

實驗活動（十）
以膜過濾技術進行水樣本的微生物檢測
（教師版本）

I. 實驗目標

1. 評定自來水和休閒用水（游泳池水）樣本的微生物質量；以及
2. 推斷測試的水樣本是否適合飲用或游泳。

II. 預期學習成果

完成這項學習活動後，學生應能：

1. 把水樣本進行膜過濾；
2. 使用膜過濾技術評估不同水樣本的微生物質量；
3. 了解大腸菌群含量與水質之間的關係；以及
4. 認識飲用水和休閒用水的安全標準。

III. 教學筆記

1. 與學生一起探討「背景」和「情景」部分，或讓學生閱讀這些部分以及「關於實驗設計的導引問題」，作為課前活動。
2. 使用「關於實驗設計的導引問題」與學生討論實驗的設計。
3. 根據學校的課時並參考第 IV 部分「實驗活動時間分配」以編排實驗流程。
4. 時刻提醒學生有關實驗各部分的安全預防措施。
5. 與學生一起探討「結果」和「討論」部分。

IV. 實驗活動時間分配

實驗活動		需時	
		課堂內	課堂外 (由實驗室技術員完成)
實驗課一：實驗第(1)部分(可由實驗室技術員準備)			
1	從水龍頭採集水樣本	20 分鐘	
2	從游泳池採集水樣本	40 分鐘(不包括來回時間)	
3	將水樣本存放在 4°C		不超過 2 天
實驗課二：實驗第(2)部分			
1	組裝真空過濾裝置	10 分鐘	
2	為水樣本製備連續稀釋液	20 分鐘	
3	進行膜過濾	50 分鐘	
4	培養濾膜上的微生物 (由實驗室技術員完成)		1 – 3 天
實驗課三：實驗第(3)部分			
1	數算菌落和分析實驗結果	30 分鐘	
總實驗課時		實驗課一：60 分鐘 實驗課二：1 小時 20 分鐘 實驗課三：30 分鐘	

V. 實驗設備、材料和準備工作

A. 實驗第（1）部分：採集水樣本

a) 設備（每組）

- 冰箱 × 1

b) 材料（每組）

- 無菌 200 ml 樣本瓶 × 2
- 標記筆 × 1

c) 準備工作

無需特定的準備工作。

B. 實驗第（2）部分：把水樣本進行膜過濾和培養濾膜上的微生物

a) 設備（每組）

- 本生燈 × 1
- 打火器 × 1
- 整套膜過濾裝置 × 1

b) 材料（每組）

- 來自第（1）部分的樣本 × 2
- 稀釋瓶（盛有 99 ml 無菌緩衝溶液） × 3
- 無菌 250 ml 量筒 × 7
- 無菌 20 ml 量筒 × 3
- 無菌濾膜 × 7
- 鑷子 × 1
- LB 瓊脂平板 × 7
- 無菌蒸餾水（100 ml） × 1
- 大腸桿菌溶液（100 ml） × 1
- 標記筆 × 1
- 噴壺（盛有 70%乙醇） × 1
- 洗瓶（盛有無菌蒸餾水） × 1
- 紙巾 × 1 盒
- 生物危害品丟棄袋 × 1
- 廢棄物貯存容器（盛有 10%氯漂白劑） × 1

c) 準備工作

製備 LB 瓊脂平板及大腸桿菌溶液（實驗課前一天由教師或實驗室技術員完成）

1. 根據製造商的說明，將 LB 瓊脂粉溶解於蒸餾水中，對 LB 瓊脂溶液進行高壓滅菌，然後將其倒入培養皿中（每盤 15–20 ml）。用石蠟封口膜將 LB 瓊脂平板包裹後，以 4°C 保存，直至使用。為每組學生準備 7 塊 LB 瓊脂平板。如沒有足夠時間製備，可向本地的生物技術公司購買即用式 LB 瓊脂平板。
2. 以合適的液體培養基（例如 LB 液體培養基）培養一瓶大腸桿菌（Sigma-Aldrich or Promega）約 16 小時。對經過一整夜培養的大腸桿菌細胞培養物進行 100 倍稀釋。將 100 ml 培養物稀釋液等分加至無菌瓶中，為每組學生準備 1 瓶。

Sigma-Aldrich 在香港的分銷商：天恆科技；電話：2817 2121

網址：www.tinhangtech.com/home/

Promega 在香港的分銷商：伯齊科技；電話：2646 6101

網址：www.bio-gene.com.hk

製備無菌緩衝溶液及其他相關溶液（實驗課前一天由教師或實驗室技術員完成）

磷酸鹽緩衝液

1. 將 34.0 g 磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4)，溶解於 500 ml 蒸餾水中。
2. 使用 pH 計，加入 1N 氫氧化鈉 (NaOH)（可以從生物技術公司購買），將該溶液的 pH 調節至 7.2。
3. 使用量筒將無菌蒸餾水加入該溶液，至總容量 1 L。

氯化鎂溶液

1. 將 81.1 g 六水合氯化鎂 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)，溶解於蒸餾水中，至總容量 1L。

製備無菌緩衝水溶液

1. 在 1 L 瓶中，加入 1.25 ml 磷酸鹽緩衝液。
2. 再加入 5 ml 氯化鎂溶液。
3. 加入無菌蒸餾水，至總容量 1 L。
4. 對溶液進行高壓滅菌。

1. 將 99 ml 已高壓滅菌的緩衝溶液等分加至無菌稀釋瓶。為每組學生準備 3 瓶。
2. 將 100 ml 蒸餾水等分加至無菌稀釋瓶。為每組學生準備 1 瓶。

VI. 「關於實驗設計的導引問題」的建議答案

1. 為何我們要測試水樣本的微生物質量呢？

測試水的微生物質量，旨在防止水源性疾病暴發，保護公眾健康，避免因飲用含有致病細菌的食水而致病。

2. 水樣本中含有大腸菌群表示什麼？

水樣本中含有大腸菌群表示該水是不安全的，不適宜人類食用。如果食用，可能會導致健康問題。

3. 水龍頭水的大腸菌群含量可接受水平是怎樣？

在理想情況下，自來水的大腸菌群含量應為：0 CFU/100 ml

參考網站：

<https://www.wsd.gov.hk/en/core-businesses/water-quality/my-drinking-water-quality/hong-kong-drinking-water-standards/index.html>

4. 游泳池水的細菌總含量可接受水平是怎樣？

在理想情況下，游泳池水的細菌總含量是每毫升的池水樣本不超過 200 個細菌

參考網站：

<https://www.lcsd.gov.hk/en/beach/atten-general/swim-watqal.html>

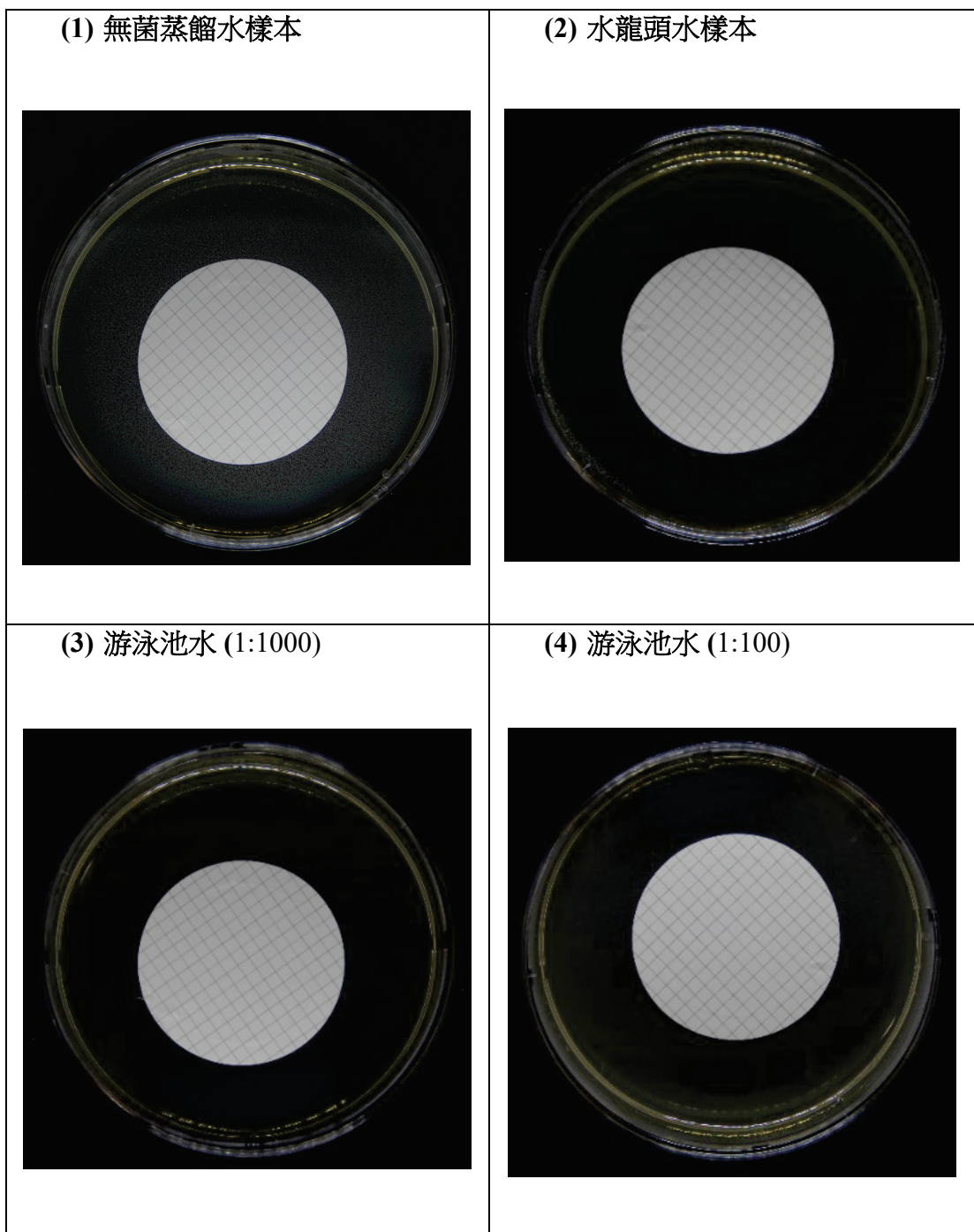
（註：因下列情況，大腸菌群含量可能會更高，例如：

- 人類活動污染了水源
- 供水管有洩漏
- 沒有有效地消毒水源
- 游泳池的衛生環境差劣)

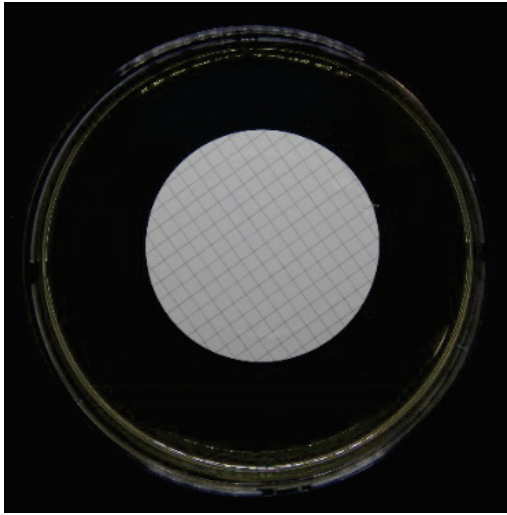
VII. 結果

1. 濾膜的照片或繪圖（在 LB 瓊脂平板經培養後）

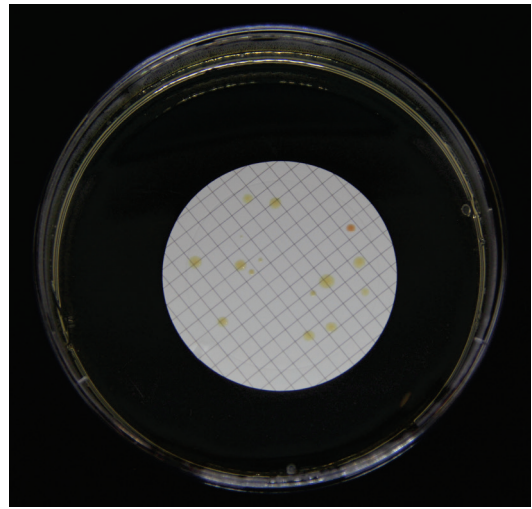
[僅供參考]



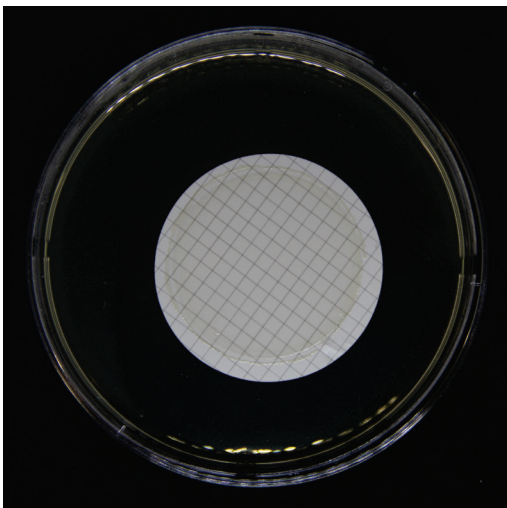
(5) 游泳池水 (1:10)



(6) 無稀釋的游泳池水



(7) 大腸桿菌溶液



2. 填寫下表。

表 2

瓊脂平板	1	2	3	4	5	6	7
樣本標記	水	龍	池； 1:1000	池； 1:100	池； 1:10	池	菌
樣本	無菌 蒸餾水 (陰性 對照)	水龍頭 水	游泳池 水； 1:1000	游泳池 水； 1:100	游泳池 水； 1:10	游泳池 水； 無稀釋	大腸桿 菌溶液 (陽性 對照)
CFU	無	無	無	無	無	15	數不清
CFU / 100 ml	--	--	--	--	--	17 (=15/90 $\times 100$)	數不清

VIII. 討論

1. 將你的水樣本與瓊脂平板 1（即陰性對照）的結果進行比較。結果是否接近你的預期？

接近預期。儘管在大多數水樣本中發現的細菌菌落含量都預期與瓊脂平板 1 相同（即無菌落），但未稀釋的游泳池水樣本卻顯示出可檢測水平的細菌。該結果表明游泳池水可能不宜作飲用，但適合作休閒用途。

附註：如果在陰性對照中發現任何菌落，則說明樣本存在污染。如果樣本處理不當，這種污染可能來自環境或其他外間來源。基於相同的原理，如果發生污染，樣本中的 CFU 含量可能會比預期高。因此，需要進一步的確認實驗。

2. 為什麼本實驗需要陽性對照？

瓊脂平板 7 中 CFU 的高含量應表明膜過濾和微生物培養程序被正確執行，因為大腸桿菌溶液應引起可觀察的微生物生長。如果在瓊脂平板 7 沒出現高數量 CFU，則表明實驗中可能存在一些錯誤。低估水樣本中的細菌含量，可能會引起嚴重的問題。

3. 在樣本採集及過濾過程中，哪些因素可能會影響你的結果？

- 樣本瓶或濾膜受到污染。
- 實驗中有移液錯誤。
- 樣本處理不當。

4. 為什麼某些水樣本需要稀釋呢？

- 如果水樣本中的細菌水平很高，那麼濾膜上可能會出現 250 個以上的菌落，這會超出了可數範圍，所以需要稀釋。
- 如果水樣本本身的濁度很高，基於上述的道理，那麼濾膜上極可能會出現 250 個以上的菌落，這會超出了可數範圍，所以同樣需要稀釋。

5. 測試的水樣本是否適合作飲用和休閒用途？簡要說明每個水樣本的適用情況。

自來水樣本的微生物質量良好，因為在未經稀釋的樣本中也沒發現細菌菌落。因此，自來水樣本適宜飲用。

泳池水樣本的微生物質量不佳，因為在未稀釋的樣本中檢測到細菌菌落，每 100 毫升 CFU 含量為 17。但根據 LCSD 的細菌總數標準，該結果仍處於可接受的範圍內。因此，游泳池水應該適合休閒用途。

參考網站：www.lcsd.gov.hk/en/beach/atten-general/swim-watqal.html。

IX. 參考資料

Bartram, J., & Ballance, R. (1996). *Water quality monitoring—A practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Forster, B., & Arango Pinedo, C. (Eds.). (2015). Bacteriological examination of waters: membrane filtration protocol. *American Society for Microbiology* (ASM).

National Environmental Methods Index. EPA-approved method for analysis of *E. coli* in ambient water. *Standard Methods*, 20th ed., 9213D.

Pan American Health Organization. *Manual for bacteriological analysis of natural water supply sources in disaster situations*.

Pelczar, M. J., Chan, E. C. S., & Krieg, N. R. (2007). *Microbiology*. 5th edn. New Delhi: Tata McGraw Hill-Education.

<https://microbeonline.com/analysis-of-water-membrane-filtration-technique/>