

實驗活動（七）
培養微生物和估算微生物的含量
（教師版本）

I. 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。

II. 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。

III. 教學筆記：

1. 與學生一起探討「背景」部分，或讓學生閱讀這部分及「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：

| 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 | | | |
| 1 | 平板劃線 | 30 分鐘 | |
| 2 | 培養微生物 | | 3-4 天 |
| 實驗課二：實驗第(2)部分 | | | |
| 1 | 連續稀釋益生菌飲品 | 20 分鐘 | |
| 2 | 塗布平板 | 30 分鐘 | |
| 3 | 傾倒平板 | 30 分鐘 | |
| 4 | 培養微生物 | | 3-4 天 |
| 實驗課三：實驗第(3)部分 | | | |
| 1 | 數算 CFU 和計算細菌含量 | 30 分鐘 | |
| 總實驗課時 | | 實驗課一：30 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：進行平板劃線以分離菌落

a) 設備 (每組)

- 本生燈 × 1
- 打火器 × 1

b) 材料 (每組)

- 接種環 × 1 (每位學生)
- PCA 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

c) 預備工作

製備 PCA 平板及等分益生菌飲品（由教師或實驗室技術員完成）

1. 實驗課前一天，根據製造商的說明，將 PCA 粉溶解於蒸餾水中，對 PCA 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 PCA 平板包裹後，放於 4°C 保存，直至使用；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 PCA 平板。為每位學生製備 1 塊 PCA 平板。

[提示：瓊脂通常為粉末狀，須由實驗室技術員處理。根據製造商的說明，以蒸餾水溶解瓊脂，煮沸至完全溶解。煮沸後，將其冷卻至約 50°C，然後瓊脂溶液倒入培養皿中（每盤約 15–20 ml），讓其於室溫下固化。把瓊脂平板倒置，存放於拉鍊袋中（或以膠帶密封瓊脂平板），放 4°C 保存。生物科技公司也會售賣即用式的瓊脂平板。]

[提示：如果將瓊脂平板保存在 4°C 的環境，培養皿的蓋內可能會凝結出一些水點。在使用這些瓊脂平板之前，建議將培養皿倒置，將蓋子半開，放於乾淨的 37°C 恆溫箱中 1 小時，以除去凝結的水點。]

2. 本實驗可使用市面上有售的益生菌飲品（如益力多和 Active V）。實驗前，準備新鮮的益生菌飲品，分成 1 ml 等分倒入微量離心管中，標記為 A 管，放 4°C 保存，直至使用。要確保每位學生均獲分配 1 支。請注意，含有一種以上細菌的益生菌飲品，可能會出現不同形狀或顏色的菌落。

d) 消毒和棄置

實驗後，應當把一些設備及需要棄掉的材料（固體或液體）以 121°C、15 psi 壓力下的壓力蒸汽（高壓滅菌器）消毒至少 30 分鐘，或浸入 10% 的氯漂白劑中至少 2 小時。

B. 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（每組）

- 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

b) 材料（每組）

- 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

c) 預備工作

製備 PCA 平板及等分熔融的 PCA 溶液、磷酸鹽緩衝液（PBS）及益生菌飲品（由教師或實驗室技術員完成）

1. 實驗課前一天，根據製造商的說明，用蒸餾水將 PCA 粉溶解，對 PCA 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 PCA 平板包裹後，放於 4°C 保存，直至使用。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 PCA 平板。為每組學生製備 9 塊 PCA 平板。
2. 實驗課前一天，根據製造商的說明，用蒸餾水將 PCA 粉溶解，對 PCA 溶液進行高壓滅菌，然後分成 120 ml 等分加入無菌瓶中。請為每組學生準備 1 瓶。使用前，將 PCA 溶液放在培養箱或烤箱中保溫。
3. 按照製造商的說明，用蒸餾水將 10X PBS 粉溶解，然後將 10X 溶液以蒸餾水稀釋至 1X，並分成 5 ml 等分加入離心管中。請為每組學生準備 1 支。

VI. 「關於實驗設計的導引問題」和表 1 的建議答案

1. 哪個（哪些）瓊脂平板上能找到純化的細菌群落？

平板 B

2. 哪個（哪些）瓊脂平板提供可靠的菌落含量？

平板 B 和平板 C

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。

我們可以先對測試溶液進行連續稀釋，然後通過塗布平板/傾倒平板等技術在瓊脂平板上培養這些細菌稀釋液。培養後，我們可以選擇具有菌落在可數範圍內（即 25-250 個菌落）的平板來作計算，並使用這些數字來計算測試溶液的細菌含量。

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 | 100 | 100×100 $= 10,000$ | $100 \times 100 \times 100$ $= 1,000,000$ |

VII. 結果

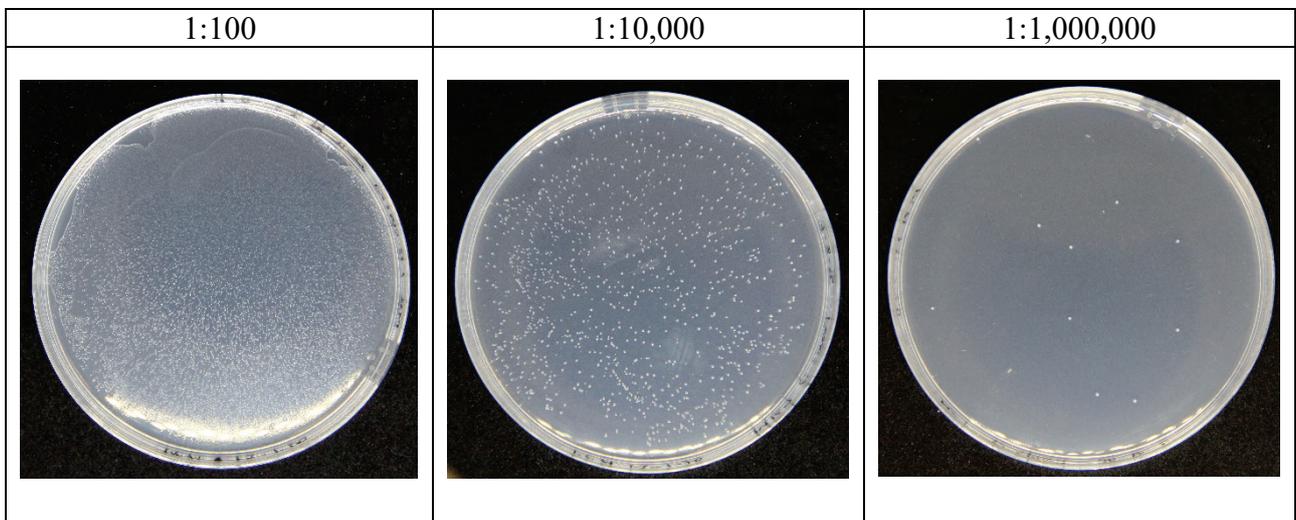
1. 貼上實驗第（1）部分瓊脂平板的照片或以繪圖記錄，並圈出單一菌落。



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 | 數不 清 | 數不 清 | 數不 清 | 數不 清 | 數不 清 | 數不 清 | 9 | 10 | 11 |
| 平均值 | -- | | | -- | | | 10 | | |
| CFU/ml | -- | | | -- | | | $10 \times 1,000,000 / 0.1$ $= 1 \times 10^8$ | | |

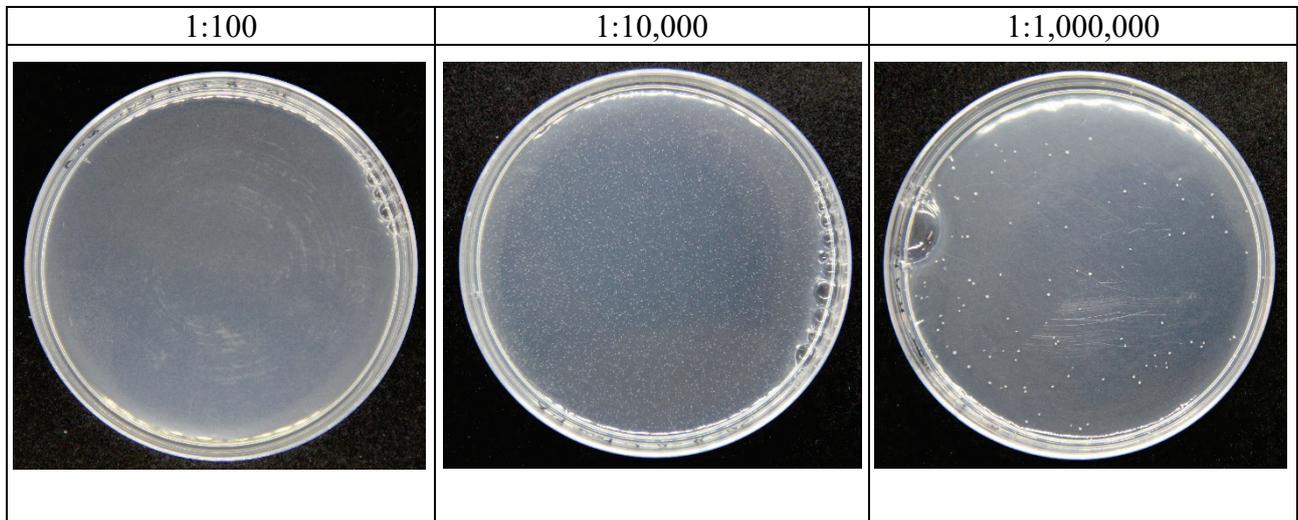
塗布平板的結果（僅供參考）



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 | 數不 清 | 數不 清 | 數不 清 | 數不 清 | 數不 清 | 數不 清 | 102 | 98 | 100 |
| 平均值 | -- | | | -- | | | 100 | | |
| CFU/ml | -- | | | -- | | | $100 \times 1,000,000$ $= 1 \times 10^8$ | | |

傾倒平板的結果 (僅供參考)



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？

製造商聲稱 1×10^{10} CFU (即一百億)

(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

每毫升細菌量： 1×10^8 CFU/ml

益生菌飲品容量： 100 ml

*益生菌飲品瓶中細菌的總量 = 每毫升細菌量 \times 益生菌飲品容量
 $= 1 \times 10^8$ CFU/ml \times 100 ml $= 1 \times 10^{10}$ CFU*

ii. 通過傾倒平板計算

每毫升細菌量： 1×10^8 CFU/ml

益生菌飲品容量： 100 ml

*益生菌飲品瓶中細菌的總量 = 每毫升細菌量 \times 益生菌飲品容量
 $= 1 \times 10^8$ CFU/ml \times 100 ml $= 1 \times 10^{10}$ CFU*

(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？

實驗估算的細菌總量與製造商聲稱的含量相稱。

VIII. 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？

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。

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？

CFU 在 25 到 250 之間的稀釋度，即把益生菌飲品稀釋一百萬倍的那一個。

3. 為什麼需要三個平板來數算細菌含量？

盡量減少移液誤差的影響。

[給教師的提示：統計學上，需要最少三個數據才可以計算出標準差 (SD)，而標準差是對所獲得數據離散程度的一種量度，從而可以反映實驗的精確度和數據的可靠性。如果 SD 大於平均值，則應把數據丟棄。]

IX. 參考資料

da Silva N, Taniwaki MH, Junqueira VCA, Silveira NFA, do Nascimento MS, Gomes RAR. Basic plate count techniques for enumeration of microorganisms. Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual, 2nd Edition. Second edition ed. Leiden, the Netherlands: CRC Press / Balkema; 2018. p. 25

da Silva N, Taniwaki MH, Junqueira VCA, Silveira NFA, do Nascimento MS, Gomes RAR. Aerobic plate count. Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual. Second ed. Leiden, the Netherlands: CRC Press / Balkema; 2018. p. 65.