

2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070006

參展科別 微生物學

作品名稱 探究 *Nocardiopsis* 菌落環狀紋路與相鄰同宗菌
落間隙的成因

得獎獎項 二等獎
瑞士國際人才論壇 ISTF 代表

就讀學校 臺中市立臺中女子高級中等學校

指導教師 孟孟孝

作者姓名 黃壬淳

關鍵詞 *Nocardiopsis*、氣生菌絲、
sibling bacterial colonies

作者簡介



我是就讀台中女中三年級的黃壬淳，高中的生物課程不僅是我的拿手科目，更引發我對這個領域的熱情與好奇。因緣際會下我步入分子生物實驗室，展開兩年的研究。在此期間，非常感謝孟孟孝教授細心的指導，每一次的討論都讓我獲益良多。也感謝劉禹佑學長指導我無菌操作技巧，協助我進行實驗。最後感謝呂億真老師給我的建議、鼓勵與支持。

這個研究主題讓我一窺微生物的奧妙，期望我能為菌落型態的研究盡一份心力，也希望未來能繼續朝這個方向邁進！

摘要

我們研究自黑液污染土壤篩選出的*Nocardiosis*（擬諾卡氏菌）菌落環狀紋路的成因，發現環狀紋路形成具有遺傳性且可能是基因變異產生。在低營養濃度（Tryptone濃度小於1g/L）條件下，菌落紋路明顯，推測是由於基層菌絲無法取得足夠養分供給氣生菌絲，氣生菌絲無法生長，直到基層菌絲往外拓展至有足夠的營養物質的區域，氣生菌絲才再次開始生長，因而產生一環一環的不連續生長帶。

此外我們發現多個*Nocardiosis*菌落之間，會因抑制物質作用產生間隙，此間隙大小受營養物質濃度、菌落間初始距離、周圍菌落數目的影響，且其機制與形成環狀紋路的機制並不相同，可能與菌落間偵測感應等複雜機制有關。我們萃取此抑菌物質送液相層析串聯質譜儀（LC-MS/MS）鑑定其成分，發現抑制物質可能是Streptogrisin C或其他非蛋白質物質。深入研究Streptogrisin C的濃度與抑制*Nocardiosis*生長的關係，以及其他抑制物質的可能性是我們未來的研究方向。

Abstract

The *Nocardiosis sp.* isolated from the black liquor-contaminated soil showed unique colonial morphology, including wave pattern in single colony and mutually inhibition zone between nearby sibling colonies. It is concluded that the wave pattern formed due to insufficient nutrients and inheritance factor. The substrate mycelium is assumed to be unable to support the growth of aerial hyphae under low-nutrition condition. Therefore, the aerial hyphae were sparse in the valley part of wave pattern. This phenomenon is suggested to be a strategy to expand the colonial territory quickly.

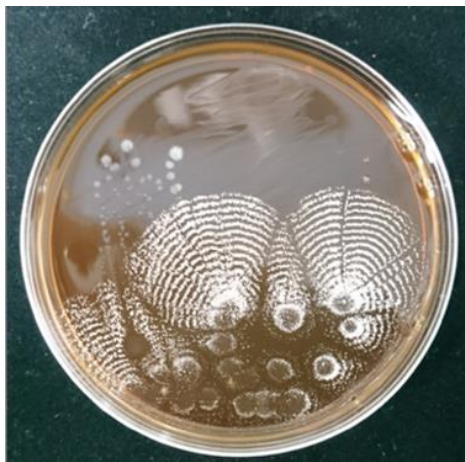
Moreover, our experiments indicated that the mutually inhibition zone formed if sibling colonies contacted each other directly under insufficient environment, resulting in sparse substrate mycelium. This indicated that the inhibition may be the result of sophisticated detection and secretion of inhibitors between nearby sibling colonies. The factors affecting the gap width including the initial inoculate distance and the numbers of neighboring colonies, the latter indicated that the inhibitor is cumulative. We extracted the substances in the mutually inhibition zone to go through LC-MS/MS analysis. The result showed that the inhibitor may be Streptogrisin C. Our future work will be to investigate the inhibition effect of Streptogrisin C's concentration, and the possibility of other chemical compounds being the inhibitor.

壹、前言

一、研究動機

黑液 (Black liquor)，是造紙時木片用強鹼處理後的廢液。從黑液污染的泥土中分離出來的 *Nocardiopsis* 菌，在含有黑液的培養基上會長成有環狀紋路的菌落，同時，兩相鄰菌落之間也有間隙存在，如圖一所示。

我們對於實驗室此發現極感興趣，但在查閱了有關 *Nocardiopsis* 菌的文獻資料後，發現並無菌落生長產生環狀紋路與 *Nocardiopsis* 菌同宗菌落 (sibling colonies) 抑制的相關研究。*Nocardiopsis* 菌屬於放線菌門，許多能提煉抗生素的細菌都來自於此門菌種，如：鏈黴菌屬的細菌，因此我們推測 *Nocardiopsis* 菌落抑制生長的特性可能與細菌素 (Bacteriocin) 或抗生素等抑菌物質有所關聯。*Nocardiopsis* 廣泛分佈於陸地與海洋，與許多動植物有交互關係，其中兩菌株是機會性人體病原菌，研究它們生長與抑制的現象有助於我們進一步了解這菌種，具有環境研究與生物醫學上的實質意義。



圖一、從黑液分離出的 *Nocardiopsis* 菌，在培養基上菌落產生水波紋狀的紋路。

二、研究目的

- (一) 探究培養基中 *Nocardiopsis* 菌落形成環形紋路的機制與生成條件。
- (二) 了解 *Nocardiopsis* 菌同宗菌落間生成間隙的條件。
- (三) 鑑定 *Nocardiopsis* 菌於菌落間抑制區產生的抑制物質成份。

三、文獻回顧

- (一) *Nocardiopsis* 的生物學分類

Nocardiopsis 在分類上屬於細菌界 (*Bacteria*)、放線菌門 (*Actinomycetota*)、放

線菌綱 (*Actinomycetia*)、放線菌目 (*Actinomycetales*)、擬諾卡氏菌科 (*Nocardiopsaceae*)、擬諾卡氏菌屬 (*Nocardiopsis*)。在J. Meyer [1] 之前，*Nocardiopsis*是屬於馬度拉放線菌屬(*Actinomadura*)，但由於其模式種*N. Dassonovillei* 在形態上的差異，Meyer 在放線菌目下把它獨立為*Nocardiopsis* genus (擬諾卡氏菌屬)。

擬諾卡氏菌屬*Nocardiopsis*與馬杜拉放線菌屬*Actinomadura*的差別有以下兩點：

1. *Nocardiopsis*菌屬的氣生菌絲 (aerial mycelia) 和基層菌絲 (substrate mycelia) 在孢子形成初期是細長、分枝適中、且有些鋸齒狀，這與馬度拉放線菌屬的型態明顯不同。
2. *Actinomadura*菌的全細胞水解物質含有馬杜糖 (madurose)，而*Nocardiopsis*則無。

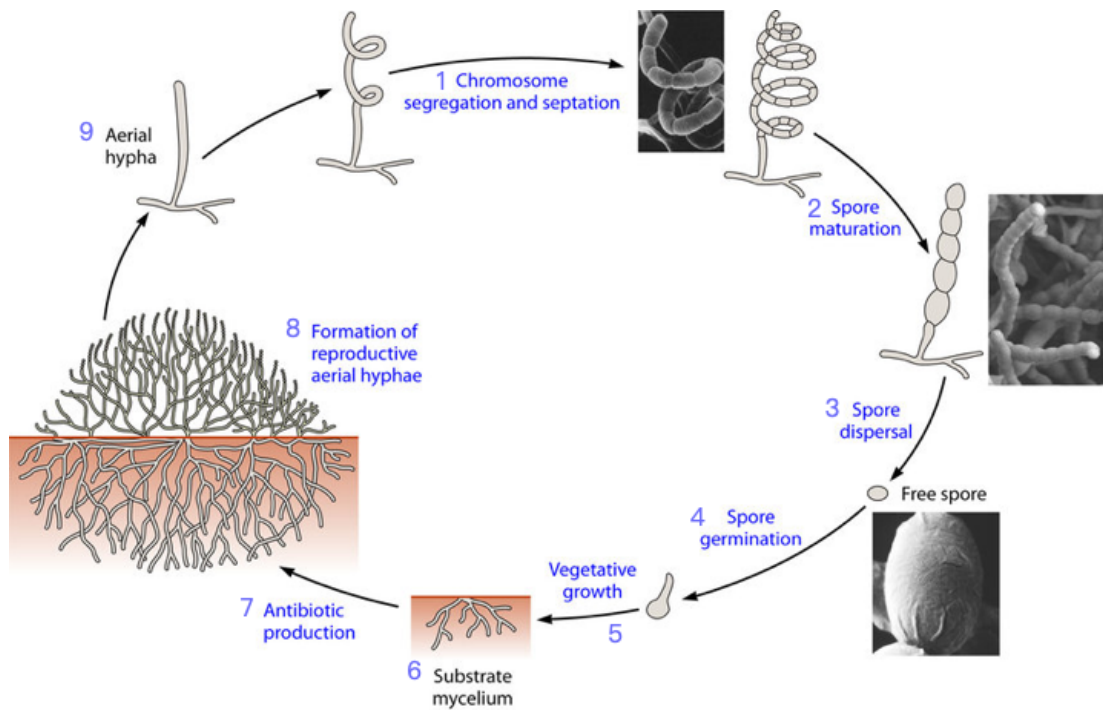
此外比較細胞壁的成分，*Nocardiopsis*菌屬是type III/C，諾卡氏菌屬 (*Nocardia*) 是type IV、鏈黴菌屬 (*Streptomyces*) 是type I。綜合上述研究可知，即使*Nocardiopsis*菌與馬杜拉放線菌屬 (*Actinomadura*)、諾卡氏菌屬 (*Nocardia*)、鏈黴菌屬(*Streptomyces*) 的細菌有所相似，但根據形態分析學者將*Nocardiopsis*獨立成為新的屬。

(二) *Nocardiopsis* 的生活史

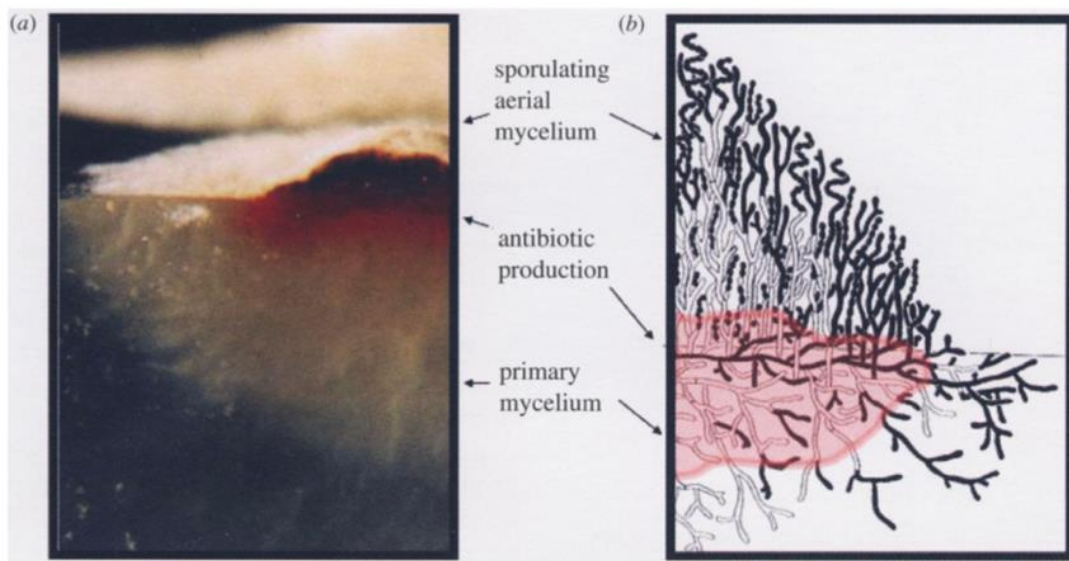
根據Tahsin Bennur等人的論文內容 [2]，*Nocardiopsis* 的生活史與鏈黴菌屬 (*Streptomyces*) 相似如圖二所示。

成熟孢子在含有可溶性營養物質的環境下萌發，菌絲體生長迅速，形成基層菌絲 (圖二過程：1~6)。而當可溶性營養物質耗盡時，基層菌絲會分泌酶來降解不溶性的高分子聚合物，產生營養物質，同時製造抗生素來防止其他微生物的生長，確保菌絲對溶解的營養物質獨佔使用，此機制與鏈黴菌屬 (*Streptomyces*) 相同 [3]如圖三所示，這也可能是一種伏擊策略，分泌的酶可以造成入侵微生物死亡，並提供額外的營養。

接續酶被分泌以降解不溶性高分子聚合物後，氣生菌絲體向上長出，部分基層菌絲分解，提供營養使氣生菌絲生長。氣生菌絲體末端分化出孢子絲後，產生的孢子能夠抵抗惡劣的條件，透過不同方式傳播 (圖二過程：7~9)，至此為一個完整的生命週期。



圖二、鏈黴菌屬 (*Streptomyces*) 的生活史[4]



圖三、(a) 鏈黴菌菌落的垂直切片。(b)顯示菌落的下部產生抗生素，以保護死細胞(白色)釋出的營養物質提供給氣生菌絲和孢子，活細胞是以黑色顯示。

(三) *Nocardioopsis* 與生物的交互關係

Nocardioopsis 菌廣泛分佈於海洋與陸地等自然環境，且可以從多種陸地或海洋中的脊椎、無脊椎動物中分離出來。

在海洋生物中，*Nocardioopsis* 菌被發現與海綿有共生關係 [2]：海綿提供細菌更安全與較多營養物質的環境，而細菌則生成抗生素或毒素，來防止病原體與掠食者的侵害。在陸地生物中，將自熱帶家蚊 (*Culex quinquefasciatus*) 幼蟲腸道分離出來

的 *Nocardiopsis* 菌與該孢子孵化，結果 *Nocardiopsis* 菌能夠在孢子發育初期達到100% 致死率，這項研究能夠應用於生物防治技術上，減少熱帶家蚊傳播瘧疾等蟲媒疾病 [4]。在與人類的關係上，*Nocardiopsis* 菌屬的成員大多無致病性，只有兩個菌株 (*N. dassonvillei* 和 *N. synnemataformans*) 是機會性人體病原菌。其中 *N. dassonvillei* 與放線菌病、罕見的化膿性肺部感染、孢子絲狀皮膚感染等疾病有關 [1]。

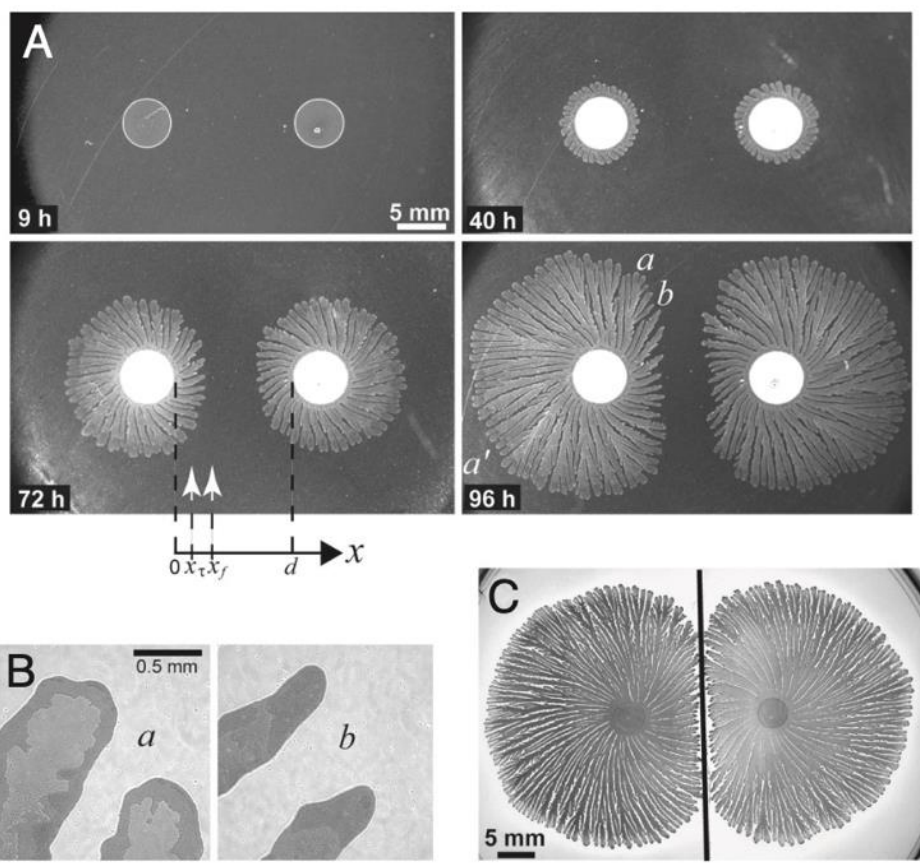
(四) 同宗菌落間致命競爭 (Deadly competition between sibling bacterial colonies)

Avraham Be'er 等人 (2009) 的研究顯示，取自同一個樹突狀芽孢桿菌 (*Paenibacillus*) 菌落培育出來的兩個菌落進行實驗，結果顯示這兩個同宗菌落 (sibling colonies) 具有競爭關係 [6]。

當細菌暴露在飢餓、極端高溫、有害化學物質的環境時，會分泌多種胞外酶殺死另一菌落。例如在低營養物質生長的兩個樹突狀芽孢桿菌同宗菌落會在兩菌落到達一定的距離時，透過分泌物相互抑制生長，宛如形成一道鴻溝 (如圖四A, B)。且此現象必須要兩菌落的直接接觸才會發生，如圖四C所示。

比對菌落接觸區域以及菌落外側區域的分泌物質，Avraham Be'er 等人發現 (2010)，菌落接觸區域多產生了兩種胞外酶：「枯草桿菌蛋白酶 (subtilisin)」以及「樹突狀同宗細菌素 (一種同宗致死因子 sibling lethal factor (Slf))」 [7]。枯草桿菌蛋白酶會促進細菌生長，使菌落擴張；樹突狀同宗細菌素暴露於枯草桿菌蛋白酶下，會導致原本分子量20kDa的無活性形式裂解為有活性的12kDa形式。研究顯示，枯草桿菌蛋白酶能夠調節樹突狀芽孢桿菌的生長：當細菌濃度過低時，它可以促進細菌的生長與菌落擴張；但當細菌濃度過高時 (如兩菌落之間)，細菌會分泌樹突狀同宗細菌素至培養基中，造成細菌死亡以維持細菌族群濃度 [7]。

特別的是，這種稱為細菌素 (bacteriosin) 的抑制物質，只能對同種菌或親緣關係極近的菌種產生抑制效果，有別於一般認知的抗生素。



圖四、(A)取自相同的細菌培養物的兩個菌落相隔距離 d ，9h後開始往外生長；40h後，兩菌落如同獨立的菌落，彼此不互相干擾；72h後，開始產生抑制物質，前沿生長開始減速；96h後，前沿成長幾乎停止，兩菌落之間留下一個間隙。(B) a未被抑制，b被抑制，顯現出不同的型態。(C)在兩個菌種間插入玻璃隔板，菌種生長未被抑制，直到碰到玻璃隔板。

貳、研究方法與過程

一、研究設備與器材

(一) 菌種

菌種來源我們使用的*Nocardiopsis*細菌是從台中市東勢山區一處受紙工廠廢水（黑液）污染的土壤篩選出，經鑑定為*Nocardiopsis*菌屬的細菌。

(二) *Nocardiopsis*菌培養基A

我們調製的培養基A配方如表一。

表一：培養基A配方

品項	藥品	重量	附註
X	NaHCO ₃	30	PH=10.5 X、Y 分開滅菌
	K ₂ HPO ₄	5	
	NaCl	10	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	
Y	Yeast extract	2	
	Tryptone	0、0.2、0.5、0.7、1.0、 5.0、10.0	
	Agar	15	
	ddH ₂ O	1L	

(三) 藥品

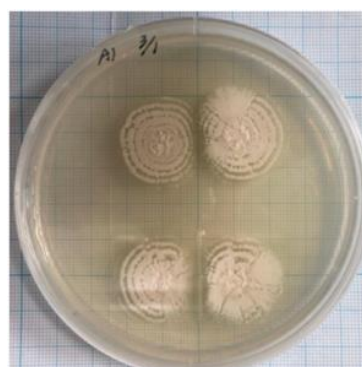
- | | | |
|------------------------------------|---|-------------------------|
| 1. Agar | 6. NaCl | 11. 70%酒精 |
| 2. ddH ₂ O | 7. MgSO ₄ ·7H ₂ O | 12. 冰丙酮 |
| 3. Tryptone | 8. Yeast extract | 13. TCA |
| 4. NaHCO ₃ | 9. 甘油 | 14. 考馬斯藍染劑 |
| 5. K ₂ HPO ₄ | 10. 含Triton X-100的PBS | 15. SDS-PAGE sample dye |

(四) 設備與器材

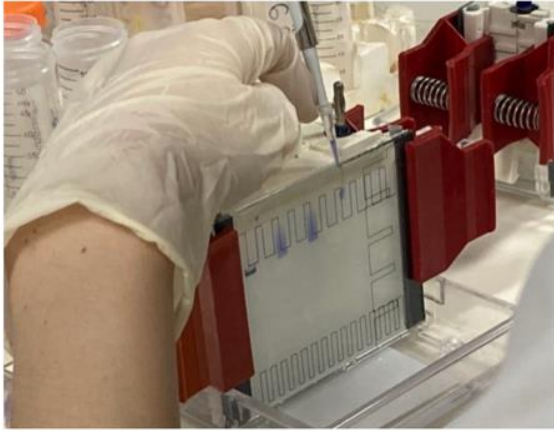
- | | | |
|---------------|--------------------|------------------|
| 1. 血球計數器 | 6. 玻璃隔板培養基 (圖六) | 11. 離心機 |
| 2. 顯微鏡 | 7. SDS膠片 (圖七) | 12. 震盪混合儀 |
| 3. 滅菌釜 | 8. 蛋白質電泳設備 (圖八) | 13. vortex mixer |
| 4. 濕度控制箱 (圖五) | 9. pipetman | 14. 針筒過濾器 |
| 5. 恆溫培養箱 | 10. eppendorf tube | 15. 乾浴槽 |



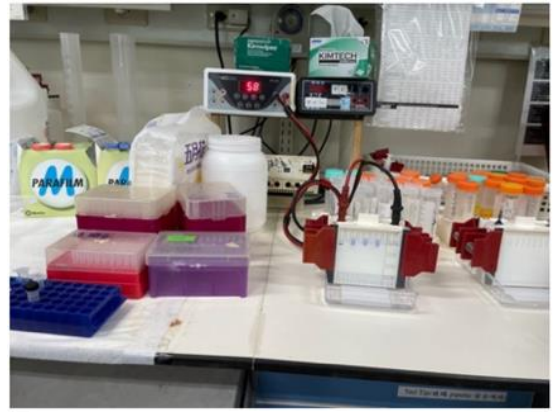
圖五：濕度控制箱



圖六：玻璃隔板培養基
(下方菌落間插入玻璃片)



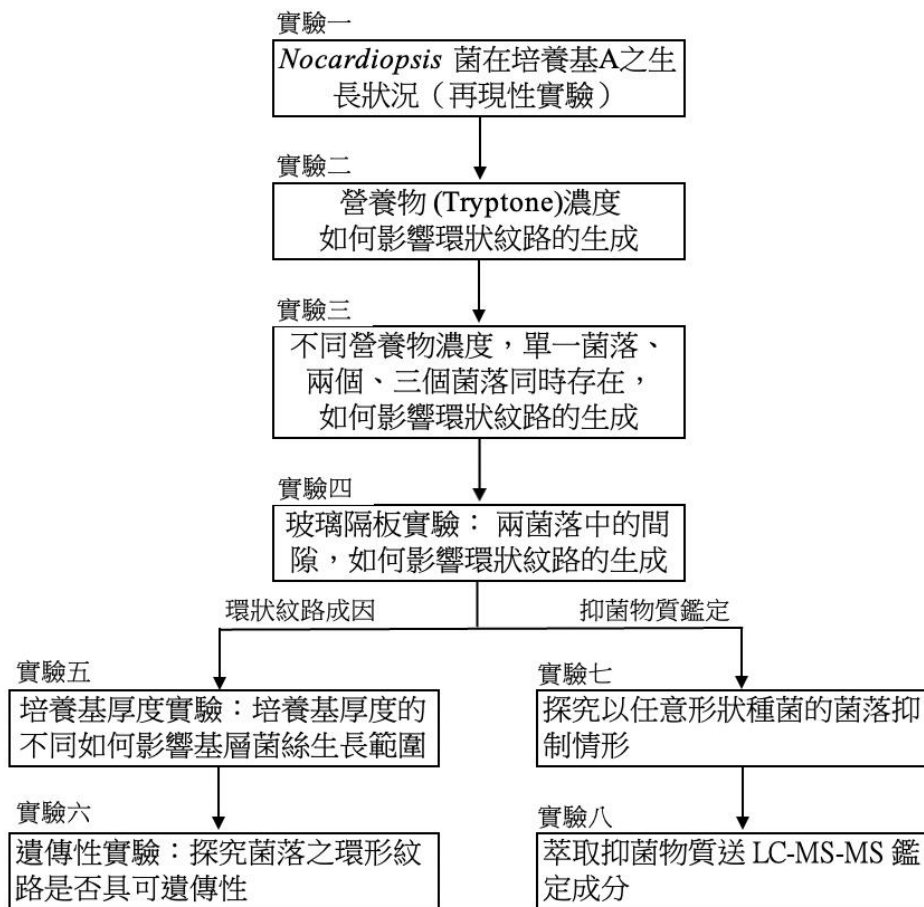
圖七、SDS膠片



圖八：蛋白質電泳設備

二、研究流程圖

為了探究 *Nocardiosis* 菌落生成環狀紋路的機制，我們進行了一系列實驗，研究流程圖如圖九。



圖九：研究流程圖

三、實驗步驟

(一) 實驗一：*Nocardiosis*菌之培養

1. 使用含Triton X-100的PBS洗下培養基上的孢子。
2. 利用血球計數器計算孢子數量。
3. 加入甘油，使濃度為7.5~10個孢子/ μl 。
4. 種菌時，每一個菌落滴2 μl 菌液，使每個菌落都含有15~20個孢子。
5. 種菌後將培養皿放入濕度維持裝置，並於28°C恆溫箱培養。

(二) 實驗二：營養物濃度對環狀紋路型態的影響

1. 依照表三培養基A配方配製tryptone濃度0、1、5、10g/L的培養基。
2. 每一培養基種三菌落，各取10 μl 菌液。
3. 控制濕度、溫度（28°C）培養多天後觀察生長狀況。

(三) 實驗三：相鄰的菌落對環狀紋路型態的影響

1. 依照培養基A配方配製tryptone濃度0、0.2、0.5、0.7、1.0g/L的培養基。
2. 每一濃度均有五盤培養基，分別種一菌落、兩菌落距離1cm、兩菌落距離2cm、三菌落距離1cm、三菌落距離2cm。每一菌落取2 μl 菌液。
3. 控制濕度、溫度（28°C）培養多天後觀察生長狀況。

(四) 實驗四：玻璃隔板對相鄰菌落環狀紋路型態的影響

1. 裁切蓋玻片成1.0*2.0cm大小的長方形隔板，浸泡酒精滅菌後備用。
2. 在培養基尚未凝固時，用鑷子將玻璃隔板插入培養基中間，凝固後即完成。
3. 在玻璃隔板兩側各種一菌落，於下方開放空間也種同初始距離的兩菌落做對照組。
4. 控制濕度、溫度（28°C）培養多天後觀察生長狀況

(五) 實驗五：不同厚度培養基對環狀紋路型態的影響

1. 調製Tryptone濃度為0g/L的A培養基備用。
2. 控制倒入培養基的量形成厚、薄的培養基，分成三組：0.90cm（A組）、0.55cm（B組）、0.22cm（C組），每組各有兩盤。
3. 每一盤培養基種一菌落。
4. 控制濕度、溫度（28°C）培養多天後觀察生長狀況。

(六) 實驗六：探究環形紋路的遺傳性

1. 以接種環分別挖取一菌落中「環形紋路」與「非環型紋路」區域的細菌。
2. 懸浮於滅菌水中，並計算孢子數目進行適當稀釋，使濃度為7.5~10個孢子/ μl 。
3. 每一盤培養基種一菌落。
4. 控制濕度、溫度（28°C）培養多天後觀察生長狀況。

（七）實驗七：探究以任意形狀種菌的菌落抑制情形

1. 於白紙上畫出不同圖形，並於每一公分處做記號，此即菌落的初始距離。
2. 將圖紙墊在配置好的A培養基下，依照記號種菌。
3. 控制濕度、溫度（28°C）培養多天後觀察生長狀況。

（八）實驗八：萃取三菌落間*Nocardiosis*的分泌物質

1. 萃取分泌物質

用刀片分別切下「三菌落之間」、「菌落外圍」、「無菌絲的培養基」三個區域的培養基，壓碎後加入A培養基的X部分（buffer）。震盪混合儀混合55分鐘（77rpm）後，vortex並用10000g 離心25分鐘。取上清液，並用針筒過濾器過濾，以濾除菌絲。

2. 蛋白質沈澱

另一部分的上清液加入20%TCA保存於 -80°C。接著再用18000g 4°C離心5分鐘，吸掉上清液，加入冰丙酮，重複兩次以冰丙酮洗去TCA。最後放置於乾浴槽使丙酮揮發，留下蛋白質沈澱物，保存於 -20°C。

3. SDS-PAGE分析蛋白質產物

上步驟完成的蛋白質沈澱物復溶於少量滅菌水中，加入sample dye，三種sample分別注入SDS膠片的孔洞，接上正負電，進行蛋白質電泳。蛋白質跑到底部時，將膠片取出，用考馬斯藍染色蛋白質以利觀察。

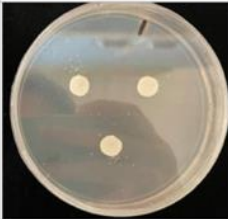
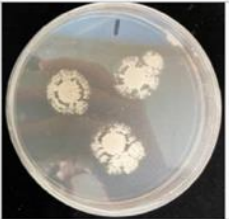
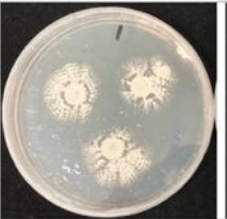
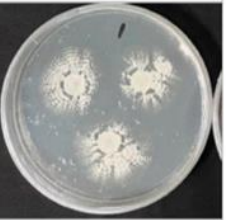
4. LC-MSMS分析蛋白質產物

因樣品濃度過低，SDS-PAGE無顯著結果，因此我們改將（1）萃取完未經TCA處理的樣品中「三菌落之間」、「菌落外圍」兩樣品直接送LC-MSMS分析。

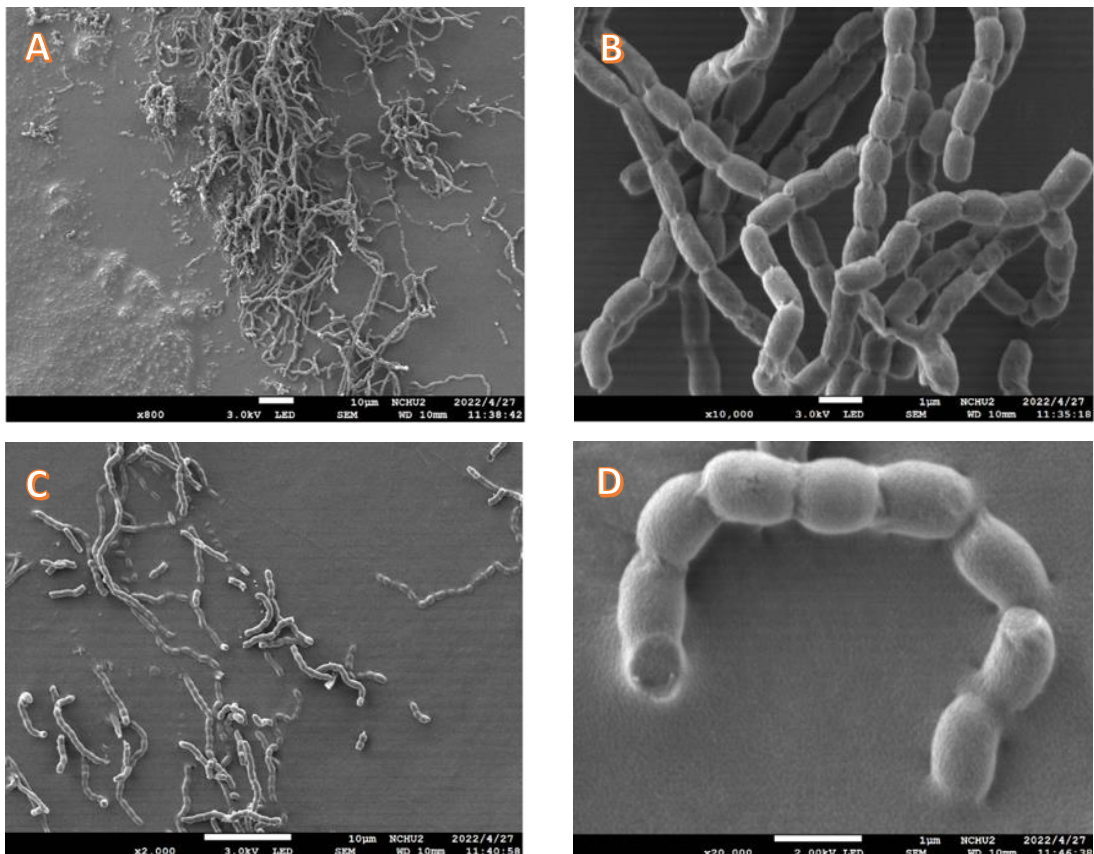
參、研究結果與討論

一、*Nocardiosis*菌在培養基中的生長與菌落型態觀察

我們依實驗一步驟，以A培養基Tryptone濃度=1g/L培養*Nocardiosis*菌，培養約3~5天即開始長出菌絲，28~30天左右即可觀察到菌落有明顯的環狀紋路產生，到第35天時，環狀紋路與第28天相似幾乎無差異，如圖十所示。以電子顯微鏡 (SEM) 觀察氣生菌絲在環上及環與環間的差異，可觀察到環上的氣生菌絲茂密 (如圖十一A,B)，而環與環間氣生菌絲則是稀疏 (如圖十一C,D)。

生長天數	第四天	第十八天	第二十八天	第三十五天
A培養基 (Tryptone濃度=1g/L)				
結果	細菌開始生長	有環狀紋路出現	環狀紋路更明顯	與第28天差異不大

圖十、用點菌的方式以培養A (Tryptone濃度=1g/L) 培養*Nocardiosis*菌的狀況



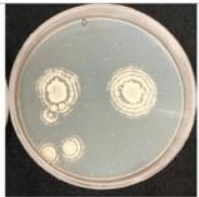

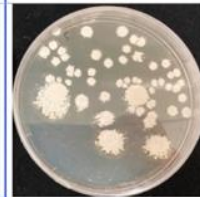
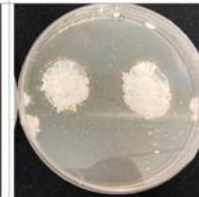
圖十一、SEM觀察：環上氣生菌絲x800倍(A)，x10,000倍(B)。環與環間的氣生菌絲x2,000倍(C)，x20,000倍(D)。

二、*Nocardiosis*「環狀紋路」與「相鄰菌落間間隙」的差異

以肉眼觀察，*Nocardiosis*的「環狀紋路間隔」與「相鄰菌落間間隙」都少有氣生菌絲生長，因此我們以實驗二～四進一步探討兩者差異。

(一) 營養物質 (Tryptone) 濃度對環狀紋路與相鄰菌落間間隙的影響。

我們依上述實驗二步驟進行實驗，以Tryptone濃度為1g/L編號A2作為對照組，A1、A3、A4為實驗組，結果如圖十二。可觀察到A1的環狀紋路比對照組明顯，而A3、A4則無環狀紋路。

編號	A1	A2	A3	A4
A培養基 (Tryptone濃度 split)	Tryptone 濃度= 0 g/L	Tryptone 濃度= 1 g/L	Tryptone 濃度= 5 g/L	Tryptone 濃度= 10 g/L
點菌2點 (距離4cm) 生長28天後				
結果	有環狀紋路	有環狀紋路	無環狀紋路	無環狀紋路

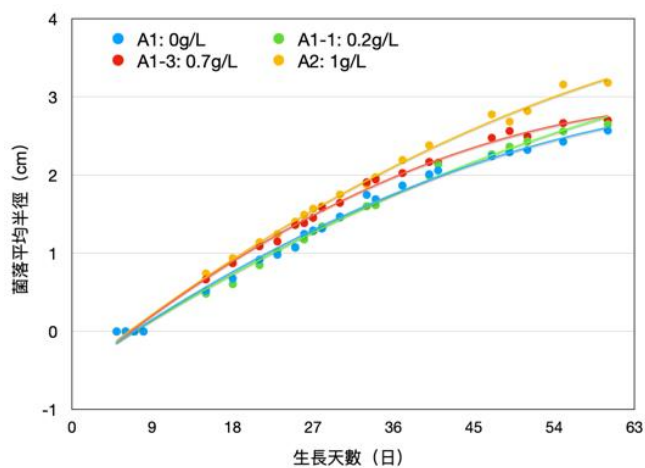
圖十二、Tryptone濃度愈小，環狀紋路愈明顯。A2藍框為對照組。

實驗三進行了更細微的濃度分組，在Tryptone濃度=0~1g/L分成五組，並種1~3菌落，計算單一菌落的環數，結果如圖十三。以單一菌落的生長半徑對生長天數做圖，可以觀察到細菌的生長速率，如圖十四。以顯微鏡觀察A1 (Tryptone濃度=0) 三菌落距離2cm的環與環間隔及菌落間間隙，其結果如圖十五。

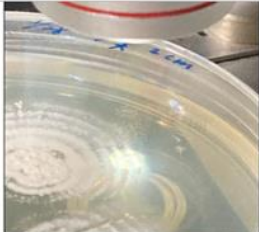
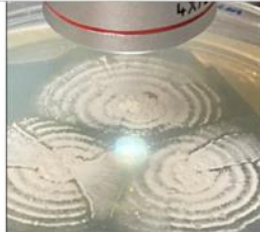
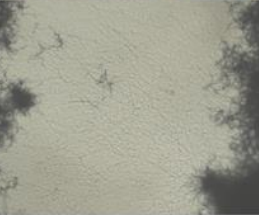
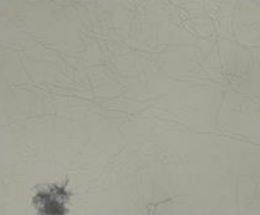
編號	A1	A1-1	A1-2	A1-3	A2
A培養基 (Tryptone濃度)	Tryptone = 0 g/L	Tryptone = 0.2g/L	Tryptone = 0.5g/L	Tryptone = 0.7g/L	Tryptone = 1 g/L
一菌落					
兩菌落 (距離1cm)					
兩菌落 (距離2cm)					
三菌落 (距離1cm)					
三菌落 (距離2cm)					
一菌落時的環數	9	9	因圈環過於破 碎，不計算	8	6

圖十三、Tryptone濃度與點菌距離 vs. 環狀紋路

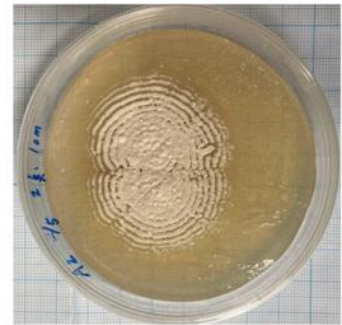
編號	生長 天數	菌落平均半徑 (cm)				
		A1 : 0g/L	A1-1 : 0.2g/L	A1-2 : 0.5g/L	A1-3 : 0.7g/L	A2 : 1g/L
1	5	0	0	0	0	0
2	6	0	0	0	0	0
3	7	0	0	0	0	0
4	8	0	0	0	0	0
5	15	0.52	0.483	0.47	0.665	0.7425
6	18	0.6775	0.605	0.5575	0.8725	0.94
7	21	0.91875	0.8475	0.7925	1.09	1.1425
8	23	0.98125	1.0275	0.81375	1.15125	1.2475
9	25	1.0775	1.07	0.9775	1.3625	1.405
10	26	1.24875	1.17625	1.035	1.38625	1.49375
11	27	1.29375	1.2825	1.0525	1.45375	1.57125
12	28	1.31625	1.34375	1.19375	1.585	1.60375
13	30	1.47	1.46	1.2075	1.645	1.7525
14	33	1.7475	1.6025	1.35	1.91	1.8775
15	34	1.6925	1.615	1.4525	1.945	1.975
16	37	1.8675	1.8675	1.4475	2.0275	2.195
17	40	2.0125	1.9925	1.7	2.17	2.3825
18	41	2.06	2.1375	1.6875	2.16	
19	47	2.2425	2.2675	1.8675	2.4775	2.7775
20	49	2.2925	2.365	1.8925	2.565	2.685
21	51	2.3225	2.4325	1.945	2.495	2.82
22	55	2.4275	2.56	1.95	2.6675	3.16
23	60	2.57	2.65	2.135	2.7025	3.1825



圖十四、各濃度單一菌落生長速率

樣品	A1三菌落外圍環紋間隙	A1三菌落中間間隙
觀察區域		
顯微鏡下影像		
結果	基層菌絲眾多且完整	基層菌絲稀少且多數斷裂

圖十五、以顯微鏡觀察外圍環紋間隙 vs.三菌落中間間隙



圖十六、Tryptone濃度 1g/L、菌落距離1cm時，菌落間無間隙產生

表二：兩菌落間隙大小與初始距離的關係

編號	A1	A1-1	A1-3	A2
培養基Tryptone濃度	0g/L	0.2g/L	0.7g/L	1g/L
間隙大小 (cm) (初始距離1cm)	0.09	0.11	0.05	0
間隙大小 (cm) (初始距離2cm)	0.19	0.14	0.13	0.08

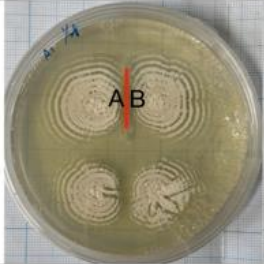

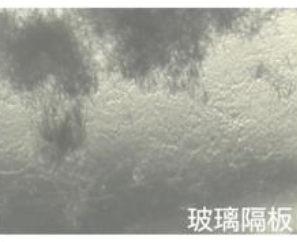
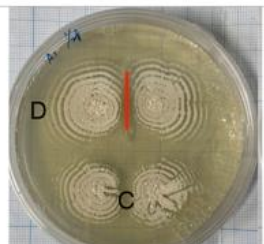
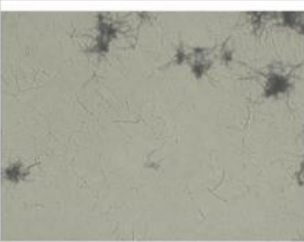

討論如下：

1. 營養物質 (Tryptone) 的匱乏是生成環狀紋路與相鄰菌落間產生間隙的必要條件，Tryptone濃度 > 5g/L時，幾乎沒有環狀紋路的產生。而Tryptone濃度 1g/L、兩菌落距離 1cm時，菌落間無間隙產生，如圖十六（放大圖十三）。
2. 營養濃度愈低產生的環狀紋路與相鄰菌落間間隙愈明顯，產生的環數愈多（如圖十三）。營養濃度愈高，單一菌落生長速率愈快，而且隨著時間拉長，生長速率趨緩（如圖十四），因為營養物質濃度慢慢降低，細菌的生長速率也就降低了。
3. 同一營養濃度、同菌落數目，兩菌落間初始距離愈大，產生的間隙愈大（如表二）。

4. 環狀紋路間隔與相鄰菌落間間隙的基層菌絲有極大的差異（如圖十五），環狀紋路間隙依然保有大量且完整的基層菌絲，而相鄰菌落間的鴻溝則只有稀少且斷裂的基層菌絲，這說明了兩者形成的機制是不相同。

（二）玻璃隔板對環狀紋路與相鄰菌落間間隙的影響。

實驗四，以上半部有玻璃隔板的培養基進行實驗。在有玻璃隔板和無玻璃隔板兩邊種菌，觀察玻璃隔板對環狀紋路與菌落間間隙的影響，結果如圖十七。

<p>A1培養基</p> 	<p>A 區：在玻璃隔板旁</p>  <p>玻璃隔板</p>	<p>B 區：在玻璃隔板另一側</p>  <p>玻璃隔板</p>
<p>顯微鏡觀察結果</p>	<p>基層菌絲眾多且完整</p>	<p>基層菌絲眾多且完整</p>
<p>A1培養基</p> 	<p>C 區：在兩個菌落中間間隙</p> 	<p>D 區：在菌落外圍透光區</p> 
<p>顯微鏡觀察結果</p>	<p>基層菌絲稀少且多數斷裂</p>	<p>基層菌絲眾多且完整</p>

圖十七、以顯微鏡觀察玻璃隔板旁的基層菌絲、兩個菌落間的基層菌絲，以及菌落外圍的基層菌絲（紅色直線處有玻璃隔板）。

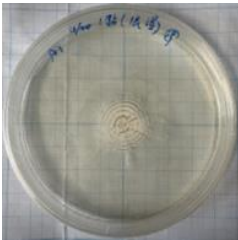
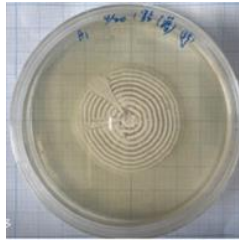
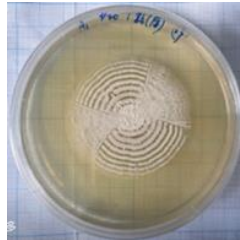
討論如下：

1. 中間設有玻璃隔板的兩菌均可生長直到接觸隔板，而下方無玻璃隔板的兩菌落則產生間隙。同時，上下兩組皆產生環狀紋路。因此環狀紋路的產生不受玻璃隔板影響，而菌落間間隙的產生會受影響，兩者的形成機制不同。
2. 觀察圖十七A, B區，玻璃版兩側的基層菌絲多且完整，可以毫無阻礙的生長至玻璃隔板。而C區的基層菌絲稀少且斷裂，兩側菌落無法繼續生長產生間隙。推論C區產生抑制物質裂解基層菌絲，且間隙的產生並非是「抑制物質隨細菌生長不斷累積濃度」的結果，而可能與偵測感應的機制有關，需要兩菌落的直接接觸。

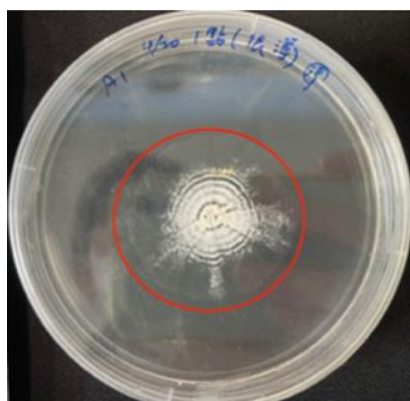
三、環狀紋路形成機制與特性

(一) 環狀紋路形成機制探究

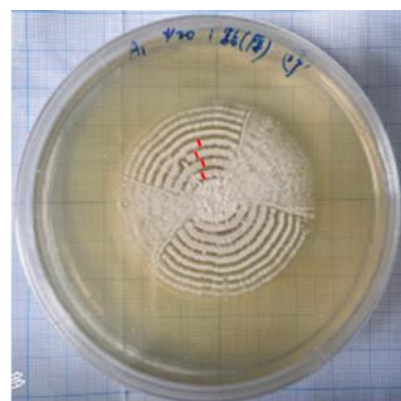
實驗二～四已證實環狀紋路的形成與營養物質濃度有關。我們進行實驗五，進一步以相同的Tryptone濃度(0g/L)，但厚度不同的培養基，觀察對環狀紋路的影響，結果如圖十八。其中可以觀察到，培養基最薄的A樣品氣生菌絲範圍最小，但其基層菌絲拓展的範圍卻相當遠(如圖十九)，幾乎與B、C樣品相當。量測由中心內向外前四環(如圖二十)的平均寬度，樣品 $C > B > A$ 。

培養基樣品	A	B	C
培養基平均厚度(cm)	0.22	0.55	0.90
內四環寬度平均(cm)	0.15	0.185	0.205
基層菌絲範圍 (直徑 cm)	4.58	5.03	5.69
氣生菌絲範圍 (直徑 cm)	2.30	4.71	5.54
菌落紋路照片			

圖十八、培養基厚薄程度對環型紋路的影響。



圖十九、A樣品的基層菌絲範圍



圖二十、量測內四環寬度

討論如下：

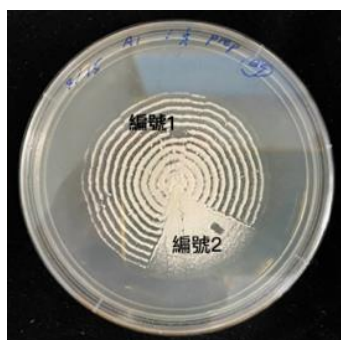
1. 營養濃度低的樣品A菌落外圍只有基層菌絲生長，而無氣生菌絲生長。且內四環平均寬度 $C > B > A$ ，其中B與C都能產生氣生菌絲，但每一環氣生菌絲生長

的距離依然受到營養物質濃度影響。因此氣生菌絲生長與否與營養是否足夠有直接的關係。

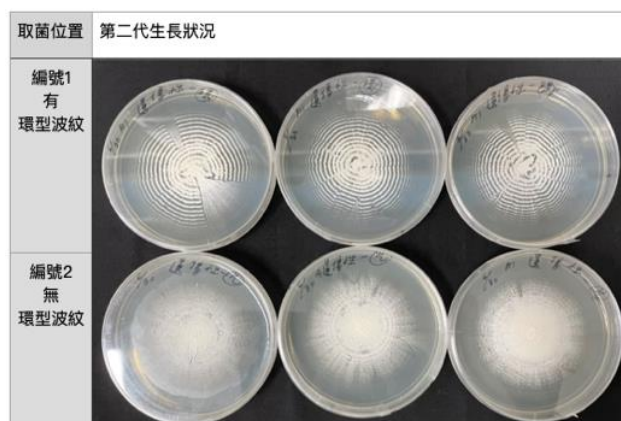
2. 根據以上觀察，環狀紋路的形成機制假設如下：當*Nocardioopsis*菌在營養物質充足時，基層菌絲生長的同時也支持了氣生菌絲的生長，進而生長成孢子絲並產生孢子繁殖（如圖十七、B, C），若在營養物質匱乏時，就只有基層菌絲生長（如圖十七、A），直到基層菌絲擴展到外圍較豐富的營養物質時，氣生菌絲又可開始生長，如此便形成環狀紋路的圖形了。
3. 我們推測環狀紋路的產生是*Nocardioopsis*菌為了快速拓展版圖的策略。如圖十八所示，內四環平均寬度 $C > B > A$ ，表示在營養濃度低時會產生較大的紋路間隔以在同樣時間內達到與高營養濃度時相近的菌落大小。

（二）探討環狀紋路的特性

我們在培養*Nocardioopsis*的過程中發現一菌落內有些區域會產生明顯環狀紋路，有些區域則否（如圖二十一），依實驗六步驟，我們分別取編號1（有環狀紋路）、編號2（無環狀紋路）兩區域培養第二代細菌，結果如圖二十二，編號1產生明顯環形紋路，而編號2則不產生紋路。



圖二十一：同一菌落內編號1區域有環狀紋路，編號2區域則無。



圖二十二、第二代細菌生長狀況：編號1細菌第二代有明顯的環形波紋，編號2細菌第二代則無。

討論如下：

*Nocardioopsis*菌產生環形紋路與否是有遺傳性的。這可能是基因變異所致，圖二十一親代部分表現出環形紋路的特性，部分則否。培養第二代，編號一大部分產生環形紋路但仍有部分未產生環形紋路，但編號二全部都未表現出環形紋路，說明這種變異相當不穩定。因此，我們推測這可能是跳躍子的影響，未來將

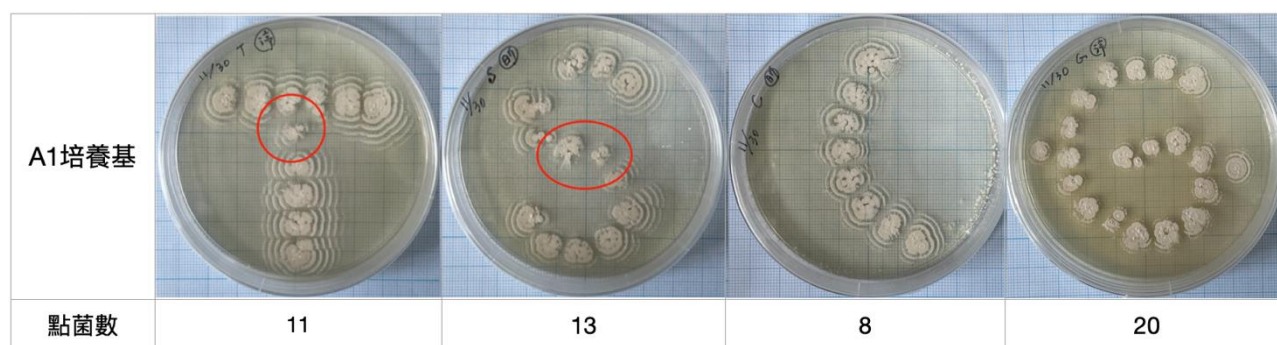
繼續朝此方向探究。

四、菌落間間隙抑制物質特性與鑑定

上述實驗已證明菌落間間隙產生與營養濃度、菌落間初始距離相關，並分泌產生抑制物質，且此現象可能與偵測感應機制有關。我們進一步探究抑制物質是否有累積加成的性質，並檢驗抑制物質是否為蛋白質。

(一) 探究抑制物質累積加成的性質

依實驗七步驟，以任意形狀種菌觀察對細菌生長的影響，結果如圖二十三，TSCG的字樣中，各種了11、13、8與20個菌落，討論如下：

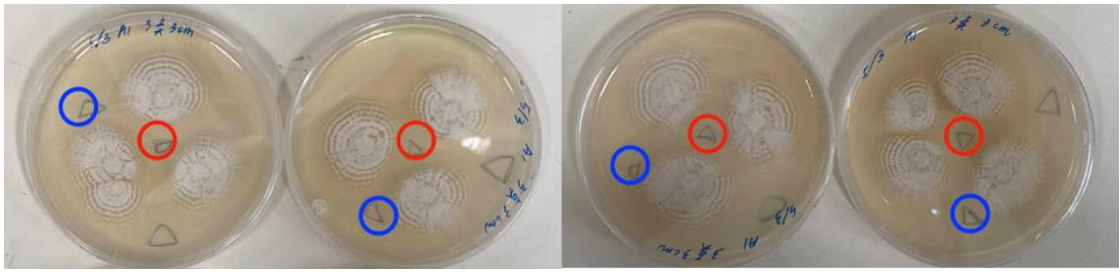


圖二十三：點菌「T、C、G、S」字樣，得到菌落之間抑制的情形。

1. 若周圍有較多的菌落，則成長相對會被抑制較明顯，圖二十三中紅框圈起來的是抑制效果明顯的菌落。
2. 這四個字樣菌落的距離一樣，但周圍菌落數目不同，菌落數目愈多整體菌落就愈小，這表示菌落愈多則產生的總抑制物質也愈多，抑制物質具有累積性。

(二) 抑制物質成分鑑定

*Nocardiosis*的基層菌絲在偵測到另一菌落的菌絲後可能分泌了某種抑制物質，根據 J. Meyer [2]、Avraham Be'er 等人[5][6] 的研究，此抑制物質或許是一種蛋白質。因此我們依據實驗八步驟分別取出兩個區域的培養基（如圖二十四），集合四盤的樣本以增加未知抑制物濃度並萃取出其中物質，並將樣本送LC-MS/MS鑑定。



圖二十四：萃取區域分為兩區，分別為菌落間抑制區域（紅圈）、菌落外圍接近基層菌絲處（藍圈）。

結果顯示兩樣本中含量最多的蛋白質是一樣的（如圖二十五），表示接觸到其他菌落的菌絲以及自由生長的菌絲分泌出的主要蛋白質皆是 Streptogrisin C。

Streptogrisin C是一種水解酶，以類似胰凝乳蛋白酶（chymotrypsin）的特異性水解蛋白質。Streptogrisin C可能專門降解幾丁質連接蛋白（chitin-linked proteins），對大的脂肪族（large aliphatic）及芳香族胺基酸（aromatic amino acids）有特異性。根據LC-MS/MS分析結果，Streptogrisin C可能在抑制區域有較高濃度因此產生抑制效果，在菌落之間產生間隙。而外圍區域的Streptogrisin C濃度較低沒有抑制現象。

	抑制區域樣本	外圍區域樣本
LC-MSMS 鑑定結果 (擷取前三名)	<p>1. LC:AB03170614 AB03170614_SMCN Mass: 38303 Score: 167 Matches: 4(4) Sequences: 2(2) eMPEI: 0.18 Streptogrisin C OS=Nocardiosis sp. L17-MgNaSL7 GN=H0627_104372 PE=3 SV=1 Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Unique Peptide 18542 818.2274 1618.4482 1617.7318 0.7084 0 74 5.7e-005 1 U R.5G5T7QAGQTLQAR.6 18548 18562 864.4048 1726.7950 1726.7932 0.8118 0 89 1.8e-006 1 U R.GQSVSVPEGVTDHTR.1 18561</p> <p>2. LC:AB03170671 AB03170672_SMCN Mass: 38078 Score: 111 Matches: 2(2) Sequences: 1(1) eMPEI: 0.09 Streptogrisin C OS=Nocardiosis sp. L17-MgNaSL7 GN=H0627_104372 PE=3 SV=1 Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Unique Peptide 18562 864.4048 1726.7950 1726.7932 0.8118 0 89 1.8e-006 1 U R.GQSVSVPEGVTDHTR.1 18561</p> <p>3. LC:AB03168051 AB03168051_SMCN Mass: 38137 Score: 88 Matches: 2(2) Sequences: 1(1) eMPEI: 0.09 Streptogrisin C OS=Nocardiosis flavescens GN=54M05421800_11970 PE=3 SV=1 Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Unique Peptide 18542 818.2274 1618.4482 1617.7318 0.7084 0 74 5.7e-005 1 U R.5G5T7QAGQTLQAR.6 18548</p>	<p>1. LC:AB03170614 AB03170614_SMCN Mass: 38303 Score: 157 Matches: 3(3) Sequences: 2(2) eMPEI: 0.18 Streptogrisin C OS=Nocardiosis sp. L17-MgNaSL7 GN=H0627_104372 PE=3 SV=1 Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Unique Peptide 12215 864.4048 1618.4482 1617.7318 0.7084 0 72 0.0078 1 U R.5G5T7QAGQTLQAR.6 12216 12215 864.4048 1727.3508 1726.7932 0.5476 0 99 1.9e-007 1 U R.GQSVSVPEGVTDHTR.1 12216</p> <p>2. LC:AB03170671 AB03170672_SMCN Mass: 38078 Score: 147 Matches: 2(2) Sequences: 1(1) eMPEI: 0.09 Streptogrisin C OS=Nocardiosis sp. L17-MgNaSL7 GN=H0627_104372 PE=3 SV=1 Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Unique Peptide 12215 864.4048 1727.3508 1726.7932 0.5476 0 99 1.9e-007 1 U R.GQSVSVPEGVTDHTR.1 12216</p> <p>3. LC:AB0307231 AB0307231_SMCN Mass: 46802 Score: 54 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) eMPEI: 0.07 Uncharacterized protein OS=Nocardiosis matches GN=H021223 GN=H021_001064 PE=4 SV=1 Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Unique Peptide 8320 410.0849 818.1532 817.4195 0.7338 1 54 0.0051 1 U R.V05MRK.E 8320</p>
蛋白質名稱	<p>1. Streptogrisin C 2. Streptogrisin C 3. Streptogrisin C</p>	<p>1. Streptogrisin C 2. Streptogrisin C 3. Uncharacterized protein</p>

圖二十五：LC-MSMS鑑定結果顯示兩樣本含量最多的蛋白質都是 Streptogrisin C。

肆、結論與應用

本研究發現，*Nocardiopsis*菌落生長形成環狀紋路型態，與相鄰菌落間產生間隙是不同的機制造成。

一、*Nocardiopsis*菌落形成環狀紋路的現象與探究

- (一) 培養基的營養物質Typtone濃度低於1g/L時，形成環狀紋路，且濃度愈低愈明顯；濃度高於5g/L時，則不形成環狀紋路。
- (二) 形成環狀紋路與否不受玻璃隔板影響，與抑制物質無關。
- (三) 營養物質較少時，只會有基層菌絲生長，而無法長出氣生菌絲。
- (四) 形成環形紋路的特性具有遺傳性，推測是跳躍子影響的結果，且此變異相當不穩定。
- (五) 推論環狀紋路產生機制如下：

最初生長時，菌絲分佈稀疏，基層菌絲所吸收的營養物質足以供應氣生菌絲生長，並在末端分化出孢子絲。生長一段時間後菌絲變得密集，營養物質不足，使得基層菌絲無法支持氣生菌絲生長，因此這個區域就只有基層菌絲，並形成第一個圈環。此時，因為沒有氣生菌絲所以無法使用孢子絲繁殖，基層菌絲只能繼續延伸尋找足夠的營養物質。等到基層菌絲往外擴一段距離後，營養物質足夠讓基層菌絲支持氣生菌絲時，此時氣生菌絲開始生長，基層菌絲與氣生菌絲一起往外生長一段距離消耗大部分營養物質後，氣生菌絲又因養分不足無法生長，於是第二個環出現，如此重複同樣的過程而產生一圈一圈的環狀條紋，直到營養物質消耗殆盡或基層菌絲因老化而停止生長為止。

- (六) 產生環形紋路可能是為了在低營養環境中快速拓展版圖的策略。

二、相鄰*Nocardiopsis*菌同宗菌落間生成間隙的條件

- (一) 營養物質濃度、菌落間初始距離、周圍菌落數目均會影響間隙的大小。
- (二) 抑制物質的產生非「抑制物質於細菌生長過程不斷分泌累積」，而是需要菌落直接接觸，推測與偵測感應機制有關。

三、鑑定*Nocardiopsis*菌於菌落間抑制區產生的抑制物質成份

- (一) 經LC-MS-MS鑑定得知，所萃取的Streptogrisin C可能是抑制物質。

(二) 若Streptogrisin C是造成間隙的抑制物質，則抑制效果可能與濃度有關。

(三) 因Nocardiopsis屬於發現多種能產生抗生素細菌的放線菌門，我們推測這種抑制物質也有可能是抗生素。

四、應用

本研究發現了以上Nocardiopsis不曾被研究的生長現象，推測我們用以實驗篩選自被黑液污染的極端環境的菌株可能產生基因變異：在低營養濃度環境產生環形紋路以快速拓展版圖，並產生抑制同種細菌生長以爭取養分。至於Nocardiopsis菌的環狀紋路是否為跳躍子影響的結果，我們將繼續培養第二子代並利用紫外光刺激等方法，觀察此特徵的穩定性。而菌落環狀紋路的產生是否還有其他分泌物質作用，以及菌落間抑制物質成分的疑點上，需要進一步研究。此想法除了讓我們更了解廣泛分佈且具重要生態意義的Nocardiopsis菌的生存機制，也可提供未來對其他生存在極端環境的微生物養分使用，以及生存模式研究新的觀點。

關於菌落間相互抑制的現象，我們未來將實驗Streptogrisin C濃度對菌落的抑制效果，以確認它對Nocardiopsis生長的影響。並再重新萃取菌落間抑制物質，做抗生素或其他常見抑制物的鑑定以探討其他抑制物成份的可能。確定抑制物成份後，再進一步進行紙錠擴散實驗確定抑制效果，並且檢驗其最低抑菌濃度。若成功分離出抑制物質，再實驗它對其他Nocardiopsis菌屬成員的抑制效果，進一步了解這種抑制效果與親緣遠近的關係。

伍、參考文獻

1. J. Meyer (1976). *Nocardiopsis*, a new genus of the order Actinomycetales. *Int J Syst Bacteriology*, 26(4), 487–493.
2. Tahsin Binnur, Ameeta Ravi Kumar, Smita Zinjard, Vaishali Javdekar (2015). *Nocardiopsis* species: Incidence, ecological roles and adaptations. *Microbiological Research*, 174, 33-47.
3. Keith F. Chater (2006). *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 361, 761–768.
4. Essaid Ait Barka, et al. (2015, November 25) Taxonomy, Physiology, and Natural Products of

Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 80(1), 1-43.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26609051/>

5. V Vasanthi, S L Hoti (1992) Microbial flora in gut of *Culex quinquefasciatus* breeding in cess pits. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 23(2), 312-317.
6. Avraham Be'er, Harry L. Swinney et al. (2009) Deadly competition between sibling bacterial colonies. *PNAS*, 106(2), 428-433.
7. Avraham Be'er, L. Swinney et al. (2010) Lethal protein produced in response to competition between sibling bacterial colonies. *PNAS*, 107(14), 6258–6263.

【評語】 070006

本研究由造紙時木片用強鹼處理後的廢液（黑液）污染的泥土中分離出來 *Nocardiopsis* 菌，屬於革蘭氏陽性菌的放射菌門，利用不同的培養方式觀察菌落環狀紋路的成因，發現了未曾被研究的生長現象，研究仔細、觀察入微，是很好的科展作品。

建議：

1. *Nocardiopsis* 菌落環狀紋路與相鄰同宗菌落間隙的研究對環境研究與生物醫學有何重要性？
2. *Nocardiopsis* 菌落環狀紋路與相鄰同宗菌落間隙的成因，有可能只是黑液去抑制菌落生長或刺激菌落分泌抑制物質嗎？為何說是基因變異產生？有做基因序列分析找出變異處嗎？事實上圖十顯示不用黑液也會產生菌落環狀紋路，而是受 Tryptone 濃度影響。是否在營養物多的狀態，菌落不需競爭食物而過度生長，就沒有菌落環狀紋路嗎？這跟黑液毫不相干。而這菌落環狀紋路與相鄰同宗菌落間隙受營養物濃度影響，應該就是普遍現象，不一定跟基因變異及抑制物質有關。
3. 他們有萃取此抑菌物質送液相層析串聯質譜儀(LC-MS-MS) 鑑定其成分，但所萃取的蛋白質並非抑制物質。也可能有效

抑制蛋白質不是最大量前三名或的萃取量不夠偵測。尚待深入研究抑制物質的化學成份以及抑制效果，但也可能沒有化學抑制物質。

4. 他們推測這種有抑制物質也有可能是抗生素。但抗生素應該不會抑制本身的生長。