

實驗活動（八）
微生物和衛生的關係
（教師版本）

I. 實驗目標

1. 按照世衛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。

II. 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。

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			
1	製作搓手液	20 分鐘	
實驗課一：實驗第(2)部分			
1	從四周環境表面採樣	20 分鐘	
2	在瓊脂平板上印手指	20 分鐘	
3	微生物培養		1-2 天
實驗課二：實驗第(3)部分			
1	革蘭氏染色及顯微觀察	40 分鐘	
實驗課二：實驗第(4)部分			
1	不同試劑濾紙片的殺菌作用	20 分鐘	
2	微生物培養		3-4 天
實驗課三：實驗第(5)部分			
1	觀察和分析	30 分鐘	
總實驗課時		實驗課一：60 分鐘 實驗課二：60 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：製作搓手液

a) 設備(每組)

- 微量移液器 (P5000, P1000 及 P200) 和無菌移液器吸頭

b) 材料(每組)

- 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 (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) 準備工作

分配實驗材料(實驗課前由教師或實驗室技術員完成)

1. 將 10 ml 96% 乙醇等分加至無菌離心管中，為每組學生準備一支。
2. 將 1 ml 3% 過氧化氫等分加至無菌離心管中，為每組學生準備一支。
3. 將 0.5 ml 98% 甘油等分加至無菌離心管中，為每組學生準備一支。
4. 將 10 ml 無菌蒸餾水等分加至無菌離心管中，為每組學生準備一支。

B. 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（每組）

- 流動裝置 × 1

b) 材料（每組）

- 無菌拭子棒（棒子可易於折斷、棒頂包有棉花） × 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

c) 準備工作

製備 LB 瓊脂平板及 LB 液體培養基（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，放 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 LB 瓊脂平板。為每組學生準備 2 塊 LB 瓊脂平板。
2. 根據製造商的說明，將 LB 培養粉溶解於蒸餾水中，對 LB 液體培養基進行高壓滅菌，然後將其等分加至無菌培養管中（每支 5 ml）。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 液體培養基。為每組學生準備 2 支。

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。

C. 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(每組)

- 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

b) 材料(每組)

- 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

c) 準備工作

預備實驗材料(實驗課前由教師或實驗室技術員完成)

1. 將所需的染料和染色劑分別加至滴管瓶中。所有即用式的染料、染色劑和滴管均可從生物技術公司購買。
2. 為每組準備一瓶結晶紫溶液。
3. 為每組準備一瓶革蘭氏碘溶液。
4. 為每組準備一瓶 96% 乙醇。
5. 為每組準備一瓶番紅溶液。

額外筆記：

革蘭氏陽性細菌的細胞壁存在着一層厚厚的肽聚醣，沒有外膜。相反，革蘭氏陰性細菌雖只有一層薄薄的肽聚醣，卻有一層外膜，而該膜更含豐富的脂多醣。

革蘭氏染色涉及四種主要試劑，分別是結晶紫、碘溶液、乙醇和番紅。結晶紫是主要染色劑，能使兩種細菌的肽聚醣層都染成紫色。碘溶液有助固定主要染色劑於細胞中，因此稱為媒染劑。乙醇用於脫色，將不穩定的結晶紫（如革蘭氏陰性細菌的肽聚醣薄層內的結晶紫）脫色。最後，將細胞用番紅複染，革蘭氏陰性細菌將呈粉紅色。

D. 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（每組）

- 本生燈 × 1
- 打火器 × 1

b) 材料（每組）

- 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

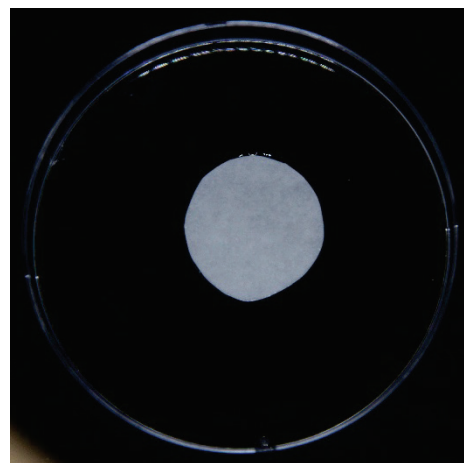
- 鑷子 × 1
- 250 ml 燒杯（盛有 70% 乙醇） × 1
- 膠帶
- 石蠟封口膜

- 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

c) 準備工作

製備浸有試劑的 3 cm 濾紙片（實驗課前一天及兩小時前由教師或實驗室技術員完成）

1. 將濾紙修剪成直徑 3 cm 的圓盤，實驗前至少一天對圓盤進行高壓滅菌。
2. 在實驗課開始前兩小時，將每塊濾紙片以 500 μ l 相應的測試溶液（已列於下表）浸泡（如下圖所示）。



濾紙片	1	2	3	4	5	6
培養皿上的標示	96% E	80% E	H ₂ O ₂	G	W	HR
濾紙片應浸泡的測試溶液	96% 乙醇	80% 乙醇	0.125% 過氧化氫	1.45 % 甘油	無菌蒸餾水	搓手液

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。

E. 實驗第（5）部分：觀察和分析實驗結果

a) 設備（每組）

- 流動裝置 × 1

b) 材料（每組）

- 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

c) 準備工作

此部分不需準備工作。

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。

VI. 「關於實驗設計的導引問題」的建議答案

1. 你預期在四周環境中會發現哪些細菌？

革蘭氏陽性和革蘭氏陰性細菌。

2. 有什麼工具適合在四周環境中用作採集微生物樣本？

拭子棒（棒子可易於折斷、棒頂包有棉花）。

3. 用作培養微生物的培養基中應含有哪些成分？

培養基應包含維持微生物所需的營養素，例如氨基酸、碳水化合物、礦物質和緩沖劑。

4. 革蘭氏染色的基本原理是什麼？

革蘭氏染色可根據細胞壁中的不同成分將細菌區分。革蘭氏陽性細菌的厚肽聚醣層，即使在酒精脫色後也能緊密地保留結晶紫的顏色；革蘭氏陰性細菌細胞在複染步驟後會出現番紅溶液的顏色。

5. 搜尋世衛建議的兩種製作酒精搓手液的配方。

配方 1：80% 乙醇（v/v）、0.125% 過氧化氫（v/v）、1.45% 甘油（v/v）及蒸餾水。

配方 2：75% 異丙醇（v/v）、0.125% 過氧化氫（v/v）、1.45% 甘油（v/v）及蒸餾水。

本實驗使用了配方 1。

6. 如何測試搓手液的殺菌效果？

我們可以在潔手前先在 1 塊 LB 瓊脂平板上印手指，然後潔手後在另 1 塊 LB 瓊脂平板上再一次印手指，通過比較 2 塊 LB 瓊脂平板上的微生物生長，就可以容易地判斷搓手液的殺菌效果。

VII. 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 μ l	80 %
2	3% 過氧化氫	417 μ l	0.125 %
3	98% 甘油	145 μ l	1.42 %
4	無菌蒸餾水	1105 μ l	--
	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 。

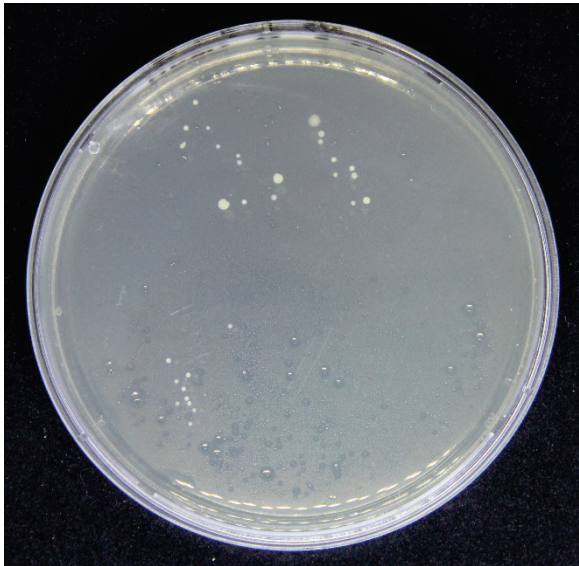
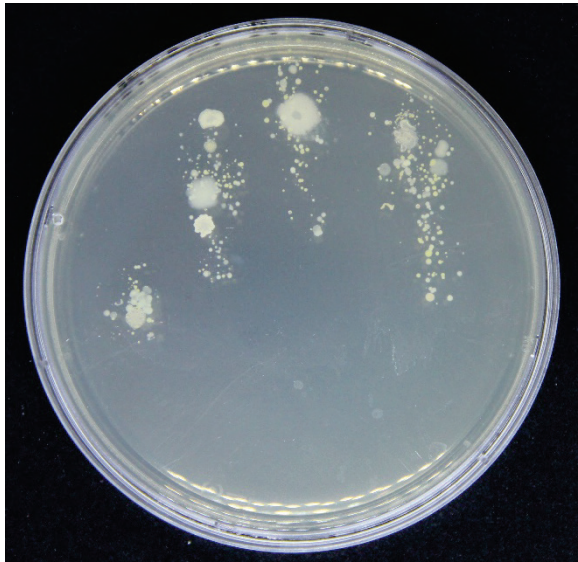
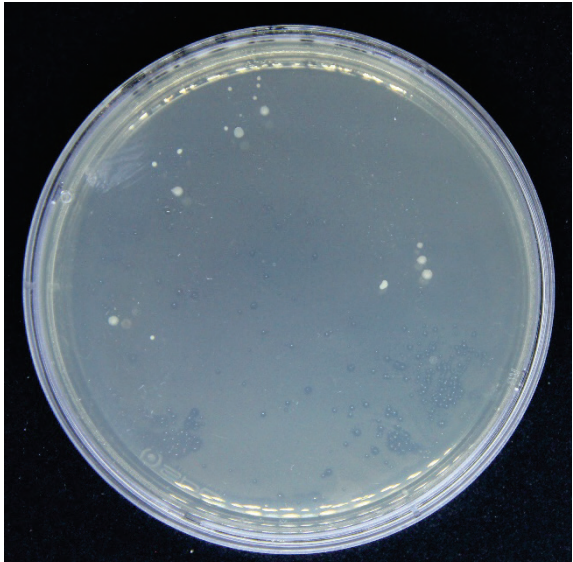
2. 哪個培養管 (A 或 B) 的液體培養基較混濁？

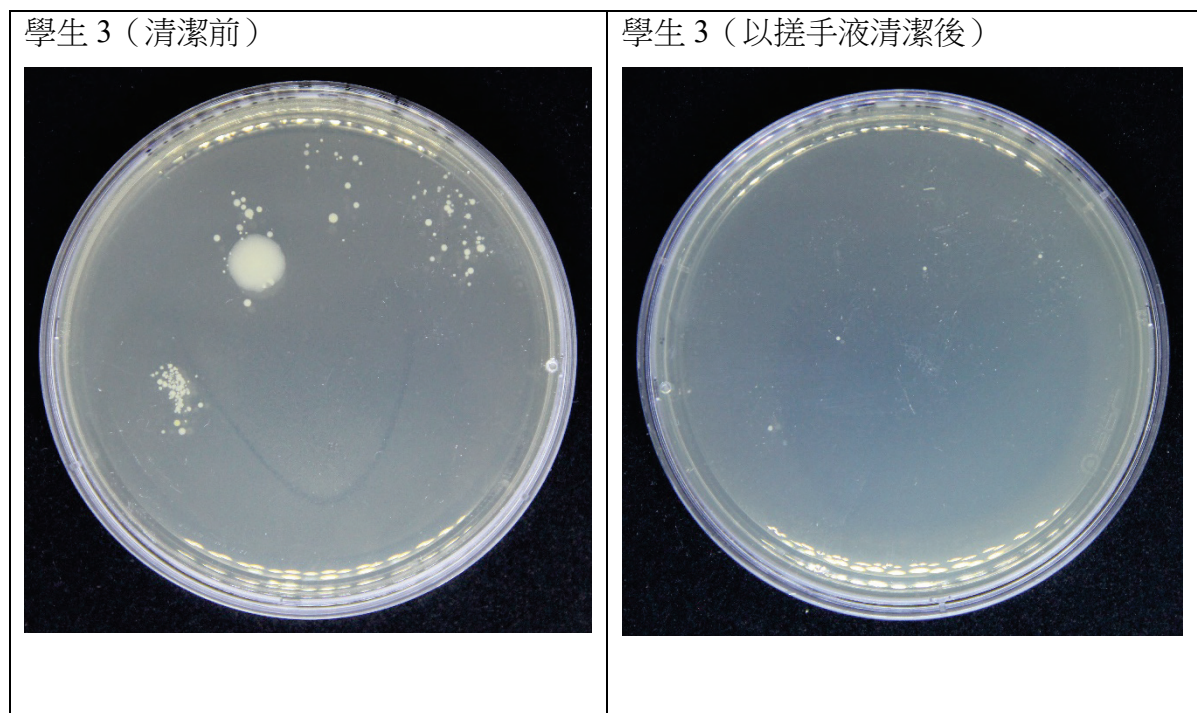
A 管的液體培養基

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。

[僅供參考]

LB 瓊脂平板 X (清潔前)	LB 瓊脂平板 Y (清潔後)
學生 1 (清潔前) 	學生 1 (以自來水清潔後) 
學生 2 (清潔前) 	學生 2 (以肥皂清潔後) 



4. 使用你的實驗數據填寫下表。

[僅供參考]

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
		自來水	168	18
		肥皂	TNTC	16
		搓手液	100	4

i) 哪塊瓊脂平板（瓊脂平板「X」或瓊脂平板「Y」）含有較多細菌？

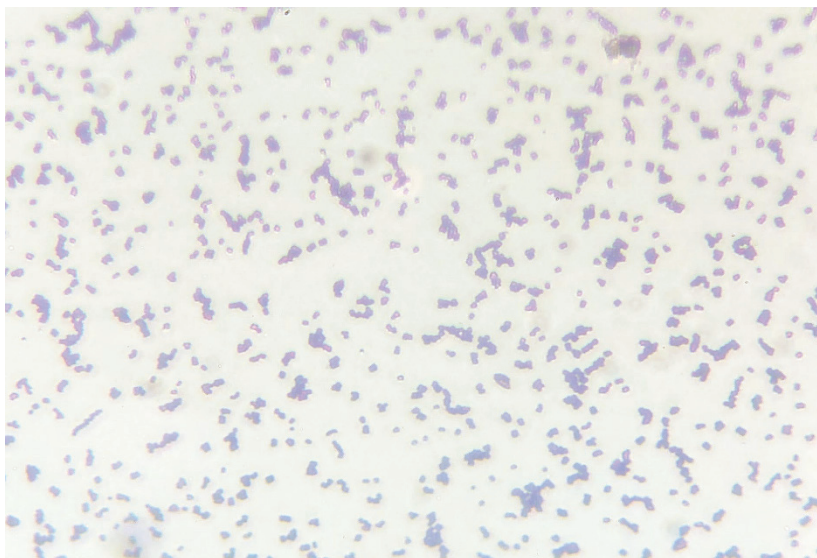
平板 [X]

ii) 清潔是否有助於減少細菌含量？

是

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？

塗片中發現染成紫色和粉紅色的細菌，即有革蘭氏陽性和革蘭氏陰性細菌。

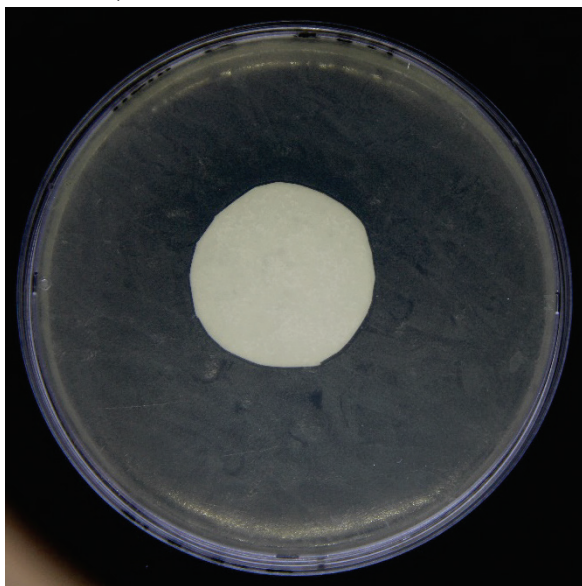
2. 從你採集的環境樣本中，哪種細菌的含量較多？

通過粗略的估計，兩種類別的細菌數目沒有很大的差異。

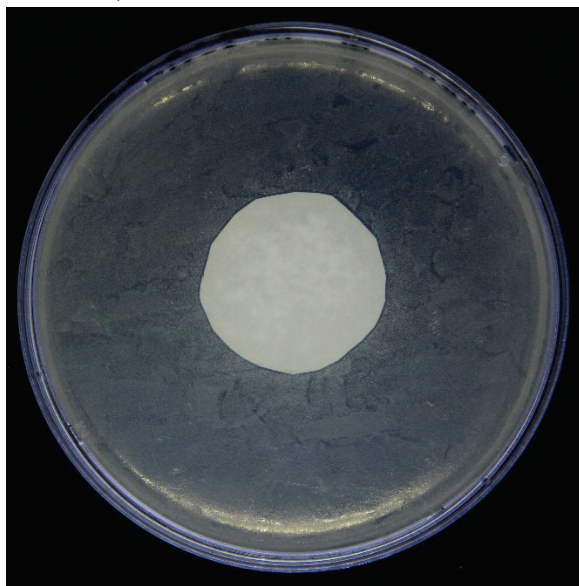
d) 實驗的第(4)部分

[僅供參考]

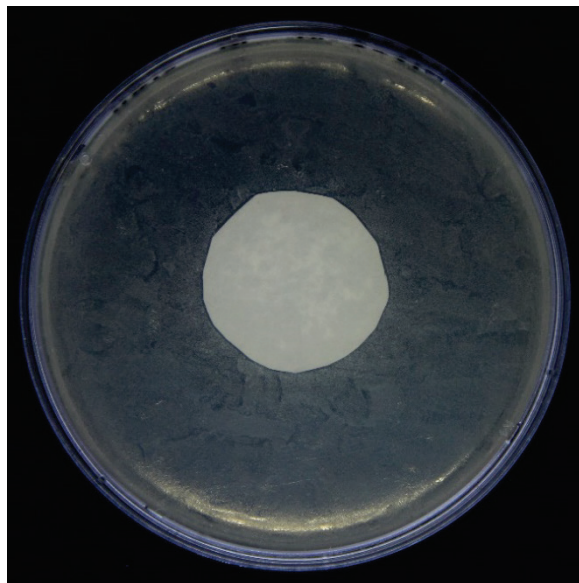
96% 乙醇



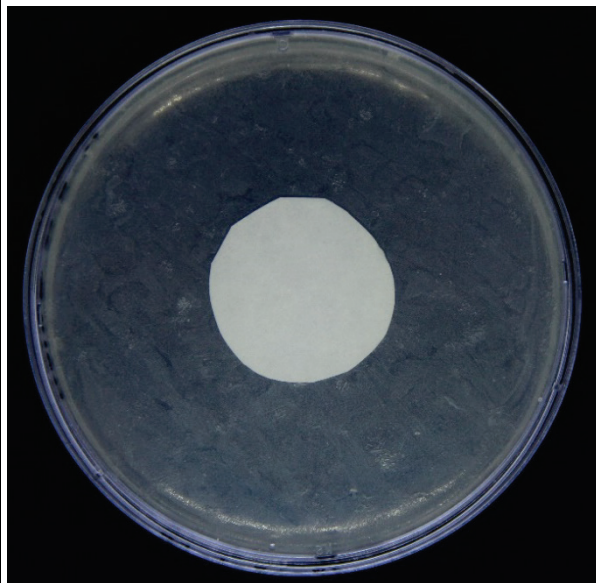
80%乙醇

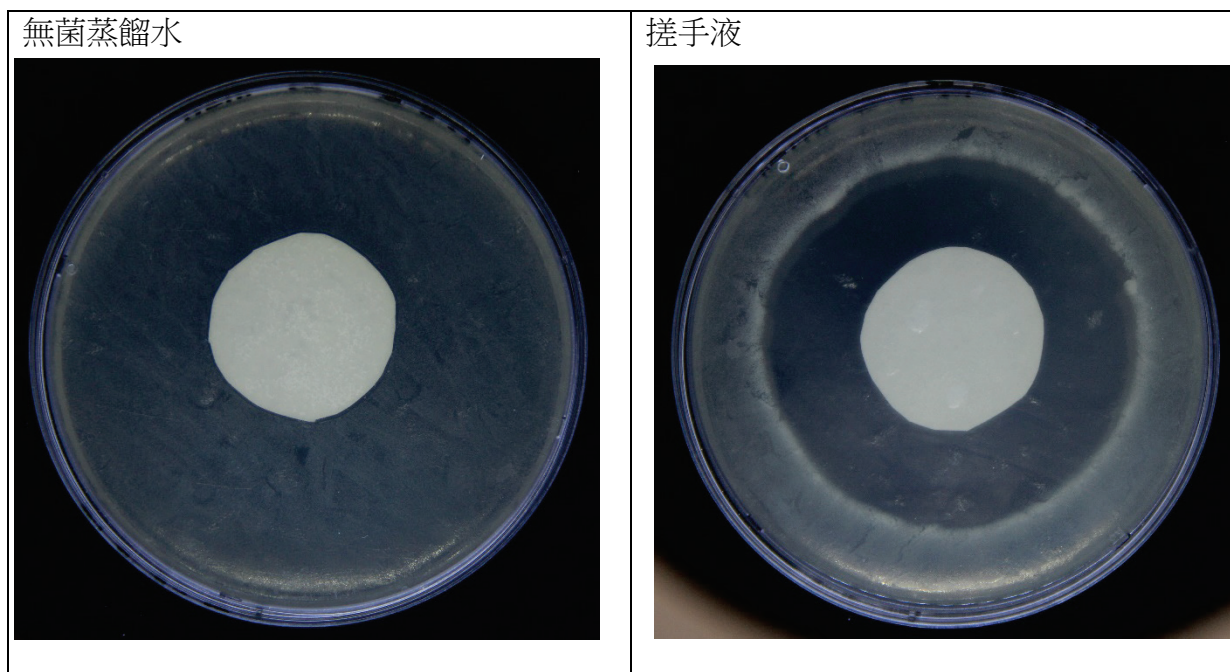


過氧化氫



甘油





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
	無	無	無	無	無	63
抑制區直徑 的平均值						

VIII. 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。

用 70%乙醇消毒是有效的。因為 A 管的濁度比 B 管高得多，這表明在用 70%乙醇清洗後，B 區比 A 區乾淨得多，微生物生長受到限制。

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？

建議使用搓手液，因為在此實驗中，搓手液對細菌的生長表現出最強的抑制作用。
（其他具實驗結果支持的答案也可接受）

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：

Staphylococcus epidermidis 表皮葡萄球菌

革蘭氏陰性：

Escherichia coli 大腸桿菌

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	活性的消毒物質
過氧化氫	用於殺死孢子，但不是殺菌的有效成分
甘油	皮膚保濕劑
蒸餾水	用作其他成分的溶劑

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。

乙醇是搓手液主要的抗菌成分，在實驗中所用的搓手液中乙醇的濃度是 80%。乙醇可在微生物的細胞壁上開孔，而 80%乙醇中的水分子就能通過細胞壁上的孔進入細胞，使細胞裂解，令微生物加速死亡。

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。

從實驗的第（4）部分的結果，80%乙醇溶液的殺菌效果並不如搓手液明顯，儘管它們的濃度相約，這可能由於80%乙醇溶液在濾紙上迅速揮發，未能發揮效用。

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。

不是。無論是無水酒精或高純度乙醇（如96%乙醇溶液）的殺菌效果，應該不及較低濃度的乙醇（如80%乙醇溶液），因為乙醇的作用是在微生物的細胞壁上開孔，卻不能直接殺死細菌；反而80%乙醇中的水分子就能通過細胞壁上的孔進入細胞，使細胞裂解，令細菌加速死亡。

IX. 參考資料

WHO guidelines on hand hygiene in health care: First global patient safety challenge clean care is safer care. (2019). Geneva: World Health Organization, 12. WHO-recommended handrub formulations. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144054/>

<https://www.today.com/health/school-experiment-shows-students-importance-hand-washing-t170186>

<https://www.chp.gov.hk/en/healthtopics/content/460/19728.html>