

第二章 微生物的纯培养和显微技术

第二章 微生物的纯培养和显微技术

第一节 微生物的纯种分离和纯培养


微生物菌种是宝贵的天然资源
用微生物纯种进行基础研究、开发应用和菌种保藏
生境中多种微生物混杂群居
如何从混杂微生物中分离纯种是重要的基本功

一、用营养琼脂平板分离纯种

微生物纯种分离
将多种混杂微生物，经某种技术或方法分离成纯种的过程。


纯培养 (pure culture)
在适宜条件下培养纯种获得的培养物 (群体)

菌落 (colony)
单个微生物在适宜的营养琼脂平板表面或内部生长、繁殖到一定程度，形成的肉眼可见、有一定形态结构的子细胞生长群体。



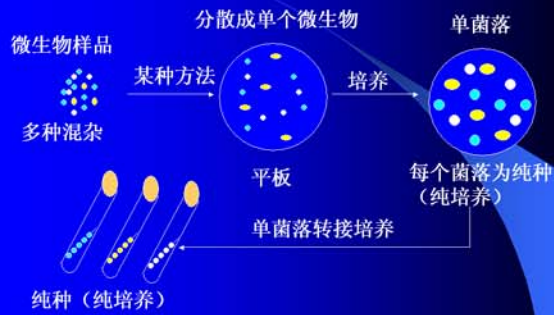
形态	点状	圆形	丝状	不规则	假根状	纺锤形
隆起	扁平	拱起	凸透镜状	枕状	乳头状	
边缘	完整	波状	裂叶状	锯齿状	丝状	卷曲

大小、形状 (圆形, 假根状, 不规则状)
表面特征 (光滑, 皱缩, 颗粒状, 龟裂状, 同心圆状)
隆起形状 (扩展, 台状, 凹面, 凸面, 乳头状)
边缘情况 (整齐, 波状, 裂叶状, 锯齿状)
表面光泽 (无光泽, 金属光泽, 闪光)
质地 (油脂状, 膜状, 粘脆)
颜色、透明度



一个菌落是一个纯种，也是一个纯培养；
单个微生物只在固体培养基上形成菌落；
在液体培养基中不会形成菌落。

1、微生物纯种分离的原理和方法

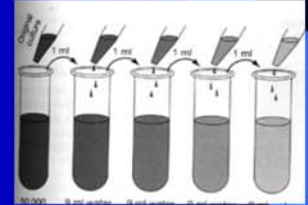


2、纯种平板分离的不同方法

从土壤中分离细菌纯种:

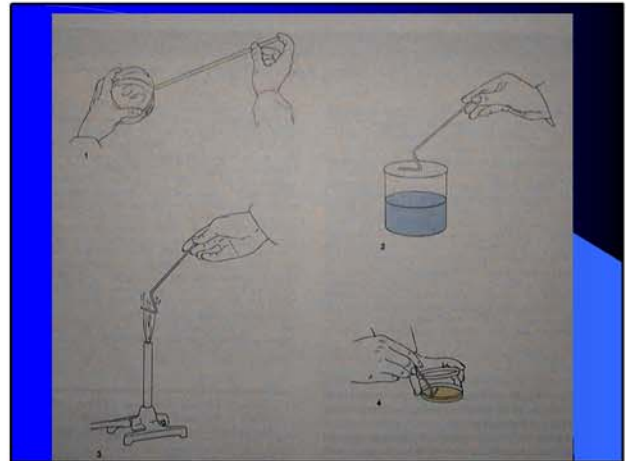
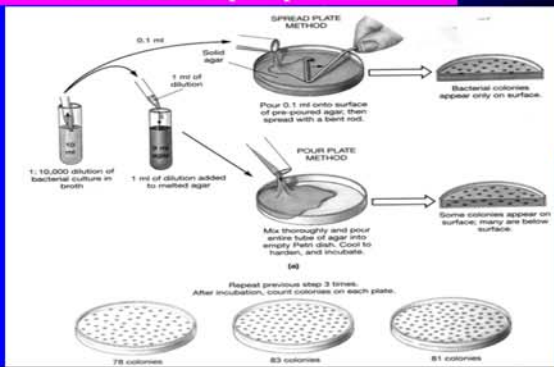


试管10倍稀释图

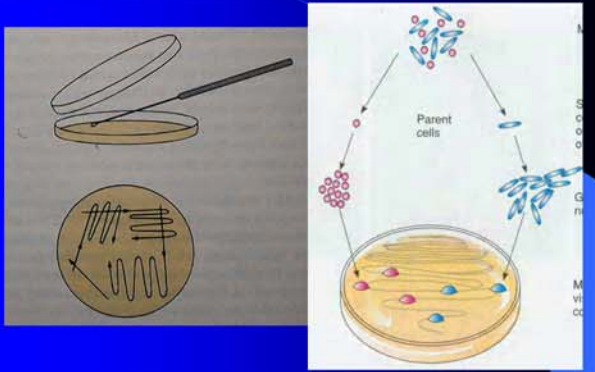


(1) 涂布平板法 (spread plate method)

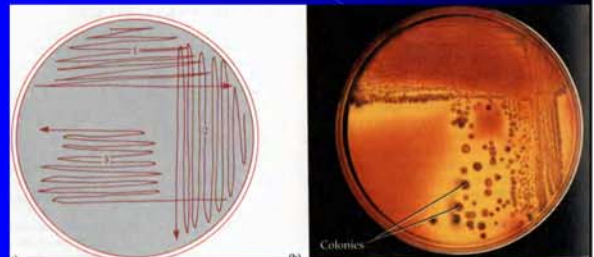
(2) 稀释倒平板法 (pour plate method)



(3) 平板划线法 (streak plate method)



蛇形线法操作图



平行线法操作图

“在平板表面长出的菌落是需氧菌”

(4) 厌氧菌的纯种分离

厌氧培养箱

将如上平板放在厌氧罐内培养

二、用液体培养基分离纯培养

个别细胞较大细菌
原生动物、藻类 } 营养琼脂平板不能长菌落

如何分离纯培养?

接种物液体培养基顺序稀释法分离

培养物在液体培养基中进行高度顺序稀释，如果稀释后的同一稀释度的大多数（95%以上）试管中没有微生物生长，有微生物生长的试管得到的培养物可能就是纯培养物。

同一稀释度 20支

↓ 培养

生长者为纯培养物

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%**

三、单细胞（孢子）分离

营养琼脂平板不能形成菌落的微生物
解剖显微镜下用吸管挑选单细胞（孢子）
显微镜下用显微操作仪挑选单细胞（孢子）
操作难度与单细胞（孢子）大小成反比

四、选择培养分离

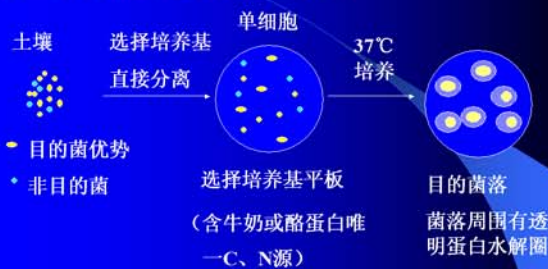
- 原理**
- 创造适于目的微生物生长条件
 - 促使目的微生物快速生长成优势菌
 - 抑制非目的微生物生长
 - 从混杂微生物中选择分离目的微生物

1、利用选择培养基直接分离目的微生物

选择培养基 (selective medium)

只允许特定微生物生长，而同时抑制或阻止其它微生物生长的培养基。

例一：分离筛选蛋白酶产生细菌

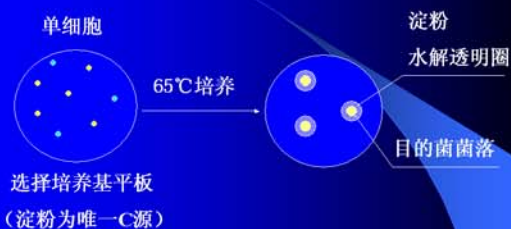


含牛奶选择培养基目的菌生长平板

营养选择因子：牛奶或酪蛋白

只允许分解利用蛋白质的目的菌生长，淘汰非目的菌
长出的目的菌并不一定是同种细菌，但皆产蛋白酶

例二：分离筛选产高温淀粉酶（65°C）细菌



**选择因子：营养选择因子淀粉
环境选择因子65°C 高温**

2、富集培养

当待分离样品中目的微生物数量少时，创造目的微生物特定生长条件，使其数量增加，再进行有效分离的技术。

富集培养是分离微生物菌种最强有力的技术之一

营养选择因子和生理条件选择因子可无穷尽组合，可从自然界选择分离各类特异微生物

例：从土壤中分离能降解利用对羟基苯甲酸的细菌

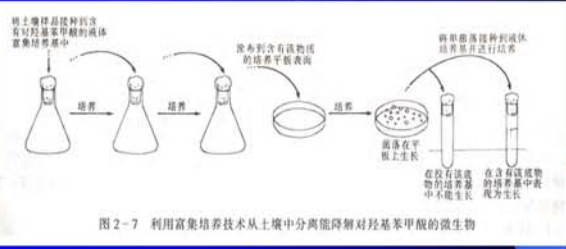


图 2-7 利用富集培养技术从土壤中分离能降解对羟基苯甲酸的微生物

富集培养

选择培养基分离

目的菌验证

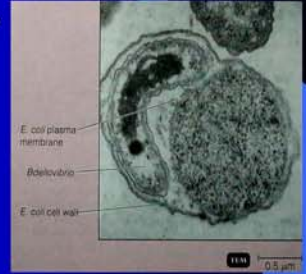
五、二元培养物

培养物中只含有两种微生物，而且是有意识的保持二者之间特定关系的培养物。

如：

病毒和宿主细胞 (*T₄*和*E.coli*)
纤毛虫、变形虫和粘细菌

蛭弧菌专性寄生于*E.coli*



六、无菌技术 (aseptic technique)

分离纯种、转接纯种、纯种培养过程中为保持纯种的“纯洁”性而防止其它微生物污染的技术。

- ▲ 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；

1、所用物品的灭菌技术



A、玻璃或金属器皿灭菌

干热灭菌：干燥箱
160-170 °C 干热空气2h灭菌



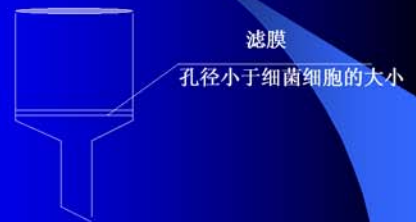
B、培养基或溶液灭菌

湿热灭菌：高压蒸汽灭菌锅
121 °C 热蒸汽灭菌30min



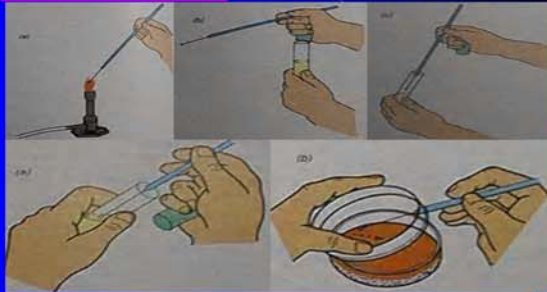
C、血清或生长因子溶液灭菌

过滤除菌：细菌滤器



2、无菌操作

A、火焰旁无菌操作



B、超净工作台无菌操作



C、无菌室

UV杀菌、超净工作台火焰区操作。



“树立无菌意识，规范无菌操作、保证纯种培养”

第二节 显微镜和显微技术

光学显微镜和电子显微镜是研究微生物形态和结构的主要工具。

几个基本概念：

放大倍数： 被观察物越小，放大倍数应越大

分辨率： 能辨别两点之间最小距离的能力

反差（色差）： 被观察物区别于背景的程度

被观察物观察的效果，除与显微镜自身特点有关外，还取决于对显微镜的正确使用技术以及良好的标本制作和观察技术，统称显微技术。

一、光学显微镜的种类及原理

1、普通光学显微镜

一般配置的最大放大倍数是多少？为什么？
如何实现一般配置的最大放大倍数？其原理？

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

其中：
 λ ：可见光波长
 n ：玻片与物镜间介质的折射率
 θ ：物镜镜口角的半数
 $n \sin \theta$ 为物镜的数值口径值

提高普通光学显微镜分辨率的技术措施：

使用波长较短的可见光（450nm的蓝光）；
使用油浸物镜（香柏油 n 为1.52最大，镜口角 θ 最大，数值口径最大）

增大反差（色差）的技术措施：

对微生物细胞或特殊结构染色

普通显微镜的物镜特征表:

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)	40mm	16mm	4mm	1.8-2.0mm
工作距离	17-20mm	4-8mm	0.5-0.7mm	0.1mm
450nm 光源 (蓝光) 时的分辨率	23 μm	0.9 μm	0.35 μm	0.18 μm

2、特殊功能的光学显微镜

名称	光源	特殊装置	视野	样品处理与观察	应用
普通光学镜	可见光		亮	染色、清晰	形态结构观察
暗视野镜	可见光	特殊聚光器	暗	不染色, 清晰	活细菌运动性观察
相差镜	可见光	环状光阑, 相差板	亮	不染色, 清晰	活细菌运动或微细结构
荧光镜	短波光	滤光片	暗	标记荧光素, 发荧光	免疫学, 环境微生物

特殊聚光器

光透射样品后, 不直接进入物镜, 暗视野光经样品反射或折射后进物镜成像
暗视野增大了背景和样品像的反差 (色差)

环状光阑, 相差板

微生物细胞不同部位光折射率、厚度、密度不同, 光透射后出现光程变化, 产生相位差。

相位差经环状光阑, 相差板处理, 转变成细胞像的明暗差。细胞像明暗差增大了与亮视野的反差 (色差)。

二、电子显微镜的种类及原理

1、透射电镜

(transmission electron microscope, TEM)

电磁波作“光源”

高速电子透射样品, 电子束通过电磁场产生偏转、汇集或发散等复杂的螺旋式运动, 聚集成像。

电磁波波长短, 分辨率高: 光学显微镜 μm 级, 电镜 nm 级。

电镜放大倍数几千倍到百万倍

2、扫描电镜

(scanning electron microscope, SEM)

电子束做电子探针在样品表面激发出二次电子, 二次电子产生的多少与样品表面立体形貌有关。对二次电子处理, 在荧光屏呈现放大样品立体图像。主要用于观察微生物的表面结构。

三、显微镜观察样品的制备

- 1、光学显微镜制样
- 2、电子显微镜制样

思考题

利用选择培养基如何筛选:

- (1) 抗链霉素 (str) 细菌?
- (2) 降解利用尿素的细菌?
- (3) 分解利用纤维素的细菌?

利用富集培养和选择培养如何分离:

- (1) 如何从土壤中分离筛选高温 (70℃) 解脲细菌?
- (2) 如何从污染废水中分离筛选苯胺降解细菌?