

台灣二〇〇二年國際科學展覽會

科 別：微生物學

作品名稱：快速檢定抗生素對細菌生物膜敏感性之新技術

得獎獎項：微生物學科佳作

學 校：臺北市立第一女子高級中學

作 者：林彭俐

作者簡介



我是各興趣廣泛的女生，喜歡追求充實豐富、多采多姿的生活。尤其在科學、運動與音樂方面，投入特別多的心力跟時間。學校樂隊和紅十字會救生員資格，是我在實驗工作之外，小小的「豐功偉業」。而從事研究，更是一段難「一言以蔽之」回憶。辛苦而有趣的歷程，充滿著日夜期盼的喜悅，與失敗時小小的沒落。很高興作品能受到肯定，今後我會更努力，期待為基礎科學研究盡一份心力。

Abstract

The purpose of this study is to set up a quick, easy and economical way to evaluate the ability of different concentration of various antibiotics to penetrate biofilm and establish the antimicrobial susceptibility patterns of various antibiotics. The susceptibility of five antibiotics upon sessile cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* XL, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Sarcina lutea* ATCC 9341 were measured in this study. The biofilms of *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* XL, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *S. aureus* ATCC 29213 proved to be very difficult to eradicate, with only Gentamicin proving to effective at achievable drug concentrations, but the *S. lutea* ATCC 9341 biofilm was the most susceptible to the Penicillin. The results demonstrated that for biofilms of the same organisms, several hundred to thousand times the concentration of a certain antibiotic were often required for the antibiotic to be effect, while other antibiotics were found to be effective at the MICs. The concentration of antibiotic to penetrate the biofilm is proportional to the thickness of biofilm. Indeed, our research have already indicated that the use of MIC values to indicate antibiotics effectiveness is misleading, because MIC values can not represent the actual effect of antibiotics on microbiologicals that have developed biofilm. The antimicrobial susceptibility patterns of antibiotics to various bacterial biofilm are different. The susceptibility of the mixed biofilm depends on the physical and biological change of biofilm. Our biofilm device offers a new technology for the rational evaluation of antibiotics effective against microbial biofilms and for the screening of new effective antibiotic drugs.

中文摘要

此研究之目的是要建立一套操作簡便、快速且費用低廉之生物膜厚度產生方法，藉此探討不同生物膜厚度對抗生素抗菌之影響，進而完成抗生素對生物膜之抗菌圖譜。本實驗將測試五種抗生素對 *Bacillus subtilis* ATCC6633，*Escherichia coli* XL，*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853，*Staphylococcus aureus* ATCC29213 和 *Sarcina lutea* ATCC9341 之抗菌圖譜。實驗結果顯示 Gentamicin 對前四株試菌有較佳之穿透力，對 *S. lutea* ATCC 9341 則是 Penicillin。實驗結果證明最小抑制濃度值確實無法實際有效地表達對已形成生物膜菌體之抗菌效果，要完全去除生物膜之抗生素濃度是為最小抑制濃度之數百倍到數千倍，而且抗生素用藥濃度隨著生物膜厚度增加而呈比例增加。不同抗生素對不同菌株生物膜有不同之抗菌圖譜，混合菌株生物膜是否會促進或抑制抗生素之穿透力，端視其生物膜結構有無改變。本實驗方法可以作為一種快速檢定抗生素對細菌生物膜敏感性之新技術，同時亦可有效地篩選新的抗生素藥物對生物膜的抗菌效應。

一、前言

(一) 研究動機：

長久以來，我們一直以最小抑制濃度（MIC—Minimal Inhibitory Concentration）作為檢測浮游性菌體對抗生素敏感性的標準方法。但對於固著性細菌生物膜，MIC 值則無法確實地顯示出抗菌效果。近年來有關細菌生物膜的研究報告很多，但是在形成生物膜裝置及方法上，並不能快速有效地評估生物膜厚度與抗生素用藥濃度的關係，特別是在不同厚度膜上的探討。因此如何克服此一問題，引起我高度的研究興趣。

(二) 研究目的：

建立一套產生生物膜的方法。兼具操作簡便、快速、不佔空間、費用低廉的優點。藉此探討不同細菌生物膜厚度對抗生素抗菌之影響，並比較傳統 MIC 值之差異性，進而完成抗生素對細菌生物膜之抗菌圖譜。

二、研究方法和過程

(一) 研究材料：

1. 供試菌株：

Bacillus subtilis ATCC 6633

Escherichia coli XL

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Sarcina lutea ATCC 9341

2. 微生物培養基：

LB 培養基：Tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L Agar 15 g/L

NA 培養基：Beef extract 3 g/L, peptone 5 g/L, agar 15g/L

3. 抗生素：

Streptomycine Boehringer Mannheim GmbH

Penicillin Sigma

Tetracycline Boehringer Mannheim GmbH

Gentamicin Kramel Biotech

Cefotaxime Kramel Biotech

4. 不同生物膜厚度（1 mm, 0.5 mm, 0.3 mm）之生成模具（見圖一）。

(二)、研究方法：

1. 紙錠檢驗法 (Paper Disc Method)

加入 0.2 mL 供試菌株於平板培養基上，以 L 型玻棒塗抹均勻，將殺過菌之紙錠加入 0.02 mL 的抗生素標準溶液，置於培養皿適當位置，然後置於 37°C 恆溫培養 18-24 小時。之後取出以游標尺量取抑制圈直徑大小。

2. 抗生素最小抑制濃度 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 之分析方法

將抗生素經一系列稀釋，配成不同濃度的稀釋液，取定量分別注入裝有液體培養基之試管中，再接入 4×10^4 試驗菌株。均勻混合，於 37°C 恆溫培養 18-24 小時後，再取適量菌液塗抹於固體培養基中，檢測其中菌體不能生長之最低濃度，則該濃度即為抗生素最小抑制濃度。

3. 利用不同生物膜厚度裝置評估抗生素對生物膜抗菌之方法

- (1) 取 18 mL LB Agar 加入培養皿中，蓋上生物膜厚度產生模具。注意不可有氣泡產生，以免影響所形成生物膜厚度之完整性。於平台靜置 25 分鐘，待洋菜膠凝固後，將模具小心拔起，即可於洋菜培養基上形成深 1.0 mm、0.5 mm、0.3 mm 之凹洞（見圖二）。
- (2) 將上述培養之對數期 (log phase) 菌液，經 9000 rpm (約 8000 g) 離心 5 分鐘，去除上清液，收集沈澱底部之菌泥，取適當菌液 (菌數為 1×10^9 cfu/mL)，加入上述不同深度凹洞中。因為每個凹洞直徑為 0.8 cm，底面積為 $\pi r^2 = \pi \times (0.4)^2 \approx 0.5026 \text{ cm}^2$ 所以 1 mm、0.5 mm、0.3 mm 生物膜厚度之菌液接種量分別為 50ul、25ul 和 15ul。將此具不同生物膜厚度的培養皿，靜置於相對溼度 100% 的室溫下培養 24 小時，以確保生物膜不會脫水而導致乾燥。
- (3) 將上述靜置 24 小時所形成之不同厚度生物膜，加入 10 mL 不同濃度的抗生素溶液，使其完全覆蓋於生物膜上。靜置作用 48 小時後，回收上清液之抗生素溶液，以紙錠法測定其殘餘力價，並與標準溶液作比較。
- (4) 去除上清液之抗生素溶液，以二次無菌水輕輕沖洗生物膜表面 5 次，以去除殘存的抗生素並取每次清洗液作抗生素活性分析，以確定抗生素沒有殘存在生物膜表面。取出不同厚度之生物膜，於 1.5 mL 之離心管中，經振動打散，再離心去上清液，重複 2~3 次。以劃阿拉伯數字 1,2,3 的方式，於固態洋菜膠上作各生物膜厚度內菌體之存活測試。若菌體仍能生長，將顯示出數字，表示該濃度之抗生素不能穿透此生物膜厚度。意即：該濃度之抗生素對該厚度之生物膜失效。

三、研究結果與討論

(一) 五種抗生素對供試菌株之敏感性測試

本實驗首先以紙錠檢驗法，從五種抗生素 (Gentamicin, Penicillin, Streptomycine, Tetracycline, Cefotaxime) 中，分別選出前兩種對 *B. subtilis* ATCC 6633、*E. coli* XL、*P. aeruginosa* ATCC 27853、*S. aureus* ATCC 29213 和 *S. lutea* ATCC 9341 菌株有較佳抑制作用者，供本實驗使用。

由表一結果得知，在相同濃度 300ppm 下，Cefotaxime 和 Gentamicin 對 *B. subtilis* ATCC 6633 和 *E. coli* XL 菌株有較佳的抑制圈，分別為 30 mm，28 mm 和 29 mm，24 mm；Gentamicin 和 Streptomycin 對 *P. aeruginosa* ATCC 27853 有較佳之抑制圈，分別為 19mm 和 18mm；Penicillin 和 Gentamicin 對 *S. aureus* ATCC 29213 則有較佳之抑制圈，分別為 38 mm 和 21 mm；對 *S. lutea* ATCC 9341 菌株而言，則是 Penicillin 和 Cefotaxime，抑制圈分別為 45 mm 和 38 mm。上述各較佳之抗生素將用以測試該菌株不同厚度生物膜之抗菌圖譜。

(二) 抗生素對供試菌株之最小抑制濃度

為比較傳統 MIC 值與本實驗抗生素對生物膜穿透力之差異性，我們測試對各菌株有較佳抑制圈之前兩種抗生素的 MIC 值。表二結果顯示，Cefotaxime 對 *B. subtilis* ATCC 6633 和 *E. coli* XL 有較低的 MIC 值，分別是 0.5 ppm 和 0.2 ppm，其次 Gentamicin 則為 0.5 ppm 和 2 ppm；Gentamicin 和 Streptomycin 對 *P. aeruginosa* ATCC 27853 之 MIC 值，分別是 2 ppm 和 16 ppm，兩者相差 8 倍；Gentamicin 和 Penicillin 對 *S. aureus* ATCC 29213 之 MIC 值，分別是 0.5 ppm 和 0.8 ppm；Penicillin 和 Cefotaxime 對 *S. lutea* ATCC 9341 則為 0.4 ppm 和 4 ppm，兩者相差十倍。

(三) Cefotaxime 和 Gentamicin 對 *B. subtilis* ATCC 6633 24 小時生物膜之抗菌圖譜測試

為了解不同厚度生物膜對抗生素抗菌的影響，本實驗設計了 1mm、0.5 mm 和 0.3 mm 不同厚度之生物膜，分析不同抗生素濃度對其生物膜穿透力之效應。由表三結果得知，30 ppm 之 Gentamicin 經過 48 小時作用即可穿透 *B. subtilis* ATCC 6633 0.3 mm 厚度之生物膜，Cefotaxime 則需要 240 ppm。此外 60 ppm 之 Gentamicin 即可穿透 0.5 mm 之生物膜，而 Cefotaxime 則需 300ppm，對於穿透 1 mm 之生物膜，Gentamicin 所需濃度為 90 ppm，Cefotaxime 則是 360 ppm。顯示 Gentamicin 比 Cefotaxime 對 *B. subtilis* ATCC 6633 有較佳之穿透力。

若與 MIC 之值 (表二) 相比較，0.3 mm 厚度生物膜，Gentamicin 抗生素作用濃度是為 MIC 值的 60 倍 ($30 \div 0.5$)。Cefotaxime 則提升至 480 倍 ($240 \div 0.5$)。此結果說明生物膜一旦形成，則抗生素作用濃度確實須提高為 MIC 值的幾百倍。而且隨著生物膜厚度的增加，抗生素濃度也相對地提高且呈正相關性。例如對 0.5 mm

和 1.0 mm 厚度生物膜而言，Gentamicin 作用濃度則提高至 120 倍 ($60 \div 0.5$) 和 180 倍 ($90 \div 0.5$)，而 Cefotaxime 則提升至 600 倍 ($300 \div 0.5$) 和 720 倍 ($360 \div 0.5$)。Gentamicin 和 Cefotaxime 對 *B. subtilis* ATCC 6633 之 MIC 值一樣，均為 0.5 ppm，但對不同生物膜厚度穿透力則差異頗巨；例如對 0.3mm 生物膜厚度而言，兩者差距則約有 8 倍 ($240 \div 30$)，再次說明 Gentamicin 比 Cefotaxime 對 *B. subtilis* ATCC 6633 有較佳之穿透力。

(四) Gentamicin 和 Cefotaxime 對 *E. coli* XL 24 小時生物膜之抗菌圖譜測試

表四結果顯示，Gentamicin 比 Cefotaxime 對 *E. coli* XL 不同生物膜亦有較佳之穿透力。720 ppm 之 Gentamicin 即可穿透 0.5 mm，但 Cefotaxime 則須提高至 1680 ppm 之間，說明 *E. coli* XL 生物膜嚴重影響 Cefotaxime 之抗菌效應。又以 0.5 mm 厚度而言，兩者抗生素作用濃度分別為 MIC 值的 360 倍 ($720 \div 2$) 和 8400 倍 ($1680 \div 0.2$)。再次說明 MIC 值與實際抗生素穿透力間存在的差異性。此外，由表三與表四結果得知，不同抗生素對不同菌株生物膜厚度之穿透力亦有所不同。例如 60 ppm Gentamicin 即可穿透 *B. subtilis* ATCC 6633 0.5 mm 之生物膜，但對 *E. coli* XL 0.5 mm 生物膜則需 720 ppm。

(五) Gentamicin 和 Streptomycin 對 *P. aeruginosa* ATCC 27853 24 小時生物膜之抗菌圖譜測試

表五結果顯示，*P. aeruginosa* ATCC 27853 菌株生物膜一旦形成，則 Streptomycin 之抗菌作用將完全失效。雖然其 MIC 值為 16 ppm，但即使濃度提高至 20,000 ppm，對 0.3 mm 生物膜仍沒有作用，再次證明其生物膜對 Streptomycin 之抗菌效應，影響甚鉅。反之，Gentamicin 只要 360 ppm 即可穿透 0.3 mm 之生物膜，而 1 mm 厚生物膜則需要 900 ppm 才可穿透。

(六) Gentamicin 和 Penicillin 對 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 24 小時生物膜之抗菌圖譜測試

相似的結果同樣在表六可見，但值得注意的是 Penicillin 對 *S. aureus* ATCC 29213 之 MIC 值僅為 0.8 ppm，但一旦生物膜形成，Penicillin 亦完全失去抗菌作用，即使作用濃度為 20,000 ppm 依然無法穿透 0.3 mm 生物膜。由此可見，MIC 值無法真實地表達對已形成生物膜菌體之抗菌效果。Ceri 等人 (1999) 研究七種抗生素對 *S. aureus* ATCC 29213 生物膜之作用，其結果顯示 Gentamicin 只需 2 ppm，Penicillin 128 ppm，Clindamycin 256 ppm 和 Ciprofloxacin 為 512 ppm 可殺死生物膜，但 Cefazolin，Oxacillin 和 Vancomycin 抗生素濃度即使提高到 1024 ppm (為該各 MIC 值之 100-1000 倍) 仍無法殺死菌體。由於該實驗中之生物膜裝置並無法製作不同厚度之生物膜，故與本實驗結果有些相異，在本實驗亦是 Gentamicin 有最佳抗菌效果，30 ppm 即可穿透殺死 0.3 mm 生物膜，但 Penicillin 則是即使提高至 20,000 ppm 仍然失效。

(七) Penicillin 和 Cefotaxime 對 *S. lutea* ATCC 9341 24 小時生物膜之抗菌圖譜測試

S. lutea ATCC 9341 所形成之生物膜表面相當特別，呈皺褶狀，具厭水性，與前述幾株菌株之生物膜表面為光滑面明顯不同。由表七結果得知，90 ppm 之 Penicillin 經過 48 小時作用即可穿透 0.3mm 之生物膜，Cefotaxime 則需要 360 ppm。兩者之 MIC 值相差 10 倍 ($4 \div 0.4$)，但對穿透 0.3 mm 生物膜而言，Penicillin 濃度提高 225 倍 ($90 \div 0.4$)，而 Cefotaxime 卻僅提高 90 倍 ($360 \div 4$)，說明對穿透生物膜而言，以 MIC 值為基礎來作比較穿透力的好壞，並不合適，就如同 Penicillin 對 *S. aureus* ATCC 29213 之 MIC 值雖僅 0.8 ppm，但對其生物膜穿透力則幾乎完全失效。Davies 等人 (1998) 研究報告指出，單一菌體與該菌體形成生物膜時，菌體和菌體之物理及生物特性是不同的，其結果再次說明抗生素對浮游性菌體與固著性菌體之抗菌作用是極大不同的。

(八) 混合菌株生物膜對抗菌藥物穿透力之影響

除了以單一菌株生物膜測試外，本實驗亦探討混合菌株之生物膜對抗生素穿透力的效應，是否具有抑制或加成的作用？依據表三、五、六之實驗結果，選擇 Gentamicin 作為 *B. subtilis* ATCC 6633、*P. aeruginosa* ATCC 27853 和 *S. aureus* ATCC 29213 三株混合菌之抗菌圖譜測試。各混合後的菌數和其單一菌株時相同。如表八結果所示，當 *P. aeruginosa* ATCC 27853 和 *S. aureus* ATCC 29213 混合以及 *P. aeruginosa* ATCC 27853 和 *B. subtilis* ATCC 6633 混合後的生物膜，對 Gentamicin 之穿透力都有些微促進作用。當測試該混和菌體於抗生素作用後殘存菌數狀況時，發現所有活菌都是殘存 *P. aeruginosa* ATCC 27853。此優勢效應可能與其本身所具有的移動性有關。

相反地，*S. aureus* ATCC 29213 與 *B. subtilis* ATCC 6633 混合後之生物膜，對 Gentamicin 之穿透力則有明顯的抑制作用。其單一菌之 0.3 mm 生物膜，僅需 30 ppm，但兩株菌混合後則提升至 180 ppm，顯示混合後之生物膜反而會增加對菌體的保護，而抑制 Gentamicin 的穿透力。該混合菌體之殘存活菌測定顯示二株菌均有存活。當三株菌一起混合時，則可些微促進 Gentamicin 之穿透力，殘存之菌體仍是以 *P. aeruginosa* ATCC 27853 為主。結果顯示混合菌中只有單一且菌為優勢種時，可推測其整體生物膜結構改變不會太大，此時抗菌圖譜可能與該單一優勢菌之抗菌圖譜差不多；但若混合菌是均等的分佈，則其混合後生物膜的特性與原先各單一菌株之生物膜特性便有所不同。

(九) 最佳抗生素之篩選

由於每一種菌株所形成之生物膜特性不同（如多醣類組成成份、光滑表面、皺褶等），對於相同濃度抗生素之穿透力大小亦將有所不同。例如：30 ppm 之 Gentamicin 可穿透 0.3 mm *B. subtilis* ATCC 6633 和 *S. aureus* ATCC 29213 之生物膜，但對 *P. aeruginosa* ATCC 27853 和 *E. coli* XL 則否。相對地，不同抗菌藥物對於相同厚度生物膜之穿透力，因抗菌藥物特性不同（殺菌力強弱、作用機制不同、

溶解性大小)，其用藥濃度亦將有所不同。例如：對穿透 0.5 mm 之 *B. subtilis* ATCC 6633 生物膜而言，Gentamicin 僅需 60 ppm，Cefotaxime 則需要 300 ppm。藉由本實驗設計方式，可快速完成上述彼此相對之測試，有助於了解不同生物膜特性與不同抗菌藥物特性之關係，然後依上述實驗結果，篩選出具有最低用藥濃度和最大穿透力之較佳抗菌藥物，同時將不同穿透力之抗菌藥物作不同等級歸納與分類。例如在本實驗中，對 *B. subtilis* ATCC 6633，*E. coli* XL，*P. aeruginosa* ATCC 27853 和 *S. aureus* ATCC 29213 菌株之生物膜而言，Gentamicin 是五種抗生素中，相對較佳之抗生物膜藥物。而且對革蘭氏陽性菌之生物膜似乎亦有較強之穿透作用。

(十)本研究生物膜製造方法與 Robbins 和 Calgary 生物膜製造方法之比較

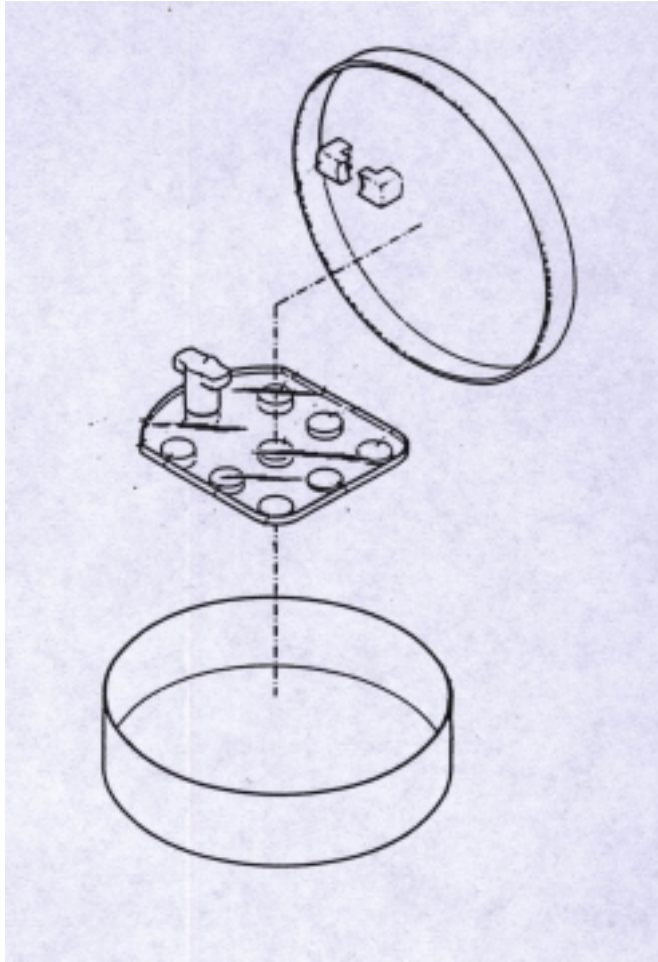
本研究與有關生物膜製造模具方法之文獻報告相比較，其結果如表九所示。由於 Robbins 生物膜裝置主要是由生物膜反應器、反應餵食器和幫浦及一些輸送管路所組合而成的，因此相對於 Calgary 和本研究器材，其複雜設備結構，則不僅操作繁瑣、成本高，而且生物膜生成時間往往需 1-2 星期，而 Calgary 和本研究方法則只要一天既可。此外該反應器的形狀、大小、攪拌流速及幫浦轉速快慢，對管壁所產生之流體剪力、迴流應力等作用，均會影響反應器內生物膜厚度生成之穩定性與再現性。由於 Calgary 和本研究方法，設計上並無一些輸送管路及幫浦，故無此缺點。但相對地，則無法做生物膜生成之動力學探討。在本實驗中不同生物膜厚度之調控是相當簡單的(如研究方法 3. 所述)，而且生物膜再現性良好，反觀 Calgary 生物膜膜具則無法做不同生物膜厚度之調控。實驗結果證明，本實驗是為一種操作簡便、結構簡單、成本低廉的裝置與方法，可以快速有效地評估抗生素對不同厚度生物膜的穿透效力。

四、結論及應用

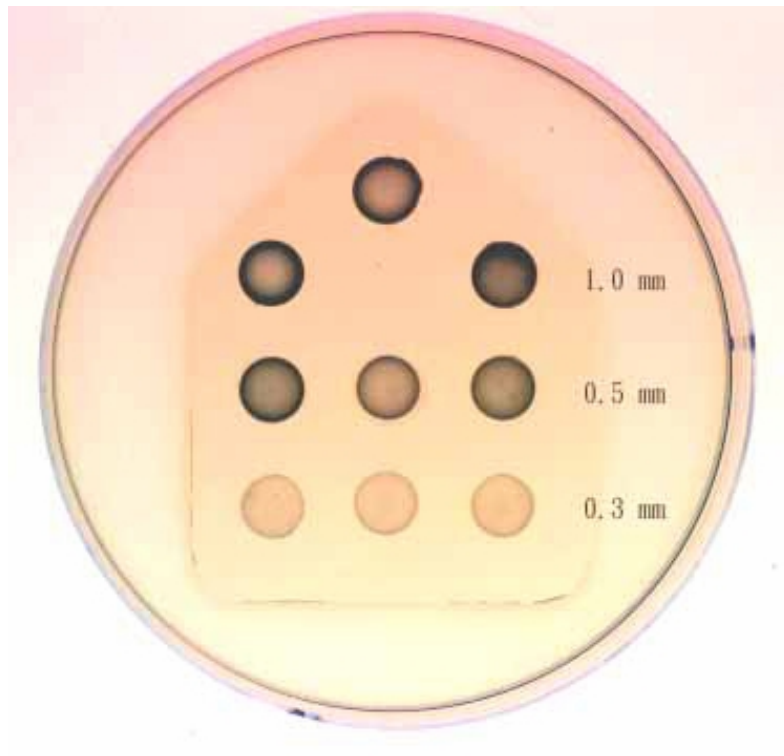
- (一) 很顯然，實驗結果證實，MIC 值確實無法有效評估抗生素對已形成生物膜菌體的殺菌效果。而本實驗方法不僅可以彌補上述缺失，更可進一步區分出不同厚度生物膜間的差異性，以達成對固著性菌體有效評估的目標。
- (二) 實驗結果顯示 Gentamicin 對 *B. subtilis* ATCC 6633、*E. coli* XL、*P. aeruginosa* ATCC 27853 和 *S. aureus* ATCC 29213 生物膜有較佳之穿透力，對 *S. lutea* ATCC9341 則是以 Penicillin 為最佳。
- (三) 實驗結果顯示生物膜一旦形成，其抗生素作用濃度是 MIC 值的幾百至幾千倍。而且隨著生物膜厚度的增加，抗生素抗菌濃度也相對地呈比例提升。
- (四) 由於每一種菌株生物膜特性對抗菌藥物之作用並不同，因此，不同抗生素對不同菌株生物膜將產生不同之抗菌圖譜。
- (五) 混合菌株生物膜是否會促進或抑制抗生素的穿透力，端視其生物膜結構有無改變。若混合菌株僅剩單一優勢菌存在，則其抗菌圖譜將與該單一菌株原先之抗菌圖譜相似。反之，若混合菌株均等生長，則其抗菌圖譜將有所不同。
- (六) 本實驗成功地建立一種操作簡便、結構簡單、成本低廉的裝置與方法，用以評估抗生素對生物膜的穿透效力。特別是實驗所設計之生物膜厚度模具，可以快速且有效地製作各種不同厚度的生物膜，對探討生物膜厚度對抗生素抗菌影響的研究，將有極大助益。此外，本實驗對於研發新抗生素對生物膜抗菌效應之篩選，亦可為往後的研究者提供很好的評估模式。

五、參考文獻

1. 王西華, 基礎微生物, 台北市, 藝軒圖書出版社, p.396-415 (1985)
2. 李國鏞, 游若萩, 微生物學, 台北市, 華香園出版社, p.207- 217 (1996)
3. 陳智育, 隋婉君, 一種評估生物殺菌劑穿透力之生物膜厚度模具方法與裝置, 中華民國發明專利第 081401 號 (1996)
4. Ceri, H., M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck, and A Buret. 1999. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(6):1771-1776.
5. Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, and E. P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-cell signals in the development of bacterial biofilms. *Science*. 280:295-298.



圖一、不同生物膜厚度之生成模具 (1 mm, 0.5 mm 和 0.3 mm)。



圖二、不同厚度生物膜 (1.0 mm , 0.5 mm 和 0.3 mm)。

表一、五種抗生素對供試菌株之紙錠敏感性測試

Strains	Clear Zone (mm)				
	Streptomycin	Penicillin	Tetracycline	Gentamicin	Cefotaxime
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	24	9	25	28	30
<i>E. coli XL</i>	24	17	19	24	29
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	18	9	9	19	15
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	19	38	20	21	20
<i>S. lutea</i> ATCC 9341	26	45	18	18	38

表二、抗生素對供試菌株之最小抑制濃度

Strains	MIC (ppm)				
	Streptomycin	Penicillin	Tetracycline	Gentamicin	Cefotaxime
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	—	—	—	0.5	0.5
<i>E.coli XL</i>	—	—	—	2	0.2
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	16	—	—	2	—
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	—	0.8	—	0.5	—
<i>S.lutea</i> ATCC 9341	—	0.4	—	—	4

備註：—表示未測試

表三、Gentamicin 和 Cefotaxime 對 *B. subtilis* ATCC 6633 24 小時生物膜之
 抗菌圖譜測試

Antibiotics (ppm)	Gentamicin			Cefotaxime		
	Depth of Biofilm (mm)			Depth of Biofilm (mm)		
	0.3	0.5	1.0	0.3	0.5	1.0
10	—	—	—	—	—	—
30	+	—	—	—	—	—
60	+	+	—	—	—	—
90	+	+	+	—	—	—
180	+	+	+	—	—	—
240	+	+	+	+	—	—
300	+	+	+	+	+	—
360	+	+	+	+	+	+
720	+	+	+	+	+	+

備註：+代表菌體無法長出，該濃度之抗生素可以穿透此生物膜厚度。

—代表菌體仍能長出，該濃度之抗生素不能穿透此生物膜厚度。

表四、Gentamicin 和 Cefotaxime 對 *E. coli* XL 24 小時生物膜之抗菌圖譜測試

Antibiotics (ppm)	Gentamicin			Cefotaxime		
	Depth of Biofilm (mm)			Depth of Biofilm (mm)		
	0.3	0.5	1.0	0.3	0.5	1.0
300	—	—	—	—	—	—
360	—	—	—	—	—	—
600	+	—	—	—	—	—
720	+	+	—	—	—	—
1080	+	+	—	—	—	—
1440	+	+	+	+	—	—
1560	+	+	+	+	—	—
1680	+	+	+	+	+	—
1800	+	+	+	+	+	+

備註：+代表菌體無法長出，該濃度之抗生素可以穿透此生物膜厚度。

—代表菌體仍能長出，該濃度之抗生素不能穿透此生物膜厚度。

表五、Gentamicin 和 Streptomycin 對 *P. aeruginosa* ATCC 27853
24 小時生物膜之抗菌圖譜測試

Antibiotics (ppm)	Gentamicin			Streptomycin		
	Depth of Biofilm (mm)			Depth of Biofilm (mm)		
	0.3	0.5	1.0	0.3	0.5	1.0
90	—	—	—	—	—	—
180	—	—	—	—	—	—
360	+	—	—	—	—	—
600	+	+	—	—	—	—
720	+	+	—	—	—	—
900	+	+	+	—	—	—
5,000	+	+	+	—	—	—
10,000	+	+	+	—	—	—
20,000	+	+	+	—	—	—

備註：+ 代表菌體無法長出，該濃度之抗生素可以穿透此生物膜厚度。
— 代表菌體仍能長出，該濃度之抗生素不能穿透此生物膜厚度。

表六、Gentamicin 和 Penicillin 對 *S. aureus* ATCC 29213 24 小時生物膜之抗菌圖譜測試

Antibiotics (ppm)	Gentamicin			Penicillin		
	Depth of Biofilm (mm)			Depth of Biofilm (mm)		
	0.3	0.5	1.0	0.3	0.5	1.0
10	—	—	—	—	—	—
30	+	—	—	—	—	—
60	+	+	—	—	—	—
90	+	+	+	—	—	—
180	+	+	+	—	—	—
720	+	+	+	—	—	—
5,000	+	+	+	—	—	—
10,000	+	+	+	—	—	—
20,000	+	+	+	—	—	—

備註：+代表菌體無法長出，該濃度之抗生素可以穿透此生物膜厚度。
 —代表菌體仍能長出，該濃度之抗生素不能穿透此生物膜厚度。

表七、Penicilli 和 Cefotaxime 對 *S. luteas* ATCC 9341 24 小時生物膜之抗菌圖譜測試

Antibiotics (ppm)	Penicilli			Cefotaxime		
	Depth of Biofilm (mm)			Depth of Biofilm (mm)		
	0.3	0.5	1.0	0.3	0.5	1.0
10	—	—	—	—	—	—
30	—	—	—	—	—	—
60	—	—	—	—	—	—
90	+	—	—	—	—	—
180	+	—	—	—	—	—
360	+	+	—	+	—	—
720	+	+	+	+	+	—
1,080	+	+	+	+	+	+
1,440	+	+	+	+	+	+

備註：+代表菌體無法長出，該濃度之抗生素可以穿透此生物膜厚度。
 —代表菌體仍能長出，該濃度之抗生素不能穿透此生物膜厚度。

表八、Gentamicin 對混和菌株 24 小時生物膜之抗菌圖譜測試

Antibiotics (ppm)	P+S			P+B			S+B			P+S+B		
	Depth of Biofilm (mm)									0.3	0.5	1.0
	0.3	0.5	1.0	0.3	0.5	1.0	0.3	0.5	1.0	0.3	0.5	1.0
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
60	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
90	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
180	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
360	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+
600	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
720	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
900	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

備註： P 代表 *P. aeruginosa* ATCC 27853

S 代表 *S. aureus* ATCC 29213

B 代表 *B. subtilis* ATCC 6633

+ 代表菌體無法長出，該濃度之抗生素可以穿透此生物膜厚度。

— 代表菌體仍能長出，該濃度之抗生素不能穿透此生物膜厚度。

表九、本研究生物膜製造方法與 Robbins 和 Calgary 生物膜製造方法之比較

比較項目	Robbins	Calgary	本研究方法
儀器構造	複雜	簡單	簡單
成本	高	低	低
操作	複雜	簡單	簡單
生物膜生成時間	長	短	短
生物膜動力探討	可以	不可以	不可以
生物膜再現性	不佳	良好	良好
生物膜厚度調控	困難	不能	容易

評 語

- (1) 本計畫主要設計一組簡單之器具，可做成不同厚度之生物膜，再經由此設計探討不同病原菌對應不同抗生素之敏感度。
- (2) 此設計有很好的創意，兼具學術及應用價值，惟進行之時間太短，數據稍嫌薄弱，表達方式亦需再度整理。