微生物学研究法

陈声明　刘丽丽　编著

31

中国农业科技出版社

微生物学研究法

微生物学研究法

Методика Исследования Микробиологии

Methodology for Microbiological Research

陈声明　刘丽丽　编著

Чэнь Шэнмин и Лию Лили

Chen Shengming & Liu Lili

中国农业科技出版社

(京)新登字 061 号

图书在版编目(CIP)数据

微生物学研究法/陈声明编著.—北京:中国农业科技出版社,1996.7
ISBN 7-80119-252-4

Ⅰ.微… Ⅱ.陈… Ⅲ.微生物学-研究方法 Ⅳ.Q93-31

中国版本图书馆 CIP 数据核字(96)第 13167 号

微生物学研究法

责任编辑	韩扬云　郝心仁
技术设计	陈声明
出版发行	中国农业科技出版社 (北京海淀区白石桥路 30 号)
经　　销	新华书店北京发行所发行
印　　刷	浙江农业大学印刷厂印刷
开　　本	787×1092 毫米　1/16　印张:13.5
印　　数	1—6500 册　　字数:324 千字
版　　次	1996 年 7 月第一版　1996 年 7 月第一次印刷
定　　价	13.80 元

编著人员名单

主　编：陈声明　刘丽丽

副主编：（按姓氏笔画为序）

王志刚　裘娟萍　唐建军　阚德义

参加编著人员：（按姓氏笔画为序）

王志刚　王钦升　刘丽丽　陈声明　陈厚德　张岐蜀

阿拉坦布日古德　周正明　庞建华　胡子信　图布丹扎布

郭景芳　贾小明　裘娟萍　唐建军　阚德义　冀洪林

审稿者：杨洁彬　张　篪　李淑高

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

内容简介

《微生物学研究法》将几十年教学实践经验的微生物实验技术规范为经典的实验方法，同时吸收了近代微生物学新技术如扫描隧道显微镜，DNA探针和酶标抗体等。

全书分为十四个部分，每部分有若干试验，共有110个试验，书中内容主要包括显微镜；形态观察；大小测定和计数；培养基制备与灭菌、消毒；无菌操作和接种技术；育种与菌种保藏；微生物与物质转化、土壤和环境微生物分离、培养和观察；还有杀虫微生物、动物微生物、食品微生物、发酵微生物和食用菌等的分离、培养和观察等技术。

该书取材新颖，内容丰富，技术完整，可操作性强，教学指导意义大、科研参考价值高。因此，本书可以作为农、林、牧、食品、轻工、环保和发酵等有关专业大专院校本、专科生的微生物学实验教科书，又可作为教师、科研人员和研究生进行微生物研究的有益参考。

序

微生物学是生命科学中一门典型的实验学科。纵观微生物学发展历史可以发现,它的每一重大进步,无不以实验技术的重大创新为前提。目前,微生物学实验技术正在日新月异地发展,并广泛渗透或融合到现代生命科学的各个重要分支中,为繁荣发展生命科学作出了无可估量的贡献。

我国的微生物学基本上是从本世纪 50 年代初才开始建立和发展的。在我步入微生物学领域并从事教学工作共 40 余年生涯中,时时关注着本学科的教材和教学参考书的建设,自己也十分投入。对不断出版的新教材尤其是实验教材总是爱不释手。据我所知,几十年来教材发展的状态大体上是实验性的滞后于理论性的,农业、工业微生物学实验滞后于医学微生物学实验,多科性的厚本滞后于单科性的薄本,等等。此外,还感到对我们这个具有 12 亿人口的泱泱大国来说,可供选用的微生物学实验教材或参考书还应更丰富些才好。

不久前,当我得知浙江农业大学的同行陈声明教授正在全力主编一本内容丰富、特色显著的《微生物学研究法》时,十分高兴并翘首以待。近日恰收到他寄来的“二校样”并邀我作序。因这是一件大好事,故欣然为之。经匆匆翻阅全稿并与同类书稍作比较后,深感本书除全面、系统地介绍了用于微生物学研究的各种基础实验外,还充分发挥了作者们的优势和特长,较详细地介绍了各相关微生物学分科包括土壤、环境、农业、食品、发酵和牧医等领域中大量有代表性的实验研究方法,从而使本书在同类书中独树一帜。相信本书的出版,将对有关学校和部门的教学、科研和生产等都有十分重要的参考价值。作为首批读者之一的我,谨向主编、作者和出版社的同志们致以深切的谢意。

自然,无瑕之璧毕竟难觅,更何况是一本著作。阅读之余,也发现本书在内容的平衡、现代分子生物学实验的安排等方面还存在某些不足。这些均有待今后再版时作参考和改进。

周德庆

1996 年 7 月 10 日于复旦大学

序

微生物学是一门实验科学。这门学科 300 多年的历史，特别是近百年的迅速发展历程突出地表明，实验技术的创建对每一个重大发现和每项基础理论的确立都起了决定性的作用。巴斯德结束学术界长期争论不休的自然发生说并奠定了灭菌和无菌操作的微生物学基本原理，正是依靠他创建的“曲颈瓶实验”。研究传染性病害中的“科赫氏假说”，也是在科赫学派共同创立了一系列实验技术的基础上提出来的。近年来多聚核酸酶链式反应(PCR)的发明，不仅使基因操作技术向前跨了一大步，为工、农、医、食品和环保等应用部门带来了巨大的方便，还使微生物系统发生的研究进入了一个崭新的阶段。

随着我国社会主义现代化的迅速发展，无论在教学科研方面，还是各应用领域，都希望有更新颖和实用的微生物研究方法得到普及。正是在这种形势下，尽管相似主题的书籍并不少见，陈声明教授仍然带头组织多位教师，团结一致，分工协作，编写了这本《微生物学研究法》。从全书内容的编排看，它具有内容新颖(例如介绍了扫描隧道显微镜和 PCR 技术等)、可操作性强(既有一定的顺序性，某些部分又能独立成篇)和教学指导意义大(每个实验单元后面附有注意事项、思考题和参考书目录，附录中介绍了实验报告的写作方法等)的特点，这是陈教授和他的合作者多年亲身教学和在科研第一线辛勤耕耘的经验结晶。我们还欣喜地看到，参加本书编写的有多位年轻的科技工作者。他们思想活跃，对新鲜事物敏感，也许这正是这本新著散发出新世纪到来的书香的原因。

作为这本新著的最早读者之一，我在阅读过程中，学习了许多新的知识，就是一些过去熟悉的技术，在重新阅读时，也收到了温故知新的效益。为了报答陈教授和他的合作者，我不揣冒昧，写下了这些话。

应该说，本书还有一些不足之处，例如一些必备的手册性资料介绍较少，在细菌生长方面没有测定生长曲线和计算世代时间的内容等。这些缺陷，相信会在读者帮助下，在再版时更臻完美 。

程光胜

1996 年 6 月于北京中关村

目　　录

第一部分　显微镜 ……………………………………………… (1)

1－1　普通光学显微镜的构造和油镜的使用 ……………………… (1)

1－2　相差显微镜的构造和使用 ……………………………… (4)

1－3　暗视野显微镜的构造与使用 ……………………………… (6)

1－4　透射电子显微镜的构造与使用 …………………………… (7)

1－5　扫描电子显微镜的构造与使用 …………………………… (11)

1－6　扫描隧道显微镜 ………………………………………… (14)

第二部分　形态观察 ……………………………………………… (16)

2－1　三种形态细菌的简单染色 ………………………………… (16)

2－2　细菌的革兰氏染色 ……………………………………… (17)

2－3　细菌的芽孢染色 ………………………………………… (18)

2－4　细菌的荚膜染色 ………………………………………… (19)

2－5　细菌的运动性观察及鞭毛染色 …………………………… (20)

2－6　蓝细菌的培养与观察 …………………………………… (22)

2－7　霉菌和假丝酵母的载片培养与观察 ……………………… (23)

2－8　酵母囊菌子孢子的培养与观察 …………………………… (24)

2－9　蘑菇菌丝体和子实层的形态观察 ………………………… (25)

2－10　放线菌的插片、搭片培养及观察 ………………………… (27)

2－11　放线菌的玻璃纸复盖法和印片染色法 …………………… (28)

2－12　昆虫病毒多角体的染色观察 …………………………… (29)

2－13　病毒粒子的电镜观察 …………………………………… (30)

2－14　噬菌体的培养和噬菌斑的观察 …………………………… (32)

2－15　几大类微生物菌落识别与观察 …………………………… (33)

第三部分　大小测定与计数 ……………………………………… (38)

3－1　微生物细胞大小的测定 ………………………………… (38)

3－2　微生物的显微镜直接计数 ……………………………… (40)

3－3　微生物的平板稀释法计数 ……………………………… (42)

3－4　最近似值法计数(稀释培养计数) ………………………… (44)

第四部分　培养基的制备与灭菌消毒 ……………………………… (46)

4－1　培养基的制备 …………………………………………… (46)

4－2　干热灭菌法 ……………………………………………… (48)

4－3　常压蒸汽灭菌法 ………………………………………… (49)

4－4　加压蒸汽灭菌法 ………………………………………… (50)

4－5　过滤除菌法 ……………………………………………… (51)

4－6　紫外线灭菌 ……………………………………………… (54)

4－7　化学药剂消毒灭菌 …… (55)
第五部分　无菌操作与接种技术 …… (58)
5－1　无菌操作技术(讲解和示教) …… (58)
5－2　微生物的接种技术 …… (60)
第六部分　育种和菌种保藏 …… (64)
6－1　紫外线诱变育种 …… (64)
6－2　化学诱变育种 …… (66)
6－3　原生质体融合育种 …… (67)
6－4　微生物菌种的常规保藏法 …… (73)
6－5　微生物菌种的冷冻干燥保藏法 …… (76)
6－6　液氮超低温保藏法 …… (78)
第七部分　土壤和环境微生物 …… (81)
7－1　土壤中好氧细菌的分离与计数 …… (81)
7－2　土壤放线菌的分离与计数 …… (82)
7－3　土壤中真菌的分离与计数 …… (84)
7－4　土壤生物量的测定 …… (85)
7－5　外生菌根菌的分离及染色观察 …… (86)
7－6　玉米联合固氮菌的分离 …… (88)
7－7　从豆科植物根瘤内分离根瘤菌 …… (89)
7－8　根瘤菌的结瘤试验 …… (90)
7－9　根瘤固氮菌的固氮酶活性测定 …… (92)
7－10　环境微生物的观察 …… (93)
第八部分　微生物与物质转化 …… (96)
8－1　纤维素的微生物降解 …… (96)
8－2　果胶物质的微生物分解 …… (97)
8－3　钾素的微生物分解 …… (98)
8－4　磷素的微生物分解 …… (99)
8－5　硫化作用及硫化细菌观察 …… (99)
8－6　氨化作用 …… (100)
8－7　硝化与反硝化作用 …… (101)
第九部分　杀虫微生物 …… (105)
9－1　从感病死亡昆虫分离杀虫苏云金杆菌 …… (105)
9－2　从感病死亡昆虫分离日本金龟子芽孢杆菌(乳状菌) …… (106)
9－3　用选择性培养基从土壤中分离苏云金杆菌 …… (107)
9－4　苏云金杆菌芽孢和伴孢晶体的区别染色 …… (107)
9－5　苏云金杆菌感染菜青虫 …… (108)
9－6　乳糖—丙酮沉淀法制备苏云金杆菌粉剂 …… (110)
9－7　苏云金素液相色谱测定 …… (111)
9－8　白僵菌的分离和鉴定 …… (112)
9－9　白僵菌生产菌株的虫体复壮 …… (113)

9－9　白僵菌生产菌株的虫体复壮……………………………………………………（113）
9－10　用液体—固体培养法制备白僵菌粉 ……………………………………（114）
9－11　核多角体病毒的分离与提纯 ……………………………………………（116）
9－12　棉铃虫核多角体病毒制剂的制备 ………………………………………（117）
第十部分　动物微生物（Ⅰ）…………………………………………………………（120）
10－1　病料的采集、包装和运送……………………………………………………（120）
10－2　常见动物致病菌的检出 ……………………………………………………（122）
10－3　病毒的鸡胚接种技术 ………………………………………………………（127）
10－4　鲜乳的微生物学检验 ………………………………………………………（130）
10－5　青贮饲料的微生物学检验 …………………………………………………（133）
10－6　单细胞蛋白饲料生产 ………………………………………………………（134）
第十一部分　动物微生物（Ⅱ）………………………………………………………（137）
11－1　病毒的血凝与血凝抑制实验 ………………………………………………（137）
11－2　病毒的微量血凝与血凝抑制实验 …………………………………………（138）
11－3　病毒中和试验 ………………………………………………………………（140）
11－4　补体结合反应 ………………………………………………………………（143）
11－5　免疫复合物电镜 技术………………………………………………………（146）
11－6　免疫酶标记电镜技术 ………………………………………………………（147）
11－7　胶体金标记电镜 技术………………………………………………………（148）
11－8　免疫酶技术 …………………………………………………………………（150）
11－9　基因探针技术 ………………………………………………………………（151）
11－10　沉淀反应……………………………………………………………………（158）
11－11　直接凝集反应………………………………………………………………（159）
11－12　间接凝集反应………………………………………………………………（161）
11－13　SPA 协同凝集反应（以炭疽为例） ………………………………………（164）
第十二部分
食品微生物…………………………………………………………………………（168）
12－1　食品中细菌总数的测定 ……………………………………………………（168）
12－2　食品中大肠菌群的检验 ……………………………………………………（170）
12－3　蕃茄制品中的霉菌直接镜检计数 …………………………………………（172）
12－4　动物食品中蛋白质分解菌的检查与计数 …………………………………（173）
12－5　食品中耐热性细菌的检验与计数 …………………………………………（174）
12－6　食品大肠埃希氏菌的检验 …………………………………………………（176）
12－7　商业性灭菌试验 ……………………………………………………………（179）
12－8　微生物热力致死时间的测定 ………………………………………………（181）
第十三部分　发酵微生物……………………………………………………………（184）
13－1　糖化曲中糖化酶的测定 ……………………………………………………（184）
13－2　酒曲中酵母菌的分离 ………………………………………………………（187）
13－3　红曲的制备及红方腐乳的生产 ……………………………………………（187）
13－4　泡菜制作及乳酸菌的分离与初步鉴定 ……………………………………（189）

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

13－5　酸奶的酿造及乳酸的快速测定(酶法) ……………………………… (191)
13－6　食醋的酿造及醋醪中醋酸菌的分离 ……………………………… (192)
13－7　食品中乙醇的快速测定(酶法) ……………………………… (194)
第十四部分　食用菌 ……………………………… (196)
14－1　子实体形态观察 ……………………………… (196)
14－2　平菇的母种、原种、栽培种的制备 ……………………………… (197)
14－3　平菇的出菇试验 ……………………………… (199)
14－4　香菇的纯种分离与培养 ……………………………… (200)
14－5　灵芝的纯种分离与培养 ……………………………… (201)
14－6　食用菌的菌种保藏与复壮 ……………………………… (202)
作者单位及姓名 ……………………………… (205)

第一部分　显微镜

由于显微镜的发明，帮助人类揭开了微生物世界的奥秘。随着人类科学技术的不断发展，显微镜技术也获得了长足的进步，已由利用可见光的光学显微镜（普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜等）发展到利用紫外光源及非光源的电子显微镜（透射电子显微镜、扫描电子显微镜和扫描隧道显微镜），从而大大地提高了显微镜的放大率和分辨率。

1－1　普通光学显微镜的构造和油镜的使用

微生物学实验室最常用的仪器是普通光学显微镜，无论是观察微生物个体形态还是测量微生物细胞大小都必须用它。因此显微镜是研究微生物的重要工具，显微镜是一种精密的光学仪器，使用时应了解其构造和原理，以达到正确使用和保养的目的。本实验要求：了解普通光学显微镜的构造和原理；掌握普通光学显微镜，重点是油镜正确使用的方法。

一、实验材料

1．显微镜；显微镜灯；香柏油；二甲苯；擦镜纸；吸水纸等。

2．细菌的染色标本。

3．载玻片；盖玻片；接种环；酒精灯。

二、实验程序

（一）显微镜的构造和油镜使用的原理

1．显微镜的构造

普通光学显微镜由机械装置和光学系统两部分组成（见图1－1－1）。

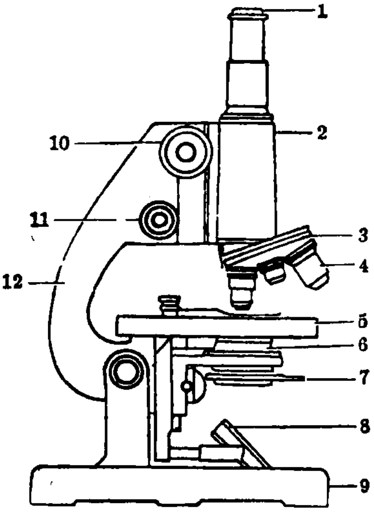

图1－1－1　光学显微镜的构造

1.目镜；2.镜筒；　3.物镜转换器；4.物镜；5.镜台；6.聚光器；7.可变光阑；　8.反光镜；9.镜座；　10.粗调节螺旋；11.细调节螺旋；　12.镜臂

（1）机械装置

① 镜座和镜臂：是显微镜的基本骨架，起稳固和支撑显微镜的作用。直筒显微镜的镜臂与镜座之间有一倾斜关节，可使显微镜倾斜一定的角度，便于观察。

② 镜筒：它是一个金属制的圆筒，上端安放目镜，下端安装转换器，镜筒长160mm。有些显微镜的镜筒长度是可调节的。

③ 转换器：它是一个用于安装物镜的园盘，其上装3～4个物镜。为使用方便，物镜应按低倍到高倍的顺序安装。转换物镜时，必须用手按住园盘旋转，勿用手指直接推动物镜，以免使物镜和转换器间的螺旋松脱而损坏显微镜。

④ 镜台：用于安放载玻片。镜台上有载玻片夹或载玻片移动器，调节移动器上的螺旋可使标本前后左右移动，有些移动器上还装有刻度标尺，可标定标本的位置，便于重复观察。

⑤ 调焦装置：安装在镜筒后方两侧的粗调节螺旋和细调节螺旋，用于调节物镜与标本间的距离，使物像变清晰。粗调节螺旋转一圈可使镜筒升降10mm，细调节螺旋转一圈可使镜筒升降约0.1mm的距离。

（2）光学系统

① 目镜:目镜的功能是把物镜放大的物像再次放大。目镜由两片透镜组成,上面一块为接目透镜,下面一块为聚透镜,两片透镜之间有光阑。光阑的大小决定了视野的大小,光阑的边缘就是视野的边缘,因此,又称为视野光阑。由于标本正好在光阑上成像,因此在光阑上粘一小段细发作为指针,可用来指示标本的具体部位。光阑上还可放置测量微生物大小的目镜测微尺。目镜上标5×,10×,15×等放大倍数,不同放大倍数的目镜,其口径是统一的,可互换使用。

② 物镜:是显微镜中最重要的部件。物镜有低倍(10×以下)、中倍(20×)、高倍(40~65×)和油镜(90×以上)等不同的放大倍数。油镜镜壁上刻有"OI"(oil immersion)或HI(homogeneous immersion)字样,也有刻一圈红线或黑线为标记的,借以区别其他物镜。物镜上标有放大倍数、数值孔径(numerical aperture,简写为NA)、工作距离(物镜下端至盖玻片间的距离,mm)及要求盖玻片的厚度等主要参数(图1-1-2)。

数值孔径是指介质的折射率与镜口角1/2正弦的乘积,可用 $NA = n \cdot \sin\frac{\alpha}{2}$ 表示。式中,n为物镜与标本间介质的折射率,α为镜口角(通过标本的光线延伸到物镜前透镜边缘所形成的夹角)(图1-1-3)。

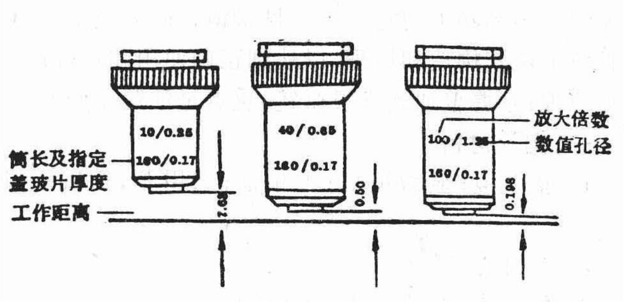

图1-1-2　XSP-16型显微物镜的主要参数

显微镜的优劣主要取决于物镜分辨率的大小。所谓分辨率就是显微镜工作时能分辨出物体两点间最小距离(D)的能力。D值愈小表明分辨率愈高。D值可用下列公式表示:

$$D = \frac{\lambda}{NH}$$

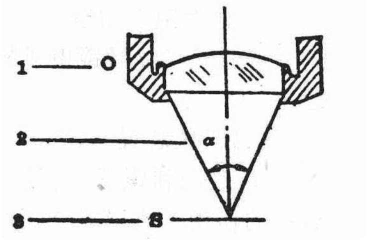

图1-1-3　物镜的镜口角

1.物镜;2.镜口角;3.标本面

若要提高物镜的分辨率有两条途径:(a)缩短光的波长。普通光学显微镜的缺点是所用的照明光源不可能小于可见光的波长范围(约400~700nm)。(b)增大物镜的数值孔径。其影响因素之一是镜口角α。当sinα增大到最大时,α值=180°,就是说进入透镜的光线与光轴成90°角,这是不可能的,所以 $\sin\frac{\alpha}{2}$ 的最大值总是小于1。现在所用的油镜其 $\frac{\alpha}{2}$ 为60°左右。影响数值孔径的另一个因素是介质的折射率。不同的介质,其折射率是不同的,空气的折射率为1.0,水的折射率为1.33,香柏油的折射率为1.52,玻璃的折射率为1.5。因此,通常在物镜和标本之间加入香柏油作介质,就可使数值孔径增大到1.2~1.4。所以,当用数值孔径为1.25的油镜来观察标本时,就能分辨出距离不小于0.2μm的物体,而大多数细菌的直径在0.5μm左右,故在油镜下能看清其细胞形态及某些构造。

显微镜的总放大倍数是指物镜放大倍数和目镜放大倍数的乘积。但由于物镜和目镜搭配的不同,其分辨率也不同。例如在总放大倍数一样的情况下,采用数值孔径大的40倍物镜和10倍目镜相搭配,其分辨率就比数值孔径小的20倍物镜和20倍目镜相搭配时高些,效果也较好。

③ 聚光器:聚光器是起聚光线的作用,可上下移动,其边框上刻有数值孔径值。当用低倍物镜时聚光器应下降,而当用油镜时则聚光器应上升到最高位置。在聚光器的下方安装有可变光阑(虹彩光圈),它是由十几张金属薄片组成,以放大或缩小光圈来调节光强度和数值孔径的大小。在观

察较透明的标本时，光圈宜缩小一些，这时分辨率虽降低，但反差增强，从而使透明的标本看得更清楚。但不宜将光圈关得太小，以免由于光干涉现象而导致成象模糊。

④ 反光镜：反光镜安装在聚光器下方的镜座上，它是一个由平凹两个面的双面镜，可以在水平与垂直两个方向上任意旋转。其作用是采集光线，并将光线射向聚光器。凹面镜能起会聚光线的作用，因此，未安装聚光器的显微镜及光源较弱时可应用凹面，而在光源较强及用聚光器时，一般可用平面镜。

2. 油镜使用的原理

对于个体微小，用高倍镜仍观察不清的微生物，则必须使用油镜。使用时，需要在标本和物镜之间加入一种镜头油，如香柏油，所以叫油浸接物镜，简称油镜。

由于油镜镜面很小，使用时，标本与镜面又非常靠近(0.14～0.19mm 左右)，因而，进入镜头的光线较少。当光线由聚光器通过载玻片与镜头间的空气时，由于载玻片与物镜之间的介质为空气(接物镜干燥系，图 1－1－4，A)

空气折射率为 1，由于空气与载玻片的密度不同，使光线受到折射，发生散射现象，结果进入物镜的光线必然减少，这样就降低了视野的照明度。若载玻片与物镜之间的介质不是空气，而是一层油质，一般用香柏油，其折射率为 1.515，与玻璃的折射率(1.52)接近。光线通过载玻片后直接经过香柏油进入物镜而几乎不发生折射(接物镜油浸系，图 1－1－4，B)，使视野增加照明度，使物镜的数值孔径增大，这样就能使物像更加清晰。

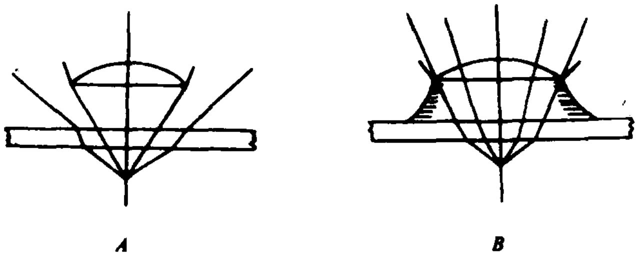

图 1－1－4　**干燥系物镜 A 与油浸系物镜 B 光线通路**

(二)显微镜的使用(主要是油镜的使用)

1. 用前检查：从显微镜箱中取出显微镜时，用右手拿镜臂，左手托镜座，直立移动，轻放在平稳的桌面上，检查各部零件是否齐全，镜头是否清洁，否则报告老师。

2. 调节光源：正确的照明是获得良好观察效果的前提。将低倍镜转到工作位置，使镜头与载物台距离约为 5mm 左右，下降聚光器，完全打开可变光阑，然后移动反光镜采集光源，一般以采集北窗射入的自然散射光为宜，不宜采用直射日光。如遇阴天、下雨或晚上可用普通日光灯照明。

当用显微镜灯(钨丝灯泡)照明时，因其亮度较亮，而且发射光谱中有较多刺激眼睛的红光，故应根据标本染色情况选用绿色、黄绿或蓝绿色滤光器或一面磨砂的有色滤光片，以减弱光的强度，同时又可吸收掉红光，使视野光线柔和，并可保护眼睛。

旋转反光镜，使光线投射到反光镜中央，并调节聚光器或调节光圈大小，使视野得到均匀的照明。

3. 低倍观察：低倍镜视野广焦点深度深，易发现目标确定观察位置，故先低倍镜观察。

将载玻片标本(涂面朝上)置于载物台的标本夹上，并将标本中心部位移至物镜的正下方，转动粗调节螺旋，使镜头下降至镜面距离检视物大约 5mm 处。然后以左眼看目镜，另一眼睁开，一边观察视野，一边扭动粗调节螺旋，使镜头缓慢地升高，至视野内出现物像后，改用细调节螺旋，上下微微转动，仔细调节焦距和照明，直至视野内出现清晰的物像，选择适当部位，移到视野中心。

4. 中倍、高倍观察：依次由低倍镜至中倍镜、高倍镜观察的过程中，应适当逐步上升聚光器，以

调节光照，同样也要选择适当部位，并移至视野中心。

5. 油镜观察：将聚光器提升至最高点，转动转换器，移开高倍镜，使高倍镜和油镜成“八”字形，在标本中央滴一小滴香柏油，使油镜镜头浸入香柏油中，微微转动细调节螺旋，使物镜清晰可见。若油镜上升到已离开油面还未看清物像，则需重新调节。此时，可以侧面注视，用粗调节螺旋将油镜小心地下降，使镜头几乎与标本相接，但不可用力过猛，以免压碎载玻片，损坏镜头。再用右手向上转动粗调节螺旋，当视野中有模糊物像出现时，改用细调节螺旋，使物像清晰为止。

6. 调换标本：观察新的标本时，必须从第3条开始操作。

7. 用后复原：观察完毕，上旋镜筒，先用擦镜纸擦去镜头上的油，然后再用擦镜纸沾取少许二甲苯（香柏油可溶于二甲苯）擦去镜头上的残留油迹，最后再用擦镜纸擦去残留的二甲苯。机械部件可用细软布擦去灰尘和冷凝水，下降镜筒，将接物镜转成八字形置于载物台上。下降聚光器（切勿使接物镜与聚光器相碰受损），反光镜垂直于镜座。放进显微镜箱中锁好，并放入规定的显微镜柜中。

三、注意事项

1. 不准擅自拆卸显微镜的任何部件，以免损坏。

2. 镜面只能用擦镜纸擦，不能用手指或粗布擦，以保证镜面的光洁度。

3. 观察标本时，必须依次用低倍镜、中倍镜、高倍镜，最后用油镜。与目视接目镜时，特别在使用油镜时，切不可用粗调节螺旋向下转，以免物镜碰到载玻片而受到损伤或压碎载玻片。

4. 观察时，两眼睁开，养成两眼能够轮换观察的习惯，以免眼睛疲劳，并且能够在左眼观察时，右眼注视绘图。

5. 拿显微镜时，一定要右手拿镜臂，左手托镜座，不可单手拿，更不可倾斜拿。

6. 显微镜应存放在阴凉干燥处，以免镜片生霉菌而腐蚀镜片。

四、问题与思考

1. 要使视野明亮，除光源外，还可采取哪些措施？

2. 使用油镜时应注意哪些问题？

3. 列表比较油镜、高倍镜和低倍镜在数值孔径、工作距离及物镜镜头大小等方面的差别。

4. 镜检标本时，为什么先用低倍镜观察，而不是直接用高倍镜或油镜观察？

5. 试述影响分辨率的三要素。

6. 当物镜由低倍到油镜时，随着放大倍数的增加，视野的亮度是增强还是减弱？应如何调节？

1-2 相差显微镜的构造和使用

相差显微镜可用于观察活的细菌细胞形态及其内部某些结构，如观察酵母菌的细胞核形态。本实验要求：了解相差显微镜的原理并学习使用方法。

一、实验材料

1. 相差显微镜；显微镜灯。

2. 擦镜纸；载玻片；盖玻片等。

3. 待观察活菌种或水封片。

二、实验程序

（一）相差显微镜的原理及构造

当光线通过透明的活细胞后，由于细胞内各部分结构密度的差异（或折射率不同），而使光波的相位发生变化，形成相位差。但是，人的肉眼是分辨不出相位差异的，只能分辨出波长（颜色）和振

幅(明暗)的差异。因此,活的透明细胞在普通光学显微镜下观察时,整个视野的亮度是均匀的,无法看出细胞的细微结构。相差显微镜就是根据光波干涉原理,借助于环状光阑和相板这两个特殊部件的作用,把相位差转变为可见的振幅差,从而能观察到活细胞内的一些结构。相差显微镜的成像原理见图(1-2-1)。相差显微镜包括环状光阑、相板及合轴调整望远镜三个特殊的部件,简介如下:

1. 环状光阑:环状光阑上有一透明的亮环,使来自反光镜的直射光只能从环状部分通过,形成一个空心园筒状的光柱,经聚光器并照射到标本以后,就产生两部分光,一部分是直射光,另一部分是经过标本后的衍射光,这两部分经物镜内相板的作用而改变了光的相位和振幅。

在相差聚光器下面装有一个转盘,盘上镶有宽窄不同的环状光阑,在不同光阑上刻有 10×、20×和 40×等字样,这表示当用不同放大倍数的物镜时,必须配合相应的环状光阑。

2. 相板:相板安装在物镜的后焦平面上,带有相板的物镜称为相差物镜(蔡氏厂用红色“PH”表示)。

相板上有一灰色的环状圈,称为共轭面。面上涂有吸光物质,直射光从这部分通过,并吸收了约 80% 直射光,以降低它的透光度。在共轭面的内外侧部分称为补偿面,面上涂有减速物质,使衍射光的相位发生改变,因此这两者相结合就能分别改变直射光和衍射光的振幅和相位。

在被检物的折射率大于介质的情况下,透过共轭面的直射光被吸收 80% 后亮度变暗,而它产生的衍射光在通过被检物后其相位已推迟 1/4 波长,再通过相板的补偿面时,相位又推迟 1/4 波长。由于这两束光的相位不同(差 1/2 波长),其合成波的振幅为两者之差,所以光线就更加暗,而标本的介质只有直射光,结果形成明亮的背景和暗的标本。这称为暗相差或正相差。

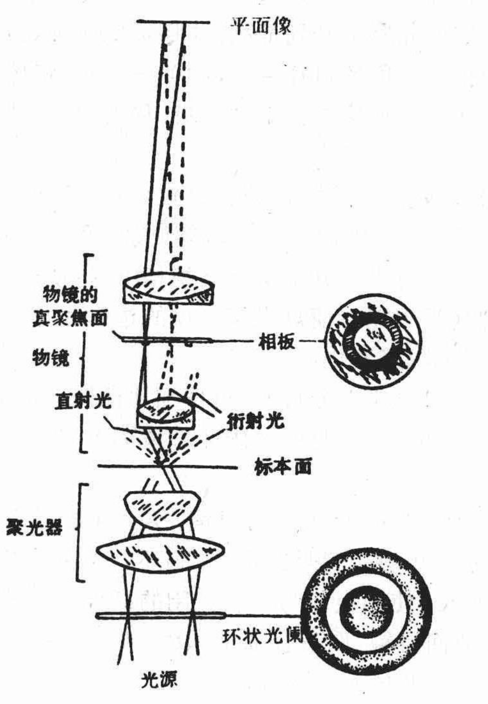

图 1-2-1 相差显微镜成像图

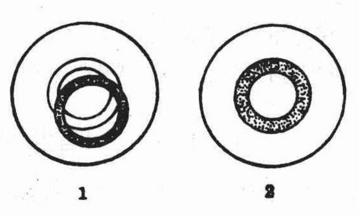

图 1-2-2 合轴调节

1. 环状光阑与相板环不重合
2. 环状光阑与相板环完全重合

与此相反,如果相板的共轭面上涂的减速物质,推迟直射光 1/4 波长,而补偿面涂的是吸光物质,结果就是直射光与衍射光的相位相同(衍射光通过物体的相位推迟了 1/4 波长),其合成波的振幅为两者之和,结果物体是明亮而背景是暗的,这称为明相差或负相差。

3. 合轴调速望远镜:它是一架特制的低倍望远镜,用以调节环状光阑和相板环的重合。

此为试读,需要完整PDF请访问: www.ertongbook.com