中華民國第 56 屆中小學科學展覽會

作品說明書

國中組　生物科

最佳團隊合作獎

030305

「酵」林小子

―酵母菌對橘子綠黴菌之拮抗關係研究

學校名稱：新竹縣立成功國民中學

作者：	指導老師：
國二 呂喬榆 國二 許庭瑋 國二 彭梓芃	黃伶莉 蘇曉霓

關鍵詞：黴菌、酵母菌、拮抗

摘要

橘子為本縣重要的經濟水果，但常因採收後堆疊方式保存而容易長黴，所以本實驗欲找出替代傳統化學藥劑浸泡橘子之延緩長菌之生物防治方式。本實驗將長有黴菌的橘子，分離出病原菌，並找出對此病原菌有拮抗作用之可能菌種。從多株菌中利用對峙培養之方式找出於培養基上有明顯生長抑制環的有效抑制菌種並接種在橘子果實上作田野試驗。分離出的病原菌再接種回橘子上確認其有致病性外，設計了 9 組，每組 30 重複，在 270 顆橘子果實上分別做不同的模擬處理田野試驗。綜合實驗結果發現本實驗的潛力菌對於引起橘子發黴的綠黴菌是有明顯延緩其生長之效果。期望此實驗結果能達到生物防治之效，有效且安全的使用在橘子農產品上，替代化學保鮮藥劑減少環境汙染。

壹、 研究動機

本縣以生產柑橘為名，且每到過年佳節，家中總會收到象徵大吉大利的橘子(年節水果之一)，但橘子一旦經過長時間的存放，橘皮上總是會出現**生物課本**圖片中的粉粉綠綠的**黴菌**，橘子也就因而爛掉無法再食。除了對真菌界的黴菌充滿好奇心想一探究竟外，在對於採收後橘子的保鮮存放問題，更是我們興趣想知道的。於是我們找了一天去訪問栽種橘子的農民，他們分享了近年來因為橘子多為成熟後採收，若又經逢下雨，加上經常是以成堆疊放方式保存，很容易一顆橘子被黴菌感染後，造成其他橘子也得病，因此他們摘下橘子後大多會先用化學保鮮劑(腐絕)浸泡後再上市。保鮮劑爲一種化學製劑，雖也許對浸泡過的橘子果肉沒有滲入影響，但橘子皮上殘留的化學藥劑卻不確定清洗得掉，除了對環境汙染會是隱憂外，擔心若用這樣的橘子皮泡水代茶飲或製成精油後，對身體健康的損害會將是可見的。於是我們心中浮現， 在生物課程中老師曾經提及過所謂的**生物防治**，一種可以利用生物和生物之間的各種交互關係，一物剋一物，來達到防制病蟲害目的之方式，如果我們能找到有哪一種生物也能來對抗這種造成橘子腐爛的黴菌且能有效減少或延緩黴菌生長進而取代化學藥劑的使用，那不就也能減少其對環境汙染的危害，且同時保障大眾與果農的利益。於是我們和老師討論過後並開始蒐集相關資料，展開一連串的探究實驗。

貳、 研究目的

一、從腐爛的橘子中分離出導致橘子發霉的病原菌並了解其形態。

二、於實驗驗室中，試圖找出能有效減緩黴菌生長的生物防治潛力菌。

三、選擇效果佳的潛力菌種做田間試驗，預期在橘子上也能看到其防治或延緩腐壞之效果。

四、觀察篩選出生物防治菌(微生物)之形態。

參、 研究設備及器材

一、無菌設備:

(一).無菌操作臺、(二).25℃培菌箱、(三).無菌手套、(四).無菌刀、(五).防水無菌紙、(六).離心管、(七).高壓滅菌釜、(八).紫外燈、(九).酒精〈95、75%〉

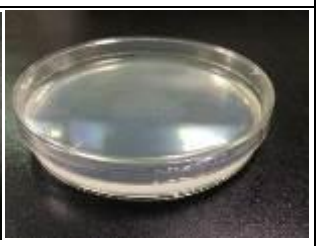
二、製作培養基及培養菌類:

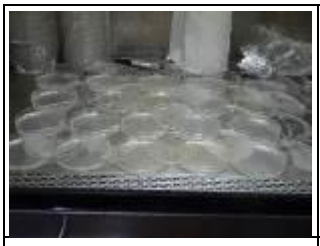
(一).平板培養皿、(二).微量滴管、(三).L 型玻棒、(四).無菌水、(五).無菌竹籤(替代接種環)、(六).培養基(PDA、PDB、YMA)、(七).複式顯微鏡

三、田野試驗:

(一).次氯酸鈉(6%漂白水稀釋)、(二).自產橘子未浸泡保鮮農藥、(三).大型置物箱、(五).大型垃圾袋、(六).標示紙、(七).浸泡橘子的桶子、(八).血球計數器、(九).石蠟膜

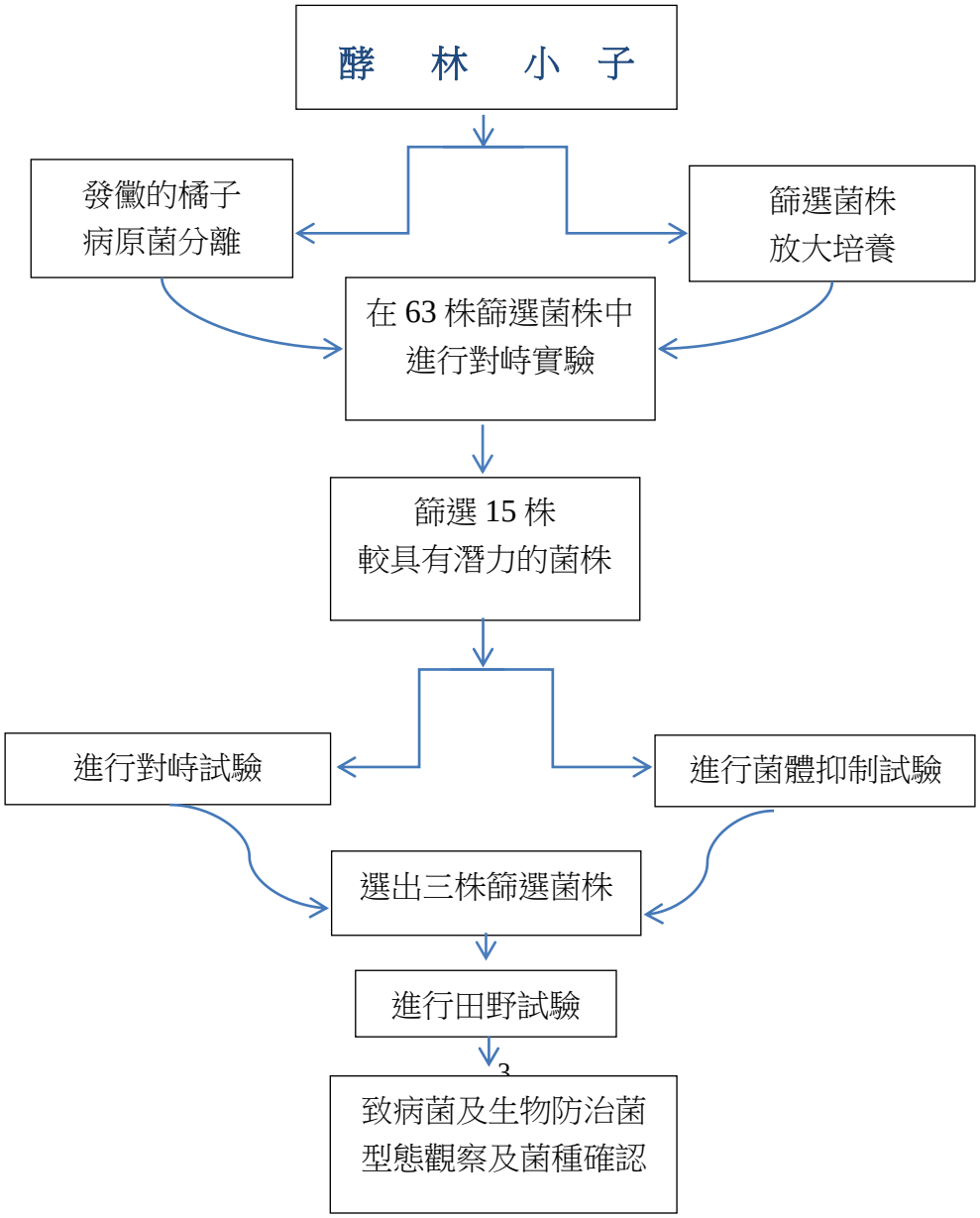
四、實驗器材圖片

無菌操作臺	25℃培養箱	無菌刀	離心管
			
高溫殺菌燈	酒精 75% 95%	鑷子	平板
微量滴管	L 型玻棒	無菌水	無菌竹籤 (替代接種環)

			
培養基(PDA、YMA)	籃子	270 顆橘子	石蠟膜
果汁機	次氯酸鈉	挖洞器	複式顯微鏡

肆、研究過程或方法

一、實驗架構流程圖



二、橘子病原菌培養實驗

(一). 樣本選擇、收集樣本(橘子):橘子為本縣盛產且過年期間應景常食之水果，在採收後也常會以堆疊方式儲存，容易被黴菌感染，所以選擇橘子作為實驗材料。

(二). 分離病原菌：

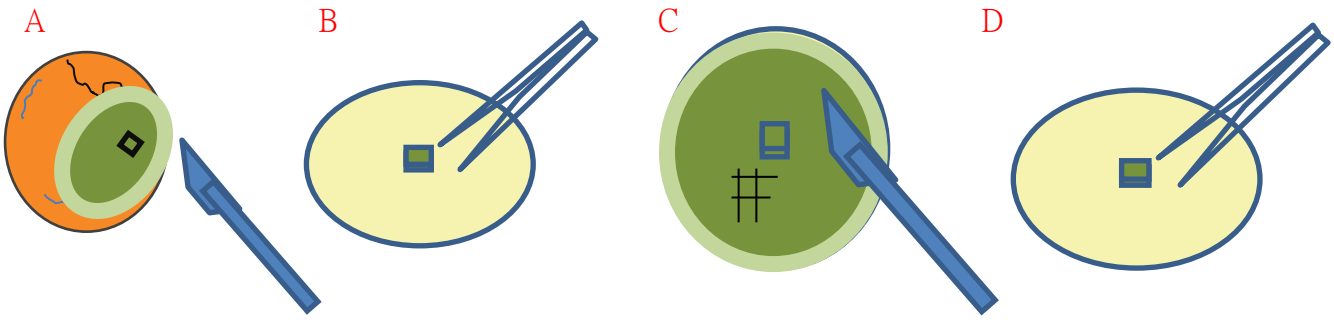
1. 至各大賣場或水果攤找尋有產生病斑或已被黴菌感染的橘子，將橘子帶回實驗室，準備分離出感染此橘子造成發黴的黴菌。
2. 製作培養基-製作培養黴菌的 PDA 培養基，用 PDB 7.2g、Agar 6.0g、Water 300g，將以上物質加入錐形瓶調配攪拌，並在降溫後於 22℃ 至 28℃常溫下保存。

3.培養黴菌方法:

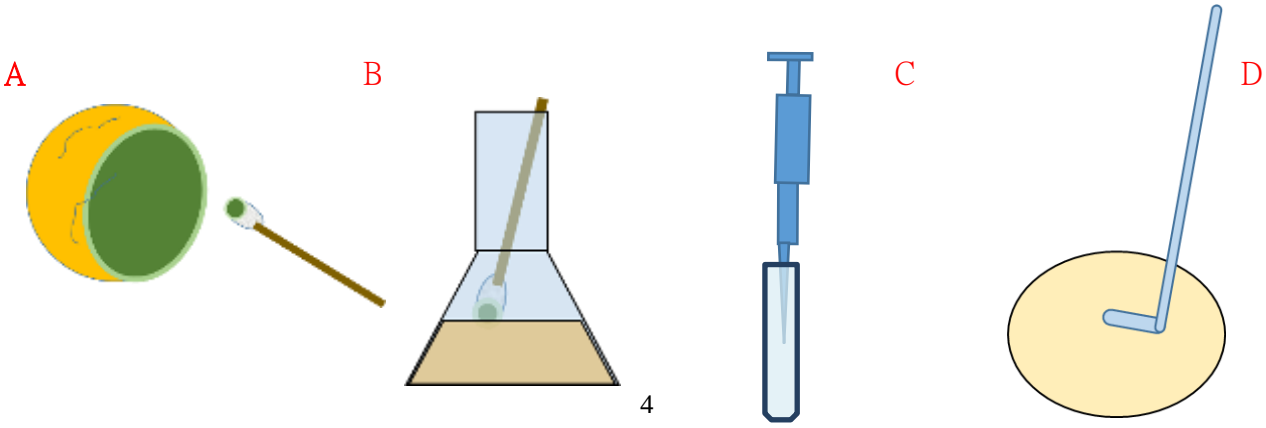
(1).切塊: A.將發霉的橘子的發霉處，用解剖刀切下一塊；B.放置在 PDA 培養基上七日；C.再用解剖刀切取培養基上的發霉處；D.放置於一培養基上培養黴菌。(如下**示意圖一**)

(2).直接:A.棉花棒沾取橘子上的黴菌；B.加入無菌水攪拌；C.稀釋 100 倍；D.將溶液用 L 型玻棒均勻的塗抹在 PDA 培養基上。(如下**示意圖二**)

＊病源菌分離(示意圖一、切塊)



＊病源菌分離(示意圖二、直接)



水果攤中找尋到 發霉的橘子	調配培養基並 倒平板	解剖刀切取 培養基上的黴菌	竹籤取黴菌 畫平版培養

4. **PDA 培養基配方：(** 1).葡萄糖(glucose) 20%、(2).洋菜(agar) 2%、(3).馬鈴薯抽取物(potato infution) 2%。

5.病原菌的形態觀察:

(1).巨觀: A.說明:觀察培養基上的菌落及生長形態； B.方法:利用前述黴菌培養之方式於培養基上培養； C. 培養後於第三天觀察其菌絲生長或產孢情形。

(2).微觀: A.說明:觀察菌絲及孢子；

B.方法: (A).製作黴菌液，滴在載玻片上，並蓋上蓋玻片；(B).用紙巾壓印(防止在顯微鏡中有多層畫面重疊)；(C).用指甲油封起來； (D). 觀察。

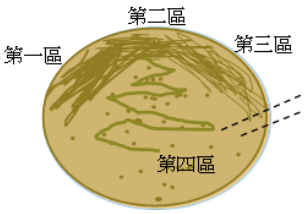
(3).病原菌 DNA 定序鑑定:將培養好的黴菌從平板上切下，避免切取到培養基的部分，收集至一定的量後，再送至鄰近的研究單位請求協助做菌種的鑑定。

三、 生物防治菌種篩選實驗

(一).菌種來源：我們試圖詢問學校附近研究單位相關可能的菌種，非常幸運也榮幸得找到了肯協助提供我們一些菌種的研究室，其中他們逢機挑選了 63 株菌(在報告中，稱為**篩選潛力菌株**，提供我們此次的實驗。實驗室中的這些菌種是從台灣本土分離的菌且都尚未證實出有防治效用的菌。我們利用這些菌來做為我們此次實驗的生物防治菌的篩選菌株，期待能從其中找出有防治效果之菌種。

(二).活化菌體與培養：

1.用無菌竹籤以三區四線法畫盤培養，將這幾種菌再加以活化培養，取第四區之單一菌落為佳。

			
實驗室提供之原菌種	分別編上代號	以三區四線法畫盤活化	三區四線

2.製作培養菌體之培養基(YMA): (1). 酵母抽出物(yeast extract) 0.3%、(2). 麥芽抽出物(malt extract) 0.3%、(3). 蛋白凍(peptone) 0.5%、(4). 葡萄糖(glucose) 1%、(5). 洋菜(agar) 2%。

(三)、病原菌(黴菌)vs. (篩選菌株)生物防治菌之對峙試驗(以下實驗皆於無菌操作台中操作)

1.說明:此實驗的主要目的是在實驗室中先利用對峙實驗篩選出能較有效抑制黴菌生長的菌種。我們推測將此病原黴菌及研究單位提供的 63 株菌利用此方式共同培養在培養基上再觀察其分別菌落生長情形，若培養基上有產生明顯的一圈黴菌生長抑菌環，就可以推測這些菌種是可以有抑制黴菌生長之可能的。再由這 63 株菌中連續幾次篩選出表現較佳的幾株菌種，作為田野試驗中的測試。

2.步驟:先將 63 株的篩選菌株進行對峙試驗，後篩選出 15 株較有效的具潛力篩選菌株，再度進行對峙試驗及菌體抑制試驗，最後，篩選出 3 株有潛力的篩選菌株，做為橘子果實田野試驗的三株菌種。

3.方法:

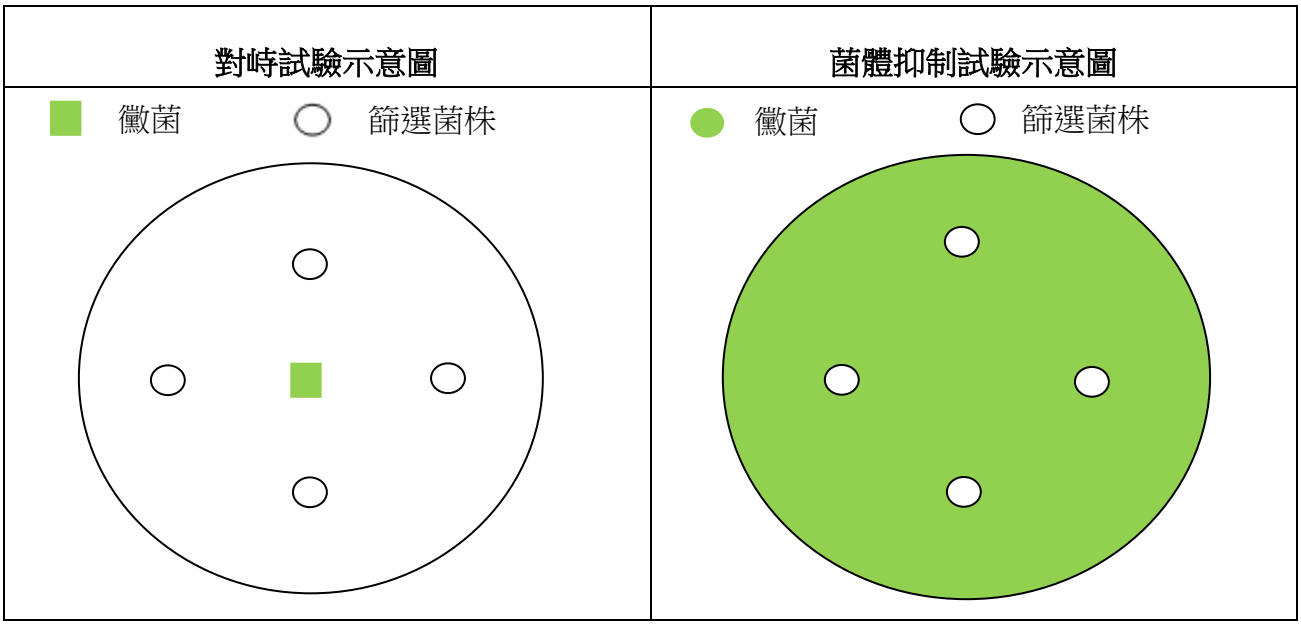
(1).**對峙試驗:**先在培養基(PDA)中央放置從橘子中分離出並培養的黴菌病原菌切塊，再用先前培養之酵母菌放置在周圍，一個平板放置四株菌種，且與黴菌快的距離都為 1.5

公分。最後置於 25℃的恆溫生長箱中培養，分別於第 3、5、7 天觀察菌落生長情形。

(2).**菌體抑制試驗:** 為再度確認生物防治菌之抑菌效果，我們使用另一種方式來培養和觀察它們的生長，已利我們再一次確認抑制效果外，也可在不同生長條件下再次比較出兩者生長之關係。使用 L 玻棒將黴菌液均勻塗盤於 PDA 培養基上，要注意力道以免培養基刮破汙染，再用吸管將 agar 塊取出造成一圓形小洞，最後於挖的小洞中加入酵母菌液，觀察培養基中各種菌落之生長情形。培養後於第 3 天記錄其抑制效果

(3).黴菌液製作：A.將無菌水(2ml)加入黴菌平板；B.用 L 型玻棒均勻攪拌黴菌。

酵母菌液的製作：以竹籤沾取已培養單一菌落酵母菌菌落，置於無菌水中攪拌均勻。



於無菌操作台中操作	切下黴菌塊放置對峙實驗之培養基上	刮下米粒大小的篩選菌株至於培養基

四、選擇產生明顯抑制環的篩選菌株進行田間試驗，實驗在橘子果實上是否也能有防治或延緩腐壞之效果。

(一). 田野試驗

1.說明: 利用對峙試驗所篩選具潛力篩選菌株在橘子體內做試驗，若其亦未對橘子有致病性，那麼這些微生物菌就可考慮做為本實驗所採用之生物防治菌種。

2.方法:

(1).先挑選外表較完整無撞傷或挫傷的橘子共 270 顆(橘子是從同一棵橘子樹上取下，我們親自至寶山產橘子農民處央請他們，橘子採收後務必不要浸泡化學保鮮藥劑且於採收後隔天馬上將橘子送進實驗室做為我們此次田野實驗的樣本。將實驗分成下列 9 組(即 30 顆/組重複處理)，在裝橘子的籃子上分別標記處理。組別如下：

A、自然組(完全不做任何處理)；

B、控制組(即對照組，有挖洞，洞內只注入 100 μl 無菌水)；

C、Mold(黴菌 only)；

D、具潛力之篩選菌株 Y1(編號 3-4)；

E、具潛力之篩選菌株 Y2(編號 2-1)；

F、具潛力之篩選菌株 Y3(編號 3-2)；

G、Y1(編號 3-4)+M(Mold)；

H、Y2(編號 2-1)+M(Mold)；

I、Y3(編號 3-2)+M(Mold)

(2).稀釋次氯酸鈉(漂白水)至重量百分濃度 2%，並將橘子於挖洞前 15 分鐘浸泡其中。

(3).除自然組完全不做任何處理外，其餘橘子皆於無菌操作台使用相同挖洞器孔徑統一挖洞 0.5cm。

(4).依組別加入樣本，加入順序：具潛力的篩選菌株 100 μl；1 小時後：黴菌 100 μl，以水作為對照。

(5).所有操作完成後，將橘子已挖洞處朝上放置並以牛皮紙鋪在籃子上以避免滾動並做保護固定，再套入垃圾袋，並於垃圾袋上打洞以免袋內過於潮濕悶熱，造成其他

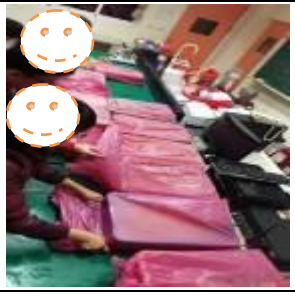
微生物生長，影響實驗結果

3.備註： (1).篩選菌株菌液製作:用無菌竹籤刮取平板上的篩選菌株，並加入 PDB 中混和

(2).篩選菌株培養液濃度計算(血球計數器)與稀釋:將酵母菌液滴在載玻片上，蓋上蓋玻片後，玻片與計數器的間距恰好為 0.1mm，故每小格的體積等於 $0.00025m^3$。實驗時滴入菌液蓋上蓋玻片(22mm*22mm)，使菌液充滿計數器凹槽中，接著以顯微鏡觀察計算小方格內菌體數量，即可求得單位體積樣品之總菌數，並由 10^9 稀釋至 10^7。

(3).黴菌液製作：A 將無菌水(2ml)加入黴菌平板；B 用 L 型玻棒均勻攪拌黴菌。

(4).菌液濃度計算:與篩選菌株培養液之計算方式相同，並由 10^7 稀釋至 10^5。

挑選外表較完整無撞傷或挫傷的橘子共 270 顆	浸泡次氯酸鈉消毒後，將橘子分類	於無菌操作台中將橘子打洞，準備做不同的處理
注入無菌水＼篩選菌株懸浮液＼黴菌液	將橘子已挖洞處朝上放置並固定，再套入垃圾袋	測量紀錄觀察黴菌生長情形(菌絲生長圈大小)
		
將處理完的橘子帶回至學校實驗室觀察	分類處理組別依序擺置	再次確認每一處理是否 set 好，凌晨 2 點準備就緒

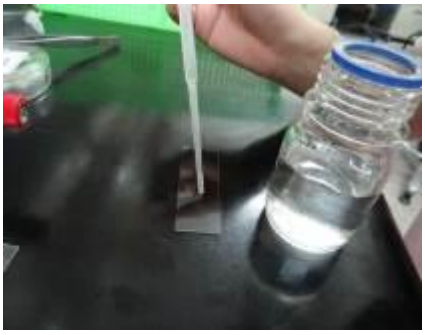
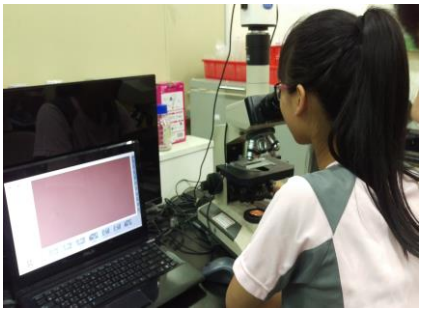
五、生物防治菌之形態觀察。

(一).巨觀: 1.說明:觀察培養基上的菌落及生長形態。

2.方法:利用前述黴菌培養之方式於培養基上培養；培養後於第三天觀察其生長情形。

(二).微觀: 1.說明:觀察此微生物於顯微鏡下之形態；

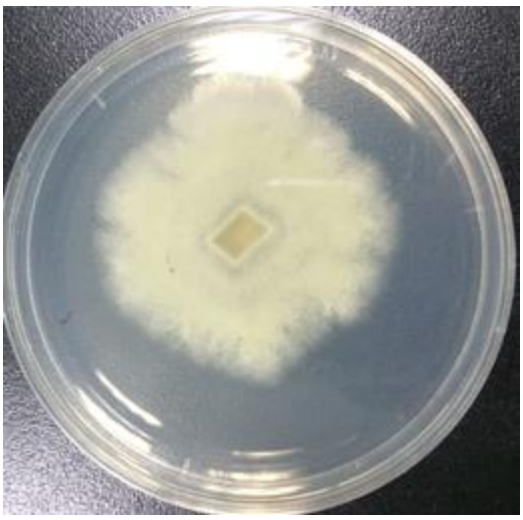
2.方法: A.製作酵母菌液，滴在載玻片上，並蓋上蓋玻片；B.用紙巾壓印(防止在顯微鏡中有多層畫面重疊)；C.用指甲油封起來； D. 於顯微鏡下觀察。

		
挑取欲觀察之菌落	將無菌水滴在載玻片上	用紙巾壓印
		
用指甲油封起來	封好之微觀酵母菌玻片	於顯微鏡下觀察

伍、研究結果

一、將發黴橘子帶至實驗室中分離出導致橘子發霉的病原菌與其形態。

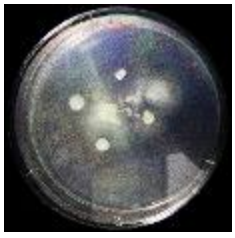
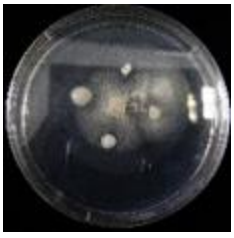
(一).病原菌之微觀與巨觀觀察結果：

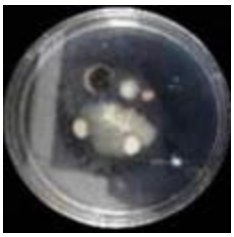
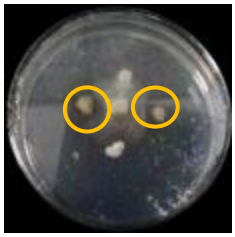
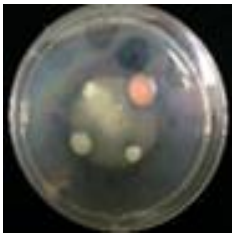
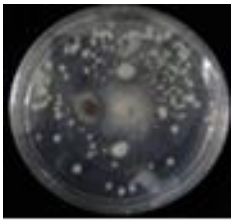
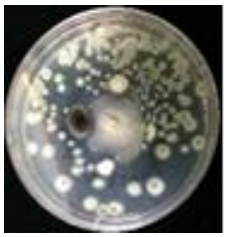
	微觀	巨觀
黴菌		
	微觀描述：此圖為顯微鏡放大 400 倍下的型態，有孢子著生在菌絲上，且菌絲有橫膈	**巨觀描述：**此為肉眼下的型態，菌絲呈白色，孢子呈綠色

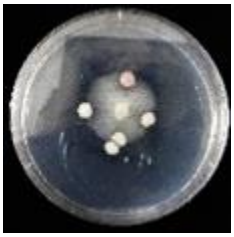
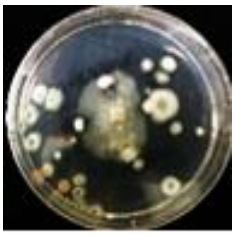
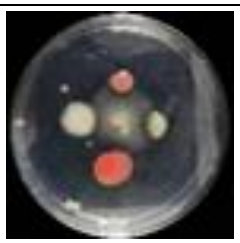
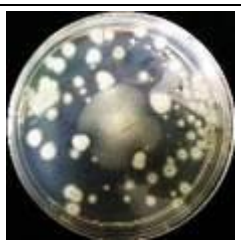
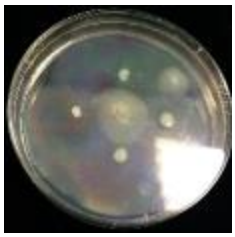
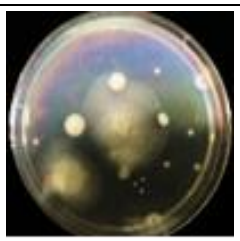
(二).將此病原菌送至研究單位並央請實驗室協助做 DNA 序列鑑定：經 ITS 序列鑑定出此病源菌為橘子**綠黴病**菌，學名：Penicillium digitatum

二、 **生物防治菌種篩選實驗結果：**於實驗室中，利用對峙(切塊)實驗，試圖做實驗找出能有效減緩或抑制黴菌生長的生物防治菌，結果如下:

(一). 63 株的篩選菌株進行對峙實驗結果圖

第三天	第五天	第七天	觀察描述
			上:抑制環較模糊 右:抑制環較模糊 左(2-1):抑制環明顯
			上:抑制環較模糊 下:抑制環較模糊 左:沒有抑制環 右:沒有抑制環

			上:抑制環較模糊 下:抑制環較模糊 左(3-2):抑制環明顯 右(3-3):抑制環明顯
			上:抑制環較模糊 下:沒有抑制環 左:沒有抑制環 右:抑制環較模糊
			上(3-1):抑制環明顯 下:沒有抑制環 左:沒有抑制環 右:抑制環較模糊
			上:沒有抑制環 下:抑制環較模糊 左(3-4):抑制環明顯 右(3-5):抑制環明顯
			上(4-2):抑制環明顯 下:抑制環較模糊 左:沒有抑制環 右:抑制環較模糊
			上:抑制環較模糊 下(4-1):抑制環明顯 左:有抑制環 右:抑制環較模糊
			上:沒有抑制環 下:抑制環較模糊 左:抑制環較模糊 右:沒有抑制環

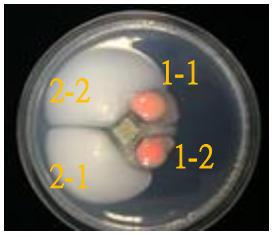
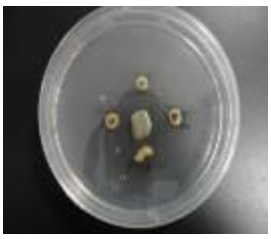
			上:抑制環較模糊 下:沒有抑制環 左:沒有抑制環 右:沒有抑制環
			上(1-2):抑制環明顯 下:沒有抑制環 左:沒有抑制環 右:抑制環較模糊
			左上:抑制環較模糊 左下(1-1):抑制環明顯 右上:抑制環較模糊 右下:抑制環較模糊
			上(2-2):有抑制環 下(4-5):有抑制環 左(4-4):有抑制環 右(3-6):有抑制環
			上:抑制環較模糊 下(4-3):抑制環明顯 左:抑制環較模糊 右:抑制環較模糊
			上:抑制環較模糊 下:抑制環較模糊 左:抑制環較模糊 右:抑制環較模糊
			上:沒有抑制環 下:沒有抑制環 左:抑制環較模糊 右:抑制環較模糊

實驗結果說明:我們篩選了抑制圈較為明顯的十五株篩選菌株，將其編號後進下一次的篩選。

(二) .將此 15 株初篩選得到的篩選菌株再度進行對峙試驗： 由之前的結果可以知道，對峙(切塊)實驗於第 7 天結果較明顯，也避免開培養皿照相所造成的落菌汙染，故本次實驗直接進行 7 天拍照，觀察篩選菌株對黴菌對抗的情況。

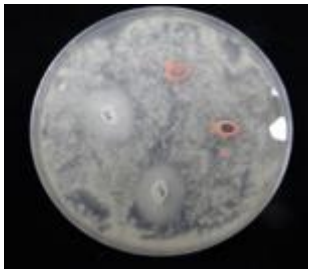
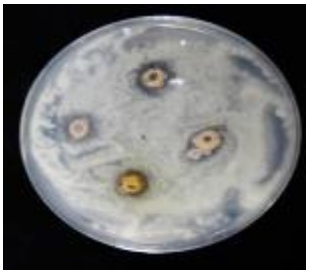
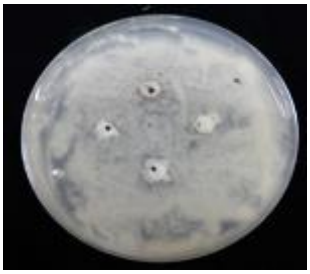
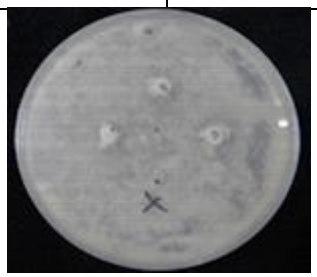
1. **對峙試驗結果：**

對峙試驗結果(第 7 天)

編號	上：1-1	左：2-2	上：3-2	左：3-3	上：3-5	左：3-6	上：4-4	左：4-5
	下：2-1	右：1-2	下：3-4	右： 3-1	下：4-1	右：4-2		右：4-3
圖片								
說明	由抑制圈觀察，篩選菌株 2-1 有些微抑制黴菌的效果		此 4 株篩選菌株，均有明顯抑制黴菌生長的結果		由抑制圈觀察，篩選菌株 3-5 及 4-1 有些微抑制黴菌的效果		由抑制圈觀察，篩選菌株 4-3、4-4、4-5 有些微抑制黴菌的效果	

2. **菌體抑制試驗結果：**

菌體抑制試驗結果(第 3 天)

編號	上：1-1	左：2-2	上：3-2	左：3-3	上：3-5	左：3-6	上：4-4	左：4-5
	下：2-1	右：1-2	下：3-4	右： 3-1	下：4-1	右：4-2		右：4-3
圖片								
說明	無抑制圈產生		較其他株菌，3-4 的抑制環較為清晰，而 3-1~3-3 的抑制環則有些模糊		無抑制圈產生		無抑制圈產生	

酵母菌樣本	1-1	1-2	2-1	2-2	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	3-6	4-1	4-2	4-3	4-4	4-5
抑制圈直徑(cm)	無	無	無	無	1.1	1.3	1	1.2	無	無	無	無	無	無	無

實驗結果說明:

根據上述對峙試驗(切塊及挖洞)結果，我們決定選用 3 株篩選菌株進行田野試驗。

(1).原編號 **3-4(**作為我們下一個田野試驗中編號 **Y1** 的樣本**)**。

原因:較 3-3、3-2、3-1，其抑制環較為清晰，而其餘的抑制環則有些模糊 。

(2).原編號 **3-2(**作為我們下一個田野試驗中編號 **Y2** 的樣本**)**。

原因:我們挑選對峙挖洞實驗中，抑制環最大的，但抑制圈的旁邊不清晰，有菌落生長。

(3).原編號 2-1(作為我們下一個田野試驗中編號 Y3 的樣本)。

原因:選用抑制效果較沒有這麼好之篩選菌株來比對試驗。

3.備註:菌體抑制試與對峙試驗的主要差別在於，菌體抑制試驗較能以數據量化，且因黴菌較具優勢，故能較準確的判斷哪些生物防治菌對綠黴菌具有延緩其生長之效。

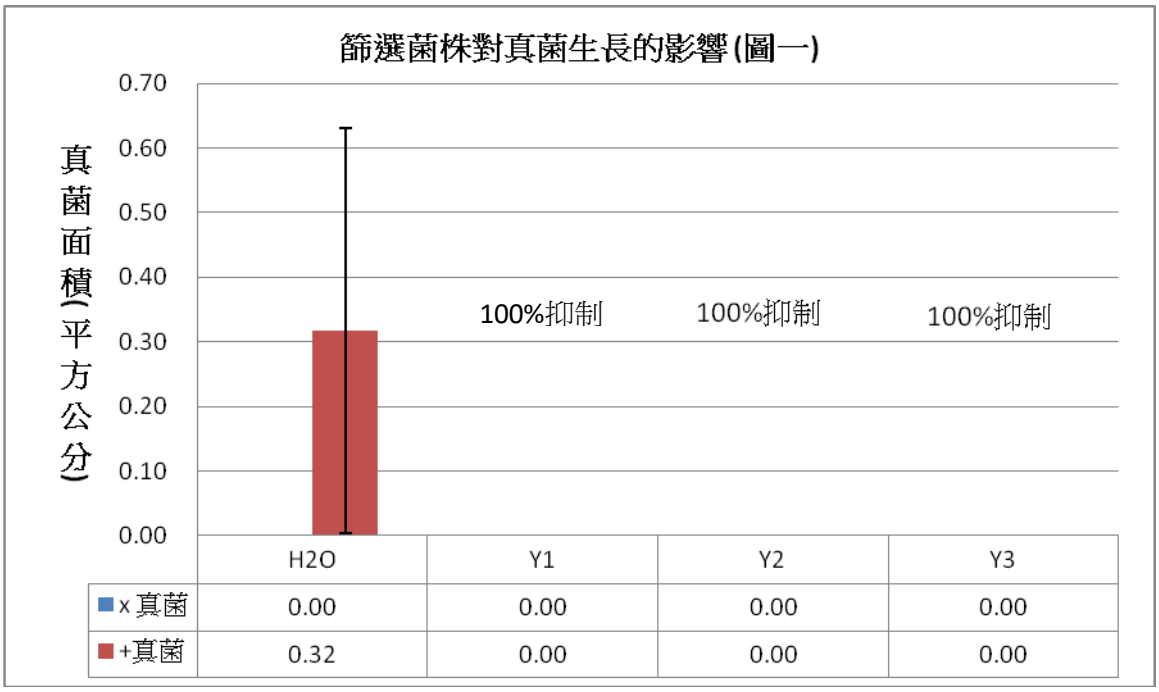
三、橘子田野試驗結果：

橘子田野試驗結果拍照圖片及數據分析表(分天數呈現)

(一).橘子田野試驗結果拍照圖片(第 3 天)

	圖片 (第 1-15 顆)	圖片 (第 16-30 顆)	黴菌生長 直徑(cm)	觀察描述
自然組			NA	果實表面 尚無變化
控制組			-	果實表面 尚無變化
Y1			-	果實表面 尚無變化

Y2			-	果實表面 尚無變化
Y3			-	果實表面 尚無變化
M			0.28±0.23	果實表面 尚無變化
Y1+M			-	果實表面 尚無變化
Y2+M			-	果實表面 尚無變化
Y3+M			-	果實表面 尚無變化



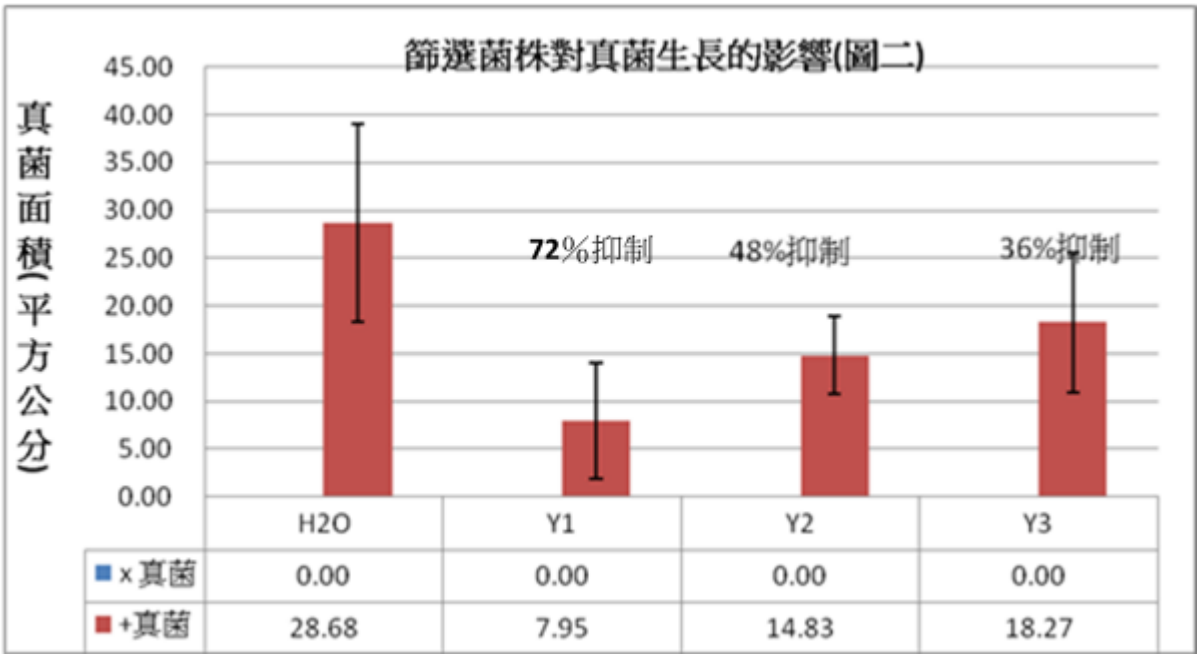
圖一、橘子田野試驗結果數據分析表(第 3 天)

實驗結果說明(圖一):我們是以黴菌生長面積減掉洞的面積的方式來計算，而從上述表格中我們可以得知，除黴菌 only 的生長面積平均為 0.32cm 外，其餘都沒有生長情形，故 Y1、Y2、Y3 三株篩選菌株在這第 3 天的觀察結果顯示是對此黴菌有近乎高達 100%的抑制效果。

(二).橘子田野試驗結果拍照圖片(第 5 天)

	圖片 (第 1-15 顆)	圖片 (第 16-30 顆)	黴菌生長 直徑(cm)	觀察描述
自然組			NA	橘子表面仍無改變
控制組			-	橘子表面仍無改變

Y1			-	橘子表面仍無改變
Y2			-	橘子表面仍無改變
Y3			-	橘子表面仍無改變
M			5.48±1.03	單獨接種黴菌的處理發現已有極明顯生長菌絲環，表示此分離出之病原菌對橘子確定是有致病性的
Y1+M			2.49±1.22	黴菌雖可看出菌絲生長，但明顯比其他處理別的菌絲圈小，由其比較黴菌 only 得更是有顯著差異
Y2+M			3.84±0.56	黴菌菌絲已生長，但仍比單獨接種黴菌的菌絲圈小
Y3+M			4.26±0.56	黴菌生長，菌絲圈平均也比單獨接種黴菌的小

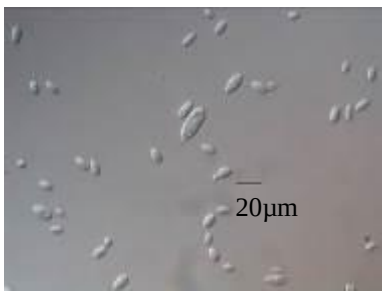
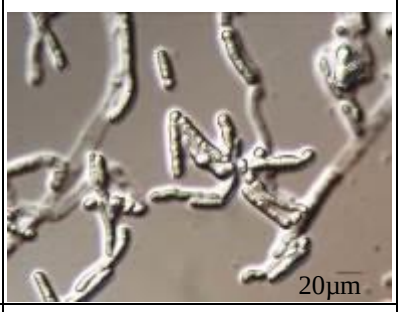


圖二、橘子田野試驗結果數據分析表(第 5 天)

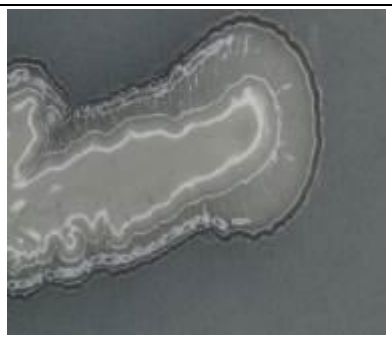
實驗結果說明: 從上述表格中我們可以得知，控制組與 Y1、Y2、Y3 only 三種菌種處理橘子上都沒有出現任何病徵，Y1+M 的生長面積平均為 7.95 cm^2；Y2+M 的生長面積平均為 14.83cm^2；Y3+M 的生長面積平均為 18.27 cm^2，而 Mold only 的生長面積則平均大到為 28.68 cm^2，除了可以再次確定此黴菌對此椪柑是有致病性視為其病原菌外，也可明顯看出 Y1、Y2、Y3 在第 5 天對此病原菌分別有 72%、48%、36%的抑制效果。而 Y1 對其他兩株菌種在抑制效果上有出現顯著差異(統計資料參見附錄)。

四、篩選出之生物防治菌(Y1、Y2、Y3)之形態觀察結果。

第七天(皆為顯微鏡放大 1000 倍下的形態)

	田野試驗編號 Y1	田野試驗編號 Y2	田野試驗編號 Y3
微觀			
微觀描述	此圖亦發現菌絲,而型態仍呈尖圓狀	此圖亦發現菌絲，而菌株呈長形	菌株呈長橢圓形

第七天(為顯微鏡放大 40 倍下的型態)

	田野試驗編號 Y1-1(3-4)	田野試驗編號 Y2-2(2-1)	田野試驗編號 Y3-3(3-2)
巨觀			
巨觀描述	顏色為橘黃色，有菌絲。	顏色為白色，有菌絲	顏色為白色， 菌絲邊緣呈黑色

實驗結果說明:

由形態上觀察，這 3 株進行田野試驗的篩選菌株，與酵母菌較相似，以往在課本中所提到的酵母菌多以出芽生殖的方式生殖，但在這三株菌的巨觀及微觀結果中卻看到此三株篩選菌株似乎是具有菌絲的，有別於我們認識的酵母菌，在鑑定後並查詢資料時發現有一類特別的菌屬於具有偽菌絲的類酵母菌，它們是具有菌絲且會進行出芽生殖的酵母菌(很驚訝地看到了與生物課本上所描述不同的例外酵母菌了!)。

將篩選出來的這 3 株菌經委託實驗室鑑定結果如下：

編　　號	菌種名稱	來源
Y1	Aureobasidium sp.02	Leaf of Maoutia setosa, Taoyuan, Kaohsiung, Taiwan
Y2	Trichosporon sp.01	Water
Y3	Aureobasidium sp.01	Water

陸、討論

一 、樣本的取得：因橘子為本季當地之水果，且在進行此實驗的時間恰巧是橘子的產季，所以橘子取得容易。但困難的是因為橘子運送至各大賣場或水果攤時多已浸泡保鮮化學藥劑，所以要找到有長黴菌的橘子的確不易。有些可能只是撞傷、挫傷或只是擺放較久剛開始出現些許病徵而已，所以我們遍尋了附近各水果攤，非常努力的在廢棄水果籃中尋找，終於找到了有白色菌絲和綠色孢子生長在橘子果實上的樣本(如文中圖片)。

二、無菌操作技術及各種菌種之培養：在本次的實驗中，我們強烈感受到老師說的：看不到，並不表示不存在之偉大微生物。因為是第一次接觸無菌的操作，我們在學習過程中必須非常注意每一個操作步驟以防止汙染，不論是紫外燈照射時間、噴酒精或本生燈高溫殺菌都必須非常徹底，已達到精準之實驗。當然過程中，我們也曾經因為在倒培養基、活化菌種或是對峙實驗時因疏忽被其他菌汙染，但為了追求真理，我們一次又一次的，利用下課或假日時間不斷地重複再重新來過，就為了找到更準確的發現。每一次的操作都是再一次的學習，最後終能有如此美麗的發現。

三、對峙實驗：在本實驗的設計目的是為了在生長培養基中看出黴菌和酵母菌的生長情形。若能清楚看出黴菌菌絲的生長抑制圈，那勢必可以推測此酵母菌是能有拮抗作用的。採用龐大的 63 株酵母菌的對峙實驗讓我們大開眼界地看到 63 種菌落型態有差異但都很可愛的酵母菌。很幸運的除了在課本圖片上看到所謂單細胞出芽生殖的酵母菌外，我們也看到了長菌絲的類酵母菌。看到同樣都是酵母菌，但是對於同一株黴菌卻有著不同的抑制效果，這著實是個活生生極有趣的生物物種多樣性的故事，彷彿生物課本的呈現，真的是收獲滿滿。

四、田野試驗：這是一項我們最難忘的實驗，一整天從選取 270 顆龐大的橘子 (為了使實驗準確度增加，我們希望重複樣本數須夠多)，每一顆橘子必須都先淨身(全部使用次氯酸鈉漂白水消毒，以確保每顆橘子表面都是乾淨的)，開始做黴菌和酵母菌的實驗設計處理，討論想好條件、計算好並調配好菌液濃度，在每一種不同處理的橘子表面上用打洞器打出相同大小的孔洞(因本次實驗選用的是皮較厚的椪柑)，打洞是希望在有效的短時間內模擬製造同等傷害的傷口，於無菌操作台做完實驗後還必須將每一種處理的橘子分

類放置好，工程之浩大，必須在一天時間內全部做完且不容輕忽延宕，終於在晚上凌晨2點時把所有處裡就緒，和老師同伴們的合作，此時的感動已不容言語。同時透過本實驗，我們深刻了解到微生物的生長時間及生長狀況因為不是我們肉眼所能見，所以就更加難以掌控，對於這些小小的微生物肅然起敬。

五、統計數據分析生長：田野試驗後的第 3、5、7 天我們都有觀察記錄，第三天時除了黴菌 only 的長了一些菌絲外，其他處理皆無生長，至第 5 天時，酵母菌(Y1、Y2、Y3 only)處理橘子的也未見黴菌生長，在 Y1、Y2、Y3 都有黴菌一起處理時也可以發現 Y1 此株酵母菌有比起 Y2、Y3 有顯著差異的延緩效果(在附錄的統計分析表上提及)，從統計數據分析結果上是可見其酵母菌拮抗抑制綠黴菌生長之效果是有其顯著差異的。

六、 在田野試驗的結果觀察後，我們發現到:雖然用挖洞的方式可以模擬受傷的情形以及較快速的達到病原侵入之效果，但在實際採收橘子時，若本體造成傷口本來就會容易染病，所以如果我們能利用一些技術或方法，把酵母菌製作成類似溶液的酵母菌製液，再於生長期噴灑，來克服橘子皮可能太厚難以快速滲透的條件，就像為橘子施打「預防針」，期待有更好的防治及保鮮的效果。

七、 經對峙試驗篩選後，我們發現較有效的抑制黴菌生長的酵母菌都屬於介於酵母菌與黴菌間的很特別的「類酵母菌」，我們推測可能是因「類酵母菌」有假菌絲(psedohypha)，因而能攀附於黴菌或侵犯深層組織以取得優勢。

八、最後，我們試圖猜測酵母菌究竟是利用何種拮抗機制來抑制綠黴菌生長的呢?是因酵母菌的生長速率優勢，才造成黴菌與酵母菌之間相互營養競爭，取得勝利的結果？還是因為酵母菌分泌了某種毒素(toxin)，會對於綠黴菌的生長真正造成 toxic 抑制而造成此結果呢?這將是我們可以進一步再設計實驗去找出答案的，也是我們下一步期望去實驗發現的。

柒、結論

一、從橘子分離出來的黴菌，紀錄及觀察它的外部形態，透過鑑定知道他的菌種為橘子綠黴病，學名 Penicillium digitatum。將其於田野試驗中再回接至椪柑時也發現有致病性，會導致橘子腐爛，產生相同病徵。

二、從實驗室中的對峙實驗中挑選出三株生物防治菌皆為酵母菌，分別是 Aureobasidium sp.02、Trichosporon sp.01、Aureobasidium sp.01。在平板培養基上的對峙實驗及菌體抑制實驗結果，都有產生明顯的抑菌環。從 63 株菌中篩選出的此三株酵母菌在文獻中也都尚未在文獻中查到有提及防治效果之菌，期望將它們做為田野試驗中之防止或延緩橘子綠黴菌生長之生物防治菌。

三、實驗中篩選出的這三株菌進行田野試驗結果，觀察紀錄發現有加此三株酵母菌的橘子上，黴菌的生長明顯的比只接種黴菌的橘子有延緩生長之情形，尤其以 Y1 酵母菌 (Aureobasidium sp.02)添加，測量菌絲生長面積並將數據做統計分析更是有顯著之差異，此菌株為我們本實驗最佳之篩選生物防治潛力菌。

四、期望若能以此篩選出來之酵母菌來做為生物防治製劑來取代橘子浸泡化學藥劑保鮮，除了能減少危害健康外，更能減少各種因子所造成的環境汙染，為地球環境保護盡一份力。

捌、參考資料及其他

一、培養基配置和無菌操作的要領

取自 http://www.cnferment.net/Soft/fajiao/200612/20061221134735190.pdf

二、康軒 自然與生活科技(下冊) 第一章生殖、第四章分類

三、科學發展 2009 年 12 月，444 期 F 害蟲與天敵 eature Report 專題報導 楊平世 什麼是生物防治？

四、以菌制菌

取自 http://www.shs.edu.tw/works/essay/2011/03/2011033015464430.pdf

五、拮抗作用

取自 http://www.twwiki.com/wiki/%E6%8B%AE%E6%8A%97%E4%BD%9C%E7%94%A8

六、有機農業全球資訊網 競爭作用 拮抗微生物

取自 http://info.organic.org.tw/supergood/front/bin/ptdetail.phtml?Part=sick1-1&PreView=1

七、天下文化 微生物學的世界 作者:張碧芬、游呈祥、袁紹英

八、柑橘青黴病和綠霉病
http://www.twword.com/wiki/%E6%9F%91%E6%A9%98%E9%9D%92%E9%BB%B4%E7%97%85%E5%92%8C%E7%B6%A0%E9%9C%89%E7%97%85

玖、附錄

田野試驗: 不同 酵母菌 的 種類 對 黴菌生長 之變異數分析摘要表

DAY3

	平方和	自由度	平均平方和	F	事後比較
組間	1.722	3	.574	43.421***	Mold>Y1+M, Y2+M, Y3+M***
組內	1.534	116	.013		
總和	3.256	119			

***p<.001

- 由上表可知，單因子變異數分析結果:F=43.421,p=.000<.0001，表示4組間的實驗結果有顯著差異。根據Levene變異數同質性檢定p=.000<.05, 表示變異數同質，因此採用Dunnett T3檢定法做事後比較。
- 根據Dunnett T3 檢定法做事後比較的結果顯示: Mold>Y1+M, Y2+M, Y3+M

DAY5

	平方和	自由度	平均平方和	F	事後比較
組間	136.923	3	45.641	49.133***	Mold>Y1+M, Y2+M, Y3+M***
組內	107.757	116	.929		Y2+M, Y3+M >Y1+M***
總和	244.680	119			

***p<.001

- 由上表可知，單因子變異數分析結果:F=49.133,p=.000<.05,表示4組間的實驗結果有顯著差異。根據Levene變異數同質性檢定p=.006<.05, 表示變異數同質，因此採用Dunnett T3 檢定法做事後比較。
- 根據Dunnett T3 檢定法做事後比較的結果顯示:

  Mold >Y1+M, Y2+M, Y3+M

  Y2+M, Y3+M >Y1+M

【評語】030305

1. 此作品主要欲將酵母菌應用於柑橘綠黴菌之生物防治，想法雖可能具有應用性，仍須評估所使用之菌株對環境的影響，甚至對農作物長期儲存是否有不良的作用。

2. 若其可行，也要思考如何施用的方法，例如：浸泡或噴灑等，以利於實際的應用。

3. 雖所篩選的菌株可降低真菌附蓋面積，但就實務而言，這些都是長霉的水果，沒有商品價值。應設計實驗，評估在儲存時期，此酵母菌生物防治法實際上可降低多少比率綠黴菌的感染。