜调节:双筒显微镜的目镜间距可以适当调节,而左目镜上一般还配有曲光度调节环,可以适应瞳距不同或两眼视力有差异的不同观察者。

(4) 聚光器数值孔径的调节:调节聚光器虹彩光圈值与物镜的数值孔径相符或略低。有些显微镜的聚光器只标有最大数值孔径值,而没有具体的光圈数刻度。使用这种显微镜时可在样品聚焦后取下一目镜,从镜筒中一边看着视野,一边缩放光圈,调整光圈的边缘与物镜边缘黑圈相切或略小于其边缘。因为各物镜的数值孔径值不同,所以每转换一次物镜都应进行这种调节。

4.2 显微观察 在目镜保持不变的情况下,使用不同放大倍数的物镜所能达到的分辨率及放大率都是不同的。一般情况下,特别是初学者进行显微镜观察时,应遵守从低倍镜到高倍镜再到油镜的观察程序,因为低倍数物镜视野相对较大,容易发现目标及确定检查的位置。

(1) 低倍镜观察:将金黄色葡萄球菌等染色标本玻片置于载物台上,用标本夹夹住,移动推进器使观察对象处在物镜的正下方。下降10 \times 物镜,使其接近标本,用粗调节器慢慢升起镜筒,使标本在视野中初步聚焦,再使用细调节器调节物像清晰。通过玻片夹推进器慢

慢移动玻片，认真观察标本各部位，找到合适的目的物，仔细观察并记录所观察到的结果。

(2) 高倍镜观察：在低倍镜下找到合适的观察目标并将其移到视野中心后，轻轻转动物镜转换器，将高倍镜移至工作位置。对聚光器光圈及视野亮度进行适当调整后微调细调节器使物像清晰，利用推进器移动标本仔细观察并记录所观察到的结果。

(3) 油镜观察：在高倍镜或低倍镜下找到要观察的样品区域后，用粗调节器将镜筒升高，然后将油镜转到工作位置。在待观察的样品区域加滴香柏油，从侧面注视，用粗调节器将镜筒小心地降下，使油镜浸在香柏油中并与标本相连。将聚光器升至最高位置并开足光圈，若使用聚光器的数值孔径值超过了1.0，还应在聚光镜与载玻片之间也滴加香柏油，保证其达到最大的效能。调节照明使视野的亮度合适，用粗调节器将镜筒徐徐上升，直至视野中出现物像，并用细调节器使其清晰聚焦为止。

4.3 显微镜用毕后的处理

(1) 上升镜筒，取下载物片。

(2) 用擦镜纸拭去镜头上的香柏油，然后用擦镜纸蘸少许二甲苯（或乙醚：乙醇=7：3的混合液）擦去镜头上残留的油迹，最后再用干净的擦镜纸擦去残留的二甲苯。

(3) 用擦镜纸清洁其他物镜及目镜；用绸布清洁显微镜的金属部件。

(4) 将各部分还原，反光镜垂直于镜座，将物镜转成“八”字形，再向下旋。同时把聚光镜降下，以免接物镜与聚光镜发生碰撞危险。

5 实验结果

绘制出你在低倍镜、高倍镜和油镜下观察到的各细菌、酵母菌和霉菌的形态图。并注明物镜放大倍数和总的放大倍数。

6 注意事项

(1) 调焦时，应先用粗调节器使镜台下降（或镜筒上升），等看到物像后再用细调节器使物像清晰。

(2) 切忌在调焦时误将粗调节器向反方向转动，这样很容易损坏镜头和载玻片。

(3) 保持镜头干净，不要用手和其他纸擦拭镜头，以免使镜头沾上污渍或产生划痕而影响观察。

7 思考题

(1) 用油镜观察时应注意哪些问题？在载玻片和镜头之间滴加什么油？起何作用？

(2) 影响显微镜分辨率的因素有哪些？

(3) 油镜用毕后，为什么必须把镜油擦掉？用过多的二甲苯擦镜头有什么危害？

实验2 电子显微镜样品的制备及使用

1 目的要求

(1) 熟悉制备微生物电镜样品的基本方法。