實驗活動（八）

微生物與衞生的關係

（學生版本）

I. 背景

在日常環境中，微生物（例如細菌）可說是無處不在，實驗檯面、門柄、鍵盤、手機的屏幕都可以找到它們。微生物的體積非常細小，我們無法用肉眼看到。然而，由於這些物體的表面已被污染，就算輕輕觸摸，這些「看不見的」微生物已黏附到我們的手上。在大多數情況下，我們可以用肥皂和清水正確地洗手，去除手上的細菌。在沒有肥皂和清水時，我們則可使用酒精搓手液為雙手消毒。

在本實驗中，你將會首先依照世界衞生組織（World Health Organisation, WHO）建議的配方製作消毒搓手液；然後從四周環境和雙手表面採集微生物樣本，比較清潔前後微生物的生長情況。最後，比較不同的潔手用品及搓手液中不同成分的殺菌效果，評估這些潔手用品及搓手液成分對抑制微生物生長的有效性。

此外，你將會學習使用一種常見的染色方法 —— 革蘭氏染色（Gram staining），把所採集樣本中的細菌區分為兩組。

根據革蘭氏染色的原理，革蘭氏陽性細菌在完成整個染色過程後會呈紫色，而革蘭氏陰性細菌則呈粉紅色，這樣的區別源自於它們細胞壁裏不同的結構成分（圖 1）。在染色步驟中（表 1），因為革蘭氏陽性細菌的細胞壁存在着一層厚厚的肽聚醣，這層肽聚醣能保存較多結晶紫染色劑，因而在脫色步驟之後仍能呈現出紫色；而且即使利用粉紅色的番紅複染後，番紅也不能把紫色遮蓋。相反，由於革蘭氏陰性細菌只有一層薄薄的肽聚醣，不能有效地保存結晶紫，在脫色步驟及複染後，會被番紅染成粉紅色。

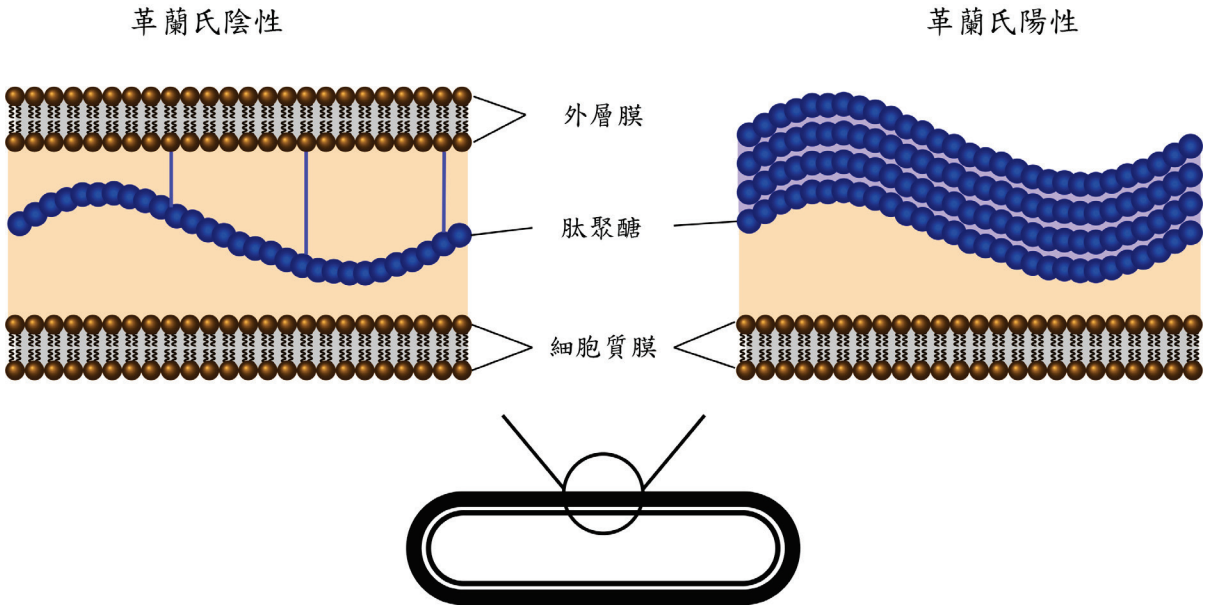
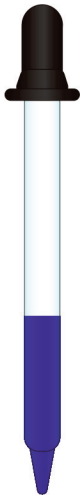
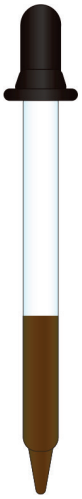
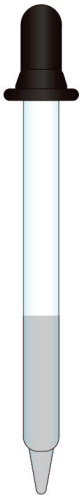
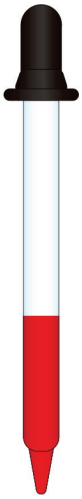


圖 1 革蘭氏陽性和陰性細菌細胞壁的結構

表 1 革蘭氏染色步驟

步驟	1 （染色）	2 （固定染料顏色）	3 （脫色）	4 （複染）
				
染色劑 / 試劑	結晶紫（紫色染色劑）	碘溶液	乙醇	番紅（紅色染色劑）
結果	全紫	全紫	革蘭氏陽性細菌：紫色 革蘭氏陰性細菌：無色	革蘭氏陽性細菌：紫色 革蘭氏陰性細菌：粉紅色

II. 關於實驗設計的導引問題

1. 你預期在四周環境中會發現哪些細菌？
2. 有什麼工具適合在四周環境中用作採集微生物樣本？
3. 用作培養微生物的培養基中應含有哪些成分？
4. 革蘭氏染色的基本原理是什麼？
5. 搜尋世衞建議的兩種製作酒精搓手液的配方。
6. 如何測試搓手液的殺菌效果？

III. 實驗目標

1. 按照世衞建議的配方製作搓手液；
2. 從四周環境和雙手表面採集及培養微生物樣本；
3. 通過革蘭氏染色技術把細菌區分為兩大類；
4. 展示不同清潔劑的殺菌作用；以及
5. 比較搓手液不同成分的殺菌效果。

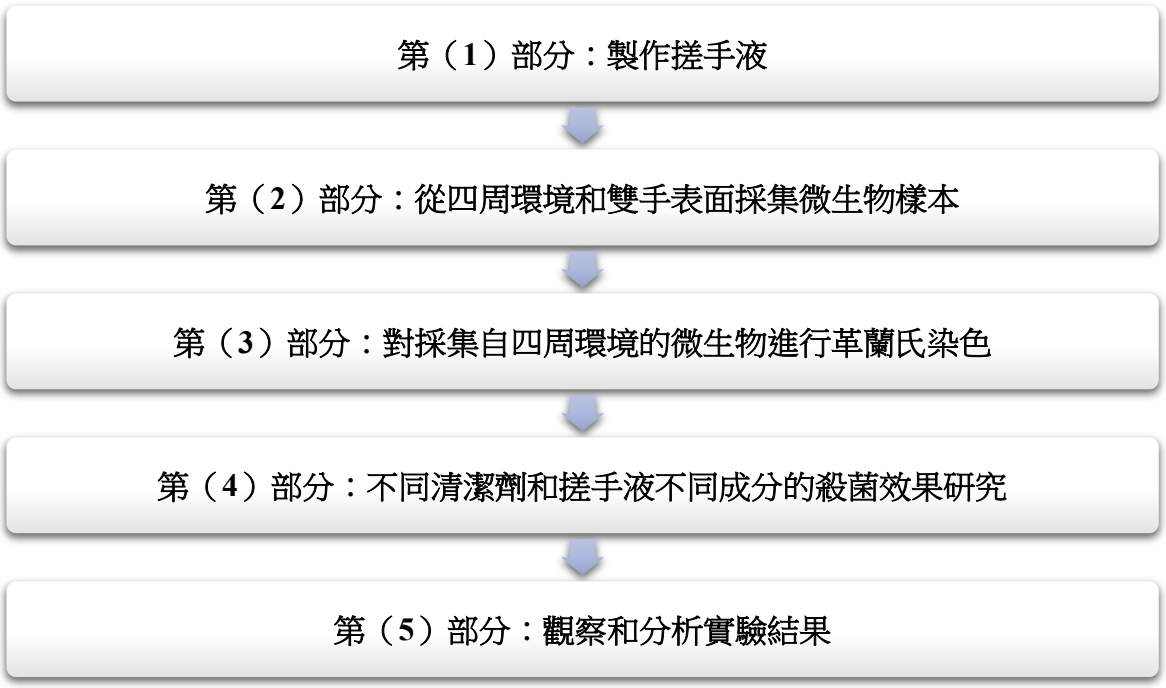
IV. 預期學習成果

完成學習活動後，學生應能：

1. 採集及培養來自四周環境的微生物；
2. 比較不同清潔劑的殺菌作用;
3. 進行革蘭氏染色；以及
4. 製作搓手液並測試其殺菌作用。

V. 實驗活動

A. 概述



B. 實驗第（1）部分： 製作搓手液

a) 設備和材料（每組）

設備

- 微量移液器（P5000, P1000 及 P200）和無菌移液器吸頭

材料

- 無菌 15 ml 離心管 × 1
- 離心管架 × 1
- 96% 乙醇（10 ml） × 1
- 3% 過氧化氫（1 ml） × 1
- 98% 甘油（0.5 ml） × 1
- 無菌蒸餾水（10 ml） × 1

- 標記筆 × 1
- 噴壺（載有 70% 乙醇） × 1
- 紙巾 × 1 盒
- 生物危害品丟棄袋 × 1
- 廢棄物貯存容器（載有 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。
- 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. 標記 15 ml 離心管為「HR」，以及寫上實驗日期及組別（圖 2）。

圖 2

3. 在「HR」離心管加入 8333 µl 96% 乙醇。

4. 在「HR」離心管再加入 417 µl 3% 過氧化氫及 145 µl 98% 甘油。

5. 最後，在「HR」離心管加入 1105 µl 無菌蒸餾水，至總容量 10 ml。

表 2：下表列出世衛建議的搓手液配方，請計算每種成分的最終濃度百分比。

	成分	所需容量	每種成分最終濃度百分比（v/v）
1	96% 乙醇	8333 µl [提示：5000 µl + 3333 µl]	%
2	3% 過氧化氫	417 µl	%
3	98%甘油	145 µl	%
4	無菌蒸餾水	1105 µl	--
	總容量	10 ml	--

6. 把離心管蓋好並輕輕搖晃混勻，然後將其放置在試管架中，直到實驗第（2）部分。

C. 實驗第（2）部分：從四周環境和雙手表面採集微生物樣本

a) 設備和材料（每組）

<u>設備</u>

- 流動裝置 × 1

<u>材料</u>

- 無菌拭子棒（棒子可易於折斷、捧頂包有棉花） × 2
- 美紋紙膠帶 × 1
- 來自第（1）部分的世衛配方搓手液 × 1
- 洗手皂 × 1
- 擦手濕紙巾 × 1 包
- 培養管（盛有 5 ml 無菌 LB 液體培養基） × 2
- 培養管架 × 1
- LB 瓊脂平板 × 2（每位組員）
- 膠帶
- 石蠟封口膜

- 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。
- 實驗後洗手，以去除所有污染。
- 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

從四周環境中採集微生物樣本

1. 在要測試的環境表面（如門柄、實驗檯表面、電梯按鈕、手機屏幕等）選擇一個採樣區域。

*注意危險：嚴禁從潛在危險源（如污水）中取樣。
嚴禁於疫症大流行期間進行環境取樣。

2. 如圖 3 所示，以美紋紙膠帶於所選採樣區域上標記兩個相等部分的邊界（如 A 區及 B 區 ），並在表 3 記錄採樣區域的面積（如 5 cm × 5 cm）。

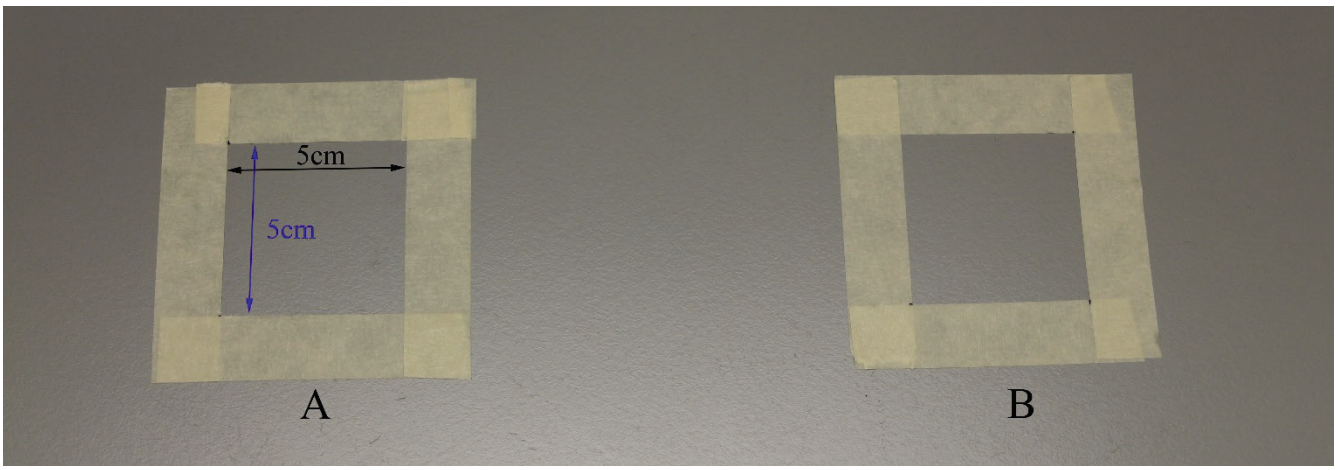


圖 3

表 3

組別	所選擇的環境表面	A 區 （没有進行清潔）	B 區 （已進行清潔）

a) 對 A 區不作任何處理，此區代表没有進行清潔的區域。

b) 用消毒劑（即 70% 乙醇）清潔 B 區，此區是已進行清潔的區域。

3. 分別標記 2 支載有 LB 液體培養基的培養管為「A」（圖 4）及「B」，並寫上實驗日期、組別。

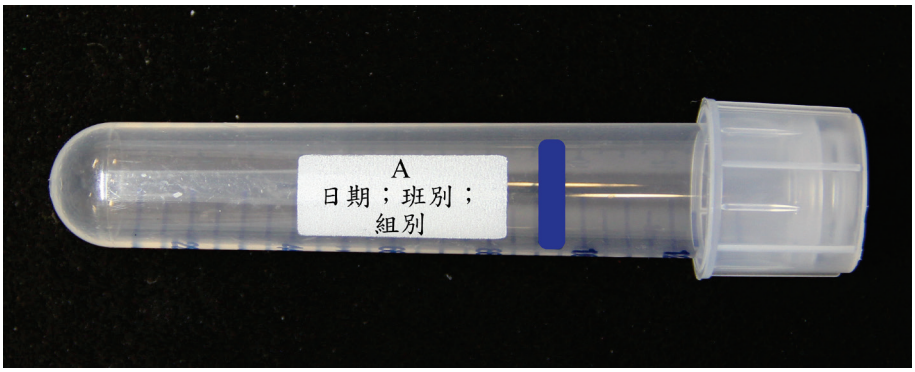


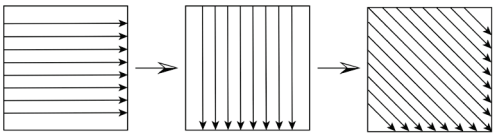
圖 4

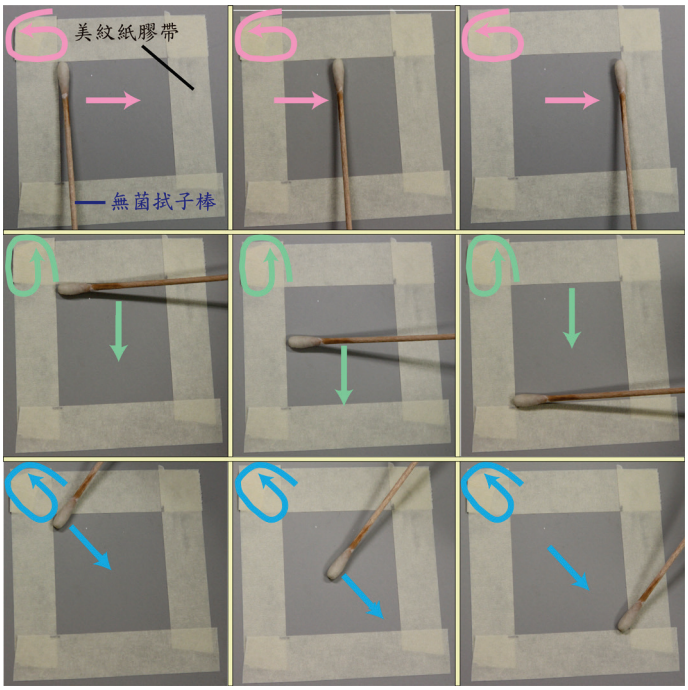
4. 從無菌包裝中取出拭子棒，將其浸入「A」管中，頂部要浸透。

5. 將拭子棒頂部按壓在管壁上，以去除多餘的液體（圖 5）。

圖 5

6. 使用拭子棒在所選的環境表面上採集微生物樣本，如圖 6a 所示，將拭子棒以三個方向擦拭 A 區；在擦拭的同時，不斷旋轉拭子棒，如圖 6b 中成圈狀的箭頭所示，以達至從所選區域上獲得最多的微生物樣本。





(a) (b)

圖 6

7. 以無菌技術將拭子棒部分木籤折斷（圖 7）讓其頂端浸於「A」管的無菌 LB 液體培養基中，然後把「A」管蓋好。

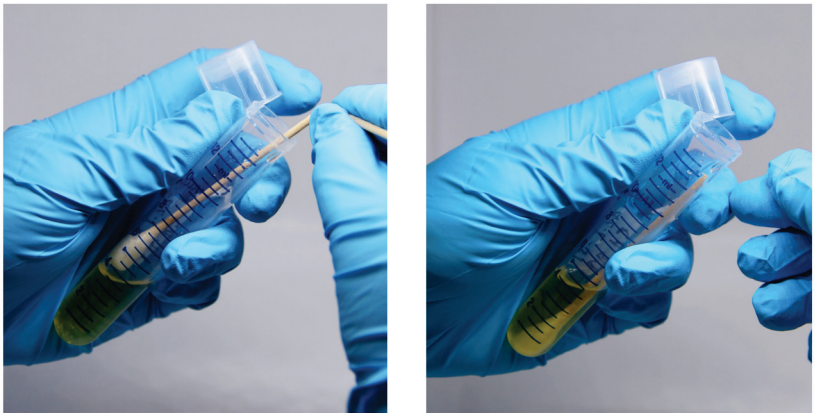


圖 7

8. 重複步驟 4–7 ，以同樣方法從 B 區採樣到「B」管。

9. 把所有培養管放於室溫*環境下或設置在 25 – 30°C 的恆溫箱中培養 1 – 2 天。

> *注意：室溫在不同的處所環境有所差異；因此，所需要的培養時間也可能會有所不同。

10. 將使用過的拭子棒丟棄在指定盛有 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。

11. 完成建議的培養時間後，比較並記錄這 2 個試管的混濁度。 將「A」管儲存在 4°C 下，直到進行實驗第（3）部分。

從雙手表面採集微生物樣本

12. 每位組員都要各自拿取兩塊 LB 瓊脂平板，分別標記為「X」和「Y」，並寫上實驗日期、班別、組別及你的姓名縮寫（圖 8）。

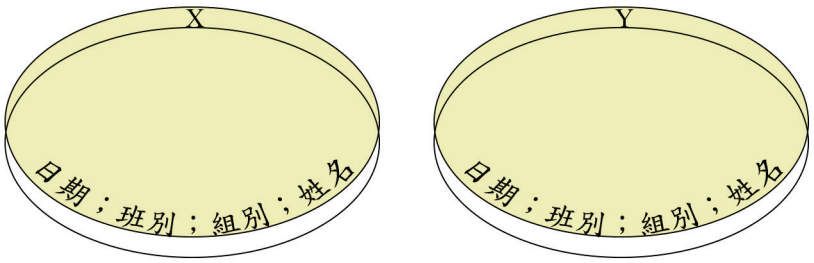


圖 8

13. 脫掉一隻手的手套（印手之前，不要洗手）。

14. 把瓊脂平板「X」的蓋打開，將手指輕按在瓊脂表面上（圖 9），然後將手移開，蓋上蓋子。

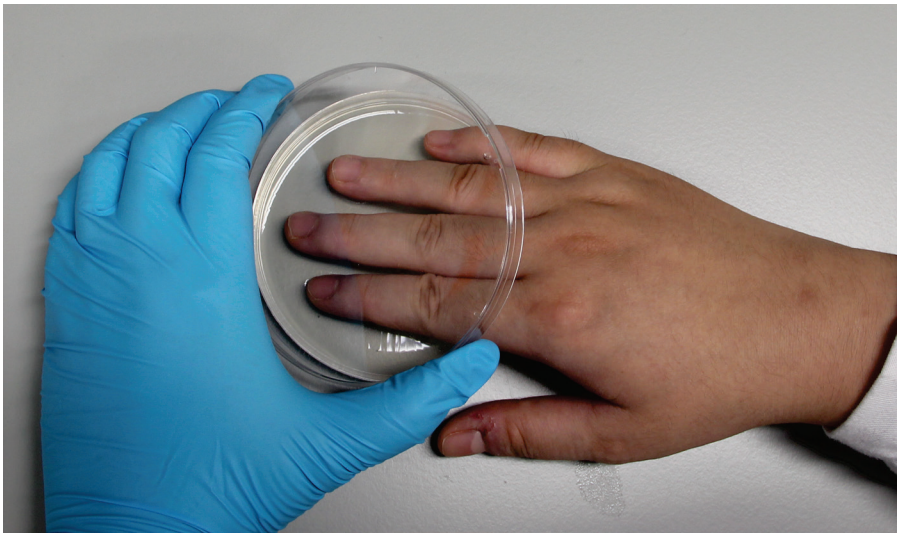


圖 9

15. 以你選擇的潔手用品徹底洗手至少 20 秒，用紙巾擦乾雙手。在表 4 記錄你和你的組員所使用的清潔劑。

表 4

組別	姓名縮寫	清潔劑（自來水、搓手液、擦手濕紙巾和肥皂等）	平板 X 的菌落含量（清潔前）	平板 Y 的菌落含量（清潔後）

16. 把瓊脂平板「Y」的蓋打開，將已清潔的手指輕按在瓊脂表面，然後將手移開，蓋上蓋子。

17. 在印手實驗之後，徹底清潔雙手，並戴上新的手套。

18. 在 LB 瓊脂平板相對的邊緣貼上膠帶，如圖 10 所示，把平板底部和蓋固定在一起。

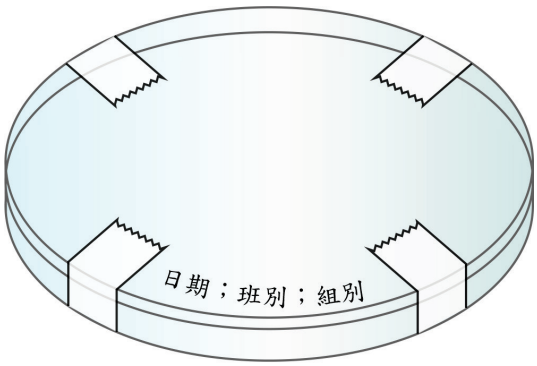


圖 10

19. 將所有瓊脂平板倒置，於室溫*環境下或設置在 25–30°C 的恆溫箱中培養 1–2 天。

> *注意：室溫在不同的處所環境有所差異；因此，所需要的培養時間也可能會有所不同。

20. 完成建議的培養時間後，用石蠟封口膜包裹平板的邊緣（圖 11）。並將其保存在 4ºC，直至下堂進行數板和分析。

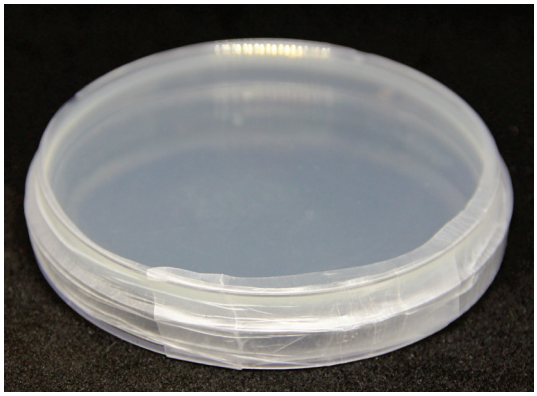


圖 11

21. 記錄 2 個瓊脂平板上的菌落形成單位（CFU）#的含量。

> #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，可以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。

22. 使用流動裝置為瓊脂平板拍照。

23. 在觀察和分析後，將不需要的瓊脂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。

D. 實驗第（3）部分： 對採集自四周環境的微生物進行革蘭氏染色

a) 設備和材料（每組）

設備

- 具有 20X 或 40X 物鏡的立體顯微鏡 × 1
- 本生燈 × 1
- 打火器 × 1
- 微量移液器（P20）和無菌移液器吸頭
- 流動裝置 × 1

材料

- 來自第（2）部分的「A」培養管 × 1
- 接種環 × 1
- 500 ml 燒杯 × 1
- 顯微鏡載玻片 × 1
- 蓋玻片 × 1
- 鑷子 × 1
- 無菌蒸餾水（1 ml） × 1
- 結晶紫溶液（1 ml） × 1
- 革蘭氏碘溶液（1 ml） × 1
- 96% 乙醇（5 ml） × 1
- 番紅溶液（1 ml） × 1
- 木製載玻片夾 × 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

b) 安全措施

- 穿着實驗袍。
- 束起長髮。
- 實驗期間佩戴手套和護目鏡。
- 實驗前後洗手，以去除所有污染。
- 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. 取回來自第部分（2）的「A」培養管。

3. 標記 1 塊載玻片為「A」並寫上班別及組別，以 70%乙醇清潔載玻片的右邊（圖 12）。

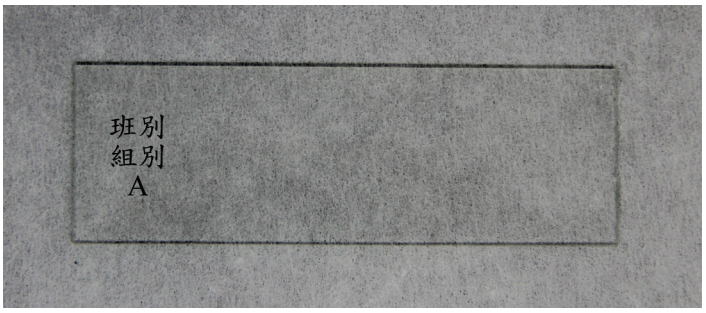


圖 12

4. 點燃本生燈。

5. 搖動「A」培養管，使用微量移液器（P20）和無菌吸頭將 20 µl 細菌培養液從「A」管轉移到載玻片「A」上（圖 13）。

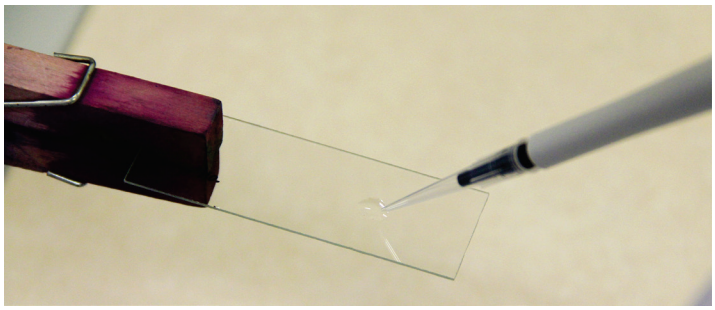


圖 13

6. 將接種環燒至通紅（圖 14），然後讓其冷
卻*。

圖 14

*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。

7. 用已滅菌的接種環將細菌樣本塗抹在載玻片上，使其形成一層薄膜，然後讓其完全風乾（圖 15）。

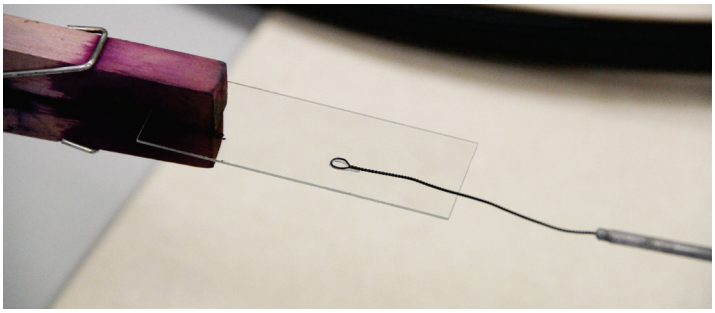


圖 15

8. 使用木製載玻片夾握住載玻片，對樣本進行熱固定#，在火焰上來回移動三至四次，直至載玻片上所有水分被蒸發（圖 16）。

#以打圈方式移動載玻片，可避免局部過熱！

9. 關掉本生燈。

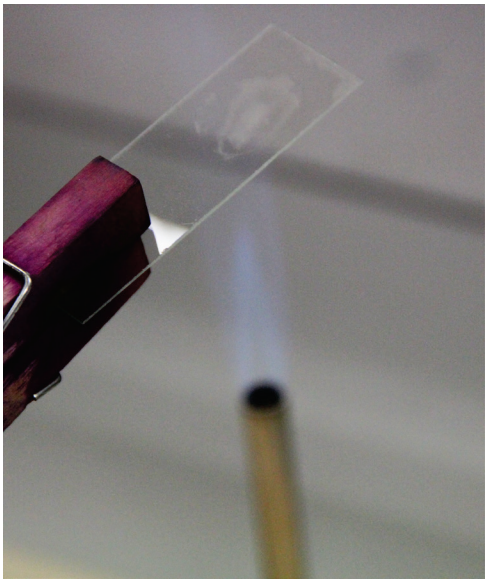


圖 16

10. 讓載玻片冷卻至室溫， 添加兩滴結晶紫溶液到樣本上（圖 17）。

11. 等待 1 分鐘。

12. 以蒸餾水沖洗載玻片，以沖洗掉結晶紫溶液。

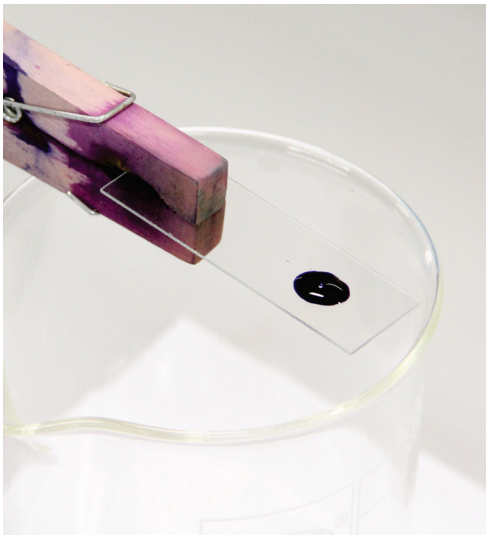


圖 17

13. 用紙巾輕輕擦拭載玻片以去除多餘的水分（圖 18）。

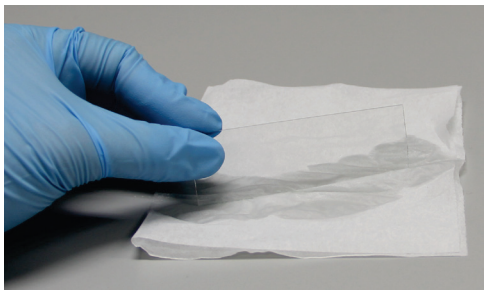


圖 18

14. 添加兩滴革蘭氏碘溶液到樣本上（圖 19）。

15. 等待 1 分鐘。

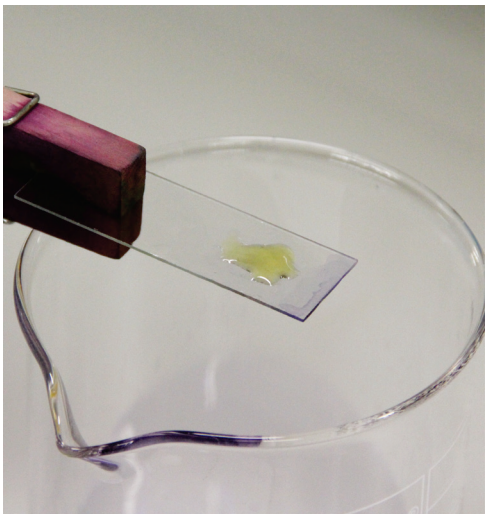


圖 19

16. 以蒸餾水沖洗載玻片，以沖洗掉革蘭氏碘溶液。

17. 把載玻片傾斜放置，將 96% 乙醇慢慢地滴加到載玻片上（圖 20）。

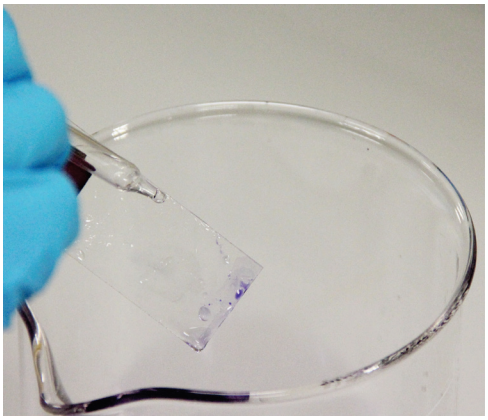


圖 20

18. 繼續把乙醇慢慢地逐滴加到載玻片上，直到所有藍紫色溶液被沖洗掉，持續 20 秒。

19. 立即以蒸餾水沖洗載玻片。

20. 用紙巾輕輕擦拭載玻片，以去除多餘的水分。

21. 添加兩滴番紅溶液到樣本上（圖 21）。

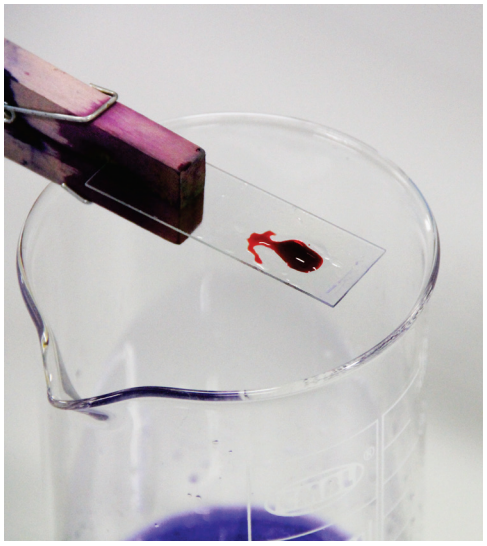


圖 21

22. 等待 30 秒。

23. 用蒸餾水沖洗載玻片，以沖洗掉番紅溶液。

24. 輕拍載玻片以去除多餘的水分。

25. 趁載玻片仍然濕潤，在其上蓋上一塊蓋玻片。否則，在載玻片上先添加一滴水，然後蓋上一塊蓋玻片（圖 22）。

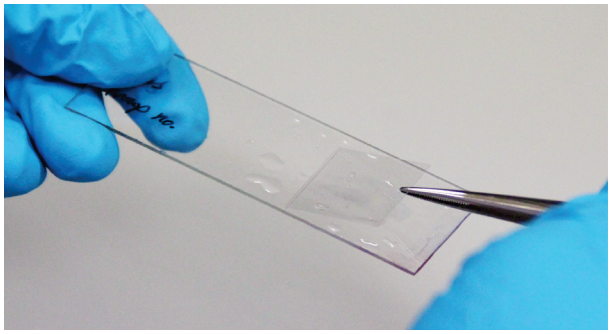


圖 22

26. 在立體顯微鏡下檢查已染色的塗片（即載玻片）。

27. 使用流動裝置為塗片拍照。

28. 在觀察和分析後，將不需要的載玻片丟棄在指定盛有 10%氯漂白劑的玻璃廢棄物貯存容器內。

E. 實驗第（4）部分： 不同清潔劑和搓手液不同成分的殺菌效果研究

a) 設備和材料（每組）

設備

- 本生燈 × 1
- 打火器 × 1

材料

- 來自第（2）部分的「A」培養管 × 1
- LB 瓊脂平板 × 6
- 無菌拭子棒（棒子可易於折斷、棒頂包有棉花） × 6
- 浸有試劑的 3 cm 濾紙片 × 6
- 鑷子 × 1
- 250 ml 燒杯（盛有 70% 乙醇） × 1
- 膠帶
- 石蠟封口膜

- 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。
- 實驗期間佩戴手套和護目鏡。
- 實驗前後洗手，以去除所有污染。
- 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. 根據表 5，標記 6 塊 LB 瓊脂平板為「96% E」、「80% E」、「H_2O_2」、「G」、「W」 和「HR」，並寫上實驗日期、你的班別及組別（圖 23）。

表 5

瓊脂平板	1	2	3	4	5	6
標示	96% E	80% E	H_2O_2	G	W	HR
縮寫解釋	96% 乙醇	80% 乙醇	過氧化氫	甘油	無菌蒸餾水	搓手液

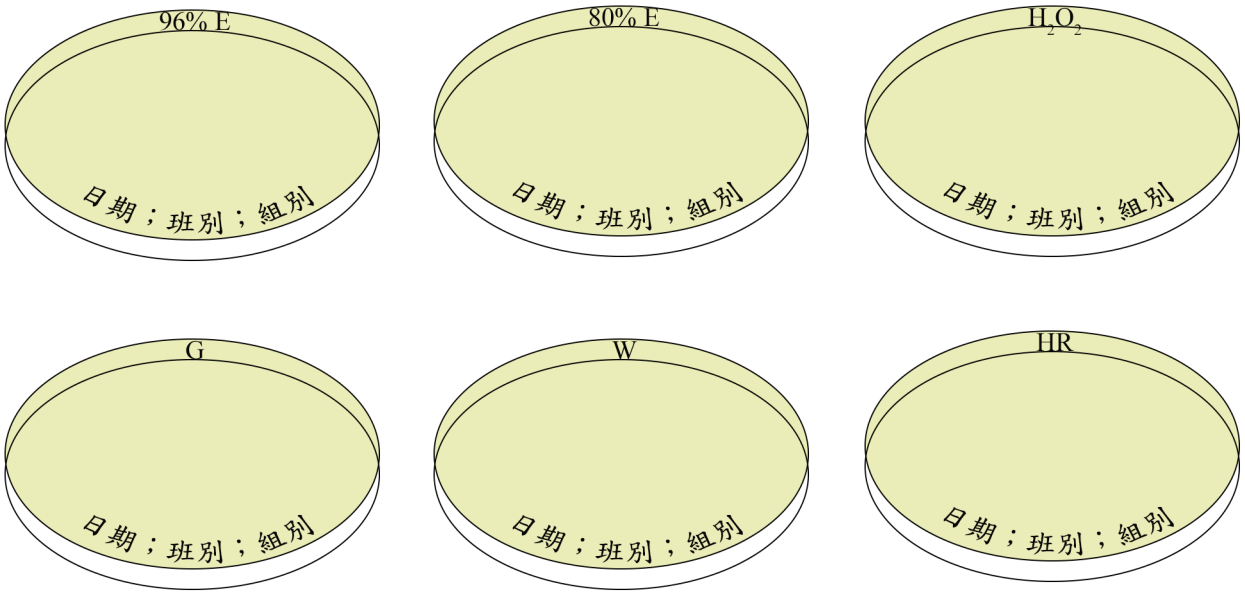


圖 23

3. 點燃本生燈。

4. 從無菌包裝中取出拭子棒。

5. 將拭子棒浸入「A」 培養管的液體培養基中，將其頂部按壓在管壁上，以去除多餘的液體（圖 24）。

圖 24

6. 把瓊脂平板的蓋打開（圖 25），在平板上用拭子棒以鋸齒形劃線（圖 26）。

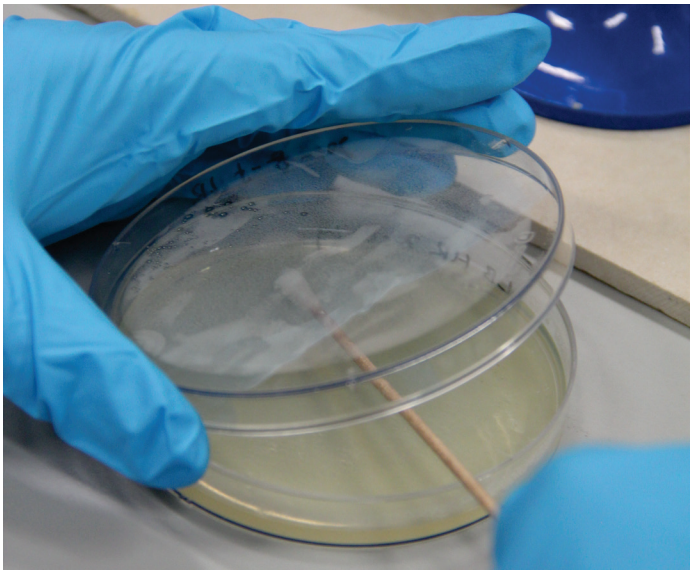


圖 25

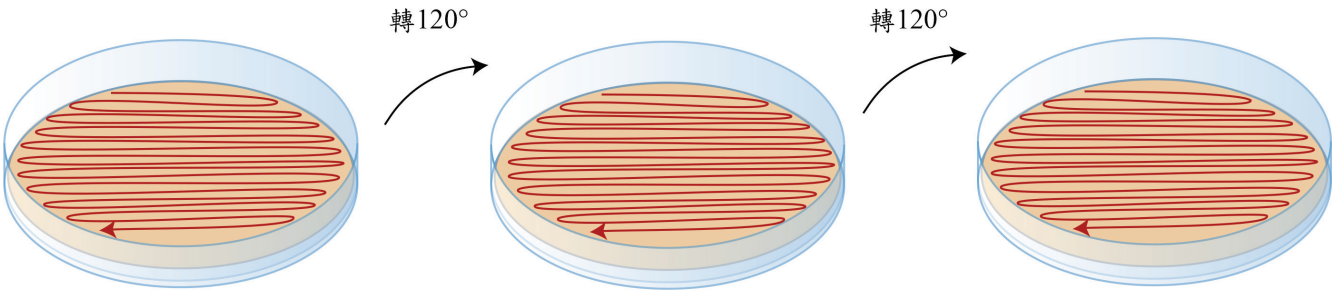


圖 26

7. 蓋上蓋子，把瓊脂平板旋轉約 120º，再根據步驟 6 以鋸齒形劃線擦拭整塊平板（圖 26）。
8. 再次重複以上的旋轉及劃線步驟。
9. 重複步驟 4–8，以同樣手法在其餘的 5 塊瓊脂平板上劃線。
10. 讓微生物培養物滲入瓊脂 5–10 分鐘。
11. 從教師或實驗室技術員領取 6 塊直徑 3 cm 的濾紙片，每塊分別以不同的溶液浸透（如表 6 所示的溶液）。

表 6

濾紙片	1	2	3	4	5	6
培養皿上的標示	96% E	80% E	H_2O_2	G	W	HR
浸有	96% 乙醇	80% 乙醇	0.125% 過氧化氫	1.45 % 甘油	無菌蒸餾水	搓手液

12. 使用以火焰消毒過的鑷子將 6 塊濾紙片逐一放入相應的 LB 瓊脂平板上的中央位置（圖 27）。

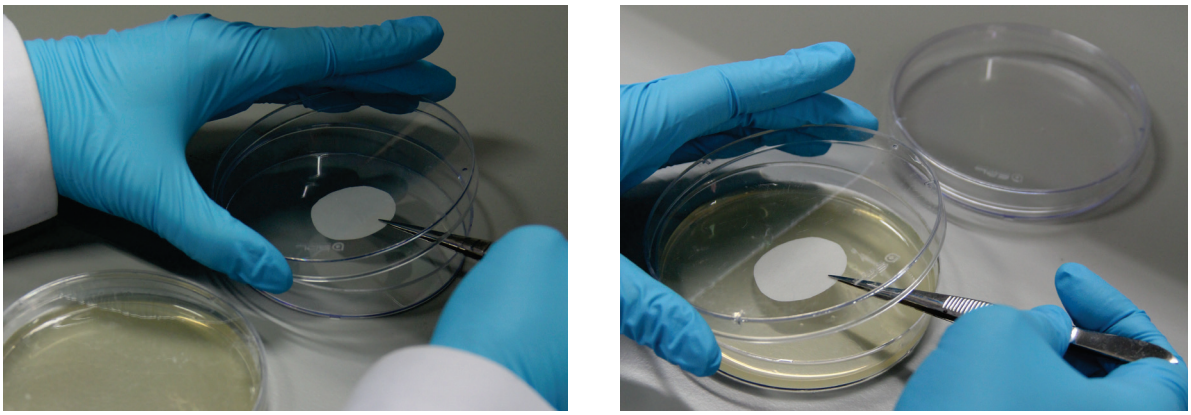


圖 27

13. 關掉本生燈。
14. 讓濾紙片在瓊脂上靜置 5–10 分鐘（圖 28）。

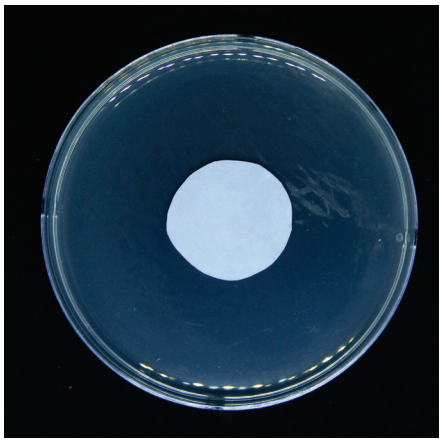


圖 28

15. 在 LB 瓊脂平板的相對的邊緣貼上膠帶，如圖 29 所示，把平板底部和蓋固定在一起。

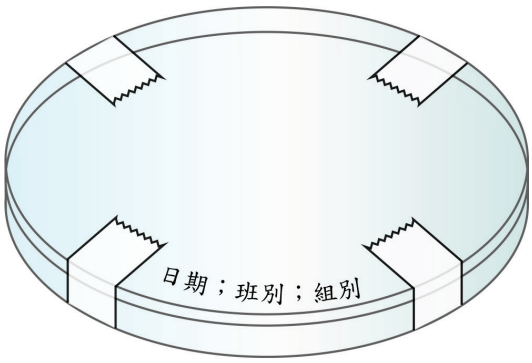


圖 29

16. 將所有瓊脂平板倒置，在室溫*環境下或設置在 25–30°C 的恆溫箱中培養 3–4 天。

> *注意：室溫在不同的處所環境有所差異；因此，所需要的培養時間也可能會有所不同。

17. 將使用過的拭子棒和培養管丟棄在指定盛有 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。

18. 完成建議的培養時間後，用石蠟封口膜包裹平板的邊緣，將瓊脂平板儲存在 4°C 下，直到進行實驗第（5）部分。

F. 實驗第（5）部分：觀察和分析實驗結果

a) 設備和材料（每組）

設備

- 流動裝置 × 1

材料

- 來自第（4）部分的 LB 瓊脂平板 × 6
- 標記筆 × 1
- 直尺 × 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。
- 實驗期間佩戴手套和護目鏡。
- 實驗前後洗手，以去除所有污染。
- 在靠近任何火焰之前，請確保雙手或手套手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. 收集你所有的 LB 瓊脂平板，觀察微生物的生長情況。

2. 使用流動裝置為所有瓊脂平板拍照。

3. 用直尺量度來自第（4）部分 LB 瓊脂平板上清晰區（即是抑制生長區）的直徑，如有（圖 30）。

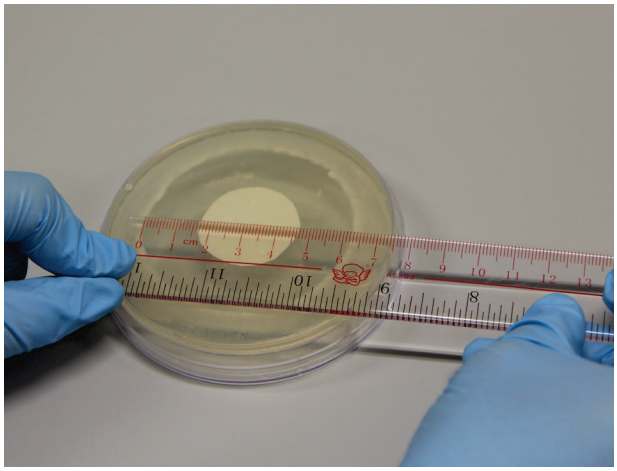


圖 30

4. 在觀察和分析後，將不需要的瓊脂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

a) 實驗的第（1）部分

在下表列出世衛建議的搓手液配方，請計算每種成分的最終濃度百分比。

	成分	所需容量	每種成分最終濃度百分比（v/v）
1	96% 乙醇	8333 µl [提示：5000 µl + 3333 µl]	%
2	3% 過氧化氫	417 µl	%
3	98%甘油	145 µl	%
4	無菌蒸餾水	1105 µl	--
	總容量	10 ml	--

b) 實驗的第（2）部分

關於從四周環境採集的微生物樣本

1. 你選擇採樣的環境表面是 _____，採樣範圍 A 區的面積是 _____ cm^2，以及採樣範圍 B 區的面積是 _____ cm^2。

2. 哪個培養管（A 或 B）的液體培養基較混濁？

   _____。

關於從雙手採集的微生物樣本

3. 在下面的空框內，貼上與 LB 瓊脂平板在培養期後相對應的照片 。

LB 瓊脂平板 X（清潔前）	LB 瓊脂平板 Y（清潔後）

4. 使用你的實驗數據填寫下表。

組別	姓名縮寫	清潔劑	瓊脂平板 X 上的 CFU 含量	瓊脂平板 Y 上的 CFU 含量

i) 哪塊瓊脂平板（瓊脂平板 「X」或瓊脂平板 「Y」）含有較多細菌？

_____。

ii) 清潔是否有助於減少細菌含量？

_____。

c) 實驗的第（3）部分

在下面的空框內，貼上載玻片 「A」在進行革蘭氏染色後的照片 。

1. 從染色的塗片 中發現什麼類別的細菌？

_____

_____

2. 從你採集的環境樣本中，哪種細菌的含量較多？

_____

_____

d) 實驗的第（4）部分

將結果與班中的所有組別進行比較，並填寫下表。

組別	清晰區（抑制生長區）的直徑／mm					
	96% 乙醇	80% 乙醇	0.125% 過氧化氫	1.45% 甘油	無菌蒸餾水	搓手液
抑制區直徑的平均值						

VII. 討論

1. 根據實驗第（2）部分的結果，比較 A 管和 B 管的渾濁度後，你認為使用 70% 乙醇消毒能有效抑制微生物生長嗎？ 簡要說明你的答案。

2. 根據實驗第（2）部分指印 LB 瓊脂平板的結果，與其他同學比較後，你建議我們日常應使用哪種（哪些）潔手用品呢？

_____

_____

3. 從微生物學書籍或互聯網上搜尋資料，試列出一些革蘭氏陽性和陰性細菌的常見例子。

革蘭氏陽性：

_____

革蘭氏陰性：

_____

4. 從微生物學書籍或互聯網上搜尋資料，試列出搓手液中不同配方成分的功能。

成分	功能
乙醇	
過氧化氫	
甘油	
蒸餾水	

5. 在實驗中所用的搓手液，主要的抗菌成分是什麼？該成分的濃度是多少？試解釋其殺菌作用。

6. 根據實驗第（4）部分的結果，80%乙醇溶液可否提供與搓手液相似的殺菌效果呢？試解釋你的答案。

7. 你認為濃度愈高的乙醇（例如 96%乙醇溶液），其殺菌效果是否愈高呢？試解釋你的答案。