

高等医药院校

微生物学实验指导

余 濱 主 編

人民卫生出版社

供医疗、儿科、卫生及口腔专业用

微生物学实验指导

余 濱 主 編

陸德源 言穆琳 編
彭輝云 張 詠

人 民 卫 生 出 版 社

一九六四年·北京

微生物学实验指导

开本: 787×1092/16 印张: 11⁶/₈ 字数: 270 千字

余 瀛 主 编

人 民 卫 生 出 版 社 出 版

(北京书刊出版业营业许可证出字第〇四六号)

• 北京崇文区横子胡同三十六号 •

国防工业出版社印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 • 各地新华书店经售

统一书号: 14048·2936

1964 年 6 月第 1 版—第 1 次印刷

定价: (科五) 1.10 元 [K]

印 数: 1—6,000

序

本实验指导主要是根据“医学微生物学教学大纲”中的实验计划,并参考了部分院校的
实验讲义而编写的。

本指导分总论和各论两部分。总论着重于基本操作的学习;各论主要识别一些常见
传染病病原体的生物性状,以及了解数种临床标本的微生物学诊断过程。希望每一个医
学生,学完本指导所列内容后,除对有关的微生物学基本理论知识有进一步理解外,尚能
掌握微生物学的基本技术操作如涂片染色、分离接种、稀释方法等等;为今后有关临床医
学及科学研究工作打下扎实的基础。

实验中学生操作或示教的划分,是我们根据教学计划、教学大纲要求和我国目前多数
院校的条件而建议的,各院校可结合具体情况自行调整。至于未列入本指导的一些较为
复杂或新尖的项目,如有可能,亦可适当组织学生进行示教。

微生物学实验技术操作范围极广,我们学识有限,且对有关教学文件学习不够;选编
的内容不恰当或错误之处在所难免,尚祈各院校多予批评和指正,以能不断修订,提高质
量。

余 濱 1963 年 6 月

上海第二医学院微生物学教研组

目 录

微生物学实验的目的与要求	1	六、淀粉水解试验(示教)	34
微生物学实验室规则	2	七、吲哚试验	34
总论	3	八、硫化氢试验	35
细菌的形态学	3	九、明胶液化试验	35
实验一 显微镜的使用与细菌正		十、尿素分解试验	36
常形态的观察	3	十一、酪蛋白分解试验(示教)	36
一、普通光学显微镜	3	十二、色素的产生(示教)	36
二、细菌正常形态的观察(示教)	6	微生物在自然界和正常机体的分布	38
实验二 细菌动力检查法	7	实验七 正常人体与环境中的细菌	
一、悬滴法(示教)	7	的检查	38
二、压滴法	7	一、人体皮肤及咽喉腔中的细菌	38
三、暗视野显微镜法(示教)	8	二、水中的细菌	39
四、相差显微镜法(示教)	9	三、空气中的细菌	39
五、半固体琼脂培养基法(示教)	10	四、土壤中的细菌(示教)	40
实验三 细菌染色标本检查法	12	外界因素对微生物的影响	41
一、单染色法	12	实验八 物理因素对细菌的影响	41
二、革兰氏染色法	13	一、常用灭菌器与滤菌器(示教)	41
三、抗酸染色法	14	二、温度与细菌生长繁殖的关系	45
四、荧光染色法(示教)	14	三、细菌对湿热的抵抗力	46
五、细菌各种结构染色片的观察(示教)	15	四、紫外线对细菌的作用	46
细菌的生理学	18	实验九 化学因素对细菌的影响	48
实验四 基础培养基的制备	18	一、常用化学消毒剂的杀菌力	49
一、肉汤培养基	18	二、石炭酸对不同细菌的杀菌效力	49
二、肉膏汤培养基(示教)	19	三、不同浓度酒精的杀菌效力	50
三、肉汤琼脂固体培养基	20	四、龙胆紫对细菌的抑菌作用	50
四、肉汤琼脂半固体培养基(示教)	20	五、有机物质影响化学消毒剂杀菌	
实验五 细菌的培养法	23	效力试验	50
一、分离培养法	23	实验十 磺胺药和抗菌素对细菌	
二、纯种细菌接种法	25	的影响	51
三、厌氧培养法(示教)	27	一、磺胺药制菌的机制	51
四、二氧化碳培养法(示教)	29	二、土壤中菌类间的拮抗现象(示教)	52
实验六 细菌的新陈代谢	31	三、药物对细菌的抑菌作用(药物筛	
一、脱氢酶试验(示教)	31	选法)	52
二、单糖发酵试验	32	四、细菌对磺胺药、抗菌素的敏感度	
三、V. P. 试验	32	测定	53
四、甲基红试验	33	实验十一 噬菌体	56
五、枸橼酸盐利用试验	33	一、噬菌体的分离、鉴定和制造过程	

(示教)·····	56	二、血浆凝固酶的作用·····	82
二、噬菌体的特异性·····	57	三、链激酶的作用·····	83
三、噬菌体的效价测定·····	57	四、透明质酸酶的作用(示教)·····	83
四、噬菌体效价增长试验(示教)·····	58	实验二十 细菌毒素的作用·····	84
微生物的变异性·····	59	一、外毒素对机体的毒性及毒素与 抗毒素的体内中和作用·····	84
实验十二 细菌的变异性·····	59	二、伤寒杆菌内毒素的致病作用·····	85
一、形状的变异·····	59	实验二十一 机体的天然免疫机 制·····	86
二、鞭毛的变异·····	59	一、种的免疫·····	86
三、光滑型与粗糙型菌落变异·····	60	二、正常血清的杀菌作用·····	86
四、耐药性变异·····	60	三、溶菌酶的溶菌作用及效价测定·····	87
血清学反应·····	61	四、吞噬作用·····	87
实验十三 凝集反应·····	61	实验二十二 免疫血清的制备·····	88
一、玻片凝集反应·····	62	一、抗原的制备及免疫·····	89
二、试管凝集反应·····	62	二、动物的采血(示教)·····	89
三、间接血球凝集试验(示教)·····	63	实验二十三 变态反应·····	90
四、凝集吸收试验(示教)·····	64	一、动物过敏反应(示教)·····	91
实验十四 血型鉴定及交互配血 试验·····	66	二、结核菌素试验(示教)·····	91
一、玻片法·····	66	三、Arthus-Caxapov 氏现象(示教)·····	92
二、试管法(示教)·····	67	实验二十四 生物制品·····	92
三、交互配血试验(示教)·····	67	一、自家菌苗制备法·····	93
实验十五 沉淀反应·····	68	二、常用生物制品介绍(示教)·····	93
一、环状沉淀试验·····	69	各论·····	95
二、絮状沉淀试验·····	69	病原性球菌·····	95
三、琼脂弥散试验(示教)·····	70	实验二十五 葡萄球菌·····	95
实验十六 溶血反应与补体结合 反应·····	72	一、葡萄球菌形态及染色性·····	95
一、溶血反应与补体的作用·····	73	二、葡萄球菌培养及生化特性·····	96
二、补体结合反应·····	74	三、致病性葡萄球菌的鉴定·····	96
传染与免疫·····	77	实验二十六 链球菌·····	97
实验十七 动物的实验感染法·····	78	一、形态及染色·····	97
一、小白鼠腹腔接种法·····	78	二、培养特性·····	97
二、豚鼠皮下接种法·····	79	三、溶血试验·····	98
三、豚鼠皮内接种法(示教)·····	79	四、链激酶试验·····	98
四、家兔静脉注射法(示教)·····	79	五、抗链球菌溶血素“O”测定(示教)·····	98
实验十八 感染动物的尸体解剖 及细菌学检查·····	80	六、C反应性蛋白试验(示教)·····	99
死亡小白鼠的尸体剖检及病原菌的 分离培养·····	80	实验二十七 肺炎球菌·····	101
实验十九 细菌的侵袭力·····	82	一、肺炎球菌形态构造、培养及生化 反应(示教)·····	101
一、荚膜的致病作用·····	82	二、胆汁溶菌试验·····	102
		三、奥泼托根(Optochin)敏感试验·····	102

实验二十八 奈瑟氏菌属.....	104	二、血液培养.....	119
一、脑膜炎球菌与卡他球菌生物特性(示教).....	104	三、血清学检查——肥达氏试验.....	120
二、淋球菌形态(示教).....	104	实验三十五 霍乱弧菌.....	122
三、氧化酶试验.....	104	一、霍乱弧菌形态及染色性(示教).....	122
实验二十九 病原性球菌未知标		二、霍乱弧菌培养特性(示教).....	123
本检查.....	105	三、霍乱弧菌生化反应(示教).....	123
一、脓汁或渗出液.....	105	四、霍乱弧菌血清凝集反应(示教).....	123
二、喉拭子.....	106	五、霍乱弧菌动力观察(以水弧菌代).....	123
三、痰.....	107	六、霍乱弧菌溶菌试验(以水弧菌代).....	123
四、血液标本.....	108	七、霍乱弧菌及 El Tor 弧菌 V. P. 试验及溶血试验(示教).....	124
五、脑脊液.....	108	实验三十六 嗜血杆菌属及包特氏菌属.....	126
肠道杆菌.....	109	一、流行性感冒杆菌生物特性(示教).....	126
实验三十 大肠杆菌、产气杆菌.....	109	二、百日咳杆菌生物特性(示教).....	126
一、大肠杆菌、产气杆菌形态(示教).....	110	实验三十七 巴氏杆菌属.....	127
二、大肠杆菌、产气杆菌培养(示教).....	110	一、鼠疫杆菌形态.....	127
三、大肠杆菌、产气杆菌生化反应(示教).....	110	二、鼠疫杆菌培养(示教).....	128
实验三十一 沙门氏菌属.....	112	实验三十八 布鲁氏菌属.....	129
一、沙门氏菌属形态及染色(示教).....	112	一、布鲁氏菌生物特性(示教).....	129
二、副伤寒丙杆菌、肠炎杆菌培养、生化反应及血清反应(示教).....	112	二、黑得尔逊(Huddleson)氏反应.....	129
三、伤寒杆菌、副伤寒甲杆菌、副伤寒乙杆菌培养、生化反应及血清反应.....	113	三、调理吞噬试验(示教).....	130
实验三十二 痢疾杆菌.....	114	实验三十九 需氧芽胞杆菌属.....	132
一、痢疾杆菌属形态(示教).....	114	一、炭疽杆菌生物特性(示教).....	132
二、志贺氏痢疾杆菌及史密斯氏痢疾杆菌培养、生化反应及血清反应(示教).....	114	二、枯草杆菌生物特性(示教).....	132
三、弗氏及宋内氏痢疾杆菌培养、生化反应及血清反应.....	115	三、Ascoli 氏反应(示教).....	133
实验三十三 粪产硷杆菌、变形杆菌、绿脓杆菌及嗜盐杆菌.....	116	实验四十 厌氧芽胞杆菌属.....	133
一、粪产硷杆菌及普通变形杆菌生物特性(示教).....	116	一、肉毒杆菌形态(示教).....	134
二、绿脓杆菌生物特性(示教).....	117	二、破伤风杆菌及产气荚膜杆菌形态及培养特性.....	134
三、嗜盐杆菌生物特性(示教).....	117	三、破伤风杆菌及产气荚膜杆菌动物试验.....	134
实验三十四 肠道杆菌未知标本检查.....	118	四、Nagler 氏反应(示教).....	135
一、粪便(或肛拭)标本分离病原菌.....	118	实验四十一 棒状杆菌属.....	136
		一、白喉杆菌及类白喉杆菌形态染色.....	136
		二、白喉杆菌及类白喉杆菌培养特性.....	136
		三、白喉杆菌及类白喉杆菌生化反应.....	137
		四、白喉杆菌及类白喉杆菌毒力试验(示教).....	137
		五、标本检查.....	138
		实验四十二 分枝杆菌属.....	139

一、麻风杆菌形态染色(示教)·····	140	三、病毒干扰现象及干扰素(示教)·····	156
二、非致病性分枝杆菌形态及培养 (示教)·····	140	实验四十六 病毒培养法·····	158
三、结核杆菌形态及培养(示教)·····	140	一、病毒动物接种法·····	158
四、结核杆菌毒力试验(示教)·····	141	二、病毒鸡胚培养法·····	160
五、结核菌素试验(示教)·····	142	三、病毒的组织培养法·····	163
六、结核病人痰标本的直接检查·····	142	实验四十七 病毒血清学反应·····	165
实验四十三 螺旋体·····	144	一、血凝抑制试验·····	166
一、螺旋体形态及染色·····	145	二、补体结合试验(示教)·····	168
二、梅毒病人血清学反应·····	145	三、中和试验(示教)·····	170
三、钩端螺旋体凝集-溶解反应暗视 野检查(示教)·····	147	实验四十八 病毒的分离与鉴定·····	173
实验四十四 立克次氏体·····	150	一、流感病毒的分离和鉴定·····	173
一、立克次氏体形态和染色性(示教)·····	151	二、脑炎病毒的分离与鉴定(示教)·····	174
二、鸡胚培养法(卵黄囊接种)·····	151	三、肠道病毒的分离与鉴定(示教)·····	176
三、血清学诊断法——外斐二氏反应·····	152	实验四十九 真菌与放线菌·····	177
病毒·····	154	一、真菌基本形态及菌落特点 (示教)·····	177
实验四十五 病毒的形态学及生 物特性·····	154	二、浅部真菌病临床标本检查·····	179
一、病毒形态学·····	154	三、几种深部真菌病病原菌的形态及 培养特性(示教)·····	180
二、病毒血凝、释放及溶血现象 (示教)·····	156	四、观察牛型放线菌病灶组织切片·····	180
		五、真菌的小培养法·····	180

微生物学实验的目的與要求

医学微生物学的实验课,是本课程学习过程中的重要环节之一。

医学微生物学实验的目的。在于使学生加深和巩固对讲课内容的理解和体会;并在系统理论知识的基础上,使学生学习及掌握微生物学的基本操作技术,为今后有关的传染病诊断与科学研究工作上必要的检查方法和技能打下良好基础。

实验分为总论、各论两大部分。在总论实验中,着重于涂片染色、分离接种、稀释方法等基本操作的学习。各论实验中,主要对一些危害人类健康较为严重的传染病病原微生物进行较有系统的生物学性状试验;并通过数种临床标本的检查,使学生了解传染病的病原学及血清学诊断方法的过程。在微生物学的整个实验过程中,应严格贯彻“无菌概念”的培养和训练。

实验形式基本上分为教师示教及学生自己操作两种。前者主要印证理论,而后者尚能通过对各项实验的操作,可从不同角度进行反复学习、训练,以致最后能较熟练地掌握这些基本操作技能。

为了提高实验课的效果,要求学生们在实验前后,应做到下列数点。

每次实验前务必作好预习,明确实验的目的、内容、操作中注意点及其理论依据等,避免或减少错误的发生。

在实验过程中,要坚持严肃性、严格性与严密性。对操作的实验,应遵照实验指导所列步骤,依次进行;对示教的实验,也要仔细观察,并联系有关理论。实验中亦须注意科学地分配和运用时间。

实验结果必须真实地记录下来,然后进行分析,得出结论。遇有和理论不符的结果时,应尽量探讨其原因,训练自己的科学思维。实验完成后,要写出实验报告。

微生物学实验室规则

在进行微生物学实验时,时时要记住,我们实验的对象大多是病原微生物。如果不慎发生意外,不仅自身可能招致感染,且有可能将病原微生物传给他人。

一、书包、衣物等勿带入实验室,必要的文具、实验指导、笔记等带入后,亦要和操作部位远离。

二、进实验室穿上实习衣,离室时脱下,要反折。

三、实验室内要保持安静、有秩序,不得高声谈笑,或随便走到别组,影响他人实验。

四、实验室内禁止饮食、吸烟或用嘴湿润铅笔或标签等,也不要以手抚摸头面等部。

五、若发生吸入菌液、割破手指等事故,应立即报告指导教师,进行紧急处理。

1. 皮肤破伤:先除尽异物,用蒸馏水或生理盐水洗净后,涂以2%红汞或2%碘酒。

2. 灼伤:涂以凡士林油、5%鞣酸或2%苦味酸。

3. 化学药品腐蚀伤:若为强酸,先用大量清水冲洗,再以5%碳酸氢钠或5%氢氧化铵溶液洗涤中和之;强硷腐蚀伤则先以大量清水冲洗后,再用5%醋酸或5%硼酸溶液洗涤中和之。若受伤处是眼部,经过上述步骤处理后,最后滴入橄榄油或液体石蜡一、二滴以滋润之。

4. 吸入病菌菌液:应立即吐出后,以大量清水漱口;并根据菌类不同,必要时需服用有关药物等以资预防。

5. 菌液流洒桌面:立即以抹布浸沾2~3%来苏或5%石炭酸液后,泡在污染部位,经半小时始可抹去。若手上沾有活菌,亦应浸泡于上述消毒液10~20分钟后,再以肥皂及水洗刷之。

6. 火险:关闭电门、煤气门;如系酒精、乙醚、汽油等火,切勿用水,应以沙土等灭火。

六、吸过菌液的吸管、毛细吸管,要投入含有2~3%来苏或5%石炭酸液的玻璃筒中,不得放在桌上,亦不可冲洗于水槽内。用过的玻片也应放于含消毒液的器皿内。

七、爱护公物,节约使用实验材料。器材如有损坏,应立即向指导教师报告,听候处理。

八、实验完毕,整理桌面;需培养的物品要放入孵育箱。水电等关好;洗手后离室。

总 論

細菌的形态学

細菌是微生物中的一类,为单细胞植物。种类繁多,按正常形态可分成球菌、杆菌和螺旋菌三类。体积很小,通常以微米(μ)计算;各菌大小虽不一致,但大多在一至数微米之间。如化脓性球菌的直径,一般为 $0.8\sim 1.2\mu$;肠道杆菌约长 $2\sim 3\mu$,宽 $0.5\sim 1\mu$;弧菌约长 $1\sim 3\mu$,宽 $0.3\sim 0.6\mu$ 。在不同的环境条件下,細菌的形态和大小可以发生变化。細菌细胞的结构基本上与高等植物者相似,有细胞壁及由细胞浆、胞浆膜、核组成的原生质,有的尚有鞭毛、荚膜或芽胞等特殊构造。每种结构在細菌的生命活动过程中都起着一定的作用。

由于細菌微小,且为无色半透明体;因此,不能被肉眼直接看到。必须借显微镜放大,最好是经过合宜的染色后,才能较清楚地察见。

实验一 显微镜的使用与細菌

正常形态的观察

內 容

一、普通光学显微镜

二、細菌正常形态的观察(示教)

一、普通光学显微镜

显微镜是一种放大仪器。根据实验的目的要求不同,可分别选用普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜或电子显微镜等。在細菌的形态学检查方面,以普通光学显微镜(以下简称显微镜)最为常用。

(一) 显微镜的构造

显微镜的构造(图1),分为光学和机械两大部分。

1. 光学部分:

(1) 接物鏡:因其下端接近被检物体,故名。为显微镜上的主要光学装置,由多块透鏡组成。一般显微镜具有 $3\sim 4$ 个接物鏡,分成干燥系及油浸系两组;干燥系又按放大倍数分为低倍鏡和高倍鏡。各接物鏡的放大率可由其外形辨认,鏡頭长度愈大,鏡片口径愈小,放大倍数愈大;反之,放大倍数愈小。油鏡頭的下缘,一般刻有一圈黑线。此外,各接物鏡上尚有其它标志,如低倍鏡: $10\times$ (放大倍数),N. A. (Numerical aperture,孔径数) 0.25;高倍鏡: $40\times$, N. A. 0.65;油鏡: $100\times$, N. A. 1.25。

(2) 接目鏡:亦为重要的光学部分之一,装在鏡筒上端,和检查者的眼睛接近,故名。接目鏡由二块透鏡组成,其上刻有放大倍数,常用的为5倍、10倍及15倍。为便于指示物象起见,鏡中常装有黑色细絲一条,作为指针。

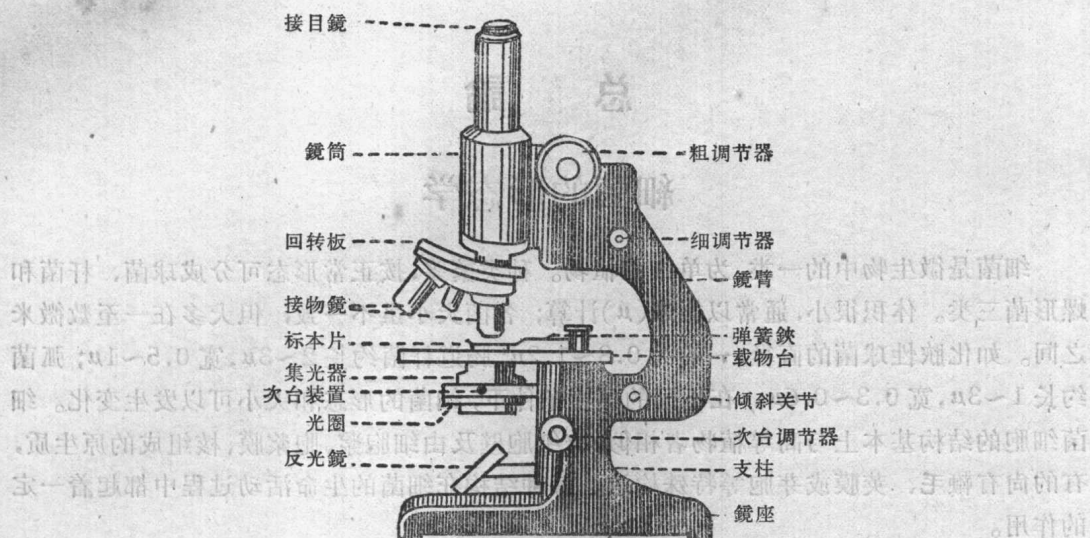


图1 普通光学显微镜

(3) 集光器：位于载物台下方的次台上，由数个透镜组成。可以上下移动，调节并集聚由反光镜反射来的光线，使集中于载物玻片上。

(4) 反光镜：装在显微镜的最下方，有平凹两面，可自由转动方向，以反射光线至集光器。

2. 机械部分：

(1) 镜筒：在显微镜前方，是一个金属制的高心圆筒，光线可从此通过。

(2) 镜臂：在镜筒后面，呈圆弧形。使显微镜便于搬移，并为将镜筒倾斜时的握持部。

(3) 镜座：是显微镜的底部，呈马蹄形，用以支持全镜。

(4) 回转板：装在镜筒下端，有3~4个圆孔，备装不同放大率的接物镜用。根据需要，回转板可以转动，借以调换接物镜。

(5) 倾斜关节：介于镜臂和镜座间，为镜筒作前后倾斜变位时的支持点。

(6) 调节器：在镜筒后方两侧，分粗细两种。粗调节器在镜筒与镜臂之间，司镜筒较大距离的升降。细调节器位于粗调节器下方，可以精确地调节距离；每转一周，可使镜筒升降 100μ ；有的在细调节器螺旋上附有刻度，每一小格刻度相当于 2μ 。

(7) 载物台：在镜筒下方，呈方形或圆形，用以载放被检物体。中央有孔，可以透光。台上装有一付弹簧夹，镜检时用以固定标本片。有的载物台上装有标本推进器，捻转螺旋，能使标本前后左右移动。

(8) 光圈(虹彩)：在集光器下方，可以任意开闭，用以调节射入集光器光线的多寡。

(9) 次台：位于载物台下，装放集光器及光圈用。

(二) 显微镜的使用法

1. 使用显微镜时，必须端坐，凳和桌的高低要配合适宜。显微镜应直立桌上，勿将镜臂弯屈。因于微生物学实验时，大多使用油镜或直接检查不染色的活菌悬液；若载物台倾斜，油滴或菌液将流淌外溢，影响观察或造成污染。

2. 显微镜不能采用直接阳光作为光源，因其光线过强，反而不易看清；且反射热有损光学装置；以间接日光佳。在光线灰暗的白昼或夜晚，可采用青色或蓝色灯光。若是黄色

灯光,应在集光器下加放一块蓝色玻璃片,或在灯光和显微镜间置一盛有蓝色硫酸铜溶液的球形烧瓶,滤去黄光。以天然光为光源时,用反光镜的平面;采用人工灯光时,宜用其凹面。

3. 转动反光镜,使光线集中于集光器。根据需要,上下集光器和缩放光圈,以获得最合宜的光度。一般染色标本、油镜检查时,光度宜强,可将光圈开足,集光器上升至载物台相平;未染色标本、低倍镜或高倍镜观察时,应适当地缩小光圈、下降集光器,使光度减弱;否则光线过强,反不易窥见。

4. 将标本放在载物台上,用弹簧夹或标本推进器固定,移置欲检部分于接物镜下。

5. 先用低倍镜找出标本的范围,再换用高倍镜或油镜观察。

6. 使用油镜时,先加香柏油(Cedar oil)(或以松香蓖麻油混合液替代)一滴于标本的欲检部位。眼睛从镜筒侧面看着,将粗调节器作顺时针方向缓缓转动,使镜筒渐渐下降,直至油镜头浸没于油内(下降的程度是使油镜的透镜镜面几乎和标本片接触,但两者切勿相碰!);然后移目至接目镜,一面观察,一面再将粗调节器作反时针方向缓慢地转动,获得模糊物象时,换用细调节器转动至物象清晰为止。调节时千万不可使用强力将镜头任意下压,以致压碎标本玻片,或甚至将贵重的油镜损毁。

使用油镜时,须加香柏油的原理是由于油镜的透镜很小,自标本玻片透过的光线,因介质密度(从载物玻片至空气,再进入油镜)不同,有些光线因折射(如图2中之AA')或全反射,就不能进入透镜,致使射入的光线较少,物象显现不清。若在油镜与载物玻片中间加入和玻璃折射率($n = 1.52$)相仿的香柏油($n = 1.515$),则不使通过的光线有所损失,进入透镜的光量既多,视野的亮度也就增大了。此外,加用香柏油后,尚能增加孔径数,提高显微镜的分辨本领。

7. 由低倍镜换用高倍镜观察时,可转动回转板,将高倍镜移至镜筒下,再略行调节即可。若直接使用高倍镜,亦须如使用油镜然,先以眼睛从侧面看着镜筒下降至镜头将触及标本时,再移目至接目镜,以粗细调节器调节之。

8. 观察时如发现有黑影或异物,可先转动接目镜,若该物随之亦转,则在接目镜中;如不随着转动,可移动标本片,若移动,则在片上;否则,即在接物镜上。

9. 显微镜放大率的计算法有数种。精确计算法是以M表示放大倍数,D表示明视距离, Δ 表示镜筒长度, f_1 表示物镜的焦距, f_2 表示目镜的焦距,则得下列公式:

$$M = \frac{\Delta D}{f_1 f_2}$$

设某显微镜的高倍镜焦距为4毫米,接目镜焦距为25毫米,镜筒长160毫米,则此显微镜的放大率为:

$$M = \frac{160 \times 250}{4 \times 25} = 400 \text{ 倍}$$

若镜筒的长度不变,显微镜的放大倍数即为接目镜和接物镜的各单独放大率的乘积。如使用的接目镜为10倍,接物镜为100倍,则:

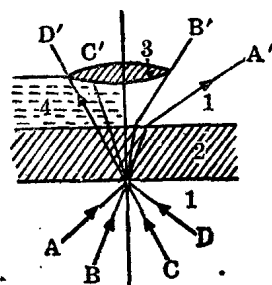


图2 油镜加香柏油的原理

1. 空气 2. 玻璃片 3. 油镜透镜 4. 香柏油

$$M = \text{接目鏡放大率} \times \text{接物鏡放大率} = 10 \times 100 = 1,000 \text{ 倍}$$

普通光学显微镜一般能将物体放大1,000~2,500倍。

10. 观察标本时,应练习两眼同时睁开,以减少疲劳。开始不习惯时,可用一手掩目,但被遮盖的眼睛不要闭上,以后再逐渐将手移去。最好以左眼窥镜,右眼管书绘。

(三) 显微镜的保护

1. 显微镜是很贵重和精致的仪器,使用时要小心爱惜,勿随意折散玩弄。
2. 接物镜和接目镜必须保持清洁。油镜用毕,应即以擦镜纸或软绸(不能用布类或普通纸张)拭去香柏油。如油已干,或透镜模糊不清,可沾少许二甲苯擦净,并随用干的擦镜纸或软绸拭去二甲苯;否则用以粘固透镜的胶质能被二甲苯溶解,日久后镜片将移位或脱落。
3. 强酸、强碱、氯仿、酒精、乙醚等都能去漆或损坏机件,不可使用。
4. 显微镜用毕,擦净油镜后,需将低倍镜移至中央,或将各物镜转成“八”字形;集光器稍下降,以免接物镜与集光器相碰受损。然后放入镜箱,或镜外加盖钟形玻罩。
5. 显微镜放置的地方要干燥,以防止透镜生霉;但亦要避免阳光的曝晒。

二、细菌正常形态的观察(示教)

细菌在适宜的环境条件下,保持着一定的形态。细菌的正常形态基本上分为球菌、杆菌和螺旋菌三类。球菌按其分裂方向与分裂后排列情况又分成双球菌、链球菌、四联球菌、八迭球菌、葡萄球菌等;杆菌也有球杆菌、链杆菌、分枝杆菌、棒状杆菌等之分;螺旋菌中菌体仅有一个弯曲,呈逗点状者叫弧菌,菌体有2~3个回转,且较坚硬者为螺菌。

材料

1. 球菌示教片: 双球菌、链球菌、四联球菌、八迭球菌、葡萄球菌。
2. 杆菌示教片: 大杆菌、小杆菌、球杆菌、棒状杆菌、分枝杆菌。
3. 螺旋菌示教片: 弧菌、螺菌。

方法

1. 使用显微镜的油镜,观察各种球菌、杆菌和螺旋菌示教片,比较各菌的形状、大小、排列等性状。
2. 绘图说明。

附录

自制显微镜油法: 取上等松香100克,以50毫升乙醚溶解之;用滤纸过滤,除去杂质;滤液于60℃左右水锅中蒸发,至完全没有乙醚气味为止,否则,将有损于油镜头。煮沸蓖麻油20~30分钟,除去水滴,使之透明;煮沸时需用玻棒不断搅动,以防油中水滴因受热爆炸外溢。将已经处理过的松香油与蓖麻油按1:3~4比例混合,混合时要边加边搅动,且需在加热过程中进行;混合后,继续煮沸5~10分钟,以助溶解,直至透明为止。若不够清晰,可用一、二层纱布过滤,再煮沸,即能获得满意的结果。

问 题

1. 显微镜的透镜为何不能用普通纸张或布类揩擦?
2. 仅根据细菌的形态,能否鉴别其菌类?

实验二 细菌动力检查法

内 容

一、悬滴法(示教)

四、相差显微镜法(示教)

二、压滴法

五、半固体琼脂培养基法(示教)

三、暗视野显微镜法(示教)

一般认为鞭毛是细菌的运动器官。有鞭毛的细菌,具有真正的运动,能定向地由一个地方较快速地泳动到另一个地方。没有鞭毛的细菌,由于体重微小,受到所处环境中液体分子的冲击而仅呈左右前后、位置变更不大的摇摆颤动。检查细菌有无动力的方法颇多,有悬滴法、压滴法、暗视野显微镜法、相差显微镜法、半固体琼脂培养基法等,其中以半固体琼脂培养基法及压滴法较最常用。

许多杆菌和螺形菌具有鞭毛,有动力;一般球菌无鞭毛,没有动力。因此,细菌的运动力是细菌特征之一,可以帮助鉴别细菌的种类。

一、悬滴法(示教)

材料

1. 菌种: 变形杆菌、葡萄球菌幼龄(8~12 小时)肉汤培养物。
2. 凹玻片、盖玻片、凡士林(或浆糊)。

方法

1. 取凹玻片一张,在凹窝四周涂抹凡士林(或浆糊)少许。
2. 取一接种环的变形杆菌或葡萄球菌幼龄肉汤培养物,放于盖玻片中央。
3. 将凹玻片反转,使凹窝对准盖玻片中心,复于其上;粘住盖玻片后再反转。以接种环柄轻压盖玻片,使与凹窝边缘粘紧(图 3)。

4. 先以低倍镜找到悬滴的边缘后,再换用高倍镜观察(因凹玻片较厚,油镜焦距很短,故一般不能用油镜来检查)。

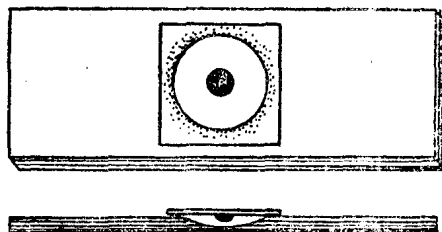


图 3 悬滴法
上、正面 下、侧面

二、压 滴 法

材料

1. 菌种: 变形杆菌、葡萄球菌幼龄(8~12 小时)肉汤培养物。
2. 盖玻片、载玻片、镊子。

方法

1. 以接种环取变形杆菌或葡萄球菌菌液 2~3 环,放于载玻片中央。
2. 用镊子挟住盖玻片,复盖于菌液上。放置时,先使盖玻片一边接触菌液,缓缓放下,以不发生气泡为佳。
3. 先以低倍镜找妥位置,再以高倍镜或油镜观察。

三、暗視野显微镜法(示教)

普通光学显微镜让来自光源的光线,在透过标本后直接进入物镜。由于标本的各部分对光线吸收的程度不一,因而产生了明显的对比,使我们能认识标本各部分的形态与大小;这时视野是明亮的,这种照明方法叫做明视野照明,是通常使用的方法。

暗视野显微镜,是在普通光学显微镜上安装一个特制的集光器——暗视野集光器,其中央为不透光的黑板所遮,光线不能直接通向镜筒,仅可从其四周边缘斜射到载玻片的标本上。因光线不能直接上升,所以视野背景是暗的。从集光器斜射到细菌等微粒上的光线,由于散射作用而发出亮光,反射到接物镜内。故在强光照射下,可以在黑色的视野中看到发亮的菌体。犹如黑夜的天空,闪烁着点点星光;也正象我们在暗室内,能看见从隙缝漏入的阳光内,有千万颗尘埃微粒跳跃飞舞其中一样。

暗视野集光器有两种类型,即抛物面型(图4)和心型(图5)。在微生物学中大多使用抛物面型。

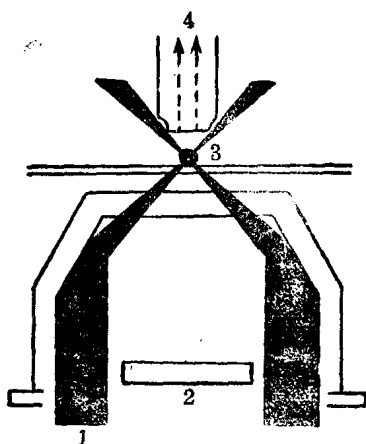


图4 抛物面型暗视野集光器

- 1.光束 2.遮光板 3.标本
4.射入镜筒的光线

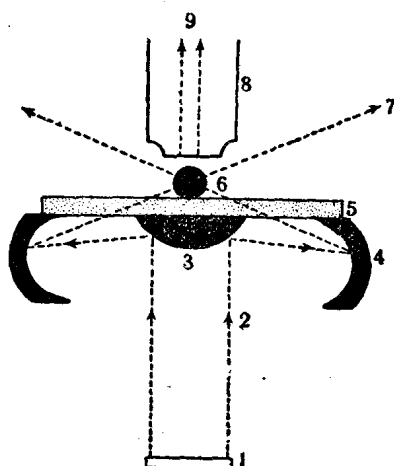


图5 心型暗视野集光器

- 1.光源 2.光束 3.圆形反光镜 4.反射光线
(经此再反射到标本) 5.载物玻片 6.标本
7.散射光线 8.接物镜 9.射入镜筒的光线

暗视野检查中,由于不让光源的光线直接进入物镜,因此,物镜的N.A.(孔径数)一般不应大于0.9;若用N.A.比0.9大的物镜,就必须在物镜中加装一个虹彩光阑,以减少N.A.;有的特制油镜头内附有可以缩放的光阑,使用更为便利。

暗视野显微镜的分辨本领比普通光学显微镜要大,可以查见相当于可见光波波长1%大小的微粒的存在。直径大于 0.3μ 的颗粒,在暗视野显微镜中可以看出其大小和形态;对于更小的颗粒,则仅能根据其发亮的点,知其存在与地位,而无法判断其形态及大小。

在微生物学中,暗视野检查法主要用于未染色的活体细菌、螺旋体等的形态和动力的观察;尤其是未染色的活螺旋体,在普通光学显微镜明视野检查时极难观察清楚。

材料

1. 菌种: 变形杆菌、葡萄球菌幼龄(8~12小时)肉汤培养物。

2. 盖玻片(0.16mm 以下)、薄载玻片(1.5mm 以下)、暗视野集光器、虹彩光阑或附有光阑的特制油镜头、强光灯。

方法

1. 取下普通光学显微镜上原有的明视野集光器,换装暗视野集光器,使其顶面与载物台相平。

2. 卸下油镜,添加一虹彩光阑或换以附有缩放光阑的特制油镜头。

3. 取2~3环菌液,放于薄载玻片上,加复盖玻片。

4. 在暗视野集光器上加香柏油一滴,然后将次台略向下移。

5. 置标本片于载物台上,上升集光器,使其表面的镜油与载玻片接触,慎勿发生气泡。

6. 转动反光镜,使光线集中于暗视野集光器上;用低倍镜观察,当视野中有一圆形光环出现时,转动集光器上的调节柄,将光环移置于视野中心。

7. 另加香柏油一滴于盖玻片上,以油镜检查。

四、相差显微镜法(示教)

相差显微镜的主要特点是在普通光学显微镜的光学系统中加装一些装置,使透过光线中的一部分光束速度减慢;因而部分地或完全地抵消了其余光束的光度,使标本变为灰暗色,和背景的对比鲜明,易于检查。

相差显微镜有三个特殊装置。相差接物镜:有低倍、高倍和油镜,即在普通接物镜的后焦点处加装了一个相差板。相差板是一块玻璃板,表面涂有吸收膜,由银、铬等金属在真空中蒸发沉淀而成,可将强烈光线吸去50~95%;此外,尚用氯化镁等喷涂成圆环形的相差膜,使光线延迟或加快 $\frac{1}{4}\lambda$ 。相差集光器:在器下有一转盘,盘上装置直径不同的3~4个圆环形光阑,光阑孔一般很窄,上标明10×、20×、40×、100×等;另有未装光阑的孔,可供明视野检查用。辅助镜:或称对中心镜,系一种调整中心用的合轴望远镜。此外,尚有强光灯、滤光片、隔热玻片等附件。

相差显微镜可用在组织学、血液学、原虫学、微生物学等不染色的活体组织细胞的检查,以及一些非生物学方面的研究。在微生物学中,能用来观察细菌的动力、芽胞的形成与出芽、细菌的分裂繁殖、细胞中的病毒包涵体等。

材料

1. 菌种:变形杆菌、葡萄球菌幼龄(8~12小时)肉汤培养物。

2. 相差显微镜、载玻片、盖玻片。

方法

1. 将相差集光器装好,并放妥滤光片及隔热玻片,对准光源。

2. 制作压滴片,将标本放在载物台上。

3. 若用低倍相差接物镜检查,则将低倍镜头移至镜筒下端;转动集光器上转盘,使光线通经明视野孔处,调节距离及光度,使物象清晰;再转动转盘,使光线通经低倍镜专用的圆环形光阑。拔出接目镜,换上辅助镜,并将其抽管上下抽动,至能同时看清接物镜中相差板上的暗圈(即相差膜)和光阑上的亮圈时,捻紧抽管旁螺旋,使之固定。操纵转盘两侧