



第2章

纯培养和显微技术

武汉大学生命科学学院

陈向东

2018年下半年微生物学授课安排：



一、绪论（4）

二、纯培养和显微技术（3）

三、微生物类群与形态（10）

四、微生物的营养（3）

五、微生物的代谢（5）

六、微生物的生长繁殖及其控制（4）

七、病毒（3）

八、微生物遗传（8）

九、微生物与基因工程（1）

十、微生物的进化、系统发育与分类鉴定（3）

十一、微生物的生态（2）

十二、感染与免疫（3）

微生物的基本特点：

参见P14

小！



- ▲ 在绝大多数情况下都是利用微生物的群体来研究其属性；
- ▲ 微生物的物种（菌株）一般也是以群体的形式进行繁衍、保存；



培养技术在微生物学中具有重要意义！

在研究中所使用的微生物培养群体：

参见P14

培养物： 在一定的条件下培养、繁殖得到的微生物群体

混合培养物： 含有多种微生物的培养物；

纯培养物： 只有一种微生物的培养物；

通常情况下只有纯培养物才能提供可以重复的结果

纯培养技术是进行微生物学研究的基础！

微生物的基本特点：

参见P14

小！



微生物个体微小的特点也决定了**显微技术**是进行微生物研究的另一项重要技术，因为绝大多数微生物的个体形态及其内部结构只能通过显微镜才能进行观察和研究。（P12第一段）

第一节 微生物的分离和纯培养

无菌概念、纯培养概念、纯培养物的获得方法

第二节 显微镜和显微技术

各种显微镜的基本原理及其样品制备方法

第一节 微生物的分离和纯培养

从混杂的群体中分离特定的某一种微生物，
是研究和利用微生物的第一步。(参见P13、14)

一、无菌技术

- ▲ 用于分离、培养微生物的器具事先不含任何微生物；
- ▲ 在转接、培养微生物时防止其它微生物的污染，其自身也不污染环境； (P14第1段)

1、微生物培养的常用器具及其灭菌

常用的器具： 试管、瓶子、培养皿等

常用的灭菌方法：

高压蒸汽灭菌

高温干热灭菌

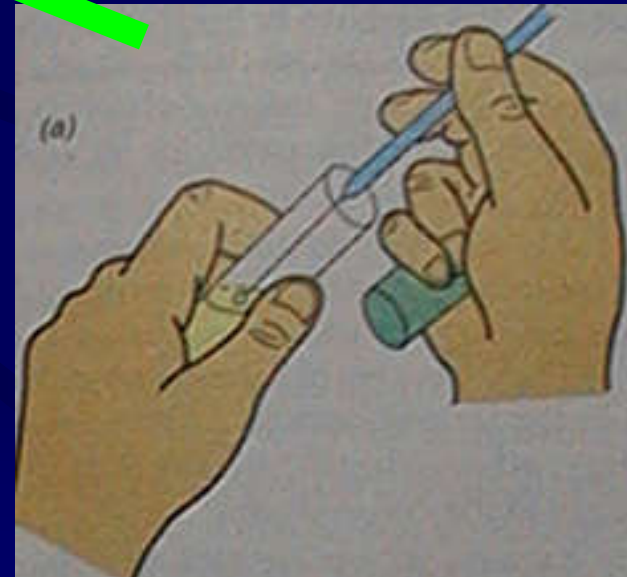
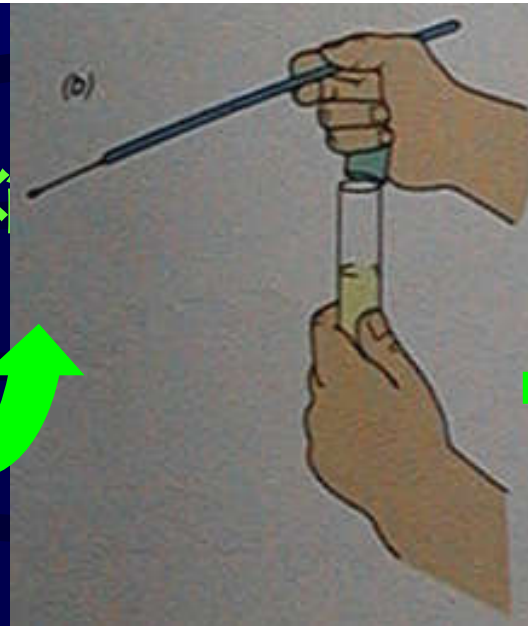
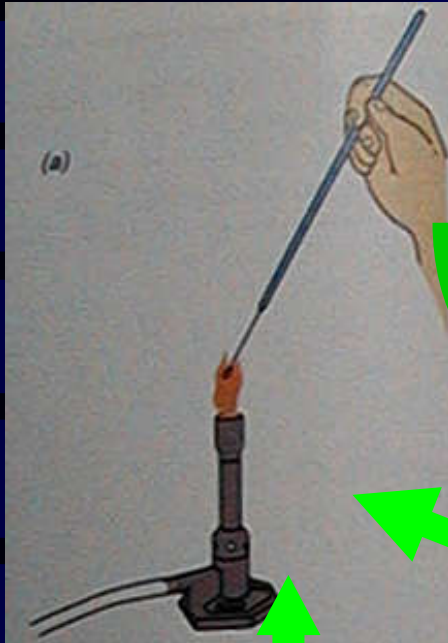
(具体灭菌方法第6章介绍)

2、接种操作

参见P15

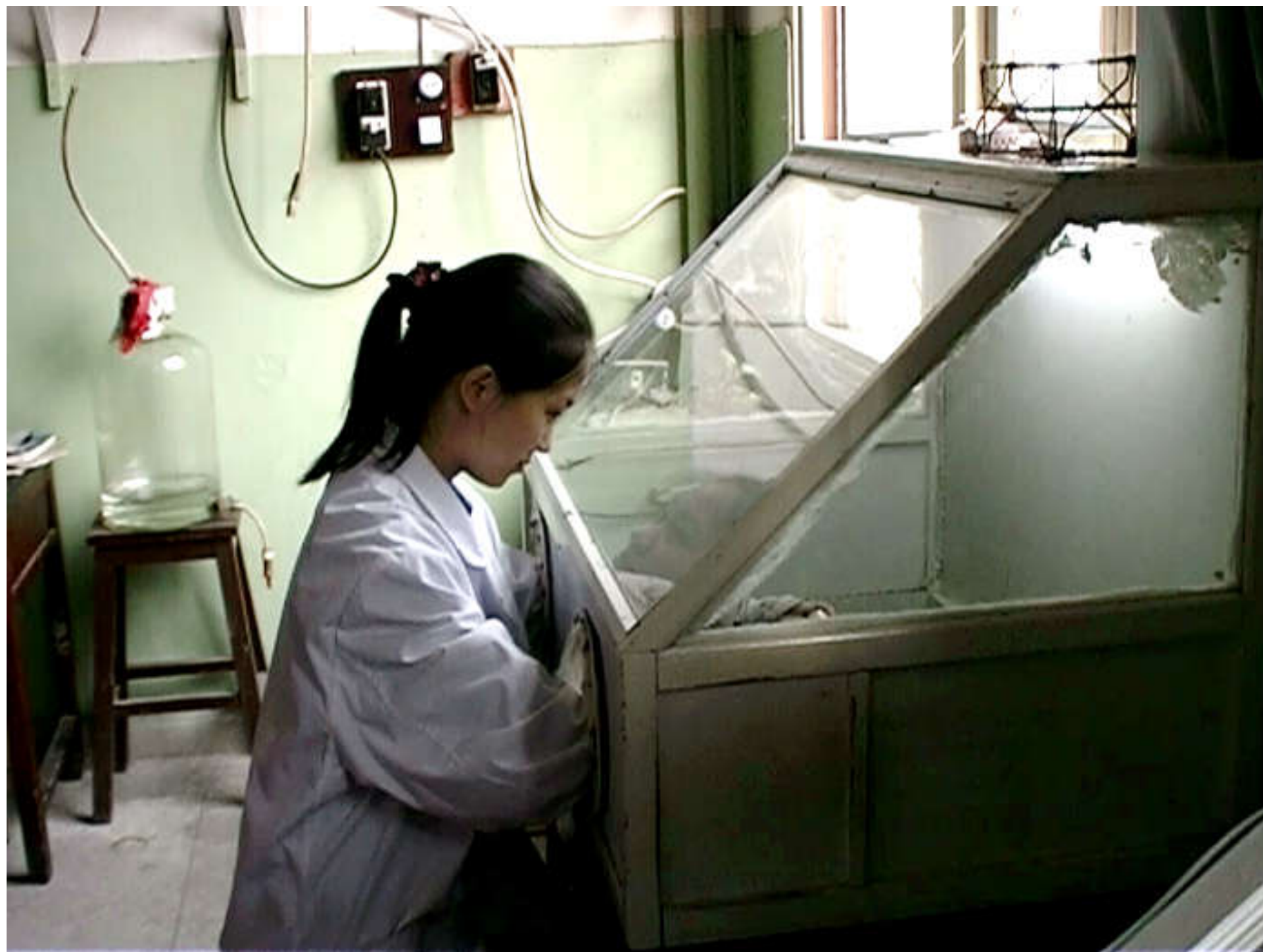
火焰

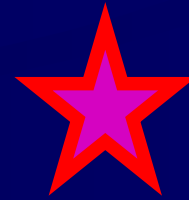
丁、煤





2004 6 25





搜狐首页 >> 搜狐IT >> 科学频道 >> 每日热点

吸取非典实验室感染教训 严防病原体感染

IT.SOHU.COM 2004-06-22 08:19 转自: 中国青年报

页面功能 【我来说两句】 【我要“揪”错】 【推荐】 【字体: 大 中 小】 【打印】 【关闭】

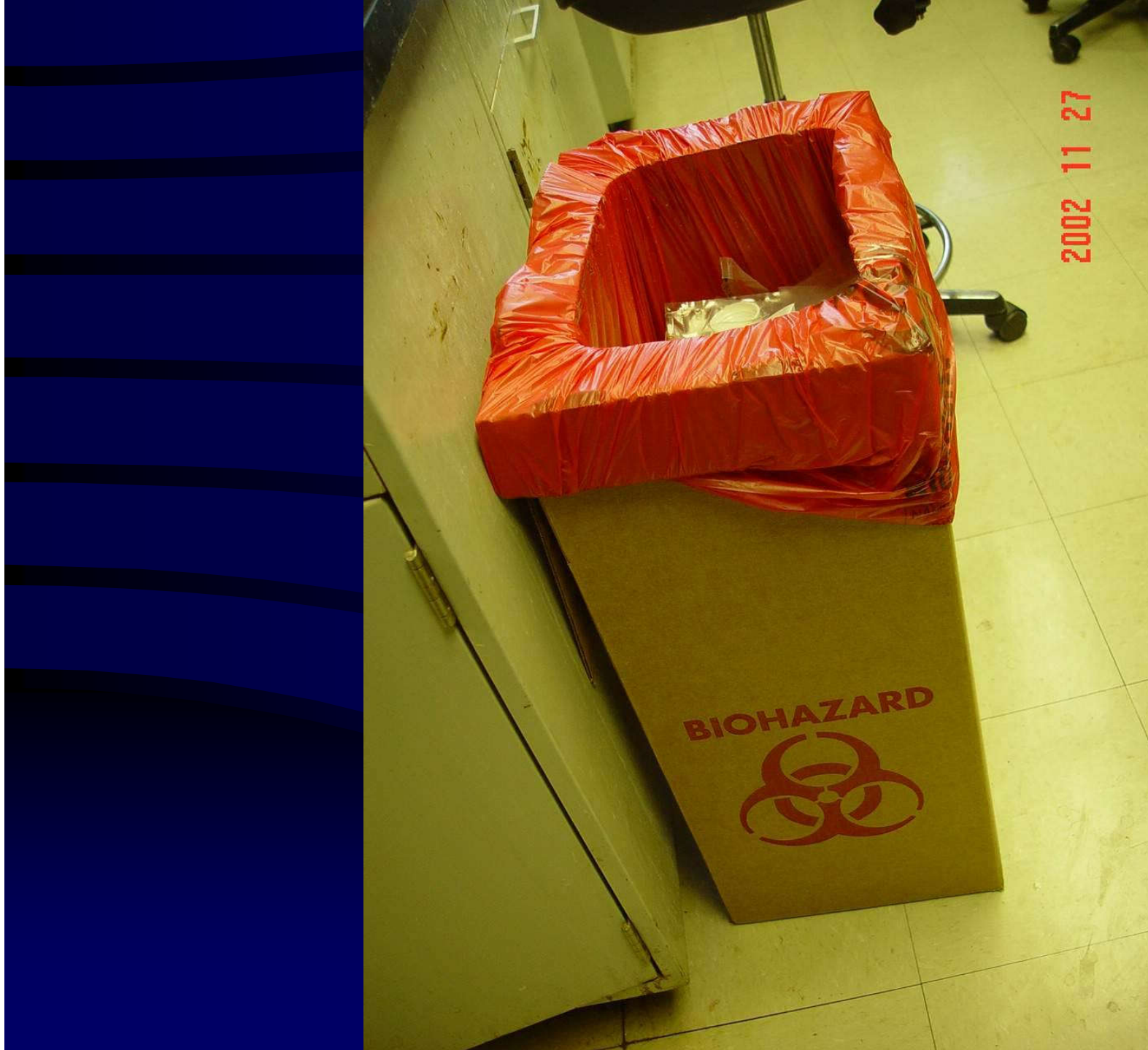
本报北京6月21日电(记者崔丽)确有必要加强对实验室及传染病菌种、毒种的监督管理,以严防传染病病原体的实验室感染和扩散。

全国人大法律委员会副主任委员胡光宝今天就《传染病防治法(修订草案)》修改情况,向十届全国人大常委第十次会议进行汇报时,明确作出以上表示。



《传染病防治法(修订草案)》规定了防止实验室感染和病原微生物扩散以及对传染病菌种、毒种的管理。经初次审议,有的常委会组成人员提出,要吸取今年发生的国家疾病预防控制中心实验室“非典”病毒感染事件的教训,严格传染病菌种、毒种的监督管理制度,防止实验室感染和病原微生物扩散。法律委员会经研究建议,在二审稿中将国家建立传染病菌种、毒种库单列一款。并修改为,疾病预防控制机构、医疗机构和从事病原微生物实验的单位,应

当按照国家有关规定,建立严格的监督管理制度,对传染病病原体样本按照规定的措施实行严格监督管理,严防传染病病原体的实验室感染和病原微生物的扩散。



二、用固体培养基分离纯培养

参见P15-16

培养基： { 液体培养基；
固体培养基；
半固体培养基； } ← 固化剂

↑
琼脂



柯赫 (Robert Koch)
的助手W Heese和
他的夫人Fran Heese

二、用固体培养基分离纯培养

菌落 (colony) :

单个（或聚集在一起的一团）微生物在适宜的固体培养基表面或内部生长、繁殖到一定程度可以形成肉眼可见的、有一定形态结构的子细胞生长群体。 (P15, 倒数第2段)

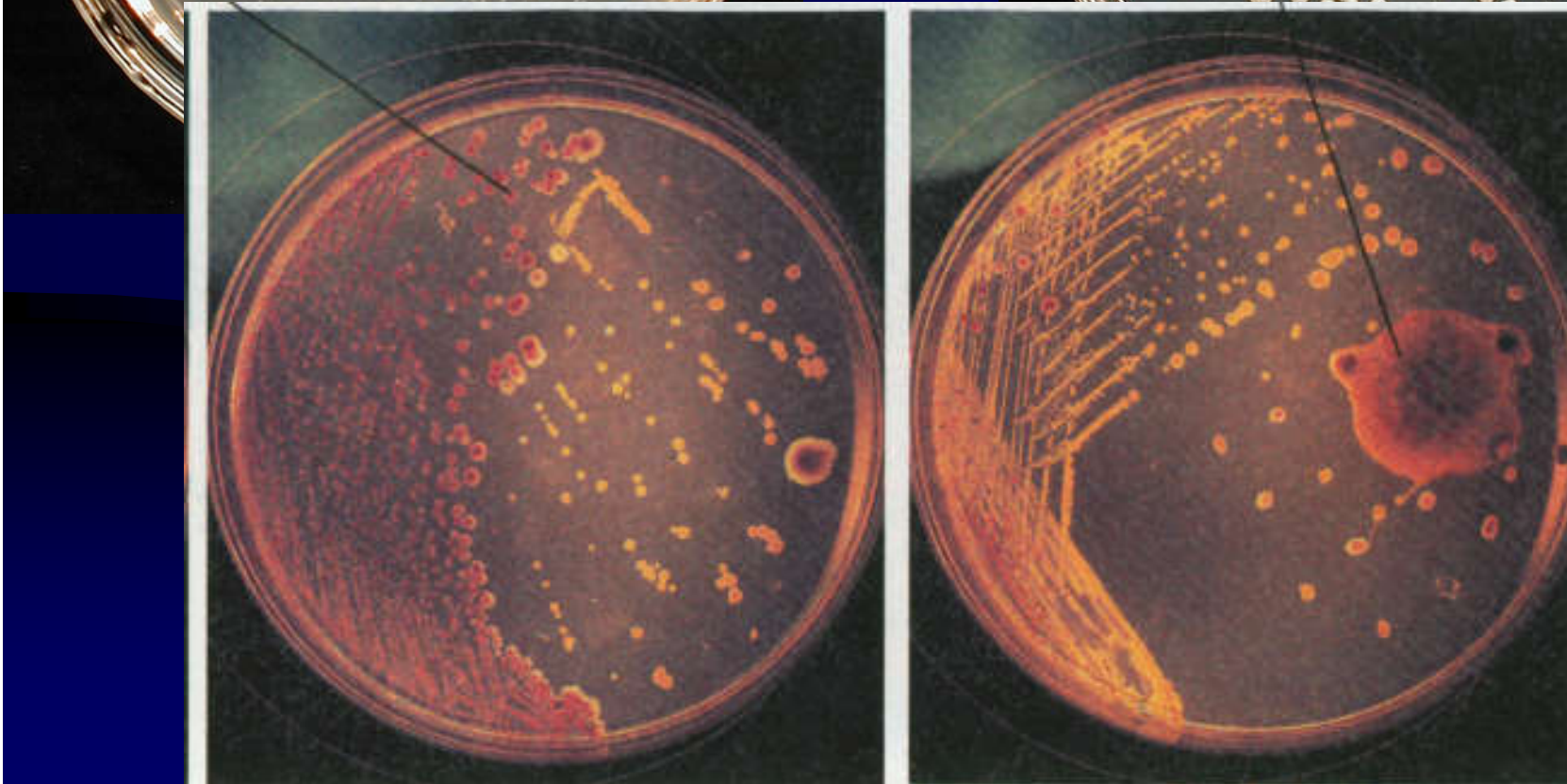


众多菌落连成一片



菌苔 (lawn)

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**），可以成为对该微生物进行分类、鉴定的重要依据（**见P15-16，图2-3**）。



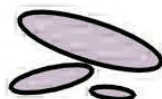
形态



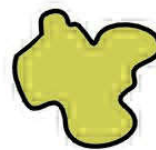
点状



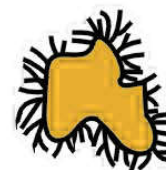
圆形



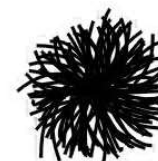
纺锤形



不规则



假根状



丝状

隆起



扁平



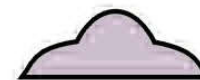
拱起



凸透镜状



脐凹状

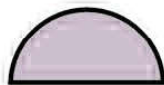


脐突状

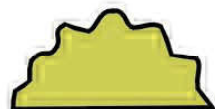


枕状

边缘



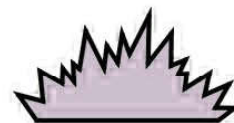
完整



波状



裂叶状



啮蚀状



丝状



卷曲

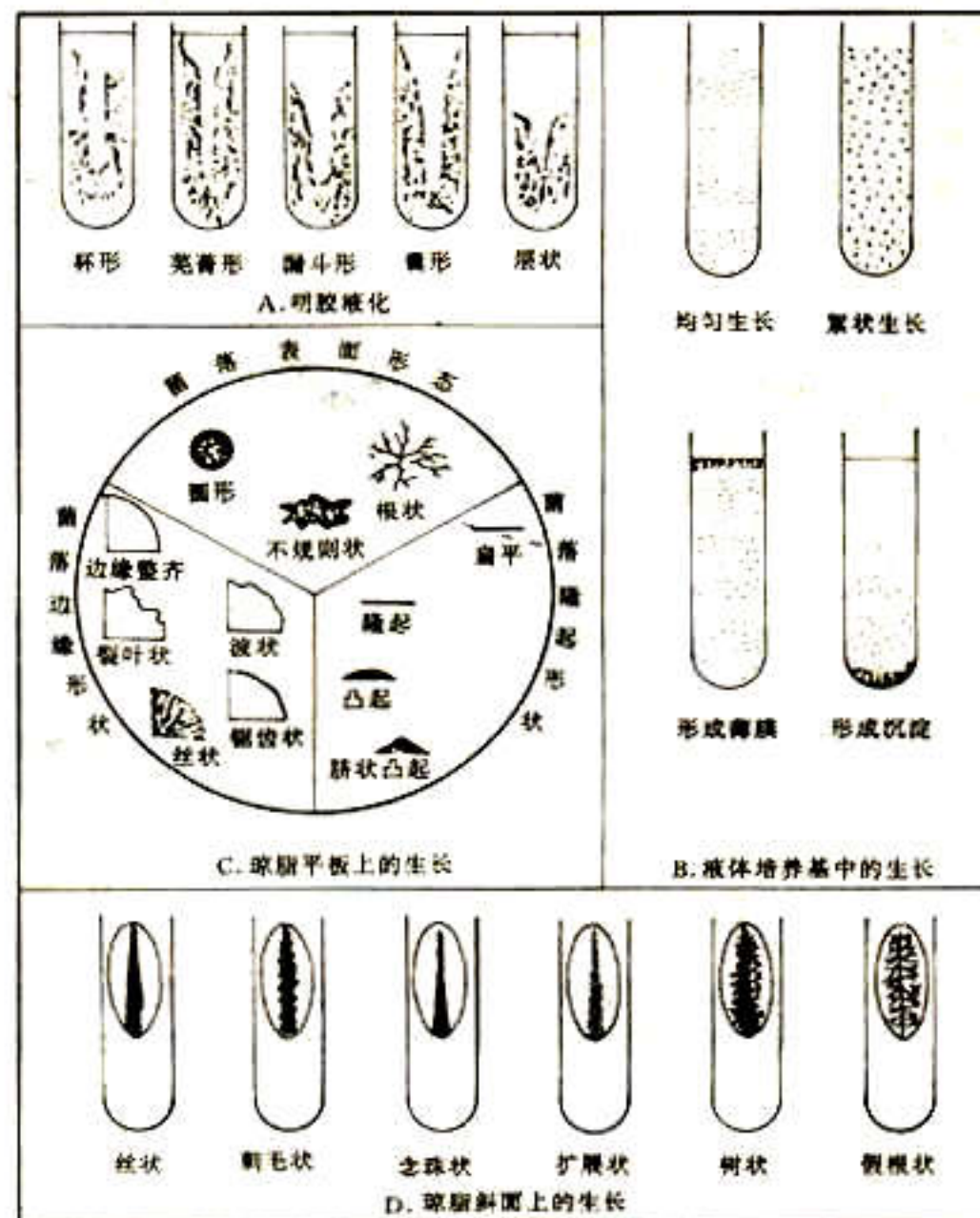
各种微生物形成的菌落特征

(P16 图 2-3)



同一细菌在不同的培养平板上形成不同的特征菌落





图VII-8 细菌的培养特征

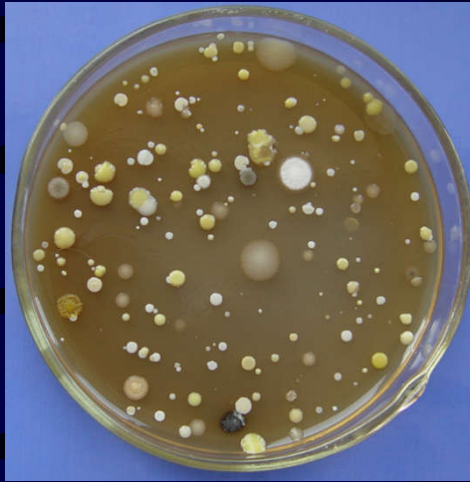
二、用固体培养基分离纯培养

参见P16

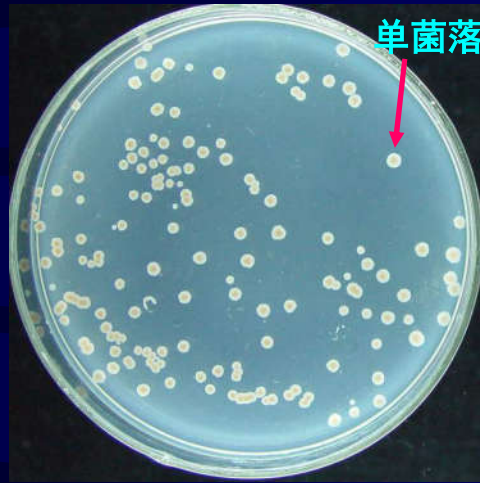
使微生物在固体培养基平板上形成单个菌落的基本方法：

稀释！

二、用固体培养基分离纯培养



自然沉降法



稀释涂布法



连续划线法

稀释涂布法

稀释倒平板法（含菌材料用培养基进行稀释）

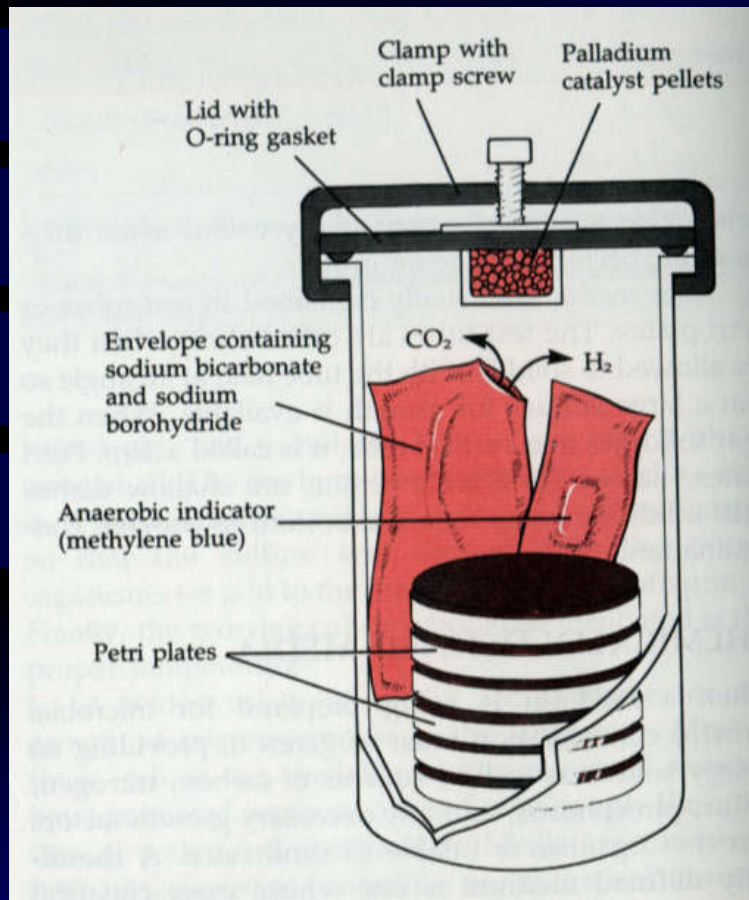
涂布平板法（含菌材料用无菌水稀释后涂布到事先制备好的无菌平板上）

请结合实验课掌握上述方法的基本原理和特点

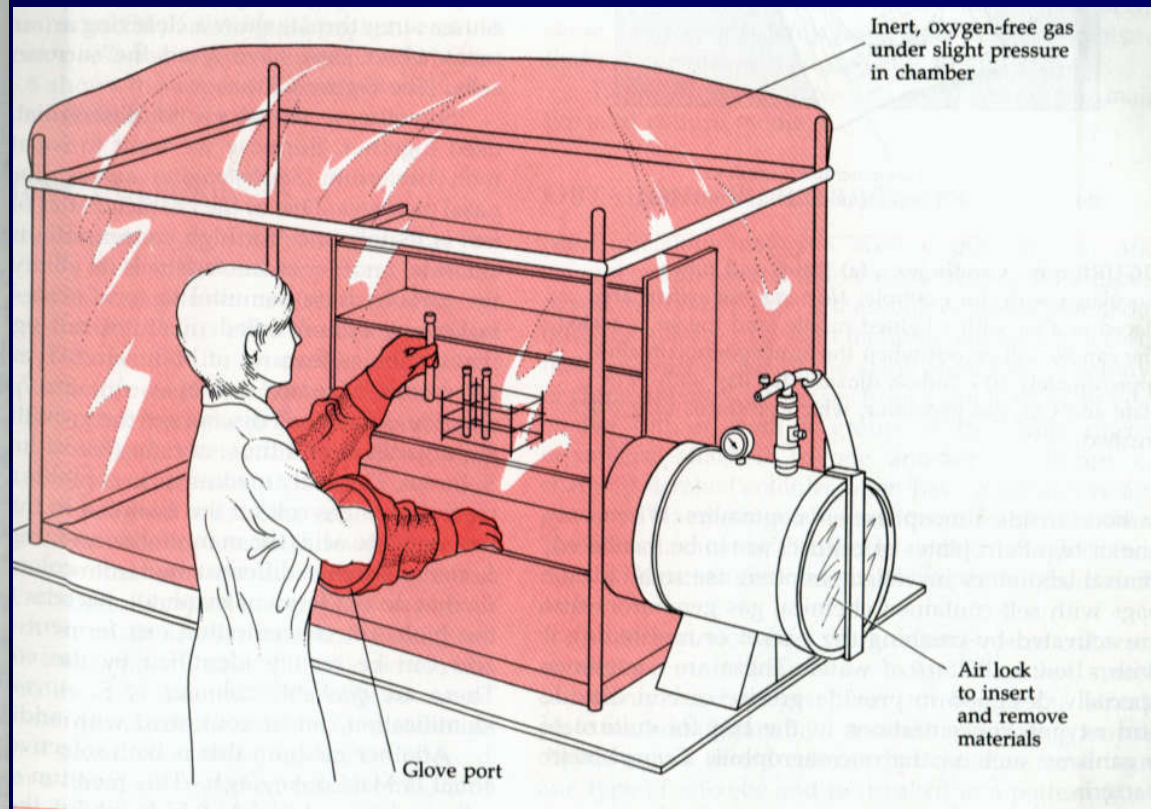
二、用固体培养基分离纯培养

参见P17

4、厌氧微生物的分离



厌氧罐



厌氧手套箱

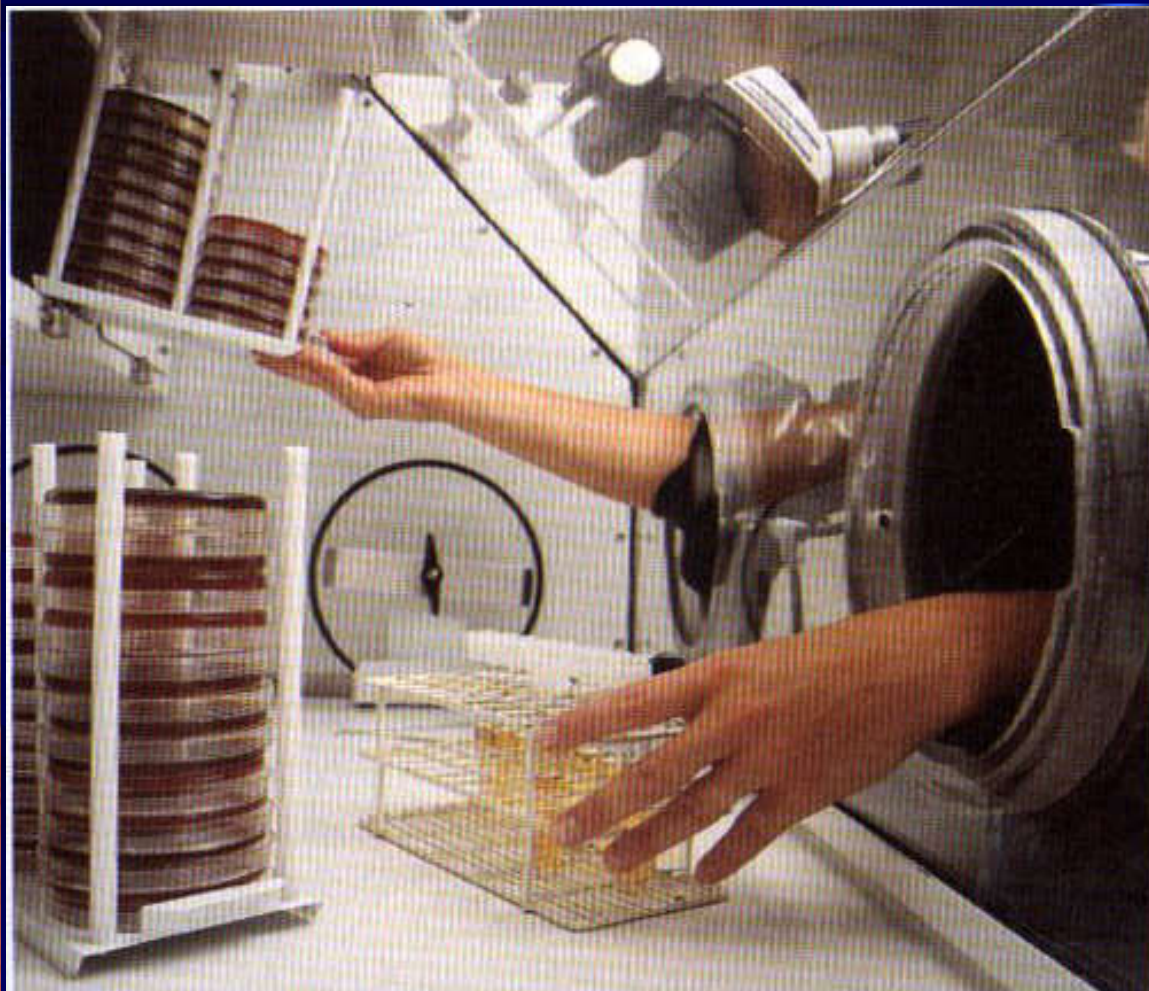
参见P17

二、用固体培养基分离纯培养

4、厌氧微生物的分离



厌氧罐



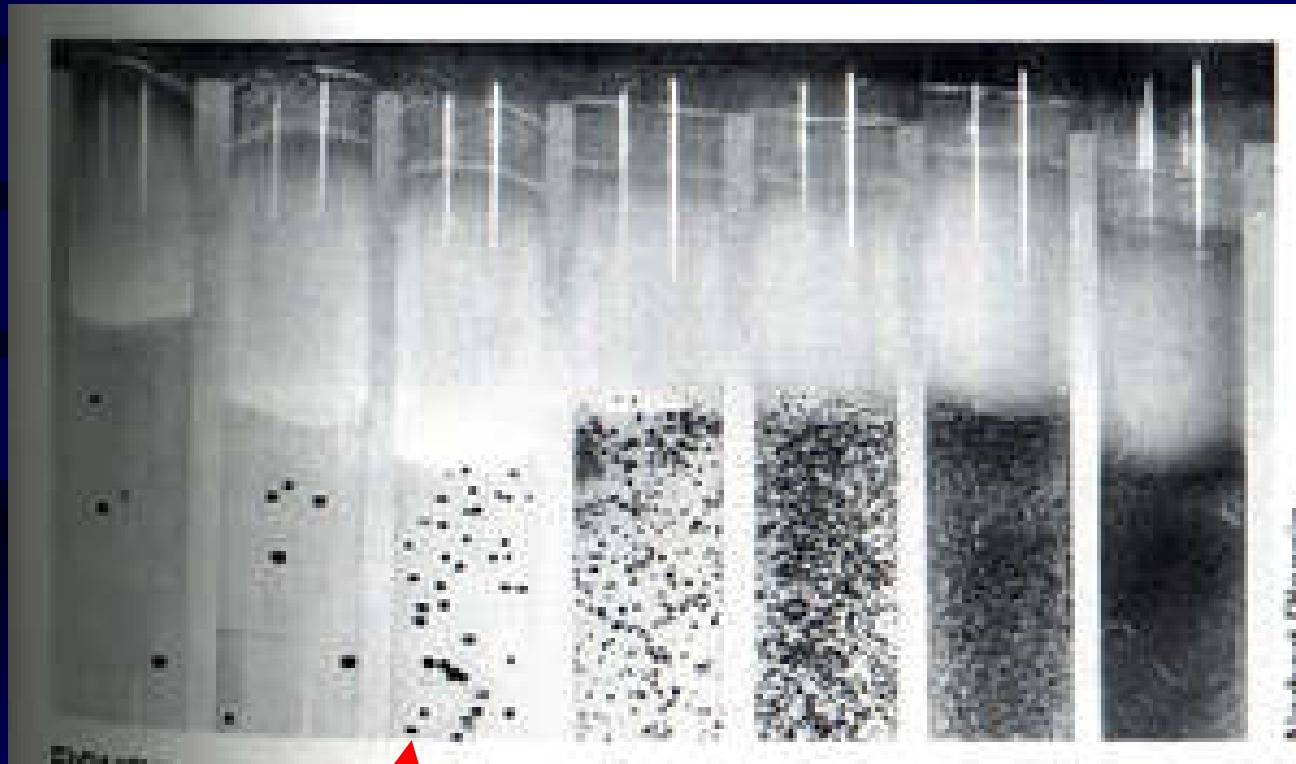
厌氧手套箱

二、用固体培养基分离纯培养

参见P17

4、厌氧微生物的分离

没有厌氧罐或厌氧手套箱还能进行厌氧菌分离吗？



稀释摇管法

琼脂柱中的微生物（菌落）一定是厌氧菌吗？如何通过实验确定？

三、用液体培养基分离纯培养

参见P18

稀释法进行液体分离必须在同一个稀释度的许多平行试管中，大多数（一般应超过95%）表现为不生长。

例如：若同一稀释度的试管中有95%表现为不生长，则生长的试管中仅含一个细胞的几率为：4.8%；
含二个细胞的几率为：0.12%；
含三个细胞的几率为：0.002%

$$\frac{0.048}{0.048 + 0.0012 + 0.0002} = 0.975$$

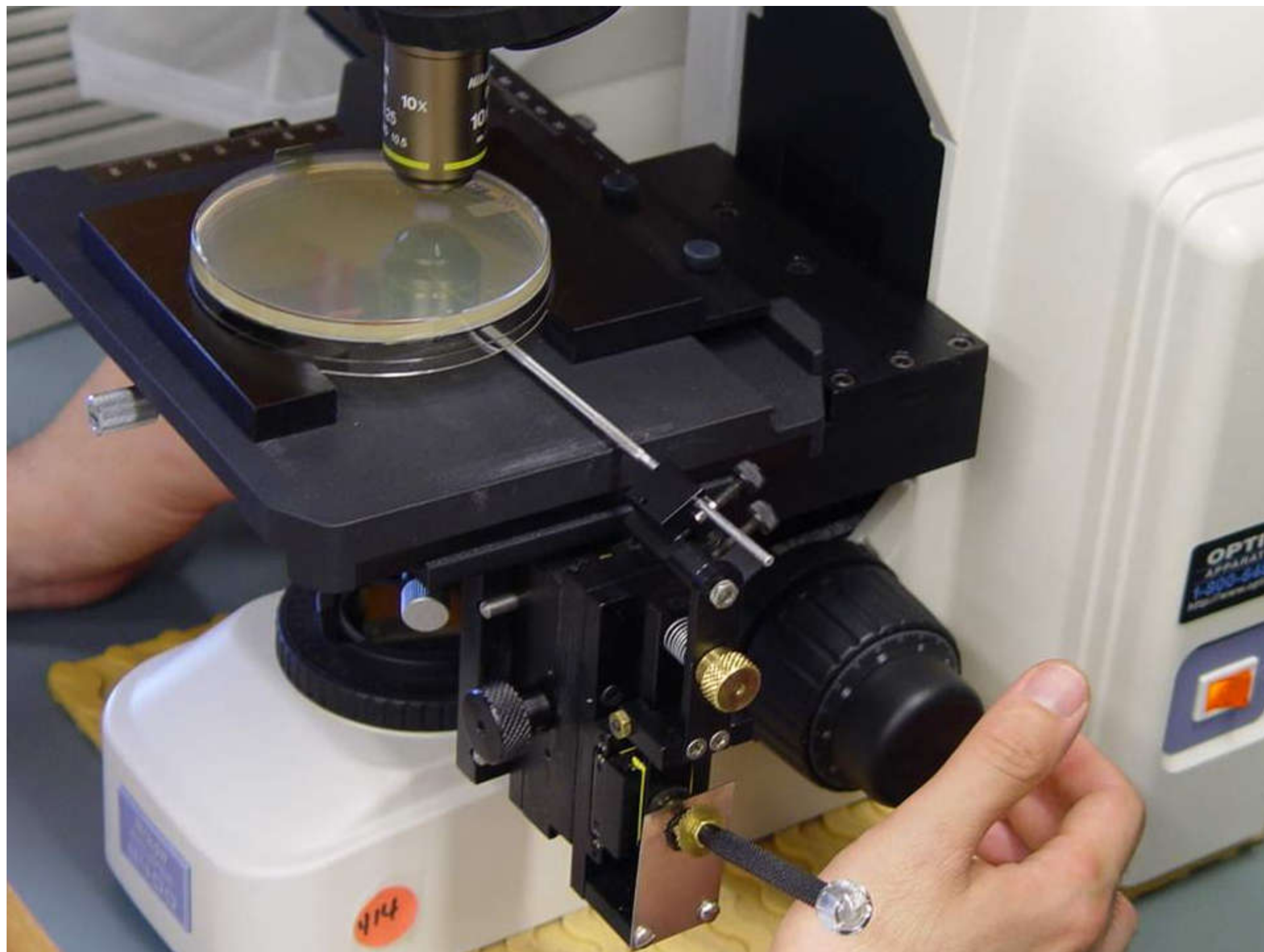
在有细菌生长的试管中得到纯培养的几率为97.5%

参见P18

四、单细胞（孢子）分离

- ▲ 一般采用显微操作仪，在显微镜下进行；
- ▲ 操作难度与细胞或个体的大小成反比；

通过机械、空气或油压传动装置来减小手的动作幅度，
在显微镜下用毛细管或显微针、钩、环等挑取单个
微生物细胞或孢子以获得纯培养。





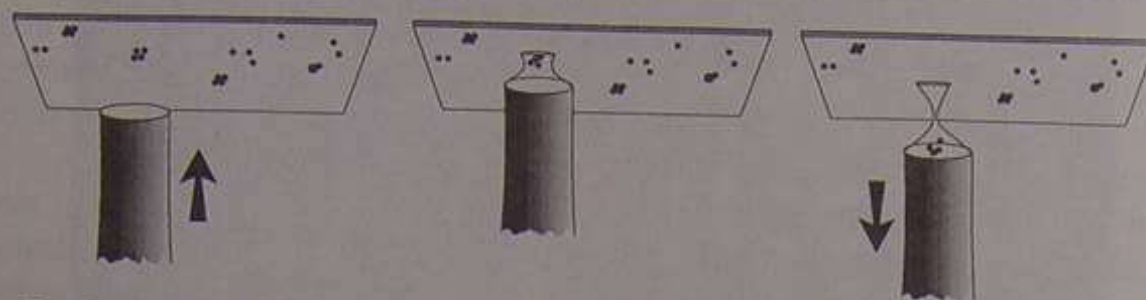
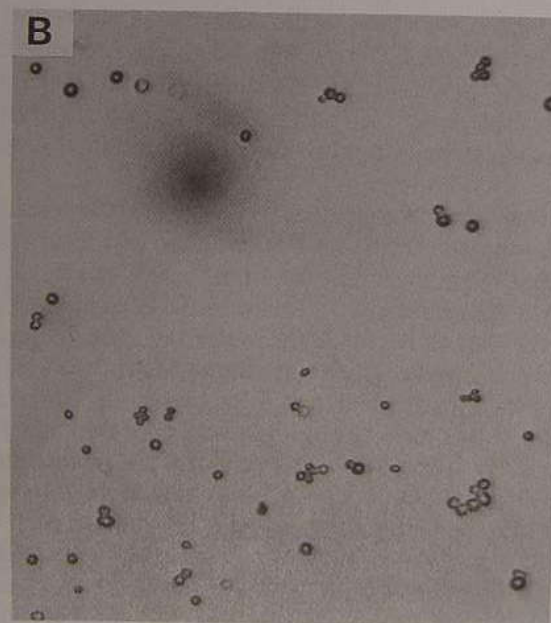
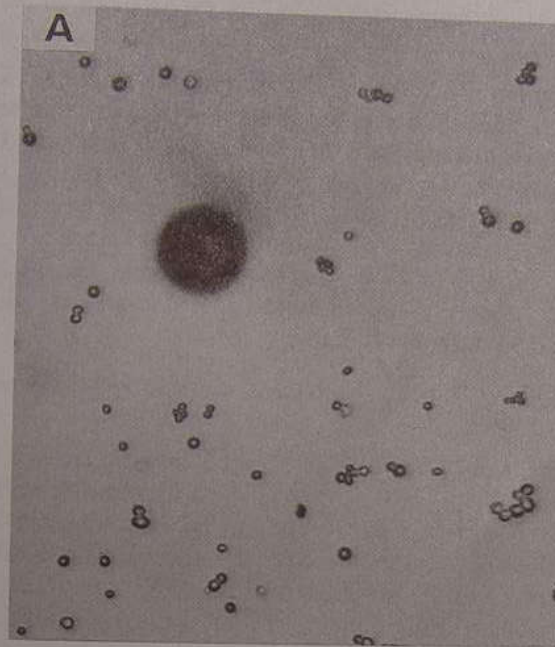


FIG. 9. Transfer of four spores from an agar surface to the platform of a microneedle, by way of a water meniscus.

behind. A simple technique for achieving this goal is to move the microneedle onto the surface of the agar, forming the crisp image and halo, directly next to the cluster of spores and to vibrate the microneedle by tapping more or less gently on the table near the microscope. The spores will often be separated by several microneedle diameters by this action. Three spores can be collected by sweeping the surface of the agar with the needle tip, and the process is repeated at the next three stops.

Note the position on the mechanical stage and place the four spores on the surface of the agar at least 5 mm from the streak. Pick up three spores and move the dish away from the streak another 5 mm (Fig. 10). Deposit the three spores and pick up two spores. Move the chamber an additional 5 mm; deposit the two spores and pick up one spore. Move the chamber 5 mm more and plant the remaining spore. Move the chamber 5 mm from



2004
6

FIG. 8. A field of sporulated culture. (A) A four-spored cluster is seen to the right of the microneedle tip. (B) The cluster was picked up on the microneedle, which was lowered beneath the focal plane. The ascospores and the tip of the microneedle are, respectively, approximately 5 and 50 μm in diameter.

第一节 微生物的分离和纯培养

一、无菌技术

二、用固体培养基分离纯培养

- 1、自然沉降法；
- 2、稀释涂布法；
- 3、平板划线法；
- 4、稀释摇管法；

三、用液体培养基分离纯培养

四、单细胞（孢子）分离

微生物在自然条件下存在的特点：

- 同一生态环境中混杂存在着不同种类的细菌；
- 不同细菌在数量存在差异；

利用刚才介绍的技术，我们是否有可能获得某一个生态环境（例如1克土壤）中所有种类细菌的纯培养？**否**

假设待分离的细菌均能利用某一相同的培养基生长

五、选择培养分离

参见P18

微生物群落中数量占少数的微生物的分离纯化：

▲ 抑制大多数其它微生物的生长；

▲ 使待分离的微生物生长“突出”；



直接挑取待分离的微生物的菌落获得纯培养。

▲ 使待分离的微生物生长更快；



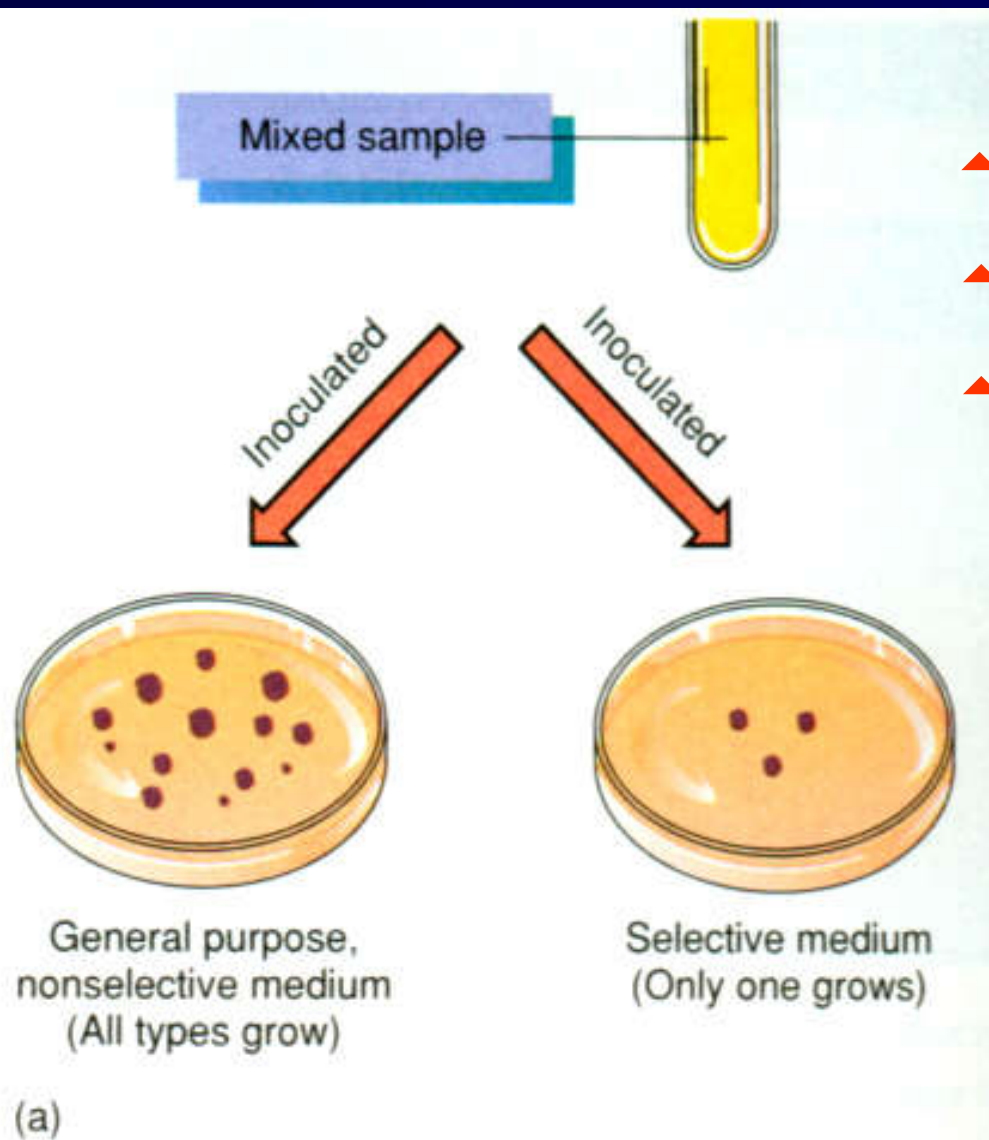
使待分离的微生物在群落中的数量上升，
方便用稀释法对其进行纯化。

没有一种培养基或一种培养条件能够满足自然界中一切微生物生长的要求，在一定程度上所有的培养基都是选择性的。

（ P18 倒数第1大段）

五、选择培养分离

1. 利用选择培养法进行直接分离

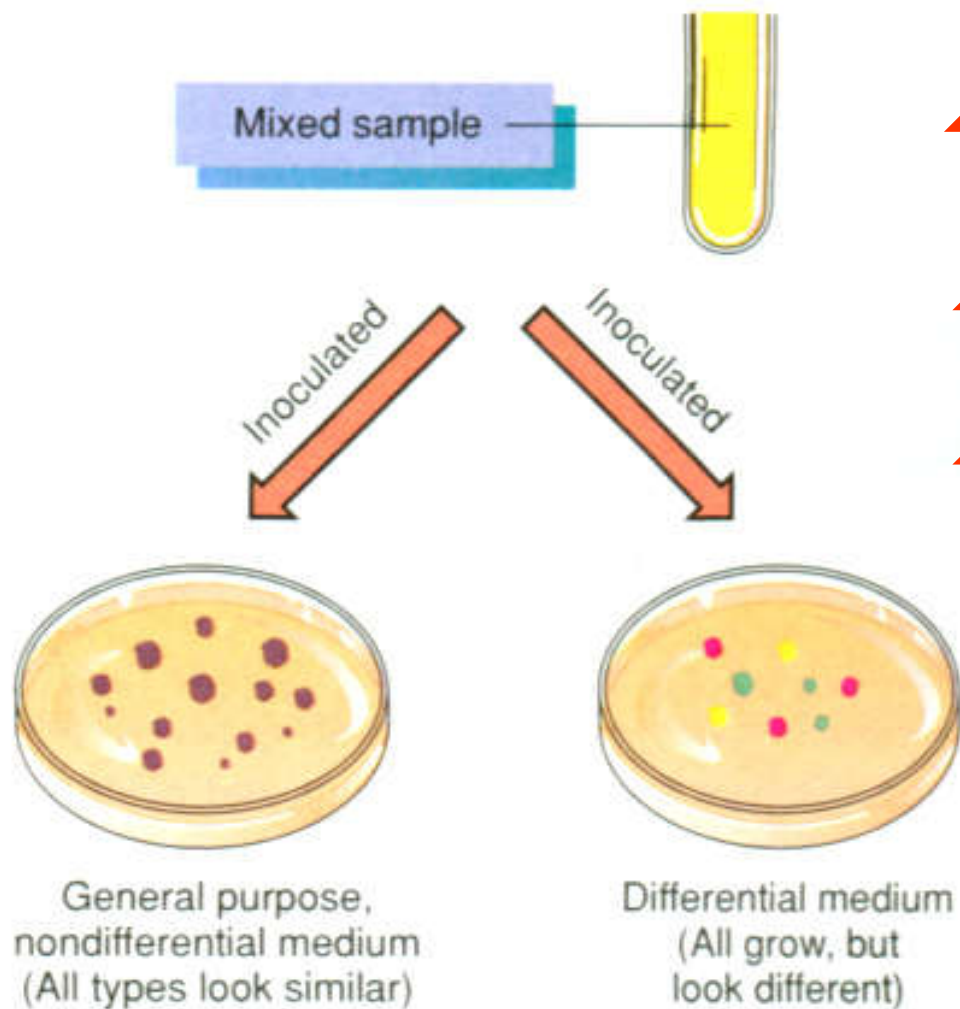


- ▲ 高温下培养：分离嗜热细菌；
- ▲ 培养基中不含N：分离固氮菌；
- ▲ 培养基加抗生素：分离抗性菌；

待分离的微生物生长，
其它微生物的生长被抑制

五、选择培养分离

1. 利用选择平板进行直接分离



(b)

- ▲ 牛奶平板：分离蛋白酶产生菌；
- ▲ 颜色反应：分离特定的菌株；
- ▲ 利用特定细菌（例如黏细菌）的滑动特点进行分离纯化；

待分离的微生物的生长特征明显不同于其它微生物

五、选择培养分离

参见P19

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



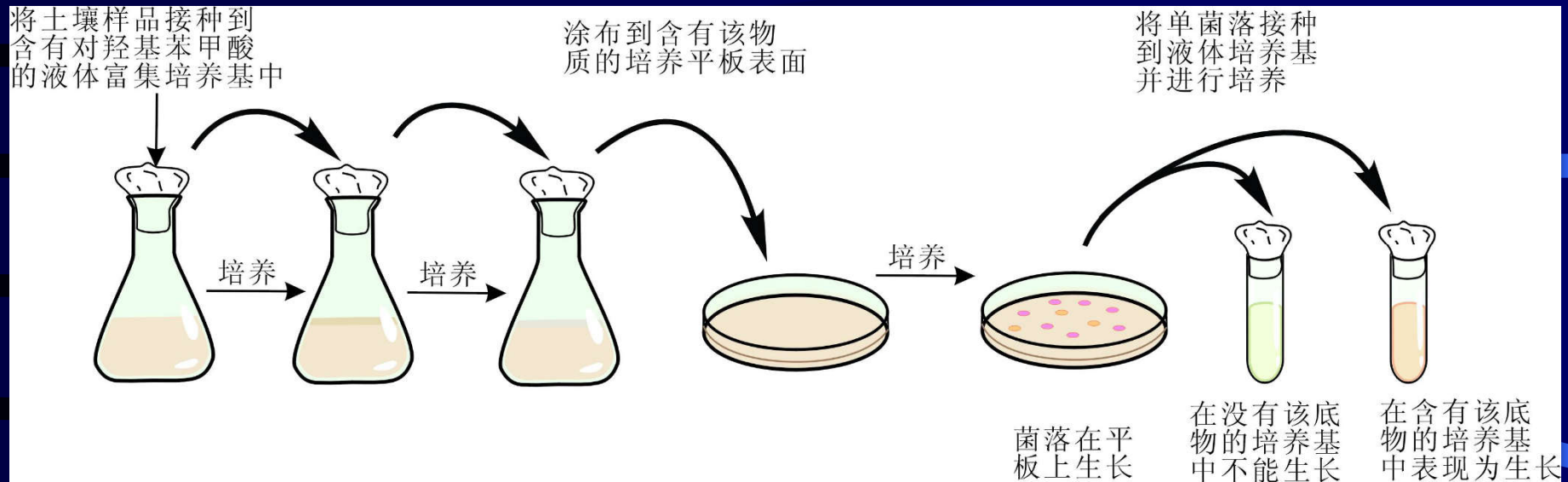
待分离微生物在群落中的数量大大增加



从自然界中分离到所需的特定微生物

2. 富集培养

参见P19



富集培养是微生物学家最强有力的技术手段之一。营养和生理条件的几乎无穷尽的组合形式可应用于从自然界选择出特定微生物的需要。

(P 19, 倒数第一大段)

根据微生物的特殊要求，从自然界分离出特定已知微生物种类；

分离培养在特定环境中能生长的微生物；

利用刚才介绍的各种纯种分离技术（包括选择培养技术），我们是否有可能获得某一个生态环境（例如1克土壤）中所有种类微生物的纯培养？

否

参见微生物学教材网上资源（微生物分离培养新技术）；

p19 扫一扫

未培养微生物的内容第10、11章介绍；

六、二元培养物

培养物中只含有二种微生物，而且是有意识的保持二者之间的特定关系的培养物称为二元培养物。

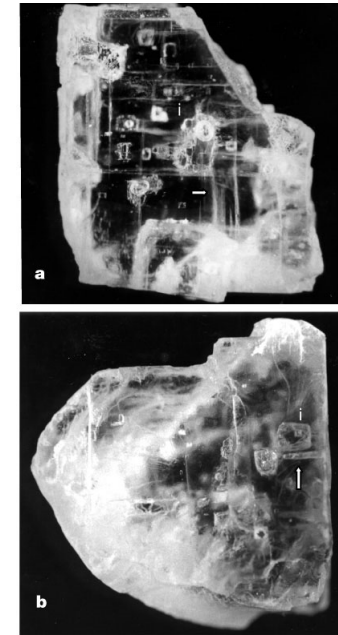
参见微生物学教材的网上资源；p19 扫一扫

- ▲ 病毒和宿主细胞；
- ▲ 纤毛虫、变形虫和其食物（细菌）；
- ▲ 蛭弧菌及其寄主菌；

休眠长：

世界上最古老的活细菌（芽胞）：2.5亿年
Nature 407, 897 – 900 (2000)

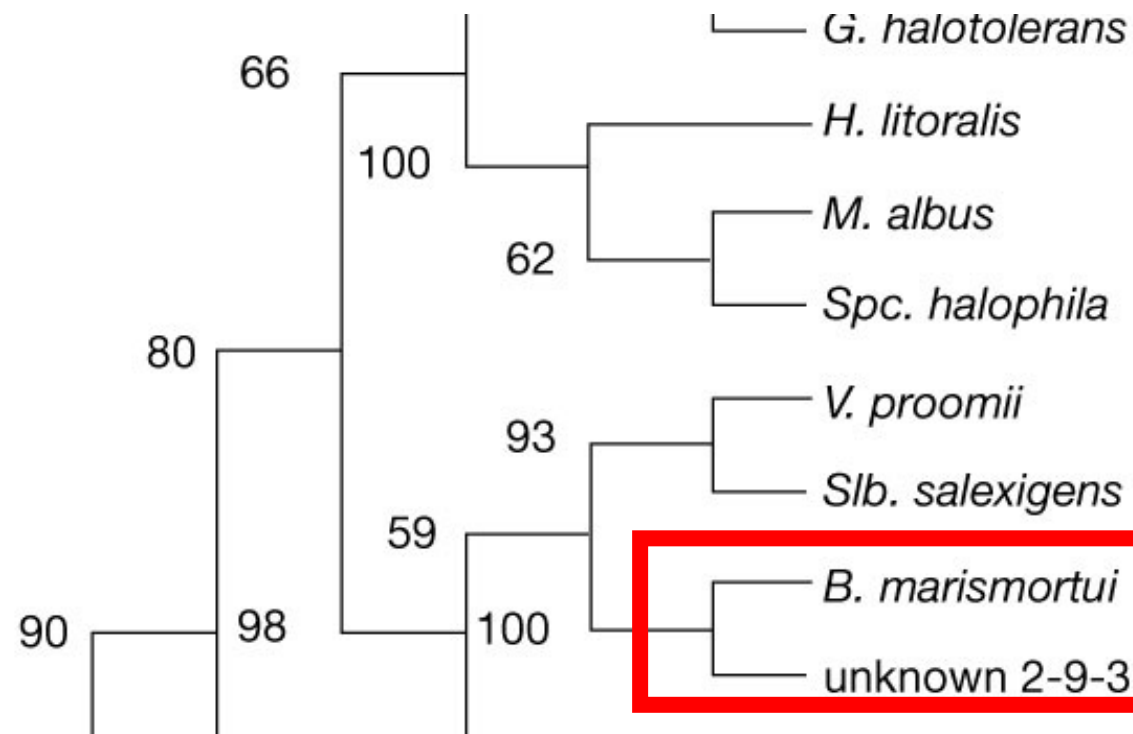
细菌芽胞的特点第三章介绍



第2章现实案例（p11）：原生或污染？——2.5亿年“高龄”细菌的身世之争

该盐岩形成于2.5亿年，因此推断这些细菌已经在地下以休眠芽胞的形式存活了2.5 亿年。作者将该菌命名为 *Virgibacillus* sp. Permian strain 2-9-3，即枝芽胞杆菌二叠纪菌株2-9-3

在此之前，地球上生命存活的记录保持者是在琥珀内蜜蜂肠道中以芽胞形式休眠了2500万~4000万年的一种 *Bacillus sphaericus*（球型芽胞杆菌）菌株，因此这个发现几乎将地球上生命存活的记录延长了10倍。这项研究结果对于揭示生命进化历程和微生物的多样性无疑具有重要意义。



但很快有人指出，2-9-3菌株的生物学特性与1999年发现和命名的一种的生活于现代环境的中度嗜盐菌*Salibacillus marismortui*（死海需盐芽胞杆菌）差别不大，使其身世遭到质疑。

- 1、为什么人们会特别关注菌株2-9-3是原生还是污染的问题？从各类环境中分离微生物时都会遇到这个问题吗？
- 2、从盐岩等样品中分离潜在的远古微生物时应注意哪些方面的实验操作？
- 3、除了微生物污染之外，还有哪些因素会影响人们对菌株2-3-9存活时间的判断？（参考答案参见微生物学教材网上资源）

七、微生物的保藏技术

（移到第八章 微生物遗传）

第二节 显微镜和显微技术

几个基本概念：

参见
P 21

放大

被观察物越小，放大倍数应越大，否则难以看清！

分辨率

特定条件下能辨析的两点之间的最小距离

反差

被观察物区别于背景的程度

被观察物区别于背景的程度

与显微镜的自身特点有关，但也取决于进行显微观察时对显微镜的正确使用及良好的标本制作和观察技术，这就是显微技术。 P21 倒数第一段

一、显微镜的种类及原理

1. 普通光学显微镜

复式显微镜

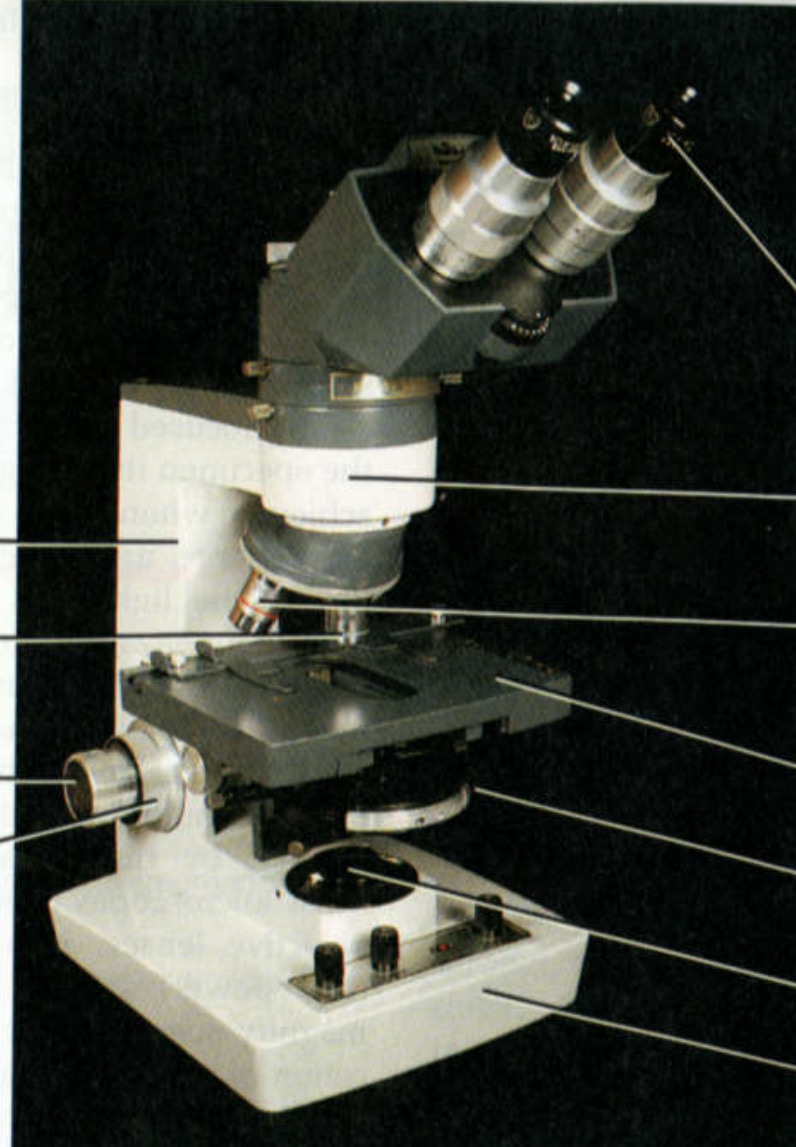
1.1 The compound microscope. (a) Principal parts and their functions. Path of light (bottom to top). Because the refractive indexes of the microscope slide and the immersion oil are the same, light rays do not refract when passing from one to the other. The oil immersion lens is used.

Arm

Condenser
Focuses light
through specimen

Coarse
adjustment knob

Fine
adjustment knob



Ocular (eyepiece) Remagnifies the image formed by the objective lens

Body tube Transmits the image from the objective lens to the ocular

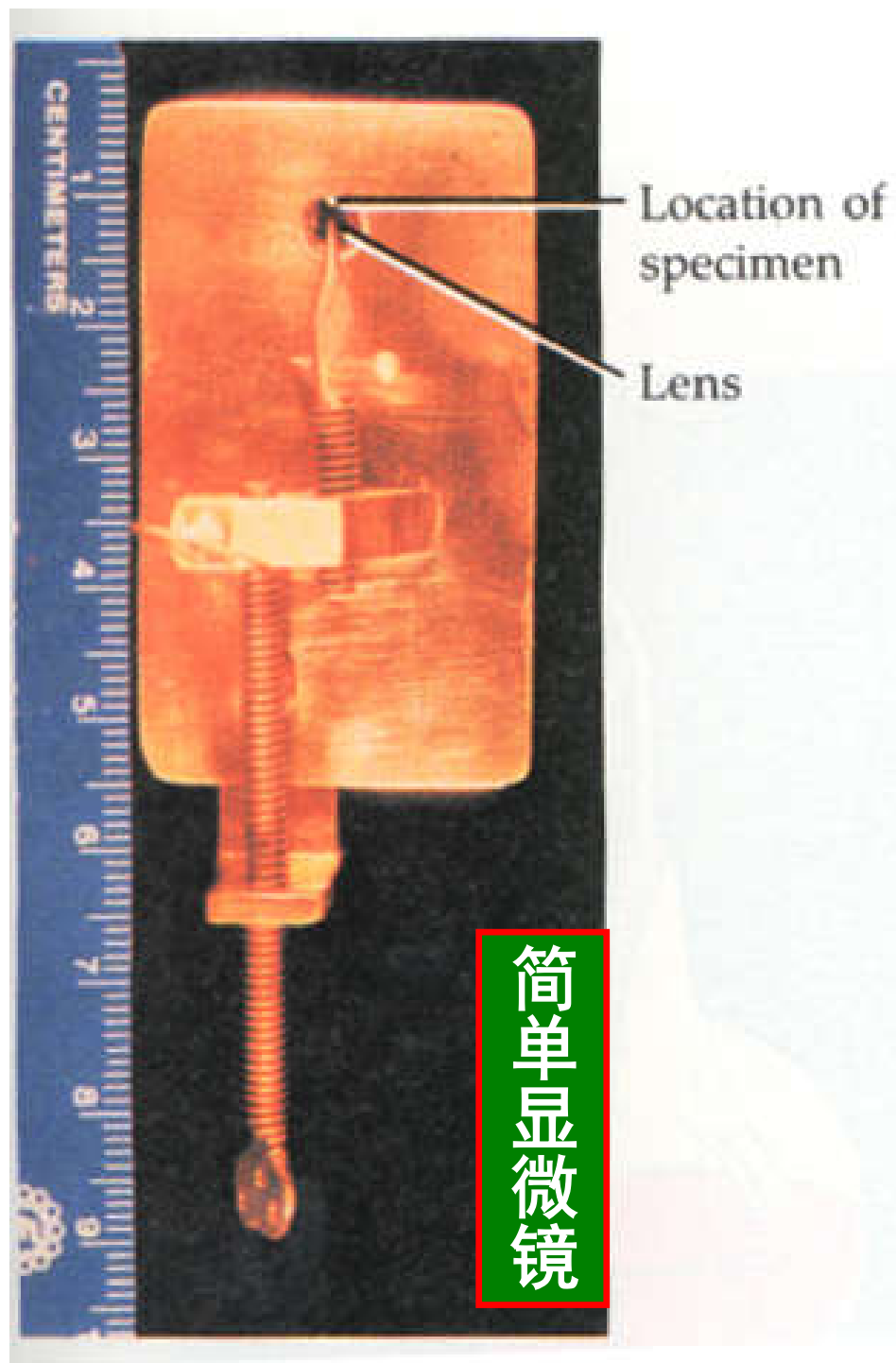
Objective lenses Primary lenses that magnify the specimen

Stage Holds the microscope slide in position

Diaphragm Controls the amount of light entering the condenser

Light Source of illumination

Base



一、显微镜的种类及原理

参见P 22

1. 普通光学显微镜

光学显微镜一般配置的最大放大倍数是多少？为什么？

目镜：10~15×；物镜：100×；总放大倍数1000~1500×；

如何实现光学显微镜一般配置的最大放大倍数？其原理？

使用油镜，即在100×物镜和载玻片之间滴加香柏油；

1. 普通光学显微镜

参见P 22

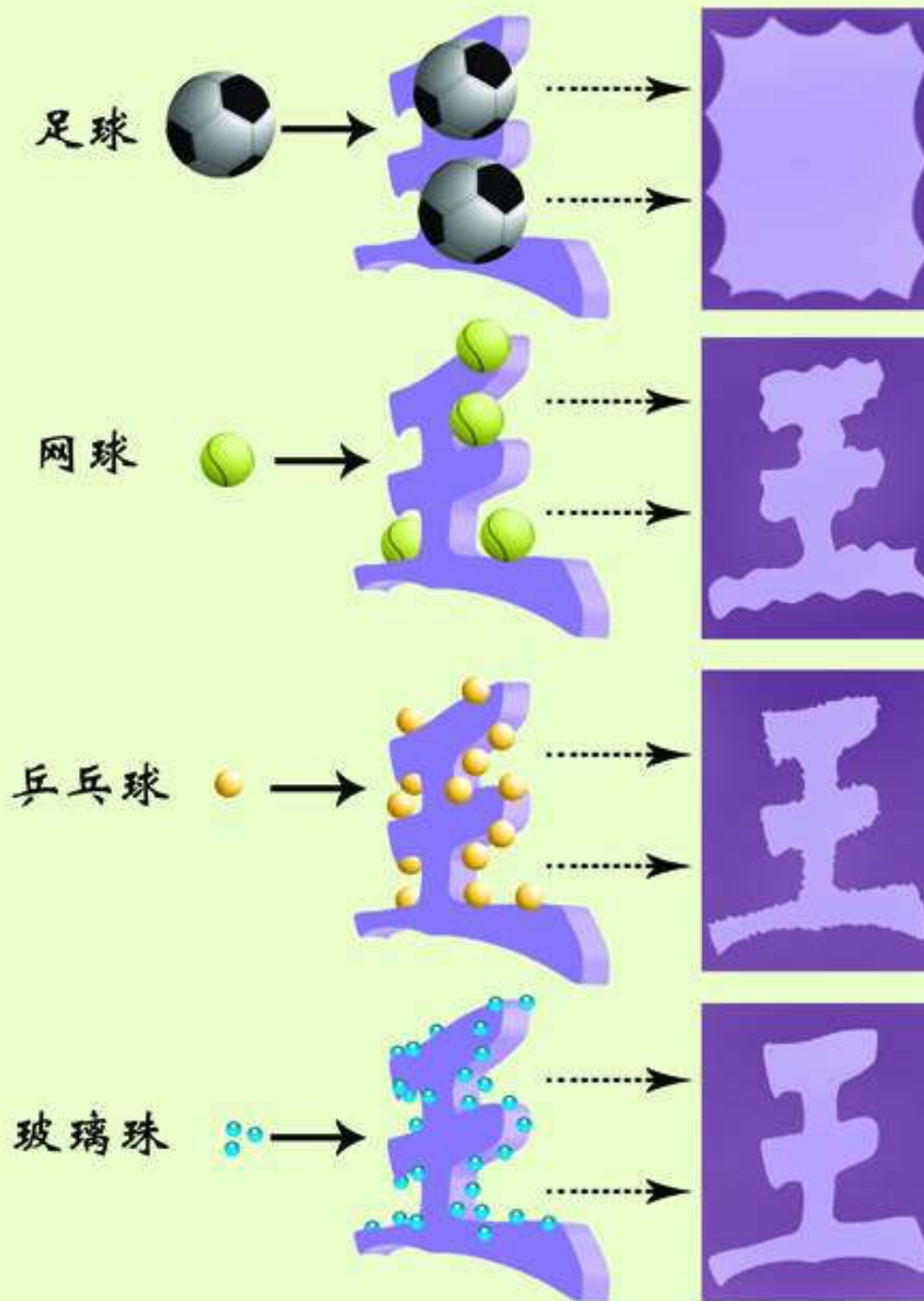
$$\text{最小可分辨距离(分辨率)} = \frac{0.5 \lambda}{n \sin \theta}$$

分辨率与所用波长成反比！

1. 普通光学显微镜

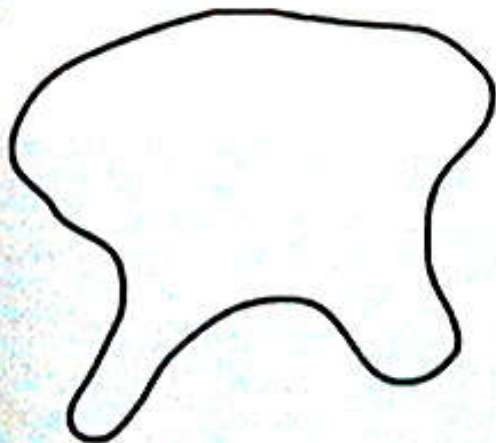
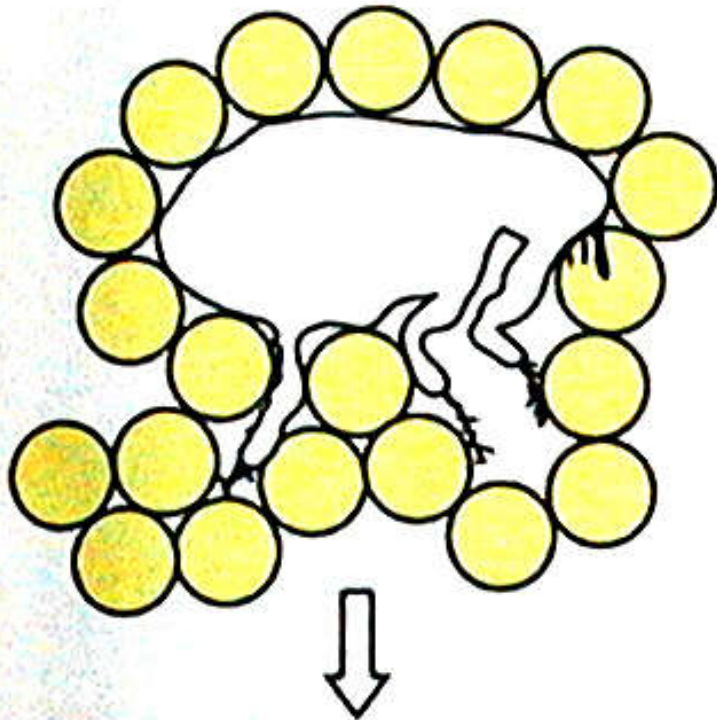
分辨率与所用
波长成反比！

参见P 22

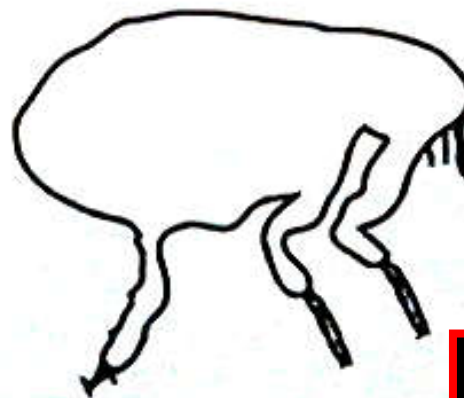
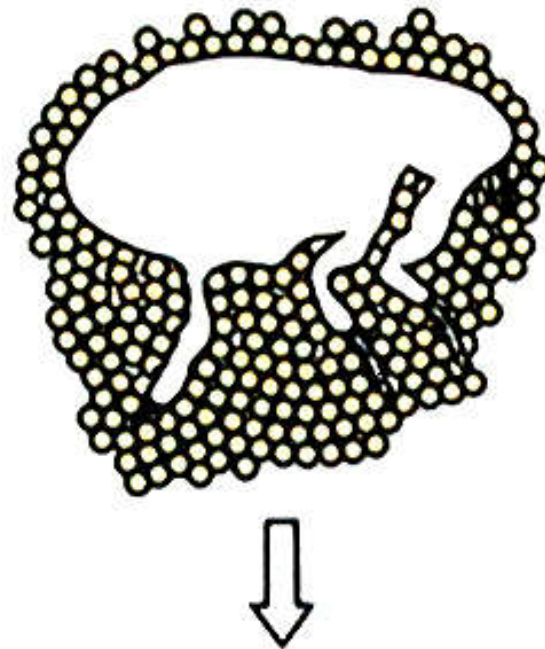


1. 普通光学显微镜

参见P 22



(a)



(b)

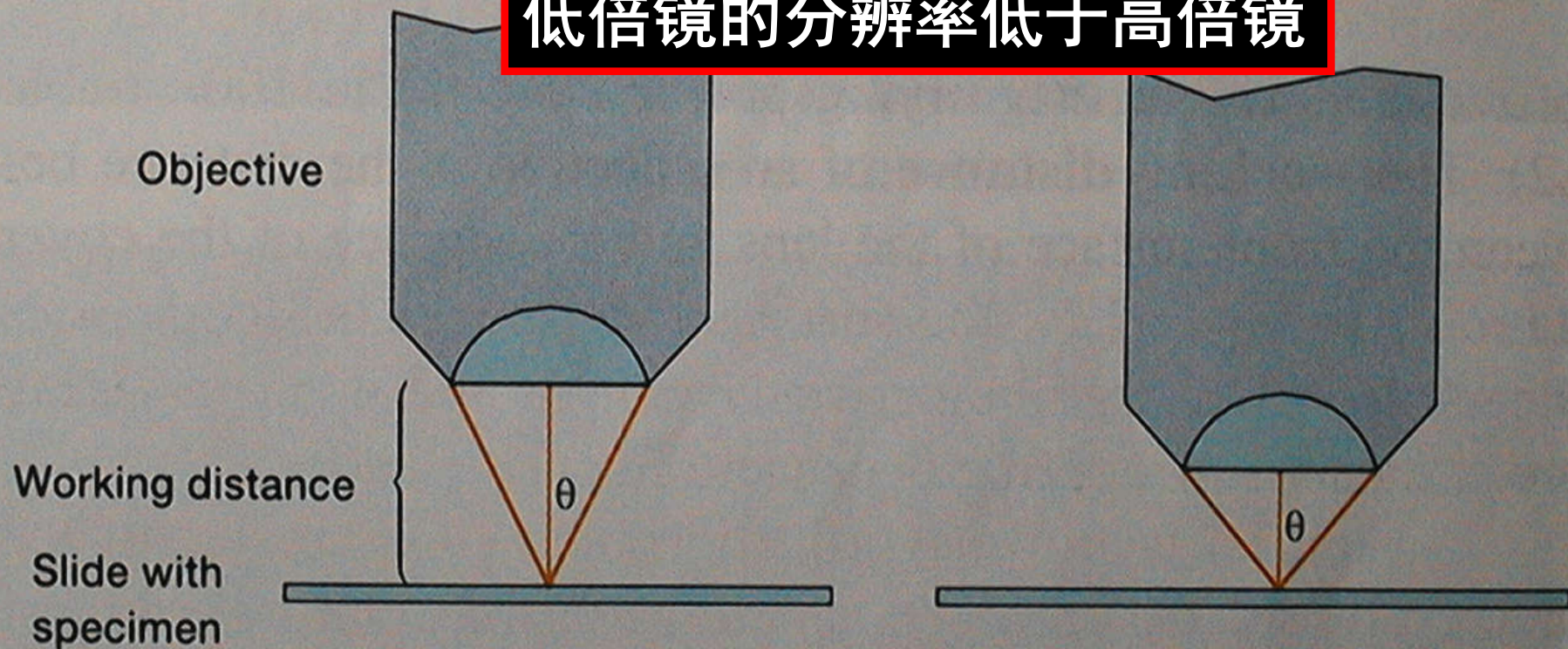
分辨率与所用
波长成反比！

1. 普通光学显微镜

参见P 22

$$\text{分辨率（最小可分辨距离）} = \frac{0.5 \lambda}{n \sin \theta}$$

低倍镜的分辨率低于高倍镜



θ 为物镜镜口角的半数，它取决于物镜的直径和工作距离

1. 普通光学显微镜

参见P 22

$$\text{分辨率（最小可分辨距离）} = \frac{0.5 \lambda}{n \sin \theta}$$

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（ $n=1.52$ ）

显微观察时可根据物镜的特性而选用不同的介质

是否可以寻找 n 值更高的介质来进一步提高分辨率？

用浸没油取代空气的作用：

参见P 22 第2大段

介质折射率提高

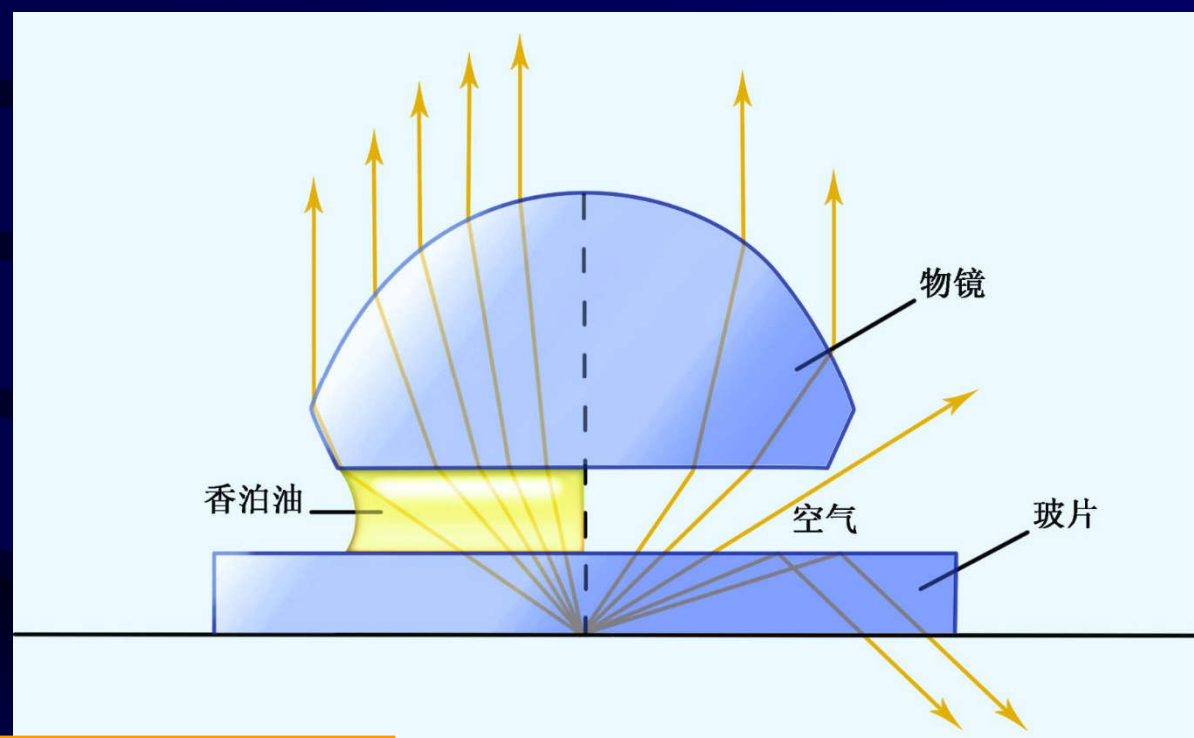


分辨率得到提高

改变光折射角度



增加照明亮度



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。（ P22 第2大段）

是否可以寻找 n 值更高的介质来进一步提高分辨率？

否！

光学显微镜物镜的特性

参见P 23

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

人眼的分辨能力在0.2 mm左右，因此光学显微镜的最大有效放大倍数（使用油镜）是1,000×到1,500×。

一、显微镜的种类及原理

1. 普通光学显微镜

2. 暗视野显微镜

3. 相差显微镜

4. 荧光显微镜

5. 透射电子显微镜

6. 扫描电子显微镜

7. 扫描隧道显微镜

请自学掌握如下内容：

各种显微镜的基本原理；

相比于普通光学显微镜，左边所列各种显微镜在显微技术上有何改进和发展？

哪些显微镜技术何时获得了诺贝尔奖？ 能否找出什么规律？

一、显微镜的种类及原理

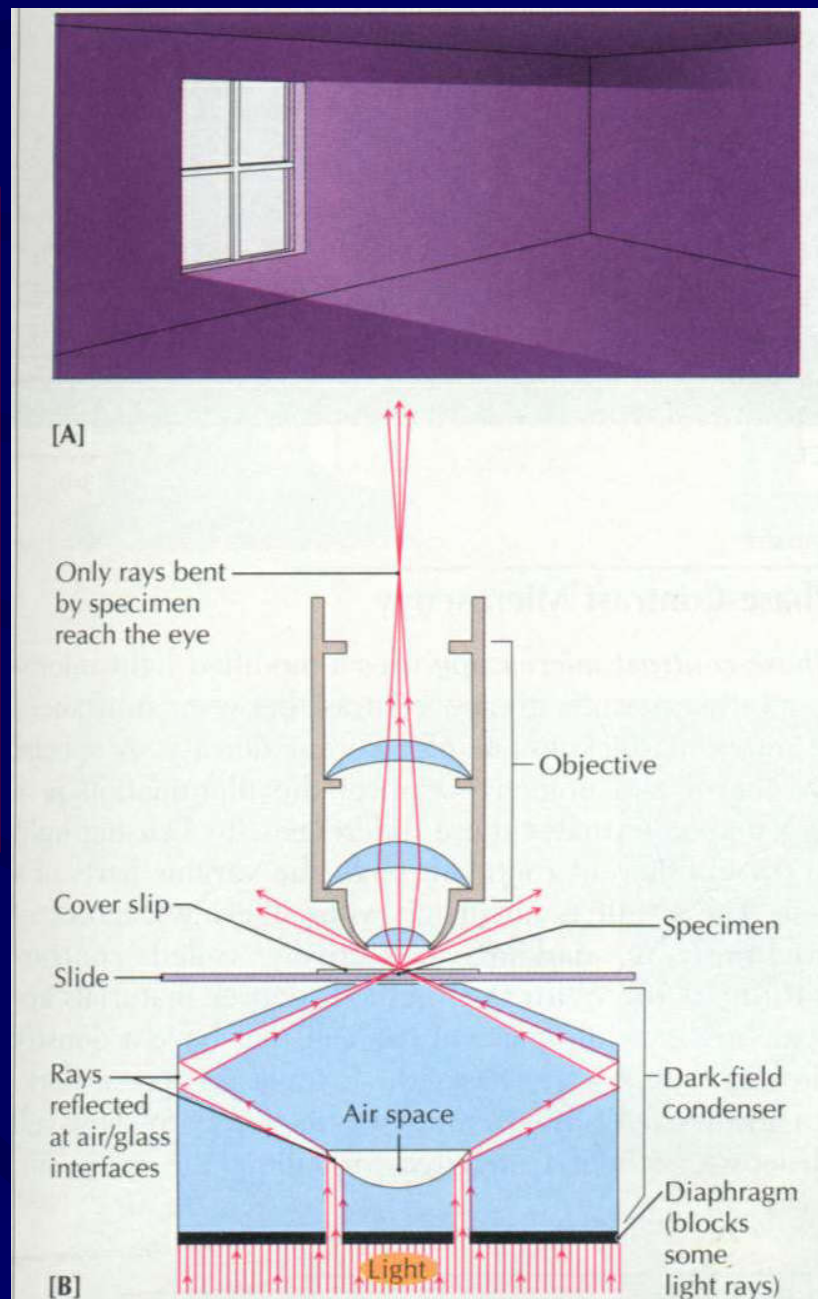
2. 暗视野显微镜

普通光学显微镜又称**明视野显微镜**

其照明光线直接进入视野，

属**透射照明**。

(参见P 23 第1大段)



二、显微观察样品的制备

请结合实验课自己学习

第二章思考题

- 1、为什么无菌技术和纯培养技术是微生物学建立与发展的基石？
- 2、试分析比较各种获得微生物纯培养方法的特点
- 3、试利用表格形式对各类显微镜在原理、样品制备和观察方面的异、同进行概括、比较。
- 4、你认为样品制备和显微观察中（光镜和电镜）应通过哪些方法改变样品的反差以改善观察效果？
- 5、试找到一篇使用微生物照片的科学文献（科研论文），分析该文为什么要使用微生物照片，采用的是何种显微观察技术？依你之见，该文作者的这张照片还可以用哪些技术获得？
- 6、近年来显微技术有哪些技术突破？目前显微镜的最高分辨率达到了多少？其中光学显微镜的最高分辨率可以达到多少？