

农业微生物学 实验技术

李阜棣 喻子牛 何绍江 主编



中国农业出版社

农业微生物学实验技术

李阜棣 喻子牛 何绍江 主编

内 容 提 要

本书系统介绍了农业微生物科研、教学及应用中所涉及的微生物实验的基本原理和技术,既包含了现代微生物研究方法中的高新技术,也包括了微生物在农业中的应用技术。

全书共分三篇。上篇为微生物学基本实验技术,包括光学显微镜的使用和微生物形态学研究法、微生物的纯培养技术和常规育种方法;中篇为微生物生态学实验,包括土壤微生物和环境微生物的研究方法;下篇为农业应用微生物实验,包括杀虫微生物、农用抗生素、食品酿造微生物、沼气微生物、食用菌、细菌的血清学鉴定和植病研究法等内容。

本书可供农业院校作为教科书,也可供科研单位、高等学校生物类学科及生产单位参考。

农业微生物学实验技术

李阜棣 喻子牛 何绍江 主编

* * *

责任编辑 李耀辉 阎 芹

中国农业出版社出版 (北京市朝阳区农展馆北路2号)

新华书店北京发行所发行 北京市密云县印刷厂印刷

787×1092mm16开本 20.75印张 446千字

1996年5月第1版 1996年5月北京第1次印刷

印数 1—6,000册 定价 22.50元

ISBN 7-109-04266-9/S·2641

《农业微生物学实验技术》编写组

主 编：李阜棣 喻子牛 何绍江

参编单位：华中农业大学微生物科学技术系、植保系、食科系
中国农业大学 南京农业大学 沈阳农业大学
华南农业大学 浙江农业大学 河南农业大学
四川农业大学 江西农业大学 福建农学院
贵州农学院 湖北农学院 中科院南京土壤研究所

编 委：(以姓氏笔画为序)

何绍江 李寿星 李顺鹏 李阜棣 闵 航 陈锡时
贾新成 喻子牛 颜耀祖

编写人员：(以姓氏笔画为序)

王 平	王明祖	石木标	史玉英	关 雄	成国英
刘生浩	刘坚贞	刘爱英	何绍江	陈 强	陈雯莉
陈亚华	陈福生	陈锡时	李 颖	李寿星	李顺鹏
李阜棣	闵 航	吴云汉	沈 昌	沈 标	沈爱光
沈鞠群	罗信昌	罗国威	罗曦霞	林开春	赵 斌
钟士清	胡福荣	高勇生	贾新成	阎淳泰	郭树凡
顾向阳	顾宗濂	梁如玉	梁运祥	黄 云	喻子牛
廖树云	熊晓辉	颜耀祖	戴经元	戴冠群	

序

《农业微生物学实验技术》是十二所农业大学(学院)和中科院南京土壤研究所的微生物学教师和研究集体编写的一本实验技术指导书。本书除一般微生物学基本实验技术外,着重服务于种植业的微生物学实验技术,包括种植业的生产环境、种植业生产的应用微生物学和种植业产品加工的微生物学诸方面。本书明确的侧重面来源于编写者们自身的教学和工作实践和农业院校教学改革趋向。对于农业院校的教师、学生和有关的产业和科技部门的实验工作者是一本很实际的案头书。

陈华癸 识 1995年4月

43536

前 言

微生物学是一门实践性很强的学科，微生物学实验技术是该学科的重要组成部分。从微生物学的发展历史可知，显微镜的发明和纯培养技术的创立，奠定了微生物学发展的基础，而电子显微镜和超速离心机等的问世又使微生物的研究进入到超微结构时代。随着分子生物学的诞生和新技术的广泛应用，微生物学为分子生物学的发展作出了重要贡献。因此，掌握微生物实验技术不仅对人类开发利用有益微生物，而且对推动整个生命科学的发展都具有十分重要的意义。

1962年，华中农学院微生物教研室在陈华癸教授的主持下编写了《微生物实验》一书。该书对推动当时我国土壤微生物的发展起了积极作用。三十多年过去了，农业微生物的研究已从过去以物质转化为主要内容的土壤微生物研究发展成与整个大农业密切联系的农用微生物体系，包括直接为植物生产服务的农用抗生素和杀虫微生物；以农产品加工为目的的食品、酿造微生物；以食用、医用为目的的食用菌和药用菌；以解决农村能源为目的的沼气发酵微生物；以解决环境污染为目的的环保微生物等。随着农业微生物研究领域的扩大和研究内容的深入，过去的实验教科书已不能适应当前农业院校微生物实验课程的需要。为此，我们组织全国部分农业院校编写了这本《农业微生物学实验技术》。

根据农业院校微生物课教学的长期经验，结合各农业院校当前专业设置情况，本书共分三篇：上篇为基本技术，包括普通光学显微镜的使用和常规染色技术；微生物的纯培养技术；微生物的测计技术和菌种保藏技术。这些实验技术是各专业的学生在学习微生物课程时必须掌握的基本实验技术。中篇为微生物生态学研究法，包括土壤、水、空气微生物的分离计数；土壤微生物引起的物质转化和转化强度的测定；微生物与环境污染和净化等。下篇是农业应用微生物实验技术，包括杀虫微生物，农用抗生素，沼气发酵微生物；食品酿造微生物；食用菌和植物病原菌的研究等内容。除了上篇是各专业的共同学习内容外，中、下篇供不同的专业选择使用。对每个学生来说，书中的内容不可能都做到，但可供课外阅读和走向社会后作参考。

参加本书编写的成员大多数是多年从事微生物教学、科研的专家，书中的内容都是他们实践经验的总结。农业微生物实验内容丰富，由于篇幅的限制，我们从收到的200多个实验初稿中选择了现在书中的内容奉献给各位读者。由于水平有限，书中的缺点和错误在所难免，敬请读者指正！

主 编

1995年3月于武汉狮子山

目 录

上篇 微生物学基本实验技术

I 微生物形态研究法	1
实验一 普通光学显微镜的构造和使用	1
实验二 相衬显微镜的构造和使用	6
实验三 暗视野显微镜的构造和使用	9
实验四 透射电子显微镜的构造和使用	10
实验五 细菌的形态观察	14
实验六 真菌形态观察	22
实验七 放线菌形态观察	25
实验八 病毒形态观察	26
实验九 微生物的大小测定和计数	28
II 微生物纯培养技术	37
实验十 培养基的配制	37
实验十一 灭菌和消毒	46
实验十二 微生物接种技术	55
III 微生物常规育种技术和菌种保藏	61
实验十三 微生物的诱变	61
实验十四 原生质体融合	64
实验十五 微生物菌种保藏	65

中篇 微生物生态

IV 土壤微生物	69
实验十六 土壤中好气性细菌的分离与计数	69
实验十七 土壤中放线菌的分离与计数	70
实验十八 土壤中真菌的分离与计数	71
实验十九 土壤中厌气性细菌的培养与分离	72
实验二十 土壤中贫营养细菌的培养与计数	75
实验二十一 用选择培养基分离土壤中的固氮菌	75
实验二十二 土壤中藻类的分离和培养	77
实验二十三 土壤中原生动物的分离与培养	79
实验二十四 土壤中固氮蓝藻的分离与计数	80
实验二十五 土壤中微生物生物量的测定	82
实验二十六 土壤中纤维分解菌的分离	84

实验二十七	土壤氨化细菌的分离	86
实验二十八	土壤硝化细菌的分离	87
实验二十九	土壤反硝化细菌的分离	88
实验三十	土壤中酚分解细菌的分离	90
实验三十一	土壤中磷细菌的分离	90
实验三十二	豆科植物根瘤中根瘤菌的分离与类菌体的观察	92
实验三十三	根瘤菌离体(纯培养)固氮酶活性及根瘤固氮酶活性的测定	93
实验三十四	根瘤菌感染性的鉴定(结瘤试验)	95
实验三十五	根瘤菌质粒的快速检测	97
实验三十六	弗兰克氏菌的分离	98
实验三十七	玉米联合固氮菌的分离、纯化和鉴定	100
实验三十八	外生菌根真菌的形态观察及分离培养	101
实验三十九	泡囊丛枝状菌根(VAM)真菌孢子的分筛	103
实验四十	泡囊丛枝状菌根(VAM)的染色测定方法	104
V	空气和水体微生物	106
实验四十一	空气中微生物的计数	106
实验四十二	水中大肠菌群总数的测定	108
实验四十三	水中溶解氧(DO)的测定	115
实验四十四	废水中化学需氧量(COD)的测定	117
实验四十五	废水中生化需氧量(BOD)的测定	119
VI	微生物引起的物质转化	122
实验四十六	土壤中细菌、真菌呼吸强度的测定	122
实验四十七	土壤纤维分解强度的测定	123
实验四十八	氨化作用强度的测定	124
实验四十九	硝化作用强度的测定	125
实验五十	反硝化作用强度的测定	126
实验五十一	酚分解作用强度的测定	128
实验五十二	磷转化作用强度的测定	130
实验五十三	土壤中纤维素酶活的测定	132
实验五十四	土壤中蛋白酶活的测定	134
实验五十五	土壤中脲酶的测定	136
实验五十六	土壤中磷酸酶的测定	137
VII	微生物与环境污染和净化	140
实验五十七	有机磷农药的降解	140
实验五十八	有机氯农药降解菌的筛选	142
实验五十九	表面活性剂的降解	143
实验六十	生物污泥的活性测定	145
实验六十一	活性污泥菌胶团及生物相观察	146
实验六十二	富营养化湖中藻量的测定	148
实验六十三	发光细菌法检测急性毒性	149

下篇 农业应用微生物

VIII 杀虫微生物学	155
(I) 杀虫微生物的分离	155
实验六十四 罹病昆虫标本的采集和疾病的诊断	155
实验六十五 从感病死亡昆虫中分离杀虫细菌	156
实验六十六 用选择性培养基从土壤中分离苏云金杆菌	157
实验六十七 从感病死亡昆虫中分离杀虫真菌	158
实验六十八 核多角体病毒的分离与提纯	158
(II) 杀虫微生物的感染试验	160
实验六十九 苏云金芽胞杆菌感染菜青虫	160
实验七十 球形芽胞杆菌感染蚊幼虫	161
实验七十一 金龟子芽胞杆菌感染蛴螬	162
实验七十二 白僵菌对昆虫的致病性测定	163
实验七十三 颗粒体病毒感染家蚕	164
(III) 杀虫微生物制剂的制备及产品质量检验	165
实验七十四 苏云金杆菌的半固体发酵——一步法	165
实验七十五 乳糖-丙酮沉淀法制备苏云金杆菌粉剂	167
实验七十六 用液体-固体培养法制备白僵菌粉	168
实验七十七 白僵菌生产菌株的虫体复壮	169
实验七十八 棉铃虫核多角体病毒制剂的制备	170
实验七十九 白僵菌分生孢子显微测数和孢子萌发试验	171
实验八十 用小菜蛾幼虫测定苏云金杆菌制剂的毒力效价	172
实验八十一 用库蚊幼虫测定球形芽胞杆菌制剂的毒力效价	175
实验八十二 用棉铃虫测定核多角体病毒的毒力	177
实验八十三 苏云金素的生物测定	179
IX 农用抗生素	181
(I) 抗生素产生菌的分离鉴定	181
实验八十四 从土壤中分离稀有放线菌	181
实验八十五 放线菌的细微结构观察	183
实验八十六 链霉菌类群的划分	187
实验八十七 放线菌细胞壁氨基酸和全细胞糖型的测定	189
实验八十八 DNA 中 (G+C) mol% 的测定	192
(II) 抗生素的筛选	196
实验八十九 农用抗生素的体外筛选法 (体外抑菌活性的测定)	196
实验九十 农用抗生素的离体组织测定	198
实验九十一 农用抗生素的植株测定	202
实验九十二 农用抗生素筛选的田间试验	207
(III) 抗生素的效价测定	209
实验九十三 用管碟法测定春雷霉素发酵液的生物效价	209
实验九十四 用倒转法测定井冈霉素发酵产品的生物效价	212

实验九十五	用比色法测定井冈霉素产品的化学效价	213
(IV)	抗生素的提取	215
实验九十六	离子交换法提取卡那霉素	215
实验九十七	溶媒萃取法提取莫能霉素	216
X	食品和酿造微生物	218
实验九十八	微生物热力致死时间的测定	218
实验九十九	微生物 D 值测定	219
实验一〇〇	水分活性试验	220
实验一〇一	微生物的耐盐性试验	222
实验一〇二	微生物的耐糖性试验	223
实验一〇三	酒精发酵及酒曲中酵母菌的分离	223
实验一〇四	乳酸发酵及酸泡菜中乳酸菌的分离	225
实验一〇五	食醋的酿造及醋醅中醋酸菌的分离	227
实验一〇六	红曲的制备及红方腐乳的制作	228
实验一〇七	酸奶制作	230
实验一〇八	酱油中杂菌总数的测定	232
实验一〇九	动物食品中蛋白质分解菌的检查与计数	235
实验一一〇	食品中淀粉分解菌的检查	236
实验一一一	酱油中氨基酸含量的测定	237
实验一一二	糖化酶活力的测定	238
实验一一三	蛋白酶活力测定	240
XI	沼气微生物	244
实验一一四	用亨氏厌氧技术配制无氧试剂和无氧培养基	244
实验一一五	产甲烷细菌分离源的富集培养	248
实验一一六	产甲烷细菌的分离	250
实验一一七	产甲烷细菌菌落的移接和纯化	251
实验一一八	甲烷的气相色谱检测	253
实验一一九	产甲烷细菌的荧光显微镜检	256
实验一二〇	厌氧纤维分解菌的分离	257
XII	应用真菌	259
实验一二一	霉菌单孢子分离	259
实验一二二	真菌孢子的萌发试验	260
实验一二三	木耳孢子的极性测定	262
实验一二四	食用真菌细胞核的染色	264
实验一二五	银耳及伴生菌纯种的分离培养	266
实验一二六	木耳纯种分离培养及扩制	268
实验一二七	香菇纯种分离培养	270
实验一二八	茯苓纯种分离培养	271
实验一二九	食用菌菌种的提纯复壮	273
实验一三〇	食用菌塑料管菌种制作方法	274
实验一三一	食用菌菌种保藏	275

XIII	植物病原微生物	278
实验一三二	植物病害症状类型的识别	278
实验一三三	植物病害标本的采集和制作	280
实验一三四	植物真菌病害的诊断	282
实验一三五	植物病原真菌的感染试验	283
实验一三六	植物细菌病害的诊断	285
实验一三七	植物病原细菌致病性的测定	288
实验一三八	植物病毒的分离和纯化	289
实验一三九	植物病毒病症状及内含体简易观察	291
实验一四〇	植物病毒的传染试验	293
实验一四一	植物寄生线虫的漏斗分离法	295
实验一四二	植物线虫的形态观察和虫体测计	296
实验一四三	松树萎蔫线虫致病性测定	298
XIV	细菌的血清学鉴定	299
实验一四四	苏云金杆菌鞭毛及菌体抗原血清学鉴定	299
实验一四五	根瘤菌体抗原的血清学鉴定	303
附录		305
一、	常用培养基配方	305
二、	常用染色液、缓冲液及试剂的配制	308
三、	微生物混浊度计数法麦法兰云度计的配制与菌数对照表	315
四、	最大或然数统计表	315
主要参考文献		318

上篇 微生物学基本实验技术

I 微生物形态研究法

实验一 普通光学显微镜的构造和使用

一、光学显微镜的结构及其基本原理

(一) **光学显微镜的结构** 光学显微镜是由一组光学放大系统和机械支持及调节系统组成(图1)。

1. **机械系统部件** 显微镜的机械部件,是整个显微镜装配的骨架,它是安装光学放大系统的基座。显微镜的机械部件包括镜座、载物台、物镜转换器、镜筒和调节器等。

(1) **镜座** 镜座是显微镜的基本支架,它由底座和镜臂两部分组成。在它上面连接有载物台和镜筒,它是用来安装光学放大系统部件的基座。

(2) **载物台** 又称镜台,是载放被观察标本的地方。在用低倍镜观察样品时(如平皿上的菌落),用手移动样品就可以了,如用高倍镜或油镜观察时,用载物台上的压片夹固定样品。较好的显微镜则是用标本移动器(或称推进器),转动旋钮,可以使标本前、后、左、右移动。有的标本移动器带有标尺,可指明标本所在位置。

(3) **粗、细调节旋钮** 粗调节旋钮和细调节旋钮是调节镜筒或载物台上下移动的装置,以达到调焦的目的。一般较好的显微镜,其粗、细调节旋钮是共轴式的,在细调节旋钮的外侧还刻有分度,可用于测量被检物体的厚度。

(4) **物镜转换器** 它是装配物镜用的,可以装配4—6个物镜。由于观察样品时,需要从低倍镜转向高倍镜以至油镜,因此,在物镜转换器上按顺序安装一套不同放大倍数的物镜,使用起来很是方便。

(5) **镜筒** 从物镜的后缘到镜筒尾端的距离称机械筒长或镜筒。因为物镜的放大率是对一定的镜筒长度而言的。镜筒长度的变化,不仅放大倍率随之变化,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,此数字标在物镜的外壳上。

2. **光学放大系统部件** 光学显微镜的光学系统包括反光镜、聚光器、物镜和目镜等(图2)

(1) **反光镜** 反光镜是普通显微镜的取光设备,它有二个面,一是平面镜,另一面是凹面镜,镜体安装在弧弓上,可自由翻转以调整位置,使光线射向聚光器。无聚光器的显微镜,在使用低倍物镜时可用平面镜,用高倍物镜时则用凹面镜。在有聚光器的显微镜中,无论使用低倍或高倍物镜时都应使用平面镜。如在微弱光线下不得已可使用凹面镜。

(2) **聚光器** 聚光器安装在载物台下,其作用是将光源经反光镜反射来的光线聚焦于

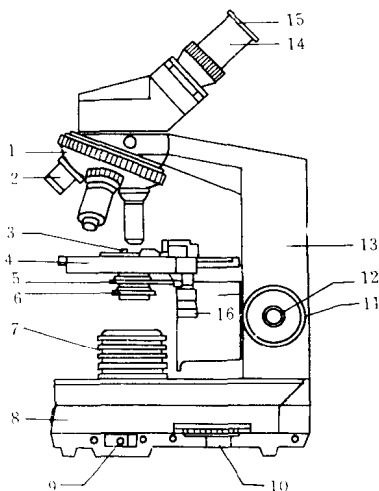


图 1 光学显微镜构造示意图

1. 物镜转换器 2. 物镜 3. 游标卡尺 4. 载物台
5. 聚光器 6. 彩虹光阑 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

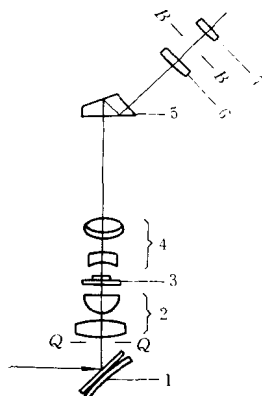


图 2 显微镜的光学系统

1. 反光镜 2. 聚光器 3. 标本 4. 物镜 5. 半
五角棱镜 6. 场镜 7. 接目透镜 Q. 聚光器
孔径光阑 B. 目镜视场光阑

样品上，以得到最强的照明，使物象获得明亮清晰的效果。聚光器的高低可以调节，使焦点落在被检物体上，以得到最大亮度。一般聚光器的焦点在其上方 1.25mm 处，而其上升限度为载物台平面下方 0.1mm。因此，要求使用的载玻片厚度应在 0.8—1.2mm 之间，否则被检样品不在焦点上，影响镜检效果。聚光器前透镜组前面还装有孔径光阑，它可以开大和缩小，影响着成像的分辨力和反差，若将孔径光阑开放过大，超过物镜的数值孔径时，便产生光斑；若收拢孔径光阑过小，分辨力下降，反差增大。因此，在观察时，通过孔径光阑的调节再把视场光阑（具备视场光阑的显微镜）开启到视场周缘的外切处，使不在物视场内的物体得不到任何光线的照明，以避免散射光的干扰。

（3）物镜 安装在镜筒前端物镜转换器上的透镜。利用光线使被检物体第一次造像，因而直接关系和影响成像的质量，对分辨力有着决定性的影响。

物镜的性能可以从物镜外壳上标志着的数值孔径（numerical aperture，简称为 NA）大小来表示。NA 是指物镜前透镜与被检物体之间介质的折射率（ η ）和镜口角（ u ）（图 3）半数的正弦之乘积，可用公式表示： $NA = \eta \cdot \sin u / 2$ 。

数值孔径的大小又是衡量一台显微镜分辨力强弱的依据。分辨力是指显微镜能辨别物体两点之间最小距离的能力。用 δ 表示，其公式如下：

$$\delta = \frac{\lambda}{NA}$$

从公式中可看出，NA 愈大，或观察时所用光波愈短，则分辨力愈大。提高分辨力有下

述措施：

① 选择波长较短的光源，在使用可见光（如卤素灯或钨丝灯）作光源时，可加蓝色滤光片以吸收长波的红、橙光，使波长接近于平均波长（ $0.55\mu\text{m}$ ）。如果使用波长为 $0.27\mu\text{m}$ 的紫外光为光源，其分辨力可提高 2 倍。

② 增大介质的折射率。空气折射率为 1.0，水折射率为 1.33，玻璃折射率为 1.52，香柏油折射率为 1.51。所以在观察细菌形态时，都使用油浸物镜，目的是利用香柏油与玻璃的折射率近似的特性，以减少光线从一介质进入另一介质时产生折射而散失（图 4），可增强视野的亮度和提高分辨力。

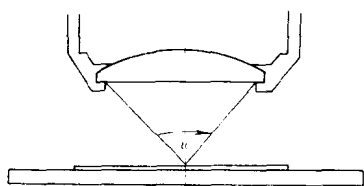


图 3 物镜的镜口角

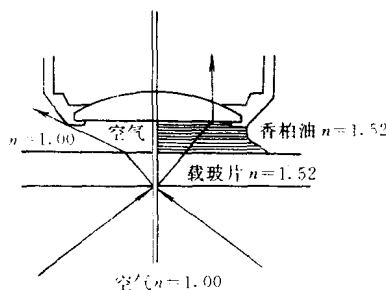


图 4 油浸物镜的作用

左侧为干燥系透镜；右侧为油浸系透镜； n ：折射率。

③ 增大物镜的镜口角，但其极限值最大也难达到 180° ，改良余地很小。

④ 增加明暗反差，使标本的明暗对比增强，这也是提高清晰度的一项措施。

物镜的种类很多，可从不同角度来分类：

根据物镜前透镜与被检物体之间的介质不同，可分为：

① 干燥系物镜 以空气为介质，如常用的 $40\times$ 以下的物镜，数值孔径均小于 1。

② 油浸系物镜 常以香柏油为介质，此物镜又叫油镜头，其放大率为 $90\times-100\times$ ，数值孔径值大于 1。

根据物镜放大率的高低，可分为：

① 低倍物镜 指 $1\times-6\times$ ， NA 值为 $0.04-0.15$ ；

② 中倍物镜 指 $6\times-25\times$ ， NA 值为 $0.15-0.40$ ；

③ 高倍物镜 指 $25\times-63\times$ ， NA 值为 $0.35-0.95$ ；

④ 油浸物镜 指 $90\times-100\times$ ， NA 值为 $1.25-1.40$ 。

根据物镜像差校正的程度来分类可分为：

① 消色差物镜 是最常用的物镜，外壳上标有“Ach”字样，主要可以校正轴上点的位置色差（红、蓝二色）和球差（青光）以及近轴点慧差。镜检时通常与惠更斯目镜配合使用。

② 复消色差物镜 物镜外壳上标有“Apo”字样。除能校正红、蓝、绿三色光的色差外，还能校正黄色光造成的相差。通常与补偿目镜配合使用

③ 特种物镜 在上述物镜基础上，为达到某些特定观察效果而制造的物镜。如：带校

正环物镜；带虹彩光阑物镜；相衬物镜；荧光物镜；无应变物镜；无罩物镜；长工作距离物镜等。目前在研究中常用的物镜还有：半复消色差物镜（FL），平场物镜（Plan），平场复消色差物镜（Plan Apo），超平场物镜（Splan），超平场复消色差物镜（Splan Apo）等。

（4）目镜 目镜的作用是把物镜放大的实像再放大一次，并把物像映入观察者的眼中。目镜的结构较物镜简单，普通光学显微镜的目镜通常由两个透镜组成，上端的一块透镜称“接目镜”，下端的透镜称“场镜”。上下透镜之间或在两个透镜的下方，装有由金属制的环状光阑或叫“视场光阑”，物镜放大后的中间像就落在视场光阑平面处，所以其上可安置目镜测微尺。

普通光学显微镜常用的目镜为惠更斯目镜（Huygens eyepiece），如果要进行研究用时，一般选用性能更好的目镜，如补偿目镜（K）、平场目镜（P）、广视场目镜（WF）。照相时选用照相目镜（NFK）。

（二）光学显微镜的成像原理

显微镜的放大是通过透镜来完成的，单透镜成像具有像差，影响像质。因此由透镜组合起来相当于一个凸透镜，起到放大的作用。图 5 是显微镜的成像原理模式。 AB 为标本→物镜 Lo →目镜 Le →眼睛。 $A''B''$ 和眼点的距离为显微镜的明视距离，它的成像原理是：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。当光线传递到 Le （目镜）时， $A'B'$ 的实像在 $A''B''$ 处被放大成一个直立（相对中间像而言）的虚像，然后传递到视网膜 $A''B''$ 上，标本 AB 就被放大了，人眼看到的 AB 被放大后的虚像 $A''B''$ 与原样品像的方向是相反的。

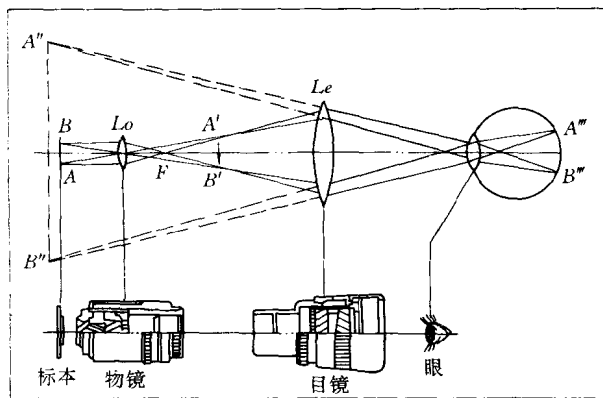


图 5 显微镜的成像原理模式图

二、显微镜的使用操作及注意事项

显微镜结构精密，使用时必须细心，要按下述操作步骤进行。

（一）观察前的准备

1. 显微镜从显微镜柜或木盒内拿出时，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。
2. 将显微镜放在自己身体的左前方，离桌子边缘约 10cm 左右，右侧可放记录本或绘图纸。
3. 调节光源 可利用灯光或自然光，但不能用直射阳光，直射阳光会影响物像的清晰，损坏光源装置和镜头并刺激眼睛。

应先用 10×物镜，将聚光器上视场光阑打开到最大位置，用左眼观察目镜中视野的同时，转动反光镜，使视野的光线最明亮最均匀为止。如果靠近光源，或光线较强时，宜用

平面的反光镜，如果光源较远或光线较弱时，宜用凹面的反光镜。

4. 调节光轴中心 显微镜在观察时，其光学系统中的光源、聚光器、物镜和目镜的光轴及光阑的中心必须跟显微镜的光轴同在一直线上。如具备视场光阑的显微镜，调时先将视场光阑缩小，用 $10\times$ 物镜观察，在视场内可见到视场光阑圆球多边形的轮廓像，如此像不在视场中央，则利用聚光器外侧的两个调整旋钮将其调至中央，然后缓慢地将视场光阑打开，能看到光束向视场周缘均匀展开直至视场光阑的轮廓像完全与视场边缘内接，说明光线已经合轴。

(二) 低倍镜观察 镜检任何标本要养成必须先用低倍镜观察的习惯。因为低倍镜视野较大，易于发现目标和确定检查的位置。

将标本制片放置载物台上，用标本夹夹住，移动推动器，使被观察的标本处在物镜正下方，转动粗调节旋钮，使物镜降至距标本 0.5cm 处，用目镜观察并同时用粗调节旋钮慢慢升起镜筒或下降载物台，直至物像出现，再用细调节旋钮使物像清晰为止。移动标本，找到合适的目的物并将它移到视野中央，进行观察或为下步进行高倍镜观察用。

(三) 高倍镜观察 在低倍物镜观察的基础上转换高倍物镜。在正常情况下，高倍物镜的转换不应碰到载玻片或其上的盖玻片，若使用不同型号的物镜，在转换物镜时要从侧面观察，避免镜头与玻片相撞。然后从目镜观察，调整光亮适度，缓慢调节粗调节旋钮，使载物台上升或镜筒下降，直至物像出现，再用细调节旋钮调至物像清晰为止。找到需观察的部位，并移至视野中心进行观察或准备用油镜观察用。

(四) 油镜观察 油浸物镜的工作距离（指物镜前透镜的表面到被检物体之间的距离）很短，一般在 0.2mm 以内，再加上一般光学显微镜的油浸物镜没有“弹簧装置”，因此使用油浸物镜时要特别细心，避免由于“调焦”不慎而压碎标本制片，使物镜也受到损害。必须按下列步骤操作：

1. 先用粗调节旋钮将镜筒提升（或将载物台下降）约 2cm ，再转换油浸物镜至中央。
2. 在玻片标本的镜检部位滴上一滴香柏油。
3. 从侧面注视，用粗调节旋钮将镜筒缓慢地下降（或上升载物台），使油浸物镜浸入香柏油中，其镜头几乎与标本接触。

4. 从接目镜内观察，放大视场光阑及聚光镜的孔径光阑，上调聚光器，使光线充分照明。用粗调节旋钮将镜筒徐徐上升（此时绝不能将镜筒下降），当出现物像后改用细调节旋钮调至最清晰为止。如油镜已离开油面而仍未见到物像，必须再从侧面观察，重复上述操作。

5. 观察完毕，上升镜筒，转动物镜转换器，使油浸物镜偏位，先用擦镜纸擦去镜头上的油，再用擦镜纸蘸少许乙醚酒精混合液（乙醚 2 份 + 纯酒精 3 份）或二甲苯。擦去镜头上残留油迹，最后再用擦镜纸擦拭一下即可。

6. 将各部分还原，转动物镜转换器，使物镜头不与载物台通光孔相对，而是成八字形位置，再下降至最低，降下聚光器，反光镜与聚光器垂直，用柔软纱布清洁载物台等机械部分，然后将显微镜放回柜内或箱中。

（颜耀祖）

实验二 相衬显微镜的构造和使用

一、相衬显微镜的结构和镜检原理

(一) **相衬显微镜的特点** 相衬显微镜又叫相差显微镜,是一种将光线通过透明标本细节时所产生的光程差(即相位差)转化为光强差的特种显微镜。

人眼只能在光的波长(颜色)和光的振幅(亮度)有变化的情况下,才能在显微镜下看到被检物体的存在。但活的透明的生物体标本,由于它们的各部分结构的透明,折射率的差异并不太大,因此,光的波长和振幅变化不显著,用一般明视场显微镜来观察它们时,标本的细微结构是看不清的。相衬显微镜的特点就是利用光的干涉现象,将人眼不可分辨的相位差转化为人眼可以分辨的振幅差,从而使活体透明标本清晰可见。

(二) **相位和相位差** 光的传播具有波动性,波动的能量以平衡位置为准,以一定的振幅反复振动而前进(图 1a)。光波在传播时,在单位时间内所能达到的位置便是它的相位。如果有 A、B 两束光在不同的介质中传播, A 光束只通过单一介质(空气); B 光束在传播中途还通过一块透明玻璃介质,这样 B 光束便受到玻璃介质的阻力,速度减慢, A 和 B 光束之间便产生一定的相位差别,这个差别就叫相位差(图 1a、b)。

由于光在空气中运动很快,这种相位差是人的眼睛无法分辨的。如果在光传播途中加一块能吸收光的物质(图 1c),那么 C 光束通过这块吸收物质后,它的光强度就要明显减弱,这样 C 光束与明亮的 A 光束比较,就发生明暗的差别,这样就能为人眼所分辨。

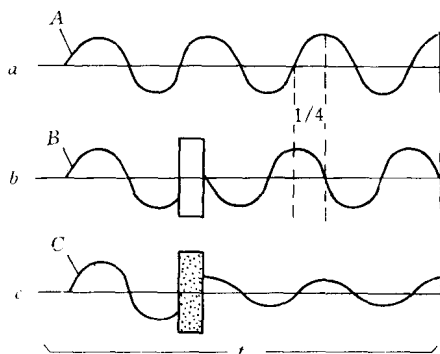


图 1 相位差及振幅的减小示意图

(三) **相衬显微镜的结构和装置** 相衬显微镜与普通光学显微镜的基本结构是相同的,所不同的是它具有四部分特殊结构;即环状光阑、相板、合轴调节望远镜及绿色滤光片。

1. **环状光阑** 具有环形开孔的光阑。位于聚光器的前焦点平面上,光阑的直径大小是与物镜的放大倍数相匹配的,并有一个明视场光阑,与聚光器一起组成转盘聚光器。在使用时只要把相应的光阑转到光路即可。

2. **相板** 位于物镜内部的后焦平面上。相板上有两个区域,直射光通过的部分叫“共轭面”,衍射光通过的部分叫“补偿面”。带有相板的物镜叫相衬物镜,常以“Ph”字样标在物镜外壳上。

相板上镀有两种不同的金属膜:吸收膜和相位膜。吸收膜常为铬、银等金属在真空中蒸发而镀成的薄膜,它能把通过的光线吸收掉 60%—93%,相位膜常为氟化镁等在真空中蒸发镀成,它能把通过的光线相位推迟 1/4 波长。

根据需要,两种膜有不同的镀法,从而制造出不同类型的相衬物镜。如果吸收膜和相