

## 醋酸對十一種 $\gamma$ -變形菌綱的抑菌及殺菌作用探討

呂秋錦<sup>1\*</sup> 呂玉珍<sup>2</sup> 黃弘文<sup>3</sup> 林怡初<sup>4</sup> 曾昭能<sup>5</sup> 莫顯菁<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 國立中山大學海洋科學系

<sup>2</sup> 高雄榮民總醫院急診加護病房

<sup>3</sup> 國立中山大學生物醫學研究所

<sup>4</sup> 私立輔英科技大學生物技術系

<sup>5</sup> 高雄醫學大學天然藥物研究所

(收稿日期: 2014.8.17, 接受日期: 2014.9.8)

### 摘要

很多重要的致病菌都屬於 $\gamma$ -變形菌綱, 本研究探討低濃度醋酸對 $\gamma$ -變形菌綱(gammaproteobacteria)中的海水性細菌之生長抑制及殺菌作用, 針對 *Morganella morganii*, *Pseudomonas* sp., *Pseudoalteromonas* sp., 及 *Vibrio* spp., 等細菌, 在含有 0.125%、0.0625% 及 0.03125% 的醋酸下出現不同的影響作用, 結果顯示, 分離出的 11 株  $\gamma$ -變形菌綱細菌中, *Morganella morganii* 具有較高的醋酸耐受性, 研究中最高醋酸濃度為 0.125%, 在此條件下僅出現些微的抑制作用, 其餘 10 株菌在 0.125% 下皆無法生長。

**關鍵詞:** 醋酸、 $\gamma$ -變形菌綱、16S rRNA 基因、醋

### 緒言

$\gamma$ -變形菌綱(gammaproteobacteria)在醫學、生態及科學上是很重要的一群細菌, 像是腸桿菌科(Enterobacteriaceae)的大腸桿菌(*Escherichia coli*)和摩根氏摩根菌(*Morganella morganii*)等、弧菌科(Vibrionaceae)的創傷弧菌(*Vibrio vulnificus*)等、假單孢菌科(Pseudomonadaceae)的銅綠假單孢菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等, $\gamma$ -變形菌綱皆屬於格蘭氏陰性菌。摩根氏摩根菌通常存在於環境和人類、哺乳類及爬蟲類的腸道中屬於正常菌種(Winslow *et al.*, 1919), 但摩根氏摩根菌亦會引起許多徵狀如:敗血症、膿瘡、眼內炎、絨毛膜羊膜炎、更常見的是, 尿道感染、皮膚和軟組織感染、腦膜炎和化膿性關節炎(Tucci *et al.*, 1981; McDermott *et al.*, 1984); 假單孢菌廣泛存在於水及土壤中(Palleroni, 2010), 由於其溶血活性, 使得非致病性的假單孢菌偶爾也會成為臨床上的問題, 如藉由輸血時產生的感染(Khabbaz *et al.*, 1984); 弧菌感染屬於公共衛生的問題, 弧菌分布於海洋、河口及淡水環境, 弧菌會引起魚類、貝類、哺乳類及人類等的感染, 從 1980 年至今發現弧菌屬內致病的種數已從 21 增加至超過 100

種(Mercogliano *et al.*, 2012)。大部分致病菌起因皆與腸道相關, 但也常感染開放性的傷口及引起敗血症。臨床研究報告文獻指出, 醋酸應用於感染具抗藥性的假單孢菌屬之傷口的治療(Williams *et al.*, 1993), 用作殺菌的醋酸濃度範圍在 0.5% 到 5% (Sloss *et al.*, 1993)。

在細菌鑑種規則中, 根據 Stackebrandt 博士在 2006 年的報告中指出, 16S rRNA 基因序列相似度大於 98.7% 到 99% 以上可視為同種, 此結果建立在 16S rRNA 基因序列長度大於 1300 bp 且不明確鹼基(ambiguity)少於 5% 的規則(Stackebrandt *et al.*, 2002)。

目前的研究, 在分離出的 11 株 $\gamma$ -變形菌綱的細菌中, 有 2 株菌的最低醋酸殺菌濃度為 0.03125%, 有 3 株菌的最低醋酸殺菌濃度為 0.0625%, 有 5 株菌的最低醋酸殺菌濃度為 0.125%, 其中有一株在 0.125% 只出現抑菌結果。

### 材料與方法

#### 細菌純化及生長條件

取樣自海水養殖池內的水體, 以 LB 洋菜膠(GMbiolab, Taichung, Taiwan)經畫線培養, 取得單

\*通信作者: 呂秋錦 (Chiu-Chin Lu); FAX: 886-7-5255130; E-mail: lu.chiu.chin@gmail.com

一菌落放大培養，培養條件為 26°C 下 24 小時。LB 洋菜膠的配製每公升加入 25 克 LB 及 15 克的洋菜膠，在高溫高壓滅菌器中滅菌 15 分鐘後，倒入無菌培養皿中待其凝固。

### 聚合酶鏈鎖反應及產物定序

核酸萃取方法依照商業套組步驟進行，Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA)，放大片段為 16S rRNA 基因，所使用的引子為 fD2 (AGAGTTTGATCATGGCT CAG) 及 rP1 (ACGGTTACCTTGTTACGACTT) (Wisotzkey *et al.* 1990)，放大套組為 PCR master mix (Promega, Madison, USA)，進行 35 個循環，酵素活化條件為 95°C 5 分鐘；循環條件：95°C 30 秒、53°C 1 分鐘及 72°C 1 分鐘；完全反應：72°C 7 分鐘，儀器為 Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (California, USA)。定序使用之儀器 ABI 3730XL (Genomic Biosci & Tech, Taipei, Taiwan)。

### 抗菌活性檢測

檢測細菌所使用的濃度為  $2.5\sim 5 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>，培養基為含有 0%、0.03125% (v/v)、0.0625% (v/v) 及 0.125% (v/v) 醋酸濃度的 LB，在 26°C 下培養 24 小時後，各取 5  $\mu$ L 點在 LB 洋菜膠上，觀察菌落生成的結果。

在含有 0%、0.03125% (v/v)、0.0625% (v/v) 及 0.125% (v/v) 醋酸的 LB，觀察 0 小時、24 小時及 48 小時之細菌生長曲線。

### 形態觀察

檢測細菌所使用的濃度為  $2.5\sim 5 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>，培養基為含有 0% (v/v)、0.03125% (v/v)、0.0625% (v/v) 及 0.125% (v/v) 醋酸濃度的 LB，在 26°C 下培養 5 小時。以  $5,000 \times g$  離心 5 分鐘收集細菌，加入含 2.5% glutaraldehyde 的 PBS，於 4°C 下固定 24 小時， $5,000 \times g$  離心 5 分鐘收集細菌，將細菌滴於濾紙上，進行脫水，分別以 25%、50%、70%、80%、90%、95%、99.9% 的酒精及 100% 丙酮，進行臨界點乾燥，機型為 Emitech K850。樣本進行鍍金 220 秒，機型為 Hitachi E1010，再以掃描式電子顯微鏡 (SEM, Hitachi S-3000N) 擷取其表面結構紋路。

### 結 果

### 鑑種

利用 Wisotzkey 博士於 1990 年發表的 16S rRNA 基因引子放大基因片段，作為細菌鑑種的辨識，經過 NCBI 中的 BLAST 進行序列比對，研究結果有 11 株菌屬於  $\gamma$ -變形菌綱的細菌，根據 Stackebrandt 博士及 Ebers 博士在 2002 年及 2006 發表對同種細菌的定義(在片段長度大於 1300 bp、不明確鹼基百分比(ambiguity)小於 5%、相似度在 98.7% - 99%)，本研究篩選出的  $\gamma$ -變形菌綱的細菌，11 株細菌的片段長度皆大於 1400 bp、不明確鹼基小於 5% 且相似度皆大於 99%，鑑種結果包括了 *Morganella morganii*, *Pseudoalteromonas sp.*、*Pseudomonas sp.* 及 8 株 *Vibrio spp.* (Table 1)。

### 抑菌試驗

11 株菌在含有 0%、0.03125%、0.0625% 及 0.125% 醋酸濃度的 LB broth 下，出現不同程度的抑制作用 (Table 2)，有 2 株菌的最低醋酸殺菌濃度為 0.03125%，分別是 MB002 (*Pseudoalteromonas sp.*, GI number 57996806；種名，Genbank 編碼) 及 MB016 (*Vibrio sp.*, GI number 254772332)，有 3 株菌的最低醋酸殺菌濃度為 0.0625% 分別是 MB010 (*Vibrio shilonii*, GI number 218533908)、MB013 (*Vibrio sp.*, GI number 124244489) 及 MB015 (*Vibrio sinaloensis*, GI number 307602677)，有 5 株菌的最低醋酸殺菌濃度為 0.125%，分別是 MB001 (*Pseudomonas pachastrellae*, GI number 183238726)、MB008 (*Vibrio communis*, GI number 348499384)、MB009 (*Vibrio sp.*, GI number 301133593)、MB011 (*Photobacterium damsela*, GI number 370987302) 及 MB012 (*Vibrio harveyi*, GI number 283857168)，其中 MB003 (*Morganella morganii*, GI number 219809045) 在醋酸濃度 0.125% 條件下只出現生長受抑制的結果。

紀錄六株分離細菌 (MB001、MB008、MB009、MB010、MB011 及 MB012) 在含有 0%、0.03125%、0.0625% 及 0.125% 醋酸條件下的生長變化，時間點取 0 小時、24 小時及 48 小時，檢測波長 595 的吸光值。MB001 及 MB010 在醋酸濃度 0.03125% 存在下，生長曲線顯示 0 小時到 24 小時生長速度緩慢，細菌生長受醋酸影響，但經過 24 小時後此濃度即失去其抑制作用，當醋酸濃度在 0.0625% 下此兩株菌則無法生長；MB008、MB009 及 MB012 在醋酸濃度 0.0625% 下，生長

表一、根據 Stackebrandt and Ebers 2006 年發表之法則，以 16S 序列鑑定海水細菌。

Table 1. Marine bacteria identified by 16S sequence according to Stackebrandt and Ebers 2006 rule.

Number	Fragment length (bp)	Nucleotide database of NCBI	Similarity (%)	Ambiguity (%)	GI number
MB001	1408	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	>99	0	GI:183238726
MB002	1403	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	>99	0	GI:57996806
MB003	1413	<i>Morganella morgani</i>	>99	0.2	GI:219809045
MB008	1419	<i>Vibrio communis</i>	>99	0.4	GI:348499384
MB009	1433	<i>Vibrio</i> sp.	>99	0	GI:301133593
MB010	1432	<i>Vibrio shilonii</i>	>99	0	GI:218533908
MB011	1429	<i>Photobacterium damsela</i>	>99	0	GI:370987302
MB012	1419	<i>Vibrio harveyi</i>	>99	0	GI:283857168
MB013	1423	<i>Vibrio</i> sp.	>99	0	GI:124244489
MB015	1429	<i>Vibrio sinaloensis</i>	>99	0	GI:307602677
MB016	1419	<i>Vibrio</i> sp.	>99	0	GI:254772332

表二、 $\gamma$ 變形菌培養在含有不同醋酸濃度下的 LB 培養液，溫度為 26°C，經過 24 小時，轉移至 LB 洋菜膠培養 24 小時。

Table 2 Gammaproteobacteria culture with different percentages of acetic acid after 24 hours transferred to an agar plate and cultured for 24 hours at 26°C.

Number	Acetic acid (%)			
	0	0.03125	0.0625	0.125
MB001	+++	+++	+	
MB002	+++			
MB003	+++	+++	+++	++
MB008	+++	+++	+++	
MB009	+++	+++	+++	
MB010	+++	+++		
MB011	+++	+++	+++	
MB012	+++	+++	+++	
MB013	+++	++		
MB015	+++	+++		
MB016	+++			

+++ Bacteria grow on agar plates very well.



++ Number of bacteria colony was less than that of 0 percent of acetic acid in comparison.



+ Number of bacteria colony could count.



曲線顯示 0 小時到 24 小時細菌生長受抑制，但經過 24 小時此濃度即失去其抑制作用，當醋酸濃度在 0.125% 存在下此三株菌則無法生長；MB011 在 0.0625% 的醋酸存在下無法生長 (Figure 1)。

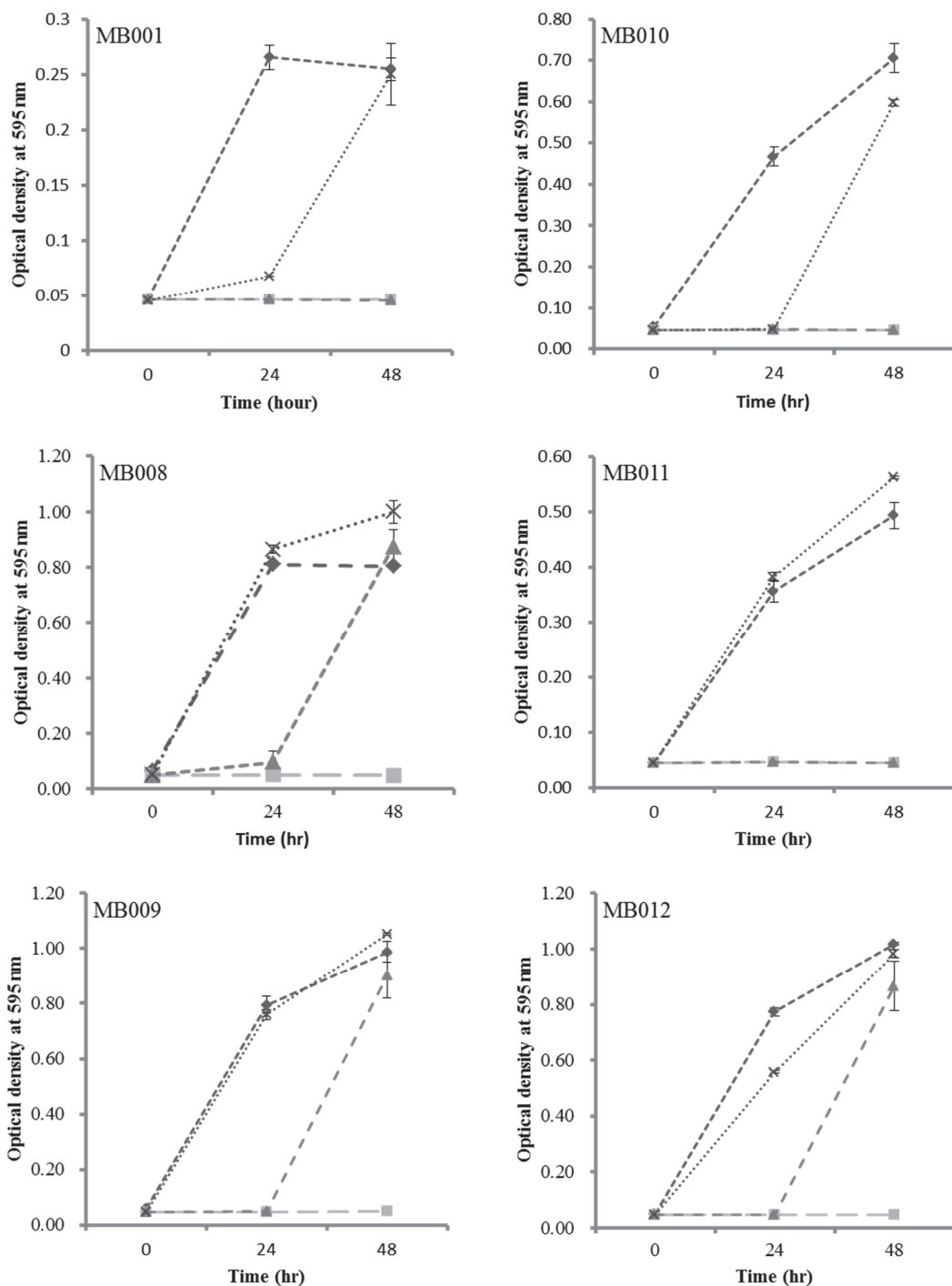
0.03125% 醋酸存在下，外觀出現萎縮或膨脹成近圓形，長度差異大；0.0625% 及 0.125% 醋酸存在下，外觀形態出現不完整及細菌完整性受破壞 (Figure 2)。

### 形態觀察

MB002 在 0%、0.03125%、0.0625% 及 0.125% 的醋酸濃度下，細菌外觀也受到影響，0% 醋酸條件下，外觀形態為橢圓形，長度約 1-2  $\mu\text{m}$ ；

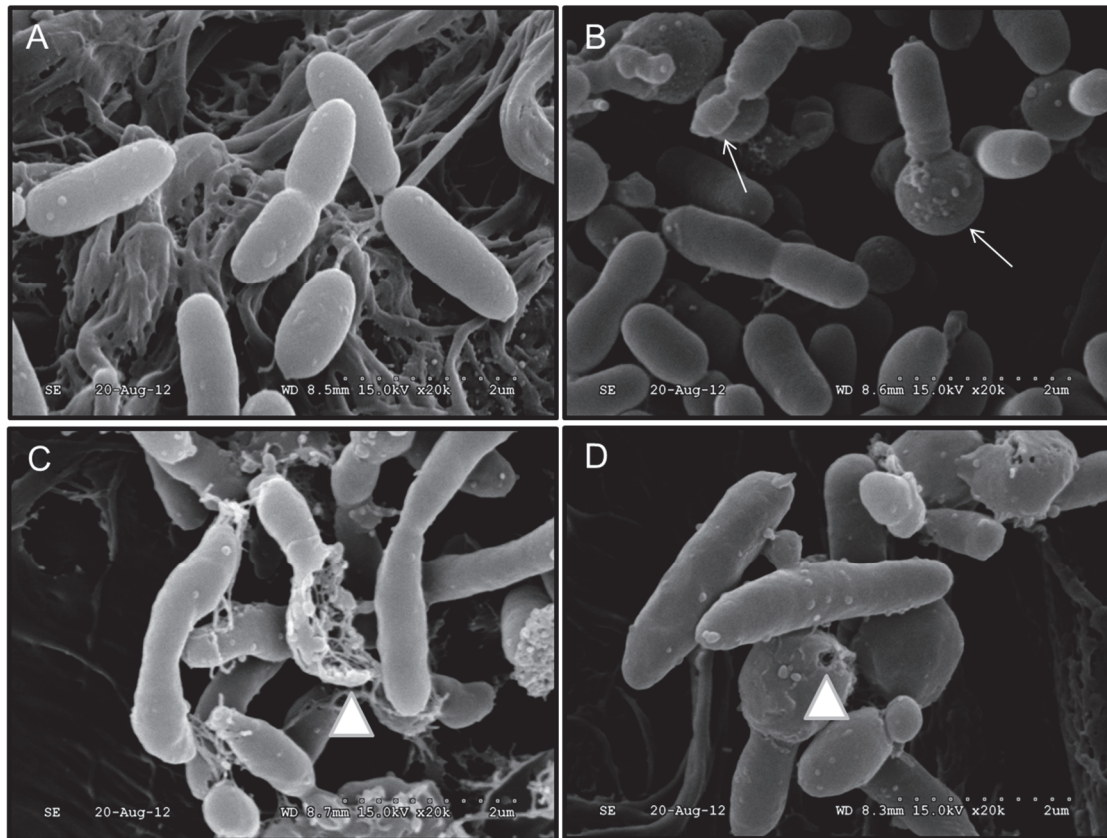
### 討論

本研究探討 11 株  $\gamma$ -變形菌綱的細菌對醋酸的敏感性，以及醋酸在抗菌成份中扮演的角色，結果顯示這 11 株菌對醋酸具有不同敏感性，其



圖一、加入醋酸的六種 $\gamma$ 變形菌之生長曲線。細菌編碼分別為MB001, MB008, MB009, MB010, MB011及MB012，細菌密度為 $2.5\text{-}5 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>培養環境溫度為26°C，紀錄0小時、24小時及48小時下OD<sub>595</sub>的數值，0%醋酸環境以---x---表示、0.03125%醋酸環境以---x---表示、0.0625%醋酸環境以- \* -表示及0.125%醋酸環境以-■-表示，實驗進行三重複。

**Figure 1.** Growth curves of six gammaproteobacteria, namely, MB001, MB008, MB009, MB010, MB011 and MB012. Bacteria were cultured at 26°C. The cell density was  $2.5\text{-}5 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> at 0 hour. The cultured bacteria were recorded at various time points (0, 24 and 48 hours) to measure cell density at OD<sub>595</sub>. (---x---) acetic acid of 0%; (---x---) acetic acid of 0.03125%; (- \* -) acetic acid of 0.0625%; and (-■-) acetic acid of 0.125%. The experiment was a triplicate.



圖二、編碼 MB002 細菌之掃描式電子顯微影像。LB 培養基中細菌形態成短桿狀且外觀具完整性(A)，加入 0.03125%醋酸(B)，0.0625% (C) and 0.125% (D)的細菌外觀呈不規則且不完全性。

**Figure 2.** SEM micrographs of MB002 on cellulose filters. In an LB broth medium the cells are rod and intact (A). After treatment with 0.03125% acetic acid (B), 0.0625% (C) and 0.125% (D), the cells look irregular (arrow in B) and have an incomplete shape (arrowhead in C and D).

中 MB003 相對於其他 10 株菌對醋酸的敏感性低，在檢測的最高濃度範圍下，0.125%醋酸只出現對 MB003 產生抑制作用，並沒有達到殺菌結果；MB001 在含有 0.125%醋酸的 LB 下，26°C 培養 24 小時後轉移到 LB agar plate 時，無菌落生成，從生長曲線的結果發現，0.03125%醋酸對 MB001 在 24 小時培養下生長緩慢，而 0.0625%醋酸則會抑制 MB001 生長，當 MB001 於加入 0.0625%醋酸的 LB broth 中培養 24 小時後，將菌液轉移到 LB agar plate 時，濃度會因擴散而降低，抑制作用消失，細菌開始在 LB agar plate 上生長，而加入 0.125%醋酸條件下，由於細菌被殺死，即使轉移到 LB agar plate 上仍無法生長，這也說明了抑菌濃度不同於殺菌濃度，由 MB001 生長曲線中發現，0.03125%醋酸抑制作用消失後，細菌會快速地進入對數生長期，這種現象普遍出現在其他分離出來的菌株。

醋酸對細菌產生的生理機制並不清楚，但掃

描式電子顯微鏡所擷取的圖像，觀察到醋酸造成 MB002 細菌形態上的改變(Figure 2)，包括 0.03125%醋酸條件下出現細胞分裂受阻的狀態，無法形成兩個相同形狀的細菌，一端為正常細菌形態另一端則出現似球體狀或發育不良形狀；0.0625%及 0.125%的醋酸條件則除了影響其細胞分裂，甚至造成細胞膜破裂改變其滲透性，導致細胞死亡。

我們知道由於台灣四面環海，從事與海洋接觸相關工作的人相當多，許多因海洋性細菌所引起的感染常導致嚴重的損傷，臨床最常發生的為傷口感染以及原發性敗血症，若能在新傷口以預防性的低濃度醋酸處理，或許可以降低海洋性細菌感染的風險。而醋酸為一般可取得的組成分，市售的食用醋其醋酸含量約有 3%-5%，或許亦可應用於常接觸海水的工作者，受傷時預防性的殺菌劑。

## 誌 謝

感謝張晏瑋博士協助實驗結果「掃描式電子顯微鏡影像」擷取，感謝薛仁鈞及黃珠美協助水體採樣。

## 參考文獻

- Khabbaz RF, Arnow PM, Highsmith AK, Herwaldt LA, Chou T, Jarvis WR, Lerche NW and Allen JR. 1984. *Pseudomonas fluorescens* bacteremia from blood transfusion. *Am. J. Med.* 76:62-68.
- McDermott C and Mylotte JM. 1984. *Morganella morganii*: epidemiology of bacteremic disease. *Infect Control* 5:131-137.
- Mercogliano F, Vitullo M, Tamburro M, Sammarco ML, Grasso GM, Luzzi I and Ripabelli G. 2012. [Vibrio spp. infections of clinical significance and implication for public health]. *Ann. Ig.* 2:85-102.
- Palleroni NJ. 2010. The *Pseudomonas* story. *Environ. Microbiol.* 12:1377-1383.
- Sloss JM, Cumberland N and Milner SM. 1993. Acetic acid used for the elimination of *Pseudomonas aeruginosa* from burn and soft tissue wounds. *J. R. Army. Med. Corps.* 139:49-51.
- Stackebrandt E and Ebers J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 33:152-155.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kampfer P, Maiden MC, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Truper HG, Vauterin L, Ward AC and Whitman WB. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1043-1047.
- Tucci V and Isenberg HD. 1981. Hospital cluster epidemic with *Morganella morganii*. *J. Clin. Microbiol.* 14:563-566.
- Williams NM, Wales S and Carlson GL. 1993. *Pseudomonas* infection of the catheter exit site successfully managed with topical acetic acid. *Clin. Nutr.* 12:369-370.
- Winslow CE, Kligler IJ and Rothberg W. 1919. Studies on the Classification of the Colon-Typhoid Group of Bacteria with Special Reference to their Fermentative Reactions. *J. Bacteriol.* 4:429-503.
- Wisotzkey JD, Peter Jurtshuk JR, and Fox GE. 1990. PCR amplification of 16S rDNA from lyophilized cell cultures facilitates studies in molecular systematics. *Curr. Microbiol.* 21:325-327.

## To Investigate the Effect of Acetic Acid on Gammaproteobacteria of Eleven Species for Inhibition and Bactericidal Activity

Chiu-Chin Lu<sup>1\*</sup>, Yu-Chen Lu<sup>2</sup>, Hurng-Wern Huang<sup>3</sup>, Yi-Reng Lin<sup>4</sup>, Chao-Neng Tseng<sup>5</sup>  
Hin-Kiu Mok<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oceanography, National Sun Yat-Sen University  
Kaohsiung, Taiwan

<sup>2</sup>Department of Nursing, Kaohsiung Veterans General Hospital  
Kaohsiung, Taiwan

<sup>3</sup>Institute of Biomedical Sciences, National Sun Yat-Sen University  
Kaohsiung, Taiwan

<sup>4</sup>Department of Biotechnology, Fooyin University  
Kaohsiung, Taiwan

<sup>5</sup>Graduate Institute of Natural Products, Kaohsiung Medical University  
Kaohsiung, Taiwan

(Received: 17 August 2014, accepted: 8 September 2014)

### ABSTRACT

An exceeding number of important pathogens belong to gammaproteobacteria. The aim of this study is to verify that marine gammaproteobacteria, namely, *Morganella morganii*, *Pseudomonas* sp., *Pseudoalteromonas* sp., and *Vibrio* spp., are affected by acetic acid. Three different concentrations of acetic acid, 0.125%, 0.0625% and 0.03125% in LB broth cultured bacteria were used. Ten isolates were inhibited by 0.125% of acetic acid in LB broth, but *Morganella morganii* was not.

**Keywords:** acetic acid, gammaproteobacteria, 16S rRNA gene, Vinegar