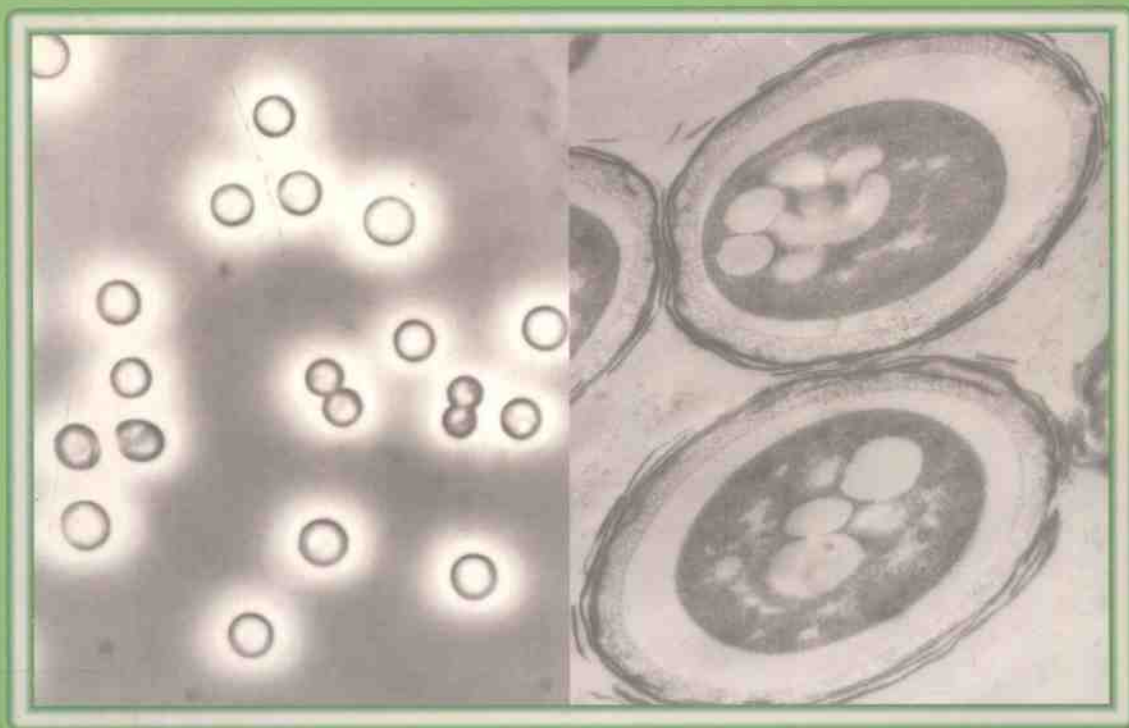


微生物顯微鏡學

Microscopy for Microorganisms

林良平 編著



藝軒圖書出版社

微生物顯微鏡學

Microscopy for Microorganisms

林良平 編著

藝軒圖書出版社

國家圖書館出版品預行編目資料

微生物顯微鏡學=Microscopy for Microorganisms/

林良平編著. --第一版.--臺北市：藝軒，

2002 印刷

面：公分。

ISBN 957-616-651-9 (平裝)

1. 生物學—技術 2. 電子顯微鏡

368.5

91002060

本書任何部份之文字或圖片，如未獲得本社書面同意，
不得以任何方式抄襲、節錄及翻印

新聞局出版事業登記證局版台業字第一六八七號

微生物顯微鏡學

(平裝) 特價新臺幣

元

編著者：林 良 平

發行所：藝軒圖書出版社

發行人：彭 賽 蓮

總公司：台北縣新店市寶高路 7 巷 1 號 5 樓

電話：(02)2918-2288

傳真：(02)2917-2266

網址：[//www.yihscient.com.tw](http://www.yihscient.com.tw)

E-mail: yihscient@ms17.hinet.net

總經銷：藝軒圖書文具有限公司

台北市羅斯福路三段 316 巷 3 號

(台大校門對面·捷運新店線公館站)

電話：(02)2367-6824

傳真：(02)2365-0346

郵政劃撥：0106292-8

台中門市

台中市北區五常街 178 號

(健行路 445 號宏總加州大樓)

電話：(04)2206-8119

傳真：(04)2206-8120

國際書局

台中市學士路 187 號

(中國醫藥學院附近)

電話：(04)2201-5386

大夫書局

高雄市三民區十全一路 107 號

(高雄醫學院正對面)

電話：(07)311-8228

本公司常年法律顧問／魏千峰、邱錦添律師

二〇〇二年四月第一版

ISBN 957-616-651-9

本書如有缺頁、破損或裝訂錯誤，請寄回本公司更換。

讀者訂購諮詢專線：(02) 2367-0122

序 文

この度、林教授から「微生物顕微鏡學」の序文を書く依頼を受けました。林教授に最初に逢ったのは何時だつたかあまりはつきりしないのですが、台灣を最初に訪ねたのは、私が1960年英國ケンブリッジ大學でのVisiting Research Professorshipの仕事を終えての歸途、臺灣警察捜査研究所にある電子顕微鏡運轉状況を視察の爲に立ち寄つた時であつたように思います。その時、若い白哲の研究者が遠慮深く流暢な日本語で話かけられたのが、當時大學の研究生である林教授であつたと思へます。英語、日本語を極めて流暢に語され、ほんの暫く話ただけでしたが、又専門分野が異なりましたが、學問研究に對して非常な熱意をもつておられる方であるという印象を受けました。

その後、私は1980年 IFSEM（國際電子顕微鏡學連合會）の委員に選出されました。そして1982年からは會長に4年間、副會長に4年間選ばれました。その頃にアジア太平洋地區に在住する科學者が、容易に國際會議に出席し研究發表ができる様にと、EUREM（歐洲地區電子顕微鏡學會）と肩を並べるAPEM（アジア太平洋電子顕微鏡學會）を發足させました。そしてこれをIFSEM創設時に、EUREMと同時に設立されて、活動を停止していたAOREM（アジア、オセアニア地區電子顕微鏡學會）を引き繼ぐものとなりました。そしてその會長職を2期8年間、副會長を4年間勤めました。この間、アジア、オセアニア地區の各國を頻繁に訪問し、電子顕微鏡學會設立上その活動の應援を行つてきました。この頃から林教授との接觸は數多くなり、同教授の人格に深くふれ、非常な努力家であることを確信しました。

又私はアジアの電顯學振興の手始めにと、日本—中國電子顕微鏡學會研究セミナーを1981年より2年おきに實施する事を中國電子顕微鏡學會會長と約束しました。更に、實施に努力を払つて來ました。そして第6回會議を日本岡山で實施した時には、臺灣からの研究者にも參加して頂くのがよいと考え、林教授を微生物學研究者の代表としてお招きしました。そしてこの機會を通じて同教授は日本の學者、研究者とも廣く接觸され、一層研贊されることになりました。

本書は、光學顯微鏡から電子顯微鏡の基本的概念に亘る数々の重要な事柄を、すべて網羅出来るように努められており、更に、後半では操作上に必要とされる事項をマニュアル一式に纏められております。林教授は日本語、英語共に熟達しておられ、各國の多くの書籍と資料をもとに、行き届いた説明を行つておられるように思います。

二十一世紀はナノメータの時代とになるだらうと言われています。「微の世界」に踏みこみ、多くの驚異に満ちた事柄を発見するのに、光學顯微鏡と電子顯微鏡による構造解析は欠くことの出来ないものであると思います。今後その重要性はますます高まつて行き、更に多くの利用面が開けて行くでしょう。本書の刊行が東南アジアの顯微鏡學の發展に役立ち、より多くの讀者がこの道に參入して、活發な研究成果を上げられるのに役立つことを願う次第であります。

橋本初次郎

中華民國顯微鏡學會名譽會員

大阪大學名譽教授

京都工藝纖維大學名譽教授

岡山理科學大學教授

2002 年 1 月

橋本序文

林良平譯

這次接受林教授之委託，來撰寫“微生物顯微鏡學”的序文。最初見到林教授的確實日期，已經記不起來了。僅記得可能是於 1960 年，我完成英國劍橋大學的訪問研究教授（Visiting Research Professorship）的工作以後的回途，順路去察看台灣省警務處刑警大隊鑑識科內之電子顯微鏡運轉情況的時候。該時有位很有禮貌斯文的研習員，很客氣地以流暢的日語向我打招呼，那位當時還是大學研究生的人，可能就是林教授。那時候我們的談話雖然很短促，可是在我的印象中，這位研究生雖然與我研究的領域不同，但是因為他的英語、日語都很流暢，所以能互相充分溝通，深感他對於學問的研究，具有非凡的熱情。

後來，於 1980 年我被選上 IFSEM（國際電子顯微鏡學聯合會）的委員，而從 1982 年起就擔任會長四年以及副會長四年，在這段期間，為了使亞細亞太平洋地區的科學家能夠順利地，在國際會議上發表研究報告，特開創與 EUREM（太平洋電子顯微鏡學會）並列的 APEM（亞細亞太平洋電子顯微鏡學會）。我當了該會會長 2 期共 8 年以及副會長 4 年。在這期間，我時常訪問亞細亞（Asia）、大洋州（Oceania）地區的國家從事援助電子顯微鏡學會的設立。從此以後和林教授的接觸就增多了，而且深深地感覺到他的為人，同時確認到他是非常勤勞的研究者。

為了亞細亞電子顯微鏡學的振興，我跟中國（大陸）電子顯微鏡學會會長約定每 2 年要實施一次，日本-中國電子顯微鏡學研討會，並努力其付之實施。於第六屆會議在日本岡山開會時，我認為該有台灣的研究者來參加比較好，因此邀請林教授為微生物學研究者的台灣代表。透過這個機會能使林教授與日本的學者和研究者有更廣泛的接觸，對顯微鏡新的理論與技術得以精進。

本書係包括光學顯微鏡及電子顯微鏡中許多重要原理與技術。於後半部把操作上必要的步驟，編成手冊以利讀者查閱。又因林教授不但精通日、英文，又能夠參考各國很多的書籍

和資料，加以詳細的說明。

據說 21 世紀將成為『奈米的時代』。我想欲踏進『奈米世界』去發現更多驚異的事物者，使用光學顯微鏡與電子顯微鏡來作構造分析是不可缺少的。今後顯微鏡的重要性會不斷地提高，而會開拓出更廣大地利用空間。我希望本書的發行能帶給東南亞顯微鏡學的發展，而有助於許許多多使用顯微鏡的讀者們，達成更輝煌地成果。

橋本初次郎

中華民國顯微鏡學會名譽會員

大阪大學名譽教授

京都工藝纖維大學名譽教授

岡山理科大学教授

2002 年 1 月

陳 序

對瞭解細胞之微細結構上，光學顯微鏡及電子顯微鏡為不可或缺之工具。近年來，電子顯微鏡已普遍應用在各領域之生物技術上，尤其在擴大及深化微生物學之基礎與應用之研究上，更是貢獻良多。1970 年以後，電子顯微鏡之性能大大的提昇，漸漸轉變為精密的自動化：自動曝光、自動送底片、自動記錄及相關訊息，甚至 1990 年後演變成電腦控制（computer mode operation），進步之速令人驚異。21 世紀為奈米的時代，也是生物技術的時代，光學與電子顯微鏡及特殊顯微鏡之重要性愈形明顯，在農業方面，對作物病毒病害之了解及治療上更佔有重要的地位。

本人從事電子顯微鏡及其技術之推廣，已有 40 年之經驗，深覺電子顯微鏡在農業教學及研究之應用上佔有極重要之地位。林良平博士專攻微生物學，在環境微生物方面造詣甚深，尤精於電子顯微鏡技術，民國五十八年自美返國後，即在臺灣大學農業化學系擔任普通微生物學、土壤微生物學、環境微生物學、微生物細胞學、電子顯微鏡學等課程，並主持農學院電子顯微鏡館。積極推動電子顯微鏡教學及應用，近年來日本對電子顯微鏡之發展已是世界牛耳，林博士精通英日文，三十餘年來不斷廣集歐美日本及國內相關電子顯微鏡之資料，尤其對日本最新技術之探索更是不遺餘力。幸聞林博士經多年辛苦將多年所蒐集之資料暨本人研究之成果去蕪存菁，編著為「微生物顯微鏡學」，欲嘉惠於學子，並提供給利用電子顯微鏡做為研究工具之專業學者們之參考。付梓之時，出示於余，喜其有成，故為之序。

陳 脉 紀

中華民國電子顯微鏡學會榮譽理事

謹識於國立中興大學植物病理學系

電子顯微鏡室

中華民國九十一年一月

序 言

生物形態經 17 世紀之雷文霍克 (Antonie van Leewenhoek)、虎克 (Robert Hooke)、馬比奇 (Marcello Malpighi) 等人, 使用光學顯微鏡達到細胞層次之觀察, 揭開微細世界之門, 進入 19 世紀之後半, 由於生物標本製作法及顯微鏡 “Apochromat” 鏡頭之改良, 使顯微鏡之解像力提昇, 相繼發現感染性病原細菌, 以及細胞胞器 (organelles) 之微小結構, 生物學家得以探討細菌與動物、植物胞器間其機能之關連。光學顯微鏡, 尤其最近發展出之共軛焦顯微鏡 (Confocal Microscope), 對生物體及相關物質更提供快速而有效的觀察方法, 其結果可提供更多之訊息, 以補充化學及物理分析之不足。1939 年首台電子顯微鏡由西門子 (Siemens) 公司上市後, 迄今已約 62 年之光陰, 由於操作方法與硬體之不斷翻新及改進, 使生物研究者對細胞構造與高分子生命物質有進一步之瞭解, 不僅細胞固定後之構造, 連細胞在生活狀態下的構造也可知道。在配合生化上之研究得知生物產物, 甚至生物本身均由無機世界同樣之元素所構成。顯然對生物之微細結構之瞭解, 已經達到奈米 (nanometer) 之層次。21 世紀為奈米技術 (nanotechnology) 之時代, 不但需要觀察及利用奈米材料 (nanomaterial) 並且對奈米結構 (nanostructure) 也需有深入瞭解。為達此目的, 電子顯微鏡, 電子探針顯微鏡 (Electron Probe Microscope) 等, 勢將扮演重要的角色。

本書乃根據作者任教臺灣大學農業化學系, 擔任微生物研究法、農化實驗法、生物電子顯微鏡技術等課程所編之教材, 增訂編輯而成。內容包括海內外匯集之重要資料暨本人研究之部分成果, 公諸於世, 本書注重基本而綜合性之原理和方法, 使讀者得以有系統的瞭解顯微鏡之精髓。本書除可供大專院校各科系有關顯微鏡之教學課本及參考書外, 尚可供一般使用顯微鏡之研究人員參考。本書計分三大篇共二十五章, 第一至六章 (第一篇) 介紹光學顯微鏡之發展歷史, 原理與應用、染色之基本認識、及微生物的染色法; 第七章至第十七章 (第二篇) 敘述特殊顯微鏡及其相關技術與應用; 第十八章至第二十五章 (第三篇) 為電子顯微鏡及相關技術之介紹。最後附錄主要為研究工作者之方便而編輯, 包括常用藥品、廠商、常用單位及有關學會及期刊之資料。本書參考很多書籍及資料, 其中較為重要者列舉於文後及附錄中之主要參考書, 又對以下提供資料之公司本人深表謝意:

1. 萊卡 (Leica) 總代理, 美嘉儀器股份有限公司: 提供第二章、第十一章及第十三章之圖及部分資料。
2. 日本電子 (JEOL) 總代理, 捷東股份有限公司: 提供圖 19-1; 19-2; 23-1; 24-3; 25-2; 25-7; 25-8; 25-9。
3. 尼康 (Nikon) 總代理, 國祥貿易股份有限公司: 提供表 3-2; 9.2 節之圖; 9.4 節之圖; 第十二章之圖。
4. 島津 (Shimadzu) 總代理, 三津股份有限公司: 提供圖 17-11a~11d; 17-11f~11l。
5. 萊卡 (Leica) 切片機總代理, 友聯光學股份有限公司: 提供圖 22-8; 圖 22-11。

本書初稿承蒙日本橋本初次郎教授、陳脉紀教授之指正並惠賜序文, 橋本教授乃國際電顯界知名學者; 陳教授則為國內生物界, 尤其在農業科學界電子顯微鏡學之最先進者。本書能獲兩位之青睞, 至感榮幸並此致謝。本書編輯過程承蒙同仁劉清標、余佳汾、紀素貞及內子玲珍的協助; 並承林廉清、黃柳川、李宜瑩、曾文聖、陳佑誠、吳淑姿、胡淳怡、朱鈞耀、陳旭麗、蔡舒聿、賴玉珊、林育諄等同學之協助; 使本書得以順利完成, 謹此一併誌謝。本書應各方之急需倉卒脫稿, 而編者才疏學淺, 錯誤之處勢所難免。尚希專家指正作為再版修正及補充之參考。

林 良 平

國立臺灣大學農學院電子顯微鏡館

中華民國九十一年二月

目次

序文	i
橋本序文	iii
陳序	v
序言	vii

第一篇 光學顯微鏡及相關技術

第一章 顯微鏡研發的歷史及標本製備法 3

1.1 單式顯微鏡的發明	3
1.2 生物切片製作方法	5
1.2-1 植物切片的製作方法	5
1.2-2 浮游生物的採集與觀察	5
1.2-3 各種生態環境中的藻類和浮游生物	6
1.3 微生物標本製備法	8
1.3-1 濕抹片	8
1.3-2 抹片的製備法	8
1.3-3 觀察前的標本製備	9
1.3-4 懸滴玻片的製備	10
1.3-5 黴菌之玻片培養與觀察	10

第二章 顯微鏡原理與運用 13

2.1 顯微鏡的成像系統	13
2.1-1 肉眼視覺	13
2.1-2 放大器與顯微鏡	14
2.1-3 顯微鏡的基本光學原理	15
2.1-4 放大率：單透鏡組的放大倍數與增生比值	15
2.1-5 力學與光學連結管長	17
2.1-6 顯微鏡的解像力	17
2.1-7 視域與物域	21

2.2 光學像差及其校正	22
2.2-1 球面像差	22
2.2-2 色差缺陷	23
2.2-3 像散現象與像域彎曲	24
2.2-4 彗形像差與畸變現象	25
2.2-5 蓋玻片厚度的影響	25
2.3 如何保養顯微鏡的光學組成結構	27
2.3-1 一般性狀況	27
2.3-2 特殊事例	27
第三章 光學顯微鏡	29
3.1 概 說	29
3.2 顯微鏡操作中常用的專有詞彙及其意義	29
3.2-1 虛像	29
3.2-2 放大率	29
3.2-3 數示孔徑	30
3.2-4 解像度與解像力	30
3.2-5 明晰度	30
3.2-6 操作距離	30
3.2-7 焦距的縱深	30
3.2-8 解像力的計算	31
3.3 光照的重要性	31
3.4 一般氣浸式物鏡與油浸式物鏡的比較	32
3.5 特殊光學顯微鏡的介紹	32
3.5-1 位相差顯微鏡	32
3.5-2 暗視野顯微鏡	32
3.5-3 螢光顯微鏡	33
3.6 光學顯微鏡術	33
3.6-1 常用的量度單位及定義	33
3.6-2 標本片的類型及其製備	35
3.6-3 染色處理中所需的菌抹片或組織切片的製備	36
3.6-4 顯微鏡的使用與維護	38
3.6-5 聚光鏡之簡介及使用法	39

第四章 染色劑與染液	43
4.1 概 說	43
4.2 染 料	44
4.2-1 染料的定義	44
4.2-2 酸性染料與鹼性染料	44
4.2-3 擔色體	45
4.3 無色化合物	46
4.4 生物染色劑的分類	46
4.4-1 硝基類染色劑	47
4.4-2 偶氮類染色劑	47
4.4-3 蒽醌類染色劑	47
4.4-4 噻唑類染色劑	48
4.4-5 醌亞胺類染色劑	48
4.4-6 苯基甲烷類染色劑	49
4.4-7 雙苯噻吩類染色劑	50
4.4-8 天然類染色劑	52
第五章 染 色	55
5.1 染色劑的種類與性質	55
5.2 常用的染色液(劑)名稱	56
5.3 單染色法與負染色法	56
5.4 示差性染色法	56
5.5 染色處理常用的專有辭彙	57
5.6 切片的封埋	58
5.7 染色所需切片的製備	59
5.8 色素體的去除	59
5.8-1 氯化汞沈渣	59
5.8-2 甲醛屍腐性沈澱	59
第六章 微生物的染色法	61
6.1 單染色法	61
6.1-1 酚硫磺素染色法	61
6.1-2 Loeffler 氏鹼性四甲基藍染液	61

6.2 格蘭氏染色法	61
6.2-1 染色的程序	62
6.2-2 對切片的染色方法	62
6.2-3 格蘭—威捷氏染色劑	62
6.3 Mycobacteria 屬細菌的染色	63
6.3-1 Ziehl-Neelsen 氏染液	63
6.3-2 奧黃—酚螢光染色法	63
6.3-3 奧黃—薔薇紅螢光染色法	64
6.4 Corynebacteria 屬的染色法	64
6.4-1 Albert 氏染色液染色法	64
6.4-2 Neisser 氏染色液染色法	64
6.4-3 Pugh 氏染色液染色法	65
6.5 孢子的染色方法	65
6.5-1 苯胺紅—四甲基藍孢子染色法	65
6.5-2 Fleming 氏苯胺紅—靛素	65
6.5-3 孔雀石綠染色法	65
6.6 莢膜的染色法	66
6.6-1 結晶紫莢膜染色法	66
6.6-2 靛素—四甲基藍莢膜染色法	66
6.6-3 印度墨汁負染色法	66
6.6-4 Leishman 氏染色法	67
6.6-5 Hiss 氏染色法	67
6.7 鞭毛的染色法	67
6.7-1 Kirkpatrick 氏染色法	67
6.7-2 鞭毛染色法	68
6.7-3 Casares-Gil 氏鞭毛染色法	68
6.7-4 Loeffler 氏鞭毛染色法	68
6.7-5 Fleming 氏染色法	68
6.8 螺旋菌的染色法	69
6.8-1 Fontana 氏染色法	69
6.8-2 Giemsa 氏染色法	69
6.8-3 Levaditt 氏切片染色法	69

6.9 對濾過性病毒包容體基本生長體，及立克次小體等的染色法	70
6.9-1 Castaneda 氏染色法	70
6.9-2 Giitstein 氏染色法	70
6.9-3 Macchiavello 氏染色法	70
6.9-4 Lendrun 氏石南紅—酒石酸染色法	71
6.10 親曙紅性白血球的染色法	71
6.11 細胞內脂肪質的染色法	71
6.12 原生動物的染色法	71
6.12-1 Giemsa 氏染色法	72
6.12-2 Heidenhain 氏染色法	72
6.12-3 Delafield 氏血氧素染色法	72
6.12-4 Mann 氏甲基藍—曙紅混合染色法	72
6.12-5 Field 氏染色法	72
6.12-6 Kohn 氏糞便原生動物染色法	73
6.13 真菌類的染色法	73
6.13-1 Needle 氏水膜標本片製備法	73
6.13-2 Schiff 氏過碘酸染色法	73
6.14 微藻類的固定及染色法	73

第二篇 特殊光學顯微鏡及相關技術

第七章 微生物大小與總數的測定	77
7.1 測量微生物大小與放大倍率	77
7.1-1 用顯微鏡測量微生物的大小	77
7.1-2 目鏡測微玻片的使用方式	77
7.1-3 使用顯微鏡測量標本物的大小	78
7.2 血球計數器	78
7.3 彼德—郝史氏計數器	79
7.4 郝德氏黴菌計算板	80
7.5 浮游性生物之計數法	81
7.5-1 微細藻類之定義	81
7.5-2 浮游性生物	81
7.5-3 器具及材料	83

7.5-4 試驗步驟	83
7.5-5 檢討與注意事項	85
第八章 位相差顯微鏡及其照相技術	87
8.1 前 言	87
8.2 發展歷史	87
8.3 位相差顯微鏡之原理	88
8.3-1 光在介質中通過的特性	88
8.3-2 位相差顯微鏡中光的通路	88
8.4 操作及攝影程序：以位相差顯微鏡為例	88
8.4-1 校正	88
8.4-2 觀察	89
8.4-3 攝影	90
8.5 討 論	91
8.6 位相差顯微鏡照相範例	91
第九章 干涉相位差顯微鏡	95
9.1 原 理	95
9.2 Nomarski 顯微鏡構造的細部構造	98
9.3 Nomarski 影像的特徵	100
9.4 顯微鏡的校正	100
9.4-1 聚光鏡之置中	100
9.4-2 振動方向之校正	101
9.4-3 相位環之校正	101
9.5 Nomarski 之使用	102
9.6 顯微鏡之保養與清潔	102
9.6-1 清潔部位	102
9.6-2 清潔方法	102
第十章 螢光顯微鏡術	105
10.1 前 言	105
10.2 螢 光	105

10.2-1 螢光的定義	105
10.2-2 螢光及磷光之分類	106
10.2-3 螢光的特性	106
10.3 螢光顯微鏡概述	106
10.3-1 螢光顯微鏡的原理	106
10.3-2 螢光觀察（依標本分類）	106
10.3-3 螢光染劑	108
10.3-4 免疫螢光	109
10.3-5 螢光顯微鏡的應用	110
10.4 螢光顯微鏡的組成條件	110
10.4-1 必要條件	110
10.4-2 光源	111
10.4-3 濾光片	111
10.4-4 浸液	111
10.5 穿透式螢光顯微鏡	111
10.5-1 光徑概論	111
10.5-2 暗視野聚光鏡	112
10.5-3 穿透螢光光源	112
10.5-4 表玻璃	112
10.5-5 穿透式螢光顯微鏡的發展	112
10.6 落射螢光顯微鏡	112
10.6-1 光徑概要	112
10.6-2 激發光及螢光機構	113
10.6-3 吸收濾片的功能	113
10.6-4 物鏡	113
10.6-5 光源	113
10.6-6 落射螢光顯微鏡的發展	113
10.7 激發法	114
10.8 總結—穿透及落射螢光之比較	114
10.8-1 穿透螢光的優點	114
10.8-2 穿透螢光的缺點	114
10.8-3 落射螢光的優點	114
10.8-4 落射螢光的缺點	114