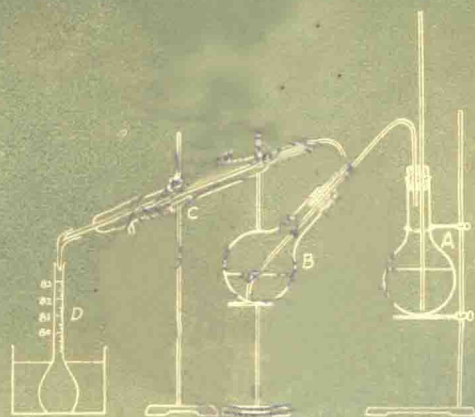


應用微生物學實驗法

第三篇 細菌實驗法

方心芳 著



生活·讀書·新知三聯書店出版

應用微生物學實驗法

第三篇 細菌實驗法

方 心 芳 著

生活・讀書・新知
三聯書店



版權所有

重慶·貴州·新華三聯書店出版

北京西總布胡同29號

*

1951年8月在北京印造初版

31//X43//1/25·138定價頁·總號767·分號Q468

0001—4000冊·定價5500元

*

三聯·中華·商務·開明·聯華聯合組織

中國圖書發行公司發行

第三篇 目次

細菌實驗I	植物浸液之觀察	1
細菌實驗II	一般細菌觀察法	2
細菌實驗III	負染色法(negative staining).....	6
細菌實驗IV	克氏染色法	7
細菌實驗V	孢子染色法	9
細菌實驗VI	莢膜染色法.....	11
細菌實驗VII	異染小粒之染色法.....	13
細菌實驗VIII	細菌運動之觀察.....	15
細菌實驗IX	鞭毛之染色.....	16
細菌實驗X	緩衝劑.....	18
細菌實驗XI	培養基酸鹼值之調整.....	20
細菌實驗XII	酸鹼值對微生物之影響.....	24
細菌實驗XIII	氧氣對細菌生長之影響.....	26
細菌實驗XIV	美藍之還原.....	29
細菌實驗XV	硝酸鹽之還原.....	31
細菌實驗XVI	滲透壓對微生物生長之影響.....	32

細菌實驗XVII	表面張力對微生物之影響.....	34
細菌實驗XVIII	細菌對醣類之作用.....	36
細菌實驗XIX	澱粉水解之證明.....	38
細菌實驗XX	油脂之分解.....	40
細菌實驗XXI	明膠之利用.....	41
細菌實驗XXII	細菌對牛奶之作用.....	43
細菌實驗XXIII	凝基質生成之證明.....	45
細菌實驗XXIV	硫化氫之生成.....	47
細菌實驗XXV	Catalase 之生成.....	48
細菌實驗XXVI	殺菌藥.....	49
細菌實驗XXVII	重金屬之微動作用.....	53
細菌實驗XXVIII	枯草菌.....	55
細菌實驗XXIX	醋菌.....	58
細菌實驗XXX	葡萄糖酸菌之選種.....	60
細菌實驗XXXI	清涼茶糖(Sorbose)發酵.....	62
細菌實驗XXXII	大腸菌羣細菌分離法.....	65
細菌實驗XXXIII	泡菜內乳酸菌之分離.....	67
細菌實驗XXXIV	德氏乳桿菌.....	69
細菌實驗XXXV	丙酸菌.....	71
細菌實驗XXXVI	厭氧細菌分離法.....	75
細菌實驗XXXVII	酪酸菌.....	76
細菌實驗XXXVIII	丙酮丁醇菌之分離與選種.....	79
細菌實驗XXXIX	果膠分解發酵菌.....	84

細菌實驗XL	醋酸菌之鑑定.....	86
--------	-------------	----

附錄

附錄1 培養基	89
附錄2 染色液	99
附錄3 緩衝液	101
附錄4 指示藥及試藥	102
附錄5 丁酸鈣及乙酸鈣溶解度與溫度之關係	108
主要參考書	110
名詞解釋表	111

細菌實驗 I

植物浸液之觀察

1) 引言

把植物體浸於水中，置溫暖處，停留數天，即有各種的微生物生出來。微生物的種型，因浸漬的植物、時間及溫度的不同，而相異。

2) 材料

1. 植物浸液(草切碎，入瓶，加水。一瓶置 37°C 保溫箱中，48 小時。另一瓶，室溫，72 小時)。

2. 顯微鏡，載片，蓋片，接種環，酒精燈。

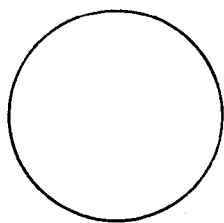
3) 操作

(a) 作濕標本：用接種環取植物浸液，置載片上。浸液須一大滴，以免加蓋片時，內生氣泡。

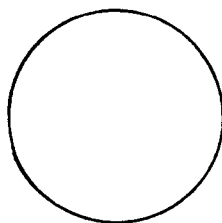
(b) 先用低倍鏡頭(16mm.)觀察，然後換高倍(4mm.)者。所

見到之較小生物，常能活潑的運動，就是細菌(bacteria)。體較大，運動較慢的，是原生虫(protozoa)。注意區別微生物及植物碎屑。

將所見到的微生物，按其大小比例，繪圖於下圓圈中。



37 度



室 溫

問 題

在顯微鏡下所見細菌是怎樣繁殖的？

細菌實驗 II

一般細菌觀察法

1) 引言

細菌的個體太微薄，且減光率(extinction)小，在顯微鏡下不能顯明的呈露出來。若將它染上色，減光率加大，就易觀察了。還有，細菌以及細菌菌體各部分對某些染料的着色性不一樣，因此，用染色的方法，可以區別不同的細菌，以及菌體的各部，這是染色的重要效果。

染色時須注意的事件，爲載片要乾淨，無油膩，塗抹的菌體勿太多，加熱固定及染色勿過度及不足，染色尤其是脫色時間不能過長或過短。比較困難的染色法，要多加練習，自然會有把握。

下面所舉的，是日常用的染色法，以此說明基本染色術及其程序。

2) 材料

1. 膜醋菌 (*Acetobacter xylinum*)，枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*)，大腸桿菌 (*Escherichia coli*)，產氣桿菌 (*Aerobacter aerogenes*) 各一管。

2. 齊氏石炭酸復紅液 (Ziehl's carbol fuchsin)。

3. 顯微鏡，乾淨載片，蓋片，接種針，酒精燈。

4. 盛普通水的洗瓶，吸水紙，鏡頭油 (immersion oil)，抹鏡紙 (lens paper) 及二甲苯 (xylol)。

3) 操作

(a) 塗片 (preparation of smear)

取曾用鹼水煮過洗淨浸於酒精內之載片一個，燒去殘酒，置蒸餾水一滴於其中央。

用接種針自培養管中，取出極少一點菌體，和入載片上之蒸餾水中，和勻，攤開，使成一薄層。風乾，或微微加熱使乾。

(b) 固定

持載片，在火焰內通過二或三次，使塗片內之菌體貼牢於載片上，以免染色洗滌時之脫落。

通過火焰時，速度勿過於快或慢。過快難達固定目的；過慢，溫度過高，細胞形改變。

(c) 染色

置數滴齊氏石炭酸復紅液於塗片上，稍搖動，使全塗片面上都蓋上染色液。稍加熱，靜置一分鐘。

經常用的營養細胞染色液，如呂氏美藍液，淡結晶紫液 (dilute crystal violet soln) 等，染色時間，均以一分鐘為準。

(d) 洗滌

染色時間一到，即用普通水沖洗，使塗片上的染色液洗去。

(e) 乾燥

用吸水紙吸乾 (blot dry)，較為便當，故多用之。法將載片仰置於數張吸水紙上，再拿數張紙蓋上，用手按摩吸水紙，使之貼着載片，以吸其上之水。但切勿使載片移動，以免將塗片擦落。

(f) 鏡檢

吸水紙吸乾的載片，自紙中取出，稍停片刻，水汽全去，即可鏡檢。

置鏡頭油一滴於塗片上。將載片放於鏡台中央之稍上部，扶正油鏡頭，推下鏡筒，使鏡頭抵觸載片，然後稍提鏡筒，以載片能自由進退為度。移動載片，使塗片置於鏡頭下。注意觀察，且微微推動升降輪，以物體清楚為度。

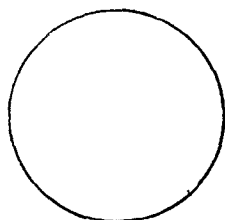
詳察細菌細胞之形狀及其排列法。繪圖於下圓圈中。

(g) 作一濕標本觀察，以證染色標本視察之優點。法置蒸餾水一滴於載片，取菌體極少量和入，攤開，加蓋片，去除水。加鏡

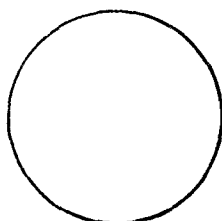
頭油一滴於蓋片上。推下鏡筒，使鏡頭觸及蓋片，用升降輪微提鏡筒，且注意觀察。見到菌體時，調節光圈大小及鏡頭高低，以達最清楚爲度，然菌體之呈露，仍無染色者清晰。

(h)同法觀察各菌，繪圖於下。

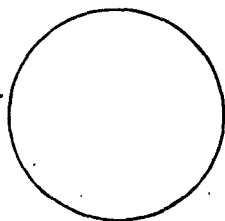
(i)顯微鏡不用時，用抹鏡紙浸吸二甲苯少許，將鏡頭上之油抹乾淨後，才能置入盒中。



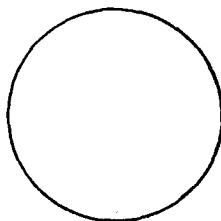
炭 疽 菌



枯 草 菌



大腸桿菌



產氣桿菌

問 題

經驗上告訴你染色時應注意那幾點？

細菌實驗 III

負染色法(negative staining)

1) 引言

將減光率小的細菌細胞，染上色，增加減光率後，雖然可明晰的在顯微鏡下觀察，不過染色時細胞受到加熱及化學藥品的處理，其形狀多少會有所改變。因此有人想到，用相反的方法，呈露細胞形狀。細菌細胞減光率小，既為透明體，若將其背景染成黑色，則細胞即明顯的露出。染背景為黑色的藥品為中國或印度墨汁(Chinese or India ink)或黑素液(nigrosin soln)。所以嚴格的說，這不是一種染色法，而是一種托襯法。

2) 材料

1. 植物浸漬液，泡菜水，德氏乳桿菌 (*Lactobacillus delbrueckii*)。
2. 牙籤。
3. 黑素液(加防腐劑的飽和水溶液)。
4. 顯微鏡，載片，二甲苯，鏡頭油，抹鏡紙，接種環，酒精燈。

3) 操作

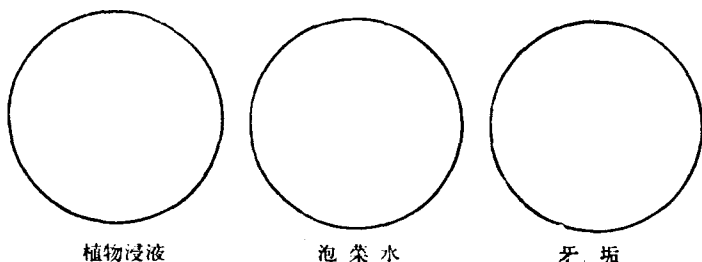
(a) 置二接種環的植物浸漬液於載片，加一滴黑素液於內，和勻，攤成薄層，風乾，勿加熱固定。

乾後，加鏡頭油一滴於塗片上，用油鏡頭觀察之。推動載片，尋找塗層厚薄適度、菌體明顯的地方，詳細觀察各種微菌細胞形

狀。

(b)如上法觀察泡菜水中菌類。

(c)加水一滴於載片，用牙籤取牙垢少許，和入水中，然後加黑素液，塗片，風乾，觀察其中菌類。



問 題

你能寫出濕標本，染色片及負染片之優劣點嗎？

細菌實驗 IV

克氏染色法

1) 引言

克氏染色法(Gram stain)是細菌染色術中之最重要者，這是一種鑑別染色法(differential staining)，能分菌類為二大羣：克氏陽性細菌(Gram positive bacteria)及克氏陰性細菌(Gram negative bacteria)。用結晶紫液及碘液染色後，細胞着色，不能為酒精所洗脫者，稱克氏陽性菌；為酒精所洗脫者，叫克氏陰性

菌。不過無色的克氏陰性菌在顯微鏡下不易觀察，故多用不同的染色液再行複染一次，使陰性菌染成不同的顏色，俾易觀察。這叫做複染色法 (counterstain)。

不過也有少數例外的菌，它們有時為克氏陽性，有時為克氏陰性，甚至一個培養中也有陰陽性之別。培養基也有影響。比方在鹼性液生長的細胞，因其蛋白質為酸性，故易為結晶紫液染上色，用碘液處理，更增加蛋白質之酸性，染料之貼着也愈堅固。但在酸性液中生成的細胞，蛋白質為鹼性，不易與鹼性染色液染成堅固的顏色。細胞的老幼，對克氏染色也有影響，須加注意。

2) 材料

1. 培養 24 小時的大腸桿菌、蕈狀桿菌及酵母菌。
2. 克氏染色液。
3. 乾淨載片。
4. 顯微鏡，鏡頭油，抹鏡紙及二甲苯。

3) 操作

(a) 每種菌分別於不同的載片上製備一個塗片，第四個載片上塗大腸菌及酵母菌，第五個載片，大腸菌及蕈狀菌。都風乾，加熱固定。

(b) 用下法染色，先染酵母菌(克氏陽性)，易於觀察練習；然後染色其他塗片：

(甲) 置結晶紫液數滴於塗片面，停留二分鐘。用吸水紙吸乾。

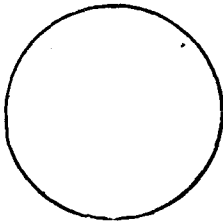
(乙) 加碘液數滴於塗片上，一分鐘後用紙吸乾。

(丙)用 95% 酒精脫色。斜持載片，一滴一滴的加酒精於塗片上，隨加隨流去，約 30 秒鐘。即用水洗。

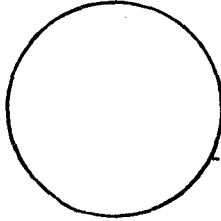
(丁)蕃紅花紅液染色 30 秒鐘。水洗，用紙吸乾。

(戊)用油鏡頭檢察。克氏陽性菌體應為深紅藍色；克氏陰性菌體為淡紅色。

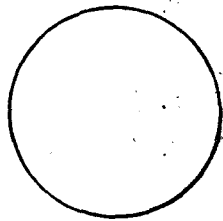
此法甚重要，須多加練習，以確有把握為度。



大腸菌



鞭狀桿菌



酵母菌

問題

你以為克氏染色法應注意那幾點？若失敗過，失敗原因何在？

細菌實驗 V

孢子染色法

1) 引言

一部分細菌能形成內孢子(spore, 有譯為芽胞者)。這孢子的存在與否，雖然可由它抵抗高溫等等，加以證明，但有時以在顯微鏡下檢定為方便。孢子的滅光率雖較強大，可是染色後觀察更

爲清楚。孢子染色方法不少，但以用熱石炭酸復紅者爲多。成熟的孢子，常不吸着冷水溶液內的染料，故須加熱。

2) 材料

1. 蔗糖豆芽汁瓊脂斜面培養 48 至 72 小時，30° C 的蕈狀桿菌 (*Bacillus mycoides*) 及枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 各一管。

2. 齊氏石炭酸復紅液，孔雀綠液，蕃紅花紅水溶液，呂氏美藍液，結晶紫沖淡液，1% H_2SO_4 液。

3. 顯微鏡，載片，蓋片，接種針，酒精燈。

4. 鏡頭油，二甲苯。

3) 操作

(a) 作一濕標本：置水一滴於載片，接種針取蕈狀桿菌些許，混入水中，加上蓋片。置此標本於鏡下，用高倍鏡頭詳察孢子及營養細胞 (vegetative cells) 之區別。

(b) 將枯草桿菌塗於載片上，陰乾，加熱固定，用沖淡結晶紫液染 30 分鐘，水洗，用紙吸乾，油鏡頭檢察。可見營養細胞上色，孢子無色，但能見其輪廓。繪圖於下圈中。

(c) 塗枯草菌於載片，風乾，加熱固定。加齊氏石炭酸復紅液於塗面，火焰上加熱至生水汽，但不要沸騰，維持生汽溫度最少 5 分鐘，不要使染色液乾涸，可繼續添加之。冷涼，普通水洗。

用 1% 的 H_2SO_4 液脫色約 10 秒鐘。

用水洗硫酸。

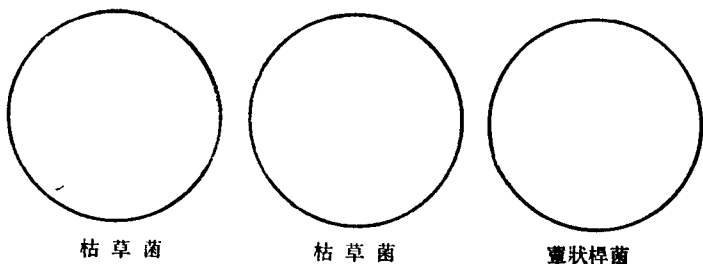
加呂氏美藍液，染 2 分鐘。

水洗，吸水紙吸乾，油鏡頭檢察。孢子爲紅色及營養細胞爲藍色(Moeller's 法)。繪圖。

(d)孔雀綠法染孢子：塗蕈狀桿菌於載片，加熱固定。加孔雀綠液於塗片上，加熱至生水汽，維持3分鐘，載片冷涼，水洗。

蕃紅花紅水溶液染30秒鐘。

水洗，吸乾，油鏡頭觀察。孢子爲綠色及營養細胞爲紅色。繪圖。



枯草菌

枯草菌

蕈狀桿菌

問題

你覺得那種孢子染色法較好？

細菌實驗 VI

莢膜染色法

1) 引言

一部分細菌，分泌於體外一種粘質，不溶於培養基內，圍繞於細胞，稱爲莢膜(capsule)。莢膜質似由複雜的 polysaccharides