

中華民國第 52 屆中小學科學展覽會  
作品說明書

---

高中組 生活與應用科學科

最佳(鄉土)教材獎

040817

終結金紙灰－細菌對紙灰之降解研究

學校名稱：國立臺南第一高級中學

作者： 高二 陳力賓 高二 陳泓誌 高二 蔡皓宇	指導老師： 陳宇楓
-----------------------------------	--------------

關鍵詞：金紙灰、細菌、耐鹼性

# 終結金紙灰-細菌對紙灰之降解研究

## 摘要

為了處理燃燒金紙所造成的紙灰污染，我們從數種污染環境中尋找能夠生存於強鹼紙灰的微生物，藉由強鹼性培養基的篩選，在化學廢液回收桶與加油站土壤附近，分離出四種菌株(CS-W、CS-Y、PE-L、PE-S)，進一步發現與紙灰土共同培養後，其具有調降 pH 值之效果，在顯微鏡菌落、革蘭氏染色觀察和染色體定序後，判斷應為細菌，嘗試與金紙灰共同培養並於灰燼上栽種小白菜，發現其可讓種子發芽，經參考文獻與實驗我們推測其中參與的生化反應與代謝葡萄糖產生酸性物質，以及鉀離子代謝相關，本研究目的為利用細菌改造紙灰，使其成為可栽種植株之物質，增加了紙灰的利用價值性。

## 壹、研究動機

金銀紙錢的使用隨著漢人的移民到台灣已有四百多年之久，民間祭拜常用的金銀紙錢超過二十種，燃燒後的紙錢成分並非一般人認為是接近植物灰的草鹼(碳酸鉀)居多，紙面因祭拜對象與節日不同，所用的材質與染料種類繁多，燃燒後的空氣成分除了有毒的揮發性有機物(苯、甲苯、乙苯)，還具有戴奧辛等致癌物質，而燃燒後的固態成分，則包含飛灰與多種粒狀污染物，金紙灰主要成分含CaO、SiO<sub>2</sub>、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、MgO、SO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>O、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>O、有毒微量金屬鉛與硫化物惡臭物質等。雖然過去有相關研究利用金紙灰進行水泥土改造，但是技術上仍需改善，以及建蓋物的安全性還需進一步評估。

實地採訪台南市玉皇宮廟祝，指出大包的金紙灰是以垃圾掩埋方式處理，因為涉及環境污染確實是一大問題。我們發現金紙灰水混合液為強鹼溶液(pH 值約為 12)，若以酸鹼中和的化學方法來進行處理，對環境而言將是另一種危害，在高中基礎生物第七章中曾提到分解者的概念，於是著手研究燃燒後的灰燼是否可利用分解者來進行強鹼降解，故我們嘗試篩選自然環境中存在的細菌，進行金紙灰的分解代謝，並予以植物栽種，以及一般土壤中的無脊椎動物進行適應性觀察，來評估金紙灰在處理後是否具有能源再生性。

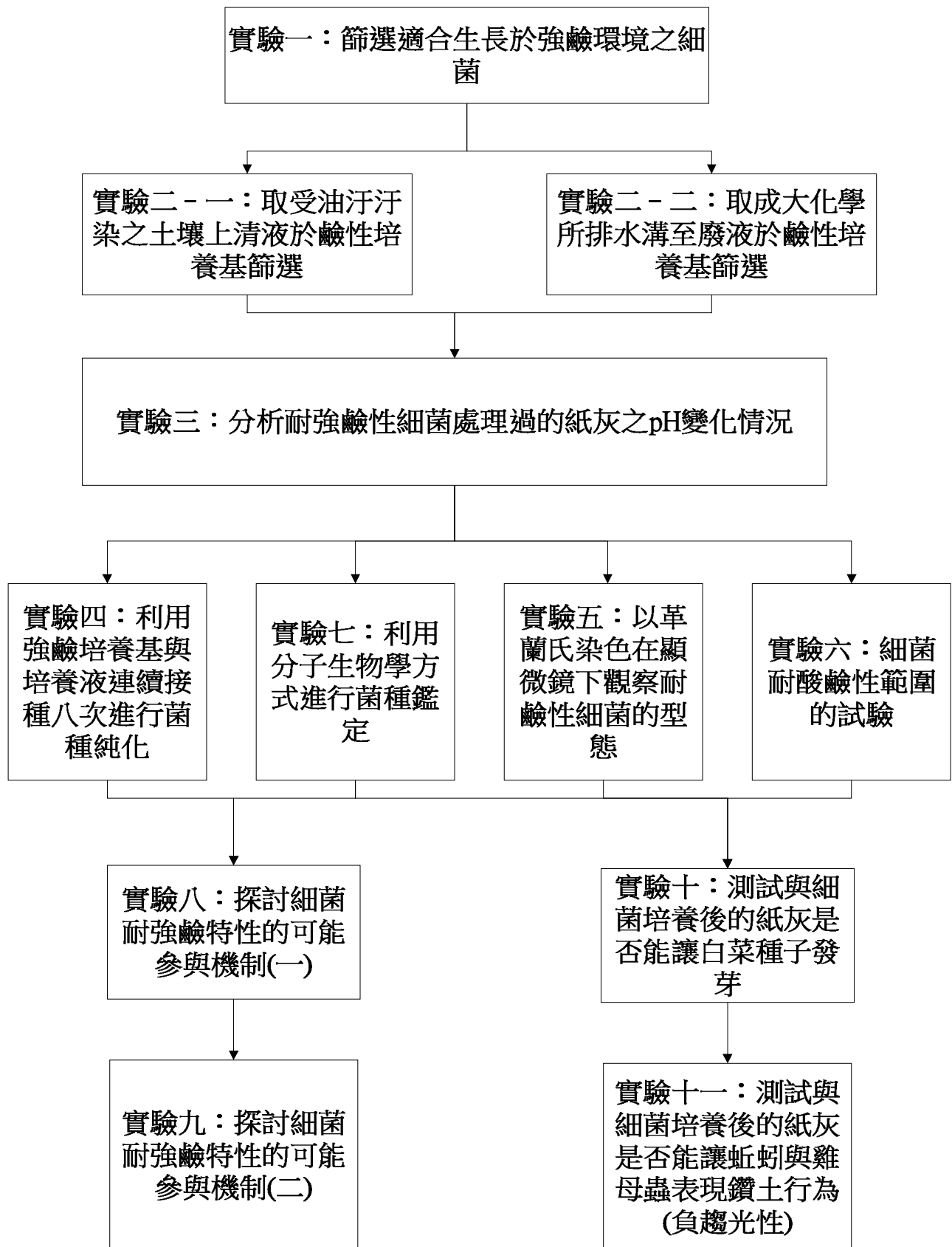
## 貳、研究目的

- 一、利用金紙灰上清液調製鹼性培養基，從數種污染環境中，篩選出可以生存於強鹼條件的細菌，並觀察細菌之型態。
- 二、在錐型瓶中進行金紙灰與細菌共同培養，並觀察其 pH 值之變化。
- 三、分析細菌的生理特性，並探討在鹼性環境中生存的生化機制。
- 四、將細菌分解代謝後的紙灰進行植物栽種，觀察其生長情形與評估紙灰利用性。
- 五、將細菌分解代謝後的紙灰置入鑽土動物，觀察鑽土行為(負趨光性)與評估紙灰利用性。

## 參、 研究設備及器材

1. 無菌操作台
2. 高溫高壓滅菌釜
3. 迴旋式震盪培養箱
4. 離心機
5. 水浴槽
6. 顯微鏡 (Olympus)
7. 廣用試紙 (Merck)
8. 微量吸管(Pipetman)
9. 培養用錐形瓶
10. 棉花
11. 附蓋玻璃試管
12. 離心管 (1.5mL、15 mL、50 mL)
13. 篩網
14. 天公廟金紙灰
15. 10 mL 塑膠注射筒
16. 0.22 $\mu$ m 過濾膜
17. LB 培養液、培養基
18. 塗盤滾珠
19. 接種環
20. 酒精燈
21. L 型玻棒
22. 無菌棉花棒
23. 結晶紫染劑
24. 番紅染劑
25. 碘液
26. 絕對酒精
27. 細菌染色體套組(Wizard® Genomic DNA Purification Kit)
28. 聚合酶鏈鎖反應器(Takara PCR Thermal Cycler)
29. DNA電泳膠體(Agarose Gel)與裝置
30. 聚合酶鏈鎖反應回收套組(Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit)
31. Coomassie Brilliant Blue染色劑
32. 蛋白質電泳膠體(SDS PAGE)與裝置
33. 超音波震盪器
34. 蛋白溶解緩衝液

#### 肆、研究過程或方法



### 一、實驗一：製作強鹼性培養基，當作篩選細菌的生長環境。

- (一)、動機：為了模擬金紙灰燼在一般環境中遇水所產生的鹼性環境，我們利用上清液加入 LB agar 粉末製作成鹼性培養基(pH=11)。
- (二)、實驗步驟：
  1. 取篩網篩過之金紙灰燼 1Kg，並加入 2L 水後，均勻攪拌後靜置混合液。
  2. 吸取混合液的上清液，以濾紙過濾。
  3. 再以十倍稀釋法，將上清液濃度稀釋成  $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  倍。
  4. 將 LB agar 粉末、RO 水和不同濃度的上清液混合。
  5. 高溫高壓 121°C，滅菌 20 分鐘，並將其倒入培養基中，製作成鹼性培養基。

### 二、實驗二：取成大化學所廢液存放桶附近土壤的液體，以及加油站附近的土壤上清液於鹼性培養基塗抹，進行細菌篩選。

- (一)、動機：由於成大化學所運作各式化學實驗已有相當時間，我們認為廢液存放桶附近土壤之細菌組成結構不同於其他地方；以及長期受石油浸潤的土壤中，或許有些細菌具有能分解污染物質的特性，所以嘗試從中篩選對強鹼具耐受性的細菌。
- (二)、實驗步驟：
  1. 在無菌台操作，以無菌棉花棒沾取土壤上清液，在鹼性培養基進行四區劃法。
  2. 把培養基置於 35°C 的環境中培養 2~3 天。
  3. 挑選培養基上的菌落，加入液態培養基(3mL LB Broth + 2mL 無菌灰燼上清液) 中培養 24 小時。

### 三、實驗三：分析耐強鹼性細菌處理過的紙灰之 pH 變化情況。

- (一)、動機：將篩選到的耐強鹼細菌，進一步分析是否具有調降灰燼強鹼性的能力。
- (二)、實驗步驟：
  1. 製作附蓋試管培養空間(5g 金紙灰和 25mL 毫升無菌水)。
  2. 將先前已篩選到的菌株與無菌的上清液對照組，分別置於上述容器中，利用振盪器混合均勻，在 35°C，110rpm 的條件下，連續培養 48 小時。
  3. 將錐形瓶或附蓋試管以震盪機震盪，使其均勻混合，靜置後以微量滴管吸取其上清液。
  4. 將取出的上清液加入廣用試紙上，觀察試紙的顏色變化，並拍照記錄結果。

### 四、實驗四：利用強鹼培養基與培養液連續接種八次進行菌種純化。

- (一)、動機：自然界細菌常以共生方式存在，在連續固態與液態培養基交錯接種後，可以得到較為精純之菌落，將真正具耐強鹼細菌篩選出來。
- (二)、實驗步驟：
  1. 將挑選到的菌株以四區劃法培養於鹼性培養基。
  2. 將單一菌落挑起，並放入液態培養基(3 mL 上清液+0.5 mL LB Broth) 中進行培養。
  3. 重複 1、2. 步驟各 8 次。
  4. 分別以顯微鏡和離心方式觀察菌落型態。

## 五、實驗五：以革蘭氏染色在顯微鏡下觀察耐鹼性細菌的型態。

(一)、動機：想了解耐鹼性細菌在顯微鏡下是為何種構造型態。

(二)、實驗步驟：

1. 取 0.1 mL 之菌液，滴於載玻片上，並以酒精燈加熱，進行熱固定。
2. 將玻片加入適量(以蓋滿細菌塗面)的結晶紫染劑染色，靜候 1 分鐘後，倒去染色液，用自來水從玻片背面緩緩沖洗。
3. 加入碘液進行媒染，靜候 1 分鐘後，用自來水從玻片背面洗去碘液。
4. 將玻片傾斜，連續滴加 95%乙醇脫色 20~25 秒，至流出液無色，立即水洗。
5. 滴加蕃紅染液進行複染 45 秒後，用水洗去塗片上的蕃紅染色液。
6. 最後以顯微鏡觀察，並判斷菌體的革蘭氏染色反應性。

## 六、實驗六：細菌耐酸鹼性範圍的試驗。

(一)、動機：想了解細菌所能生長的 pH 值範圍分別為何。

(二)、實驗步驟：

1. 分別以 1M 的 HCl 和無菌水將過濾後的灰燼上清液調成 pH=2、pH=4、pH=6、pH=8、pH=10 和 pH=12 的溶液。
2. 在無菌的 15 mL 離心管中，加入上述溶液 3mL。
3. 再分別加入 0.5mL 的 LB 液態培養液，當作是培養細菌的溶液。
4. 分別挑取一個菌落於 3mL 的無菌水中均勻混合。
5. 取 20 $\mu$ L 的上述混合液至步驟 3 的細菌培養液中。
6. 在恆溫培養箱中進行 24 小時培養。
7. 利用分光光度計偵測細菌生長的吸光值，並測試 pH 值變化情形。

## 七、實驗七：利用分子生物學方式進行菌種鑑定。

(一)、動機：了解挑選出來的菌株，所屬菌種為何並探討是否為病原菌易造成人體危害。

(二)、實驗步驟：

1. 依抽取染色體套組的說明書步驟將所挑選的菌株進行分離。
2. 以原先被拿來當作菌種鑑定的引子(16S ribosomal RNA 的基因片段)來進行聚合酶鏈鎖反應。
3. DNA 電泳分析，並進行聚合酶鏈鎖反應 DNA 產物膠體回收。
4. 送定序中心進行分析。
5. 將分析序列結果與 Blast 網站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)現有 DNA 序列進行相似度比對。
6. 嘗試找出耐鹼性菌株所屬菌種。

## 八、實驗八：探討細菌耐強鹼特性的可能參與機制(一)。

(一)、動機：由於細菌能生長在強鹼中，並將原來的強鹼性調降到中性環境，所以我們藉此利用實驗室常見強鹼性溶液 NaOH 和 KOH 做進一步生長分析。

(二)、實驗步驟：

1. 先配置 10M 的 NaOH 和 10M 的 KOH 水溶液，進行高溫滅菌。

2. 在無菌的 15 mL 離心管中，分別加入水溶液 10mL。
3. 再加入 20 $\mu$ L 的 10M 的 NaOH 或 10M 的 KOH 水溶液，得到 20mM 的 NaOH 和 KOH 水溶液(pH=11)。
4. 接著進行十倍連續稀釋。
5. 分別取 3mL 的步驟 4 水溶液，再加入 0.5mL 的 LB 液態培養液，當作是培養細菌的溶液。
6. 分別挑取一個菌落懸浮在 3mL 的無菌水中，充分混合均勻。
7. 取 100  $\mu$ L 的菌液到步驟 5 的細菌培養液中。
8. 在恆溫培養箱中進行 24 小時培養。
9. 利用分光光度計偵測細菌生長的吸光值，並測試 pH 值變化情形。

#### 九、實驗九：探討細菌耐強鹼特性的可能參與機制(二)。

(一)、動機：由於細菌在不同環境中常會有特殊的生存方式，想了解耐鹼性細菌在中性與強鹼性環境中代謝產生的蛋白質是否有差異。

(二)、實驗步驟：

1. 分別取無菌的生理食鹽水和紙灰上清液各 3mL，加入 0.5 mL LB broth 當作細菌培養液。
2. 以 Tip 分別挑取一個菌落懸浮在 3mL 的無菌水中，充分混合均勻。
3. 取 20  $\mu$ L 的菌液到步驟 1 的細菌培養液中，進行 24 小時培養。
4. 取 100 $\mu$ L 菌液進行吸光值 600 偵測細菌生長情況。
5. 再以 1.5 mL 微量離心管在 13000 rpm，3 分鐘條件下離心收集菌體。
6. 加入 100 $\mu$ L 蛋白溶解緩衝液，利用超音波震盪將菌體打破。
7. 在 13000 rpm，10 分鐘，4 $^{\circ}$ C 條件下離心收集上清液(含蛋白質)。
8. 分別進行 10%與 15%SDS PAGE 蛋白質電泳後，利用 Comassie Brilliant Blue 進行染色。
9. 觀察細菌在中性與強鹼環境中所分泌蛋白質是否有差異。

#### 十、實驗十：測試與細菌培養後的紙灰是否能让白菜種子發芽。

(一)、動機：在發現菌株具有調降 pH 值的能力後，我們想了解細菌是否具有改造強鹼性紙灰成為能夠種植植物的物質。

(二)、實驗步驟：

1. 製作錐形瓶培養環境(40g 金紙灰和 90mL 無菌水)，進行高溫高壓滅菌。
2. 另外準備 130mL 的 RO 水加入 1g LB broth 粉末，進行高溫高壓滅菌後，加入 1mL 菌液，連續培養 24 小時。
3. 以 100mL 無菌水清洗步驟 1 的紙灰三次，加入步驟 2 的大量菌液，連續培養 48 小時。
4. 移去菌液，以 100mL 無菌水清洗三次，灑下數顆白菜種子。
5. 每天觀察發芽情況並記錄。

## 十一、實驗十一：測試與細菌培養後的紙灰是否能让蚯蚓表現鑽土行為(負趨光性)。

(一)、動機：在細菌改良後的紙灰能使白菜種子發芽之後，我們進一步想了解是否能使一般土壤無脊椎動物生存其中。

(二)、實驗步驟：

1. 製作錐形瓶培養環境(40g 金紙灰和 90mL 無菌水)，進行高溫高壓滅菌。
2. 另外準備 130mL 的 RO 水加入 1g LB broth 粉末，進行高溫高壓滅菌後，加入 1mL 菌液，連續培養 24 小時。
3. 以 100mL 無菌水清洗步驟 1 的紙灰三次，加入步驟 2 的大量菌液，連續培養 48 小時。
4. 移去菌液，以 100mL 無菌水清洗三次，曝曬陽光使過多水分蒸散。
5. 用刮勺鬆軟紙灰後，每組各放入三隻蚯蚓。
6. 觀察鑽土行為與適應情況，連續一週。



## 伍、 研究結果

### 一、 實驗一：製作強鹼性培養基，當作篩選微生物的生長環境。



圖1 由左而右，分別是 $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 倍稀釋。

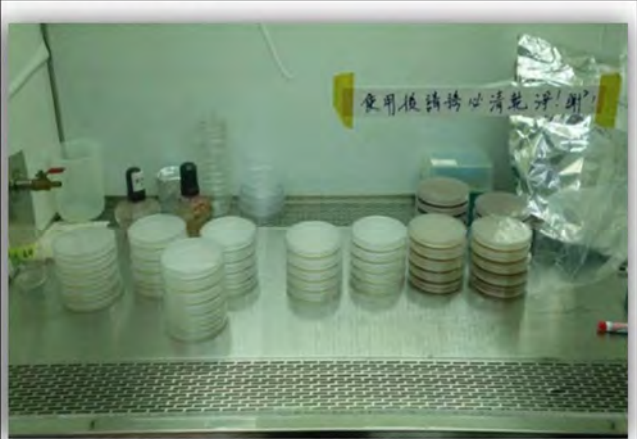


圖2 於無菌抽氣櫃倒盤完成之情況。

### 二、 實驗二：取成大化學所廢液存放桶附近土壤的液體，以及加油站附近的土壤上清液於鹼性培養基塗抹，進行微生物篩選。

#### (一)、 成大化學所廢液存放桶附近土壤的液體：

- 1 在鹼性培養基中，長出 8 個菌落。
- 2 這 8 個菌落命名為 Chem-Soil-01~Chem-Soil-08(CS-01~CS-08)。
- 3 成功以 LB broth 大量培養 CS-01~CS-08。

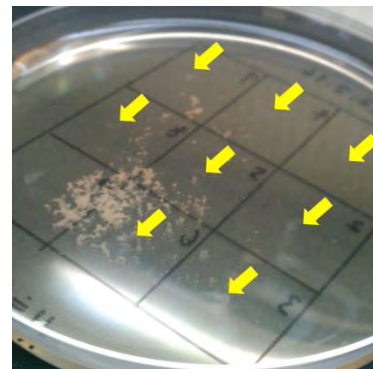


圖 3 箭頭所指八個白色菌落

#### (二)、 加油站附近的土壤上清液：

- 1 在鹼性培養基中，長出 5 個菌落。
- 2 這 5 個菌落命名為 Petro-01~Petro-05(PE-01~PE-05)。
- 3 成功以 LB broth 大量培養 PE-01~PE-05。

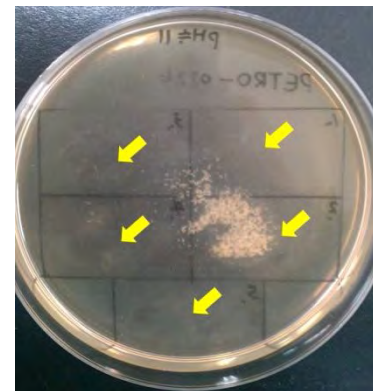


圖 4 箭頭所指五個白色菌落

### 三、實驗三：分析耐強鹼性微生物處理過的紙灰之 pH 變化情況。

- (一)、CS-01~CS-08 菌株雖然可以在強鹼性液態培養基中生長，但是只有 CS-04 菌株可由對照組的 pH12 調降至 pH10~ pH11。
- (二)、PE-01~05 菌株雖然可以在強鹼性液態培養基中生長，但是只有 PE-04 菌株可由對照組的 pH12 調降至 pH10。
- (三)、決定改用附蓋試管進行實驗操作後，測量加入各菌液的附蓋試管，在 35°C，110 rpm 的環境培養 48 小時後，含有 CS-04 菌株之試管其 pH 值由對照組之 pH12 下降至 pH10 左右，而 PE-04 菌株也大幅下降至 pH10~11。

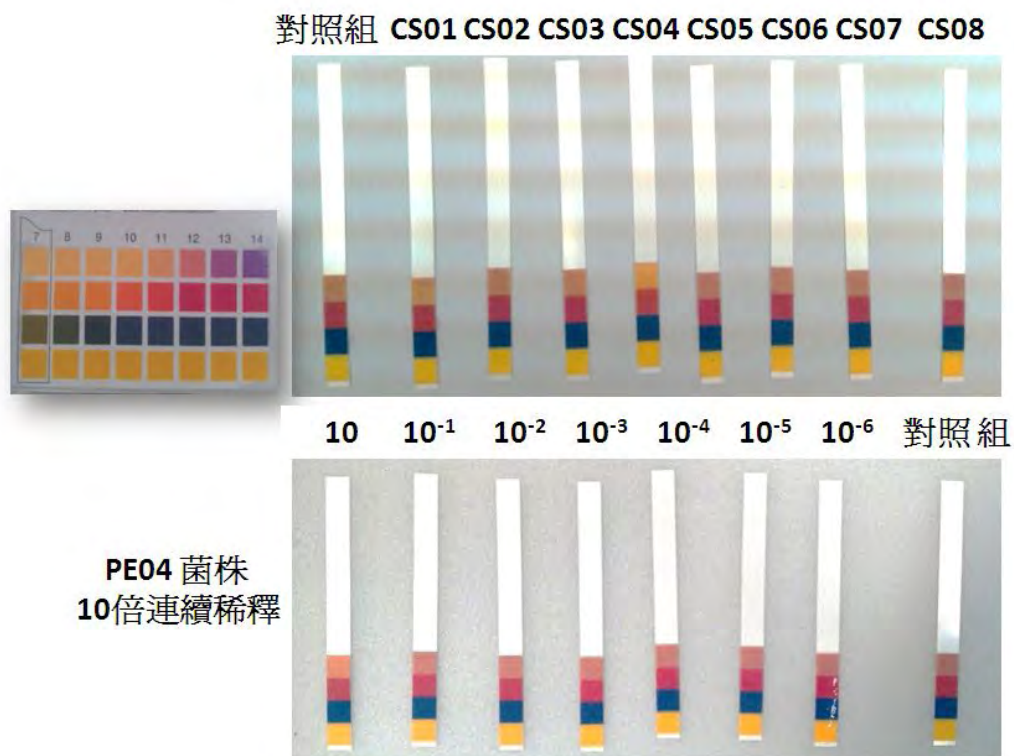
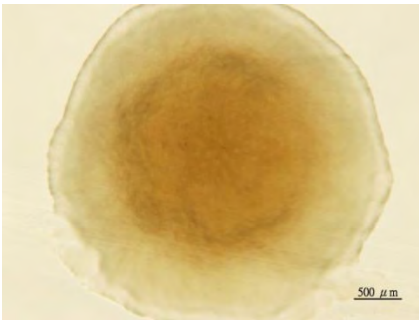

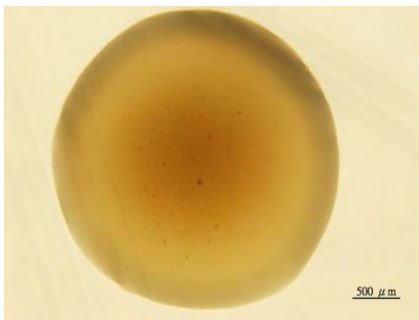

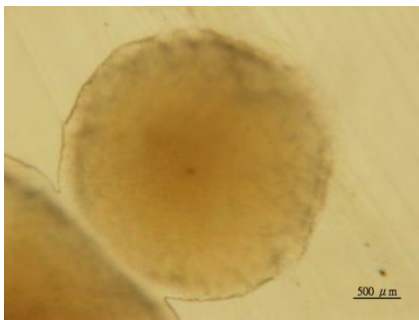

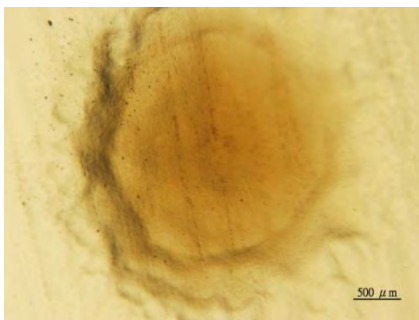



圖 5 廣用試紙測試 CS01~08 與 PE04 菌株培養後的上清液 pH 值

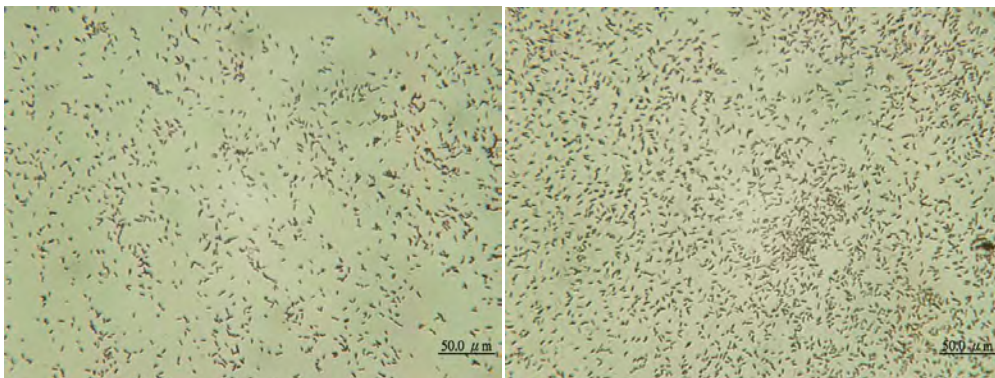
四、實驗四：利用強鹼培養基與培養液連續交叉接種八次進行菌種純化。

觀察項目 微生物	顯微鏡下菌落(400X)	菌落顏色
CS-W		 <p>粉紅色</p>
CS-Y		 <p>黃色</p>
PE-L		 <p>粉紅色</p>
PE-S		 <p>粉紅色</p>

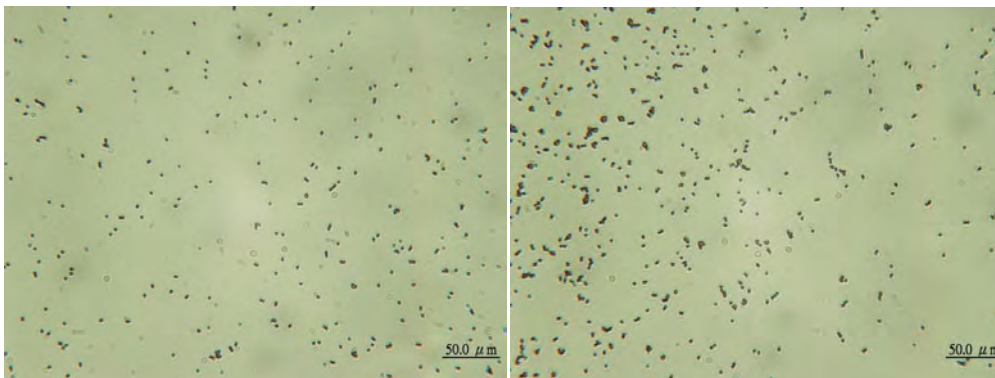


五、實驗五：以革蘭氏染色在顯微鏡下觀察耐鹼性微生物的型態。

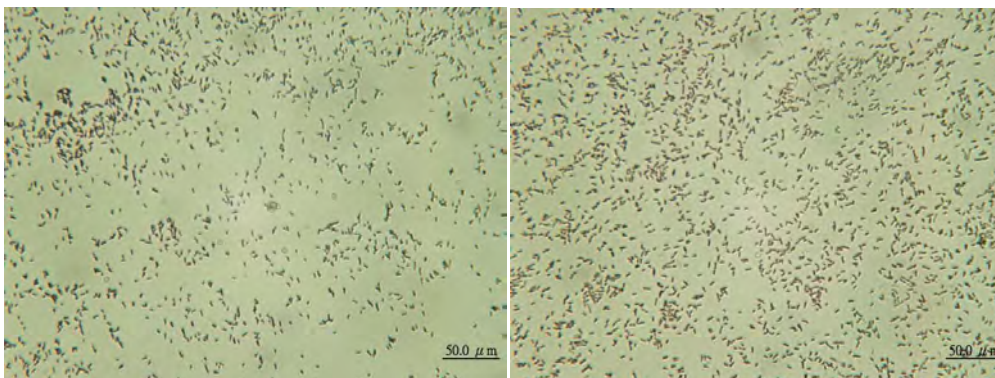
(一)、CS-W 菌株在 500X 視野下的型態：由染色判斷應為革蘭氏陰性桿菌。



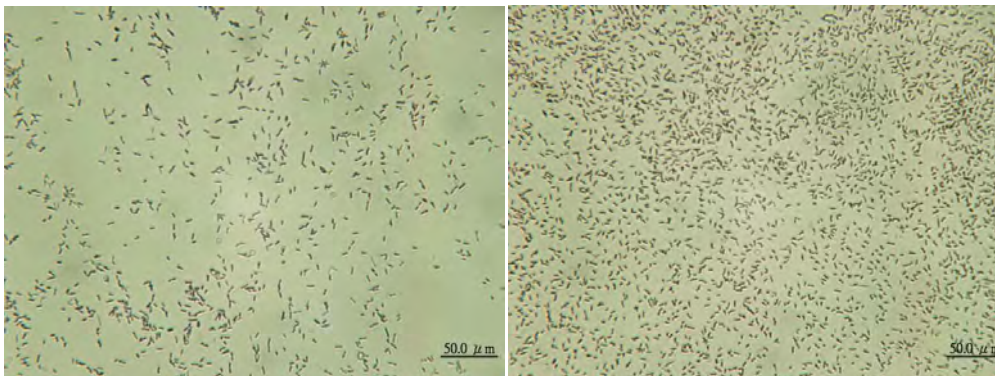
(二)、CS-Y 菌株在 500X 視野下的型態：由染色判斷應為革蘭氏陽性球菌。



(三)、PE-L 菌株在 500X 視野下的型態：由染色判斷應為革蘭氏陰性桿菌。



(四)、PE-S 菌株在 500X 視野下的型態：由染色判斷應為革蘭氏陰性桿菌。



六、實驗六：四種微生物耐酸鹼性的試驗。

- (一)、菌種 CS-W、PE-L 與 PE-S 可在 pH=4~10 環境中生長良好。
- (二)、菌種 CS-Y 在 pH=8~10 環境中生長雖然較好，但不及以上三種菌。
- (三)、四種菌株在 pH=4 或 pH=10 環境中生長時，具有調整 pH 值接近中性的能力。

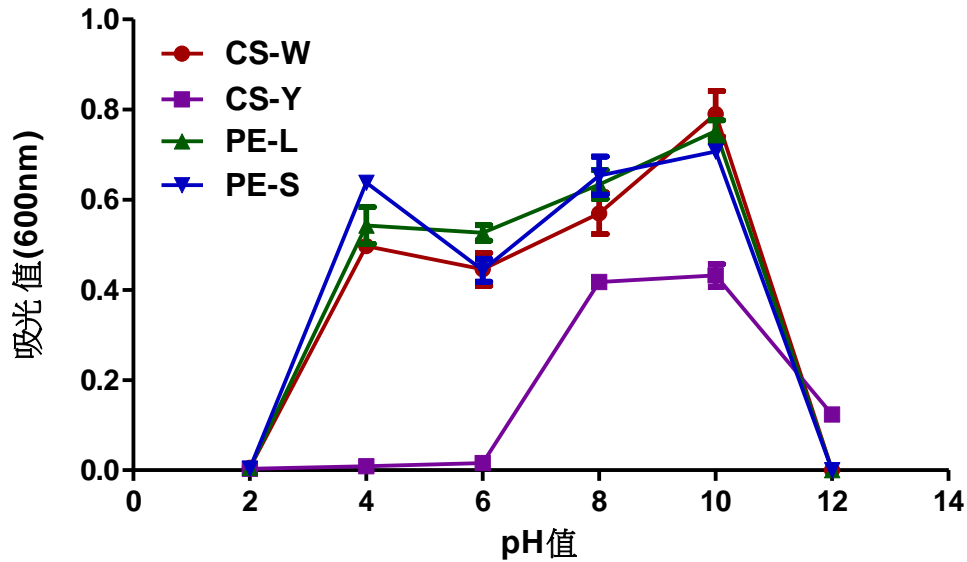


圖 6 四種微生物所能耐受的pH值範圍(以下表格內之圖片，其試管由左而右分別為對照組(無菌水)、pH=2、pH=4、pH=6、pH=8、pH=10 的環境中生長的情形)。

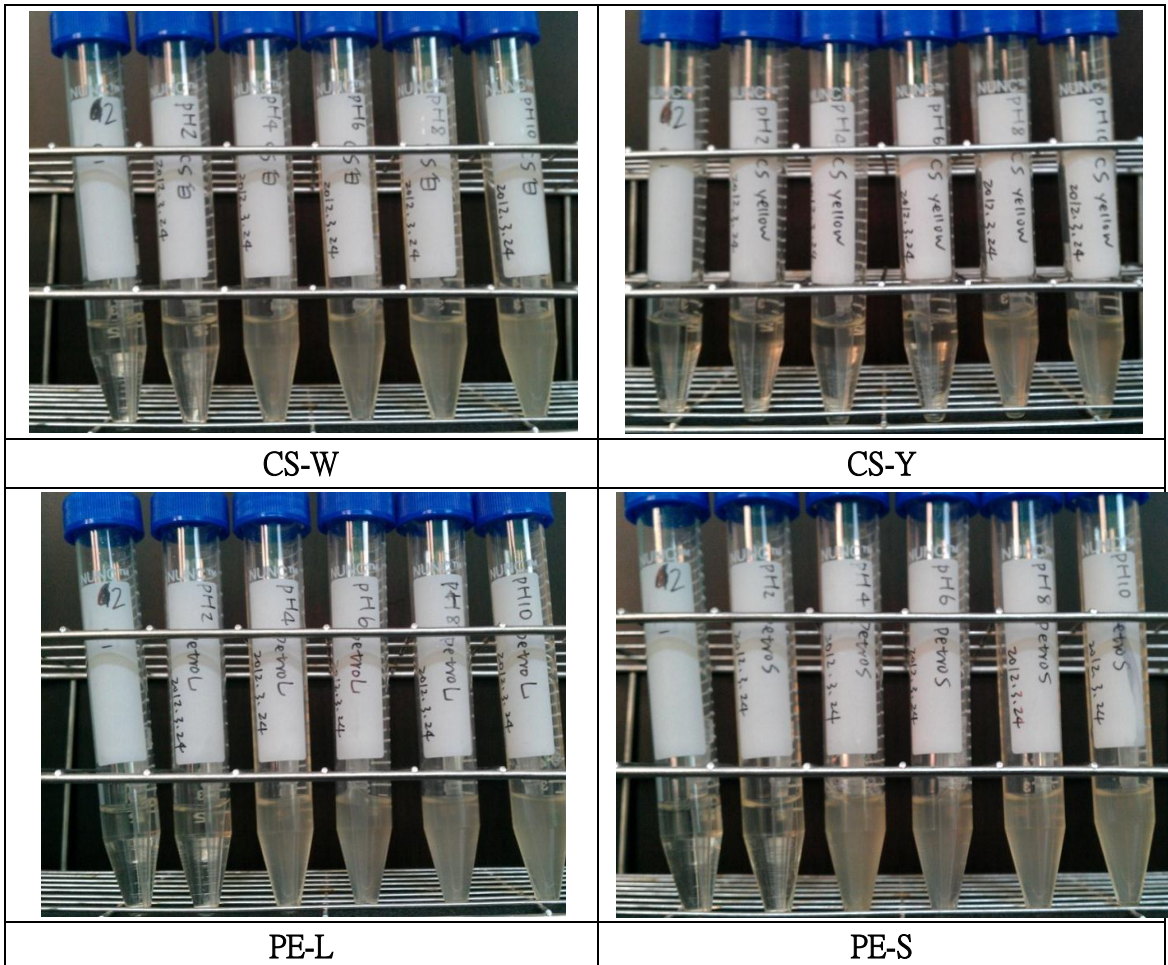


表1 四種細菌在培養24小時後的pH值變化情形

菌種 pH值	對照組	CS-W	CS-Y	PE-L	PE-S
2	3	4	4	4	4
4	4	7	6	7	7
6	6	7	6	7	7
8	8	7	7	7	7
10	9	8	8.5	8	7

七、實驗七：利用分子生物學方式進行菌種鑑定。

- (一)、將定序結果於 Blast 網站現有 DNA 序列進行相似度比對後，發現 CS-W、PE-L、PE-S 之序列極為相似(98%)，且均為假單孢菌屬，與其親緣最為相近之菌種為 *Pseudomonas alcaliphila*，並非人類致病菌種，但是所屬確實菌種還需進一步鑑定。
- (二)、由於 CS-Y 在進行幾次染色體 DNA 抽取過程中，狀況不佳，因此在進行聚合酶鏈鎖反應後並無引子所複製出來的 1.5 kb 片段。如下圖：

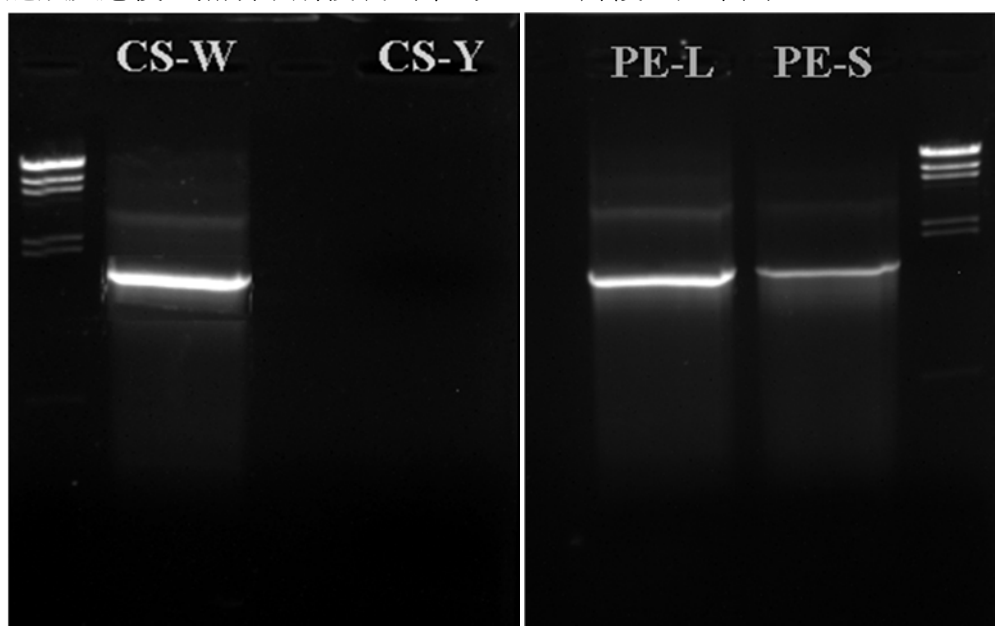


圖 7 以菌種鑑定的引子進行聚合酶鏈鎖反應後的電泳結果



八、實驗八：探討細菌耐強鹼特性的可能參與機制(一)。

(一)、四種菌株皆可在 20mM 的 KOH 中代謝生長，對於 20mM 的 NaOH 則無法生長。

(二)、四種菌株可將 20mM KOH 的 pH 值由 11 調降到 pH=8~8.5。

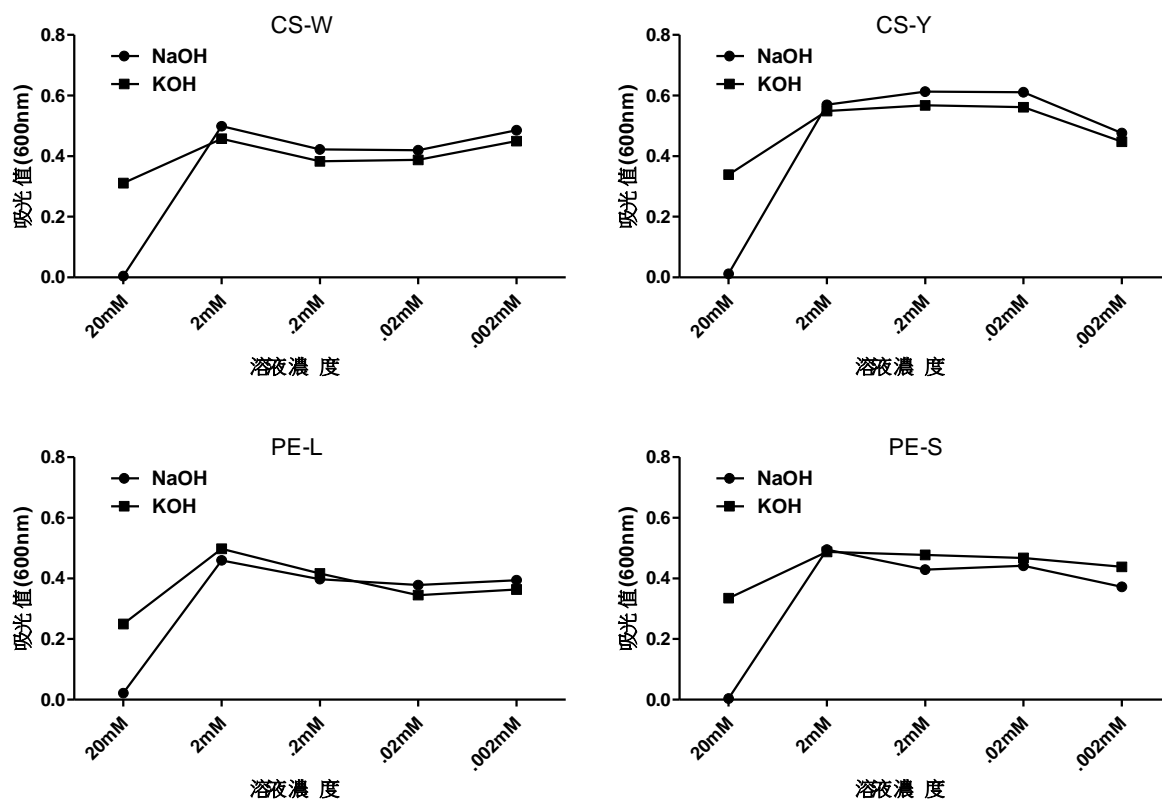


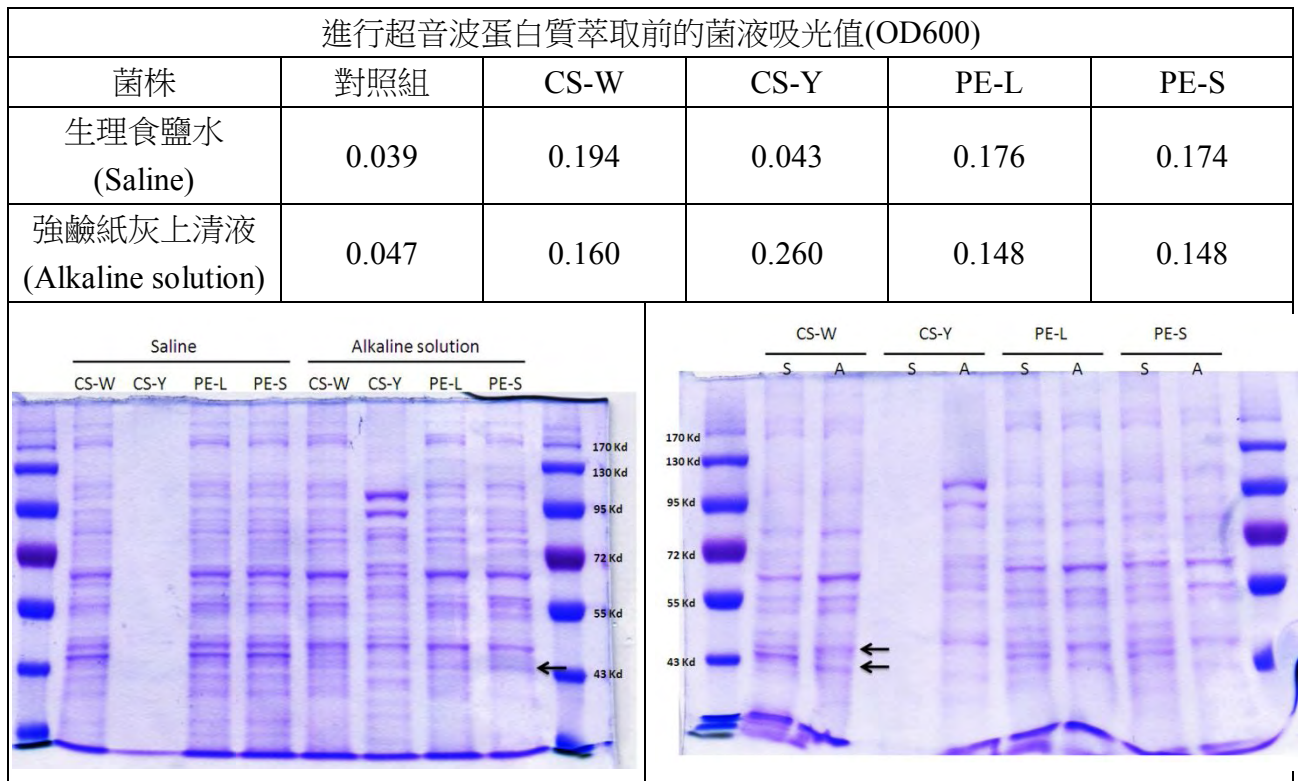
圖8 四種菌株在不同濃度的NaOH與KOH溶液中生長24小時所測的吸光值

表2 細菌在NaOH和KOH中生長24小時後的pH值

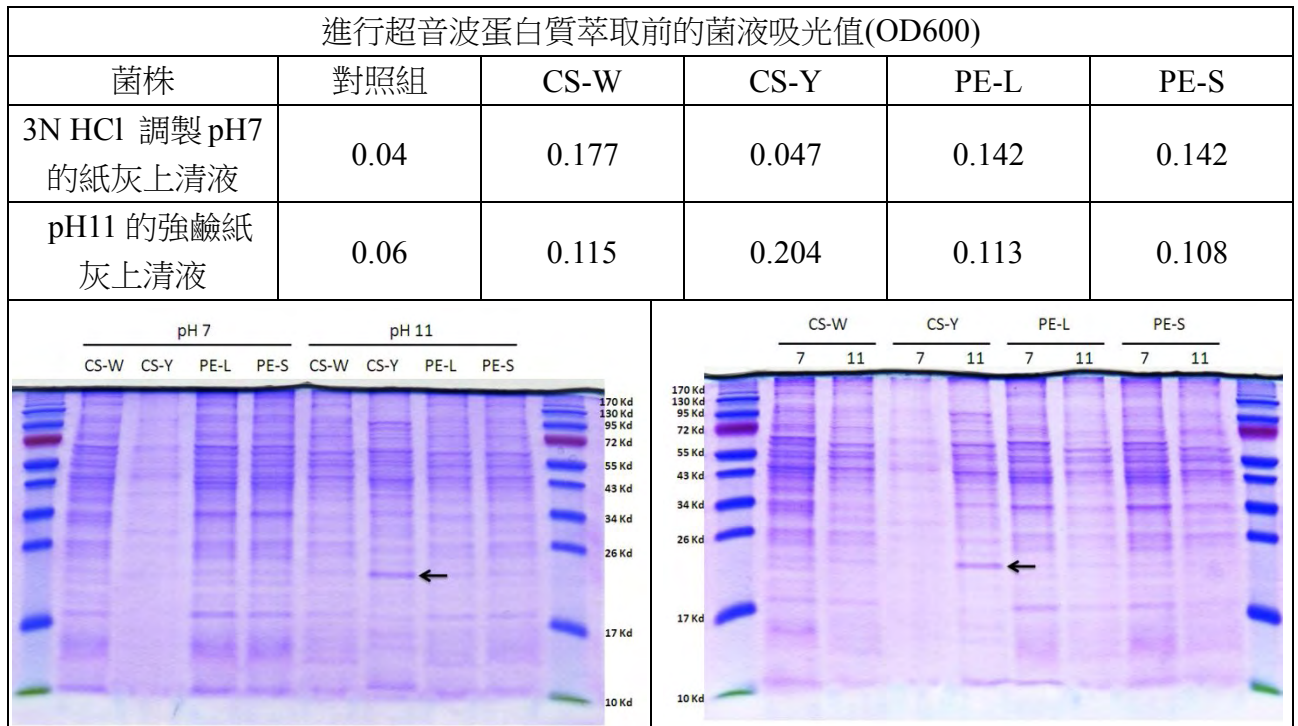
NaOH濃度		20mM	2mM	0.2mM	0.02mM	0.002mM
菌株						
CS-W		10	7.5	7.5	7.5	7
CS-Y		10	7.5	7.5	7.5	7.5
PE-L		9	7.5	7.5	7.5	7.5
PE-S		10	7.5	7.5	7.5	7.5
KOH濃度		20mM	2mM	0.2mM	0.02mM	0.002mM
菌株						
CS-W		8	7.5	7.5	7.5	7.5
CS-Y		8	7.5	7.5	7.5	7.5
PE-L		8.5	7.5	7.5	7.5	7.5
PE-S		8.5	7.5	7.5	7.5	7.5

九、實驗九：探討細菌耐強鹼特性的可能參與機制(二)。

(一)、以 10%SDS PAGE 進行蛋白質電泳，箭頭所指的是 CS-W、PE-L、PE-S 在進行強鹼性紙灰上清液(pH=11)培養後，所產生的蛋白質(分子量約在 43Kd)。



(二)、以 15%SDS PAGE 進行蛋白質電泳，箭頭所指的是 CS-Y 在進行強鹼性紙灰上清液 (pH=11)培養後，所產生的蛋白質(分子量約在 22Kd)。





十、實驗十：測試與細菌培養後的紙灰是否能讓白菜種子發芽。  
 在灑下種子的第 5 天發芽情況如圖 8 所示。



















土壤對照組	無菌液對照組	CS-W 處理組
 <p data-bbox="309 638 497 674">發芽數：5 株</p>	 <p data-bbox="730 638 919 674">發芽數：0 株</p>	 <p data-bbox="1129 638 1359 674">種皮脫落有 4 顆</p>
CS-Y 處理組	PE-L 處理組	PE-S 處理組
 <p data-bbox="290 1120 517 1155">種皮脫落有 1 顆</p>	 <p data-bbox="708 1120 935 1155">種皮脫落有 1 顆</p>	 <p data-bbox="1129 1120 1359 1155">種皮脫落有 2 顆</p>

圖 10 白菜種子在各組第 5 天發芽情況

十一、實驗十一：測試與細菌培養後的紙灰是否能讓蚯蚓表現鑽土行為(負趨光性)。

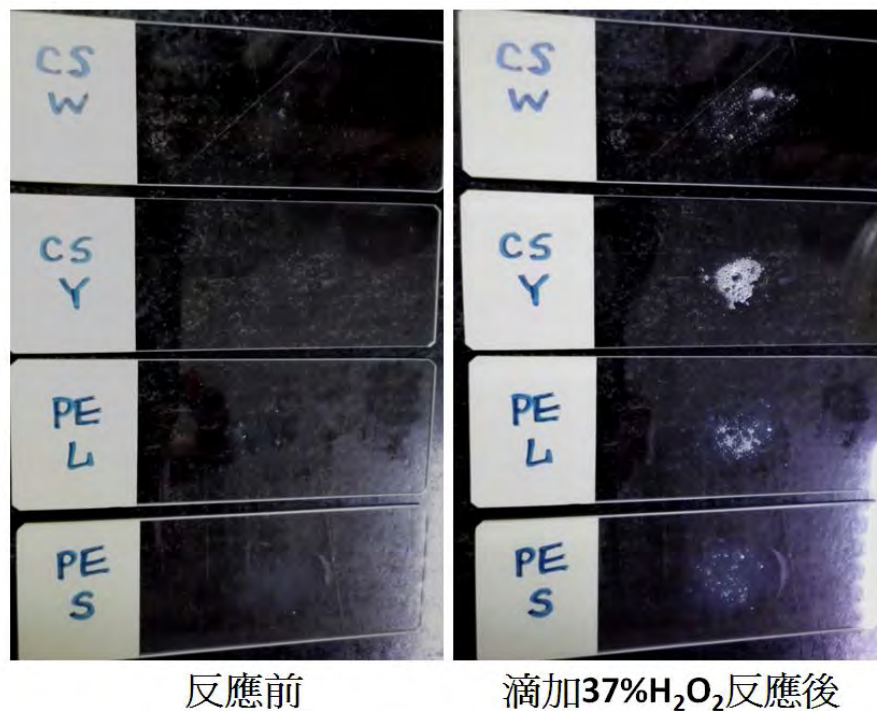
- (一)、蚯蚓在土壤對照組除了明顯鑽土行為之外，可以存活超過 24 小時。
- (二)、蚯蚓在無菌液對照組沒有明顯鑽土行為，並在 1 小時內死亡。
- (三)、蚯蚓在 CS-W、CS-Y、PE-L 與 PE-S 處理組除了明顯鑽土行為之外，可以存活超過 4 小時。(上圖下圖分別為鑽土前後)

土壤對照組	無菌液對照組	CS-W 處理組
		
		
CS-Y 處理組	PE-L 處理組	PE-S 處理組
		
		



## 陸、討論

- 一、在微生物的篩選中，我們發現以灰燼上清液製作強鹼性液態或固態培養基，來進行培養，確實可以找到能在灰燼中生存的微生物。
- 二、金紙灰燼上清液因為含有紙灰細微粉末，在偵測 pH 值時易將 pH 值機的偵測微孔塞住，造成測量誤差，故我們將偵測 pH 值的方式改以廣用試紙。
- 三、選取數種特殊環境篩選耐鹼性的微生物，其理由如下，(1)成大化學所廢液桶附近土壤，受到某些揮發性強酸或強鹼化學物質而影響，長期生存在這塊土地的微生物必須具有耐受性才能存活下來；(2)加油站附近土壤，石油含有無數不同的化合物，若以元素組成來說，碳占全部含量的 84.5%，其次為氫 13%，以及具弱鹼性質，和我們想研究的灰燼特性有相似之處。
- 四、和強鹼性的上清液對照組做比較，耐鹼性的菌株可以將 pH=11~12 調降到 pH=10，推測這幾株菌能夠分解代謝灰燼的成份，接著利用 NaOH 及 KOH 等強鹼性溶液，進行菌株生長分析，發現菌株在 20mM 的 KOH 溶液中能進行大量複製，但是所參與的生化機制仍需進一步分析。
- 五、原本的 CS-04 在菌種純化過程中被分離出 CS-W 與 CS-Y；而 PE-04 則被分離出 PE-S 與 PE-L，在革蘭氏染色的結果觀察，初步判斷 CS-W、PE-S 與 PE-L 為陰性桿菌，CS-Y 為陽性球菌，這在 CS-W、PE-L 與 PE-S 的染色體 DNA 定序結果是相吻合的，而因為 CS-Y 的染色體 DNA 不易抽取，目前已經委託新竹市生物資源保存及研究中心進行菌種鑑定。
- 六、經由參考資料得知 *Pseudomonas alcaliphila* 這類細菌具有過氧化氫酶(catalase)的活性，所以我們也將 37%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分別滴到四種菌液中，觀察反應，得到四種菌皆為陽性反應，其中 CS-Y 為強陽性，如下圖：



- 七、在參考資料中提到 *Pseudomonas alcaliphila* 這類細菌能夠生存在強鹼環境中，除了藉由菌體內脂肪酸鏈含碳數不同的調控之外，可以將葡萄糖代謝為酸性物質來調降pH值，若將來能應用在民間，期望可將甘蔗渣等有機廢料進行共同掩埋。
- 八、在種子發芽率的實驗中，發現紙灰在與細菌共同培養後，雖然 pH 值可以調降到 8，但是保濕效果沒有土壤好，必須常常補水，一旦處於乾燥狀態，就會影響種皮脫落與發芽，而就整個情形判斷，細菌處理後的紙灰是具有利用價值性。
- 九、在蚯蚓適應性的實驗中，雖然細菌處理組有呈現明顯鑽土行為，但是紙灰粉末過細與水混合後，推測有堵塞蚯蚓表皮呼吸孔，才易造成蚯蚓死亡，將來應用上可以混合具有孔隙的砂礫吸附微細紙灰粉末，較能吸引小動物前來居住。
- 十、雖然我們也有進行雞母蟲適應性的測試，目前各組皆超過五天，加上數量還不具統計意義，所以尚未能下定論。

## 柒、 結論

我們藉由本研究找到自然界中耐強鹼的細菌(CS-W、CS-Y、PE-L、PE-S)，在進行菌株純化後，發現具有調降強鹼性紙灰的能力，並推測涉及代謝葡萄糖產生酸性物質；和鉀離子代謝是相關的，以及被細菌處理後的紙灰，可以使白菜種子種皮脫落；和無菌對照組相比可增加蚯蚓的生存時間，顯示細菌應用在紙灰污染上是具可行性的。

## 捌、參考資料

- 一、施晶琳。2004。臺南市金銀紙錢文化之研究。國立臺南大學台灣文化研究所碩士論文。
- 二、周文傑。2006。燃燒金紙與拜香所產生氣態污染物及飛灰中金屬成份之分布。國立成功大學環境工程學所碩士論文。
- 三、董士誠。2002。祭拜金銀紙錢燃燒煙塵廢氣調查與改善之研究。國立台灣大學環境工程學所碩士論文。
- 四、陳黎安等。2007。讓神明保佑“泥”！金紙灰水泥砂漿試體試驗。中華民國第四十七屆中小學科學展覽會，土木科。
- 五、李雅廷。2008。為「世紀之毒」找解藥！- 探討以 *Pseudomonas mendocina* 菌株降解污染土壤中戴奧辛與戴奧辛類化合物之效能。臺灣二〇〇八年國際科學展覽會，環境科學。
- 六、卓文慶。2008。呼籲不燒金紙 減少地球暖化。台南市環境保護聯盟 & 台南市水資源保育聯盟。<http://www.wretch.cc/blog/teputnbr/12394036>。
- 七、Ulrike Edwards, Till Rogall, Helmut Blocker, Monica Emde and Erik C. Bottger. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*. 17(19), 7843-7853.
- 八、Isao Yumoto, Koji Yamazaki, Megumi Hishinuma, Yoshinobu Nodasaka, Akio Suemori, Kenji Nakajima, Norio Inoue and Kosei Kawasaki. 2001. *Pseudomonas alcaliphila* sp. nov., a novel facultatively psychrophilic alkaliphile isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51, 349-355.

## 【評語】 040817

嘗試以生物法解決本土祭祀習俗的產物金紙灰的汙染問題，中規中矩，並於探討細菌耐強鹼特性的可能機制，可圈可點。