

實驗活動（七）

培養微生物和估算微生物的含量

（學生版本）

I. 背景

細菌培養技術和培養基，是由細菌學奠基始祖羅伯特·科赫（Robert Koch）發明的，而細菌培養技術，早已被公認為現代微生物學發展其中一項最重要的突破。有了這項技術，我們可以純化及辨認細菌種類，從而鑑定各種傳染病（如肺結核和霍亂）的病原體。根據羅伯特·科赫的理論，從患者所得的樣本中分離出細菌，從而培養出純化菌種群落的技術，已被確認為鑑定傳染病的病原體的標準技術。

除了分離及純化菌種群落之外，估算細菌含量也是醫學、食品和環境微生物學的一項基本技術。塗布平板及傾倒平板計數法，都是利用固體培養基發展出數算細菌含量的方法。這兩種數算法都是以培養物中菌落形成單位（Colony-forming unit，簡稱 CFU）的含量，來表達經常用於其他較複雜的微生物測試之中，例如用於確定食品中的細菌含量，以及比較抗微生物劑對抑制不同菌種生長的功效等。

在本實驗的第（1）部分，你將會學習如何運用平板劃線法去分離和純化菌種群落。在本實驗的第（2）部分，你將會學習以適當稀釋度的培養物，以及使用兩種平板菌落計數法去測定一種益生菌飲品中的細菌含量。

II. 關於實驗設計的導引問題

圖 1 顯示三個瓊脂平板上所培養的不同菌種形態。

1. 哪個（哪些）瓊脂平板上能找到純化的細菌群落？
2. 哪個（哪些）瓊脂平板提供可靠的菌落含量？

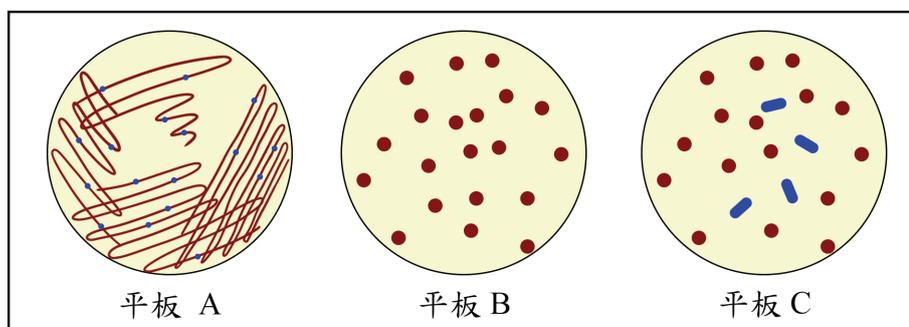


圖 1 三個瓊脂平板上細菌生長形態的示意圖；瓊脂平板上的圓點、線狀和棒狀圖案代表細菌群落。

3. 如果一小點的測試溶液已令瓊脂平板上長出太多的菌落，讓我們難以數算，試建議一個可估算測試溶液中的細菌含量的方法。

III. 實驗目標

1. 分離和純化單一菌落；
2. 測定樣本的細菌含量；以及
3. 找出適用於菌落的數算方法，以便計算細菌含量的稀釋因子。

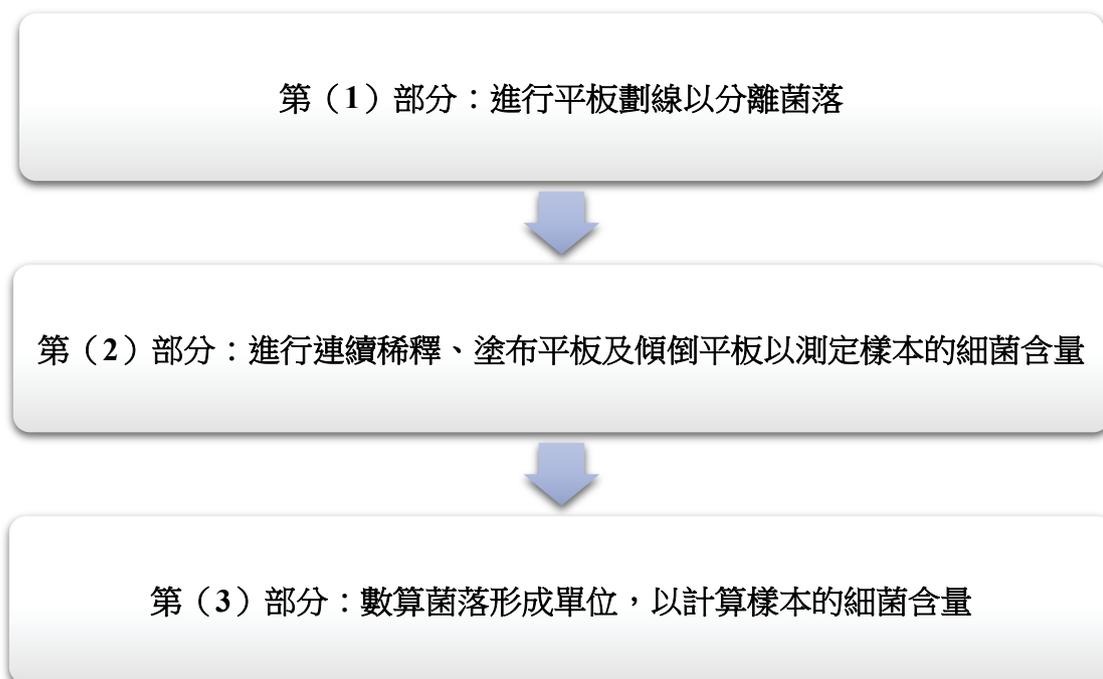
IV. 預期學習成果

完成這項學習活動後，學生應能：

1. 使用無菌技術，並遵循安全程序去接種、培養及處置微生物；
2. 進行平板劃線、塗布平板及傾倒平板；
3. 概述連續稀釋溶液及計算細菌含量的技術；以及
4. 運用菌落形成單位（CFU）及適當的公式去計算樣本的細菌含量。

V. 實驗活動

A. 概述



B. 實驗第(1)部分：進行平板劃線以分離菌落

a) 設備和材料 (每組)

設備

- 本生燈 × 1
- 打火器 × 1

材料

- 接種環 × 1 (每位學生)
- PCA (Plate Count Agar) 平板 × 1 (每位學生)
- 益生菌飲品 (A 管; 1 ml) × 1 (每位學生)

- 標記筆 × 1
- 噴壺 (盛有 70% 乙醇) × 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

b) 安全措施

- 穿着實驗袍。
- 束起長髮。
- 實驗期間佩戴手套。
- 實驗前後洗手，以去除所有污染。
- 確保乙醇遠離火源。
- 在靠近任何火焰之前，請確保雙手或手套上的乙醇已完全揮發。
- 實驗結束後，妥善處理或消毒所有材料。

c) 實驗步驟

1. 以 70 % 乙醇* 消毒實驗檯面和戴着手套的手。



***注意危險：遠離火源！
在乙醇未完全揮發之前，
不要點燃火焰！**

2. 在瓊脂平板（即 PCA 平板）底部寫上「線」、實驗日期、班別及學號（圖 2）。



圖 2

3. 點燃本生燈。
4. 將接種環燒至通紅（圖 3），然後讓其冷卻#。



#必須將金屬接種環燒至通紅，去除之前的所有細菌殘留，以防止當前樣本被污染。

讓接種環充分冷卻也是很重要的，因為冷卻不足會殺死接種的細菌。如果使用一次性的無菌塑料接種環，則無需用火燒，但必須每次更換。



圖 3

5. 以無菌技術*用接種環蘸 A 管的益生菌飲品。

*註解：有關無菌技術的詳細內容，請參閱附錄 1 步驟 3-4。



圖 4

6. 把瓊脂平板蓋打開至約 45° (圖 5)^，將接種環放到瓊脂平板上。

^注意：這做法可盡量減少瓊脂暴露於大氣中。

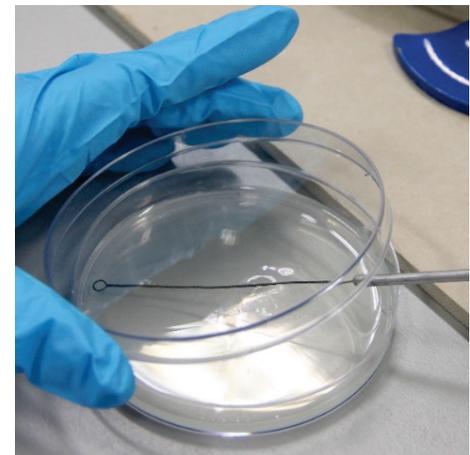


圖 5

7. 如圖 6a 所示，在瓊脂平板上以鋸齒形條紋劃線*，把細菌接種到第一區域 (即圖中 Ⓐ 部分) 上。

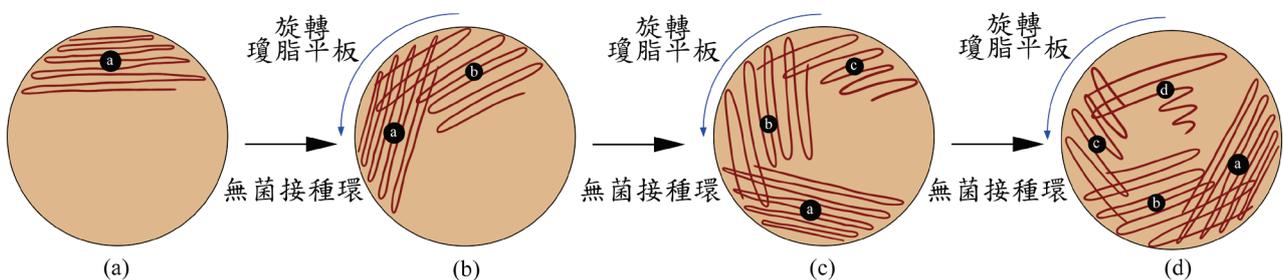


圖 6 以平板劃線法分離菌種群落。
圖中棕色線為應有的劃線軌跡方向。

8. 蓋上蓋子。
9. 把瓊脂平板旋轉 90°。
10. 將接種環燒紅，然後讓其冷卻。
11. 如圖 6b 所示，交疊接種前一區的樣本 2-3 次，並以鋸齒形條紋劃線至下一區（即圖中 ⑥ 部分）。
12. 如圖 6c 及 6d 所示，重複步驟 8-11，以完成第三（即圖中 ③ 部分）及第四區（即圖中 ④ 部分）的接種*。

*注意：通過平板劃線分離單個菌落的原理是從一個區域中收集一小部分細菌，並將其接種到下一個區域中，從而降低當中的細菌密度，並可以將在隨後區域的細菌分為單個菌落。在每輪劃線前，先將接種環燒紅，以防止把過量細菌從先前的區域帶到下一個區域。

有些經驗豐富的實驗室技術員或微生物學家會使用接種環不同的側面來劃線，而無需每次轉換區域時都將接種環燒紅；然而，我們建議學生（作為初學者）在每次轉換區域時，先將接種環燒紅，才把細菌接種到下一個區域。

13. 蓋上蓋子，以火焰消毒接種環，然後讓其冷卻。
14. 關掉本生燈。
15. 將瓊脂平板倒置，置於室溫#環境下或放置在 25-30°C 的培養箱中，培養 3-4 天。



#注意：室溫可因不同的處所環境而有所差異；因此，所需要的培養時間也可能會有所不同。

16. 取出瓊脂平板，用石蠟封口膜把邊緣包好，存放於 4°C，直至實驗課三。

C. 實驗第(2)部分：進行連續稀釋、塗布平板及傾倒平板，以測定樣本的細菌含量

a) 設備和材料 (每組)

設備

- 本生燈 × 1
- 打火器 × 1
- 微量移液器 (P5000, P1000, P200 及 P20) 和無菌移液器吸頭

材料

- 2.0 ml 微量離心管 × 3
- 玻璃塗抹棒 × 1
- PCA 平板 × 9
- 熔融的 PCA 溶液 (120 ml) × 1
- 無菌培養皿 × 9
- 益生菌飲品 (A 管; 1 ml) × 1
- 磷酸鹽緩衝液 (PBS, 5 ml) × 1
- 250 ml 燒杯 (盛有 70% 乙醇) × 1
- 20 ml 量筒 × 1

- 標記筆 × 1
- 噴壺 (盛有 70% 乙醇) × 1
- 紙巾 × 1 盒
- 生物危害品丟棄袋 × 1
- 廢棄物貯存容器 (盛有 10% 氫漂白劑) × 1

b) 安全措施

- 穿着實驗袍。
- 束起長髮。
- 實驗期間佩戴手套。
- 實驗前後洗手，以去除所有污染。
- 確保乙醇遠離火源。
- 在靠近任何火焰之前，請確保雙手或手套上的乙醇已完全揮發。
- 實驗結束後，妥善處理或消毒所有材料。

c) 實驗步驟

稀釋細菌樣本

1. 以70% 乙醇* 消毒實驗檯面和戴着手套的手。



*注意危險：遠離火源！
在乙醇未完全揮發之前，
不要點燃火焰！

2. 標記3支 2.0 ml 微型離心管為「B」、「C」和「D」。
3. 點燃本生燈。
4. 用 P1000 微量移液器，分別在 B、C、和 D 的微型離心管內加入 1485 μl [#] PBS（見圖 7）。

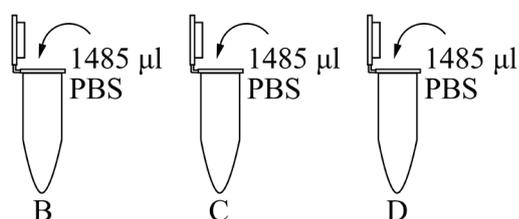


圖 7

[#]註解：P1000 微量移液器的最大容量為 1000 μl 或 1 ml。
如果需要轉移 1485 μl 的容量，就需要吸取 2 次，每次 742.5 μl 。

5. 用 P20 微量移液器，於 B 管加入 15 μl A 管溶液。此時，A 管溶液即被稀釋了 100 倍（圖 8）。
6. 關上管蓋，將 B 管上下倒置3次，以混勻所有加入的液體。

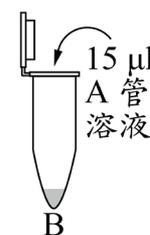


圖 8

7. 用 P20 微量移液器，於 C 管加入 15 μl B 管溶液，此時，B 管溶液即被稀釋了 100 倍（圖 9）。
8. 關上管蓋，將 C 管上下倒置3次，以混勻所有加入的液體。

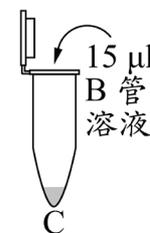


圖 9

9. 用 P20 微量移液器，於 D 管加入 15 μ l C 管溶液，此時，C 管溶液即被稀釋了100倍（圖 10）。

10. 關上管蓋，將 D 管上下倒置3次，以混勻所有加入的液體。

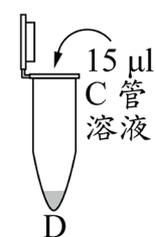


圖 10

請完成下表。

表 1

	A 管	B 管	C 管	D 管
連續稀釋*倍數	0	A 管的 100 倍稀釋	B 管的 100 倍稀釋	C 管的 100 倍稀釋
益生菌飲品的稀釋倍數	0			

*注意：連續稀釋是指將測試溶液逐步稀釋，而在每次稀釋中，測試樣本及溶劑的比例都相同，所以可產生呈幾何級數的稀釋濃度。

進行塗布平板

11. 取 9 塊 PCA 平板，在所有平板的底部清楚寫上「布」、實驗日期、班別和組別。

12. 取其中3塊 PCA 平板，在板底標記「1:100」；跟着另取3塊標記為「1:10,000」，餘下的3塊則標記為「1:1,000,000」（圖 11）。

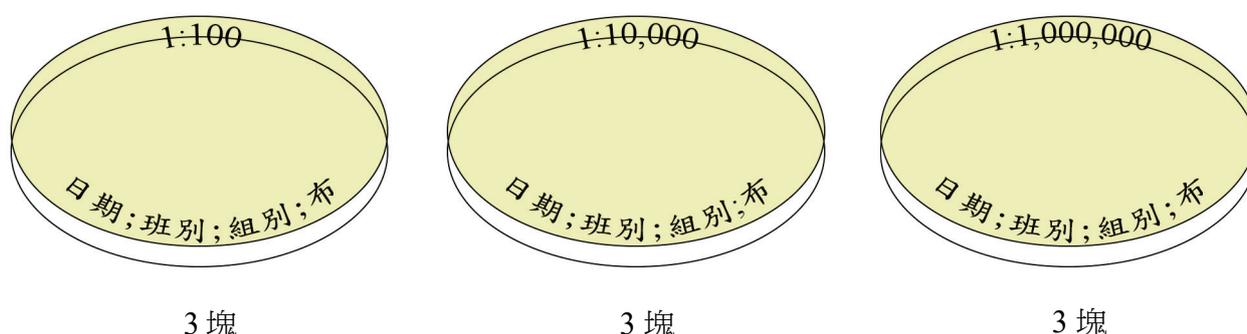


圖 11

13. 標記完畢，把瓊脂平板翻轉，蓋子朝上。

14. 以手指輕拂 B 管（圖 12）。

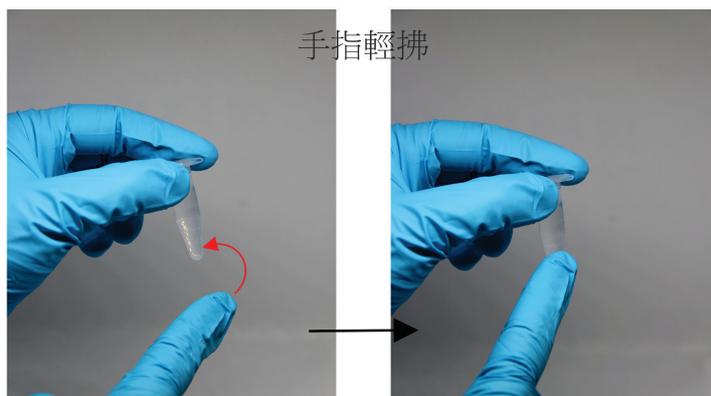


圖 12

15. 用 P200 微量移液器，以無菌技術*把 0.1 ml B 管的溶液轉移到其中 1 個標示「1:100」的 PCA 平板上（圖 13）。

*註解：有關無菌技術的詳細內容，請參閱附錄 1 步驟 3-4。

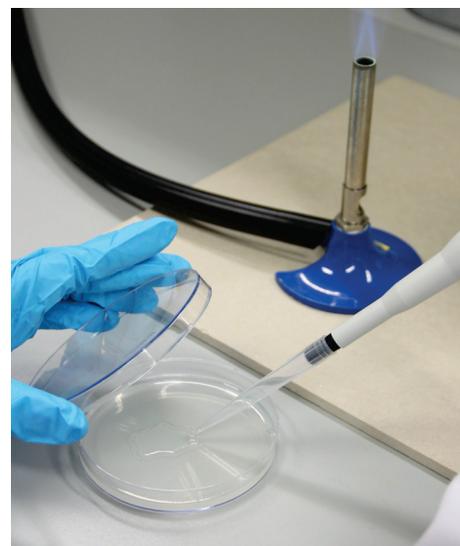


圖 13

16. 將玻璃塗抹棒浸入盛有 70% 乙醇的燒杯中，將塗抹棒取出並在本生燈的火焰上掃過*，重複幾次，然後讓其冷卻（圖 14）。

***注意危險：請勿把熱的塗抹棒放入乙醇中，因為乙醇可能因而着火。一旦乙醇着火，用一塊防火板（尺寸需大於燒杯）覆蓋燒杯，以斷絕氧氣供應，從而弄熄火源。**



圖 14

17. 用消毒過的塗抹棒把移液均勻地塗抹在整塊瓊脂平板上，塗抹的同時旋轉瓊脂平板可幫助均勻塗抹（圖 15）。

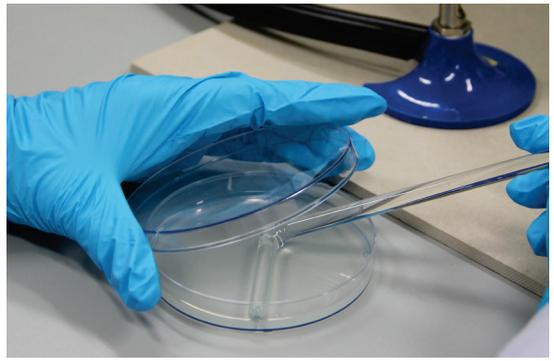


圖 15

18. 重複步驟 14-17，以同樣方法處理其餘 2 塊標示「1:100」的瓊脂平板。
19. 重複步驟 14-17，將 C 管溶液塗抹在標示「1:10,000」的瓊脂平板上，共 3 塊。
20. 重複步驟 14-17，將 D 管溶液塗抹在標示「1:1,000,000」的瓊脂平板上，共 3 塊。

進行傾倒平板

21. 取 9 個無菌培養皿，在所有培養皿的底部清楚寫上「倒」、實驗日期、班別和組別。
22. 取其中 3 個，在皿底標記「1:100」，跟着另外 3 個標記為「1:10,000」，餘下 3 個則標記為「1:1,000,000」（圖 16）。

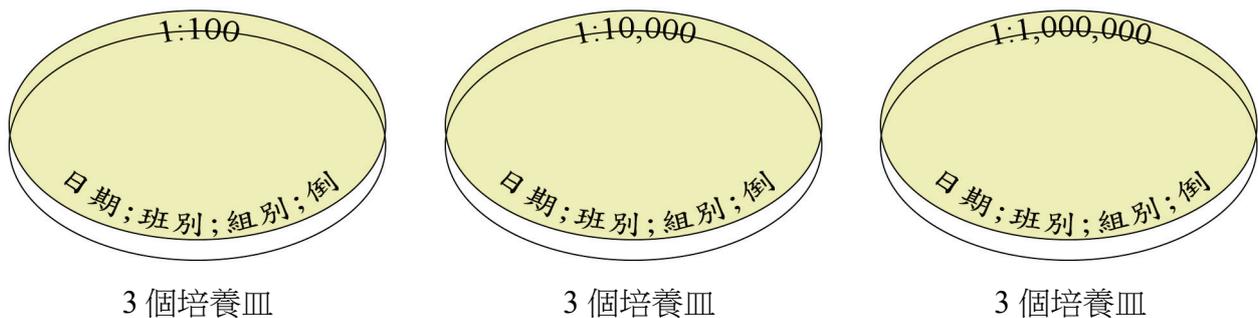


圖 16

23. 標記完畢，把培養皿翻轉，蓋子朝上。

24. 以手指輕拂 B 管，用 P1000 微量移液器，以無菌技術* 把 1 ml B 管的溶液轉移到其中 1 個標示「1:100」的無菌培養皿中（圖 17）。

*註解：有關無菌技術的詳細內容，請參閱附錄 1 步驟 3–4。

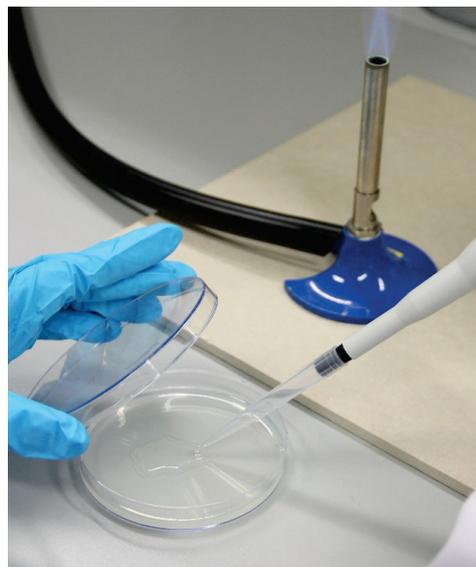


圖 17

25. 用 20 ml 量筒把 11 ml 熔融的 PCA 溶液轉移到培養皿中，把培養皿輕輕旋轉以混合溶液#，然後讓其冷卻及凝固（圖 18）。

#注意：建議輕柔地旋轉，以免有氣泡於瓊脂中形成。

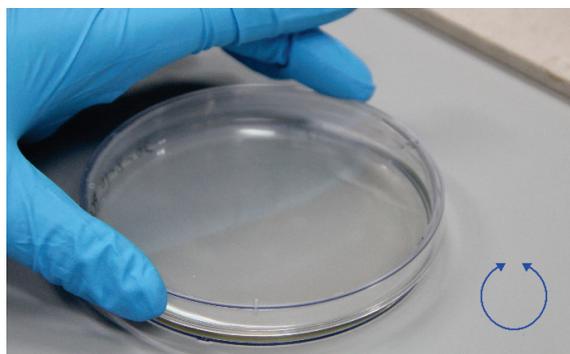


圖 18

26. 重複步驟 24–25，以同樣方法處理其餘 2 個標示「1:100」的培養皿。
27. 以手指輕拂 C 管，以無菌技術把 1 ml C 管溶液轉移到其中 1 個標示「1:10,000」的無菌培養皿中。
28. 把 11 ml 熔融的 PCA 溶液加入培養皿中，把培養皿輕輕旋轉以混合溶液，然後讓其冷卻及固化。
29. 重複步驟 27–28，以同樣方法處理其餘 2 個標示「1:10,000」的培養皿。
30. 以手指輕拂 D 管，以無菌技術把 1 ml D 管溶液轉移到其中 1 個標示「1:1,000,000」的無菌培養皿中。
31. 把 11 ml 熔融的 PCA 溶液加入培養皿中，把培養皿輕輕旋轉以混合溶液，然後讓其冷卻及固化。
32. 重複步驟 30–31，以同樣方法處理其餘 2 個標示「1:1,000,000」的培養皿。
33. 關掉本生燈。
34. 將使用過的離心管和吸頭丟棄在指定盛有 10% 氯漂白劑的廢棄物貯存容器內（無需高壓滅菌處理），或放置於生物危害品丟棄袋內，以便容進行高壓滅菌處理。

c) 實驗步驟

1. 培養後，數算所有瓊脂平板上菌落形成單位 colony-forming unit* (CFU) 的含量，如果平板上的菌落含量高於 250 CFU，標籤為 TNTC (Too Numerous To Count；數不清)。

*注意：菌落含量在 25 到 250 之間才可用於數算。
用「菌落形成單位 (CFU)」代替「菌落」是為了反映一個實際情況，因為在瓊脂平板上看到的單個菌落不一定是由單一細菌細胞形成的，可能是由附近的幾個細菌細胞結合而形成的。
如果使用「菌落」去表示細菌含量時，這樣計算出來的細菌總含量可能略低於實際的細菌總含量。

2. 使用以下公式來計算不同稀釋度的樣本中每毫升的CFU含量。

$$CFU/ml = \left[\frac{(\text{平板 1 的 CFU} + \text{平板 2 的 CFU} + \text{平板 3 的 CFU})}{3} \right] \times \text{稀釋倍數}$$

3. 觀察和分析後，將所有不需要的 PCA 平板丟棄在指定盛有 10% 氯漂白劑的廢棄物貯存容器內（無需高壓滅菌處理），或放置於生物危害品丟棄袋內，以便容後進行高壓滅菌處理。

VI. 結果

1. 貼上實驗第 (1) 部分瓊脂平板的照片或以繪圖記錄，並圈出單一菌落。



2. 實驗第(2)部分的數據表 — 塗布平板計算法

稀釋 倍數	1:100			1:10,000			1:1,000,000		
	平板 1	平板 2	平板 3	平板 1	平板 2	平板 3	平板 1	平板 2	平板 3
CFU									
平均值									
CFU/ml									

3. 實驗第(2)部分的數據表 — 傾倒平板計算法

稀釋 倍數	1:100			1:10,000			1:1,000,000		
	平板 1	平板 2	平板 3	平板 1	平板 2	平板 3	平板 1	平板 2	平板 3
CFU									
平均值									
CFU/ml									

4. (a) 製造商聲稱一瓶益生菌飲品含有的細菌總含量是多少？

(b) 根據以上數據，試估算實驗中使用的益生菌飲品瓶中細菌的總含量。

i. 通過塗布平板計算

ii. 通過傾倒平板計算

(c) 實驗估算的細菌總量與製造商在其產品說明中聲稱的含量相稱嗎？

VII. 討論

1. 平板劃線法如何幫助分離瓊脂平板上的菌種群落至單一菌落？

2. 哪個稀釋度的益生菌飲品最適合用來數算飲品的細菌含量？

3. 為什麼需要三個平板來計數算細菌含量？
