

1. 計算 pour plate 實驗之生菌數

計算方式與上週的實驗方法相同

1. 登記到上次的實驗紀錄，並討論相同樣本但不同組的生菌數有何不同？學生實驗的結果與廠商宣稱的生菌數有何不同？為何可能有這樣的誤差？
2. 觀察 colonies 的外觀是否相同？尤其是實驗飲料有兩種以上的菌種，就肉眼觀察外觀是否會有不同？
3. 請觀察生長在表面與嵌在培養基內部的 colonies 有何不同？可以使用顯微鏡取出染色後觀察。
4. 使用顯微鏡觀察：各組可以將 colonies 取出，使用簡單染色後，在顯微鏡下觀察。
提示：這次都是 Lactobacillus 屬的乳酸菌，可能是什麼形狀？

2. 計算酵母菌菌數與吸光值實驗簡介

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。

A. 測吸光值 (OD600)

實驗室有一台 Thermo Genesys6 spectrophotometer

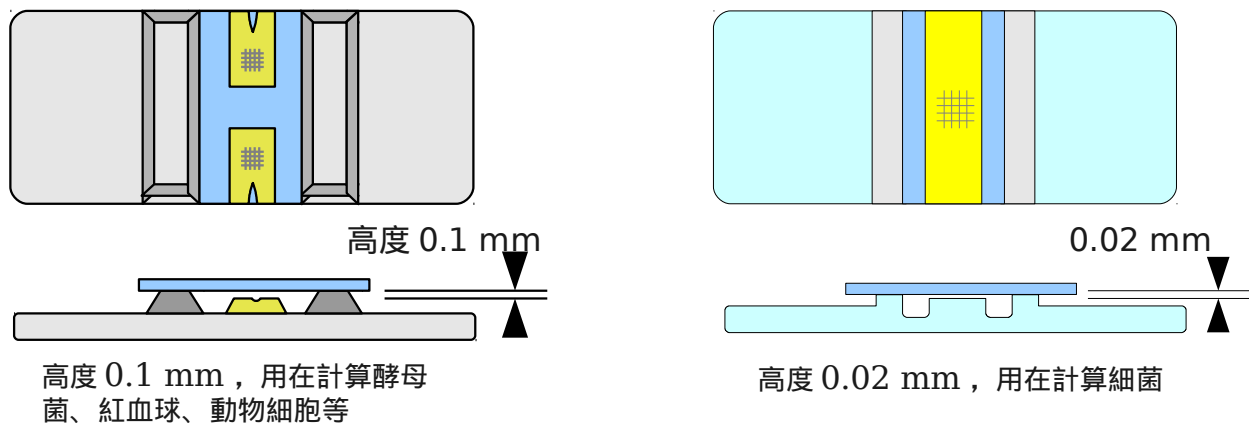
1. 由助教或是老師開機後設定在 600 nm，並使用 blank (在此使用自來水)進行歸零。
2. 每組將所發到的原始樣品 (在 100 mL 燒杯中，市售的酵母加水)，進行不同濃度的樣品製備。
3. 每組發給 5 隻小試管，容積是 8 mL。要測量只要 3 mL 就夠了，所以該如何配置不同濃度的樣本？
4. 測量前請使用試管振盪機混勻，並記下所測的數值。(請見示範)

B. 使用血球計數器

實驗室有兩個血球計數器，又因為在換到 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. 為了漸少壓破蓋玻片，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)、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)，取下來 (請不要動到升降台，以免找不到適當的教據)。
3. 使用試管振盪機將樣品混合均勻。取下血球計數器，小心放上蓋玻片，使用 pipette 及 yellow tip 取 0.1 mL 的樣品，從側面的缺角加到觀察區，放回顯微鏡，切換到 40X 物鏡小心進行對焦。

4. 此時會看到網格 (請參考下頁講義), 請算出五個邊長為 $200\ \mu\text{m}$ 的方格的酵母菌, 每個 $200\ \mu\text{m}$ 的正方格含有 16 個邊長為 $50\ \mu\text{m}$ 的小方格。
 1. 在格子中, 酵母壓在格子的上線以及左線要算, 而下線及右線則不算的菌數
 2. 計算左上、左下、右上、右下、中央的總菌數, 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)
5. 可以使用染料 methylene blue 進行染色及觀察。



C. 建立檢量線 (找出兩者的相關性)

檢量線是非常重要的觀念, 各領域科學中常會用到, 而且觀念不難, 有如國中學到數學函數的觀念。重點在找出兩者之間不同量的相關性, 建立回歸線, 以便日後使用內差法推算未知的樣品。因此學會檢量線的觀念, 其他領域都可以應用。

本實驗目的是由血球計數器所得的菌數, 與使用分光光度計所測得的數值, 建立找出兩者的相關性。因為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 (一切就緒, 測量一個樣品只要幾秒鐘), 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。一般常用的是線性回歸。在微生物, 可以將菌數取 log 值之後進行回歸計算。

1. 計算左上、左下、右上、右下、中央的總菌數
2. 若有壓線，上線以及左線要算，而下線及右線則不算

