

中華民國第 56 屆中小學科學展覽會  
作品說明書

---

高級中等學校組 環境學科

最佳(鄉土)教材獎

052601

土壤微生物監控

學校名稱：國立臺中女子高級中學

作者： 高二 施育禎 高二 余美香	指導老師： 陳玉珊
-------------------------	--------------

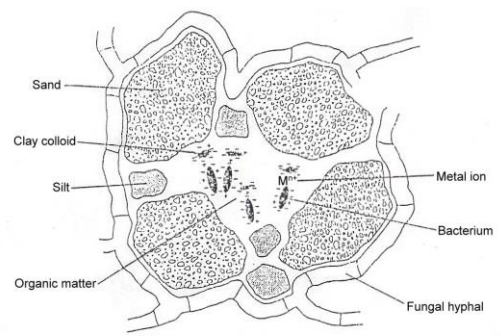
關鍵詞：土壤監控、理化因子、微生物相

## 摘要

土壤微生物是地球上生態系中不可或缺的分解者，更是推動各種元素循環之基層生物。為了永續經營大自然的理念，以及更了解我們人類所依附的土壤，本研究主要目的是調查校園中相鄰兩區域土壤中微生物相的相似程度，並探討微生物數量變化與環境理化因子(溫度、pH 值與雨量)的關聯性，找出優勢菌種並進行 DNA 定序。本研究結果發現土壤中同時存在有益植物生長及有害人體的微生物。此外，經由微生物數量變化與環境理化因子圖表製作與分析，發現土壤微生物的數量多寡和土壤環境溫度、pH 值及含水量多寡相關。若持續調查土壤微生物相，未來將可應用於農作物的栽培，使其更能順應季節的變化以及減少病蟲害。

## 壹、研究動機

土壤微生物是地球上生態系中不可或缺的分解者，是推動各種元素循環之基層生物。土壤中充滿微小生物，一匙校園內沃土可能含數十億個微生物，其中包括細菌、真菌、藻類、原蟲與病毒。土壤中之微生物相可用無數與包羅萬象以形容其特徵，根據文獻資料，生活於一公頃（2.47 公畝）上層 15 公分土壤之微生物，其重量就介於 0.5~4 公噸。



Hypothetical spatial arrangement of microorganisms in relation to soil particles.

圖一、土壤組成

當土壤環境中的理化因子(溫度、酸鹼度、雨量)發生變化或外來因素(例如：不當使用農藥)的擾動皆會改變土壤狀態，進而對土壤中之好氣性、嫌氣性、兼性微生物的族群變遷有直接的影響。健康的土壤其微生物多樣性高，但當土壤環境改變(如有機質加入、通氣性改變等)，部分微生物皆有可能大量繁殖或停止生長，而導致植物養分供應受阻，引起作物缺乏某種養分，如果長期下來農作物必然受害，對長久以來的全球糧食不足的問題更是雪上加霜。

土壤微生物的多樣性與否在維持高品質土壤上扮演重要的角色，但現今研究對許多土壤相關問題，例如：土壤微生物的指標、土壤微生物多樣性和土壤各種微生物比例隨環境理化因子變遷等方面仍極度缺乏瞭解。加上因全球暖化與環境污染的變遷，都可能影響土壤的菌相，為了解土壤微生物及外在因素的關係，本研究選擇從小地方研究起，藉由觀察校園鄰近兩區域土壤中的微生物相，探究兩地微生物相隨溫度、酸鹼度、雨量的變化而改變的情形。

## 貳、研究目的

- 一、探討校園內兩相鄰區域微生物數量變化與環境理化因子(溫度、pH 值與雨量)的關聯性。
- 二、比較校園內兩相鄰區域微生物相之相似程度。
- 三、找出校園內兩相鄰區域微生物相中細菌、真菌的優勢種，檢視其隨時間季節的數量變化。

## 參、研究設備及器材

### 一、實驗器材：

滅菌釜、無菌操作台、電子秤、磁石攪拌器、培養皿、錐形瓶、溫度計、玻璃棒、pH meter、震盪箱、快速震盪器、試管、試管架、石臘膜、PCR 機器(廠牌/規格：FlexCycle2 twin 48G/Analyti)、PCR 專用退冰盒、電泳槽、暗箱等。

### 二、實驗藥品：

Nutrient Broth、Potatao Dextrose Broth、硫酸鏈黴素(streptomycin sulfate)、DEB(DNA Extraction Buffer)、Lysing Matrix Tube、Vortex、氯仿、異戊醇、異丙醇、Ammonium acetate、TE 緩衝液、Agarose、TAE、EtBr(溴化乙錠，核酸染料)等。

## 肆、研究過程或方法

### 一、樣區的選擇

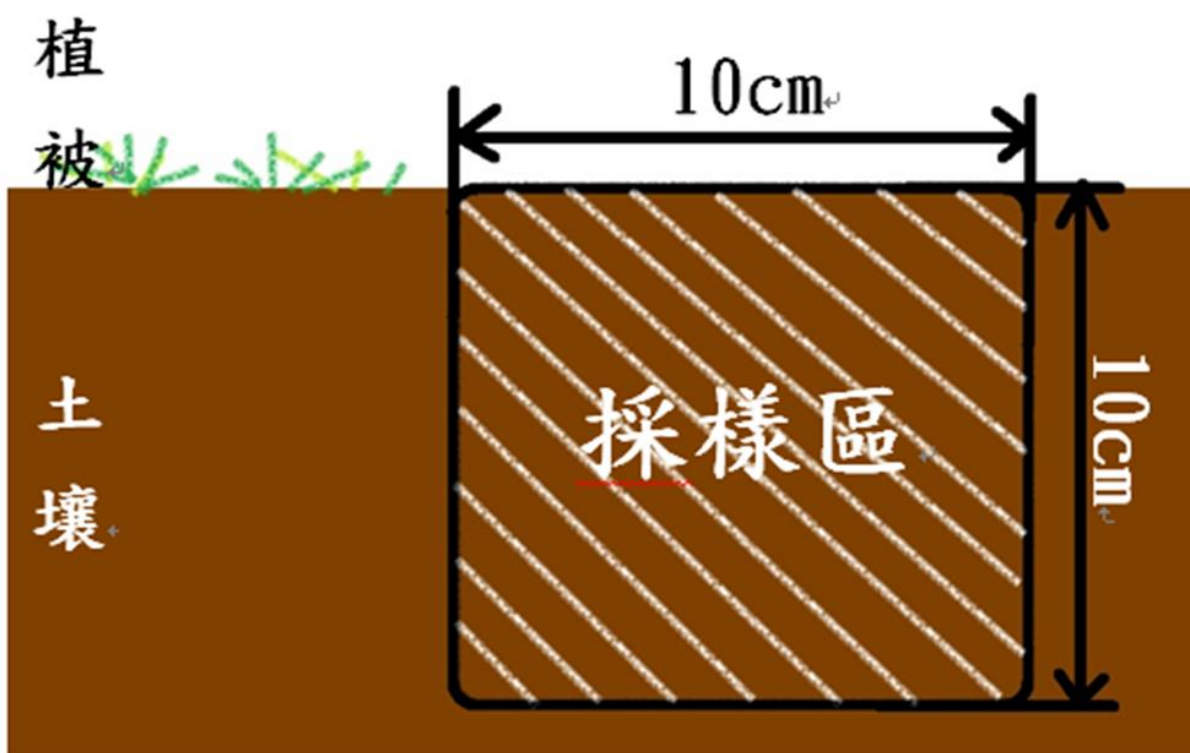
- (一)於校園內椰子樹下一塊較少被踐踏的草地，選擇相距 9 公尺的甲、乙兩區，選取每區 10 cm X 10 cm 大小的樣區挖取土壤。



圖二、甲區俯視



圖三、乙區俯視



圖四、採樣區範圍圖示



X:稀釋倍率( $10^{-4}$  倍率= $10^4$  倍代入) V:每皿加入的菌液量(ml/皿)

## 六、培養基配製

### (一) NA 培養基(用於培養細菌)：

取 1.3 克的 Nutrient Broth 溶於 0.1 L 去離子水中，以磁石攪拌器攪拌均勻，在錐形瓶中加入 1.5 g 的 Agar，放入滅菌釜滅菌(高溫高壓 121°C、1.2atm)。待冷卻後，分裝到培養皿中(約 8 皿)，搖勻放涼封膜。

### (二) PDA 培養基(用於培養真菌)：

取 2.4 克的 Potatao Dextrose Broth 溶於 0.1 L 去離子水中，以磁石攪拌器攪拌均，在錐形瓶中加入 1.5 g 的 Agar，放入滅菌釜滅菌(高溫高壓 121°C、1.2 atm)。待冷卻後，加入硫酸鏈黴素(streptomycin sulfata) 0.02g，裝到培養皿中(約 8 皿)，搖勻放涼封膜。

## 七、菌株物種定序

### (一)染色體 DNA 萃取：

- 1.加 800  $\mu$ L DEB 進 Lysing Matrix Tube 中(已加入 Silica Bead 並滅菌之 Vial)。
- 2.由分區劃線法取完整之單一菌落或 200-400 mg 菌絲加入 Lysing Matrix Tube 中吸放均勻。(在無菌操作台完成)
- 3.將 Tube 用 Vortex 以轉速 4 M/s 震盪 20 秒。
- 4.以 65°C 水浴槽加熱 60 分鐘，每 15 分鐘用手搖勻一次。
- 5.加入 750  $\mu$ L 24:1 氯仿與異戊醇的混和液，手搖混和均勻。
- 6.以 18000g 離心 15 分鐘。(此步驟之廢液需回收)
- 7.取上清液移入新管中，並加入 600  $\mu$ L 異丙醇與 150  $\mu$ L Ammonium acetate。
- 8.上下倒轉數次後，靜置 10 分鐘，再以 20000 g 離心 10 分鐘。
- 9.移除上清液，或將管子倒置但不可超過 5 分鐘。(此步驟之廢液需回收)
- 10.加入 100  $\mu$ L 70% ethanol 混合均勻，並以 20000g 離心 1 分鐘後移除濾液。
- 11.加入 100  $\mu$ L 95% ethanol 混合均勻，並以 20000g 離心 1 分鐘後移除濾液。

12.倒置 5 分鐘後加入 50-100  $\mu\text{L}$  pH8 的 TE 緩衝液。

13.將 DNA 貯存於 $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱隔夜或兩天後，備用。

## (二)菌株染色體 DNA 放大

1.以聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)進行放大，選用引子對

fD1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、rD1(5'-CTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3')。

2.使用 PCR 專用退冰盒，拿出 DNA buffer、dNTP、fD1、rD1 及先前萃取的染色體 DNA，退冰 30 至 60 分鐘。

3.退冰完成後，除 DNA 外的溶液先一起進行配置混和再分裝，分裝時要先減去 DNA 量，且總體積不變，因此若 DNA 量欲增加， $\text{H}_2\text{O}$  量要減少。

表二、混和溶液成分

藥品	單位( $\mu\text{L}$ )
DNA buffer	2
dNTP	1.6
fD1	1
rD1	1
DNA	1
TAG	0.1
$\text{H}_2\text{O}$	13.3
<b>Total</b>	<b>20</b>

4.分裝完成後加入先前萃取的染色體 DNA，放入 PCR 機器。

5.反應程序：

(1)變性(denature)：利用  $95^{\circ}\text{C}$  高溫，使雙股 DNA 打開為單股。

(2)黏合(annealing)：溫度降為  $55^{\circ}\text{C}$ ，使引子對黏合至配對的 DNA 上。

(3)延伸(extention)：溫度升為  $72^{\circ}\text{C}$ ，利用添加的 dNTP，相對的鹼基對會黏合至 DNA 上，進行多個循環後會產生大量 DNA 片段。

6.設定好預設條件，轉緊上蓋，在完成時間收取。

## (三)電泳

- 1.配膠：取適量的 Agarose 粉末和 TAE(緩衝溶液)混合並微波 40 秒，加到有磁石的 250 ml 三角燒瓶。
- 2.沖水降溫後，置於攪拌器上攪拌，加入 2  $\mu$ L EtBr(溴化乙錠，核酸染料)。
- 3.膠片製作：由製膠模板右下角緩緩(無氣泡)倒入膠液，等待凝固約 20 分鐘。
- 4.Loading 液體配置：  
DNA(5  $\mu$ L)+dye(2  $\mu$ L)+H<sub>2</sub>O(5  $\mu$ L) 將此三種液體置於乾淨面之石臘膜上，用 10  $\mu$ L 微量吸管抽吸均勻，加入膠洞前再混勻。
- 5.待膠面凝固後取下梳子，將膠面連同透明夾板一起放入電泳槽(以 45° 放入)，TAE 液面需淹過膠面表面。
- 6.將 DNA 樣品混勻後放入膠洞內，電泳槽正極接正極，負極接負極，設定電壓=80V，約 40 到 50 分鐘。
- 7.完成後，連同透明膠板一起拿起，將膠片輕輕滑上暗箱，不要有氣泡，完成後用相機或蓋上透明板，開 UV 燈，觀察 DNA 條帶。

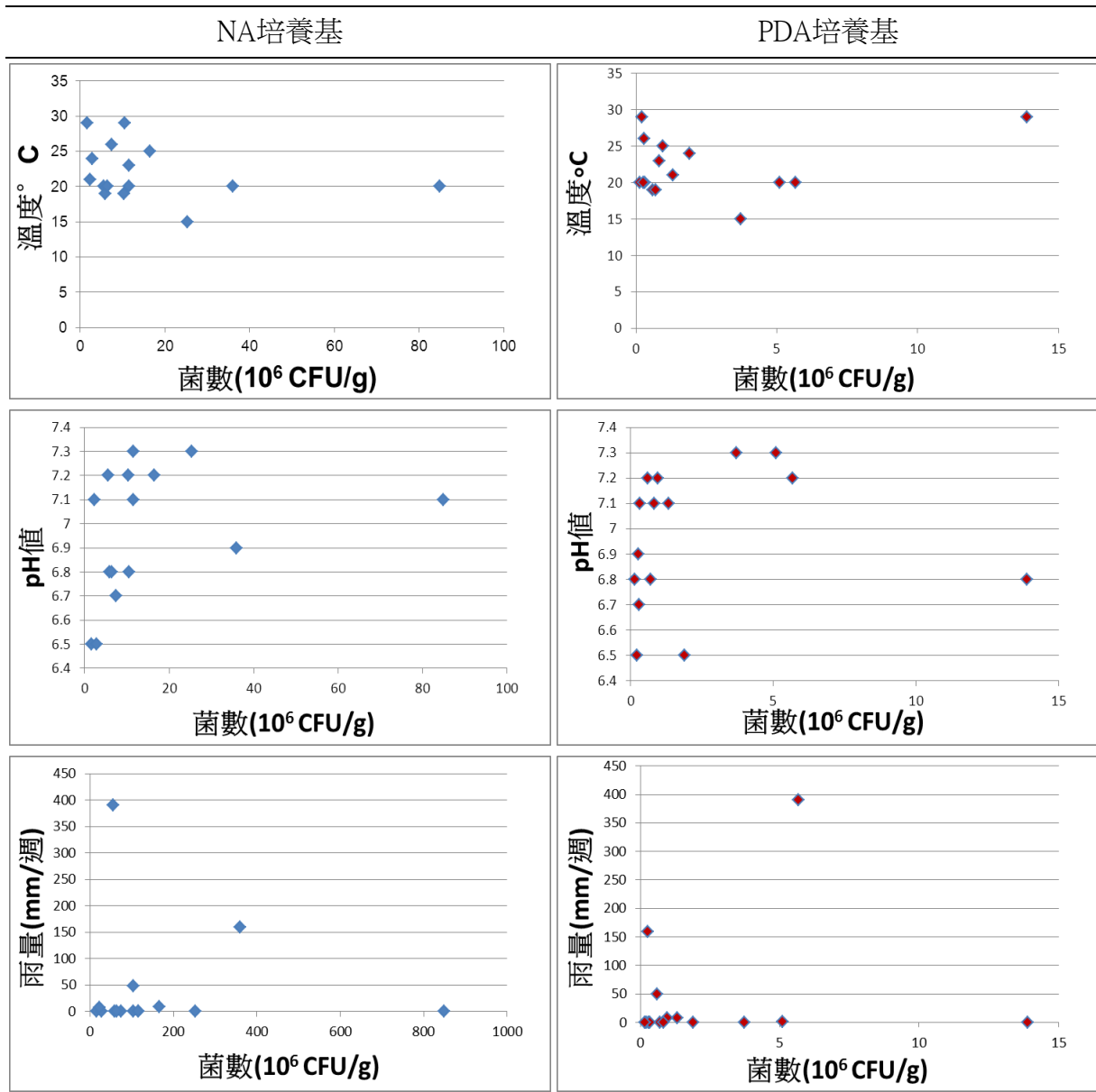


## 伍、實驗結果

一、探討微生物數量變化與環境理化因子(溫度、pH 值與雨量)的關聯性

1.甲區

圖五、甲區菌數與溫度、pH值、雨量比較



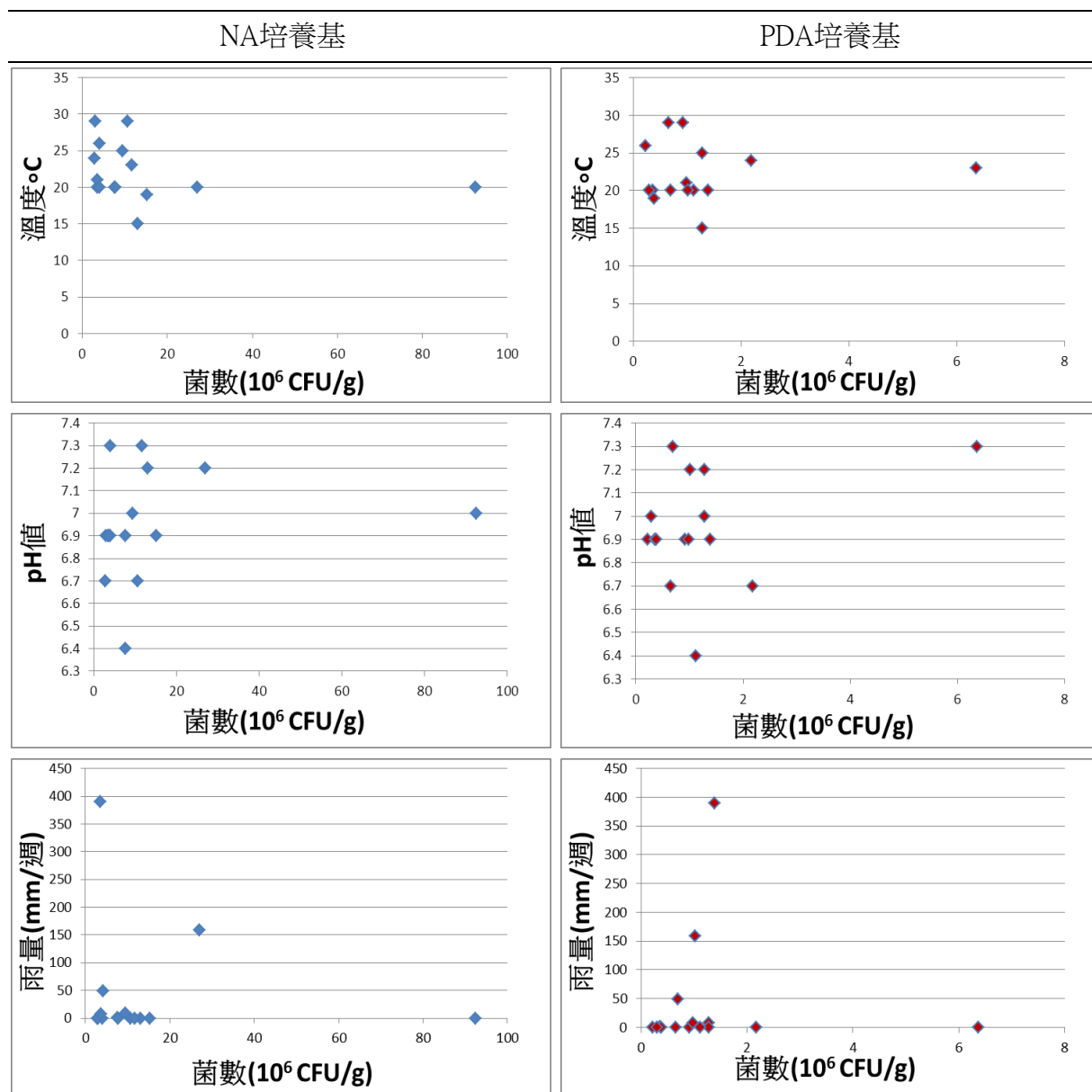
表三、甲區菌數與環境理化因子之相關係數

甲區	溫度	pH 值	雨量
NA	-0.28913	0.28332	-0.03917
PDA	0.264431	0.102094	0.155073

根據圖五，得知甲區微生物在土壤溫度15~20°C 情況下數目較多。此外，根據表三結果，甲區微生物生長曲線與土壤中溫度及雨量變化較無相關性，但與pH值變化相關係數高。

## 2.乙區

圖六、乙區菌數與溫度、pH值、雨量比較



表四、乙區菌數與環境理化因子之相關係數

乙區	溫度	pH 值	雨量
NA	-0.23104	0.155782	-0.08632
PDA	0.052405	0.325566	-0.01376

根據圖六，得知乙區微生物在土壤溫度15~25°C情況下數目較多。此外，根據表四結果，乙區微生物生長曲線與土壤中溫度及雨量變化較無相關性，但與pH值變化相關係數高。

## 二、DNA定序結果

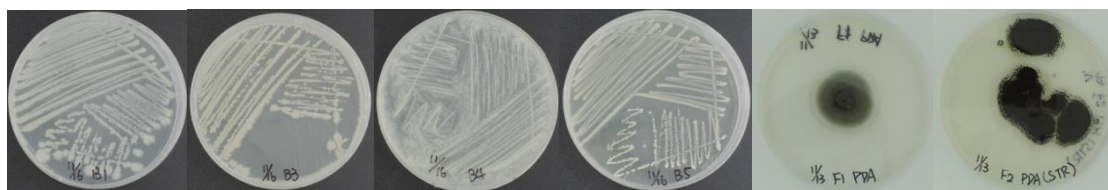
(一)取9隻菌種定序，並分別命名為B1、B3、B4、B5、F1、F2、B6、B8、B9。

(“B”表示Bacterium，細菌；“F”表示Fungus，真菌)

表五、甲、乙兩區優勢菌種

	細菌	真菌
甲區	B5 B6 B9	F2
乙區	B1 B3 B4 B8	F1

圖七、細菌塗碟與真菌培養，從左到右依序為B1、B3、B4、B5、F1、F2



表六、DNA 定序結果

編號	菌種(NCBI)相似度	相似度	菌種(EzBioCloud)相似度	相似度
F1	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	99%		
F2	<i>Aspergillus niger</i>	99%		
B1	<i>Bacillus cereus</i>	98%	<i>Bacillus anthracis</i>	96.48%
B3	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	99%	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	99.57%
B4	<i>Bacillus mycoides</i>	99%	<i>Bacillus anthracis</i>	99.70%
B5	<i>Bacillus pumilus</i>	100%	<i>Bacillus aerophilus</i>	100%
B6	<i>Uncultured bacterium</i>	98%	<i>Mucilaginibacter litoreus</i>	97.53%
B8	<i>Sphingobium chinhatense</i>	98%	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i>	98.63%
B9	<i>Bordetella avium</i>	99%	<i>Bordetella avium</i>	99.09%

### 三、土壤中細菌NA、真菌PDA的優勢菌種其隨時間季節的數量變化

本研究定義優勢菌種為在培養基上覆蓋面積大、出現頻率高的菌種。

#### (一)NA培養基在稀釋 $10^{-4}$ 倍率下菌落樣貌

日期	甲區	乙區	日期	甲區	乙區
9/25	長蛆不採計	長蛆不採計	1/20		
11/1	長蛆不採計		1/26		
11/6	長蛆不採計		2/12		長蛆不採計
11/20			2/19		
12/4			3/18	長蛆不採計	長蛆不採計
12/11	長蛆不採計	長蛆不採計	4/1		長蛆不採計
12/18	長蛆不採計	長蛆不採計			
12/31		長蛆不採計			
1/8					

根據上圖在NA培養基的數週觀察結果，經由DNA定序結果找出2株優勢細菌分別為B1 (*Bacillus cereus*)與B4(*Bacillus mycoides*)。

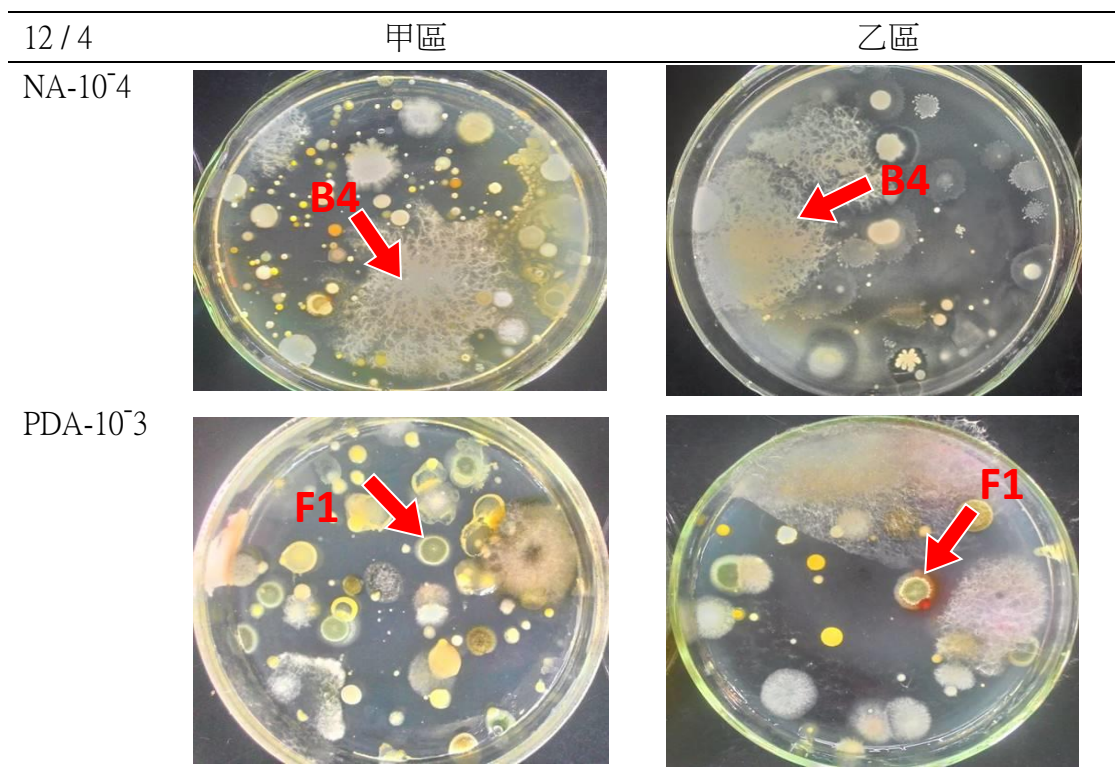
(二)PDA培養基在稀釋 $10^{-4}$ 倍率下菌落樣貌

日期	甲區	乙區	日期	甲區	乙區
9/25			12/31		
11/1			1/8		
11/6			1/20		
11/20			1/26		
12/4			2/12		
12/11			2/19		
12/18			3/18	長蛆不採計	
			4/1		

根據上圖在PDA培養基的數週觀察結果，經由DNA定序結果找出1株優勢真菌菌種為F1(*Microsphaeropsis arundinis*)。此外尚發現當環境溫度下降時B8(*Sphingobium chlorophenicum*)大量出現。根據文獻資料，發現B8具有能分離礦化農藥五氯苯酚(PCP)的功能。

#### 四、比較甲區和乙區的微生物相

表七、12月4日甲、乙區微生物相比較



比較甲、乙兩區微生物相，發現有同時存在的 F1 與 B4，如箭頭所示；也有不同的菌種。

### 陸、討論

一、土壤中存在各式各樣微生物，本研究所探討的細菌及真菌，為較容易研究、土壤中存在數目較多、有機物分解能力較佳者，根據文獻資料得知在 1 克土壤中微生物種類與數量。

表八、土壤中微生物種類與數量

微生物	1g 土壤中微生物數
細菌	16,900,000
放線菌	1,340,000
嫌氣性細菌	1,000,000
絲狀菌	205,000
嫌氣性絲狀菌	1,326
藻類	500
原生動物	40

表九、土壤微生物適宜之溫度與耗氧率

微生物	QO <sub>2</sub>	溫度(°C)
細菌 <i>Azotobacter agilis</i>	1,200	30
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	50	30
放線菌 <i>Nocardia opaca</i>	12	30
真菌 <i>Fusarium solani</i>	10	20
藻類 <i>Chlorella sp.</i>	40	30
原生動物 <i>Paramecium</i>	0.5	20

二、根據表十文獻資料所示，大部分微生物分布於地面以下數公分。本研究所挖掘土壤深度為 10 cm。

表十、菌數與挖掘深度

深度(cm)	菌數/g 土壤(x1000)		
	好氣性細菌	嫌氣性細菌	真菌
3~8	7800	1950	110
20~25	1800	379	50
35~40	472	98	14
65~75	10	1	6
135~145	1	0.4	3

三、本研究結果發現，微生物生長曲線與pH值變化相關係數高。其中造成此現象的可能原因為：環境中的pH值會引起細胞膜電荷的變化，影響了微生物對營養物質的吸收，還會影響代謝過程中酶的活性，並改變生長環境中營養物質的有效性以及有害物質的毒性。根據Johnson和Guenzi(1963)的數據指出一般土壤細菌數在土壤pH=3.4~7.5時，pH愈高菌數也會從每克1百萬逐漸升高到每克9千5百萬。

四、根據表十一文獻資料所示，土壤含水量會影響真菌數量。土壤含水量受雨量影響，若水分過多，則土壤間氣體交換及氧氣的供應減少，此時環境偏向厭氧狀態，影響微生物代謝活性，進而影響微生物數量。但根據本研究結果，發現微生物生長曲線與雨量變化較無相關性。

表十一、真菌數目與土壤含水量

土壤含水量 平均百分比率	真菌/克×10 <sup>3</sup>			孢子占總量 之百分比率
	總量	菌絲單位	孢子	
8.9	99	60	39	39
11.2	89	57	32	36
18.5	142	113	29	20
24.2	149	133	16	10
27.1	173	153	20	12

五、透過 NA、PDA 培養基培養土壤中微生物，找出土壤中細菌與真菌的優勢種

本研究找出土壤中的優勢種，分別為 *Bacillus cereus*、*Bacillus mycooides*、*Aspergillus niger* 以及 *Sphingobium chinhatense*。根據文獻資料，*Bacillus cereus* 與 *Sphingobium chinhatense* 廣泛存在於土壤中。*Bacillus mycooides* 可促進植物生長，提高作物對逆境與病害之耐受性，例如減緩白粉病之發生。*Aspergillus niger* 黑麴黴，屬於散囊菌目發菌科麴黴屬的一種真菌，生長在土壤、糧食、藥材、蟲體、枯枝落葉、動物糞便、霉腐物上，會導致生物生病，在工業應用上利用此菌發酵作用可用以生產檸檬酸與葡萄糖酸。

## 柒、結論

根據本研究結果發現土壤中微生物相的生物多樣性非常高，且相鄰兩區域土壤中的優勢種會相同，例如 *Aspergillus niger* 與 *Bacillus mycooides*，這些菌種對生態系中物質元素的循環很有幫助，有利於植物或動物屍體的分解，但偶爾也會發現存在危害人體的病原菌 *Microspora arundinis*。此外，經由微生物數量變化與環境理化因子圖表製作與分析結果，發現微生物生長曲線與土壤中溫度及雨量變化較無相關性，但與 pH 值變化相關係數高。

地球氣候變遷對地球上的生物造成一定的氣候影響，土壤中為數眾多且生態系中佔有無法被取代地位的分解者-細菌及真菌勢必也會受到氣候所影響，本研究透過監控土壤中微生物優勢菌種的改變，可發現土壤存在的微生物也會受環境的變因(溫度、雨量及 pH 值)影響，而菌數也會隨其呈現變化。

## 捌、未來展望

土壤微生物多樣性是生態保育的基礎，重視土壤微生物多樣性，才有健康的土壤環境，亦才有健康的人類，這是一個值得全民重視的課題。透過長期監控土壤微生物，找出微生物菌數隨季節所展生的規律變化，並探討其變化是否和菌種的特性有關。



## 玖、參考文獻

- Atlas, R.M. and Bartha, R. 1998. *Microbial Ecology: Fundamentals & Applications*, 4th edition. Benjamin/Cummings Pubs. Company Inc. Calif. (8)
- Errakhi, R, A. Lebrihi, and M. Barakate. 2009. In vitro and in vivo antagonism of actinomycetes isolated from Moroccan rhizospheric soils against *Sclerotium rolfsii*: a causal agent of root rot on sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Appl. Microbiol.* 107:672-681.
- Clark, Melody S. (1997) *plant molecular biology- a laboratory manual*. Springer, New York.
- Dai M, Copley SD. (2004). Genome shuffling improves degradation of the anthropogenic pesticide pentachlorophenol by *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723. *NCBI US National Library of Medicine National Institutes of Health*. from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066836>
- 林良平(1978) • *土壤微生物學* • 台北市：天然書社
- 黃裕銘 • *土壤簡介* • 台中：國立中興大學土壤環境科學系
- 林靜宜(2004) • *荖濃河流域之土壤微生物相調查* • 高雄：國立中山大學生物科學系
- 李冠群、李遠豐(2013) • *微生物與有機農業（三）：土壤微生物的功用* • *科技大觀園* • 取自 <https://scitechvista.most.gov.tw/zh-tw/Feature/C/13/13/10/1/851.htm>

## 【評語】 052601

1. 研究團隊以校園土樣進行土壤微生物培養，並進行優勢菌種 DNA 定序，嘗試連結微生物數量變化與環境理化因子的關連。  
整體實驗設計架構完整，科學目的明確。
2. 環境變因代表取樣時的土壤初始狀態，所以科學分析的重點除探討培養菌種的差異外，應探討初始狀態對實驗室所培養菌種的所可能造成之差異與機制。
3. 建議應分析取樣時的土壤含水量以取代降水量，較符合取樣時的土壤初始狀態，主要由於降水量並不足以反應取樣時之實際土壤含水量。
4. 所分析的環境因子僅 pH 值與菌數有較高之相關性，但相關係數仍偏低，建議思考環境因子是否是影響優勢菌種的主要變因。  
還是應進一步分析其他可能影響菌種繁殖的土壤或土壤水的化學特性。