

[第4版]

# 微生物學實驗

方世華 · 吳禮字 · 李珍珍 · 洪千惠  
項千芸 · 劉昭君 · 賴志河 · 鍾景光 ■ 編著

Fourth Edition

Microbiology  
Selected Experiments

生命科學

Sciences

[第4版]

# 微生物學實驗

方世華 · 吳禮字 · 李珍珍 · 洪千惠  
項千芸 · 劉昭君 · 賴志河 · 鍾景光

■ 編著

Fourth Edition

Microbiology  
Selected Experiments

國家圖書館出版品預行編目資料

微生物學實驗 / 方世華等編著. — 第四版. —  
臺北縣中和市：新文京開發，2008.09  
面；公分

ISBN 978-986-150-916-7 (平裝)

1. 微生物學 2. 實驗

369.034

97013570

微生物學實驗（第四版）

（書號：B101e4）

---

|       |                                    |
|-------|------------------------------------|
| 編著者   | 方世華 吳禮字 李珍珍 洪千惠<br>項千芸 劉昭君 賴志河 鍾景光 |
| 出版者   | 新文京開發出版股份有限公司                      |
| 地址    | 台北縣中和市中山路二段 362 號 8 樓（9 樓）         |
| 電話    | (02) 2244-8188（代表號）                |
| F A X | (02) 2244-8189                     |
| 郵撥    | 1958730-2                          |
| 初版    | 西元 2000 年 10 月 15 日                |
| 第二版   | 西元 2001 年 8 月 31 日                 |
| 第三版   | 西元 2005 年 9 月 1 日                  |
| 第四版   | 西元 2008 年 9 月 1 日                  |

---

有著作權 不准翻印

建議售價：250 元

法律顧問：蕭雄淋律師

ISBN 978-986-150-916-7

# PREFACE 四版序

在基礎醫學中，微生物學是相當重要的一環，同時也是醫護相關科系學生必修的重要課程之一。而微生物學實驗則是讓同學體驗理論與實際操作結合的最佳方法。由於微生物學所教授的內容多為肉眼不可見的，因此實驗課程便更顯得格外重要。

現今坊間的微生物學實驗課本，內容生動、資料更是豐富，但如此多元化的實驗課程，對同學來說，無疑是一大負擔。在考慮醫學院學生必須修習許多課程的龐大壓力下，精選數個具代表性且精簡的實驗是必需的。本實驗課本是由本校微生物及免疫學的授課教師，在多年的授課經驗累積下，整理了數個較具代表性的實驗編輯成書。本書共分為六個章節 18 個實驗，內容涵蓋：微生物基本技術、細菌、病毒、黴菌、免疫與微生物遺傳學等實驗。希望在對於同學的實驗過程及疑惑的解答上，能有所助益。

雖然內容的安排與編輯歷經多次審核，但難免會有遺漏或不完整之處，尚冀先進不吝指正，以期更臻完美。

編著者 謹識

2008 年初秋

# CONTENTS 目錄

## ■ 實驗室安全規則和注意事項 1

### 第一章 概論與技術 3

---

- 實驗 1 環境中的微生物 4
- 實驗 2 細菌的接種 9
- 實驗 3 染色的方法 15
- 實驗 4 物理因子與化學因子對微生物的作用 21
- 實驗 5 抗生素感受性試驗 31
- 實驗 6 水中微生物的檢驗 37
- 實驗 7 牛奶中細菌的檢驗 41

### 第二章 免疫學實驗 47

---

- 實驗 8 沉澱試驗 48
- 實驗 9 凝集試驗 53

### 第三章 細菌學實驗 57

---

- 實驗 10 化膿性球菌 58
- 實驗 11 腸內桿菌科 67
- 實驗 12 結核分枝桿菌 73
- 實驗 13 白喉棒狀桿菌 81

## 第四章 黴菌學實驗 87

---

實驗 14 黴菌的培養與染色 88

## 第五章 病毒學實驗 93

---

實驗 15 噬菌體溶菌斑計數 94

實驗 16 血球凝集試驗與血球凝集抑制試驗 99

## 第六章 細菌遺傳學實驗 105

---

實驗 17 形質轉換 106

實驗 18 接合作用 111

## 參考資料 117

---

# 實驗室安全規則和注意事項

實驗室為了維護人員的安全和實驗品質，必須訂定安全規則，尤其是微生物學實驗室，因為所用的材料常為肉眼無法看見的致病性微生物(pathogen)，使用的儀器常需滅菌，操作方法需使用無菌操作法。因此在實驗進行中特別要小心謹慎，確實遵守實驗室安全規則和注意事項，以防止實驗材料受到污染(contamination)，並確保工作人員安全。

1. 每次實驗需著長及膝的實驗衣，以防受到污染或染劑染色至一般衣服。
2. 進入實驗室，需將外套、書籍及私人的物品放置在規定的位置。切勿將實驗不相關之物品放在實驗桌面上。
3. 進入實驗室和離開之前，需用消毒劑（70%酒精或 2%來舒(Lysol)）將桌面擦拭消毒。做完實驗後，徹底清洗雙手。
4. 在實驗過程中如有需要，請將門窗關閉，以防受到空氣的污染。
5. 實驗室內酒精燈或各種儀器在使用之前須先瞭解使用方法。
6. 嚴禁在實驗室內大聲喧嘩、抽菸和飲食。
7. 萬一有任何物品受到細菌污染，應趕快通知老師或實驗室的專職人員做適當的處理。實驗操作時注意個人衛生習慣與安全，以避免自己或他人受到污染。
8. 嚴禁將實驗室內培養基、菌種及器材攜帶外出。實驗室其他物品勿隨意觸摸或移動，以免發生污染或意外。
9. 接種環(loop)、接種針(needle)和玻璃吸量管(pipette)勿隨意置於桌面上。接種環和接種針使用前後一定要用火熾燒滅菌，置於架上。玻璃吸量管使用完畢要放入含有漂白劑的吸量管桶內。
10. 實驗完畢，所有的培養液和器材應置於各指定的位置。液體嚴禁倒入水槽，所有欲丟棄的物品需滅菌處理後才能丟棄。



11. 每次應安排一組人員輪值，負責分發實驗用品。實驗結束後，各組應將桌面清理乾淨，輪值人員應負責最後實驗室的清潔及物品、椅子和空調等復原工作。
  12. 實驗結果須於隔天觀察者，應準時至實驗室記錄觀察結果。
  13. 實驗分組以四人為一組，請照學號順序排列，每組分發一支油性簽字筆，請在每次實驗課帶來以便標記實驗組別等。
-



# 概論與技術 |

- 實驗 1 環境中的微生物
- 實驗 2 細菌的接種
- 實驗 3 染色的方法
- 實驗 4 物理因子與化學因子  
對微生物的作用
- 實驗 5 抗生素感受性試驗
- 實驗 6 水中微生物的檢驗
- 實驗 7 牛奶中細菌的檢驗



Microbiology-  
Selected Experiments

# 環境中的微生物

(Bacteria in Environment)

微生物(microorganism)乃指一群微小的生物，它們分布的範圍非常廣，可以說幾乎無所不在，例如空氣中、食物中、日常生活的各項器具上等，與我們的生活息息相關。但是，由於它的體積非常小，無法以肉眼觀察，所以常被人所忽略。本實驗即藉由培養基中細菌菌落(colony)狀況可以瞭解環境中微生物分布的情形。

## 一、目的

1. 讓同學瞭解實驗室的空氣及口腔中的微生物分布情形。
2. 瞭解日常生活中，如何正確的洗手以去除微生物，並加強衛生觀念。
3. 培養同學無菌操作的觀念與技術。

## 二、實驗材料

1. 四片營養培養基平盤(nutrient agar plate)，營養培養基成分包括：
  - (1) 牛肉萃取物(beef extract, 1%)
  - (2) 蛋白胨(peptone, 1%)
  - (3) 氯化鈉(NaCl, 0.3~0.5%)
  - (4) 洋菜膠(agar, 1.5%)
2. 無菌衛生紙（包於白報紙內）

## 三、實驗步驟

1. 空氣中的細菌（落菌試驗）
  - (1) 自由選擇實驗室的一個角落。
  - (2) 打開培養皿的蓋子，在空氣中暴露 30 分鐘。
  - (3) 蓋上蓋子。

## 2. 口腔中的細菌（飛沫試驗）

- (1) 打開培養皿的蓋子，將培養基面向一位同學的嘴巴。
- (2) 請這位同學直接咳嗽。
- (3) 蓋上蓋子。

## 3. 洗手前後的細菌（洗手試驗）

- (1) 先在培養皿底盤劃一條線將其分為兩部分(W; N)。
- (2) 在洗手前，以一根手指在 N 部位的培養基上，輕作 Z 字型劃線後，蓋上蓋子。
- (3) 同樣的請這位同學以肥皂或消毒水洗手，洗手方式不拘，需予以記錄。
- (4) 洗淨後，用無菌的衛生紙擦乾，以步驟(2)中相同的一根手指，再於 W 部位的培養基上輕作 Z 字型劃線。
- (5) 蓋上蓋子。

## 4. 對照組（不做任何處理）

5. 將以上四組培養皿倒置(agar side up)，並放入 37°C 的培養箱中，18~24 小時後觀察結果。

## 四、注意事項

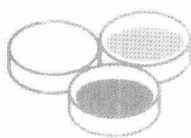
1. 配置培養基時，以洋菜膠為凝固劑，而不用澱粉，因為大部分的細菌會分解澱粉而不會分解洋菜膠。
2. 做口腔中的細菌實驗時，培養皿必須垂直的面向嘴巴，乃避免空氣中落菌的因素影響實驗的結果。
3. 洗手後需先擦乾，以避免液體留在培養基上，造成細菌的流動，而無法看到菌落的形成。



## 五、觀察結果

1. 觀察並記錄菌落的大小、數目、形狀及顏色等特點。
2. 比較各組實驗結果的差異性。

# 實驗報告



系所：

姓名：

學號：

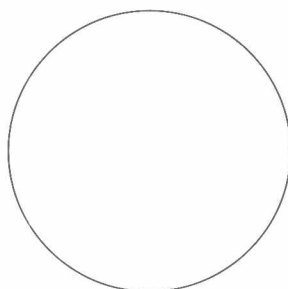
實驗

## 結果紀錄

1. 繪圖並描述所觀察到的菌落，請將結果填於下表。

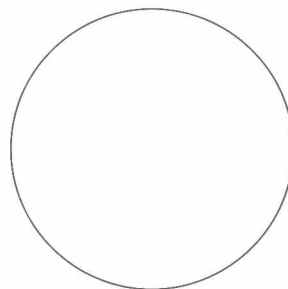
(1) 空氣中：

\_\_\_\_\_



(2) 口腔中：

\_\_\_\_\_

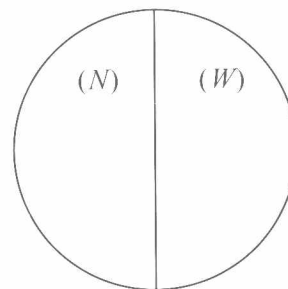


(3) 洗手前：

\_\_\_\_\_

洗手後：

\_\_\_\_\_



(4) 對照組：

\_\_\_\_\_



2. 請與其他組別比較結果的差異。

## 問題討論

1. 比較洗手前後的結果，並加以討論可能的原因。
2. 若想知道不同形態的菌落是何種細菌，應如何做進一步的實驗？
3. 平盤培養皿放入 37°C 的培養箱時，需要倒置，試解釋其理由。

## 細菌的接種

(Inoculation of Bacteria)

臨床上許多由細菌引起的疾病，在採取治療步驟之前，必須先找出致病菌，才能對症下藥。所以，菌種的分離與純種培養(isolation and pure culture)是臨床微生物學實驗中最基本也是最重要的技術之一。近年來，細菌遺傳學及分子生物學的研究發展中，由於細菌之基因簡單易控制，且繁殖速率快，已成為不可或缺的材料之一。因此，如何針對不同的實驗目的，選擇培養基的形態及成分，並正確地接種，才能成功地分離、培養及鑑定細菌，即是本實驗的目的。

### 一、目的

1. 讓同學瞭解如何針對實驗的需要，選用不同形態的培養基。
2. 練習不同接種方式。

### 二、實驗材料

1. 一般所指不同形態的營養培養基，其主要成分完全相同（如前章所述），分類上乃依其所含洋菜膠(agar)之百分比，分為固態培養基(solid medium，約含 1.5% 洋菜膠)、半固態培養基(semi-solid medium，約含 0.65~1%洋菜膠)及液態培養基(liquid medium，又稱 broth，不含洋菜膠)。
2. 固態培養基可再依需要而分裝在塑膠培養皿(petri dish)，稱之為平盤培養基(plate)，或試管中，形成一斜面，稱之為斜面培養基(slant)。
  - (1) 平盤培養基適用於菌種分離(isolation)、純種培養(pure culture)、計算菌落數目(colony count)及水質檢測時的傾倒平盤法(pour plate)等項目。菌種分離時的接種方式稱為四區劃分法(streaking method)。以接種環(loop)取菌，先在培養基其中約四分之一部分作 Z 字型連續劃線（如圖 2-1(a)）後，將接種環燒紅，待冷卻後，再由第 I 區劃出到第 II 區（圖 2-1(b)），重複相同





的步驟，完成第 III 區與第 IV 區的接種（圖 2-1(c)、(d)），各區間隔約 90 度角。

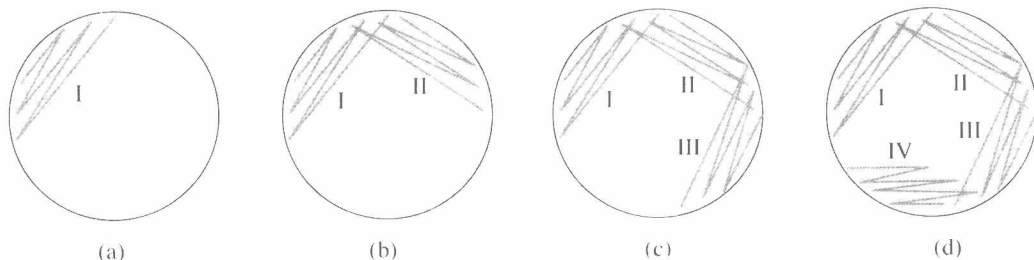


圖 2-1 菌種分離法

- (2) 固態培養基置於試管中常製備成斜面，以增加接菌面積，適用於菌種保存、運送及生化試驗。以接種環取菌後，在斜面上作蛇形劃線（如圖 2-2(a)）。另外，也可以接種針取菌後，在斜面上作蛇形劃線，同時進行穿刺（如圖 2-2(b)）。

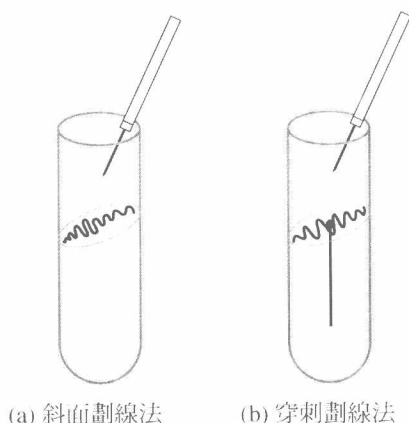


圖 2-2 斜面培養基的接種方法

3. 半固態培養基適用於菌種之生化特性檢驗。例如：觀察細菌發酵醣類的情形、是否產生氣體及運動特性等現象。接種方式稱為穿刺法(stabbing method)，以接種針(needle)為工具，使用原則與接種環相同，即需先經加熱滅菌，冷卻後再取菌，直接插入培養基約三分之二深，再依原路徑抽出接種針（如圖 2-3）。



圖 2-3 半固態培養基的接種方法

4. 液態培養基適用於瞭解細菌生長曲線圖及大量培養細菌時。接種方法可用接種環或接種針取菌後，直接伸入培養基中，輕輕攪拌(stirring)即可。
5. 菌種：金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (標記為“S”)。  
大腸桿菌(*Escherichia coli*) (標記為“E”)。

### 三、實驗內容

1. 每組分得：
  - (1) 一片平盤固態培養基
  - (2) 兩管斜面固態培養基
  - (3) 兩管半固態培養基
  - (4) 兩管液態培養基
2. 依上述之接種方式進行接種，再放入 37°C 的培養箱，隔夜培養。

### 四、注意事項

1. 做平盤固態培養基接種時，蓋子半開，或靠近酒精燈周圍，以免空氣落菌影響結果。
2. 做試管內接種時，接種環或接種針不可碰到管口，以免雜菌污染。