

2006 年第十七屆國際生物奧林匹亞競賽

--實驗試題(2)

中華民國生物奧林匹亞競賽代表團

實驗四：微生物學

細菌的分類有不同的系統，但最常用的為在 Bergey 的細菌學手冊中所記載的。

以下為一種由生化觀點鑑定細菌菌株的方法之概要：

1. 分離菌株並取得純化培養
2. 取活細胞以革蘭氏染色後以顯微鏡觀察，可得知微生物的形態及革蘭染色類型，並根據其是否會形成菌團、孢子及其他形態學上的特性，也是鑑定微生物種類的重要方式
3. 判斷營養特性(通常需先行分離、純化培養菌株)：光合自營、光合異營、化學自營、化學異營等
4. 進行先期試驗：下列的試驗組稱為先期試驗，用來判斷此種純化菌株的屬及科分別為何。除了革蘭染色及形態觀察之外，主要的先期試驗包括觸酶活性、氧化酶活性、葡萄糖發酵活性和活動性等

【試劑和設備】

1. 滴瓶--裝有龍膽紫
2. 滴瓶--裝有 Lugol
3. 滴瓶--裝有革蘭去色劑
4. 滴瓶--裝有 Safranin
5. 滴瓶--裝有蒸餾水
6. 一個試管架
7. 二支試管--含有生長在 Luria-Bertani 培養液培養的 A 和 B 二菌種
8. 一副手套
9. 口罩
10. 油性標示筆
11. 紙巾
12. 一支本生燈
13. 顯微鏡
14. 接種環
15. 4 片玻片
16. 玻片盤
17. 1 個塑膠瓶-裝有洗滌用的水
18. 一個拋棄式小杯
19. 一滴瓶礦物油
20. 一滴瓶 3% H₂O₂
21. 二個 Luria-Bertani 洋菜培養盤--含有菌種 A、B
22. 一微量離心管--含有 2 片氧化酶圓片
23. 一支鑷子
24. 二支試管
25. 一支有蓋的試管--含有無菌蒸餾水
26. 一支塑膠巴斯德吸管
27. 三盤含有伊紅甲基藍洋菜培養基的培養皿(一盤裝有菌種 A，一盤裝有菌種 B，另一盤無菌)

28. 三管苯丙胺酸(一管裝有菌種 A，一管裝有菌種 B，另一管無菌)
29. 一個滴瓶含 10%氯化鐵
30. 三根試管--含有 SIM (可測硫化氫，吡啶，及活動性之試劑) 培養基(一管裝有菌種 A，一管裝有菌種 B，另一管無菌)
31. 一滴瓶--含有吡啶試劑
32. 三試管--含有尿素培養液(一管裝有菌種 A，一管裝有菌種 B，另一管無菌)
33. 三試管--含有 MIO (可測活動性，吡啶，及鳥胺酸)培養基(一盤裝有菌種 A，一盤裝有菌種 B，另一盤無菌)
34. 三試管--含有 Simmons 檸檬酸 (標示 SC-A、SC-B 及未接種 SC)
35. 時鐘--置於學生可看到處

【注意】

心操作培養基和試劑，這些試劑只能提供一份!!

如果不小心操作--如動作太突然，或操作時離開本生燈太遠，你就會因培養基污染而無法得到好的結果。

生化試驗結果的呈現需根據操作培養基，試劑所得之結果，或根據題目所提供的細菌資訊(圖和表)。

注意：不要丟棄含有菌種 A 和 B 的管子，在實驗 2 中仍會使用。

實驗 1：對菌種 A、B 進行革蘭氏染色

【實驗步驟】

《操作》

革蘭氏染色可以區分二種類型的細菌之細胞壁，有些細菌因其細胞壁的化學特性，能在如丙酮或酒精等脫色劑的處理後，仍能夠保留結晶紫的顏色。

【革蘭氏染色操作技術】

1. 將待研究的材料於玻片上製成薄的抹片標本，並風乾
2. 將玻片於本生燈上過火三、四次以固定材料，避免在染色過程中被洗去
3. 將玻片放置於玻片染色架上，並以 Gentian Violet (龍膽紫)染劑蓋過材料
4. 以龍膽紫染色三十秒後，以流水沖洗
5. (lugol, 媒染劑)覆蓋材料 30 秒
6. 以拇指和食指握住玻片，並以數滴丙酮或酒精清洗材料，直到脫色劑不再呈現紫色為止，此過程約需 10 秒鐘
7. 以流水沖洗後，再將玻片放置於染色架上，以 safranin(番紅染劑)覆蓋 20 秒以進行對比染色，再以流水沖洗
8. 將玻片豎立於染色架上，流去多餘的水分，並將玻片風乾
9. 於 100 倍油鏡下以顯微鏡檢查染色完成的玻片樣本
10. 當對焦完成後，請監試人員確認

將正確的答案填入正確的位置中

菌種	Gram staining		監試人員確認
A	<input type="checkbox"/> 陽性	<input type="checkbox"/> 陰性	
B	<input type="checkbox"/> 陽性	<input type="checkbox"/> 陰性	

實驗 2：菌種 A 和 B 的生化特性

在這部分請利用前述提供的資訊或以下操作的實驗，來判定 A、B 兩菌種所屬的科及屬。

【觸酶反應】

有些細菌具有黃素蛋白，可還原氧氣產生具有毒性的過氧化物(H_2O_2 或 O_2^-)，因它們是強氧化物，會破壞細胞的構造。因此許多細菌會產生酵素來分解這些有毒物質，以保護自己。

《操作》

對菌種 A 和 B 進行觸酶測試，以接種環分別取二種液態培養基中的細菌懸浮液(標示 LB-A 和 LB-B)水膜三次，放置於載玻片上，分別加兩滴過氧化氫於玻片上的細菌懸浮液中。

注意：將所得的結果，以 + (表示有反應)、- (表示無反應)寫於生化反應的表格中。

《問題》

觸酶可催化下列何項反應？

- 1) $H_2O_2 + NADH + H^+ \rightarrow 2H_2O + NAD^+$
- 2) $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
- 3) $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- 4) $4 O_2^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O + 3 O_2$

將答案以數字寫於下方虛線處

【氧化酶反應】

測試細胞色素 c 氧化酶(存在於不同屬細菌中，如 *Pseudomonas* spp., *Neisseria*

spp., *Moraxella* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp.)，氧化酶圓片(Oxidase discs)中含有細胞色素 c 氧化酶的受質(dimethyl-para- phenylene-diamine)，若細菌具有此種酵素，在有氧氣的環境中，將使氧化酶圓片呈現紅紫色變化。

《操作》

依據以下指示，進行氧化酶測試於菌種 A 和 B 上。以試管進行氧化酶測試，將純化培養的細菌，以 0.2ml 無菌蒸餾水製成懸浮液(懸浮液製法如下)，並加入一片氧化酶圓片。

懸浮液製法：分別從標示 LB-A 和 LB-B 的培養皿中，以接種環刮取三個菌落，分別配置成細菌懸浮液。

《結果》

一般而言，室溫下，多可於一分鐘內呈現陽性反應，若超過二分鐘才有變化，則視為無反應(陰性反應)。

陽性反應：圓片呈現紅紫色

陰性反應：圓片無變化

注意：將所得的結果，以 + (表示有反應)、- (表示無反應)寫於生化反應的表格中。

【伊紅甲基藍(EMB)洋菜培養基】

此種培養基可用來篩選生長快速、及對營養需求極少的革蘭氏陰性菌，它可培養所有種類的腸內菌。

《目的》

此培養基結合了 Holt-Harris 及 Levine's 兩種配方，來增進腸內菌及其他革蘭氏陰

性菌的篩選效果。要分辨能夠進行乳糖及(或)蔗糖發酵的菌種、及無法進行發酵的菌種，可藉由伊紅(eosin)及甲基藍(methylene blue)來辨識，而這些指示劑也會抑制某些革蘭氏陽性菌生長。

培養許多品系的大腸桿菌屬和檸檬酸菌屬的菌落時，培養基中會呈現出綠色金屬光澤。

能夠進行乳糖及(或)蔗糖發酵的菌種，菌落的中央會呈現深色，而周圍則為藍色或粉紅色；而無法進行發酵的菌種，菌落則呈現無色。

這種培養基除了可以培養腸內菌外，也可培養其他菌種，但不同菌種所形成的菌落外形不同，可用來區分之。

《指示》

使用 EMB 培養基（分別標示 EMB-A 和 EMB-B 表示菌種 A 和 B），來判斷菌種 A 和 B 對蔗糖和(或)乳糖的利用狀況。

注意：將所得的結果，以+(表示有反應)、-(表示無反應)寫於生化反應的表格中。

《問題》

發酵作用

- 結果可能造成蔗糖的分解，並產生酸及氣體
- 為兼氣菌於硫醣(Thioglycollate, 一種還原劑)培養基中的生長方式；在無氧環境中，菌落的生長狀態較稀疏
- 通常與菌體中觸酶表現陽性反應有關

將答案以英文字母寫於下方虛線處

【苯丙胺酸洋菜培養基(試管以 Ph 標示)】

苯丙胺酸培養基可用來測定 **苯丙胺酸** 經 **去胺反應** 所產生的 **苯丙酮酸**，在滴加 10% 氯化鐵(ferric chloride)溶液後，如呈現綠色，即表示有反應(陽性反應)。

《實驗指引》

加 4~5 滴氯化鐵溶液(ferric chloride)於含有苯丙胺酸的斜面培養基中(試管標示 Ph-A、Ph-B 代表菌種 A、B)，當試劑加入後，旋轉試管使溶液接觸培養基，若在十分鐘內呈現深綠色，即表示反應產生了苯丙酮酸。

注意：將所得的結果，以+(表示有反應)、-(表示無反應)寫於生化反應的表格中。

【SIM 培養基(為測定硫化氫、吲哚的產生，以及菌體活動性的培養基，試管分別以 SIM A 和 SIM B 表示)】

此種培養基可用來測定硫化氫及吲哚的產生，及菌體的活動性，(I)硫化氫產生為硫代硫酸或硫酸還原酶(thiosulphate or sulphate reductases)的作用，在接種線周圍產生黑色，表示產生硫化氫(為陽性反應)，一般而言，需要在接種 18~24 小時後，才會出現。(II)若菌體在 SIM 培養基中具有活動性，則菌落會在接種線附近呈現輻射狀的分布，因此這種培養基可用來測試菌種是否具有 *Listeria's*(一種桿菌)的

特徵(傘狀活動性)。(III)培養基中含有高濃度的 tryptone，也可用於測定吲哚(indole)的產生。

《實驗指引》

使用 SIM 試管(分別標示 SIM-A 和 SIM-B 表示菌種 A、B)，用以測定 A、B 二菌種產生硫化氫、吲哚的情形及其活動性。

測定吲哚的產生，可加五滴試劑(於管上標示吲哚 indole)於含有高濃度細菌的 SIM 培養液試管中，若立即變為粉紅色，則表示有吲哚存在。

注意：將所得的結果，以+(表示有反應)、-(表示無反應)寫於生化反應的表格中。

《問題》

活動性的陰性反應(即無活動性)...

- A) 表示以穿刺接種於培養基時，菌種只會沿線生長
 - B) 將菌液滴於固態培養基上，可根據其生長過程來判斷
 - C) 可呈現出覆蓋於培養基表面的生長情形
 - D) 好發於絕對好氧性及活動性的菌種
- 將答案以英文字母寫於下方虛線處

【西門氏檸檬酸洋菜培養基】

這是一種用來判斷菌種能否利用檸檬酸滲透酶的培養基。

《實驗指引》

使用西門氏檸檬酸培養基試管(分

別標示 SC-A 和 SC-B 表示菌種 A、B)，來判斷菌種 A 和 B 是否生長。

注意：將所得的結果，以+(表示有反應)、-(表示無反應)寫於生化反應的表格中。

【活動吲哚鳥胺酸(MIO)培養基】

於此培養基中可觀察到以下的反應：

鳥胺酸去碳酸反應(ODC)：藉由酸鹼指示劑觀察試管底部培養基(下方 3/4 的無氧區域)變色情形，細菌可於此區生長，而其能否產生 ODC 酵素可由以下結果判斷：

- 呈現灰色、藍色或紫色：陽性反應，表示發生 ODC 反應，產生強鹼性產物，可過度中和由葡萄糖發酵所產生的酸，並使溶液呈現鹼性。
- 黃色：陰性反應，呈現原本的顏色，由葡萄糖發酵產生酸所造成。

《實驗指引》

使用含有 MIO 培養基的試管(分別標示 MIO-A 和 MIO-B 表示菌種 A、B)，判斷菌種 A、B 產生 ODC 酵素的情形。

注意：將所得的結果，以+(表示有反應)、-(表示無反應)寫於生化反應的表格中。

【實驗結果】

填入生化反應的結果於以下的表格中(11分)：

Organism	觸酶	乳糖	蔗糖	活動性	吲哚	硫化氫	苯丙胺酸	ODC	尿素酶	檸檬酸	氧化酶
A											
B											

利用附表中的資訊判斷菌種 A、B 之科及屬分別為何? (9 分)

	Family 科	Genus 屬
Organism A		
Organism B		

《問題》

1. 若你培養下列五種細菌，但含有培養基的試管上的標籤脫落，需要重新標示。因此，請根據下表所列之試劑反應，回答下列問題：

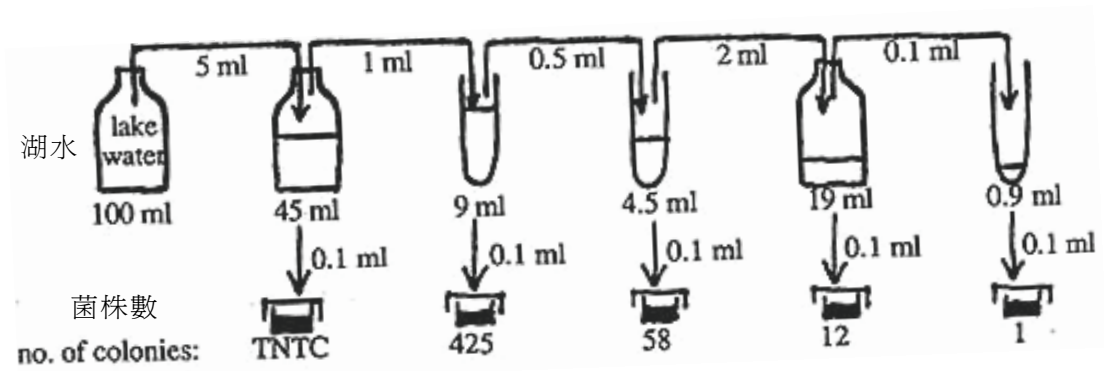
Genus 屬	Gram stain 革蘭染色	Shape 形狀	Catalase reaction 觸酶反應	glucose fermentation 葡萄糖發酵	lactose fermentation 乳糖發酵	phenylalanine deaminase 苯丙胺酸去胺酶	Citrate utilization 檸檬酸利用
<i>Bacillus</i>	+	Rod 桿狀	+	+ or -	?	?	?
<i>Staphylococcus</i>	+	Coccus 球狀	+	+	?	?	?
<i>Enterobacter</i>	-	Rod	+	+	+	-	+
<i>Morganella</i>	-	Rod	+	+	-	+	-
<i>Pseudomonas</i>	-	Rod	+	-	-	-	?

以下何種測試可區分 *Bacillus* 和 *Staphylococcus* 兩菌屬，並能藉此區別此兩屬與其他三菌屬：

- A) 葡萄糖發酵
- B) 檸檬酸利用
- C) 觸酶反應
- D) 革蘭氏染色

將答案以英文字母寫於下方虛線處

2. 應用以下的稀釋方法



a. Report the total number of CFUs (colony forming units 形成多少個菌株) in the entire 100 ml amount of the original lake water sample. (TNTC=too numerous to count.數量太多以至於無法計數), 請問原本 100ml 湖水中之總菌株數(CFU)為何?

- A) 5.8×10^7 cfu / 100 ml
- B) 4.25×10^8 cfu / 100 ml
- C) 1.2×10^9 cfu / 100 ml

將答案以英文字母寫於下方虛線處

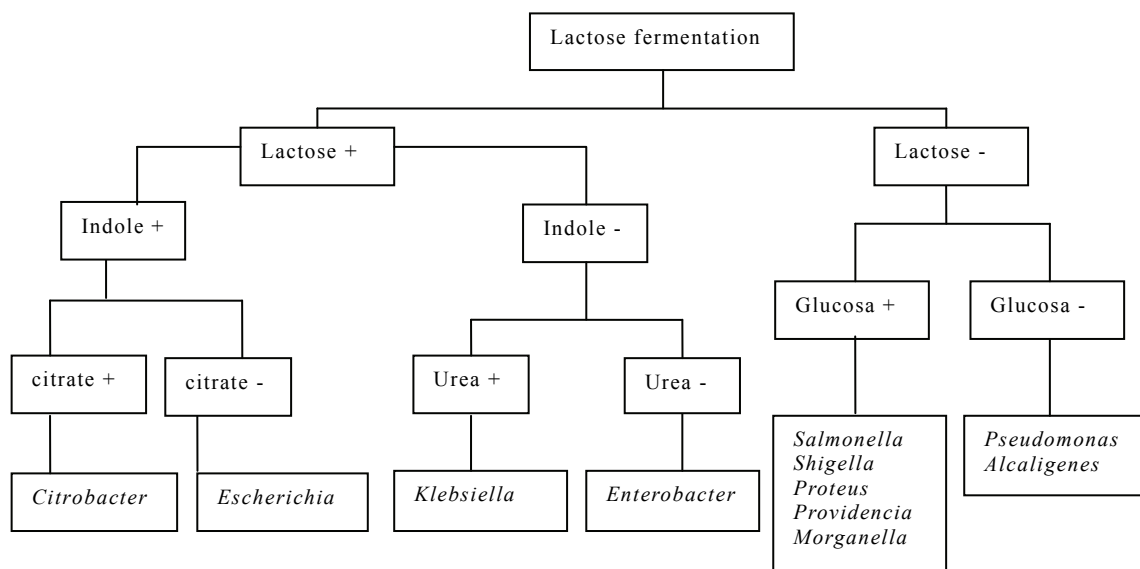
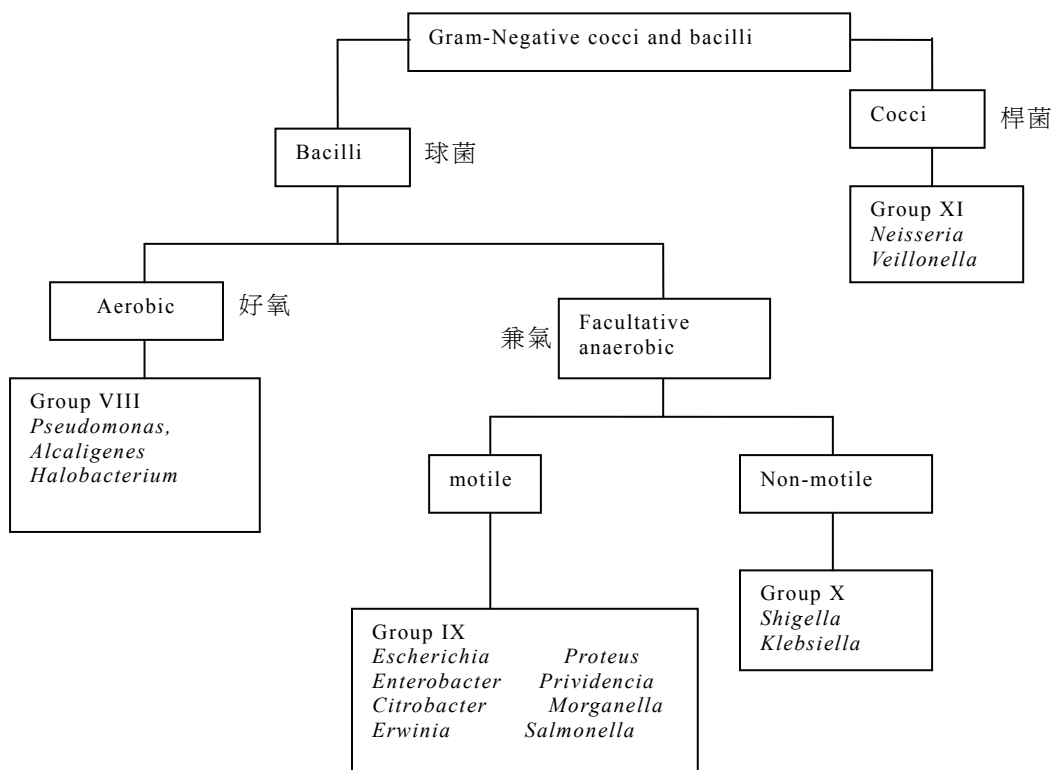
b. 若於第一次稀釋時，加 1ml 樣本於 9ml 稀釋液中，你認為上述的答案是否可能改變？

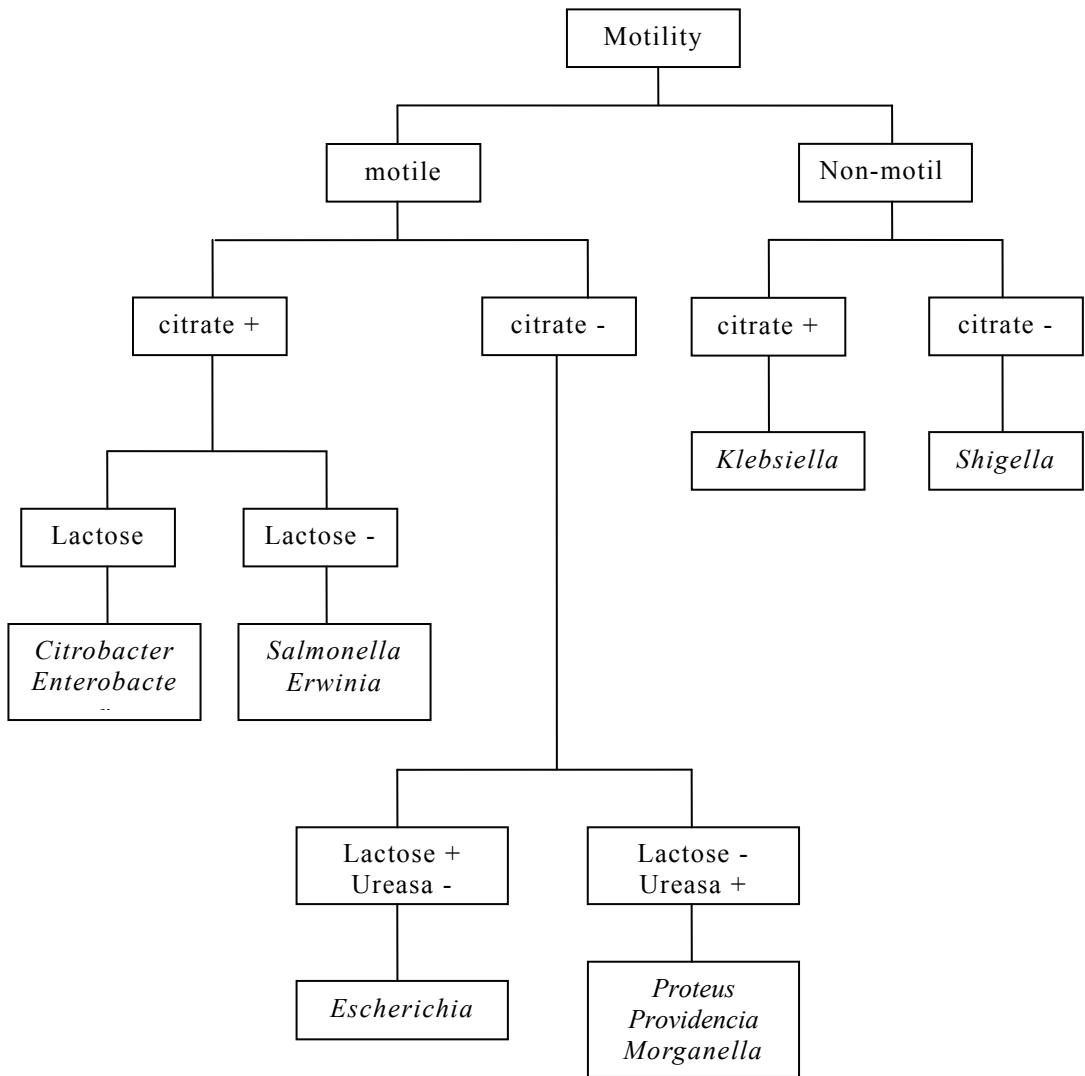
- A) Yes
- B) No

將答案以英文字母寫於下方虛線處

Annex 1 附表 1

Gram stain (fresh culture) 革蘭染色	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Shape 形狀	coccus	coccus	coccus	coccus	rod	rod	Rod	rod	rod	rod	rod	rod	coccus
Grouping 聚合方式	Clusters 群聚	Clusters 群聚	Chains 鏈狀	Tetrads 四聯體									Pairs 成對
aerobic growing 有氧生長情形	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
anaerobic growing 無氧生長情形	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
motility 活動性	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
catalase 觸酶	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
oxidase 氧化酶									+	+	-	+	+
fermentation of glucose to acid or acid+gas 葡萄糖發酵產生酸	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>Micrococcus</i>	X												
<i>Staphylococcus</i>		X											
<i>Streptococcus</i>			X										
<i>Lactococcus</i>			X										
<i>Enterococcus</i>			X										
<i>Clostridium</i>						X							
<i>Bacillus</i>							X	X					
<i>Alcaligenes</i>									X				
<i>Pseudomonas</i>										X			
<i>Enterobacterias</i>											X		
<i>Aeromonas</i>												X	
<i>Chromobacterium</i>												X	
<i>Neisseria</i>													X





Family	Genus	Oxidation 氧化			motility	indole	SH ₂	Phenyl alanine	ODC	Ureasa	citrate	Oxidase
		catalase	lactose	sucrose								
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	<i>Shigella</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	<i>Salmonella</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
	<i>Citrobacter</i>	+	+/-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
	<i>Proteus</i>	+	-	+	+	+/-	+	+	+	+	+/-	-
	<i>Morganella</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
	<i>Enterobacter</i>	+	+	+/-	+	-	-	-	+	+/-	+	-
	<i>Serratia</i>	+	+/-	+/-	+	-	-	-	+/-	+	+	-
	<i>Klebsiella</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+/-	-
Pseudomonaceae	<i>Pseudomonas</i>	+	?	-	+	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+

(完)