

2012 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

編號：070007

作品名稱

別再用拖鞋打小強了!

MRSA 超級細菌的剋星在小強的腸道中

得獎獎項

大會獎：四等獎

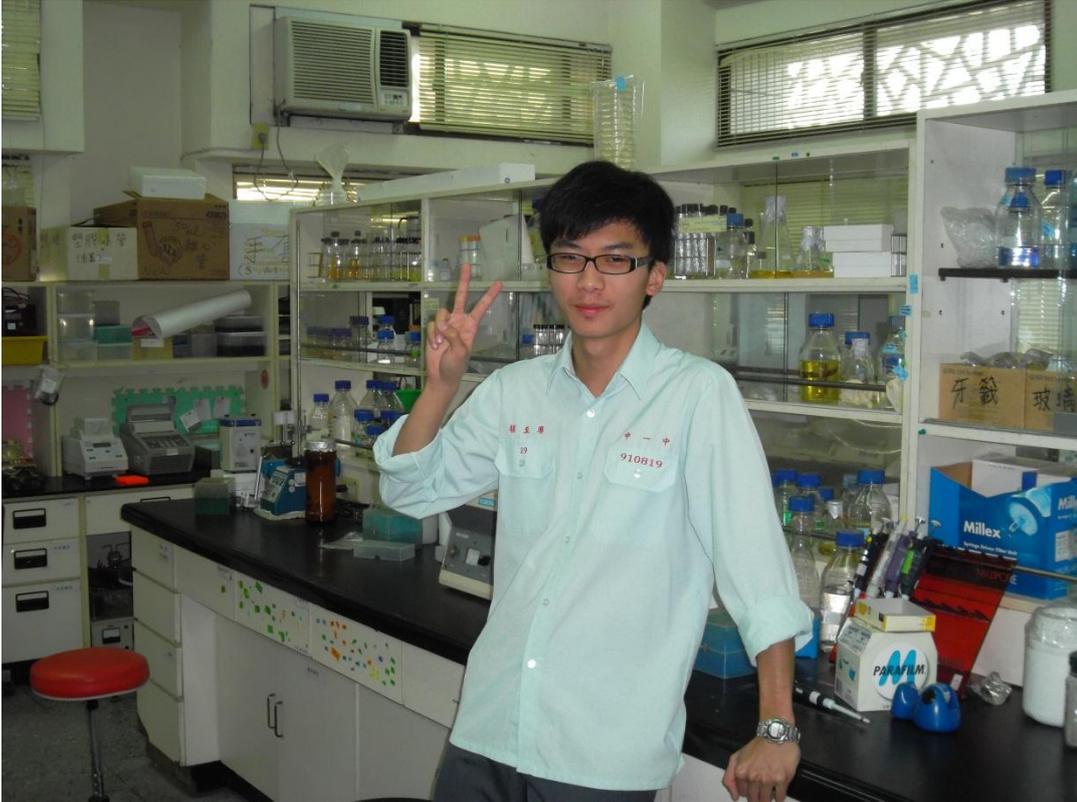
作者姓名：廖至騏

就讀學校：國立臺中第一高級中學

指導教師：溫福賢

關鍵字：蟑螂、抗生素、金黃色葡萄球菌

作者簡介



我是廖至騏，目前就讀台中一中二年級。喜歡思考的我，國中時參加了科展和科創等競賽，從此和科學結下不解之緣，立志向科學研究之路前進。進入高中之後，很高興能參加「中央研究院高中生命科學人才培訓計劃」，不但拓展了我的視野，也是我專題研究生涯的開始。學業壓力如影隨形，實驗瓶頸常來搗蛋，我的專題研究生活挫折是絕對少不了的，但這些挫折也是可貴的學習機會，是我成長的歷程。非常感謝指導教授和實驗室學長姐的指導和協助，否則我的專題不會那麼順利如期完成。

別再用拖鞋打小強了!

MRSA 超級細菌的剋星在小強的腸道中

摘要

從美洲蜚蠊的消化道分離出一株 *Bacillus* 屬細菌，暫且稱之為 *Bacillus cockroach*，能產生抗生素，對革蘭氏陽性細菌有較強的抑制作用，對革蘭氏陰性細菌的抑制作用則較弱。此抗生素對 *Staphylococcus* 屬細菌的抑制尤其明顯，甚至能抑制 37 株也能抗褐黴素 (fusidic acid) 的多重抗藥性金黃色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 臨床分離株。以 100 ml 之 Luria-Bertani (LB) 培養基培養 *B. cockroach*，生長在培養 3.5 小時後進入靜止期，於第 23 小時開始產生抗生素，培養第 28 小時所取得之離心過濾菌液於第 28 小時達到最高峰，然後逐漸下降，至第 40 小時完全消失。若在培養至第 20 小時添加 20 ml LB，離心過濾菌液出現抑菌活性高峰的時間大致不變，但抑菌活性增強，活性消失的時間也延至培養 48 小時之後。將抑菌活性最強的離心過濾菌液稀釋 50 倍之後，仍然有明顯可見的抑菌作用；而有抑菌活性的離心過濾菌液以 100 °C 加熱 10 分鐘，活性不受影響，以滅菌釜加熱 5 分鐘則仍可保有 70% 以上的活性；而以蛋白質分解酶 proteinase K 處理 1 小時之後也仍然保有抑菌活性。因此 *B. cockroach* 產生的抗生素是否為肽類仍待確定。以離心過濾菌液處理 *S. aureus* 的實驗結果則顯示 *B. cockroach* 產生的抗生物質能殺死 *S. aureus*，而非只是抑制其生長而已。

Don't hit cockroaches with your slippers anymore! The buster of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is in the digestive tract of cockroaches

Abstract

A bacterium, temporarily named "*Bacillus cockroach*" was isolated from the digestive tract of American cockroach. It can produce antibiotics which have stronger inhibition on gram-positive bacteria. Its inhibition on gram-negative bacteria was weak. The antibiotics inhibition to staphylococci were especially obvious that it could inhibit the growth of thirty-seven clinical isolates of fusidic acid- and methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). When *B. cockroach* was grown in 100 ml of Luria-Bertani (LB) broth, its growth entered stationary phase after 3.5 hours. *B. cockroach* started to produce the antibiotics while being cultivated for 23 hours, and the highest inhibition to *S. aureus* appeared in the supernatant collected from the culture at the 28th hour. And then the inhibition gradually went down until the 40th hour. If 20 ml of LB broth was added to the 20th hour culture, the time of the highest inhibition appeared was the same as those without adding LB broth. But the inhibition of those with adding LB broth extended to the 48th hour. When the filtered culture fluid with the highest inhibition was diluted into 50 folds, the inhibition still remained. After autoclaving the active filtered culture fluid for 5 minutes or digesting it by proteinase K for 1 hour, the antibiotics effects remain effective. We cannot sure whether antibiotics produced by *B. cockroach* is protein or not by these data. Experimental results also showed that the antibiotics produced by *B. cockroach* could kill *S. aureus* instead of suppressing its growth.

Key words : *Bacillus cockroach*, *cockroach*, *antibiotics*, *Staphylococcus aureus*

壹、前言

有些微生物為了競爭養分和生存空間，會分泌一些物質抑制其它微生物的生長，這分泌的物質就是抗生素，它的化學性質不一，作用機制包括阻礙細菌細胞壁的合成、破壞原生質膜的構造與通透性、抑制蛋白質的合成、阻礙 DNA 的複製和轉錄、抑制一些代謝反應等，也因此，某些抗生物質作用的對象便有某種程度的專一性。抗生素除了學術研究的用途之外，更重要的是在醫學上用來對付病原微生物。但是不正確使用抗生素的結果，卻造成多重抗藥性病原微生物的出現，需要尋找更好的抗生素或其它治療方法才能奏效。

一、研究動機

動物的消化道中也能發現微生物間生存競爭的現象。「腸道有好菌，就不怕壞菌」，大多數人類對飲食健康都非常注重。反觀蟑螂，生活在陰暗潮濕又環境衛生不良的環境中，取食極不乾淨的食物，但蟑螂仍能生長健康，這引起了我的好奇：為何蟑螂取食不衛生的食物仍能生長健康？猜測這或許跟蟑螂消化道中的共生菌（朱，2011；Gullan and Cranston, 1995）有關，所以就進行本專題研究，探討蟑螂消化道中微生物的奧秘。

二、研究目的

進行本研究是想瞭解蟑螂消化道中是否存在有能抑制其他微生物生長的細菌，如果有，則將檢視它對什麼類別的細菌(如革蘭氏陽性細菌或是革蘭氏陰性細菌)、真菌(如單細胞或絲狀真菌)，甚至特別類別的病原菌有較強的抑制作用。進一步探討此菌所產生的抗生素的基本特性。期望找到的菌株能產生極具學術研究與醫學價值的新抗生素，以造福人類。

三、美洲蜚蠊 (*Periplaneta americana*) 簡介

英文俗名為 American cockroach、ship cockroach，是廣泛分布於全球的熱帶性蟑螂，常見於家屋內，也分布於野外。體長 40~50 mm，是居家性蟑螂中最大型

的，身體呈紅褐色，觸角長度超過體長，前胸背板有黃褐色的環紋狀，又稱「環紋蜚蠊」。

美洲蜚蠊的消化道從吃進食物到排出依序為食道、嗉囊、前胃、中腸、後腸，食物在咀嚼時和食道與咽頭下分泌的唾液混合，經過嗉囊進入前胃。食物在前胃被更徹底的磨碎，接著食物回到嗉囊受到消化酵素作用，再進入中腸，中腸主要的功能是吸收營養。中腸與後腸之間有許多淡黃色絲狀構造懸浮在體腔中，稱為馬氏管，將體液代謝的後的物質排到腸中，最後隨糞便經由排泄孔排出(朱,2011)。

貳、研究方法和過程

一、實驗器材

(一) 實驗動物：美洲蜚蠊

(二) 試驗菌種：

1. 細菌：

Bacillus amyloliquefaciens (實驗室的菌種)

Bacillus cereus (實驗室的菌種)

Bacillus cockroach (本研究從蟑螂消化道分離得到的菌株)

Bacillus subtilis (實驗室的菌種)

Enterobacter aerogenes (實驗室的菌種)

Escherichia coli (實驗室的菌種)

Klebsiella pneumoniae (實驗室的菌種)

Micrococcus luteus (實驗室的菌種)

Proteus vulgaris (實驗室的菌種)

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (中國醫藥大學吳禮字教授提供)

Salmonella typhimurium (實驗室的菌種)

Serratia marcesens (實驗室的菌種)

Staphylococcus albus (實驗室的菌種)

Staphylococcus aureus (實驗室的菌種)

Staphylococcus aureus ATCC 25923 (中國醫藥大學吳禮字教授提供)

Staphylococcus aureus ATCC 29213 (長庚大學林美惠教授提供)

37 株兼抗褐黴素 (fusidic acid) 之多重抗藥性金黃色葡萄球菌

(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 臨床分離株 (中

國醫藥大學吳禮字教授與中興大學蘇鴻麟教授提供) (附件 1)

2. 真菌：

Aspergillus niger (中興大學陳錦樹教授提供)

Candida solani (中興大學陳啟予教授提供)

Candida amphixiae (中興大學陳啟予教授提供)

Pichia sp. (中興大學陳全木教授提供)

Saccharomyces cerevisiae BCRC21550 (中興大學陳錦樹教授提供)

Saccharomyces kluyveri (中興大學陳啟予教授提供)

Trichoderma reesei (中興大學陳昇明教授提供)

(三) 培養基：

1. Luria-Bertani (LB) broth

每公升水中含 tryptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g, pH7.0。

2. LB agar

LB broth 中加入 1.5% agar；滅菌後倒入培養皿，培養基固化後即稱為 LA 平板。

3. Mueller-Hinton agar

每公升水中含 beef-infusion from 300 g、casamino acid 17.5 g、starch 1.5g、agar 17g，pH 7.3。

4. PDA agar

去皮馬鈴薯塊 200g 加 600 ml 去離子水滅菌 5 分鐘，冷卻後以四層紗布濾出馬鈴薯汁液，再加入 glucose 20 g 並加水至總量為 1 公升，最後加入 agar 15g，再次滅菌 20 分鐘，在培養基尚未固化前倒入培養皿，凝固後即為 PDA agar。

(四) 器皿用具

無菌過濾器 (0.2 μ m)、塑膠針筒、無菌塑膠培養皿、試管、微量離心管 (ependrof tube)、燒杯、量筒、血清瓶、採集箱

(五) 儀器設備

高速 (冷凍) 離心機、真空濃縮離心機、分光光度計、無菌操作檯、滅菌釜 (autoclave)、定溫 (震盪) 培養箱、4 $^{\circ}$ C 冷藏箱、恆溫水液槽、試管震盪器 (vortex)、pipetman、電腦、數位相機

二、研究方法

(一) 抗生素產生菌的分離

1. 將美洲蜚蠊以 70% 酒精浸泡 2 分鐘作表面消毒，再用無菌水清洗兩次之後，在無菌操作檯內解剖取出消化道，移至 ependrof tube 中加 500 μ l 無菌水搗碎，再用無菌水作 10X、100X、1000X、10000X 序列稀釋。
2. 分別從稀釋 100X、1000X、10000X 的混合液中，取出 100 μ l，分散滴於 LA 平板上，接著倒入約 10 顆滅過菌的小玻璃珠，蓋上上蓋，以不同方向水打旋

轉方式搖動培養皿，使玻璃珠快速滾動以均勻塗菌。塗完菌倒出玻璃珠，將三個平板送入 37°C 生長箱培養。

3. 待菌落長出後，觀察平板上菌落較密集的区域是否出現有某一菌落抑制鄰近細菌生長而形成抑制區的情形，如果有，這個菌落的細菌就極有可能會產生抗生素。用接種環挑取此菌落，以四區畫線法來得到純菌。

(二) 抗生素產生菌的鑑定

1. 菌種的鑑定是採 16S rDNA 定序法來做。抗生素產生菌用 10 ml 的 LB 培養 16 小時之後離心收菌萃取基因體 DNA。
2. 利用針對細菌 16S rRNA 基因的引子對 16SF (5' -GCCACGAGCCGCGGT-3') /16SR (5' -ACGGGCGGTGTGTAC-3') 對基因體 DNA 進行聚合酶連鎖反應 (PCR)，複製 16S rDNA 中一段長約 1 kb 的 DNA 片段。
3. 將此 DNA 片段插入 yT & A vector (Yeastern Biotech Co., Ltd) 之後送請中興大學生物科技中心進行定序。
4. 將定出的核苷酸序列用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站的 BLAST 程式 (Basic Local Alignment Search Tool, Blast; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 進行比對分析即可知道菌種的分類歸屬。

(三) 抗生素產生菌的抗菌菌譜測試

1. 畫線法

- 1) 用接種環挑取抗生素產生菌的一個菌落畫於 LA 平板的中線，畫好之後將平板放入 37°C 生長箱先培養 1 天。

2) 在抗生素產生菌的一邊，分別將欲測試的菌種從靠近但不接觸抗生素產生菌的一點開始，以垂直的方向畫向平板的邊緣，畫好之後將平板放入 37°C 生長箱培養 1 天即可取出觀察結果。本實驗要測試的菌種包括 8 株革蘭氏陽性細菌、7 株革蘭氏陰性細菌，以及 37 株來自台中童綜合醫院和台中榮民總醫院的多重抗藥性金黃色葡萄球菌（MRSA）臨床分離菌株。

2. 覆蓋法

1) 用接種環挑取抗生素產生菌的一個菌落，在 LA 平板的中心塗成直徑約 1 cm 的圓環，再放入 37°C 生長箱培養 1 天。

2) 預先將分裝在試管且已滅菌的 5 ml LB agar 置於 55°C 水浴槽保溫備用。取 30 μ l 各測試菌的懸浮菌液加入試管中，和培養基混合之後，迅速倒入 LA 平板，使均勻覆蓋整個表面，靜置等到培養基凝固，放入 37°C 生長箱培養 1 天後觀察結果。

3) 真菌改以 PDA 平板進行測試。單細胞真菌以畫線法測試，絲狀真菌則取孢子以具有高抑菌活性的離心過濾菌液浸泡處理 3.5 小時之後展布 PDA 平板，再培養觀察生長情形。

（四）抗生素產生菌的生長測定

1. 挑取分離菌的一個菌落接種至 5 ml 的 LB broth，於 37°C 下培養 18 小時。
2. 取 500 μ l 培養菌液接種至 100 ml 的 LB broth，於 37°C 下以 160 rpm 的轉速進行培養。
3. 開始培養之後，每隔半小時取 1 ml 培養菌液，用分光光度計測量對 600 nm 波長可見光的吸光值。連續量測 8 小時，將所測得的數據在半對數表上畫成生長曲線圖。

4. 可同時在此菌生長的指數期量測細胞大小，並觀察是否會產生內生孢子。

(五) 抗生素產生時間的測定

1. 以和上述”抗生素產生菌的生長測定”同樣的方式接種並培養抗生素產生菌。
2. 從培養 6 小時開始至 48 小時終止，每一小時取 1 ml 菌液以桌上型高速微量離心機 (KUBOTA, KM-15200) 離心 (12000 rpm) 5 分鐘，上清液再以注射針筒型無菌過濾器 (0.22 μm) 過濾，濾液即可用來進行抗生素活性的測試。

(六) 抗生素的熱穩定性測試

取 4 支滅過菌的 eppendorf tube，於各管加入 100 μl 具有最高抑菌活性的離心過濾菌液，蓋緊之後其中 3 管分別放入 50°C、80°C、100°C 的水浴槽加熱 10 分鐘，另一管以滅菌釜 (121°C, 15 lb/in²) 處理 5 分鐘 (實際的時間超過 1 小時) 加熱，然後取處理過的離心過濾菌液進行對 *S. aureus* 的抑菌活性測試。

(七) 抗生素的蛋白質分解酶分解測試

取 100 μl 具有最高抑菌活性的離心過濾菌液加至 eppendorf tube，再加入 5 μl 的 proteinase K (Sigma, 20 mg/ml)，混合均勻後靜置於 37°C 水浴槽反應 1 小時，然後取出進行對 *S. aureus* 的抑菌活性測試。

(八) 離心過濾菌液不同稀釋濃度之抑菌活性測試

取培養不同時間收取、製備而顯示有最高抑菌活性的離心過濾菌液，稀釋成 10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍之後，分別測試抑菌活性。

(九) 離心過濾菌液抑菌活性測試

1. 點加法 (Spot test)

- 1) 將滅過菌的 5 ml LB agar 放在 55°C 水浴槽保溫。

- 2) 取一個菌落的 *S. aureus* 用 5 ml LB medium 培養過夜之後，取 30 μ l 菌液加至 5 ml LB agar 中，震盪混合之後迅速倒入 LA 平板使均勻覆蓋整個表面。
- 3) 待培養基固化後，取 40 μ l 欲測試抑菌活性的高活性離心過濾菌液分兩次（各 20 μ l）加至平板定點表面，當液體完全被吸收之後即可移至 37°C 生長箱培養。

2. 濾紙片擴散法 (Disk diffusion test)

- 1) 製備 Mueller-Hinton medium 平板，每一平板倒入 20 ml 培養基。
- 2) 將用 LB medium 培養過夜的 *S. aureus* 調為 OD 600=0.3。
- 3) 用棉花棒沾吸 *S. aureus* 菌液，擠出過多的菌液之後，以標準的塗菌法將 *S. aureus* 塗滿平板。
- 4) 取直徑 6.5 mm 的標準濾紙片放在平板上，吸取 20 μ l 的離心過濾菌液加在濾紙片上，蓋上培養皿上蓋之後，放置於 37°C 生長箱培養一天，觀察並量出濾紙片周圍的抑制區寬度。

(十) 抗生素之殺菌或靜菌測試

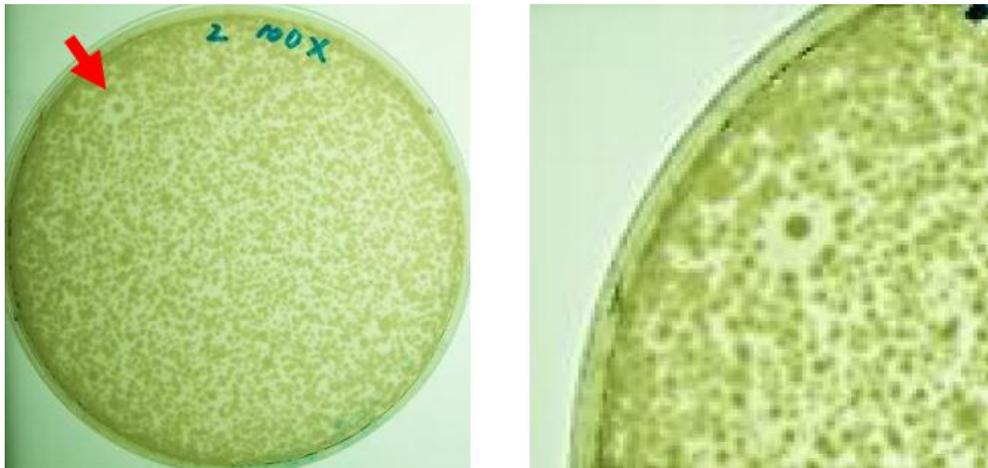
1. 先以 5 ml LB 培養 *S. aureus* 18 小時，取 100 μ l 菌液（約 1.8×10^{10} cells/ml）分別加至兩支 eppendorf tube，離心去除上清液之後一支加入 100 μ l LB 另一支加入 100 μ l 無菌水以懸浮菌體，再分別加入 100 μ l 有最高抑菌活性的離心過濾菌液，混合後均放置 37°C 培養箱培養 3.5 小時。
2. 離心，去除各管的上清液，加入 200 μ l 無菌水震盪清洗菌體，然後離心去除上清液。

3. 加 200 μ l LB broth 懸浮各管內的菌體，再以 10 倍系列稀釋的方式依序稀釋為 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 。分別從 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的稀釋管中取 100 μ l 菌液分散滴在 LA 平板上，再以小玻璃珠展布開來，隨即放入 37°C 生長箱培養一天。
4. 同時取等量的 *S. aureus* 菌液，除了不經有抑菌活性的離心過濾菌液處理之外，做同樣的操作以作為對照。

參、研究結果

一、 抗生素產生菌的分離與分類鑑定

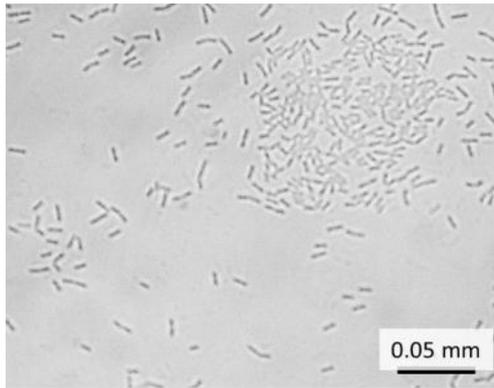
將蟑螂的消化道搗碎，用無菌水稀釋不同倍數，再展佈在 LA 平板上之後，在稀釋 100X 的 LA 平板上發現有一個菌落，它的周圍出現沒有其他菌落生長的空白區域（圖一），推測可能是這個菌落的細菌產生了某種抗生素抑制其他細菌生長而造成的結果。用接種環挑出這個菌落，並以畫線法使它在 LA 平板上長成代表純系的單菌落（圖二）。以明視野光學顯微鏡放大 400 倍觀察，這株菌的細胞呈長桿狀，大小約為 $9.2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ ；若培養時間較長，菌體變短，會產生內生孢子（圖三）。將這株菌用 16S rDNA 定序法鑑定，發現它的 16S rDNA 的核苷酸序列（附件二）和 *B. cereus* 以及 *B. thuringiensis* 都有高達 99% 的相似性，無法確定它是哪一種（species），因此在本研究暫時稱它為 *Bacillus cockroach*，日後再進行更確切的分類鑑定。



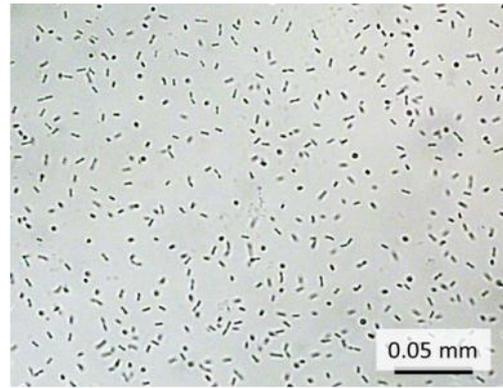
圖一、疑似能產生抗生素以抑制周圍細菌生長的菌落（箭頭處），右圖為局部放大。



圖二、 疑似抗生素產生菌在 LA 平板上長出的單菌落。



B. cockroach 培養 2 小時

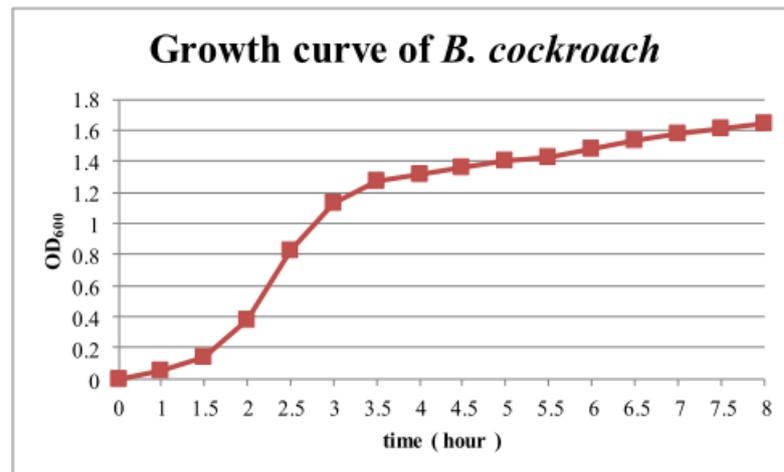


B. cockroach 培養 27 小時

圖三、以明視野光學顯微鏡觀察 *B. cockroach* 菌體及其產生的內生孢子 (400X)

二、*B. cockroach* 的生長曲線

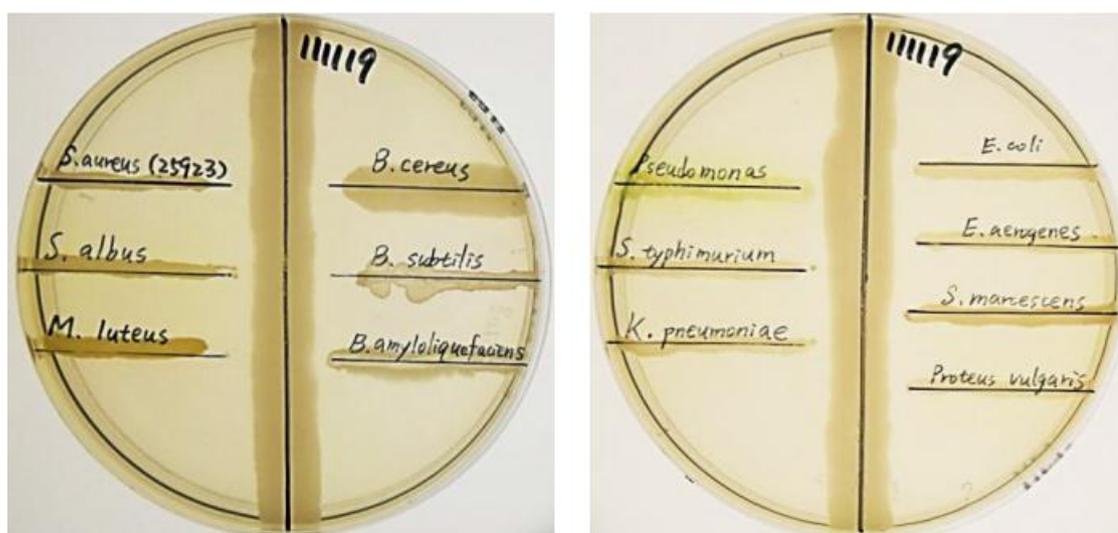
將培養 18 小時的菌源以 200X 的稀釋度接種到 100 ml 的 LB broth，在 37°C 下震盪培養測量得到的生長曲線如 (圖四)。從圖中可知 *B. cockroach* 生長快速，它的 generation time 約為 30 分鐘。雖然曲線顯示在培養 3.5 小時進入靜止期，但到培養 8 小時為止，整體的生長仍一直呈現微幅的增加。



圖四、*B. cockroach* 的生長曲線。

三、*B. cockroach* 對不同細菌的生長抑制測試

以畫線法測試 *B. cockroach* 對 8 株革蘭氏陽性細菌和 7 株革蘭氏陰性細菌的生長抑制情形，結果顯示 *B. cockroach* 似乎對革蘭氏陽性細菌有較強的抑制作用，對 *Staphylococcus* 屬細菌的抑制更是明顯；相較之下，對革蘭氏陰性細菌的生長抑制則較弱（圖五，表一）。以覆蓋法進行生長抑制測試的結果（圖六）和畫線法的結果相同，但更能顯示出抑制作用強弱的差別。



圖五、*B. cockroach* 對革蘭氏陽性菌(左)及革蘭氏陰性菌(右)的生長抑制測試

表一、以畫線法測試 *B. cockroach* 對不同革蘭氏陰性細菌及革蘭氏陽性細菌之生長抑制

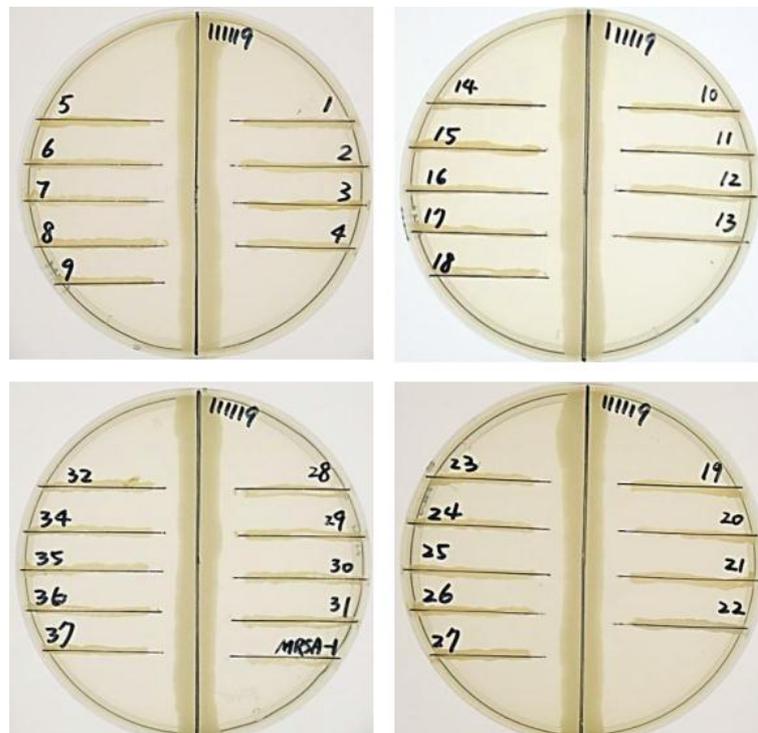
革蘭氏陰性細菌	抑制區寬度 (mm)	革蘭氏陽性細菌	抑制區寬度 (mm)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1.0	<i>B. cereus</i>	5.0
<i>S. typhimurium</i>	4.0	<i>B. subtilis</i>	7.5
<i>K. pneumoniae</i>	3.0	<i>B. amyloliquefaciens</i>	2.0
<i>E. coli</i>	3.0	<i>M. luteus</i>	8.0
<i>E. aerogenes</i>	2.0	<i>S. albus</i>	6.0
<i>S. marcescens</i>	2.0	<i>S. aureus</i>	7.0
<i>P. vulgaris</i>	2.0	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7.0
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	7.0



圖六、以覆蓋法進行 *B. cockroach* 對革蘭氏陰性細菌及革蘭氏陽性細菌生長抑制測試的部分結果。由左至右上排依次是：*K. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis*。下排依次是 *E. coli*, *E. aerogenes*, *M. luteus*, *B. cereus*。

四、*B. cockroach* 對能抗褐黴素之不同多重抗藥性金黃色葡萄球菌 (MRSA) 臨床分離株的生長抑制測試

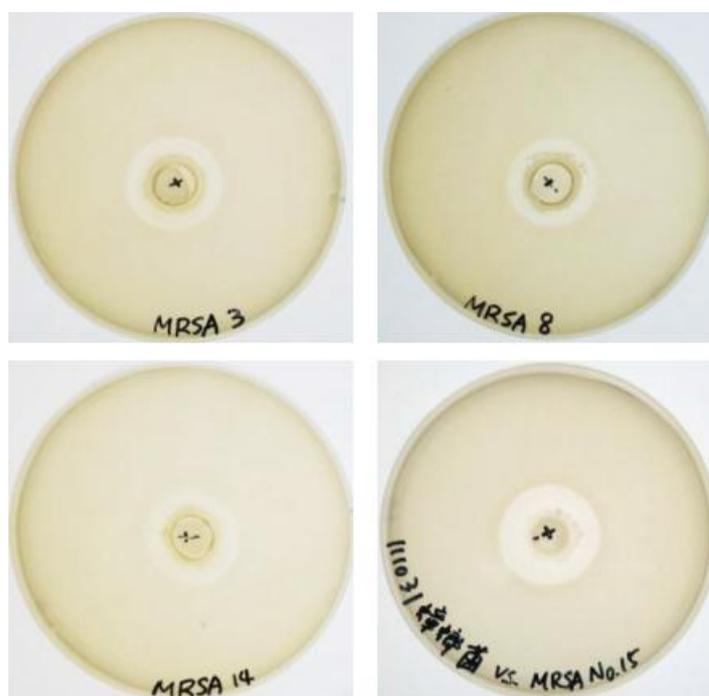
以畫線法測試的結果顯示 *B. cockroach* 對 37 株能抗褐黴素的多重抗藥性的金黃色葡萄球菌臨床分離株有程度不一的生長抑制作用 (圖七, 表三)



圖七、*B. cockroach* 對 37 株多重抗藥性金黃色葡萄球菌臨床分離株的生長抑制測試。

表三、以畫線法測試 *B. cockroach* 對 37 株多重抗藥性金黃色葡萄球菌臨床分離株的生長抑制

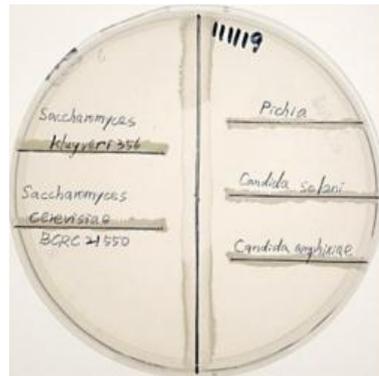
菌株	抑制區(mm)	菌株	抑制區(mm)	菌株	抑制區(mm)
1	6.0	14	6.0	27	7.0
2	6.0	15	5.0	28	5.0
3	6.0	16	8.0	29	5.0
4	5.0	17	6.0	30	6.0
5	6.0	18	5.0	31	6.0
6	6.0	19	6.0	32	7.0
7	6.0	20	8.0	33	7.5
8	6.0	21	5.0	34	7.0
9	6.0	22	7.0	35	7.0
10	6.5	23	7.0	36	6.0
11	7.5	24	7.0	37	6.0
12	6.0	25	7.0		
13	6.0	26	7.0		



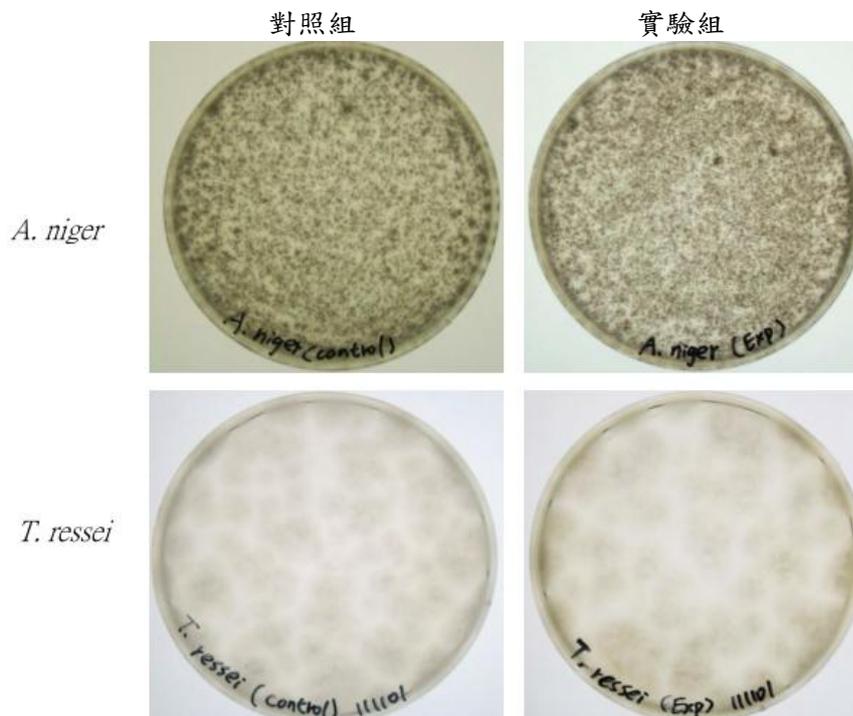
圖八、以覆蓋法進行 *B. cockroach* 對多重抗藥性金黃色葡萄球菌臨床分離株生長抑制測試的部分結果。

五、*B. cockroach* 對真菌的生長抑制測試

以畫線法測試的結果顯示 *B. cockroach* 不會抑制 *S. cerevisiae* BCRC 21550、*S. kluyveri*、*C. solani*、*C. amphixiae*、*Pichia sp.* 五株單細胞真菌的生長（圖九）。將絲狀真菌 *Aspergillus niger* 與 *Trichoderma reesei* 的孢子浸泡在有高抑菌活性的離心過濾上清液中 3.5 小時，再將孢子展佈在 PDA 平板上，結果孢子均能萌發長出菌絲，未見有生長受到抑制的情形（圖十）。



圖九、*B. cockroach* 對單細胞真菌的生長抑制測試

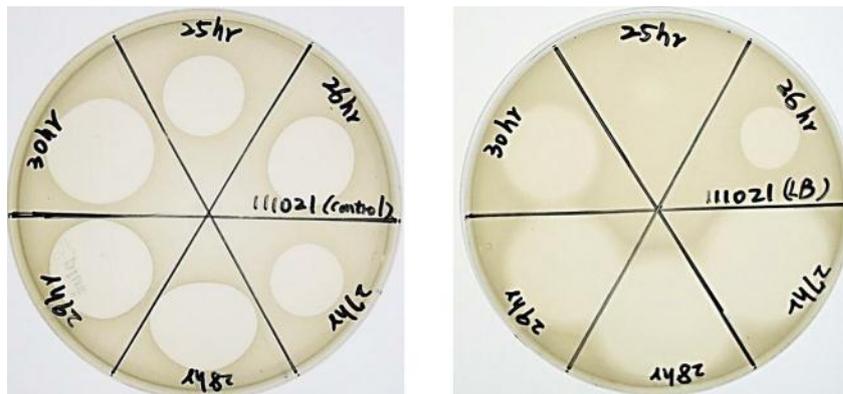


圖十、兩種絲狀真菌孢子以具高抑菌活性的離心過濾菌液處理 3.5 小時之後塗布於 PDA 平板的生長情形，對照組為不經離心過濾菌液處理。

六、*B. cockroach* 產生抗生素時間的測定

在測定 *B. cockroach* 的生長曲線時，於菌的生長進入靜止期之後不同時間取菌液離心再過濾，然後測試離心過濾菌液抑制 *S. aureus* 生長的活性強弱。採點加法 (spot test) 進行測試的結果顯示 *B. cockroach* 要培養到第 23 小時才開始產生抗生物質，此時離心過濾菌液的抑菌活性微弱。到第 28 小時離心過濾菌液的抑菌活性達到最高峰，此後逐漸下降，至第 40 小時完全消失。若在培養至第 20 小時添加 20 ml LB 至培養瓶，離心過濾菌液抑菌活性高峰出現的時間和未添加 LB 之對照組相近，但抑菌活性明顯較強，活性消失的時間也延至培養至第 48 小時之後。

用 LA 平板並以實驗室的 *S. aureus* 作為測試菌株，以點加法比較在培養到第 20 小時有添加 LB 組與未添加 LB 的對照組二者的離心過濾菌液最高活性 (在第 28 小時收取)，添加 LB 組的抑制區直徑是 28mm，而對照組的抑制區直徑則為 23mm (圖十一，表四)



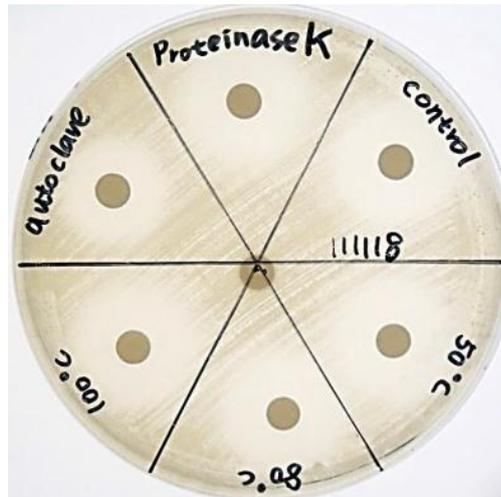
圖十一、以點加法測試培養 *B. cockroach* 至第 20 小時添加 LB 與否對離心過濾菌液抑菌活性的影響。左邊為對照組(未添加 LB)，右邊為實驗組(於第 20 小時添加 20 ml LB)。

表四、培養 *B. cockroach* 至第 20 小時添加與否對離心過濾菌液抑菌活性的影響

對照組(不添加 LB)		實驗組(添加 20ml LB)	
收取菌液的時間	抑制環直徑(mm)	收取菌液的時間	抑制環直徑(mm)
第 25 小時	18	第 25 小時	5 (turbid)
第 26 小時	20	第 26 小時	14
第 27 小時	17	第 27 小時	27
第 28 小時	23	第 28 小時	28
第 29 小時	23	第 29 小時	21

七、 抗生素的熱穩定性測試

將具有最高抑菌活性的離心過濾菌液分別在 50°C、80°C、100°C 的水浴槽加熱 10 分鐘，以及用 autoclave (121°C, 15 lb / in²) 處理 5 分鐘，然後以濾紙片擴散法測試抑菌活性，可以發現相較於未加熱的對照組，50°C、80°C、100°C 等溫度處理不會改變離心過濾菌液的抑制活性，autoclave 處理則使抑菌活性降低約 28% (圖十二，表五)，由此可知 *B. cockroach* 產生的抗生物質具有相當高的熱穩定性。



圖十二、濾紙片擴散法測試不同溫度及 proteinase K 處理對離心過濾菌液抑菌活性的影響。中心點之濾紙片直接加 proteinase K 溶液作為對照。

表五、離心過濾菌液經不同溫度及 proteinase K 處理後的抑菌活性測試

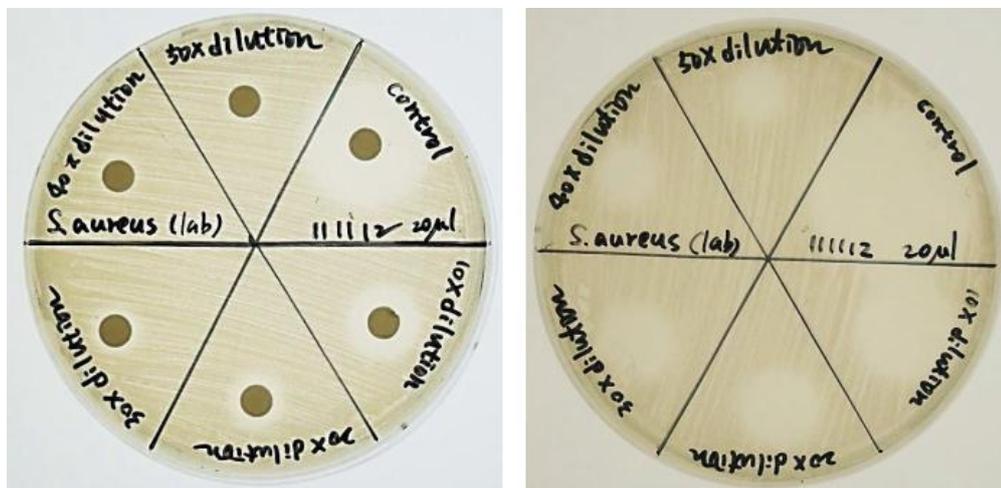
處理方式	抑制環直徑(mm)
Control	22
50 °C, 10 min	22
80 °C, 10 min	22
100 °C, 10 min	22
Autoclave, 5 min	16
Proteinase K, 37 °C, 1 hr	22
Proteinase K only(control)	0.0

八、 抗生素的蛋白質分解酶分解測試

將具有最高抑菌活性的離心過濾菌液以 proteinase K 在 37°C 處理 1 小時之後以濾紙片擴散法測試，發現抑菌活性並無任何改變（圖十二）。

九、 離心過濾菌液不同稀釋濃度之抑菌活性測試

將離心過濾菌液用無菌水稀釋為 10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍之後，取 20 μ l 各稀釋倍數的溶液，分別以濾紙片擴散法和點加法測試對 *S. aureus* 實驗室菌株和 *S. aureus* ATCC 25923 標準菌株的抑菌活性，測試的結果如（圖十三、圖十四、表六、表七）。



圖十三、以 *S. aureus* 實驗室菌株測試離心過濾菌液不同稀釋濃度之抑菌活性，左邊為濾紙片擴散法，右邊為點加法。



圖十四、以 *S. aureus* ATCC 25923 測試離心過濾菌液不同稀釋濃度之抑菌活性，左邊為濾紙片擴散法，右邊為點加法。

表六、不同稀釋倍數之離心過濾菌液對 *S. aureus* 實驗室菌株的抑菌活性測試

稀釋倍數	測試法	濾紙片擴散法	濾紙片擴散法
		抑制環直徑(mm)	抑制環直徑(mm)
1 倍		24	30
10 倍		12	20
20 倍		9	17
30 倍		7	15
40 倍		0	10
50 倍		0	9

表七、不同稀釋倍數之離心過濾菌液對 *S. aureus* ATCC 25923 的抑菌活性測試

稀釋倍數	測試法	濾紙片擴散法	濾紙片擴散法
		抑制環直徑(mm)	抑制環直徑(mm)
1 倍		22	27
10 倍		8.5	15
20 倍		0	8 (turbid)
30 倍		0	0
40 倍		0	0
50 倍		0	0

十、抗生物質之殺菌或靜菌測試

為瞭解 *B. cockroach* 產生的抗生素對測試菌的抑制作用是殺菌(bactericide) 還是靜菌 (bacteriostatic)，按實驗方法中的做法，將 100 μ l 培養過夜的 *S. aureus* 離心下來，再加入 LB 或無菌水，以及有抑菌活性的離心過濾菌液，混合後放置 37 $^{\circ}$ C 培養 3.5 時，然後將培養菌液依序稀釋為 10^{-1} 10^{-7} 。從稀釋為 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的各管中取 100 μ l 菌液展佈在 LA 平板上，結果在培養一天之後並無菌落長出。不經過有抑菌活性的離心過濾菌液處理的對照組，稀釋為 10^{-7} 的菌液平均可長出 9 個菌落，稀釋為 10^{-6} 的菌液平均可長出 118 個菌落，以後者估算原先培養過夜的 *S. aureus* 菌液約為 2.36×10^{10} cells/ml。根據以上的結果，可以推斷 *B. cockroach* 產生的抗生素對 *S. aureus* 的作用是殺菌而不是靜菌。

肆、討論

蟑螂到處覓食，必定有許多微生物隨著食物進入它的消化道，有些甚至成為消化道內共生正常菌叢的一份子。蟑螂吃進的微生物中，難免有些種類會產生毒性物質，影響甚至危害蟑螂的“健康”。對於這些有害的微生物，蟑螂消化道內是否有常住的或隨食物進入的某些微生物能頡抗它們，為蟑螂消災解厄呢?這個問題便引發了這個專題研究。

分離可能存在於蟑螂消化道內的頡抗菌的方法是採用堪稱抗生素教父的 Selman Waksman 首創的“Crowded plate technique” (Cappuccino and Sherman, 1996)，其做法是將菌源（如土壤、昆蟲的消化道等）做成懸浮液，必要時加以稀釋，再將適量的懸浮液展佈在固態培養基上，經培養之後檢視是否出現某株菌抑制周圍其它菌生長的情形，如果有，則此株菌即可能是會產生抗生素的菌株。可能是幸運，也可能是蟑螂消化道內真的存在一些護衛“健康”的微生物，第一次試驗就分離得到本研究的主角(圖一)。由於以 16S rDNA 定序分析法鑑定的結果，此菌的 16S rDNA 核苷酸序列和 *B. cereus* 與 *B. thuringiensis* 的 16S rDNA 核苷酸序列同樣都有 99% 相似度，無法判定它是屬於哪一種，因此將此菌暫時命名為 *Bacillus cockroach*，日後可進一步藉由染色來觀察細胞內是否有 *B. thuringiensis* 特有的毒蛋白結晶 (Ammons, et al., 2002)，以及分析比較包含 tRNA 基因的 16S-23S rRNA 基因間區 (ITS) 核苷酸序列 (Daffonchio, et al., 2006) 等來知道此菌真正的分類歸屬。在顯微鏡下可以看到此菌在養分充足時菌體呈長桿狀，養分耗盡時則轉而形成内生孢子，這都是 *Bacillus* 屬細菌具有的基本特性。

很多土壤微生物能產生抗生素，臨床上有用的抗生素主要是從四群土壤微生物分離而來，即屬於放射線菌的 *Streptomyces*，屬於真細菌的 *Bacillus*，以及屬於真菌的 *Penicillium* 和 *Cephalosporium* (Cappuccino and Sherman, 1996)。它們所產生的各種抗生素，就能抑制的對象而言，有廣效性的，也有較專一性的，視不同的抗生素而定。在本研究測試的不同微生物中，*B. cockroach* 對革蘭氏陽性細菌有較強的抑制作用，對革蘭氏陰性細菌的抑制作用較弱，而對單細胞真菌與絲狀真菌則沒有抑制作用。由於革蘭氏陽性細菌和革蘭氏陰性細菌細胞構造主要的差別

就在細胞壁。雖然革蘭氏陰性細菌細胞壁中的肽聚醣層遠較革蘭氏陽性細菌的肽聚醣層薄，但是它的細胞壁在肽聚醣層外面多了一層革蘭氏陽性細菌所沒有的外膜，會對抗生素的進入有阻礙的作用 (Willey, et al., 2011)。另外真菌為真核生物，生理生化機制不同於細菌，對不同抗生素的反應也就不同。至於 *B. cockroach* 對它們造成差別抑制作用的真正原因尚待進一步探討。

抗生素一般被認為是次級代謝產物，是微生物生長進入靜止期之後才產生；有一些抗生素則是在微生物生長的指數期產生；也有一些抗生素可能是在指數期開始產生，但是一直要累積到靜止期的某一時段到達一定的濃度之後才能表現出(被偵測出)明顯的活性。*B. cockroach* 用 LB broth 培養，要到第 23 小時離心過濾菌液才會顯現抑菌活性，到第 28 小時活性達到最高峰，然後逐漸下降，至第 40 小時完全消失。微生物合成抗生素必定需要用到許多資源，LB medium 雖然是屬於相當豐盛的培養基，但經過 *B. cockroach* 長達 20 多小時的生長消耗，養分必定所剩無幾，以致限制抗生素的產生量。因此假定若在抑菌活性出現的時間之前添加 LB broth，可能有助於抗生素的合成。果然在培養到第 20 小時於培養瓶添加 20 ml LB broth 之後，雖然離心過濾菌液出現抑菌活性高峰的時間大致不變，但抑菌活性明顯增強，抑菌活性消失的時間也較不添加 LB broth 的對照組要延後許多。

要測試 *B. cockroach* 培養菌液對金黃色葡萄球菌的抑菌活性，除了不同的受測菌株敏感性不同之外，測試的方法和測得的抑菌活性之間也有密切的關係。以在培養至第 28 小時收取並製備而得具有最高抑菌活性的離心過濾菌液為例，同樣取 20 μ l 菌液，以點加法 (spot test) 測得的抑制區直徑均較以濾紙片擴散法測得的抑制區直徑大，也可在較高的稀釋倍數測得抑制區(圖十三、圖十四、表六、表七)。這個結果顯示可能是部分抗生素吸附在濾紙片上，以致降低了擴散出來的濃度。

雖然將具有最高抑菌活性的離心過濾菌液在 100°C 加熱 10 分鐘仍能保有和原菌液一樣的抑菌活性，以滅菌釜處理 5 分鐘 (整個滅菌過程超過 1 小時) 也仍保有 70% 以上的活性，顯示 *B. cockroach* 產生的抗生素有相當好的耐熱性；此外，離心過濾菌液以 proteinase K 處理 1 小時之後也還保有和原菌液一樣的活性，但是這樣的結果仍不足以說明 *B. cockroach* 產生的抗生素不是 oligopeptide 或 polypeptide 的屬性。相反的，此抗生素可能是屬於 oligopeptide 或 polypeptide 類，但因為它在

合成的過程環化或經過修飾，或可能含有一般蛋白質所沒有的 D-form amino acids 等，以致增強它的耐熱性並且不會被 proteinase K 分解。至於此抗生素是什麼化合物，必須進一步將其純化之後做化學分析才能知道。

抗生素對微生物的抑制作用可分為殺菌 (cidal) 和靜菌 (static) 兩種方式，前者是能將目標菌殺死，後者則只是限制目標菌的生長而不造成死亡，一旦移除抗生素，目標菌則可恢復生長 (Willey, et al., 2011)。本研究無論是將 *S. aureus* 和 LB broth 以及具有最高抑菌活性的離心過濾菌液混合，或者是以無菌水取代 LB broth 來和 *S. aureus* 以及離心過濾菌液混合，在 37°C 下培養 3.5 小時之後洗去離心過濾菌液，然後再將菌展佈在 LA 平板上，結果兩組的 *S. aureus* 都無法在 LA 平板上長出。這個結果不只顯示 *B. cockroach* 產生的抗生素會將 *S. aureus* 殺死，而不是限制它的生長，而且它的作用不只是對生長中的細胞，對不是生長中的細胞也有同樣的效益。

多重抗藥性的病原微生物，特別是多重抗藥性金黃色葡萄球菌 (MRSA) 一直被列在公共衛生最頭痛的細菌名單中。原本萬古黴素 (vancomycin) 被認為是對付抗藥性金黃色葡萄球菌的最後防線，但是現在能抗萬古黴素的金黃色葡萄球菌案例也已經出現了，全世界更是急需新的抗生素與治療的辦法來對付 MRSA 的感染。*B. cockroach* 能抑制在本研究受測的全部 37 株能兼抗褐黴素的 MRSA 醫院臨床分離株，意義重大，它產生的抗生素值得進一步深入探討。

伍、結論與應用

- 一、從蟑螂消化道分離得到的 *Bacillus cockroach* 能明顯地抑制革蘭氏陽性細菌，尤其是 *Staphylococcus* 屬細菌的生長，對革蘭氏陰性細菌的抑制作用較弱，對受測的真菌則無抑制現象。
- 二、*B. cockroach* 能明顯抑制 37 株也能抗褐黴素的多重抗藥性金黃色葡萄球菌醫院臨床分離株，在開發新抗生素的潛力上值得注意。
- 三、*B. cockroach* 產生的抗生素為水溶性的，以 LB broth 培養時，抑菌活性出現的時間在第 23 小時至第 40 小時之間，以第 28 小時為活性的最高峰。在第 20 小時添加 LB broth，不會改變抑菌活性高峰出現的時間，但能增強抑菌活性並延後抑菌活性終止出現的時間。
- 四、將具有最高抑菌活性的離心過濾菌液，稀釋 50 倍仍有微弱抑制效果。
- 五、*B. cockroach* 產生的抗生素有極佳的熱穩定性，proteinase K 不會破壞它的抑菌活性，但此抗生素是否不屬於 polypeptide 或 oligopeptide 類，仍須進一步分析。
- 六、*B. cockroach* 產生的抗生素對 *S. aureus* 的作用應是殺菌，而不是限制生長而已。

陸、參考資料

- 朱耀沂，螳螂博物學，第一版，台北市，天下遠見出版股份有限公司，P.71，2011。
- Ammons, D., J. Rampersad, and A. Khan. 2002. Usefulness of staining parasporal bodies when screening for *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 79: 203-204. 2002.
- Cappuccino, J.G. and N. Sherman. 1996. Isolation of antibiotic-producing microorganisms and determination of antimicrobial spectrum of isolates. *In Microbiology: A laboratory manual*. 4th ed. New York, The Benjamin/Cummings Company, Inc. p. 329-331. 1996.
- Daffonchio, D., N. Raddadi, M. Merabishvili, A. Cherif, L. Carmagnola, L. Brusetti, A. Rizzi, N. Chanishvili, P. Visca, R. Sharp, and S. Borin. 2006. Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1295-1301. 2006.
- Gullan, P. J. and P. S. Cranston, *The insects : An outline of entomology*. 1st ed. London, Chapman & Hall. P. 84-85. 1995.
- Wiley, J.M., L.M. Sherwood, C.J. Woolverton. *Prescott's Microbiology*. 8 th ed. McGraw-Hill Companies, Inc. 2011.

附件一、37株抗褐黴素之多重抗藥性金黃色葡萄球菌醫院臨床分離株對各類抗生素感受性

菌株	TEI	LIN	VAN	QUI	NIT	RIF	SXT	OXA	TET	GM	CIP	CLI
1	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
2	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
3	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
4	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
5	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
6	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
7	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
8	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
9	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
10	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
11	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
12	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
13	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
14	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
15	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
16	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
17	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
18	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
19	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
20	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
21	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
22	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
23	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
24	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
25	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
26	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
27	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
28	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
29	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
30	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
31	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
32	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
33	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
34	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
35	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
36	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
37	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R

TEI : teicoplanin , LIN : lincomycin , VAN : vancomycin , QUI : quinolone , NIT : nitrofurantoin , SXT : sulfamethoxazole and trimethoprim , CIP : ciprofloxacin , OXA : oxacillin , TET : tetracycline , GS : gentamycin , GM : gelimycin , CLI : clindamycin

附件二、*B. cockroach* 16S rDNA 核苷酸序列

```
.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70
TACTCTATAGGGCGAGCTCGGTACCCGGGCGAATTCCAAGC TTGCCACGAGCCGCGGTAATACGTAGGTG

.....80.....90.....100.....110.....120.....130.....140
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC

.....150.....160.....170.....180.....190.....200.....210
ACGGCTCAACCCTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAAGAGGAAAGTGGAAATTCATG

.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280
TG TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAAACCCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTGA

.....290.....300.....310.....320.....330.....340.....350
CACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG

.....360.....370.....380.....390.....400.....410.....420
TGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTA

.....430.....440.....450.....460.....470.....480.....490
CGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC

.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560
GAAGCAACGCGAAGAACC TTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCG

.....570.....580.....590.....600.....610.....620.....630
GGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGT CAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCTTGCAA

.....640.....650.....660.....670.....680.....690.....700
CGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACCTCTAAGGTGACTGCCGTGAACAAACC

.....710.....720.....730.....740.....750.....760.....770
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGA

.....780.....790.....800.....810.....820.....830.....840
CGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGG

.....850.....860.....870.....880.....890.....900.....910
CTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC

.....920.....930.....940.....950.....960.....970.....980
CGGGCCTTGTAcACACCGCCC GTAGATCTGGATCCCCCTTAGAGTCGACCTGCAgGCATGCAAGCTTGGC

.....990.....1000.....1010.....1020.....1030.....1040.....1050
GTAATCATGGTTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTTATCCGCTCACAAATTCACACAACA tACG
```

評語

1. 利用美洲蜚蠊消化道分離之細菌測試對其他微生物之抑制作用有獨特性。
2. 發現對多種菌種有抑制效果，實驗結果明顯。
3. 科展安全規則規定不宜以有害微生物之危險性生物進行，因此不宜以臨床分離菌株進行實驗。