

中華民國 第 50 屆中小學科學展覽會
作品說明書

國中組 生活與應用科學科

最佳(鄉土)教材獎

030824

你刷了沒--牙菌斑的指示劑

學校名稱：臺中市立居仁國民中學

作者： 國一 黃怡璇 國一 劉家欣 國一 楊捷茹 國一 林姿寬	指導老師： 施晶晶 黃湄鈞
---	-----------------------------

關鍵詞：牙菌斑、牙菌斑指示劑、紅色火龍果

作品名稱：你刷了沒？- 牙菌斑的指示劑

摘要

牙菌斑附著於牙齒表面，面積小不易被發現。只有牙菌斑指示劑能顯示出牙菌斑，可用於評估刷牙的效果，但一般只有在牙科診所使用，且價格不便宜，找到經濟實惠和簡易的物質，並且具有牙菌斑指示劑的功能，格外具有重要性。在此研究中，我們嘗試用紅色火龍果的汁液，作為牙菌斑指示劑，在家進行自我口腔牙菌斑的檢測，來減少齲齒發生。

我們採樣檢測人體牙菌斑的六種變化，利用紅色火龍果內含大量花青素的成份，在 pH 8 時呈現紫色鹼性染料，來做為牙菌斑指示劑。

紅色火龍果的汁液，可用來辨視牙齒上的牙菌斑染色效果，在堆積量及菌量數，是有明顯的差異，也印證除牙菌斑指示劑外，可利用生活中的食物來應用。

壹、研究動機

睡覺前爸媽總會問我說：「你刷牙沒？」，我說：「刷過了。」但他們總是說我刷牙不夠徹底，我心想若有一個指示劑，可以證明我牙齒清白該有多好。剛好飯後食用紅色火龍果，我口腔內沾滿水果色素，牙齒表面上還有污漬，和牙菌斑指示劑的顏色有點像，於是找班上幾個同學開始找尋參考資料，大部分文獻都是教導如何將牙齒潔淨，並無文獻有用紅色火龍果來呈現牙菌斑，生物課老師介紹生物體組成，在老師的指導下，我們進一步想要了解這個未知答案，來解開我們心目中的疑惑，一起來做這個探討[1]。

貳、研究目的

牙齒表面附著的牙菌斑像一層薄膜，顏色與牙齒相似，若不用牙菌斑指示劑染色，多半難以發現。牙菌斑是造成齲齒主要的因素，而且清除後還會不斷的在牙齒表面形成，因此每

天必須徹底地清除牙菌斑，才能有效預防齲齒發生。要達到控制牙菌斑的目的，必須掌握對牙菌斑的檢測評估方法，以瞭解牙齒表面的附著狀態，才能徹底地清除牙菌斑，以及準確評價牙菌斑控制的效果 [2]。

除了傳統在牙科診所使用牙菌斑指示劑外，能找到經濟實惠和簡易的牙菌斑指示劑 [3]。此次我們嘗試用深色天然水果：紅色火龍果，來作為評估牙菌斑指示劑的可行性，期盼能在家便能進行自我口腔牙菌斑的檢測，來減少齲齒發生。

參、研究設備及器材

一、器材：

杵臼、刮杓、計時器、牙籤、染色盤、微量吸量管、玻片、吸管、蓋玻片、比色管、試管架、96孔盤、48孔盤。

二、設備：微量電子天平、酵素免疫分析儀、光學顯微鏡、分光光譜儀、抽氣櫃、數位相機。

三、藥品：

格蘭氏碘液、酸鹼指示劑、牙菌斑指示劑、95 百分比酒精、格蘭氏複碘、結晶紫、石炭酸藻紅。

四、紅色火龍果：

產自嘉義，紅色火龍果是仙人掌科，三角柱屬植物，橄欖狀鮮紅外皮，果實每個 50-60 克重，紫紅色果肉含大量花青素。

肆、研究過程或方法

一、研究架構：

參考「是誰惹的禍？—探討牙菌斑」實驗中，飯後一小時已形成牙菌斑，我們便採用牙齒飯後一小時的牙菌斑量，作為人體實驗模式 [1]，採用衛生署『牙齒保健食品功能學評價程序和檢驗方法』，使用六種評估方法以檢測人體牙菌斑：照相、酸鹼值、堆積量、菌量數、菌量濃度、格蘭氏染色法 [4]。(如圖1)

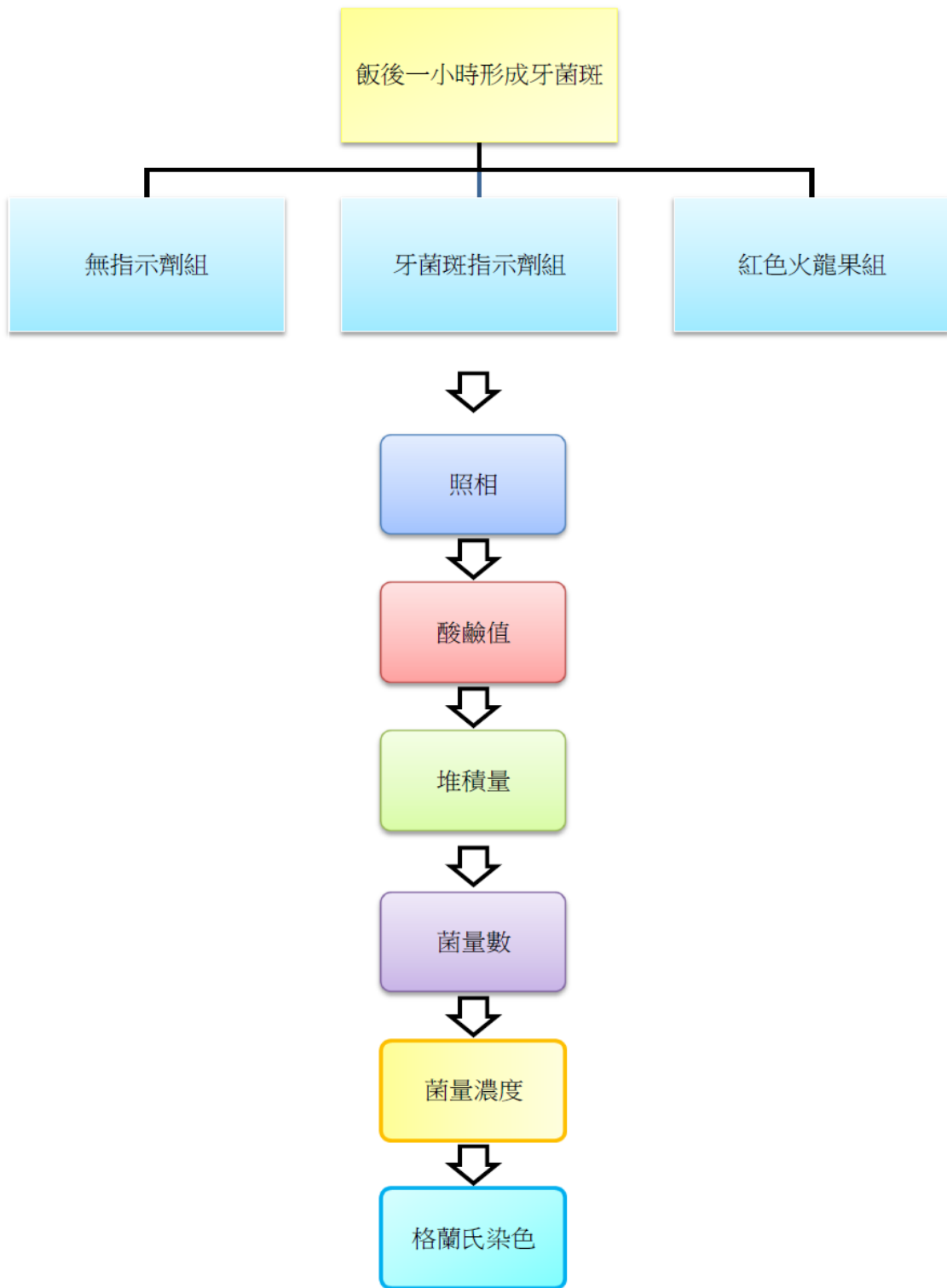


圖1 研究架構圖

二、實驗步驟：

(一) 牙菌斑人體模型分為三組，每組各4例：

- 1.第A組：無指示劑組。
- 2.第B組：牙菌斑指示劑組。
- 3.第C組：紅色火龍果組。

(二) 牙菌斑形成的人體模型：採樣人體飯後一小時牙菌斑量。

(三) 塗抹各種牙菌斑指示劑：

1.牙菌斑指示劑：為陽性反應印證實驗方法指標

(1) 原理：

牙菌斑鏈球菌是格蘭氏陽性細菌，其蛋白質帶負電荷，所以採用帶正電荷鹼性染料容易結合，使其紅色色素進入並滲透於牙齒上的牙菌斑後，不容易漱口去除，在沒有牙菌斑的部分，紅色色素可以漱口去除，因此有紅色色素便是牙菌斑的部位，必需用刷牙才能去除紅色色素。

(2) 成分：赤蘚紅 (Erythrosine)。(如圖 2)

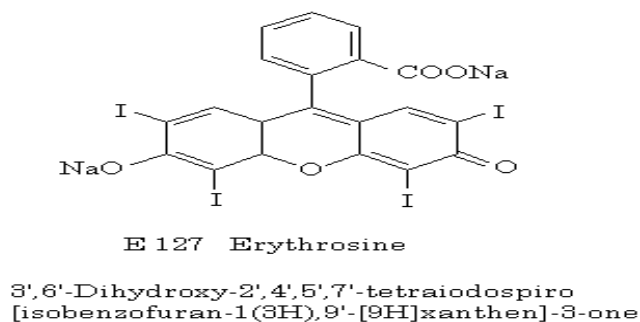


圖 2 赤蘚紅的化學結構式

(3) 方法：

牙菌斑指示劑研鉢磨成粉，給予塗抹牙齒表面後，1分鐘後吐出漱口，給予100cc清水含漱後，觀察牙齒顏色的變化情形 [3]。

2.紅色火龍果：

(1) 原理：

紅色火龍果內含花青素，屬於類黃酮（抗氧化作用），顏色會隨著酸鹼值變化，是一種天然的酸鹼指示劑。pH 7 - 8 時，呈紅紫色 [6]，因牙菌斑鏈球菌是格蘭氏陽性細菌，其蛋白質帶負電荷，所以與帶正電荷鹼性染料結合，我們可以利用紅色火龍果內花青素來作為牙菌斑染色劑。

(2) 成分：花青素。(如圖 3)

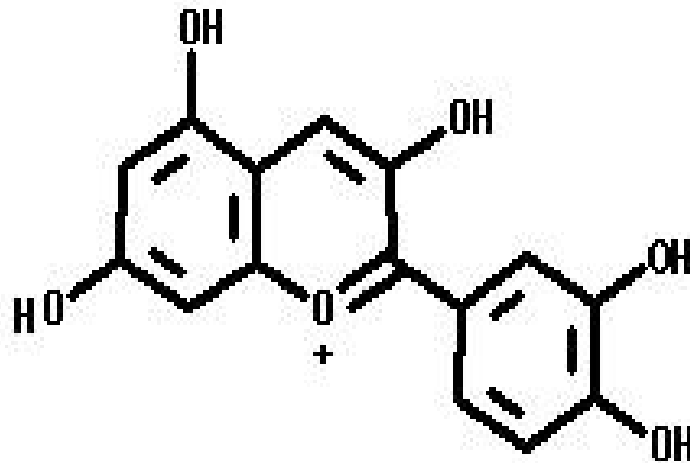


圖 3 花青素的化學結構式

(3) 方法：

去皮取果肉切塊，用研鉢磨碎成汁後，塗抹於牙齒表面後1分鐘，觀察牙齒顏色的變化情形，以檢測火龍果汁液是否與牙菌斑指示劑有共同特性。

(四) 照相各種牙菌斑指示劑變化：

1.目的：目視觀察各組牙齒染色面積指數。

2.方法：

將各種牙菌斑指示劑塗抹後，觀察牙齒顏色的變化情形，用目視觀察牙菌斑染色面積大小，參考使用 Benson 等提出的牙齒染色面積指數 [2]，其牙菌斑指數記分的標準為：

0：無菌斑。

1（25百分比）：有點狀菌斑，菌斑覆蓋牙面不超過1/3。

2（50百分比）：菌斑覆蓋牙面1/3。

3（75百分比）：菌斑覆蓋牙面2/3。

4（95百分比）：牙面大量菌斑，菌斑覆蓋牙面超過2/3。

目視各種牙菌斑指示劑之變化統計結果，若增加較無使用牙菌斑指示劑組高 20 百分比以上，則認定該實驗組有增加牙菌斑指示功能之效果。（如圖4）

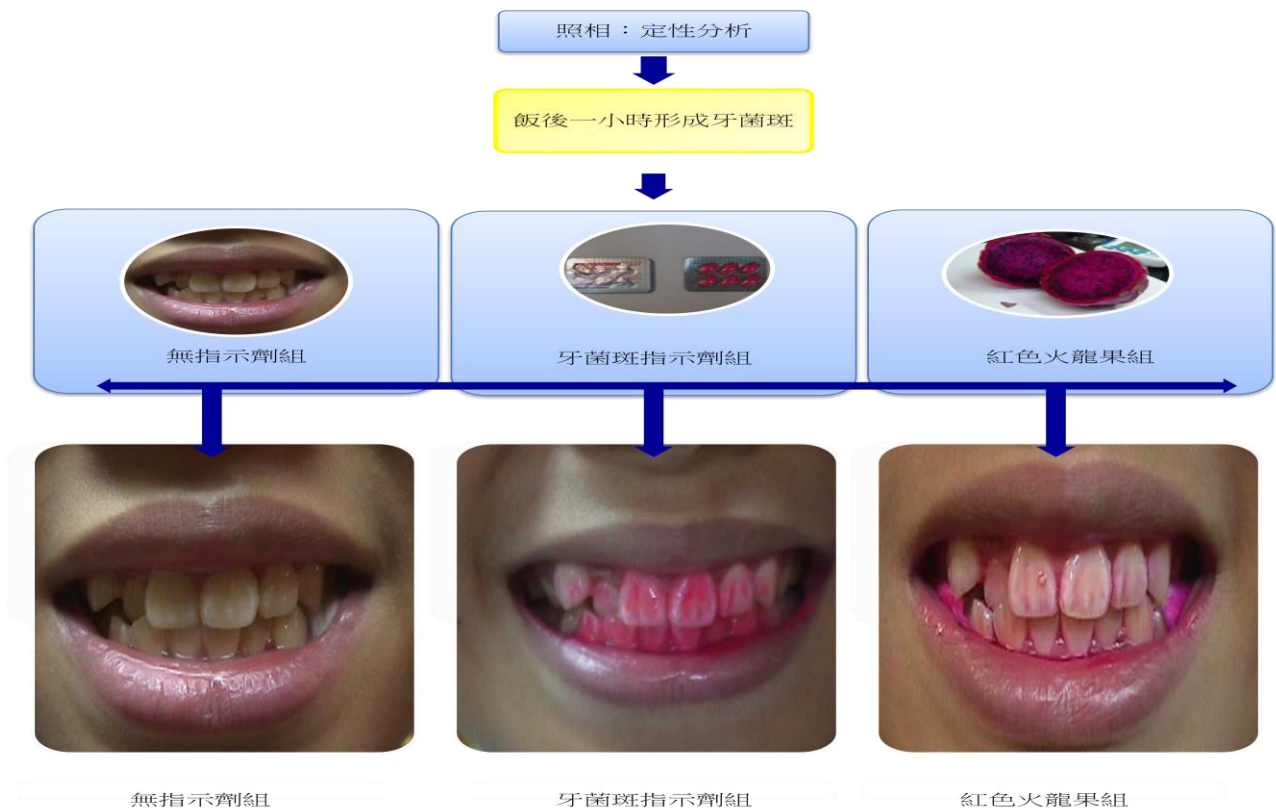


圖4 照相各種牙菌斑指示劑變化

(五) 檢測各種牙菌斑指示劑酸鹼值變化：

1.目的：評估各組酸鹼值與染色有無相關。

2.pH 5-10 酸鹼指示劑成份原理：

是由數種混合指示劑浸染而成，其變色範圍由酸到鹼，會呈現橙—淡黃—綠—藍的連續變化，可用顏色的變化量來測出酸鹼數值範圍。

3.pH 5-10酸鹼指示劑的方法：

牙菌斑酸鹼值之測量由同一人執行，用牙籤將牙齒上所有可收集牙菌斑刮下，利用酸鹼值測試紙，測試酸鹼變化，評估牙菌斑指示劑有無染色效果。（如圖5）

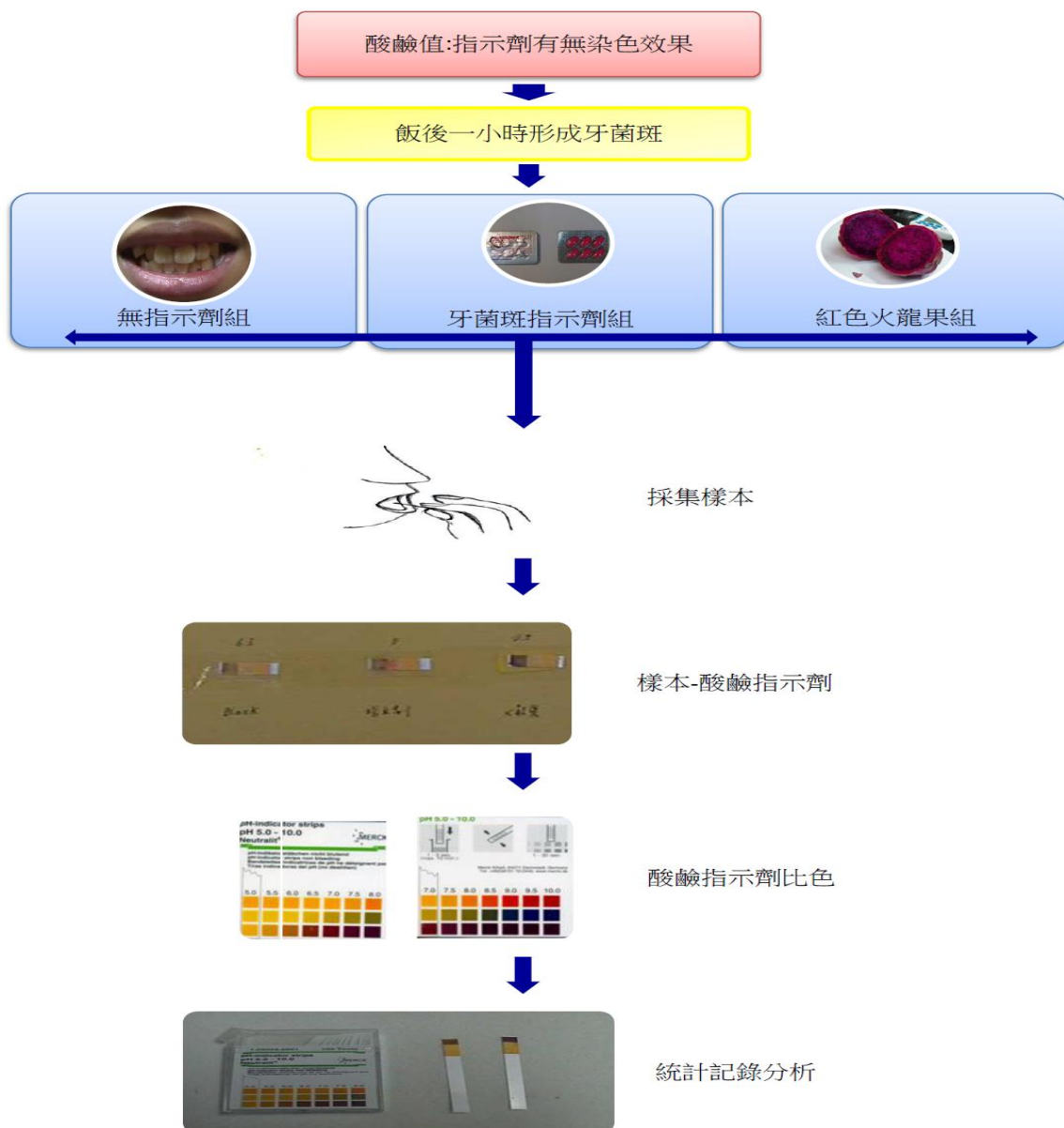


圖5 各種牙菌斑指示劑酸鹼值變化

(六) 檢測各種牙菌斑指示劑堆積量變化：

1.目的：評估各組的牙菌斑堆積量變化。

2.方法：

牙菌斑之收集由同一人執行，用牙籤將牙齒上，所有可收集牙齒上牙菌斑刮下，並馬上秤重。各種牙菌斑指示劑堆積量之變化的統計結果，若增加較無使用牙菌斑指示劑組重 20 百分比以上，則認定該實驗組有增加牙菌斑指示功能之效果。

(如圖 6)

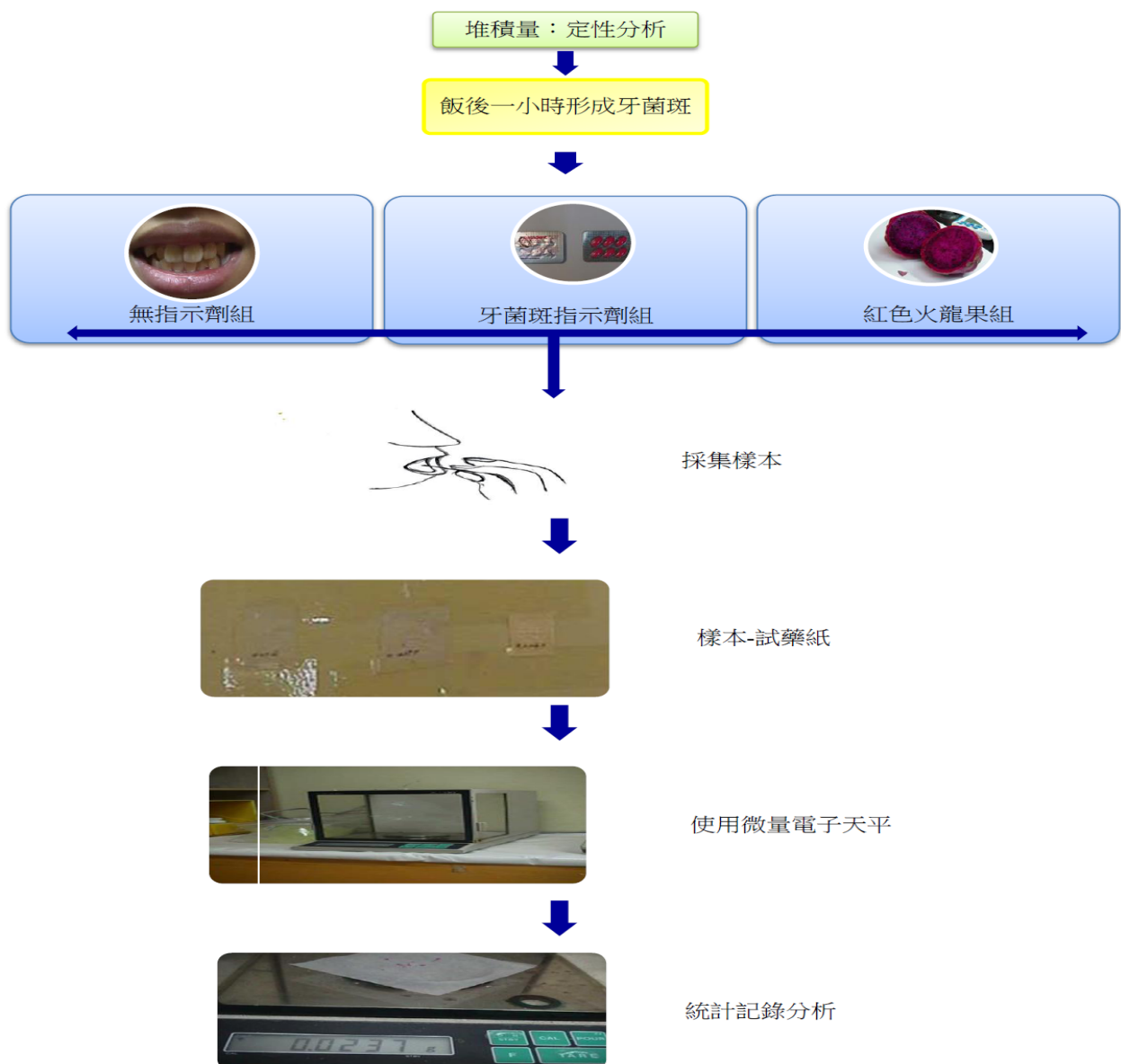


圖 6 檢測各種牙菌斑指示劑堆積量變化

(七) 檢測各種牙菌斑指示劑菌量數變化：

1.目的：

為濁度測定法，混濁度原理是將牙菌斑視為懸浮顆粒，這些顆粒可阻斷光線的通過，因此牙菌斑濃度愈高，通過的光線愈少，就等於吸光值愈大，我們用混濁度表示；因為指示劑的顏色是紅紫色，所以用分光光譜儀去測量牙菌斑濃度時，波長選用600 nm用混濁度來測量，測量3種牙菌斑菌液之吸光值。

2. 分光光譜儀主要含有：光源，鏡片，樣品及測值四個部分。(如圖 7-1)

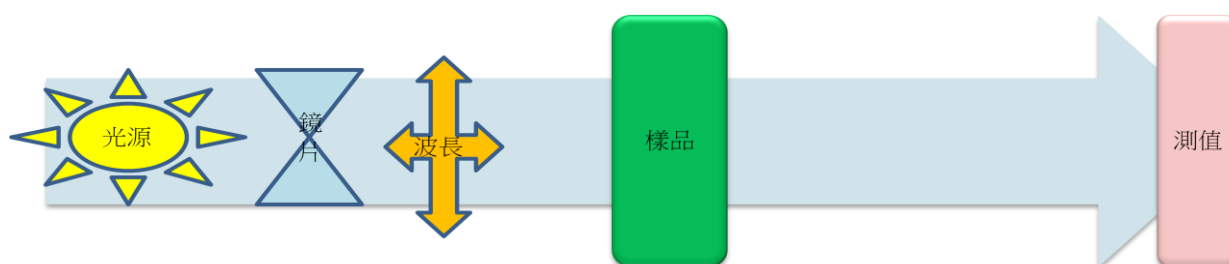


圖 7-1 分光光譜儀結構

3.方法：

牙菌斑之收集由同一人執行，用牙籤將牙齒上，所有可收集牙齒上牙菌斑刮下，並馬上秤重。吸光值測定：

- (1) 樣品置 1 cc 小瓶加蒸餾水稀釋。
- (2) 分光光譜儀，需以純水歸零。
- (3) 稀釋各種牙菌斑指示劑樣品，分別加入 1 cc的比色管。
- (4) 分別測定波長 600 nm 下之吸光值，紀錄與數據分析。

計算各種牙菌斑指示劑菌量數之變化的統計結果，若增加較無使用牙菌斑指示劑組高 20 百分比以上，則認定該實驗組有增加牙菌斑指示功能之效果。(如圖7-2)

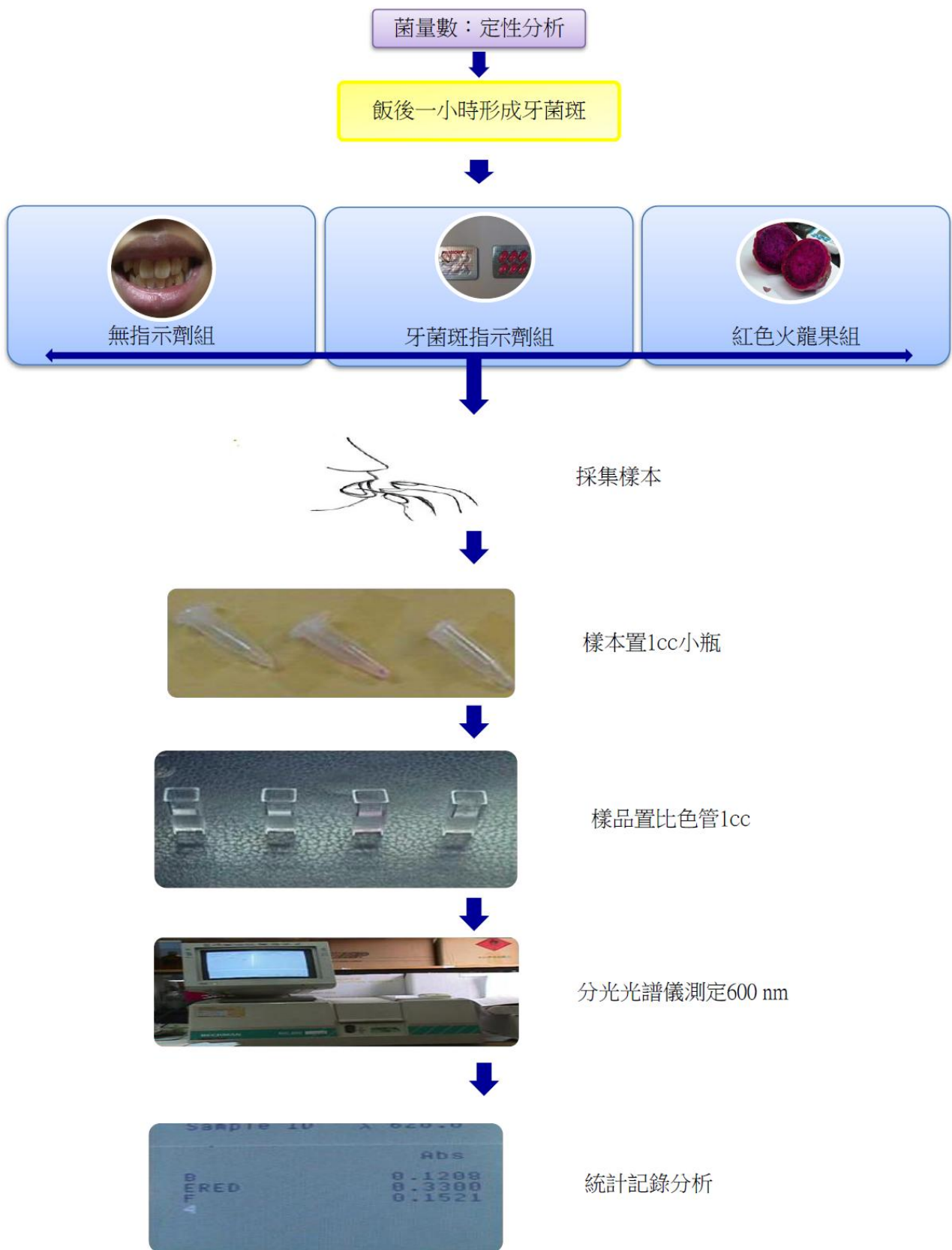


圖7-2 檢測各種牙菌斑指示劑菌量數變化

(八) 檢測各種牙菌斑指示劑菌量濃度變化：

1.目的：

以呈色法測定溶液中指示劑的含量，利用已知濃度的各種牙菌斑指示劑，製作標準曲線，再計算未知樣品的含量。

2.方法：

牙菌斑之收集由同一人執行，用牙籤將牙齒上，所有可收集牙齒上牙菌斑刮下，並馬上秤重。取牙菌斑濃度稀釋液，取 0.1 cc 放置 96 孔盤內，後將各種牙菌斑指示劑漸次稀釋濃度（0、0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50、100）百分比，置放酵素免疫分析測讀儀固定波長 570 nm 其吸光值，紀錄與數據分析。各種牙菌斑指示劑之變化的統計結果，若增加較無使用牙菌斑指示劑組高 20 百分比以上則認定該實驗組有增加牙菌斑指示功能之效果[7]。（如圖 8）

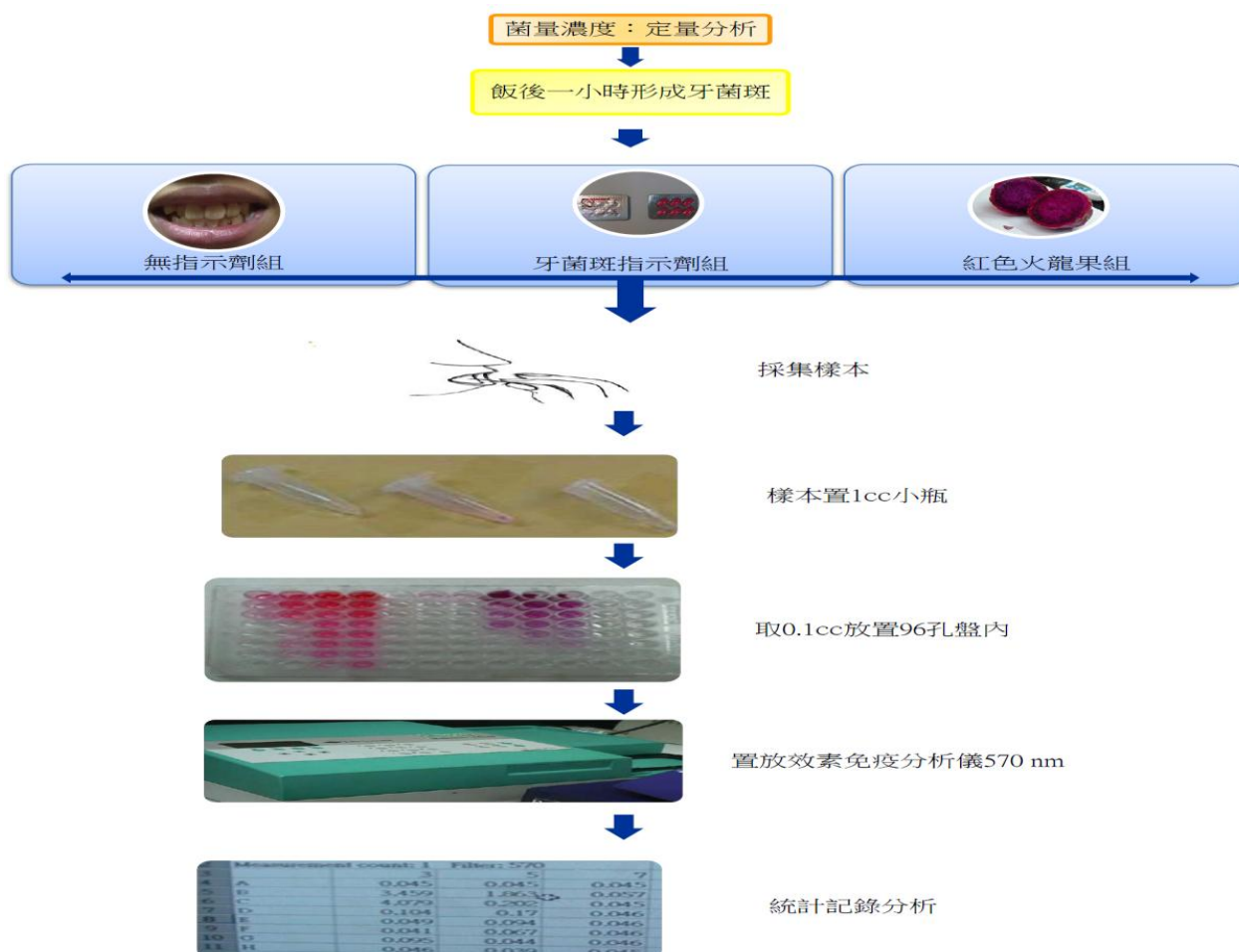


圖8 檢測各種牙菌斑指示劑菌量濃度變化

(九) 檢測各種牙菌斑指示劑格蘭氏染色變化：

1.目的：要確定取樣為牙菌斑而非殘留的澱粉。

2.方法：

本實驗以牙籤採集牙齒面檢體，牙菌斑之收集由同一人執行，用牙籤將牙齒上所有可收集牙齒上牙菌斑刮下，藉由格蘭氏染色來觀察是否是牙齒上的牙菌斑（如圖9）[8]。參考使用 Gram stain 價數判讀標準顯微鏡 1,000 倍下，細菌數目(以 20 倍視野平均)：

0 :無菌。

1+ (25百分比) : < 1(一點) 。

2+ (50 百分比) : 1-5(一些)。

3+ (75 百分比) : 6-30(多些)。

4+ (95百分比) : >30(許多)。

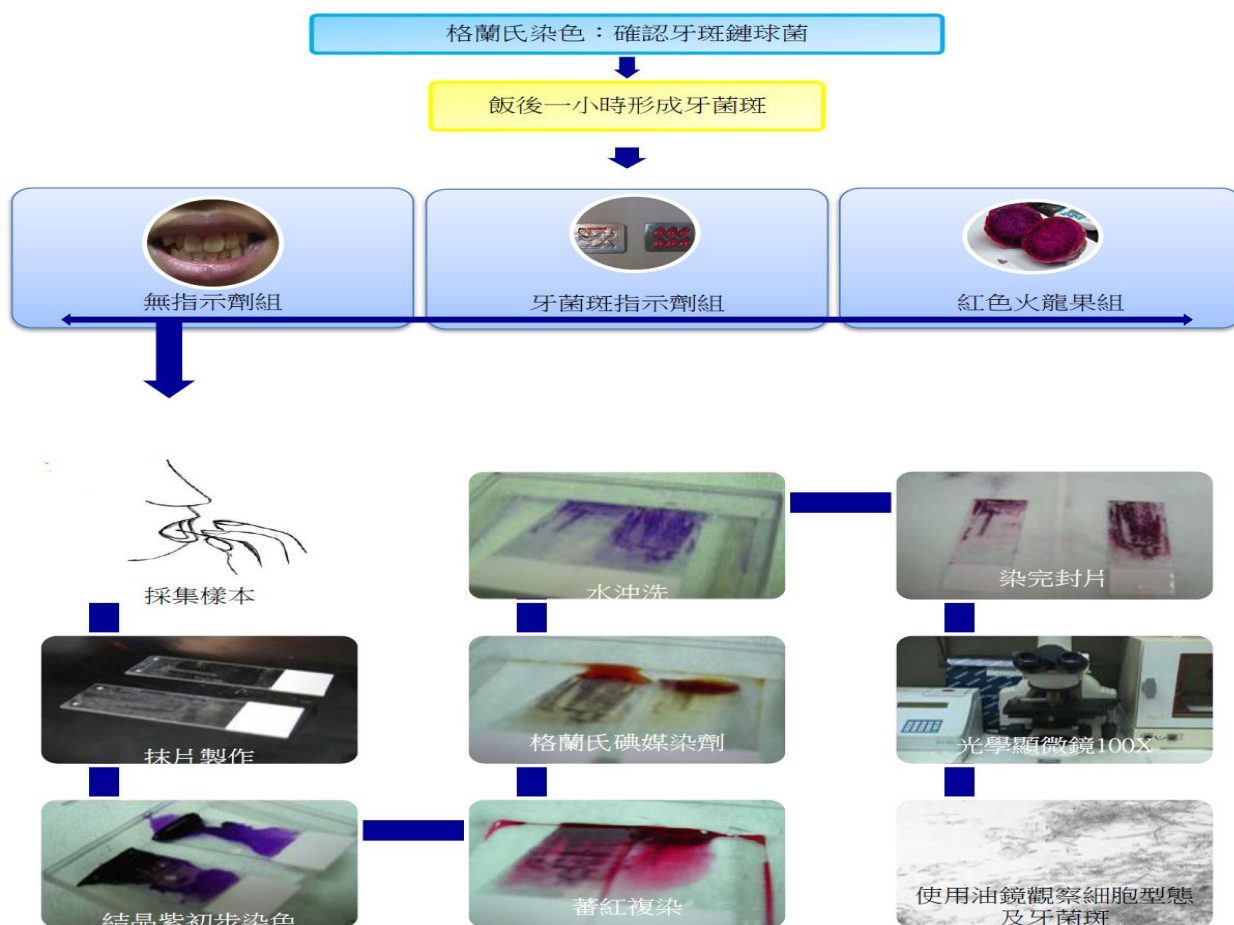


圖9 檢測各種牙菌斑指示劑格蘭氏染色變化

(十) 統計學分析：

1.目的：將各組實驗方法數據經生物統計分析，了解本實驗可行性。

2.方法：

收集分析各種方法測量牙菌斑值，用 SSPS 10 進行統計學分析，將連續數值三組以上獨立樣本，以是否因無指示劑組、牙菌斑指示劑組、紅色火龍果組染上牙菌斑而有無差異，而使用 ANOVA TEST 單一因子變異分析（如圖 10），於是得到的數據後分析，得到 P 值就可以根據值的大小，來決定實驗結果有無差異性。如果 P 值小於 0.05，我們就會說是有差異性，如果小於 0.001 那麼就會是有非常顯著的差異性 [2-7]。

	A組	B組	C組
方法			
照相	1A	1B	1C
酸鹼值	2A	2B	2C
堆菌量	3A	3B	3C
菌量數	4A	4B	4C
菌量濃度	5A	5B	5C
格蘭氏染色	6A	6B	6C
ANOVA TEST			

圖 10 統計學分析

伍、研究結果

一、照相牙菌斑檢測：

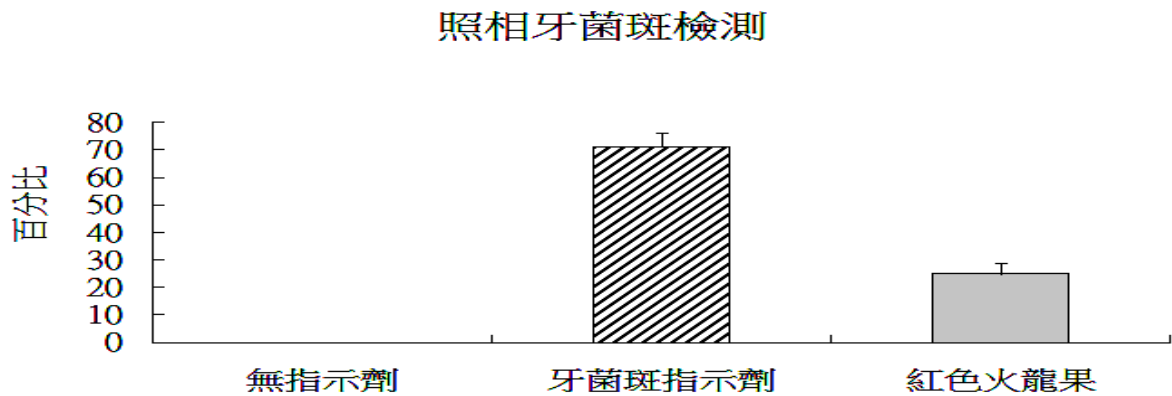


圖 11 照相牙菌斑檢測

照相無指示劑組牙菌斑指示劑組及紅色火龍果組變化發現，目測牙齒顏色的變化情形，無指示劑組無法辨識，牙菌斑指示劑組為 71 百分比 \pm 4.79，紅色火龍果組為 25 百分比 \pm 4.08 $p > 0.075$ ，雖然統計學上無明顯差異，但目視紅色火龍果組也有約 25 百分比 辨視牙菌斑功能。(如圖 4、11)

二、牙菌斑酸鹼值：

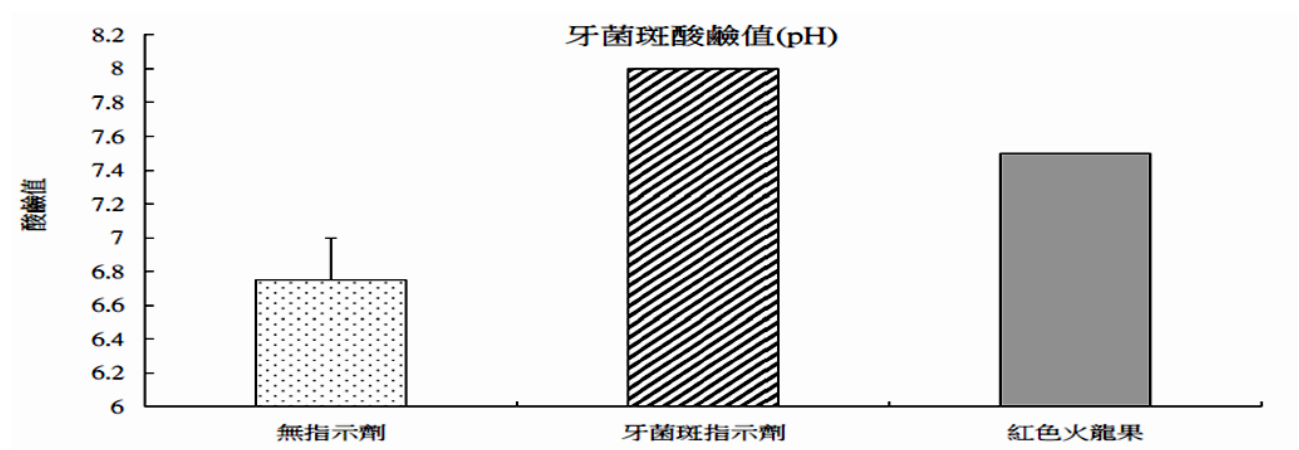


圖 12 牙菌斑酸鹼值

檢測各種牙菌斑指示劑酸鹼值變化發現，未塗各種牙菌斑指示劑，酸鹼值測試紙測試為 pH 6.75，無指示劑組為 pH 6.75 \pm 0.25，塗上各種牙菌斑指示劑，牙菌斑指示劑組為 pH 8 \pm 0，紅色火龍果組為 pH 7.5 \pm 0，無差異。(如圖 12)

三、牙菌斑堆積量：

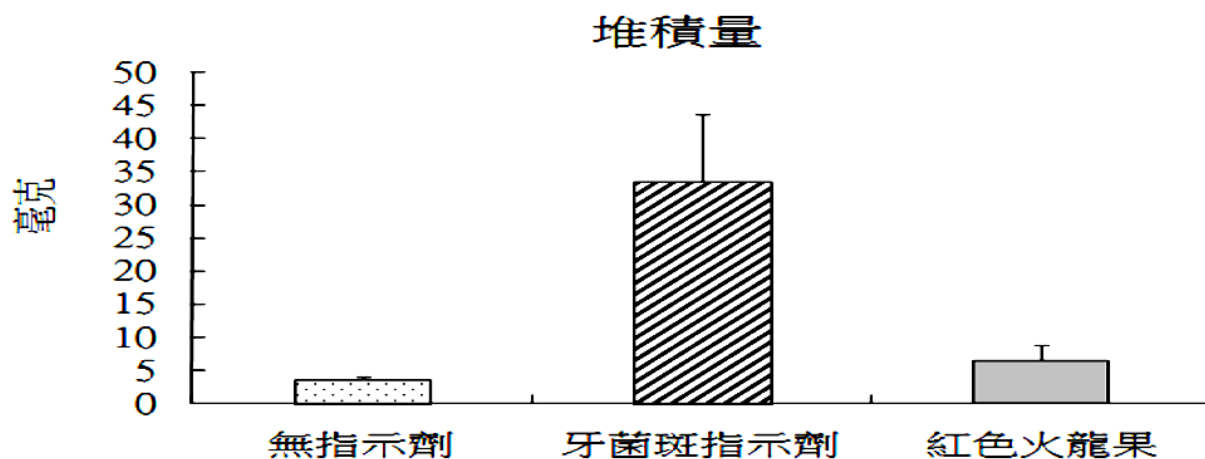


圖 13 牙菌斑堆積量

檢測各種牙菌斑指示劑堆積量變化發現，無指示劑組為 3.75 毫克 \pm 0.4，牙菌斑指示劑組為 33.6 毫克 \pm 7.4，紅色火龍果組為 6.5 毫克 \pm 2.4 $p < 0.035$ ，統計有明顯的差異。(如圖 13)

四、牙菌斑菌量數：

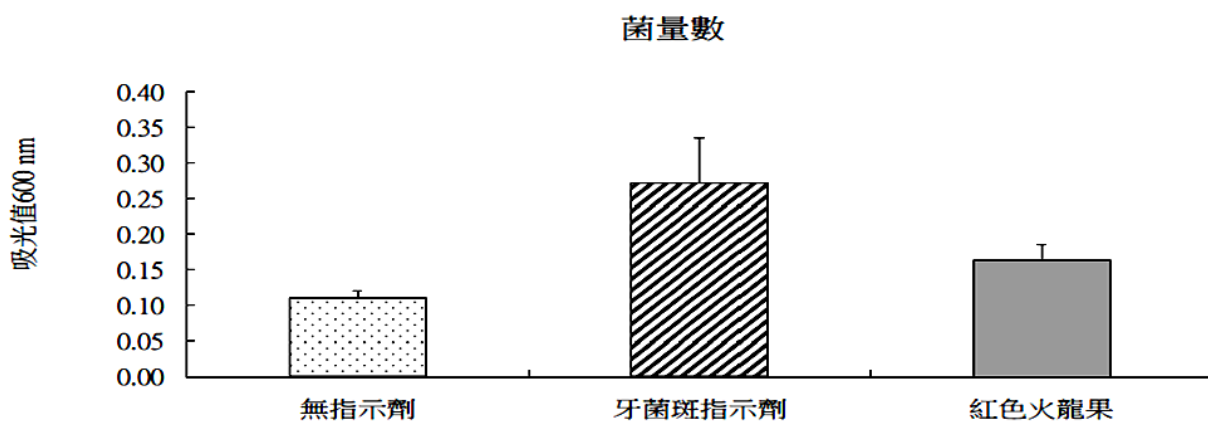


圖 14 牙菌斑菌量數

檢測各種牙菌斑指示劑菌量數變化發現，牙菌斑菌量濃度的 600 nm 吸光值變化結果發現，無指示劑組為 0.11 \pm 0.01，牙菌斑指示劑組為 0.271 \pm 0.063，紅色火龍果組為 0.165 \pm 0.024， $p < 0.001$ ，統計學有明顯的差異。(如圖 14)

五、牙菌斑菌量濃度：

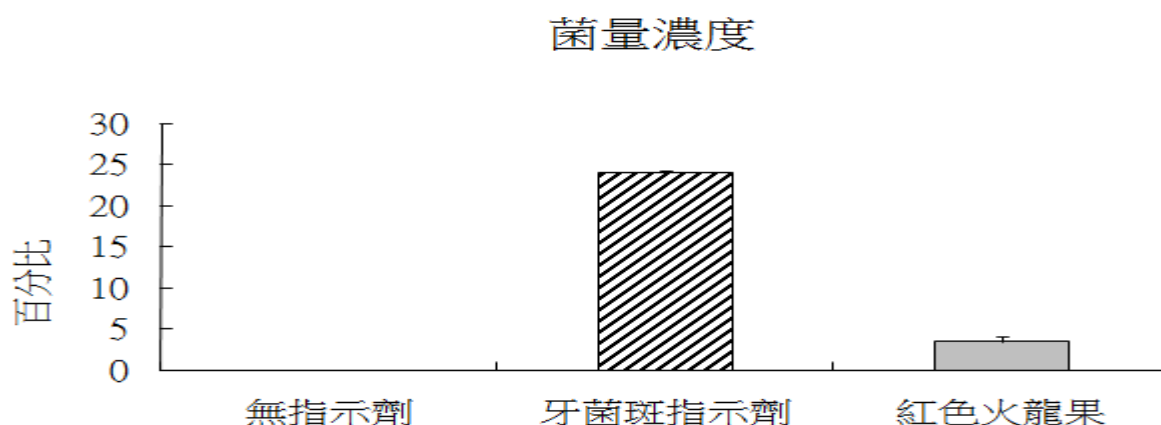


圖 15 牙菌斑菌量濃度

檢測各種牙菌斑指示劑菌量濃度變化發現，檢測各種牙菌斑指示劑菌量濃度 570nm 吸光值變化發現，無指示劑組為 0，牙菌斑指示劑組為 24 百分比 ± 0.82 ，紅色火龍果組為 3.5 百分比 ± 0.58 ， $p > 0.1$ ，雖無統計學上的差異，但是紅色火龍果組為牙菌斑指示劑組的 1/7 倍。（如圖 15）

六、格蘭氏染色：

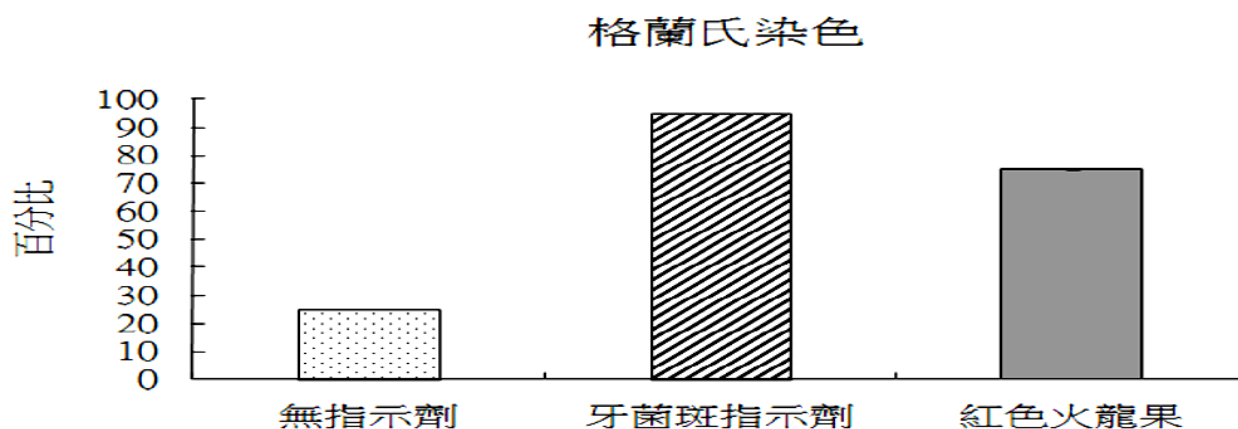


圖 16 格蘭氏染色

檢測各種牙菌斑指示劑格蘭氏陽性染色發現，無指示劑組為 25 百分比 ± 0 ，牙菌斑指示劑組為 95 百分比 ± 0 ，紅色火龍果組為 75 百分比 ± 0 $p > 0.05$ 無差異。（如圖 16）

七、人體採樣以檢測人體牙菌斑之六種變化（照相、酸鹼值、堆積量、菌種量、菌量濃度、格蘭氏染色法）來評估作為牙菌斑指示劑。（如表一）

表一 人體採樣以檢測人體牙菌斑之六種變化

	無指示劑		牙菌斑指示劑		紅色火龍果		P值
	平均值	誤差值	平均值	誤差值	平均值	誤差值	
照相牙菌斑檢測 (%)	0	0	71.25	4.79	25	4.08	0.075
牙菌斑酸鹼值 (pH)	6.75	0.25	8	0	7.5	0	>0.05
牙菌斑堆積量 (mg)	3.75	0.4	33.6	7.4	6.5	2.4	0.035 ***
牙菌斑菌量數(600 nm)	0.11	0.01	0.2718	0.0639	0.1649	0.0235	0.001 ***
牙菌斑菌量濃度測量 (%)	0	0	24	0.82	3.5	0.58	0.1
牙菌斑革蘭氏染色G (+)	25	0	95	0	75	0	>0.05

ANOVA TEST <0.05為

***明顯差異

陸、討論

目前無研究及參考資料，有用紅色火龍果來呈現牙菌斑，我們曾經使用深色水果如芒果、木瓜、葡萄、藍莓、櫻桃等，都沒有紅色火龍果染色效果佳，於是採用紅色火龍果為實驗的水果。

依據衛生署食品管理條例中「牙齒保健食品功能學評價程序和檢驗方法」，發現於照相顯示無指示劑組無法辨識牙菌斑，而紅色火龍果組可辨識牙菌斑染色有 25 百分比，比對照組增加 20 百分比以上，視為有增加牙菌斑指示之效果。檢測牙菌斑酸鹼值，未塗各種牙菌斑指示劑，酸鹼值測試紙測試為 pH 6.75，一旦塗上各種牙菌斑指示劑，牙菌斑指示劑組為 8，紅色火龍果組為 7.5，紅色火龍果內花青素容易與牙菌斑鏈球菌結合，來作為牙菌斑鹼性染色劑[6]。生物統計上檢測牙菌斑堆積量及菌量數統計是有明顯差異。在牙菌斑菌量濃度變化是屬定量性質，於紅色火龍果組牙菌斑菌量濃度，具有 1/7 用牙菌斑指示劑的效果。格蘭氏染色法結果發現，無指示劑組為量少，牙菌斑指示劑組及紅色火龍果組為無顯著差異。（如表二）

人體採樣以檢測人體牙菌斑之變化，酸鹼值紅色火龍果是良好的天然染劑，格蘭氏染色法確認牙菌斑無誤。菌量濃度雖無明顯差異，以定量方法測定樣品溶液中指示劑的含量也是一種方法。照相、堆積量、菌種量視為有增加牙菌斑指示之效果。

表二 生物統計及牙齒保健食品功能學評價程序和檢驗方法比較

	生物統計	
	P 值	增加對照組高 20% 以上
照相牙菌斑檢測	(-)	(+)
牙菌斑酸鹼值	(-)	(-)
牙菌斑堆菌量	(+)	(+)
牙菌斑菌量數	(+)	(+)
牙菌斑菌量濃度測量	(-)	(-)
牙菌斑革蘭氏染色	(-)	(-)

註：(+)：有差異 (-)：無差異

柒、結論

牙齒是淡黃色，牙菌斑薄而無色不易發現，唯有牙菌斑指示劑，可以讓牙菌斑露出原形。牙菌斑指示劑成分是一種植物性的紅色染料，能夠將牙菌斑染色。我們利用這樣的特性，將紅色火龍果內含花青素，特性很像 pH 指示劑 pH 7-8 時，為鹼性呈紅紫色，具有此種非常獨特的性質，來作為牙菌斑鹼性染色劑，而來辨別口腔內細菌的數量，進而減少細菌造成的齲齒之發生率。

牙菌斑可由人體直接取樣、觀察、分析，其實驗之方法及結果。來印證除牙菌斑指示劑外，也可利用生活中經濟實惠的食物，如紅色火龍果，作為簡易的牙菌斑指示劑，來應用其可行性，在家輔助進行自我口腔牙菌斑的檢測及減少齲齒發生。

捌、參考資料及其他

1. 陳夢蝶、蕭薇、廖笠晴、簡子蕙（2005）。嚼口香糖就可以不用刷牙了嗎？中華民國第 45 屆中小學科學展覽會作品說明書。取自：
activity.ntsec.gov.tw/activity/race-1/45/high/0308/030821.pdf。
2. L I Gang （2003）。development and methods of appliance on plaque recording and measuring of tooth surface。Chin J Conserv Dent 13 (6)352-355。
3. 鞏雲、傅相階、謝兵（2002）。不同劑型的菌斑顯示劑的研制。西南師範大學學報自然科學版（27）6：819 - 921。取自：<http://xbbjb.swu.cn/lkxb/2002/6/2002-6-0918.pdf>
4. 衛署食字第88037803 號公告（1999）。牙齒保健食品功能學評價程序和檢驗方法。取自：
www.fda.gov.tw/files/people_laws/A130.doc。
5. 高陳叔生(2008)。牙齒健康的天敵－牙菌斑。取自：www.tychb.gov.tw/.../活力健康學苑/.../970429桃總大家一起來潔牙.pdf
6. 任俊儒、周承翰（2009）。抗老聖品-花青素。取自：
www.shs.edu.tw/works/essay/2009/11/2009111315563985.pdf
7. 廖國楨。陽明大學生命科學系生命科學(一上)實驗。取自：<http://www.dls.ym.edu.tw/lsl.pdf>
8. 李江德（2009）。細菌的簡單染色和革蘭氏染色。取自：
<http://www.mingdao.edu.tw/biological/jeffery/stain.pdf>

【評語】 030824

以火龍果自製牙菌斑的指示劑，是很好的鄉土題材，平實中富有創意。惟不易量化以及不易保存，是可加強之處。