

觀察紫外線致死的結果

1. 請各組領回上週的培養皿，比較在紫外線下照射不同的時間的結果。
2. 一般來說，照射時間越長，死亡率愈高。
3. 一般來說在相同的照射條件下，實驗中的 *Bacillus* 會比 *E. coli* 存活率還的高。一來不同物種會有不同對紫外線致死的行況不同。二來，在劃培養皿時，若 *Bacillus* 形成內孢子，我們把內孢子塗在整個培養皿，而內孢子會比營養細胞更能忍受紫外線的照射，因此可能看到沒有遮掩的那一半，有不少的 *Bacillus* 菌落長出。

Spore staining (孢子染色)

原理：

常出現在新聞報導中的「孔雀綠」(malachite green)，常被水產養殖業者用來抗真菌、抗寄生蟲，但是會造成人類肝臟病變，以及致癌等，因此被禁用。而 malachite green 在微生物實驗室中，卻是孢子染色的關鍵試劑。

一般十九世紀，發展了不少針對細菌的染色方法，但是會產生細菌所產生的內孢子 (endospore)，卻因為化學試劑不易穿透其細胞壁，因此不容易在光學顯微鏡下看到內孢子。後來陸續發展出可以染內孢子的技術，其中使用 malachite green 的又稱作 Schaeffer-Fulton stain，是在 1930 年代兩位細菌學家發展出來的方法。

1. 每組發給一個培養皿，或者使用上週紫外線致死結果的培養皿，請製作 smear: 加一小滴水在玻片上，使用 loop (燒紅冷卻後) 取部份的 colony 在水滴中抹開。建議製作三個玻片，一個玻片兩個樣本。這次不會用到乙醇沖洗，所以可以標示在撥片正面。
2. 其中一塊玻片進行簡單染色，例如使用 crystal violet 或是 methylene blue [可能會觀察到球菌以及桿菌，而懷疑樣品不純]
3. 另外兩塊玻片進行 spore staining:
 1. 請交到講台，在加入 malachite green (孔雀綠) 之後，在水浴槽內使用蒸氣加熱 5 分鐘，之前需補充染料以免乾掉 [微生物教科書會建議，在玻片樣品上方蓋上紙巾後才加染料，但是阿原試作的結果效果比沒有使用紙巾的來的略差]
 2. 等玻片完全冷卻，用水溫和的沖去染料 (約 30 秒)
 3. 其中一片使用 safranin (番紅) 染 1~2 min (另外一片不使用 safranin 染色，以便對照)，用水沖去染料，壓乾後使用顯微鏡以及油鏡進行觀察。使用 safranin 將會把菌體染成紅色，更容易觀察到綠色的孢子 [與簡單染色比較，將會發現疑似球菌的東西原來是孢子]{觀察重點，找出被菌體包在菌體裡面以及單獨存在}

**各組需要照相的，請找阿原使用電子目鏡。

觀察其他樣本

1. 每組發給兩隻微量離心管，包括綠藻 (標示 C.) 以及酵母菌 (標示 S.)。
2. 綠藻比一般的細菌大，可以使用 100X 或是 400X 直接觀察，不需要染色。
3. 酵母菌可以加入 methylene blue 進行 400X 觀察。