

# 发酵微生物学实验技术

The background of the cover is a light green color. It features a large, stylized white silhouette of a microscope, positioned on the right side and pointing towards the left. Scattered throughout the green background are numerous small, white, circular and irregular shapes, which represent various types of microorganisms, such as bacteria and fungi, in different stages of growth or division.

江苏省调味副食品科技情报站

## 序

发酵微生物是一门实践性很强的应用科学，只懂得书本知识不会动手是学不好这门课程的。随着微生物学的理论和技术的发展，许多从事发酵和酿造工业的同志迫切需要微生物学实验技术书籍，本书就是为此目的编写的。

本书分十一章，共有96项实验。实验内容大多数是属于微生物试验的基本操作，有的实验属于研究性质或是提高性质的。

该书编写的特点是在每一章的实验项目前，围绕这些实验技术，论述了有关的基本概念，基本理论，操作要领。並进行了表格形式的小结，每段论述中都配有图表和一些图片，部分为作者自摄以利于读者对论述的理解，仿照图片去对照实践。

通过该书的学习能识别常见的微生物。能掌握分离，纯化培养，选育技术；对一般微生物的生理能进行特性测试，并能掌握显微摄影技术及与微生物学实验密切有关的试验室常见常用的单元操作技术。

本书在选材上注意了更新，特别是对一些新概念，新技术，着重作了介绍，但由于水平所限，谬误之处在所难免，恳切期望广大读者提出宝贵意见。

诸 葛 健

# 发酵微生物学实验技术

## 目 录

第一章 显微技术 .....	( 1 )
一、显微镜的种类和特点 .....	( 1 )
(一)明视野光学显微镜 .....	( 1 )
实验一 明视野显微镜的使用 .....	( 3 )
(二)其它光学显微镜 .....	( 5 )
实验二 暗视野显微镜的使用 .....	( 5 )
实验三 相差显微镜的使用 .....	( 6 )
(三)电子显微镜 .....	( 7 )
二、显微摄影 .....	( 9 )
实验四 显微摄影和菌落摄影 .....	( 11 )
第二章 微生物基本形态及其观察 .....	( 14 )
一、细 菌 .....	( 14 )
实验五 细菌的形态观察 .....	( 19 )
二、放线菌 .....	( 22 )
实验六 放线菌的形态观察 .....	( 24 )
三、噬菌体 .....	( 24 )
实验七 噬菌体的分离与纯化 .....	( 26 )
四、酵母菌 .....	( 27 )
实验八 酵母菌细胞形态的观察 .....	( 32 )
实验九 酵母菌巨大菌落的观察 .....	( 33 )
五、小型丝状真菌 (霉 菌) .....	( 33 )
一、藻状菌(主要指根、毛霉) .....	( 34 )
实验十 根、毛霉的形态观察 .....	( 36 )
二、曲 霉 .....	( 36 )
三、青 霉 .....	( 38 )
实验十一 曲霉、青霉的形态观察 .....	( 38 )
四、其它霉菌 .....	( 39 )
六、食用真菌 .....	( 40 )
实验十二 平菇的瓶栽 .....	( 42 )
第三章 微生物细胞一般结构与特殊结构的观察 .....	( 43 )
一、染色技术 .....	( 43 )

(一)染色的基本原理 .....	(43)
(二)染料 .....	(43)
实验十三 革兰氏鉴别染色法 .....	(46)
二、细胞内部结构成分的观察 .....	(50)
实验十四 细胞壁的制备及观察 .....	(50)
实验十五 细胞荚膜的观察 .....	(52)
实验十六 结菌鞭毛的观察 .....	(53)
实验十七 微生物细胞核的观察 .....	(54)
实验十八 异染颗粒的观察 .....	(56)
实验十九 酵母细胞内脂肪和肝糖颗粒的观察 .....	(57)
实验二十 酵母液泡和线粒体的提取 .....	(57)
三、芽孢、子囊孢子和假菌丝的观察 .....	(59)
(一)芽孢 .....	(59)
实验二十一 细菌芽胞形成及发芽的观察 .....	(62)
(二)酵母子囊孢子 .....	(63)
实验二十二 酵母子囊孢子的形成及观察 .....	(70)
(三)酵母假菌丝 .....	(71)
实验二十三 酵母假菌丝的观察 .....	(72)
第四章 微生物纯培养技术 .....	(72)
一、消毒与灭菌 .....	(72)
(一)热杀菌 .....	(72)
(二)化学消毒剂 .....	(75)
(三)紫外线和射线 .....	(75)
(四)接种室的空气灭菌 .....	(76)
(五)超膜过滤 .....	(77)
实验二十四 微孔膜滤器的使用 .....	(79)
二、培养基和培养基制备 .....	(80)
(一)培养基 .....	(80)
(二)培养基成分的说明 .....	(80)
(三)培养基的制备 .....	(83)
三、分离、接种和培养技术 .....	(84)
实验二十五 试管倾倒入培养皿分离法 .....	(84)
实验二十六 平皿划线分离法 .....	(85)
实验二十七 稀释分离平皿菌落计数 .....	(87)
(二)接种 .....	(90)
实验二十八 接种技术 .....	(90)
实验二十九 小型连续发酵试验 .....	(93)

实验三十 无氧罐分离培养厌氧微生物 .....	(95)
<b>第五章 环境因素对微生物生长与发酵的影响</b> .....	(96)
一、温    度 .....	(96)
实验三十一 酵母营养细胞致死时间的测定 .....	(98)
二、水分与渗透压 .....	(98)
实验三十二 培养基中糖和盐浓度对微生物生长的影响 .....	(100)
三、氧气和氧化还原电位 .....	(100)
实验三十三 微生物生长对氧的要求 .....	(103)
实验三十四 培养液氧化还原值(rH)的测定 .....	(103)
四、pH .....	(104)
实验三十五 pH对微生物的影响 .....	(106)
五、重金属和一些化合物对微生物的抑制作用 .....	(106)
实验三十六 滤纸片法测定重金属对微生物的影响 .....	(106)
六、表面张力 .....	(107)
实验三十七 表面张力对微生物的影响 .....	(107)
<b>第六章 微生物的生理与发酵试验</b> .....	(108)
一、微生物对碳源的利用 .....	(108)
实验三十八 细菌对糖、醇及糖苷的利用 .....	(109)
实验三十九 酵母对糖类的发酵 .....	(110)
二、微生物对氮源的利用 .....	(110)
实验四十 细菌对硝酸盐的还原作用 .....	(111)
实验四十一 酵母对氮素源的利用 .....	(112)
三、细菌鉴定中的某些特殊的生理试验 .....	(112)
实验四十二 对淀粉的水解 .....	(112)
实验四十三 V、P、反应(乙酰甲基甲醇试验) .....	(113)
实验四十四 硫化氢的生成 .....	(114)
实验四十五 吲哚试验 .....	(114)
实验四十六 过氧化氢酶的产生 .....	(115)
实验四十七 明胶液化试验 .....	(116)
实验四十八 石蕊牛乳试验 .....	(116)
实验四十九 甲基红试验 .....	(117)
实验五十 乙醇的氧化 .....	(117)
实验五十一 乙酸的氧化 .....	(118)
实验五十二 脲酶的测定 .....	(118)
四、常见常用细菌的分离和检测 .....	(119)
实验五十三 枯草杆菌 .....	(119)
实验五十四 醋酸细菌 .....	(120)

实验五十五	乳酸菌	(121)
实验五十六	德氏乳酸杆菌( <i>Lactobacillus delbrueckii</i> )	(123)
实验五十七	丙酸细菌( <i>propionibacterium</i> )	(124)
实验五十八	丁酸细菌	(126)
实验五十九	发酵法酿制食醋	(127)
五、	酵母应用特性的测定	(128)
实验六十	酵母发酵力的测定	(129)
实验六十一	压榨酵母发酵的测定	(130)
实验六十二	面包酵母发面力的测定	(131)
实验六十三	酵母忍耐酒精浓度的测定	(132)
实验六十四	酵母抵抗防腐剂能力的测定	(133)
实验六十五	细菌液化型淀粉酶定长及生定测	(133)
附:	液化型淀粉酶活力的测定方法(部颁标准)	(134)
实验六十六	曲霉的葡萄糖淀粉生长及测定	(135)
附:	糖化型淀粉酶活力的测定方法(部颁标准)	(136)
实验六十七	米曲霉的蛋白酶生成及测定(部颁标准)	(138)
附:	蛋白酶的活力测定(部颁标准)	(138)
实验六十八	乳酸发酵及测定	(141)
实验六十九	乳酸菌饮料	(142)
实验七十	葡萄酒发酵	(143)
六、	固定化细胞及其发酵工业上的应用	(143)
实验七十一	固定化生长酵母细胞连续生产酒精	(146)
附:	固定化细胞数量的测定	(147)
八、	防霉剂	(147)
实验七十二	防霉剂的选用	(148)
<b>第七章</b>	<b>发酵过程中及发酵食品中微生物的检测</b>	(149)
一、	检查微生物生长、大小与数量的方法	(149)
实验七十三	酵母细胞数的测定	(150)
实验七十四	酵母细胞大小的测定	(151)
实验七十五	细菌生长曲线的测定	(152)
实验七十六	丝状真菌生长速率的测定	(153)
二、	发酵工业中常见微生物种类及其概测	(155)
(一)	发酵工业中常见微生物种类	(155)
(二)	发酵工业中常见微生物类属检索表	(156)
(三)	发酵工业中常见微生物类别的概测	(159)
三、	发酵用水和发酵过程微生物数量的检测	(164)
(一)	发酵用水微生物数量的测定	(164)

实验七十七	水中细菌数的测定	(164)
实验七十八	水中大肠菌群数量的测定	(165)
实验七十九	水中大肠杆菌数量的测定	(169)
实验八十	大肠杆菌的简易检出法	(170)
实验八十一	固态法酒醅中微生物量的测定	(171)
实验八十二	固态发酵浆水厌氧微生物的分离	(171)
<b>第八章</b>	<b>选种和育种</b>	<b>(173)</b>
一、	选种	(173)
(一)	采样	(173)
(二)	增殖培养	(173)
(三)	纯种分离	(174)
(四)	筛选	(174)
(五)	毒性试验	(174)
实验八十三	葡萄酒酵母的筛选	(175)
实验八十四	利用碱法纸浆废液微生物的分离	(175)
实验八十五	发酵废液COD的测定	(176)
实验八十六	生产选种	(177)
二、	诱变育种	(177)
(一)	诱变剂和诱变处理	(177)
(二)	诱变育种步骤	(181)
实验八十七	紫外线的诱变育种	(182)
实验八十八	亚硝基胍诱变曲霉菌(黑曲霉、米曲霉)	(183)
实验八十九	抗结构类似物菌株的筛选	(184)
三、	营养缺陷型的选育	(185)
(一)	诱变方法	(185)
(二)	淘汰野生型	(185)
(三)	检出缺陷型	(186)
(四)	营养缺陷型生长谱的确定	(186)
实验九十	营养缺陷型的筛选	(189)
实验九十一	酵母呼吸缺陷型的筛选	(189)
四、	基因重组育种	(190)
实验九十二	细菌的杂交	(191)
五、	原生质体融合育种	(192)
(一)	原生质体融合育种的特点	(192)
(二)	原生质体融合育种步骤	(196)
(三)	原生质体融合育种的要点	(196)
实验九十三	细菌原生质体的制备	(201)

实验九十四 酵母原生质体的制备	(202)
实验九十五 原生质体的融合	(203)
<b>第九章 菌种保藏技术</b>	(203)
一、斜面传代保藏	(204)
二、液体石蜡保藏	(206)
三、无有机养分在液相中保藏	(208)
(一)蒸馏水保藏	(208)
(二)食盐水保藏	(208)
(三)磷酸盐缓冲液保藏	(208)
四、载体保藏	(209)
五、真空干燥保藏	(209)
(一)真空冷冻干燥保	(209)
(二)L-干燥保藏	(210)
六、冷冻保藏	(210)
实验九十六 快速砂土管菌种保藏	(211)
<b>第十章 微生物实验室的设计</b>	(211)
一、工业微生物实验室范围与基本要求	(212)
二、实验室的仪器设备	(212)
(一)常用玻璃仪器与设备	(212)
三、实验室大小及布局	(217)
<b>第十一章 实验室常见常用的一些单元操作技术</b>	(220)
一、搅拌和振荡	(220)
(一)搅拌器的类型	(220)
(二)套管和密封	(221)
(三)电动机	(221)
(四)振荡	(222)
二、气体的计量和导入	(222)
三、加热和冷却	(223)
(一)加热	(223)
(二)冷凝器	(224)
(三)冷却剂	(225)
四、减压操作	(226)
(一)真空的产生	(226)
(二)真空的测量	(228)
(三)真空操作	(229)
五、干燥	(229)
(一)气体	(230)



(二)液体 .....	(231)
(三)固体 .....	(231)
六、过滤和离心 .....	(232)
七、简单蒸馏 .....	(235)
八、纸层析 .....	(236)
九、溶液的脱色 .....	(238)
十、薄层层析 .....	(239)
十一、密度的测定 .....	(421)
十二、折光率测定 .....	(241)
十三、比旋光度 .....	(242)
附录 .....	(244)
一、实验室安全及防护知识 .....	(244)
(一)实验室安全知识 .....	(244)
(二)实验室灭火法 .....	(245)
(三)实验室急救 .....	(245)
二、实验室常识 .....	(245)
三、玻璃仪器的洗涤和各种洗液的配制法 .....	(248)
四、缓冲溶液 .....	(249)
五、氨基酸的一些物理常数 .....	(256)
六、指示剂 .....	(258)
七、冷剂却 .....	(259)
八、硫酸铵饱和度的常用表 .....	(260)
九、试剂的配制及一些常用数据表 .....	(261)
十、一些常用单位 .....	(267)
十一、附表 .....	(269)
1、蔗糖液比重表(17.5) .....	(269)
2、蔗糖液(比重巴林示度)温度更正表 .....	(270)
3、Gay Lussac氏酒精计表(15°C为标准) .....	(271)
4、测定糖度读取的糖度更正为糖度计的20°C时的温度更正表 .....	(274)
5、柠檬酸溶液比重表(15°C) .....	(275)
6、葡萄糖溶液比重表(17.5°C) .....	(275)
7、食盐溶液比重表(15°C) .....	(276)
8、食盐溶液比重表(20°C/4°C) .....	(276)

# 第一章 显微技术

显微技术是工业微生物试验与研究中的基本技术之一。因为微生物的大小是以微米来描述的，要对它们进行观察非得借助于显微镜不可。显微镜的种类很多，可以根据我们研究的对象和要求而选用。为了及时记录观察到的现象，我们还可以用显微摄影的方法将其记录下来。

## 一、显微镜的种类和特点

目前显微镜根据结构和原理主要分为光学显微镜和电子显微镜，它们中又分成几类型。

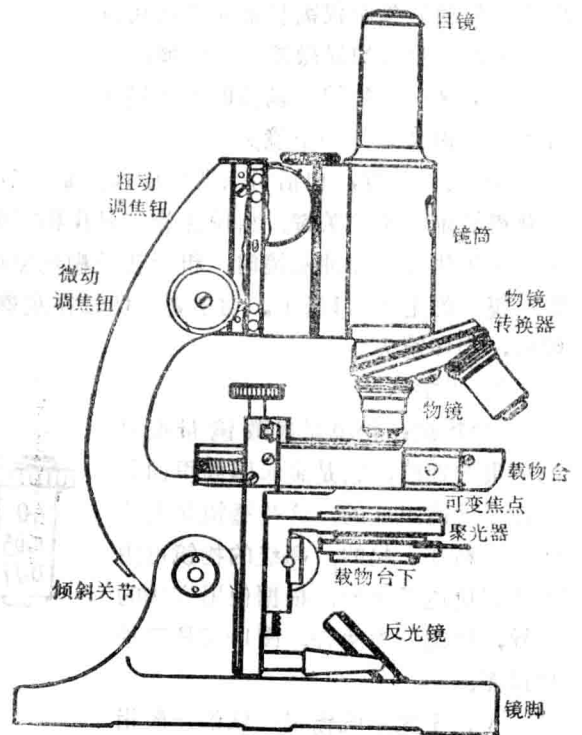
### (一)明视野光学显微镜

光学显微镜有明视野显微镜，暗视野显微镜，相差显微镜，荧光显微镜，偏光显微镜和立体显微镜等。其中以明视野显微镜最常用，图(1—1)系常见的直筒和斜筒光学显微镜，它们的都是在此基础上发展起来的。光学显微镜的基本结构可分为光学系统和机械系统两大部分。只有在光学和机械二系统良好的配合下，才能发挥显微镜高度的性能，因此要正确地掌握显微镜的用法，必须了解显微镜的结构与原理。

#### 1.机械系统

机械系统都是由金属制成的，目前也有部分用工程塑料代替的。外表大部分涂有黑色油漆，以避免反射光线妨害标本的观察和保护金属。

(1)镜座，也称镜脚，是显微镜的基本支架，由底座和镜臂组成。底座通常呈马蹄形、三角形、圆形或丁字形，并有一定的底面积和重量，使整体牢固地站立着，不至于因倾斜而失掉平衡。镜臂是显微镜的脊梁，镜筒能上下的显微镜，镜臂是活动的，而镜台能上下活动的显微镜，底座和镜臂是固定的。



a. 直筒式

(2)载物台：也称显微镜台，是支持被检标本的平台，呈圆形或方形。一般圆形载物台具旋转性，可前后左右移动；一般方形载物台装有十字动台，可直线前后左右移动，有的其上装上标尺，以利固定标本位置重复观察。

(3)镜筒：装置于镜臂上端。镜筒是空心的圆筒，上端接目镜，下端接物臂。直筒式的与载物台垂直，使目镜、镜筒和物镜的光轴在一条直线上。镜筒的长度一般为160毫米，改变长度就会改变总放大倍数。目前，显微镜多见斜筒式，特别是双斜筒的，使观察时眼睛不易疲劳，用起来方便，增加立体感。

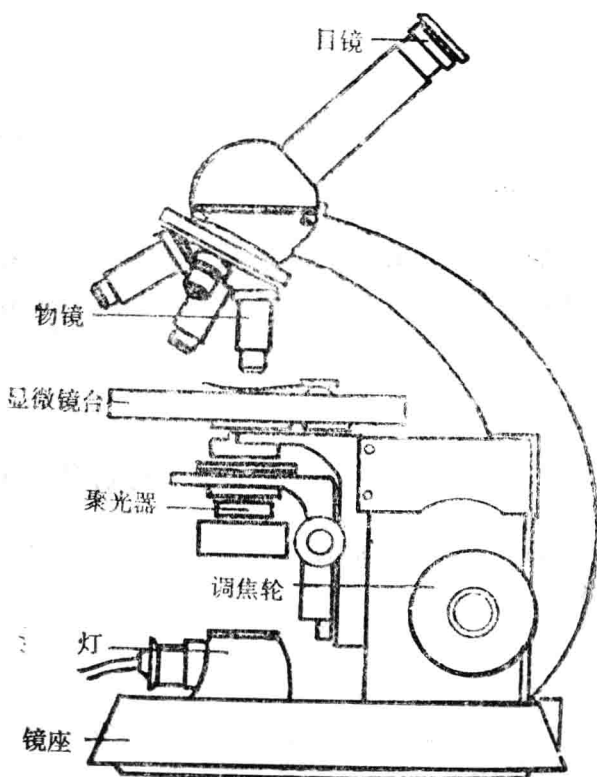
(4)转换器：位于镜筒的下端，是一个可以旋转的圆盘，它是装配物镜用的，可以装配3—5个物镜，镜检时调换镜头很方便。由于物镜长度的配合，所以镜头转换后焦距仅需稍加调节就可以观察清晰。也有的显微镜没有转换器，一次仅能装一个物镜，调换时须把镜头拆下来，再装上另一个镜头。

(5)调焦装置：包括粗细调焦旋钮，是调节镜筒或载物台上下移动的装置。这就是调焦，是获得清晰图象的关键。粗调焦旋钮只作粗略的调焦，对低倍观察仅用粗调就能获得清晰物象；在采用高倍和油浸镜时，粗调获模糊物象后还需用细调才能看清物象。细调旋钮每转一周，镜筒约上下0.1毫米。初学者，切忌在观察物象时，就将粗调旋钮向下旋转，以免触及载玻片，损坏镜头。

## 2. 光学系统

(1)物镜：物镜是显微镜最宝贵、最重要的部件，它是金属圆筒里面装有许多透镜组成的，这些透镜是用特殊的胶粘在一起的，高级的物镜可由多达12块透镜组成。根据使用方法的差异，物镜分为两种。图1—2是二种物镜图。

1、干燥系统物镜：低倍一般指放大60倍以下的物镜它们和标本。



b. 斜筒式

图1—1 光学显微镜的机械构造



图1—2物镜的各种标记

之间的介质是空气。

ii、油浸系物镜：放大100倍的物镜与标本之间加入一种和玻璃折光率(1.52)几乎相等的香柏油(1.515)才能观察到清晰的物象，这种物镜就称油镜头，一般在镜头上标以“HI”或“OI”的字样。加上香柏油是为了消除光由一种介质进入另一种介质时发生的散光现象(图1—3)。

物镜具有一定的放大率和一定的焦距。放大率越高，透镜的弯曲度越大，焦距就越短，由于放大率越高，物镜的镜筒就越长。所以油浸镜头观察时几乎触及标本。

物镜的放大倍数常有8X, 10X, 20X, 40X, 60X, 100X等，但一般光学显微镜仅有其中的3—4种。

质量高的物镜应具有消色差和消象差的性能，否则要造成物象的失真。

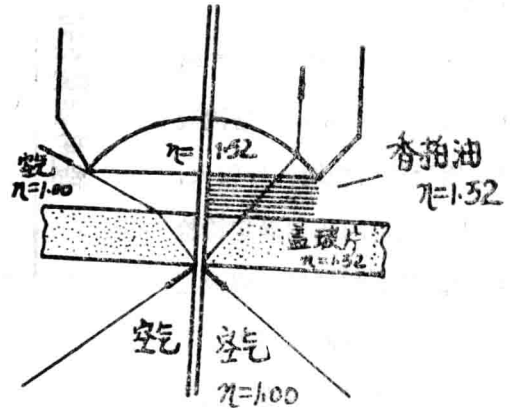


图1—3进入物镜的光路

(2)目镜：插入镜筒上端，供眼睛观察物象的是目镜。它也是由透镜构成的，一般仅1—3片。目镜能放大由物镜所造成的象，具有校正物镜之缺点，以使物象集中在目镜上等功用。一般目镜镜筒越长，放大倍数越小。目镜放大倍数也标在镜头上，常有3X, 5X, 8X, 10X, 15X等数种。

(3)集光器：由一片透镜或多片透镜组成，其最上面透镜适嵌于载物台中央圆孔的下面，它可以聚集由反光镜反射上来的光线射入镜筒中来。集光器可以上下调节，以求最适光度。集光器还附有虹彩光圈，借此也可调节光线的强弱。集光器在整个视野中所产生的照度一般是很均匀的，使观察时获得好的效果。一般当放大倍数小时，集光器下降，光圈缩小；而采用高倍物镜时，集光器则上升，光圈放大。但光圈放得过大，观察时会产生光斑，若收拢光圈会使分辨力下降，但增加反差。一般物镜的开口直径以收拢在60—70%左右为准。

(4)反光镜：由凹平二面镜子构成，它可以把光源来的光线送至集光器，在利用集光器时，通常用平面镜，因为集光器的构造最适于利用平行光线，只有在照明条件较弱或用油镜时，才用凹面镜。但一些较高级的显微镜都采用装在底座内的内光源，所以就无须反光镜了。

图(1—4)是光学显微镜的一般光路图。

### 实验一 明视野显微镜的使用

(1)置放位置：坐着观察时，显微镜放在身体左肩之前，镜臂向身体，镜身向前，镜与桌边相距约2寸左右，这样安置便于右手描绘物象。

(2)采光：镜检效果受采光影响很大。直射的阳光不是好光源。白天，面对着宽大的窗户的散射阳光是良好的光源，也可采用日光灯或显微镜灯作光源，但普通白炽灯泡并不理想。采光时，先将低倍物镜转至与镜筒成一横线，上升集光器，翻动反光镜，从侧面观看集光器上

部的透镜,使其具最大亮度,以后以左眼从目镜中观察,调节集光器高度和光圈大小至最适亮度。

(3)观察,任何需要镜检的标本都可先用低倍镜观察,因为低倍物镜视野较大,易于发现目的物和确定镜检物点。然后旋转转换器改用高倍物镜,这时需将集光器上升并放大光圈以求得适当

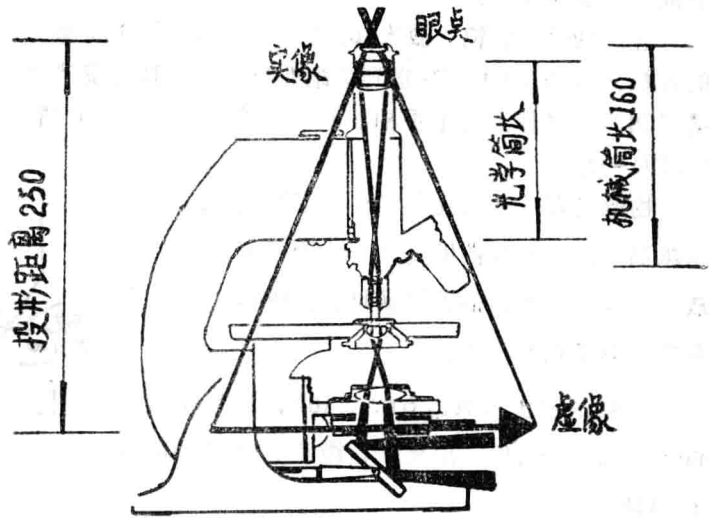


图1—4 显微镜的光路图

的亮度。适度旋转调焦旋钮,很快就会观察到目的物象。但此时切忌用粗调将旋钮向下调,以防与标本相碰。

(4)油浸镜的使用:镜检细菌或放线菌菌体形态时必须采用放大90X或100X的物镜。采用油浸物镜除需在标本与镜头之间滴加香柏油外,还应注意由于焦距极短,切勿因镜头触及载玻片而受损。在观察时为获得强的采光,需将集光器上升和增大光圈。镜检完毕需先用擦镜纸将镜头上的香柏油擦去,再用软绸布沾少许二甲苯将镜头上残留香柏油擦去,继将二甲苯擦掉。

(5)明视野显微镜使用的注意点

(1)显微镜的总放大率:显微镜的总放大率是物镜和目镜放大倍数的乘积,但这是有条件的,这里涉及“分辨力”的概念,在能分辨的情况下,上述乘积是有效的。

1、分辨力,是指显微镜能够辨别两点之间最小距离的能力,例如视力正常的人从距离250厘米处观察物体,能够分辨的最小距离是0.1厘米。显微镜的分辨力与物镜的开口率(或称数值口径,简称N.A.)和光波波长( $\lambda$ )有关:

$$\text{分辨力} = \frac{\lambda}{2 \cdot \text{N.A.}}$$

我们肉眼所能感受的光波平均长度为0.55微米,所以可以认为是个常数,开口率是镜头与标本间介质的折射率( $n$ )和最大光的入射角 $a$ 的角正弦的乘积,即

$$\text{N.A.} = n \cdot \sin a$$

这里的 $n$ ,空气为1.00,水为1.33,石蜡油为1.46,香柏油为1.51。

这里的 $a$ ,一般最大约 $120^\circ$ 所以 $\sin 60^\circ = 0.87$ 。

这样开口率最大也不过1.31左右。一般低倍物镜10X的N.A.为0.25—0.30,45X的N.A.为0.65,90×为1.25。可见物镜放大倍数越大,N.A.也越大,当然分辨力就强。由于油浸物镜的分辨力也不能小于0.2微米左右,所以不管总放大倍数多大,用普通光学显微镜是无法

观察到小于0.2微米的物象的。

ii、焦距和工作距离物镜与标本间的距离，在观察得最清晰时称工作距离，而每一物镜还有它自己的焦距。例如10X物镜的焦距为16毫米，工作距离为8.3毫米；45X物镜分别为4毫米和0.72毫米；100X物镜分别为1.6毫米和0.14毫米。

(2)显微镜使用前需检查各部分零件是否完整合用，镜面是否清洁，使用后用绸布揩干净，物镜偏于两旁，避免与集光器碰及，放入木箱中。

(3)取镜时应一手握镜臂，一手托住底座，不可斜提，防止目镜从镜筒中滑出。

(4)绝对避免镜头与被检物体直接接触，使用高倍和油浸物镜时尽可能用盖玻片，以免腐蚀镜头。用毕应先转开镜头，再除去标本，以免触及镜头。

(5)镜检以左眼为宜，两眼务必同时睁开。如果右眼闭合，则易疲劳，不久会感头眩。左眼观察时，右眼睁开可在观察同时绘图。

## (二)其它光学显微镜

### 1、暗视野显微镜

暗视野显微镜是以丁达耳效应为基础，利用特别的集光器，不使照射被检物体的光线直接射入物镜，因此可以利用被检物体表面散射的光线来观察普通照明视野显微镜下所看不到的微粒子。所以实际上是在暗视野中见到明亮的物象。这样活的透明微生物细胞用暗视野显微镜观察效果较好。

暗视野显微镜使用时要注意在聚光镜与载玻片之间要滴加香柏油，让其充满，否则照明光线于聚光镜上面全面反射，达不到被检物体，从而得不到暗视野照明。另外要把聚光镜焦点对准物体，首先要使聚光镜的光轴与物镜的光轴严格调到一直线上，需要进行中心调节和调焦。第三是调节焦点时，要考虑载玻片与盖片的厚度，因为暗视野聚光器的N.A.大，焦点较短，过厚的被检物体无法调到聚光器的焦点处。所以载玻片厚度应不大于1.0—1.2毫米，片厚度在0.1毫米以下。同时载玻片应特别清洁，无伤痕，以免反射光线。

### 实验二 暗视野显微镜的使用

(1)将光源调至最亮，使用明视野聚光器，开大光圈，用低倍镜观察，视野应均匀明亮。然后换入暗视野聚光器，提升至距载物台下约0.5厘米处，仔细滴加一大滴香柏油

(2)将待检载玻片标本放在载物台上，仔细上升聚光器，使油滴刚好与载片表面接触，而不外溢。

(3)用10X物镜进行观察，视野中出现圆形光环，若聚光器与物镜光轴不一致时，光环就偏离视野中心，此时应用二根中心调整螺杆调整合轴。若被检物体不在聚光器焦点处，进行合轴调整后，圆形光环的中央仍是黑暗的，这时要进行调焦，上下调动聚光器，使视野中心呈现一个圆形亮点而背景全黑。

(4)在盖玻片上滴加香柏油，换上油浸镜，调焦至视野中出现发光的标本。

### 2、相差显微镜

人的眼睛能够分辨光波的波长(颜色)和振幅(亮度)的差异。显微镜下观察到的物体，

大都是由于光波振幅的改变，致使物体表面的明暗不同。微生物细胞的染色主要是改变了光波波长，因而易于观察。但染色的结果是使细胞内部的自然结构受到破坏，不利于对微生物的正确观察。透明的物体不能改变振幅和波长，只能使光波的相位发生改变，而人的肉眼却无法分辨光波相位的差异。相差显微镜就是将透过反差极小的标本的光分解成位相不同的直射光和衍射光，使这两种光互相干涉，而能观察到有明暗之分的物象的一种显微镜。它与普通光学显微镜外型相似。主要的差别有二点，即使用的物镜是相差物镜和具有环状光阑的集光器，相差物镜内安有相板，物镜镜筒上一般都刻有红色 Ph 字样。相差集光器常见的是转盘集光器，上面装有不同的环状光阑，转盘前面有标记，表示位于集光器下面的光圈种类。如标记 10X 表示应与 10X 的相差物镜配合使用，40X 即与 40X 相差物镜配合使用等。另有标为 0 的，表示没有环状光阑，即作一般集光器使用。

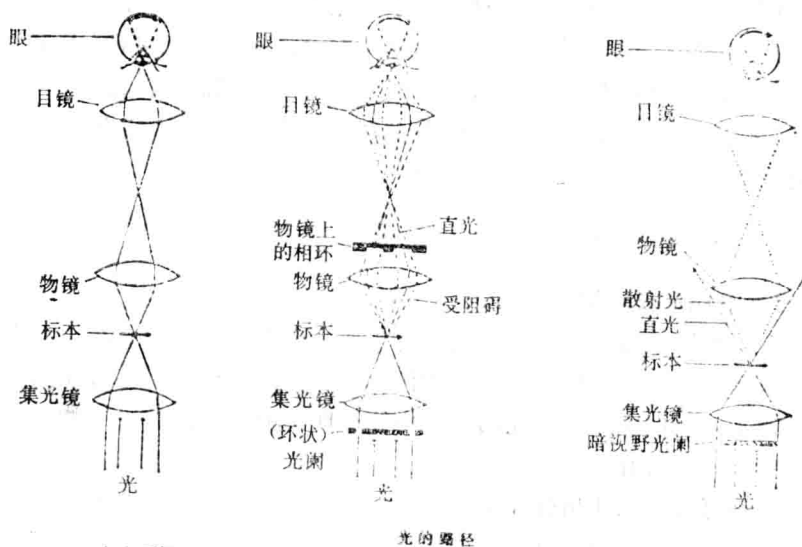


图1-5 各种光学显微镜光路图的比较

使用相差显微镜重要的是将相板和光阑的光轴同轴否则效果就差。

### 实验三 相差显微镜的使用

(1) 装上转盘集光器，并按上相差物镜。

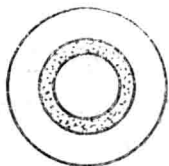
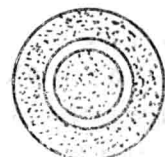
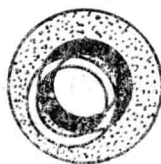


图1-6 相环和环状光阑



不合轴

合轴

图1-7 合轴调整

在滤光片架上安放好滤色片，一般用绿色。

(2) 配好相差物镜及相应光阑，将标本放在载物台上。

(3) 如明视野显微镜，调光，调焦，看到清晰图象。

(4) 拔出普通目镜，换上合轴调整望远镜，一边看望远镜，一边旋转外筒使它升降，对准焦点就看清亮环和园环，用固定螺丝固定外筒，进行中心调节。如果两个园环不能完全重合而有误差(图1—7)，则使用聚光器左右侧两个调节螺扭进行精密的调节，使两者完全重合，若亮环与园环还不重合，应采用集光器上下移动调节。

(5) 拔出望远镜，插入普通目镜进行观察。注意每次更换标本或改变不同倍数的相差物镜时，都必须重新进行调节。

相差显微镜的使用与暗视野显微镜有一些相似处，如载玻片和盖玻片的厚度，使用油浸相差物镜时，要使聚光器也油浸等。

### (三) 电子显微镜

电子显微镜为非光学显微镜，但它的基本结构和光学显微镜相似(图1—8)。其不同点是用高速的电子束代替了光束，以磁场( $L_1$ 、 $L_2$ 、 $L_3$ )代替了透镜( $L_3$ —目镜， $L_2$ —物镜， $L_1$ —集光器)。电子枪射出的高速电子束经过磁会聚透镜( $L_1$ )使电子束会聚而照射在标本上，经过磁场物镜( $L_2$ )而形成放大像，再经过中间投像镜( $L_3$ )的进一步放大而投射在荧光屏或照相底片上。

由于电子具有类似光波的波动特性，但波长极短，仅为可见光光波波长的十万分之一，所以电子显微镜的分辨率比光学显微镜要大得多。目前电镜放大倍数已达100万倍以上，分辨力已达 $1 \text{ \AA}$ 以下。所以是分子水平的各项研究中的得力工具。

电子显微镜常有透射式和扫描式两类。扫描式的特点是可以观察较厚的标本，而且扫描出来的图像有立体感。

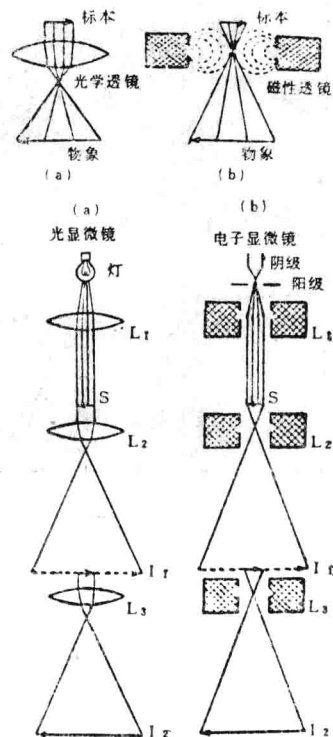
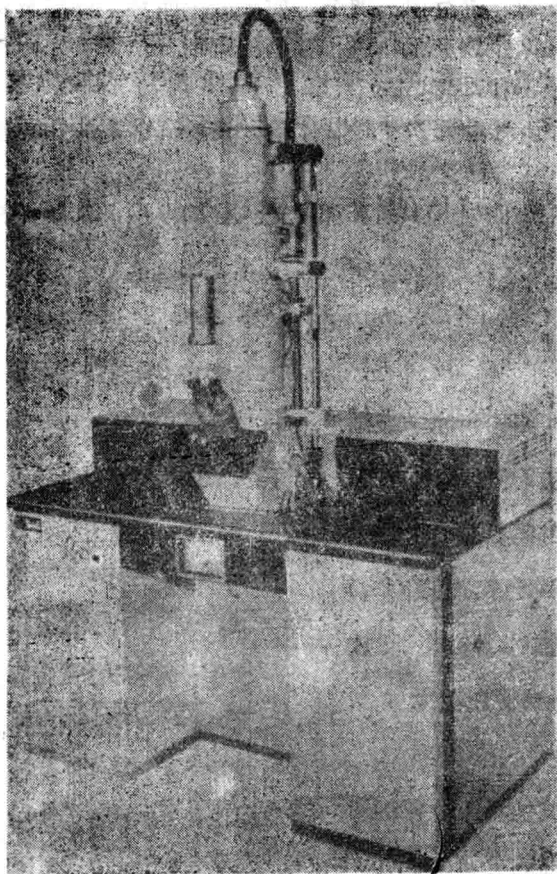


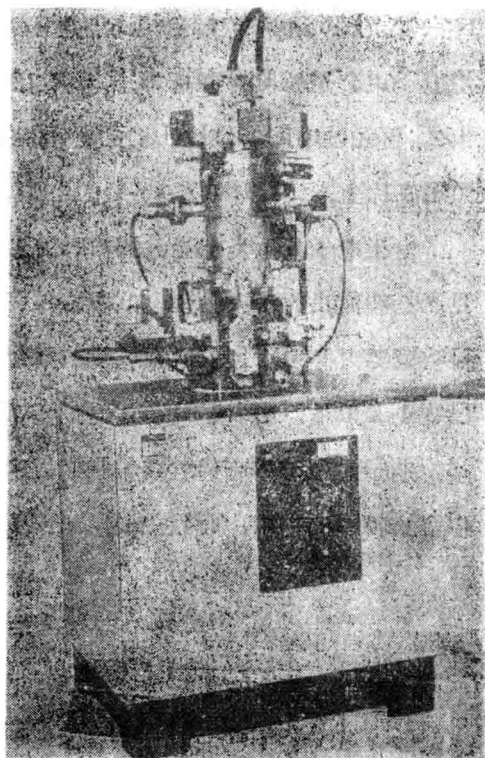
图1—8 电子显微镜和光学显微镜的基本结构比较



图1—9—1—11是电镜及新式光学显微镜的照片。



透射式



扫描、透射式

图1—9—1—11  
电  
子  
显  
微  
镜