

中華民國第四十四屆中小學科學展覽會

作者說明書

高中組生物(生命科學)科

040723

國立科學工業園區實驗高級中學

指導老師姓名

馮蕙卿

揭維邦

作者姓名

劉柔希

中華民國第四十四屆中小學科學展覽會
作品說明書

科別：生物(生命科學)科

組別：高中組

作品名稱：見光死—蘆薈薄膜的光抑菌作用

關鍵詞：蘆薈、克雷白氏肺炎菌

編號：

壹、摘要

蘆薈是百合科多肉草本植物，原產地在地中海的沿岸以及南非洲附近，目前在台灣被廣泛的種植。蘆薈品種繁多，其中吉拉索蘆薈(*Aloe Vera*)，被認為有消炎抗腫與殺菌的功效。克雷白氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 是一種常見醫院內感染菌，免疫力較低的患者如肝炎、糖尿病患者容易感染，造成肝膿瘍、敗血症、眼內炎及腦膜炎等，若能有效的控制能大大降低院內感染。本研究主要目的在探討利用蘆薈天然的性質，以達到對克雷白氏肺炎桿菌的抗菌效果。實驗初期發現添加於培養基中的蘆薈膠並沒有明顯的抑菌效果，但在後續實驗中，發現將蘆薈膠切成薄片冷凍乾燥以後製成的蘆薈薄膜，藉由光照，可使蘆薈膠薄膜表面產生未知的物性或化性變化，使生長於蘆薈薄膜上的細菌明顯減少。我認為，若是能善加利用此薄膜，例如將之放在口罩中，或是使用於冷氣機濾網，也許可以減少細菌滋生且有更好的過濾效果。因此，蘆薈薄膜具有開發類似光觸媒功能的天然物產品之潛力。

貳、研究動機

在高中生命科學第二章微生物中曾提到微生物與人類的關係密切，在我們的生活中佔有舉足輕重的地位，部分的微生物對人類有益，但其他許多的微生物為人類帶來不少威脅。抗生素曾是最有效的抑菌、抗菌物質，但近年來抗生素的使用，使得強烈的人擇因素介入的生態演化，造成了不少抗藥性菌株。目前台灣濫用抗生素的情形已是世界知名，在面對一些較頑強的細菌，往往第一線的抗生素已不足以抵抗(高中生物十四章演化)。在臨床上，克雷白氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 是一種伺機性的病菌，雖然普通，是人類腸道常見細菌之一，卻常感染一些免疫力較弱如肝炎、糖尿病的病人。感染後可能會造成肝膿瘍、尿道感染、敗血症、眼內炎及中樞神經系統發炎等，使病情一發不可收拾。克雷白氏肺炎桿菌是醫院內極需要被控制的細菌之一。有沒有什麼更好的方法能抑制像克雷白氏肺炎菌這樣的病菌呢?

在尋找的資料之中，蘆薈被認為含有多種生物效能，包括內泌素調節、免疫功能調節、血糖調節、抗癌、抗感染及殺菌能力等，我感興趣於蘆薈的抑菌功效性，若能開發其中具有抑菌效果的天然物，可作為具抑菌功效的清潔劑，或作為醫院控制院內感染菌源的防線，或作為一般家庭或公共場所衛生維護的清潔劑，我認為像蘆薈這般天然物的使用，可能較無一般使用化學物質清潔劑的不良作用與環境污染，也或許可以緩和病原菌抗藥性的問題。

參、研究目的

本研究主要在於利用蘆薈天然的性質，以達到抑制克雷白氏肺炎桿菌的效果。

伍、研究設備與器材

果汁機
恆溫培養箱
無菌操作台
0.22 μ 濾篩
高溫高壓滅菌器
分光光度計
冷凍乾燥機

陸、研究材料與方法

一、蘆薈凝膠粉末與蘆薈薄膜的製備：

由購自澎湖的吉拉索蘆薈 (*Aloe vera*) 植株，將新鮮的吉拉索蘆薈以水洗淨，先削去蘆薈前、後端的部份，再以水果刀仔細削去蘆薈葉表皮，取出蘆薈的果肉凝膠。此時將蘆薈的果肉凝膠切成片狀後以冷凍乾燥法昇華其中的水份，所得的固體擠壓成蘆薈薄膜與研磨成蘆薈凝膠粉末 [圖一]。由於蘆薈在高溫作用下會產生褐化現象，因此前段的實驗採用將蘆薈凝膠粉末回溶於水後以過濾方式除去細菌，並可過濾掉一些殘留在溶液中的雜質，使用的濾膜孔徑為 0.22 μ m，一般細菌的大小在 1 μ m 左右，因此可以將細菌濾掉。

二、蘆薈多醣體的萃取

取得上述蘆薈凝膠粉末為原料進行萃取多醣體，利用 80% 乙醇溶液在 70°C 攪拌 3 三小時，藉由離心 (1000 rpm、5 分鐘) 濾掉殘渣，再使用減壓真空濃縮儀 (Heidolph, Laborota 4000) 於 50°C 下蒸發乙醇溶劑部分，即為蘆薈多醣體的萃取液。

三、菌株及培養條件

本實驗所使用的菌株為克雷白氏肺炎桿菌，來自交通大學彭慧玲博士的贈予。克雷白氏肺炎桿菌以高營養成分的 Terrific broth 培養基（每升含 11.8 公克的 casein peptone，23.6 公克的 yeast extract，9.4 公克的 di-potassium phosphate 及 2.2 公克的 monopotassium phosphate）於 37°C、150 rpm 震盪培養，或使用較為廣泛的 LB broth 培養基（每升含 10 公克的 tryptone，5 公克的 yeast extract 及 10 公克的 NaCl）於 37°C、150 rpm 震盪培養。培養液經高溫高壓滅菌處理後備用。

四、細菌含量的測定

細菌經過適當培養後，以分光光度計測定其在 600nm 下的吸收值，當菌液的濃度越高時，其在 600nm 下的吸收值越高。每種細菌可能對不同波長的光有不同的吸收值，克雷白氏肺炎菌沒有特定的最大吸收波峰，故以一般測定細菌濃度常用的 600nm 吸收值作為測定的標準。

或者，將菌液稀釋到適當的濃度塗於固體培養基上(前述培養基中加入 15% 洋菜膠)培養 8~16 小時後計數菌落數。

五、清除自由基 (DPPH) 能力測定

DPPH 是一種含有奇數個電子的安定自由基，其乙醇溶液呈深紫色，在波長 517 nm 下有強吸收值。故當 DPPH 被具有抗氧化能力的試劑（強還原劑）還原時，兩分子的 DPPH 上的奇數電子會與抗氧化物質結合，形成一分子的 DPPH 與抗氧化物質結合的複合分子，和一分子 DPPH 還原態分子（式一）：



DPPH 還原態分子在波長 517 nm 下的吸光值即會降低。因此我們可以藉由待測樣品與 DPPH 反應後，測量 DPPH 在波長 517 nm 下吸收值的強弱，可以比較出待測樣品的抗氧化能力。

柒、結果

(一) 蘆薈對克雷白氏肺炎菌生長之影響

1. 高濃度的蘆薈多醣體可以些微的抑制克雷白氏肺炎菌

蘆薈多醣體對克雷白氏肺炎菌的抑菌效果在第 2 - 3 個小時之間最明顯。如

圖二的細菌生長曲線發現，蘆薈多醣體濃度最高的實驗組中，細菌的生長受到抑制，蘆薈多醣體濃度較低的 B、C 兩組則無明顯差異。

2. 蘆薈多醣體抑菌效果的再現性低

從圖三的實驗數據中可以看出經過過濾的蘆薈多醣體在 OD 600 nm 的吸光值比未經過過濾的蘆薈多醣萃取液較低，是因為原先蘆薈多醣體萃取液中是含有一些許細菌的，所以必須利用過濾的方式來維持實驗的正確性，由結果可見過濾細菌是有效的。

另外在實驗中為了提高蘆薈多醣體萃取液的濃度且方便保存的冷凍乾燥法，使用乾燥後的粉末回溶於水中，而為了確保這處理不影響實驗結果，也做了比較，可由結果圖三看出兩者幾乎無差異，表示冷凍乾燥的過程並不影響我的實驗。

但是這次的實驗結果(B,D 組)與對照組比較發現蘆薈多醣體對克雷白氏肺炎菌是沒有抑制的效果。

3. 蘆薈丁沒有抑菌效果

也許蘆薈抗菌的成分不在多醣體的部分，而是葉子的其他部分或是植物本身內部多種物質互相交互作用的影響，或甚至是本身特殊的結構特性影響，所以接下來的實驗朝向不萃取蘆薈的多醣體，而直接改用把蘆薈果肉凝膠切丁放入培養基中來培養細菌，看看兩者的差異，如圖四所示，結果顯示蘆薈丁非但沒有抑制克雷白氏肺炎桿菌的效果，反而增助了細菌的生長。經過了多次的重複仍呈現相同的結果，蘆薈丁似乎不能抑制克氏菌，可能還具有某些營養成分能幫助生長。

4. 光是必要的觸媒

許多資料中均顯示蘆薈能有抑制細菌的功用，但是目前的實驗結果卻不支持這樣的說法。在感到很懊惱之際，又多查了一些網路上的資料，無意中發現先前因為 SARS 侵襲台灣而紅及一時的化學光觸媒，因其照射光線之後可以產生自由基，有殺菌效果，可以有效的危害細菌和病毒的生長，而被利用為口罩的材料。於是突發奇想，說不定蘆薈要達到抑菌的效果，是需要一些刺激的。

圖五 a 結果顯示，照光處理後的蘆薈薄膜確實有抑制克雷白氏肺炎菌生長的效應。照過 UV 的蘆薈薄膜中仍然有菌存在，是因為 UV 對蘆薈薄膜的影響是表面性的，沒辦法深入比較深層的结构中，所以裡層的細菌依然能生存。兒光照與否對於原先在薄膜深層的細菌不太有影響，更顯示光照的影響是表面的。圖五 a 顯示克雷白氏肺炎菌加到有因為光照的因素而被抑制。為了更確定光照的乾燥蘆薈薄膜抑制細菌生長，塗盤結果如圖五 b，可以看出細菌菌落數的確因光照減少。

由圖六可看得出光照對克雷白氏肺炎桿菌是並無影響的，所以很有可能光照使蘆薈薄膜表面活性物質激發，或是活性物質的構性改變，導致細菌生長受到抑制。猜測可能的原因之一是蘆薈薄膜表面因受到光照產生了自由基，而破壞細菌的生長，所以接下來的目標是測出薄膜表面的自由基，若有自由基的產生，也許是此機制影響了細菌的生長，但仍待進一步實驗證實。

(二) 蘆薈清除自由基 (DPPH) 能力測定

爲了確定是否因爲經由照射日光燈處理的蘆薈薄膜所產生的自由基而達到抑菌的效應，我利用一般實驗室常用來測定抗氧化活性的方法，也許可以間接的說明。由本實驗數據顯示，如圖八所示，蘆薈薄膜中含抗氧化物，可以掃除 DPPH 自由基，但照光以後清除 DPPH 的量變少了，我推測有兩種可能：一是蘆薈薄膜中的抗氧化物因光照而失去作用，一是蘆薈薄膜照光後產生自由基，而使溶液中的自由基數增加導致未清除完的 DPPH 自由基數目相對多。若是前者的敘述較無法解釋抑制細菌的成因，後者的敘述極有可能。(見附錄一)

捌、討論

- 一、最後實驗的結果顯示萃取的蘆薈多醣體並沒有抑制克雷白氏肺炎菌的效用，表示先前找到的資料之蘆薈多醣體能抑制並殺死細菌的說法有待商榷，而直接從蘆薈果肉切成的蘆薈丁也沒辦法抑菌，可能影響的因素是水分。直到將蘆薈處理的方式改變爲乾燥的薄片，經由照光的步驟能使克雷白氏肺炎菌的生長受到影響。水分的存在很可能使蘆薈中的活性分子被氧化，或是導致其活性物質的活性受抑制。未打成粉末的蘆薈薄膜也可能具有結構上的特別之處，有助於抑制細菌的生長，所以以上不同處理蘆薈的方式是代表不同的模型，其實驗結果並不會互相矛盾。
- 二、我不嘗試去解釋爲什麼一開始的結果顯示多醣體有抑菌效果而後來的卻沒有，這很有可能是誤差，或表示實驗的再現性很差。乾燥的蘆薈薄膜在光照之後具有抑菌的效果，而回溶於培養基的蘆薈粉末卻沒有，此種現象我認爲乾燥是很大的因素，因爲水很有可能將此自由基還原而使抑菌效果不明顯，或者被光激發的活性物質因爲與水氧化而失去效用，故必須要在乾燥的環境下才能將抑菌的效果顯現。關於蘆薈抑制細菌生長的機制，仍需要再進一步探討，並設計更深入的實驗嘗試，受限於材料的關係，只能利用抗氧化功能的測定來偵測其抗氧化能力，間接的代表蘆薈表面也許是因爲光照而產生了類似自由基的有害物質，使細菌不能有效的生長，但還是需要其他的方法來提供更直接的證據。

- 三、自然界中因為光而發生改變的分子很多，有些會產生電子的躍遷，也有些會發生構型上的變化，如存在於視網膜上的感光分子，桿細胞中的視紫質，在接受光照後會裂解成視黃醛和視質，原因是因為視黃醛在光照後構型發生了改變，使其與視質分離，進而引發電位差使光能轉為神經電流。類似的例子隨處可見，而蘆薈中的特定物質也很有可能具有此一特性，使得光照後的薄膜產生了抑菌的效果。
- 四、理想的細菌生長曲線分為四期：適應期、生長對數期、穩定期和死亡期。適應期的長短會依環境的不同而有些微的不同，是四期中最短的一期，細菌的生長速度慢；接著進入生長對數期，此時細菌生長速度最快，以對數比例成長；穩定期是細菌數和環境負荷達到平衡的時候，細菌數維持在一穩定狀態，改變很小；進入死亡期的菌落開始凋亡，因環境的養分已被耗盡，細菌無法繼續生存，若是沒有外界的補給，細菌數會持續減少直到全部死亡為止。當要看蘆薈是否有抑制細菌的效果時，要培養到生長對數期時才容易察覺其差異，若是培養到穩定期，即使蘆薈有抑菌效果也看不出來，因為相同營養量能負荷的菌數是一樣的，所以兩者終究會達到一樣的穩定期。
- 五、利用可見光波照菌液 OD 值以測定菌數的多寡有誤差，因為吸光值和光徑與待測物濃度有關，若是不小心在菌液中有一群細菌黏在一起或是細菌的大小不同時都會影響吸光值。但我在實驗中盡量避免這樣的誤差產生：在測 OD 值前菌液一定先震盪過使細菌均勻散佈，且使用單一菌種。單一菌種在養分充足下其大小應是一致的，所以應該沒有因大小差異造成的誤差問題。另外我也以塗盤的方式操作一次，如此可避免上述的問題，其實驗結果是相同的，表示上述造成的誤差不大，我的實驗數據應具有參考價值。
- 六、化學光觸媒主要的特性有殺菌除臭和防霉，其原理簡單敘述是當紫外光照射光觸媒材料時使其表面電子因得到能量脫離而形成材料表面的電洞，進而使空氣中水分子游離的氫氧基形成活性極高的氫氧自由基。蘆薈抑制克雷白氏肺炎桿菌的效果似乎類似光觸媒的效應。乾燥的蘆薈薄膜經過光照後的抑菌效果，也許未來可以應用於醫院內的防護口罩或是手術衣上，尤其蘆薈本身也具有抗氧化的功能存在，使陽光激發的自由基毒性不那麼強烈而直接危害到皮膚，使對人體的傷害降到最小；或是發展製成冷氣機及空氣清淨機之濾網，也可抑制細菌滋生達到更好過濾空氣的效果。待對蘆薈之抑菌機制有更明瞭的認識之後，也可以將其運用於清潔方面，作為清潔劑或洗衣劑使用，或者以相同機制發展新的抗菌藥甚至抑制病毒的散播。

七、這次實驗中遭遇的最大困難是當蘆薈怎麼做都沒有抑菌效果時，真的很難過，找不到繼續發展下去的方向，後來做光照的實驗也是抱著姑且一試的心態，不過最後卻有令人興奮的結果。科學實驗就是要再現性高，才算真正成功的實驗，若是第一次、第二次做得出來，但是接下來都做不出來了，就要開始懷疑實驗的方法有沒有對，然後用更進一步的方法來證實自己的想法。不要總覺得實驗一定要符合自己的預期才算好結果，其實做出證明預期想法是錯的也是很了不起的。科學就是要有追根究底的精神和鍥而不捨的好奇心，然後在困難重重的時候激發無限的創意。

玖、結論

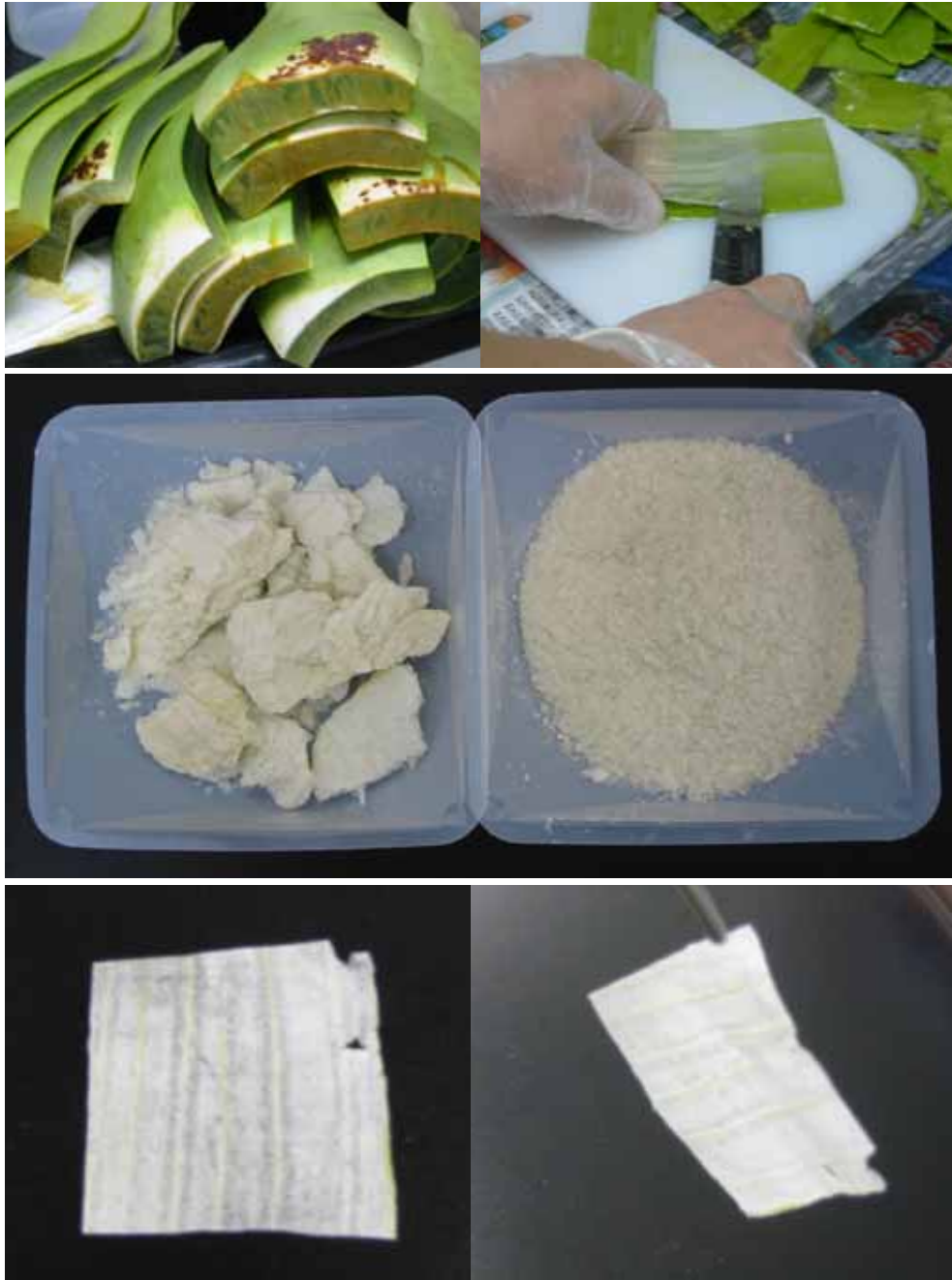
當蘆薈被製成一張乾燥的薄膜，且經過一定時間的光照後，可以產生一定程度的抑菌效果。其抑制細菌生長的方式可能是由一活性物質控制，此活性物質在照光以後可能以產生自由基的方式妨礙細菌的生長，若能更深入瞭解照光處理的蘆薈薄片之抑菌機制，將可更進一步的應用於光觸媒產品或研發新的抗菌劑。

拾、參考資料及其他

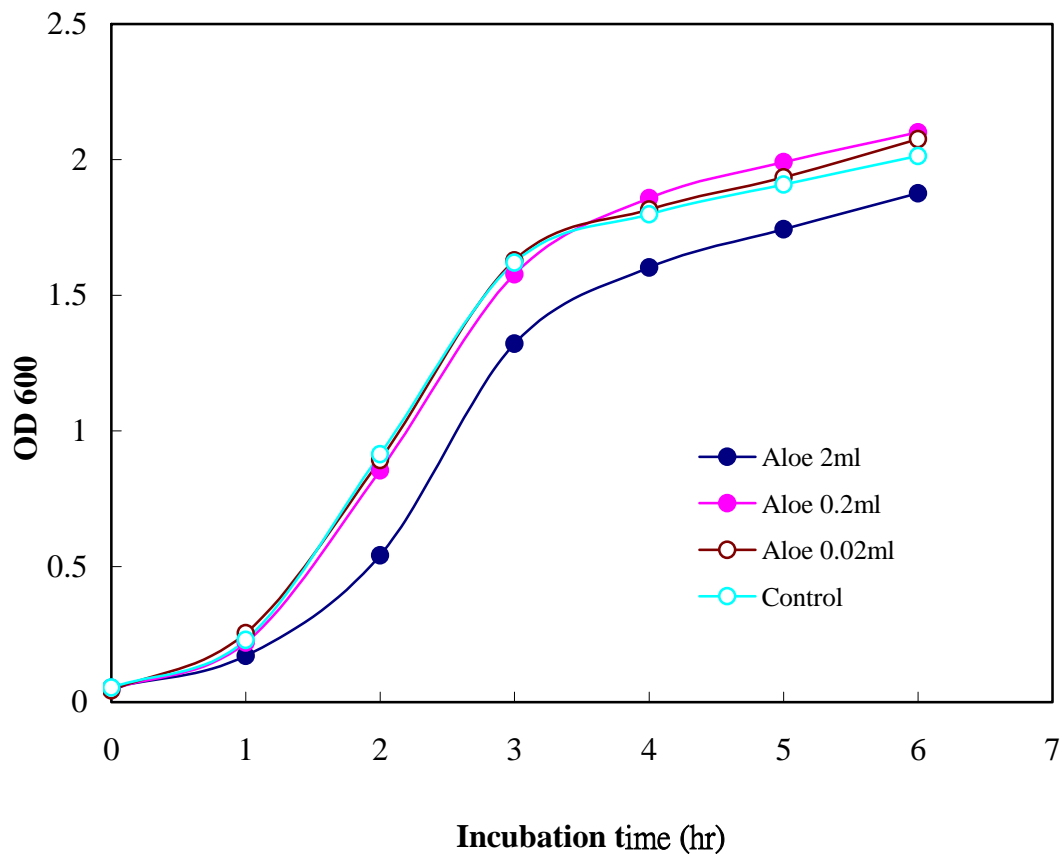
1. Crosswhite FS, Crosswhite CD. 1984. *Aloe vera*, plant symbolism and the threshing floor. *Desert Plants* 6: 43–50.
2. Grindlay D, Reynolds T. 1986. The *Aloe vera* phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *Journal of Ethnopharmacology* 16: 117–151.
3. Reynolds T, Dweck AC. 1999. *Aloe vera* leaf gel: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* 68: 3–37.
4. Wilson M.; Light-activated antimicrobial coating for the continuous disinfection of surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003 Oct;24(10):782-4
5. 劉麗鳳譯，主婦之友社編輯，來自美國的最新蘆薈健康美容法，世茂出版社，2002.3
6. 高中生命科學第二章，生物第十四章

7. Stuart Ira Fox原著，張林松等人編譯，人體生理學，文京出版社
8. 澎湖縣農會 <http://www.phfa.com.tw/default.asp>

拾壹、特別感謝交通大學林志生老師實驗室教導技術並出借儀器、藥品使用以及彭慧玲博士贈予克雷白氏肺炎菌。

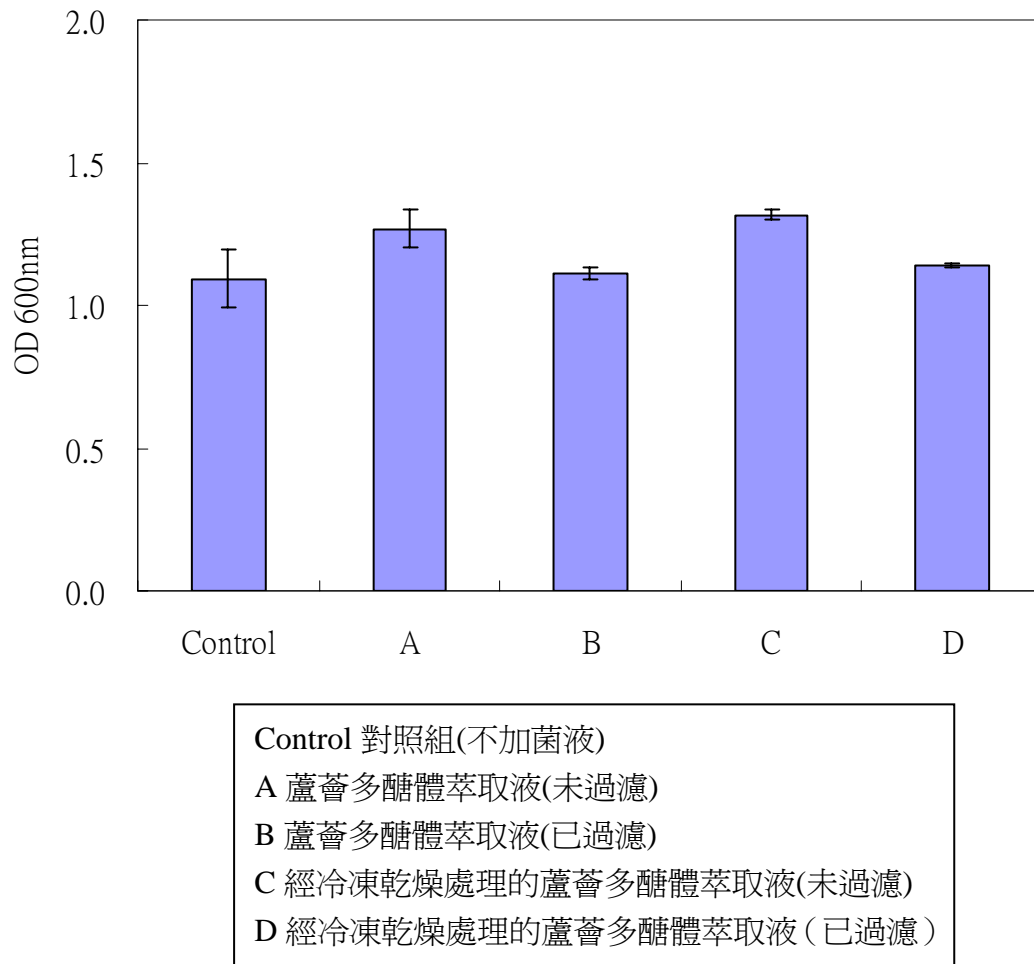


圖一、(上) 蘆薈的處理過程，左圖為去頭去尾的蘆薈，右圖中央透明的膠狀物即為蘆薈凝膠。(中) 冷凍乾燥後蘆薈；左邊是蘆薈剛乾燥完的片狀物，右邊是研磨後的蘆薈粉末。(下) 經過冷凍乾燥處理後的蘆薈，擠壓成蘆薈薄片成品。



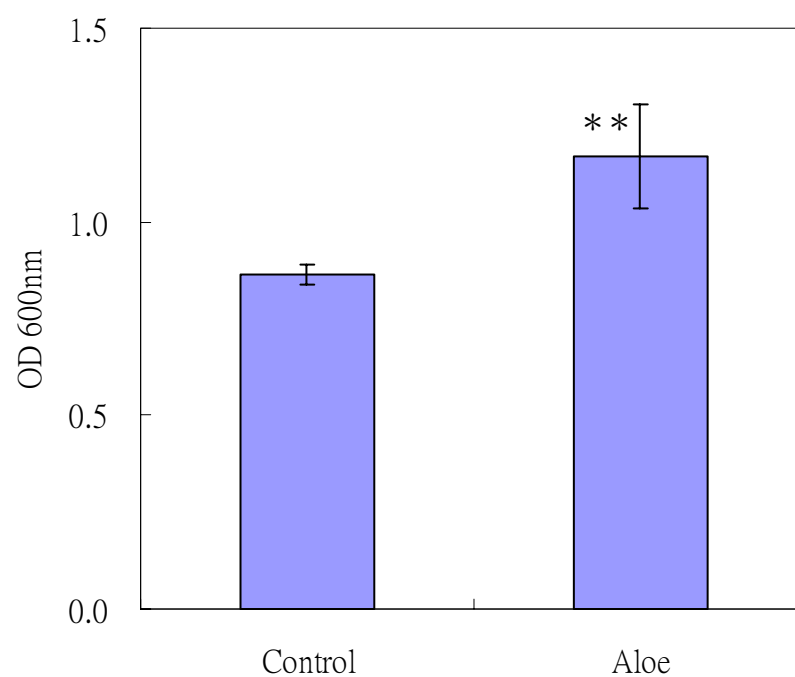
圖二、不同濃度之蘆薈多醣體萃取液對細菌的生長曲線之影響。

將 Terrific broth 分裝至 4 個錐形瓶中，每瓶 40 mL，並在每一瓶中加入不同濃度的蘆薈多醣體萃取液與等量的克雷白氏肺炎菌菌液。將錐形瓶置於 37°C、150 rpm 震盪培養，每隔 1 小時於各組取出 2 mL 菌液（4°C 保存），共收集 6 小時後，使用分光光度計 OD 600 nm 測定細菌生長曲線。



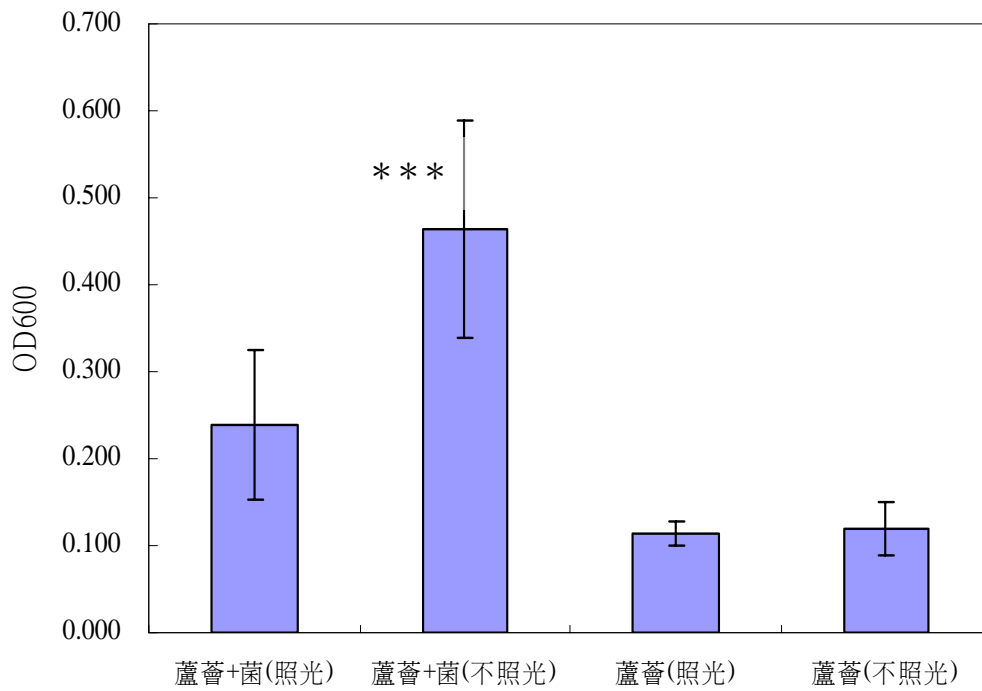
圖三、不同處理之蘆薈的抑菌效果。

於 A, B, C, D 加入等量菌液後以 37°C、150 rpm 震盪培養 2 小時後測 OD 600 nm。(實驗操作為三重複)



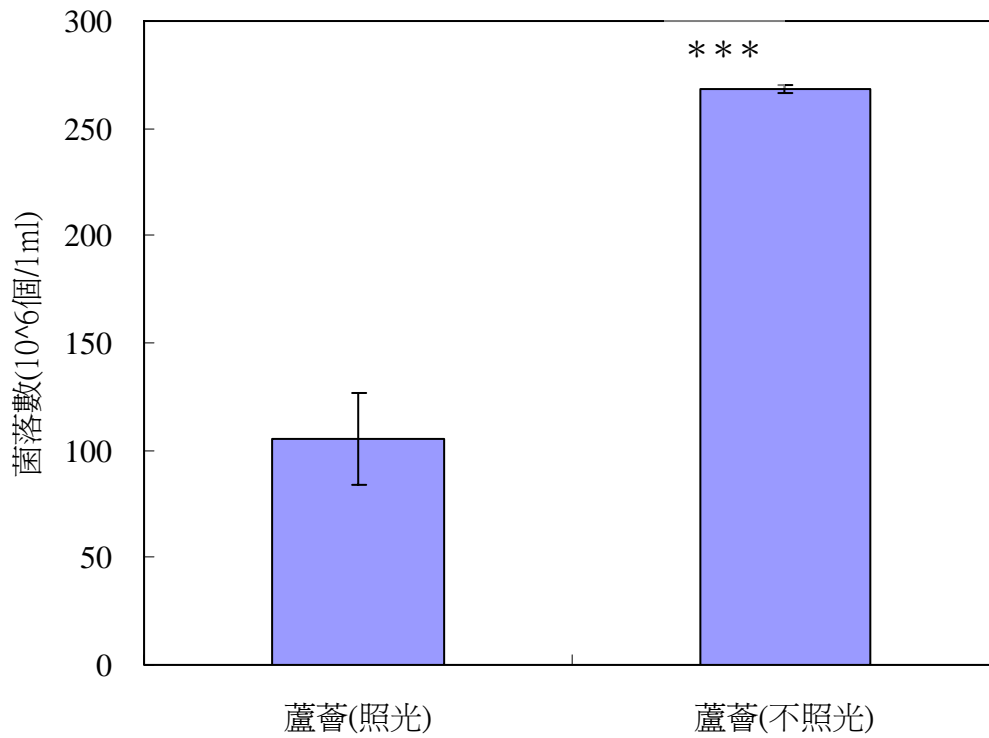
圖四、蘆薈丁對克雷白氏肺炎桿菌生長的影響測試

把蘆薈凝膠切成丁放入 2 倍稀釋的 LB broth 中與不加蘆薈丁之對照組比較，加入等量菌液，於 37°C、150 rpm 震盪培養 4 小時後測 OD 600 nm。
(實驗操作為三重複)



圖五(a)、照光後的蘆薈薄膜之抑菌效果測定。

將蘆薈薄膜片以紫外光照射除菌後，滴上菌液，區分為照日光燈與不照日光燈處理 1 小時後，把蘆薈薄膜片丟入 2 倍稀釋的 LB broth 中於 37°C、150 rpm 震盪培養 8 小時後測 OD 600 nm。(實驗操作為三重複)



圖五(b)、照光後的蘆薈薄膜之抑菌效果測定

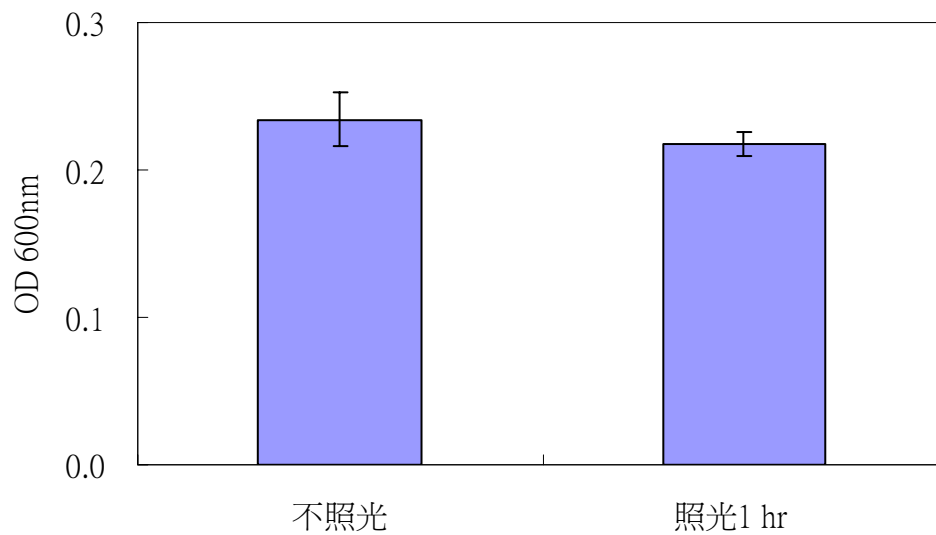
取於 37°C、150 rpm 震盪培養 5 小時的細菌將菌液稀釋至 10⁻⁵ 倍後塗在固體培養基上培養 8 小時後計數細菌菌落數。(實驗操作為三重複)

下圖為結果之照片：



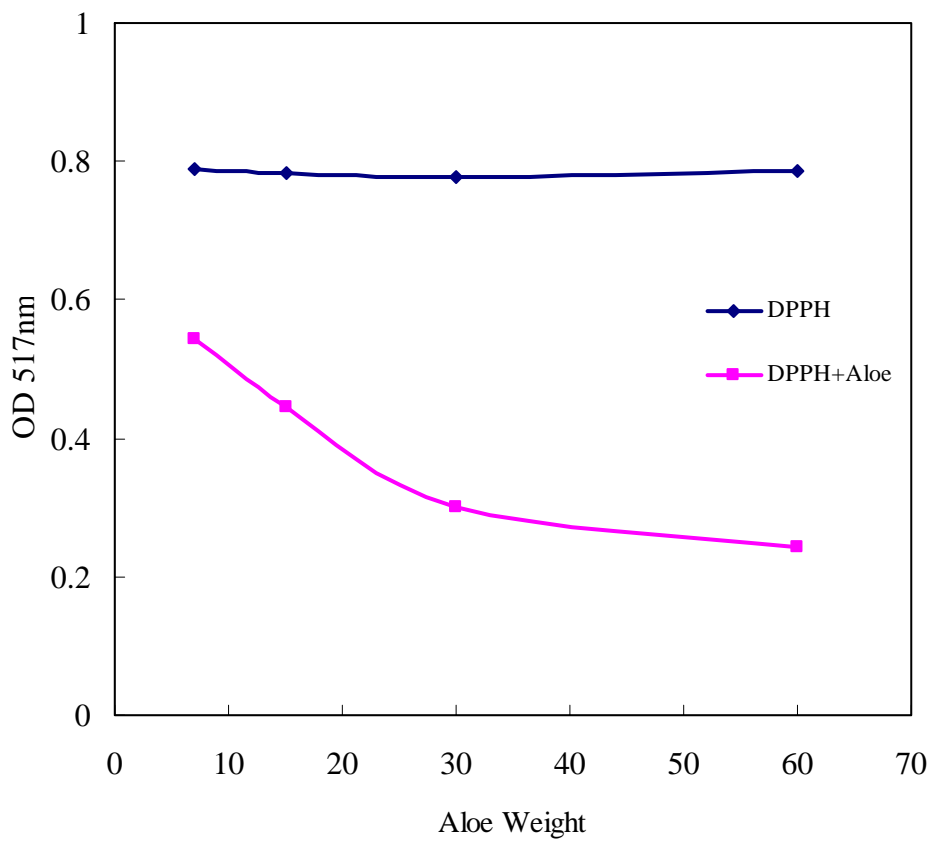
照光

不照光

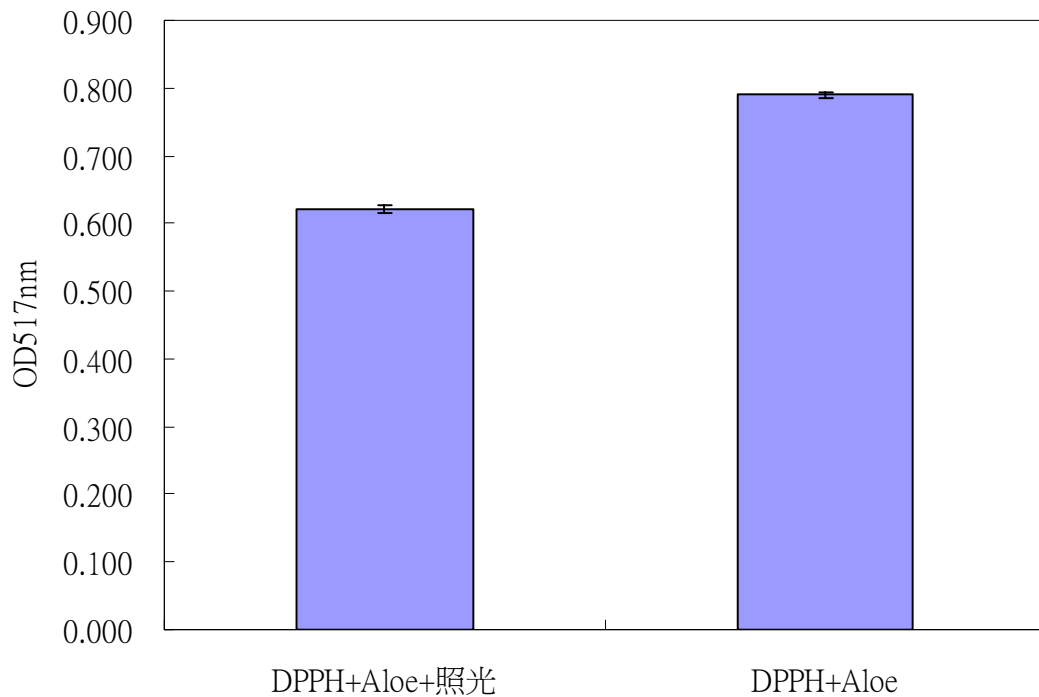


圖六、光照一小時對克雷白氏肺炎菌的影響。

細菌的生長不會受到光線的刺激而有所影響，為了證明光照是不會直接影響細菌生長的，以相同的菌量加到 2 倍稀釋的 LB broth 中再照光 1 小時，測 OD 600 nm。(實驗操作為三重複)



圖七、不同重量蘆薈薄膜與其抗氧化作用的關係，OD 517 nm 越低表示 DPPH 自由基數量少，由圖可知蘆薈薄膜的量越多，其中的抗氧化物質越多。



圖八、照光與不照光蘆薈薄膜清除 DPPH 的差異

從圖七選取適當的 DPPH 濃度與蘆薈薄膜重量，分為二組，一組蘆薈薄膜照光 1 小時，另一組蘆薈薄膜不照光 1 小時，加入 DPPH 溶液中在 37°C 下避光反應 20 分鐘，之後取分別取其溶液測 OD 517 nm。上述測出來的讀值與在 37°C 避光環境下放置 20 分鐘的 DPPH 溶液讀值相減，得到的數值製成上圖，此數值代表加入物清除 DPPH 之量。(實驗操作為三重複)下圖為實驗結果照片:



最左邊為 DPPH 靜置 20 分鐘之顏色，中間為加入不照光蘆薈的 DPPH 溶液(反應後)，最右邊為加入照光蘆薈得 DPPH 溶液(反應後)，可見三者顏色之明顯差異。

附錄一、外來自由基對 DPPH 之變色影響



在 DPPH 溶液中加入不同量的 ox-LDL(自由基)：由左至右為 0~200 μ l 每 40 μ l 為一單位。之後每一管加入 100 μ l 的 5mM 維他命 C(抗氧化劑)。可看見 DPPH 的顏色由淺到深，即在溶液中其 DPPH 被還原的量由左到右遞減。因此，外來自由基的確會影響 DPPH 溶液的顏色深淺的變化，越多的外來自由基讓 DPPH 越不容易褪色。

在我的研究中蘆薈即是扮演兼具 ox-LDL 及維他命 C 的角色，一方面產生自由基，一方面又還原自由基。因此 DPPH 溶液顏色便受到了抗氧化物與自由基兩者產生量多寡的拉鋸。我們假定不照光的蘆薈薄膜沒有產生自由基，因此加入 DPPH 溶液後蘆薈便如維他命 C 般清除自由基，而我們又觀察到了加入照光蘆薈薄膜的 DPPH 溶液顏色比較深，可以推論是因為照光的蘆薈薄膜產生了自由基，導致蘆薈中抗氧化的成分不足以清除掉與不照光蘆薈一樣多的 DPPH 分子。由上圖的結果，如此推論應是合理的。

評語

040723 高中組生物科 佳作

見光死—蘆薈薄膜的光抑菌作用

1. 發現蘆薈光照後的抑菌現象。
2. 具深入探討的價值。