

中華民國第 56 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學學科

052012

別當白屑公主-頭皮菌種與頭皮屑之關係

學校名稱：國立彰化高級中學

| | |
|---|-----------------------------|
| 作者： 高二 吳筱筑 高二 陳瑞峰 高二 潘俊融 | 指導老師： 林家帆 黃介辰 |
|---|-----------------------------|

關鍵詞：頭皮屑、微生物菌相、頭狀葡萄球菌

摘要

本研究收集有頭皮屑的人與正常人之頭皮的樣本，探討其菌相並研究其與頭皮屑之關聯，經篩選與菌種鑑定後，發現頭狀葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*)普遍存在於正常人頭皮上，而有頭皮屑的人較無此菌種，此結果顯示，頭狀葡萄球菌可能為對頭皮代謝週期有幫助的益菌。接著進行頭皮菌種乳化油脂的實驗，發現頭狀葡萄球菌的乳化油脂能力較頭皮上其他菌種：如藤黃微球菌(*Micrococcus luteus*)為佳，且頭狀葡萄球菌除了油脂仍需要其他碳源才可生長，非單靠油脂維生。最後探討洗髮精和界面活性劑(Tween20 和 Tween80)與頭皮菌種之抑菌作用，實驗結果發現洗髮精對頭狀葡萄球菌和藤黃微球菌皆有抑制效果，但界面活性劑對其並無抑制效果，推測抑制頭皮菌種的成分並非界面活性劑，而是洗髮精中的其他物質。

壹、研究動機

我們曾在基礎生物(下)中學到生態系、三域六界，上課時，老師介紹真細菌界的特性，不同的菌會生活在不同的環境，老師提出一個有趣的問題，那我們人體上有哪些微生物呢？各部位的菌會不會不太相同呢？這引發我們的好奇心，本來認為，我們身上不都是「皮膚」，還會有甚麼不同的菌種嗎？上網查詢資料後，發現人體各部位竟然真的有不同的微生物與人類共生，如腸道菌、皮膚上的金黃色葡萄球菌、腋下也有特定的菌落等。我們又觀察到身邊頭皮屑很多的同學以及頭髮稀疏的主任、老師，頭皮屑對他們造成困擾，甚至對自尊心和人際關係造成影響，我們不禁思考頭皮屑與頭皮菌種的關係是否密切，而每天使用的洗髮乳又是否能夠除去頭皮上能誘發生成頭皮屑的菌，我們因此展開了對頭皮菌群的探索及研究！

貳、研究目的

- 一、 探討頭皮上主要的細菌及找出與頭皮屑增生有關的菌種
- 二、 檢測頭皮上菌種是否會乳化油脂及碳源對其之必要性
- 三、 探討洗髮精及界面活性劑對頭皮菌種的抑制效果
- 四、 以聚丙烯醯胺膠體電泳證實頭狀葡萄球菌脂肪酶的存在
- 五、 探討頭狀葡萄球菌與藤黃微球菌的競爭關係

參、研究設備器材及藥品

一、設備

| | |
|-----------------------|-----------------|
| 無菌操作台 | 滅菌釜 |
| 聚合酶連鎖反應(PCR)機器 | 照膠器 |
| 37°C 培養箱 | 離心機 |
| 機械式微量吸管 | 水浴槽 |
| Vortex machine | 烘乾機 |
| 電泳機器 | 微量分光光度計 |
| 培養皿 | L 型玻棒 |
| 酒精燈 | 微量離心管(1.7mL) |
| 試管 | 廣口瓶 |
| 塑膠注射筒 | 0.2 μ m 過濾膜 |
| 無菌棉花棒 | 滅菌膠帶 |
| 0.2 μ m 過濾膜與塑膠注射筒 | |

三、藥品

(一)培養基

1. LB 營養劑粉末(每 500 g):(1)Tryptone 200 g (2)Yeast Extract 100 g (3)NaCl 200 g

2.洋菜膠(Agar)粉末

(二)抽取 DNA

1.Extraction Solution

2.Lysozyme Solution

3.Proteinase K Stock Solution

4. Protein Precipitation Solution

5.Isopropanol

6.70%酒精

(三)聚合酶連鎖反應(PCR)試劑

1.無菌水

2.10x buffer

3.dNTP

4.Taq polymerase

5.PrimerE8F (序列:5' →3' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)

6.PrimerU1510R (序列:5' →3' GGTTACCTTGTTACGACTT)

(四)電泳

1. Agarose (瓊脂糖凝膠)
2. Safeview (染色劑)
3. DNA dye 染劑
4. Marker 標準液

(五)樣本菌乳化油脂實驗

1. LB 培養液→每公升水加入 25g LB 粉末
2. 橄欖油
3. M9 培養液(無碳源之培養液)→每公升水加入 25g M9 粉末

(六)樣本菌與洗髮精和界面活性劑之抑菌作用實驗

1. 多芬(DOVE)洗髮精
2. Tween20 (界面活性劑)
3. Tween80 (界面活性劑)

(七)聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS PAGE)

1. 水
2. 40% Acrylamide
3. Tris-Base (1.5M pH=8.8)
4. 10% SDS
5. 10% APS
6. TEMED
7. Tris-Base (1.0M pH=6.8)
8. PMSF
9. Lysozyme
10. Dye
11. Marker(Page Ruler Prestained Protein Ladder)
12. 染劑
13. Destaining Solution
14. Running Buffer
15. Washing Buffer (50mM sodium phosphate 和 各 50mM 的磷酸二氫鈉與磷酸氫二鈉)

肆、實驗方法

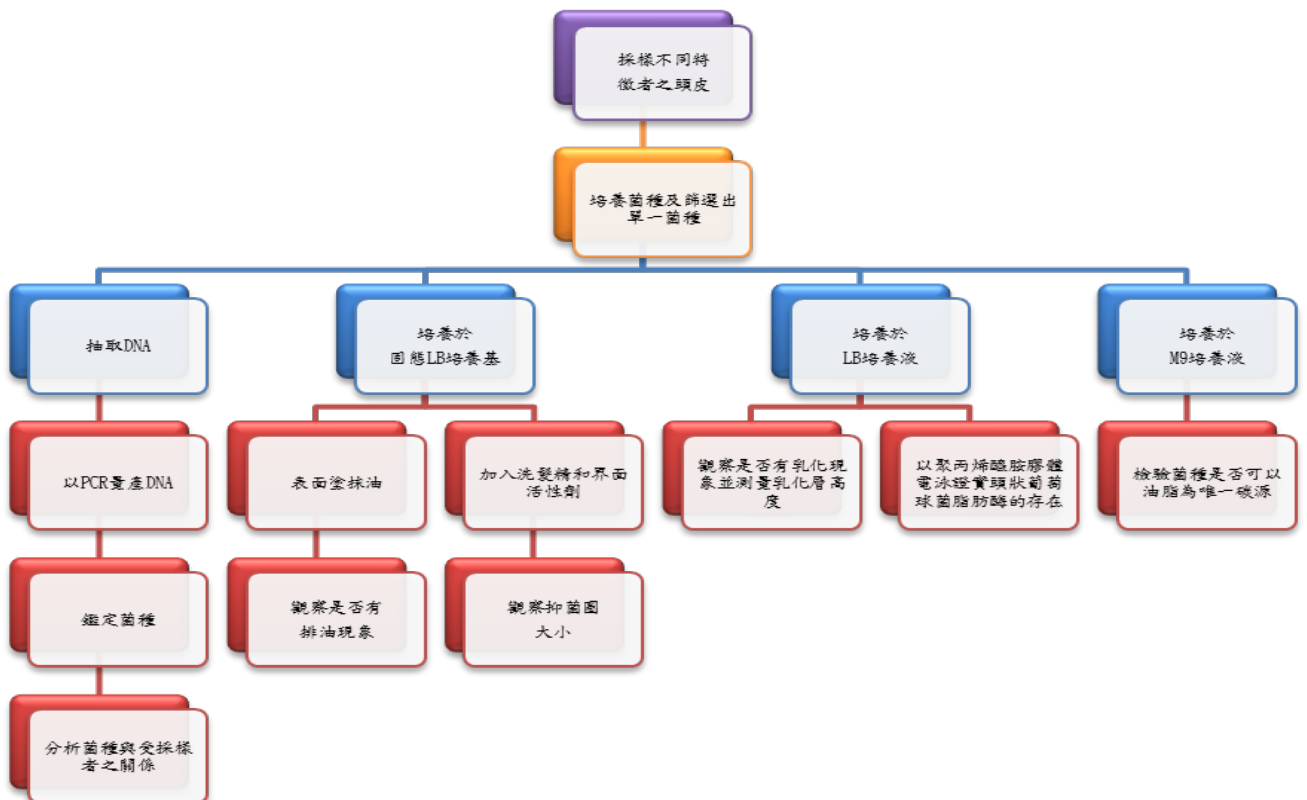


圖 4-1 實驗流程

一、 獲取樣本的 DNA

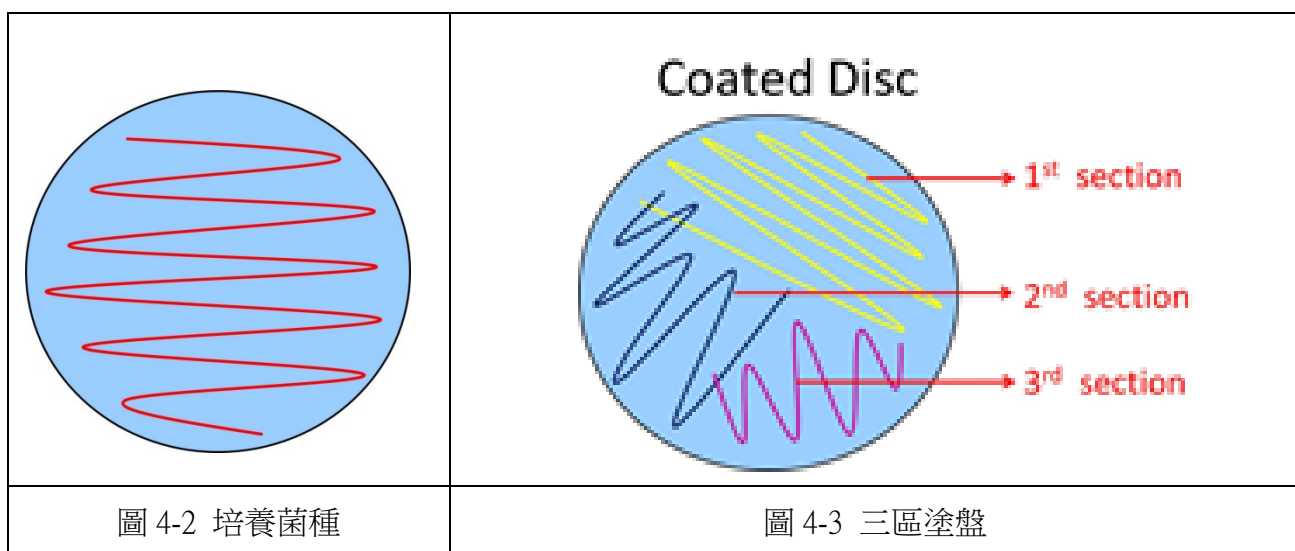
明顯頭皮屑特徵判定方式為距離受採樣者 5 公尺觀察仍可清楚觀察到其頭皮屑，且其數量繁多以致衣領及肩膀有頭皮屑掉落，正常人與其有明顯差距，本實驗著重兩極端之樣本收集。以無菌棉花棒採集有明顯頭皮屑特徵之人與正常人之頭皮樣本，將其培養於培養基上，並經過抽取 DNA、聚合酶鏈鎖反應(PCR)和定序等步驟得知樣本之菌種名稱、特性，最後加以探討哪些菌種與頭皮屑有較大的關係。詳細步驟如下：

(一)製作培養基

- 1.配製一 LB(營養劑)濃度為 25g/L 和 Agar(洋菜膠)濃度為 15g/L 的混和溶液。
- 2.在瓶蓋上貼上滅菌膠帶，放至滅菌釜中，使其在 121°C 高溫下滅菌 20 分鐘。
- 3.待其冷卻後取出，在無菌無塵操作臺將溶液倒入培養皿中，之後用紫外光照射殺菌數分鐘，待其凝固後即完成。

(二)採樣及培養菌種

- 1.將無菌棉花棒以無菌水沾濕，在受採樣者頭皮來回滾動，接著將棉花棒以圖 4-2 的方式塗在培養基上。
- 2.經過一天培養，挑取盤中單一菌落，在新的培養基上，以圖 4-3 的方式進行三區塗盤。
- 3.自第三區中挑取菌種，將各樣本集中於新培養基上，如圖 4-4。



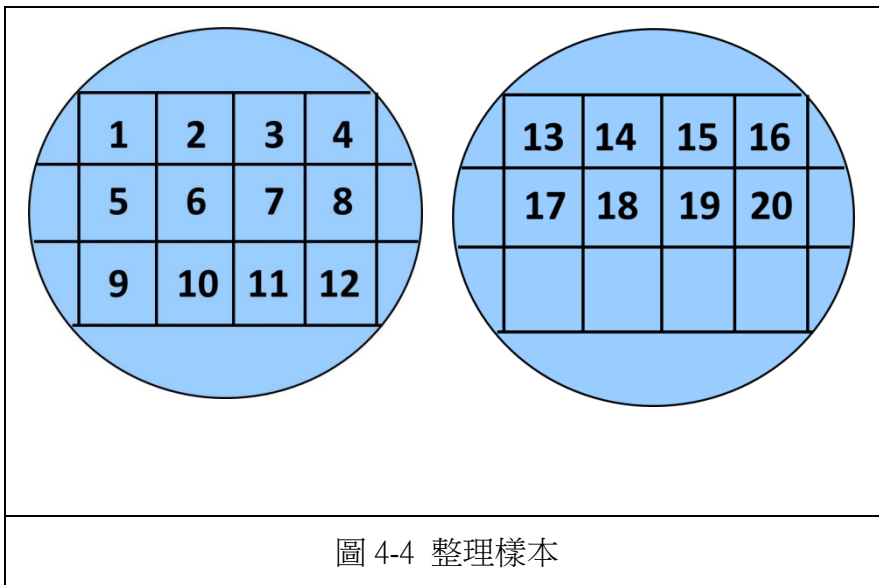


圖 4-4 整理樣本

(三)製造菌液

- 1.沾取圖 4-4 中的樣本，加入至裝有 LB 培養液的試管中
- 2.放入 37°C 培養箱 12~16 小時即完成

(四)抽取 DNA

- 1.第一個步驟分為革蘭氏陽性菌與革蘭氏陰性菌

(1)革蘭氏陰性菌：將樣本菌液離心(13000rpm，2 分鐘，室溫)，倒掉上清液，加入 600 μ L Extraction Solution，在 vortex 上使其混勻直到沒有白色沉澱物，接著跳第二步驟。

(2)革蘭氏陽性菌：將樣本菌液離心(13000rpm，2 分鐘，室溫)，倒掉上清液，加入 180 μ L Lysozyme Solution，放入 37°C 培養箱 30 分鐘，之後再加入 600 μ L Extraction Solution，接著跳第二步驟。

- 2.加入 20 μ L Proteinase K Stock Solution(濃度 0.022g/1.1mL 水)，在 vortex 上混其均勻。
- 3.置於 56°C 水浴槽 1~3 小時，每 10~20 分鐘搖 5~10 秒。
- 4.加 200 μ L Protein Precipitation Solution，在 vortex 上混和均勻。
- 5.離心 13000rpm，3 分鐘。
- 6.將上清液裝到新的 tube。
- 7.加 600 μ L Isopropanol，徹底混合均勻，直到 DNA 白濁體出現。
- 8.離心 13000rpm，一分鐘。

- 9.倒掉上清液，加 1mL 70%酒精。
- 10.離心 13000rpm，一分鐘。
- 11.倒掉上清液。
- 12.在 50°C 烘箱中烘乾，2 分鐘。
- 13.最後在 tube 中加入無菌水即完成（放入-20°C 冰箱中保存）。

二、量產所培養的樣本菌種 DNA

(一)聚合酶鏈鎖反應(PCR)

1.PCR 的添加試劑與功用

- (1)無菌水 13.8 μ l
- (2)10x buffer2 μ l : 調節 pH 值(成分:氯化鎂、氯化鉀、Tris-HCl, pH 值在 8.3 25°C)
- (3)dNTP1.6 μ l : 複製 DNA 的原料
- (4)Primer E8F 0.8 μ l : 前置引子(forward primer)
- (5)Primer U1510R 0.8 μ l : 反置引子(reverse primer)
- (6)Taq polymerase 0.5 μ l : DNA 聚合酶
- (7)樣本 DNA 0.5 μ l

2.將上述試劑與樣本 DNA 裝入小 tube 中，放入 PCR 機器進行 PCR。

3.完成後 tube 即有大量的樣本 DNA

(二)電泳

- 1.將 20 毫升 buffer 加入 0.16 克的 Agarose (瓊脂糖凝膠)。
- 2.放進微波爐加熱至顆粒完全溶解。
- 3.待冷卻後加入 Safeview(染色劑) 1 μ L。
- 4.均勻混和後倒入膠座直至凝固後放入電泳槽。
- 5.將 1 μ L 的 DNA dye 染劑和 5 μ L DNA sample(由 PCR 所得)混合後滴進在電泳槽中的膠洞裡。
- 6.第一個膠洞滴入 Marker 標準液，作為標準。
- 7.蓋上蓋子並蓋上鋁箔版以隔光，開始跑膠。

8.等待約半小時，取出放至照膠器，將膠體曝於 256~300nm 紫外光下。

9.以 Marker 為基準比對紫外光照射下出現的亮帶(band)。

三、定序

(一)以 Nanodrop(超微量分光光度計)測量樣本 DNA 的核酸濃度。

(二)將樣本和 PCR 所使用的 Primer 分裝，連同資料一起送至中興大學生物科技發展中心進行序列解析。

四、研究樣本菌乳化油脂的能力

本實驗以十分相近人類皮脂成分的橄欖油(RMB Mackenna, et al. , 1950)作為實驗油品。

第一個部分以本研究分離菌株頭狀葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*) 和藤黃微球菌(*Micrococcus luteus*)作為實驗菌種，其中頭狀葡萄球菌為對頭皮代謝週期有所幫助的益菌；而藤黃微球菌為頭皮上之正常菌種。以固態 LB 培養基培養這兩株菌，觀察其在油脂中的生長情形。

第二個部分分別以 LB 培養液及 M9 培養液加入油並調整濃度，隨後加入頭狀葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*)、葡萄球菌屬(*Staphylococcus sp*)、藤黃微球菌(*Micrococcus luteus*)和對照組芽孢桿菌(*bacillus*)。因芽孢桿菌為革蘭氏陽性菌的代表菌種，其涵蓋許多革蘭氏陽性菌的眾多特性，本實驗以此菌作為對照組，另外兩株菌為實驗組。在 37° C 培養箱中培養菌種，一日後觀察是否有乳化效果和探討這兩株菌對於碳源的依賴性。

第三個部分為測量各樣本的乳化程度，將各菌液濃度一致，加入等量的油後培養一日，測量其乳化層高度，詳細步驟如下：

(一)以「固態 LB」培養基培養樣本：頭狀葡萄球菌和藤黃微球菌。

1.以塑膠針筒及 0.2 μ m 過濾膜過濾油脂，使之無菌。

2.將三種濃度的油分別均勻塗於固態培養基，分母以固態培養基上 20mL 的 LB 來計算，分子為油的體積，三種濃度分別為 0.1%(20 μ L)、0.5%(100 μ L)、1%(200 μ L)。

3.在各個培養基上分三區點相同的菌，每個菌做三盤(三重複)。

4.將所有培養基放入 37°C 培養箱，一日後觀察結果。

(二)以「LB 培養液」培養樣本：頭狀葡萄球菌、葡萄球菌屬、藤黃微球菌和對照組芽孢

桿菌。

- 1.以塑膠針筒及 0.2 μ m 過濾膜過濾油脂，使之無菌。
- 2.將過濾後的油脂以兩種劑量 100 μ L(佔菌液的 0.5%)及 200 μ L(佔菌液的 1%)分別連同 50 μ 的菌液加入至 20mL LB 培養液試管中。
- 3.放入 37°C 培養箱，一日後觀察是否有乳化反應產生。

(三)以「M9 培養液」培養樣本:頭狀葡萄球菌、葡萄球菌屬、藤黃微球菌和對照組芽孢桿菌。(M9 為無碳源之培養液體)

- 1.以針筒及 0.2 μ m filter(過濾膜)過濾油脂，使之無菌。
- 2.將過濾後的油脂以兩種劑量 100 μ L(佔菌液的 0.5%)及 200 μ L(佔菌液的 1%)分別連同 50 μ L 的菌液加入至 20mL M9 培養液試管中。
- 3.放入 37°C 培養箱，一日後觀察是否有乳化反應產生。

(四)測量各樣本乳化效果的程度

- 1.先將各樣本菌液稀釋後以分光光度計測量其光密度值(OD 值)，經過換算將各樣本調配成光密度值皆為 0.6 的 5mL 菌液(溶劑為 LB 培養液)以統一其濃度。
- 2.將各光密度值一致的樣本加入 3mL(佔菌液的 60%)的油，接著放入 37°C 培養箱。
- 3.一日後測量其乳化層高度。

五、測試樣本菌與洗髮精和界面活性劑的抑菌作用

以市面上常見之洗髮精和界面活性劑 Tween20 和 Tween 80 進行實驗，探究其對正常頭皮菌相的影響和對頭皮菌種的抑制效果，同樣以頭狀葡萄球菌和藤黃微球菌作為實驗菌種。將菌種塗滿在 LB 培養基上，並於其中間放上小圓形棉片，將洗髮精和界面活性劑分別滴於棉片上於 37° C 培養箱培養一日後，觀察其抑制圈大小即可知道試劑與菌種之抑菌作用。

Tween20 和 Tween80 的差別在於 HLB 值，HLB 值為親水疏水平衡值(水油度)是乳化劑的一個指標，HLB 值愈高親水性越高，Tween20 的 HLB 是 16.7，而 Tween80 的 HLB 是 15，即是說 Tween20 親水性較高，因此 Tween20 對油污溶解力比 Tween80 差了一點。詳細步驟如下:

(一)洗髮精與樣本菌的實驗

- 1.將樣本菌液 100 μ L 均勻塗於 LB 培養基，於盤中間放上一小圓形棉片。

2.分別以 100%、50%、1%洗髮精滴於小圓形棉片上。

3.放入 37°C 培養箱，一日後觀察結果。

(二)界面活性劑 Tween20 和 Tween80 與樣本菌的實驗

1.將樣本菌液 100 μ L 均勻塗於 LB 培養基，於盤中間放上一無菌小圓形棉片。

2.將三種濃度的 Tween20 和 Tween80 分別滴於小圓形棉片上，分母以固態培養基上 20mL 的 LB 來計算，分子為 Tween20 和 Tween80 的體積，分別為 0.05%(10 μ L)、0.1%(20 μ L)、0.5%(100 μ L)。

3.放入 37°C 培養箱，一日後觀察結果。

六、進行聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS PAGE)

(一)膠體製作

1.將兩片玻璃板放至架膠器上，加入水後觀察是否有漏液情形。

2.以以下各溶液比例配製每片下膠：

(1)水 4.3 mL (2)40% Acrylamide 3 mL (3)Tris-Base (1.5M pH=8.8) 2.5 mL
(4)10% SDS 0.1 mL (5)10% APS 0.1 mL (6)TEMED 0.004 mL

3.加入後搖勻並盡速將下膠溶液注入兩片玻璃板間，並留些許空間以加入上膠。

4.於上膠空間注入酒精以壓平下膠上緣，並等待至其凝固。

5.凝固後將酒精倒掉並用水沖洗後吸乾。

6.以以下各溶液比例配製每片上膠。

(1)水 1.46 mL (2)40% Acrylamide 0.25 mL (3)Tris-Base (1M pH=6.8) 0.25 mL
(4)10% SDS 0.02 mL (5)10% APS 0.02 mL (6)TEMED 0.002 mL

其中 TEMED 為最後加入，且加入後搖勻並盡速將上膠溶液注滿兩片玻璃板間和插入尺梳。

7.待其凝固後即完成

(二)樣本製作

1.將樣本菌的菌液放入離心管，離心管放至離心機離心 (10000rpm，5 分鐘)。

2.將上清液取出後保留，而底下沉澱物加入 1mL Washing Buffer 混和均勻後離心

(10000rpm，5 分鐘)並倒掉上清液，重複三次。

3.將沉澱物加入 1mL Washing Buffer 和各 0.1μL 的 PMSF 和 Lysozyme，並以超音波細胞破碎機每兩秒運作每四秒停止的週期持續一分鐘破除菌種細胞壁及細胞膜。

4.將上一步驟得到的破菌溶液取 40μL，並加入 10μL 的 Dye 進行染色，混和均勻後以烘乾機在 100°C 下烘 5 分鐘即完成。

(三)電泳

1.將膠體固定於架膠器上置於電泳槽中，並倒滿 Running Buffer，將尺梳拔起以形成凹槽。

2.將 Marker(Page Ruler Prestained Protein Ladder;Thermo)和樣本依序注入凹槽中。

3.以 50 伏特、30 分鐘條件下電泳上膠。

4.以 150 伏特、60 分鐘條件下電泳下膠。

5.染色：將膠體取出放入盒子，加入適量染劑後於震盪器上震盪 30 分鐘。

6.退染：將染劑倒出，加入適量 Destaining Solution 後於震盪器上震盪 30 分鐘，接著將液體倒出並加入適量水，於震盪器震盪數小時。

7.以掃描器掃描觀察或以塑膠膜將其封閉保存。

七、研究頭狀葡萄球菌與藤黃微球菌的競爭關係

(一)將頭狀葡萄球菌液均勻塗於 LB 培養基，藤黃微球菌液滴於小圓形棉片

1.頭狀葡萄球菌液量分別為 100μL、150μL、200μL，藤黃微球菌液量分別為 10μL、15μL、20μL。

2.培養於 37°C 培養箱，一日後觀察結果。

(二)將藤黃微球菌液均勻塗於 LB 培養基，頭狀葡萄球菌液滴於小圓形棉片

1.藤黃微球菌液量分別為 100μL、150μL、200μL，頭狀葡萄球菌液量分別為 10μL、15μL、20μL。

2.培養於 37°C 培養箱，一日後觀察結果。

伍、研究結果

一、頭皮菌株的分離

(一)各樣本代號對照

表 5-1 為各樣本來源之特徵，未說明特徵即為正常樣本，男女人數為各十人，比例為 1:1(見圖 5-A)；而正常樣本與異常(頭皮屑特徵或禿頭特徵)樣本比例為 11:9(見圖 5-B)；年齡層分布於 1 到 80 歲間，分布情形見圖 5-C。

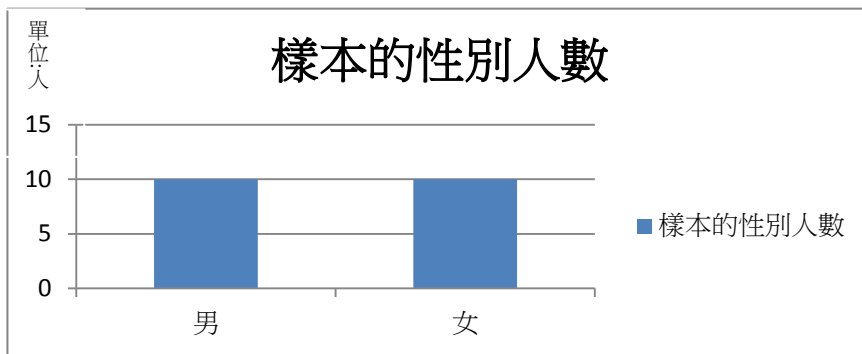


圖 5-A 樣本的性別分布

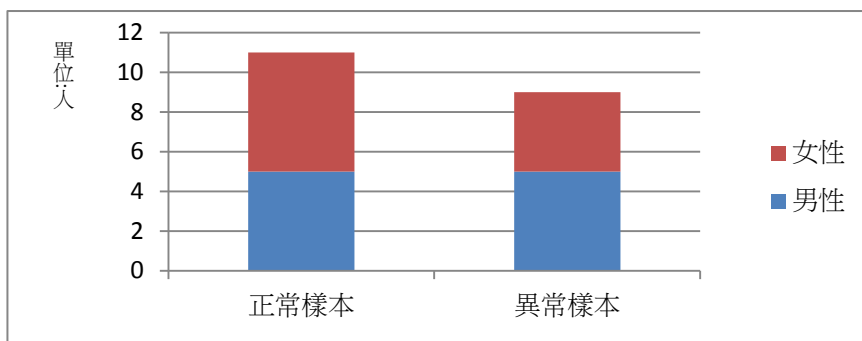


圖 5-B 正常與異常樣本比較

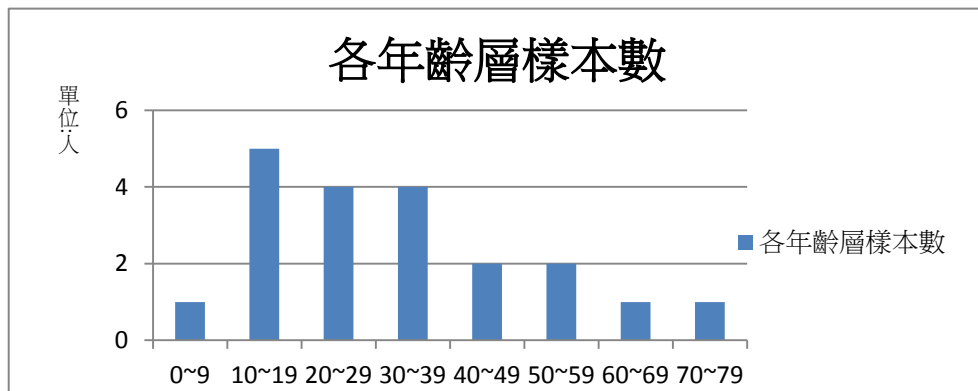


圖 5-C 樣本的年齡層分布

| 樣本代號 | 樣本來源 |
|------|----------------------|
| 1 | A 女 (17 歲) |
| 2 | B 女 (17 歲) |
| 3 | C 男 (17 歲) |
| 4 | D 男(52 歲，頭皮屑特徵、禿頭特徵) |
| 5 | E 男(17 歲，頭皮屑特徵) |
| 6 | F 女(78 歲) |
| 7 | G 女(25 歲，頭皮屑特徵) |
| 8 | H 男(1 歲) |
| 9 | I 男(60 歲) |
| 10 | J 男(16 歲，頭皮屑特徵) |
| 11 | K 男(47 歲，頭皮屑、禿頭特徵) |
| 12 | L 女(50 歲) |
| 13 | M 男(35 歲) |
| 14 | N 女(46 歲) |
| 15 | O 女(25 歲) |
| 16 | P 男(28 歲，頭皮屑特徵) |
| 17 | Q 女(37 歲，頭皮屑特徵) |
| 18 | R 女(32 歲，頭皮屑特徵) |
| 19 | S 女(22 歲，頭皮屑特徵) |
| 20 | T 男(38 歲) |

表 5-1 (註：未說明特徵即為正常樣本)

(二)菌種鑑定結果

經採樣塗盤後，菌落特徵無較大的差異性，顯示同一人頭皮菌種缺乏多樣性，表 5-2 為各樣本經鑑定後，至 NCBI 比較序列得知之菌種名稱，而圖 5-1 為在以下 20 個樣本中各菌種的數目比較圖，圖 5-2 則更進一步分開正常人頭皮與異常人頭皮進行各菌

種數目的比較。本實驗從 20 位不同年齡層的頭皮採樣，其中有頭皮正常 11 位及異常 9 位(頭皮屑特徵或禿頭特徵)，得到頭皮上的菌種有：頭狀葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*)、藤黃微球菌(*Micrococcus luteus*)、莫拉菌屬(*Moraxella sp*)、科氏葡萄球菌(*Staphylococcus cohnii*)、羅思氏菌(*Rothiaamarae*)、葡萄球菌屬(*Staphylococcus sp*)六種菌，其中頭狀葡萄球菌在九個樣本中出現，佔了總樣本數的 45%，推測其為頭皮上主要菌種，其中此菌在正常頭皮中的比例為九分之七(77.8%)，在頭皮異常特徵者的樣本中比例為九分之二(22.2%)。

| 樣本 | 英文菌名 | 中文菌名 | 代號 |
|------|-------------------------------|--------|----|
| 1 | <i>Staphylococcus capitis</i> | 頭狀葡萄球菌 | A1 |
| 2 | <i>Staphylococcus capitis</i> | 頭狀葡萄球菌 | A2 |
| 3 | <i>Staphylococcus capitis</i> | 頭狀葡萄球菌 | A3 |
| 4 * | <i>Micrococcus luteus</i> | 藤黃微球菌 | B1 |
| 5 * | <i>Moraxella sp</i> | 莫拉菌屬 | C1 |
| 6 | <i>Rothiaamarae</i> | 羅思氏菌 | D1 |
| 7 * | <i>Staphylococcus sp</i> | 葡萄球菌屬 | E1 |
| 8 | <i>Staphylococcus cohnii</i> | 科氏葡萄球菌 | F1 |
| 9 | <i>Staphylococcus capitis</i> | 頭狀葡萄球菌 | A4 |
| 10 * | <i>Staphylococcus capitis</i> | 頭狀葡萄球菌 | A5 |
| 11 * | <i>Staphylococcus sp</i> | 葡萄球菌屬 | E2 |
| 12 | <i>Staphylococcus sp</i> | 葡萄球菌屬 | E3 |
| 13 | <i>Staphylococcus capitis</i> | 頭狀葡萄球菌 | A6 |
| 14 | <i>Staphylococcus cohnii</i> | 科氏葡萄球菌 | F2 |
| 15 | <i>Staphylococcus capitis</i> | 頭狀葡萄球菌 | A7 |
| 16 * | <i>Staphylococcus sp</i> | 葡萄球菌屬 | E2 |
| 17 * | <i>Micrococcus luteus</i> | 藤黃微球菌 | B2 |
| 18 * | <i>Micrococcus luteus</i> | 藤黃微球菌 | B3 |

| | | | |
|------|------------------------|--------|----|
| 19 * | Staphylococcus capitis | 頭狀葡萄球菌 | A8 |
| 20 | Staphylococcus capitis | 頭狀葡萄球菌 | A9 |

表 5-2 樣本鑑定結果 (註 : *表異常頭皮)

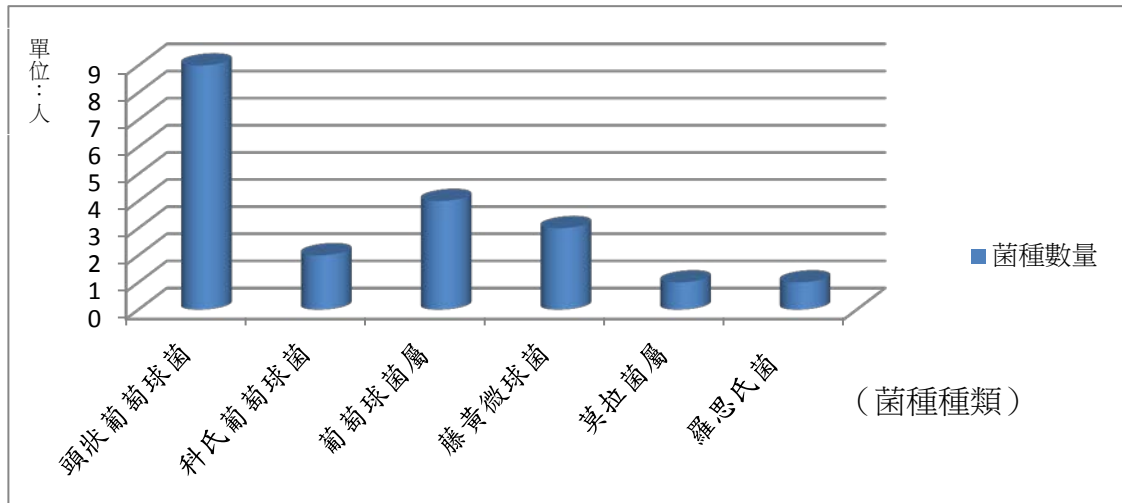


圖 5-1 樣本菌種數目圓柱圖

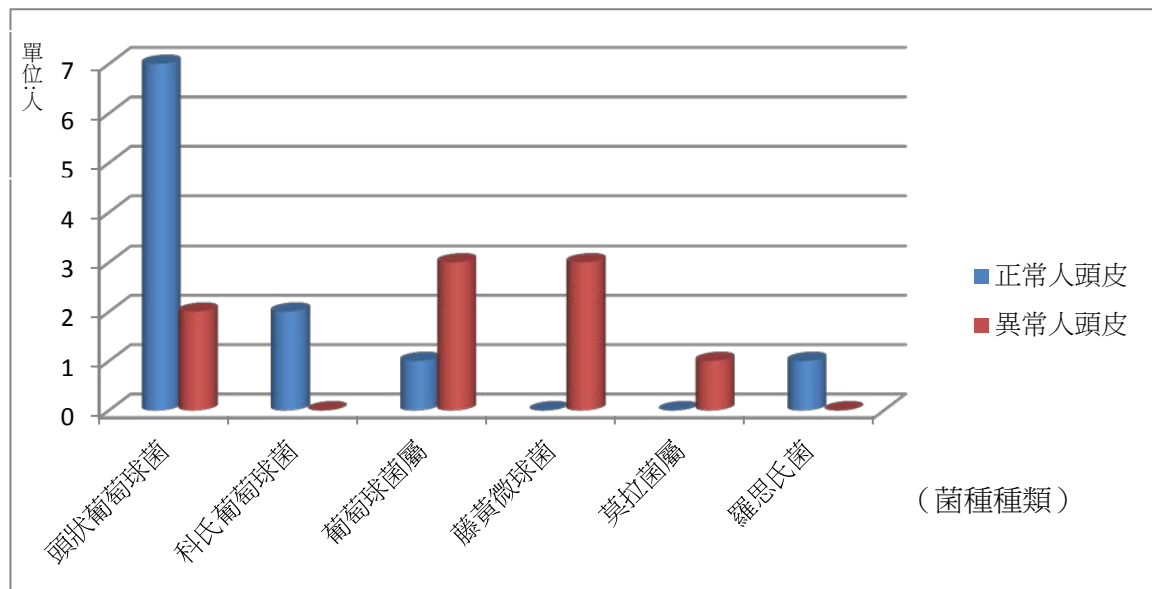


圖 5-2 各菌種正常與異常頭皮數量比較

二、樣本菌乳化油脂的能力

(一)各樣本菌於固態 LB 培養基中的生長效果

由圖 5-3~圖 5-14 可見，在固態培養基中，頭狀葡萄球菌(圖 5-3 及圖 5-7)及藤黃微球菌(圖 5-5 及圖 5-9)並無產生排油現象。

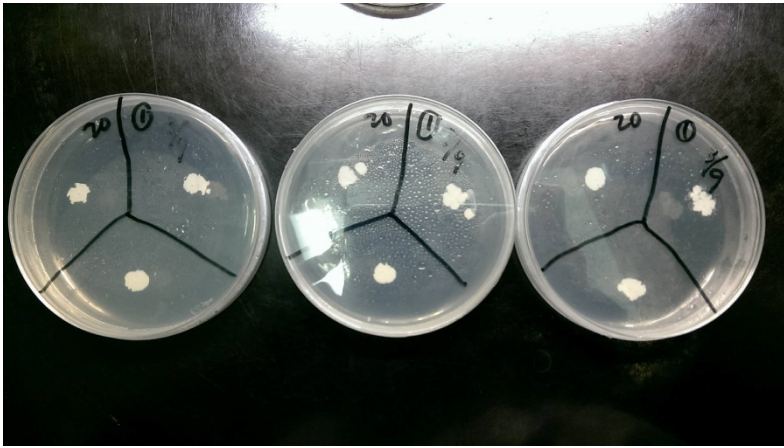


圖 5-3 頭狀葡萄球菌 A1+20μL 油 LB



圖 5-4 左圖放大

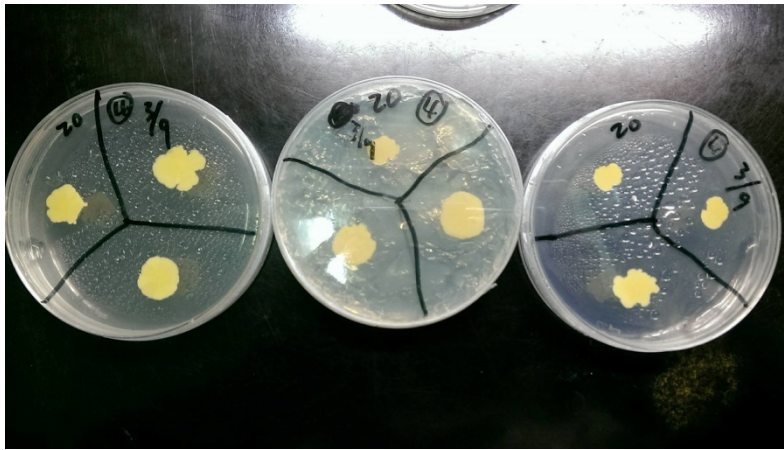


圖 5-5 藤黃微球菌 B1+20μL 油 LB

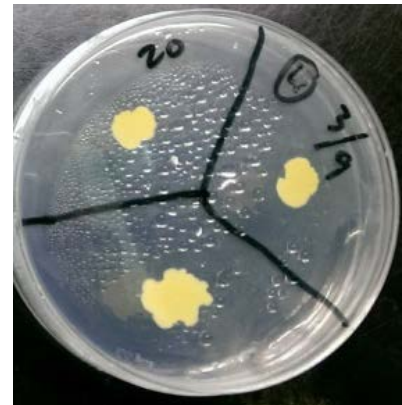


圖 5-6 左圖放大

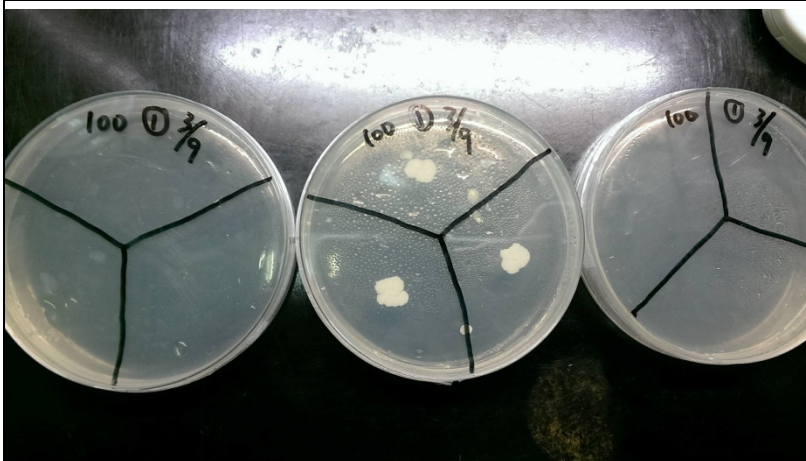


圖 5-7 頭狀葡萄球菌 A1+100μL 油 LB

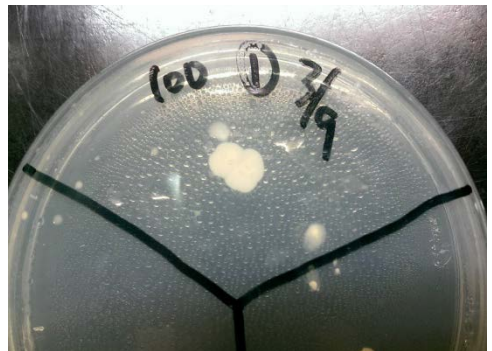


圖 5-8 左圖放大

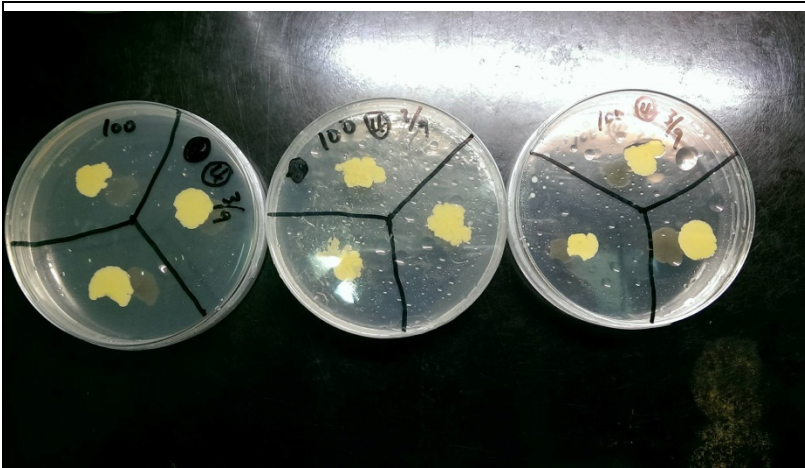


圖 5-9 藤黃微球菌 B1+100 μ L 油 LB



圖 5-10 左圖放大



圖 5-11 頭狀葡萄球菌 A1+200 μ L 油 LB



圖 5-12 左圖放大

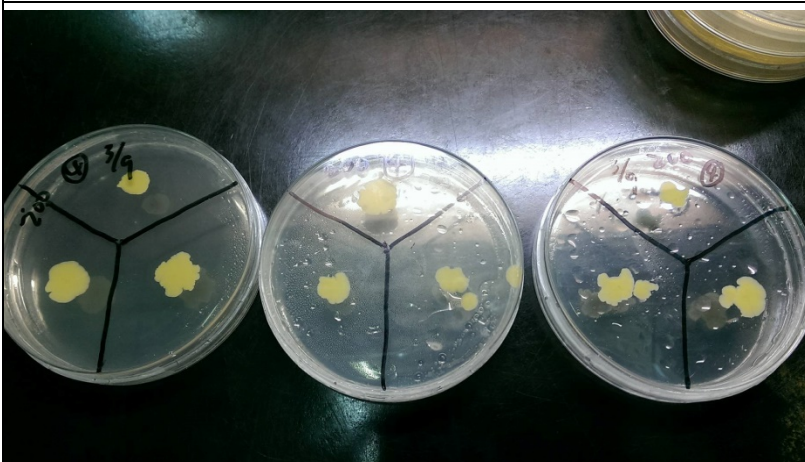


圖 5-13 藤黃微球菌 B1+200 μ L 油 LB

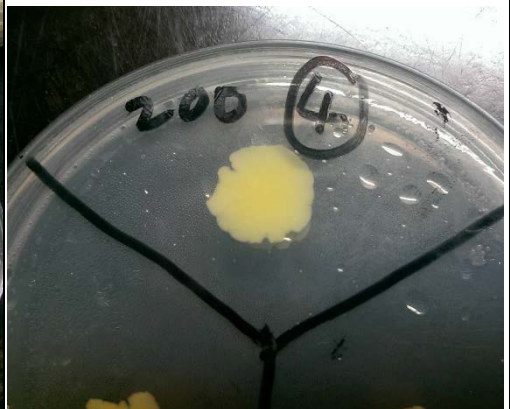


圖 5-14 左圖放大

(二)樣本菌於液態 LB 培養液中的乳化效果

由圖 5-15~圖 5-22 可見，在 100 μ L 油及 200 μ L 油 的情況下，只有頭狀葡萄球菌(圖 5-15 及圖 5-19)有明顯的乳化效果(液面上有一層白色的膠狀物)，可以推測頭狀葡萄球菌乳化油脂的能力較強；而其餘菌種皆無明顯乳化效果，即乳化油脂能力較弱。

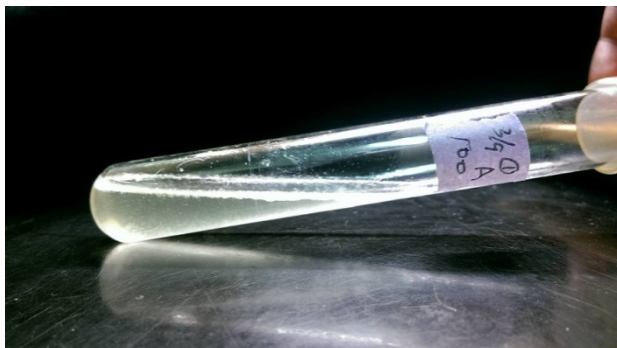


圖 5-15 頭狀葡萄球菌 A1+100 μ L 油 LB



圖 5-16 藤黃微球菌 B1+100 μ L 油 LB



圖 5-17 葡萄球菌屬 E2+100 μ L 油 LB



圖 5-18 芽孢桿菌+100 μ L 油 LB

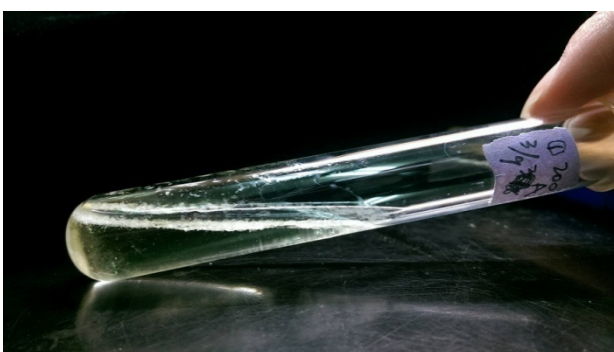


圖 5-19 頭狀葡萄球菌 A1+ 200 μ L 油 LB

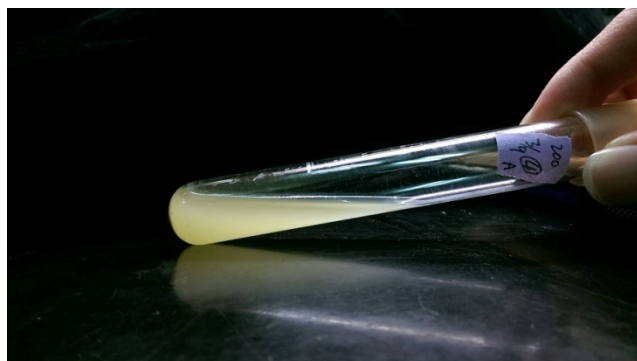


圖 5-20 藤黃微球菌 B1+200 μ L 油 LB

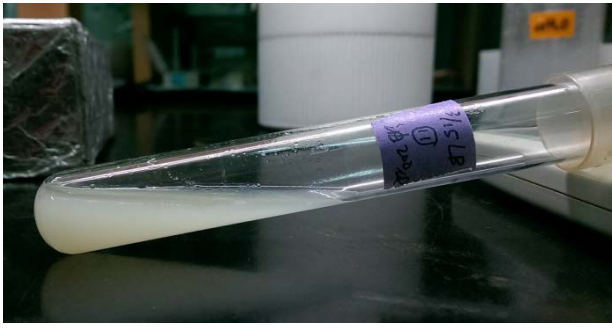


圖 5-21 葡萄球菌屬 E2+ 200 μ L 油 LB



圖 5-22 芽孢桿菌+ 200 μ L 油 LB

(三)樣本菌於液態 M9 培養液中的乳化效果

由圖 5-23~圖 5-30，發現各樣本菌種皆無乳化的現象，而又因為M9 培養液為限制營養而無碳源的培養液，故可以推測各菌種皆無法在只有油脂的情形下生長，進一步得知頭狀葡萄球菌除了油脂仍需靠其他營養來維生，因此可在缺乏油脂的正常頭皮中生存。

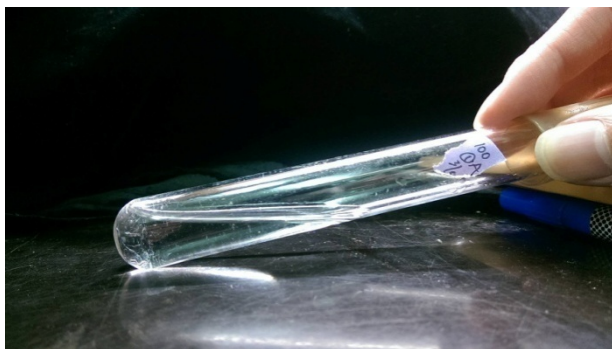


圖 5-23 頭狀葡萄球菌 A1+100 μ L 油 M9

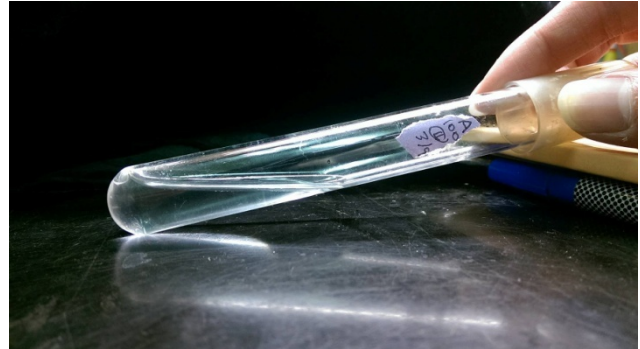


圖 5-24 藤黃微球菌 B1+100 μ L 油 M9



圖 5-25 葡萄球菌屬 E2+100 μ L 油 M9



圖 5-26 芽孢桿菌+100 μ L 油 M9

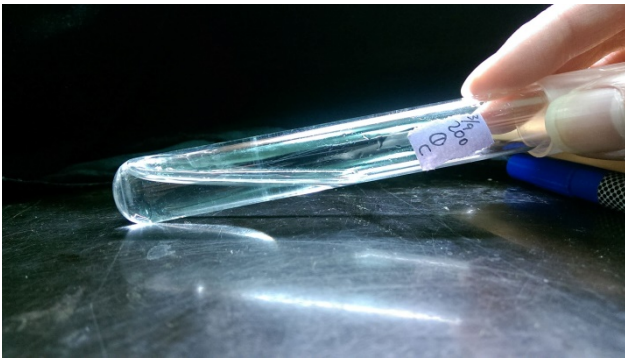


圖 5-27 頭狀葡萄球菌 A1+200 μ L 油 M9



圖 5-28 藤黃微球菌 B1+200 μ L 油 M9



圖 5-29 葡萄球菌屬 E2+200 μ L 油 M9



圖 5-30 芽孢桿菌+200 μ L 油 M9

(四)樣本菌的乳化程度

以圖 5-甲的數值換算各樣本菌液之濃度應為何，使各菌液 OD 值皆為 6 og 。由圖 5-31~圖 5-36 可歸納出圖 5-乙，由此可以觀察到：頭狀葡萄球菌的乳化效果較其他菌株為佳，而其中葡萄球菌屬 E1 的乳化程度也與頭狀葡萄球菌不相上下，故可以合理推測葡萄球菌屬 E1 為頭狀葡萄球菌。

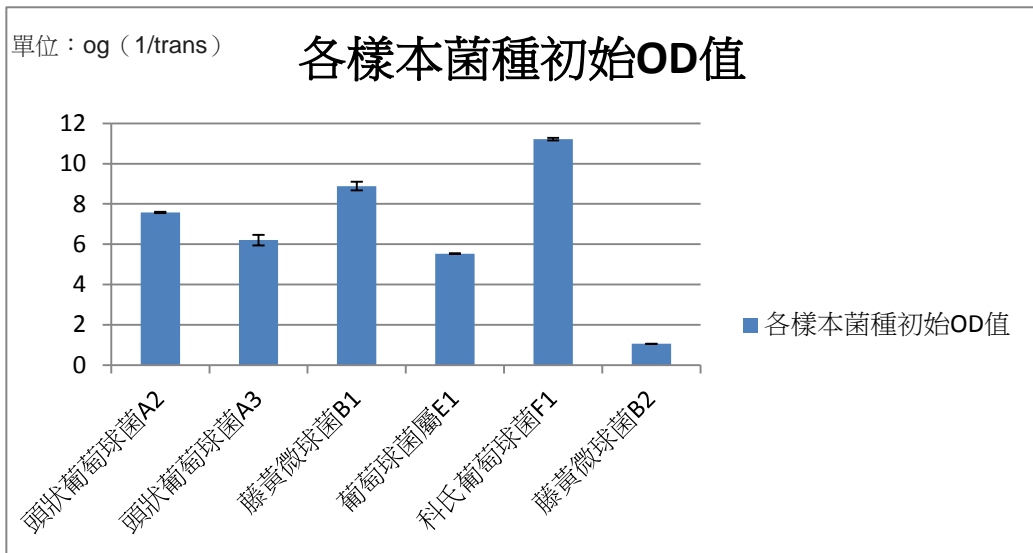


圖 5-甲 各樣本菌種初始 OD 值

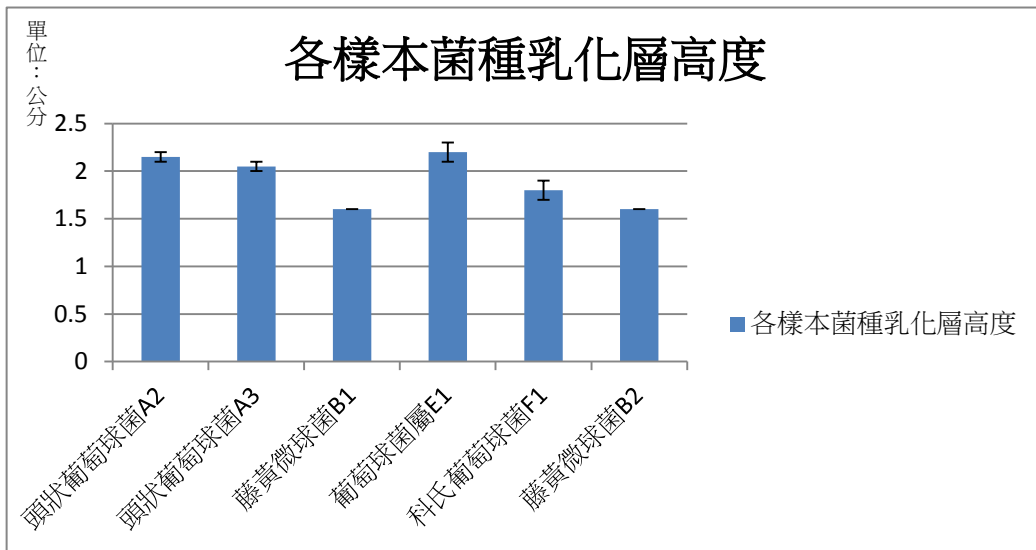


圖 5-乙 各樣本菌種乳化層高度



圖 5-31 頭狀葡萄球菌 A2

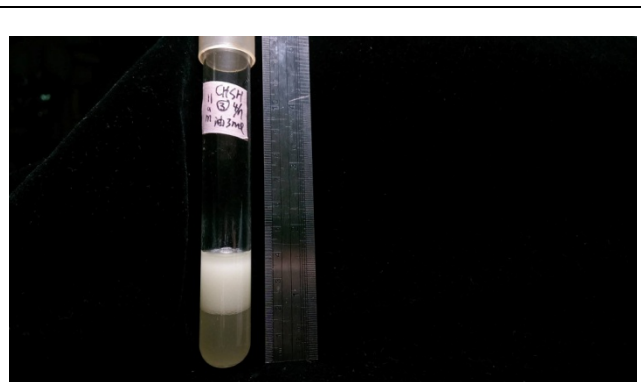


圖 5-32 頭狀葡萄球菌 A3



圖 5-33 藤黃微球菌 B1



圖 5-34 葡萄球菌屬 E1

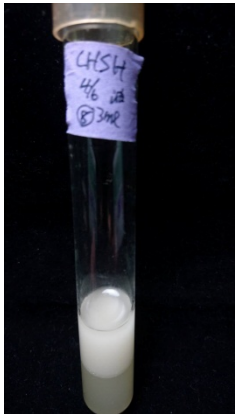


圖 5-35 科氏葡萄球菌 F1

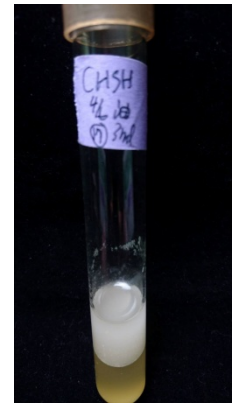


圖 5-36 藤黃微球菌 B2

三、圓盤擴散法—樣本菌與洗髮精和界面活性劑的抑菌作用

由圖 5-37~圖 5-43 和表 5-3 可見，洗髮精之抑菌效果最強，而 Tween 20、Tween80 等界面活性劑則無明顯的抑制圈，且洗髮精對頭狀葡萄球菌的抑菌效果比藤黃微球菌更甚。

(一) 各菌種於不同濃度洗髮精和界面活性劑之抑制圈大小

1. 有產生抑制圈的培養基

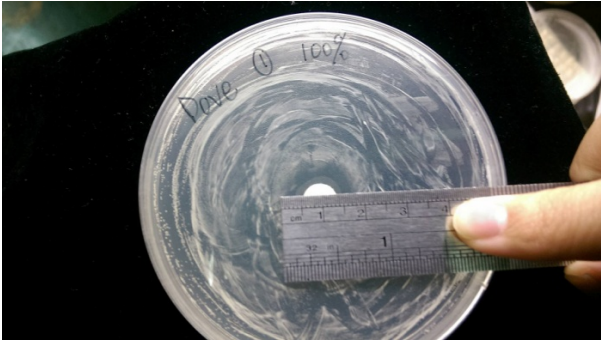


圖 5-37 葡萄球菌屬(洗髮精 100%)



圖 5-38 藤黃微球菌(洗髮精 100%)

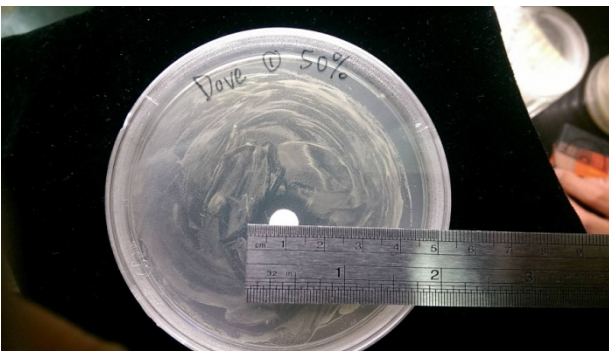


圖 5-39 葡萄球菌屬(洗髮精 50%)

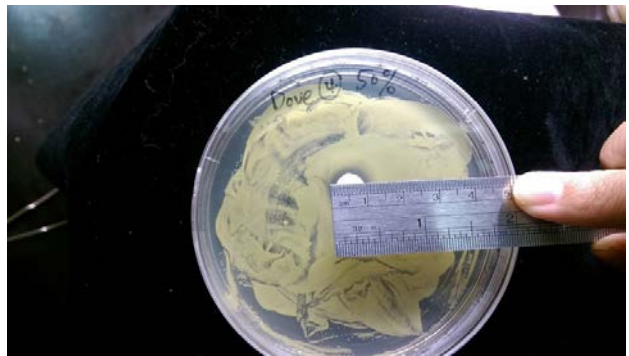
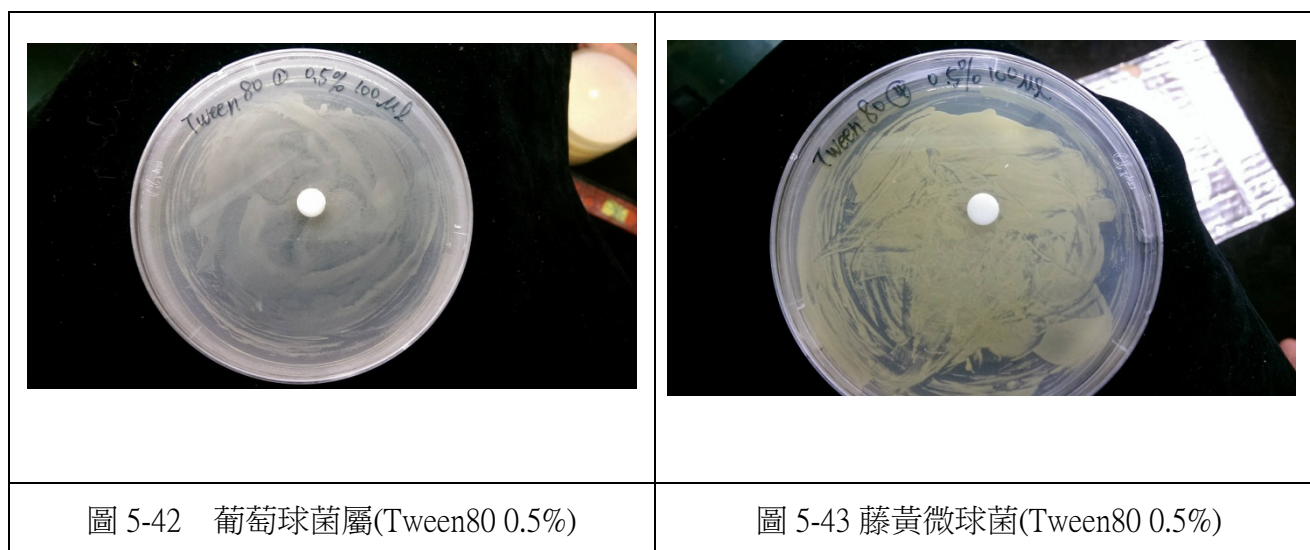


圖 5-40 藤黃微球菌(洗髮精 50%)



圖 5-41 藤黃微球菌(Tween20 0.5%)

2.無抑制圈的培養基(此二圖為代表)



(二)各菌種於不同濃度洗髮精和界面活性劑之抑制圈直徑大小

| 試劑與其濃度 | 頭狀葡萄球菌 於其中之抑制圈直徑 | 藤黃微球菌 於其中之抑制圈直徑 |
|---------------|---------------------|--------------------|
| 洗髮精 100% | 19.5mm±0.5 | 15.0mm±0 |
| 洗髮精 50% | 19.0mm±1.0 | 11.5mm±0.5 |
| 洗髮精 1% | X | X |
| Tween20 0.5% | X | 12.0mm±2.0 |
| Tween20 0.1% | X | X |
| Tween20 0.05% | X | X |
| Tween80 0.5% | X | X |
| Tween80 0.1% | X | X |
| Tween80 0.05% | X | X |

表 5-3 各菌種於不同濃度洗髮精和界面活性劑之抑制圈直徑大小

(註：直徑大小皆為縱直徑與橫直徑之平均值，X 表示其無抑制圈產生)

四、以聚丙烯醯胺膠體電泳證實頭狀葡萄球菌脂肪酶的存在

由圖 5-44 可以觀察到頭狀葡萄球菌在 35~55kDa 間有蛋白質色帶，此與頭狀葡萄球菌脂肪酶分子量 45kDa 接近，故我們認為我們所採集到的頭狀葡萄球菌是有胞外脂肪酶的。

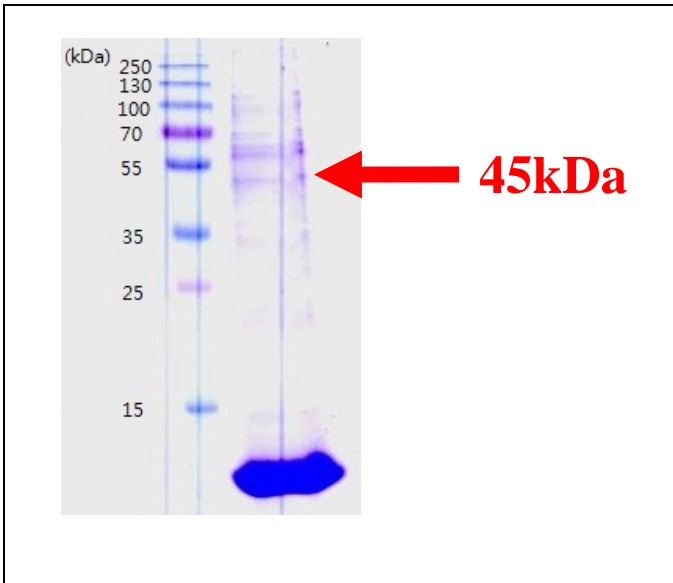
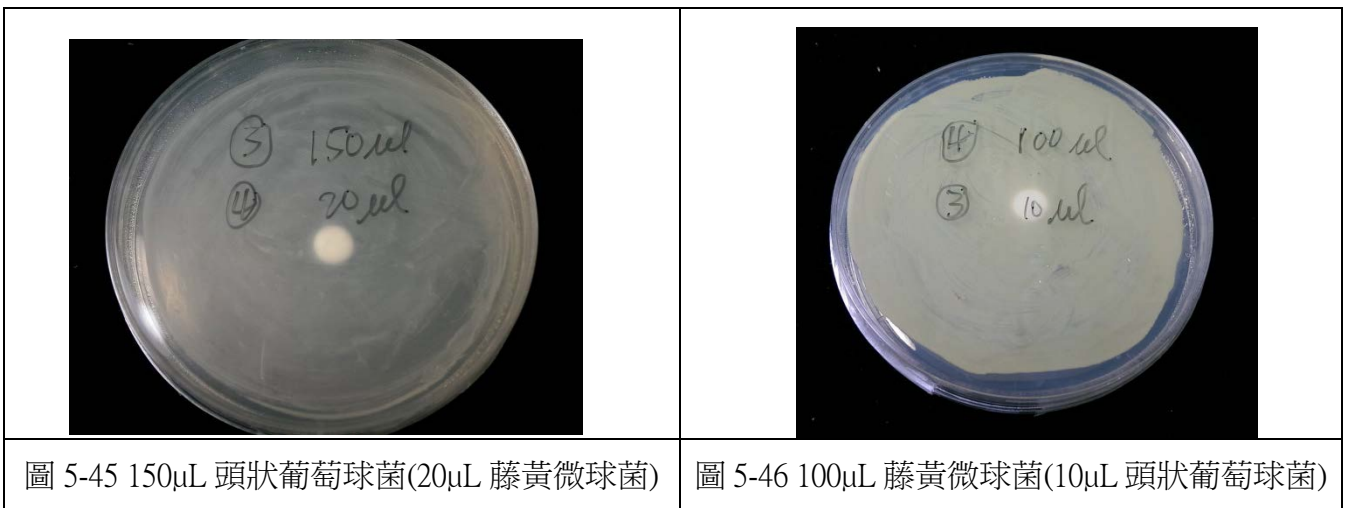
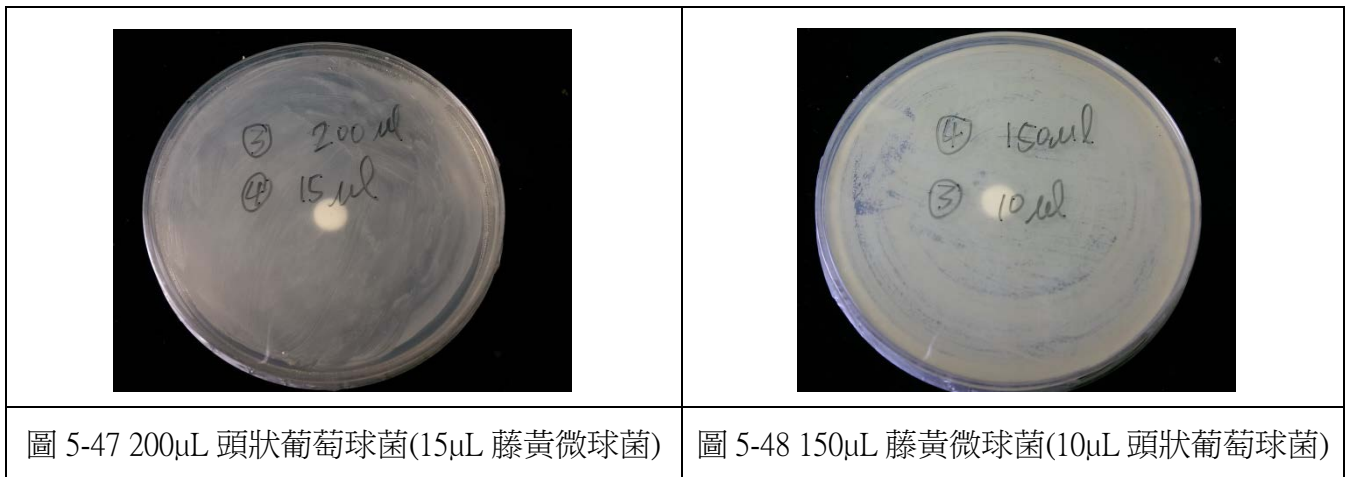


圖 5-44 掃描後膠體原圖

六、探討頭狀葡萄球菌與藤黃微球菌的競爭關係

由實驗結果，我們發現不論是將頭狀葡萄球菌塗於培養基底部、藤黃微球菌塗於小圓形棉片，或反之，並使用不同的濃度培養，兩種方式皆無觀察到兩菌種之間有明顯的抑制圈產生，由圖 5-45~5-48 四圖做為代表。





陸、討論

一、探討頭皮上主要的細菌及找出與頭皮屑增生有關的菌種

本實驗從 20 位不同年齡層的頭皮採樣，其中有正常 11 位及頭皮異常 9 位(頭皮屑特徵及禿頭特徵)，得到頭皮上的菌種有：頭狀葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*)、藤黃微球菌(*Micrococcus luteus*)、莫拉菌屬(*Moraxella sp*)、科氏葡萄球菌(*Staphylococcus cohnii*)、羅思氏菌(*Rothia amarae*)、葡萄球菌屬(*Staphylococcus sp*)六種菌，其中頭狀葡萄球菌在九個樣本中出現，佔了總樣本數的 45%，推測其為頭皮上主要菌種，其中此菌在正常頭皮中的比例為九分之七(77.8%)，在頭皮異常特徵者的樣本中比例為九分之二(22.2%)，前人研究(Xie, Winny, et al., 2012)亦指出，頭狀葡萄球菌為對頭皮代謝週期有幫助的益菌。

有趣的是，對照法國人頭皮上的菌相(Clavaud C, et al., 2003)，國人正常的頭皮上的菌種主要為頭狀葡萄球菌，但法國人正常的頭皮上主要為表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)及丙酸痤瘡桿菌(*Propionibacterium acnes*)，而本實驗在國人頭皮上採到的菌種主要為頭狀葡萄球菌，無採集到馬拉色菌及丙酸痤瘡桿菌，我們推測有可能是外國人與國人的頭皮菌相並不一致，或者是我們採集篩選菌種的過程並不適合馬拉色菌的生長。另外有頭皮屑特徵者不管國人還是法國人皆是其它菌種比例較多。這反映了擁有頭皮屑特徵的人頭皮上微生物的比例不平衡，或者是頭皮上微生物的失衡導致了頭皮屑的增生。

頭皮屑異常增生的原因之一為馬拉色菌(*Malassezia*)的代謝刺激(張浩, et al., 2009)，馬拉色菌為三大頭皮菌種之一：頭狀葡萄球菌、馬拉色菌、痤瘡丙酸桿菌(*Propionibacterium acnes*)。馬拉色菌會分解人類皮脂產生游離脂肪酸、甘油二酯，和甘油一酯，影響皮膜細胞的代謝週

期，造成頭皮屑的增生。但我們也在文獻中發現頭狀葡萄球菌也能代謝人類皮脂但其代謝後之產物不會刺激頭皮加速代謝。由我們初步定序出來的結果比較，頭皮異常的樣本中頭狀葡萄球菌的比例低於正常頭皮的樣本，由此可以推測，頭狀葡萄球菌有益於防止頭皮屑的增生。

在我們的樣本當中皆無發現馬拉色菌，推測這是因為馬拉色菌為真菌，並不適合在 LB 培養基中生長，需進一步利用不同的培養基培養。

二、頭皮上菌種乳化油脂的能力

由結果三 LB 培養液實驗的照片中，頭狀葡萄球菌、葡萄球菌屬皆有乳化效果，而由結果四可知，以頭狀葡萄球菌的乳化能力較佳，可以推測頭狀葡萄球菌乳化油脂的能力較強，而藤黃微球菌、芽孢桿菌則乳化效果較差，乳化油脂的能力較弱。在固態培養基中，頭狀葡萄球菌並無產生排油現象，推測其為使用脂肪酶來乳化油脂而非透過分泌界面活性劑來溶化油脂。在 M9 培養液實驗中，發現皆無生長及乳化的現象，M9 為限制營養而無碳源的培養液，所以可以得知頭狀葡萄球菌需靠其他碳源來維生，並可在缺乏油脂的正常頭皮中生存。

在一篇專利 (Hajime Yoshizumi, 1984) 中，提到頭狀葡萄球菌能夠生產脂肪酶，脂肪酶分解後的脂肪酸能夠抑制 5α 還原酶 (5α -reductase) 的活性，抑制此還原酶能夠降低二氫睪酮 (DHT) 的濃度，而二氫睪酮正是影響掉髮的主要激素。所以頭狀葡萄球菌的正常生長，不但能夠有效的水解我們頭皮上的脂肪來抑制馬拉色菌的增生達到控制頭皮屑的效果，且有助於防止掉髮及使健康的頭皮發根，未來也許可以以頭狀葡萄球菌作為頭皮益生菌。

頭狀葡萄球菌之抗落髮能力也反映在樣本中，其中有禿頭特徵之樣本有兩位，其採樣結果皆無頭狀葡萄球菌，應證了無頭狀葡萄球菌可能導致頭皮上雄性激素過多而落髮。

三、頭皮上菌種與洗髮精和界面活性劑之抗菌效果

在圓盤擴散法中，洗髮精之抑菌效果最強，而 Tween 20、Tween80 等界面活性劑則無明顯的抑制圈，符合理論上之革蘭氏陽性菌的細胞壁幾乎沒有脂質存在的特徵，洗髮精並非僅需依靠界面活性劑即可抑制頭皮菌種，應是由其他原料達到此效果。

而洗髮精對頭狀葡萄球菌的抑制效果比藤黃微球菌更甚，且由於頭狀葡萄球菌為保持頭皮代謝週期的關鍵菌種，此舉可能造成頭皮屑在洗完頭的短時間內增生，所以洗髮精雖然能夠抗菌，但也有可能將能夠維持頭皮代謝正常的菌相破壞，過度清洗反而可能讓其他菌種感

染而引起發炎。

四、證實頭狀葡萄球菌脂肪酶的存在

在 NCBI 網站中有提到頭狀葡萄球菌脂肪酶的分子量為 45kDa，而我們在聚丙烯醯胺膠體電泳的實驗中也發現：在 35~55 kDa 間，頭狀葡萄球菌有明顯的暗帶，故我們可以合理推斷我們所採集到的頭狀葡萄球菌很有可能也有脂肪酶的存在，進一步延伸證實我們前面所做出來的結果：頭狀葡萄球菌並非分泌界面活性劑來乳化油脂，而是自行產生脂肪酶。

五、頭狀葡萄球菌與藤黃微球菌之拮抗作用實驗

在最近的一份研究指出(Zhijue Xu, et al., 2016)，丙酸桿菌屬(*Propionibacterium*)與葡萄球菌屬(*Staphylococcus*)之間的平衡是導致頭皮屑增生的主因，兩個菌屬之間會互相抑制而平衡，這兩個菌屬的減少與頭皮屑的增生有相當大的影響，而且內容提到頭皮屑與細菌的關係比真菌更強。在頭狀葡萄球菌與藤黃微球菌的拮抗作用實驗中，我們發現這兩株菌並無明顯的拮抗作用，表示頭皮屑的生成與兩菌種間的拮抗作用無關，然而兩者的消長作用仍可能受環境因子之影響，而此消長也有可能影響頭皮屑之生成，這需要進一步的實驗驗證。而且在我們的異常樣本中，頭狀葡萄球菌的比例明顯少於正常樣本，故我們合理推測頭狀葡萄球菌與細菌間的平衡很可能與頭皮屑的增生有很大的關連。

柒、結論與未來展望

一、結論

- (一)我們將二十位採樣者頭皮上之細菌經 LB 培養再將其 16S rDNA 序列使用 NCBI 資料庫分析後，得出樣本中頭狀葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*)為正常頭皮中的主要菌種，而在頭皮正常的樣本中比例較高，頭皮異常的樣本中的比例較少。
- (二)以液態培養液觀測對油的乳化能力，得出頭狀葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*)、葡萄球菌屬(*Staphylococcus sp*)皆有乳化效果，其中，頭狀葡萄球菌的乳化油脂的能力較佳，且能生產脂肪酶。而藤黃微球菌(*Micrococcus luteus*)、芽孢桿菌(*Bacillus*)乳化效果不佳，其乳化油脂的能力較差。
- (三)洗髮精對頭狀葡萄球菌及藤黃微球菌皆有抑菌效果，對頭狀葡萄球菌的抗菌效果較強，

代表洗髮精會破壞頭皮正常的菌相，過度清洗可能導致發炎。而界面活性劑則無明顯抑菌效果，所以洗髮精之抑菌效果可能為其他成分所致。

(四)頭狀葡萄球菌與藤黃微球菌並無明顯拮抗作用，故頭皮屑的生成與之無關。

二、未來展望與應用

(一)找出頭狀葡萄球菌的脂肪酶的生產機制和乳化油脂的途徑、種類和產物，比對頭狀葡萄球菌和馬拉色菌分解的產物差異，在未來可能用來治療雄性激素過多造成的脫髮、油脂分泌旺盛及以生物防治馬拉色菌之增生以達到控制頭皮屑的目的。

(二)以真菌培養基篩取出馬拉色菌，測定其與頭狀葡萄球菌之拮抗作用，確定頭狀葡萄球菌與馬拉色菌之關係。並找出最佳比例，用以未來開發以頭狀葡萄球菌為益生菌防治頭皮屑之異常增生。

(三)以經常接觸頭皮之化學物質與頭皮上之菌種測試其交互作用，譜出各菌的生長濃度曲線，檢測其是否會破壞正常菌相，並以何菌之生長濃度回復最快來推測可能感染之菌種。

(四)收集更多禿頭者之樣本，觀察其頭上頭狀葡萄球菌的存在與否，了解頭狀葡萄球菌與禿頭之關係。

捌、參考資料及其他

一、參考資料

(一)Xie, Winny, Vivia Khosasih, Antonius Suwanto, and HyungKwounKim. (2011). Characterization of Lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Human Facial Sebaceous Skin.

(二)Byung In Ro, Thomas L. Dawson. (2005). The Role of Sebaceous Gland Activity and Scalp Microfloral Metabolism in the Etiology of Seborrheic Dermatitis and Dandruff.

(三)RMB Mackenna, VR Wheatley, A Wormall - Journal of Investigative. (1950). The composition of the surface skin fat ('sebum') from the human forearm.

(四) Cécile Clavaud, Roland Jourdain, Avner Bar-Hen, Magali Tichit, Christiane Bouchier, Florence Pouradier, Charles El Rawadi, Jacques Guillot, Florence Ménard-Szczebara, Lionel Breton.

- (2013). Dandruff Is Associated with Disequilibrium in the Proportion of the Major Bacterial and Fungal Populations Colonizing the Scalp.
- (五)張浩, 冉玉平, 李麗娜, 向耘(2008)。脂溢性皮炎致病因素中馬拉色菌致病作用的系統評價。
- (六)Hajime Yoshizumi, Teruo Amachi, Takaaki Kusumi, Takaharu Tanaka, Hiroshi Ishigooka. (1988). Lipase, antidandruff and antitch.
- (七)National Center for Biotechnology Information
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- (八)R.J. Hay: Malassezia, dandruff and seborrhoeic dermatitis. (2011). an overview
- (九)Tween20 的介紹
(<http://www.twiki.com/wiki/Tween20> \t "_blank")
- (十)Tween80 的介紹
(<https://zh.m.wikipedia.org/zh-hant/%e5%90%90%e6%b8%a980> \t "_blank")
- (十一)The Role of Sebaceous Gland Activity and Scalp Microfloral Metabolism in the Etiology of Seborrheic Dermatitis and Dandruff
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15525864>)
- (十二)Christopher M. Longshaw, Angela M. Farrell, John D. Wright, Keith T. Holland. (2000). Identification of a second lipase gene, gehD, in Staphylococcus epidermidis: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases
- (十三)PRABI-Doua: CAP3 Sequence Assembly Program
(<http://doua.prabi.fr/software/cap3>)
- (十四)Microbiology Society Research Online
(<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-25-1-62>)
- (十五)常用抗頭皮屑洗髮精皮膚科醫師
(<http://www.skin168.net/2012/06/anti-dandruff-shampoo.html>)
- (十六)頭狀葡萄球菌的分子量
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22297223>)

(十七)Dwight W. Lambe, Jr., Kaethe P. Ferguson, Curtis G. Gemmell and Jerry L. Keplinger. (?) .

Pathogenic Studies On Five Species of Coagulase-Negative Staphylococci: A Mouse Model
with a Foreign Body Implant

(十八)Zhi jue Xu, Zongxiu Wang, Chao Yuan, Xiaoping Liu, Fang Yang, Ting Wang, Junling Wang,
Kenji Manabe, Ou Qin, Xuemin Wang, Yan Zhang,a, and Menghui Zhang. (2016). Dandruff is
associated with the conjoined interactions between host and microorganisms

【評語】 052012

1. 分析人頭皮屑菌種，發現頭狀葡萄球菌(*Staphylococcus Capixis*)，普遍存在於正常人頭皮上，但有頭皮屑的人無此菌種。
2. 其原因為頭狀葡萄菌球菌，其乳化油脂能力，較其他菌種如藤黃微球菌(*Micrococcus luteus*)佳，洗髮精均可抑制頭狀葡萄菌和藤黃微球菌但界面活性劑無抑菌作用。