

教育部高中生物科學資優生培育計畫
高雄區

微生物學實驗

學生：_____

學校：_____

授課教師：楊文仁 老師

國立高雄大學 生物科技研究所

2011.12.03

細菌的培養、染色與觀察

目的

讓學員學習和熟悉生命科學實驗中微生物基本的操作技術與方法，了解細菌培養、無菌操作、分離方法、純系培養、染色鑑定與計數的方法。為將來微生物學、分子生物學、遺傳學等實驗奠定基礎。

實驗一、細菌的培養與計數

一、概述

微生物的培養方式，依培養基種類不同，可以分為肉湯/液體培養基(broth/liquid)、平碟培養基(plate)、斜面培養基(slant culture)及半固體培養基(semisolid/soft agar culture)。肉湯液體培養是以菌落震盪懸浮法培養，接種至固體培養基可用劃線法(streaking method)或塗抹法(spreading method)。若是半固體培養基則以穿刺法(stabbing method)為主。接種培養過程必需在無菌環境下操作，以避免任何雜菌的汙染。通常在無菌操作台(laminar flow)或無菌室內接種細菌。本次實驗將以劃線法進行菌落分離，形成單一菌落(single colony)及稀釋塗抹法進行菌液中細菌濃度計數。

使用固態培養基培養細菌，能藉由菌落計數(colony counts)的方法較準確的計算樣品中細菌的數量。此方法的理論基礎是：每一個細菌細胞在適當的固態培養基上都能形成一個清晰容易區別的菌落。菌落計數法和其他任何定性定量分析方法一樣，操作時的精確性及方法設計的準確度，都會影響實驗結果的真實性。因此，除了在操作過程要小心謹慎外，還要注意；(一)選擇的培養基適不適合；(二)培養條件及時間是否恰當；(三)稀釋液及器皿中有沒有抑制細菌生長的物質；(四)操作時是否造成細菌細胞死亡或帶進其他與細菌競爭生長的生物；(五)將細菌塗佈在固態培養基時是否均勻散布，使菌落容易辨識。

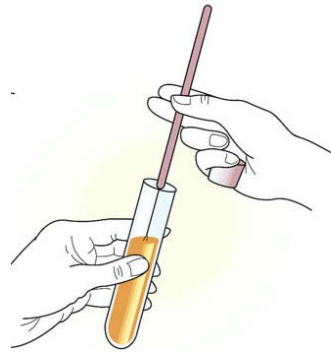
二、藥品與器材

藥品

1. 95% 酒精
2. 蒸餾水
3. 長有 Top10 *E. coli* 之液態培養菌液
4. LB agar plates：1% (w/v) Bacto-tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl，調至 pH 7.0 後，加入 1.5% (w/v) Bacto agar，以濕熱法滅菌。

器材

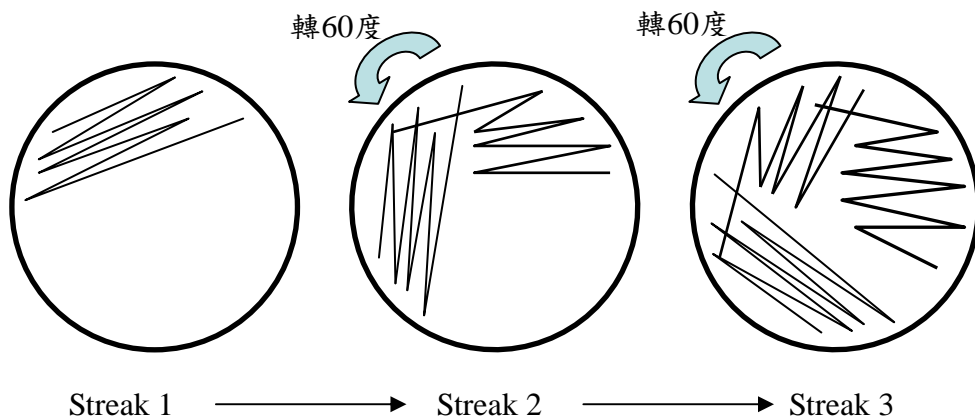
1. 接種環
2. 三角玻棒
3. 酒精燈
4. 試管
5. 試管架
6. 封口蠟膜(parafilm)



三、實驗步驟

(一)細菌之接種方法—分區劃線法 (Streaking method)

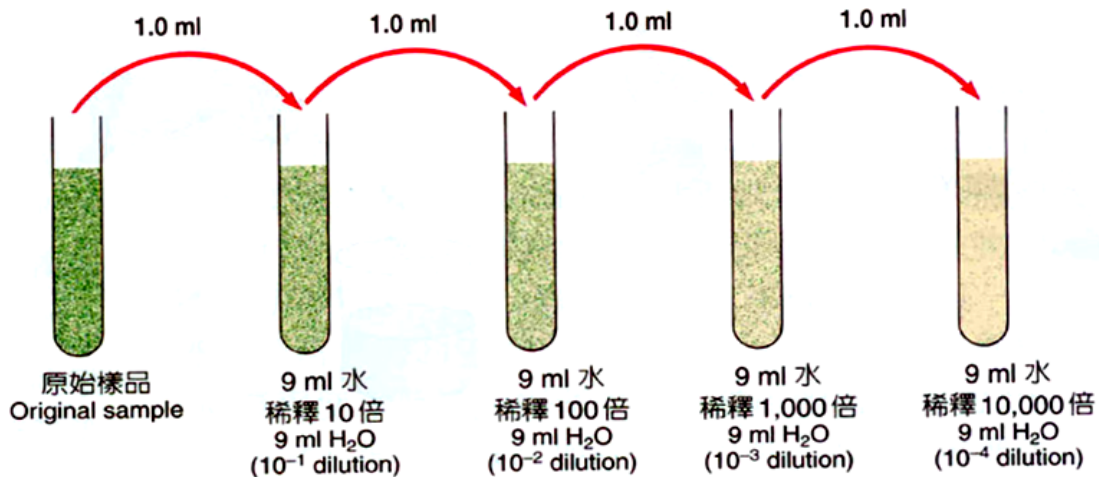
1. 每一組取一個 LB plate，在培養皿底部標明組別及日期，並寫上菌株名稱：如“Top10 *E. coli*”。
2. 將接種環在酒精燈火燄上燒紅，環上方部份亦以火燄燒過，將接種環在培養基空白處輕戳以使冷卻。【注意！蓋子請勿全開或置於實驗桌上！此時接種環請勿放置在桌上或接觸到其它東西！】
3. 用右手小指及手掌心將 Top10 *E. coli* 之液態培養菌液試管蓋子打開（蓋子夾在小指及手掌中），以接種環輕觸菌液，使接種環上沾有細菌。
4. 打開空白的 LB plate，將沾有菌落的接種環於其上輕輕連畫數條線(如下圖之 Streak 1)後，將培養皿蓋子蓋回。
5. 再次將接種環在酒精燈火燒紅並使冷卻。將培養皿旋轉約 60 度，畫第二次線(如下圖之 Streak 2)。
6. 重複上一步驟之操作，畫第三次線或第四次線(如下圖之 Streak 3)。
7. 將接種環在火燄上燒紅滅菌後置回實驗桌上。
8. 使用封口蠟膜將培養皿封好並倒置，於 37 °C 培養箱中培養過夜。



(二)細菌生長之測定—菌落之觀察與計算法

I. 系列稀釋

1. 將試管標上欲稀釋倍數，如 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} ；並於每管加入 900 μl 蒸餾水。
2. 取 100 μl 原菌液加入第一支稀釋管中混勻，再由此管吸出 100 μl 加至下一稀釋管中混勻，以此類推，進行系列稀釋。



II. 塗盤

1. 取三個 LB plate，在培養皿底部標明組別及日期，並寫上稀釋倍數。
2. 從不同稀釋管中各取出 50 μl 樣品，加入標明稀釋倍數的 LB plate。
3. 取出浸於 95% 酒精溶液的三角玻璃棒，以燃燒法將酒精燃盡後，輕觸 LB plate 無菌處或藉由空氣冷卻，待玻璃棒冷卻才能進行塗盤。**【務必注意！高溫或著火的三角玻璃棒不可插回酒精杯中，以免發生火災！玻璃棒彎曲部分應朝下，避免酒精沿玻璃棒燒傷手部】**
4. 塗盤時，將玻璃棒輕放於平板表面，以左手旋轉 LB plate，右手將玻璃棒前後推動，使菌液均勻塗佈於平板表面。
5. 將玻璃棒浸於 95% 酒精中，取出後再以火焰燃燒玻璃棒，進行滅菌。
6. 待玻璃棒冷卻再進行第二個培養皿的塗盤。
7. 使用封口蠟膜將培養皿封好並倒置，於 37 °C 培養箱中培養過夜，隔日觀察及計算菌數一般以 30~300 個菌為主。

III. 觀察與計算

1. 觀察並計算所有平板上之菌落數，若平板上菌落數超過 300 視為過多無法計算，記錄為 too numerous to count (TNTC)，若菌落數少於 30 視為過少，記錄為 too few to count (TFTC)，僅計算 30 至 300 之間的菌落數，凡表面或表面下之菌落均需計算在內。
2. 菌落數 × 稀釋倍數 = 原培養液中每毫升之細菌數

$$(\text{Number of colonies} \times \text{Dilution factor} = \text{Colony-forming unit per ml})$$

例如：

- a. 平板上菌落數=50
稀釋倍數=1：10⁶
加入平板之菌液=1 ml
 $(50 \times 10^6) \text{ cells} / 1 \text{ ml} = 5 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$ (CFU：colony-forming unit)
- b. 平板上菌落數= 50
稀釋倍數=1：10⁵
加入平板之菌液= 0.1ml
 $(50 \times 10^5) \text{ cells} / 0.1 \text{ ml} = 5 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$

實驗二、革蘭氏染色法

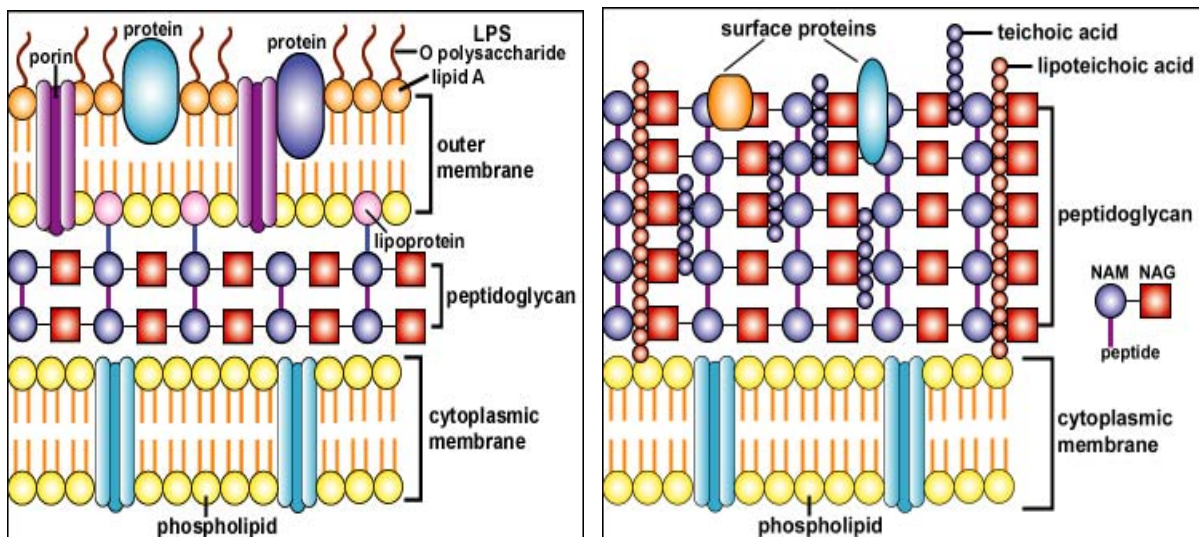
目的

革蘭氏染色(Gram-stain)為鑑別染色法中最常見者，藉染色結果可區別革蘭氏陽性菌及陰性菌，是細菌重要的分類依據之一。

一、概述

革蘭氏染色是 1884 年由丹麥微生物學家 Hans Christian Gram 發明，至今仍為鑑別細菌的最重要方法。依據革蘭氏染色可將細菌分為革蘭氏陽性(Gram-positive)以及革蘭氏陰性(Gram-negative)兩類。其染色原理與細菌之細胞壁結構有關。說法有二，其一為：革蘭氏陰性細菌之細胞壁含脂量高，以酒精處理時會將部份脂質(lipid)萃取出來，而使細胞壁結構鬆動，增加通透性(permeability)，故結晶紫(crystal violet)複合物被帶出細菌體外而無色。革蘭氏陽性細菌之細胞壁幾乎不含脂質，酒精可使其細胞壁脫水，故結構更加緊密，結晶紫複合物就被留在細菌體內。其二為：酒精處理時，會使細胞壁的肽聚醣(peptidoglycan)間隙縮小，革蘭氏陽性細菌之肽聚醣層比革蘭氏陰性厚，所以結晶紫複合物較容易離開革蘭氏陰性細菌。

在本實驗中，先以酒精處理後，用紅色的番紅(Safranin O)進行複染，此時無色的革蘭氏陰性細菌會變成粉紅色，而原本染上藍色的革蘭氏陽性細菌就會變成紫色。



革蘭氏陰性細菌 G(-) 細胞壁

革蘭氏陽性細菌 G(+) 細胞壁

資料來源: <http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab16/diseases/gonococcus/u1fig10b.html>

<http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab14/diseases/enterococcus/u1fig9b.html>

二、藥品與器材

藥品

1. 液態培養菌液
 - * 大腸桿菌 *Escherichia coli*
 - * 金黃色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*
2. 染劑
 - * 初染劑：2% Crystal Violet
 - * 媒染劑：Gram Iodine
 - * 脫色劑：95%酒精
 - * 複染劑：3.6%之 Safranin
3. 蒸餾水洗滌瓶
4. 95%酒精
5. 鏡油

器材

1. 光學顯微鏡
2. 玻片 x2
3. 拭鏡紙
4. 酒精燈
5. 接種環

三、實驗步驟

(一) 玻片塗抹

1. 玻片先以清潔劑洗淨，再以蒸餾水與 95%酒精潤濕後擦乾備用。
2. 以接種環取出一環菌液，塗抹於乾淨玻片中央，再均勻分散之。
3. 塗抹之玻片為半透明、白色的一層膜狀物，風乾後，快速在酒精燈上加熱 2~3 次，以便將菌體固定在玻片上，並於玻片旁邊以簽字筆註明菌名與座號。

(二) 革蘭氏染色

1. 將此玻片平放，先以 2% Crystal Violet 染液作用 1 分鐘，再以蒸餾水將剩餘染料沖洗去除。
2. 加入 Gram Iodine 媒染液(Mordant)，作用 1 分鐘，用水沖洗。
3. 再以 95%酒精進行脫色作用。將玻片斜置，由上往下滴入酒精溶液，直到流出的酒精變成無色後，再用水沖洗。
4. 加入第二種染液 3.6%之 Safranin (Counterstain)，繼續作用 1 分鐘後，用水沖掉多餘之染料，以濾紙吸去玻片上之水份，以顯微鏡於 100 倍油鏡下觀察並記錄細胞之外形與顏色。

四、實驗結果(50%)

學校：_____ 姓名：_____

1. 細菌染色之觀察

革蘭氏陽性菌 G(+): _____

形狀：_____

顏色：_____

革蘭氏陰性菌 G(-): _____

形狀：_____

顏色：_____

2. 分區劃線法



菌落之描述如下

大小：_____

形狀：_____

顏色：_____

其他：_____

3. 稀釋塗抹法

稀釋倍數	菌落數

估算原始菌液每 ml 菌數=_____

五、問題與討論(50%) 學校：_____ 姓名：_____

1. 無菌操作技術之重點如下，其原理為何？

- [1] 接種環使用前後必須燒紅
- [2] 燒紅之接種環必須等冷卻降溫後才取菌
- [3] 接種時管口不可離火
- [4] 試管打開後，蓋子必須握在手掌上
- [5] 管口在接種前後先以酒精燈過火

2. 單離菌落的原因？其方法有哪些？

3. 稀釋塗抹法之優點及缺點

4. 為何在革蘭氏染色時要用 Mordant 和 Counterstain？

5. 實驗心得