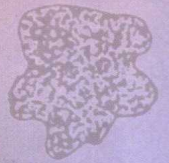




郝林编

食品微生物学 实验技术



中国农业出版社



食品微生物学实验技术

郝 林 编

中 国 农 业 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

食品微生物学实验技术/郝林编. —北京: 中国农业出版社, 2001.5

ISBN 7-109-06871-4

I. 食… II. 郝… III. 食品-微生物学-实验-技术 IV. TS201.3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2001) 第 18375 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 沈镇昭

责任编辑 郑剑玲

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2001 年 6 月第 1 版 2001 年 6 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 10

字数: 224 千字 印数: 1~3 300 册

定价: 18.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

内容提要

本书较系统地介绍了与食品微生物学教学、科研和生产中有关的微生物学实验的基本原理和操作技术,同时还适当介绍了一些与当前生产实践、生物工程有关的新技术。全书共十四章(79个实验),包括显微镜技术、无菌操作技术、染色技术、形态结构观察、培养基制备、消毒灭菌、接种与培养、分离与纯化、生理生化反应、诱变及基因重组育种、食品中微生物学检测、菌种保藏等内容。书后附有常用染色剂、指示剂、试剂、溶液、缓冲液、培养基配方及配制方法。

本书可作为大专院校食品及生物专业的食品微生物学实验课教材,也可作为从事食品微生物学科研和生产的技术人员参考书和工具书。

前 言

人类刚刚迈入 21 世纪，在这个“生物学世纪”中，微生物学将发挥特别重要的作用。从 20 世纪末到新世纪初，在世界范围内出现了许多与人类健康有关的问题，如 AIDS（艾滋病）、O157 大肠杆菌食物中毒、疯牛病、转基因食品、禽流感、口蹄疫等都属于微生物学研究的内容。

食品微生物学作为微生物学的分支学科，它是生物技术在食品工业中应用的主要领域，他直接关系到人类的饮食安全和饮食健康。因此，倍受人们的关注。食品微生物学的研究内容包括：①研究与食品有关的微生物的形态结构特征及生命活动规律；②如何利用有益微生物为人类生产食品；③如何控制有害微生物，防止食品腐败变质；④检测食品中微生物的方法，制定食品中的微生物指标，为判断食品的卫生质量提供科学依据。这些内容的深入研究和解决，除了需要掌握食品微生物学的理论知识外，还必须学习和掌握食品微生物学的实验技术，学会辨别有益的、腐败的和病原的微生物，选育和开发微生物资源，提高原有产品的产量和质量，开发新产品，控制和防止食品腐败变质，杜绝由此引起的食物中毒，为人类提供安全、健康、营养的食品。

当前，我国的食品工业及发酵食品工业的发展十分迅猛，许多大专院校的师生及研究单位和企业的技术人员都在从事这一领域的研究工作，他们迫切地需要一本系统地介绍食品微生物学实验技术的专业书籍。为此，笔者在总结了多年来开设食品微生物学实验课和从事科学研究工作的基础上，参考了国内近年来出版的有关教材和资料，编写出这本书。

由于编写水平所限，本书中难免有错漏和不妥之处，衷心希望读者批评指正。

编 者
2001 年 4 月

目 录

前 言

食品微生物学实验守则	1
------------------	---

第一章 显微镜的使用

2

实验 1.1 普通光学显微镜的使用	2
-------------------------	---

实验 1.2 暗视野显微镜的使用	6
------------------------	---

实验 1.3 相差显微镜的使用	8
-----------------------	---

第二章 原核微生物的形态结构观察

10

实验 2.1 细菌简单染色	10
---------------------	----

实验 2.2 细菌革兰氏染色	11
----------------------	----

实验 2.3 细菌芽孢染色	12
---------------------	----

实验 2.4 细菌荚膜染色	13
---------------------	----

实验 2.5 细菌鞭毛染色及运动性的检查	14
----------------------------	----

实验 2.6 细菌细胞中异染粒的染色观察	15
----------------------------	----

实验 2.7 细菌培养特征的观察	15
------------------------	----

实验 2.8 放线菌的形态及其菌落特征的观察	18
------------------------------	----

第三章 真核微生物的形态结构观察

20

实验 3.1 酵母菌的形态结构观察	20
-------------------------	----

实验 3.2 酵母细胞核的染色	21
-----------------------	----

实验 3.3 酵母菌死活细胞的鉴别	22
-------------------------	----

实验 3.4 霉菌的形态结构观察	23
------------------------	----

实验 3.5 霉菌的琼脂槽培养法染色观察	24
----------------------------	----

第四章 噬菌体

25

实验 4.1 噬菌体的检查	25
---------------------	----

实验 4.2 溶源性细菌的检查和鉴定	27
--------------------------	----

第五章 培养基的配制	29
实验 5.1 普通培养基的配制	29
实验 5.2 几种常用鉴别和选择培养基的配制	30
第六章 消毒与灭菌	33
实验 6.1 加热及紫外线消毒与灭菌	33
实验 6.2 过滤除菌	36
实验 6.3 化学药物消毒与灭菌	39
实验 6.4 玻璃器皿的洗涤、包扎及灭菌	40
实验 6.5 微生物热致死时间及温度的测定	42
实验 6.6 微生物 D 值的测定	43
第七章 微生物的接种与培养	45
实验 7.1 微生物接种方法	45
实验 7.2 好氧性微生物的培养	48
实验 7.3 厌氧性微生物的培养	49
实验 7.4 低温诱导霉菌分生孢子同步生长	52
实验 7.5 乳酸杆菌与酵母菌的透析袋培养	53
实验 7.6 酵母细胞的固定化与酒精发酵	54
第八章 微生物的分离与纯化	57
实验 8.1 乳酸菌的分离	57
实验 8.2 酸乳制品中乳酸菌的分离	58
实验 8.3 醋酸菌的分离	59
实验 8.4 谷氨酸产生菌的分离	60
实验 8.5 己酸菌的分离	62
实验 8.6 枯草芽孢杆菌的分离及初筛	63
实验 8.7 酒曲中酵母菌的分离	64
实验 8.8 啤酒酵母的分离	64
实验 8.9 根霉的分离	65
实验 8.10 黑曲霉糖化酶菌株的分离	66
实验 8.11 柠檬酸产生菌的分离	67
实验 8.12 米曲霉的分离	67
实验 8.13 噬菌体的分离与纯化	68
第九章 细菌的生理生化反应	71
实验 9.1 细菌对生物大分子的分解利用试验	71

实验 9.2 细菌对含碳化合物的分解利用	73
实验 9.3 细菌对含氮化合物的分解利用	75
第十章 真菌的生理生化反应	78
实验 10.1 酵母菌糖类发酵试验	78
实验 10.2 酵母菌碳源同化试验	79
实验 10.3 酵母菌氮源同化试验	80
实验 10.4 酵母菌产酯试验	80
实验 10.5 酵母菌发酵力的测定	81
实验 10.6 酵母菌耐酒精能力试验	83
实验 10.7 酵母菌凝集力的测定	83
实验 10.8 营养成分对霉菌生长速率的影响	84
实验 10.9 根霉产酸试验	85
第十一章 微生物生长与环境条件	86
实验 11.1 血球计数板法测定微生物生长	86
实验 11.2 种曲孢子数的测定	88
实验 11.3 微生物细胞大小的测量	89
实验 11.4 细菌生长曲线的测定	90
实验 11.5 重量法测定微生物生长	91
实验 11.6 环境因素对微生物生长的影响	92
第十二章 微生物的育种	97
实验 12.1 诱变育种的基本程序及操作要点	97
实验 12.2 紫外线诱变最适剂量的测定	103
实验 12.3 高产蛋白酶曲霉的选育	105
实验 12.4 营养缺陷型突变株的筛选	107
实验 12.5 抗噬菌体菌株的选育	109
实验 12.6 酵母菌细胞原生质体融合	110
实验 12.7 电诱导酵母菌与短梗霉属间融合	113
第十三章 环境及食品中的微生物学检测	115
实验 13.1 空气中微生物的检测	115
实验 13.2 水及食品中微生物的检测	116
实验 13.3 调味品中微生物的检测	122
实验 13.4 发酵食品生产过程中的微生物学检测	123

第十四章 菌种保藏	130
实验 14.1 常用简易保藏法	130
实验 14.2 冷冻真空干燥保藏法	132
实验 14.3 液氮超低温冷冻保藏法	134
实验 14.4 厌氧性细菌保藏法	135
实验 14.5 噬菌体保藏法	136
附录一 常用染色液、指示剂及试剂的配制	138
附录二 溶液及缓冲液的配制	141
附录三 常用培养基配方及配制	143
参考文献 ...	

食品微生物学实验守则

为了使实验顺利进行，根据微生物学的特点，提出以下要求：

1. 进入实验室，应保持肃静，不可随便吃东西，禁止吸烟、用嘴湿润标签或铅笔等物。
2. 每次实验前认真预习实验指导及课堂讲授的内容，明确实验的目的、原理和方法步骤及操作中的注意事项。
3. 实验中严格遵守实验要求及操作规程，认真操作，培养从事科学研究工作的严谨态度。
4. 按时观察实验结果，以科学的态度认真填写实验报告，力求简明准确、字迹清楚、绘图真实。
5. 保持实验室的整洁，勿将用过的培养物、废纸、废液等随便乱扔，要放在指定地点。如有菌液污染桌面或地面时，应该用 75% 酒精或 5% 石炭酸或 3% 来苏尔溶液覆盖 0.5h 后才能擦去。如果不慎吸入菌液或划破皮肤应立即向教师报告，不得擅自处理。
6. 实验用过的菌种以及带有活菌的各种器皿，应先经高压灭菌后才能洗涤。制片上的活菌标本应先浸泡于 3% 来苏尔溶液或 5% 石炭酸溶液覆盖 0.5h 后再行洗刷。如系芽孢杆菌或有孢子的霉菌，则应延长浸泡或覆盖时间。
7. 在使用仪器、设备及玻璃器皿时，要认真小心，轻拿轻放，如有损坏，须做好登记。
8. 实验完毕，应将仪器用具等放回原处，擦净桌面，收拾整齐，然后用肥皂洗手，离开实验室前注意关好门、窗、灯、火、水、煤气等。

第一章

显微镜的使用

微生物的个体微小，必须借助显微镜才能看到。因此，学会使用显微镜对学习微生物学和从事微生物学的科研和生产都是十分重要的。

显微镜可分为普通光学显微镜、相差显微镜、暗视野显微镜、紫外光显微镜、偏光显微镜、荧光显微镜和电子显微镜等不同类型。

本章着重介绍普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜和荧光显微镜的结构原理和使用方法。

实验 1.1 普通光学显微镜的使用

一、目的

了解显微镜的结构及油浸镜的工作原理，学会正确地使用显微镜，并用油浸镜观察细菌形态。

二、材料

普通光学显微镜、香柏油、二甲苯、擦镜纸、金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌的染色涂片。

三、普通光学显微镜的构造

显微镜是一种高度放大的光学仪器，它的种类很多，根据实验目的不同，可分别选用普通光学显微镜、相差显微镜、暗视野显微镜、偏光显微镜、荧光显微镜及电子显微镜。在微生物一般形态的观察中，普通光学显微镜最为常用，它的主要构造包括机械和光学两部分。普通光学显微镜的构造如图 1-1 所示。

(一) 机械部分

包括镜座、镜臂、载物台、镜筒、物镜转换器、粗调螺旋和细调螺旋、推进器、聚光器升降螺旋等部件。

1. 镜座 显微镜的基座，用以支撑整个显微镜。

2. 镜臂 携带或移动显微镜的把手，上连镜筒、下连镜座，用以支撑镜筒，与镜座连接处为一关节，可使镜身倾斜。

3. 镜筒 由金属制成的中空圆筒，上端放置目镜，下端连接转换器，形成目镜与物

镜间的暗室。

4. 物镜转换器 由两个金属圆盘叠合而成，上有3~4个安装物镜的螺旋口，可依物镜放大倍数高低，顺序安装3~4个物镜。根据需要，可转动转换器将其中的某一物镜和镜筒接通，与镜筒上方的接目镜配合，构成一个放大系统。转换器的两个金属圆盘中，上面那个圆盘的正后方装有一个弹簧舌片，下面那个圆盘侧面与每个物镜相应的位置各有一个小凹缝。转换物镜时，必须使弹簧舌片嵌入此凹缝中，才是达到了正确的位置。

5. 载物台 位于镜筒下方，呈方形，中间有孔可透过光线。台上装有推进器，用以固定或移动标本的位置，使镜检标本恰好位于视野中，有些显微镜无推进器而有一对弹簧夹为固定标本用。

6. 粗调螺旋和细调螺旋 位于镜筒的两旁，粗调螺旋位于细调螺旋的上方。它们可使镜筒升降，目的是使被观察物与物镜的距离恰好等于物镜的工作距离。要使镜筒作较大幅度升降，可用粗调螺旋，要使之作甚微的升降，则用细调螺旋。

细调螺旋每转一圈，镜筒升降 $100\mu\text{m}$ ，很多显微镜的细调螺旋上附有刻度，每转动一小格相当于升降 $2\mu\text{m}$ ，当细调螺旋旋转到极限时，则不应继续用力旋转，而应重新调节粗调螺旋，使物镜与标本距离稍微拉开一些，然后反拧细调螺旋便可将物镜调至最适高度。

7. 聚光器升降螺旋 装在载物台下面的一个可使聚光器升降的部件，用它可以调节反光镜反射出来的光线。

(二) 光学部分

光学部分又可分为照明和放大两个系统，前者包括反光镜、聚光器和虹彩光圈，有的还有特殊的光源部件；后者包括物镜和接目镜。

1. 反光镜 位于显微镜的最下方，有平凹两面，可以自由转动方向，其作用是将投射到它上面的光线反射到聚光器透镜的中央，穿过透镜，照明标本。当外源光线较强时应使用平面反光镜，光线较弱时应使用凹面镜。

2. 聚光器 位于反光镜上方，由一组透镜组成。其作用是将反光镜反射来的光线聚为一束强的光锥于载玻片标本上，聚光器可根据需要上下移动调节，一般用低倍镜时应降低聚光器，用油浸镜时，聚光器应升至最高。

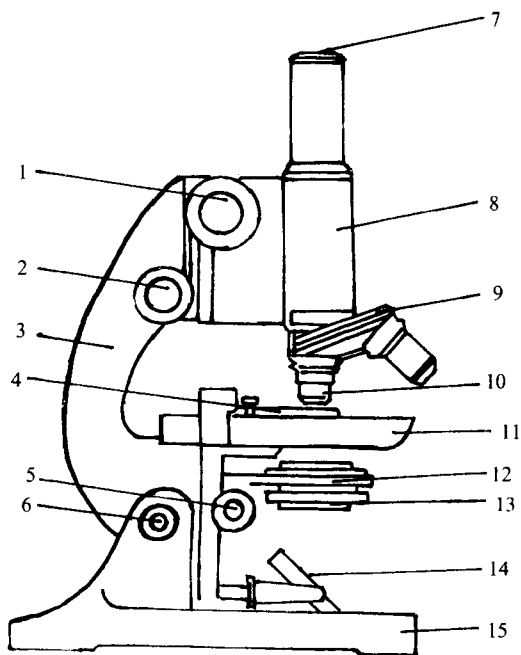


图 1-1 普通光学显微镜的构造

1. 粗调螺旋 2. 细调螺旋 3. 镜臂 4. 推进器
5. 聚光器升降螺旋 6. 倾斜关节 7. 接目镜
8. 镜筒 9. 物镜转换器 10. 接物镜 11. 载物台
12. 聚光器 13. 虹彩光圈 14. 反光镜 15. 镜座

3. 虹彩光圈 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, 推动光圈把手, 可开大或关小, 用以调节射入聚光镜光线的多少, 使照明恰到好处。

4. 接物镜 通常称为镜头, 是显微镜的重要部件, 它不仅放大标本, 而且具有分辨性能。因此, 它决定着显微镜的性能。一台显微镜通常有三个接物镜, 一个是低倍镜 (8~10×), 一个是高倍镜 (40~60×), 这两个都是干燥系接物镜 (干燥系是指接物镜与被检物之间的介质是空气), 第三个接物镜为油浸系接物镜 (90~100×), 简称油浸镜或油镜 (油浸系指接物镜与被检物之间的介质是某种油类物质)。三个接物镜按放大倍数顺序安装在转换器上, 便于依次转换使用。

接物镜的放大率可以直接通过镜头侧面刻有的放大倍数来辨认, 也可由其外形来辨认, 一般低倍物镜较短, 高倍物镜较长, 油浸镜也较长, 接物镜上面带有一圈不同颜色的线作为标记, 使用时一定要识别清楚。

放大倍数越高的接物镜, 它的焦距越小, 工作距离也越小, 也就是说, 在观察时它与被观察物的距离越小。因此, 在使用油浸镜观察时其镜头和玻片极为接近。

5. 接目镜 通常称为目镜, 位于镜筒的上端, 由两块透镜组成, 它只能将接物镜所造成的实像进一步放大形成虚像映入眼部, 不具有分辨性能。接目镜上刻有表示放大倍数的标志, 如 5×、10×、16×。通常每台显微镜都备有几种不同放大倍数的接目镜, 可根据需要选择其中一种使用。有的接目镜为便于指示物像起见, 镜头中装有黑色细丝一条作为指针。

四、显微镜的性能

显微镜的总放大倍数等于物镜放大率和目镜放大率的乘积。但显微镜性能的优劣不只是视其放大倍数的高低, 而更主要的是视其分辨细微结构的能力, 即性能良好的显微镜必须使被观察的物体放大倍数高, 而且清晰。

显微镜分辨细微结构的能力可用分辨率表示, 其能够分辨的细微结构越小, 则分辨率越高。分辨率的高低, 首先取决于物镜的性能, 若设物镜分辨出的物体两点间的最短距离为 D , 则:

$$D = \frac{\lambda}{2NA}$$

式中, λ 为可见光的波长, 平均为 $0.55\mu\text{m}$; NA 为物镜镜口率或称开口率、数值口径。镜口率 NA 是物镜和被检标本间介质的折射率 n 与镜口角 (即入射角 α) 的半数正弦的乘积, 常以下式表示:

$$\text{镜口率 } NA = n \sin \frac{\alpha}{2}$$

所以, D 也可表示为 $D = \frac{\lambda}{2n \sin (\alpha/2)}$

由上可见, 显微镜的分辨率与波长、介质折射率和镜口角 (入射角) 有关。 λ 越大, D 值越大, 分辨率越低; n 和 α 越大, D 值越小, 分辨率越高。因此, 可以通过缩短光线波长, 增大介质折射率和加大镜口角 (入射角) 来提高分辨率。紫外光显微镜和电子显微镜就是利用短波光和电子波来提高分辨率的。但普通光学显微镜用的是可见

光, 波长一定, 平均为 $0.55\mu\text{m}$, 而镜口角是指物镜光轴上的物点发出的光线与物镜前透镜有效直径的边缘所张的角度, 理论上最大为 180° , 故 $\sin(\alpha/2)$ 理论最大值为 1 (实际上镜口角度最大只能为 140°), 因此试图通过缩短波长或提高镜口角来提高光学显微镜的分辨率是有限度的。只有通过提高介质的折射率来提高镜口率, 从而提高其分辨率。在使用低倍镜和高倍镜时, 镜头与玻片标本间的介质是空气, 其折射率是 1, $\sin(\alpha/2) = \sin 70^\circ = 0.94$, 故其镜口率 $NA = 1 \times 0.94$ 。使用油镜时, 镜头与玻片标本间的介质是香柏油, 香柏油的折射率为 1.515, 则其 $NA = 1.515 \times 0.94$, 故油镜的镜口率总是大于低倍或高倍镜的镜口率, 其镜口率最大可达到 1.4, 所以油镜的分辨率比低倍镜或高倍镜要高的多。例如, 在可见光照射下, 用镜口率 1.25 的油镜 (一般油镜的镜口角半数的正弦为 0.81), 能分辨出物体两点间的最短距离 $D = 0.55 / (2 \times 1.25) = 0.22\mu\text{m}$ 。而且镜口率为 0.65 的高倍镜, 能分辨出的最短距离 $D = 0.55 / (2 \times 0.65) = 0.42\mu\text{m}$ 。即两点间的最小距离如果小于 $0.4\mu\text{m}$, 在高倍镜下即混为一点, 不可辨晰, 而在油镜下则清晰可见。

使用某一物镜时, 应配合一定镜口率的聚光镜。一般以聚光镜的镜口率大于或等于物镜的镜口率为宜, 否则影响物镜的性能。

由此可见, 显微镜的性能不只是决定于总放大率。一般来说, 显微镜的总放大率应以物镜镜口率的 500~1000 倍为宜, 这个范围内的放大率叫有效放大率。

例如, 用 $NA1.25 (100\times)$ 的物镜, 其有效放大率为 1250, 超过此数叫无效放大率, 虽用 $15\times$ 的目镜可放大 1500 倍, 但对分辨率是没有任何帮助的。

五、显微镜的使用方法

显微镜是光学精密仪器, 使用前要了解显微镜的结构及性能, 然后按下列步骤仔细操作。

1. 取镜 拿取显微镜必须一只手拿着镜臂, 一只手托着镜座, 保持镜座平直, 以防止反光镜及接目镜滑落, 置显微镜于平稳的实验台上。

2. 姿势 镜检者姿势要端正, 一般用左眼观察, 右眼进行绘图和记录, 两眼应同时睁开, 以减少疲劳。

3. 对光 正确的照明是获得良好检查效果的前提条件。晴天对着窗户的散射阳光是很好的光源, 但应避免强烈的直射光, 以防止损坏显微镜的光学系统, 在光线不足时, 可用日光灯或特制的显微镜灯作光源。普通灯泡因有黄色光影响观察, 需在聚光器下加放一块蓝色滤光片。对光的步骤是:

(1) 将低倍镜旋转于镜筒正下方, 调节粗调螺旋, 使镜头和载物台距离约 1cm 左右。

(2) 升聚光器, 使其与载物台表面距离 1mm 左右。

(3) 双眼张开用左眼看目镜调节反光镜镜面角度, 调节光圈, 直至视野内得到最均匀最适宜的照明为止。

一般染色片油镜检查时, 光度宜强, 可将光圈开大, 聚光器上升到最高, 反光镜调至最强。未染色标本, 用低倍镜或高倍镜观察时, 应适当地缩小光圈, 下降聚光器, 使光度减弱, 否则光线过强不易观察。

4. 观察 初学者应先用低倍镜观察，这是因为低倍镜视野的实际范围最大，易于发现目的物，将标本玻片放在载物台上（注意标本朝上），并使标本位于物镜的正下方，转动粗调螺旋，同时从侧面观察，待物镜下降到距标本约 0.5cm 时，开始由目镜观察，同时用粗调螺旋升起镜筒，直到出现物象后，改用细调螺旋，上下微微转动，仔细调节焦距，直至最后获得清晰的物象为止。如此时视野里所观察到的部位不理想时，可利用推进器将最适合的部位移到视野中央。

由低倍镜转换高倍镜观察时，一定要从侧面注视，以防低倍镜未对好焦距而造成镜头与玻片相撞，另外要用手指捏住转换器下面的金属盘使之旋转，而不得用手指捏住物镜来转动，否则长期使用后，会使光轴歪斜。调节光圈和聚光镜，使亮度适中，再仔细转动细调螺旋，调节焦距，获得清晰的物象。

细菌或其他标本的细微结构，都需要用油浸镜观察，由于油浸镜的工作距离很短（0.19mm 左右），故使用时必须特别小心。在低倍镜找到要观察的部位以后，将镜筒升起，在标本上加一滴香柏油，转换油镜头，从侧面注视，用粗调螺旋将镜筒小心下降，使油镜头浸入油滴，直到几乎与标本接触为止（注意切勿压在标本上，以免压碎玻片，甚至损坏油镜头）。从目镜观察，先用粗调螺旋徐徐升起（只准上升镜筒，不能向下调节），当视野中有模糊的标本物像时，改用细调螺旋调节，直到标本物像清晰为止，如转动粗调螺旋已使镜头离开油镜，应重新调节，直至调到看清物像为止。

5. 镜检后显微镜的保养

(1) 油镜使用完毕，先用擦镜纸擦去镜头上的油，再取一张擦镜纸，滴上少量的二甲苯，把镜头上的油擦净，最后再用一张干净擦镜纸将镜头上残留的二甲苯擦净，否则粘固透镜的胶质会被二甲苯溶解，日久镜片易移位脱落。

(2) 下降聚光镜，打开虹彩光圈，使反光镜垂直于镜座，以免积聚灰尘。

(3) 用纱布将显微镜各部位擦净，除去灰尘、油污、水汽，以免生锈长霉。

(4) 使显微镜各部件恢复回原位，转动转换器，使物镜呈“八”字形叉开置于载物台上，然后将显微镜送回箱中。

(5) 显微镜应放在干燥阴凉的地方，不要放在强烈的日光下曝晒，霉雨季节应在显微镜箱内放置干燥剂（硅胶），如长期不用，则光学部分应卸下放在干燥箱中，以免受潮生霉。

(6) 显微镜应严禁与挥发药品或腐蚀性药品放在一起，如碘片、盐酸、硫酸等药品。

实验 1.2 暗视野显微镜的使用

一、目的

了解暗视野显微镜的构造和原理，掌握其使用方法。

二、原理

暗视野显微镜是使用一种特殊的暗视野聚光镜或暗视野聚光器，不让光线直接照射被

检物体并进入物镜，而是使光线只能从周缘进入并会聚在被检物体的表面，利用被检物体表面的反射光线来观察物体的轮廓。暗视野显微镜适合于观察在明视野中不易观察的折射率很强的物体，以及普通明视野显微镜看不到的微小颗粒（ $0.2\sim 0.04\mu\text{m}$ ），如细菌的运动或鞭毛等。

暗视野显微镜有两种主要类型：一种是折射型，即在普通聚光镜放置滤光片的地方放上一个中心有光挡的小铁环就成为暗视野聚光器。另一种是反射型，有不同形式的产品。

三、材料

1. 菌种 枯草芽孢杆菌或大肠杆菌
2. 仪器及其他 普通光学显微镜、暗视野聚光器、显微镜灯、盖玻片（厚度 $1.0\sim 1.2\text{mm}$ ）盖玻片（厚度 $<0.17\text{mm}$ ）、香柏油、二甲苯、擦镜纸等。

四、方法与步骤

1. 安装暗视野聚光器 取下普通聚光器，换上暗视野聚光器，上升聚光器使其透镜顶端与镜台平齐。

2. 调节光源 光源宜强，将光源的光圈开到最大，聚光器光圈调至 1.4。如显微镜本身不带光源，可用显微镜灯，调整好光源和反光镜，使强光束正好落在反光镜中央并反射入聚光器。

3. 制片 取载玻片一块，加一滴幼龄菌液，盖上盖玻片。注意不要有气泡，载玻片和盖玻片应非常清洁，无油脂、无划痕，以免反射光线。

4. 置片 加香柏油于聚光器透镜的顶部，下降聚光器，然后把制片放置在载物台上，并把标本移至物镜下，升高聚光器，使镜油与载玻片背面相接触，避免产生气泡。

5. 调焦和调中 用低镜进行，调节聚光器的高低，最初可出现一个中间有一黑点的光环，再调至成为一个光点，光点愈小愈好。然后用聚光器的调中螺丝进行调节，使光点位于视野的中心，如图 1-2。

6. 用油镜观察 操作方法见实验 1.1 可进一步微调聚光器和反光镜使暗视野照明处于最佳状态，并仔细调节粗、细调节螺旋，使菌体更清晰。

五、记录结果

描述所观察菌体的运动情况。

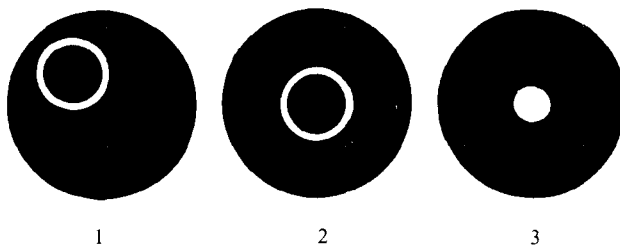


图 1-2 暗视野聚光器的中心调节及调焦

1. 集光器光轴与显微镜光轴不一致
2. 光轴一致，但聚光器焦点与被检物不一致
3. 焦点与被检物一致

实验 1.3 相差显微镜的使用

一、目的

了解相差显微镜的构造和原理，掌握其使用方法。

二、原理

用暗视野显微镜可以看到活菌体的轮廓及运动情况，但看不清细胞的内部结构。用普通光学显微镜观察活细胞时，由于活细胞多是无色透明，光线通过时，光的波长和振幅不发生变化，所以整个视野的亮度均匀，不能分辨细胞内的细微结构，而相差显微镜可以较好地解决这一问题。

相差显微镜的外形和成像原理与普通显微镜相似，不同的是相差显微镜有相差聚光器（内有环状光阑）和相差物镜（内装相板）及调节环状光阑和相板合轴的调整望远镜。

相差聚光器装有一个转盘，内有大小不同的环状光阑，在边上刻有 0、10、20、40、100 等字样，“0”表示没有环状光阑，其他数字表示环状光阑的不同大小，应和相应（10×、20×、40×、100×）相差物镜配合使用。环状光阑是一透明的亮环，光线通过环状光阑形成一个圆筒的光柱。

相差物镜有“ph”或一个红圈，或两者兼有作为标志。相差物镜的内焦平面上装有一个相板，相板上有一层金属物质及一个暗环，不同放大倍数的相差物镜其暗环的大小不同。

相差显微镜利用环状光阑和相板，使通过反差很小的活细胞的光形成直射光和衍射光，直射光波相对地提前或延后 $1/4$ 波长，并发生干涉，使通过活细胞的光波由相位差变为振幅（亮度）差，活细胞的不同构造就表现出明暗差异，使人们能观察到活细胞的细微结构。

相差显微镜可分为正反差（标本比背景暗）和负反差（标本比背景明亮）两类。正反差特别适用于活细胞内部细微结构的观察。

三、材料

1. 菌种 酿酒酵母
2. 仪器及其他 相差显微镜、载玻片（厚约 1mm）、盖玻片（厚度 0.17~0.18mm）、镜油、擦镜纸等。

四、方法与步骤

1. 安装相差装置 取下普通光学显微镜的聚光器和物镜，分别装上相差聚光器和相差物镜。

2. 制片 在洁净的载玻片中央加一滴无菌水，从斜面上取一环酵母置水滴中轻轻混合，盖上盖玻片；若是液体培养物，则可先将其摇匀，然后用滴管吸取后加一滴于载玻片