

在低倍物镜观察的基础上转换高倍物镜。较好的显微镜的低倍镜头、高倍镜头是同焦的，在正常情况下，高倍物镜的转换不应碰到载玻片或其上的盖玻片。若使用不同型号的物镜，在转换物镜时要从侧面观察，避免镜头与玻片相撞。然后从目镜观察，调节光照，使亮度适中，缓慢调节粗调节旋钮，使载物台上升（或镜筒下降），直至物像出现，再用细调节旋钮调至物像清晰为止，找到需观察的部位，并移至视野中央进行观察。

4. 油镜观察

油浸物镜的工作距离（指物镜前透镜的表面到被检物体之间的距离）很短，一般在0.2mm以内，再加上一般光学显微镜的油浸物镜没有“弹簧装置”，因此使用油浸物镜时要特别细心，避免由于“调焦”不慎而压碎标本片并使物镜受损。

使用油镜按下列步骤操作：

① 先用粗调节旋钮将镜筒提升（或将载物台下降）约2cm，并将高倍镜转出。

② 在玻片标本的镜检部位滴上一滴香柏油。

③ 从侧面注视，用粗调节旋钮将载物台缓缓地上升（或镜筒下降），使油浸物镜浸入香柏油中，使镜头几乎与标本接触。

④ 从接目镜内观察，放大视场光阑及聚光镜上的虹彩光圈（带视场光阑油镜开大视场光阑），上调聚光器，使光线充分照明。用粗调节旋钮将载物台徐徐下降（或镜筒上升），当出现物像一闪后改用细调节旋钮调至最清晰为止。如油镜已离开油面而仍未见到物像，必须再从侧面观察，重复上述操作。

⑤ 观察完毕，下降载物台，将油镜头转出，先用擦镜纸擦去镜头上的油，再用擦镜纸蘸少许乙醚酒精混合液（乙醚2份，纯酒精3份）或二甲苯，擦去镜头上残留油迹，最后再用擦镜纸擦拭2~3下即可（注意向一个方向擦拭）。

⑥ 将各部分还原，转动物镜转换器，使物镜头不与载物台通光孔相对，而是成八字形位置，再将镜筒下降至最低，降下聚光器，反光镜与聚光器垂直，用一个干净手帕将接目镜罩好，以免目镜头沾染灰尘。最后用柔软纱布清洁载物台等机械部分，然后将显微镜放回柜内或镜箱中。

五、思考题

1. 用油镜观察时应注意哪些问题？在载玻片和镜头之间加滴什么油？起什么作用？
2. 试列表比较低倍镜、高倍镜及油镜各方面的差异。为什么在使用高倍镜及油镜时应特别注意避免粗调节器的误操作？
3. 什么是物镜的同焦现象？它在显微镜观察中有什么意义？
4. 影响显微镜分辨率的因素有哪些？
5. 根据实验体会，谈谈应如何根据所观察微生物的大小选择不同的物镜进行有效的观察。

实验二 玻璃器皿的洗涤、包扎与灭菌

一、实验目的

1. 了解微生物实验中玻璃器皿洗涤的重要性。
2. 掌握玻璃器皿的洗涤方法。



3. 熟悉玻璃器皿的灭菌原理及方法。

二、实验原理

微生物实验是纯种培养，必须是无菌的。因而微生物实验需要的所有的玻璃器皿，无论是新购置的还是使用过的，都必须经过仔细的清洗和严格的灭菌后才能使用。

三、实验用材料及仪器设备

1. 材料

试管（大试管和小试管）、小塑料管（发酵小倒管或德汉小管）、各种规格的玻璃吸管、培养皿（平皿）、锥形瓶及烧杯、载玻片与盖玻片、滴瓶、玻璃涂布棒等。

2. 仪器设备

装培养皿的金属筒、干热灭菌箱等。

四、实验步骤

1. 玻璃器皿的洗涤

(1) 新购置的玻璃器皿的洗涤 新购置的玻璃器皿一般含较多的游离碱，可在2%的盐酸或洗涤液内先浸泡几小时后，用自来水冲洗干净，倒置在洗涤架上，晾干或在干燥箱内烘干备用。

(2) 使用过的玻璃器皿的洗涤

① 试管、培养皿、锥形瓶、烧杯的洗涤。可先用瓶刷（或试管刷）蘸洗衣粉或去污粉等刷洗，然后用自来水冲洗干净。洗涤后，要求内壁的水均匀分布成一薄层，表示油垢完全洗净，如还挂有水珠，则需用洗涤液浸泡数小时，然后再用自来水冲洗干净。培养皿放入装培养皿的金属筒内，或用牛皮纸包扎好备用。

② 玻璃吸管的洗涤。吸过菌液的吸管（如有棉塞应先去掉）或滴管（先拔去橡皮头）应立即放入2%的煤酚皂溶液或0.5%新洁尔灭消毒液内浸泡数小时，然后再用自来水冲洗干净，必要时还需用蒸馏水淋洗。最后放在烘箱内烘干备用。

③ 载玻片和盖玻片的洗涤。如玻片上有香柏油，先用二甲苯溶解油垢，再在肥皂水中煮沸10min左右，用自来水冲洗，然后在稀洗涤液中浸泡1~2h，自来水冲去洗涤液，最后用蒸馏水淋洗。等干燥后置于95%乙醇中保存备用。

2. 玻璃器皿的包扎

培养皿用牛皮纸包裹，或直接放入特制的金属筒内（图8-4），进行干热灭菌。干燥的吸管上端塞入1~1.5cm棉花，用纸条以螺旋式包扎。包好的多支吸管用牛皮纸包成捆灭菌（图8-5）。试管、锥形瓶塞上棉塞用牛皮纸包扎好灭菌。

3. 玻璃器皿灭菌

(1) 干热灭菌 用干燥的热空气杀死微生物的方法称为干热灭菌。通常将灭菌的物品放在鼓风箱内，在160~170℃加热1~2h。干热灭菌箱的构造如图8-6所示。

(2) 干热灭菌操作步骤

① 装箱。将包扎好的玻璃器皿放入干热灭菌箱灭菌专用的铁盒内，关好箱门。

② 灭菌。接通电源，打开干热灭菌箱排气孔，待温度升至

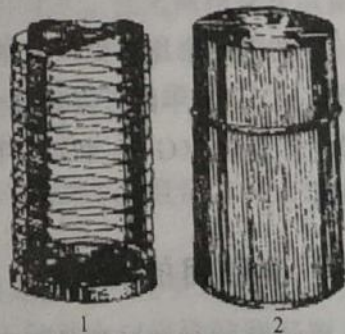


图8-4 装培养皿的金属筒

1—内部框架；2—带盖外筒



80~100℃时关闭排气孔。继续升温至 160~170℃，开始计时，恒温 1~2h。

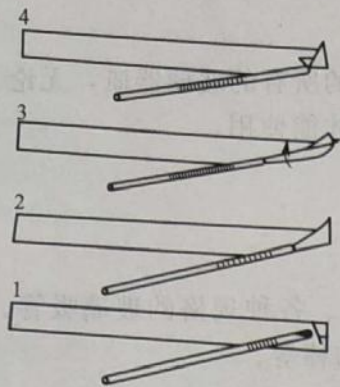


图 8-5 单支吸管的包扎方法

1~8 表示包扎先后顺序

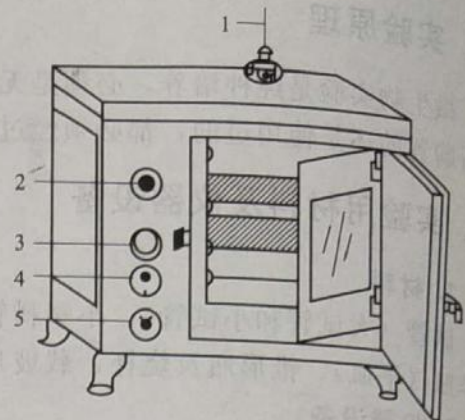
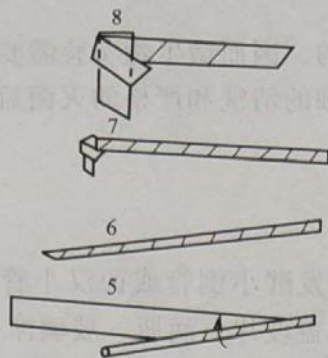


图 8-6 干热灭菌箱

1—温度计与排气孔；2—温度调节旋钮；3—指示灯；
4—温度调节器；5—鼓风机

③ 灭菌结束后，关闭电源，自然降温至 60℃，打开箱门，取出物品放置备用。

注意：灭菌物品不能有水，否则干热灭菌中易爆裂；灭菌物品不能装得太挤，以免影响温度上升；灭菌温度不能超过 180℃，否则棉塞及牛皮纸会烧焦，甚至燃烧；自然降温至 60℃ 以下，才能打开箱门，取出物品，避免因突然降温导致玻璃器皿炸裂。

附：洗涤液的配制

1. 浓洗涤液配方

成分：重铬酸钾（工业用）50g，浓 H_2SO_4 （工业用）1000mL。

配制：1000mL 浓硫酸在文火上加热，然后加入 50g 重铬酸钾溶液即成。

2. 稀洗涤液配方

成分：重铬酸钾（工业用）50g，浓 H_2SO_4 （工业用）100mL，自来水 850mL。

配制：将重铬酸钾溶解在自来水中，慢慢加入浓硫酸，边加边搅拌，配好后，贮存于广口瓶内，盖紧瓶盖备用。此洗涤液可反复用多次，直至溶液变成绿色时才失效。所以使用此溶液时，器皿必须干燥。

实验三 细菌涂片制作及革兰染色技术

细菌的涂片和染色是微生物学实验中的一项基本技术。细菌涂片是染色的基础。革兰染色法是 1884 年由丹麦病理学家 Christain Gram 创立的，革兰染色法可将所有的细菌区分为革兰阳性菌（ G^+ ）和革兰阴性菌（ G^- ）两大类。革兰染色法是细菌学中最重要鉴别染色法。

一、实验目的

1. 学习细菌的简单染色法和革兰染色法。
2. 初步认识细菌的形态特征，巩固熟悉显微镜的使用方法和无菌操作技术。

