

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 植物學科

團隊合作獎

052106

一針見共-探討針箍絨泡黏菌與其共生菌間的關係

學校名稱：臺中市立臺中女子高級中等學校

作者： 高二 周沂臻 高二 吳奇芳	指導老師： 邱伯勤 許碧蕙
---------------------------------	-----------------------------

關鍵詞：針箍絨泡黏菌、共生菌

摘要

科展中黏菌的研究屈指可數，關於共生菌的研究更完全沒有，是一個充滿未知的領域。本實驗探討黏菌及其共生菌的關係，我們的實驗對象為針箍絨泡黏菌(*Physarella oblonga*)和它的共生菌。其中針箍絨泡黏菌(A)帶有 3 種共生菌，針箍絨泡黏菌(B)帶 1 種共生菌。研究結果顯示我們研究的原生質體針箍絨泡黏菌(A)其中一個共生菌 *Paraburkholderia tropica* 和國外細胞性盤基網柄菌 *Dictyostelium discoideum* 身上的共生菌同屬，且以不同方式影響黏菌的食物。經過一系列實驗後，發現針箍絨泡黏菌會篩選對生存有利的共生菌，每種被攜帶的共生菌具有不同功能，我們認為針箍絨泡黏菌的共生菌會彼此分工合作，影響黏菌生長。

壹、前言

一、研究動機

在國、高中的課本和網路上都看過黏菌，卻從未在現實中看過它，在一次偶然機會中從校園的落葉中發現黏菌，出於好奇而開始飼養。飼養一段時間後，發現黏菌樣貌逐漸產生變化，有些持續生長，有些卻逐漸衰弱而消失。我們推測除了餵食的食物影響黏菌的生長外，應該還有其他影響因素，於是上網尋找相關資料。翻閱文獻時得知黏菌分為兩大類，一種是原生質體黏菌，另一種是細胞性黏菌，我們所飼養的黏菌為原生質體黏菌，另外文獻中提到，細胞性黏菌帶有共生菌並會對黏菌產生影響，因此對原生質體黏菌身上是否也帶有共生菌產生了好奇。經由初步塗盤檢測後發現飼養一年多的黏菌身上依然帶有不少菌落，這個發現使我們設計相關實驗找出它們的共生菌，進而探討這些共生菌的作用及其與黏菌間的關係。

二、研究目的

- (一) 了解黏菌的種類及習性。
- (二) 尋找針箍絨泡黏菌的共生菌。
- (三) 測試針箍絨泡黏菌的共生菌及環境菌是否能作為針箍絨泡黏菌(A)的食物。
- (四) 研究針箍絨泡黏菌的共生菌對環境菌的作用。
- (五) 研究針箍絨泡黏菌的共生菌之間的作用。
- (六) 探討針箍絨泡黏菌(A)對共生菌的篩選性。

貳、研究設備與器材

一、研究自定義名詞

- (一) 針箍絨泡黏菌(A)：實驗主要使用的黏菌，命名為針箍絨泡黏菌(A)。
- (二) 針箍絨泡黏菌(B)：和針箍絨泡黏菌(A)同種而不同品系黏菌，命名為針箍絨泡黏菌(B)。
- (三) 共生菌 2-1：針箍絨泡黏菌(A)繼代掉菌後篩出的其中一種共生菌，命名為共生菌 2-1。
- (四) 共生菌 3-1：針箍絨泡黏菌(A)繼代掉菌後篩出的其中一種共生菌，命名為共生菌 3-1。
- (五) 共生菌 N1：將針箍絨泡黏菌(A)移到糙米培養基繼代後新發現共生菌，命名共生菌 N1。

- (六)共生菌 W1：將針箍絨泡黏菌(B)繼代掉菌後篩出的共生菌，命名為共生菌 W1。
- (七)環境菌(E1~E10)：為針箍絨泡黏菌棲息地經由塗盤劃菌，挑選形狀和顏色較明顯的菌落並命名為環境菌 E1~E10。
- (八)P 菌：粉紅色環境菌，因顏色較鮮艷容易區分，選擇此菌，並命名為 P 菌。
- (九)酵母菌(Y1、Y2)：為針箍絨泡黏菌的食物來源，Y1、Y2 為市售的酵母菌。
- (十)黏菌繼代基準：以針箍絨泡黏菌爬完一整個 9cm 的培養盤算作一代。

二、設備與器材

(一)實驗設備

			
圖 2-1 無菌操作台	圖 2-2 恆溫培養箱	圖 2-3 分光光度計	圖 2-4 微量吸管
			
圖 2-5 高速離心機	圖 2-6 玻璃珠	圖 2-7 高壓滅菌釜	圖 2-8 UV 光機
			
圖 2-9 水平電泳槽	圖 2-10 夾具式摩天輪混合器	圖 2-11 梯度核酸連鎖反應儀	圖 2-12 混合震盪儀

(二)實驗藥品與耗材

Water Agar	Brown Rice Agar
<p>1.配法(每 1000ml)</p> <p>(1)在血清瓶中放入 980ml 的 ddH₂O 和 20g 的 Agar</p> <p>(2)蓋上蓋子，包上鋁箔紙並貼上滅菌膠帶</p> <p>(3)滅菌 121°C、1.2kg/cm²、20 分鐘</p> <p>(4)放在無菌操作台冷卻至 40-50°C</p> <p>(5)傾倒至塑膠培養皿，每盤約 20ml</p> <p>(6)開 UV 蒸發水蒸氣 30 分鐘</p> <p>(7)凝固後，寫名稱、日期，儲存 4°C 冰箱。</p>	<p>1. 配方(每 1000ml)</p> <p>糙米粉 10g</p> <p>Agar 20g</p> <p>2.配法</p> <p>(1)在血清瓶中放入 20g 的 Agar 和 10g 的糙米粉，加 ddH₂O 至 1000ml。</p> <p>(2)蓋上蓋子，包上鋁箔紙並貼上滅菌膠帶</p> <p>(3)滅菌 121°C、1.2kg/cm²、20 分鐘</p> <p>(4)放在無菌操作台冷卻至 40-50°C</p> <p>(5)傾倒至塑膠培養皿，每盤約 20ml</p> <p>(6)開 UV 蒸發水蒸氣 30 分鐘</p> <p>(7)凝固後，寫名稱、日期，儲存 4°C 冰箱。</p>

LB Agar	LB Broth
<p>1.LB 粉末配方(每 1000ml)</p> <p>Tryptone 10g</p> <p>Sodium chloride 10g</p> <p>Yeast Extract 5g</p> <p>2.配法</p> <p>(1)在血清瓶中放入 25g 的 LB 粉末及 20g 的 Agar，加入 ddH₂O 至 1000ml</p> <p>(2)蓋上蓋子，包上鋁箔紙並貼上滅菌膠帶</p> <p>(3)滅菌 121 °C、1.2kg/cm²、20 分鐘</p> <p>(4)放在無菌操作台冷卻至 40-50°C</p> <p>(5)傾倒至塑膠培養皿，每盤約 20ml</p> <p>(6)開 UV 蒸發水蒸氣 30 分鐘</p> <p>(7)凝固後，寫名稱、日期，儲存 4°C 冰箱。</p>	<p>1.配法(每 1000ml)</p> <p>(1)在血清瓶中放入 25g 的 LB 粉末，加入 ddH₂O 至 1000ml</p> <p>(2)蓋上蓋子，包上鋁箔紙並貼上滅菌膠帶</p> <p>(3)滅菌 121°C、1.2kg/cm²、20 分鐘</p> <p>(4)放在無菌操作台冷卻至 40-50°C 寫上名稱、日期，儲存於 4°C 冰箱。</p>

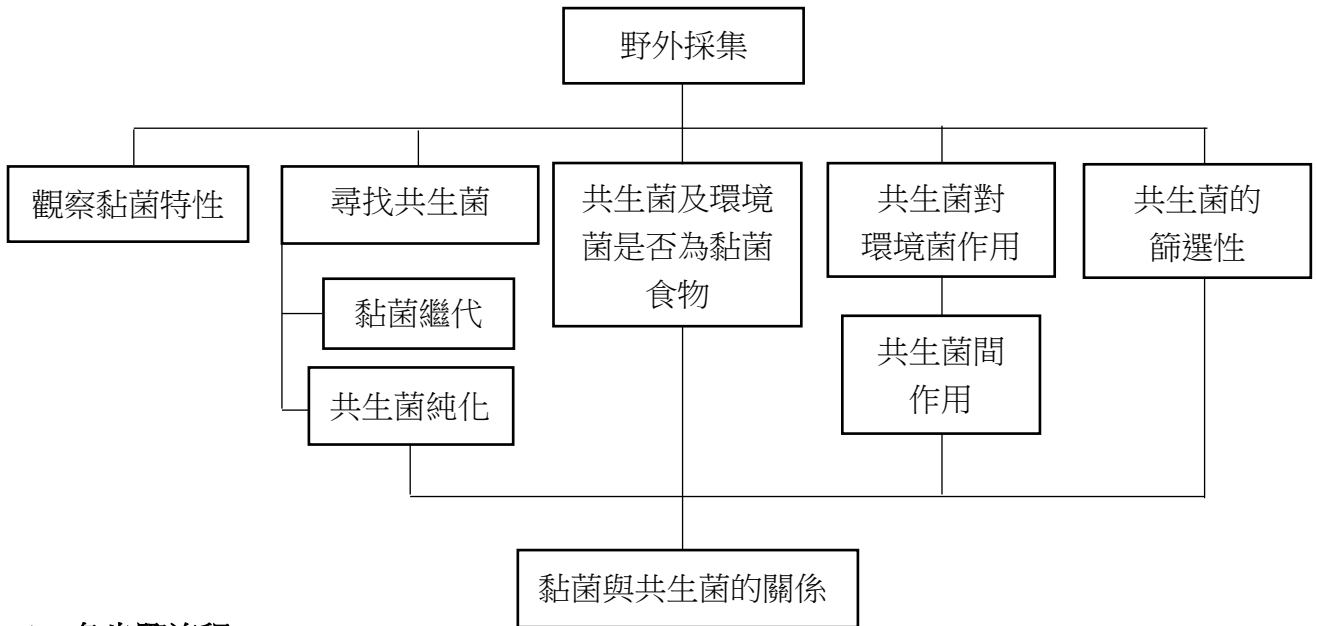
PCR	電泳
<p>1.PCR 配方</p> <p>PuriTaq 2 x PCR Master Mix 10μl</p> <p>primer 2μl</p> <p>ddH₂O 6μl</p> <p>2.過程</p> <p>細菌快抽：</p> <p>(1)在微量離心管中加入 90μl 的 PEG-NaOH</p> <p>(2)取菌株加入 PEG-NaOH 中用搖晃儀混合均</p>	<p>1.製膠配方</p> <p>TAE buffer</p> <p>(54g/L Tris</p> <p>27.5g/L 硼酸</p> <p>20ml 0.5M EDTA)</p> <p>DNA marker 5μl / 100ml</p> <p>(SafeView dyes Safe-Green)</p> <p>Agarose RAPD 2% / PCR 1%</p>

<p>勻，放入 PCR 機器(80°C，10 分鐘)</p> <p>PCR：</p> <p>(1)將 18μl PCR 藥品加入離心管</p> <p>(2)將離心管拿去離心約 5 秒</p> <p>(3)將離心管放入 PCR 儀器</p> <p>(先 95°C 5 分鐘高溫 95°C 1 分鐘，退火 52°C 30 秒，延長 72°C 1 分 30 秒，35cycle，最後一次循環 72°C 6 分鐘)</p>	<p>2.過程</p> <p>製膠：</p> <p>(1) 取 Agarose 製血清瓶中並加入 TBE 製成 2%的 gel</p> <p>(2) 混合均勻後放入微波爐中加熱 2~3 分鐘至溶液變的透明</p> <p>(3) 置於室溫並放入磁石攪拌器中攪拌到 40°C，加入 DNA marker</p> <p>(4) 攪拌 5 分鐘，將 gel 倒入製膠盒中，放入齒梳等待凝固即可</p> <p>(5) 完全凝固後將齒梳拔除</p> <p>跑電泳：</p> <p>(1) 將製好的 gel 放入電泳槽中，並加入 TBE buffer 直到淹過 gel</p> <p>(2) 取 5 μl 的 DNA marker 和 5 μl PCR 產物 加到 well 中</p> <p>(3) 將電泳槽插上接頭(正對正，負對負)，轉到 100 伏特，按下開始</p> <p>(4) 將跑完後的 gel 放入 UV 光機，觀察結果</p>
--	---

<p>RAPD(Randomly amplified polymorphic DNA)</p> <p>1.RAPD 配方</p> <p>Master Mix 10μl</p> <p>M13 primer 2μl</p> <p>ddH₂O 6μl</p> <p>2.過程</p> <p>(1)在微量離心管中加入 90μl 的 PEG-NaOH</p> <p>(2)取菌株加入 PEG-NaOH 中用搖晃儀混合均勻，放入 PCR 機器(80°C，10 分鐘)</p> <p>(3)將 18μl PCR 藥品加入離心管</p> <p>(4)將離心管拿去離心約 5 秒</p> <p>(5)將離心管放入 PCR 儀器(先 95°C 5 分鐘高溫 95°C 1 分鐘，退火 42°C 30 秒，延長 72°C 1 分 45 秒 35 循環，最後一次循環 72°C 時 6 分鐘)</p> <p>(6)從 PCR 取出菌液，分別取 2μl 加入微量離心管中</p>	<p>分解甲基纖維素</p> <p>1. 甲基纖維素 Agar 配方</p> <p>甲基纖維素 10g</p> <p>酵母萃取物 10g</p> <p>蛋白腴 20g</p> <p>Agar 20g</p> <p>2.染劑</p> <p>剛果紅染劑 1g</p> <p>食鹽水 1M</p> <p>3. Agar 配法</p> <p>(1)在血清瓶中放入 10g 的甲基纖維素、10g 的酵母萃取物、20g 的蛋白腴、20g 的 Agar，加入 ddH₂O 至 1000ml。</p> <p>(2)蓋上蓋子，包上鋁箔紙並貼上滅菌膠帶</p> <p>(3)滅菌 121 °C、1.2kg/cm²、20 分鐘</p> <p>(4)放在無菌操作台冷卻至 40-50°C</p> <p>(5)傾倒至塑膠培養皿，適時搖晃避免沉澱現象，每盤約 20ml</p> <p>(6)開 UV 蒸發水蒸氣 30 分鐘</p> <p>(7)凝固後，寫名稱、日期，儲存 4°C 冰箱。</p>
---	---

參、研究過程及方法

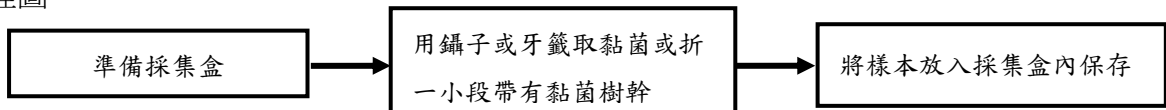
一、總研究流程



二、各步驟流程

(一)野外採集

1.流程圖

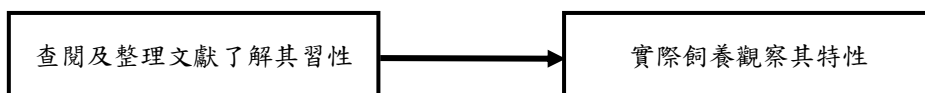


2.實驗步驟目的與原理：

採集不同種的黏菌，培養觀察。

(二)觀察黏菌特性

1.流程圖



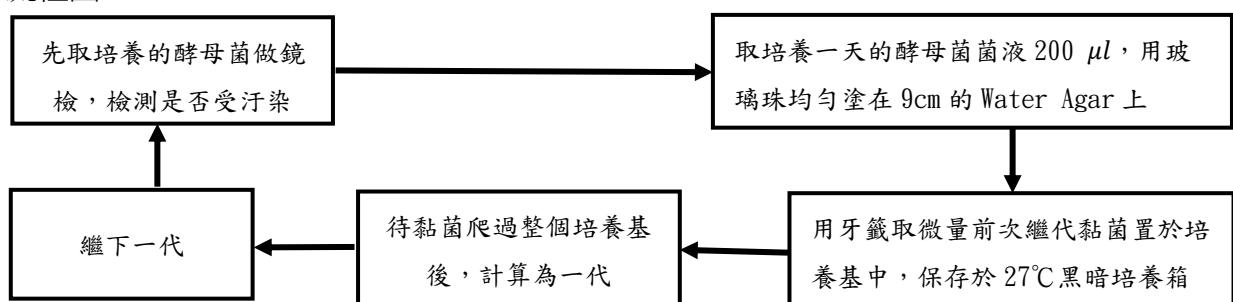
2.實驗步驟目的與原理：

了解黏菌生活及特性，並實際觀察飼養，選擇實驗黏菌。

(三)尋找共生菌

A.繼代

1.流程圖



2.實驗步驟目的與原理：

為了去除針箍絨泡黏菌身上共生菌外的細菌，我們以酵母菌為食物，在 Water Agar 上飼養針箍絨泡黏菌，黏菌在爬行進食時雜菌會被代謝，而共生菌則持續保留，因此透過持續繼代即可取得乾淨的黏菌。繼代的基準是黏菌爬完 9cm 的培養基盤，食用完酵母菌後即進行下一次繼代。餵食的酵母菌以市售麵包酵母菌培養 1 天後餵食。

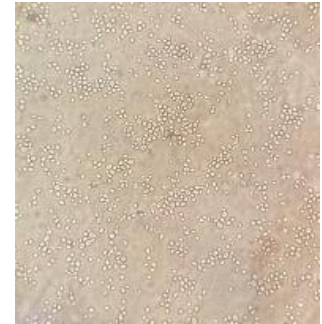
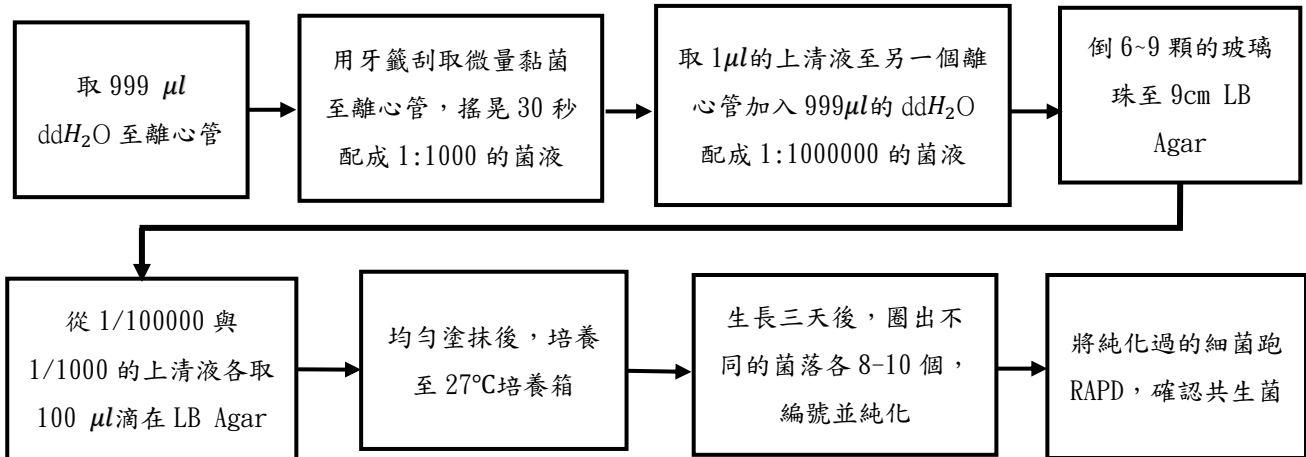


圖 3-1 酵母菌鏡檢

B.篩共生菌

1.流程圖



2.實驗步驟目的的原理：

為了瞭解繼代後針箍絨泡黏菌身上是否帶有共生菌，故將其塗盤並尋找共生菌，實驗時使用以下條件的黏菌來塗盤。

(1) 未控制環境

模擬自然環境以酵母菌飼養一年的黏菌(原代)

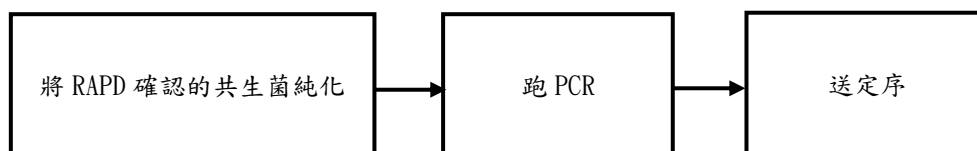
(2) 控制酵母菌為食物來源，在無菌培養基中飼養

第一代黏菌、第二代黏菌、第三代黏菌

觀察不同代塗出的共生菌是否不同，及黏菌生長狀況好壞對塗出的共生菌是否有影響，分為濃度 1/1000(編為 A 盤)和 1/1000000(編為 B 盤)做為比較，將觀察到的細菌挑選純化，跑 RAPD 比較共生菌的基因，確認共生菌種類及數量。

C.定序共生菌

1.流程圖



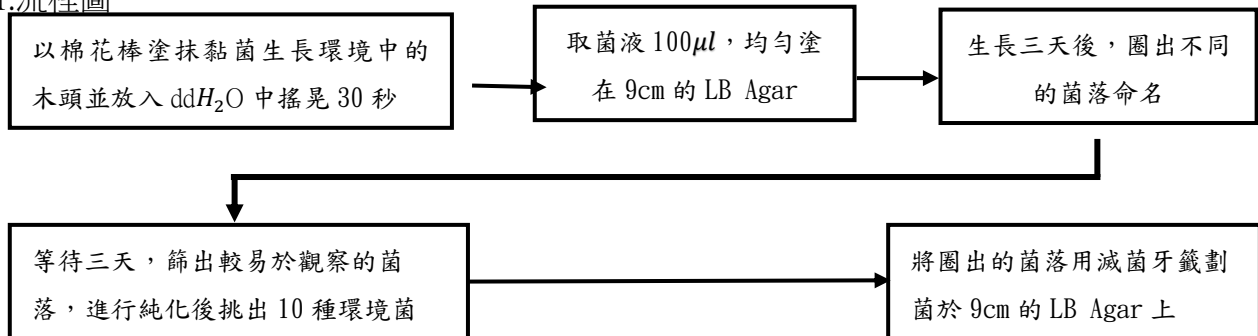
2.實驗步驟目的與原理：

以 OD 值檢測共生菌對環境菌成長率影響的實驗中發現其中一種共生菌對部分環境菌具增益效果，而自然界中的細菌應該是互相拮抗的，這令我們對它十分感興趣，想知道它是什麼細菌，故將此共生菌做 PCR，擴大辨識 DNA，並進一步做定序確認菌種。

(四) 確定環境菌與共生菌是否為針箍絨泡黏菌(1)的食物

A.取得環境菌

1.流程圖



2.實驗步驟目的與原理：

我們採集有針箍絨泡黏菌生活的腐木及蕈類塗盤，挑出十種不同大小及顏色的菌落並將其純化，並依序編號(E1、E1、E2、E3、E4、E5、E6、E7、E8、E9、E10)。

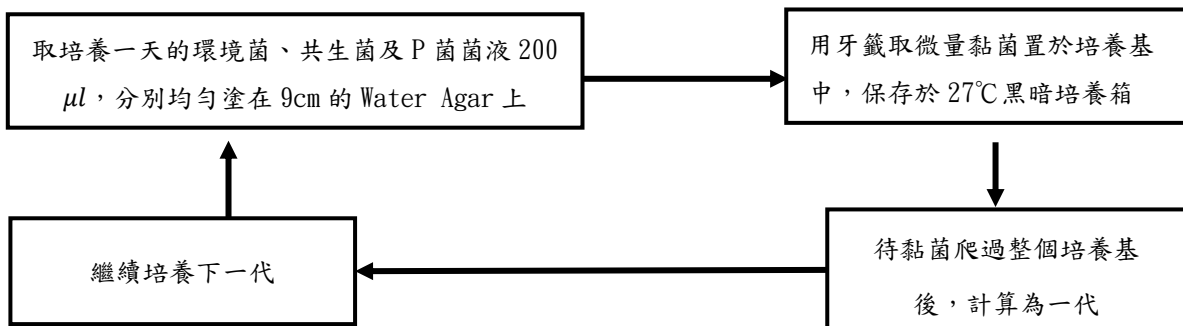
另外，我們從廢棄的培養盤中找到並純化出一種菌落為桃紅色的細菌，命名為 P 菌。



圖 3-2 環境菌 1~10 及 P 菌純化

B.確認是否為食物

1.流程圖



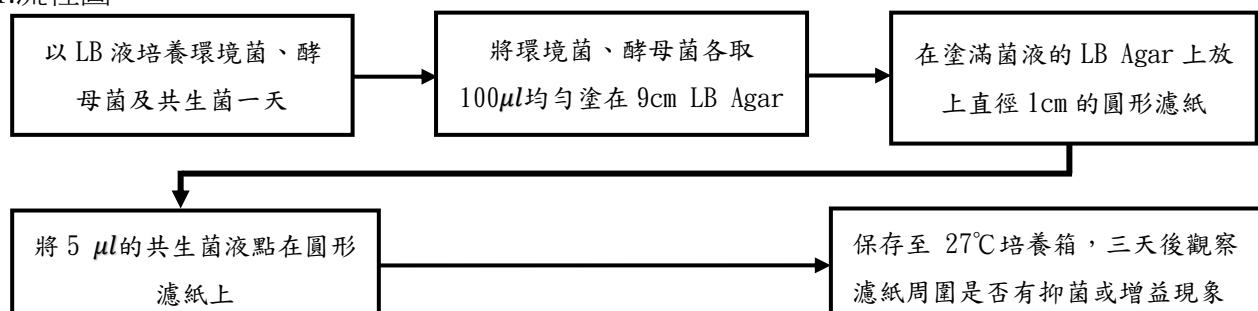
2.實驗步驟目的與原理：

在 OD 值檢測共生菌對環境菌成長率的實驗中共生菌 3-1 對某些環境菌具有增益效果，我們推測那些環境菌可能是黏菌的食物，因此以它們為食物來源進行繼代，若是繼滿三代則視為食物。另外我們也好奇共生菌是否為黏菌食物，使用了共生菌繼代。而我們還使用了 P 菌繼代，為下個實驗準備。使用的細菌：環境菌(E4、E6、E8、E9)、共生菌(W1、2-1、3-1、N1)、P 菌。

(五)黏菌與共生菌關係-共生菌對環境菌作用

A.共生菌與環境菌交互作用(抑菌圈)

1.流程圖

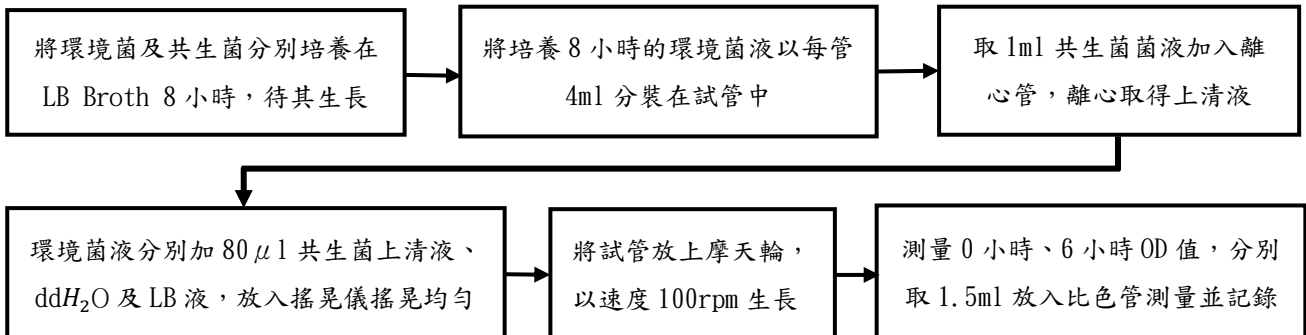


2.實驗步驟原理與目的：

為了瞭解共生菌與環境菌及酵母菌之間是否有增益或抑制作用，設計將共生菌點在環境菌上，並透過濾紙控制菌液位置，以觀察彼此間的作用。

B.共生菌與環境菌交互作用(OD 值檢測)

1.流程圖



2.實驗步驟目的與原理：

在純化過的環境菌(E1~E10)及酵母菌(Y1、Y2)液中分別加入 LB 液、ddH₂O、共生菌 W1、2-1、3-1、N1 上清液，測量生長狀況。先前抑菌圈實驗效果不明顯，故想要進一步經由 OD 值檢測更精確了解環境菌與共生菌間細微的變化。

LB 液、ddH₂O 作為對照組，若是加入共生菌上清液的成長率 > 加入 LB 液，則具有增益效果；若是加入共生菌上清液的成長率 < 加入 ddH₂O，則具有抑制效果；若是加入共生菌上清液的成長率介於加入 LB 液及 ddH₂O，則不具有增益或抑制效果。

(六)黏菌與共生菌關係-共生菌對環境菌作用

A.共生菌之間交互作用(抑菌圈)

1.流程圖

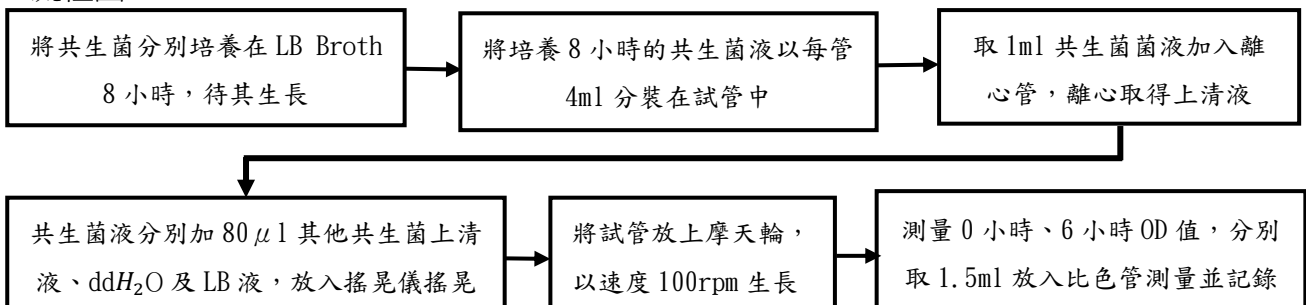


2.實驗步驟原理與目的：

為了瞭解共生菌之間是否有增益或抑制作用，設計將共生菌點在其他共生菌上，並透過濾紙控制菌液位置，以觀察彼此間的作用。

B.共生菌之間交互作用(OD 值檢測)

1.流程圖



2.實驗步驟目的與原理：

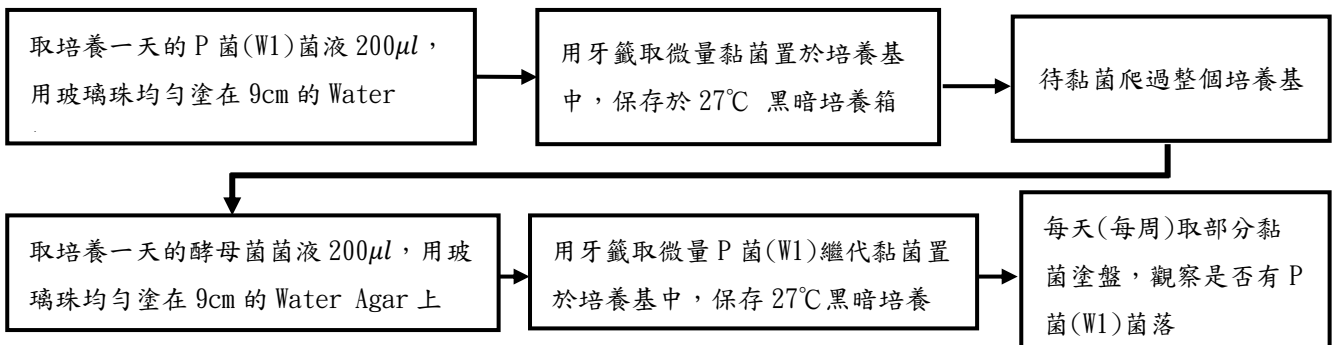
在純化過的共生菌(W1、2-1、3-1)液中分別加入 LB 液、ddH₂O、共生菌 W1、2-1、3-1 上清液，測量生長狀況。先前抑菌圈實驗效果不明顯，故想要進一步經由 OD 值檢測更精確了解共生菌之間細微的變化。

LB 液、ddH₂O 作為對照組，若是加入共生菌上清液的成長率 > 加入 LB 液，則具有增益效果；若是加入共生菌上清液的成長率 < 加入 ddH₂O，則具有抑制效果；若是加入共生菌上清液的成長率介於加入 LB 液及 ddH₂O，則不具有增益或抑制效果。

(七)黏菌對共生菌的篩選性

A. P 菌及 W1 證明共生菌的篩選性

1.流程圖



2.實驗步驟目的與原理：

(1)P 菌

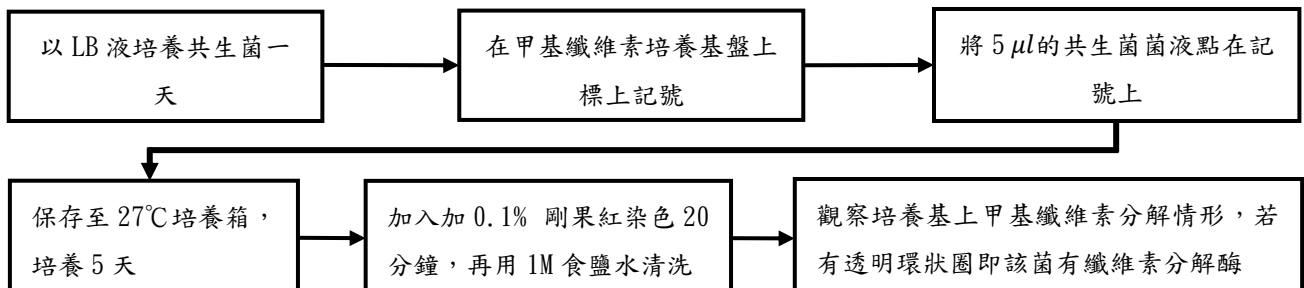
在環境中找到一種菌落呈現桃紅色，易於辨認的細菌(P 菌)，再確認為針箍絨泡黏菌(A)的食物，將針箍絨泡黏菌(A)在 P 菌繼代一代，使其身上帶有 P 菌後，改以酵母菌繼代，並每日取一部份黏菌塗盤觀察 P 菌菌落的數量變化，驗證針箍絨泡黏菌(A)共生菌是否具篩選性。

(2)W1

以針箍絨泡黏菌(B)所攜帶的共生菌 W1，繼代針箍絨泡黏菌(A)一代，使其身上帶有 W1 後，改以酵母菌繼代，並每周取一部份黏菌塗盤，並挑選菌落跑 RAPD，觀察 W1 是否被針箍絨泡黏菌(A)攜帶，來更了解針箍絨泡黏菌(A)對共生菌的篩選機制。

B.確認共生菌分解纖維素能力

1.流程圖



2.實驗步驟目的與原理：

黏菌在野外生活的落葉和木頭含有許多纖維素，且將針箍絨泡黏菌(A)飼養在 Brown Rice Agar 時，發現它會食用 Brown Rice Agar，並在表面形成坑洞。將它塗出共生菌進行 RAPD 後，發現了新的共生菌 N1，而糙米中有纖維素的成分，因此推測共生菌可能具有纖維素分解酶，故設計此實驗。

肆、研究結果

一、野外採集及觀察黏菌特性

(一)野外採集

我們在各校園和山中的木頭及落葉中尋找黏菌，變形體通常在陰暗潮濕的地方比較容易發現，像是落葉堆中或樹皮下，相對的在明亮乾燥的地方則較常發現子實體。其中採集到許多不同顏色及種類的黏菌，但大部分是黃色及橘色，偶爾會發現白色、紅色及綠色的黏菌。



圖 4-1-1 採集到黑色的子實體



圖 4-1-2 黏菌在野外採樹幹上爬行



圖 4-1-3 採集到子實體黑色表面與黃色斑紋



圖 4-1-4 採集到黃色黏菌的外觀



圖 4-1-5 顯微鏡下黃色黏菌



圖 4-1-6 黃色黏菌爬行的樣子



圖 4-1-7 採集到的白色黏菌外觀



圖 4-1-8 採集到的紅色子實體



圖 4-1-9 採集到的黑色子實體

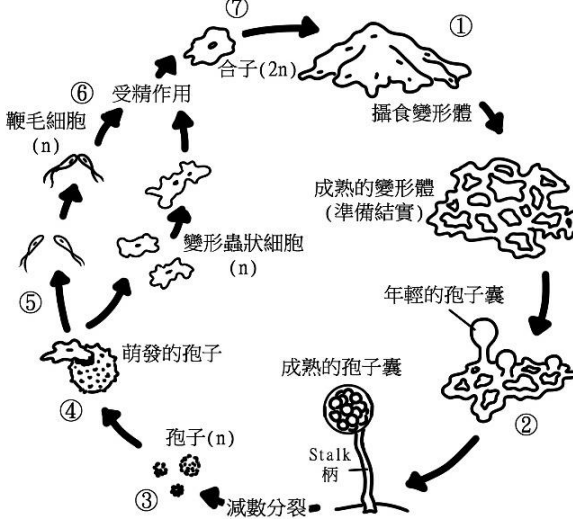
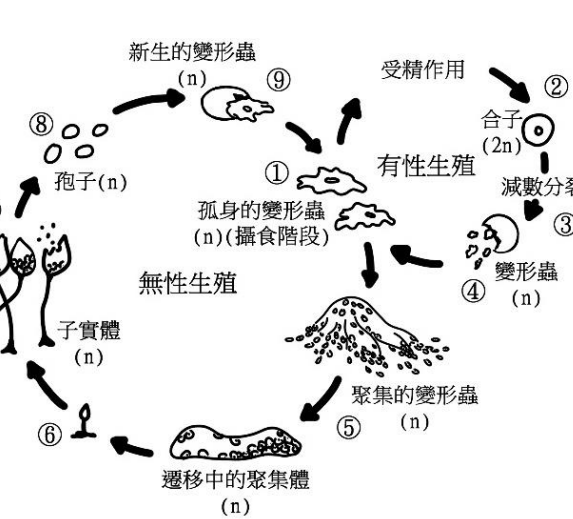
(二)觀察黏菌特性--黏菌分類及實驗黏菌種類

1.黏菌分類

黏菌屬於原生生物，有各式各樣的形狀、顏色、結構，棲息於潮濕陰暗且溫度適宜的地方，常發現於腐木、枯葉堆中，因溫度適宜故春天和秋天較容易發現，而當環境條件欠缺時，就會形成子實體，直到環境適宜時孢子會散發出來。

黏菌依生活方式和生理結構分為兩大類：原生質體黏菌(Phylum Myxomycota)和細胞性黏菌(Phylum Acrasiomycota)，兩者的主要差異在於生命週期與生理結構。本實驗使用的針箍絨泡黏菌均屬於原生質體黏菌。

2. 兩種種類黏菌生長圖

A. 原生質體黏菌(Phylum Myxomycota) 生長史	B. 細胞性黏菌(Phylum Acrasiomycota) 生長史
 <p>圖 4-1-10 原生質體黏菌生長圖(研究者自繪)</p>	 <p>圖 4-1-11 細胞性黏菌生長圖(研究者自繪)</p>
<p>說明：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 攝食階段是一個多核變形體。 2. 當條件變嚴苛時，變形體會豎起具柄的子實體（孢子囊）。 3. 孢子囊內，減數分裂產生單倍數的風媒孢子。 4. 抗性孢子在條件適宜時萌發，釋放運動細胞。 5. 會動的單倍數細胞可能是變形蟲型，或是具鞭毛型，這二類型可輕易彼此轉換型態。 6. 同型細胞融合，形成二倍數合子。 7. 合子細胞核重複進行沒有胞質分裂的有絲分裂，形成變形體。 	<p>說明：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 在攝食階段，單倍數變形蟲吞食細菌，並定期進行有絲分裂。 2. 在有性生殖階段，兩個單倍數變形蟲形成一個合子。 3. 合子從單倍數變形蟲化成一個巨大細胞，發育出具抗性的細胞壁後，進行減數分裂，再進行數次有絲分裂。 4. 細胞破裂，釋出新的單倍數變形蟲。 5. 食物枯竭時，上百個變形蟲應化學物質的吸引，聚集形成一個蛞蝓狀聚集體。 6. 聚集體遷移一段時間後會停下，有些細胞在形成支撐無性生殖子實體的柄之後會乾枯。 7. 其餘的細胞會沿柄上行並發育成孢子。 8. 釋放的孢子。 9. 條件適宜變形蟲冒出孢子外殼開始攝食。
<p>特色：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 平時以二倍體的方式生存。 2. 由數千個細胞聚在一起的變形蟲型態。 3. 孢子囊內部將各個細胞隔開變為孢子。 4. 形成子實體時孢子囊外被膜包裹著。 	<p>特色：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 生命中大多數以單倍體生存。 2. 發出化學信號給周遭的同伴。 3. 在形成子實體時會有數個單倍體聚集。 4. 形成的孢子囊是裸露在外的。

3.本實驗黏菌

實驗使用的黏菌皆在校園中發現。經由子實體、變形體的比對發現使用的是針箍絨泡黏菌(A) *Physarella oblonga*，為原生質體黏菌，是最早發現的黏菌，外表呈現亮黃色，在控制食物來源養了一年以後，其生長狀況也穩定，故選為主要實驗對象。

經過子實體、變形體比對發現所使用的是同種不同品系的針箍絨泡黏菌(B) *Physarella oblonga*，外表呈現淺黃色，易受環境因素影響，不容易飼養，爬行速度較慢，故未選擇當主要實驗對象，僅篩出共生菌使用。



圖 4-1-12 針箍絨泡黏菌(A)變形體



圖 4-1-13 針箍絨泡黏菌(A)變形體在衛生紙培養



圖 4-1-14 針箍絨泡黏菌(A)變形體在木頭上爬行



圖 4-1-15 針箍絨泡黏菌(A)子實體
表面有鈣化沉積物斑點

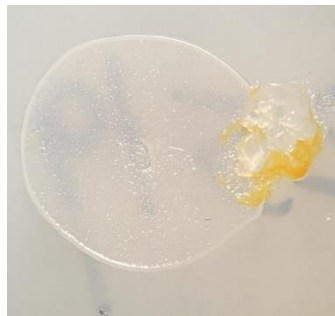


圖 4-1-16 針箍絨泡黏菌(A)正食用酵母菌

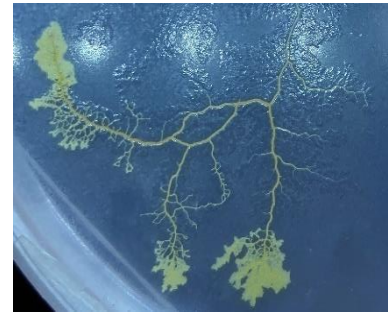


圖 4-1-17 針箍絨泡黏菌(A)在 Water Agar 爬行

二、針箍絨泡黏菌(A)、(B)的繼代及尋找共生菌

為了找出針箍絨泡黏菌身上是否帶有共生菌，進行繼代，將不同代的黏菌塗盤尋找共生菌。在無菌的環境下進行繼代、塗菌、純化、RAPD 後，在針箍絨泡黏菌(A)找到 3 種共生菌；針箍絨泡黏菌(B)找到 1 種共生菌。

(一)繼代

在無菌的 Water Agar 上繼代針箍絨泡黏菌，並控制酵母菌為唯一食物來源，使黏菌去除雜菌。



圖 4-2-1 針箍絨泡黏菌(A)
繼代爬滿培養皿

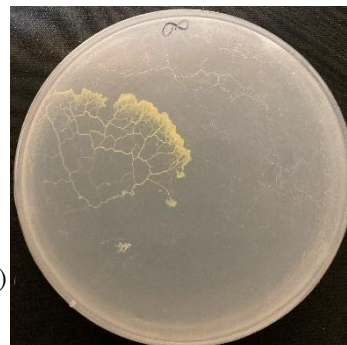


圖 4-2-2 針箍絨泡黏菌(B)
繼代爬滿培養皿

(二)塗菌

將不同代的針箍絨泡黏菌(A)及(B)塗盤，觀察菌落變化。發現塗出菌落的種類隨著繼代次數增加而減少，實驗結果顯示針箍絨泡黏菌(A) 主要有黃色較小、白色較小、白色較大的三種菌落；而針箍絨泡黏菌(B)有透明較小及白色較大的兩種菌落，培養基內還有參雜少數其他顏色大小的菌落，推測為污染的雜菌。並將黃色較小的菌落命名為 Y 菌，顏色偏透明較小的菌落命名為 S 菌，白色較大的菌落命名為 W 菌。



圖 4-2-3 針箍絨泡黏菌(A)塗盤

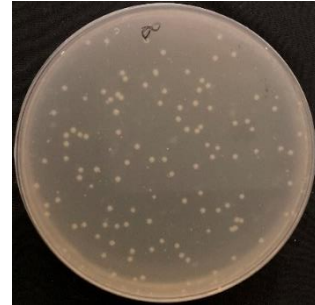


圖 4-2-4 針箍絨泡黏菌(B)塗盤

(三)共生菌 2-1、3-1、W1 RAPD

1.挑選及純化菌落

圈出外觀不同的菌落各 8-10 個，命名編號並純化。



圖 4-2-5 將 S 菌挑 8 個純化



圖 4-2-6 將 Y 菌挑 8 個純化



圖 4-2-7 將 W 菌挑 8 個純化

2.RAPD 結果

RAPD 結果顯示從針箍絨泡黏菌(A)挑出的菌落中主要有兩種條帶，推測為針箍絨泡黏菌(A)的兩種共生菌，將黃色的 Y 菌落命名為 2-1，白色的 W 菌落命名為 3-1；針箍絨泡黏菌(B)的條帶中主要有一種條帶，推測為針箍絨泡黏菌(B)的共生菌，並將它命名為 W1，而其餘種類的條帶重複較少，應為污染菌落。

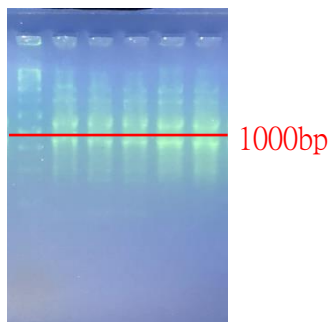


圖 4-2-8 共生菌 2-1
RAPD 結果

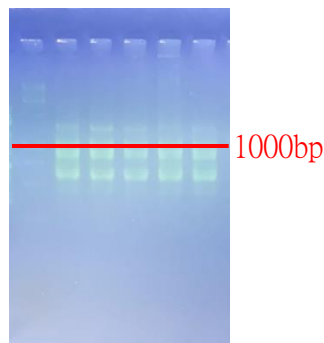


圖 4-2-9 共生菌 3-1
RAPD 結果

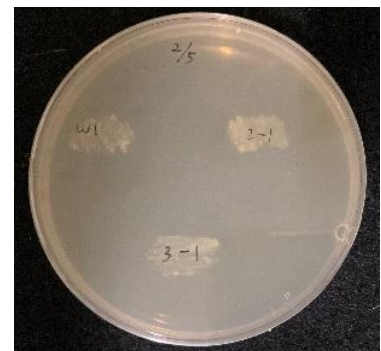


圖 4-2-10 共生菌 2-1、3-1、W1
純化

(四) 發現共生菌 N1

當繼代到六、七代時針籬絨泡菌(A)爬行速度變慢，每次所需的時間隨著繼代次數增加，推測可能是因為以 Y2 作為單一食物導致，所以在調配 Water Agar 時加入含不同營養素的糙米粉，測試黏菌生長狀況是否改善。

結果顯示，在將針籬絨泡黏菌(A)養在 Brown Rice Agar 後，黏菌的生長速度變快、爬行時間變短，並在 Brown Rice Agar 表面留下坑洞，推測這些改變可能和共生菌有關，便將針籬絨泡菌(A)在 Brown Rice Agar 生長的變形體及三個子實體打碎塗盤。



圖 4-2-11 在 Brown Rice Agar 生長良好的針籬絨泡黏菌(A)

1. 塗盤及純化

將糙米培養基培養的針籬絨泡黏菌(A)塗盤後挑選 11 個菌落純化，另外取三個子實體塗盤並編號為子實體 1、子實體 2、子實體 3，分別取 8、9、4 個菌落純化。

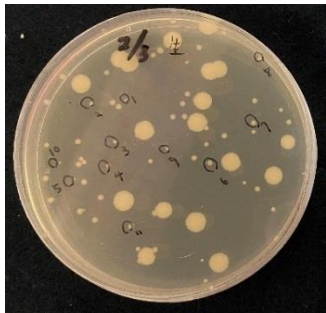


圖 4-2-12 將針籬絨泡黏菌(A)塗盤菌圈出 11 個菌落



圖 4-2-13 將針籬絨泡黏菌(A)圈出的菌落純化

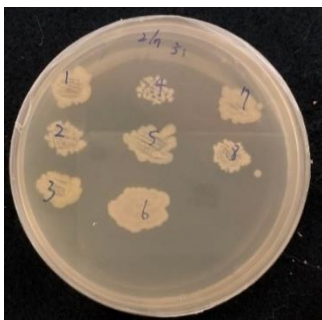


圖 4-2-14 子實體 1 挑 8 個菌落純化

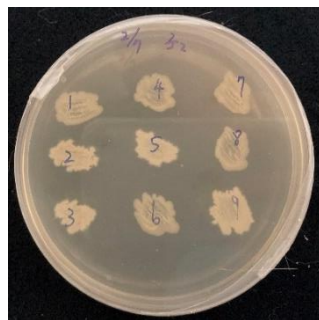


圖 4-2-15 子實體 2 挑 9 個菌落純化

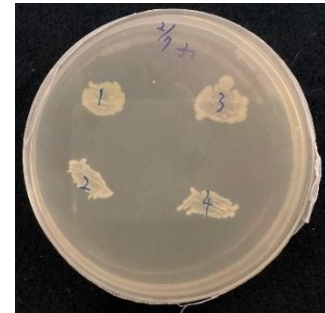


圖 4-2-16 子實體 3 挑 4 個菌落純化

2. RAPD

實驗結果顯示，在針籬絨泡黏菌(A)、子實體 1、2、3 中皆出現一種不同於 2-1、3-1 的條帶，雖然無法得知來源及出現原因，但推測應為針籬絨泡黏菌(A)的共生菌，並將此共生菌命名為 N1。(紅線為 1000bp 條帶位置，藍框為共生菌 N1)

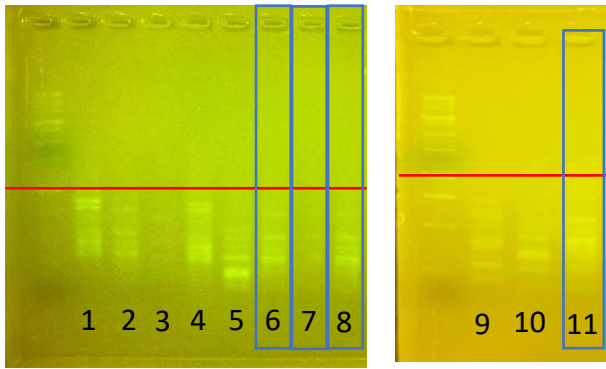


圖 4-2-17 針箍絨泡黏菌(A)變形體 RAPD 結果編號 1~11

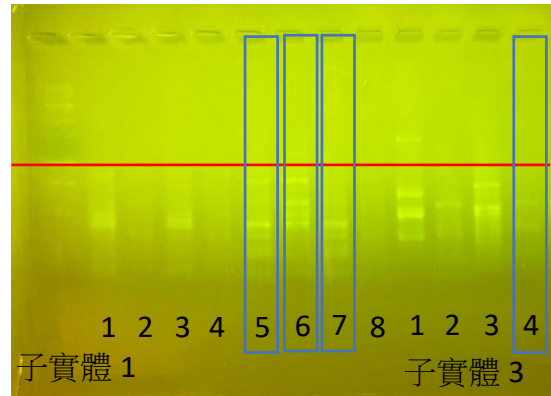


圖 4-2-18 針箍絨泡黏菌(A)子實體 1 RAPD 結果
編號 1~8、子實體 3 編號 1~4

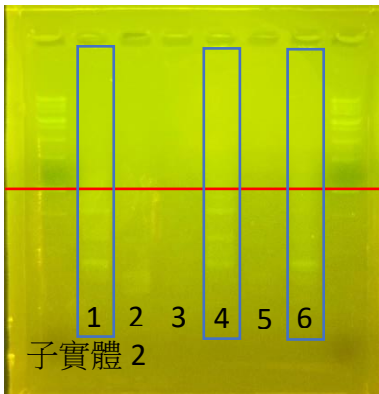


圖 4-2-19 針箍絨泡黏菌(A)
子實體 2 RAPD
結果編號 1~6

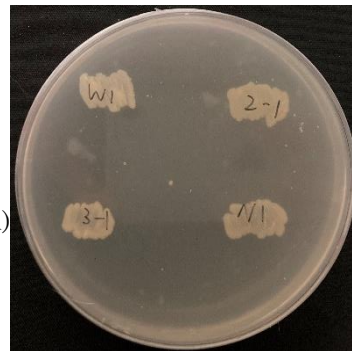


圖 4-2-20 共生菌 W1、2-1、
3-1、N1 純化

三、確定共生菌與環境菌是否為針箍絨泡黏菌(A)的食物

(一)共生菌是否能作為針箍絨泡黏菌(A)食物

黏菌在野外的生活環境有很多細菌，卻挑選其中幾種作為共生菌，我們想知道被留下的共生菌是否能作為黏菌的食物，因此使用共生菌 W1、2-1、3-1、N1 為食物繼代針箍絨泡黏菌(A)。若繼代滿三代依舊存活則判定為針箍絨泡黏菌(A)食物；不超過三代則判定非食物。

表 4-3-1 共生菌與環境菌是否為針箍絨泡黏菌(A)的食物

菌種	針箍絨泡黏菌(A)			是否為針箍絨泡黏菌(A)食物
	第一代	第二代	第三代	
共生菌 2-1	✓	×	—	否
共生菌 3-1	✓	✓	✓	是
共生菌 W1	✓	×	—	否
共生菌 N1	✓	✓	✓	是

實驗結果顯示，共生菌 3-1、N1 皆繼代滿三代，可作為針箍絨泡黏菌(A)的食物；共生菌 2-1 及 W1 在第二代時便死亡，並非針箍絨泡黏菌(A)的食物。

(二)環境菌是否能作為針箍絨泡黏菌(A)食物

由上述實驗得知部分共生菌能作為黏菌食物，此外也想要知道黏菌生活環境中的環境菌

是否能作為黏菌食物，便挑選出其中 4 種及酵母菌 Y1 繼代測試。另外也測試了菌落顏色為桃紅色的 P 菌，為後續的篩選性實驗做準備。

表 4-3-2 共生菌與環境菌是否為針箍絨泡黏菌(A)的食物

繼代次數 菌種	針箍絨泡黏菌(A)			是否為針箍絨泡黏菌(A)食物
	第一代	第二代	第三代	
E4	✓	✓	✓	是
E6	✓	✓	✓	是
E8	✓	✓	✓	是
E9	✓	✓	✓	是
Y1	✓	✓	✓	是
P 菌	✓	✓	✓	是

實驗結果顯示環境菌 E4、E6、E8、E9、Y1 及 P 菌皆繼代滿三代，為針箍絨泡黏菌(A)的食物。

四、共生菌對環境菌生長的影响

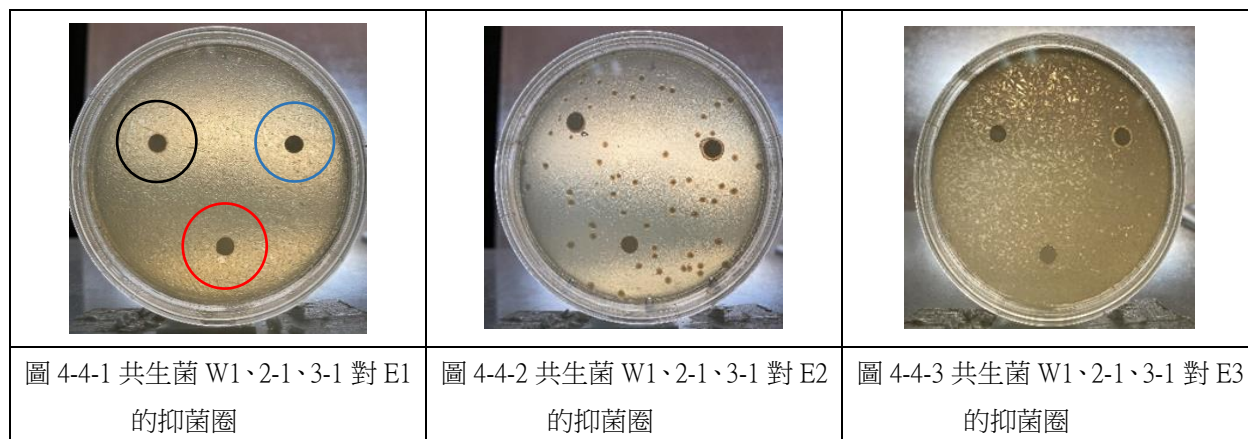
上述實驗顯示針箍絨泡黏菌攜帶的共生菌不一定能作為它的食物，而它生活環境中的許多環境菌能作為食物，我們推測共生菌和環境菌之間可能有交互作用，另外，也曾在文獻中看到國外的細胞性盤基網柄菌 *Dictyostelium discoideum* 身上的共生菌 *Burkholderia* 會影響作為黏菌食物的細菌，而針箍絨泡黏菌(A)、(B)為不同綱的原生質體黏菌，因此設計了以下實驗，測試共生菌對環境菌是否具增益或抑制的效果。

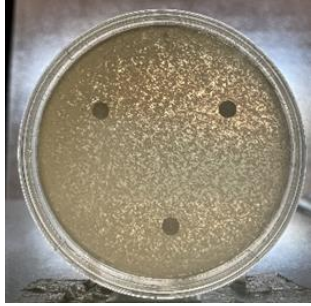
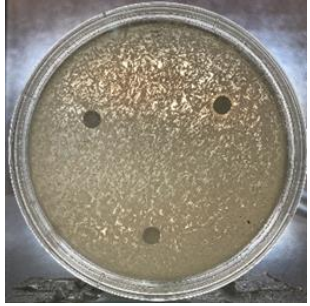
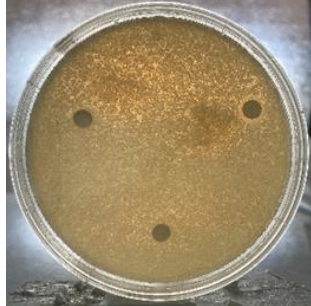



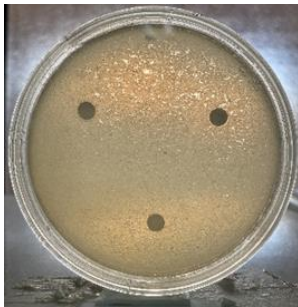

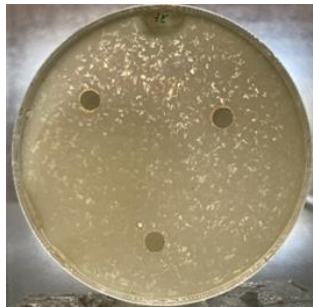
(一) 共生菌 W1、2-1、3-1 對環境菌生長的影响

1. 抑菌圈實驗

將共生菌 W1、2-1、3-1 點在環境菌(E1~E10)和酵母菌(Y1、Y2)中生長，觀察有無抑菌圈產生，或周遭環境菌生長較佳的狀況。

(黑色圈代表共生菌 2-1，紅色圈代表共生菌 3-1，藍色圈代表共生菌 W1)



		
圖 4-4-4 共生菌 W1、2-1、3-1 對 E4 的抑菌圈	圖 4-4-5 共生菌 W1、2-1、3-1 對 E5 的抑菌圈	圖 4-4-6 共生菌 W1、2-1、3-1 對 E6 的抑菌圈
		
圖 4-4-7 共生菌 W1、2-1、3-1 對 E7 的抑菌圈	圖 4-4-8 共生菌 W1、2-1、3-1 對 E8 的抑菌圈	圖 4-4-9 共生菌 W1、2-1、3-1 對 E9 的抑菌圈
		
圖 4-4-10 共生菌 W1、2-1、3-1 對 E10 的抑菌圈	圖 4-4-11 共生菌 W1、2-1、3-1 對 Y1 的抑菌圈	圖 4-4-12 共生菌 W1、2-1、3-1 對 Y2 的抑菌圈

實驗結果都沒有產生明顯的抑菌圈，周遭的環境菌也沒有生長較佳的現象。推測可能不具增益或抑制效果或是效果不明顯，因此使用 OD 值來檢測是否有抑菌或增益效果。

2. OD 值檢測

在環境菌 E1~E10 及酵母菌 Y1、Y2 共 12 種環境菌與酵母菌中分別加入共生菌上清液、ddH₂O 及 LB Broth，檢測共生菌的分泌物是否會對環境菌產生影響。

若具有抑制效果，加入共生菌上清液的环境菌 OD 值成長率應小於加入 ddH₂O 及 LB Broth 的环境菌；若有增益效果，加入共生菌上清液的环境菌 OD 值成長率應大於加入 ddH₂O 及 LB Broth 的环境菌；若無抑制或增益效果，加入共生菌上清液的环境菌 OD 值成長率應介於加入 ddH₂O 及 LB Broth 的环境菌。

成長率計算方法：

我們每次使用(環境菌+共生菌上清液)*2+(環境菌+ddH₂O)*2+(環境菌+LB Broth)*2 管樣本，取得 2 個數據計算成長率，成長率的計算方式為(6 小時 OD 值-0 小時 OD 值)/0 小時 OD 值。

(1)加入共生菌 W1 上清液的環境菌 OD 值檢測結果(綠框為增益效果、紅框為抑制效果)

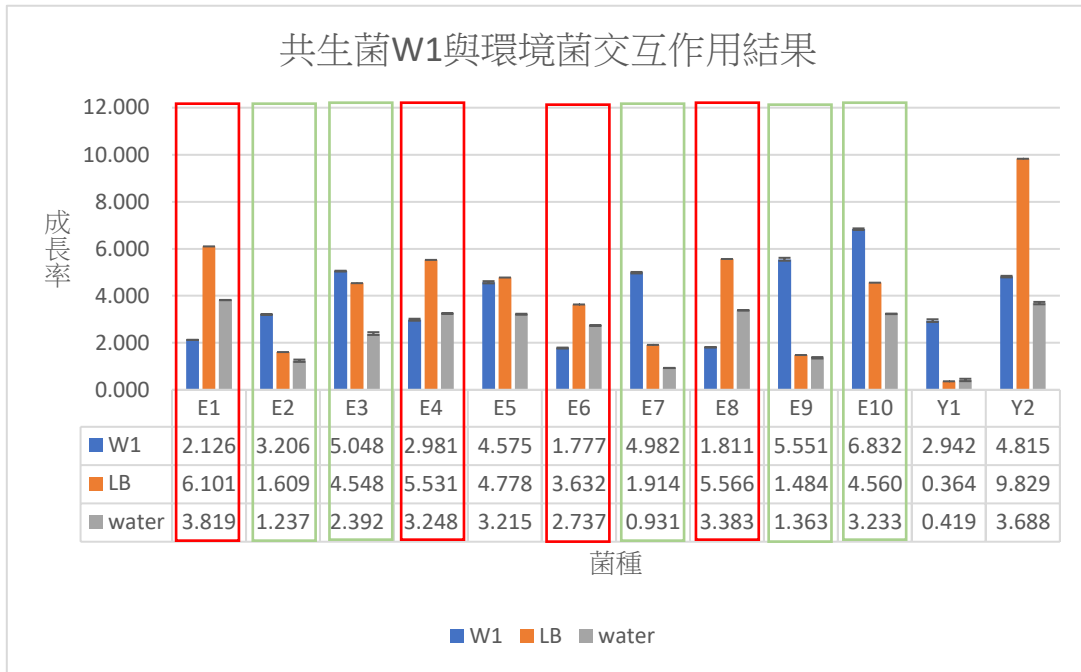


圖 4-4-13 共生菌 W1 對環境菌(E1~E10、Y1、Y2)的 OD 值檢測結果

實驗結果顯示，共生菌 W1 上清液對環境菌 E1、E4、E6、E8 有抑制效果，而對於環境菌 E2、E3、E7、E9、E10 有增益的效果。Y1 的 OD 值之中加入水的 > 加入 LB Broth 的，而理論上 LB 的 OD 值應大於水的 OD 值，故此數據不符合。

(2)加入共生菌 2-1 上清液的 OD 值檢測結果(綠框為增益效果、紅框為抑制效果)

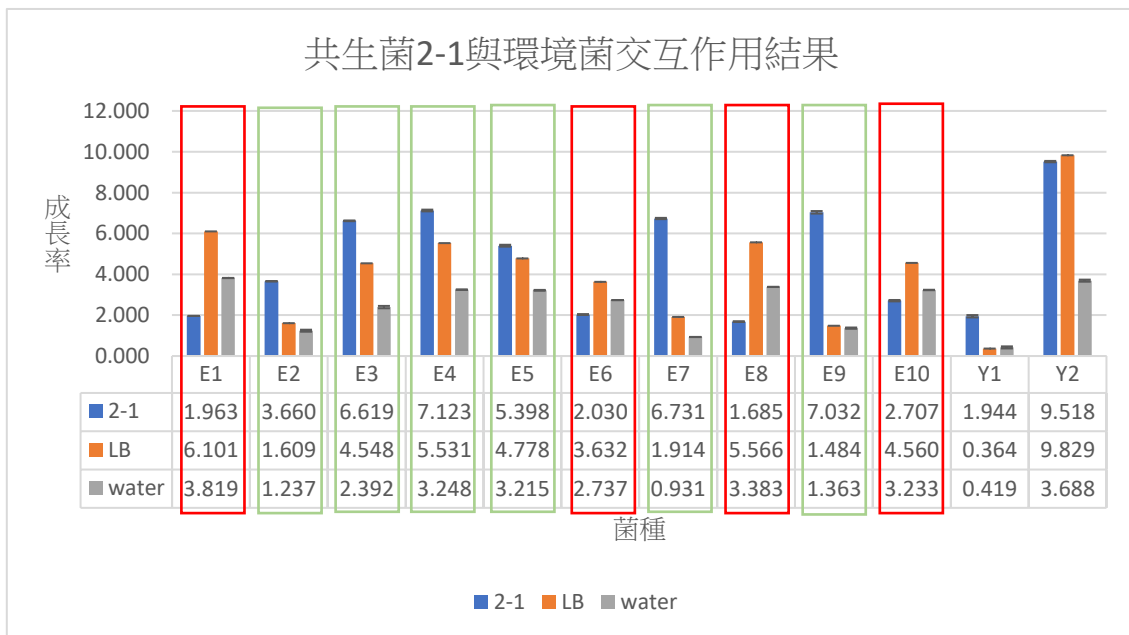


圖 4-4-14 共生菌 2-1 對環境菌(E1~E10、Y1、Y2)的 OD 值檢測結果

實驗結果顯示，共生菌 2-1 上清液對環境菌 E1、E6、E8、E10 具有抑制的效果；對環境菌 E2、E3、E4、E5、E7、E9 具有促進的效果。Y1 的 OD 值之中加入水的 > 加入 LB Broth 的，而理論上 LB 的 OD 值應大於水的 OD 值，故此數據不符合。

(3)加入共生菌 3-1 上清液的 OD 值檢測結果(綠框為增益效果、紅框為抑制效果)

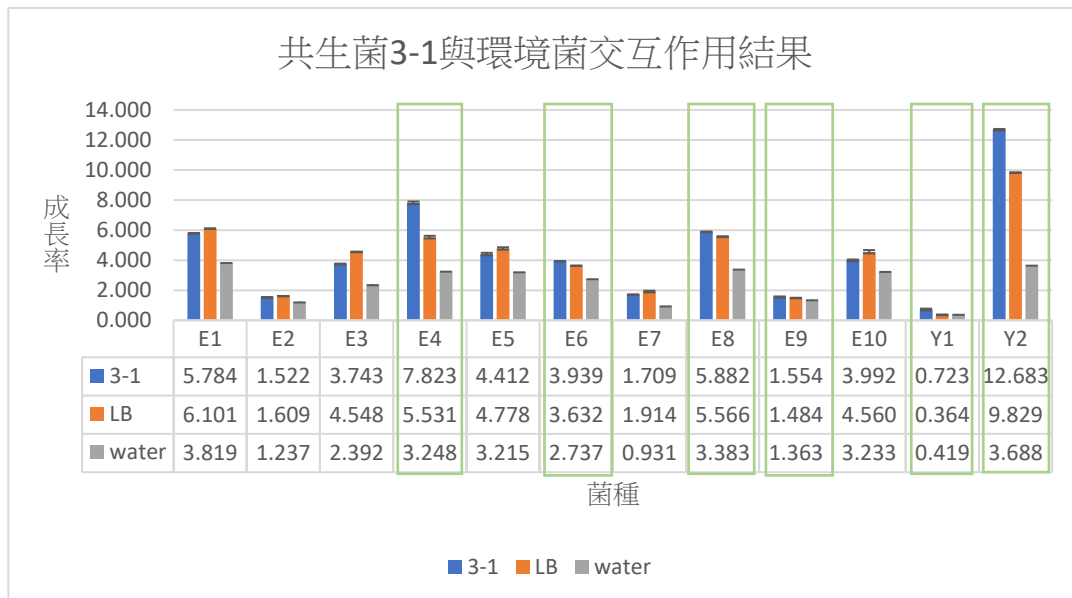


圖 4-4-15 共生菌 3-1 對環境菌(E1~E10、Y1、Y2)的 OD 值檢測結果

實驗結果顯示，共生菌 3-1 上清液對環境菌 E4、E6、E8、E9 與酵母菌 Y1、Y2 具有增加的效果，並無抑制效果。

(二)針對共生菌 3-1 有增益效果的環境菌具進行重複實驗

前一個實驗中，發現共生菌 3-1 對環境菌 E4、E6、E8、E9、Y1、Y2 具增進效果，且無抑制效果，相較於其他共生菌這結果十分奇特，因此針對共生菌 3-1 做進一步地確認它對這些環境菌的影響。

1.對前測有增益效果的環境菌進行 10 重複

每次使用(環境菌+共生菌上清液)*5+(環境菌+ddH₂O)*5+(環境菌+LB Broth)*5 管樣本，在不同時間進行了二重複，控制兩次環境菌及共生菌初始 OD 值差異在 0.1 內，共取得 10 個數據計算成長率，成長率的計算方式為：(6 小時 OD 值-0 小時 OD 值)/0 小時 OD 值。

加入共生菌 3-1 上清液的 OD 值檢測結果(綠框為增益效果、紅框為抑制效果)

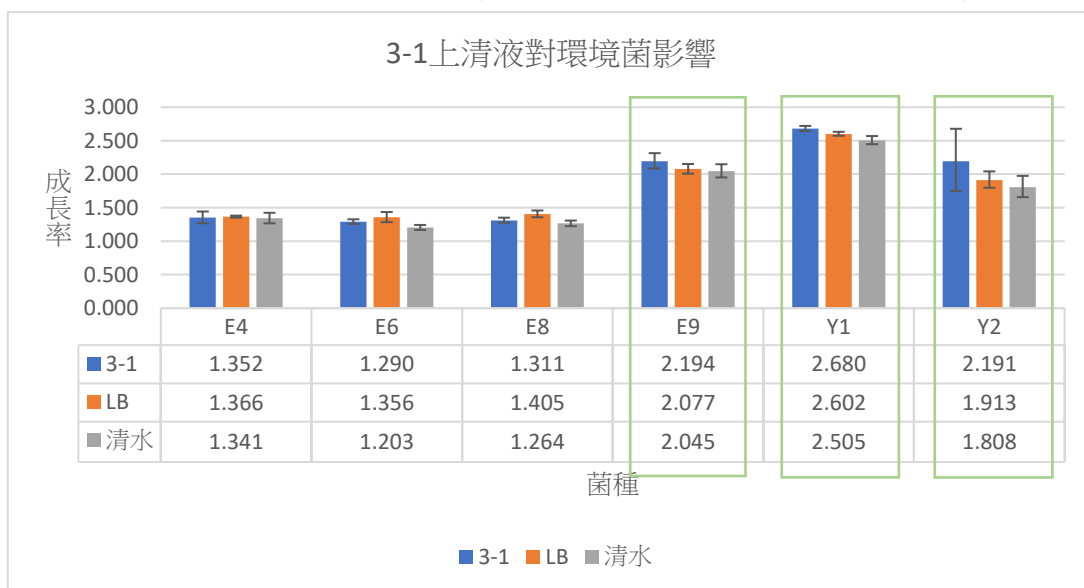


圖 4-4-16 共生菌 3-1 上清液對環境菌(E4、E6、E8、E9、Y1、Y2)的 OD 值檢測結果

實驗結果顯示，共生菌 3-1 上清液對環境菌 E9 與酵母菌 Y1、Y2 具有增加的效果，對 E4、E6、E8 並無增益或抑制效果。

2. 共生菌 3-1 定序

實驗結果證實共生菌 3-1 對部分環境菌有增益效果，而在自然界中大部分細菌是競爭關係，應該是互相抑制的，所以進一步 PCR 夾出基因，並使用 16S rRNA 基因鑑定技術 V3-V4 806 reverse primer 和 341 forward primer 來定序菌種，定序結果共生菌 3-1 為 *Paraburkholderia tropica*。

```
301 cagactccta cgggaggcag cagtggggaa ttttgacaa tgggcgaaag cctgatccag
361 caatgccgcg tgttgaaga aggccttcgg gttgtaaagc actttgtcc gaaagaat
421 ccctgtctc ataatggccg ggggatgacg gtaccggaag aataagcacc ggctaactac
481 gtccagcag ccgcgtaat acgtagggtg caagcgttaa tcggaattac tgggcgtaaa
541 gcgtgcgag gcggtgatg aagaccgatg tgaatcccc gggctcaacc tgggaactgc
601 attggtgact gcatcgctt agtatggcag aggggggtag aattccacgt gtacagtgta
661 aatgcgtaga gatgtggagg aataccgatg gcgaaggcag ccccctgggt caatactgac
721 gctcatcac gaaagcgtgg ggagcaaca ggattagata ccctggtagt ccacgccta
781 aacgatgta actggtgtc ggttctcat tgacttgta acgtagtaa cgcgtgaagt
```

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Paraburkholderia tropica strain PSBR 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paraburkholderia tropica	998	998	100%	0.0	100.00%	1358	MN389235.1
Paraburkholderia tropica strain KSB9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paraburkholderia tropica	998	998	100%	0.0	100.00%	1401	MH312037.1
Burkholderia sp. strain Y23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Burkholderia sp.	998	998	100%	0.0	100.00%	1443	MH266123.1
Paraburkholderia bannensis strain BE22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paraburkholderia bannensis	998	998	100%	0.0	100.00%	1423	MK041544.1
Paraburkholderia tropica strain BE15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paraburkholderia tropica	998	998	100%	0.0	100.00%	1423	MK041543.1
Paraburkholderia tropica strain SA9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paraburkholderia tropica	998	998	100%	0.0	100.00%	1477	MK336433.1
Paraburkholderia tropica strain 202 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paraburkholderia tropica	998	998	100%	0.0	100.00%	1147	MK389460.1
Burkholderia sp. NNJA893-2-3 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	Burkholderia sp.	998	998	100%	0.0	100.00%	1181	LC372998.1
Burkholderia sp. strain XCP9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Burkholderia sp.	998	998	100%	0.0	100.00%	1478	MG333614.1
Paraburkholderia tropica strain S23-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paraburkholderia tropica	998	998	100%	0.0	100.00%	1420	KU049653.1
Paraburkholderia tropica strain S23-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paraburkholderia tropica	998	998	100%	0.0	100.00%	1421	KU049652.1
Paraburkholderia tropica strain S23-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paraburkholderia tropica	998	998	100%	0.0	100.00%	1423	KU049651.1
Paraburkholderia tropica strain S22-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paraburkholderia tropica	998	998	100%	0.0	100.00%	1421	KU049650.1
Burkholderia tropica strain BRUESC674 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paraburkholderia tropica	998	998	100%	0.0	100.00%	1445	KT390891.1

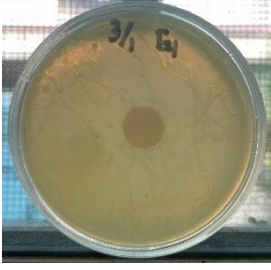



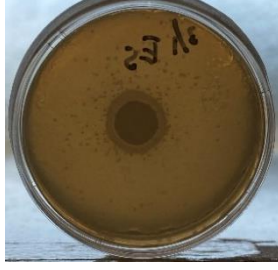







圖 4-4-17 共生菌 *Paraburkholderia tropica* 序列比對結果

(三) 共生菌 N1 對環境菌生長的影響

將針箍絨泡黏菌(A)繼代到 Brown Rice Agar 後，發現了新的共生菌 N1，想了解它對針箍絨泡黏菌(A)生活環境中的環境菌是否也具有抑制或增益效果，便設計了以下實驗。

1. 抑菌圈實驗

將共生菌 N1 以濾紙點在環境菌(E1~E10)和酵母菌(Y1、Y2)中生長，觀察有無抑菌圈產生，或周遭環境菌生長較佳的狀況。

		
圖 4-4-18 共生菌 N1 對 E1 的抑菌圈	圖 4-4-19 共生菌 N1 對 E2 的抑菌圈	圖 4-4-20 共生菌 N1 對 E3 的抑菌圈
		
圖 4-4-21 共生菌 N1 對 E4 的抑菌圈	圖 4-4-22 共生菌 N1 對 E5 的抑菌圈	圖 4-4-23 共生菌 N1 對 E6 的抑菌圈
		
圖 4-4-24 共生菌 N1 對 E7 的抑菌圈	圖 4-4-25 共生菌 N1 對 E8 的抑菌圈	圖 4-4-26 共生菌 N1 對 E9 的抑菌圈
		
圖 4-4-27 共生菌 N1 對 E10 的抑菌圈	圖 4-4-28 共生菌 N1 對 Y1 的抑菌圈	圖 4-4-29 共生菌 N1 對 Y2 的抑菌圈

實驗結果顯示，在點菌實驗中，共生菌 N1 都沒有產生明顯的抑菌圈，周遭的環境菌也沒有生長較佳的現象。推測可能不具增益或抑制效果或是效果不明顯，因此使用 OD 值來檢測是否有抑菌或增益效果。

2. OD 值檢測

在環境菌 E1~E10 及酵母菌 Y1、Y2 共 12 種環境菌與酵母菌中加入共生菌 N1 的上清液、ddH₂O 及 LB Broth，檢測共生菌的分泌物對環境菌的影響。

每次使用(環境菌+N1 上清液)*3+(環境菌+ddH₂O)*3+(環境菌+LB Broth)*3 管樣本，在不同時間進行了二重複，控制兩次環境菌及共生菌初始 OD 值差異在 0.1 內，共取得 6 個數據計算成長率，成長率的計算方式為：(6 小時 OD 值-0 小時 OD 值)/0 小時 OD 值。

N1 上清液對環境菌影響(綠框為增益效果、紅框為抑制效果)

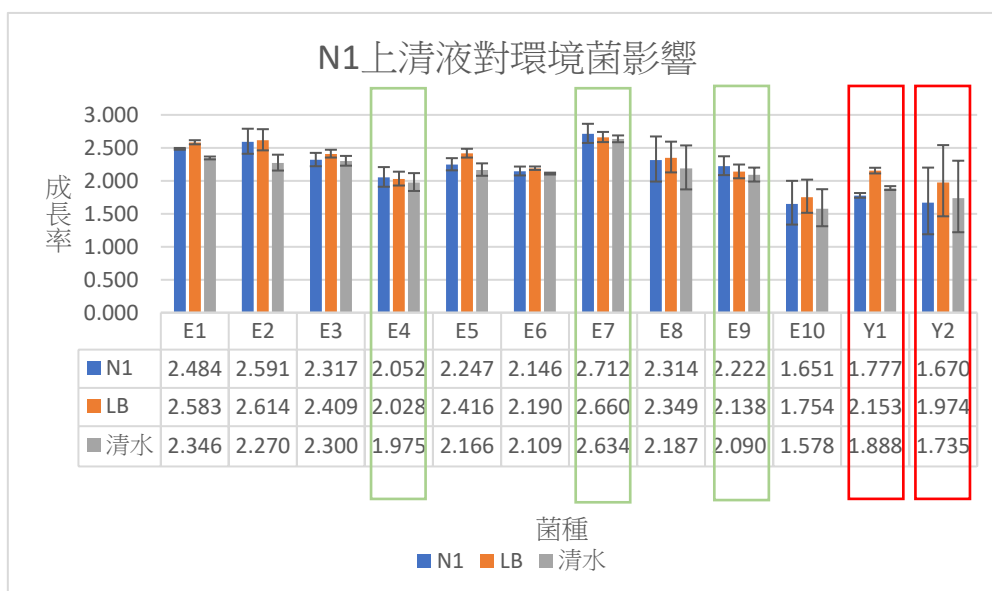


圖 4-4-30 共生菌 N1 對環境菌(E1~E10、Y1、Y2)的 OD 值檢測結果

實驗結果顯示，共生菌 N1 上清液對環境菌 Y1、Y2 具抑制效果，而對 E4、E7、E9 具增益效果。

五、W1、2-1、3-1 之間生長的影响

前述實驗中，發現共生菌 W1、2-1、3-1 對環境菌具有增益或抑制的效果，而不同共生菌同時被黏菌攜帶，我們想了解它們彼此之間是否也會有增益或抑制效果，因此設計以下實驗。

(一) 抑菌圈實驗

在共生菌 W1、2-1、3-1 中，以濾紙點上另外兩種共生菌，待生長後觀察有無抑菌圈產生，或周遭共生菌生長較佳的狀況。

共生菌 2-1 對 w1、3-1	共生菌 3-1 對 2-1、w1	共生菌 w1 對 2-1、3-1
圖 4-5-1 共生菌 2-1 對 W1、3-1 的 抑菌圈	圖 4-5-2 共生菌 3-1 對 W1、2-1 的 抑菌圈	圖 4-5-3 共生菌 2-1 對 W1、3-1 的抑菌圈

實驗結果顯示，在點菌實驗中，共生菌 W1、2-1、3-1 之間沒有明顯的抑菌圈，也沒有增益的現象，可能增益或抑制效果不明顯，因此使用 OD 值來檢測是否有抑菌或增益效果。

(二) OD 值檢測

在共生菌 W1、2-1、3-1 中分別加入另外兩種共生菌的上清液、ddH₂O 及 LB Broth，檢測它們之間的生長是否受到影響。

每次使用(共生菌+共生菌上清液)*5 +(共生菌+ddH₂O)*5+(共生菌+LB Broth)*5 管樣本，在不同時間進行了二重複，控制兩次環境菌及共生菌初始 OD 值差異在 0.1 內，共取得 10 個數

據計算成長率，成長率的計算方式為： $(6 \text{ 小時 OD 值} - 0 \text{ 小時 OD 值}) / 0 \text{ 小時 OD 值}$ 。

1. W1 加入 2-1、3-1 上清液 OD 值檢測結果(綠框為增益效果、紅框為抑制效果)

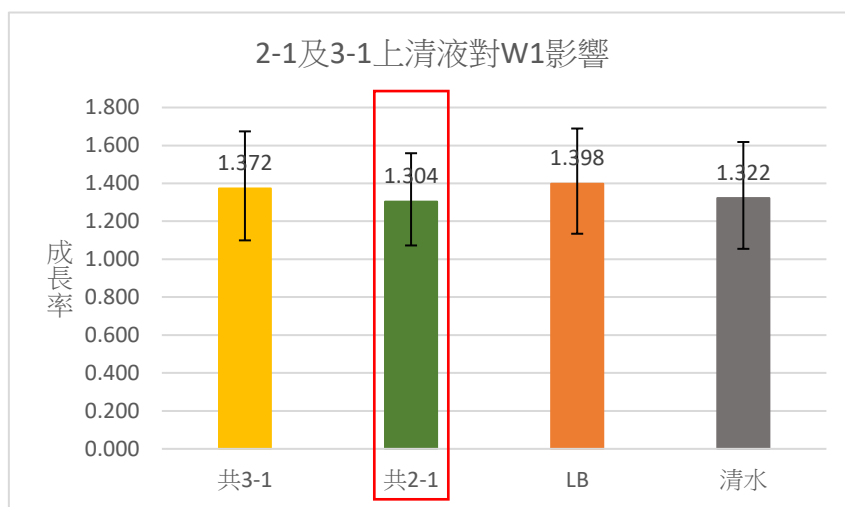


圖 4-5-4 共生菌 2-1、3-1 上清液對共生菌 W1 成長率的影響

實驗結果顯示，加入共生菌 3-1 上清液的成長率介於加入水跟 LB 的成長率，共生菌 3-1 對 W1 無增益或抑制的效果；加入共生菌 2-1 上清液的成長率 < 加入水的成長率，共生菌 2-1 對 W1 具抑制效果。

2. 共生菌 2-1 加入 W1、3-1 上清液的 OD 值檢測結果(綠框為增益效果、紅框為抑制效果)

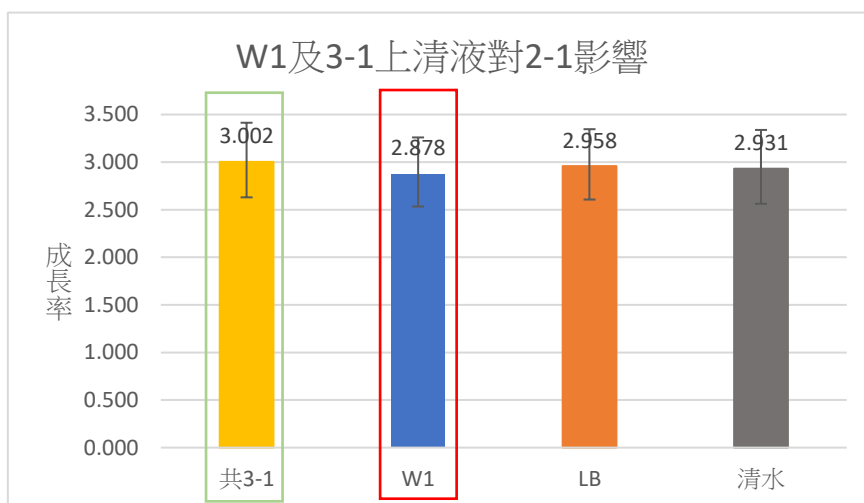


圖 4-5-5 共生菌 3-1、W1 上清液對共生菌 2-1 成長率的影響

實驗結果顯示，加入共生菌 3-1 上清液的成長率 > 加入 LB 的成長率，共生菌 3-1 對 2-1 具增益效果；加入共生菌 W1 上清液的成長率 < 加入水的成長率，共生菌 W1 對 2-1 具抑制效果。

3. 共生菌 3-1 加入 2-1、W1 上清液的 OD 值檢測結果(綠框為增益效果、紅框為抑制效果)

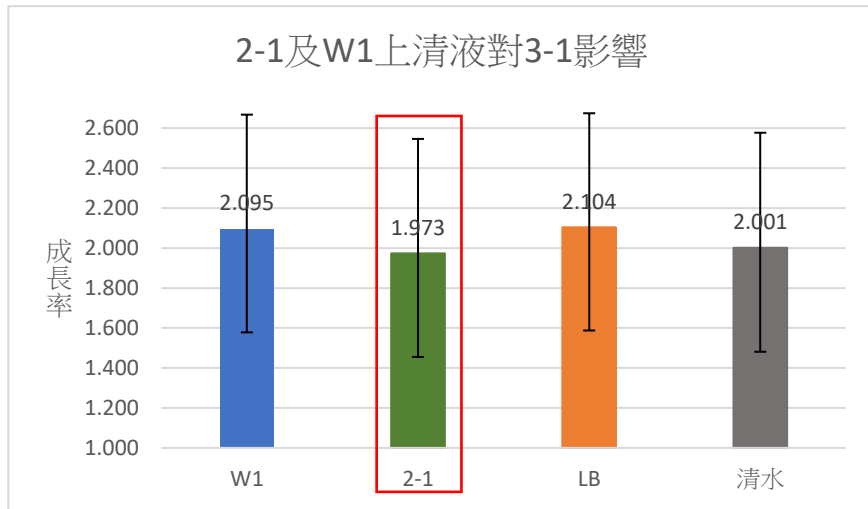


圖 4-5-6 共生菌 2-1、W1 上清液對共生菌 3-1 成長率的影響

實驗結果顯示，加入共生菌上清液的成長率 < 加入 LB 的成長率，共生菌 2-1 對 3-1 具抑制效果；加入共生菌 W1 上清液的成長率介於加入水跟 LB 的成長率，共生菌 W1 對 3-1 無增益或抑制效果。

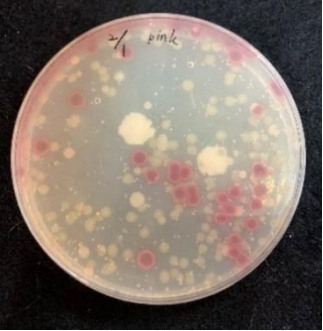
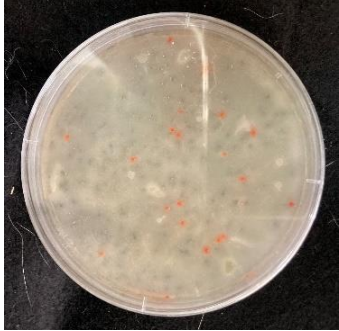

六、針箍絨泡黏菌(A)對共生菌的篩選性

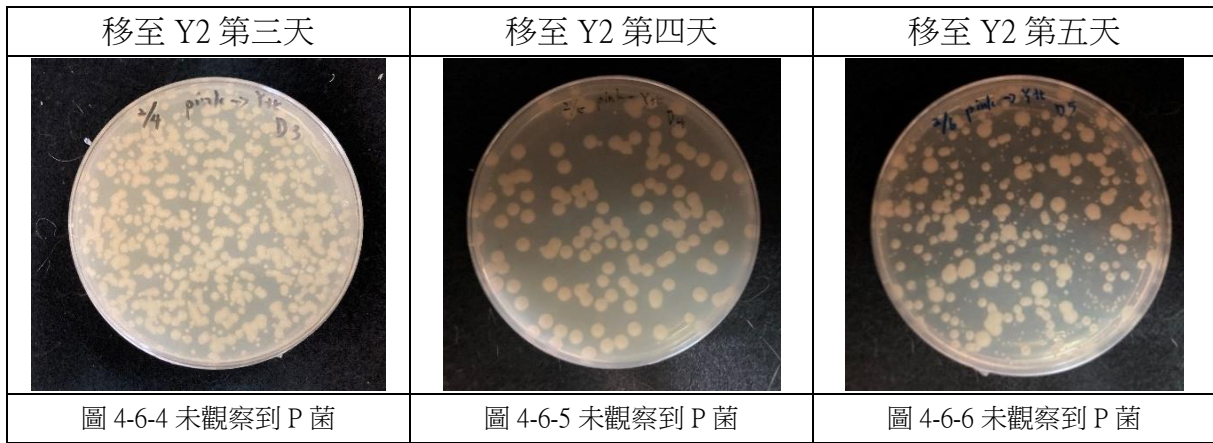
經過前述的實驗，推測黏菌對共生菌可能具篩選性，便進行以下兩個實驗，證明黏菌對共生菌的篩選性。

(一)使用 P 菌及共生菌 W1

1.P 菌

以菌落顏色為鮮艷桃紅色，且為針箍絨泡黏菌(A)食物的 P 菌，作為食物餵養針箍絨泡黏菌(A)一段時間後，再以 Y2 為唯一食物來源繼代，並每天取部分黏菌塗盤，測試 P 菌會被針箍絨泡黏菌(A)留下，或是消化代謝。

移至 Y2 當天	移至 Y2 第一天	移至 Y2 第二天
		
圖 4-6-1 培養盤中有明顯的 P 菌菌落	圖 4-6-2 相較前一日，P 菌菌落有減少的跡象	圖 4-6-3 未觀察到 P 菌



實驗結果顯示，在改餵酵母菌 2 天後的塗盤中都未發現 P 菌菌落，已被針箍絨泡黏菌(A)消化完畢，不會被作為共生菌攜帶，證明針箍絨泡黏菌(A)的共生菌具篩選性。

2.W1

以不能作為食物，且由針箍絨泡黏菌(B)攜帶的共生菌 W1，餵養針箍絨泡黏菌(A)一段時間後，移至 Y2 為唯一食物來源繼代，並每周取部分黏菌塗盤，挑選 7 個菌落跑 RAPD，查看是否有被針箍絨泡黏菌(A)留下作共生菌，或在黏菌爬行過程中掉落。

分別使用第 0 周、第一周及第 2 周的 7 個菌落及 W1 進行 RAPD。因第一次電泳結果不明顯，第二次電泳取第一次電泳顯示的不同菌落和 W1 進行比對。

(紅線為 1000bp 條帶位置，黃框為共生菌 W1)

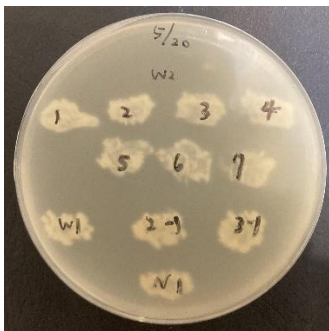


圖 4-6-7 針箍絨泡黏菌(A) 第 2 周 7 個菌落純化及 4 種共生菌

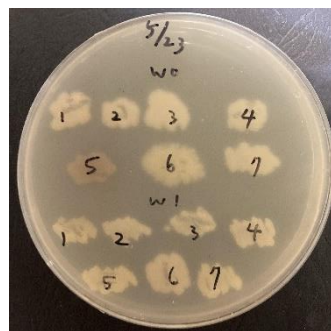


圖 4-6-8 針箍絨泡黏菌(A) 第 0 周及第一周 7 個菌落純化

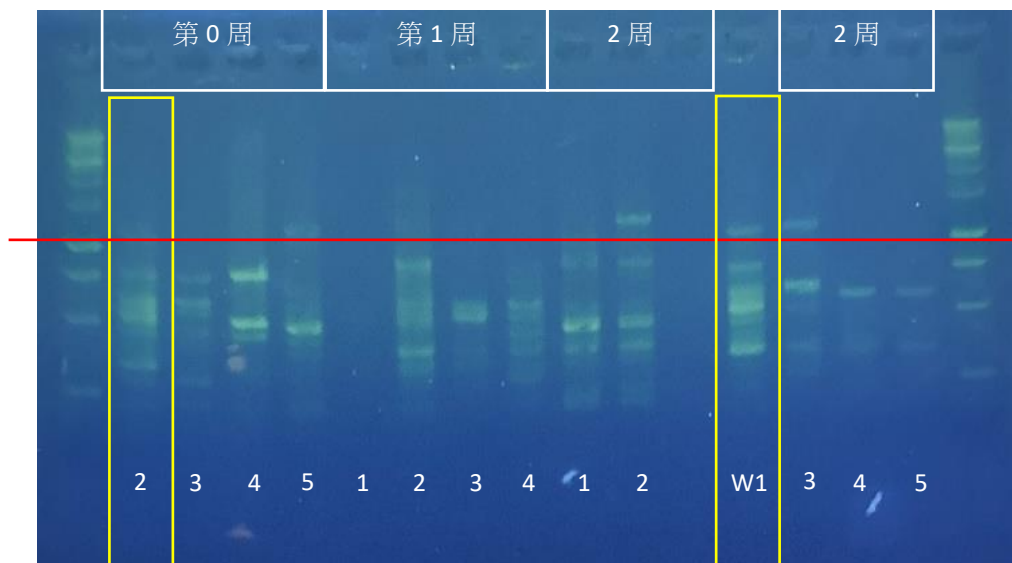
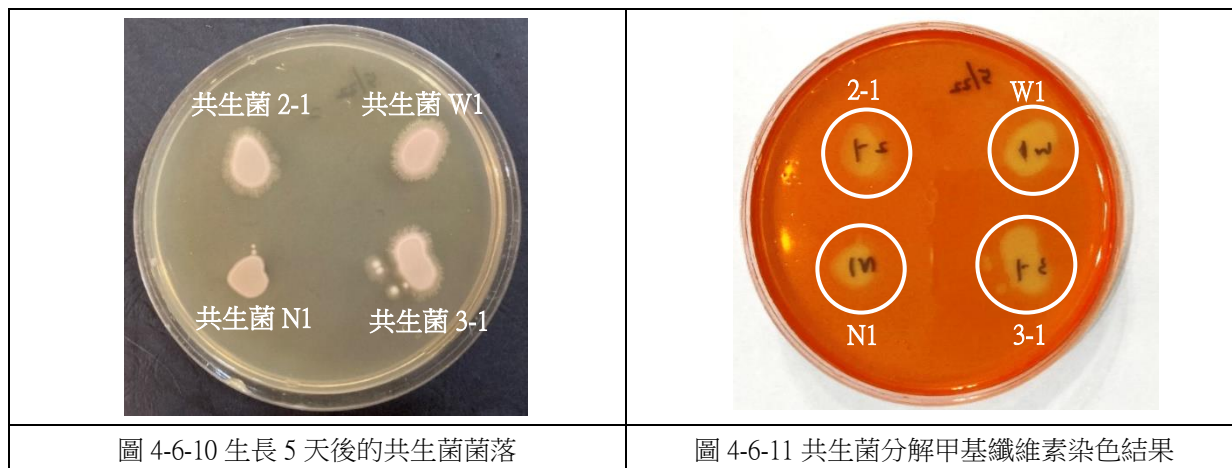


圖 4-6-9 針箍絨泡黏菌(A) 第二次電泳結果，第 0 周編號 2~5、第一周編號 1~4、第二周編號 1~5 和共生菌 W1 的 RAPD 結果

RAPD 結果顯示第零週出現 W1，第一週、第二週後皆未發現共生菌 W1 菌落，已被針箍絨泡黏菌(A)代謝，不會被留下作為共生菌攜帶，證明針箍絨泡黏菌(A)對共生菌具篩選性，即使是另一個品系的針箍絨泡黏菌所攜帶的共生菌 W1 也不會被留下。

(二)纖維素分解酶

黏菌在野外的生活環境是落葉和枯木堆，而落葉和枯木堆都含有纖維素的成分，因此推測黏菌的共生菌可能具纖維素分解酶，將共生菌 W1、2-1、3-1、N1 點在甲基纖維素 Agar 上測試。若是具纖維素分解酶，共生菌生長五天後，經剛果紅染色，菌落生長位置會留下透明圈。



結果顯示實驗結果顯共生菌 W1、2-1、3-1、N1 皆具纖維素分解酶，原菌落位置在染紅的 Agar 上留下明顯透明區塊，會分解甲基纖維素。

伍、討論

一、針箍絨泡黏菌之共生菌討論

從針箍絨泡黏菌(A)身上篩出的共生菌共有三種，分別為 2-1、3-1 及 N1；從針箍絨泡黏菌(B)篩出的共生菌有一種，為 W1。其中針箍絨泡黏菌(A)、(B)為同種不同品系的黏菌而攜帶了不同的共生菌，推測黏菌可能因為生長環境不同而攜帶不同的共生菌。

共生菌 N1 為將針箍絨泡黏菌(A)繼代到 Brown Rice Agar 後發現，推測可能是在 Water Agar 培養時比例較低而被忽略，繼代到 Brown Rice Agar 後共生菌比例改變才被發現，或是黏菌在轉移時從環境中攜帶上的，從黏菌到形成子實體時也帶著它，可以確定共生菌 N1 為針箍絨泡黏菌(A)的共生菌。我們推測黏菌共生菌的來源除了原本主動攜帶的，也可能從環境中取得並攜帶特定菌種成為它的共生菌。未來可以透過改變針箍絨泡黏菌(A)的生長環境，或是給予它不同菌種，找出針箍絨泡黏菌(A)攜帶共生菌的機制。

二、針箍絨泡黏菌共生菌對環境菌作用討論

在針箍絨泡黏菌(A)的共生菌中，共生菌 2-1 的上清液對環境菌 E1、E6、E8、E10 具有抑制的效果，對環境菌 E2、E3、E4、E5、E7、E9 具有促進的效果；共生菌 3-1 的上清液對 E9、Y1、Y2 有增益的效果；共生菌 N1 的上清液對環境菌 Y1、Y2 具抑制效果，而對 E4、E7、E9 具增益效果。針箍絨泡黏菌(B)的共生菌中共生菌 W1 的上清液對環境菌 E1、E4、E6、E8 有抑制效果，而對於環境菌 E2、E3、E7、E9、E10 有增益的效果。

其中 2-1、3-1、N1 所增益及抑制的菌種差異較大，推測同黏菌中，不同的共生菌可能有不同的功用，互相調節影響黏菌。而 2-1 和 W1 為不同黏菌中篩出的共生菌，增益及抑制的菌種相近，我們認為不同黏菌可能會帶有功能類似的共生菌。

表 5-1 共生菌與環境菌之間的互相拮抗結果

共生菌 菌種	針箍絨泡黏菌(A)		(B)	
	2-1	3-1	N1	W1
E1	-			-
E2	+			+
E3	+			+
E4	+		+	-
E5	+			
E6	-			-
E7	+		+	+
E8	-			-
E9	+	+	+	+
E10	-			+
Y1		+	-	
Y2		+	-	
總計	+6 /-4	+3	+3 /-2	+5 /-4

三、針箍絨泡黏菌(A)的共生菌 *Paraburkholderia tropica* 和 *Dictyostelium discoideum* 黏菌的共生菌 *Burkholderia*(*Paraburkholderia*) 討論

國外文獻中共生菌 *Burkholderia*(*Paraburkholderia*) 會將細胞性黏菌培養成農夫，它會幫助黏菌攜帶另一種食物細菌，當黏菌到新的環境，會將攜帶的食物細菌傳播到環境中，讓其生長成為食物，而黏菌變成子實體時也會攜帶著此種共生菌，讓下一代繼續受益。在遇到其他黏菌時，*Burkholderia*(*Paraburkholderia*) 還會將它改造成自己的農夫。

本實驗中針箍絨泡黏菌(A)的共生菌 3-1(*Paraburkholderia tropica*) 與國外文獻中的共生菌 *Burkholderia*(*Paraburkholderia*) 同屬，但角色有些微差異。從本研究結果顯示針箍絨泡黏菌(A)的共生菌 3-1(*Paraburkholderia tropica*) 是針箍絨泡黏菌的食物，也會促進部份環境菌生長，並且沒有抑制效果出現。我們推測 3-1(*Paraburkholderia tropica*) 可能同時兼具兩種身分，第一種是糧食角色；第二種是肥料角色，增益部份作為黏菌食物的環境菌，幫助黏菌取得食物作用。

四、2-1 和 3-1 及 W1 間作用討論

實驗結果顯示，共生菌 3-1 對 2-1 是增益效果，對 W1 則沒有顯著的增益或抑制效果；共生菌 W1 對 2-1 為抑制效果，對 3-1 則沒有明顯的增益或抑制效果；共生菌 2-1 對 3-1、W1 都是抑制效果。

其中 2-1 及 3-1 同為針箍絨泡黏菌(A)的共生菌，它們之間卻會增益或抑制對方，我們推測黏菌存在著某種調控機制來管理共生菌，讓它們可以共存而不會影響彼此生長導致失衡。而 W1 是針箍絨泡黏菌(B)的共生菌，和 2-1 會抑制彼此的生長，推測它們可能有類似的角色。

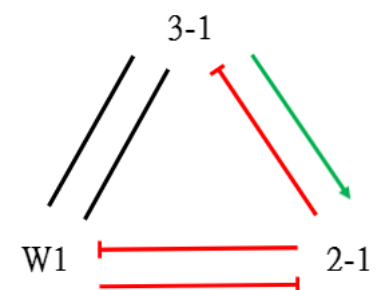


圖 5-1 共生菌間作用結果

綠色：具增益效果

紅色：具抑制效果

黑色：不具增益或抑制效果

五、黏菌對共生菌的篩選性討論

由實驗結果得知，P 菌為針箍絨泡黏菌(A)的食物，將其給予黏菌時，不會被留下成為共生菌。不能作為食物，且為同種不同品系的針箍絨泡黏菌(B)攜帶的共生菌 W1，也不會被針箍絨泡黏菌(A)留下成為共生菌。而在針箍絨泡黏菌(A)現有的共生菌中，2-1 非針箍絨泡黏菌(A)的食物，而共生菌 3-1 及 N1 為針箍絨泡黏菌(A)的食物，皆會被黏菌攜帶，我們推測針箍絨泡黏菌對共生菌具篩選性，且不同共生菌有不同功能。

六、共生菌分解纖維素討論

在實驗過程中發現針箍絨泡黏菌(A)在野外木頭及 Brown Rice Agar 上的生長狀況都比在 Water Agar 上好，且木頭及 Brown Rice Agar 都含有纖維素。因此推測它攜帶的共生菌可能會分解纖維素，並以甲基纖維素 Agar 測試。實驗結果顯示 4 種共生菌皆具纖維素分解酶，推測共生菌可能幫助分解纖維素提供針箍絨泡黏菌(A)營養，並在表面留下凹痕，我們認為黏菌會篩選並攜帶有功能的共生菌。

陸、結論及應用

一、結論

實驗結果顯示，針箍絨泡黏菌這種簡單的生物和許多複雜生物一樣，都具有共生菌。在共生菌及環境菌是否為黏菌食物的實驗中，得知針箍絨泡黏菌共生菌不一定能作為它的食物，而許多環境菌都能作為食物。在共生菌對環境菌的作用實驗中，共生菌 2-1、N1 及 W1 對部分環境菌有增益或抑制的效果，共生菌 3-1 對部分環境菌有增益作用卻沒有抑制效果，而不同品系針箍絨泡黏菌具有相似功能的不同共生菌 2-1、W1，就像人類的人種不同，體內會帶有功能相似的不同共生菌。共生菌之間的作用實驗中，共生菌 W1 和 2-1 互相抑制，共生菌 W1 和 3-1 間沒有抑制或增益效果，共生菌 2-1 會抑制 3-1，而共生菌 3-1 會增益 2-1，我們猜測黏菌體內有調控機制讓共生菌得以共處，類似人體內的免疫系統。在共生菌篩選性實驗中，做為針箍絨泡黏菌(A)食物的 P 菌及針箍絨泡和不作為食物且為同種不同品系黏菌(B)所攜帶的共生菌 W1，都不會被針箍絨泡黏菌(A)留下成為共生菌。而 4 種共生菌皆具有纖維素分解酶，推測黏菌會篩選並攜帶不同功能的共生菌。最後，經過本實驗，我們認為經過演化，生物跟微生物之間已具有密不可分的關係。

二、未來研究方向

- (一)將共生菌 2-1、N1 定序，了解共生菌的特性和與黏菌之間的關係
- (二)尋找不同黏菌種類，測試是否有共生菌並進行比較

柒、參考文獻資料

1. 陶偉, 王娜, 陳雙林, & 閔淑珍. (2016). 實驗室培養條件下絨泡菌科四種黏菌個體發育比較研究. 菌物學報, 35(2), 138 - 146. <https://doi.org/10.13346/j.mycosystema.140233>
2. 薛良凱(1992). 黏菌研究(科展報告).黏菌攝食方式的探討n-胞內、胞外消化的驗證 台灣省立新竹高級中學

3. Bonner JT. Evolution of development in the cellular slime molds. *Evol Dev.* 2003 May-Jun;5(3) : 305-13. doi : 10.1046/j.1525-142x.2003.03037.x.
4. Brock, D., Douglas, T., Queller, D.*et al.* Primitive agriculture in a social amoeba. *Nature* 469, 393 – 396 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature09668>
5. DiSalvo et al. 2015. Burkholderia bacteria infectiousy induce the proto-farming symbiosis of Dictyostelium amoebae and food bacteria.
6. DuBose JG, Robeson MS, Hoogshagen M, Olsen H, Haselkorn TS. Complexities of Inferring Symbiont Function : Paraburkholderia Symbiont Dynamics in Social Amoeba Populations and Their Impacts on the Amoeba Microbiota. *Appl Environ Microbiol.* 2022 Sep 22;88(18) : e0128522. doi : 10.1128/aem.01285-22.
7. Fadeev E, Cardozo-Mino MG, Rapp JZ, Bienhold C, Salter I, Salman-Carvalho V, Molari M, Tegetmeyer HE, Buttigieg PL, Boetius A. Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3-V4 and V4-V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. *Front Microbiol.* 2021 Feb 16;12 : 637526. doi : 10.3389/fmicb.2021.637526.
8. Jane B. Reece (2019).*生物學： Vol. 上冊(第十版)*. 台灣培生教育出版股份有限公司.P.732-733
9. Marsh, G. Slime moulds prosper on the microfarm. *Nature* (2011). <https://doi.org/10.1038/news.2011.27>
10. Paraburkholderia Tropica Strain Ppe8 16S Ribosomal RNA, Partial Sequence. (n.d.). National Center of Biotechnology Information. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NR_028965.1
11. Toret C, Picco A, Boiero-Sanders M, Michelot A, Kaksonen M. The cellular slime mold Fonticula alba forms a dynamic, multicellular collective while feeding on bacteria. *Curr Biol.* 2022 May 9;32(9) : 1961-1973.e4. doi : 10.1016/j.cub.2022.03.018.
12. Van Haastert PJ, Bosgraaf L. Food searching strategy of amoeboid cells by starvation induced run length extension. *PLoS One.* 2009 Aug 28;4(8) : e6814. doi : 1371/journal.pone.0006814.

【評語】 052106

1. 本研究自野外分離出針箍絨泡黏菌，經由繼代培養分離出針箍絨泡黏菌的共生菌。更進一步測試共生菌對環境菌是否具增益或是抑制的效果。
2. 本研究實驗結果發現針箍絨泡黏菌(A)帶有 3 種共生菌，針箍絨泡黏菌 (B) 帶 1 種共生菌。而 (A) 其中之一個共生菌 *Paraburkholderia tropica* 和國外細胞性盤基網柄菌 *Dictyostelium discoideum* 身上的共生菌同屬。另外發現針箍絨泡黏菌會篩選對生存有利的共生菌。
3. 本研究以初步觀察結果為主，對結論所言共生菌會彼此分工合作，則仍需更多的實驗加以證實。

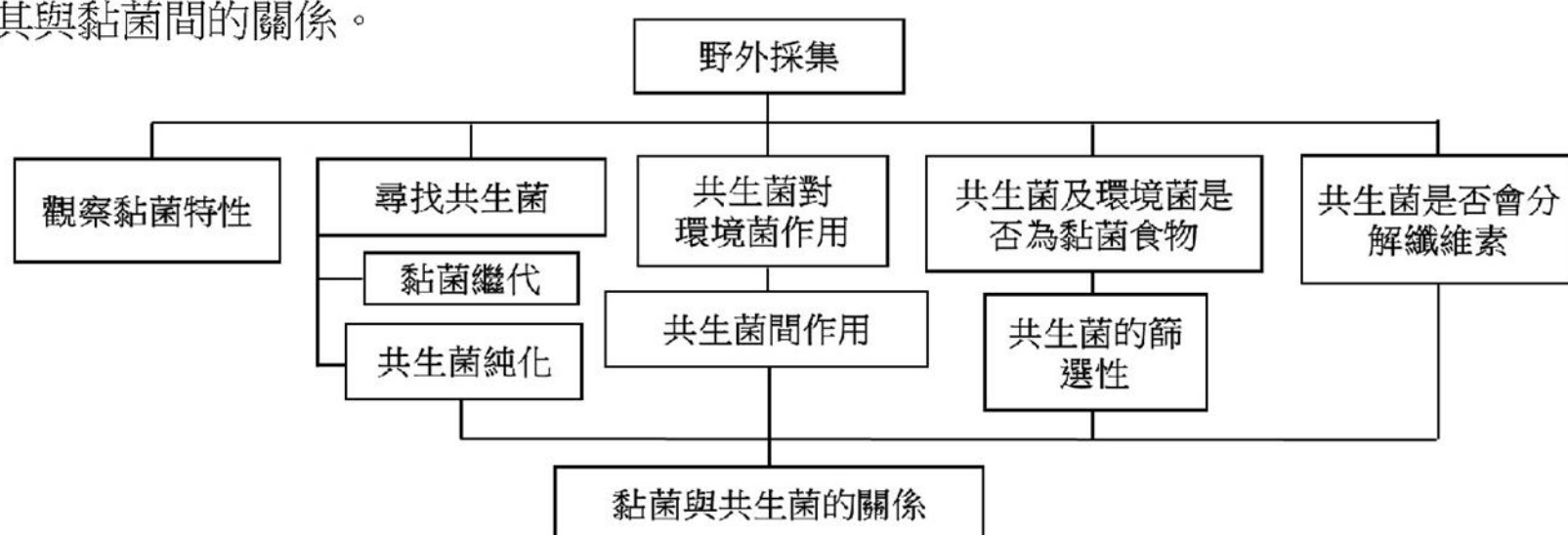
作品海報

摘要

科展中黏菌的研究屈指可數，對共生菌的研究更是完全沒有，是一個充滿未知的領域。本實驗探討黏菌及其共生菌的關係，我們的實驗對象為針箍絨泡黏菌(*Physarella oblonga*)和它的共生菌。其中針箍絨泡黏菌(A)帶有3種共生菌，針箍絨泡黏菌(B)帶1種共生菌。研究結果顯示我們研究的針箍絨泡黏菌(A)其中一個共生菌 *Paraburkholderia tropica* 和國外細胞性盤基網柄菌 *Dictyostelium discoideum* 身上的共生菌 *Burkholderia* 同屬，也有類似促進環境菌生長、提供黏菌食物的功能。經過一系列實驗後，我們發現不同的黏菌會帶有不同的共生菌，不同環境也可能影響攜帶的共生菌，且黏菌對攜帶的共生菌具篩選性，每種被攜帶的共生菌有不同功能，我們認為它們會彼此分工合作影響黏菌生長。



研究動機

在國、高中的課本和網路上都看過黏菌，卻從未在現實中看過它，在一次偶然機會中在校園的落葉中發現黏菌，出於好奇而開始飼養。飼養一段時間後，發現黏菌樣貌逐漸產生變化，有些持續生長，有些卻逐漸衰弱而消失。我們推測除了餵食的食物影響黏菌的生長外，應該還有其他影響因素，於是上網尋找相關資料。翻閱文獻時得知黏菌以綱分為兩大類，一種是原生質體黏菌，另一種是細胞性黏菌，我們所飼養的黏菌為原生質體黏菌，另外文獻中提到，某種細胞性黏菌帶有共生菌並會對黏菌產生影響，因此對原生質體黏菌身上是否也帶有共生菌產生了好奇。經由初步塗盤檢測後發現飼養一年多的黏菌身上依然帶有不少菌落，這個發現使我們設計相關實驗找出它們的共生菌，進而探討這些共生菌的作用及其與黏菌間的關係。



實驗黏菌及其共生菌

在不同地點發現外觀不同的兩種黏菌，經過子實體及變形體的比對，確認為不同品系的針箍絨泡黏菌 *Physarella oblonga*，為原生質體黏菌，將其命名為針箍絨泡黏菌(A)、(B)。其中黏菌(A)生長狀況較好，選擇為主要實驗對象；而黏菌(B)只取共生菌進行實驗。

黏菌	照片	發現地	共生菌	比較
針箍絨泡黏菌(A) <i>Physarella oblonga</i>		國姓	2-1、3-1、N1(繼代到 Brown Rice Agar後發現)	1.外表呈現亮黃色 2.較容易飼養 3.爬行速度較快
針箍絨泡黏菌(B) <i>Physarella oblonga</i>		魚池	W1	1.外表呈現淺黃色 2.易受環境因素影響 3.爬行速度較慢

一、共生菌與環境菌是否為針箍絨泡黏菌(A)的食物

目的:

餵食針箍絨泡黏菌(A)共生菌及部分環境菌，測試它們是否能作為針箍絨泡黏菌(A)的食物。繼代三代依舊存活判定為針箍絨泡黏菌(A)食物；不超過則非食物。

結果:

共生菌2-1及W1在第二代時死亡，非針箍絨泡黏菌(A)的食物；共生菌3-1及N1繼代滿三代，為針箍絨泡黏菌(A)的食物。

環境菌E4、E6、E8、E9、Y1、P菌皆繼代滿三代，為黏菌的食物，其中E9、Y1及共生菌3-1繼代的黏菌生長狀況最佳。

討論:

共生菌3-1及N1能作為食物，而2-1及W1不行。其中部份生長速度受到增益的環境菌能作為黏菌的食物，推測共生菌可能具有增加對黏菌有益，或抑制對黏菌有害的環境菌生長速度的功能。

黏菌代數 菌種	針箍絨泡黏菌(A)			是否為 針箍絨 泡黏菌 (A)食 物
	第一代	第二代	第三代	
共生菌2-1	✓	×	—	否
共生菌3-1	✓	✓	✓	是
共生菌W1	✓	×	—	否
共生菌N1	✓	✓	✓	是
E4	✓	✓	✓	是
E6	✓	✓	✓	是
E8	✓	✓	✓	是
E9	✓	✓	✓	是
Y1	✓	✓	✓	是
P菌	✓	✓	✓	是

二、共生菌對環境菌生長的影响

目的：

以抑菌圈實驗及OD值計算成長率，檢測培養一夜的針箍絨泡黏菌共生菌上清液對生長環境中環境菌及作為食物的酵母菌的生長速度是否具增加或抑制效果。

結果：

共生菌2-1上清液對環境菌E1、E6、E8、E10的生長速度具有抑制的效果；對環境菌E2、E3、E4、E5、E7、E9的生長速度具有促進的效果。共生菌W1上清液對環境菌E1、E4、E6、E8的生長速度有抑制效果，對環境菌E2、E3、E7、E9、E10的生長速度有增加的效果。共生菌3-1上清液對環境菌E4、E6、E8、E9與酵母菌Y1、Y2的生長速度具有增加的效果，無抑制效果。共生菌N1上清液對環境菌Y1、Y2的生長速度具抑制效果，而對E4、E7、E9的生長速度具增加效果。

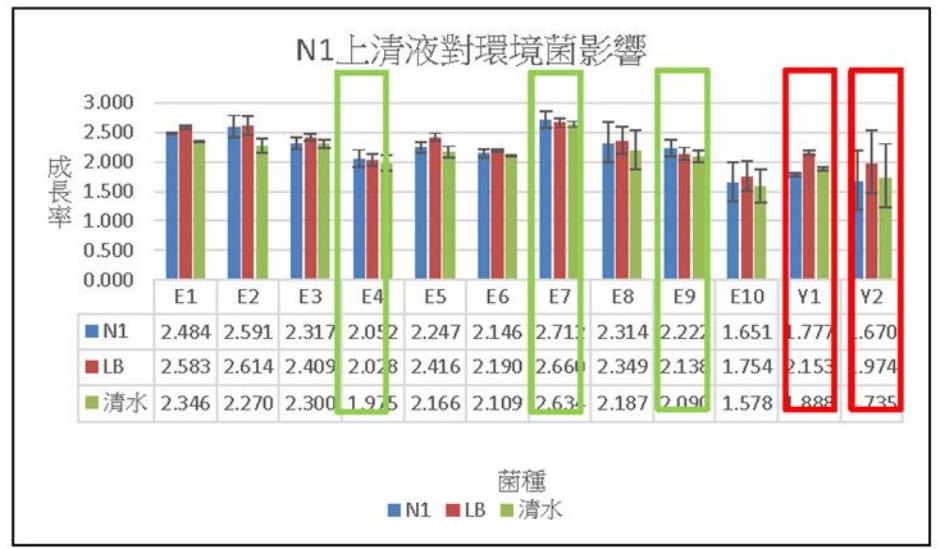
討論：

2-1、3-1和N1所增加及抑制生長速度的菌種差異較大，推測在同黏菌中，不同的共生菌有不同的功用，互相調節影響黏菌。

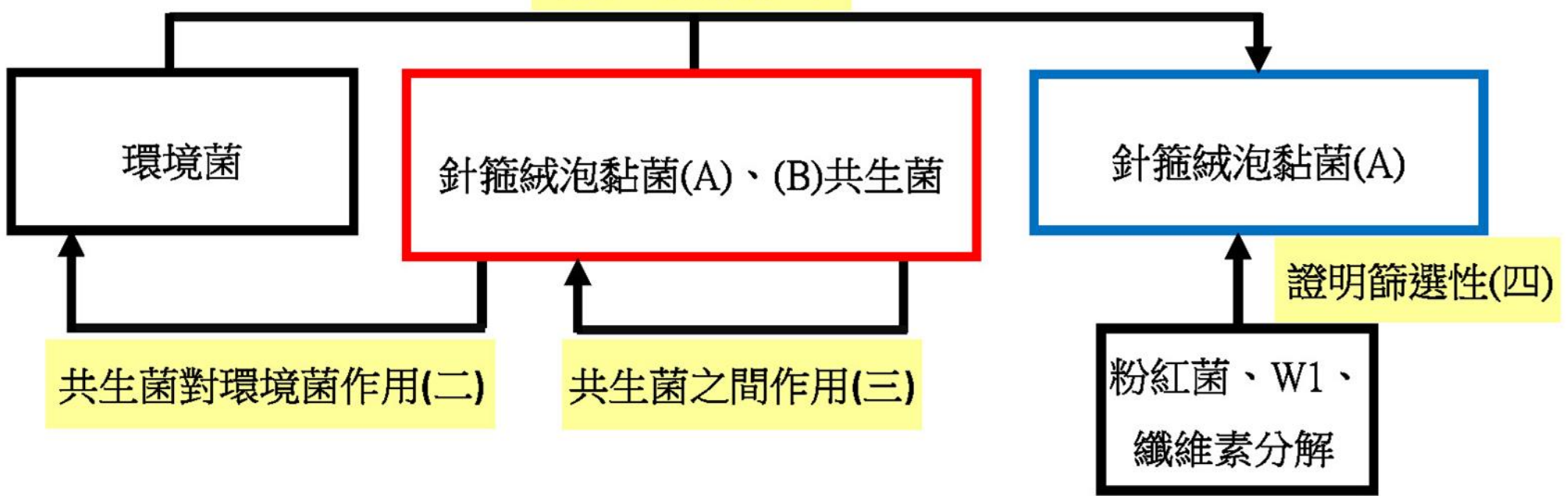
2-1和W1為不同黏菌中篩出的共生菌，增加及抑制生長速度的菌種相近，我們認為不同黏菌可能會帶有功能類似的共生菌。

3-1會促進部份環境菌生長，且沒有抑制效果出現，自然界中細菌應該是競爭關係，這讓我們對它感到十分好奇，變將他定序，結果顯示3-1為*Paraburkholderia tropica*，和國外文獻中不同綱的細胞性黏菌的共生菌*Burkholderia(Paraburkholderia)*同屬。不同綱的黏菌竟然會攜帶同屬的共生菌，我們猜測這株共生菌對黏菌可能很重要，也許在黏菌的共同祖先時便已經和它有共生關係。

共生菌 菌種	黏菌(A)			(B)
	2-1	3-1	N1	W1
E1	-			-
E2	+			+
E3	+			+
E4	+		+	-
E5	+			
E6	-			-
E7	+		+	+
E8	-			-
E9	+	+	+	+
E10	-			+
Y1		+	-	
Y2		+	-	
總計	+6 / -4	+3	+3 / -2	+5 / -4



是否為食物(一)



三、共生菌之間的影响

目的：

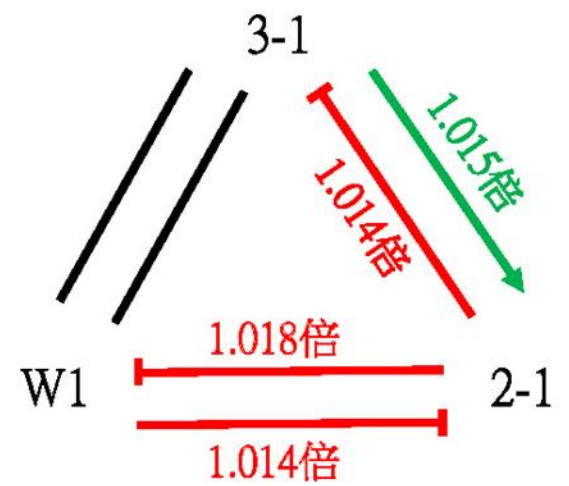
前面的實驗中發現共生菌對環境菌具增加或抑制生長速度的效果，因此好奇針箍絨泡黏菌的共生菌之間是否也會有類似的作用以抑菌圈實驗及OD值計算成長率，檢測不同共生菌對彼此是否有影響。

結果：

共生菌3-1對W1的生長速度無增加或抑制的效果，對2-1的生長速度具增加效果；共生菌2-1對W1的生長速度具抑制效果，對3-1的生長速度具抑制效果；共生菌W1對2-1的生長速度具抑制效果，對3-1的生長速度無增加或抑制效果。

討論：

2-1及3-1同為針箍絨泡黏菌(A)的共生菌，它們之間卻會增加或抑制對方的生長速度，我們推測黏菌存在著某種調控機制來管理共生菌，讓它們可以共存不會導致失衡。



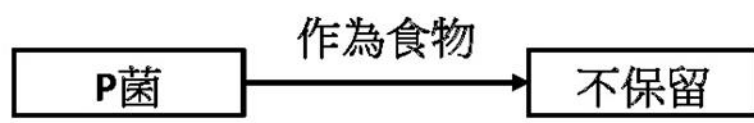
共生菌間作用結果
 綠色：具增益效果
 紅色：具抑制效果
 黑色：不具增益或抑制效果

四、共生菌的篩選性

(1) P菌

目的:

前3個實驗指出，黏菌對共生菌可能具有篩選性，便設計實驗給予針箍絨泡黏菌(1)能作為食物的P菌，測試是否會被針箍絨泡黏菌(1)保留，驗證其共生菌是否具篩選性。

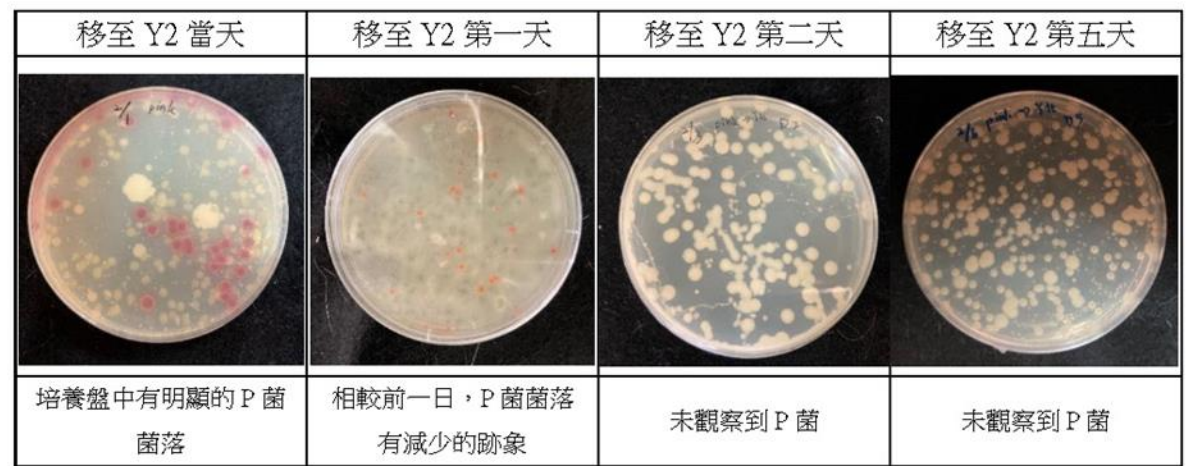


結果:

P菌菌落隨著移植天數增加減少，第二天以後便沒再出現，已被黏菌消化完，沒有留作共生菌。

討論:

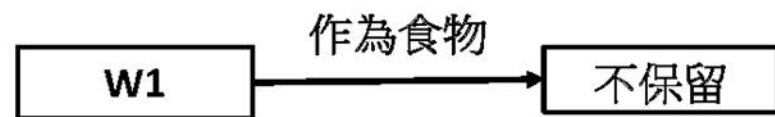
P菌為針箍絨泡黏菌(A)的食物，給予黏菌時，不會被留下。而在針箍絨泡黏菌(A)現有的共生菌中，2-1非針箍絨泡黏菌(A)的食物，而共生菌3-1、N1為針箍絨泡黏菌(A)的食物，皆會被黏菌攜帶，我們推測針箍絨泡黏菌對共生菌具篩選性。



(2) W1

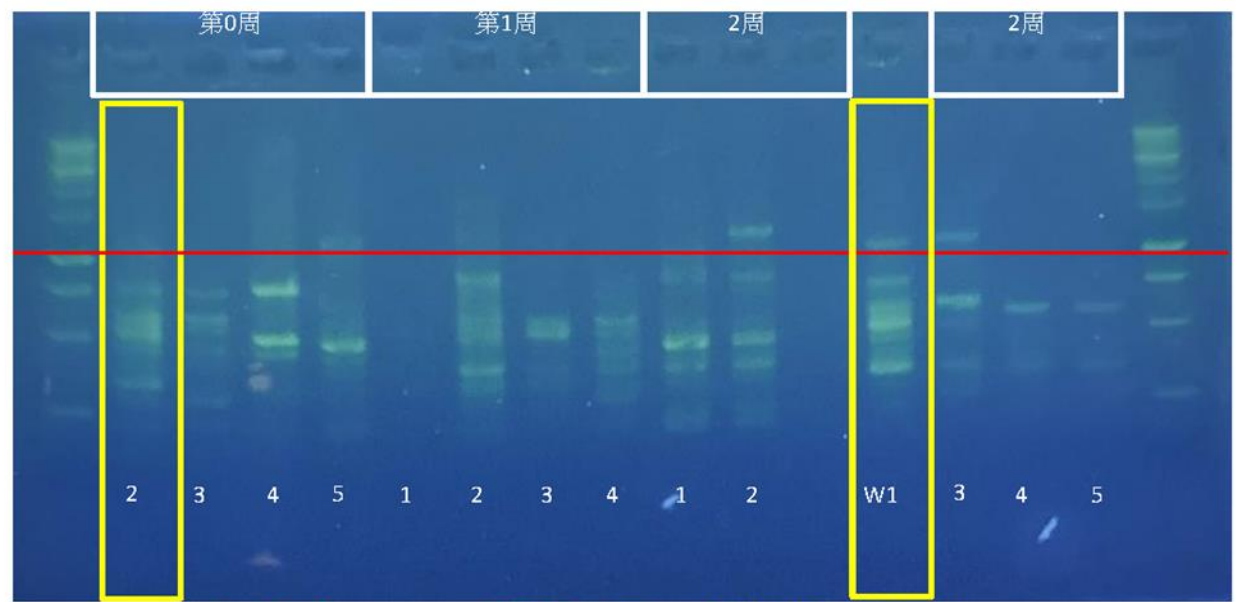
目的:實驗顯示W1和2-1增加及抑制生長速度的環境菌類似，而他們是在不同品系的針箍絨泡黏菌中發現的，因此我們好奇不能作為黏菌(A)食物，且為黏菌(B)所攜帶的共生菌W1是否會被黏菌(A)留做共生菌。

前面的



結果:

RAPD結果顯示第零週時有W1菌落，第一週、第二週後皆未發現共生菌W1菌落，已被針箍絨泡黏菌(A)代謝，不會被留下作為共生菌攜帶。



(紅線為1000bp條帶位置，黃框為共生菌W1)

討論:

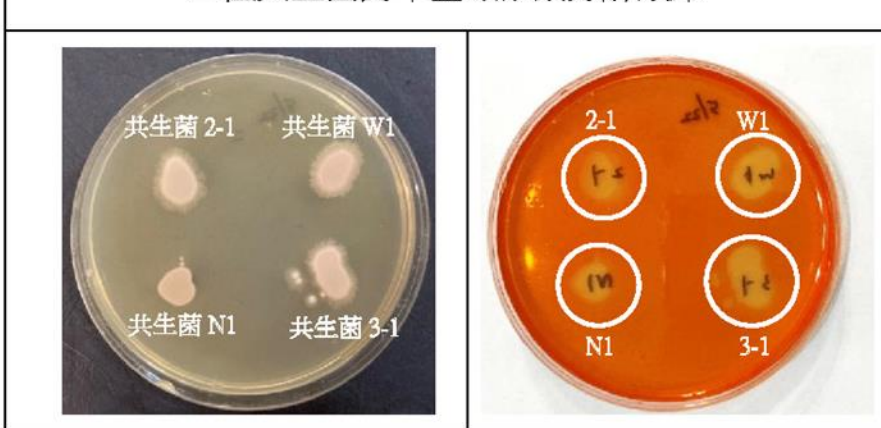
W1是針箍絨泡黏菌(B)所攜帶的共生菌，和2-1對環境菌生長速度的影響有類似的作用，且不能作為黏菌(A)的食物，將它給予黏菌(A)時不會被留下。我們認為黏菌與共生菌之間可能已經有某種程度的專一性。

(3)共生菌分解甲基纖維素

目的:

黏菌在野外的生活環境是落葉和枯木堆，而落葉和枯木堆都含有許多碳源，能提供微生物營養，因此我們推測黏菌的共生菌可能會分解纖維素，便將共生菌W1、2-1、3-1、N1點在甲基纖維素Agar上測試。若是具纖維素分解酶，共生菌生長五天後，經剛果紅染色，菌落生長位置會留下透明圈。

四種共生菌對甲基纖維素分解效果



結果:

實驗結果顯共生菌W1、2-1、3-1、N1皆具纖維素分解酶，原菌落位置在染紅的Agar上留下明顯透明區塊，會分解甲基纖維素。

討論:

4種共生菌皆具纖維素分解酶，推測共生菌可能會分解纖維素，提供共生菌本身或是針箍絨泡黏菌(A)營養。

綜合所有實驗，我們認為黏菌的共生菌具有的功能不是單一的，包括作為黏菌食物、增加對黏菌有益的環境菌生長速度、抑制對黏菌有害的環境菌生長速度及分解纖維素提供碳源。我們推測這些共生菌是黏菌在演化過程中挑選並留下的，而它們之間具有專一性。

結論

1. 在同種不同品系的黏菌發現對環境菌抑制及增益效果相似的共生菌，如同不同人種會帶有功能類似的共生菌。
2. 黏菌對共生菌具篩選機制，且扮演調控的角色讓不同的共生菌能維持平衡，如同人的免疫系統會篩選腸道菌。
3. 即使是黏菌這種原始的生物也和細菌有共生關係，各種生物在經過演化後，與微生物之間的關係都密不可分。

參考資料

1. Brock, D., Douglas, T., Queller, D. *et al.* Primitive agriculture in a social amoeba. *Nature* 469, 393 – 396 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature09668>
2. DiSalvo et al. 2015. *Burkholderia* bacteria infectious induce the proto-farming symbiosis of *Dictyostelium* amoebae and food bacteria.
3. Toret C, Picco A, Boiero-Sanders M, Michelot A, Kaksonen M. The cellular slime mold *Fusiclona alba* forms a dynamic, multicellular collective while feeding on bacteria. *Curr Biol.* 2022 May 9;32(9):1961-1973.e4. doi: 10.1016/j.cub.2022.03.018.
4. 生物學：Vol. 上冊 (第十版). 台灣培生教育出版股份有限公司.P.732-733
5. *Paraburkholderia Tropica* Strain Ppe8 16S Ribosomal RNA, Partial Sequence. (n.d.). National Center of Biotechnology Information. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NR_028965.1