

# 酵母的幾種生活力染色測定 法的計量比較研究

徐 浩 方心芳

(中國科學院菌種保藏委員會)

用染色方法分辨酵母的死亡的和生活的細胞，不論在學理上和實用上都具有很重要的意義。在釀酒廠中，認識酵母的死活是預測發酵優劣的重要方法之一。在研究酵母的個體發育中，則常用細胞死亡率的大小來衡量酵母生活的好壞。因此不論在工廠及研究室內都需要一種簡便易行準確可靠的活力測定法。當然生活力的測定法在其他微生物的研究和應用工作中，也是極為需要的。

生活力的染色測定法主要分兩大類：一種是普通光學顯微術的染色，目前很多工廠採用的次甲基藍法 (Methylene blue staining method) 便屬於這一類；另外一種是螢光顯微術染色法，這種方法近年來進步很快，目前已採用的螢光染料有吖啶橙 (acridine orange)<sup>[1]</sup>，櫻草素 (primulin)<sup>[2]</sup> 和硫酸黃連素 (berberine sulphate)<sup>[3]</sup> 等多種，但這一類方法在我國目前尚且很少有人使用。各種生活力染色測定法的準確性和可靠性學者們的意見頗有分歧<sup>[3-5]</sup>。爲了澄清這些爭論，我們選擇了普通光學染料次甲基藍和最常用的兩種螢光染料——吖啶橙與硫酸黃連素，用它們作了酵母生活力染色的計量比較研究。

## 方 法

**等電點的測定** 爲了進行生活力染色測定法，首先需要粗略的測定酵母細胞的等電點。測定是用兩個染料的方法進行，採用的酸性染料是酸性復紅 (acid fuchsin)，鹼性染料是次甲基藍。測定時先取在麥芽汁瓊脂斜面上培養約 24 小時 (25°C) 的啤酒酵母 (*S. cerevisiae*) 一管加入 50% 的乙醇溶液 5 毫升固定並作成懸液，在不同 pH 值的緩衝溶液 3 毫升中加入 0.2 毫升的酵母懸液，然後再加入上述兩種染料 1% 的水溶液各約 0.1 毫升，染色 10—20 分鐘，然後進行油浸鏡鏡檢。根據鏡檢結果定出該啤酒酵母細胞的等電點。

生活力測定用的酵母懸液的製備：取與上述相同的酵母培養用 10 Brix 麥芽汁 10 毫升作成懸液，然後用移液管精確量取 5 毫升加熱沸騰 3 次，使其中酵母全部死亡，冷

却至室溫後再加入 5 毫升未加熱的懸液,是為母液。母液放在  $4^{\circ}\text{C}$  中,供 8 小時內完成的鏡檢工作之用。

生活力染色測定實驗本身分普通顯微鏡檢(次甲藍法)和螢光顯微鏡檢(吖啶橙法和硫酸黃連素法)兩部分。都是用同樣實驗材料同時進行的。結果用統計方法整理並分析。

**次甲基藍法** 取上述母液 0.1 毫升,加入 pH 4、6 或 7 的磷酸系統衝液 0.8 毫升,再加次甲基藍 0.1% 的水溶液 0.1 毫升,染色 10 分鐘,用 Neubauer 血球計數器進行鏡檢計數。計算 80 個小方格內細胞總數和死亡的細胞數目,求出死亡數的百分數。鏡檢倍數是  $20 \times 10 \times 1.5$ 。

**吖啶橙法** 在母液 0.1 毫升中加入 pH 6 或 7 的磷酸系統衝液 0.8 毫升,吖啶橙 0.1% 水溶液 0.1 毫升,在黑暗中染色 30—45 分鐘,然後進行螢光鏡檢。每一 pH 值計算 10 個視野內死亡的(發紅色螢光)和生活的(發綠色螢光)細胞數目。另外計算這些視野內用可見光照明時的細胞總數。然後求出死亡細胞在細胞總數中所佔的百分數和這個方法的鏡檢效率,後者指死亡細胞與生活細胞之和在細胞總數中所佔的百分數。我們採用的儀器是維也納 Reichert 廠出品的大型螢光顯微鏡,鏡檢時所用的放大倍數是  $5 \times 60$ 。照明光源是長波紫外綫。

**硫酸黃連素法** 取母液 0.1 毫升,用上法用硫酸黃連素染色 30 分鐘左右,螢光鏡檢計算死亡百分率及鏡檢效率。

## 實驗及其結果

由於本實驗的啤酒酵母生長條件及培養年齡大致相同,因此它們的等電點應當是相同的。並且在這些活力較強的培養中將很少有死亡的細胞,在加熱處理作成的母液中則約含將近等數的死亡的和生活的細胞。由於母液是用 10 Brix 的麥芽汁作成的,因此活細胞不會在母液中自動衰亡,而在  $4^{\circ}\text{C}$  中放置時,由於溫度較低,細胞也不會增殖。這樣便不會影響到計量比較研究的結果。

表 1 用兩個染料等電點測定的結果

pH 值	細胞的顏色
3.8	整個細胞紅色
4.1	胞質藍色,微紫,部分胞器紅色
4.6	胞質藍色,部分胞器淡紅色
4.8	胞質藍色,部分胞器淡紅色
5.2	胞質藍色,部分胞器淡紅色
5.8	胞質藍色,部分胞器紫色

由以上結果看來酵母細胞的組成蛋白依等電點的不同至少可區分為兩類。第一類

蛋白等電點較低約在 pH 4.1 至 4.6 左右，它們分佈於細胞的貼壁層，這一點我們的測定是與前人的工作符合的<sup>[7]</sup>。第二類蛋白等電點較高約在 pH 5.2—5.8 左右，一些胞器屬於這種蛋白。由此可見，當我們用次甲基藍進行死亡與生活的細胞區辨性染色時，pH 值至少要高於 5.8。否則由於某些胞器的不能着色，將造成整個細胞着色的減弱，因而發生區辨生活細胞及死亡細胞時的困難，並且對生存細胞數目估計過高。我們用次甲基藍在 pH 5.2 染色時，便看到這種現象。爲了證實這種想法，我們選擇了三個 pH 值進行了次甲基藍生活力染色計數實驗，其中 pH 4.0 是低於酵母細胞的最低等電點而 pH 6.0 是高於它的最高等電點的。結果如表 2。

表 2

pH 值	死 亡 細 胞 %			死亡率平均 %	百分數的標準差
	第 1 次	第 2 次	第 3 次		
4.0	52.7	14.2	37.0	34.6	15.7
6.0	53.1	51.3	52.0	52.1	1.3
7.0	50.5	64.7	44.6	53.3	8.4

實驗結果表明 pH 4.0 的標準差 (standard deviation) 最大，即數值散佈廣，參差大，用這 pH 值進行染色時結果最不穩定，而且百分率距 50% 最遠，因此顯然在低 pH 值進行染色是不適宜的。其他兩個 pH 值試驗的結果都接近於 50%，但 pH 7.0 標準差較大。爲了更確切的判斷它們的結果，我們用統計方法進行了它們的顯著性 (significance) 的分析列如表 3。

表 3

pH 值	細胞總數	死亡細胞數	死 亡 %	與 pH 6 比較的機率
4.0	290	102	35.2	< 0.01
6.0	277	145	52.3	= 1
7.0	254	133	52.4	> 0.05

在顯著性的測驗中死亡的百分率是相應 pH 值中死亡總數與總細胞數之比，而不是表 2 中所列的 3 次百分數的平均值。結果表明 pH 6 與 pH 7 相比較的機率 (probability) 大於 0.05，故相差不顯著，而 pH 4 與 pH 6 相比較機率遠小於 0.01，故相差極顯著。由此可見不論用 pH 6 或 pH 7 染色結果都沒有什麼區別，而 pH 4 的結果則遠劣於 pH 6。

吖啶橙螢光鏡檢法是絕大多數學者公認的最優良的生活力染色測定法。因爲吖啶橙的毒性較小，而且最重要的它是一種毒性較緩的染料<sup>[10]</sup>。特別是由於這種染料的濃度效應，即在濃度爲 1:100 時發紅色螢光，1:1,000 時發黃色螢光，而 1:10,000 至 1:100,000 時則發綠色螢光，同時由於一切螢光都是單色光，不會發生色差，因此它是

一種較好的方法。儘管如此，最近有些學者却對這種方法有所懷疑<sup>[3-5]</sup>，Bogen 和 Красильников 二氏都曾發現在低濃度染料中染色時，死的細胞會發綠色螢光。我們的實驗證實了這些報告。當用 1:10,000 濃度的吡啶橙染色時，用 30 磅蒸汽滅菌 30 分鐘的酵母懸液內，經過 20 分鐘染色後，竟有橙黃的細胞出現，但在染色 30 分鐘時，便看不到這樣現象。因此我們認為這並不是這個方法本身的缺陷，而只是由於染料濃度和時間的不當，顯然任何種方法的染色都是不能不滿足這兩個條件的。因此我們所用的染料濃度是 1:5,000，即每毫升溶液內約含 0.2 毫克的染料，而染色時懸液的細胞數目每毫升最大值又不超過  $3 \times 10^5$  個。依 Kälbel<sup>[9]</sup> 的計算，染色時每個活的酵母細胞約吸收  $2 \times 10^{-10}$  毫克染料，而每個死細胞約吸收  $28 \times 10^{-10}$  毫克染料。因此在本實驗內所用的懸液內，即使細胞全部是死亡的，所用的染料也不會超過 0.001 毫克，即耗去不足  $1/200$  的染料，這樣便保證了足夠的染料。此外我們所用的染色時間是 30—45 分鐘，這個時間由實驗證明是安全的，沒有毒害的。實驗結果如下。

表 4

pH 值	死 亡 率 %			死亡率平均 %	鏡 檢 效 率 %		
	第 1 次	第 2 次	第 3 次		第 1 次	第 2 次	第 3 次
6.0	53.5	50.7	44.8	49.7	84.7	94.9	82.8
7.0	53.6	46.6	39.5	46.9	92.0	81.8	87.8

在吡啶橙染色時，因為 pH 4 無法觀察，所以不再進行。結果表明不論是 pH 6 或 pH 7，死亡率都接近於 50%，但它們的鏡檢效率都沒有達到 100%，這說明一部分生存的健全的細胞仍沒有着色，這些細胞可能是生活力最強的個體。在表 4 中可以看到 pH 6 和 7 的死亡率百分數的標準差 pH 7 比 pH 6 要大得多。pH 6 和 pH 7 的顯著性測驗如表 5 所示，表中所列的百分數同表 3 中的計算法，而不是如表 4 中所列的 3 次的平均值。

表 5

pH 值	細胞總數	死亡細胞數	死 亡 %	與 pH 6 比較的機率
6.0	602	300	49.8	= 1
7.0	545	254	46.6	> 0.05

結果表明 pH 6 和 pH 7 的結果並沒有顯著的差異。因此這兩個 pH 值都可以採用。

1955 年 Geissler<sup>[3]</sup> 報告了用硫酸黃連素測定生活的及死亡的細胞的結果，據報告採用這個方法時，染料濃度 (1—0.005%)、pH 值 (3.4—9.0)、細胞密度 ( $1.25 \times 10^6$ —

$7.8 \times 10^4$ /毫升) 都不會發生影響, 染色最短時間是 10—15 分鐘, 在 24 小時亦不會有毒害作用。但是我們的實驗未能證實他的報告, 我們覺得這個方法的唯一優點是死亡細胞所發黃色螢光極為鮮明, 極易觀察。反之活的細胞的藍色螢光則極弱, 極難觀察, 而且 pH 4 時已不能着色, 視野是黑暗的, 無法計數。根據我們的實驗染色時間, 15 分鐘亦嫌太短。並且由死亡細胞的百分數看來, 它的毒害作用似乎較強, 實驗結果如表 6。

表 6

pH 值	死 亡 率 %			死亡率 平均%	死亡百分率 標準差	鏡 檢 效 率 %		
	第 1 次	第 2 次	第 3 次			第 1 次	第 2 次	第 3 次
6.0	55.1	60.4	62.9	59.5	3.3	69.7	82.7	80.4
7.0	50.0	69.3	51.0	56.8	8.8	85.0	84.2	79.2

結果表明死亡率的估計高於應有的數字。這個方法的 pH 6 與 pH 7 所得結果的顯著性測驗如下:

表 7

pH 值	細胞總數	死亡細胞數	死 亡 %	與 pH 6 比較的機率
6.0	422	255	60.4	= 1
7.0	370	206	55.7	> 0.05

表 7 可以看出硫酸黃連素法 pH 6 與 pH 7 的結果並無差異, 它們的結果都不够好。

在以上的實驗中我們已將各種方法的條件與結果作過比較, 爲了決定到底那個染色方法是最好的, 我們用吖啶橙 pH 6 所得的結果作標準和次甲基藍 (pH 6) 染色, 硫酸黃連素 (pH 6) 染色作了比較, 它們的顯著性測驗結果如下:

表 8

方 法	次 甲 基 藍 (pH 6)	硫 酸 黃 連 素 (pH 6)
與吖啶橙 pH 6 比較的機率	> 0.05	< 0.01

結果表明次甲基藍 pH 6 染色結果與吖啶橙 pH 6 染色結果相差並不顯著, 但是由於螢光染料不會發生色差, 而且死細胞紅色極為顯著, 易於識別, 而次甲基藍染色中, 有某些細胞染成淡藍色, 很難決定, 因此吖啶橙法較次甲基藍法更佳。上表同樣表明硫酸黃連素法結果遠劣於吖啶橙法, 因此不宜採用。

## 結 論

1. 一切活力染色測定法都是根據死亡細胞 和生活細胞吸收染料量的差異。因此

一切染色方法都應當注意到細胞數目和染料的比例,原生質的等電點和染色時間。

2. 次甲基藍方法的缺點是死細胞和活細胞顏色差別不够明顯,因此不如吖啶橙法。

3. 由於吖啶橙的濃度效應,由於死細胞紅色很鮮明和沒有色差,因此吖啶橙法有其特殊優點。

4. 硫酸黃連素法染色結果未能證實 Geissler 氏的報告,它的結果不若次甲基藍法和吖啶橙法良好。

5. 一切螢光鏡檢效率百分數都不能達到 100%,這是由於一部分最健全的活細胞吸入染料極少或竟不吸收染料之故,但是它並不會影響到死亡率實驗的結果。

## 參 考 文 獻

- [1] Strugger, S.: *Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie*. 1949, M. und H. Schaper Verlag, Hannover.
- [2] Pick, J.: *Zts. wis. Mikro.*, 51: 338—351, 1935.
- [3] Geissler, E.: *Naturwiss.*, 42: 372, 1955.
- [4] Bogen, H. Y.: *Arch. f. Mikrob.*, 18: 2, 170—197, 1953.
- [5] Красильников, Н. А. и М. Н. Бехтерева: *Микроб.*, 25: 279—285, 1956.
- [6] Lindegren, C. C.: *The Yeast Cell, its Genetics and Cytology*. 1949, Educational Pub.
- [7] Van Duijn, Jhr., C.: *The fluorescence microscopy*, 10: 1—3, 5—6, 1954—1955.
- [8] Conn, H. H.: *Biological Stains*. 1953, Biotech. Pub. Geneva, N. Y.
- [9] Kölbel, H.: *Zts. f. Naturforsch.* 2b, 281, 1947.
- [10] Wiede, M. und F. Meyer: *Protoplasma*, 44: 3, 1955.

## THE COMPARATIVE STUDIES ON SOME STAINING METHODS FOR THE DETERMINATION OF VITALITY OF YEAST CELLS

Tsu Hao and Fang Hsin-fang

Type Culture Commission, Academia Sinica

Staining method for the determination of vitality is very important both theoretically and practically. In general there are 3 methods adopted by microbiologists, i.e. methylene blue staining method by ordinary microscopy; acridine orange and berberine sulphate staining methods by fluorescence microscopy. In the present work, attempts were made to find the most satisfactory method, and the criteria of preference are its simplicity and accuracy.

The brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) which had been cultivated in incubator on wort agar slant for about 24 hours was used as the experimental material. The isoelectric points (I. E. P.) of the yeast protoplasm was first determined. The I. E. P. are pH 4.1—4.6 and pH 5.2—5.8 for cytoplasm and some organelles respectively. From the above, we compared various pH values for vital staining and the following conclusions were reached:

1. The principle of all staining methods for determination of vitality is based on the stain-absorption difference caused by the living and dead protoplasm. All these methods would require much attention paid to the ratio of number of cells, to the concentration of the staining solution, as well as to the I. E. P. of the protoplasm, and the time of staining.

2. The defect of methylene blue method is that there is always the existence of intermediary colors between living and dead cells. It is less preferable than acridine orange method.

3. We could not confirm the result obtained by Geissler with the berberine sulfate method. It is less accurate than methylene blue and acridine orange methods.

4. The chief advantages of the acridine orange method lie mainly upon the concentration effect of this stain, the sharp color distinction between living and dead cells, and the absence of chromatic aberration.

5. The efficiency of all the fluorescence microscopic methods was slightly or much lower than 100%, because the most healthy cells took very little or even no stains, but this defect did not influence the result of our experimental data.