

环境生物学

实验技术

HUANJINGSHENGWUXUE SHIYANJISHU

主编 卫亚红

西北农林科技大学出版社

环境生物学实验技术

主 编 卫亚红

副主编 段 敏 黄懿梅



西北农林科技大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

环境生物学实验技术 / 卫亚红主编. —杨凌:西北农林科技大学出版社, 2013. 2
ISBN 978-7-81092-800-7

I. ①环… II. ①卫… III. ①环境生物学—实验 IV. ①X17-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 038343 号

环境生物学实验技术

卫亚红 主 编

出版发行	西北农林科技大学出版社
地 址	陕西杨凌杨武路 3 号 邮 编:712100
电 话	总编室:029—87093105 发行部:87093302
电子邮箱	press0809@163.com
印 刷	陕西杨凌森奥印务有限公司
版 次	2013 年 05 月第 1 版
印 次	2013 年 05 月第 1 次
开 本	787 mm × 1092 mm 1/16
印 张	14.25
字 数	342 千字

ISBN 978-7-81092-800-7

定价:26.00 元

本书如有印装质量问题,请与本社联系

编审人员

主 编 卫亚红

副主编 段 敏 黄懿梅

编 委 (依姓氏笔画为序)

卫亚红 刘香利 李素俭 李晓明 陈德育

范三红 范宁娟 单丽伟 段 敏 黄懿梅

主 审 唐 明 曲 东

前言

环境生物学是论述生物与受人类干扰的环境之间相互作用规律及其机理的科学,是环境科学专业的学科基础课程。通过学习,使学生了解生物对环境污染的机理及生物学方法和技术在环境污染物净化中的作用;明确环境生物学的理论基础、研究领域、重要意义、目的和任务;系统掌握环境生物学的基本研究方法。要求学生熟练掌握环境生物学中污染物对分子和生化水平、细胞和个体水平影响的研究方法。通过环境生物学实验,加深学生对课程的理解和掌握,让学生掌握基本的实验技能,是提高学生实践能力的重要保证。

根据西北农林科技大学 2008 版环境科学专业课程设置,原《环境生物学》实验课调整为综合实践教学,总学时 1.5 周(48 学时),为重要的环境科学专业学生必修的“环境科学综合实习”环节。2007 年我们所编写的《环境生物学实验》校内教材已经不能适应新的课程设置的要求,亟需根据学科发展充实实习内容。基于此,我们编写了《环境生物学实验技术》一书。全书共分四大部分:第一部分理论部分;第二部分基本实验;第三部分综合性实验;第四部分附录。正文之前附有“环境生物学实验室守则”。本书力求增加与环境生物学相关的分子生物学理论分析技术和基础实验内容,以弥补环境科学专业学生分子生物学理论知识及基本实验的欠缺和不足。

本教材编委是《环境生物学》、《微生物学》、《基因工程》和《分子生物学》等课程以及对应课程实验课和实习课的教学、科研第一线的青年骨干教师和实验技术人员。参编人员也多次参与《环境生物学实验》课程的实验预作和准备工作,有着较丰富的实验教学经验。编写中我们力求文字简练通达,使学生通过预习、阅读,初步掌握环境生物学最基本的概念、原理和方法,同时掌握相关的基本环境生物学实验技能,通过思考题的提示,巩固学习效果。实验内容由唐明教授和曲东教授审定,并对具体实验内容和试验方法提出了指导性意见和建议。

本书编写过程中参阅和引用了有关环境生物学、微生物学、生物化学以及植物病理学方面的书籍,在此对上述书籍的作者表示衷心的感谢。同时,也感谢教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT1035)及西北农林科技大学教学改革研究项目(JY1102090)对本书的顺利出版所给予的资助。本教材的出版得到了西北农林科技大学出版社的大力支持,硕士生程珂珂、李泽华和马晓慧参与书稿的校对工作,在此一并表示诚挚的谢意。

限于编者水平,书中疏漏和错误在所难免,恳请各位同行及读者批评指正。

编 者

2012 年 8 月

环境生物学实验室守则

一、实验室基本要求

1. 每次实验前要充分预习实验指导,明确本次实验的目的要求、原理和方法,做到心中有数。

2. 实验操作要细心谨慎,认真进行观察,做好实验记录。

3. 实验用过的菌种及带有活菌的各种器皿应先经高压灭菌后才能洗涤。特别是对于检疫性实验材料,必须进行灭活处理,绝不能扩散出实验室。制片上的活菌应先浸泡于3%来苏尔或5%石炭酸溶液中半小时后再洗刷。

4. 进行高压蒸汽灭菌时,严格遵守操作规程。负责灭菌的人灭菌过程中不准离开灭菌室。

5. 使用显微镜及其他贵重仪器时要按要求操作。取、放显微镜时应一手握住镜臂,一手拖住底座,使显微镜保持直立,防止镜头滑落地面而损坏。

6. 实验完毕应将仪器放回原处,擦净桌面,收拾整齐。离开实验室时前注意关闭门、窗、水、灯等,并用肥皂洗手。

二、实验室安全知识

在实验室中,经常与毒性强、有腐蚀性、易燃烧和具有爆炸性的化学药品直接接触,常使用易碎的玻璃和瓷质的器皿,以及在煤气、水、电等高温电热设备的环境下进行着紧张而细致的工作。因此,必须十分重视安全工作。

1. 进入实验室开始工作前,应了解煤气总阀门、水阀门及电闸所在处。

2. 使用煤气灯时,应先将火柴点燃,一手执火柴靠近灯口,一手慢开煤气门。不能先开煤气门,后燃火柴。火焰大小和火力强弱,应根据实验的需要来调节。用火时,应做到火着人在,人走火灭。

3. 使用电器设备(如烘箱、恒温水浴、离心机、电炉等)时,严防触电;绝不可用湿手或在眼睛旁视时开、关电闸和电器开关。用电笔检查电器设备是否漏电,凡是漏电的仪器,一律不能使用。

4. 使用浓酸、浓碱,必须极为小心地操作,防止溅失。用吸量管量取这些试剂时,必须使用橡皮球,绝对不能用力口吸取。若不慎溅在实验台或地面上,必须及时用湿抹布擦洗干净。如果触及皮肤,应立即治疗。

5. 使用可燃物,特别是易燃物(如乙醚、丙酮、乙醇、苯、金属钠等)时,应特别小心。不应放在靠近火焰处,只有在远离火源或将火焰熄灭后,才可大量倾倒这类液体。低沸点

的有机溶剂不准在火焰上直接加热,只能在水浴上利用回流冷凝管加热或蒸馏。

6. 如果不慎倾出了相当量的易燃液体,立即关闭室内所有的火源和电加热器;立即关门,开启小窗及窗户;用毛巾或抹布擦拭撒出的液体,并将液体拧到大的容器中,然后再倒入带塞的玻璃瓶中。

7. 易燃和易爆炸物质的残渣(如金属钠、白磷、火柴头)不得倒入污物桶或水槽中,应收集在指定的容器内。

8. 废液,特别是强酸和强碱不能直接倒在水槽中,应先稀释,然后倒入水槽,再用大量自来水冲洗水槽及下水道。对于可能造成环境污染的物质应密封于塑料袋中,送到指定的地点集中处理。

9. 毒物应按实验室的规定办理审批手续后领取,使用时严格操作,用后妥善处理。

三、实验室急救

在实验过程中不慎发生受伤事故,应立即采取适当的急救措施。

1. 受玻璃割伤及其他机械损伤。首先必须检查伤口内有无玻璃或金属等物的碎片,然后用硼酸水洗净,再涂擦碘酒或红汞水,必要时用纱布包扎。若伤口较大或过深而大量出血,应迅速在伤口上部和下部扎紧血管止血,立即到医院诊治。

2. 烫伤。一般用浓的(90% ~ 95%)酒精消毒后,涂上苦味酸软膏。如果伤处红痛或红肿(一级灼伤),可擦医用橄榄油或用棉花蘸酒精敷盖伤处;若皮肤起泡(二级灼伤),不要弄破水泡,防止感染;若伤处皮肤呈棕色或黑色(三级灼伤),应用干燥而无菌的消毒纱布轻轻包扎好,尽快送医院治疗。

3. 灼伤。强碱(如氢氧化钠,氢氧化钾)、金属钠、钾等其他碱性化学药品触及皮肤而引起灼伤时,要先用大量自来水冲洗,再用5%硼酸溶液或2%乙酸溶液涂洗。强酸、溴、氯、磷或其他酸性化学药品触及皮肤而致灼伤时,应立即用大量自来水冲洗,再以5%碳酸氢钠溶液或5%氢氧化铵溶液洗涤。如酚触及皮肤引起灼伤,可用酒精洗涤。

4. 触电时可按下述方法之一切断电路:①关闭电源;②用干木棍使导线与被害者分开;③使被害者和地面分离。急救者必须做好防止触电的安全措施,手和脚必须绝缘。

目 录

第一部分 理论部分

1.1 显微镜技术	(3)
1.1.1 普通光学显微镜	(3)
1.1.2 暗视野显微镜	(8)
1.1.3 相差显微镜	(9)
1.1.4 电子显微镜	(13)
1.2 现代生物学实验技术	(19)
1.2.1 细胞培养技术	(19)
1.2.2 动植物组织和细胞研究	(22)
1.2.3 基因工程技术	(27)
1.2.4 免疫技术	(33)
1.2.5 离心技术	(38)
1.3 土壤微生物多样性分析技术	(46)
1.3.1 微生物的物种多样性分析	(46)
1.3.2 微生物的功能多样性分析	(49)
1.3.3 微生物的结构多样性分析	(51)
1.3.4 微生物的遗传多样性分析	(56)

第二部分 基本实验

2.1 环境微生物实验	(87)
2.1.1 环境中微生物的检测	(87)
2.1.2 细菌简单染色	(88)
2.1.3 细菌的革兰氏染色法	(90)
2.1.4 水中细菌总数检测	(91)
2.1.5 水中大肠菌群检测	(93)
2.1.6 土壤及空气中微生物的检测	(99)
2.1.7 酚降解菌的分离及其性能的测定	(102)
2.1.8 阿特拉津降解菌的分离筛选及其降解特性测定	(104)
2.1.9 2,4-D 降解菌的分离筛选及其降解特性测定	(105)

2.2 生物效应实验	(108)
2.2.1 种子发芽毒性实验	(108)
2.2.2 蚕豆微核试验	(109)
2.2.3 藻类急性毒性实验	(112)
2.2.4 重金属在植物体内的残留	(116)
2.2.5 艾姆斯(Ames)致突变实验	(118)
2.2.6 急性毒性实验	(123)
2.3 酶学实验	(126)
2.3.1 脱氢酶活性测定	(126)
2.3.2 羧甲基纤维素酶活性测定	(128)
2.3.3 污染物对乙酰胆碱酯酶的影响	(129)
2.4 分子生物学基础实验	(131)
2.4.1 质粒 DNA 的提取及琼脂糖凝胶电泳	(131)
2.4.2 聚合酶链式反应(PCR)与 DNA 的体外扩增	(134)
2.4.3 大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒的转化	(135)
2.4.4 PCR 产物的 T-A 克隆及重组子的蓝白斑筛选	(137)
2.4.5 植物基因组 DNA 提取及电泳检测	(138)

第三部分 综合性实验

3.1 重金属对小麦生长影响的盆栽试验	(143)
3.2 重金属对小麦光合色素含量的影响	(151)
3.3 重金属对小麦的膜质过氧化作用	(155)
3.4 重金属对小麦 SOD 活性的影响	(157)
3.5 重金属对小麦生物量的影响	(160)

第四部分 附录

附录一 环境生物学学位论文写作	(165)
附录二 环境生物学实验室基本仪器设备及其使用	(171)
附录三 常用培养基配方	(181)
附录四 常用指示剂、试剂的配制	(204)
附录五 常用消毒剂的配制	(207)
附录六 常用染色剂、封片剂的配制	(208)
附录七 常用缓冲溶液的配制	(211)
附录八 国内外微生物菌种保藏机构	(213)
参考文献	(215)

第一部分

■ ■ ■ 理论部分

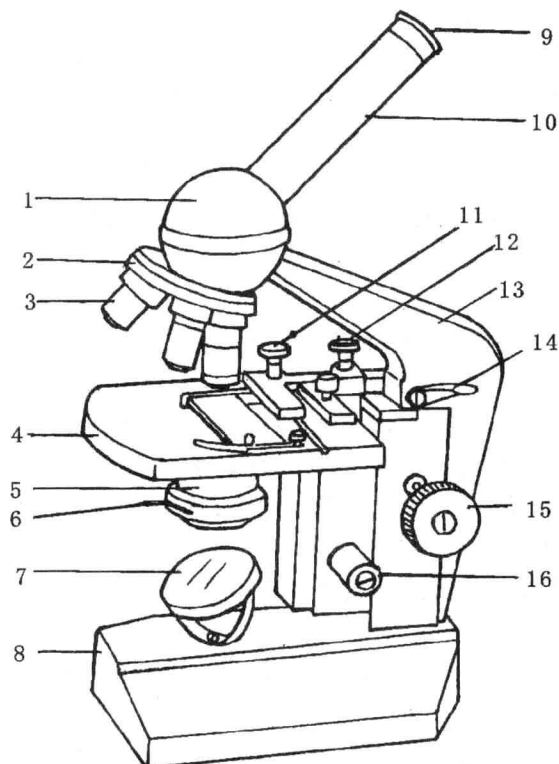
1.1 显微镜技术

显微镜是一种精密的光学仪器,是学习和研究微生物的重要工具之一。实验室常用的是一种普通光学显微镜,只有了解它的原理和构造,才能正确地使用和充分发挥它的性能,从而得到良好的实验效果,并使其免于受损。

1.1.1 普通光学显微镜

1.1.1.1 光学显微镜的构造

光学显微镜由机械部分和光学部分组成(图 1-1)。



1. 棱镜套 2. 物镜转换器 3. 接物镜 4. 载物台 5. 聚光镜 6. 虹彩光圈
7. 反光镜 8. 镜座 9. 接目镜 10. 镜筒 11. 标本推动器 12. 标本推动器
13. 镜臂 14. 粗动限位器 15. 粗动螺旋 16. 微动螺旋

图 1-1 光学显微镜的构造

1. 显微镜的机械部分

显微镜的机械部分包括镜座、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台、推动器、粗动螺旋、微

动螺旋。

(1) 镜座

镜座即显微镜的底座,使显微镜稳立台面,有的显微镜座内装有照明光源及反光镜。

(2) 镜臂

镜臂为弓形金属物,上接镜筒,下连镜座,可作为移动显微镜的把手。

(3) 镜筒

镜筒位于镜臂上方,圆筒形,上端装置目镜,下端连接物镜转换器,形成目镜与物镜间的暗室。一般镜筒多为 45° 倾斜式,便于使用。

(4) 物镜转换器

物镜转换器由两个金属叠合成的转盘装置,其上安装有 3~4 个不同倍数的物镜,按照放大倍数高低顺序排列,旋转转换器时,物镜可挨个地被推到正确的使用位置上。物镜光轴与目镜光轴同轴,使用时应用手指捏住转换器转盘旋转,不要扳物镜旋转,否则日久易使光轴歪斜,成像质量变差。

(5) 载物台

载物台即安放标本片的方形或圆形的工作台,中央有一通光孔为光线通路。台上装有一对弹簧标本夹或附有标本夹的十字推动器。有的载物台上还有纵横坐标的游标尺,一般读数为 0.1 mm,用以测定标本的大小或对被检部分做标记,便于下次镜检。

(6) 推动器

推动器是装在载物台两侧的螺旋或附在载物台上的标本推动器,用作移动标本,寻找物象。

(7) 粗动螺旋和微动螺旋

为得到清晰物像,需调节物镜与标本间的距离,使之与物镜的工作距离相等,这种操作叫调焦。在显微镜的镜臂下后方,装有大、小两个螺旋,大螺旋为粗动螺旋,操作时作快速调焦用。调到隐约可见标本物像为止,然后改用小的微动螺旋做精确调焦,使所观察的标本至最清晰为佳。在微动螺旋的外侧一般刻有刻度,每旋转一周,镜筒或载物台移动 0.1 mm 或 0.2 mm (依显微镜型号而定)。当标记达到极限时,需重新用粗动螺旋拉开物镜与标本片的距离,再行调节。

显微镜的调焦装置有镜筒升降式和载物台升降式二种。

2. 显微镜的光学部分

显微镜的光学部分包括反光镜、聚光镜、光圈、接物镜和接目镜。

(1) 反光镜

反光镜装在聚光镜下面的镜座上,可以任意方向转动以对准光源。其一面为平面镜,另一面为凹面镜。作用是使光源发出的光线射向聚光镜。在光线充足时用平面镜,反之用凹面镜。

(2) 聚光镜

聚光镜位于载物台之下,是由一组透镜组成,作用是起会聚光线成一束强的光锥,增强标本照明强度。使用时,用聚光镜升降螺旋调节,一般低倍镜观察时,应降低聚光镜位置,使光线减弱;用高倍镜或油镜时,应升高聚光镜位置,使光线增强。

(3) 光圈

光圈也叫虹彩光圈或可见光阑,位于聚光镜下方,由十几张金属薄片组成,中心部分形成圆孔。推动侧面光圈把手,可随意调节大小,以变换光量。推动调节把手时不可用力过猛,也不要用手指触摸光圈薄片,以免损坏。光圈作用是调节光强度和使聚光镜的数值孔径与物镜的数值孔径相适应,以充分发挥显微镜性能。在用低倍镜镜检时宜调小光圈,若用高倍镜和油镜时可开大光圈。在光圈下面,有一圆形滤光片托架,便于放置滤光片,供选择某波段的光线用。

(4) 接物镜

接物镜简称物镜,安装在转换器上,一般有 3~4 个物镜头。其作用是将标本作第一次放大,然后再由目镜作第二次放大。它是决定显微镜性能最重要的部件,关系到分辨率的高低。

物镜按放大倍数分为低倍镜,8×、10×;中倍镜,20×;高倍镜,40×、45×、65×;油浸镜(简称“油镜”),90×、100×。油镜头上常刻有“HI”(homogeneous immersion)字样标记。

物镜按使用条件不同分为干燥系物镜和油浸系物镜。用干燥系物镜观察标本时,在物镜与标本间不加任何液体介质,光线自标本射出后,经过空气折射再进入物镜;使用油浸物镜时,在标本片与物镜间加入一种与玻璃折射率($\eta = 1.52$)相近的介质,可以避免光的散射。常用的介质为香柏油(cedar oil),其折射率 $\eta = 1.515$ 。

物镜的放大倍数、数值孔径和工作距离是物镜的主要性能参数(表 1-1),通常标记于镜头上。如 10 倍物镜上标有 10/0.25 和 160/0.17 字样。10 为放大倍数,0.25 为数值孔径($N \cdot A$),160 为镜筒长度(mm),0.17 为要求的盖玻片厚度(mm)。

表 1-1 常用接物镜的主要性能参数

接物镜	放大倍数	工作距离/mm	数值孔径/ $N \cdot A$	分辨率/ μm
低倍镜	8×	9.0	0.20	1.37
	10×	7.6	0.25	1.10
中倍镜	20×	2.0	0.40	0.68
高倍镜	40×	0.54~0.60	0.65	0.40
	45×	0.4	0.85	0.32
油 镜	90×~100×	0.17~0.19	1.25	0.22

(5) 接目镜

接目镜简称目镜,安装在镜筒上端。作用是将物镜放大的实像再放大形成虚像映入眼帘。其放大倍数有 8×、10×、15×或 16×,字样标记于目镜上,目镜不宜随意取下,以防尘埃落入镜筒。

1.1.1.2 光学显微镜的基本原理

显微镜的总放大率等于物镜放大率与目镜放大率的乘积。观察物体时,人们总希望

能看到放大率高且物像清晰的图像,这就要求显微镜的分辨力要高。

分辨力(也称分辨率)指显微镜分辨物体细微结构的能力,或者说分辨物体两点间的最短距离(D)的能力,分辨力的高低,首先取决于物镜的性能,其次为目镜和聚光镜的性能,其公式如下:

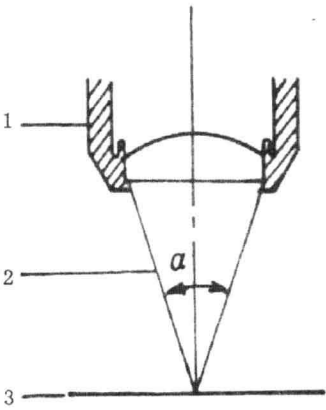
$$D = \frac{\lambda}{2N \cdot A} \tag{1-1}$$

式中:D 为物镜分辨物体两点间的最短距离;

λ 为可见光的波长(平均为 $0.55\ \mu\text{m}$);

$N \cdot A$ 为物镜的数值孔径。

由上式可知,D 值愈小,分辨率愈高;光波愈短,数值孔径愈大,则分辨力愈高。而可见光的波长为 $0.4 \sim 0.8\ \mu\text{m}$,平均为 $0.55\ \mu\text{m}$,由于光的衍射现象,普通光学显微镜只能分辨等于或大于波长一半的物体,否则,即无分辨力。故需增大物镜的数值孔径来提高显微镜的分辨力。



数值孔径,也叫镜口率(Numerical aperture 简写 $N \cdot A$),在物镜与聚光镜上都有一定的 $N \cdot A$,它们是判断显微镜最重要的参数,由下列公式计算:

$$N \cdot A = \eta \cdot \sin \frac{\alpha}{2} \tag{1-2}$$

所以 D 也可用下式表示:

$$D = \frac{\lambda}{2\eta \cdot \sin \frac{\alpha}{2}} \tag{1-3}$$

式中: η 为物镜与标本间的介质折射率;

α 为物镜的镜口角。

镜口角指光波投射到物镜前透镜边缘的最大夹角

1. 物镜 2. 镜口角 3. 标本片 (图 1-2),镜口角愈大,进入的光亮愈多,显微镜的分辨

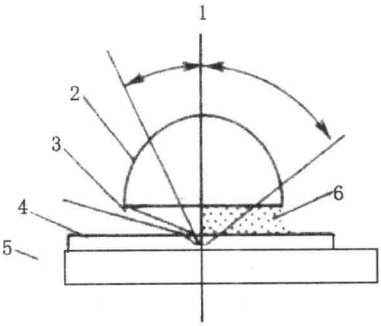
力愈高,但其理论
图 1-2 物镜的镜口角
限度为 180° , $\sin \alpha/2 = 1$ (实际该角度只能达到 140°),因镜口角增大有限度,故油镜选用折光率与玻璃相近的介质(通常用香柏油),是提高镜口率、增大分辨率最重要的途径(图 1-3)。

一些物质的折射率如下:

玻璃	1.52	香柏油	1.515
石蜡油	1.481	甘油	1.475
水	1.33	空气	1.000 3

1.1.1.3 光学显微镜的保养

(1)显微镜不能在直射阳光下曝晒和靠近热源



1. 光轴 2. 物镜的前透镜 3. 空气
4. 盖玻片 5. 载玻片 6. 香柏油

图 1-3 接物镜干燥系与油浸系的比较

放置,以免引起透镜破裂或脱落。

(2) 显微镜勿与挥发性、腐蚀性的药物(如碘片、酒精、酸类、碱类)同处存放。

(3) 显微镜要安放于清洁的室内,注意防尘。再次使用前后,应用绒布或绸布擦去机械部分和反光镜的灰尘,镜头则必须用擦镜纸擦拭,做到勿沾任何油迹、污迹和灰尘。

(4) 显微镜应注意防潮,箱内防潮的硅胶布袋要定期烘烤干燥,以免失效。

(5) 显微镜不准随意拆卸,机械部分应加润滑油,以减少摩擦。

(6) 每次使用完毕,各部件归原,使之保持存放状态,即下降聚光镜,开大光圈,反光镜垂直于镜座,下降镜筒并使物镜头呈八字形状态。

1.1.1.4 光学显微镜的使用

1. 取镜

打开镜箱,右手握镜臂,左手托镜座,小心地轻放于实验台上,用绸布或绒布把镜身擦拭干净(不可用于擦目镜和物镜)。

2. 对光

将低倍物镜至镜筒下方,转动粗动螺旋,使物镜前透镜镜面与载物台距离 1 cm 左右;上升聚光镜,开大光圈,调节反光镜对准光源,从旁观察使聚光镜镜面非常明亮,再以左眼从目镜中观察,并继续调节反光镜,直至视野内得到均匀明亮的照明为止。

光源中直射阳光不能采用,晴天散射光是良好的光源。实验室宜用 20 ~ 30 W 的日光灯或 60 ~ 100 W 的乳白电灯泡为光源。

3. 低倍镜观察

低倍镜镜面大、视野宽,易于发现目标和确定待检位置,故任何被检标本都需先经低倍镜观察。

将标本片置于载物台上(正面朝上),被检部位用推动器移至物镜正下方。旋转粗动螺旋下降物镜(或升高载物台)至距标本约 0.5 cm 处,以左眼看目镜,同时用粗动螺旋反时针方向慢慢升起镜筒(或降低载物台)至视野内出现物象后,改用微动螺旋上下微调至视野出现清晰物像,并将最好部位推至视野正中央,准备换高倍镜观察。

【提示】在任何时候使用粗调节器聚焦物像时,必须养成先从侧面注视,小心向下调节物镜靠近标本,然后用目镜观察,慢慢调节物镜离开标本进行聚焦的习惯,以免因一时的误操作而损坏镜头及载玻片。

4. 高倍镜观察

将高倍镜($40\times$)转至镜筒下方,操作时要从侧面注视,防止镜头与玻片相撞。调节光圈和聚光镜使光线亮度适中。观察时先用粗动螺旋慢慢升起镜筒(或下降载物台)至发现物像,再用微动螺旋调焦至物像清晰为止。仔细观察后,移动最好部位至视野中央,准备换油镜作进一步观察。

5. 油镜观察

细菌或其他标本的细微结构都需要用油镜($90\times$ 或 $100\times$)观察。一般油镜工作距离极短(0.19 mm 左右),使用时要特别小心。先用粗动螺旋将镜筒提起(或载物台降低)约 1.5 ~ 2.0 cm 时,将油镜头转于镜筒下方,在标本片的镜检部位滴上一小滴石蜡油。眼睛

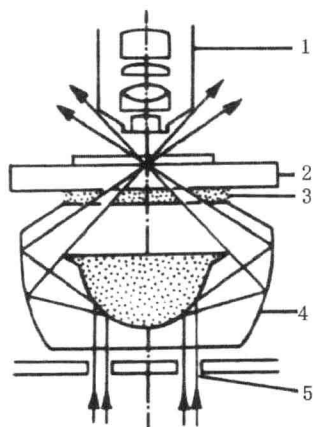
从侧面注视,用粗动螺旋缓缓地将油镜头小心地浸在石蜡油中,使物镜前端接近而又未触及标本片为止。这步操作要非常小心,防止发生油镜压破玻片或进一步发生玻片顶坏油镜前透镜的危险。从目镜中观察,先调节光线至明亮,即开大光圈、升高聚光器,用粗动螺旋十分缓慢地升高镜筒(或降低载物台),直至视野出现模糊物像时,再改用微动螺旋调节工作距离,使物像十分清晰为止。如果上升镜筒时油镜已离开油面,必须重新从侧面注视,将油镜头再次侵入油中,重复上面操作,直至看到物像为止。

6. 整理

镜检完毕,将镜筒提起,取下载玻片,将油镜头转离通光孔,先用一张擦镜纸擦去镜头上的油滴,再取另一张擦镜纸蘸取一滴酒精乙醚液,以直线方向擦拭镜头二次,最后再用一张干净的擦镜纸擦去酒精乙醚液残渍。

最后把显微镜镜身各部擦净,并将反光镜、聚光镜、镜筒、物镜等恢复存放状态,盖好绸布,放入镜箱,填写“显微镜使用登记卡”后,锁好箱门。

用过的标本片,于涂面上滴一滴酒精乙醚液,用吸水纸擦去油污至洁净后,放入标本盒中。



1. 物镜 2. 标本 3. 香柏油
4. 暗视场野聚光器 5. 环状隙缝

图 1-4 暗视野聚光器
(心型)的光路

1.1.2 暗视野显微镜

1.1.2.1 暗视野显微镜基本原理

在普通光学显微镜上,换上一暗视野聚光器,即成为暗视野显微镜。其主要原理是在暗视野聚光器透镜中央有一遮光板,使来自反光镜的光不能直接进入物镜,而由聚光器的周缘斜射到被检物体上,利用被检物体表面的反射光和衍射光进入物镜(图 1-4)。故在暗视野的背景中可见到明亮的细胞轮廓。

常用的暗视野聚光器有抛物面型、同心球型、心型等。不同的聚光器对物镜的镜口率($N \cdot A$)要求是不同的,一般要求镜口率在 0.9 以下,目的是防止部分光线进入物镜。

暗视野显微镜技术适用于观察明视野中由于反差过小或折射率很强不易观察的物体,以及超出光镜分辨率的微小颗粒等,故常用来观察活菌体的存在、运动或鞭毛等。

1.1.2.2 暗视野显微镜的使用

1. 安装聚光器

取下光镜上原有聚光器,换上暗视野聚光器。上升聚光器使其透镜顶面与载物台平齐。

2. 调节光源

光线宜强。应用带有会聚透镜的显微镜灯照明。调节光源和反光镜,使光线恰好落