中華民國第57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

第二名

052610

臺灣常見菊科植物之應用

學校名稱:國立臺南第一高級中學

作者:

高二 朱禹任

高二 于子緯

高二 侯沛妤

指導老師:

林静吟

關鍵詞: 菊科、天然萃取物、抑菌驅蟲

摘要

有許多昆蟲是人類或動物疾病攜帶者的主要或中間宿主。大多數的化學驅蟲劑對環境造成嚴重損害。因此,迫切需要開發新的無污染驅蟲劑和抗微生物劑。在本次研究,我們從臺灣常見六種菊科植物中,使用蒸餾水與絕對酒精來萃取花朵和葉子的二次代謝物,並針對原核生物種:大腸桿菌(Escherichia coli-DH5 a)與枯草桿菌(Bacillus subtilis)及真核生物種:果蠅分別進行抑菌實驗及驅避實驗。結果顯示本實驗挑選之菊科植物:孔雀菊、長柄菊、南美蟛蜞菊、大黄菊(壽菊)的二次代謝物確實有殺菌及驅蟲之功效。研究目的是為人類開發以植物為主的抗菌與驅蟲物質以提供健康與環保無污染的新選擇。

壹、 研究動機

由於臺灣地理位置屬於北部是亞熱帶、南部是熱帶氣候、夏天蚊蠅等蟲類繁殖旺盛、攜帶病 原體的昆蟲常造成大規模的疾病傳染,造成農牧漁業與醫療成本的嚴重損失,有鑑於市售的 驅蟲藥品或是驅蟲農藥大多為化學合成,既可能破壞自然界生態的平衡又不環保,若是誤用、 誤食更可能傷害人體健康。隨著生態保育、環保意識及永續觀念的抬頭,於是我們企圖尋找 能以天然與日常容易取得的材料,來進行抗菌與驅蟲活性的研究,以達到利用天然物質來防 治病蟲害,近而減少化學驅蟲藥劑使用的目的。由過去文獻發現,我們得知有關於除蟲菊此 類菊科植物,其組織液內的某些化學物質能夠以氣味等方法驅除蒼蠅、蚊蟲,亦從其花中可 cinerins Ⅰ與Ⅱ,甚至能夠達到滅菌效果,因此決定以菊科植物為出發點進行相關研究。除 此之外,除了熟知的除蟲菊,關於菊科植物的介紹,只有少數相關文獻提到其中能夠驅蟲的 化學物質。而我們知道常用的驅蟲物質有DDT(Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane)、百利普芬 (Pyriproxyfen)、陶斯松(Chlorpyrifos)、益達胺(Imidacloprid)、賽滅寧(Cypermethrin)、亞培松 (Temephos)等,但此類物質皆有強毒性及環境污染性,亦即效用強大卻會帶來嚴重的環境危 害,過量使用更會因為危害人體的環境荷爾蒙而影響生理功能。再者,近來市面上被用來防 治害蟲的天然物質,一般以植物較常見,研究的也最多,市面上亦有某些防蟲藥劑,以植物 萃取液製成,雖然效果可能無法與上述化學合成藥劑相比,但它確實能達到驅蟲效果,如此 一來使用上不但安全無虞,天然防蟲的方法對於環境造成的負擔也相對地減少了許多,達成 雙贏的局面。

貳、 研究目的

本研究的主要目的有:

- 一、尋找菊科植物葉片與花朵的二次代謝物,將其分離濃縮。
- 二、研究所含化學物質的抗菌能力。
- 三、探討其中抗菌能力較好者對蠅蟲的趨避效果。
- 四、分析有效化學物質之結構。

參、 研究設備及器材

一、實驗設備與器材:

() 、	超音波均質機	$(/ \clip \clip)$ 、	滅菌釜	(十五)、 層析用矽膠片
(<u> </u>	真空負壓濃縮機	(九)、	細菌培養旋轉機	(tlc silica gel 60 f254)
(\equiv) 、	離心機	(十)、	試管震盪器	(十六)、 趨避實驗方瓶
(四)、	微量離心機	(+-)、	電磁攪拌器	(十七)、 紫外光照射工具
(五)、	微量吸管	(十二)、	電子秤盤	(十八)、 毛細管
$\left(\frac{1}{2}\right)$,	無菌操作台	(十三)、	酒精燈	(十九)、 細菌培養液與培養

基(註一)

(註一)細菌培養液與培養基之配方

(七)、 分光光度計 (十四)、 接種環

細菌培養液(LB broth)配置材料	取量	細菌培養基(LB agar)配置材料	取量
Yeast extract	5g	Bacteriological agar	30g
Tryptone	10g	Yeast extract	10g
NaCl	5g	Tryptone	20g
DDH2O	1000ml	NaCl	10g
		DDH2O	2000ml

二、本次實驗所用的植物種類與簡要介紹:



香茅/Cymbopogon citratus(對照組):非菊科,是常見驅蟲植物代表。



孔雀菊/Aster tataricus:菊科,原產於墨西哥,由姬孔雀草和萬壽菊雜交改良而來。



長柄菊/Tridax procumbens: 菊科,長柄菊 是臺灣中南部常見的菊科植物,屬歸化 種。



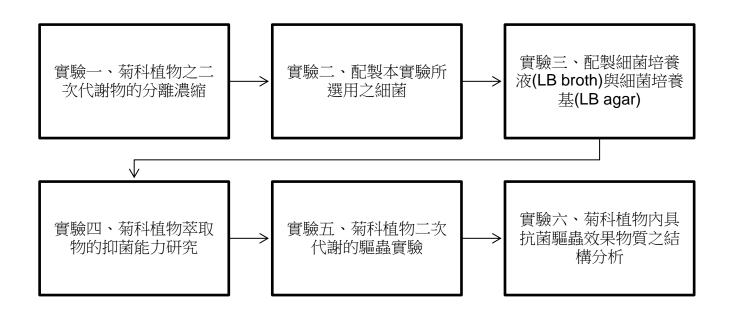
大黃菊(壽菊)/Tagetes erecta: 菊科,越年生草本,全台皆有,可萃取葉黃素加以利用。



大花咸豐草/Bidenspilosa: 菊科,全台低海 拔極為常見,為極具侵略性之歸化雜草。



肆、 研究過程及方法



實驗一、 菊科植物之二次代謝物的分離濃縮:

(一)、 動機:參考過去文獻,得知有關於除蟲菊此類菊科植物,其組織液內的某些化 學物質能夠有驅蟲、滅菌效果,因此我們以以下實驗分離濃縮出其二次代謝物,來 作為本次實驗的萃取液。

(二)、 實驗步驟:

- 1. 採集在學校周圍的野生植株,洗淨後分別剪下花及葉的部分。
- 2. 秤重後放入離心管內,加入20ml酒精使用均質機打碎組織細胞。

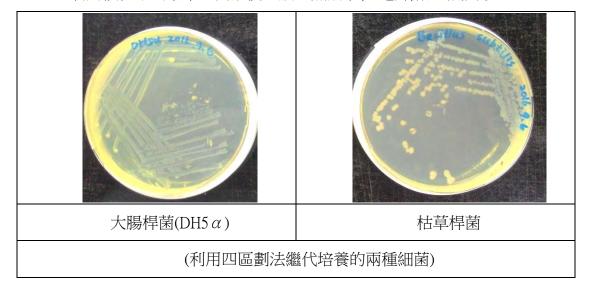
- 3. 放入離心機內離心並吸取上清液,再使用濃縮機將其蒸發,使萃取物留在錐形 瓶裡。(註一),蒸餾完成,呈現乾燥狀態。
- 4. 萃取後的錐形瓶於先後分別滴入1毫升蒸餾水或酒精,滴入後用試管震盪器使萃取物與1毫升溶劑混和均勻。
- 將回溶液用微量吸管分裝入1.5毫升微量離心管指管,於管身標記後,使用石臘 膜封裝,存放4℃冰箱,等待分析。
- (註一):萃取液濃縮-利用真空負壓萃取機,在60℃的環境下將溶劑蒸餾,留下的乾燥物質分次加入1毫升蒸餾水或酒精做為回溶劑,可溶於水的物質與水形成新的濃縮液,取出來另外存放在指管,剩下來難溶於水的物質即以酒精為溶劑將上述過程反覆製作一次。本操作皆先以蒸餾水回溶後,再加入酒精二次回溶以區分兩種不同的溶劑。

實驗二、 配製本實驗所選用之細菌:

(一)、 動機:本次實驗選擇的菌種為自然界常見的兩種細菌:大腸桿菌及枯草桿菌, 作為實驗對象,而他們亦是革蘭氏陰性菌及陽性菌的代表,因為我們認為細胞壁成 分及通透性可能直接或間接受化學物質的影響。

(二)、 實驗步驟:

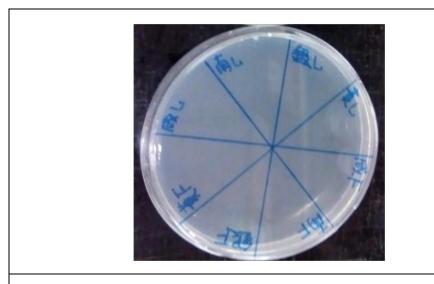
- 1. 細菌種類:大腸桿菌(Escherichia coli-DH5 α)與枯草桿菌(Bacillus subtilis)
- 2. 利用接種環刮取單一菌落後,放入蒸餾水(10毫升)配置成菌液。



- 實驗三、 菊科植物萃取物的抑菌能力研究一以肉眼觀察菌落分布型態
 - (一)、 動機:以肉眼直接觀察菌落的分布型態,以便初步篩選出有抑菌能力的菊科植物之二次代謝物。

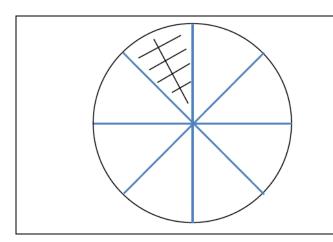
(二)、 實驗步驟:

1. 首先將做好的培養盤底部平均區分為八格,並分為「大腸桿菌組」及「枯草桿菌組」,再各依照塗上的萃取物為「以水溶或酒精溶」再分為兩組,每種萃取物分成水或酒精加入大腸桿菌或枯草桿菌進行三重複的測試,如下圖一。



圖一、分成八等分後,寫上欲測試的萃取物

- 2. 按照上述分組方式,將水溶劑及酒精溶劑的植物萃取液(20 μ L)塗至培養基上,並且放置無菌操作臺一天待萃取液乾燥。
- 3. 將接種環以酒精燈滅菌確保無菌,待接種環冷卻後,將1個Loop菌液以四條橫槓 一條直線的劃法塗至培養基,如圖二。



圖二、以菌液劃線示意圖

- 所有培養基製作完成後,放入暖房(35℃)靜置一天,記錄培養基上細菌菌落分布 及生長情形。
- 5. 細菌培養基生長判讀方法:以肉眼觀察菌落分布型態,以「+」號分三等級, 「+」號愈多代表細菌生長的愈多,N表示幾乎無細菌生長。

菊科植物萃取物的抑菌能力研究一以分光光度計偵測菌液吸光值 實驗四、

(─_**)** 、 動機:以分光光度計偵測菌液吸光值,以便較精確測定有抑菌能力的菊科植物 之二次代謝物。

$(\underline{})$ 實驗步驟:

- 將3毫升細菌培養液、0.001毫升萃取液及1個Loop菌液加入乾淨試管,再將管口 1. 及管蓋過火滅菌,確保不會混入其他細菌等。
- 2. 將配製完成的菌液放入暖房(35℃)的旋轉儀培養一天。
- 細菌培養液生長判讀方法:將放置一天的混和液取出100 µL,利用分光光度計 3. 測量吸光值代表菌量濃度,得到的數據即細菌在同量不同種的萃取液裡的生長 情形比較。並將離心後的吸光值減去離心前的吸光值(OD600),來扣除液體背景 值造成的干擾,如下圖三。



圖三、以分光光度計偵測菌液吸光值

- 菊科植物萃取物的抑菌能力研究一以紙錠擴散試驗法判讀抑菌圈大小與最低抑 實驗五、 制濃度(Minimum Inhibitory Concentration:MIC)
 - (--)動機:此實驗只針對實驗(一)、(二)效果較顯著的菊科植物物種進行測試,以此 方法能明顯比較各萃取液抑菌傾向及最小抑菌濃度。

(二)、 實驗步驟:

- 1. 此實驗只針對實驗(一)、(二)效果較顯著的菊科植物物種進行測試:大黃菊(壽菊)、 孔雀菊、南美蟛蜞菊、長柄菊,並分為「大腸桿菌組」及「枯草桿菌組」,再各 依照紙錠浸泡的萃取物為「以水溶或酒精溶」分組。
- 2. 以打洞器打出圓形濾紙代替紙錠,再放置滅菌釜進行滅菌。
- 3. 將菊科植物的萃取液(以水溶或酒精溶)分別稀釋成十個濃度,每一濃度為前一個濃度的 1/2 倍,如下圖四。



圖四、稀釋後的萃取液。由右至左為萃取液種類(無照順序排列);由上至下為濃度梯度 濃度往下漸減,每一濃度為上一個濃度的1/2倍。

- 4. 分別將滅菌後的紙錠放入萃取液(原萃取液及經稀釋處理的萃取液)浸泡約兩小時
- 取 100 μ L 菌液到培養基上,將三角形塗抹棒以酒精燈過火滅菌確保無菌,待三 角形塗抹棒冷卻後,將菌液均勻地塗在培養基上。
- 6. 用鑷子夾紙錠,直線排列在培養基中間,濃度由上而下遞減,每一濃度為上一個濃度的 1/2 倍,如圖五。



圖五、將紙錠排列在中間。

7. 藉大腸桿菌及枯草桿菌的成長分佈,視其抑菌圈大小與最低抑制濃度(mic),比較兩者細菌在萃取液裡的生長情形,進而判讀各種菊科植物萃取液的抑菌效果。

實驗六、 菊科植物二次代謝物的驅蟲實驗

(一)、 動機:以抗菌效果較顯著的萃取液進行驅蟲測試,模擬現實環境中蠅蟲是否因 為菊科植物萃取液的氣味,而產生驅離的現象;亦揣測有抑菌效果的萃取液可能可 以破壞蠅蟲體內菌叢生態之平衡,影響蠅蟲生理機能,進而達到驅蟲的效果。

(二)、 實驗步驟:

1. 以果蠅做為真核物種進行驅蟲實驗,為野生種,並在實驗室培養,如圖六。



圖六、作為驅蟲實驗的果蠅

使用品種為:黑腹果蠅

(Drosophila melanogaster)

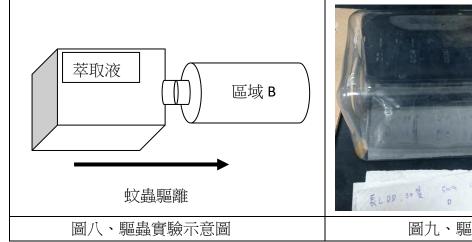
2. 此實驗只針對實驗(一)、(二)效果較顯著的物種進行測試:大黃菊(壽菊)、孔雀菊、南美蟛蜞菊、長柄菊,再依照萃取物為「以水溶或酒精溶」分組。

- 將塑膠透明方瓶與塑膠透明寶特瓶之瓶口相接,劃分為兩區域,塑膠透明方瓶 3. 一端放有萃取液,為果蠅放入端(以下代稱區域A),另一端(塑膠透明寶特瓶)則 無放置萃取液(以下代稱區域B),兩區域透過瓶口相連。
- 將約20±5隻果蠅引入區域 A 洞口內,並迅速以棉花沾滿萃取液 0.5mL,將棉 花置於區域 A 中間,如圖七。



圖七、 將約20±5隻 果蠅引入區 域A洞口內

觀察果蠅是否受到菊科植物萃取液氣味的趨避,而從區域 A 經由相連的瓶口飛 5. 到區域 B,並記錄固定時間(15分鐘內,每隔5分鐘紀錄一次)後離開區域 A飛 至區域 B 之果蠅隻數,以探討各類菊科植物之趨避效果,如下圖八、九。



實驗七、 菊科植物內具抗菌驅蟲效果物質之結構分析

(一)、 動機:此實驗只針對實驗(一)、(二)效果較顯著的菊科植物物種進行測試,先以 薄層層析(Thin layer chromatography, TLC)使混合物分離,後進行高效液相色譜法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)分析與核磁共振光譜法(Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR), 欲找出其中化學物質之結構。

(二)、 實驗步驟:

- 1. 配置展開液:
 - (1). 無菌水
 - (2). 二甲基甲醯胺+甲醇(比例 1:1,共 6ml)。
 - (3). 正己烷+醋酸+異丙醇(比例 1:1:1, 共 6ml)。
- 2. 以毛細管將待測萃取物點於層析用矽膠片,並放入展開槽進行展開。
- 3. 在 λ=365nm 的紫外光線下照射,初步觀察各化學物質展開的情形。
- 4. 挑其中一種萃取液:長柄菊的花(以酒精溶)進行高效液相色譜法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)分析。

伍、 研究結果

一、菊科植物二次代謝物的抑菌能力研究-以肉眼觀察細菌培養基菌落分布型態

	Bacil	lus subtilis	7	Escherichia coli-DH5 α			
植物	1	2	3	1	2	3	
		1	DDH	2O			
水	++	+	++	++	++	++	
香茅	以市售萃	取液當作	對照,故	以只在酒精	的實驗結	果顯示。	
孔雀菊-花	+++	++	++	N	N	N	
孔雀菊-葉	+++	+++	+++	+++	++	+++	
長柄菊-花	+++	++	+++	N	N	N	
長柄菊-葉	+++	+++	+++	N	N	+	
大黃菊(壽菊)-花	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
大黃菊(壽菊)-葉	+++	+++	+++	++	+	++	
大花咸豐草-花	++	++	++	+	++	+	

大花咸豐草-葉	+++	+++	++	++	+++	+++
南美蟛蜞菊-花	+++	+++	+++	++	++	+
南美蟛蜞菊-葉	+++	+++	+++	+	N	+
銀膠菊-花	+++	++	+++	+	+	+++
銀膠菊-葉	+++	+++	+++	N	N	+

表一、植物葉與花萃取物在枯草桿菌與大腸桿菌的培養基生長測試 (菌落形成單位(colony-forming unit, CFU): +++, 菌數大於200; ++, 菌數大於100;

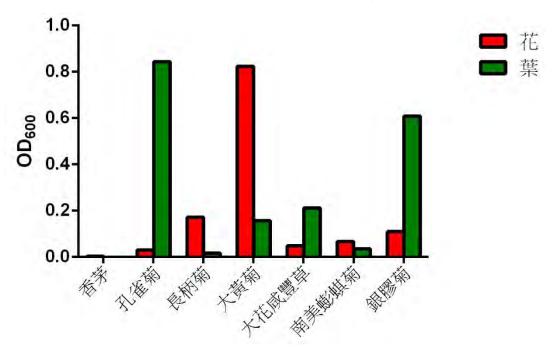
+,菌數大於50;N,菌數小於50或幾乎完全抑菌,各組實驗重複3次)

	Bacille	us subtilis		Escher	<i>ichia coli</i> -D)H5 α
植物	1	2	3	1	2	3
		A	lcohol Sol	vent (99%]	ЕТОН)	
酒精	++	+	++	++	++	++
香茅	N	N	N	+	+	++
孔雀菊-花	+++	+++	+++	++	+	+
孔雀菊-葉	+++	+++	+++	+++	+++	+++
長柄菊-花	N	N	N	+	++	+
長柄菊-葉	N	N	+	++	++	++
大黃菊(壽菊)-花	++	+	+++	++	+	+
大黃菊(壽菊)-葉	+++	+++	+++	+++	++	+
大花咸豐草-花	+++	+++	+++	+	+	++
大花咸豐草-葉	+++	+	+++	+++	++	+
南美蟛蜞菊-花	N	N	N	+	++	+
南美蟛蜞菊-葉	N	N	N	++	+	+
銀膠菊-花	N	N	N	+	++	+
銀膠菊-葉	+++	+	++	++	+	++

表二、植物葉與花萃取物在枯草桿菌與大腸桿菌的培養基生長測試 (菌落形成單位(colony-forming unit, CFU): +++,菌數大於200; ++,菌數大於100;

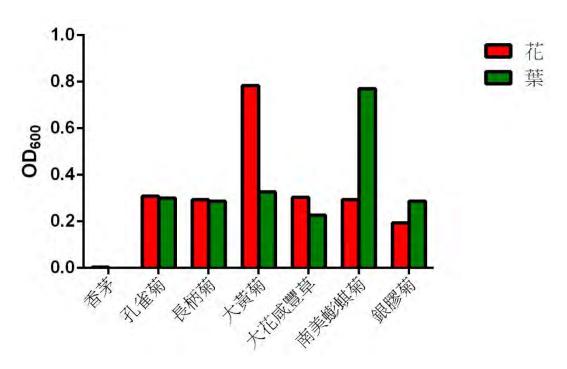
+,菌數大於50;N,菌數小於50或幾乎完全抑菌,各組實驗重複3次)

二、菊科植物二次代謝物的抑菌能力研究-以分光光度計偵測細菌培養液吸光值 表三為以 DDH2O 為溶劑的萃取物對於大腸桿菌之抑菌結果

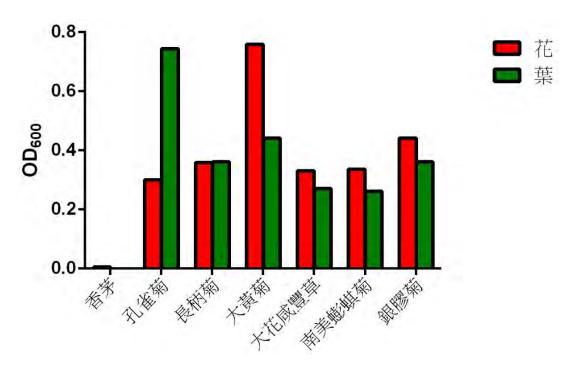


表三、植物葉與花萃取物(DDH2O)在大腸桿菌的培養液吸光值測試

表四為以酒精為溶劑的萃取物對於大腸桿菌之抑菌結果

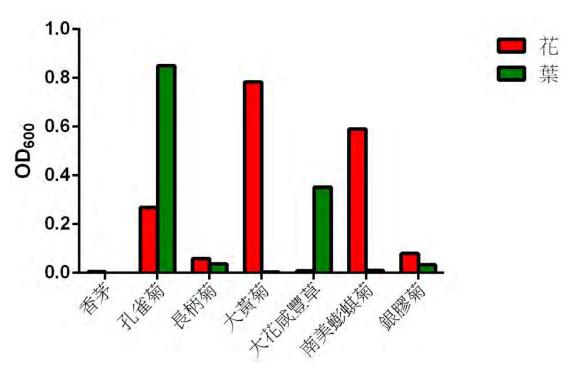


表四、植物葉與花萃取物(酒精)在大腸桿菌的培養液吸光值測試



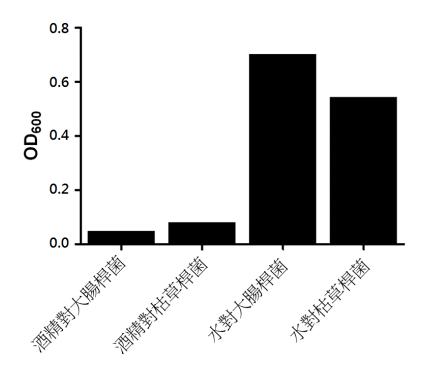
表五、植物葉與花萃取物(DDH2O)在大腸桿菌的培養液吸光值測試





表六、植物葉與花萃取物(酒精)在枯草桿菌的培養液吸光值測試

表七為酒精與水對於大腸桿菌與枯草桿菌之抑菌結果



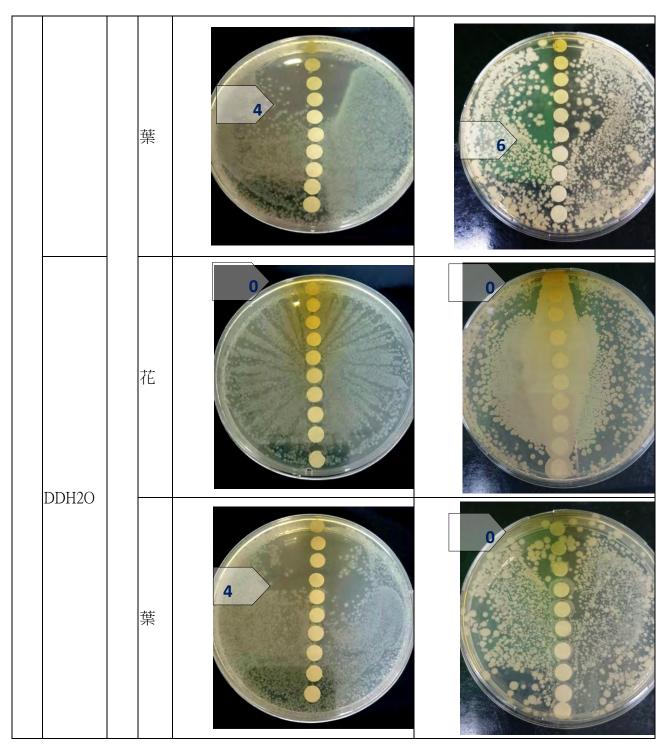
表七、酒精與水個別在大腸桿菌的培養液以及枯草桿菌的培養液吸光值測試 三、菊科植物二次代謝物的抑菌能力研究-以紙錠擴散試驗法判讀抑菌圈大小

植	植物:大黄菊(壽菊)			Escherichia coli-DH5 α	Bacillus subtilis		
溶劑種類	Alcohol Solvent (99% ETOH)	植物部位	花	4			

			葉		
	DDH2O		花		
	DDH2O		葉		
	植物:孔	1	.]	Escherichia coli-DH5 α	Bacillus subtilis
劑種	Alcohol Solvent (99% ETOH)	植物部位	花		2

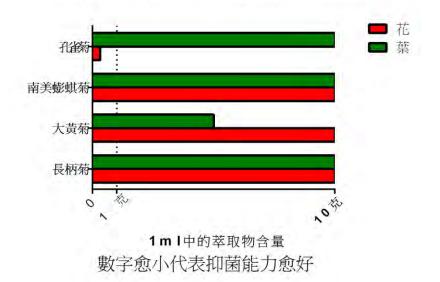
		HTA ATT	葉	4	
		- /	花		6
	DDH2O	ITIN	芒未		
	植物:南菊	美蟛	蜞	Escherichia coli-DH5 α	Bacillus subtilis
劑種	Alcohol Solvent (99% ETOH)	植物部位	花		5

	葉	3	
	花	4	2
DDH2C	葉		
植物:	長柄菊	Escherichia coli-DH5 α	Bacillus subtilis
溶 Alcohol 劑 Solvent 種 (99% 類 ETOH)	物花部		5



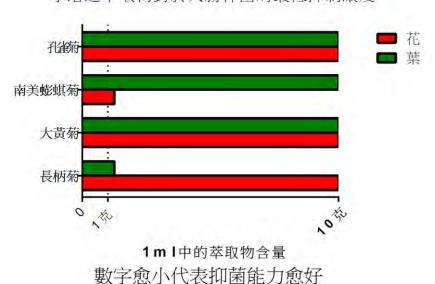
表八、以紙錠擴散試驗法之菊科植物二次代謝物的抑菌能力研究 培養基內的紙錠由上而下濃度漸減,最高濃度為,且每一濃度為上一個濃度的 1/2 倍,視其抑菌圈大小與最低抑制濃度(Minimum Inhibitory Concentration,MIC),比較兩者 細菌在萃取液裡的生長情形。

水溶之萃取物對於枯草桿菌的最小抑制濃度



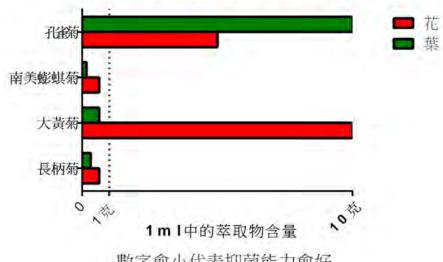
表九、以紙錠擴散試驗法之水溶萃取物對於枯草桿菌的最小抑制濃度

水溶之萃取物對於大腸桿菌的最低抑制濃度



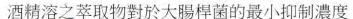
表十、以紙錠擴散試驗法之水溶萃取物對於大腸桿菌的最小抑制濃度

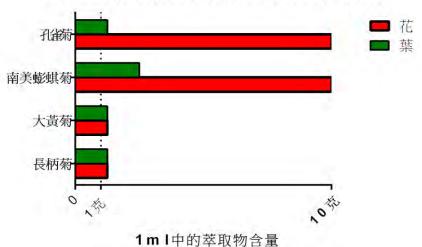
酒精溶之萃取物對於枯草桿菌的最小抑制濃度



數字愈小代表抑菌能力愈好

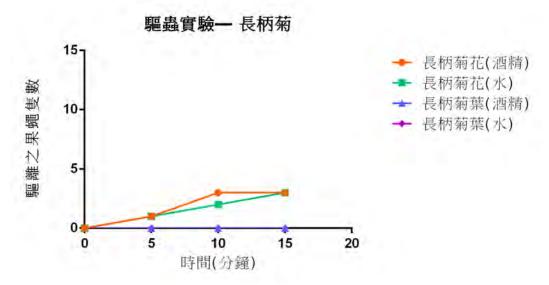
表十一、以紙錠擴散試驗法之酒精溶萃取物對於枯草桿菌的最小抑制濃度



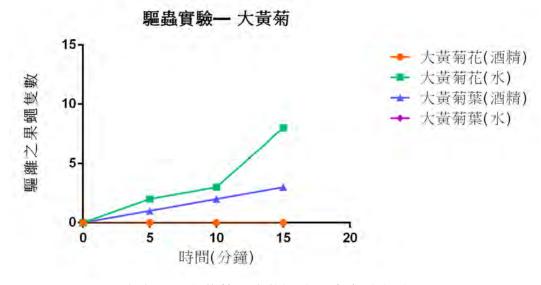


數字愈小代表抑菌能力愈好

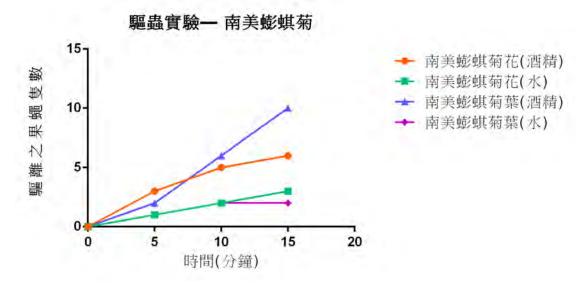
表十二、以紙錠擴散試驗法之酒精溶萃取物對於大腸桿菌的最小抑制濃度



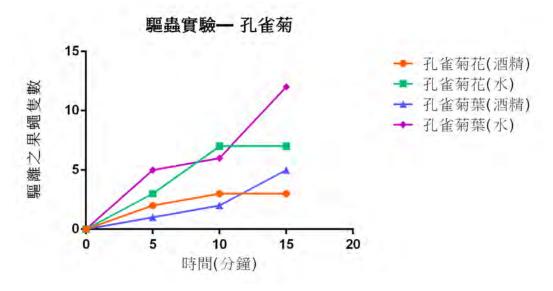
表十三、長柄菊二次代謝的驅蟲實驗之效果



表十四、大黃菊二次代謝的驅蟲實驗之效果



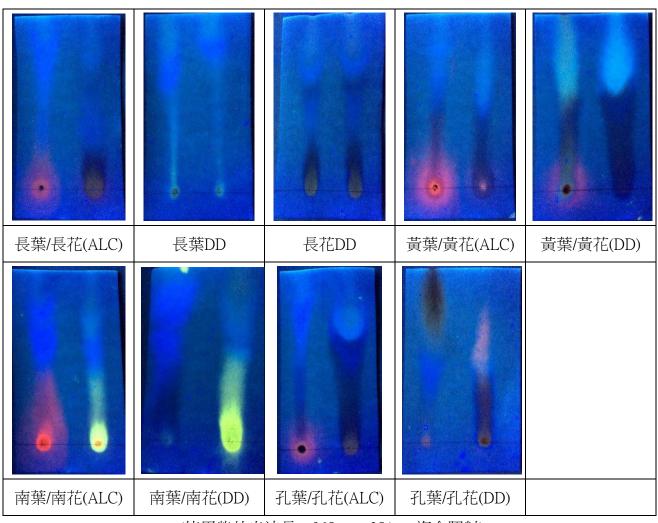
表十五、南美蟛蜞菊二次代謝的驅蟲實驗之效果



表十六、孔雀菊二次代謝的驅蟲實驗之效果

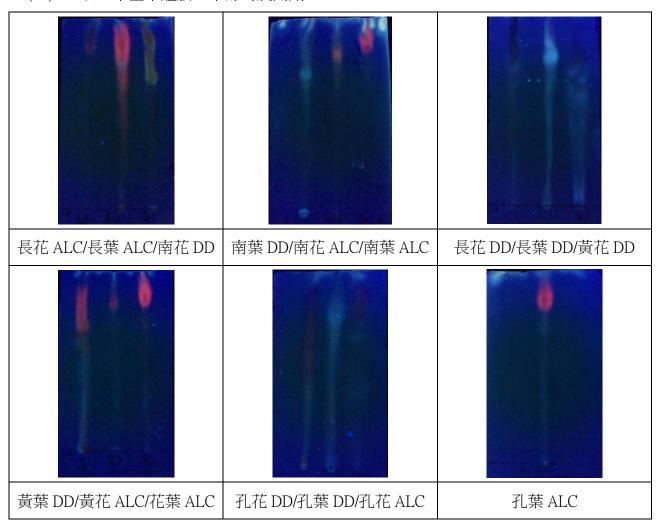
五、菊科植物內具抗菌驅蟲效果物質之結構分析

(一)、 以水為展開劑:



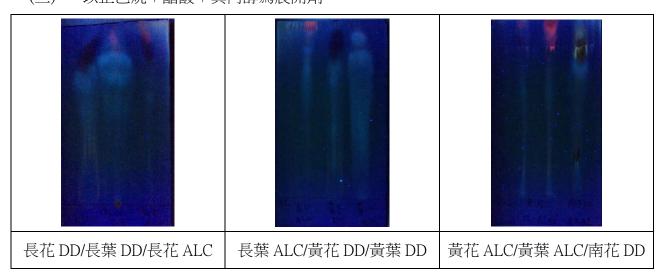
(使用紫外光波長:365nm、254nm 複合照射)

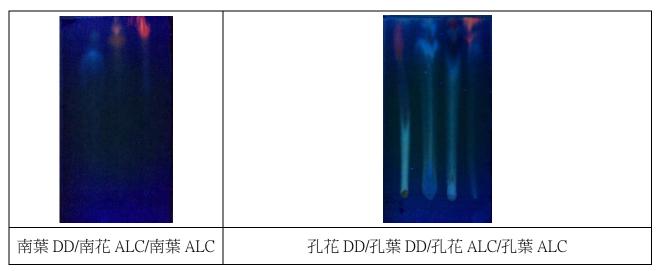
(二)、 以二甲基甲醯胺+甲醇為展開劑:



(使用紫外光波長:365nm、254nm 複合照射)

(三)、 以正己烷+醋酸+異丙醇為展開劑:





(使用紫外光波長:365nm、254nm 複合照射)

依據最小抑菌濃度(mic)實驗、分光光度計菌量檢測實驗、果蠅趨避實驗以及考慮經架價值效益,選取「長柄菊的花(酒精溶)」進行高效液相色譜法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)以及核磁共振光譜法(Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) 進行化學物質之檢測與分析。

陸、 討論

- 一、菊科植物二次代謝物的抑菌能力研究-以肉眼觀察細菌培養基菌落分布型態 結果說明:
 - (一)、 由伍、研究結果中的表一,以 DDH2O 溶劑的菊科植物二次代謝物,對於枯草桿菌, 整體的抑菌效果較不明顯;而對於大腸桿菌,以孔雀菊花、長柄菊花葉、南美蟛蜞菊 葉與銀膠菊葉的抑菌較果最佳。
 - (二)、由伍、研究結果中的表二,以酒精溶劑的植物萃取物,對於枯草桿菌而言,如香茅、 長柄菊花葉、南美蟛蜞菊花葉與銀膠菊的花,幾乎沒有菌落產生,即抑菌效果較顯 著:而對於大腸桿菌,其抑菌效果整體而言相對枯草桿菌較差。
 - (三)、 綜觀整體,以這兩組溶劑來看,長柄菊、南美蟛蜞菊與銀膠菊的抑菌效果表現最佳, 且花的作用較葉子顯著。
- 二、菊科植物二次代謝物的抑菌能力研究-以分光光度計偵測細菌培養液吸光值結果說明:

- (一)、 以 DDH2O 為溶劑的萃取物對於大腸桿菌之抑菌結果: 由伍、研究結果中的表三得知, 孔雀菊花、長柄菊葉、大花咸豐草花、南美蟛蜞菊花葉明顯抑菌效果佳。
- (二)、 以酒精為溶劑的萃取物對於大腸桿菌之抑菌結果: 由伍、研究結果中的表四得知, 除了大黃菊(壽菊)花、南美蟛蜞菊葉外,都有些微的效果,但不顯著。
- (三)、 以 DDH2O 為溶劑的萃取物對於枯草桿菌之抑菌結果: 由伍、研究結果中的表五得知, 孔雀菊花、大花咸豐草、南美蟛蜞菊雖有些微的效果, 但不顯著。
- (四)、 以酒精為溶劑的萃取物對於枯草桿菌之抑菌結果: 由伍、研究結果中的表六得知, 長柄菊花葉、大黃菊(壽菊)葉、大花咸豐草花、南美蟛蜞菊葉與銀膠菊花葉明顯抑 菌效果佳。
- 三、菊科植物二次代謝物的抑菌能力研究-以紙錠擴散試驗法判讀抑菌圈大小結果說明:
 - (一)、 以酒精為溶劑的萃取物對於大腸桿菌之抑菌結果: 由伍、研究結果中的表七得知大 黃菊葉(壽菊)的花葉、南美蟛蜞菊葉、長柄菊花葉呈現明顯的抑菌效果,另外南美蟛 蜞菊花、孔雀菊的葉亦有些微的抑菌效果。
 - (二)、 以 DDH2O 為溶劑的萃取物對於大腸桿菌之抑菌結果: 由伍、研究結果中的表七得 知孔雀菊的花、南美蟛蜞菊的花、長柄菊的葉呈現明顯的抑菌效果。
 - (三)、 以酒精為溶劑的萃取物對於枯草桿菌之抑菌結果: 由伍、研究結果中的表七得知大 黃菊葉(壽菊)的葉、南美蟛蜞菊的花葉、長柄菊的花葉呈現明顯的抑菌效果,另外孔 雀菊的花亦有些微的抑菌效果。
 - (四)、 以 DDH2O 為溶劑的萃取物對於枯草桿菌之抑菌結果: 由伍、研究結果中的表七得知大黃菊葉(壽菊)的花、孔雀菊的花、南美蟛蜞菊的花、長柄菊的葉呈現明顯的抑菌效果另外孔雀菊的葉亦有些微的抑菌效果。
 - (五)、 綜觀整體,以這兩組溶劑來看:將大腸桿菌及枯草桿菌受到萃取物(酒精為溶劑的) 的抑菌作用之生長分布交叉比對,可明顯看出大黃菊(壽菊)的葉、南美蟛蜞菊的花葉 與長柄菊花葉對於大腸桿菌及枯草桿菌都有顯著抑菌效果;將大腸桿菌及枯草桿菌 受到萃取物(DDH2O 為溶劑的)的抑菌作用之生長分布互相比較,可明顯看出孔雀菊 的花、南美蟛蜞菊的花、長柄菊對於大腸桿菌及枯草桿菌都有顯著抑菌效果。

四、菊科植物二次代謝的驅蟲實驗

結果說明:

- (一)、 以酒精為溶劑的萃取物對於果蠅之趨避效果: 由伍、研究結果中的表八得知南美蟛 蜞菊葉有明顯的驅蟲效果,另外南美蟛蜞菊花、孔雀菊的葉亦有些微的驅蟲效果。
- (二)、 以 DDH2O 為溶劑的萃取物對於果蠅之趨避效果: 由伍、研究結果中的表八得知孔 雀菊的花葉、大黃菊(壽菊)的花、長柄菊的花有明顯的驅蟲效果,另外南美蟛蜞菊的 花葉亦有些微的驅蟲效果。

柒、 結論

- 一、由本實驗結果得知,菊科植物的二次代謝物具有殺菌效果,由分光光度計、細菌塗盤方法進行分析,發現紙錠試驗結果相符合:以這兩組溶劑來看:DDH2O溶劑對於大腸桿菌: 孔雀菊、長柄菊、南美蟛蜞菊;酒精溶劑對於大腸桿菌:大黃菊(壽菊)、南美蟛蜞菊; DDH2O溶劑對於枯草桿菌:孔雀菊、南美蟛蜞菊;酒精溶劑對於枯草桿菌:長柄菊、南美蟛蜞菊、大黄菊(壽菊)有較明顯抑菌效果。整體來說孔雀菊、長柄菊、南美蟛蜞菊、大黄菊(壽菊)的二次代謝物皆能抑菌。
- 二、由本實驗結果得知,整體來說孔雀菊、長柄菊、南美蟛蜞菊、大黃菊(壽菊)的二次代謝物皆具有驅蟲效果。
- 三、由上述兩點可得知,本實驗挑選之菊科植物:孔雀菊、長柄菊、南美蟛蜞菊、大黄菊(壽菊)的二次代謝物確實有殺菌及驅蟲之功效。
- 四、此研究的未來展望,可將有抑菌效果及成蠅趨避效果顯著的幾種植物進行測試,以更進一步測試菊科二次代謝物的其他功能,以及找出其真正能夠抗菌驅蟲的化學物質,期望可應用於日常生活當中:針對有驅蟲與抑菌之效的菊科植物萃取物添加於日用品中,如防蚊液,防蚊磚,以兼顧生態保育與維護人體健康;或應用於農業植物病蟲害防治當中:針對有驅蟲與抑菌之效的菊科植物萃取物製成天然農藥;或將其種植在經濟作物外圍,形成天然防護,減少蟲害,減少化學合成農藥的使用,以達到保護環境與永續發展的目的。

捌、参考資料及其他

- 一、余志儒、陳炳輝。2007。作物蟲害之非農藥防治技術-天然防蟲物質19-28頁。行政院農業委員會農業試驗所,台中,臺灣。
- 二、許如君、吳昌昱。2015。農用藥劑分類及作用機制檢索。行政院農委會動植物防疫檢疫局,台北,臺灣。
- 三、鐘楊聰、林良恭、張立雪、黃壁祈。2012。Biology Package,8th Edition-Bacteria and Archaea 629-643頁,台灣培生教育出版股份有限公司,台北,臺灣。

【評語】052610

- 本研究針對臺灣常見六種菊科植物,使用蒸餾水與絕對酒精來萃取花朵和葉子的二次代謝物,並針對原核生物種大腸桿菌與枯草桿菌進行抑菌實驗;以果蠅進行驅避實驗。利用生物技術提出環境無毒用藥之可行性,具有環境科學研究精神。
- 2. 研究結果顯示孔雀菊、長柄菊、南美蟛蜞菊、大黄菊的二次代謝物具有殺菌及驅蟲之功效,提供環保無污染的驅蟲劑。 本研究具有應用性,研究設計與分析方法具體。若能提供花 朵和葉子的二次代謝物萃取劑量與抑菌效果之劑量效應資 料,將更具說服力。
- 若未來進一步分析找出各種萃取物中能夠抑菌驅蠅的化學物質有效劑量,將更有學術性與應用性。

作品海報

臺灣蟲類繁殖旺盛

大規模的疾病傳染

農牧漁業與醫療成本 的損失

市售的驅蟲藥品多為 化學合成,誤用更可 能傷害人體健康

尋找天然與本土 易取得的材料, 進行抗菌與驅蟲 活性的研究以達 到利用天然物質 來防治病蟲害, 進而減少化學驅 蟲劑使用之目的

1.文獻發現除蟲菊含某些 化學物能驅除蚊蠅 2.只有少數文獻提到菊科 植物能夠驅蟲的化學物質 3.目前用來防治害蟲的天

然物質·以植物較常見

以菊科植 物進行相 關研究

研究目的

- 1. 尋找菊科植物葉片與花朵的二次 代謝物,將其分離濃縮。
- 研究所含化學物質的抗菌能力。
- 探討其中抗菌能力較好者對蠅蟲 的趨避效果。
- 分析有效化學物質之結構。

研究設備與器材

超音波均質機 真空負壓濃縮機 離心機

微量離心機 無菌操作台 微量吸管

分光光度計 細菌培養旋轉機 滅菌釜 紫外光照射工具 電磁攪拌器 酒精燈

震盪器 趨避實驗方瓶 電子秤盤

層析用矽膠片(TLC silica gel 60 f254)

細菌培養液與培養基 接種環試管 毛細管

大黃菊 (壽菊)

大花咸豐草 南美蟛蜞菊

銀膠菊





孔雀菊



長柄菊









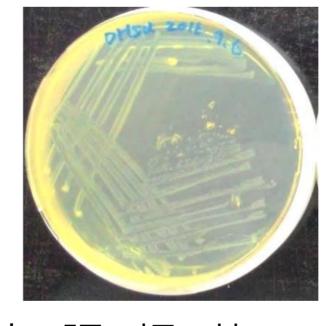
、研究過程及方法

實驗一、菊科植物之二次代謝物的分離濃縮

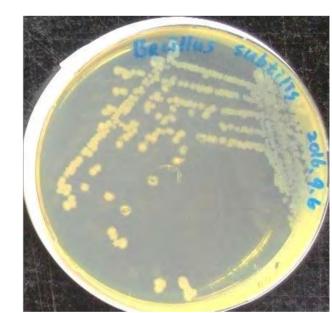
- 將植株取下花及葉秤10 gm,與20 mL酒 精加入離心管,使用均質機打碎組織細胞。
- 離心後,取上清液以真空負壓萃取機將溶 劑揮發(60°C),使萃取物留在錐形瓶裡蒸 餾完成,呈現乾燥狀態
- 先後個別以1 mL無菌蒸餾水、絕對酒精作 為溶劑回溶,存放4°C冰箱。

實驗二、配製本實驗所選用之細菌

利用接種環刮取單一菌落後,放入無菌蒸 餾水(1 mL)配置成菌液。



大陽桿菌 (*Escherichia coli*-DH5α)



枯草芽孢桿菌 (Bacillus subtilis)

實驗三、菊科植物萃取液的抑菌能力研究

方法一、以肉眼觀察菌 落分布型態

方法二、以分光光度計 偵測菌液吸光值

驗法判讀抑菌環 將3 mL培養液、1 μL萃取 1.

- 將培養盤分格組 將萃取液塗上並等待乾燥
- 以接種環劃上1 Loop菌液 2.

畫法:四橫一豎

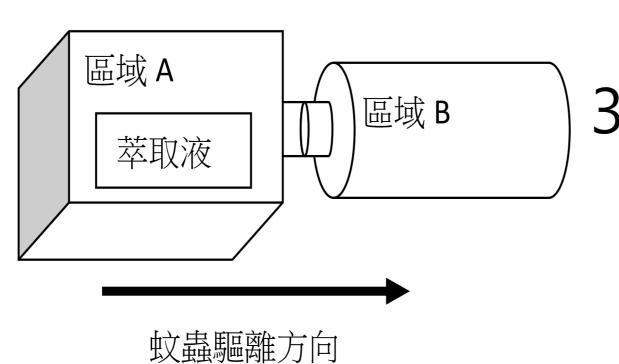
- 液及1 Loop菌液加入試管 放入暖房(35°C)的養菌旋轉儀培養14小時
- 取出100 µL,使用分光光度計測量吸光值(OD₆₀₀)
- 將萃取液進行2倍稀釋, 連續10次,紙錠放入 萃取液浸泡兩小時

方法三、以紙錠擴散試

2. 取100 µL菌液在培養基上塗勻並排上紙錠

實驗四、菊科植物二次代謝物驅蟲實驗(果蠅)

- 將約20±5隻果蠅引入區域A並迅速以棉花 沾滿0.5 mL萃取液至於區域A中間
- 觀察並記錄果蠅是否 受到菊科植物萃取液氣 味的影響,而飛往區域B



實驗五、二次代謝物之結構分析

- 配置色層分析用的展開液。
 - 將萃取液點於層析用矽膠片,並放入 展開槽展開,觀察展開情形。
- 將部分菊科植物萃取液進行高效液相 色譜法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)分析。

伍、研究結果與討論

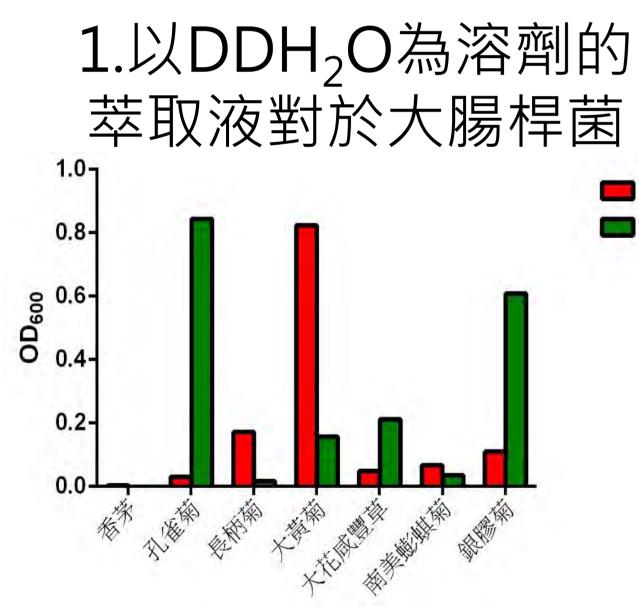
菊科植物二次代謝物的抑菌活性研究-以肉眼觀察菌落分布型態

		স্থান	1日177 —	_ /\ \	ה א רגו, נפו	1/ KZJ /F		H以 住心 フ	下四/口		ニン 心で		
	Ba	cillus sub	tilis	Escher	richia coli	-DH5α		Ва	cillus suk	otilis	Escher	richia coli	-DH5α
植物	1	2	3	1	2	3	植物	1	2	3	1	2	3
			無菌蒸餾	火(DDH ₂ O)						絕對酒精	(99% ETOH)	
香茅	N	N	N	+	+	++	香茅	N	N	N	+	+	++
孔雀菊-花	+++	++	++	N	N	N	孔雀菊-花	+++	+++	+++	++	+	+
孔雀菊-葉	+++	+++	+++	+++	++	+++	孔雀菊-葉	+++	+++	+++	+++	+++	+++
長柄菊-花	+++	++	+++	N	N	N	長柄菊-花	N	N	N	+	++	+
長柄菊-葉	+++	+++	+++	N	N	+	長柄菊-葉	N	N	+	++	++	++
大黃菊(壽菊)-花	+++	+++	+++	+++	+++	+++	大黃菊(壽菊)-花	++	+	+++	++	+	+
大黃菊(壽菊)-葉	+++	+++	+++	++	+	++	大黃菊(壽菊)-葉	+++	+++	+++	+++	++	+
大花咸豐草-花	++	++	++	+	++	+	大花咸豐草-花	+++	+++	+++	+	+	++
大花咸豐草-葉	+++	+++	++	++	+++	+++	大花咸豐草-葉	+++	+	+++	+++	++	+
南美蟛蜞菊-花	+++	+++	+++	++	++	+	南美蟛蜞菊-花	N	N	N	+	++	+
南美蟛蜞菊-葉	+++	+++	+++	+	N	+	南美蟛蜞菊-葉	N	N	N	++	+	+
銀膠菊-花	+++	++	+++	+	+	+++	銀膠菊-花	N	N	N	+	++	+
銀膠菊-葉	+++	+++	+++	N	N	+	銀膠菊-葉	+++	+	++	++	+	++

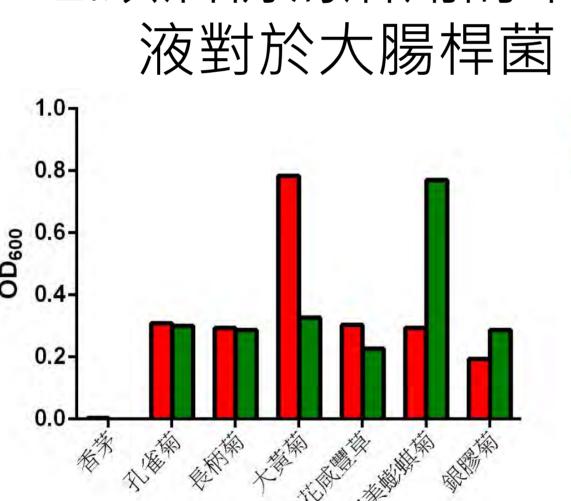
菌落形成單位(colony-forming unit, CFU):【+++,菌落數大於200 CFU】【++,菌落數100-200 CFU】

- 【+,菌落數50-99 CFU】【N,菌落數小於50或幾乎完全抑菌】各組實驗重複3次
- 對於枯草桿菌,整體的抑菌效果較不明顯;而對於大腸桿菌,以孔雀菊花、長柄菊花葉、南美蟛蜞菊 葉與銀膠菊葉的抑菌較果最佳。
- 2. 對於枯草桿菌而言,如香茅、長柄菊花葉、南美蟛蜞菊花葉與銀膠菊的花,幾乎沒有菌落產生,效果 較顯著;而對於大腸桿菌,其抑菌效果整體而言相對枯草桿菌較差。
- 綜觀整體,**長柄菊、南美蟛蜞菊與銀膠菊**的抑菌效果表現最佳,且花的作用較葉子顯著。

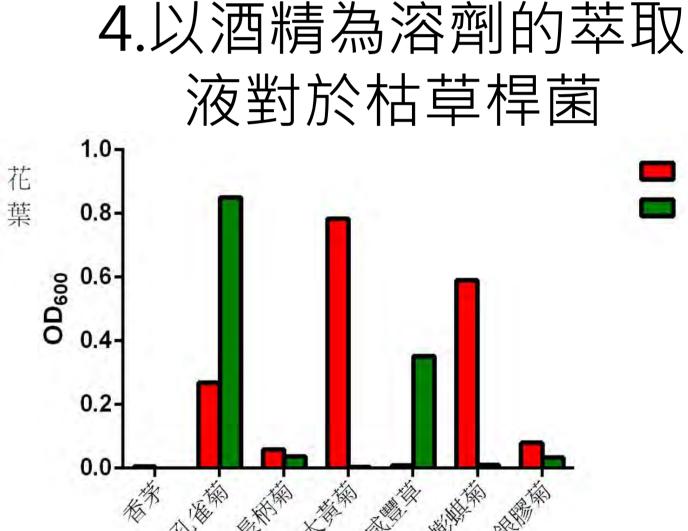
二、菊科植物二次代謝物的抑菌活性研究-以分光光度計偵測菌液吸光值



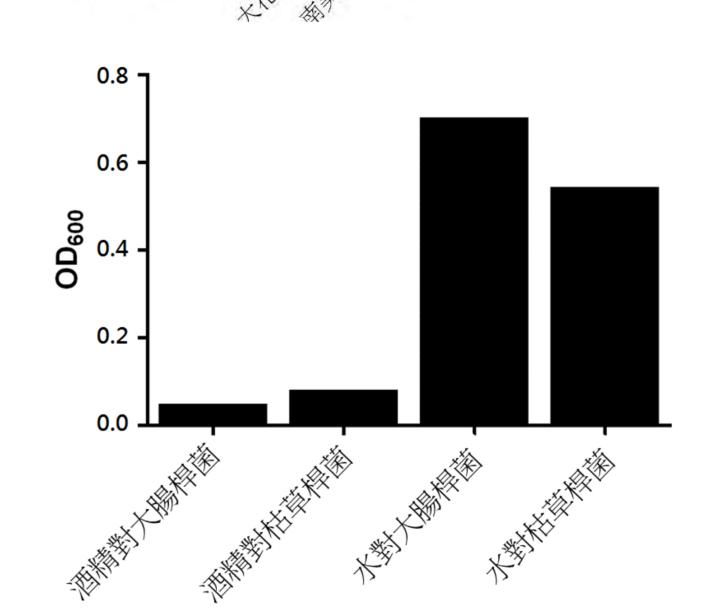
2.以酒精為溶劑的萃取 液對於大腸桿菌



3.以DDH2O為溶劑的 萃取物對於枯草桿菌

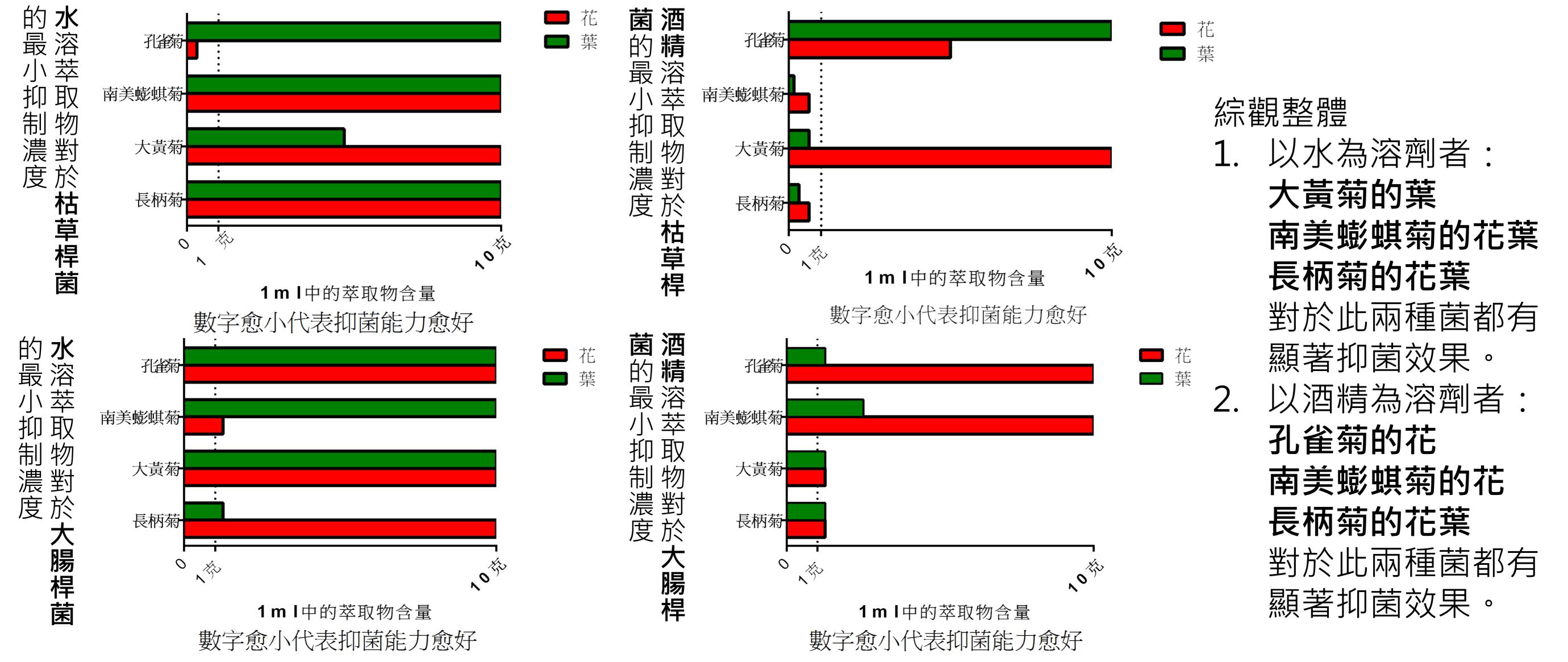


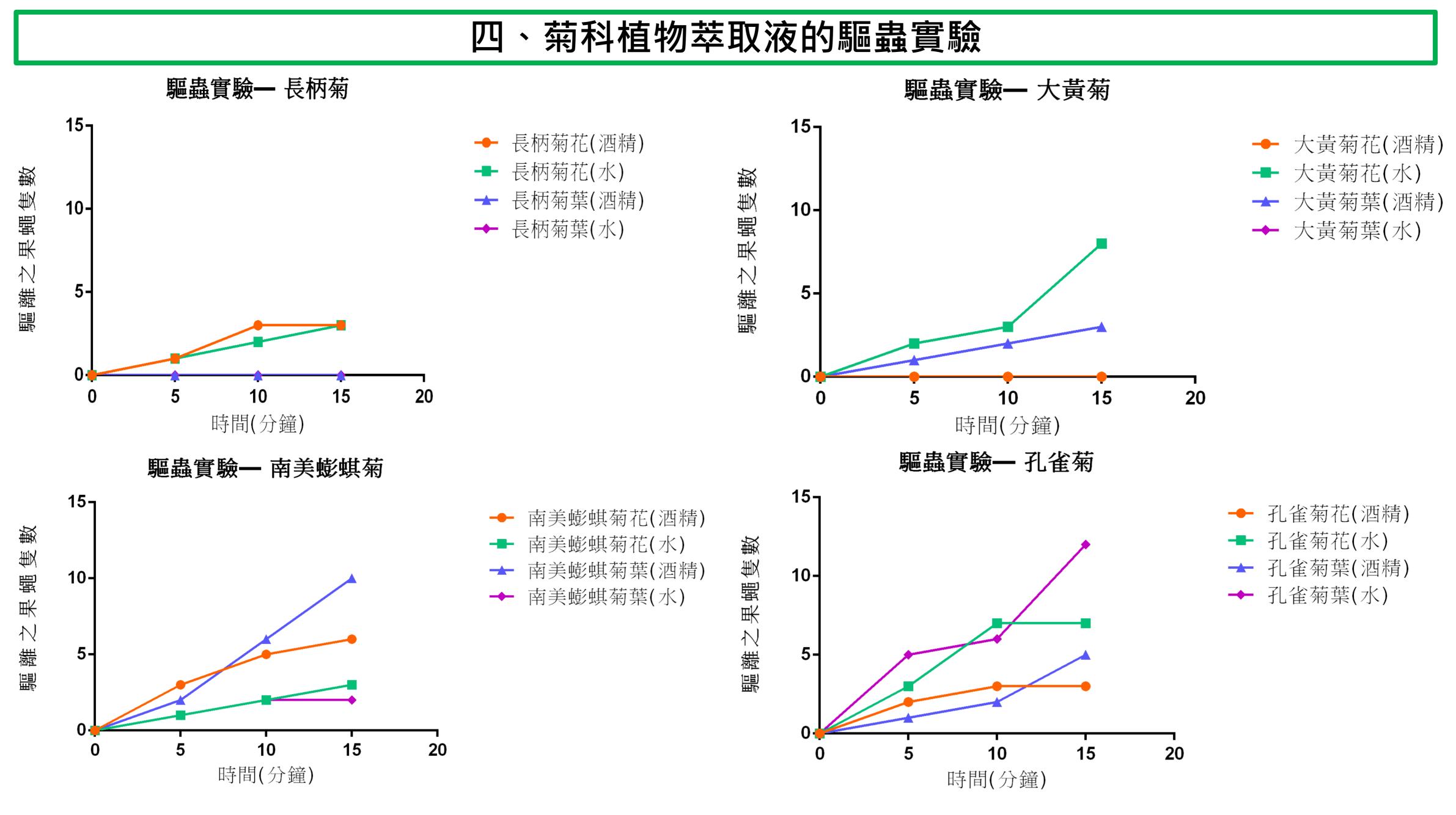
- 孔雀菊花、長柄菊葉、大花咸豐草花 南美蟛蜞菊 花葉明顯抑菌效果佳
- 除了大黃菊花、南美蟛蜞菊葉外,其他有些微效果
- 孔雀菊花、大花咸豐草、南美蟛蜞菊有些微的效果 長柄菊花葉、大黃菊葉、大花咸豐草花、南美蟛蜞 菊葉與銀膠菊花葉抑菌效果較佳



酒精與水個別在大腸 桿菌的培養液以及枯 草桿菌的培養液吸光 值測試

菊科植物二次代謝物的抑菌能力研究-以紙錠擴散試驗法判讀抑菌環





- 1. 以酒精為溶劑的萃取物對於果蠅之趨避效果:**南美蟛蜞菊葉**有較明顯的效果,而南 美蟛蜞菊花、孔雀菊的葉亦有些微的效果。
- 2. 以純水為溶劑的萃取物對於果蠅之趨避效果:**孔雀菊的花葉、大黃菊的花、長柄菊的花**有較明顯的效果,而南美蟛蜞菊的花葉亦有些微的驅蟲效果。

五、菊科植物二次代謝內具抗菌驅蟲效果物質之結構分析

依據最小抑菌濃度(MIC)實驗、分光光度計菌量檢測實驗、果蠅趨避實驗以及考慮經濟價值效益,選取部分菊科植物萃取液進行高效液相色譜法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)以及核磁共振光譜法(Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)進行化學物質之檢測與分析。

陸、結論

1.由上述實驗可知,菊科植物的二次代謝物具有殺菌效果,由分光光度計、細菌塗盤 方法進行分析,發現紙錠試驗結果相符合。

有較明顯抑菌效果	大腸桿菌	枯草桿菌
DDH ₂ O溶劑	孔雀菊、長柄菊、 南美蟛蜞菊	孔雀菊、 南美蟛蜞菊
酒精溶劑	大黃菊、 南美蟛蜞菊	長柄菊、大黃菊、 南美蟛蜞菊

整體來說孔雀菊、長柄菊、南美蟛蜞菊及大黄菊的二次代謝物皆有抑菌效果。

- 2.由驅蟲實驗得知,整體來說孔雀菊、長柄菊、南美蟛蜞菊、大黃菊(壽菊)的二次代謝物皆具有驅蟲效果。
- 3.由上述兩點可得知,本實驗挑選之菊科植物:孔雀菊、長柄菊、南美蟛蜞菊、大黄菊(壽菊)的二次代謝物確實有殺菌及驅蟲之功效。

4.此研究的未來展望:

可對於抑菌效果及成蠅趨避效果顯著的幾種植物,更進一步測試其二次代謝物的其他功能,以及找出真正能夠抗菌驅蟲的化學物質,期望可應用於日常生活當中:例如,針對有驅蟲與抑菌之效的菊科植物萃取物添加於日用品中,如防蚊液,防蚊磚,以兼顧生態保育與維護人體健康;或應用於農業植物病蟲害防治當中:針對有驅蟲與抑菌之效的菊科植物萃取物製成天然農藥;或將其種植在經濟作物外圍,形成天然防護,減少蟲害,減少化學合成農藥的使用,以達到保護環境與永續發展的目的。

柒、參考資料及其他

- 1.余志儒、陳炳輝。2007。作物蟲害之非農藥防治技術-天然防蟲物質19-28頁。 行政院農業委員會農業試驗所,台中,臺灣。
- 2.許如君、吳昌昱。2015。農用藥劑分類及作用機制檢索。行政院農委會動植物防疫檢疫局,台北,臺灣。
- 3.鐘楊聰、林良恭、張立雪、黃壁祈。2012。Biology Package,8th Edition-Bacteria and Archaea 629-643頁,台灣培生教育出版股份有限公司,台北,臺灣。