

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：林順富 老師

國立高雄大學 生命科學系

實驗一、革蘭氏染色法

目的

由於細菌是透明之微小生物，無法以肉眼觀察，必在顯微鏡下才可看到。事實上，顯微鏡下的細菌仍很微小，一般多以染料使其著色，以便觀察。

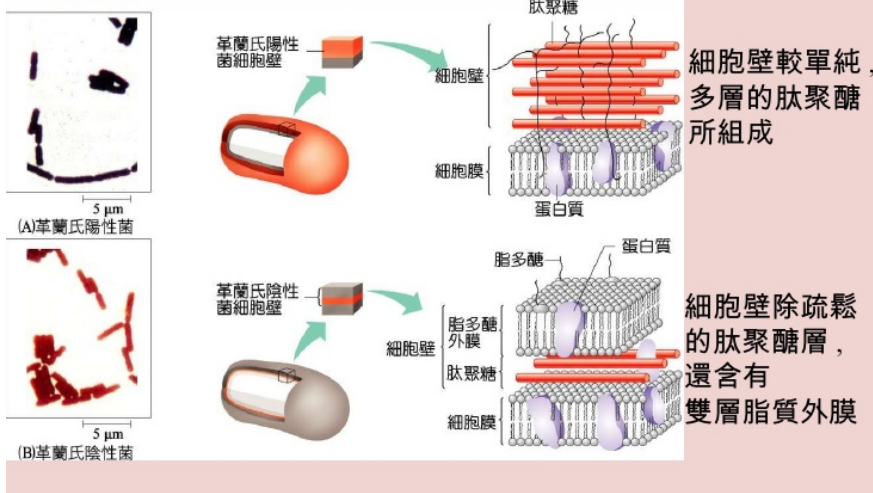
一、概述

革蘭氏染色法是由一位丹麥微生物學家漢斯-克理斯蒂安-革蘭(Hans Christian Gram)於 1884 年發明，至今仍為鑑別細菌關鍵的第一步驟。依據革蘭氏染色法可將細菌分為革蘭氏陽性以及革蘭氏陰性兩類。現已證明細菌之細胞表層結構可簡單歸納如下圖，其染色原理推測其與此兩類細菌之細胞表層結構有很大的不同有關。革蘭氏陽性菌的細胞壁結構較為簡單，由數十層交疊的肽聚糖構成，強度較高。革蘭氏陰性菌的細胞壁結構較為複雜，但強度較低。細胞壁外多了一層外膜。革蘭氏陰性菌的細胞壁層較薄，一般只含有寥寥數層肽聚糖。

染色原理說法有二，其一為：革蘭氏陰性菌之細胞壁含脂量高，以酒精處理時會將部份脂質萃取出來，而使細胞壁結構鬆動，通透性增加，故結晶紫-碘複合體被帶出細菌體外而呈無色。革蘭氏陽性菌之細胞壁幾乎不含脂質，酒精甚至會使細胞壁脫水，故結構更加緻密，結晶紫-碘複合體就被留在細菌體內。其二為：酒精處理時，會使細菌之細胞壁肽聚糖空隙縮小。革蘭氏陽性菌之細胞壁肽聚糖較厚，而革蘭氏陰性菌較薄，所以造成結晶紫-碘複合體離開的機會較大。

在本實驗中，先以結晶紫-碘進行初染後，酒精處理後，最後再以紅色番紅進行複染時，此時革蘭氏陰性菌就會染成紅色，而原本已染上藍色的革蘭氏陽性菌就會呈現出紫色。

細菌：細胞壁由大量的肽聚糖組成



細菌之細胞表層結構圖。

二、藥品與器材

藥品

- 液態培養菌液
 - * 大腸桿菌(*Escherichia coli*)
 - * 金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)
- 染劑
 - * 初染劑：2% Crystal Violet (結晶紫)
 - * 媒染劑：Gram's Iodine (革蘭氏碘液)
 - * 脫色劑：95% Ethanol (酒精)
 - * 複染劑：3.6% Safranin (番紅)
- 蒸餾水洗滌瓶
- 95%酒精
- 鏡油

器材

- 光學顯微鏡
- 玻片 x2
- 拭鏡紙
- 酒精燈
- 接種環

三、實驗步驟

(一)玻片塗抹

1. 取出玻片，於正中央畫一小圈。
2. 以接種環取出一環菌液，塗抹於玻片小圈的反側內，再均勻分散之。
3. 在酒精燈上加熱進行熱固定，以便將菌體固定在玻片上。

(二)革蘭氏染色

1. 將此玻片平放，先以 2% Crystal Violet 染液作用 30 秒，再以蒸餾水將剩餘染料沖洗去除。
2. 加入 Gram Iodine 媒染劑(Mordant)，作用 30 秒，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 30 秒後，用水沖掉多餘之染料，以濾紙吸去玻片上之水份，在乾燥後，滴油，於顯微鏡下仔細觀察，並記錄細胞之外形與顏色。

實驗二、細菌菌數的計數法

目的

細菌為單細胞生物，其生長並非指細胞的變大或增重，而是指在充分養分存在下，細胞經由不斷的分裂變成一個大的族群稱之。本實驗主要能熟悉如何利用菌數之直接計算法與菌落之形成。

一、概述

細菌繁殖的結果，菌數會明顯的增加，當然整個族群的總重量也隨之提高，而養分的消耗與廢物的堆積更加明顯，這些現象都可做為細菌生長的指標。其中以菌數的測定最為方便且實用。細菌數目的測定，可直接在顯微鏡下觀察，或以肉眼看到菌落之形成，還可利用菌液之混濁度來判斷。

二、藥品與器材

藥品與器材

1. 金黃色葡萄球菌
2. 營養肉湯
3. 營養平碟
4. 0.85%食鹽水
5. 無菌試管
6. 微量吸管：20-200 μl 、100-1000 μl
7. 彎曲玻棒泡在酒精中
8. 簽字筆
9. 酒精燈及試管架

三、實驗步驟

A. 序列稀釋

1. 備一培養好之金黃色葡萄球菌菌液(原液)。
2. 取出將滅菌過之試管數支，排立於試管架上，每管各先加入 0.9 毫升滅菌過之 0.85%食鹽水。
3. 取 0.1 毫升原液菌體樣本，加入 0.9 毫升第一稀釋管混勻，此即 10^{-1} 之稀釋液。
4. 再由 10^{-1} 之稀釋液中取出 0.1 毫升菌液，加至下一稀釋管混勻，此即 10^{-2} 之稀釋液。以此類推。
5. 依同法繼續稀釋下去，亦即進行 10 倍的連續稀釋至最後一管。

B. 菌液塗抹

1. 備 3 個固體營養培養基，標示稀釋倍數。
2. 分別由最低等稀釋液中取出 0.1 毫升菌液，均勻塗抹於對應之培養平碟上，於 30°C 培養過夜後，計算菌落之數目，一般範圍以 30~300 個為主。

C. 觀察與計算

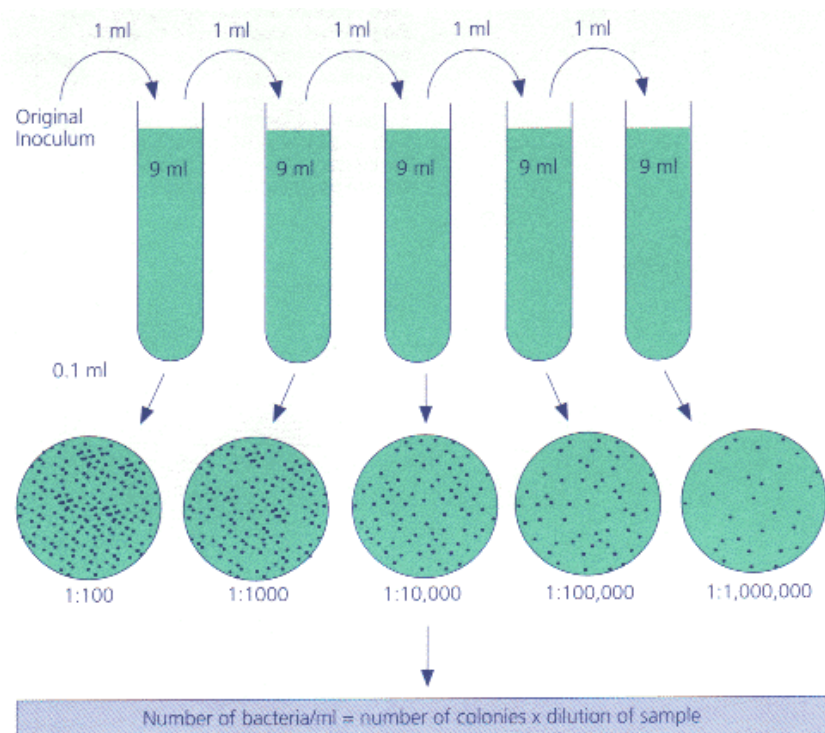
1. 於培養平碟後方以簽字點數計算菌落數，僅計算 30 至 300 之間的菌落。
2. 菌落數 × 稀釋倍數 × 10 = 原培養液中每毫升之菌體數

$$\text{稀釋倍數} = 1 : 1 \times 10^6 = 10^{-6}$$

培養皿上平均菌數 = 34

回推原樣本中之原液菌體數：

$$(34 \times 10^6) \text{ 菌落數} / 0.1 \text{ ml} = \underline{3.4 \times 10^8 \times 10 \text{ CFU/ml}} \text{ (CFU : colony-forming unit)}$$



序列稀釋及菌液塗抹示意圖。

實驗三、抑菌活性的分析

目的

微生物學的研究起於人類對微生物造成的生命威脅，如何控制微生物長久來就是一很重要課題。以物理方法及化學藥劑可控制細菌的生長，許多化學物質會影響細菌之生長，甚至會破壞細菌之結構或干擾其代謝反應。本實驗主要以抗生素來學習測定細菌之抑菌效果的檢測方法，以期能擴大應用來篩選出適當且有效之抗生素。

一、概述

常用抑菌活性的分析法有最低濃度抑制法及濾紙擴散法。稀釋法是將不等量之抗菌劑以漸增的方法，加入於液體或固體培養基內，被檢之細菌在一定菌數濃度下接種於此培養基，以觀察抗菌劑在何種濃度下方能完全阻止其生長或將其消滅。而擴散法是以一個濾紙盤，多孔杯或無底的小量杯，其內含有已知量的藥物，將其放入於已接種培養之被檢固體培養基內，一定時間培養後(通常 18-20 小時)測定細菌發育被抑制環之大小，來檢定其對被檢細菌之抗菌能力。然而此種方法除藥物與細菌之間的反應外，尚有一些物理及化學上主觀的因素如培養基的性質、擴散力及藥品分子之大小及其穩定性，因此使狀況標準化就能以定量的檢定藥效或微生物的感受性。

二、藥品與器材

藥品及器材

- 1.液態培養菌液
大腸桿菌(*Escherichia coli*)
金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)
2. 抗生素
- 3.小濾紙
4. 鑷子

三、實驗步驟

1. 備一隔夜培養好之金黃色葡萄球菌及大腸桿菌菌液(濃度約為每毫升 10^5 至 10^6 CFU) 各一管。
2. 取 2 個營養平碟，以簽字筆分別標明 a 及 b ；a 菌碟接種金黃色葡萄

球菌，b 菌碟接種大腸桿菌。

3. 自培養液分別吸取 0.1 毫升菌液，以塗抹法均勻密塗於 a 及 b 菌碟中。
4. 以鑷子夾取小濾紙將其平鋪於菌碟培養基表面上，各濾紙間保持一定距離。
5. 取 40 μ l 不同濃度之抗生素依序加至小濾紙上。
6. 於 30°C 培養，隔天觀察細菌生長受抗生素抑制之情形，測量抑制圈之大小並記錄之。

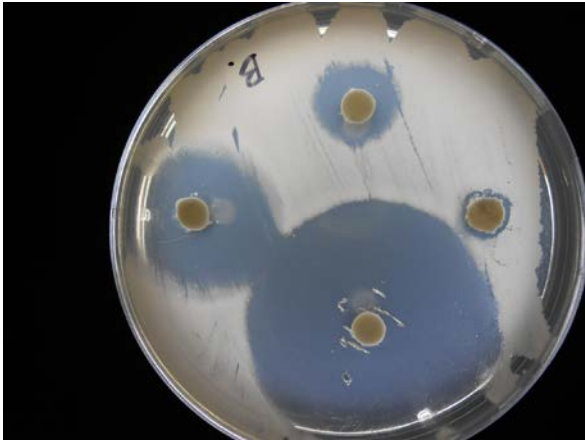


圖 不同抗生素濃度對細菌產生的抑菌效果。

四、實驗結果

學校：_____ 姓名：_____ 座號：_____

1. 細菌染色之觀察

Escherichia coli:

中文學名：_____

形狀：_____

顏色：_____

為革蘭氏_____菌，簡寫為(G__)

Staphylococcus aureus:

中文學名：_____

形狀：_____

顏色：_____

為革蘭氏_____菌，簡寫為(G__)

圖檔裁切後貼此

圖檔裁切後貼此

2. 細菌菌落數測試

| 稀釋倍數 | 菌落數 |
|------|-----|
| 10— | |
| 10— | |

計算：

回推樣本原液之細菌菌數=_____

3. 抗生素感受性測試

| 濃度 | 菌種 |
|----|--------------|
| | 抑制圈大小 (mm) |
| | 金黃色葡萄球菌/大腸桿菌 |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

五、討論

(請於課後三週內將報告電子檔 e-mail 到 wjyang@nuk.edu.tw)

檔名：學號+姓名；例如：1 號高大雄)