

花蓮縣 第 64 屆 國民中小學科學展覽會 作品說明書

科 別：生物科

組 別：國中組

作品名稱：從腸計議—植物乳桿菌對黃斑黑蟋蟀產卵與孵化之影響

關鍵詞：植物乳桿菌、黃斑黑蟋蟀、產卵與孵化

編 號：_____（主辦單位填寫）

摘要

本研究目的主要在探討腸道菌對黃斑黑蟋蟀產卵與孵化的影響。研究發現對蟋蟀餵食植物乳桿菌，可提高產卵數，使最後成功孵出小蟋蟀的數量較多。分析可能原因為：一、植物乳桿菌可提高蟋蟀的食慾，使之獲得較充足營養。二、植物乳桿菌可抑制大腸桿菌、蘇力菌及 88.89%從蟋蟀體表、腸道、產卵管分離出來的微生物，調節菌相平衡，促進蟲體健康。三、植物乳桿菌可分泌神經傳導物質 GABA，調控蟋蟀的生殖行為。此外，本研究亦發現對蟋蟀餵食抗生素或蘇力菌會降低卵的品質與孵化率，最後孵出的小蟋蟀數較少，其原因可能與卵黃生成素（vitellogenin）的抑制有關。因此本研究證明了腸道菌對黃斑黑蟋蟀的生殖也會造成許多重大影響。

壹、前言

一、研究動機

學姊在進行黃斑黑蟋蟀（*Gryllus bimaculatus*）研究時，發現對雄性蟋蟀餵食不同種類食物會使雄蟋蟀的存活率與鳴叫行為產生差異，單獨餵食植物「翠玲瓏」，雄蟋蟀死亡率較高，常會出現水便狀況，攻擊性強，並且有吃掉同伴的現象；而餵食「米糠粉」的雄蟋蟀死亡率較低，較不好鬥，求偶時也表現較高的耐心（求偶鳴叫持續時間較長）；最後學姊自餵食米糠粉的蟋蟀腸道中分離出一株植物乳桿菌（*Lactobacillus plantarum*），推測食物可能改變蟋蟀腸道菌相，進而改變雄蟋蟀鳴叫行為（周佳儒、詹淳茹，2022）。然而我們好奇，這株植物乳桿菌是否會造成蟋蟀產卵數與子代孵化率的差異？原因為何？因此，我們便決定繼續探究下去。

二、研究目的

- （一）探討植物乳桿菌是否會對蟋蟀產卵與孵化產生影響
- （二）植物乳桿菌是否可抑制蟋蟀體表、腸道及產卵管微生物，平衡菌相
- （三）植物乳桿菌是否可藉由產生 GABA 影響蟋蟀產卵及孵化率
- （四）植物乳桿菌是否會促進雌性蟋蟀產生儲存蛋白及卵黃生成素

三、文獻探討

（一）黃斑黑蟋蟀簡介

黃斑黑蟋蟀（*Gryllus bimaculatus*）屬於直翅目，雜食性，翅基部有 2 個黃斑，體長約 25~30 mm。雌蟲翅膀為直紋狀，具長針狀產卵管，約為身長三分之一；雄蟲翅膀具

明顯的渦紋，翅紋雜亂，右翅常在左前翅之上，雄蟲可用上翅摩擦發音，有求偶、警示、領域宣示等作用。黃斑黑蟋蟀交配時公蟲在下、母蟲在上，約 1 分鐘左右完成。母蟋蟀產卵時，會將產卵管插入衛生紙或土中，再拔出來，反覆來回進行。一隻母蟋蟀可多次產卵，每次約可產 100 顆以上，常溫下卵期 10~14 天，幼蟲十齡，每齡 6~11 天，完成一次約需 2.5 個月。（苗栗區農業改良場苗栗區農情月刊，2024）



圖 1 黃斑黑蟋蟀

（二）腸道菌對昆蟲的影響

昆蟲是世界上數量最多、生活方式最多樣的生物，因此也造就出多樣的微生物與其共生，微生物可以幫助宿主分解食物、降解環境中化合物、合成一些必需營養物質、抵抗病菌，甚至對昆蟲行為許多產生影響（陳欣妤，2021）。黑腹果蠅腸道中的醋酸桿菌（*Acetobacter pomorum*）和植物乳桿菌（*Lactobacillus plantarum*）會影響蛻皮激素表達，幫助果蠅幼蟲度過營養不足逆境，調控宿主對胺基酸的食慾，提升生理健康（Shin，2011）；果蠅偏好與腸道共生菌組成接近的個體交配，有植物乳桿菌共生的雄性果蠅較醋酸桿菌共生的雄性果蠅能交配更長的時間，子代數量較多（Erkosar，2013）。我們推測植物乳桿菌或其產生的物質可能也會對蟋蟀生殖行為產生影響，因此，本研究的目的之一是藉由對蟋蟀餵食植物乳桿菌或或改變腸道菌相組成，觀察蟋蟀除了鳴叫行為改變外，對於產卵及孵化是否也會造成影響。

植物乳桿菌是一種能與腸壁細胞或組織結合的細菌，可在腸道繁殖，代謝或是產出乳酸、短鏈脂肪酸等來改善腸道環境，能抑制壞菌生長，調整腸道菌叢生態，改善腹瀉、幫助消化、促進腸道功能、調節免疫作用（林命權，2020）。我們推測餵食米糠粉的雄蟋蟀較不會產生腹瀉或水便情形也許與蟋蟀腸道內共生的植物乳桿菌抗菌能力有關，因此本研究目的二是藉由抑菌實驗來檢測植物乳桿菌是否能夠抑制蟋蟀體表、產卵管或其他腸道微生物，進而促進蟲體健康。

許多腸道微生物會合成神經傳導物質誘導上皮細胞釋放因子，調節腸神經系統內的神經信號傳導，透過腸腦軸線（gut-brain axis）機制，影響神經、生理或心理的作用。例如：*Lactobacillus spp.*產生乙醯膽鹼和 GABA；*Escherichia spp.*產生去甲基腎上腺

素、多巴胺、血清素等。植物乳桿菌是一種精神益生菌，有能力產生或作為媒介影響神經傳導物質的作用，在小鼠的研究中發現餵食植物乳桿菌可提升小鼠前額葉多巴胺及血清素的量，改善類憂鬱行為（林命權，2020）。GABA（ γ -amino butyric acid， γ -胺基丁酸）是一種大腦鎮靜劑，具有抗憂慮、改善睡眠、降低血壓、調控腸胃運動的功能（林玟姘，2012），GABA 對生殖系統亦會產生作用，可調節下視丘、腦垂腺與腦垂腺前葉激素，影響哺乳類雌性卵巢及輸卵管功能，對雄性動物則會影響精子運動與睪固酮分泌，精子細胞膜表面具 GABA 受體，可誘發頂體反應（Acrosome reaction），提高精子進入卵細胞能力（Shouhei Kurata et.al，2019）。我們推測植物乳桿菌或許能藉由分泌 GABA，使公蟋蟀在求偶時變得比較有耐心，攻擊性減弱並對蟋蟀的產卵與孵化產生影響，因此本研究目的三是想了解此株由學姊分離出來的植物乳桿菌是否會藉由合成 GABA，對黃斑黑蟋蟀的生殖產生作用。

目前已有許多研究發現昆蟲腸道菌對於昆蟲生長發育、生殖造成影響，但分子機仍在研究階段，2017 年 Jun Beom Lee 等人證明了伯克氏菌（*Burkholderia*）可藉由調控儲存蛋白（hexamerin）和卵黃生成素（vitellogenin）的基因表達促進點蜂緣椿（*Riptortus pedestris*）的生長和產卵，儲存蛋白是一種大小約 68 kDa 的蛋白質，由昆蟲脂肪體合成，運送至血淋巴作用，為幼蟲與成蟲發育及生殖所需的蛋白質，在昆蟲蛻皮及交配時可分解為胺基酸提供能量，並有研究指出儲存蛋白與賀爾蒙運送、免疫反應、表皮形成、幹細胞生長亦有關聯。卵黃生成素是一種大小約 50 kDa 的蛋白質，由昆蟲脂肪體合成，血淋巴運輸，藉受體媒介胞吞作用進入卵細胞，卵黃生成素是卵黃蛋白質的前驅物，為卵胚胎發育重要養分，並具有調節昆蟲雌性個體繁殖期性發育的功能。因此本研究目的四為進行 SDS-PAGE，觀察餵食植物乳桿菌的蟋蟀血淋巴中是否具有儲存蛋白和卵黃生成素，或許可更合理推論腸道菌對蟋蟀產卵與孵化的影響。

貳、主要研究設備及器材

無菌操作台、滅菌釜、恆溫振盪培養箱、植物生長箱、ELISA reader、抽氣櫥、烘箱、離心機、電子天平、光學顯微鏡、微量滴管（pipetman）、接種環（loop）、酒精燈、燒杯、解剖剪刀、鑷子、昆蟲飼養盒、培養皿、離心管、濾紙、0.22 μ m 針頭過濾器、TLC（薄層層析）、96 孔微量盤、SDS-PAGE 電泳槽、電源供應器、黃斑黑蟋蟀、燕麥片、狗飼料、米糠粉、植物乳桿菌（*Lactobacillus plantarum*）、大腸桿菌（*E.coli DH5 α* ）、蘇力菌（*Bacillus thuringiensis*）、鹽酸四環素（Tetracycline HCL）、安莫西林（Amoxicilin）、紅黴素（Erythromycin）、MRS、TSB、agar、酒精、GABA、正丁醇、醋酸、麩胺酸鈉、BSA、

Bradford protein binding assay dye、Tris、HCl、SDS、glycine、methanol、acrylamide/bis (29:1)、APS、comassie blue brilliant blue R250、Glycerol、beta-mercaptoethanol、bromophenol blue、蛋白質標記、TEMED



圖 2 實驗器材

參、研究過程或方法

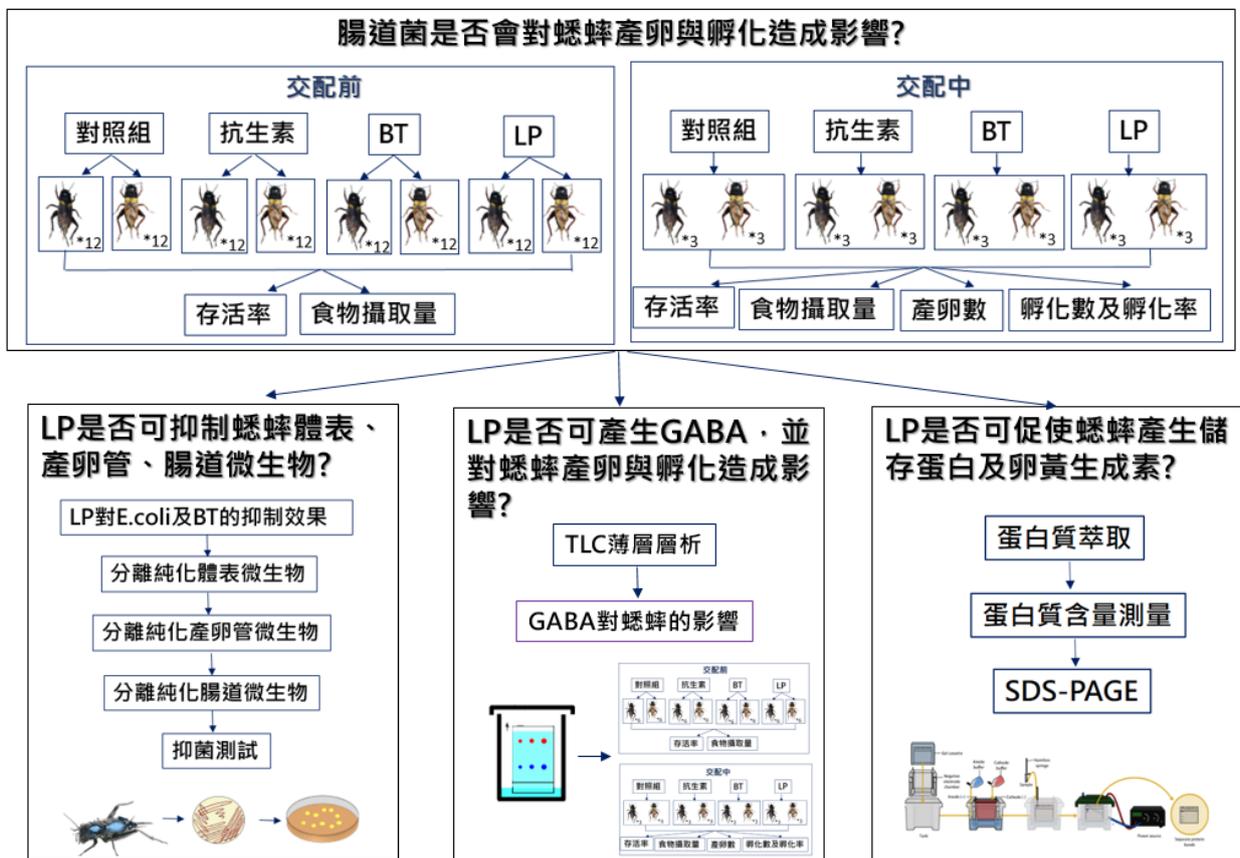


圖 3 實驗流程圖

一、腸道菌對蟋蟀產卵與孵化是否會造成影響

(一) 製作微生物培養基

- 1.TSB：取 500 ml 燒杯，加入 TSB 粉末 3 g，d.d H₂O 100 ml，溶解後倒入血清瓶中，貼上滅菌膠帶，放入滅菌釜滅菌（121°C，15 min）。
- 2.MRS：取 500 ml 燒杯，加入 MRS 粉末 5.5 g，d.d H₂O 100 ml，溶解後倒入血清瓶中，放入滅菌釜滅菌。
- 3.dTSA：在 500 ml 燒杯中加入 TSB 粉末 0.3 g，agar 粉末 1.5 g，d.d H₂O 100 ml，蓋上鋁箔紙，放入滅菌釜滅菌，略冷卻後倒入培養皿，每個培養皿約倒入約 15 ml 液體。
- 4.MRSA：在 500 ml 燒杯中加入 MRS 粉末 5.5 g，agar 粉末 1.5 g，d.d H₂O 100 ml，蓋上鋁箔紙，放入滅菌釜滅菌，略冷卻後倒入培養皿，每個培養皿約倒入 15 ml 液體。

(二) 餵食 LP、BT 或抗生素後腸道菌觀察

- 1.LP (*Lactobacillus plantarum*，植物乳桿菌) 為學姊自蟋蟀體內分離鑑定所得。BT (*Bacillus thuringiensis*，蘇力菌) 則由校園土壤分離後鑑定得到，BT 是一種生物殺蟲劑，有研究指出對鱗翅目、雙翅目昆蟲、線蟲會產生傷害，而對直翅目黃斑黑蟋蟀的傷害尚有待驗證 (曾經洲，2005)。
- 2.利用 loop 挑選 LP 及 BT 單一菌落接種於 20 ml MRS 或 TSB 中，恆溫震盪培養 (28°C，120 rpm) 1 天，調整 OD₆₀₀=1，放置於 4°C 冰箱保存。
- 3.配置 10% 抗生素水：在 30 ml 無菌水中加入鹽酸四環素、安莫西林、紅黴素粉末各 100 mg。
- 4.黃斑黑蟋蟀購自蟋蟀繁殖場，再自行飼養繁殖。我們將未曾交配過的雌雄蟋蟀再各分為四組 (對照組、抗生素組、LP 組、BT 組)，每組各 10 隻蟋蟀。
- 5.每個飼養箱中放置 2 個飼料盒，1 個放入 6 克燕麥片，另一個放入放入 3 張衛生紙，內含水、1% 抗生素的水、含菌液濃度約為 OD₆₀₀=0.1 的水。
- 6.將蟋蟀飼養箱放入恆溫生長箱中 (28°C，12 小時光照，12 小時黑暗) 飼養一週，每兩日更換食物並清潔環境。
- 7.蒐集各組蟋蟀新鮮糞便秤重，加入 9 倍的無菌水後搗碎
- 8.以微量滴管吸取 100 μl 上清液，加入 900 μl 無水中混合均勻，序列稀釋至 10⁻⁶ 倍。
- 9.以微量滴管吸取 100 μl 稀釋後之糞便菌液滴入 dTSA 及 MRSA 培養基中，再以三

角玻棒塗抹均勻。

10.將菌盤放入 28°C 恆溫培養箱中培養 2 天。

11.觀察菌盤結果，比較餵食抗生素或菌液後蟋蟀腸道菌相的變化。

(三) 腸道菌對蟋蟀存活率及食物選擇的影響

1.取 8 個大小相同飼養箱，放入未曾交配過，分別餵養抗生素、LP、BT 一週之雌雄蟋蟀各 12 隻。

2.在飼養箱中各放入 2 個飼料盒，1 個放入 10 克燕麥片（澱粉含量多），1 個放入 10 克狗飼料（蛋白質含量多）。

3.在飼養箱中放入 1 個 60 ml 飲水器，內含 60 ml 水或含抗生素（1%）、LP（ $OD_{600}=0.1$ ）、BT（ $OD_{600}=0.1$ ）的水。

4.紀錄一週後平均每隻蟋蟀的食物攝取量。

5.重複二次實驗。

(四) 腸道菌對蟋蟀產卵數及孵化率的影響

1.取 4 個大小相同飼養箱，挑選不同餵養條件之年輕健康、未曾交配、肢體完整之雌雄蟋蟀各 3 對。

2.在飼養箱中各放入 3 個飼料盒，1 個放入 3 克燕麥片，1 個放入 3 克狗飼料，1 個放入 5 張濕衛生紙供產卵用。

3.在飼養箱中放入 1 個 60 ml 飲水器，內含 60 ml 水或含抗生素（1%）、LP（ $OD_{600}=0.1$ ）、BT（ $OD_{600}=0.1$ ）的水

4.紀錄一週內平均每隻蟋蟀的食物攝取量、存活率，以鑷子夾取各組的卵逐一計算數量，並放入另一觀察盒，維持適當濕度，觀察卵的孵化情形。

5.一週後卵陸續孵化成小蟋蟀，以水彩筆收集二週內孵化的小蟋蟀放入另一個飼養盒，並計算數量。

6.重複二次實驗。

二、植物乳桿菌是否可抑制蟋蟀體表、產卵管及腸道微生物

(一) 植物乳桿菌的對 *E.coli*、BT 的抑制效果

1.不同量（濃度）的 LP 上清液對 *E.coli*、BT 的抑制效果—固體培養法

(1) 以 loop 分別挑選 *E.coli*、BT 之單一菌落和接種於含 10 ml TSB 的離心管中，將 LP 接種於含 10 ml MRS 離心管中，恆溫震盪培養（28°C，120 rpm）1 天。

- (2) 以 TSB 調整菌液濃度至 $OD_{600}=1.0$ ，以微量滴管分別吸取 100 μl *E.coli*、BT 菌液，滴入 dTSA 培養基中，以三角玻棒塗抹均勻。
 - (3) 利用 tip 鈍端在培養基上打出四個洞（約 0.8 mm）
 - (4) 將 LP 菌液放入 1.5 ml 離心管中，離心 14000 rpm，5 分鐘。以針筒吸取上清液，使之通過 0.22 μm 過濾膜除菌。
 - (5) 在 4 個小洞中分別滴入 25 μl 、50 μl 、75 μl 、100 μl LP 無菌上清液。
 - (6) 將培養皿放入 28°C 恆溫培養箱中培養 1 天，觀察抑菌圈。
2. 不同量（濃度）的 LP 上清液對 *E.coli*、BT 的抑制效果—液體培養法
- (1) 以 TSB 調整 *E.coli* 或 BT 菌液至 $OD_{600}=0.5$ ，在養菌管中分別加入 1 ml 菌液。
 - (2) 在養菌管中加入 0、0.25、0.5、0.75、1 ml 濃度之 LP 無菌上清液，每管 3 重複。
 - (3) 恆溫震盪培養（28°C，120 rpm）1 天，以 ELISA reader 測量菌液濃度（ OD_{600} ）。

（二）分離純化蟋蟀體表、產卵管微生物

1. 以無菌棉花棒沾無菌水後塗抹蟋蟀體表或產卵管，再塗抹於 dTSA 培養基，將培養基放入恆溫培養箱 28°C 恆溫培養 24 hr。
2. 以接種環挑選不同形狀、顏色之細菌，以畫線法純化菌種。
3. 利用解剖顯微鏡觀察細菌菌落外觀，並以手機拍照記錄

（三）分離純化蟋蟀腸道微生物

1. 解剖蟋蟀後取出腸道組織，置入 15 ml 離心管中。
2. 以滅菌過的鑷子將腸道搗碎，秤重並加入 9 倍的無菌水。
3. 震盪 5 秒均勻混合。
4. 以微量吸管吸取 1 ml 上清液至另一離心管中，加入 9 ml 無菌水混合均勻，序列稀釋至 10^{-6} 倍。
5. 吸取 100 μl 液體，以三角玻棒塗抹於 dTSA 培養基，28°C 恆溫培養 24 hr。
6. 以接種環挑選不同形狀、顏色之細菌，以畫線法純化菌種。
7. 利用解剖顯微鏡觀察細菌菌落外觀，並以手機拍照記錄。

（四）植物乳桿菌對體表、產卵管及腸道微生物的抑菌測試

1. 以接種環（loop）分別挑選分離自體表及腸道微生物之單一菌落和接種於含 3 ml TSB 的離心管中，將 LP 菌落接種於含 5 ml MRS 離心管中，恆溫震盪培養（28°C，120 rpm）1 天

- 2.以微量滴管分別吸取 100 μ l 菌液（體表、產卵管及腸道微生物），滴入 dTSA 培養基中，以三角玻棒塗抹均勻。
- 3.利用 tip 鈍端在培養基上打出一個洞（約 0.8 mm），分別在洞中加入 100 μ l LP 菌液。
- 4.將培養皿放入恆溫培養箱中 28°C 恆溫培養 1 天，觀察是否有抑菌圈形成。

三、植物乳桿菌是否可產生 GABA，影響蟋蟀的產卵及孵化率

（一）TLC 薄層層析

- 1.將植物乳桿菌接種在含 1% 麩胺酸鈉（monosodium L-glutamate）的 MRS 中，恆溫震盪培養（28°C，120 rpm）3 天。離心 14000 rpm，5 min。利用毛細管沾點上清液於 TLC 片上。
- 2.分別取 250 mg/ml GABA、250 mg/ml glutamate、MRS 以毛細管沾點在 TLC 片上做對照。
- 3.配置展開液 100 ml，正丁醇：醋酸：水=4：1：3，茚三酮 0.5%，將展開液放入 3000 ml 燒杯中。
- 4.將 TLC 片放入 3000 ml 燒杯中，上方覆蓋鋁箔紙，放置在抽氣櫥中進行層析。
- 5.完成後放入烘箱 90°C，10 min 烘烤顯色。

（二）不同 GABA 濃度對蟋蟀存活率及食物選擇的影響

- 1.取 8 個大小相同飼養箱，其中四組各放入未經交配之年輕雄蟋蟀 6 隻，另外四組各放入雌蟋蟀 6 隻。
- 2.在飼養箱中各放入 2 個飼料盒，1 個放入 3 克燕麥片，1 個放入 3 克狗糧。
- 3.在飼養箱中放入 1 個 60 ml 飲水器，內含水、5、10、20 mg/ml GABA。
- 4.紀錄一週後平均每隻蟋蟀的食物攝取量、存活率。
- 5.重複二次實驗。

（三）不同 GABA 濃度對蟋蟀產卵數及孵化率的影響

- 1.取 4 個大小相同飼養箱，分為對照組、5 mg/ml、10 mg/ml、20 mg/ml，分別放入經上述處理之雌雄蟋蟀各 3 對。
- 2.在飼養箱中各放入 3 個飼料盒，1 個放入 3 g 狗飼料，1 個放入 3 g 燕麥片，另外一個飼料盒中，放入五張含水衛生紙，提供蟋蟀產卵。
- 3.不同飼養箱中各放入一個給水器，分別加入水、5、10、20 mg/ml 的 GABA。最後將蟋蟀飼養箱放入恆溫箱中（28°C，12 小時光照，12 小時黑暗），紀錄一週後

蟋蟀取食量、存活率、產卵量。

- 4.紀錄一週內平均每隻蟋蟀的食物攝取量、存活率，以鑷子夾取各組的卵逐一計算數量，並放入另一觀察盒，維持適當濕度，觀察卵的孵化情形。
- 5.一週後卵陸續孵化成小蟋蟀，以水彩筆收集二週內孵化的小蟋蟀放入另一個飼養盒，並計算數量。
- 6.重複二次實驗。

四、植物乳桿菌是否可促使蟋蟀產生儲存蛋白及卵黃生成素

(一) 蛋白質萃取

- 1.將 9 齡蟋蟀分成四組，每組有 25 隻公蟋蟀與 25 隻母蟋蟀，分別以前述方法飼養，餵食抗生素、LP、BT 一週。
- 2.分別萃取各組羽化一週內成蟲之血淋巴。以注射針筒自蟋蟀腹部注射 50 μ l tris buffer，再自另一端吸取血淋巴，每組取 3 隻。
- 3.將血淋巴放入 1.5 ml 離心管後，以 14000 rpm，5 min 高速離心去除沉澱雜質，再吸取上清液至另一 1.5 ml 離心管冷藏保存。

(二) 蛋白質含量測定

1. BSA 標準曲線製作

- (1) 配置濃度 0、20、40、60、80、100 μ g/ml 的 BSA 系列標準品。
- (2) 分別取 50 μ l 不同濃度的 BSA 標準品，以 3 重複加入 96 孔微量盤的槽中。每槽再加入 200 μ l Bradford protein binding assay dye。
- (3) 靜置室溫 10 min，以 ELISA reader OD 595 nm 測吸光值，計算標準曲線。

2. 蟋蟀蛋白質定量

- (1) 取各組蟋蟀蛋白質萃取液 50 μ l 加入 96 孔微量盤的槽中，每槽再加入 200 μ l Bradford protein binding assay dye。
- (2) 靜置室溫 10 min，以 ELISA reader OD 595 nm 測吸光值。
- (3) 代入 BSA 標準曲線，換算蟋蟀萃取物蛋白質濃度。

(三) SDS-PAGE

1. 溶液配置

- (1) 1.5 M Tris (pH 8.8) 緩衝溶液：取 9.09 g Tris 加 d.d H₂O 至 100 ml，以 HCl 調整 pH 至 8.8
- (2) 0.5 M Tris-HCl (pH6.8) 緩衝溶液：取 3.94 g Tris 加 d.d H₂O 至 100 ml，以

HCl 調整 pH 至 6.8

- (3) 電泳緩衝液 (running buffer): 取 1.53 g Tris, 0.5 g SDS, 7.25 g glycine, 加 d.d H₂O 至 500 ml。
- (4) 退染劑: 取 methanol 100ml, acetic acid 50ml, 加 d.d H₂O 至 500 ml。
- (5) 10 % SDS: 取 1 g SDS 加 d.d H₂O 至 10 ml。
- (6) 30 % acrylamide/bis (29 : 1): 取 3 g 加 d.d H₂O 至 10 ml。
- (7) 10 % APS: 取 1 g APS 加 d.d H₂O 至 10 ml。
- (8) 膠片染色液: 取 0.1 g comassie blue brilliant blue R250 溶於 50 ml 甲醇, 加入 10 ml 醋酸, 再加入 50 ml d.d H₂O。
- (9) 4X sample buffer: Tris-HCl (pH 6.8) 1 ml, d.d H₂O 4.7 ml, Glycerol 1 ml, beta-mercaptoethanol 0.1 ml, 0.05 % bromophenol blue 0.8 ml

2.10%分離膠 (separating gel)

- (1) 取一 50 ml 燒杯, 加入 d.d H₂O 4 ml, 30 % acrylamide/bis (29 : 1) 3.3 ml, 1.5M Tris-HCl (pH 8.8) 2.5 ml, 10 % SDS 100 μ l, TEMED 5 μ l, 10 % APS 100 μ l, 使總體積為 10 ml, 輕輕搖勻。
- (2) 以微量吸管吸取混合溶液 5 ml 至注膠槽, 再加入異丙醇於膠體上方壓膠, 靜置凝固約 60 分鐘。

3.5 %堆疊膠 (stacking gel)

- (1) 倒出壓膠用的異丙醇, 注入純水潤洗一次, 倒出純水, 並以吸水紙吸乾純水。
- (2) 取一 50 ml 燒杯, 加入 d.d H₂O 3.4 ml, 30 % acrylamide/bis (29 : 1) 0.83 ml, 0.5M Tris-HCl (pH 6.8) 700 μ l, 10 % SDS 50 μ l, TEMED 10 μ l, 10 % APS 50 μ l, 輕輕搖勻後加入已凝固分離膠上。
放入 10 孔尺梳於凝膠上方, 不可壓入空氣, 靜置膠體凝固約 45 分鐘。

4.SDS-PAGE 電泳

- (1) 取 30 μ l 樣品與 10 μ l 的 4X sample buffer 混勻, 於 95 °C 煮 3~5 min。
- (2) 將配好的膠片放入電泳槽, 於電泳槽上方注入電泳緩衝液 (running buffer)。
- (3) 以微量吸管分別注入 3 μ l 蛋白質標記或 20 μ l 待測樣品至膠體孔洞中。
- (4) 接上電極, 連接電源供應器, 設定 100 伏特, 240 分鐘, 待藍色標記物到達底端即停止電泳。

5. 染色及退染

(1) 將膠體取出後浸入染劑 Comassie blue 搖晃染色 30 分鐘

(2) 將膠體移至 d.d H₂O 潤洗 1 分鐘，再浸到退染劑 10 分鐘，重複退染至蛋白條帶清楚顯色。



圖 4 實驗過程

肆、研究結果

一、腸道菌對蟋蟀產卵、孵化率的影響

(一) 餵食 LP、BT 或抗生素後腸道菌觀察

對蟋蟀餵食 LP、BT 或抗生素後，以蟋蟀糞便塗盤觀察菌落，結果顯示有很大不同，因此對蟋蟀餵食抗生素或菌液的確能讓腸道菌產生改變（圖 5）。

(二) 交配前腸道菌對蟋蟀存活率及食物選擇的影響

1. 改變蟋蟀腸道菌後再對蟋蟀進行一週的存活率及食物選擇影響實驗，發現蟋蟀存活率及食物攝取量產生了差異。蟋蟀的平均存活率依序為對照組（97.92 %）> 抗生素（95.83 %）> LP（93.75 %）= BT（93.75 %）。各組均無發現屍體，可能已被其他蟋蟀當作食物吃下肚。（表 1）

2. 食物總攝取量依序為 LP（0.39±0.00 g/隻）> 抗生素（0.35±0.03 g/隻）> 對照組（0.33±0.02 g/隻）> BT（0.29±0.00 g/隻）。狗飼料平均攝取量為抗生素（0.3±0.04 g/隻）> LP（0.27±0.01 g/隻）> 對照組（0.24±0.02 g/隻）> BT（0.22±0.00 g/隻）。麥

片平均攝取量為 LP (0.12 ± 0.02 g/隻) > 對照組 (0.09 ± 0.00 g/隻) > BT (0.07 ± 0.00 g/隻) > 抗生素 (0.05 ± 0.01 g/隻) (表 1、圖 6)。

5. 腸道菌相的變化可能造成食慾的改變，抗生素組及 LP 組也許是因為腸道菌種類及數量相對較少，對於養分的分解與吸收造成影響，食慾反而增加；BT 組腸道菌相的變化則造成較不良的影響，導致食慾下降。
6. 各組均為母蟋蟀較公蟋蟀攝取較多食物，且母蟋蟀對於狗飼料及麥片的總攝取量均高於公蟋蟀。推測生殖期的蟋蟀可能因為即將孵育下一代，攝取較多蛋白質食物。

(三) 交配中腸道菌對蟋蟀存活率及食物選擇的影響

1. 各組無蟋蟀死亡，可能與挑選了身體健康狀況較為良好的蟋蟀，體弱的蟋蟀在分開飼養時已被淘汰有關。
2. 交配中各組食物攝取量較交配前多，對於狗飼料取食量均較麥片多。總食物攝取量為 LP (0.58 ± 0.01 g/隻) > 抗生素 (0.56 ± 0.00 g/隻) > 對照組 (0.49 ± 0.01 g/隻) > BT (0.38 ± 0.02 g/隻)。狗飼料攝取量為 抗生素 (0.41 ± 0.04 g/隻) > LP (0.37 ± 0.05 g/隻) > 對照組 (0.31 ± 0.04 g/隻) > BT (0.25 ± 0.03 g/隻)。麥片攝取量為 LP (0.21 ± 0.04 g/隻) > 對照組 (0.18 ± 0.02 g/隻) > 抗生素 (0.15 ± 0.04 g/隻) > BT (0.13 ± 0.00 g/隻) (表 2、圖 7)。

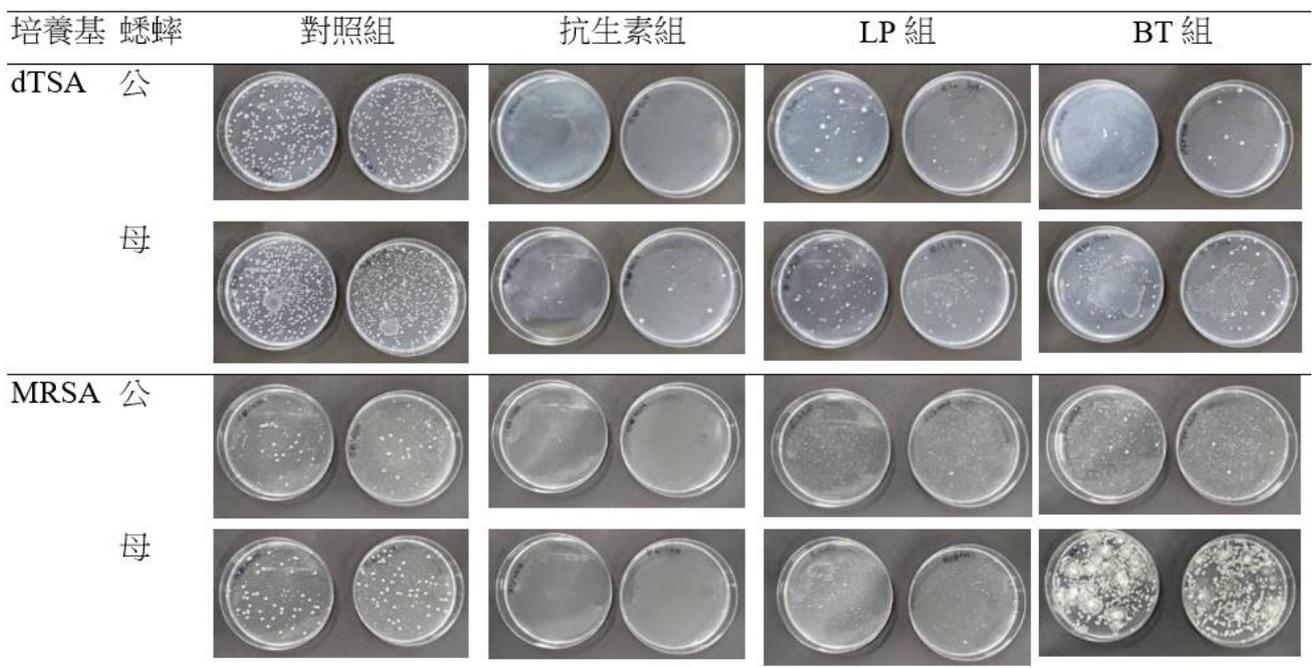


圖 5 對黃斑黑蟋蟀餵食 LP、BT 或抗生素後腸道菌觀察

表 1 交配前腸道菌對蟋蟀存活率與食物攝取量的影響（單位：克/隻）

| | | 對照組 | | 對照組 | | 抗生素 | | 抗生素 | | LP公 | LP母 | LP | BT公 | BT母 | BT | |
|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 公 | 母 | 公 | 母 | 公 | 母 | 公 | 母 | | | | | | | |
| 存活率 | 平均數 | 12 | 11.5 | 23.5 | 11.5 | 11.5 | 23 | 12 | 10.5 | 22.5 | 11 | 11.5 | 22.5 | 11 | 11.5 | 22.5 |
| | 標準差 | 0 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0 | 0 | 0 | 0.71 | 0.71 | 0 | 0.71 | 0 | 0.71 | 0.71 |
| 狗飼料 | 平均數 | 0.16 | 0.32 | 0.24 | 0.24 | 0.36 | 0.3 | 0.18 | 0.38 | 0.27 | 0.17 | 0.26 | 0.22 | 0.17 | 0.26 | 0.22 |
| | 標準差 | 0.01 | 0.03 | 0.02 | 0.01 | 0.06 | 0.04 | 0.02 | 0 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0 |
| 麥片 | 平均數 | 0.08 | 0.1 | 0.09 | 0.04 | 0.07 | 0.05 | 0.1 | 0.14 | 0.12 | 0.06 | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.07 |
| | 標準差 | 0.02 | 0.01 | 0 | 0.01 | 0 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0 |
| 總食物 | 平均數 | 0.24 | 0.42 | 0.33 | 0.27 | 0.43 | 0.35 | 0.28 | 0.52 | 0.39 | 0.24 | 0.33 | 0.29 | 0.24 | 0.33 | 0.29 |
| | 標準差 | 0.03 | 0.03 | 0.02 | 0 | 0.06 | 0.03 | 0.01 | 0.03 | 0 | 0 | 0.01 | 0 | 0 | 0.01 | 0 |

表 2 交配中腸道菌對蟋蟀存活及食物攝取量的影響（單位：克/隻）

| | | 對照組 | 抗生素 | LP | BT |
|-----|-----|------|------|------|------|
| | | 存活數 | 平均值 | 6 | 6 |
| | 標準差 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 狗飼料 | 平均值 | 0.31 | 0.41 | 0.37 | 0.25 |
| | 標準差 | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 0.03 |
| 麥片 | 平均值 | 0.18 | 0.15 | 0.21 | 0.13 |
| | 標準差 | 0.02 | 0.04 | 0.04 | 0 |
| 總食物 | 平均值 | 0.49 | 0.56 | 0.58 | 0.38 |
| | 標準差 | 0.01 | 0 | 0.01 | 0.02 |

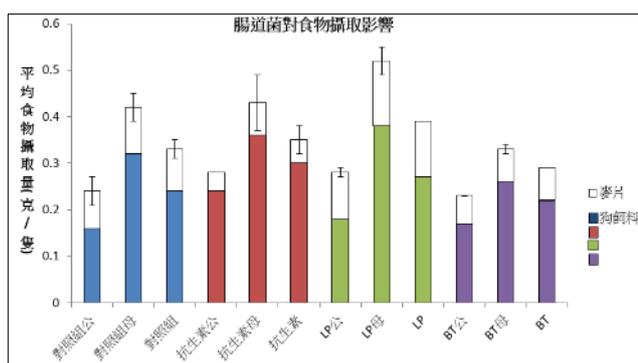


圖 6 交配前腸道菌對蟋蟀食物攝取量的影響

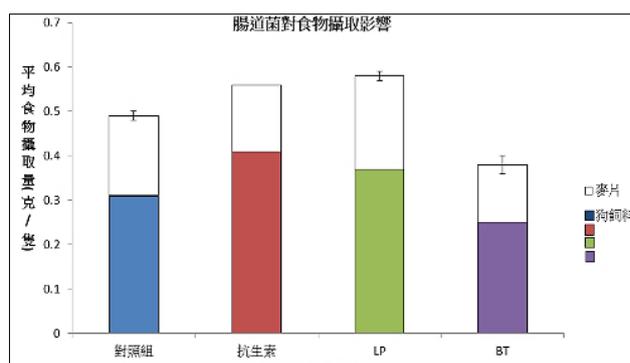


圖 7 交配中腸道菌對攝食的影響

(四) 腸道菌對蟋蟀產卵數的影響

平均每隻母蟋蟀產卵數為 LP (407.17 ± 61.05 顆/隻) > 抗生素 (391.67 ± 8.96 顆/隻) > 對照組 (306.83 ± 29.93 顆/隻) > BT (279.00 ± 8.49 顆/隻) (表 3、圖 8)。與食物攝取量有相關性。

(五) 腸道菌對蟋蟀產卵及孵化的影響

- 1.產卵後約一週小蟋蟀陸續孵化，連續收集二週內孵化的小蟋蟀並逐一計算數量，發現平均每隻母蟋蟀產出小蟋蟀的數量為 LP (293.5±4.48 隻) > 對照組 (222.17 ±7.31 隻) > BT (122.5±5.89 隻) > 抗生素 (119.67±5.19 隻) (表 4、圖 9)。
- 2.平均蟋蟀卵的孵化率依序為對照組 (72.41%) > LP (72.08%) > BT (43.91%) > 抗生素 (30.55%)。與對照組相比，LP 組卵數量多，略大；抗生素組雖產卵數多，但卵較小，顏色深，易破，最後成功孵化出小蟋蟀的數量少；BT 組產卵數少，最後成功孵出小蟋蟀的數量也少 (表 4、圖 10、圖 11)。

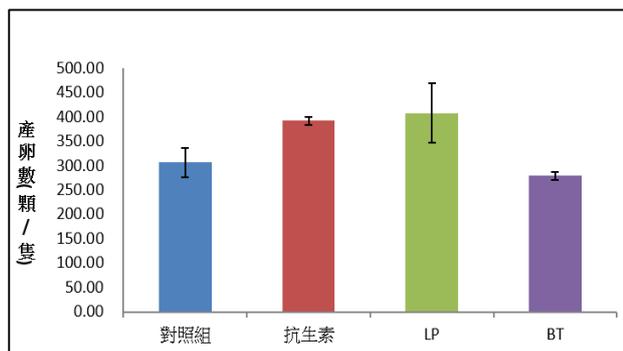


圖 8 腸道菌對蟋蟀產卵數的影響

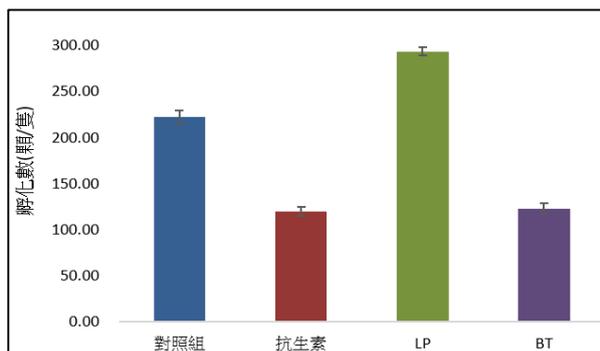


圖 9 腸道菌對蟋蟀卵孵化數的影響

表 3 腸道菌對蟋蟀產卵數的影響 (單位：顆/隻)

| 產卵數 | 對照組 | 抗生素 | LP | BT |
|-----|----------|----------|----------|----------|
| 第一次 | | | | |
| 第二次 | | | | |
| 平均數 | 306.83 顆 | 391.67 顆 | 407.17 顆 | 279.00 顆 |
| 標準差 | 29.93 | 8.96 | 61.05 | 8.49 |

表 4 腸道菌對蟋蟀卵孵化的影響

| 孵化數 | 對照組 | 抗生素 | LP | BT |
|-----|---|---|--|---|
| 第一次 |  |  |  |  |
| 第二次 |  |  |  |  |
| 平均 | 222.17 隻 | 119.67 隻 | 293.50 隻 | 122.50 隻 |
| 標準差 | 7.31 | 5.19 | 4.48 | 5.89 |
| 孵化率 | 72.41 % | 30.55 % | 72.08 % | 43.91 % |

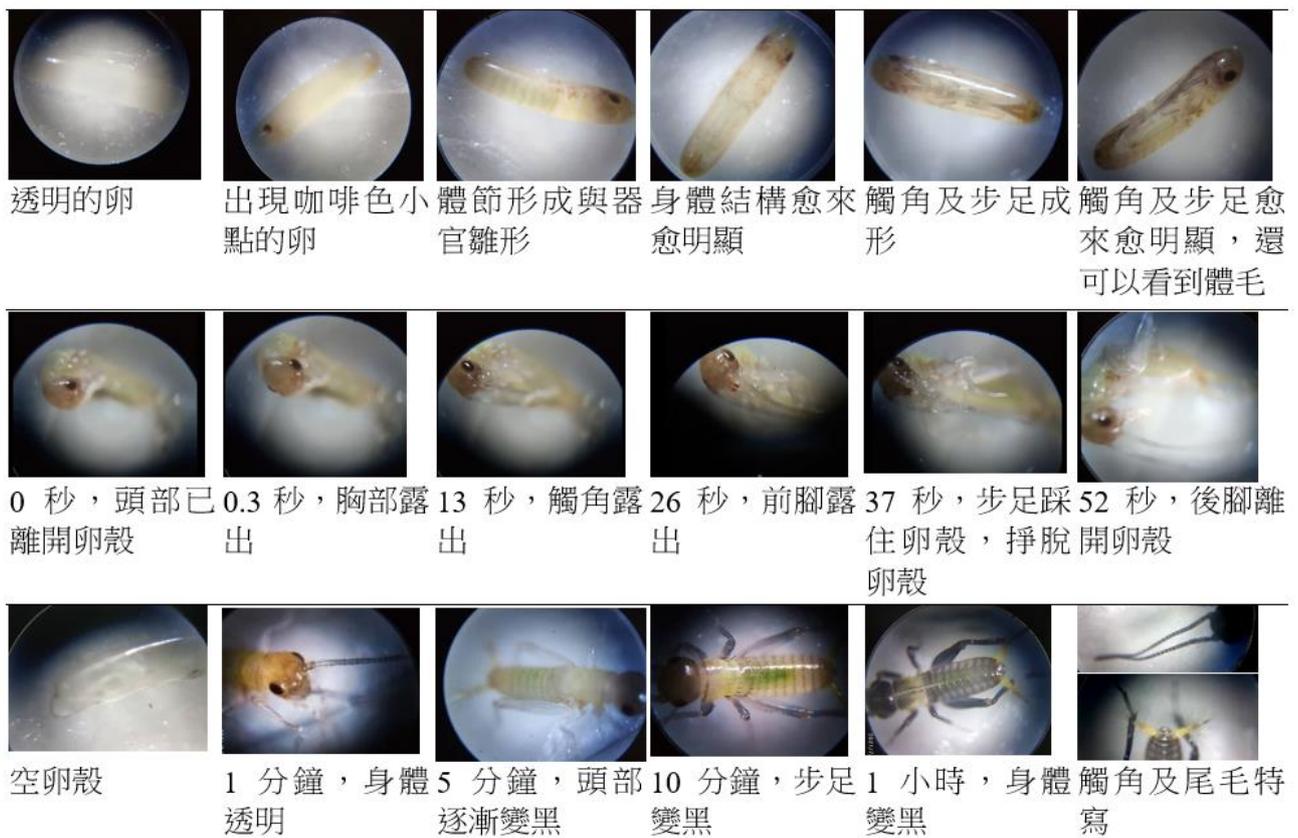


圖 10 正常發育的卵及卵的孵化過程

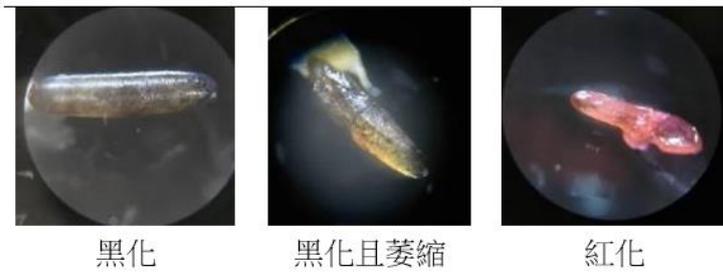


圖 11 發育異常的卵

二、植物乳桿菌是否可抑制蟋蟀體表、產卵管及腸道微生物

(一) 植物乳桿菌的對 *E.coli*、BT 的抑制效果

1. LP、*E.coli*、BT 菌落型態如圖 12，利用 LP 上清液進行固體培養基抑菌實驗，發現 LP 對 *E.coli* 及 BT 均有抑制效果，當上清液愈多，濃度愈高，抑制效果愈明顯。
2. 液體培養後發現，0.25 ml LP 上清液即可抑制 *E.coli* 或 BT 生長，但無法完全消滅 *E.coli* 或 BT。

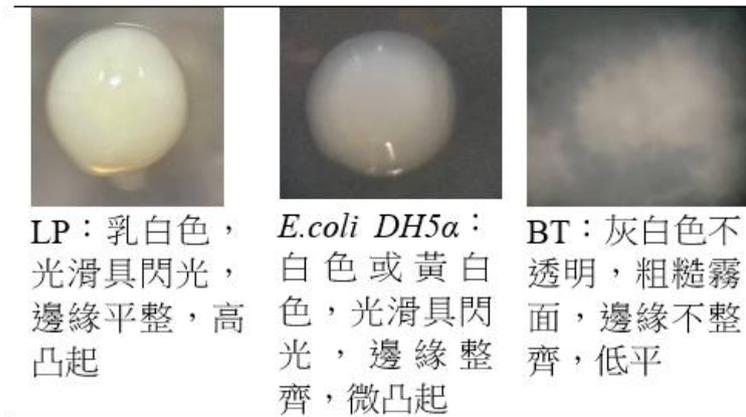


圖 12 LP、*E.coli*、BT 菌落型態



圖 13 LP 對 *E.coli* 抑菌測試



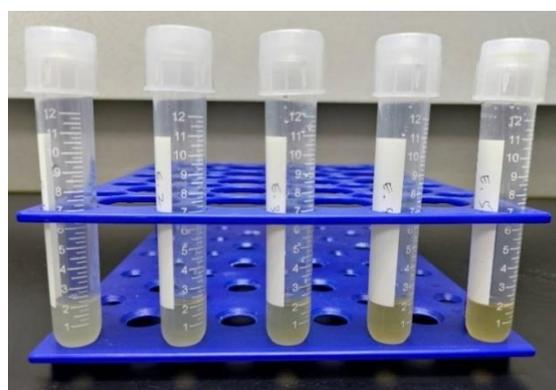
圖 14 LP 對 BT 抑菌測試

表 5 不同濃度 LP 對 *E.coli* 抑菌測試

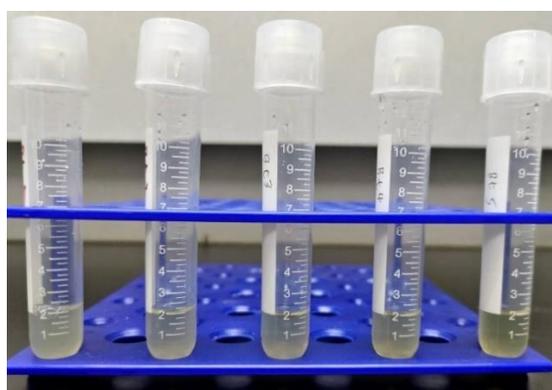
| | EC1 | EC2 | EC3 | EC4 | EC5 |
|------------------------------------|-------|---------|--------|---------|-------|
| E.coli 菌液 (OD ₆₀₀ =0.5) | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| LP 無菌上清液 | 0 ml | 0.25 ml | 0.5 ml | 0.75 ml | 1 ml |
| TSB | 1 ml | 0.75 ml | 0.5 ml | 0.25 ml | 0 ml |
| 平均 OD ₆₀₀ | 1.929 | 0.826 | 0.725 | 0.661 | 0.571 |

表 6 不同濃度 LP 對 BT 抑菌測試

| | BT1 | BT2 | BT3 | BT4 | BT5 |
|--------------------------------|-------|---------|--------|---------|-------|
| BT 菌液 (OD ₆₀₀ =0.5) | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| LP 無菌上清液 | 0 ml | 0.25 ml | 0.5 ml | 0.75 ml | 1 ml |
| TSB | 1 ml | 0.75 ml | 0.5 ml | 0.25 ml | 0 ml |
| 平均 OD ₆₀₀ | 1.455 | 0.795 | 0.515 | 0.376 | 0.316 |



EC1 EC2 EC3 EC4 EC5



BT1 BT2 BT3 BT4 BT5

圖 15 不同濃度 LP 對 *E.coli* 抑菌測試

圖 16 不同濃度 LP 對 BT 抑菌測試

(二) 植物乳桿菌對體表、腸道及產卵管微生物的抑菌測試

1. 我們從蟋蟀體表純化出 10 株菌，分別命名為 A1~A10；從腸道純化出 11 株菌，分別命名為 B1~B11；從產卵管純化出 6 株菌，分別命名為 C1~C6。菌落外觀及特徵如圖 17。
2. 抑菌測試發現在 27 個菌株中，LP 對 24 個菌株都有不同程度的抑制效果（88.89%），有些菌株抑菌圈透明，有些抑制圈中仍有少量細菌生長，B9、B10、B11 等 3 個菌株則沒有抑制圈（圖 18）。
3. 由以上結果推測 LP 應具有調節體表、腸道、產卵管菌相平衡的能力。

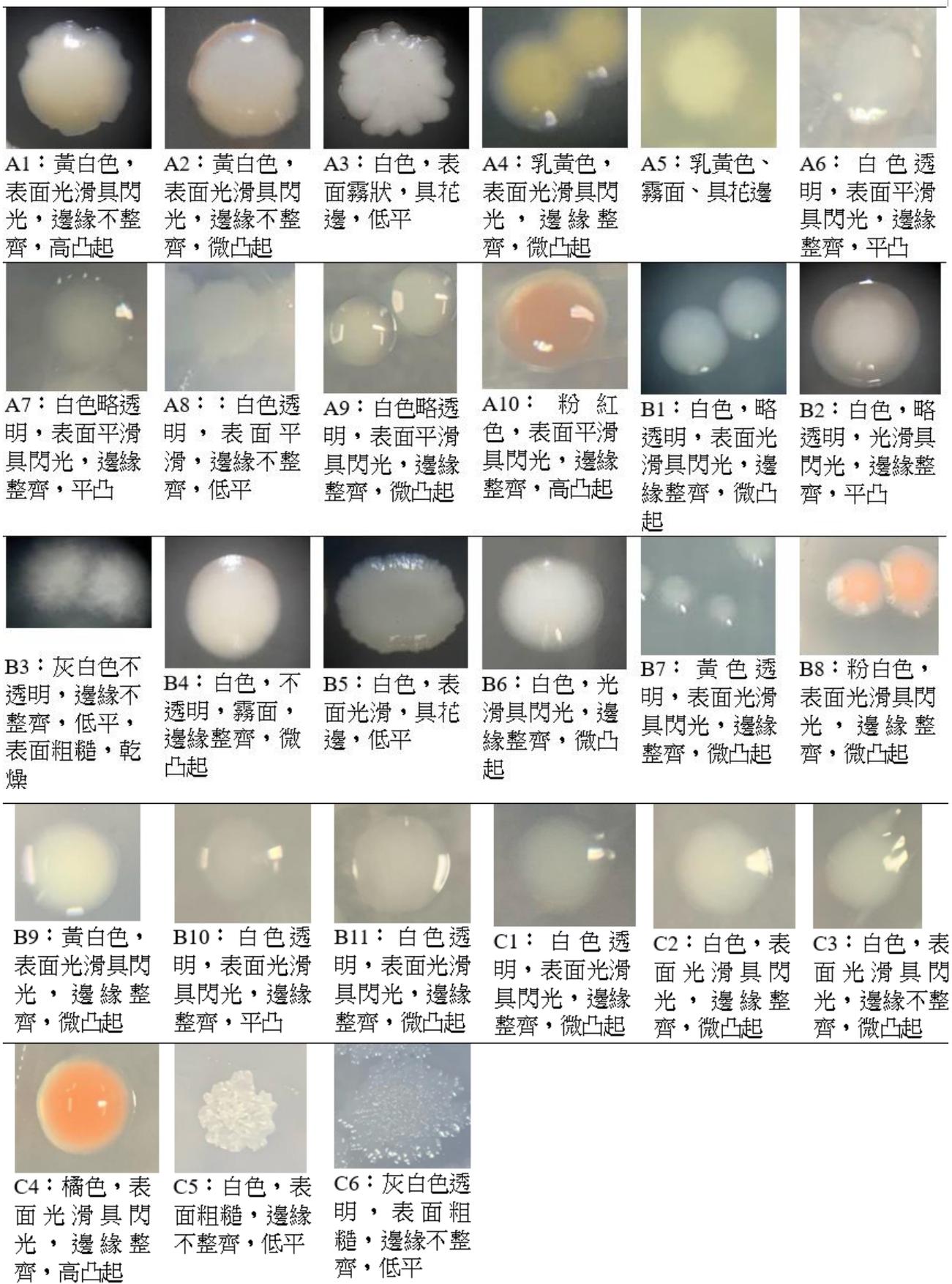


圖 17 體表 (A1~A10)、腸道 (B1~B11)、產卵管 (C1~C6) 菌落型態

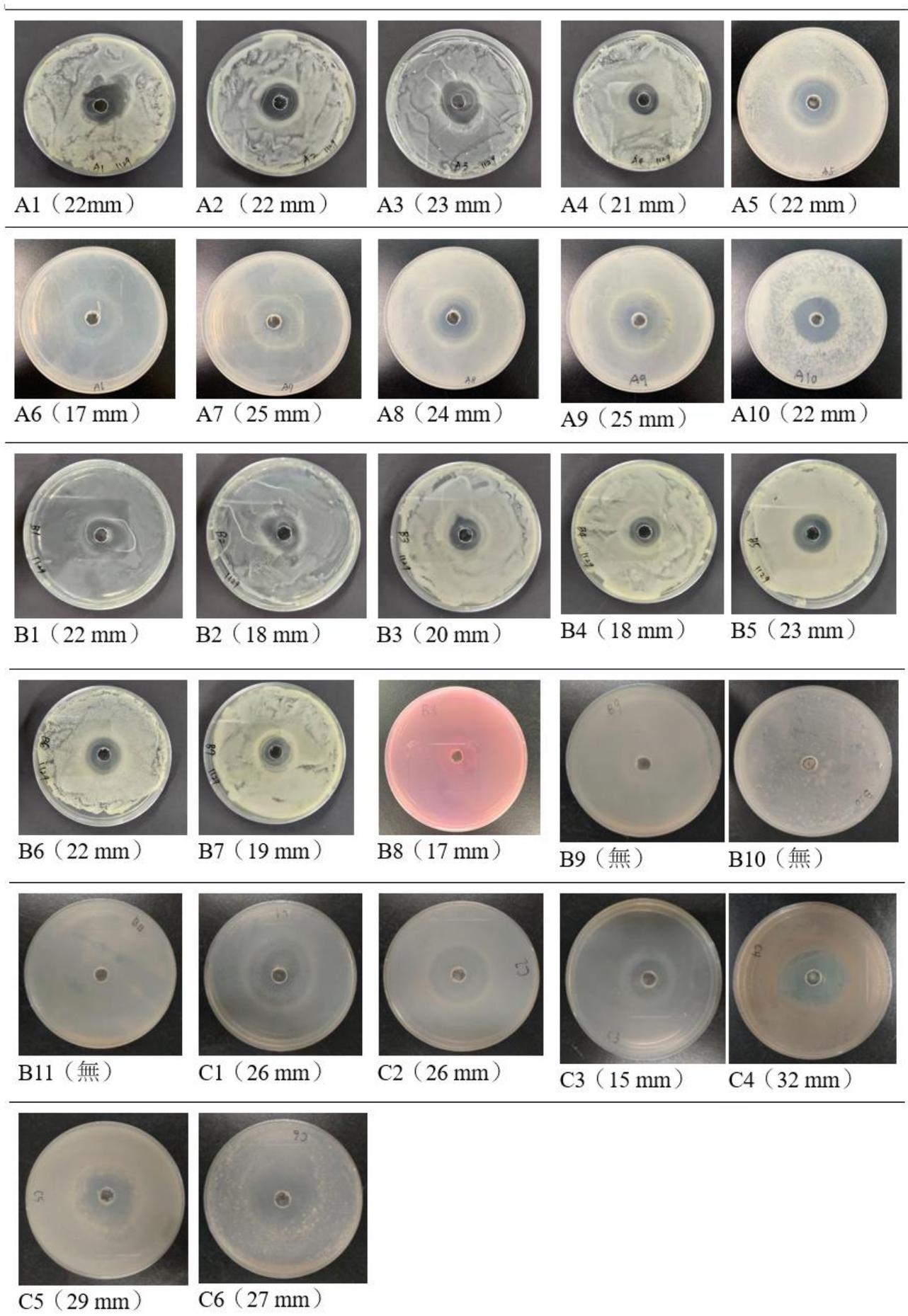


圖 18 植物乳桿菌對體表 (A1~A10)、腸道菌 (B1~B11)、產卵管 (C1~C6) 的抑菌測試

三、植物乳桿菌是否可產生 GABA，影響蟋蟀產卵及孵化率

(一) TLC 薄層層析

TLC 結果可觀察到 LP 可產生 GABA，Rf 值約為 $5.5/14=0.39$ (圖 19)。

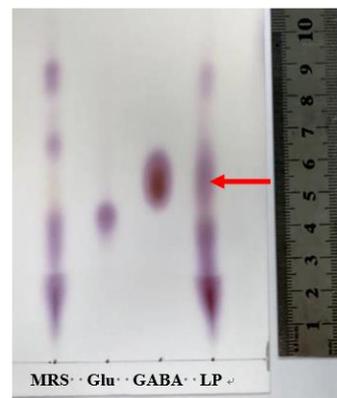


圖 19 利用 TLC 進行 GABA 分析

(二) 交配前 GABA 對蟋蟀存活率及食物選擇的影響

1. 對蟋蟀餵食不同濃度的 GABA 後，發現餵食 GABA

的量愈多，蟋蟀死亡率愈高 (表 7)，無發現屍體，可能已被同伴吃掉，同時也觀察到蟋蟀餵食 GABA 後的反應較為遲鈍，不好鬥，出現較多清潔步足及觸角行為，推測可能與 GABA 為抑制型神經傳導物質，降低了蟋蟀遇到危險時的逃跑行為有關。

2. 交配前總食物的平均攝取量為 G20 (0.57 ± 0.01 g/隻) = G10 (0.57 ± 0.01 g/隻)、G5 (0.40 ± 0.02 g/隻) > G0 (0.32 ± 0.01 g/隻)。狗飼料的平均攝取量為 G20 (0.31 ± 0.01 g/隻) > G10 (0.30 ± 0.01 g/隻) > G5 (0.25 ± 0.01 g/隻) > G0 (0.21 ± 0.01 g/隻)。麥片飼料的平均攝取量為 G20 (0.26 ± 0.02 g/隻) > G10 (0.27 ± 0.00 g/隻)、G5 (0.15 ± 0.00 g/隻) > G0 (0.11 ± 0.00 g/隻) (表 7、圖 20)。

(三) 交配中 GABA 對蟋蟀存活率及食物選擇的影響

1 將餵食不同濃度 GABA 的蟋蟀進行交配，發現僅餵食 20 mg/ml GABA 組有公蟋蟀死亡，飼養箱中只剩下翅膀殘骸 (表 8)。

2. 交配中總食物的平均攝取量為 G20 (0.70 ± 0.03 g/隻) > G10 (0.64 ± 0.04 g/隻) > G5 (0.48 ± 0.00 g/隻) > G0 (0.36 ± 0.05 g/隻)。狗飼料的平均攝取量為 G20 (0.40 ± 0.05 g/隻) > G10 (0.36 ± 0.01 g/隻) > G5 (0.30 ± 0.01 g/隻) > G0 (0.23 ± 0.03 g/隻)。麥片飼料的平均攝取量為 G20 (0.30 ± 0.02 g/隻) > G10 (0.28 ± 0.03 g/隻) > G5 (0.18 ± 0.01 g/隻) > G0 (0.13 ± 0.02 g/隻) (表 8、圖 21)。

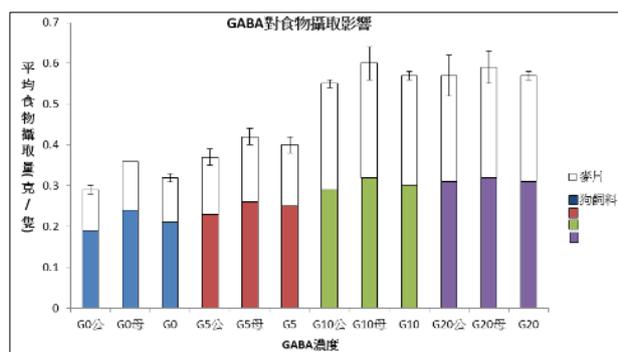


圖 20 交配前 GABA 對蟋蟀食物攝取量的影響

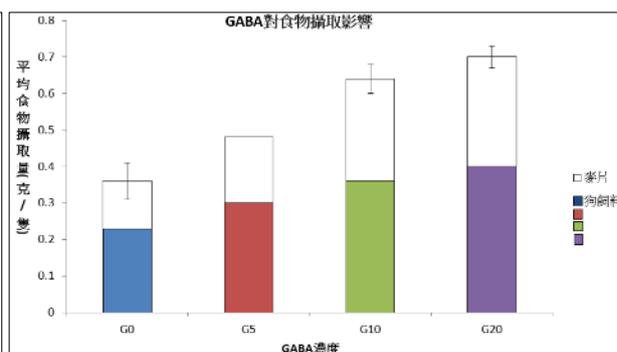


圖 21 交配中 GABA 對蟋蟀食物攝取量的影響

表 7 交配前 GABA 對蟋蟀存活及食物攝取量的影響（單位：克/隻）

| | | G0 公 | G0 母 | G0 | G5 公 | G5 母 | G5 | G10 公 | G10 母 | G10 | G20 公 | G20 母 | G20 |
|------------|-----|---------|---------|------|------|------|------|----------|----------|------|----------|----------|------|
| 存活率 | 平均 | 6 | 6 | 12 | 5.5 | 5.5 | 11 | 5.5 | 5 | 10.5 | 3 | 3 | 6 |
| | 標準差 | 0 | 0 | 0 | 0.71 | 0.71 | 0 | 0.71 | 0 | 0.71 | 1.41 | 0 | 1.41 |
| 狗飼料 攝取量 | 平均 | 0.19 | 0.24 | 0.21 | 0.23 | 0.26 | 0.25 | 0.29 | 0.32 | 0.3 | 0.31 | 0.32 | 0.31 |
| | 標準差 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0 | 0.03 | 0.01 |
| 麥片 攝取量 | 平均 | 0.1 | 0.12 | 0.11 | 0.14 | 0.16 | 0.15 | 0.26 | 0.28 | 0.27 | 0.26 | 0.27 | 0.26 |
| | 標準差 | 0.02 | 0.02 | 0 | 0.01 | 0.02 | 0 | 0 | 0.01 | 0 | 0.05 | 0 | 0.02 |
| 總食物 攝取量 | 平均 | 0.29 | 0.35 | 0.32 | 0.37 | 0.42 | 0.4 | 0.55 | 0.6 | 0.57 | 0.57 | 0.59 | 0.57 |
| | 標準差 | 0.01 | 0 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.05 | 0.04 | 0.01 |

表 8 交配中 GABA 對蟋蟀存活及食物攝取量的影響（單位：克/隻）

| | | G0 | G5 | G10 | G20 |
|------------|-----|------|------|------|------|
| 存活數 | 平均值 | 6 | 6 | 6 | 5 |
| | 標準差 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 狗飼料 攝取量 | 平均值 | 0.23 | 0.3 | 0.36 | 0.4 |
| | 標準差 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.05 |
| 麥片 攝取量 | 平均值 | 0.13 | 0.18 | 0.28 | 0.3 |
| | 標準差 | 0.02 | 0.01 | 0.03 | 0.02 |
| 總食物 攝取量 | 平均值 | 0.36 | 0.48 | 0.64 | 0.7 |
| | 標準差 | 0.05 | 0 | 0.04 | 0.03 |

（四）GABA 對蟋蟀產卵及孵化的影響

1. 平均每隻母蟋蟀產卵量依序為 G20（ 507 ± 11.79 顆/隻）>G10（ 449.33 ± 22.63 顆/隻）、G5（ 350 ± 17.44 顆/隻）>G0（ 287.83 ± 2.12 顆/隻）（表 9、圖 22）。
2. 蟋蟀卵約一週後小蟋蟀陸續孵化，收集二週內孵化的小蟋蟀並逐一統計數量，發現平均每隻母蟋蟀產出小蟋蟀的數量依序為 G20（ 381.67 ± 16.50 隻）>G10（ 324.00 ± 8.49 隻）>G5（ 251.67 ± 9.43 隻）>G0（ 205.33 ± 3.30 隻）。同時我們也觀察到 G10 及 G20 組的小蟋蟀較早孵化，體型較大，活動力較佳。統計各組的卵成功孵化出小蟋蟀的比率，發現各組數據差異不大（G0：71.34%，G5：71.91%，G10：72.11%，G20：75.28%）（表 10、圖 23）。

表 9 GABA 對蟋蟀產卵數的影響

(單位：顆/隻)

| 產卵數 | G0 對照組 | G5 | G10 | G20 |
|-----|---|---|--|---|
| 第一次 |  |  |  |  |
| 第二次 |  |  |  |  |
| 平均數 | 287.83 顆 | 350.00 顆 | 449.33 顆 | 507.00 顆 |
| 標準差 | 2.12 | 17.44 | 22.63 | 11.79 |

表 10 GABA 對蟋蟀孵化的影響

| 孵化數 | G0 對照組 | G5 | G10 | G20 |
|-----|---|---|--|---|
| 第一次 |  |  |  |  |
| 第二次 |  |  |  |  |
| 平均數 | 205.33 隻 | 251.67 隻 | 324.00 隻 | 381.67 隻 |
| 標準差 | 3.30 | 9.43 | 8.49 | 16.50 |
| 孵化率 | 71.34 % | 71.91 % | 72.11 % | 75.28 % |

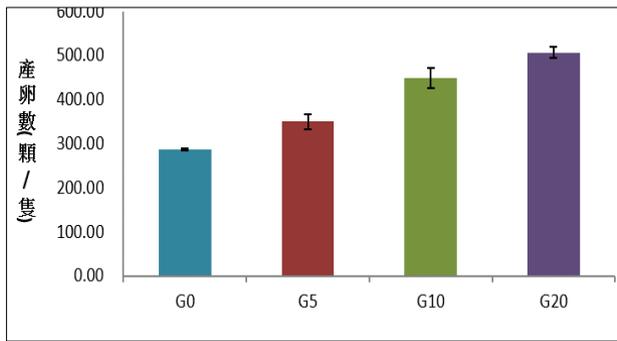


圖 22 GABA 對蟋蟀產卵數的影響

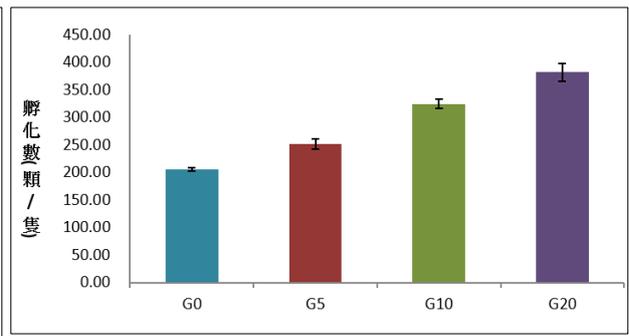


圖 23 GABA 對蟋蟀孵化數的影響

四、植物乳桿菌是否可產生儲存蛋白 (hexamerin) 及卵黃生成素 (vitellogenin)

(一) 蛋白質含量測量 (圖 24)

將 BSA 標準品的 OD₅₉₅ 數值輸入 excel 後可得線性迴歸曲線為 $y = 0.0059x + 0.3064$ ($R^2 = 0.993$) (圖 25)。將蟋蟀 OD₅₉₅ 數值代入 BSA 標準曲線後，可得蛋白質濃度如表 11。

(二) SDS-PAGE

蛋白質電泳如圖 26，各組在 68 kDa 左右均具有蛋白質條帶，推測有可能為儲存蛋白 (hexamerin)；LP 母及對照組母在 50 kDa 亦具蛋白質條帶，且 LP 組較對照組明顯，BT 母及抗生素母則此條帶不明顯，推測此為卵黃生成素 (vitellogenin)。未來將透過膠體蛋白質純化及胺基酸定序確認蛋白質種類及進行 RT-PCR 定量相關基因表達。

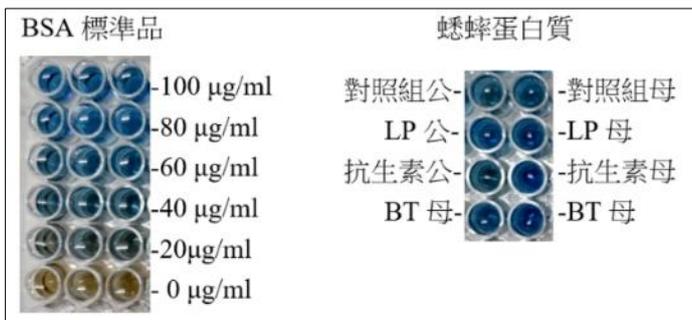


圖 24 BSA 標準品及蟋蟀血淋巴蛋白質定量

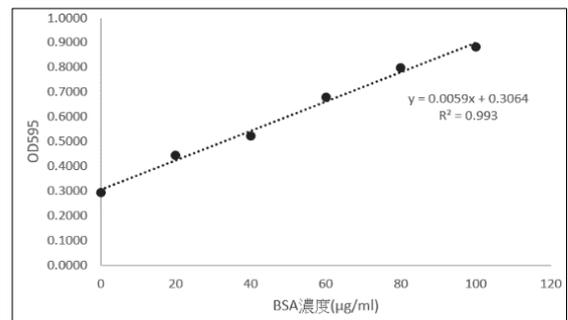


圖 25 BSA 標準品線性迴歸曲線

表 11 蟋蟀血淋巴總蛋白質含量

| | 對照組 公 | 對照組 母 | 抗生素 公 | 抗生素 母 | LP 公 | LP 母 | BT 公 | BT 母 |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|--------|--------|--------|--------|
| OD ₅₉₅ | 0.7510 | 0.8774 | 0.7771 | 1.1450 | 1.0434 | 1.0523 | 0.9860 | 1.1429 |
| 濃度 (µg/ml) | 75.36 | 96.78 | 79.78 | 142.14 | 124.92 | 126.42 | 115.19 | 141.78 |

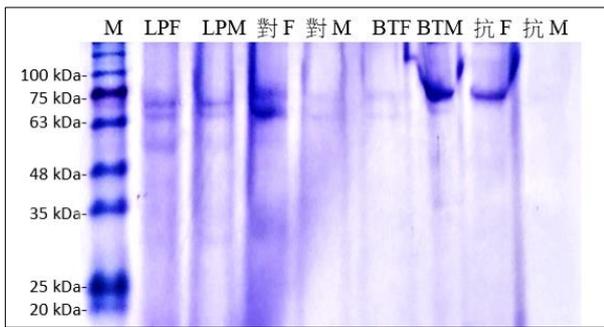


圖 26 蟋蟀血淋巴蛋白質 SDS PAGE

表 12 BSA 標準品 OD₅₉₅

| 濃度(μg/ml) | 1 | 2 | 3 | 平均 |
|-----------|--------|--------|--------|--------|
| 0 | 0.2830 | 0.3057 | 0.2944 | 0.2944 |
| 20 | 0.4200 | 0.4219 | 0.4884 | 0.4434 |
| 40 | 0.5123 | 0.5094 | 0.5503 | 0.5240 |
| 60 | 0.6083 | 0.7092 | 0.7159 | 0.6778 |
| 80 | 0.7797 | 0.8439 | 0.7742 | 0.7993 |
| 100 | 0.8764 | 0.9041 | 0.8655 | 0.8820 |

表 13 腸道菌對蟋蟀的影響（與對照組比較）

| 腸道菌 | 害菌數 | 食量 | GABA | hexamerin | vitellogenin | 產卵數 | 孵化數 |
|-----|-----|----|------|-----------|--------------|-----|-----|
| LP | ↓ | ↑ | ↑ | 有 | 有 | ↑ | ↑ |
| 抗生素 | ↓ | ↑ | 未檢測 | 有 | ↓ | ↑ | ↓ |
| BT | ↑ | ↓ | 未檢測 | 有 | ↓ | ↓ | ↓ |

伍、討論

一、腸道菌對蟋蟀產卵與孵化的影響

我們對黃斑黑蟋蟀餵食植物乳桿菌（LP）、蘇力菌（BT）及抗生素後，觀察腸道菌對蟋蟀產卵與孵化的影響，結果顯示 LP 組產卵量高於對照組及 BT 組，LP 組最後孵化出小蟋蟀的數量則高於對照組、抗生素組及 BT 組，若計算卵的孵化率，LP 組則高於抗生素組及 BT 組。比較 LP 組與對照組，LP 雖然可提高產卵的數量，使最後孵出的小蟋蟀較多，但卵的品質與對照組沒有太大差異，平均卵的孵化率也差異不大。若比較抗生素組與對照組，發現抗生素的產卵數大於對照組，但最後孵化出小蟋蟀的量較少，孵化率較低。BT 則是一種生物殺蟲劑，文獻中沒有明確提出對黃斑黑蟋蟀的影響，在我們的研究中發現，餵食 BT 對蟋蟀成體存活率沒有太大影響，卻同樣會導致產卵數下降，卵孵化失敗。因此推論腸道菌對於黃斑黑蟋蟀產卵及孵化具有重要影響（表 13）。

Morimoto 等人曾做過不同腸道菌對果蠅生殖影響的實驗，他們發現公果蠅的腸道菌對交配、生殖有影響，LP 腸道菌之公果蠅和 LP 雌果蠅或 *Acetobacter pomorum*（AP）雌果蠅交配所得子代數目及子代的體型大小皆較 AP 公果蠅佳。我們的實驗結果顯示 LP 有助於提高產卵數，子代蟋蟀體型也較大，與此研究相似。另外，Morimoto 的研究發現擁有 LP 腸道菌的公果蠅交配時間會較長，這和學姊之前觀察到餵食米糠（腸道中有 LP 菌）的蟋蟀求偶較有耐心有相似之處（Morimoto, 2017）。

我們的實驗中也測量了蟋蟀交配前、交配中的食物攝取量，發現交配前 LP 組母蟋蟀食物攝取量較其他組多，公蟋蟀則沒有太大差別；在交配中 LP 組蟋蟀取食量也較對照組及 BT

組多，因此推測食欲增加可能是促使蟋蟀產卵數量增加的原因之一。

二、植物乳桿菌可否抑制蟋蟀體表、腸道及產卵管微生物，平衡菌相

植物乳桿菌已被證實可以抑制許多人類腸道致病菌，例如 *Acinetobacter baumannii* 和 *Pseudomonas aeruginosa* (Dallal et al., 2016)。研究指出植物乳桿菌會分泌酒石酸、乳酸和醋酸等的有機酸以抑制其他菌類，並會以不同種類的有機酸以各種比例搭配。這些各種不同搭配有機酸可以達到抑制不同菌種的效果 (Hu et al., 2019)。

乳酸菌是一種常見的腸道益生菌，會抑制腸道中有害的細菌生長，維持腸道菌的平衡，因此我們測試了植物乳桿菌是否會抑制大腸桿菌 (*E.coli*) 以及蘇力菌 (BT) 生長，此外並分離黃斑黑蟋蟀腸道、體表、產卵管微生物進行抑菌實驗。我們觀察到植物乳桿菌可以抑制大腸桿菌、蘇力菌，也可抑制 88.89%體表、腸道、產卵管微生物。因此推論植物乳桿菌應具有調節蟲體健康功能。

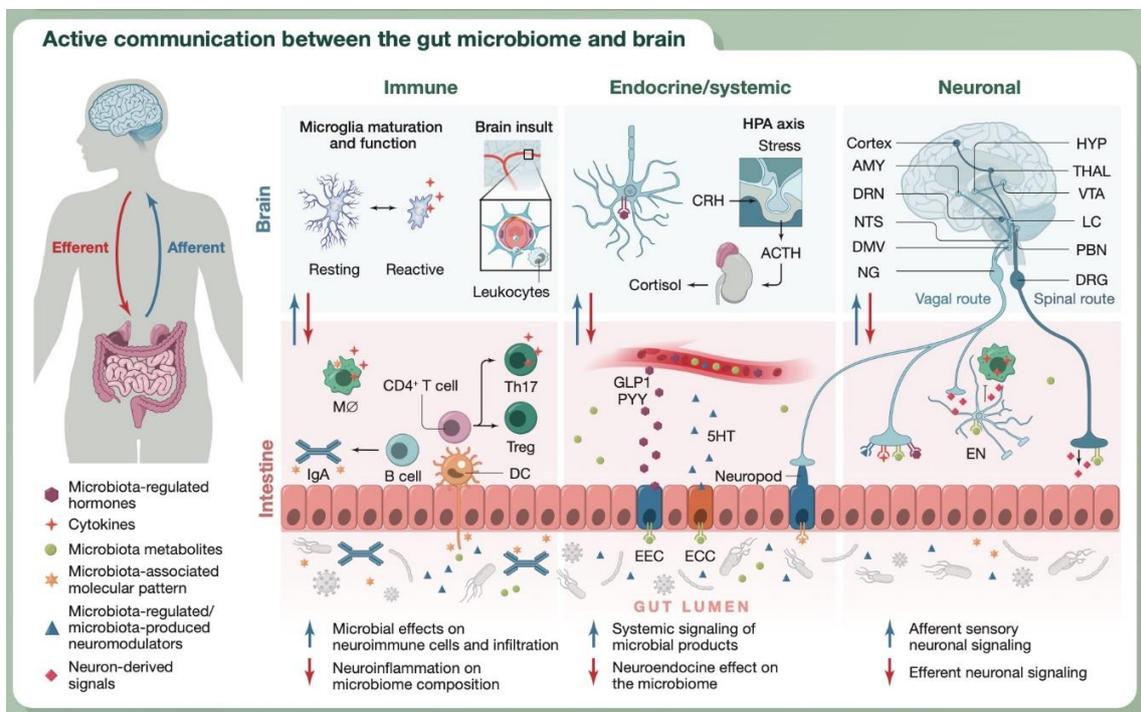
Wanzhen Su 等人的研究發現，植物乳桿菌可抑制果蠅致病菌 *Diaporthe* FY 的生長，並降低感染 *Diaporthe* FY 果蠅的死亡率，此外，有植物乳桿菌共生的果蠅還會迴避將卵產在經過 *Diaporthe* FY 處理的食物上，轉而產卵在以植物乳桿菌為主的食物上 (Wanzhen Su et al., 2012)，透過行為改變，提高了子代存活率。Yang Du 等人則利用從健康石斑魚腸道中分離得到的植物乳桿菌養殖凡納濱對蝦，結果發現在飲食中增加植物乳桿菌可降低飼料轉換率，並使蝦子形成較厚的腸絨毛層，增強了對病原體損傷的保護，避免感染副溶血性弧菌 E1，同時也提高了蝦腸道內免疫和消化相關酵素 SOD、CAT、TRY、AKP、LIP 和 AMS 的活性 (Yang Du et al., 2012)。在我們的研究中也發現植物乳桿菌能抑制蘇力菌生長，或許也能藉此緩解蟋蟀感染蘇力菌所產生的致病性，將來運用在其他昆蟲的飼養上。

三、植物乳桿菌是否可產生 GABA，影響蟋蟀產卵及孵化率

Jie Tu (2022) 等人曾以家蠶 (*Bombyx mori*) 為研究對象，將 GABA 噴灑在桑葉上，發現可提高成年蠶的繁殖力，並可增加抗氧化能力及調節長壽相關基因的表達而具有抗衰老潛力。Svetlana Dzitoyeva 等人則發現對果蠅胚胎注射 GABA 受體拮抗劑 (CGP54626)，則會降低果蠅孵化率並導致死亡 (Svetlana Dzitoyeva et al.2005)。因此推論 GABA 與昆蟲生殖亦有關聯。

本研究藉由TLC分析，發現此株由蟋蟀體內分離出來的植物乳桿菌具有產生GABA的能力，當我們對蟋蟀餵食不同濃度的GABA，GABA量增加則蟋配前與交配中蟋蟀總食物攝取量也增加，產卵數量及最後成功孵出小蟋蟀的數量也顯著提升，若計算平均卵的孵化率則沒

有太大差異，此結果與LP對蟋蟀生殖影響類似。此外，GABA是一種抑制型神經傳導物質，我們推測或許也能藉由腦腸軸線調節蟋蟀行為（圖28），適量的GABA將使蟋蟀變得情緒和緩不好鬥，對求偶也較具耐心。



| Neuromodulators | Reported bacterial producers |
|----------------------|--|
| GABA | <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp. |
| Serotonin | <i>Enterococcus</i> spp., <i>Escherichia</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>M. morgani</i> , <i>Spectrococcus</i> spp. |
| Dopamine | <i>Bacillus</i> spp., <i>Escherichia</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>M. morgani</i> , <i>Spectrococcus</i> spp. |
| Noradrenaline | <i>Bacillus</i> spp., <i>Escherichia</i> spp. |
| Acetylcholine | <i>Bacillus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp. |
| Histamine | <i>Enterococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>M. morgani</i> , <i>Spectrococcus</i> spp. |
| Secondary bile acids | <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp. |
| SCFA | Bacteroidetes phylum (e.g., <i>Prevotella</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp.): ++ acetate and propionate; Firmicutes phylum (e.g., <i>Clostridium leptum</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>): ++ butyrate |

圖27 菌腦腸軸線(from:Gulistan Agirman and Elaine Y. Hsiao,2021)

四、植物乳桿菌是否可產生儲存蛋白（hexamerin）及卵黃生成素（vitellogenin）

我們對蟋蟀九齡幼蟲餵食植物乳桿菌（LP）、蘇力菌（BT）及抗生素，待羽化成蟲後隨即萃取血淋巴進行蛋白質電泳（SDS PAGE），以蛋白質分子量大小觀察血淋巴蛋白質種類，研究發現各組在 68 kDa 左右具有蛋白質條帶，推測可能為儲存蛋白（hexamerin），hexamerin 是幼蟲與成蟲發育及生殖所需的蛋白質，與賀爾蒙運送、表皮形成、養分供應有關；LP 母

蟋蟀及對照組母蟋蟀在 50 kDa 亦具蛋白質條帶，其他組則不明顯，推測此蛋白質可能為卵黃生成素（vitellogenin），vitellogenin 是卵黃蛋白質的前驅物，為卵胚胎發育重要養分，並具有調節昆蟲雌性個體繁殖期性發育的功能，推測 BT 母蟋蟀及抗生素母蟋蟀可能缺乏此蛋白質，導致缺乏卵黃蛋白質，使胚胎發育不良。

我們觀察了各組蟋蟀所產出的卵，發現 LP 組的卵發生異常機率的較低，卵略大，卵的成長速度較快，較早有小蟋蟀孵出來；抗生素組與 BT 組的卵異常機率較高，時常有黑化、萎縮、紅化狀況出現，最後很多卵都沒有孵出來，因此抗生素組的產卵數雖然大於對照組，孵化數卻小於對照組，因此我們推測抗生素組與 BT 組可能因為缺乏卵黃生成素，對卵的孵化造成了負面的影響。

文獻中提到，保幼激素 JHSB₃ 可增加 hexamerin 和 vitellogenin 的基因表現。Shin 等人發現點蜂緣椿象腸道共生菌伯克氏菌可以促進保幼激素 JHSB₃ 的分泌，並可提升 hexamerin 和 vitellogenin 的表現量。這些蛋白質表現較多之點蜂椿象產的卵比其對照組多，生下的小椿象生長並成為成蟲的速度也比對照組的小椿象快（Shin, 2016、Shin, 2019）。比對文獻，點蜂椿象產卵數增加的現象和我們做的第一個實驗所得結果相似，因此我們推測 LP 和伯克氏菌皆具有促進保幼激素分泌並增進兩種蛋白質基因表現的能力，不過我們目前無法測量並判斷保幼素分泌量是否隨 LP 腸道菌而增加，只能透過 SDS-PAGE 確認蟋蟀血淋巴中的蛋白質大小，用來推測 hexamerin 和 vitellogenin 的表現，至於我們的推測是否正確目前只能觀察和其他研究結果是否有相似之處，希望未來可以更深入探究。

陸、結論

- 一、腸道菌會對黃斑黑蟋蟀產卵及孵化造成影響。對蟋蟀餵食植物乳桿菌，可提高產卵數量，最後成功孵出小蟋蟀的數量也較多；餵食抗生素或蘇力菌雖然對蟋蟀存活率沒有太大影響，卻會降低卵的品質與孵化率，最後成功孵出小蟋蟀的數量較少。
- 二、從蟋蟀腸道分離出來的植物乳桿菌可抑制蘇力菌、大腸桿菌、蟋蟀體表、產卵管或腸道微生物，具有平衡菌相促進蟲體健康的功能。
- 三、植物乳桿菌具有分泌 GABA，提升蟋蟀產卵數及孵化數的潛力。
- 四、對照組及 LP 組均有儲存蛋白和卵黃生成素的產生，抗生素組與 BT 組可能因為缺乏卵黃生成素而使卵發育或孵化受阻。

柒、參考資料

周佳儒，詹淳茹（2022）。腸道菌對黃斑黑蟋蟀社會互動行為影響之研究。中華民國第 62 屆

中小學科學展覽會。

苗栗區農業改良場苗栗區農情月刊（2024）。觀光休閒昆蟲 系列—鬥蟋蟀。苗栗區農業改良場苗栗區農情月刊，第 8 期。取自 <https://www.mdare.gov.tw/ws.php?id=1772&print=Y>

曾經洲（2005）。生物農藥：昆蟲的穿腸毒藥—蘇力菌。科學發展，391 期，6-9。

林命權（2020）。發酵乳桿菌 PS150TM 在小鼠模式的睡眠改善作用。國立陽明大學生化暨分子生物研究所博士論文。

林玥姘（2012）。 γ -胺基丁酸對生理機能應用之回顧。中華醫事大學生物醫學研究所機能性生醫產業研發碩士專班學位論文。

Shouhei Kurata, Yuuki Hiradate, Kohei Umezu, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura (2019). Capacitation of mouse sperm is modulated by gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration *Journal of Reproduction and Development*, 65 (4) .

Shin, S., S. H. Lim, H. You, B. Kim, A. C. Kim, K. A. Lee, J. H. Yoon, J. H. Ryu, and W. J. Lee. (2011) . *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis insulin signaling. *Science* 334,670-674.

Erkosar, B., G. Storelli, A. Defaye, and F. Leulier (2013) . Host-intestinal microbiota mutualism : learning on the fly. *Cell host and microbe* 13,8-14.

Morimoto, J., S. J. Simpson, and F. Ponton (2017) . Direct and trans-generational effects of male and female gut microbiota in *Drosophila melanogaster*. *Biol. Lett* 13, 20160966-20160971.

Bested, Alison C, Logan, Alan C, Selhub, Eva M (2013) . Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Metchnikoff to modern advances: part III – convergence toward clinical trials. *Gut Pathogens* 5 (1) , 4.

Jun Beom Lee, Kyoung-Eun Park, Seung Ah Lee, Seong Han Jang, Ho Jeong Eo, Ho Am Jang, Chan-Hee Kim, Tsubasa Ohbayashi, Yu Matsuura, Yoshitomo Kikuchi, Ryo Futahashi, Takema Fukatsu, Bok Luel Lee (2017) . Gut symbiotic bacteria stimulate insect growth and egg production by Modulating hexamerin and vitellogenin gene expression. *Developmental and Comparative Immunology*. 13 : 1–22.

Lee J, Kim CH, Jang HA, Kim JK, Kotaki T, Shinoda T, Shinada T, Yoo JW, Lee BL (2019) . *Burkholderia* gut symbiont modulates titer of specific juvenile hormone in the bean bug *Riptortus pedestris*. *Dev Comp Immunol*. 99:103399.

Storelli G, Defaye A, Erkosar B, Hols P, Royet J, Leulier F (2011) . *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell Metab*. 14(3):403-14.

- Hu CH, Ren LQ, Zhou Y, Ye BC (2019) . Characterization of antimicrobial activity of three *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese traditional dairy food. Food Sci Nutr. 7(6):1997-2005.
- Soltan Dallal MM, Davoodabadi A, Abdi M, Hajiabdolbaghi M, Sharifi Yazdi MK, Douraghi M, Tabatabaei Bafghi SM (2016) . Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lb. fermentum* isolated from the faeces of healthy infants against nonfermentative bacteria causing nosocomial infections. New Microbes New Infect. 15:9-13.
- Tsukamoto Y, Kataoka H, Nagasawa H, Nagata S (2014) . Mating changes the female dietary preference in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*. Front Physiol. 5:95.
- Donoughe S, Extavour CG (2016) . Embryonic development of the cricket *Gryllus bimaculatus*. Dev Biol. 411(1):140-56.
- Geister TL, Lorenz MW, Hoffmann KH, Fischer K (2008) . Effects of the NMDA receptor antagonist MK-801 on female reproduction and juvenile hormone biosynthesis in the cricket *Gryllus bimaculatus* and the butterfly *Bicyclus anynana*. J Exp Biol. 211(Pt 10):1587-93.
- Wanzhen Su, Jialin Liu, Peng Bai, Baocang Ma, Wei Liu (2019) Pathogenic fungi-induced susceptibility is mitigated by mutual *Lactobacillus plantarum* in the *Drosophila melanogaster* model BMC Microbiol. 19(1):302
- Jie Tu, Yingchun Jin, Jun Zhuo , Xitao Cao, Guanhui Liu , Hengjun Du , Li Liu, Jun Wang, Hang Xiao (2022) .Exogenous GABA improves the antioxidant and anti-aging ability of silkworm (*Bombyx mori*). Food Chem.383:132400.
- Svetlana Dzitoyeva, Alan Gutnov, Marta Imbesi, Nikola Dimitrijevic, Hari Manev (2005) .Developmental role of GABAB(1) receptors in *Drosophila* Brain Res Dev Brain Res.158(1-2):111-4.
- Gulistan Agirman and Elaine Y. Hsiao (2021) . SnapShot: The microbiota-gut-brain axis. Cell. 184:2524.