

中華民國第四十四屆中小學科學展覽會

作者說明書

高中組生物(生命科學)科

040703

國立花蓮高級中學

指導老師姓名

廖美菊

作者姓名

呂健銘

葛俊言

徐伯誠

林哲宇

# 目錄

摘要	1
壹、研究動機	2
貳、研究目的	3
參、研究設備及器材	3
肆、研究過程及方法	3
伍、研究結果	5
陸、討論	18
柒、結論	22
捌、參考資料及其他	22
玖、誌謝	23

## 摘要：

台灣溫泉資源豐富，花蓮區約有十個溫泉。目前花蓮溫泉區開發加劇，溫泉生態快速改變。但查遍文獻，並無人對花蓮溫泉菌做完整研究。

本研究對花蓮的安通、文山及紅葉溫泉取樣培養，樣區水溫從文山 35°C 到紅葉的 79°C，pH 值 6.9~10.4。本研究共分離出 12 屬菌，革蘭氏陽性菌有 *Anoxybacillus*、*Brevibacillus*、*Geobacillus*、*Bacillus*、*Tepidimonas*，革蘭氏陰性菌有 *Caenibacterium*、*Ramlibacter*、*Deinococcus*、*Thermomonas*、*Meiothermus*、*Xanthomonas*，在台灣未紀錄的有 *Brachymonas*、*Ramlibacter*、*Tepidimonas*、*Thermomonas*、*Caenibacterium*、*Anoxybacillus*、*Xanthomonas* 七屬。

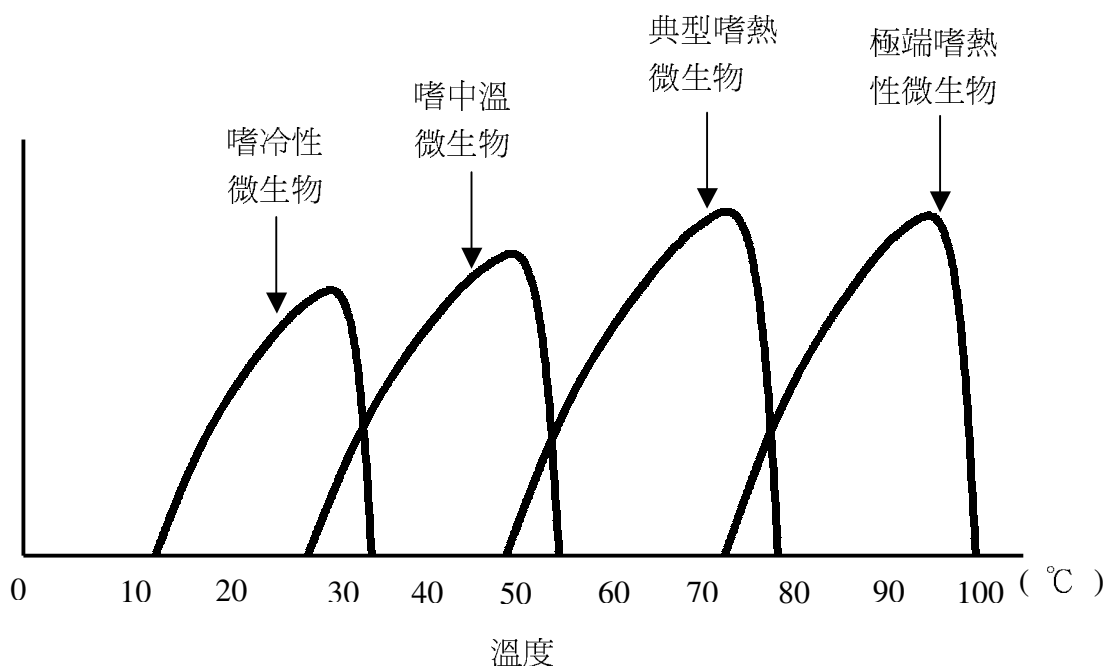
更換培養溫度時，發現同種菌取自高溫取樣點的菌株較能適應高溫，有受溫度馴化現象；更換異地溫泉水培養後，六屬菌生長情形無明顯差異，顯示水質不是它們分布的限制因子。

## 壹、研究動機：

台灣地處歐亞板塊與太平洋板塊交接處，溫泉處處可見，是休閒的好去處；而在高中基礎生物中提到溫泉菌是一種特殊的微生物，與平常在自然界中存在的細菌大不相同；能在高溫環境下生長。

微生物主要分為嗜冷性、嗜中溫、典型嗜熱和極端嗜熱四種(圖一)(陳，2002)，在 40°C 以上可快速生長的高溫微生物被稱為嗜熱性微生物。嗜熱性微生物可存於自然及人為的某些環境中，如溫泉區、太陽直射的土壤、海底熱泉、堆肥、熱水器等。嗜熱菌的種類很多，大多數的最適溫度為 50-70°C，有些在 25-40°C 仍可緩慢生長，(陳，2002)。「溫泉」定義為地底下湧出的泉水，水溫高於當地的地下水溫者，即稱之。溫泉微生物包括細菌、真菌甚至藻類，由於溫泉中微生物甚多，故我們只選真細菌部分做研究。

查遍網路上的學術文獻，發現只有台大植物所的陳懋彥之「台灣地熱區嗜熱性細菌之研究」為相關論述。生物多樣性是保育的主軸，但隨著休閒活動的興起，各地的溫泉區正加速開發中，但迄今仍未有任何文獻涉及花蓮區溫泉菌的多樣性的研究，我們還不知道花蓮有些什麼，它們卻可能永遠在我們身旁消失了。有鑑於此，我們四人利用有限的空暇，對花蓮的三個溫泉區—「安通溫泉」、「文山溫泉」與「紅葉溫泉」的溫泉菌做基礎研究，希望能為花蓮生物多樣性做些貢獻。



圖(一)生物溫度與微生物分布之關係圖(陳，2002)

## 貳、研究目的：

- 一、分析花蓮安通溫泉、文山溫泉與紅葉內溫泉中的菌種
- 二、探討在不同溫度下細菌能否存活
- 三、探討溫泉菌於不同的溫泉水中生長情形

## 參、研究設備及器材：

溫度計	捲尺	試管震盪器
pH 儀	湯匙	無菌操作台
本生燈	相機	恆溫箱
指南針	塑膠瓶	聚合酶鏈鎖反應器
玻璃瓶	培養皿	顯微鏡
取樣瓶	滅菌箱	離心機
一般文具	定量滴管	

## 肆、研究過程及方法：

### 一、樣本採集

- (一) 觀察地理位置並選擇取樣的溫泉
- (二) 在溫泉中依特徵、溫度、pH 值...等訂定取樣點並採集水樣



圖(一)取樣區溫泉地圖

表(一)花蓮區溫泉水的化學組成(濃度單位:mg/l)

所在地	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>++</sup>	Ca <sup>++</sup>	Al <sup>3+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	B	SiO <sub>2</sub>
文山	97	7.5	42	196	0.5	微量	11	298	614	1	45
紅葉	103	1.2	5.1	56	0.7	微量	17	444	10	1.2	48
安通	505	40	0.1	88	3.9	微量	664	73	370	2.1	45

資料來源: 陳肇夏(魏, 2000)

## 二、菌種鑑定

### (一) 選製培養基

製作不同成分培養基，測試不同培養基中溫泉菌是否能生長。(因篇幅有限，詳見作者現場陳述)

### (二) 細菌培養

- 1、將各取樣瓶放在試管震盪器上震盪後靜置，再從取樣瓶中取出 100  $\mu$ l 的樣品滴在固態培養基上。
- 2、將三角棒浸在 70% 酒精中消毒，並在本生燈上過火後，將樣品在培養基上塗布均勻。
- 3、放在 52°C 恆溫箱中培養，並觀察其生長情形。
- 4、數天後以無菌牙籤沾取單一菌落，再移至新培養基作繼代培養。

### (三) 革蘭氏染色

以一般通用革蘭氏染色法進行實驗 (方法詳見作者現場陳述)

### (四) 16S rDNA 序列比對

- 1、用牙籤從培養基上挑一點細菌懸浮於 50  $\mu$ l 無菌水中，再以震盪器將菌體打散。
- 2、在沸水中加熱 10 分鐘打破細菌細胞，再以 13000r.p.m. 的速度離心 5 分鐘，取上清液進行 PCR 反應(PCR 反應之引子序列與參數因篇幅所限，詳見作者現場陳述)。
- 3、以膠體電泳確認其產物。

(五) PCR 產物之定序委託基龍米克斯生物科技公司進行。

(六) 利用 **GenBank** 進行序列比對，以菌種鑑定。

## 三、不同溫度下細菌能否存活

- 1、以繼代培養方式將菌種分別培養於 42°C、52°C、62°C 下的固態培養基中
- 2、培養兩天後觀察有無菌落生成

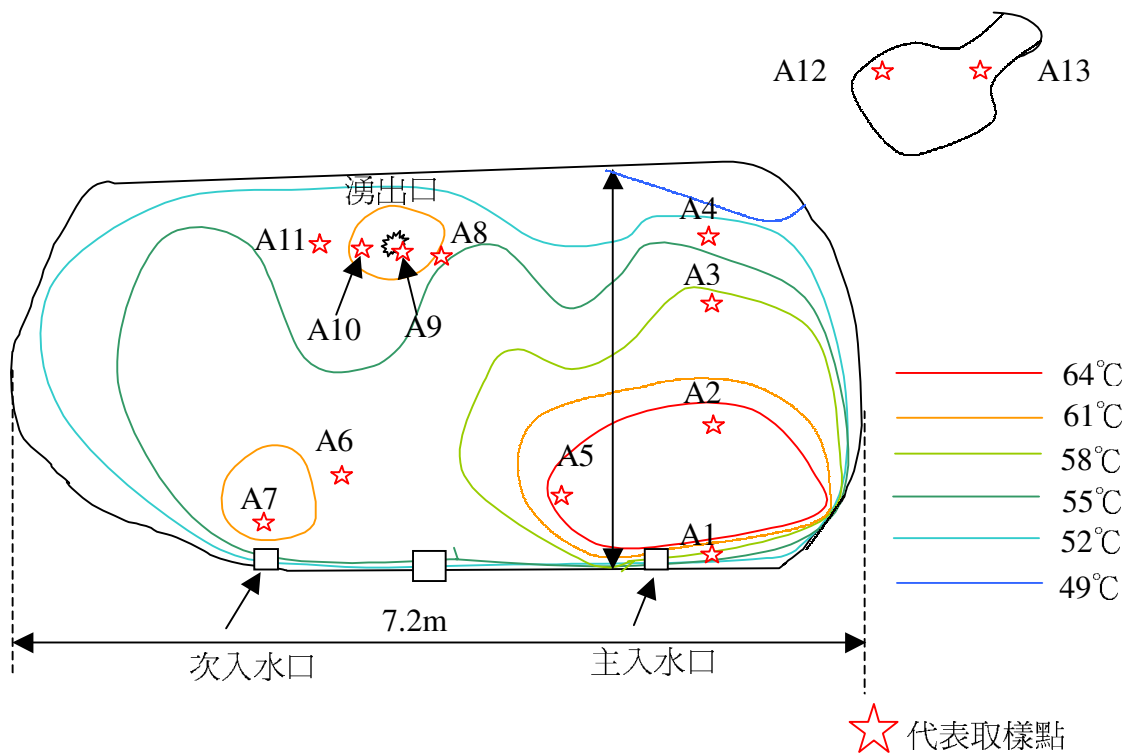
## 四、各不同溫泉水中各菌的生長情形

- 1、隨機取六屬細菌分別養原溫泉水的液態培養基，24 小時後測量其 O.D.<sub>600</sub>。
- 2、取隔夜培養之細菌稀釋至 O.D.<sub>600</sub> 到 0.02，分別培養於三區溫泉水，在 52°C、24 小時後測其 O.D.<sub>600</sub>，並於血球計數器上計算細菌數量，推算細菌數與 O.D.<sub>600</sub> 之關係

## 伍、研究結果：

### 一、採樣點與等溫線圖

本研究中三個樣區皆屬中溫溫泉，溫度及 pH 值上均有差異，從文山的最低溫 35°C 到安通的 62°C 皆有細菌被鑑定出來；文山及紅葉的 pH 值上較接近中性，而安通 pH 值為 9.5~10.4。



圖(二) 安通溫泉(代號為 A)

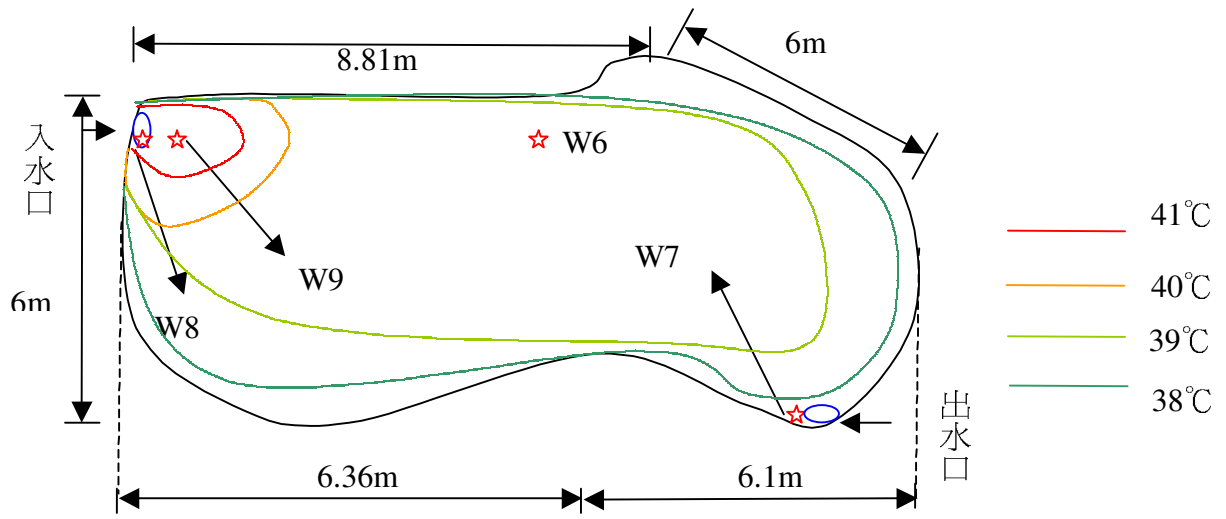


圖(三)安通露頭溫泉全景

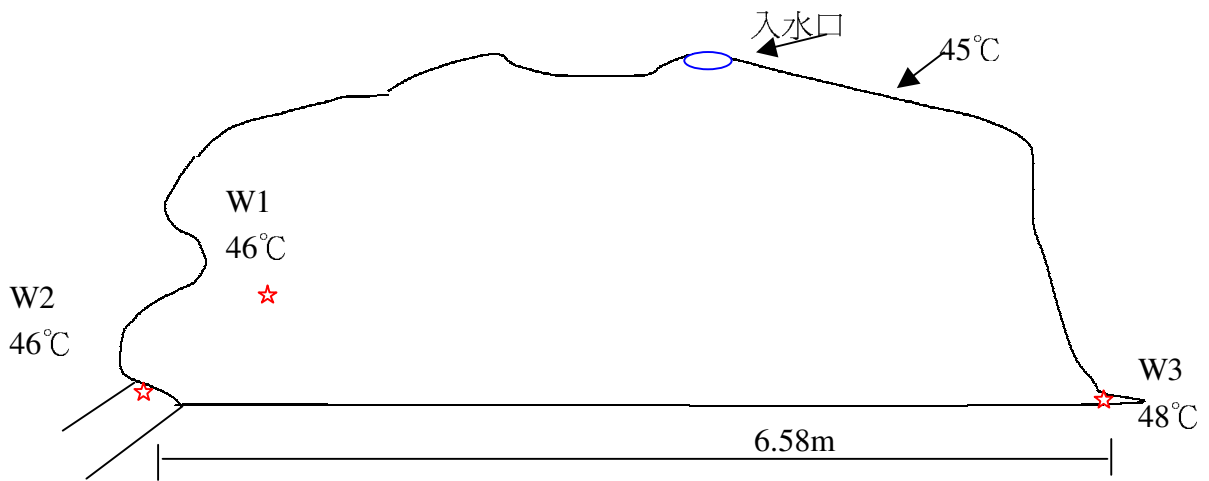


圖(四)採樣點 A13





圖(五)文山溫泉(代號為 W)熱池



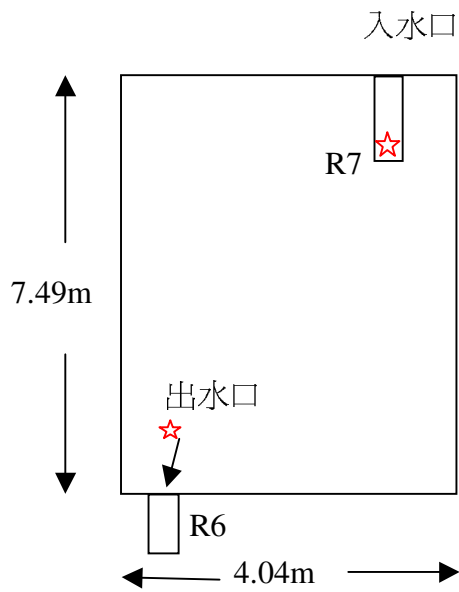
圖(六)文山溫泉溫池



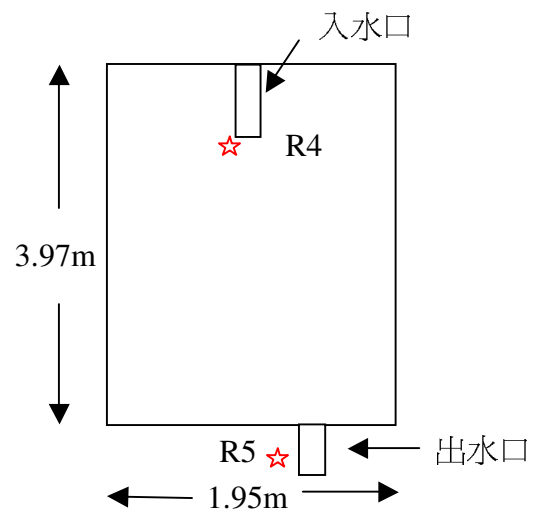
圖(九)文山溫泉熱池全景



圖(十)文山溫泉溫池全景



圖(七)紅葉男室內大眾池



圖(八)紅葉露天大眾池



圖(十一)紅葉溫泉 R1.R2 取樣點(pH8.3)

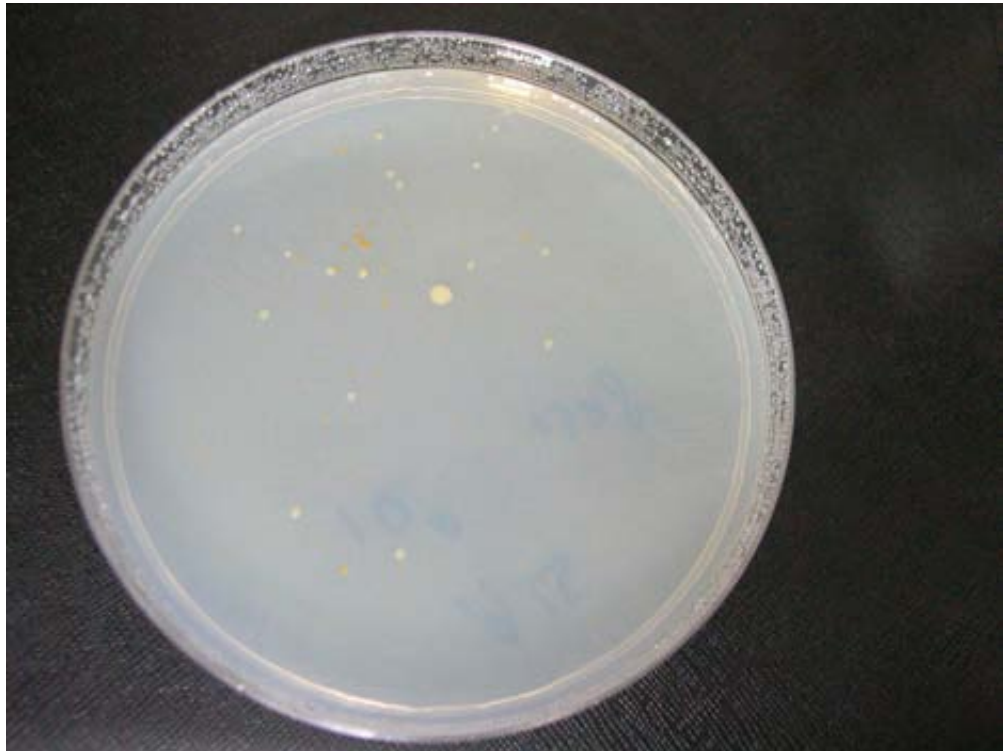


圖(十二)R3 取樣點(pH7.8)

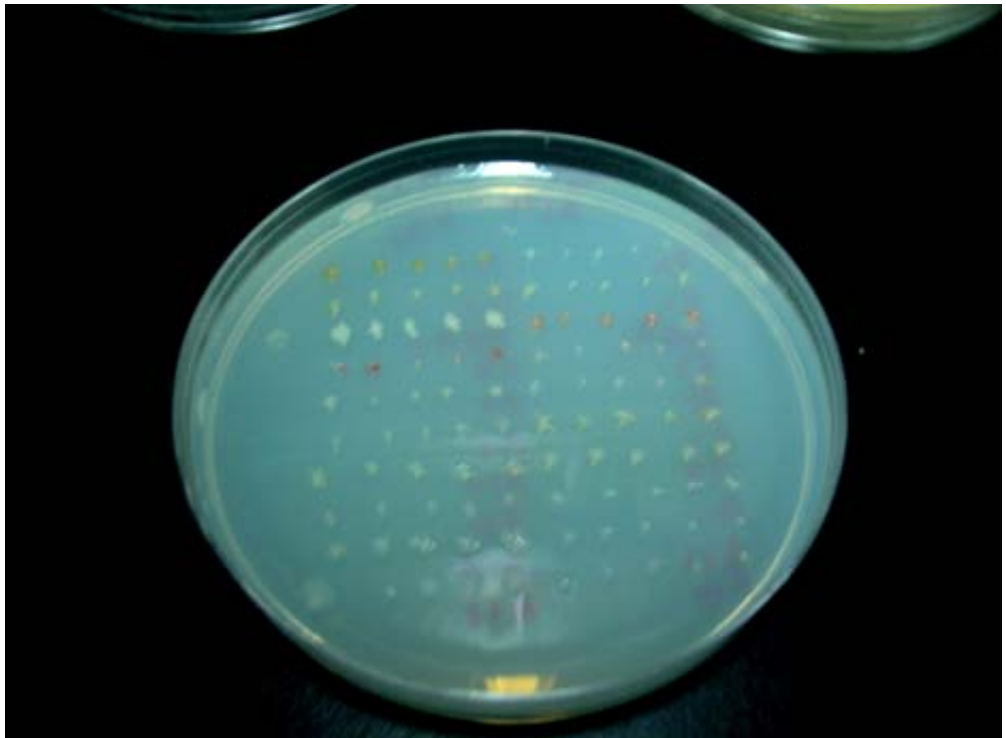


圖(十三)R4 取樣點(pH7.4)

二、菌種培養：

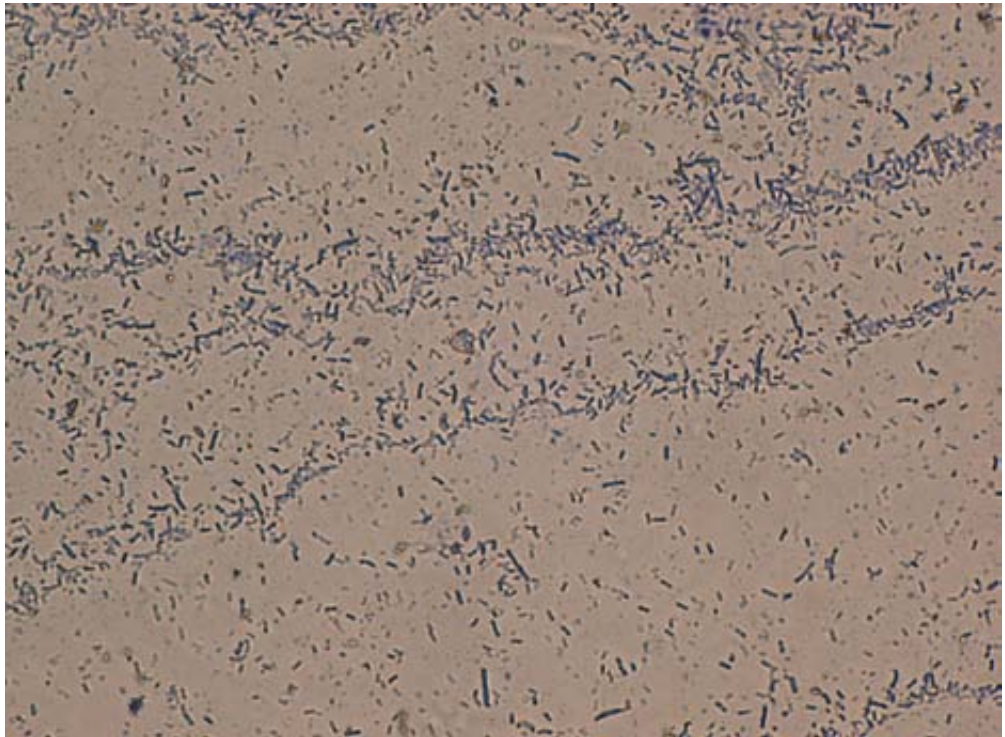


圖(十四) 從溫泉水樣中培養情形：安通溫泉 11 個水樣，文山溫泉 9 個，紅葉 7 個。

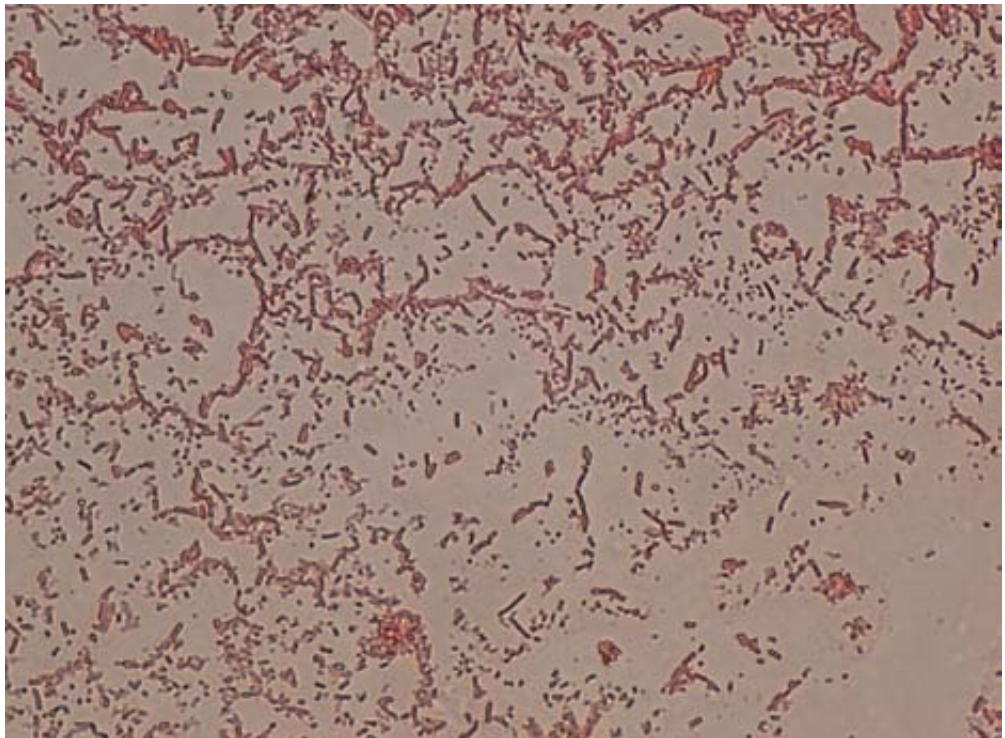


圖(十五) 繼代培養：安通 120 株(如上圖)，文山 55 株，紅葉 13 株

三、革蘭氏染色：



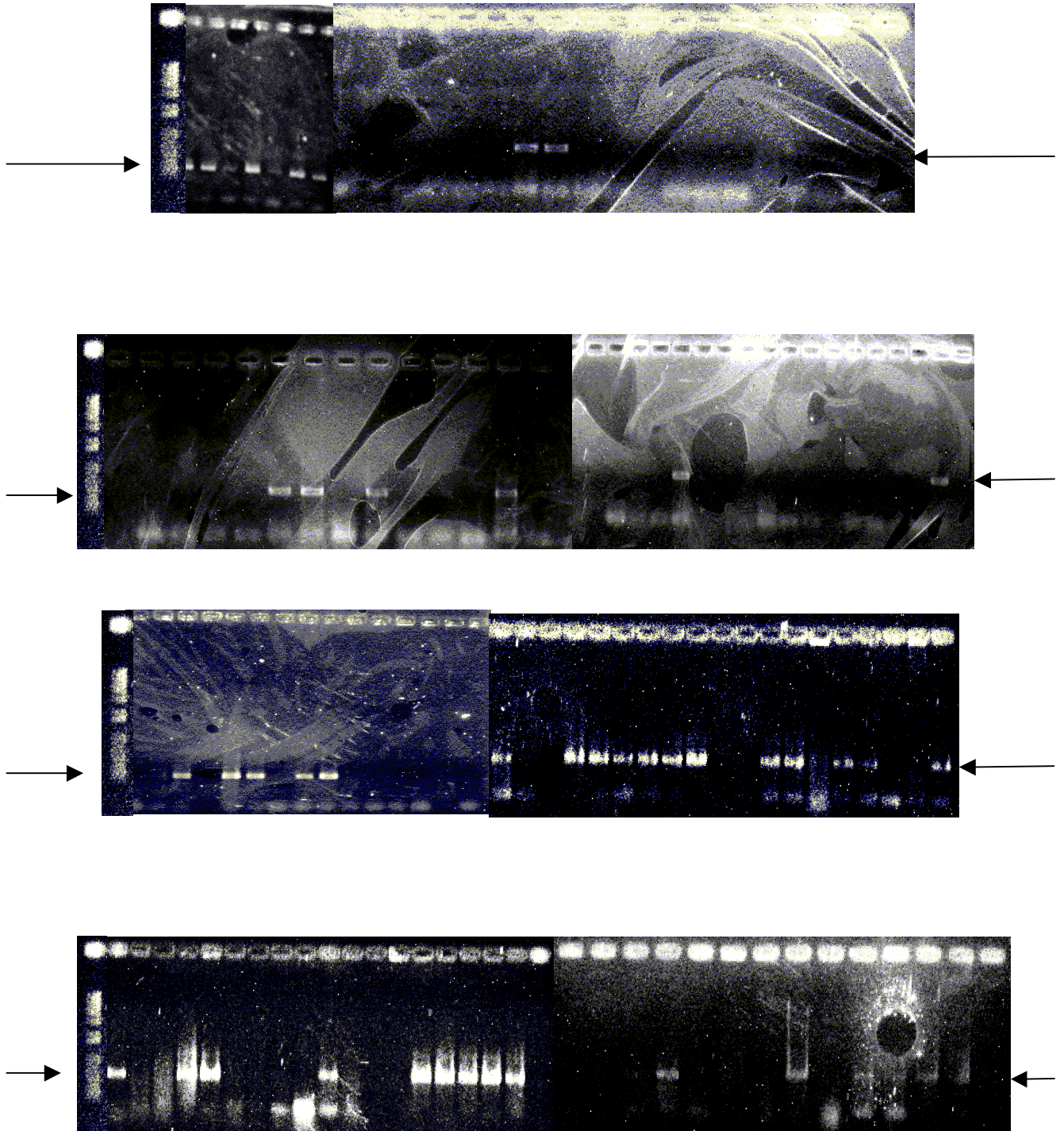
圖(十六) 革蘭氏陽性菌，共 145 個菌株



圖(十七) 革蘭氏陰性菌，共 37 個菌株

#### 四、菌種鑑定

(一) PCR：取 76 株菌之 DNA 進行 PCR 反應，結果 58 株有產物(圖十八)



箭頭所指之處表示 PCR 結果

圖(十八)膠體電泳的結果

(二) 定序反應：將 58 個 PCR 產物定序，經 GenBank 序列比對後得到表(二)結果

表(二)各採樣點之細菌鑑定

溫泉	菌種編號	採樣點	細菌學名	採樣點環境
安通		A1	* (* 表無培養出細菌 # 表 PCR 無結果 ◦ 表已重複出現於其他採樣點)	66°C，底質無附著物，出水口，流動性高，。
	1	A2	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	62°C，底質上交雜著綠色與灰黑色，水流較緩。
	2		<i>Brevibacillus thermoruber</i>	
			◦ <i>Brevibacillus sp.</i>	
		A3	*	55°C，底質上交雜著綠色與灰黑色，水流較緩。
	3	A4	<i>Bacillus sp.</i>	55°C，底質呈綠色，近出水口，水流較快。
	4		<i>Geobacillus sp.</i>	
	5		<i>Tepidimonas ignava</i>	
		A5	*	62°C，底質上交雜著綠色與灰黑色。
		A6	#	57°C，底質交雜著綠色、深綠色及鐵銹色。
		A7	*	60°C，溫泉排廢水口，水流快，底質交雜著鐵銹、黃、綠色。
	6	A8	<i>Xanthomonas sp.</i>	60°C，底質為深紅色，呈片狀。
			◦ <i>Brevibacillus sp.</i>	
		A9	◦ <i>Geobacillus sp.</i>	60°C，底部為深綠色，呈片狀。
			◦ <i>Brevibacillus sp.</i>	
	A10	#	60°C，底部為青綠色，呈片狀。	
	A11	#	58°C，底部為橘色，呈片狀。	
	A12	◦ <i>Xanthomonas sp.</i>	54°C，白色和綠色交雜在池邊及木塊上。	
	A13	*	49°C，池邊交界處為白色、綠色生物交雜。	
	7	W1	<i>Brachymonas petroleovorans</i>	48°C，最高溫，底質有綠色。
	8	W2	<i>Ramlibacter henchirensis</i>	46°C，出水口。
	9	W3	<i>Deinococcus sp.</i>	46°C，暗黃色岩壁。



文山			◦ <i>Brachymonas petroleovorans</i>	35°C , 石頭附近的水
	10	W4	<i>Caenibacterium thermophilum</i>	
			◦ <i>Tepidimonas ignava</i>	
			◦ <i>Geobacillus sp.</i>	
		W5	◦ <i>Tepidimonas ignava</i>	35°C , 石頭沖下的水
		W6	◦ <i>Tepidimonas ignava</i>	40°C , 綠色岩壁
		W7	◦ <i>Tepidimonas ignava</i>	39°C , 出水口
		W8	◦ <i>Tepidimonas ignava</i>	44°C , 綠色岩壁
		W9	◦ <i>Tepidimonas ignava</i>	44°C , 白色漂浮物
	◦ <i>Deinococcus sp.</i>			
紅葉		R1	*	79°C , 水管外圍結晶
		R2	*	79°C , 水管外圍結晶
		R3 11	◦ <i>Ramlibacter henchirensis</i>	41°C , pH7.8
			◦ <i>Deinococcus geothermalis</i>	
			<i>Meiothermus silvanus</i>	
		R4	◦ <i>Tepidimonas ignava</i>	41°C , 入水口
			◦ <i>Brachymonas petroleovorans</i>	
		R5	◦ <i>Deinococcus geothermalis</i>	35°C , 出水口
		R6	◦ <i>Tepidimonas ignava</i>	43°C , 出水口
12	R7	<i>Thermomonas haemolytica</i>	48°C , 入水口	

表(三)溫泉菌之特性

菌種	基本特性	採樣點環境
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	G(+) 生長溫度在 37°C-66°C 之間 pH 值介於 8.0-10.5 之間 會產生內孢子 (Pikuta E, et al 2003)	62°C , pH9.5
<i>Brevibacillus thermoruber</i>	G(+) 或 革蘭氏不定性 具鞭毛及移動性 生長溫度 37—56°C 。 會產生內孢子 (陳, 2002)	60、62°C 採樣點底質有顏色
<i>Bacillus sp.</i>	G(+) 或 革蘭氏不定性 嗜熱菌中最早被發現的屬 生長於 37-59°C 會產生內孢子 (陳, 2002)	55°C 採樣點水流速度快, 底質 為綠色。
<i>Xanthomonas sp.</i>	G(-)	60°C 及 54°C
<i>Geobacillus sp.</i>	G(+) 生長溫度 50-75°C 。 (Nazina TN, et al, 2001)	55、60、35°C 底質綠色
<i>Tepidimonas ignava</i>	G(+) 最適生長溫度為 55°C 。 (Moreira C, et al, 2000)	55°C、35-44°C 分布於三個溫泉區
<i>Caenibacterium thermophilum</i>	G(-) 最適生長溫度為 47°C 。 (Manaia C, et al, 2003)	35°C
<i>Brachymonas petroleovorans</i>	G(+)	48、35、41°C
<i>Ramlibacter henchirensis</i>	G(-), 無鞭毛或孢囊 (Heulin T, et al, 2003)	46、41°C , pH7.8
<i>Deinococcus sp.</i>	G(-) 最適生長溫度 45-50°C 產生橘色菌落 (Ferreira AC, et al, 1997)	35、41、44、46°C , pH7.8
<i>Meiothermus silvanus</i>	G(-) 最適生長溫度 55°C 產生黃色菌落 (Tenreiro.S, et al, 1995)	41°C , pH7.8
<i>Thermomonas haemolytica</i>	G(-) (Busse HJ, et al, 2002)	48°C

五、觀察不同溫度下各菌之生長

表(四)不同溫度下溫泉菌的生長 (+ 表能生長, - 表不能生長)

學名	採樣點	42°C	52°C	62°C
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	A2	+	+	-
<i>Brevibacillus thermoruber</i>	A2	+	+	+
	A8. A9. A2	+	+	-
<i>Bacillus sp.</i>	A8	+	+	-
<i>Geobacillus sp.</i>	A4	+	+	-
	A9	-	+	+
<i>Tepidimonas ignava</i>	A4	+	+	+
	W4.5.6.7.8.9, R4.6	+	+	-
	W9	-	+	-
<i>Xanthomonas sp.</i>	A8 A12	-	+	-
<i>Brachymonas petroleovorans</i>	W1. W4. R4	+	+	-
<i>Ramlibacter henchirensis</i>	W2. R3	+	+	-
<i>Deinococcus sp.</i>	R3. R5. W9. W3	+	+	-
<i>Caenibacterium thermophilum</i>	W4	+	+	-
<i>Meiothermus silvanus</i>	R3	+	+	-
<i>Thermomonas haemolytica</i>	R7	+	+	-

六、不同溫泉水中各菌的生長情形

表(五)溫泉菌於不同溫泉水中的生長情形 (菌數以  $10^8$  為單位)

編號	細菌學名	安通溫泉水	文山溫泉水	紅葉溫泉水
1	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	2.00	3.15	2.77
2	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	4.18	5.63	3.58
3	<i>Bacillus sp.</i>	5.64	7.42	6.1
4	<i>Geobacillus sp.</i>	2.33	2.54	2.85
5	<i>Tepidimonas ignava</i>	5.31	3.78	5.46
6	<i>Xanthomonas sp.</i>	12.3	11.7	8.49

## 陸、討論：

一、本研究對 29 個取樣點水樣進行細菌培養，有 22 個取樣點有培養出細菌；76 株菌種進行 PCR 反應，58 株有結果。經序列比對，共鑑定出 12 屬，其中 10 屬可鑑定至種，所有菌種在 GenBank 序列比對的相似度都在 98% 以上，其中有 2 株菌種由於定序結果出現許多無法定出的序列，故無法確認。

### 二、鑑定結果與分布差異

#### (一) 鑑定結果分析

革蘭氏陽性菌有：*Anoxybacillus*、*Brevibacillus*、*Geobacillus*、*Bacillus*、*Tepidimonas*，革蘭氏陰性菌有：*Caenibacterium*、*Ramlibacter*、*Thermomonas*、*Meiothermus*、*Xanthomonas*、*Deinococcus*，其中 *Tepidimonas ignava* 在三區皆有分布，*Brachymonas petroleovorans*、*Deinococcus sp.*及 *Ramlibacter henchirensis* 在文山及紅葉皆有分布，*Geobacillus sp.*在安通及文山皆分布。

#### (二) 各溫泉之溫泉菌分布差異

##### 1、各區溫泉之分布

三區都各鑑定出 6 屬菌(見表二)。安通的 *Anoxybacillus*、*Brevibacillus*、*Bacillus*、*Geobacillus* 因親緣關係較近，可歸類為 Bacilli 群。本研究中發現此區 Bacilli 群分布最多，此現象與陳，2002 所提相符，高溫、中鹼性的溫泉區以 Bacilli 群分布較廣，可能與其能夠產生內孢子較易傳播有關。

文山以 *Tepidimonas ignava* 分布最廣；紅葉的 *Meiothermus*，依前人論述在全台灣溫泉分布廣泛，但在花蓮區卻只分布在紅葉區。此外，紅葉溫泉 R1、R2 取樣點為剛從地底打出 79°C 燙泉水。將 R1、R2 取樣點的水樣培養在 52°C 時沒有發現細菌，推測可能因採樣點剛從地底冒出細菌數太少；亦可能是此區菌種屬較高溫嗜熱菌，但我們的培養條件為 52°C，致養不出細菌。

##### 2、三區溫泉之比較

紅葉與文山都有頻繁的泡湯活動，初步推測紅葉與文山的菌種對人為干擾耐受性較強，比對發現兩區 8 種菌中有 4 種相同；安通取樣點溫度高，人為干擾少，與文山只有 2 屬相同，與紅葉只有 1 屬相同。

#### (三) 特殊的菌種介紹

##### 1、新紀錄種

台大植研所陳懋彥「台灣地區嗜熱性溫泉菌之研究」中，共紀錄 15 屬溫泉菌；本研究所做的菌種中 *Bacillus*、*Brevibacillus*、*Geobacillus*、*Deinococcus*、*Meiothermus* 五屬與論文中一致，另有 *Brachymonas*、*Ramlibacter*、*Tepidimonas*、*Thermomonas*、*Caenibacterium*、*Anoxybacillus*、*Xanthomonas* 七屬尚未查閱到台灣有紀錄，可能是台灣的新紀錄種，可見台灣未知領域非常寬廣。

## 2、*Tepidimonas ignava*

*Tepidimonas ignava* 在三個採樣區中皆有分布，但安通溫泉中，僅出現於一取樣點，推測可能與 *Bacilli* 群間的競爭較弱所致。

文山溫泉共有三個池，熱池由於溫度較高，遊客較少，人為干擾相對較少，取樣點中皆沒有這種細菌；溫池中，遊客較多，*Tepidimonas*

*ignava* 分布於每個採樣點；推測可能因 *Tepidimonas ignava* 與其他菌競爭力弱，但對人為干擾的耐受性較好；若此假說成立，則紅葉也有人為干擾，也應出現 *Tepidimonas ignava*，經查證，得知紅葉亦有此菌分布，符合此推論。

## 3、*Geobacillus* 與 *Brevibacillus*

根據陳,2002，*Geobacillus* 與 *Brevibacillus* 在 *Bacilli* 群中是生長溫度較低的兩屬，從台灣區溫泉菌的研究中發現 *Bacilli* 群是台灣分布最廣的一屬，而文山溫泉中只發現 *Geobacillus sp.* 卻沒有 *Brevibacillus sp.* 的細菌，文獻顯示文山溫泉的條件符合這兩屬菌的生長適應範圍，因此我們推測可能與文山的取樣點較少我們沒採到或人為干擾多不利其生存，以致我們只看到 *Geobacillus*，未來若有機會將更進一步取樣以驗證之。

## 4、*Xanthomonas sp.*

在安通溫泉 54°C 與 60°C 的兩個採樣點發現此屬細菌，是較嗜高溫的菌，序列比對上 100% 相似，由於我們在鑑定時使用的 16S rDNA 片段可能長度不足，無法在 GenBank 中判定細菌的種名，此菌種還待進一步研究。

## 5、*Ramlibacter henchirensis*

此菌種在 GenBank 序列比對的相似度在 98% 以上，從新種發表文獻知此菌是由沙漠下被分離出的土壤菌，竟然也在文山及紅葉溫泉環境中鑑定出，顯示此種細菌的分布環境非常廣泛。

### 三、溫度對溫泉菌生長的影響：

從繼代培養中選取的 12 株菌中，再個別作 42°C、52°C、62°C 的培養，42°C 有三種菌未長，62°C 中有 8 種菌未長，可生長種數由多到少為 52°C、42°C、62°C，因菌種都是在 52°C 下所培養出來，故某些較適合高溫生長的細菌可能已被篩除。

#### (一) 各區溫泉菌在同溫中的生長比較：

在 62°C 的培養基中，安通 6 屬中長出 3 屬，文山及紅葉皆無；在 42°C 中安通區有 2 株未長、文山區有 1 株、紅葉皆可生長。而在 62°C 中，生長株數由多至少為安通、文山、紅葉；42°C 時由多至少則為紅葉、文山、安通。可能因採樣區溫度不同，經過環境馴化，所以在高溫的環境下，安通的菌種在高溫下生長情形較好。

文山與紅葉所採樣菌種都無法在 62°C 下生長，此溫度與安通的溫度相似，由上述分布之差異可推知溫度是影響溫泉菌分布的主要原因。

## (二) 各溫度中特殊種的分析：

### 1、在 62°C 中能生長的菌：

*Tepidimonas ignava* 取自安通 55°C 的菌株在 62°C 能長；取自文山 40°C 採樣點取到的菌株在 62°C 不能生長。另外，*Geobacillus sp* 取自安通 60°C 取到的菌株在 62°C 能長，取自文山 35°C 所取到的菌株在 62°C 不能長，不同溫度採樣點所選取的同種菌，放入新的溫度下有不同生長情形。究其原因可能是長期在不同溫度下生活，被環境所馴化，採自低溫的菌株耐熱蛋白尚未被誘導出來時突然被轉移至高溫的環境，菌株的基因調控來不及應變，取自低溫的菌在 52°C 中可存活，62°C 中不能存活，取自 55°C 的菌在 62°C 可存活，故推測其耐熱蛋白誘導溫度可能介於 52°C~55°C。

### 2、在 42°C 中未生長的菌：

在 55°C 的採樣點分離出的 *Geobacillus sp.* 在 42°C 時能長，但在 60°C 下的採樣點為分離出的 *Geobacillus sp.* 在 42°C 下不能長，亦為同種菌在不同取樣環境下得到不同實驗結果，其原因可能也是菌株的基因調控來不及應變所致。

## 四、更換溫泉水之實驗探討

根據表（四）可知取樣菌株在其他溫泉水中生長情形並無很大變化，可知三個溫泉的 pH 及離子的差異不是影響其生長的主要限制因子。

## 五、研究結果與文獻比較

本研究與台灣地區嗜熱性細菌之研究皆對文山溫泉進行採樣，由於陳，2002 未標明採樣點的鑑定結果，只推知本研究文山六屬菌中最多只有兩屬與陳之結果相同，僅兩次不同時間的採樣竟有如此大的差異，顯示花蓮地區溫泉菌多樣性的豐富。

## 六、研究時的困難與克服：

### (一) 充實背景知識

剛開始我們對細菌十分陌生，對採樣方法、PCR 與膠體電泳的技術、DNA 序列比對以及後續的實驗方法上更沒多少概念。必須從書本網路尋找相關資料，並經常請教老師及教授。我們學會如何在大量資訊中找尋所需的資料。

### (二) 搜尋菌種資料

當鑑定序列回傳後，使用 GenBank 做序列比對，並尋找菌種相關資料等成了一大挑戰。網路上的資訊是那麼的多，但真正可用的資料卻那麼的少。在一大片英文字海中，使我們深刻體會英文能力的重要性。經過努力翻閱字典後，不但找到所需資料、學會使用 GenBank，更學會很多字彙！

### (三) 尋求協助

實驗中所需的器材大多非常昂貴而非我們可負擔。而一些實驗的技巧、方法，在所查閱的文獻中也未描寫詳盡，因此，逼著我們必須向外求助。我們很高興能順利得到慈濟大學的實驗室協助，知道很多實驗的方法及態度，並在各種實驗技巧上得到磨練。

### (四) 實驗過程

花蓮很多溫泉地處偏僻，如二子山溫泉單程需步行四個小時左右；採樣期間又逢大雨特報，基於安全性考量，只能選取花蓮區開發最早的三個溫泉—安通、文山與紅葉溫泉作為取樣區。

雖然有實驗室提供協助，但還有些實驗器材不足，及不知如何下手的情況：一開始不知該用何種培養基，查閱文獻並經測試四種培養基後，才找出能養出細菌的培養基；我們整能借到一個培養箱，其最高只達 65°C，故溫度實驗中培養的溫度範圍僅限於 42°C、52°C、62°C；我們使用的恆溫箱只能培養出好氧性或兼氧性的細菌，若有厭氧性的細菌就無法培養出來，此部分只待另有設備才能進行。

## 七、基礎研究的價值與其未來展望

這次科展最大的貢獻在於對花蓮地區溫泉菌作基礎的調查，過去沒有人對花蓮區溫泉菌作整體性調查，更顯得這是一個寶貴的結果。我們從其他文獻中得知人為開發對溫泉菌的影響很大，而花蓮地區的溫泉隨著觀光業的興起也逐步開發，許多較原始的溫泉環境都被興建成商業化的溫泉池，加上定期清洗與遊客的干擾，可能已有許多溫泉菌在尚未紀錄前就消失，所以這一份報告可作為日後比對花蓮區溫泉菌多樣性的參考文獻。

由前人文獻中可發現溫泉菌有許多特別的應用潛力，如 *Deinococcus* (Ferreira AC. et al, 1997) 有抗輻射的特性；每一種細菌都有其特性，小小微生物卻蘊藏著無窮的可能，希望未來有更多人能投入這個領域探討這些小生命的奧秘。

## 柒、結論：

- 一、從安通、文山、紅葉溫泉鑑定出 12 屬以及明確的 10 種溫泉菌，安通、文山、紅葉各 6 屬。
- 二、同一種菌可能被不同環境馴化後對溫度有不同的耐受性。
- 三、*Tepidimonas ignava* 之耐高溫蛋白誘導溫度範圍可能在 52°C 至 55°C 之間。
- 四、溫泉水水質不是已知菌種的生長限制因子。
- 五、溫泉水之溫度會影響菌種的生長。
- 六、*Tepidimonas ignava* 為分布最廣的菌種。
- 七、*Tepidimonas ignava* 與 *Deinococcus sp.* 對人為影響可能有較高的耐受性。
- 八、安通溫泉分布最多的為 Bacilli 群，文山溫泉為 *Tepidimonas ignava*，紅葉則無明顯優勢種。

## 捌、參考資料及其他：

- 一、高中基礎生物 楊榮祥主編 康熙圖書
- 二、Campbell 生物學 Neil A. Campbell 著 李家維等人編譯 偉明圖書
- 三、台灣能源礦產及地下水資源 魏稽生主編 經濟部
- 四、台灣地熱區嗜熱性細菌之研究 陳懋彥 國立台灣大學植物學研究所博士論文
- 五、菌種資料庫中心(GenBank)：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 六、菌種中心：<http://www.dsmz.de>
- 七、台灣溫泉探勘服務網：<http://www.twem.idv.tw>
- 八、生物多樣性 Andrew P.Dobson 著 陳立人譯
- 九、**Busse HJ, Kampfer P, Moore ER, Nuutinen J, Tsitko IV, Denner EB, Vauterin L, Valens M, Rossello-Mora R, Salkinoja-Salonen MS.(2002)** *Thermomonas haemolytica* gen. Nov., sp. Nov., a gamma-proteobacterium from kaolin slurry. *Int J Syst Microbiol.* 2002 Mar;52(Pt 2):473-83.
- 十、**Heulin, T., Barakat, M., Christen, R., Lesourd, M., Sutra, L., De Luca, G., Achouak, W.(2003)** *Ramlibacter tataouinensis* gen. nov., sp. nov., and *Ramlibacter henchirensis* sp. nov., cyst-producing bacteria isolated from sub-desert soil in Tunisia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- 十一、**Manaia, C. M., Nunes, O. C., Nogales, B.(2003)** *Caenibacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov., isolated from a thermophilic aerobic digester of municipal sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*



- 十二、**Pikuta E, Lysenko A, Chuvilskaya N, Mendrock U, Hippe H, Suzina N, Nikitin D, Osipov G, Laurinavichius K. (2001)** . *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* Mar;51(Pt 2):433-46
- 十三、**Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE, Lysenko AM, Petrunyaka VV, Osipov GA, Belyaev SS, Ivanov MV.(2001)** Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(Pt 2):433-46
- 十四、**Moreira C, Rainey FA, Nobre MF, da Silva MT, da Costa MS. (2000)** *Tepidimonas ignava* gen. nov., sp. nov., a new chemolithoheterotrophic and slightly thermophilic member of the beta-Proteobacteria.  
*Int J Syst Evol Microbiol.* 2000 Mar;50 Pt 2:735-42
- 十五、**Ferreira AC, Nobre MF, Rainey FA, Silva MT, Wait R, Burghardt J, Chung AP, da Costa MS. (1997)** *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs. *Int J Syst Bacteriol.* 1997 Oct;47(4):939-47.
- 十六、**Tenreiro,s.,Nobre,M.F. & da Costa, M.S.(1995).** *Thermus silvanus* sp. Nov. and *Thermus chliarophilus* sp. Nov., two new species related to *thermos ruber* but with lower growth temperatures.*Int J Syst Bacteriol* **45**,633-639.

## 玖、誌謝：

- 1.慈濟大學林念聰教授實驗室及研究生提供器材及技術方面的支援。
- 2.瑞穗地區以及紅葉溫泉業者的熱情贊助。
- 3.組員們的家長大力支持。
- 4.採樣時同學們的熱心協助。

## 評語

040703 高中組生物科 第二名

花蓮區溫泉菌之研究

1. 題材及研究方向正確。
2. 菌種分析方法精確。
3. 具深入研究潛力。