

中華民國第 55 屆中小學科學展覽會 作品說明書

國中組 生物科

030308

細菌人-刷牙及漱口水的使用對於口腔菌叢之影響

學校名稱：新北市立八里國民中學

作者： 國三 吳欣翰 國三 孫瑞麟 國三 汪汶惠	指導老師： 張雅迪 王俊凱
---	-----------------------------

關鍵詞：微生物檢測、預防齲齒、牙齒防護

摘要：

在潔牙商品廣告中，常稱產品可降低牙齒細菌量，然學校教育我們使用貝氏刷牙法來預防齲齒，生物課亦學習到細菌與生物的生活息息相關，這引發我們的研究動機，想了解哪種潔牙方式能將細菌量有效降低，希藉此來提醒大家日常潔牙的重要性。除此之外，也想了解長期住在我們牙齒上的細菌到底是什麼模樣，故我們選用市售牙膏及漱口水，分別在潔牙前及潔牙後在牙齒表面上取樣，並分別以 TSA 以及 LA 培養基進行培養，統計比較後發現：刷牙後，最有效降低細菌量；次之，刷牙搭配使用漱口水；最後是單用漱口水。而在不同培養基的結果中發現具有顯著差異，可藉培養基了解牙齒細菌較喜歡何種營養，日常生活上可避免過度攝取該類食物，進而達到預防齲齒之效果。

壹、研究動機：

在人體的口腔有超過 600 種細菌[4]，在溫熱潮溼的環境下繁殖，人體唾液中含有水分、胺基酸、蛋白質、脂質、醣類以及一些無機物，是個適合菌體生長之環境，大量菌體在牙齒表面上附著會漸漸形成牙菌斑[3]，在口腔內部的主要菌叢為厭氣性螺旋體與弧菌、葡萄球菌、乳酸桿菌及鏈球菌，然而乳酸桿菌及鏈球菌附著於齒面上，可將醣類發酵產生乳酸，造成牙齒的脫鈣作用，進而形成細微的穿孔，最後導致齲齒[1][2]。然而牙膏以及漱口水是我國國民生活必需品之一，除了想藉由實驗了解日常生活中潔牙方式對於牙齒上菌數之影響，並想藉此引起大家注意潔牙習慣對於預防齲齒的重要性。

貳、研究目的：

一、不同潔牙方式對牙齒菌叢的影響：

- 〈一〉飯後刷牙對於牙齒表面細菌數量的影響。
- 〈二〉飯後使用漱口水對於牙齒表面細菌數量的影響。
- 〈三〉飯後刷牙以及搭配漱口水對於牙齒表面細菌數量的影響。

二、以不同培養基菌叢之差異：

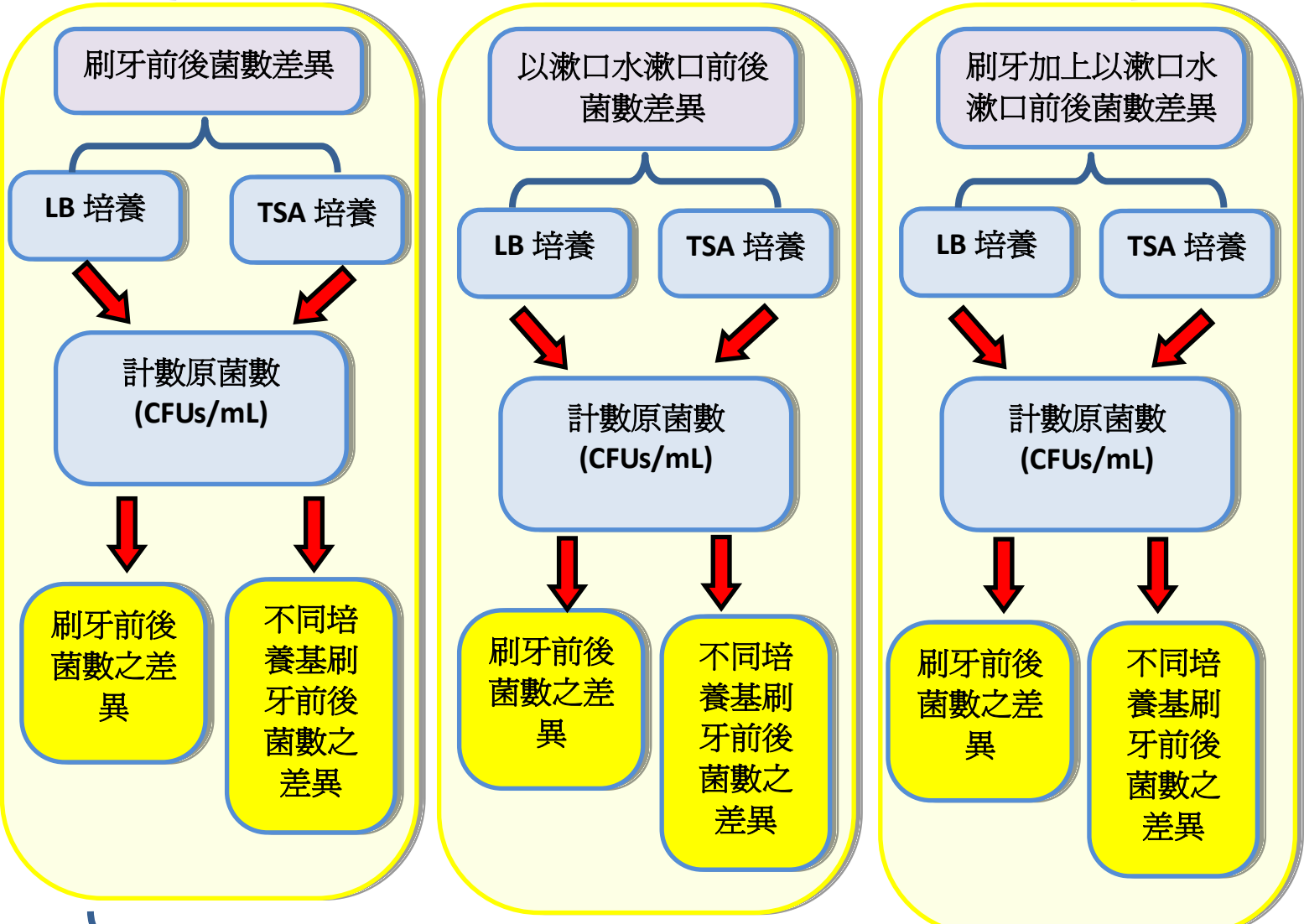
- 〈一〉刷牙前後牙齒表面細菌培養於不同培養基結果之差異。
- 〈二〉漱口水使用前後牙齒表面細菌培養於不同培養基結果之差異。
- 〈三〉飯後刷牙以及搭配漱口水前後牙齒表面細菌培養於不同培養基結果之差異。

三、口腔中的微生物到底長什麼樣子：

- 〈一〉觀察菌落培養出的菌落型態
- 〈二〉利用革蘭氏染色法進行顯微鏡觀察

研究架構圖

刷牙及漱口水使用
對於口腔菌數之影響




綜合討論

參、研究設備及器材：

一、藥品：				
名稱				
	LB 粉末培養基 (Lysogeny broth)	胰酶大豆粉末培養 基(Tryptic Soy Broth)	洋菜/瓊脂 (Agar)	結晶紫
用途	作為培養細菌之營 養來源	作為培養細菌之營 養來源	製作固態培養基	革蘭氏染色初染劑
名稱				
	革蘭氏碘液	95%乙醇	酚品紅	95%乙醇
用途	革蘭氏染色媒染劑	革蘭氏染色脫色劑	革蘭氏染色複染劑	配製 75%乙醇

二、器材：

名稱				
	純水製造機	高溫高壓滅菌釜	微量吸管	試管震盪器
用途	用於配置培養基、食鹽水。	將所使用的器具以及藥品做前置滅菌工作	吸取定量溶液	將試管均勻震盪，避免吸取菌液時，細菌量分布不均勻。
名稱				
	解剖顯微鏡	光學顯微鏡	微量電子天秤	恆溫培養箱
用途	觀察菌落外觀	觀察細菌型態	秤量藥品	培養細菌
名稱				
	計時器	微量吸管尖 100ul	微量吸管尖 1000ul	滅菌棉棒
用途	定時刷牙以及漱口時間	吸取定量溶液，可拋式避免取樣污染。	吸取定量溶液，可拋式避免取樣污染。	取樣牙齒上細菌。
名稱				
	玻璃推棒	牙膏	牙刷	漱口水
用途	將菌液均勻塗抹於培養基上	清潔牙齒材料	清潔牙齒工具	清潔牙齒材料

肆、研究過程與方法：

一、材料配製：

(一) LA 培養基配製：

- 1.取 LB 粉末培養基 36 公克溶於 1.2 公升純水中，此為 LB 溶液。
- 2.將 1.2 公升分裝至 500 毫升之血清瓶中，每瓶裝 400 毫升 LB 溶液。
- 3.秤 6 公克洋菜至每個血清瓶中。
(由於室溫下洋菜不可溶，所以需於分裝後加入)
- 4 將配製好之血清瓶口旋緊後，再鬆半圈。
(此目的為讓瓶中空氣在滅菌時可以宣洩)
- 5.在瓶蓋外包裹鋁箔紙，並貼上滅菌膠帶(如圖一所示)。
(滅菌膠帶再高溫高壓滅菌釜達到滅菌標準會出現黑色條紋，若無則表示未達滅菌標準，需重新滅菌。)
- 6.將配製完血清瓶放入高溫高壓滅菌釜，將滅菌釜水箱補水至最低水位之上，最高水位之下。
- 7.開始滅菌，滅菌條件為：121°C，1.2 大氣壓下滅菌 20 分鐘。
- 8.滅菌完後即為 LA 溶液。將其移至水浴冷卻至 35~40°C。(雙手可握即可)
- 9.於無菌操作台中，點燃酒精燈，瓶口需過火滅菌，將 20 毫升 LA 溶液倒至培養皿 (Petri dish)，蓋上上蓋等待冷卻，冷卻後倒置於無菌操作台隔夜。
- 10.此即為 LA 固態平板培養基。(含 1.5%洋菜)



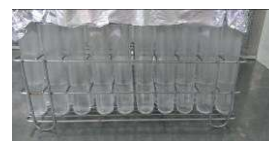
圖一、滅菌完成之培養基

(二) TSA 培養基配製：

- 1.取 TSB 粉末培養基 30 公克溶於 1.2 公升純水中，此為 TSB 溶液。
- 2.將 1.2 公升分裝至 500 毫升之血清瓶中，每瓶裝 400 毫升 TSB 溶液。
- 3.秤 6 公克洋菜至每個血清瓶中。
- 4 將配製好之血清瓶口旋緊後，再鬆半圈。
- 5.在瓶蓋外包裹鋁箔紙，並貼上滅菌膠帶(如圖一所示)。
- 6.將配製完血清瓶放入高溫高壓滅菌釜，將滅菌釜水箱補水。
- 7.開始滅菌，滅菌條件為：121°C，1.2 大氣壓下滅菌 20 分鐘。
- 8.滅菌完後即為 TSA 溶液。將其移至水浴冷卻至 35~40°C。
- 9.於無菌操作台中將 20 毫升 TSA 溶液倒至培養皿，冷卻後倒置於無菌操作台隔夜。
- 10.此即為 TSA 固態平板培養基。(含 1.5%洋菜)

(三) 無菌 0.9%生理食鹽水配製：

- 1.取氯化鈉 9 公克溶於 1 公升純水中，分別裝 9ml 以及 10ml 至試管中。
- 2.滅菌後待冷卻後，放入 4°C 冰箱待用，使用前需回溫至室溫(如圖二)。



圖二、0.9%食鹽水

二、前置實驗：

(一) 選定牙刷置放方式：(實驗人數 5 人)

1. 將新開封牙刷使用一週後，再進行相關實驗。
(模仿日常牙刷使用方式)
2. 正置(圖三) / 倒置(圖四)牙刷：
 - (1) 將使用後牙刷置於漱口杯中，隔夜備用。
 - (2) 將牙刷浸入裝有 20 毫升無菌食鹽水之 50 毫升離心管中，均勻混合。
 - (3) 混合液即為 20 倍稀釋之原菌液。
 - (4) 將原菌液均勻震盪。
 - (5) 取 0.1 毫升原菌液置於 TSA 平板。
 - (6) 將三角玻璃推棒，浸酒精後，燃燒滅菌，待冷卻後將菌液均勻塗抹於平板。
 - (7) 將平板倒置，於室溫下隔夜培養。
 - (8) 實驗結果於附錄一、附錄二，分析結果為表一所示。



圖三、牙刷正置



圖四、牙刷倒置

三、實驗方法：

(一) 貝氏刷牙法：

1. 刷牙的順序：先刷上牙、再刷下牙；右邊開始、右邊結束。頰側牙面用同側手刷，舌側牙面用對側手刷，咬合面用同側手刷，前牙用右手刷。
2. 牙刷的握法：拇指前伸，刷毛與牙面成 $45^{\circ}\sim 60^{\circ}$ ，涵蓋一點點牙齦。兩顆兩顆來回的刷，約 10 次。
3. 貝氏刷牙步驟：
 - (1) 由右上頰側開始。
 - (2) 刷上排前牙。
 - (3) 刷左上頰側。
 - (4) 刷左上咬合面。
 - (5) 刷左上舌側
 - (6) 刷上排前牙舌側。
 - (7) 換左手刷右上舌側。
 - (8) 刷右上咬合面，到此，刷牙是由右邊開始，也在右邊結束。
 - (9) 用同樣的方法及順序，刷下排牙齒。由右下頰側開始。

(二) 漱口水使用方法：

1. 依據商品建議使用，刷牙後，取一個瓶蓋漱口水，於口中漱口 30 秒。
2. 漱口水吐掉後，不可再使用水漱口。

(三) 刷牙前後菌數測定實驗：(實驗人數 9 人)

- 1.刷牙前，以滅菌棉棒塗抹左半邊牙齒，將塗抹完棉棒置於 1ml 無菌食鹽水中均勻震盪，此為刷牙前原菌液。
- 2.取含有 9mL 之無菌食鹽水試管，過火後加入 1mL 原始菌液，此試管即為 10^{-1} 稀釋菌液。
- 3.取含有 9mL 之無菌食鹽水試管，過火後加入 1mL 之 10^{-1} 稀釋液，此試管為 10^{-2} 稀釋菌液。
- 4.取含有 9mL 之無菌食鹽水試管，過火後加入 1mL 之 10^{-2} 稀釋液，此試管為 10^{-3} 稀釋菌液。
- 5.從稀釋液中吸取 0.1mL 之菌液，置於無菌瓊脂平板(LA、TSA)中央，再將已經浸酒精且燃燒後之三角玻璃推棒，將菌液均勻塗抹。
(左手旋轉平板，右手將玻棒前後推動，使菌液均勻，直至菌液全乾)
- 6.刷牙後，以滅菌棉棒塗抹右半邊牙齒，將塗抹完棉棒置於無菌食鹽水中均勻震盪，此為刷牙後原菌液。
- 7.依步驟 2~4 作連續稀釋至 10^{-3} 稀釋菌液。
- 8.從稀釋液中吸取 0.1mL 之菌液，置於無菌瓊脂平板(LA、TSA)中央，再將已經浸酒精且燃燒後之三角玻璃推棒，將菌液均勻塗抹。
(左手旋轉平板，右手將玻棒前後推動，使菌液均勻，直至菌液全乾)
- 9.用封口膜(Parafilm)將平板與上蓋密封後倒置於室溫下隔夜培養。
- 10.推算原菌液濃度。(實驗過程操作人員皆吃相同食物)

(四) 漱口前後菌數測定實驗：(實驗人數 9 人)

- 1.漱口前，以滅菌棉棒塗抹左半邊牙齒，將塗抹完棉棒置於 1ml 無菌食鹽水中均勻震盪，此為刷牙前原菌液。
- 2.取含有 9mL 之無菌食鹽水試管，過火後加入 1mL 原始菌液，此試管即為 10^{-1} 稀釋菌液。
- 3.取含有 9mL 之無菌食鹽水試管，過火後加入 1mL 之 10^{-1} 稀釋液，此試管為 10^{-2} 稀釋菌液。
- 4.取含有 9mL 之無菌食鹽水試管，過火後加入 1mL 之 10^{-2} 稀釋液，此試管為 10^{-3} 稀釋菌液。
- 5.從稀釋液中吸取 0.1mL 之菌液，置於無菌瓊脂平板(LA、TSA)中央，再將已經浸酒精且燃燒後之三角玻璃推棒，將菌液均勻塗抹。
(左手旋轉平板，右手將玻棒前後推動，使菌液均勻，直至菌液全乾)
- 6.漱口後，以滅菌棉棒塗抹右半邊牙齒，將塗抹完棉棒置於無菌食鹽水中均勻震盪，此為刷牙後原菌液。
- 7.依步驟 2~4 作連續稀釋至 10^{-3} 稀釋菌液。
- 8.從稀釋液中吸取 0.1mL 之菌液，置於無菌瓊脂平板(LA、TSA)中央，再將已經浸酒精且燃燒後之三角玻璃推棒，將菌液均勻塗抹。
- 9.用封口膜(Parafilm)將平板與上蓋密封後倒置於室溫下隔夜培養。
- 10.推算原菌液濃度。(實驗過程操作人員皆吃相同食物)

(五) 刷牙漱口前後菌數測定實驗：(實驗人數 9 人)

- 1.刷牙漱口前，以滅菌棉棒塗抹左半邊牙齒，將塗抹完棉棒置於 1ml 無菌食鹽水中均勻震盪，此為刷牙前原菌液。
- 2.取含有 9mL 之無菌食鹽水試管，過火後加入 1mL 原始菌液，此試管即為 10^1 稀釋菌液。
- 3.取含有 9mL 之無菌食鹽水試管，過火後加入 1mL 之 10^1 稀釋液，此試管為 10^2 稀釋菌液。
- 4.取含有 9mL 之無菌食鹽水試管，過火後加入 1mL 之 10^2 稀釋液，此試管為 10^3 稀釋菌液。
- 5.從稀釋液中吸取 0.1mL 之菌液，置於無菌瓊脂平板(LA、TSA)中央，再將已經浸酒精且燃燒後之三角玻璃推棒，將菌液均勻塗抹。
(左手旋轉平板，右手將玻璃棒前後推動，使菌液均勻，直至菌液全乾)
- 6.刷牙漱口後，以滅菌棉棒塗抹右半邊牙齒，將抹完棉棒置於無菌食鹽水中均勻震盪，此為刷牙後原菌液。
- 7.依步驟 2~4 作連續稀釋至 10^3 稀釋菌液。
- 8.從稀釋液中吸取 0.1mL 之菌液，置於無菌瓊脂平板(LA、TSA)中央，再將已經浸酒精且燃燒後之三角玻璃推棒，將菌液均勻塗抹。
(左手旋轉平板，右手將玻璃棒前後推動，使菌液均勻，直至菌液全乾)
- 9.用封口膜(Parafilm)將平板與上蓋密封後倒置於室溫下隔夜培養。
- 10.推算原菌液濃度。(實驗過程操作人員皆吃相同食物)

(六) 菌落計數方式：

- 1.將隔夜培養之平板置於黑布上，以奇異筆點在平板背面，計數菌落數目。
- 2.若是菌落數少於 30 記錄為 too few to count (TFTC)，太少不能列入。
- 3.若是菌落數多於 300 記錄為 too numerous to count (TNTC)，太多不能列入。

(七) 統計分析：

- 1.利用 R project 軟體進行統計分析各實驗數據，分別進行盒形圖製作、T-test，虛無假設無差異進行雙尾檢定，若 P 值小於 0.05 表示虛無假設不成立，可確定實驗結果是具有顯著差異的。
(P 值小於 0.05 標示為*；P 值小於 0.01 標示為**；P 值小於 0.001 標示為***)
2. 利用 JMP 軟體進行統計分析各組實驗處理之數據，進行 Single Factor ANOVA Tukey test。

(八) 革蘭氏染色法：

- 1.無菌操作，每菌分別置備一抹片，於空氣中乾燥，熱固定後備用。
- 2.滴結晶紫，靜置一分鐘後，以蒸餾水清洗。
- 3.再滴革蘭氏碘液媒染劑，靜置一分鐘後，以蒸餾水清洗。
- 4.用 95%乙醇脫色後，以蒸餾水清洗。
- 5.滴酚品紅複染 45 秒，以蒸餾水清洗。

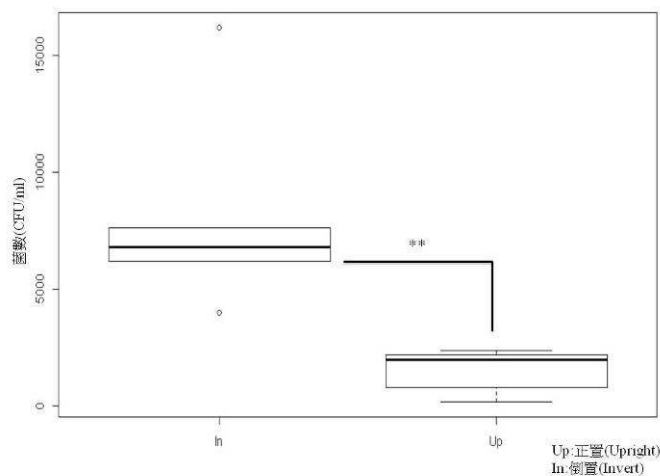
伍、研究結果：

一、前置實驗：

(一) 選定牙刷置放方式：

表一、牙刷正置與牙刷倒置平均菌數表

牙刷放置方式	平均樣本原始濃度(CFU/ml)	P Value
正置	1.52×10^3	0.007937
倒置	3.82×10^4	



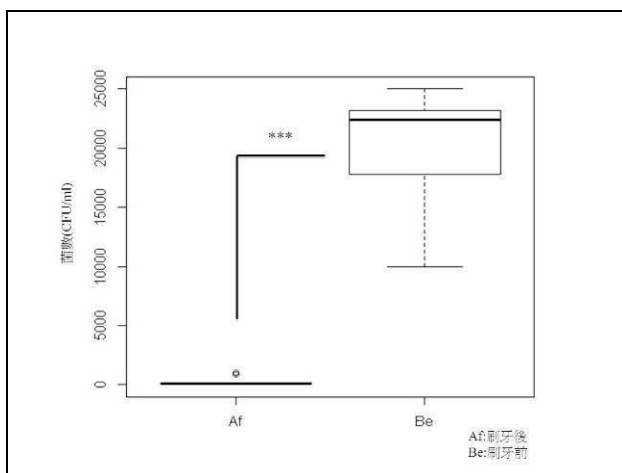
圖五、牙刷正置與倒置菌數量盒形圖

二、不同潔牙方式實驗：

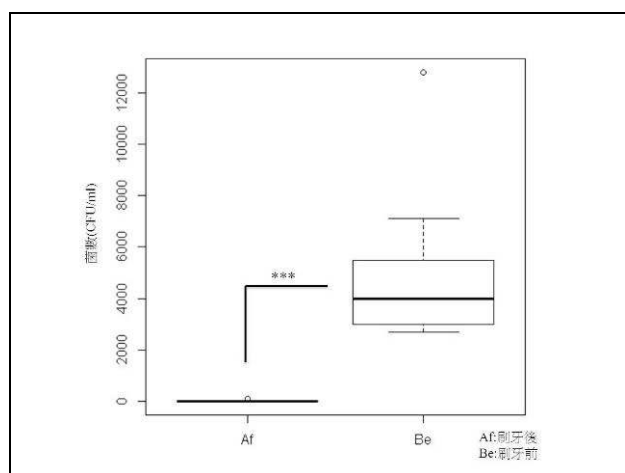
(一) 刷牙前後菌數測定實驗：

表二、不同培養基培養刷牙前後平均菌數表

培養基	刷牙前平均菌數(CFU/ml)	刷牙後平均菌數(CFU/ml)
TSA	1.97×10^4	2.66×10^2
LA	5.13×10^3	2.2×10



圖六、TSA 培養基培養刷牙前後菌數量盒形圖

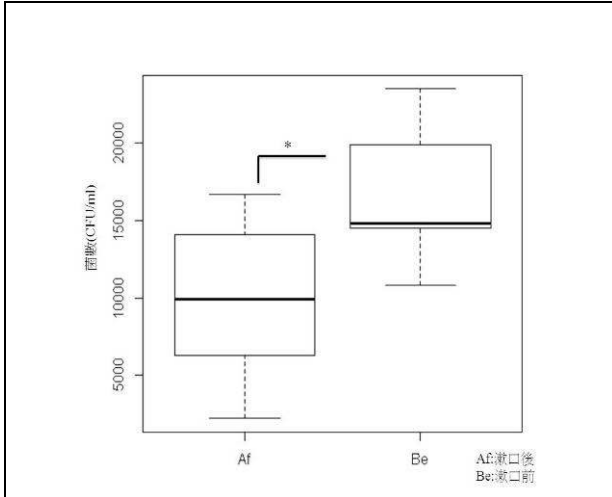


圖七、LA 培養基培養刷牙前後菌數量盒形圖

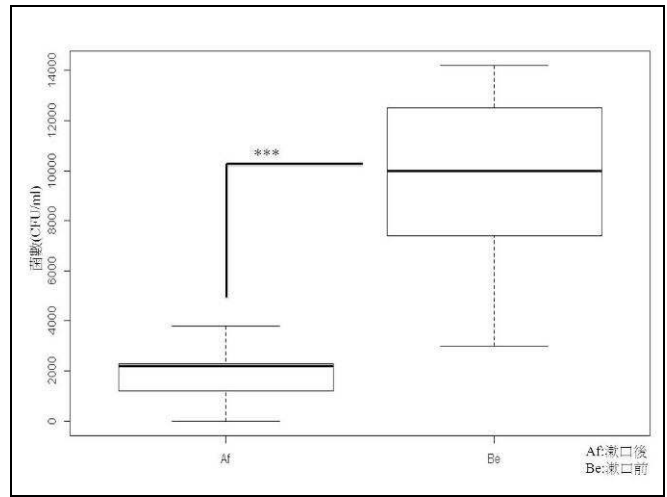
(二) 漱口前後菌數測定實驗：

表三、不同培養基培養漱口前後平均菌數表

培養基	漱口前平均菌數(CFU/ml)	漱口後平均菌數(CFU/ml)
TSA	1.67×10^4	9.96×10^3
LA	9.8×10^3	1.86×10^3



圖八、TSA 培養基培養漱口前後菌數盒形圖

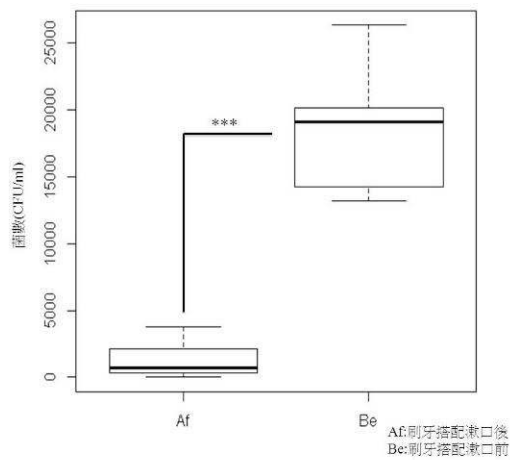


圖九、LA 培養基培養漱口前後菌數盒形圖

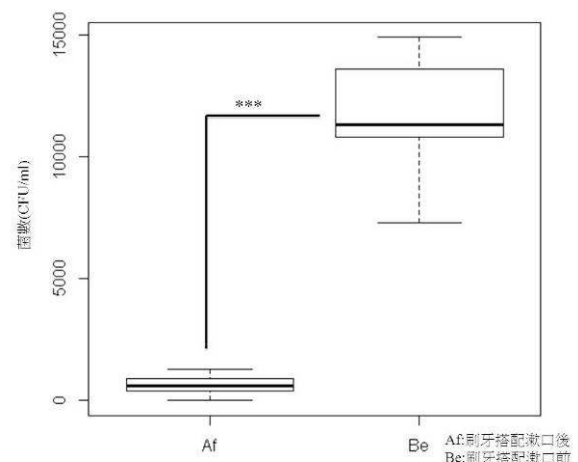
(三) 刷牙漱口前後菌數測定實驗：

表四、不同培養基培養刷牙漱口前後平均菌數表

培養基	刷牙漱口前平均菌數 (CFU/ml)	刷牙漱口後平均菌數(CFU/ml)
TSA	1.85×10^4	1.27×10^3
LA	1.16×10^4	6.33×10^2



圖十、TSA 培養基培養刷牙漱口前後菌數盒形圖



圖十一、LA 培養基培養刷牙漱口前後菌數盒形圖

(四) 綜合結果：

表五、潔牙前後培養於不同培養基之統計檢定 (培養基/菌數- Single Factor ANOVA Tukey test)

Level	組別	Least Sq Mean
刷牙漱口前	A	15050
漱口前	A	13250
刷牙前	A	12427.778
漱口後	B	5916.667
刷牙漱口後	C	955.556
刷牙後	C	144.444

三、細菌及菌落型態之觀察：

(一) 菌落觀察結果：

表六、菌落型態觀察記錄表：

	外觀型態	顏色	菌落透明度	菌落與培養基結合程度	含水狀態	菌落邊緣	大小
菌落 A	圓形絲狀突起	中央黑色 外圍白色	不透明	緊密	乾燥	絲狀	直徑 0.2cm
菌落 B	圓形扁平	粉白色	不透明	緊密	微濕	有突起	直徑 0.7cm
菌落 C	圓形光滑	白色	不透明	緊密	較濕	光滑	直徑 0.2cm
菌落 D	圓形光滑	黃色，中間較深黃	不透明	緊密	非常濕潤	光滑	直徑 0.3cm
菌落 E	圓形突起	乳黃色	不透明	緊密	微濕	雲狀邊緣	直徑 0.5cm
菌落 F	扁平不規則	白色	不透明	不結合	乾燥	粉末狀	直徑 1.3cm
菌落 G	圓形突起	白色	透明帶	緊密	非常濕潤	透明圈	直徑 1.0cm
菌落 H	圓形突起	白色霧面	不透明	緊密	微濕	中央具突起	直徑 0.7cm
菌落 I	光滑突起	中央橘色，周圍具透明膠狀物	外圈為透明	緊密	較濕	圓滑	直徑 0.3cm
菌落 J	特殊規則突起	白色霧狀	不透明	結合鬆散	乾燥	圓滑	直徑 0.5cm
菌落 K	有微粒突起	白色	不透明	緊密	非常濕	圓滑	直徑 1.2cm
菌落 L	圓形突起	乳黃色	不透明	緊密	非常濕	圓滑	直徑 0.3cm
菌落 M	圓形絲狀	白色	不透明	結合鬆散	乾燥	圓形	直徑 0.3cm
菌落 N	特殊規則圖形	黃色	半透明	完全不結合	乾燥	圓形	直徑 1.7cm
菌落 O	圓形絲狀	外圍白色	不透明	結合鬆散	乾燥	圓形	直徑 0.3cm
菌落 P	圓形絲狀	外圍具長絲	不透明	結合鬆散	乾燥	絲狀	不含絲直徑 1cm
菌落 Q	圓形絲狀	外圍白色，中央淡黃色	不透明	結合鬆散	乾燥	圓形	直徑 0.9cm
菌落 R	圓形	白色霧面	不透明	不結合 (易移動)	乾燥	圓滑	直徑 0.3cm



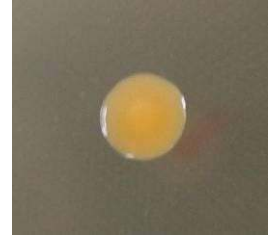
圖十二、菌落 A



圖十三、菌落 B



圖十四、菌落 C



圖十五、菌落 D



圖十六、菌落 E



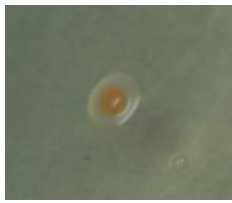
圖十七、菌落 F



圖十八、菌落 G



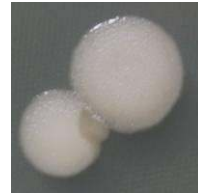
圖十九、菌落 H



圖二十、菌落 I



圖二十一、菌落 J



圖二十二、菌落 K



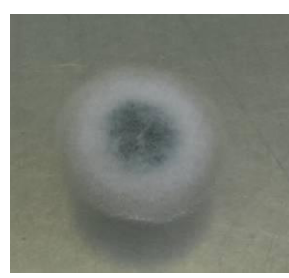
圖二十三、菌落 L



圖二十四、菌落 M



圖二十五、菌落 N



圖二十六、菌落 O



圖二十七、菌落 P



圖二十八、菌落 Q



圖二十九、菌落 R

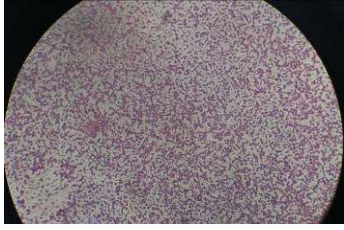
(二) 革蘭氏染色鏡檢結果：



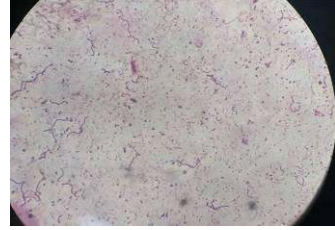
圖三十、菌落 A(似菌絲以及孢子構造)



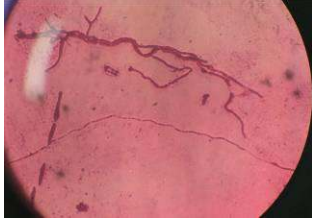
圖三十一、菌落 B(短桿狀)



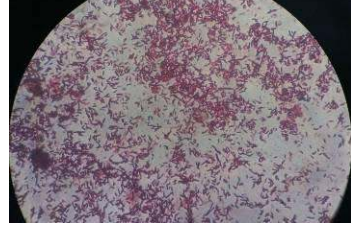
圖三十二、菌落 C(球狀)



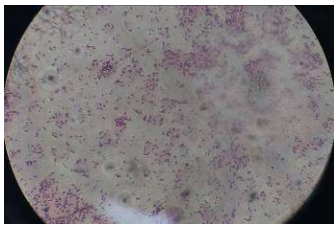
圖三十三、菌落 D(鏈球菌)



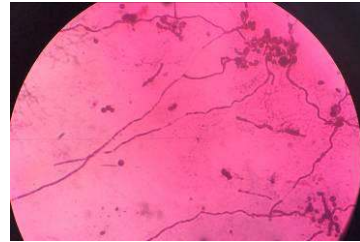
圖三十四、菌落 F(具分節似真菌菌絲構造)



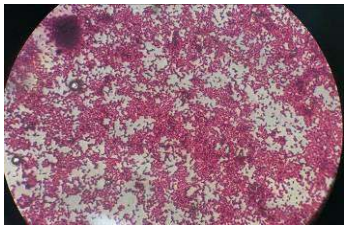
圖三十五、菌落 G(桿菌)



圖三十六、菌落 I(球菌)



圖三十七、菌落 J(似真菌菌絲及孢子構造)



圖三十八、菌落 L(球菌)



圖三十九、菌落 M(似真菌菌絲構造)

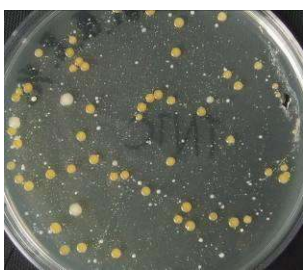


圖四十、菌落 N(長桿狀似線桿菌)

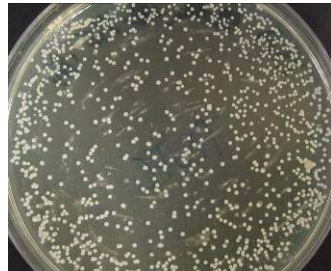


圖四十一、菌落 O
(似真菌菌絲、孢子囊以及孢子構造)

(三) 潔牙前後於培養基培養狀況：



四十二、刷牙前(TSA,原液)



圖四十三、漱口前(TSA,原液)



圖四十四、刷牙漱口前(TSA, 10^{-1})



圖四十五、刷牙後(TSA,原液)



圖四十六、漱口後(TSA,原液)



圖四十七、刷牙漱口後(TSA, 10⁻¹)



圖四十八、刷牙前(LA,原液)



圖四十九、漱口前(LA,原液)



圖五十、刷牙漱口前(LA,10⁻¹)



圖五十一、刷牙後(LA,原液)



圖五十二、漱口後(LA,原液)



圖五十三、刷牙漱口後(LA,10⁻¹)

陸、討論：

一、前置實驗：

(一) 選定牙刷置放方式：

牙刷正置(圖三)及倒置(圖四)實驗平均菌數如表一所示，根據原始數據附錄一、附錄二，製成圖五。從表一中可見，牙刷正置菌數為 1.52×10^3 (CFU/ml)，牙刷倒置菌數為 3.82×10^4 (CFU/ml)，牙刷倒置的的細菌數量高於牙刷正置。從圖五中牙刷正置與倒置菌數量盒形圖可見，牙刷倒置與牙刷正置的菌數分布無明顯重疊，且透過統計分析方法 T-test 得到 P 值為 0.007937，標示為兩顆「*」符號，表示具有顯著差異。

牙刷正置的細菌量較倒置低，可能來自於正置可避免將牙刷刷頭浸泡在液體中，倒置的牙刷可能浸泡在液體中會造成滋生細菌在牙刷刷頭，此步驟可於未來實驗中再深入探討更多擺放方式：如懸掛式、牙刷刷頭蓋頭等。

二、不同潔牙方式實驗：

(一) 刷牙前後菌數測定實驗：

刷牙前後培養於 TSA 及 LA 培養基之菌數記錄於附錄三至附錄六，由附錄三中可見 10 倍稀釋度所計數之菌株數量落於 30 至 300 之間，故在實驗中挑取 10 倍稀釋樣本來推算牙齒上原菌數。從附錄四可見，10 倍稀釋之樣本之菌落數皆低於 30，在平板計數之實驗中若是菌落數少於 30 記錄為 too few to count (TFTC)，太少不能列入。實驗依然以此數據推測原菌液濃度，雖會造成極大極小值的出現影響誤差值，但由於實驗是測試潔牙前

後之菌數，由前人文獻得知潔牙後應菌數減少，故採用之。

依附錄三至附錄六，繪製圖六以及圖七盒形圖。如表二所示，刷牙前培養於 TSA 培養基平均菌數 1.97×10^4 (CFU/ml)，刷牙後培養於 TSA 培養基平均菌數 2.66×10^2 (CFU/ml)，刷牙前菌數高於刷牙後菌數。經統計分析方法 T-test 得到 P 值為 0.00039，表示具有顯著差異，標示為三顆「*」符號。

刷牙前培養於 LA 培養基平均菌數 5.13×10^3 (CFU/ml)，刷牙後培養於 LA 培養基平均菌數 2.2×10 (CFU/ml)，刷牙前菌數高於刷牙後菌數。經統計分析方法 T-test 得到 P 值為 0.0002697，表示具有顯著差異，標示為三顆「*」符號。

LA 培養基與 TSA 培養基相比，潔牙前後所培養出細菌量，皆為 TSA 培養基細菌量較高，而 LA 培養基所培養出細菌量較低。

(二) 漱口前後菌數測定實驗：

漱口前後培養於 TSA 及 LA 培養基之菌數記錄於附錄七至附錄十，依實驗(一)之結果挑取 10 倍稀釋樣本來推算牙齒上原菌數，製圖八以及圖九盒形圖。

如表三中所示，漱口前培養於 TSA 培養基平均菌數 1.67×10^4 (CFU/ml)，漱口後培養於 TSA 培養基平均菌數 9.96×10^3 (CFU/ml)，漱口前菌數高於漱口後菌數。經統計分析方法 T-test 得到 P 值為 0.01876，表示具有顯著差異，標示為一顆「*」符號。

漱口前培養於 LA 培養基平均菌數 9.8×10^3 (CFU/ml)，漱口後培養於 LA 培養基平均菌數 1.86×10^3 (CFU/ml)，漱口前菌數高於漱口後菌數。經統計分析方法 T-test 得到 P 值為 0.0007873，表示具有顯著差異，標示為三顆「*」符號。

LA 培養基與 TSA 培養基相比，潔牙前後所培養出細菌量，皆為 TSA 培養基細菌量較高，而 LA 培養基所培養出細菌量較低。

(三) 刷牙漱口前後菌數測定實驗：

漱口前後培養於 TSA 及 LA 培養基之菌數記錄於附錄十一至附錄十四，依實驗(一)之結果挑取 10 倍稀釋樣本來推算牙齒上原菌數，製圖十以及圖十一盒形圖。

如表四中所示，刷牙漱口前培養於 TSA 培養基平均菌數 1.85×10^4 (CFU/ml)，刷牙漱口後培養於 TSA 培養基平均菌數 1.27×10^3 (CFU/ml)，刷牙搭配漱口前菌數高於刷牙漱口後菌數。經統計分析方法 T-test 得到 P 值小於 0.001，表示具有顯著差異，標示為三顆「*」。

刷牙漱口前培養於 LA 培養基平均菌數 1.16×10^4 (CFU/ml)，刷牙漱口後培養於 LA 培養基平均菌數 6.33×10^2 (CFU/ml)，刷牙搭配漱口前菌數高於刷牙漱口後菌數。經統計分析方法 T-test 得到 P 值小於 0.001，表示具有顯著差異，標示為三顆「*」符號。

LA 培養基與 TSA 培養基相比，潔牙前後所培養出細菌量，皆為 TSA 培養基細菌量較高，而 LA 培養基所培養出細菌量較低。

(四) 綜合討論：

利用 JMP 軟體進行統計分析各組實驗處理之數據，進行 Single Factor ANOVA Tukey test 分析，結果如表五所示，刷牙前、漱口前及刷牙漱口前被分為 A 組，其三處理無顯著差異，與 B、C 兩組具有顯著差異；漱口後被分為 B 組，與 A、C 兩組具有顯著差異；刷牙後及刷牙漱口後被分為 C 組，其二實驗處理無顯著差異，與 A、B 兩組有顯著差異。

刷牙前、漱口前及刷牙漱口前被分為 A 組，此結果非常重要，本實驗操作員有九人，日常生活習慣皆不同，根據前人研究指出，每個人口腔內的細菌種類以及優勢菌叢有些許不同，此結果指出潔牙方式前的細菌量，在不同人的實驗結果中是不具有顯著差異的，

也代表著潔牙前的實驗結果具有重複性質，才得以用來做潔牙後的細菌數量比較。

值得注意的是，只使用漱口水的潔牙方式，單一被分為 B 組，與其他二種潔牙方式被歸為不同組別，且具有顯著差異，加上菌數為最高組別，表示單使用漱口降低的菌數最少，也可能無法達到預防齲齒。

另外，雖然刷牙搭配使用漱口水與單使用漱口水同為 C 組，但是刷牙搭配漱口水的細菌量卻高於單使用漱口水的實驗處理，此一結果與實驗目的期望不同，此一結果非常引人注目。我們推測此原因可能來自於，刷牙時並不能有效將齒縫做清潔，導致漱口時將齒縫的細菌沖出齒縫，雖漱口水有些微抑制細菌生長之物質，但因為操作過程中，刷牙漱口後立即將牙齒上細菌抹下至生理食鹽水，導致刷牙漱口後被沖出齒縫的細菌在培養基上生長。未來實驗可加入使用牙線清理牙縫或其他輔助潔牙方式，來探究是否單使用刷牙並不能有效清除牙縫中的細菌。

針對上一點討論，未來研究中可添加，先漱口後刷牙來與本次研究中的先刷牙後漱口來比較，或者是刷牙漱口後，以靜置口腔時間來做取樣的分隔，來應證我們的推測是否為真。然而，此結果非常引人注目，若我們研究假設菌數提高的原因為真，表示我們潔牙方式仍有許多不足之處，才會導致刷牙漱口後，反而有細菌被沖洗出現，或許改變潔牙習慣也是十分重要，如刷牙時間、刷牙前或刷牙後的輔助潔牙方式以及潔牙商品的選擇，此問題將會有更有趣的實驗探討空間。

綜合以上三種潔牙處理之結果，第一是潔牙後菌數皆低於潔牙前；第二，LA 培養基與 TSA 培養基相比，不論潔牙前後所培養出細菌量，皆為 TSA 培養基細菌量較高，而 LA 培養基所培養出細菌量較低；第三，潔牙後不論 TSA 還是 LA 培養基所測得菌數，由高而低依序為漱口後、刷牙漱口後及刷牙後。

三、細菌及菌落型態之觀察：

(一) 菌落觀察結果：

菌落 A 至菌落 R 外觀觀察紀錄如表六所示，菌落照片於圖十二至圖二十九。實驗過程中，我們觀察到 18 種外觀形態極為不同的菌落，搭配革蘭氏染色發現其中許多菌株疑似為真菌而非細菌(如：菌落 A、F、J、M、N、O)，但若想得知是否真為真菌，且發現到的菌株到底為何種菌株，必須透過菌種鑑定才可確定。

然造成此原因的可能，或許來自於人體口腔為一個開放式的微環境，不免在飲食、談話等情況下，接觸到環境中的真菌孢子，但造成齲齒的並非真菌，且真菌並不會在人體口腔生長，所以未來在要探討造成齲齒的口腔細菌時，可能必須添加抑制真菌生長的物質。

(二) 革蘭氏染色鏡檢結果：

如圖三十至圖四十一，其中菌落 E、H、K、P、Q、R 因染色失敗而無照片。在染色過程中失敗的原因可能為：第一，熱固定不足導致菌株無法固定在玻片上；第二，脫色時間過長導致在顯微鏡下觀察不到菌株；第三，菌落無法均勻打散導致玻片上無法觀察到細菌的型態；第四，可能該菌株以革蘭氏染色法無法有效染色，須使用他種染色技巧。

(三) 潔牙前後於培養基培養狀況：

潔牙前後於培養基培養狀況如圖四十二至五十三所示，可發現潔牙前菌落數量明顯高於潔牙後的菌落數量。

(四) 綜合討論：

根據前人研究中，人體的口腔有超過 600 種細菌，本研究所採用的培養方式為固態培養基，無法完整的探究人體的口腔細菌，若要完整的探究完所有口腔細菌，可能需要增加其他培養方式或研究方法，如 DNA 萃取、DNA 定序、液態培養基及厭氧培養設備等。

柒、結論：

一、前置實驗：

(一) 選定牙刷置放方式：

根據討論牙刷正置所培養出的細菌量較低，故選用使用過後的牙刷採取正置的擺放方式(如圖三)，來進行本次研究的實驗。

二、不同潔牙方式實驗：

(一) 刷牙前後菌數測定實驗：

單使用刷牙的潔牙方式中，經過統計分析得到 P 值小於 0.001，表示具有顯著差異。然細菌數量為三個潔牙方式中最低的實驗處理，故使用刷牙確實能降低牙齒上的細菌數量，進而達到預防齲齒的功能。

(二) 漱口前後菌數測定實驗：

單使用漱口水作為潔牙方式中，經統計分析得到的 P 值表示具有顯著差異。潔牙後細菌數量為三個潔牙方式中菌數最高者，雖漱口前後菌數具有顯著差異，但是仍然有高濃度細菌量，故平常潔牙方式不適合單使用漱口，因仍有殘留許多細菌在牙齒表面上，恐無法有效達到預防齲齒的期望。

(三) 刷牙漱口前後菌數測定實驗：

在刷牙後搭配使用漱口實驗中，經由統計分析得到 P 值小於 0.001，表示具顯著差異。表示刷牙搭配漱口水，確實能降低牙齒上的菌數，但潔牙後細菌數量卻高於單使用牙刷的方式，我們認為此原因可能來自於，刷牙時並不能有效將齒縫清潔，導致漱口時將齒縫的細菌沖出，導致刷牙漱口後細菌數量高於單使用刷牙的實驗結果。

(四) 綜合結果：

三種潔牙方式使用前歸類為 A 組，屬無顯著差異，表示具有重複性。單使用刷牙、單使用漱口以及刷牙後漱口，此三種潔牙方式使用後皆具有顯著差異，表示此三種潔牙方式都可以有效降低牙齒表面上細菌數量。

三種潔牙方式中，效果最好者為單使用刷牙；第二為刷牙後搭配漱口水的的使用；最後為單使用漱口水的方式。

值得關心的是，單使用漱口的細菌數量，在統計分析上與刷牙後及刷牙漱口後的菌數，被視為不同組，也就是說單使用漱口與刷牙後及刷牙漱口後有顯著的差異，表示單使用漱口為最不能有效降低菌數的潔牙方式，也存在著可能不能達到有效預防齲齒的期望。

即便在統計上將刷牙後以及刷牙漱口後之實驗組歸為 C 類，但在菌數上可見，刷牙漱口後平均菌數高於刷牙後。我們推測此原因可能來自於，刷牙時並不能有效將齒縫做清潔，導致漱口時將齒縫的細菌沖出，在培養基上生長。

TSA 培養基平均菌數皆高於 LA 培養基菌數，表示在本研究中 TSA 培養基所含養分以及培養條件較適合牙齒上菌叢之生長，或許選用不同培養基可培養出不同之菌種，未

來可嘗試使用他種培養基，搭配菌種鑑定，有效認識牙齒上所含的細菌，也可藉此了解細菌的營養來源，從飲食下手，有效控管齲齒的發生率。

由前人研究中發現，牙齒上造成齲齒的細菌為厭氧性的細菌，未來可增加有氧氣培養、微氧氣培養以及無氧氣培養，或許可以觀察更多樣化的牙齒細菌。

三、細菌及菌落型態之觀察：

實驗過程中，我們觀察到 18 種外觀形態極為不同的菌落，菌落 A 至菌落 R 外觀觀察紀錄如表六所示，菌落照片為圖十二至圖二十九所示，革蘭氏染色鏡檢結果如圖三十至圖四十一，其中菌落 E、H、K、P、Q、R 因染色失敗而無照片。

捌、參考資料：

1. Silk, H (March 2014). "Diseases of the mouth.". Primary care 41(1): 75 – 90.
2. Laudenbach, JM; Simon, Z (November 2014). "Common Dental and Periodontal Diseases: Evaluation and Management.". The Medical clinics of North America 98 (6): 1239 – 1260.
3. Ryan LA (September 1983). "5. Confectionery and dental caries". J Dent 11 (3): 207 – 9. doi:10.1016/0300-5712(83)90186-0.
4. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota : Living with a permanent guest[J]. DNA Cell Biol, 2009, 28 (8) : 405- 411.

玖、附件資料：

附錄一、牙刷正置菌落數紀錄表

牙刷放置方式	試管稀釋濃度	取樣毫升數	最後稀釋濃度	菌落數	樣本原始濃度 (CFU/ml)
正置	2×10^{-1}	0.1	2×10^2	1	2×10^2
	2×10^{-1}	0.1	2×10^2	4	8×10^2
	2×10^{-1}	0.1	2×10^2	10	2×10^3
	2×10^{-1}	0.1	2×10^2	12	2.4×10^3
	2×10^{-1}	0.1	2×10^2	11	2.2×10^3

平均樣本原始濃度： 1.52×10^3 (CFU/ml)

附錄二、牙刷倒置菌落數紀錄表

牙刷放置方式	試管稀釋濃度	取樣毫升數	最後稀釋濃度	菌落數	樣本原始濃度 (CFU/ml)
倒置	2×10^{-1}	0.1	2×10^2	34	6.8×10^3
	2×10^{-1}	0.1	2×10^2	81	1.62×10^4
	2×10^{-1}	0.1	2×10^2	25	5.0×10^3
	2×10^{-1}	0.1	2×10^2	20	4.0×10^3
	2×10^{-1}	0.1	2×10^2	31	6.2×10^3

平均樣本原始濃度： 3.82×10^4 (CFU/ml)

附錄三、刷牙前培養於 TSA 培養基之菌落數紀錄表

稀釋濃度	取樣毫升數	最後稀釋濃度	菌落數	樣本原始濃度(CFU/ml)
原液	0.1	10^1	TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
10^{-1}	0.1	10^2	224	2.24×10^4
			135	1.35×10^4
			232	2.32×10^4
			234	2.34×10^4
			226	2.26×10^4
			250	2.5×10^4
			178	1.78×10^4
			196	1.96×10^4
			100	1.0×10^4
			10^{-2}	0.1
22				
0				
21				
21				
24				
17				
15				
11				
10^{-3}	0.1	10^4		
			1	
			2	
			0	
			8	
			11	
			0	
			3	
			5	

平均樣本原始濃度： 1.97×10^4 (CFU/ml)

附錄四、刷牙前培養於 LA 培養基之菌落數紀錄表

稀釋濃度	取樣毫升數	最後稀釋濃度	菌落數	樣本原始濃度(CFU/ml)
原液	0.1	10^1	TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			148	
			170	
			107	
			TNTC	
			TNTC	
10^{-1}	0.1	10^2	30	3.0×10^3
			37	3.7×10^3
			27	2.7×10^3
			128	1.28×10^4
			71	7.1×10^3
			30	3.0×10^3
			55	5.5×10^3
			44	4.4×10^3
			40	4.0×10^3
			TNTC	
10^{-2}	0.1	10^3	0	
			20	
			1	
			8	
			1	
			2	
			0	
			11	
			15	
			TNTC	
10^{-3}	0.1	10^4	1	
			2	
			0	
			1	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			3	

平均樣本原始濃度： 5.13×10^3 (CFU/ml)

附錄五、刷牙後培養於 TSA 培養基之菌落數紀錄表

稀釋濃度	取樣毫升數	最後稀釋濃度	菌落數	樣本原始濃度(CFU/ml)
原液	0.1	10^1	0	
			1	
			2	
			0	
			44	
			1	
			27	
			3	
			19	
10^{-1}	0.1	10^2	0	0
			1	1.0×10^2
			2	2.0×10^2
			0	0
			0	0
			1	1.0×10^2
			9	9.0×10^2
			1	1.0×10^2
			10	1.0×10^3
10^{-2}	0.1	10^3	0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			9	
			0	
10^{-3}	0.1	10^4	1	
			0	
			3	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	

平均樣本原始濃度： 2.66×10^2 (CFU/ml)

附錄六、刷牙後培養於 LA 培養基之菌落數紀錄表

稀釋濃度	取樣毫升數	最後稀釋濃度	菌落數	樣本原始濃度(CFU/ml)
原液	0.1	10^1	0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			1	
			0	
			0	
			0	
			0	
10^{-1}	0.1	10^2	0	0
			0	0
			1	1.0×10^2
			0	0
			0	0
			1	1.0×10^2
			0	0
			0	0
			0	0
			0	0
10^{-2}	0.1	10^3	0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			1	
			0	
			0	
10^{-3}	0.1	10^4	0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	

平均樣本原始濃度： 2.2×10 (CFU/ml)

附錄七、漱口前培養於 TSA 培養基之菌落數紀錄表

稀釋濃度	取樣毫升數	最後稀釋濃度	菌落數	樣本原始濃度(CFU/ml)
原液	0.1	10^1	TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			293	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
10^{-1}	0.1	10^2	147	1.47×10^4
			145	1.45×10^4
			108	1.08×10^4
			148	1.48×10^4
			132	1.32×10^4
			165	1.65×10^4
			199	1.99×10^4
			235	2.35×10^4
			224	2.24×10^4
			10^{-2}	0.1
7				
1				
1				
13				
29				
3				
23				
17				

平均樣本原始濃度： 1.67×10^4 (CFU/ml)

附錄八、漱口前培養於 LA 培養基之菌落數紀錄表

稀釋濃度	取樣毫升數	最後稀釋濃度	菌落數	樣本原始濃度(CFU/ml)
原液	0.1	10^1	TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
10^{-1}	0.1	10^2	30	3.0×10^3
			135	1.35×10^4
			96	9.6×10^3
			74	7.4×10^3
			125	1.25×10^4
			59	5.9×10^3
			121	1.21×10^4
			100	1.0×10^4
			142	1.42×10^4
			10^{-2}	0.1
11				
7				
1				
17				
4				
5				
0				
3				

平均樣本原始濃度： 9.8×10^3 (CFU/ml)

附錄九、漱口後培養於 TSA 培養基之菌落數紀錄表

稀釋濃度	取樣毫升數	最後稀釋濃度	菌落數	樣本原始濃度(CFU/ml)
原液	0.1	10^1	TNTC	
			154	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
10^{-1}	0.1	10^2	22	2.2×10^3
			120	1.2×10^4
			58	5.8×10^3
			141	1.41×10^4
			67	6.7×10^3
			160	1.6×10^4
			63	6.3×10^3
			99	9.9×10^3
			167	1.67×10^4
10^{-2}	0.1	10^3	0	
			0	
			0	
			2	
			4	
			11	
			9	
			8	
			13	

平均樣本原始濃度： 9.96×10^3 (CFU/ml)

附錄十、漱口後培養於 LA 培養基之菌落數紀錄表

稀釋濃度	取樣毫升數	最後稀釋濃度	菌落數	樣本原始濃度(CFU/ml)
原液	0.1	10^1	32	
			78	
			102	
			138	
			7	
			89	
			97	
			234	
			148	
			10^{-1}	
0	0			
12	1.2×10^3			
2	2.0×10^2			
22	2.2×10^3			
38	3.8×10^3			
13	1.3×10^3			
23	2.3×10^3			
35	3.5×10^3			
10^{-2}	0.1	10^3		0
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	

平均樣本原始濃度： 1.86×10^3 (CFU/ml)

附錄十一、刷牙漱口前培養於 TSA 培養基之菌落數紀錄表

稀釋濃度	取樣毫升數	最後稀釋濃度	菌落數	樣本原始濃度(CFU/ml)
原液	0.1	10^1	TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
10^{-1}	0.1	10^2	191	1.91×10^4
			133	1.33×10^4
			263	2.63×10^4
			179	1.79×10^4
			142	1.42×10^4
			227	2.27×10^4
			196	1.96×10^4
			201	2.01×10^4
			132	1.32×10^4
			10^{-2}	0.1
25				
20				
37				
11				
9				
14				
27				
37				
10^{-3}	0.1	10^4		
			4	
			0	
			0	
			6	
			1	
			3	
			2	
			0	
			0	

平均樣本原始濃度： 1.85×10^4 (CFU/ml)

附錄十二、刷牙漱口前培養於 LA 培養基之菌落數紀錄表

稀釋濃度	取樣毫升數	最後稀釋濃度	菌落數	樣本原始濃度(CFU/ml)
原液	0.1	10^1	TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			234	
			TNTC	
			TNTC	
			TNTC	
			207	
			293	
10^{-1}	0.1	10^2	113	1.13×10^4
			109	1.09×10^4
			116	1.16×10^4
			149	1.49×10^4
			73	7.3×10^3
			108	1.08×10^4
			143	1.43×10^4
			136	1.36×10^4
			98	9.8×10^3
10^{-2}	0.1	10^3	7	
			18	
			0	
			4	
			12	
			21	
			9	
			10	
			16	
10^{-3}	0.1	10^4	0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			1	
			0	
			1	
		3		

平均樣本原始濃度： 1.16×10^4 (CFU/ml)

附錄十三、刷牙漱口後培養於 TSA 培養基之菌落數紀錄表

稀釋濃度	取樣毫升數	最後稀釋濃度	菌落數	樣本原始濃度(CFU/ml)
10 ⁻¹	0.1	10 ²	4	4.0×10 ²
			21	2.1×10 ³
			18	1.8×10 ³
			38	3.8×10 ³
			7	7.0×10 ²
			23	2.3×10 ³
			0	0
			3	3.0×10 ²
			1	1.0×10 ²
			10 ⁻²	0.1
14				
13				
9				
7				
0				
1				
0				
0				
0				
10 ⁻³	0.1	10 ⁴	0	
			8	
			2	
			2	
			0	
			1	
			0	
			0	
			0	
			1	

平均樣本原始濃度：1.27×10³ (CFU/ml)

附錄十四、刷牙漱口後培養於 LA 培養基之菌落數紀錄表

稀釋濃度	取樣毫升數	最後稀釋濃度	菌落數	樣本原始濃度(CFU/ml)
10^{-1}	0.1	10^2	2	2.0×10^2
			0	0
			4	4.0×10^2
			7	7.0×10^2
			11	1.1×10^3
			6	6.0×10^2
			13	1.3×10^3
			5	5.0×10^2
			9	9.0×10^2
			10^{-2}	0.1
0				
0				
2				
7				
0				
1				
0				
3				
10^{-3}	0.1	10^4		
			5	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	

平均樣本原始濃度： 6.33×10^2 (CFU/ml)

【評語】 030308

研究刷牙對口腔菌的影響，有簡單的構想，結果也如預期。數據的表現法相當正確，但是作者不了解為何如此做，可見得對老師的指導並沒有完全吸收。