

中華民國第 53 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

040705

龍菌物語

學校名稱：新北市立板橋高級中學

作者： 高二 劉彥廷 高二 黃鼎鈞 高二 施昭仰	指導老師： 簡青紅
---	------------------

關鍵詞：保麗龍、麵包蟲、腸道共生菌

作品名稱

龍菌物語

摘要

由 2009 年台灣國際科學展覽會的優勝作品「從麵包蟲體內分離出可分解保麗龍之菌種」中，我們知道麵包蟲腸道內有可分解保麗龍之腸道共生菌-紅菌。

利用傳統厭氧培養的方式，我們進一步研究發現，除麵包蟲外，體型較大的麥皮蟲其腸道也具有共生菌-紅菌和白菌。藉由兩者菌相比較，麥皮蟲的腸道中，白菌較多(佔 80%)，紅菌較少；而麵包蟲的腸道中，紅菌較多(佔 75%)，白菌較少。當我們以保麗龍為碳來源的無機培養液篩選時，白菌無具有分解保麗龍的能力，紅菌則具有。最後，分離出可分解保麗龍的五株菌株：SR429、SR7412、SR8514、SR8515 及 SR851，而且皆由麵包蟲分離而來。

藉由細菌生理特性分析，發現五株菌株型態皆為厭氧菌、球菌、格蘭氏陽性菌，生長情況比較： $30^{\circ}\text{C} > 25^{\circ}\text{C} > 20^{\circ}\text{C}$ 。未來將探討其最適合生長的環境(溫度)，希望可以大量培養可分解保麗龍的菌株，及未來找出這些菌株可分解保麗龍的酵素，以期能降低保麗龍所造成的環境污染。

壹、研究動機

保麗龍是當今人類生活中被大量使用的塑料，在我們四周皆可隨意發現，保麗龍是由聚苯乙烯 (Polystyrene, PS) 加發泡劑後高溫發泡形成的一種材料，通常叫“泡沫塑膠”。加熱成型時，依發泡倍率的不同，可以製成免洗餐具、生鮮托盤及泡麵碗等容器。也可用做防震包裝墊。聚苯乙烯是由石油提煉出來的一種塑膠原料，由碳和氫組成，化學式是 $(\text{C}_8\text{H}_8)_n$ ，它可以製成蛋盒、養樂多瓶、錄像帶匣等塑膠製品，它具有質輕、可塑性高、強大的保溫效果、耐衝擊以及價格便宜等許多的好處，但是保麗龍卻有個致命缺點，那便是它不易被大自然所分解，所以若是將其不當濫用或是隨意丟棄的話，對於現今的生態環境會造成很大的汙染。

難道保麗龍就沒有任何可以剋它的天然天敵嗎？在台灣國際科學展覽會的優勝作品「從麵包蟲體內分離出可分解保麗龍之菌種」中，我們得知在麵包蟲的消化道內存在若干種共生菌，其中有可分解保麗龍的酵素之共生菌-紅菌存在。

既然已有研究找出麵包蟲腸道內含有分解保麗龍的菌種，那麼，如果我們可以找出一個最適合此菌種生長的環境使其大量繁殖，並且可長期繁殖保存，就如同我們高二應用生物學 4-2 環境汙染物中所提到利用生物處理環境汙染物質所帶來的優點，那麼每當有廢棄的保麗龍，就丟入一個具有這樣菌種抑或是含有大量分解保麗龍酵素的桶子中，讓其自然分解，或許大量使用保麗龍所造成的環境汙染將可以大大地改善。

貳、研究目的

- 一、分離麵包蟲腸道中可分解保麗龍的腸道共生菌。
- 二、分析各腸道共生菌的生理特性：
OD 值、pH 值、細胞型態、革蘭氏菌種類。
- 三、找出最合適的生長環境：
溫度。

參、研究設備及器材

一、實驗動物：

(一)麵包蟲：

又稱黃粉蟲(Mealworm, *Tenebrio molitor*)，隸屬節肢動物門、昆蟲綱、鞘翅目、擬步行蟲科、粉蟲甲屬，是完全變態的昆蟲。

麵包蟲原產於南美洲，體內含有脂肪 31%和蛋白質 56%，常用來飼養觀賞魚類、蛙類、珍禽、鳥類、禽類、爬行類。



(二)麥皮蟲：

又稱超級麥皮蟲、大麥蟲(Superworm, *Zophobas morio*)，是完全變態的昆蟲。

是由麵包蟲與黑麥蟲雜交培養出，含脂肪 29%和蛋白質 51%，並含有多種醣類、胺基酸、維生素、激素、酶及礦物質，常用來養殖各種龍魚或觀賞魚、觀賞鳥、棘胸蛙、鱉、蛇等稀有動物。



◎ 麵包蟲 vs.麥皮蟲：

麥皮蟲與麵包蟲的食性相似，非常雜，麥麩、各種果菜殘體、人工飼料、動物屍體均可採食。

麥皮蟲比一般麵包蟲個體大 2~3 倍，成蟲繁殖量也比麵包蟲多 3 倍以上，營養價值更遠遠超過麵包蟲。

二、儀器&器材：

(一) 研究設備：

- | | | |
|------------|----------|---------|
| 1. 無菌操作台 | 7. 分光光度計 | 13. 試管 |
| 2. 滅菌箱 | 8. pH計 | 14. 量筒 |
| 3. 培養箱 | 9. 顯微鏡 | 15. 燒杯 |
| 4. 震盪培養箱 | 10. 氮氣瓶 | 16. 培養皿 |
| 5. 厭氧缸和厭氧包 | 11. 接種環 | 17. 酒精 |
| 6. 磁石攪拌器 | 12. 針筒 | 18. 酒精燈 |

(二) 養殖器材：

- | | |
|--------|--------|
| 1. 塑膠盒 | 3. 棉花 |
| 2. 瓶蓋 | 4. 保麗龍 |

三、實驗藥品：

(一) LB 培養基:

- | | |
|--------------------|------------|
| 1. Tryptone | 10.0 g / L |
| 2. Yeast extract | 5.0 g / L |
| 3. Sodium chloride | 10.0 g / L |
| 4. 洋菜 | 10.0 g / L |

(二) 無機培養液(IS):

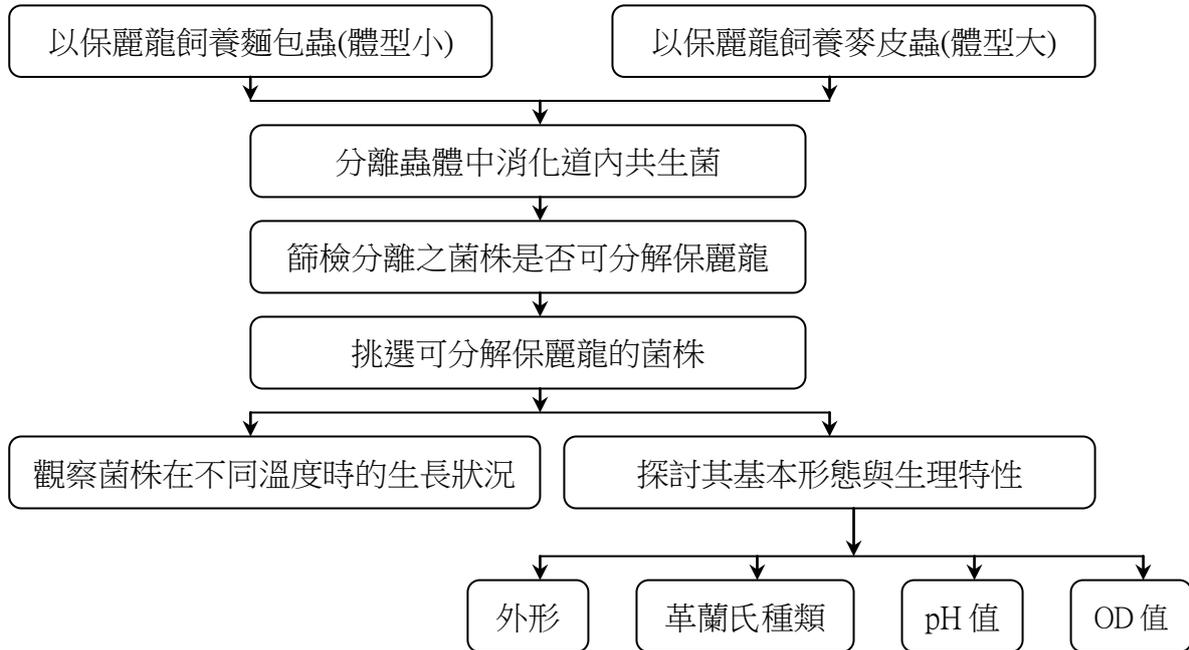
- | | |
|-----------------------------------|-----------|
| 1. Sodium chloride | 5.0 g / L |
| 2. Magnesium sulfate | 0.2 g / L |
| 3. Ammonium dihydrogen phosphate | 1.0 g / L |
| 4. Dipotassium hydrogen phosphate | 1.0 g / L |

(三) 革蘭氏菌種測試劑

1. 結晶紫
2. 碘液
3. 沙紅

肆、研究過程或方式

一、研究流程：



二、實驗過程：

(一) 養殖麵包蟲、麥皮蟲，尋找腸內共生菌

1. 將麵包蟲、麥皮蟲分別以 20 隻、10 隻為一盒共五盒養殖，以塊狀保麗龍餵食，促進腸道內分解保麗龍之共生菌生長，另以瓶蓋盛水供給水分，每週清理及換新保麗龍。



▲ 餵養麵包蟲及麥皮蟲之養殖環境

2.經過一週餵食後，可以明顯觀察到保麗龍皆有被食用，且麵包蟲和麥皮蟲也可正常維生。



▲ 保麗龍的食用情形 ▲

(二)測試腸道是否可分解保麗龍

- 1.將上述餵養一週後之麵包蟲及麥皮蟲取出，進行腸道內共生菌分解保麗龍的初步測試。
- 2.解剖麵包蟲、麥皮蟲，先切斷其頭與尾，以鑷子拉出腸道，使用研鉢及杵分別搗碎，各放入一夾鏈袋中，並各放入相同大小的保麗龍碎屑，密封之後放置一週。
- 3.觀察比較保麗龍試驗前後的差異。



▲ 搗碎麥皮蟲腸道分解保麗龍



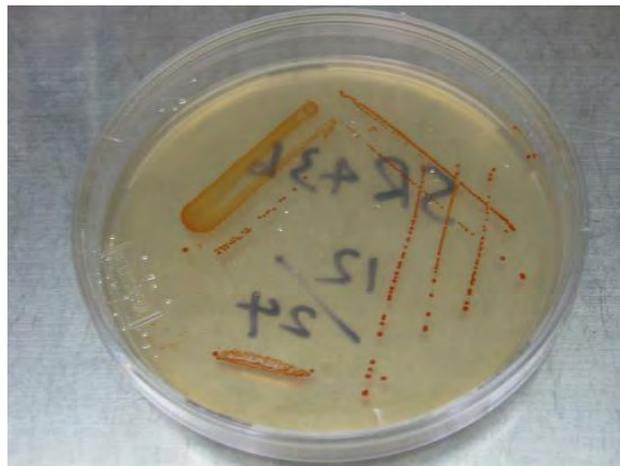
▲ 搗碎麵包蟲腸道分解保麗龍

(三)麵包蟲及麥皮蟲腸道共生菌菌株培養

- 1.於馴化飼養之麵包蟲及麥皮蟲中各取 20 隻，分別以接種環沾抹切碎的腸道進行畫碟，將畫碟完成的 LB 放入厭氧缸內，加入厭氧包，靜置於培養箱一週，待菌株成長形成菌落。
- 2.篩選出麵包蟲及麥皮蟲個別的红菌、白菌之菌落，同步驟(1)以接種環個別沾抹進行畫碟，放入厭氧缸並置於培養箱，靜置一週使菌株成長形成菌落。(編號方式見註一)



▲ 放入厭氧缸



▲ 紅菌菌落



▲ 白菌菌落

3. 篩選紅菌、白菌之菌落共 20 個，以接種環沾抹菌落，浸入 LB 培養液中，曝氮氣使管內成厭氧狀態，靜置於培養箱使細菌成長。
4. 將保麗龍切為薄長方片浸泡於無機培養液中，曝氮氣使管內成厭氧狀態，以針筒打入前培養之菌液 1 ml，放入震盪培養箱內並保持搖晃，放置兩週。

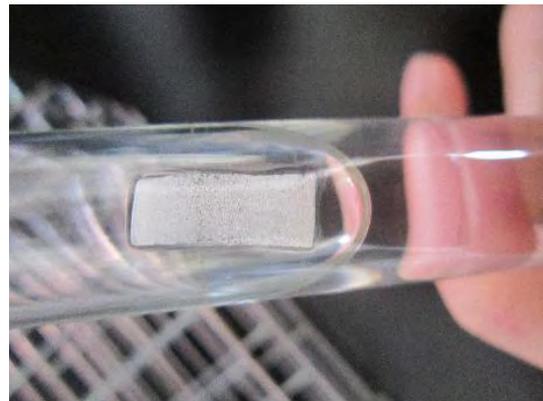


▲LB 培養液



▲將保麗龍薄片浸泡於菌液中

5. 以肉眼觀察試驗前後保麗龍表面侵蝕情況(表面是否完整)，篩選出其中目測保麗龍分解最佳之五管的菌株(SR429、SR7412、SR8514、SR8515、SR8518)。



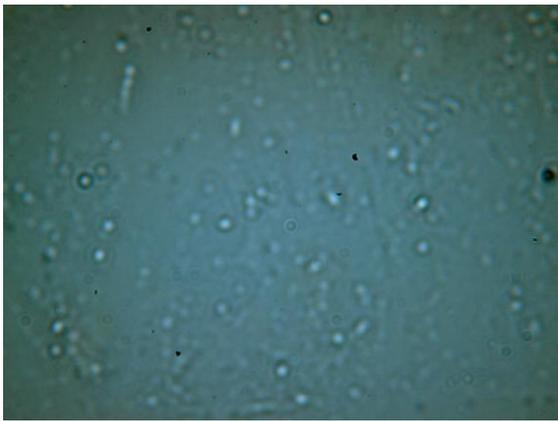
▲保麗龍分解狀況(圖為 SR429)

(四)實驗菌株之生長狀況

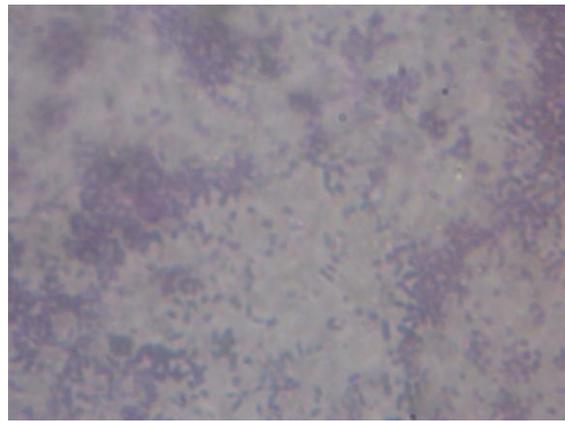
1. 培養篩選出的五株菌株。
2. 以 LB 培養液培養五株菌株各 3 管，一管打入 1 ml 的菌液，置於培養箱內兩天。
3. 利用分光光度計，以波長 600nm，測定各管之 OD 值；利用 pH 計，測定各管之 pH 值。

(五)觀察菌株之形態

1. 將篩選出的五株菌株進行革蘭氏染色。
2. 以顯微鏡觀察，研究其革蘭氏種類及外形。



▲顯微鏡下的紅菌(未染色)(10x40)



▲革蘭氏染色後的紅菌(10x40)

註一：S代表麵包蟲之腸道菌、B代表麥皮蟲之腸道菌

R代表紅菌、W代表白菌

首位數字為第一次培養之培養皿編號

次位數字為第二次培養之培養皿編號

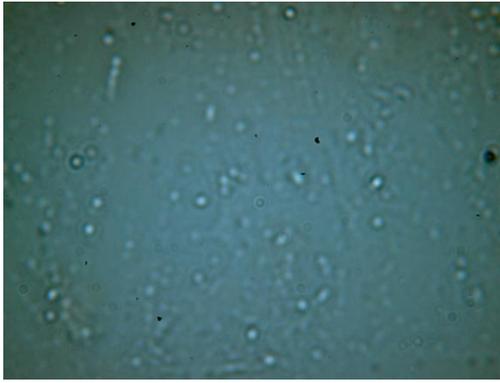
後一或二位數字為第二次培養之篩選出之菌落，紅菌、白菌個別編號

伍、研究結果

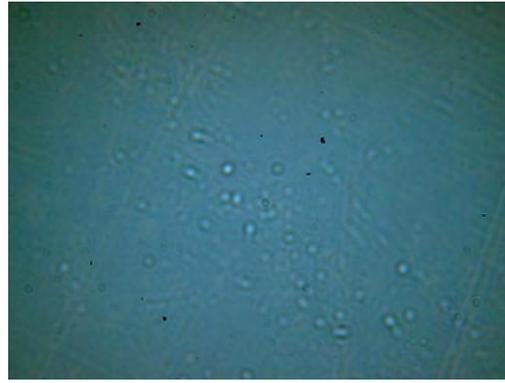
- 一、在腸道是否可以分解保麗龍的測試中，我們發現麥皮蟲(大)袋內之保麗龍碎屑變小，且明顯變軟；麵包蟲(小)袋內之保麗龍碎屑也可感覺變軟。
- 二、我們分離出麥皮蟲腸道中的菌株多為白菌(約佔 80%)，而麵包蟲的腸道內所分離出的菌株則多為紅菌(約佔 75%)。
- 三、分離出可分解保麗龍的五株菌株：SR429、SR7412、SR8514、SR8515、SR8518。
- 四、經革蘭氏染色法後，五株菌株皆呈藍色，為革蘭氏陽性菌。
- 五、以光學顯微鏡觀察，五株菌株皆為球菌。
- 六、五株菌株的生理特徵：

溫度	菌株名稱	OD 值(%T)	pH 值
20°C	SR429	71.4 ± 1.1	6.72 ± 0.03
	SR7412	68.3 ± 1.6	6.77 ± 0.02
	SR8514	76.7 ± 0.6	6.72 ± 0.02
	SR8515	75.1 ± 1.0	6.76 ± 0.01
	SR8518	75.8 ± 0.3	6.69 ± 0.03
25°C	SR429	74.3 ± 1.3	6.72 ± 0.06
	SR7412	76.2 ± 1.6	6.60 ± 0.04
	SR8514	77.1 ± 0.9	6.72 ± 0.02
	SR8515	80.7 ± 2.8	6.74 ± 0.00
	SR8518	80.3 ± 2.8	6.84 ± 0.02
30°C	SR429	87.7 ± 1.8	6.95 ± 0.06
	SR7412	72.3 ± 0.9	6.88 ± 0.07
	SR8514	83.9 ± 8.0	6.82 ± 0.13
	SR8515	78.4 ± 6.3	6.70 ± 0.06
	SR8518	83.8 ± 6.9	6.90 ± 0.03

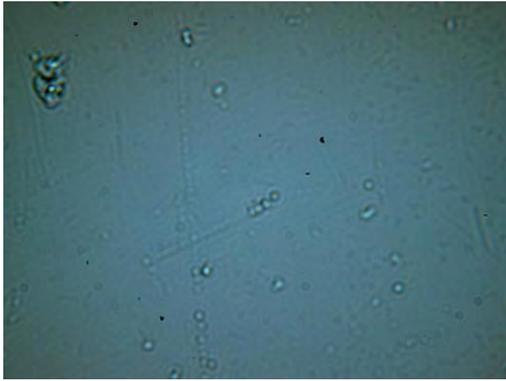
每個溫度菌株試驗數目為 3 (n = 3)



▲SR429 培養於 25°C



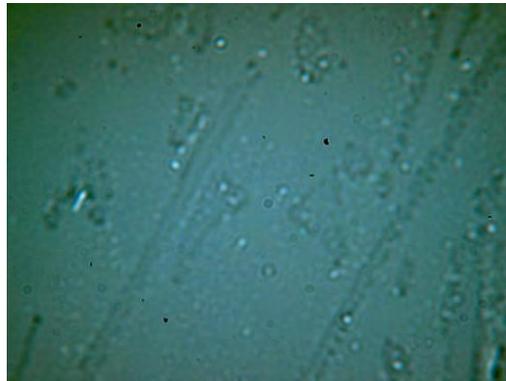
▲SR7412 培養於 25°C



▲SR8514 培養於 25°C



▲SR8515 培養於 25°C



▲SR8518 培養於 25°C

註：放大倍率 400 倍

陸、討論

一、飼養麵包蟲和麥皮蟲所碰到的問題及解決方法

我們在剛開始飼養麵包蟲及麥皮蟲時，食物方面只供給保麗龍，而水的方面我們使用寶特瓶蓋盛水放置，但是不到一天的時間，由於寶特瓶蓋對麵包蟲跟麥皮蟲來說都過大，所以牠們為了喝水，便栽進了瓶蓋中溺死了，於是我們趕緊將浸水的棉花塞入瓶蓋中，才總算改善此問題。

二、如何使保麗龍能夠均勻的泡入菌液中，並讓氮氣漏出量減少

在「從麵包蟲體內分離出可分解保麗龍之菌種」中，作者將保麗龍放進試管中的菌液浸泡，由於保麗龍是浮體，往往無法均勻的浸泡於菌液中，這可能保麗龍的分解情形受到影響，而作者所用的解決方法，是將保麗龍泡進菌液後，再以震盪培養箱搖晃，但是我們覺得這還是無法達到均勻浸泡的效果，針對此問題，我們提出了幾種解決方法，並加以嘗試：

(一) 在保麗龍上增加重物，使其沉入菌液中，再予以搖晃。

當初在討論時就已駁回，因為重物若要重到大於保麗龍的浮力，而且又能塞入狹窄的試管中，其密度一定要相當大，且不提如何將重物繫於保麗龍薄片上，光是能找到適當的物品就已是難題。

(二) 裁切一個適當寬度的保麗龍，使其能剛好卡在試管壁上。

未進入試驗階段就已放棄，原因是保麗龍裡的泡狀顆粒使裁切寬度難以控制，而且保麗龍要卡在試管壁上需有足夠的厚度，可能使其分解的狀況難以顯現。

(三) 把保麗龍片勾上鐵絲，使其能被壓入菌液中。

這個方法實行時狀況不錯，將消毒後的鐵絲一端勾住保麗龍，另一端刻意超出試管口一至兩公分長，如此一來在蓋上蓋子時便能順勢將保麗龍片壓到管內，但此法後來也遭放棄，因為放入保麗龍時所花的時間過長，管內已曝好的氮氣可能早已散逸。後來我們試著邊噴氮氣邊放保麗龍，結果在搖晃時，脆弱的保麗龍片會斷裂，重新浮到液面上，故此法依舊不可行。

(四) 利用兩個試管架，以橫式的擺法搖晃。

這是我們能想到的操作最為快速又能盡量讓保麗龍片浸泡均勻的方法，就是將第二個試管架蓋到原先已放置試管的試管架上，再用橡皮筋捆牢後，以橫擺的方式放到震盪培養箱中，這樣的方式既可使菌液有充分的搖晃空間，又不必將其他異物放入管內增加汙染的機會，而保麗龍片雖是浮在液面上，但是橫擺的液面表面積較直擺的大得多，深度也較淺，所以保麗龍片能夠很均勻的浸泡在菌液中。

三、保麗龍之分解狀況測量，紅菌在無機培養液中，分解保麗龍之效果分析

如何判斷紅菌是否分解保麗龍？

接菌前，裁切完成的保麗龍薄片懸浮於無機培養液之液面上，表面平整，而接菌後的一週內卻看不出有絲毫異變，直到一至兩週才可用肉眼看出保麗龍薄片有幾處變得更薄並出現細小的縫隙及小洞，由此我們判斷紅菌雖然分解效果不甚好，但確實是有分解的。

為什麼所分離出的菌株分解保麗龍的成效和其他作品之結果有所出入？

我們培養出的菌種分解保麗龍的時間耗費了近兩週的時間始見成效，與「從麵包蟲體內分離出可分解保麗龍之菌種」作品中僅僅只耗費五天便可看出分解效果的研究結果有很大的差別

在經過討論之後我們整理出以下原因：

(一) 保麗龍薄片的厚度影響

雖然我們已經將保麗龍切割成薄片，但其厚度卻仍無法透光，與另一作品中已切割成透光度頗佳之保麗龍片有些許差異，此一差異導致菌株的分解較難以用肉眼看見，但為了不汙染培養液，並沒有將其取出置於顯微鏡下觀察，因此不知道保麗龍是否有被分解，在經過較長時間的放置之後才可得知，如果我們能夠再將保麗龍片切的更薄，也許可以解決此一問題。

(二) 菌量稀少

我們並無法得知自菌落取出的紅菌數量多寡，是否取出之菌量太過稀少，導致需要長時間的放置才能有所效果？若我們自多個菌落取出紅菌，也許能夠改善此問題。

(三) 菌液 pH 值不適合分解保麗龍的酵素

由結果三可知，菌液多偏酸性，但是我們從「從麵包蟲體內分離出可分解保麗龍之菌種」的實驗結果得知，紅菌所產生的酵素是在 pH 值 >7 的環境下活性較大，所以偏酸性的菌液自然會使酵素分解保麗龍的效率變差，造成這樣的結果。

四、麵包蟲和麥皮蟲分解保麗龍效果的比較

(一) 麵包蟲體內的腸道共生菌紅菌較多

經過實驗和觀察，我們發現紅菌的分解效果明顯優於白菌，白菌幾乎沒有分解能力，又麵包蟲體內的紅菌多於白菌，故麵包蟲分解保麗龍的效果較麥皮蟲好。

五、麵包蟲腸道中分解保麗龍的共生菌種分析

在科展作品「屠龍高手—分解保麗龍細菌之分離」中，有運用基因比對麵包蟲腸道內兩種不同的共生菌，分別為：

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

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

我們得知這兩種菌都是厭氧菌、革蘭氏陰性菌、桿菌。這與我們所分離出的腸道共生菌(革蘭氏陽性菌，球菌)表徵不同，由此我們或許可以推論在麵包蟲腸道內，參與分解保麗龍的共生菌菌種應相當多樣。

柒、結論

- 一、本研究自麵包蟲的腸道中分離出可分解保麗龍之紅菌：
SR429、SR7412、SR8514、SR8515 及 SR8518。
- 二、藉由生理、型態分析發現，五株菌特性皆為厭氧菌、革蘭氏陽性菌、球菌。
- 三、五株菌在 20°C、25°C、30°C 的生長情況比較：最佳生長溫度 SR429、SR8514、SR8518 為 30°C，SR7412、SR8515 為 25°C；最差生長溫度皆為 20°C。

捌、未來展望

經過這次的研究之後，我們得知可分解保麗龍的紅菌之型態、生理特徵及其適合生長的環境，如果我們能利用這些結果再進一步的研究，也許能夠試著更深入探討此紅菌的分解機制，看能不能找出分離出此共生菌所產生之可分解保麗龍的酵素，並找找除了麵包蟲的腸道之外，還有沒有別的地方也有此菌株存在，未來還希望能找出一個讓這些菌株大量生長的溶液，在廢棄保麗龍上淋上此液，以降低其對環境的汙染。

玖、參考資料

- 一、曾依晴－從麵包蟲體內分離出可分解保麗龍之菌種
2009 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品
<http://activity.ntsec.gov.tw/activity/race-2/2009/pdf/070006.pdf>
- 二、張雅晴、陳佳妤、田永筠、邱麟雅、江佳儒、白韻涵-保麗龍的剋星－麵包蟲
臺灣 第 42 屆中小學科展 高雄市三民區博愛國民小學
<http://activity.ntsec.gov.tw/activity/race-1/49/pdf/080829.pdf>
- 三、周姿妙、李紀廣、王馨敏、王筱菱、黃裕翔、馮志揚-小蟲立大功~大麥蟲對環境保護之研究
臺灣 第 50 屆中小學科展 臺南縣柳營鄉柳營國民小學
<http://activity.ntsec.gov.tw/activity/race-1/50/pdf/080316.pdf>
- 四、麥皮蟲參考資料
<http://tw.knowledge.yahoo.com/question/question?qid=1609081607295>
- 五、張永達、陳俊宏 (2012) 應用生物學。台北。三民書局股份有限公司。
- 六、詹鈞翔、詹鈞年、謝典儒－屠龍高手－分解保麗龍細菌之分離
臺灣 第 52 屆中小學科展 佳作作品
<http://activity.ntsec.gov.tw/activity/race-1/52/pdf/040703.pdf>

【評語】 040705

題目以環保為出發點，有發展性，唯少有新的突破發現，可再
思慮進一步的探究分析。