

# 中華民國第 62 屆中小學科學展覽會 作品說明書

---

高級中等學校組 農業與食品學科

## 團隊合作獎

052205

冷面殺手李斯特菌-探討抑制李斯特菌台灣食品  
分離株之方法

學校名稱：臺北市私立復興實驗高級中學

作者：  高一 陳以晏  高一 陳以捷	指導老師：  馬瑪宣  呂毓蘋
---------------------------------	-----------------------------

關鍵詞：李斯特菌、抑菌、李斯特菌第四致病基因群

## 摘要

李斯特菌污染，恐致腦膜炎、敗血症，WHO 報告更顯示死亡率高達 2 成 5。本實驗研究抑制李斯特菌(*Listeria innocua*)之方法，以全基因解碼 R19.1045 為模組，與由台灣本土雞翅與豬肉分離出之 38 隻李斯特菌分離株做比較，觀察其型態、生長曲線及菌落形成單位(CFU)不同，以及致病力相關之磷酸轉移酶系統(phosphotransferase system, PTS)，又稱第四致病基因群，是否廣泛存在於李斯特菌。研究結果顯示，37°C 溫度培養 L19N.053 分離株在第 5~第 6 小時有生長延滯的雙生長期(diauxic growth)現象，與 PCR 檢測初步結果呼應，L19N.053 菌於 PTS 基因有部分片段缺失。R19.1045 的 CFU 約為  $2.14 \times 10^9$ 。低溫(4°C)、酸性環境(pH=2)和酒精濃度 35%，皆能有效抑制李斯特菌生長，為正常 37°C 環境生長速率之 1/70-1/92。

## 壹、前言

### 一、研究動機

2019 年新聞報導有關食用美國蘿蔓生菜遭李斯特菌污染，消費者吃下肚，引發嚴重的血性腹瀉，甚至死亡。而我們研究的李斯特菌是無致病性的 P1 實驗室等級的細菌，我們想知道這個細菌的生長情形，以及其利用醣類的代謝系統，藉此研究了解與其同屬之致病性李斯特菌，進而可以找出相關的方法，抑制致病性李斯特菌的繁衍及擴散。

### 二、目的

- (一)利用複式顯微鏡及解剖顯微鏡觀察菌落型態。
- (二)培養李斯特菌，並了解李斯特菌於不同環境的生長情形。
- (三)找出相關抑制李斯特菌的方法，抑制致病性李斯特菌的繁衍及擴散。
- (四)設計引子並利用 PCR 了解以其利用醣類代謝系統基因 PTS，也是與致病力相關的基因，是否普遍存在其分離株。

### 三、文獻回顧

## (一)李斯特菌特性

李斯特菌廣泛存在於自然界中，可從土壤、灰塵、廢水、牛隻、飼料、動物糞便和水產中品等中被分離出來，共包含 *L. monocytogenes*、*L. innocua*、*L. seeligeri*、*L. welshimeri*、*L. ivanovii*、*L. murrayi* 與 *L. marthii* 等 7 個種類菌，其中只有單核球增多性李斯特菌(*L. monocytogenes*)可引起人類疾病，雖然 *Listeria* 廣泛地分布於自然界，但此菌引起的人類感染症並不常見，一般常局限於特定的族群，如：新生兒、老年人、孕婦，以及細胞性免疫反應有缺陷的患者。*L. ivanovi* 主要感染反芻類動物，進而造成人類感染。因此我們研究 *L. innocua* 的生長曲線和 CFU。

李斯特菌為兼性厭氧 (facultative anaerobe) 之革蘭氏陽性桿菌，廣布於周遭環境，可自土壤、水及腐爛的蔬菜以血液培養基分離培養；此菌可存活於多種不同的環境條件，於 4°C 條件下可持續生長繁殖，因此，人類如生食蔬果或未經充分加熱的即食性食品，便可能感染李斯特菌。(吳俊忠，2020)

## (二)磷酸轉移酶系統 PTS 介紹(李斯特菌第四致病基因群)

PTS 是一種催化磷酸基團由供體轉移到接納體的反應的酶，PTS 由酶 I (EI)、組氨酸磷酸載體蛋白(HPr 或 NPr)和酶 II 複合物等磷酸轉移酶組成，PTS 主要是通過磷酸級聯反應將各種糖及其衍生物進行磷酸化然後運輸到胞內，PTS 為細菌體上的一種主動運輸作用。以糖為例，被傳輸的糖在磷酸轉移酶系統(phosphotransferase system, PTS)的催化之下，形成磷酸化的糖被移入細胞，由於細胞對大多數磷酸化的化合物具高度的不滲透性，所以磷酸化的糖一旦形成，就不再透出細胞。

PTS 廣泛存在於細菌、真菌和一些古細菌中，但不存在於動植物中。PTS 既具有催化轉運功能，又具有非常廣泛的調節功能。PTS 能參與碳、氮中心代謝，調節鐵、鉀穩態，調控某些病原體的毒力，生物膜的形成抗藥性。PTS 被 Saul Roseman 實驗室所發現，第一篇描述大腸桿菌 PTS 組分-HPr 及其在己糖磷酸化中作用的文章於 1964 年發表。在大腸桿菌中發現 PTS 後不久，人們陸續在許多其他細菌中也發現了 PTS，它們主要負責能源運輸過程中大量碳水化合物的吸收並催化其轉化為各自的磷酸酯。在之後長期的研究中，人們逐漸意識到 PTS 不僅是一個糖運輸系統，介導碳水化合物的攝取和磷酸化，還具有十分強大的調節能力，參與調控中心碳、氮代謝，調節金屬離子穩態，調節細菌毒力，而且越來越多的研究表明其與應激反應之間也存在著密不可

分的聯繫。PTS 組分形成的磷酸化 PTS 蛋白通常彼此融合，從而形成由兩個或多個結構域組成的多功能複合物。一種或兩種可溶性 PTS 組分與跨膜轉運蛋白的 N 末端或 C 末端融合，因此位於膜的胞質側。例如，枯草芽孢桿菌的寡糖-β-葡萄糖苷特異性 PTS 由 3 種不同的蛋白質組成，而在同一生物體的甘露醇特異性 PTS 通透酶中，EIIB 成分融合到跨膜 EIIC 的 C 末端，只有 EIIMt1 是單獨的蛋白質。

提供無害李斯特菌分離株之實驗室主持人於 2016 發表於 Nature Genetics 國際期刊的研究中發現在西方國家特定高致病性的菌株中有一特殊的”磷酸根傳遞調控系統”，此系統參與李斯特菌致病性，並命名為”李斯特菌第四致病基因群”。

### (三)引子設計及 PCR:

引子 (primer) 本質上是人工合成的短 DNA 片段，一般不超過 50 個鹼基 (通常 18—25 個)，與所要擴增的 DNA 片段於起始和終止區域完全互補。在「黏合」時引子結合於 DNA 模板的起始和終止點，DNA 聚合酶結合到這兩個位置，開始合成新的 DNA 鏈。根據 DNA 複製的原理，使特定 DNA 片段大量複製，由變性(denature)、黏接 (annealing)、延展(extension)等反應步驟構成，使用少量的雙股 DNA 為模板 (template)，加上單股的引子 (primer)、dNTPs、Taq DNA polymerase、buffers 等，利用 PCR machine 進行 30-40 回合(cycles)循環的反應程序，產生特定片段 DNA 的大量複製。

聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 又稱多聚酶鏈式反應，是一項利用 DNA 雙鏈複製的原理，在生物體外複製特定 DNA 片段的核酸合成技術。透過這項技術，可在短時間內大量擴增目的基因，而不必依賴大腸桿菌或酵母菌等生物體。

表一 細菌分類地位表

分類地位
Listeria innocua 屬於直立細菌目(Enbacteriales)中的棒狀桿菌科(corynebacteriaceae)之李斯特菌屬(Listeria)。
目：直立細菌目(Enbacteriales)
科：棒狀桿菌科(corynebacteriaceae)
屬：李斯特菌屬(Listeria)
種：innocua

#### (四)食品細菌汙染:

李斯特菌症 (Listeriosis) 是由單核細胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 以下簡稱李斯特菌) 感染產生的感染症, 感染李斯特菌後的臨床表現會因引發侵襲性感染 (invasive infection) 或非侵襲性感染 (non-invasive infection) 而有所差異, 疾病嚴重程度取決於受感染者的免疫狀況, 免疫力正常者不易遭受李斯特菌感染或感染後僅有腹瀉、噁心、嘔吐等腸胃道症狀, 然而對年長者、免疫力低下的族群、孕婦、胎兒及新生兒則可能引發侵襲性感染, 依據世界衛生組織 (WHO) 研究報告, 李斯特菌症可分為侵襲性感染及非侵襲性感染兩大類。一、非侵襲性感染: 主要以發燒、腹瀉、噁心、嘔吐之自限性 (self-limited) 腸胃炎表現。二、侵襲性感染: 可導致敗血症及中樞神經系統感染 (以腦膜炎、腦膜腦炎最為常見), 伴隨死亡風險, 主要發生在孕婦、胎兒、新生兒、免疫力低下者及年長者。李斯特菌症主要傳染途徑是以食物為媒介, 國內曾於香脆山豬皮、櫻桃鴨捲、滷牛筋等經包裝的即食肉品檢出李斯特菌, 生魚片也是高風險食品; 此疾病亦可由母親傳染給胎兒導致流產、死胎、早產, 或在分娩於經過生殖道時感染胎兒, 造成新生兒侵襲性感染。另有少數病例, 是新生兒直接接觸李斯特菌或獸醫、畜產工作者因接觸動物、家畜排泄物而感染。(衛生福利部疾病管制署, 李斯特菌症, 2021)

#### (五)磷酸轉移酶系統(PTS) (李斯特菌第四致病基因群)系統重要性:

磷酸烯醇丙酮酸 (PEP): 碳水化合物磷酸轉移酶系統(PTS)僅存在於細菌中, 它催化大量單醣、二糖、氨基糖、多元醇和其他糖衍生物的轉運和磷酸化。為了在糖轉運和磷酸化中發揮催化作用, PTS 使用 PEP 作為能源和磷酰基供體。PEP 的磷酰基通常通過四種不同的蛋白質 (結構域) 轉移到與 PTS 的相應膜成分 (EIIC 和 EIID) 結合的轉運糖上。PTS 組織為四步磷酸轉移系統, 其中所有 P 衍生物表現出相似的能量 (磷酸化發生在組氨酰或半胱氨酰殘基), 令人驚訝, 作為一個單一的蛋白質 (或結構域) 耦合能量轉移和糖磷酸化就足以實現 PTS 功能。對 PTS 複雜性的一個可能解釋是通過發現 PTS 還執行許多監管功能而提供的。根據它們的磷酸化狀態, 形成 PTS 磷酸化級聯的四種蛋白質 (結構域) (EI、HPr、EIIA 和 EIIB) 可以磷酸化或與許多非 PTS 蛋白質相互作用, 從而調節它們的活性。此外, 在某些細菌中, 一種 PTS 成分(HPr)在絲氨酸殘基處被 ATP 磷酸化, 這增加了 PTS 介導的調節的複雜性。在這篇綜述中, 我

們試圖總結 PTS 已知的與蛋白質磷酸化相關的調節功能。( Pieter W. Postma , 1997 )

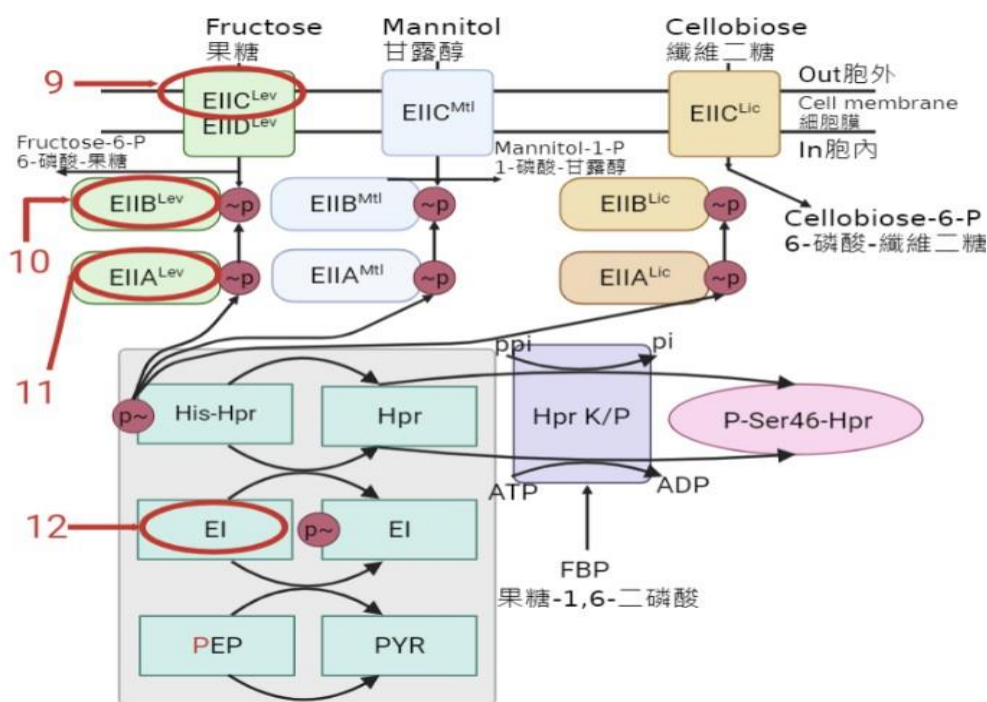


圖 1 磷酸轉移酶系統(PTS)系統示意圖

#### (六)菌落形成單位 CFU:

CFU 是菌落形成單位(Colony-forming unit)的縮寫，係指樣品在適當的稀釋狀態下，每一個細菌細胞在培養基上，生長繁殖所形成的單一易區別菌落，每菌落單位稱為 1 CFU。

CFU/g：每公克樣品中含有的細菌菌落總數。

CFU/mL：每毫升樣品中含有的細菌菌落總數。

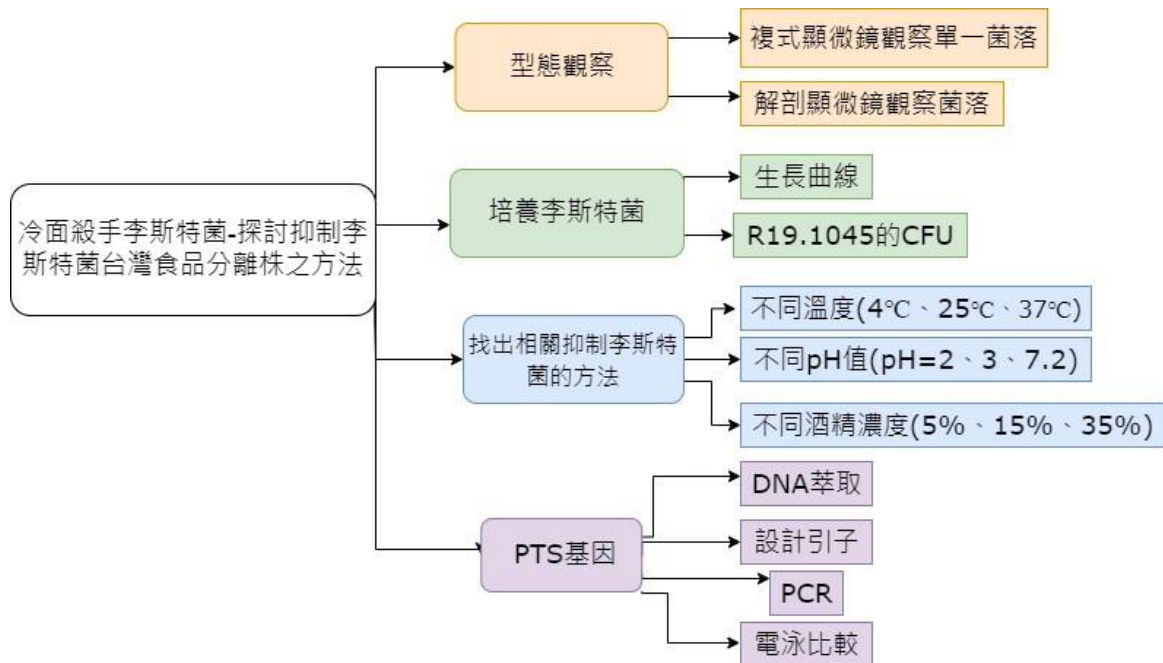
CFU/cm<sup>2</sup>：每平方公分樣品中含有的細菌菌落總數。

此計算方式便於判別產品衛生狀況或微生物汙染程度，數字越大表示樣品中微生物含量越多，數字越小表示越少微生物存在，然而還是有所缺點，一方面樣品中的細菌可能因處理時受到傷害死亡，一方面因微生物本身對於氧氣、溫度、營養等生存條件的需求差異，在培養條件下無法生長形成菌落，不過這些死亡或無法生長的細菌並非我們主要的實驗標的或不會影響測試目的，因此並不會顯著影響實驗結果所呈現的意義。(台美檢驗微生物檢驗專家，2021)與本實驗的相關性與研究目的為 CFU 是菌落形

成單位(Colony-forming unit) 的縮寫，係指樣品在適當的稀釋狀態下，每一個細菌細胞在培養基上，生長繁殖所形成的單一易區別菌落，每菌落單位稱為 1 CFU。

CFU/mL：每毫升樣品中含有的細菌菌落總數。

## 實驗流程



## 貳、研究設備及器材

### 一、設備及器材

微量吸管分注器(pipette)、電動吸管(pipette aid)、培養箱、10 公分培養皿、微量吸管尖(pipette tip)、微量離心管、15mL 離心管、50mL 離心管、無菌操作台、4°C 冰箱、-20°C 冰箱、-80°C 冰箱、拭鏡紙、電腦、微量天平、滅菌釜、鋁箔紙、分光光度計、光吸管、塑膠把手燒杯、碼表、錐形瓶、500mL 燒杯、BHI Powder、Agra、恆溫培養箱、聚合酶連鎖反應儀、秤藥盤、攪拌棒、離心管架、藥匙、凍菌管、39 隻菌盤、0.1M 鹽酸、95%酒精

### 二、生物材料

本實驗之 39 隻李斯特菌屬隻細菌由台灣原產隻豬肉、雞翅之中分離出來，由陽明大學

生命科學系所提供，並由疾管屬質譜儀鑑定，為李斯特菌屬。本實驗之大腸桿菌為無致病性 *E. coli*(K-12)。

## 參、研究過程或方法

一、利用複式顯微鏡及解剖顯微鏡觀察菌落型態。

(一)於玻片上將菌落混合蒸餾水，進行熱固定。

(二)滴結晶紫，靜置一分鐘，以蒸餾水清洗。

(三)滴革蘭氏碘液，靜置一分鐘，以蒸餾水清洗。

(四)以 95%乙醇脫色，以蒸餾水清洗。

(五)滴番紅，靜置一分鐘，以蒸餾水清洗。

(六)以吸水紙吸乾，並用油鏡觀察。

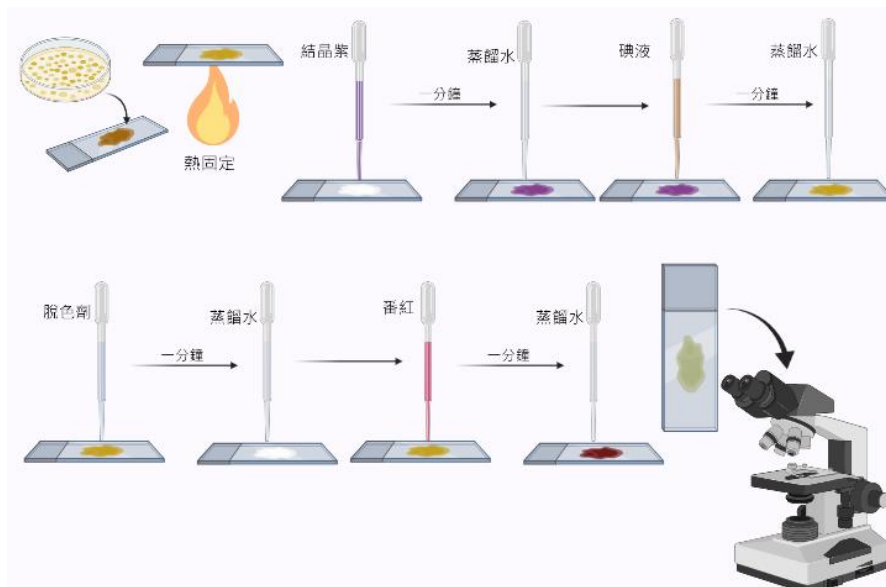


圖 2 革蘭氏染色步驟示意圖



## 二、培養李斯特菌，並了解李斯特菌於不同環境的生長情形。

### (一)製作培養基

#### 1. 液態培養基:

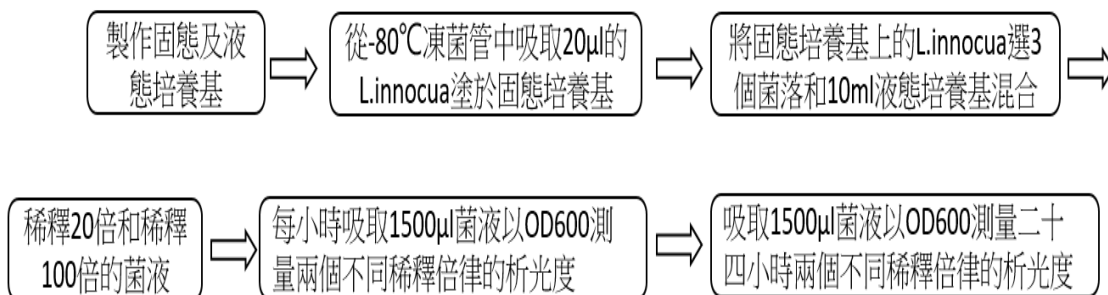
- (1)以微量天平秤 18.5 公克的 BHI Powder
- (2)將 18.5 公克的 BHI Powder 融入 500 毫升的 RO 水中(以磁石攪拌器和磁石攪拌)
- (3)倒入血清瓶中瓶蓋需要半旋，放入滅菌釜中滅菌
- (4)完成滅菌之後，放入冰箱保存。

#### 2. 固態培養基:

- (1)以微量天平秤的 18.5 公克的 BHI Powder 和 8 公克的 Agra。
- (2)將 18.5 公克的 BHI Powder 和 8 公克的 Agra 融入 500 毫升的 RO 水中(以磁石攪拌器和磁石攪拌)。
- (3)倒入錐形瓶中，放入滅菌釜中滅菌。
- (4)完成滅菌之後，把未凝固的固態培養基分別倒入培養皿中，等培養基凝固後封條封好，放入冰箱保存。

### (二)細菌培養

#### 1. 培養 *Listeria innocua*



實驗過程分成四天:

第一天:從-80°C凍菌管中吸取 20 µl 的 *L. innocua* 塗於固態培養基

第二天:從菌盤中挑選三個單獨的菌落放入裝有 10ml 液態培養基的離心管中，放入 37°C 的培養箱(shaker)中 24 小時。

第三天：將昨日的細菌原液取  $500\ \mu\text{l}$  及  $250\ \mu\text{l}$  分別放入裝有  $24500\ \mu\text{l}$  液態培養基以及  $24750\ \mu\text{l}$  液態培養基的離心管中配置成稀釋 20 倍和稀釋 100 倍的菌液，之後每小時吸取  $1500\ \mu\text{l}$  菌液以 OD600 測量兩個不同稀釋倍律的吸光度，若 OD 值超過 0.5 就要塗盤。塗盤之前要先做序列稀釋，步驟如下：準備 8 個 1.5 毫升離心管，將  $450\ \mu\text{l}$  無菌水分別裝入 8 個 1.5 毫升離心管中，將  $50\ \mu\text{l}$  的原液加入  $10^1$ (第一格)，換微量吸管尖再將  $50\ \mu\text{l}$  的  $10^1$  加入  $10^2$ (第二格)，以此類推到  $10^8$ (第八格)。

第四天：吸取  $1500\ \mu\text{l}$  菌液以 OD600 測量二十四小時兩個不同稀釋倍律的吸光度。

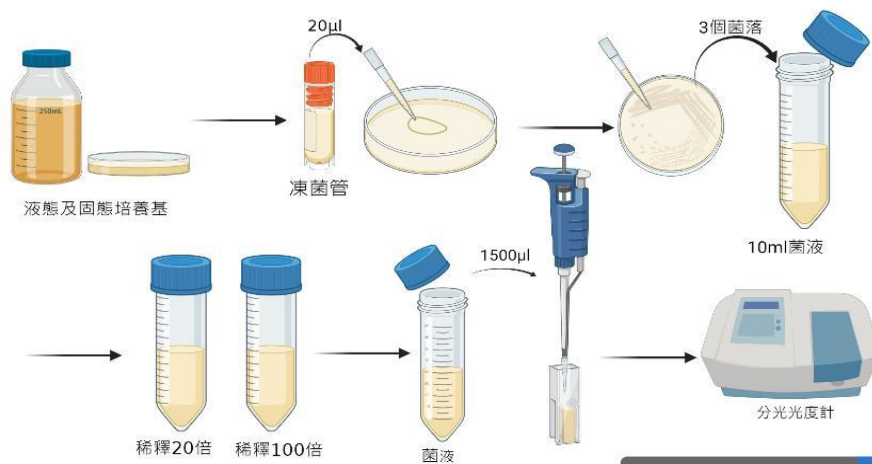


圖 3 細菌培養後測 OD 值之步驟示意

### (三)計算 CFU 算式：

以 R19. 1045 及 L19N. 002 至兩隻菌進行 CFU 計算。

算式：兩次菌數平均 $\times$ 選擇序列稀釋倍率 $\times$ (1000/原菌液稀釋倍率)

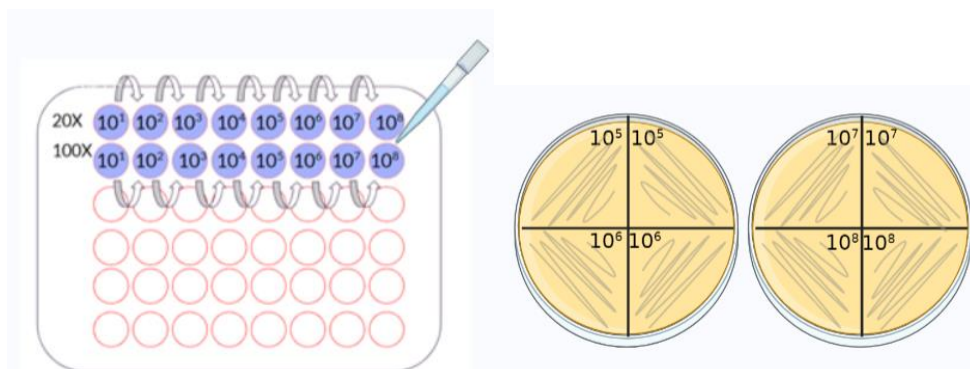


圖 4 塗盤：選 OD 超過 0.5 稀釋，塗盤 (x20 : 4h)(x100:5hr)

三、找出相關抑制李斯特菌的方法，抑制致病性李斯特菌的繁衍及擴散。

(一)將 *Listeria innocua* 與大腸桿菌 K-12 於 4°C 冰箱中培養

李斯特菌與大腸桿菌皆為常出現於環境中和食品中的細菌，因此我們培養 P1 級的大腸桿菌 K-12，了解李斯特菌於寒冷環境亦可生長。

(二)李斯特菌 L19N. 053 於 4°C、室溫 25°C、37°C 的生長曲線

於三種不同溫度下培養李斯特菌的第一天實驗方法皆相同，實驗第二天於全部 OD 值為 0.001 時分別放入 37°C 恆溫培養箱中培養，25°C 置於室溫環境培養，4°C 置於冰箱中培養，並且每個溫度皆進行三重複以讓數據更為精確。

(三)李斯特菌 L19N. 053 於 pH=2、pH=3、pH=7.2 的生長曲線

將李斯特菌 L19N. 053 於液態培養基中加入鹽酸形成 pH=2、pH=3 的環境觀察其生長曲線並與原培養基 pH=7.2 做比較，模擬酸性環境中李斯特菌的生長情形。實驗第二天於全部 OD 值為 0.001 時分別放入 pH=2 模擬檸檬汁、pH=3 模擬可樂和 pH=7.2 原本培養基之環境中培養，並且每個 Ph 值皆進行三重複。

(四)李斯特菌 R19. 1045、L19N. 053 於酒精濃度 5%、15%、35% 的生長曲線

將李斯特菌 R19. 1045、L19N. 053 於液態培養基中加入 95%酒精配置 5%、15%、35% 的環境，實驗第二天於全部 OD 值為 0.001 時分別放入酒精濃度 5%模擬啤酒、15% 模擬葡萄酒、35%模擬白蘭地，其中我們配置酒精加培養基的方式是固定培養基的量加入不同量的酒精以讓李斯特菌的營養固定，並且每個酒精濃度抑制實驗皆進行三重複。

四、設計引子並利用 PCR 了解以其利用醣類代謝系統基因 PTS，也是與致病力相關的基因，是否普遍存在其分離株。

(一)DNA 萃取:

取隔夜培養的各菌液 200  $\mu$ l 以 100 度加熱 20 分鐘後將細菌去活化，接著離心 12000rpm 5 分鐘進行 DNA 簡單粗萃取，細菌去活化及離心之後的上清液即可直接凍-20°C 以供後續 PCR 實驗。

(二)設計引子:

從細菌的 DNA 序列中找出目標基因，用 NCBI(美國國家生物技術資訊中心)的 BLAST 確認兩段基因是否完全相同，開始設計引子:找一段長 18 至 25 的序列，其中 GC 值大於 50%，T<sub>m</sub> 值大於 50°C，且不可有 hairpin。





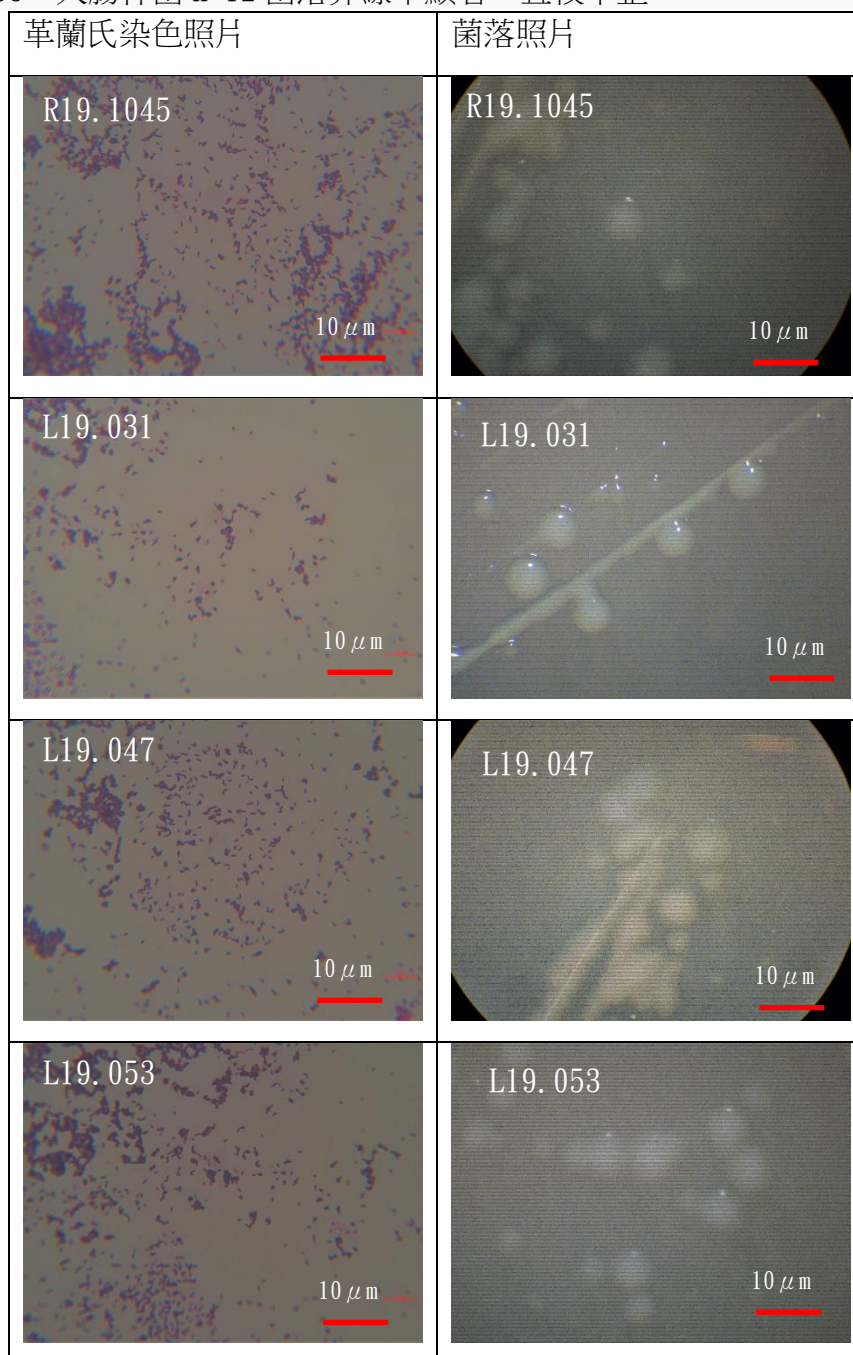
## 肆、研究結果

一、利用複式顯微鏡及解剖顯微鏡觀察菌落型態。

我們以 *E. coli*(K-12) 為染色對照組確認染色結果 *E. coli*(K-12) 為革蘭氏陰性短桿菌染色結果為粉紅色，我們再染無致病性李斯特菌結果是紫色，因此為革蘭氏陽性桿菌。

其中李斯特菌長度約為 0.5 至 2.0  $\mu\text{m}$ ，直徑 0.5 - 4  $\mu\text{m}$ ，形狀略小的圓柱狀，同一個視野下可以看到多個不同大小的李斯特菌。大腸桿菌長度約為 1.0 至 2.0  $\mu\text{m}$ ，直徑 0.5  $\mu\text{m}$ ，形狀略微細長。李斯特菌的菌落以 31、87 號菌外型最為立體，且光滑。

1045、47、53、大腸桿菌 K-12 菌落界線不顯著，且較平整。



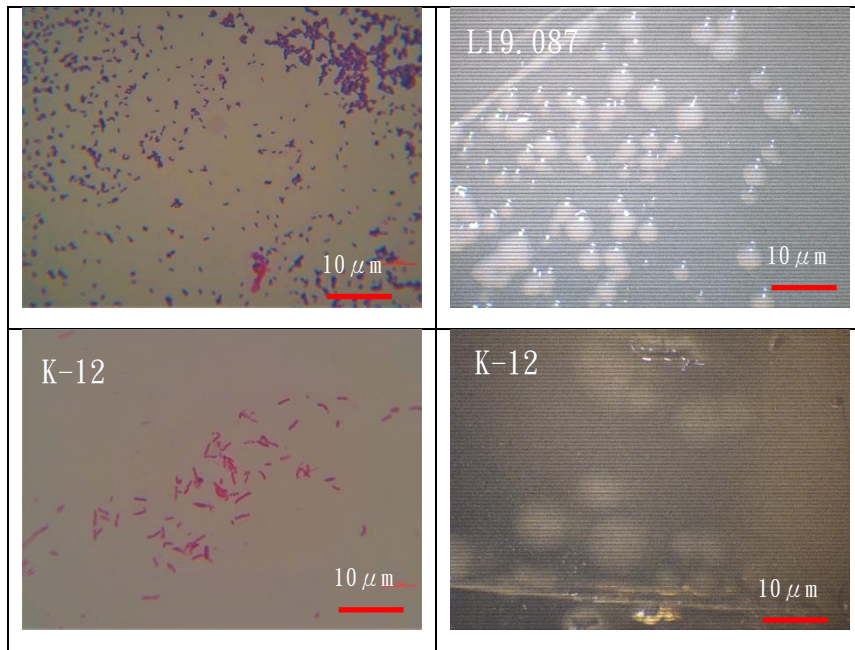
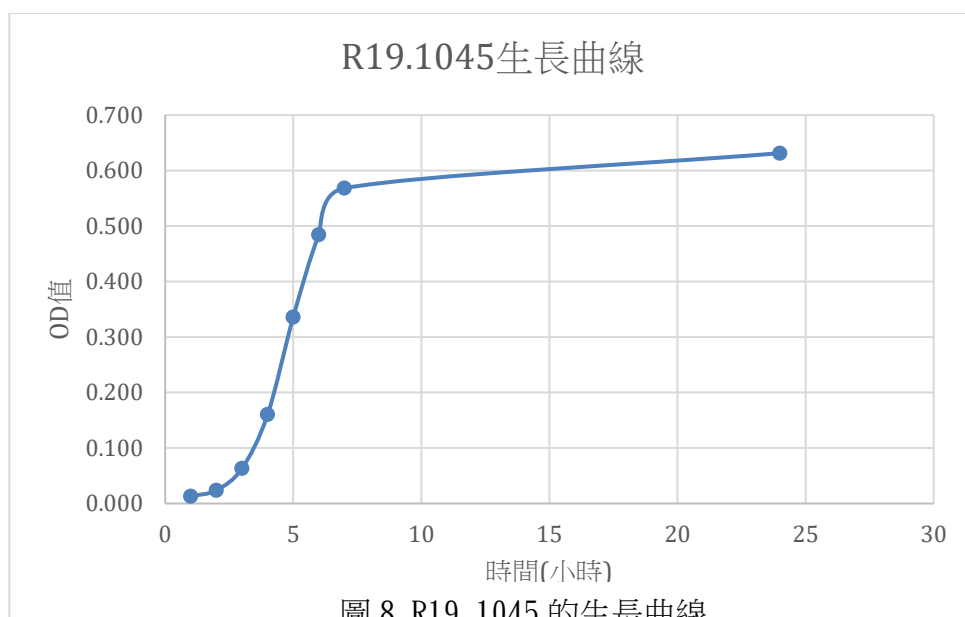


圖 7 將李斯特菌與大腸桿菌革蘭氏染色處理，以及菌落觀察

二、培養李斯特菌，並了解李斯特菌於不同環境的生長情形。

(一)、培養 *Listeria innocua*-R19.1045 實驗

1. 由 OD 值、菌數和生長曲線計算出 CFU 經過四次細菌培養實驗，我們以 R19.1045 為對照組，其 CFU 平均為  $2.14 \times 10^9$ 。
2. 在 0 至 6 小時之間是以指數型函數生長，從 7 小時到 24 小時生長速率快速下降。



(二)培養 39 隻菌比較生長情形

次數	1	2	3	4	平均
CFU	$1.91 \times 10^9$	$2.29 \times 10^9$	$2.24 \times 10^9$	$2.14 \times 10^9$	$2.14 \times 10^9$

圖 9 R19. 1045 四次實驗的 CFU

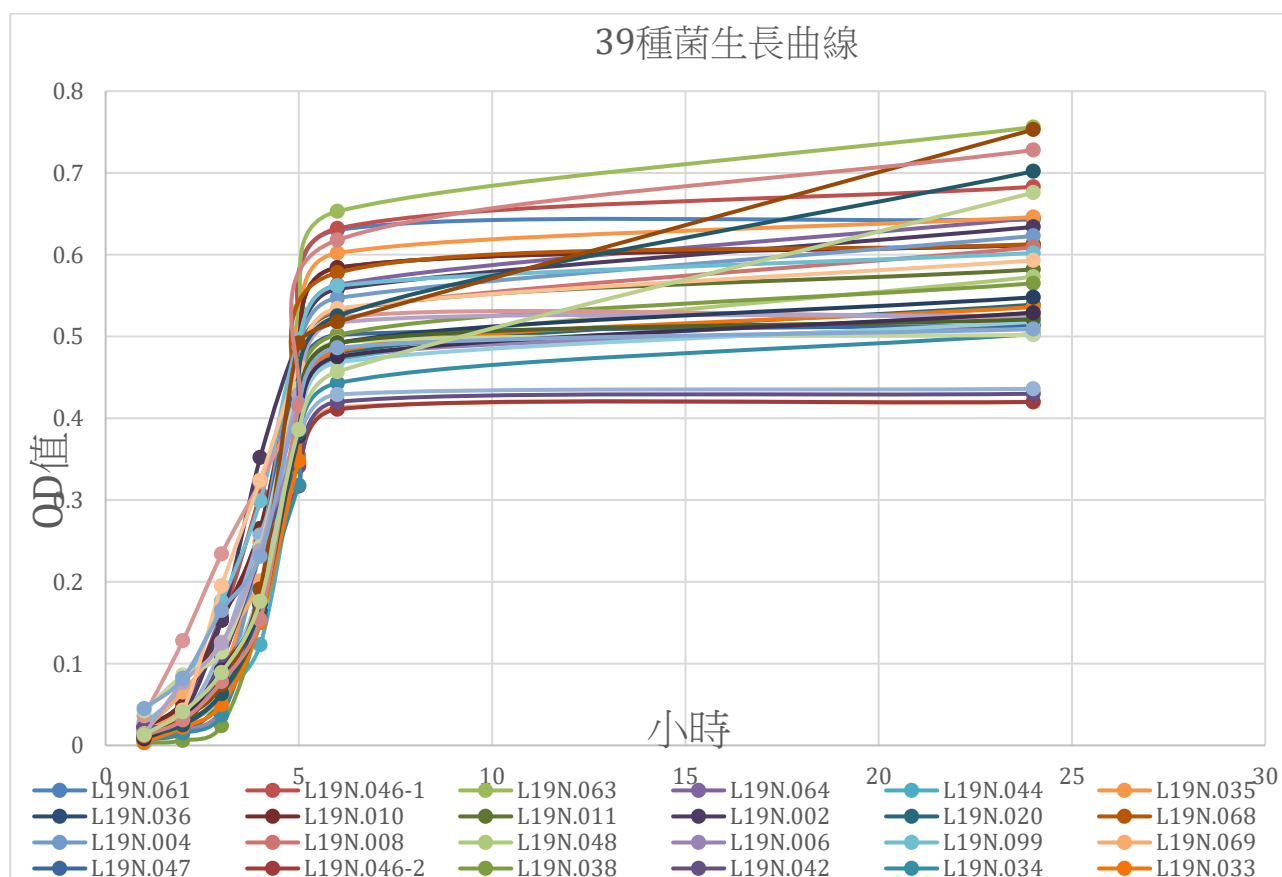
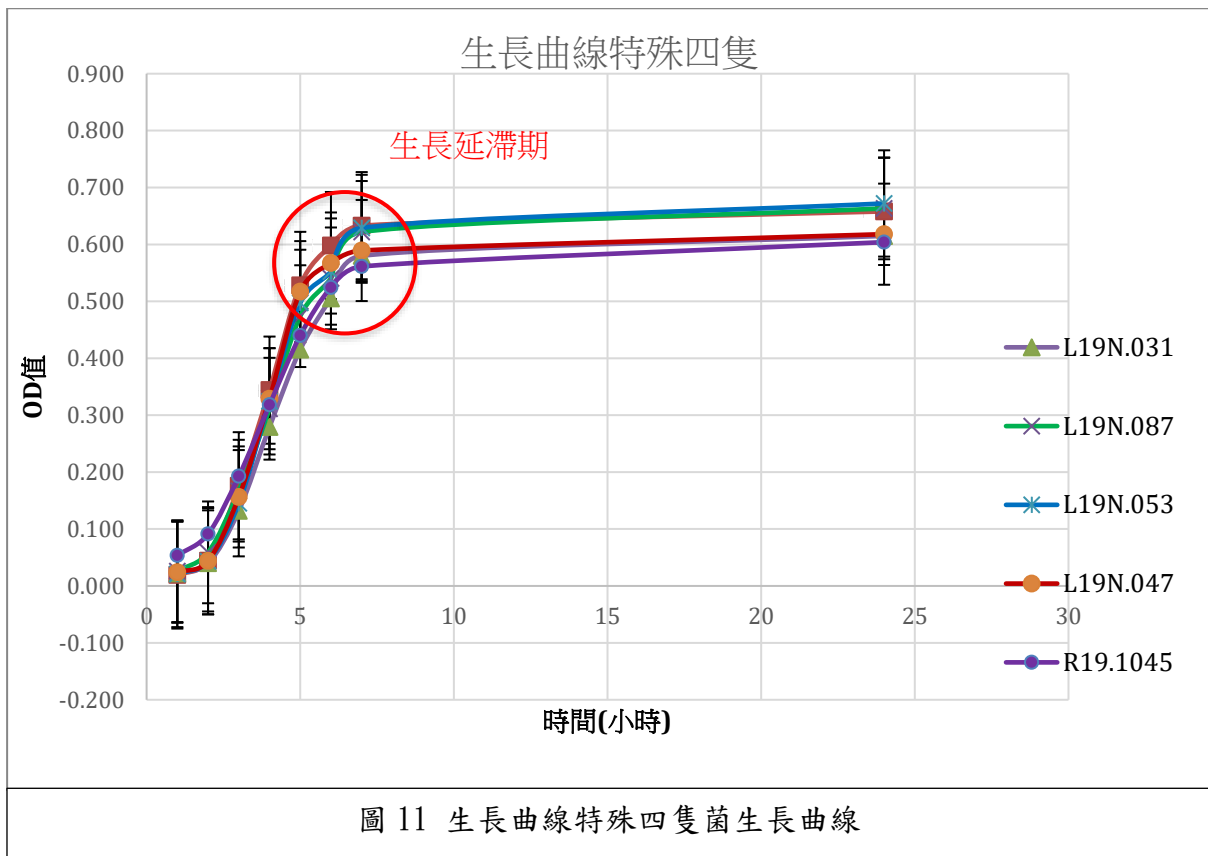


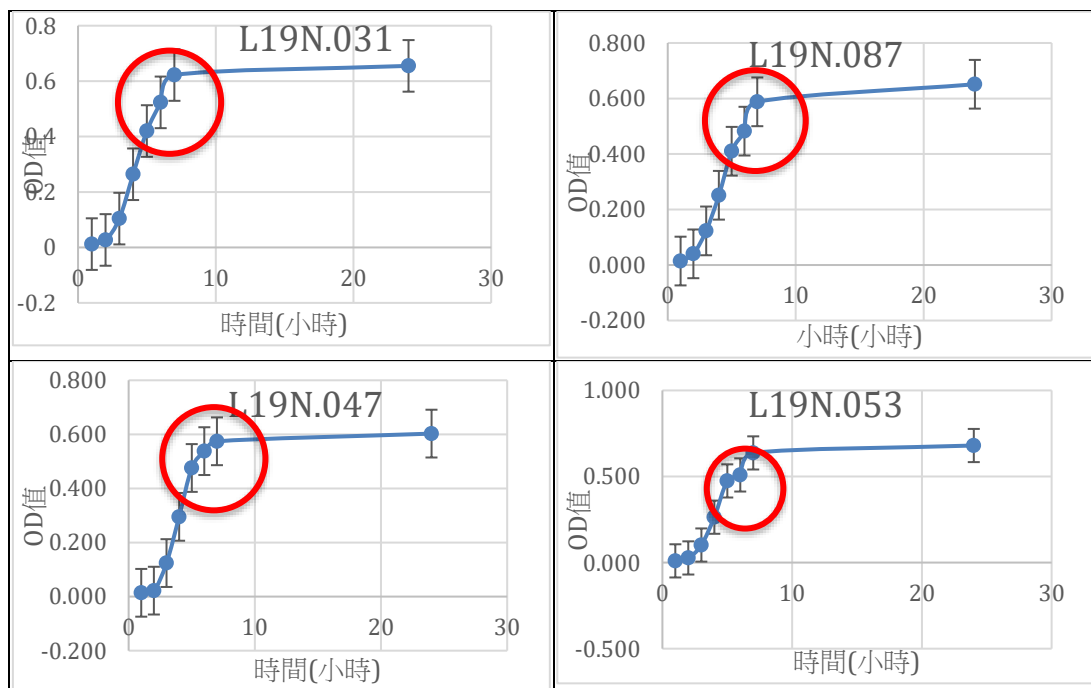
圖 10 39 隻菌生長曲線疊圖

(三)培養生長曲線特殊的四隻 *Listeria. innocua*

在培養 39 隻菌實驗中，我們發現其中四隻菌分別為 L19N. 031、L19N. 047、L19N. 053 及 L19N. 087 生長曲線在 5 至 6 小時生長速度減緩，但到 6 至 7 小時速度又有增加的趨勢，最終在 7 至 24 小時生長速度迅速下降，平衡時 OD 值落在 0.6-0.7 之間，因此將這三種菌和對照組 R19. 1045 的生長曲線在重複三次實驗進行對照，在第二和第三次實驗結果中確定以上四種菌株有特殊的生長曲線，經過三次重複，我們最終選擇 R19. 1045、L19N. 053 及 L19N. 087 進行 PCR。



在第一次實驗中我們發現其中四隻菌分別為 L19N. 031、L19N. 047、L19N. 053 及 L19N. 087 的生長曲線在 5 至 6 小時生長速度減緩，但到 6 至 7 小時速度又有增加的趨勢，最終在 7 至 24 小時生長速度迅速下降。



從第二次實驗中 L19N. 031 和 L19N. 047 第 7 到 24 小時都可以發現趨勢有上升，但到第三次



實驗兩種菌株在第 7 到 24 小時之間的趨勢呈現平，在第一次的實驗中發現 L19N.053 和 L19N.087 第五和第六個小時之間有異常的趨勢

(四)探討 L19N.053 在 5~6 小時生長延滯現象

在進行第一次實驗中我們發現，L19N.053 在 5~6 小時有生長延滯的情形，因此分別計算每個小時的生長速率，發現在 5~6 小時的生長速率，L19N.053 的生長曲線約為其他分離株之 1/5~1/2。並且，5~6 小時的生長斜率也與 1~2 小時類似，同為 lag phase。

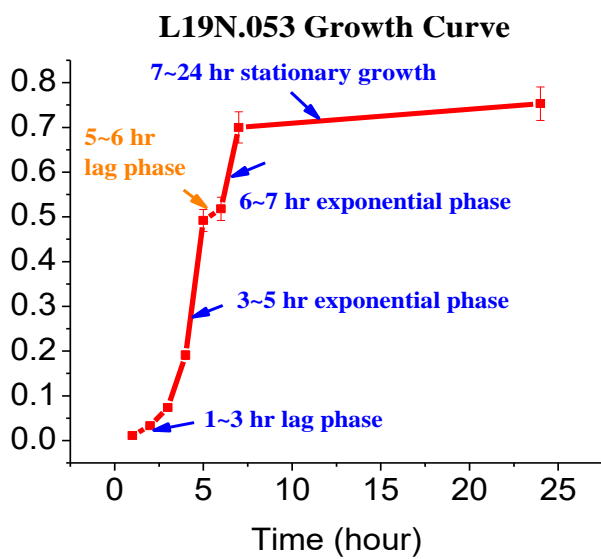


圖 13 L19N.053 生長曲線分期比較圖

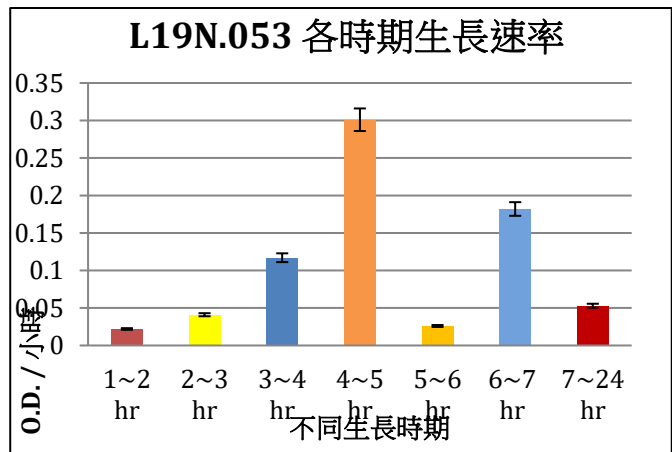


圖 14 L19N.053 各時期生長速率

三、找出相關抑制李斯特菌的方法，抑制致病性李斯特菌的繁衍及擴散。

(一)將 *Listeria innocua* 與 K-12 於 4°C 冰箱中培養

從將 *Listeria innocua* 與 K-12 於 4°C 冰箱中培養的實驗結果和趨勢可以發現 R19.1045 和 K-12 兩者都仍有生長的趨勢。但是生長速率及吸光值明顯比培養於 37°C 恆溫培養箱中低，兩者的吸光值約相差 60 倍。其中於 4°C 冰箱中培養的實驗結果 R19.1045 約為 K-12 的 1.5 倍，可見大腸桿菌 K-12 生長速度較緩慢，而李斯特菌在 4°C 時仍持續生長。

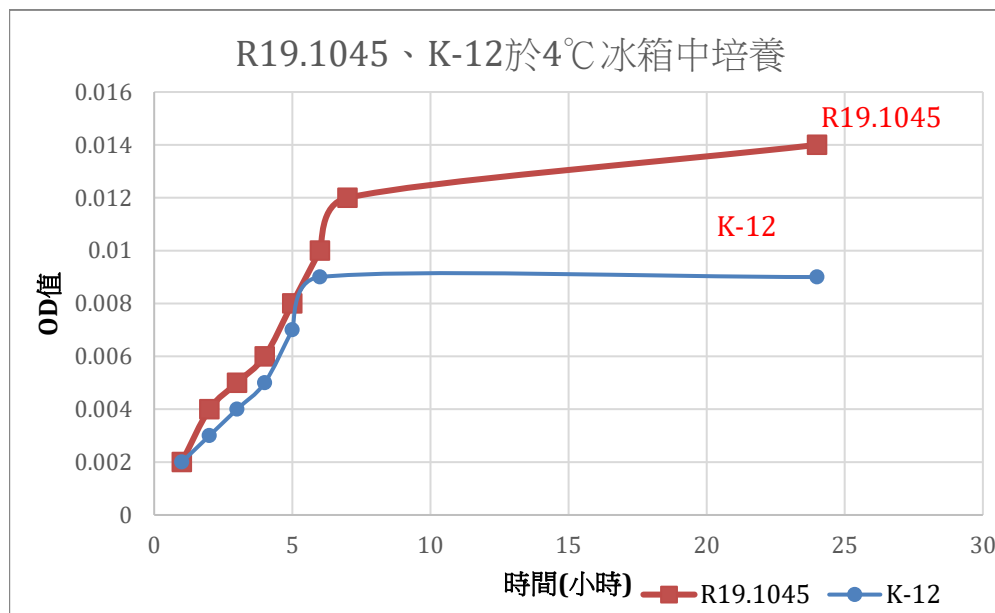


圖 15 K-12 R19.1045、K-12 於 4°C 冰箱中培養

(二)李斯特菌 L19N.053 於 4°C、室溫 25°C、37°C 的生長曲線

於 4°C 冰箱中培養 L19N.053 仍生長速率明顯比培養於 37°C 恆溫培養箱中低，到達平衡期時，37°C 培養的細菌數約為 4°C 培養之 70 倍。於 25°C 生長速率明顯比培養於 37°C 恆溫培養箱中緩慢，到達平衡期時，37°C 培養的細菌數約為 25°C 培養之 1.6 倍，由此可知低溫會延緩李斯特菌生長。

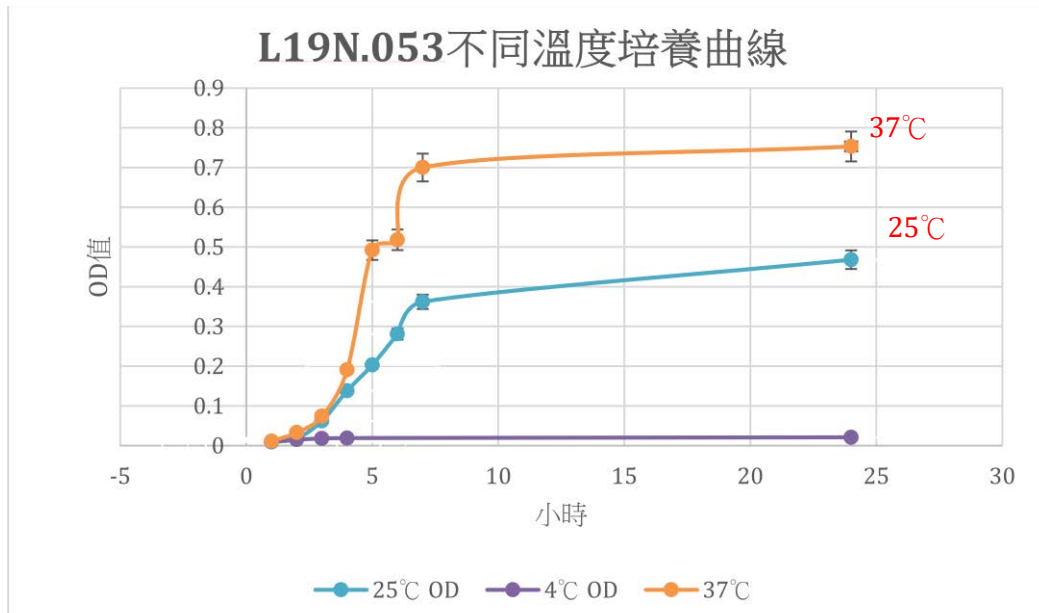


圖 16 李斯特菌 L19N. 053 於 4°C、室溫 25°C、37°C 的生長曲線

(三) 李斯特菌 L19N. 053 於 pH=2、pH=3、pH=7.2 的生長曲線

培養於在 pH3 37°C 的培養基中，於第 3 至 4 小時開始快速生長，而在 pH2 培養基中，在第 4 至 5 小時開始快速生長，酸性環境會抑制李斯特菌生長。pH=7.2 於 24 小時之 OD 值為 pH=3 的 21 倍及 pH=2 的 25 倍

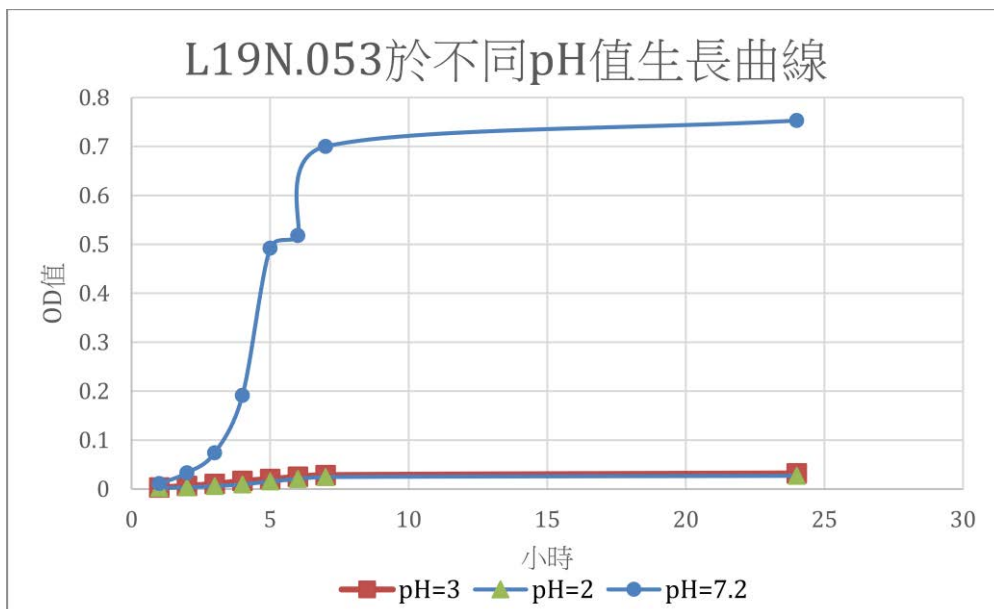


圖 17 李斯特菌 L19N. 053 於 pH=2、pH=3、pH=7.2 的生長曲線

#### (四)李斯特菌 R19.1045、L19N.053 於酒精濃度 5%、15%、35%的生長曲線

1.從酒精抑制 L19N.053 以及 R19.1045 的實驗數據中可以看到三個不同濃度的酒精皆有明顯抑制李斯特菌生長的效果。其中我們以 5%、15%、35%分別模擬三種常見的酒:啤酒、葡萄酒和白蘭地。實驗結果中可明確看出 35%酒精的抑制效果最好。在未改變培養基環境所培養的 L19N.053 的 OD 值約為添加酒精 5%的 14 倍，15%的 35 倍，35%的 63 倍；在未改變培養基環境所培養的 R19.1045 的 OD 值約為添加酒精 5%的 26 倍，15%的 54 倍，35%的 92 倍；也可以發現 35%酒精對於 R19.1045 的抑制效果最佳。

2. 我們發現一個有趣的現象: 不同酒精濃度對於兩株菌的生長抑制情形不同，R19.1045 的生長情形較差，約為 L19N.053 的一半。如此說明了 R19.1045 對於酒精較為感，至於此現象是否與 PTS 基因之存在與否有關，需要再進一步的研究確認。

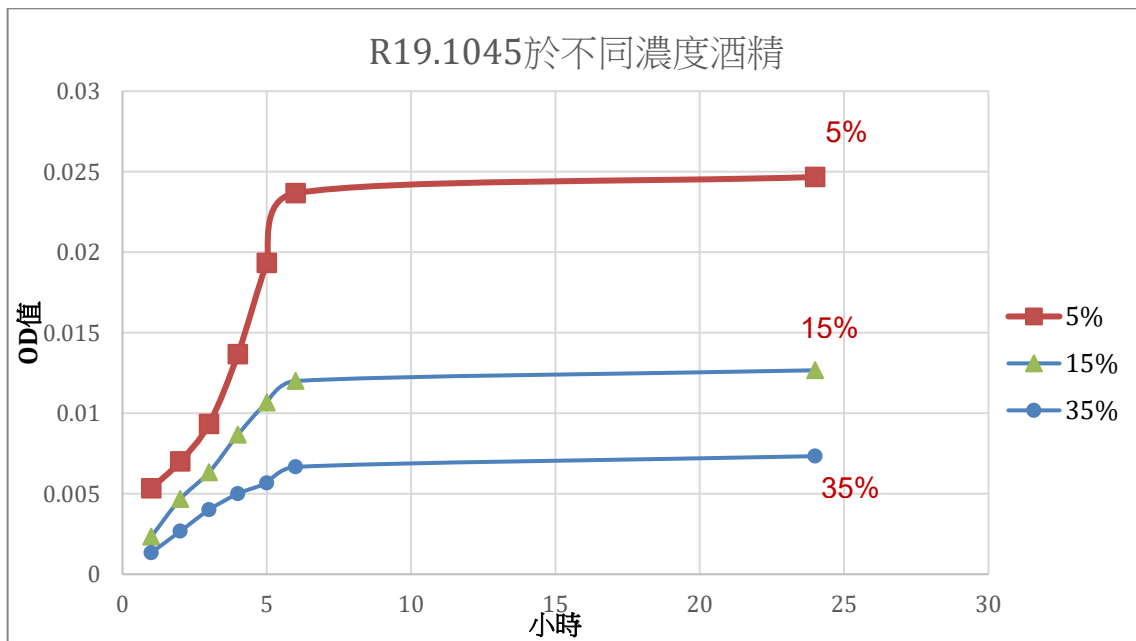


圖 18 R19.1045 於酒精濃度 5%、15%、35%生長曲線

#### 四、確認 PTS 基因是否廣泛存在於李斯特菌

PTS 基因為李斯特菌第四致病群，與醣類的代謝有關，也與李斯特菌的致病相關。在我們研究的 P1 級李斯特菌 39 支菌中，已知 R19.1045 有此基因全部序列。

我們想知道 PTS 基因是否廣泛存在於李斯特菌非致病的分離株，先以有特殊 5~6 小時有生長延滯的 L19N.053 分析 PTS 基因是否存在，再進一步可得知這些基因缺失與李斯特菌生理特性表現的相關性，在基因層次對於李斯特菌有更進一步的了解。

##### (一) 引子設計結果

表 2 引子序列 9~14 (R19.1045)

Primer	Sequence(5' to3' )
PTS 5' F	GTCGACTGGATGGTTCTTCAATTTAATCC
5' R	GCCGGCAAGATAAGTTACATCA
3' F	AACAAATTATTACTATCGCCGGTGG
3' R	CAATGCTGCGAAGTCCATATGAA
PTS 3' R	CAATCGCTGTTGCTTTATGAATATCTG

##### (二) PTS 基因 PCR 結果分析

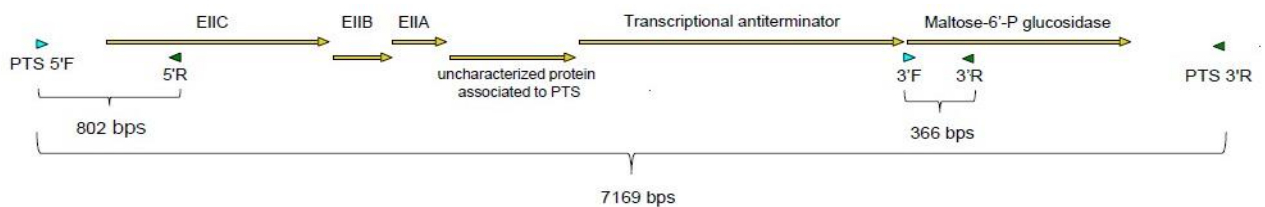
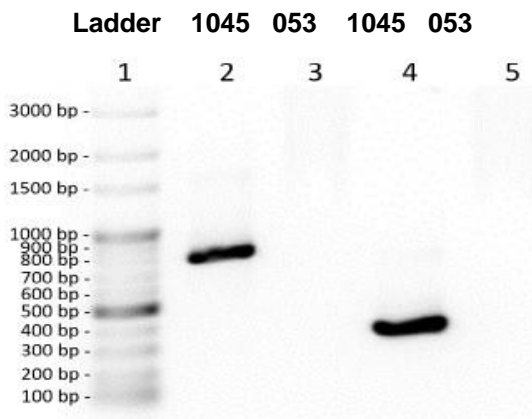


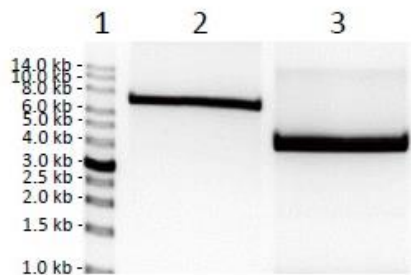
圖19、李斯特菌PTS基因方向與實驗使用的相關引子位置示意圖



- Lane 1: 100 base pair ladder
- Lane 2: PTS 5' partial region of R19.1045
- Lane 3: PTS 5' partial region of L19N.053
- Lane 4: PTS 3' partial region of R19.1045
- Lane 5: PTS 3' partial region of L19N.053

圖19、以圖A中的引子放大R19.1045與L19N.053 PTS 5端與3端序列後的電泳結果

從電泳結果可知，相較於 R19.1045 分離株，L19N.053 並無 PTS 由 5'F 5'R 引子夾出的基因(總長 802 bps)；也無由 3'F 3'R 引子夾出的基因(總長 366 bps)



- Lane 1: 1kb base pair ladder  
- Lane 2: whole PTS region of R19.1045  
- Lane 3: whole PTS region of L19N.053

圖20、以圖A中的引子放大R19.1045與L19N.053 PTS 基因群全長的電泳結果

R19.1045 表現 PTS 全基因，總長 7169 bps，然而 L19.053 PTS 基因明顯部分缺失，未達 7169 bps.

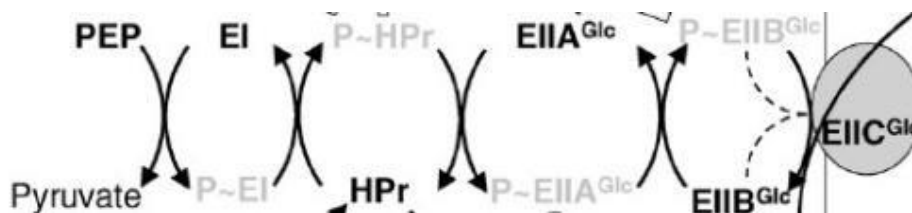


圖 21、PTS 相關的蛋白酵素作用機制示意圖

圖片來源：Josef D. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria 2008 Current Opinion in Microbiology

1. PCR 結果顯示，R19.1045 存在 PTS 全基因(李斯特菌致病相關基因群)，但是 L19N.053 分離株，PTS 基因有部分缺失。(圖 20、圖 21)
2. 在環境中同時有兩種碳源時，細菌會先消耗其中一種碳源，用掉了其中一種主要碳源時，再利用第二種，稱為醣類分解代謝物抑制作用(carbon catabolite repression)，如此有效利用環境中。
3. L19N.053 分離株 PTS 基因缺失使得在 PTS 系統裡(圖 22)的某些蛋白酵素產生缺陷，因此 053 在選用第二種碳源時有所遲疑，因此在 5~6 小時有生長延滯期。

## 伍、討論

- 一、將李斯特菌的 CFU 和 *E. coli*(K-12) 進行比較，李斯特菌的 CFU 約為  $2 \times 10^9$  *E. coli*(K-12) 的 CFU 為  $10^8$ ，由此可推估出在相同體積的菌液中有較多數量的李斯特菌。
- 二、在環境中李斯特菌無處不在，在絕大多數食品中都能找到李斯特菌。肉類、蛋類、禽類、海產品、乳製品、蔬菜等都被證實是李斯特菌的感染源。李斯特菌是嗜冷菌，在冰箱冷藏溫度、沙拉中均能生長繁殖。從生長曲線的趨勢中，在 1 至 6 小時生長速度快速上升，進而能預測出建議的抑菌時間。未來在食物保存建議與保鮮建議，甚至減少食物中毒的可能性。
- 三、進行將李斯特菌和 *E. coli*(K-12) 在 4°C 與 37°C 培養生長曲線進行比較，能發現李斯特菌在 4°C 時仍持續生長，而 *E. coli*(K-12) 生長速度較緩慢。此點與文獻中指出冷藏在 4°C 冰箱中的食品生存長達數個月之久，有相似的結果。
- 四、李斯特菌不同的抑制方法：
  1. 將李斯特菌 L19N.053 於 4°C、室溫 25°C、37°C 的生長曲線可發現溫度越低，其生長的速度越慢，但是都仍有持續生長的趨勢。
  2. 李斯特菌 L19N.053 於 pH=2、pH=3、pH=7.2 於在 pH3 37°C 的培養基中，第 3 至 4 小時開始快速生長，而在 pH2 培養基中，在第 4 至 5 小時開始快速生長，酸性環境會抑制李斯特菌生長。
  3. 李斯特菌 R19.1045、L19N.053 於酒精濃度 5%、15%、35% 三個不同濃度的酒精皆有明顯抑制李斯特菌生長的效果，其中以 35% 酒精對於 R19.1045 的抑制效果最佳。
- 五、目前先以 R19.1045、L19N.053 及 L19N.087 的一對引子做 PCR，發現 R19.1045 存在 PTS 基因，但是 L19N.053 菌株疑似沒有第四致病基因群。PTS 基因有多段缺失至於是哪段基因還需要用純化過的 DNA 做基因定序，就能有更具說服力的結果，相當令人期待。

六、如果時間允許，實驗室可以進行野生型菌株特性分析，研究有無生物膜(biofilm)使用不同類碳源利用的情形；基因重組實驗，可以操作 PTP(PTS 拿掉)-變異株(同源換用)互補株-放在不同位置，相信對於李斯特菌的特性有更清楚的了解。

### 七、李斯特菌與大腸桿菌之比較

表 3 李斯特菌與大腸桿菌之比較

兩種菌比較	李斯特菌	大腸桿菌
細菌大小外型	約 0.5 至 2.0 $\mu\text{m}$ ，為格蘭氏陽性桿菌。	約 1.0 至 2.0 $\mu\text{m}$ ，為格蘭氏陰性短桿菌。
生理特性	分布在飲水、土壤、蔬果沙拉製品、肉類、人類腸道中。在正常情況下互相依存，互相制約，保持一定的數量和比例。發酵葡萄糖不產氣。	分布在飲水、土壤、蔬果沙拉製品、肉類、人類腸道中，大部分為正常菌群。發酵葡萄糖產生大量蟻酸、乳酸、醋酸與微量二氧化碳。
於冷藏時的生長速率	較快，約為大腸桿菌於 4°C 冰箱中培養的 1.5 倍。	幾乎不生長或死亡。
致病力	在人體抵抗力下降、服用免疫抑制劑時，腸道病原菌易引起人類感染性腹瀉，亦能由細菌的代謝產物造成食物中毒。常見於夏季。	在人體抵抗力下降、服用免疫抑制劑，引起人類感染性腹瀉。較常見的食物中毒細菌者為病原性大腸桿菌。
預防方法	將食物煮熟、使用酒精消毒、使用肥皂洗手、浸泡於酸性液體，或 5%-35%酒精中。	將食物煮熟、避免飲用未經滅菌處理的生乳或果汁、注意水源是否遭到污染、飲用煮沸的開水、用肥皂洗手。



## 陸、結論

1. 無致病性的李斯特菌的生長曲線大約在 0 至 6 小時之間生長速度快速增加，從 7 至 24 小時生長速率快速下降。
2. R19. 1045 的菌落形成單位約為  $2.14 \times 10^9$ ，L19N. 002 的 CFU 約為  $1.8666 \times 10^9$
3. 將李斯特菌 L19N. 053 於 4°C、室溫 25°C、37°C 的生長曲線可發現溫度越低，其生長的速度越慢，但是都仍有持續生長的趨勢。李斯特菌 L19N. 053 於 pH=2、pH=3、pH=7.2 於在 pH3 37°C 的培養基中，第 3 至 4 小時開始快速生長，而在 pH2 培養基中，在第 4 至 5 小時開始快速生長，酸性環境會抑制李斯特菌生長。李斯特菌 R19. 1045、L19N. 053 於酒精濃度 5%、15%、35% 三個不同濃度的酒精皆有明顯抑制李斯特菌生長的效果，其中以 35% 酒精對於 R19. 1045 的抑制效果最佳。
4. 在 4°C 培養時無致病性的大腸桿菌(K-12)生長速度較無致病性的李斯特菌慢。
5. 目前先以 R19. 1045、L19N. 053 及 L19N. 087 的一對引子做 PCR，發現 R19. 1045 與 PTS 全基因，但是 L19N. 053 菌株疑似 PTS 基因有部分缺失。
6. 經革蘭氏染色李斯特菌為革蘭氏陽性菌。

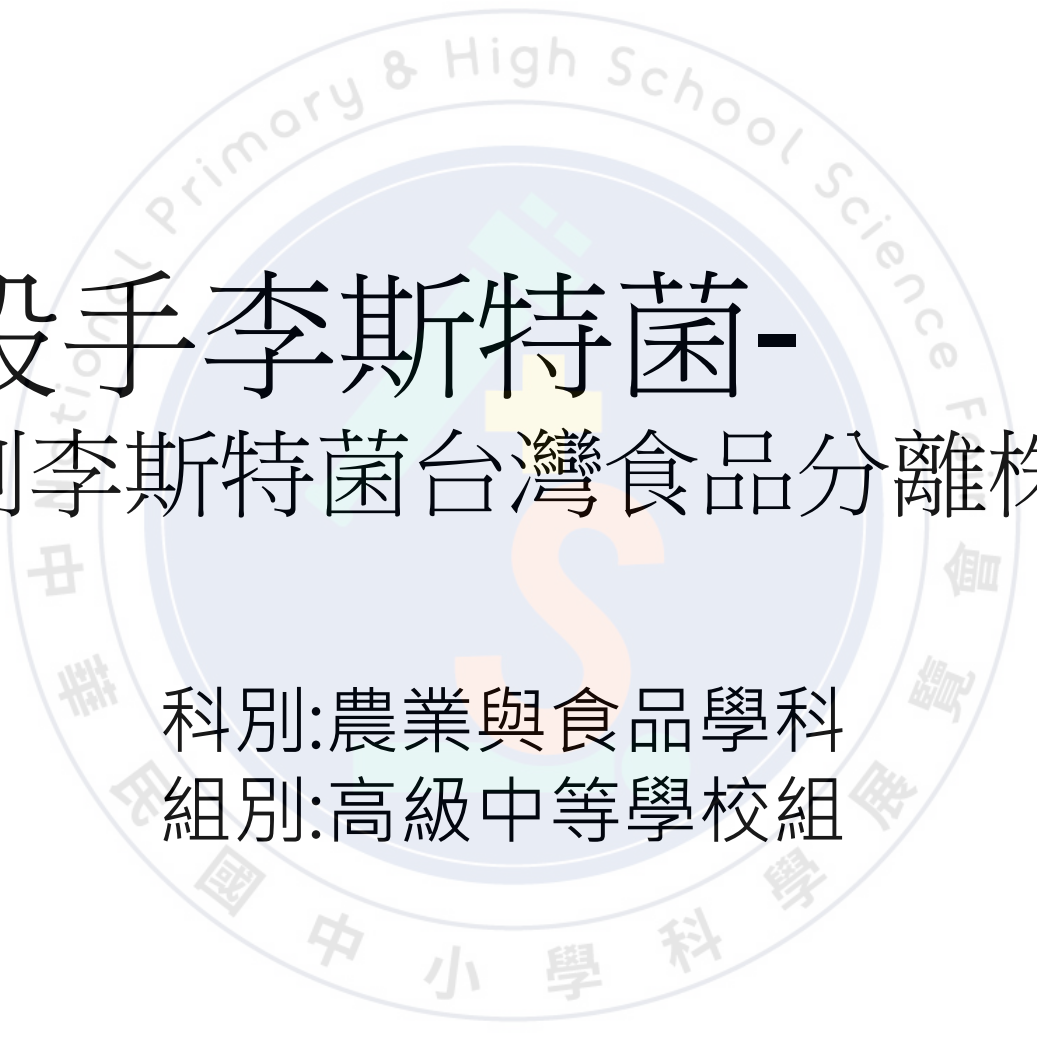
## 柒、參考文獻資料

1. 吳俊忠(2020)。臨床微生物學-細菌與黴菌學。臺北市:五南。
2. 衛生福利部疾病管制署(2021)。李斯特菌症。疾病資訊。取自 <https://www.cdc.gov.tw/Disease/SubIndex/yrsLujlBevFlvrtmgzz7Tg>。
3. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Biozentrum, Universität Würzburg(2010). The major PEP-phosphotransferase systems (PTSs) for glucose, mannose and cellobiose of *Listeria monocytogenes*, and their significance for extra- and intracellular growth, *Microbiology*, 156, 1069 – 1083. Retrieved November 24, 2020 by guest, from <http://mic.sgmjournals.org/>
4. Deutscher Josef et al.(2014). The Bacterial Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System: Regulation by Protein Phosphorylation and Phosphorylation-Dependent Protein-Protein Interactions, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2), p. 231 – 256. Retrieved November 24, 2020 by guest, from <http://mibr.asm.org/>
5. Yu-Tze Horng, Soo P.C. (2018). The Roles of Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System (PTS) in Bacterial Infection, Department of Laboratory Medicine and Biotechnology College of Medicine, Tzu Chi University, Hualien, Taiwan, Republic of China, 30(4), p. 75 – 81. Retrieved November 24, 2020 by guest, from <https://www.airitilibrary.com/>
6. Aude Locatelli, Micah A. Lewis and Michael J. Rothrock Jr(2017). The Distribution of *Listeria* in Pasture-raised Broiler Farm soils is Potentially related to University of Vermont Medium enrichment Bias toward *Listeria innocua* over *Listeria monocytogenes*, *Frontiers in Veterinary Science*, 4(227), p. 3 – 11. Retrieved November 24, 2020 by guest, from <https://www.readcube.com/articles/10.3389/fvets.2017.00227>

## 【評語】 052205

1. 作者提出由台灣本土雞翅與豬肉中分離出具有 PTS 系統之李斯特菌。並提出低溫、酸性環境與酒精濃度可有效抑制李斯特菌之生長。對相關人員具有吸引力與實用性，尤其是食品安全相關從業人員，釐清致病機理等。
2. 本作品評估生長溫度、pH 值、酒精濃度對李斯特菌株的影響。結果發現低溫 (4°C)、酸性環境 (pH=2)和酒精濃度 35%，均會抑制李斯特菌生長，符合實驗預期。
3. 結論中 TS 基因缺失與李斯特菌對於酒精的耐受性之關聯性並不清楚，需更多研究佐證。
4. 作者說明了研究目的、詳細列出實驗材料與器材，也提供相關照片佐證實驗結果。建議能先對於抑制微生物生長之因子與欄柵效應先行了解，再對於實驗設計進行修正。
5. 研究團隊分工明確，進行報告時表達清晰，相互支援，具有團隊精神。

## 作品簡報



# 冷面殺手李斯特菌-

## 探討抑制李斯特菌台灣食品分離株之方法

科別:農業與食品學科

組別:高級中等學校組

# 簡介

- 冷藏食品中之李斯特菌污染，恐致腦膜炎、敗血症，WHO報告更顯示死亡率高達2成5。由於致病性單核細胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)與無治病性P1級李斯特菌(*Listeria innocua*)是同屬，演化上有些相似特徵，因此我們利用(*L. innocua*)去推估出 (*L. monocytogenes*)的生理特性，並找出防治之方法。
- 本實驗由台灣本土雞翅與豬肉分離出之39株P1級李斯特菌分離株，觀察其型態、於不同環境之生長情形。第一階段研究結果顯示，37°C下L19N.053分離株在第5~第6小時有生長延滯的雙生長期(diauxic growth)現象。生長環境(溫度、pH值、酒精)會抑制其生長。
- 第二階段研究結果證實，L19N.053菌於磷酸轉移酶系統(phosphotransferase system, PTS, 與致病力相關之基因)有部分片段缺失，推測PTS基因與李斯特菌雙生長情形，及對酒精之耐受性有關。

## 研究目的

### 第一階段：

- 1.了解李斯特菌於不同環境壓力的耐受度低溫、強酸、酒精度及生長情形。
- 2.找出抑制李斯特菌的食品添加物配方，抑制致病性李斯特菌的繁衍及擴散。

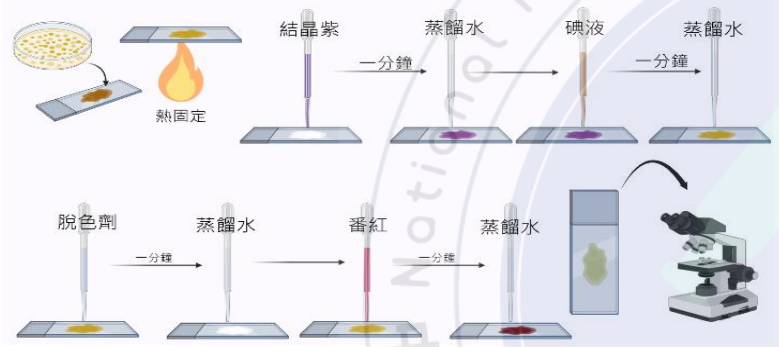
### 第二階段：

1. 驗證第一階段發現之L19N.053生長延滯現象與PTS 基因系統相關性。

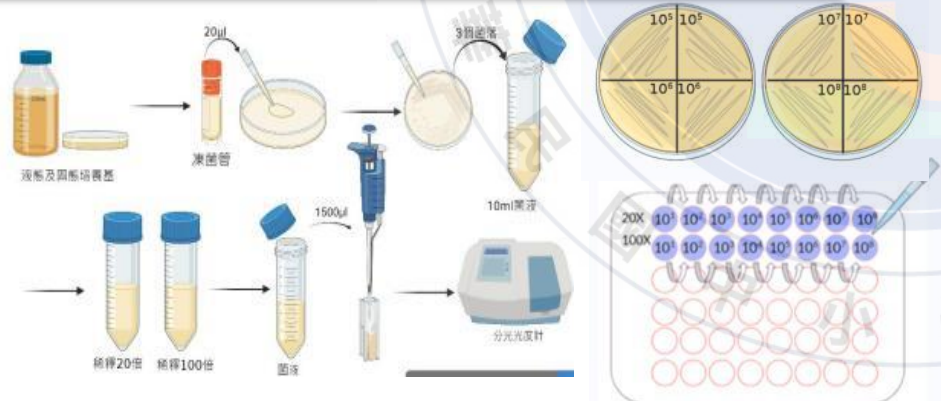


# 研究過程與方法-第一階段實驗

## 一、利用顯微鏡觀察李斯特菌菌落及革蘭氏染色觀察



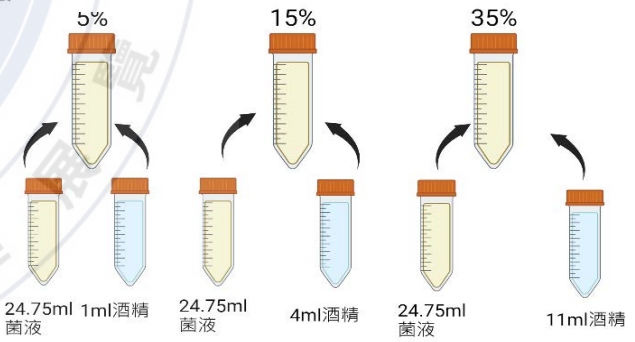
## 二、培養李斯特菌，繪製生長曲及線計算CFU



## 三、了解李斯特菌於不同環境壓力的耐受度低溫、強酸、酒精度及其生長情形



### 耐酸測試



### 耐低溫測試

### 耐酒精度測試

# 研究結果與討論-第一階段實驗

## 39株李斯特菌分離株生長情形、CFU、染色觀察

*Listeria innocua* 39 株分離株生長曲線

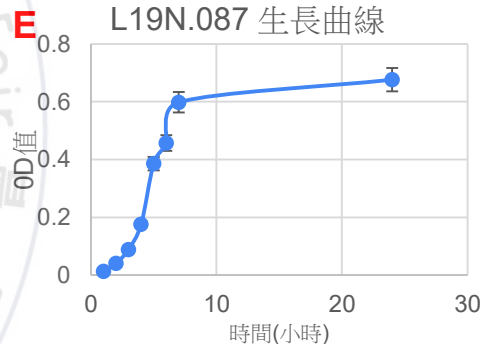
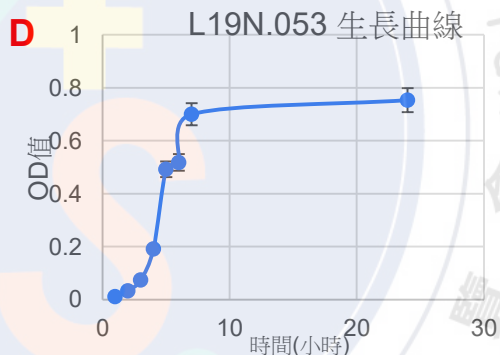
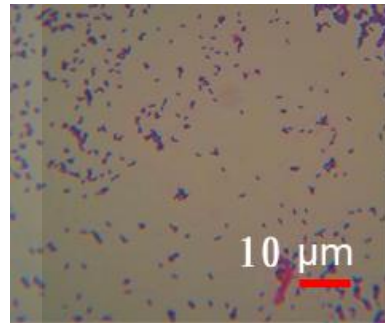
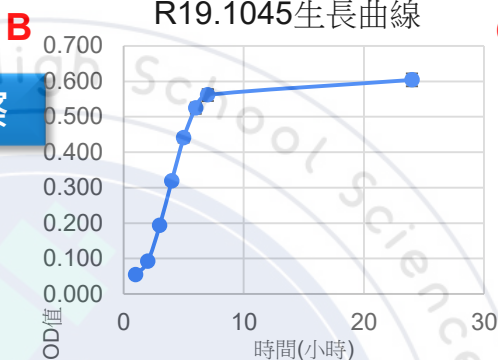
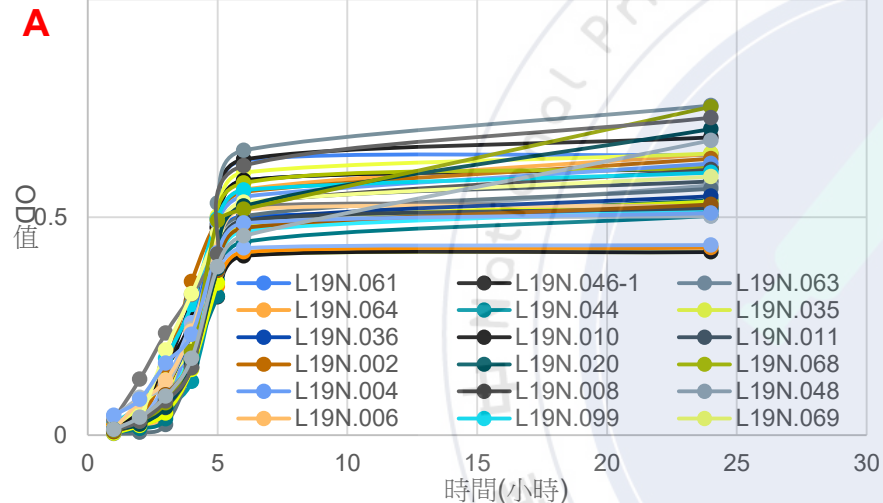


圖1. 39株(A)及指標菌株R19.1045(B)李斯特菌生長曲線、2種李斯特菌生長延滯現象(D、E)、格蘭式染色R19.1045(C)

1. 在培養39株細菌實驗中我們發現其中四株菌分別為19N.053及L19N.087生長曲線在5至6小時生長速度驟減，因此將這2種菌和對照組R19.1045的生長曲線在重複三次實驗進行對照。
2. 由OD值、菌數和生長曲線計算出CFU經過四次細菌培養實驗，我們以R19.1045為指標菌株，其CFU平均為  $2.14 \times 10^9$ 。0至6小時之間是以指數型函數生長，從7小時到24小時生長速率快速下降，達到生長飽和的平衡期的OD值約為0.6。
3. 李斯特菌R19.1045革蘭氏結果呈紫色為陽性桿菌，長度約為0.5至2.0μm，直徑0.5–4 μm(圖1C)



## L19N.053於第5~6小時生長延滯現象

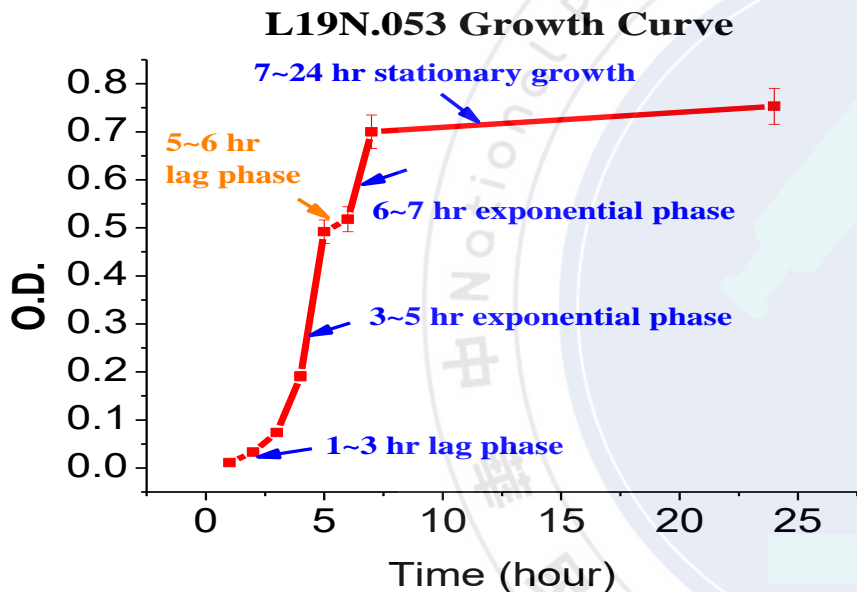


圖2A. L19N.053於5~6小時生長延滯圖

5~6小時的生長斜率與1~3小時類似，同為lag phase延滯期。

菌株編號	生長速率	菌株編號	生長速率	菌株編號	生長速率	菌株編號	生長速率
L19N.061	0.131	L19N.044	0.118	L19N.046-2	0.094	L19N.069	0.067
L19N.062	0.203	L19N.024	0.114	L19N.064	0.088	L19N.099	0.066
L19N.068	0.2	L19N.020	0.11	L19N.090	0.088	L19N.002	0.063
L19N.046-1	0.15	L19N.025	0.11	L19N.027	0.085	L19N.004	0.059
L19N.011	0.149	L19N.036	0.109	L19N.006	0.082	L19N.088	0.056
L19N.031	0.143	L19N.010	0.109	L19N.042	0.079	L19N.080	0.051
L19N.033	0.134	L19N.083	0.108	L19N.008	0.074	L19N.047	0.039
L19N.038	0.128	L19N.048	0.102	L19N.009	0.071	L19N.053	0.026
L19N.034	0.125	L19N.035	0.1	L19N.087	0.071		
L19N.063	0.121	L19N.019	0.097	L19N.055	0.068		

計算5~6小時的生長速率，L19N.053的生長速率為其他分離株之1/5~1/2。

## L19N.053 各時期生長速率

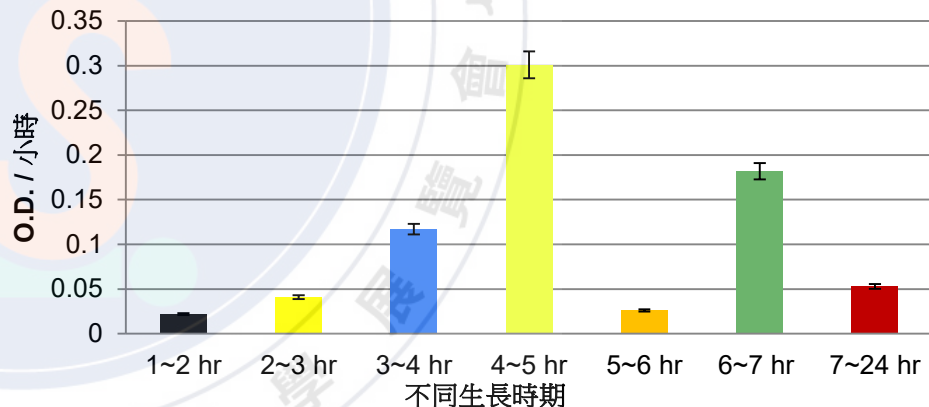


圖2B. L19N.053不同時期生長速率比較

# 低溫抑制R19.1045和L19N.053生長

37°C

兩種菌於37°C生長曲線

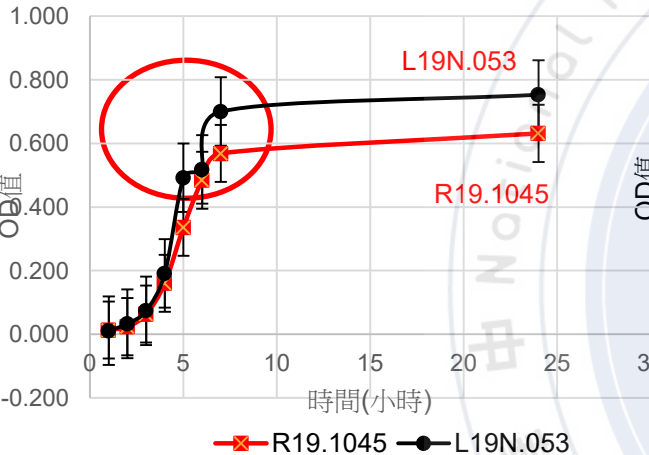


圖3A.兩種菌於37°C生長曲線

25°C

兩種菌於25°C生長曲線

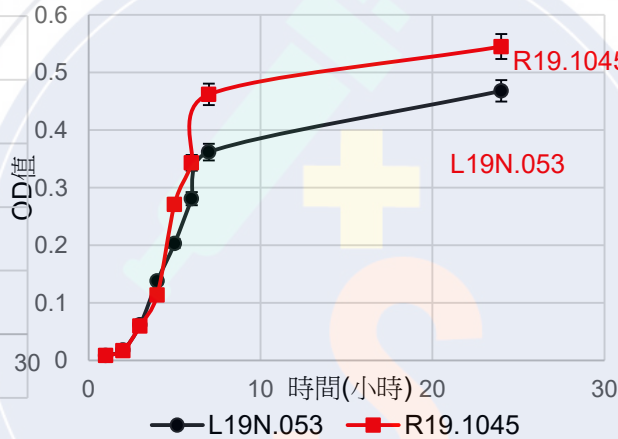


圖3B.兩種菌於25°C生長曲線

4°C

兩種菌於4°C生長曲線

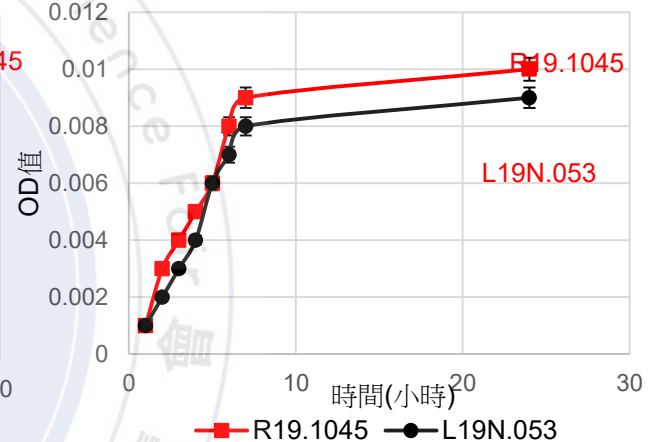


圖3C.兩種菌於4°C生長曲線

1. 相較於37 °C 及25°C，4°C兩株菌生長速率明顯受到抑制(圖3A、3B、3C)。
2. 37°C培養的L19.053細菌數約為R19.1045培養之1.2倍，但25 °C及4 °C時情況反轉，生長情形R19.1045約為L19.053培養之1.17及0.15倍(圖3A、3B、3C)。
3. L19N.053對溫度變化較敏感，於室溫25°C生長速率較R19.1045低約30% (圖3B)。

# 酸性環境抑制R19.1045和L19N.053生長

pH=2

兩種菌於pH=2生長曲線

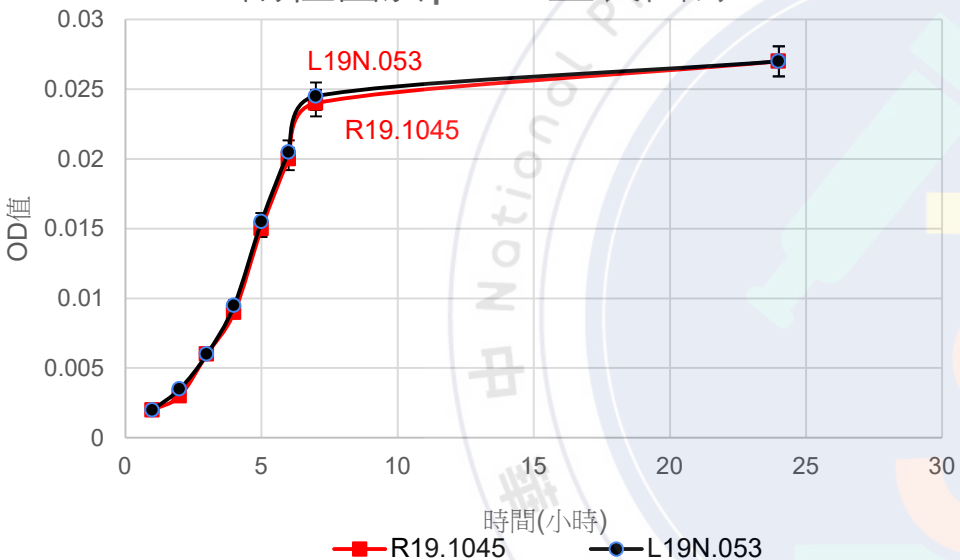


圖4A.兩種菌於pH=2生長曲線

pH=3

兩種菌於pH=3生長曲線

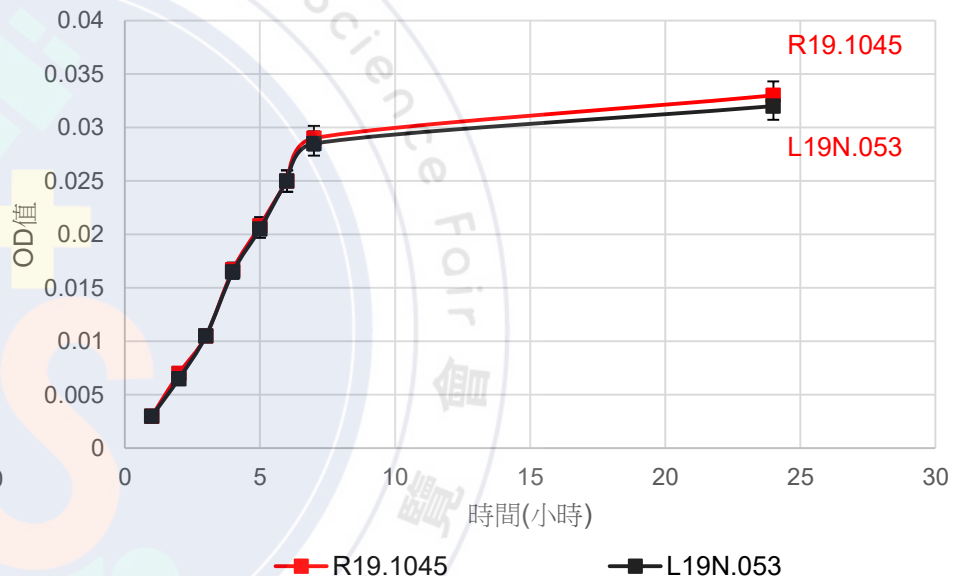
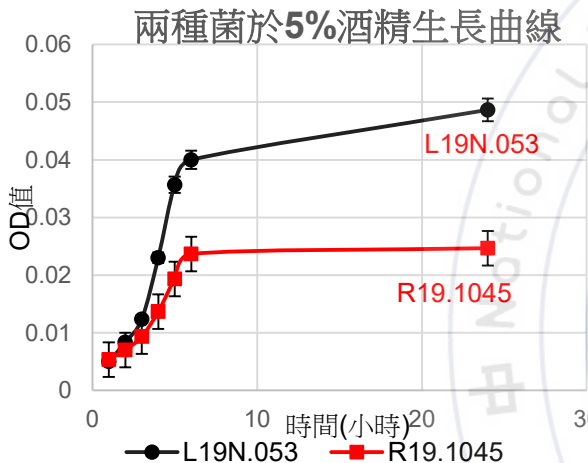


圖4B.兩種菌於pH=3生長曲線

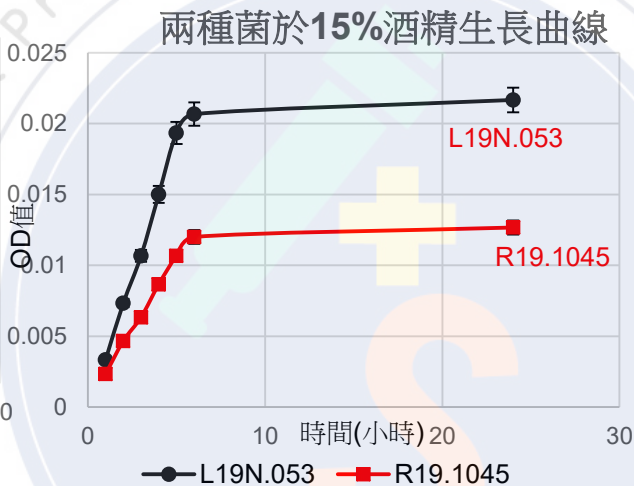
1. R19.1045與L19N.053對酸性環境敏感，強酸對兩者生長皆有明顯之抑制作用(圖4A、圖4B)。
2. 兩者於pH=2之強酸環境生長速率皆為37°C生長之1/30倍。

# 酒精濃度5%、15%、35%環境抑制R19.1045和L19N.053生長

5%



15%



35%

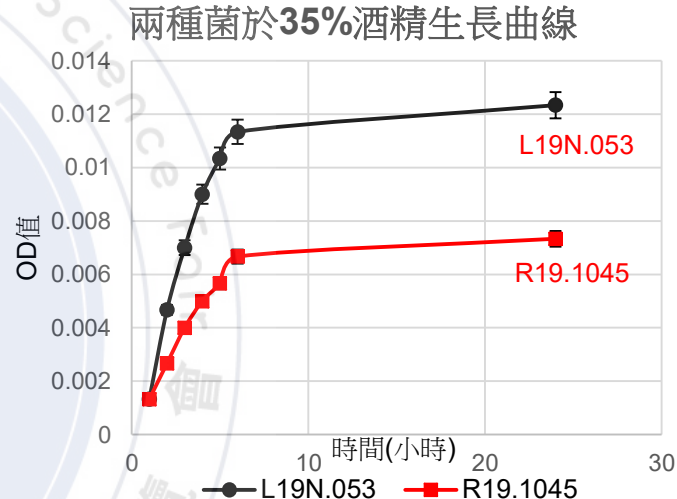


圖5A.兩種菌於5%酒精生長曲線

圖5B.兩種菌於15%酒精生長曲線

圖5C.兩種菌於35%酒精生長曲線

1. 5%酒精濃度模擬啤酒、15%酒精濃度模擬紅酒、35%酒精濃度模擬白蘭地。
2. 三個不同濃度的酒精皆有明顯抑制李斯特菌生長的效果(圖5A、5B、5C)，35%酒精抑制效果最好(圖5C)。
3. 不同酒精濃度對於兩株菌的生長抑制情形不同，R19.1045的生長情形較差，OD值約為L19N.053的一半(圖5A、5B、5C)。

# 研究過程與方法-第二階實驗設計

## 由第一階段實驗得到的結果：

1. L19.053 在5~6小時有生長延滯現象，由文獻查證，細菌之生長延滯現象與醣類代謝有關，此為雙生長期現象(參考文獻3)。當培養基裡有兩種以上碳源，會先利用其中一種主要碳源，再接著利用另一種。
2. 由酒精實驗結果得知，L19.053在環境中有酒精存在的情況之下(酒精為一種碳源)，在不同酒精濃度生長時，皆與有完整PTS系統之R19.1045有顯著不同，較不受酒精影響其生長。

## 由第一階段實驗結果做第二階段研究假設：

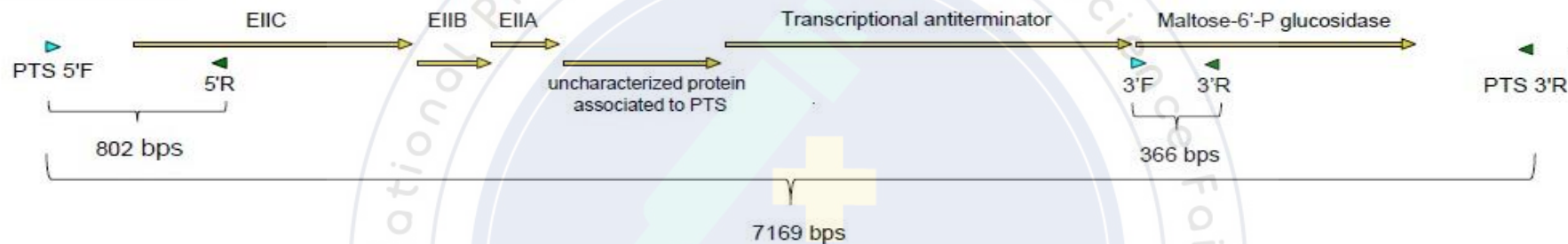
1. L19.053在與醣類利用相關之PTS基因缺失，因此在轉換醣類利用時有所遲疑，導致雙生長期現象(diauxic growth)以及對環境中存在酒精時生長較不受抑制。

## 由第一階段實驗結果做第二階段實驗：

1. 查出PTS全段基因，並設計引子。
2. 萃取R19.1045及L19.053全DNA。
3. 用所設計的引子PCR兩株李斯特菌DNA，用電泳檢驗PCR結果。

# 研究過程與方法-第二階段實驗

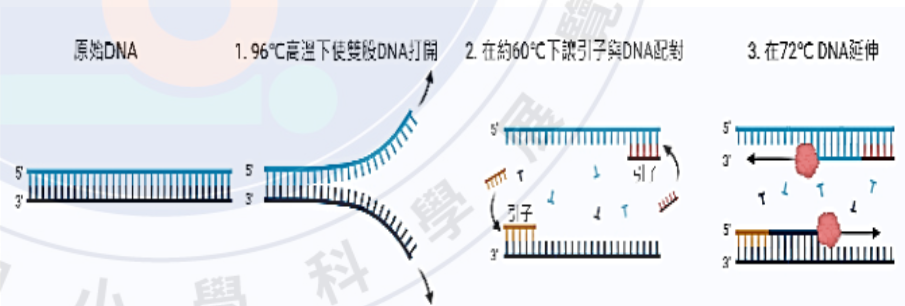
## PTS基因



## 設計引子PCR放大PTS基因、及跑電泳確認片段長度

表2. PTS基因其中兩片段之引子序列

引子	Sequence(5'to3')
PTS 5'F	GTCGACTGGATGGTTCTTCAATTTAATCC
5'R	GCCGCAAGATAAGTTACATCA
3'F	AACAAATTACTACTATCGCCGGTGG
3'R	CAATGCTGCGAAGTCCATATGAA
PTS 3'R	CAATCGCTGTTGCTTTATGAATATCTG

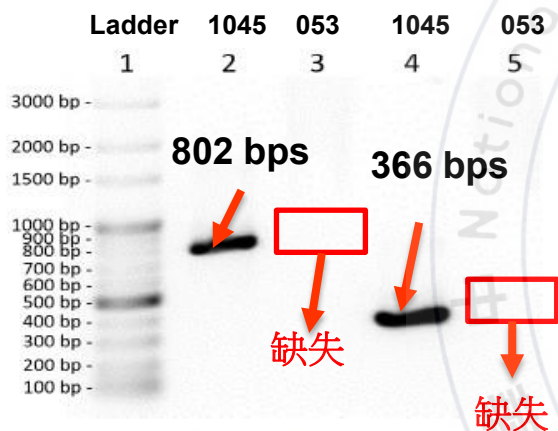




# 研究結果與討論-第二階段實驗

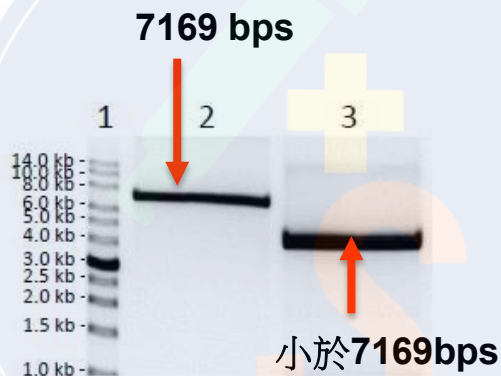
結果驗證假設:

L19N.053 PTS基因有部分缺失，推測雙生長期現象，及對酒精的耐受性較高，與此基因缺失有關。



- Lane 1: 100 base pair ladder
- Lane 2: PTS 5' partial region of R19.1045
- Lane 3: PTS 5' partial region of L19N.053
- Lane 4: PTS 3' partial region of R19.1045
- Lane 5: PTS 3' partial region of L19N.053

圖7. 以5' F&5' R及3' F&3' R引子 PCR R19.1045及L19N.053 PTS電泳結果圖



- Lane 1: 1kb base pair ladder
- Lane 2: whole PTS region of R19.1045
- Lane 3: whole PTS region of L19N.053

圖8. PTS全基因PCR電泳結果圖

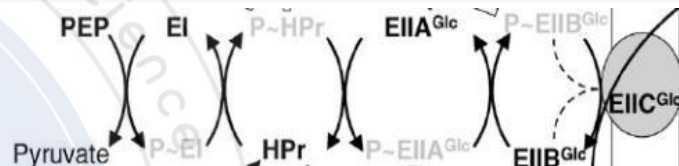


圖9. PTS蛋白酵素作用示意圖

1. PCR結果顯示，R19.1045存在PTS全基因，但是L19N.053分離株，PTS基因有部分缺失(圖7、圖8)。
2. 推測L19N.053分離株PTS基因缺失使得在PTS系統裡的某些蛋白酵素產生缺陷(圖9)，造成L19N.053在選用第二種碳源時有所遲疑，因此在5~6小時有生長延滯期。

# 結論

1. 李斯特菌(*L. innocua*)的CFU約為 $2 \times 10^9$ 。
2. 李斯特菌在4°C時仍持續生長。此點與文獻中指出冷藏在4°C冰箱中的食品生存長達數個月之久，有相似的結果。
3. 從生長曲線實驗可證明低溫(4 °C)、強酸性(pH=2)、酒精(35%)環境皆能有效抑制李斯特菌生長。
4. L19N.053分離株於在5~6小時有生長延滯的情形，且PTS基因有部分片段缺失。
5. 我們推論PTS系統基因的部分片段缺失造成醣類轉換延遲，因此L19N.053分離株於在5~6小時有生長延滯的情形。
6. 由酒精抑制實驗及PTS基因PCR結果推論，PTS基因缺失可能影響李斯特菌對於酒精的耐受性。

# 未來展望

1. 基因方面，能進行全基因定序並Knock out確認L19N.053缺失基因是否與其致病性相關。
2. 希望未來能進行39株分離株PCR確認PTS系統是否廣泛存在於李斯特菌。

# 參考文獻資料

1. 吳俊忠(2020)。臨床微生物學-細菌與黴菌學。臺北市:五南。
2. Quereda JJ, Meza-Torres J, Cossart P, Pizarro-Cerdá J(2017). Listeriolysin S: A bacteriocin from epidemic *Listeria monocytogenes* strains that targets the gut microbiota. *PubMed*,8(4),384-391.
3. DominiqueChu & David J. Barnes (2016) The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate *Scientific Reports* | 6:25191 | DOI: 10.1038/srep25191