中華民國第 64 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組　農業與食品學科

團隊合作獎

052208

發光蛋——簡易發光細菌培養法

學校名稱： 國立新竹科學園區實驗高級中等學校

作者：	指導老師：
高二 胡恬 高二 劉名峻 高二 戴世炘	揭維邦

關鍵詞： 替代培養基、螢光強度、教育應用

發光蛋-簡易發光細菌培養法

摘要

現況下，國中小對於微生物培養並不普及，主因在於沒有足夠經費與設備。本研究發現使用：水解乳清蛋白、濃縮乳清蛋白、雞蛋蛋白等可以替代 LB 培養基。且各項替代培養基金錢成本比起 LB 皆下降七成至九成，並且有六種替代培養基於第 24 小時平均光強度皆大於 LB 培養基，且替代培養基中最高平均發光強度為 0.296 較同時間的 LB 之數值 0.046 高。此外，使用電鍋滅菌雖無法完全無菌，但仍有一定能力可作為滅菌釜的簡易替代；自製操作台則有替代無菌操作台的之較高可行性。本研究並發現雞蛋液態和固態培養基的製作，其材料簡單、培養效果佳，故具備中小學教學推廣的價值，以及發光細菌在毒物檢驗中的應用等極具有推廣的潛力。

壹、 前言

一、研究動機

在求學的過程中，我們在課本上學習到很多關於細菌和微生物的知識，知道這些肉眼無法輕易看見的微小生命廣泛存在於世界上各個角落。雖然很微小，但他們在自然的運行中扮演重要的角色，扮演生產者、消費者和分解者。對於人類而言，細菌和微生物可能是互惠的盟友也可能是相互廝殺的敵人，也可能是人類的工具用來發酵或製作胰島素等等。雖然這些微生物如此重要，但我們在過去卻從未親驗見識到或參與和微生物相關的實驗。這樣的現況可歸咎於微生物實驗的設備及材料專業門檻高，採集到鑑定種類需要極為繁瑣的過程和專業設備。又加上金錢門檻高，如高溫高壓滅菌釜、無菌操作台和 LB 培養基於國中小並無標配（行政院公報，2019），且實驗經費不高且多只補助於特定實驗學校（教育部，2021），所以微生物實驗在國中小階段並不常見。

在查找資料我們發現「發光細菌」可以利用其發光的獨特能力以肉眼

篩選，藉由這樣的方式可以節省繁瑣的鑑定過程。且實驗的操作對於學生在學術方面和學習參與度上都有好處（Steele, 2023），因此我們認為親身觀察和操作發光細菌培養實驗可以更認識細菌的生命樣態以及保持乾淨衛生的根本方法及原因，有助於學生對於細菌和自然有更深的了解。

所以本實驗希望能研發出培養發光細菌所需材料及設備的替代方法，降低培養發光細菌所需的金錢成本，同時利用生活中可見的材料增加替代方案的方便性，使微生物觀察實驗變得簡易且容易上手，開發其蘊含的教育意義，並實現普及細菌實驗及觀察的願景。

二、研究目的

（一）找出市面上容易取得的替代培養基材料

（二）測試出經濟實惠且有效果之替代培養基配方

（三）測試簡易的無菌操作台及家用大同電鍋滅菌可行性

（四）研發易於觀察的發光蛋教具

（五）試驗發光細菌之應用方法

三、文獻回顧

（一）LB 培養基的主要成分探討

1.胰蛋白胨（Tryptone）

胰蛋白胨由酪蛋白（casein）經過胰臟水解酵素水解而成。酪蛋白為牛奶中的蛋白質的主要成分，佔約 80%，其主要由 α_{S1}-、α_{S2}-、β-、k-casein 四種蛋白質所組成（Gigli, 2016）。

2.酵母萃取物（Yeast Extract）

酵母萃取物主要由自溶啤酒酵母提取而成，可以透過機械破碎、酶裂解、有機溶劑或使用鹽作為增溶劑的自溶等方式破壞酵母細胞以萃取其中養分（Tao *et al*., 2023）。酵母萃取物富含核苷酸、蛋白質、胺基酸、醣類和維生素 B 及多種微量元素（Tao *et al.*, 2023），主要的營養成分為 35~40% 游離胺基酸的部分水解蛋白質，而主要之胺基酸為谷氨酸

（glutamic acid），其中遊離谷氨酸和總谷氨酸的含量分別佔約 5% 和 10%（Tomé, 2021）。

（二）胰蛋白腺替換物成分探討

1.乳清蛋白（whey protein）

乳清蛋白是乳製品加工的副產物，它約佔用轉化為成熟乳酪的牛奶體積的 84-80%，並保留了約 55%的牛奶營養成分（Sinha *et al*., 2007），其主要成分為 β-乳球蛋白（β-lactoglobulin）、α-乳白蛋白（α-Lactalbumin）、血清白蛋白（serum albumin）、免疫球蛋白（immunoglobulins），且含有高含量的含硫胺基酸，具有抗氧化功能（Sophia, 2019）。

2.濃縮乳清蛋白（whey protein concentration）

濃縮乳清蛋白是超濾膜過濾（Ultrafiltration, UF）乳清蛋白的產物，隨著濃縮次數增加及水透析過濾，可得整體蛋白質含量約達 80%、脂肪含量 7%、乳糖含量 4% 與灰分含量 3.1% 之濃縮乳清蛋白產品（Sophia, 2019）。

3.水解乳清蛋白（whey protein hydrolysate）

水解乳清蛋白是乳清蛋白水解後的產物，原來的乳清蛋白中 β-乳球蛋、α-乳白蛋白的肽鍵約分別有 65%和 40%遭破壞，因此在水解乳清蛋白中是短鏈鍵佔主要的地位（Melnikova *et al.*, 2022）。

4.雞蛋蛋白

蛋清是一種凝膠狀結構，缺乏脂質，主要由水組成（約 88%），在蛋清中總共鑒定出 150 種不同的蛋白質，且卵清蛋白占蛋清蛋白總量的 50%，其中含有多種必需胺基酸，目前被認為是為了提供雞胚生長養分。（Réhault-Godbert *et al.*,2019）。

（三）酵母萃取物替換物成分探討

1.酵素糖

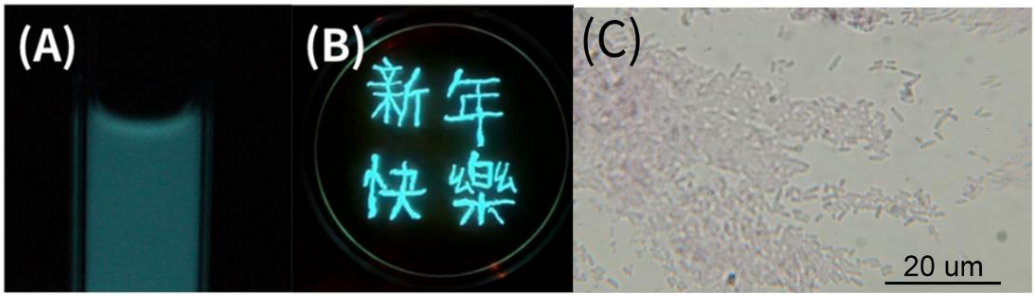
以黑金磚原味酵素糖為例。酵素糖具有糖蜜酵母粉，糖蜜酵母粉是將

甘蔗加工製糖後產生的副產物糖蜜，進行發酵後產生，含有多種酵母蛋白。且酵素糖中亦含有鈣粉、維結晶纖維素以及綜合酵素（鳳梨酵素、木瓜酵素、蛋白質分解酵素、澱粉分解酵素、脂質分解酵素）（黑糖生活館，2024）。

2.實驗級活性乾酵母

活性乾酵母 （ADY） 源自於釀酒酵母，廣泛用作動物日糧中的飼料添加劑 （Ma *et al.*,2021），且酵母菌含有豐富的蛋白質、維生素等養分，可以提取輔酶 A、細胞色素 C、腺核苷三磷酸 （ATP） 等生化原料產品。（陳裕星等，2005）

（二）實驗所用之發光細菌



圖一、實驗用之發光細菌圖。(A)液態培養基的發光情形；(B)塗盤的發光情形；(C)革蘭氏染色複式顯微鏡下之觀察。（圖片來源：實驗者自行拍攝）

發光細菌（圖一），是自然界能發出生物螢光（Bioluminescence）的生物之一。生物發光的常見目的為吸引獵物、嚇阻捕食者、消光剪影（英文：Counter-illumination）和個體之間溝通，但目前不確定發光細菌發光的主要目的為何，有觀察發現其可在魚隻糞便中發光以吸引其他魚隻食取有發光細菌之糞便，延續種族（Brodl,2018）。發光細菌大多分布在兩個數別之中，分別是 Vibrio（弧菌屬）和 Photobacterium（發光菌屬）兩者皆為革蘭氏陰性菌，常存在於海洋及魚和軟體動物之體表和消化道中，甚至有些魚和烏賊和發光細菌存在共生關係（揭維邦，1994）。因其具有特殊的發光基因（lux gene）、螢光酵素（Luciferase）和螢光素（luciferin），所以最大

特色在於他們可以在養分及氧氣充足的情況下持續放出藍色（490nm）的生物螢光（揭維邦，1994），我們利用這個特性來簡化細菌鑑定和純化之步驟。

（四）使用 ImageJ 分析相機拍攝的發光情形

此為測定光強度的方法，將照片轉換成 8-bit 模式後反轉照片，將照片進行校正並在其 function 欄位選擇 uncalibrated OD，這一步驟將八點陣圖像的灰度值轉換為未校正的光密度值，通過這一公式 Uncalibrated OD = log10(255 / (255 - Gray Value))可得知所得出的值為吸光值，選定閾值來框選圖片中的光訊號，最後透過軟體分析被圈選範圍中的平均螢光強度。（Ferreira & Rasband,2012）

（五）菌種鑑定

1.革蘭氏染色

革蘭氏染色法是由一位丹麥微生物學家漢斯-克理斯蒂安-革蘭(Hans Christian Gram)於 1884 年發明，是現今常見的鑑別菌種的方法。其主要原理是利用細菌細胞壁之構造差異來區別細菌。革蘭氏陰性菌的細胞壁有較多的脂質，再利用結晶紫及碘液染色後以 95%酒精沖洗處理時會將部份脂質萃取並帶走結晶紫-碘複合體使其脫色，再以番紅染色，顯微鏡下觀察細菌最終呈現紅色。陽性菌則因細胞壁中幾乎脂質存在，酒精沖洗反而會使細胞壁脫水讓結構更緻密，將結晶紫-碘複合體細胞壁中。（楊文仁，2018）

2.革蘭氏陰性腸內桿菌的鑑定

API 20E 套件是一個識別系統適用於腸桿菌科細菌和其他非挑剔的革蘭氏陰性菌，使用 21 個標準化以及小型生化測試和資料庫。

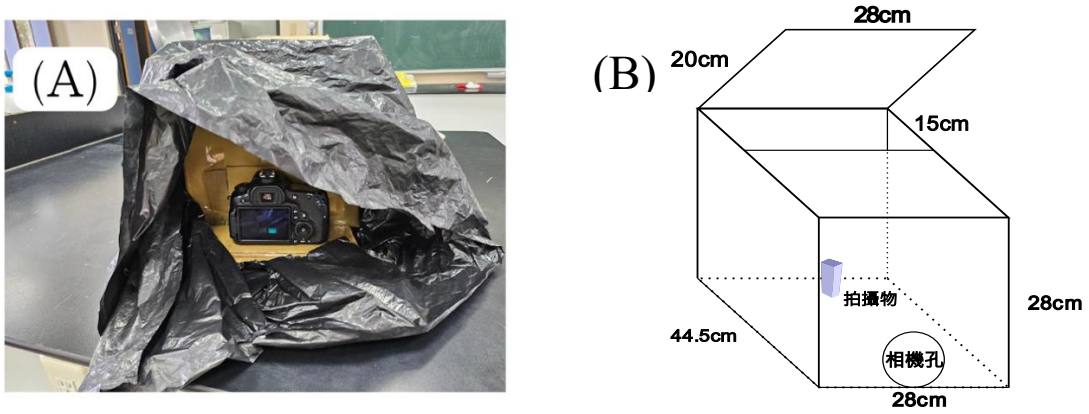
它由 21 個含有脫水的微管組成基材。（Topic Popovic *et al.*,2007）檢驗組合中包含各式可供酵素梅分解之物質和酸鹼指示劑。當細菌存在特定酵素酶時，分解後產物可使酸鹼指示劑變色，讓使用者觀察到被測菌株具有此特

性。

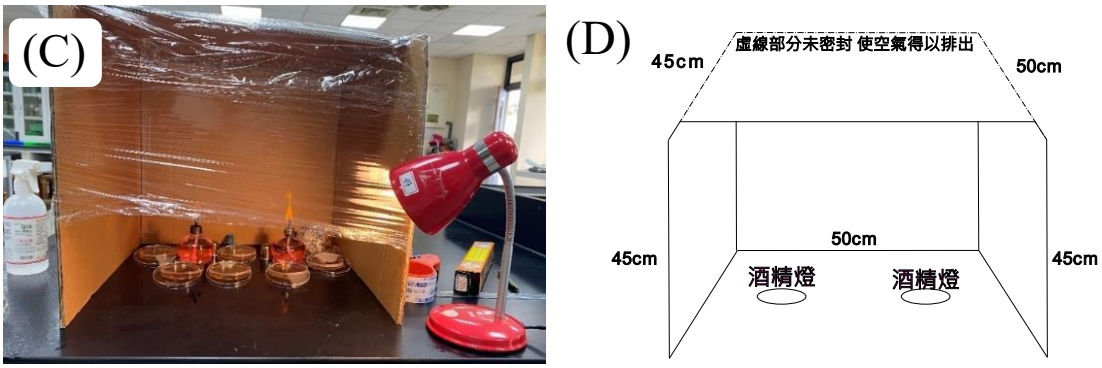
貳、 研究設備及器材

表一、研究設備與器材。

儀器	自製器材
高溫高壓滅菌釜、無菌操作台、恆溫培養箱、恆溫震盪箱、分光光度計	自製小暗室（圖一）、 自製簡易操作台（圖二）
工具器材	**替代材料**
錐形瓶、燒杯、鋁箔紙、接種環、酒精燈、酒精、石蠟膜、酒精棉球、鑷子、已滅菌塑膠培養皿、玻璃培養皿、保鮮膜、採集細菌管、pipette tips、pipette、電鍋、塑膠比色管、相機、API 20E	蛋白質： Tryptone、水解乳清蛋白、濃縮乳清蛋白、雞蛋。 營養補充物：酵母粉、酵素糖、Yeast Extract。 標準培養基： LB Agar Broth。 其他：Agar、食鹽、蒸餾水



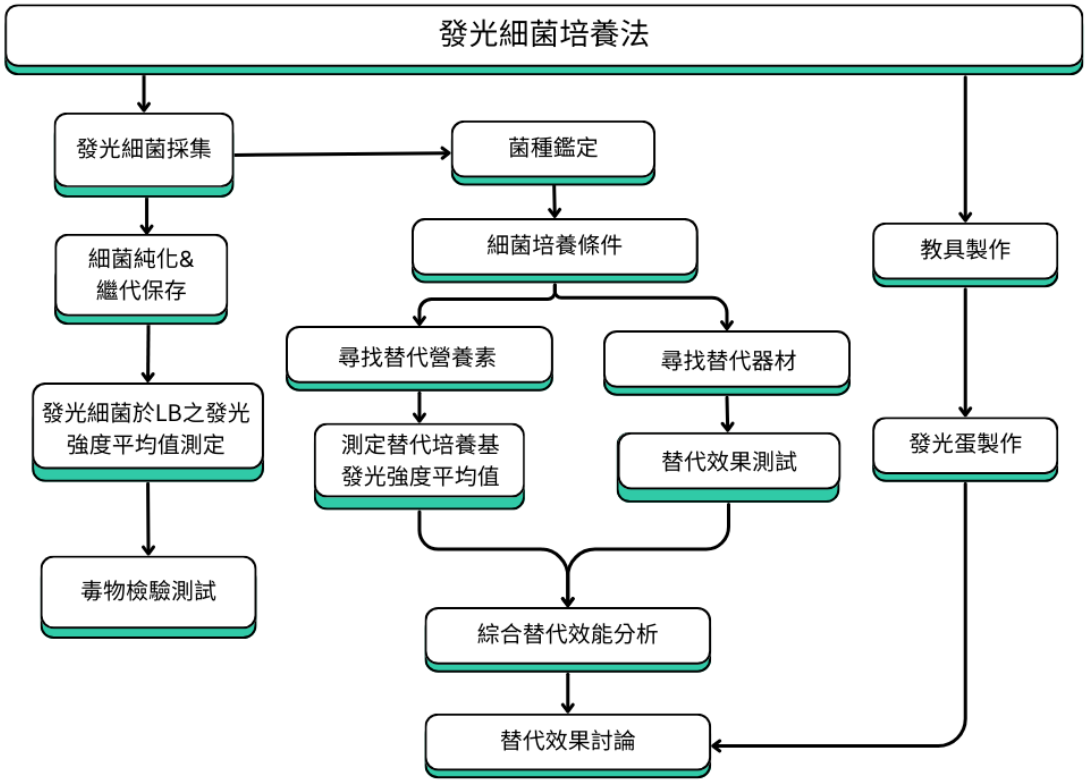
圖二、自製小暗室。(A)正面相機置處；(B)結構示意圖。（圖片來源：實驗者自製）



圖三、自製簡易操作台。(C)簡易操作台正面；(D)結構示意圖。（圖片來源：實驗者自製）

參、 研究過程或方法

一、實驗架構圖



（圖片來源：實驗者自製）

二、發光細菌之採集與純化

（一）發光細菌的採集

1.採集地點：新竹南寮漁港魚鱗天梯旁之沙灘。

2.採集魚種：沙梭（*Sillago aeolus*）。（圖四）

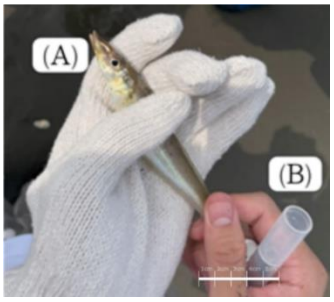
3.採集步驟：

（1）將剛被釣取的沙梭固定於手。

（2）使用採集棒來回多次刮取沙梭體表之黏液。

（3）將採集棒插回已裝好原生海水的採集管中。

（4）放入 4℃的冰箱中保存。



圖四、採集沙梭黏液。
(A)新鮮現釣之沙梭；
(B)採集管。
（圖片來源：實驗者自製）

（二）發光細菌的純化

1.將取樣的細菌海水液用已滅菌的海水與進行 10^{-3} 倍之稀釋。

2.使用微量滴管頭沾取稀釋後之菌液，進行單區畫線塗盤法。

3.篩選培養基中的發光亮點。使用接種環採樣發光點，並以分區劃線法塗盤於新的培養基（以下稱為第一代）。

4.在暗室中標記第一代中發光之單一菌落，並取之進行新一輪分區畫線，此過程重複三次。

三、菌種鑑定

（一）革蘭氏染色

1.拭淨玻片後，以無菌操作，取發光細菌塗抹於玻片上。於空氣中乾燥，利酒精燈熱固定。

2.將細菌以結晶紫覆蓋，靜置一分鐘。以蒸餾水輕洗。

3.用碘液覆蓋細菌，靜置一分鐘。以蒸餾水輕洗。

4.至於衛生紙上，傾斜玻片以 95%乙醇脫色，至發現結晶紫未自塗抹中釋出。以蒸餾水輕洗。

5 以番紅複染兩分鐘。

6.以吸水紙吸乾，並用油鏡觀察。

（二）以 API 20E 進行細菌特性測試

1. 將少量菌落塗抹在濾紙的一小部分區域上，加入幾滴氧化酶試劑。觀察樣品是否有顏色變化（OX test），呈現紫色為陽性。

2.培養盒加入無菌 RO 水，使其內部濕潤。

3. 取一個單獨菌落，將接種物轉移到一個 5 毫升無菌鹽水管中，並充分混合以形成均勻懸液。

4.依照試劑上之圖示填充菌液，須無氧環境之測試管需添加礦物油。

5.蓋上孵育盤的蓋子，並在 37°C 下孵育 18 至 24 小時。

6.觀察和記錄反應，如果 GLU 管為陽性，按順序添加測試試劑。

7.將測試結果輸入數據庫，查尋可能菌種。

四、LB 培養基第 4-7 小時之發光強度平均值測定

種菌於五管 LB 液態培養基後第 4-7 小時，每一小時以相機拍攝，並使用 ImageJ 進行分析，目的在 4-7 小時內尋找發光強度平均值最大值進行實驗。

（一）步驟

1.選取單一菌落接種於 LB 液態培養基中，置於恆溫震盪箱（25°C、140rpm）。

2.每一小時取出 1ml 之菌液，倒入塑膠比色管中，然後將比色管管口以膠帶封住。

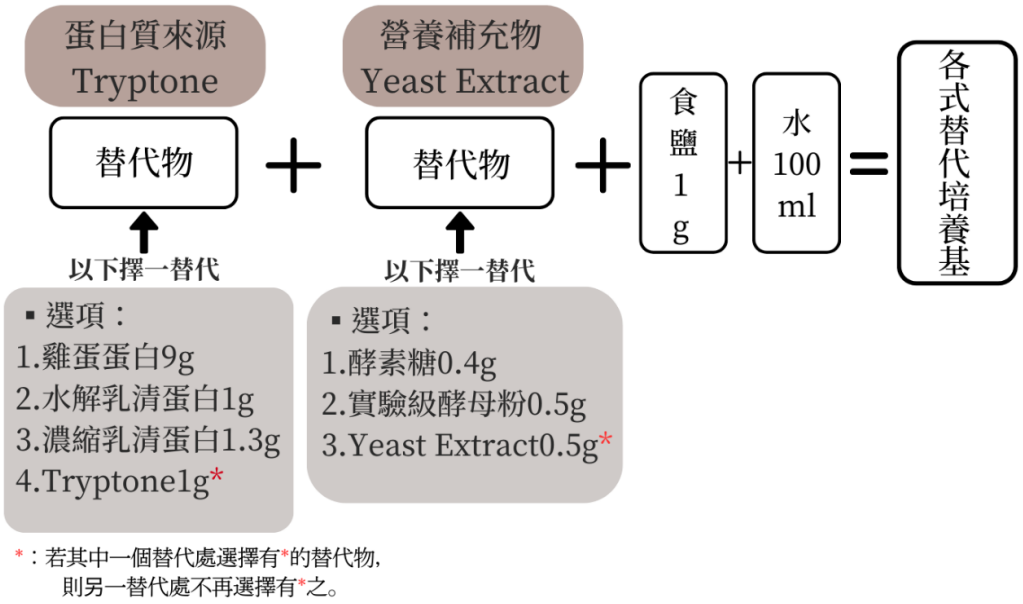
3.上下搖晃翻轉五次菌液後，將裝有菌液的比色管置於自製小暗室的固定位置，以固定之相機參數。（相機參數：ISO:6400/4s/3.2f 100 公釐 ）進行拍攝。

4.使用 ImageJ 分析圖片 ，取得圖片中發亮區域之發光強度平均值。

5.上述步驟重複五次，共進行五組。

五、替代培養基實驗

（一）製作、測試替代培養基步驟



圖五、替代培養基配方比例說明。（圖片來源：實驗者自製）

1.依據 LB 培養基原材料中 Tryptone 及 Yeast Extract 之蛋白質的含量，進行替代物之比例換算。（圖五）

2.將不同之替代配方依照比例加入水中攪拌溶解後分裝至試管後，滅菌釜 121°C 滅菌 15 分鐘，並接種單一菌落至替代培養基測試是否發亮。

（二）根據 LB 發光強度平均值結果進行替代培養基之發光強度平均值測定

1.根據替代培養基種菌測試結果，篩選出可以成功培養發光細菌之替代培養基。

2.根據生長曲線測定結果，選擇發光細菌在 LB 培養基種菌後 4-8 小時中發光強度平均值最大之小時，並將替代培養基培養至該小時後取出 1ml 之菌液，倒入塑膠比色管並封住管口。

3.上下搖晃翻轉五次菌液後，將裝有菌液的比色管置於自製小暗室的固定位置，以相機（相機參數：ISO:6400/4s/3.2f 100 公釐）進行拍攝。

4.使用 ImageJ 分析圖片，取得圖片中發亮區域之發光強度平均值。

5.上述步驟重複五次，每個替代培養基共進行五組。

（三）第 24 小時替代培養基之發光強度平均值測定

1.種菌於替代培養基第 24 小時後取出 1ml 之菌液，倒入塑膠比色管並封住管口。

2.上下搖晃翻轉五次菌液後，將裝有菌液的比色管置於自製小暗室的固定位置，以相機（相機參數：ISO:6400/4s/3.2f 100 公釐）進行拍攝。

3.使用 ImageJ 分析圖片，取得圖片中發亮區域之發光強度平均值。

4.上述步驟重複五次，每個替代培養基共進行五組。

（四）金錢成本及發光強度平均值之綜合分析

1.計算出各替代培養基每 100ml 之新台幣價格，以評估金錢成本。

2.統計各替代配方發光強度平均值，以此定義其細菌發光強度。

3.綜合分析。

六、替代器材與設備實驗

（一）電鍋替代滅菌釜實驗

表二、電鍋滅菌與對照組之變因比較。

		電鍋組	滅菌釜組	未滅菌組
操作變因	滅菌設備	電鍋加入 400ml 的蒸餾水進行滅菌	滅菌釜 121°C 滅菌 15 分鐘	無
控制變因	操作處	無菌操作台		
	培養處	恆溫培養箱（25°C；48 小時）		

1.電鍋組步驟：（表二）

（1）加入 6g 之 LB Broth Agar 粉末和 150ml 蒸餾水於錐形瓶中，加熱至溶解。

（2）加入 400ml 的蒸餾水進電鍋中，以雙層鋁箔紙包覆錐形瓶瓶口後放入電鍋進行滅菌直到電鍋開關跳停。

（3）取出後於無菌操作台進行分裝，共六盤。

（4）將六盤培養基倒置堆疊，並於外層包裹保鮮膜，25°C 放入恆溫培養中，於 48 小時後進行觀察。

2.滅菌釜組步驟：（表二）

（1）加入 6 公克之 LB Broth Agar 粉末和 150 毫升蒸餾水於錐形瓶中，加熱至溶解。

（2）放入滅菌釜 121°C 下滅菌 15 分鐘。

（3）取出後於無菌操作台進行分裝，共六盤。

（4）將六盤培養基倒置堆疊，並於外層包裹保鮮膜，放入 25°C 恆溫培養中，於 48 小時後進行觀察。

3.未滅菌組步驟：（表二）

（1）加入 6g 之 LB Broth Agar 粉末和 150ml 蒸餾水於錐形瓶中，加熱

至溶解。

（2）不進行滅菌，僅煮至沸騰 15 分鐘，直接於無菌操作台進行分裝，共六盤。

（3）將六盤培養基倒置堆疊，並於外層包裹保鮮膜，25°C 放入恆溫培養中，於 48 小時後進行觀察。

（二）自製簡易操作台替代無菌操作台實驗

表三、自製簡易操作台與對照組之變因比較。

		自製簡易操作台組	**無菌操作台組**
操作變因	操作處	自製簡易操作台	無菌操作台
控制變因	滅菌設備	滅菌釜 121°C 滅菌 15 分鐘	
	培養處	恆溫培養箱（25°C；48 小時）	

1.自製簡易操作台步驟：（表三）

（1）加入 6 公克之 LB Broth Agar 粉末和 150 毫升蒸餾水於錐形瓶中，加熱至溶解後放入滅菌釜 121°C 下滅菌 15 分鐘。

（2）架設簡易無菌操作台於桌面，並在簡易操作台中噴灑酒精消毒。

（3）點燃兩個酒精燈，距離約 10~15cm，使簡易操作台內部氣流程向上趨勢，避免污染物落於培養皿。

（4）於自製簡易操作台進行固態培養基的製備作為滅菌測試之依據，共六盤。

（5）將六盤培養基倒置堆疊，並於外層包裹保鮮膜，放入 25°C 恆溫培養中，於 48 小時後進行觀察。

2.無菌操作台組步驟：（表三）

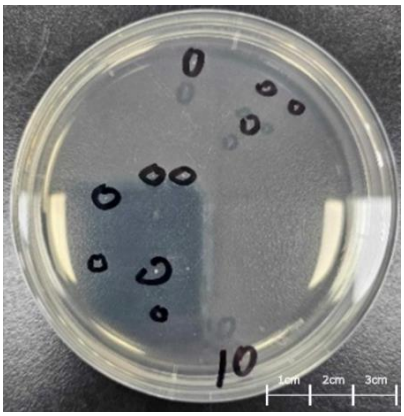
（1）加入 6 公克之 LB Broth Agar 粉末和 150 毫升蒸餾水於錐形瓶中，加熱至溶解後放入滅菌釜 121°C 下滅菌 15 分鐘。

（2）取出後於無菌操作台進行分裝，共六盤。

（3）將六盤培養基倒置堆疊，並於外層包裹保鮮膜，放入 25°C 恆溫培養中，於 48 小時後進行觀察。

（三）替代滅菌釜與無菌操作台結果分析方式

我們透過圈選單一菌落的方式，計算以不同方式進行滅菌或操作的 LB 培養基，在經過 48 小時於 25°C 恆溫培養箱後，單一菌落之生長數目（圖六）



圖六、電鍋滅菌的 25°C LB 培養基下第 48 小時之單一菌落生長情形（圖片來源：實驗者自製）

七、教具開發——發光蛋製作

（一）液態雞蛋培養基製作步驟

表四、發光蛋製作實驗組與對照組變因比較。

		實驗組	**對照組**
操作變因	實驗級酵母粉	0.5g 實驗級酵母粉/100ml 水	無
控制變因	食鹽水	濃度 1%	
	培養處	恆溫震盪箱（25°C；140rpm；17 小時）	

1.實驗組步驟：（表四、圖七）

（1）將鑷子以酒精棉擦拭前端至少兩公分並過火以達到滅菌之目的。

（2）以酒精棉擦拭外殼，從雞蛋較鈍的一端敲出一開口並擴展到氣室邊緣，去除內殼膜後將蛋黃從開口倒出，並攪拌蛋殼內所存之雞蛋蛋白。

（3）以 0.5g 實驗級酵母粉+1g 食鹽+100ml 蒸餾水比例調配酵母鹽水，取 5ml 加入蛋殼中與雞蛋蛋白混合。

（4）選取單一菌落接種於雞蛋蛋白與酵母鹽水之混合液中，放入恆溫震盪箱（25°C；140rpm）於 17 小時後進行觀察。

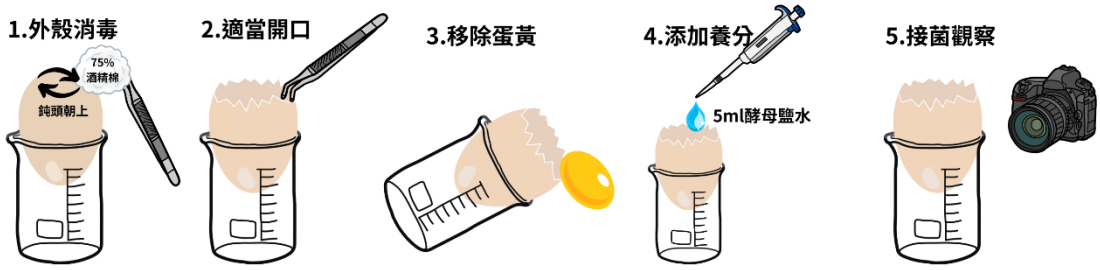
2.對照組步驟：（表四）

（1）將鑷子以酒精棉擦拭前端至少兩公分並過火以達到滅菌之目的。

（2）將雞蛋固定於 50ml 燒杯上，以酒精棉擦拭外殼，從雞蛋較鈍的一端敲出一開口並擴展到氣室邊緣，去除內殼膜後將蛋黃從開口倒出，並攪拌蛋殼內所存之雞蛋蛋白。

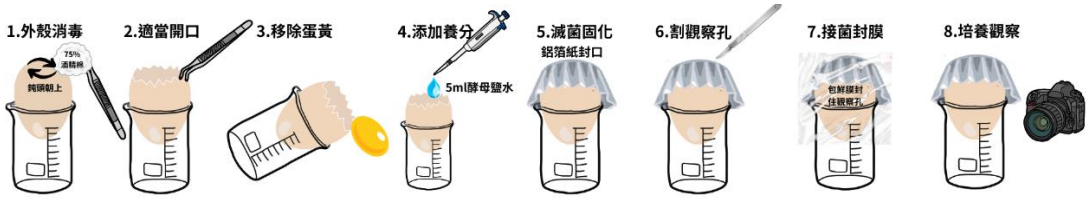
（3）取 5ml 濃度 1%之食鹽水，加入蛋殼中與雞蛋蛋白混合。

（4）選取發光菌之單一菌落接種於雞蛋蛋白與食鹽水之混合液中，放入恆溫震盪箱（25°C；140rpm）於 17 小時後進行觀察。



圖七、液態雞蛋培養基製作流程示意圖。（圖片來源：實驗者自製）

（三）固態雞蛋培養基製作步驟（圖八）



圖八、固態雞蛋培養基製作流程示意圖。（圖片來源：實驗者自製）

1.將鑷子以酒精棉擦拭前端至少兩公分並過火以達到滅菌之目的。

2.將雞蛋固定於 50ml 燒杯上，以酒精棉擦拭外殼，從雞蛋較鈍的一端敲出一開口並擴展到氣室邊緣，去除內殼膜後將蛋黃從開口倒出，並攪拌蛋殼內所存之雞蛋蛋白。

3.取 5ml 食鹽濃度為 1%之酵素糖鹽水，加入蛋殼中與雞蛋蛋白混合。

4.以雙層鋁箔紙包裹雞蛋開口後送入滅菌釜進行滅菌，並利用滅菌釜之高溫使蛋白質變性達到固化之目的。

5.選取發光菌之單一菌落，於無菌操作台內對固態雞蛋培養基進行分區畫線。

6.在包裹雞蛋的鋁箔紙上，以酒精消毒過的解剖刀切割一個不大於雞蛋開口的觀察口，最後以酒精擦拭過的保鮮膜封頂，以利隔日進行觀察和拍攝。

7.置於恆溫培養箱 25°C 第 48 小時。

八、發光細菌毒物分析實驗

表五、發光細菌毒物分析實驗組與對照組 14%福馬林稀釋倍數比較。

處理方式	**實驗組**				**對照組**
	1	**2**	**3**	**4**	
14%福馬林稀釋倍數	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	不加福馬林

（一）實驗步驟（表五）

1.選取單一菌落接種於 LB 培養基中，置於恆溫震盪箱（25˚C、140rpm）。於 24 小時後取，取 1ml 之菌液加入塑膠比色管中，共取 5 管。

2.將 14%福馬林分別稀釋成 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} 倍，各取 1ml 分別加入 4 管菌液中，並取 1ml 之純水加入剩餘之 1 管菌液中。

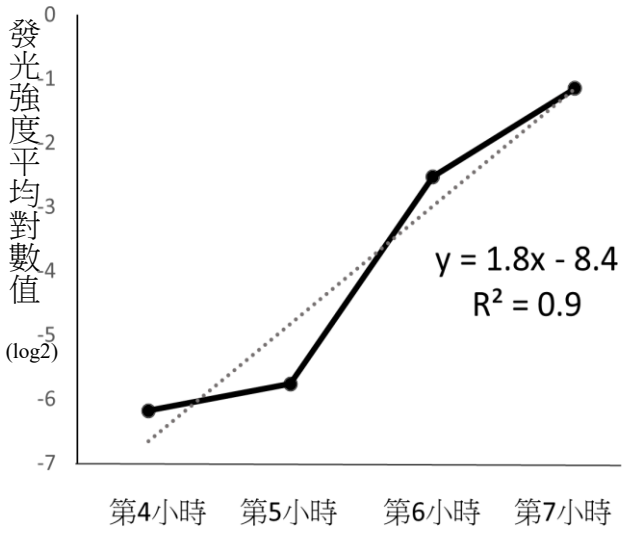
3.將塑膠比色管管口封住，上下翻轉搖晃 5 次後置於自製小暗室的固定位置，以相機（相機參數：ISO:6400/4s/3.2f 100 公釐）進行拍攝。

4.使用 ImageJ 分析圖片 ，取得圖片中發亮區域之發光強度平均值

肆、 研究結果

一、發光細菌於 LB 中第 4~7 小時生長情形及生化特性測試結果

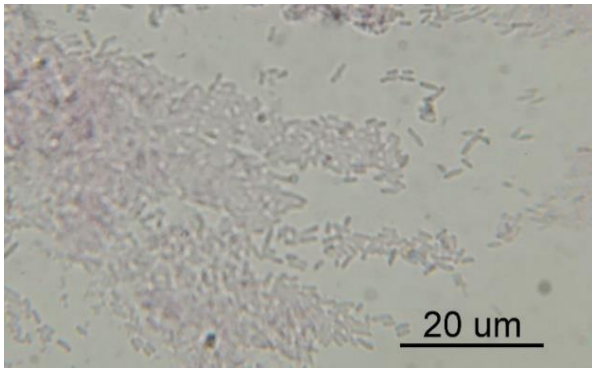
（一） LB 中第 4~7 小時生長情形



圖九、25°C LB 第 4-7 小時發光強度平均值

在圖九中，可發現 LB 培養基之發光強度平均值隨著時間有逐漸上升的趨勢(R^2=0.9)，表示其平均發光強度越來越大，至第 7 小時達到最大值，且考量到後續應用的易觀察性，因此我們選定第 7 小時作為後續替代培養基發光強度平均值測定之時間標準，進行測量及比較。

（二）革蘭氏染色



在圖十中，發光細菌在經過革蘭氏染色之後顯微鏡下成紅色，屬於革蘭氏陰性菌。

圖十、發光細菌革蘭氏染色結果。（圖片來源：實驗者自行拍攝）

（三）發光細菌生化特性測試



圖十一、發光細菌生化測試結果。(A) API 20E 套組。(B)加入細胞色素 C。（圖片來源：實驗者自行拍攝）

在圖十一(A)中，針對測試條中的 20 項測試均為陰性，而在此測試套組中包含幾種胺基酸的測試，例如：含硫胺基酸(H2S)、賴氨酸(LDC)、鳥氨酸

(ODC)等在此測試結果中皆顯示為陰性，可見上述胺基酸並非發光細菌生長之必需營養素。且檢測用之發光細菌皆為同一株細菌之繼代培養，故能維持穩定的生化測試結果，因此本鑑定方法可能不適用於發光菌屬。

在圖十一(B)中的 Oxidase test 針對細胞色素 C 的檢測中結果呈現藍紫色(陽性)，依此結果查詢，得到奈瑟氏菌、莫拉氏菌、彎曲桿菌和巴斯德斯菌對此測試會呈現陽性。

二、替代培養基實驗

（一）替代培養基種菌測試結果

表六、各式替代培養基接種發光細菌後之發光情形表。

編號	Tryptone 替代物	Yeast Extract 替代物	食鹽	水	發光情形
1	Tryptone 1g	酵素糖 0.4g	食鹽 1g	水 100ml	+
2	Tryptone 1g	實驗級酵母粉 0.5g			+
3	水解乳清蛋白 1g	Yeast Extract 0.5g			+
4	水解乳清蛋白 1g	酵素糖 0.4g			-
5	水解乳清蛋白 1g	實驗級酵母粉 0.5g			-
6	濃縮乳清蛋白 1.3g	Yeast Extract 0.5g			+
7	濃縮乳清蛋白 1.3g	酵素糖 0.4g			+
8	濃縮乳清蛋白 1.3g	實驗級酵母粉 0.5g			-
9	雞蛋蛋白 9g	Yeast Extract 0.5g			+
10	雞蛋蛋白 9g	酵素糖 0.4g			+
11	雞蛋蛋白 9g	實驗級酵母粉 0.5g			+

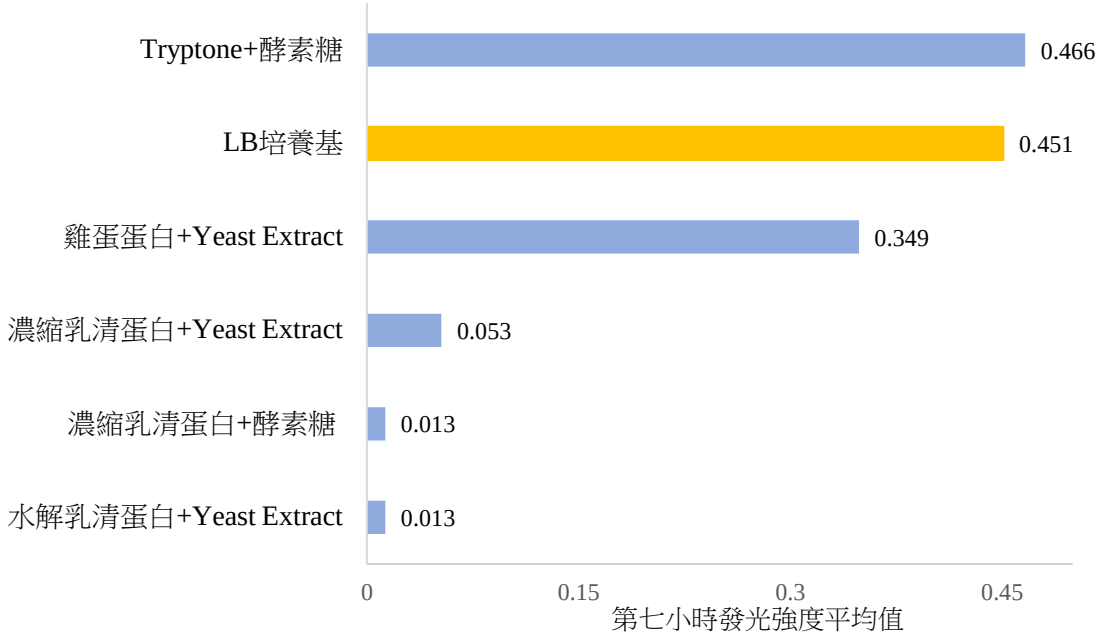
+：表示替代培養基有發光

-：表示替代培養基無發光

在表六中可看到，編號 1、2 使用酵素糖、實驗級酵母粉搭配 Tryptone，與編號 3、6、9 使用水解乳清蛋白、濃縮乳清蛋白和雞蛋蛋白搭配 Yeast Extrac 時皆在種菌後有出現發光情形。在酵素糖、實驗級酵母粉及水解乳清蛋白、濃縮乳清蛋白和雞蛋蛋白同時替代 Tryptone 與 Yeast Extract 成分之編號 7、10、

11 亦有出現發光情形。而水解乳清蛋白在搭配酵素糖及實驗級酵母粉均無法成功培養，濃縮乳清蛋白與實驗級酵母粉亦無法。

（二）第 7 小時替代培養基之發光強度平均值測定

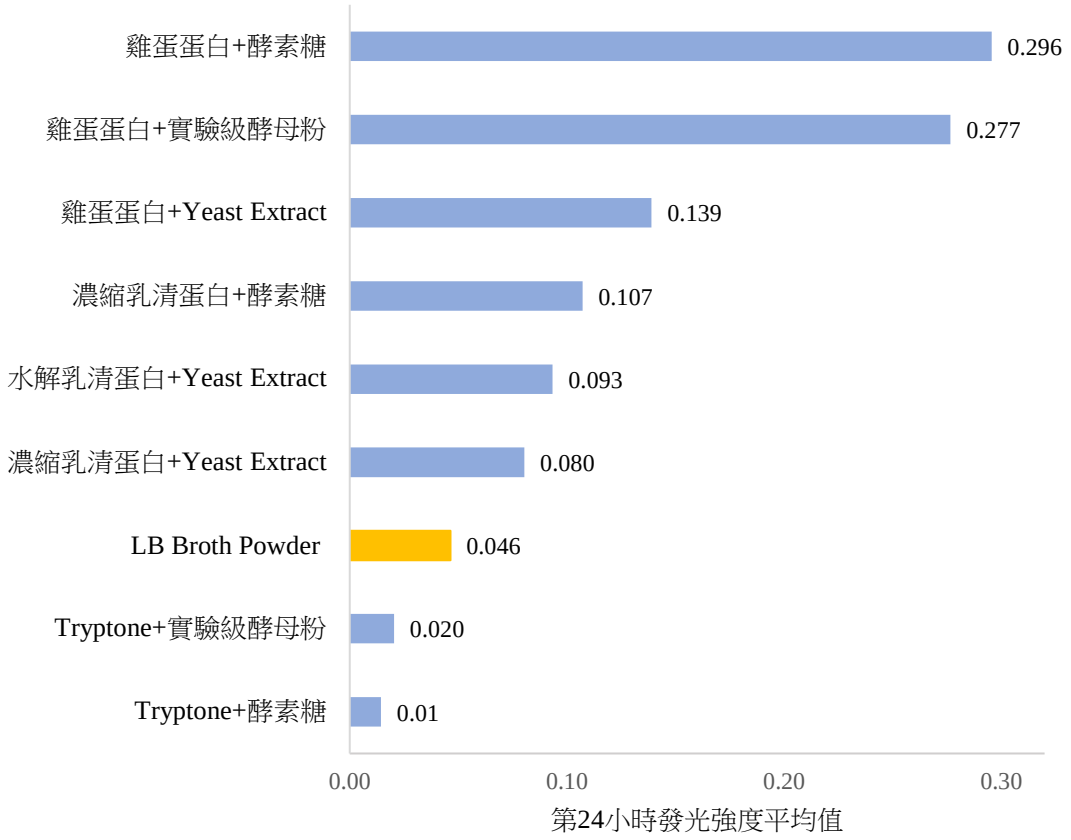


圖十二、發光細菌 25°C 五種替代培養基與 LB 第 7 小時發光強度平均值橫條圖。

我們根據 LB 培養基之發光強度平均值最大值第七小時，進行五種替代培養基之第七小時發光強度平均值測定，並與 LB 進行比較（圖十二），可發現 Tryptone+酵素糖替代培養基在第七小時發光強度平均值略大於使用 LB 的情況，而雞蛋蛋白+Yeast Extract 則次於 LB 培養基。濃縮乳清蛋白+酵素糖與水解蛋白+Yeast Extract 於第 7 小時尚未出現發光情形。

（三）第 24 小時替代培養基之發光強度平均值測定

根據第 7 小時替代培養基之發光強度平均值測定，我們發現有些替代培養基於第 7 小時尚未出現發光情形，因此我們根據過往觀測替代培養基發光情形經驗，大多替代培養基皆能在半天以上之時間發現發光情形，因此我們選定第 24 小時進行第二次的替代培養基發光強度平均值測定。



圖十三、發光細菌 25°C 所有替代培養基與 LB 第 24 小時發光強度平均值橫條圖。

在圖十三中，在有使用蛋白質替換物如雞蛋蛋白、濃縮乳清蛋白、水解乳清蛋白的替代培養基在第 24 小時之發光強度平均值皆大於 LB 之發光強度平均值 0.046，而以雞蛋蛋白+酵素糖發光強度平均值為最大。而以 Tryptone+酵素糖替代培養基在此次實驗中五管皆無發光情形，Tryptone +實驗級酵母粉替代培養基只有一管有發亮，濃縮乳清蛋白+Yeast Extract 與雞蛋蛋白+Yeast Extract 皆各有一管未發亮。

（四）金錢成本及發光強度平均值之綜合分析

表七、五種替代培養基與 LB 培養基金錢成本與第 7 小時發光強度平均值表。

編號	替代物		金錢成本 NTD/100ml	第 7 小時發光強度平均值	P 值
	Tryptone	**Yeast Extract**			
1	LB Broth Powder（品牌 G-Bioscience）		15.62	0.451	-
2	Tryptone	酵素糖	4.72(70%↓)	0.466(3%↑)	0.220
3	水解乳清蛋白	Yeast Extract	3.27(79%↓)	0.013(97%↓)	--
4	濃縮乳清蛋白	Yeast Extract	2.95(81%↓)	0.053(88%↓)	0.001*
5	濃縮乳清蛋白	酵素糖	1.30(91%↓)	0.013(97%↓)	--
6	雞蛋蛋白	Yeast Extract	3.70(76%↓)	0.349(22%↓)	0.142

*：P<0.05 ; ** : P<0.01 (P 值由各替代配方對 LB 之發光強度平均值 t 檢定而得

↓/↑：相較於 LB 之金錢成本或發光強度平均值之降幅/增幅。

--：編號 3 與 5 培養基因無出現發光情形故不統計 P 值。

在表七中，各替代培養基相對於 LB 之金錢成本，皆減少 70%以上，而在第七小時發光強度平均值之情況，只有編號 2 Tryptone+酵素糖替代培養基略高於 LB 培養基 3%，而編號 3 與 5 之替代培養基於第 7 小時尚未發亮，發光強度平均值呈現最低，而編號 4 與 6 分別使用濃縮乳清蛋白及雞蛋蛋白進行蛋白質之單一替代，比起 LB 之發光強度平均值下降了 88%與 22%。且表七中各替代培養基對 LB 作 t 檢定，僅 4 號（P=0.001）有顯著差異（P<0.05）。

表八、替代培養基與 LB 培養基之金錢成本與第 24 小時發光強度平均值表。

編號	替代物		金錢成本	第 24 小時發光強度平均值	P 值
	Tryptone	**Yeast Extract**	**NTD/100ml**		
1	LB Broth Powder（品牌 G-Bioscience）		15.62	0.046	-
2	Tryptone	酵素糖	4.72(70%↓)	0.014(70%↓)	0.010*
3	Tryptone	實驗級酵母粉	4.97(68%↓)	0.020(57%↓)	0.037*
4	水解乳清蛋白	Yeast Extract	3.27(79%↓)	0.093(102%↑)	0.199
5	濃縮乳清蛋白	Yeast Extract	2.95(81%↓)	0.080(74%↑)	0.094
6	濃縮乳清蛋白	酵素糖	1.30(91%↓)	0.107(132%↑)	0.066
7	雞蛋蛋白	Yeast Extract	3.70(76%↓)	0.139(202%↑)	0.031*
8	雞蛋蛋白	酵素糖	1.55(90%↓)	0.296(543%↑)	0.0001**
9	雞蛋蛋白	實驗級酵母粉	2.30(85%↓)	0.277(502%↑)	0.042*

*：P<0.05 ; ** : P<0.01 (此處 P 值由各替代配方對 LB 之發光強度平均值 t 檢定而得)

↓/↑：相較於 LB 之金錢成本或發光強度平均值之降幅/增幅。

在表八中可知，編號 2、3 替代培養基分別可節省 70%及 68%，但發光強度平均值未超過 LB。以及共有六款替代配方金錢成本降幅在 76%以上且發光強度平均值均大於 LB 培養基。其中金錢成本最低的是濃縮乳清蛋白+酵素糖（編號 6），成本為 1.30 NTD/100ml，降幅為 91%，同時其發光強度平均值為 0.107，增幅為 132%。金錢成本次低的是雞蛋蛋白+酵素糖（編號 8）成本為 1.55 NTD/100ml，降幅為 90%，同時其發光強度平均值為 0.296，增幅為 543%。且經 t 檢定分析 P 值：編號 2（P=0.01）、3（P=0.037）、7（P=0.031）、8（P=0.0001）、9（P=0.042），具有顯著差異（P<0.05）。

三、替代器材與設備實驗

表九、六種替代條件各六組 25℃ LB 培養基下第 48 小時之單一菌落個數。

處理方式		1	2	3	4	5	6	平均值	標準差
滅菌處	操作處								
電鍋滅菌	無菌操作台	15	9	7	10	11	9	10.17	2.71
未滅菌	無菌操作台	×	×	×	×	×	×	×	×
滅菌釜滅菌	無菌操作台	-	-	-	-	-	-	0.00	0.00
滅菌釜滅菌	自製簡易操作台	1	-	-	-	-	-	0.17	0.41
電鍋滅菌	自製簡易操作台	3	2	5	5	5	2	3.70	1.51

-：無細菌生長

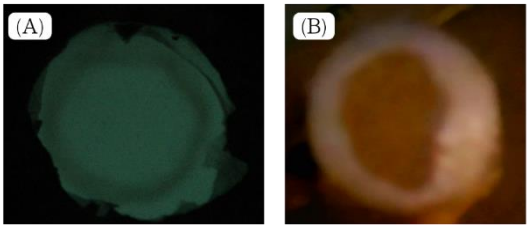
×：培養基大面積汙染無法計數

表九中可知，在都是使用滅菌釜滅菌的條件下，自製簡易操作台較無菌操作台以平均菌落個數而言多 0.17 個菌落，但簡易操作台在六組數據之中僅有一組出現一個單一菌落。由此結果可見自製簡易操作台有接近無菌操作台之效果。

在都是使用無菌操作台的情況下，以電鍋滅菌相較滅菌釜滅菌而言平均菌落個數多 10.17 個，每組菌落量介於 7~15 個菌落。另外，不進行滅菌只煮沸 15 分鐘的組別皆為區塊性汙染，無單一菌落，不能進行菌落個數比較。由此結果可見電鍋具有一定之滅菌能力，但其滅菌能力並不比滅菌釜佳。在同時以電鍋代替滅菌釜，以簡易操作台替代無菌操作台時，平均菌落個數多 3.7 個，每組菌落量介於 2~5 個菌落。但此組別在電鍋保溫時長較電鍋滅菌+無菌操作台的組別多 1 小時，故無法和其他組別進行比較，只能確定在此組合加上電鍋滅菌約 1 小時 30 分鐘能有此結果。

四、教具開發——發光蛋製作

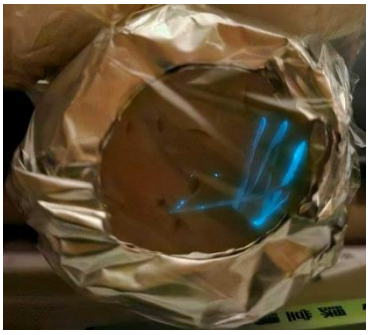
（一）液態雞蛋培養基



圖十四、25°C 液態雞蛋培養基第 17 小時實驗組與對照組於暗室之拍攝發光情形。（圖片來源：實驗者自製）（A）加入實驗級酵母粉鹽水之實驗組。（B）只加入鹽水之對照組。

圖十四中，在第 17 小時，有加入實驗級酵母粉鹽水之雞蛋已經有出現發光情形，而只加入鹽水之雞蛋則沒有發光。而一顆液態發光蛋成本為新台幣 6.5 元，並且材料容易取得。

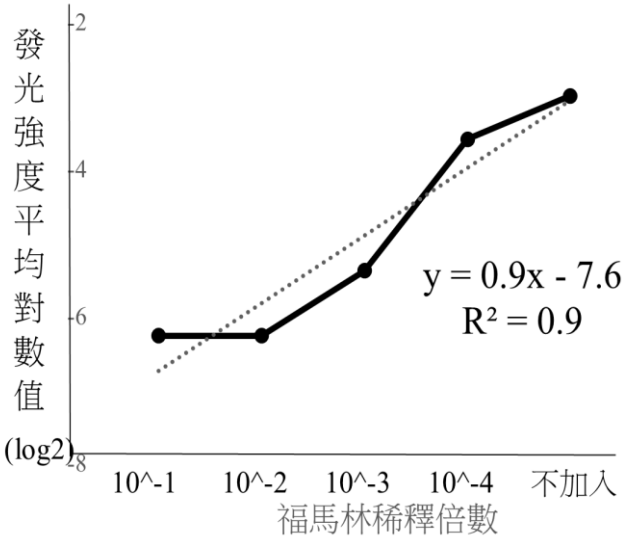
（二）固態雞蛋培養基



圖十五、25°C 固態雞蛋培養基第 48 小時於暗室拍攝情形。（圖片來源：實驗者自行拍攝）

塗盤於加入酵素糖鹽水之固態雞蛋培養基之發光情形（圖十五），可發現發光細菌可於固態雞蛋培養基表面生長，並且可看見幾處單一菌落點。而一顆固態發光蛋成本為新台幣 6.5 元，並且材料容易取得。

五、細菌毒物分析實驗



圖十六、滴入 1ml 不同稀釋倍數之福馬林稀釋液後各管之發光強度平均值長條圖。

在圖十六中，在菌液中滴入不同稀釋倍數之福馬林，隨著稀釋倍數越小，其發光強度平均值越大(R^2=0.9)。而不加入福馬林只加入 1ml 純水發光強度平均值為最大，滴入福馬林稀釋倍數 10^{-1} 與 10^{-2} 之 發光強度平均值為最小，可見發光細菌具有不同濃度的毒物分析能力。

伍、 討論

一、替代培養基可行性與效果討論

根據實驗結果，使用酵素糖、實驗級酵母粉作為 Yeast Extract 之替代營養補充物，在與 Tryptone 搭配時皆在種菌後有出現發光情形，此表示酵素糖、實驗級酵母粉具有替代 Yeast Extract 的可行性；水解乳清蛋白、濃縮乳清蛋白和雞蛋蛋白在與 Yeast Extract 搭配時皆在種菌後有出現發光情形，表示水解乳清蛋白、濃縮乳清蛋白、雞蛋蛋白亦具有替代 Tryptone 的可行性。而在以酵素糖、實驗級酵母粉與水解乳清蛋白、濃縮乳清蛋白、雞蛋蛋白同時替代 LB 的 Tryptone 與 Yeast Extract 成分之替代培養基，可發現酵素糖搭配濃縮乳清蛋白或雞蛋蛋白以及實驗級酵母粉搭配雞蛋蛋白時可成功培養細菌，表示酵素糖、實驗級酵母粉搭配不同 Tryptone 替代物為部分有效；水解乳清蛋白與所有 Yeast Extract 替代物均無法成功培養，濃縮乳清蛋白只有與酵素糖時可成功培養細菌，而雞蛋蛋白則與所有 Yeast Extract 替代物均可以成功培養，可看出雞蛋蛋白在搭配酵素糖與實驗級酵母粉較水解乳清蛋白與濃縮乳清蛋白有效。

在第 7 小時所比較的替代培養基中除了 Tryptone+酵素糖之外的配方發光強度平均值結果皆不及同一時刻 LB 之測量結果，又因 Tryptone+酵素糖替代培養基未和 LB 呈現顯著差異，故無法有效證明其培養發光菌之能力勝過 LB 培養基。而在第 24 小時之各項發光強度平均值比較，發現水解乳清蛋白+Yeast Extract、濃縮乳清蛋白+Yeast Extract、濃縮乳清蛋白+酵素糖、雞蛋蛋白+Yeast Extract、雞蛋蛋白+酵素糖、雞蛋蛋白+實驗酵母粉替代培養基發光強度平均值皆高於 LB，具有較 LB 佳之發光強度表現，而其中尤以雞蛋蛋白+酵素糖之發光強度平均值最高，甚至可達 LB 培養基六倍。且包含雞蛋蛋白之替代培養基不只發光強度平均值皆具有顯著差異（$P<0.05$），也較 Tryptone+實驗級酵母粉與 Tryptone+酵素糖替代培養基之發光情形穩定。

而在第 7 小時測定之替代培養基部分出現沒有發亮之情形，在第 24 小時觀

察時卻又可見其發光，並且有些於第 7 小時平均發光強度低於 LB 者，在第 24 小時卻高於 LB 培養基。綜合以上兩點推測，加上本實驗所選用之蛋白質來源替換物及營養補充物多為混合物，含較大分子。相較於成分純度較高的 LB 培養基而言，細菌需要較多時間分解替代培養基中的營養物質以利吸收。但在時間充足的情況下可提供更良好的發光條件，具有相當的替換能力。此外，蛋白質替換物在經過高溫高壓滅菌時，其蛋白質均會出現變性凝固的情況。本實驗曾嘗試離心移除替代培養基中的固態蛋白質，後續種菌測試皆失敗，但觀察到其中殘留的固態蛋白質仍有發光之可能，故推測發光細菌生長或發光所需營養物質主要存在於固態蛋白質中。因此，現有的替代配方不適用於需要使用如分光光度計等要求培養基清澈度的實驗中。但由實驗結果可證明有六款替代配方用於發光細菌之繼代保存或發光觀察中，會有比 LB 更好的表現。

二、替代培養基成本與發光強度平均值綜合分析

本實驗所試驗出可使發光細菌發光的替代培養基相對 LB 培養基的金錢成本均可節省 70~90%。而濃縮乳清蛋白+酵素糖成本下降為最多，降幅高達 91%，而其第 24 小時之發光強度平均值相較於 LB 則提高 132%，在各項替代培養基中排行第四。次之為的雞蛋蛋白+酵素糖其成本下降了 90%，與成本下降最多之濃縮乳清蛋白+酵素糖價錢相差無幾，不過其發光強度平均值是卻為所有替代培養基中增加百分比最高者，高達 543%，且其 t 檢定 $p=0.0001$（$p<0.05$），與 LB 培養基有著極為顯著的差異，可見此替代培養基具有成本低、發光能力佳且發光情形穩定的特性。而同樣具有顯著差異者（$p<0.05$），有 Tryptone+實驗級酵母粉（$p=0.037$）、Tryptone+ 酵素糖（$p=0.01$）、雞蛋蛋白+Yeast Extract（$p=0.031$）、雞蛋蛋白+實驗級酵母粉（$p=0.042$），其中 Tryptone+實驗級酵母粉、 Tryptone+ 酵素糖替代培養基，雖然金錢成本有所下降，但它們的發光強度平均值卻低 LB 培養基，且發光情形不穩定；而雞蛋蛋白+Yeast Extract 替代培養基與雞蛋蛋白+實驗級酵母粉替代培養基成本下降 7 成以上，而發光強度平均值則分別為 LB 培養基之三倍與六倍，可見其具有成

本低、發光能力不錯且發光情形穩定的特性。

三、替代無菌操作台設備之效果

表九中，固態培養基在電鍋進行滅菌者平均有 9.75 個菌落生長，使用滅菌釜滅菌者並無細菌生長，在未滅菌的情況下細菌大面積生長而難以計數，由此結果可見電鍋具有一定之滅菌能力，且增加在電鍋的加熱時長有助於增加滅菌的效果，但其滅菌能力並不比滅菌釜佳，在無滅菌釜等專業滅菌的狀況下可選用電鍋增加滅菌效果。由電鍋及簡易操作台無菌效果實驗，觀察到自製簡易操作台可以在短時間內產生接近無菌操作台的無菌環境，在使用簡易操作台的過程中觀察到上方縫隙有熱風溢出，下方操作處的風朝簡易操作台內部流入，整體空氣流動方向向上。在同樣使用滅菌釜滅菌的情況下，使用無菌操作台操作之六組均無菌落生長，而使用自製簡易操作台操作僅有其中一組出現一個單一菌落，其餘五組均無出現菌落生長，由此結果可見自製簡易操作台極為接近無菌操作台之效果。

四、發光蛋的製作

此可行性測試建立於先前的自製替代培養基材料實驗的觀察之上，我們發現雞蛋蛋白無論搭配 Yeast Extract、實驗級酵母粉或酵素糖皆有良好的發光情況，表八中含雞蛋蛋白之替代配方發光強度平均值表現至少是 LB 的兩倍。加上雞蛋內部是低菌量的狀態，所以我們嘗試結合以上兩點，設計蛋白質材料無須滅菌的液態雞蛋培養基，希望增加觀察發光細菌發光的方便性，測試直接於雞蛋中組合替代培養基之可能性。而目前的嘗試結果說明液態雞蛋培養基在這樣的操作下可以成功發光，肉眼觀察有微光，要利用相機長曝光功能才能更好觀察（圖十）。後續也嘗試利用蛋白質遇熱變性的特點製作固態雞蛋培養基，取一單一發光菌菌落用其進行發光菌的分區畫線。如圖十一的結果所示，固態雞蛋培養基，具有可使發光菌生長並發光的能力，有潛力作為進行純化發光細菌所需的固態培養基。且液態發光蛋與固態發光蛋僅需要 6.5（元/顆）即可培養細菌，大幅度的降低成本，同時提升了材料取得與操作的方便性。

五、發光細菌簡易替代培養法推廣應用之可行性

以目前台灣國中小實際情況來說，普通國中小之生物類教學類設備基準（行政院公報，2019）配備中並無滅菌釜、無菌操作台、細菌培養基等培養細菌所需之器材，而在經費上教育部每一年只對於特定實驗教育學校有額外之實驗補助經費（教育部，2021），且國教署推出之科學專案補助亦有各學校件數和經費補助限制（教育部，2018），因此於普通國中小來說，在設備與經費便是此階段之學生難以接觸並且普及微生物相關實作課程的主要原因，而透過我們的實驗結果歸納了以下幾點此簡易發光細菌培養法推廣至國中小之可行性：

第一，根據發光細菌方便採集的特性，無須擔心菌種保存不佳時需重新購買新的菌株之問題，且依據 BCRC 生物安全等級查詢結果，其所查詢之 11 筆結果顯示生物等級皆為 1 或 2，可以說明此細菌並無高危險性，並且此細菌之發光特性可讓學生於暗室中輕易地觀察發光細菌，亦可以容易地進行簡易之酒精、洗手乳抑菌或毒物測試之實驗，讓學生於課本以外，能夠有更深入對於微生物世界的認識與好奇。第二，根據替代培養基的實驗結果，我們研究出多種可以替代高價且較不易取得之 LB 培養基的替代培養基，以成本低且發光能力佳之雞蛋蛋白+酵素糖為例，其成本比起 LB 大幅減少，且發光能力於第 24 小時更甚於 LB 培養基，且其中雞蛋與酵素糖之取得便利，僅需在一般超商及網購即可快速且方便的製作出效果佳之替代培養基。第三，根據替代器材的實驗結果，顯示電鍋滅菌與自製簡易操作台皆具有一定程度之簡易替代可行性，且大同電鍋與自製簡易操作台皆方便取得且操作方便，不過，在使用自製簡易操作台應注意通風、火源等。最後，製作發光蛋作為教具可以有效地減少如培養皿等器材，並且具有簡易操作與取得之便利性，使用一顆雞蛋及相關材料，僅需要 6.5（元/顆）便可最直接的觀察微生物的存在。綜上所述，此實驗結果所得出之發光細菌簡易培養法具有推廣應用至國中小之可行性。

陸、結論

一、實驗結果證實使用水解乳清蛋白、濃縮乳清蛋白、雞蛋蛋白作為 Tryptone 之替代物，以及使用酵素糖、實驗級酵母粉作為 Yeast Extract 之替代物具有可行性。

二、**Tryptone+酵素糖**、**Tryptone+實驗級酵母粉**、**水解乳清蛋白+Yeast Extract**、**濃縮乳清蛋白+Yeast Extract**、**濃縮乳清蛋白+酵素糖**、**雞蛋蛋白+Yeast Extract**、**雞蛋蛋白+酵素糖**、**雞蛋蛋白+實驗酵母粉**各項替代培養基皆具有培養發光細菌的能力，且比較 LB 培養基的金錢成本皆可節省 70-90%之金錢成本。而各項替代培養基皆可使發光細菌發光，在第 7 小時，Tryptone+酵素糖、濃縮乳清蛋白+Yeast Extract、雞蛋蛋白+Yeast Extract 三種替代培養基皆可發光，但其平均光強度（發光強度平均值）皆小於 LB。在第 24 小時，Tryptone+酵素糖、Tryptone+實驗級酵母粉、水解乳清蛋白+Yeast Extract、濃縮乳清蛋白+Yeast Extract、濃縮乳清蛋白+酵素糖、雞蛋蛋白+Yeast Extract、雞蛋蛋白+酵素糖、雞蛋蛋白+實驗酵母粉替代培養基皆可發光，而尤以雞蛋蛋白+酵素糖之發光強度平均值超過 LB 且具有最佳之發光能力，具有應用的經濟效益。

三、實驗結果證實電鍋滅菌具有一定之滅菌效果，雖然無法達到與使用滅菌釜之完全無菌的情況，但若是在無滅菌釜之情況，電鍋仍舊是一項可簡易替代滅菌釜的選項；自製簡易操作台十分接近無菌操作台可以達到之使用效果，故自製簡易操作台應可以作為無菌操作台之簡易替代，但因簡易操作台需使用酒精燈，故須注意通風、用火安全及備妥滅火措施。

四、實驗結果證實發光蛋之液態與固態培養基具有材料簡單、培養效果佳、成本低廉（6.5 元/顆）等優勢，有進一步作為國中小微生物課程教具之教育應用價值。

五、實驗結果證實發光細菌具有分析不同濃度毒物之能力，發光細菌具有檢驗毒物之應用價值。

六、整體而言，自發光細菌之取得、培養，與替代培養基與替代器材以及發光蛋製作之簡易替培養法其便利性，具有可推廣應用於國中小微生物課程學習之教育應用價值。

柒、 參考文獻資料

一、中文部分

（一）學位論文

1. 揭維邦（1994）。**海洋生物附生性發光細菌之研究**。高雄：國立中山大學。

（二）網路資源

1. Sophia（2019 年 7 月 24 日）。從起司工廠的廢棄物到健身必備，貴鬆鬆的「乳清蛋白」是怎麼來的？。取自 https://pansci.asia/archives/164835
2. 知識大圖解（2014）知識大圖解：圖解攝錄影機的運作原理。取自 https://pansci.asia/archives/69343
3. 黑糖生活館（2024）原味酵素糖。台中市：黑金磚公司。取自 https://shousheng.tw/index.php#main
4. 陳裕星、洪梅珠、林秀儒（2005）釀酒用酵母菌的篩選與鑑定。農業部，151。取自 https://www.moa.gov.tw/ws.php?id=8280
5. 楊文仁（2018）教育部高中生物科學資優生培育計畫高雄區微生物學實驗。取自 https://www2.nsysu.edu.tw/Bio/images/commen/microbio-ex1070825.pdf

（三）政府出版品

1. 教育部（2018）。**教育部國民及學前教育署專案補助中小學科學教育計畫申請作業要點**。台北市：作者。21。
2. 教育部（2019）。**國民小學及國民中學設施設備基準**。台北市：作者。25。
3. 教育部（2021）。**教育部國民及學前教育署補助推動實驗教育要點**。台北市：作者。

二、英文部分

（一）書本

1. Gigli, I. (Ed.). (2016). Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects

（二）期刊

1. Brodl, E., Winkler, A., & Macheroux, P. (2018). Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence. Computational and structural biotechnology journal, 16, 551–564.
2. Ferreira, T., & Rasband, W. (2012). ImageJ user guide. Imagej/fiji, 1, 155-161.Health Aspects. InTech.
3. Ma, J., Wang, C., Wang, Z., Cao, G., Hu, R., Wang, X., Zou, H., Kang, K., Peng, Q., Xue, B., Wang, L., Zhu, Y., & Zhu, X. (2021). Active dry yeast supplementation improves the growth performance, rumen fermentation, and immune response of weaned beef calves. Animal nutrition (Zhongguo xu mu shou yi xue hui), 7(4)
4. Melnikova, E. I., Bogdanava, E. V., & Koshevarova, I. B.(2022). Nutritional evaluation of whey protein hydrolysate: chemical composition, peptide profile, and osmolarity. Food Science and Technology, 42.
5. Réhault-Godbert, S., Guyot, N., & Nys, Y. (2019). The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health. Nutrients, 11(3), 684.
6. Sinha, R. , Radha, C., Prakash, J., & Kaul,P. (2007) ,Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. Food Chemistry, 4,(101),1484-1491.
7. Steele, J. (2023). The Impact of Experiments on Students. Learning to Teach Language Arts, Mathematics, Science, and Social Studies Through Research and Practice, 12(1).
8. Tao, Z., Yuan, H., Liu, M., Liu, Q., Zhang, S., Liu, H., Jiang, Y., Huang, D., & Wang, T. (2023). Yeast Extract: Characteristics, Production, Applications and Future Perspectives. Journal of microbiology and biotechnology, 33(2), 151–166.
9. Tomé, D. (2021). Yeast Extracts: Nutritional and Flavoring Food Ingredients. ACS Food Sci. Technol,1(4),487-494
10. Topic Popovic, N. , Coz-Rakovac, R. , Strunjak-Perovic, I. (2007). Commercial phenotypic tests (API 20E) in diagnosis of fish bacteria: a review. Veterinární Medicína, 52,(2), 49–53.

【評語】052208

1. 本作品擬利用水解乳清蛋白、濃縮乳清蛋白、雞蛋蛋白等替代LB培養基中的部分成分，並嘗試以電鍋取代滅菌釜，以自製操作台替代無菌操作台。在替代培養基可行性之實驗中，除了以自製小暗室拍攝並使用 ImageJ 分析圖片中發亮區域之發光強度平均值以外，是否有使用實驗儀器如分光光度計、冷光儀等進行測量，以確認自製方法的準確性。另，除了測量發光強度以外，建議可以塗盤的方式測量菌落數。

2. 試驗項目似乎未設重複，難以比較試驗項目之有無差異，第 10 頁中之重複 5 次，並非統計上之重複，比較出之差異亦非試驗變因之差異。

3. 研究報告錯別字稍多，凸顯出用心之不足，宜加強校對工作。參考文獻之書寫不完整，且部分並不符合科學文獻之定義。

4. 在產業界要求的是成本降低，但在科學及教育上卻不宜，仍以精準為第一，且須能與國際接軌。雖然國中小實驗經費有限，部分實驗無法進行，但學校為教育機構，若教育之方法並不符合國際上公認之規範，則未來學生進入更高教育階段，較不易接軌，出校門至業界工作，更易造成學用之落差，故本研究之應用較為有限。

作品簡報



發光蛋

——簡易發光細菌培養法



壹、摘要

現況下國中小對於微生物培養並不普及，主因在於各校經費與設備上的困難。本研究自行採集台灣沿海產發光弧菌*Vibrio campbellii*，並分析評估替代培養基的成本與可行性。結果發現：使用水解乳清蛋白、濃縮乳清蛋白、雞蛋蛋白等，可替代LB培養基。且各項替代培養基金錢成本比起LB均下降七成至九成。其中有六種替代培養基於第24小時平均細菌發光強度大於LB培養基，且經ImageJ影像分析最高平均發光強度值，較LB培養基之發光強度更高。此外，使用家用電鍋雖未達完全滅菌，但評估仍可作為簡易的替代方案；自製操作台亦有國中小實驗教室簡易施作的可行性。本研究另發現雞蛋液態和固態培養基的製作方法，其材料簡單、培養效果佳，為一項最新發明的教學方案，極具中小學微生物教學推廣的價值。

貳、研究目的

一、找出市面上容易取得的培養基材料

二、測試出經濟實惠且有效果之培養基配方

三、測試簡易的無菌操作台及家用大同電鍋滅菌可行性

四、研發易於觀察的發光蛋教具

五、試驗發光細菌之應用方法



參、實驗器材

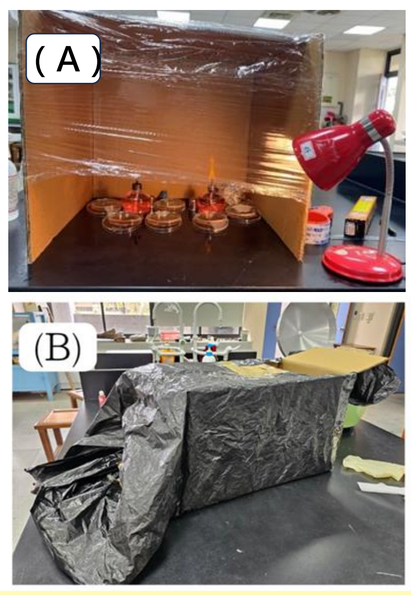
一、實驗所用之發光細菌

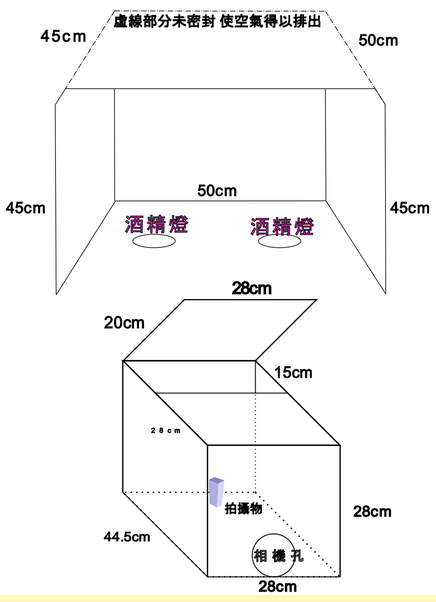


- **學名**：*Vibrio campbellii*
- **特性**：具有特殊的發光基因（lux gene）、螢光酵素（Luciferase）和螢光素（luciferin）可以在養分及氧氣充足的情況下持續放出藍色（490nm）的生物螢光常存在於海洋及魚和軟體動物之體表和消化道中（揭，1994）。
- **用途**：利用其發光及海魚提表及可取得的特性簡化取得細菌時所需的細菌鑑定

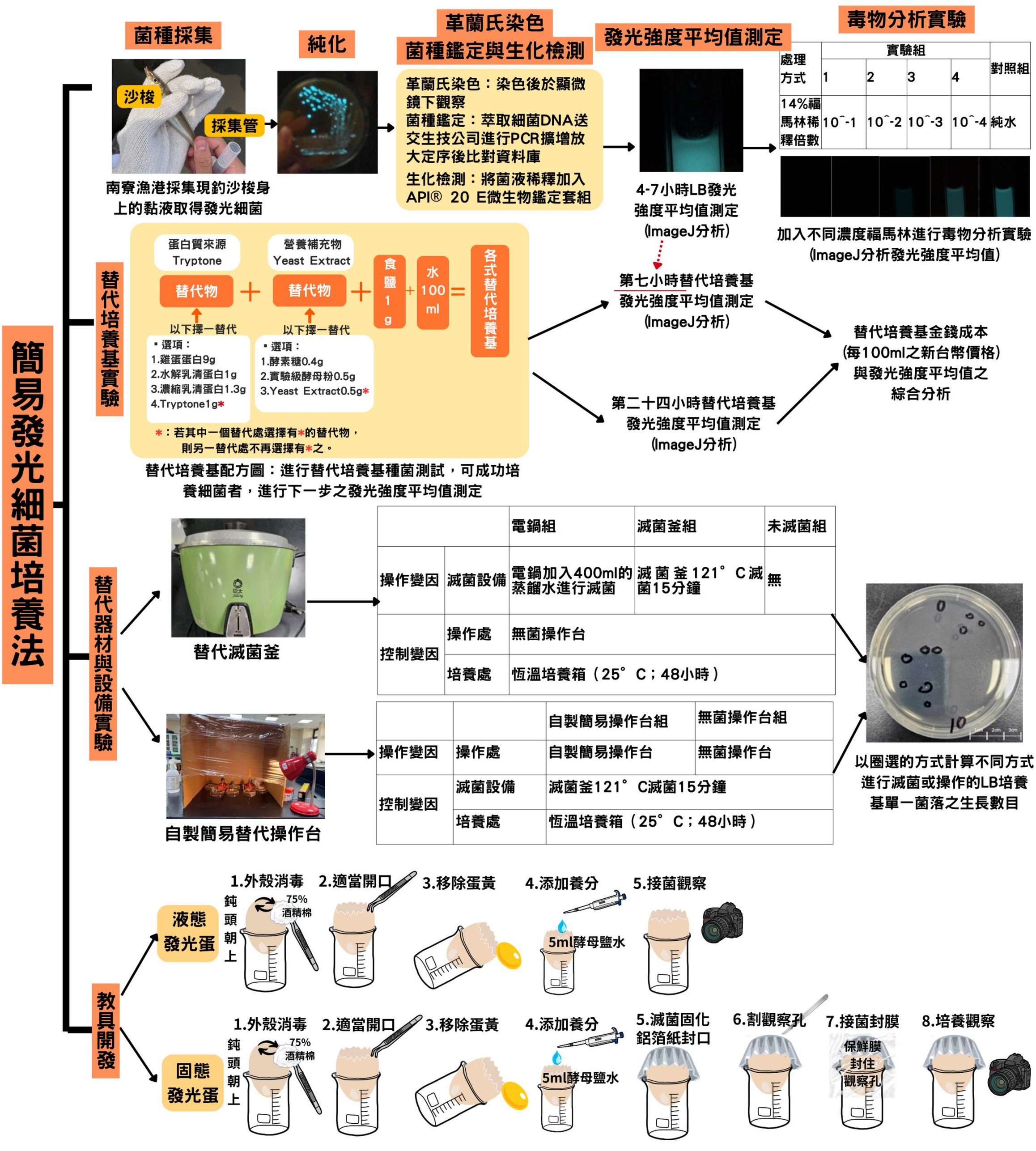
二、替代設備

自製替代操作台　自製小暗室



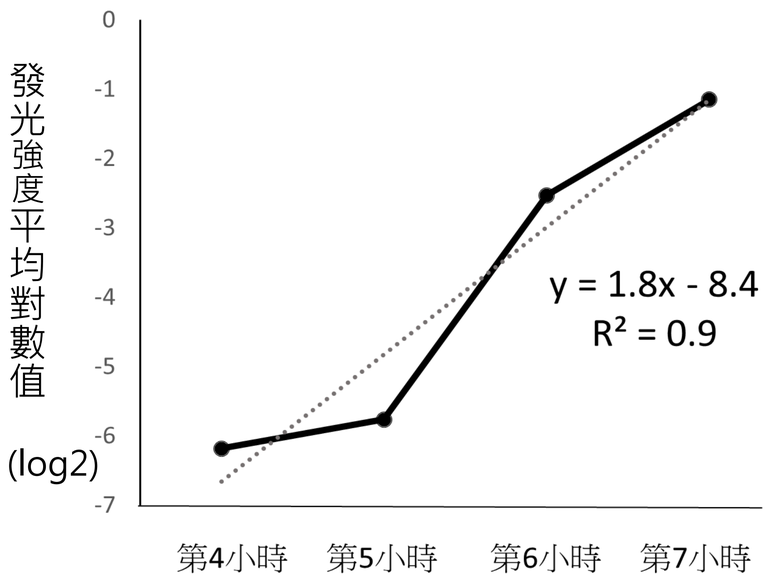


肆、研究過程及實驗方法



伍、實驗結果

一、LB培養基第4-7小時之發光強度平均值測定結果

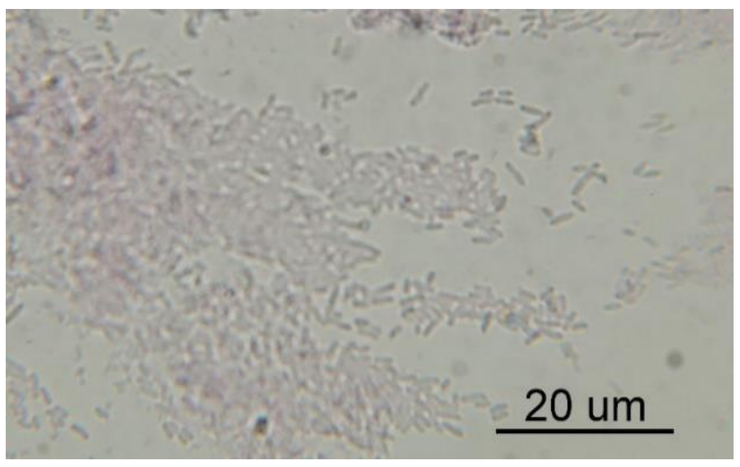


在圖一中，LB培養基之發光強度平均值隨著時間有逐漸上升的趨勢(R^2=0.9)。

圖一　25°C LB第4-7小時發光強度平均值折線圖

因為平均發光強度至第7小時達到最大值，且考量到後續應用的易觀察性，因此我們選定第7小時作為後續替代培養基發光強度平均值測定之時間標準，進行測量及比較。

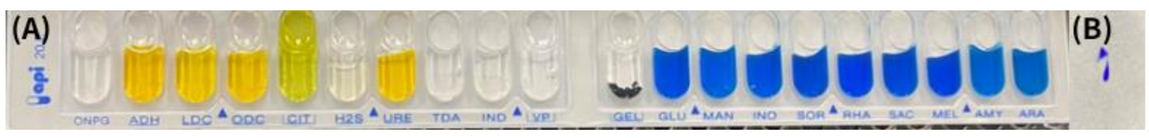
(一)革蘭氏染色



在圖二中，發光細菌在經過革蘭氏染色之後顯微鏡下呈紅色，屬於革蘭氏陰性菌。

圖二　發光細菌革蘭氏染色結果

(二)發光細菌生化特性測試



圖三　發光細菌生化測試結果。(A) API 20E套組。(B)加入細胞色素C。

在圖三(A)中，針對測試條中的20項測試均為陰性。在圖三(B)中的Oxidase test針對細胞色素C的檢測中結果呈現藍紫色(陽性)。

(三)菌種分子鑑定

經16S rDNA 特定區域(V1~V9 和 V1~V4)以 PCR 擴增放大、定序，定序的結果和NCBI 16Sribosomal RNA sequences (Bacterial and Archaea) 資料庫比對結果與 *Vibrio campbellii* 相符機率達99.72%

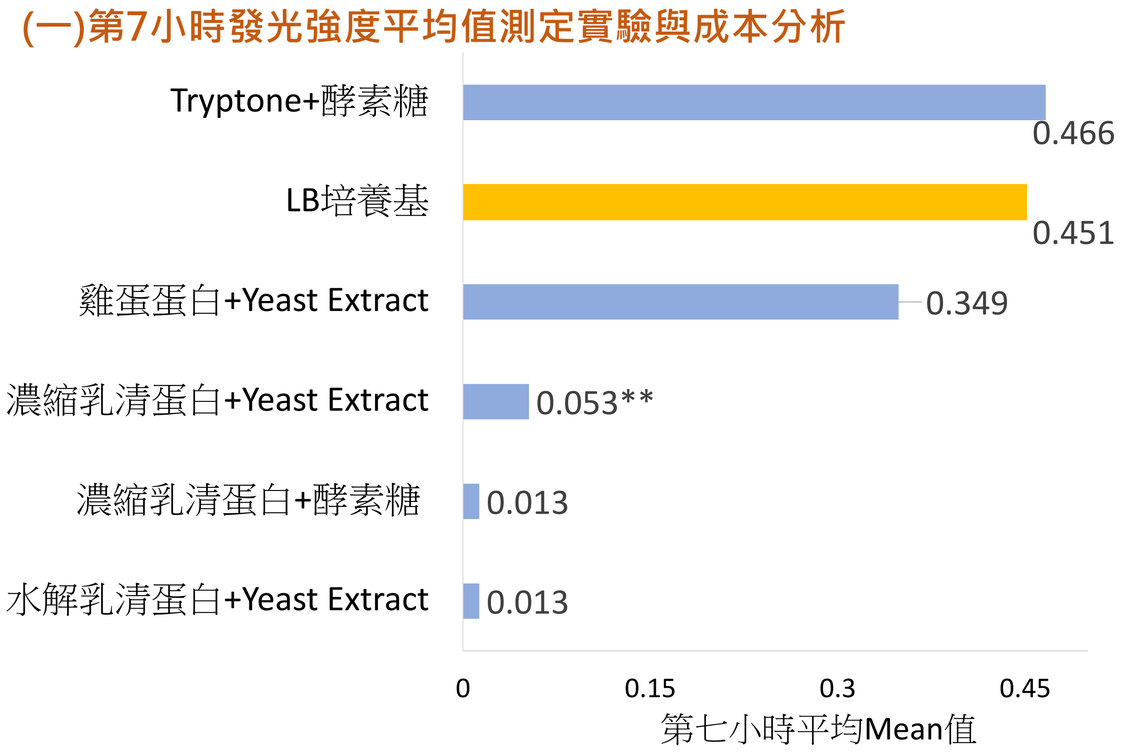
二、替代培養基實驗

表一　各式替代培養基接種發光細菌後之發光情形

編號	Tryptone替代物	Yeast Extract替代物	食鹽	水	發光情形
1	Tryptone 1g	酵素糖 0.4g	食鹽 1g	水 100 ml	+
2	Tryptone 1g	實驗級酵母粉 0.5g			+
3	水解乳清蛋白 1g	Yeast Extract 0.5g			+
4	水解乳清蛋白 1g	酵素糖 0.4g			-
5	水解乳清蛋白 1g	實驗級酵母粉 0.5g			-
6	濃縮乳清蛋白 1.3g	Yeast Extract 0.5g			+
7	濃縮乳清蛋白 1.3g	酵素糖 0.4g			+
8	濃縮乳清蛋白 1.3g	實驗級酵母粉 0.5g			-
9	雞蛋蛋白9g	Yeast Extract 0.5g			+
10	雞蛋蛋白9g	酵素糖0.4g			+
11	雞蛋蛋白9g	實驗級酵母粉 0.5g			+

+：表示培養基有發光
-：表示培養基無發光

(一)第7小時發光強度平均值測定實驗與成本分析



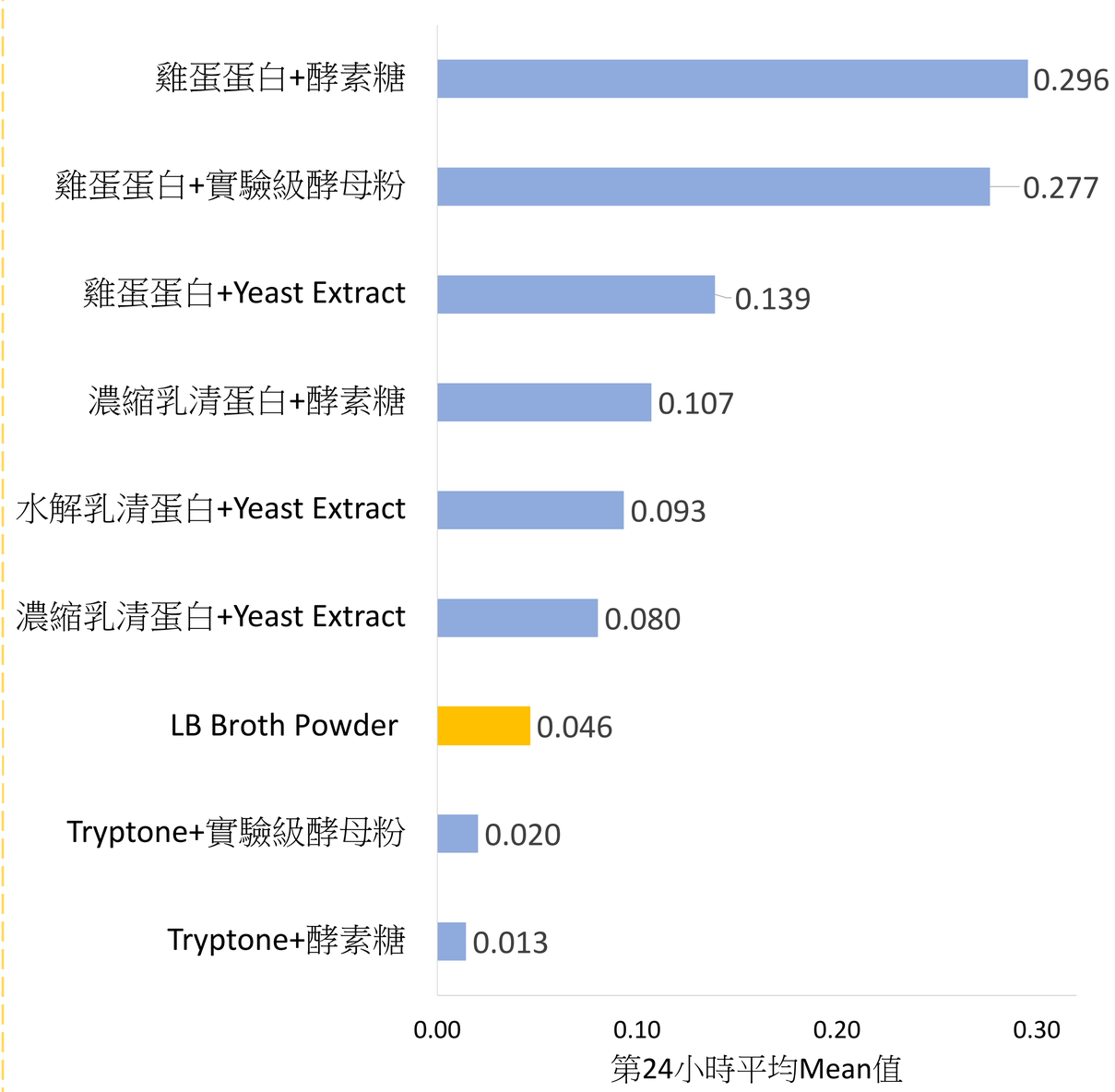
圖四　發光細菌五種替代培養基與LB第7小時發光強度平均值橫條圖

表二　五種替代培養基與LB培養基之金錢成本與第7小時發光強度平均值

編號	替代物 Tryptone	替代物 Yeast Extract	金錢成本 NTD/100ml	第7小時發光強度平均值	P值
1	LB Broth Powder（品牌G-Bioscience）		15.62	0.451	-
2	Tryptone	酵素糖	4.72(70%↓)	0.466(3%↑)	0.220
3	水解乳清蛋白	Yeast Extract	3.27(79%↓)	0.013(97%↓)	--
4	濃縮乳清蛋白	Yeast Extract	2.95(81%↓)	0.053(88%↓)	0.001*
5	濃縮乳清蛋白	酵素糖	1.30(91%↓)	0.013(97%↓)	--
6	雞蛋蛋白	Yeast Extract	3.70(76%↓)	0.349(22%↓)	0.142

*：P<0.05；**：P<0.01 (P值由各替代配方對LB之發光強度平均值t檢定而得
↓/↑：相較於LB之金錢成本或發光強度平均值之降幅/增幅。
--：編號3與5培養基因無出現發光情形故不統計P值。

(二)第24小時發光強度平均值測定實驗與成本分析



圖五　發光細菌25°C 所有替代培養基與LB第24小時發光強度平均值橫條圖

表三　所有替代培養基與LB培養基之金錢成本與第24小時發光強度平均值表

編號	替代物 Tryptone	替代物 Yeast Extract	金錢成本 NTD/100ml	第24小時發光強度平均值	P值
1	LB Broth Powder（品牌G-Bioscience）		15.62	0.046	-
2	Tryptone	酵素糖	4.72(70%↓)	0.014(70%↓)	0.010*
3	Tryptone	實驗級酵母粉	4.97(68%↓)	0.020(57%↓)	0.037*
4	水解乳清蛋白	Yeast Extract	3.27(79%↓)	0.093(102%↑)	0.199
5	濃縮乳清蛋白	Yeast Extract	2.95(81%↓)	0.080(74%↑)	0.094
6	濃縮乳清蛋白	酵素糖	1.30(91%↓)	0.107(132%↑)	0.066
7	雞蛋蛋白	Yeast Extract	3.70(76%↓)	0.139(202%↑)	0.031*
8	雞蛋蛋白	酵素糖	1.55(90%↓)	0.296(543%↑)	0.0001**
9	雞蛋蛋白	實驗級酵母粉	2.30(85%↓)	0.277(502%↑)	0.042*

*：P<0.05；**：P<0.01 (此處P值由各替代配方對LB之發光強度平均值t檢定而得)
↓/↑：相較於LB之金錢成本或發光強度平均值之降幅/增幅。

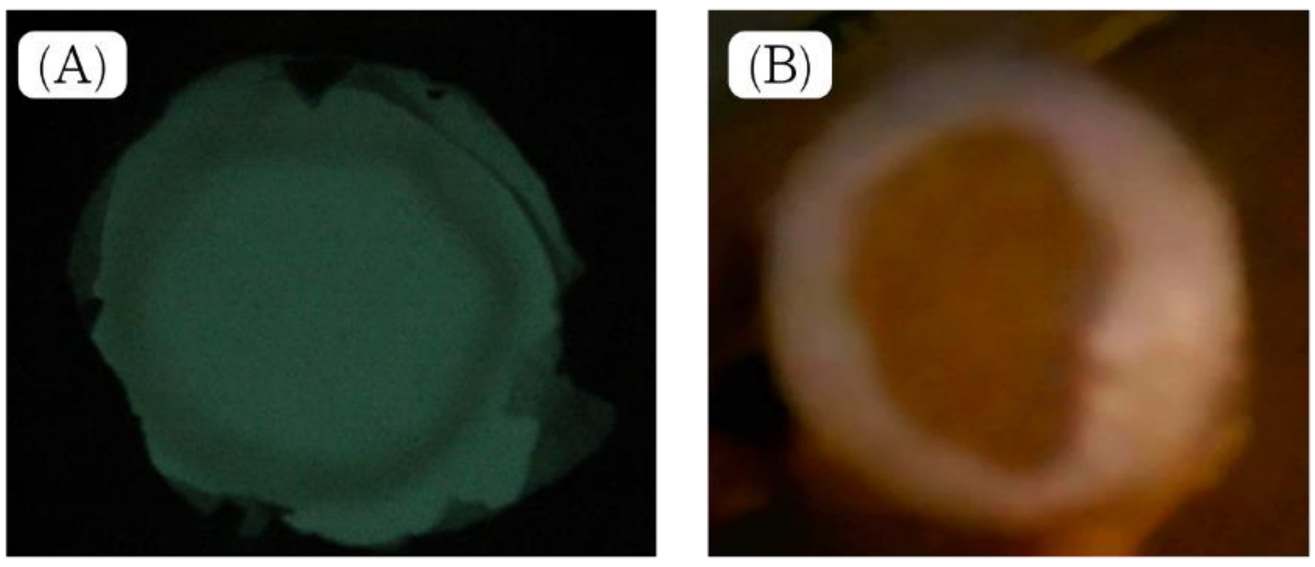
三、替代器材與設備實驗

表四　六種替代條件各六組25°C LB培養基下第48小時之單一菌落個數

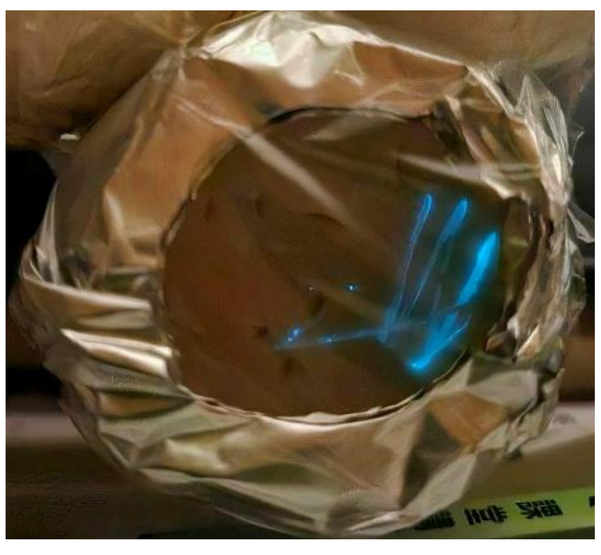
處理方式 滅菌處	處理方式 操作處	1	2	3	4	5	6	平均值	標準差
電鍋滅菌	無菌操作台	15	9	7	10	11	9	10.17	2.71
未滅菌	無菌操作台	×	×	×	×	×	×	×	×
滅菌釜滅菌	無菌操作台	-	-	-	-	-	-	0.00	0.00
滅菌釜滅菌	自製簡易操作台	1	-	-	-	-	-	0.17	0.41
電鍋滅菌	自製簡易操作台	3	2	5	5	5	2	3.70	1.51

-：無細菌生長
×：培養基大面積汙染無法計數

四、教具開發-發光蛋製作



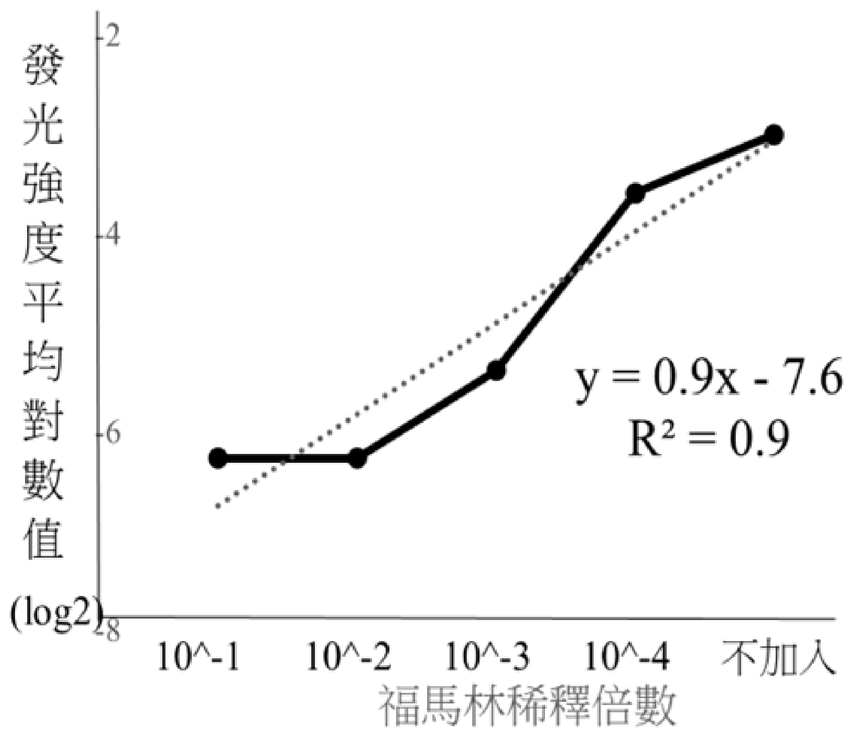
圖六　25°C液態雞蛋培養基第17小時實驗組與對照組於暗室之拍攝發光情形。（A）加入實驗級酵母粉鹽水之實驗組。（B）只加入鹽水之對照組。



圖六中，在第17小時，有加入實驗級酵母粉鹽水之雞蛋已經有出現發光情形，而只加入鹽水之雞蛋則沒有發光。塗盤於加入酵素糖鹽水之固態雞蛋培養基之發光情形（圖七），可發現發光細菌可於固態雞蛋培養基表面生長，並且可看見幾處單一菌落點。

圖七　25°C固態雞蛋培養基第48小時於暗室拍攝情形。

五、發光細菌毒物分析實驗



圖八　滴入1ml不同稀釋倍數之福馬林稀釋液後各管之發光強度平均值折線圖

在圖八中，在菌液中滴入不同稀釋倍數之福馬林，隨著稀釋倍數越小，其發光強度平均值越大。可見發光細菌具有不同濃度的毒物分析能力。

陸、討論

一、以市售材料製作發光細菌培養基之替代可行性與效果討論

實驗結果表明，**酵素糖、實驗級酵母粉、水解乳清蛋白、濃縮乳清蛋白和雞蛋蛋白都具有一定程度的替代潛力**。另外，蛋白質替代物在高溫高壓滅菌時可能出現變性凝固，**固態蛋白質中可能含有細菌生長所需的營養物質**。總體而言，部分替代配方在細菌培養和發光方面表現優異，但不適用於需要清澈培養基的實驗。

二、替代培養基成本與平均發光強度平均值綜合分析

本實驗所試驗出**替代培養基相對LB培養基的金錢成本均可節省70~90%。雞蛋蛋白+酵素糖成本下降了90%且其發光強度平均值是培養基中增加百分比最高者，高達543%，其t檢定p=0.0001（p <0.05），與LB培養基有著極為顯著的差異，可見此替代培養基具有成本低、發光能力佳且發光情形穩定的特性**。而雞蛋蛋白+Yeast Extract 培養基與雞蛋蛋白+實驗級酵母粉培養基成本下降7成以上，發光強度平均值則分別為LB培養基之三倍與六倍，可見其具有成本低、發光能力不錯且發光情形穩定的特性。

三、替代器材之效果

根據實驗結果，**電鍋具有一定之滅菌能力**，且增加在電鍋的加熱時長有助於增加滅菌的效果，在無滅菌釜下可選用電鍋增加滅菌效果。同樣使用滅菌釜滅菌的情況下，使用無菌操作台操作之六組均無菌落生長，而使用自製簡易操作台操作僅有其中一組出現一個單一菌落，其餘五組均無出現菌落生長，由此結果可見**自製簡易操作台極為接近無菌操作台之效果**。

四、教具製作——發光蛋可行性

液態發光蛋在自製替代培養基材料的使用與低菌量的條件下製作，可以**成功**以肉眼觀察其微光，利用相機長曝光功能可更好觀察。後續利用蛋白質遇熱變性的特點製作固態雞蛋培養基並分區畫線，發現**固態發光蛋可使發光菌生長並且發光，有潛力作為進行純化發光細菌所需的固態替代培養基。**

五、發光細菌簡易培養法推廣應用至國中小之可行性

第一，根據發光細菌的特性：**方便採集、生物安全等級無高危險性，發光特性**可讓學生於暗室中輕易地觀察發光細菌。第二，根據實驗結果：**成本大幅下降且材料方便取得的替代培養基**、**電鍋滅菌與自製簡易操作台**的簡易替代可行性，**液態、固態發光蛋教成本低、簡易操作且取得便利**。綜上所述，此簡易發光細菌簡易培養法具有推廣應用至國中小之可行性。

柒、結論

一. 自南寮漁港採集之發光細菌，經16S rDNA 特定區域(V1~V9 和 V1~V4)以 PCR 擴增放大、定序，定序的結果和NCBI 16Sribosomal RNA sequences (Bacterial and Archaea) 資料庫比對結果與***Vibrio campbellii*** **相符機率達99.72%.**

二. 培養結果證實LB培養基中Tryptone可使用**水解乳清蛋白、濃縮乳清蛋白、雞蛋蛋白**等作為替代物，Yeast Extract可用**酵素糖、實驗級酵母粉**作為替代物。

三. 各項替代培養基皆具有培養發光細菌的能力，且比較LB培養基的金錢成本皆**可節省70-90%之金錢成本**。而各項替代培養基中尤以**雞蛋蛋白+酵素糖之發光強度平均值超過LB培養基**。

四. 電鍋滅菌具有一定之滅菌效果，若是在無滅菌釜之情況，電鍋仍舊是一項可簡易替代滅菌釜的選項；**自製簡易操作台**接近無菌操作台可以達到之使用效果。

五. 成本分析結果顯示**發光蛋之液態與固態培養基具有材料簡單、培養效果佳、成本低廉(6.5元/顆)等優勢**，有進一步作為國中小微生物課程教具之教育應用價值。

六. 測試不同濃度福馬林結果，顯示發光細菌**具有檢驗毒物之應用價值**。

捌、重要參考文獻

一、中文部分

教育部（2019）。國民小學及國民中學設施設備基準。台北市：作者。25。

二、英文部分

1. Brodl, E., Winkler, A., & Macheroux, P. (2018). Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence. Computational and structural biotechnology journal, 16, 551–564.
2. Ferreira, T., & Rasband, W. (2012). ImageJ user guide. Imagej/fiji, 1, 155-161.Health Aspects. InTech.
3. Réhault-Godbert, S., Guyot, N., & Nys, Y. (2019). The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health. Nutrients, 11(3), 684.