嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNEE94-06

計畫名稱：人工濕地大腸桿菌抗生素耐受性基因探討

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

■整合型計畫　　□個別型計畫

計畫總主持人：林瑩峰　　計畫主持人：

子計畫主持人：王淑珍

中華民國 94 年 12 月 31 日

一、摘 要

隨著現今細菌抗藥性問題日益嚴重，探討環境中大腸桿菌抗生素耐受性之分布乃為重要之課題。本研究應用傳統 disc diffusion technique 及 PCR 方法，進行抗生素耐受性及抗生素耐受性基因之檢測。由大腸桿菌之抗生素耐受性試驗結果顯示，所使用七種抗生素中以 cefotaxone、chloramphenicol 等抗生素對大腸桿菌有較強的作用效力。大腸桿菌抗生素耐受性基因檢測中，本研究選用 tetracycline、streptomycin 抗生素基因 *tetA* 及 *strA* 作更深入之探討。由檢測結果得知，對 tetracycline 具耐受性之 *E. coli*, 在人工濕地之原進水點（Influent）有 36 株；氧化塘（Lagoon）中有 72 株；在 free water surface flow（FWS）中有 66 株；subsurface flow system（SSF）中有 35 株；而最後放流水點（Effluent）則有 2 株。對 streptomycin 具耐受性之 *E. coli*,在人工濕地之原進水點之基因檢測結果為 34 株；氧化塘中有 69 株; FWS 中有 60 株；SSF 中有 29 株；最後放流水則未檢測出含 *strA* 抗生素耐受性基因之 *E. coli*.

關鍵字:大腸桿菌、抗生素耐受性

二、前言

台灣水溫適中、日照充足，利用人工濕地處理各類污水是既經濟且可行之方法，且因其具有省能源、低成本、操作及維護簡單等優點，更可提供人們休憩、生態教育等多功能用途，故若能有效設計規劃並善用之，則不失為簡單而有效之水資源復育技術。

本研究從 92 年 7 月起至 94 年 2 月底止共計一年半時間，持續針對以處理民生污水為主之台南縣仁德鄉保安村二行社區人工濕地中的大腸桿菌，進行抗生素耐受性及抗生素耐受性基因之檢測。

本研究使用 disc diffusion technique 測試由人工濕地分離之 312 株大腸桿菌之抗生素耐受性試驗，使用之抗生素分別為 cefotaxone(CRO)、chloramphenicol (C)、nalidixic acid (NA)、tetracycline (T)、streptomycin (S)、ampicillin (AM)、gentamicin (GM) 等七種較常檢測大腸桿菌抗生素耐受性之抗生素，抗生素使用劑量依 NCCLS 報告。本研究依大腸桿菌對抗生素之耐受程度以 R(resistant), I(intermediate), S(susceptible) 三種不同程度表示之。

本實驗除了利用傳統 disc diffusion technique 法檢測大腸桿菌之抗藥素耐受性外，亦利用 PCR 方法檢測人工濕地系統分離之大腸桿菌抗生素耐受性基因，本研究選用 tetracycline、streptomycin 兩種抗生素基因 *tetA* 及 *strA* 作更深入之探討。

三、實驗方法

(2) *E. coli* 質體 DNA 粗水解液之製備

經 Luria-Bertani broth 隔夜培養之大腸桿菌 (*E. coli*)，取 4μl 菌液加 196ml 無菌水，置於微量離心管(Eppendorf)中混合均勻後，於 100℃水浴中煮 10 分鐘，再經 1000 rpm 5 分鐘，取出上澄液於４℃備用。

(3) **PCR 引子（primes）之設計**

應用 *E. coli* 抗生素耐受性基因檢測之 primers 進行檢測實驗，針對 Streptomycin 之耐受性基因，選擇以 *strA*[37] 為檢測基因，而 Tetracyclin 耐受性則以 *tetA* 為檢測基因[37]，PCR primers 序列如下所示：

strA 2F：5'-CCTGGTGATAACGGCAATTC-3'

2R：5'-CCAATCGCAGATAGAAGGC-3'

tetA TetA-L：5'-GGCGGTCTTCTTCATCATGC-3'

TetA-R：5'-CGGCAGGCAGAGCA AGTAGA-3'

上述引子委託台北快興科技公司合成

(4) Polymerase chain reaction

取大腸桿菌(*E. coli*) DNA 粗水解液 10 μl， 加入 10mM dNTP 1μl， 10 x PCR buffer（合適 Mg^{+2}濃度） 5μl ，加入適量 μl primers ，Taq DNA polymerase 及無菌水至最終體積 50μl 將離心管放入 Microprocessor Controlled thermal cycler（Gene Amp PCR system 2400，Perkin Elmer CT, USA）先升溫至 94℃，加熱 2 分鐘，接著 94℃，40 秒，使 DNA 分開成單股，再降溫 55℃，50 秒，進行黏合作用（annealing），接著進行聚合作用，72℃, 50 秒，最後以 72℃維持 2 分鐘使作用完全，如此共進行 30cycles，所有過程皆以程式連結。分析時取 10μl 聚合酶鏈鎖反應產物，以 2.5 % agarose gel 於 1 x TBE buffer 中進行電泳分析，經 ethidium bromide 染色後，置於 UV box 觀察拍照並記錄。

四、結果

(一)、人工濕地中大腸桿菌抗生素耐受性之檢測

（1） 傳統 disc diffusion technique 測試

傳統 disc diffusion technique 測試，在本實驗所使用七種抗生素中以 cefotaxone、chloramphenicol 對大腸桿菌之生長有較強抑制效用（如表 1）。

（2）Ploymerase chain reaction （PCR）method 測試

本實驗除研究利用傳統disc diffusion technique法檢測大腸桿菌之抗藥素耐受性外，亦利用 PCR 方法檢測人工溼地系統分離之大腸桿菌抗生素耐受性基因，本研究選用 *tetA*、*strA* 兩種抗生素基因作更深入之探討[()]。由檢測結果得知，在原進水點（Influent，12.6 圖三採集點 1 位置）所分離出 48 株大腸桿菌，有 株（75.00 ％ ）對 *tetA* genet 呈正反應，氧化塘（圖三採集點 2-5 位置）所分離出 102 株大腸桿菌，有 72 株（70.58 ％ ）對 *tetA* genet 呈正反應，由 Free water surface flow system（FWS，圖三採集點 6-9 位置）分離之 95 株大腸桿菌，有 66 株（69.47 ％ ）對 *tetA* genet 呈正反應，由 subsurface flow system（SFW，圖三採集點 10-11 位置）分離之 63 株大腸桿菌，有 35 株（55.56 ％ ）對 *tetA* genet 呈正反應，而最後放流水（Effluent）所分離出 4 株大腸桿菌則有 2 株具有 *tetA* 抗藥素耐受性基因。

Table 1. Antimicrobial resistance of *E. coli* strains isolated from constructed wetland

Antimicrobial agent		Numbers (%)[a] of resistant isolates obtained from													
		Influent			Lagoon			FWS			SSF			Effluent	
(amt per disk)		N=48			N=102			N=95			N=63			N=4	
	R[b]	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Disk diffusion															
CRO[c]	2	7	39	0	32	70	5	24	73	8	16	39	0	2	2
C	6	6	36	12	22	68	14	12	69	12	20	31	0	3	1
NA	9	29	10	17	69	16	19	51	25	22	25	16	3	1	0
TE	10	26	12	23	60	22	25	46	24	25	17	21	1	3	0
S	14	23	11	20	56	19	30	47	18	31	22	10	3	1	0
A	18	15	15	38	43	21	36	44	15	38	14	11	4	0	0
GM	19	15	14	46	37	19	46	39	10	38	25	0	4	0	0

[a] All fractions of Numbers are constructed wetland

[b] R: resistant strains, I：intermediate, S：susceptibility,

[c]CRO：cefotaxone, C：chloramphenicol, NA：nalidixic acid， TE：tetracycline, AM：ampicillin, S：streptomycin, GM：gentamicin,

(2) Polymerase chain reaction（PCR）method 測試

Table2. Frequency of antibiotic resistance determinants streptomycin isolated from constructed wetland [a]

	Influent	Lagoon	FWS	SSF	Effluent
	N=48	N=102	N=95	N=63	N=4
tet A	36（75%）	72（70.58%）	66（69.47%）	35（55.56%）	2（50.0%）
str A	34（70.83%）	69（67.64%）	60（63.15%）	29（46.01%）	0（0%）

[a]Values correspond to frequency（%） for constructed wetland syste m

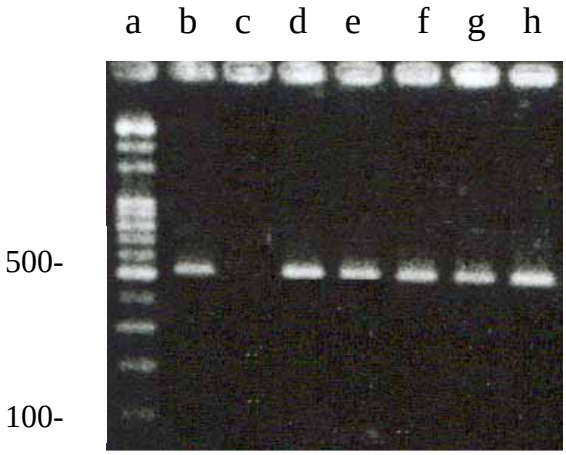

Fig.29 Specificity for PCR detedction of *tetA* gene isolated *E. coli*. Lane a: 100bp DNA ladderas molecular weight marker ; Lanes b : postive control (BCRC1175) , Lanes c: nagtive control , Lanes d:-h : PCR products amplified from DNAs of *tetA* gene of *E. coli* isolated from Layout of constructed Wetland systems.

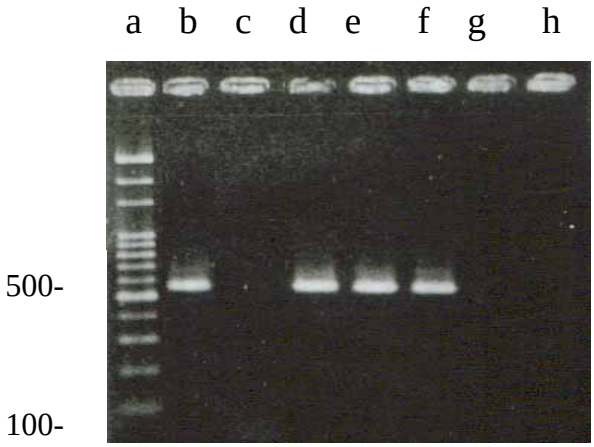

Fig.30 Specificity for PCR detedction of *strA* gene isolated *E. coli*. Lane a:100bpDNA ladderas molecular weight marker；Lanes b：postive control （BCRC1175）, Lanes c: nagtive control，Lanes d:-h：PCR products amplified from DNAs of *strA* gene of *E. coli*. isolated from Layout of constructed wetland systems.

嘉南大學