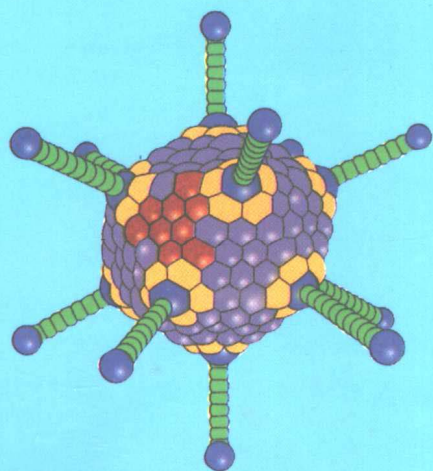
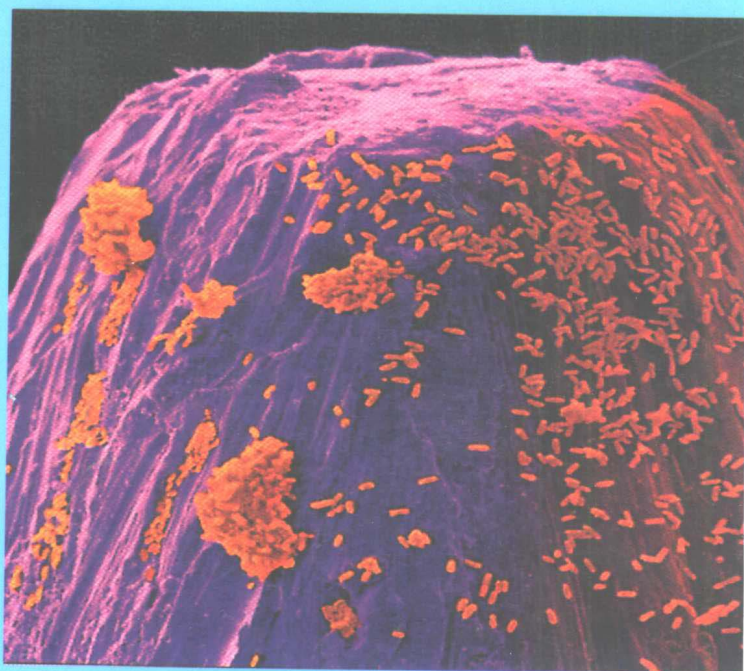




钱存柔 黄仪秀 主编

微生物学实验教程



北京大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验教程/钱存柔 黄仪秀主编. --北京:
北京大学出版社, 1999. 7
ISBN 7-301-04054-7

I. 微… II. ①钱… ②黄… III. 微生物学-实验-教程
IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 17833 号

书 名: 微生物学实验教程

著作责任者: 钱存柔 黄仪秀 等

责任编辑: 张仲鸣

标准书号: ISBN 7-301-04054-7/Q · 0080

出版者: 北京大学出版社

地 址: 北京市海淀区中关村北京大学校内 100871

网 址: <http://cbs.pku.edu.cn/cbs.htm>

电 话: 出版部 62752015 发行部 62754140 编辑部 62752038

电子信箱: zpup@pup.pku.edu.cn

排 版 者: 北京高新特公司激光照排中心

印 刷 者: 北京大学印刷厂印刷

发 行 者: 北京大学出版社

经 销 者: 新华书店

787×1092 16 开本 18.375 印张 459 千字

1999 年 7 月第一版 1999 年 7 月第一次印刷

定 价: 25.00 元

内 容 提 要

本书内容着重训练学生微生物学实验的基本操作和技能,同时适当增加了一些与当前生产实践、生物工程应用有关的新技术。

全书共分十三章,涵盖 56 个实验,其中包括显微镜使用技术、微生物形态结构、病毒、培养基配制、微生物的分离与纯化、微生物的生化反应、微生物生长、遗传与育种、菌种保藏、免疫技术、微生物发酵、饮用水和食品中微生物检测等实验技术。书后还附有培养基配制、灭菌与消毒、接种技术、培养方法、染色液及试剂等配制、教学常用菌种学名、常用汉英微生物学词汇、细菌鉴定及检索、主要参考书等。

本书可作为高等院校微生物学基础实验课教材。其中的各个实验相对独立,因而根据具体情况可酌情选做。此书也可作为从事微生物工作的有关教师及科研人员的实验参考书。

前 言

微生物学是生命科学的重要组成部分,一向处于生命科学研究的前沿,许多生命活动规律都是在研究微生物的过程中得到阐明的,它既是研究生命基础理论的学科,同时也是一门应用极为广泛的学科。在为人类寻找有效的医药用品、丰富人们食品种类、清除环境污染、开发地下矿藏以及研究新的能源等各个领域,均发挥了巨大作用。回顾近三百余年微生物学发展的历史,都和研究微生物的实验方法的不断完善与突破是分不开的,没有列文虎克制造的显微镜就不可能了解肉眼视力范围以外的微小世界,巴斯德在研究家畜、家禽传染病时所建立的免疫技术至今仍然有效。柯赫设计的固体培养基、细菌染色方法和无菌技术仍然是当前微生物学实验中的基础……,可见微生物学实验的发展与微生物学学科本身的进步是不可分割的,同时微生物学实验方法还极大推动了如病毒学、分子生物学、生物工程学等新兴学科的发展。

本书取材主要考虑对大学或师范院校中的生命科学学院或生物学系本科生基础课的要求,总结了我校长期开设微生物学实验课和科学研究中的部分工作经验,在我校编写的《微生物学实验指导》(高等教育出版社,1964),《微生物学基础知识与实验指导》(科学出版社,1979)和《微生物学实验》(北京大学出版社,1985)的基础上,参考了国内兄弟院校编写的有关教材以及国外的有关资料,适当增加了部分新技术,充实了新内容,如显微镜技术部分增加了电子显微镜的使用;病毒部分增加了植物病毒的接种、培养与测定,溶源性菌株的检查和鉴定;微生物分离纯化部分增加了有特殊生理性能的化能自养菌、光合细菌和降解含酚污水的菌的分离纯化;微生物遗传方面增加了营养缺陷型突变株筛选,细菌的转化、转导、接合,细菌和酵母菌原生质体融合和艾姆氏试验等内容;微生物发酵部分增加了细胞固定化和小型发酵罐的使用等。概括起来这些实验内容可分为四个方面:

一、微生物学实验的基本操作和技能训练:如无菌操作技术、显微镜技术、各类微生物的分离与纯化,各类微生物标本片的制作,细菌染色,微生物测微和计数以及培养基制备等技术。这些内容分别编成不同的实验,其中一些最基本的内容在不同实验中可得到多次重复与强化,以求学生对这些基本训练能达到操作正确、运用熟练的要求。

二、为加深学生对理论部分的理解而设计的实验,如各类微生物形态观察,微生物生理生化测定,环境因素对微生物生长的影响,微生物生长曲线的测定,微生物遗传变异及免疫学技术等。

三、微生物菌种的分离、纯化、培养、选育和保藏技术,学生学习后既可从一般环境分离出不同类型微生物,也可从特殊环境分离出具特殊生理性能的微生物,还可通过诱变、转化或转导、原生质体融合及基因工程等手段进行菌种的遗传改造,并从中筛出性状优良的突变株和重组体。

四、考虑微生物学本身广泛的应用性及学生毕业后可能从事与微生物学有关的教学,或与工业、农业、医药卫生、环境保护等有关工作的需要,适当增加了与当前生产实践或与生物工程发展有关的新技术,如多粘菌素发酵、食品及饮用水的卫生检查、固定化细胞发酵和小型发酵罐的使用等内容。

以上内容共编成 56 个实验,大部分实验包括了约 3~4 学时所能完成的内容。教师备课时可根据每个实验所列出的需用菌种、仪器、试剂的种类和数量,根据具体情况,或单个实验进行,或组织成综合性实验,或作为示范组织教学。书后并有附录及参考书目。我们热切希望老师和同学们在使用本书时所发现的错误或存在问题提出批评和改进的意见,以便及时能得到修正和补充。

本书由钱存柔担任主编,黄仪秀任副主编,参加编写的还有林稚兰、罗大珍、李玲君、梁崇志等,电子显微镜实验由本院电镜室马淑芳、傅宏兰参加编写。各章的具体分工是第一章:梁崇志、马淑芳、傅宏兰,第二章、第三章和第六章:李玲君,第四章:林稚兰,第五章和第十章:黄仪秀、林稚兰,第七章:黄仪秀,第八章:梁崇志、罗大珍、林稚兰,第九章:罗大珍、林稚兰、黄仪秀、李玲君、梁崇志,第十一章:罗大珍,第十二章:林稚兰、罗大珍、梁崇志,第十三章:李玲君、罗大珍、林稚兰,附录各部分分别由林稚兰、李玲君、钱存柔等分别撰写。参加过前文所提及各书编写的还有陈德元、董碧虹、张素芳、罗妙芳,此外我们还要感谢臧淑苹、李荣娟等同志在实验试做及编写过程中所提供的热情帮助。

编 者
1999 年 5 月

微生物学实验室守则

- 一、为了保证实验室的整洁和实验顺利进行,非必要的物品和书包,请勿带入室内。
- 二、每次实验前要充分预习实验指导,明确本次实验的目的要求、原理和方法,做到心中有数。
- 三、实验进行时,应尽量避免在实验室内走动,以免染菌。同时请勿高声谈话,保持室内安静。
- 四、实验操作要细心谨慎,认真进行观察,及时做好实验记录。
- 五、凡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% 石炭酸溶液中 0.5 h 后再行洗刷。如系芽孢杆菌或有孢子的霉菌,则应当延长浸泡时间。
- 六、实验过程中,如不慎将菌液洒到桌面或地面,应以 5% 石炭酸溶液或 3% 来苏尔溶液覆盖 0.5 h 后才能擦去。如不慎将菌液吸入口中或皮肤破伤处或烫伤,应立即报告指导教师,及时处理,切勿隐瞒。
- 七、进行高压蒸汽灭菌时,严格遵守操作规程。负责灭菌的人在灭菌过程中不准离开灭菌室。
- 八、实验进行培养的材料,应注明组别、名称及处理方法,放于教师指定的地点进行培养。
- 九、爱护国家财产。使用显微镜及其他贵重仪器时要按要求操作。注意节约药品、水、电。
- 十、实验完毕,应将仪器放回原处,擦净桌面,收拾整齐。离开实验室前注意关闭门、窗、灯、火、煤气等,并用肥皂洗手。
- 十一、每次实验结果,应以实事求是的态度填写实验报告,及时交给指导教师批阅。

目 录

前言	(I)
微生物学实验室守则	(Ⅲ)
第一章 显微镜使用技术	(1)
实验 1-1 普通光学显微镜的使用	(1)
实验 1-2 暗视野显微镜的使用	(7)
实验 1-3 相差显微镜的使用	(9)
实验 1-4 电子显微镜的使用	(11)
第二章 原核微生物的形态结构观察	(16)
实验 2-1 细菌的形态结构观察(I) (简单染色、革兰氏染色、抗酸染色)	(16)
实验 2-2 细菌的形态结构观察(II) (芽孢染色、荚膜染色、鞭毛染色)	(21)
实验 2-3 放线菌的形态结构观察	(24)
第三章 真核微生物的形态结构观察	(26)
实验 3-1 酵母菌的形态结构观察及测微技术	(26)
实验 3-2 霉菌的形态结构观察	(29)
第四章 病毒	(31)
实验 4-1 噬菌体的分离与纯化	(31)
实验 4-2 噬菌体的增殖、效价测定及保藏	(36)
实验 4-3 溶源性细菌的检查和鉴定	(39)
实验 4-4 动物病毒的接种与培养 (鸡胚接种与培养技术)	(42)
实验 4-5 植物病毒的接种、培养与定量测定 (枯斑测定技术)	(45)
第五章 培养基的配制及灭菌	(48)
实验 5-1 培养基的常规配制程序	(48)
实验 5-2 细菌、放线菌常用培养基的配制	(53)

实验 5-3	酵母菌、霉菌常用培养基的配制	(56)
实验 5-4	几种常用鉴别和选择培养基的配制	(58)
实验 5-5	高压蒸汽灭菌	(61)
第六章	微生物的分离与纯化技术	(66)
实验 6-1	土壤中细菌、放线菌、酵母菌及霉菌的分离与纯化	(66)
实验 6-2	化能自养微生物的分离与纯化 (硅胶平板分离纯化硝化细菌)	(74)
实验 6-3	光合细菌的分离与纯化 (红螺菌科细菌的富集培养、分离及纯化)	(77)
实验 6-4	含酚污水降解菌的分离、纯化与筛选	(81)
第七章	微生物的生化反应	(85)
实验 7-1	微生物对生物大分子的分解利用	(85)
实验 7-2	微生物对含碳化合物的分解利用	(88)
实验 7-3	微生物对含氮化合物的分解利用	(92)
第八章	微生物生长	(97)
实验 8-1	血球计数板直接计数法测定微生物生长	(97)
实验 8-2	比浊法测定微生物生长	(99)
实验 8-3	重量法测定微生物生长	(100)
实验 8-4	细菌生长曲线的测定	(101)
实验 8-5	环境因素对微生物生长的影响	(103)
实验 8-6	利用厌氧罐培养丙酮丁醇梭菌	(109)
实验 8-7	石炭酸系数法对药物药效的检测	(111)
实验 8-8	稀释法对非酚类消毒剂的药物药效的检测	(113)
第九章	微生物遗传和育种	(117)
实验 9-1	紫外线对枯草芽孢杆菌产生淀粉酶的诱变效应	(117)
实验 9-2	硫酸二乙酯对枯草芽孢杆菌产生蛋白酶的诱变效应	(120)
实验 9-3	氨基酸营养缺陷型突变株的筛选	(123)
实验 9-4	大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	(130)
实验 9-5	大肠杆菌 λ 噬菌体的局限性转导	(133)
实验 9-6	细菌接合和基因定位	(136)
实验 9-7	细菌原生质体融合	(140)
实验 9-8	酵母菌单倍体原生质体融合	(143)
实验 9-9	电场诱导酵母菌原生质体融合	(145)
实验 9-10	用艾姆斯试验(Ames test)检测诱变剂和致癌剂	(147)

第十章 菌种保藏	(154)
实验 10-1 常用简易保藏法	(154)
实验 10-2 冷冻真空干燥保藏法	(158)
实验 10-3 液氮超低温冷冻保藏法	(161)
第十一章 免疫学技术	(164)
实验 11-1 免疫血清的制备	(164)
实验 11-2 凝集反应	(168)
实验 11-3 沉淀反应(琼脂双向扩散试验)	(170)
实验 11-4 琼脂凝胶对流免疫电泳	(172)
第十二章 微生物发酵	(175)
实验 12-1 多粘菌素 E 发酵及管碟法测定生物效价	(176)
实验 12-2 酿酒酵母细胞固定化与酒精发酵	(182)
实验 12-3 小型发酵罐的使用与发酵过程中主要生化指标测定	(186)
第十三章 饮用水和食品中微生物的检测	(195)
实验 13-1 饮用水中细菌总数及大肠菌群的检测	(195)
实验 13-2 食品中细菌总数及大肠菌群的检测	(198)
附录一 玻璃器皿的洗涤.....	(203)
附录二 实验常用培养基的配方及配制方法.....	(205)
附录三 灭菌与消毒.....	(224)
附录四 微生物的接种技术.....	(235)
附录五 微生物的培养方法.....	(239)
附录六 实验常用染液配制.....	(243)
附录七 实验常用试剂及溶液配制.....	(246)
附录八 教学常用菌种学名.....	(257)
附录九 常用汉英微生物学词汇.....	(259)
附录十 细菌鉴定及检索.....	(272)
主要参考书目	(282)

第一章 显微镜使用技术

微生物的个体微小,肉眼难以看见,必须借助显微镜才能观察到。因此,显微镜就成为微生物学研究工作者不可缺少的基本工具,从事有关微生物学教学、科研和生产的人员,都应该了解显微镜的种类、结构、功能和正确地掌握不同显微镜的使用方法。

显微镜可分为光学显微镜和非光学显微镜两大类。光学显微镜有普通光学显微镜、相差显微镜、微分干涉差显微镜、暗视野显微镜、紫外光显微镜、偏光显微镜和荧光显微镜等不同类型。非光学显微镜是指电子显微镜。

本章重点介绍普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜的结构原理和使用步骤,简要介绍电子显微镜原理及使用方法。

实验 1-1 普通光学显微镜的使用

一、目的要求

了解普通光学显微镜的结构、基本原理、维护和保养的方法。

掌握普通光学显微镜的正确使用方法。

二、基本原理

(一) 普通光学显微镜的结构

普通光学显微镜(图 1-1-1)是由一组光学系统和支持及调节光学系统的机械系统组成。

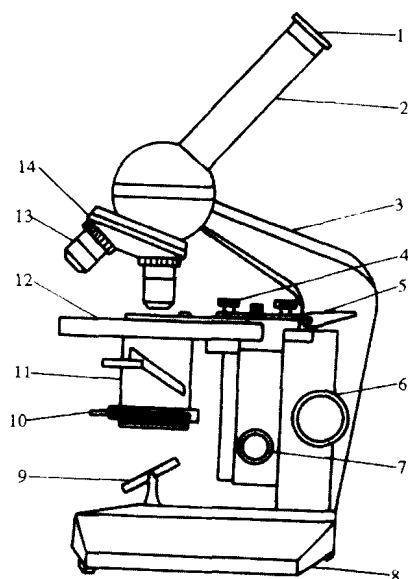


图 1-1-1 显微镜的结构

1. 目镜;2. 镜筒;3. 镜臂;4. 标本移动器;5. 粗动限位器;6. 粗调节器;7. 细调节器;8. 底座;
9. 反光镜;10. 聚光器孔径光阑(光圈);11. 聚光器;12. 镜台(载物台);13. 物镜;14. 物镜转换器

机械系统包括镜座、镜臂、镜台、物镜转换器、镜筒及调节器等。

镜座是显微镜的基座,使显微镜能平稳地放置在桌子上。

镜台又称载物台,是放置标本的地方,为方形或圆形。镜台上有压片夹用的固定被检标本,较好的显微镜则有标本移动器,转动螺旋可使标本前后和左右移动。有的标本移动器带有游标尺,可指明标本所在位置。

镜臂用以支持镜筒,也是移动显微镜时手握的部位。

镜筒是连接目镜和物镜的金属筒。镜筒上端插入目镜,下端与物镜转换器相接。

物镜转换器安装在镜筒的下端,其上装有 3~5 个不同放大倍数的物镜,可以通过转动物镜转换器随意选用合适的物镜。

调节器安装在镜臂基部,是调节物镜与被检标本距离的装置,通过转动粗、细调节螺旋便可清晰地观察到标本。

普通光学显微镜的光学系统主要包括目镜、物镜、聚光镜和反光镜等。较好的显微镜还有光源(图 1-1-2)。

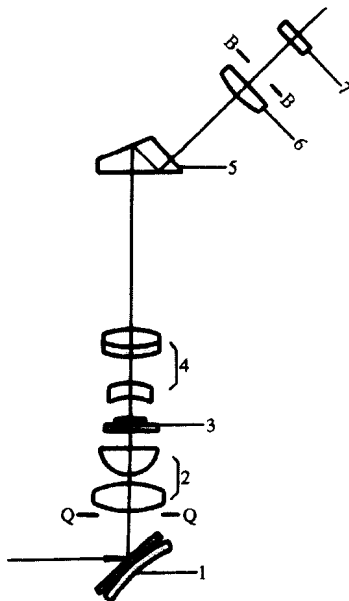


图 1-1-2 显微镜的光学系统

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. 聚光器孔径光栏;B. 目镜视场光栏

目镜一般由两块透镜组成。上面一块称接目透镜,下面一块称场镜。在两块透镜中间或场镜的下方有一视场光阑。在进行显微测量时,目镜测微尺便要放在视场光阑上。不同的目镜上刻有 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 或 $20\times$ 等字符以表示该目镜的放大倍数。可根据需要选择适当的目镜使用。

物镜是显微镜中很重要的光学部件,由多块透镜组成。根据物镜的放大倍数和使用方法的不同,分为低倍物镜、高倍物镜和油镜三类,低倍物镜有 $4\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$ 。高倍物镜有 $40\times$ 和 $45\times$ 等。油镜有 $90\times$ 、 $95\times$ 和 $100\times$ 等。在物镜侧面刻有一些符号(各生产厂家的符号及其含

义不尽相同),现举例说明其含义如下:

10×0.30 ——表示放大 10 倍,NA=0.31(NA 表示数值口径)。

40/0.65 ——表示放大 40 倍,NA=0.65,为消色差物镜。

100/1.25 oil ——表示放大 100 倍,NA=1.25,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 160 mm,斜线下方为一短横划,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 160 mm,盖玻片的厚度应为 0.17 mm 或小于 0.17 mm。

聚光镜(又称聚光器)安装在镜台下,是由多块透镜构成,其作用是把平行的光线聚焦于标本上,增强照明度。聚光镜的焦点必须在正中,使用聚光镜上的调节器可以进行调中。通过转动手轮调节聚光镜的上下,以适应使用不同厚度的载玻片,也能保证焦点落在被检标本上。但因聚光镜的焦距短,载玻片也不能太厚,一般以 0.9~1.3 mm 之间为宜。聚光镜上附有虹彩光阑(俗称光圈),通过调整光阑孔径的大小,可以调节进入物镜光线的强弱。

反光镜是普通光学显微镜的取光设备,使光线射向聚光镜,它一面是凹面镜,另一面是平面镜。有聚光镜的显微镜,无论使用低倍或高倍物镜均应用平面镜,只在光量不足时才使用凹面镜。没有聚光镜的显微镜,低倍物镜时用平面镜,高倍物镜及油镜均用凹面镜。

内光源是较好的光学显微镜自身带有的照明装置,安装在镜座内部,由强光灯泡发出的光线通过安装在镜座上的集光镜射入聚光镜。集光镜上有一视场光阑,可改变照明视场的大小。集光镜上可放置不同颜色的滤光片,以改变进入聚光镜光线的波长。

(二) 普通光学显微镜的光学原理

由单透镜构成的放大镜和由几块透镜组成的实体显微镜(解剖镜)称单式显微镜。目前微生物学教学及科研所用的光学显微镜一般是复式显微镜。

1. 光学显微镜成像的原理

由外界入射的光线经反光镜反射向上,或由内光源发射的光线经集光镜向上,再经聚光镜会聚在被检标本上,使标本得到足够的照明,由标本反射或折射出的光线经物镜进入使光轴与水平面倾斜 45°角的棱镜,在目镜的焦平面上,即在目镜的视场光阑处,成放大的侧光实像,该实像再经目镜的接目透镜放大成虚像,所以人们看到的是虚像(图 1-1-3)。

2. 显微镜的放大倍数

被检物体经显微镜的物镜和目镜放大后的总放大倍数是物镜的放大倍数和目镜放大倍数的乘积。如用放大 40 倍的物镜和放大 10 倍的目镜的总放大倍数是 400 倍。

3. 分辨率

物镜前面发光点发射的光线进入物镜的角度称开口角度。透镜的放大率与开口角度成正比,与焦距成反比。数值口径(又称开口率 numerical aperture

简写为 NA)是光线投射到物镜上的最大开口角度一半的正弦,乘上标本与物镜间介质的折射

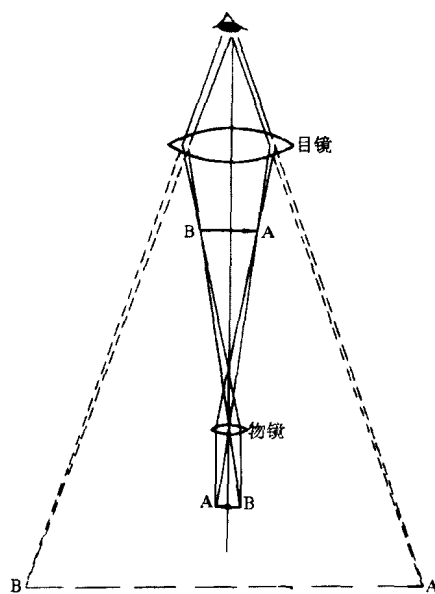


图 1-1-3 光学显微镜的成像原理

率的乘积。

$$NA=n \times \sin \theta$$

NA 为数值口径, n 是介质折射率, θ 为最大开口角度的半角。

由于介质为空气时, $n=1$, θ 最大值只能到 90° (实际上不可能达到 90°), $\sin 90^\circ=1$, 所以干燥系下物镜的数值口径都小于 1。使用油镜时, 物镜与标本间的介质为香柏油 ($n=1.515$) 或液体石蜡 ($n=1.52$), 不仅能增加照明度, 更主要的是增大数值口径, 目前技术下最大的数值口径为 1.4 (表 1-1-1)。

表 1-1-1 物镜的放大倍数与数值口径

物镜类型	焦距/mm	放大倍数	开口角度	θ	$\sin \theta$	折射率 n	NA
干燥系	16	10×	29°	14.5°	0.2504	1	0.25
	4	40×	81°	40.5°	0.6494	1	0.65
	4	40×	116°	58°	0.8503	1	0.85
油浸系	2	90×	110°	55°	0.8223	1.52	1.25
	2	90×	134°	67°	0.9211	1.52	1.4

评价一台显微镜的质量优劣, 不仅要看其放大倍数, 更重要的是看其分辨率。分辨率是指显微镜能够辨别发光的两个点或两根细线间最小距离的能力。该最小的距离称为鉴别限度 (R):

$$R=\frac{\lambda}{2n\sin \theta}=\frac{\lambda}{2NA}$$

R 为鉴别限度, λ 为光波波长。

日光的波长 $\lambda=0.5607 \mu\text{m} \approx 0.6 \mu\text{m}$, 如果用 $NA=1.4$ 的物镜, 则

$$R=\frac{0.6}{2 \times 1.4} \mu\text{m}=0.22 \mu\text{m}$$

4. 工作距离

工作距离是指观察标本最清晰时, 物镜透镜的下表面与标本之间 (无盖玻片时) 或与盖玻片之间的距离。物镜的放大倍数越大, 其工作距离越短, 油镜的工作距离最短, 约为 0.2 mm, 所以使用油镜时, 要求盖玻片的厚度为 0.17 mm。虽然不同放大倍数的物镜工作距离不同, 但生产厂家已进行校正, 使不同放大倍数物镜转换时, 都能观察到标本, 只需进行细调焦便可使物像清晰。

5. 目镜的放大倍数

根据计算, 显微镜的有效放大倍数是:

$$E \times O=1000 \times NA$$

E 为目镜放大倍数, O 为物镜放大倍数。

目镜的有效放大倍数是:

$$E=\frac{1000 \times NA}{O}$$

根据上式可知, 在与物镜的组合中, 目镜有效的放大倍数是有限的, 过大的目镜放大倍数并不能提高显微镜的分辨率。如用 90×, NA 为 1.4 的物镜, 目镜有效的最大倍数是 15×。

三、实验材料

(一) 仪器和其他物品

普通光学显微镜、液体石蜡或香柏油、二甲苯、擦镜纸。

(二) 微生物材料

枯草芽孢杆菌的染色标本。

四、实验内容

显微镜的使用方法。

(一) 显微镜的放置

显微镜应直立放置在桌上,离桌缘约 3 cm,不要将直筒显微镜倾斜。

(二) 光源

显微镜不能采用直射阳光。晴天可用近窗的散射光作光源,也可用日光灯作光源,而专为显微镜照明而制造的聚丝电灯是较好的光源。

调节照明的步骤:

首先,使用低倍物镜,旋转粗调节器,使物镜和镜台间的距离约为 3 mm。

然后,旋转聚光镜螺旋,使聚光镜与镜台的上表面相距约 1 mm。

最后,调节反光镜(在较强的自然光下观察,以平面反光镜为宜),使光线充分地进入聚光镜,开闭聚光镜上的孔径光阑,调节光线强弱程度,直至照明效果最佳时为止。

另外,使用具有光源的显微镜时,可在接通电源后,取下目镜,直接向镜筒内观察,并调节聚光镜上的孔径光阑,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(开口率 NA)相一致,既可充分发挥该物镜的分辨力;又能把超过该物镜可能接受的多余光挡住,否则能产生干扰,影响清晰度。所以,原则上使用不同的物镜时应相应调节孔径光阑。放回目镜后,通过调节集光镜上的视场光阑或调节照明度控制钮,选择最佳的照明效果。

(三) 低倍镜和高倍镜的使用

1. 标本放置

下降镜台或升高镜筒,把枯草芽孢杆菌染色标本置镜台上,用载片夹夹牢。

2. 调焦

转动粗调节螺旋,升高镜台(或下降镜筒),使低倍物镜的前端接近载片,用左眼在目镜上观察,并转动粗调节螺旋,使镜台下降(或镜筒上升),可看到物像,然后转动细调节螺旋,使物像清晰。

3. 换高倍镜

用低倍镜看到物像后,转动标本移动器上的螺旋,选择合适的视野,并把要观察的部位置于视野的中央;转动物镜转换器把高倍镜置镜筒下方。显微镜在设计制造时,都是共焦点的,即低倍镜对焦后,转换高倍镜时一般都能对准焦点,能看到物像,只需转动细调节螺旋便可使物像清晰。通过调节集光镜上的视场光阑或照明度控制钮使获得最佳照明。

(四) 油镜的使用

由于细菌个体微小,需要用油镜进行观察。

1. 滴加镜油

转动粗调节螺旋,使镜台下降(或使镜筒上升),在染色标本处滴加 1~2 滴液体石蜡或香柏油。

2. 转换油镜

转动物镜转换器,把油镜置镜筒下方。

3. 调焦

转动粗调节螺旋,使镜台上升(或镜筒下降),让镜头的前端浸入镜油中。操作时要从侧面仔细观察,只能让镜头浸入镜油中紧贴着标本而避免让镜头撞击载玻片,导致玻片和镜头损坏。然后在目镜下进行观察,并缓慢地转动粗调节器使镜台下降(或使镜筒上升)即可看到物像,再转动细调节螺旋使物像清晰。

转动粗调节器使镜台下降(或使镜筒上升)时,若油镜已离开油滴,必须重新进行上述调焦操作。不得边用左眼在目镜上观察,边转动粗调节器使镜台上升(或镜筒下降)使镜头前端浸入油滴中,这样易使镜头撞击载玻片,损坏标本和镜头。

4. 调节孔径光阑和视场光阑

把孔径光阑开到最大,使与油镜的数值口径相匹配。通过调节视场光阑或照明度控制钮,选择合适的照明。

5. 显微镜使用后的处置

转动粗调节螺旋,使镜台下降(或使镜筒上升),取出染色标本玻片,然后先用擦镜纸擦去油镜上的香柏油,再用擦镜纸沾少量二甲苯(不能用酒精)擦去沾在油镜上的镜油,最后用擦镜纸擦净二甲苯及镜油。用液体石蜡作镜油时,可以只用擦镜纸即可擦净,不必用(或仅用极少量)二甲苯。把镜头转成“八”字形,套上镜罩后放入显微镜柜中。

附显微镜的维护和保养要点:

显微镜是贵重精密的光学仪器,正确的使用、维护与保养,不但观察物体清晰,而且延长显微镜的使用寿命。

(1) 显微镜应放置在通风干燥,灰尘少,不受阳光直接曝晒的地方。不使用时,用有机玻璃或塑料布防尘罩罩起来。也可套上布罩后放入显微镜箱内或显微镜柜内,并在箱或柜内放置干燥剂。

(2) 显微镜要避免与酸、碱及易挥发具腐蚀性的化学物品放在一起,以免显微镜受损。

(3) 从显微镜箱或柜内取出或放入显微镜时,应一手提镜臂,另一手托镜座,让显微镜直立,防止目镜从镜筒中脱落。

(4) 显微镜应防止震动和暴力。粗、细调节螺旋、聚光镜升降螺旋和标本推进器等机械系统要灵活而不松动,如不灵活可在滑动部位滴加少许润滑油。

(5) 显微镜的目镜、物镜、聚光镜和反光镜等光学部件必须保持清洁,防止长霉。镜检时通过转动目镜、物镜及调整焦距等措施判断灰尘或污脏所在的部位,如附有灰尘,则先用洗耳球吹去灰尘,或用擦镜纸轻轻擦去。若有污脏,用擦镜纸或脱脂棉球沾无水乙醚 7 份和无水乙醇 3 份的混合液轻轻擦拭,然后用擦镜纸擦干。显微镜的金属油漆部件和塑料部件,可用软布沾中性洗涤剂进行擦拭,不要使用有机溶剂。

(6) 用油镜观察后,先用擦镜纸擦去镜头上的油,然后用擦镜纸沾少许上述混合液或二甲苯擦拭,最后用干净的擦镜纸擦干。混合液或二甲苯用量不要过多,以免溶解胶合透镜的树脂,使透镜脱落。

五、实验报告内容

用油镜观察枯草芽孢杆菌的染色标本,并绘图。

六、思考题

- (一) 油镜用毕后,为什么必须把镜油擦净?用过多的二甲苯或用酒精擦镜油有什么危害?
- (二) 观察时为什么要用左眼,并且两眼都应睁开?
- (三) 使用油镜时,为什么选用香柏油或液体石蜡作为物镜与玻片间的介质?用其他液体行吗?

(梁 崇 志)

实验 1-2 暗视野显微镜的使用

一、目的要求

了解暗视野显微镜构造和原理,掌握其使用方法。
学会在暗视野显微镜下观察细菌的运动。

二、基本原理

暗视野(或称暗场)显微镜是使用一种特殊的暗视野聚光镜或暗视野聚光器,在此聚光镜中央有一光挡,使光线只能从周缘进入并会聚在被检物体的表面,光线被超显微的质点散射进入物镜,这些微小质点,就像黑色天空中的一颗颗闪亮的小星。我们在黑暗的背景中看到的只是物体受光的侧面,是它边缘发亮的轮廓。暗视野显微术适于观察在明视野中,由于反差过小而不易观察的折射率很强的物体,以及一些小于光学显微镜分辨极限的微小颗粒。在微生物学研究工作中,常用暗视野显微术来观察活菌的运动或鞭毛等。

暗视野聚光镜有两种主要类型:一是折射型,只要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(图 1-2-1)就成为一个暗视野聚光镜,甚至在一圆形玻璃片中央贴上一块圆形的黑纸也可获得暗视野的效果。另一类暗视野聚光镜是反射型,为各厂家所特制,有不同型式(图 1-2-2)。

要使暗视野显微术获得良好的效果,首先,不能有光线直射进入物镜,当用油镜时,因油镜的开口角度大,为避免直射光线进入,应选用有开口光圈的油镜;其次,要用强烈的光源,一般是使用强光源显微镜灯;第三,要求倾斜光线的焦点正好落在被检物上,这要对暗视野聚光镜进行中心调节和调焦,要求使用的载玻片不可太厚,通常为 1.0~1.2 mm,盖玻片厚度不要超过 0.17mm。玻片应非常清洁,无油污,无划痕,以免反射光线;使用高倍物镜时,聚光镜和载玻

片间要加镜油。

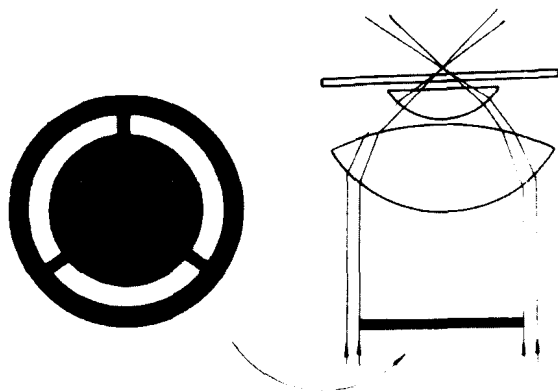


图 1-2-1 折射型暗视野聚光镜

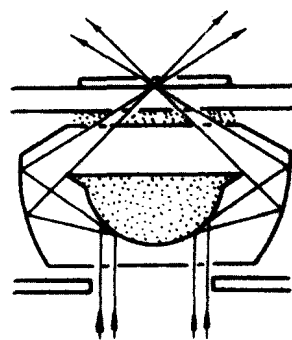


图 1-2-2 反射型暗视野聚光镜的光路

三、实验材料

(一) 微生物材料

枯草芽孢杆菌或大肠杆菌,经多次转接传代的 16~18 h 培养物。

(二) 仪器和其他物品

普通光学显微镜、暗视野聚光镜、显微镜灯、盖玻片、载玻片、镜油、擦镜纸、二甲苯等。

四、实验内容

显微镜的使用方法和步骤。

(一) 安装暗视野聚光镜

将普通聚光镜取下,换上暗视野聚光镜。转动螺旋上升聚光镜。

(二) 调节光源

光源要强,把集光镜上的光阑开到最大,聚光镜上的光阑调至 1.4。显微镜本身不带光源的,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镜。

(三) 制片

取厚度为 1.0~1.2 mm 的洁净载玻片一块,加一滴枯草芽孢杆菌或大肠杆菌的幼龄菌液,盖上不超过 0.17 mm 厚的洁净盖玻片,注意不要有气泡。

(四) 置片

加香柏油于暗视野聚光镜的顶部,下降聚光镜,然后把制片放置在载物台上,并把观察的标本移至物镜下,转动旋钮升高聚光镜,使镜油与载玻片背面相接触,这样可避免产生气泡。

(五) 调焦和调中

使用低倍物镜,转动聚光镜升降螺旋,调节聚光镜的高低,可出现一个光环,最后出现一个光点,光点愈小愈好。然后用聚光镜的调中螺丝进行调节,使光点位于视野的中央(图 1-2-3)。