

普通光学显微镜的 油镜使用及细菌形态（三型标本片）的观察

主讲人:孔召玉

kongzhaoyu@hotmail.com

南昌大学生物技术系

实验室纪律

- 一、学生进入实验室前，须**预习实验内容**；实验结束后须完成实验报告；
- 二、学生进入实验室后不得打闹、大声喧哗；不得抽烟；**不得携带食物**进入实验室；
- 三、**按操作规程使用仪器设备**，并按仪器设备管理要求登记；不得擅自操作教师未要求学生使用的设备，如有违反操作规程或擅自操作造成设备损坏的，照价赔偿；
- 四、**废物、废水**不得随意弃置、倾倒，按教师指定方式处理；
- 五、严禁刻划实验台面，违反者照价赔偿（市场价约1500元/米）；严禁踩踏、污损实验室墙面，违反者视情节轻重给予罚款处理；
- 六、除教师批准外，严禁将实验室消耗品带出实验室；除中心办公室批准外，严禁将实验室仪器设备带出实验室；如有违反，交学校保卫部门处理；
- 七、实验结束后，学生应**自行清理**实验台面，由学生班长按教师要求指派值日生，打扫实验室。

一、实验目的

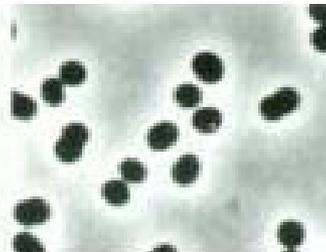
1. 了解显微镜的构造和各部分的操作。
2. 学习并掌握油镜的原理和使用方法。
3. 认识细菌的三种基本形态。

细菌形态

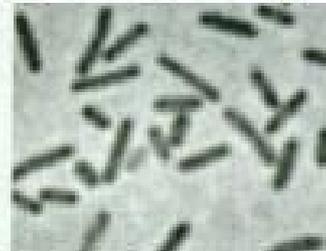
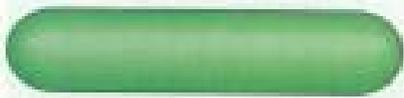
显微照片

模式图

球菌



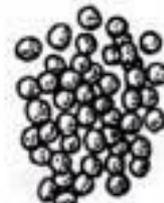
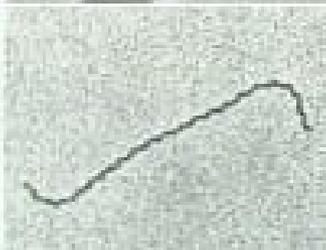
杆菌



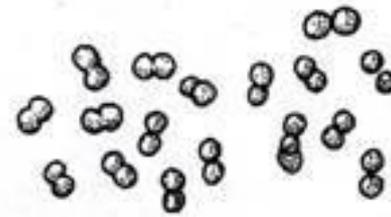
螺旋菌



螺旋菌



葡萄球菌



各种双球菌



球杆菌



链球菌



四连球菌



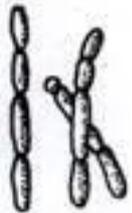
八叠球菌



弧菌



螺菌



链杆菌

二、显微镜的基本结构及油镜的工作原理

◆ 普通光学显微镜的基本结构

- 普通光学显微镜的构造可分为两部分：一为机械装置，二为光学系统。
- 机械装置由镜座、镜筒、物镜转换器、载物台、推动器、粗动螺旋和微动螺旋等部件组成。
- 光学系统由目镜、物镜、聚光器、光源、滤光片、虹彩光圈等组成。

普通光学显微镜基本构造

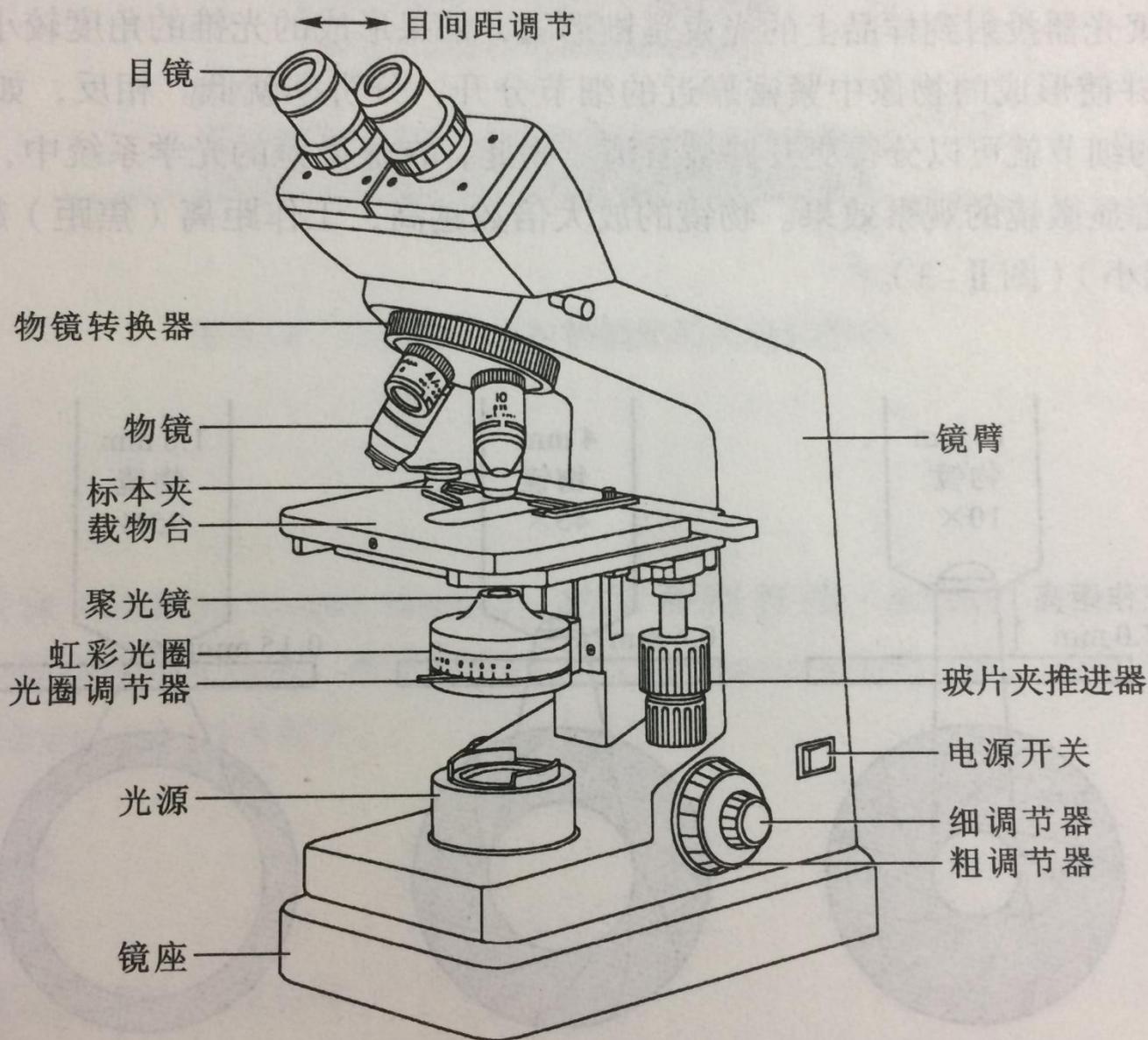


图 II-1 显微镜构造示意图

放大倍数:

- 4×: 低倍
- 10×: 低倍
- 40×: 高倍
- 100×: 油镜



物镜

显微镜
放大倍数

=

目镜
放大倍数

×

物镜
放大倍数

放大倍数:

- 10×
- 15×

放大倍数:

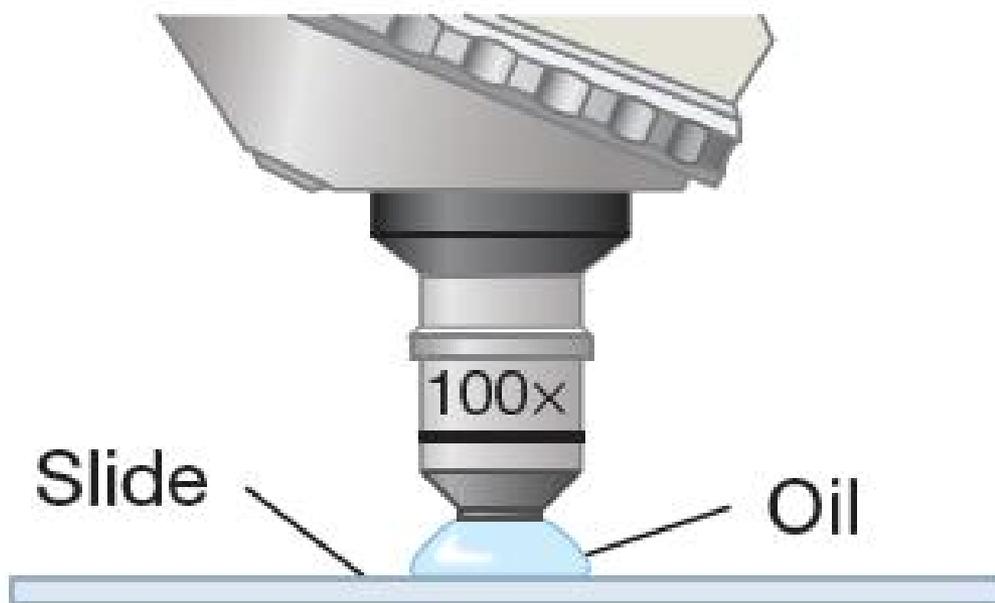
- 4×: 低倍
- 10×: 低倍
- 40×: 高倍
- 100×: 油镜

显微镜使用总原则:

- 先低倍后高倍
- 先粗调后微调

油镜的工作原理

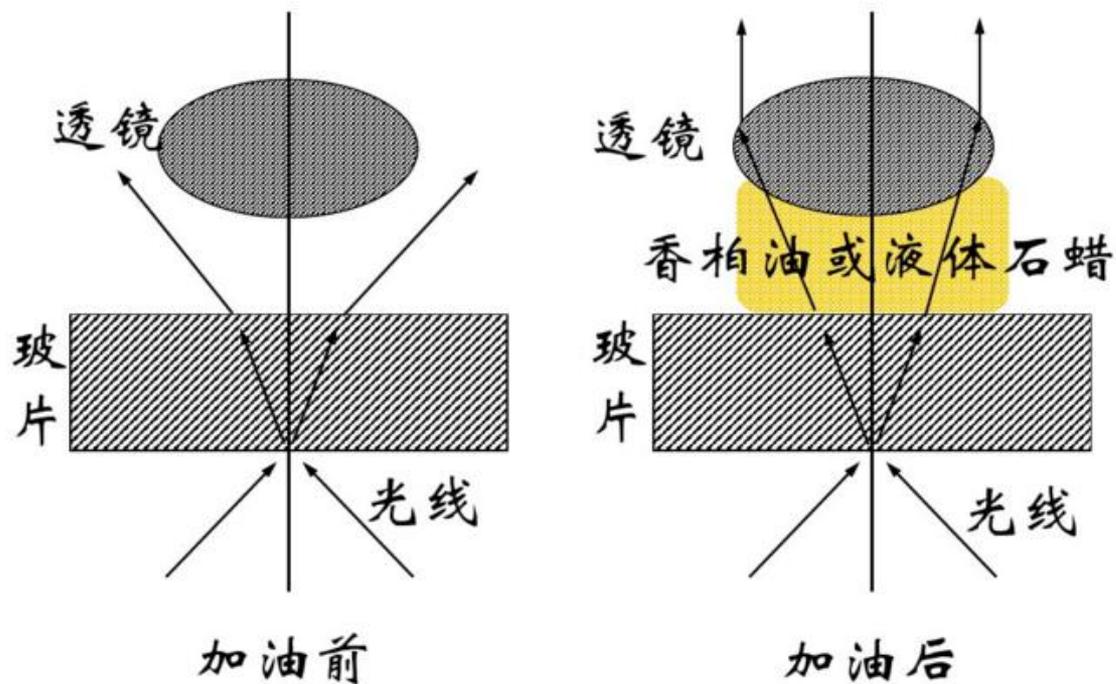
普通光学显微镜通常配置的几种物镜中，油镜的放大倍数最大（ $100\times$ ），对微生物学研究最为重要。与其他物镜相比，油镜的使用方法比较特殊，需要在载玻片和镜头之间加滴镜油。



◆ 滴加镜油的作用

(1) 增加照明亮度

油镜放大倍数大，而焦距很短，直径很小，需要的光照强度大，在镜头和玻片加折射率 $n=1.52$ 镜油(通常用香柏油)，与玻璃的折射率 $n=1.55$



(2) 增加显微镜的分辨率

分辨率：是指显微镜能辨别两点之间最小距离的能力。

$$\text{最小可分辨距离} = \lambda / 2\text{NA}$$

式中 λ =光波波长； NA=物镜的数值孔径值

$$\text{NA} = n \cdot \sin\theta$$

θ 为物镜镜口角的半数，它取决于物镜的直径和工作距离，一般最大只能达到 120° 。

n 为介质折射率，香柏油的折射率（1.52）比空气和水的折射率（分别为1.0和1.33）要高。

油镜NA：1.2~1.4； 低倍镜、高倍镜：<1.0

三、实验器材

- 显微镜、擦镜纸、载玻片、盖玻片、香柏油、二甲苯等。
- ∞ 细菌三型片（球菌、杆菌、螺旋菌）

四、操作步骤

(一) 观察前的准备

1. 取镜和安放

置显微镜于平稳的实验台上，镜座距实验台边沿约为3~4cm。镜检者姿势要端正。

(取、放显微镜时应一手握住镜臂，一手托住底座，使显微镜保持直立、平稳。切忌用单手拎提；且不论使用单筒显微镜或双筒显微镜均应双眼同时睁开观察，以减少眼睛疲劳，也便于边观察边绘图或纪录。)

2. 光源调节

打开光圈。将聚光器上升到最高位置，安装在镜座内的光源灯可通过调节电流或电压来获得适当的照明亮度，使视野内的光线均匀，亮度适宜。

3. 根据使用者个人情况，调节双目显微镜的目镜

双目显微镜的目镜间距可以适当调节，使其与观察者两个眼睛瞳孔的距离相符。

4. 聚光器数值孔径值的调节

调节聚光器虹彩光圈值与物镜的数值孔径值相符或略低。在聚光器的数值孔径值确定后，若需改变光照度，可通过升降聚光器或改变光源的亮度来实现，**原则上不应对虹彩光圈进行调节。**

(二) 显微观察

1. 低倍镜的操作

- ❧ 将标本片放在载物台上，用标本夹夹住，调节标本移动螺旋，使观察的目的物处于物镜的正下方。
- ❧ 调节粗调螺旋，使物镜（10×）与标本靠近，眼睛在侧面注视物镜，防止物镜和载玻片相碰。
- ❧ 张开双眼向物镜里观察，如果见到目的物，但不十分清楚，可用细准焦螺旋，至目的物清晰为止。
- ❧ 通过玻片夹推进器慢慢移动玻片，认真观察标本各部分，找到合适的目的物，仔细观察并记录所观察到的结果。

2. 高倍镜的操作

- ❧ 使用高倍镜前，必须先用低倍镜观察，发现目的物后将它移至视野正中处。
- ❧ 旋动转换器换高倍镜。如果高倍镜触及载玻片立即停止旋动，这说明原来低倍镜并没有调准，目的物并没有真正找到，必须用低倍镜重新调节。如果高倍镜下观察目的物有点模糊，调节细准焦螺旋，直到视野清晰。调节细准焦螺旋时要注意旋转方向与载物台上升或下降的关系，防止镜头与载玻片强力接触，损坏镜头或载玻片。

3. 油镜的操作

- ❧ 如果用高倍镜目的物未能看清，可用油镜。先用低倍镜和高倍镜检查标本片，将目的物移到视野正中。用粗调螺旋下降载物台。
- ❧ 在载玻片上滴一滴香柏油，将油镜移至正中，缓慢调节粗调螺旋使浸没在油镜头油中，刚好贴近载玻片。然后再用细准焦螺旋微微向上调（切忌不用粗准焦螺旋）即可。（油镜头与载玻片的距离约0.7 mm左右）
- ❧ 油镜观察完毕，用油镜纸将镜头上的油揩净，另用擦镜纸蘸少许二甲苯揩拭镜头，再用擦镜纸揩干。
(应特别注意不要因在下降镜头时用力过猛，或者调焦时误将粗调节螺旋向反方向转动而损坏镜头及载玻片)

4. 换片

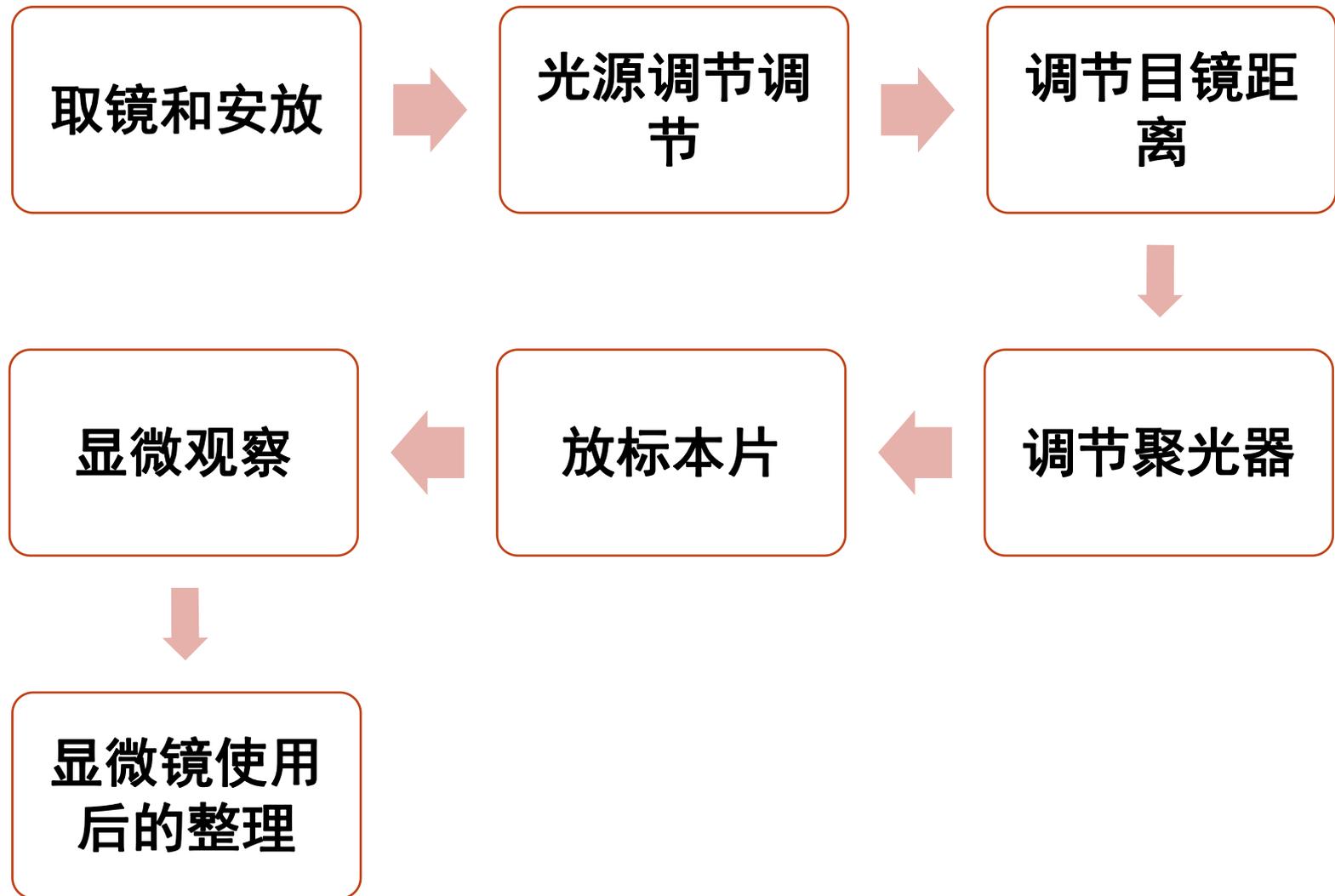
观察完一个标本后，如果想要再观察另一标本时，**需先将高倍物镜（或油镜）转回到低倍物镜，取出标本，按放片的方法换上新片，即可观察。千万不可在高倍物镜（或油镜）下换片，以防损坏镜头。**

注意：切不可将高倍镜转动经过加有镜油的区域。

(三) 显微镜使用后的整理

- 1、调节光源到最小再关掉电源开关。调节粗调螺旋，使载物台下降到最低，取下载玻片。
- 2、用擦镜纸拭去镜头的镜油，然后用擦镜纸蘸少量二甲苯擦去镜头上残留的油迹，最后再用干净的擦镜纸擦去残留的二甲苯。
- 3、将各部分还原，将物镜转成“八”字形，擦干净镜体，罩上防尘罩，然后放回原处。

∞ 操作步骤流程：



八、实验报告及思考题

∞ 实验报告

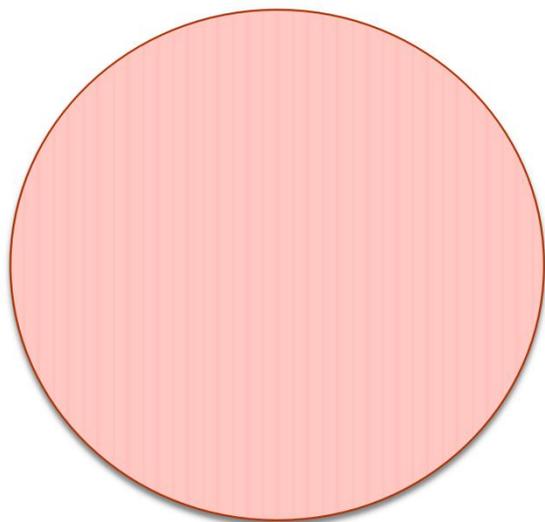
结果部分要求绘出你在油镜下观察到的细菌的形态。

∞ 思考题与练习

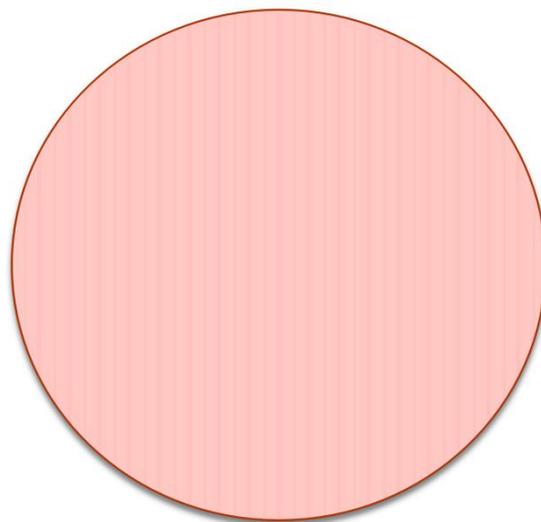
- 1、显微镜的构造分哪几部分？各部分有什么作用？
- 2、用油镜观察时应注意那些问题？在载玻片和镜头之间加滴什么油？起什么作用？
- 3、什么是物镜的同焦现象？它在显微镜观察中有什么意义？
- 4、影响显微镜分辨率的因素有那些？

实验（数据及处理）结果

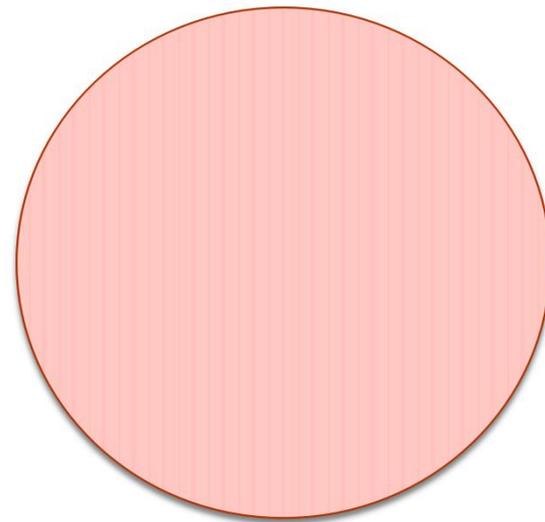
分别绘制出你所观察到的球菌、杆菌和螺旋菌的形态。



球菌： _____
观察物镜 _____
放大倍数 _____



杆菌： _____
观察物镜 _____
放大倍数 _____



螺旋菌： _____
观察物镜 _____
放大倍数 _____

实验报告格式

- 一、实验项目名称
- 二、实验目的
- 三、实验基本原理
- 四、主要仪器设备及耗材
- 五、实验步骤
- 六、实验（数据及处理）结果
- 七、思考讨论题