

中華民國第四十五屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科

040714

乳酸菌的牛奶浴-與胃酸、膽汁共舞

國立武陵高級中學

作者姓名：

高二 張恩慈 高二 余思嫻 高二 蕭宇珊
高二 巫泓憲

指導老師：

許根火 黃教銓

中華民國第四十五屆中小學科學展覽會

作品說明書

科 別： 生物科

組 別： 高中組

作品名稱： 乳酸菌的牛奶浴--與胃酸、膽汁共舞

關 鍵 詞： 乳酸菌、膽汁、胃酸

編 號：

摘要

茲認為乳酸菌及其衍生物對整個人類飲食有極深遠的影響，激起我們以乳酸菌為研究主題的想法。此實驗探討乳酸菌對環境改變的適應能力，以期達到有效的利用。

- 一、使溫度由 5°C 驟變至 37°C (人體溫度)，觀察乳酸菌對驟變環境的適應能力，並比較緩慢回溫時乳酸菌之恢復情形，以及兩者恢復活力的效率又是如何。
- 二、模擬人體消化道環境，比較全脂及脫脂優酪乳內的乳酸菌通過胃酸及膽汁後的存活情形，探討乳酸菌的活力減退程度與環境因子的影響。了解脂質與蛋白質的多寡是否會影響膽汁及胃酸對乳酸菌的抑制程度。
- 三、比較乳酸菌在 pH7、pH7.8、添加膽汁的 pH7.8 培養液中的生長情形，以判定膽汁對乳酸菌的抑制效果是否導因於酸鹼度或膽汁的內含物。

壹、研究動機

在市面上琳琅滿目的飲料中，大部份是糖分居多，每次選購飲料時總是怕裡頭的成份會影響健康，買牛奶又怕喝了肚子不舒服(乳糖不耐)，於是優酪乳成了替代的最佳選擇。

生物課講到第二章微生物學時，老師提到了優酪乳的許多好處：增加腸內益菌及延年益壽等。引起我們的好奇：乳酸菌是否真的可以通過胃酸和膽汁的考驗？乳酸菌的最佳攝取時間是在飯前還是飯後？第五章生理學時老師也提到膽汁在小腸內的功能之一是乳化脂質，優酪乳內所含脂質多寡是否也會影響膽汁抑制乳酸菌的程度？回顧第一章細胞的生理，我們得知蛋白質對人體內的酸鹼緩衝十分重要，那麼平日飲食中蛋白質攝取量的多寡，是否也會影響乳酸菌抵抗胃酸的能力？

於是我們與老師仔細商量討論後，設計了一連串的小實驗以釐清我們心中的疑惑。

貳、研究目的

藉由數個相關實驗來驗證我們的假設，並透過小組討論，激盪出更佳思考模式，自行設計合於邏輯且不過於複雜的實驗步驟，在實驗中運用課堂上所學知識，持續修正不合理的實驗步驟，統整實驗所得數據，分析其結果，歸納出各種因子與乳酸菌的關係，探討各種環境變化對乳酸菌的整體影響，了解其關聯性。研判何種攝取方式才可讓乳酸菌到達腸道時的存活率最高，並在人體內發揮最佳的效益。

參、研究設備與器材

一、主要器材

- (一) 分光光度計 (Spectrophotometers)：Thermo 出品「SPECTRONIC20D+型」
- (二) 高溫高壓滅菌機 (Autoclave)：TM-322 型
- (三) 無菌操作台 (cabinet)
- (四) 培養箱 (incubator)
- (五) 電磁攪拌機 (magnetic stirrer)、磁攪拌棒 (stir bar)
- (六) 水浴槽

二、次要器材

- (一) 錐形瓶 (1000ml、250ml、100ml) (Erlenmeyer flask)
- (二) 血清瓶 (250ml)
- (三) 玻璃刻度吸管 (Measuring Pipettes)
- (四) 手提式分注器 (WITOPETTE Hand Held Dispenser)
- (五) 旋蓋試管 (test tube)
- (六) 接種環
- (七) 移液管 (10ml、5ml、1ml) (pipette)
- (八) 玻璃量筒 (100ml、50ml、25ml) (Graduated Measuring Cylinders)
- (九) 酒精燈 (Spirit lamp)
- (十) 試管夾 (Tube clamp)
- (十一) 載玻片 (Microslide)
- (十二) 顯微鏡 (附油鏡) (Microscope)

三、基本培養基

(一) 菌種來源：台灣佳乳股份有限公司提供之克菲爾氏菌種。

(二) LB 培養基配方：

Distilled water	1000.0 ml
D-Glucose(Dextrose)	5.0 g
Peptone	5.0 g
NaCl	2.0 g
Yeast extract	2.0 g
#Agar	14.0 g

(#為製作固體培養基用途)

(三) MRS 培養基配方：

Distilled water	1000.0 ml
Oxoid peptone	10.00 g
meat extract	10.00 g
yeast extract	5.00 g
K ₂ HPO ₄	2.00 g
di-ammonium hydrogen citrate	2.00 g
Glucose	20.00 g
sodium acetate	5.00 g
MgSO ₄ ·7H ₂	0.58 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.25 g

(四) 革蘭氏染色試劑

初染劑：結晶紫

媒染劑：革蘭氏碘液

脫色劑：95%乙醇

複染劑：沙黃

肆、研究過程或方法

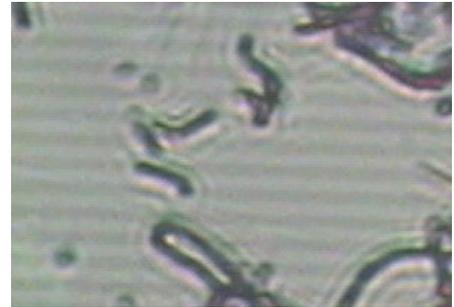
一、菌種鑑定：

菌種名稱：*Lactobacillus delbrueckii*

參考 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth edition 的生化特性說明來進行鑑定：

- (一) 革蘭氏染色鑑定：革蘭氏陽性菌呈深紫色；革蘭氏陰性菌呈粉紅色或紅色。
- (二) 氧化酶鑑定：氧化酶陽性菌在十秒內會呈現藍紫色；若無，則為氧化酶陰性菌。
- (三) 觸酶鑑定：觸酶陽性菌有產生氣泡；觸酶陰性菌則無。

	形態	革蘭氏染色	氧化酶	觸酶
<i>Genus Lactobacillus</i> 菌種性質	桿菌	陽性	陰性	陰性
鑑定結果	桿菌	陽性	陰性	陰性



最後鑑定結果：完全符合。

確定為 *Genus Lactobacillus*

二、實驗一（溫度驟變對乳酸菌的影響）：

- (一) 在實驗前將母菌培養液放置在 5°C 之環境中冷藏。
- (二) 用鋁箔紙將六根分光光度管管口封住，送入高溫滅菌機中滅菌，使管中呈無菌狀態。
- (三) 滅菌後，取出母菌培養液，分別以移液管抽取 6 毫升菌液，注入分光光度管裡頭。
- (四) 測量其透光度以作為基準點。
- (五) 隨即把三管分光光度管放入 37°C 的水浴槽中。三管分光光度管放在室溫下。
- (六) 接下來每五分鐘測量一次透光度，共測量兩個小時。

三、實驗二（酸鹼環境及膽鹽對乳酸菌的影響）：

- (一) 以市售全脂、脫脂牛奶，分別配製重量百分比為 50%、75%、100% 的培養液共六組。
- (二) 取六個血清瓶各裝稀釋液 50 毫升，放入磁攪拌棒，一起滅菌。
- (三) 滅菌後，每瓶分別注入含母菌的 MRS 培養液 20 毫升。
- (四) 抽取 5 毫升培養液注入分光光度管，測量其透光度，以作為最初的基準點。
- (五) 放在 47°C 恆溫培養箱中的磁攪拌器上，模擬胃腸的攪動情形，使其生長一個小時。
- (六) 每瓶分別注入 0.15 毫升的鹽酸（使 pH 值達到 2 到 3 之間，以模擬胃中環境。）。
- (七) 重新取校正液，每半個小時測量一次透光度，共記錄 1.5 個小時。
- (八) 加入膽汁 150 毫升及 NaHCO₃ 克（使培養液變為 pH 值 7.8，以模擬腸內環境）。
- (九) 重新取校正液，每半個小時測量一次透光度，直到曲線趨緩為止。

四、實驗三（膽汁中物質或酸鹼度對於乳酸菌的影響）：

- (一) 準備 3 個裝有 100 毫升 MRS 培養液的血清瓶。
- (二) 一瓶加入 NaHCO₃（小蘇打）配成 pH 值 7 的培養液，一瓶加入 NaHCO₃ 配成 pH7.8 的

- 培養液，另一瓶加入 20 毫升的豬膽汁，再加入 NaHCO_3 使成 pH7.8 的培養液。
 (因爲 NaHCO_3 是胰液內的主要成份，本實驗利用其來達到近似小腸的環境)。
 (三) 稍微旋開瓶蓋，放入高溫高壓滅菌機裡滅菌。
 (四) 滅菌後每瓶分別注入含母菌的培養液 20 毫升。
 (五) 放入 47°C 恆溫培養箱中。
 (六) 每半個小時抽出 5 毫升的培養液來測定透光度，記錄其結果。

五、膽汁的處理

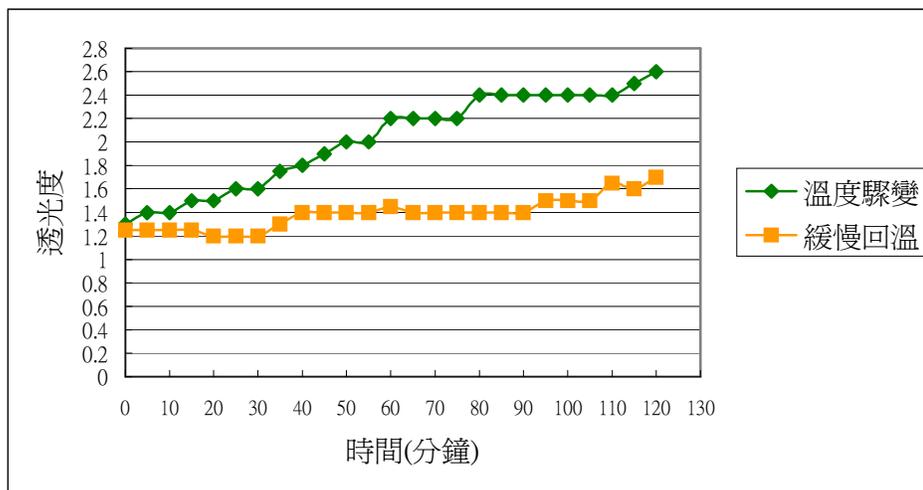
- (一) 由黑豬屠宰場取得現殺的豬膽30顆。
 (二) 以乾淨的解剖刀劃開連著肝的豬膽囊皮，倒出深褐色的膽汁。
 (三) 集結成一杯後，覆上鋁箔紙。將之滅菌，放涼用於製造人體小腸的 pH 值環境。



伍、實驗結果

(透光度減少代表受測溶液中物質含量增多，使光線較不易通過，在實驗中表示乳酸菌增加)

一、實驗一 (溫度驟變對乳酸菌的影響)：

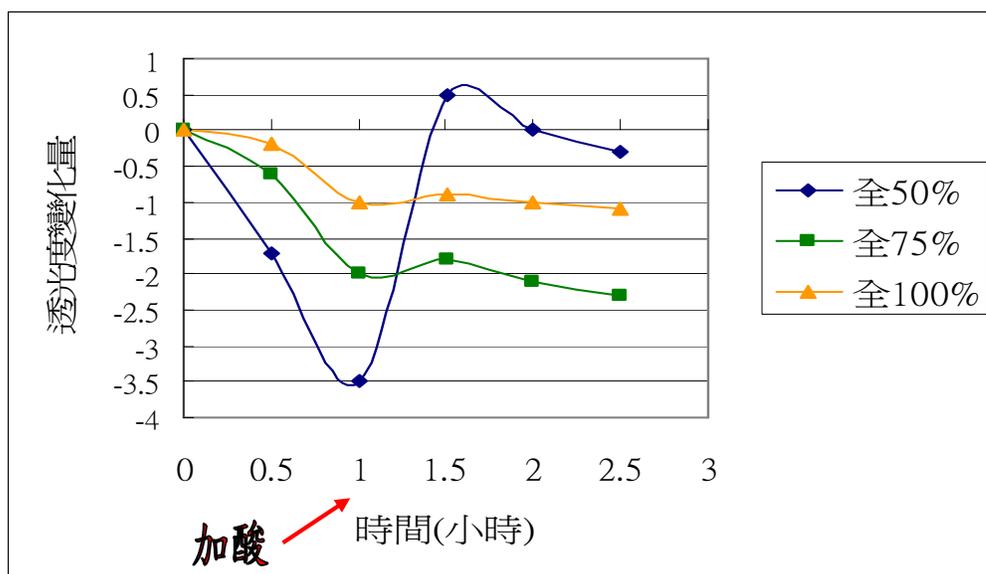


由圖形趨勢顯示，溫度驟變($5^\circ\text{C}\sim 37^\circ\text{C}$)的實驗，曲線不斷上升，代表乳酸菌量不斷減少，在兩個小時內曲線都沒有下降的現象，但中途曲線有兩度平緩。

而緩慢回溫的實驗部分，從一開始曲線就十分穩定，回溫大約二十到三十分鐘的時候，曲線有稍微下降，顯示乳酸菌量微幅增加，但在三十分鐘後曲線就開始上升，兩個小時內沒有再下降的現象，曲線並非大幅上升，乳酸菌是以平緩的速度在減少。

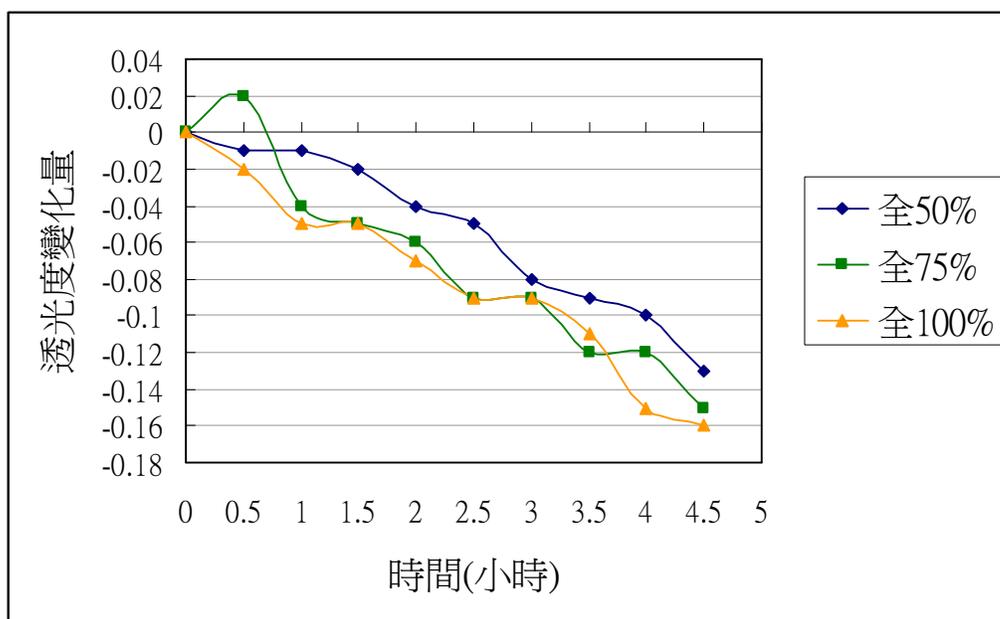
二、實驗二（酸鹼環境及膽鹽對乳酸菌的影響）：

（一）全脂牛奶加鹽酸後：



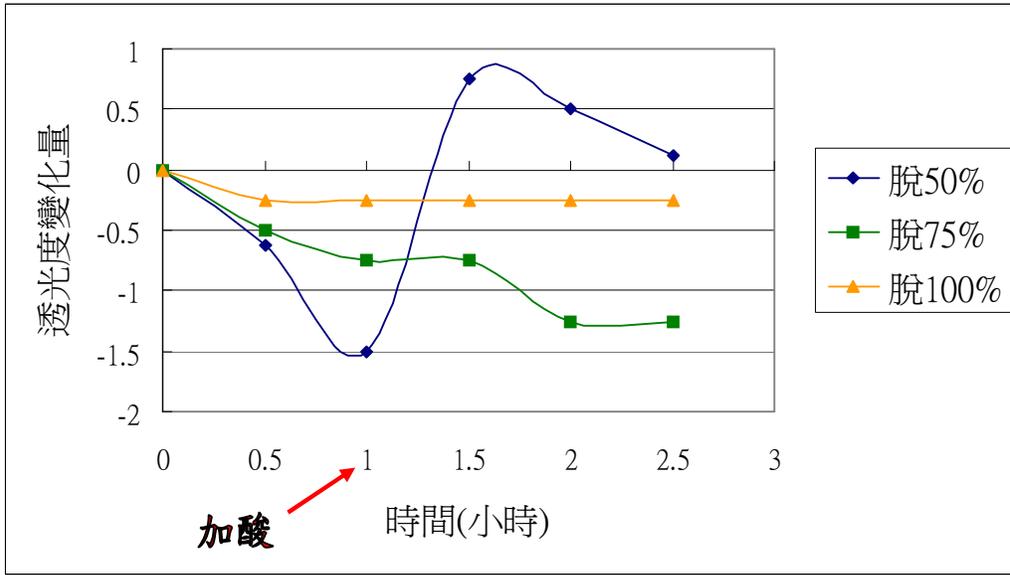
由實驗的結果顯示：在實驗的第一個小時，50%的菌數增加率最多，其次為75%，最差者為100%。加酸後一個小時，50%的菌數明顯減少；75%的菌數只增加少許，而100%的菌量幾乎沒有改變；但其後的兩個小時，50%的菌數增加率仍是最高，75%次之，100%最低。

（二）全脂牛奶加膽汁後：



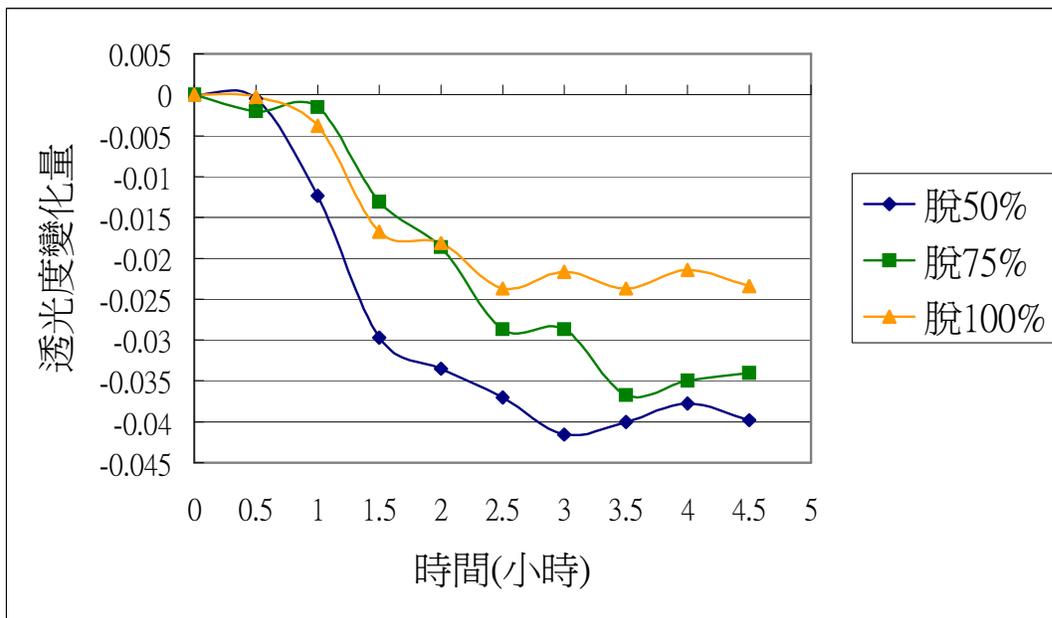
由實驗的結果顯示：加入膽汁後，50%的生長情形較75%與100%的生長情形差。亦即50%濃度的受到膽汁抑制的效果較其他兩者顯著，而比較75%與100%兩組數據，所得加入膽汁後乳酸菌生長曲線接近，但75%在一開始測量菌量有下降，由後來的曲線，推測其為實驗測量時的誤差。

(三) 脫脂牛奶加鹽酸後：



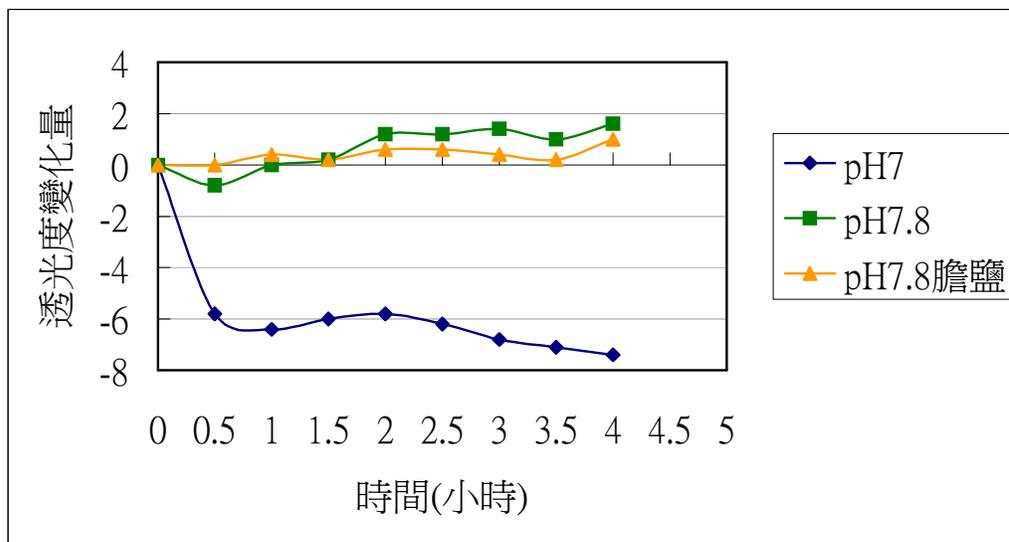
由實驗的結果顯示：在實驗的第一個小時，50%的菌數增加率最多，其次為75%，最差者為100%。加酸後，50%的菌數明顯減少；75%的菌數增加少許，而100%的菌量幾乎沒有改變，呈現平穩狀態，但接下來，乳酸菌又開始生長，50%的菌數增加率仍是最高，75%次之，100%幾乎沒有增加。

(四) 脫脂牛奶加膽汁後：



由實驗的結果顯示：加入膽汁後，一開始100%和75%生長情形相近，而50%菌量增加較快，曲線異於其他兩者。接下來兩個小時，生長情形呈現50%優於75%優於100%。而在約第三小時到第四小時間，三條曲線乳酸菌的菌量都攀過高峰，而後稍微下降。三者最後的菌量都比加入膽汁前的菌量增加。

三、實驗三（膽汁中物質或其酸鹼度對於乳酸菌的影響）：



結果顯示乳酸菌在 pH7 環境中生長良好，四個小時仍持續生長中；但在 pH7.8 的環境和在 pH7.8 含膽汁的環境中，兩者曲線相近，皆呈現稍微下降的趨勢。

陸、討論

一、實驗一（溫度驟變）的討論：

此實驗乃是為了得知乳酸菌在 5°C~37°C 此劇烈變化的溫度下的生長情形是否良好。結果顯示，乳酸菌在此一溫度驟變的環境下，在極小時間差(五分鐘)內，透光度呈現微小的增加，代表乳酸菌在短時間內有了減少的情形。經過接下來一個小時密集的取樣，我們發現乳酸菌加熱至 37°C 後並非立即的蓬勃繁衍，而是經過一段適應環境的平緩期，所以我們知道乳酸菌在遇到溫度驟變後會影響其活性，於是我們得到優酪乳從冰箱拿出來後不要直接喝下肚，而是放在桌上一陣子，使其緩緩回溫後再飲用，因為如果從冰箱拿出來就直接飲用，溫度驟變的結果會使乳酸菌的量減少，相對地存活率也就降低。而若是使其緩慢回溫，乳酸菌的活性就可以平緩回復，菌量也不會大幅減少，相對地存活率也就提升。

二、實驗二（胃酸及膽汁對乳酸菌的抑制效果）的討論：

（一）胃酸對乳酸菌的抑制：

由文獻得知，影響乳酸菌在人體生長的主要因素為胃酸和膽鹽，在通過胃酸時，乳酸菌的存活率很低；因此設計出此實驗探討乳酸菌在加入 pH2.0 的鹽酸（≡胃酸的 pH 值）後其生長曲線的變化，印證是否酸鹼度為胃酸抑制乳酸菌生長的原因；並觀察乳酸菌在不同濃度的牛奶中對酸的耐受力是否不同。

1. 全脂牛奶：

由所得數據分析，在加酸前存活著的乳酸菌增加率是隨濃度增加而遞減，亦即生長情形 50% 優於 75% 優於 100%，其中 100% 的幾乎沒有增加；加酸後，乳酸菌的存活率是 100% 優於 75% 優於 50%，推測是蛋白質的緩衝發生作用。但其後的兩個小時，50% 的菌數增加率仍是最多的，75% 次之，100% 最少。推測可能是乳酸菌在含水量較多的環境下生長較好或是在養份充足的情況下，水量較多的培養液所堆積的廢物濃度較小。

2. 脫脂牛奶：

由實驗的趨勢顯示，在加酸後生長曲線會下降，代表乳酸菌受到鹽酸的抑制而趨向負成長，但在後兩個小時我們發現乳酸菌的生長開始活絡，其回復速度和全脂牛奶相近，50%的乳酸菌在回復活性後生長較快，推測是因為脫脂牛奶中的蛋白質與全脂牛奶相同，故在遇到胃酸時，蛋白質的緩衝功能都發揮了相同效果。故加酸後乳酸菌並不會全部死亡，仍有部分乳酸菌能通過酸性環境。但比較各濃度加了酸後的變化，濃度越稀者越是劇烈，推測可能是推測可能是濃度越稀者所含蛋白質越少，對酸的緩衝作用越弱，抵抗胃酸的能力就下降。

（二）膽汁對乳酸菌的抑制：

由文獻得知，通過胃後，膽汁也是抑制乳酸菌生長的一大因素，而由生物課中了解：膽汁的主要功用是中和胃酸和乳化脂質。因此設計出此實驗，推測乳酸菌在腸道中會減少的原因乃因為膽汁 pH \approx 8 為鹼性環境而降低生長，或膽汁內的其他物質也會影響乳酸菌生長；並證明出乳酸菌在不同濃度的脂質牛奶中與膽汁作用結果為何，脂質濃度對於其生長有無影響。是否因為脂質的存在降低脂質對乳酸菌的抑制效果。

1. 全脂牛奶：

由實驗的趨勢顯示：加入膽汁後，乳酸菌仍有增加，只是數值都很小，而 50% 的生長情形較其他兩者差。50% 濃度的受到膽鹽抑制的效果較其他兩者顯著，可能是因為牛奶中的脂質會與膽汁作用降低膽汁對乳酸菌的抑制程度，50% 濃度的因含牛奶較少，相對地脂質較少，所以較無法抵抗膽汁的抑制。而比較 75% 與 100% 兩組數據，所得加入膽汁後乳酸菌生長曲線接近，推測可能是因為平常情況下乳酸菌生長情況隨濃度增加而遞減。此因素的影響，與膽汁作用的影響有所抵銷。

2. 脫脂牛奶：

由實驗的趨勢顯示：加入膽汁後，大小依序是 100%、75%、50%。而生長曲線顯示出 100% 呈現小幅成長，75% 菌量一開始只稍微成長，在第二個小時開始呈現較大成長。50% 則是始終呈現較快的成長率。由於不論稀釋與否，培養液中皆不含脂質，故推測是因為稀釋後水分含量不同，水分較多者使得乳酸菌有較大的空間可累積廢物，降低其濃度。

比較全脂和脫脂優酪乳，發現全脂優酪乳對於膽汁的耐受力比脫脂優酪乳高，故所得曲線較平穩。此菌種通過膽汁環境後有稍微成長，但不是極大幅度。由此可見膽汁有抑制乳酸菌生長的效果，但卻無法完全殺死 *Lactobacillus delbrueckii*，比較起來，胃酸對於乳酸菌的抑制能力較強，膽汁對於乳酸菌的抑制能力較弱。在人體中膽汁甚至可以中和胃酸，連帶減輕消化道對於乳酸菌的殺傷力，使乳酸菌可以在腸道生存；至於膽汁抑制乳酸菌生長的說法，我們猜測可能是膽鹽因為造成的鹼性環境，也可能是膽汁內其他物質，非關酸鹼度，相關證明見實驗三。（由實驗三得知，導因於膽鹽所造成的鹼性環境）

三、實驗三（膽汁中物質或酸鹼度對於乳酸菌的影響）的討論：

由實驗結果得知，乳酸菌在 pH7 中生長良好，在 pH7.8 培養液和 pH7.8 的膽汁環境中生長緩慢。酸鹼度只相差了 0.8，生長情形就顯著不同。而有加膽鹽與沒加膽鹽的培養液生長情形卻相差不遠。因此我們推測 pH 值的變化對於乳酸菌的影響大於膽汁內其餘成份對乳酸菌的影響，亦即膽汁對乳酸菌的抑制效果導因於膽汁的鹼性。

柒、結論

由以上實驗我們得到了以下幾點結論：

- 一、冰箱拿出來的優酪乳不要直接飲用，最好是先放置二十分鐘使其稍微回溫後再飲用，如此乳酸菌便沒有經歷劇烈的溫度改變，菌量不會大幅減少，存活的可能性也就更高。
- 二、比較純優酪乳和稀釋的優酪乳，純優酪乳中的乳酸菌對於胃酸的耐受力遠較稀釋的優酪乳良好（蛋白質的緩衝作用），所以喝完優酪乳後暫時別喝水或其他飲料，以免稀釋了優酪乳，大大降低乳酸菌在胃中的存活率。
- 三、比較全脂和脫脂優酪乳，乳酸菌在全脂優酪乳中對於膽汁環境的耐受力遠高於乳酸菌在脫脂優酪乳中對膽汁環境的耐受力，因此若想要有效增加體內益菌，飲用全脂優酪乳比脫脂優酪乳有效。
- 四、如果想要提高乳酸菌在胃酸中的存活率，建議優酪乳選在飯後飲用。因為攝取食物時，所攝取之食物內含蛋白質成份，可以產生蛋白質的緩衝作用以保護乳酸菌。

捌、參考文獻

一、參考書籍

- （一）王貴譽編著. 1984. 小的格蘭氏陰性桿菌. 微生物學. p211~214. Taipei
- （二）王進琦編著. 1996. *Yersinia*. 基礎微生物學. P486~488. Taipei
- （三）江晃榮編著. 1985. 微生物保存法. 微生物菌種保存法. P56~59. Taipei
- （四）蔡文城、張仲明、張南驥、朱明惠. 1985. Identification of *Yersinia* species. Laboratory Manual for Medical Microbiology. p164~165. Taipei
- （五）蔡文城編著. 1987. 嗜氧性格蘭氏陰性桿菌之鑑定 實用臨床微生物診斷學 第四版. p535~537. Taipei
- （六）蘇勳璧編著. 1992. 耶爾辛桿菌屬. 微生物學 .p144~148. Taipei
- （七）Edwin H. Lennette. 1985. Media, Reagents and Stains. Manual of Clinical Microbiology 4th edition. U.S.A
- （八）John C. Sherris. 1990. Pathogenic Bacteria. Medical Microbiology. P378~379
- （九）John G. Holt. 1983. Facultatively Anaerobic Gram-negative Rods. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 1. p498~505.

二、網路資源

- （一）菌種保存研究中心菌種資料查詢庫. 食品工業發展研究
(<http://www.ccrcc.firdi.org.tw/>)
- （二）AWWARF. Drinking Water Inspectorate Fact Sheet-- *Yersinia enterocolitica*.
(<http://www.awwarf.com/newprojects/pathegeons/YERSINIA.html>)
- （三）Center for Biologics Evaluation and Research. U.S. Food and Drug Administration.
(<http://www.fda.gov/cber/>)
- （四）JGI Microbial Genomics (http://genome.jgi-psf.org/mic_home.html)

玖、附錄

一、菌種鑑定(菌種生化小試驗)

- (一) KIA 培養基：以接種針取菌種，先刺入斜面培養基底部至離底約半公分，抽出後以針頭在斜面表面來回塗抹完成培養基表面的接種。然後在 37°C 培養 18~24 小時後，觀察顏色變化。
- (二) 氧化酶試驗：取一小片濾紙，置於一清潔的培養皿中，滴上二至三滴試劑，以無菌木棒或牙籤取足量細菌塗抹在浸有試劑的濾紙上，計時十秒，若待測菌株是氧化酶陽性菌，應在十秒內呈現藍紫色。
- (三) 觸酶反應：取一清潔載玻片，滴一滴 3% H₂O₂ 溶液，然後以接種環取少量細菌在液滴中攪拌，觀察是否有氣泡產生，有氣泡產生者為陽性。
- (四) 革蘭氏染色：革蘭氏陽性為深紫色；革蘭氏陰性為粉紅色或紅色。詳細步驟見【附錄四之(二)】

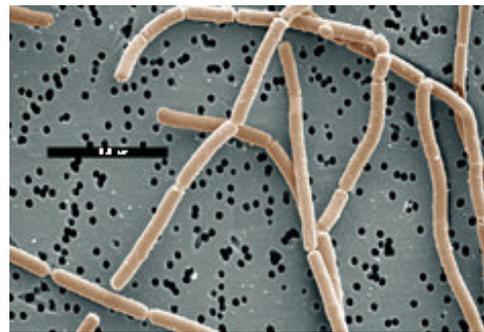
二、菌種介紹：*Lactobacillus delbrueckii*

- (一) 形態特徵：均勻桿狀，0.5~0.8 × 2.0~9.0 μm。通常為長棍狀，呈短鏈，但有時也近球狀。
- (二) 生化特性：格蘭氏陽性、觸酶陰性、氧化酶陰性、不產內孢子、少有運動性、少有致病性。
- (三) 資料出處：

1. 細菌生化鑑定參考書籍

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth edition

2. 照片出自 http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/lacde/lacde.home.html



三、實驗器材照片



(圖) 培養箱



(圖) 無菌操作台



(圖) 磁攪拌器



(圖) 高溫高壓滅菌機



(圖) 分光光度計

四、基本操作技巧

(一) 高溫蒸氣滅菌法

1. 步驟：

- (1)將待滅菌的東西放入高溫高壓滅菌機(autoclave)中。
- (2)加適量的蒸餾水。
- (3)將 autoclave 的門旋緊並將氣閥關閉，以確保滅菌機裡面為密閉系。
- (4)溫度調至 121°C，滅菌時間 15 分鐘，內外壓力差約為 1.2 到 1.5atm 之間。
- (5)滅菌完成後，先將氣閥打開才可打開 autoclave 的門。

2. 注意事項：

- (1)加入的水一定要是蒸餾水，因為自來水會產生不必要的沉澱物，影響滅菌效果。
- (2)將待滅菌的東西放入 autoclave 的箱子中時，需將箱子的孔關閉。
- (3)若待滅菌物中有旋蓋試管之類密閉的容器，需將蓋子旋開一些，避免爆炸。
- (4)待滅菌物應用錫箔紙包裹或容器盛裝，以免取出後又遭到污染。
- (5)有爆炸或變質危險的器材或藥品，不可送入高溫高壓滅菌機進行滅菌。

(二) 革蘭氏染色 (Gram staining)

1. 將玻片洗淨，拭淨後，在中央點上一滴蒸餾水。
2. 貼上標籤，置於空氣中乾燥，熱固定後備用。
3. 吸取一滴待測菌的培養液，或沾培養基中的單一菌落，塗抹於蒸餾水上。
4. 以結晶紫覆蓋住塗抹範圍，靜置一分鐘。
5. 以蒸餾水沖洗，注意讓蒸餾水由上往下流，不要直接沖洗染色部位。
6. 覆以革蘭氏碘液媒染劑，再靜置一分鐘。
7. 以蒸餾水沖洗。
8. 以 95%乙醇脫色，謹記勿脫色過度，逐滴滴下，直到不再釋出紫色液體為止。
9. 以蒸餾水沖洗。
10. 以沙黃複染 45 秒。

11. 以吸水紙吸乾，染色部份注意不要用力擦拭。
12. 以油鏡觀察菌的外形及顏色，和標準菌株比較。

類型	形態或特色	標準菌株
革蘭氏陽性	深紫色	金黃色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>
革蘭氏陰性	粉紅色或紅色	大腸桿菌 <i>Escherichia coli</i>

(三) 測定 pH 值

1. 步驟：

- (1)校正電極。
- (2)用蒸餾水沖洗電極。
- (3)用柔軟的面紙將電極稍稍吸一下。
- (4)把電極放在分析溶液裡。
- (5)等待一會兒使酸鹼度計穩定，然後記錄酸鹼度計顯示的酸鹼度值。
- (6)再用蒸餾水清洗電極即完成。

2. 注意事項：

- (1)pH 計每次使用前要用蒸餾水沖洗電極，並用柔軟的面紙將電極稍稍吸一下，避免非測定溶液影響 pH 值。
- (2)pH 計沒有在使用時一定要將電極浸泡在水中，以免玻璃電極乾掉，失去功能。

(四) 分光光度計

1. 步驟：

- (1)打開電源開關。
- (2)調整波長至 610nm。
- (3)放入 Blank，將讀數歸零。
- (4)放入樣品，讀取透光度值。

2. 注意事項：

- (1)測定 UV 範圍請用石英測光管。
- (2)測定之吸光值若超過 2，請將溶液稀釋後再測。
- (3)光度計上請勿放置任何物品，尤其是溶液。
- (4)放入測光管前，請將測光管外壁擦拭乾淨，不可有液體殘留。
- (5)使用後測光管必須立即以蒸餾水沖洗乾淨，拭乾後置回原位。
- (6)兩次使用間隔時間若不超過一小時，則可維持開機狀態，不必關掉燈泡及電源。

(五) 無菌操作

1. 種菌：用火烤後的接種環撈取菌粉（剛從冷凍庫拿出的），轉植入旋蓋試管內培養。
2. 保存菌種：當細菌長到一定程度時，一管繼續放在培養箱裡生長；另一管則保存在 5°C 的環境中，使其停止生長，才能確保菌種的一致性，以後如果受到汙染，或是其他突然事件

發生時，有一個備用預留的菌種可補救，被保存的菌我們特稱之為母菌。

3. 注意事項：

- (1)母菌的冰凍時間不宜過長，約以一至兩個星期為適當，所以要常常更換不同的菌株來冰凍，但來源需一致。
- (2)一般而言，細菌寄代越多次，其性狀相似度越低，所以我們所有的實驗，寄代次數都控制在三次以內。
- (3)母菌拿出來後要立即開始轉種並且實驗，否則母菌會回溫，使實驗產生極大的誤差。

(六) 豬膽汁的成份簡介：

膽汁是一種消化液，同時也是一種排泄物。膽液的主要成份是膽鹽(Bile salts)、膽色素(Bile pigments)、脂類物質和電解質。膽鹽包括多種酸性化合物，其中的成份隨著動物品種而異。人體內膽鹽含有膽酸(Cholic acid)、雙羥膽烷酸(Chenodeoxy-cholic acid，亦稱鵝脫氧膽酸)和去氧膽酸(Deoxycholic acid)等數種成份。膽酸在膽液中以鈉鹽的形式和甘氨酸(Glycine)或氨基乙磺酸(Taurine)結合。

膽酸和雙羥膽烷酸，是原生膽酸(Primary bile acid 或初級膽酸)，在肝中直接生成。去氧膽酸是再生膽酸(Secondary bile acid，或次級膽酸)，是膽酸在小腸中經細菌的作用生成。原生膽酸和再生膽酸都可在腸中被吸收入門脈系統，然後再由肝細胞排到腸中。這種排泄和再吸收的週期稱腸肝循環(Enterohaptic circulation)。由於這種過程，膽汁中只有一部份的膽鹽是新合成的。大部份的膽鹽能在腸肝循環中經歷十數次。正常情況下，新生成的膽鹽僅用來補充失去或破壞的膽鹽，以維持體內整個膽鹽量的恆定。人體內每次腸肝循環約有 5~10%的膽鹽在腸中被細菌破壞，不能被再吸收而排於糞便中。人體內總膽鹽含量約在 3~5 克之間；每日新合成的膽鹽約有 0.8 克。這相當於每日排出 0.6 克的膽固醇和少量的其他固醇物(Steroids)。如因任何原因使膽鹽不能在小腸中再吸收時(如膽瘻管)，血中膽酸的量即降低。肝細胞合成原生膽酸的量將增高。血漿中膽固醇的濃度也將隨之下降。膽固醇的轉變率也加速。相反的，如血中的膽鹽濃度增高(如膽管阻塞)，肝細胞合成原生膽酸的量將降低。血漿中膽固醇的濃度將隨之上升。膽固醇的轉變率也減慢。這許多相關的變化，有一管制機轉互相調節。肝中所形成的各種膽酸，主要來自膽固醇。如用放射性元素作追跡劑，標化膽固醇環狀結構上的某些部位。注射入體內後，可發現 90%的放射性標化物質可在膽酸中找到。

膽汁的棕黃色是因為含有膽色素(Bile pigments)，主要是膽紅素(Bilirubin)。十二指腸中膽紅素如回流入胃，就被胃酸、作用生成膽綠素(Biliverdin)，使含膽的內容物變為綠色。膽紅素是紅血球中血紅蛋白分解後的代謝產品，在破壞紅血球的組織中產生，並不是肝細胞製造的。但血液中的膽紅素大多數是從肝中出，由膽管進入小腸。膽汁中的膽紅素是以雙尿苷酸化合物(Diglucuronide)的形式存在。一部份的膽紅素可被小腸再吸收入血液，剩餘的則出現於糞便中。正常糞便的顏色就因為含有膽紅素。人體內每日大約可產生 0.5~2.0 克的膽紅素。如果膽紅素在肝臟中與尿甘酸結合，膽紅素就不能經肝細胞排入膽管，聚集在血液中可引起黃膽症(Jaundice)。在另一方面，如膽管阻塞，結合的膽紅素雖可通過肝細胞，但不能由膽管排出，也將在血液中聚集流生黃膽症狀。不過，結合的膽紅素能由腎臟排出。

膽汁離開肝臟時約含有 2.3%的固體物質，其中一半是膽鹽，其 pH 值約為 7.8。在人和其他有膽囊的動物，肝細胞是不停的分泌膽汁。未進食時，分泌出的膽汁並不進入十二指腸，

而是流入膽囊。膽囊黏膜上皮細胞能將膽汁中的 NaCl 和 NaHCO_3 以活性運送方式再吸收入血，水份亦隨著被動的吸收，將膽汁濃縮。自膽囊流出的膽汁，如以膽鹽和膽紅素的濃度來計算，較自肝臟流出的濃十倍左右。空腹時，總輸膽管末端開口於十二指腸的歐氏括約肌 (Sphincter of Oddi) 是處在收縮的狀態，膽汁因而不能流入小腸，只有流入膽囊存之。但當食糜進入十二指腸後，特別是含有脂肪酸和蛋白質的分解物時，可刺小腸黏膜細胞分泌縮膽囊素 (CCK)。該物質被吸收入血液帶到膽囊和括約肌，即使膽囊收縮，同時也使括約肌舒張，以利膽液和胰液流入十二指腸。食物在小腸中除分泌縮膽囊素外，也產生腸促胰泌素。這種局部內分泌素除了加胰液的分泌外，也可作用於肝細胞和膽管，使膽汁的總分泌量增加。具富有電解質，特別是 HCO_3^- 的液體。對膽鹽和膽紅素的分泌量並沒有太大的影響，這一點和它作用在胰臟的情形相同。進餐以後，縮膽囊素和腸促胰泌素的分泌促使液流量增加，同時也加速腸肝循環。

從肝細胞分泌的膽汁，以及從膽囊流出的膽汁，其滲透度都與血漿的相近。不過，膽囊裡膽液中的鈉離子的濃度常高過血漿中的濃度。另外，膽小管能分泌 HCO_3^- ，所以膽汁中 HCO_3^- 的濃度比較高。這現象在經腸促胰泌素三刺激作用以後更明顯。當 HCO_3^- 濃度增加時，膽汁中 Cl^- 的濃度則相對的降低。這情形也和胰液的分泌相似。單純的濾過作用 (Filtration) 並不是膽汁生成的重要步驟。因為離體灌注的膽臟，在灌注壓超過血壓時，肝細胞仍舊可以分泌膽汁。實驗證明多物質，如膽鹽、膽紅素、抗生素 (青黴素)，以及多種染料都能以活性運送的方式從血液轉移到膽汁中，以後曾以染料 BSP (Sulfobromophthalein) 試驗肝臟功能，即依據這種特性。肝細胞運送物質的機轉屬於共同性。多種物質在運送時有互相競爭的現象。肝臟中也有自主神經的纖維分佈，可是它們對膽汁的分泌量和成份所能產生影響都不及局部內分泌素。副交感神經 (迷走神經的分枝) 興奮時，可以使膽汁分泌略微增加，交感神經 (內臟神經分枝) 興奮時，血管縮小，膽汁的分泌量也略減少。

中華民國第四十五屆中小學科學展覽會
評 語

高中組 生物(生命科學)科

040714

乳酸菌的牛奶浴-與胃酸、膽汁共舞

國立武陵高級中學

評語：

本計劃試圖模擬乳酸菌在腸胃道之存活，以取得最佳攝食條件。但變因太多，結論很難明確，又數據處理與表達方式仍需改進。