

第十一屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA11-353

作品名稱：Super star!發現剋制 MRSA
超級細菌的抗生素

姓名：廖至騏

關鍵字：蟑螂、抗生素、金黃色葡萄球菌

目 錄

中文摘要	2
英文摘要	4
壹、前言	5
貳、研究方法和過程	6
參、研究結果	11
肆、討論與應用	22
伍、結論	24
陸、參考資料	25
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	
附件二 BacillusX 16S rDNA 核苷酸序列	

Super star!

剋制 MRSA 超級細菌的抗生素

摘要

抗生素的定義是「一種微生物所產生的物質可以抑制別種微生物的生長」。依據此定義，微生物為了競爭養分和生存空間，會分泌抑制其它微生物生長的物質，這些物質統稱為抗生素。台灣地區抗生素的濫用與不正確使用的結果，造成多重抗藥性病原微生物的出現，使我們需要尋找更好的抗生素或其它治療方法以克制這些具有抗藥性的微生物。

從電視上的廣告詞「腸道有好菌，就不怕壞菌」，聯想到蟑螂生活與覓食在排水溝中，腸道中可能會有特殊的細菌，因此便從美洲蜚蠊的消化道中，分離出一株 *Bacillus* 屬細菌，暫稱之為 BacillusX (圖 A)。

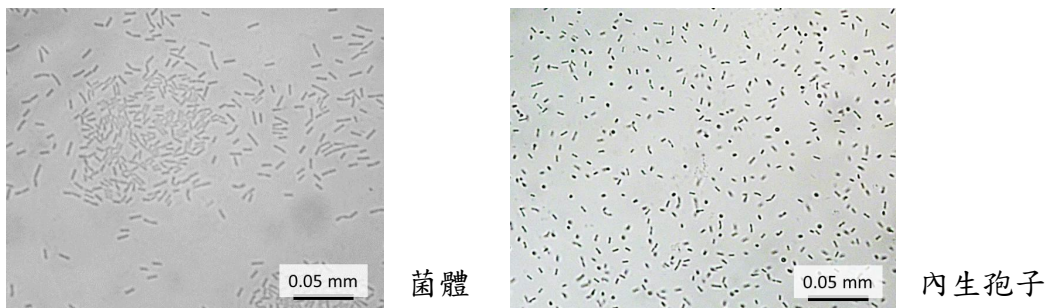


圖 A、以明視野光學顯微鏡觀察 BacillusX 菌體及其產生的内生孢子 (400X)

經由實驗操作中它能對許多細菌產生抑制生長的作用，證明它能產生抗生素。這種抗生素對革蘭氏陽性細菌有較強的抑制作用，對 *Staphylococcus* 屬細菌的抑制尤其明顯，甚至能夠抑制多重抗藥性金黃色葡萄球菌的臨床分離株 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) (圖 B)。

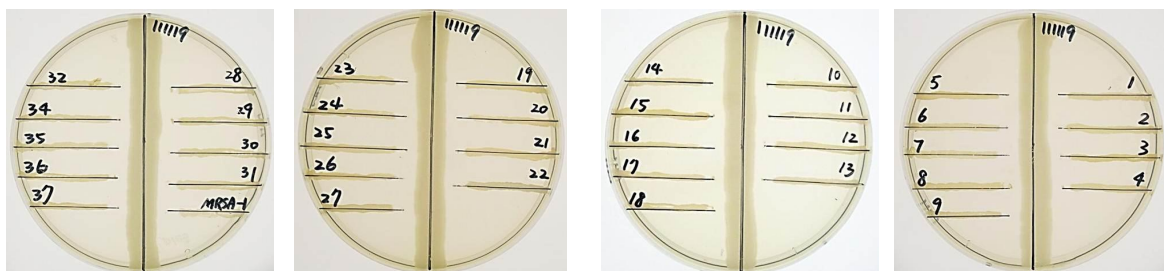


圖 B、BacillusX 對 37 株 MRSA 的生長抑制測試。

產生抗生素的時間方面，BacillusX 以 Luria-Bertani (LB) 培養基培養 3.5 小時後進入靜止期，於第 23 小時開始產生抗生素，28 小時抑菌活性達到最高

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 LB，抗生素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。增加 LB 培養基即可提升抗菌的效用和時效（圖 C）。



圖 C、以點加法測試培養 BacillusX 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(未加 LB)，右邊為實驗組(添加 LB)。

抗生素的熱穩定性及濃度效用方面，若將具有最高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，改以滅菌釜加熱 5 分鐘則仍可保有 70% 以上的活性，證明抗生素具有相當的熱穩定性（圖 D）。將菌液稀釋 50 倍之後，濾紙片擴散法可能因濾紙吸附抗生素而抑菌效果不明顯，但在點加法實驗中，仍然有明顯可見的抑菌作用，顯示此抗生素在低濃度即可發揮效用（圖 E）。

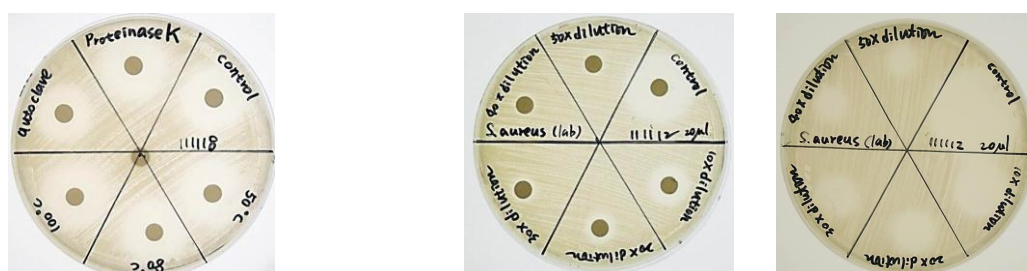


圖 D、濾紙片擴散法測試不同溫度對離心過濾菌液抑菌活性的影響。

圖 E、以 *S. aureus* 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。

抗生素的作用方面，以離心過濾菌液處理 *S. aureus* 的實驗結果顯示 BacillusX 產生的抗生物質能有效殺死 *S. aureus*，移除抗生素後，細菌不能恢復生長可有效達成滅菌的目的。所以此抗生素具有容易生產培養、少量效用佳、受熱穩定性高、滅菌效果好、能有效抑制 MRSA，這些都顯示它極可能是未來醫藥界的明日之星！

關鍵詞：蟑螂、抗生素、金黃色葡萄球菌

**Super star! A antibiotic suppressing to the
methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)
is discovered**

Abstract

A bacterium, temporarily named “BacillusX ” was isolated from the digestive tract of the American cockroach. It can produce antibiotics which have stronger inhibition on gram-positive bacteria. The antibiotics inhibition to staphylococci were is especially obvious when it comes to curbing the growth of thirty-seven clinical isolates of fusidic acid- and methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). When BacillusX is grown in 100 ml of Luria-Bertani (LB) broth, its growth enters the stationary phase after 3.5 hours. BacillusX starts to produce the antibiotics while being cultivated for 23 hours, and the highest inhibition to *S. aureus* appears 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 is added to the 20th hour culture, the highest inhibition appears at the same time as those without additional LB broth. But with added LB broth the inhibition extends to the 48th hour. After autoclaving the active filtered culture fluid for 5 minutes, the antibiotics remain effective. When the filtered culture fluid with the highest inhibition is diluted into 50 folds, the inhibition still remains. Experimental results also show that the antibiotics produced by BacillusX could kill *S. aureus* instead of suppressing its growth.

Key words : 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。抗生素的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、抑制代謝反應等，也因此，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，因此需要尋找更好的抗生素或其它治療方法才能有效控制不斷產生的病原。

一、研究動機

「腸道有好菌，就不怕壞菌」，蟑螂，生活在陰暗潮濕又衛生不良的環境中，免不了吃下各種有害細菌，如果是人類置身相同環境，早就因腹瀉而送醫，甚至因此而送命了，但蟑螂仍能健康生長，這引起了我的好奇：為何蟑螂置身髒亂環境仍能維持健康？猜測這或許跟蟑螂消化道中的細菌能抑制其他有害細菌（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：

- (一)、蟑螂消化道中是否存在有能抑制其他微生物生長的細菌
- (二)、探討它對什麼類別的細菌有較強的抑制作用
- (三)、探討此菌的生長與抗生素的產生時間
- (四)、探討此菌所產生抗生素的基本特性

貳、研究方法和過程

一、實驗器材

(一)、實驗動物：美洲蜚蠊 (*Periplaneta americana*)

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「環蚊蜚蠊」。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）。本實驗即是取美洲蜚蠊的消化道做為實驗的材料。

(二) 試驗細菌菌種：

Bacillus amyloliquefaciens (實驗室的菌種)

Bacillus cereus (實驗室的菌種)

Bacillus subtilis (實驗室的菌種)

BacillusX (本研究從蟑螂消化道分離得到的菌株)

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 marcescens (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)

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)

(三)、培養基：

1. Luria-Bertani (LB) broth

每公升水中含 tryptone 10 g， yeast extract 5 g， NaCl 5 g， pH 7.0。

2. LB agar (LA)

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 300 g、casamino acid 17.5 g、starch 1.5 g、agar 17 g， pH 7.3。

(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 (KUBOTA, KM-15200)、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°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 eppendorf 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，以玻璃珠均勻塗菌。再將三個平板送入 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區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，找到後用接種環挑取此菌落，以四區畫線法來得到純菌，並以實驗菌稱之。

(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。產生抗生素的實驗菌用 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)、產生抗生素實驗菌的抗菌菌譜測試

1. 畫線法

- (1) 用接種環挑取實驗菌的一個菌落畫於 LA 平板的中線，畫好後將平板放入 37°C 生長箱先培養 1 天。
- (2) 在實驗菌的一邊，分別將欲測試的菌種從靠近但不接觸實驗菌的一點開始，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。測試的菌種包括 6 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) 用接種環挑取實驗菌的一個菌落，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。

(四)、產生抗生素實驗菌的生長測定

1. 挑取實驗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. 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

離心過濾菌液，抑菌活性的測試方法可分為兩種：

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) 挑取一個菌落的 *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，震盪混合之後迅速均勻倒入 LA 平板中。
- (3) 待培養基固化後，將稀釋過的實驗菌高活性離心過濾菌液個別取 20 μ l 分兩次 (各 10 μ l) 加至平板中央，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，將稀釋過的實驗菌高活性離心過濾菌液個別吸取 20 μ l 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。

3、測定抗生素產生的時間與添加培養液的影響

- (1) 挑取實驗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) 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離心 (12000 rpm) 5 分鐘，上清液再以注射針筒型無菌過濾器 (0.22 μ m) 過濾，濾液即可以點加法，用來進行抗生素活性的測試。
- (4) 在抑菌活性高峰出現前添加 LB，觀察對抗生素的產生量有何影響。

(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 μ l 具有實驗菌最高抑菌活性的離心過濾菌液，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) 加熱 5 分鐘處理 (實際的加熱時間超過 1 小時)，取處理過的菌液以濾紙片擴散法，進行對 *S. aureus* 的抑菌活性測試。

(七)、實驗菌離心過濾菌液不同稀釋濃度之抑菌活性測試

取最高抑菌活性的實驗菌離心過濾菌液，稀釋成 10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍之後，以濾紙片擴散法及點加法，分別測試抑菌活性。

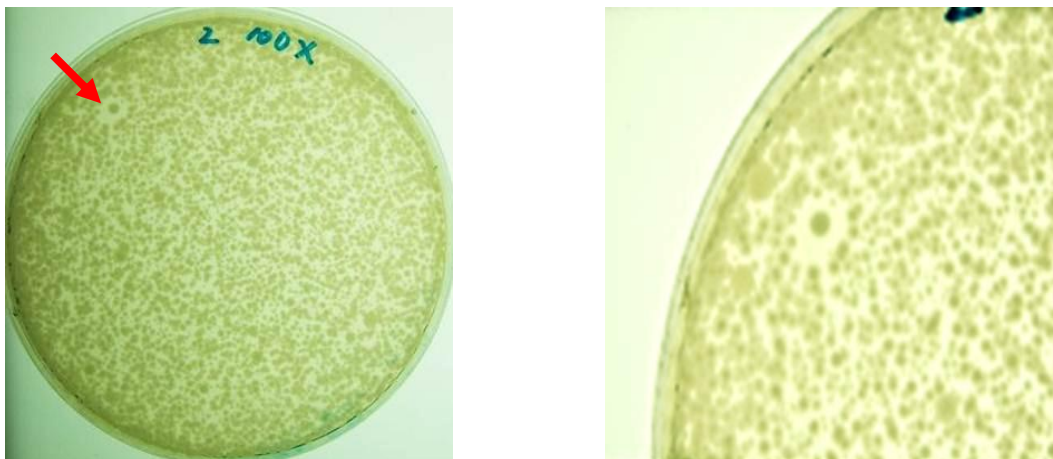
(八)、抗生素之殺菌或靜菌測試

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 有實驗菌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} ~ 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

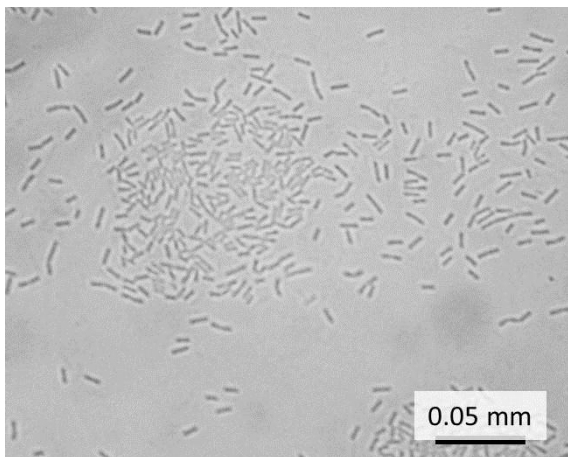
將蟑螂的消化道搗碎，用無菌水稀釋不同倍數，再展佈在 LA 平板上之後，在稀釋 100X 的 LA 平板上發現有一個菌落，它的周圍出現沒有其他菌落生長的空白區域（圖一），推測可能是這個菌落的細菌產生了某種抗生素抑制其他細菌生長而造成的結果。用接種環挑出這個菌落，並以畫線法使它在 LA 平板上長成代表純系的單菌落（圖二）。以明視野光學顯微鏡放大 400 倍觀察，這株菌的細胞呈長桿狀，大小約為 $9.2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ ；若培養時間較長，菌體變短，會產生內生孢子（圖三）。將這株菌用 16S rDNA 定序法鑑定，發現它的 16S rDNA 的核苷酸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



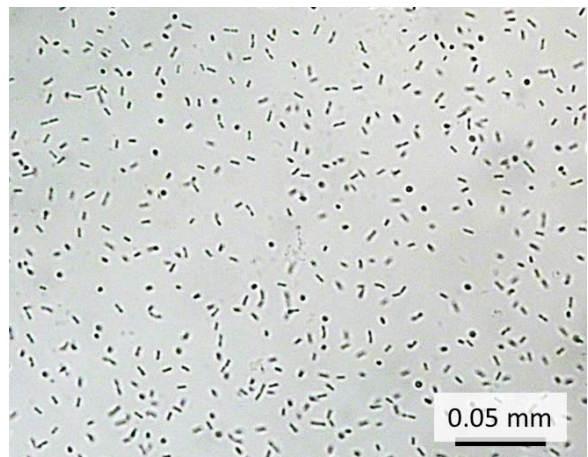
圖一、疑似能產生抗生素以抑制周圍細菌生長的菌落（箭頭處），右圖為局部放大。



圖二、疑似抗生素產生菌在 LA 平板上長出的單菌落。



BacillusX 菌體(培養 2 小時)

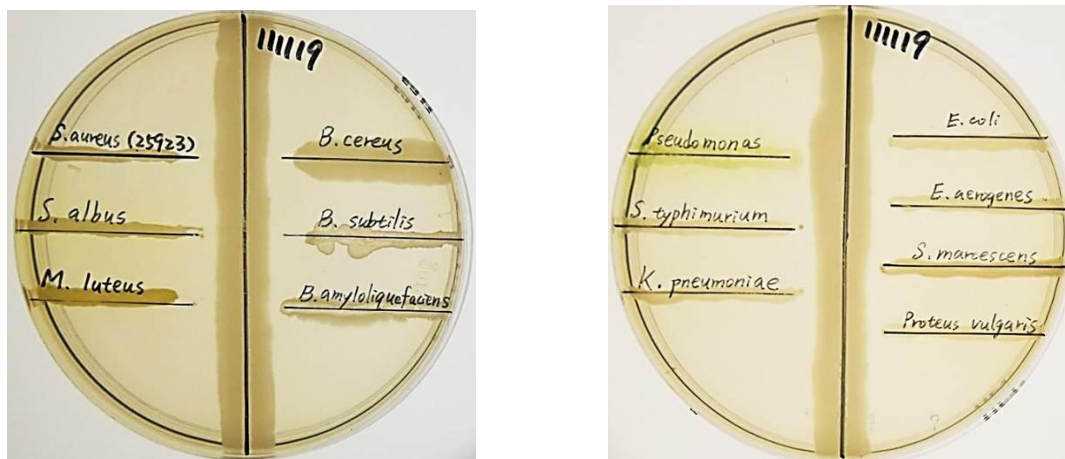


BacillusX 內生孢子(培養 27 小時)

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

二、BacillusX 對不同細菌的生長抑制測試

以畫線法測試 BacillusX 對 6 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 BacillusX 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（圖四，表一）。以覆蓋法進行生長抑制測試的結果（圖五）和畫線法的結果相同，但更能顯示出抑制作用強弱的差別。



圖四、BacillusX 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 BacillusX 對不同革蘭氏陰性細菌及革蘭氏陽性細菌之生長抑制

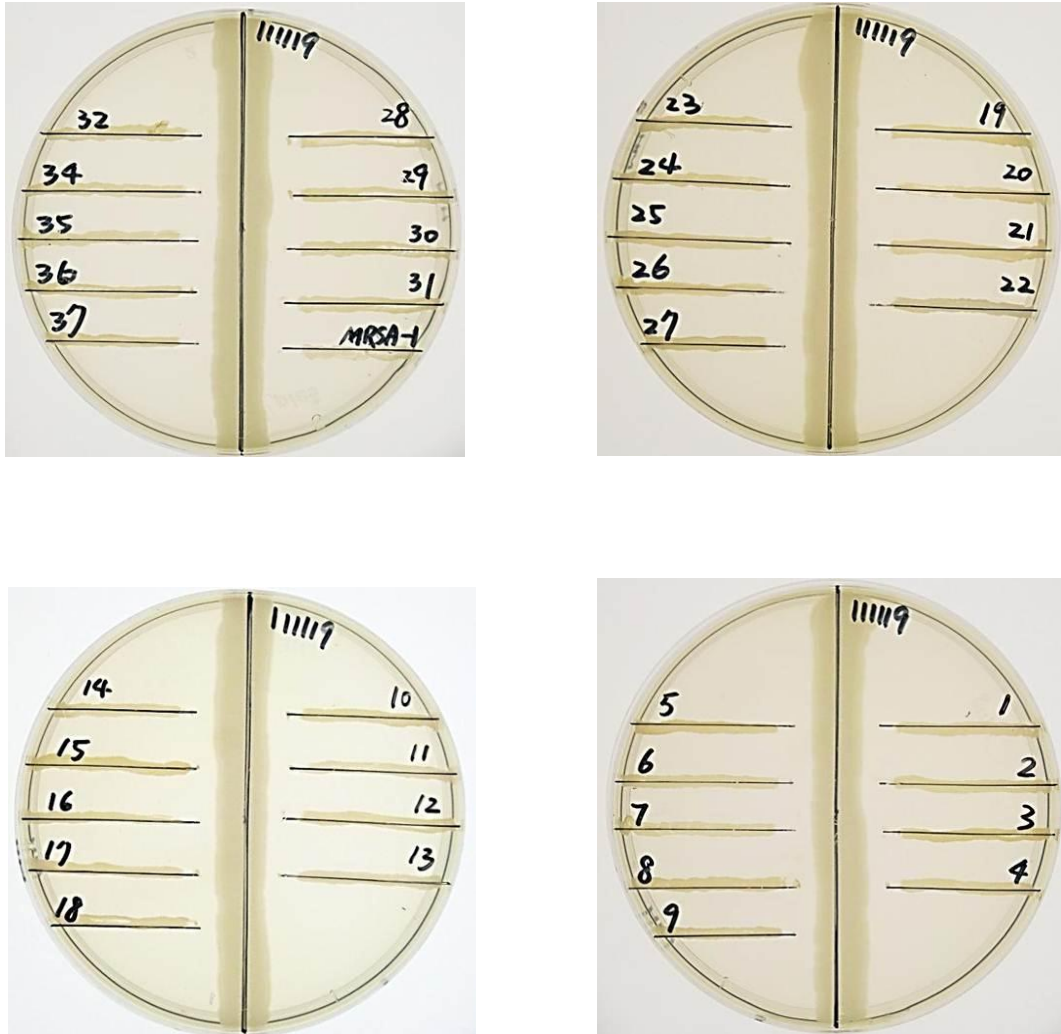
革蘭氏陽性細菌	抑制區寬度 (mm)	革蘭氏陰性細菌	抑制區寬度 (mm)
<i>B. cereus</i>	5.0	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1.0
<i>B. subtilis</i>	7.5	<i>S. typhimurium</i>	4.0
<i>B. amyloliquefaciens</i>	2.0	<i>K. pneumoniae</i>	3.0
<i>M. luteus</i>	8.0	<i>E. coli</i>	3.0
<i>S. albus</i>	6.0	<i>E. aerogenes</i>	2.0
<i>S. aureus</i>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



圖五、以覆蓋法進行 BacillusX 對革蘭氏陽性細菌及革蘭氏陰性細菌生長抑制測試的部分結果。由左至右上排(革蘭氏陽性細菌)依次是：*M. luteus*、*B. cereus*、*S. aureus* ATCC 25923、*B. subtilis*。下排(革蘭氏陰性細菌)依次是 *E. coli*、*E. aerogenes*、*K. pneumoniae*、*S. typhimurium*。

三、BacillusX 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 BacillusX 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 (圖六, 表二)。覆蓋法也顯示對多重抗藥性金黃色葡萄球菌臨床分離株生長有抑制效果(圖七)。



圖六、BacillusX 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。

表二、以畫線法測試 BacillusX 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

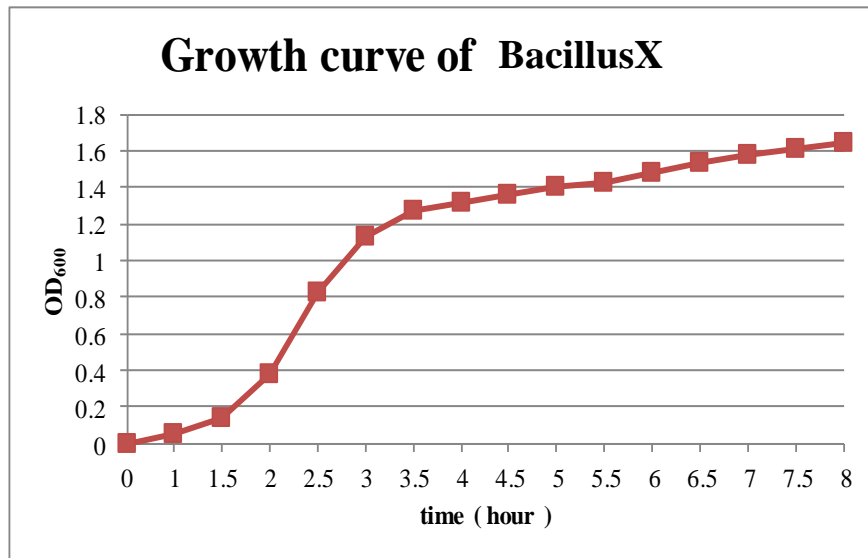
菌株	抑制區 (mm)	菌株	抑制區 (mm)	菌株	抑制區 (mm)
1	6.0	14	6.0	27	7.0
2	6.0	15	5.0	28	5.0
3	6.0	16	8.0	29	5.0
4	5.0	17	6.0	30	6.0
5	6.0	18	5.0	31	6.0
6	6.0	19	6.0	32	7.0
7	6.0	20	8.0	33	7.5
8	6.0	21	5.0	34	7.0
9	6.0	22	7.0	35	7.0
10	6.5	23	7.0	36	6.0
11	7.5	24	7.0	37	6.0
12	6.0	25	7.0		
13	6.0	26	7.0		



圖七、以覆蓋法進行 BacillusX 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。

四、BacillusX 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(圖八)。從圖中可知 BacillusX 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。

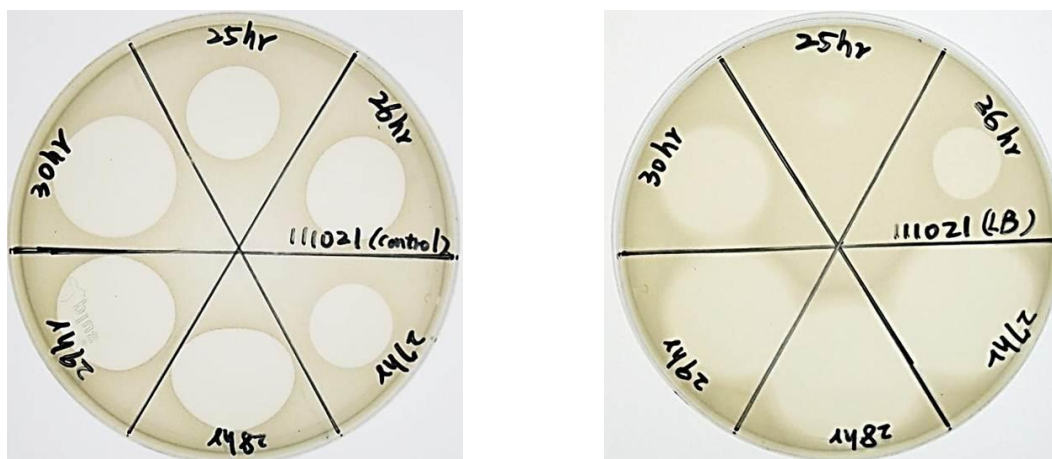


圖八、 BacillusX 的生長曲線。

五、BacillusX 產生抗生素時間與產生量調控的測定

在測定 BacillusX 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 BacillusX 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 28 mm，而對照組的抑制區直徑則為 23 mm (圖九，表三)



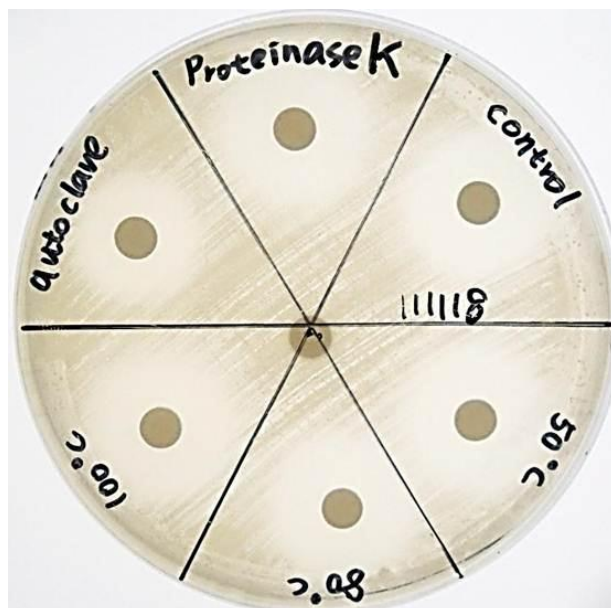
圖九、以點加法測試培養 BacillusX 至第 20 小時添加 LB 與否對離心過濾菌液抑菌活性的影響。左邊為對照組(未添加 LB)，右邊為實驗組(於第 20 小時添加 20 ml LB)。

表三、培養 BacillusX 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 20 ml 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

六、 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，表四)，由此可知 BacillusX 產生的抗生物質具有相當高的熱穩定性。



圖十、 濾紙片擴散法測試不同溫度對離心過濾菌液抑菌活性的影響。

表四、離心過濾菌液經不同溫度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

七、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* 實驗室菌株的抑菌活性，測試的結果如下（圖十一、表五）。



圖十一、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。

表五、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	點加法
		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

八、抗生物質之殺菌或靜菌測試

為瞭解 BacillusX 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°C 培養 3.5 小時，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，在加入 LB 培養 3.5 小時後，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的 *S. aureus* 菌液約為 2.36×10^{10} cells/ml。根據以上的結果，可以推斷 BacillusX 產生的抗生素對 *S. aureus* 的作用是殺菌而不是靜菌。

肆、討論與應用

- 一、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，蟑螂消化道內很可能有常住的或隨食物進入的某些微生物能頑抗它們，為蟑螂提供保護。
- 二、分離可能存在於蟑螂消化道內的保護菌的方法是採用抗生素教父的 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。在實驗中發現到蟑螂消化道內真的存在抗菌的微生物，經由試驗分離得到本研究的主角。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，因此將此菌暫時命名為 BacillusX，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內生孢子，這都是 *Bacillus* 屬細菌具有的基本特性。
- 三、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，有廣效性的，也有較專一性的。在本研究測試的不同微生物中，BacillusX 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。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)，這可能就是 BacillusX 對它們造成差別抑制作用的原因。
- 四、抗生素一般被認為是次級代謝產物，產生的時間不同，可能是在微生物生長的指數期產生，或是生長進入靜止期之後才產生，但是要累積達到一定的濃度之後才能表現出明顯的活性。BacillusX 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。微生物合成抗生素需要用到許多資源，LB medium 經過 BacillusX 長達 20 多小時的生長消耗，養分已經所剩無幾，以致限制抗生素的產生量。而若在第 20 小時添加 20 ml LB broth，有助於抗生素的合成。因此添加後，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，所以只需添加 LB broth 就可增加抗生素產生的量。

五、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；若改以滅菌釜處理 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 BacillusX 產生的抗生素有相當好的耐熱性，而此耐熱的穩定性在未來生產有治療效果的抗生素上是相當有利的。

六、測試 BacillusX 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。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。但不論是點加法或濾紙片擴散法都顯現出，雖然稀釋達 30 倍的濃度但都能顯現優良的抑菌效果，點加法更於稀釋達 50 倍時，還能顯現出抑菌效果，可見在低濃度下便可產生抗菌的作用。

七、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）。本研究顯示對於 *S. aureus*，無論是生長中的細胞或是非生長中的細胞，只要混合過實驗菌具有最高抑菌活性的離心過濾菌液，兩組的 *S. aureus* 都無法在 LA 平板上長出。顯示 BacillusX 產生的抗生素會將 *S. aureus* 殺死，而不是限制它的生長，證明此抗生素具良好的殺菌效果。

八、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。BacillusX 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，在本研究中的抗生素若能進一步進行醫學上的試驗與研究，這將是台灣未來醫藥上的明日之星，更可能是創造醫藥革命的另一個超級巨星（Super star）。

伍、結論

- 一、從蟑螂消化道分離得到能分泌抗生素的細菌，以 16S rDNA 定序分析法鑑定為 *Bacillus* 屬的細菌，暫名為 BacillusX，它能明顯地抑制革蘭氏陽性細菌，尤其是 *Staphylococcus* 屬細菌的生長。
- 二、BacillusX 的 generation time 約為 30 分鐘，培養 3.5 小時進入靜止期，但到培養 8 小時為止，生長仍一直呈現微幅的增加，此細菌具有容易培養的特點。
- 三、BacillusX 產生水溶性的抗生素，若在第 20 小時添加 LB broth，抑菌活性高峰(第 28 小時)出現的時間相同，但抑菌活性增強並能延長有效抑菌時間，它具有易於短時間內生產，而且容易增加抗生素產量的特性。
- 四、BacillusX 的離心過濾菌液在 100°C 加熱 10 分鐘後抑菌活性不受影響；甚至以滅菌釜處理 5 分鐘活性仍保有 70% 以上，顯示 BacillusX 產生的抗生素有相當好的耐熱穩定性，在醫藥的生產與保存上是相當方便的。
- 五、將 BacillusX 具有最高抑菌活性的離心過濾菌液，稀釋 50 倍後仍有抑制效果，若未來使用於醫療上，可於低濃度顯現效果，減少藥害並保有藥效。
- 六、BacillusX 產生的抗生素對 *S. aureus* 的作用是殺菌，而不是限制生長而已，使用在醫療上能將細菌殺死而不必擔心在藥物濃度降低後，細菌增生使疾病症狀再度復發，這可有效降低藥物使用量及減少耐藥性的產生。
- 七、BacillusX 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，在聞 MRSA 色變的今日，已成為繼萬古黴素 (vancomycin) 之後的重大研究發現，它又具有那麼多優秀的特點，經過適當的試驗與開發後，相信這個抗生素將成為台灣醫藥上的超級巨星 (Super star)。

陸、參考資料

朱耀沂，蟑螂博物學，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

Willey, 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 : geliomycin , CLI : clindamycin

附件二、 BacillusX 16S rDNA 核苷酸序列

```

      10      20      30      40      50      60      70
TACTCTATAGGGCGAGCTCGGTACCCGGGCGAATTCCAAGCTTGCCACGAGCCGCGGTAAATACGTAGGTG

      80      90     100     110     120     130     140
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC

     150     160     170     180     190     200     210
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATG

     220     230     240     250     260     270     280
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGA

     290     300     310     320     330     340     350
CACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCBTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG

     360     370     380     390     400     410     420
TGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTA

     430     440     450     460     470     480     490
CGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTC

     500     510     520     530     540     550     560
GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC TTGACATCCTCTGACAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCG

     570     580     590     600     610     620     630
GGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCTTGCAA

     640     650     660     670     680     690     700
CGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACCTTAAGGTGACTGCCGTGAACAAACC

     710     720     730     740     750     760     770
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCCTACACACCGTGCTACAATGGA

     780     790     800     810     820     830     840
CGGTACAAAGAGCTGCAAGACC GCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGG

     850     860     870     880     890     900     910
CTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC

     920     930     940     950     960     970     980
CGGGCCTTGTAcACACC GCCCGTAGATCTGGATCCCTCTAGAGTCGACCTGCAgGCATGCAAGCTTGGC

     990     1000    1010    1020    1030    1040    1050
GTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATTCACACAAACAACG

```