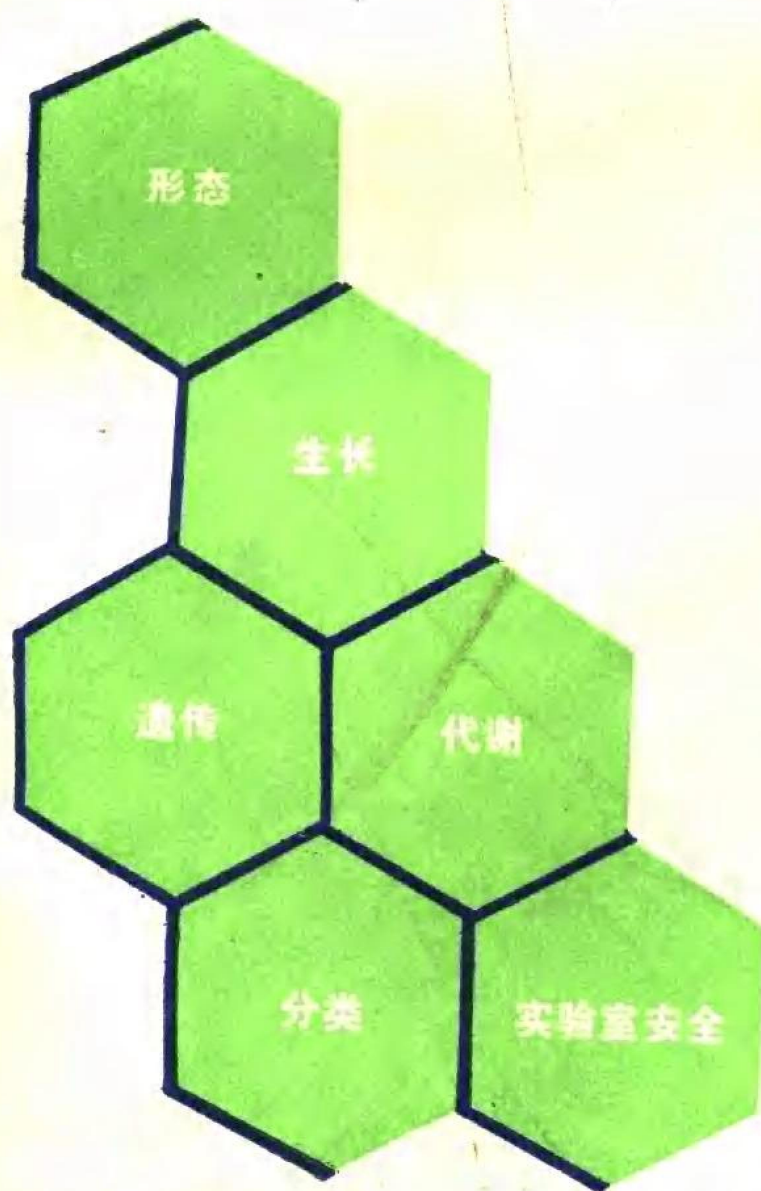


普通细菌学方法手册

〔美〕 Philipp Gerhardt 主编
厦门大学生物系微生物学教研室 译
苏文金 郑志成 审



厦门大学出版社

内 容 简 介

本书译自1981年美国微生物学会出版的英文同名著作。内容包括形态学、生长、遗传学、新陈代谢、分类、实验室安全和附录等7篇25章。该书涉及面广，科学性、逻辑性强，内容新颖，方法实用可靠，参考文献丰富，反映出80年代初细菌学研究的最新技术进展。译著语言流畅、精练，意思准确，比较忠实地反映原著的风格，也适合我国读者的习惯。本书读者对象为大学微生物学专业的本科生和研究生，从事微生物学教学、科研的教师和研究人员。生物化学、分子生物学、环境科学、工业发酵、食品加工、植物保护和卫生检验等与微生物有关的科技工作者均可从本书获得有益的资料。

Philipp Gerhardt *Editor in-Chief*

Manual of Methods for General Bacteriology

American Society for Microbiology

1981

普通细菌学方法手册

〔美〕Philipp Gerhardt 主编

厦门大学生物学系微生物学教研室译

苏文金 郑志成 审校

厦门大学出版社出版发行

福建第二新华印刷厂印刷

开本787×1092 1/16 42.75印张 1040千字

1989年10月 第1版 1989年10月 第1次印刷

印数：1—1000册

ISBN 7—5615—0231—1/Q·8

定价：8.40元

原 著 作 者

- | | |
|-----------------------|---------------------------------|
| Brian Austin | 美国马里兰大学微生物系 |
| W. Emmett Barkley | 美国Bethesda 国立健康研究所安全部 |
| Barbara J. Brown | 美国乔治大学分子和群体遗传学系 |
| Bruce C. Carlton | 美国乔治大学分子和群体遗传学系 |
| Roger M. Cole | 美国Bethesda 国立变态反应和传染病研究所链球菌病实验室 |
| Rita R. Colwell | 美国马里兰大学微生物系 |
| Ralph N. Costilow | 美国密执安州立大学微生物和公共健康系 |
| Jorge H. Crosa | 美国华盛顿大学微生物系 |
| Roy Curtiss III | 美国伯明翰Alabama 大学微生物系 |
| Walter J. Dobrogosz | 美国北卡罗来纳州立大学微生物系 |
| R. N. Doetsch | 美国马里兰大学微生物系 |
| Stephen W. Drew | 美国弗吉尼亚综合技术学院化学工程系 |
| Stanley Falkow | 美国华盛顿大学微生物系 |
| Philipp Gerhardt | 美国密执安州立大学微生物和公共健康系 |
| Robert L. Gherna | 美国标准菌种保藏所 |
| Beverly M. Guirard | 美国得克萨斯大学微生物系 |
| R. S. Hanson | 美国明尼苏达大学淡水生物研究所 |
| John L. Johnson | 美国弗吉尼亚综合技术学院厌氧菌实验室 |
| Arthur L. Koch | 美国印第安纳大学微生物系 |
| Michael S. Korczynski | 美国Abbott 实验室医院产品部 |
| Noel R. Krieg | 美国弗吉尼亚综合技术学院生物系 |
| R. E. Marquis | 美国Rochester 大学微生物系 |
| R. G. E. Murray | 加拿大西安大略大学微生物和免疫学系 |
| Eugene W. Nester | 美国华盛顿大学微生物系 |
| G. Briggs Phillips | 美国卫生工业制造商协会 |
| J. A. Phillips | 美国维斯康星大学细菌系 |
| Terry J. Popkin | 美国Bethesda 国立变态反应和传染病研究所链球菌病实验室 |
| C. F. Robinow | 加拿大西安大略大学微生物和免疫学系 |
| Carl A. Schnaitman | 美国弗吉尼亚大学微生物系 |
| Robert M. Smibert | 美国弗吉尼亚综合技术学院厌氧菌实验室 |
| Esmond E. Snell | 美国得克萨斯大学微生物系 |
| Willis A. Wood | 美国密执安州立大学生化系 |

代 译 者 序

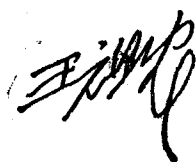
《普通细菌学方法手册》译自美国微生物学会编辑出版的“Manual of Methods for General Bacteriology”，内容包括细菌的形态、生长、遗传、代谢、分类和实验室安全及附录等7篇25章。原作者从原理入手，先使读者理解为什么采用该方法，以及怎样进行操作；再一步步地介绍实验，细节充分，读者在一般情况下可以不必参考其他文献就可独立地应用于所需目的。此外，作者还介绍研究概况；指出在实验中常遇到的问题、易犯的错误及其预防措施，这样就可使读者在实践中少走弯路。本书文字叙述简练，方法新颖可靠，反映了八十年代初细菌学研究的最新实验技术进展。

本书的对象为大学微生物学专业的本科生和研究生；同时，也是从事微生物教学与研究的教师和研究人员的实验参考书。同微生物学有关的专业如生物化学、分子生物学、环境科学以及食品卫生细菌学等科技工作者均可从本书中获得有益的资料。

本书译者长期从事微生物学的教学和科研工作，有较丰富的实践经验。在本书翻译过程中，力求忠实于原著的风格，同时也对原文中的某些错漏作了更正。

当前，包括生物工程在内的技术革命方兴未艾，作为基础学科的微生物学，将继续起着不可忽视的作用。而实验方法论是细菌学的一个重要内容，但国内在这方面的出版物仍远不能满足广大读者的需求。我相信本书中译本的出版将有助于促进国内微生物学研究工作的深入以及有关学科的发展，使其在经济建设中发挥更大的作用，以适应新形势的要求。

国家教委生物学教材编委会微生物学编审小组组长



原 序

本书旨在提供一本文字简洁、价格中等、并能满足从事普通细菌学实验室工作所需的可靠的基本方法手册。

本书包括了细菌分类学的所有类群，既以自然界普遍存在的腐生菌为主，也兼及寄生菌和致病菌。对于纯细菌学和应用细菌学来说，这是一本概括性的入门实验手册。本书不企图包括应用领域的特殊方法或所有微生物学方法；只在介绍以噬菌体作为基因转移载体时才涉及病毒；藻类只论及蓝绿藻（蓝绿细菌）；偶尔提到酵母、霉菌和原生动物。

本书读者为已具备基础知识并需要获得在实验中开展细菌学应用和研究技术的学生，主要读者是大学本科高年级学生和已开始研究生课程的低年级研究生。本书对于教师设计实验室练习、研究人员开展研究工作也是有用的参考书。工业和联邦政府机构的实验室人员也可以从中得到许多实用的知识。

从特点和风格看，这是一本介绍怎么做的手册。作者介绍了足够的原理以理解为什么和方法是怎么进行的，一步步地介绍实验步骤，细节充分，使用者不必进一步参考其他来源的文献就可应用实验方法。书中还指出了常见的问题、易犯的错误以及预防措施等。作者尽可能地应用例子、说明、表格和示意图，选择最常用和可靠的方法；对于较次要的方法，则指出参考文献，指导读者从中查索。方法虽常用作作者所熟悉的或广泛应用的特殊细菌作为例子加以说明，但尽可能地具普遍性，这样，就可能应用于新分离的未知细菌。

本节所描述的方法虽然经权威学者所推荐，是可靠的，但决不能因此认为就是最好的或标准的方法。决不能因为由美国微生物学会赞助和出版该书就可认为学会要对这些方法负责或这些方法是得到官方认可的。对于设备和材料，作者常介绍了商品来源，但这并不意味着赞成或反对某一特殊产品。

本书按普通细菌学的主题分成7篇，再按方法论的有关领域分章。每一章都是独立的，附有目录，以帮助读者了解章节的内容，找到某一特殊的方法；目录采用十进制数字系统，以方便查阅和编索引；章节标题内容突出，文字简明扼要；每章末尾附有引用文献：先是一般文献，后是特殊文献；某些章还收入商品来源目录。

全书的审阅是大量而严格的。编者不是简单地将手稿集中在一起，而是从文字上加以推敲润色。由于需要大量时间，全书手稿分给3所大学的普通微生物系的学者进行审阅和修改，最后，主编再从内容和一致性方面统揽全书。这一审阅与编辑过程虽然很费时间和精力，但却是很有帮助。我们欢迎进一步的批评；通过使用，我们才能知道需要在以后的版本中增加、删减或修改什么内容。

本书的历史可追溯至1923年。当时，学会出版了《方法手册》的活页本，H. J. Conn是第一位作者。后来，H. J. Conn担任了出版《细菌纯培养研究方法手册》活页本的细菌学技术委员会主席，并负责主编工作。该委员会建立了无偿写作的先例，出售手册所得也成了学会经费收入的一个主要部分。1957年，由M. J. Pelczar, Jr.领导的委员会重新修

改和整理了上述手册，将书名更改为《微生物学方法手册》，并以书籍的形式出版。

现在，出版本书的目的在于满足读者对1957年版本的不断需求并使其内容现代化。为了使本书成为一本篇幅最小而赘语最少的单卷本，一开始就把页数分配给每一作者。本书力求价廉。以便学生能够购置。由于学会拥有自己的印刷厂，并拥有众多的、日益扩增的会员（1980年已超过30,000人），因此，学会能够以低价出版印数大的书籍；而且，学会还是一免税的非盈利机构，编辑和作者均无个人收入或版税，所以，上述愿望是可以实现的。

真诚感谢每一位对本书做出贡献的人：作者和编辑在该书写作过程中给予了真诚的合作和杰出的贡献；许多审阅者（多数名字列在名单中）提出了诚恳和建设性的批评；Erwin F. Lessel 及他所在实验室（Lederle Laboratories）的工作人员为完善本书而无偿地承担了美工与绘图工作；许多大学和其他有关机构为本书提供了大量的时间、人力和财力；Cynthia Lounsbury 设计封面；美国微生物学会出版社职员，特别是Estella B. Bradley 誊写和校订本书并编索引。我们还感谢Cheryl Cross（图书部主任）和Gisella Pollock（代理编辑主任）。总之，我们都为本书的出版做出了贡献。

（苏文金 译 黄克服 校）

普通细菌学的方法论

任何一门普通的学科都有一定的研究范围，普通细菌学研究细菌的所有群体，而不是研究某一特殊的细菌类型；其方法论包括了做为细菌的性质和利用的实验室研究的基础而被广泛采用的实验步骤和技术。本书涉及了《伯杰细菌鉴定手册》中所描述的所有细菌类群，但不特别强调其中某一类群。因此，本书的方法应用广泛，既可用于任何可发现细菌的环境，又可用于任何以细菌为研究对象的实践。

只有在独特的方法发展以后，细菌学才真正成为一门科学，而且这些方法持续影响并已渗透到伴之而来的病毒学、免疫学和分子生物学等领域。如科赫（Koch）发明的纯培养技术，巴斯德（Pasteur）应用的免疫应答和化学分析，在今天乃至今后仍具有影响。

本书的方法论力求反映出在该领域内几本较好的教科书的内容，因此，分为形态、生长、遗传、代谢、分类、实验室安全和附录等7篇；篇内再按普通细菌学方法的主题分章。这样的划分经常是随意的，有些方法会出现重复；如有重复之处，注明了其出处。书中采用十进制数字目录系统，便于查阅。每一章还列出了有关的引用文献。

需查阅本书以外方法的读者，一般可参考由许多作者编著的共有若干卷的《微生物学方法》^[5]。Meynell 等著的《实验细菌学的理论和实践》^[4]，提供了许多有益的操作方法的出处。美国微生物学会早期出版的《微生物学方法手册》^[8]，至今仍然有用。对于医学微生物学和免疫学方法（其中许多也可应用于普通细菌学），可参考大量的文献，包括《临床微生物学手册》^[3]和《临床免疫学手册》^[6]。《CRC微生物学手册》^[2]和《微生物学词典》^[7]都是普遍适用的参考书籍。有关商品来源的资料可查阅《仪器、设备和用品的黄页分类》^[1]、《美国实验室》、《化学工程》和《科学》等杂志的购物指导专辑。

（苏文金 译 黄克服 校）

引用文献

1. Industrial Research/Development. 1979. Yellow pages of instrumentation, equipment and supplies. Industrial Research/Development Publishers, Barrington, Ill.
2. Laskin, A. I., and H. Lechevalier. 1978—1980. CRC handbook of microbiology, 2nd ed. CRC Press, Inc., Cleveland.
Vol. 1. Bacteria. *Introductory descriptions occupy the first 120 pages; the next 340 pages provide useful descriptions of the main groups of bacteria; the last 220 pages contain usual handbook information, including a list of culture collections.*

Vol. 2. Fungi, algae, protozoa and viruses.

Vol. 3. Amino acids and proteins.

Vol. 4. Carbohydrates, lipids and minerals.

3. Lennette, E. H., A. Balows, W. H. Hausler, Jr., and J. P. Truant (ed.). 1980. Manual of clinical microbiology, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
4. Meynell, G. G., and E. Meynell. 1970. Theory and practise in experimental bacteriology, 2nd ed. University Press, Cambridge, England.
An excellent, compact (347 pages) resource book containing the rationale and procedure for many methods in general bacteriology. There are sections on growth, culture media, oxygen, carbon dioxide, and anaerobiosis, sterilization, light microscopy, quantitation, and genetic technique.
5. Norris, J. R., and D. W. Ribbons (ed.). 1969—1979. Methods in microbiology, vol. 1-13. Academic Press, Inc., New York.
Volumes 1, 2, 3A, 5A, 5B, 6A, 6B, 7A, 7B, 8, and 9 include methods for general bacteriology. Volume 4 covers mycology, and volumes 10 to 13 describe typing methods for the epidemiology of pathogenic bacteria. A cumulative table of contents for the preceding volumes is contained in each volume. The style of presentation varies with each author but usually is that of a comprehensive review with extensive references to original papers.
6. Rose, N. R., and H. Friedman (ed.). 1980. Manual of clinical immunology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
7. Singleton, P., and D. Sainsbury. 1978. Dictionary of microbiology. John Wilson & Sons, Inc., New York.
A useful 481-page encyclopedia of terms, tests, techniques, taxa, concepts, and other topics. Entries range from short definitions to concise reviews and cover the broad field of pure and applied microbiology, including biochemistry and genetics.
8. Society of American Bacteriologists, Committee on Bacteriological Technique. 1957. Manual of microbiological methods. McGraw Hill Book Co., Inc., New York.
This 315-page book continues to be useful particularly because of its chapters on staining methods, preparation of media, and routine tests for the identification of bacteria.

目 录

代译者序(王祖农)

原序(PHILIPP GERHARDT)

普通细菌学的方法论(PHILIPP GERHARDT主编).....(1)

第一篇 形态学(R.G.E. MURRAY 编).....(1)

第1章 光学显微镜镜检术(R.G.E. MURRAY和C.F. ROBINOW).....(2)

1.1 普通显微镜镜检术.....(2)

1.2 相差显微镜镜检术.....(4)

1.3 高分辨率显微镜镜检术.....(5)

1.4 荧光显微镜镜检术.....(7)

1.5 浸镜油.....(8)

1.6 显微镜的保养.....(9)

1.7 故障的排除.....(10)

1.8 舒适的显微镜镜检条件.....(12)

1.9 显微摄影技术.....(12)

1.10 资料来源.....(13)

1.11 参考文献.....(13)

第2章 光学显微镜镜检标本的制备(R.G.E. MURRAY和C.F. ROBINOW).....(15)

2.1 活体培养法.....(15)

2.2 固定标本.....(16)

2.3 参考文献.....(18)

第3章 光学显微镜镜检的鉴定方法(R.N. DOETSCH).....(20)

3.1 取样.....(20)

3.2 标本.....(21)

3.3 特征鉴定.....(24)

3.4 特殊技术.....(33)

3.5 参考文献.....(37)

第4章 电子显微镜技术(ROGER M. COLE和TERRY J. POPKIN).....(39)

4.1 透射电子显微镜技术.....(41)

4.2 扫描电子显微镜技术.....(51)

4.3 摄影技术.....(51)

4.4 解释.....(52)

4.5 特殊鉴定.....(53)

4.6 材料.....(54)

4.7 商品来源.....(57)

4.8 参考文献.....(58)

第5章 细胞分级分离 (CARL A. SCHNAITMAN)	(65)
5.1 破碎技术	(65)
5.2 分级分离技术	(69)
5.3 分级分离实例: 大肠埃希氏菌	(74)
5.4 引用文献	(75)
第二篇 生长 (RALPH N. COSTILOW 编)	(77)
第6章 生长的生物物理因子 (RALPH N. COSTILOW)	(78)
6.1 pH	(78)
6.2 水活度和渗透压	(82)
6.3 温度	(83)
6.4 压力	(85)
6.5 氧	(85)
6.6 厌氧生活	(86)
6.7 引用文献	(92)
第7章 生长的生物化学因子 (BEVERLY M. GUIRARD和ESMOND E. SNELL)	(96)
7.1 营养要求	(97)
7.2 培养基的组成	(102)
7.3 生长因子的定量分析	(103)
7.4 引用文献	(137)
第8章 细菌的富集和分离 (NOEL R. KRIEG)	(146)
8.1 生物物理法富集细菌	(148)
8.2 生物化学法富集细菌	(155)
8.3 生物学法富集细菌	(164)
8.4 细菌的分离法	(165)
8.5 培养基和试剂	(167)
8.6 引用文献	(183)
第9章 固体培养 (NOEL R. KRIEG和PHILIPP GERHARDT)	(189)
9.1 凝固剂	(189)
9.2 固体培养技术	(191)
9.3 半固体培养技术	(194)
9.4 引用文献	(196)
第10章 液体培养 (STEPHEN W. DREW)	(198)
10.1 分批培养系统	(199)
10.2 连续培养系统	(207)
10.3 特殊培养系统	(214)
10.4 产品的收获与提纯	(221)
10.5 生长产率的计算	(224)
10.6 商品来源	(226)
10.7 引用文献	(228)
第11章 生长的测定 (ARTHUR L. KOCH)	(231)

11.1	直接计数法	(234)
11.2	菌落计数法	(238)
11.3	最大或然数	(241)
11.4	光散射法	(246)
11.5	统计与计算	(253)
11.6	引用文献	(263)
第12章	菌种的保存 (ROBERT L. GHERNA)	(266)
12.1	短期保存法	(266)
12.2	长期保存法	(268)
12.3	商品来源	(276)
12.4	引用文献	(276)
第三篇	遗传学 (EUGENE W. NESTER 编)	(279)
第13章	基因突变 (BRUCE C. CARLTON 和 BARBARA J. BROWN)	(281)
13.1	突变型的确定	(282)
13.2	诱变剂的选择	(283)
13.3	突变型的表达	(289)
13.4	突变型的富集	(289)
13.5	突变型的检出 (直接法)	(290)
13.6	突变型的检出 (间接法)	(293)
13.7	突变型的特征鉴定	(296)
13.8	特殊应用	(297)
13.9	细菌培养基配方	(302)
13.10	菌株和特殊材料的来源	(305)
13.11	引用文献	(307)
第14章	基因转移 (ROY CURTISS III)	(309)
14.1	转化	(309)
14.2	转导	(317)
14.3	接合	(326)
14.4	培养基与菌株	(333)
14.5	引用文献	(338)
第15章	质粒 (JORGE H. CROSA 和 STANLEY FALKOW)	(340)
15.1	质粒DNA的分离	(341)
15.2	大质粒DNA的分离	(344)
15.3	质粒的特征鉴定	(345)
15.4	引用文献	(357)
第四篇	新陈代谢 (WILLIS A. WOOD 编)	(361)
第16章	物理方法 (W. A. WOOD)	(362)
16.1	光度法	(362)
16.2	离子电极	(368)
16.3	色谱法	(372)
16.4	放射性	(388)

16.5. 凝胶电泳.....	(399)
16.6. 检压法.....	(407)
16.7. 引用文献.....	(408)
第17章 化学组成 (R. S. HANSON 和 J. A. PHILLIPS).....	(412)
17.1. 主要化学组分: 分级分离和放射性测定.....	(412)
17.2. 碳水化合物.....	(417)
17.3. 脂类.....	(424)
17.4. 细胞壁多聚物.....	(432)
17.5. 核酸.....	(437)
17.6. 氮化合物.....	(440)
17.7. 有机酸和醇类.....	(451)
17.8. 元素.....	(452)
17.9. 引用文献.....	(452)
第18章 酶活性 (W. J. DOBROGOSZ)	(458)
18.1. 细胞制剂.....	(459)
18.2. 活性的测定.....	(463)
18.3. 活性的调控.....	(472)
18.4. 合成的调节.....	(476)
18.5. 途径的分析.....	(480)
18.6. 引用文献.....	(489)
第19章 通透性与运输 (R. E. MARQUIS)	(491)
19.1. 通透性.....	(492)
19.2. 运输.....	(496)
19.3. 特殊方法.....	(498)
19.4. 引用文献.....	(503)
第五篇 分类学 (NOEL R. KRIEG 编)	(507)
第20章 一般特征 (ROBERT M. SMIBERT 和 NOEL R. KRIEG)	(509)
20.1. 常规试验.....	(511)
20.2. 特殊试验.....	(527)
20.3. 培养基配方.....	(536)
20.4. 试剂溶液.....	(543)
20.5. 引用文献.....	(548)
第21章 数值分类学 (RITA R. COLWELL 和 BRIAN AUSTIN)	(553)
21.1. 菌株的选择.....	(553)
21.2. 试验的选择.....	(554)
21.3. 数据编码.....	(555)
21.4. 计算机分析.....	(555)
21.5. 结果表达与解释.....	(556)
21.6. 引用文献.....	(558)
第22章 遗传学特征 (JOHN L. JOHNSON)	(560)
22.1. 用于核酸分离的细胞破碎法.....	(562)

22.2	DNA分离	(562)
22.3	RNA分离	(562)
22.4	核酸的浓缩与纯化	(566)
22.5	DNA碱基成分	(568)
22.6	DNA同源性	(569)
22.7	RNA同源性	(582)
22.8	引用文献	(585)
第六篇	实验室安全 (G BRIGGS PHILLIPS 编)	(589)
第23章	灭菌 (MICHAEL S. KORCZYNSKI)	(590)
23.1	湿热灭菌	(592)
23.2	干热灭菌	(595)
23.3	通气灭菌	(596)
23.4	辐射灭菌	(599)
23.5	过滤除菌	(600)
23.6	商品来源	(601)
23.7	引用文献	(602)
第24章	抑菌和消毒 (W. EMMETT BARKLEY)	(605)
24.1	实验室一般实践	(605)
24.2	实验室特殊操作	(608)
24.3	物理抑菌	(614)
24.4	化学消毒	(617)
24.5	引用文献	(622)
第七篇	附录	(625)
第25章	稀释剂和生物量的测量 (PHILIPP GERHARDT)	(625)
25.1	稀释剂	(625)
25.2	生物量的测量	(626)
25.3	引用文献	(628)
索引		(630)

第一篇 形态学

显微镜以及显微技术为微生物学提出一个基本的概念，即微生物学是生物科学的一个分支。高级和简单显微镜技术的发展已使细菌学和对细菌的描述工作获得极大的好处，因为这些普遍存在的原核生物确实是很小的细胞。现在，可以把细胞的成分分辨到大分子和具有功能的组分水平，并在细胞分级分离组分中研究其过程。高分辨率分析技术增加了电子显微镜的多效性与应用范围，但在自然的和培养的细菌以及无细胞组分的研究中，所有各个水平的显微镜技术都发挥着作用。

本篇介绍了对学生有用的和最有机会成功的方法，其目的在于合理地借鉴别人的研究成果，以扩充读者对观察细菌的基本知识的理解，特别是使显微镜（包括光学显微镜和电子显微镜）发挥更有用、更有效和更有价值的作用。由于绝大部分的教科书和本篇各章所引用的文献对仪器的基本性能和装置已有大量描述，因此在这方面仅作最少的说明。所以，我们尽可能清楚地介绍我们认为工作所必需的实验步骤以及应注意掌握的难点。我们试图指出，即使是用简单的设备，也可完成较好的工作任务，而且只有通过实践，才能实现这一点，除此别无他法。

光学显微镜对于所有微生物学工作者来说，是必需而有用的工具。因为有效的使用是如此必需，而往往很少收到理想的结果，所以，在第1章中提出了某些详细的建议——每个显微镜操作者都应该了解所有这些内容；第2章和第3章分别叙述了利用光学显微镜观察细胞结构及鉴定细菌的方法。电子显微镜是更加特殊的仪器，通常由负责指导、帮助和提出建议的专业人员来操作和维护，因此，在第4章里较注重介绍了样品制备的方法。所有方法对于理解第5章中所描述的细胞破碎和细胞分级分离步骤都是必需的——由于电子显微镜可证实细胞结构与功能的关系，因此，是检查亚细胞成分纯度的必要仪器。

第1章 光学显微镜镜检

- | | |
|-------------------|--------------------|
| 1.1 普通显微镜镜检术(2) | 1.6 显微镜的保养(9) |
| 1.2 相差显微镜镜检术(4) | 1.7 故障的排除(10) |
| 1.3 高分辨率显微镜镜检术(5) | 1.8 舒适的显微镜镜检条件(12) |
| 1.3.1 柯勒照明(6) | 1.9 显微摄影技术(12) |
| 1.4 荧光显微镜镜检术(7) | 1.10 资料来源(13) |
| 1.5 浸镜油(8) | 1.11 引用文献(13) |

如果能获得四种不同的设备,就能轻松而精确地进行有趣的显微镜镜检工作。这四种设备包括:(1)功能完善的普通显微镜以满足最基本的需要;(2)相差设备;(3)具高分辨率和可进行最佳显微摄影的可调显微镜;(4)荧光显微镜设备。这四种设备可组装在一起,但在日常使用中不一定都会用上。最好是将这些设备一直保持在良好的状况,以备使用。

市场上有众多的显微镜可供选择,其中,第一流显微镜制造厂商生产的产品质量相当好,并有许多附件可供选用。不同显微镜的差别经常是在镜座结构方面,可根据使用者的方便和爱好进行选择。真正可靠的仪器是昂贵的。只要小心操作,用一台普通的或甚至是学生用的显微镜,配上一流的光学镜片也可取得较好的工作效果。当然,这不能与最好的现代显微镜相比。别的选择标准可能包括技术要求。我们总是建议在自己的工作条件下用自己的材料对可能的设备和可替换的附件作直接的比较,这样,就不必很了解厂商。应该知道,一台好的显微镜(无论它是什么年代的),其构件部分的合理选择以及了解如何使用它们,将可增加对工作的兴趣,节省时间并改善工作的精密度。使用调节不当、光照恶劣的显微镜是如此普遍,以致很少有生物学家能知道如何正确使用显微镜,当按照1.1节或1.3和1.3.1节概述的原理、甚至用一台是学生显微镜来证明可获得很高分辨力时,将会使他们大吃一惊。

1.1 普通显微镜镜检术

设计用于教学、研究室或常规实验室的显微镜,在型号、质量和状况等方面可能是各不相同的。细菌学应用的普通显微镜可回答下列问题:有无细菌和染色性质的物体存在?其大小和形状是否一致?是革兰氏阳性还是革兰氏阴性细菌?有否多于一种的细菌或细胞存在等等?这些初步的观察通常不需要最高的分辨率,因此只需简单的操作步骤。使用者必须知道,如果需要较高的分辨率,几乎每一操作步骤都应该改进。

显微镜(图1-1)应配备有:

1. 目镜:目镜要求至少放大10倍。但是对细菌的认真观察则需要更高放大倍数(12或15倍)的补偿目镜。这些目镜装在显微镜的镜筒上,镜筒长度可以固定或是可调节的(调节至180mm或制造厂家推荐的镜筒长度)。

2. 物镜:低倍、干燥物镜(10倍和40倍),供观察生长的培养物和鉴定制片中感兴趣的区域之需。

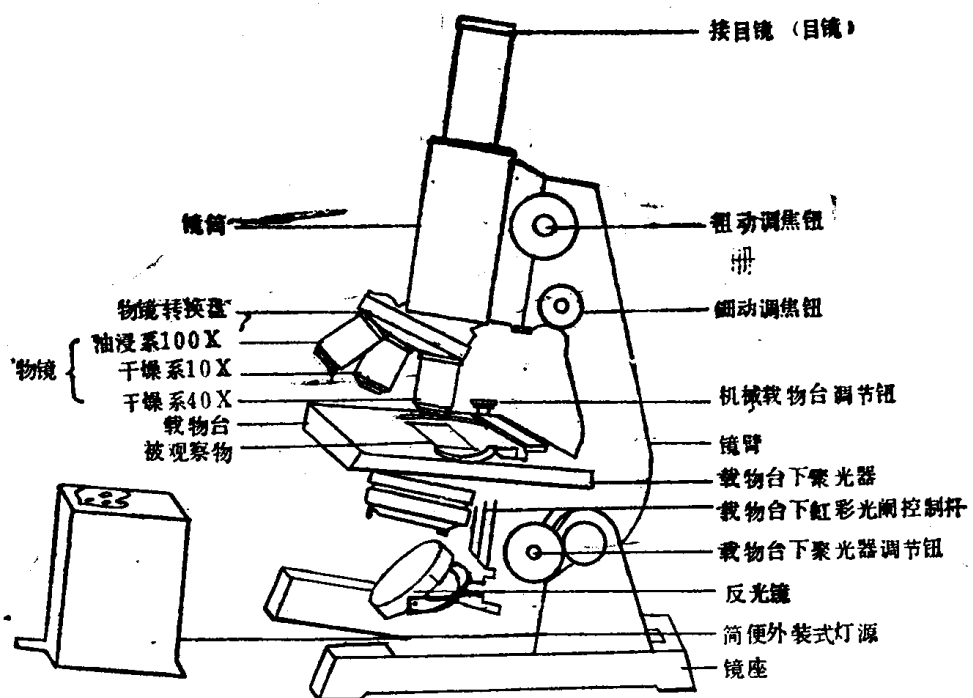


图1—1 常用的普通显微镜及其各部件

3. 高倍物镜：消色差油浸物镜（90倍—100倍）。这对细菌学来说是必需的。

4. 载物台：具有一个夹持载玻片的机械装置或简单弹簧夹的载物台。如果装置一个机械的载物台，使之容易移动，则可用低倍物镜来检查平板或染色皿。

5. 聚光镜：为装在载物台下的改良阿培氏（Abbe）型聚光器（有三个透镜的消球差镜，其数值孔径为1.3—1.4的较佳）。它对油浸物镜是必不可少的，因为它提供了它们所需要光的质和量。聚光器应在透镜的下部装有一个虹彩光阑。

6. 光源：可进行有限调节的内装式灯室或可移动的外装光源（较好）。若采用后者，聚光器下安装一个可调节的反光镜（一面为平面而另一面为凹面的），光线由斜射向上直接射入到显微镜的光轴上。有许多种灯泡供选用，许多工作只需在“牛眼形”透镜后面配备一个磨砂灯泡。然而，如果能够有一个投射光源的灯泡，灯室光路上装有滤光片的中槽和一个视野虹彩光阑，将能使研究的染色标本象质有很多的改善，尤其使用柯勒照明时更是如此（1.3.1）。缠绕丝状投射灯泡（投射映出一个不均匀的图象）必须聚焦在毛玻璃扩散屏上，然后通过倾斜灯室反光镜使图象扩散开来并使焦点稍微偏离，以得到一可做为光源的更加均匀明亮的光表面。

显微镜操作步骤如下：

1. 把目镜和10倍物镜放置在应有的位置上，将聚光器上升至几乎与载物台成水平，孔径光阑（聚光器）全开，倾斜反光镜，使光线向上进入光轴。调节物镜（粗动调节钮）以便聚焦光源，然后用反光镜使其共轴。多数显微镜使用平面反光镜。

2. 在载物台上放一块合适的载玻片，将物镜聚焦，得到一个清晰的（无需良好照明）标本象，再通过调节聚光器的位置和虹彩光阑来改善标本象，以取得最佳的效果。

3. 根据我们的经验，确定聚光器最适当位置的最好方法是取出目镜，并通过镜筒往下看物镜的焦点后平面。边看边调节聚光器的位置以使物镜得到最充分和最均匀的照明。倘若光线不集中，可倾斜反光镜加以调节。通过缩小聚光器的孔径光阑（如果可利用的话）使均

匀的光亮刚刚照射到整个视场以减少闪耀光。这种均匀的光量先聚焦于标本上，就会得到比较好的效果。该步骤适用于一切物镜。

4. 放回目镜，以检查标本。为获得最佳照明效果可进行最后的调节。

5. 将物镜转换盘转至其他所需要的物镜。许多显微镜厂家提供齐焦物镜（即一个物镜焦点的位置几乎与全部物镜的焦点位置相同）。对于干燥系物镜来说，工作距离是足够的。如果物镜因制作或匹配错误而被搞混的话，在油浸物镜调焦前，稍为提高镜筒是明智的，油浸物镜的短焦距物镜。当标本装封在一块盖玻片下面时，工作距离将会更短。

6. 如果需用油浸镜的话，那么在把载玻片置于载物台上之前，须加一滴油到载玻片上（标本的中心）。如果已经用低倍物镜审视了检查区域，在油浸物镜旋入位置之前，滴油是很方便的。

7. 即使油浸物镜的前端装有弹簧以保护前透镜和载玻片，对油浸物镜的使用和调焦也需要熟练和小心谨慎（参见1.5和1.6）。从侧面看载玻片，将物镜下降碰到油滴并稍微向下，缓慢地调节粗动调焦钮，并通过目镜来观察标本。当发现标本象时，可使用细动调焦钮。如上所述调节照明，即可主观确定最适的焦点位置。

8. 如果标本象模糊不清、飘移或只是模糊和不清晰，那么是光路上的某些元件有毛病，可能需要把物镜前透镜擦干净（须用透镜纸）。油浸物镜如果遇到油中的气泡（取出目镜并由镜筒朝下看，很容易鉴别气泡），可升高物镜或旋转物镜转换盘以擦去油（气泡通常上升至物镜上），然后重新调焦，气泡即可去掉。另一个原因也许是偶然地关小了光阑，或移动了灯泡，或移动了反光镜。有关故障排除的建议请参阅1.7节。

记住如下显微镜操作的简单规则并加以练习：

规则1. 聚焦标本象时要求尽可能符合最佳状况的光质和光量。

规则2. 如果光线太强，最好用中灰密度的滤光片或将光源移远些使之减弱。对于油浸系（数值孔径值大的）物镜，重要的是要避免减少视场光阑（降低聚光器或将光阑关10%以上），虽然这样做对数值孔径值小的干燥系物镜和观察未染色的活体细胞有所帮助。

规则3. 如果光线对所希望使用的物镜来说是太弱的话，可能是光程中有些障碍或者需要一个更合适的照明系统（灯泡和聚光器）。

规则4. 标本必须有接近均一性的光学系统的条件，并可滴上油或水或封装某些适当介质内。用干燥系物镜观察干燥细菌的染色涂片是不能看清楚细节的。

规则5. 保持透镜清洁，不沾有灰尘、指纹、鼻印以及油状睫毛的污垢等。

通过培养皿背面，即使使用10倍物镜也能清楚地看到单个的活细菌、酵母菌或真菌的菌丝，无需进一步操作，便可确定被检查的样品的性质和形状。观察培养皿应注意两点：（1）凹面反光镜提供了穿过平皿的背面进行观察的最好照明，（2）由于玻璃损伤或平皿底部形状的不均匀性，会使标本象变形。改善的方法：把一滴浸镜油滴在有关区域，上面加盖玻片，可以得到均匀的光程和无裂纹的表面。

1.2 相差显微镜检术

专门用于相差显微镜检的仪器要优于兼做相差显微镜和普通光学显微镜的仪器。相差