

2022年【全國科學探究競賽-這樣教我就懂】

高中(職)組 成果報告表單

題目名稱：令“狐”冲威震江湖

一、摘要：

身體異味的問題一直困擾著許多人的生活，而人葡萄球菌(*Staphylococcus Hominis*)則是造成異味的真正原因。我們本次實驗透過抑菌圈技術及液態培養技術研究並測量了不同中藥材對於抑制人葡萄球菌的效果，發現黃連的抑制效果最好。為了實際應用在現實生活中，可以將黃連進一步製作成膠布的型態使用；同時我們也從人體以及廢水中純化出人葡萄球菌的專一性噬菌體，參考其他資料的製作方式，並希望未來能將其製成噴霧加以使用。

二、探究題目與動機

青少年時期，大家都相當在意自己的儀容外貌，渴望獲得同儕的認同。但身體部位散發出的氣味不僅造成了生活上的不便、影響自信心，在社交上也造成不小的影響。根據資料文獻[1]，身體上的氣味大多都是微生物分解天然的分泌物分解成具有臭味的揮發性氣體。腋下是頂漿腺(apocrine sweat gland)主要分佈的位置之一，頂漿腺以頂漿分泌的方式分泌汗液，又名頂泌汗腺；又因其體積為另一種汗腺，外泌汗腺的10倍左右，故又稱大汗腺。狐臭即是由於頂泌汗腺感染人葡萄球菌(*Staphylococcus Hominis*)而產生特殊臭味。人葡萄球菌存在頂漿腺，透過分解汗液產生硫醇，進而產生氣味。透過此實驗，我們希望能在不使用抗生素前提下最有效抑制狐臭的方法，並透過廢水、身體部位採集樣本，分析純化出(*Staphylococcus Hominis*)的專一噬菌體，解決擁有狐臭的困擾。

三、探究目的與假設

- 一、從廢水、身體部位採樣，培養並純化出*Staphylococcus Hominis*的專一性噬菌體
- 二、比較不同中藥材、噬菌體和市面上抑制狐臭之藥品對於*Staphylococcus Hominis*生長的影響
- 三、濃度變化影響：將不同濃度的菌液(原倍、稀釋十倍)、中藥材(原倍、濃縮十倍、濃縮二十倍)交互組合呈現於培養皿中，觀察並分析哪一組成效最好
- 四、液態培養量化黃連抑制效果：
利用吸光值(OD)測量稀釋過的菌液加入黃連水溶液後實際生長結果，並與加入水、蒲公英水溶液和純菌液作比較

四、探究方法與驗證步驟

一、人葡萄球菌的生長抑制

(一)抑制狐臭藥品

一開始我們希望分析市面上藥品對狐臭的影響，但大部分藥品都只有止汗功能，並沒有抑制細菌生長的效果

(二)中藥材

經閱讀資料文獻[2]，我們決定使用魚腥草、蒲公英、黃連、金銀花這四種有抑菌效果的中藥材進行抑菌圈實驗，

(三)噬菌體

基於噬菌體對細菌具有專一性，且不會對人造成危害，我們希望藉採樣取得此菌種的專一噬菌體



二、中藥材抑菌圈

(一)將15ml中藥材磨碎，加入50ml純水高溫高壓滅菌

(二)在無菌操作台中取出混和物離心、並取出上清液過濾 圖一：滅菌後的中藥水溶液

(三)將四種藥劑利用ependorf分裝成10、100、200 μ l各兩管，將100、200 μ l的藥劑利用乾浴槽把水分蒸乾，再回溶10 μ l的無菌水，製備成10倍、20倍濃縮溶液

(四)將0.75%soft agar 分裝6管5ml

(五)取40 μ l菌液和360 μ l水混合，配置成稀釋10倍的菌液，取其中100 μ l菌液和soft agar混合均勻並倒盤，等待其凝固

(六)在培養皿下蓋用奇異筆分割六等分，分別標註四種中藥材和陽性／陰性對照組

(七)用鑷子取紙錠，輕放在各等分內

(八)取10 μ l藥劑、ampicillin(抗生素)、水分別用pipette滴在紙錠上

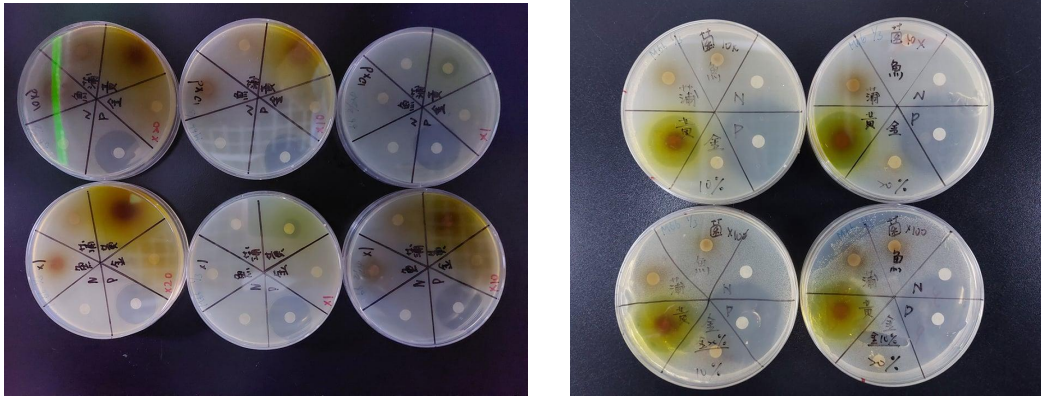
(九)放置培養箱培養並觀察其生長狀況

三、抑菌圈之實驗結果

(一)在三次重複實驗中，抑菌圈效果最明顯為陽性對照組和黃連，有明顯透明、無細菌生長的區域圓

(二)魚腥草、蒲公英、金銀花雖然在傳統觀念中具有抑菌效果，但針對人葡萄球菌似乎沒有抑制其生長

(三)經不同濃度互相組合後發現，中藥材濃縮10倍效果最好，而細菌原倍和稀釋10倍的抑菌效果差異不大。



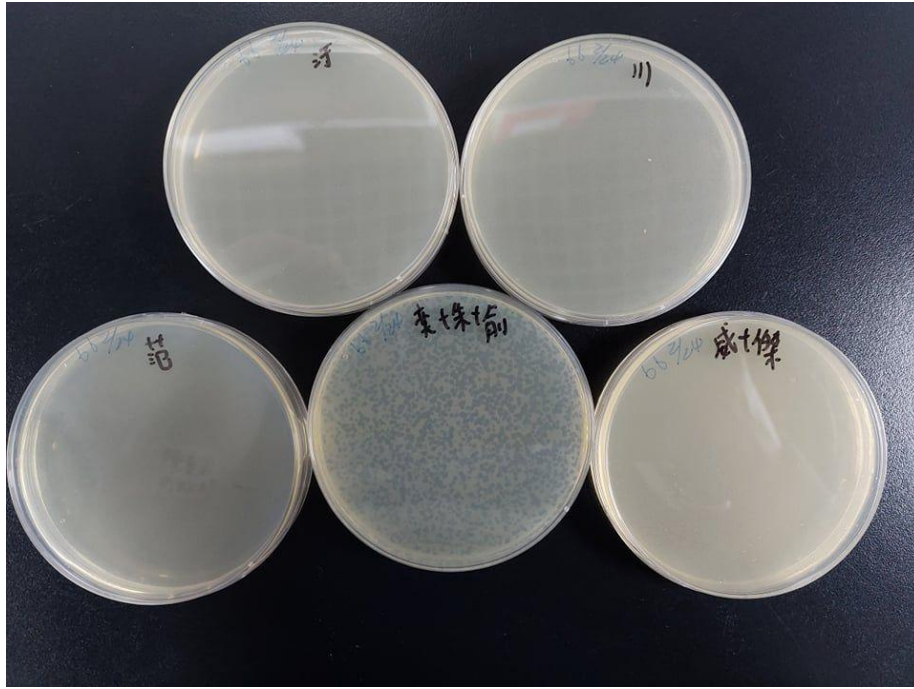
圖二、圖三:不同菌液濃度和中藥材濃度的生長狀況

四、噬菌體採樣、純化

- (一)分別利用離心管從汗水集中處撈取廢水、利用粗棉花棒沾水輕輕刮取身體易流汗部位並將採集的樣本裝進離心管，蒐集不同樣本
- (二)將採集樣本用濾紙過濾，用另一離心管裝
- (三)利用離心機(14200xg, 30min, 4°C)將採集的樣本離心，並將離心後的上清液使0.45μm一次性過濾器過濾
- (四)取新的離心管，分別加入100μl的廢水和100μl的菌液，並放入培養箱4小時，使其混和均勻
- (五)將離心管取出、用離心機(14200xg, 30min, 4°C)將內容物離心，並將離心後的上清液使用0.45μm一次性過濾器過濾
- (六)取離心管中100μl內容物和100μl菌液混和，加入5ml soft agar並倒盤
- (七)放入培養箱培養並觀察其生長狀況

五、噬菌體採樣之結果

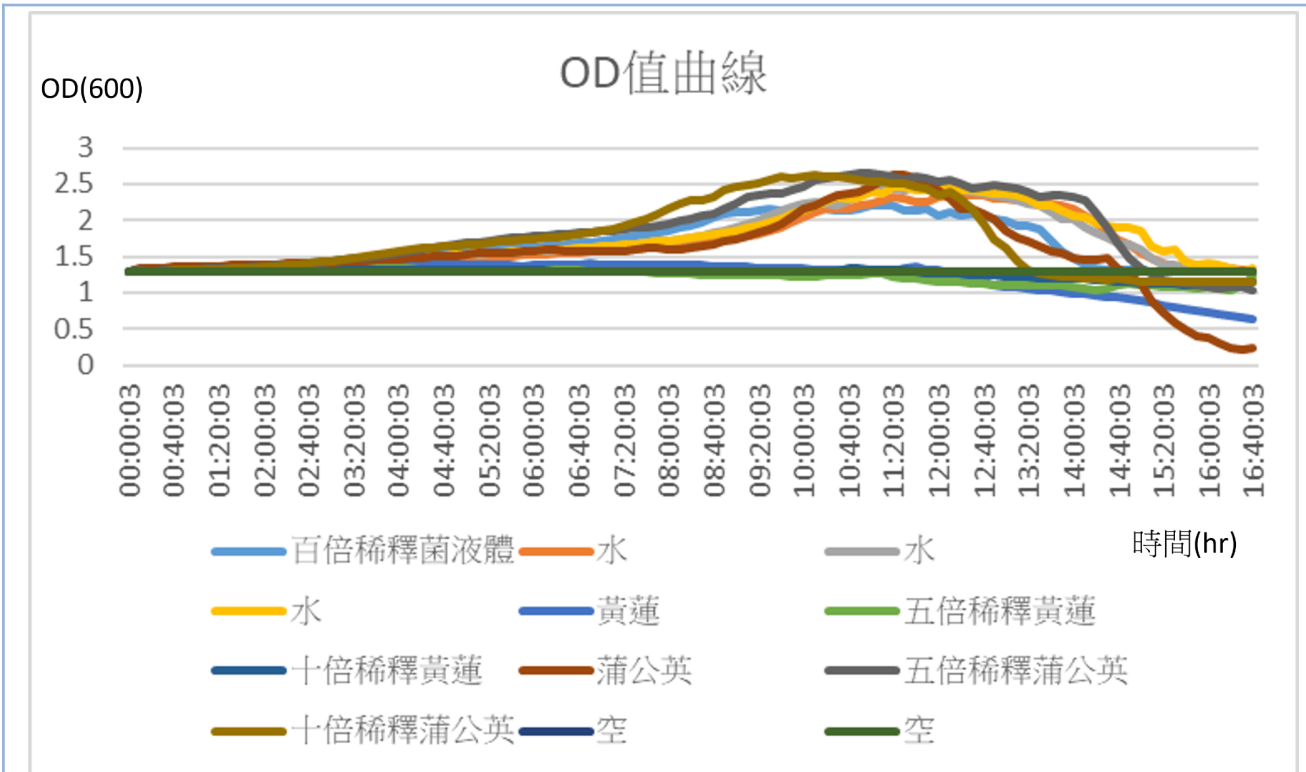
- (一)在此實驗中，我們將樣本分成三大類，分別是廢水、易有汗臭味的人體部位採集，和不易有汗臭味的人體部位採集
- (二)觀察圖四得知，下排中間的培養皿有許多透明小圓環，表示該不易產生汗臭的人體樣本，成功培養出人葡萄球菌的噬菌體



圖四:不同樣本的噬菌體生長情形

六、液態培養量化黃連抑菌效果

- (一)透過抑菌圈實驗得知，黃連對人葡萄球菌有明顯抑制效果，因此我們希望透過測量光密度值(OD)，觀察黃連抑制細菌生長的數據
- (二)在實驗中，我們將待測物分成純菌液、菌液加水、菌液加黃連、菌液加蒲公英，以不同濃度(1:1、1:5、1:10)吸取至96孔盤，觀察隨著時間的變化的數值曲線
- (三)根據圖五，在8小時過後加入其他水溶液的菌液之OD值皆有升高，表示細菌仍在生長；而加入黃連的數值卻幾乎沒有增加，表示黃連確實能抑制人葡萄球菌生長，證實我們原先的假設
- (四)根據圖五，在約11小時開始，OD值都有下降的趨勢，而加入黃連水溶液的數值則較原始值低。經討論後我們推測是因為長時間觀測導致孔盤內液體乾涸，導致機器判讀時數值下降



圖五:水、蒲公英、黃連水溶液和菌液以不同濃度混和得出的細菌濃度生長曲線

五、結論與生活應用

討論:

- (一)在噬菌體採樣實驗中，我們發現人體易流汗部位可能帶有人葡萄球菌的噬菌體；而兩種人體採集樣本中有噬菌體的那組是較不容易有汗臭的樣本，推論汗臭氣味的產生與皮膚上是否含有該種噬菌體有直接相關。
- (二)在實驗中，我們發現前一天養的人葡萄球菌較其他管細菌清澈；在純化噬菌體過程中，我們也發現噬菌體形成肉眼可見的透明圓圈歷時較其他一般大腸桿菌久，推測人葡萄球菌成長速率較慢，需花費更多時間才能達到特定濃度。
- (三)在實驗過程中，我們發現第三次實驗有一培養皿內有汙染，經組員討論分析，我們認為操作上有一些小細節能避免汙染，例如:細菌倒盤時手不要從開蓋的培養皿正上方經過、使用pipette吸取溶液時應將溶液傾斜吸取，避免pipette非一次性使用區域伸入容器內，都能有效提升實驗成功率。
- (四)在抑菌圈實驗中，部分中藥材經濃縮後呈膠狀，用pipette很難吸取。為解決此問題，吸取較濃稠中藥材時，會將pipette吸取的動作放慢，讓溶液能被慢慢抽出；若仍然無效，則使用tip挖取定量膠狀溶液，解決無法抽取中藥材的問題。

生活應用:

在中草藥的部分我們透過實驗得出黃連的效果最好，為了實際解決狐臭的問題，我

們希望未來能將黃連製成貼布的形式作為使用，但有鑑於不少傳統藥膠布都有藥物釋放不良的問題，因此我們希望將黃連製成水膠，水膠是一種親水性的高分子物質，可以吸收大量的水分，也能夠保持接觸水後結構的完整性。因為聚乙烯醇是一種較便宜且無毒的水溶性多羥基聚合物，因此可以透過含有聚乙烯醇和黃連之水溶液加入戊二醛生成交連的網狀聚乙烯醇水膠，隨後在透過輻射照射聚合物，就可以使聚合物分子間藉由化學鍵連，不需添加起始劑，使聚合物之產物更純粹。上層再添加透氣性的伸縮不織布，下層則添加保護膜。

而在噬菌體的部分我們希望將純化過後的phage製作成噴霧以方便使用，由於噬菌體是一種蛋白質結構，而影響蛋白質變性的因素的影響，則有有機溶劑，高溫，pH值，離子強度.....等複雜因素，因此我們打算參考了資料]中的第三種保存方式，將噬菌體在7°C中凍存。

結論：

綜合上述實驗，我們發現黃連能有效抑制人葡萄球菌生長，而其中以濃縮10倍的綜合效果最佳；我們也得知人類身上的易流汗部位可能會擁有天然的人葡萄球菌噬菌體，而噬菌體的有無和是否容易擁有狐臭有直接相關。對於未來進一步的實驗構思，我們想將黃連以水膠的形式做成貼布、將噬菌體以冷凍乾燥方式保存，在確保其活性和抑菌效果下，製成噴霧形式，並比較其成效，幫助那些有狐臭的人不再為此所苦。

參考資料

1. Rudden, M., Herman, R., Rose, M. *et al.* The molecular basis of thioalcohol production in human body odour. *Sci Rep* 10, 12500 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68860-z>
2. 彭顥顥、黃炯菱，狐亂發臭—腋下細菌叢林的秘密，臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯,2015<https://twsf.ntsec.gov.tw/activity/race-2/2015/pdf/070008.pdf>
3. 許維素、宋增福、陳彪，一種嗜菌體保存劑及其制備方法和應用，發明專利申請 <https://patentimages.storage.googleapis.com/1b/b6/1d/7482854496f849/CN106065399A.pdf>