

# 實驗室內—活生物 的維護與管理

國立臺灣師範大學 生物系 邵鵬飛

## 前 言

在生物學教學時，常常需要活生物來作為實驗的材料，例如最近國中生物學之教學進度大約在實驗4—6，蛙的消化系統，但目前時及冬至，青蛙早已蟄伏，若到市場去購買這種活蛙可能價格極為昂貴，如到野外去採集未必能達到你的願望，這就告訴我們生物的生長是受時令限制的緣故。一般生物學老師在準備活生物作實驗教學時，不外乎採取兩種方法：一種他可以到野外熟悉的地方去採集他所需要的生物種類：另一種就是他自己去培養他所需要的東西。生物的成功培養而不致於失敗是要靠一種適合生長培養基的選擇，以及對培養物的適當照顧和管理來決定的。

## 原始生物 (PROTISTS)

通常對微生物的培養有下列八項原則：

1 所用的水質是決定性的重要。自來水通常含有氯氣，對微生物有害，常使培養發生困難，倘若可能得話，泉水或者煮過的池水比較好一點，並可大量貯備，當配製人造池水用作培養溶液時，則蒸餾水是最理想的一種。如果要使用自來水，則可讓其陳放在一個乾淨的容器內，靜置數日後，再經煮沸、冷卻纔能使用。所有用於培養的溶液均應加熱到  $30^{\circ}\text{C}$ ，而後冷卻，在應用前藉搖動或用灌氣器 (Aerador) 以溶入空氣。

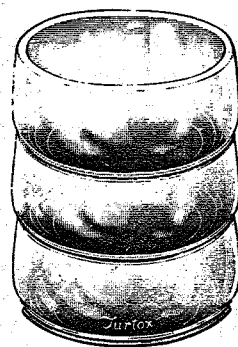
2 培養溶液必須小心配製，尤其注意特定成份中的適當含量。稀釋時應正確地依照配去做。並將各種培養溶液都貼上標籤。

3 培養基的 pH 須保持中性或極弱的鹼性。

4 除細菌外，所有微生物的最適溫度約為  $21^{\circ}\text{C}$ 。

5 培養皿應加蓋，以防止污染或塵埃落入，

但應允許空氣進入，如果用洗指碗 (Finger bowls) 來作培養皿是很理想的，因洗指碗可



三個洗指碗重疊圖

一個個重疊起來，這種設計不但可防止塵埃落入，同時可允空氣進入。最上面的一個洗指碗可覆蓋一塊玻璃板。每碗培養液的含量以 200 毫升最為理想。倘若學校無此預算來購買洗指碗的話，則利用其他各種玻璃容器來代替。

6 培養藻類當然需要有光，但所有其他微生物則應置於弱光的地方。

7 每種培養物在一定的時間內 (通常是每 4

—6週)其族群都會到達尖峯,故須移植到新鮮的培養液內再培養,以便在全學年中維持最佳的生長狀態。

8. 最好將培養物遠離有害的氣體,諸如酸性氣體,煤氣以及其他揮發性的化學藥品。

當然,所有玻璃容器和吸量管在使用之前都要用蒸餾水沖洗乾淨,不能有任何化學藥品、肥皂或清潔劑等殘留其上,應用前,最好用一些培養液沖洗一下。

### A. 藻類 (Algae)

在實驗室或在學生的實驗課中常會應用到藻類和鞭毛類。這些藻類包括水綿、剛毛藻和間生藻等都是絲狀形式的綠藻;鼓藻類如新月藻;大團藻以及其他團藻類;眼蟲;輪藻及擬輪藻 (*Nitella*);其中那有別的種類。這些淡水藻類可常在池塘、湖泊、沼澤和溪澗中採得,但一般在自然環境中都不能保持很久,故此需要培養它們以供研究或教學之用。

藻類的純種培養技術已甚有進展,但這些藻類仍無法維持其正常生長以供全班學生使用。較適合於學生在實驗課中所用的純種培養技術係在柏林雪姆 (E. G. Pringsheim) 所著的藻類的純種培養一書中節錄出來的<sup>(1)</sup>。

在藻類培養中須考慮三項主要因素:溫度、光,以及一種滿意的培養基。最適多數藻類生長和維持的溫度為  $20^{\circ}\text{C}$ 。許多藻類會生活在此最適溫度之上或下範圍內,但決不可超過  $27^{\circ}\text{C}$ 。在實驗室中培養藻類總希望能想出一些方法,儘可能地使溫度接近  $20^{\circ}\text{C}$ 。一般來說,高溫度對培養物的破壞或腐敗總較低溫為大。

北面光線,若是可利用的話,一般而言是最好的,因為藻類植物不需要直射的陽光。不管在什麼情況下,都應避免太陽的直接照射,因為這樣會使培養液的溫度升高到  $33^{\circ}\text{C}$  或以上。如須

要較窗戶進來的光度要明亮些,則可在距離培養皿幾呎遠處,裝置一個 40 瓦的日光燈,或其他的 50—75 呎/燭光強度的照明燈就可補足自然光,以促使它們生長。如以 16 小時的光期 (Light period) 與 8 小時的暗期,交替照射可使藻類生長得極為成功;用 200 呎/燭光強度,可刺激剛培養的藻類快速生長。在學校放寒假時,須每天固定照光 16 小時。

目前適用於普通或特殊藻類生長的培養基種類很多,通常可不必完全知道,如有特殊用途,可於參考文獻中查得。

1913 年柏林雪姆發現一種土壤抽出物可供藻類生長所需之要素,而這種要素是其他無機培養基所無法供應的。下面介紹兩種適合大多數藻類生長的培養液。一般較不普遍的幾種其他技術亦作概要說明。

#### 1 藻類的基本培養液

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| 硝酸鉀 ( $\text{KNO}_3$ )             | 1.0 克     |
| 硫酸鎂 ( $\text{MgSO}_4$ )            | 0.25 克    |
| 磷酸氫二鉀 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) | 1.25 克    |
| 蒸餾水                                | 1000.0 毫升 |

#### 2 波耳特氏基本培養液 (有時稱為改良的布利史妥耳氏溶液) <sup>(2)</sup>

將下列六種鹽類分別溶於 400 毫升的蒸餾水中,配製成六種貯備液:

|                                                   |        |
|---------------------------------------------------|--------|
| 硝酸鈉 ( $\text{NaNO}_3$ )                           | 10.0 克 |
| 氯化鈣 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) | 1.0 克  |
| 硫酸鎂 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) | 3.0 克  |
| 磷酸氫二鉀 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )                | 3.0 克  |
| 磷酸二氫鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )                | 7.0 克  |
| 氯化鈉 ( $\text{NaCl}$ )                             | 1.0 克  |

將上述六種貯備液每種各取出 10 毫升,加到 940 毫升的蒸餾水中,並加入下列四種微量元素的貯備液各 1.0 毫升:

(a) 50 克乙二胺四醋酸 (EDTA) <sup>(3)</sup> 和 31 克氫氧化鉀 (KOH) 溶於一公升水中。

(b) 4.98 克硫酸鐵 ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 溶於一公升的酸化水 (將 1.0 毫升硫酸加入 999 毫升的蒸餾水即成) 中。

(c) 11.42 克硼酸 ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 溶於一公升水中。

(d) 將下列五種鹽類依所示的重量, 全部溶於一公升水中:

|                                                               |        |
|---------------------------------------------------------------|--------|
| 硫酸鋅 ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )             | 8.82 克 |
| 氯化亞錳 ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )            | 1.44 克 |
| 三氧化鉬 ( $\text{MoO}_3$ )                                       | 0.71 克 |
| 硫酸銅 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )             | 1.57 克 |
| 硝酸亞鈷 [ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ] | 0.49 克 |

在高壓蒸汽滅菌器 (或壓力鍋) 中滅菌, 冷卻後即可應用 <sup>(4)</sup>。

### 3. 布利史妥耳氏溶液

用以培養藻類。將下列六種鹽類分別溶於 400 毫升的蒸餾水中即配製成貯備液:

|                                                   |        |
|---------------------------------------------------|--------|
| 硝酸鈉 ( $\text{NaNO}_3$ )                           | 10.0 克 |
| 氯化鈣 ( $\text{CaCl}_2$ )                           | 1.0 克  |
| 硫酸鎂 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) | 3.0 克  |
| 磷酸氫二鉀 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )                | 3.0 克  |
| 磷酸二氫鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )                | 7.0 克  |
| 氯化鈉 ( $\text{NaCl}$ )                             | 1.0 克  |

取上述貯備液每種 10 毫升加到 940 毫升的蒸餾水中。然後加一滴 1% 氯化鐵 ( $\text{FeCl}_3$ ) 及 2 毫升由如下配製成的微量元素溶液:

|                                                   |         |
|---------------------------------------------------|---------|
| 硫酸鋅 ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) | 0.1 克   |
| 硼酸 ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )                    | 0.1 克   |
| 硫酸錳 ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) | 0.1 克   |
| 硫酸銅 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) | 0.03 克  |
| 蒸餾水                                               | 1000 毫升 |

### 4. 歐特·許立般溶液 (Erd-Schreiber solution)

1000 毫升過濾的海水

50 毫升土壤抽出液 (將精細篩選過的花園土壤一公斤加到 1 公升的自來水中, 在高壓蒸汽滅菌器內, 以 10 磅的壓力滅菌一小時。靜置冷卻, 使土壤沉澱, 吸取其澄清液。如有需要的話, 可用離心機快速澄清)。

磷酸氫二鈉 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 0.03 克  
硝酸鈉 ( $\text{NaNO}_3$ ) 0.2 克

第一天: 以華特曼一號濾紙過濾海水, 然後加熱到  $73^\circ\text{C}$ 。

第二天: (a) 再將海水加熱到  $73^\circ\text{C}$

(b) 將土壤抽出液在高壓蒸汽滅菌器內, 以 15 磅壓力滅菌 30 分鐘。

(c) 將上述二種鹽類溶液用高壓滅菌 (將鹽類分別溶於蒸餾水 1 毫升中, 因其為 1 公升培養液所需的量)。

第三天: 加二種鹽類溶液於土壤抽出液中, 然後再加入海水中。在接種藻類之前, 應使培養液到達合宜的溫度。這種培養液平時應保存在冰箱內 <sup>(5)</sup>。

### 5. 魚肉培養基 (Fishmeal medium)

這是一種適合多數藻類生長的理想培養基。將市場出售的魚肉 0.2 克加到 1 公升泉水中, 加熱到  $80^\circ - 90^\circ\text{C}$ 。當趁熱時, 用濾紙過濾, 並加入 0.5 毫升剛新配製的 1% 氯化鐵溶液。當餘熱仍存時不斷搖動, 使空氣溶入, 而後倒在洗指碗中。冷卻後, 可移入團藻、水綿和其他藻類。

### 6. 無機鹽類培養基

很多無機鹽類培養基，例如布利史妥耳氏溶液，克諾波氏溶液等均已被成功地應用於藻類的培養。在洗指碗或類似的容器中以 1 : 1 的比例將其稀釋，培養液的含量需 100 — 200 毫升。並且就前述所給予合宜的光和溫度。

### 7. 改良的克里拔氏溶液 ( Modified Kleb's solution )

這種溶液專門用以培養眼蟲的，其配方如下：

|                                                              |         |
|--------------------------------------------------------------|---------|
| 硝酸鉀 ( $\text{KNO}_3$ )                                       | 0.25 克  |
| 硫酸鎂 ( $\text{MgSO}_4$ )                                      | 0.25 克  |
| 磷酸二氫鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )                           | 0.25 克  |
| 硝酸鈣 [ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ] | 1.00 克  |
| 菌用色胺酸肉羹                                                      | 0.01 克  |
| 加蒸餾水到                                                        | 1000 毫升 |

應用時，以 1 : 10 的比例用蒸餾水或滅過菌的池水稀釋之。

### 8. 克諾波氏溶液 ( Knop's solution )

將 1 公升蒸餾水等分成四個 250 毫升，把下列四種鹽類分別加於 250 毫升的蒸餾水中。

|                                                              |        |
|--------------------------------------------------------------|--------|
| 硫酸鎂 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )            | 0.10 克 |
| 磷酸氫二鉀 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )                           | 0.20 克 |
| 硝酸鉀 ( $\text{KNO}_3$ )                                       | 1.00 克 |
| 硝酸鈣 [ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ] | 0.10 克 |

將四種溶液混合。但硝酸鈣溶液要最後加入。在每一公升混合液中再加入新近配製的 4 % 氯化鐵溶液一滴。用蒸餾水以 1 : 1 稀釋之，使其 pH 調整到 7.6。再依照指示方法來培養藻類。

原始的克諾波氏溶液的配方，經各家學者培養藻類和其他植物後已有許多修改，這些改良溶液顯示一些經驗，就是使用後纔知道那一種溶液是最為合宜。我在這裡提供二種改良過的配方，是由波耳特和葛尼梯 ( Gamett ) 兩位所提出，希望這些為學生所設計的配方能夠合用，說不定

對你的研究工作可獲得滿意稱心。

### 9. 改良的 1 % 克諾波氏溶液

由波耳特氏修改，是用來培養藻類的，其配方如下：

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| 磷酸氫二鉀 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) | 1.0 克  |
| 硝酸鉀 ( $\text{KNO}_3$ )             | 1.0 克  |
| 硝酸鈣 [ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ] | 4.0 克  |
| 1 % 氯化鐵溶液                          | 1 滴    |
| 去離子蒸餾水                             | 700 毫升 |

以部分的去離子蒸餾水將三種鹽類分別溶於乾淨的玻璃容器內，然後混合在一起；硝酸鈣溶液須最後加入，這樣所成的溶液就是 1 % 的改良克諾波氏溶液了。培養團藻可用 0.05 % 濃度的溶液，配法是將 1 % 克諾波氏溶液吸取 1 毫升，加到 20 毫升的蒸餾水中即成。

### 10. 改良的 0.6 % 克諾波氏溶液

由葛尼梯氏修改，作為藻類的培養液，其配方如下：

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| 硝酸鉀 ( $\text{KNO}_3$ )             | 2.0 克  |
| 硫酸鎂 ( $\text{MgSO}_4$ )            | 2.0 克  |
| 磷酸氫二鉀 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) | 2.0 克  |
| 晶體的硝酸鈣                             | 6.0 克  |
| 去離子蒸餾水                             | 200 毫升 |

以部分的蒸餾水將四種鹽類分別溶解於玻璃容器內，然後混合在一起；硝酸鈣溶液須最後加入，這樣配製成的溶液就是 0.6 % 的克諾波氏貯備液。應用時，將每公斤的蒸餾水中分別加入少量的克諾波氏貯備液 1 滴、10 滴、20 滴等三種，作為某種藻類的試驗培養。

### 11. 柏林雪姆氏的土壤抽出術

這種技術需要有肥沃的花園土壤，其中含有充份的腐植質和少量的黏土。同時在最近時間內

未曾施過化學肥料的土壤，則更為適用。大試管、小燒瓶或廣口瓶等都可作為培養藻類的好容器。在每個容器內加入 1.5 — 2.5 公分厚的土壤。然後注入蒸餾水至容器約 3/4 滿。以棉花塞或鋁箔紙鬆鬆地蓋住瓶口，將其放置在另大形有蓋的鋁鍋內，並倒入清水 5—7.5 公分高度，加上鍋蓋，連續加熱二天，每天 1—2 小時，加熱時不要煮到沸騰，在沸點以下能有大量的蒸汽就可以了。此種在沸點以上的間歇性加熱可收到二種效果：(1)可使土壤內的腐植質和其他物質溶解；(2)可毀滅大部分存在於土壤和水中的生物。讓容器冷卻、沈澱澄清後（一天的時間應該足夠了），接種你要培養的藻類。許多藻類需要在弱鹼性的環境中生長，故可在容器底，也就是土壤層的下方加少許碳酸鈣粉（用解剖刀尖挑取一點就足夠了）。大部分淡水藻類，例如水綿、新月藻、網水綿、大團藻以及剛毛藻等都可在此培養液內生長得很好。

## 12. 波耳特氏土壤抽出培養液

這種溶液為許多藻類學家所喜愛，甚至勝過其他無機鹽類的培養基。掘取田間或花園內的土壤 500 克，加在 1 公升的去離子的蒸餾水中，置於高壓蒸汽滅菌器內，以 15 磅壓力處理 2 個小時。冷卻、沈澱、倒出澄清液過濾多次，直到濾液清澈為止，這樣所成的液體就算是波耳特氏的貯備了。應用時，可依照下表稀釋成 A、B、C、D 等四種稀釋液。此外還須配製 5 % 的硝酸鉀貯備液（配法是將 5 克硝酸鉀溶於 100 毫升的去離子蒸餾水中即得）。

| 稀釋液 (ml) | A  | B  | C  | D  |
|----------|----|----|----|----|
| 成份       |    |    |    |    |
| 去離子蒸餾水   | 94 | 84 | 74 | 64 |
| 波耳特貯備液   | 5  | 15 | 25 | 35 |
| 硝酸鉀貯備液   | 1  | 1  | 1  | 1  |

將各種稀釋液分別倒入洗指碗內，置放在一涼爽、光線良好的地方，將你想要培養的藻類接種到裡面，碗上需加蓋，以免水份蒸散。上面四種稀釋液可作不同藻類培養的實驗。保存各稀釋的 pH 數據（可用氫離子紙測量之），也許在每個洗指碗內加入 5 毫升不同 pH 值的磷酸緩衝液。

有關 B 細菌之維護和培養技術，將留待以後討論。內文之陳述如有詞句欠詳或謬誤之處，多請同好不吝指教。

賜教處：國立臺灣師範大學生物系邵鵬飛收

## 附註：

- 1 Pringsheim, E.G. Pure cultures of algae : their preparation and maintenance, Cambridge University Press, 1946
- 2 Bold's basal medium ( Sometimes called "modified Bristol's solution" Bischoff and Bold. 1963 ).
- 3 EDTA = Ethylene diamine tetra acetate
- 4 錄自 Harold C. Bold 所著的 "忽視了的隱花植物 ( The neglected Cryptograms )", 刊載於美國生物學教師, 第 27 期 ( 2 : ), 第 101- 103 頁, 1965 年 2 月。
- 5 錄自 : Bold. American Biology Teacher, 27, 103.

( 上接 60 頁 )

包溫氏 ( Bouins solution ) 固定液之配法：

- 1 Saturated picric acid aqueous solution 750 ml
  - 2 Formalin 250 ml
  - 3 Glacial acetic acid 50 ml
- 1 加 2 加 3 混合即成。