

中華民國 第 49 屆中小學科學展覽會

作品說明書

---

高中組 生物（生命科學）科

040721

篩選兩點鋸鋏形蟲分解纖維素之腸內菌

學校名稱：國立溪湖高級中學

作者：  高二 邱鈺婷  高二 周玟岑  高二 楊佩軒  高二 莊玉錚	指導老師：  楊雅雯  許少岳
---	-----------------------------

關鍵詞：纖維素、纖維素分解菌株

## 摘要

本實驗使用兩點鋸楸形蟲的二齡幼蟲，將腸內菌分為前腸培養、後腸培養、上清液培養、下清液培養，以有氧環境或厭氧環境中培養，來分析菌相是否具有差別。結果顯示前腸與後腸純化後菌落種類相似。下清液較上清液具有較多真菌，而純化出來的細菌菌落種類相似。在有氧環境中共培育純化出 35 種菌落，其中有 3 種菌落有分解纖維素的分解圈形成；在厭氧環境中，共培育純化出 81 種菌落，其中有 4 種菌落有分解圈的形成。從我們的實驗顯示兩點鋸楸形蟲幼蟲的腸內菌大多都是厭氧菌，但是不論有氧、厭氧皆有可分解纖維素能力的微生物。

## 壹、研究動機

近年來全世界的目光已轉向生產生物乙醇和生物氫氣作為應對全球暖化和增進全球能源安全的策略上。木質纖維素是地球上量最豐富的生質物，若能將木質纖維素分解醱化，它正是用微生物以發酵的方式生產乙醇或氫氣的最佳原物料。鋤形蟲的幼蟲生活在尚未完全腐朽的木頭中，又不似白蟻腸道中有鞭毛蟲共生，故我們認為是極有潛力篩選到分解木質纖維素能力的微生物。剛好學校自然生態研究社有養甲蟲，在一番了解後，決定以台灣產兩點鋤形蟲的二齡幼蟲為樣本。而我們又好奇腸道的前、後段的腸內菌是否相同？如果直接放腸子能培養嗎？而洗出來的菌是否會因重量不同而分布在水中的不同深度？

## 貳、研究目的

1. 研究兩點鋤形蟲的幼蟲腸道內，有無分解纖維素的菌。
2. 將腸道分為前腸及後腸，比較腸道內的細菌有無差異。
3. 將清洗過腸子的清液分別吸取上清液及下清液，比較細菌有無差異。
4. 於有氧及厭氧的環境下培育，探討其細菌種類有無差異。

## 參、研究設備及器材

### 一、藥品

- |                                       |                           |
|---------------------------------------|---------------------------|
| 1. 牛肉膏 Beef Extract Pste              | 5. 羧甲基纖維素鈉 Sodium Carboxy |
| 2. 寒天末 Agar Powder                    | Methyl Cellulose          |
| 3. 蛋白凍 Peptone Fype1, Bacteriological | 6. 酒精 Ethyl Alcohol       |
| 4. 氯化鈉 Sodium Chloride                | 7. 無菌水                    |
|                                       | 8. 剛果紅                    |

### 二、器材

- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| 1. 酸鹼度計 pH meter            | 15. 保鮮膜                                    |
| 2. 加熱板                      | 16. 密封罐                                    |
| 3. 高壓滅菌鍋                    | 17. 鋁箔紙                                    |
| 4. 恆溫箱                      | 18. 產氣包 (CO <sub>2</sub> +N <sub>2</sub> ) |
| 5. 無菌操作台                    | 19. 照相機                                    |
| 6. 電子秤                      | 20. 解剖盤                                    |
| 7. 燒杯                       | 21. 大頭針                                    |
| 8. 酒精燈                      | 22. 錐形瓶                                    |
| 9. 接種環                      | 23. 噴霧器                                    |
| 10. 培養皿                     | 24. 磁石                                     |
| 11. 解剖刀                     | 25. 微量塑膠吸管                                 |
| 12. 酒精棉                     | 26. L 玻棒                                   |
| 13. 鑷子                      | 27. 微量離心管                                  |
| 14. 微量吸管 Pluripet (0.5-1ml) | 28. 打火機                                    |

## 肆、研究過程或方法

一、

### (一) 藥品配置

#### 1. 牛肉膏：

先量 1000ml 的蒸餾水  $\xrightarrow{\text{倒出一點}}$  溶解牛肉膏 3g  $\xrightarrow{\text{加入}}$  蛋白凍 8g、NaCl 5g  
 $\xrightarrow{\text{測 pH 值達到 } 7.0 \pm 0.1 \text{ 再加入}}$  瓊脂 20g  $\xrightarrow{\text{加熱即完成}}$  置入滅菌鍋滅菌。

#### 2. 纖維素：

先量 1000ml 的蒸餾水  $\xrightarrow{\text{倒出一點}}$  溶解 CMC 3g 倒入溶液  $\xrightarrow{\text{加入}}$  溶解牛肉膏 1.5g  $\xrightarrow{\text{加入}}$   
蛋白凍 5g、NaCl 5g  $\xrightarrow{\text{測 pH 值達到 } 7.0 \pm 0.1 \text{ 再加入}}$  瓊脂 20g  $\xrightarrow{\text{加熱即完成}}$  置入滅菌鍋滅菌。

3. 剛果紅：先量 0.1g 的剛果紅  $\xrightarrow{\text{倒入}}$  90ml 的蒸餾水及 95% 酒精 10ml 即配置完成。

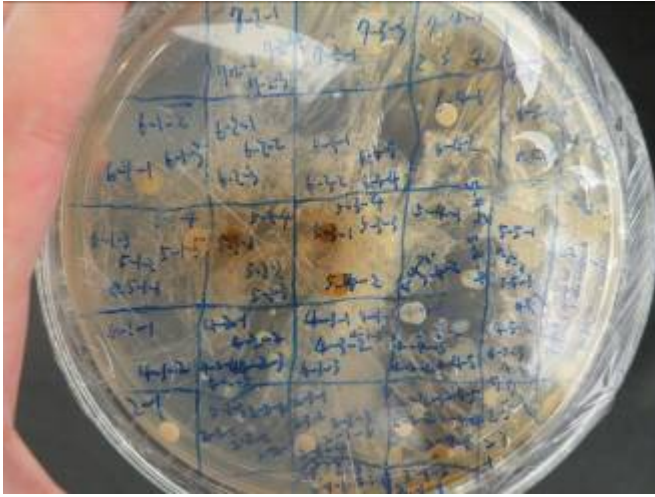
4. 1M NaCl：先量 500ml 蒸餾水  $\xrightarrow{\text{倒入}}$  2.9225g NaCl 即配置完成。

### (二) 實驗過程：

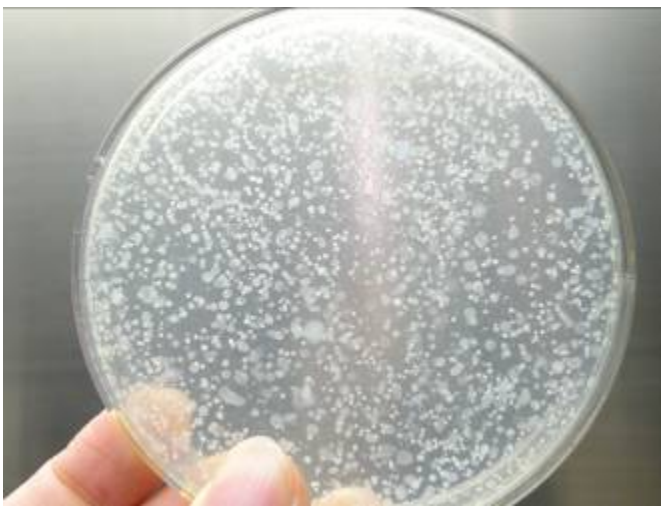
先用酒精棉將蟲的表面擦拭乾淨，再用大頭針固定於解剖盤上，於無菌操作台用剪刀及鑷子直剖並取出腸子放入無菌水中攪拌，使其清楚可見，將腸子分成前腸及後腸再分別置於培養基中（圖一），再將洗過腸子的無菌水靜置 20 分鐘，分成上清液及下清液，各分別稀釋為 1/10、1/100、1/1000，再用 L 型玻棒劃於培養基上（圖三），之後再分成兩批（有氧及厭氧），分別放入恆溫箱（35℃）及密封罐（放產氣包）置於培養箱中（25℃）培育，靜待觀察（有氧：約三天，厭氧：約一至二禮拜），等菌長到一定程度後，經我們的觀察，發現稀釋成 1/1000 的菌落較分明，所以我們採用，在培養基上畫格子（如圖二）再將位於不同格內的菌一一編號，並用無菌牙籤（鈍的那一邊）點入新的纖維素培養基中（培養基中若有兩個接近的菌，即採用劃線法將其純化），等待菌長出後，倒入 10ml 的剛果紅將其染色，靜置 10 至 15 分後到出，再倒入 10ml 的 1MNaCl 將其退染，靜置 1 分鐘後到出，觀察其周圍是否有分解圈的形成。



圖一 銹形蟲幼蟲之後腸道



圖二 清液稀釋為 1/1000 並劃格子標記號



圖三 銹形蟲幼蟲之上清液塗抹培養基

### (三) 研究材料與方法

#### 1. 篩菌步驟

先取 1.5ml 之無菌水於微量離心管中，在用接種環取一點菌落於微量離心管，震盪其管內物質使均勻分布，再以接種環沾取菌液，接種至平面培養基上，再沿培養基表面劃線後，置於有氧（35°C）培養箱、厭氧（25°C）培養箱內培養，隔天觀察細菌菌落之形成（圖四），再以同樣方法純化菌落直到為單一菌落為止。



圖四 鍬形蟲幼蟲菌落純化

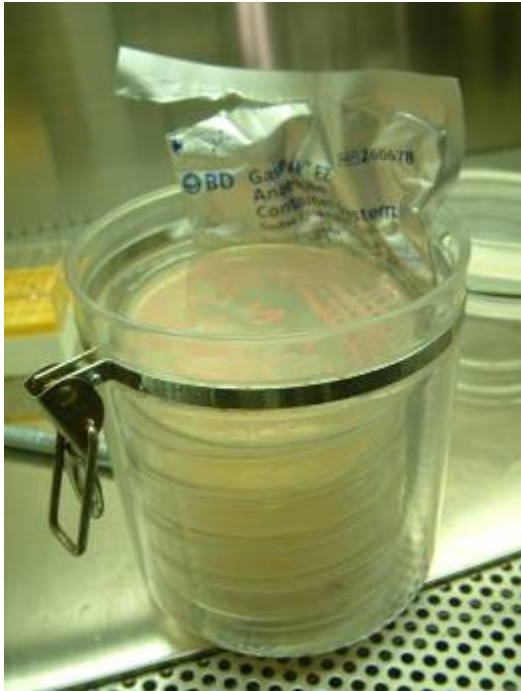
## 2. 菌株保存

### (1) 有氧：

將點好的培養基用保鮮膜將其密封，避免其遭受外界菌污染，置於 4°C 下保存，約 2 個星期活化更新一次；並重新進行纖維素分解試驗，留下分解能力未退化之菌株。

### (2) 厭氧：

將點好的培養基置入密封罐中並放入產氣包（圖五）置於培養箱中（25°C）保存，約 2 個星期活化更新一次；並重新進行纖維素分解試驗，留下分解能力未退化之菌株。



圖五 密封罐及產氣包

## 伍、研究結果

### 1. 有氧

在前腸（圖六）及後腸（圖七）內有氧環境下，我們發現 2 種不同的菌落。使用塗抹法將清液分為上清液（圖八）及下清液（圖九），下清液中的真菌較上清液為多，因我們沒有打算培養真菌，故只有純化細菌菌落，一共發現 35 種不同菌落。而且菌落種類純化後都類似，所以我們將前腸及後腸，與上清液及下清液併為討論（表一）



圖六 有氧環境鍬形蟲幼蟲之前腸

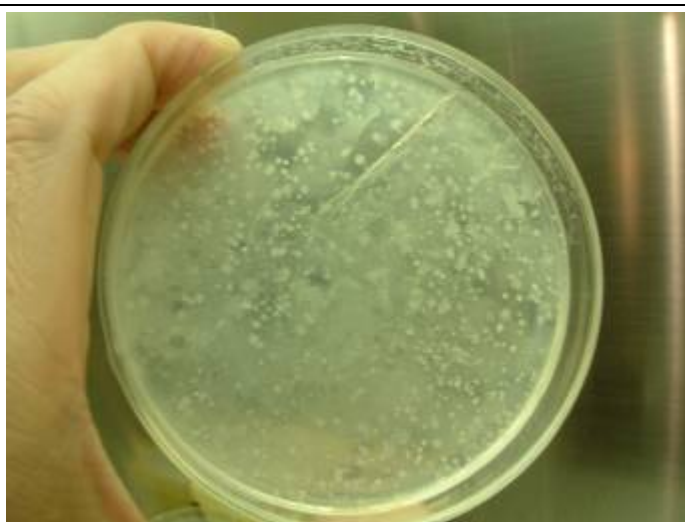


圖七 有氧環境鍬形蟲幼蟲之後腸



圖八 有氧環境鍬形蟲幼蟲之上清液塗抹培養基





圖九 有氧環境鍬形蟲幼蟲之下清液塗抹培養基

表一、有氧環境之菌落特性

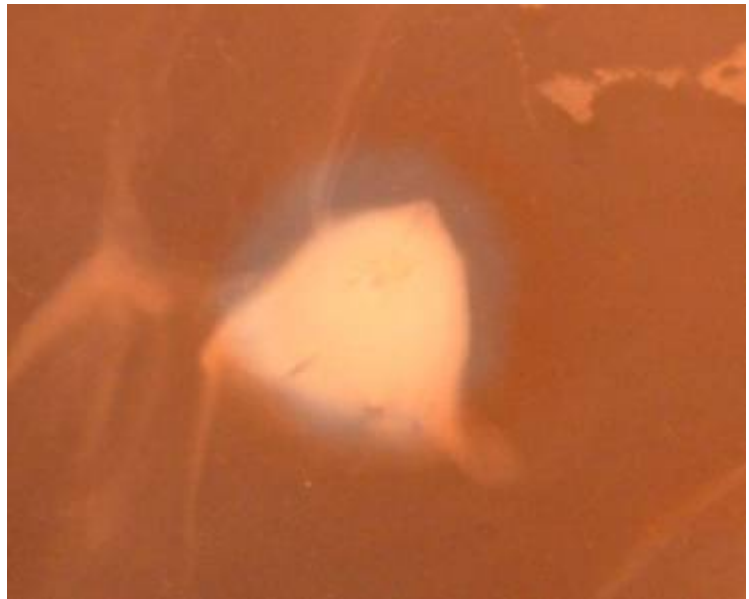
菌株編號	外觀描述
O2-1-3	中間黃色，外圈白，表面光滑
O2-1-2	中間白，外圈咖啡，表面毛狀
*O7-3-1-1	中間黃，外圈白，表面光滑
O5-4-1	乳白色，表面光滑
O5-4-4-2	黃色，表面光滑
O3-1-2	黃色，中間不規則凸
O2-4-1	黃色，中間凸
O2-1-6	乳白色，不規則狀，表面不平滑
O4-3-4	中間黃，外一圈白，表面凹凸
O4-4-3	乳白色，表面顆粒狀
O4-4-1	黃色，表面不平滑
O4-6-2	乳白色，不規則狀
O5-1-3	乳黃色，表面不平滑
O5-1-5	中間黃，外一圈白，表面平滑
O4-6-3	中間黃，外圈白，中間不平滑
O4-5-1	乳白色，表面平滑
O4-2-5	乳白色，中間略黃，表面光滑
O4-5-3	乳黃色，表面凹凸不平
O4-4-5	黃色，表面光滑
O6-2-1	白色，中間較白，表面光滑
O6-3-1	白色，外圈透明，表面光滑
O6-2-3	白色，表面粗糙，不規則狀
O7-2-4	白色，外圈黃色，表面粗糙



O7-2-2	中間白色，外圈黃色，中間凸起
O7-2-3	黃色，表面光滑
O7-3-2	白色，外圈黃色，表面凹凸不平
O7-4-1	白色，凹凸不平
O7-3-3-2	外圈乳白，中間有一點較明顯粗糙
O7-3-3-1	黃色，表面光滑，中間凸起
*O7-2-4	中間白，外圈黃，表面凸起
O2-5-1-3	黃色，表面乾燥
O5-1-5-2	黃色，表面光滑
O5-4-4-4	白色，表面光滑但凹凸
O5-3-5-1	白色，中間凹狀
*O6-6-1	乳白色，表面光滑

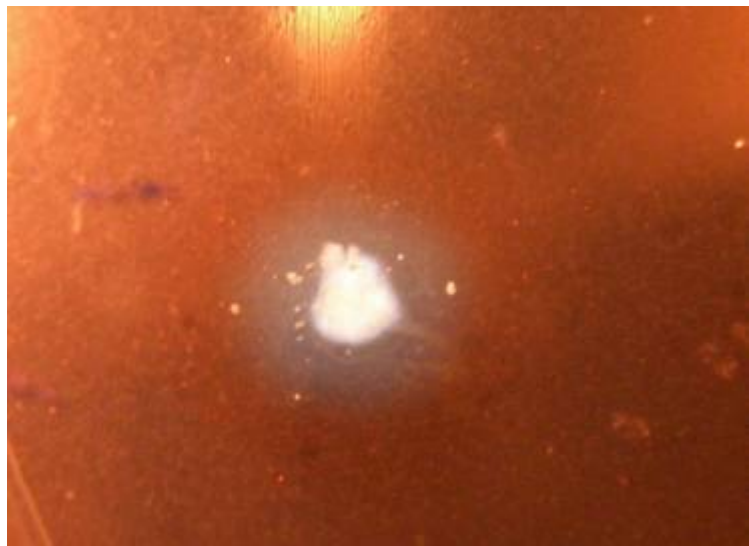
培養溫度為 35°C

“\*” 表示有分解圈的形成

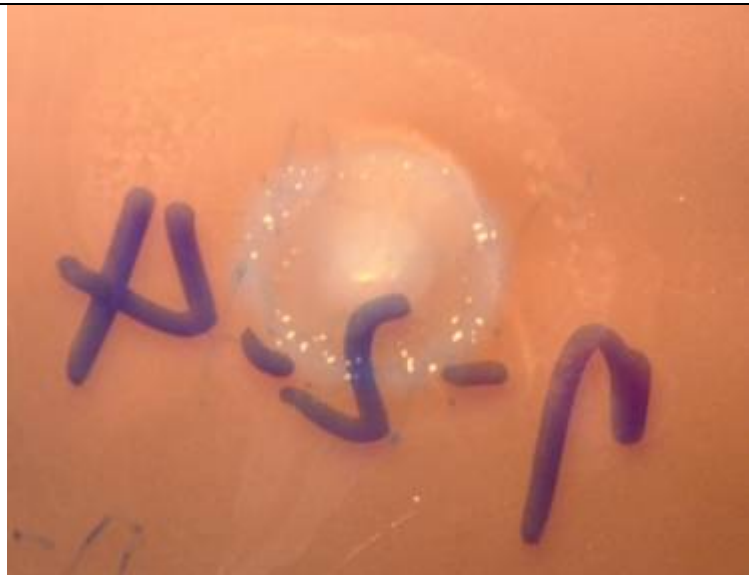


圖十 有氧環境菌落編號 O7-3-3-2 點圖

在有氧環境中，我們將 35 種菌落分別點開置於纖維素培養基中培育後，發現 3 種菌落有分解圈的形成（圖十）（圖十一）（圖十二），圖十（分解圈直徑／菌落直徑）約 1.25，圖十一（分解圈直徑／菌落直徑）約 2.5，圖十二（分解圈直徑／菌落直徑）約 1.67。



圖十一 有氧環境菌落編號 O6-6-1 點圖



圖十二 有氧環境菌落編號 O7-2-4 點圖

## 2.厭氧

厭氧環境的培養，除了將產氣包置於密封罐及溫度的不同外，做法均與有氧相同，菌落前腸（圖十三）及後腸（圖十四），與上清液（圖十五）及下清液（圖十六）所純化出來的菌落都類似，所以也都併為討論（表二）。

我們看到厭氧的下清液（圖十六）也出現真菌時，嚇了一大跳，以為哪裡做錯了！經過翻閱文獻之後，才知道真的有厭氧的真菌存在，真是令人大開眼界！高中生物課本寫錯了！



圖十三 厭氧環境線形蟲幼蟲之前腸



圖十四 厭氧環境線形蟲幼蟲之後腸



圖十五 厭氧環境線形蟲幼蟲之上清液塗抹培養基



圖十六 厭氧環境銹形蟲幼蟲之下清液塗抹培養基

表二、厭氧環境之菌落特性

菌株編號	外觀描述
A8-1-1	圓形，稍微透明
A9-1-3	圓形，白色
A8-4-3	周圍模糊，中間白色
A8-1-2	外圍較透明，中間黃白
A9-3-3	圓形，較透明，中間白
A2-2-3	黃色，不規則狀，表面凹凸
A8-5-7	外圍透明，中間白
A8-1-5	外圍透明，中間黃白
A8-1-3	不規則，中間白
A9-1-2	外圍稍霧，白色
A8-6-4	圓形，粉紅色
A2-4-7	圓形，外圍透明，中間白
A9-3-2	邊緣整齊，白色
A9-4-1	邊緣整齊，中間較深
A8-7-1	周圍透明，中間白
A9-2-3	微凸，深白
A9-5-4	微凸，淺白
A9-1-7	圓形，周圍一圈較淡，粉紅色
A7-9-1	心形，周圍一圈較淡，粉紅色
A1-1-3	圓形，外圍透明，中間粉紅，中間白
A9-7-2	外圍模糊，一圈白，一圈較淡
A7-3-5	非常圓，白色
A5-3-2	圓形，外圍白，中圈粉紅，中間透明

A5-6-2	外圍模糊且白，中圈透明，中間白
A2-2-3	外圍模糊，中圈透明，中間粉紅
A5-5-6	圓形，外圍白，中間粉紅
A4-4-1-1	圓形，外圍透明，中間較白
A5-1-1-1	圓形，白色，中間深
A6-2-1	外圍模糊，中間白
A2-3-5	外圍模糊，中間黃
A7-3-3-1	黃色，表面光滑，中間凸起
A3-2-5	外圍模糊，外圈白，中間深
A5-6-2	圓形，外圍白，中間深
A7-2-1	圓形，外圍透明，中間白
A3-2-1	圓形，外圍白，中間深
A1-2-3	外圍模糊，中間較白
A2-1-3	中間黃色，外圈白，表面光滑
A2-1-2	中間白，外圈咖啡，表面毛狀
A2-1-1	中間白，表面毛狀
*A7-3-1-1	中間黃，外圈白，表面光滑
A5-4-1	乳白色，表面光滑
A5-4-4-2	黃色，表面光滑
A3-1-2	黃色，中間不規則凸
A2-4-1	黃色，中間凸
A2-1-6	乳白色，不規則狀，表面不平滑
A4-3-4	中間黃，外一圈白，表面凹凸
A2-3-4	乳白色，不規則狀
A2-3-3	白色，中間凸起，不規則狀
A4-5-1	中間白，外圈透明
A4-6-1	外圈咖啡色，中圈白，表面毛狀
*A4-5-7	中間白，外圈扇狀
A4-5-6	白色，表面凹凸不平
A2-5-1-3	淡橘，表面平滑
A5-4-2	白色，周圍不規則
A5-1-5-1	淡黃色，表面光滑
A7-3-3-2	黃色，周圍不規則
A7-3-3-1	淡黃色，表面平滑，周圍不規則
A7-4-2	深黃色，表面平滑
A4-5-4	白色，周圍不規則
A4-5-6	淡黃色，外圈光滑，中間乾燥
A4-5-4	淡黃色，表面平滑
A5-4-1	黑色，表面凹凸不平

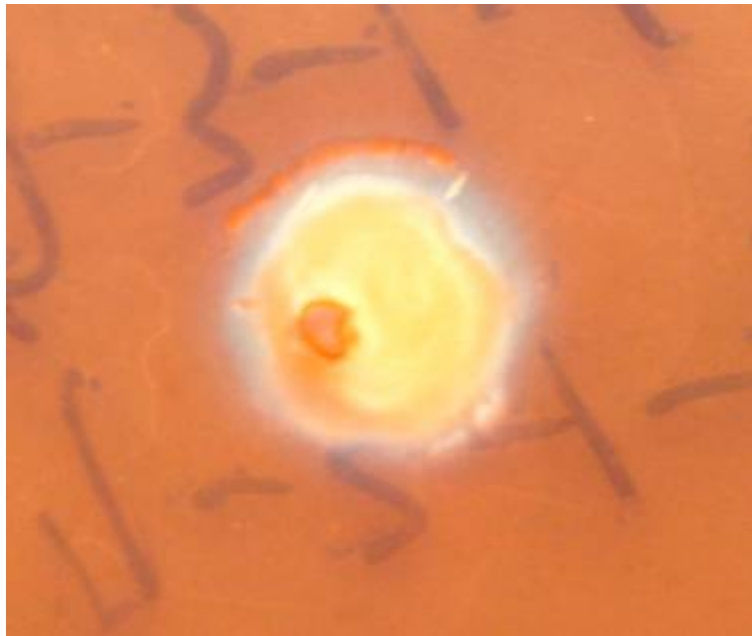
A4-5-2-2	白色，周圍整齊，表面光滑及凸起
A6-3-3	白色，周圍不整齊
A6-5-1	白色，周圍不整齊，表面凸起
A7-4-4	深黃，表面凹凸不平
A7-4-3	外面一圈白，表面凹凸不平
A2-4-4	白色，表面光滑，周圍整齊
A2-4-5	半透明，周圍不整齊
A2-3-3	淡黃，表面凹凸但光滑
A2-3-1	螺旋狀，紋路呈咖啡色，表面毛狀
A5-4-4-4	黃色，表面光滑
A2-5-5	黃色，中間黃，表面光滑
A6-1-1-3	外圈黃，中間咖啡，中間毛狀
A4-5-3	乳白色，中間凸起且光滑，中間較白
A5-4-4-2	白色，表面光滑
A6-1-1-3	白色，中間咖啡，表面毛狀
A2-1-1	中間白表面毛狀
A6-1-1-2	外圈白，中間咖啡色，表面毛狀
*A5-4-2	白色，表面光滑，周圍霧狀
*A4-5-2-1	白色，中間凸起

培養溫度為 25°C

“\*”表示有分解圈的形成

(圖片參考附錄)

在厭氧環境中，我們用肉眼判定後，把重複的菌種刪除，培養至單一菌落後只剩 81 種，再分別點開置於纖維素培養基中培育，發現 4 種菌落有分解圈的形成（圖十七）（圖十八）（圖十九）（圖二十），圖十七（分解圈直徑／菌落直徑）約 1.3，圖十八（分解圈直徑／菌落直徑）約 3.5，圖十九（分解圈直徑／菌落直徑）約 3.1，圖二十（分解圈直徑／菌落直徑）約 3.3。

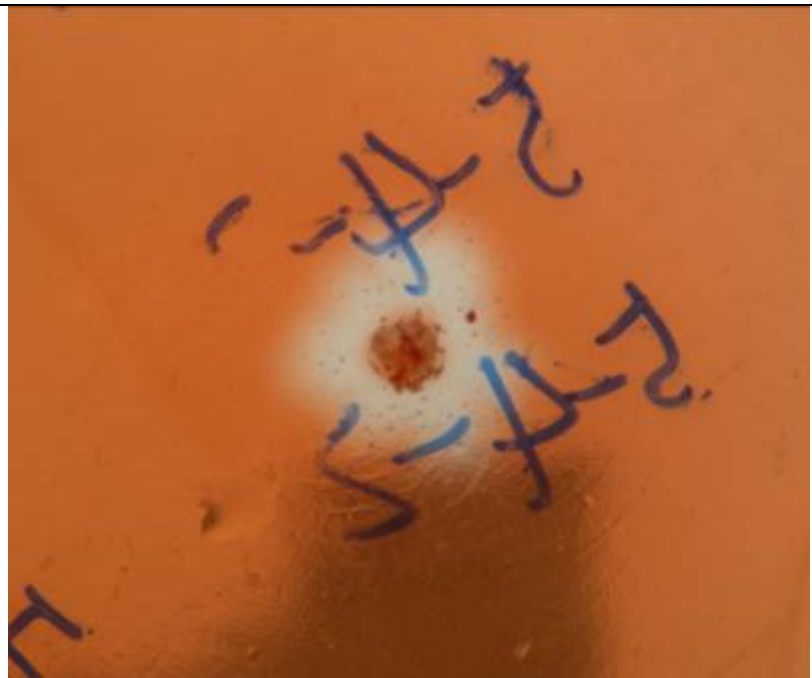


圖十七 厭氧環境菌落編號 A7-3-1-1 點圖

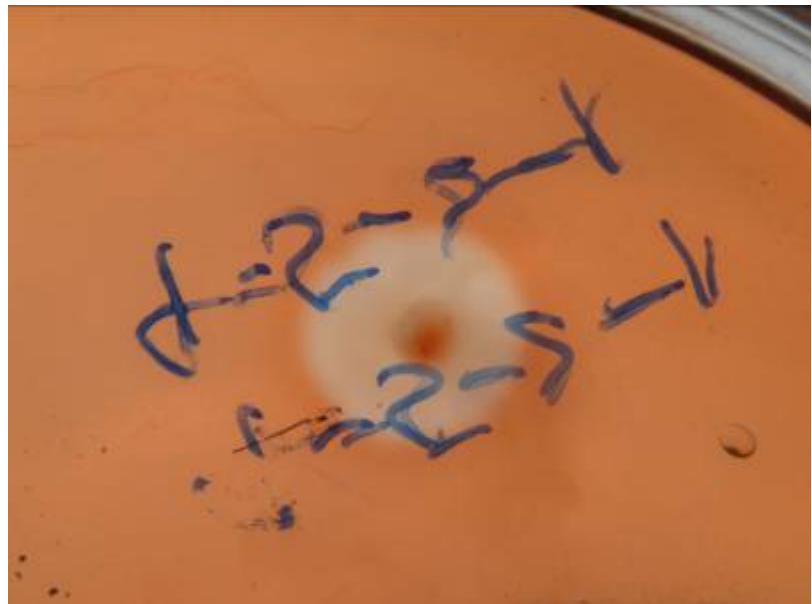


圖十八 厭氧環境菌落編號 A4-5-7 點圖





圖十九 厭氧環境菌落編號 A5-4-2 點圖



圖二十 厭氧環境菌落編號 A4-5-2-1 點圖

## 陸、討論

只用腸子真的還是會有菌長出來！不過，我們篩檢的結果，清液中還是能篩出比較多種菌。而前腸和後腸的菌相比較並無差異。下清液中，不論有氧、厭氧都有較多真菌。而上清液只有有氧有真菌，顯示真菌較重會往下沉。

本實驗篩選出 7 株具分解纖維素能力的菌株。進一步可以再分析纖維素分解菌之蛋白活性，並測試其不同纖維素分解能力及產氫能力。再進行醱化植物基質及共培養實驗，評估菌種的醱化能力和共培養的角色，此研究結果如可成功實際應用，並配合政府推行的能源計畫，應對臺灣利用生質能源上，可提供重要的幫助。

## 柒、結論

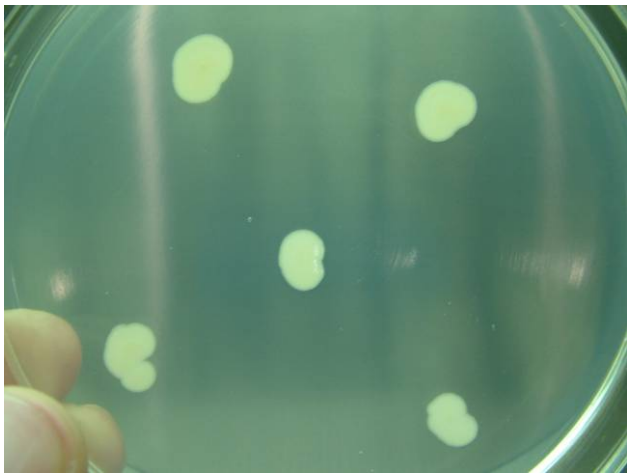
1. 鍬形蟲幼蟲腸道內不論有氧、厭氧皆有可分解纖維素的菌種。
2. 前腸和後腸所篩選純化出來的菌相相似。
3. 下清液較上清液具有較多真菌，顯示真菌較重，而純化出來的細菌菌落種類相似。
4. 鍬形蟲幼蟲腸道中以厭氧菌種類較多。

## 捌、參考資料及其他

### 一、參考資料

1. 楊美桂（2006） 維生物學第二版，藝軒圖書出版社。
2. 齊倍慶（2001） 從堆肥中篩選纖維素分解酵素生產菌及其酵素性質研究。國立清華大學生命科學系碩士論文。
3. 朱冠穎（2007） 白蟻腸道菌 *Clostridium xylanolyticum* Ter3 之分離及其糖化纖維素與產氫活性分析。國立中興大學生命科學系碩士學位論文。
4. 楊美桂（2006） 普通維生物學實驗第二版，藝軒圖書出版社。
5. 郁儀豪（2003） 蔗渣堆肥中嗜高溫菌之分離與應用。國立台灣大學環境工程學研究所。
6. 李佩真（2007） 厭氧纖維素分解真菌的篩選及特性分析。國立中興大學生命科學系碩士學位論文。

二、附錄



菌落編號：A9-1-3



菌落編號：A2-4-7



菌落編號：A6-4-5



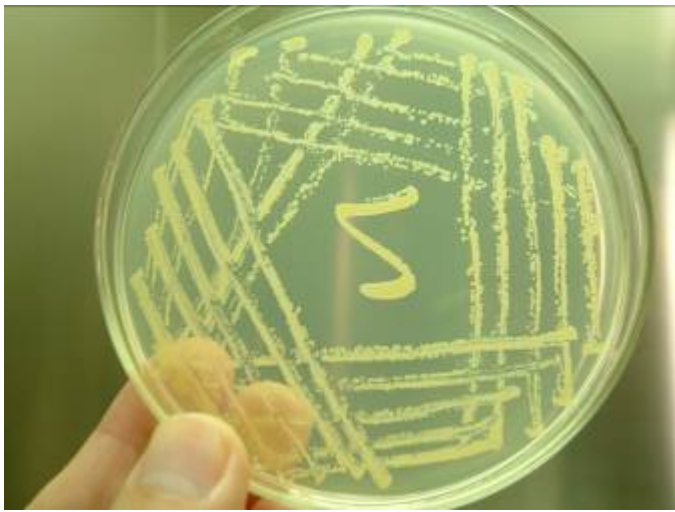
菌落編號：A5-1-1-1



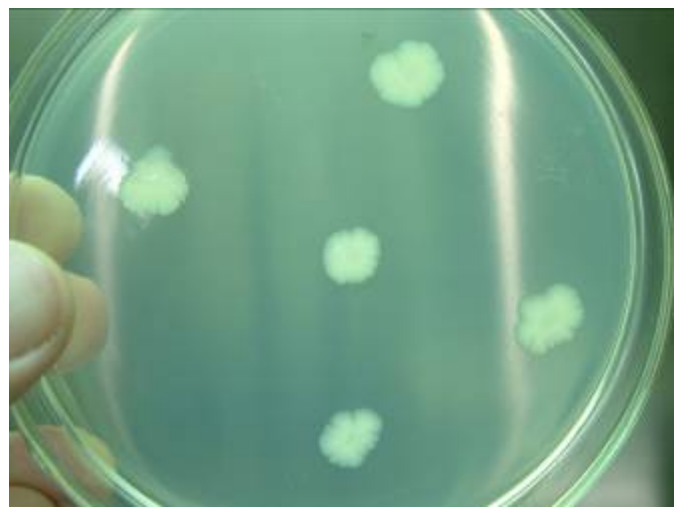
菌落編號：A4-4-1



菌落編號：A3-2-5



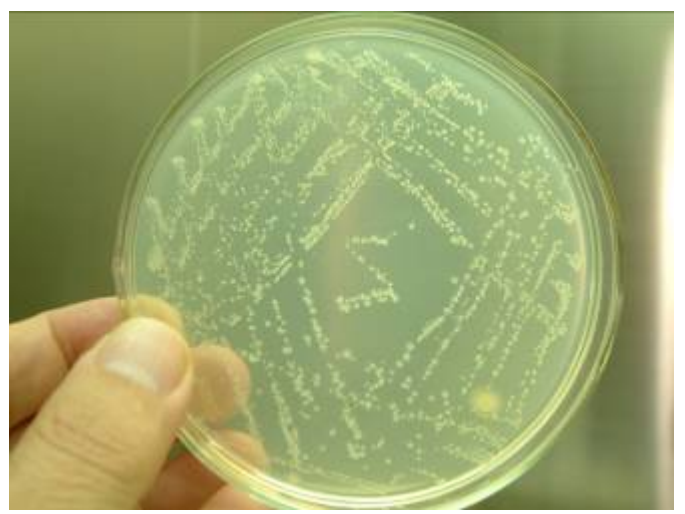
菌落編號：A2-3-5



菌落編號：A9-3-3



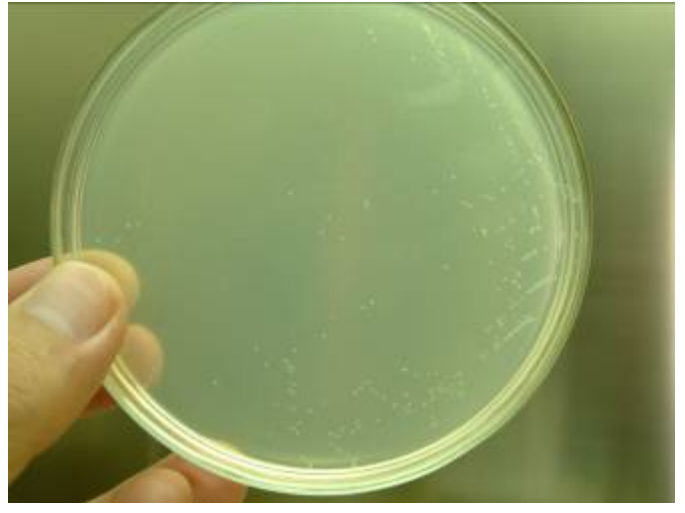
菌落編號：A1-1-3



菌落編號：A6-2-1

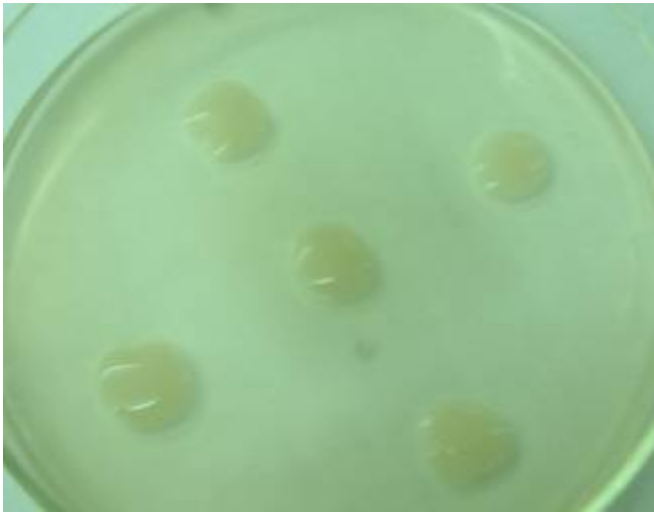


菌落編號：A8-4-3

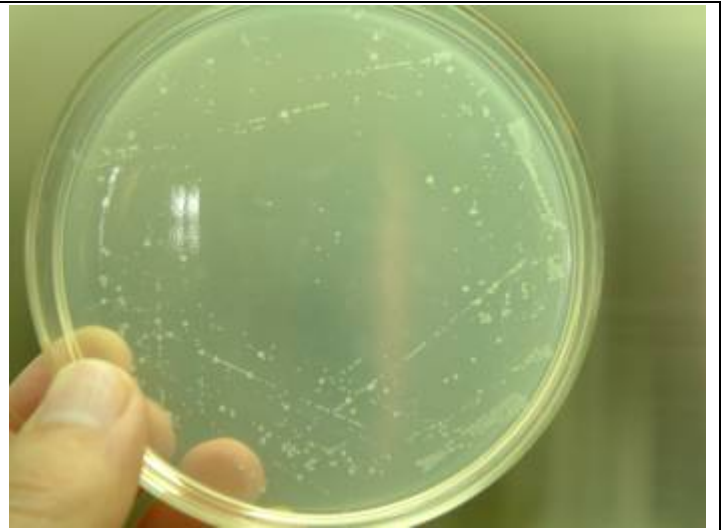


菌落編號：A7-2-1

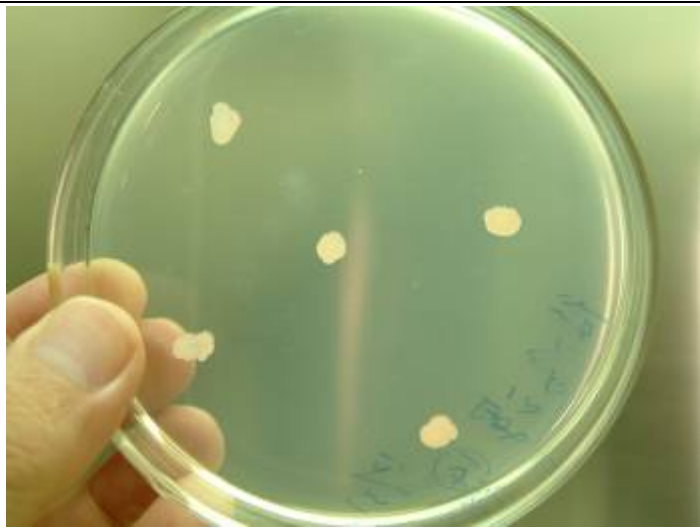




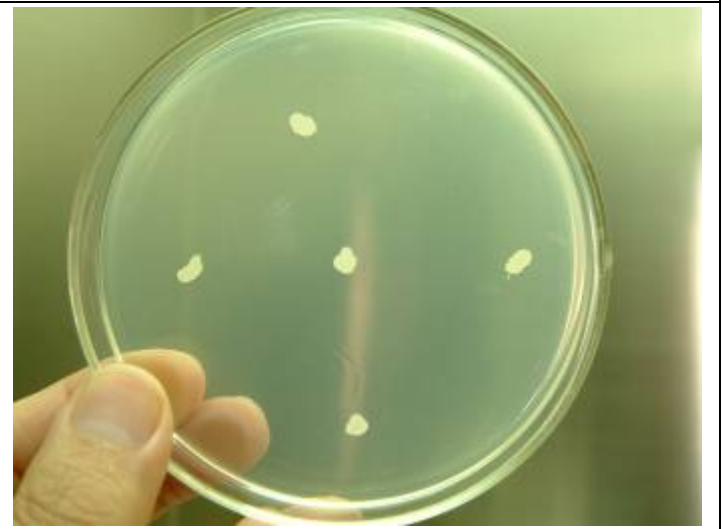
菌落編號：A7-3-5



菌落編號：A9-7-2



菌落編號：A4-4-2



菌落編號：A9-1-2



菌落編號：A5-6-2



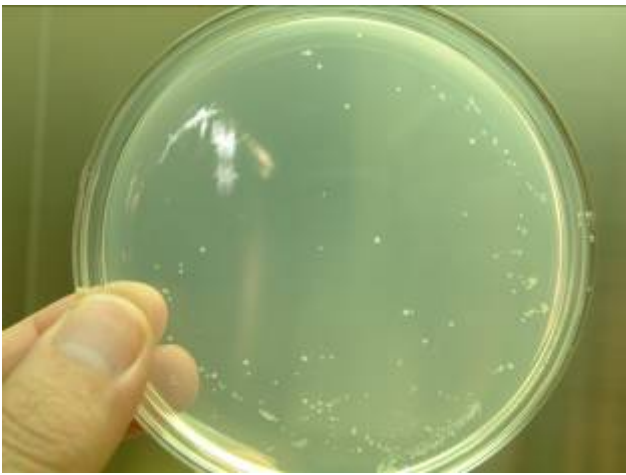
菌落編號：A9-4-1



菌落編號：A5-2-5



菌落編號：A8-5-7



菌落編號：A8-1-5



菌落編號：A8-7-1



菌落編號：A9-3-2

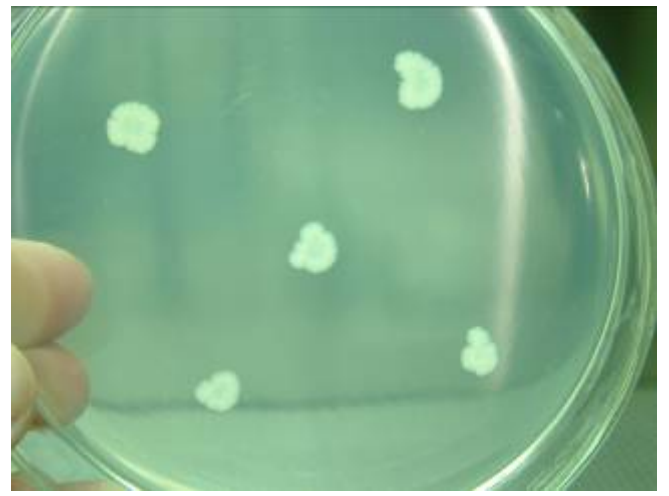


菌落編號：A3-2-1

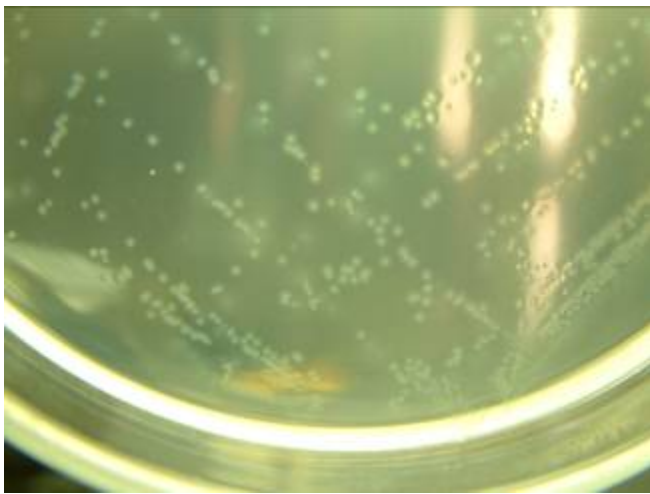




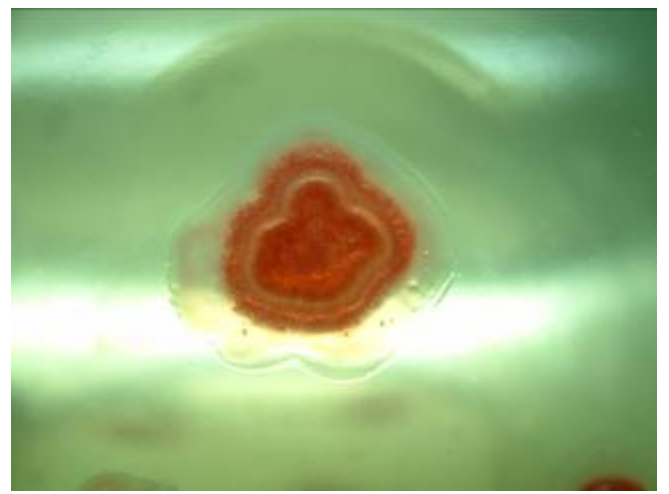
菌落編號：A5-3-2



菌落編號：A9-2-3



菌落編號：A1-2-3



菌落編號：A2-2-3



菌落編號：A9-1-7



菌落編號：A7-9-1



菌落編號：A9-5-4

## 【評語】 040721

利用解剖方式，取其腸內菌做分析，並以培養基篩選佳，分析菌落數多，口說表現可。

待改進：菌的後續觀察，初步鑑定，分析特性，培養基的選擇使用，菌落觀察分析的統整，實際分解纖維素的應用。