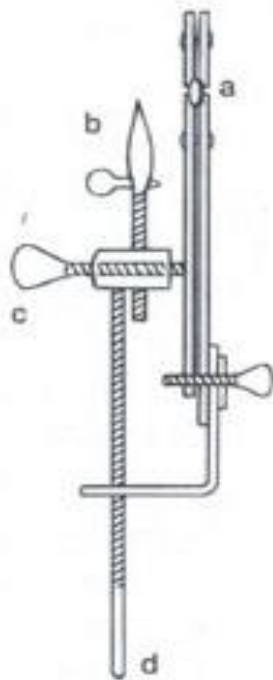
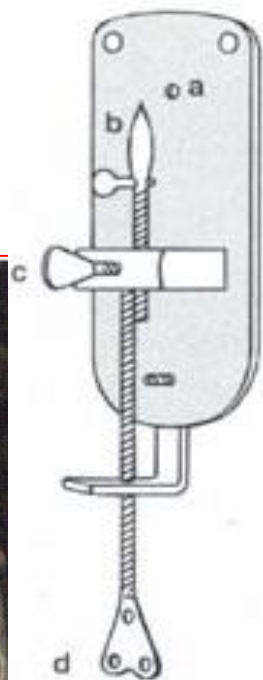
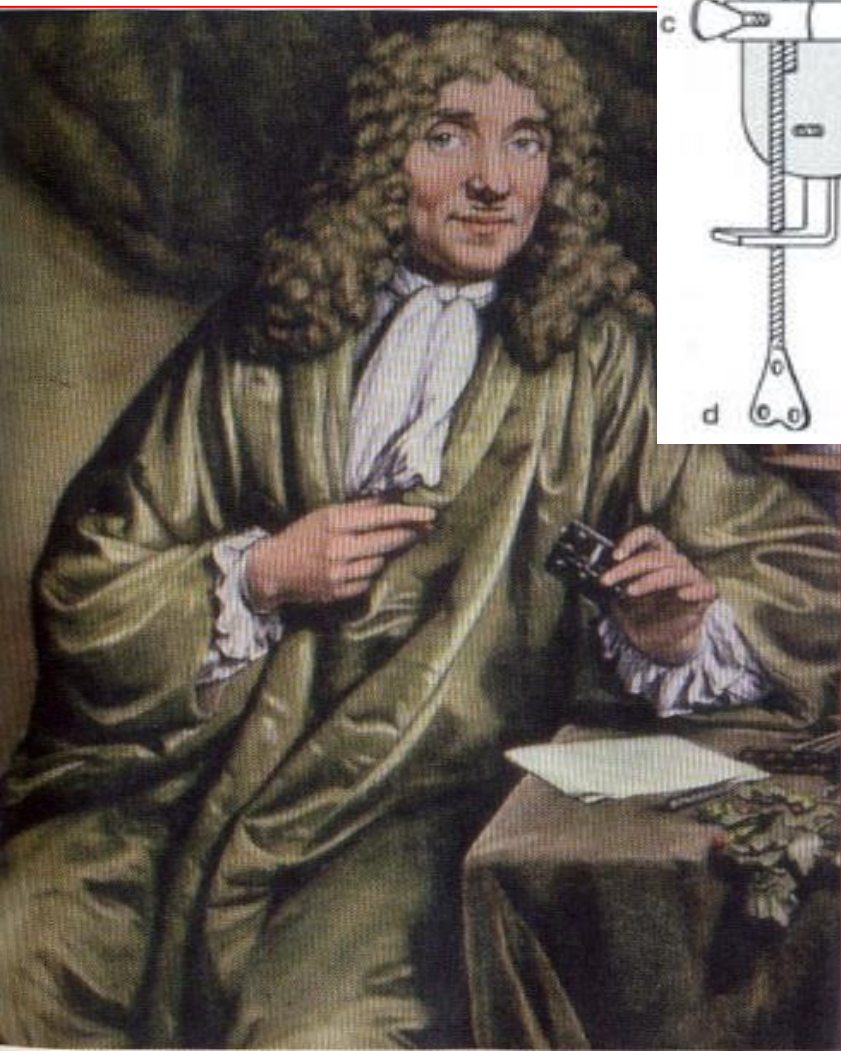


# Chapter II

## **Microscopy and pure culture**

## **显微技术与纯培养**



*fig: A* —

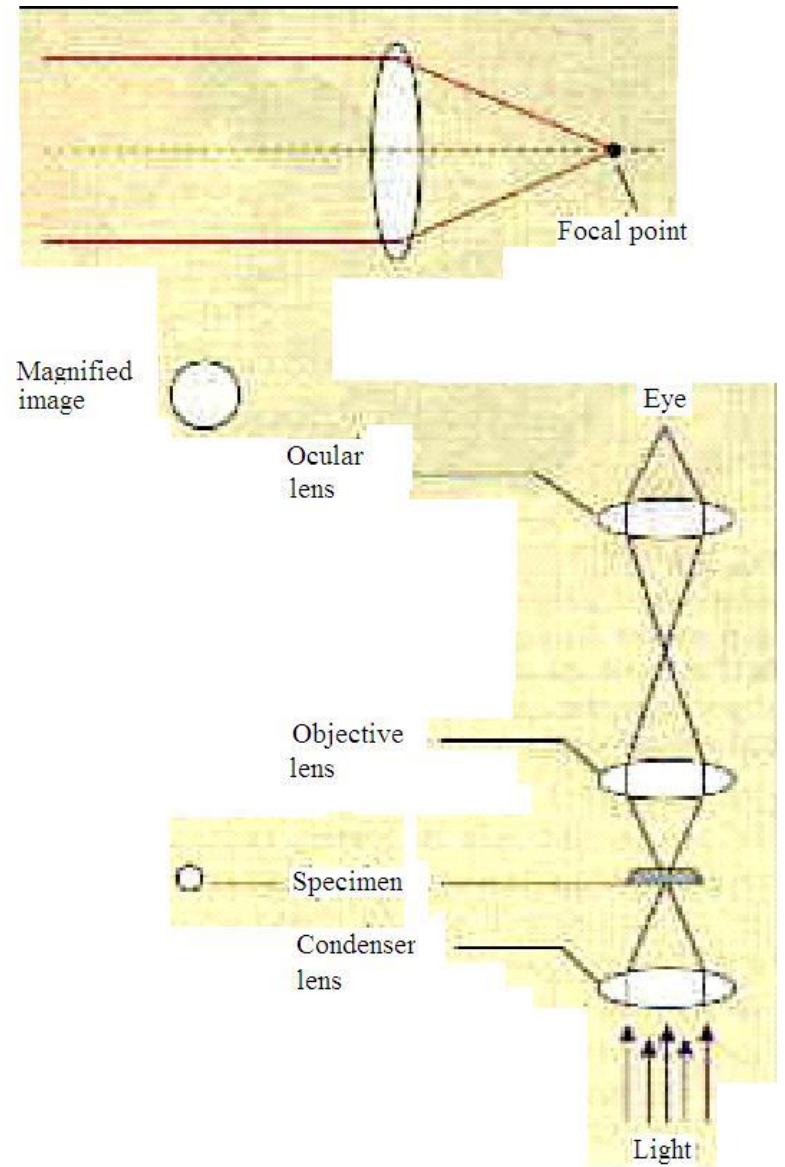
*fig: B* — *D*

*fig: E:* *fig: G.* —

*fig: F* —

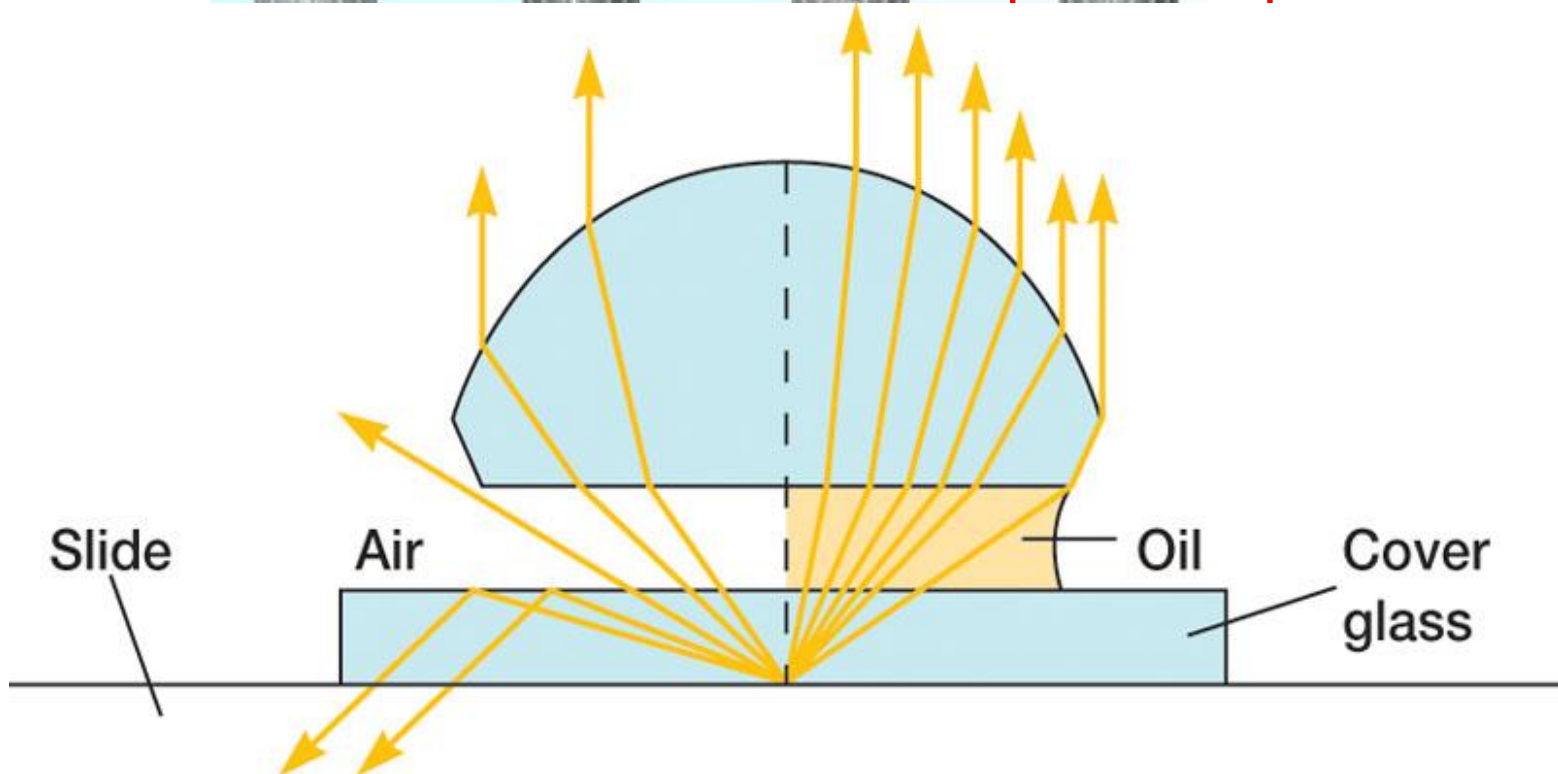
列文虎克 (1632-1723)

# 电光源光学显微镜



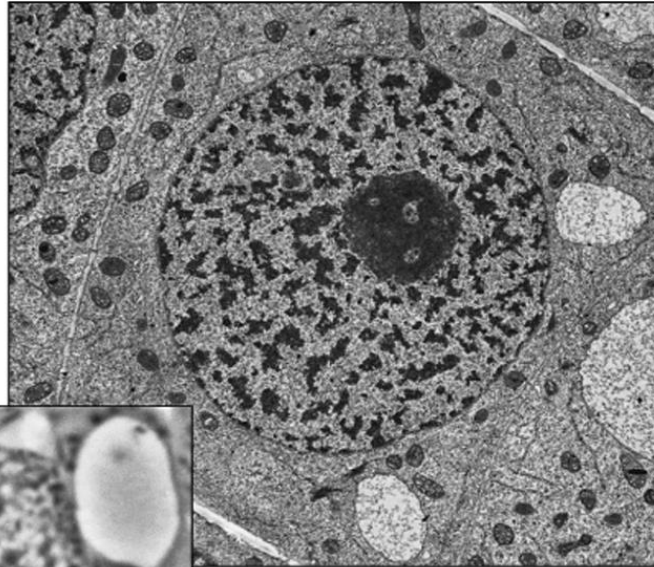
影响因素之一：

## 放大倍数 (Magnification)

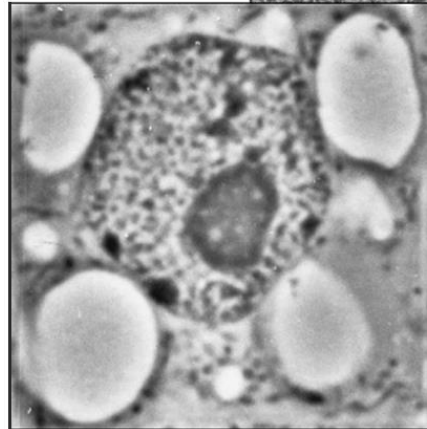


## 影响因素之二：分辨率（Resolution）

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Electron microscope (450X)



Light microscope (450X)

**Resolution (Resolving power, Resolving distance)** is defined as the closest spacing between two points at which they can still be seen clearly as separate entities.



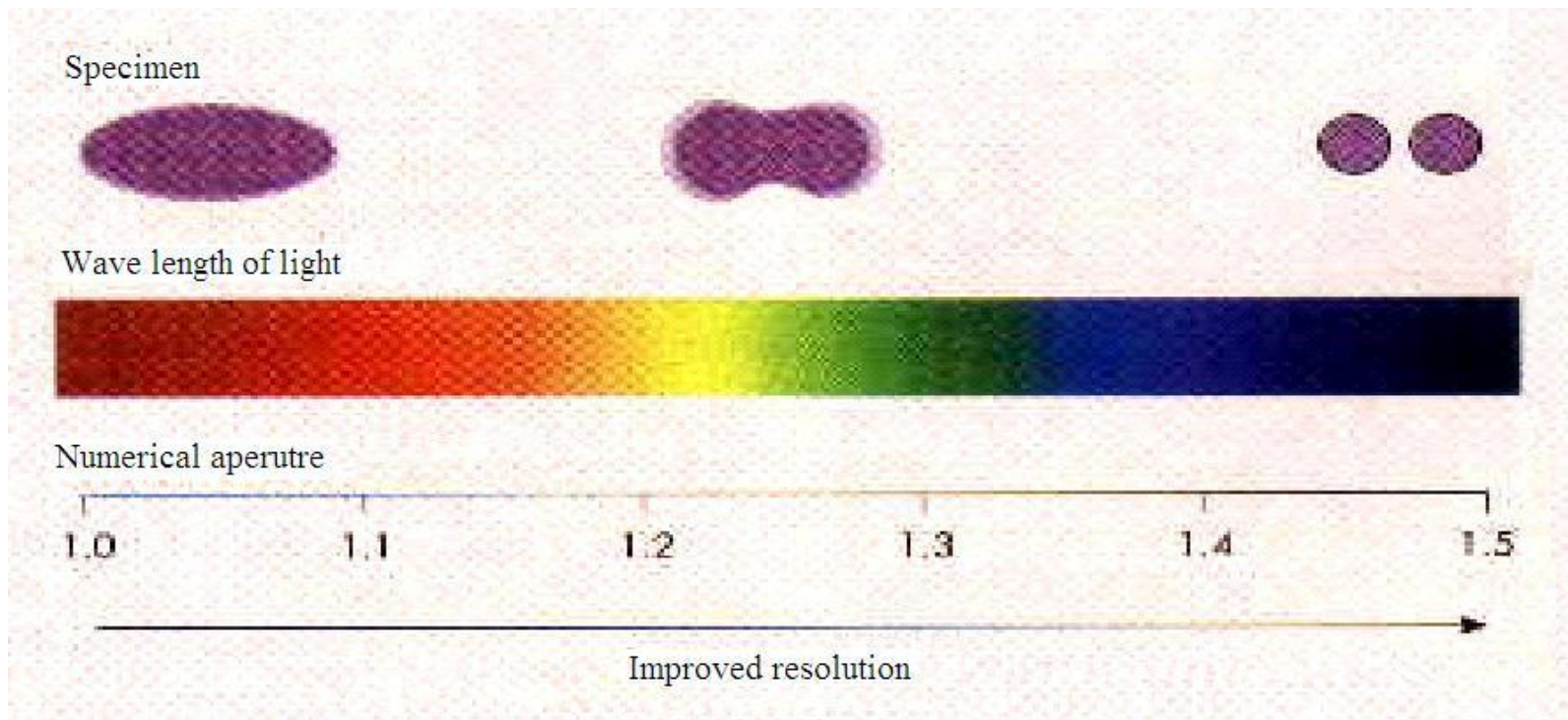
$$R = \lambda / (\text{NA}_{\text{objective lens}} + \text{NA}_{\text{condenser lens}})$$

**R: Resolution**

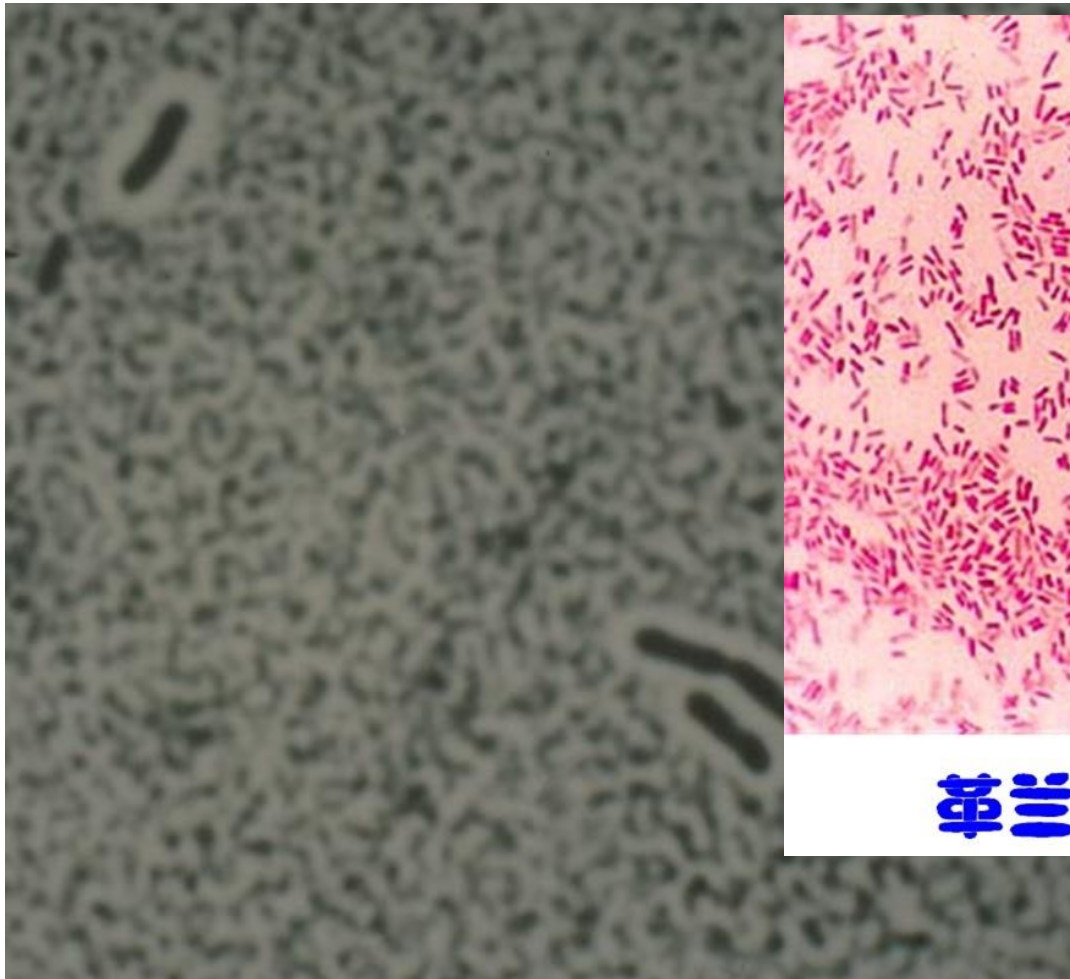
**NA: Numerical aperture (数值孔径),**

**represents the amount of light that can enter the lens.**

**$\lambda$ : the wavelength of the light**



**分辨率与所用波长成反比!**



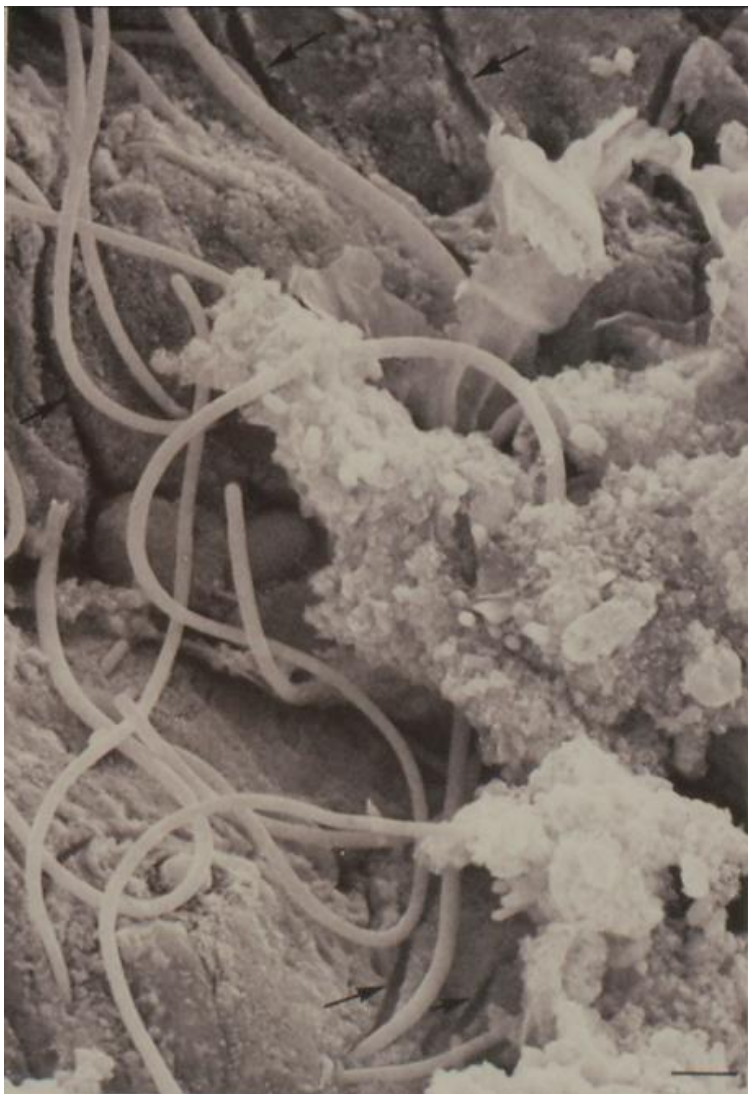
**革兰氏阴性菌染色结果**

## **Characteristics of Light Microscopy:**

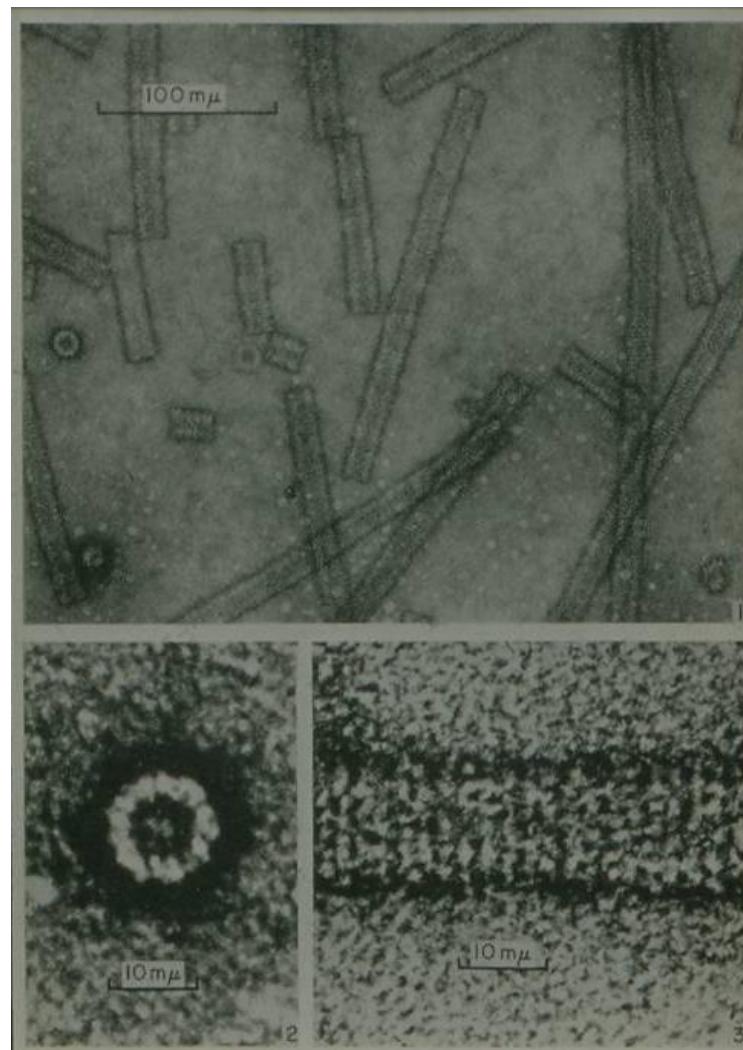
- Low resolution – 200nm
- Whole cells



# 电子显微镜

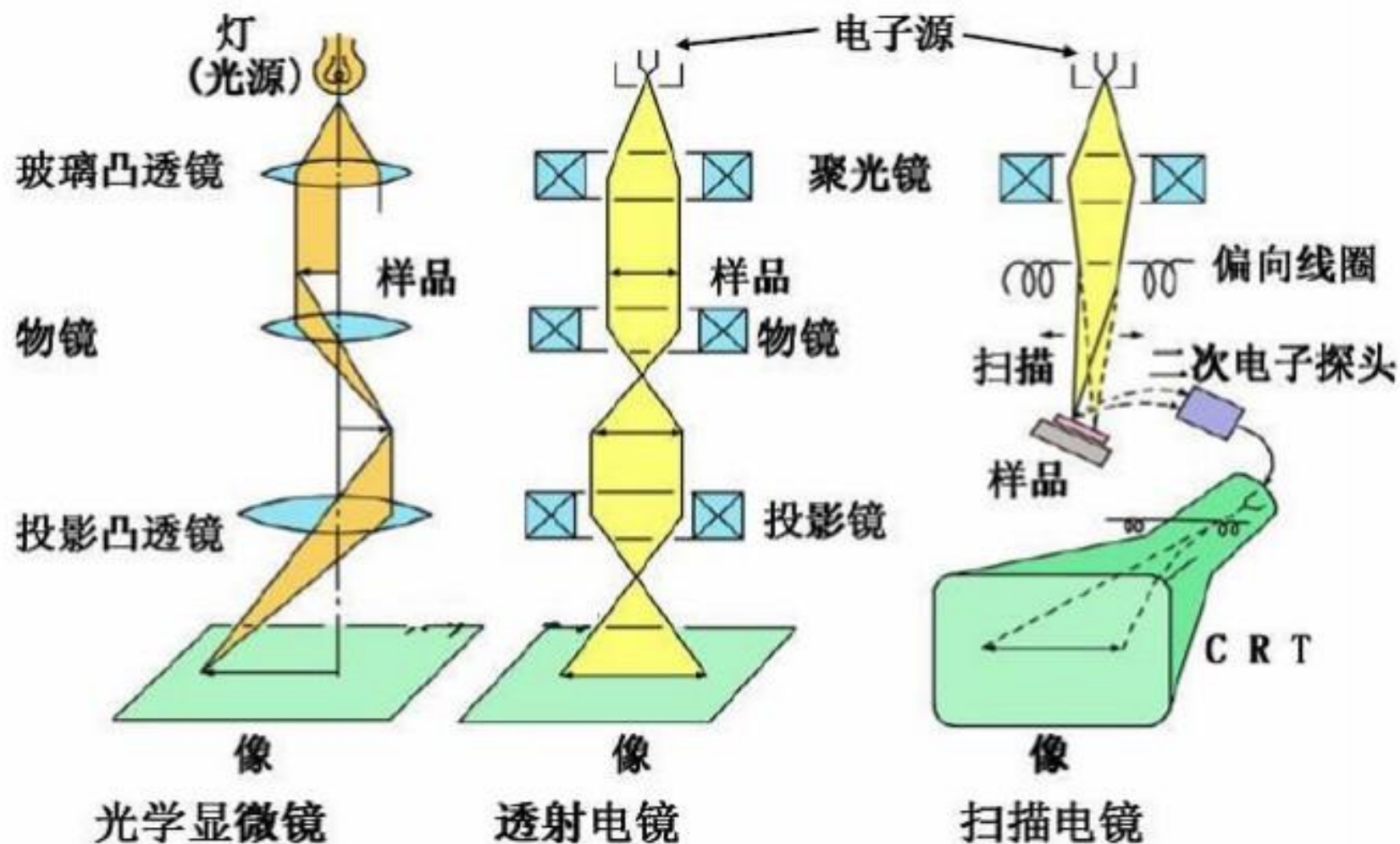


扫描电子显微镜



透射电子显微镜





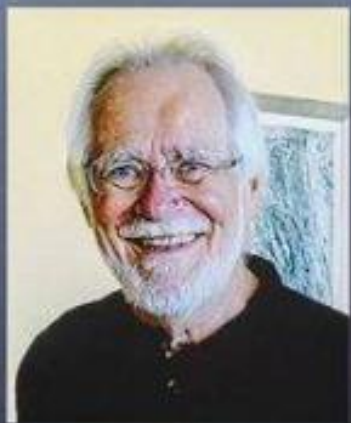
## 光学显微镜和电子显微镜的区别



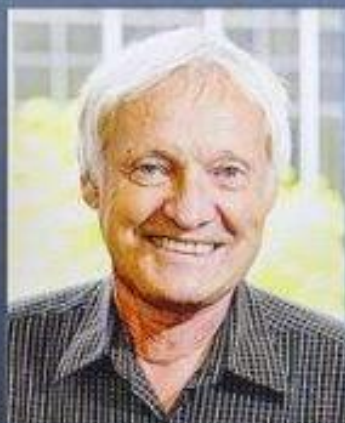
The Nobel Prize in Chemistry 2017

# Nobelpriset i kemi 2017

KUNGL.  
VETENSKAPS  
AKADEMIEN  
THE ROYAL SWEDISH ACADEMY OF SCIENCES



**Jacques Dubochet**  
Université de Lausanne,  
Switzerland



**Joachim Frank**  
Columbia University, New  
York, USA



**Richard Henderson**  
MRC Laboratory of  
Molecular Biology,  
Cambridge, UK

*"för utveckling av kryoelektronmikroskopi för högupplösande strukturbestämning av biomolekyler i lösning"*  
*"for developing cryo-electron microscopy for the high-resolution structure determination of biomolecules in solution"*

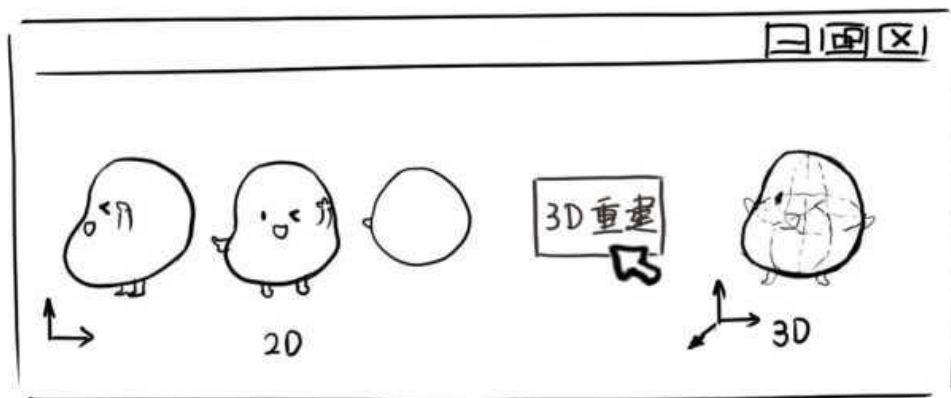
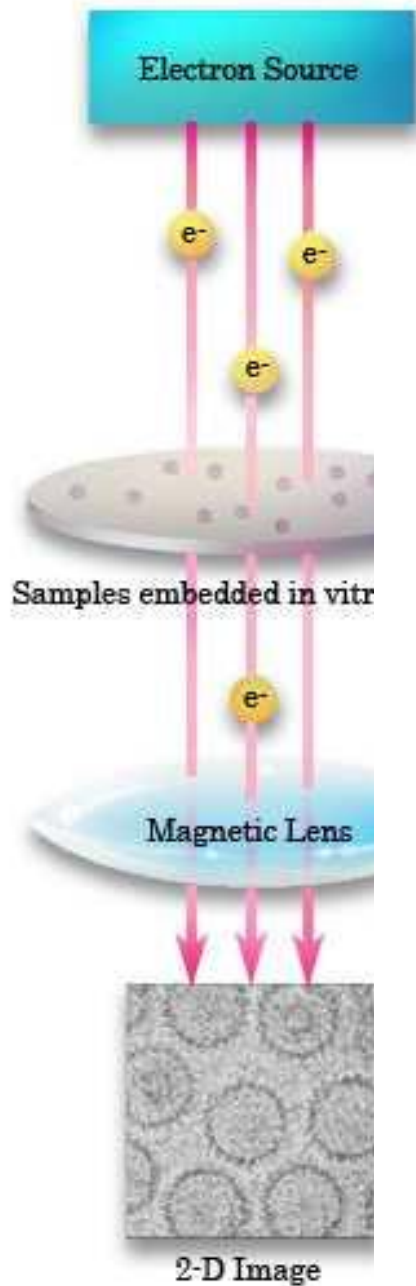
**新华网**  
WWW.NEWS.CN

4 October 2017

© Kungl. Vetenskapsakademien

## 冷冻电子显微镜技术

# 冷冻电子显微镜技术





# 超分辨荧光显微镜



美、德三名科学家  
分享2014年诺贝尔化学奖



瑞典皇家科学院当地时间10月8日宣布



**埃里克·贝齐格**  
美国科学家



**斯特凡·黑尔**  
德国科学家



**威廉·莫纳**  
美国科学家

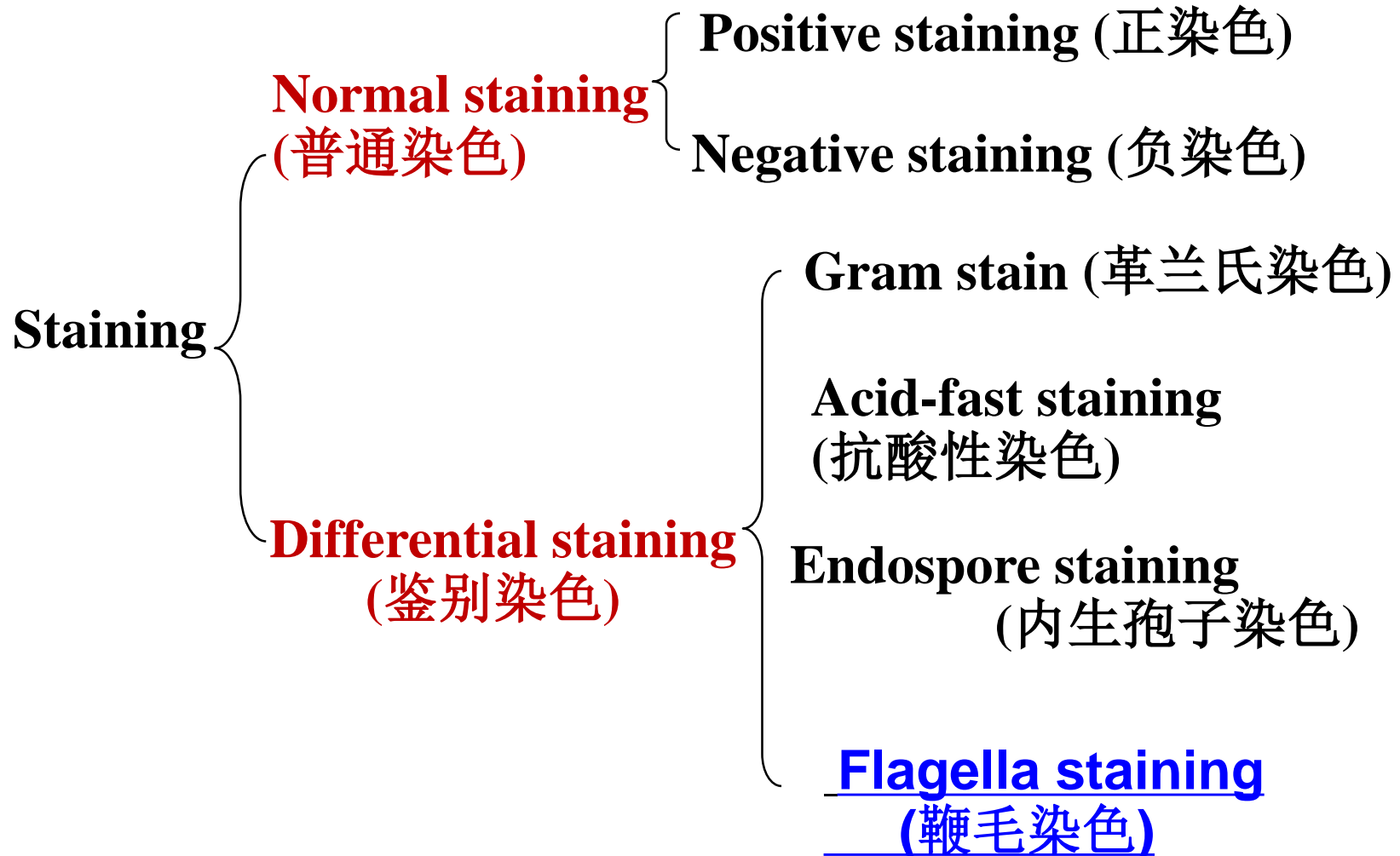
**获奖理由 发展超分辨率荧光显微镜所作的贡献**

今年诺贝尔化学奖奖金共800万瑞典克朗（约合111万美元），将由三位获奖者平分



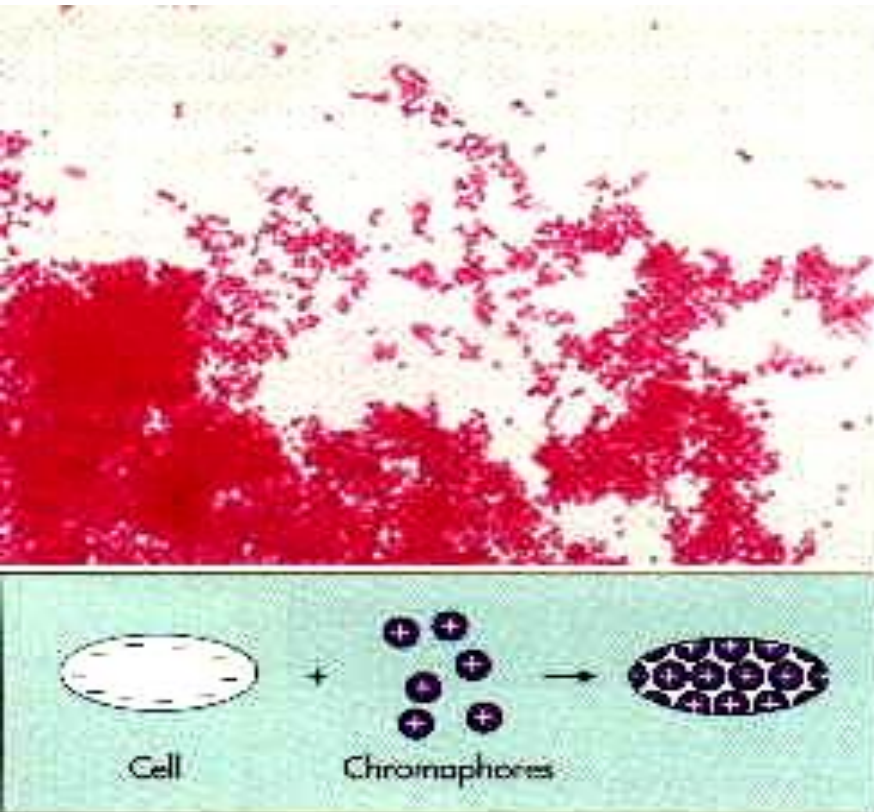
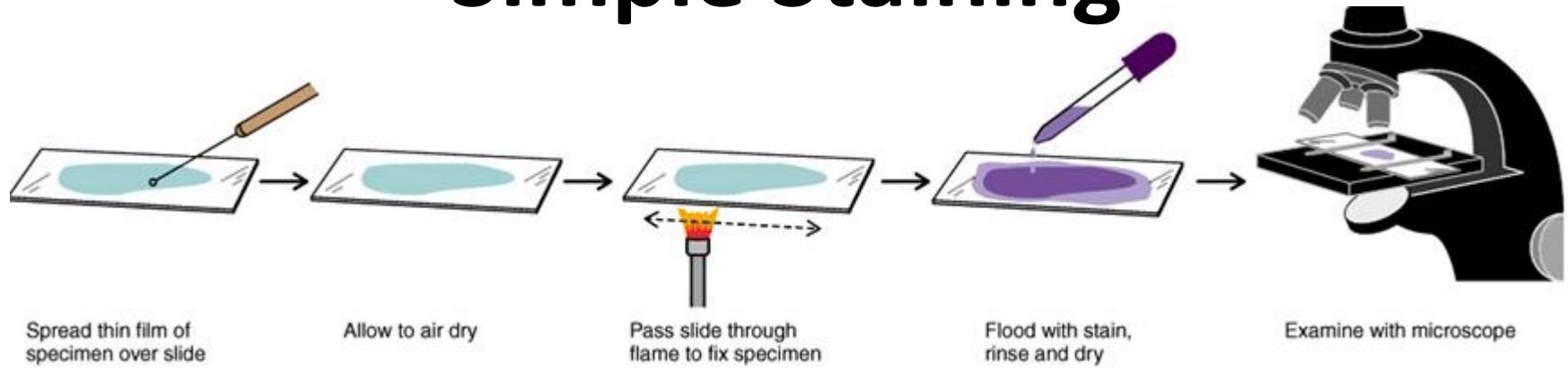
# Contrast and Staining

- Staining (染色) creates contrast between a specimen and its background so it can be seen.
- Fixation (固定) is the first step of staining. Fixation preserves the shape of the cell and prevents them from being washed off during staining.
  - ❖ **Heat fixation:** use gentle flame heating and air-drying.
  - ❖ **Chemical fixation:** use chemicals to penetrate cells and react with cellular components, proteins and lipids, to render them inactive, insoluble and immobile.





# Simple Staining



The outer layer of a cell is **negatively charged**, a positively charged stain chromophore is attached to the cell

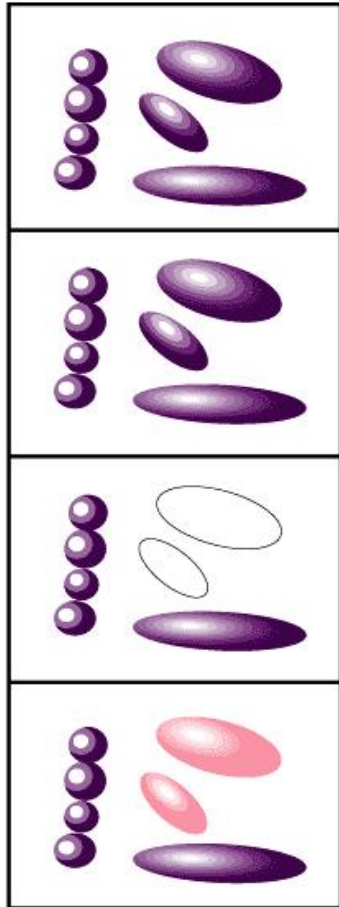
# Simple Staining



Light micrograph of *Bacillus cereus* (蜡样芽孢杆菌)

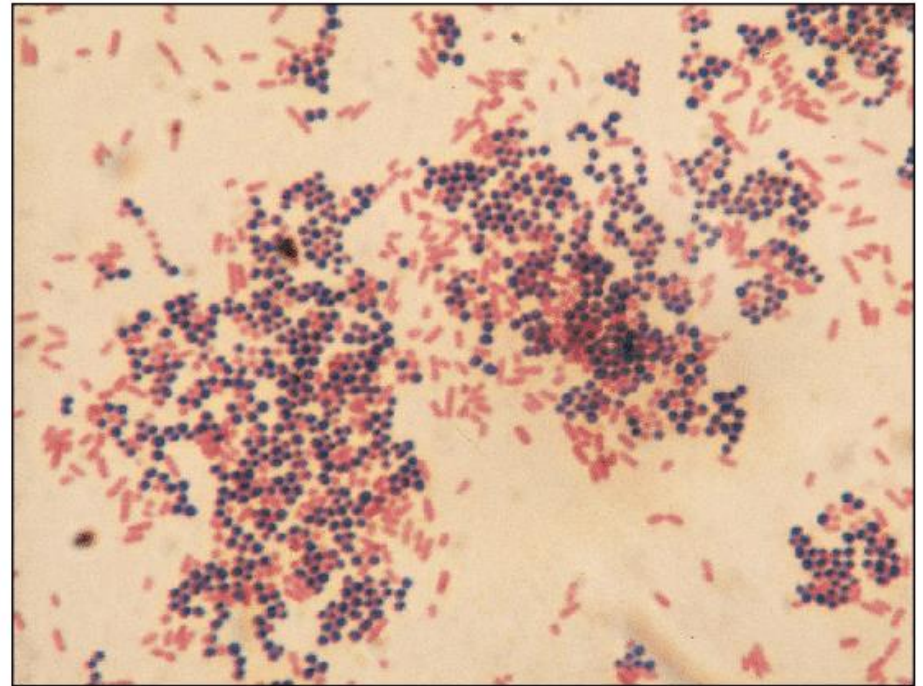
# Gram Staining

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



(a)

Steps in Staining	State of Bacteria
Step 1: Crystal violet (primary stain)	Cells stain purple.
Step 2: Iodine (mordant)	Cells remain purple.
Step 3: Alcohol (decolorizer)	Gram-positive cells remain purple; Gram-negative cells become colorless.
Step 4: Safranin (counterstain)	Gram-positive cells remain purple; Gram-negative cells appear red.

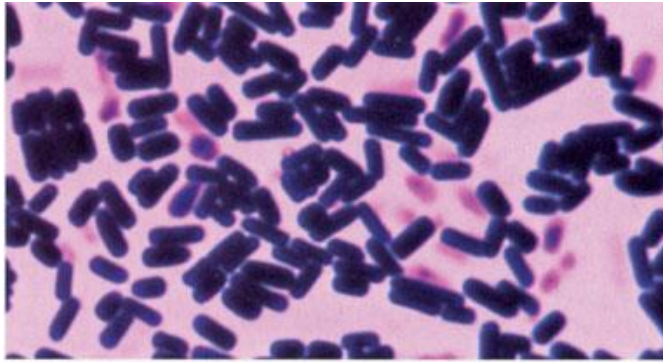


(b)

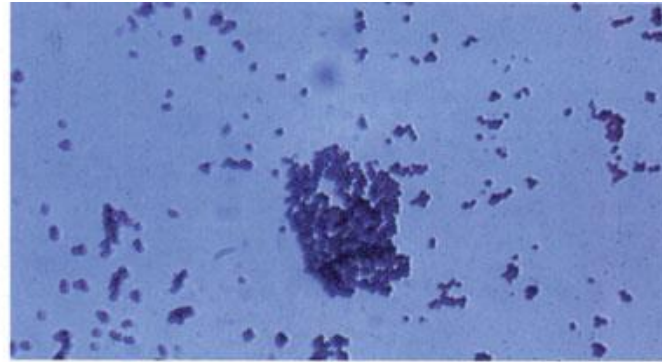
10  $\mu\text{m}$



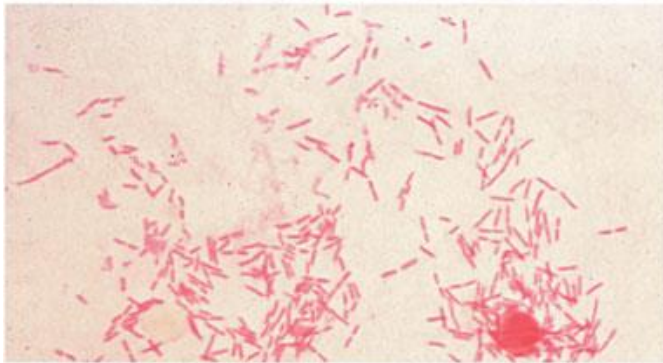
# Examples of Gram Staining



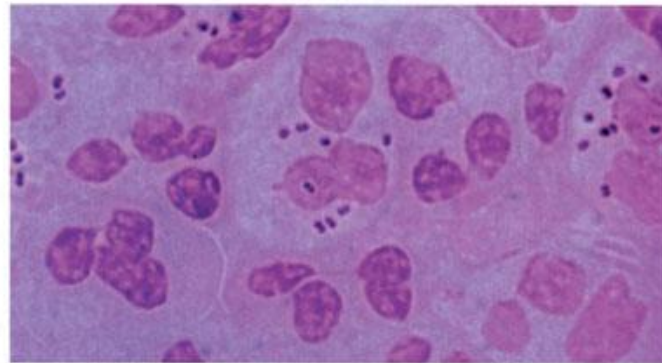
(a)



(b)



(c)



(d)

**(a) *Clostridium perfringens* (产气荚膜梭菌) (800×)**

**(b) *Staphylococcus aureus* (1000 ×)**

**(c) *E. coli* (500 ×)**

**(d) *Neisseria gonorrhoeae* (淋病奈瑟球菌) (1000 ×).**

# ■ 微生物的纯培养

1. 无菌技术

2. 用固体培养基分离纯培养

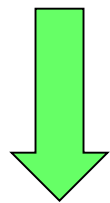
3. 用液体培养基分离纯培养

4. 单细胞（孢子）分离

5. 选择培养分离

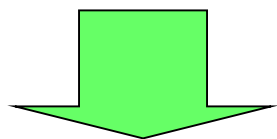
6. 二元培养物

微生物个体：小



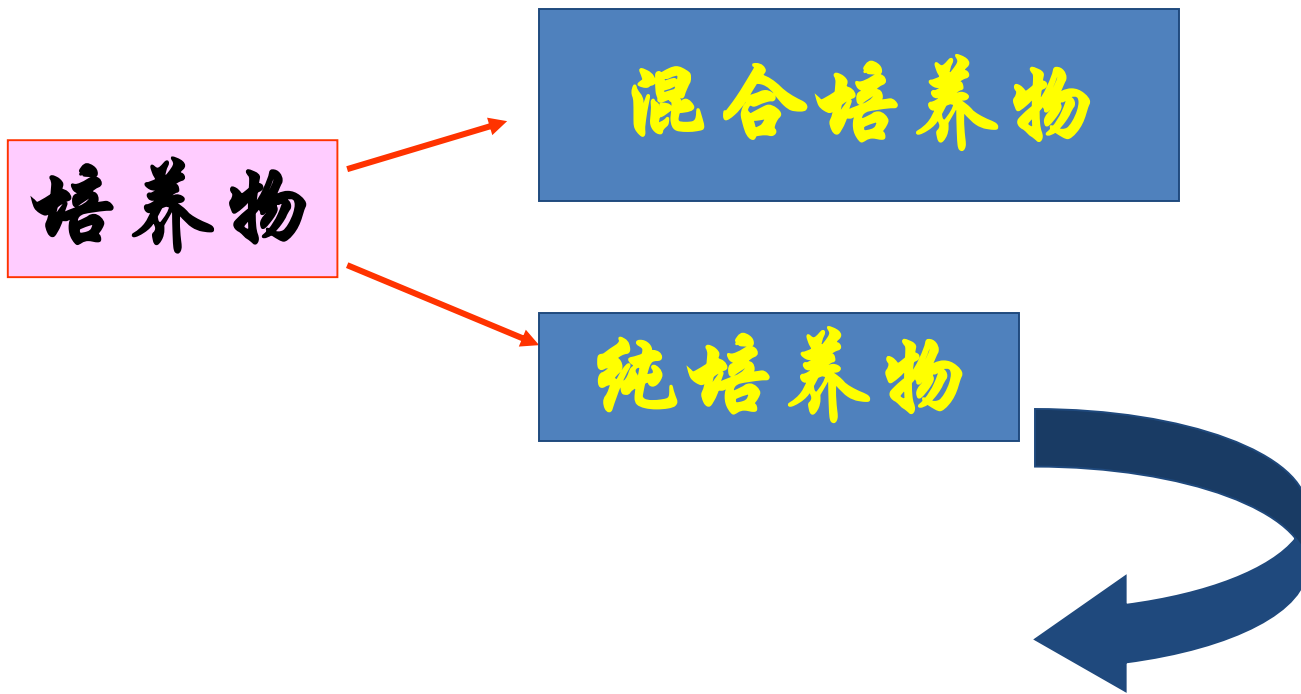
利用群体研究属性

群体形式繁衍、保存



人为规定的条件下培养繁殖得到的  
微生物群体为培养物

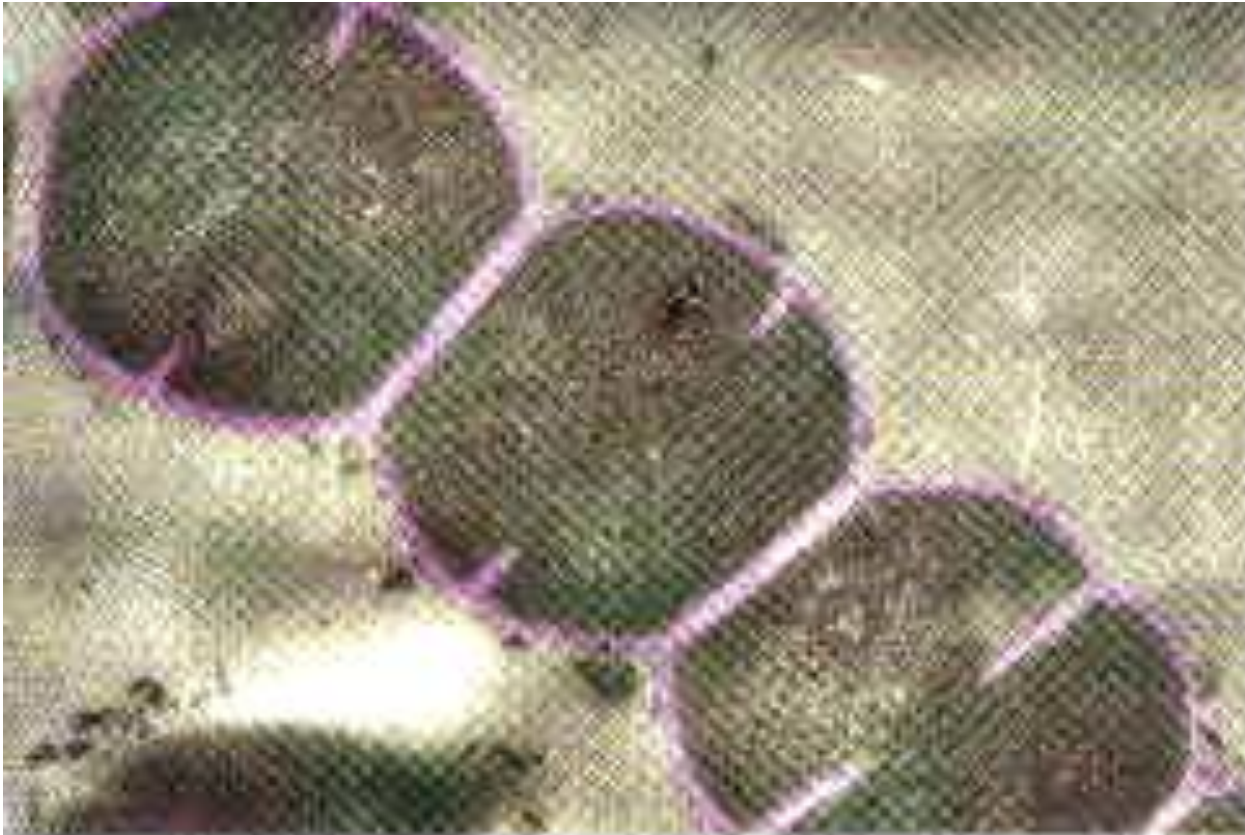




纯培养能较好地得到重复结果，  
是微生物研究的重要技术之一

# Pure Culture Methods

- **A pure culture (纯培养) of bacteria** is a population of identical bacteria all derived by asexual reproduction (无性繁殖) from a single bacterial cell.



# Early Development of **Pure Culture Methods**

- **Robert Koch (柯赫) and his assistants.**
- **Agar (琼脂) media (培养基) and Petri plates (培养皿).**



- **Agar** melts at 100°C and re-solidifies at 42°C.
- **Agar** can't be consumed by most bacteria.
- Petri plates provide convenient operations on microorganisms without risk of contamination by other microorganisms in the air.

# 无菌技术 (aseptic technique)

- prevent the contamination of a **pure culture** of a microorganisms with extraneous microorganisms
- prevent human contact with potentially dangerous microorganisms.
- 微生物学研究正常进行的关键!





无菌操作台

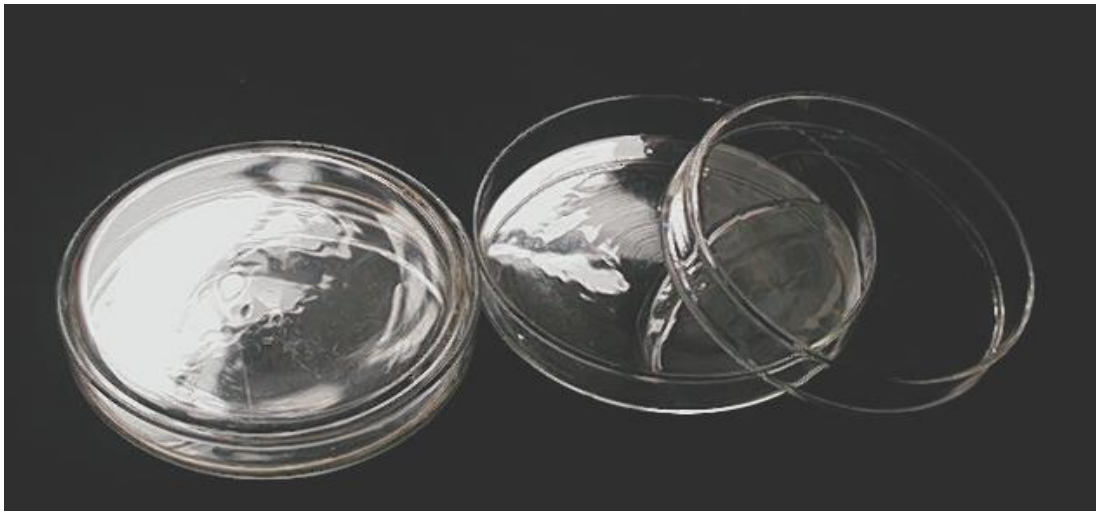


火焰旁无菌区

## 微生物培养常用器皿及灭菌

试管、烧瓶、培养皿、Tip、EP等常用器皿

灭菌方法有：高压蒸汽灭菌、高温干热、煮沸等



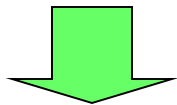
# 接种操作，最基本技术



- 接种针或接种环分离或将微生物从一个培养器皿转接到另一个，无菌操作。
- 镍铬合金
- 液体培养物用无菌移液管或移液枪

# 用固体培养基分离纯培养

**菌落(colony)**：单个微生物在固体培养基或内层) 生长繁殖形成肉眼可见的，有一定形态结构的子细胞生长群体。



菌落连成片为菌苔 (lawn)

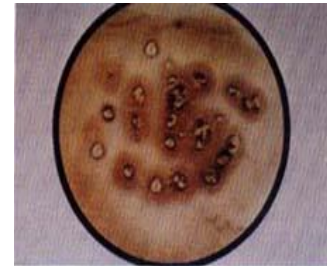


图 10-40 衣氏放线菌硫磺颗粒



图 10-41 衣氏放线菌硫磺颗粒压片 (革兰染色)



图 10-42 衣氏放线菌在厌氧血琼脂平板上的粗糙型菌落

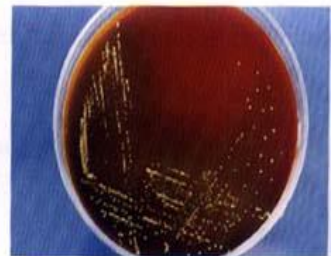
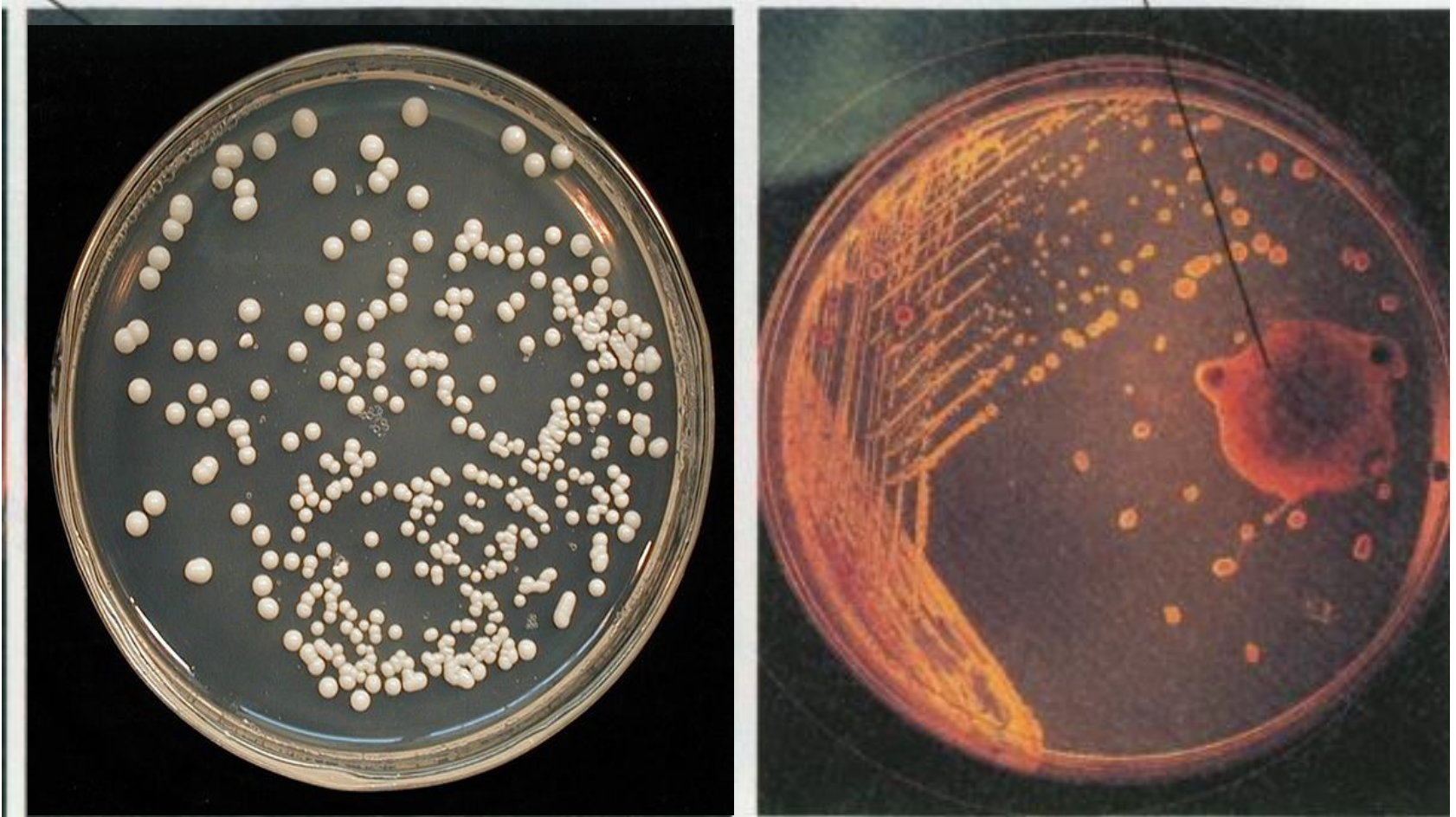


图 10-43 衣氏放线菌在厌氧血琼脂平板上的光滑型菌落 (3-4d)

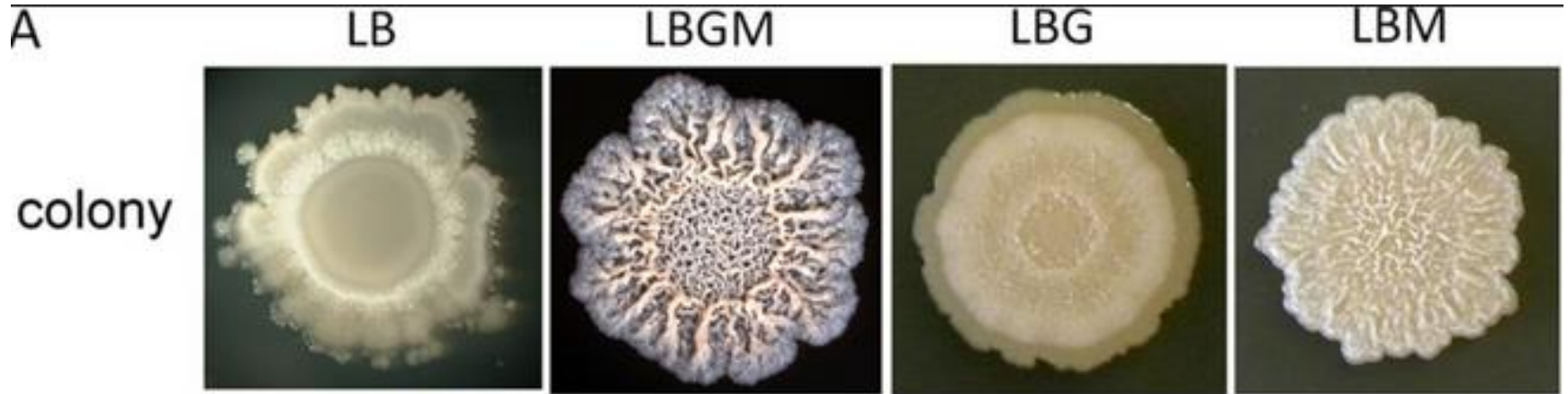
各种菌落





不同微生物在**特定培养基**上生长形成的菌落或菌苔一般都具有稳定的特征（**形状、颜色**等），是微生物分类、鉴定的重要依据。

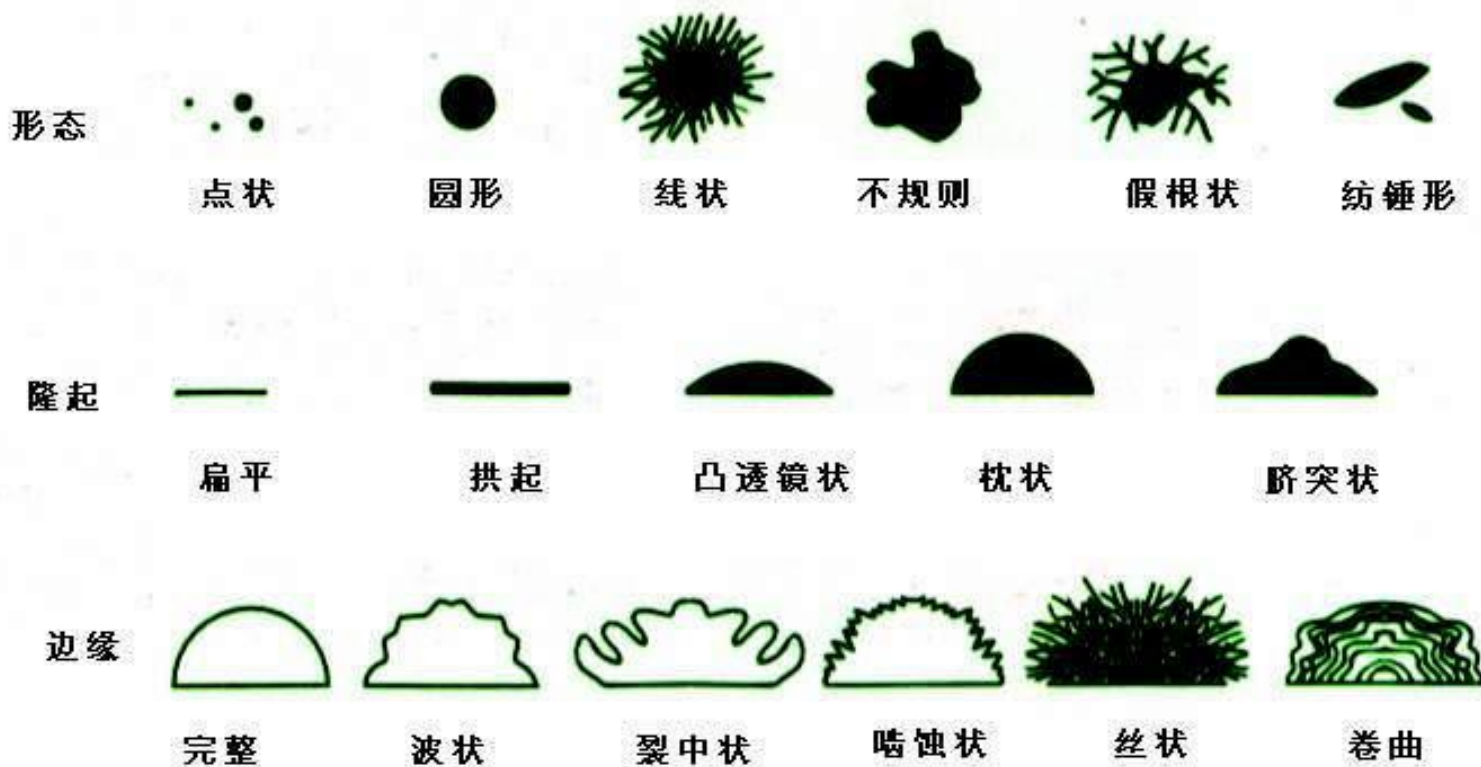
# 细菌在不同的培养平板上形成不同的特征菌落



Effect of glycerol (甘油) and manganese (Mn) on *B. subtilis* NCIB3610

## 菌落特征描述

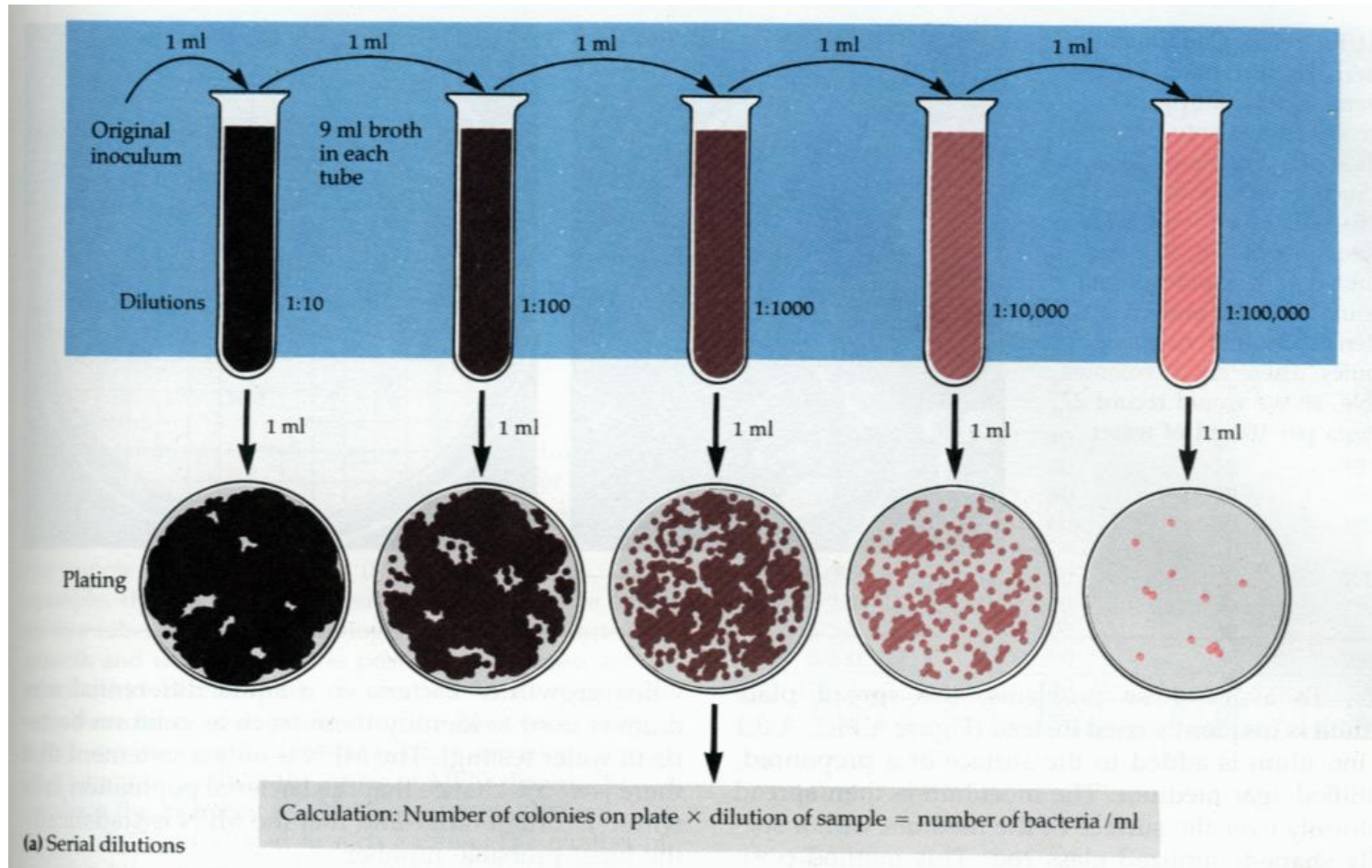
大小，形状，隆起形状，边缘情况，表面状态，表面光泽，质地，颜色，透明度等。





# 常用固体分离纯培养方法 (1) :

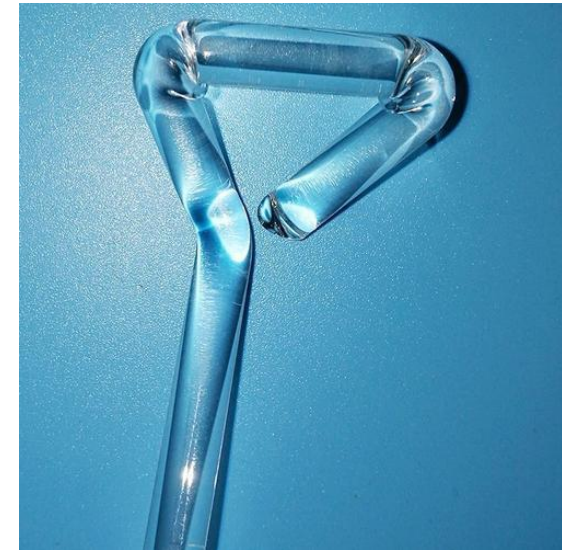
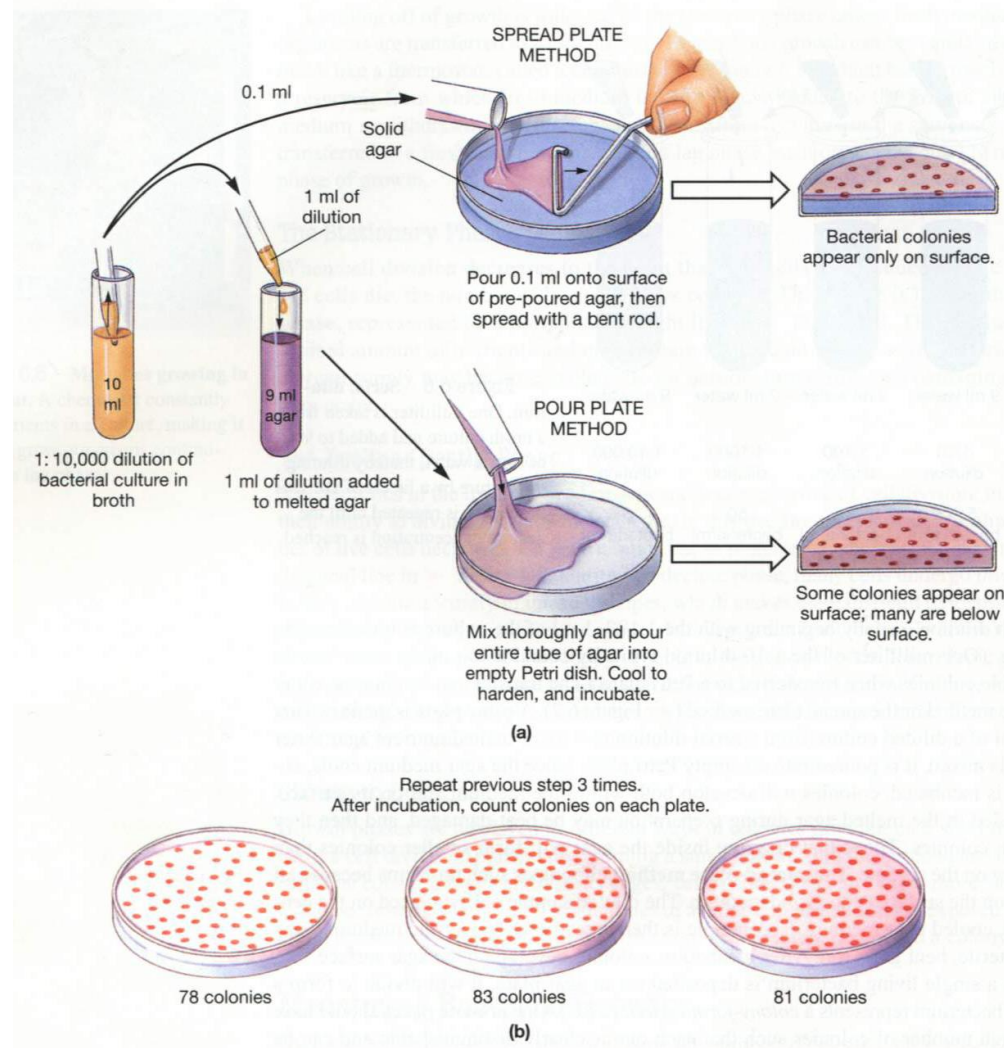
## 稀释平板法 (pour plate method)





# 常用固体分离纯培养方法 (2) :

## 涂布平板法 (spread plate method)



# 常用固体分离纯培养方法 (3) :

## 平板划线分离法 (streak plate method)

接种环沾取少许微生物，在无菌平板扇形、平行等划线，随划线次数增加而分散开，得到单菌落。





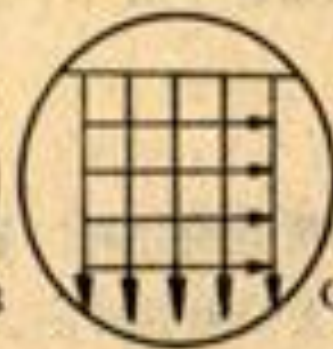
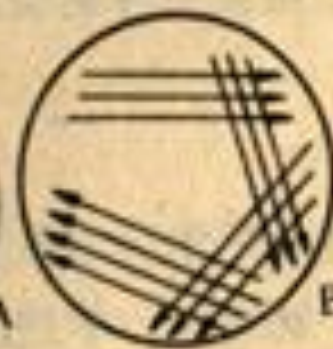
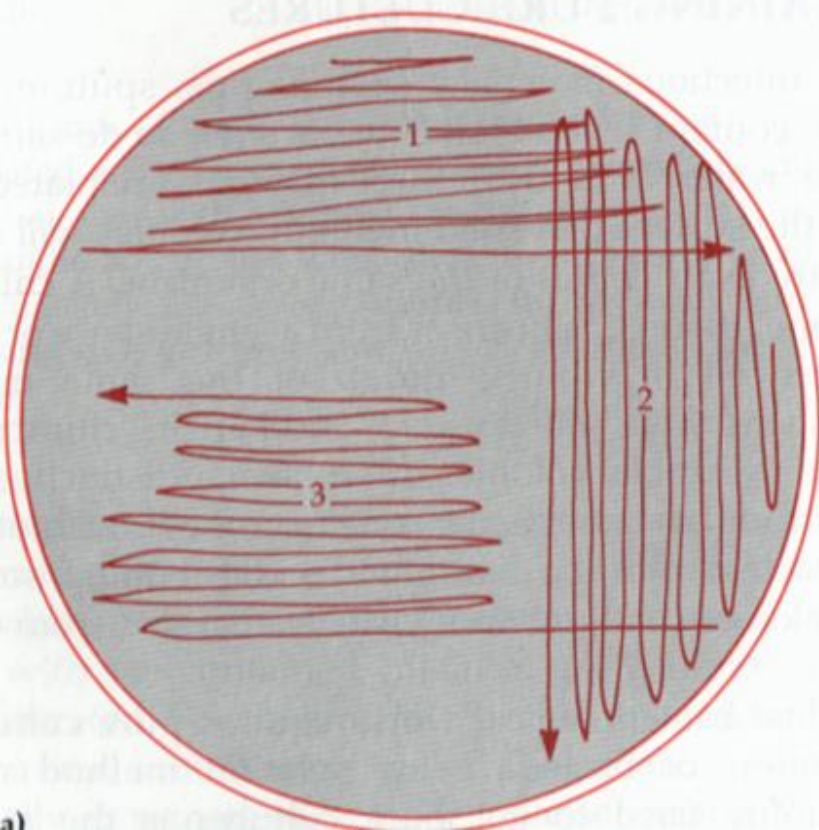


图 6-2 平行划线后细菌生长情况

图 6-3 平板划线分离法

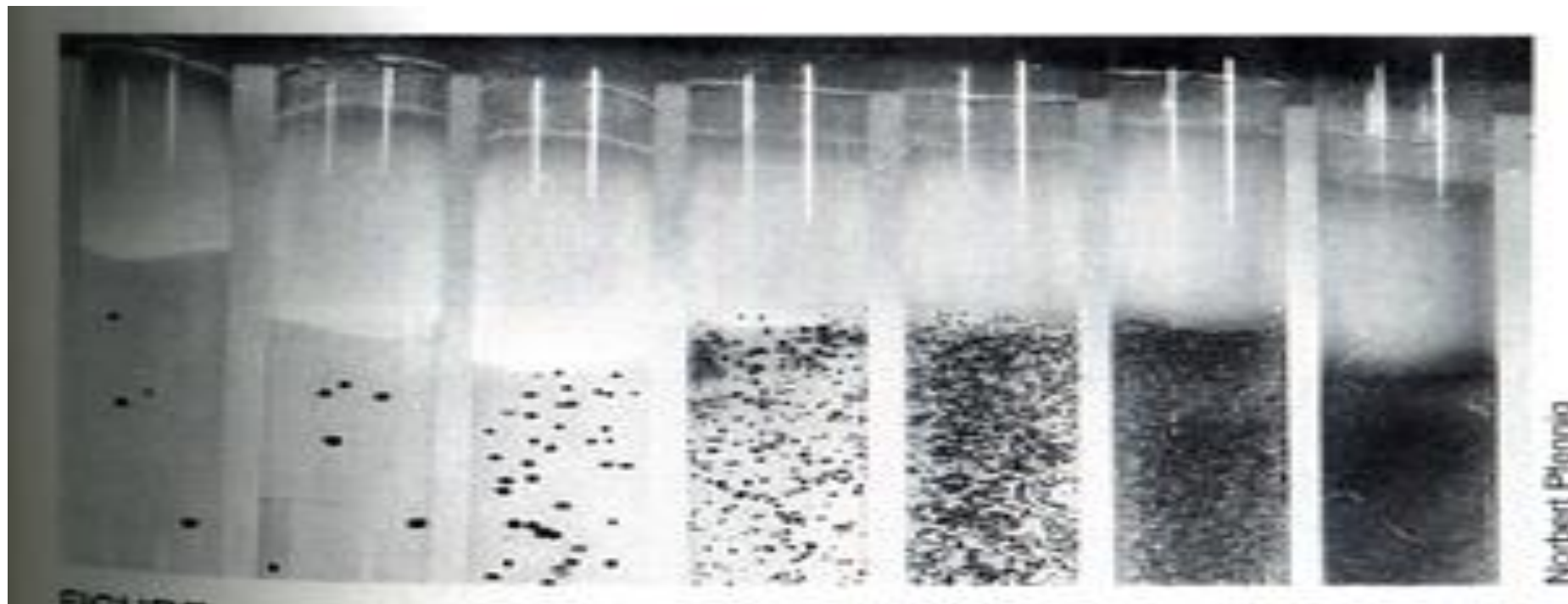
A. 扇形划线; B. 连续划线; C. 方格划线



# 常用固体分离纯培养方法 (4)

## 稀释摇管法(dilution shake culture method) - 厌氧

操作：盛培养基试管加热融化，冷却至50℃，待分离菌用这些试管梯度稀释，摇匀，冷凝，石蜡封口

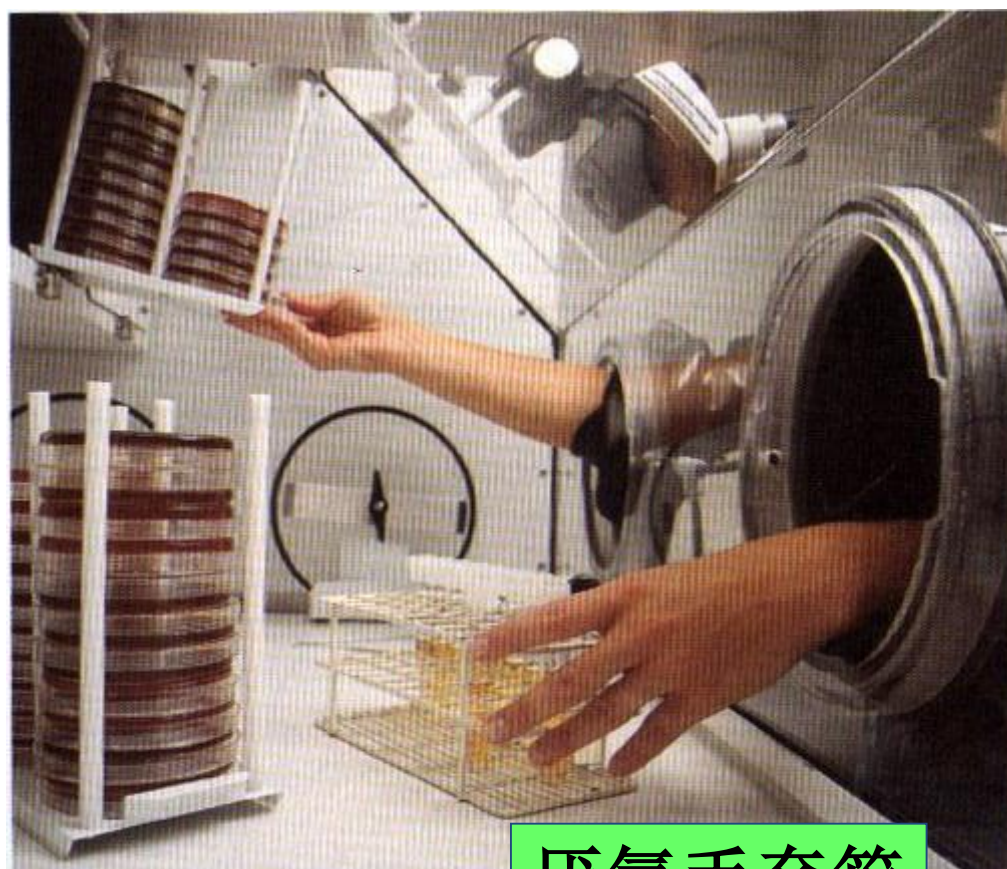




单菌落的挑取和移植: 灭菌针将石蜡盖取出, 再用毛细管插入琼脂和管壁之间, 吹入无菌无氧气体, 将琼脂柱吸出, 置放在培养皿中, 用无菌刀将琼脂柱切成薄片进行观察和菌落的移植。



厌氧罐



厌氧手套箱

## 液体培养基分离纯培养：

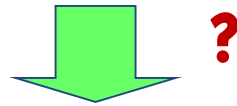
原生动物、藻类**液体培养基**分离纯培养。

### 稀释法：

接种物在液体培养基中**高度稀释**，每个试管中分配不到一个。若稀释后同一梯度的平行试管中大多数（**>95%**）没有，那么有微生物的可能是纯培养，否则可能性下降。

# 单细胞（单孢子）显微分离：

稀释法缺点  分离的优势菌



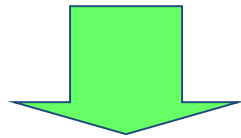
显微分离法直接分离单细胞或单个个体培养获得纯培养



显微操作仪，专业程度高

如果某微生物在混杂群体中很少怎么办？

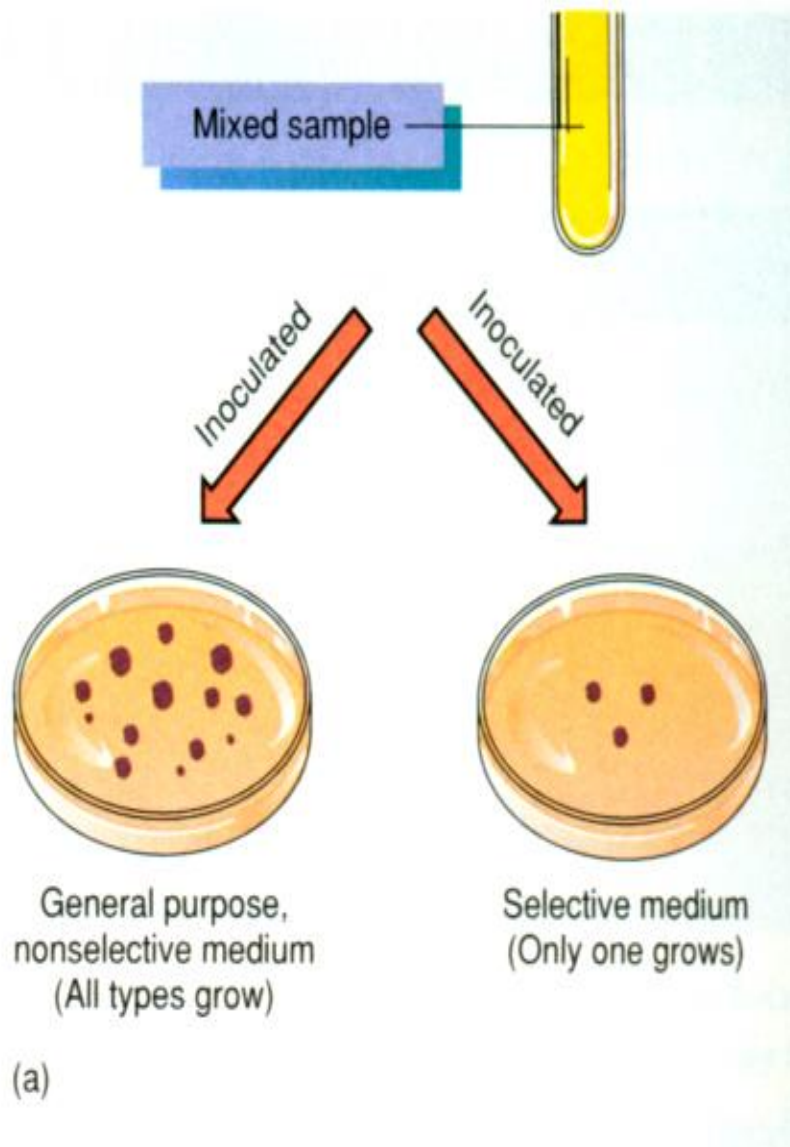
选择培养分离方法：



设计适合某微生物生长繁殖的培养基，抑制其他菌生长



# 1) 选择培养基直接分离



## 2) 富集培养

特定的环境条件



仅适应于该条件的微生物旺盛生长



待分离微生物在群落中的数量大大增加



从自然界中分离到所需的特定微生物

# 富集培养实例

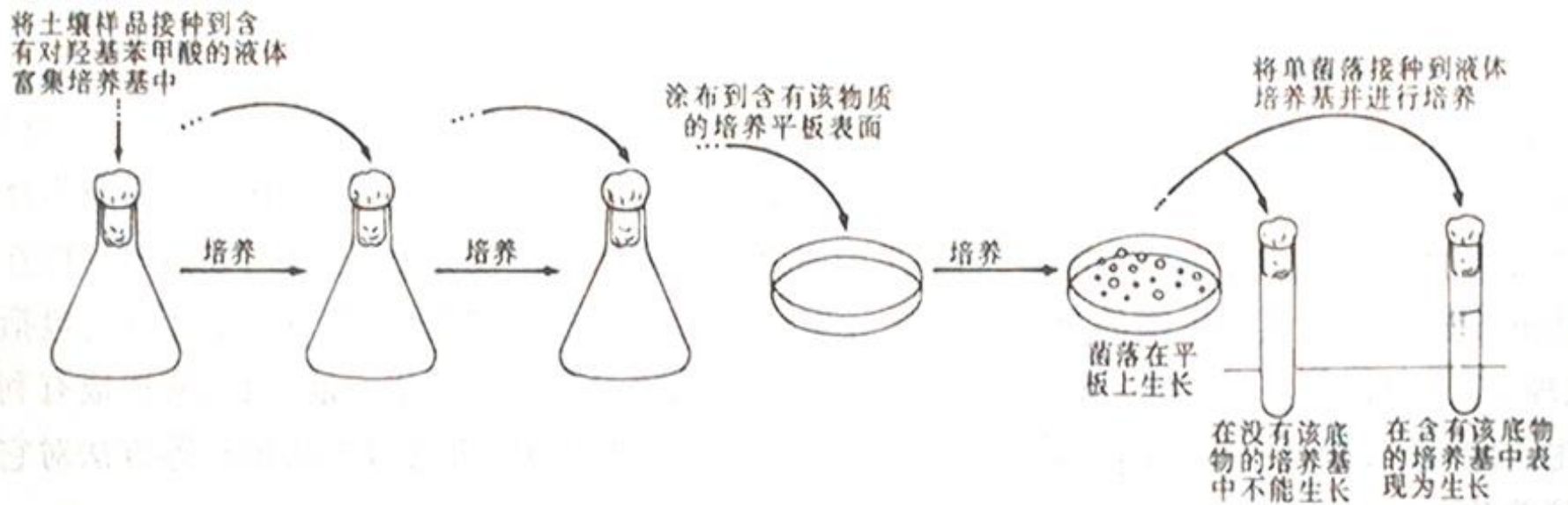


图 2-7 利用富集培养技术从土壤中分离能降解对羟基苯甲酸的微生物

## 二元培养物：

培养物只含两种微生物，并有意保持两者之间的特定关系的培养物为二元培养物。

如：病毒——宿主，原生动物——细小微生物



# 微生物菌种保藏技术:

中国微生物菌种保藏委员会 (CCCCM), 中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 美国典型菌种保藏中心 (ATCC) 等

为何保藏

如何保藏

性状稳定的菌种  
是微生物工作最  
重要的基本要求

要求: 菌种不死,  
不污染, 不变

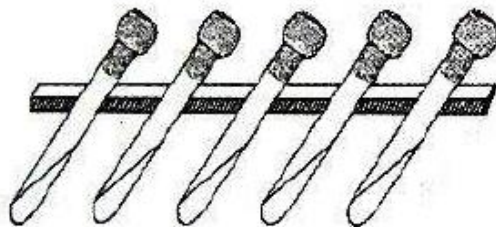
# 微生物菌种保藏技术:

如何保藏

根据菌种特性和保藏目的不同，  
给特定环境使其存活而得以保存

连续移种或改变环境条件：干燥、低温  
缺氧、避光、缺乏营养等

# 1) 传代保藏

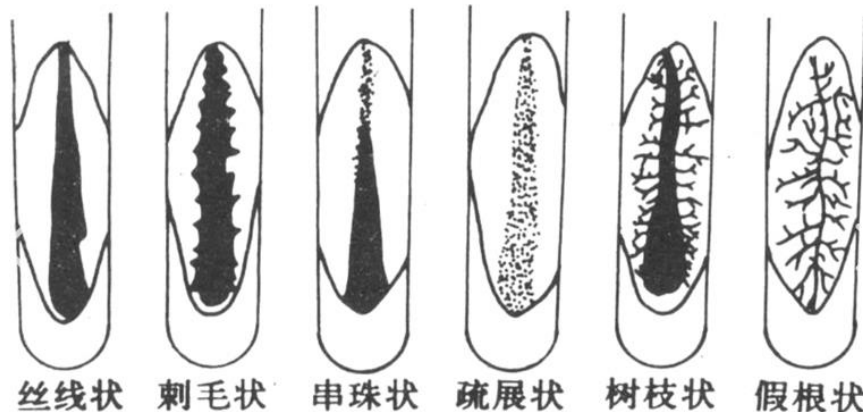


斜面、半固体琼脂柱、液体

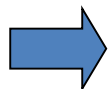
**斜面：**保存数周至数年，可用石蜡或橡皮塞封口

**液体：**制成菌悬液，低温（悬液保藏法）

**缺点：**繁琐、易污染、变异



## 2) 冷冻保藏

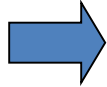


液氮保藏、低温冰箱等  
液氮可达 $-196^{\circ}\text{C}$ ，效果较好

**注意：**速冻，减少冰晶损伤细胞



### 3) 干燥保藏



沙土管保藏、冷冻真空干燥

**沙土管：**产孢子菌。制成孢子悬液，加无菌沙土管，减压抽干水分，石蜡封口，冰箱保存。

**冷冻真空干燥：**加保护剂预先冷冻，真空升华去水，低温保存，保存数十年，目前最普遍、最重要的方法，菌种保藏中心多采用此法。

**注意：**菌种保藏时采用不同手段保藏，防止某种方法失败导致菌种丧失。

- 1.常用的固体分离纯培养都有哪几种？ 如何操作？
2. 显微镜样品染色方法有哪些？
- 3.常用的菌种保藏技术有哪些？ 为何要对菌种进行保藏？
4. 名词解释：

分辨率 菌落 平板 富集培养 二元培养物 无菌操作