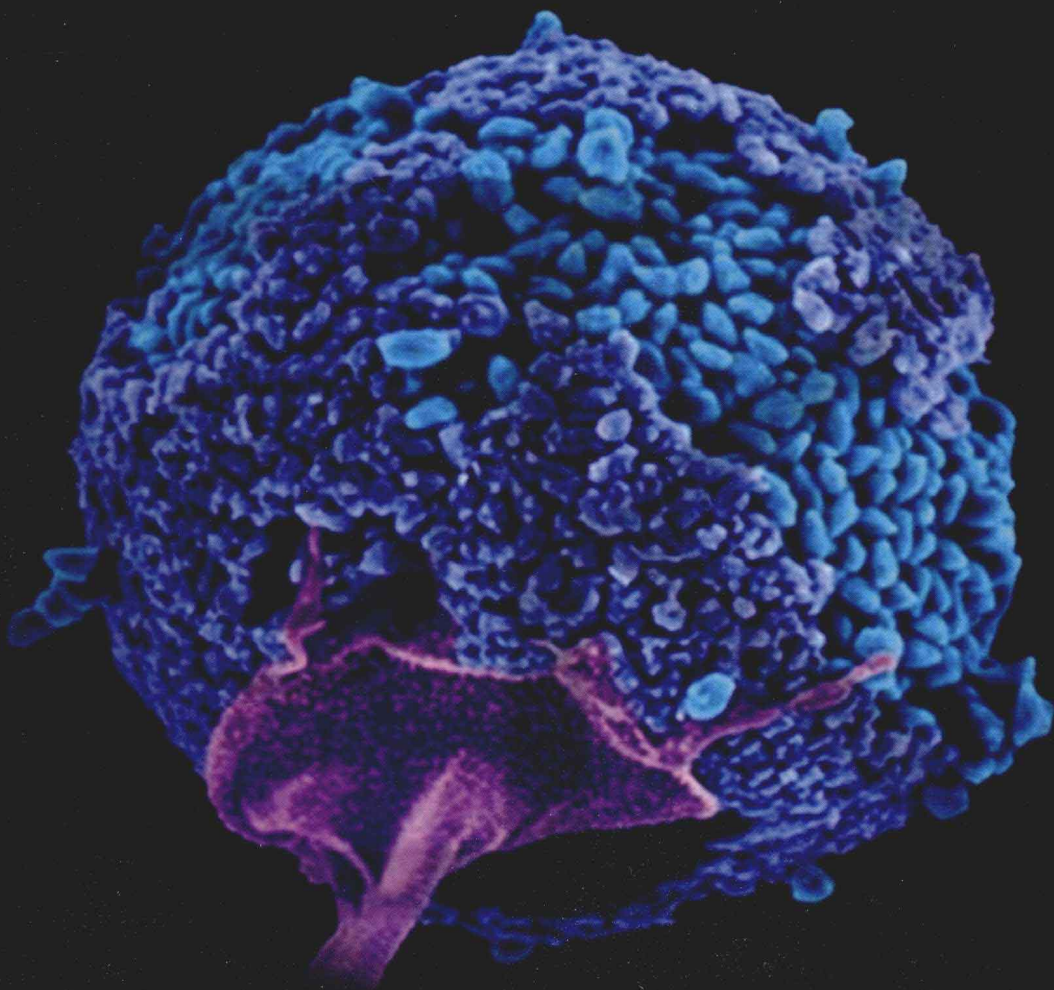


Experimental Microbiology

微生物学实验

车振明 主编



科学出版社

微生物学实验

车振明 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书根据微生物学实验技术特点,较为详尽地阐述了微生物学实验中的基本操作和基本技能,加大了综合设计性微生物实验部分的内容比重。全书包括微生物学实验基础技术,微生物染色与形态观察,微生物的分离与纯化,微生物的代谢,微生物的生长,微生物的遗传与变异,菌种的保藏,综合性、设计性微生物实验及附录等内容,共计 46 个实验,每个实验后附有思考题。本书力求在培养学生的动手能力的同时,培养学生独立思考和运用微生物学知识的能力,以全面提高学生的综合素质。

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

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验/车振明主编. —北京:科学出版社,2011.6
ISBN 978-7-03-031034-7

I. ①微… II. ①车… III. ①微生物学-实验-高等学校-教材
IV. ①Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 085934 号

责任编辑:席 慧 王国栋 / 责任校对:邹慧卿
责任印制:张克忠 / 封面设计:耕者设计工作室

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双 青 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011 年 6 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2011 年 6 月第一次印刷 印张:9 1/4

印数:1—4 000

字数:200 000

定价:24.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《微生物学实验》编写人员名单

主 编 车振明

编 委 (按姓氏汉语拼音排序)

车振明	(西华大学)
胡 征	(湖北工业大学)
黄 丹	(四川理工学院)
焦士蓉	(西华大学)
李 翔	(成都大学)
李玉锋	(西华大学)
缪礼鸿	(武汉工业学院)
宋宏新	(陕西科技大学)
唐 洁	(西华大学)
向文良	(西华大学)
张 玲	(西南科技大学)
张文学	(四川大学)
张永勤	(青岛科技大学)
祖国仁	(大连工业大学)

前 言

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学科，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必不可少，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。例如，微生物形态的观察、革兰氏染色、生长曲线的测定等内容。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。例如，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，尝试自己分析实验结果，以培养学生综合运用所学知识的能力。

本书由西华大学车振明教授主编，多所院校相关教师参与编写。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，科学出版社的编辑为本书的出版做了大量工作，在此一并致谢。本书在编写过程中参考了许多优秀的微生物学实验指导书，特别是一些经典实验的内容均选自参考书籍，在此对原书作者深表感谢。

由于编者水平有限，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

2011年1月于西华大学

目 录

前言

第 1 章 微生物学实验基础技术	1
1.1 实验室常用器皿、仪器简介	1
1.1.1 微生物实验室常用器皿	1
1.1.2 常用仪器及其使用要求	6
1.2 显微镜的构造、性能和使用方法	7
1.2.1 实验 1-1 普通光学显微镜的使用	7
1.2.2 实验 1-2 相差显微镜的使用	12
1.3 消毒与灭菌.....	14
1.3.1 基本概念.....	14
1.3.2 实验 1-3 灭菌及消毒的方法	14
1.3.3 实验 1-4 干热灭菌技术	17
1.3.4 实验 1-5 高压蒸汽灭菌	18
1.3.5 实验 1-6 紫外线灭菌	21
1.3.6 实验 1-7 微孔滤膜过滤除菌	23
1.4 培养基的配制.....	24
1.4.1 实验 1-8 培养基的常规配制程序	24
1.4.2 实验 1-9 细菌、放线菌常用培养基的配制	28
1.4.3 实验 1-10 酵母菌、霉菌常用培养基的配制	31
1.4.4 实验 1-11 几种常用鉴别和选择培养基的配制	33
1.5 微生物的接种与培养.....	36
1.5.1 实验 1-12 微生物的接种与培养	36
第 2 章 微生物染色与形态观察	41
2.1 微生物染色概述.....	41
2.2 实验 2-1 细菌的简单染色法	43
2.3 实验 2-2 革兰氏染色法	45
2.4 实验 2-3 细菌的芽孢染色法	47
第 3 章 微生物的分离与纯化	50
3.1 实验 3-1 噬菌体的分离和纯化	50
3.2 实验 3-2 厌氧菌的分离与培养	52
第 4 章 微生物的代谢	55
4.1 实验 4-1 微生物对生物大分子的分解利用	55
4.2 实验 4-2 微生物对含碳化合物的分解利用	58
4.3 实验 4-3 微生物对含氮化合物的分解利用	61

第 5 章 微生物的生长	65
5.1 实验 5-1 微生物大小的测定	65
5.2 实验 5-2 平板菌落计数法	68
5.3 实验 5-3 显微镜直接计数法	70
5.4 实验 5-4 大肠杆菌生长曲线的测定	73
第 6 章 微生物的遗传与变异	75
6.1 实验 6-1 紫外线对枯草芽孢杆菌产生淀粉酶的诱变效应	75
6.2 实验 6-2 电场诱导酵母菌原生质体融合	78
6.3 实验 6-3 抗药性突变菌株的分离	80
第 7 章 菌种的保藏	83
7.1 实验 7-1 常用简易保藏法	83
7.2 实验 7-2 冷冻真空干燥保藏法	87
第 8 章 综合性、设计性微生物实验	90
8.1 综合性微生物实验	90
8.1.1 实验 8-1 土壤微生物的分离与纯化	90
8.1.2 食品中细菌总数及大肠菌群数的测定	94
8.1.2.1 实验 8-2 食品中细菌总数的测定	94
8.1.2.2 实验 8-3 食品中大肠菌群的测定	97
8.1.3 实验 8-4 沼气发酵	100
8.1.4 有机废水的生物化学需氧量和化学需氧量测定	102
8.1.4.1 实验 8-5 微生物传感器测定生物化学需氧量	102
8.1.4.2 实验 8-6 化学需氧量的测定(重铬酸钾法)	104
8.1.5 实验 8-7 光合细菌处理高浓度有机废水	106
8.1.6 实验 8-8 抗生素效价的生物测定(管碟法)	108
8.1.7 实验 8-9 大肠杆菌质粒 DNA 的快速提取	111
8.1.8 实验 8-10 试管凝集反应	113
8.1.9 实验 8-11 酶联免疫吸附试验(ELISA)	115
8.1.10 实验 8-12 酿酒酵母细胞固定化与乙醇发酵	117
8.2 设计性微生物实验	123
8.2.1 实验 8-13 中温 α -淀粉酶高产菌株的筛选	123
8.2.2 实验 8-14 高产油脂酵母的筛选	124
8.2.3 实验 8-15 平菇的紫外线诱变育种	125
8.2.4 实验 8-16 富铁酵母的选育	126
8.2.5 实验 8-17 微生物固定化技术处理污水	126
主要参考文献	128
附录 I 染色液的配制	129
附录 II 培养基的配制	131
附录 III 试剂和溶液的配制	139

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）后才能使用，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受高温（121℃）、高压（0.1MPa）、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，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，以下介绍实验用玻璃器皿和接种工具的种类、洗涤方法、包装和灭菌方式。

1. 玻璃器皿的类别、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（图1-1）。

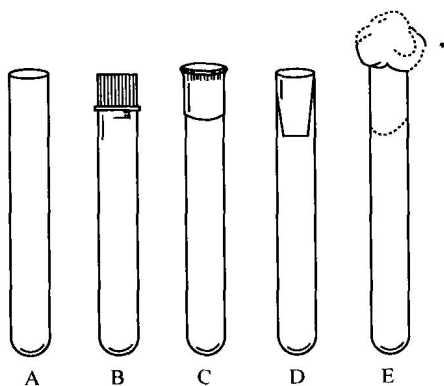


图1-1 试管与试管帽（塞）

A. 细菌学试管；B. 螺帽；C. 塑料帽；D. 硅胶泡沫塑料塞；E. 棉塞

① 大试管（约18mm×180mm） 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

本章实验

- 实验 1-1 普通光学显微镜的使用/7
- 实验 1-2 相差显微镜的使用/12
- 实验 1-3 灭菌及消毒的方法/14
- 实验 1-4 干热灭菌技术/17
- 实验 1-5 高压蒸汽灭菌/18
- 实验 1-6 紫外线灭菌/21
- 实验 1-7 微孔滤膜过滤除菌/23
- 实验 1-8 培养基的常规配制程序/24
- 实验 1-9 细菌、放线菌常用培养基的配制/28
- 实验 1-10 酵母菌、霉菌常用培养基的配制/31
- 实验 1-11 几种常用鉴别和选择培养基的配制/33
- 实验 1-12 微生物的接种与培养/36

实验笔记

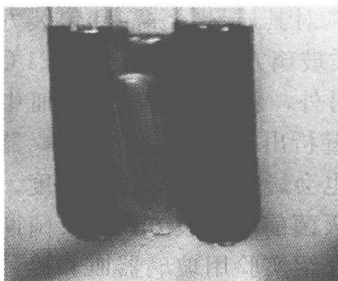
振荡培养。

② 中试管 $[(13\sim15)\text{mm}\times(100\sim150)\text{mm}]$ 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。

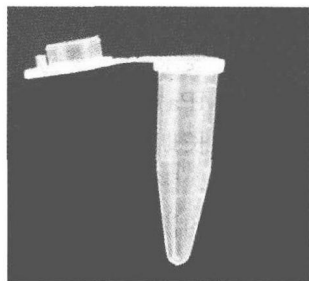
③ 小试管 $[(10\sim12)\text{mm}\times100\text{mm}]$ 一般用于细菌或酵母菌的糖发酵试验或血清学试验。

(2) 德汉氏小管 (Durham tube) 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 (图 1-2A)。

(3) Eppendorf 管 即小塑料离心管 (图 1-2B)。分 1.5ml 和 0.5ml 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, DNA 和 RNA 的提取等。



A



B

图 1-2 德汉氏小管 (A) 和 Eppendorf 管 (B)

(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: 0.1ml、1ml、2ml、5ml 和 10ml, 用于吸取溶液和菌悬液, 此外吸取不计量的液体, 如染色液、离心上清液、无菌水、少量抗原、抗体、酸溶液、碱溶液等可用具乳胶头的毛细吸管。

② 微量加样器 (micropipette) 微量加样器又称微量吸管, 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 $1\sim10\mu\text{l}$ 、 $2\sim20\mu\text{l}$ 、 $20\sim100\mu\text{l}$ 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。

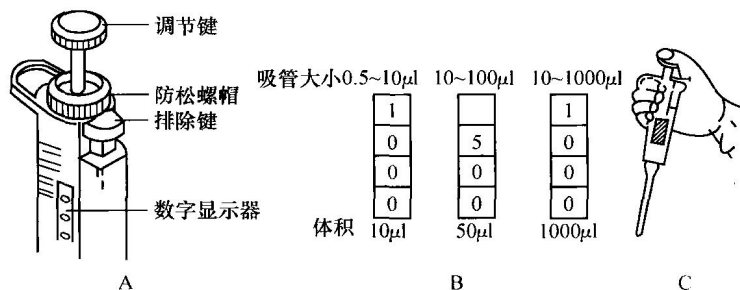


图 1-3 微量加样器

A. 微量加样器各部分组成；B. 微量加样器数字显示器；C. 微量加样器的握法

(5) 培养皿 (petri dish) 常用培养皿如图 1-4 所示，皿底直径 90mm，高 15mm，皿底、皿盖均为玻璃制成，但有特殊需要时，可使用陶器皿盖，因其能吸收水分，使培养基表面干燥。例如，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。

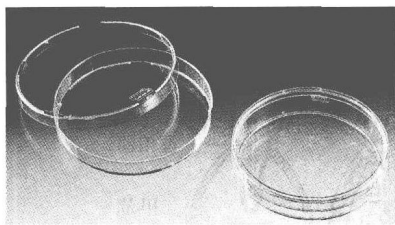


图 1-4 培养皿

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) 多用于贮存培养基和生理盐水，有 50ml、100ml、150ml、200ml、250ml、500ml、1000ml、2000ml 等多种规格，其底大口小，便于加塞，放置平稳。常用烧杯有 50ml、100ml、250ml、500ml 和 1000ml 等，用于配置培养基和各种溶液。

(7) 注射器 (injector) 注射器的容量有 1ml、2ml、5ml、10ml、20ml、25ml，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) 磨口分为广口和小口，根据需贮存试剂的量选用不同大小的试剂瓶，有棕色和无色两种，棕色主要用来贮存避光试剂。

(9) 玻璃缸 (glass vat) 盛放石炭酸或来苏水等消毒

实验笔记

实验笔记

液，以备浸泡用过的载玻片、盖玻片等。

(10) 载玻片 (slide) 和盖玻片 (cover slip) 普通为长方形，常用于微生物涂片、染色进行形态观察及免疫学中的凝集反应。凹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 (图 1-5)。

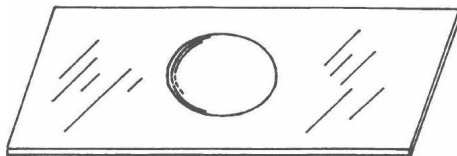


图 1-5 凹玻片

(11) 双层瓶 (double bottle) 由内、外两个玻璃瓶组成，内层小锥形瓶装有机油，外层瓶装二甲苯 (图 1-6A)。

(12) 滴瓶 (dropper bottle) 用来盛装各种染液和无菌水等 (图 1-6B)。

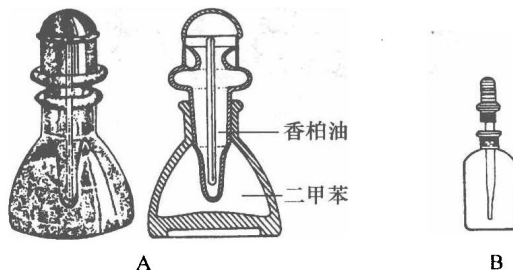


图 1-6 双层瓶与滴瓶

A. 双层瓶；B. 滴瓶

(13) 接种工具 有接种环、接种针、接种钩、接种铲，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 (图 1-7)。

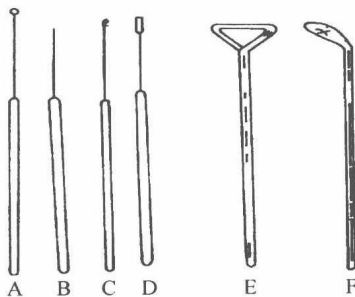


图 1-7 接种工具

A. 接种环；B. 接种针；C. 接种钩；D. 接种铲；E 和 F. 玻璃涂布器

实验笔记

2. 玻璃仪器的清洗

(1) 新玻璃器皿的洗涤方法 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, 浸泡后用自来水冲洗。

(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 24h 或者开水煮沸 30min 再洗, 带病原菌的培养物先进行高温灭菌再洗。

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脱脂棉或玻璃棉、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, 应先用牙签拨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), 再行洗涤, 风干或烘干备用。吸过菌液的玻璃吸管或塑料吸嘴用上述消毒液浸泡, 或开水煮沸, 或超声波清洗器, 超声洗涤 10~20min, 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后方可使用。

③ 载玻片与盖玻片 用过的载玻片与盖玻片, 如滴有香柏油, 先用卫生纸擦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, 于洗液中浸泡 1~2h。自来水冲洗, 蒸馏水冲洗后, 经目测, 载玻片或盖玻片上无残留水珠, 可视为洗涤干净, 风干后于 95% 乙醇中保存备用, 使用时用镊子取出, 烧去残留乙醇即可。

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

3. 玻璃器皿的包装和灭菌

(1) 培养皿的包装和灭菌 主要有以下几种包装和灭菌方式。

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 (130~140℃, 4h 或 150~170℃, 1~2h), 或高压蒸汽灭

实验笔记

菌 20~30min, 冷却后备用, 见图 1-8。

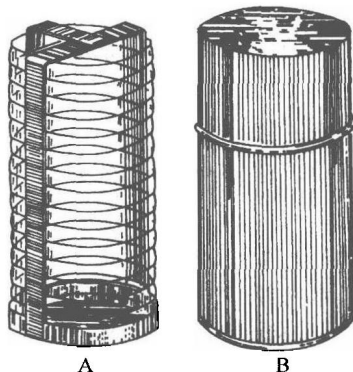


图 1-8 装培养皿的金属筒

A. 内部框架; B. 带盖外筒

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 130~140℃ 烘箱内干热灭菌 3~4h 后, 待温度自然冷却至 40℃ 以下方可取出。烘箱温度高于 100℃ 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。

(2) 吸管的包装和灭菌 主要有以下几种包装和灭菌方式。

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 试管用棉花塞好或用橡皮帽塞好, 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, 外面再用牛皮纸包好, 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。箱内设有数层金属孔架, 用来搁置培养标

实验笔记

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。常见的培养箱有电热恒温培养箱、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，减少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

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

超净工作台的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，并且工作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：使用前30min要打开紫外灯杀菌；使用前10min将通风机开启，用白纱布将台面擦干净；物品的放置不能妨碍气流的正常流动；超净工作台的安装要远离有震动及噪声大的地方；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和相差显微镜的使用技术。

1.2.1 实验 1-1 普通光学显微镜的使用

【目的要求】

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

实验笔记

【基本原理】

1. 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。

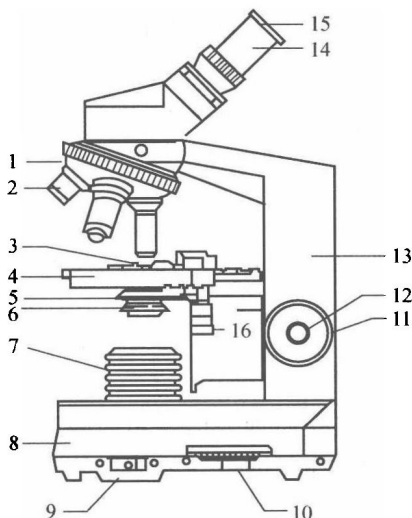


图 1-9 普通光学显微镜的结构

1. 物镜转换器；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

(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。物镜的放大率越高，透镜的弯曲度越大，焦距就越短。由于放大率越高，物镜的镜筒就越大，所以油浸镜头在观察时几乎触及标本。镜筒长度的变化，不仅影响放大倍率，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 160mm。

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，

并且在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 用于粗放调节物镜和标本的距离。

⑦ 微调螺旋 用来细微调节直至看到清晰的图像。

(2) 光学部分 包括以下部分。

① 反光镜 由一平面和另一凹面镜子组成，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 装在物镜转换器上，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。

2. 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 是其成像模拟图， $A''B''$ 和眼睛的距离为显微镜的明视距离，标本 AB 的像经过 Lo (物镜) 后到 $A'B'$ 处成为一个放大倒立的实像 (中间像)， F 为 Lo 的后焦点；当光线传到 Le (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。

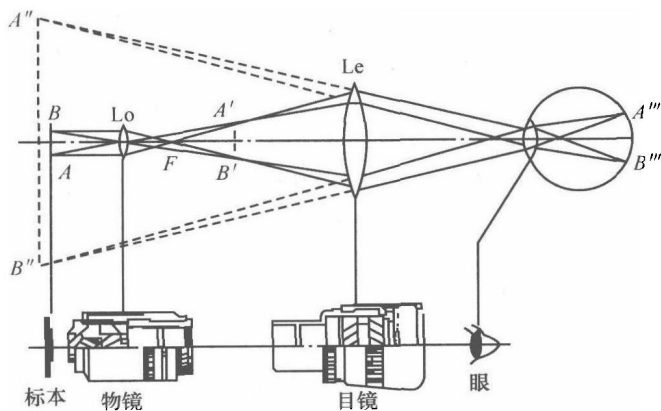


图 1-10 光学显微镜的成像原理

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。

实验笔记

实验笔记

(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, NA 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:

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

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, 常用可分辨出的物象两点间的最短距离 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 V 等于物镜放大率 V_1 和目镜放大率 V_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 (250mm);

Δ —光学筒长。

(4) 焦深 在显微镜下观察一个标本时, 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越大, 焦深越小。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。

【实验材料】

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 染色玻片标本, 普通光学显微镜, 香柏油, 乙醚, 擦镜纸。

【操作步骤】

(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