

高等学校教材

供 医 学 、 药 学 及 护 理 专 业 用

实验微生物学

许国强 主编



河南大学出版社
HENAN UNIVERSITY PRESS

高等学校教材

供医学、药学及护理专业用

实验微生物学

主 编 许国强
副主编 孙会升 黄红莹
裴景堂
编 者 (以姓氏笔画为序)
孙会升 刘英杰
许国强 杜耀武
黄红莹 裴景堂



河南大学出版社
HENAN UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

实验微生物学/许国强主编. —开封:河南大学出版社, 2006. 12

ISBN 7-81091-511-8

I. 实… II. 许… III. 微生物学-实验-高等学校-教材 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 089027 号

责任编辑:薛建立

封面设计:马 龙

出版发行 河南大学出版社

地址:河南省开封市明伦街 85 号 邮编:475001

电话:0378-2825001(营销部) 网址:www.hupress.com

排 版 河南第一新华印刷厂

印 刷 河南省诚和印制有限公司

版 次 2006 年 12 月第 1 版 印 次 2006 年 12 月第 1 次印刷

开 本 787mm×1092mm 1/16 印 张 10.25

字 数 243 千字

印 数 1—3000 册

ISBN 7-81091-511-8/Q·18

定 价 16.00 元

(本书如有印装质量问题请与河南大学出版社营销部联系调换)

前 言

根据教育部新的教育精神,医药专业的培养目标是培养我国卫生事业发展需要的,具有扎实的基础理论、基本知识和基本技能的,有初步独立工作和科研能力的,有较强的创新精神和实践能力的,素质较高的应用型医药高级专门人才。微生物学实验技术为微生物学的创建和快速发展奠定了坚实的基础,也极大地推动了医药专业的发展。目前,微生物学实验技术已广泛地渗透到生命科学的各个领域,不断发挥着它的重要作用。因此,学习掌握微生物学的基本知识和基本技能是保证整体教学水平、提高教学质量、培养医药专业合格人才的重要环节。

随着微生物学的快速发展,实验技术不断更新,为适应学科发展和满足教学的需要,培养学生理论联系实际和独立思考、独立操作能力,提高实验教学质量,我们查阅了大量有关资料,参考兄弟院校相关实验教材,总结吸收多年实验教学经验,结合本学科特点,编写了该《实验微生物学》教材,以配合理论规划教材的使用,供医学、药学及护理本科大学生学习微生物学实验课之用。本教材以“基础性、实用性、科学性和先进性”为原则,共分21章,73个实验项目,每一实验项目包括目的要求、实验原理、材料、方法、结果和思考题等,以利于学生学习使用。本教材是医学、药学及护理专业本科大学生学习微生物学课程的必备工具,使学习效果事半功倍。

学习《实验微生物学》,能使学生了解和掌握微生物学的基本实验技能操作和基本研究方法,同时也能获取相应的感性知识。为了培养学生的思维能力和独立操作能力,在进行综合性、设计性实验课教学时,学生也能利用《实验微生物学》作为工具,顺利地进行实验操作,以节省学生获取知识的时间,我们对每项实验的目的及实际意义都有所交代,对实验结果的观察与分析,也予以必要的辅导。限于教学时数和条件,有些内容可以示教、电视或录像教学方式,以弥补未能亲自操作之不足。有关实验课程的改革设想,仍须不断地接受实践考验,发扬成绩,克服缺点,以便更好地改进提高。

本书通过各位编者的辛勤努力,得到了河南大学医学院、教务处及教材科的大力支持与帮助,也得到了出版社的支持与协助,在此一并表示感谢。

由于编写时间仓促,编者水平和能力有限,恳请各位同行专家及读者提出宝贵意见。

许国强

2006年6月

目 录

第一章 显微镜的使用与维护	(1)
实验一 普通光学显微镜	(1)
实验二 暗视野显微镜	(7)
实验三 荧光显微镜	(9)
第二章 细菌的形态与结构检查	(12)
实验一 细菌不染色标本的检查	(12)
实验二 细菌单染色法	(13)
实验三 细菌革兰染色法	(15)
实验四 细菌的特殊结构染色法	(17)
实验五 其他染色法	(20)
第三章 细菌培养技术	(24)
实验一 常用培养基的制备	(24)
实验二 细菌的接种技术	(27)
实验三 细菌的培养方法	(31)
第四章 细菌的生化反应	(34)
实验一 糖分解与生化反应	(34)
实验二 蛋白分解与生化反应	(36)
第五章 细菌的分布	(39)
实验一 细菌在人体的分布	(39)
实验二 环境中细菌分布的检测	(40)
第六章 消毒与灭菌	(41)
实验一 物理因素对细菌的影响	(41)
实验二 化学因素对细菌的影响	(47)
实验三 生物因素对细菌的影响	(48)
第七章 细菌的遗传与变异	(53)
实验一 细菌变异的现象	(53)

实验二 L 型细菌的检查	(55)
实验三 细菌的基因转移	(56)
第八章 细菌的致病性	(59)
实验一 荚膜的致病作用	(59)
实验二 细菌内毒素的检查——鲎试验	(59)
实验三 破伤风外毒素的毒性作用	(60)
第九章 病原性球菌	(62)
实验一 临床标本化脓性球菌的分离与鉴定	(62)
实验二 葡萄球菌的检查	(63)
实验三 链球菌的检查	(65)
实验四 肺炎球菌的检查	(67)
实验五 脑膜炎球菌的检查	(70)
实验六 淋球菌的检查	(72)
第十章 消化道感染细菌	(74)
实验一 大肠埃希菌	(74)
实验二 沙门菌属	(75)
实验三 志贺菌属	(78)
实验四 粪便标本中致病性肠道杆菌的分离与鉴定	(79)
实验五 霍乱弧菌	(82)
第十一章 厌氧性细菌	(85)
实验一 破伤风梭菌	(85)
实验二 产气荚膜梭菌	(86)
实验三 肉毒梭菌	(87)
实验四 临床标本厌氧菌的分离鉴定	(88)
第十二章 呼吸道感染细菌	(92)
实验一 结核分枝杆菌属	(92)
实验二 白喉棒状杆菌	(95)
第十三章 动物源性细菌与其他细菌	(98)
实验一 革兰氏阴性小杆菌的形态与菌落观察	(98)
实验二 假单胞菌属的检测	(98)
实验三 布鲁杆菌属的检测	(99)
实验四 需氧芽胞杆菌属的检测	(101)

第十四章 螺旋体	(104)
实验一 暗视野观察钩端螺旋体	(104)
实验二 螺旋体染色标本的检查	(105)
实验三 钩端螺旋体的人工培养	(105)
实验四 钩端螺旋体的血清学试验	(106)
实验五 梅毒螺旋体	(108)
第十五章 支原体、立克次体、衣原体	(113)
实验一 支原体的检查	(113)
实验二 立克次体的检查	(114)
实验三 衣原体的检查	(116)
第十六章 真菌的检查	(119)
实验一 真菌的菌落与形态观察	(119)
实验二 浅部感染真菌的检查	(121)
实验三 深部感染真菌的检查	(122)
第十七章 病毒学试验	(123)
实验一 常见病毒学检查方法	(123)
实验二 病毒的分离培养方法	(129)
第十八章 药物的体外抗菌试验	(136)
实验一 液体培养基稀释法测定药物的 MIC(和 MBC)	(136)
实验二 固体培养基稀释法测定药物的 MIC	(137)
第十九章 抗生素的效价测定	(139)
实 验 二剂量法	(139)
第二十章 药品的微生物学检查	(142)
实验一 注射针剂的无菌检查	(142)
实验二 口服药品的细菌总数测定	(143)
实验三 口服药品的霉菌和酵母菌总数测定	(145)
实验四 药品中病原菌的检查	(145)
第二十一章 综合性实验	(149)
实验一 呼吸道标本的细菌检查	(149)
实验二 粪便标本的微生物学检查	(152)

第一章 显微镜的使用与维护

微生物个体微小,肉眼不能直接看到,必须借助于显微镜或电子显微镜放大后才能看到,因此显微镜是微生物实验室必需的基本工具。显微镜的种类很多,根据结构和原理不同,分为光学显微镜和非光学显微镜两类。光学显微镜有普通光学显微镜、倒置显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜、万能显微镜、共聚焦显微镜等不同类型;非光学显微镜是指电子显微镜,还有光电结合的新型显微镜和电视显微镜。在观察细菌形态结构时最常用的是普通光学显微镜。

实验一 普通光学显微镜

一、目的要求

1. 了解普通光学显微镜的结构与作用。
2. 掌握油镜的使用原理及正确的使用方法。

二、材料

1. 器材。普通光学显微镜、香柏油(cedaroil)、二甲苯(dimethylbenzene)、擦镜纸(lens-paper)。
2. 标本。细菌革兰染色标本片。

三、基本结构

普通光学显微镜由机械系统、照明系统和光学系统组成。

(一)机械系统(mechanical system)

机械系统的主要作用是稳定和支持整个镜体,它由镜座(base or foot)、镜臂(arm)、镜筒(tube)、载物台(stage)、物镜转换器(revolving nosepiece)、调焦装置(focusing adjustment)等组成(见图1-1)。

(二)照明系统(illumination system)

照明系统是决定显微镜性能和功能的关键部分,不同显微镜的光源和照明方式亦不同。照明系统由光源、反光镜、聚光器、光栏、滤光片等组成。其作用有二:一是改变入射光的性质,即决定吸收哪些光和透过哪些光;二是改变入射光的强度,即调节光束大小。

显微镜用的照明光源有天然光源和人工光源。天然光源是用较柔和、对人眼睛无损害的太阳光。人工光源采用低压灯泡产生的强光,再通过汇聚透镜加强光的亮度,并使光均匀照射。人工光源中的弧光灯用于暗视野照明,紫外灯用于紫外显微镜,碘钨灯、氙灯、

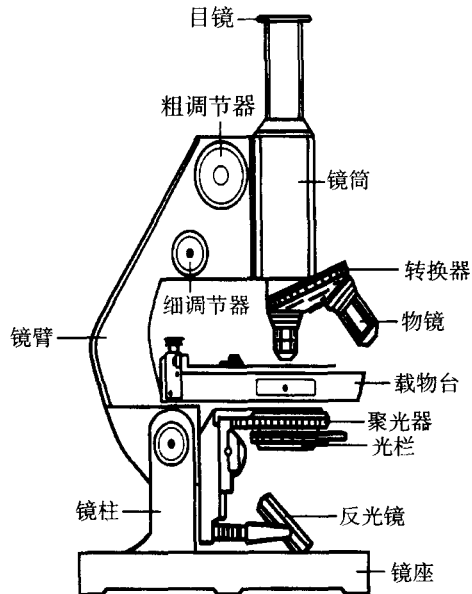


图 1-1 普通光学显微镜的结构

高压汞灯用于荧光显微镜。

反光镜在光栏的下面,是一面为平面、另一面为凹面的双面反射镜,可向各方向转动改变采光的方向。平面镜反射的光较弱,而凹面镜反射的光强度大、亮度高。

聚光器由 1~3 块透镜组成。最上面的一块是平面透镜,其作用是使平行光汇聚在透镜上方 1~2.5mm 处,使光线继续射入物镜的整个镜口角,并可得到均匀的亮度。

光栏装在聚光器下,其作用是控制光束的大小而起调节亮度的作用。有虹彩光栏和转盘光栏两种。前者是由多个半月形的薄金属片重叠镶在圆形框架上,各片之间是活动的,通过把手调节。光栏的中心为透光孔;后者也称环状光栏,是一块设有大小不等环形孔洞的平板,选择不同的孔洞可以控制光量,提供不同亮度,每种环孔与相应的物镜对应使用。

滤光片是用有色玻璃制成,在聚光器的下方,其作用是有选择性地吸收某色光或某种波长的光而透过另一些色光或波长的光,以便产生单色光减少色差。滤光片只是对某种光容易透过,如颜色越深者吸收某种光的能力越强。蓝色滤片透过蓝光而吸收黄光,红色滤片透过红光而吸收蓝光与绿光。

可见光根据波长及颜色的差异分为七种单色光,即红、橙、黄、绿、青、蓝、紫,波长依次为 700nm、650nm、600nm、550nm、500nm、450nm 和 400nm。其中红、绿和蓝三种光组成白光,红与绿组成黄光,红与蓝合为紫光。

各色滤光片具有不同的作用。①红色滤片:透过最多的光是红色,也通过一部分橙黄光,吸收绿、蓝、紫光。②蓝色滤片:用于白炽灯光,吸收黄色光,透过较多的蓝光及少量的青紫光。③黄色滤片:透过较多的黄色和少量的红、橙和绿光。④绿色滤片:使绿和黄色光通过,透过绿色较多,吸收蓝紫光和红光。⑤乳白色滤片:用于强光光源,降低光的亮

度,使光线变柔和,不刺激眼睛,有利于观察细微结构。

(三) 光学系统(optical system)

显微镜的好坏主要取决于光学系统,它起到所观察的样品在显微镜中成像的作用。主要由目镜和物镜组成。

1. 目镜(ocular eyepiece)

(1)组成:目镜由两块透镜(lens)组成,上面与眼接触的一块叫接目镜,下面一块靠近视野的叫视野透镜。上、下透镜之间有一个金属圆环为光栏,物镜在这个光栏面上成像。在光栏上可安装目镜测微尺(micrometer),有时可将毛发粘在光栏上,作为指针,指示物象。

(2)作用:目镜的作用是把物镜所放大的像再放大一次;校正物镜预留下来的相差;将物像投射到一定位置上,便于放映或照相。

(3)放大倍数:显微镜的目镜上刻有 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 等字样表示不同的放大倍数。低倍目镜的视野深度和视野面积都比高倍目镜大,故常先用低倍镜来寻找载片上的目标。

2. 物镜(objective)(显微镜最重要的部分)

(1)组成:物镜由多块透镜组成,光线经过透镜时,通过中轴像和通过边缘的像不在同一平面上,而使成像不清,称为像差(spherical aberration)。此外,各色光的折射率不同也引起成像不清楚,称为色差(chromatic aberration)。利用几种球面和光学特性不同的玻璃制成的透镜来组成接物镜就可以消除像差和色差。物镜按色差分为四种:消色差物镜(achromat, Ach)、复消色差物镜(apochromat, Apo)、平场消色差物镜(achromattic aplanatic)和平场复消色差物镜(apochromat aplanatic)。消色差物镜是目前最常用的一种,质量最高的物镜为平场复消色差物镜。

(2)作用:对被检物体做第一次放大,形成倒立的实像并将放大像投射到目镜光栏处。

(3)放大倍数:物镜具有一定放大率,其放大率和透镜焦距成反比。通常显微镜上备有3~4个放大率不同的物镜,其放大倍数分别为4~10倍(低倍镜)、40倍(高倍镜)、100倍(油镜)。标本的放大主要靠物镜。

(4)符号:在物镜侧面刻有一些符号,如10/0.30,表示放大10倍,NA=0.30。40/0.65,表示放大40倍,NA=0.65,为消色差物镜。100/1.25oil,表示放大100倍,NA=1.25,为消色差油镜。Plan 16/0.35、160/-,表示放大16倍,NA=0.35,平场消色差物镜,镜筒长度160mm,斜线下方为一短横线,无数字,表示对盖玻片厚度要求不严格;如果是160/0.17,则表示镜筒长度160mm,盖玻片的厚度应为0.17mm或小于0.17mm(见图1-2)。

四、基本原理

(一) 成像原理(mechanism of imagery)

由光源发出的光线至聚光镜,汇聚到被观察的标本片上,使标本得到足够的照明。由标本所透射的照明光线经物镜进入,使光轴倾斜 45° 角,在目镜的视场光栏处形成倒立、放大的实像(物镜对标本的第一次放大)。该实像经过接目镜再次放大,进入人的眼睛,通

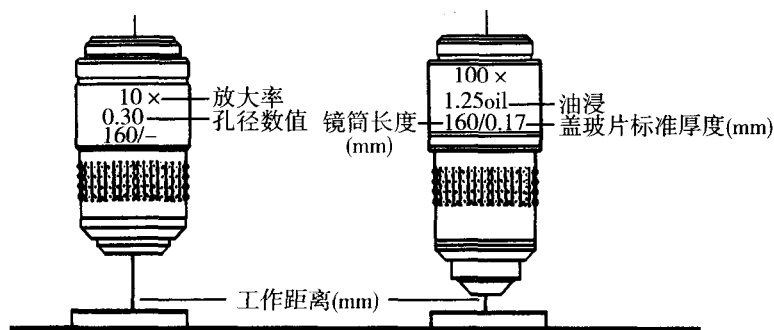


图 1-2 物镜

过眼睛所观察的是物体放大而清晰的虚像(离开眼睛 250mm)。普通光学显微镜的成像原理如图 1-3 所示。

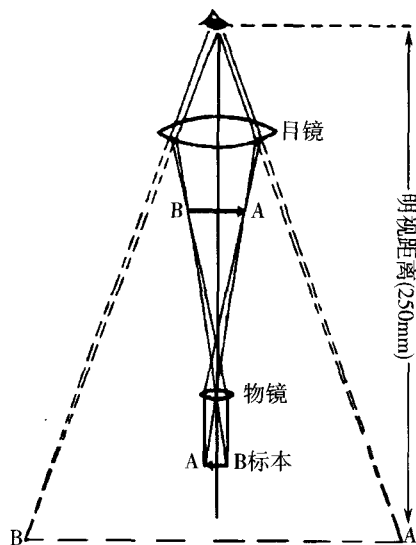


图 1-3 普通光学显微镜成像原理

(二) 分辨力 (resolving power)

人的眼睛对物体的分辨力仅 $250\mu\text{m}$ (0.25mm), 多数球菌直径大约为 $0.5 \sim 2\mu\text{m}$, 杆菌长约 $1 \sim 5\mu\text{m}$ 、宽 $0.3 \sim 1\mu\text{m}$ 。观察细菌时, 要选择分辨力至少为 $0.5\mu\text{m} \times 1000$ 倍的油镜头。评价显微镜质量的好或差, 不仅要看放大倍数, 更重要的是看分辨力。

分辨力是指显微镜分辨两个物体之间最短距离的能力。以 R 表示, 分辨距离越短 (R 值越小), 显微镜的分辨能力就越高,

$$R = 0.16\lambda / \text{NA}, \text{NA} = n \times \sin(\alpha/2).$$

公式中 λ 为入射光波长, NA 为物镜数值孔径 (numerical aperture, NA), n 为物镜与标本之间介质的折光率 (refractive index), α 为光线进入物镜的最大镜口角。由于 λ 与 α 一般不会改变, 因此折光率 n 对显微镜分辨力影响很大。油镜的透镜小, 观察时由于聚光器聚集的光源通过载玻片经空气进入物镜头时, 空气的折光率 ($n = 1.0$) 与玻片折光率 ($n =$

1.52)不同,产生折射,降低了显微镜的分辨率。使用油镜时,在油镜头与标本片之间滴加香柏油($n=1.515$),使之与玻片的折光率趋向一致,减少了折射,增加了视野亮度,提高了分辨力(见图1-4)。

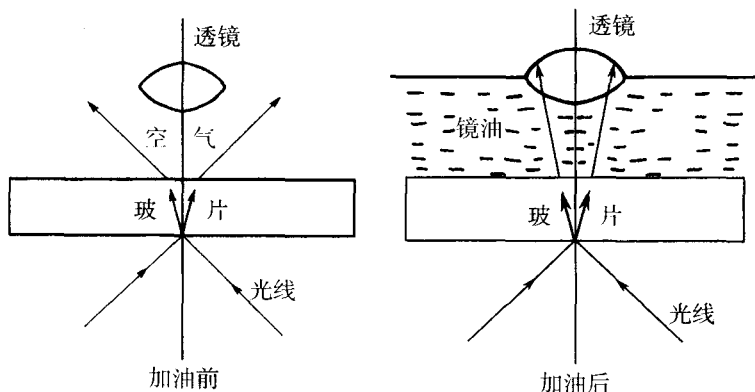


图1-4 油镜原理

(三) 放大倍数或放大率 (magnification)

放大率是眼睛看到物像的大小与对应标本大小的比值,放大倍数是指长度而不是指面积与体积。

目镜放大倍数 = (明视距离) / f_{mm} (目镜焦距)

物镜放大倍数 = (光学筒长) / f_{mm} (物镜焦距)

显微镜总放大倍数 = 物镜放大倍数 $\times$ 目镜放大倍数

明视距离是指从眼球晶状体到目镜所放大的虚像之间的距离,一般为250mm。

光学筒长是指物镜上下焦点平面之间的距离。光学筒长的长度随机械筒长及物镜筒长而不同,光学筒长略小于机械筒长,一般为长的。仪器上所注数字一般是指机械筒长。

(四) 焦点深度 (depth of focus)

焦点深度是指显微镜通过调焦看标本的某一点时,不仅这一物点,而且它的上下两侧也能看清楚,能看清楚这两侧之间的厚度。物镜的放大倍数越大,焦点深度越小。

(五) 视野 (visual field)

视野是指所看到的被检标本的范围。视野的大小与总放大倍数成反比,即放大倍数越大,视野越小。

(六) 工作距离 (working distance, WD)

工作距离是指观察标本最清晰时,物镜透镜的下沿与标本之间或与盖玻片之间的距离。物镜的放大倍数越高,其工作距离越短。油镜的工作距离最短,约为0.2mm,故用油镜时,要求盖玻片的厚度为0.17mm。

五、使用方法

(一) 正确放置

双手托持显微镜,平稳地放在自己面前的实验台上,镜座距实验台边缘约5cm。勿使

镜臂倾斜,避免油滴外溢,影响观察。

(二)调节照明

1. 带内光源的显微镜:当显微镜自身带有安装在镜座内部的灯泡作为光源时,首先接通电源,取下目镜,直接向镜筒内观察,并调节聚光镜上的孔径光栏,使其孔径与视野恰好一样大或略小于视野,其目的是使入射光展开的角度与物镜的数值口径相一致,充分发挥物镜的分辨力以及能挡住超过该物镜可能接受的多余光。放回目镜,调节聚光镜上的视场光栏或调节灯泡亮度。

2. 反光镜采光:不带电源的显微镜,使用反光镜采集自然光或灯光作为照明光源时,应根据光源的强度及所用物镜的放大倍数选用凹面或平面反光镜。人工光源或光量不足时用凹面镜,自然光线用平面镜。显微镜不能采用直射阳光,晴天可用近窗的散射光作光源或用日光灯作光源。

(三)调节光圈

把聚光器升到最高位置,光圈完全打开,增大射入光线的强度。

(四)放置标本

将标本片固定在载物台上,先用低倍镜调至视野最亮。因标本染色后有红或紫颜色,故可先看清颜色,再观察标本,找到适宜视野后再换油镜。如果显微镜是双筒目镜,应先调节目镜的焦距,而左目镜上一般配有屈光度调节环,可适应眼距不同或两眼视力有差异的不同观察者。

(五)油镜标志

油镜镜头入光孔径最小,油镜头上缘一般刻有蓝色或黑色圆圈,标有 100 倍或 oil 字样。

(六)换用油镜

先在标本片上的预检部位加镜油(香柏油)一滴,眼睛从镜筒侧面注视油镜头,小心转动粗调节器,使载物台缓慢上升,镜头浸入油中至几乎与玻片接触为止,且勿使两者相碰,以免压坏镜头或玻片。

(七)观察标本

用目镜观察标本,仔细转动粗调节器,升高载物台。当见到模糊像时,再用细调节器上下调节,直到物像清晰为止。观察标本时,不论是单目镜或双目镜均应两眼同时睁开,以减少眼睛疲劳,左眼用于窥镜,右眼用于观看绘图和记录实验结果。

(八)擦拭镜头

镜检完毕,降下载物台,取下标本片,擦拭油镜头三次,先用擦镜纸轻轻顺一个方向擦去镜油,再在干净的擦镜纸上滴少许二甲苯擦拭,并随即用干净的擦镜纸擦去残存的二甲苯,以防其腐蚀镜片。

(九)用后处置

转动旋转盘,将物镜摆成低倍镜向前、高倍镜与油镜各向两侧的位置;下降聚光器,关闭光圈,亮度调节至最小,关闭电源,拔下电源插座;擦掉载物台上的油,罩上镜套,双手托持显微镜,放回原处;登记使用前后情况,签名;在标本片上滴加少许二甲苯,用吸水纸吸去镜油和二甲苯(勿用擦镜纸)。

六、注意事项

1. 显微镜是贵重精密仪器,使用时要精心保护,不得随意拆散和碰撞。
2. 取送显微镜时应轻拿轻放,双手托持,右手持镜臂,左手托镜座,平端于胸前。
3. 显微镜的细调节器是精密脆弱的部分,只能做有限的旋转,当旋转感到有阻力时则表明已达极限,决不能再继续向此方向旋转,必须立即向反方向旋转退回。
4. 油镜用完后一定要擦拭,以防油干影响其使用效果和寿命。
5. 使用油镜时一定要等标本干后才能加香柏油,滴油时避免形成气泡。
6. 显微镜应放置在背阴干燥处,以防止潮湿生霉,影响使用寿命。

七、思考题

1. 怎样调节光线、螺旋,才能使视野清晰,物像清楚?
2. 油镜有哪些标志?
3. 油镜用毕后,为什么必须把镜油擦净?用过多的二甲苯擦镜头有何危害?
4. 使用油镜时,为什么选用香柏油作为物镜与玻片间的介质?是否可以用液体石蜡代替香柏油?
5. 观察标本时,用左眼还是用右眼或两眼都睁开?
6. 一台好的显微镜的关键部件是什么?怎样确定其质量优劣?

实验二 暗视野显微镜

暗视野显微镜是根据丁大尔(Tyndall)现象原理设计的显微镜,与普通光学显微镜不同之处是使用一种特殊的暗视野聚光器。暗视野显微镜具有较高的分辨力,它主要用于观察未染色的活体细菌、螺旋体等微生物。

一、目的要求

1. 了解暗视野显微镜的结构与原理。
2. 掌握暗视野显微镜的使用方法。
3. 熟悉在暗视野显微镜下观察细菌的动力。

二、材料

1. 菌种:大肠埃希菌培养物。
2. 器材:普通光学显微镜、暗视野聚光器、显微镜灯。

三、基本结构

暗视野显微镜与明视野显微镜在结构上的主要区别在于聚光器的不同。暗视野聚光器有折射型和反射型两种。折射型只要在普通聚光器放置滤光片的位置放上一个中央挡光板就成为一个暗视野聚光器(见图1-5)。反射型聚光器有不同类型(见图1-6)。

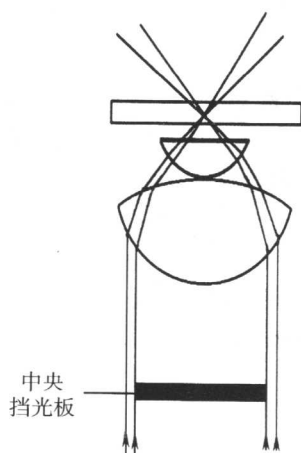


图 1-5 折射型聚光器

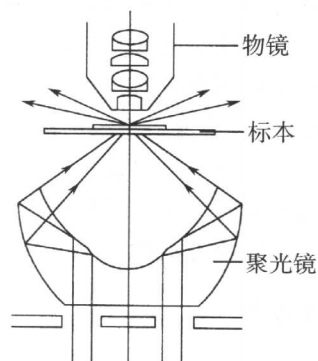


图 1-6 反射型聚光器

四、基本原理

暗视野显微镜的主要原理是使来自反光镜的中央光线不能直接上升进入物镜,所以视野背景是黑暗的。从聚光器的周缘斜射到细菌等标本上的光线,由于物体反射或衍射的散射光进入物镜内,其结果是:整个视野黑暗,菌体则发亮。该原理类似暗室内透入一线强光,在光线所经之处可看到空气中的尘埃发出亮点,用这种方法可以分辨小到 $0.04\mu\text{m}$ 的超微粒子(小于 $0.1\mu\text{m}$ 的粒子)。而明视野显微镜最多能分辨 $0.2\mu\text{m}$,小于 $0.2\mu\text{m}$ 的物体,则不能分辨。暗视野显微镜仅能看到菌体的轮廓,而看不到内部结构(见图 1-7),故常用于确定生物体的存在,观察未染色标本中的细菌、霉菌等,观察细菌的运动。

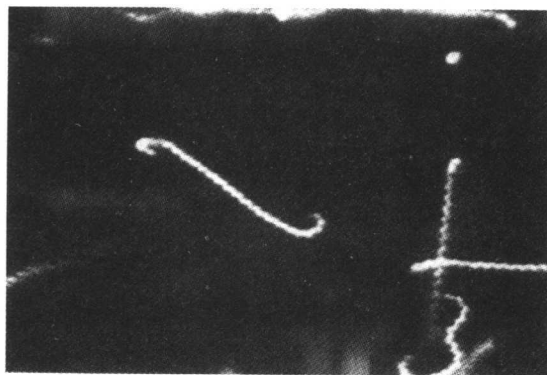


图 1-7 暗视野显微镜下钩端螺旋体

五、使用方法

(一) 安装

取下普通光学显微镜的聚光器,换上暗视野聚光器。转动螺旋上升聚光器。

(二) 调光

光源要强,把聚光器上的光栏开到最大,聚光器上的光栏调至 1.4。

(三) 制片

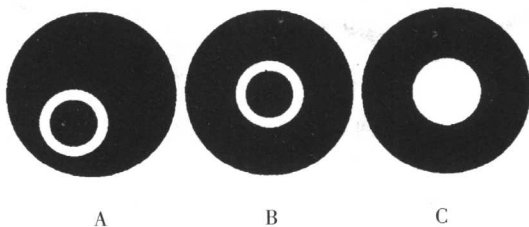
取一滴大肠埃希菌菌液,滴到洁净的载玻片上,放上盖玻片,不要有气泡出现。

(四) 置片

在暗视野聚光器的镜头上加香柏油,下降聚光器,将标本玻片固定在载物台的移动器上,并将被检部分置于载物台通光孔中央,转动旋钮上升聚光器,使镜油与载玻片底面相接触。

(五) 调中

使用低倍物镜,转动聚光器升降螺旋,调节聚光器的高低,可出现一个光环,最后出现一个光点,光点越小越好。然后用聚光器的调中螺丝进行调节,使光点居中(见图 1-8)。



A. 聚光镜光轴与显微镜光轴不一致 B. 聚光镜的焦点没落在标本上 C. 聚光镜焦点落在标本上

图 1-8 光轴调节

六、注意事项

1. 聚光器光轴与显微镜光轴必须在一直线上(合轴)。
2. 聚光器与载物片底面、盖玻片与油镜之间应充满香柏油,不能含有气泡。
3. 暗视野显微镜观察标本所用的载玻片要求厚度一般为 1.0mm,盖玻片厚度不超过 0.17mm。如过厚,标本则不能恰好位于聚光镜焦点上,使物体成像不清晰。
4. 制作标本时,菌液不应太稠,否则由于细菌过多只能见到一片亮光。如过稠可用生理盐水稀释。

七、思考题

1. 暗视野显微镜与普通光学显微镜有何区别?
2. 在微生物学研究中,常用暗视野显微镜观察细菌的何种结构?

实验三 荧光显微镜

某些物质受紫外线照射后可发生荧光,这种物质称为荧光物质。细胞内的维生素、脂褐素、核黄素等为天然荧光物质,还有些细胞成分虽然不是荧光物质,但可与某些荧光物质,如酸性品红、甲基绿等结合,经紫外线照射后发出荧光。

荧光显微镜是利用一定波长的光使样品受到激发,产生不同颜色的荧光,再通过物镜

和目镜的放大作用观察和分辨微生物的细胞和细胞内的某些物质及其性质的一种显微装置(见图 1-9)。

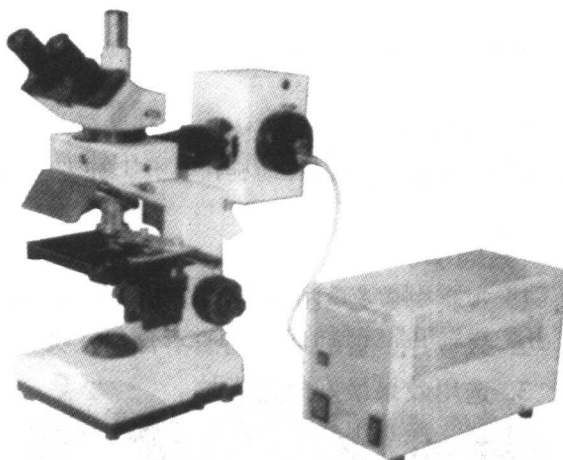


图 1-9 荧光显微镜

一、目的要求

1. 熟悉荧光显微镜的结构与原理。
2. 了解荧光显微镜的使用方法。

二、主要结构

荧光显微镜与普通光学显微镜的结构主要区别有三点:

1. 荧光光源。在荧光显微镜中经常使用 100 ~ 200W 的高压汞灯作为光源。在通电后 10s 能使水银蒸气发光, 15s ~ 1min 光度稳定, 可连续使用 24h 以上。该灯放出光的波长主要在 365nm 与 435nm 之间, 有丰富的紫外光与蓝紫光。根据所用荧光素不同, 选择所用的光源。

2. 三组滤镜。(1) 激发滤镜: 位于光源与反射镜之间, 其作用是吸收可见光, 产生单色光源, 只允许一定波长的紫外光和紫蓝光通过, 成为激发光源。

(2) 吸热滤镜: 位于光源与激发滤镜之间, 作用是吸收光源发出的热量。

(3) 阻断滤镜: 位于目镜与物镜之间, 作用是吸收未被标本吸收的紫外线和紫蓝光, 以保护观察者的眼睛; 吸收激发光源而使某段光波通过, 形成单一性荧光。

3. 聚光系统和反射镜均采用特制的石英玻璃和表面镀铝的反射镜, 因它不吸收紫外线, 而可见光和紫外线均能较好地通过和反射, 使激发光的强度不受损失。

三、基本原理

聚光器汇聚荧光显微镜光源发出的激发光(通常是紫外光、蓝紫光), 通过激发滤镜后, 滤除比紫外光长的波长, 只允许一定波长的紫外光和蓝紫光通过并到达已被荧光染色的被检标本上, 从而使标本内的荧光物质被激发辐射出比紫外光的波长较长的荧光(蓝紫