

2021 年第 32 屆中華民國生物奧林匹亞國手選拔營

微生物學與微生物生態學實作

材料及實驗設備：

A 實驗器材：	數量	B 藥品溶液：	數量
1. 載玻片	2 片	1. 培養於 42℃ 優格加益生菌樣品(0hr) (置於冰上)	1 管
2. p20 微量吸管	1 支	2. 培養於 42℃ 優格加益生菌樣品(3hr) (置於冰上)	1 管
3. p20 微量吸管尖	1 盒	3. 培養於 42℃ 優格加益生菌樣品(6hr) (置於冰上)	1 管
4. 拭鏡紙	1 包	4. 培養於 42℃ 優格加益生菌樣品(9hr) (置於冰上)	1 管
5. 無塵紙	1 盒	5. 結晶紫染液(crystal violet)	1 管
6. 計數器	1 個	6. 碘液(Lugol Reagent)	1 管
7. 計時器	1 個	7. 95%乙醇(Decolor Reagent)	1 管
8. 洗滌瓶	1 瓶	8. 番紅染液(Safranin)	1 管
9. 油鏡油	1 瓶	儀器：	1 管
10. 極細奇異筆	1 枝	光學顯微鏡	1 臺
11. 酒精棉片	1 片	加熱板(公用)	1 臺
12. 廢液杯	1 個		
13. 垃圾桶	1 個		

※ 請注意：

1. 桌上的材料及器材用完後，將不再補充。
2. 本試卷(含封面、試題卷)共 4 頁，於交卷時全部繳回。
3. 本試場作答時間共為 90 分鐘。
4. 請於本卷上作答，試題答案可寫至背面，但請註明並標上題號

一、背景介紹

優格 (yogurt) 是一種乳製發酵食品，人類食用優格已有數千年的歷史。許多科學研究顯示，優格中的乳酸菌類是對人類健康非常有幫助的益生菌。傳統的優格中含有許多不同種類的乳酸菌，屬於混合菌種的微生物發酵食品，有些乳酸菌可快速生長產生酸性物質，有些則可產生各種具有芳香氣味的代謝物質，造成優格的特殊風味。儘管優格的品類眾多，風味也各有特色，但通常都含有二種乳酸菌：球狀的嗜熱鏈球菌 (*Streptococcus thermophilus*, St) 以及桿狀的保加利亞乳酸桿菌 (*Lactobacillus bulgaricus*, Lb)。St 與 Lb 二種乳酸菌在發酵乳品的過程中，分別扮演了不同的角色，互相競爭又相輔相成。St 生長較快速並會代謝產生有機酸，使乳品的 pH 值下降，產生的二氧化碳也可促進 Lb 的生長；而 Lb 則可將醣類、蛋白質、以及脂質加以分解代謝，產生許多具有特殊芳香氣息的小分子代謝物。這也就是大家所熟悉具有酸味又有特殊氣息之優格風味的主要原因。

優格在發酵過程中，St 與 Lb 二種細菌會隨著培養時間的過程而發生消長的現象，二者細胞數目的比例也會產生變化。本實驗即在透過染色與顯微鏡觀察，比較不同培養時間的發酵樣品中，球菌與桿菌的比例變化情形。

二、實驗材料

培養於 42°C 不同時間的優格加益生菌樣品(0hr、3hr、6hr、9hr)、顯微鏡、油鏡油、載玻片、結晶紫染液 (crystal violet)、碘液、95%乙醇、番紅染液 (safranin)，加熱板、p20 微量吸管、拭鏡紙、無塵紙、計數器、計時器、洗滌瓶。

三、實驗步驟

1. 用 p20 微量吸管各取出(0hr、3hr、6hr、9hr)10μl 優格加益生菌樣品，在同一個載玻片上等距離上製作 4 個抹片。

考 號	0hr	3hr	6hr	9hr
	○	○	○	○

2. 進行格蘭氏染色，步驟如下：

- a. 塗抹完成後，載玻片寫上考號並拿至加熱板區，交由助教用加熱板加熱乾燥，待乾燥後由助教送回。
- b. 第 1 液 結晶紫染液(crystal violet)染色 1 分鐘，在廢液杯上用洗滌瓶從玻片正面最上面邊緣滴水，緩緩流過抹片即可移除多餘染劑(簡稱正面水洗)。
- c. 第 2 液 碘液(Lugol Reagent)染色 1 分鐘，從載玻片正面水洗。
- d. 第 3 液 95%乙醇(Decolor Reagent)脫色 20 秒，從載玻片正面水洗。
- e. 第 4 液 番紅染液 (safranin) 液染色 1 分鐘，從載玻片正面水洗。
- f. 將玻片放在無塵紙上，玻片上用另張無塵紙輕輕抵乾多餘水份。
- g. 觀察樣品，使用顯微鏡注意事項：

請先用掃瞄鏡(4X)找到要觀察的位置，再漸近調至 40 倍確認清晰度，向左轉開物鏡後滴 1 小滴油鏡油，再轉至 100 倍進行觀察。

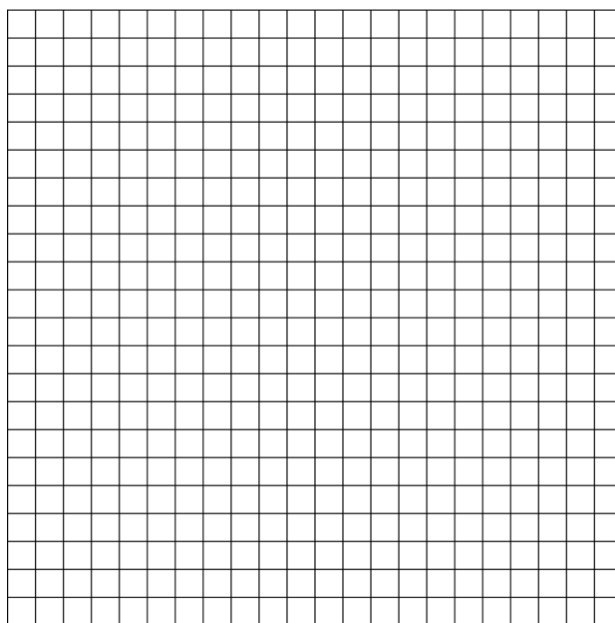
3. 任選一視野，計數球菌與桿菌的細胞數目，每一抹片須計數 3 個視野，取細菌細胞數目平均值。
4. 計算球菌：桿菌的比例
5. 於方格紙上繪比例曲線圖
6. 本試題作答完畢，確認載玻片已寫上考號並放在無塵紙上，試後由助教收取。
7. 實驗進行完畢(1)計數器歸零(2)請將酒精棉片打開，將多餘的酒精擠壓後，擦拭 40X 及 100X 物鏡上多餘的油漬再用拭鏡紙擦乾(3)桌面整理 (請確實做完！否則扣分)

四、實驗結果與討論

1. 填寫數據 (30%)

小時 細胞數目		0hr			3hr			6hr			9hr		
球菌 細胞數目	計數 3 個視野												
	每一視野下 平均數目												
桿菌 細胞數目	計數 3 個視野												
	每一視野下 平均數目												
球菌：桿菌比例													

2. 製圖 (20%)



3. 請敘述你的實驗結果如何？ (25%)

五、問題

1. 除了培養時間外，你認為還有哪些因素會影響球菌與桿菌的消長現象？請一一列出並加以討論。(15%)
2. St 與 Lb 分別為格蘭氏陽性菌或陰性菌？(5%)
3. 何謂益生菌？除了乳酸菌外，請任舉出一益生菌的例子。(5%)