

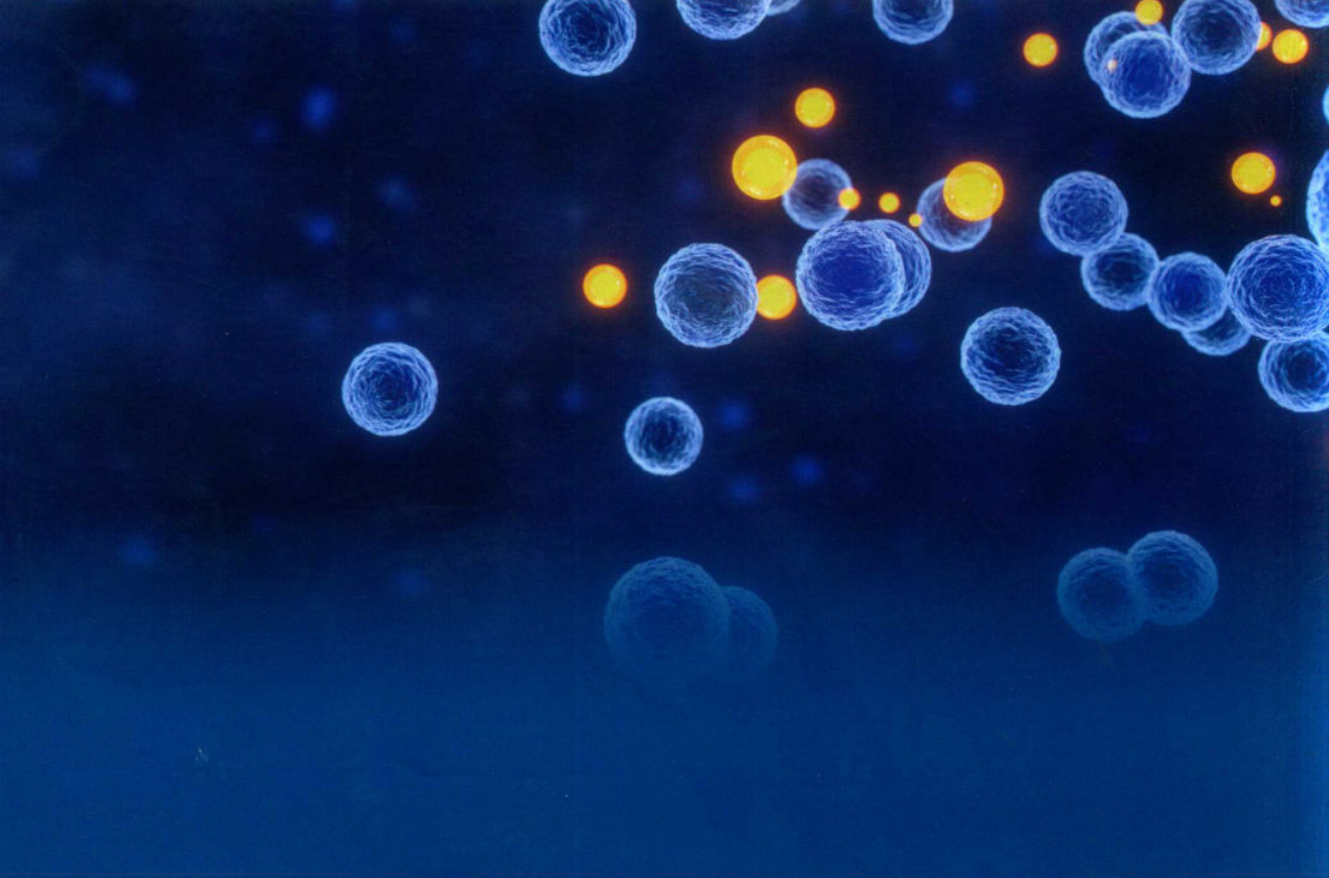
环境工程微生物学实验

Experimental Manual of Environmental Engineering Microbiology

王秀菊 王立国 主编



中国海洋大学出版社
CHINA OCEAN UNIVERSITY PRESS



责任编辑：孙玉苗
封面设计：王谦妮
终 审：魏建功

ISBN 978-7-5670-1761-0



9 787567 017610 >

定价：39.00 元

环境工程微生物学实验

主 编 王秀菊 王立国

副主编 何 芳 刘 素 韩雪梅
王仲鹏 赵春辉 柳彩云

2017年2月... 王秀菊、王立国、何芳、刘素、韩雪梅、王仲鹏、赵春辉、柳彩云... 环境工程微生物学实验教材... 王秀菊、王立国、何芳、刘素、韩雪梅、王仲鹏、赵春辉、柳彩云...

济南大学于20世纪90年代开始开设环境工程微生物学课程。学校历任教授深老师都为环境工程微生物学实验课程建设付出了大量精力和心血。经过近30年的试用、修改、补充,本校环境工程微生物学实验教学逐步形成了较稳定的组织架构。这部《环境工程微生物学实验》为高等学校环境微生物学实验教材,是在前菜的多个工作基础上,根据环境工程微生物学的发展现状和新工科本科教学的实际需要,各任课老师了大量实验材料,经过反复修改、选择、扩充而成的,是济南大学全体环境微生物实验课程教师集体智慧的结晶。

环境工程微生物学实验教材... 王秀菊、王立国、何芳、刘素、韩雪梅、王仲鹏、赵春辉、柳彩云... 环境工程微生物学实验教材... 王秀菊、王立国、何芳、刘素、韩雪梅、王仲鹏、赵春辉、柳彩云...

本书得到了济南大学教务处、环境工程研究所的大力支持,在此深表感谢。由于编者水平有限,书中难免存在不足之处,恳请广大读者批评指正。

中国海洋大学出版社
· 青 岛 ·

ISBN 978-7-303-05232-1
定价: 39.00元

图书在版编目(CIP)数据

环境工程微生物学实验 / 王秀菊, 王立国主编. —

青岛: 中国海洋大学出版社, 2019.9

ISBN 978-7-5670-1761-0

I. ①环… II. ①王…②王… III. ①环境微生物学—实验—高等学校—教材 IV. ①X172-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2019)第 236889 号

出版发行 中国海洋大学出版社

社 址 青岛市香港东路 23 号

邮政编码 266071

出版人 杨立敏

网 址 <http://pub.ouc.edu.cn>

电子信箱 lanyeshusheng@163.com

订购电话 0532-82032573(传真)

责任编辑 孙玉苗

电 话 0532-85901040

印 制 日照报业印刷有限公司

版 次 2019 年 9 月第 1 版

印 次 2019 年 9 月第 1 次印刷

成品尺寸 185 mm×260 mm

印 张 12.75

字 数 253 千

印 数 1~1000

定 价 39.00 元

前 言

2017年2月以来,教育部积极推进新工科建设,先后形成了“复旦共识”,开展了“天大行动”,发布了“北京指南”,并采取了一系列新工科建设研究与实践的举措,全力探索形成领跑全球工程教育的中国模式、中国经验,助力高等教育强国建设。在新工科背景下,为主动应对新一轮科技革命与产业变革,高等学校环境微生物学实验教材内容的优化与更新日趋紧迫。

济南大学于20世纪90年代初开始设立环境工程微生物学课程。学校历任授课老师都为环境微生物学实验项目的设计和内容的选定花费了大量精力和心血。经过近30年的试用、修改、补充,本校环境工程微生物学实验教学逐步形成了较稳定的组织构架。这部《环境工程微生物学实验》为高等学校环境微生物学实验教材;是在前辈的多年工作基础上,根据环境工程微生物学的发展现状和新工科本科教学的实际需要,参阅和学习了大量实验教材,经过反复修改、选粹、扩充而成的;是济南大学全体环境微生物实验教师集体智慧的结晶。

环境工程微生物学是一门环境学、工程学、微生物学等多学科交叉的新兴学科,与之配套的实验教材内容丰富。本书按照“渐进式”思维模式编写,系统性强,包括基础性实验、应用性实验和现代微生物技术实验三部分;所选实验项目具有代表性且易于操作,重点突出对学生独立操作能力的培养。本书力求内容准确,表述严谨且通俗易懂。本书能够满足本科环境科学、环境工程、给排水科学与工程、环境监测、微生物学等专业相关实验课程的教学需求,也可供相关领域的科研工作者参考。

本书得到了济南大学教务处、济南大学水利与环境学院和中国海洋大学出版社的大力支持,在此深表感谢!

由于编者水平有限,书中疏漏和不妥之处在所难免。敬请各位读者不吝赐教!

王秀菊 王立国

2019年9月

目 录

第一章 基础性实验	1
第一节 微生物的观察	1
实验 1-1 普通光学显微镜的结构、原理及使用	1
实验 1-2 暗视野显微镜和倒置显微镜的使用	8
实验 1-3 相差显微镜的使用	9
实验 1-4 荧光显微镜的使用	14
实验 1-5 不同微生物形态的观察	16
实验 1-6 活性污泥中微生物相的观察	16
实验 1-7 微生物的染色法	18
实验 1-8 细菌的芽孢、荚膜和鞭毛染色法	21
实验 1-9 微生物的大小及数量测定	24
实验 1-10 微型动物的计数	30
实验 1-11 微生物数量的测定——光电比浊计数法	32
实验 1-12 微生物平板菌落计数法	34
第二节 微生物的分离、培养与保藏	37
实验 1-13 培养基的制备——普通牛肉膏蛋白胨固体培养基	37
实验 1-14 培养基母液的配制	41
实验 1-15 高压蒸汽灭菌实验	44
实验 1-16 干热灭菌实验	46
实验 1-17 间歇式灭菌实验	47
实验 1-18 过滤除菌	48
实验 1-19 化学灭菌与消毒	50
实验 1-20 紫外线灭菌	53
实验 1-21 细菌纯种分离、培养——浇注平板法	54
实验 1-22 细菌纯种分离、培养——划线平板法	56
实验 1-23 细菌纯种分离、培养——平板表面涂布法	58
实验 1-24 细菌纯种分离、培养——试管斜面接种法	60
实验 1-25 细菌纯种分离、培养——穿刺接种培养法	62

实验 1-26	细菌纯种分离、培养——厌氧菌的接种培养	64
实验 1-27	纯培养菌种的菌体、菌落形态的观察	66
实验 1-28	大肠杆菌生长曲线的测定(比浊法)	68
实验 1-29	大肠杆菌噬菌体的分离、纯化及效价测定	70
实验 1-30	微生物菌种的简易保藏	73
实验 1-31	微生物菌种冷冻真空干燥保藏法	77
实验 1-32	微生物菌种液氮超低温冷冻保藏	80
第三节 微生物的生理生化反应		83
实验 1-33	微生物的氧化酶实验	83
实验 1-34	微生物的过氧化氢酶实验	84
实验 1-35	微生物的淀粉水解实验	85
实验 1-36	微生物的油脂水解实验	86
实验 1-37	微生物的葡萄糖氧化发酵实验	87
实验 1-38	微生物的甲基红实验	88
实验 1-39	微生物产硫化氢实验	89
实验 1-40	微生物利用柠檬酸盐实验	91
实验 1-41	微生物的吲哚试验	91
实验 1-42	微生物硝酸盐还原实验	93
第二章 应用性实验		95
实验 2-1	空气细菌的检测——沉降法	95
实验 2-2	空气细菌的检测——撞击法	97
实验 2-3	空气细菌的检测——滤膜法	98
实验 2-4	空气微生物的检测——过滤法	99
实验 2-5	常见霉菌的检测与形态观察	101
实验 2-6	土壤微生物的检测	102
实验 2-7	水中细菌总数的测定	104
实验 2-8	多管发酵法(MPN法)检测水中大肠菌群	106
实验 2-9	滤膜法检测水中大肠菌群	111
实验 2-10	富营养化湖泊中藻类的监测(叶绿素 a 法)	113
实验 2-11	活性污泥代谢活性测定	115
实验 2-12	光合细菌处理高浓度有机废水	119
实验 2-13	污水好氧生物处理——活性污泥法	122
实验 2-14	污水好气生物处理——生物膜法(生物流化床)	125
实验 2-15	废水厌氧硝化——反硝化生物脱氮	129

实验 2-16 废水生物除磷	133
实验 2-17 有机固体废弃物好氧堆肥实验	136
第三章 现代微生物技术实验	140
实验 3-1 用 Ames 法监测环境中的致癌物	140
实验 3-2 聚合酶链式反应(PCR)	146
实验 3-3 实时荧光定量 PCR 的使用	148
实验 3-4 土壤微生物的 PCR 检测	149
实验 3-5 质粒 DNA 的分离纯化和鉴定实验	154
实验 3-6 基因工程菌的连续培养和降解效率的测定实验	157
实验 3-7 微生物细胞的固定化技术实验	159
附录	162
附录一 环境微生物实验安全、无菌概念、急救	162
附录二 微生物实验室相关仪器的使用	163
附录三 常用培养基	170
附录四 实验用染色液的配制	174
附录五 环境微生物实验用试剂的配制	175
附录六 实验常用洗涤剂及消毒剂的配制	178
附录七 大肠菌群检索表(MPN 法)	180
附录八 堆肥腐熟度的判定	183
附录九 化学需氧量的测定——重铬酸钾法(COD _{Cr})	185
附录十 碘量法测定水中溶解氧	187
附录十一 生化需氧量的测定——BOD ₅	189
参考文献	193

第一章 基础性实验

第一节 微生物的观察

17世纪荷兰人列文·虎克制造了第一台显微镜,首次把微生物世界展现在人类面前,至今已经历300余年。显微镜的问世对微生物学的奠基和发展起到了不可估量的作用。在长期的实践中,显微镜不断推陈出新,已成为微生物研究的重要工具。

显微镜的种类很多,一般可分为光学显微镜与非光学显微镜两大类。光学显微镜按其性能不同又可分为明视野显微镜(普通光学显微镜)、暗视野显微镜、相差显微镜、紫外光显微镜、偏光显微镜、荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜、微分干涉差显微镜、倒置显微镜等。非光学显微镜为电子显微镜。在微生物实验中,常用的显微镜主要有普通光学显微镜、暗视野显微镜、倒置显微镜、相差显微镜和荧光显微镜等。

实验 1-1 普通光学显微镜的结构、原理及使用

普通光学显微镜简称光学显微镜(light microscope),以平均波长为550 nm的可见光作为光源,能分辨的两点距离约为 $0.22\ \mu\text{m}$ 。多数细菌的个体大于 $0.25\ \mu\text{m}$,因此可在光学显微镜下观察。由于许多细菌的大小与光学显微镜的分辨率处于同一个数量级,为了看清细菌的形态与结构,经常使用油镜来提高显微镜的分辨率。在光学显微镜的使用中,油镜的使用是一项十分重要的操作技术。

一、实验目的

- (1)了解普通光学显微镜的主要构造、原理及其性能,掌握显微镜的操作和保养方法。
- (2)掌握低、高倍镜的正规使用方法,反复练习,观察时保持两眼同时睁开和两手并用。
- (3)结合实验室提供的实验装片观察微生物的形态,并学习测量微生物大小的方法。

二、实验器材

- (1)微生物实验装片。

(4)镜筒:镜筒长度一般是 160 mm,位于镜臂的前方,它是连接目镜和物镜的金属圆筒,其上端插入目镜,下端连接物镜转换器。根据镜筒的数目,光镜可分为单筒式和双筒式。单筒光镜又分为直立式和倾斜式两种镜筒,直立式的目镜与物镜的光轴在同一直线上,而倾斜式的目镜与物镜的中心线互成 45° 角,在镜筒中装有使光线转折 45° 的棱镜。双筒式光镜的镜筒均为倾斜式的,镜筒长度通常为 160 mm,有的显微镜的镜筒长度可调节。

(5)转换器:又称旋转盘,位于镜筒下端,一般装有 2~4 个放大倍数不同的物镜。物镜一般按由低倍到高倍的顺序安装。旋转转换器就可以转换物镜。当旋至物镜和镜筒成直线时,会发出“咔”的响声,这时方可观察玻片标本。注意:转换物镜时,必须用手旋转圆盘,切勿用手推动物镜,以免损坏物镜。

(6)载物台:也称镜台,位于镜臂下方,用于放置玻片标本。载物台中央有一圆形的通光孔,光线可以通过它由下向上反射。载物台上装有 2 片固定玻片的压片夹,还装有标本移动器,转动标本移动器螺旋可以前后、左右移动标本。移动器上带有标尺,可指示标本的位置,便于反复观察。

2. 光学系统

光学系统包括目镜、物镜、聚光器、反光镜等。

(1)反光镜:是装在镜台下方的可转动的平凹两面圆镜,可自由转动方向,用于反射光线至集光器。平面镜聚光力弱,适合光线较强时使用。凹面镜聚光力强,适于光线较弱或无聚光器的显微镜使用。转动反光镜,可将光源反射到聚光器上,再经载物台中央圆孔照明标本。

(2)聚光器或称集光器:在载物台下方,用来集合由反光镜反射来的光线。它可以上、下调整,中央装有光圈,用以调节光线的强弱。当光线过强时,应缩小光圈或把集光器向下移动。

(3)虹彩光圈:是在聚光镜底部的一个圆环状结构,其上有许多大小不一的光圈(也称光阑或虹彩光圈)。可以旋转虹彩光圈以调节通光孔、镜头的进光量,使物像更清晰。

(4)目镜(接目镜):装在镜筒上端,作用是把物镜放大的实物再放大一次,并把物像映入观察者的眼中。一般使用的显微镜有 2~3 个目镜,其上刻 $5\times$ 、 $10\times$ 或 $15\times$ 等数字及符号,分别表示使用时可以放大 5 倍、10 倍或 15 倍。目镜内常装有一指示针,用以指示要观察的某一部分。

(5)物镜(接物镜):在成像中起最重要的作用。装在物镜转换器上,一般分低倍镜、高倍镜和油镜 3 种。低倍镜镜体较短,放大倍数小;高倍镜镜体较长,放大倍数较大;油镜镜体最长,放大倍数最大。在镜体上刻有数字:低倍镜一般有 $4\times$ 、 $10\times$ 两种,高倍镜一般有 $40\times$ 、 $45\times$ 两种,油镜一般是 $90\times$ 、 $100\times$ 两种(\times 表示放大倍数)。

显微镜放大倍数的计算:目镜放大倍数 \times 物镜放大倍数=显微镜对实物的放大倍数。例如,用放大 40 倍的物镜与放大 10 倍的目镜所得的物象的放大倍数为 400 倍;如果

用放大 15 倍的接目镜则放大倍数为 $40 \times 15 = 600$ (倍)。目镜装在镜筒上端,在使用过程中并不经常变动,所以通常所谓的低倍镜、高倍镜或油镜的观察主要是指使用不同的物镜而言的。

油镜的放大倍数最大(90 倍或 100 倍)。放大倍数这样大的镜头,焦距很短,直径很小,所以自标本玻片透过的光线,因介质密度(从玻片至空气,再进入油镜)不同,有些因折射或全反射,不能进入镜头,致使进入的光线过少,物象显现不清楚。所以,为了不使通过的光线有所损失,须在油镜与玻片中间加入和玻璃折射率相仿的镜油。因为这种物镜使用时要加镜油,所以我们叫它油镜。一般的低倍镜或高倍镜使用时不加油,所以我们叫它干镜。

使用低倍镜和高倍镜时,一般做活体的观察,不进行染色。在观察细小动物时,低倍镜容易看到物体的全貌,主要用来区别动物的种类和看出它们的活动状态;而高倍镜则可以看出动物的结构特征。油镜在大多数情况下用来观察染色的涂片。

(二)显微镜的光学原理

显微镜的性能主要取决于分辨力(resolving power)的大小,也叫分辨率。利用显微镜观察微生物时,希望能看见最细微的部位,即分辨力(分辨本领)要高。分辨力是指显微镜能够辨别物体两点间最小距离的能力,主要是由物镜来决定的。分辨力与物镜的数值口径成反比,与镜检时光波长度成正比,可用下式表示: $\delta = 0.61 \times \lambda / NA$ 。

数值口径(亦称开口率, numerical aperture, 简称为 NA)越大,光波越短,则所能辨识的物体越小。普通光学显微镜所用的照明光源不可能超过人们肉眼所能感受的光(即可见光)波长范围(400~700 nm),平均光波长度为 $0.55 \mu\text{m}$,试图通过缩短光的波长提高物镜的分辨率是不可能的。如用放大倍数为 90 倍的油镜($NA = 1.25$)和放大倍数为 9 倍的接目镜时,其总放大倍数虽为 810 倍,但分辨力为 $0.61 \times 0.55 / 1.25 \approx 0.27(\mu\text{m})$,即所能分辨的最小物体为 $0.27 \mu\text{m}$ 。即使用倍数更大的接目镜,使显微镜的总放大率增加,也仍然分辨不出小于 $0.27 \mu\text{m}$ 的结构。

数值口径可由下式计算: $NA = n \cdot \sin \alpha$ 。 α 为镜口角(最大入射角)的一半。 n 为介质折射率。镜口角(图 1-2)的大小决定于物镜透镜的直径和焦距,是显微镜光学质量的关键。介质的折射率:空气的是 1,水的是 1.33,香柏油的是 1.515。油镜头焦距短,镜口角大,又滴加香柏油作为介质,因而其数值口径最高。

使用油镜必须加油的另一原因是避免散光现象。空气折射率和玻璃的折射率(1.52)相差较大,当光线经载玻片,再经空气进入物镜时,部分光线将因折射而散失,视野得不到足够的照明;如果加香柏油,则因其折射率与玻璃折射率相近,可使视野光亮充足(图 1-3)。

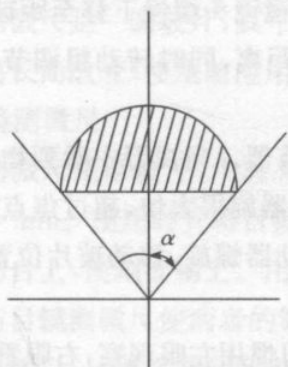


图 1-2 物镜的镜口角

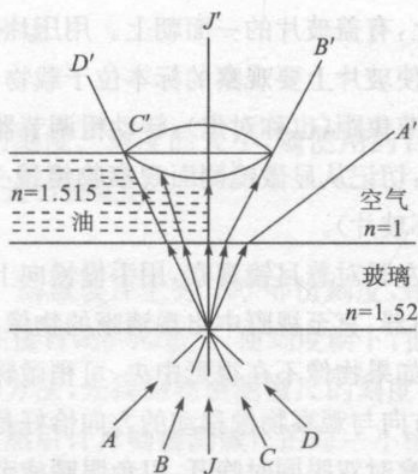


图 1-3 光线在不同介质中的折射情况

(三) 显微镜的使用方法

1. 低倍镜的使用

(1) 取下镜罩(或打开镜箱),右手紧握镜臂,左手托住镜座,把显微镜轻放在实验台上,直立平移(图 1-4),镜臂对向胸前,坐下进行操作(图 1-5)。检查各部件是否完好,镜身、镜头必须清洁。

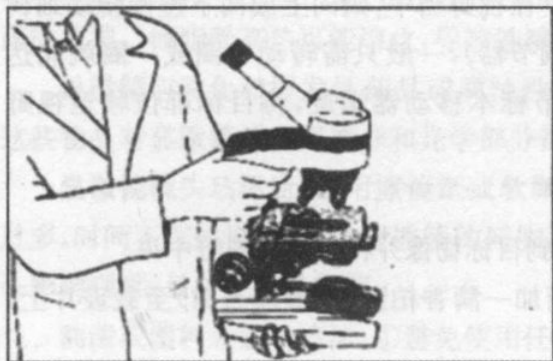


图 1-4 显微镜的移动

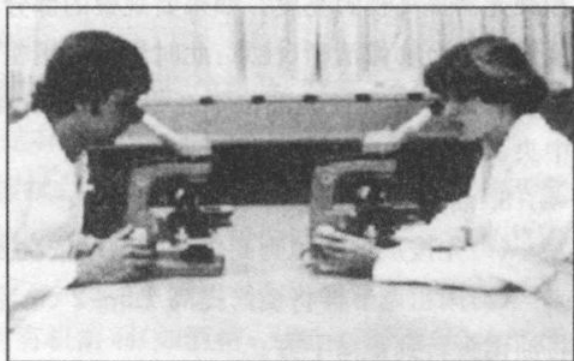


图 1-5 显微镜的放置

(2) 用手转动粗调节器,使镜筒上升;然后转动物镜转换器,使低倍镜对准镜台中央圆孔。

(3) 对光:打开开关,调节光线(不宜用直射阳光,宜用散射光);旋转载物台下方的遮光器,调节光圈。用左眼(两个眼睛都要睁开)通过目镜观察,升高聚光器,用手调整反光镜。一般在光线较强的天然光源下,宜用平面反光镜;光线较弱的天然光源或人工光源,宜用凹面镜。对光时要求整个视野均匀明亮。镜检染色标本时宜用强光;镜检未染色的标本时,宜用弱光。

(4) 放置玻片标本:转动粗调节器提升镜筒,使低倍镜镜头升至最高位。取玻片标本

放在镜台上,有盖玻片的一面朝上。用压片夹夹住玻片两端,然后转动标本移动器螺旋,移动玻片,使玻片上要观察的标本位于载物台中央圆孔(通光孔)中央。

(5)调节焦距(也称对焦):转动粗调节器,使低倍物镜镜头缓慢下移至距玻片 0.5 cm 左右(注意:切记从显微镜侧面观察物镜镜头与玻片的距离,同时转动粗调节器,以免镜头触碰损坏玻片)。

(6)用左眼对着目镜观察,用手慢慢向上转动粗调节器。当视野中看到物像轮廓时,改调细调节器,直至视野中出现清晰的物像。若粗调节器旋得太快,超过焦点,则需要按(5)重调。如果物像不在视野中央,可稍微转动标本移动器螺旋,移动玻片位置(注意:移动玻片的方向与观察物像移动的方向恰好是相反的)。

(7)观察时双眼同时睁开,以免眼睛疲劳。应练习习惯用左眼观察,右眼看着绘图。

反复练习上述操作,直到迅速熟练地找到目标物像。

2. 中、高倍镜的使用

(1)一定要先在低倍镜下找到要观察的目标物像后,才能用中、高倍镜观察。

(2)慢慢转动物镜转换器,依次使中、高倍镜(较长的物镜)转到镜台中央圆孔处,同时从侧面进行观察,防止镜头触碰玻片。如果高倍镜镜头碰到玻片,应重新转换用低倍镜调节物距。

(3)调节焦距:转换好高倍镜后,用左眼从目镜中观察。如果视野较暗,可调节光圈和聚光器提高视野亮度。如果要观察的部分不在视野当中,则向上或向下慢慢转动细调节器微调至物像清晰(注意:此时切勿使用粗调节器),一般只需转动半圈或一圈就能达到要求。若要观察的部位不在视野中,可调节标本移动器螺旋,将目标部位移至视野中央。

3. 油镜的使用

(1)先按从低倍镜到高倍镜的顺序依次找到目标物像并将其移至视野中央。

(2)用粗调节器将镜筒提高 1.5~2 cm,滴加一滴香柏油(或液体石蜡)至载玻片上,将油镜头转到镜筒下方。

(3)眼睛侧面注视,转动粗调节器缓慢降下镜筒,直到油镜头浸没在油中,镜头贴近玻片但不能触碰,避免压碎载玻片、损坏油镜头。此时从目镜观察,调节光圈和聚光器,增加亮度;微微转动细调节器,直到物像清晰。

(4)调换标本:观察新标本玻片时,必须重新从(1)开始操作。

(5)用后复原:观察完毕,转动粗调节器提升镜筒,取下载玻片,先用擦镜纸擦去镜头上的香柏油,再用擦镜纸蘸少许二甲苯或 1:1 的乙醚酒精溶液(香柏油可溶于二甲苯及 1:1 的乙醚酒精溶液),擦净镜头上的残留油迹,之后用干净的擦镜纸擦去残留的二甲苯或 1:1 的乙醚酒精溶液。降低镜筒,载物台降至最低,将物镜转成“八”字形置于载物台上方。降低聚光器,避免聚光器与物镜相碰。使反光镜垂直于镜座,以防受损。将镜罩在显微镜上放回显微镜箱中锁好。

(四) 目镜测微尺和物镜测微尺及其使用方法

1. 目镜测微尺

目镜测微尺是一圆玻片,其中央有精确的刻度。刻度的大小,随使用的目镜和物镜的倍数及筒长而改变,使用前应用物镜测微尺进行标定。

2. 物镜测微尺

物镜测微尺是厚玻片,中央有圆盖玻片。圆盖玻片上有 100 等份刻度,每等分的长度为 $1/100 \text{ mm}$ 。使用时先将目镜测微尺装在接目镜的隔板上,使刻度朝下;把物镜测微尺放在载物台上,使刻度朝上。用平常观测的方法,先找到物镜测微尺的刻度,再移动物镜测微尺与目镜测微尺使两者的第一线重合,然后计算物镜测微尺的每一小格有目镜测微尺的小格数目,计算后者刻度表示的长度。如物镜测微尺的一小格相当于目镜测微尺的 5 格,则目镜测微尺在此种条件下,每格的长为 $2 \mu\text{m}$ 。如在同样条件下测量物体,而物体的长为目镜测微尺的 2 小格,宽为半小格,知物体的大小为 $1 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ 。

(五) 显微镜的保养

显微镜的光学系统是显微镜的主要部分,尤其是物镜和目镜。一架显微镜的机械装置虽好,但光学系统不好,显微镜的作用就不会好。

显微镜应避免直接在阳光下曝晒,因透镜与透镜之间,透镜与金属之间都是用树脂或亚麻仁油黏合起来的。金属和透镜的膨胀系数不同。因受高热膨胀不均,透镜可能脱落或破裂。树脂受高热可能熔化,导致透镜脱落。

显微镜应避免和挥发性药品或腐蚀性酸类放在一起,如碘片、酒精、乙酸、硫酸等。这些物品对显微镜的金属部分和光学部分都是有害的。

显微镜镜头玷污后,要用擦镜纸或软绸擦拭。用有机溶剂擦拭油镜镜头,用且不宜过多,时间不宜过长,以免黏合透镜的树脂融化。切不可用手摸透镜。沾染有机物的镜头影响观察,日久还要长霉菌。

油漆或塑料表面的清洁:①避免使用任何有机溶剂(如酒精、乙醚、稀释剂等)清洗仪器的油漆或塑料表面而建议使用硅布,更多的顽固污垢可以用软性清洗剂清洗。②塑料表面只能用软布蘸上清水来清洁。

显微镜不能随意拆卸,尤其是镜筒。因为拆卸后空气中的灰尘和有机物落入里面,容易生霉。机械部分要经常加润滑油,以减少磨损。

显微镜存放:①显微镜不用时,镜罩盖好,放在干燥、清洁、平稳、无腐蚀性气体和阴凉通风的地方。②物镜和目镜应保存在干燥器一类的容器中,并放干燥剂。③镜架应放入镜箱内,并加罩防尘;箱内应存放硅胶,以免受潮生霉。

粗动手轮松紧的调节:请一定使用调节手轮,切忌将两个粗动手轮向相反的方向同时旋转,以免造成损害。

为保持显微镜的性能,应进行定期检查。

四、思考题

- (1) 镜检玻片标本时,为什么要先用低倍物镜,而不直接用高倍接物镜或油镜观察?
- (2) 如何正确使用油镜?

实验 1-2 暗视野显微镜和倒置显微镜的使用

一、实验目的

了解暗视野显微镜、倒置显微镜的工作原理、构造和使用方法。

二、实验内容和方法

(一) 暗视野显微镜

暗视野显微镜的分辨力比普通光学显微镜大。在检验中,主要用于未染色的螺旋体的形态和运动的观察;活体细菌虽可用于观察运动力,但一般较少用。

1. 工作原理和结构特点

工作原理:暗视野显微镜是利用光学上的丁达尔现象设计的。在日常生活中,室内飞扬的微粒灰尘是不易被看见的,但在暗的房间中若有一束光线从门缝斜射进来,灰尘便粒粒可见了,这就是微粒发光,也就是丁达尔现象。

2. 结构特点:暗视野显微镜是与普通光学显微镜的区别在于两者的聚光器不同。暗视野显微镜装有一个中央遮光板或暗视野聚光器,光源的中央光束被阻挡而不能由下而上地通过标本直接射入镜筒进入物镜,从而使光线改变途径,从四周边缘斜射到载玻片的标本上,照明光线在聚光器顶透镜(或盖片)的上表面发生全反射,不进入物镜,因而视野背景是暗的。标本被斜射光照射发生反射或散射,在黑暗的背景下呈现明亮的像。通过暗视野显微镜,我们只能看到物体的存在和运动,不能辨清物体的细微结构。暗视野显微镜可分辨 $0.004\ \mu\text{m}$ 以上的微粒,可用以观察微小粒子、细菌的形态和计数,观察透明标本、活细胞的结构和细胞内微粒的运动等。

3. 使用方法

- (1) 将显微镜上的普通聚光镜取下,装暗视野聚光器。
- (2) 选用强的光源,一般用显微镜灯照明。
- (3) 在低倍镜下找聚光镜的光亮点或环状圈,并扭动暗视野聚光镜上附设的调节棒使亮点或环状圈移至视野的正中央。
- (4) 向聚光镜透镜面上滴一滴香柏油,然后稍降下聚光镜,放置标本(载玻片厚度为 $1\ \text{mm}$,盖玻片厚度为 $0.17\ \text{mm}$)于载物台上。将聚光镜慢慢上移,使载玻片与聚光镜上

的香柏油接触,先用高倍镜观察,后用油浸镜观察。用油浸镜观察时,在盖玻片上滴一滴香柏油,将物镜前透镜与标本上的香柏油接触。调焦,直至观察到清晰的标本像。

(二)倒置显微镜

光学原理与普通光学显微镜原理基本相同,主要差别是倒置显微镜的光源安装在标本的上方,物镜装在标本的下方,因此可以用来观察生长在培养皿底部的细胞状态。它与相差装置配合,可以用来观察培养的活细胞。

三、思考题

暗视野显微镜、倒置显微镜与普通光学显微镜的结构与工作原理有何不同?

实验 1-3 相差显微镜的使用

细菌标本没有染色时,菌体的折光性与周围背景相近,在光学显微镜下不易看清。相差显微镜(phase contrast microscope)是一种能将光线通过透明标本后产生的光程差(即相位差)转化为光强差的特殊显微镜。以相差显微镜观察标本,可以克服光学显微镜的缺陷,看清活细胞及其细微结构,并产生立体感。

一、目的要求

- (1)了解相差显微镜的构造特点和工作原理。
- (2)掌握相差显微镜的使用方法。

二、基本原理

(一)相差显微镜的工作原理

光线通过透明标本时,光的波长(颜色)和振幅(亮度)不会发生明显的变化。因此,采用普通光学显微镜观察未经染色的标本,难以分辨细胞的形态和内部结构。然而,由于细胞各部分的折射率和厚度不同,光线穿过标本时,直射光和透射光会产生光程差,并由此导致光波相位差(图 1-6)。通过相差显微镜上的特殊装置——环状光阑和相板,利用光的干涉原理,可将光波的相位差转变为人眼可以察觉的振幅差,即明暗差(图 1-7)。视野上的明暗差可增强检视物的对比度,从而看清在普通光学显微镜下不易看到的活细胞及其细微结构(图 1-8)。