

# 2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070002

參展科別 微生物學

作品名稱 利用麵包蟲腸道菌降解聚丙烯並探討其優化策略

得獎獎項

就讀學校 國立彰化女子高級中學

指導教師 蕭碧鳳

作者姓名 謝依軒、吳仔叡

關鍵詞 麵包蟲、腸道菌、降解塑膠

## 作者簡介



我們是吳仔叡和謝依軒，目前就讀彰化女中數理資優班三年級，很幸運有機會接觸到專題研究，並進入實驗室做實驗，研究的過程中雖然遇到許多挫折，但多虧了組員間互相打氣激勵及學長姐、老師和教授的協助，還有許許多多在背後一直支持我們的人，我們才能一路走到現在，也因此我們學到寶貴的科學經驗。

## 摘要

塑膠對環境危害甚深，雖已有研究證實部分昆蟲可降解塑膠類的聚苯乙烯（PS），但關於聚丙烯（PP）的生物降解研究很少，也沒有進一步透過腸道菌相分析，鑑定出負責降解的菌種。因此我們希望利用麵包蟲生物降解 PP，透過 16S rRNA 定序分析找出可降解 PP 的潛力菌種，解決塑膠垃圾對環境造成的傷害。我們的實驗結果顯示，麵包蟲能攝食 PP 並生長，且加入濕料及利用糞便移植腸道菌相能增加麵包蟲對 PP 的消耗量，證明麵包蟲能攝食 PP 與腸道菌相有關。利用次世代基因定序分析腸道菌相，麵包蟲攝食 PP 後腸道菌相有極為顯著的變化，其中腸道菌 *Pseudomonas stutzeri* 顯著增多，經實驗證實此菌可降解 PP，且在 37°C、中性環境的降解效果較佳，一星期約降解 3.4 % 的 PP。我們所使用的方法可快速篩選出能降解 PP 的菌種。

## Abstract

Plastics have exactly done grave harm to the environment. Research indicates that some particular insects can degrade polystyrene, but the research regarding biodegradation in polypropylene (PP) is still few. Moreover, it didn't identify the bacteria in charge of plastic degradation via intestinal guts analysis. Therefore, we exploited mealworms for biodegrading PP. Using metagenomic sequencing analysis-16s rRNA, we examined potential bacteria that can degrade PP. This study was for an intention to resolve the threat that plastic waste poses to the environment. Our experimental results suggested that mealworms could consume PP as well as grow. In addition, adding wet foods and fecal microbiota transplants could hugely increase the consumption rate. These results showed that mealworms consuming PP were associated with gut-microbe. We then found a significant change in gut-microbiome after mealworms consume PP by metagenomic analysis. *Pseudomonas stutzeri* significantly increased among these gut-microbe, and it turned out that this kind of gut-microbe could degrade PP. We also showed that *Pseudomonas stutzeri* degraded significantly more PP at 37 °C and neutral pH, and it degraded approximately 3.4 % of PP within a week. The method we used can quickly screen out the bacteria that is able to degrade PP.

# 壹、 前言

## 一、研究動機

### (一) 文獻探討

#### 1. 聚丙烯 (PP) 對環境與生態的危害

塑膠污染中，以塑膠微粒構成的環境及生態破壞最為嚴重，多數塑膠微粒隨著河流流入海洋，因其表面積高，且對污染物吸附係數高，除了降低海洋浮游植物的存活率，也會刺激海洋浮游植物產生高蛋白且具黏性的分泌物，加速塑膠微粒聚合。而在環境中，塑膠微粒大多為聚丙烯 (PP) 及聚乙烯 (PE)，這兩者也是產量排名前二的塑膠，產量排名僅次於第一名的聚乙烯 (PE) 便是聚丙烯 (PP)，聚丙烯被廣泛應用在我們的日常生活中，如：飲料封膜、免洗餐具、吸管等，更有研究指出：未來 5 年，全球對聚丙烯的需求仍保持 4% 左右的速度增加，甚至有很大一部分的聚丙烯在使用過後並沒有被回收。聚丙烯常用來製造免洗餐具，現今免洗餐具廣泛被使用，但人類卻隨手丟棄，使得聚丙烯對環境及生態造成莫大的傷害，我國雖從 2002 年開始實行限塑政策，但是在 2009 年到 2019 年間，塑膠免洗餐具的使用量在 10 年間的成長量竟高達 37%；再者，聚丙烯的立體分子結構具有支鏈而較為堅韌，表面具有疏水性，且聚丙烯在主碳鏈上的每個重複單元上有甲基支鏈，這也使它比聚乙烯還難降解，成為最難以被降解的塑膠。目前文獻多為探討生物降解保麗龍 (PS) 及寶特瓶 (PET) 等塑膠的研究，而生物降解聚丙烯的研究卻屈指可數，可能是礙於聚丙烯較不易被降解，不過仍有研究指出：*Bacillus subtilis*、*Bacillus flexus* 等菌種可降解聚丙烯 (Ambika et al., 2010)，顯示聚丙烯還是有生物降解的可能性。

#### 2. 篩選降解塑膠菌種的方法

根據研究顯示，大多數能降解塑膠的菌種是由塑膠垃圾場、污水處理廠，或是回收場富含腐植質的活性污泥裡，採集塑膠環境樣本，並以塑膠作為唯一碳源的篩選培養基培養，找出能夠降解塑膠的菌種。如：2016 年 Shosuke Yoshida 等人在寶特

瓶回收場收集兩百五十個 PET 塑膠殘骸樣本，並培養在 PET 塑膠膜上，找到可降解 PET 的菌種。而有另一研究為從土壤中分離出可降解聚苯乙烯（EPS）的菌種，利用 EPS 薄膜提供碳源，找出附著在 EPS 薄膜上面的細菌（Naima et al., 2010）。除了從環境中取得降解塑膠的菌種，也有部分研究顯示可由生物體的腸道菌分離出可降解塑膠的菌種，也為篩選降解塑膠菌種的相關研究多了一個新的突破與發現。

### 3. 麵包蟲具有可降解塑膠的腸道菌

有研究指出麵包蟲有可降解聚苯乙烯的腸道菌（Yu et al., 2015），可使聚苯乙烯長鏈結構變化，裂解成低分子量的碎片，且現今已有來自 22 個國家的學者證實麵包蟲可藉由攝食保麗龍（聚苯乙烯）而存活（Shan et al., 2018），而其腸道菌相扮演了重要角色，能分解聚苯乙烯作為能量來源。而食用聚苯乙烯的麵包蟲，就算被其他生物攝食後亦不會造成生物鏈的破壞（Anja et al., 2020），由上述研究可知：可藉由麵包蟲腸道中找出可降解塑膠的菌種，來協助塑膠垃圾的處理。

## （二） 實驗動機

新聞媒體時常報導塑膠對生態環境的危害，如：海龜誤食塑膠吸管而死亡，或是塑膠微粒對環境造成的傷害。這些報導中傷害環境的罪魁禍首就是「塑膠」，這些塑膠垃圾被隨意丟棄，或是被當作一般垃圾一樣掩埋，最終會在環境中被野生動物誤食，抑或經歷風化變成塑膠微粒，對生態環境造成更深的傷害。更進一步探討，塑膠對生態環境的傷害，最終還是會回到身為最高級消費者的人類身上，因此如何解決塑膠對生態造成的危害，已是刻不容緩的事。由上述文獻探討可知，產量排名第二的聚丙烯是最難被降解的塑膠，因此，找到有效率的降解聚丙烯的方法非常重要。

在眾多研究文獻中可知：麵包蟲的腸道根據攝食不同塑膠，產生具有可降解聚苯乙烯（PS）、聚乙烯（PE）、聚氯乙烯（PVC）等不同塑膠的菌種。不過對於聚丙烯（PP）的研究卻屈指可數，是因為麵包蟲只能攝食發泡過的塑膠，沒有發泡的塑

膠過於堅硬，不利於麵包蟲啃食，而在聚丙烯的發泡過程中，氣體很難被 PP 熔體包覆，也因熔體黏度變化大使得發泡 PP 不容易製作。在能夠取得發泡 PP 的情況下，想探討：麵包蟲能不能食用目前最難以被降解的聚丙烯，並生成可降解聚丙烯的腸道菌相，並從這些腸道菌中，找到能夠有效降解聚丙烯的方法。

## 二、研究目的

- (一) 探討攝食發泡聚丙烯 (PP) 對麵包蟲生長的影响：
  - 1. 探討麵包蟲能否以 PP 作為營養來源
  - 2. 加入濕料能否增加麵包蟲對 PP 的消耗量
  - 3. 糞便移植腸道菌相能否增加麵包蟲對 PP 的消耗量
- (二) 探討攝食發泡 PP 對麵包蟲腸道菌相的影响
- (三) 從麵包蟲的腸道菌相中，篩選出可降解 PP 的腸道菌
- (四) 檢測篩選出來的腸道菌降解 PP 之能力
- (五) 探討腸道菌降解 PP 能力的優化策略

## 貳、 研究方法或過程

### 一、研究材料

#### (一) 攝食塑膠 (PP) 對麵包蟲生長的影響

			
篩網	盤子	電子天秤	恆溫行生長箱
			
胡蘿蔔切片 (濕料)	麥片	發泡塑膠粒 (聚丙烯PP)	麵包蟲 <i>Tenebrio molitor</i>
			
鑷子			

#### (二) 麵包蟲腸組織 DNA 萃取及 16S rRNA 定序：

##### 1. 設備及器材

			
麵包蟲 <i>Tenebrio molitor</i>	解剖用具	培養皿	微量離心管
			
震盪器	研磨棒	離心機	乾浴槽
			
Genomic DNA Mini Column			

## 2. 藥品

Lysis buffer

Proteinase k

FX buffer

酒精 (98-100 %)

WS Buffer

ddH<sub>2</sub>O

### (三) 腸道菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 降解聚丙烯 (PP) 能力測試：

			
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (BCRC 17221)	分光光度計	無菌操作臺	微量分注器
			
酒精燈	三角塗抹棒	比色管	微量離心管
			
恆溫行生長箱	震盪器	血清瓶	血清瓶固定器
			
培養皿	滅菌釜	LB培養基	石臘膜
			
塑膠粒 (聚丙烯PP)			



## 二、研究方法

### (一) 研究流程圖

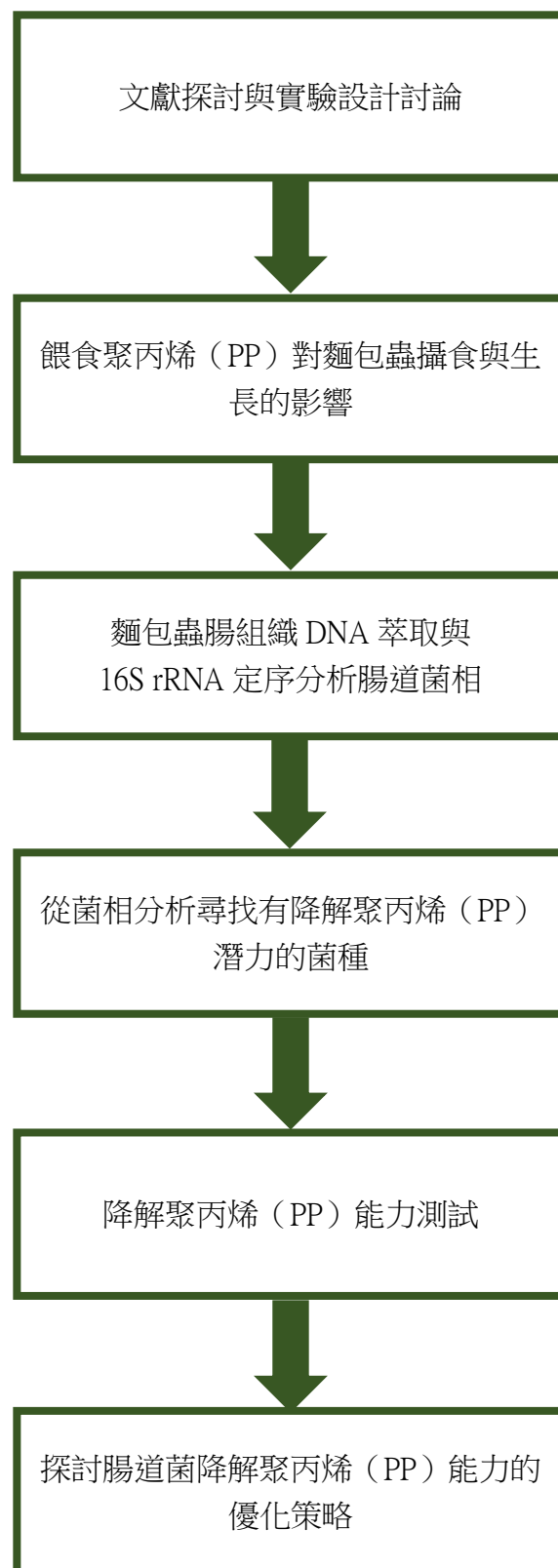


圖 (一) 研究流程圖

## (二) 攝食聚丙烯 (PP) 對麵包蟲攝食與生長的影響

### 1. 麵包蟲能否以 PP 為營養來源

#### (1) 操作變因

餵食聚丙烯 (PP) 的組別是實驗組，餵食麥片的組別是控制組。

#### (2) 實驗方法

在溫度 24 °C、相對濕度 70 % 的環境下，選用重量為 0.04~0.05 g 的麵包蟲，並將其分為麥片組 (控制組) 與 PP 組，每組各三個重複組，每個重複組 10 隻麵包蟲。

每隔一週測量麵包蟲生長量及飼料消耗量。



圖 (二) 塑膠組麵包蟲

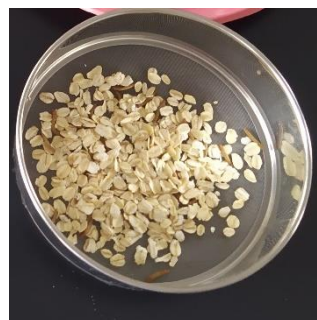


圖 (三) 麥片組麵包蟲

### 2. 加入濕料 (紅蘿蔔) 能否增加麵包蟲對聚丙烯 (PP) 的消耗量

#### (1) 操作變因

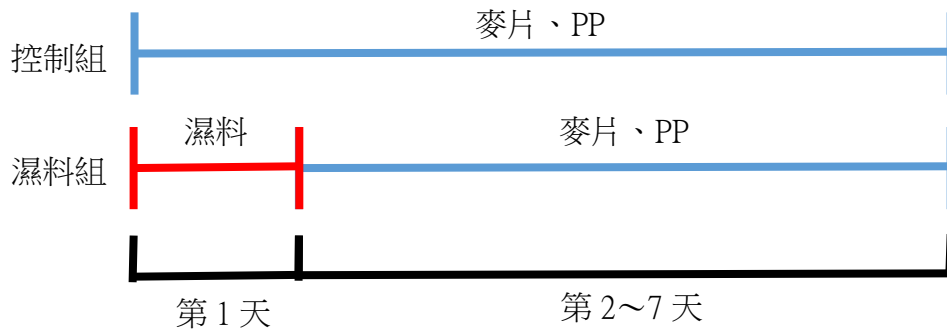
在餵食的飼料 (麥片、PP) 中加入濕料的組別為實驗組，不加入濕料的組別為控制組。

#### (2) 實驗方法

在溫度 24 °C、相對濕度 70 % 的環境下，選用重量為 0.04~0.05 g 的麵包蟲，並將其分為控制組與濕料組，每組各三個重複組，每個重複組 10 隻麵包蟲。

實驗設計如圖 (四)，在每週的第一天餵食濕料並測量在此一天中麵包蟲生長量及濕料消耗量，在第二天到第七天拿出濕料並分別餵食麥片及

塑膠，測量六天中麵包蟲生長量及飼料消耗量。



圖（四） 濕料組實驗設計



圖（五） 餵食濕料（紅蘿蔔）的麵包蟲

### 3. 糞便移植腸道菌相能否增加麵包蟲對聚丙烯（PP）的消耗量

#### （1） 操作變因

餵食 PP 的麵包蟲受到糞便移植的組別為實驗組，無糞便移植的組別為控制組。

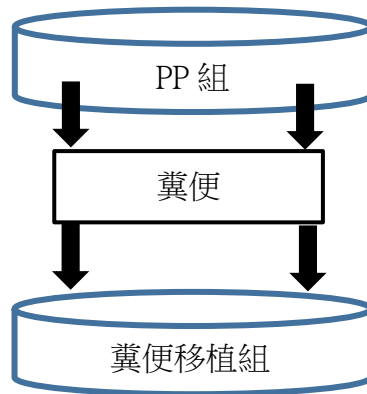
#### （2） 實驗方法

在溫度 24 °C、相對濕度 70 %的環境下，選用重量為 0.04~0.05 g 的麵包蟲，並將其分為 PP 組（控制組）與糞便移植組，每組各三個重複組，每個重複組 10 隻麵包蟲。

每隔一週測量麵包蟲生長量及飼料消耗量。

糞便移植組實驗設計如圖（六），糞便來源為長期吃 PP 的麵包蟲產生的糞便，將 PP 混合糞便作為飼料餵食麵包蟲，並在底下鋪糞便及落下糞便的方

式讓麵包蟲接觸移植。



圖（六）糞便移植實驗設計

### （三）腸組織 DNA 萃取及 16S rRNA 定序分析腸道菌相

#### 1. 腸組織 DNA 萃取

- （1）選用前面實驗：麵包蟲能否以 PP 為營養來源的麵包蟲，將麵包蟲解剖並取其腸道，每隻蟲的腸組織約為 18~24 mg。
- （2）取腸組織放入 1.5 ml 離心管，加入 0.18 ml Lysis buffer 再以均質機攪碎，加入 0.02 ml Proteinase k 震盪搖晃 20 秒再以 60 °C 培養 1 小時。
- （3）加入 0.3 ml FX buffer 在 70 °C 震盪培養 10 分鐘，再加入 0.2 ml 酒精（98~100 %），震盪搖晃後加入 Genomic DNA Mini Column，以 8000 rpm 離心 2 分鐘。
- （4）加入 0.5 ml WS Buffer 重複離心（8000 rpm，2 分鐘）二次，再空離心（10000rpm，2 分鐘）以去除殘留的酒精。
- （5）將 Column 放置到新的 1.5 ml 微量離心管加入 0.2 mL ddH<sub>2</sub>O（事先預熱至 65°C）靜置 5 分鐘，最後離心（8000 rpm，2 分鐘），收集離心下來的 Genomic DNA。



圖（七） 解剖取麵包蟲腸組織



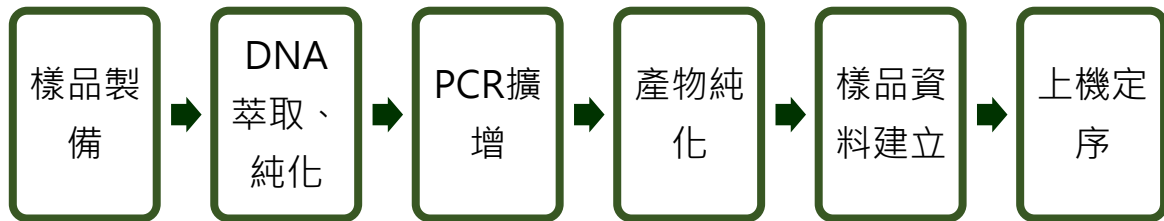
圖（八） 麵包蟲腸組織



圖（九） 萃取出腸組織 DNA（紅圈處）

## 2. 16S rRNA 定序

我們將麵包蟲腸組織 DNA 樣本送交生技公司做 16S rRNA 定序，生技公司再將定序結果整理後提供給我們，以下是生技公司的定序流程。



圖（十） 定序流程圖

#### （四） 腸道菌（*Pseudomonas stutzeri*）降解聚丙烯（PP）的能力測試

從餵食 PP 的麵包蟲腸道菌相分析中，得到前十大優勢菌種（屬階級），藉由查詢文獻比對找出最可能降解 PP 的菌種，並向生物資源保存及研究中心（BCRC）購買 *Pseudomonas stutzeri*（編號：17221，來源：臺灣）。以下實驗皆以波長為 600 nm 測量吸光值。

##### 1. 測量吸光值對應菌液濃度的標準曲線

- （1） 用 LB 培養液繼代培養 *Pseudomonas stutzeri*
- （2） 取菌液 2 ml 測吸光值
- （3） 分別將菌液連續稀釋，取 2 ml 測吸光值
- （4） 取不同稀釋倍率菌液 0.02 ml 滴在固態培養基上，以三角塗抹棒塗開
- （5） 培養於 37 °C，經一天後取出計算菌落數



圖（十一） 塗開後培養一天的 *P. stutzeri*

## 2. 生長曲線的測定

- (1) 取 100 ml 血清瓶裝入 99 ml LB 培養液
- (2) 將大約  $10^6$  CFU/ml (吸光值大約 0.0500~0.0600) *P. stutzeri* 取 1 ml 接種至 LB 培養液中，形成大約  $10^4$  CFU/ml (吸光值大約 0.0100~0.0300) 的菌液
- (3) 將血清瓶蓋轉鬆一圈並以鋁箔紙包住以防污染，放置在血清瓶固定器中，以轉速 200 rpm 震盪培養於 37 °C
- (4) 每一小時取出並抽取 2 ml 菌液測量吸光值

## 3. 腸道菌 (*P. stutzeri*) 降解聚丙烯 (PP) 的能力測試

### (1) 操作變因

在達到穩定期 (Stationary phase) 後加入 PP 的組別為實驗組，不做任何改變的組別為控制組。

### (2) 實驗方法

根據 *P. stutzeri* 生長曲線，12 小時後進入穩定期，PP 組 (實驗組) 在第 14 小時加入 PP，控制組不做改變，以轉速 200 rpm 震盪培養於 37 °C，每一小時測量吸光值變化。

## (五) 探討腸道菌降解 PP 能力的優化策略

### 1. pH 值

調整 LB 培養基酸鹼值，分為 5、7、9 三種 pH 值。

根據測量出的生長曲線，先以不同 pH 值的 LB 培養基培養，PP 組 (實驗組) 在進入穩定期後加入 PP，控制組不做改變，以轉速 200 rpm 震盪培養於 37 °C，每一小時測量吸光值變化。

### 2. 溫度

分別在不同溫度的生長箱培養，分為 25°C、30°C、37°C 三種溫度。

根據測量出的生長曲線，先以不同 pH 值的 LB 培養基培養，PP 組 (實驗組) 在進入穩定期後加入 PP，控制組不做改變，以轉速 200 rpm 震盪培養於 37 °C，每一小時測量吸光值變化。

## 參、研究結果與討論

### 一、研究結果

#### (一) 攝食聚丙烯 (PP) 對麵包蟲生長的影響

##### 1. 麵包蟲能否以 PP 為營養來源

平均生長量為平均每隻麵包蟲每週增加的重量。飼料平均消耗量為平均每隻麵包蟲每週消耗的飼料量，利用飼料減少的重量再減去糞便重量，得到真實被消耗的飼料量。飼料轉換率的公式為

$$\text{飼料轉換率} = \frac{\text{飼料消耗量(g)}}{\text{麵包蟲生長量(g)}}, \text{ 意義為每隻麵包蟲每增加 1 g 重量所需的飼料量。}$$

- (1) 根據圖 (十二)，PP 組在攝食 PP 後有生長，表示麵包蟲能夠以 PP 作為營養來源。
- (2) PP 組在第二週的平均生長量超過麥片組。在圖 (十三) 中，麥片組第二週的平均消耗量也明顯降低，造成麥片組第二週平均生長量較少的原因為飼料平均消耗量的減少。
- (3) 麥片組第一週與第三週的飼料平均消耗量比 PP 組多，且具有顯著差異，但在圖 (十二) 的平均生長量卻沒有顯著差異。
- (4) 表 (一) 的結果顯示：PP 組麵包蟲的飼料轉換率較麥片組低，也就是麵包蟲利用 PP 的效率較利用麥片高。

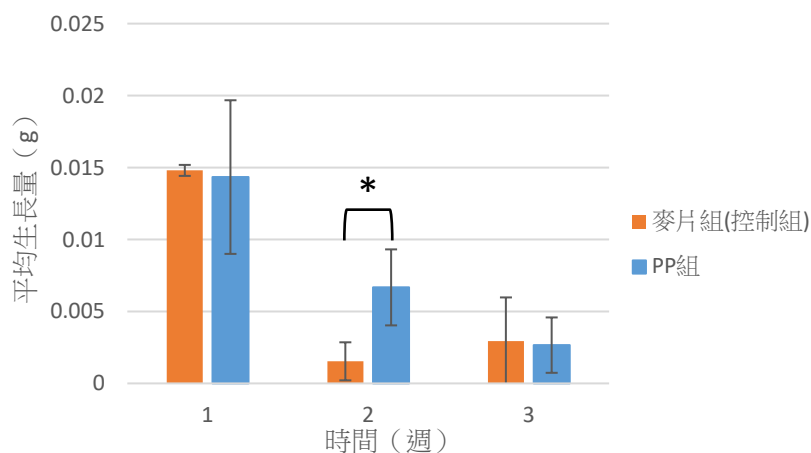
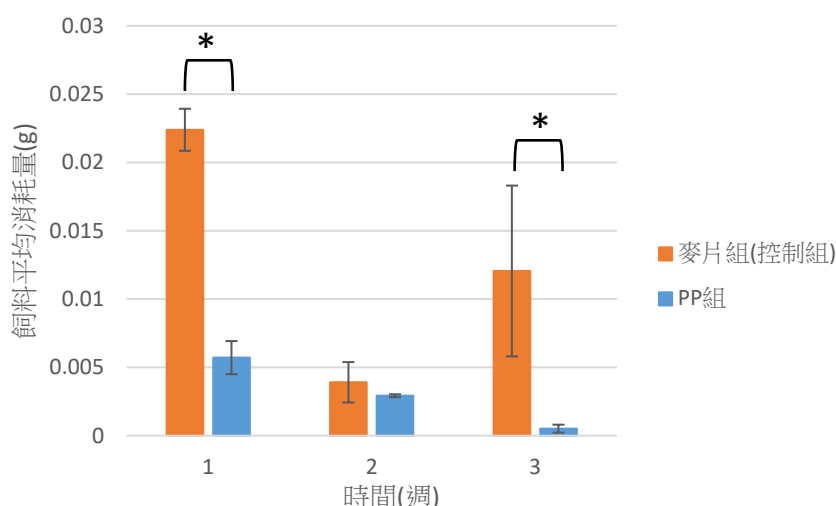


圖 (十二) PP 組與麥片組 (控制組) 麵包蟲平均生長量變化





圖（十三） PP 組與麥片組（控制組）的飼料平均消耗量比較

表（一） PP 組與麥片組（控制組）的飼料轉換率比較

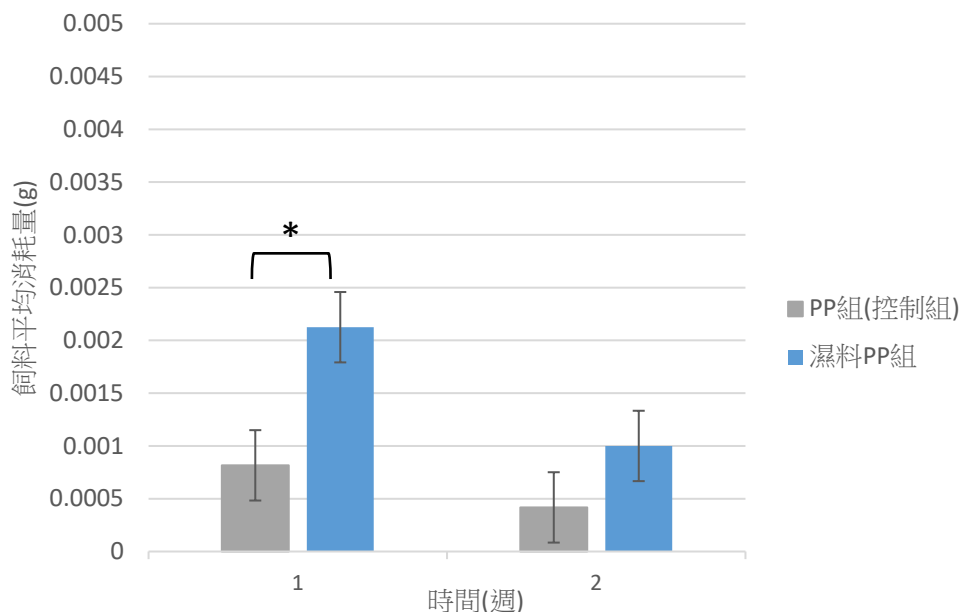
	麥片組	PP組
第1週	1.515	0.411
第2週	4.708	0.479
第3週	6.457	0.210

2. 加入濕料（紅蘿蔔）能否增加麵包蟲對聚丙烯（PP）的消耗量

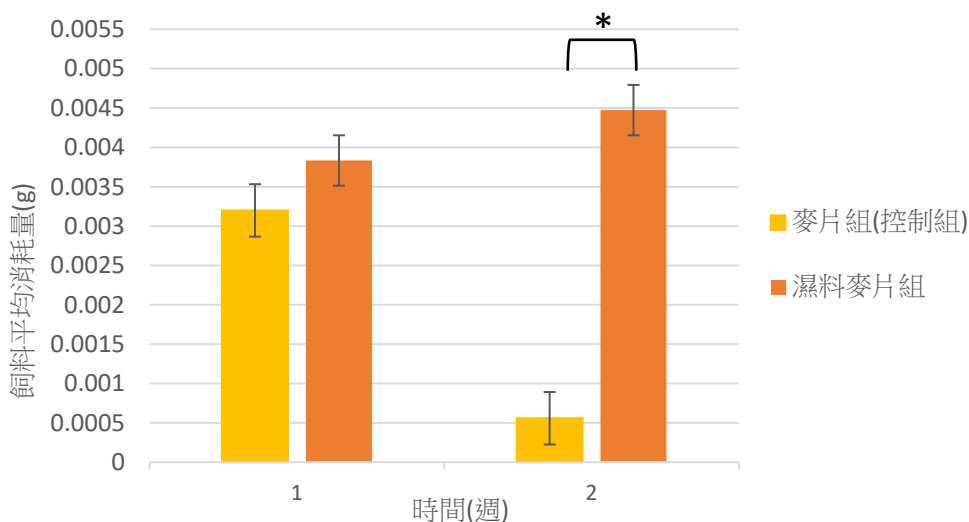
在此實驗中，飼料平均消耗量為平均每隻麵包蟲每天消耗的飼料量。

- (1) 圖（十四）顯示：濕料 PP 組的飼料平均消耗量大於 PP 組（控制組），攝食濕料（紅蘿蔔）使麵包蟲對 PP 的平均消耗量增加。
- (2) 在圖（十五）中，紅蘿蔔麥片組的飼料平均消耗量大於麥片組（控制組），攝食濕料（紅蘿蔔）使麵包蟲對麥片的平均消耗量增加。

(3) 綜合圖(十四)與圖(十五)，攝食濕料(紅蘿蔔)可使麵包蟲對飼料的平均消耗量增加。



圖(十四) 濕料PP組與PP組(控制組)的飼料平均消耗量比較



圖(十五) 濕料麥片組與麥片組(控制組)的飼料平均消耗量比較

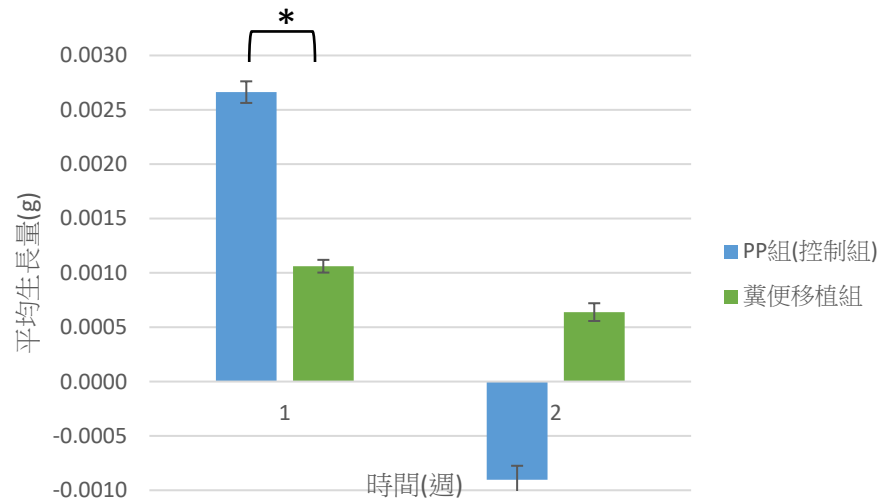
### 3. 糞便移植腸道菌相能否增加麵包蟲對聚丙烯(PP)的消耗量

在此實驗中，飼料平均消耗量為平均每隻麵包蟲每天消耗的飼料量。

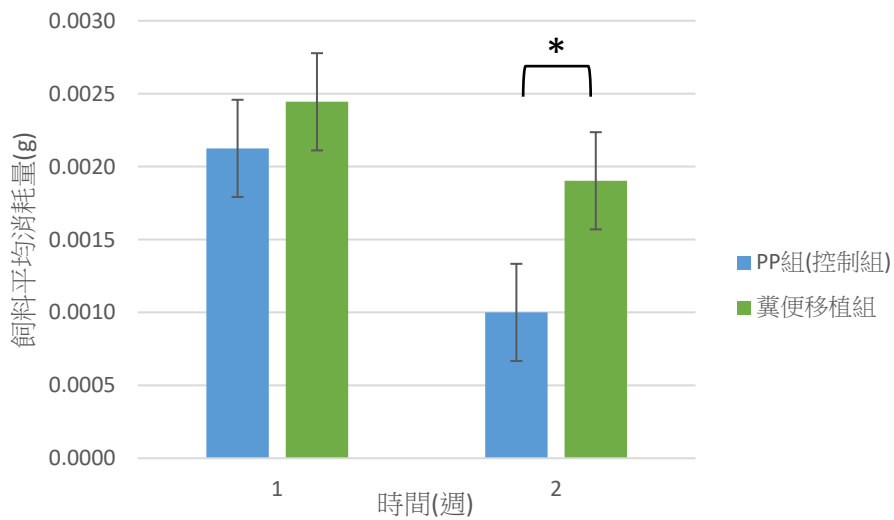
(1) 根據圖(十六)可知道：糞便移植後，糞便移植組的平均生長量在第一週

小於 PP 組（控制組），到了第二週平均生長量下降，但是超越 PP 組。

(2) 在圖（十七）中，糞便移植組的飼料平均消耗量在第一週大於 PP 組，說明藉由糞便移植能促進麵包蟲消耗更多 PP。



圖（十六） 糞便移植組與 PP 組（控制組）麵包蟲平均生長量變化

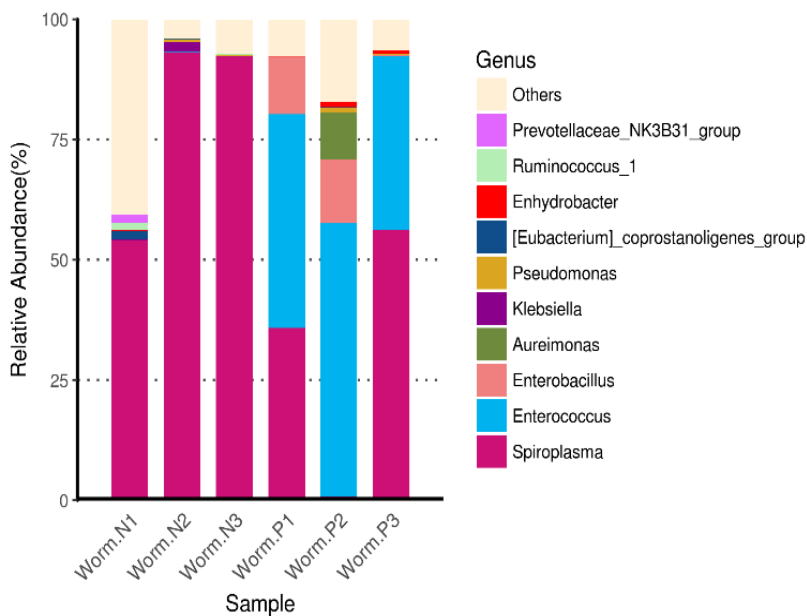


圖（十七） 糞便移植組與 PP 組（控制組）的飼料平均消耗量比較

## (二) 腸組織 DNA 萃取及 16S rRNA 定序分析腸道菌相

利用 16S rRNA 定序分析麵包蟲腸道內的腸道菌相，圖（十八）是不同組腸道菌相前十大優勢菌種（屬階級），N1~N3 組為麥片組（控制組），P1~P3 組為 PP 組。

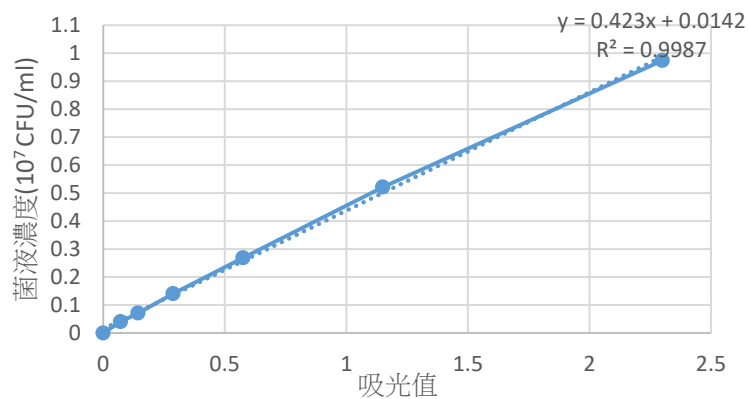
1. 攝食 PP 改變麵包蟲的腸道菌相，從圖（十八）中就可直接看出麥片組及 PP 組的腸道菌相有極大的差異，且同組但不同個體的麵包蟲腸道菌相的相似度很高。
2. 在 PP 組中較為優勢的菌種，可能為可降解 PP 的菌種或是協助其他菌種降解 PP，例如：*Enterococcus*、*Enterobacillus*、*Aureimonas*、*Pseudomonas* 屬。



圖（十八） 不同組麵包蟲腸道菌相前十大優勢菌種（屬階級）

## (三) 腸道菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 降解聚丙烯 (PP) 的能力測試

1. *Pseudomonas stutzeri* 吸光值對應菌液濃度的標準曲線



圖（十九）*Pseudomonas stutzeri* 標準曲線

## 2. *Pseudomonas stutzeri* 生長曲線

大約第 3 小時進入對數期 (Log phase)，第 12 小時進入穩定期 (Stationary phase)。

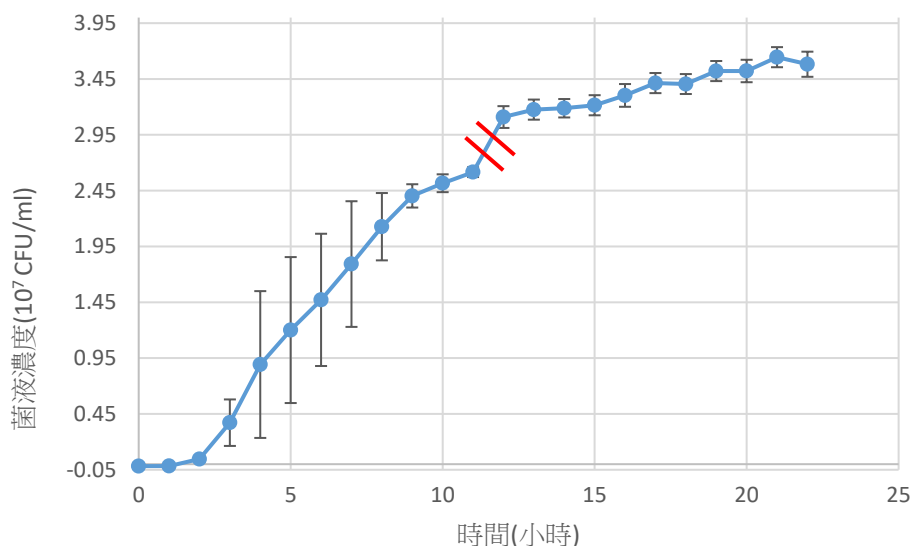
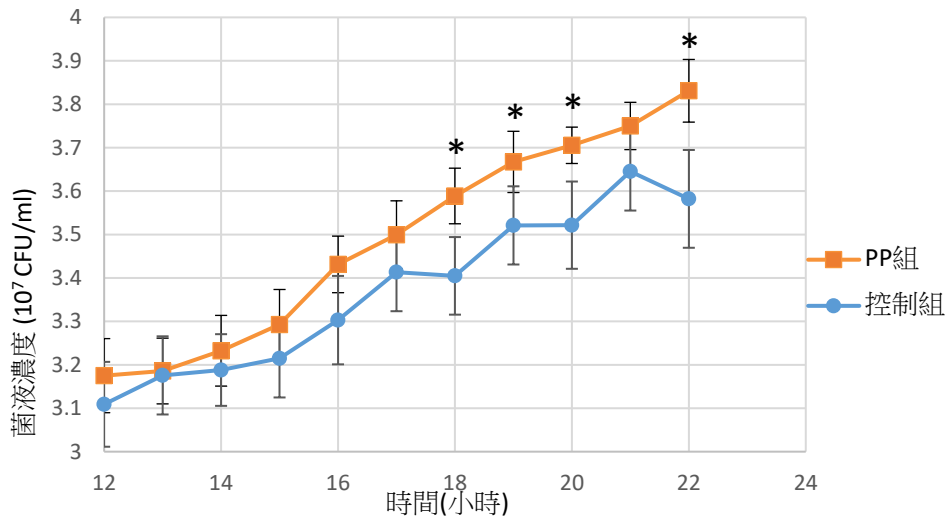


圖 (二十) *Pseudomonas stutzeri* 生長曲線

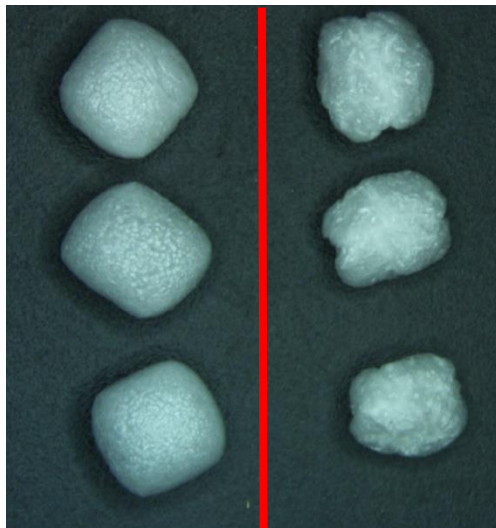
## 3. 腸道菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 降解聚丙烯 (PP) 的能力測試

- (1) 在第 14 小時加入 PP 粒，可從圖 (二十一) 看出 PP 組的曲線相對於控制組上升。
- (2) 利用 T.TEST 分析，在第 18 小時開始有顯著差異，且在之後的時間也持續有顯著差異。
- (3) 在圖 (二十二) 中，可看到經過 *P.stutzeri* 降解後的 PP 粒，比未被降解的 PP 粒更小，表面也更不平整。

(4) 圖(二十三)顯示：降解前後 PP 粒重量減輕，並且有顯著差異。



圖(二十一) PP 組與控制組 *P.stutzeri* 生長曲線比較



圖(二十二) 降解 PP 前後的 PP 粒表面比較  
(左邊為降解前，右邊為降解後)

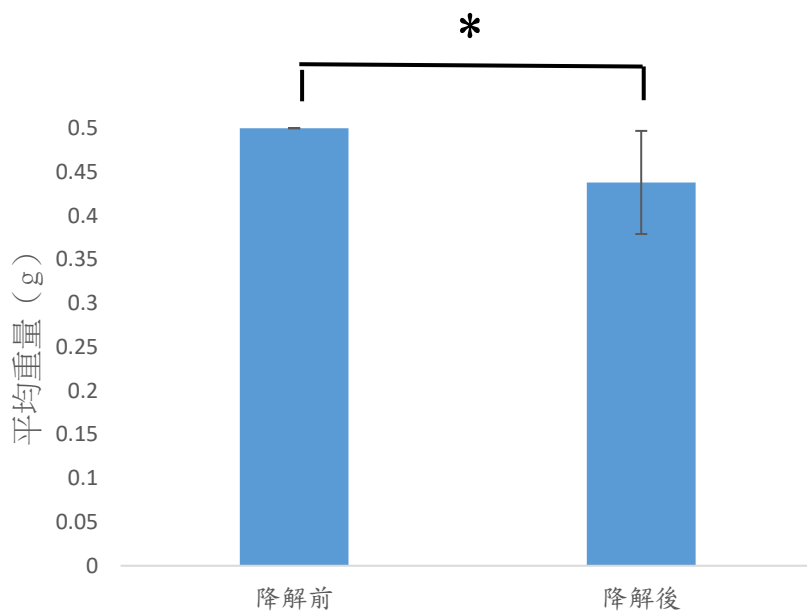


圖 (二十三) 降解前後 PP 粒平均重量比較

(四) 探討腸道菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 降解 PP 能力的優化策略

1. pH 值

在不同 pH 值的環境下培養，從圖 (二十四) 得知：*P. stutzeri* 在 pH 值為 5、9 的環境下較不利於降解 PP，在 pH 值為 7 時，PP 重量減輕較多，且有顯著差異。

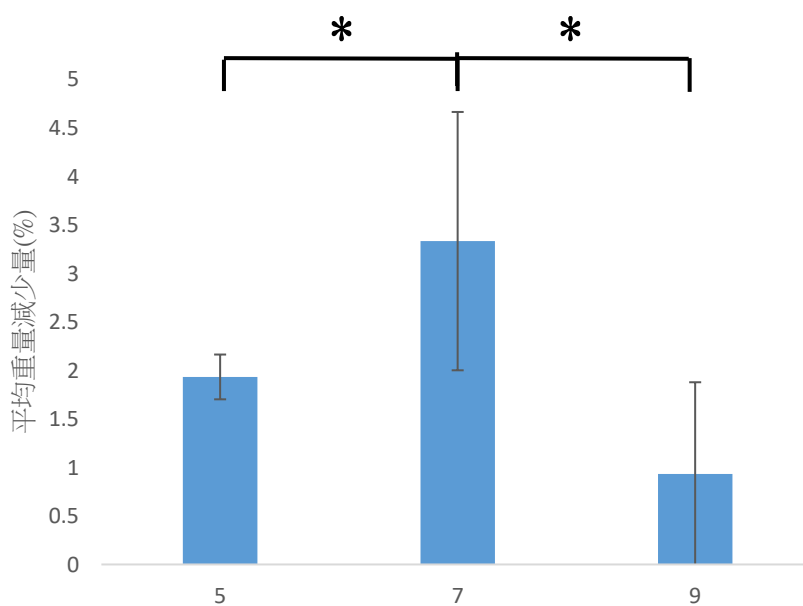
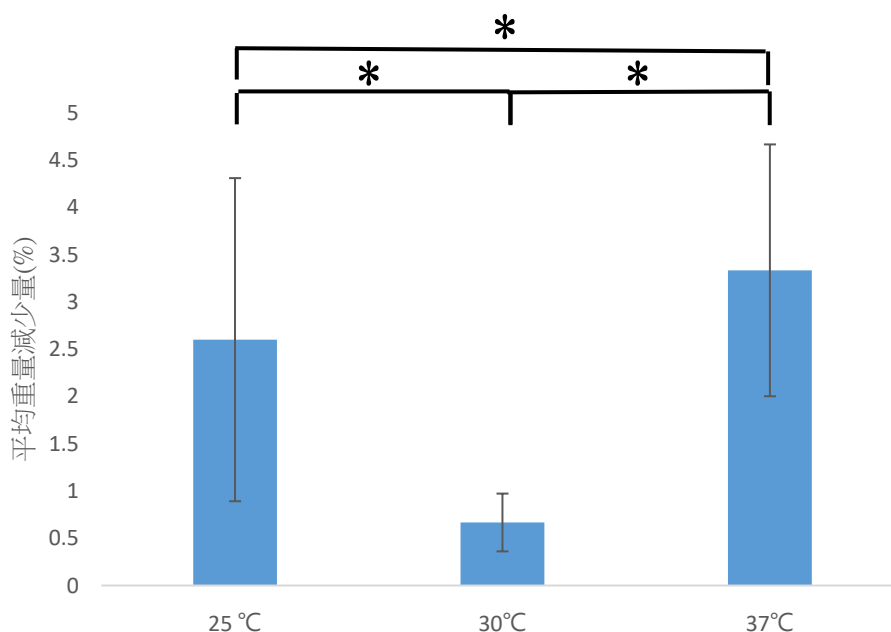


圖 (二十四) 不同 pH 值環境下降解一週 PP 粒平均重量減少量比較

## 2. 溫度

在不同溫度的環境下培養，圖（二十五）顯示 *P. stutzeri* 在溫度為 25°C、30°C 的環境下不利於降解 PP，在溫度為 37°C 時，PP 重量減輕較多，且有顯著差異。



圖（二十五）不同溫度下降解一週 PP 粒平均重量減少量比較

## 二、研究討論

### （一）攝食聚丙烯（PP）對麵包蟲生長的影響

#### 1. 麵包蟲能否以聚丙烯（PP）為營養來源

##### （1）實驗方法的改進

在實驗設計上使用篩網分離飼料及糞便，同時也可減少麵包蟲接觸糞便而生病。實驗所使用的 PP 經由切片處理，為了使其與麥片形態相近。

##### （2）實驗結果的討論

PP 組麵包蟲重量增加，則麵包蟲能以 PP 作為營養來源，表示麵包蟲能降解 PP，我們先前做過無飼料組的麵包蟲生長實驗，麵包蟲在沒有飼料的情況下會不斷蛻皮、重量下降及體型縮小，在實驗中未發現麵包蟲有此現象，所以排除利用殘留於體內食物來生存的可能性。



造成第二週麥片組麵包蟲生長量下降的原因為飼料消耗量減少，我們推論麵包蟲飼料消耗量減少是由於餵食單一飼料造成，而餵食單一飼料愈久麵包蟲生長愈差。

## 2. 加入濕料（紅蘿蔔）能否增加麵包蟲對聚丙烯（PP）的消耗量

根據麵包蟲能否以聚丙烯（PP）為營養來源的實驗數據，PP 的消耗量遠遠低於麥片的消耗量，且麵包蟲的飼料消耗量減少可能是因為餵食單一飼料，我們在經過觀察及結果推論：PP 消耗量低於麥片消耗量的原因是 PP 組麵包蟲活力較麥片組差，且餵食單一飼料造成飼料消耗量減少。向專門培養麵包蟲的繁殖場詢問後，得知加入濕料會讓麵包蟲長得更好，所以設計此實驗。

## 3. 糞便移植腸道菌相能否增加麵包蟲對聚丙烯（PP）的消耗量

### （1） 實驗方法的改進

在查詢文獻時發現可藉由糞便移植改變腸道菌相，糞便移植主要有兩個做法：餵食糞便及從肛門將糞便液注入。但是麵包蟲體型較小，只能以飼料混合糞便讓麵包蟲吃下，為了提高糞便移植的成功率，所以我們加入以接觸糞便的方式來進行糞便移植。原本上方放置長期吃 PP 麵包蟲，下方放糞便移植組，上方的麵包蟲會降下糞便。由於降下的糞便量不多且接觸時間短，造成與控制組無明顯差異，所以我們在實驗設計中加入以底下鋪糞便的方式來接觸移植。

### （2） 實驗結果的討論

糞便移植組的生長量在第二週超越 PP 組（控制組），但是 PP 組在第二週的生長量為負，這是因為選取的麵包蟲可能剛好在第二週蛻皮，造成測量時重量減少，而糞便移植組雖然也會因蛻皮減重，但因攝取更多 PP 且消化能力較強，所以沒有減重反而增重，在第二週有顯著差異。

糞便移植組的飼料平均消耗量大於 PP 組，雖然在第一週差異不顯著，但在第二週才有顯著差異，可能原因是麵包蟲接觸糞便的時間不長且以接觸移植腸道菌相的效果有限，需要較長時間才能產生作用。

糞便移植腸道菌相能增加麵包蟲消耗 PP 的量並提升平均生長量，證明麵

包蟲能降解 PP 與腸道菌相有關。

## (二) 腸組織 DNA 萃取及 16S rRNA 定序的實驗結果討論

餵食麥片組和 PP 組的麵包蟲腸道菌相在屬階級的優勢菌種具有明顯的差異，且同組不同個體的腸道菌相分析的結果很相似，我們推測其原因為麵包蟲的適應力很強，食性廣泛，可以攝食單一食物很長時間而不會死亡，讓腸道菌相有夠長的時間隨著食物改變而調整變化，產生同組間較為一致性的結果。

## (三) 腸道菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 降解聚丙烯 (PP) 的能力測試的實驗結果討論

1. 在 PP 組中大量出現的菌種，可能為可降解 PP 或是協助降解 PP 的菌種，接下來需要找出在 PP 組與麥片組具有顯著差異且有降解 PP 潛力的菌種。我們查詢文獻後，發現有研究指出 *Pseudomonas stutzeri* 能降解聚苯乙烯 (PS) (Peng et al., 2020)，且 *P.stutzeri* 在 PP 組與麥片組具有顯著差異，如圖 (二十六)，之後再針對這個菌設計實驗，檢測其是否有降解聚丙烯 (PP) 的能力。

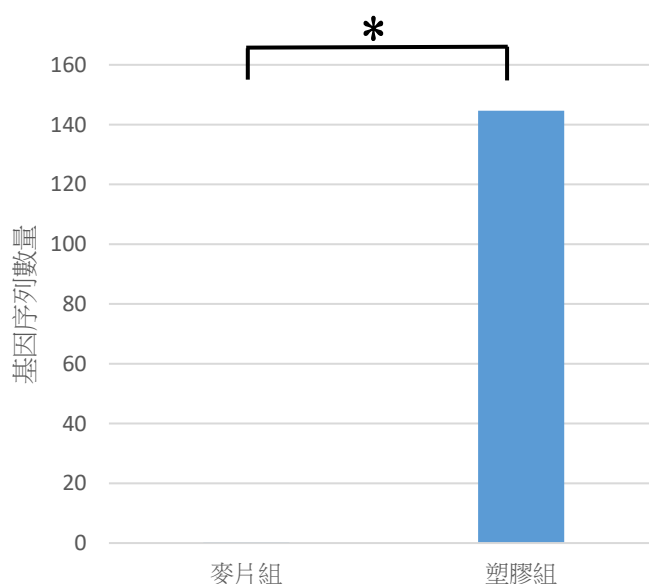


圖 (二十六) *P.stutzeri* 在麥片組與 PP 組腸道菌相的基因序列數量比較

2. 在第 14 小時加入 PP 後，生長曲線並沒有立即產生顯著差異，因為在加入 PP 後，需要一段適應期。

3. 在第 18 小時開始有顯著差異，PP 組的族群生長曲線明顯超越控制組，雖然在第 21 小時沒有顯著差異，但隨後第 22 小時仍具有顯著差異；另外比較 PP 組的 PP 粒與原始 PP 粒表面的顯微照片，可發現 PP 組的 PP 粒明顯變小，且表面變得不規則，可證實 *Pseudomonas stutzeri* 確實可降解 PP。
4. *Pseudomonas stutzeri* 確實可降解 PP，以 PP 作為營養來源並促進生長，但加入 PP 後無法再產生一個如同對數期的快速生長，原因為：
  - (1) 聚丙烯 (PP) 為碳氫聚合物，只能提供碳和氫，但細菌生長所需的物質不只有碳和氫。
  - (2) 穩定期的細菌活性較對數期來得差，以及代謝廢物的增加，條件與環境受限。
  - (3) 加入的 PP 粒與菌液接觸表面積太小，導致只有極少部分細菌接觸到 PP 粒，若能找到微米或奈米級 PP 微粒進行實驗，結果應該大為不同。
  - (4) 只有單一菌種降解 PP，缺少輔助菌種。

#### (四) 探討腸道菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 降解 PP 能力的優化策略的實驗結果討論

*P. stutzeri* 在 pH 值為 5、9 的環境下較不利於降解 PP，而在 pH 值為 7 時降解效果較佳，且 *P. stutzeri* 在溫度為 25°C、30°C 的環境下較不利於降解 PP，而在 37°C 時降解效果較佳，顯示 *P. stutzeri* 在偏中性及 37°C 的環境下，能夠比較有效率的降解 PP，大約一星期可降解 3.4 % 的 PP。

(五) 麵包蟲很適合作為篩選降解塑膠菌種的生物

在篩選降解塑膠菌種方面，將麵包蟲篩選與從環境中直接篩選做比較，如表

(二)，我們認為麵包蟲很適合作為篩選降解塑膠菌種的生物，其篩選方式更容易也更快速。我們在餵食麵包蟲三週後，取 PP 組與麥片組麵包蟲各三隻作菌相分析就可得到如此顯著的結果，篩選出可分解 PP 的菌種，代表麵包蟲很適合用來作為篩選菌種的方式。

表(二) 麵包蟲篩選與其他篩選方式比較

	取樣方式	樣本數量	篩選方法	篩選的效率
麵包蟲篩選	讓麵包蟲攝食食物，並等待麵包蟲生成腸道菌相。	培養10~30隻麵包蟲	1. 腸道菌相分析，找到較為優勢的菌種，將篩選範圍縮小到「屬」。 2. 腸道液細菌培養在篩選培養基上	較高 1. 等待麵包蟲生成腸道菌相，大概只需三個星期，且只需培養10~30隻，所花費的時間較少。 2. 先經由麵包蟲初步篩選，將篩選範圍縮小後再篩選，效率較高。
從環境中直接篩選	需實地到回收場採集底泥、廢水等。	100個以上	將不同樣本細菌培養在篩選培養基上	較低 1. 實地採集超過100個樣本，消耗較多時間、心力。 2. 篩選至少100個樣本，相當於海選且成功率低，效率較低。

## 肆、結論與應用

### 一、結論

- (一) 麵包蟲能夠降解聚丙烯 (PP) 並從中獲得能量促進生長，加入濕料餵食效果更好。
- (二) 糞便移植腸道菌相能促使麵包蟲消耗更多的 PP 並促進生長，可知腸道菌相的改變有助於麵包蟲降解 PP。
- (三) 麵包蟲餵食 PP 組與麥片組的腸道菌相差異極大。在 PP 組中，基因序列數量較多且與麥片組有顯著差異的菌種，有極大可能為可降解聚丙烯或是協助降解聚丙烯的菌種。
- (四) 經由腸道菌相分析找出的 *Pseudomonas stutzeri* 可降解 PP，以 PP 為營養來源並促進生長，且在偏中性及 37°C 的環境下，能更有效率的降解 PP，一星期約可降解 3.4 % 的 PP。
- (五) 在篩選降解塑膠菌種方面，與從環境中直接篩選做比較，麵包蟲篩選較為快速、容

易，因此我們認為麵包蟲很適合作為篩選降解塑膠菌種的生物。

## 二、未來展望與應用

- (一) 探討腸道菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 降解 PP 能力的優化策略中，未來可更深入探討溫度、接觸表面積、PP 預處理 (如 UV 處理 PP 使其碎裂) 等因素，找到能讓 *P. stutzeri* 更有效率降解 PP 的方法。
- (二) 麵包蟲能消耗聚丙烯 (PP) 可能不完全是特定腸道菌的作用，麵包蟲腸道內可能有其他或輔助菌種、甚至麵包蟲本身也有相關機制參與作用，未來可加入多種抗生素處理組，清除麵包蟲腸道菌相的特定菌種或相關菌群，釐清菌群間的交互作用或確認麵包蟲本身能否消耗 PP。麵包蟲腸道菌相中，菌的種類非常多，降解 PP 的作用可能是許多腸道菌共同作用的結果，未來可嘗試混合不同腸道菌來降解 PP。
- (三) 根據文獻，麵包蟲在攝食聚苯乙烯 (PS) 後，在 PS 中的有毒添加物不會累積在麵包蟲身體裡 (Anja et al, 2019)。未來可更進一步探討麵包蟲在攝食 PP 後，會不會將有毒的添加物累積在體內，以及腸道菌是否具有降解有毒添加物的可能性。
- (四) 麵包蟲及腸道菌都是生物，在降解 PP 時會遇到許多環境及條件限制，假使能夠找到其降解 PP 的作用機制，將能使降解 PP 的作用應用到更多層面。

## 伍、參考文獻

- 一、劉家慧、林芸君、李智鈞、董怡芳 (2006)。活體垃圾車。中華民國第四十六屆中小學科學展覽會作品說明書。
- 二、曾依晴 (2009)。從麵包蟲體內分離出可分解保麗龍之菌種。2009 年臺灣國際科學展覽會優勝作品。
- 三、吳威逸、陳泓安、朱庭彤 (2020)。塑膠「麥」來—麥皮蟲消化高密度聚乙烯 (HDPE) 塑膠之探討。108 學年度中學生小論文優等作品。

- 四、 Ambika, A. , Asha, A. J. , Sumit, B. , Parasu, V. U. , & Mukesh, D. (2010) . **Growth of Pseudomonas and Bacillus biofilms on pretreated polypropylene surface.** International Biodeterioration & Biodegradation. 64, Issue 6, 530-536.
- 五、 Anja, M. B. , Shu, G. , Renmao, T. , Daliang, N. , Shan, S. Y. , Jizhong, Z. , Wei, W. , & Craig, S. C. (2018) . **Biodegradation of Polyethylene and Plastic Mixtures in Mealworms (Larvae of *Tenebrio molitor*) and Effects on the Gut Microbiome.** Environmental science & technology, 6526-6533.
- 六、 Anja, M. B. , Sahar, H. E. A. , Uwakmfon, A. I. , Yeo, M. C. , Wei, M. W. , Craig, S. C. (2019) . **Fate of Hexabromocyclododecane (HBCD), A Common Flame Retardant, In Polystyrene-Degrading Mealworms: Elevated HBCD Levels in Egested Polymer but No Bioaccumulation.** Environ. Sci. Technol, 364–371.
- 七、 Cacciari, I. , Quatrini, P. Zirletta, G. , Mincione, E. , Vinciguerra, V. , Lupattelli, P. , & Sermanni, G. (1993) . **Isotactic Polypropylene Biodegradation by a Microbial Community: Physicochemical Characterization of Metabolites Produced.** Applied And Environmental Microbiology, 3695-3700.
- 八、 Christabel, N. M. , Huxley, M. , Gabriel, M. , & Mabel, I. (2018) . **Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya.** Plos One.
- 九、 Elaine, R. M. (2008. 9) . **Next-Generation DNA Sequencing Methods.** Vol. 9, 387-402.
- 十、 Jiakang, R. , Yixin, H. , & Yu, Y. (2020) . **Microbial Degradation and Valorization of Plastic Wastes.** frontiers in Microbiology.
- 十一、 John, M. B. (2012) . **DNA Extraction Methods.** Advanced Topics in Forensic DNA Typing, 29-47.
- 十二、 Muralidhar, T. (2018) . **Plastic (LDPE) Degradation by Induced Mutations In Pseudomonas Putida.** Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology. Volume 12, Issue 9, 34-40.

- 十三、 Naima, A. , Ahmed, G. , Muhammad, I. A. , & Saadia, A. (2010) . **Isolation and identification of polystyrene biodegrading bacteria from soil.** African Journal of Microbiology Research. Vol. 4 ( 14 ) , 1537-1541.
- 十四、 Peng, Z. , Xue, S. D. , Bin, Z. , Qiang, A. , & Jin, S. G. (2020) . **Acceleration of biofilm formation in start-up of sequencing batch biofilm reactor using carriers immobilized with Pseudomonas stutzeri strain XL-2.** Bioresource Technology 314 , 123736.
- 十五、 Sam, B. , & Patrick, S. T. (2013) . **What is next generation sequencing?** BMJ Journals.
- 十六、 Shosuke, Y. , Kazumi, H. , Toshihiko, T. , Ikuo, T. , Hironao, Y. Yasuhito, M. , ..... Kohei, O. (2016) . **A bacterium that degrades and assimilates poly ( ethylene terephthalate ) .** American Association For The Advancement Of Science. Vol 351, Issue 6278, 1196-1199.
- 十七、 Shan, S. Y. , Wei, M. W. , Anja, M. B. , Han, Q. F. , Joseph, P. R. , Yiran, L. , ..... Craig, S. C. (2018) . **Ubiquity of polystyrene digestion and biodegradation within yellow mealworms, larvae of Tenebrio molitor Linnaeus.** Volume 212, 262-271.
- 十八、 Yu, Y. , Jun, Y. , Wei, M. W. , Jiao, Z. , Yiling, S. , Longcheng, G. , Ruifu, Y. , & Lei, J. (2015) . **Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 1. Chemical and Physical Characterization and Isotopic Tests.** Environ. Sci. Technol, 12080–12086.
- 十九、 Yu, Y. , Jun, Y. , Wei, M. W. , Jiao, Z. , Yiling, S. , Longcheng, G. , Ruifu, Y. , & Lei, J. (2015) . **Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 2. Role of Gut Microorganisms.** Environ. Sci. Technol. 12087–12093.

## 【評語】 070002

塑膠垃圾對環境的污染及生態的破壞，甚為嚴重，而在環境污染塑膠中，聚丙烯（PP）塑膠微粒，因結構的關係難以降解，更受關注。本研究擬尋找分解 PP 塑膠之菌種，利用麵包蟲能攝食 PP 並生長，當加入濕料及利用糞便移植，增加麵包蟲對 PP 的消耗量，並利用次世代定序分析腸道菌相，選取優勢菌種，進一步分析 *Pseudomonas stutzeri* 塑膠分解能力，顯示在中性環境、37°C 下，降解效果較佳。研究構想良好，並獲致初步結果，值得鼓勵，然諸多實驗細節未敘明，且菌株的選擇欠周詳，未具說服力，導致此延續性研究的結論及連貫性不足，甚是可惜。

1. 定序結果 *Pseudomonas* 並非最明顯之優勢種類，由前人文獻搜尋後選取 *Pseudomonas stutzeri* 進行後續實驗，而非由優勢種類分離或取得，進行後續驗證，欠缺本文的原創性及最初的實驗目的，殊為可惜。
2. 實驗材料需說明麵包蟲的來源、種源確認，以及飼養與保存的方法。PP 的來源，以及餵食食物的來源都需說明清楚，以確認實驗可以有再現性及穩定性。
3. 腸道菌降解 PP 優化實驗部分可再加強，以強化應用的潛力。