

真 菌 的 格 片 小 培 養 法

劉 遠 光

(廣州市衛生防疫站微生物檢驗科)

近十餘年來，真菌學的研究更被重視，在工業、農業，以及衛生部門，均設有真菌學的研究機構。研究真菌的目的和方法各有不同，惟對菌株形態的鑑定均視為工作上之首要步驟。培養真菌的小培養法，已有許多種^[1-3]，雖然經常採用，可是一般小培養法仍有若干缺點，因此特創設一種較完善的小培養法——格片法，今介紹以供同道參考。

格 片 法

格片是在片子中間有方形空格子的瓷片，在格子兩側面可黏藏蓋片，片子的一側有和格子相通的扁圓錐形的孔道。該孔道外口用棉花塞子或用紙捲摺成的塞子堵塞住，亦可用薄金屬片製成的小蓋子遮蓋住（見圖 1、2）。

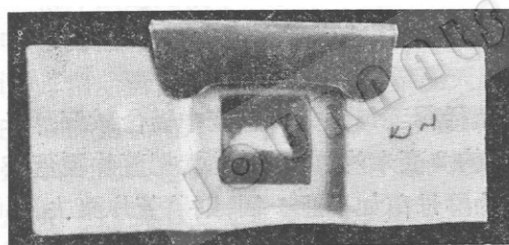


圖 1 黴菌及類黴菌的接種法，瓊脂佔培養格子下 1/3 容積，真菌靠近在蓋片處接種，片上有特製金屬小蓋為調節通氣用

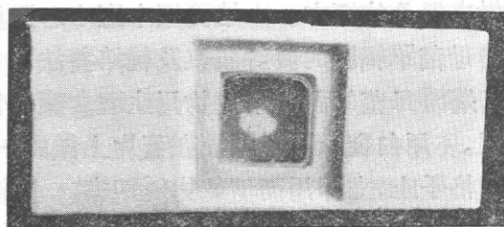


圖 2 酵母及類酵母菌的接種法，瓊脂平鋪在格子一蓋片的內面上成一薄層（不超過 1 毫米厚）真菌接種在中央部分的瓊脂之內

製備方法 各用物均經過無菌手續處理，以石蠟或凡士林將蓋片黏貼於格子兩側面；或用生雞蛋白先將蓋片黏裝好行高壓蒸氣或乾熱滅菌後再用凡士林將蓋片四周之空隙填密。裝置好蓋片後，用毛細玻璃管吸取融化的培養基瓊脂經過孔道注入格子內，所需培養基的量及培養基在格子中分佈的位置是應按照接種物的性質和觀察的目的來決定。生長速度快的菌絲型菌株所用培養基相當於格子三分之一的容積的份量已足夠（見圖 1）。生長速度較緩慢的菌絲型菌株應給以多些培養基，份量要達到格子容積之半。注入培養基後將格片直立待培養基凝固即可使用。真菌菌塊可以用直的真菌針或細小的曲形的真菌針通過格片的孔道接種在接近蓋片處的培養基上。酵母及類酵母的接種（見圖 2）：培養基注入格子內時格片是取平放位置，使培養基平整的鋪放在蓋片上厚度約 1 毫米。接種完畢，蓋塞好孔口，置於有蓋的玻璃盒子中，盒底鋪以濕濾紙以供應真菌發育時所需要的

1957 年 2 月 4 日收到。

濕度和防止培養基的過早乾涸。然後放在溫箱中培養,在培養時,格片的位置取直立或平放俱可。

格片法的各種應用

1. 菌絲體融合試驗法:

根據 Davison 氏試驗^[4],同種的真菌在互相貼近在一起培養時菌絲的生長能互相融合,而不同種的則否。利用格片進行此試驗觀察上至為清晰。操作方法:注入格子內的培養基量約佔格子四分之一的容積即止,將格片向一側豎立而放,俟瓊脂凝固後,再注入同量的培養基而將格片改向另一側豎立放置,待瓊脂完全凝固即可使用。真菌分別接種在格子兩側的培養基上。兩處菌絲各向對側生長,互相接觸,逐漸產生融合為一的菌絲,較久則彼此連成一片,不同種的真菌則沒有此種情形。

2. 接合孢子形成之試驗:

有些無隔膜菌絲的黴菌當菌絲互相接觸時,能產生接合孢子。應用格片進行此試驗,操作方法與上述菌絲體融合試驗法相同。

3. 培養標本保存法:

為着保存有代表性的培養物形態的特徵,可以應用 40% 福爾馬林將真菌殺死。以濾紙一方醮取 40% 福爾馬林後,將濾紙放於陪替氏皿中,格片培養物置濾紙上。格片的孔道除去遮蓋物讓其開放,然後將平皿蓋好。經過 24 小時,可以將格片孔道口用石蠟封住,就做成保全的標本。小培養標本應小心避免震動,免致孢子因受震力而脫落。

4. 酵母菌單細胞的發育觀察及純培養法:

將酵母菌的新鮮培養物用生理食鹽水作連續稀釋至每白金耳懸液中僅含數個酵母菌為度。用白金耳取菌懸液在蓋片上做成一直徑約 2 毫米的扁平的懸滴,把蓋片覆蓋在格片的格子上,立即用高倍乾物鏡觀察。懸滴中的酵母菌如不止一個,則將蓋片棄去,另取一新蓋片依照上述情形重做。懸滴中如僅得一個酵母菌,應立即用石蠟將蓋片封黏在格子邊緣,格子另側亦一樣裝置上蓋片。融化的培養基瓊脂(冷至約 45°C)經過孔道用毛細玻璃節直接滴在懸滴上(此時格片取平放位置),蓋塞好孔道口,俟瓊脂凝固,再行鏡檢,找到原來的細胞,將格片固定在載物几上,以備隨時作連續觀察。

施用格片法注意事項

1. 小蓋與橡皮膏布的使用法:

小蓋是用薄鐵片做成,代替塞子來遮蓋孔道口,作為格片的通氣裝置。格片接種完畢,以無菌凡士林少許塗在孔道外口周圍,然後將小蓋緊壓住孔口。若小培養物發育正常,孢子產生良好,表示格子內空氣量夠供應,此時可以不將蓋子放鬆。倘若真菌發育欠佳,孢子形成緩慢,與空氣量可能有關係時,可將小蓋鬆離孔口俾外間空氣與格子內空氣經過小蓋下之通道互相溝通。每日給予通氣時間數小時。為防制外界小昆蟲爬入格子內,孔道口的開放時間不宜太久,在行顯微鏡檢查時,小蓋仍可附在格片原來位置上,不必移開。

格片孔道口使用橡皮膏布遮蓋,在操作上雖然得到一些便利,但實驗證明,自橡皮膏

布上而來的揮發性的物質對於真菌的發育是有害的。它能抑制真菌的發育，使真菌發育緩慢，或者不產生孢子，所以橡皮膏布不可以直接代替蓋子和塞子之用。如果用凡士林塗在橡皮膏布的黏面然後用以遮蓋外孔口，減少揮發性物質對真菌的侵害，真菌可以正常的發育，這是使用橡皮膏布遮蓋格片孔道口時應注意的。

2. 格片的其他處理：

注裝了培養基的格片未接種時，如果是少數（僅數個），就用載片夾在它們的兩側，用紙包着，再以小繩子紮好，放在 $2-4^{\circ}\text{C}$ 的冰箱裏保藏備用。如果這些格片製備了很多，就宜用小盒子來盛着放到冰箱裏。這些格片保存至月餘仍可應用。

3. 廢棄的格片培養物的處理法：

觀察完畢預備丟棄的格片培養物都放在一個大的搪瓷盅內疊齊整，注加入盅內的2%來蘇兒水溶液使浸過格片的上層，煮沸30分鐘，趁熱傾去融浮在液面的石蠟與凡士林。將切碎肥皂摻入再煮片刻，取出格片與蓋片分別洗刷乾淨，用清水沖洗，待乾，用3%鹽酸酒精浸漬一夜，水洗，待乾後用紙包好，放在盒子裏，經過乾熱消毒後備用。

黏貼有橡皮膏布的格片，丟棄前宜用鑷子除去橡皮膏布，再以棉花竹蘸汽油洗除附在格片上的橡皮膏布的污跡，然後將格片煮洗消毒。

討 論

格片法是比較了一般小培養法（特別是鋼圈法）的優缺點而提出改進的方法，設計上作了多方面考慮並經過反覆使用。曾經接種過各種病原性真菌、黴菌、類黴菌、酵母菌及類酵母菌。青黴菌的格片培養物第三天即見產生孢子，第五天形成排列成帶狀的孢子鍊。白色念珠菌在格片中4—6天成長多數厚膜孢子，毛黴菌及小芽孢黴菌的發育甚為良好。在觀察期間的整個過程未嘗遭遇過小培養蓋片下的水蒸氣凝滴的模糊視野的情況，亦未見過格子內發現平時習見的小昆蟲。小培養於每次觀察後立即放回舖有濕濾紙的盒子裏並加蓋密閉，在 30°C 的室溫下經過三十多天，培養基仍呈濕潤，並無發生乾燥收縮的現象。前面所述各種試驗（即菌絲的融合現象等試驗）經過多次進行，結果感覺滿意。作者認為格片法有下列優點：（1）蓋片位置安全，蓋片藏在格子裏不露出格片表面，避免了傍邊的外力不致被推損，因此格片培養任何危險菌株亦不需要再加強蓋片方面的封固。（2）培養物藏在格子裏，毫無被掀離脫落之弊，有利於標本的保全，使教學示教上亦感方便。（3）格片的格子不取圓形而取方形的格式，使瓊脂在其中的位置能夠得到穩定，不會因受震力而滑動和轉變位置。（4）格子兩側均採用蓋片，兩側都可以接種菌塊，無論培養物向那一側方向生長都可以應用高倍物鏡詳細觀察，因此亦甚有利於顯微鏡的攝影。（5）片子取直立放置法，能夠減少水蒸氣凝滴的積聚在蓋片上。（6）接種通道為扁圓錐形，接種物容易送入格子內，接種針也能夠作較大角度的擺動，故能在格子內隨意選擇地點接種，在幾個地點同時接種菌塊，菌塊接種多些，真菌的生長率也高些。扁圓錐形的通道，可以讓細小的曲的真菌針通過（曲的真菌針釣取菌絲較之直的真菌針為容易）。利用格片行菌絲體融合試驗時應用細曲的真菌針釣取菌絲直接接種在格片的培養基上，較之採用直的真菌針更為便利。（7）應用生蛋白黏貼蓋片然後行滅菌手續，增加了無菌的保障，也增進製備過程中的工作效率。（8）運用小蓋代替塞子作為通氣裝置，在培養需氧菌

時是很合用的、格片的孔道口在小蓋的遮蔽擋護下,外面的異物像粉塵等需要通過狹長的道路方能達到孔道的外孔口,外孔口週圍的凡士林將要把那些粉塵拘留着,因此格片內的培養物很少發生染污,小昆蟲也不容易進入內面。(9) 格片可以並排堆放,節省地方,處理容易。瓷質格片價錢便宜,符合節約要求。

作者亦曾使用格片試驗細菌的動力,以半固體培養基注入格子內幾滿達孔道內口處,將格片直立放置俟瓊脂凝固,取傷寒沙門氏菌作穿刺接種,置 37°C 溫箱中培養一夜,翌日檢視,見培養物分散如羽毛狀,甚為美麗。

結 語

本文介紹一種新設計的格片小培養法的使用方法以及其特殊優點。

附誌: 本文承我站站長陳安良教授、微生物檢驗科主任張厚修先生以及孫任醫師的校閱謹此致謝。

主要參考文獻

- [1] 蔡宏道等: 實用臨床檢驗學, 宏文書局, 1955, 1442: 1443.
- [2] 陳騫聲: 實用微生物學, 商務印書館, 1953, 557.
- [3] 中國人民解放軍第二軍醫大學編: 微生物學實驗指導(講義), 1953, 224.
- [4] Simons: Handbook of tropical dermatology and medical mycology, Elsevier, 1953, 1048.

A NEW MODIFICATION IN THE MICRO-CULTURE FOR FUNGUS

LIU YUAN-KUAN

(The Municipal Laboratory Service, Canton)

By the use of a flat oblong piece of china-ware, in the center of which is a square hole which is opeaed on one side, the author found that it can serve as a better slide for micro-culture when both surfaces of the hole are sealed with cover slips. After the agar has set in the hole, with the cover slips sealed, the opening in the side could be closed with cotton plug. This slide has been found useful for the study of fusion of mycelia, for the preservation of specimens, for the observation of the growth of yeast, etc. The details of the method was given in this report together with a few photographs illustrating its uses.