

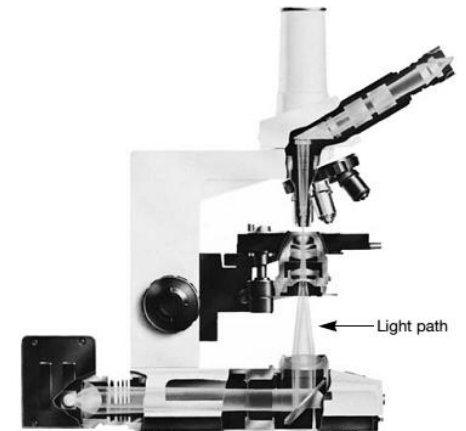


# Chapter 2

## The technique of the pure culture and microscope

*here are more animals living in the scum on the teeth in a man's mouth than there are men in a whole kingdom.*

—Antony van Leeuwenhoek





## 前言

◆ 微生物学的定义，包括两方面的内容：

1.研究的对象是微生物； 2.研究微生物而发展起来的一套微生物学的技术。

**Microbiology is defined not only by the size of its subjects but the techniques it uses to study them.**

◆ 微生物学能够成为一门科学，主要依赖于显微技术和纯培养技术的发展。

**The development of microbiology as a scientific discipline has depended on the availability of the microscope and the ability to isolate and grow pure cultures of microorganisms.**

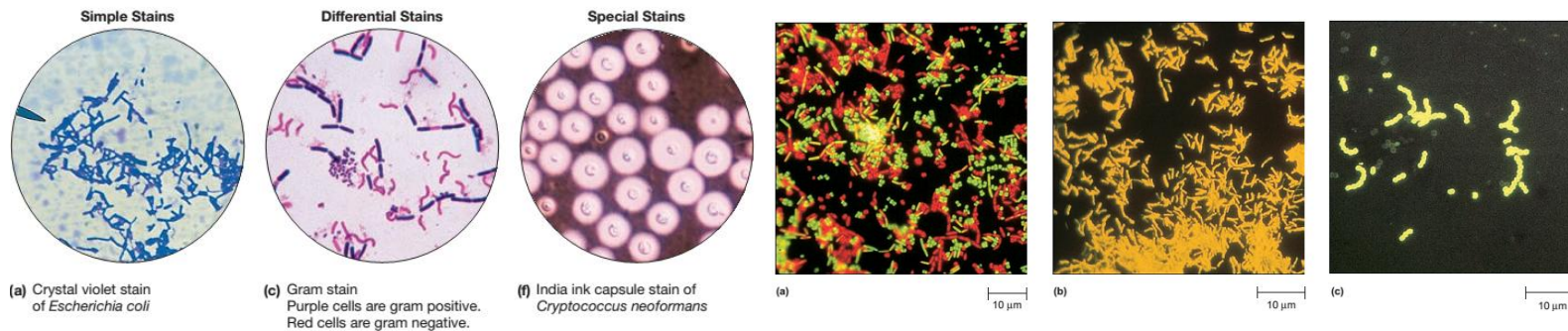


# 主要内容

## 1. 微生物的分离和纯培养技术:

培养基、培养皿、克隆、纯培养、菌落、菌苔、传代、无菌操作、菌种保藏、倍比稀释法、染色方法等基本概念。

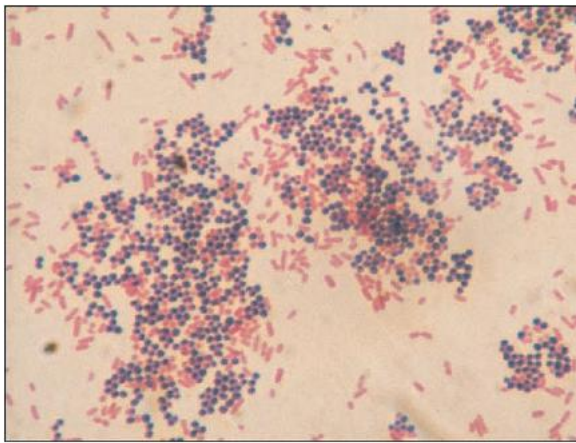
## 2. 显微设备的类型和基本原理及微生物学上的应用。





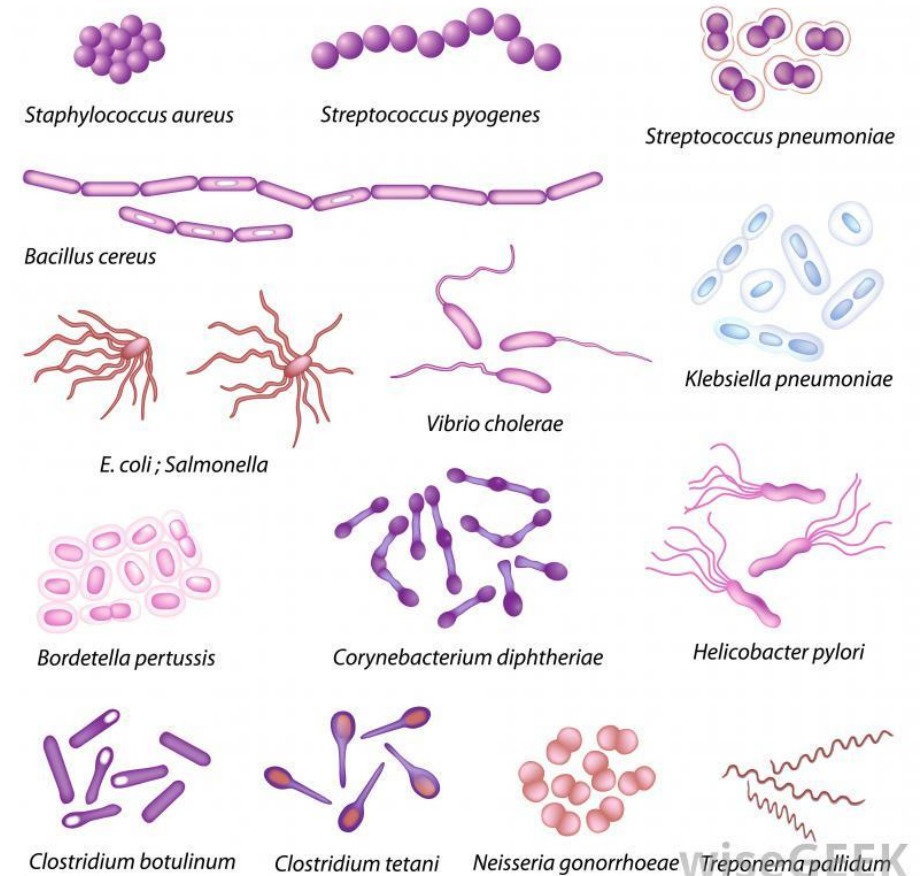
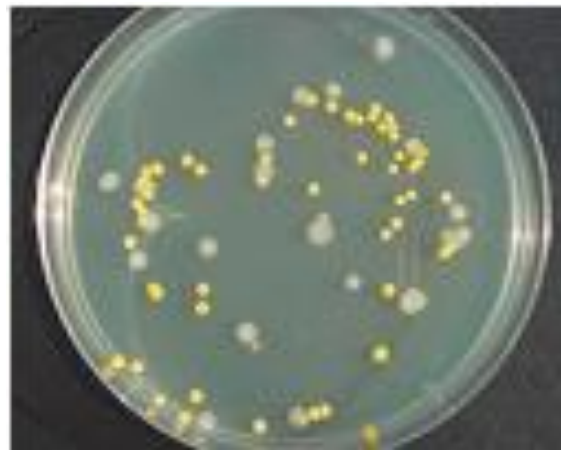
# 微生物研究的特点

微生物的特点是小：即形态微小。以单个细胞进行研究，难以进行。因此，必须以群体细胞来进行研究，所以微生物无论是菌落还是单克隆，都是细胞群体！



(b)

10 μm

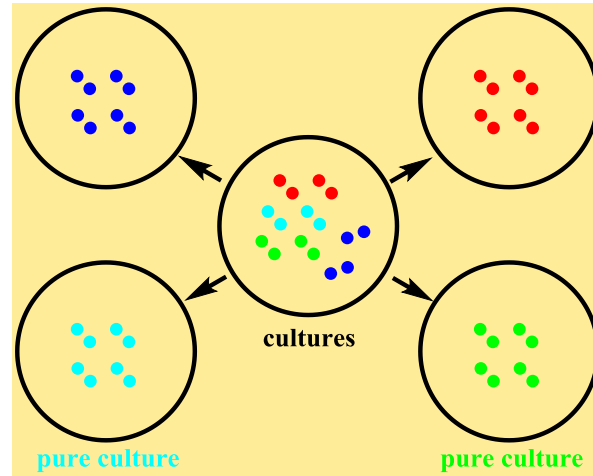
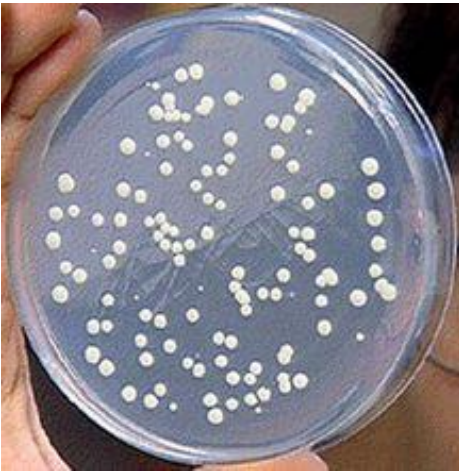






# 1. 微生物分离和纯培养技术

- ◆ **培养物 (culture)** : 在一定的条件下培养、繁殖得到的微生物群体。
- 不可培养 (uncultured) 微生物: 人工无法进行培养的微生物。自然界超过99%以上的微生物不可培养!





## 微生物的分离 (isolating the microbes)

无菌技术 (aseptic technique): 指对微生物的所有操作过程中, 不能有出现任何污染的操作技术。主要包括:

- ◆ 所有的操作工具都要保持无菌;
- ◆ 你的微生物材料不能污染环境;
- ◆ 环境不能污染你的微生物材料。

实验室常用的灭菌方法: 高压蒸汽灭菌、紫外照射灭菌、火焰灼烧灭菌、医用酒精消毒。





## 培养基 (medium) :

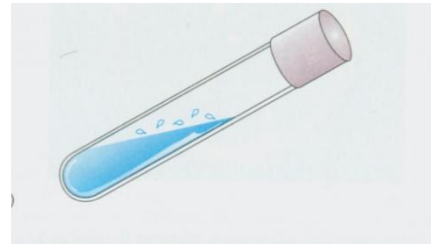
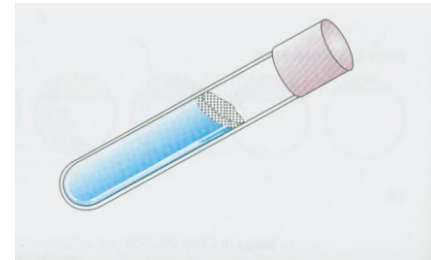
为微生物生长繁殖所提供的营养物质。主要包括碳源、氮源、磷源、维生素、无机盐、水等几大类营养物质。



Fannie Eilshemius (1850–1934) and  
Walther Hesse (1846–1911).

固体培养基  
半固体培养基  
液体培养基

琼脂



琼脂 (agar) 是海藻中提取的多糖, 作为凝固剂, 添加在培养基中, 能经受高压蒸汽灭菌。根据添加的量来配制固体和半固体培养基。多数微生物不能利用琼脂, 是理想的凝固剂, 代替了以前的土豆片、明胶培养基。





## 不同培养基的用途

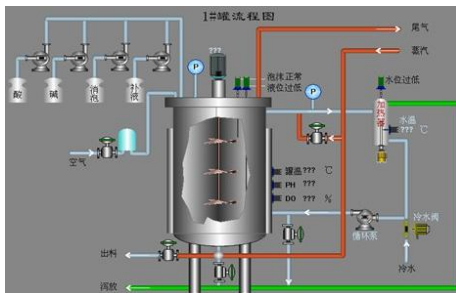
传统的固体培养基有红茶发酵、酿造酱油、制醋、酿酒及制作醪糟、甜醅等用的固体培养基，例如云南普洱茶还采用传统的固体发酵工艺，也包括制作泡菜、发面等一系列固体培养基，至今还在民间和生活中广泛使用。



半固体培养基一般在实验室使用，主要用来检测微生物有无运动器官及其运动能力。



液体培养基大量地在工业酿造生产中使用，如大型的啤酒发酵、红酒发酵和氨基酸、抗生素发酵等，有批量发酵和连续发酵等技术。采用大型的发酵罐，实现了计算机的自动化管理。在实验室一般采用液体摇瓶发酵以供研究。





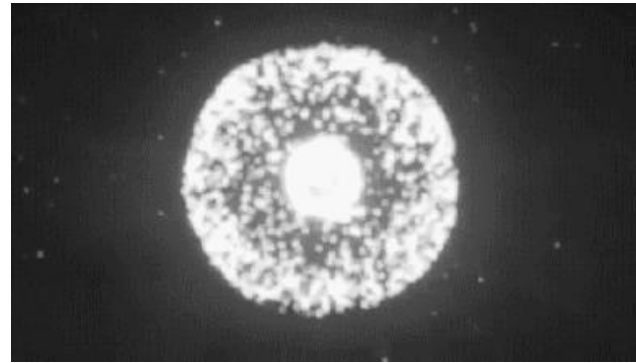
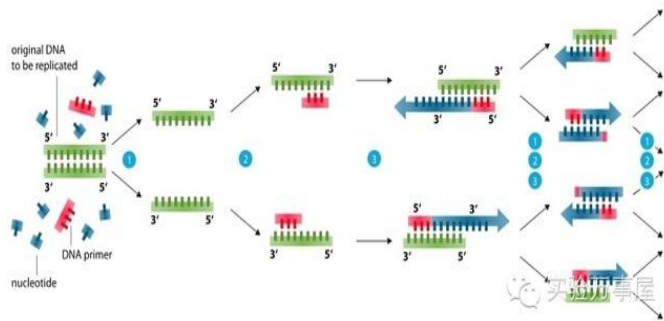


# 克隆 (clone)

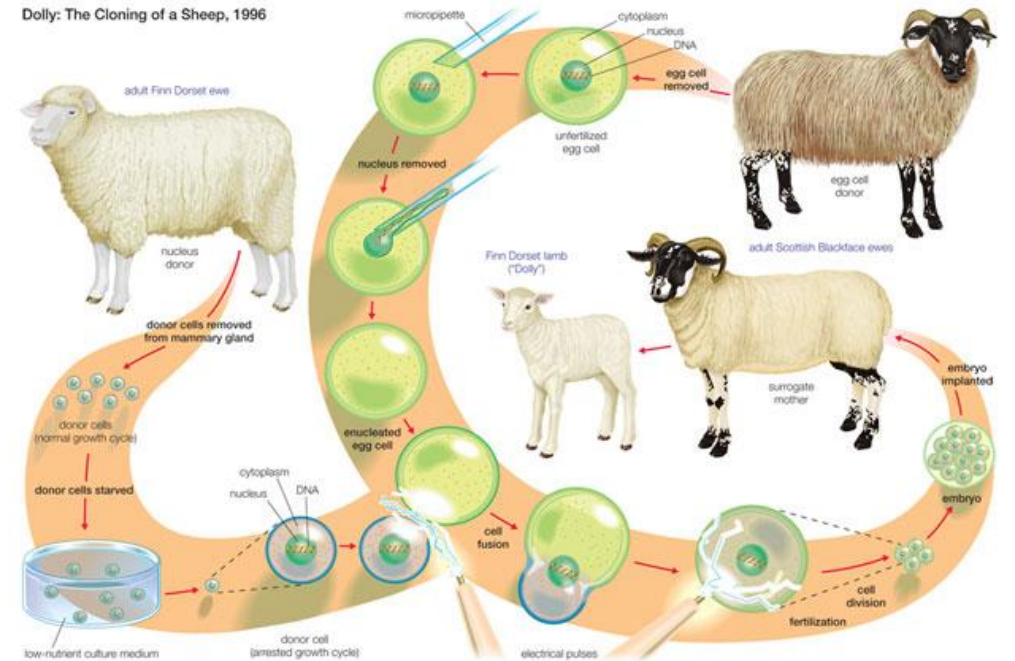
指无性繁殖系。有三个层面的意思：

1. 分子层面：一般指DNA分子的复制和扩增产物；
2. 细胞层面：指一个细胞经无性繁殖后产生的大量后代群体，如细菌的单克隆，就是一个单菌落；
3. 个体层面：指多细胞动物的无性繁殖体，如克隆羊多利。

微生物学上的常说的克隆是第一、二层面的内涵。



Dolly: The Cloning of a Sheep, 1996





## 菌落 (colony)

指一个或多个微生物细胞产生的，在固体培养基上生长起来且彼此分离的肉眼可见的克隆。

- ◆ 菌落经常和克隆互换，是微生物操作中的克隆实体，也是微生物学当中最常见的专业术语。
- ◆ 一个单菌落也称为CFU (Colony Formation Unit)。
- ◆ 菌落的大小、颜色、形态、隆起状态、表面光滑度、边缘等指标可作为菌种分类、鉴定的形态学依据。



细菌菌落



链霉菌菌落



酵母菌落



霉菌菌落



# 菌落特征

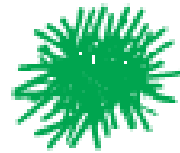
Form



Punctiform



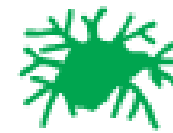
Circular



Filamentous



Irregular



Rhizoid



Spindle

Elevation



Flat



Raised



Convex



Pulvinate

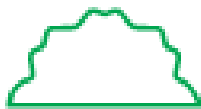


Umbonate

Margin



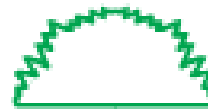
Entire



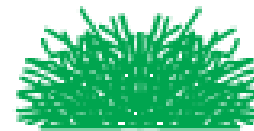
Undulate



Lobate



Erose



Filamentous

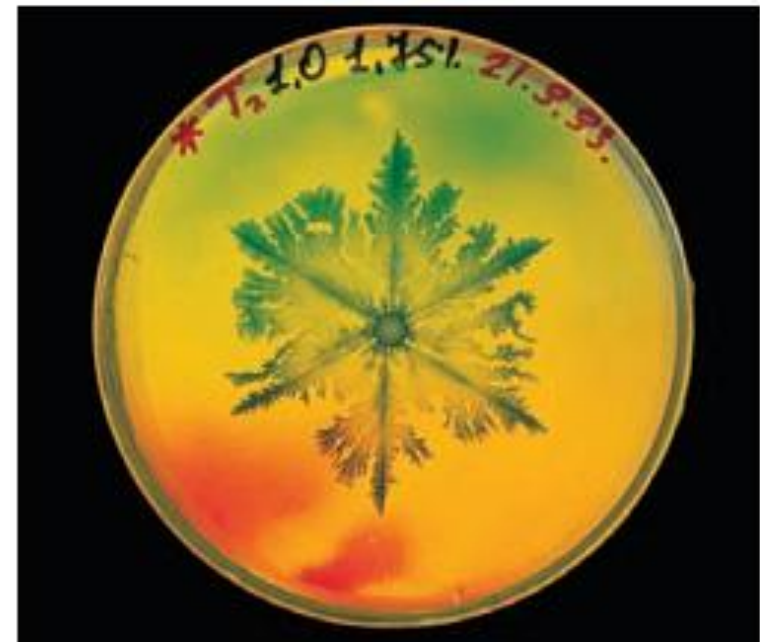


Curled





- ◆ 在不同的平板和培养环境下其形态学指标有变化，但是，在确定的培养基上有相对稳定的状态。



枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）生长在氮源贫瘠的琼脂平板，呈现出不同的表观形态



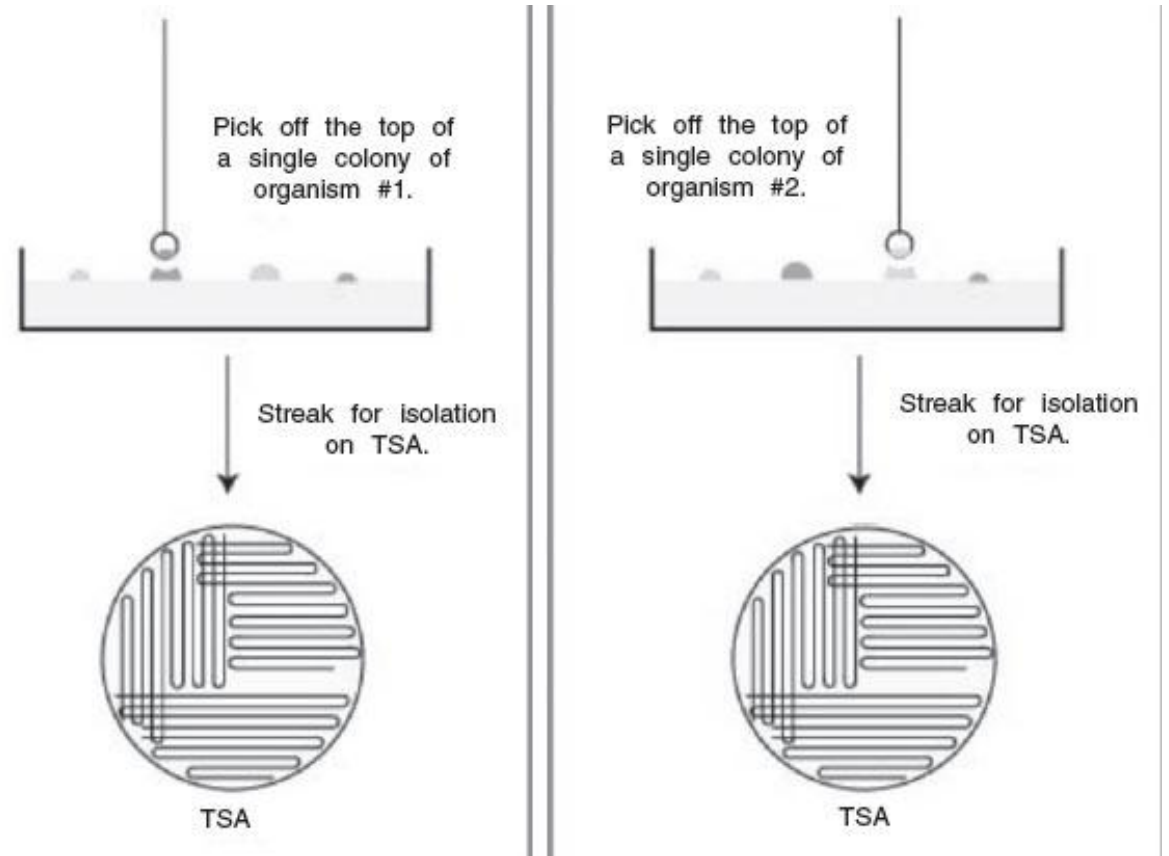
## 纯培养 (pure culture) :

一个细胞的后代组成的群体

### 特点:

培养时各方面的性质都相同: 包括颜色、形态、染色、大小、理化性质、遗传变异、抗原免疫、基因组等, 结果可重复。

获得纯培养是研究微生物的第一步, 是展开研究的基础, 因为材料是关键!

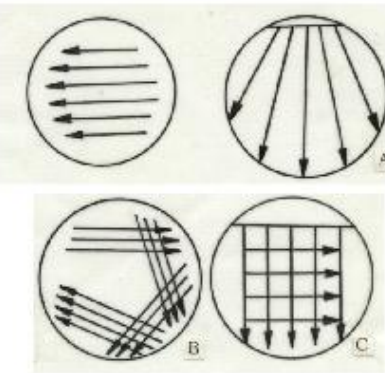




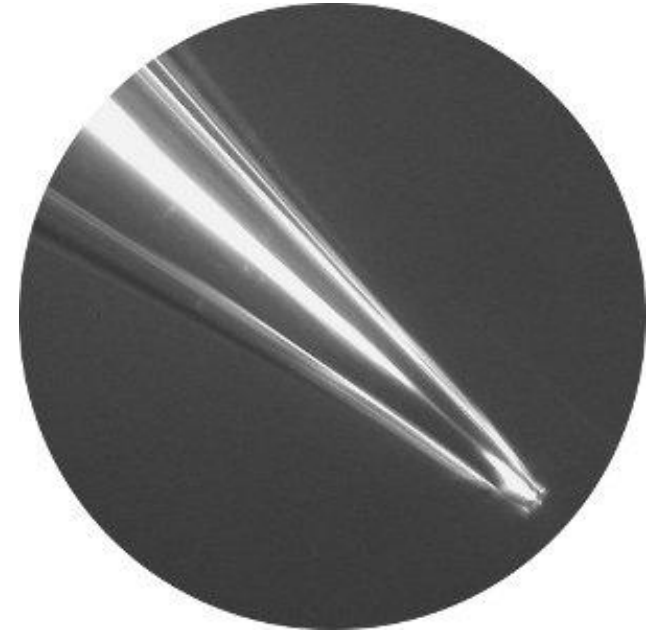
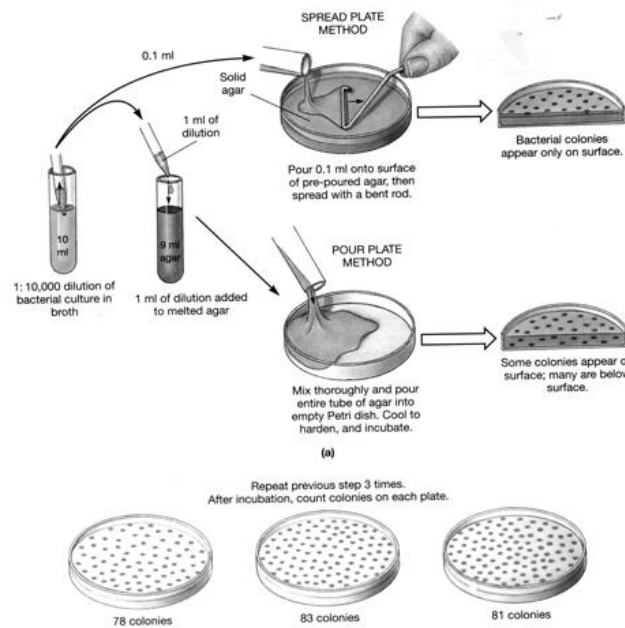
# 如何获得纯培养？

获得纯培养物，就是不断的获得单克隆或单菌落的过程。一般通过下面四种方法获得纯培养：

1. 固体平板划线；
2. 稀释倒固体平板；
3. 稀释后推固体平板；
4. 显微操作单细胞。



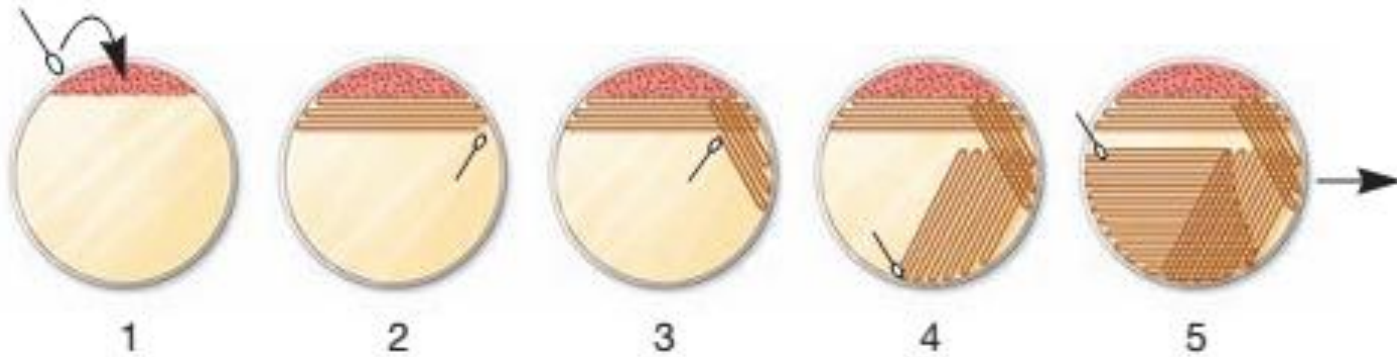
交叉划线法  
连续划线法



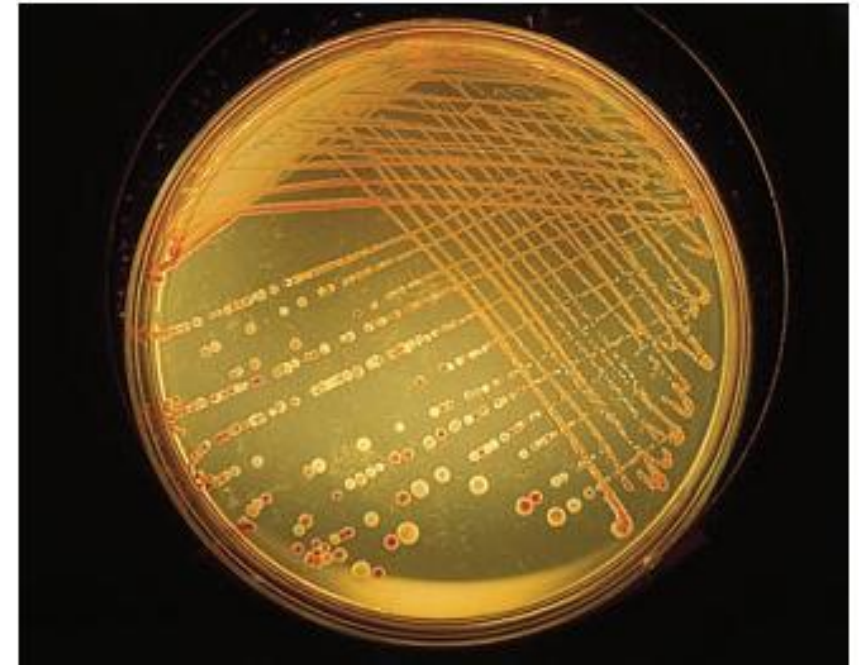




# 1、固体平板划线法 (streak-plate technique) ;

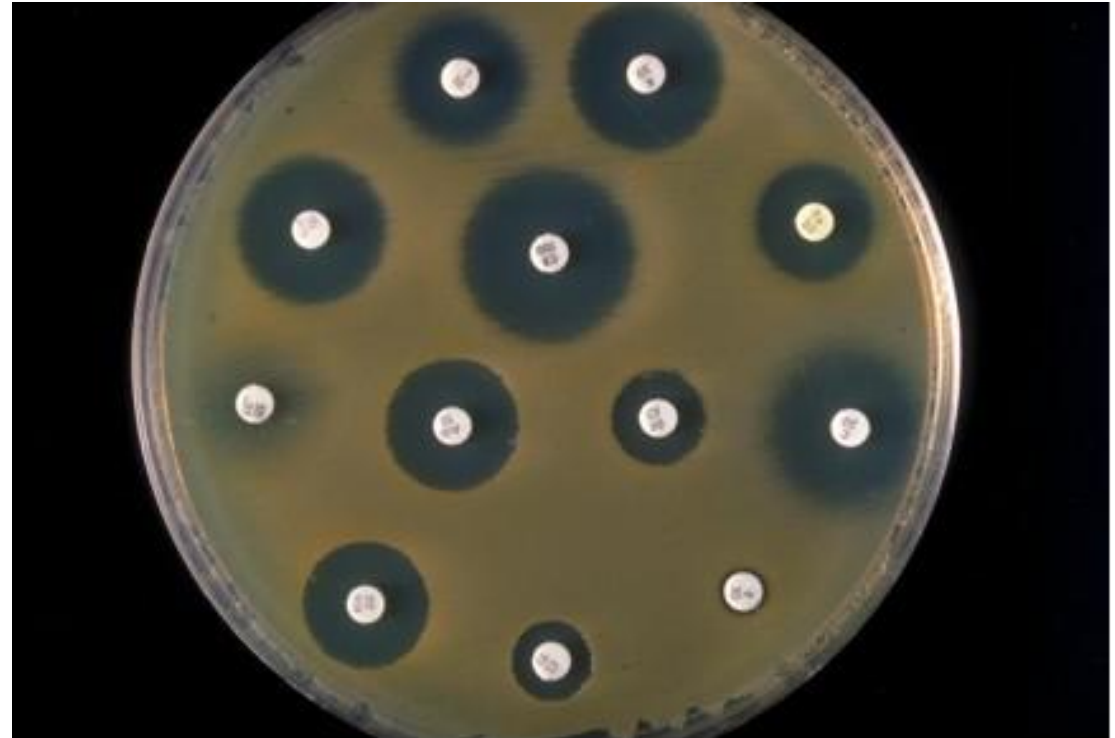
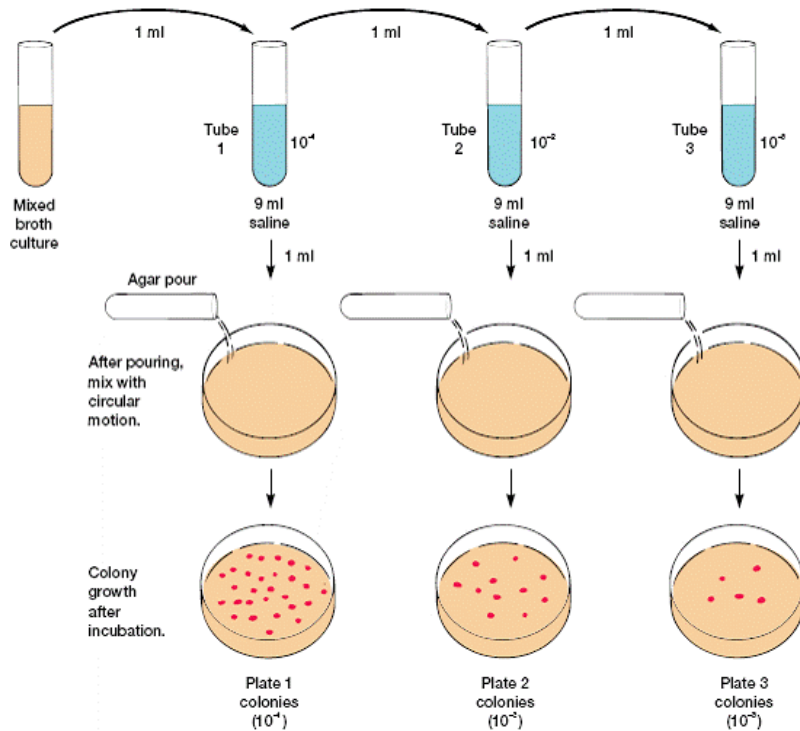


目的：最终出现单克隆或单菌落





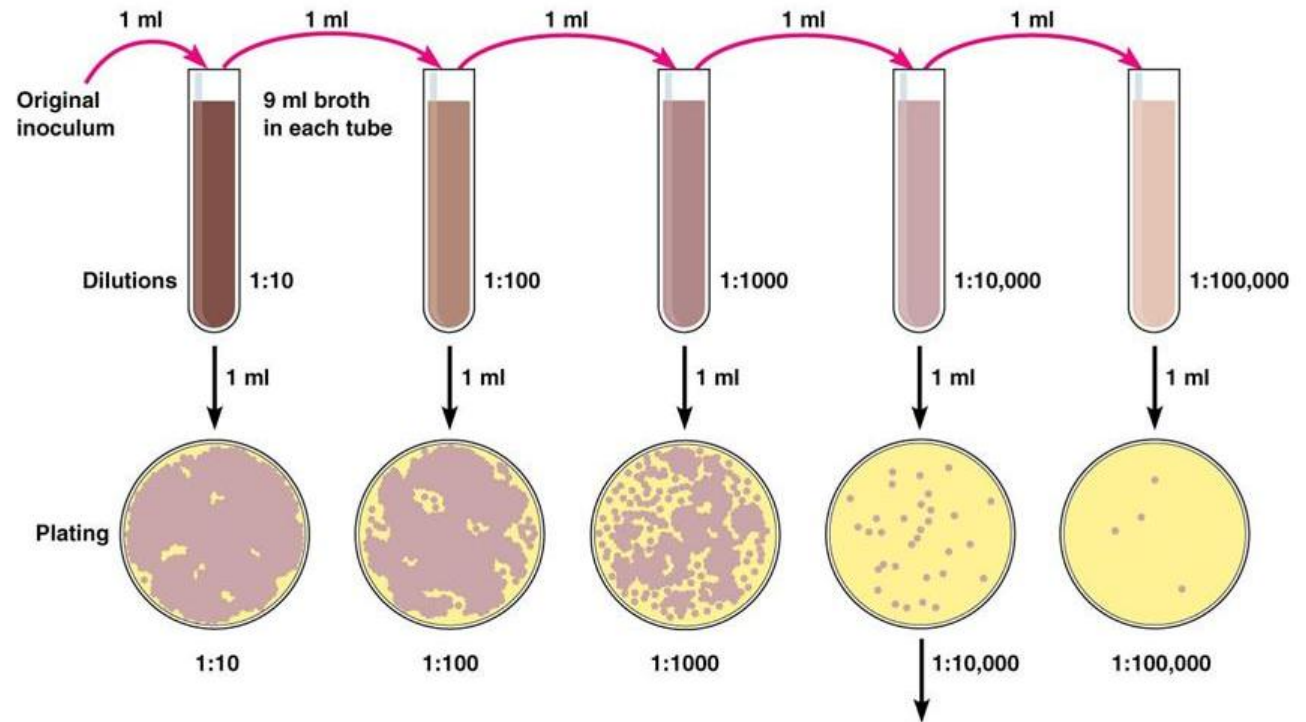
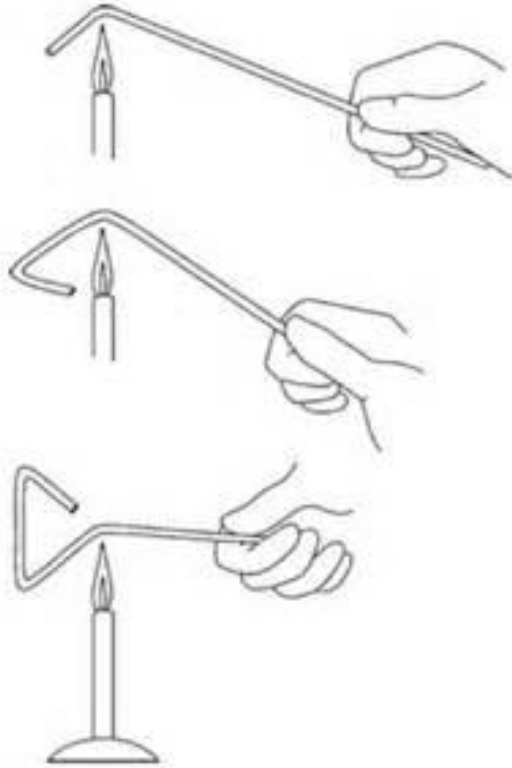
## 2. 稀释倒固体平板 (dilution pour-plate technique)



对热敏感和好氧的微生物一般不会倒稀释倒平板！通常做抑菌实验时采用此方法。



### 3. 稀释后推固体平板 (spread-plate technique)



Calculation: Number of colonies on plate  $\times$  reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml  
(For example, if 32 colonies are on a plate of  $1/10,000$  dilution, then the count is  $32 \times 10,000 = 320,000$  bacteria/ml in sample.)





- ◆ 平板划线最为常用，操作简单，容易上手；
- ◆ 推平板法也比较常用，操作简单；
- ◆ 稀释倒平板法须掌握好培养基的温度，不能太热，否则细胞会烫死，太凉则培养基凝固，无法混匀细胞，须多次操纵直到熟练；
- ◆ 单细胞操作要求较高，须借助显微镜，操作难度与细胞大小成反比。

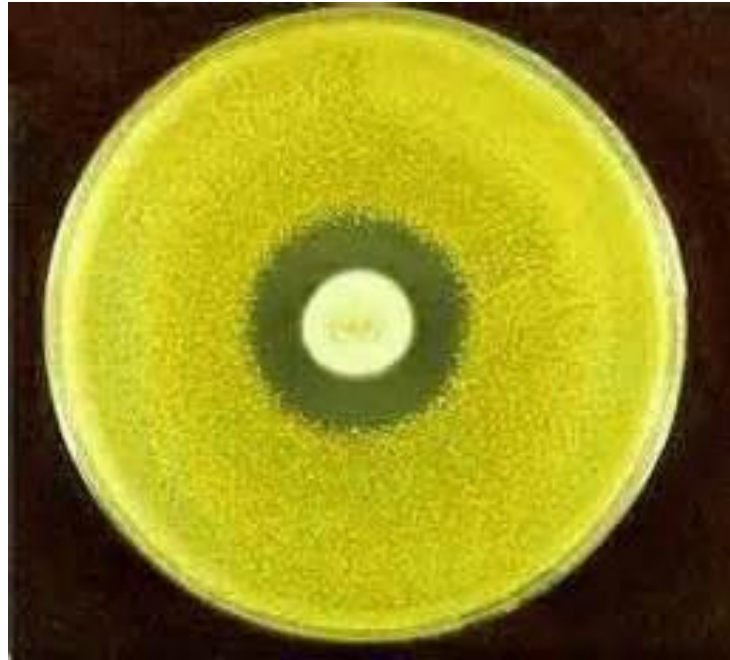
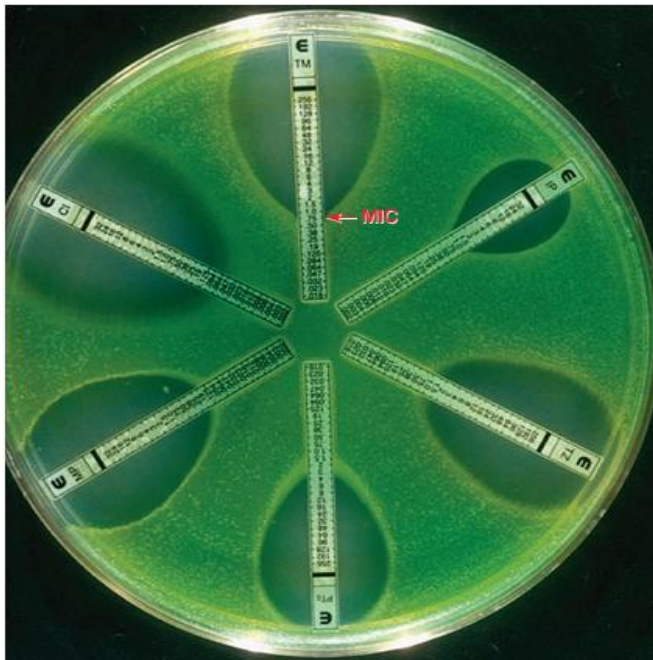
**必须注意无菌技术！**

**熟能生巧，多多益善！**



## 菌苔 (lawn)

菌落之间连成一片后形成的如同草坪一般的表观形态。





## 微生物的保藏技术

菌种保藏技术就是根据菌种特性及保藏目的的不同，给微生物菌株以特定的条件，使其存活而得以延续。

针对微生物进行连续传代或移种。

改变环境条件：干燥、低温、缺氧、避光、缺乏营养等

实验室通常用甘油管来保藏：孢子或菌体存放在20%的甘油中，-70度可存放1年。

低温冷冻干燥保藏为最佳的保藏方法。

菌种保藏的原则：不污染；不死；不变；不乱。

### 菌种保藏

传代  
培养

冷冻  
保藏

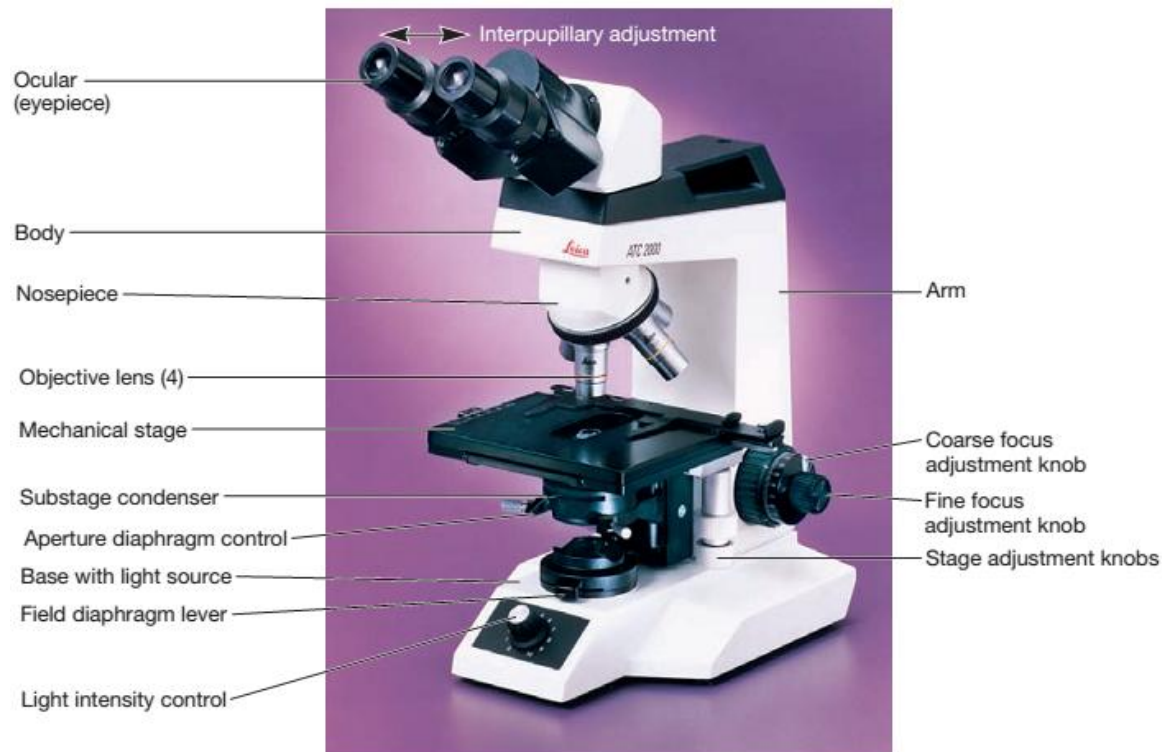
干燥  
保藏



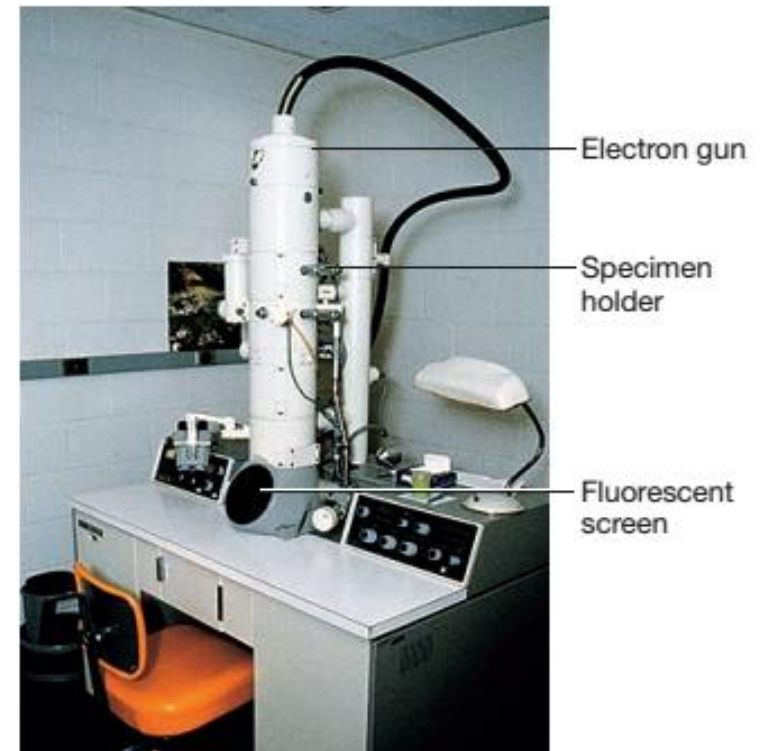


## 微生物研究的特点

微生物是单细胞生物，特点是小！对细胞形态、细胞结构、亚细胞结构等结构的观察都必须借助显微设备，例如光学显微镜或电子显微镜等。



Final image can be displayed on fluorescent screen or photographed.





## 2. 显微设备的类型和基本原理及微生物学上的应用。

	光源	波长 ( $\lambda$ /nm)	分辨率 ( $d$ )	放大倍数 (M)	功能
普通光镜 (明视野)	可见光	400-760	0.2um	1000-1500	细胞
暗视野光镜	可见光	400-760	0.2um	1000-1500	活的未染色细胞
相差光镜	可见光	400-760	0.2um	1000-1500	活的未染色细胞
荧光光镜	激光	紫外、紫光	0.2um	1000-1500	荧光染料染色细胞
共聚焦光镜	激光	紫外、紫光	<0.2um	>1500	三维立体图像
透射电镜	电子束	$\geq 0.005\text{nm}$	0.5nm	$\geq 100,000$	亚细胞内部结构
扫描电镜	电子束	$\geq 0.005\text{nm}$	0.5nm	$\geq 100,000$	表面结构
原子力扫描电镜	电流信号			-100 million	表面原子

常见的显微设备及其功能



**Table 2.4** Characteristics of Light and Transmission Electron Microscopes

Feature	Light Microscope	Transmission Electron Microscope
Highest practical magnification	About 1,000–1,500	Over 100,000
Best resolution <sup>a</sup>	0.2 $\mu\text{m}$	0.5 nm
Radiation source	Visible light	Electron beam
Medium of travel	Air	High vacuum
Type of lens	Glass	Electromagnet
Source of contrast	Differential light absorption	Scattering of electrons
Focusing mechanism	Adjust lens position mechanically	Adjust current to the magnetic lens
Method of changing magnification	Switch the objective lens or eyepiece	Adjust current to the magnetic lens
Specimen mount	Glass slide	Metal grid (usually copper)

<sup>a</sup>The resolution limit of a human eye is about 0.2 mm.





## 光镜 (light microscope)

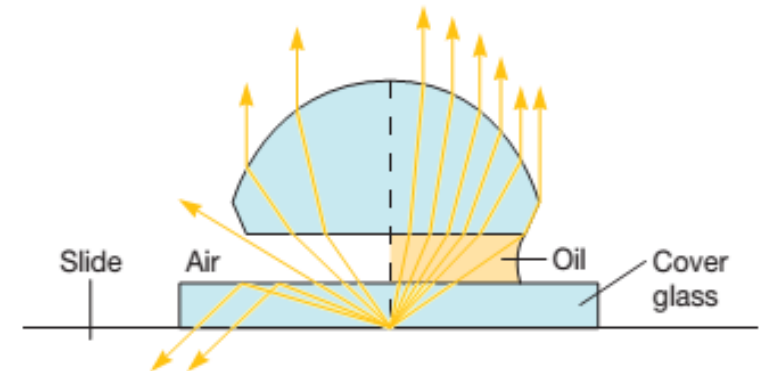
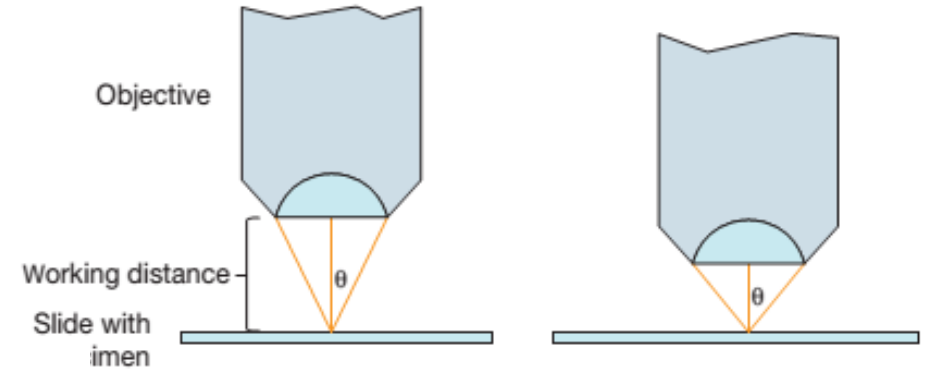
以自然光或可见光为光源，由发光光源聚光镜、物镜、目镜、载物台及支架构成。普通光镜就是明视野 (**bright-field**) 显微镜。

数值孔径 (numerical aperture) :  $NA = n \sin \theta$   
分辨力 (resolution) :

$$d = \frac{0.5\lambda}{n \sin \theta} \quad d = \frac{(0.5)(530 \text{ nm})}{1.25} = 212 \text{ nm or } 0.2 \mu\text{m}$$

肉眼的分辨力  $D$ : 能辨别的两点之间的最小距离. 约为 0.2mm.

物镜有效放大倍数上限:  $D/d = 1000$





由目镜和物镜的最佳组合同时添加香柏油，可产生上限为**1500**倍的有效放大倍数。

Table 2.2 The Properties of Microscope Objectives

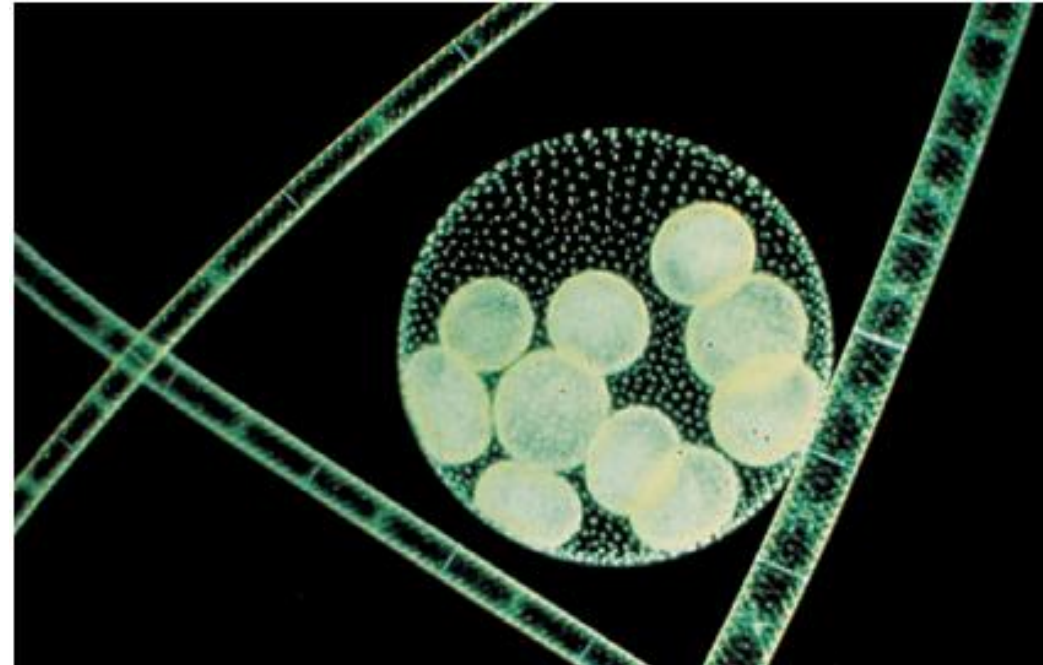
Property	Objective			
	Scanning	Low Power	High Power	Oil Immersion
Magnification	4×	10×	40–45×	90–100×
Numerical aperture	0.10	0.25	0.55–0.65	1.25–1.4
Approximate focal length ( <i>f</i> )	40 mm	16 mm	4 mm	1.8–2.0 mm
Working distance	17–20 mm	4–8 mm	0.5–0.7 mm	0.1 mm
Approximate resolving power with light of 450 nm (blue light)	2.3 μm	0.9 μm	0.35 μm	0.18 μm



## 暗视野下的微生物



(a) *T. pallidum*: dark-field microscopy



(b) *Volvox* and *Spirogyra*: dark-field microscopy

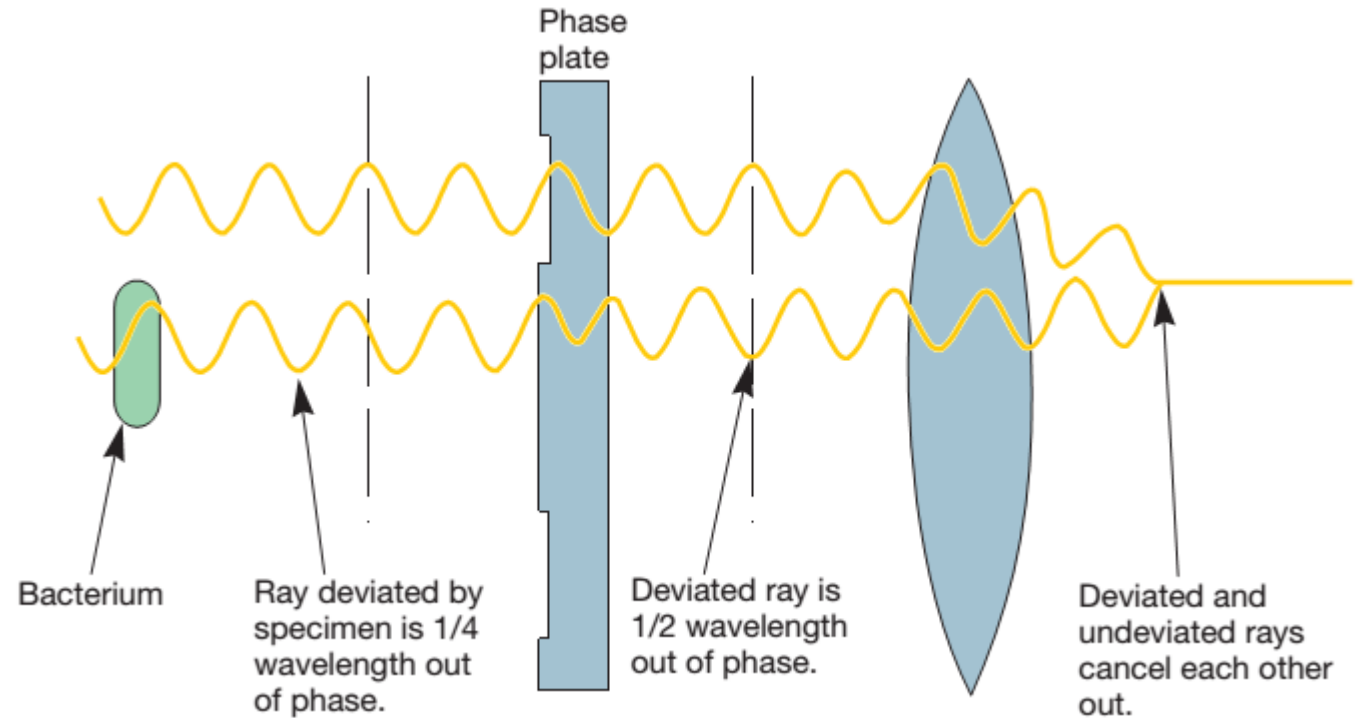




## 相差显微镜 (The Phase-Contrast Microscope)

光线穿过不同的物质和不同密度的样品时，由于折射率的不同，光线产生光程差，即相位差。而这种不同肉眼不能辨别。而通过调整相位差的信号并将其放大到肉眼能够辨别的水平，由于样品的结构的不同将产生明暗对比大的效果，如同样品经过染色一样，方便观察。相差显微镜解决了无需染色便能方便观察细胞样品的问题。

相差显微镜特别方便观察活的细胞，如细胞的运动、芽孢、吞噬和细胞内部的颗粒物。



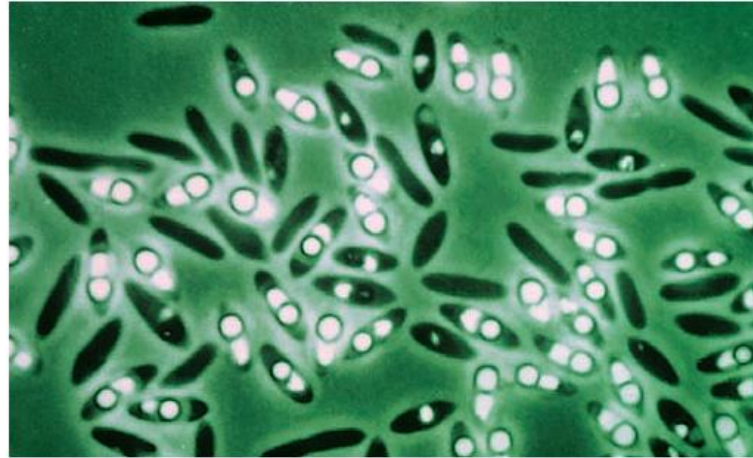


## 相差显微镜下的微生物



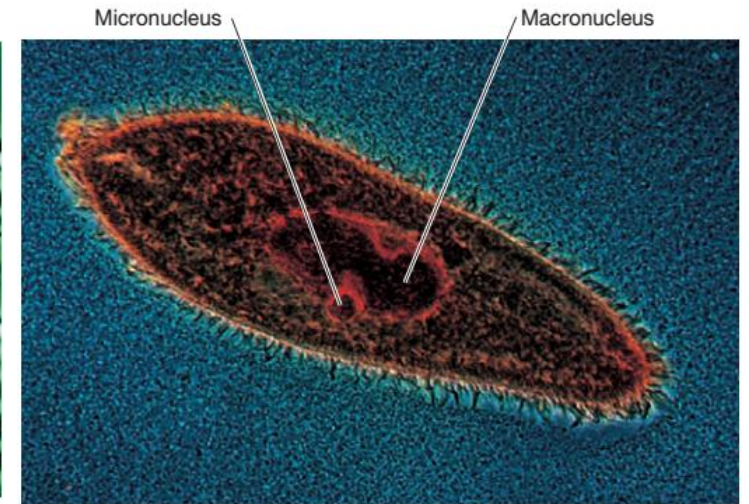
(c) *Pseudomonas*: phase-contrast microscopy

假单胞菌



(d) *Desulfotomaculum*: phase-contrast microscopy

脱硫杆菌



(e) *Paramecium*: phase-contrast microscopy

草履虫

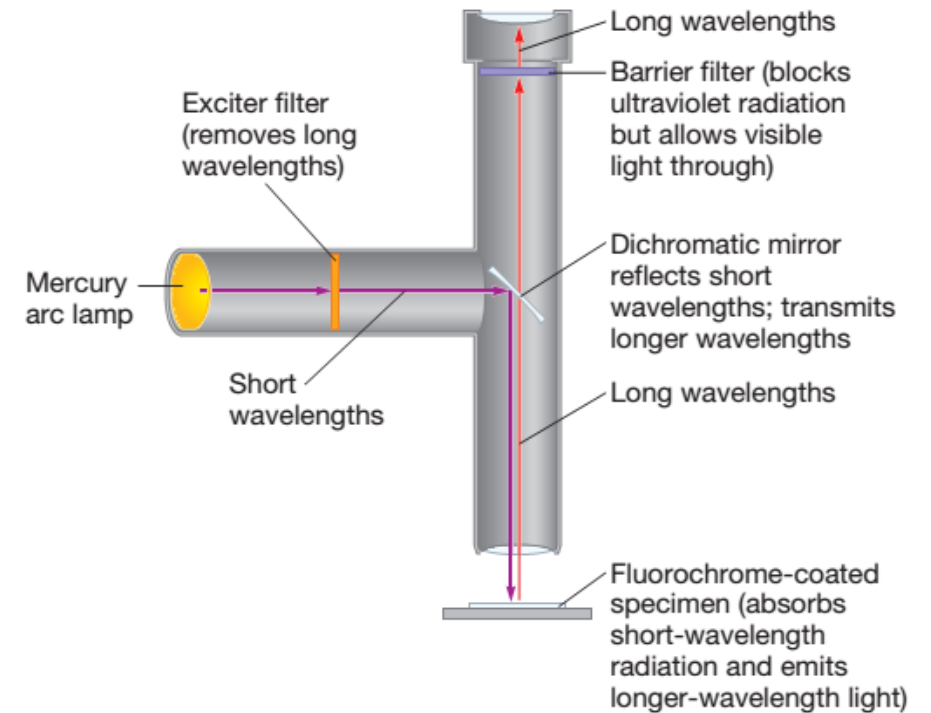


## 荧光显微镜 (The Fluorescence Microscope)

有些物质经激光照射后，能发出荧光，这种物质称为荧光物质。照射激光称为激发光，发射光称为荧光。

激发光波长短，频率高，能量高；而荧光波长长，频率低，能量低。

荧光显微镜通常观察荧光物质标记的细胞样本。荧光物质集中在细胞表面或内部，能够作为示踪的信号，来研究物质在细胞中的定位，在医学微生物学的必备工具。如绿观察色荧光蛋白GFP在细胞中的位置，荧光标记抗体与细胞表面的结合，荧光标记的探针信号等。也能观察进行光合作用的细胞，由于光合色素也是荧光物质。

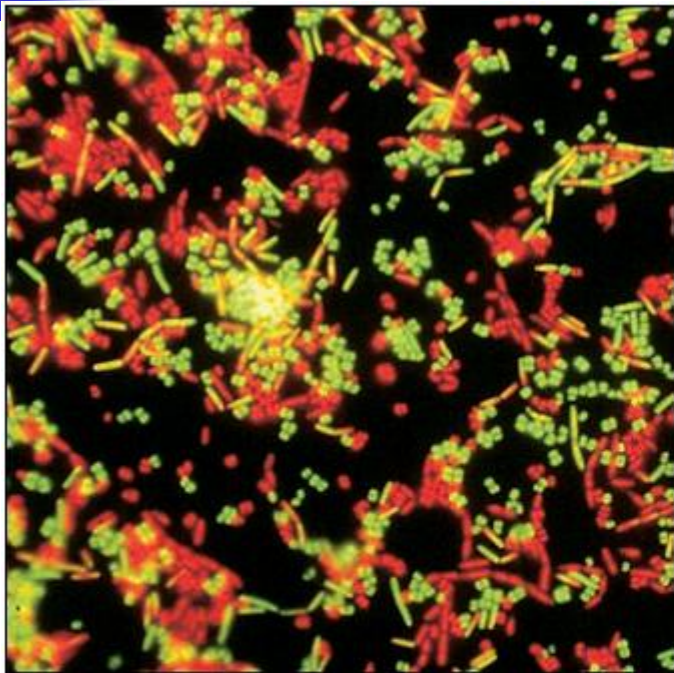


**Figure 2.12 Epifluorescence Microscopy.** The principles of operation of an epifluorescence microscope.



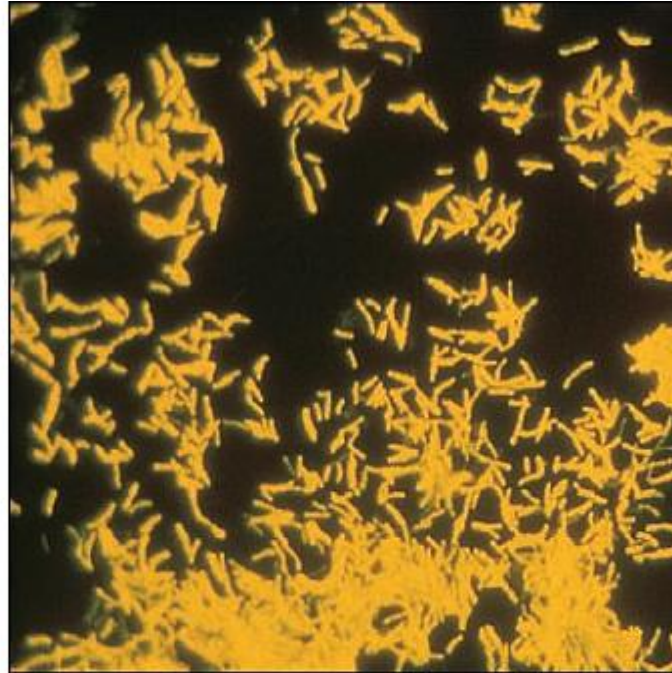


## 荧光显微镜下的细胞



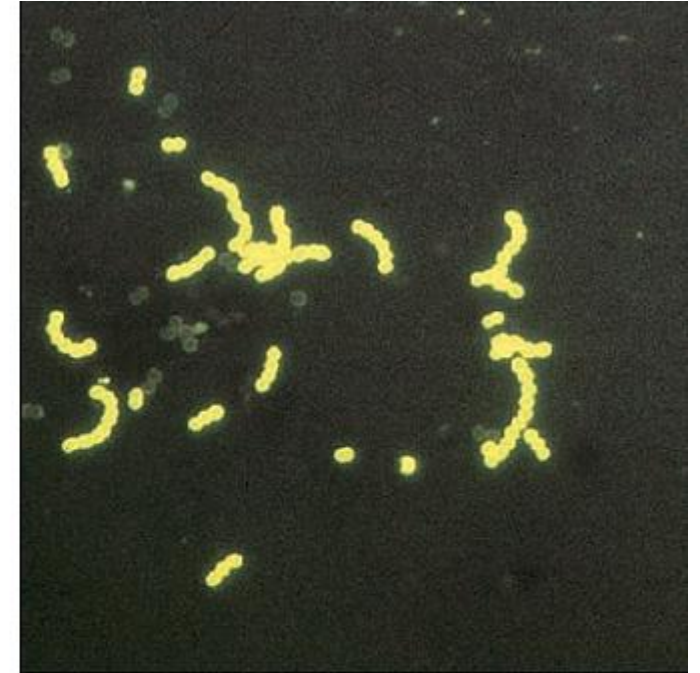
(a)

10  $\mu\text{m}$



(b)

10  $\mu\text{m}$



(c)

10  $\mu\text{m}$

**Figure 2.13 Fluorescent Dyes and Tags.** (a) Dyes that cause live cells to fluoresce green and dead ones red; (b) Auramine is used to stain *Mycobacterium* species in a modification of the acid-fast technique; (c) Fluorescent antibodies tag specific molecules. In this case, the antibody binds to a molecule that is unique to *Streptococcus pyogenes*.



# 电子显微镜 (electron microscope)

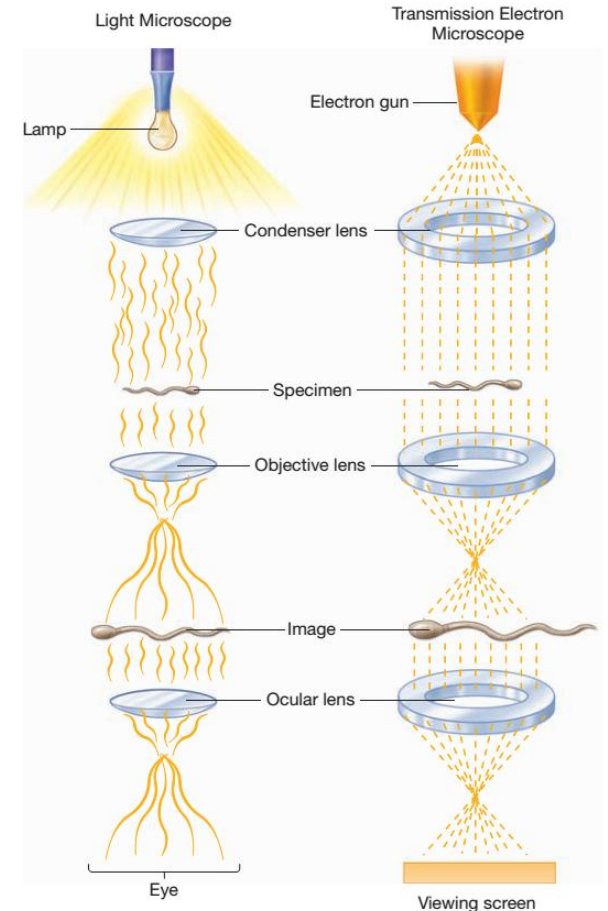
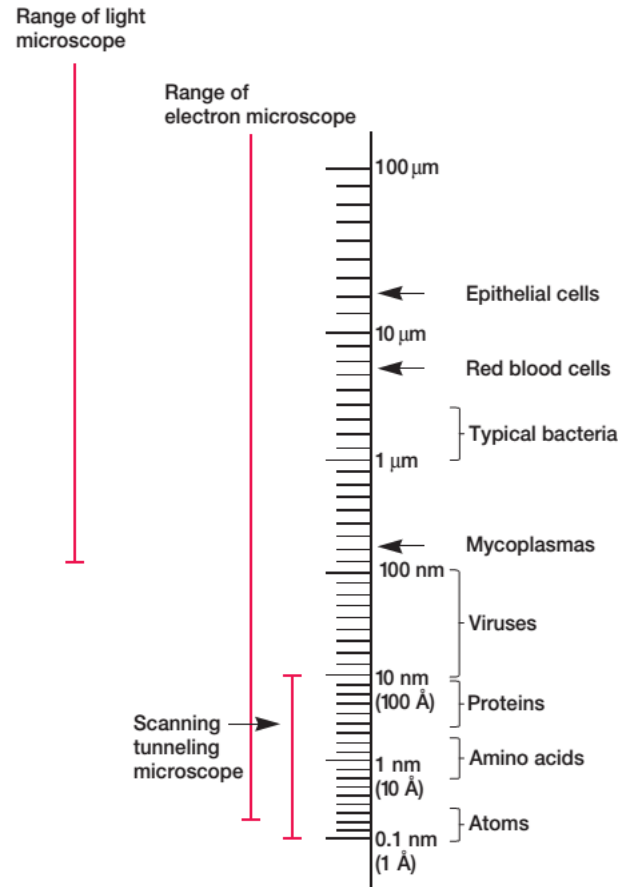
电子显微镜由真空室、电子枪、电磁透镜、成像设备和进样装置构成。

分为透射电镜 (transmission electron microscope) 和扫描电镜 (scanning electron microscope)

光源为电子束，所以波长  $\geq 0.005\text{nm}$ ，所以放大倍数高，分辨率高，可以观察病毒和亚细胞结构。

电镜的样品制备复杂，尤其是透射电镜，可能产生赝像 (artifacts)。

电镜照片都是黑白图像。





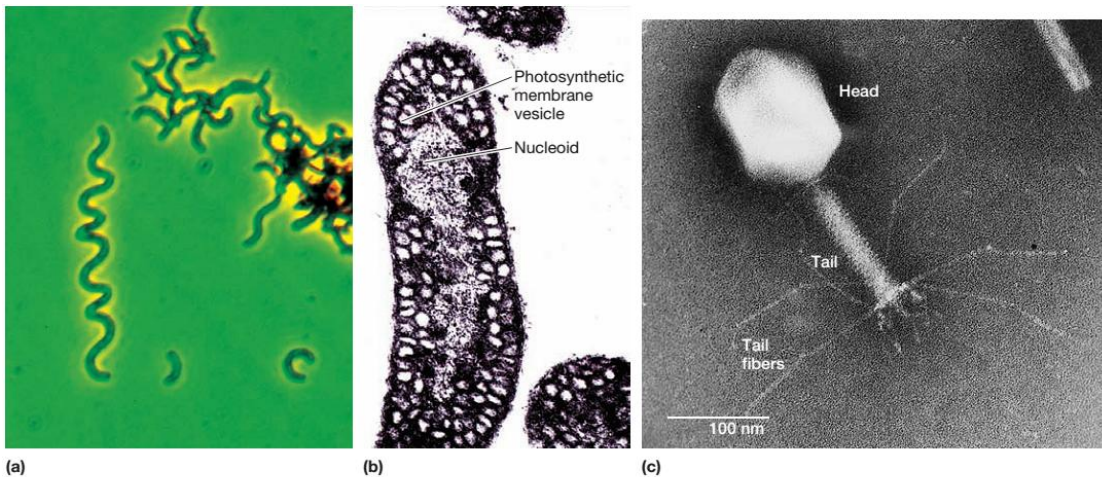


# 透射电镜 ( transmission electron microscope )

样品制备比较复杂。

负染技术 ( negative stain technique )

投影技术 ( shadowing technique )



**Figure 2.17 Light and Electron Microscopy.** A comparison of light and electron microscopic resolution. (a) *Rhodospirillum rubrum* in phase-contrast light microscope ( $\times 600$ ). (b) A thin section of *R. rubrum* in transmission electron microscope ( $\times 100,000$ ). (c) A transmission electron micrograph of a negatively stained T4 bacteriophage.

固定：钨酸或戊二醛

脱水：丙酮或乙醇

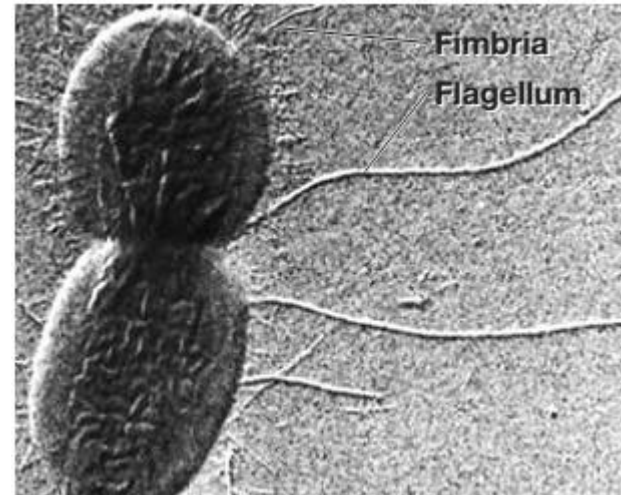
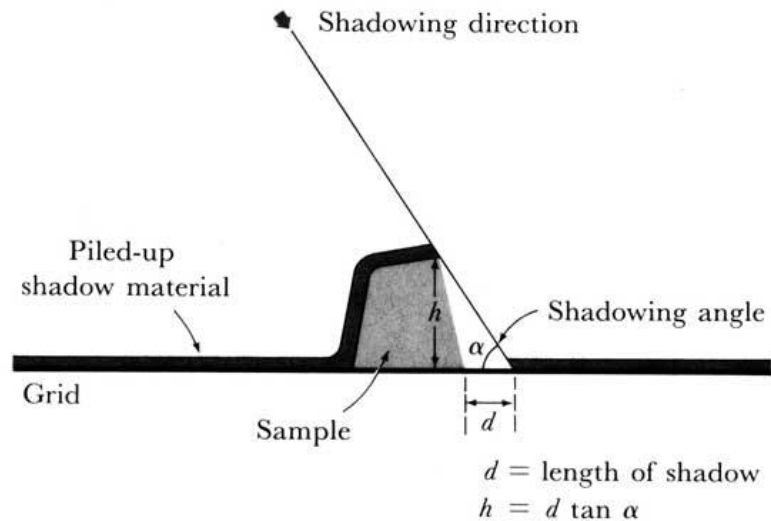
包埋：环氧塑料

切片：20-100nm

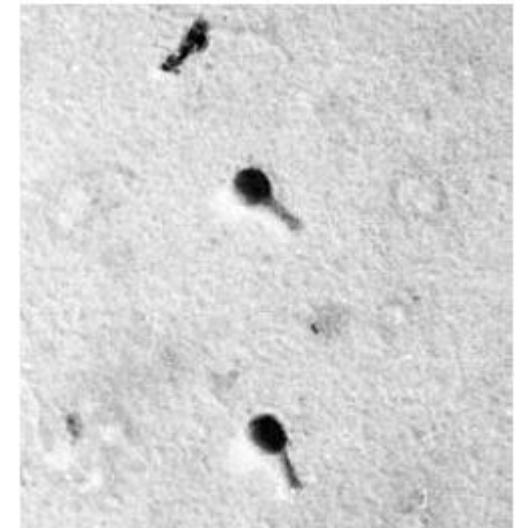
染色：柠檬酸铅或钨酸



负染技术：将超薄切片放在含有磷钨酸的薄膜上观察，样品明亮而背景暗淡；  
造影技术：将碳粉和铂粉蒸汽以45度角喷向样品然后观察。



(a) *P. mirabilis*

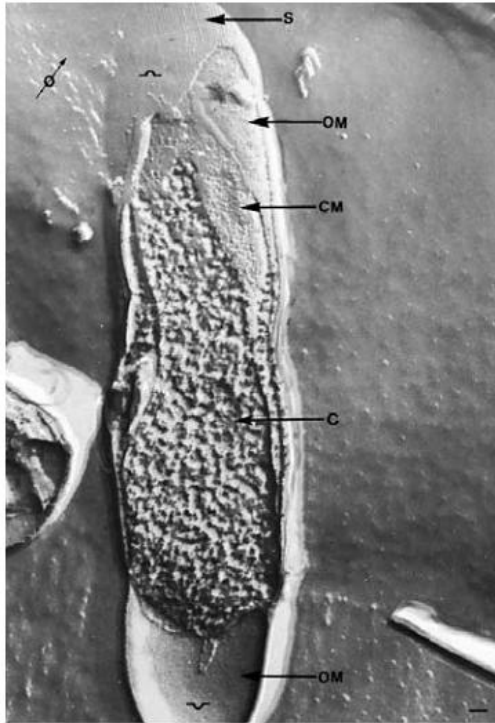


(b) T4 coliphage

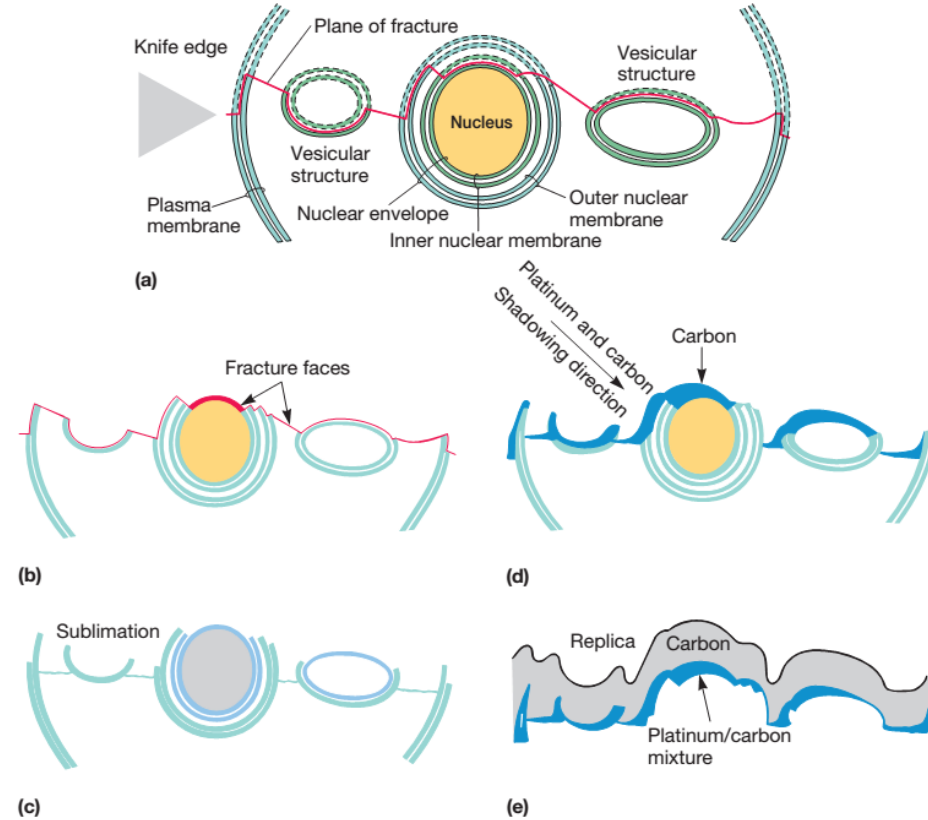




# 冰冻蚀刻技术 ( The Freeze-Etching Technique. )



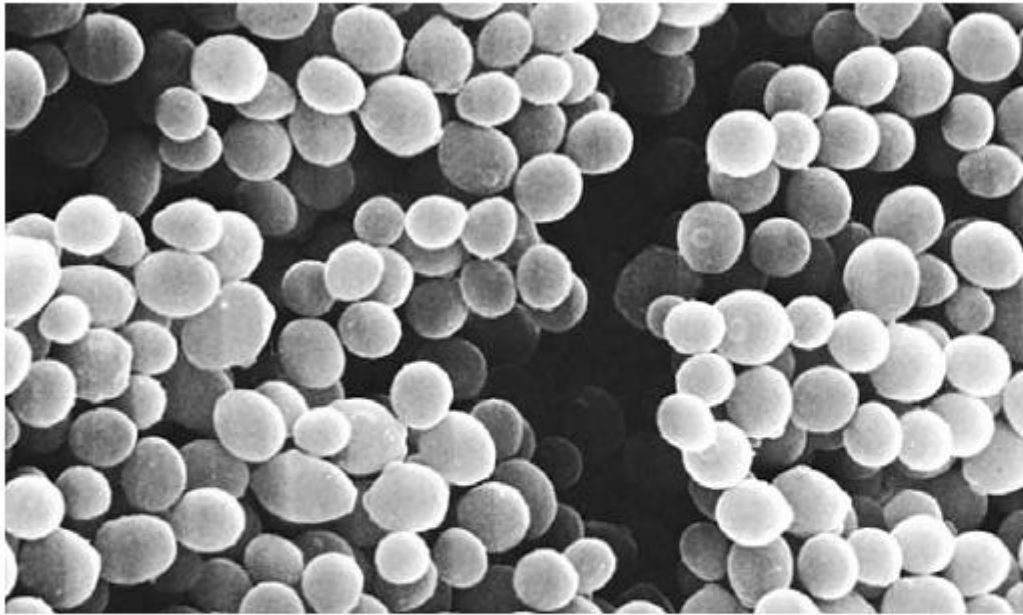
**Figure 2.22** Example of Freeze-Etching. A freeze-etched preparation of the bacterium *Thiobacillus kabobis*. Note the differences in structure between the outer surface, S; the outer membrane of the cell wall, OM; the cytoplasmic membrane, CM; and the cytoplasm, C. Bar = 0.1 μm.



**Figure 2.21** The Freeze-Etching Technique. In steps (a) and (b), a frozen eucaryotic cell is fractured with a cold knife. Etching by sublimation is depicted in (c). Shadowing with platinum plus carbon and replica formation are shown in (d) and (e). See text for details.



## 扫描电镜照片



(a) *S. aureus*

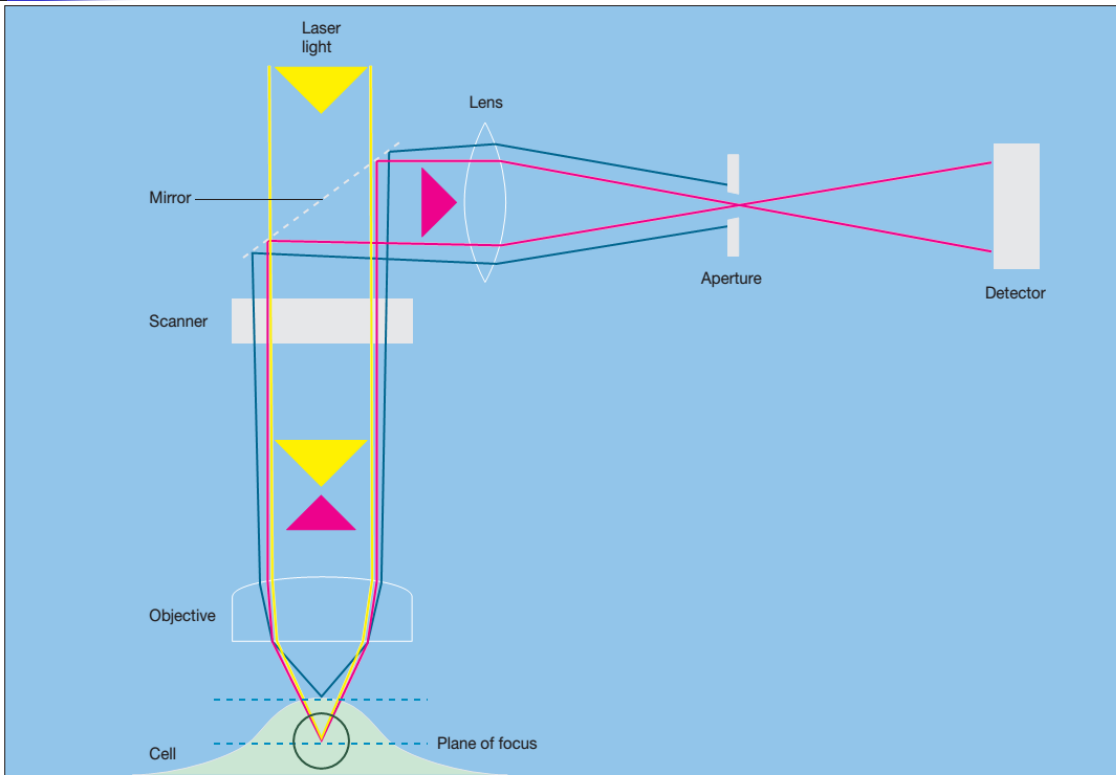


(b) *Cristispira*

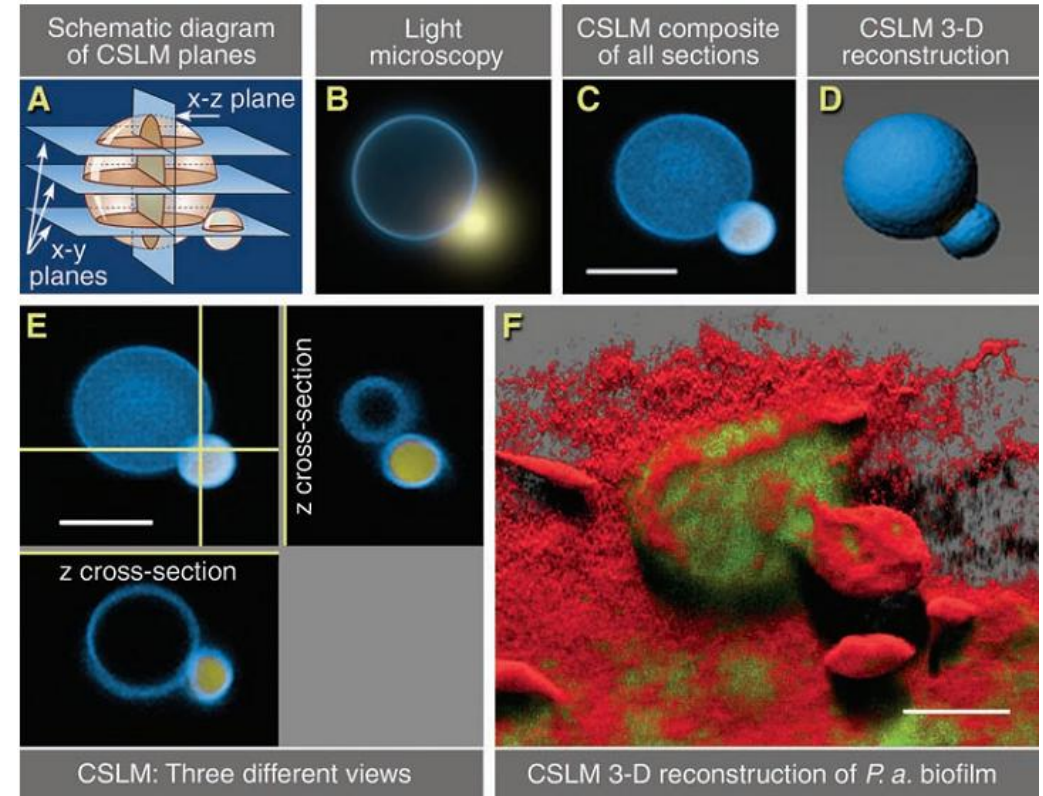
**Figure 2.24 Scanning Electron Micrographs of Bacteria.** (a) *Staphylococcus aureus* ( $\times 32,000$ ). (b) *Cristispira*, a spirochete from the crystalline style of the oyster, *Ostrea virginica*. The axial fibrils or periplasmic flagella are visible around the protoplasmic cylinder ( $\times 6,000$ ).



# 激光扫描共聚焦显微镜 (confocal scanning laser microscope)



**Figure 2.26** A Ray Diagram of a Confocal Laser Scanning Microscope. The yellow lines represent laser light used for illumination. Red lines symbolize the light arising from the plane of focus, and the blue lines stand for light from parts of the specimen above and below the focal plane. See text for explanation.



样品需要荧光染色, 特别方便观察生物膜 (biofilm) !



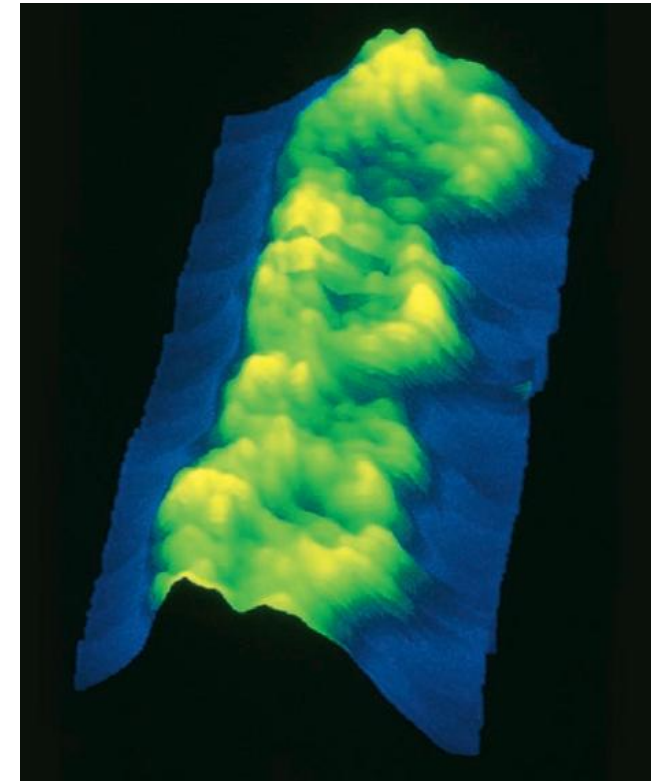
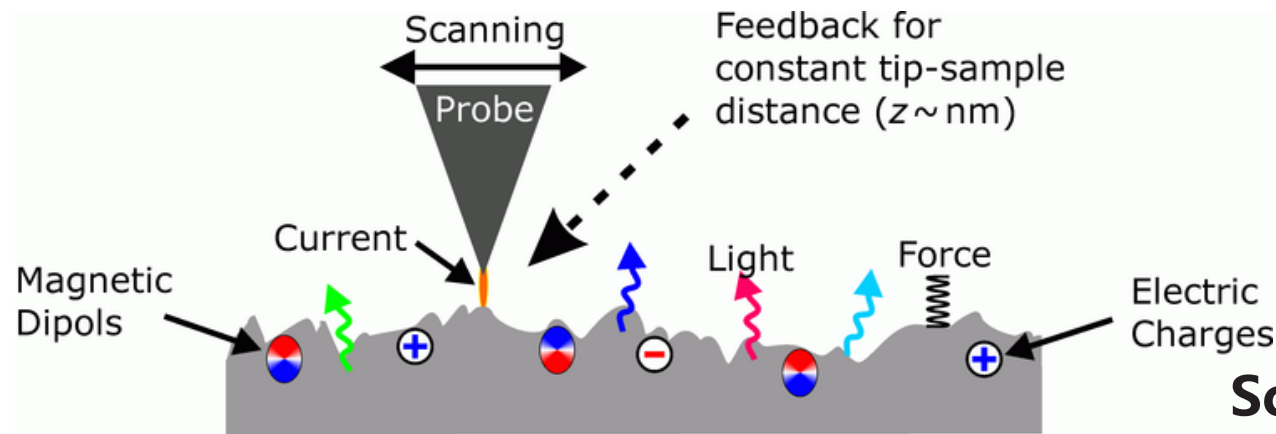


# 扫描探针显微镜 (scanning probe microscope)

极尖锐的探针（针尖只有一个原子大小）保持一定的距离在样品上方移动时，针尖与样品之间会产生电流，电流的大小与样品表面的结构相关，电流信号转化为图像信号，就可获得样品表面的观察。

放大倍数可达**100,000,000**倍，可直接观察**DNA**等。

原子力显微镜的原理与扫描探针显微镜类似

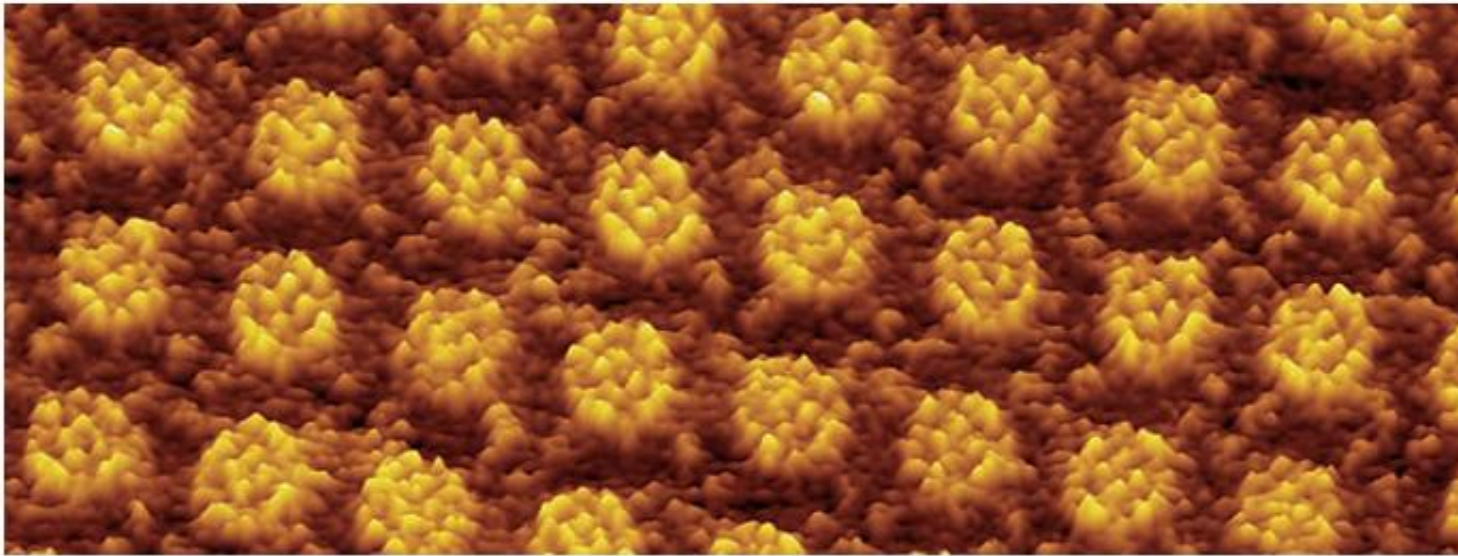


Scanning Tunneling Microscopy of DNA

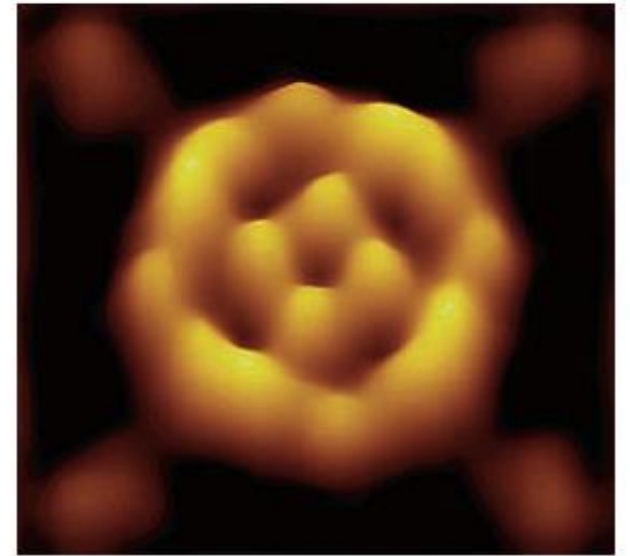




## 原子力显微镜下的膜蛋白图像



(a)



(b)

**Figure 2.29 The Membrane Protein Aquaporin Visualized by Atomic Force Microscopy.** Aquaporin is a membrane-spanning protein that allows water to move across the membrane. **(a)** Each circular structure represents the surface view of a single aquaporin protein. **(b)** A single aquaporin molecule observed in more detail and at higher magnification.



## 光镜的样品的制备和染色 (preparation and staining of sample)

生物样品可直接观察，但通常进行染色才能提高背景与样本之间的反差、突出结构特征，提高观察效果。

样本的制备、染色和观察

固定

- 杀死细菌并使之黏附于载玻片上
- 增加对染料的亲和力

染色

- 简单染色：单一染料一步染色
- 复合染色：一种以上的染料多步染色

观察

- 先用低倍镜找到目标
- 再用高倍镜或油镜观察



## 染料知识

染料通常有发色团（**chromophore groups**）：含有共轭结构的基团,如苯环结构。

功能：产生颜色；与样本有较高的亲和力。

碱性染料：甲基蓝（**methylene blue**），碱性品红（**basic fuchsin**），结晶紫（**crystal violet**），番红（**safranin**），碱性孔雀绿（**malachite green**）。碱性染料带正电通常结合带负电的样品，如DNA，蛋白和原核细胞表面，属于正染。

酸性染料：曙红（**eosin**）、酸性品红（**acid fuchsin**），孟加拉玫瑰红（**rose bengal**）。酸性染料带负电通常结合带正电的细胞物质。



## 染色方法

**简单染色(simple staining):** 用一种染料完成染色。分为正染, 如结晶紫染色细胞, 鞭毛染色, 芽孢染色; 负染, 如印度墨水荚膜染色。

**复合染色(differential staining):** 两种以上染料染色, 革兰氏染色 (**Gram staining**) 为代表。

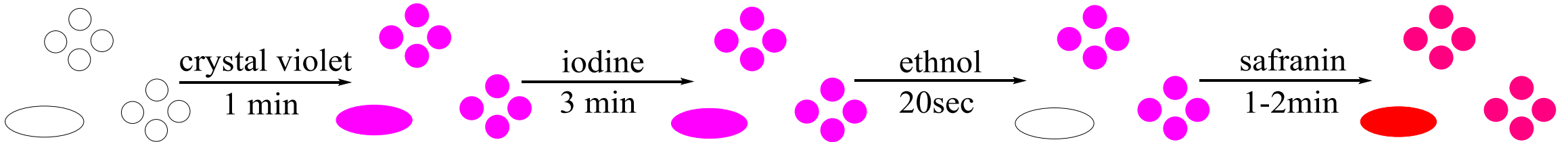
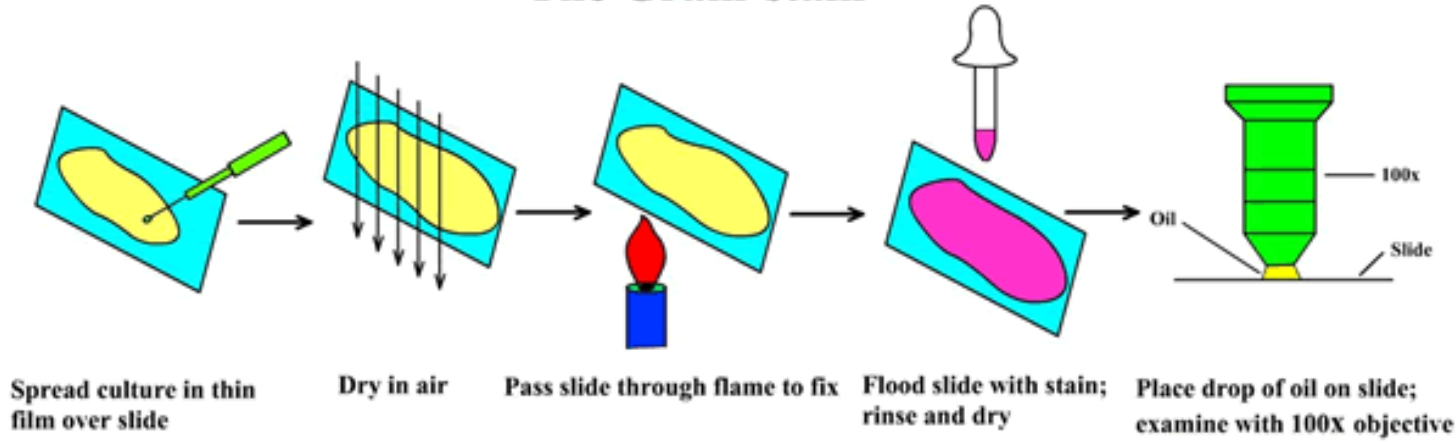
**抗酸染色 (acid-fast staining) :** 主要鉴定结核分枝杆菌、麻风杆菌等细胞壁含有大量脂类的细菌。石炭酸番红在加热染色**3-5**分钟后, 用盐酸-乙醇溶液脱色**30**秒-**1**分钟后, 再用碱性美兰负染 (对比染色) 后观察。





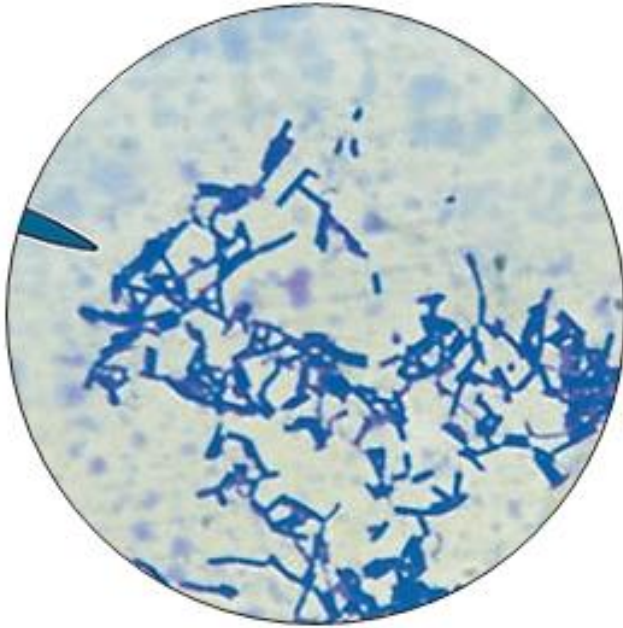
# 革兰氏染色:

## The Gram-stain



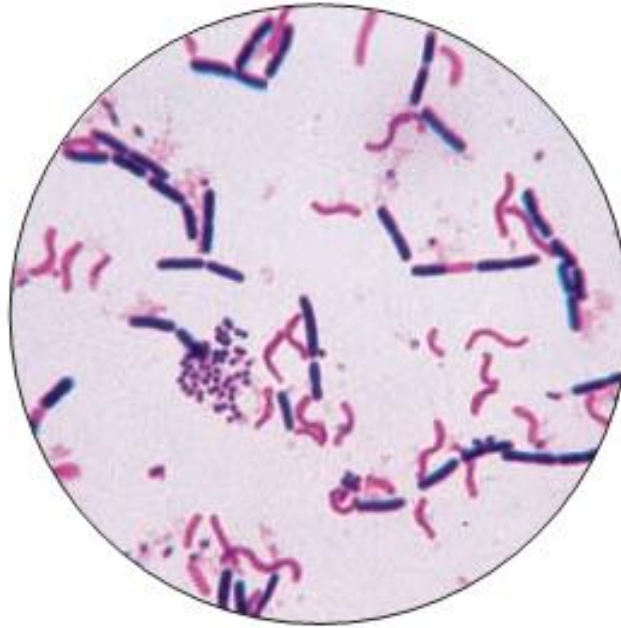


Simple Stains



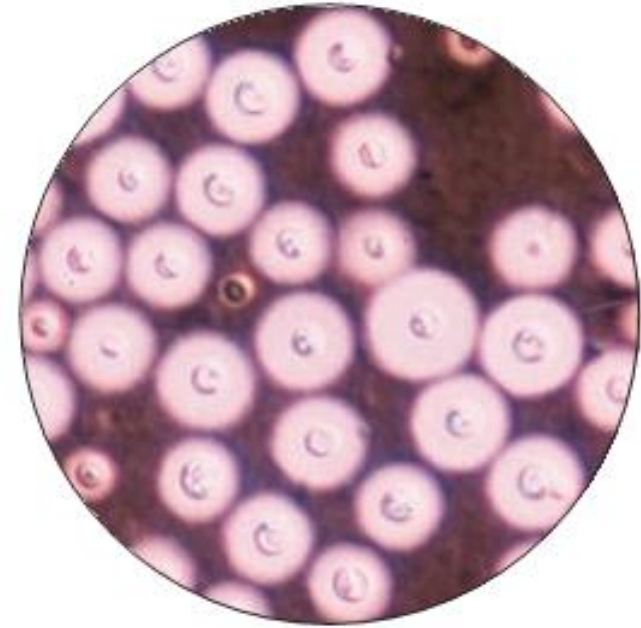
(a) Crystal violet stain of *Escherichia coli*

Differential Stains

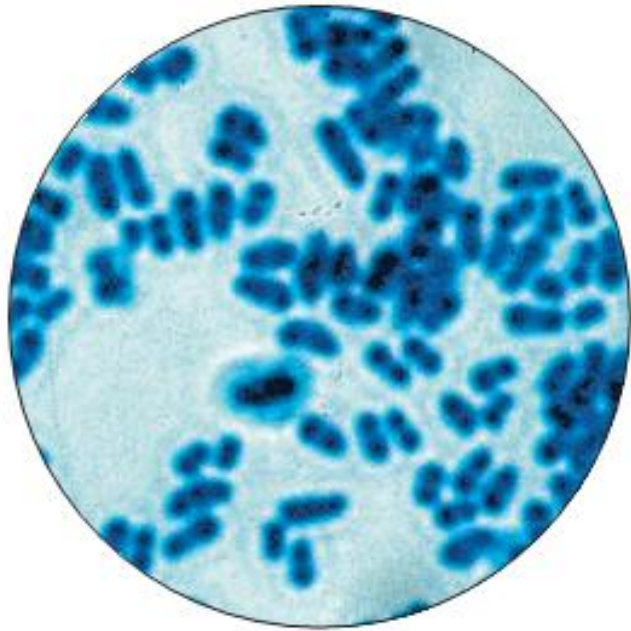


(c) Gram stain  
Purple cells are gram positive.  
Red cells are gram negative.

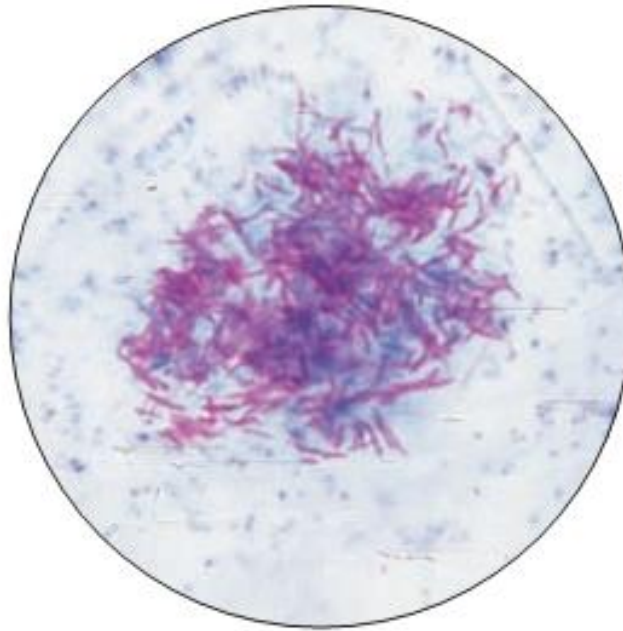
Special Stains



(f) India ink capsule stain of *Cryptococcus neoformans*



**(b)** Methylene blue stain  
of *Corynebacterium*



**(d)** Acid-fast stain  
Red cells are acid-fast.  
Blue cells are non-acid-fast.



**(g)** Flagellar stain of *Proteus vulgaris*.  
A basic stain was used to  
build up the flagella.



## Key Terms

acidic dyes 26  
acid-fast staining 26  
atomic force microscope 36  
basic dyes 26  
bright-field microscope 18  
capsule staining 26  
chemical fixation 26  
chromophore groups 26  
confocal scanning laser microscope (CSLM) 34  
dark-field microscope 21  
differential interference contrast (DIC) microscope 23

differential staining 26  
endospore staining 26  
eyepieces 18  
fixation 25  
flagella staining 28  
fluorescence microscope 23  
fluorescent light 23  
fluorochromes 24  
focal length 18  
focal point 18  
freeze-etching 30

Gram stain 26  
heat fixation 25  
mordant 26  
negative staining 26  
numerical aperture 19  
objective lenses 18  
ocular lenses 18  
parfocal 18  
phase-contrast microscope 21  
refraction 17  
refractive index 17

resolution 18  
scanning electron microscope (SEM) 30  
scanning probe microscope 35  
scanning tunneling microscope 35  
shadowing 29  
simple staining 26  
substage condenser 18  
transmission electron microscope (TEM) 29  
working distance 20





Thanks for your  
attention!

