中華民國第 52 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高中組　生物（生命科學）科

佳作

040703

屠龍高手－分解保麗龍細菌之分離

學校名稱：新北市私立竹林高級中學

作者：	指導老師：
高三 詹鈞翔 高一 詹鈞年 高一 謝典儒	顏嘉怡

關鍵詞：保麗龍、聚苯乙烯、微生物

屠龍高手－分解保麗龍細菌之分離

摘要

從麵包蟲、大麥蟲、汙水樣本中，我們利用單一碳源(聚苯乙烯)富基培養的方式，與吸光值的生長測定，總共分離出了七株可能可以分解聚苯乙烯的菌，其中又以 C1 的菌株在好氧培養下，分解保麗龍的能力最佳。另外我們做了 16S rRNA 基因的定序，並與 NCBI(Ntaional Center for Biotechnology Information)資料庫比對，比較親緣關係，也進行 Biolog 生理測試比對，比較生理特性的差異，發現 B1、B2 兩株菌株的比對結果皆為 *Citrobacter* 屬，且在生理測試方面兩者有相近的特性(附錄三)，但發現兩者資料庫在 A1、A2、C2、C3 菌株的比對結果不相符，推測可能為這幾株菌株尚未有人進行分類與研究，必須進行更進一步的親緣關係比對。

壹、 研究動機：

在高中化學課本中，有機化合物的單元，學習到人類大量開發石化產品，如：塑膠、保麗龍、尼龍…等，這些高分子聚合物，不易在自然界中，被生物分解，使得如今的地球充斥著數以萬計的垃圾。

而在生物課本中，生物科技的單元中，了解到有許多微生物，能代謝一些其他生物難以代謝的物質，又先前讀到一篇 2009 年國際科展的論文，內文介紹了從麵包蟲中分離出的紅菌，可分解聚苯乙烯(保麗龍)，因此激發我們想進一步了解在自然環境與其他生物腸道中，是否也有可分解保麗龍的菌種。

我們希望找到這些菌種，比較其間的親緣關係與分解聚苯乙烯的能力差異，進而找出能分解保麗龍的最佳菌種，期望未來能利用生物分解的方式，移除掉這些令人頭疼的廢棄物。

貳、 研究目的：

一、重複前人科展從麵包蟲腸道菌分離可分解聚苯乙烯的細菌。又因大麥蟲亦可藉由吃聚苯乙烯成長，因此嘗試從大麥蟲中分離可分解聚苯乙烯之腸道菌種；也嘗試從環境中，分離可分解聚苯乙烯之菌種。

二、分離出可分解聚苯乙烯之腸道菌種後，進行 DNA 定序，並比較不同環境中菌種的異同，與親緣關係，並比較分解聚苯乙烯的能力及分解條件。

三、將分離出的菌株進行革蘭氏染色，並進行 Biolog 生理測試比對，比較生理特性上的差異。

參、 研究設備及器材

一、樣本

(一)麵包蟲樣本

1.學名： *Tenebrio molitor*，是一種甲蟲，屬於鞘翅目下擬步行蟲科粉甲蟲屬

2.分布於北美洲

3.幼蟲呈黃色，體長約 2.5 厘米；成蟲呈黑色，體長 1.25 至 1.8 厘米。

(二)大麥蟲樣本

1.學名：*Zophobas morio*，是由麵包蟲與黑麥蟲雜交培養出來的一種擬步行蟲的幼蟲。

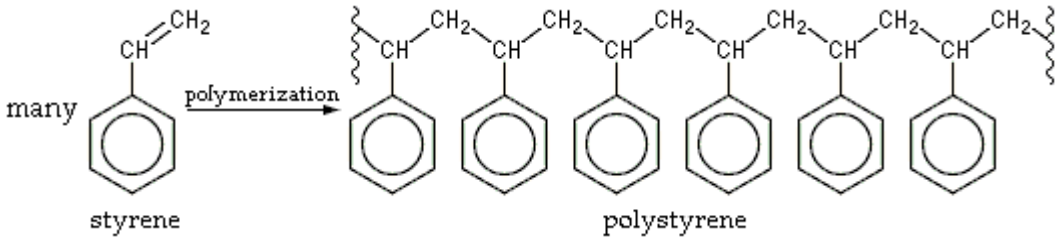
2.最大體長達 7 公分，比一般麵包蟲個體大 2～3 倍。

(三)汙水樣本

1.取自於山豬窟垃圾衛生掩埋場得進流水區以及回流汙泥區。

二、聚苯乙烯(保麗龍)

(一)聚合反應式：



(二)化學性質：

聚苯乙烯以苯乙烯為單體聚合而成，化學穩定性較差，溫度於 75°C 至 95°C 會釋放出單體(苯乙烯)。耐強酸強鹼，但可被多種有機溶劑溶解，不抗油脂，受到紫外光照射後易變色。

聚苯乙烯無色透明，質地硬而脆，可和多種染料混合產生不同的顏色。發泡後聚苯乙烯(俗稱保麗龍)，可用於建築材料上，具吸音、隔音、隔熱等效果，近來被大舉使用於中空樓板(新工法)。

三、富基培養研究設備及器材

(一)麵包蟲：學名：*Tenebrio molitor*，來源為台北市萬華區和平西路三段三興鳥園。

(二)大麥蟲：學名：*Zophobas morio*，來源為台北市萬華區和平西路三段三興鳥園。

(三)汙水處理廠樣本：汙水處理廠樣本採自山豬窟垃圾衛生掩埋場的進流水區及回流汙泥區。

(四)試管(長：12.5cm，半徑：1.6cm，容量：16mL)

(五)解剖刀

(六)鑷子

(七)微量吸取器

(八)聚苯乙烯(粒狀)

(九)無機培養基：含 NaCl，$(NH_4)_2H_2PO_4$，$MgSO_4$

(十)LA 固體培養基(LB broth 25g/L， Argar 16g/L)

四、四區劃線研究設備及器材

(一)LA 固體培養基

(二)接種環

(三)酒精燈

五、分解測試研究設備及器材

(一)接種環

(二)無機培養基：含 NaCl，$(NH_4)_2H_2PO_4$，$MgSO_4$

(三)聚苯乙烯(片狀)(切割為厚度 0.1mm, 直徑 5mm)

(四)試管

六、吸光值測定器材：

(一).分光光度計

(二).石英管

七、破菌抽取 DNA 器材、藥品：

(一)微量離心機

(二)37℃培養箱

(三)30℃培養箱

(四)水浴槽

(五)TE buffer： 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0

(六)絕對酒精（或95%酒精）及70% 酒精

八、DNA 電泳器材、藥品：

(一)迷你電泳槽及鑄膠器(Mupid II)

(二)UV transillu分鐘ator 及膠片影像分析系統

(三)瓊脂糖粉末(Argarose)

(四)1xTBE 電泳緩衝溶液

(五) Ethidium bromide (EtBr) stock solution：12 μg/mL

(六) DNA 標準分子量

九、PCR 器材：

(一)PCR 機器：Applied Biosystem 2420

(二)Dream Tag DNA polynerase

(三)dNTP

(四)Primers

十、革蘭氏染色相關器材：

(一)BUG Argar plate

(二)37℃培養箱

(三)載玻片

(四)接種環

(五)酒精燈

(六)結晶紫

(七)碘液

(八)酒精(95%)

(九)芬紅

(十)複式顯微鏡

十一、Biolog 革蘭氏陰性菌(GN)生理測試相關器材與藥品：

(一)GN 2 Plate 革蘭氏陰鑑菌專用鑑定盤

(二)GN/GP-IF革蘭氏菌接種液20mL

(三)Biolog

(四)八爪可調式微量吸管

(五)BUG Agar

肆、研究方法

一、實驗流程圖

(1)

進行採樣
a. 麵包蟲：腸道
b. 大麥蟲：腸道
c. 汙水處理廠：進流水區及回流汙泥區

(2)

進行單一碳源(聚苯乙烯)培養，並繼代培養數次

(3)

以推平板以及四區劃線的方式，分離出各種菌株

(4)

將各種菌株，進行聚苯乙烯分解測試

(5)

篩選後，將能分解聚苯乙烯之菌株在厭氧及好氧環境下培養，了解在不同環境生長情形

(6)

將能分解聚笨乙烯之菌株，進一步進行 DNA 定序及菌株鑑定，進行親緣關係的比較

(7)

為進一步進行生理測試，將各菌株進行革蘭氏染色

(8)

利用 Biolog 測試分解聚苯乙烯之菌株的生理特性

二、單一碳源(聚苯乙烯)富基培養：

從麵包蟲、大麥蟲腸道中以及汙水處理，採集樣本，並將樣本至於只含單一碳源(只含聚苯乙烯)的培養基中，以富基培養的方式，繼代培養數次，以期能分離出能分解保麗龍的菌株。步驟如下：

1.配製無機培養基 900mL，並將培養基分裝到各試管，每管 10mL 並加入 4 顆聚苯乙烯顆粒，之後進行滅菌處理。

2.將麵包蟲腸道取出，剪開後將內含物置入培養基中，大麥蟲取樣方式同上所述，每種蟲各取樣 3 管，共 6 管。

3.將汙水處理廠樣本震盪後，靜置 30 分鐘後待雜質沉澱，取上清液 1mL 加入培養基中，共取 3 管。

4.取樣完畢後，將麵包蟲樣本標示 A，大麥蟲樣本標示 B。A、B 兩大類樣本皆置於厭氧包中培養一星期。

5.將汙水樣本標示 C 置於含氧環境，並且搖晃震盪培養一星期。

6.一星期後取出 1mL 樣本液，置入新的培養基中培養(繼代培養)，重複上述步驟數次，使樣本菌相趨於單純。

7. 繼代培養數次後，取 1mL 樣本液，加入 LA 培養基中，並以推棒推勻，檢視樣本中的菌相。

三、四區劃線：

由於繼代培養數次後，各樣本中能有數種菌株，因此在 LA 培養基上，以四區劃線的方式，劃出各種菌株的單一菌落，再將各個單一菌落置入單一碳源培養基中，進行培養。步驟如下：

1.將 A.B.C 樣本推至固體培養基後，以接種環取不同型態之單一菌落。

2.將取出菌落以四區劃線方式，在 LA 上培養一星期。

3.一星期後觀察，是否成功畫出單一菌落。

四、片狀聚苯乙烯分解測試：

分離出的各種菌株，以聚苯乙烯培養基培養，並繼代培養數次後，將菌株置入含片狀保

麗龍的無機培養基中，培養一星期後，觀察保麗龍分解狀況。步驟如下：：

1.配製無機培養基 450mL 並分裝入 9 個試管中各 5mL，滅菌處理後，分別加入無菌的聚苯乙烯每管各一片。

2.將分離出的單一菌落標示 A1 到 A9，B1 到 B9，C1 到 C3，置於 LB 培樣基培養一天後，取出 2mL 離心。

3.離心後倒掉上清液，留下沉澱物，以 0.5mL 無菌水回溶。

4.回溶後，將 0.5mL 溶液加入準備好之片狀聚苯乙烯培養基試管。

5.A.B.大類以厭氧培養，C 大類以好氧培養，皆培養 1 星期。

6.一星期後觀察聚苯乙烯分解狀況。

五、吸光值測定：

由於聚苯乙烯分解狀況皆不如預期中的明顯，於是我們採行另一種方式，以證明菌株在只以聚苯乙烯為碳源的無機培養基中能夠生長。再加入菌株的第一天先測定培養基溶液的吸光值，培養一星期後，在取出溶液，測定吸光值，若吸光值有明顯上升，則代表培養基中有細菌生長的現象。步驟如下：

1.進行繼代時，先將剛剛置入菌液的培養基，吸取 1mL 進行吸光值測定。

2.培養 1 星期後，再取出 1mL 培養液，進行吸光值測定。

3.比較培養前，培養後吸光值差異。

六、抽取分解聚苯乙烯菌株 DNA

欲將分離出的七株菌(A1-A2、B1-B2、C1-C3)DNA 抽出，以便進行 DNA 定序。步驟如下：

1.每組取2 支乾淨離心管，在管蓋上標示組別。每管各加入1.5 mL 菌液，以6000 rpm 離心3 分鐘。離心後，倒掉上清液，再加入1 mL 菌液，同上條件離心。離心後，倒掉上清液，並以微量吸管盡可能吸去殘留液體，保留沈澱（菌體）部分。

2.每管加入50 μL STE，震盪(vortex) 懸濁後，加入300 μL Cell Lysis Buffer，震盪混合均勻後，置於60℃乾浴槽中反應10 分鐘。反應期間，需每隔3 分鐘將離心管翻轉幾

次，反應後溶液應呈透明狀。

3.每管加入4 μL RNaseA，震盪混合均勻。將離心管蓋緊，置於37℃乾浴槽10分鐘。

4.每管加入 100 μL Protein Remove Buffer，立即震盪 10 秒。

5.以13000 rpm 離心5 分鐘 後，小心將上清液吸至乾淨離心管中。若上清液中仍有白色沈澱懸浮，需再離心一次，將沈澱去除乾淨。

6.在上清液中加入0.9 mL 絕對酒精，蓋緊管蓋，反覆翻轉離心管使溶液充分混合均勻，置於室溫2-5 分鐘。

7.以13000 rpm 離心5 分鐘 後，吸去上清液，保留沈澱。每管加入0.5 mL 70% 酒精，蓋緊管蓋，上下混合後，以13000 rpm 離心3 分鐘。吸去上清液（小心別吸到DNA 或把DNA 倒掉），沈澱再以70% 酒精重複清洗及離心一次。

去除上清液後，將離心管置回離心機，離心10 秒 後取出，以微量吸管儘可能吸去殘留液體。

8.將離心管置於通風櫥中（管蓋要打開），待沈澱表面乾燥後，每管加入50m L TE-8.0。將離心管置於60 ℃乾浴槽中30 分鐘，期間每隔5-10 分鐘 以手指彈拍管底，以助DNA 溶解，進一步進行16S rRNA基因 PCR反應。

七、PCR(聚合酶連鎖反應)

因需定序的 DNA 片段僅有 16S rRNA 基因部分，因此使用 PCR 反應，產生特定序列的大量複本，以利 DNA 定序。步驟如下：

DNA	4 μl
1492r (10 μm)	2 μl
27f (10 μm)	2 μl
dNTP (10 μm)	2 μl
Buffer	5 μl
Tag enzyme	0.6 μl
ddH2O	34.4 μl
Total	50 μl

Step 1 94℃ 5 分鐘

Step 2 94℃ 1 分鐘

Step 3 55℃ 1 分鐘

Step 4 72℃ 1 分鐘

Step 5 72℃ 2 分鐘

Step2-step4 repeat 30 times

八、DNA 電泳

PCR 反應後，欲確定所要的樣本片段有被確實複製，因此進行 DNA 電泳分析，以確認 PCR 反應的有無與產物為所要的片段的大有是否正確。步驟如下：

1.膠片製備：

(1)每組製備一片6-well 0.8% agarose gel：秤取適量agarose 粉末後，加入1×TAE（小片Mupid II 膠片約需20 mL），以微波爐加熱溶解後，置55℃水浴降溫。

(2)加入EtBr（每50 mL 膠體溶液加一滴stock solution），混合均勻，將膠體溶液倒入鑄膠模，插上齒模，置室溫至少30 分鐘使凝結。

2.準備DNA 樣品：

(1)每管染色體DNA 各取2 及10 mL 兩種體積，分別置於微量離心管中，各加入1 mL 10× 追蹤染劑。

(2)將染色體DNA 及Mr（已經加入追蹤染劑） 置65℃ 水浴5 ～ 10 分鐘後，立即移置冰浴中。

3.電泳：

(1)小心拔開齒模，將膠片置於電泳槽中，倒入1×TAE（加入EtBr，最終濃度為0.5 μg /mL），直至溶液蓋過膠片。

(2)將各個DNA 樣品加入樣品槽中，蓋上電泳槽之透明蓋。以50 V 進行電泳，待追蹤染劑 bromophenol blue 行進至膠體三分之二處時，關閉電源，取出膠片，以UV transillu分鐘ator box 觀察色帶位置。

九、革蘭氏染色：

由於要將菌株進行Biolog生理測試，為了解菌株所使用的鑑菌專用鑑定盤，必須了解菌株為革蘭氏陰性菌或是革蘭氏陽性菌。步驟如下：

1.玻片製備：

(1)將各菌株以四區劃線的方式接於BUG Argar plate上，於37℃培養箱中培養24小時。

(2)滴10μL RO水於載玻片上，從BUG Argar plate 以接種環刮取單一菌落並與載玻片上的RO水混勻塗開。

(3)待載玻片上菌液乾掉後於酒精燈上加熱1~2秒進行熱固定。

2.進行革蘭氏染色：

(1)將1~2滴結晶紫滴於載玻片上，靜置1分鐘後以RO水沖洗載玻片上多餘結晶紫。

(2)將1 ~2滴碘液滴於載玻片上，靜置1分鐘後以RO水沖洗載玻片上多餘碘液。

(3)以1 ~2滴酒精沖洗載玻片 。

(4)將1~2滴芬紅滴於載玻片上，靜置45秒後以RO水沖洗載玻片上多餘芬紅。

3.於相位差顯微鏡下觀察菌株外觀以及革蘭氏染色結果。(1000X 油鏡)。

十、Biolog 革蘭氏陰性菌(GN)生理測試：

革蘭氏染色後，我們發現所有菌株皆為陰性，因此我們進行革蘭氏陰性菌(GN)生理測試，步驟如下：

1.菌株培養：

(1)將各菌株以推平板的方式接於BUG Argar plate上，於37℃培養箱中培養24小時。

(2)另外將各菌株以四區劃線的方式接於BUG Argar plate上，於37℃培養箱中培養24小時，以確認接種來源是否無汙染。

2. GN/GP-IF革蘭氏菌接種液：

(1)取1mL RO水於離心管中備置。

(2)將推平板於BUG Argar plate上生長24小時後的菌株以接種環刮取適量，溶於1.5mL離心管中並震盪使均勻混合。

(3)將菌液離心，並以離心後倒出上清液，再加入1mL RO水，重複此步驟兩次以洗去原培養基上含有的養分。

(4)將菌液稀釋五倍後以分光光度計測得吸光值，並計算需加入於GN/GP-IF革蘭氏菌接種液的菌液量，使每一管菌液吸光值皆為0.1。

3.接菌於GN 2 Plate革蘭氏陰鑑菌專用鑑定盤：

(1)將吸光值調為0.1的GN/GP-IF革蘭氏菌接種液倒於空白無菌的plate上，以八爪微量吸管各取150μL加入鑑定盤上的96個孔中，於37℃培養箱含氧培養19小時。

4.Biolog鑑定：

(1)將經培養後的鑑定盤置入Biolog儀器中讀取數據。

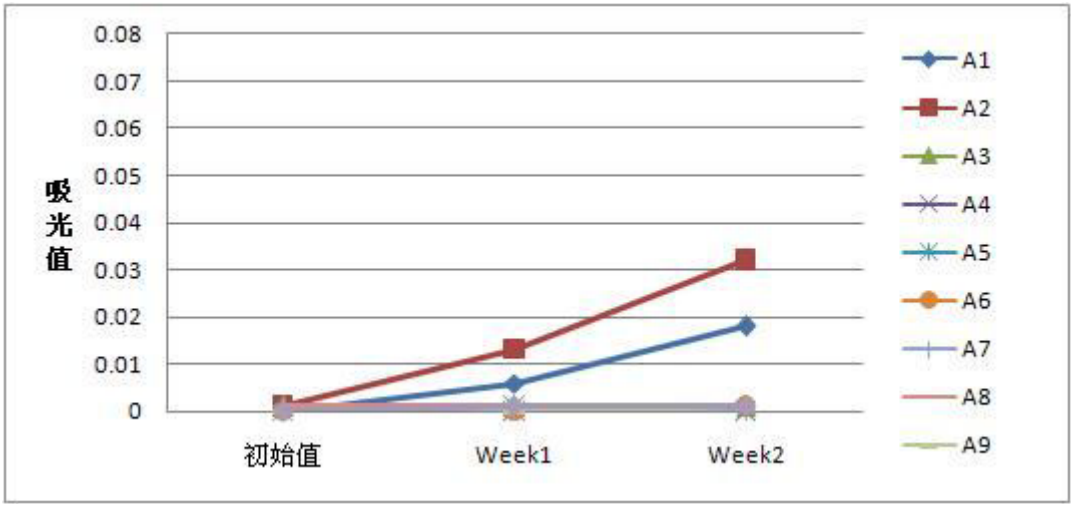
伍、研究結果

一、初步篩選可分解聚苯乙烯細菌

(一)富基培養後各菌株生長吸光值變化

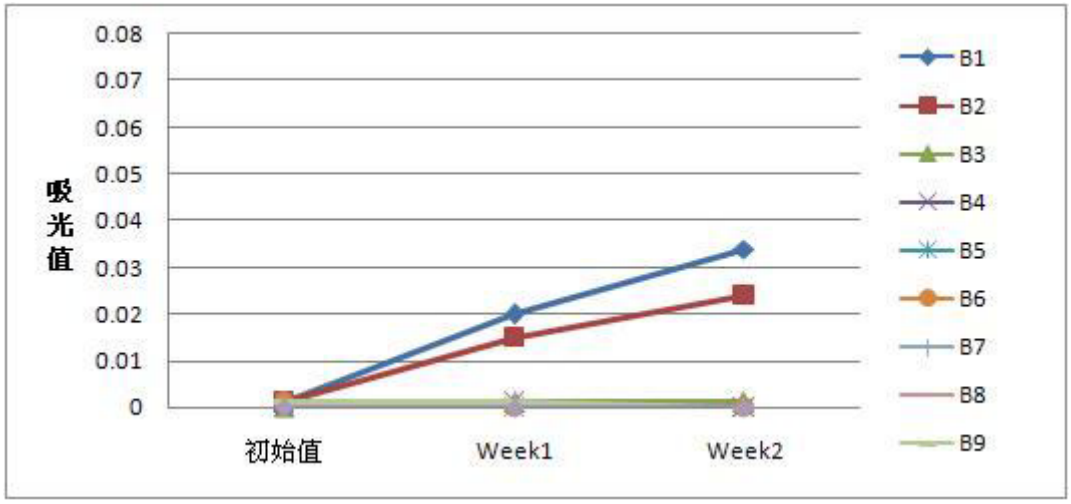
經由富基培養，與吸光值的測定，我們從原先的二十一株菌株中，分離出了七株能分解聚苯乙烯的細菌，其中源於麵包蟲的菌株有兩株(A1~A2)、大麥蟲的有兩株(B1~B2)、汙水樣本的有三株(C1~C3)。

1.從麵包蟲腸道初步分離出的菌株編號 A1~A9，從表一與圖一可以看出九株菌株中，A1 與 A2 生長情形較明顯，因此挑出，預備進行進一步測試。



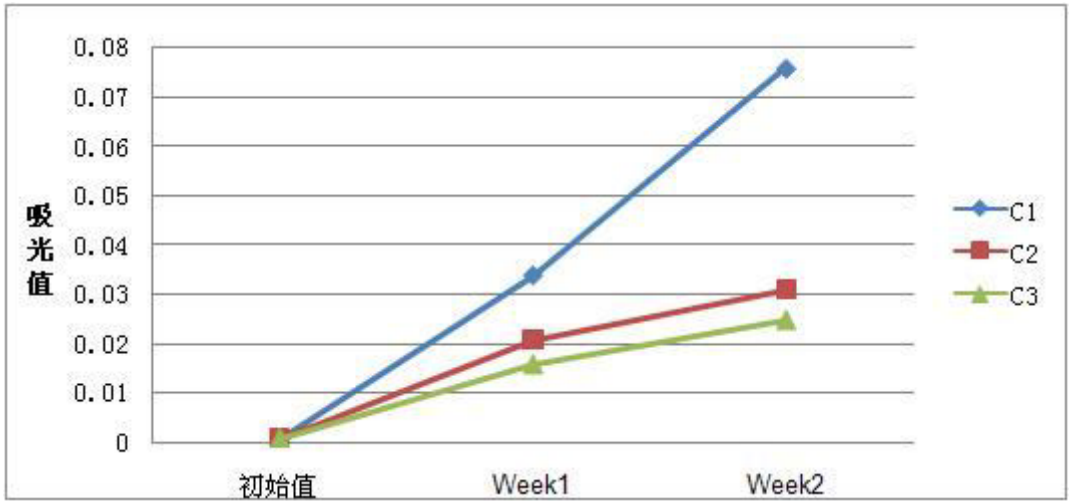
圖一、從麵包蟲腸道初步分離出的菌株編號 A1~A9 在富基培養基培養兩週的吸光值變化

2.從大麥蟲腸道初步分離出的菌株編號 B1~B9，從表二與圖二可以看出九株菌株中，B1 與 B2 生長情形較明顯，因此挑出，預備進行進一步測試



圖二、從大麥蟲腸道初步分離出的菌株編號 B1~B9 在富基培養基培養兩週的吸光值變化

3. 從汙水樣本中得到初步分離出的菌株編號 C1~C3，從表三與圖三可以看出三株菌株中，C1、C2 與 C3 生長情形皆明顯，因此挑出，預備進行進一步測試。

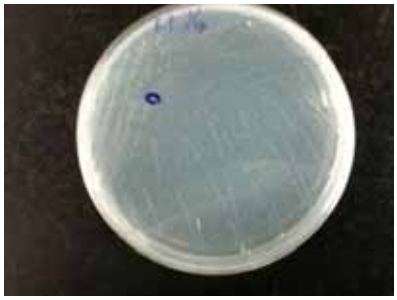


圖三、從汙水樣本中得到初步分離出的菌株編號 C1~C3 在富基培養基培養兩週的吸光值變化

二、經吸光值測定後篩選出可能分解聚苯乙烯的菌株

(一)麵包蟲組

A1：取自麵包蟲腸道，編號 A1

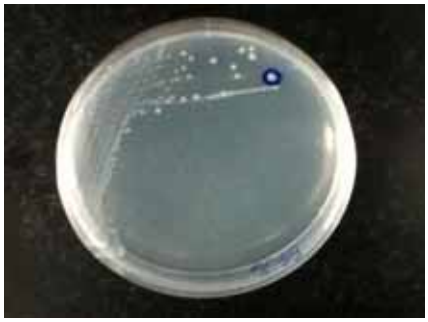


A2：取自麵包蟲腸道，編號 A2

(二)大麥蟲組

B1：取自大麥蟲腸道，編號 B1

B2：取自大麥蟲腸道，編號 B2



(三)汙水處理廠組

C1：取自汙水樣本，編號 C1

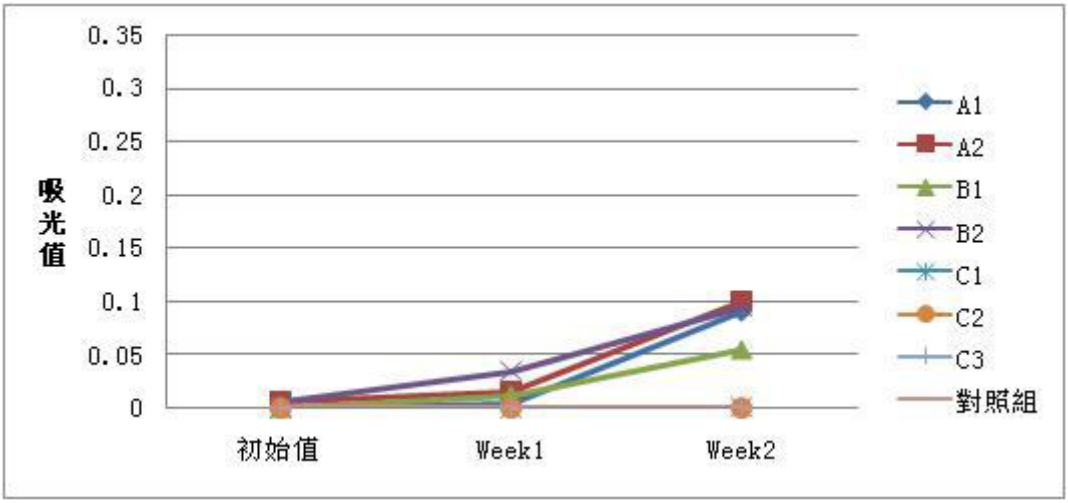
C2：取自汙水樣本，編號 C2

C3：取自汙水樣本，編號 C3

三、篩選後能分解聚苯乙烯之細菌在不同環境下生長吸光值變化

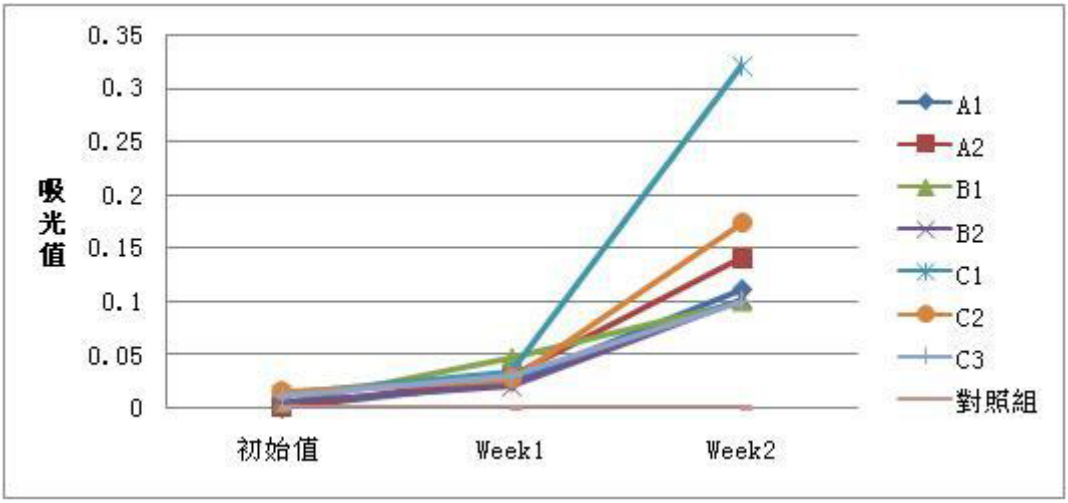
由表四、表五、圖四、圖五，可以發現由麵包蟲與大麥蟲分離出的菌株屬於兼性厭氧細菌，而其分解聚苯乙烯的能力，在好氧震盪下比在厭氧環境中來的明顯，而由汙水中分離出的菌株，僅可以在好氧的狀況下生存與分解聚苯乙烯，又比較好氧培養與厭氧培養的結果，以及各菌株培養的結果，可知分離出 C1 菌株在好氧培養下分解聚苯乙烯的能力最好，而麵包蟲與大麥蟲分離出的菌株在好氧培養下，分解聚苯乙烯的能力也比厭氧環境來的好。

(一)篩選後能分解聚苯乙烯之菌株在厭氧環境下培養的生長吸光值變化



圖四、篩選後能分解聚苯乙烯之菌株在厭氧環境下培養的生長吸光值變化

(二) 篩選後能分解聚苯乙烯之菌株在好氧震盪環境下培養的生長吸光值變化



圖五、篩選後能分解聚苯乙烯之菌株在好氧震盪環境下培養的生長吸光值變化

四、菌株鑑定(16S ribosomal RNA 基因比對)與親緣關係比較

由圖六、圖七、圖八可知，此實驗所分離出的菌屬可能為三個屬(*Pseudomonas* 屬、*Citrobacter* 屬、*Pandoraea* 屬)，其中由麵包蟲與大麥蟲中分離出的菌株，鑑定結果皆為 *Citrobacter* 屬，在汙水樣本方面則為 *Pseudomonas* 屬、*Pandoraea* 屬。

A：自麵包蟲分離的細菌：

A1：與 *Citrobacter werkmanii* strain CDC 0876-58 16S ribosomal RNA gene-相似性 93%(Identities = 1247/1337 (93%), Gaps = 1/1337 (0%))

A2：與 *Citrobacter freundii* strain XW722 16S ribosomal RNA gene 相似性 95%(Identities = 1335/1411 (95%), Gaps = 0/1411 (0%))

B：自大麥蟲分離的細菌：

B1：與 *Citrobacter freundii* strain XW722 16S ribosomal RNA gene 相似性 95%(Identities = 1323/1393 (95%), Gaps = 6/1393 (0%))

B2：與 *Citrobacter werkmanii* strain CDC 0876-58 16S ribosomal RNA 相似性 95%(Identities = 1280/1344 (95%), Gaps = 1/1344 (0%))

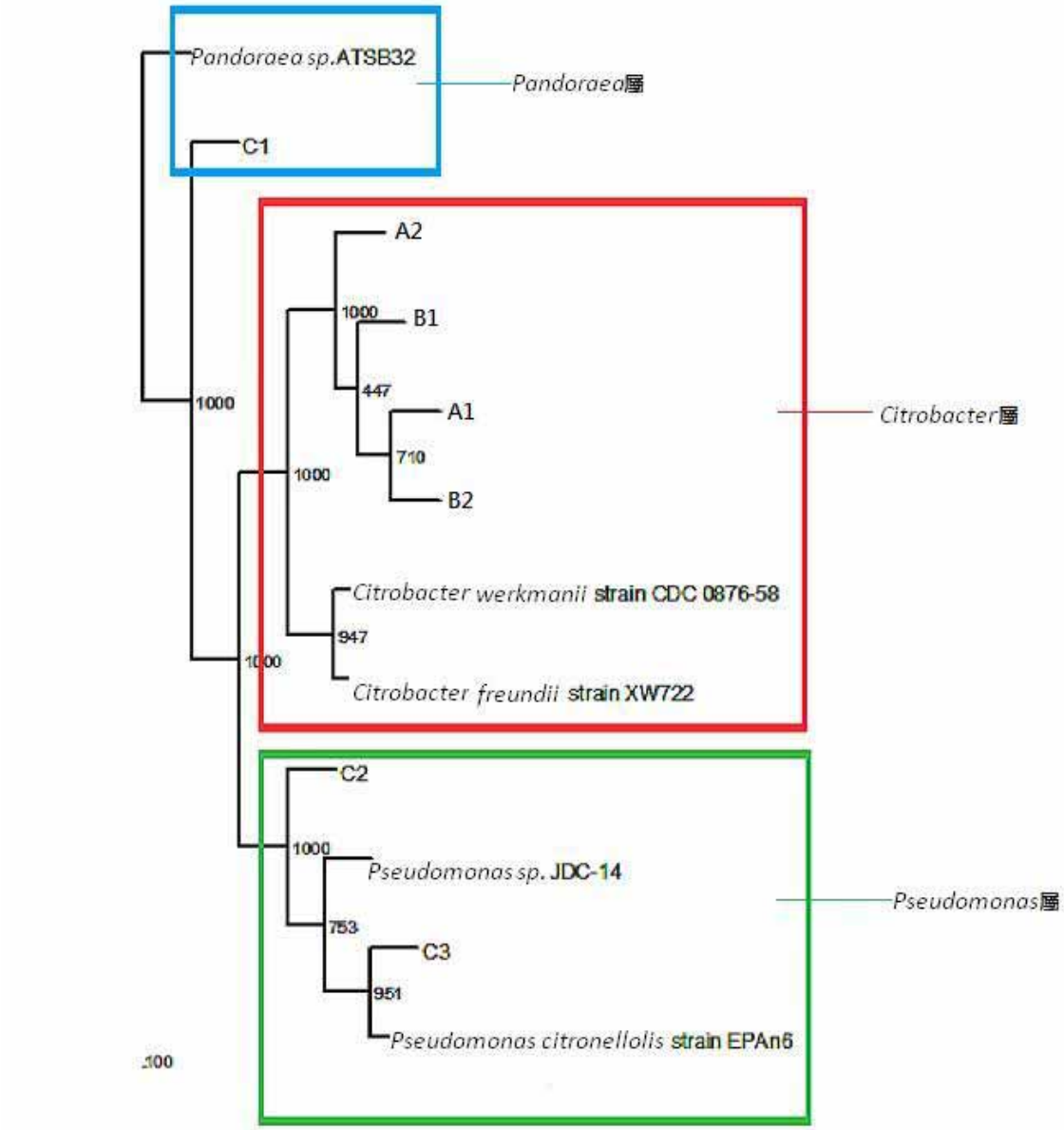
C：自汙水中分離的細菌：

C1：與 *Pandoraea sp.* ATSB32 16S ribosomal RNA gene 相似性 99%
(Identities = 1406/1407 (99%), Gaps = 0/1407 (0%))

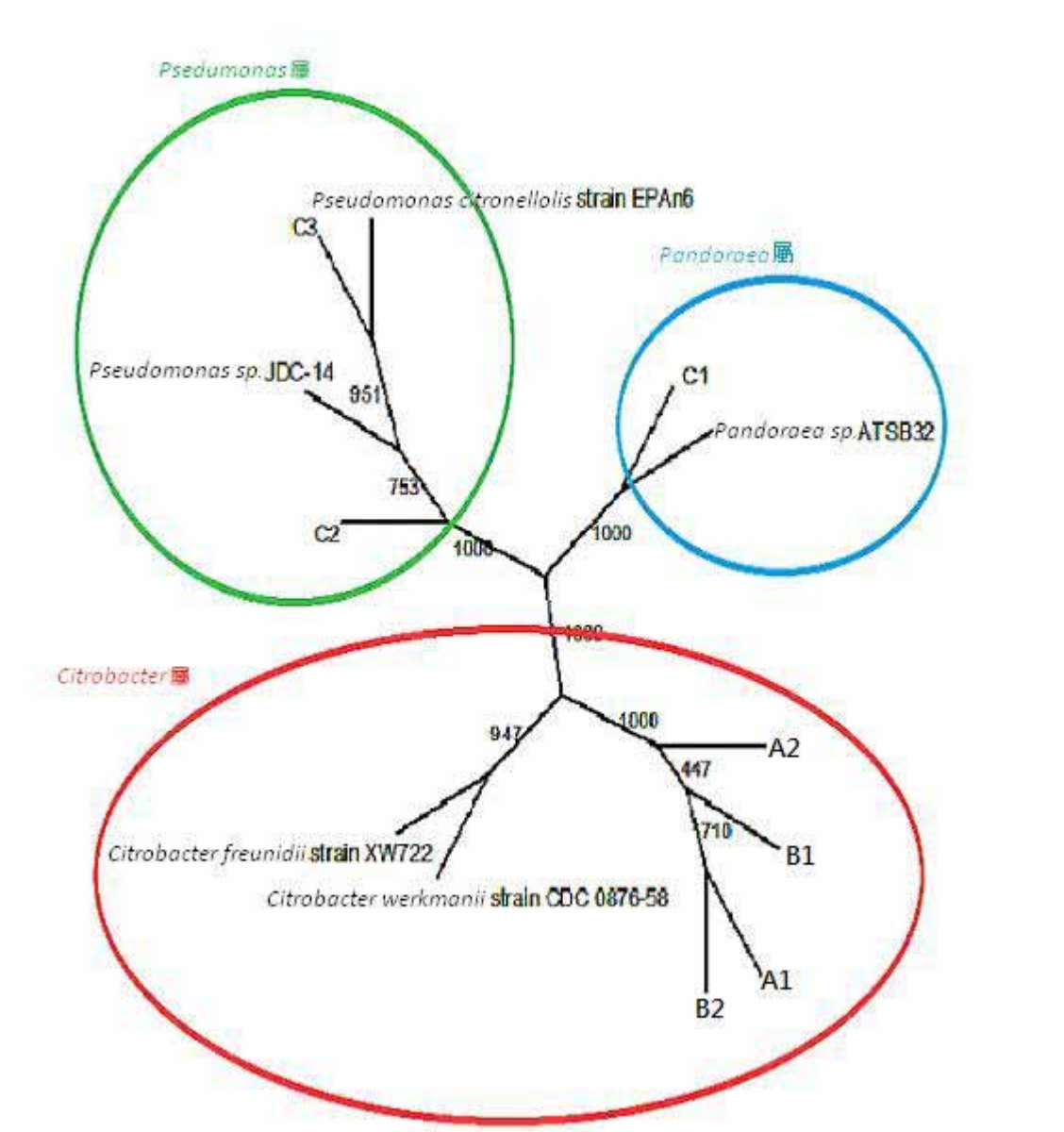
C2：與 *Pseudomonas citronellolis* strain EPAn6 16S ribosomal RNA gene 相似性 99%(Identities = 1388/1391 (99%), Gaps = 1/1391 (0%))

C3：與 *Pseudomonas sp.* JDC-14 16S ribosomal RNA gene 相似性 99%
(Identities = 1412/1414 (99%), Gaps = 1/1414 (0%))

圖六、分解聚苯乙烯之細菌菌株鑑定(16S ribosomal RNA gene 比對)



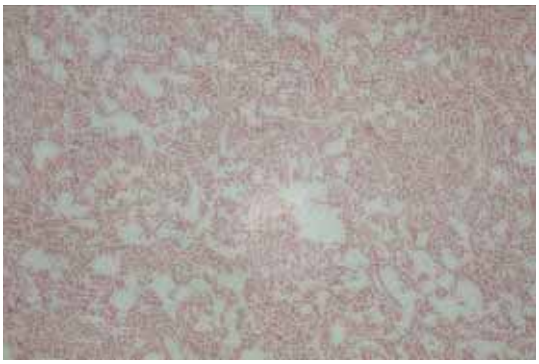
圖七、分解聚苯乙烯之細菌親緣關係比較(樹狀圖)



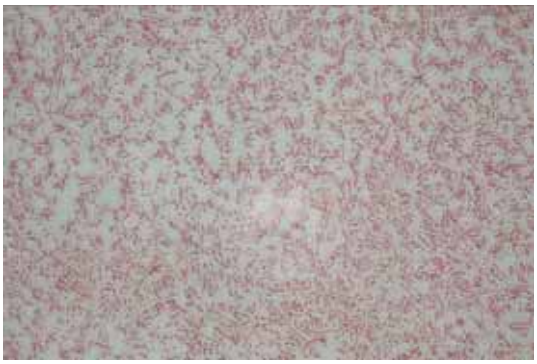
圖八、分解聚苯乙烯之細菌親緣關係比較(輻射圖)

五、革蘭氏染色結果：

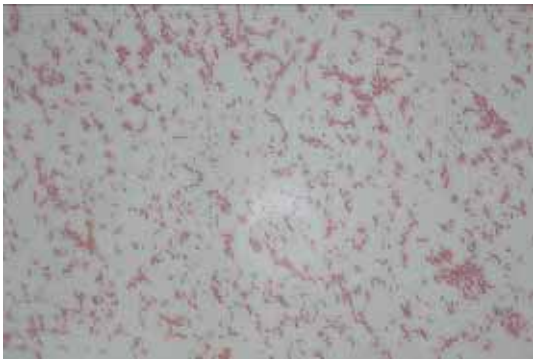
經由革蘭氏染色結果，我們發現 A1、A2、B1、B2、C1、C2、C3 皆為革蘭氏陰性菌。



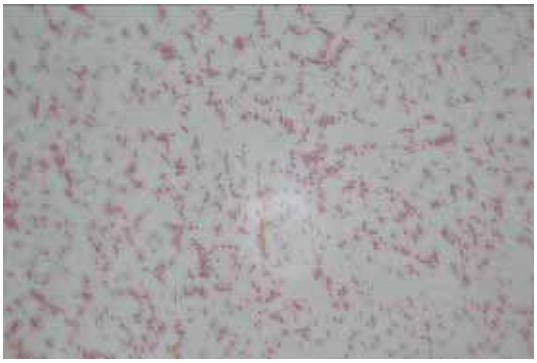
圖八、菌株 A1 顯微照相圖



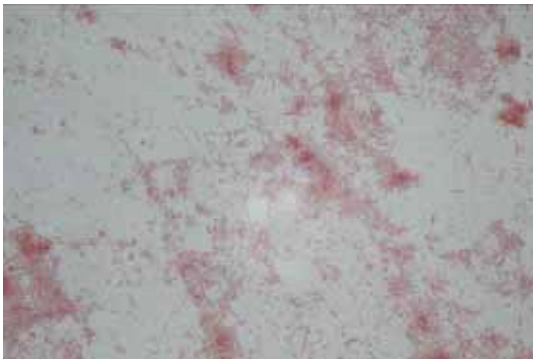
圖九、菌株 A2 顯微照相圖



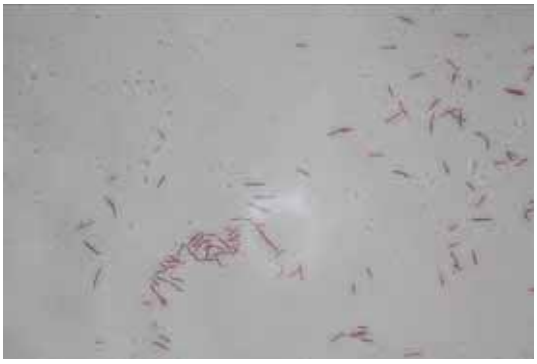
圖十、菌株 B1 顯微照相圖



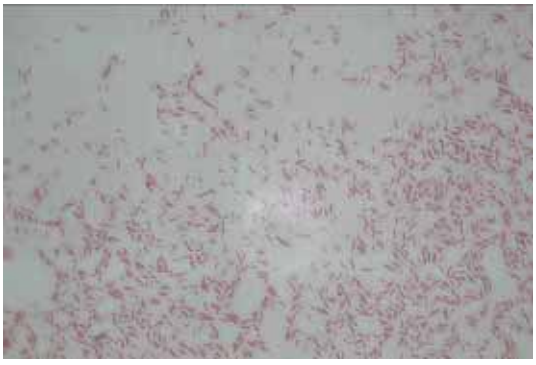
圖十一、菌株 B2 顯微照相圖



圖十二、菌株 C1 顯微照相圖



圖十三、、菌株 C2 顯微照相圖



圖十四、、菌株 C3 顯微照相圖

註: 利用相位差顯微鏡下觀察
放大倍率 1000X

六、Biolog 生理測試：

我們將讀出的 Bbiolog 鑑定結果進行分析，發現 B1、B2 兩株菌株的比對結果皆為 *Citrobacter* 屬，且在生理測試方面兩者有相近的特性。， (見附錄三)。

A：自麵包蟲分離的細菌：

A1：與 *Proteus mirabilis* 相似度 31.2%(Similarity =0.312, Distance=10.81 , Probability=---)

A2：與 *Proteus mirabilis* 相似性 49.5% (Similarity =0.312, Distance= 11.20 , Probability=---)

B：自大麥蟲分離的細菌：

B1：與 *Citrobacter werkmanii* 相似性 17.1% (Similarity=0.171, Distance= 11.66, Probability=---)

B2：與 *Citrobacter youngae* 相似性 15.7% (Similarity = 0.157, Distance=10.81, Probability=---)

C：自汙水中分離的細菌：

C1：(由於在進行 Biolog 生理測試時，產生偽陽性，鑑定盤無法讀出數據, Probability=---)

C2：與 *Acidovorax delafieldii* 相似性 64.4% (Similarity=0.644, Distance= 3.25, Probability=82%)

C3：與 *Burkholderia multivorans* 相似性 49.5% (Similarity = 0.207, Distance= 14.95, Probability=---)

※Probability 必須於 Similarity 大於 0.5 時才會呈現。

陸.討論

一、腸道菌的厭氧培養：因在動物腸道內的環境基本處於無氧狀態，故腸道中所含的菌株應屬於厭氧菌或是兼性厭氧菌，所以在培養麵包蟲與大麥蟲腸道菌時，我們採用厭氧培養，以模擬腸道的環境。

二、汙水樣本的好氧培養：汙水處理廠處理廢水及汙泥時，會通入大量氧氣，促進微生物分解有機物質，所以我們在培養汙水樣本時，採用好氧的方式培養樣本。

三、由於分解片狀保麗龍的實驗結果不甚明顯與理想，故我們改採測定吸光值變化量的方式，證明在單一碳源培養基中，有細菌的增長。

四、吸光值測試，可以發現由麵包蟲與大麥蟲分離出的菌株(A1、A2、A3)屬於兼性厭氧細菌而其分解聚苯乙烯的能力，在好氧震盪下比在厭氧環境中來的明顯。

五、由吸光值測試，可以發現由汙水中分離出的菌株(C1、C2、C3)為好氧性細菌，僅可以在

好氧的狀況下生存與分解聚苯乙烯。

六、由 16S rRNA 基因定序可推測，分離出的菌屬主要可分成三個屬(*Pseudomonas* 屬、*Citrobacter* 屬、*Pandoraea* 屬)，其中由麵包蟲與大麥蟲中分離出的菌株，皆為 *Citrobacter* 屬，推測是因為麵包蟲與大麥蟲的食物相似，使得腸道內的環境類似，因此腸道內的微生物種類、型態、族群分布也相近，故皆分離出相同菌屬能分解聚苯乙烯的細菌。在汙水樣本方面共分離出 *Pseudomonas* 屬、*Pandoraea* 屬，兩屬的細菌，推測是因汙水處理廠收集的許許多多不同環境的垃圾廢水，汙水中含有各式各樣的細菌，所以較容易收集到不同屬且能分解聚苯乙烯的細菌。

七、但經由 Biolog 生理測試比對後，並比較 16S rRNA 基因定序結果，發現部分菌株於兩方資料鑑定結果顯示的菌屬不同，A1、A2、C1、C2、C3 的菌株於 Biolog 生理測試上所鑑定出的親緣關係與 16S rRNA 基因定序上的結果不符，推測這幾株菌株尚未有人進行分類與研究，必須進行更進一步的親緣關係比對。另外，B1、B2 經 Biolog 測試的結果顯示出的菌屬與 16S rRNA 基因定序結果顯示得菌屬皆為 *Citrobacter* 屬，因此兩株菌很有可能為 *Citrobacter* 屬。

八、經由 Biolog 生理測試比對後，發現 B1 與 B2 在生理方面的特性可能較為相近。(見附錄三)

柒、結論

一、 本次實驗，我們發現不僅在麵包蟲腸道中，在其近親大麥蟲腸道與自然環境中，亦可以分離出能分解聚苯乙烯的菌株。

二、 在麵包蟲與大麥蟲腸道中分離出分解聚苯乙烯菌株屬於兼性厭氧細菌。

三、 在我們分離出的眾多菌株中，發現由汙水樣本中，分離出的 C1 菌株在好氧震盪下，分解聚苯乙烯的能力是我們所分離之所有菌株中最好的。

四、 進行革蘭氏染色後，我們發現分離出的七株菌株皆為革蘭氏陰性菌。

五、 經由 Biolog 生理測試，我們發現在 16S rRNA 基因定序進分類後的菌株，也會有某些生理上的差異。

捌、未來展望

一、 希望進一步了解各種分離菌株的細胞學特性、生理特性與比較其中異同

二、 希望進一步研究各的菌屬代謝聚苯乙烯的路徑，以了解其中的差異，找出最有效的聚苯乙烯生理分解路徑，與分解聚苯乙烯代謝的最佳條件。

三、希望進一步進行分類學上的研究，以確定分離出的七株菌株間的親緣關係。

玖、參考資料及其他

壹、中文部分

一、【一本書】

李國鏞、游若筱（民 77）。微生物學（1 版）。臺北市：華香園。

貳、網路資源

一、中文部分

【期刊文章】

1. 2009年臺灣國際科學展覽會編號：070006<從麵包蟲體內分離出可分解保麗龍之菌種>.民100年5月20日

2.染色體 DNA 分離與檢定，取自 http：//homepage.ntu.edu.tw/~shihchung/BCX/BCX%2097-1%20files/BCX%20N1-97.pdf.民 101 年 3 月 26 日

3.Real Time PCR – 標準作業流程，取自： http：//research.tpec.edu.tw/%E5%AF%A6%E9%A9%97%E6%8A%80%E8%A1%93/%E5%AE%9A%E9%87%8FPCR%E4%B9%8B%E6%93%8D%E4%BD%9CSOP%E6%B5%81%E7%A8%8B%E8%88%87%E6%B3%A8%E6%84%8F%E4%BA%8B%E9%A0%85%20%5B05-08%5D.pdf.民 101 年 3 月 26 日

二、英文部分

【摘要及資料庫資料】

1.http：//www.ncbi.nlm.nih.gov/.民 101 年 3 月 26 日

附錄一

各項藥品與器材詳細資料：

一、器材：

(一)培養相關器材：	
器材	廠牌
37℃培養箱	Firstek Scientific
30℃培養箱	Firstek Scientific
(二) 吸光值測定相關器材：	
器材	廠牌
分光光度計	矽新、Metertech
(三)破菌抽取 DNA 相關器材：	
器材	廠牌
微量離心機	eppendorf
水浴槽	YIH-DER、裕德
(四)DNA 電泳相關器材：	
器材	廠牌
迷你電泳槽集鑄膠器(Mupid II)	Embi-Tec
膠片影像分析系統	UVP
(五)PCR 相關器材：	
器材	廠牌
PCR 機器	Applied Biosystem 2420
(六)Biolog 生化測試相關器材：	
八爪可調式微量吸管 (3114)	Eppendorf
Biolog	

二、藥品：

(一)培養相關藥品：	
藥品	廠牌
NaCl	LAB-SCAN
$(NH_4)H_2PO_4$	Sigma
$MgSO_4$	nacalai
LB broth Tryptone.....10.0g/25g Yeast Extract.....5.0g/25g Sodium Chloride.....10.0g/25g	Difco
Argar	nacalai
(二)破菌抽取 DNA 相關藥品：	
藥品	廠牌

2%CTAB 萃取緩衝溶液：	
5M NaCl..... 140mL 0.5M EDTA.....20mL 1M Tris-HCl.....50mL PVP-40 solid.....10g 10% cetyl trimethy ammonium bromide..... 100mL 2-mecarptoethanol.....0.5%	LAB-SCAN nacalai nacalai Sigma Sigma Sigma
沖洗緩衝液：	
95% ethanol.....380mL 1M ammonium acetate.....5mL	導久 nacalai
5X TBE 緩衝液：	
Tris-base.....54g Boric acid.....27.5g 0.5M EDTA, pH8.....20mL ※加水至 1000mL	nacalai nacalai nacalai
(三)DNA 電泳相關藥品：	
藥品	廠牌
(四)DNA 電泳相關器材：	
藥品	廠牌
Argarose	invitrogen
5X TBE 緩衝液(同上)	
Ethidium bromide (EtBr) stock solution,,,,.....12 μL/mL	Sigma
100bp DNA tadders Plus： 3000,2000,1500,1200,1031,900,800,700,600,500,400,300,200,100bp	Fermentas
Dream Tag DNA polynerase	Fermentas
dNTP	Genomics

附錄二、實驗數據

表一、從麵包蟲腸道初步分離出的菌株編號 A1~A9 在富基培養基培養兩週的吸光值變化

編號　吸光值	起始吸光值	一週後吸光值	兩週後吸光值
A1	0.001	0.006	0.018
A2	0.001	0.013	0.032
A3	0.001	0.001	0.001
A4	0.000	0.000	0.000
A5	0.000	0.001	0.000
A6	0.000	0.000	0.001
A7	0.000	0.000	0.000
A8	0.001	0.001	0.001
A9	0.000	0.000	0.001
對照組	0.000	0.001	0.001

表二、從大麥蟲腸道初步分離出的菌株編號 B1~B9 在富基培養基培養兩週的吸光值變化

編號　吸光值	起始吸光值	一兩週後吸光值	兩週後吸光值
B1	0.001	0.020	0.034
B2	0.001	0.015	0.024
B3	0.000	0.001	0.001
B4	0.000	0.001	0.000
B5	0.001	0.000	0.000
B6	0.001	0.000	0.000
B7	0.000	-0.001	0.000
B8	0.001	0.000	0.000
B9	0.001	0.001	0.000
對照組	0.000	0.000	0.000

表三、從汙水樣本中得到初步分離出的菌株編號 C1~C3 在富基培養基培養兩週的吸光值變化

編號 \ 吸光值	起始吸光值	一週後吸光值	兩週後吸光值
C1	0.001	0.034	0.076
C2	0.001	0.021	0.031
C3	0.001	0.016	0.025
對照組	0.000	0.000	0.001

表四、篩選後能分解聚苯乙烯之細菌在厭氧環境下培養的生長吸光值變化

吸光值 \ 編號	起始吸光值	一週後吸光值	二週後吸光值
A1	0.001	0.005	0.091
A2	0.006	0.016	0.100
B1	0.001	0.011	0.056
B2	0.006	0.035	0.095
C1	0.000	-0.000	0.001
C2	0.000	0.000	0.000
C3	0.001	0.000	0.001
對照組	0.000	0.000	0.001

表五、篩選後能分解聚苯乙烯之細菌在好氧震盪環境下培養的生長吸光值變化

編號 \ 吸光值	起始吸光值	一週後吸光值	二週後吸光值
A1	0.001	0.025	0.112
A2	0.001	0.031	0.141
B1	0.005	0.047	0.100
B2	0.006	0.021	0.102
C1	0.014	0.035	0.321
C2	0.016	0.028	0.174
C3	0.011	0.030	0.101
對照組	0.000	0.001	0.000

附錄三、利用 Biolog 測試可分解聚苯乙烯菌株之生理特性

96孔	生理特性		菌株					
			A1	A2	B1	B2	C 2	C3
A1	Water	水						
A2	α-cyclodextrin	α-環狀糊精						
A3	Dextrin	糊精	O	O	O	O		O
A4	Glycogen	肝醣	W					O
A5	Tween 40	氧乙烯山梨糖醇酐單棕櫚酸酯	O	O			O	O
A6	Tween 80	氧乙烯山梨糖醇酐單油酸酯	O	O	O	O	O	O
A7	N-acetyl-D-Galactosamine	N-乙醯-D-半乳糖胺	O	O				O
A8	N-acetyl-D-Glucosamine	乙醯基葡萄糖胺	O	O	O	O		O
A9	Adonitol	核糖醇						O
A10	L-Arabinose	L-阿拉伯糖		W	O	O		O
A11	D-Arabitol	D-阿拉伯糖醇						O
A12	D-cellobiose	D-纖維二糖			W			O
B1	i-Erythritol	赤蘚糖醇						
B2	D-Fructose	D-果糖	O	W	O	O	O	
B3	L-Fucose	L-岩藻糖		W	O	O		O
B4	D-Galactose	D-半乳糖	O	O	O	O		W
B5	Gentiobiose	龍膽二糖						O
B6	α-D-Glucose	α-D-葡萄糖	O	O	O	O		O
B7	m-Inositol	m-肌醇						
B8	α-D-Lactose	α-D-乳糖單水合物		W	O	O		O
B9	Lactulose	乳果糖			W	W		O
B10	Maltose	麥芽糖		W	O	O		O
B11	D-mannitol	D-甘露醇		W	O	O		O
B12	D-Mannose	D-甘露糖		W	O	O		W
C1	D-Melibiose	D-蜜二糖						
C2	β-Methyl-D-Glucoside	β-甲基-D-葡萄糖苷		W	O	O		
C3	D-Psicose	D-阿洛酮糖		W	O	O	O	O
C4	D-Raffinose	D-綿子糖						
C5	L-Raffinose	L-綿子糖		W	O	O		O
C6	D-Sorbitol	山梨醇		W	O	O		O
C7	Sucrose	蔗糖	O	W				
C8	D-Trehalose	D-海藻糖	O	O	O	O		W
C9	Turanose	松二糖	O	W				O

C10	Xylitol	木糖醇						O
C11	Pyruvic Acid Methyl Ester	丙酮酸甲酯	O	O	O	O	O	O
C12	Succinic Acid mono-Methyl Ester	丁二酸單甲酯	O	O	W	O	O	O
D1	Acetic Acid	醋酸	O	O	O	O		O
D2	Cis-Aconitic Acid	順式烏頭酸	O	W	O	O		O
D3	Citric Acid	檸檬酸	O	O	O	W		O
D4	Formic Acid	蟻酸	O	O		O		W
D5	D-Galactonic Acid Lactone	D-半乳糖酸內酯						
D6	D-Galacturonic Acid	D-半乳糖醛酸		W	O	O		O
D7	D-Gluconic Acid	D-葡萄糖酸鈉	O	O	O	O		O
D8	D-Glucosaminic Acid	D-氨基葡萄糖酸		W	O	O		O
D9	D-Glucuronic Acid	D-葡萄糖醛酸		W	O	O		W
D10	α-Hydroxybutyric Acid	α羥丁酸			O			
D11	β-Hydroxybutyric Acid	β-羥丁酸				O	W	O
D12	γ-Hydroxybutyric Acid	γ-羥丁酸	W					W
E1	p-Hydroxy Phenylacetic Acid	對羥基苯乙酸						O
E2	Itaconic Acid	衣康酸						W
E3	α-Keto Butyric Acid	α-丁酮酸					O	
E4	α-Keto Glutaric Acid	α-戊酮二酸	O	O	W			O
E5	α-Keto Valeric Acid	α-戊酮酸					W	
E6	D,L-Lactic Acid	D,L-乳酸	O	O	O	O		O
E7	Malonic Acid	丙二酸			O	O		W
E8	Propionic Acid	丙酸			O	O	W	O
E9	Quinic Acid	奎寧酸						O
E10	D-Saccharic Acid	D-葡萄糖二酸		W	O	O		
E11	Sebacic Acid	癸二酸					O	W
E12	Succinic Acid	丁二酸	O	O	O	O		O
F1	Bromosuccinic Acid	溴代丁二酸	O	O	O	O	W	O
F2	Succinamic Acid	丁醯胺酸						
F3	Glucuronamide	葡萄糖醛醯胺		W	O	O		
F4	L-Alaninamide	L-丙氨醯胺	O	W	W			
F5	D-Alanine	D-丙氨酸	O	O	O	O		W
F6	L-Alanine	L-丙氨酸	O	O	O	O		O
F7	L-Alanylglycine	L-丙氨醯甘胺酸	O	O	O	O		O
F8	L-Asparagine	L-天冬醯胺	O	O	O	O		O
F9	L-Aspartic Acid	L-天門冬氨酸	O	O	O	O		O
F10	L-Glutamic Acid	L-麩氨酸	O	O	O	O		O

F11	Glycyl-Laspartic Acid	甘氨酸-天冬氨酸	O	O	O	O		O
F12	Glycyl-Lglutamic Acid	甘氨醯-谷氨酸	O	O	O	O		W
G1	L-Histidine	L-組氨酸		O	W			O
G2	Hydroxy-Lproline	L-羚脯氨酸						
G3	L-Leucine	L-亮氨酸		O				W
G4	L-Ornithine	L-鳥氨酸						W
G5	Lphenylalanine	苯丙氨酸						O
G6	L-Proline	L-脯氨酸	O	O	O	O		O
G7	L-Pyroglutamic Acid	L-焦谷氨酸	O	O				O
G8	D-Serine	D-絲氨酸	O	O	O	O		
G9	L-Serine	L-絲氨酸	O	O	O	O		O
G10	L-Threonine	L-蘇氨酸	O	O		W		O
G11	D,L-Carnitine	D,L-肉鹼						O
G12	γ-Amino Butyric Acid	γ-胺基丁酸			W	W		O
H1	Urocanic Acid	尿刊酸		W	O	O	O	O
H2	Inosine	肌苷	O	O	O	O		
H3	Uridine	尿嘧啶核苷	O	O	O	O		
H4	Thymidine	胸腺嘧啶核苷	W	O	O	O		
H5	Phenyethylamine	苯乙胺						W
H6	Putrescine	腐胺		W	O	O		W
H7	2-Aminoethanol	乙醇胺			W	W		W
H8	2,3-Butanediol	2,3-丁二醇						O
H9	Glycerol	丙三醇	O	O	O	O		
H10	D,L-α-Glycerol Phosphate	D,L-α-甘油磷酸	O	O	O	O		W
H11	α-D-Glucose-1-Phosphate	α-D-葡萄糖-1-磷酸		W	O	O		
H12	D-Glucose-6-Phosphate	D-葡萄糖-6-磷酸	O	O	O	O		O

O表示24小時出現正反應

**W表示48小時出現正反應

***未標示為無正反應

【評語】040703

從環境及生物體中篩選分離菌種，做環保議題的發揮應用，建議：1.可嘗試比較混菌、單菌的成效。2.成效的評估須再精確量化估算。3.進階找出控制的酵素作用。