

屏東縣第65屆國民中小學科學展覽會

作品說明書

科 別：生活與應用科學科(二)

組 別：國小組

作品名稱：剋菌新思維:天然物和奈米粒子在水果防腐上的
效果

關 鍵 詞：奈米粒子、天然物、抗菌（最多3個）

編號：A7011

剋菌新思維:天然物和奈米粒子在水果防腐上的效果

摘要

細菌、黴菌對水果及動物都會造成損害，細菌、黴菌對傳統抗生素的抗藥性持續增加是一個全球性問題。我們藉由此研究證實是否有其他物質如奈米粒子(銀、鋅)、天然物(茶樹精油、尤加利精油)可以去抑制細菌、黴菌的生長。從實驗結果中我們發現奈米鋅、奈米銀、茶樹精油、尤加利精油在培養液、培養盤中都有抑制細菌及黴菌生長的效果，且濃度越高效果越好。在有加細菌的柑橘上加茶樹精油、尤加利精油後，其柑橘果肉較陰性對照組腐爛較慢。在有加黴菌的柑橘上先用茶樹精油、尤加利精油處理，其柑橘果肉黴菌生長的量較陰性對照組少。從電子顯微鏡的觀察結果中發現奈米銀可以進入到黴菌孢子內造成黴菌孢子的破壞，茶樹精油會造成黴菌孢子外膜出現破裂。

壹、前言

一、研究動機

自然老師上課的時候老師提到鐵可以被水、酸性和氧氣造成生鏽，但是塗油漆就可以防止鐵生鏽是因為把空中氧氣和水分隔離。有一次因為我發現我喜歡的水果都被霉菌和細菌感染後就爛掉了，所以我們認為可以塗抹奈米銀、奈米鋅、尤加利精油還有茶樹精油的隔離應該也可以保護水果，以免被細菌或黴菌感染，讓水果比較慢發霉可以保存較久。我們對此產生好奇，所以我們就開始實驗去研究發現是否真的可以有幫助。

二、研究目的

- (一)用奈米金屬(鋅、銀)去抑制細菌跟黴菌在水果上的生長。
- (二)用天然物(尤加利跟茶樹精油)去抑制細菌跟黴菌在水果上的生長。

三、文獻回顧

(一)抗藥性持續增加需要新型抗菌藥物來源

細菌對傳統抗生素的抗藥性持續增加是一個全球性問題。如今抗藥性菌株很常見，例如抗甲氧西林金黃色葡萄球菌、抗藥性肺炎鏈球菌和結核分枝桿菌…等。同樣地，真菌也對多西環素(polys)、唑類(azoles)和棘白菌素(echinocandins)產生了抗藥性，所有真菌物種都出現了抗藥性菌株。這凸顯了研究新的抗菌劑來治療上述微生物引起的感染是有其必要的。植物界是各種藥物的來源，藥用植物在醫療保健中發揮重要作用，並且可能成為對抗高抗藥性和多重抗藥性微生物的重要新型抗菌藥物來源。這些新型抗菌劑可能隱藏在安全的奈米粒子或藥用植物萃取精油中。

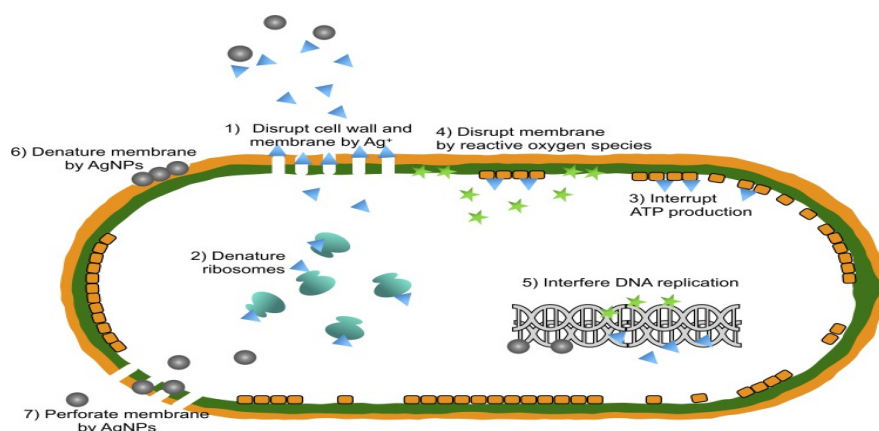
(二) 奈米鋅介紹

奈米鋅是一種過渡金屬氧化物和半導體，具有高結合能，因而具有高度氧化性。此反應導致活性氧的形成作為殺菌作用的途徑。另一種殺菌作用機制是透過釋放鋅離子（ Zn^{2+} ）來破壞細胞膜並可能干擾某些代謝途徑。多項研究顯示奈米鋅對人體細胞無毒性，此特性使得它們可用作抗菌劑，且對人體

細胞具有良好的生物相容性。奈米材料的多種抗菌機制主要歸因於其較高的比表面積與體積比及其獨特的物理化學性質。關於奈米鋅抗菌作用機制的進一步研究可以有助於預測細菌抗藥性的可能機制以及優化接觸時間和有效抑制作用。

(三)奈米銀介紹

銀奈米粒子可以持續釋放銀離子，這可能被認為是殺死微生物的機制。由於靜電吸引和對硫蛋白的親和力，銀離子可以黏附在細胞壁和細胞質膜上。黏附的離子可以增強細胞質膜的通透性，導致細菌包膜的破壞。遊離銀離子進入細胞後，呼吸酵素會失去活性，產生活性氧，但會中斷三磷酸腺苷的產生。活性氧可能是破壞細胞膜和脫氧核糖核酸 (DNA) 修飾的主要因素。由於硫和磷是 DNA 的重要組成部分，銀離子與 DNA 的硫和磷相互作用會導致 DNA 和細胞複製出現問題，甚至導致微生物的滅亡。此外，銀離子還可以透過使細胞質中的核糖體變性來抑制蛋白質的合成。



奈米銀粒子的抗菌作用

(<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7174845/>)

(四)茶樹精精油介紹

在澳大利亞，“茶樹”也被稱為“紙皮樹”，而 *M. quinquenervia* 的俗名包括“闊葉茶樹”和“闊葉紙皮樹”。此外，分別從紐西蘭植物 *Kunzea ericoides* 和 *Leptospermum scoparium* 中提取的精油被稱為紐西蘭茶樹精精油，儘管它們的成分與澳洲茶樹精精油有很大不同。我們文章中的茶樹精精油僅

指 *M. alternifolia* 油。茶樹精精油是由 *M. alternifolia* 生產的。千層屬屬於桃金娘科，約有 230 個種，幾乎全部原產於澳洲。當自然生長時，*M. alternifolia* 會長成一棵高約 5 至 8 公尺的樹。3 年以上的樹木通常在 10 月和 11 月開花，花序鬆散，呈白色至乳白色的頂生穗狀花序。

科學文獻中許多描述茶樹精精油抗菌活性。現已對多種細菌有敏感性，雖然大多數細菌對濃度為 1.0% 或更低有敏感，茶樹精精油在大多數情況下具有殺菌作用，儘管在較低濃度下還是可能具有抑菌作用。茶樹精精油對抗抗生素抗藥性細菌具有抗菌性引起人們的廣泛興趣，其中對耐甲氧西林金黃色葡萄球菌(超級細菌)有殺滅效果迄今為止受到的關注最多。茶樹精油確實能有效抑制金黃色葡萄球菌，並有抗發炎之機轉

(五)尤加利精油介紹

尤加利精油萃取至桃金娘科桉屬(*Eucalyptus*)的一種樹。本科有 140 屬，約 3800 種，分佈於世界熱帶、亞熱帶地區。桉樹屬原產於澳洲和塔斯馬尼亞(Tasmania)，有 800 多種，分佈在世界各地，由於其適應性強、生長迅速。因此，桉樹已成為世界上種植最廣泛的樹種之一。赤桉（舊稱 *Eucalyptus rostrata* Schl.）又稱長喙桉、墨累紅桉、紅桉、河桉、紅河桉，是分佈最廣的桉樹種之一。它也被認為是世界上種植最廣泛的樹種之一（種植面積約 5000 000 公頃）。赤桉生命形態為單莖樹，樹幹較大。它是中型到高大的樹木，平均高度 30 公尺，儘管一些作者記錄的樹高可達 45 公尺。葉呈灰藍色，互生，下垂，長 8-22 厘米，寬 1-2 厘米，通常彎曲或鐮刀狀，逐漸變細，基部短尖。果實為細柄末端的很小的蒴果，長 5-8 毫米，裂片 4 個，內有微小的種子。赤桉是一種常綠多年生植物，它的壽命可達 500-1000 年。通常生長在河畔。

該植物的傳統醫學應用顯示其具有很強的抗菌性，赤桉(*E. camaldulensis*)精油對許多革蘭氏陽性菌和革蘭氏陰性菌已證實具有抗菌作用，但根據萃取程序的不同，其效果會有顯著差異。與尤加利屬其他樹種的精油相比，赤桉精油的抗菌性最強。赤桉精油對大多數真菌是有抗菌效果的。



此樹為赤桉是尤加利精油的來源（由 Stephen D. Hopper 教授提供）

(六)黑黴菌

黑麴菌(*Aspergillus niger*)是一種黴菌，有時可歸因於某些肺炎病例的病因。它也是某些食物（如杏子、洋蔥、葡萄等）外部「黑黴菌」的致病因子，因此黑麴菌是一種食物「腐敗」生物。這些被歸類為「分生孢子梗」一種形成絲狀或菌絲的生物，也稱為分生孢子（真菌無性繁殖方式）。“曲霉菌”這個名字來自拉丁語“*aspergillum*”，這些噴水器的形狀與這些真菌在顯微鏡下觀察到的形狀非常相似。黑麴菌有大量的菌株。作為單一生物體，不同黑麴菌株的大小範圍為 900-1,600 μm 長，粗糙的球形分生孢子尺寸為 3-5 μm 。據了解，有些黑麴菌 菌株會分泌赭麴毒素，這種黴菌毒素會導致多種動物出現腎毒性和腎臟腫瘤，並且人類食用後會對健康造成潛在危害。殺死黑麴菌的過程很簡單，使用基本的抗真菌藥物通常效果最好。最常見的治療方法包括三唑和棘白菌素抗黴菌藥物。

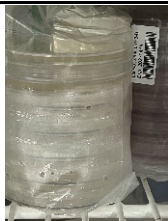
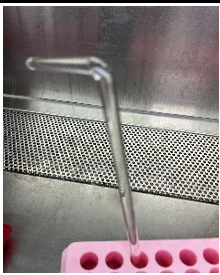
(七)大腸桿菌

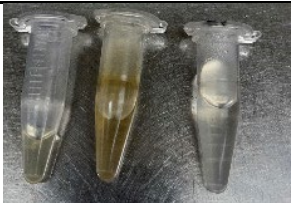
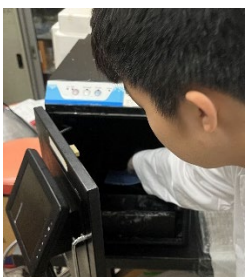
大腸桿菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*, DH5 α) 是一種革蘭氏陰性桿菌，是正常腸道菌叢的一部分，但也可能引起人類腸道和腸外疾病。目前已發現數百種大腸桿菌菌株，可導致從輕度、自限性胃腸炎到腎衰竭和感染性休克等一系列疾病。大腸桿菌的毒性使其能夠逃避宿主的防禦並對常用抗生素產生抗藥性。腸道疾病將透過致病大腸桿菌亞型來描述，包括產毒性大腸桿菌 (ETEC)、腸出

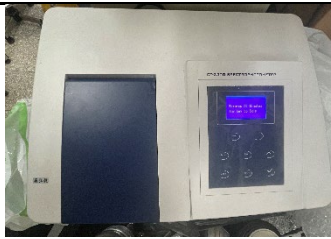
血性大腸桿菌 (EHEC)，也稱為產志賀毒素大腸桿菌 (STEC)，將被稱為 EHEC/STEC、腸侵襲性大腸桿菌 (EIEC)、腸致病性大腸桿菌 (EPEC) 和大腸桿菌聚集性大腸桿菌 (EAEC)。大腸桿菌引起腸道疾病的患者的照護首先從症狀治療開始。腹瀉疾病會帶給患者極大的痛苦。建議補液和止瀉藥作為輕度疾病的主要治療方法。對於所有腹瀉患者，在可以耐受的情況下，口服補充液體是建議的第一線治療方法，其效果與靜脈注射一樣有效。當患者無法耐受口服攝取時，建議進行靜脈注射。對於病情嚴重的患者，使用抗生素治療

貳、研究設備與器材

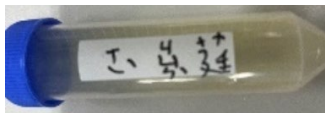
一、研究設備與器材

柑橘	相機	LB Agar	Sabouraud Detrose Agar(薩氏葡萄糖瓊脂培養基)
			
滅菌接種棒	玻璃塗抹棒	電子顯微鏡	酒精燈
			
塗菌旋轉台	無菌操作台	乳膠手套	微量吸管
			

微量吸管尖	光學顯微鏡	載玻片、蓋玻片	滅菌指示膠帶
			
高壓滅菌釜	精密電子秤	離心機	微量離心管加熱器
			
無菌紙錠(40 μ l)	t u b e	微量離心管	夾鏈袋
			
無菌水	培養箱	錐形瓶	照膠儀
			

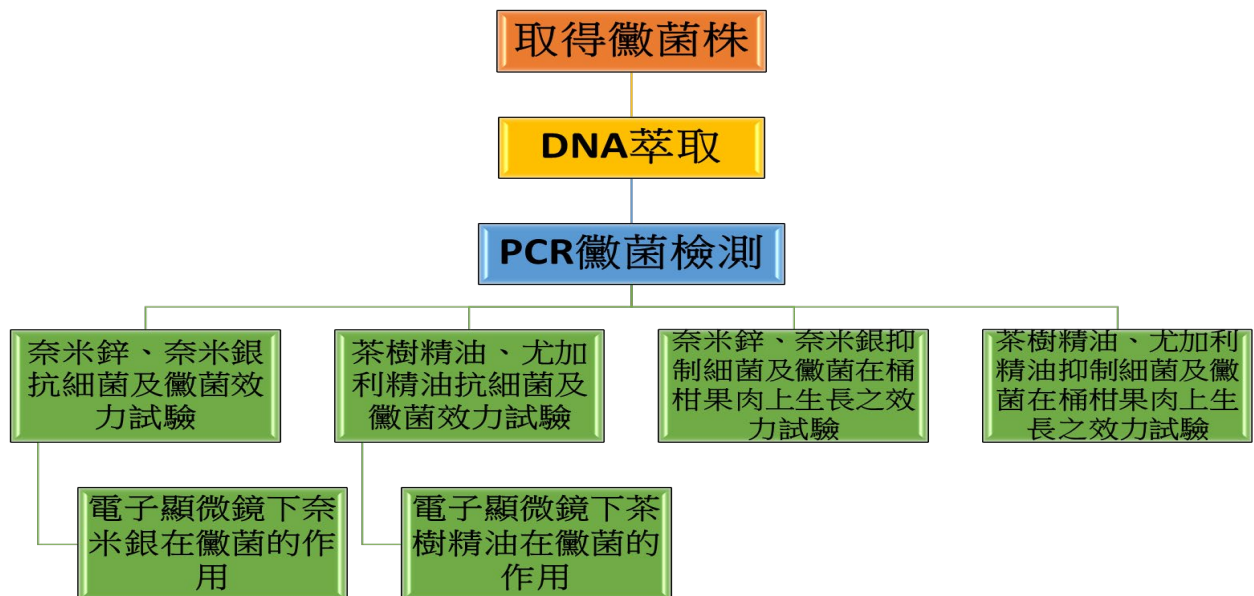
P C R 機	製 膠 盤	瓊 脂 膠	電 泳 槽
			
測 定 管	分 光 光 度 儀		
			

二、實驗藥品

茶樹精油	尤加利精油	奈米銀金屬 (1000ppm)	奈米鋅金屬 (1000ppm)	藍特淨 (含氯消毒水)
				
大腸桿菌 (屏科大提供之無致病性 E. coli)		黑麴黴 (請屏科大鑑定之黴菌 Aspergillus niger)		
				

參、研究過程與方法

一、實驗流程圖

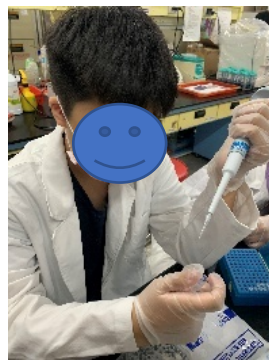
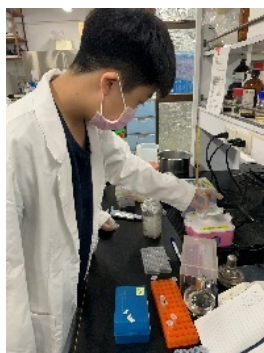


二、研究方法

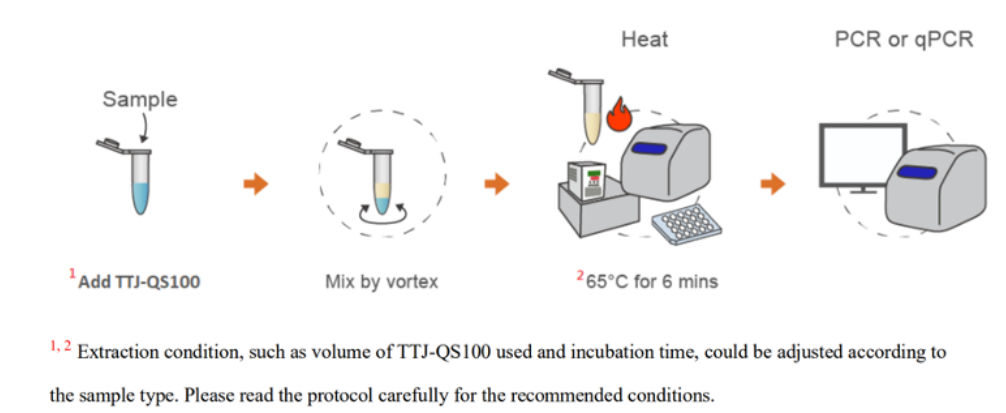
(一)取得黴菌株

1.以柑橘培養黴菌，讓柑橘自然長出黴菌，先將桶柑放入夾鏈袋內保存。14 天後，長出種黴菌，然後轉種到 agar 培養。8 天後，觀察黴菌生長情形，以此做為實驗黴菌樣品。

(二)DNA 萃取



EX-TOOL Quick DNA Extraction Solution (TTJ-QS100)和黴菌混和並加熱處理 6 分鐘，然後 13000rpm 離心 5 分鐘，取上清液即可取得 DNA 去進行 PCR。



(產品公司所附的操作圖)

(三) PCR 黴菌檢測

1.PCR 反應物混合:

(1)在冰浴中，按以下各成分加入無菌 0.5ml 離心管中。

試劑	用量
Master Mix (dNTP mix 、 Taq 酶、 2×PCR buffer)	10 μ l
引子 1 (10pM)	1 μ l
引子 2 (10pM)	1 μ l
DNA 模板	8 μ l
加 ddH ₂ O 至	20 μ l

PCR primers and their associated identities, sequences, applied and ideal annealing temperatures, approximate resulting amplicon lengths and references. * Ideal annealing temperature in relevant temperature range from 56 to 70 °C.

Primer	Sequence: 5' → 3'	Applied annealing temp. (T _A)	Ideal annealing temp.*	Amplicon length	Locus	Ref.
Bt	Bt2a GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	68 °C	62–70 °C	338 bp	β-tubulin	(Glass & Donaldson, 1995)
	Bt2b ACCCCTCAGTGTAGTGACCCCTGGC					
CaM	CMD5 CCGAGTACAAGGARGCCTTC	67.5 °C	65.2 °C	580 bp	Calmodulin	(Yin et al., 2017)
	CMD6 CCGATRGAGGTGATACGCTGG					
Btub	Btub2Fd GTBCACCTYCARACCGGYCARTG	66.4 °C	62–67 °C	400 bp	β-tubulin	(Woudenberg, Aveskamp, de Gruyter, Spiers, & Crous, 2009)
	Btub4Rd CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC					(Vancov & Keen, 2009)
ITS1F/LR3	ITS1F CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA	64.4 °C	63.6 °C	1,150 bp	Internal transcribed spacer	(Rehner & Samuel, 1994)
	LR3 CCGTGTTCAAGACGGG					(Fujita, Senda, Nakaguchi, & Hashimoto, 2001)
ITS2	ITS3 GCATCGATGAAGAAGCAGC	62 °C	56 °C	300 bp	Internal transcribed spacer	(Yin et al., 2017)
	ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC					(Bunyard, Nicholson, & Royse, 1996)
LR	LR0R ACCCGCTGAACCTTAAGC	60 °C	56 °C	1,200 bp	Large subunit (LSU)	(Vilgalys & Hester, 1990)
	LR6 GGCCAGTTCTGCTTACC					(Caporaso et al., 2011)
F515/R806	F515 GTGCCAGCMGCGCGGTAA	58.7 °C	56 °C	300 bp	Small subunit (SSU)	(White et al., 1990)
	R806 CCCATWGCYTGCTTMCCCAT					
NS	NS1 GTAGTCATATGCTTGCTCTC	58 °C	59.2 °C	1,120 bp	Small subunit (SSU)	
	NS4 CTCCGTCGAATTCCTTAAG					

(2)調整好反應程序。將上述混合液稍加離心，立即置 PCR 儀上，執行擴增。



2.PCR 反應條件

95°C 5min,
95°C 10 sec/ annealing temp 30 sec/ 72°C 30sec total 35cycles,
72°C 10 min

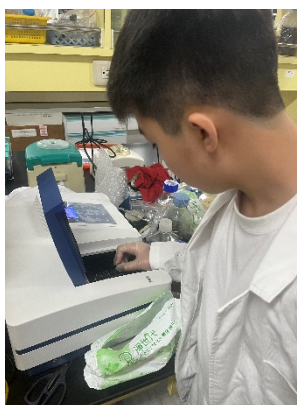
3.進行電泳

PCR 反應完接著進行電泳。先製作電泳膠，利用瓊脂糖粉末及緩衝液 TBE，製備 1.5%之瓊脂糖溶液。將瓊脂糖粉末加入盛有緩衝液的錐形瓶內。將混合物置於微波爐內加熱約一分鐘，以待瓊脂糖溶解。慢慢地將瓊脂糖溶液注入鑄膠器內。靜候約 30 分鐘以待瓊脂糖溶液凝固。把樣本梳拿走，便可看到凝膠上出現一系列凹穴。將凝膠置於電泳槽內，其有凹穴的一方須靠向陰極。加入緩衝液至覆蓋整塊凝膠。用微量吸管小心地將 PCR 產物注入凹穴內。最後打開電源進行電泳 40 分鐘。

(四)奈米鋅、奈米銀抗細菌及黴菌效力試驗

每一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液，再依照各組實驗條件加入奈米鋅、

奈米銀、細菌。陰性對照 1:一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液滴 0.2 毫升無菌水，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。陽性對照 1:一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液滴 0.2 毫升消毒水（藍特靜，含氯消毒水），再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 A1:一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液滴 0.2 毫升的 100%奈米鋅，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 A2:一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液滴 0.2 毫升的 10%奈米鋅，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 A3:一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液滴 0.2 毫升的 1%奈米鋅，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 B1: 一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液是滴 0.2 毫升的 100%奈米銀，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 B2: 一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液是滴 0.2 毫升的 10%奈米銀，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 B3: 一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液是滴 0.2 毫升的 1%奈米銀，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。放在 37 度溫培養箱培養 20 小時。



先將 0.2 毫升黴菌用 L 棒均勻的塗在培養盤上，接著把六片紙錠貼在培養盤上，然後滴上陰性對照是滴 0.04 毫升無菌水，陽性對照是滴上消毒水（藍特靜，含氯消毒水），實驗組: C1 紙錠是滴 0.04 毫升的 100%奈米鋅(1000ppm)、C2 紙錠是滴 10%奈米鋅(100ppm)、C3 紙錠是滴 10%奈米鋅(10ppm)，D1 紙錠是滴 100%奈米銀(1000ppm)、D2 紙錠 10%奈米銀 (100ppm)、D3 紙錠 1%奈米銀 (10ppm)，放在室溫培養箱培養 5 天。



(五)茶樹精油、尤加利精油抗細菌及黴菌效力試驗

每一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液，再依照各組實驗條件加入茶樹精油、尤加利精油、細菌。陰性對照 3:一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液滴 0.2 毫升無菌水，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。陽性對照 4:一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液滴 0.2 毫升消毒水（藍特靜，含氯消毒水），再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 E1:一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液滴 0.2 毫升的 10% 樹精油，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 E2:一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液滴 0.2 毫升的 1%樹精油，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 E3:一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液滴 0.2 毫升的 0.11%樹精油，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 F1: 一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液是滴 0.2 毫升的 10%尤加利精油，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 F2: 一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液是滴 0.2 毫升的 1%尤加利精油，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 F3: 一組有三瓶 2 毫升的 LB 細菌培養液是滴 0.2 毫升的 0.1%尤加利精油，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。放在 37 度溫培養箱培養 20 小時。



先將 0.2 毫升黴菌用 L 棒均勻的塗在培養盤上，接著把六片紙錠貼在培養盤上，然後滴上陰性對照是滴 0.04 毫升無菌水，陽性對照是滴上消毒水（藍特靜，含氯消毒水），實驗組:G1 紙錠是滴 0.04 毫升的 10%茶樹精油、G2 紙錠是滴 1%茶樹精油、G3 紙錠是滴 0.1%茶樹精油，H1 紙錠是滴 10%尤加利精油、H2 紙錠 1%尤加利精油、H3 紙錠 0.1%尤加利精油，放在室溫培養箱培養 5 天。

(六)奈米鋅、奈米銀抑制細菌及黴菌在桶柑果肉上生長之效力試驗

每一組有三片橘子，我們把每片橘子放進獨立的夾鏈袋再依照各組實驗條件加入奈米鋅、奈米銀、細菌、黴菌。陰性對照 1:一組有三片橘子滴 0.2 毫升無菌水，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。陽性對照 1:一組有三片橘子滴 0.2 毫升消毒水（藍特靜，含氯消毒水），再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 A:一組有三片橘子滴 0.2 毫升的 100%奈米鋅，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 B:一組有三片橘子是滴 0.2 毫升的 100%奈米銀，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。放在室溫培養箱培養 5 天。

陰性對照 2:一組有三片橘子滴 0.2 毫升無菌水，再塗上黴菌。陽性對照 2:一組有三片橘子滴 0.2 毫升消毒水（藍特靜，含氯消毒水），再塗上黴菌。

實驗組 C:一組有三片橘子滴 0.2 毫升的 100%奈米鋅，再塗上黴菌。實驗組 D:一組有三片橘子是滴 0.2 毫升的 100%奈米銀，再塗上黴菌。放在室溫培養箱培養 10 天。



(七)茶樹精油、尤加利精油抑制細菌及黴菌在桶柑果肉上生長之效力試驗

每一組有三片橘子，我們把每片橘子放進獨立的夾鏈袋再依照各組實驗條件加入茶樹精油、尤加利精油、細菌、黴菌。陰性對照 1:一組有三片橘子滴 0.2 毫升無菌水，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。陽性對照 1:一組有三片橘子滴

0.2 毫升消毒水（藍特靜，含氯消毒水），再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 E:一組有三片橘子滴 0.2 毫升的 10%茶樹精油，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。實驗組 F: 一組有三片橘子是滴 0.2 毫升的 10%尤加利精油，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。放在室溫培養箱培養 5 天。

陰性對照 2:一組有三片橘子滴 0.2 毫升無菌水，再塗上黴菌。陽性對照 2:一組有三片橘子滴 0.2 毫升消毒水（藍特靜，含氯消毒水），再塗上黴菌。

實驗組 G:一組有三片橘子滴 0.2 毫升的 10%茶樹精油，再塗上黴菌。實驗組 H: 一組有三片橘子是滴 0.2 毫升的 10%尤加利精油，再塗上黴菌。放在室溫培養箱培養 10 天。

(八)電子顯微鏡下奈米銀、茶樹精油在黴菌的作用

將奈米銀、茶樹精油對黴菌作用過 1 小時候後的樣本送屏科大進行電子顯微鏡觀察，以了解奈米銀、茶樹精油的可能作用機制。



參與點子顯微鏡拍攝過程

伍、研究結果

(一)培養出黴菌株

1.以柑橘培養黴菌



圖一：黴菌在柑橘上生長的情形

2.讓柑橘自然長出黴菌，先將桶柑放入夾鏈袋內保存。14 天後，長出種黴菌，然後轉種到 agar 培養。3 天後，觀察黴菌生長情形，以此做為實驗黴菌樣品。

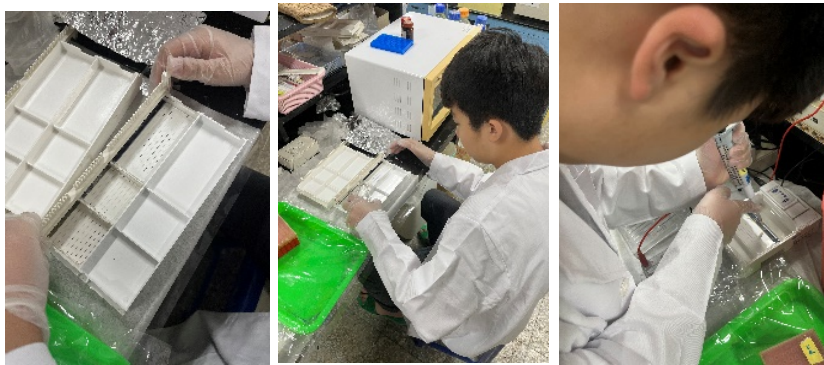


圖二:黴菌在培養基上生長的情形

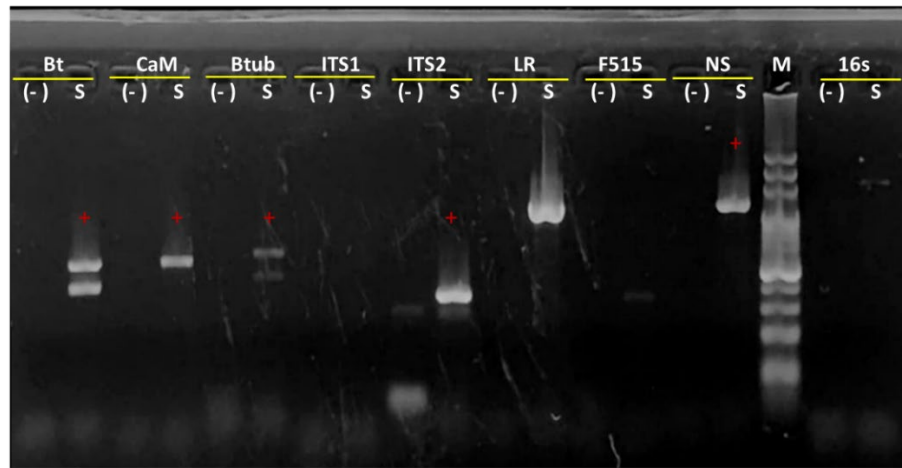
(二)確定黴菌菌株

DNA 萃取及 PCR 黴菌檢測

EX-TOOL Quick DNA Extraction Solution (TTJ-QS100)和黴菌混和並加熱處理 6 分鐘，然後 13000rpm 離心 5 分鐘，取上清液即可取得 DNA 去進行 PCR。調整好反應程序。將上述混合液稍加離心，立即置 PCR 機器上，執行黴菌片段 DNA 複製。然後進行電泳(圖三)得到黴菌鑑定結果為黑黴菌(圖四)。(此鑑定送屏科大進行鑑定，我們同時參與檢驗過程)



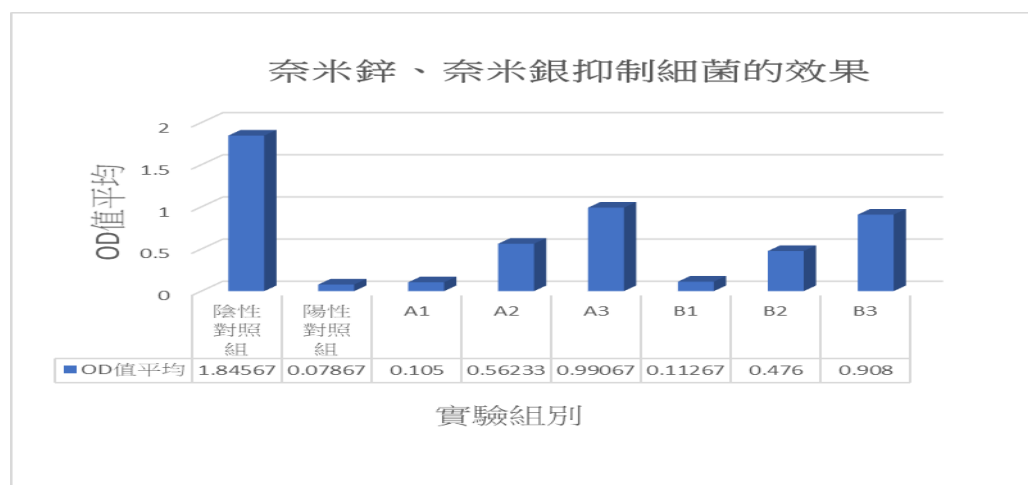
圖三、PCR 黴菌檢測，我們同時參與檢驗過程



圖四:電泳得到黴菌鑑定結果為黑黴菌

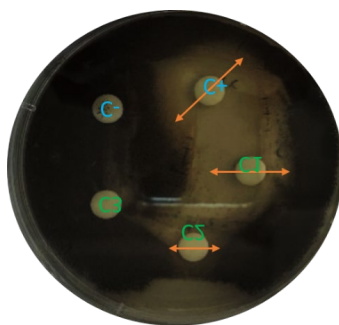
(四)奈米鋅、奈米銀抑制細菌及黴菌的效果

在細菌抑制實驗中，陰性對照組在(無菌水)三管菌液 OD 值 (吸光值)為 1.834、1.921、1.782，平均 OD 值為 1.846。陽性對照組(消毒水) 三管菌液 OD 值為 0.082、0.063、0.091，平均 OD 值為 0.079。實驗組 A1 (100%奈米鋅) 三管菌液 OD 值為 0.098、0.105、0.112，平均 OD 值為 0.105，A2 (10%奈米鋅) 三管菌液 OD 值為 0.564、0.541、0.582，平均 OD 值為 0.562，A3 (1%奈米鋅) 三管菌液 OD 值為 0.964、0.987、1.021，平均 OD 值為 0.113(圖五)。B1 (100%奈米銀) 三管菌液 OD 值為 0.116、0.113、0.109，平均 OD 值為 0.113，B2 (10%奈米銀) 三管菌液 OD 值為 0.427、0.503、0.498，平均 OD 值為 0.476，、B3 (1%奈米銀) 三管菌液 OD 值為 0.867、0.921、0.936，平均 OD 值為 0.908 (圖六)。



圖五: 奈米鋅抑制細菌實驗

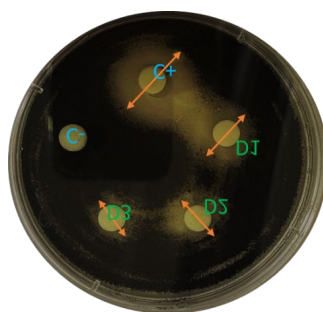
在奈米鋅黴菌抑制實驗中，陰性對照組在(無菌水)紙錠周圍長了黴菌，陽性對照(消毒水)紙錠周圍一圈沒有長黴菌(抑菌圈直徑 2.6 公分)，實驗組 C1 (100%奈米鋅)紙錠周圍一圈沒有長黴菌(抑菌圈直徑 2.2 公分)、C2 (10%奈米鋅)紙錠周圍一圈沒有長黴菌但抑菌圈較小(抑菌圈直徑 1.6 公分)、C3 (1%奈米鋅)紙錠周圍長黴菌無抑菌圈(圖七)。



圖七: 奈米鋅抑制黴菌實驗

在奈米銀黴菌抑制實驗中，陰性對照組在(無菌水)紙錠周圍長了黴菌，陽性對照(消毒水)紙錠周圍一圈沒有長黴菌(抑菌圈直徑 2.4 公分)，D1 (100%奈米銀)紙錠周圍一圈沒有長黴菌(抑菌圈直徑 1.7 公分)、D2 (10%奈米銀)紙錠周圍一圈沒有長黴菌但抑菌圈較小(抑菌圈直徑 1.4 公分)、D3 (1%奈米銀)紙錠周圍一圈沒有長黴菌但抑菌圈更小(抑菌圈直徑 1 公分)(圖八)。

所以奈米鋅和奈米銀都有抑制黴菌生長的效果，且濃度越高效果越好。奈米銀抑制黴菌的效果比奈米鋅好，奈米銀在 1%時還有抑制黴菌的效果。

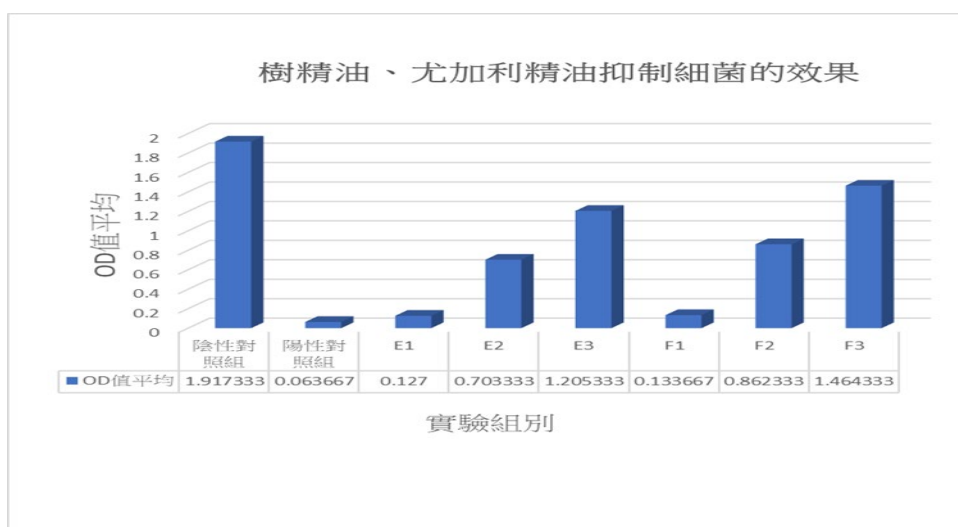


圖八: 奈米銀抑制黴菌實驗

(五)茶樹精油、尤加利精油抑制細菌及黴菌的效果

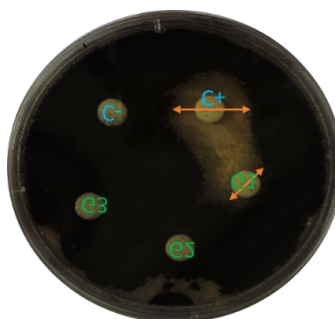
在細菌抑制實驗中，陰性對照組在(無菌水) 三管菌液 OD 值為 1.924、1.897、1.931，平均 OD 值為 1.917。陽性對照(消毒水) 三管菌液 OD 值為 0.068、0.071、

0.052，平均 OD 值為 0.064。實驗組 E1 (10%茶樹精油) 三管菌液 OD 值為 0.122、0.131、0.128，平均 OD 值為 0.127，E2 (1%茶樹精油) 三管菌液 OD 值為 0.709、0.689、0.712，平均 OD 值為 0.703，E3 (0.1%茶樹精油) 三管菌液 OD 值為 1.216、1.208、1.192，平均 OD 值為 1.205，(圖九)，F1 (10%尤加利精油) 三管菌液 OD 值為 0.139、0.128、0.134，平均 OD 值為 0.134，F2 (1%尤加利精油) 三管菌液 OD 值為 0.846、0.889、0.852，平均 OD 值為 0.862，F3 (0.1%尤加利精油) 三管菌液 OD 值為 1.143、1.467、1.492，平均 OD 值為 1.1464 (圖十)。



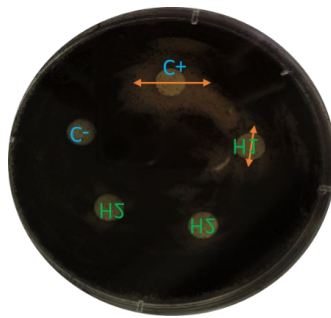
圖六: 奈米銀抑制細菌實驗

在茶樹精油黴菌抑制實驗中，陰性對照組在(無菌水)紙錠周圍長了黴菌，陽性對照(消毒水)紙錠周圍一圈沒有長黴菌(抑菌圈直徑 2.2 公分)，實驗組 G1 (10%茶樹精油)紙錠周圍一圈沒有長黴菌(抑菌圈直徑 1.3 公分)、G2 (1%茶樹精油)紙錠周圍長黴菌無抑菌圈、G3 (0.1%茶樹精油)紙錠周圍長黴菌無抑菌圈(圖十一)。



圖十一: 茶樹精油抑制黴菌實驗

在茶樹精油黴菌抑制實驗中，陰性對照組在(無菌水)紙錠周圍長了黴菌，陽性對照(消毒水)紙錠周圍一圈沒有長黴菌(抑菌圈直徑 2.2 公分)，H1 (10%尤加利精油)紙錠周圍一圈沒有長黴菌(抑菌圈直徑 1.2 公分)、H2 (1%尤加利精油)紙錠周圍長黴菌無抑菌圈、H3 (0.1%尤加利精油)紙錠周圍長黴菌無抑菌圈 (圖十二)。



圖十二:尤加利精油抑制黴菌實驗

所以茶樹精油和尤加利精油都有抑制細菌及黴菌生長的效果，只有在 10%濃度實在能有效抑制黴菌。茶樹精油抑制細菌及黴菌的效果比尤加利精油稍微好一點。

(六)奈米鋅、奈米銀在桶柑果肉抑制細菌及黴菌的效果

每一組有三片橘子，我們把每片橘子放進獨立的夾鏈袋再依照各組實驗條件加入奈米鋅、奈米銀、細菌、黴菌(圖十三)。



圖十三: 把每片橘子放進獨立的夾鏈袋再依照各組實驗條件加入奈米鋅、奈米銀、細菌、黴菌

陰性對照 1:一組有三片橘子滴 0.2 毫升無菌水，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌) (圖十四)。陽性對照 1:一組有三片橘子滴 0.2 毫升消毒水 (藍特靜，含氯消

毒水)，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌) (圖十五)。結果顯示有加消毒水的柑橘果肉腐爛較慢。



圖十四: 陰性對照 1:無菌水加細菌



圖十五: 陽性對照 1: 消毒水加細菌

陰性對照 2:一組有三片橘子滴 0.2 毫升無菌水，再塗上黴菌(圖十六)。陽性對照 2:一組有三片橘子滴 0.2 毫升消毒水（藍特靜，含氯消毒水），再塗上黴菌(圖十七)。結果顯示有加消毒水的柑橘果肉上黴菌較少。



圖十五: 陰性對照 2:無菌水加黴菌



圖十六: 陽性對照 2: 消毒水加黴菌

在奈米鋅細菌抑制實驗組 A:一組有三片橘子滴 0.2 毫升的 100%奈米鋅，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌) (圖十八)。在奈米銀細菌抑制實驗組 B: 一組有三片橘子是滴 0.2 毫升的 100%奈米銀，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌)。(圖十九)。結果顯示有加奈米鋅、奈米銀的柑橘果肉較陰性對照組腐爛較慢。



圖十八: 實驗組 A 奈米鋅加細菌



圖十九: 實驗組 B 奈米銀加細菌

在奈米鋅黴菌抑制實驗組 C:一組有三片橘子滴 0.2 毫升的 100%奈米鋅，再塗上黴菌(圖二十)。在奈米銀黴菌抑制實驗組 D: 一組有三片橘子是滴 0.2 毫升的 100%奈米銀，再塗上黴菌(圖二十一)。結果顯示有加奈米鋅、奈米銀的柑橘果肉黴菌較陰性對照組少。



圖二十: 實驗組 C 奈米鋅加黴菌



圖二十一: 實驗組 D 奈米銀加黴菌

(七)茶樹精油、尤加利精油在桶柑果肉上抑制細菌及黴菌的效果

每一組有三片橘子，我們把每片橘子放進獨立的夾鏈袋再依照各組實驗條件加入茶樹精油、尤加利精油、細菌、黴菌。實驗組 E:一組有三片橘子滴 0.2 毫升的 10%茶樹精油，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌) (圖二十二)。實驗組 F: 一組有三片橘子是滴 0.2 毫升的 10%尤加利精油，再滴入 0.2 毫升細菌(10000 顆細菌) (圖二十三)。結果顯示有加茶樹精油、尤加利精油的柑橘果肉較陰性對照組腐爛較慢。



圖二十二: 實驗組 E 茶樹精油加細菌



圖二十三: 實驗組 F 尤加利精油加細菌

實驗組 G:一組有三片橘子滴 0.2 毫升的茶樹精油，再塗上黴菌(圖二十四)。實驗組 H: 一組有三片橘子是滴 0.2 毫升的 10%尤加利精油，再塗上黴菌(圖二十五)。結果顯示有加茶樹精油、尤加利精油的柑橘果肉黴菌較陰性對照組少。



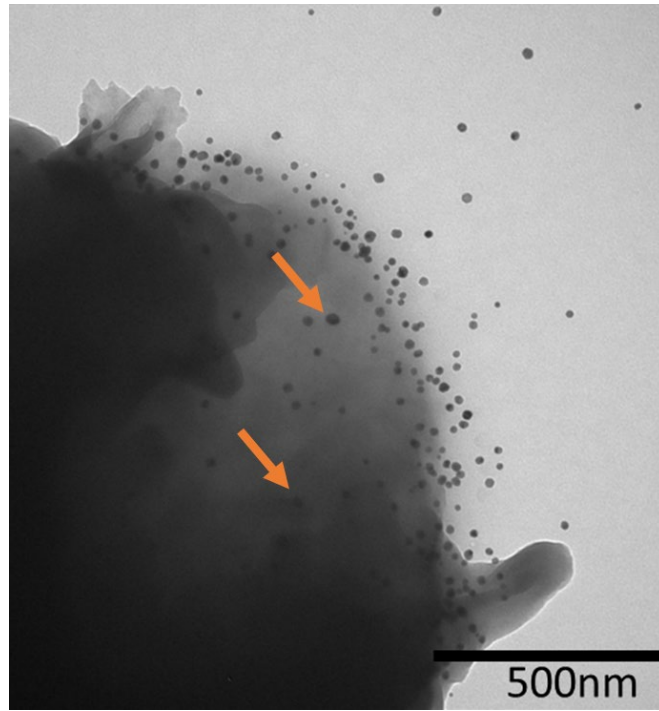
圖二十四: 實驗組 G 茶樹精油加黴菌



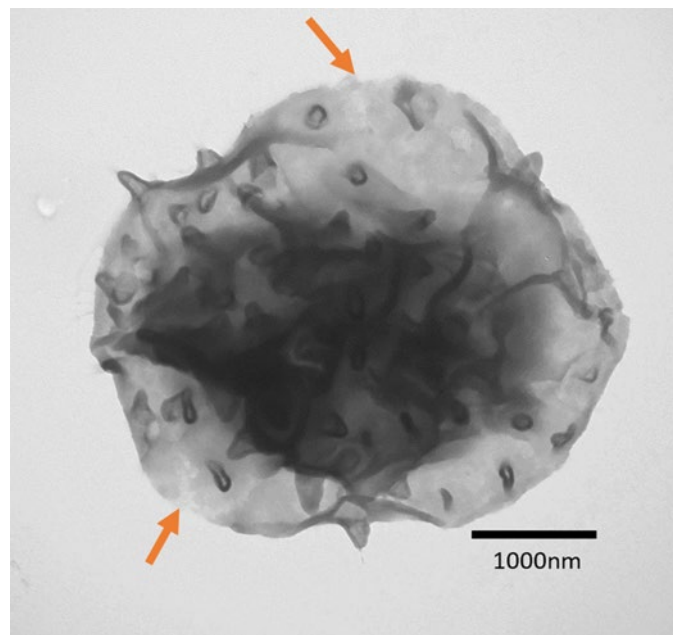
圖二十五: 實驗組 H 尤加利精油加黴菌

(八)電子顯微鏡下發現奈米銀、茶樹精油對黴菌的損傷

將奈米銀、茶樹精油對黴菌作用過 1 小時候後的樣本進行電子顯微鏡觀察，結果發現奈米銀可以進入到黴菌孢子內造成黴菌孢子的破壞(圖二十六)。茶樹精油對黴菌作用過 1 小時候後電子顯微鏡觀察到黴菌孢子外膜出現破裂(圖二十七)。



圖二十六: 奈米銀可以進入到黴菌孢子內

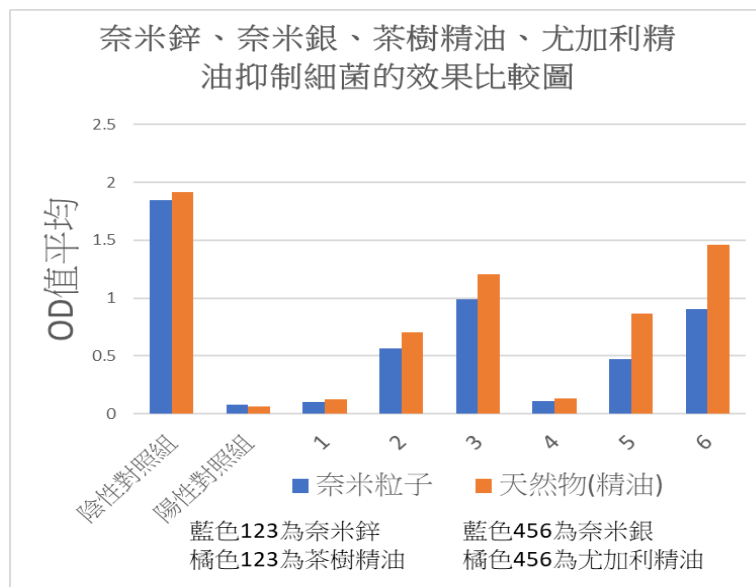


圖二十七: 茶樹精油造成黴菌孢子外膜出現破裂

陸、研究討論

在我們的研究中觀察到跟過去的研究中有相同的結果，奈米鋅、奈米銀、茶樹精油、尤加利精油可以有效的抑制細菌及黴菌。我們有新的發現，奈米鋅、奈米銀比天然物精油有較好的抑制細菌和黴菌的效果。尤其奈米銀的效果最好不管在水果和培養基上的抑菌效果都是最好的。而兩種精油中又以茶樹精油對細菌及黴菌的抑制效果較好(圖二十八)。所以我們挑選了奈米銀進行進一步的電子顯微鏡觀察奈米銀在黴菌上的作用情形，我們確實也看到奈米銀進入到黴菌孢子中這與文獻中提到奈米銀進入細菌體內作用的情形相似，這可能可以間接證明了奈米銀在黴菌內的作用跟細菌也是相似的。我們也同時以電子顯微鏡觀察了茶樹精油在黴菌上的作用情形，我們發現精油可以讓黴菌孢子外膜破裂，這可能是為何精油可以抑制黴菌生長的原因。

奈米鋅、奈米銀、茶樹精油、尤加利精油在對大腸桿菌的抑制效果又比黴菌來的好。這可能是因為黴菌是真核細胞對抗菌物質較能有較多的機制可以抵抗，所以奈米鋅、奈米銀、茶樹精油、尤加利精油對黴菌的抑制效果較不好，但這還需要更進一步的研究才能去了解其原因。



圖二十八: 奈米鋅、奈米銀、茶樹精油、尤加利精油抑制細菌的效果比較圖

柒、研究結論

- 一、奈米鋅、奈米銀都有抑制細菌及黴菌生長的效果，且濃度越高效果越好。
- 二、茶樹精油、尤加利精油都有抑制細菌及黴菌生長的效果，且濃度越高效果越好。
- 三、在有加細菌的柑橘上加茶樹精油、尤加利精油後，其柑橘果肉較陰性對照組腐爛較慢。
- 四、在有加黴菌的柑橘上先用茶樹精油、尤加利精油處理，其柑橘果肉黴菌生長量較陰性對照組少。
- 五、從電子顯微鏡的觀察結果中發現奈米銀可以進入到黴菌孢子內造成黴菌孢子的破壞。
- 六、從電子顯微鏡的觀察結果中發現茶樹精油會造成黴菌孢子外膜出現破裂。

捌、參考文獻

一、認識多重抗藥性微生物(2025)。取自：

<https://www.chp.gov.hk/tc/wapdf/103329.html>。

二、李育穎(2017)。奈米氧化鋅合成、鑑定與抗菌之研究。博碩士論文。

三、何軒慧(2010 年)。奈米銀粒子製備及其抗菌之研究。中原大學/理學院化學研究所碩士論文。

四、林佩儒(2006)。精油於改善青春痘之應用。嘉南藥理科技大學化妝品科技研究所論文。

五、陳立偉(2008)。茶樹精油應用於痤瘡治療之功效與安全性評估。臺北醫學大學藥學院生藥學研究所碩士論文。

六、周家慶(2020)。微生物風險評估在白麵包控制 *Aspergillus niger* 生長之應用。博碩士論文。

七、國立自然科學博物館真菌一族(2025)。取自：<http://www.nmns.edu.tw/fungi/>

八、病原性大腸桿菌(2025)。取自：<https://www.fda.gov.tw/tc/sitecontent.aspx?sid=1944>