



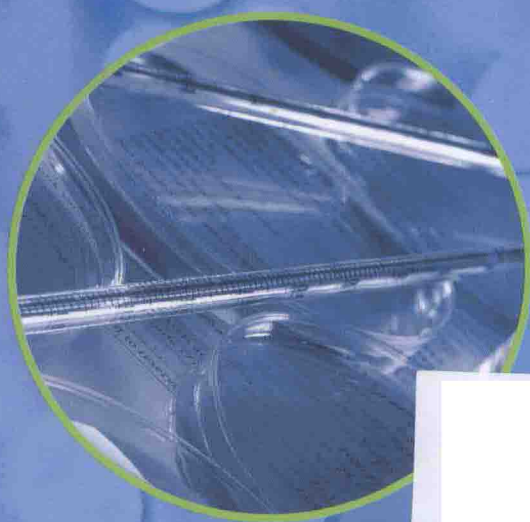
普通高等教育“十二五”规划教材



现代工业微生物学实验技术

(第二版)

杨汝德 主编



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

现代工业微生物学 实验技术

(第二版)

主 编 杨汝德
副主编 林晓珊 吴 虹
雷晓凌 银玉容

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书包含了工业微生物学八大实验技术：工业微生物的显微技术，工业微生物的形态观察、制片及染色技术，工业微生物的纯培养技术，工业微生物的检测技术，工业微生物的生理与发酵实验技术，环境工程的微生物学实验技术，工业微生物的育种技术，工业微生物的基因工程实验技术。本书共设置了 49 个实验，其中大部分为工业微生物学基本技能训练实验，各相关专业师生在使用时，可根据实际情况加以取舍或精简；还有部分实验为大型综合性实验和研究性实验，可供学生课外科技活动或毕业实践时参考应用。

本实验教材可作为 2015 年出版的《工业微生物学教程》（罗立新主编）等主教材的配套实验教材，颇具理工科特色，适合于理工科大学的生物工程、生物技术、生物制药工程、食品科学与工程、食品质量与安全、环境科学与工程等专业的本科生使用，也适合于高等职业技术学院相关专业的专科生使用。

图书在版编目 (CIP) 数据

现代工业微生物学实验技术/杨汝德主编. —2 版. —北京：科学出版社，2015.3

普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-03-043828-7

I. ①现… II. ①杨… III. ①工业微生物学—实验—高等学校—教材
IV. ①Q939.97-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 053791 号

责任编辑：席 慧 闫小敏 / 责任校对：胡小洁

责任印制：赵 博 / 封面设计：迷底书装

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>

文林印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009 年 1 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2015 年 4 月第 二 版 印张：15 1/2

2015 年 4 月第十次印刷 字数：367 000

定价：36.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

前 言

工业生物技术是继医药生物技术和农业生物技术后的第三次生物技术革命,是生物学、化学和工程学的交叉技术,其核心是大规模利用微生物细胞和酶催化物质转化。我国早就将工业生物技术列为国家中长期科学和技术发展规划的重点发展领域。为了配合我国工业生物技术革命,为了更好地跟上 21 世纪工业微生物学迅猛发展的步伐,我们对 2009 年出版的《现代工业微生物学实验技术》教材做了大幅度的更新、扩充和提高,重新修编为《现代工业微生物学实验技术》(第二版),并由科学出版社出版。

第二版修编的主要内容包括:①删减了第一章工业微生物学实验常用器皿和仪器设备;②删减了第九章工业微生物学实验附录;③删减了第五章工业微生物的生理与发酵实验技术的 3 个研究性实验;④参照食品安全国家标准 GB 4789—2010,大幅修改更新了第四章工业微生物的检测技术的第二节(食品卫生微生物学检验技术);⑤参照食品安全国家标准 GB 4789—2010 和 GB 4789—2012,新增编第四章工业微生物的检测技术的第三节(乳酸菌和双歧杆菌的检验技术);⑥新增编第六章环境工程的微生物学实验技术(共 6 个实验);⑦总实验数由第一版的 44 个增加至第二版的 49 个。

本书涵盖了工业微生物学八大实验技术,共设置了 49 个实验,每个实验的编写内容均包括:目的要求、基本原理、实验器材、实验内容及操作步骤、实验注意事项、实验报告与思考题等。大部分实验为工业微生物学基本技能训练实验(基础性实验和备选用实验),各相关专业师生在使用时,可根据实际情况加以取舍或精简;还有部分实验为大型综合性实验和研究性实验,可供学生课外科技活动或毕业实践时参考应用。

现代工业微生物学是一门实践性很强的应用生物科学。掌握工业微生物学实验技术对每一位学生来说,其重要性绝不亚于理论课程。因此,在学习理论课的同时,务必注重工业微生物学实验操作技能的训练和提高。

本实验教材可作为 2015 年出版的《工业微生物学教程》(罗立新主编)等主教材的配套实验教材,颇具理工科特色,适合于理工科大学的生物工程、生物技术、生物制药工程、食品科学与工程、食品质量与安全、环境科学与工程等专业的本科生作为实验技术教材使用,也适合于高等职业技术学院相关专业的专科生使用。

本书由杨汝德主编,林晓珊、吴虹、雷晓凌、银玉容作为副主编主持编写。由于编者的学识和水平所限,书中不足之处在所难免,希望各位教师、学生、读者和同行给予批评指正。

杨汝德

2015 年 1 月

目 录

前言

工业微生物学实验规则与安全	1
第一章 工业微生物的显微技术	4
第一节 普通光学显微镜的操作技术	4
实验一 使用普通光学显微镜观察各种微生物标本片	7
第二节 暗视野显微镜的操作技术	10
实验二 使用暗视野显微镜观察活菌体	12
第三节 相差显微镜的操作技术	14
实验三 使用相差显微镜观察啤酒酵母细胞内部结构	17
第四节 荧光显微镜的操作技术	19
实验四 使用荧光显微镜观察酵母菌和细菌的形态结构	20
第五节 电子显微镜的操作技术	22
实验五 透射电镜微生物样品的制备与观察	24
实验六 扫描电镜微生物样品的制备与观察	28
第二章 工业微生物的形态观察、制片及染色技术	31
第一节 酵母菌和霉菌的形态观察及制片技术	32
实验七 酵母菌和霉菌的制片、染色技术及形态观察	36
第二节 细菌和放线菌的形态观察及制片技术	42
实验八 细菌和放线菌的制片、染色技术及形态观察	49
实验九 细菌特殊结构的制片、染色技术及形态观察	55
第三章 工业微生物的纯培养技术	60
第一节 培养基的配制与灭菌技术	60
实验十 培养基的配制和灭菌	64
第二节 无菌操作技术	70
实验十一 无菌操作和微生物菌种的移接	72
第三节 工业微生物的分离与纯化技术	77
实验十二 微生物菌种的分离与纯化	78
实验十三 碱性纤维素酶产生菌的分离纯化	82
实验十四 噬菌体的分离与纯化	85
第四节 厌氧微生物的纯培养技术	89
实验十五 厌氧微生物的纯培养	91
第五节 工业微生物的菌种保藏技术	98
实验十六 工业微生物菌种的保藏	99

第四章 工业微生物的检测技术	105
第一节 微生物生长繁殖的测定技术	105
实验十七 酵母菌细胞数、出芽率及死亡率的测定	108
实验十八 微生物细胞大小的测定	112
实验十九 光电比浊法测定细菌生长曲线	115
第二节 食品安全微生物学检验技术	118
实验二十 水和食品中菌落总数的测定	120
实验二十一 食品中大肠菌群的计数	125
第三节 乳酸菌和双歧杆菌的检验技术	131
实验二十二 食品中乳酸菌的检验	133
实验二十三 食品中双歧杆菌的检验	138
第四节 噬菌体的检测技术	145
实验二十四 噬菌体的检查及其效价测定	145
第五章 工业微生物的生理与发酵实验技术	151
第一节 工业微生物的生理生化实验技术	151
实验二十五 微生物对碳源的利用实验	153
实验二十六 微生物对氮源的利用实验	157
实验二十七 环境因素对微生物生长的影响实验	161
第二节 工业微生物的发酵实验技术	166
实验二十八 酵母菌的乙醇发酵实验	166
实验二十九 短杆菌的谷氨酸发酵实验	169
实验三十 枯草芽孢杆菌的 α -淀粉酶发酵实验	172
实验三十一 乳酸细菌的乳酸发酵实验	174
第六章 环境工程的微生物学实验技术	181
第一节 活性污泥微生物的镜检分析	182
实验三十二 活性污泥中菌胶团细菌、原生动物及微型后生动物的形态观察	184
第二节 空气卫生微生物的检测	186
实验三十三 空气中细菌的检测	187
第三节 土壤中微生物数量和组成的测定	189
实验三十四 土壤中微生物的分离和计数	190
第四节 污染物降解菌的分离纯化与性能测定	193
实验三十五 表面活性剂降解菌的富集、分离及降解能力测定	195
实验三十六 酚降解菌的驯化、分离及性能测定	198
实验三十七 光合细菌的分离纯化及对有机废水的处理	199
第七章 工业微生物的育种技术	203
第一节 工业微生物的诱变育种技术	203
实验三十八 应用物理因素诱变选育抗药性的淀粉酶高产菌株	203
实验三十九 应用化学因素诱变选育腺嘌呤营养缺陷型菌株	207

第二节 工业微生物的原生质体育种技术	210
实验四十 酵母菌原生质体的诱变育种	211
实验四十一 酵母菌原生质体的融合育种	214
第八章 工业微生物的基因工程实验技术	217
实验四十二 细菌质粒 DNA 的小量制备	218
实验四十三 细菌总 DNA 的提取	220
实验四十四 PCR 扩增目的基因	222
实验四十五 质粒 DNA 的酶切及从凝胶中回收 DNA	224
实验四十六 感受态细胞的制备及转化	225
实验四十七 DNA 体外重组	227
实验四十八 葡聚糖内切酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达	228
实验四十九 纳豆激酶基因的克隆及在酵母菌中的表达	234
主要参考文献	240

工业微生物学实验规则与安全

一、工业微生物学实验目的和要求

1. 工业微生物学实验目的

工业微生物学是一门实践性很强的应用学科，必须在掌握广泛理论知识的同时，掌握好扎实娴熟的操作技能，这样才能真正掌握好这门学科。因此，在理工科学校开设工业微生物学实验课程，可以训练学生掌握微生物学基本的操作技能，同时也让学生初步接触学科先进的技术和方法，使学生在有限的的时间里系统扎实地掌握微生物学独特的实验操作技术，并将实验技能与实际应用密切联系起来，以更好地服务于相关的工业、农业、食品、环境及医学等领域。通过实验课，培养学生观察、思考、分析问题和解决问题的综合能力；树立严谨、求实的科学态度，以及敢于创新的开拓精神；培养勤俭节约、爱护公物、相互协作的优良作风。

2. 工业微生物学实验要求

为了上好工业微生物学实验课，确保实验顺利进行，保证实验安全，特别对上工业微生物学实验课的学生提出下列几点要求。

(1) 每次实验前必须对实验内容进行充分预习，以了解实验目的、原理、方法和实验步骤，操作时能达到心中有数。只有思路清楚，胆大心细，有条不紊，才不易出现意外的实验效果。

(2) 上课时，非必要的物品和书包请勿带入室内，勿随便走动和高声谈话，保持室内安静；关好门窗，以免空气干扰造成污染。

(3) 实验操作前需认真聆听教师讲解和观看演示，实验操作时需认真、细心、谨慎。对每次实验的现象和结果要认真仔细观察，对于当前不能得到结果而需要连续观察的实验需记下每次观察的现象和结果，并需及时记下，以便分析和作出正确的报告。

(4) 实验需进行培养的材料，一律要求注明班别、组别和日期，有的还需注明实验项目的名称和菌种的名称，并放于教师指定的地点进行培养。

(5) 实验微生物培养物均需轻取轻放，小心、严格地按操作规程进行，以免发生意外致容器破损，造成污染。若微生物培养物污染桌面、地面、用具、衣服或皮肤甚至菌液误入口中，应立即报告指导教师，及时处理，切勿隐瞒。

(6) 使用显微镜或其他贵重仪器时，要求细心操作，特别爱护。进行高压蒸汽灭菌时，要严格遵守操作规程。负责灭菌的同学在灭菌过程中不准离开实验室，并随时观察灭菌锅工

作情况,以免发生意外。

(7) 每次实验完毕,必须将实验器材洗净放妥,整理台面,并将实验室收拾整洁,养成良好的实验习惯。凡带菌的器材需经浸泡消毒或高温灭菌后才能清洗。严禁将实验的菌种及器材随意携带到室外。

(8) 每次实验结束,应以实事求是的科学态度认真作出实验报告,对异常或不理想的结果需加以讨论,对实验现象作出合理的解释,下次实验时交给指导教师批阅,

二、微生物学实验室的规章制度和安全守则

微生物实验室存在化学方面有毒、易燃、易爆、腐蚀和致癌的危害,有时还存在高压、紫外线和其他辐射的危害。另外,微生物工作者还会受到来自微生物菌株的危害,在处理菌株、载玻片和所有装过或接触过活菌株的容器时要加倍小心。菌株主要通过消化道、呼吸道、皮肤伤口和眼部等部位造成人体的感染(眼睛是感染原进入却不发生局部病理反应的大门),一些微生物菌株甚至可以通过皮肤进入体内。因此,在微生物学实验室进行实验时,实验人员必须遵循微生物操作技术规范,必须符合实验室生物安全守则要求。

1. 微生物学实验室的规章制度

(1) 正在进行实验时,由实验室主管限制人员进入。实验人员一律穿工作衣进入实验室,以防衣服被菌污染或被染液弄脏,离开实验室时脱下,并应经常洗干净。留长发者应戴帽或将长发束扎于脑后,以免着火或被污染。

(2) 非实验所需物品不得置于实验台上。未经教师许可,不得将实验室内物品带出。

(3) 实验室应保持安静,不得高声谈笑,无事不得到处走动。不得在实验室内进食、喝水、抽烟、处理隐形眼镜、使用化妆品。食物应储存于工作区外的专用橱柜或冰箱内。

(4) 禁止使用口吸移液管,应使用机械移液装置。制定安全使用和处理锐利器具如注射器针头、手术刀片等的方案。

(5) 仔细进行每一步操作,以减少飞溅物或气溶胶的产生。工作台面在每天工作结束前至少应消毒一次,发生生物活性物质泼洒时应及时处理。所用培养物、储存物及其他废物在排放前,应先经过可行的消毒如高压灭菌法处理。

(6) 实验后的废物和用过的化学药品分别倾入污物桶或瓷缸内,不得丢入水槽,以免堵塞下水道或腐蚀水管。

(7) 要在实验室外临近处进行消毒处理的物品,必须存放在耐用、防扩散的密闭容器中,且必须依据当地及国家的相关规定进行包装后才能从实验室中移出。

(8) 实验完毕后,对所用的仪器、工具、标本等,要认真进行清点和擦洗,如有短缺、损坏需填写赔偿报告单。值日生离开实验室前必须将实验室打扫干净,用消毒液擦抹桌面,并检查水、电、窗是否关好。

2. 微生物学实验室的安全守则

(1) 对贵重的精密仪器,必须详细阅读仪器说明书后方可使用。实验中所用的试剂,应了解它的性质后再使用。若试剂瓶标签上字迹不清或出现标签脱落时,则试剂必须经过检验,否则不得使用。

(2) 在使用有毒物品或易挥发的有毒液体(氰化钾、氢氟酸、二硫化碳等),以及易挥发的强酸、氨或易发生恶臭的物质(硫化铵、硫化氢等)时,必须在排气良好的地方或通风

橱中进行；在使用易爆品、浓酸和浓碱，以及其他一些有强烈反应性能的物质时，应戴护目镜和橡皮手套。

(3) 吸取有毒液体及浓酸、浓碱时，都不得以移液管用口吸的方式吸取，必须用上端带有橡皮球的移液管或注射器吸取，或用量筒、量杯量取。强酸的浓溶液（盐酸、硝酸、硫酸）或 25% 的氨水，均应储存在磨口瓶中。

(4) 对易爆乙醚不得轻易加热，必须经测试确定其中无过氧化物后方可操作。对盛有易燃、易爆液体（乙醚、苯、二硫化碳等）的瓶子和安瓿，不得放在使用煤气或有电热器的实验室内加热，应放在无火源的通风处使用。一离开实验桌子要熄火。

(5) 使用具有爆炸性的试剂时（如苦味酸和多硝基化合物）应特别小心。严防火源、火花，避免猛力冲击和振荡。

(6) 危险试剂必须由专人保管和储存。有毒或易爆物品应封闭在铁箱或铁柜中，并由专人保管物品账册和钥匙。

(7) 易吸水的试剂（氯化钙、氢氧化钠、氢氧化钾等）必须严封在有盖的玻璃瓶中，用后宜用石蜡封好；见光即发生变化的试剂（硝酸银、磺胺剂、四氯化碳等）应保存在棕色玻璃瓶中，放在阴凉的柜、橱中，避免日光直射；在空气中可以自燃的金属钾、黄磷等，应保存在相应的盛有适当液体的密闭容器中，如金属钾应保存在煤油中，黄磷要放在水中保存。

(8) 凡进行易燃、易爆性实验时，所需仪器设备必须符合要求，不得马虎敷衍，以免发生危险。

(9) 必须保证实验室的安全，防护器材时刻处于完善待用状态。

(10) 其他特殊药品、仪器的安全操作规程，应由教师及有关人员予以补充指导。

第一章 工业微生物的显微技术

微生物最显著的特征就是个体极其微小，人这双肉眼的眼力不足，必须借助于显微镜才能观察到它们的个体形态及内部结构。实际上，正是由于显微技术的建立，才使人类真正认识到丰富多彩的微生物世界。因此，显微技术是一项很重要的技术，熟练掌握显微操作技术是研究微生物不可缺少的手段。现代的显微技术，除用于观察生物体的形态和细微结构外，还可与计算机结合，用于生物体组成成分的定性与定量分析等。

显微镜的种类很多，一般可将它们分为光学显微镜和非光学显微镜两大类。光学显微镜又可分为可见光显微镜和不可见光显微镜两类。可见光显微镜包括明视野显微镜（即普通光学显微镜）、暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜和偏光显微镜等，其中以普通光学显微镜最为常用；不可见光显微镜包括 X 射线、红外光、紫外光等显微镜。非光学显微镜包括透射电子显微镜、扫描电子显微镜及超声波显微镜等。

本章将对目前微生物学研究中最常用的普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜和荧光显微镜的操作技术进行介绍，对于电子显微镜（电镜）则侧重介绍其生物标本的制作特点和基本技术。通过以下几个实验，使学生对不同类型的显微镜能有比较全面的了解，并能根据所要观察微生物的种类和情况，选择适当的显微镜进行观察，基本上能掌握观察微生物个体形态和细胞结构的显微技术。

本章的主要内容包括：①普通光学显微镜的操作技术；②暗视野显微镜的操作技术；③相差显微镜的操作技术；④荧光显微镜的操作技术；⑤电子显微镜的操作技术。本章共设置 6 个实验，除实验一为学生必修的基础性实验外，其他 5 个显微技术实验可根据实际情况加以取舍或精简。

第一节 普通光学显微镜的操作技术

普通光学显微镜（以下简称显微镜）（图 1-1、图 1-2）是一种具有高度放大作用的光学仪器，它的分辨率（分辨两点或两根细线之间最小距离的能力）最高可以达 $0.2\mu\text{m}$ ，而人的眼睛对明视距离的最高分辨率仅有 0.1mm ，即 $100\mu\text{m}$ 。微生物的个体很微小，一般是以微米（ μm ）来描述的。人们要研究微生物的个体形态和细胞结构，单凭肉眼的眼力是远远不够的，必须借助于显微镜，它能使人眼的分辨率提高 500 倍。因此，显微镜是微生物学必不可少的常用工具，人们必须了解清楚显微镜每一部件的结构和功用，熟练掌握它的操作技术。

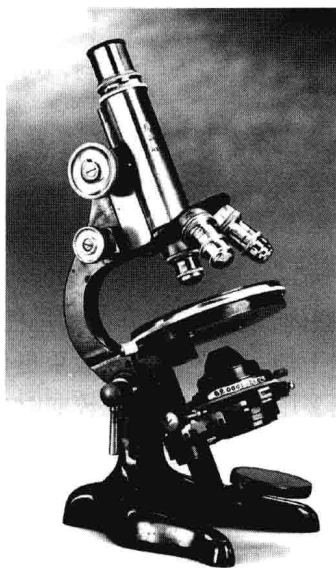


图 1-1 普通光学显微镜（单筒式）



图 1-2 普通光学显微镜（双筒式）

普通光学显微镜的结构可分为两大部分（图 1-3）：机械装置和光学系统。机械装置保证光学系统的准确配置和灵活调控，是显微镜的基本构架；光学系统直接影响着显微镜的性能，是显微镜的核心组件。

1. 机械装置

（1）镜座：显微镜的底座，起支撑和稳固作用。镜座可呈马蹄形、圆形、三角形或“丁”字形等，并有较大的底面积和质量。

（2）镜臂：显微镜的脊梁，立于镜座上面，起支撑镜筒、镜台和光学部件的作用。有的还可调节倾斜度，便于观察。凡镜筒能上下升降的显微镜，镜臂也是活动的；而镜台能上下升降的显微镜，镜臂是固定于镜座的。

（3）镜台：又称载物台。是放置标本片的平台，方形或圆形。一般圆形镜台为旋转式，方形镜台为固定式。镜台上面装有标本片固定夹和标本移动器，可使标本片前后左右移动，以利于观察标本的不同部位。有的还装有标尺，可固定标本位置以利于重复观察。镜台中央均留有一孔洞，可让入射光束透过。

（4）镜筒：位于镜臂上端，是一个空心的圆筒，上端可放入目镜，下端接转换器和物镜。从镜筒的下端螺纹口到上端目镜的距离一般为 160mm。镜筒有直筒式、单斜筒式、

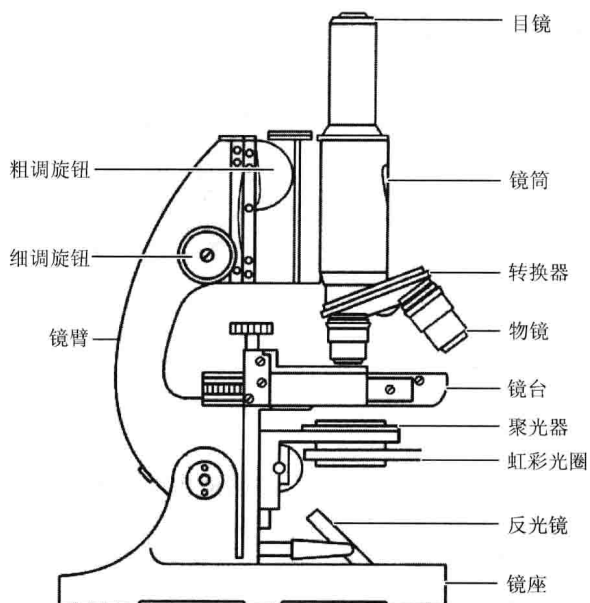


图 1-3 普通光学显微镜的构造图

双斜筒式等。

(5) 转换器：是一个能转动的圆盘，用于装配物镜，上面有 3~5 个孔洞，可装上和调换几种不同放大倍数的物镜。

(6) 调焦旋钮：用于调节镜筒或镜台上下移动，使物镜焦距准确，以便获得清晰的物像。包括粗调旋钮和细调旋钮，前者升降速度快，只做粗略的调焦；后者升降速度很慢，每转一周，镜筒仅升降 0.1mm，可进行细微调焦。

2. 光学系统

(1) 光源：新式显微镜的光源通常安装在显微镜的镜座内，通过按钮开关和拉杆来控制。常用灯光或散射日光作光源。在使用白炽灯时，在聚光器下加一蓝色滤光片效果更佳。

(2) 反光镜：由凹、平两面圆形镜子组成。通常强光多用平面镜，光线较弱时才用凹面镜。可自由转动方向，以反射光线至聚光器上。镜座内装有内置光源的显微镜则不需反光镜。

(3) 聚光器：位于镜台下面，由数个透镜组成。用于集聚由反光镜反射来的光线，使其集中于标本上。聚光器可以上下移动调节，以获得最适光亮度。下面装有虹彩光圈，可任意开闭，用来调节射入聚光器光线的强弱。

(4) 物镜：即接物镜，又称镜头，是最重要、最贵重的部件。物镜由许多透镜组成，起着放大标本片上被检物物像（实像）的作用。物镜的性能可以用数值孔径（numerical aperture, NA）来表示。一般物镜上标有放大倍数、数值孔径、镜筒长度和指定使用盖玻片厚度 4 种数字。在低倍镜、高倍镜和油镜 3 种物镜中，油镜的放大倍数和数值孔径最大，工作距离最短，即最接近标本片（图 1-4）。

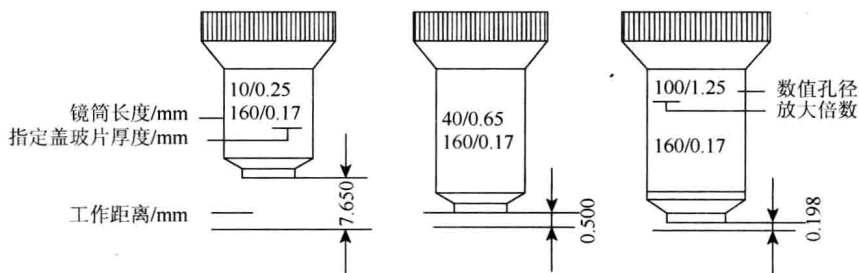


图 1-4 物镜的标注及工作距离

(5) 目镜：由 1~3 片透镜组成，可将经物镜放大的实像进一步放大成虚像，并映入人的眼睛。不同目镜上也标有 5×、10×、15× 等标志以表示其放大倍数。使用时可根据需要选用适当的目镜。

在显微镜的光学系统中，物镜的性能最为重要。普通光学显微镜通常配置有几个物镜，可分为干燥系和油浸系两种物镜。干燥系物镜与标本片之间的介质是空气，而油浸系物镜（油镜有红、黑线圈标志，或标有“oil”或“HI”字样）与标本片之间的介质是香柏油。

若载玻片与物镜之间的介质为空气，则当光线通过载玻片后受到曲折，发生散射现象，进入物镜的光线显然减少，这样就降低了视野的光亮度；反之，若载玻片与物镜之间的介质为香柏油（其折射率是 $n=1.51$ ，与玻璃相当），当光线通过载玻片后，可直接通过香柏油进入物镜而不发生曲折（图 1-5）。

油镜的放大倍数最大,对微生物学研究最为重要。利用油镜能增加光亮度,更主要是能增加数值孔径(NA),即增加显微镜的分辨率。

所谓数值孔径,即光线投射到物镜上最大角度(镜口角)的一半(α)的正弦,乘上载玻片与物镜间介质的折射率(n)所得的乘积($NA=n \cdot \sin \alpha$)。以空气为介质时: $NA=1 \times 0.87=0.87$ 。而以香柏油为介质时: $NA=1.51 \times 0.87=1.31$ 。

显微镜的分辨率= $1/2$ 光波长 $\div$ 数值孔径= $1/2\lambda \div NA$,它与物镜的数值孔径成反比,与光波波长成正比,因此物镜的数值孔径越大,光波波长越短,则显微镜能辨别两点之间的距离越小,被检物的细微结构也越能明显地被辨别出来。例如,用数值孔径为 1.25 的油镜时,能辨别两点之间的最小距离= $1/0.55 \div 1.25=1.45$ (μm)。

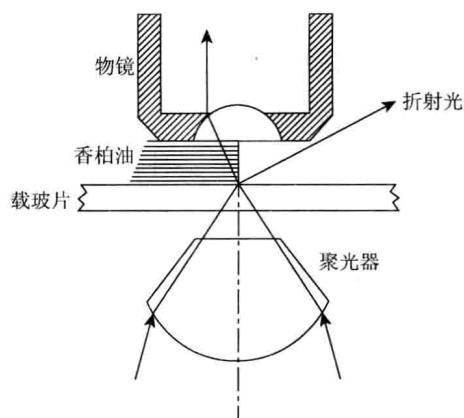


图 1-5 干燥系与油浸系对光路的影响

实验一 使用普通光学显微镜观察各种微生物标本片

一、目的要求

- (1) 复习普通光学显微镜各部分的结构、性能和工作原理。
- (2) 学习并掌握用低倍镜观察各种霉菌和酵母菌标本片的操作技术。
- (3) 学习并掌握用高倍镜观察各种酵母菌和放线菌标本片的操作技术。
- (4) 学习并掌握用油镜观察各种细菌染色标本片的操作技术。
- (5) 掌握普通光学显微镜的维护及保养方法。

二、基本原理

普通光学显微镜(明视野显微镜)由机械装置和光学系统两大部分组成。在光学系统中,显微镜利用目镜和物镜两组透镜系统进行放大成像,故普通光学显微镜也称为复式显微镜。在显微镜的光学系统中,物镜的性能最为重要,因为它直接影响着显微镜的分辨率。在目镜保持不变(如 $10\times$)的情况下,使用不同放大倍数的物镜,显微镜放大倍数和分辨率都不同。通常在配置的低倍镜、高倍镜和油镜中,油镜的放大倍数最大,使用方法较特殊,操作难度也相对较大。用油镜观察标本片时,需要在载玻片和镜头之间滴加香柏油,以增加显微镜的光亮度和分辨率。

在使用显微镜进行观察时,应根据所观察微生物的个体大小选用不同的物镜。例如,要观察霉菌、酵母菌、放线菌等个体较大的微生物形态时,可选择低倍镜或高倍镜,而要观察个体较小的细菌或细胞结构时,则宜选用放大倍数和分辨率最高的油镜。初学显微观察的学生,要求先学习操作低倍镜,因为低倍镜的视野较大,焦距较高,易发现目标,较易确定观察的位置。在熟练操作低倍镜的基础上再学习操作高倍镜,最后学习操作油镜,遵循从易到难,循序渐进的观察程序。

三、实验器材

- (1) 微生物标本：各种霉菌标本片、放线菌标本片、酵母菌标本片、细菌染色标本片。
- (2) 仪器设备：各种普通光学显微镜（备有光源）。
- (3) 其他材料：香柏油、二甲苯、擦镜纸。

四、实验内容及操作步骤

1. 显微镜的放置

- (1) 将显微镜放在平整的实验台上，放置要平稳且要便于采光。



图 1-6 显微镜的放置与观察姿势

- (2) 镜座距实验台边缘 3~4cm。
- (3) 坐着观察时姿势要端正，双眼同时睁开。
- (4) 调节好凳子的高度或使镜筒稍倾斜（图 1-6）。

2. 调节照明

显微镜可采用白天的散射阳光或日光灯作为光源。

- (1) 先将聚光器升高，然后翻动反光镜并调节其角度，使视野内的光线均匀，光亮度适宜。

- (2) 对镜座内安装有光源的显微镜，可通过调节电压以获得适当的光亮度。

- (3) 根据光源的强度、所用物镜的放大倍数和所观察标本的不同，可升降聚光器和缩放光圈，以获得合适的光亮度。

- (4) 通常观察染色标本时光线要强，而观察未染色标本的光线不宜太强。

3. 用低倍镜观察霉菌的操作步骤

- (1) 装入目镜（10×或 12.5×），旋上低倍镜（10×）。
- (2) 将霉菌的标本片置于镜台上的标本片固定夹内，旋动标本移动器，使要观察的部位（琼脂片边缘生长的菌丝体）对准聚光器上面的透镜中心。
- (3) 从侧面注视，向下旋动粗调旋钮，使物镜下降至距标本片约 5mm 的高度。
- (4) 两眼同时睁开，用左眼在目镜上观察，两手向上缓慢旋动粗调旋钮使物镜上升（距标本片约 8mm），至视野中出现较满意的被检物，并可通过升降聚光器和缩放光圈适当调节光线的强弱。
- (5) 移动标本片，寻找较满意的被检物位点，放在视野中心，用细调旋钮向上或向下调至图像最清晰，仔细观察并绘图记录。

- (6) 观察完毕，用擦镜纸将物镜和目镜的透镜擦干净，放入干燥器内。

4. 用高倍镜观察酵母菌和放线菌的操作步骤

- (1) 由低倍镜转换高倍镜观察。低倍镜视野较宽，容易发现被检物和确定镜检位点，故可先用低倍镜观察，然后再改用高倍镜，其方法如下。

- 1) 装入目镜（10×或 12.5×），同时旋上低倍镜和高倍镜（40×或 45×）。
- 2) 将酵母菌或放线菌标本片固定于镜台上，并使镜检位点对准聚光器。

3) 先用低倍镜如上法操作,待发现被检物后(视野中可见微小的酵母菌或放线菌),转动转换器改用高倍镜。将光圈缩小,向上或向下稍微旋动细调旋钮,使被检物清晰可见。

(2) 直接用高倍镜观察。

1) 分别装入目镜($10\times$ 或 $12.5\times$)和高倍镜($40\times$ 或 $45\times$)。

2) 将酵母菌或放线菌标本片固定于镜台上,并使镜检位点对准聚光器。

3) 向下旋动粗调旋钮,同时从侧面注视,使高倍镜缓慢下降至距标本片约 0.5mm 的高度(很接近盖玻片但尚未接触)。

4) 左眼注视目镜,两手向上(不能向下)微微旋动粗调旋钮使物镜上升(距标本片约 0.7mm),发现视野中的被检物后,改用细调旋钮向上或向下旋动,至能清楚地观察到被检物;适当调节光线至物像最清晰为止,仔细观察并绘图记录。

注:若物镜上升超过 1mm 后,仍未发现被检物,应从第3)步起重复上述操作,切勿上下盲目升降,以防损坏镜头或标本片。

5. 用油镜观察细菌的操作步骤

(1) 装入目镜($10\times$ 或 $12.5\times$),小心旋上油镜($100\times$ 或 $90\times$)。

(2) 将聚光器上升到最高,光圈开到最大,以获得最强的光亮度。

(3) 将细菌的染色标本片固定于镜台上,于被检物染色部位滴加一滴香柏油,调节标本移动器使油滴对准聚光器的透镜。

(4) 从侧面注视,缓慢下降油镜至浸入油滴中,并几乎与标本片接触或轻微接触,但切勿重压标本片。

(5) 左眼注视目镜,两手向上(切勿向下)微微旋动粗调旋钮使油镜很慢地上升(距标本片约 0.14mm)。当视野中出现模糊的被检物时,改用细调旋钮向上或向下调至被检物物像清晰为止,仔细观察并绘图记录。

注:在向上旋动粗调旋钮时,若油镜已离开油滴而未发现被检物,则应从第(4)步起重复上述操作,切忌上下盲目升降。

6. 显微镜用毕后的维护及保养

(1) 观察完毕,旋动粗调旋钮,上升镜筒,取下标本片。

(2) 用擦镜纸抹去镜头上的香柏油,再用擦镜纸蘸少许二甲苯擦拭镜头上残留的油迹(2或3次),然后再用干净擦镜纸抹干残留的二甲苯。

(3) 用擦镜纸擦拭其他物镜及目镜,将全部物镜及目镜取下,放入干燥器内保存。

(4) 用柔软的绸布擦拭显微镜的金属部件。

(5) 关闭光源,将反光镜垂直于镜座,将镜台降到最低位置,并降下聚光器。

(6) 将整部显微镜用红黑两层布罩罩好,移置入镜箱中。

五、实验注意事项

(1) 显微镜为精密仪器,在从箱中取出或放入时,应一手紧握镜臂,另一手托住镜座,并保持显微镜直立和平稳,防止振动和暴力。

(2) 显微镜应放在通风干燥处,避免阳光直射或曝晒,避免与酸碱和腐蚀性的化学试剂等放在一起。

(3) 在放置显微镜的镜箱内,应放有小袋装的干燥剂(硅胶或氯化钙),以避免受潮。

干燥剂要经常更换。

(4) 物镜和目镜为贵重部件, 必须保持清洁, 若有灰尘应用擦镜纸擦拭, 切忌用布或其他物品擦拭。

(5) 油镜观察完毕后, 在用擦镜纸蘸二甲苯擦拭油镜的透镜时, 应注意二甲苯用量不能太多, 也不能让其在镜头上停留时间过长, 因为油镜上的几块透镜是用树胶黏合在一起的, 过多的二甲苯将会溶解树胶, 导致透镜脱落。

(6) 显微镜在暂停使用时, 勿使物镜与聚光器相对, 宜将物镜转成“八”字形, 同时缩短物镜和镜台之间的距离, 避免因镜筒滑落而损坏物镜。

(7) 盖玻片很薄, 在操作中应注意不要用力过猛而压碎盖玻片; 取放标本片时不要触摸到加有样品的部位, 以免影响观察结果。

(8) 用显微镜观察标本片时, 一般应摘下近视眼镜。确需戴眼镜观察时, 应注意眼镜不要与目镜接触, 以免在镜片上留下划痕, 影响观察。

六、实验报告与思考题

1. 实验结果

(1) 将你所观察到的各种微生物个体形态, 分四大类(霉菌、酵母菌、放线菌、细菌)绘成视野圆形图, 并分别注明所用物镜及放大倍数。

(2) 试列表比较低倍镜、高倍镜及油镜在各方面的不同之处。

2. 思考题

(1) 你认为影响明视野显微镜分辨率的因素有哪些?

(2) 应如何根据所观察四大类微生物大小的不同, 选择不同的物镜进行有效观察?

(3) 在使用高倍镜及油镜时, 应特别注意避免粗调旋钮的哪些错误操作?

(4) 用油镜观察细菌染色标本片时, 在盖玻片和镜头之间滴加的香柏油起什么作用?

(5) 用油镜观察时及观察完毕后, 主要应注意哪些问题?

第二节 暗视野显微镜的操作技术

使用明视野显微镜对较透明的微生物活菌体进行观察时, 通常需要对被检样品进行染色处理, 以提高透明活菌体与明亮视野背景间的反差。因为明视野显微镜的照明属于透射照明, 光线直接进入视野, 菌体因与背景间反差过小而不易看清楚。本节介绍的暗视野显微镜(图 1-7、图 1-8)及下面两节介绍的相差显微镜、荧光显微镜, 都是通过在成像原理上的改进, 提高了在显微镜观察时被检样品与背景间的反差, 从而实现对微生物活菌体的直接观察。

暗视野显微镜的视野背景是黑暗的, 将明视野光学显微镜的聚光器更换为一个暗视野聚光器就成为一台暗视野显微镜了。暗视野聚光器的特别之处是, 在其底部中央有一块遮光片, 使来自光源的光线只能从聚光器的周缘部位斜射到标本片上。

暗视野聚光器有抛物面形和心形两种。以抛物面形聚光器为例, 其透镜成斜度较小的抛物线形式, 底部中央有一块遮光片, 照明时其光路如图 1-9 所示。进入抛物面形聚光器的全部光线都集中地反射出来, 恰好与被检样品处于同一平面上。用小口径物镜观察时, 直射的