

微 生 物

實 習 報 告

班級：

組別：

學號：

姓名：

實 驗 六

微生物的分離
及 接 種 法

一 實驗目的

- ◆ 細菌的純系化分離的原理是讓細菌都能適當地在固體培養基上分開，使每一隻細菌可以單獨繁殖形成一群細菌，稱為菌落 (Colony)。然後再從這個菌落中，將純一單種細菌保留繁殖起來。
- ◆ 至於接種的原理是依照微生物對氧氣及溫度需求的不同。而將經純系化分離的各種不同菌株分別接種到液體，洋菜斜面、深層、半固體及平板中，並將它放入微生物最適宜溫度中培養，以增進微生物的快速生長及繁殖。

二 前言

- ◆ 細菌在自然界中很少以單種存在，經常是很多種細菌群聚在一起。研究細菌的遺傳、生殖.....等，首先要得到純種的細菌。由混合的細菌標本中，將某一種細菌與其他種類的細菌完全分開，且將此純種細菌加以保存，使其單獨在培養基中生長繁殖，此謂之細菌之純系化分離。

1. 微生物的分離(The isolation of microbes)

在自然界中，大部分發現到的微生物不是單獨的生長，而是很多不同的微生物一起生長。在微生物的研究上，由於混合的微生物很難表現出單一微生物的特性，因此在研究中，微生物需要純系化菌株 (pure culture)。純系化菌株是為研究微生物的特性、致病性、代謝作用及抗體的感受性，而做僅只含有單一微生物菌株的培養法。因為微生物太小，無法經由微細操作設備直接分離而純化它。

李斯特 (Lister) 於 1870 年，希望能從一系列的稀釋液中得到純系化細菌。理論上雖然可行，但成功率很有限，經常在菌液中得到了一些不想要的細菌。

柯霍 (Koch) 於 1880 年製造固態培養基，細菌就可在固態培養基上被分離稀釋出來。經由培養基的培養，一個單離的細菌生長為一個菌落 (Colony)，此菌落僅包含一種細菌。

目前有三種常用的稀釋法用於分離細菌。

- (1) 劃線平板分離法 (streak plate)：使用接種環將混合細菌樣品，在固體培養基的表面上作多次的劃線。理論上，接種環在洋菜表面重複劃線時，細菌會一個一個掉落，每個細菌經培養後形成菌落。此分離法為目前最常用的方式。
- (2) 塗抹平板分離法 (spread plate)：將預先稀釋的細菌樣品，用無菌的塗抹 (彎曲的三角形玻璃) 在固體洋菜培養基表面塗開。
- (3) 混合倒皿分離法 (pour plate)：取出少量經多次稀釋細菌樣品，加到含有熔融洋菜培養基的試管中，經充分混合後，倒入培養皿中，使培養皿中有單離的菌落產生。

2. 微生物的接種 (The transference of microbes)

用於研究及鑑定細菌的特性，一般單一純系化的多量細菌呈現的特性比單一細菌為好。因此在細菌學研究中，如何使用物質及方法，讓單一細菌生長及增殖，是最重要也是最基本的要求。培養基為以人工方式營造一個適合細菌生長的營養環境。依照接種使用方式的不同而將培養基放入試管、三角瓶或螺蓋瓶中三種方法。

至於一般接種的類型，大致可分為下面五種。

- (1) 液體接種：純系化的菌株接種在液體培養基裡。
- (2) 洋菜斜面接種：於試管中存放約 5 mL 的固體培養基，經熔融及冷卻後形成斜面。純系化的菌株接種在培養基的表面上。
- (3) 深層接種：試管裡含有與管壁垂直的洋菜或明膠而成固化的培養基。接種時，接種針從培養基的中心垂直插入。
- (4) 半固體接種：細菌生長於含 0.5-0.7% 洋菜的培養基中，以增加培養基的黏性。接種時，接種針從培養基的中心垂直插入。
- (5) 平板接種：
 - i 劃線平板接種:為了研究菌落形成的情形，或混合菌株的分離情形，將純系化菌株劃線於平板上。
 - ii 混合倒皿接種:菌株加入到含有熔融的洋菜培養基試管中，在倒入培養皿之前，震動試管使其均勻。使用此法建議作一系列之稀釋及混合倒皿。
 - iii 塗抹平板接種:將純系化菌株加入到固體洋菜平板培養基表面上，並以塗抹棒將其均勻的塗抹於培養基表面。

3. 微生物的培養 (The incubation of microbes)

在鑑定研究時，除某些特殊培養基之外，菌株應該恆溫於最適溫度 (Optimum temperature)。若菌株檢測運動性及鞭毛形式時，其恆溫的溫度應比最適溫度再低 3-5°C 中培養。在研究腐敗性菌株時，恆溫的溫度需為食物推薦或預測的儲藏溫度。平板培養基正常應被翻轉過來 (底面朝上)，防止冷凝的水掉到生長的細菌上。

三 實驗材料及設備

- ◆ 酒精燈 1 個/組。
- ◆ 95% 酒精 200 mL/組。
- ◆ 試管架 1 個/組。
- ◆ 接種環或針 1 支/組。
- ◆ 培養皿含有營養洋菜培養基，9 片/組。
- ◆ 含 9mL 無菌磷酸緩衝溶液，9 支/組。
- ◆ 含有 6 mL 斜面營養洋菜培養基 (6 支/組、+ 3 支/組) x 12 組。
- ◆ 含有 6 mL 半固體營養洋菜培養基，3 支/組。
- ◆ 含有 6 mL 營養培養液，3 支/組。
- ◆ 油性簽字筆，1 支/組。
- ◆ 菌種：金黃色葡萄球菌(*Streptococcus aureus*)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。

四 實驗藥品

- ◆ 液體培養基：營養培養液 (Nutrient Broth, NB)。
- ◆ 半固體培養基：0.5% 軟洋菜運動性試驗培養基 (Motility Test Medium, MT)。
- ◆ 固體培養基：營養洋菜培養基 (Nutrient Agar, NA)。

五 實驗步驟

1. 劃線分離法

平行減少劃線法

- (1) 接種環於酒精燈上垂直燒到赤紅，並維持 10 秒後，冷卻 10 秒，或於取菌前先在培養基上接觸使冷卻。
- (2) 用無菌接種環在細菌樣品上輕抹菌落表面取微量細菌，在培養基上輕輕劃 3-4 條平行線，此為 A 區。劃好後，

接種環立即在酒精燈上輕彈三下以滅菌。

- (3) 將培養皿轉 90 度，從 A 區中引 3-4 條平行線，而得到 B 區。劃好後，接種環立即在酒精燈上輕彈三下以滅菌。
- (4) 將培養皿再轉 90 度，又如上述 (3) 的步驟重複實施，而得到 C 區。劃好後，接種環立即在酒精燈上燒到赤紅，並維持 10 秒以滅菌。
- (5) 在培養皿底部標示組別、細菌樣品名稱或編號及日期。
- (6) 將培養皿翻轉底部朝上，放入 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的恆溫箱中。

平行減少劃線法

- (1) 接種環於酒精燈上垂直燒到赤紅，並維持 10 秒後，冷卻 10 秒，或於取菌前先在培養基上接觸使冷卻。
- (2) 用無菌接種環在細菌樣品上輕抹菌落表面取微量細菌，在培養基上往復劃線，使菌落裡的細菌分散後得到 A 區。劃好後，接種環立即在酒精燈上輕彈三下以滅菌。
- (3) 將培養皿轉 90 度，接種環從 A 區將分散的細菌引一條線到培養基無菌處繼續劃蛇行線，得到 B 區。劃好後，接種環立即在酒精燈上輕彈三下以滅菌。
- (4) 將培養皿再轉 90 度，在如上述 (3) 的步驟重複實施，而得到 C 區。劃好後，接種環立即在酒精燈上燒到赤紅，並維持 10 秒以滅菌。
- (5) 在培養皿底部標示組別、細菌樣品名稱或編號及日期。
- (6) 將培養皿翻轉底部朝上，放入 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的恆溫箱中。

2. 稀釋分離法：用於困難單離的細菌

- (1) 接種環於酒精燈上垂直燒到赤紅，並維持 10 秒後，冷卻 10 秒，或於取菌前先在培養基上接觸使冷卻。
- (2) 用無菌接種環在細菌樣品上輕抹菌落表面取微量細菌，放入

9 mL 無菌磷酸緩衝溶液中。將試管放到試管震盪器，使管內產生三次漩渦後停止，得到試管 A。

(3) 以無菌的 1.0 mL 量管吸取 1.0 mL 上述菌液，放入另一含有 9 mL 無菌磷酸緩衝溶液之試管中，將試管放到試管震盪器，使管內產生三次漩渦後停止，得到試管 B。

(4) 重複 (3) 步驟，得到試管 C。

(5) 個別由試管 B、C 中吸取 0.1 mL 菌液，放入平板營養洋菜上作塗抹。

(6) 在培養皿底部標示組別、細菌樣品名稱或編號及日期。

(7) 將培養皿翻轉底部朝上，放入 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的恆溫箱中。

3. 試管對試管接種法

斜面接種法、深層接種法、半固體接種法及液體接種法。一般用於菌種保存及生化特性的測定。

(1) 將接種針或接種環畫於本生燈（或酒精燈）火燄最熱部分，使接種環全部灼紅維持 10 秒，冷卻之。儲存細菌試管與欲接種試管置於不拿接種環的手掌中，並以大拇指將二試管分開成 V 字形。

(2) 以持接種環之一手，藉其小指與中指之指間，分別夾住二支試管之管筆，並將其提取（勿將管蓋置於實驗畫上）。管頸則輕輕通過火燄。次將接種環伸入儲存細菌試管內，並輕觸無菌之試管內壁，使再度冷卻。

(3) 以接種針或接種環勾取接種物 (inoculums) (依培養基而定，如為培養液一般使用接種環，若為洋菜斜面培養基，則二者均可使用)。勾取時以接種針或接種環輕觸生長處之表面即可，勿挖取洋菜 [如自液體或固體培養移種至洋菜深層試管 (agar deep tube)，則以接種針為宜)。

(4) 將攜有細菌之接種針或接種環插入欲接種之試管內劃線。

如為培養液，將接種環於培養液內輕輕振動使細菌進入培養液內。若為洋菜斜面 (agar slant) 培養基，則於斜面上劃一直線或呈鋸齒狀劃線。接種洋菜深層試管，可將接種針以直線狀垂直插入管底，而後沿穿刺線抽出。

- (5) 接種後移開接種環 (或針)，管頸再通過火燄，依原次序上蓋。
- (6) 最後將接種針或接種環在酒精燈上燒到赤紅，並維持 10 秒以滅菌。
- (7) 將斜面培養基的試管放於試管架上，置於 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的恆溫箱中，恆溫 24 小時。
- (8) 當細菌在斜面上生長後，以伸縮膠膜 (Paraffin film) 將螺蓋與玻璃試管密封，置於 11°C 的冰箱中冷藏。

4. 試管對平板接種法

將純系化的細菌，用經酒精滅菌的接種環以直線或蛇行的彎曲的方式，接種到平板培養基上，用以測定細菌的生化特性。

- (1) 將接種針或接種環置於本生燈 (或酒精燈) 火燄最熱部分，使接種環全部灼紅維持 10 秒，冷卻之。貯存細菌試管先置於不拿接種環 (或針) 的手掌中並以大拇指、食指及中指將試管夾緊。
- (2) 以持接種環之一手，藉其小指與無名指之指間，夾住試管之管蓋，並將其提取 (勿將管蓋置於實驗臺上)。管頸則輕輕通過火燄。次將接種環伸入儲存細菌試管內，並輕觸無菌試管之斜面培養基上，使再度冷卻。
- (3) 以接種針或接種環勾取接種物 (inoculum) 勾取時以接種針或接種環輕觸生長處之表面即可，勿挖取洋菜。
- (4) 勾取接種物後移開接種環 (或針)，管頸再通過火燄，依原次序上蓋後，將試管放回試管架上
- (5) 不持接種針的手掌將培養皿上皿握住，稍微將上皿往上提起。

- (6) 依照劃線分離的方法將勾取的接種物劃線在平板培養基上。
劃線後接種環（或針）在酒精燈上燒到赤紅，並維持 10 秒以滅菌。
- (7) 將培養皿翻轉底部朝上，放入 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的恆溫箱中，恆溫 24 小時。
- (8) 觀察並紀錄之。

六 結果

七 討論

八 問題



四 參考文獻

- ◆ 方式華、吳禮字、莊榮豐、項千芸、劉昭君、鍾景光。微生物學實驗。新文京開發出版股份有限公司。台灣，中和。
- ◆ 吳全耀、吳黃素月。2003。普通微生物實驗。九州圖書文物有限公司。台灣，台北。
- ◆ 陳幸臣。2003。食品微生物學實驗法。華香園出版社。台灣，台北。
- ◆ 陳彩雲、江春梅。食品微生物實習。台灣復文興業股份有限公司。台灣，台南。