1. 計算生菌數

本文版權沒有，歡迎使用　2012-01-02
開南大學保健營養學系 江易原 編輯

操作

1. 請取回上週各組的培養皿。可以使用菌落計數器 (有放大鏡與背光燈)，配合奇異筆進行計算。或是直接使用奇異筆點算菌落。[經驗上可以直接計算，未必需要計數器]
2. 挑選菌落數在 30~300 之間的培養皿的，將二重複培養皿的菌數平均後，按照其稀釋度，推算原始的生菌數。
3. 觀察 colonies 的外觀是否相同？各組可以將 colonies 取出，使用簡單染色後，在顯微鏡下觀察。

2. 傾注平板法（pour plate）簡介

說明：

上次介紹塗布法，將樣品經過 serial dilution 後塗在培養基上，等長出菌落後就可以算 CFU 並推算原樣品的生菌數。本實驗一樣需要經過 serial dilution，倒入培養基，等長出菌落後計算生菌數。

操作：

1. 每組發給六支滅過菌的稀釋液 (0.85% NaCl, sterile)，請將樣品 (一般優酪乳或是稀釋型乳酸飲料) 進行 serial dilution。[請參考上次課程的操作技巧]
2. 每組發給 12 個全新無菌培養皿 (六種稀釋度，二重複，共 12 個)，請標上組別、樣品名稱以及稀釋度 (-1 ~ -6)。
3. 每種稀釋液取 0.1 mL，滴在全新的培養皿 (二重複)。
4. 請先調整好實驗桌上的空間，因爲倒完培養基後，需要靜置數分鐘，等待凝固，過程中請避免移動培養皿。
5. 請向老師或助教領取融化態的培養基 (45℃) 共 200 mL，分批倒入加有稀釋樣品的培養皿中，溫和的混勻培養基與稀釋液 (請勿過於激烈，以免培養基濺出)。

   [教科書會告訴大家，應該將培養基分裝試管中，每隻試管的融化態培養基剛好倒一個培養皿。但是爲了簡化實驗，感謝李老師的建議，我們使用之前微生物實驗製備培養皿的方式]

   [技巧很簡單，慢慢倒，當液體蓋住 80-90%的面積時就停止，接下來寄行混勻的動作]
6. 約 48~72 小時之後可以計算生菌數。

3. 酵母菌計算菌數與測吸光值實驗簡介

說明：

本實驗將使用分光光度計 (spectrophotometer) 對不同濃度的酵母樣品測量吸光值，以及使用血球計數器 (hemocytometer) 計算酵母菌的數量。之後作圖找出吸光值與菌數之間的相關。

測吸光值 (OD600)

實驗室有一台 Thermo Genesys6 spectrophotometer

1. 由助教或是老師開機後設定在 600 nm，並使用 blank 歸零。
2. 每組將所發到的樣品 (在 8 mL 的螺紋試管中)，確定蓋子蓋緊後，先使用試管振盪機將樣品混合均勻。
3. 進行測量，並記下所測的數值。(請見示範)

使用血球計數器

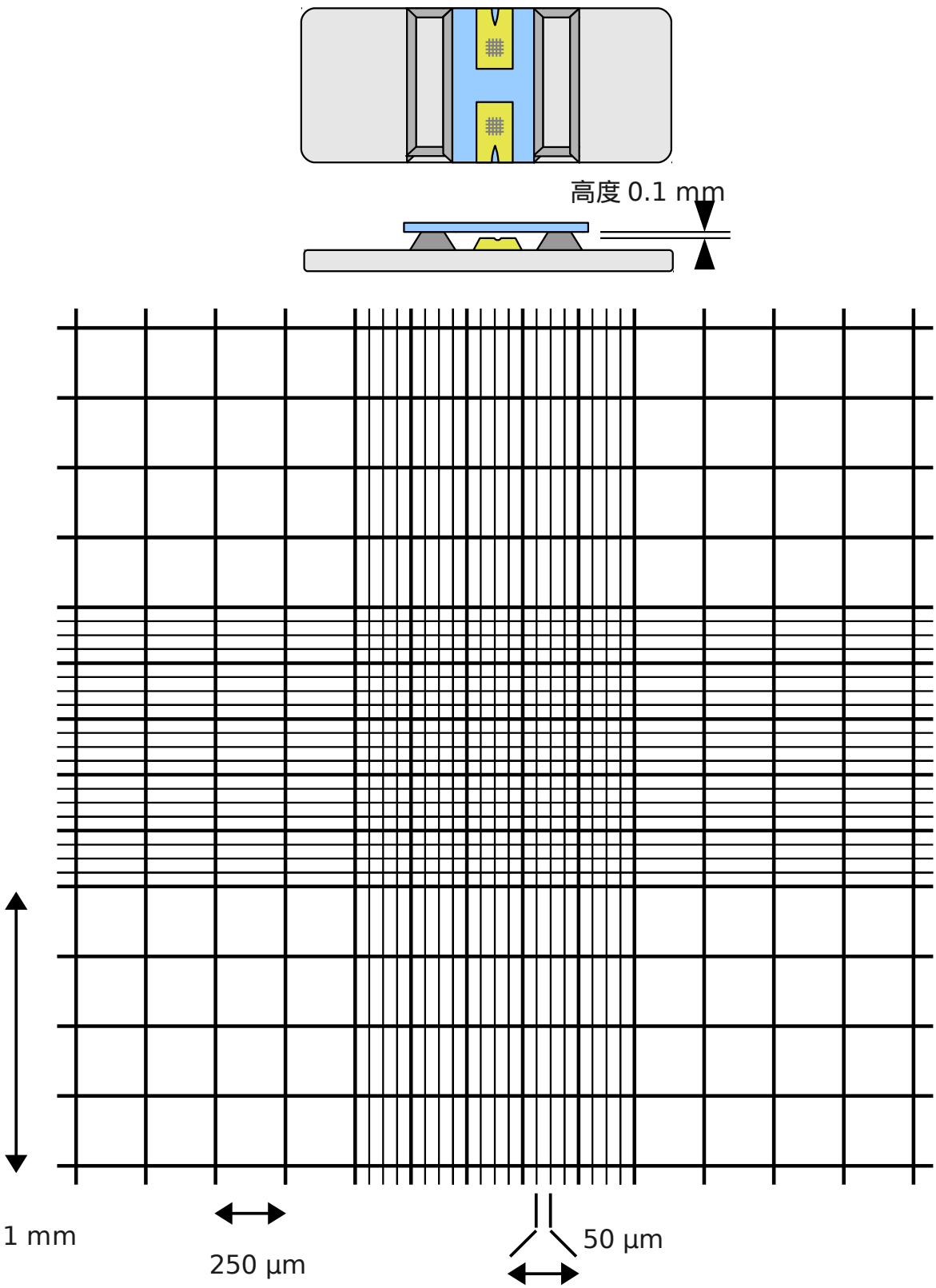
目前實驗室購買兩個血球計數器，又因爲在換到 40 倍物鏡時，容易壓破蓋玻片，因此要小心進行 (請配合老師或是助教的操作)

1. 爲了漸少壓破蓋玻片，此處我們將一般操作程序進行修正。一般程序是放上玻片才加上樣品 (或者先加上樣品才放上玻片)。再來放到顯微鏡，由最低倍率的物鏡 (4X) 對焦後，開始調到 10X 以及 40X。
2. 這裡我們進行修正，先將血球計數器放上到顯微鏡，先進行對焦 (4X 及 10X)，使用 pipette 及 yellow tip 取 0.1 mL 的樣品 (先使用試管振盪機將樣品混合均勻)，加到觀察區，小心放上蓋玻片，切換到 40X 物鏡進行對焦。
3. 此時會看到網格 (請參考下頁講義)，請算出五格的酵母菌 (在格子中，酵母壓在格子的上線以及右線要算，而下線及左線則不算)的菌數，然後推算出每毫升的菌數 (請注意，這是總菌數，但不是所有的酵母都是活著的)

找出兩者的相關性 (建立檢量線)

因爲使用分光光度計測量微生物的濁度可以不用開啓樣品 (以減少污染的可能)，是種很快速方便的方法，但是需要跟菌數先做圖，找出相關性

1. 各組回報所測定的 OD600 與計算的菌數。
2. 使用軟體進行做圖並找出相關性。



使用公分爲單位 (一毫升是一立方公分)，因此最小的方格的體積是：

0.1 mm * 50 µm * 50 µm → 0.01cm * 0.005 cm * 0.005 cm = $2.5*10^{-7}$ cm^3

在放大 400 倍下，取 5 個最小方格計算酵母菌的數量，並推算體積爲一毫升時的菌體數量。