

2025 年【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：菌蛙交鋒--青蛙抗菌肽對發光菌發光作用的抑制

一、摘要

現今面臨許多抗藥性細菌誕生與前陣子新型肺炎病毒的威脅，增加疾病防治的難度，因此我們選擇「生物抗菌肽」為研究方向，尋找更簡單且便宜的抑菌藥物。我們以自行抓取的野生虎皮蛙之表皮黏液作為抗菌肽來源，搭配自行養殖的螢光細菌進行抑菌檢測實驗。實驗結果發現，抗菌肽於滴入螢光細菌培養皿後約 1~2 分鐘內即出現明顯抑菌環，且青蛙於腿、背部和趾間皆可分泌大量的抗菌肽，甚至進一步影響周遭環境變化。參考過往文獻後，我們有更深入的發現:抗菌肽可直接干擾微生物生理機制，減少細菌產生抗藥性，且此實驗方式具備來源取得容易、操作方便、快速獲得結果，期望可成為新型抑菌藥物開發方向之一。

二、探究題目與動機

我們於「怪奇事物所」這本書上翻閱到牛奶利用放入活青蛙可以達到保鮮效果的有趣現象，查詢資料來源後，發現在俄羅斯有一群科學家使用俄羅斯褐蛙進行實驗，並在其黏液上找到 21 種具有抗生素和其他潛在醫療活性的物質，其中某些物質對抗沙門氏菌和金黃葡萄球菌的效果與某些處方抗生素藥物一樣好。我們便突發奇想：台灣常見的青蛙中，是否也具有如此奇妙特徵的現象呢？抗菌肽相較於一般傳統抗生素的差異之處究竟在哪？是否能更進一步的將此發現實際應用於醫療中呢？我們於是展開一系列調查與實驗設計。

三、探究目的與假設

目的：一、探討不同濃度的黏液抗菌肽對螢光細菌的抑制效果

二、探討虎皮蛙不同部位所分泌的黏液抗菌性差異

三、探討抗菌肽活性與其放置的時間關係

假設：一、台灣一般青蛙所分泌黏液也具備一定程度之抑菌效果

二、青蛙生存於溫暖潮濕的易滋生細菌環境，各部位皆具備一定濃度的抗菌肽

三、此抗菌肽可在短時間內明顯有抑菌效果

四、探究方法與驗證步驟

(一) 實驗動物與實驗器材

本次實驗對象為虎皮蛙 (*Hoplobatrachus chinensis*) 與發光細菌。虎皮蛙由我們前往桃園山區抓捕，並養殖於水缸中；而發光細菌則由我們前往漁港向釣客借魚，並使用棉花棒輕刮其表皮，裝入小採集管中返回實驗室，塗抹於培養皿上並數次純化而得。

(二) 實驗前準備

1、查詢資料



圖一：細菌純化記錄

抗菌肽是由 12~80 個胺基酸所構成多肽，可以在包含青蛙的眾多生物中發現。其具有親水性和疏水性，大部分抗菌蛋白帶正電，與帶負電的微生物細胞膜直接作用，改變其通透性，造成膜的物理性損傷，導致細胞內容物外滲而死亡。

2、養殖青蛙與螢光細菌

我們將抓補之虎皮蛙養於自行設計的水缸，附有加溫棒與潛水馬達確保溫度與水質。並定時進行換水和餵食，減少實驗的數據誤差。螢光細菌則於 2~3 天內重新接種於新培養基上，維持其存活與發光度。

(三) 實驗方法與結果

1、設計抑菌實驗

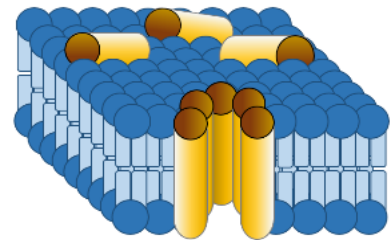
(1) 原先以棉花棒刮取青蛙表皮黏液，但效果並不顯著

A. 原因：棉花會吸收黏液，導致無法取得

B. 解決：自行配置兩棲生物專用之生理食鹽水，於刮取時滴於皮膚和棉花上，增加濕潤度後緩慢收集

(2) 塗抹發光細菌：使用滅菌的 L 形玻璃棒，刮取原培養基的部分發光細菌，旋轉塗抹至新培養基，完成後放入恆溫箱中培養 24 小時。

抗菌肽會平躺於細胞膜上，並使其逐漸變薄



表面過薄產生破洞，抗菌肽插入破洞並固定

圖二：抗菌肽對細菌造成影響



圖三：青蛙養殖水缸外觀

表一：發光細菌隨時間之生長變化

生長時間	0 小時	4 小時	10 小時
圖示			
說明	一層薄細菌覆蓋，呈現半透明狀	細菌形成，屬於點狀分布	細菌幾乎覆蓋培養皿，只剩幾處小缺口
生長時間	16 小時	24 小時	30 小時以上
圖示			
說明	細菌於 16~24 時為細菌亮度最大的時段，可拍攝出最清楚的實驗照片		即使沒死亡，細菌發光度仍會急速下降

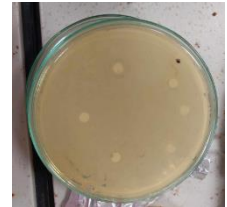
根據上方表格，我們可知：

A. 發光細菌生長至成熟大約需時 16~24 小時，約一天的範圍

B. 30 小時後，發光亮度急遽下降，但發光細菌仍然可存活約 2~3 天；若是保存於冰箱中，則可以延續存活 1~2 星期。

C. 額外觀察：若將培養皿從恆溫箱中拿至室外超過約五分鐘後，細菌亮度也會持續下降。推測：細菌對於外界環境變化極為敏感，溫度差異導致酵素反應速率下降，亮度隨之下降。

(3) 濾紙擴散法：取小濾紙沾附實驗液體，並放置於發光細菌上，放入暗室記錄細菌改變情形。相較於液體培養基，此種方法可快速看出細菌亮度變化以及抑菌環的範圍，既能一次檢測多種液體效果，也方便攝影與快速實驗。

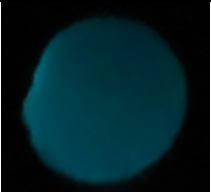
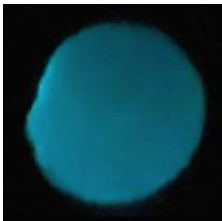
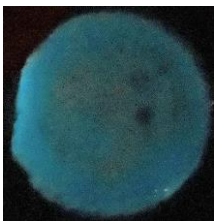
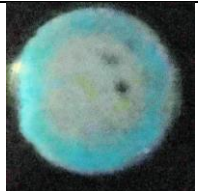


(4) 檢測抗菌肽濃度有效範圍

我們首先檢測抗菌肽的濃度與抑菌活性相關度，以便後續實驗選擇最適當的抗菌肽濃度

表二：黏液濃度對細菌的影響

圖四：濾紙擴散法實驗外觀

經過時間	0 秒	10 秒	30 秒
圖示			
放亮對比			
經過時間	50 秒	70 秒	90 秒
圖示			
放亮對比			

我們首先測試黏液濃度改變對發光菌的影響，正右上方為原始濃度，依逆時鐘方向持續稀釋 10 倍黏液濃度。在此實驗中，我們發現：

A. 台灣虎皮蛙之黏液含抗菌肽，可**有效抑制**細菌發光活性

B. 黏液**稀釋至 100 倍**以後，由於抗菌肽成分過低，抑制發光的效果幾乎為 0

C. 從黏液滴入培養基上，持續至抑菌環範圍完整形成之時間相當快速，大約 **1~2**

分鐘即可看出結果

(5) 抑菌環完整產生時間與面積

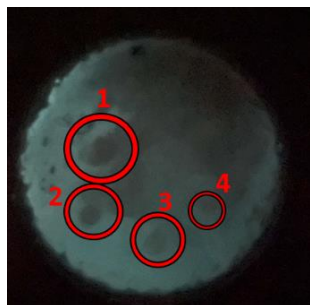
我們進一步觀察抗菌肽與其他種類的溶液相比，是否具有明顯的抑菌優勢，以及符合我們假設與否

表三：各種溶液形成抑菌環時間

溶液名稱	原始黏液	稀釋 10 倍黏液	75%酒精
第一次實驗	57.3s	92.5s	11.7s
第二次實驗	61.1s	93.2s	12.1s
第三次實驗	58.8s	96.7s	11.4s
平均	59.1s	94.1s	11.7s

透過記錄抑菌環形成時間，我們發現：

- A. 比較強力殺菌效果的酒精，青蛙黏液對於細菌的抑制能力也屬於相當快速
- B. 相較原始黏液，稀釋過的黏液需要更長的時間（約一分半），由上至下緩慢打開發光細菌的缺口
- C. 雖然時間略有差異，但符合預期的成果：「快速且明顯的抑菌效果」



- (1)：原始濃度黏液
- (2)：稀釋 10 倍黏液
- (3)：青蛙生活水域之水
- (4)：無菌海水（對照組）

圖五：各濃度之抑菌環大小

經由實驗多次比對後，我們發現：

- A. 抑菌環大小：酒精 > 原始濃度黏液 > 稀釋 10 倍黏液 $\approx$ 青蛙水域之水 > 生理食鹽水 $\approx$ 無菌海水 = 0（只有濾紙痕跡）
- B. 以直徑 14 公分的培養皿為比例尺，酒精形成之抑菌環大約有 2 平方公分，原始黏液則有 1.50 ~ 1.75 平方公分，稀釋 10 倍黏液則是大約 1.0 ~ 1.1 平方公分。
- C. 作為對照組的無菌海水與生理食鹽水，缺口直徑經由比例尺轉換後落在 0.6 ~ 0.7 公分間，與做為工具的小濾紙直徑幾乎一致，證明其**無特殊抗菌**功能，符合預期。

(6) 青蛙各部位皮膚之抗菌肽濃度

我們額外發想：虎皮蛙各部位分泌抗菌物質的量是否有所不同？且其身上的黏液可能影響到棲息環境的細菌變化，作為兩棲生物，泡在水中的虎皮蛙理應會將抗菌肽也散播到周圍的水域中

(三) 青蛙生活水域之水：

藍色：生活水域之水

紅色：無菌海水

黃色：酒精

作為含有抗菌肽黏液之青蛙長時間浸泡的場所，此水域也是我們實驗的重點對象，透過多次實驗後，我們發現：

(1) 水域之水介於酒精和無菌海水的抑菌環大小間，且不像對照組所呈現不清楚的模樣，水池的水可排出一孔清楚完整的抑菌環。

(2) 經多次數據比對，水域之水的抑菌程度與稀釋 10 倍黏液的效果幾乎相同，甚至**稍微超過**。

(3) 推測相較野外環境，本水缸之水域環境小，且青蛙數量較多，造成水池之水的抗菌性更加明顯，也說明青蛙有將抗菌肽黏液帶給**周遭環境**，達成防禦手段的特性。

(四) 青蛙身上各部位黏液

紅色：無菌海水

綠色：青蛙趾間與蹼上黏液

黃色：青蛙腹部與腿部黏液

藍色：青蛙背部黏液

(顏色皆依順時針第二個圈為該原始黏液的稀釋 10 倍)

雖然青蛙分泌黏液主要功能是保濕作用，抗菌肽是其次，但細分各部位黏液的額外功用又有些許不同，根據我們的實驗結果，我們發現：

(1) 背部為青蛙與**空氣接觸最大**部分，為了**保濕**功能而分泌最多黏液，抗菌效果最佳。

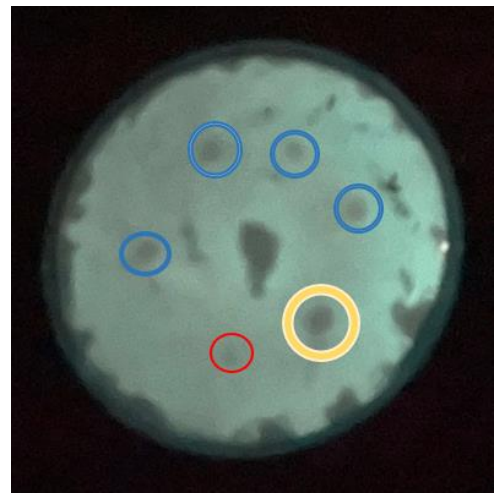
(2) 腿、蹼上與腹部為了**移動抓地**或是**鑽地**之用，也是產生黏液的主要地點，但抗菌肽的量值相較背部仍少了許多，稀釋 10 倍後效果與對照組相似

7、抗菌肽抑菌活性對時間的關係

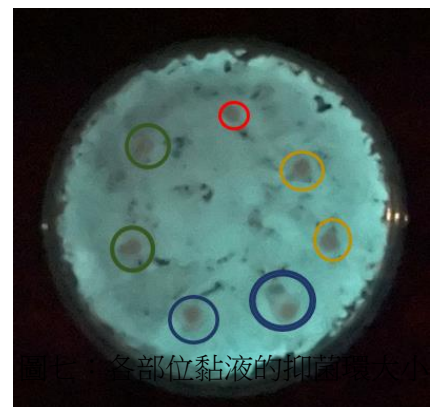
最後，我們思考抗菌肽是否可以提早提取並保存，於需要時再一次取出使用，便設計此次實驗檢測抗菌肽對時間的活性變化

表四：青蛙黏液隨時間抑菌效果差別

時間	一小時	三小時
圖示		



圖六：比較水域之水的抑菌環



各部位黏液的抑菌環大小

- 1、黏液於**半小時內**對發光細菌之效果最好，於半小時後黏液的抗菌效果會急速下降
- 2、由圖可看出放置黏液約於**三小時後**，基本觀察不見黏液抑菌環範圍
- 3、推測黏液抗菌活性急速下降的原因：
 - (1) 黏液剛採取時較為濃稠，隨時間流逝後，黏液逐漸流散或降解導致失去效果
 - (2) 抗菌肽放置於外界時，因為結構改變而減低抑菌能力

五、結論與生活應用

一、結論：

- (一) 虎皮蛙產生黏液含有抗菌肽成分，且抗菌效果與黏液濃度呈現**正相關**
- (二) 黏液的抗菌效果只需約**一分鐘**，便可觀察到完整的抑菌環
- (三) 青蛙棲息之水域的水也擁有一定程度的抑菌效果
- (四) 青蛙黏液檢測雖然快速，但抑菌效果於半小時內效果最佳，超過時間後會逐漸失去活性
- (五) 生物抗菌肽不同於傳統抗生素，對抗藥性病毒或細菌能有**抑制與破壞**效果

二、生活應用：

藉由實驗結論可知，青蛙抗菌肽於短短幾分鐘內便可產生明顯的抑菌環，以抑菌能力來說，相當**快速且價格便宜、操作簡單**。透過此研究，我們希望為新型抗菌檢測提供另類可行方案，降低耐藥性細菌與病毒突變帶來的公共衛生風險。於如今的社會中，除了持續誕生的**新型病毒**危害全球外，也有許多對於現有藥物產生**抗藥性**的細菌等微生物。根據蒐集資料，有許多科學家針對具有特殊抗菌肽的青蛙著手展開研究，因每種青蛙黏液身上皆含有數量眾多的**胜肽**，對於不同的細菌、病毒亦有不同程度之影響，包含針對流感病毒、原核生物甚至是新冠病毒「COVID-19」的研究。生物抗菌肽有別於傳統抗生素，他針對微生物**細胞膜破壞**的方式，使細菌、病毒很難產生抗藥性，我們覺得抗菌肽是針對未來醫學界作為**檢測和殺死病毒**，非常具有潛力的新星。

六、參考資料

- (一) 鄭明倫(2009)。照亮生命科學的地球微光 (一) 生物發光。取自
<https://libknowledge.nmns.edu.tw/nmns/lib/PDF/106/358/2.pdf>
- (二) 浙江海邊多地出現「藍眼淚」現象 (2017 年 5 月 21 日)。大紀元。取自
https://www.nmmba.gov.tw/News_Content.aspx?n=FF40572369107C6E&sms=4BD2D29B72CA27F8&s=D7F43488CF79E46D