

第六屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA6-090

作品名稱：雙黴搶珠——從黴菌的競爭關係尋找生物抑制物

姓名：黃瑞陽

關鍵字：黴菌、競爭、濾液

目錄

項目	頁數
一、研究動機	3
二、研究目的	3
三、研究器材	3
四、研究原理	4
五、研究過程與方法	4
六、研究結果	7
七、討論	13
八、結論	14
九、未來展望	15
十、參考資料	15
十一、附錄	16

一、 研究動機

一九二八年佛萊明意外發現了第一個抗生素——盤尼西林，隨後在一九四零年代開始引進臨床使用...開啟了人類對生物間互相抑制作用的認識，人類努力尋找對細菌、病毒、真菌生存抑制物，真菌對細菌等原核生物抑制生長的效果是為人所知的，而我們搜尋許多資料後，並未提到對於真菌這類生物的生存抑制。我們懷疑，像黴菌這樣的微生物，在種與種之間會不會也有類似大型生物般的競爭關係？於是我們開始這個研究。

二、 研究目的

- (一). 由黴菌在培養基上所佔面積統計出生長曲線，從而比較黑黴菌和青黴菌的生長速率
- (二). 從不同的競爭模式中，觀察青黴菌和黑黴菌對彼此生長的影響，與在不同狀況下，兩種黴菌何者具有競爭優勢
- (三). 觀察黴菌的分泌物是否會影響另一種黴菌的生長

三、 研究器材

- (一). 麵包, 橘子(採集黴菌用)
- (二). 培養皿
- (三). 燒杯
- (四). 錐型瓶
- (五). 試管(含蓋)
- (六). 電子天平
- (七). 加熱板(兼電磁攪拌器)
- (八). 酒精燈
- (九). 白金接種環
- (十). 鑷子
- (十一). 無菌操作台
- (十二). 生長箱(incubator)
- (十三). 鋁箔紙

- (十四). 封口膜
- (十五). 無菌過濾膜
- (十六). 針筒(附針頭)
- (十七). 滅菌釜
- (十八). 滅菌袋
- (十九). 滅菌指示帶
- (二十). 手套
- (二十一). 數位相機
- (二十二). 電腦
- (二十三). 繪圖軟體

四、 研究原理

兩種不同的生物，生存在同一環境中，對於生存的需求條件相同時，會互相競爭生存空間與養分，因此我們以簡單的培養基觀察黑黴菌和青黴菌在此環境中彼此的競爭情形。

五、 研究過程與方法

(一). 前置作業

1. 製作培養基

- (1) 使用 yeast-malt-extract medium。每一公升 yeast-malt-extract medium 其組成如下：

成分	份量(g/公升)
Yeast extract	3.0
Beef extract	3.0
Peptone	5.0
Glucose	10.0

- (2) 使用電子天平秤取適量成分
- (3) 將各藥品倒入燒杯中，加適量蒸餾水
- (4) 加入一顆磁石，放置加熱板上，開始攪拌及加熱。
- (5) 加入 2%洋菜粉，成為固體培養基；不添加洋菜粉則為液體培養基
- (6) 固體培養基倒入錐形瓶，用鋁箔紙封口；液體培養基裝入有

蓋的試管中

(7) 放入滅菌釜，使用高壓蒸氣滅菌法滅菌

(8) 滅菌後，在無菌操作台內將固體培養基倒進培養皿內至適當深度，冷卻後使用。

2. 環境變因維持

(1) 在生長箱培養黴菌(37°C)，其內放一杯無菌水保持溼度

(2) 使用滅菌釜進行滅菌。

i. 待滅菌之物品封入滅菌袋，袋口貼一小段滅菌指示帶

ii. 放入滅菌釜中，調至 120°C、1.1atm、15 分鐘

(3) 所有實驗步驟皆在無菌操作臺中完成

3. 採集及培養菌種

(1) 以麵包及橘子培養自然環境中之黑黴菌(*Rhizopus stolonifer*)及青黴菌(*Penicillium notatum*)

(2) 採集到的黴菌，接種至培養基中，放在生長箱裡

4. 抽取黴菌分泌物

(1) 將黴菌接種在液體培養基中

(2) 四天之後(孢子成熟)，黴菌會在液體表面長出一層菌體

(3) 用針筒抽取底下含有分泌物的液體培養基，以無菌過濾模。

(MF-Millipore MCE membrane)過濾。得到黴菌分泌物

5. 面積百分比計算法

(1) 將紀錄黴菌生長的照片，以繪圖軟體(Photoimpact)開啟

(2) 用選取工具選取培養皿的面積

(3) 選取區的像素數得數據 A

(4) 黴菌生長的面積重複步驟(2)(3)得數據 B

(5) $(B/A) \times 100\%$ 即為黴菌生長面積所佔百分比

6. 對照組

(1) 在正常狀況下生長箱中培養的黴菌

(二). 黴菌的生長曲線

1. 使用接種環，從親代黑黴菌及青黴菌採集適量黴菌孢子

2. 在培養皿(含培養基)中央輕觸
3. 培養皿上標記放入生長箱中
4. 每隔一天，以數位相機拍照紀錄
5. 利用面積百分比計算法進行照片分析，畫出面積百分比與時間之生長曲線

(三). 競爭模式之兩側接種

1. 使用接種環，從親代青黴菌採集適量黴菌孢子
2. 接種在培養皿(含培養基)邊緣一端
3. 將黑黴菌接種在另一端
4. 培養皿上標記放入生長箱中
5. 每隔一天，用數位相機拍照紀錄
6. 同上 5.

(四). 競爭模式之同側接種

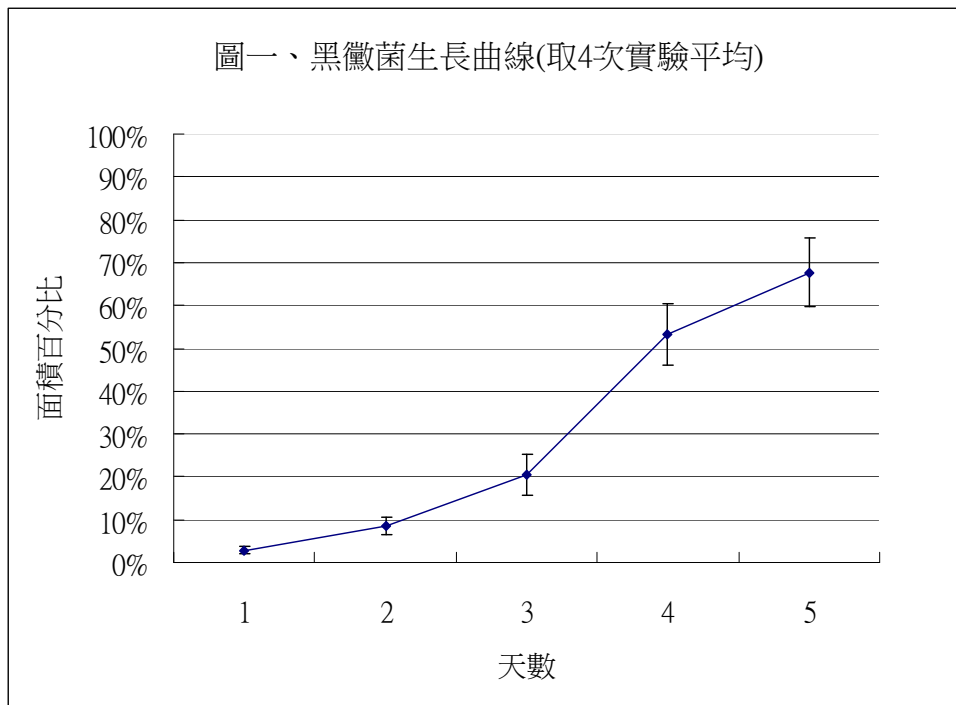
1. 使用接種環，從親代青黴菌採集適量黴菌孢子
2. 接種在培養皿(含培養基)邊緣一端
3. 將黑黴菌接種在青黴菌旁邊
4. 培養皿上標記放入生長箱中
5. 每隔一天，用數位相機拍照紀錄
6. 同上 5.

(五). 黴菌分泌物對另一種黴菌的影響

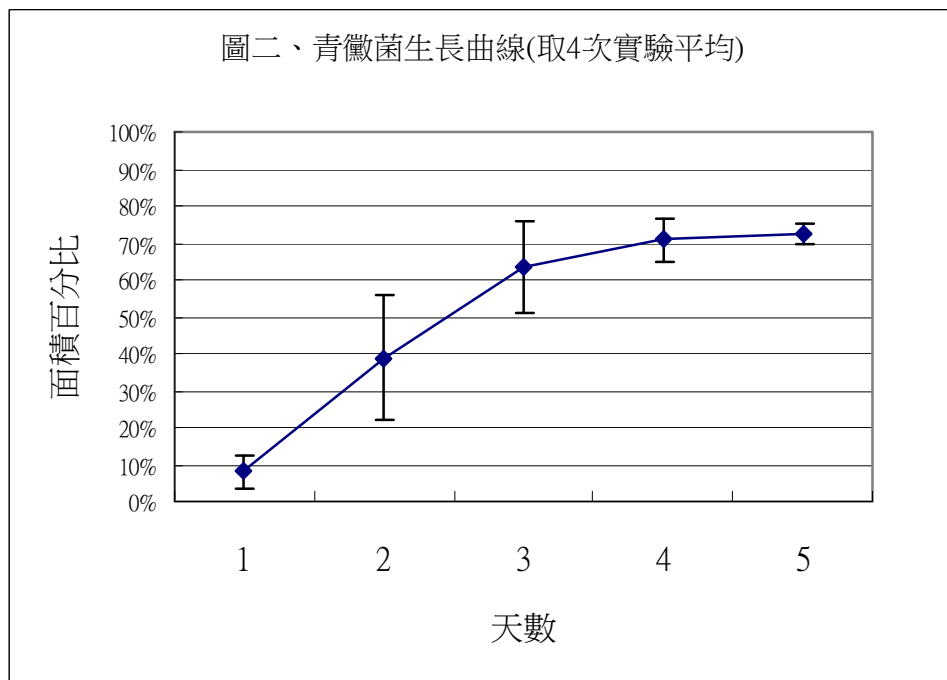
1. 抽取青黴菌的分泌物
2. 針筒內的液體，經過無菌過濾膜，過濾到培養皿(含固體培養基)中
3. 三個培養皿，分別加入有 1ml、2ml、3ml 的青黴菌濾液，分別接種黑黴菌
4. 另設置一對照組，含有 3ml 的純液體培養基，接種黑黴菌
5. 同上 5.
6. 相對的，重覆 1.~5.，取黑黴菌濾液，接種青黴菌，觀察其影響

六、 研究結果

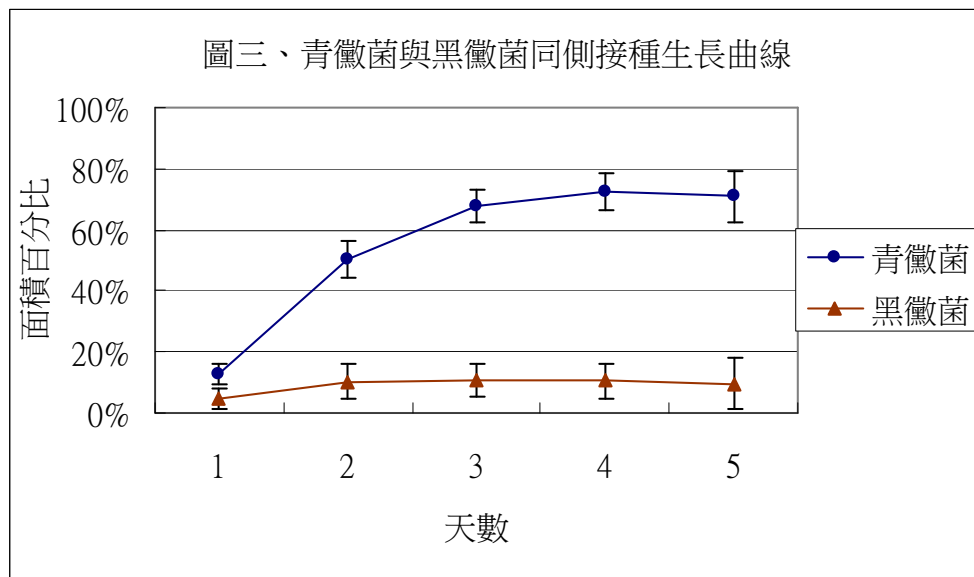
(一). 黑黴菌生長曲線：由圖一可發現約在第 4 天可達 50%面積。最後可達 67.69%



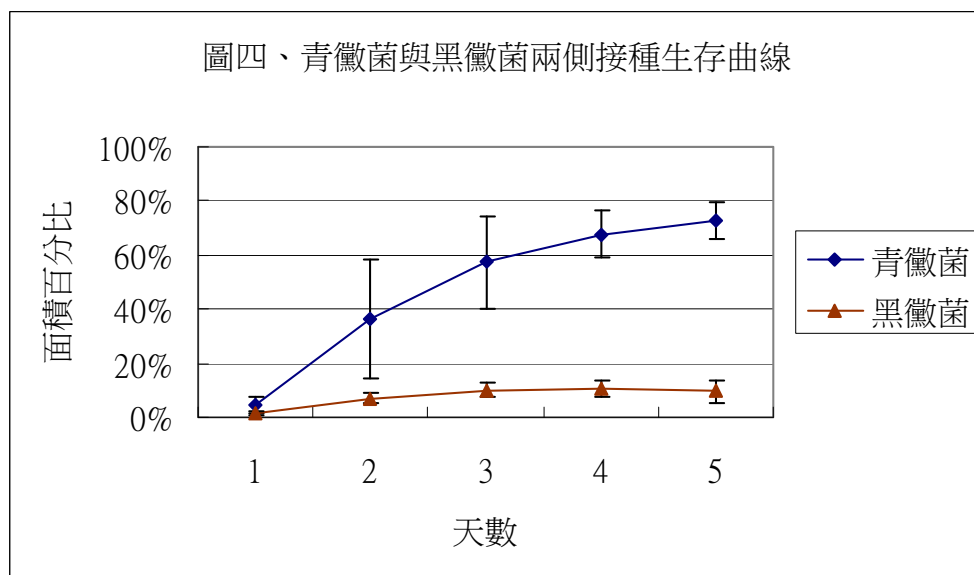
(二). 青黴菌生存曲線：由圖二可發現在第 4 天所達面積約 70%。生長速率較黑黴菌快



(三). 同側接種之競爭: (取 4 次實驗平均): 由圖三可發現, 同側接種青黴菌與黑黴菌, 青黴菌在第 4 天所佔面積可達約 70%, 而黑黴菌約 10%。顯示青黴菌擁有較高生存競爭優勢。

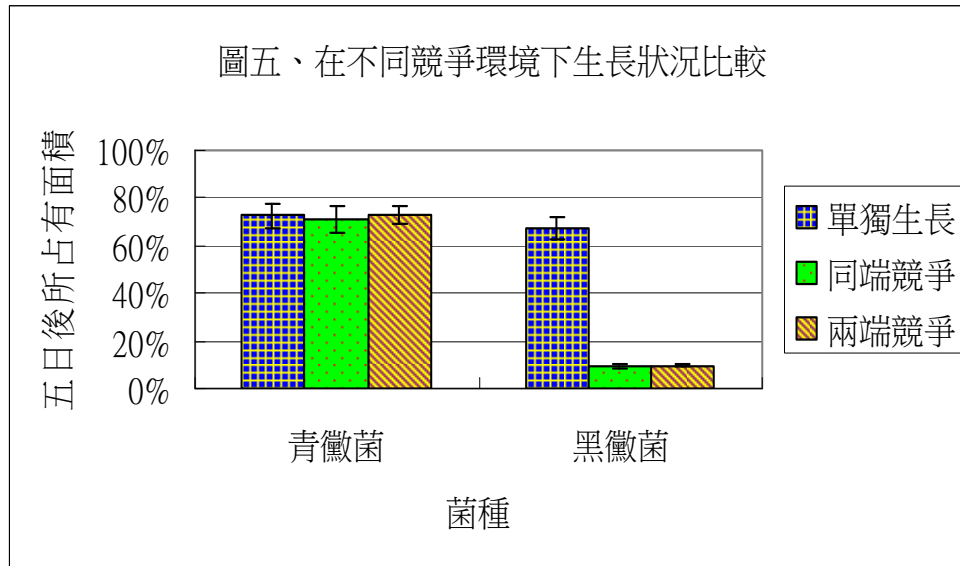


(四). 兩側接種之競爭: (取 4 次實驗平均): 由圖四可發現, 兩側接種青黴菌與黑黴菌, 青黴菌在第 4 天所佔面積可達約 60%, 而黑黴菌約 10%。也顯示青黴菌較黑黴菌擁有較高的競爭優勢

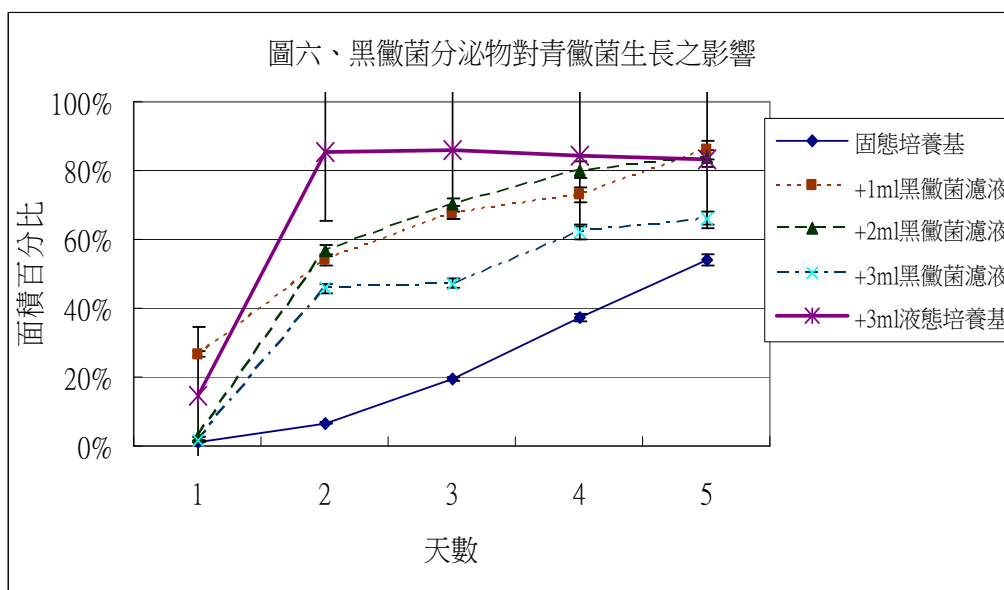


(五). 作競爭實驗時, 可觀察到兩種黴菌均不能完全消滅或殺死另一方, 推論兩者之間的關係應是競爭生存空間與養分的關係

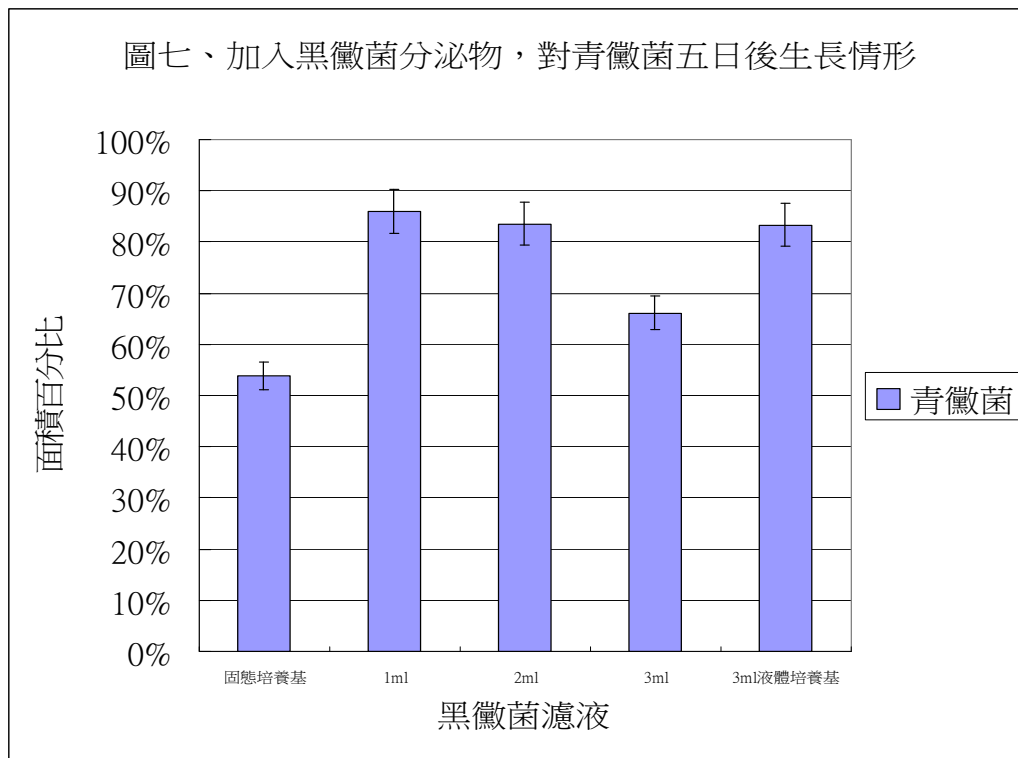
(六). 由圖五可知。作競爭實驗時，兩種黴菌擴展速率與單獨生長時的生長速率不同。青黴菌的生長與單獨生長速率相近，但黑黴菌生長的速率則被抑制。若將個別單獨生長時訂為 100，競爭時，青黴菌可達到約 100，黑黴菌約只有 14。當兩種黴菌在同一個環境中一起培養時，青黴菌似乎存在著抑制黑黴菌生長的因子。



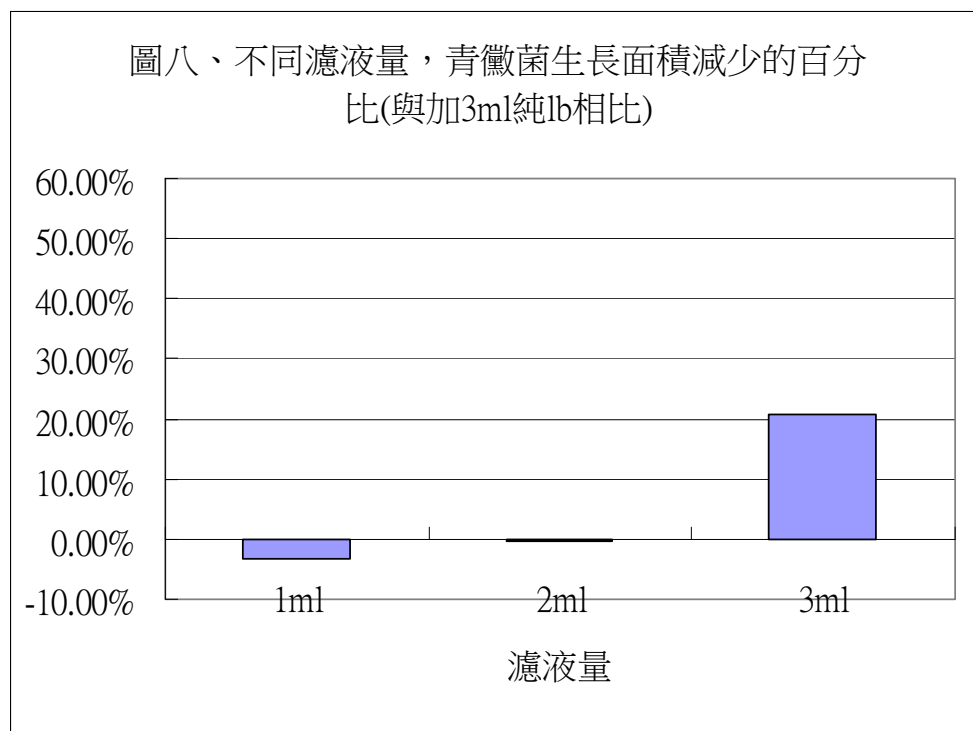
(七). 黑黴菌分泌物對青黴菌生長的影響：由圖六可知，青黴菌的生長情形與濾液的量並無明顯規則。有加液體培養基的培養皿，生長速率較未加液體培養基的培養皿的快。



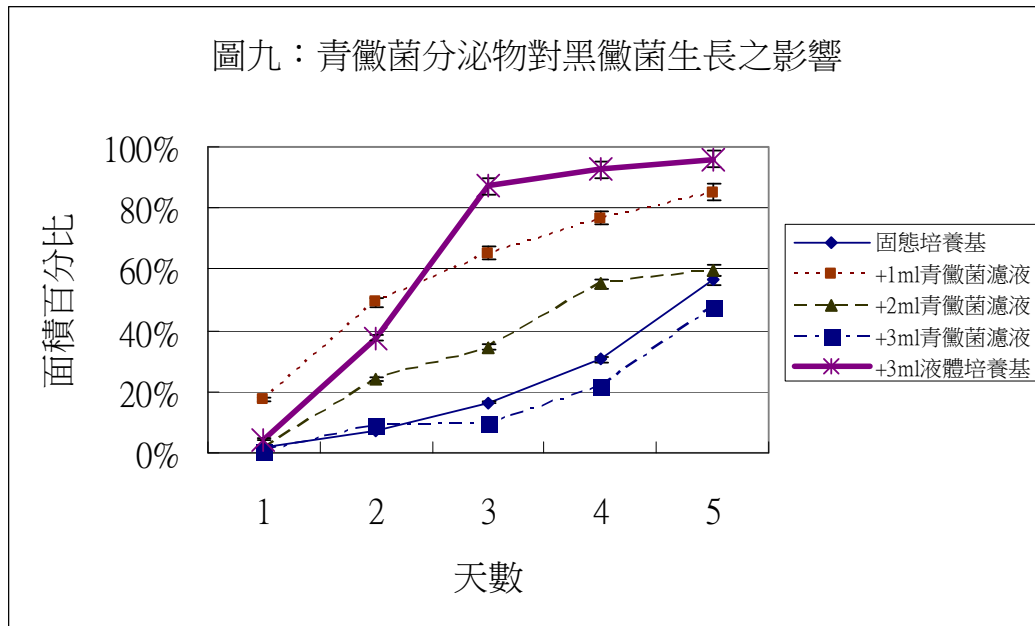
(八). 黑黴菌分泌物對青黴菌生長的影響：由圖七可知，黑黴菌分泌物對青黴菌的生長並無影響。



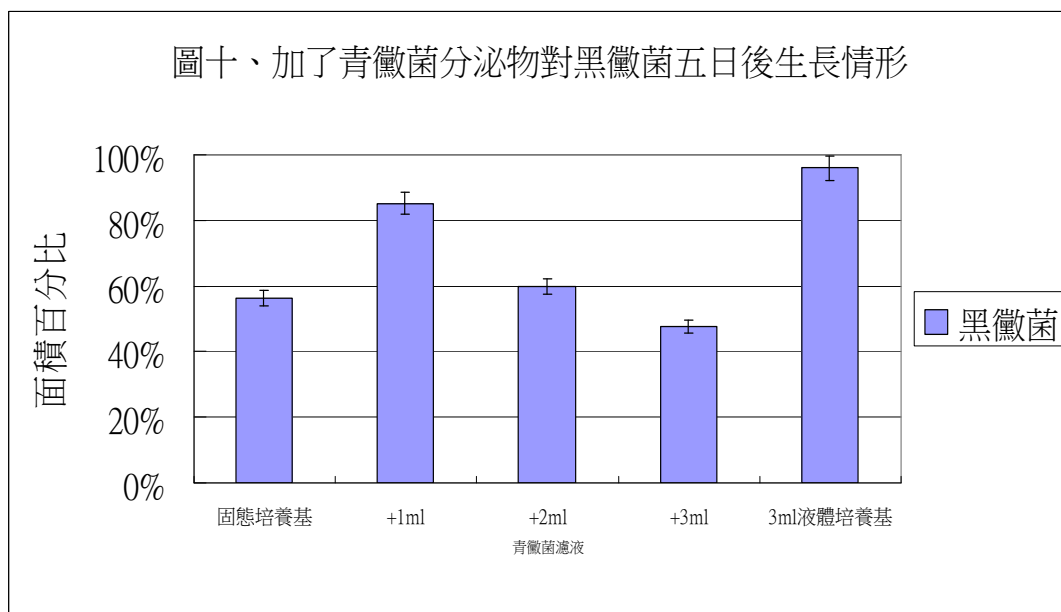
(九). 加入不量的黑黴菌濾液對青黴菌生長之影響情形與加入三毫升液體培養基比較，加入一毫升培養基濾液反而促進生長，加入兩毫升濾液無明顯影響，加入三毫升黑黴菌濾液約減少百分之二十支生長面積，由此可知黑黴菌濾液對青黴菌之生長無明顯影響



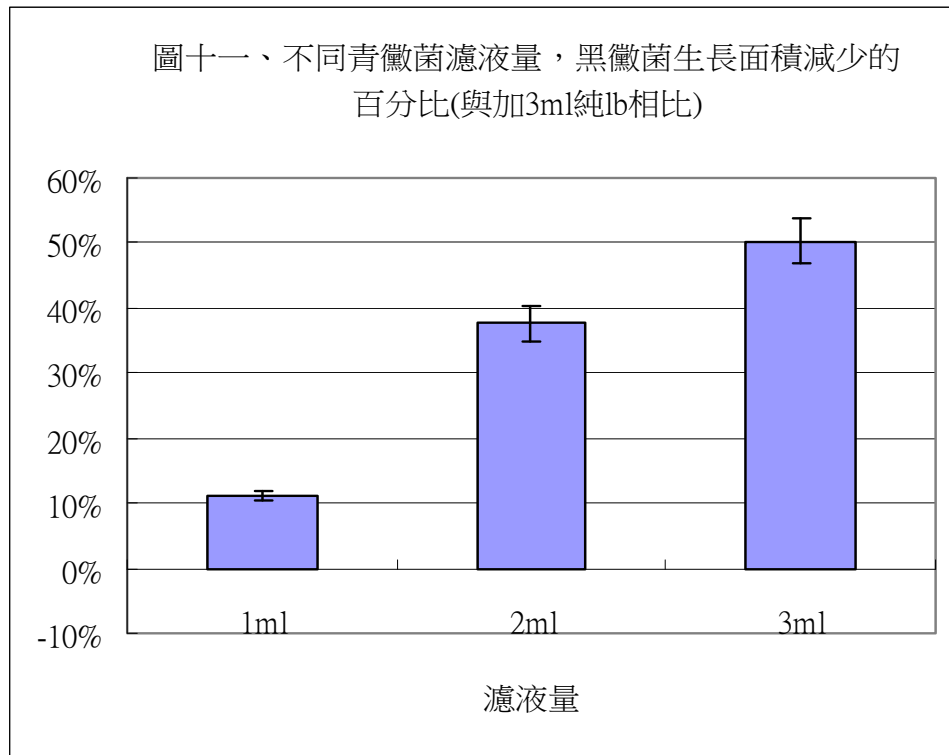
(十). 青黴菌分泌物對黑黴菌生長之影響：由圖九可知，加入濾液之量越多，黑黴菌的生長情況越差。加入液體培養基的培養皿除加入加入 3ml 青黴菌濾液之實驗外，生長量均比固態培養基生長速率快。



(十一). 由圖十可知，加入青黴菌濾液之量越多，黑黴菌的生長越受抑制



(十二). 比較加入不同量的青黴菌濾液後，黑黴菌生長受抑制的百分比。與加入 3ml 純液體培養基的相比，加入 1ml 青黴菌濾液，黑黴菌的生長約減少 10%、2ml 約減少 35% ， 3ml 約減少 50%，由圖可知青黴菌濾液量越多，黑黴菌受抑制的情形越明顯。



七、 討論

- (一). 在器材滅菌後，移出滅菌釜到無菌操作台，及實驗操作過程中，會因為人為操作疏失使培養基被空氣中的孢子或接種環上前一個操作的殘留孢子污染實驗結果，但經過謹慎的操作後有明顯改善的情形。
- (二). 在數次實驗中常常發現當進行青黴與黑黴接種在同一培養基中時，常常會在第二天後有小部份青黴長在黑黴旁邊，而在往後的幾天黑黴的生長範圍即被青黴的菌絲所包圍而被限制住了，對此我們懷疑是否為一種造成他的生長優勢的機制。
- (三). 我們以 Photoimpact(友立資訊股份有限公司出品)軟體比較黴菌在照片中所占有的像素與培養基的像素比例分析其生長速度。
- (四). 在接種黴菌孢子時，為求實驗的準確，應使接種的孢子數相等。但由於孢子體積太小，無法做到十分精確，僅能在接種時盡量少量為準。
- (五). 黴菌在生長培養時置於生長箱中，生長箱內的溫度維持在約 37°C，但培養基容易在幾天內便乾掉、阻礙黴菌生長。後來我們取一杯無菌水在培養箱中，使情況稍微改善
- (六). 在做濾液的實驗時，由於實驗器材暴露在空氣的時間較長，實驗易被細菌污染
- (七). 在濾液的實驗中，兩種黴菌都是在第二天突然增加了許多面積，應該是因為液體能幫助孢子傳播，而使黴菌能迅速擴張。
- (八). 青黴菌或黑黴菌到最後均不能占滿整個培養皿，研判應是養份不足

(九). 培養青黴菌的培養皿較養黑黴菌的不容易被污染，是否青黴具有可抑制它種微生物生長之機制，尚待進一步研究。

(十). 之後我們又選了第三種黴菌，加入實驗中，與青黴和黑黴同作競爭…等相關實驗。我們認為，若黴菌間有競爭力，應可排出三者之間的名次。我們發現的是這第三種黴菌生長速率遠遜於前二者，在競爭實驗時表現均輸給青黴菌和黑黴菌。

八、 結論

(一). 比較生長曲線可發現青黴菌的生長速率較黑黴菌為快。

(二). 青黴菌與黑黴菌，在同一個培養基生長時，在資源有限的生長空間，無論是從同一側開始接種、或是從不同側開始接種，青黴菌均較黑黴菌擁有較大的競爭優勢

(三). 在加入濾液的實驗中，黑黴菌濾液的量對青黴菌生長並無明顯抑制，推論黑黴菌濾液不影響青黴菌生長。而加入青黴菌濾液的量越多，可發現黑黴菌生長情形明顯受抑制，推論在濾液中存在某種物質能影響黑黴菌的生長

(四). 由此實驗中可發現，青黴菌對其他微生物的生長有明顯抑制情形，或許可解釋為何青黴素是最早被發現的抗生素

九、 未來展望

(一). 找出青黴菌分泌物中可抑制生長的成分

改變青黴菌的液體培養基，簡化液體培養基成分，以利分析青黴菌之分泌物。利用 GC(氣相層析儀) 分析青黴菌之分泌物，推估其可能成份，再依其可能成分設計吸附樹脂，再以此樹脂，利用 HPLC(高壓液相層析儀) 分離待測物之成分。進而分析其成分，日後可以大量培養純化或是藉由遺傳工程方式大量生產，或許可作為日後之黴菌抑制藥劑，成為生活中之防霉劑。

(二). 建立微生物競爭實驗的模式

可以利用此實驗之模式，改變競爭之生物，藉由相同方法，尋找其他生物抑制劑，分析成分而大量生產之。

十、 參考資料

(一). 劉英俊 汪金追、劉裕國，民 87；最新圖解生物科技基礎實驗法，初版，台北市，中央圖書：1-18

(二). Neil A. Campbell, 2005;Biology, 6th edition, 臺北市，台灣培生教育出版:763-779

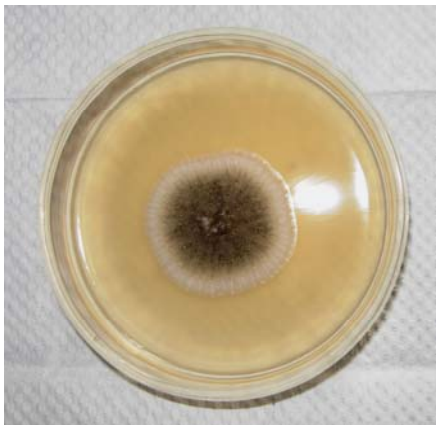
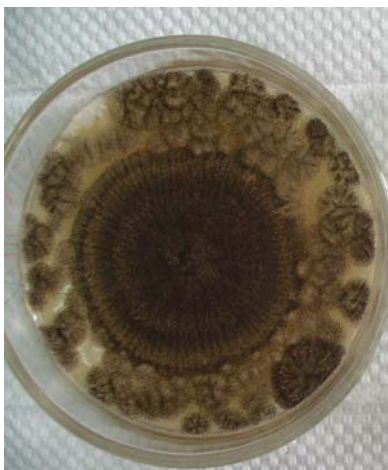
(三). 孫逸民 陳玉舜 趙敏勳 謝明學 劉興鑑，民 87；儀器分析，初版，台北市，全威書局：51-94

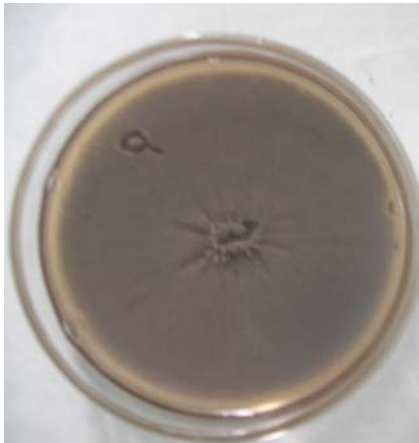
(四). 網站

http://www.nsc.gov.tw/_newfiles/popular_science.asp?add_year=2003&popsc_aid=215

吳天鳴 朱延和 （中正大學化學暨生物化學研究所）行政院國家科學委員會・科普知識 生命會自尋出路——細菌的抗藥性

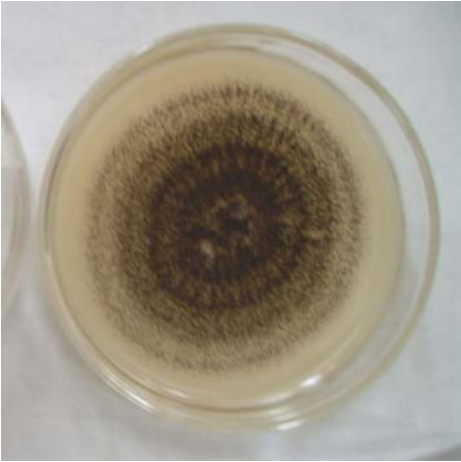
十一、 附錄

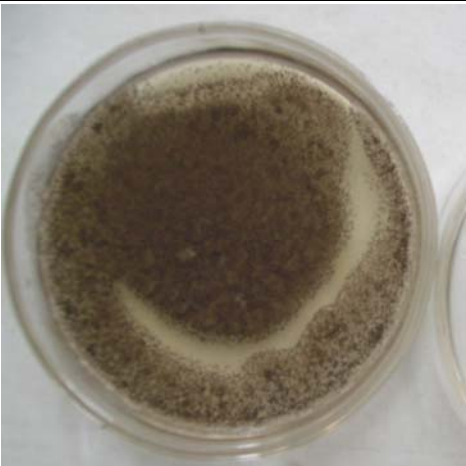
1. 黑黴菌生長照片			
	一日後		二日後
	三日後		五日後
2. 青黴菌生長照片			
	一日後		二日後

	三日後		四日後
3. 青、黑同側競爭照片(中央)			
	一日後		二日後
	三日後		五日後

4. 青、黑同側競爭照片(邊緣)			
	一日後		二日後
	三日後		四日後
5. 青、黑兩端競爭照片照片			
	一日後		二日後

	三日後		五日後
6. 黑黴菌濾液，青黴菌生長情形 (五日後)			
	正常狀況		1ml
	2ml		3ml

	1.5ml 純 1b		
7. 青黴菌濾液，黑黴菌生長情形			
	正常狀況		1ml
	2ml		3ml

	1.5ml 純 1b		
---	---------------	--	--