

實驗活動（九）
抗菌研究：果汁和草本茶
（教師版本）

I. 實驗目標

1. 從日常環境中採集並培養微生物樣本；
2. 通過與 0.5 McFarland 濁度標準液比較，估算液體培養物的微生物密度；以及
3. 測試所選果汁和草本茶的抗菌作用。

II. 預期學習成果

完成這項學習活動後，學生應能：

1. 培養從環境中採集的微生物；
2. 通過與濁度標準液比較來估算液體培養物的微生物密度；以及
3. 從抑制菌落形成的效果來評估果汁和草本茶的抗菌作用。

III. 教學筆記

1. 與學生一起探討「情景」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

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	取樣	30 分鐘	
2	培養時間		2 天
實驗課二：實驗第（2）部分			
1	估算液體培養物的微生物密度	15 分鐘	
2	在不同的測試溶液中培養微生物	15 分鐘	
3	培養時間		2 天
實驗課三：實驗第（3）部分			
1	稀釋液體培養物，並將微生物接種到瓊脂平板	30 分鐘	
2	培養時間		2 天
實驗課四：實驗第（4）部分			
1	觀察和分析	30 分鐘	
總實驗課時		實驗課一：30 分鐘 實驗課二：30 分鐘 實驗課三：30 分鐘 實驗課四：30 分鐘	

V. 實驗設備、材料和準備工作

A. 實驗第（1）部分：從環境採集微生物樣本

a) 設備（每組）

此部分不需要設備。

b) 材料（每組）

- 培養管（盛有 10 ml 無菌 LB 液體培養基） × 1（每位組員）
- 無菌拭子棒（棒子可易於折斷、棒頂包有棉花） × 1（每位組員）
- 培養管架 × 1
- 美紋紙膠帶 × 1
- 直尺 × 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

製備 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 培養粉溶解於蒸餾水中，對 LB 液體培養基進行高壓滅菌，然後將其等分至培養管中（每支 10 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 1 支。

B. 實驗第（2）部分：估算液體培養物的微生物密度和在不同的測試溶液中培養微生物

a) 設備（每組）

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

b) 材料（每組）

- 來自第（1）部分的 LB 液體培養物 × 1（每位組員）
- 無菌 LB 液體培養基（30 ml） × 1
- 蘋果汁（1.5 ml） × 1
- 石榴汁（1.5 ml） × 1
- 金銀花茶（1.5 ml） × 1
- 氨苄青黴素（25 mg/ml, 1.5 ml） × 1
- 無菌蒸餾水（1.5 ml） × 1
- 0.5 McFarland 濁度標準 × 1
- 黑白相間的紙板 × 1
- 培養管架 × 1
- 微量離心管架 × 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) 預備工作

製備 LB 液體培養基及分配實驗材料（由教師或實驗室技術員完成）

製備 LB 液體培養基：

1. 實驗課前一天，根據製造商的說明，將 LB 培養粉溶解於蒸餾水中，對 LB 培養液進行高壓滅菌，然後將其等分至無菌瓶中（每瓶 30 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 培養液。為每位學生準備 1 瓶。

製備 0.5 McFarland 濁度標準液：

1. 將 0.01 g 氯化鋇 (BaCl_2) 溶於 0.99 g 蒸餾水中，以製備 1% w/w 氯化鋇溶液。
2. 將 1 ml 硫酸 (H_2SO_4) 加進 99 ml 蒸餾水中，以製備 1% v/v 硫酸。
3. 將 0.5 ml 1% 氯化鋇溶液與 99.5 ml 1% 硫酸徹底混合。
4. 將 10 ml 標準溶液等分加至培養管中，為每組學生準備一支。
5. 如非使用時，可將溶液放於室溫貯存，並以錫紙包裹培養管。貯存 6 個月後，便需重新準備標準溶液。

分配蘋果汁及石榴汁：

（果汁應為新鮮製備，或者從坊間購買一些不含防腐劑的瓶裝果汁。）

1. 實驗課前，把兩種果汁各以 1.5 ml 等分加至兩個微量離心管中。為每組學生準備兩種果汁，每種準備 1 支。

製備及分配金銀花茶：

1. 將 50 g 金銀花浸在 200 ml 蒸餾水中 30 分鐘。
2. 將混合物煮沸 45 分鐘，去除殘渣，放 4°C 保存，直至使用。
3. 實驗課前，將 1.5 ml 等分加至微量離心管中，為每組學生準備一支。

製備及分配氨苄青黴素：

1. 將 250 mg 氨苄青黴素粉溶解於 10 ml 無菌蒸餾水中，上下倒置幾次，以混勻所有液體，以 4°C 保存，直至使用。
2. 實驗課前，將 1.5 ml 等分加至微量離心管中，為每組學生準備一支。

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：果汁和草本茶的抗菌研究

a) 設備（每組）

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

b) 材料（每組）

- 來自第（2）部分的 LB 液體培養物 × 5
- 培養管架 × 1
- LB 瓊脂平板 × 5
- 15 ml 離心管 × 10
- 離心管架 × 1
- 無菌 LB 液體培養基（200 ml） × 1
- 接種環 × 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

製備 LB 瓊脂平板及分配蒸餾水（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 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）。用石蠟封口膜將瓊脂平板包裹後，以 4°C 保存，直至使用。為每組學生準備 5 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. 實驗課前，將 200 ml 無菌 LB 液體培養基等分加至瓶子中，為每組學生準備一瓶。
3. 實驗課前一天，通過與 0.5 McFarland 標準液進行比較，檢查學生採樣液體培養物的濁度。如果同組學生培養物的濁度均遠低於標準液的濁度，即代表沒有足夠含量的細菌，則需為該組學生提供合適濁度的大腸桿菌培養物（詳情請參閱步驟 4）。如同組學生培養物的濁度均遠高於標準液的濁度，則為其中一支培養物加入無菌培養基進行稀釋，直至濁度與標準液相約。
4. 為無法在其取樣培養液中獲得足夠細菌含量的組別提供大腸桿菌過夜培養液，以進行後續的實驗程序。以適當的液體培養基（例如 LB 培養基）培養大腸桿菌（Sigma-Aldrich 或 Promega）約 16 小時。對大腸桿菌過夜培養物進行 1：5 的稀釋（即用 4 ml 無菌 LB 液體培養基稀釋 1 ml 大腸桿菌培養物）。為每組有需要的學生準備 1 支已稀釋的大腸桿菌培養物。

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

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。

D. 實驗第（4）部分：數算菌落和分析結果

a) 設備（每組）

- 流動裝置 × 1

b) 材料（每組）

- 來自第（3）部分的 LB 瓊脂平板 × 5
- 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

此部分不需要準備工作。

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」和表格 2 的建議答案

1. 有什麼工具適合在四周環境中用作採集微生物樣本？

無菌拭子棒（棒子可易於折斷、棒頂包有棉花）及液體培養基。

2. 如果沒有精密儀器，我們如何估算液體培養物的微生物密度？

我們可以將液體培養基培養物的濁度與一些標準液的濁度進行比較，例如 0.5 McFarland 濁度標準液。0.5 McFarland 標準液的濁度與每毫升 1.5×10^8 CFU 的細菌懸浮液相稱。

3. 如果測試的飲品聲稱具抗菌特性，預期在微生物培養期後，在瓊脂平板上會觀察到什麼？

我們預期在瓊脂平板上會觀察到有較少微生物菌落，因為有抗菌特性的飲品理應能夠抑制微生物的生長。

表 2

	「A」培養管	「A1」離心管	「A2」離心管	「A3」離心管
稀釋倍數	0	稀釋了「A」培養管的液體培養物 100 倍	稀釋了「A1」離心管混合物 100 倍	稀釋了「A2」離心管混合物 10 倍
液體培養物的稀釋倍數	0	100	10,000	100,000

VII. 結果

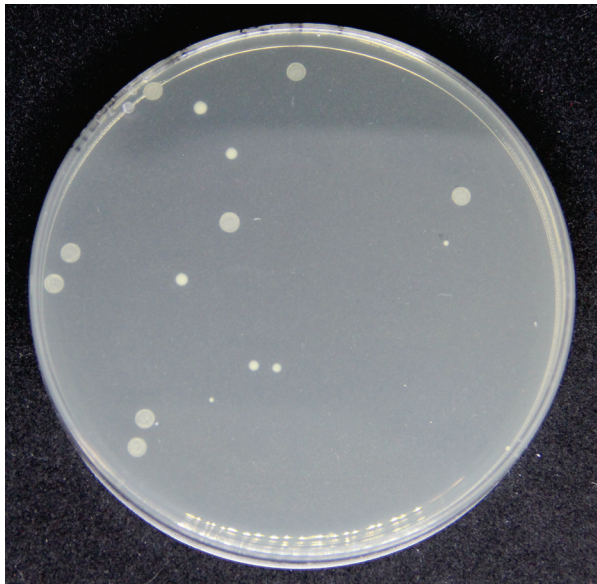
1. 你選擇採樣的環境表面是_____，採樣範圍的面積是_____ cm^2 。
2. 記錄組內各人收集的微生物樣品資料和液體培養物的濁度。

組員名稱	採樣的環境表面	採樣表面的面積 (cm^2)	液體培養物的濁度與 0.5 McFarland 標準液的比較 (高於 / 低於 / 類似)	誰的液體培養 液被挑選用作 在不同的測試 溶液中進行進 一步的培養？ (以「✓」表示)

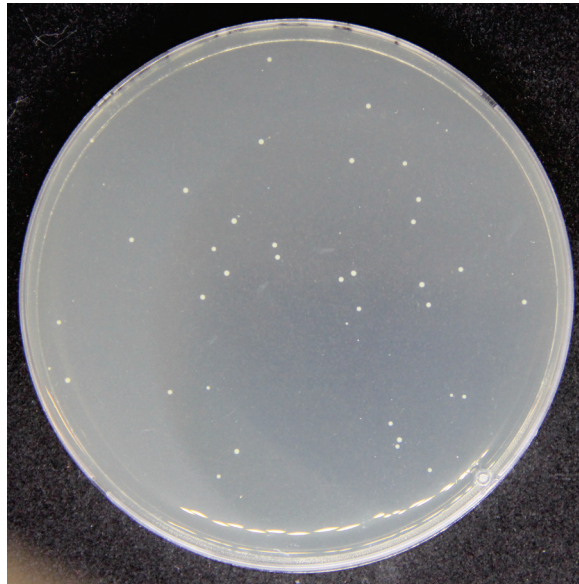
3. 在下面的空框內，貼上與 LB 瓊脂平板在培養期後相對應的照片。

「僅供參考。實驗結果可因應果汁濃度不同而有所分別。」

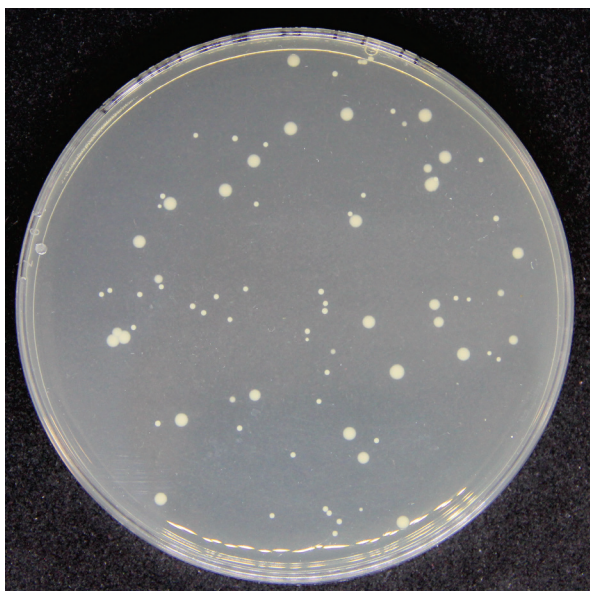
「A」蘋果汁



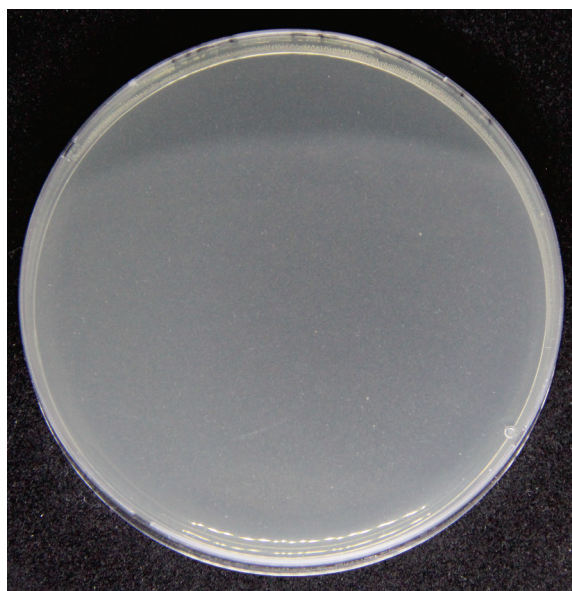
「P」石榴汁



「H」金銀花茶



「Amp」氨苄青黴素溶液



「W」無菌蒸餾水



4. 在下表中記錄 LB 瓊脂平板上的 CFU 含量。

測試溶液	CFU 含量
蘋果汁	15
石榴汁	41
金銀花茶	83
氨苄青黴素	0
無菌蒸餾水	129

VII. 討論

1. 在瓊脂平板接種之前，為什麼必須稀釋液體培養物？試解釋原因。

希望經培養後，在瓊脂平板上的菌落形成單位是在可數算範圍內（即 25–250）。

2. CFU 的含量與微生物生長呈正相關。因此，哪種測試溶液能使微生物生長得最多？哪種測試溶液具有最佳的抗菌效果？

無菌蒸餾水可使微生物生長最多，而氨基青黴素溶液具有最佳的抗菌效果。

3. 根據上題的原理及實驗的數據，以降序排列測試果汁和草本茶的抗菌效能。

[僅供參考] 蘋果汁 > 石榴汁 > 金銀花茶。

4. 氨基青黴素溶液和無菌蒸餾水在本實驗中是用作對照，請說明當中的原理。

氨基青黴素具有已知抗菌的作用，所以用作陽性對照；蒸餾水是陰性對照，因它沒有任何抗菌作用。

VIII. 參考資料

Holland, K. T. (1989). Microbiological sampling techniques. In M. W. Greaves & S. Shuster (Eds). *Pharmacology of the skin II. Handbook of experimental pharmacology*, 87(2). Berlin and Heidelberg: Springer.