

# 中華民國第 58 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

**第一名**

052611

**HEY!你這個吃塑膠的小傢伙**

學校名稱：國立中興大學附屬高級中學

作者：  高二 黃怡華  高二 鄭毓澤	指導老師：  許世賢
---------------------------------	------------------

關鍵詞：塑膠降解、生物可分解塑膠、新菌種

## 得獎感言

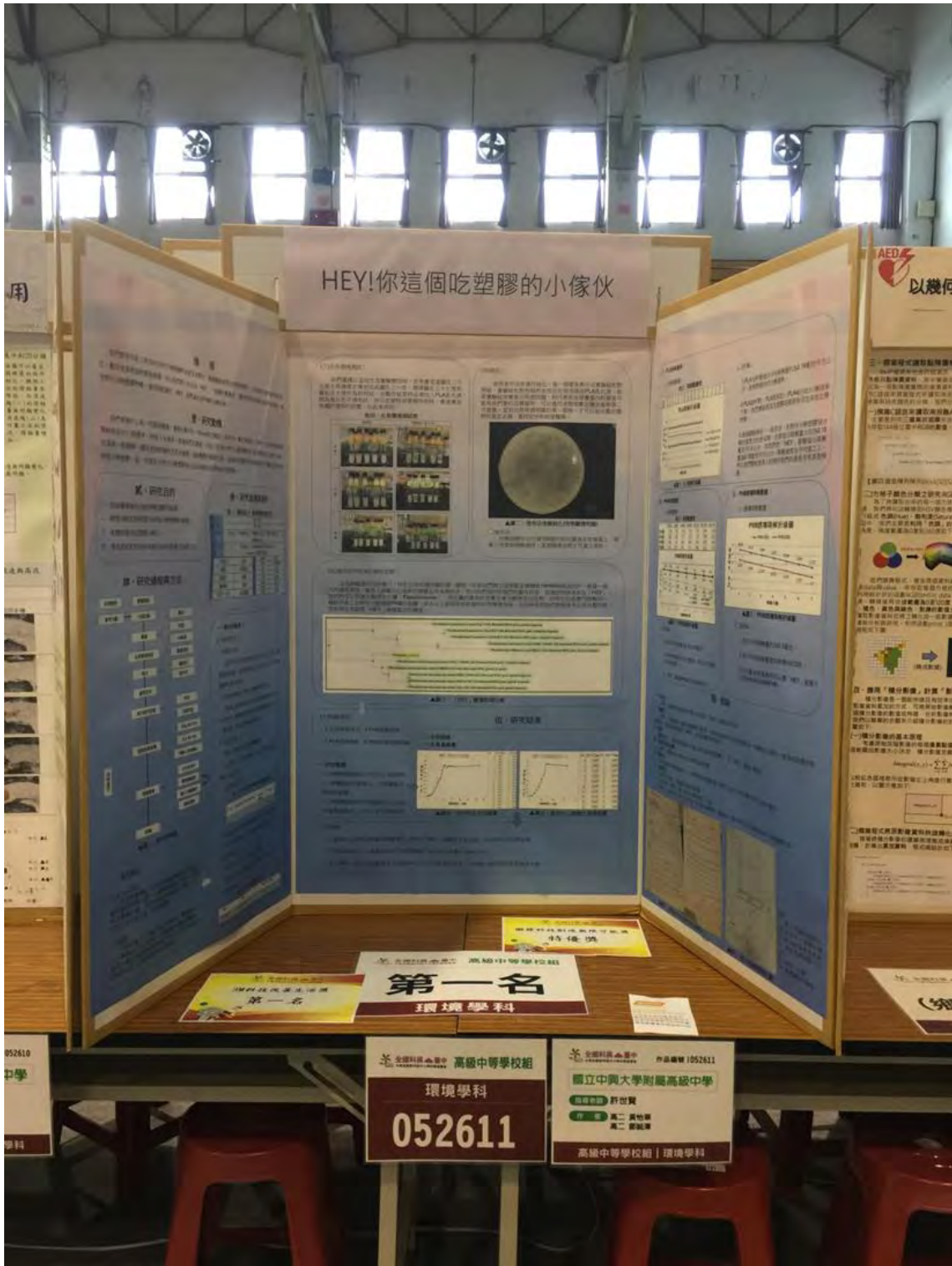
### HEY！你這個吃塑膠的小傢伙得獎感言

剛升上高一的暑假，學校給新生們一些暑假作業，其中有一本 Live 英文雜誌，其中一篇內容讓我們印象深刻，那就是有關於國內外研究細菌分解寶特瓶的文章。從那時候開始，我們懷有想要拯救地球的梦想，於是，我們開始了尋找該菌種的旅程。但我們萬萬沒想到，意外發現新菌種。

剛開始的我們一波三折，先是跑了許多地方尋找我們需要的樣本，但我們沒考慮到樣本的挖取和保存有多少注意要點，經過重複的篩菌，我們在中興大學裡面的中興湖畔挖到了我們的成果「hey」。當然找他不是那麼容易的，我們先經過三個月的篩菌，再經過三個月的純化，無論是藥品配置還是參與他的分解過程，我們樣樣都自己來。還記得我們每天放學後的傍晚，都會到實驗室報到，並且開始做實驗，每次實驗時間都超過兩個小時，面對學校龐大的課業壓力，我們仍不放棄，只為了找到解決塑膠的辦法，如今有了這樣的成果，是喜也是淚，喜在塑膠的問題有了解決之道，淚在辛苦了將近兩年終於有了成果。

在這次的全國科展大賽，最有印象的就是比賽前的佈展以及頒獎現場，佈展的時候懷著忐忑不安的心情和充滿期待的熱情，面對著接下來一周未知的考驗，就算再累也不敢有半分鬆懈。頒獎現場當天，雖然嘴巴上說著：我對自己的表現非常有信心，但是身邊都是強勁的隊伍，我內心懷著的不只是喜悅，更多的則是滿滿的緊張感。在獎項公布的那一剎那，歡呼的我笑了，也哭了。

在這一次的科展，我成長了許多。過程中首先遇到的是：我的組員因為某些原因無法參與這個比賽，導致我只能獨自面對種種的難題。無論是應對著評審教授的提問，還是淌著淚水踏出既緊張又帶點自信的步伐走入會場，對我來說：都是一種成長。在這個比賽裡面，我學會了獨立自主和快速應答的能力，教授的每個提問我都只能想不到一秒就要立即的回答，在如此緊迫的情況下，我撐過去了！也因為如此，我才有今天的成果。



科展海報以及得獎名次總覽





頒獎典禮--大會獎第一名(左 1)



頒獎典禮--3M 科技改善生活獎(左 1)

## 摘要

為了更加了解「微生物分解塑膠之過程」，我們開始從周遭的土壤中做篩菌，並使用市面上常見的生物可分解塑膠 PLA 及回收場蒐集的 PLA 做為我們篩菌的目標物，透過觀察乳化過後的 PLA 透明度變化，找出最有效率的一株菌種，再開始進行純化，如此反覆操作，直到找到我們所需要的單一菌落。送去鑑定機構分析結果發現這株菌的酵素跟菌保中心專門分解 PLA 的菌都有產生 PLA 分解酵素的基因片段，同時這株菌是新種，所以我們將它命名為「HEY」。此菌在能與菌保中心的菌一樣分解 PLA 的同時，也能有效分解另一種生物可分解塑膠 PHB，所以我們開始測定「HEY」對 PLA 以及 PHB 的分解效率。

## 壹、研究動機

還記得我們準備升上高一的那個暑假，學校發給每個高一新生一本 Live 英文雜誌當作暑假作業，在研讀的同時，印象最為深刻的便是那篇有關於塑膠分解的文章。文章裡面提及：分解一小片保特瓶塑膠需要耗時至少六個禮拜，分解時程非常的久，甚至有些塑膠要耗時幾百年才能被大自然所代謝掉，這使我們開始進行如何分解塑膠的研究。

一開始經過我們的調查，那些生物可分解塑膠其實並不是用掩埋的方式進行分解，而是跟一般塑膠一樣用直接燃燒的方式來處理，雖然快速，但這就有違我們使用生物可分解塑膠的初心，而且又造成嚴重的空氣汙染和環境汙染。

這個原因讓我們萌生研究塑膠分解之動力，希望能找尋到一種微生物來有效率地分解塑膠。這一切就從生物可分解塑膠袋以及垃圾場回收的 PLA 垃圾開始。

## 貳、研究目的

- 一、從身邊環境找出能降解塑膠的細菌。
- 二、篩選出能在短時間內有效分解塑膠的細菌。
- 三、能實際應用在塑膠分解上。
- 四、尋找其他更有效率地解決地球環境汙染的方法。

## 參、研究設備及器材

### 一、藥品：

表一：藥品使用配方表

藥 品	PLA	單一材料
	PHB	單一材料
	BSM	YE(1g/L)、硫酸銨(4g/L)、磷酸氫二鉀(2g/L)、磷酸二氫鉀(1g/L)、 硫酸鎂(0.5g/L)
	PYM	YE(5g/L)、七水硫酸鎂 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O(0.6g/L)、 Polypeptone 多聚蛋白脲(5g/L)

### 二、器材：

表二：器材用品表

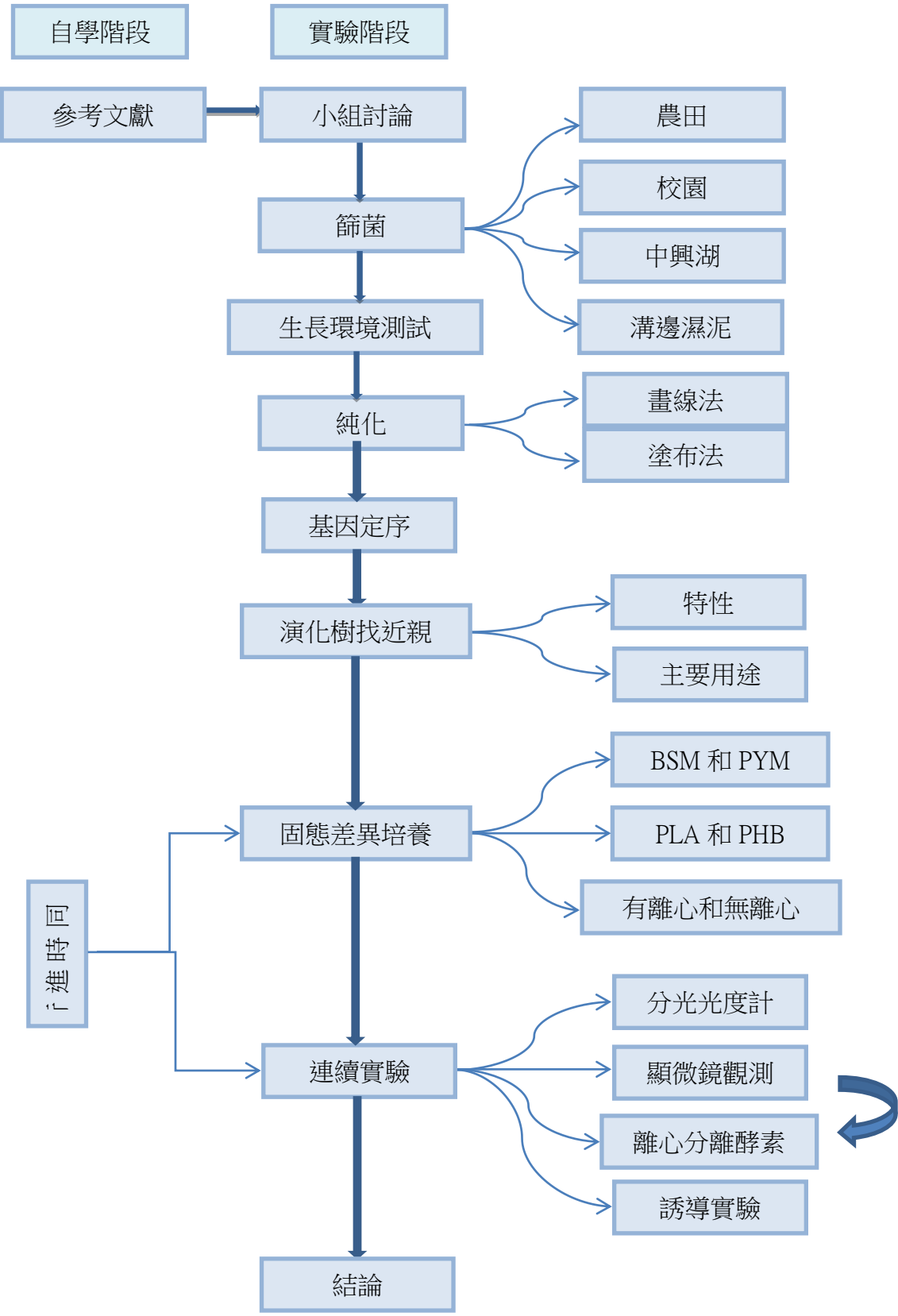
器 材	微量吸管	離心管
	培養皿	三角型玻璃棒
	燒杯	量筒
	針筒	小飛碟
	血清瓶	樣本瓶
	接種環	鑷子
	錐形瓶	試管
	試管架	錶玻璃

### 三、設備：

表三：大型設備使用表

設 備	分光光度計	離心機
	顯微鏡	高溫滅菌釜
	無菌操作台	抽風櫃
	震盪培養器	烘乾機
	冰箱(6度、-20度)	超音波破膜機

# 肆、研究過程與方法



圖一：研究架構圖

## 一、樣品的製備：

### (一)研究方法：

#### 1.篩菌介紹：

我們的目的是從周遭生活中找出可以有效分解塑膠的細菌，相較於 PET、PP、PE 這些極難被分解的塑膠材料，我們選擇生物可分解塑膠中生活上常見的 PLA 作為對象。

#### 2.被分解物聚乳酸 PLA、聚羥基丁酸酯 PHB 的介紹：

PLA 以及 PHB 為常見之生物可分解塑膠，所以常將 PLA 以及 PHB 作為醫療用手術縫線，這樣可以在身體內被完全分解，免除術後拆線，而近年來生物可分解塑膠經常被拿來做為塑膠袋等，產生大量垃圾，所以我們選擇使用生物可分解塑膠作為目標分解物，開始進行研究。

### (二)研究過程：

#### 1.PLA、PHB 乳化液及薄膜製備：

(1)材料：二氯甲烷 DCM、泡舒界面活性劑、PLA、去離子水

(2)材料配方：

表四：PLA 以及 PHB 材料配方表

材料	二氯甲烷 DCM	泡舒界面活性劑	PLA/PHB 固體顆粒	去離子水
量	40ml	1g	1g	100ml

(3)乳化液不同於薄膜的製作方法：將上述成分以一定比例混和後，以超音波破膜機將其乳化。

#### 2.菌保製備：

(1)材料：甘油、欲保存之菌液。

(2)目的：保存於負二十度冰箱時不會結凍，但是甘油不可以加太多。



(3)材料配方：

表五：菌保材料配方表

材料	甘油	欲保存之菌液
百分率	百分之二十五	百分之七十五

二、研究過程：

(一)小組討論：

在本校圖書館以及某大學圖書館找尋跟塑膠分解有關的相關文獻，上網搜尋一切有關之文章，開始制定實驗計畫，並跟老師討論實驗的步驟跟可行性不斷加以修正，再開始實行。

(二)篩菌：

分別從農田、校園土壤、中興湖、溝邊濕泥隨出土壤樣本以及水樣本，其中水樣部分，我們擔心其因為菌落密度過低，在培養時無法及時找到目標菌落，所以我們使用抽氣過濾瓶進行濃縮，然後加入 BSM 培養基和 PLA 乳化液。至於土樣部分，我們將採集好的樣本放入試管中，加入去離子水，並利用勻質機使之均勻分散在水中，隨後將之靜置直到出現上清液。吸取上清液至另一個試管，加入 BSM 培養基和 PLA 乳化液，每天觀察和拍照記錄，數日後，便有機會觀察到相較之下較為澄清的樣本。







經過幾次的篩菌實驗，最終在攝氏 30 度的培養環境下找出一支分解速度最快的試管，並取樣進行純化實驗。

(三)生長環境測試：

因為我們採集到的都是日常生活中存在的樣本，所以當我們選擇以溫度作為實驗變因時，考慮室溫攝氏二十五度生長速度太慢而改成攝氏三十度，並選擇攝氏三十七度和攝氏五十度作為對照組。

在製作試管時必須加入 PLA 乳化液，因為是白色不透明狀，所以在被特定菌種吸收時，會逐漸呈現趨於透明的狀態，如此一來，較容易被判別出來。

表六：生長環境測試表

	降解前	降解後(2至3天)
30度		
37度		
50度		

#### 1.攝氏二十五度：

因為是室溫，所以決定直接放在桌上培養，不多加搖晃，於 106 年 5 月 23 日開始培養，但因為長太慢了且試管底部有菌泥，擔心會是厭養菌，所以於 106 年 5 月 27 日提出置入攝氏三十度震盪培養箱試一試，或許可以得到較佳結果。

#### 2.攝氏三十度：

於 106 年 5 月 27 日轉換過來的，效果極佳，五根試管裡面有三根試管開始澄清，其中有在攝氏三十七度就表現良好的二號和三號，比較特別的是五號，兩天之內就完全透明了，效能比攝氏三十七度的二號和三號還要好。

#### 3.攝氏三十七度：

於 106 年 5 月 23 日開始培養，其中效果最好的二、三號於 106 年 5 月 26 日些微變淡，而在 106 年 5 月 28 日二號完全透明。因為擔心完全透明的樣本會沒有碳源，所以開始進行純化。首先，取完菌液塗在 BGM 和 PLA 培養基，再來製成菌保。放在攝氏負二十度的菌保盒內保存。菌液使用完後繼續放回培養箱培養。

#### 4.攝氏五十度：

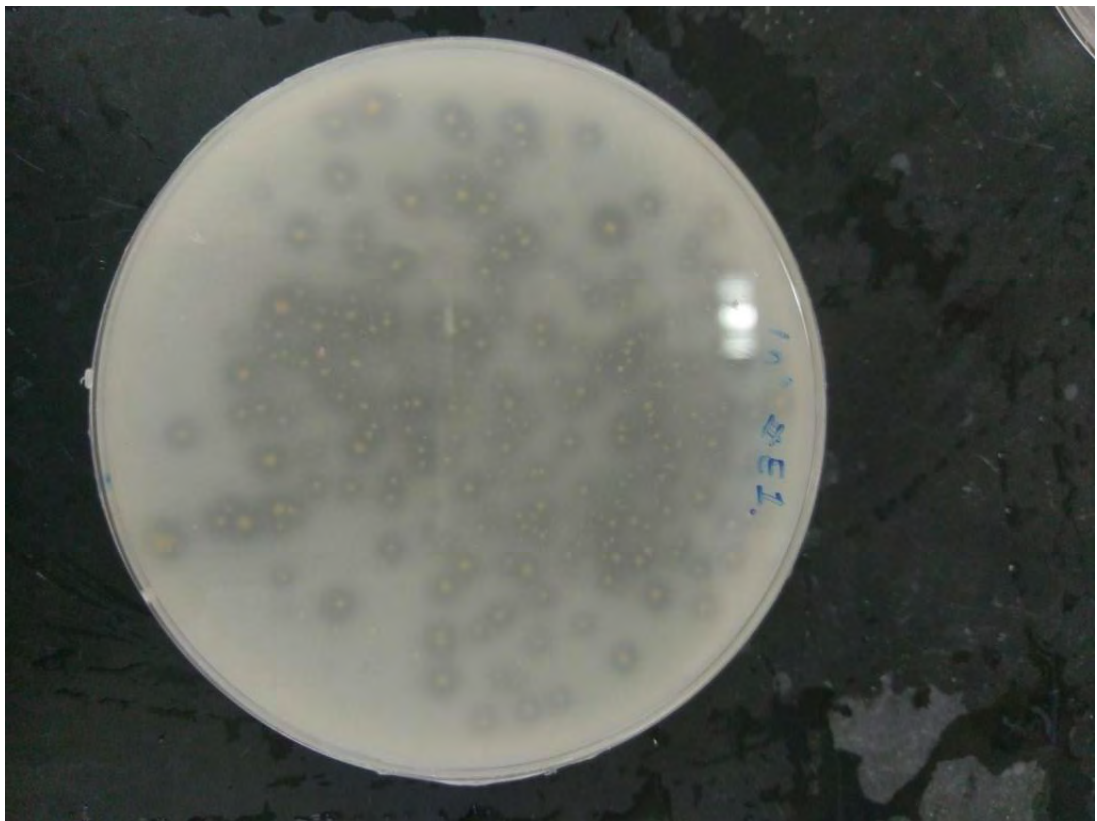
於 106 年 5 月 23 日開始培養，推測因為溫度太高了，所以一直都沒什麼變化。

#### (四)純化：

基本上分成塗布法和畫線法來進行純化。每一個樣本都分成實驗組和對照組，實驗組是由基本維生營養素和 PLA 乳化液所組成；然而對照組則是只有基本維生養分，不添加 PLA 乳化液，如果實驗組培養基出現透明圈，則代表長在培養基內的菌落可能有我們要的目標菌物，可以把挖起來放到試管內並加入液態培養基和 PLA 乳化液，進行培養至穩定後做第二次塗盤。純化的目的是為了分離菌株，必須經過數次的純化和培養直到出現有透明圈的單一菌株，如此一來才可以送去鑑定菌株的真正名稱、基因定序和細菌種類。

##### 1.塗布法：

先滴 100 微升的的菌液在培養基上，再拿三角型玻璃棒在培養基上塗抹，直到菌液全乾才可蓋上密封，全程都在無菌操作台內操作。



圖二：塗布法塗盤純化(有明顯透明圈)

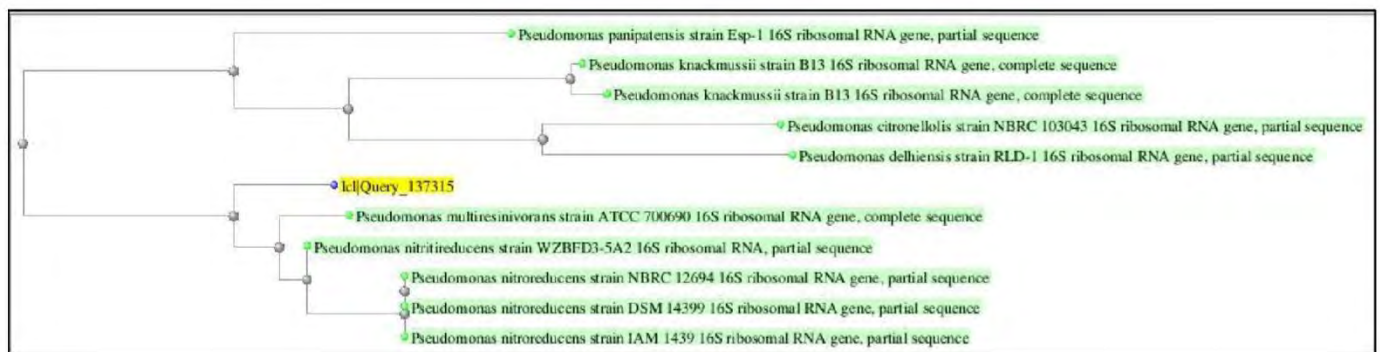
##### 2.畫線法：



先滴 100 微升的菌液在培養基上，再拿細的微量吸管尖從菌液低落處開始輕輕地不間斷的畫線，畫完一條後便更換下一個微量吸管尖從上一個終止處劃下一條線，以此類推，完成一個樣本需要用去四個微量吸管尖，目的是能夠分離菌液直到出現單一菌株。相同的，此步驟亦須全程在無菌操作台內操作。但是因為此方法技巧太多，和塗布法比較下來，成效也不明顯，所以在第一批實驗後便全數改為塗布法。

#### (五)基因定序和演化樹找近親：

在為期數個月的培養下，終於出現有透明圈的單一菌株，於是我們將它送到鑑定機構做 16S rRNA 基因定序，經過一個月的漫長等待，報告上面顯示它是新的菌種且尚未被命名，所以我們就利用我們的羅馬拼音，經過排列後命名為「HEY」。我們利用它的演化樹得知它屬「Pseudomonas」，而此屬的菌易於培養，而且是會分解界面活性劑的菌屬，同時它也是專門降解另一種較昂貴之生物可分解塑膠 PHB 的菌屬。綜合以上原因得知此菌的利用價值很高，也同時促使我們要做更多且更完整的研究和測定來探索「HEY」菌種真正的價值。



圖三：「HEY」菌種的演化樹

#### (六)效能測定：

##### 1.生長曲線測定：

將我們製作的「HEY」菌保菌液以百分之十的比例和去離子水混和，並利用分光光度計每小時取點測量細菌濁度直到到達穩定期。

##### 2.PLA 塑膠降解：

我們將裁剪成大約 1 平方公分大小的 PLA 塑膠袋固體樣本，放入樣本瓶中並加入我們養好的菌液進行分解，並且每日測量，計算每日降解的塑膠重量，以了解此菌的分解效率。

##### 3.PHB 塑膠降解：

因為我們 PLA 的塑膠分解實驗中有達到我們的預期，所以我們開始進行更深入的探討，從「HEY」菌種的近親推測，它有可能可以分解 PHB，而且非常有效，所以我們比照 PLA 實驗的步驟，進行 PHB 的分解速率研究。

#### 4.PHB 誘導塑膠降解：

透過網路上所查到的學術文章得知，可以利用細菌喜歡的物質來誘導其分解更多的酵素來達到更有效的實驗目的，所以我們利用這個誘導的方法，使用界面活性劑在主培養時作為誘導，再離心取出酵素來進行塑膠降解。

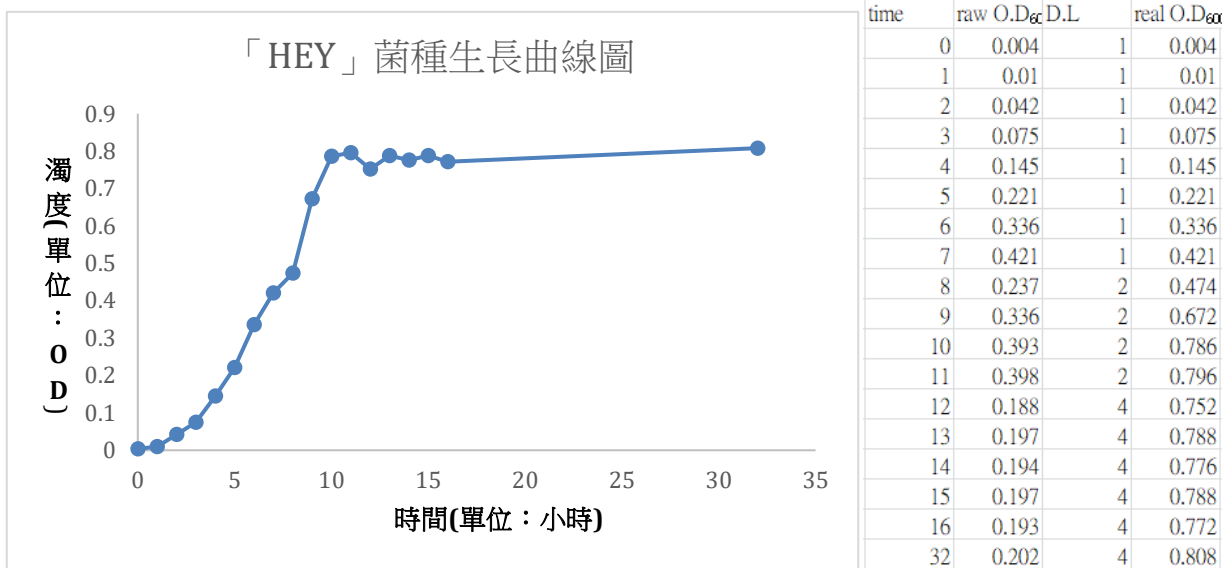
### 伍、研究結果與討論

#### 一、研究數據：

- (一) 實驗數據都是 7 至 8 天為一個週期。
- (二) 實驗經過不斷修正，才能實驗出適當的數據。
- (三) 實驗數據如有不規則起伏，則為測量儀器誤差，平均下來可忽略不計。

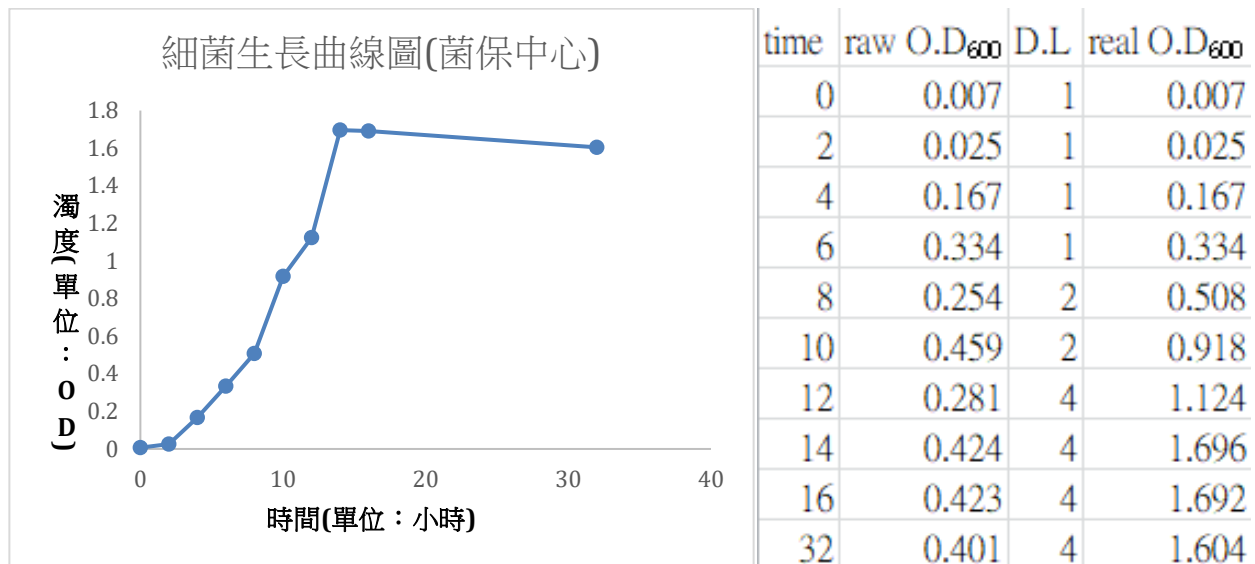
#### 二、生長曲線：

##### (一)生長曲線圖：



圖四：HEY 的生長曲線圖





圖五：菌保中心菌種生長曲線圖

(二)討論：

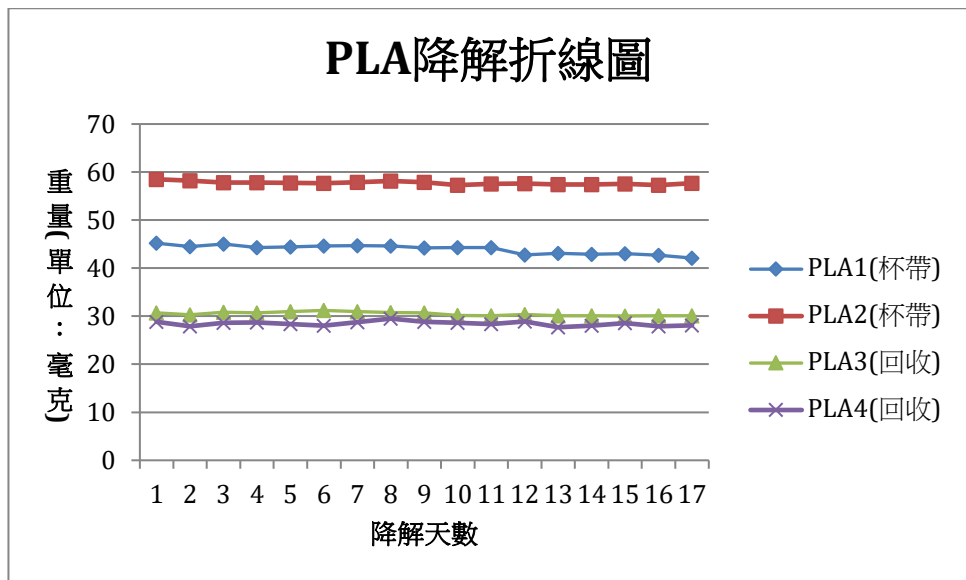
- 1.透過分光光度計測量其濁度變化，得知「HEY」菌種的生長週期，12 至 16 小時為穩定期。
- 2.得知菌保活化、養菌皆為 12 小時預培養，12 小時主培養，共 24 小時。
- 3.「HEY」的生長速度基本上跟菌保中心的生長速度差不多，不用擔心這支菌的成長速度太慢。

三、PLA 降解圖表：

(一)降解數據：

表七：降解數據表

	10月31日	11月1日	11月2日	11月3日	11月4日	11月5日	11月6日	11月7日	11月8日	11月9日	11月10日	11月11日	11月12日	11月13日	11月14日	11月15日	11月16日
PLA1(杯帶)	45.2	44.5	45.01	44.3	44.45	44.6	44.655	44.61	44.2	44.31	44.28	42.76	43.08	42.9	43.03	42.72	42.1
PLA2(杯帶)	58.5	58.2	57.82	57.8	57.75	57.7	57.915	58.13	57.88	57.3	57.53	57.61	57.42	57.4	57.54	57.28	57.65
PLA3(回收)	30.7	30.3	30.8	30.7	30.95	31.2	30.975	30.75	30.69	30.15	30.1	30.37	30.07	30.06	30.05	30.07	30.06
PLA4(回收)	28.8	27.9	28.64	28.7	28.35	28	28.75	29.5	28.85	28.6	28.35	28.91	27.7	28.04	28.53	27.88	28.07



圖六：PLA 降解折線圖

(二)討論：

1.PLA1(杯帶)日平均降解量約為 0.18 毫克，是相對較快的分解速率。

2.PLA2(杯帶)、PLA3(回收)、PLA4(回收)分解效率不彰，我們懷疑是因為塑膠袋裡面有添加其他化學物質，導致無法正常分解。

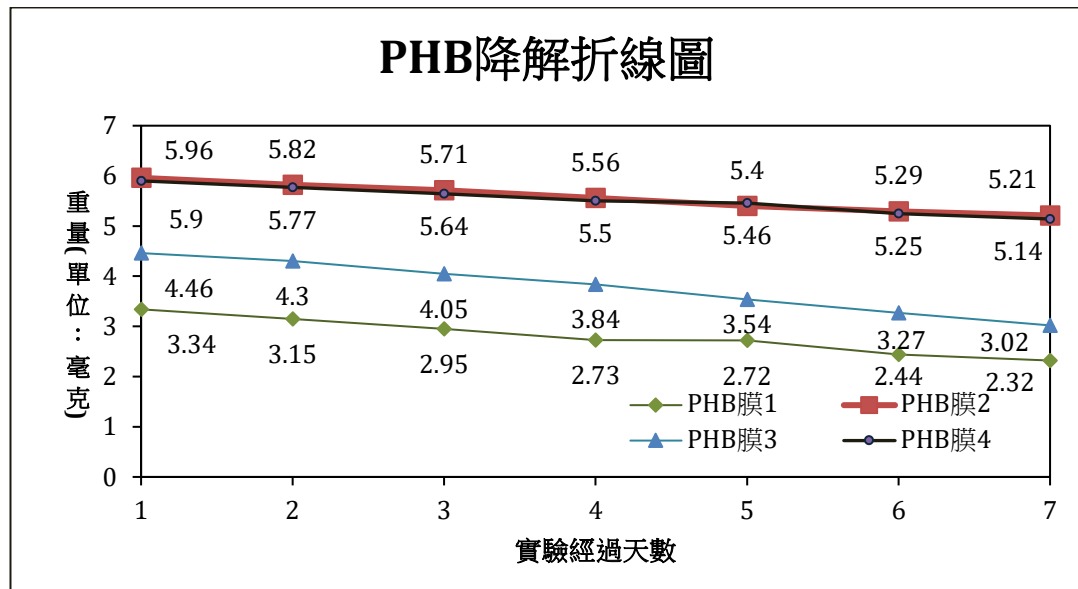
3.透過網路得知，一般而言，生物可分解塑膠袋分解的速度大約是 12 周，估算每日降解量大約為 0.15 毫克/平方公分，而我們的「HEY」菌種每日降解量為 0.18 毫克/平方公分，降解速度在平均值之上，所以我們開始更深入的探討我們的菌是否有其他特點。

四、PHB 降解數據：

(一)降解數據：

表八：降解數據表

	1月7日	1月8日	1月9日	1月10日	1月11日	1月12日	1月13日
PHB膜1	3.34	3.15	2.95	2.73	2.72	2.44	2.32
PHB膜2	5.96	5.82	5.71	5.56	5.4	5.29	5.21
PHB膜3	4.46	4.3	4.05	3.84	3.54	3.27	3.02
PHB膜4	5.9	5.77	5.64	5.5	5.46	5.25	5.14



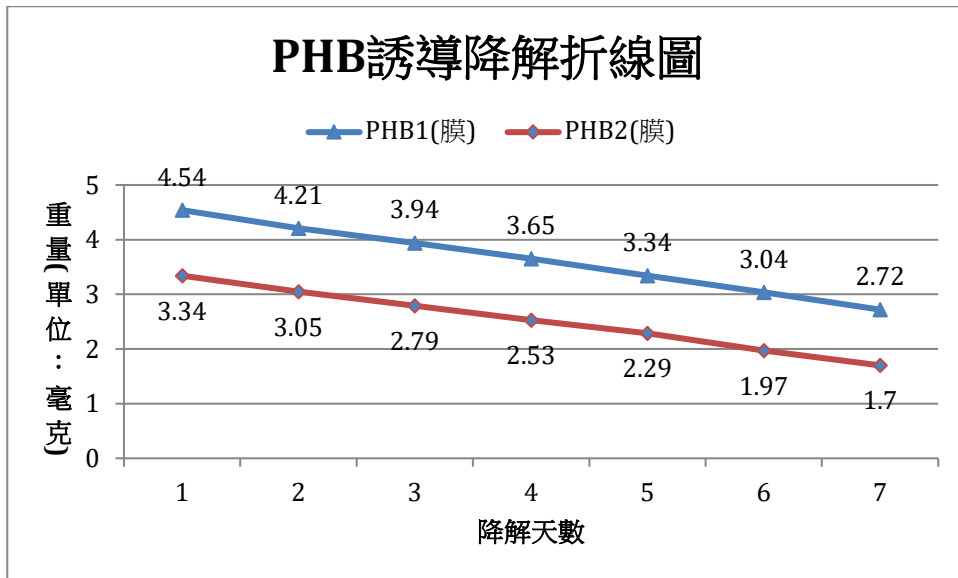
圖七：PHB 降解折線圖

(二)討論：

- 1.每日平均降解量為 0.1-0.15 毫克。
- 2.因為 PHB 膜都是自行製備，所以沒有難以被分解的情形。
- 3.「HEY」菌種對 PHB 也有降解能力。

五、PHB 誘導降解數據：

(一)誘導降解數據：



圖八：PHB 誘導降解折線圖

(二)討論：

- 1.每日平均降解量約為 0.3 毫克。
- 2.每日平均降解量達到誘導前的 2 倍。
- 3.可以斷定誘導真的可以讓「HEY」菌種可以更效率的降解 PHB。

## 陸、結論

一、安全性：

因為「HEY」菌種是從自然界中篩出來的菌，所以相較於人為基改出來的菌株對環境的危害較小，如果大量培養做為分解塑膠垃圾之用，基本上也不會有什麼疑慮。

二、適應力：

「HEY」菌種比菌種中心裡所提供的菌適應力更好，有些菌種遇到界面活性劑或是 PLA、PHB 乳化液時，會造成該菌種細胞膜破裂，然而我們發現的「HEY」菌種適應力相對良好，仍能持續發揮功效。

三、效率：

國內外論文統計：平均 80 至 90 天可以分解一小片塑膠。但是我們經由研究發現：在誘導的環境下「HEY」菌種可以加快分解的腳步。總體而言，「HEY」菌種只需 30 天，就可以分解完一樣的材料。

#### 四、優養化現象：

因為在演化樹找近親時，發現「HEY」菌種這個「屬」有分解界面活性劑的功能，而界面活性劑就是我們日常生活中常常用來洗滌東西的材料。日前，我們在學習化學課程中的有機化合物時，了解到界面活性劑內的磷基或氨基對環境造成的水質優養化現象十分嚴重，所以當我們經過一連串實驗證實：「HEY」菌種在 5 小時內能分解界面活性劑時，著實是一件令人高興的好消息，因為或許「HEY」菌種可以直接從根本解決優養化問題。

#### 五、便利性：

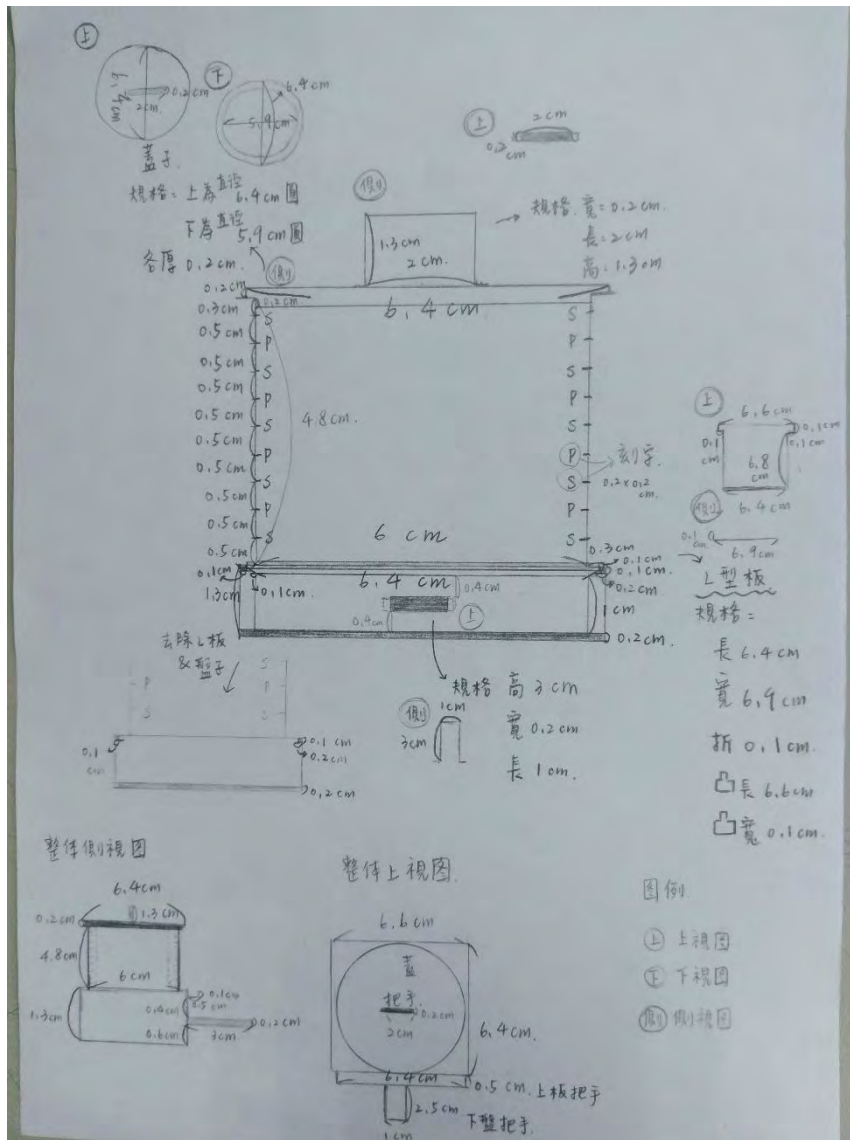
如果真的要解決環境優養化，分解界面活性劑的部分將可以在汙水處理廠或是下水道中進行，投入菌種的方法十分簡單：只要將它加入活性污泥中一起過濾汙水，而我們也不必害怕在汙泥中難以培養，因為它本身就來自土壤。而且經過我們多次的實驗測試，「HEY」菌種對環境的適應力極佳。如此一來，「HEY」菌種能進一步投入解決目前環境汙染、水質優養化的問題，實在令人期待！

#### 五、未來展望：

(一) 研究「HEY」菌種對環境的影響。

(二) 如何將「HEY」投入垃圾分解場或下水道。

(三) 設計一個居民日常生活中就可使用的發酵槽，能隨手分解平常自己製造的生物可分解塑膠垃圾。



圖九：縮小版發酵槽設計圖

備註：

\*1：除了下盤和 L 型板以及把手以外，其餘皆要有以 0.1cm 為直徑的氣孔，密度為 8 個點/平方公分。

\*2：材料：白鋼。

\*3：整體模型總高 7.8cm。

## 柒、參考資料

(一) 維基百科：生物可分解塑膠

<https://zh.wikipedia.org/wiki/%E7%94%9F%E7%89%A9%E5%8F%AF%E5%88%86%E8%A7%A3%E5%A1%91%E8%86%A0>

(二) axonomy -*Pseudomonas nitroreducens*

[www.uniprot.org/taxonomy/46680](http://www.uniprot.org/taxonomy/46680)



- (三) 吳桐、馮詩媛、王子恩(2017)。遠離「塑」命-海需要開發淡菜足絲。國立科學教育館：中華民國第 57 屆中小學科學展覽會參展作品專輯（高中組環境學科 052602）臺北市：國立科學教育館。
- (四) 有保存期限的塑膠袋?專家告訴你生物可分解塑膠冷知識  
<https://e-info.org.tw/node/202720>

## 【評語】 052611

1. 本作品從周遭的土壤中篩菌找出一種能分解聚乳酸 PLA 塑膠的新菌種，命名為「HEY」，並發現「HEY」還可快速分解聚羥基丁酸酯 PHB。研究具有創新應用性，研究架構合理明確。
2. 實驗條件的設計說明應更具體明確，篩菌鑑別等應具體說明，本作品塑膠降解實驗係以重量法量測，所使用天平的精度宜註明，實驗誤差值亦宜呈現。
3. 建議未來宜以不同分析方法驗證降解塑膠功能，例如量測實驗過程 HEY 菌相變化或生長，並深入了解其降解反應機制，可嘗試降解其他塑膠
4. 建議增加文獻回顧，並可與其做比較，藉以驗證研究發現與規劃後續應用。



# 摘要

我們使用市面上常見的生物可分解塑膠PLA做為目標物，透過觀察試管的透明度變化，找出最有效率的樣本進行純化。鑑定後發現這株菌是新種，所以我們將它命名為「HEY」。後續的實驗中，讓我們發現此菌也能有效分解另一種生物可分解塑膠PHB，進而開始測定「HEY」對PLA以及PHB的分解效率。

## 壹、研究動機

我們準備升上高一的那個暑假，暑假作業中有一本Live英文雜誌，其中有一篇文章提及：分解一小片保特瓶塑膠需要耗時至少六個禮拜，時程十分漫長。經過我們的調查，市面上許多生物可分解塑膠並不是用掩埋的方式進行分解，而是跟一般塑膠一樣用直接燃燒的方式來處理，造成嚴重的環境汙染。這個原因讓我們希望能找到一種微生物來有效率地分解塑膠。這一切就從生物可分解塑膠袋以及垃圾場回收的PLA垃圾開始。

## 貳、研究目的

- 一、從身邊環境找出能降解塑膠的細菌。
- 二、篩選出能在短時間內有效分解塑膠的細菌。
- 三、能實際應用在塑膠分解上。
- 四、尋找其他更有效率地解決地球環境汙染的方法。

## 參、研究設備與器材

表一：藥品配方、設備與器材使用表

藥品	成分
PLA	單一材料
PHB	單一材料
BSM	YE(1g/L)、硫酸銨(4g/L)、磷酸氫二鉀(2g/L)、磷酸二氫鉀(1g/L)、硫酸鎂(0.5g/L)
PYM	YE(5g/L)、七水硫酸鎂 MgSO4·7H2O(0.6g/L)、Polypeptone 多聚蛋白胨(5g/L)

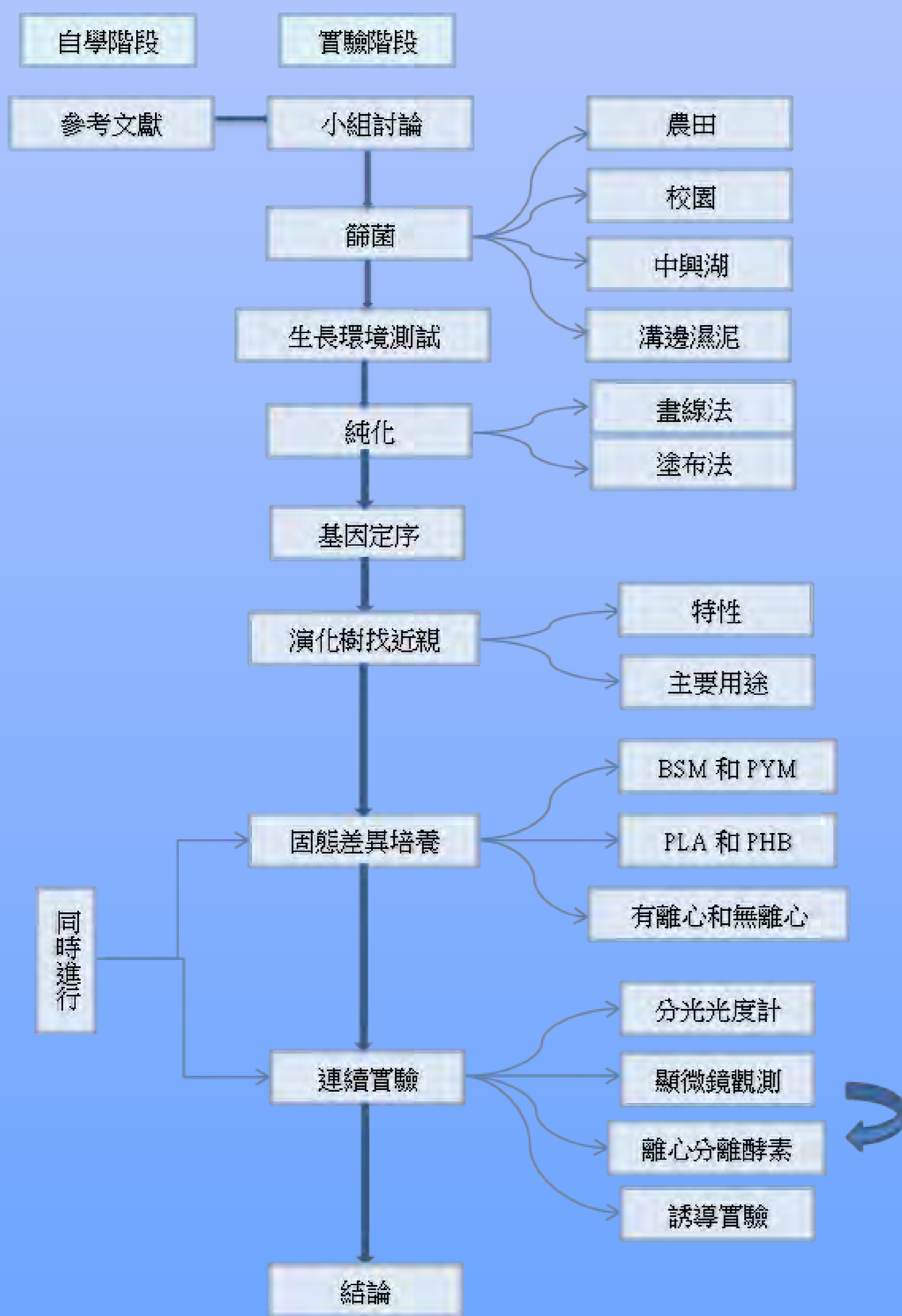
  

設備	器材
分光光度計	離心機
顯微鏡	高溫滅菌釜
無菌操作台	抽風櫃
震盪培養器	烘乾機
冰箱(6度、-20度)	超音波破膜機

器材	器材
微量吸管	離心管
培養皿	三角型玻璃棒
燒杯	量筒
針筒	小飛碟
血清瓶	樣本瓶
接種環	鑷子
錐形瓶	試管
試管架	錶玻璃

## 肆、研究過程與方法



### 一、樣品的製備：

#### (一)研究方法：

##### 1.篩菌介紹：

我們的目的是從周遭生活中找出可以有效分解塑膠的細菌，我們便選擇生活上常見的生物可分解塑膠PLA作為對象。

##### 2.聚乳酸PLA、聚羥基丁酸酯PHB的介紹：

PLA以及PHB為常見之生物可分解塑膠，近年來生物可分解塑膠經常被拿來做為塑膠袋等，產生大量垃圾，所以我們開始進行研究。

#### (二)研究過程：

##### 1.PLA、PHB乳化液及薄膜製備：

(1)材料：二氯甲烷DCM、泡舒界面活性劑、PLA、去離子水。

##### (2)材料配方：

表二：PLA以及PHB 材料配方表

材料	二氯甲烷 DCM	泡舒界面活性劑	PLA/PHB 固體顆粒	去離子水
量	40ml	1g	1g	100ml

(3)乳化液不同於薄膜的製作方法：將上述成分以一定比例混和後，以超音波破膜機將其乳化。

##### 2.菌保製備：

(1)材料：甘油、欲保存之菌液。

(2)目的：保存於負二十度冰箱時不會結凍。

##### (3)材料配方：

表三：菌保材料配方表

材料	甘油	欲保存之菌液
百分率	百分之二十五	百分之七十五

### 二、研究過程：

#### (一)小組討論：

在本校圖書館以及某大學圖書館找尋跟塑膠分解有關的相關文獻，上網搜尋相關之文章。開始制定實驗計畫，並跟老師討論實驗的步驟以及可行性。加以修正後，再開始實行。

#### (二)篩菌：

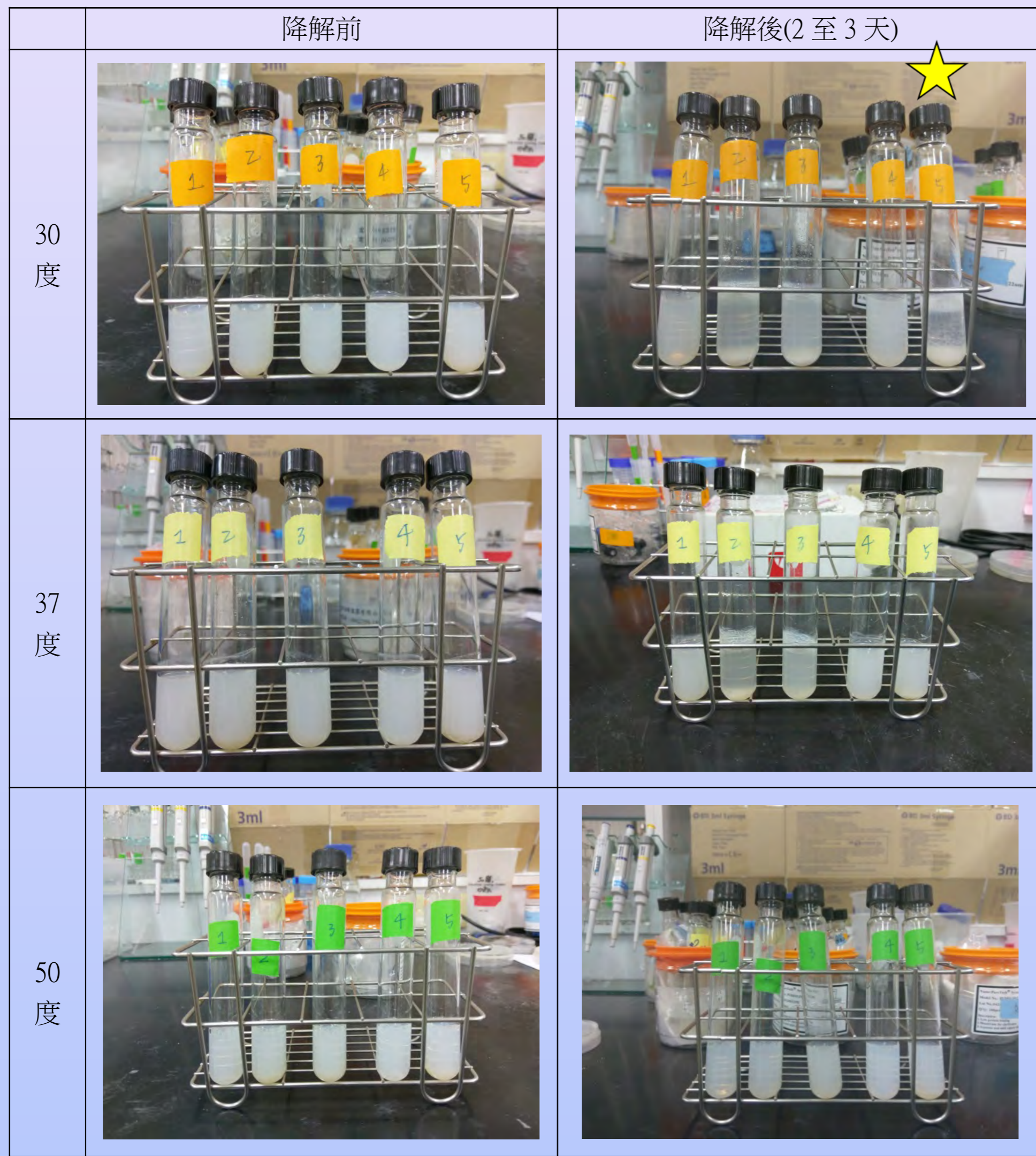
分別從農田、校園土壤、中興湖、溝邊濕泥取出土壤樣本以及水樣本。經過幾次的篩菌實驗，最終在攝氏30度的培養環境下找出一支分解速度最快的試管，並取樣進行純化實驗。



(三)生長環境測試：

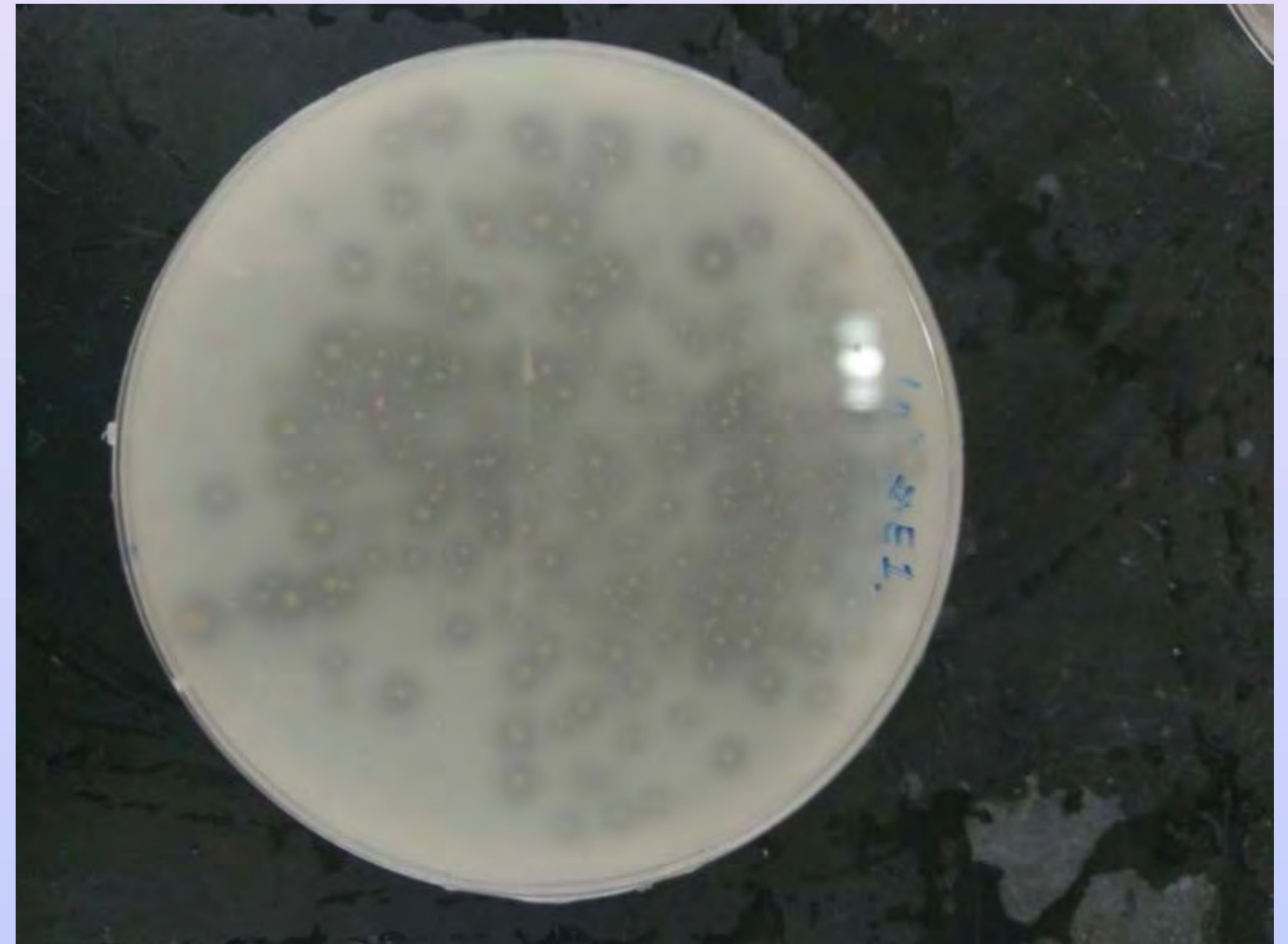
我們選擇以溫度作為實驗變因時，並考慮室溫攝氏二十五度生長速度太慢而改成攝氏三十度。選擇攝氏三十七度和攝氏五十度作為對照組。在製作試管時必須加入PLA乳化液，因為是白色不透明狀，所以在被特定菌種吸收時，會逐漸呈現趨於透明的狀態，以此來判別。

表四：生長環境測試表



(四)純化：

使用塗布法來進行純化。每一個樣本都分成實驗組和對照組，實驗組和對照組的差別在於是否添加PLA乳化液，如果實驗組培養基出現透明圈，則代表長在培養基內的菌落可能有我們要的目標菌物，可以進行液態培養至穩定後做第二次塗盤。直到出現有透明圈的單一菌株，才可以送去鑑定菌株的真正名稱、基因定序和細菌種類。



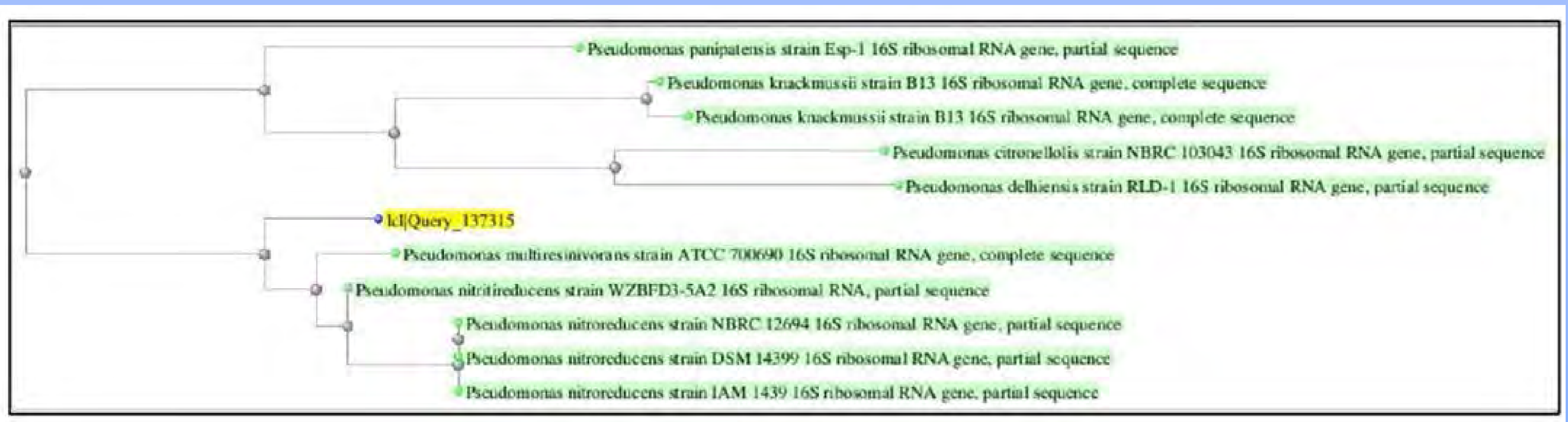
▲圖二：塗布法塗盤純化(有明顯透明圈)

★塗布法：

在無菌操作台內滴100微升的菌液在培養基上，再拿三角型玻璃棒塗抹，直到菌液全乾才可蓋上密封。

(五)基因定序和演化樹找近親：

在為期數個月的培養下，終於出現有透明圈的單一菌株，於是我們將它送到鑑定機構做16S rRNA基因定序，經過一個月的漫長等待，報告上面顯示它是新的菌種且尚未被命名，所以我們就利用我們的羅馬拼音，經過排列後命名為「HEY」。我們利用它的演化樹得知它屬「Pseudomonas」，而此屬的菌易於培養且會分解界面活性劑，同時它也是專門降解另一種較昂貴之生物可分解塑膠PHB的菌屬。綜合以上原因得知此菌的利用價值很高，也同時促使我們要做更多且更完整的研究和測定來探索「HEY」菌種真正的價值。



▲圖三：「HEY」菌種的演化樹

(六)效能測定：

- 1.生長曲線測定    3.PHB塑膠降解
- 2.PLA塑膠降解    4.PHB誘導塑膠降解

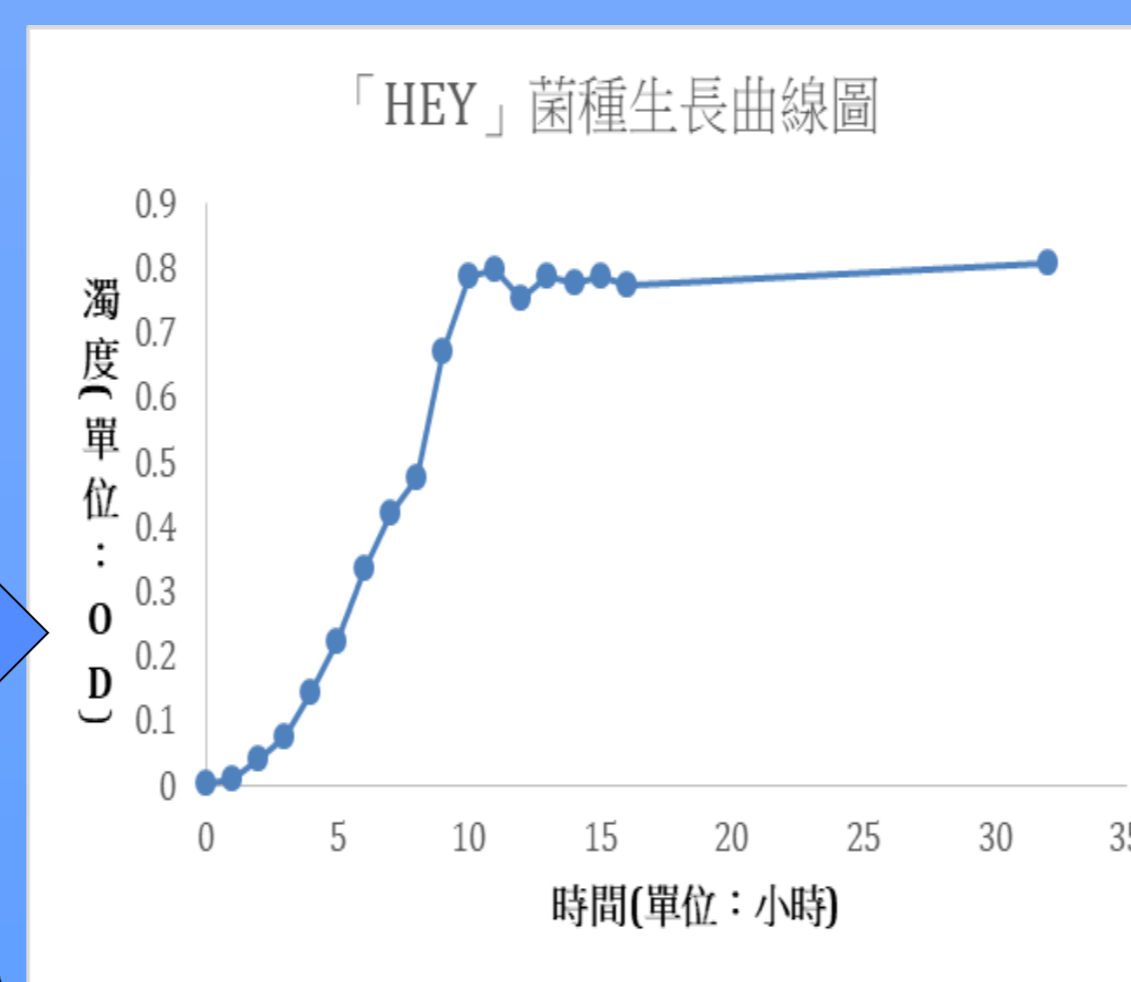
伍、研究結果

一、研究數據：

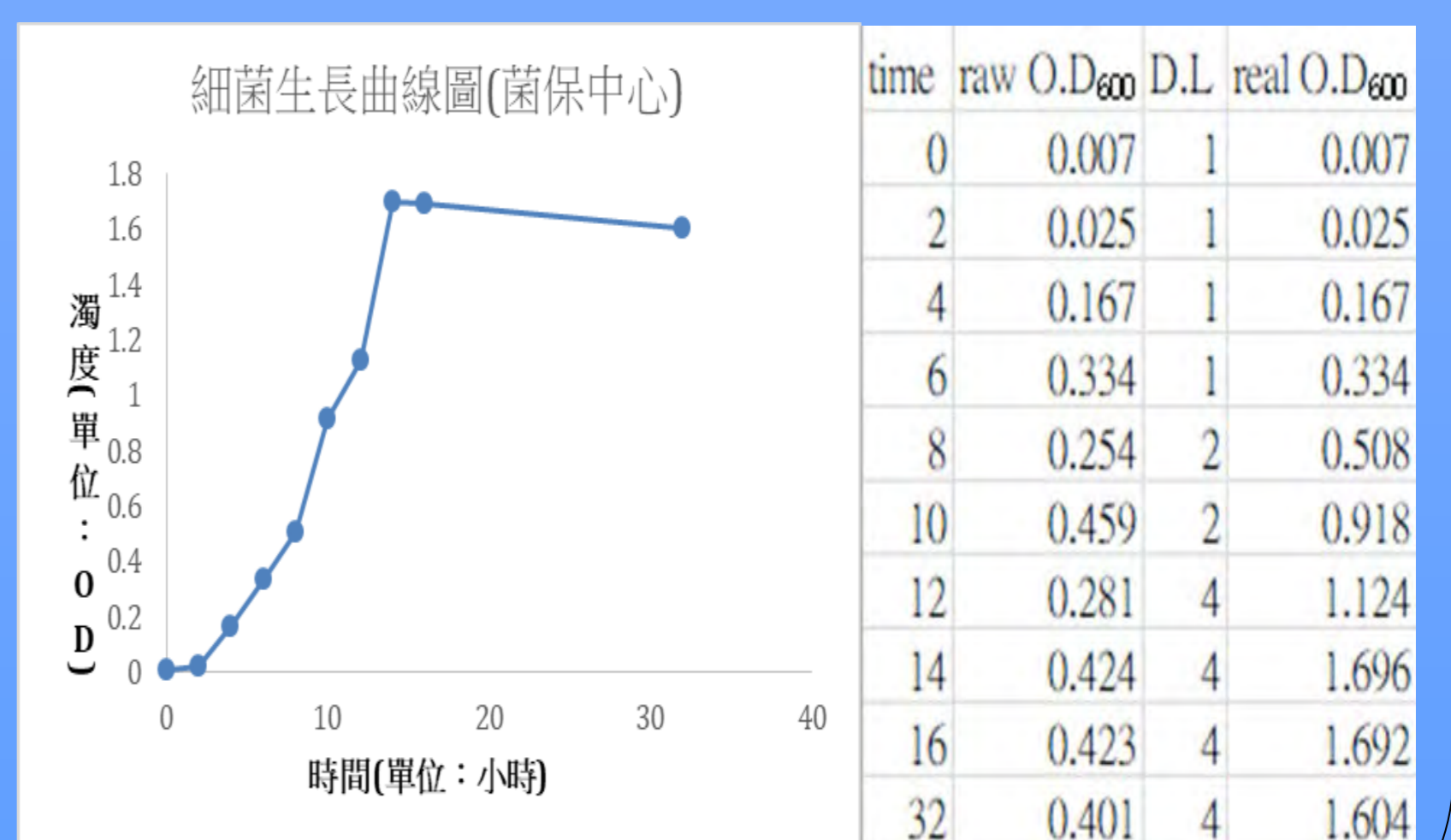
- (一)實驗數據都是7至8天為一個週期。
- (二)實驗經過不斷修正，才能實驗出適當的數據。
- (三)實驗數據如有不規則起伏，則為測量儀器誤差，平均下來可忽略不計。

二、生長曲線：

(一)生長曲線圖：



▲圖四：HEY的生長曲線圖



▲圖五：菌保中心菌種生長曲線圖

(二)討論：

- 1.透過分光光度計測量其濁度變化，得知「HEY」菌種的生長週期，12至16小時為穩定期。
- 2.得知菌保活化、養菌皆為12小時預培養，12小時主培養，共24小時。
- 3.«HEY»的生長速度基本上跟菌保中心的生長速度差不多，不用擔心這支菌的成長速度太慢。

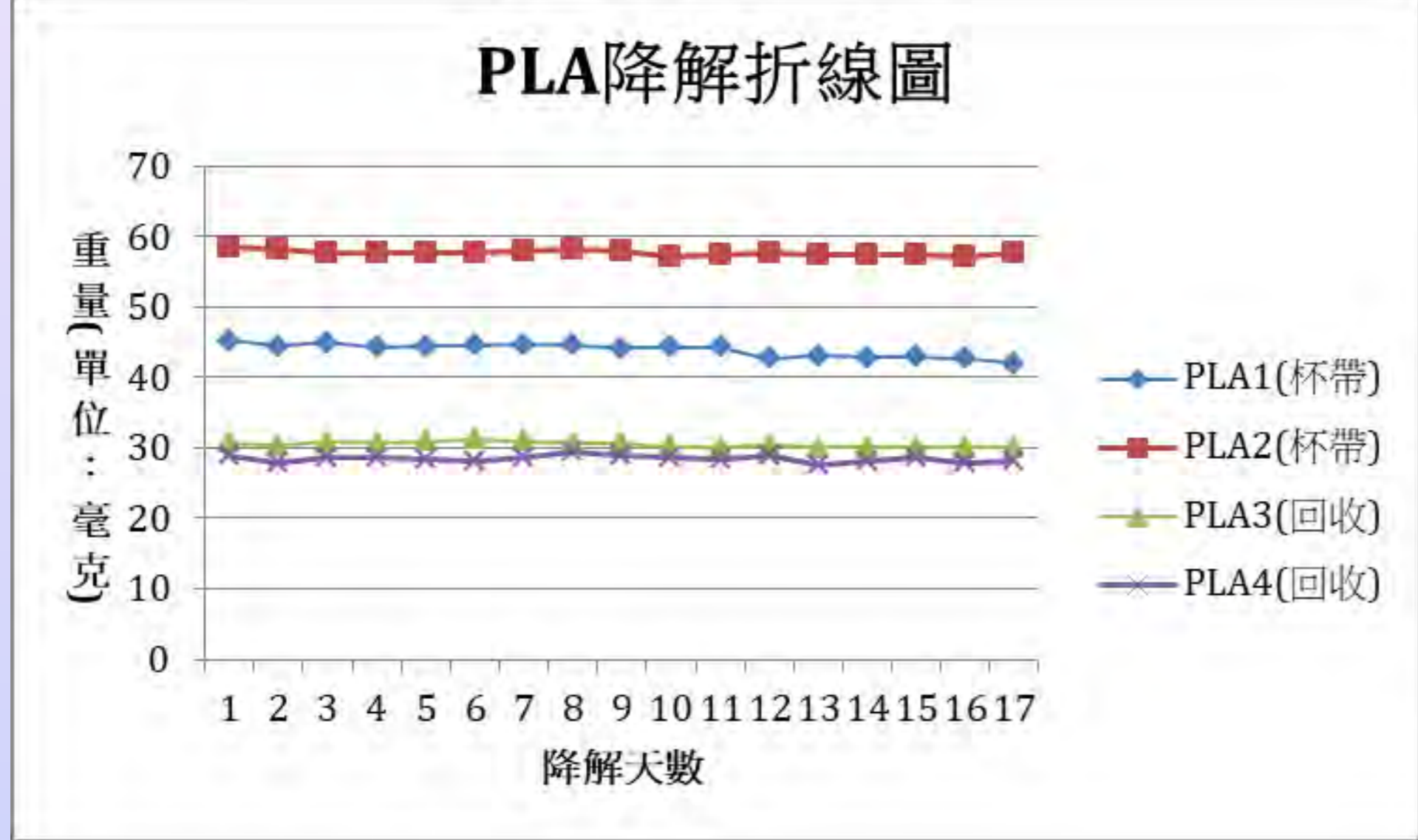


### 三、PLA降解圖表：

(一)降解數據：

表五：降解數據表

	10月31日	11月1日	11月2日	11月3日	11月4日	11月5日	11月6日	11月7日	11月8日	11月9日	11月10日	11月11日	11月12日	11月13日	11月14日	11月15日	11月16日
PLA1(杯帶)	45.2	44.5	45.01	44.5	44.45	44.6	44.55	44.61	44.2	44.31	44.29	42.76	43.88	42.9	43.03	42.72	42.1
PLA2(杯帶)	58.5	58.2	57.82	57.8	57.75	57.7	57.615	58.13	57.58	57.5	57.53	57.61	57.42	57.4	57.54	57.28	57.65
PLA3(回收)	30.7	30.3	30.8	30.7	30.95	31.2	30.975	30.75	30.69	30.15	30.1	30.37	30.07	30.06	30.05	30.07	30.06
PLA4(回收)	28.9	27.9	28.64	28.7	28.35	28	28.75	29.5	28.85	28.6	28.35	28.91	27.7	28.04	28.53	27.88	28.07



▲圖六：PLA降解折線圖

(二)討論：

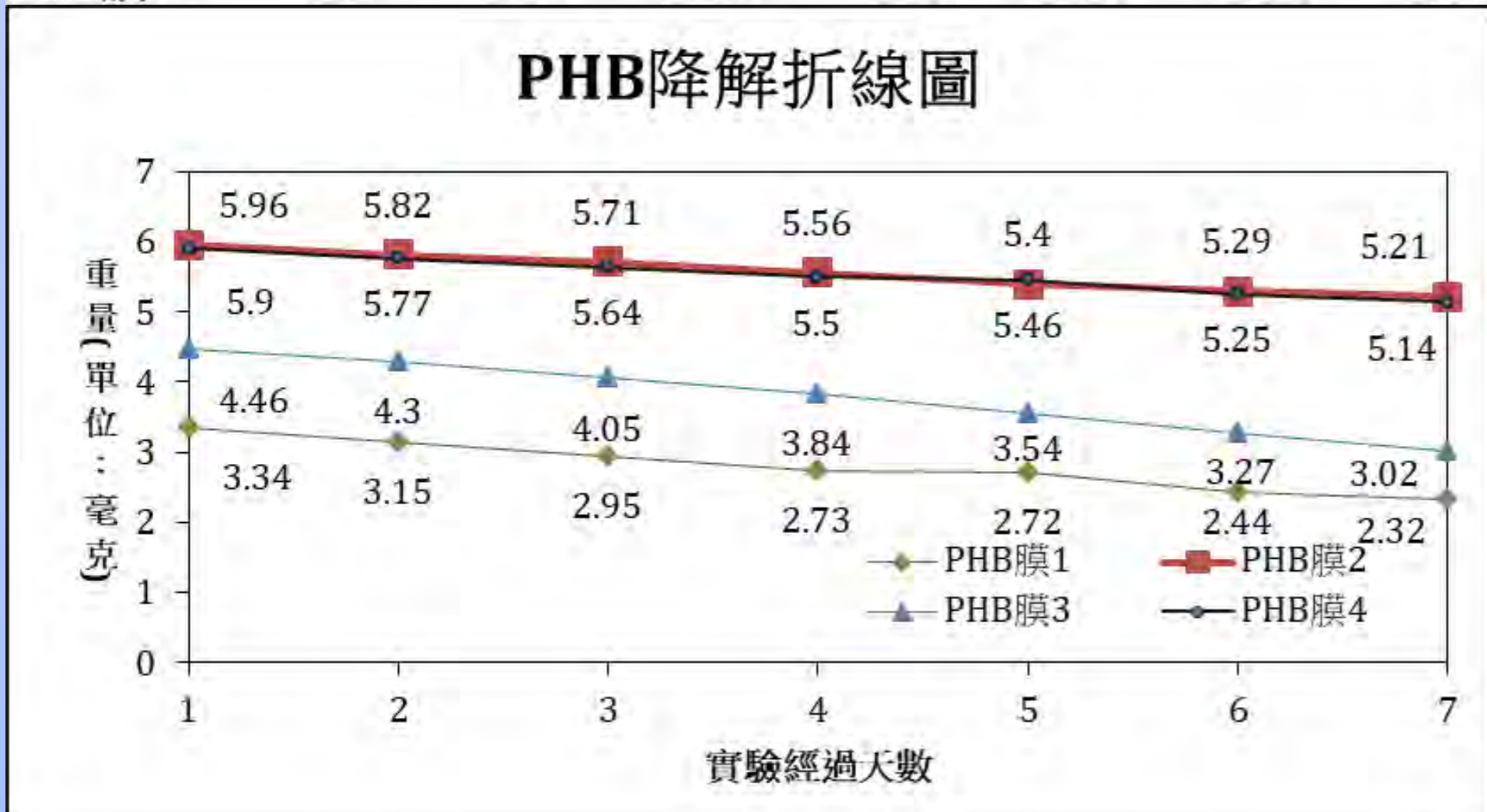
1. PLA1(杯帶)每天平均降解量約為0.18毫克/平方公分，是相對較快的分解速率。
2. PLA2(杯帶)、PLA3(回收)、PLA4(回收)分解效率不彰，我們懷疑是因為塑膠袋裡面有添加其他化學物質。
3. 透過網路得知，一般而言，生物可分解塑膠袋分解的速度大約是12周，估算每日降解量大約為0.15毫克/平方公分，而我們的「HEY」菌種每日降解量為0.18毫克/平方公分，降解速度在平均值之上，所以我們開始更深入的探討我們的菌是否有其他特點。

### 四、PHB降解數據：

(一)降解數據：

表六：降解數據表

	1月7日	1月8日	1月9日	1月10日	1月11日	1月12日	1月13日
PHB膜1	3.34	3.15	2.95	2.73	2.72	2.44	2.32
PHB膜2	5.96	5.82	5.71	5.56	5.4	5.29	5.21
PHB膜3	4.46	4.3	4.05	3.84	3.54	3.27	3.02
PHB膜4	5.9	5.77	5.64	5.5	5.46	5.25	5.14



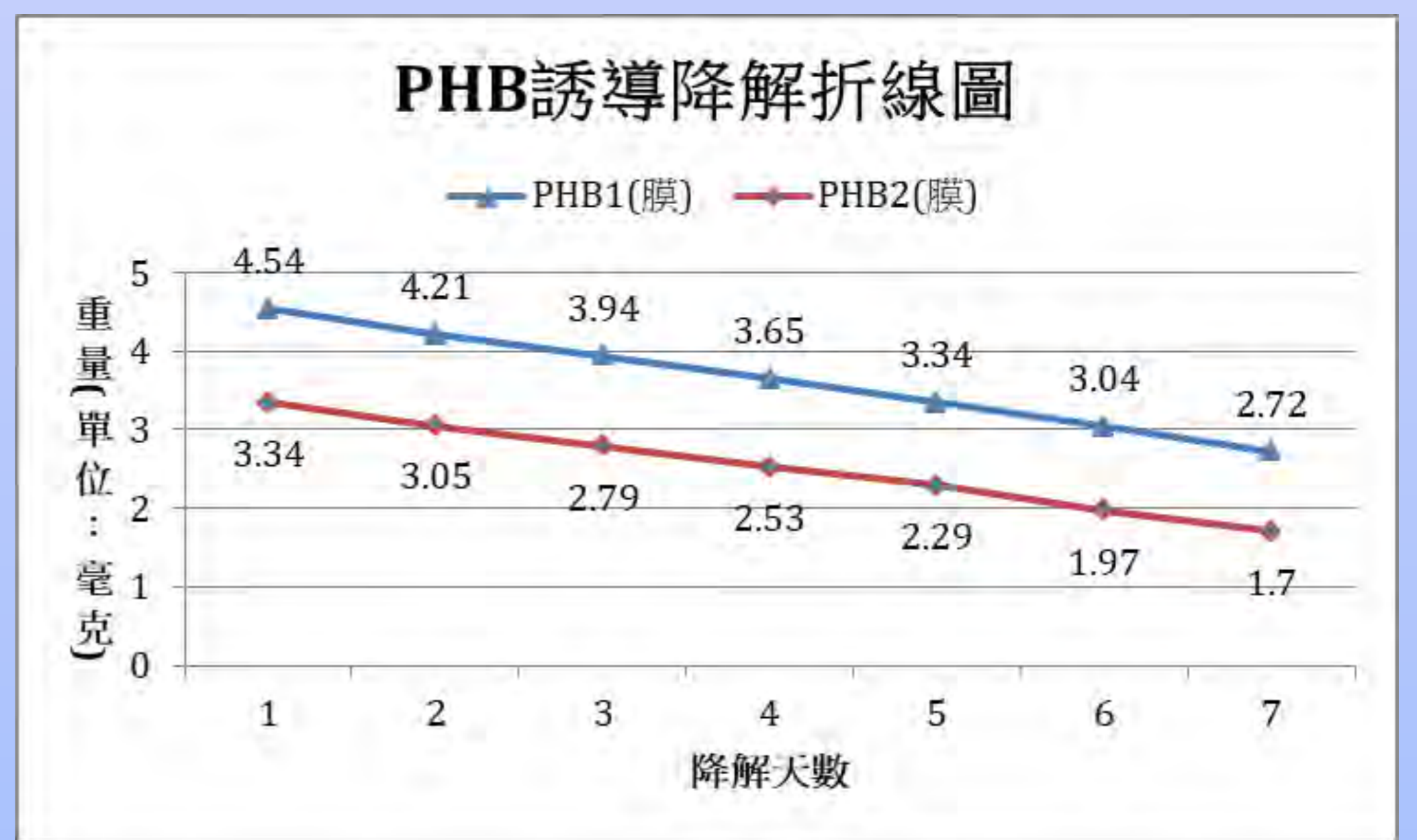
▲圖七：PHB降解折線圖

(二)討論：

1. 每日平均降解量為0.1-0.15毫克。
2. 因為PHB膜都是自行製備，所以沒有難以被分解的情形。
3. 「HEY」菌種對PHB也有降解能力。

### 五、PHB誘導降解數據：

(一)誘導降解數據：



▲圖八：PHB誘導降解折線圖

(二)討論：

1. 每日平均降解量約為0.3毫克。
2. 每日平均降解量達到誘導前的2倍。
3. 可以斷定誘導真的可以讓「HEY」菌種可以更有效率的降解PHB。

## 陸、結論

#### 一、安全性：

「HEY」菌種是從自然界中篩出來的菌，而非人為基改出來的。

#### 二、適應力：

「HEY」比菌種中心賣的菌適應力更好，有些菌遇到界面活性劑或PLA、PHB乳化液時，會造成該菌的細胞膜破裂，然而我們發現的「HEY」仍能持續發揮功效。

#### 三、效率：

總體而言，一樣的材料國內外論文研究發現需要90天，而「HEY」菌種只需30天。

#### 四、分解界面活性劑：

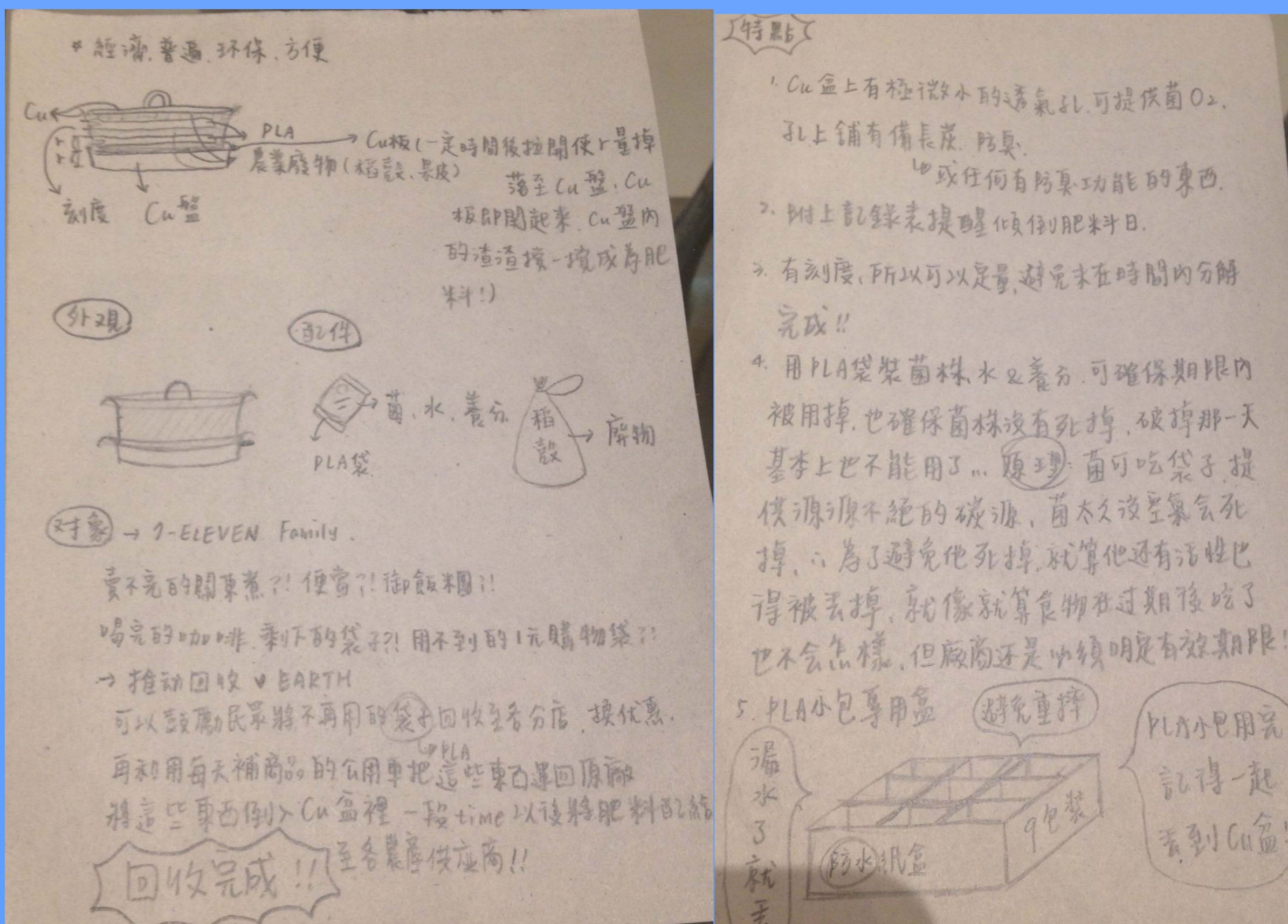
「HEY」菌種在5小時內能分解界面活性劑。

#### 五、便利性：

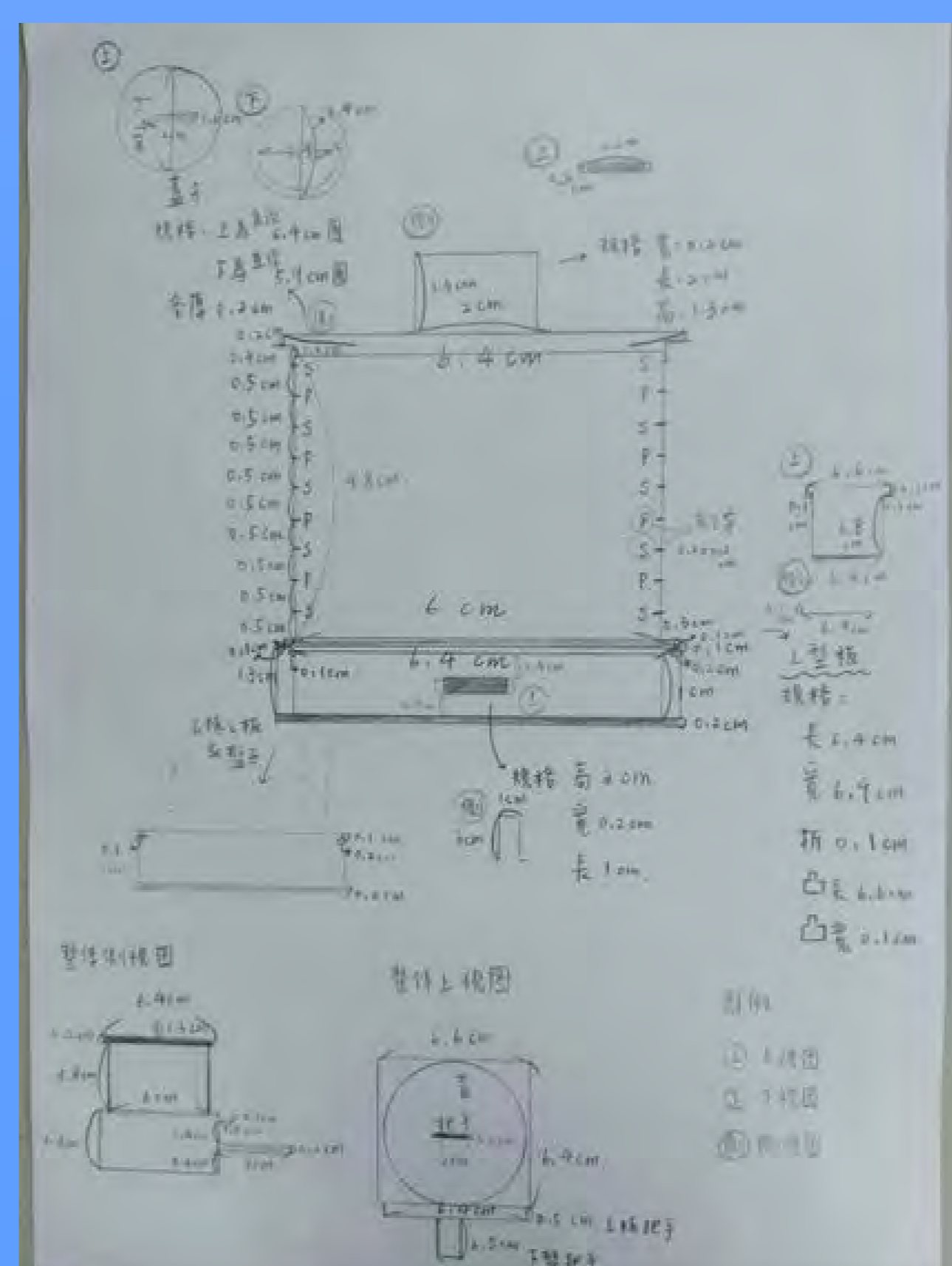
如果希望解決環境優養化，分解界面活性劑的部分將可以在汙水處理廠或是下水道中進行。

#### 六、未來展望：

- (一)研究「HEY」菌種對環境的影響。
- (二)如何將「HEY」投入垃圾分解場或下水道。
- (三)設計一個居民日常生活中就可使用的發酵槽，能隨手分解平常自己製造的生物可分解塑膠垃圾。



▲圖九：草稿版的未來展望(最初構思)



▲圖十：縮小版發酵槽設計圖