

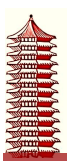
微生物学实验

任课老师

洪龙、董春霞

2022年09月27日





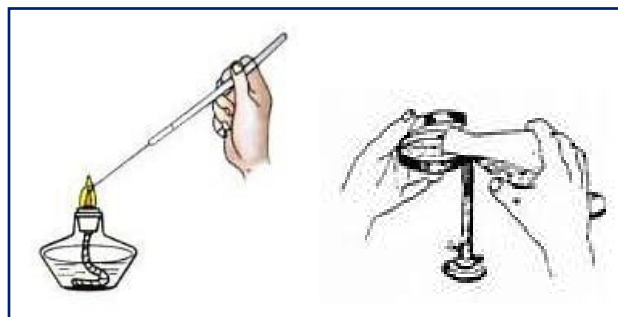
微生物学实验特别注意事项

注意无菌操作

微生物实验的最基本实验技术，尽量少说话，来回走动等；



无处不在的微生物

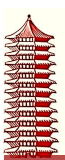


火焰旁的无菌区

注意安全

防止烫伤、感染等，注意卫生。**一般情况下，使用过的载玻片应浸泡在消毒缸内再清洗等。**

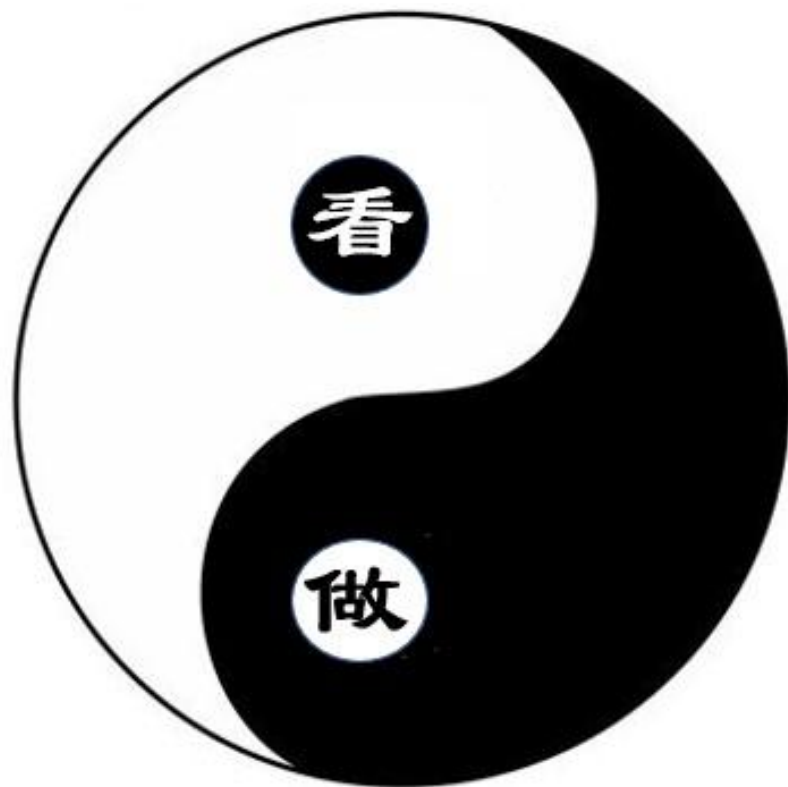




微生物学的基础实验技术

○显微技术

○染色技术



● 纯种分离与培养技术

● 无菌技术

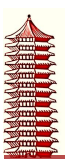


北京大学
PEKING UNIVERSITY

目录 CONTENTS

- 1 | 四大类微生物的形态学特征
- 2 | 微生物的分离纯化
- 3 | 病毒效价的测定
- 4 | 功能微生物的筛选
- 5 | 利用图像识别和指纹光谱快速鉴别蓝藻





微生物基础实验课的教学安排

分为5个模块：

第一个模块

四大类微生物的形态学特征，基础知识—**验证性实验**；要求同学能**认识四大类微生物**；

第二个模块

四大类微生物的分离；涉及培养四大类微生物所需培养基的配制，灭菌、**纯种分离**、保藏等，巩固第一个模块的知识—**探索性实验**，注重广度；

第三个模块

噬菌体效价测定—**验证性实验**；**病毒特性**；

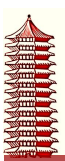
第四个模块

功能微生物的筛选：**LysC产生菌的初步筛选或微生物拮抗作用的发现**—**探索性实验**，注重深度；

第五个模块

利用**图像识别和指纹光谱快速鉴定蓝细菌**—**创新性实验**

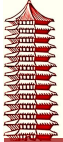




微生物基础实验课包含三种类型的实验

- **验证性实验** 着重基础实验技术，要求熟练掌握，吃透实验原理，打好基础；
- **探索性实验** 巩固基础实验技术，丰富实验内容并有意识提高实验内容的宽度和深度；在掌握基础实验技术的前提下要求较高，材料自选，结果未知，提高运用所学知识和基本实验技术的能力；
- **创新性实验** 跨领域运用化学分析方法—光谱获得其指纹光谱，结合图像识别和数据分析方法（这里主要涉及新兴的化学计量学），探索蓝细菌的快速鉴定方法，旨在培养同学学科交叉的意识和科研创新能力。



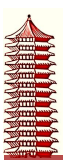


微生物基础实验内容简介

第一个模块：细菌、放线菌、酵母和霉菌的形态学特征(实验一二三四)；

- 基础性实验，也是验证性实验，其中涉及了四项微生物学基础实验技术的两种——显微技术和染色技术，要求牢固掌握这四大类微生物中**模式微生物的形态特征**。
- 微生物学的形态特征是微生物理论课的重要内容，是认识微生物的基础，常见四大类微生物的形态学特征是微生物学的入门知识。具体的要求是：
 - ◆ 熟练掌握显微技术和染色技术，并能认识到由于**四大类微生物特征不同，需用不同的染色方法**。
 - ◆ 熟练掌握四大类微生物中具有代表性的菌株个体形态(微观)和菌落形态(宏观)特征，能从个体形态和菌落形态能区分四大类微生物；



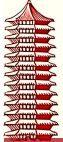


微生物基础实验内容简介

第二个模块：四大类微生物的分离(实验五)；

- 四大类微生物培养基的配制、灭菌、微生物的分离、纯化、培养和菌种保藏技术等，旨在掌握四项微生物学基础实验技术的另两种——无菌技术和纯种分离和培养，并巩固第一个模块的知识。
- 整个实验过程如培养基的制备、灭菌、样品的处理、微生物的分离、菌体形态特征观察等都由同学自己动手完成。了解四大类微生物在自然界的生境；**初步认识微生物的多样性。**



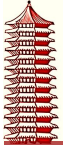


微生物基础实验内容简介

第三个模块：噬菌体效价测定(实验六)；

这个模块的实验对象是病毒，病毒是最简单的微生物，病毒学是新世纪生命科学中的研究热点和前沿，有必要了解病毒的生物学特点。病毒无法获得纯培养，只能通过二元培养物，即培养它们的宿主细胞然后它们才能复制，而且在实验过程中还涉及到双层琼脂法、效价测定的方法、负菌落的概念等，噬菌体效价测定是微生物学基础实验中重要的实验内容和技术。



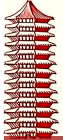


微生物基础实验内容简介

第四个模块：功能微生物的筛选(专业不同选做)；

- Lys-C产生菌的初步筛选（生命科学专业选做，实验七）
- 土壤微生物拮抗现象的观察（生态专业选做，实验八）
- 自然界中存在大量不同的微生物，利用它们的生物多样性及代谢多样性可筛选到有用的生物制品；
- 自然界中大量不同的微生物之间存在不同的相互作用。Waksman利用拮抗作用发现了多种抗生素，是微生物学发展历史的重要里程碑；利用生物之间的拮抗作用是开发生物活性物质的重要手段。



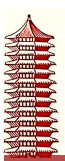


微生物基础实验内容简介

第五个模块：利用图像识别技术和指纹光谱快速鉴定蓝藻(实验九)。

- 现代科学发展的一个主要趋势是学科之间的交叉与融合，学科交叉促使各个学科向其他领域渗透、发展，成为现代科学研究的创新源泉。蓝藻可进行光合作用，细胞内含有大量的色素分子如叶绿素和藻胆素等以吸收光能，这些色素分子可提供丰富的光谱信号，因此利用常用的光谱学分析方法如UV-Vis、三维荧光、拉曼及红外光谱，可得到不同种类蓝藻的“指纹光谱”，结合蓝藻重要的形态学特征，可对蓝藻进行快速鉴定；
- 此外，对该方法进行一定程度的拓展后，可对混种蓝藻在未经纯种分离和培养的条件下进行快速鉴定，突破传统蓝藻的鉴定方法。



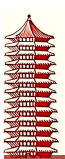


实验一、细菌(原核微生物)培养基的配制与形态(个体、菌落)观察

实验目的和要求:

1. 学习**细菌涂片和染色**的基本技术，掌握细菌的**革兰氏染色方法**；
2. 初步认识**细菌的形态特征**；
 镜检（**个体形态**）；
 菌落特征（**群体形态**）
3. 掌握显微镜（**油镜**）的使用方法；
4. 了解**培养基的配制原理**、要求和注意事项；学习并掌握培养基的配制。





微生物最基本的特点决定了显微技术是微生物学基本实验技术

微生物的基本特点：

- 与动物、植物细胞大小的差异

原核微生物细胞直径： $\leq 1 \mu\text{m}$

真核微生物细胞： $N \mu\text{m}$

病毒： $\leq 0.2 \mu\text{m}$

- 单细胞或简单的多细胞

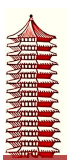
小

肉眼分辨能力： $0.25\text{mm}=250 \mu\text{m}$

借助**显微镜**观察



北京大学
PEKING UNIVERSITY



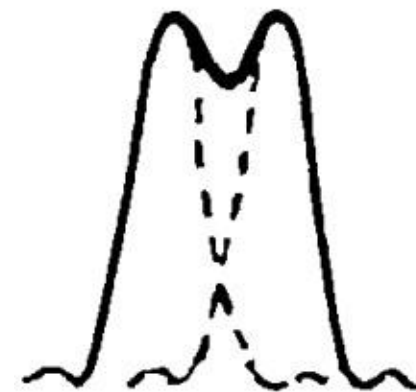
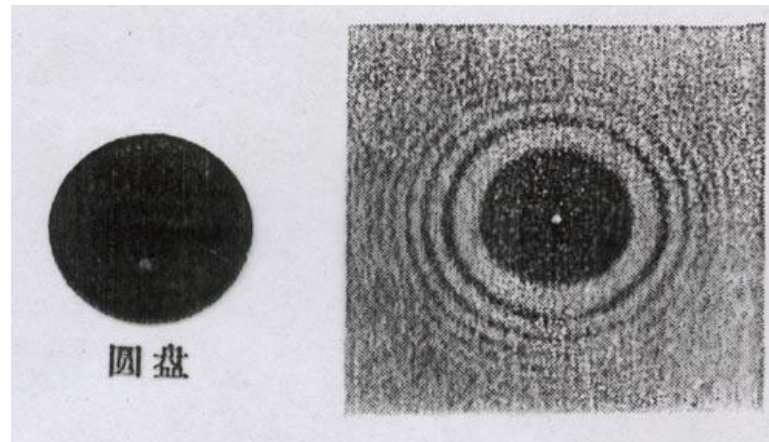
分辨率是决定观察效果最重要的指标

分辨率：最小可分辨距离

$$\text{分辨率} = \frac{0.61\lambda}{n \sin \theta}$$

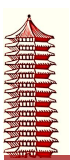
其中， n ：玻片与物镜间介质的折射率

- 空气 ($n=1.0$);
- 水 ($n=1.33$);
- 香柏油 ($n=1.52$)
- 玻璃 ($n=1.54$)



光的衍射及瑞利判据



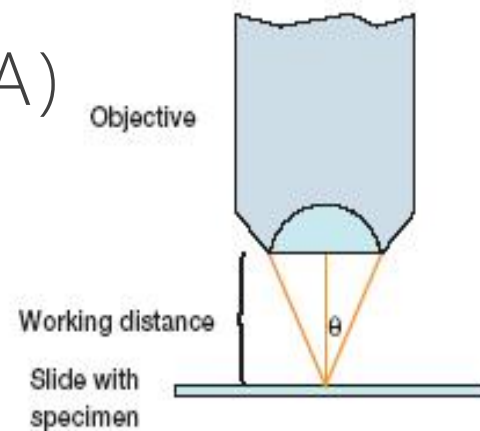


光学显微镜的数值孔径

- $n \sin \theta$: **数值孔径** (numerical aperture, NA)

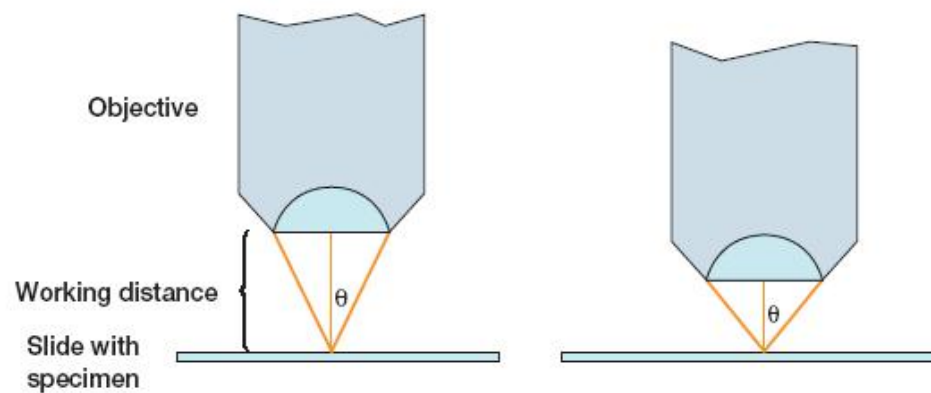
其中, θ : 物镜镜口角的一半

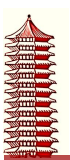
NA数值越大, 显微镜分辨率越好。



- 分辨率与 θ 的关系

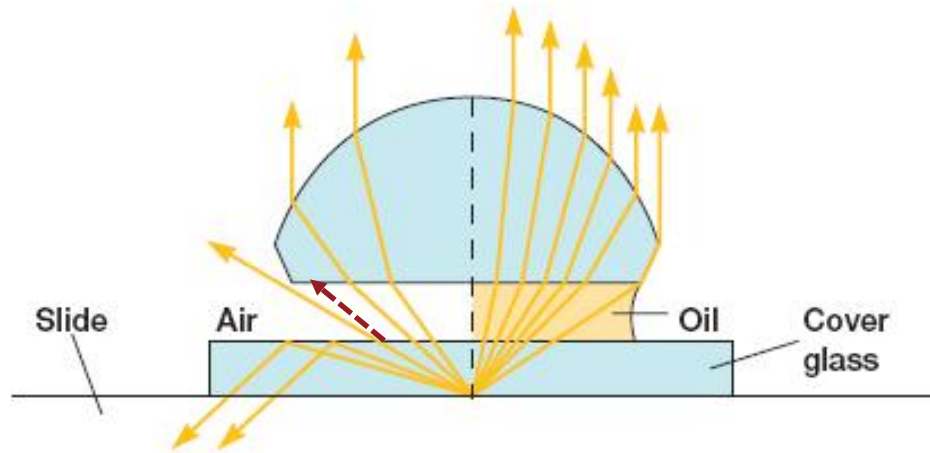
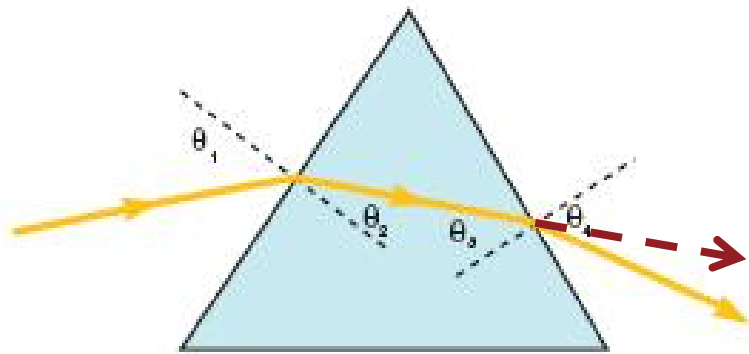
放大倍数越高, 工作距离越短。

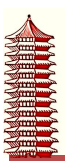




油镜的工作原理

- 光线在穿过折射率不同的介质时发生折射；
- 浸没油与玻璃的折射率相近；
- 很多原来由于在透镜及载片表面的反射和折射而损失的光线可以进入物镜，使照明亮度提高，改善观察效果。



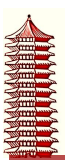


光学显微镜常见物镜的各种参数

特性	物镜			
	搜索物镜	低倍镜	高倍镜	油镜
放大倍数	4×	10×	40-45×	90-100×
数值孔径值	0.10	0.25	0.55-0.65	1.25-1.4
焦距 (f)	40 mm	16 mm	4 mm	1.8-2.0 mm
工作距离	17-20 mm	4-8 mm	0.5-0.7 mm	0.1 mm
450nm 光源 (蓝光) 时的分辨率	2.3 μm	0.9 μm	0.35 μm	0.18 μm

在对细菌、放线菌等原核微生物进行光学显微镜观察时，油镜最常使用，也最为重要。





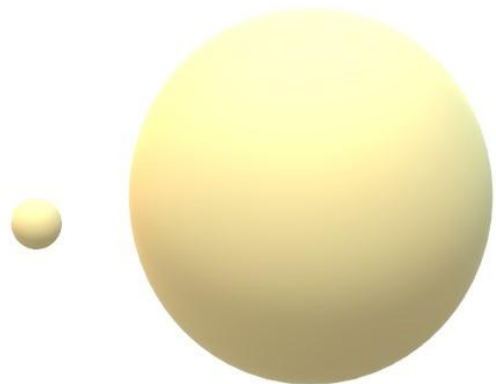
影响显微镜观察效果的两个重要因素

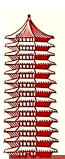
- 分辨率：最小可分辨距离
- 反差：样品区别于背景的程度

对于光学显微镜而言，反差来源于 { 波长
振幅

- 形体较小的原核生物反差小

$$P_{\text{scattering}} \propto \frac{d^6 (n^2 - 1)^2}{\lambda^4} I_{\text{incident}}$$



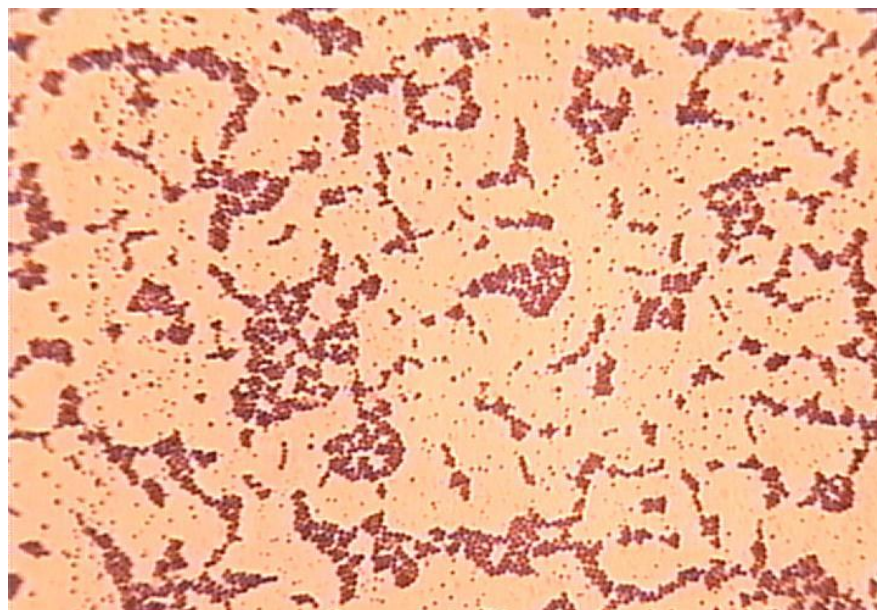
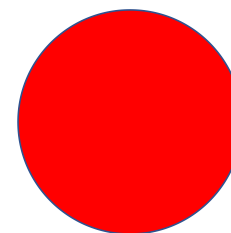


增强反差—光学显微镜观察样品的制备和染色

(原核)微生物形体较小，近乎无色透明，与背景折光率相差无几，染色可增强(颜色)反差；

球菌直径： $0.3\text{ }\mu\text{m}$ ；

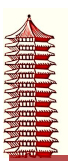
酵母直径： $2\text{--}3\text{ }\mu\text{m}$



利用油镜观察金黄色葡萄球菌，1000X

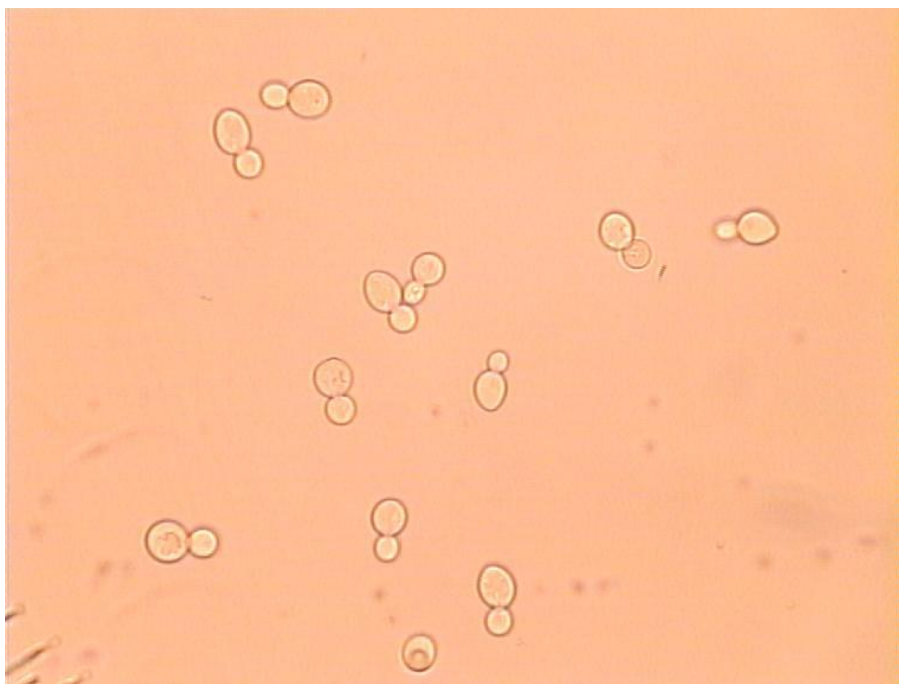
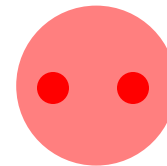


北京大学
PEKING UNIVERSITY



反差的第二个来源—强度

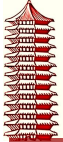
如果样品(细胞)足够大，光线通过时会产生折射、散射和吸收等因素，造成与背景的（光强）差别，可不经染色直接观察。



利用高倍镜(400X)直接观察未染色的酵母



北京大学
PEKING UNIVERSITY



细菌制片步骤

涂片 (液体样品、固体样品) → 干燥
→ 固定 → 染色 → 水洗 → 吸干残水
→ 镜检

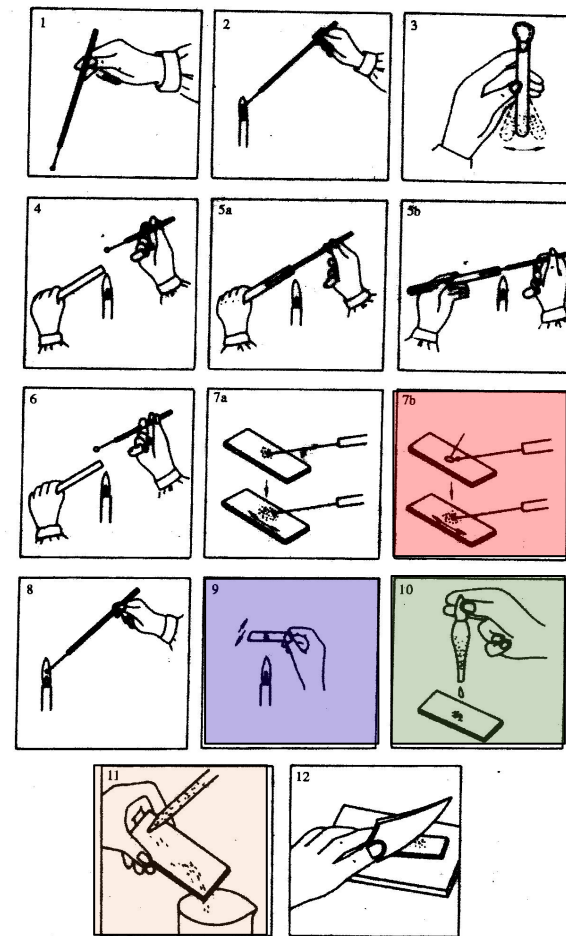
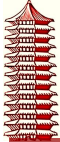


图 2-1-2 细菌染色标本制作及染色过程

1. 取接种环； 2. 灼烧接种环； 3. 摇匀菌液； 4. 灼烧管口； 5a. 从菌液中取菌（或 5b 从斜面菌种中取菌）； 6. 取菌毕，再灼烧管口，加上塞； 7a. 将菌液直接涂片（或 7b 从斜面菌种中取菌与玻片上水滴混匀涂片）； 8. 烧去接种环上的残菌； 9. 固定； 10. 染色； 11. 水洗； 12. 吸干。



北京大学
PEKING UNIVERSITY



细菌染色具体操作步骤

1. 在载玻片上，滴一小滴(或用接种环挑取1~2环)蒸馏水于玻片中央，用接种环以无菌操作方法分别从平板上挑取少量菌苔于水滴中，混匀并涂成薄膜；

注意：载玻片要清洗干净保证洁净无油，取蒸馏水和取菌不宜过多，**涂片均匀**，不宜过厚。

2. 室温自然干燥；

3. 涂面朝上，通过火焰2~3次固定涂片；

此操作过程称**热固定**，其目的是使细胞质凝固，以固定细胞形态，并使之**牢固附着在载玻片上**。固定温度**不宜过高(以玻片边缘不烫手为好)**，**否则会改变甚至破坏细胞形态。**

4. 染色：滴加1-2滴染液于涂片上(染液刚好覆盖涂片薄膜为宜)并保持1-2分钟；

5. 水洗：倒去染液，用水冲洗，直至涂片上流下的水无色为止（用洗瓶和废液缸）；

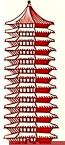
注意：**水洗时不要直接冲洗涂面**，水流不宜过急、过大以免涂片菌膜脱落。

6. 干燥用吸水纸吸干即可；

7. 镜检涂片干燥后镜检。

注意：（细菌）**涂片必须完全干燥**后才能用显微镜（油镜）观察。





革兰氏染色的步骤

- 1、用**碱性染料**结晶紫对菌液涂片进行**初染(单染)**;
- 2、用碘溶液进行**媒染**;
- 3、用**乙醇或丙酮**冲洗进行脱色;
- 4、用一种与结晶紫**具有不同颜色的碱性染料**对涂片进行**复染**。

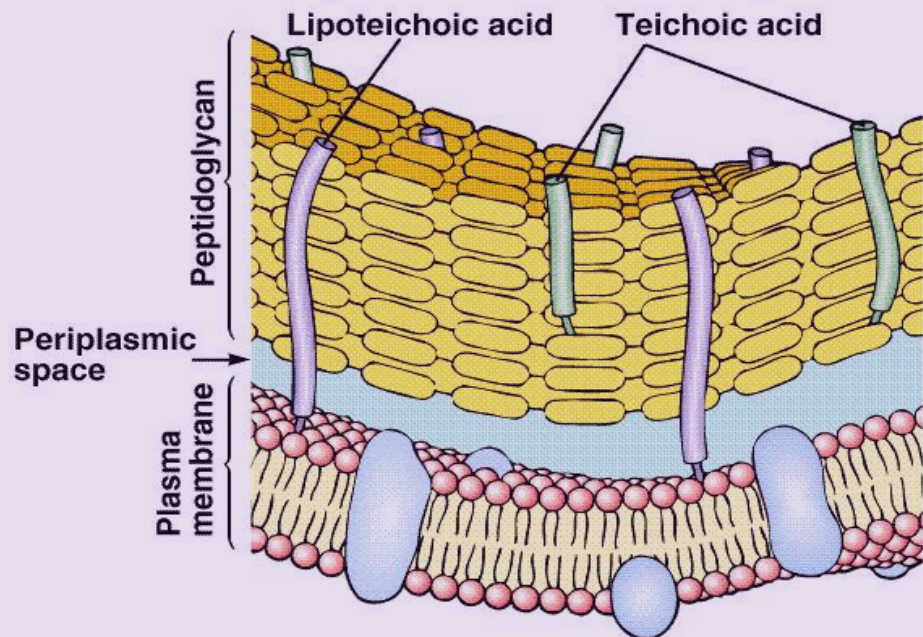


细菌细胞壁结构示意图

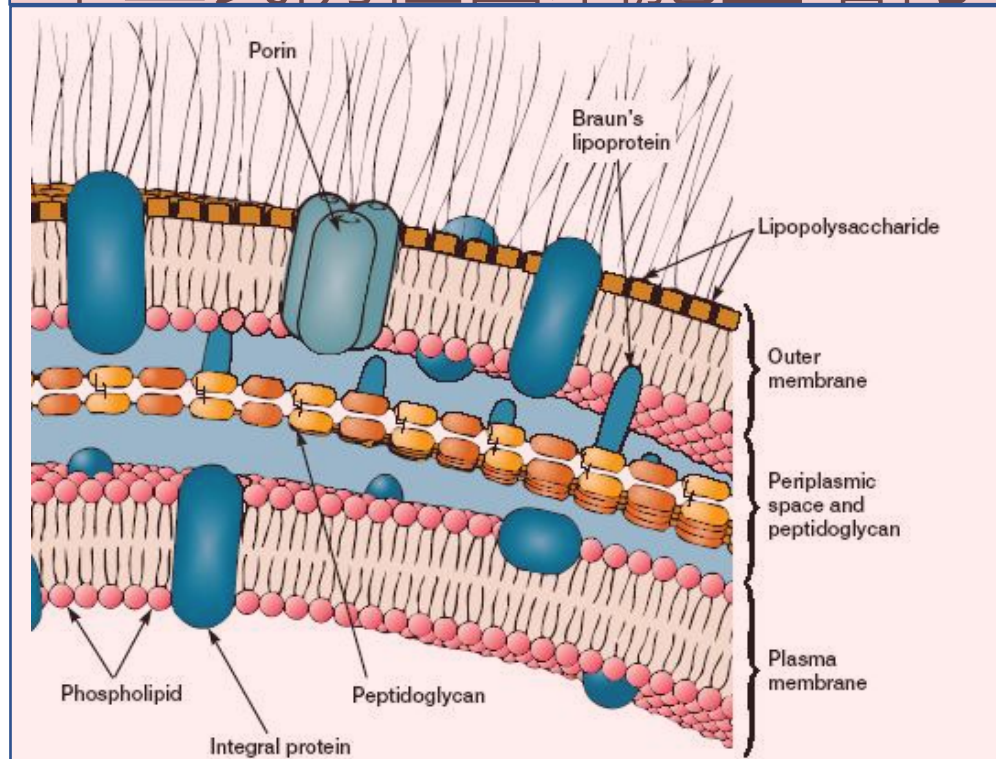
革兰氏阳性菌细胞壁结构

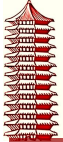
Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein, *Microbiology*, 4e. Copyright © 1999 The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Gram-positive Envelope



革兰氏阴性菌细胞壁结构





革兰氏染色的机制

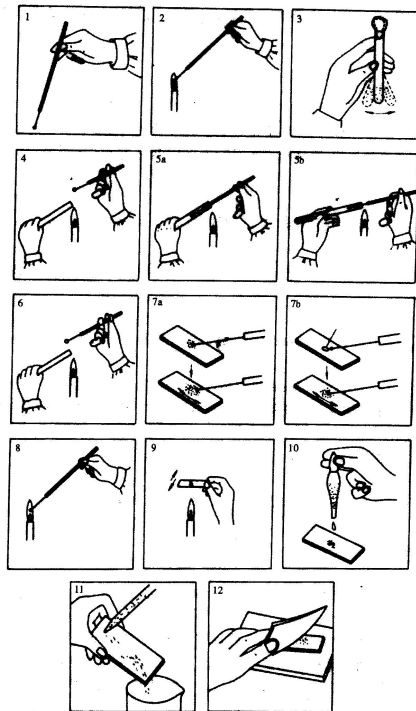
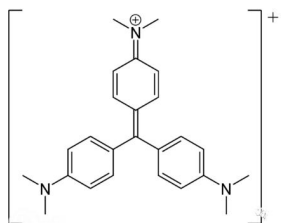


图 2-1-2 细菌染色标本制作及染色过程

1. 取接种环； 2. 灼烧接种环； 3. 摇匀菌液； 4. 灼烧管口； 5a. 从菌液中取菌（或 5b 从斜面菌种中取菌）； 6. 取菌半，再灼烧管口，加上塞； 7a. 将菌液直接涂片（或 7b 从斜面菌种中取菌与玻片上水滴混匀涂片）； 8. 烧去接种环上的残留菌； 9. 固定； 10. 染色； 11. 水洗； 12. 吸干

Step	Microscopic Appearance of Cell	
	Gram (+)	Gram (-)
1. Crystal violet		
2. Gram's iodine		
3. Alcohol		
4. Safranin (red dye)		

- 阳性菌的细胞壁厚和其分子交联度较紧密；
- 乙醇溶解阴性菌的类脂；
- 乙醇脱色是关键步骤，可区分阳性菌与阴性菌结构与化学成分的差别。



结晶紫结构

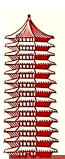




实验内容

- 1、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌在同一张片子上做革兰氏染色，枯草芽孢杆菌做单染，另作一个片子，观察其芽孢；
- 2、观察完片子后，将载玻片放入消毒缸浸泡10分钟以上，做完实验后洗净放在实验台前；
- 3、革兰氏染色**关键步骤—脱色**，并要注意培养时间。
- 4、画镜检图及其要求：画出**视野、轮廓**，注意**细胞之间的相对大小、排列特征**等细胞特征，**注明放大倍数**；
- 5、拍照。

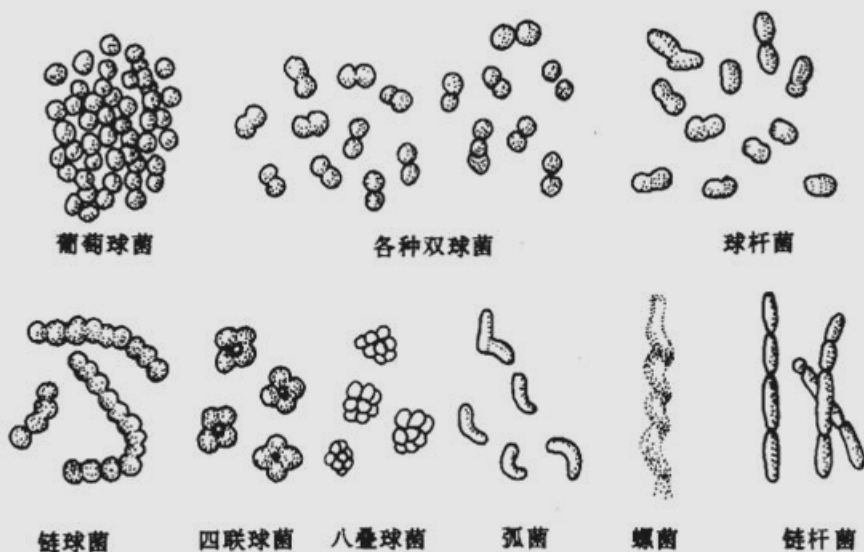




细菌细胞的形态

细菌的基本形态（示意图）：

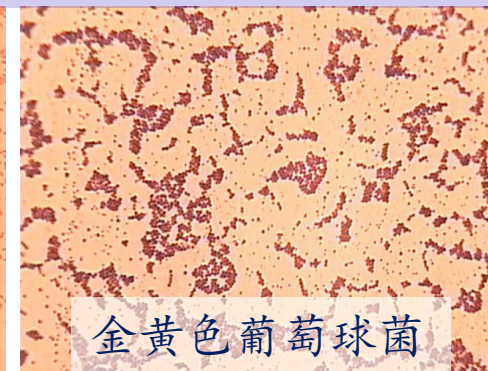
① **杆菌**； ② **球菌**； ③ **螺旋菌**



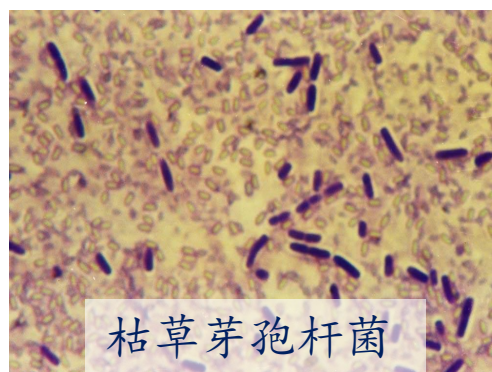
显微镜(油镜)下的细胞个体形态



大肠杆菌



金黄色葡萄球菌



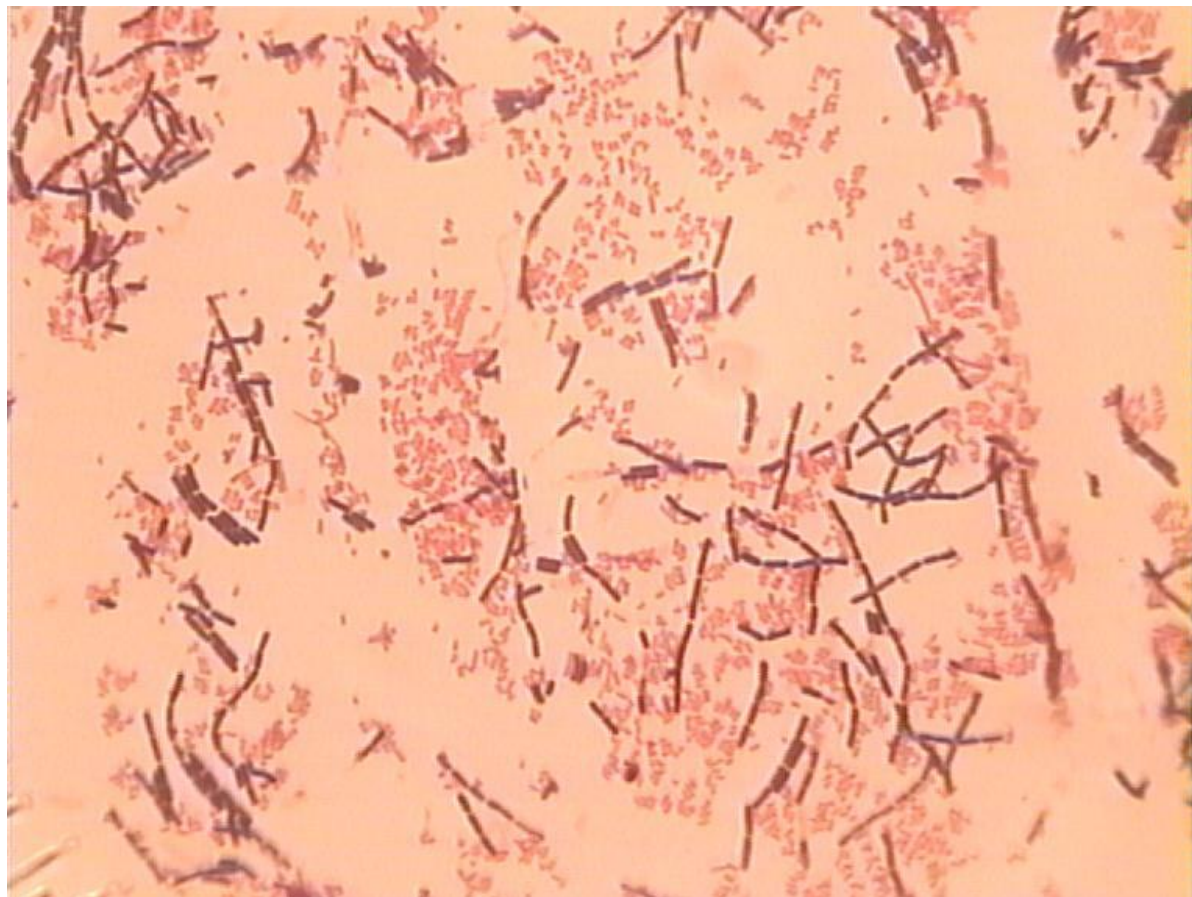
枯草芽孢杆菌



北京大学
PEKING UNIVERSITY

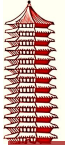


镜检不仅可以观察形态，还可以检测是否为纯培养

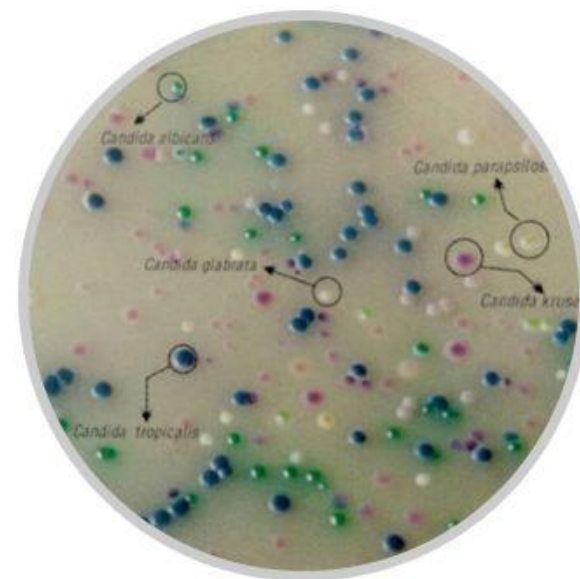
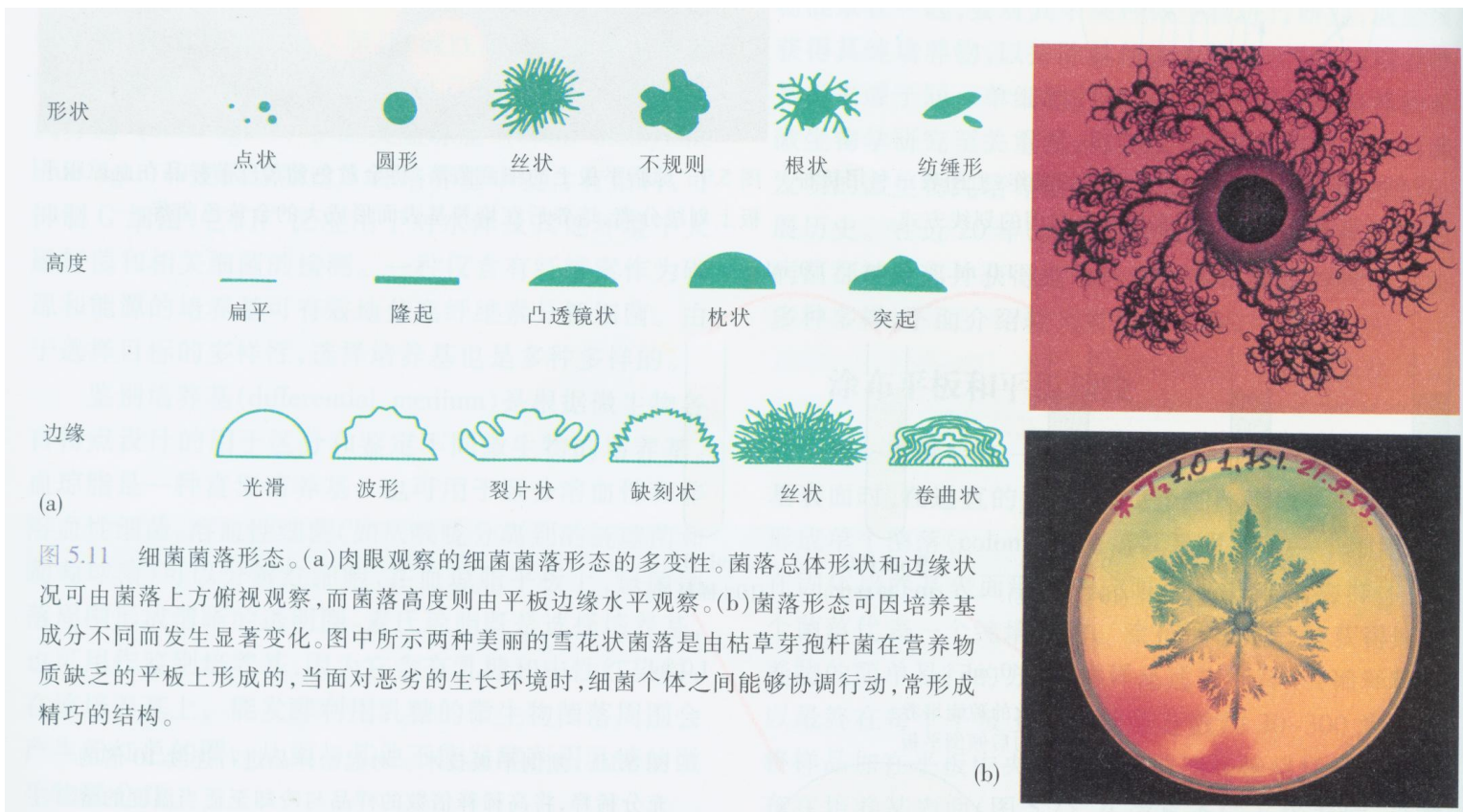


利用细胞的**个体形态学特征鉴定纯培养**，这些特征包括形状、长短、直径、排列及革兰氏染色结果，是一种**最直接、可靠**的鉴定方法。





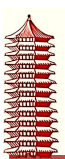
菌落特征—细胞集合体的特征



菌落颜色与分泌(产)色素

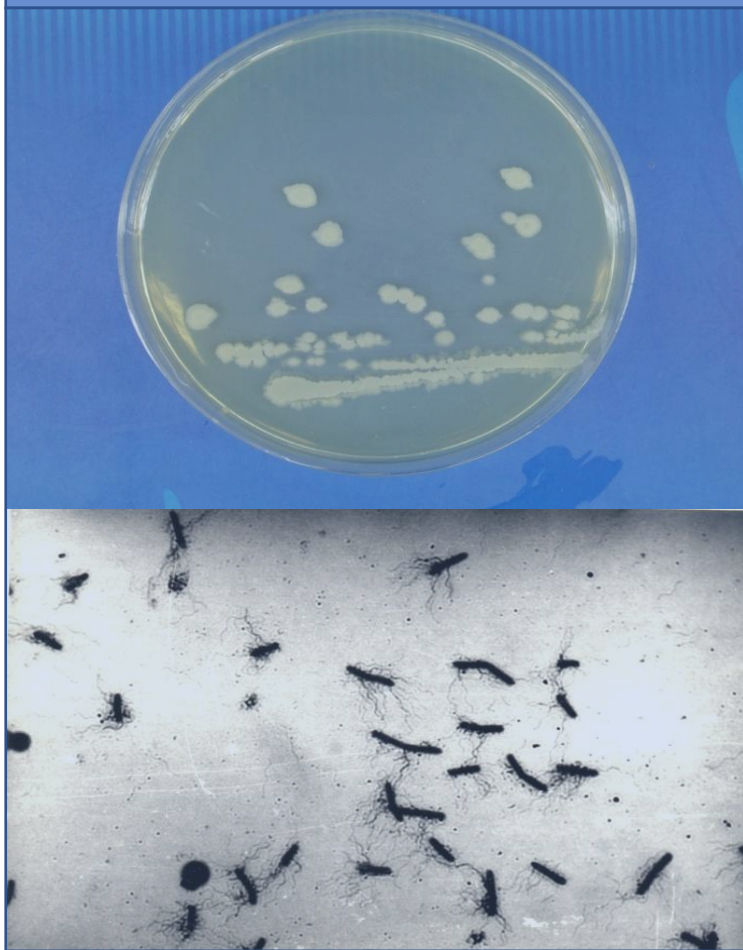
微生物的菌落特征包括其形状、大小、边缘、含水程度、与培养基结合的紧密程度、生长快慢、颜色、分泌色素、气味等。实验方法简单、直观,是重要的形态学特征。



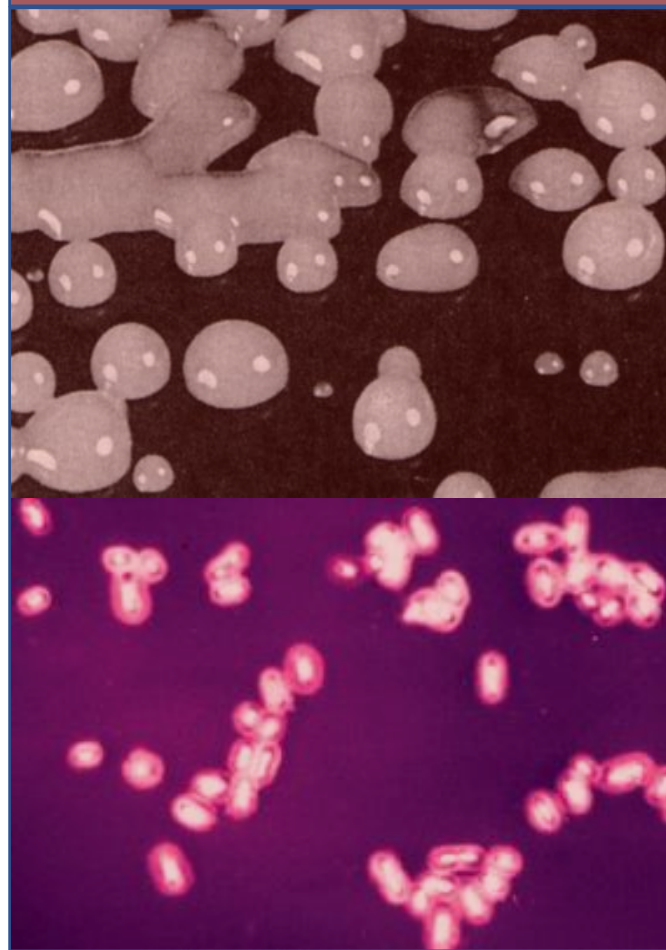


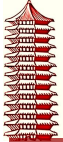
群体特征与个体特征的联系

菌落边缘不整齐与鞭毛的联系



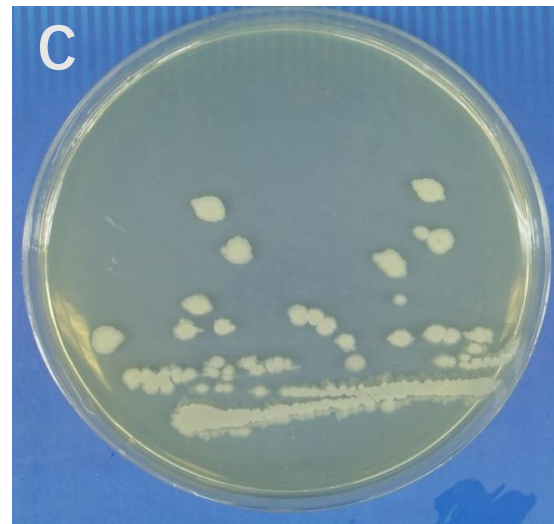
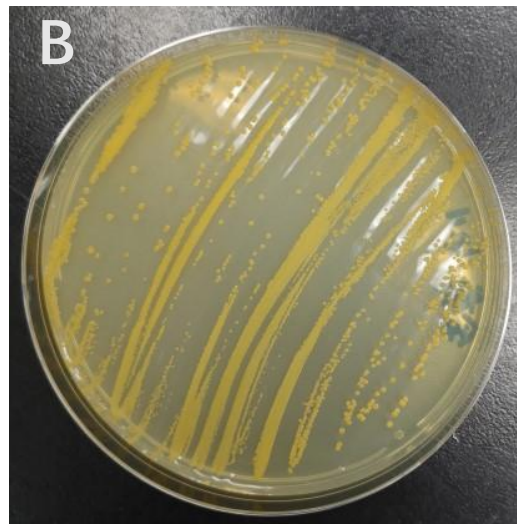
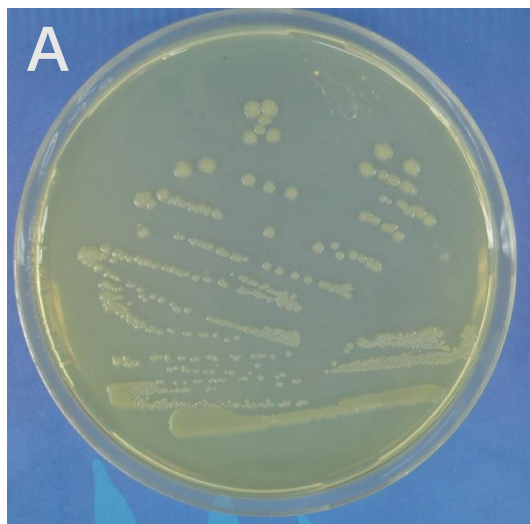
菌落光滑与荚膜的联系





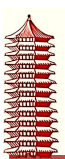
细菌的菌落特征

菌种	大小	颜色	边缘	生长快慢	与培养基结合程度	厚度	干湿	透明度	气味
大肠杆菌	小	乳白色	不整齐	快	不紧密	薄	湿润	透明	粪臭味
金黄色葡萄球菌									
枯草芽孢杆菌									



大肠杆菌(A)、金黄色葡萄球菌(B)及枯草芽孢杆菌(C)的菌落形态





观察菌落形态还可以判断是否为纯培养



根据微生物菌落的各种特征进行判断



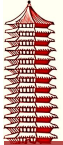


实验报告内容

结果观察：

- 1、对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的革兰氏染色、枯草芽孢杆菌的简单染色结果进行拍照；
- 2、根据观察结果，绘出大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的形态图；
- 3、记录大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的菌落形态。



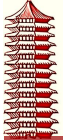


实验二 放线菌的形态观察

实验目的和要求：

- 1、观察放线菌的个体形态、繁殖方式以及菌落形态；
- 2、掌握放线菌形态观察的方法以及制片方法。





两大类型的放线菌

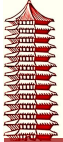
一、链霉菌（高等）

通过孢子繁殖，有较发达的分枝菌丝；

二、诺卡氏菌（低等）

不形成大量的菌丝体，气生菌丝少，营养菌丝容易断裂为球状或杆状细胞。





链霉菌

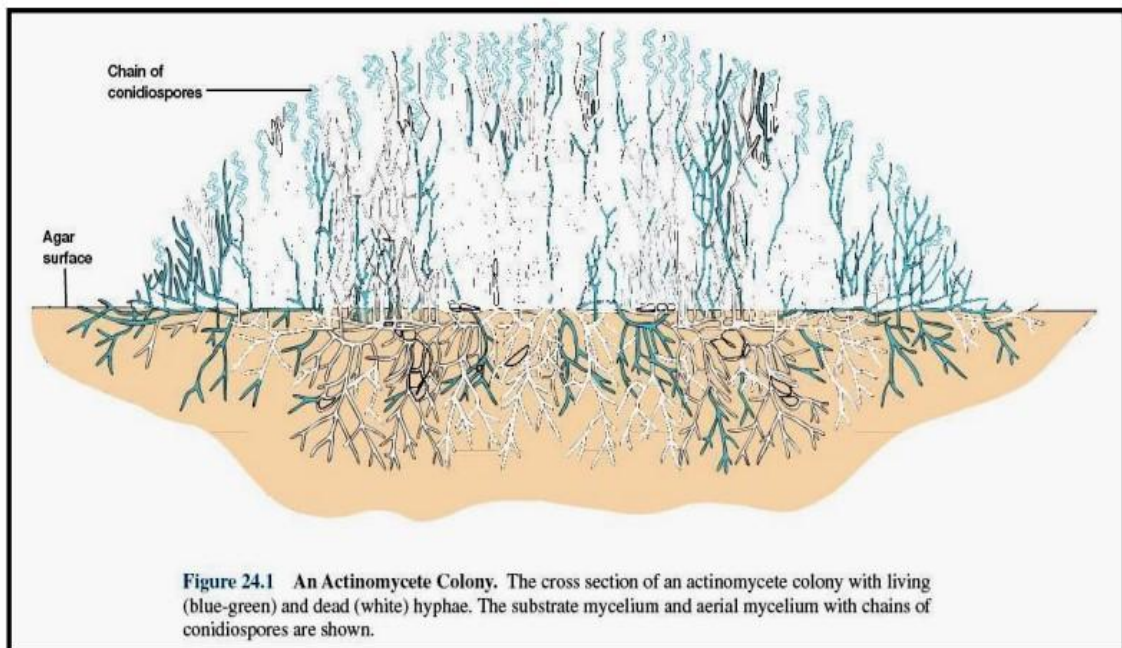


Figure 24.1 An Actinomycete Colony. The cross section of an actinomycete colony with living (blue-green) and dead (white) hyphae. The substrate mycelium and aerial mycelium with chains of conidiospores are shown.

图：链霉菌的菌丝

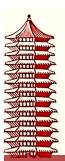


图：插片法示意图

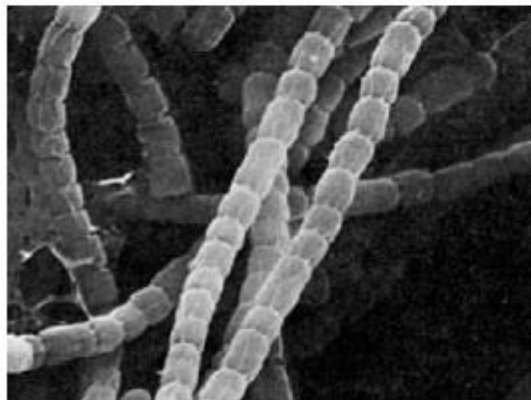
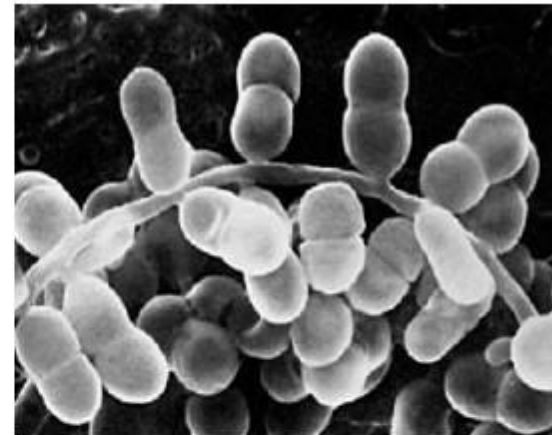
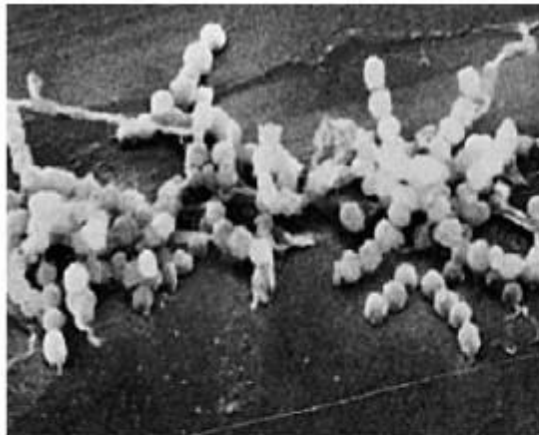
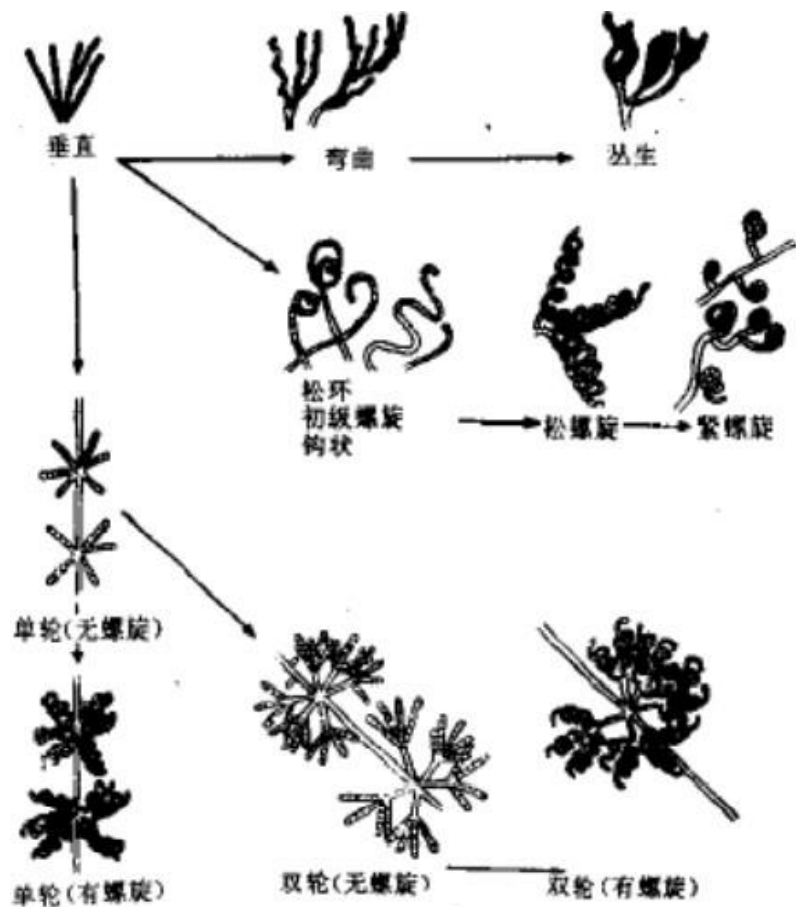
放线菌显微形态观察要点：

- 1、个体形态；
孢子丝和孢子的形态；
- 2、菌落形态；
- 3、制片方法；
为何与细菌不同？——**压片法**
- 4、需要使用高倍镜或油镜；
- 5、在菌苔处压片（示范）。





孢子及孢子丝的形态是放线菌重要的形态特征

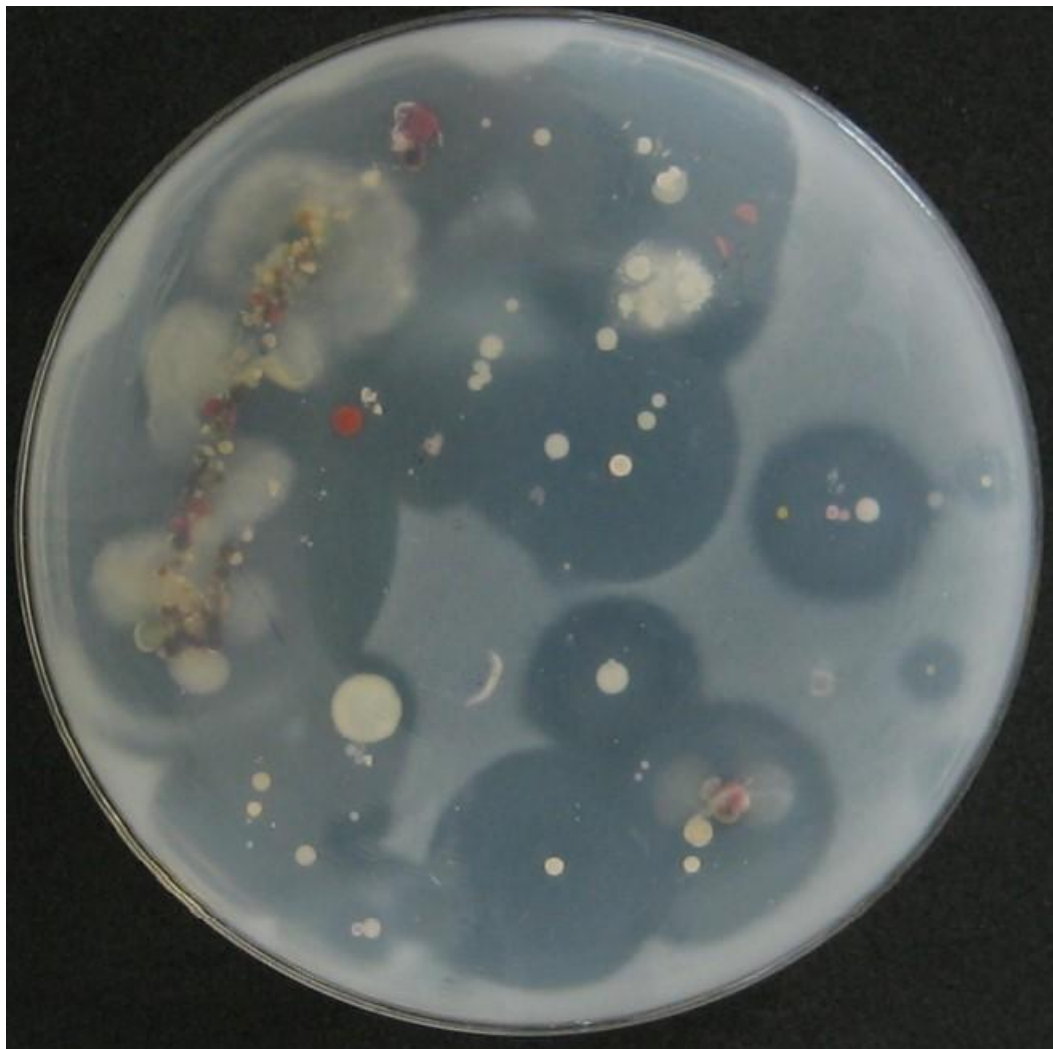


图：链霉菌各种形态的孢子丝和孢子





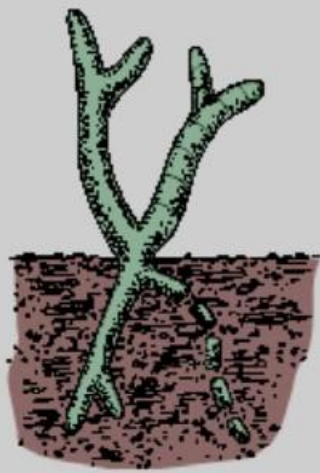
放线菌是产生抗生素数量最多的微生物



- 灰色链霉菌：产生链霉素。
- 分离纯化实验：产生抗生素的放线菌；



二、地中海诺卡氏菌

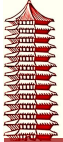


Nocardia

- 个体形态及菌落特征;
- 产生利福霉素。

Figure 24.10 *Nocardia*. *Nocardia asteroides*, substrate mycelium and aerial mycelia with conidia illustration and light micrograph ($\times 1,250$).





实验内容

- 1. 记录三种放线菌(灰色链霉菌、淡紫灰链霉菌及地中海诺卡氏菌)的菌落特征;
- 2. 当场记录并绘制三种放线菌的个体形态及生殖方式图。

放线菌	大小	含水程度	菌落颜色	与培养基结合的牢固程度	臭味
灰色链霉菌			正面: 背面:		
淡紫灰链霉菌			正面: 背面:		
地中海诺卡氏菌			正面: 背面:		

