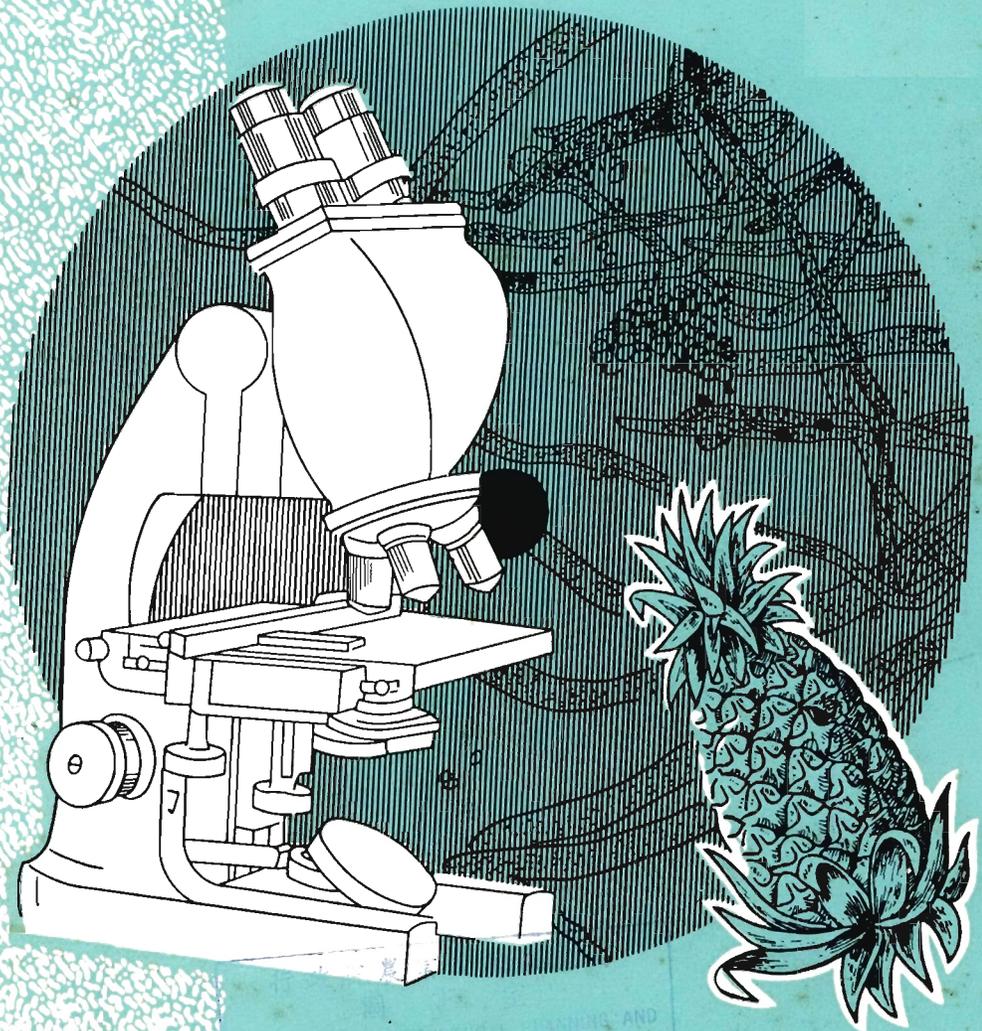


# 微生物檢查法

罐頭食品叢書之四



中國農村復興聯合委員會編印

# 微生物檢查法

## 目 錄

### 一 微生物之形態及大小之概念 (Microtaxonomy)

(一)簡介 (General Remarks).....	1
(二)應用材料 (Materials Required).....	1
(三)實驗步驟 (Examination Procedure).....	1

### 二 微生物之分離 (Isolation of Microorganism)

(一)扁平培養法 (Plate Culture).....	2
1. 簡介 (General Remarks).....	2
2. 應用器具及試料 (Materials Required).....	2
3. 分離操作步驟 (Procedure for the isolation).....	2
(二)林德拿氏小滴培養法 (Sinder's droplet culture).....	2
1. 簡介 (General Remarks).....	2
2. 應用器具及藥品 (Materials Required).....	3
3. 小滴培養法之步驟 (Procedure of droplet culture).....	3
(三)酵母之純粹分離法 (Isolation of Yeast).....	3
1. 簡介 (General Remarks).....	3
2. 培養基 (Medium).....	3
3. 分離操作步驟 (Procedure for the isolation).....	3
(四)菌之純粹分離法 (Isolation of Fungi).....	4
1. 簡介 (General Remarks).....	4
2. 培養基 (Medium).....	4
3. 分離操作步驟 (Procedure for the isolation).....	4
(五)醋酸菌之分離 (Isolation of Acetobacter).....	4
1. 簡介 (General Remarks).....	4
2. 培養基 (Medium).....	4
3. 分離操作步驟 (Procedure for the isolation).....	4
(六)嫌氣性細菌之培養法 (The culture of anaerobic bacteria).....	5
1. 簡介 (General Remarks).....	5
2. 應用器具及材料 (Materials Requiaed).....	5
3. 分離操作步驟 (Proedure for the isolation).....	5

### 三 細菌之鑑定 (Rontine test for the Identification of bacteria)

(一)簡介 (General Remarks).....	7
------------------------------	---

(二)溫度與生長 (The effects of temperature).....	7
(三)死亡溫度 (Thermal Deathpoint).....	8
(四)培養特性 (Culture Characteristics).....	9
(五)真菌細胞之形態 (Morphogeny of fungi cell) .....	9
(六)菌體之運動 (Movement of cell of bacteria).....	11
(七)内生孢子之形成 (Presence of Endospore).....	11
(八)Acid-Fast 染色 (Acid-Fast Stain) .....	11
(九)格勒姆染色 (Gram stain) .....	11
(十)包囊染色 (Capsule stain) .....	11
(十一)與氧氣之關係 (Relations to free oxygen).....	11
(十二)色素之產生 (Chromogenesis).....	12
(十三)營魚之還原作用 (The Reduction of nitrate).....	13
(十四)Indol 之生成 (Indol production).....	15
(十五)硫化氫之生成 (The Production of Hydrogen sulfide).....	17
(十六)膠的液化 (Liquefaction of gelatin).....	18
(十七)碳水化合物之發酵 (The fermentation of carbohydrate).....	19
(十八)澱粉之水解 (Hydrolysis of starch).....	21
(十九)甲基紅試驗 (The methy Red test) .....	23
(二十)Voges-Proskauer 試驗 (The Voges-Proskauer test) .....	24
(二十一)牛乳中產生酸 (Acid production in Milk) .....	25

#### 四 霉菌之形態 (Morphology of Molds)

(一)試樣 (Sample).....	26
(二)器具 (Materials Requiaed).....	26
(三)實驗步驟 (Procedure) .....	26

#### 五 各種培養基 (Various kinds of Mediums)

(一)普通培養基 (General Medium).....	28
(二)細菌數測定用標準培養基 (Standard Medium for bacteria count method) .....	29
(三)大腸菌屬檢驗用培養基 (Medium for identification of Escherichia) .....	29
(四)嫌氣性菌用培養基 (Medium of anaerobacter) .....	31
(五)霉及酵母用培養基 (Medium of yeast and mold) .....	32
(六)特殊培養基 (Special Medium) .....	33

#### 六 酵母霉菌細菌等孢子之耐熱性 (Comparative Heat Resistance of Spores of Yeast, Mold and Bacterial)

(一)簡介 (General Remarks) .....	35
(二)菌種及培養基 (Organisms and Media) .....	35
(三)實驗步驟 (Procedure).....	35

<b>七 培養基的酸度對細菌孢子耐熱性之效果 (Effect of pH of Substrate on Heat Resistance of Bacterial Spores)</b>	
(一)簡介 (General Remarks).....	37
(二)菌種及培養基 (Organisms and Media) .....	37
(三)實驗步驟 (Procedure) .....	37
<b>八 細菌學上一般染色法 (General Staining Methods)</b>	
(一)簡單染色法 (Simple staining) .....	39
(二)革蘭氏染色法 (Gram's staining) .....	40
(三)莢膜染色法 (Capsule staining).....	40
(四)芽胞染色法 (Spore staining).....	41
(五)鞭毛染色法 (Flagella staining).....	41
(六)異染小體染色法 (Metachromatic staining).....	42
<b>九 果實及蔬菜之腐爛 (Spoilage of Fruits &amp; Vegetable)</b>	
(一)簡介 (General Remarks).....	43
(二)器具及藥品 (Material; Required).....	43
(三)實驗步驟 (Procedure) .....	43
<b>十 乾果類之檢驗 (Examination of the Dried fruits)</b>	
(一)簡介 (General Remarks) .....	45
(二)器具及藥品 (Materials Required).....	45
(三)實驗步驟 (Procedure) .....	45
<b>十一 鹽漬鹽藏及醃漬蔬菜成品之檢驗 (Examination Salted and Pickled Vegetable Products)</b>	
(一)簡介 (General Remarks).....	47
(二)樣品 (Sample).....	47
(三)器具藥品及培養基 (Materials, Chemicals and media).....	47
(四)對一般產品之檢查步驟 (General Produce for examination method).....	49
(五)對各種產品之檢查步驟 (Special examination methods for different kinds of product .....	51
<b>十二 肉及肉製品檢驗法 (Examination of Meat and Meat Product)</b>	
(一)檢驗步驟 (Procedure) .....	57
1. 檢體之採取 (Method of sampling) .....	57
2. 檢驗操作 (Operation) .....	57
3. 生菌數 (The number of living micro-organism).....	57
4. 大腸桿菌屬檢驗 (Examination of Escherichia coli).....	57

5. 結核菌之檢驗 (Examination of Tubercle Bacillus).....	57
6. 布氏桿菌屬檢驗 .....	57
7. 炭疽菌檢驗 .....	58
8. 豬丹毒菌檢驗 .....	58
9. 沙門菌屬檢驗 .....	59
10. 寄生蟲檢驗 .....	59

### 十三 水產食品細菌檢查法 (Examination of Marine Product)

(一) 養魚池中水之檢驗 .....	60
本法適用於養魚池之水及市場店舖處理加工廠等洗淨及處理用水之污染檢驗	
(二) 鮮魚類檢驗 (Examination of fresh and refrigerant fish).....	60
本法適用於淡水海水之鮮魚類及冷凍等	
(三) 加工水產食品之檢驗法 .....	61
本法適用於魚丸魚漿及魚漿加工品等	
(四) 加工水產食品之檢驗法 .....	62
本法適用於海草類及其他水產製品等(如佃煮、鹽率、乾製、燻製、鹽藏等)	

### 十四 蛋之微生物及蛋之腐敗 (Examination of Spoilage of Eggs)

(一) 簡介 (General Remarks).....	64
(二) 菌種及培養基 (Organisms and Media) .....	64
(三) 實驗步驟 (Procedure) .....	64

### 十五 蔗糖及澱粉之微生物 (Microorganism in Sugar and Starch)

(一) 簡介 (General Remarks) .....	68
(二) 器具及藥物 (Materials Required).....	68
(三) 實驗步驟 (Examination procedure).....	68
(四) 糖及澱粉之標準 (The standard of sugar and starch) .....	69

### 十六 調味料之檢查 (Examination of Flavouring Substance)

(一) 簡介 (General Remarks) .....	71
(二) 器具及培養基 (Materials and Media).....	71
(三) 實驗步驟 (Examination procedure).....	71

# 一 微生物之形態及大小之概念

## (一) 簡介 (General remarks)

微生物 (Microorganisms, Microbes), 係指原生動物 (Protozoa), 藻類 (Algae), 黴 (Moulds), 酵母 (Yeasts), 及更小的細菌 (Bacteria) 此等微生物用光學顯微鏡均可看見, 吾人通常實驗者亦屬於此類者。另有比細菌更小的噬菌體 (Bacteriophage), 過濾性病毒 (Virus), 亦應包括於微生物之研究範圍, 惟此項研究需特殊之操作及儀器, 故初步實驗均略之。

微生物之大小, 普通用米格龍 (Micron) 為單位表示其大小, 符號用  $\mu$  ( $1\mu = 0.001 \text{ mm}$ ), 微通常呈菌絲狀 (Mycelium) 及孢子 (Spores), 菌絲 (Filaments) 的幅約為  $4\sim 10 \mu$ , 其長約為數 cm。酵母為單細胞, 其直徑為  $4\sim 6 \mu$ 。細菌亦為單細胞, 其大小約為  $1\sim 4 \mu$ 。

## (二) 應用材料 (Materials required)

配好的樣本[註一]

## (三) 實驗步驟 (Procedure)

照下述之順序, 每一項請仔細觀察比較之。

1. 顯微鏡之放大率 ( $10\times 10$ ), 即將實物放大 100 倍下, 試驗下列各點。
  - (1) 菌絲體 (Mycelium), 絲狀 (Filaments), 及分枝 (Branch) 等。
  - (2) 在此放大率下, 是否能窺見細菌。
  - (3) 試比較菌絲, 菌幅之大小。
  - (4) 酵母之形狀, 大小如何。
  - (5) 酵母有無出芽 (Budding) 或連結等現象。
2. 將目鏡改換為 15 倍或 20 倍者 (變成 150 倍或 200 倍), 按照上述各項重覆觀察之。
3. 接物鏡 ( $40\times$ ) 及接目鏡 ( $10\times$ ) 即 400 倍放大率下, 再作上述之觀察。
4. 將物鏡換為油浸鏡 (Oil immersions lens  $\times 100$ ), 將細菌標本[註一]用染色劑染之, 即滴 1 滴染色液於標本上, 放置  $1\sim 2$  分鐘後, 將多餘之染色液, 傾棄之, 或在水中輕輕洗掉。
5. 取 1 滴 Cedar oil 滴於標本上, 用油浸鏡觀察之。一般細菌, 在低倍之顯微鏡下, 可以看到, 但有的要在高倍的顯微鏡下, 方能看得見。  
試觀察細菌之形狀及大小, 細菌之形態約可分為球狀 (Coccus), 桿狀 (Rod), 逗點狀 (Vibrio), 或螺旋桿 (Spirally)。

[註一]: 用細菌 (Bacillus subtilis) Staphylococcus aureus, E. Coli, 及放射菌 (Streptomyces griseus) 照染色法(看其項)之操作樣本, 微菌樣本之作法看微菌之形態一項。

## 二 微生物之分離 (Isolation of microorganisms)

### (一) 扁平培養法 (Plate culture)

#### 1. 簡介 (General remarks)

酵母之分離有稀釋法 (Dilution method) 及塗抹法 (Smearing method) 等多種，在此採用稀釋扁平培養法。

#### 2. 應用器具及試料 (Materials required)

二重皿 (乾熱殺菌)	無菌水 (在試管中)
麩汁固體培養基 (Bllg 10°, pH 5.5, 間歇殺菌)	
小吸管	白金絲或白金耳
酒精燈	無菌箱
玻璃鐘罩	恆溫器
電氣水溶器 (附有溫度調節器)	其他

#### 3. 分離操作步驟 (Isolation Procedure)

先將無菌箱及其他器具，及手指等完全殺菌後開始操作。操作一律在無菌箱內進行之。

(1) 將試料少許置於無菌水中，振盪使之均勻稀釋。

(2) 準備麩汁固體培養基 (在試管中) 三支，在熱水中溶解並保持溫度45~50°C，在試管上用紅筆註明 I, II, III 符號，以資識別。

(3) 準備已經乾熱殺菌之二重皿 (Petri dish) 三個，亦註明 I, II, III 符號。

(4) 用白金耳或小吸管自試料稀釋液中沾取或收取一滴，加入溶解麩汁培養基 I，輕緩振盪，使其均勻混和。

(5) 用白金耳或小吸管自培養基 I 取一滴，加入培養基 II，同樣輕緩振盪使其均勻混和，乃將餘下之培養基 I 迅速倒入準備好的二重皿 I，輕輕轉動，使夾雜有微生物之培養基均勻分佈在二重皿內。

(6) 同樣用白金耳或小吸管自培養基取一滴，加入培養基 III，將餘下之培養基 II，倒入二重皿 II。

(7) 輕緩振盪培養基 III，使其均勻混和，即倒入二重皿。

(8) 待麩汁固體培養基在二重皿內凝固後，自無菌箱取出，倒置放入玻璃鐘罩內 (先利用昇汞水消滅罩內空氣中之微生物)

(9) 將玻璃鐘罩移入保溫箱，保溫30~32°C。

(10) 待24~48小時後，選擇二重皿內固體培養基上單離之酵母聚落 (Colony)，接種至斜面培養上。

### (二) 林德拿氏小滴培養法 (Lindner's droplet culture)

#### 1. 簡介 (General remarks)

微生物之純粹培養方法甚多，而適合於絲狀菌及酵母純粹分離培養者，需依小滴培養法 (Small droplet culture) 或 Micromanipulator (顯微解剖機) 分離單細胞 (或單胞

子)，小滴培養法最先為林德拿氏 (Lindner) 所採用，故又名為林德拿氏法 (Lindner's method)。今在此採用林德拿氏小滴培養法。

## 2. 應用器具及藥品 (Materials required)

錶面玻璃 (Watch glass) (在二重皿內)

鋼筆尖 (Pen) 白金絲或白金耳

蓋玻片，凹玻片，

麴汁液體培養基 (Blg 10°, pH 5.5)

凡士林 (Vaseline), 殺菌濾紙小片

郭南德氏鉗子 (Cornet pincers)

顯微鏡及顯微鏡用電燈

酒精燈，鋼絲架，恆溫器，

## 3. 小滴培養法之步驟 (Procedure)

操作皆在無菌箱內進行，先將無菌箱及其他器具，手指等完全殺菌後，開始操作。

(1) 將麴汁倒入錶面玻璃內。

(2) 用白金絲取酵母體 (新鮮培養者) 少許，置於錶面玻璃內之麴汁中攪拌均勻。

(3) 自60~70%酒精中取出蓋玻片，用紗布拭乾，在酒精燈火焰上往來2~3回殺菌。夾在 (Cornet pincers) 上待用。

(4) 用無菌鋼筆尖沾取含有酵母細胞之麴汁在蓋玻片上依照一定的距離點九點，將此蓋玻片覆在凹玻片上，移至顯微鏡下檢視，如獲得某一點祇含有一個細胞即用凡士林密封之。

(5) 將凹玻片放在鋼絲架上，移入保溫箱，於30~32°C保溫。

(6) 保溫一日後，在顯微鏡下檢視，如見單獨細胞尚未繁殖，再保溫一日，以後再檢查其生長情形，如發見由單獨細胞已經繁殖至多數細胞，即卸下蓋玻片，用無菌濾紙小片吸取酵母細胞，投入麴汁液體培養基，使其發育繁殖。

(7) 在麴汁中即可取得純粹酵母

## (三) 酵母之純粹分離法

### 1. 簡介 (General remarks)

酵母之聚落呈白色，半球狀，有時亦有角狀突出者。再經更長時間便依酵母之種類而呈種種之形狀。例如有中央突起者，凹狀者，固邊有皺者，有溝者，扁平而呈粉狀者等各種形狀，須分別採取之。

### 2. 培養基 (Media)

酵母之分離與培養主要用 Blg 10° 之麴汁或麥芽汁及其洋菜固體培養基，在特殊情形下，如葡萄酒酵母，果實酵母等則亦有用葡萄汁或其他的果汁等作為培養基。

### 3. 分離操作步驟 (Procedure)

(1) 取葡萄，蘋果等果實，花蜜樹液或醱酵液於麴汁中在30°C下，繁殖培養1~2日，或直接用麴汁洋菜培養基，行扁平培養。

(2) 定溫器為25~30°C。

(3) 經12~日後便發生聚落。

(4) 各種聚落須分別採取之。

- (5) 採取後再行扁平培養。
- (6) 在同一條件下 (即溫度, 培養等) 有變化, 同一種也形成不同形狀之聚落) 由大體相同的聚落中再予採取。
- (7) 如此重覆2~3次。
- (8) 如常發生同樣之聚落時, 便可認為大概純粹。
- (9) 更由此以 Lindner 小滴培養法或以 Micromanipulator 採取單一細胞予以培養始可認為純粹培養。

#### (四) 微之純粹分離法

##### 1. 簡介 (General remarks)

分離時應注意下列二項。

- a) 有孢子者只取其孢子, 操作時需輕緩, 以免孢子飛散。
- b) 無孢子者取其極小量的菌絲。

##### 2. 培養基 (Media)

微菌一般都喜歡含糖性之培養基。其培養基需按照分離及培養之目的予以選擇。依微菌之種類, 例如 *Rhizopus* 等難於同化硝酸鹽, 故不宜用 Czapek 液, 又不完全菌如糖濃度不稀薄則難於生育等等, 尤應注意。分離一般使用麩汁洋菜, 麥芽汁洋菜, Czapek 洋菜等, 使 pH 呈微酸性則可防止細菌的生育以便於分離。

##### 3. 分離操作步驟 (Procedure)

- (1) 用上述培養基行扁平培養。
- (2) 保溫 25°C 或 30°C 則2—3日後便形成聚落。
- (3) 由此以白金鉗採取而接種於斜面培養基上。
- (4) 微菌的生育至聚落形成為止, 比細菌或酵母的生育慢, 但一旦聚落形成後繁殖急速, 故採取的時期很重要, 從培養一日後應每日注意。
- (5) 如此採取接種於斜面培養基以使其生育, 再扁平培養之, 如此反覆數次。
- (6) 正確的純粹分離法需依小滴培養法或 Micromanipulator 分離單孢子。

[註] 微菌之耐酸性一般比細菌或酵母菌強, 故把分離用培養基的 pH 用檸檬酸等調節至 3~5 較好, 欲於洋菜不凝固程度之低 pH 分離時預先在二重皿內敷以濾紙而殺菌之, 然後將分離用培養液輕注在濾紙上, 使之吸收後, 置於定溫器內則濾紙上便發生聚落, 這種方法對於檸檬酸生成菌之分離尤為便利, 此外分離選擇特定的微菌時, 可改變培養基的組成或加以特定的物質。

#### (五) 醋酸菌之分離

##### 1. 簡介 (General remarks)

醋酸菌之分佈甚廣, 尤其在氣候溫暖之臺灣地區更是如此, 例如酒粕, 種酢, 酢膠, 酸敗之米飯, 清酒, 乾柿及果實等均有其踪跡。

##### 2. 培養基

清酒洋菜或麩汁洋菜 (加少量酒精)

##### 3. 分離操作步驟

- (1) 由種酢酢膠直接行扁平培養, 以分離生酸菌株。
- (2) 乾柿果實浸於醋酸酸性 (2%) 之酒精 (2倍稀釋) 中, 於 30°C 下繁殖培養 7~10 日。

- (3) 取所發生菌膜一小片，行扁平培養。
- (4) 所得純粹之菌株，經試驗後選擇能生成多量揮發酸之菌株。
- (5) 液面菌膜平滑粘狀者屬於 *Acetobacter aceti*，有膜，皺且呈乾燥狀者屬於 *Acetobacter pasteurianum*

[註] 醋酸菌每易與產膜酵母混雜不甚分明惟在扁平培養時，產膜酵母之聚落較高，表面光滑，且聚落較大，醋酸菌之聚落較小，聚落之四周邊緣不及酵母聚落之圓滑，又在同一種培養基中，產膜酵母在1~2日內即可繁殖生長，而醋酸菌之繁殖生長較緩。

## (六) 嫌氣性細菌之培養法

### 1. 簡介 (General remarks)

嫌氣性細菌之培養法有二種

- (1) 除去空氣之方法
  - A. 用機械方法杜絕空氣
  - B. 用化學方法吸收氧氣

(2) 充填空氣之方法。

### 2. 應用器具及材料 (Materials required)

肉汁洋菜或肉汁膠培養基及肉汁培養基，(在試管中)白金耳，恆溫器，刀片，70%酒精，0.1%昇汞水，流動 Paraffin，大型試管 Pyrogallol，1.5% Kotlsolu 橡皮蓋 Desiccator (乾燥器)，二重皿，玻璃細管，大型玻璃鐘罩，酒精燈。

### 3. 分離操作步驟 (Procedure)

#### 1. 除去空氣之方法

##### (1) 用機械方法杜絕空氣

採用此法者有使用固體培養基與液體培養基二種，使用固體培養基之場合普通係採用洋菜 (Agar-agar) 或 Gelatin 培養基，而在試管內與細菌混合後高層培養。這種場合培養基須先充分煮沸將溶解在內之空氣驅出，然後與扁平培養法，同樣使其冷卻至 40°C 左右後，自檢體 (Sample) 取出細菌混合，次用白金耳將此混合液接種於同樣冷卻至 40°C 左右之另一支試管內。於是三支稀釋度各不同之細菌混合液調製完畢，即置於恆溫器內培養，經過一定時間嫌氣性細菌聚落即生成於試管底部，為欲完全杜絕空氣起見待細菌混合液凝固後，於其上面另蓋未加細菌之培養基 (亦有被採用) 或採用經殺菌油類以蔽蓋之。

自此培養基取出聚落之方法不用白金耳鉤取，通常將所培養之試管破壞，以已消毒之刀片將聚落切下來，但破壞之前，試管之周圍要用酒精或 0.1% 昇汞水妥為殺菌為要。

採用液體培養基時宜用 Bouillon 培養基為佳。將此培養液煮沸驅出空氣後，與前同樣方法冷卻，混合檢體 (Sample)。為避免由表面侵入空氣起見，使用已殺菌之流動 Paraffin 注加至相當厚度為宜。

##### (2) 用化學方法吸收氧氣

此法係利用如 Pyrogallol (焦性沒食子酸) 之化合物，其在鹼性 (Alkali) 下放置時有自然吸收空氣中氧氣之性質。此法係先準備大支試管，內加溶解於 5cc 水之沒食子酸 2~3g，再添加 1.5% Kotlsolu 10cc 然後將已培養細菌之小形試管經過棉塞後放入大支試管中迅速蓋以橡皮蓋即可。

沒食子酸 1g 能充分除去空氣 10cc 內之氧氣。故如以 Desicator (乾燥器) 代替大支試管培養嫌氣性細菌時，則加入多量之沒食子酸即可，使用 Desicator 以杜絕空氣時，不一定使用小形試管，採用二重皿 (Petri dish) 亦可。

## 2. 填充氫氣之方法

最簡單的方法是裝有培養基的試管倒放後填充氫氣將空氣驅出，以橡皮塞住後密封，而放置於恆溫器中培養之。但是以此法無法完全除去空氣，不能說為良法。

更完全之方法係使用二支玻璃細管之橡皮塞住試管者。二支玻璃細管之一支為較長而能達到管底者，而另一支玻璃細管則較短而祇直接接觸於橡皮塞者。此等玻璃細管之外部需施棉塞以防止細菌之混入試管內之洋菜，培養基加溫溶解使其液化後，自較長之玻璃細管送入氫氣，完全驅出空氣後將試管燒融密封即可，此法雖稍麻煩，但可完全除去空氣。

使用二重皿填充氫氣而培養細菌時，要選擇能夠裝入二重皿之大型玻璃鐘罩。大型二重皿則須選擇適合於玻璃鐘罩底面者。二重皿內放入流動 Paraffin。此 Paraffin 之作用係防止玻璃罩與外氣之通流。在玻璃鐘與二重皿之間插入彎曲之玻璃管二支。由一支玻璃管導入氫氣而由另一支玻璃管驅出空氣，如此玻璃鐘罩內之空氣完全由氫氣所置換。在此玻璃鐘罩內放置予先培養細菌之二重皿。因而二重皿內形成嫌氣性之狀態，此種裝置叫做 Botkins apparatus 此種裝置極為方便，故被採用甚廣。

## 3. 填充二氧化碳之方法 (適合於分離纖維分解細菌)

# 三 細菌之鑑定

## (Routine test for the Identification of Bacteria)

### (一) 簡介 (General Remarks)

鑑定 (Identify) 一種細菌所要作的工作，可分為形態，培養基上的特徵，生理作用及病理作用，此工作可以下面所提的記述表來作，而實際上利用已純化的幾種菌種為中心來作模範。

記述表 (Descriptial charts) 有二種：

(1) 標準記述表 (Standard Descriptive Chart) 如 p 141 圖 2

(2) 指示記述表 (Descriptive Chart for Instruction) 如 p 145 圖 3

將一種菌種的特性記載於標準記述表之前頁，某些性質則記於表之邊緣，大部分記於表之右部，發酵作用則被記於底部，用右手邊緣與底部能比較很多表，標準表之後頁是留用於記載補助數據。

為了實習方便，產生一種較簡單之指示記述表，且有一些研究室發現指示記述表較標準記述表有用。

### (二) 溫度與生長 (The-effect of Temperature)

#### 1. 簡介：

每一種生物 (Organism) 都有其最適溫度 (Optimum-temperature) 在該溫度時發育良好，在最低溫度 (Minimum temp) 以下時生物不能生長，而在最高溫度 (Maximum) 以上時生物也不能發育，最低與最高間之溫度稱為生長溫度 (Growth temperature)。本實驗之目的在於大略地決定數種細菌之最低最適及最高溫度。

#### 2. 所需物品 (Material required)

接種環 (Loop)	1支
酒精燈	1個
保溫箱	2臺
菌種及培養基 (Organisms & medium)	
大腸菌 (Escherichia coli) 肉汁培養24小時者	1支
枯草菌 (Bacillus subtilis) 肉汁培養24小時者	1支
Bacillus viridulus 肉汁培養24小時者	1支
肉汁洋菜斜面 (Nutrient agar slant)	12支

#### 3. 實驗步驟：

- (1) 各取1接種環量(1 loopful)已培養24小時之大腸菌肉汁液於4支肉汁洋菜斜面上。
- (2) 各取1接種環量已培養24小時之枯草菌肉汁液於4支肉汁洋菜斜面上。
- (3) 依同法接種 Bacillus viridulus
- (4) 將肉汁洋菜斜面分為4級，各依下表所示的溫度培養之。
- (5) 注意每一情況下之發育程度。
- (6) 紀錄所觀察之結果於下表中

菌種名稱	冰箱中°C	室溫°C	37°C	55°C
大腸菌				
枯草菌				
<i>B. viridulus</i>				

(7) 用下列紀號紀錄發育之程度

- 沒有發育  
 + 發育不多  
 廿 發育良好  
 卅 發育甚優

### (三) 死亡溫度 (Thermal Death point)

T. D. P. 是指在某特定條件下於10分鐘內可殺死菌體之溫度。

#### 1. 所需物品 (Materials required)

培養24小時之大腸菌肉汁培液	1支
培養24小時之 <i>Micrococcus pyogenes var. aureus</i> 肉汁培液	1支
培養24小時之 <i>Streptococcus lactis</i> 肉汁培液	1支
培養72小時之枯草菌肉汁培液	1支
培養72小時之巨大菌 ( <i>B. megatherium</i> ) 肉汁培液	1支
載玻片 (Slide)	
水浴槽 (Water bath)	
滅菌試管	6支
溫度計	1支
滅菌 1 cc 吸管	
滅菌二重皿	7個
肉汁洋菜	7支

#### 2. 實驗步驟

- (1) 以 Gram 染色法觀察菌種之純度 (Purity)。
- (2) 在二手掌間滾動培養基以獲得均勻之懸濁液。
- (3) 排7個二重皿於實驗桌上。
- (4) 以臘筆在二重皿上記上所指定之溫度。
- (5) 留1個做控制試驗 (Control)。
- (6) 以滅菌吸管 (1ml) 吸取 1 ml 菌液於百支滅菌試管中。
- (7) 置另 1 cc 菌液於控制二重皿中 (Control plate)。
- (8) 加熱使水浴槽達到表上之最低溫度。
- (9) 置 1 或有 1 cc 菌液之試管於水槽內10分鐘。
- (10) 10分鐘後應即取出，將菌液倒入二重皿內 (此時注意無菌操作以免雜菌污染)
- (11) 將水槽溫度提高 5°C，重覆上述試驗。
- (12) 依上法同樣試驗其他的溫度。
- (13) 溶解7支肉汁洋菜使冷卻至 50°C 左右。

(14)將肉汁洋菜倒入二重皿內輕輕搖動使洋菜與菌液混合均勻。

(15)將洋菜凝固後倒置培養於 37°C 保溫箱內48小時。

(16)如有聚落發生，計算並記於下表內：

菌種名稱	聚落數目					
	55°C	60°C	65°C	70°C	75°C	80°C
大腸菌						
<i>M. pyogenes</i> var <i>aureus</i>						
<i>S. lactis</i>						

菌種名稱	聚落數目					
	75°C	80°C	85°C	90°C	95°C	100°C
枯草菌						
巨大菌						

#### (四) 培養特性 (Culture Characteristics)

##### 1. 所需物品 (Materials required)

菌種	1支
肉汁培養液	1支
肉汁膠 (Nutrient gelatin)	1支
肉汁洋菜斜面	2支
接種環	1支
接種針	1支
二重皿	1個

##### 2. 實驗步驟 (Procedure)

1. 將1支肉汁洋菜斜面溶解，冷卻至 50°C 左右。
2. 取一接種環量菌種於其中，混合均勻。
3. 倒入二重皿中做成平面。
4. 又分別取一接種環量菌種於肉汁洋菜斜面上劃線並混於肉汁培養液內。
5. 再用接種針沾取菌種於肉汁膠內行穿刺接種。
6. 將上述各管及二重皿培養於 37°C 保溫箱內。
7. 24小時後取出觀察其成長特性。
8. 將結果分別記下並繪圖可參閱 (Manual of microbiological method p149)

#### (五) 真菌細胞之形態 (Morphology of Fungi Cell)

觀察細胞之形態可分為二部分：一為觀察已染色之乾標本，另為觀察未經染色菌體之懸滴培養，現分別將之敘述如下：

##### A. 觀察已染色之乾標本 (Stained dried preparation)

染色標本為觀察其營養細胞故須自培養數小時後即須取出觀察，直至48小時後每隔數小時觀察一次並將培養時之溫度，所用之培養基及培養時間一併記下。

##### 1. 所需之物品 (Material Required)

菌種

載玻片

酒精燈

接種環

蒸餾水

Methylene blue 染色劑 [註一]

## 2. 實驗步驟 (Procedure)

- (1) 夾住一片載玻片於火焰上加熱以除去其上之油脂。
- (2) 放於桌上待冷。
- (3) 滴加蒸餾水於載玻片之中央。
- (4) 將接種環在火焰上加熱以殺菌。
- (5) 用無名指及小指夾出菌種試管上之棉栓。
- (6) 管口在火焰上加熱並迅速以接種環取出少量菌種。
- (7) 塞上棉栓。
- (8) 將接種環上之菌種混於載玻片上之蒸餾水中，使成一均勻懸濁液。
- (9) 再加熱接種環以殺菌。
- (10) 使懸濁液在空氣中乾燥或離火焰之高處乾燥之。
- (11) 乾燥後又在火焰上來回數次固定之，此即所謂之塗抹 (Spreading)
- (12) 在其上滴加 Methylene blue 染色劑。
- (13) 染色 5 分鐘。
- (14) 用水沖洗之，吸乾，並使之在空氣中乾燥。
- (15) 於顯微鏡下觀察其形態 (物鏡用油鏡) 並繪圖。

[註一] Methylene blue 染色劑之配法：

Methylene blue (90%)	0.3克
酒精 (95%)	30cc
蒸餾水	100cc

溶解 Methylene blue 於酒精中再加入蒸餾水，以濾紙過濾之。

## B. 觀察未經染色菌體之懸濁培養 (Unstained organisms in Hanging drop)

觀察菌體之懸濁培養可追踪其發育過程。

### 1. 所需物品 (Materials required)

菌種

肉汁培液

無菌水

接種環

中央成凹形之載玻片 (Hollon slide)

蓋玻片

### 2. 實驗步驟 (Procedure)

- (1) 滴加無菌水於載玻片之凹形內。
- (2) 滴一滴肉汁培液於蓋玻片上。
- (3) 以接種環沾取少量菌種塗於肉汁培液中使成懸濁液。

- (4)將此蓋玻片覆於載玻片之凹形上。
- (5)用白蠟封蓋玻片之四周。
- (6)培養於保溫箱中。
- (7)每隔數小時取出觀察之並記錄其結果。

## (六)菌體之運動 (Motility)

一般認為菌體之運動有二型：一為勃郎運動 (Brownian movement)——由於液體中小分子之來回引動，另一則為有生命的運動 (Vital monement)——由於有運動器官如鞭毛之存在。

### 1. 所需物器 (Materials required)

培養於肉汁洋菜斜面上24小時之枯草菌	1支
培養於肉汁洋菜斜面24小時之 <i>Micrococcus pyogenes</i> var <i>aureus</i> motility test medium [註一]	1支

### 2. 實驗步驟 (Procedure)

- (1)用接種針沾取少量經培養24小時之枯草菌，以深刺法 (Deep stab) 接種於 Motility test medium 試管中
- (2)依上法同樣接種 *M. Pyogenes* var *aureus*
- (3)於 37°C 培養48小時。
- (4)觀察劃線處之生長情形：有運動之菌體其生長通常會自劃線處擴展而成一帶形，或自劃線上之一點或數點向外擴展，不運動之菌體則僅在劃線上生長。
- (5)將觀察結果記於下表中。

菌 種 名 稱	勃 朗 運 動	有 生 動 的 運 動
枯 草 菌 <i>M. pyogenes</i> var <i>aureus</i>		

#### [註一] Mobility test Medium

其配法如下：

Tryptophan, (Difes)	10克
食鹽	5克
洋菜	5克
蒸餾水	1000cc

將各成分加於蒸餾水中，加熱使之溶解，調節 pH 至 7.2，裝管，於高壓釜內 15磅壓力下殺菌15分鐘。

## (七)内生孢子之形成 (Presence of Endospore)

## (八)Acid-fast 染色

## (九)格勒姆染色 (Gram stain)

## (十)包囊 (Capsule) 染色

## (十一)與氧氣之關係 (Relation to free oxygen)

### 1. 所需物品 (Materials required)

菌種

培養基〔註一〕

滅菌吸管

滅菌試管

## 2. 實驗步驟 (Procedure)

(1) 吸取 1 ml 菌液於 45°C 之培養基中混合均勻之。

(2) 吸取已接種之培養基於另一滅菌試管中，搖震之，務使菌種與培養基混合均勻。

(3) 保溫於 37°C

(4) 觀察結果

a. 好氣性菌 (Aerobes) 生長於表面。

b. 微好氣性菌 (Microaerobes) 生長於表面下數毫米處。

c. 隨意嫌氣性菌 (Facultative anaerobes) 整個培養基內均有生長可見。

d. 嫌氣性菌 (Anaerobes) 僅生長在底部深處。

〔註一〕 培養基

* 肉汁 (Meat extract)	3克
Peptone	5克
Glucose (葡萄糖)	5克
Agar (洋菜)	20克
水	1000cc

## (十二) 色素之產生 (Chromogenesis)

### 1. 簡介 General remarks

細菌常能產生各種色素尤以強烈好氣性菌為甚。但這些色素必須與硫黃菌營光合作用後所產生之色素加以區別，通常只有在有氧氣存在下方有色素之出現，若把有色素產生之培養基置於嫌氣狀態下，特殊顏色逐漸消失，及至重置於好氣狀態，即可重新顯出。

有些色素留於細菌細胞內，其他的則分泌於培養基中，只有少數色素是水溶性的，而大多數的則能溶於醚，氯仿，丙酮，四氯化碳，苯及酒精等脂溶媒。

色素之真正作用至今尚未明瞭，但色素之存在能利用於細菌之鑑別與分類。

### 2. 所需物品 (Materials Required)

(Glucose yeast extract agar slant 〔註一〕)

1. 培養於葡萄糖酵母肉汁洋菜斜面之 *Senatia marcescens*
2. 培養於葡萄糖酵母肉汁洋菜斜面之 *Micrococcus rosens*
3. 培養於葡萄糖酵母肉汁洋菜斜面之 *Saicina lutea*
4. 培養於葡萄糖酵母肉汁洋菜斜面之 *Pseudomonas fluoresceus*
5. 培養於葡萄糖酵母肉汁洋菜斜面之 *Chromobacterium violaceum*
6. 滅菌過的葡萄糖酵母肉汁洋菜斜面 10支
7. 附有軟木塞之乾淨試管 25支
8. 酒精
9. 醚 (Ether)
10. 氯仿 (Chloroform)

## 11. 丙酮 (Acetone)

### 3. 實驗步驟 (Procedure)

1. 將每一菌種接種於2支葡萄糖酵母肉汁洋菜斜面之試管。
2. 分為兩組一置於常溫，一組置於37°C保溫箱內。
3. 保溫一週或至色素出現良好時為止。
4. 將25支附有軟木塞之乾淨試管分為5組每組5支，在5支試管內各放入數滴不同之溶媒，水，酒精，Ether，Chloroform 與 Acetone
5. 以接種環移少量菌體懸濁液於上述各種溶媒中。
6. 塞緊軟木塞激烈搖動。
7. 對於每一菌種做同樣實驗。
8. 記錄結果於下表中。

菌種名稱	色素之存 否與顏色		在洋菜中的擴散性	色素之溶解性				
	20°C	37°C		水	酒精	醚	氯仿	丙酮
S. marc escens								
M. rosens								
S. lutea								
Ps. fluoresceus								
C. violaceum								

[註一] 葡萄糖酵母肉汁洋菜

酵母粉	5克
Peptone	5克
葡萄糖	10克
洋菜	20克
蒸餾水	1,000cc

混合上述各成分並加熱溶解之，調節 pH 至 7.2 過濾後裝管於 Arnold 殺菌器中 10°C 下殺菌 20 分鐘並連續三日。

### (十三) Nitrate 之還原作用 (The Reduction of Nitrate)

#### 1. 簡介 (General Remark)

Nitrate 之還原作用係指培養基中存在之 Nitrate 因受細菌之影響而消失，平常的細菌只把它還原至 Nitrite 為止，不過有的時候這個作用會行至氮之出現，甚至於到氮氣之出現為止。

Nitrate 之還原作用只能在嫌氣狀態下產生 如果在好氣狀態下培養則此作用不能發生 Nitrate 成為受氫體 (Hydrogen acceptor) 以支持細菌之嫌氣生長。

這個實驗對於細菌之鑑別及分類非常有價值。

#### 2. 所需物品 (Materials required)

1. 於肉汁洋菜斜面培養24小時之 *Proteus vulgaris* 1支
2. 於肉汁洋菜斜面培養24小時之 *Pseudomonas fluoresceus* 1支
3. Nitrate broth [註一] 3支

4. Sulfanilic acid 試液 [註二]

5. x-naphthylamine 試液 [註三]

6. 試管

7. 1 cc 吸管

2支

3. 實驗步驟 (Procedure)

1. 由培養24小時的 *P. vulgaris* 洋菜斜面接種於1支 Nitrate broth
2. 由培養24小時之 *Ps. fluoresceus* 洋菜斜面接種於另一支 Nitrate broth 中
3. 留第3支 Nitrate broth 作為控制試驗 (Control)
4. 將3支都保溫於 37°C
5. 由每一支 Nitrate broth 各移去 1cc 培養液於試管中，在每一試管中加兩滴 Sulfanilic acid 試液兩滴  $\alpha$ -naphthylamine 試液，粉紅色 (Pink) 或紅色 (Red) 之出現表示有 Nitrite 之存在。
6. 將結果記於下表中。

菌種	Nitrate 還原為 Nitrite 日數									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
<i>P. vulgaris</i>										
<i>Ps. fluoresceus</i>										
Control										

7. 繼續作實驗至菌種之一表示 Nitrate. 存在這個結果表示 Nitrite 已完全還原為氨 (Ammonia)。

8. 記錄結果於下表中。

菌種	Nitrite 還原為 Ammonia									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
<i>P. vulgaris</i>										
<i>Ps. fluoresceus</i>										
Control										

4. 觀察

1. 氣體 (Gas) 之發生可由。

肉汁培養液產生泡沫 (Foam)

洋菜斜面發生裂痕 (Cracks)

觀察。

此氣體可能是氨 (Ammonia) 或氮氣 (N<sub>2</sub>)。

2. Gas 之產生明顯的表示已有還原作用發生。

3. Nitrite 之存在表示 Nitrate 已被還原。

4. 負的結果 (Negative result) 並不證明該菌種不能還原 Nitrate 這在種場合下還需要更進一步的研究。[註四]

[註一] Nitrate broth :

肉汁	3克
Peptone	5克
硝酸鉀 (化學用)	1克
蒸餾水	1,000cc

混合上述各成分並加熱至沸騰調節 pH 至 7.2，過濾後裝管後於高壓釜內 15 磅壓力下殺菌 30 分鐘。

[註二] Sulfanilic acid 試液：

Sulfanilic acid	8克
濃硫酸	48cc
蒸餾水	加至 1,000cc

將濃硫酸加於 500 cc 水中，而後再加入 Sulfanilic acid，最後再加水直至 1,000 cc。

[註三]  $\alpha$ -naphthylamine test solution

$\alpha$ -naphthylamine sol	5克
濃硫酸	8cc
蒸餾水	1,000cc

加濃硫酸於水中，混合後再加入  $\alpha$ -naphthylamine 震搖溶解之。

[註四]：

如果菌種在 Nitrate broth 中發育不良時需將培養液之成分變更如下：

1. 增加或減少 Peptone 之含量。
2. 變更 Nitrate 之量。
3. 改變 pH
4. 加些碳水化合物。
5. 加入 0.1~0.5 % 的洋菜使液體培養基成為半固體培養基。

在任何一種 Nitrate 培養基中若發現有 Nitrite 存在 (而 Control 者沒有時) 便要認為有還原作用發生。

在菌種發育良好而不能發現 Nitrate 時，一方面可能是 Nitrite 已完全被消耗，還原作用已超過 Nitrate 的階段而成為氨 (Ammonia) 或氮 (Nitrogen) 等，一方面可能是沒有還原作用發生，因此 Nitrate 之有無可加少些鋅粉 (Zinc dust) 於已加入 Nitrite 試藥的培養液中待數分鐘，如有 Nitrate 存在便被還原為 Nitrite 而呈現粉紅色 (Pink color)。

置 Diphenylamine 晶體於白瓷盤上的濃硫酸中，然後再加一滴培養液 (如果是洋菜培養基可取斜而底部之液體) 藍色 (Blue color) 之發生表示 Nitrate 之存在 (如果沒有 Nitrite 之存在)。

由上述之二實驗證明 Nitrate 未被利用，此菌種可能不利用 Nitrate 但為了事實之確定還需有更進一步的證明在此必須明瞭 Nitrate 未被還原只是說明沒有 Nitrite 之產生而已。

#### (十四) Indol 之生成 (Indole production)

1. 簡介 (General Remark)

Indol 是某些細菌對於氨基酸 (Amino acid) tryptophan 行分解作用而生成的，自然界的氨基酸中惟有 Tryptophane 含有 Indol ring 因此這個實驗對於此化合物是很

特殊的。

細菌以各種不同方式分解 Tryptophone 而並不是所用的細菌能把它分解為 Indol。因此這個實驗能用於細菌的鑑別與分類。

2. 所需物品 (Materials required)

1. 於肉汁培液培養24小時之大腸菌 (*E. coli*) 1支
2. 於肉汁培液培養24小時之 *Proteus vulgaris* 1支
3. 於肉汁培液培養24小時之 *Micriococcus pyogenes varaureus* 1支
4. Tryptone broth [註一] 6支
5. Gnezda oxalic acid 試紙 [註二]
6. Kovacs reagent [註三]

3. 實驗步驟 (Procedure)

1. 取兩支 Tryptophan broth 各接種1接種環量於肉汁培養液中培養24小時之大腸菌。
2. 同樣接種 *P. vulgaris* 及 *B. M. Pyogenes varaureus* 於二支 Tryptophone broth 中。
3. 分為二組在其中一組試管內懸掛 Gnezda oxalic acid 試紙 (即將試紙放入後以棉塞將紙條塞位於試管內壁)。
4. 保溫於 37°C 4 天, 如果發育良好通常只要 2 天便夠。
5. 保溫期滿後依照下法作試驗。

(Gnezda Oxalic acid 法)

6. 觀察掛有 Oxalic acid 試紙的3支試管如果有 Indole 產生 Oxalic acid 之結晶體呈現粉紅色 (Pink)。
7. Indole 是揮發性的因此如果細菌能分解 Tryptophone 而產生 Indole, 則 Oxalic acid 試紙一定呈現粉紅色, 並且 Indole 是細菌能產生的唯一揮發性物質, 能使 Oxalic acid 晶體變成粉紅色的, 故此試驗是具有特殊性的。

(Kovais 法)

8. 各加 5ml Kovais reagent 於第二組之每一試管中, 在試液層內產生櫻桃紅色 (Cherry red color) 表示有 Indole 之存在。
9. 此方法不但在有 Indole 時產生顏色, 而且有  $\alpha$ -methyl indole 存在時也有同樣結果, 因此這一方法不如 Gnezda 法具有特殊性。

10. 結果記於下表中:

菌 種	Indole 反應	
	Gnezda 法	Kovais 法
<i>E. coli</i>		
<i>P. vulgaris</i>		
<i>M. pyogenes var aureus</i>		

4. 觀察:

1. 做此實驗最重要的條件是培養基中 Peptone 須含有 Tryptophan, 通常細菌學上所用的 Peptone 是瘦肉 (Leanmeat) 消化而成, 而有的不含有 Indole, 所以須改用消化 Casein (Casein digest) 才合適。

2. 細菌的發育良好時1~2天的保溫已足夠，如果生長旺盛在24小時後可能是正，但48小時後變為負，故48小時後，每24小時應作實驗一次。
3. 有些 Para-dimethyl-aminsbenzaldehyde 與 Amyl 或 Butyl alcohol 不能使用於 Indole test，因此供給新的藥品時須先檢試是否適用。

[註一] Tryptone broth

Tryptone	10克
肉汁	3克
蒸餾水	1,000ml

將各種成份溶於蒸餾水中煮沸，調節 pH 為 7.2 以濾紙過濾後置於試管中，在高壓釜滅菌（121 °C 15磅壓力下30分鐘）

[註二] Gnezda Oxalic acid 試紙

浸一塊濾紙於溫熱的 Oxalic acid 飽和溶液後懸起來乾燥，到冷卻時紙上有 Oxalic acid 結晶體，待完全乾燥後將它剪為 ¼ × 3 吋而保存於緊密之廣口瓶內。

[註三] Kovais 試液。

Para-dimethyl-amino benzaldehyde	5克
Amyl 或 Butyl alcohol	75cc
濃鹽酸	25cc

將 Para-dimethyl-amino benzaldehyde 溶於 Amyl 或 Butyl alcohol 中後加鹽酸。

## (十五) 硫化氫之生成 (The Production of Hydrogen sulfide)

### 1. 簡介 (General Remark)

有些細菌能分解含有硫 (Sulfur) 的氨基酸 (Amino acid) 如 Cystine 而放出硫化氫，硫化氫是被認為一種由嫌氣腐敗所產生的化合物，硫化氫之產生可在培養基中加入重金屬 (Heavy metal) 以探知，因當硫化氫產生時立即與重金屬作用而生成金屬硫化物，這些化合物都具有顏色，因此可以很容易地看出來。

在各種重金屬中鉛 (Lead) 最常被利用，但因鉛不很敏感，因此後來漸漸地以其他重金屬如鐵 (Iron) 鎳 (Nickel) 鈷 (Cobalt) 或鉍 (Bismuth) 代替。

有些細菌能夠分解 Cystine 為硫化氫，但其他的則不能，這些實驗有助於鑑別或分類細菌。

### 2. 所需物品 (Materials required)

1. 於肉汁洋菜斜面培養24小時的 *Proteus vulgaris* 1支
2. 於肉汁洋菜斜面培養24小時的 *E. coli* 1支
3. 百補登鐵洋菜培養基 (Peptone iron agar) [註一] 2支

### 3. 實驗步驟 (Procedure)

1. 以接種針取些培養24小時的 *P. vulgaris* 刺入百補登鐵洋菜培養基。
2. 同樣接種 *E. coli*。
3. 保溫於 37°C 2 至 4 天。
4. 觀察所生長的綠色的周圍是否有黑色出現。
5. Gram 染色法檢查所接種菌是否受到任何雜菌之感染。

6. 記錄所得結果於下表：

菌 種	變 黑 色		Gram 染色 之反應
	有	無	
E. coli			
P. vulgaris			

4. 醋酸鉛試紙 (Lead acetate paper) 之使用。

將白色濾紙切成 5×50mm 大，浸於醋酸鉛之飽和溶液中放於有棉栓之試管內，於 120°C 乾熱箱中乾燥之，而後將之插入含有肉汁培液之試管之棉栓下約占全長之  $\frac{1}{4}$  至  $\frac{1}{2}$ ，接種後保溫於 37°C，每日觀察濾紙條上是否有黑色出現。

[註一] Peptone iron agar

Peptone	15克
Proteose peptone	5克
檸檬酸鐵銨 (Ferric ammonium citrate)	0.5克
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1克
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5H <sub>2</sub> O (.P)	0.08克
洋菜	20克
蒸餾水	1,000ml

將各成分加入蒸餾水中，煮沸至洋菜完全溶解為止，添加蒸餾水以補充蒸發量，調節 pH 至 6.8 以棉花濾過，分置於試管中於高壓釜內以 15 磅壓力 121°C 滅菌 30 分鐘，取出後將試管直立使凝固為洋菜柱以便刺入接種。

## (十六) 膠的液化 (Liquefaction of Gelatin)

1. 簡介 (General remark)

膠乃是由一種不溶性蛋白質 (Collagen) 經水解 (Hydrolysis) 後所得之蛋白質，當膠溶於水後凝固為一種膠質物 (Jelly)，因為這是一種蛋白質，因此能被許多細菌分解而失去膠性，能發生此作用的酵素 (Enzyme) 便稱為 Gelatinase，這是一種細胞外酵素 (Extracellular enzyme) 所以其存在可因加些菌體濾過液於適當的 Substrate 而證明，但如果有碳水化合物 (Carbohydrate) 存在，則碳水化合物便立即被發酵而不能產生該酵素，所以欲實驗菌種是否能生出 Gelatinase 時必須使用不含碳水化合物的培養基才可，有些菌種能生成 Gelatinase 有些則否，所以這個實驗能供鑑別與分類之用。

2. 所需物品 (Materials required)

於肉汁培液 (Nutrient broth) 培養 24 小時的 <i>Proteus vulgaris</i>	1 支
於肉汁培液 (Nutrient broth) 培養 24 小時的 <i>E. coli</i>	1 支
肉汁膠培基 (Nutrient gelatin)[註一]	3 支
5% 石炭酸 (Phenol) 水溶液	
1ml 吸管	

3. 實驗步驟 (Procedure)

有活的細菌存在時

1. 取一接種環量於肉汁培液 (Nutrient broth)，培養24小時的 *P. vulgaris* 接種於第一支肉汁膠培养基內。
2. 同樣接種 *E. coli* 於第二支肉汁膠培养基內。
3. 保溫於 37°C 48小時。
4. 移入冰箱內置 1 小時。
5. 觀察膠是否凝固。

沒有活的細菌存在時

1. 在 Arnold 滅菌器或沸水槽內溶解 10ml 的肉汁膠培养基。
2. 加 1ml 的 5% Phenol 水溶液 [註二] 於溶解的肉汁膠內。
3. 這樣使 Phenol 的最後濃度約為 0.5%。
4. 在兩手掌之間滾動試管使不發酸液與培養液混合均勻。
5. 使冷卻為 45°C。 [註三]
6. 加入 0.5ml 的培養 *P. vulgaris* 24 小時的肉汁培液。
7. 再滾動試管。
8. 保溫於 37°C 48小時。
9. 移入冰箱內置 1 小時。
10. 觀察膠是否凝固。
11. 紀錄你所觀察的結果於下表中。
12. 討論兩種實驗之結果。

菌種	膠之液化作用	
	有活的細菌存在時	沒有活的細菌存在時
<i>P. vulgaris</i>		
<i>E. coli</i>		

[註一] 肉汁膠培养基之配法。

肉抽出液	3克
百補登 (Peptone)	5克
膠 (Gelatin)	150克
蒸餾水	1,000ml

混合上述成分於水中，煮沸使之溶解，調節 pH 為 7.2 以棉花過濾之，裝管於 Arnold 殺菌器 100°C 20分鐘連續三日。

[註二] 5% 石炭酸水溶液。

是一種滅菌劑。

[註三] 冷卻至 45°C 之目的。

因細菌在 45°C 時加入可免因熱而變性 (Denaturation)。

## (十七) 碳水化合物之發酵 (The fermentation of carbohydrates)

### 1. 簡介 (General Remark)

各種菌種發酵碳水化合物之能力各不相同，有些細菌能分解某種碳水化合物而產生酸 (Acid) 與氣體 (Gas)。有些只能產生酸而不生氣體，更有些是不能發酵該化合物，這

些知識對於細菌的鑑定與分類是有價值的。

2. 所需物品 (Materials required)

於肉汁培養液培養24小時的 *E. coli*

於肉汁培養液培養24小時的 *E. coli* var *communior*

於肉汁培養液培養24小時的 *Micrococcus pyogenes* var *aureus*

於肉汁培養液培養24小時的 *Proteus vulgaris*

裝於 Dichum inbe [註一] 的加有 Bromthymol blue [註二] 指示劑的

葡萄糖醱酵培養液[註三] 4支

裝於 Durham tube 的加有 Bromthymol blue 指示劑的乳糖醱酵培養液[註四] 4支

裝於 Durham tube 的加有 Bromthymol blue 指示劑的蔗糖醱酵培養液[註五] 4支

裝於 Durham tube 的加有 Bromthymol blue 指示劑的甘露糖醱酵培養液[註六] 4支  
Mannose

裝於 Durham tube 的加有 Bromthymol blue 指示劑的糊精醱酵培養液[註七] 4支  
Dextrin

3. 實驗步驟：

1. 以一接種環量的培養於肉汁培養液24小時的 *E. coli* 接種於一組培養液即葡萄糖，乳糖，蔗糖，Mannose dextrin 醱酵培養液各1支共5支合為一組。
2. 同樣以一接種環量之 *E. coli* var *communior* 接種於第二組培養液內。
3. 同樣以一接種環量之 *M. pyogenes* var *aureus* 接種於第三組培養液內。
4. 同樣以一接種環量之 *P. vulgaris* 接種於第四組培養液內。
5. 將所有的培養液都保溫於 37°C 48小時。
6. 紀錄結果於下表中。

菌 種	反應及氣體之生成				
	Glucose 葡萄糖	Lactose 乳糖	Sucrose 蔗糖	Mann- ose	Dextrin
<i>E. coli</i>					
<i>E. coli</i> var <i>communior</i>					
<i>M. pyogenes</i> var <i>aureus</i>					
<i>P. vulgaris</i>					

注意：以 a：代表酸之生成  
G：代表氣體之生成  
空白表示沒有生成

例如

Glucose	Lactose	Sucrose
a. G	a.	

4. 附：1. 如果以加有指示劑的固體 (Solid) 或半固體 (Semisolid) 培養基代替培養液 (Broth) 時便不需用 Durham tube 可由培養基的裂痕或氣泡知道是否有氣體產生。  
2. 某一在加有碳水化合物之培養基能產生酸與氣體而在不含有碳水化合物的普通培養基則不發生任何酸與氣體便可說該菌種能醱酵此碳水化合物。

[註一] Durham tube

大試管 150 × 18mm

小試管 75×10mm

將一小試管倒置於大試管內所成的一套稱為 Durhum 管，亦可以 Smith 管來作此實驗。

[註二] 使用於醱酵培養基 (Fermentation medium) 所用之 Bromthymole blue (溴麝香芸) 指示劑溶液。

pH 範圍

黃色 6.1~7.7	青色
Bromthymol blue	16克
酒精(95%)	500ml
蒸餾水	500ml

將 Bromthymol blue 於酒精後加入蒸餾水，以濾紙過濾，此濃度之溶液只能使用於製造培養基而不能用於平常滴定用的指示劑。

[註三] 葡萄糖醱酵培養液，但：Glucose fermentation broth

肉汁 (Meat extract)	3克
百補登 (Peptone)	5克
葡萄糖	5克
Bromthymol blue 指示劑溶液	1ml
蒸餾水	1,000ml

將肉汁百補登葡萄糖加入蒸餾水煮沸調節 pH 為 7.0 加入指示劑溶液混合均勻以濾紙過濾分於 Durhum 試管在 Arnold 滅菌器中以 100°C 20分鐘繼續滅菌三天。

[註四] 以乳糖 5克代葡萄糖。

[註五] 以蔗糖 5克代葡萄糖。

[註六] 以 Mannose 5克代葡萄糖。

[註七] 以 Dextrin 5克代葡萄糖。

## (十八) 澱粉之水解 (Hydrolysis of starch)

### 1. 簡介 (General Remark)

澱粉是一種多醣類 (Polysaccharide) 有些細菌能分泌一種細胞外酵素稱為 “Amylase” 或 “Diastase” Amylase 能夠水解膠態澱粉分子 (Colloidal starch molecule) 為麥芽糖 (Maltose) 麥芽糖能擴散 (Diffusible) 入細菌內，然後在菌體內被細菌體酵素 (Intracellular enzyme) 分解。

細菌或者可根據能否分解澱粉而分為兩大類，因此這個實驗能供給細菌的分類與鑑別。

### 2. 所需物品 (Materials required)

1. 於肉汁培養液培養24小時的枯草菌 *Bacillus subtilis*
2. 於肉汁培養液培養24小時的大腸菌 *E. coli*
3. 盛有 250ml 肉汁培養液之三角瓶 2個
4. 5ml 澱粉培養液[註一] (Starch broth) 3支
5. 澱粉洋菜 (Starch agar) [註二] 2支
6. 滅菌過的 Seetz 或 Berkefeld 型過濾器 (Filter) 2個
7. 滅菌過的 500ml 過濾三角瓶 (Filter flask) 2個

8. 滅菌過的二重皿 (Petri-dish)
9. 碘溶液 (Iodine solution) [註三]

### 3. 實驗步驟 (Procedure)

#### 沒有細菌存在時

1. 以一接種環量的培養於肉汁培養液歷24小時的 *B. subtilis* 將其接種於三角瓶內之肉汁培養液中。
2. 同樣接種肉汁培養液培養24小時的 *E. coli* 於第二個三角瓶內。
3. 保溫該兩個三角瓶於 37°C 5 天。
4. 以 Seetz 或 Berkefeld 型過濾器濾過 *B. subtilis* 之培養液並聚集濾液於滅菌過的 500ml 三角瓶。
5. 同法過濾 *E. coli* 的培養液。
6. 加 3ml *B. subtilis* 濾液於澱粉肉汁培養液 (Starch broth)
7. 加 3ml *E. coli* 濾液於澱粉肉汁培養液 (Starch broth)
8. 將第三支留為 Control
9. 將三支培養液都保溫於 37°C 24 小時。
10. 保溫期滿後各加數滴碘液於三支培養液而搖動記錄顏色。

#### 有細菌存在時

1. 在 Arnold 滅菌器或沸水槽內溶 2 支澱粉洋菜。
2. 待洋菜冷卻至 50°C 左右。
3. 將洋菜倒入兩個滅菌過的二重皿 (Petri dish) 內。
4. 放置待洋菜凝固。
5. 以一接種環量的於肉汁培養液已培養24小時的 *B. subtilis* 於洋菜平板表面 (Plate) 劃線 (Streak)。
6. 同樣將 *E. coli* 亦在另一平板表面上劃線。
7. 保溫於 37°C 48 小時。
8. 保溫期滿後以稀釋碘液倒於洋菜表面。
9. 注意所產生之顏色。
10. 記錄所見之結果於下表中。
11. 解釋 2 種實驗的結果。

菌 種	澱 粉 的 水 解	
	濾 液	培 養
<i>B. subtilis</i>		
<i>E. coli</i>		

#### [註一] 澱粉培養液

肉汁	3克
可溶性澱粉	2克
蒸餾水	1.000ml

將各成份溶於蒸餾水中煮沸調節 pH 為 7.4 以棉花濾過分於試管或三角瓶內在高壓釜內以 15 磅壓力 121°C 滅菌 30 分鐘。

[註二] 澱粉洋菜

肉汁	3克
可溶性澱粉 (Soluble starch)	2克
洋菜	20克
蒸餾水	1,000ml

將各成份與蒸餾水混合煮沸至洋菜完全溶解為止，再加蒸餾水以補充蒸發量，調節 pH 為 7.4 以棉花濾過分於試管中，在高壓釜內以 15 磅壓力 12°C 滅菌 30 分鐘。

[註三] 碘溶液 (可用 Lugols solution)

碘	50克
碘化鉀	100克
蒸餾水	加至 1,000ml

在研鉢 (Mortar) 中將碘與碘化鉀磨成細粉，每次以少量水洗出鉢中之內容物於量筒 (Graduate) 內，最後加蒸餾水至 1,000ml 混合均勻。

## (十九) 甲基紅試驗 (The Methyl Red test)

### 1. 簡介 (General remark)

甲基紅試驗的用意在於測定結腸羣 (Colou group) 的各份子所產生的酸量，對於同量的碳水化合物大腸菌 (*E. coli*) 所產生之酸比 *Aerobacter aerogenes* 多，僅夠大腸菌能產生最低限度氫離子 (Hydrogen ion) 的碳水化合物之量，是不適合於 *A. aerogenes* 產生最大酸度的 (Maximum acidity) 其結果大腸菌不能有更進步的變化時，*A. aerogenes* 則首先用完了碳水化合物但不能產生其最低限度氫離子濃度，因此分解培养基中含有氮的成份 (Nitrogen constituents) 而供構成 (Structure) 與能力 (Energy) 之用，在這種情形下培养基趨向於鹼性 (Alkaline)。

大腸菌的典型菌株能產生足夠的酸以使甲基紅指示劑顯示紅色，而 *A. aerogenes* 的典型菌株則顯示黃色或橙色。

### 2. 所需物品 (Materials required)

培養於肉汁培液的未知菌種	1支
培養於肉汁培液 24 小時的大腸菌	1支
培養於肉汁培液 24 小時的 <i>A. aerogenes</i>	1支
甲基紅培液 (Methyl red broth) [註一]	3支
甲基紅指示劑溶液 [註二]	

### 3. 實驗步驟 (Procedure)

1. 以一接種環量的於肉汁培液已培養 24 小時的大腸菌接種於第一支甲基紅培液內。
2. 同法將 *A. aerogenes* 接種於第二支甲基紅培液內。
3. 同法將未知菌種接於第三支甲基紅培液內。
4. 保溫於 37°C 4.8 小時
5. 從保溫箱取出試管後各加 5 滴甲基紅指示劑溶液混合均勻。
6. 產生明顯紅色時為 Methyl red +
7. 產生明顯黃色時為 Methyl red -
8. 產生明顯中間顏色時須紀錄為有問題 (Questionable)

[註一] 甲基紅培液 (Methyl red broth)

Proteose peptone	7克
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 磷酸一氫鉀	5克
葡萄糖	5克
蒸餾水	1,000ml

將各成分與水混合煮沸，以濾紙過濾，分於試管中，在 Arnold 滅菌器中以 100°C 20分鐘連續滅菌3日。

[註二] 甲基紅指示劑溶液

甲基紅	0.1克
酒精(95%)	250ml
蒸餾水	250ml

溶甲基紅於酒精中加蒸餾水後以濾紙過濾。

## (二十)Voges-Proskauer 試驗 (The Voges-Proskauer test)

### 1. 簡介

Voges-Proskauer (V-P) 試驗的正結果有類於碳水化合物之中間代謝產物 Acetylmethyl carbinol 之存在。這種化合物能被 *Aerobacter aerogenes* 及其他菌種產生，而大腸菌則否，在氫氧化鈉與空氣之存在下，Acetylmethyl carbinol 能更進一步的被氧化成為 Diacetyl，而 Diacetyl 在有 Peptone 之存在下能產生如 Eosin 的顏色 (Eosinlike color)。

V-P 試驗能清楚的分別 Colou group (結腸羣中的典型 fecal 含渣滓的) 分子與 Non-fecal 分子，因此在衛生學方面具有相當的重要性。

### 2. 所需物品 (Materials required)

培養於肉汁洋菜斜面的未知菌種	1支
於肉汁培液培養24小時的 <i>E. coli</i>	1支
於肉汁培液培養24小時的 <i>Aerobacter aerogenes</i>	1支
甲基紅培液[註一]	3支
$\alpha$ -naphthol 溶液[註二]	
Potassium hydroxide-creatine 溶液[註三]	

### 3. 實驗步驟 (Procedure)

1. 以一接種環量的於肉汁培液培養24小時的 *E. coli* 接種於第一支甲基紅培液。
2. 同法接種 *A. aerogenes* 於第二支甲基紅培液。
3. 以未知菌種接種於第三支甲基紅培液。
4. 保溫於30°C 24至48小時。
5. 保溫期滿後在每一支培液中各加 3 ml  $\alpha$ -naphthol 溶液，然後再加 1ml Potassium hydroxide-creatine 溶液。
6. 激烈的搖動試管 1分鐘。
7. 試藥加入後2~4小時間產生深紅色 (Crimson) 一紅玉色 (Ruby) 時視為正反應。
8. 將未知菌種與 *E. coli* *A. aerogenes* 比較。

[註一] 甲基紅培液

視甲基紅試驗一節之〔註一〕

〔註二〕  $\alpha$ -naphthol 溶液

$\alpha$ -naphthol 5克  
酒精(95%) 加至100ml  
溶解  $\alpha$ -naphthol 於酒精內使最後體積為100ml。

〔註三〕 Potassium hydroxide-creatine 溶液

氫氧化鉀 40克  
Creatine 0.3克  
蒸餾水加至 100ml

溶解氫氧化鉀於蒸餾水中待溶液之溫度冷卻為室溫時加入 Creatine 後，再加蒸餾水使最後體積為 100ml。

## (二十一)牛乳中產生酸 (Acid Production in Milk)

### 1. 簡介 (General Remark)

細菌在牛乳中產生的酸很容易測定，但是實驗要考慮到牛乳的顏色是不透明的，因此在與標準色比較前需將牛乳作適當的稀釋才可，石蕊牛乳 (Litmus milk) 是最常用的指示劑牛乳，它在中性時 (pH 6.9) 呈淡紫色 (Lavender color) 產生酸後變紅色，產生鹼後則變藍色，除了石蕊以外 Bromcresol purple 也被用於測定牛乳之酸性。用 Bromcresol purple 可將酸性分為5級如下表。

酸度 (Acidity)	指示劑之顏色反應等	pH 範圍
Neutral	對 Bromcresol purple 呈藍至灰綠色	6.2—6.8
Weak	對 Bromcresol purple 呈灰綠至綠黃	5.2—6.0
Moderate	對 Bromcresol purple 呈黃色無凝乳現象	4.7—6.0
Strong	對 Bromphenol blue 呈藍或綠色有凝乳現象	3.4—4.6
Very strong	對 Bromphenol blue 呈黃色	3.4以下

### 2. 所需物品 (Materials required)

培養於肉汁培液之 *Alcaligenes viscosus* 1支  
培養於肉汁培液之 *Micrococcus cremorisviscosi* 1支  
石蕊牛奶 (Litmus milk) 〔註一〕 2支

### 3. 實驗步驟 (Procedure)

1. 以一接種環量而培養於肉汁培液的 *A. viscosus* 接種於 1 支石蕊牛奶中。
2. 同法接種 *M. cremorisviscosi* 於另一支石蕊牛奶中。
3. *A. viscosus* 保溫於 20°C *M. cremorisviscosi* 保溫於 30°C 一星期。
4. 觀察顏色之變化粘性及凝固情形。

〔註一〕 石蕊牛奶

脫脂鮮奶 1,000ml  
Azolitmin 1克

加數滴 1N NaOH 以助 Azolitmin 溶於 10ml 的蒸餾水，加此指示劑溶液於脫脂鮮奶中並混合均勻分於試管中，在 Arnold 滅菌器內作 3 日間歇滅菌每次在 100°C 滅菌 20 分鐘。

# 四 黴菌之形態

## (Morphology of molds)

### (一) 試樣 (Sample)

培養於培養基上24小時，48小時及一星期之麴菌 (Aspergillus)，青黴 (Penicillum)，根黴 (Rhizopus)，及鐮刀菌 (Insarium)，斜面培養者及平面培養者。

### (二) 器具 (Material Required)

1. 潔淨的載玻片及蓋玻片
2. 乳酸一酚 (Lactophenol) 液[註一]
3. 接種針
4. 酒精燈
5. 夾子
6. 顯微鏡

### (三) 實驗步驟 (Procedure)

#### 1. 培養基上之特徵及觀察

照下述之各項調查並紀錄之：

- (1) 聚落 (Colonies) 之大小，生育之速度，形狀，及其凹凸。
- (2) 聚落表面之形狀，及其顏色，如毛線狀，稀毛狀，束狀，繩狀等。
- (3) 聚落周圍之形狀。
- (4) 培養基顏色之變化。
- (5) 聚落之臭氣。
- (6) 聚落上所溢出之水滴量及顏色。

以上各項通常在25°C下，連續培養 3~7 日，按時觀察之。

#### 2. 顯微鏡的觀察

- (1) 加一滴 Lactophenol 於載玻片之中央，將接種針在火焰上，燒至紅熱，殺菌之。
- (2) 特製有菌絲之試管口，在火焰上，殺菌之。打開棉栓，以接種針鉤取少量菌種，塞上棉栓，將菌體放於 Lactophenol 液中。
- (3) 以二支接種針，將菌體略加撕開，並使其被 Lactophenol 液所濕潤，但切不可太用力，以免破壞菌體整體。
- (4) 蓋上蓋玻片，不要使氣泡進入。
- (5) 先用低倍率觀察菌體之全貌[註二]，再換以高倍率觀察各部分之形態及大小。

[註一] 乳酸一酚 (Lactophenol) 液，此染色液，不引起菌類細胞之分裂且不易蒸發，故可用作蒙蓋 (Mounting fluid)，其配方如下：

酚 (Phenol)	20 g
乳酸	20 cc
甘油	40 cc
蒸餾水	40 cc

將上列各成分混合均勻就可，配好應貯藏於褐色瓶中保存之。

[註二] A. 麴菌及青黴形態之觀察

- (1) 有無橫隔 (Septa)。
- (2) 有無足細胞 (Foot cell)。
- (3) 分生子柄 (Conidiophore)，即足細胞上，所生之氣生菌絲，有無分枝。
- (4) 頂囊 (Vesicle) 之形狀，即氣生菌絲頂端膨大之部分。
- (5) 小梗 (Sterigmata)，即着生於頂囊上之瓶狀物單列或雙列。
- (6) 分生子 (Conidium) 之形狀及大小；由小梗分生而成之球狀物。

B. 根黴菌形態之觀察

- (1) 有無葡萄枝 (Stolon) 即培養基上，所蔓延之一種菌絲。
- (2) 有無假根 (Rhizoid)，即葡萄枝與培養基接觸之部分，向下分枝之根狀物。
- (3) 孢子囊柄 (Sporangisphore)：向上着生之菌絲，有無分枝。
- (4) 孢子，囊 (Sporangium)：着生於孢子囊柄之頂端。
- (5) 孢子 (Spore) 之大小及形狀。
- (6) 中軸 (Columella)：着生於孢子囊之基部之形狀如何。

C. 鐮刀菌形態之觀察

- (1) 菌絲有無分枝。
- (2) 孢子之形狀及大小。
- (3) 有無橫隔。
- (4) 孢子中有無分隔。

## 五 各種培養基

### (一) 普通培養基

#### (a) 肉羹培養基製法

- |         |          |
|---------|----------|
| (1) 牛肉膏 | 5 公克     |
| 蛋白胨     | 10 公克    |
| 蒸溜水     | 1,000 公撮 |

(2) 矯正 pH 6.4~7.0

(3) 各 10cc 分注試驗管內然後滅菌

#### (b) 1% 葡萄糖肉羹培養基製法

- |         |          |
|---------|----------|
| (1) 肉 羹 | 1,000 公撮 |
| 葡萄糖     | 10 公克    |

(2) 溶解然後分注

(3) 各 10 公撮分注試驗管內然後在 100°C 下行 20 分鐘三次間隔滅菌或高壓滅菌 120°C 15 分鐘一次滅菌。

#### (c) 普通瓊脂培養基製法

- |         |          |
|---------|----------|
| (1) 肉 羹 | 1,000 公撮 |
| 瓊 脂     | 25~30 公克 |

(2) 溶解然後矯正 pH 6.4~7.0

(3) 以後一次高壓滅菌

#### (d) 0.5~1% 葡萄糖瓊脂培養基製法

供檢驗罐頭食品之平面酸敗 (Flat-sour) 原因菌，嫌氣性菌，及好氣性菌用。

- |                  |          |
|------------------|----------|
| (1) 2.5~3% 之普通瓊脂 | 1,000 公撮 |
| 葡萄糖              | 5~10 公克  |

(2) 葡萄糖先用少量之水溶解後加熱溶解混合普通瓊脂然後分注。

(3) 分注後滅菌

#### (e) 筋膠培養基製法

- |         |            |
|---------|------------|
| (1) 肉 羹 | 1,000 公撮   |
| 精製筋膠    | 100~200 公克 |

(2) 放在 65°C 的溫槽內，攪拌溶解，然後矯正 pH 6.4~7.0，以後混合 2 個卵白，放在蒸氣滅菌器內，於 100°C 下加熱 30 分鐘後濾過，再矯正 pH 倘濾液不透明，可再加卵白，反復操作，然後分注於試驗管內並在 100°C 下行 15 分鐘三次間隔滅菌。

注意事項：

① 所加筋膠量冬天 100 公克，夏天 200~300 公克並宜先浸於水內一夜，然後應用。

② 筋膠溶液呈強酸性，矯正 pH 時所需鹼液較多。

③ 製造此種培養基時，當極力避免過度加熱，故不宜使用高壓滅菌器滅菌。

④ 滅菌後，即速冷却凝固。

⑤ 筋膠培養基在 25°C 左右即可溶解，故不可放在 37°C 孵卵器內，只宜於室溫培養，惟臺灣氣溫較高，在夏季普通實驗室內，概不能應用。

⑥此種培養基多應用於一般細菌之分離，水的細菌檢查，筋膠液化性之檢查及菌種保存。

(f) 生理食鹽水製法

(1) 精製食鹽 8.5 公克  
蒸溜水 1,000 公撮

(2) 溶解然後分注

(3) 高壓滅菌

(g) 1%食鹽水

(1) 精製食鹽 10 公克  
蒸溜水 1,000 公撮

(2) 溶解然後分注

(3) 高壓滅菌

(4) 1%食鹽水是魚介類(使用)檢體稀釋用

## (二) 細菌數測定用標準培養基

(a) 牛乳用標準培養基製法

(1) 瓊脂 25 公克 (精製瓊脂粉 15 gm)  
牛肉膏 3 公克  
蛋白胨 5 公克  
葡萄糖 1 公克  
蒸溜水 1,000 公撮※  
※ 脫脂乳

(2) 矯正 pH 6.6~7.0 (最適當是 pH 7.0)

註 ※1:10倍稀釋以上，培養之時，加1%之脫脂乳，脫脂乳粉10公克加水100公撮然後溶解，瓊脂培養基1,000公撮加10公撮，濾過分注，高壓滅菌。

(b) 使用乳製品以外之標準瓊脂培養基

普通瓊脂培養基加 0.1% 葡萄糖，製法依照葡萄糖瓊脂培養基

## (三) 大腸菌屬檢驗用培養基

(a) 乳糖肉糞培養基製法(即乳糖醱液)

(1) 普通肉糞加純乳糖 0.5%

(2) 分注於醱管內，高壓滅菌後即時冷卻或是使用間歇滅菌

(b) 遠藤氏培養基製法 (Endo medium)

(1) 3%之普通瓊脂培養基 (pH 7.4~7.8) 1,000公撮溶解

(2) 先用小量的水溶解純乳糖15公克充分混合溶解

(3) 再加品紅之酒精溶液 (90%之酒精 100 C 溶解品紅約10 gm) 約加 1.0公撮。

(4) 冷卻至約50°C之時徐徐滴入新製之10%亞硫酸鈉以還原至淡桃色大約需要10~15公撮

(5) 分注後於100°C 30分鐘間隔滅菌，然後放置冷暗處。

(c) 伊紅，美藍瓊脂培養基製法 (E. M. B. Medium)

(1) 蛋白胨 10 公克

二鹽基磷酸鉀 ( $K_2HPO_4$ ) 2 公克

瓊脂 25~30 公克

蒸溜水 1,000 公撮

放在水浴內加熱溶解，然後用蒸溜水補充蒸發時之損失

(2) 加乳糖 10 公克，2% 伊紅溶液，20 公撮，0.5% 美藍水溶液 13 公撮充分混合。

(3) 分注後間隔滅菌然後放在冷暗處

(d) 煌綠乳糖膽汁肉羹培養基製法 (B. G. L. B. Medium)

(1) 蛋白朊 10 公克

乳糖 10 公克

蒸溜水 500 公撮，溶解

(2) 加新鮮牛膽汁 200 公撮 (使用牛膽粉之時牛膽粉 20 公克，水 200 公撮溶解，矯正 pH 7.0~7.5)

(3) 再加蒸溜水全量約 975 公撮，矯正 pH 7.4

(4) 然後加 0.1% 煌綠水溶液 13.3 公撮

(5) 全量達 1,000 公撮然後濾過分注於醱酵管內後後分注施行間隔滅菌 (滅菌後之 pH 7.1~7.4)

(e) 蟻酸鹽蓖麻酸鹽肉羹培養基製法

(1) 蛋白朊 5 公克

乳糖 5 公克

蟻酸鈉 5 公克

蓖麻酸鈉 1 公克

蒸溜水 1,000 公撮

矯正 pH 7.3~7.5

(2) 檢體 1 公撮時醱酵管內分注 10 公撮，檢體 10 公撮時依照前處方各 1.5 倍分注 20 公撮。

(3) 高壓滅菌

(f) Desoxycholate 瓊脂培養基製法

(1) 蒸溜水 1,000 公撮

蛋白朊 10 公克

瓊脂 25 公克

乳糖 10 公克

食鹽 5 公克

檸檬酸鐵銣 2 公克

磷酸水素二鉀 2 公克

Desoxyrhole 酸鈉 1 公克

中性紅 0.033 公克

矯正 pH 7.3~7.5

(2) 先將蛋白朊、瓊脂、乳糖、食鹽、檸檬酸鐵銣、磷酸水素二鉀加蒸溜水 1,000 公克加熱溶解濾過，矯正 pH 7.3~7.5 然後加 Desoxychole 酸鈉 1 公克中性紅 0.033 公克，再矯正 pH 後施行間隔滅菌

(g) 雷雪氏雙糖環脂培養基製法 (Russell)

- |         |          |
|---------|----------|
| (1)乳 糖  | 10 公克    |
| 葡萄糖     | 1 公克     |
| 標示藥     | 10 公克    |
| 普通瓊脂培養基 | 1,000 公撮 |

(2)先溶解瓊脂培養基，加入糖類後充分混和後加標示藥，分注於試驗管內惟分注量應較製作普通斜面稍多。

(3)在 100°C 下，行 20 分鐘三次間隔滅菌。

(4)標示藥之製法：酸性品紅 0.5 公克溶解於 100 蒸溜水內徐徐滴入一當量苛性鈉溶液，直至轉為桃紅色止，所需鹼量約 17 公撮。

註 此種培養基用於大腸菌，沙氏桿菌及出血性敗血症菌的鑑別。

#### (四)嫌氣性菌用培養基

##### (a) 肝片肝臟肉糞培養基製法

- |                       |          |
|-----------------------|----------|
| (1)普通肉糞               | 1,000 公撮 |
| 新鮮肝片 1cm <sup>3</sup> | 130 個    |

(2)於 100°C 下，浸漬 1 小時後濾過，次將肝片收集於篩網，以流水充分洗滌除去污物，將收集之濾液，矯正 pH 至 7.8，每試驗管分注 10 公濾液。

(3)並加入照上法調製之肝片 (0.5 cm<sup>3</sup>) 4~5 個

(4)放在高壓滅菌內 120°C 40 分鐘間隔滅菌

(5)臨用時放在 100°C 下煮沸 5~10 分鐘，急速冷卻，藉以驅出空氣

##### (b) 亞硫酸鹽添加瓊脂培養基製法

- |        |          |
|--------|----------|
| (1)蛋白朊 | 10 公克    |
| 亞硫酸鈉   | 1 公克     |
| 瓊 脂    | 20 公克    |
| 水      | 1,000 公撮 |

(2)分注之時，以洗淨之鐵之細片或是鐵釘放入試驗管內，不要矯正 pH

(3)高壓滅菌

※ 檢驗硫化水素之形成及變敗菌之檢出用

注意 該培養基使用新鮮不得過一星期及使用亞硫酸鈉溶液不得過一星期以上。

##### (c) 硫羥基乙酸培養基製法 (Thioglycolate medium)

- |                                   |          |
|-----------------------------------|----------|
| (1)胱氨酸 (l-cystin-1—雙—3—硫代—3 氨基丙酒) | 0.75 公克  |
| 食 鹽                               | 2.5 公克   |
| 葡萄糖                               | 5.0 公克   |
| 粒狀瓊脂 (水含 15% 以下)                  | 0.75 公克  |
| 酵母水浸越幾斯                           | 5.0 公克   |
| 乾酪素之胰素消化物                         | 15 公克    |
| 蒸溜水                               | 1,000 公撮 |
| 硫羥基代乙酸鈉 (或硫基乙酸)                   | 0.3 公克   |
| Resozurin 0.1% 溶液                 | 1.0 公撮   |

(2)矯正 pH 7.1~7.2 分注滅菌試驗管中然後於 15 磅 (121°C) 滅菌 15~20 分鐘。

(3) 滅菌後，急速冷卻，貯於冷暗處

(4) 此種調製液如上部 $\frac{1}{8}$ 呈紅色時，再煮沸，逐出空氣後使用

※ 食品之腐敗性嫌氣性菌用

(d) Holman 之加鹽處理肉之培養基製法

(1) 新鮮肉 (無脂肪)	500 公克
蒸溜水	1,000 公撮
蛋白胨	5 公克
食鹽	5 公克

(2) 新鮮肉 500g 加蒸溜水置冰箱內一夜，濾過除去肉之固形分濾液補充至原量後加蛋白胨 5g 食鹽 5g 於 100°C 加熱 10 分鐘，再加一規定之苛性鈉注加排諾他林至變紅色然後於加熱 15 分鐘，濾過矯正 pH 7.2~7.4。

(3) 分注試驗管內加壓榨肉 2 公克及肉汁 10 公撮混合於 121°C (15 磅) 滅菌 20 分鐘。

(e) Weinberg 之 V.F. 高層瓊脂培養基製法

(1) 牛肉	200 公克
牛肝臟	50 公克
化學用濃鹽酸	10 公撮
胃蛋白	0.5 公克
蒸溜水	1,000 公撮
瓊脂	10 公克
葡萄糖	2 公克
硝酸鉀	1 公克

(2) 牛肉與牛肝臟切成細片加水，再加鹽酸及胃蛋白混合，放置於 48°C 內 24 小時加溫消化，此時常常攪拌混合。

(3) 80°C 10 分鐘加熱後，用濾紙濾過，然後於 100°C 加熱 25 分鐘後用 10% 苛性鈉矯正 pH 8.0。

(4) 再加 1% 瓊脂溶解後，再加葡萄糖及硝酸鉀加熱濾過分注。

(5) 在 110°C 滅菌 15 分鐘。

(f) Zeissler 之葡萄糖血液瓊脂培養基製法

(1) 3% 之普通瓊脂加 2% 之葡萄糖，溶解後冷卻至 40~45°C 後再加新鮮血液 $\frac{1}{10}$ 量。

### (五) 黴及酵母用培養基

(a) 麩汁瓊脂培養製法

(1) 麩汁 (新鮮米麩)	1 公斤
蒸溜水	4,000 公撮

放置 60°C 之水容器內加溫，米麩入木棉袋中懸垂，水溫保持 60°C 中放置約 3~5 小時，常常搖動以促進糖化，糖化完了時採少量注入試驗管內滴下碘液後無青色之時始為糖化完了，後煮沸待冷卻後用紗布及脫脂棉濾過，糖濃度應為 10~12 Bé 糖化完了後濃厚時再加水，若濃度比較低時再加熱以蒸發水分。

(2) 麩瓊脂

1,000 公撮，麩汁加瓊脂 30 公克後溶解，然後分注間隔滅菌。

### (3) 雜菌試驗

貯藏一星期以檢明雜菌之混入

#### (b) 麥芽瓊脂培養基製法

- |        |          |
|--------|----------|
| (1) 麥芽 | 1 公斤     |
| 蒸溜水    | 4,000 公撮 |

(2) 以下依照麴汁瓊脂培養基製法施行之。

#### (c) 照以上製法培養基加 0004% 溴甲酚 (Brom cresol purple)

#### (d) 馬鈴薯，葡萄糖瓊脂培養基製法 (Potato Dextrose Agar)

- |         |                  |
|---------|------------------|
| (1) 馬鈴薯 | 200 公克           |
| 蒸溜水     | 1,000 公撮         |
| 葡萄糖     | 20 公克            |
| 瓊脂      | 30 公克 (純瓊脂粉15公克) |

(2) 剝馬鈴薯皮用刀切成細片取 200 公克，加蒸溜水 1,000 公撮煮沸 1 小時後，用白布絞出訂正 1,000 公撮之量，然後加葡萄糖 20 公克，瓊脂 30 公克 (純瓊脂粉 15 公克)，加熱溶解，濾過，矯正 pH 4.5~5.0，分注，行間隔滅菌，矯正 pH 之時用 10% 酒石酸液。

## (六) 特殊培養基

#### (a) 酸性緩衣肉汁培養基製法

- |         |          |
|---------|----------|
| (1) 蒸溜水 | 1,000 公撮 |
| 新鮮挽牛肉   | 500 公克   |
| 蛋白胨     | 5 公克     |
| 食鹽      | 5 公克     |
| 檸檬酸鉀    | 12 公克    |
| 葡萄糖     | 10 公克    |
| 檸檬酸     | 11 公克    |

(2) 牛肉與蒸溜水混合放置冰箱內一夜，後煮沸 30 分鐘，用適當之布濾過除去肉渣，後加蒸溜水補充不足分至 1,000 公撮然後加蛋白胨 5 公克及食鹽 5 公克，用檸檬酸鉀與檸檬酸矯正 pH 4.6，後再加葡萄糖，濾過。

(3) 除去肉渣採取約 2 公克各注入試驗管內後加 10 公撮肉汁，然後施行高壓滅菌。

(4) 使用前將培養基煮沸 10 分鐘後急速放入水中冷卻。

※ 檢驗罐頭中之耐酸性變敗原因菌用

#### (b) Peptone Azide 瓊脂培養基製法

- |          |                   |
|----------|-------------------|
| (1) 蒸溜水  | 1,000 公撮          |
| 蛋白胨      | 2 公克              |
| 食鹽       | 5 公克              |
| 瓊脂       | 25 公克 (若純瓊脂粉15公克) |
| 250 倍氮化鈉 | 10 公克             |

(2) 先作成蛋白胨瓊脂培養基，使用時另注加 250 倍氮化鈉  $\text{NaN}_3$  10 公撮

※ 檢驗溶血性之球菌用

#### (c) 結晶紫加肝臟瓊脂培養基製法

- (1) 肉 羹 1,000 公撮  
肝 臟 (細小片) 250~300 公克  
瓊 脂 25 公克  
7 萬倍結晶紫 10 公撮

(2) 肉羹 1,000 公撮加肝臟 250~300 公克，100°C 煮沸 30 分鐘，濾過後，加瓊脂 25 公克溶解，然後再加 7 萬倍結晶紫 (Crystal violet) 10 公撮

※ 檢驗布魯氏菌屬 (Brucella) 用

(d) 血液瓊脂培養基製法

- (1) 蒸溜水 1,000 公撮  
蛋白朊 5 公克  
瓊 脂 35 公克  
食 鹽 5 公克

(2) 矯正 pH 7.2，高壓滅菌，使溶解，冷卻至 40~45°C，然後加脫纖維血液 5%，使用血液：牛、馬、羊、家兔均可。

※ 檢驗溶血連鎖球菌用

## 六 酵母黴菌細菌等孢子之相對耐熱性

### (Comparative Heat Resistance of Spores of Yeast, Mold and Bacteria)

#### (一) 簡介 (General remarks)

各種孢子對熱之耐性不相同，其致死溫度不同，而在同一溫度之持久性也不同。由下面實驗可知在60°C下各種孢子之持久性。

#### (二) 菌種及培養基 (Organisms and medium)

1. 熱水槽60°C
2. 冷水或冰水
3. 溫度計
4. 酵母孢子懸液[註五] Suspension of sporulated yeasts) 1支
5. 1 ml滅菌吸管 3支
6. 葡萄糖酵母水培養液 (Glucose yeasts water broth)[註一] 14支及100 ml 1瓶
7. 黴菌孢子懸液 (Suspension of mold spore)[註四]  
例如麴黴菌 (Aspergillus) 或青黴菌 (Penicillium)
8. 乾燥滅菌試管 4支
9. 10 ml滅菌試管 1支
10. 枯草菌孢子 (Spores of Bacillus subtilis)[註三]懸液 4支
11. 肉汁培養液 (Nutrient broth)[註二] 4支

#### (三) 實驗步驟 (Procedure)

1. 注意
  - (1) 接種操作中勿使菌種接觸於試管內壁，如接觸時應於耐熱試驗開始前以火焰燒滅之。
  - (2) 所接菌種和培養基輕輕混合之。
  - (3) 如試管在水中加熱時應保持水面比培養基面高。
  - (4) 加熱時間與溫度應遵守指示。
  - (5) 加熱完了時試管應即刻放進冷水或冰水中。
2. 酵母孢子之耐熱性
  - (1) 每次接0.1 ml 酵母孢子懸浮液於7支葡萄糖酵母水培養基中。
  - (2) 6支試管在60°C之水浴中各加熱4, 6, 8, 10, 12, 及15分鐘。
  - (3) 迅速冷卻試管，把所有試管包括對照的第七支試管在室溫培養2~5日。
  - (4) 觀察酵母生長特性，例如陰暈，沉澱，氣泡等生長相對量以加號(+)之多少表示之，記載於表格。
3. 黴菌芽胞之耐熱性
  - (1) 濕熱
    - a. 每次接0.1 ml 黴菌芽胞懸浮液於7支葡萄糖酵母水培養液。
    - b. 留1支為對照，其他6支在60°C各加熱4, 6, 8, 10, 12, 及15分鐘

- c. 即刻冷却之，所有試管在室溫培養25日。  
 d. 觀察微菌之生育特性，注意芽胞之有無，生長相對量，以加號(+)之多少表示之，記載於表格。

(2) 乾熱

- a. 於4支裝乾芽胞之試管(1滴芽胞懸浮液在管內乾燥者)於60°C之水浴中加熱10, 20, 30, 及60分鐘。  
 b. 露出水面之試管上部以火焰燒後，用滅菌吸管加試管半量之葡萄糖酵母水液，以滅菌白金針攪拌微菌芽胞於液內。  
 c. 在室溫培養2~5日，觀察微菌之生長紀錄於表格。

4. 細菌孢子之耐熱性

(1) 取在60°C保持1, 2, 4及7日之枯草菌(*Bacillus subtilis*)孢子之懸浮液0.1ml於肉汁培養液中試驗孢子生存量。

(2) 接種之培養液在室溫培養2~5日觀察枯草菌生產表膜記於表格。

1. 酵母菌及微菌孢子之耐熱性(濕熱)

表格

菌種名稱	菌體之生長相對量 (以十表示之)						
	0分鐘	4分鐘	6分鐘	8分鐘	10分鐘	12分鐘	15分鐘
酵母菌							
麴微菌							
青微菌							

2. 微菌孢子之耐熱性(乾熱)

菌種名稱	生長情形				
	0分鐘	10分鐘	20分鐘	30分鐘	50分鐘
麴微菌					
青微菌					

3. 細菌孢子之耐熱性(濕熱)

菌種名稱	菌體生長量 (以十表示之)				
	不加熱	1日	2日	4日	7日
枯草菌					

[註一] 葡萄糖酵母水培液 (Glucose yeast water broth)。

見鹽藏試驗[註一]一項。

[註二] 肉汁培液 (Nutrient broth)。

視培養製法實驗步驟一項。

[註三] 接種枯草菌於肉汁培液於37°C保溫後便成。

[註四] 以白金耳觸及 *Aspergillus* 或 *Penicillium* 之孢子後，擴散於生理鹽水中。

[註五] 酵母孢子懸液。

# 七 培養基 pH 對細菌孢子耐熱性之效果

## (Effect of Substraten pH to Heat Resistance of Bacterial Spores)

### (一) 簡介 (General remarks)

培養枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 於溫度不同的牛肉汁、蕃茄汁、及豌豆汁中，觀察其生長之差別，而了解細菌孢子之耐熱性及耐酸性。

### (二) 菌種及培養基 (Organisms and media)

1. 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 孢子懸液 1支
2. 牛肉汁 (Beef consomme) pH 4.5 4支[註一]  
pH 6.0 4支  
pH 7.0 4支  
pH 9.0 4支
3. 冰水
4. 滅菌鹼液 (0.05N NaoH solution)
5. 0.1 ml 吸管 6支
6. 蕃茄汁 4支
7. 豌豆汁 4支

### (三) 實驗步驟 (Procedure)

1. 在各種酸度 pH 牛肉汁 (Beef consomme) 中之耐性。
  - (1) 接 0.1ml 枯草菌 (*B. subtilis*) 之孢子懸浮液於每組 4 支之 pH 4.5, 6.0, 7.0 及 9.0, 之牛肉汁中。
  - (2) 每組抽出 1 支為對照，餘 3 支在 100°C 蒸氣中加熱，5, 15, 60. 分鐘即刻冷卻之。
  - (3) 以滅菌鹼液中和 pH 4.5, 之試管。
  - (4) 所有試管在室溫培養 2—5 日觀察菌之生長，結果應紀錄於表格。
2. 在蕃茄汁及豌豆汁中之耐性
  - (1) 接 0.1ml 之枯草菌孢子懸浮液於每組 4 支之蕃茄汁及豌豆汁中。
  - (2) 每組中 3 支依上述方法加熱處理，另一支留做對照，加熱完 3 時即刻冷卻之。
  - (3) 加熱處理後每支蕃茄汁以滅菌鹼液中和之。
  - (4) 在室溫培養 2—5 日觀察枯草菌之生長紀錄於表格。

表格

pH	時 間		生 產 結 果			
			0 分	5 分	15 分	60 分
培	牛	4.5				
	肉	6.0				
	汁	7.0				
		9.0				

養	豌豆	4.5				
	豆	6.0				
	汁	7.0				
	汁	9.0				
基	蕃	4.5				
	茄	6.0				
	汁	7.0				
	汁	9.0				

〔註一〕 牛肉汁 (Beef consomme)

瘦牛肉	500克
百補登	20克
食鹽	5克
蒸餾水	1升

除去瘦牛肉中的肋膜及脂肪後，放入研鉢中磨碎，將碎肉放於水中於攝氏4度至6度下浸漬一夜，翌日將之加熱至攝氏4.5度，並保持一小時之久，再沸騰半小時使之冷卻而無需攪拌，刮去上層之脂肪，傾出澄清液，沉渣以壓肉機壓出肉汁與澄清液混合，以玻璃棉濾過之填充水份至1升，溶入百補登及食鹽，調節至所需之pH，而後使之沸騰20分鐘，靜置，傾出澄清液，分注於各試管中在高壓殺菌器內於攝氏121度殺菌15分鐘。

## 八 細菌學上一般染色法

實驗室內常用之染料有品紅 (Fuchsin) 龍膽紫 (Gentian violet) 及美藍 (Methylene blue) 等，品紅着色力最強，龍膽紫次之，美藍最弱，上述各染料之純酒精飽和溶液稱為原液。貯藏褐色瓶內。

原液之配法：

品 紅	約 11 公克	+	純酒精	100 公撮
龍膽紫	約 7 公克	+	純酒精	100 公撮
美 藍	約 5 公克	+	純酒精	100 公撮

上述原液稀釋製成下列染色液。

(A) 呂夫洛氏美藍液之配法：(Löffler's Methylene blue)

美 藍 原 液	30 公撮	} 混合，濾過。
0.01% 苛性鉀水溶液	100 公撮	

(B) 萇耳氏石炭酸品紅液之配法：(Ziehl's Carbol Fuchsin)

品 紅 原 液	10 公撮	} 混合，濾過。
5% 石炭酸水溶液	100 公撮	

(C) Pfeiffer 氏液之配法：

將萇耳氏石炭酸品紅液用蒸溜水稀釋為 5~10 倍液即成 Pfeiffer 氏液。

(D) 石炭酸龍膽紫液之配法：

龍 膽 紫 原 液	10 公撮	} 混合，濾過。
5% 石炭酸水溶液	100 公撮	

(E) 俾士麥氏褐色素液之配法：(Bismarck brown)

俾士麥氏褐色素 Y	1 公克	} 混合，溶液，濾過。
純 酒 精	10 公撮	
蒸 溜 水	100 公撮	

(F) 蘆戈路氏碘溶液之配法：(Lugol's iodine solution)

碘	1 公克
碘 化 鉀	2 公克
蒸 溜 水	300 公撮

先用碘化鉀 2 公克與蒸溜水 5~10 公撮碘解。後加碘 1 公克混合後，追加蒸溜水至所定量。

(G) 胞色液之配法

(a) 純酒精 (革蘭氏染色用)

(b) 3% 鹽酸酒精 (抗酸性菌染色用)，純酒 100 公撮加純鹽酸 3 公撮。

### (一) 簡單染色法 (Simple stains)

1. 抹片于空氣中乾燥後，以火焰固定之。
2. 滴加染色液于抹片上靜置約半分鐘至 1 分鐘。
3. 水洗、乾燥、鏡檢。
4. 滴加 Lugol 氏碘液一分鐘染色、水洗。

5. 用95%酒精褪色，約30秒並用水洗。
6. 用沙黃複染液 (Sofranin Solution) 複染30秒鐘，做對照染色。

沙黃複染液之配法：

2.5% 沙黃酒精溶液	10 公撮
蒸溜水	90 公撮

7. 水洗、乾燥、鏡檢。

鏡檢結果：用這種分類染色法，可將細菌分為二類，有些細菌仍保留原來染上的深紫色，稱為革蘭氏陽性菌 (Gram-positive organism)，反之，有些細菌原來染上的深紫色，全被褪色，而顯複染液所呈的紅色，稱為革蘭氏陰性菌 (Gramnegative organisms)。

- (a) 球菌，深淋菌髓膜炎菌及種奈氏雙球菌屬 (Neisseria) 外，所有球菌均屬革蘭氏陽性。
- (b) 大部份的病原性腸內細菌(傷寒菌，沙門氏菌，赤痢菌，霍亂菌)都呈革蘭氏陽性。
- (c) 具有芽胞的細菌都是革蘭氏陽性。
- (d) 所有的螺蘭原蟲均屬革蘭氏陰性。
- (e) 其他白喉桿菌 (Corynebacterium diphtherias)，結核菌 (Mycobacterium tuberculosis) 呈陽性，鼠疫菌 (Pasteurella pestis) 呈陰性。

## (二) 革蘭氏染色法 (Gram's stain)

革蘭氏染色法為1884年，革蘭氏所創的細菌分類染色法。在細菌鑑別診斷上有極大的價值。

### 1. 普通法

- (A) 塗抹片宜薄勻，在空氣中乾燥，於酒精燈火焰上固定之。
- (B) 滴加石炭酸龍膽紫液作用一分鐘 (不要加溫) 後傾去染色液，(無需水洗)。
- (C) 滴加 Lugol 氏碘液作用一分鐘。最好 Lugol 氏碘液換數回。(無需水洗)。
- (D) 用純酒精褪色數回限一分鐘，並用水洗後用濾紙吸收水分。
- (E) 用錫士麥氏褐色液做對照染色，作用2~3分鐘。
- (F) 水洗、乾燥、鏡檢。

鏡檢結果：用這種分類染色法，革蘭陽性菌呈暗紫色。革蘭陰性菌呈褐色或紅色。

### 2. Hucker 染色法：

色液之配法：

第一液	{ 結晶紫 (Crystal violet)	2 公克
	{ 95% 酒精	20 公撮
第二液	{ 草酸銨 Ammonium oxalalate	0.8 公克
	{ 蒸溜水	80 公撮

- (A) 按常法塗抹片，固定。
- (B) 上項之第一液與第二液的混合液一分鐘紫色，水洗。

## (三) 莢膜染色法 (Capsule stain)

### (1) Anthony 氏法

- (A) 塗抹，乾燥(不要固定)。

(B) 1%結晶染水溶液2分鐘染色，(不要加濕)。

(C) 再用20%硫酸銅水溶液沖洗，用濾紙吸收水分，乾燥。鏡檢。

鏡檢結果：在紫色背景中，可見到藍色的莢膜，環繞於紫色的菌體的四圍。

(2)Hiss 氏法：

(A) 塗抹、乾燥、固定。

(B) 加下列水溶液數秒種加溫染色。

品紅原液(或龍膽紫原液) 5 公撮

蒸 溜 水 65~95 公撮

(C) 用20%硫酸銅水溶液沖洗。再用濾紙吸收水分，乾燥，鏡檢。

(3)Johne 氏法

(a) 塗抹，乾燥固定。

(b) 用2%龍膽紫水溶液，加溫染色約1分鐘，水洗之。

(c) 再用2%醋酸水作用5~10秒水洗之。

(d) 即刻蓋上蓋玻片，鏡檢。

### (四)芽胞染色法 (Spore Stain)

(1)Moller 氏法

(A) 塗抹，乾燥，固定。

(B) 以5%鉻酸水溶液 (Chromic acid solution.) 滴加於塗抹片上作用2~3分鐘，充分水洗。

(C) Ziehl氏石炭酸品紅液加溫染色2~3分鐘，待冷卻後水洗。

(D) 1~3%硫酸水脫色，約5秒鐘立即水洗。

(E) Loeffler 氏美藍液加4倍之蒸溜水，作用30秒~1分鐘。

(F) 水洗，乾燥，鏡檢。

鏡檢結果：芽胞呈紅色，菌體呈淡青色。

(2)Wirtz, Schaeffer-Fulton 氏改良法

(A) 塗抹，乾燥，固定。

(B) 滴加5%孔雀綠水溶液 (Malachit green) 加溫染色約1分鐘，水洗。(約30秒)

(C) 用0.5%沙黃水溶液 (Safranin Solution) 複染30秒鐘。

(D) 水洗，乾燥，鏡檢。

鏡檢結果：芽胞呈綠色，菌體呈紅色。

### (五)鞭毛染色法 (Flagella Stain)

(1)呂夫洛氏法 (Loeffler 法)

Loeffler 媒染劑：

20%鞣酸水溶液 (Tannic acid solution)	20 公撮
硫 酸 亞 液 (Ferrous sulphate solution)	10 公撮
品 紅 原 液 (Fuchsin stock solution)	2 公撮

上項之染色液混合放置褐色瓶內，使用前過濾。

(A) 塗抹，乾燥，火焰上輕輕固定。

(B) 滴加 Loeffler 煤染劑，于火焰上加溫染色2~3分鐘。(染色中間 Loeffler 煤染劑換1回比較好)。

(C) 待冷卻，輕輕水洗。

(D) 浸於純酒精後再水洗。

(E) 滴加石炭酸龍膽紫液或 Ziehl 氏石炭酸品紅液，輕輕加溫染色1~2分鐘。

(F) 水洗，乾燥，鏡檢。

鏡檢結果：在油鏡下，可見到菌體呈褐色的鞭毛。

## (2) Liefson 氏法

染色液：A. 1.5%食鹽水 (NaCl solution, C. P.)

B. 1.5%鞣酸液 (Tannic acid solution)

C. 1%鹼性品紅酒精液 (95% Ethyl alcohol solution)

(使用時將 A. B. C. 三液作等量混合)

(A) 取幼稚培養放入蒸溜水中，製成輕度溷濁菌液。

(B) 在十分清潔的玻璃片上，用臘筆劃一直徑約1~2公分的圓環。

(C) 置菌液一滴于玻璃片圓環內，使菌液散流圓環內，乾燥後，不必固定。

(D) 滴加染色液，染色10分鐘，水洗，乾燥，鏡檢。

鏡檢結果：在油鏡下，可見到由菌體發出的鞭毛。

## (六) 異染小體染色法 (Metachromatic stain)

### (1) Neisser 氏法

Neisser 氏液之配法：

A液：美藍 (Methylene blue) 0.1 公克	} 先將色素與酒精撮混合，溶解後加冰醋酸與蒸溜水。
冰醋酸 (Glacial acetic acid) 5.0 公撮	
純酒精 (95% Ethyl alcohol) 2.0 公撮	
蒸溜水 (Distilled water) 100 公撮	
B液：結晶紫 (Crystal violet) 0.1 公克	} 混合，溶解。
純酒精 (95% Ethyl alcohol) 1.0 公撮	
蒸溜水 (Distilled water) 30.0 公撮	

使用前A液2對B液1混合。(色素之配法，先用小量的酒精溶解)。

Chrysoidin 水溶液之配法：

Chrysoidin 2 公克	} 溫蒸溜水中溶解不得煮沸。
蒸溜水 300 公撮	

# 九 果實及蔬菜之腐爛

## (Spoilage of fruits & Vegetables)

### (一) 簡介 (General remarks)

關於果實及蔬菜之腐爛，首先要觀察其腐爛情形，然後研究引起腐爛之原因而分離引起腐爛之菌種，並決定其所屬之 Genus。

### (二) 器具及藥品 (Materials required)

- |             |                                                       |
|-------------|-------------------------------------------------------|
| 1. 腐爛的果實及蔬菜 | 9. 滅菌吸管                                               |
| 2. 顯微鏡      | 10. 95% 酒精                                            |
| 3. 擴大鏡      | 11. 葡萄糖酵母洋菜斜面[註一](glucose yeast water agar slant) 2 支 |
| 4. 接種針      | 12. 葡萄糖酵母洋菜 1 支                                       |
| 5. 酒精燈      | 13. 10% 甘油                                            |
| 6. 鑷子       | 14. 濕室 (Moist Chamber)                                |
| 7. 蓋片       |                                                       |
| 8. 玻璃片      |                                                       |

### (三) 實驗步驟 (Procedure)

#### 1. 果實

(1) 用肉眼，擴大鏡，顯微鏡檢查

- a. 如果有菌絲存在。
  - i) 用接種針或鑷子(滅菌的)接取一小片果皮及菌絲放在玻璃片 (slide glass) 上。
  - ii) 把菌絲盡可能地弄散(仔細地)。
  - iii) 用 16 mm 接物鏡檢查碎片之邊緣。
  - iv) 特別注意其子實體及特殊構造。
- b.
  - i) 取一片菌絲或果實之腐爛斑點於載玻片上。
  - ii) 用接種針把它撕開。
  - iii) 滴一滴10%甘油於其上。
  - iv) 以蓋玻片蓋着。
  - v) 用 16 mm 及 4 mm 接物鏡檢查，注意孢子及菌絲之橫隔膜等等。
- c.
  - i) 用滅菌鑷子或小刀提取腐爛部份之果皮。
  - ii) 把它接種於葡萄糖酵母洋菜斜面 (glucose yeast water agar slant) 上。
  - iii) 於室溫下放置 5~7 天。
  - iv) 用肉眼，擴大鏡及顯微鏡觀察洋菜面之邊緣特別是靠近斜面之頂端部分。
- d. 依上述方法不易決定其屬 (Genus) 者，可用下列 slide chamber technique 決定之。
  - i) 將熔融的葡萄糖酵母洋菜冷卻為45°C。
  - ii) 將欲檢查微菌之孢子濃密地接種。

- iii) 混合均勻。
- iv) 浸 24×40 mm 蓋玻片 (glass cover slip) 於95%酒。
- v) 取出並燒去附着之酒精。
- vi) 把尚溫熱之蓋片放在桌上。
- vii) 用滅菌吸管滴一滴洋菜與孢子的混合液於蓋片上接近線之一端。
- viii) 在洋菜還沒有凝固前，把蓋片上之洋菜小滴壓於玻璃片 (slide glass) 已經過火焰滅菌之面上。
- ix) 把玻璃片 (slide glass) 反過來，使蓋片在上。
- x) 使蓋片之有洋菜之一端在下置室溫下，培養於封閉的濕室 (moist chamber) 內，直到孢子生成。
- xi) 取出用顯微鏡檢查，鑑定其所屬之屬 (Genus)，並繪圖。

(2) 果實之腐爛係由所分離微菌所引起之證明。

- a. 果皮之反面用酒精燈滅菌之。
- b. 用滅菌接種針穿刺果皮之一面，以為受傷效果之對照標準。
- c. 用接種針自腐爛果實取菌種而穿刺於其反面。
- d. 把果實放置桌上培養，定期的觀察其腐爛徵象。

(3) 由擠出腐果實之汁及保溫果實做染色標本檢查。

2. 蔬菜：腐爛之原因可能為：

(1) 蔬菜本身之酵素作用。

(2) 微菌。

(3) *Eruinia cartovora* (bacterial salt rot)

(4) *Saprophytic Bacteria* 在堆積濕蔬菜中生長所致，關於蔬菜之腐爛須要。

- a. 鑑定引起腐爛之菌種為何屬。
- b. 描繪腐爛情形及有關菌種。

[註一]：葡萄糖酵母水洋菜 (glucose yeast water agar)

洋菜 (agar)	20 克
葡萄糖酵母水	1,000 ml (參考鹽藏試驗[註一])

# 十 乾果類之檢驗

## (Examination of the Dried fruits)

### (一) 簡介 (General remarks)

乾果類之檢驗，首先應試驗其總菌數，而後檢查細菌之特殊性質，對於黴及酵母亦應做同樣試驗。

### (二) 器具及藥品 (Material required)

1. 天平
2. 乾果 (Dried or Dehydrated Friuts)
3. 99ml 無菌水 2 支
4. 葡萄糖酵母水，洋菜培養基 (Glucose, yeast, water agar) [註] 20 ml 4 支
5. 葡萄糖酵母，培液 (Glucoss, yeast, water broth) [註一] 7 ml 2 支
6. 麥芽汁洋菜 (malt agar) [註四] 20 ml 4 支
7. 2 ml 吸管 10 支
8. 滅菌過之二重皿 8 個
9. 顯微鏡
10. 比色計
11. 玻璃片 (Slide)
12. 玻璃蓋片 (Coner glass)
13. 裝於 Durham tube 之乳酸培液 (Lactose broth) 2 支

### (三) 實驗步驟 (Procedure)

1. 平板計算
  - (1) 秤取11克乾果，量於99 ml 無菌水中，靜置 10~15 分鐘後，用力振盪。
  - (2) 取上列混合液 1 ml 於 9 ml 的無菌水中，混合均勻為10倍的稀釋液。(1:10)
  - (3) 由 1:10 的稀釋液取 1ml 於 9ml 的無菌水中，混合均勻便可得 1:100 的稀釋液。
  - (4) 各取 1 ml 1:10 及 1:100 的稀釋液於滅菌二重皿內後倒入熔融而保溫於45°C 左右的葡萄糖酵母洋菜。
  - (5) 在桌面上緩慢的轉動二重皿一二次，使菌液與洋菜混合而待凝固。
  - (6) 將上列二重皿放在室溫下培養五天，然後計數其聚落數，並依聚落情形分別各微生物之類型。
2. 酵母之檢出
  - (1) 取 1 片乾果，放入含有 7 ml 酸葡萄糖酵母培養液 (Acidified glucose yeast water broth) [註五] 之試管內 (如果不呈酸性，則用無菌乳酸若干 ml 調整為酸性) 於室溫下放置 5 天。
  - (2) 用顯微鏡檢查是否有酵母或細菌之存在。
3. 乳酸醱菌的檢出

- (1) 取 1 片乾果置於含有乳糖培液 (Lactose broth) 之 Durham 管內，於 37°C 下保溫 2 天。
- (2) 觀察有無氣體或酸產生。
- (3) 用比色法測定酸度 (pH)。
- (4) 用顯微鏡檢查有無細菌之存在。

#### 4. 微菌之檢出

- (1) 取 10 克乾果於 90 ml 無菌水中，放置 10~15 分鐘後，用力振盪。
- (2) 取上列混合液，依 A 之 2 及 3 項方法分別用無菌水稀釋為 10 倍及 100 倍。
- (3) 各取 1 ml 稀釋液於滅菌過之二重皿內，然後倒入熔融而保溫於 55°C 的麥芽汁洋菜 (malt extract agar pH 3.5)。
- (4) 在桌面上緩慢的轉動二重皿一兩次，使菌液與洋菜混合，待其凝固。
- (5) 於室溫下放置 5 天。
- (6) 計算微菌之數目並檢定其種類。

[註一]：葡萄糖酵母水培液。

Tryptphan 5 g 酵母抽出稀 (yeast extract 2.5 g)  
 葡萄糖 1 g 水 1 升

[註二]：麥芽汁洋菜 (Malt extract agar)

視鷄蛋之微生物及蛋之腐敗 [註五] 一項

[註三]：乳糖肉汁培液 (Lactose broth)

視鷄蛋之微生物及蛋之腐敗 [註三] 一項

[註四]：葡萄糖酵母水洋菜

[註一] 一項液體培養基加洋菜 2 g

[註五]：對完全殺菌註一培養基用殺菌好的 85% 乳酸加入以調節 pH 為 3.5

# 十一 鹽漬、鹽藏及醃漬蔬菜 (Brined salted & pickled vegetable products)

## (一) 簡介 (General remarks)

本實驗係觀察一些鹽漬及鹽藏蔬菜經自然醱酵及處理過程中之微生物之變化。

## (二) 樣品 (Sample)

鹽漬鹽藏及醃漬蔬菜可區分為下列各類：

1. 胡瓜醃漬品及其他類似醃漬品 (Cucumber pickles & Similar pickle products)。
  - (1) 鹽藏且經處理過的醃漬成品 (Salt stock for cured pickle products)。
    - a. 胡瓜(及洋葱、胡椒、蕃茄、花椰菜、甜瓜皮等)。
    - b. 純蒔蘿醃漬品。
  - (2) 經鹽漬後之最終醃漬品 (Finished pickle products from brine cured stock)。
    - a. 甜漬物。
    - b. 酸漬物。
    - c. 混合漬物。
    - d. 調味料。
    - e. 人工或加工蒔蘿。
  - (3) 經殺菌之醃漬物(未經鹽水處理) Types of Pasteurized pickle (not Brine-cured)。
    - a. 蒔蘿(切片或整個)。
    - b. 甜物(切片或整個)。
    - c. 調味料(混合蔬菜)。
    - d. 除胡瓜外之蔬菜(洋葱胡椒蕃茄等)。
2. 非醱酵鹽漬及鹽藏蔬菜 (Brined & salted vegetables for nonpickle use)。
  - (1) 鹽漬 (Brined)。
    - a. 秋葵(整個)。
    - b. 芹菜(整個)。
    - c. 甜椒殼。
  - (2) 乾醃 (Dry salted)。
    - a. 玉蜀黍。
    - b. Lima 豆。
    - c. 豌豆。
    - d. 黃豆。
    - e. 秋葵(切片)
    - f. 芹菜(切段)。

## (三) 器具藥品及培養基 (Materials Chemicals & Media)

1.  $\frac{3}{16}$ 吋之不銹鋼管。

2. 鉛或白臘少許。
3. 橡皮管。
4. 12呎瓶。
5. 抽氣球。
6. 70%酒精。
7. 酒精燈。
8. 開罐器。
9. 無菌試管(16×150毫米)
10. Plastic screw cap having pulp-backed vinylite and teflon liners。
11. Sodium 2,4,5 trichlorophenolate solution [註一]。
12. 3—4呎之藥瓶。
13. Toluene。
14. Breed pipette 0.1ml 刻度至0.001ml
15. 載玻片。
16. 蓋玻片。
17. 格勒姆 (Gram) 染色[註三]劑。
18. 顯微鏡1臺。
19. Erythrosin 染色劑[註四]。
20. 白金鉀(直徑為3毫米)。
21. 血球計 (Nenhauer double-ruled hemalytometer)。
22. 蒸餾水。
23. 0.1 N NaOH (鹼液)。
24. 酚酞。
25. 玻璃電極。
26. Salometer (鹽度計)
27. 0.171 N 硝酸銀溶液[註五]。
28. 0.5% Dichlorofluorescein。
29. (Pipette) 吸管 1ml。
30. Pipette。
31. 二重皿。
32. Nutritive caseinate agar [註六]。
33. V-G medium [註七]。
34. Brilliant green lactose bile agar [註八]。
35. Violet red bile [註九]。
36. Deoxycholate lactose agar [註十]。
37. 酸性葡萄糖洋菜 (Dextrose agar, acidified) [註十一]。
38. 含鹽之葡萄糖培養液 (Dextrose broth) [註十二]。
39. 含鹽之肝汁培養液 (Liver broth) [註十四]。
40. Petroleum jelly。
41. 碳酸鈣。

42. 水浴槽。

43. 肝汁培養液 (Liver broth medium) [註十五]。

#### (四) 對一般產品之檢查步驟 (General Examination Method for Products)

##### 1. 鹽漬樣品之收集貯藏及配法 (Collection, storage, and preparation of Brine sample)

收集容器內覆於蔬菜物質上之鹽水或鹽汁作為微生物之觀察用，容器之大小不一，小如家用醃缸大至1,000蒲式耳 (Bushel) 之醃桶，樣品自大桶中取出之方法如下：

在大桶之開口處插入一直徑為 $\frac{3}{16}$ 吋之不銹鋼管(一端以鉛或白臘封住，距離封口約6~8吋處穿幾個 $\frac{1}{16}$ 吋大之孔)直至醃菜之中央，由一預先安置好的橡皮管內取出鹽水至--12兩(oz)之瓶內，該收集瓶上之橡皮塞上插有二支短玻璃管，一支上有一橡皮管導至不銹鋼樣品管，另一支上裝一抽氣球 (Suction ball) 開始虹吸作用 (Siphoning action) 至於不銹鋼管之長度隨容器之深度而定。

在取得最終樣品(約10ml)之前，在一無菌試管內取出約24兩鹽水，若在醃桶過程中有微生物之變化，則在開始鹽敷或鹽漬時取樣同時繼續在醃桶盛期每1~2日採樣。

對於非醃桶醃漬用途之 Gennine Dilk 及鹽藏蔬菜等，若為緊密大桶 (Tightly-headed barrels) 樣品可自上端或邊塞處取出，若自小容器(如小缸或醃漬物之罐頭)中取出時，必放先搖動，而後以無菌吸管自中央吸出，先以酒精拭擦缶之上端，在火焰上殺菌，再以開缶器在頂上穿孔若其中有氣壓時先以加熱之冰錐在頂上穿孔小心地除去氣體。

##### 2. 樣品之貯藏：

自醃桶旺盛之物質中取出之鹽汁樣品以及醃漬物樣品最好盡可能地即刻檢驗觀察以防止其中微生物作用而使之發生變化，若需經運輸或貯藏時則良好的冷凍條件乃為必需，且自採集至觀察其間不可超過12~24小時，當需運輸時將樣品收集於無菌試管(16×150毫米mm)內，蓋上塑膠螺旋帽(有 Pulp-backed vinylite 及 Teflon 薄膜者)。

作為日後化學測定用之鹽汁樣品，可加入 Sodium 2,4,5 Trichlorophenolate 使成1:10,000之稀釋液貯藏之，將樣品採取於3~4兩之藥瓶內加入10滴10%該藥品水溶液震搖使之均勻，蓋薄膜之螺旋帽，若樣品作為測定酵素之活性時，可加入10~15滴 Toluene 以代 Sodium 2,4,5 trichlorophenolate 作為防腐劑。

樣品經上述藥品處理後，是不適於食用，故需註以記號。

##### 3. 樣品之配法：

除對絕對好鹽性菌 (Halophiles) 外通常都將鹽汁及鹽水做成適當之稀釋液，對好鹽性菌直接用含鹽之液體培養基稀釋之，或需做成平面時則用含鹽之固體培養基稀釋之，但稀釋空白需含有與鹽水樣品同量之鹽量，對於醃桶旺盛之鹽水其稀釋程度不一，每c.c樣品中所有之微生物含量可假想為，生酸細菌10:10億，酵母菌10:1億，絕對好鹽性菌10:10億，大腸菌型細菌1:14萬，抗鹽性球菌1:14萬，經適當程度殺菌後成品之鹽汁中微生物含量較少，且都是些不活動的，有孢子之抵抗力較強的細菌，對這些成品稀釋10倍及100倍已足夠了，但對於不當之成品，由於酸生成菌及酵母菌較多，因此稀釋倍率即需重新加以估計。

##### 4. 顯微鏡觀察：

對於鹽水樣品中之微生物最好以顯微鏡觀察，同時計數之。

(1) 細菌之觀察：

細菌之直接計數可以下法實施之：

以 Breed pipette 吸取 0.01ml 鹽汁樣品展開於載玻片上約1平方厘米，配法以及計算法依照 Breed 氏法之黃氏修正法[註二]，染色依照格勒姆染色之(Gram stain)之 Kapeloff 及 Cohen 修正法。觀察結果以每一 cc 內含有不同形態之格勒姆陽性(Gram-positive) 及格勒姆陰性 (Gram-negative) 之細胞數表示之。

也可以血球計 (Hemocytometer) 來計算細菌之個數(參閱酵母菌計算法一項)。

(2) 酵母菌之觀察：

顯微鏡之觀察可用來決定醱酵蔬菜鹽水中及有氣體性腐敗之各種最終醱漬物中之酵母菌數目，對於檢查酵母之活性此乃為一迅速可靠之方法，尤其當每 cc. 樣品中菌體之數目超過 10,000~20,000 個時，直接鏡檢染色標本時又可將死與活之細胞加以區分。

在計算醱酵胡瓜鹽汁中之表面附近 (Subsurface) 的活酵母 (Viable yeast) 數時平均比用平面法計算時多4~5倍，此乃因活細胞在平面上可聚集成一聚落之故，但對氣體生成酵母以及表面附近的酵母菌數無法用直接鏡檢法或平面法真正計算之，因容器表面有發育旺盛之產膜酵母，而其可引起混入。

對於含有鹽分或糖分之鹽水或鹽汁中酵母菌數之計算步驟如下：(採用 Bells 氏 Etchells 氏對於 Mills 氏之修正法)。

加 1cc 鹽水或醱漬物之鹽汁於 1cc Erythrosin 染色劑中，震搖使之混合均勻，以白金耳 (直徑為 3mm) 移植足夠量之混濁液於血球計算器 (Improved nenhauer double-ruled hemocytometer) 蓋玻片下之小室中，靜置 5 分鐘後以顯微鏡(4毫米接物鏡及15倍接目鏡)計算，酵母菌數被染成粉紅色者為死細胞，未被染上者為活細胞參閱酵母菌計算法一項)。

每 cc 鹽水或鹽汁中所有酵母菌之計算法如下：

$$\frac{\text{酵母菌數} \times \text{稀釋倍率} \times 250,000}{\text{大格之數目}} = \text{每 cc 中之數目}$$

若只數血球計小室之一邊時(25個大格)每 cc 之時酵母菌最低需有 20,000 個，當數二邊時(50個大格)至少每 cc 應含有 10,000 個。

結果以每 cc 樣品中所含有之(1)酵母菌總數，(2)死細胞數及(3)活細胞數表示之。

5. 酸度之滴定及 pH 值之測定。

在細菌分析上，樣品中酸度之滴定及 pH 值之測定是極度有用的。

測定酸度之方法如下：

10ml 鹽水或鹽汁樣品以 30~50cc 蒸餾水稀釋之加熱至沸騰，即刻冷卻之，以 0.1 N NaOH 液滴定之，(酚酞為指示劑)結果以每 100cc 中所含乳酸之克數表示之(對鹽水樣品)或每 100cc 中所含醋酸之克數表示之(對鹽汁樣品)。

每 10cc 樣品被滴定時之計算法如下：

以 0.1 N NaOH 滴定時所用之 cc 數  $\times 0.111 = 100\text{cc}$  中所有之乳酸克數。

以 0.1 N NaOH 滴定時所用之 cc 數  $\times 0.074 = 100\text{cc}$  所有之醋酸克數。

當樣品為少量時每次採取 2cc 樣品作為滴定之用。

將樣品通氣去CO<sub>2</sub>後以玻璃電極測定pH值或以比色法測定之(參閱培養基之配法一節)。

6. 測定樣品中之含鹽量：

鹽汁樣品若在 200cc 以上時可用鹽度計 (Salometer) 測定之，當僅有少量樣品時同時為了準確起見可採用下列之化學測定之。

在三角瓶中加入 1cc 樣品，以 15~20cc 蒸餾水稀釋之。0.171 N 硝酸銀液滴定之，並滴加 3~5 滴 0.5% Dichlorofluorescein 為指示劑，震搖以破壞沈澱使呈橙紅色，滴定 1cc 樣品所用之每 1cc 硝酸銀液即表示每 100cc 樣品中有 1 克氯化鈉。

### (五) 對各種產品的檢查步驟 (Special Examination Method for Certain Products)

1. 胡瓜醃漬品及其他類似醃漬品 (Cucumber pickle & similar pickle product)

成品可分下列三大類：

- A. 鹽藏蔬菜及 Genuine Dills (salt-stock vegetable & genuine Dills)。
  - B. 加工醃漬成品 (Finished or packaged pickle products made from salt stock)。
  - C. 自新鮮貯藏後之部分殺菌醃漬物 (Pasteurized pickle made from fresh stock)。
- 胡瓜是製醃漬物時之主要蔬菜，但在雜菜醃漬品，調味料或單種醃漬品時，亦常用到洋葱、胡椒、瓜椰菜及青蕃茄等蔬菜。

(1) 鹽藏蔬菜 (Salt-stock vegetable) 及 Genuine Dills 用各種培養基之平面培養法 (Plating technic)。及加各種稀釋液(倍數以十進位)於不同之培養液中以測定微生物之數及型，其方法如下：

將樣品稀釋液放於二重皿中加入不同之培養基(每一實驗作二次)：

- a. 菌體總數 (Total count)。  
加入 nutrition caseinate agar 於二重皿中在 32°C 培養 3 日，此皿可計算乳酸生成細菌及抗鹽性球菌。
- b. 乳酸生成細菌 (Lactic acid-forming bacteria)。  
用 Nutritive caseinate agar 為培養基於 32°C 培養 3 日，然後計算在聚落周圍有黃暈 (Yellow halo) 且有 Casein 沉澱之聚落數，又 V-8 medium 可區分此等細菌之各型，如乳酸桿菌 (Lactobacilli) 之聚落為綠至黑色，且有黃暈。
- c. 抗鹽性球菌 (Salt-tolerant cocci)。  
用 Nutritive caseinative agar 為培養基於 32°C 培養 3 日後，計算呈灰白色大小中等完整且發光之聚落數，及呈橙黃至黃色之類似聚落數，在表面下之聚落為扁平形至橢圓形，當有酵母菌雜入時可以顯微鏡觀察區別之。
- d. 大腸菌型之細菌 (Coliform Bacteria)。  
以 Brilliant green lactose bile agar, violet red bile agar, 或 Deoxycholate lactose agar 為培養基於 32°C 培養 18~24 小時。
- e. 酵母菌及黴菌 (Yeast & mold)。  
用 Dextrose agar, 酸性葡萄糖洋菜 acidified 於 32°C 培養 3 至 5 日。
- f. 產膜酵母菌 (film yeast)。  
揀選培養於酵母菌平面洋菜上之代表性聚落，於含有 5% 及 10% 鹽量之葡萄糖培養液 (Dextrose broth) 中於 32°C 培養 3 至 5 日，觀察表面之厚膜，採用含

有5%及10%二種鹽量之培養液，是因為有些產膜酵母，喜低鹽量之培養液，有些則相反。

g. 絕對好鹽性菌 (Obligate Halophilise)。

培養於含鹽之肝汁培養液 (Liver broth) 之試管中，以融化之 Petroleum jelly 或 Liquid paraffin 封口，於 32°C 培養 7 日，每日觀察之，若發見封口上升是為有氣體產生，若無特殊氣味生成者視為正反應。

g. 丁酸形成細菌 (Butyric acid-forming bacteria)。

鹽水樣品以多量無菌碳酸鈣中和之，將 50 至 100cc 樣品於 80°C 水浴上加熱，20 分鐘以殺死營養細胞，做成各種稀釋液(以十進位)待冷卻後培養於肝汁培養液 (Liver broth medium) 中以 Petroleum jelly 封口，於 32°C 培養 7 日，每日觀察之，有氣體之產生及有強烈丁酸氣味者視為正反應。

(2) 加工醃漬成品 (Finished pickle product)。

經處理過的鹽藏蔬菜，再經過濾鹽，醋漬加糖等加工後，而成最終醃漬物，這些成品之保存是靠足量之醋(如醋漬品)或醋與糖(甜漬品)，若量不足時醱酵隨即發生，即有乳酸生成細菌及酵母菌之產生，醃漬桶不密閉之結果，在鹽汁上會有產膜酵母及黴菌之生長。

對於樣品之鹽汁需觀察 (1) 微生物之總數 (2) 生酸細菌 (Acid-forming bacteria) (3) 酵母菌及黴菌，及 (4) 產膜酵母，方法與 (1) 鹽藏蔬菜同。

當有產膜酵母及黴菌生長時，必需小心地將它除去，否則它會影響生酸細菌及酵母菌之計算，尤其當搖動時，在此酸性成品中對大腸菌型細菌，抗鹽性球菌，好鹽性菌及酸生成細菌之觀察是不必要的。

(3) 經部分殺菌之醃漬物 (Pasteurized types of pickle)。

一般說來對中間產物之部分殺菌為在 165°F 時維持 15 分鐘後，應即冷卻，如此所得之醃漬物即不需含有足量之醋及糖，亦可停止某些微生物之醱酵，成打的胡瓜醃漬物如新鮮蒔蘿，新鮮醃漬胡瓜片及微酸性甜漬物以及蕃茄甜椒及不經處理貯藏之新鮮蔬菜調味料。

腐敗之發生是由於殺菌之不適當或酵母菌及生酸細菌對熱處理後之尚可生存，黴菌及產膜酵母主要是由於桶之密閉不佳。

成品鹽汁之觀察項目與加工醃漬物一節相同，在該成品中所觀察微生物之意義主要與一節相同，由於酸度較最終醃漬物低且多半來自未經處理之新鮮蔬菜，因此必須檢查腐敗性微生物，如此亦可明瞭加工中何種步驟不恰當而加以改進。

2. 非醱酵醃漬用之鹽藏及鹽漬蔬菜 (Salted & Brined vegetables for nonpickle use)。

(1) 鹽藏蔬菜 (Salted vegetables)。

經變白作用後之蔬菜，通常以 1 與 5 之比例(鹽對蔬菜量)約在冰點之溫度 (1.7°C~1.4°C) 下將其醃藏於緊密之木桶內，採用此法處理之蔬菜計有青豌豆，黃豆切開之秋葵，切開之芹菜，這些鹽漬蔬菜，可作羹湯、雜菜以及壓榨蔬菜 (Strained vegetable) 成品等用途。

(2) 鹽漬蔬菜 (Brined vegetable)。

秋葵芹菜及甜紅椒等常以 20% 鹽水浸漬，其用途與上述者相同。

微生物觀察：對於自 (1) (2) 兩型蔬菜中所取得之鹽水樣品，觀察之項目如菌體總

數，乳酸生成細菌，抗鹽性球菌，大腸型細菌，酵母菌及黴菌，產膜酵母菌，絕對行鹽性菌及丁酸生成細菌，觀察步驟如(1)鹽藏蔬菜及 Genuine dills 一節所示。

[註一] Sodium 2,4,5 trichlorophenolate solution :

溶解 Sodium 2,4,5 trichlorophenolate 於蒸餾水中使成10%溶液。

[註二] Breed 氏法之黃氏修正法：

1. 計算顯微鏡視野之大小。

將中央有一正方形小孔之紙片放於目鏡內，再裝上目鏡測微器 (Ocular micrometer) 觀察小孔之一邊與測微器上之劃線重疊之格數，又以已知之物鏡測微器 (Stage micrometer) 來計算目鏡測微器上每格之大小，間接算出小孔之邊長，自乘之而得小孔之面積(目鏡 No. 6, 物鏡為油鏡)。

2. 載玻片先以肥皂洗淨後浸於 Dichromate cleaning solution 中，取出洗淨，復浸於95%酒精內，用時取出擦淨。

3. 塗抹標本之製法：

剪一硬紙片模型(5×10mm)放於載玻片上用玻璃棒抵柱，然後以白珞瑯質混合物(白珞瑯質及鉛白混於松節油及亞麻仁油中)沿此紙邊劃線，待乾後除去紙片即可應用，每載玻片上劃二個5×10mm 區域。

4. 所測樣品中每 cc 約合 100,000~10,000,000 時計算最為準確，若太濃時可用以生理食鹽水稀釋為 5 倍且含 1% Peptone 之牛肉抽出液稀釋之。

5. 以 0.1ml 之 Breed pipette 滴加 0.1ml 懸濁液於劃線之區域內，並以吸管之尖端使之均勻地分佈於此區域內，使之在空氣中乾燥。

6. 將此標本在火焰上來回數次以固定之，並以 Methylene blue 染色，而後再以水沖洗，使之在空氣中乾燥。

7. 在顯微鏡下觀察每一視野中菌體之數目，共觀察 50 個視野 (目鏡 No. 6 物鏡為油鏡)。

8. 計算法：

$$x = N \times \frac{S}{F} \times \frac{1}{V} \times D$$

x: 每一 cc 懸濁液中所有之平均數。

N: 每一視野中菌體之平均數。

S: 塗抹標本之面積。

F: 每一視野之面積。

V: 做塗抹標本時懸濁液之體積 (0.01ml)。

D: 稀釋倍率。

[註三] Gram 氏染色法 (Kopeloff 及 Beerman's 修正法):

1. 1% 甲基紫 (Methyl violet)	30ml
5% 重碳酸鈉溶液	80ml
2. 碘	1克
碘化鉀	3克
5% 重碳酸鈉溶液	60ml
蒸餾水	240ml

溶解碘與碘化鉀於水中再加入重碳酸鈉溶液。

3. 複染之染色劑：

a. Safranin-Safranin 之酒精飽和液	10ml
蒸餾水	90ml
6. Basic fuchsin	0.05克
蒸餾水	100ml

染色步驟如下：

1. 先以甲基紫溶液染色 5 分鐘。
2. 以水洗之。
3. 以碘液浸漬 2 分鐘。
4. 以丙酮 (Acetone) 脫色，須小心控制。
5. 以水洗之。
6. 以 Safranin 液或 Basic fuchsin 液複染 30 秒 1 分鐘。
7. 水洗在空氣中乾燥之。
8. 鏡檢菌體呈紫色者為格勒姆陽性呈紅色者則為格勒姆陰性。

[註四] Erythrosin 染色劑：

貯藏液 Erythrosin B	1克	} 溶解後貯於冰箱中
蒸餾水	100ml	

緩衝液 溶解等量之  $0.2\text{ M Na}_2\text{HPO}_4$  及  $0.2\text{ M NaH}_2\text{PO}_4$  於蒸餾水中即成。  
在應用時以 50ml 緩衝液稀釋 1ml 貯藏液使成 1:5,000 之稀釋液。

[註五] 0.171 N 硝酸銀液。

溶解 29,063 克硝酸銀於 1 升水中即成。

[註六] Nutrition Caseinate agar

Isoelectric casein (消化牛奶)	3克
Peptonized milk (乾粉)	7克
洋菜	12克
溴甲酚紫 (Brom cresol purple)	0.04克
蒸餾水	1升

加熱至沸騰使各成分皆溶於水中，裝於試管或三角瓶內，在高壓釜中於  $121^\circ\text{C}$  (15 磅壓力) 殺菌 15 分鐘，使最終 pH 為 6.5。

[註七] V-8 medium

V-8 蔬菜汁	500cc
---------	-------

V-8 (為由 8 種蔬菜汁混合而成之一種商品各，可於零售食品店內購得)

Tryptophan 或 hisate	10克
乳糖	5克
牛肉抽出液	3克
洋菜	15克
溴甲酚綠 (Brom cresol green)	0.1克
蒸餾水——使合成量達	1升

先將 V-8 蔬菜汁以二層紗布濾過之，加入其他成分並加熱使之溶解，調節 pH 至

5.7 在高壓釜 121°C 時殺菌15分鐘。

大量生成乳酸之菌體聚落為墨綠至黑玉色且有亮黃色暈，產生少量乳酸之聚落則為淺綠色，且暈亦不明顯。

[註八] Brilliant green lactose bill agar :

將下列各物質加熱使之溶解，裝管後在高壓釜內於 121°C 殺菌15分鐘，使最終 pH 為 6.9，將做好之培養基貯於暗室內。

peptone	8.25克	Erioglanims	0.0649克
乳糖	1.9克	Basic fuchsin	0.0776克
Oxgall	0.00295克	Brilliant greens	0.0000295克
亞硫酸鈉	0.205克	洋菜	10.5克
氯化鐵	0.0295克	蒸餾水	1升
磷酸二氫鉀	0.0153克		

[註九] violet red bile agar

酵母粉	3.0克	nutral red	0.03克
Peptone	7.0克	Crystal violet	0.002克
膽鹽 (Bile salts)	1.5克	洋菜	15.0克
乳糖	10.0克	蒸餾水	1.0升
氯化鈉	5.0克		

將上述各成分加於水中，靜置數分鐘後，再混合均勻並調節 pH 至 7.4，加熱並時攪拌之，使之沸騰 2 分鐘，冷卻至 42°C 可用來作為平面培養，待凝固後再覆上一層，這培養基或 Plain agar (溶化 20 克洋菜於升蒸餾水中於 121°C 殺菌 15 分鐘)，以防止表面生長及聚落之橫展。

於 37°C 培養 18~24 小時計算呈紫紅色且周圍有紅色膽沈澱帶之 1~2 毫米大小之聚落，計算平面上之聚落，以不超過 150 個時為最好。

[註十] Dexychlorate lactose agar

加熱至沸騰，溶解下列各成分，調節 pH 至 7.1 無需殺菌，除非培養基需貯藏時，因過度加熱破壞洋菜之固化，用來作為大腸菌型細菌之平面培養。

Peptone	10克	Na-deoxychlorate	0.5克
乳糖	10克	Neutral red	0.03克
氯化鈉	5克	洋菜	15克
檸檬酸鈉	2克	蒸餾水	1升

[註十一] Dextrose agar' acidified

牛肉抽出液	3克	氯化鈉	5克
Tryptophan 或 Polypeptone	10克	洋菜	15克
葡萄糖	10克	蒸餾水	1升

加熱沸騰上述各成分裝管後於高壓釜內 121°C 殺菌 15 分鐘，應冷卻至 50°C 加入足量之無菌 10% 酒石酸溶液，而調節 pH 至 3.5。

[註十二] 含鹽之 Dextrose broth

牛肉抽出液	3克
Tryptophan 或 Trypticase	10克

葡萄糖 20克  
蒸餾水 1升

加熱到沸騰以溶解之：

1. 對鹽含量低者——加入50克氯化鈉
2. 對鹽含量高者——加入100克氯化鈉

將鹽分溶入後裝管於高壓釜內 121°C 殺菌15分鐘。

[註十三] Liver broth medium

將500克牛肝碎粒加入 1,000cc 蒸餾水中，慢慢地沸騰 1 小時，調節 pH 至 7.0 後再沸騰10分鐘，以紗布濾過後，以水添入使達 1,000cc，再加10克 Peptone 及 1 克磷酸一氫鉀，再調節 pH 至 7.0 在 (5% × 6'') 試管內裝入 1/2'' 牛肉碎渣，而後再加入上述之培養液，於高壓釜內 121°C 殺菌20分鐘，在應用前在流動蒸汽內抽氣20分鐘。

[註十四] 含鹽之 Liver broth

在上述之培養液中添加15%氯化鈉(對重量)再加入於試管中之肝碎粒內，殺菌與上同。

[註十五] 鹽藏及 Genuine dills 保存之結果

大腸菌型細菌絕對好鹽性菌及酵母菌之活動，隨附有氣體性發酵而導致鹽藏胡瓜及蒔蘿醃漬品變成“Bloaters”，但通常在微酸性之鹽水中不會發現這些微生物，除非在高度緩衝之物質如豌豆中。

由於不同鹽量之鹽水中產膜酵母之盛長，致使酸性降低，當某些微菌隨同這浮膜生長時更會促使蔬菜之軟化，產膜酵母或微菌之生長均由於鹽漬物在處理及貯藏時之疏忽所致。

抗鹽性球菌，對好鹽性細菌之存在，表示其為非酸醃漬用途之鹽漬或鹽藏蔬菜。

## 十二 肉及肉製品檢驗法

### (一) 檢驗步驟

#### 1. 檢體之採取

抽檢時已包裝者照原裝採取 200 公克。肉及未經包裝之肉製品，用滅菌攝子與滅菌剪刀，最少從 5 處採取約 200 公克。放入滅菌大型扁平皿或大型廣口瓶。在不得凍結之範圍內保持 4°C 以下迅速送至檢驗室。

#### 2. 檢驗操作

檢體先用肉挽器磨碎，後在無菌操作下取 50 公克放入有刻度之滅菌稀釋瓶內。然後追加滅菌緩衝食鹽水至 100 公撮之刻線。

充分搖動混合後供檢驗。

#### 3. 生菌數

##### ① 細菌數檢驗

取被檢液 (50 倍) 或再稀釋液各 1 公撮各注於 2 個滅菌扁平皿中。加 1.5 公撮冷却至 45°C 之 0.5% 葡萄糖，加普通瓊脂培養基施行混合培養，然後放置於 35~37°C 孵卵器中培養 48±3 小時，按其結果計算每公克中細菌數。

##### ② 微菌數檢驗 (對肉製品檢查之)

依照上項之稀釋液各取 1 公撮於各 2 個滅菌扁平皿中，加 15 公撮冷却至 45°C 之馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基施行混合培養，然後放置於 21~25°C 之低溫孵卵器中培養 5 天，照稀釋倍數計算每公克中之微菌數。

#### 4. 大腸桿菌屬檢驗

被檢液 (50 倍) 2 公撮，追加滅菌生理食鹽水 8 公撮，然後取該稀釋液 10 公撮，1 公撮，0.1 公撮注於各 5 支之 B. G. L. B. 中，放置於 35~37°C 之孵卵器中培養 48±3 小時，若發生氣體者，再移植於遠藤 (Endo) 或 E. M. B 培養基施行分離培養，即放置於 35~37°C 之孵卵器中培養 24±2 小時。此時遠藤培養基上聚落周圍變紅及 E. M. B 培養基上發生金屬性光澤者，再移置於乳糖肉羹及普通瓊脂斜面培養基，若乳糖肉羹在 35~37°C 之孵卵器內培養 48±3 小時發生氣體，普通瓊脂斜面培養基培養 24±2 小時後，採取一白金耳，塗抹於玻璃片上。經革蘭染色，呈陰性，無芽胞桿菌者，即可以判定大腸桿菌屬陽性。

#### 5. 結核菌之檢驗

檢體用肉挽器細切後，精取 10 公克於滅菌乳鉢內攪拌至成乳狀，再一方面攪拌，一方面加 4% 滅菌氫氧化鈉溶液，至約 10 倍量，靜置 30 分後，放入滅菌遠心沉澱管中以每分鐘 3,000 回轉，遠心分離。10 分鐘除去上面之澄清液，餘下沉澱物即是檢體。

(a) 取少量沉澱物行動物接種。

(b) 鏡檢時行抗酸性菌染色。

(c) 加少量硫酸於沉澱物，殺滅非抗酸性菌後，於含有 Malachit-green 的卵培養基上層殖。

#### 6. 布氏桿菌屬檢驗

稀釋試料用滅菌紗布過濾，濾液注入滅菌遠心沉澱管以每分 1,000 回轉，遠心分離，5 分

鐘，上面澄液加抗布氏菌屬家兔免疫血清為1%混液，放置於37°C 2小時後，每分1,000回轉遠心分離，3分鐘取其沉澱物當做檢體。

(A) 接種項之被檢液，各採取一白金耳塗抹於20支，70萬倍結晶紫，(Crystal Violet) 加肝臟瓊脂斜面培食基上，其中10支放置於空氣中，另10支放置含有10%碳酸氣體之空氣中，培養於37°C中觀察二星期，若培養基上發現鮮明青紫色之聚落，其直徑2~7mm之公毫者，再行革蘭染色鏡檢之。

(B) 動物試驗

被檢液注射於3隻天竺鼠腹腔內，注射後最少要觀察3星期，通常於7~10天內採取心血，分離血清，阻行凝集反應，在800倍以上呈陽性者，解剖取其各臟器及淋巴腺，做成乳劑，塗抹於血液瓊脂斜面培養基上。各分別置於空氣中及含有10%二氧化碳之空氣中，於37°C培養，其餘如(A)項所述。

動物檢驗陰性者最少觀察3個月後解剖，細菌培養等操作後。才可以決定。

## 7. 炭疽菌檢驗

(A) 培養法；被檢液用滅菌細孔網或紗布過濾後，每分3,000回轉20分鐘離心分離，除去上面清液之澄清沉渣供檢驗。檢體塗抹於5個普通瓊脂培養基上，然後放置於37°C之孵卵器中培養18~24小時。從發育之聚落，檢驗是否有炭疽菌存在。

(B) 動物試驗

被檢體加少量之生理食鹽水做成乳劑。每種檢體最少接種於2隻天竺鼠之下腹部皮下。

(陳舊材料80°C 30分加溫後接種) 若有炭疽菌時，接種次日由注射局部為中心，發生波狀之浮腫。以後擴大至腹部全體。動物在數日內患敗血症斃死。然後解剖取心血脾及其他臟器，塗抹於瓊脂培養其上，放置於37°C之孵卵器中培養24小時後，檢驗是否有炭疽菌發育。

(C) 炭疽沉降反應 Ascoli test

1. 試料的調製

稀釋試料放在熱湯內煮沸30~60分，若有澄清液分離時，用經過煮沸的石綿或濾紙過濾，再煮沸至沒有澄清液分離時，加醋酸為酸性(pH3.0~3.5)，煮沸1小時後，使用碳酸鈉修正 pH 為7，再煮沸20分鐘後過濾。如有必要時本操作可反覆進行。

2. 反應

取少量濾液，注入沉澱反應用試驗管內，再用毛細管吸取家兔免疫血清，沿管壁流入管底，使血清注加於濾液下部。

陽性者，數分間內，於兩液的接觸面。發生白濁輪。

## 8. 豬丹毒菌檢驗

(A) 被檢液用滅菌細孔金網及滅菌紗布過濾。濾液移置遠心管內3,000回轉20分鐘遠心分離除去上面之渣清液，沉渣供做檢驗材料。上項之沉渣塗抹於5個普通瓊脂培養基(平面)，在37°C之孵卵器中培養48小時，然後從發育之聚落採取一白金耳，塗抹於玻片上，染色。本菌是，革蘭染色陽性。形態是狹長桿菌0.5~2 $\mu$ ×0.2~0.4 $\mu$ ，通帶菌體獨立有時呈屈曲，玻狀或分歧等短連鎖或長糸狀。無芽胞，莢膜及運動性。在瓊脂培養基上，聚落呈露滴狀圓形，大小中等，在明膠培養基上聚落是灰白

色，中央部呈顆粒，周邊是網狀，明顯的現示鋸齒狀緣。在明膠穿刺培養時，從表面下開始發育。呈灰白或淡紅白色之菌柱，同時向周圍發生樹脂狀放射，在明膠培養基上，通常不發生液化，在肉羹培養基中，發生混濁及灰白色粘稠的沉澱。此外應用小白鼠試驗有無病原性。

**(B) 動物試驗**

使用小白鼠，每件最少使用3隻以上試驗材料，使用達心沉渣，加滅菌生理食鹽水做乳劑，在小白鼠之皮下注射0.3~0.5公撮，若注射之小白鼠斃死，即取心血及其他臟器塗抹於瓊脂斜面培養基上，於37°C之孵卵器中培養48小時，採取發育之聚落做上項(A)之檢驗。至於接種小白鼠最少要觀察10天後，即行剖檢，細菌檢驗等操作。

**9. 沙門菌屬檢驗**

被檢液各取1公撮移置 Kouffmann 培養基上，以後照沙門菌檢驗法施行之。

**10. 寄生蟲檢驗**

照寄生蟲檢驗法施行之。

## 十三 水產食品衛生細菌檢查法

### (一) 養魚池中水之檢驗

本法適用於養魚池之水及市場店舖處理加工廠等洗淨及處理用水之污染檢驗。

#### 檢驗步驟

#### (1) 檢體之採取及運搬

- (A) 採取養魚池之水，包含水井、河川、湖沼、海水等用滅菌廣口瓶採取 200 公撮。但不得採取因操作污染的水。
- (B) 採取洗滌魚體之用水，加工廠處理用水，冷凍魚之水，必要時須於處理前，後，中間等不同時間採取。
- (C) 採取冷凍用水時採取最接近魚體部份的冰塊等。
- (D) 檢水應保持於 10°C 以下儘速送至檢驗室檢驗之。上項之檢水必須在 6 小時以內施行檢驗，如超過 6 小時以上時，須註明於成績書上。

#### (2) 檢體附記事項

- (A) 檢驗號碼，採取日期，採取地點及其他必要事項。
- (B) 潮之狀態，(區別為淡水、海水、半鹼水等)風向、風速、水井之水量、水溫、水清之程度。
- (C) 水質污染之程度與河川，下水廁所，舟艇，動物牧場等之關係。

#### (3) 檢驗操作

檢驗前充分振盪混合。

- (4) 大腸菌屬檢驗：依照乳及乳製品之細菌檢驗法 5 項施行之。
- (5) 細菌數檢驗：依照乳及乳製品之細菌檢驗方法 C 項施行之。

### (二) 鮮魚類檢驗

本法適用於淡水海水之鮮魚類及冷凍等。

#### 檢驗步驟

- (1) 檢體之採取一般選之數量以貝肉及貝水(貝中所含的水) 共為 200 公撮以上為宜。但是按其大小，普通的選取 20~30 個，大形的 10 個以上。

(A) 貝類(附殼)。

(B) 貝類(拔殼)用滅菌鑷子，選取 200 公克，放入 500 公撮滅菌廣口瓶中。

(C) 冷凍貝肉：採取適當之小塊狀貝肉，如為本塊狀貝肉則用刀取其適當量。

(D) 鮮魚：小魚選取其魚體之全部一般選取 10~20 尾以上，中魚選取 7 尾以上，如為大魚選取 3 尾以上。用滅菌解剖刀割取其背部。再用滅菌鑷子採取，但手不得觸及檢體。

(E) 切魚塊(生魚片)從 7 個不同處採取約 200 公克以上作為檢體。

(F) 冷凍魚：選取小魚 10~20 尾，中魚選取 7 尾以上，大魚則割取其塊狀肉之部份待其冰塊溶解後採取之。各檢體放入滅菌廣口瓶或用滅菌蠟紙包裝儘速送至檢驗室。

(G) 各項檢體貯存於 10°C 以下在 6 小時以內供檢驗。如超過 6 小時以上須於檢驗書上註明。

#### (2) 檢體附記事項

檢驗號碼，採取地點，採取日期及時間，污染之狀態，氣溫，運搬之方法其他必要事項。

### (3) 檢驗操作

- (A) 貝類(附殼貝類)：選取完整的貝類供做試料，其外面所附之泥砂先用硬刷子及水沖洗。(檢驗人員檢驗前手必須用肥皂洗滌再用 70 % 酒精消毒，而使用之刷子須經煮沸或高壓滅菌的) 然後再用適當之開殼器除去貝殼，放入大型扁平皿中以供檢驗。
- (B) 貝肉及冷凍貝肉類：一般以貝肉及貝汁混合物為試料，但是冷凍品要在凍結中，切斷為適宜大小，等其完全解凍後，再用滅菌刀及剪細切。或用滅菌磨碎器磨碎之。
- (C) 魚類：檢驗中，小魚類時，包含魚皮及背部肉。但如必要時，其內臟及魚鰓均可取做試料檢驗。檢驗時用乳鉢或小型磨碎器於無菌操作下磨碎大型魚類檢驗則按照魚肉之狀態適宜細碎後供檢。檢驗人員之手指檢驗前先用肥皂洗滌後再用 70 % 酒精消毒，操作中手指不得觸及檢體。
- (D) 準備 100 公撮附刻度之稀釋瓶精確秤量檢體(魚肉生液汁) 50 公克，用 1 % 食鹽水注加至 100 公撮。檢體使用前先振盪 3 分鐘以供檢驗。
- (E) 生魚片精確秤取 30 公克，與硫酸紙一起投入 300~500 公撮容積的滅菌廣口瓶，再加等於檢體 5 倍容積之滅菌緩衝食鹽液，以 30 公分之振幅，急速振搖 200 次以上。調製試液。

### (4) 大腸菌屬檢驗

依照養魚池水檢驗法施行之。

### (5) 總菌數檢驗：(依照直接檢鏡法 Breed 法施行之，僅貝類檢查)。

### (6) 沙門菌屬之檢驗

- (A) 直接平盤塗抹法：(3) 所調製之試料直接供做沙門菌屬之檢查，一般使用之直接鑑別分離培養基為 SS, EMB, Endo. BTB 乳糖等培養基。試料採取一白金耳塗抹之。此法可以縮短檢驗時間及提高檢出率。培養於 37°C 之孵卵器中，24 小時，本法與增菌法併用實施。
- (B) 增菌培養法：被檢液之菌數極少時有增菌之必要，普通用甘油膽汁培養基及 Kauffman 培養基等放置於 37°C 之孵卵器中，培養 24 小時，然後用上項之培養基(A) 施行分離培養。
- (C) 懷疑為引起中毒魚介類，檢驗時採取檢體 1~5 公克，放入甘油膽汁培養基內儘速至實驗室檢驗之。
- (D) 分離培養後依照沙門菌屬檢驗法施行之。

## (三) 加工水產食品之檢驗法

本法適用於魚丸、魚漿及魚漿加工品等。

### 檢驗步驟

#### (1) 檢體之採取及搬運

檢體選取約 200 公克，放入滅菌廣口瓶中，保持在 10°C 以下儘速送至檢驗室，但檢體必須於 6 小時內檢驗，如超過 6 小時以上須註明在成績書上。

#### (2) 檢體附記事項

檢驗編號。製造負責人姓。名製造日期及時間。售賣店舖，售賣人姓名，住址，原料之種類。周圍衛生狀態，鮮度。

#### (3) 檢驗操作

先準備滅菌解剖刀，鉗及鑷子等。樣品先細切然後用乳鉢及小型磨碎器磨碎(使用時先行高

壓滅菌)然後在天平上秤量50公克,放入 150~300 公撮有刻度之廣口瓶中,再加 1%滅菌食鹽水至 100 公撮之刻度,振盪 3 分鐘充分混合後,始可檢驗。

#### (4)大腸桿菌屬檢驗

##### (A) 推定檢驗

- (a) 取檢體(原檢體 1 公克)各 2 公撮移置於 5 支,10公撮之乳糖肉羹內放置於 35~37°C 之孵卵器內培養 24±2 小時。
- (b) 檢體10倍稀釋液(檢體 2 公撮加 1%滅菌食鹽水 8 公撮相當原檢體 0.1公克)各 1 公撮,移置於 5 支10公撮之乳糖肉羹內放置於 35~37°C 之孵卵器內培養 24±2 小時。
- (c) 檢體 100 倍稀釋液(10倍液 1 公撮注加 1%滅菌食鹽水 9 公撮相當原體 0.01公克)各 1 公撮移置於 5 支10公撮之乳糖肉羹中放置於 35~37°C 之孵卵器內培養 24±2 小時。
- (d) 上項乳糖肉羹培養 24±2 小時,倘有氣體發生,佔酸管十分之一以上時,其推定檢驗為陽性。
- (e) 培養 48±3 小時後倘有氣體發生,佔酸管十分之一以上時,其結果亦作陽性,倘仍無氣體發生時,即可判定大腸桿菌屬陰性。

##### (B) 確定檢驗

- (a) 乳糖肉羹陽性時,應繼續作確定檢驗。上項乳糖肉羹為陽性時,用白金耳(先於酒精燈或瓦斯燈燒過後)移植於 B. G. L. B. 及 E. M. B. 或遠藤(Endo)培養基中,放置於 35~37°C 之孵卵器中培養 48±3 小時,移植於 B. G. L. B. 的,倘無氣體發生時確定檢驗即為陰性。在 E. M. B 或 Endo 培養基上除出現典型的聚落外即可決定其確定檢驗為陰性。
- (C) 完全檢驗:在 E. M. B. 或遠藤培養基上發生典型的聚落時,再移置於乳糖肉羹與普通瓊脂斜面培養,乳糖肉羹培養 48±3 小時發生氣體及在普通瓊脂斜面培養基上採取一白金耳塗抹在玻璃片上,革蘭氏染色陰性及無芽胞桿菌,並在移置乳糖肉羹發生氣體時判定完全檢驗為陽性。
- (D) 於大腸桿菌屬為陽性時,對乳糖肉羹之狀況算出 100 公克中大腸桿菌屬之最確數,查最確數表即可得到最確數。

#### (5)細菌數檢驗

取 4 個滅菌高平皿,各取被檢液 2 公撮移置(原檢驗 1 公克)於 2 個高平皿中,另再取被檢液各 0.2 公撮注加於另 2 個高平皿後,每高平皿加入冷却至 45°C 之標準瓊脂培養基 15 公撮進行混合培養,放置於 35°C~37°C 之孵卵器中培養 48±3 小時後,計算細菌集落數。又如被檢液污染情形嚴重時再稀釋之,然後按照稀釋倍數計算每公克的細菌數。

#### (6)總菌數檢驗:(直接鏡法 Breed 法)

取被檢液一定量於玻璃片上,塗抹一平方公分的正方形,待乾燥,固定後染色測定其染色之細菌數。採取被檢液時,使用毛細吸管(牛乳用吸管)。

#### (7)沙門菌屬檢驗法:依照鮮魚介類檢驗(6)施行之。

### (四)加工水產食品之檢驗法

本法適用於海藻類及其他水產製品等(如佃煮、鹽辛、乾製、燻製、鹽藏等)。

#### 檢驗步驟

(1) 檢體之採取及運搬

海草類：鹽魚及其他乾製海產等選取 200 公克，用滅菌硫酸紙包裝，採取檢體時手指不得觸及，檢體應保持 10°C 以下迅速送至檢驗室。

(2) 檢體之記明事項

檢體編號，採取日期及時間，檢體製造者，售賣店舖住址，容器，貯藏場所，衛生狀態，原料的種類，鮮度及其他污染等事項詳細記明註於成績書上。

(3) 檢驗操作

(a) 水漬及其他瓶裝水產製品類：外面用肥皂洗滌後用酒精消毒然後施行火焰滅菌，接着用滅菌罐刀開蓋。固形品用滅菌剪刀切斷後，再用鑷子採取（如煉製品用食鹽水浸出）10~20 公克然後用滅菌生理食鹽水 100cc 混合搖動 3 分鐘（5~10 倍稀釋液）後待驗。

(b) 鹽辛：用滅菌剪刀切斷後用鑷子採取，照上項操作法做 5~10 倍稀釋液。

(c) 草類及乾燥水產製品：用已滅菌之剪刀或小刀切斷，儘可能使之細碎（用滅菌乳鉢或小型磨碎器）後秤量 10~20 公克加滅菌生理食鹽水 100 公撮（5~10 倍稀釋液）依法浸出。

(4) 器具

滅菌廣口瓶（有刻度 500 公撮）滅菌吸管，高平皿，及其他所需要之玻璃器具等。

(5) 檢體附記事項

檢驗編號，採取年月日及時間，販賣負責人，住址，檢體鮮度，衛生狀態及其他事項等詳細記錄於成績書上。

(6) 大腸桿菌屬檢驗依照 III·(4) 施行之。

(7) 生菌數檢驗

(A) 細菌數檢驗。取 4 個滅菌高平皿，先移置被檢液，各 1 公撮於 2 個高平皿中，另取被檢液各 0.1 公撮注加於另 2 個高平皿中，然後每高平皿中加入冷却至 45°C 之標準瓊脂培養基 15 公撮，進行混合培養，放置於 35°C 之孵卵器中，培養 48±3 小時後，計算細菌聚落數，又如被檢液污染情形嚴重時再稀釋之，上項被檢液按稀釋倍數計算 1 公克中之細菌數。

(B) 酵母及黴菌數檢驗分為 2 組，1 組注加被檢液各 1 公撮，另 1 組注加 0.1 公撮取 4 個滅菌高平皿，每高平皿加入冷却至 45°C 之麴汁瓊脂培養基或麥芽瓊脂培養基 15 公撮，進行混合培養，然後放置於 19~20°C 之孵卵器中培養 3 日後計算每公克中之酵母及黴菌之菌數。

(8) 總菌數檢驗依照直接鏡檢法 Breed 法施行之。

(9) 沙門菌屬之檢驗，依照鮮魚介類檢驗(6)施行之。

# 十四 蛋之微生物及蛋之腐敗

## (Examination of spoilage of Eggs)

### (一) 簡介 (General remarks)

剛生下來的蛋是無菌的，處理不當時，可引起微生物的染污。檢查方法可分為直接顯微鏡測定 (Direct microscope count)，生菌數測定 (Total count)，微菌檢查及腐數檢查。

蛋的種類可分為殼蛋 (Shell eggs)，液狀蛋 (Liquid egg)，冷凍蛋 (Frozen egg) 及乾蛋粉 (Dried egg)。

### (二) 菌種及培養基 (Organisms and Media)

1. 鮮蛋 4 個，及貯藏某些時期後之雞蛋。
2. 1 : 1,000 昇承水。
3. 鹽酸少量。
4. 銳利滅菌刀。
5. 吸管 1cc，10 支。
6. 肉汁培液 (Nutrient broth) 10 支。
7. 冷凍蛋。
8. 液狀蛋。
9. 蛋粉。
10. 滅菌藥匙，1 支。
11. 迴轉振盪機 (Rotary shaker)。
12. 生理食鹽水 [註一] (Physiological salt solution) 99 ml，1 瓶，9ml，3 支。
13. 滅菌玻璃球一匙。
14. 肉汁洋菜平面 (Nutrient agar plate) [註二] 5 張。
15. 乳糖肉汁於 Durham 管 [註三] 4 支。
16. Eosinmethylene blue agar plate [註四] 2 張。
17. 麥芽汁洋菜平面 (Malt extract agar plate pH 35) [註五] 2 張。
18. *Proteus melanogerus* 懸浮液。
19. *Pseudomonas aeruginosa* 懸浮液。
20. *Hemophilic staphylococcus* sp. 好鹽性葡萄狀菌種。
21. *Hemophilic streptococcus* sp. 好鹽性鏈球狀菌種。
22. Blood agar plate 血液洋菜平面 [註六]。
23. Holman cooked meat medium [註七]。
24. North aniline oil methylene blue [註八] 龍油梅千林青染色液。

### (三) 實驗步驟 (Examination procedure)

1. (1) 用水洗蛋，如需要時刷洗之，在 1 : 1,000 昇承水中浸 5 分鐘，再用無菌水洗淨或加一、二滴鹽酸使蛋殼軟化，用無菌水洗淨後以銳利滅菌刀在蛋較大之一端開一個

洞。

- (2) 對鮮蛋；取 2 支肉汁培養液各加 1cc 之蛋白，將蛋之另一端穿通使蛋白流出，然後再各取 1ml 之蛋黃於試管。
- (3) 對貯藏：蛋取 1ml 之蛋白於肉汁培養基混合後從此管取 1ml 於第二管，再從第二管取 1ml 於第三管，對蛋黃同樣處理之。
- (4) 在室溫培養 5 日或在 30°C 培養 2 日。
- (5) 比較鮮蛋與貯藏蛋之結果：如有微生物之繁殖採取 1 支培養，以顯微鏡觀察並決定菌型或有無其他微生物之存在。

## 2. 液狀蛋，冷凍蛋或雞蛋粉

### (1) 採樣

- a. 液體蛋類：以殺菌過的採樣品管 (Sample tube) 或長杓，將容器內之內容物 (液體蛋) 充分混和，取約 300~400ml，置於無菌之採樣品容器中，樣品之溫度須保持 5°C 以下，但須避免使其凍結，視察各容器中之氣味以正常 (Normal)，腐臭 (Putrid)，酸味 (Sour)，霉味 (Musty) 等詞句記錄之。
- b. 凍結蛋類：用已殺菌過之斧頭或鑿除去頂層，從上面鑽三孔直到容器底，第一孔鑽在中央，第二孔在中心與器壁中點，第三孔鑽在器壁附近。以殺菌過之小匙將鑽屑移置樣品容器中。然後另鑽第四孔，以嗅覺檢查之。並以 a 中之適當詞句記錄之。若分析須延緩進行或採樣處距實驗室頗遠時，應用乾冰 (固體 CO<sub>2</sub>) 或其他適合之冰凍劑將其冷凍。
- c. 蛋乾類：為小包裝可用一或數包作為樣品，若為箱裝或桶裝則以小匙或其他清潔器具去其上層，然後以清潔之採樣器 (Grain trier 長度須要到箱底) 鑽取至少三個樣品，取法按 b 中之指示行之，每一樣品須為 300~400ml 左右，將鑽取之樣品以清潔之小匙或適當器具移入採樣容器中將樣品冷凍或儲存於陰冷處。

### (2) 樣品之配製

- a. 用滅菌藥匙緩緩攪拌液體蛋或蛋粉，冷凍蛋在 37°C 週轉振盪使急速溶化之。
- b. 取 11 克蛋放入加有一匙玻璃球之 99ml 生理鹽水中。  
此 1:1。稀釋液在 46 秒中振幅 1 呎，振動 100 次由 1:10 稀釋液吸取 1ml 於 9ml 生理食鹽水混合均勻以得 1:100 稀釋液，再依次配製 1:1000，1:10000 稀釋液。

### (3) 平面培養

- a. 用肉汁洋菜做平板後，在 30°C 培養 3~5 日。
- b. 計算聚落以 1 克蛋中所含微生物數表示之。

### (4) 大腸菌族之檢出

1:10 及 1:100 稀釋液用 Durham 管乳糖肉汁培養基，在 37°C 培養 34~48 小時，觀察氣泡及酸性並要以 Eosina methylene blue agar streak plate 確定其結果，以每克蛋使中所含大腸菌族細菌數表示 (取較高陽性稀釋) 之。完全試驗甲基紅應再接種於平面上，所發現之大腸菌族細菌在肉汁洋菜斜面 (Nutrient agar slant) 上培養於 37°C 24 小時後試 Indol, methyl red, vogas Proshaner 及草酸鹽試驗。

### (5) 溶血性葡萄菌及鏈球菌 (Hemophilic staphylococci and streptococci) 的測定。

這些細菌數目可用血液洋菜平面 (Blood agar plate) 測定。

### (6) 腐敗嫌氣菌 (Putrefactive anaerobes) 的試驗，將蛋稀釋液從 100 倍至 1,000,000 倍

(依次10倍稀釋)接種於剛煮過的 Holman cooked meat medium [註七]。

(7) 細菌試驗：加1ml 蛋稀釋液於二重皿中加入 pH3.5 之麥牙汁洋菜使成平面培養，在室溫培養 5 日，酵母聚落以顯微鏡確認之。

(8) 直接顯微鏡計數：塗敷 0.01ml 蛋液或鮮凍蛋於載玻片約 1 平方公分 (或 0.01ml 1:10, 1:100 之蛋粉稀釋液塗敷 2 平方公分) 乾燥後以 Xylene 處理 1 分鐘，再以酒精處理 1 分鐘，以 North aniline oil methylene blue (靛油梅 4 林青染色液)[註八] 染色 45 秒，洗淨乾燥後鏡檢之，結果以每克中細菌數表示。

### 3. 蛋之腐敗試驗

(1) 取一個蛋在自來水中浸 5 分鐘。

(2) 取第二個蛋在 Proteus sp. (Proteus melanovogenes) 懸浮液中浸 5 分鐘。

(3) 取第三個蛋在 Pseudomonas sp. (Pseudomonas serugimasa) 懸浮液中浸 5 分鐘。

(4) 放於指導者準備之濕室，在 30°C 培養二星期。

(5) 燭光檢視後，破殼觀察之。

[註一] 生理食鹽水 (Physiological salt solution)。

食鹽 (Sodium chloride) 8.7 g

蒸餾水 (Distilled water) 1000 ml

裝於大試管或三角瓶等容器中行加壓殺菌。

[註二] 視培養基之製法實驗步驟一項。

[註三] (1) 乳糖肉汁培液 (Lactose broth)。

肉汁 (meat extract) 3 克

百補登 (Peptone) 5 克

乳糖 (Lactose) 5 克

Bromothymol blue 指示劑溶液 1ml

蒸餾水 (Distilled water) 1,000ml

量前三種成份於蒸餾水中，煮沸，調節 pH 成為 7 加入指示劑溶液而混合均勻。以濾紙過濾裝入 Durham 管內 Arnold 以殺菌器在 100°C 行 20 分鐘的間隔殺菌三次。

(2) 醱酵液用 Bromothymol blue 指示液之配法。

Bromothymol blue 16g

95% 酒精 500cc

蒸餾水 500ml

溶 bromothymol blue 於酒精加蒸餾水後以濾紙過濾。

[註四] Eosin methylene blue agar。

百補登 (Peptone) 10 克

磷酸氫鈉 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 2 克

洋菜 (Agar) 20g

蒸餾水 (Distilled water) 1,000ml

將各成份與蒸餾水混合者沸至洋菜完全溶為止，補足蒸發量，不必調節 pH 值。分裝約 100ml 於三角瓶或平底圓瓶內，在加壓釜內以 15 磅壓力殺菌 30 分鐘。使用要先在 Arnold 內溶解 100ml 裝之洋菜再添加。

乳糖	1g
Eosin Y (2%溶液)	2ml
Methylene blue (0.5%溶液)	1.25ml

混合均勻後在 Arnold 殺菌器內殺菌 5 分鐘待洋菜冷卻至 50°C 左右，倒入滅菌過之二重皿內（約 8 張）。

[註五] 麥芽汁洋菜 (Malt extract agar)。

乾燥麥芽	1 公斤
水	4 公升

取粉碎之麥芽 1 公斤於布袋中，加 4 公升水，在 60°C 前後保持 5 小時，並偶而攪拌以完成糖化。煮沸冷卻後過濾，取 1,000ml 加入 20 克洋菜加熱溶解之。以 Arnold 或 Kach 殺菌器在 100°C 行 20 分鐘的間隔滅菌三次。

[註六] 血液洋菜平面 (Blood agar plate)。

牛肉碎末(瘦肉)	500g
水	1,000ml

於冰箱中浸漬一夜後以紗布過濾，再以水補足 1,000ml，撇去油脂於 Arnold 殺菌器中以蒸氣加熱 30 分鐘，用濾紙過濾後加入下列各成分：

Peptone	10g
食鹽	5g
洋菜	15g

加熱溶解之調節 pH 至 7.6，又於 Arnold 殺菌器中以蒸氣加熱 15 分鐘，用 Buchner 抽氣瓶過濾之，裝入試管，約 10ml 在 15 磅壓力下 (121°C) 殺菌 20 分鐘，此時最終 pH 為 7.4，取出冷卻至 40°C 時復加入無纖維素之馬(羊或兔)血 6% (0.6ml 血於 10ml 培養基中)，混合後即注入滅菌二重皿中使呈水平地凝固。

[註七] Holman cooked meat medium (alkaline)

新鮮瘦牛肉碎末	500g
H <sub>2</sub> O	1,000ml
Peptone	5g
食鹽(化學用)	5g

加牛肉碎末於水中，在冰箱中浸漬一夜撇去油膩，以數層紗布濾過之，用力擠出濾液，剩肉渣塊於濾液中添水補足 1 升加入百補登於 Arnold 殺菌器中加熱 15 分鐘溶解之，濾過後加入食鹽及 1 當量濃度 (1N) 之氫氧化鈉 (NaOH) 溶液，直至對 Phenolphthaleine (酚酞) 呈鹼性，又於 Arnold 殺菌器中加熱使呈澄清過濾，於每試管中先加入 2 克之肉渣，再加入 10ml 上述之鹼性澄清液於 15 磅壓力下 (121°C) 殺菌 20 分鐘，最終為 7.2~7.4，在使用前煮沸該培養至少 10 分鐘，除去其中溶解之氧氣，立即於水浴中冷卻之。

[註八] North aniline oil methylene blue 染色液。(靛油檢千林青染色液)

混合 3.0ml 靛油 (Aniline oil) 及 10.0ml 酒精，而後懷懷加入 1.5ml 鹽酸，同時加以搖動，再慢慢加入 30ml 梅千林青 (Methylene blue) 之酒精飽和液，以補足至 100ml 濾過之。

# 十五 蔗糖及澱粉之微生物

## (一) 簡介 (General remarks)

蔗糖及澱粉之微生物通常有平面酸敗菌孢子，高溫嫌氣菌，硫化腐敗菌孢子及中溫性菌之各種孢子。檢查方式通常分為中溫性菌及高溫性菌之檢出。

## (二) 器具及藥物

- |                                                         |       |       |
|---------------------------------------------------------|-------|-------|
| 1. 二號白砂                                                 | 40mg  |       |
| 2. 6英兩瓶                                                 | 2個    |       |
| 3. 滅菌水                                                  | 100ml | 數瓶    |
| 4. 酸性葡萄糖酵母水培液 (acid glucose yeast water broth) [註一]     |       | 4支    |
| 5. 20ml 酸性洋菜培养基 (acid agar) (做法參考A之2一項)                 |       |       |
| 6. 肉汁洋菜斜面 (Nutrient agar slant) [註二]                    |       | 10支   |
| 7. 葡萄糖洋菜培养基 (glucose agar) [註三]                         |       | 2支    |
| 8. 3%滅菌洋菜                                               | 2支    |       |
| 9. 滅菌10ml吸管                                             | 10支   |       |
| 10. 澱粉                                                  | 20g   |       |
| 11. B. C. P. 葡萄糖，百補登洋菜 (B.C.P. glucose-Typten agar [註四] | 100ml | 1瓶 2支 |
| 12. 肝汁培液 liver broth [註五]                               |       | 12支   |
| 13. 亞硫酸鹽洋菜培养基 (Sulfite agar) [註六]                       |       | 12支   |
| 14. 滅菌二重皿 (petri dish)                                  |       | 6張    |

## (三) 實驗步驟 (Procedure)

1. 常溫性菌 (Mesophiles) 之檢出。
  - (1) 蔗糖中之常溫性菌；秤取20g二號砂白，移入100ml有刻度的6英兩 (Ounce) 瓶中，加無菌水至100ml。用此稀釋液直接接種於下列培养基。
    - a. 取5ml及1ml稀釋液依次注入2支酸性葡萄糖酵母水培液 (glucose yeast water broth) (酵母水加適當量的滅菌乳酸使呈酸性反應) 中，在室溫培養一星期。用顯微鏡觀察有無酵母之存在。
    - b. 取5ml及1ml稀釋液依次注入2瓶酸性洋菜培养基即依上法培養微菌。稱出各種聚落，為製平面酸性洋菜培养基，取2瓶各盛20ml葡萄糖洋菜培养基。熔解後放冷至50°C，加約3ml 1%滅菌乳酸液，接種後沿着瓶之最大平面放置待洋菜凝固。
    - c. 取10支肉汁洋菜斜面 (Nutrient agar slant)，取1白金耳的稀釋試液，塗敷於斜面上，在室溫培養1星期而觀察好氣性孢子形成菌 (Aerobic spore formers)。
    - d. 取1支葡萄糖洋菜培养基，加5ml稀釋液，蓋覆半吋厚的3%無菌洋菜在室溫1星期或37°C 2日振盪培養之，觀察嫌氣菌 (Anaerobes)。
    - e. 記錄全部結果於表格。
  - (2) 澱粉中之常溫性菌，秤取10g澱粉，移入100ml處有刻度的6英兩 (ounce) 瓶，加無菌水同時攪拌均勻至100ml，每次取樣時應慢慢攪拌均勻。依上述蔗糖之方法

接種試驗之。

## 2. 好熱性菌之檢出 (thermophiles)

- (1) 糖類中之好熱性菌檢查之法定方法，(可視 A. A. C 分析方法)，在臘紙上秤取20克糖(特砂，二砂，甜菜糖，糖菓，楓糖等)，移入有100ml標誌的滅菌三角瓶加滅菌水至100ml之刻度，急速加熱而煮沸5分鐘以滅菌水補充蒸發量(或把糖移入6g瓶中，加滅菌水至100ml蒸發8分鐘)。
- (2) 平面酸敗菌孢子之檢出，取二瓶平面 B. C. P. glucose trypton 洋菜培養基放進2ml糖，但在55°C培養36—48小時，觀察暗色的中心帶黃色暈輪之黃色聚落(法定方法規定5個二重皿中，各接種2ml，的聚落之總數再乘5，表示10g樣品中之孢子數)。
- (3) 不產生硫化氫(H<sub>2</sub>S)的嫌氣性高溫菌孢子(T. A. S.)之檢出，分注20ml糖液於6支預先蒸發液放冷之肝汁培養基(liver broth)中，然後以肉汁洋菜培養基(Nutrient agar)重疊之，而重疊進去之洋菜則在剛凝固之溫度待洋菜凝固後試管先加溫到55°C，而後在55°C下培養72小時，觀察量(有泡及類似乾酪之臭氣，等反應的試管做Gram染色，用顯微鏡檢查之)。
- (4) 產生硫化氫(H<sub>2</sub>S)之高溫性嫌氣菌孢子之檢出(硫反腐敗菌)，分注20ml糖液於6支溶態亞硫酸鹽洋菜培養基徐徐接種培養混合之，在55°C培養72小時選出周圍呈黑色之黑色聚落，普通洋菜培養基之黑色反可能是其他產生大量氫氣之嫌氣菌所引起之結果，而附隨有洋菜之割裂。
- (5) 結果之標示，平面酸敗及硫化腐敗菌以10克糖中之孢子數表示之，不產生硫化氫之嫌氣菌以正負反應試管數表示之，例如+，-等應以表格記錄之。

## 3. 澱粉中之高溫性菌，用1-B之試料，但每次取樣前應攪拌均勻。

### (1) 平面酸敗菌孢子 (flat-sour spores) 之檢出。

攪拌應加20ml澱粉懸濁液於100ml溶態B. C. 葡萄糖，百補登洋菜(Dextrose-tryptone-BCP agar)中加熱洋菜及澱粉混合物應頻頻搖動至澱粉充溢。然後搖動蒸發30分鐘後分注於6個二重皿在55°C培養36—48小時。

### (2) 不發生硫化氫之高溫性嫌氣菌孢子之檢出。

平均分配20ml之澱粉懸濁液於6支預先加熱到100°C之肝汁培養液，再加熱應慢慢振動使澱粉液均勻，防止過量之起泡，蒸發30分鐘後，以冷肉汁洋菜重疊之，在55°C培養5日。

### (3) 硫化腐敗菌孢子之檢出。

平均分配20ml澱粉懸濁液於6支溶態亞硫酸鹽洋菜培養基，慢慢振盪使澱粉液均勻，蒸發30分鐘慢慢搖動，待洋菜凝固後在55°C培養5日。

### (4) 結果之表示仿糖類4—4一項。

## (四) 糖及澱粉之標準

### 1. 全高溫性孢子數。

每批成糖澱粉取5個樣品每10克中須不超過150個孢子，總平均為不超過125個孢子。

### 2. 平面酸敗菌孢子數。

5個樣品每10克不許超過75個孢子，總平均不超過50個孢子。

3. 高溫性嫌氣菌。

5 個樣品中不許有 3 個(60%)以上含此菌，又各樣品中不許 4 支(65%)以上有反應。

4. 硫化氫腐敗菌孢子。

5 個樣品中不許有 2 個(40%)以上含此菌，又各樣品 10 克中不許有 5 個以上聚落(相當於 6 支試管中有 2 個聚落。

[註一] 酸性葡萄糖酵母水培液(acid glucose water broth)做好葡萄糖酵母水培液後加適當量的滅菌乳酸使呈酸性。

[註二] 肉汁洋菜斜面(Nutrient agar slant)。

視培養基之配法一章。

[註三] 葡萄糖洋菜(glucose agar)

肉汁(meat extract)	3 克
百補登(pepton)	5 克
葡萄糖(glucose)	10 克
洋菜(agar)	20 克
蒸餾水(Distilled water)	1,000ml

置各成分於蒸餾水煮沸至洋菜溶解，補充蒸發量調節 pH 為 7.2，以棉花過濾後分註入試管，在 Arnold 作 100°C 20 分鐘之三次間隔殺菌。

[註四] BCP 葡萄糖百補登洋菜 (BCP glucose, peptone agar)

肉汁(meat extract)	3 克
百補登(peptone)	5 克
葡萄糖(glucose)	5 克
Bromocresol purple 指示劑溶液	1ml
蒸餾水(distilled water)	1,000ml

量肉汁，百補登及葡萄糖於蒸餾水中，煮沸調節 pH 為 7 加入指示劑溶液而混合均勻。以濾紙過濾分注於發酵用試管(如 purhumtnhe) 中。在 Arnold 做 100°C 20 分鐘之三次間隔殺菌。

醋酸液用 Bromocresol purple 指示劑溶液之配法。

Bromocresol purple	16 克
酒精 95%	500ml
蒸餾水	500ml

溶 Bromocresol purple 於酒精，加入蒸餾水後以濾紙過濾。

[註五] 肝汁培液(liver broth)

視腐敗罐頭食品之細菌觀察。

[註六] 亞硫酸鹽洋菜培养基(sulfite agar)

Tryptone	10 克
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	1 克
洋菜	20 克
蒸餾水	1,000ml

量 tryptone, Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> 於蒸餾水中待溶解後復入洋菜於水浴槽中加熱溶解之，不需要調節 pH 即可注入預先裝有清淨鐵釘之試管中於 Arnold 殺菌器中做 100°C 20 分鐘之三次間隔殺菌，該培养基宜於實驗前一星期調製之。

# 十六 調味料之檢查

## (Examination of flavouring substance)

### (一) 簡介 (General remarks)

生的調味料大部份具有高度的細菌含量，因此當其他食品，混合後即無引起該等食物之腐敗，因此對於調味料中微生物之檢驗工作是相當重要的，又調味料 (Spice) 可分為下面三項：

- (一) Whole spice 如丁香
- (二) Ground spice 如胡椒
- (三) Bulky spice 如月桂葉

### (二) 器具及培養基 (Materials required)

- |                                                   |      |
|---------------------------------------------------|------|
| 1. 天平                                             | 1 臺  |
| 2. 6 呎 (OZ) 瓶子                                    | 1 個  |
| 3. 0.1 cc (立方厘米) 吸管                               | 1 支  |
| 4. 10 ml 吸管 (有刻度者)                                | 3 支  |
| 5. 1 cc 吸管                                        | 1 支  |
| 6. 二重皿                                            | 18 個 |
| 7. 載玻片 (Slide glass)                              |      |
| 8. 蓋玻片 (Cover glass)                              |      |
| 9. 調味料樣品                                          |      |
| 10. 無菌水                                           |      |
| 11. Brom cresol purple-tryptone-glucose agar [註一] | 16 支 |
| 溴甲酚紫保留原狀補登葡萄糖洋菜                                   |      |
| 12. Wort agar 麥芽汁洋菜                               | 6 支  |
| 13. Peptone-glucose-yeast extract-phosphate agar  |      |
| 百補登，葡萄糖酵母粉及磷酸鹽洋菜 [註三]                             |      |
| 14. Gensen's spiced ham medium [註四]               | 1 支  |
| 傑生化調味火腿培養基                                        |      |
| 15. Liver broth [註五] 肝汁培養液                        | 8 支  |
| 16. Sulfite agar [註六] 亞硫酸鹽洋菜                      |      |

### (三) 實驗步驟 (Experimental procedure)

#### A. 樣品的調製

- 1. 秤取10克整顆調味料 (如果為塊狀調味料則秤取2克如果為粒狀則1克便放入6呎 (oz) 瓶內。
- 2. 加入無菌水使全容積達100 ml。
- 3. 用力振盪5分鐘。
- 4. 靜止以使粗大物質沉澱下來。
- 5. 依前列方法調製10倍 100倍 1,000倍稀釋液。

## B. 生物之計算及檢出

### a. 總數之平板計算

1. 依前法用 Brom cresol purple-tryptone-glucose agar (溴甲酚紫脒補登葡萄糖洋菜) 9.9 ml 分別稀釋為10倍, 100倍, 1000倍各做4支。
2. 將各支倒入殺菌二重皿中使呈水平地凝固。
3. 置各種稀釋平板二個於 37°C 及 55°C 保溫48小時。
4. 計算每克調味料中所含常溫性 (Mesophilic) 及好熱性 (Thermophilic) 之細菌數。

### b. 耐酸性細菌及微菌

1. 用麥芽汁洋菜培養基分別稀釋為10倍, 100及1,000倍。各2支
2. 將各支倒入殺菌二重皿中使呈水平地凝固。
3. 於 25°C 或室溫下保溫5天。
4. 計算細菌數及微菌數。

### c. *Bacillus thermoacidicus* (菌名) 數之計算

1. 依 a. b 項用 Peptone-glucose-yeast extract phosphate agar 百補登葡萄糖酵母粉及磷酸鹽洋菜做成各種稀釋度洋菜平板。
2. 於 37°C 及 55°C 保溫2天。
3. 計算細菌數。

### d. 孢子之檢出

1. 煮沸調味料懸濁液五分鐘。
2. 補充因蒸發而損失之無菌水。
3. 將下面所列者以適當稀釋度保溫之。
  - i) 用 Brom cresol purple-tryptone-glucose agar (溴甲酚紫脒補登葡萄糖洋菜) 於 37°C 及 55°C 保溫二天, 計算每克調味料所含之孢子數。
  - ii) 用 Gensen's spiced ham medium 於 37°C 或 48.9°C 保溫5天, 記錄在硬化豬肉內能因好氣性孢子形成之作用, 而產生氣體之最高稀釋倍數。

### e. 嫌氣性細菌之檢出

#### 1. 腐敗性嫌氣菌 (*Putrefactive anaerobes*)

- i. 接種 1 ml 及 0.1 ml 之煮沸調味料懸濁液於含有 Liver broth (肝汁培養液) 之試管內。
  - ii. 在各試管上加入一層洋菜, 使呈嫌氣性。
  - iii. 於 37°C 培養5天。
  - iv. 觀察有無氣體之產生, 有無腐敗而產生之臭味。
2. 不產生 H<sub>2</sub>S (硫化氫) 之耐熱性嫌氣性細菌。
    - i. 分配 20 ml 煮沸調味料懸濁液於6支含有 Liver broth (肝汁培養液) 之試管內。
    - ii. 加一層洋菜於上列各試管中。
    - iii. 於 55°C 培養48小時。
    - iv. 記錄產生氣體之試管數。
  3. 產生硫化氫 (H<sub>2</sub>S) 之耐熱性嫌氣性細菌。

- i. 分配 20 ml 煮沸調味料懸浮液於 6 支含有亞硫酸鹽洋菜 (Sulfite agar) 之試管內。
- ii. 於 55°C 培養 48 小時。
- iii. 計算黑色聚落總數。
- iv. 將結果以每克調味料所含孢子數表示之。

[註一]: Brom cresol-purple-tryptone-glucose agar

溴甲酚紫胰補登葡萄糖洋菜。

詳見檢驗蔗糖及澱粉之微生物一節 [註四]

[註二]: Wort agar 麥芽汁洋菜

以上稀釋麥芽粉末至 8 Balling 調節 pH (酸度) 為 5.5~6.0 加入 2% 洋菜，而後在高壓殺菌器內於 15 磅壓力下殺菌 15 分鐘。

[註三]: Peptone-glucose-yeast extract phosphate agar

百補登 (Proteuse peptone)	5 克
酵母粉 (Yeast extract)	5 克
葡萄糖	1 克
磷酸一氫鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	4 克
洋菜	20 克
水	1,000 ml

於 115 磅壓力 (121°C) 下殺菌 20 分鐘，使最終 pH 為 5.0

[註四]: Gensen's spiced ham medium (傑生代調味火腿培养基) 在試管中裝入火腿片 (自一健全的罐頭中取出) 至  $\frac{1}{2}$  處，而後注入含有 0.4% 硝酸鈉及 2% 蔗糖之溶液，至少覆蓋肉片  $\frac{1}{4}$  吋此時，必須無氣泡在內，然後塞好棉栓在高壓殺菌中於 121°C (15 磅壓力) 殺菌 15 分鐘。

[註五]: Liver broth (肝汁培養液)

詳見蔗糖與澱粉之微生物一節 [註五]

[註六]: Sulfite agar (亞硫酸鹽洋菜)

見蔗糖與澱粉之微生物一節 [註六]

行政院農委會圖書室



0000149