

中華民國第 55 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

親愛的，微生物把保麗龍分解了！

學校名稱：新北市私立竹林高級中學

作者： 高二 董冠群 高二 莊智宇 高一 李岱瑾	指導老師： 顏嘉怡
---	------------------

關鍵詞：保麗龍、土壤、微生物

摘要

保麗龍是環境中不易分解的汙染物，本實驗將自大麥蟲腸道、麵包蟲腸道、土壤與有機堆肥分離出十三株具有分解保麗龍潛力菌株(ZM1, ZM2, ZM3, TM1, TM2, TM3, S1, S2, S3, S4, OF1, OF2 及 OF3)進行分解保麗龍測試。試驗結果顯示，液體培養中，靜置培養以菌株 TM3 有最好分解效果；震盪培養以 T all 及 OF2 有最好分解效果。而固體培養中，無法看見保麗龍明顯分解。進一步，將保麗龍拿出利用結晶紫染色，確認菌株附著在保麗龍上。同時將菌株撒入模擬環境中，觀察保麗龍分解情形，結果土壤添加有機肥環境較適合分解保麗龍，其中以菌株組合(S/OF)分解效果最為顯著 ($P < 0.05$)。最後進行菌種鑑定，所分離出具有分解保麗龍潛力菌屬，主要分為八個屬，分別為 Bacillus (ZM2), Citrobacter(OF1), Myroides(S4), Ochrobactrum(S1, S3 及 OF3), Proteus(ZM3 及 TM2), Providencia(S2), Pseudomonas(TM3 及 OF2)及 Rhodococcus (TM1 及 ZM1) 屬。

壹、研究動機

保麗龍是由聚苯乙烯發泡製成，在過去的觀念中，我們一直認為保麗龍是難以處理的汙染物，不但掩埋無法有效分解，而且不完全燃燒還會釋出苯乙烯單體、多苯環等有毒物質，長期累積恐對人體產生致癌風險。

之前國際科展作品結果顯示，利用厭氧環境，所分離的麵包蟲腸道的菌株(紅菌)可以分解保麗龍(曾，2009)。本實驗室學長想要進一步研究紅菌體內酵素如何代謝保麗龍，因無法取得紅菌，所以利用分離菌株方法，分離出麵包蟲腸道與親緣關係相近之大麥蟲腸道中可能分解保麗龍的細菌(詹等，2012)。劉等(2013)也嘗試分離大麥蟲及麵包蟲腸道可能分解保麗龍的細菌。結果分離出的菌株雖然可以利用保麗龍生長，但保麗龍無明顯被分解。所以莊等(2014)改變分離菌株方法，利用兼性厭氧環境，分離大麥蟲(ZM)及麵包蟲(TM)腸道中可能可以分解保麗龍的菌株(ZM1, ZM2, ZM3, TM1, TM2 及 TM3)。

另本實驗室學長嘗試從污水處理廠中，分離可能分解保麗龍的細菌，結果分離出的菌株可以利用保麗龍生長，但保麗龍無明顯被分解(詹等，2012)。莊等(2014)嘗試先將保麗龍埋入多種環境(純土壤、太空包、有機堆肥、垃圾水等)，觀察保麗龍表面分解情形，再從土壤(S)與有機堆肥(OF)中分離可能可以分解保麗龍的菌株(S1, S2, S3, S4, OF1, OF2 及 OF3)。綜合以上幾個實驗，雖然依照國際科展中的條件進行篩菌及分解測試，但依舊無法看到保麗龍有明顯的分解，所以**分解保麗龍依舊是個值得探討的問題。**

延續莊等(2014)去年科展實驗結果，本實驗將分離出十三株可能可以分解保麗龍的菌株(ZM1, ZM2, ZM3, TM1, TM2, TM3, S1, S2, S3, S4, OF1, OF2 及 OF3)，進行液體分解保麗龍測試及固體分解保麗龍測試，觀察菌株生長情形，以確認十三株菌株分解保麗龍的能力。加上保麗龍是結構複雜的聚合物(含聚苯乙烯、發泡劑、黏著劑等)要代謝需要很多細菌共同協助，本實驗室學長(詹等，2013)嘗試先將保麗龍進行震盪萃取、熱萃取，結果發現不同菌株會利用不同的保麗龍萃取物生長，**所以我們也想探討將同一環境分離出的菌株混合培養是否會加速保麗龍分解。**

考慮到將來保麗龍要埋到自然土壤環境中分解，先在實驗室模擬將保麗龍球埋入自然環境並灑入不同菌株與菌株組合，找出最適合分解保麗龍的條件，為地球環保盡一份心力。

貳、目的

- 一、找出在液體分解保麗龍測試中，靜置培養和震盪培養分解保麗龍效果最顯著的菌株與菌株組合。
- 二、利用固體培養基比較菌株分解保麗龍的能力，並探討將菌株混合培養是否會有更好的分解效果。
- 三、模擬將菌株與菌株組合灑入各種自然環境，比較在何種條件下保麗龍有最佳的分解效果。
- 四、進行菌種鑑定，並分析菌株的類緣關係，找出最有可能分解保麗龍的菌株菌屬。

參、實驗器材

一、直徑 2 cm 保麗龍球與直徑 1 cm 保麗龍圓柱(瑞光儀器股份公司)。

(一)聚合反應式(圖 1)

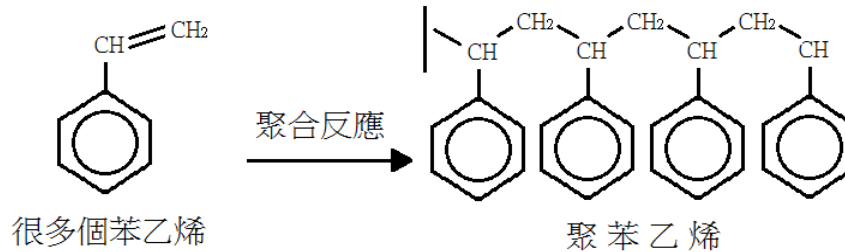


圖 1 聚苯乙烯聚合圖

(二)物理及化學性質

- 1.保麗龍是聚苯乙烯添加適量發泡劑，加工成內部多孔性結構而成，所得成品的密度低於原本的聚苯乙烯。
- 2.聚苯乙烯質地硬而脆，無色透明，可以和多種染料混合產生不同的顏色，而發泡聚苯乙烯(俗稱保麗龍)，具有吸音、隔音、隔熱等效果，近年來被大舉使用。
- 3.不易被強酸強鹼腐蝕。
- 4.聚苯乙烯的化學穩定性較差，溫度超過 75 到 95°C 會釋放出致癌物質。

二、試驗菌株

延續莊等(2014)去年科展，從大麥蟲(ZM)與麵包蟲(TM)腸道中所分離出可能可分解保麗龍的菌株(ZM1, ZM2, ZM3, TM1, TM2 及 TM3)、土壤(S)與有機堆肥(OF)中分離可能可以分解保麗龍的菌株(S1, S2, S3, S4, OF1, OF2 及 OF3)

表 1 實驗菌株來源

菌株來源		菌株編號	
麵包蟲腸道(<i>Tenebrio molitor</i> , TM)	TM1、TM2、TM3	T all(三株菌株混合培養)	ZM/TM(六株菌株組合)
大麥蟲腸道 (<i>Zophobas morio</i> , ZM)	ZM1、ZM2、ZM3	Z all(三株菌株混合培養)	
土壤環境 (Soil, S)	S1、S2、S3、S4	S all(四株菌株混合培養)	S/OF(七株菌株組合)
有機堆肥 (Organic Fertilizer, OF)	OF1、OF2、OF3	OF all(三株混合培養)	

三、分解測試藥品與器材

名稱	備註
16 g / 1 L Agar Powder	
0.2 g / 1 L MgSO ₄	購自 Nacalai tesque
2 g / 1 L NH ₄ H ₂ PO ₄	
25 g / 1 L LB broth	購自 Difco™
5 g / 1 L NaCl	購自 LAB-SCAN
Parafilm	購自 BEMIS
空培養皿	購自 ExtraGene

四、環境模擬試驗器材

名稱	成分	備註
盆栽	-	體積 250 mL
土壤	-	來源：校園
超音波洗淨器	-	購自天鵬儀器有限公司 型號：DC150
6 號透明夾鏈袋	-	購自 Zipper
有機肥	3.5% 全氮、3% 全磷酐、3% 全氧化鉀、1.5% 水溶性氧化鎂、65% 有機質，pH 6.0	廠牌：興農牌

五、革蘭氏染色藥品與觀察用具

名稱	備註
結晶紫 (Crystal violet)	
碘液 (Gram's Iodine)	購自東耀生物科技有限公司
沙紅 (Safranin)	
網路攝影機	購自愛比科技股份有限公司 型號：IPEVO P2V
電子目鏡	購自又鑫生物科技有限公司 型號：PMD-300 配合解剖、複式顯微鏡使用

六、菌種鑑定藥品與器材

名稱	備註
----	----

TE buffer	自行配置
TBE buffer	
Isoamyl Alcohol(IAA)	購自 Nacalai tesque
10% SDS	
CTAB	
12 µg/mL EtBr	購自 Sigma
Isopropanal	
10 mg/mL Proteinase K	
DNA marker(100 bp ladder)	
dNTPs	
6X Loading dye	購自 Thermo scientific
10X Taq buffer (20 mM MgCl ₂)	
10X Taq enzyme (5 U/µL)	
ddH ₂ O	-
Agarose	購自 Invitrogen
Dichloromethane	購自 LAB-SCAN
PCR 機器	型號 Applied Biosystem 2400
Primers	
27f (5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3')	參考 Jiang et al. (2006) 委託基龍米克斯公司訂製
1492r (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3')	
UVP BioDoc-it Imaging System	購自 UVP
95% 酒精	購自 SHIMAKYU
微量離心機	購自 Eppendorf 型號 Mini spin plus
迷你電泳槽及鑄膠器	購自 Embi Tec 型號 Run One™ Electrophoresis Cell

七、使用軟體與資料庫

名稱	備註
Mega	-
Microsoft office	-
National Center for Biotechnology Information	-
P2V	配合網路攝影機使用
R Project	-
View 7	配合 PMD-USB 電子目鏡使用

肆、研究方法

一、實驗架構圖

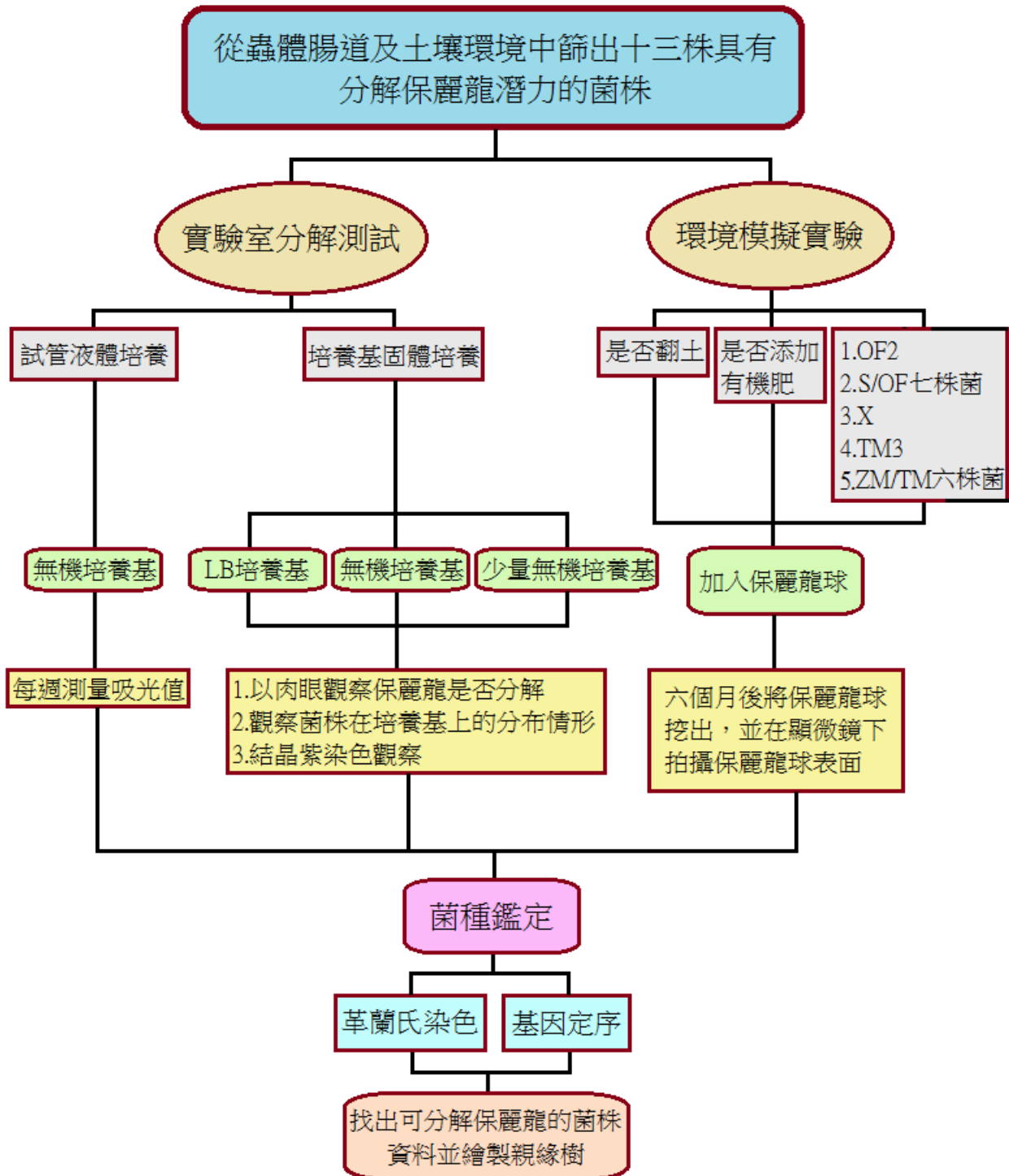


圖 2 本試驗架構圖

二、實驗步驟

(一)實驗室分解測試

液體培養分解保麗龍測試藉由測量菌液的吸光值來間接檢視菌株的生長情形，推測菌株與菌株組合是否可利用保麗龍；固體培養基則是以肉眼觀察保麗龍是否分解。

1.液體培養分解保麗龍測試(圖 3)

備妥滅過菌的試管並加入無機培養基，裁切大小相似之保麗龍塊與鋁箔紙片，在 75%酒精中浸泡 3 天滅菌後放入試管，將初始菌液的吸光值固定在 0.01，放入 27°C 恆溫培養箱培養三週，每組三重覆。每週測量試管中菌液的吸光值(OD600)，繪製成圖表且利用單因子變異數分析(One Way ANOVA)與 Multiple Comparison 比較各菌株與菌株組合的生長情形，顯著水準訂為 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。

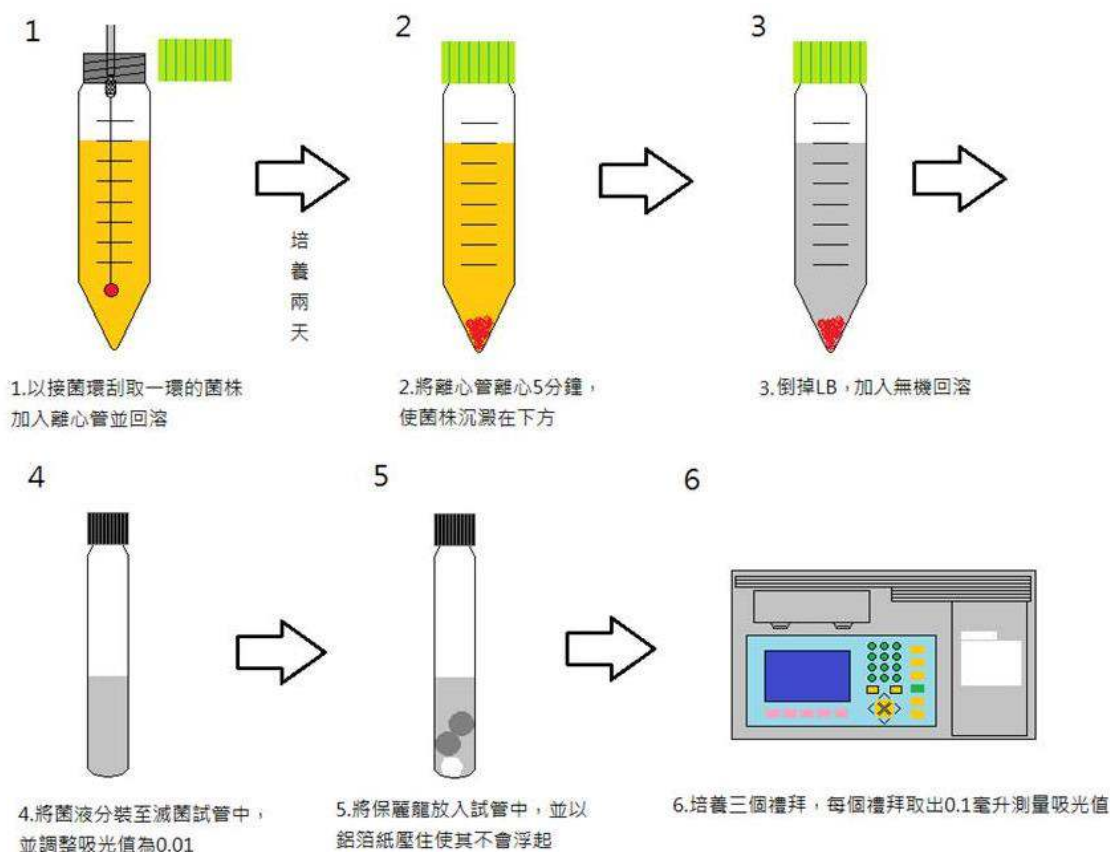


圖 3 液體培養分解保麗龍測試步驟示意圖

2.固體培養分解保麗龍測試

(1) LB 固體培養基及無機固體培養基分解保麗龍測試 (圖 4)

將各種菌株接入 LB 固體培養基及無機固體培養基，並在線上鋪上保麗龍後，分別在 27 °C 進行靜置及厭氧培養，每星期以肉眼觀察保麗龍有無明顯分解，實驗最後將保麗龍進行結晶紫染色後，利用網路攝影機進行拍照，以確認實驗期間保麗龍上確實有菌株附著。

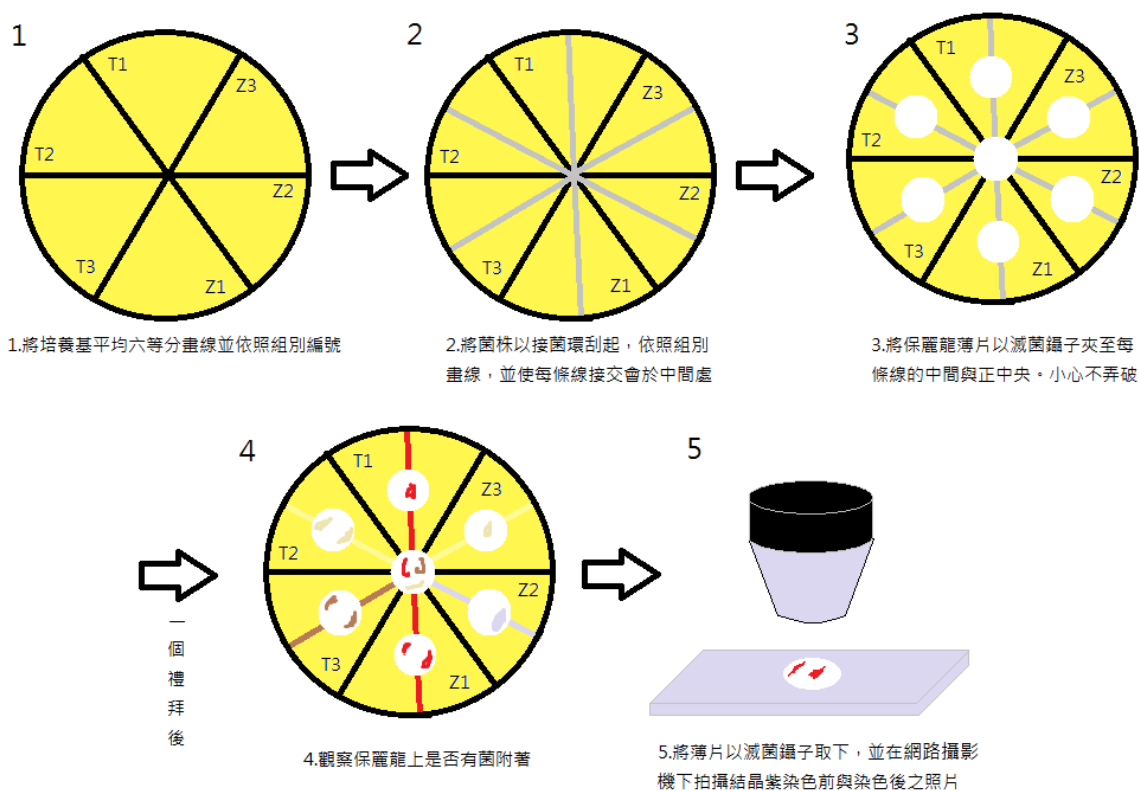


圖 4 LB 及無機固體培養基分解保麗龍測試步驟示意圖

(2) 少量無機培養基分解保麗龍測試(圖 5)

將菌液均勻塗抹到 LB 固體培養基，並在培養基上鋪上保麗龍後分別在 27 °C 進行靜置及厭氧培養。

確認菌株大量附著後，將保麗龍移到空培養基，在 27 °C 進行靜置及厭氧培養，並每星期滴入 0.2 mL 無機培養基，每兩天滴入 0.2 mL 無菌水，最後以肉眼觀察保麗龍有無明顯分解。

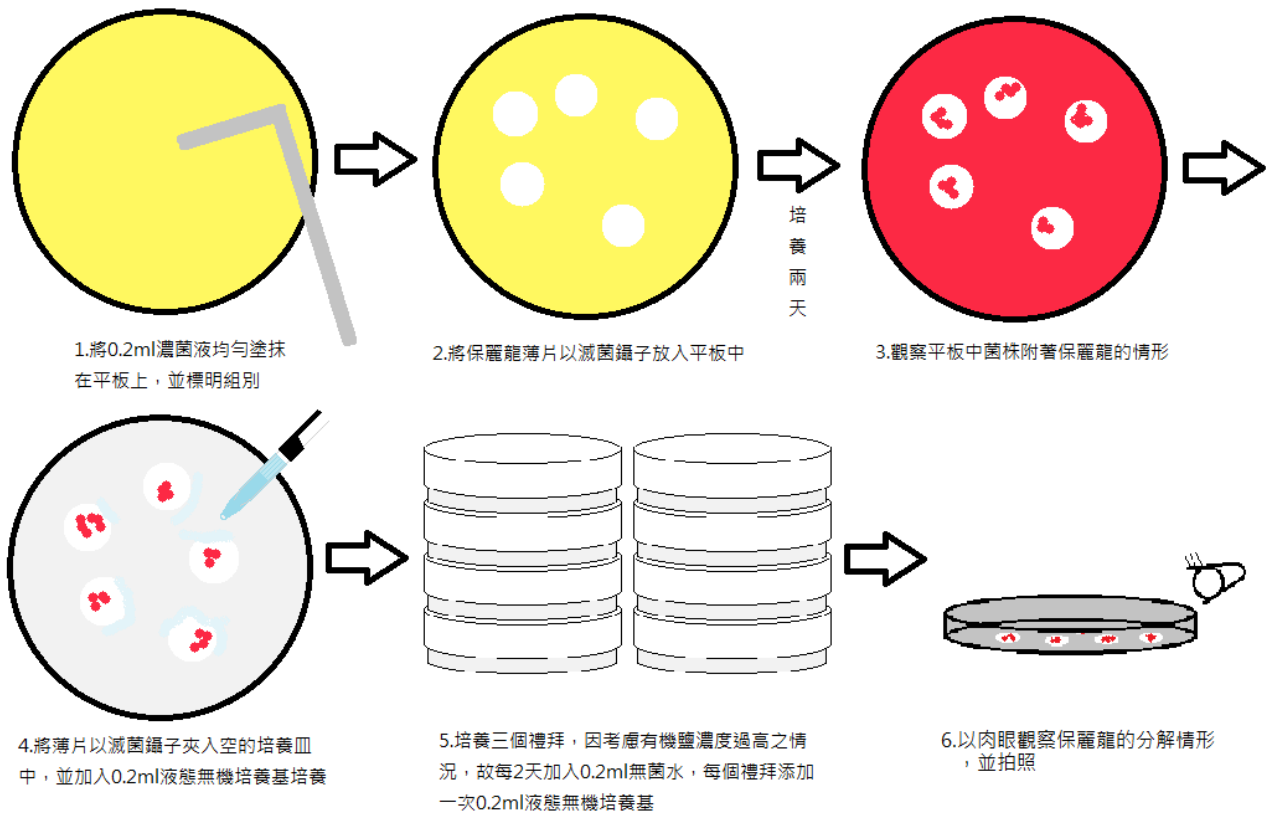


圖 5 少量無機培養基分解保麗龍測試步驟示意圖

(二)環境模擬實驗 (圖 6)

1. 利用盆栽模擬各種自然環境，環境溫度約為 25 °C，包括：

- (1) 土壤成份分為純土壤(簡稱為 S)及有機肥加土壤(簡稱為 O)，以比較土壤中純土壤環境和含有機堆肥環境之差異。
- (2) 是否定期翻土，以翻土設定為好氧(簡稱為 A)、不翻土設定為厭氧(簡稱為 AN)。
- (3) 加入不同菌株或菌株組合，包含菌株 OF2、土壤與有機肥菌株組合(簡稱為 S/OF)、不添加任何菌株(簡稱為 X)、菌株 TM3、蟲體腸道菌株組合(簡稱為 ZM/TM)，並將菌液吸光值調整到 1.000。
- (4) 另外將土壤與有機肥進行 121°C、1.2 kg/cm² 滅菌 15 分鐘，隔日再進行一次滅菌以確保土壤與有機肥滅菌完全。之後，在無菌空間中埋入保麗龍球，6 個月後挖出做為無菌對照組；將保麗龍球泡入醋酸中，6 個月後取出做為有機酸對照組。

(5)各組別名稱對照

表 2 各組別代號名稱對照

好氧處理	A	厭氧處理	AN
土壤中添加有機肥	O	純土壤	S

舉例如：AO-X 則表示掩埋保麗龍環境為翻土處理且土壤中添加有機肥，其中未加入任何菌株。

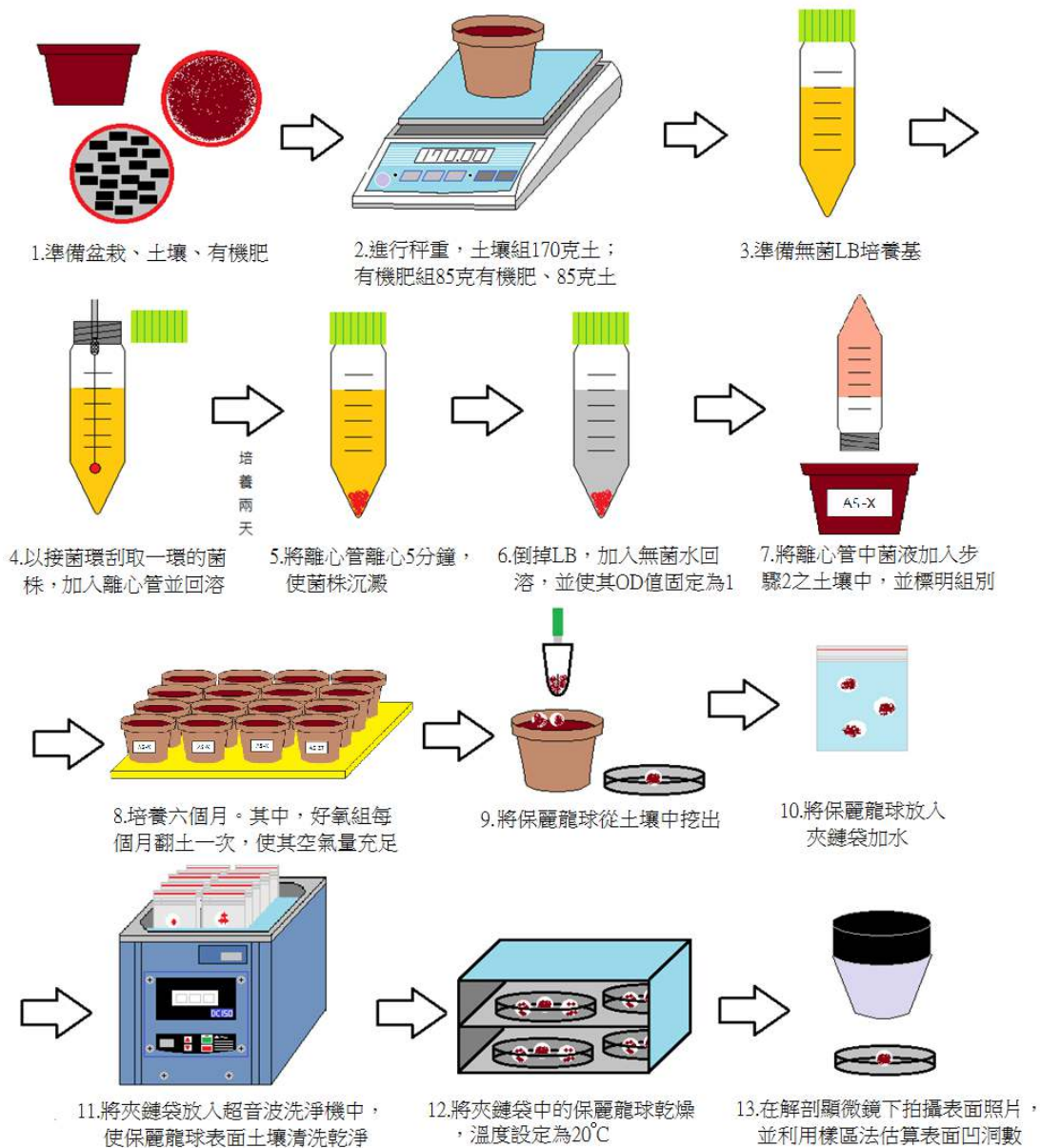


圖 6 環境模擬試驗步驟示意圖

2.每個盆栽中加入三顆保麗龍，及土壤 170 克或土壤 85 克加有機肥 85 克，並定期澆

水使土壤濕度保持適中，六個月後將保麗龍挖出，經超音波洗淨機洗淨後，放在解剖顯微鏡下，以 80X 拍攝其表面。最後利用樣區法估算單位面積下保麗龍的表面洞數，並比較不同的組別下保麗龍表面的分解情形。

(1) 定義保麗龍表面洞數：

將拍攝的保麗龍球照片清楚的部分分為九區後，插入 10X10 的網格 (如圖 7)，當一格網格中有一半以上是黑點時，將其定義為一個洞。

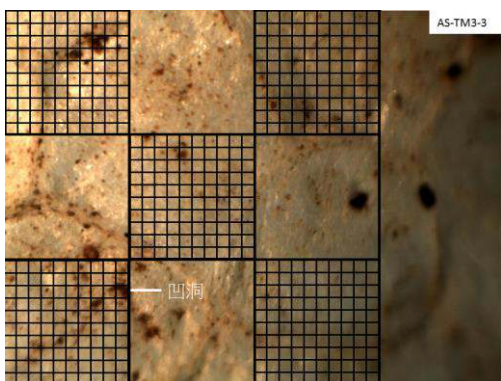


圖 7 隨機取樣保麗龍表面示意圖

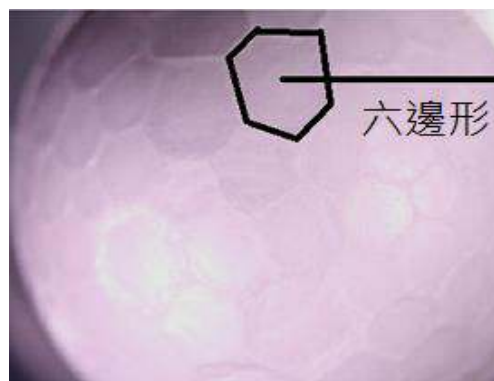


圖 8 保麗龍球表面六邊形

(2) 樣區法做法：

將保麗龍球照片清楚的部分分為九區後，固定選五區(如圖 7)，將五區洞數平均後，乘以 9 作為整張照片的洞數。

(3) 定義單位面積

一顆保麗龍球的表面由大約 192 個六邊形(如圖 8)組成，一個六邊形大約有 6.28 個 10X10 網格，保麗龍球的半徑為 1，由球體表面積公式可得保麗龍球表面積為

$$4\pi \cdot \text{一個 } 10 \times 10 \text{ 網格面積} : \frac{4\pi}{192 \times 6.28} \text{ cm}^2 \approx \frac{1}{96} \text{ cm}^2$$

3. 統計分析利用單因子變異數分析(One Way ANOVA)與 Multiple Comparison 比較不同組別保麗龍表面的差異，顯著水準訂為 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。

(三)菌種鑑定

1.革蘭氏染色

接菌環將菌株加水塗抹在玻片上，進行熱固定後，分別滴上結晶紫、碘液、脫色液、沙紅，各染色 1 分鐘後，再用蒸餾水順著玻片沖洗，最後滴上一滴鏡油，先在 400X 下觀察，確定菌株在視野中央，最後在 1000X 的光學複式顯微鏡下觀察，並拍攝菌株。

2.菌種鑑定與親緣關係比較

(1)PCR(聚合酶連鎖反應)

將 4 μL 的目標 DNA (30 $\text{ng}/\mu\text{L}$)、2 μL 的 10 μM 引子 1492r、2 μL 的 10 μM 引子 27f、 2 μL 的 10 μM dNTP、5 μL 的 10X Buffer、0.6 μL 的 Taq enzyme、34.4 μL 的 ddH₂O，總體積 50 μL 加入微量離心管內。

抽取分解保麗龍的菌株 DNA 後，接著進行 PCR 反應，將微量離心管放入 PCR 儀器(Applied Biosystem 2420)中，PCR 反應條件為 94°C, 5 分鐘 1 個循環；94°C, 1 分鐘、55°C, 1 分鐘、72°C, 1.5 分鐘共 30 循環；72°C, 2 分鐘 1 個循環(Hiraishi, 1992)。PCR 反應後，進行 PCR 產物電泳分析，以確認目標 DNA 片段的產物及大小是否正確。

(2)將確定的 PCR 產物片段送至陽明基因體中心，利用雙去氧核苷酸終止法定序後，將定序結果與 NCBI 資料庫比對類緣關係，最後利用 MEGA6 繪製類緣關係樹 (Neighbor Joining)。

伍、結果

一、實驗室分解測試

(一)液體培養分解保麗龍測試：

- 1.每週測量靜置培養的各菌株吸光值結果(圖 9 中 a)，經 ANOVA 分析，13 株菌株與 4 組菌株組合(Z all, T all, S all 及 OF all)吸光值在第 7、14 天有極顯著差異 ($P < 0.01$)，第 21 天有顯著差異($P < 0.05$)，進一步以 Multiple Comparison 分析後得知，**菌株 TM3 在第 7 天及第 14 天與其他組有最明顯的差異。**
- 2.每週測量震盪培養的各菌株吸光值結果(圖 9 中 b)，經 ANOVA 分析，13 株菌株與 4 組菌株組合(Z all, T all, S all 及 OF all)吸光值在第 7、21 天有極顯著差異 ($P < 0.01$)，第 14 天有顯著差異($P < 0.05$)，進一步以 Multiple Comparison 分析後得知，**T all 菌株組合在第 7 天與其他組有最明顯的差異；菌株 OF2 在第 21 天與其他組有最明顯的差異。**

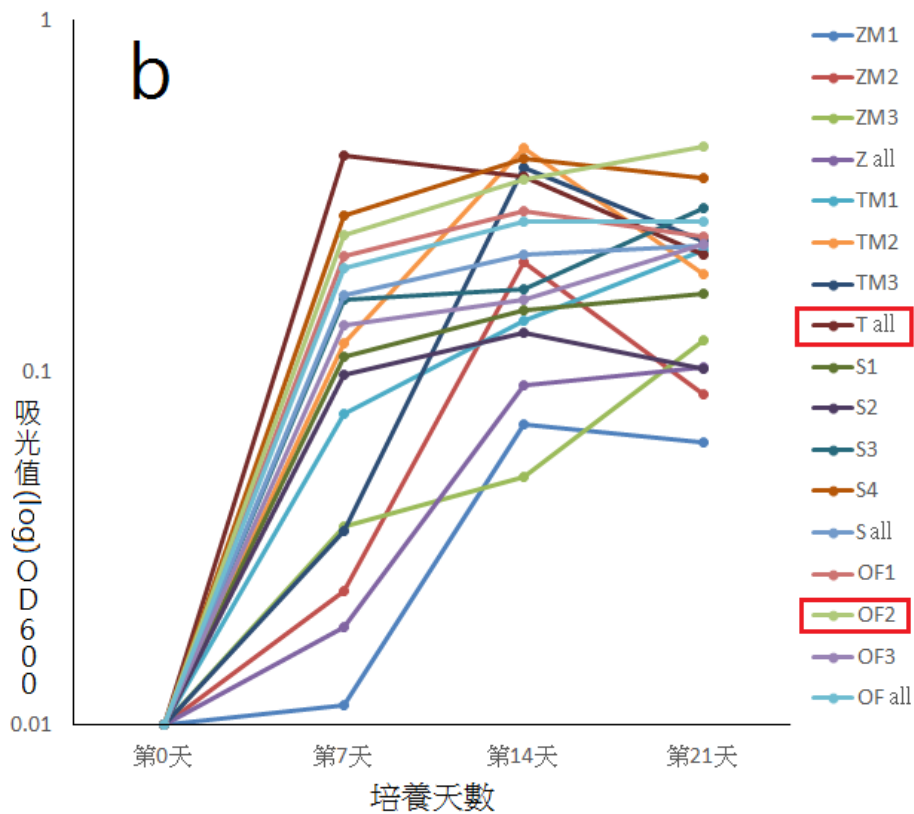
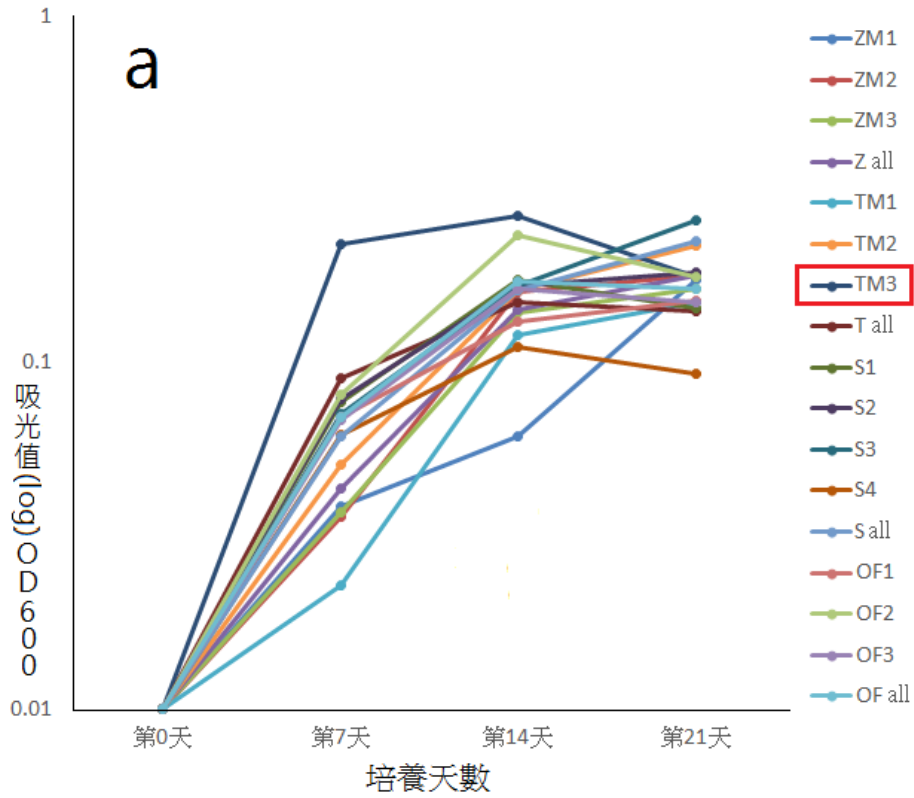


圖 9 十三株菌株與四組菌株組合進行靜置(a)及震盪(b)的液體培養分解保麗龍測試結果

註： 每組以不加入保麗龍的菌株為對照組，其 OD 值未上升

(二)固體培養分解保麗龍測試

1.將保麗龍薄片放入固體培養基中，27°C培養一個星期後，無論靜置或厭氧培養，肉眼依舊無法看見保麗龍明顯的分解(圖 10 及 11)。

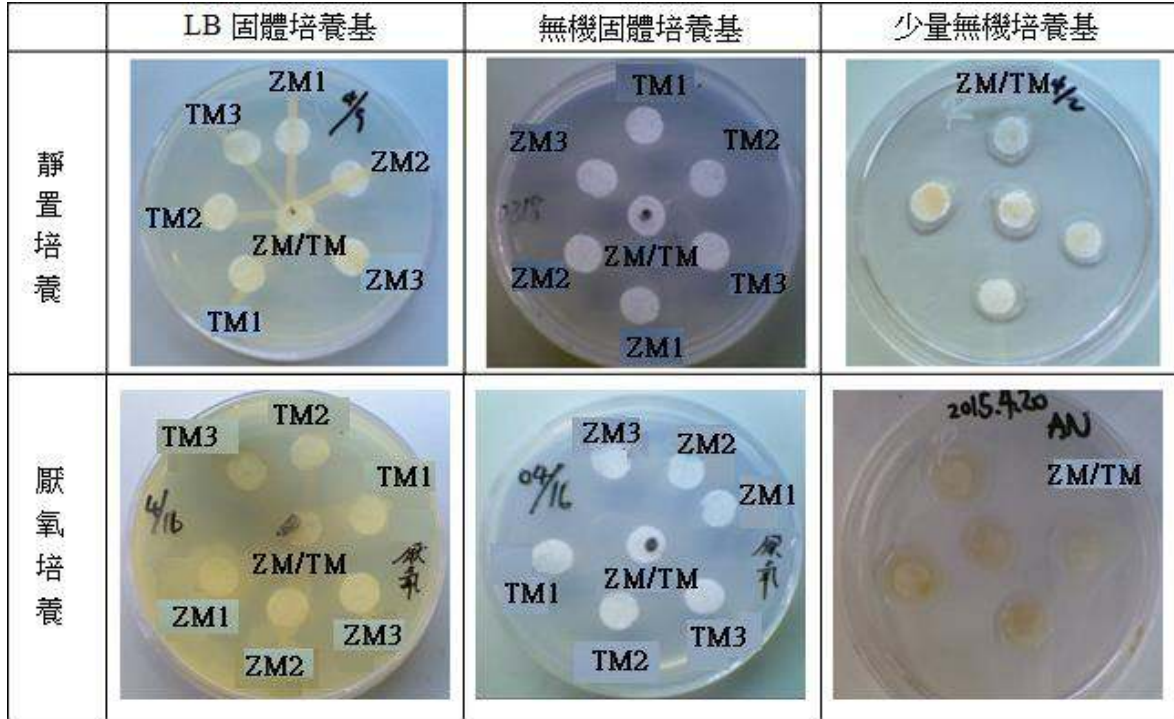


圖 10 蟲體腸道菌株在不同固體培養基(LB、無機、少量無機)下的生長情形

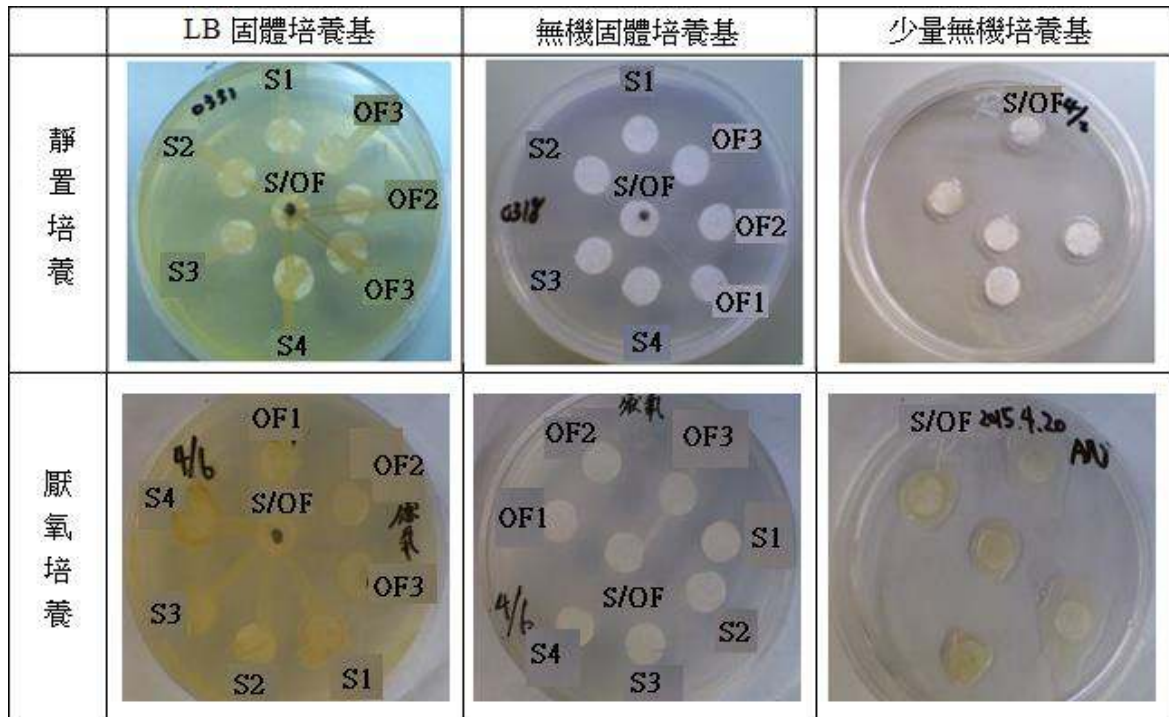


圖 11 土壤環境菌株在不同固體培養基(LB、無機、少量無機)下的生長情形

2.將保麗龍進行結晶紫染色後，結果顯示保麗龍上確實有菌株附著(圖 12)。

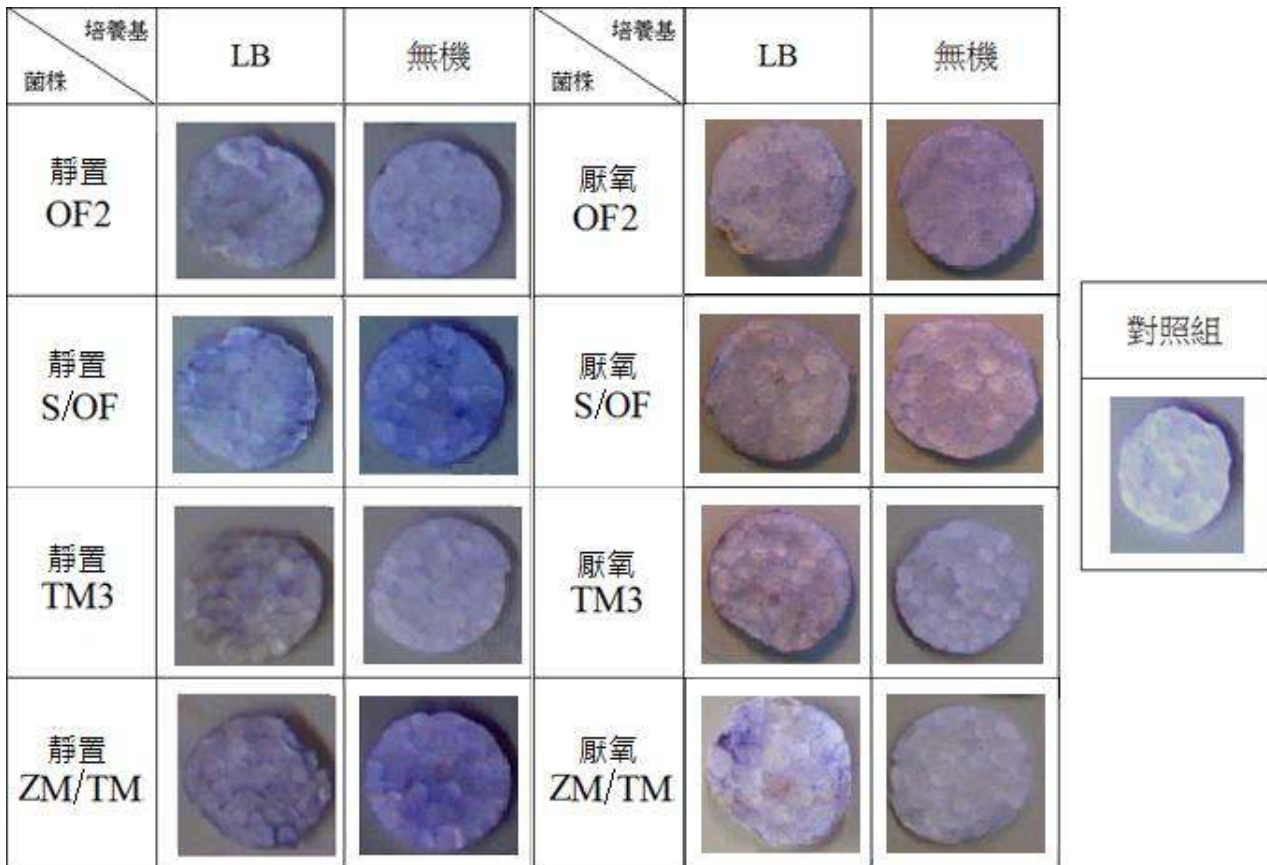


圖 12 將固體培養基中的保麗龍進行結晶紫染色

註：將無菌保麗龍加水並進行熱固定，以結晶紫染色後再用清水清洗以作為對照組

二、環境模擬實驗

將保麗龍埋入各種模擬自然環境中，六個月後挖出，在 80X 解剖顯微鏡下拍攝(圖 13)，將保麗龍利用樣區法估算，並利用 ANOVA 進行統計分析，比較在單位面積下保麗龍的表面洞數(圖 14)。

- (一)純土壤組有定期翻土(AS)經統計分析後，保麗龍表面洞數有顯著差異($P < 0.05$)，將 AS 進一步以 Multiple Comparison 分析後得知 OF2 與 X 兩組有顯著差異($P < 0.05$)(圖 14 A)。
- (二)純土壤組不翻土(ANS)經過統計分析後，保麗龍表面洞數沒有差異($P > 0.05$)，在土壤中灑入不同菌株對於分解保麗龍沒有太大影響(圖 14B)。
- (三)土壤添加有機肥組有定期翻土(AO)經過統計分析後，保麗龍表面洞數有極顯著差異($P < 0.01$)。將 AO 進一步以 Multiple Comparison 分析後得知 X 及 OF2 兩組與 TM3；S/OF 菌株組合與 ZM/TM 菌株組合有顯著差異($P < 0.05$)，S/OF 菌株組合與 TM3 組有極顯著差異($P < 0.01$)(圖 14C)。
- (四)土壤添加有機肥組不翻土(ANO)經過統計分析後，有極顯著差異($P < 0.01$)，將 ANO 進一步以 Multiple Comparison 分析後得知 OF2 與 TM3 組有顯著差異($P < 0.05$)，OF2 與 ZM/TM 菌株組合；S/OF 菌株組合、X 組與 TM3 組、ZM/TM 菌株組合都有極顯著差異($P < 0.01$)(圖 14D)。

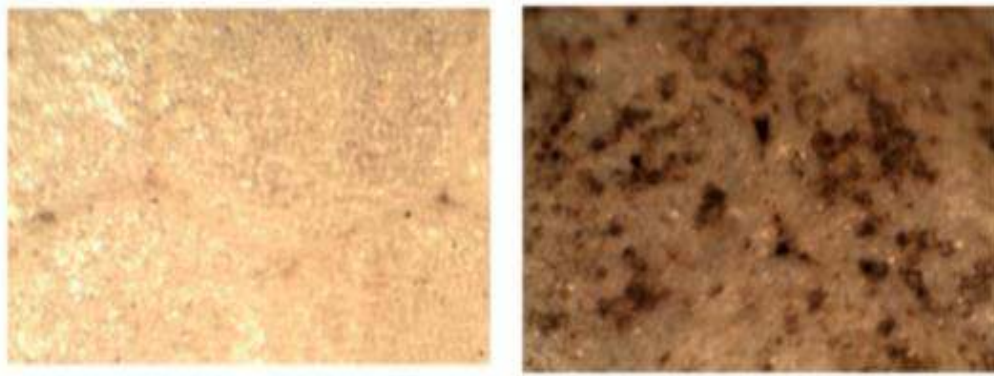


圖 13 埋在土樣六個月後將保麗龍挖出之表面情形

註：完全無菌有機土(左)與 AO-OF2(右).經超音波洗淨機洗淨後，放在解剖顯微鏡 80X 下拍攝

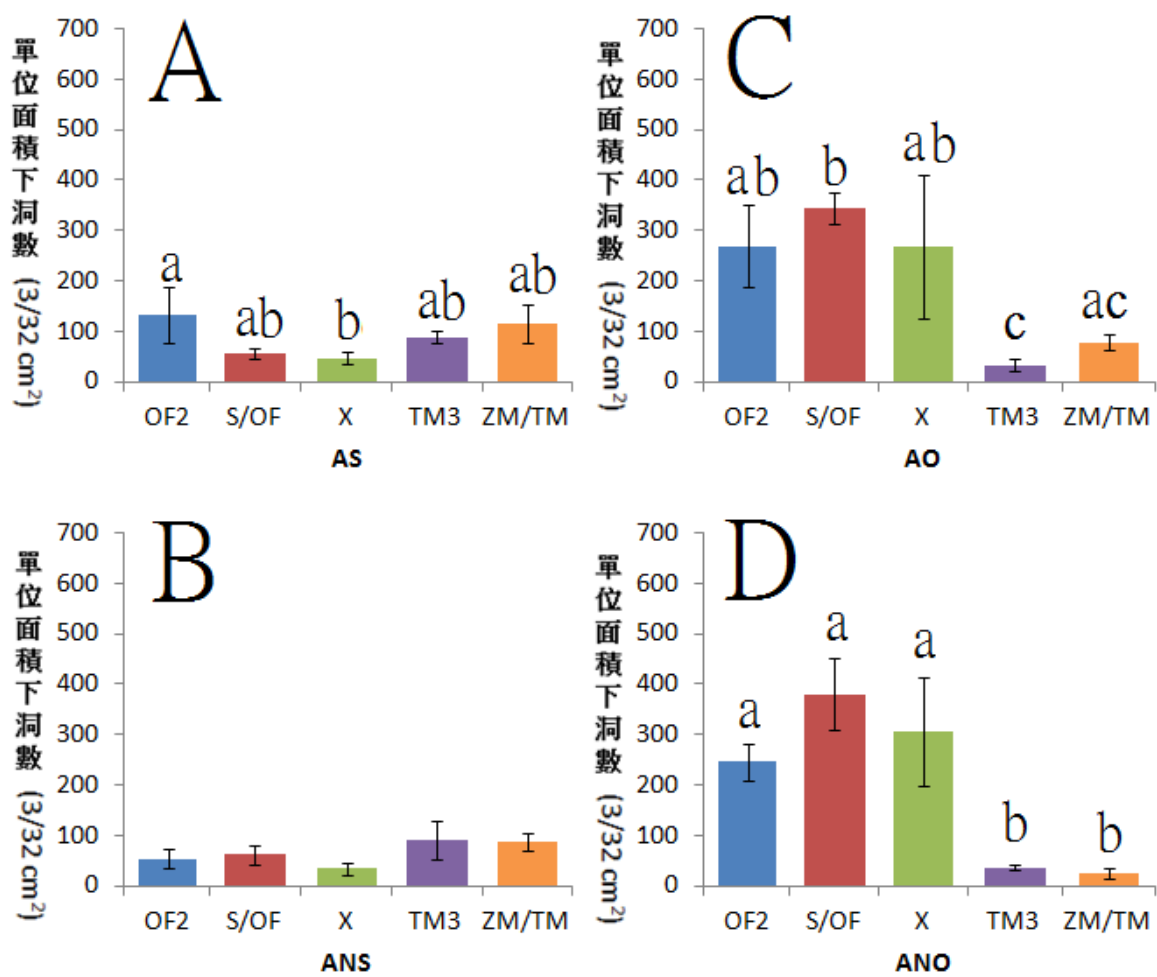


圖 14 實驗菌株在各種模擬自然環境中保麗龍表面凹洞數比較圖

- 註：1.我們將保麗龍放進醋酸中，同時也將保麗龍埋進無菌土壤或無菌有機肥的環境，保麗龍表面皆沒有凹洞
 2.組別：無菌水-X；菌株-TM3；蟲體腸道菌株組合-ZM/TM；菌株-OF2；有機肥菌株組合-S/OF
 3.處理:翻土-A；不翻土-AN、環境:純土壤-S；土壤添加有機肥-O、以樣區法估算表面凹洞數
 4.若上方英文代號相同，則代表在 Multiple Comparison 分析下 $P > 0.05$ ，無差異；若上方英文代號不同，則代表在 Multiple Comparison 分析下 $P < 0.05$ ，有顯著差異

三、菌種鑑定

(一)革蘭氏染色

由革蘭氏染色結果(圖 15)得知十三株菌中有三株為 G(+), 十株為 G(-)。

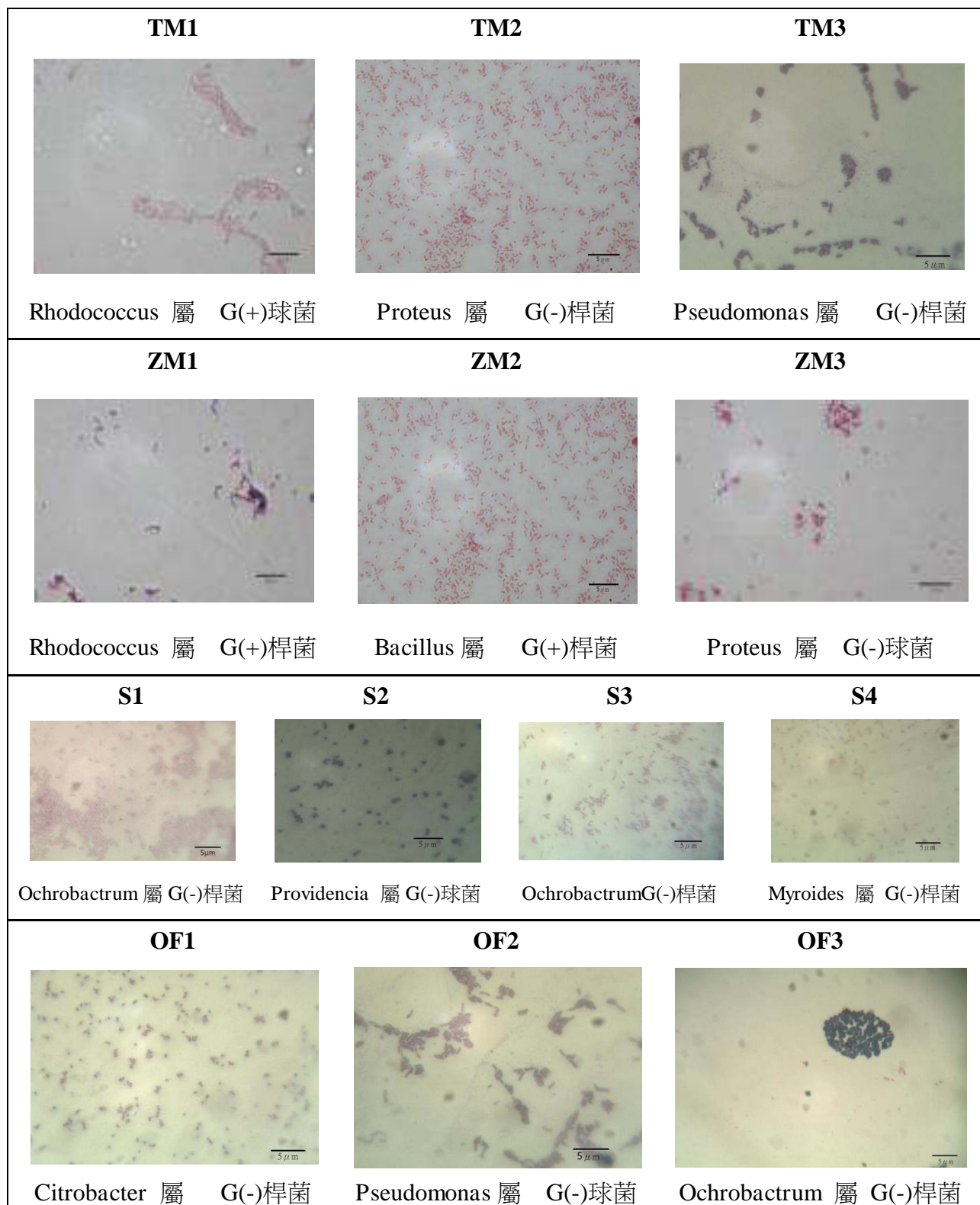


圖 15 本試驗所分離出十三株菌株革蘭氏染色結果

(二) 16S rRNA 基因比對與類緣關係比較

將 ZM1, ZM2, ZM3, TM1, TM2, TM3, S1, S2, S3, S4, OF1, OF2 及 OF3 與 NCBI 的資料庫中比對其他菌株的 16S rRNA 基因與編號(accession number) : *Ochrobactrum anthropi* strain ATCC 49188, NR_074243 ; *Providencia vermicola* strain OP1, NR_042415 ; *Myroides odoratimimus* strain CCUG 39352, NR_042354 ; *Citrobacter koseri* strain LMG 5519, NR_117751 ; *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1, NR_074828 ; *Rhodococcus rhodochrous* strain DSM 43241, NR_118621 ; *Proteus mirabilis* strain HI4320, NR_074898 ; *Bacillus anthracis* strain Ames, NR_074453 。

由 16S rRNA 基因定序(圖 16)可推測,分離出可能具有分解保麗龍潛力的菌屬主要可分成八個屬包括 *Bacillus* (ZM2), *Citrobacter* (OF1), *Myroides* (S4), *Ochrobactrum* (S1, S3 及 OF3), *Proteus* (ZM3 及 TM2) , *Providencia* (S2), *Pseudomonas* (TM3 及 OF2)及 *Rhodococcus* 屬 (TM1 及 ZM1) 。

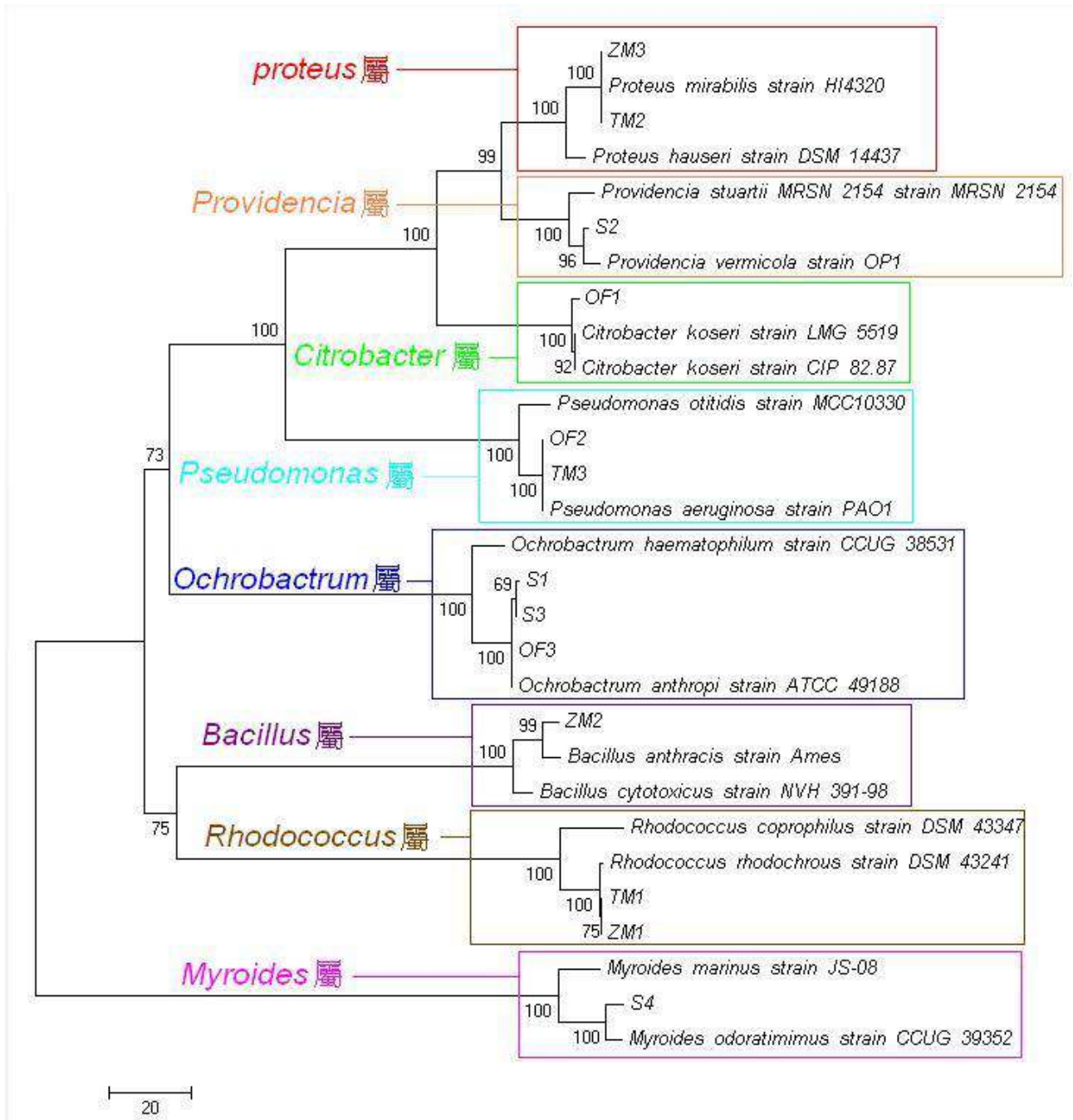


圖 16 十三株分解保麗龍之細菌類緣關係比較

註：1.構樹使用程式為 MEGA6，使用 Neighbor-Joining 法，Bootstrap 次數為 1000 次

2.參考使用序列來自 NCBI

陸、討論

一、液體培養分解保麗龍測試

之前科展作品中曾指出菌株會利用保麗龍的萃取物生長(詹等, 2013), 因此菌株吸光值上升可能是菌株利用保麗龍本身或是保麗龍的萃取物來生長, 也提到保麗龍的萃取物是含苯環的物質, 而分解苯環也是分解保麗龍的步驟之一, 因此我們認為, 菌液吸光值有上升的菌株應可能具有分解保麗龍的潛力。

二、環境模擬測試

(一)環境模擬實驗比照實驗室液體培養分解保麗龍測試, 以翻土作為震盪培養; 不翻土作為靜置培養, 來確認在實際運用上有無翻土是否會對保麗龍造成影響。

(二)添加有機堆肥的土壤環境比純土壤環境更利於保麗龍的分解, 推測有機肥可能有某種一般土壤環境中沒有的物質可刺激菌株分解保麗龍, 原因為何還需進一步的實驗探討。

(三)TM3 及 ZM/TM 菌株組合不論在是否翻土、是否添加有機肥的環境下保麗龍的分解都沒有顯著差異, 推測 TM3 及 ZM/TM 菌株組合是從蟲體腸道中分離出來的, 土壤環境可能並不適合 TM3 及 ZM/TM 菌株組合生長。

(四)從環境模擬實驗結果中(圖 14), 在環境方面, 土壤添加有機堆肥的環境(O)較適合分解保麗龍, 然而考慮到將來實際應用以靜置掩埋較為方便, 故優先考慮不翻土處理(AN); 在灑入的菌株或菌株組合方面, 不灑入菌株(X)環境中保麗龍表面洞數雖多但標準差較大, 而灑入 S/OF 組的環境保麗龍表面洞數最多且標準差較小, 推測灑入 S/OF 組的環境分解效果較不灑入菌株(X)穩定, 綜合以上應優先選擇在土壤添加有機堆肥不翻土的環境中灑入 S/OF 組菌株組合(ANO-S/OF)。

三、本試驗的菌種資料與之前科展及文獻資料之比較

(一)國際科展中指出所分離出紅菌可以分解保麗龍, 菌種鑑定為 *Proteus mirabilis*, 菌落沒有在培養基表面移動(swarming), 兼性厭氧菌(曾, 2009)。本實驗分離出 ZM3 及 TM2 同為 *Proteus mirabilis*, 菌落為淡白色, 且有在培養基表面移動(swarming), 兼性

厭氧菌。但除了曾(2009)國際科展分離出紅菌可以看到保麗龍有分解，其他實驗皆無法觀察到保麗龍有明顯分解現象(表 3)。

表 3 本試驗的菌種資料與之前科展結果比較

研究者	曾，2009	劉，2013	本實驗ZM3、TM2	本實驗ZM1、TM1
菌屬	<i>Proteus</i> 屬	—	<i>Proteus</i> 屬(註1)	<i>Rhodococcus</i> 屬(註2)
菌落顏色	紅	紅	白	紅
菌落表面移動 (swarming)	無	無	有	無
革蘭氏染色	陰性G(-)	陽性G(+)	陰性G(-)	陽性G(+)
菌株適存環境	兼性厭氧	—	兼性厭氧	兼性厭氧
實驗培養環境	厭氧培養	厭氧培養	靜置、震盪培養	靜置、震盪培養

註：1.參考資料 Belas et al. (1988)與 Philip (2005)

2.參考資料 Yoon et al. (2000)

(二)將其分離細菌方法進一步進行比較，國際科展作品利用厭氧環境分離蟲體腸道細菌，本實驗利用靜置環境分離蟲體腸道細菌，當時除了實驗限制，也參考了詹等(2012)科展進行厭氧培養分離蟲體腸道細菌，分離出可能可以分解保麗龍的細菌，其分解效果並不顯著，加上國際科展作品中分離出紅菌為 *Proteus* 屬，為兼性厭氧菌，所以將實驗設在靜置環境分離腸道細菌。我們也將 *Proteus* 屬的菌株在厭氧環境(ZM3、TM2)培養，確認菌落型態、顏色、分解保麗龍能力並不會因靜置或厭氧環境而改變。

(三) Ward et al.(2006)中有提到，綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)具有可將苯乙烯轉化成生物可分解塑膠 PHA 的能力，因此我們推測從有機肥中分離出的 *Pseudomonas* 屬的菌株最可能具有分解保麗龍的能力。

四、本實驗的創新與突破

在歷屆研究保麗龍分解的實驗中，之前研究都是以液體環境來觀察保麗龍分解，而除了液體環境，本實驗還多了固體環境的分解保麗龍測試，並以簡單的結晶紫染色確認保麗龍上有無菌株附著，是之前實驗都不曾有過的創舉，為保麗龍分解的研究開啟了新的一頁。

此外歷屆研究保麗龍分解的實驗中，都是在實驗室觀察保麗龍的分解，然而「科學探究」與「實際運用」間往往還有一段差距，所以我們設計了環境模擬實驗，實際將菌株灑入土壤中觀察保麗龍的分解情形。

歷屆研究保麗龍分解的實驗中，皆只有將具有分解保麗龍的菌株進行單獨培養，希望找到菌株能分解保麗龍，然而，本實驗室學長(詹等，2013)發現不同菌株會利用不同保麗龍的萃取物生長，保麗龍的分解也可能需要由許多不同菌株共同作用才能真正分解，因此本實驗首次將具有分解保麗龍潛力的菌株進行混合培養，探討將同一環境分離的菌株混合培養是否會加速保麗龍分解。

柒、結論

- 一、在液體分解保麗龍測試中，靜置培養下以菌株 **TM3** 有最好的分解效果；震盪培養下以 **Tall** 及 **OF2** 有最好的分解效果。
- 二、將固體無機培養基上的保麗龍進行結晶紫染色結果，菌株皆有附著在保麗龍上面，但所有固體培養基上的保麗龍以肉眼觀察皆無明顯分解。
- 三、環境模擬實驗中，土壤添加有機肥的環境較適合分解保麗龍，又以灑入 **S/OF** 組的分解效果最為顯著。
- 四、具有分解保麗龍潛力的菌屬主要可分成八個屬：*Bacillus* (ZM2), *Citrobacter*(OF1), *Myroides*(S4), *Ochrobactrum*(S1, S3 及 OF3), *Proteus*(ZM3 及 TM2), *Pseudomonas*(TM3 及 OF2), *Providencia*(S2)及 *Rhodococcus* 屬(TM1 及 ZM1)。

捌、未來展望

- 一、未來將探討可以分解保麗龍之菌株與其體內**酵素**代謝保麗龍的途徑。
- 二、未來將以 GC-MS 找出菌株分解保麗龍的代謝中間產物。
- 三、未來將離開實驗室，將菌株灑入自然土壤環境中來分解保麗龍。
- 四、未來將比較把保麗龍埋入不同深度土壤對分解效果是否有影響。
- 五、未來將找出有機肥環境能成為最適合分解保麗龍的環境之原因。
- 六、未來將觀察把保麗龍埋入自然環境中是否會對生態造成影響。
- 七、未來將確認環境模擬測試中各組別的菌相是否改變。

玖、參考資料

一、書籍部份

- 1.李國鏞、游若箴。1988。微生物學（初版）。華香園。臺北市。
- 2.施河、黃啟穎。2011。應用生物(初版)。南一書局。臺南市

二、科展報告與期刊

- 1.莊智宇、董冠群、藍辰屹。2014。新北市 102 學年度中小學科學展覽會作品說明書<化龍三重奏-分解萬年垃圾保麗龍>
- 2.曾依晴。2009。臺灣國際科學展覽會優勝作品<從麵包蟲體內分離出可分解保麗龍之菌株>
- 3.詹鈞年、謝典儒、劉則偉。2013。新北市 101 學年度中小學科學展覽會作品說明書<大解密—分解保麗龍細菌生理研究>
- 4.詹鈞翔、詹鈞年、謝典儒。2012。中華民國第 52 屆中小學科學展覽會佳作作品<屠龍高手—分解保麗龍細菌之分離>
- 5.劉彥廷、黃鼎鈞、施昭仰。2013。中華民國第 53 屆中小學科學展覽會作品說明書<龍菌物語>
- 6.Belas. R, Schneider. R and Melch. M. 1988. Characterization of *Proteus mirabilis* Precocious

- Swarming Mutants: Identification of *rsbA*, Encoding a Regulator of Swarming Behavior. *Journal of Bacteriology*. 180(23): 6126-6139.
7. Hiraishi, A. 1992. Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Letters in Applied Microbiology* 15: 210-213.
 8. Jiang, H., H. Dong, G. Zhang, B. Yu, L. R. Chapman, and M. W. Fields. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(6): 3832-3845.
 9. Philip N. Rather. 2005. Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environmental Microbiology*. 7 (8): 1065–1073.
 10. Ward, PG., M. Goff, M. Donner, W. Kaminsky, and K. E. O'Connor. 2006. A two step chemo-biotechnological conversion of polystyrene to a biodegradable thermoplastic. *Environmental Science and Technology*. 40 (7): 2433-2437.
 11. Yoon, J. H., S. S. Kang, Y. G. Cho, S. T. Lee, Y. H. Kho, C. J. Kim, and Y. H. Park. 2000. *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 2173-2180.

三、相關網站

1. 東吳微生物系網站 <http://microbiology.scu.edu.tw/>
2. 苯乙烯 (styrene) <http://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=55365>
3. 染色體 DNA 分離與檢定
<http://homepage.ntu.edu.tw/~shihchung/BCX/BCX%2097-1%20files/BCX%20N1-97.pdf>.
4. MEGA6 <http://www.megasoftware.net/>
5. NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
6. Reverse complement http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
7. RDP CLASSIFIER <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp?timeout=true>
8. R Project <http://ftp.yzu.edu.tw/CRAN/>

【評語】 040703

延續前人在科展之相關實驗，探討十三株可能具分解保麗龍能力之組合，嘗試不同菌株之混合培養及模擬環境之組合實驗。實驗筆記詳實確切，精神可嘉，惟實驗結果還有待加強，可再進一步確認或設計不同之實驗，尋找更具效果之菌株組合。