

# 【2021 全國科學探究競賽-這樣教我就懂】

## 高中（職）組成果報告表單

題目名稱：遺珠之憾·陰魂不散

### 一、摘要：

乳酸菌是我們耳熟能詳的益生菌，本實驗旨在「從泡菜及嬰兒糞便分離乳酸菌，達到抑制白色念珠菌的效果」。白色念珠菌是造成陰道炎耳熟能詳的元凶，白色念珠菌會因應環境在酵母菌及菌絲型之間轉換，造成黏膜破壞且形成生物膜難以消滅。本實驗自食物和嬰兒糞便中篩選乳酸菌，透過分別在 MRS 培養盤加入碳酸鈣和中性紅，選取具有酸性特質的菌落，再以革蘭氏染色法選出陽性的乳酸菌候選菌株。將候選菌株與白色念珠菌共同培養，並使用 transwell 共培養系統檢測乳酸菌對白色念珠菌的抑制效果。

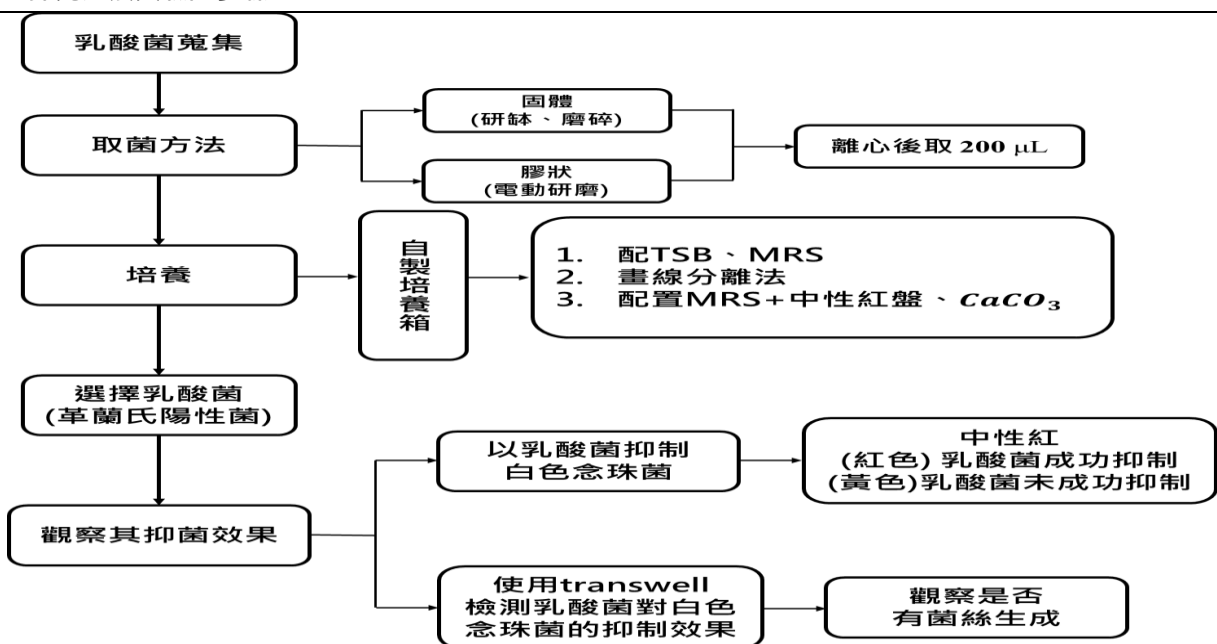
### 二、探究題目與動機

大約數個月前，我的媽媽深受陰道炎所苦，不僅在陰部會有白色無臭、半固態的濃稠分泌物，外陰有明顯搔癢感，伴隨腫脹。讓她深感困擾，晚上更是因為搔癢難耐而難以入眠，於是我們發想了這個主題，希望能幫助更多陰道炎患者能快速好轉。

### 三、探究目的與假設

白色念珠菌是二型性真菌，可在酵母菌與菌絲型態間相互轉換，常見於泌尿生殖道黏膜，是造成陰道炎最主要元凶。醫療上給藥治療多半只能消除酵母菌型態，然而轉換成菌絲型後會侵襲黏膜並形成生物膜常駐患處，抗真菌用藥也不易穿透以致極難根除。故本實驗針對市售乳酸菌產品及發酵產品來分離乳酸菌，經「乳酸菌分離純化」、「抗真菌活性定性分析」、「抗真菌活性定量分析」等方法進行實驗，探討對人體安全的乳酸菌對白色念珠菌的抑制效果。

### 四、探究方法與驗證步驟

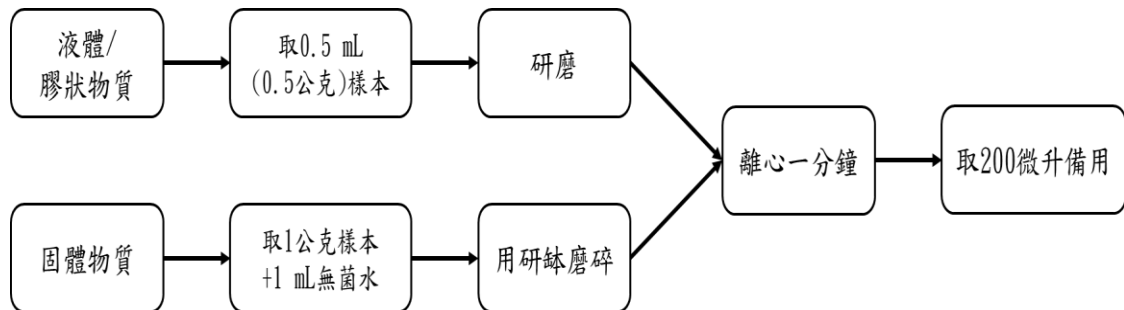


一、挑選可能含有乳酸菌之樣本

	乳酸菌來源	取得
食品	豆腐乳	超市購買
	酸菜	菜市場購買
	鳳梨	水果行購買
	黃金泡菜	超市購買
	優格	超市購買
	番茄糊	超市購買
	紫蘇梅嫩薑	超市購買
	百香果青木瓜絲	自製
其他	新生兒糞便 ( 偏酸 )	班導四個月大的小孩



(一) 進行乳酸菌採樣

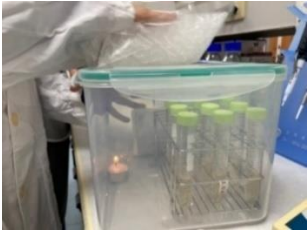



(二) 培養樣本中的菌

1. 配置 TSB 液體培養基
2. 配置 MRS 培養平盤

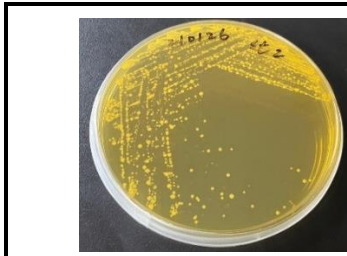
(三) 放入自製厭氧箱中培養 ( 圖一 ) :

1. 將培養基放入密封保鮮盒。
2. 將蠟燭點燃使之消耗大部分氧氣。( 須用冰塊降溫，防止盒子變形 )
3. 內置暖暖包使鐵粉氧化 ( 消耗保鮮盒中剩餘的氧氣 )。
4. 即可創造厭氧環境。( 圖二 )

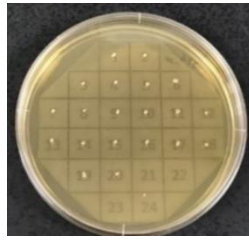
放入自製厭氧箱中培養	
	
( 圖一 ) 密封盒點燭火自製厭氧箱	( 圖二 ) 燭火(右)熄滅後 暖暖包(左)去除餘氧

#### (四) 劃線分離法、編號法點菌接種

我們採劃線分離法培養單一菌落，利用殺菌接種環在培養基上逐次劃直線，使其達到逐漸稀釋效果。為了挑選適合乳酸菌，我們先將所有分離菌落編號，並且利用自製定位透明片，貼在培養基後方將培養基區域分隔，給予相對應編號以利日後辨識菌株。



(圖三) 劃線分離法以 MRS 培養平盤分離乳酸菌



(圖四) 挑選菌落生長於定位培養基正面



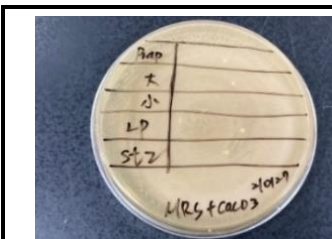
(圖五) 挑選菌落生長於定位培養基背面

#### (五) 選擇乳酸菌樣本

為了確保我們所取之菌種皆為乳酸菌，我們需要以上述的點菌接種方式（編號法）將其培養在 MRS+CaCO<sub>3</sub> 培養平盤、或是 MRS+中性紅培養平盤，以市售膠囊乳酸菌之 *L. rhamnosus* GR1、*L. reuteri* RC14、及泡菜分離 *L. plantarum* 三種菌作為對照組，觀察其是否在培養基產酸溶解CaCO<sub>3</sub>出現明顯清除圈（圖六），同時也在中性紅培養基呈現酸性紅色樣態（圖七）。最後以革蘭氏染色法鑑定出革蘭氏陽性即可確定乳酸菌。

1. 配置 MRS+中性紅培養基(圖六)
2. 配置 MRS+CaCO<sub>3</sub> 培養基(圖七)
3. 革蘭氏陽性菌(圖八)

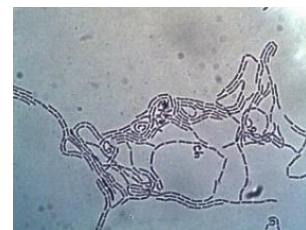
綜合以上方式，我們得以確立所挑選自食物樣本中之菌為乳酸菌。



(圖六) MRS+CaCO<sub>3</sub> 培養平盤菌落周圍清除圈



(圖七) MRS+中性紅培養平盤菌落呈現紅色



(圖八) 100X 油鏡放大下呈現革蘭氏陽性的桿菌

#### (六) 使用 96 孔培養盤觀察乳酸菌對白色念珠菌之抑制效果。

由於白色念珠菌是第二級危險群微生物，必須在 BSL-2 實驗室中操作，我們經由嘉義大學微藥系老師協助申請並取得核可(核准編號 109B2-14)，也完成生物安全訓練後在老師指導下進行相關實驗。

配置模式：

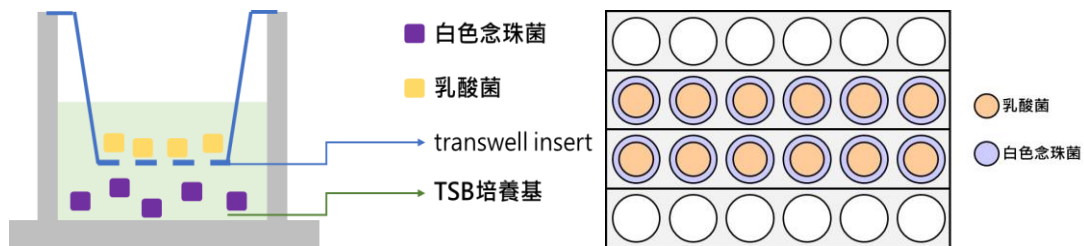
1. 取 0.3 g 的中性紅完全溶於 10 mL 的無菌水。
2. 在無菌操作台中以 0.22 μm filter 過濾滅菌。

3. 取上述 50  $\mu\text{L}$  的中性紅液體加入 100 mL 的 TSB 培養液中。
4. 取步驟(3)之溶液 100  $\mu\text{L}$  分別加入 96 孔培養盤其中的 28 孔中。重複製作兩盤。
5. 加入從泡菜、嬰兒糞便分離的 26 個樣本培養液各 2  $\mu\text{L}$ ，依序加入裝有 TSB 培養盤微孔中。(含一隻陽性的乳酸菌對照組)
6. 加入 1  $\mu\text{L}$  白色念珠菌 SC5314 (野生二性型)、HLC54 (酵母菌型)於培養盤中。

(七) 使用 transwell 檢測乳酸菌對白色念珠菌的抑制效果

配置模式：

1. 在 transwell 的培養盤中央兩排底部分別加入 1 mL 的 TSB，接種白色念珠菌。
2. 將 5  $\mu\text{L}$  的乳酸菌加入中央兩排 transwell insert 上方槽內。
3. 共同培養並用倒立顯微鏡觀察底部白色念珠菌生長結果。



五、結論與生活應用

(一) 由於白色念珠菌的最適酸鹼約 6.8~7.5 之間，因此我們使用中性紅(變色範圍 pH6.4~8.0 之間)來檢測該孔培養液的酸鹼值，若乳酸菌成功抑制白色念珠菌會產生乳酸而呈現紅色(pH 值呈現酸性)，相反的，如果白色念珠菌抑制了乳酸菌的生長則會因為分解胺基酸變鹼而呈現黃色(pH 值高於中性)。

因此我們可以對應出以下結果:

1. 可成功抑制酵母菌型 HLC54 的乳酸菌株為:

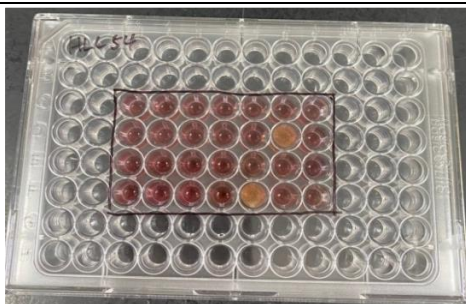
泡菜：1, 3, 5, 8, 11, 12, 14, 20

嬰兒糞便 ST2：2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20

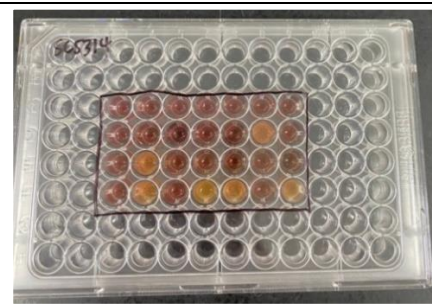
2. 可成功抑制野生二性型 SC5314 的乳酸菌株為:

泡菜：1, 3, 5, 8, 11, 12, 14, 20

嬰兒糞便 ST2：2, 3, 4, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19

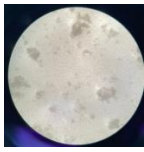
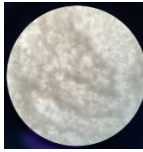

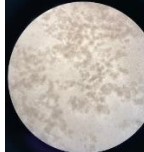
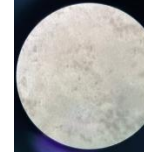
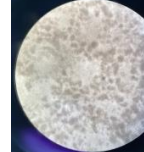
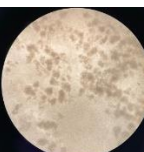

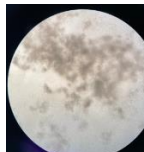

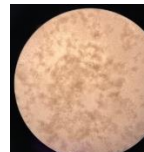
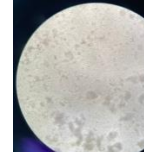


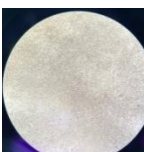

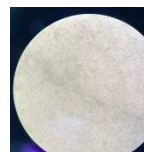
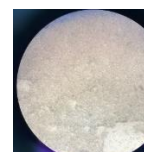

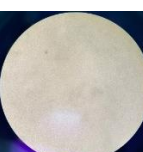
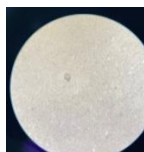




抑制酵母菌型 HLC54 呈現紅色



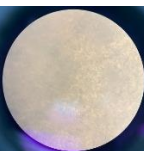
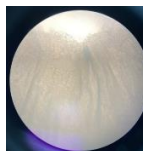
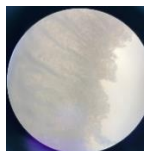
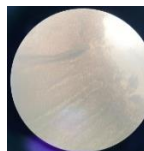
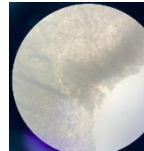
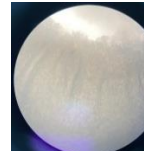
抑制野生二性型 SC5314 呈現紅色

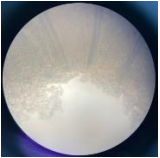
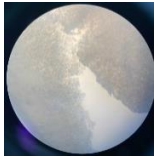
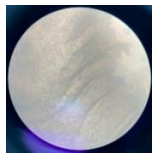
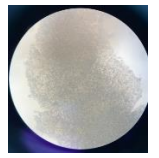

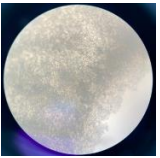
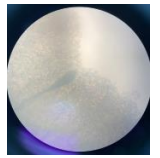
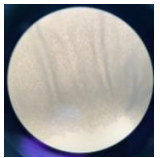
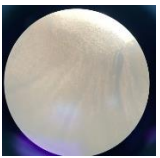
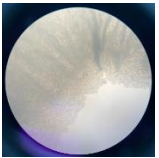
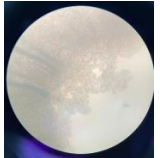
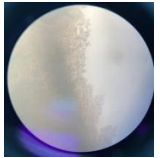
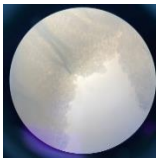
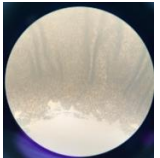

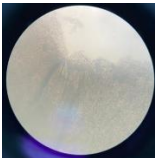
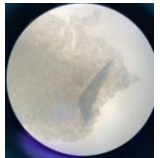
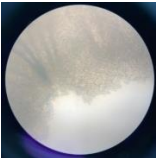
(二) 使用 transwell 檢測乳酸菌對白色念珠菌的抑制效果

野生二性型 SC5314 transwell 培養 (大量生長會出現菌絲以及複雜多層生物膜)						
樣本名稱	ST2-2	ST2-3	ST2-4	ST2-8	ST2-9	ST2-10
觀察結果						
有無菌絲	無	有	有	有	有	有 但受抑制
樣本名稱	ST2-13	ST2-14	ST2-15	ST2-16	ST2-17	ST2-18
觀察結果						
有無菌絲	有 但受抑制	有 但受抑制	有	有	有	無
樣本名稱	ST2-19	泡菜 1	泡菜 3	泡菜 5	泡菜 8	泡菜 11
觀察結果						
有無菌絲	無菌絲，類似酵母菌單層膜					
樣本名稱	泡菜 12	泡菜 14	泡菜 20	右圖為 市售女性私 密處益生菌 保健膠囊	Lrh_GR1	Lre_RC14
觀察結果						
有無菌絲	無菌絲，類似酵母菌生物膜				無菌絲	有菌絲

我們使用 HCL54 和乳酸菌共同培養，並以倒立顯微鏡觀察，  
結果發現其長出了大面積的單層膜酵母菌型態。

酵母菌型 HLC54 transwell 培養 (大量生長會出現菌絲以及多層厚度生物膜)

樣本名稱	ST2-2	ST2-3	ST2-4	ST2-8	ST2-9	ST2-10
觀察結果						
樣本名稱	ST2-11	ST2-12	ST2-13	ST2-14	ST2-15	ST2-16

觀察結果						
樣本名稱	ST2-17	ST2-18	ST2-19	ST2-20	泡菜 1	泡菜 3
觀察結果						
樣本名稱	泡菜 5	泡菜 8	泡菜 11	泡菜 12	泡菜 14	泡菜 20
觀察結果						

研究結論：

1. 泡菜、嬰兒糞便可分離出乳酸菌。
2. 上述乳酸菌可篩選出抑制白色念珠菌的菌株。
3. 可抑制酵母菌型白色念珠菌的乳酸菌，部分仍無法抑制野生二型性白色念珠菌，顯示型態變換與形成生物膜可能抵抗乳酸菌抑菌功能。
4. 未來可以進一步分析共培養抑制白色念珠菌的乳酸菌菌株，是否在含有酸鹼緩衝劑控制在中性的環境下還可以抑制白色念珠菌生長或是生物膜形成，如果抑制能力不因乳酸產酸受到影響，就可能找到可以生產抑制白色念珠菌的分子了。

參考資料

1. 台灣乳酸菌協會。2021年1月15日。取自：<http://www.talab.org.tw/knowledge.htm>。
2. 呂佳華。2012。乳酸菌胞外多醣生產條件及影響 FL83B 肝細胞葡萄糖帶入量與肝醣合成探討。取自：<http://thuir.thu.edu.tw/retrieve/18786/100THU00253022-001.pdf>。
3. 李卓然（2015）。手心的太陽怎麼運行？暖暖包的科學。取自：<https://pansci.asia/archives/73322>。