

無菌操作及細菌的接種

一·實驗前思考

每張人民幣細菌2.5萬個 具有耐藥性

上班族在買早餐時，當店主接過錢將早餐遞過來的瞬間，是否想過在這個過程中會有細菌的傳播，而載體正是人們習以為常的紙幣。

用卡增多 紙幣細菌減少

北京化工大學教授兼生命科學與技術學院院長袁其朋介紹，香港城市大學一項早年針對亞洲數個國家鈔票衛生的實驗中發現，人民幣的紙幣細菌含量最多，數量多達每張 17.8 萬個，比第二名的香港的紙幣整整多出了 16 萬個。之後研究又發現人民幣細菌數量的明顯下降，與國人越來越多地使用銀行卡、信用卡有關。”據了解，澳元是世界上首先使用塑料布作為印刷材質的國家，傳播起來含菌量極低；日元中加入了大量磁石粉，抑制細菌滋生，且國民整體衛生習慣良好，但造價很高。

紙幣上的細菌喜熱潮 細菌易通過食物傳播

袁其朋介紹，研究發現紙幣污染程度隨氣候變化明顯，細菌喜愛高溫濕熱環境。人民幣上的細菌含量就表現出了明显的季节性，夏季細菌數最多。雖然人民幣細菌總數有所減少，但潛在致病菌污染情況仍比較嚴重，實驗顯示人民幣上大腸菌群、大腸桿菌、金葡菌、沙門氏菌最容易通過食物傳播。“更需引起關注的是，人民幣菌的耐藥性問題非常嚴重。”袁其朋表示，實驗中發現這些細菌對多種抗生素有高耐受率，越來越難被殺死。

◇ 報章來源：http://life.dayoo.com/health/201309/11/129782_32455716.htm

◇ 報章日期：2013 年 8 月 11 日

思考問題：

1. 你認識的細菌是什麼？

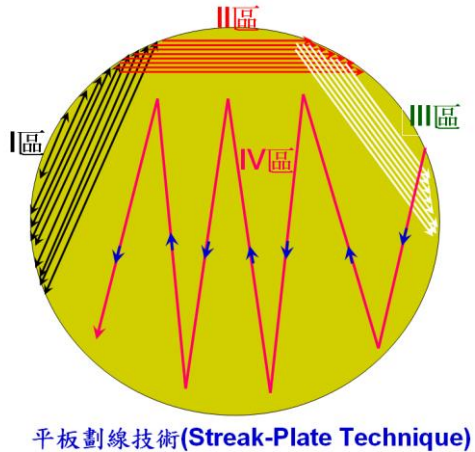
2. 細菌在我們的生活中無處不在，每種細菌都是對人體有害的嗎？

3. 菌落是怎樣形成的？我們怎樣觀測菌落的數目呢？

二·無菌操作簡介

2.1 實驗目的

- 學習基本的無菌操作觀念
 - 在處理已滅菌之製品時，避免介入微生物之污染
- 本次實驗讓學生練習平板畫線技術(Streak-Plate Technique)，分離單一菌落



平板劃線技術(Streak-Plate Technique)

2.2 實驗介紹

細菌分離

微生物體積小，屬於肉眼無法觀察的生物，所以利用微生物進行實驗時需先確認菌株為純種菌株 (pure culture)，因此可用固體培養基進行菌株分離 (isolation)。讓單一的細菌細胞長成單一的菌落 (colony)，最常使用的方法稱為畫線培養 (streak culture) — 將沾有菌種的接種環在培養基表面畫線，在畫線過程中，細胞逐漸分散，培養後形成單個菌落。純種菌株一般需定時活化，斜面培養法為最佳的方式。

無菌操作技術

無菌技術主要是避免培養用的無菌培養基、培養皿及其他實驗器具接觸到雜菌，

要完成此工作必須注意下列事項：

- 必須用消毒劑清潔工作環境，以減少可能存在的雜菌；
- 滅菌包應保持乾燥以避免毛細現象，並注意有效日期。
- 非無菌物應遠離無菌區 2 呎以上，勿對著無菌區談話、咳嗽、打噴嚏。
- 未經消毒之物品或手不可越過無菌面。
- 移殖工具必須無菌(例如：接種環在移殖前後用酒精燈燒一下以消毒)；
- 動作迅速並有效地完成以減少曝露的時間，因在那一段時間內培養基或研究人員可能會受到污染。
- 無菌和非無菌不可接觸，無菌物品懷疑污染時，視為非無菌應重新更換。

三·實驗原理及實驗材料

3.1 實驗原理

3.1.1 醇類

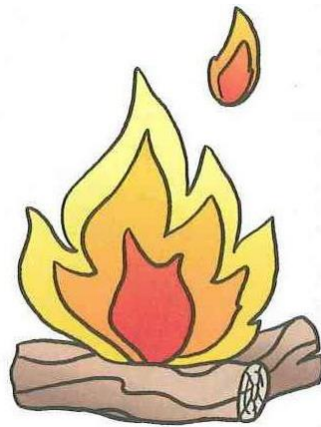
- 醇類為蛋白質變性劑，同時也是酯類的溶劑，並且醇類是具有脫水作用的脫水劑。
- 其作用機制包括 1)造成細胞膜蛋白的變性。
2)破壞細胞膜中的脂類物質。
3)且於脫水完全的狀況下，具有靜菌之功效。

3.1.2 高溫

- 高溫殺菌迅速、可殺害所有生物且能穿透一般化學滅菌劑所不能到達的位置。乾熱法的滅菌理論為導致細胞脫水、細胞內容質的沉澱以及大分子的氧化。
- 焚燒法常運用於移植環的滅菌。

3.1.3 實驗室內之無菌操作台

- 實驗室內之無菌操作台，利用高效率粒狀空氣濾網，以製造無塵、無菌的空氣。





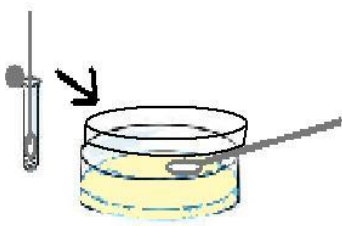


3.2 無菌材料

- 3.2.1 儀器： 平板培養基
接種環
酒精燈
石墨紙

菌種： 大腸桿菌 *Escherichia coli*

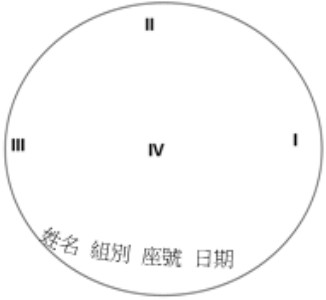
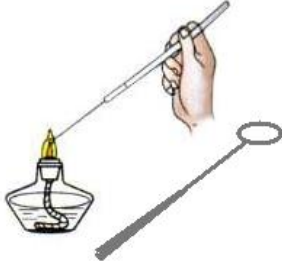
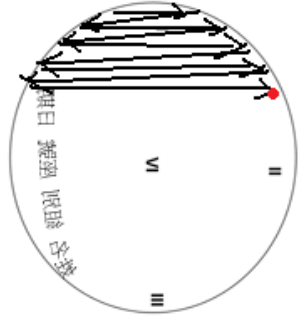
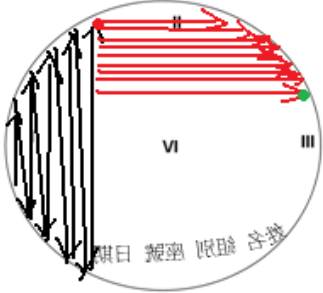
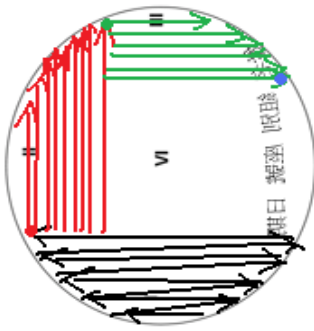
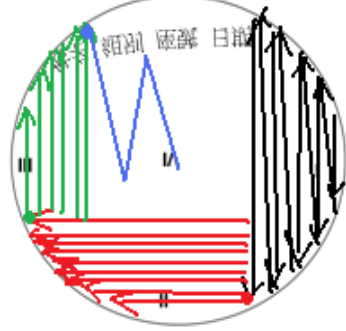
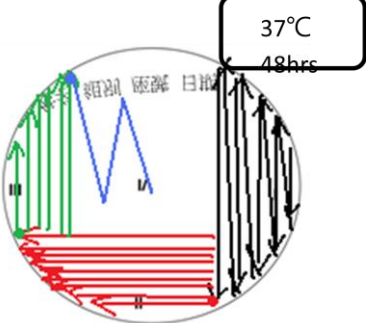
四· 實驗步驟

4.1 把菌落從一容器移植到另一容器之典型步驟如下：

		
操作步驟 1. 先把接種環燒一下	操作步驟 2. 打開試管的蓋子並把管口燒一下	操作步驟 3. 刮一些細菌細胞出來，並把它移到新鮮的培養基中；
		
操作步驟 4. 把試管管口再燒一次，然後把蓋子蓋上；	操作步驟 5. 把接種環再燒一下。	

4.2 平板畫線技術(Streak-Plate Technique)操作技術: **整個實驗應在酒精燈旁進行！**

1. 先將培養皿標示組別、座號、日期，另外逆時針標示三區（I、II、III，每一區大約差 60~90 度）及中間第四區 IV。
2. 將接種環前端的環區置於酒精燈上輕輕過火消毒，之後放於酒精燈旁冷卻（要確實冷卻）。
3. 以冷卻的接種環沾取一些菌落。打開培養皿，以接種環於第 I 區輕輕來回塗抹均勻（接種環盡量與培養皿成水平，比較不會劃破培養基），完成後蓋上培養皿。重覆步驟 2。
4. 打開培養皿，將培養皿逆時針轉約 60~90 度，自第 I 區的尾部，單方向畫線拖往第 II 區，大約劃 8-10 條線。蓋上培養皿。重覆步驟 2。
5. 打開培養皿，將培養皿逆時針轉約 60~90 度，自第 II 區的尾部，單方向畫線拖往第 III 區，大約劃 5-10 條線。
6. 培養皿再逆時針轉約 60~90 度，直接從第 III 區的尾部以 Z 字形拉線到第四區。重覆步驟 2。
7. 培養基在放置於 37°C 培養 48 h 後，觀察菌的型態、菌的分離情形。

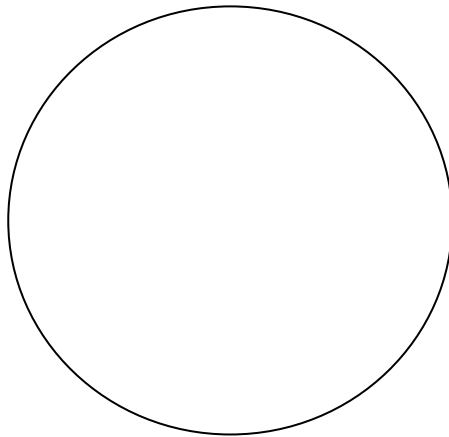
		
<p>實驗步驟 1.</p>	<p>實驗步驟 2.</p>	<p>實驗步驟 3.</p>
		
<p>實驗步驟 4.</p>	<p>實驗步驟 5.</p>	<p>實驗步驟 6.</p>
		
<p>實驗步驟 7.</p>		

五· 實驗後思考及討論

1. 試述酒精燈的用途。請解釋為什麼要在酒精燈旁進行實驗。

2. 假若在畫菌的過程中不再把接種環過火消毒，將會對實驗產生哪些影響？

3. 試繪畫出培養基上的細菌分佈情況。



4. 假若在畫線區外的地方有細菌生長，請說明原因。

六· 參考資料

- <http://openinfo.npust.edu.tw/agriculture/npus12/bb/ch4/agr2ch4.pdf>
- <http://www.wretch.cc/blog/ren961513/308485>
- http://sites.cjcu.edu.tw/biosci/Album_839.html