

中華民國第 51 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科

第三名

最佳(鄉土)教材獎

040717

分離吳郭魚腸道微生物之研究

學校名稱：國立嘉義女子高級中學

作者： 高二 謝明穎 高二 蕭雅文	指導老師： 林鈺婷
-------------------------	--------------

關鍵詞：吳郭魚、腸內菌、斑馬魚

摘要

在台灣，養殖漁業相當普遍，尤以吳郭魚之養殖最為興盛。本實驗以使吳郭魚成長更為良好為目的。我們取吳郭魚腸道內的微生物進行分離，確認分離後為單一菌種，並將之增殖。其後以菌液混入液態飼料餵食本實驗的實驗對象—斑馬魚，觀測魚的生長狀況，藉以判斷該微生物是否對魚體產生正向影響。在本實驗中，有發現兩菌種有助於斑馬魚魚體增長。但，希望之後能以吳郭魚苗為實驗對象，再次確認上述該兩種對斑馬魚有益之微生物對吳郭魚是否亦如此。盼最終能將之製為生物製劑，藉以提升吳郭魚的產值。

壹、研究動機

在生物課本中曾學到，在人體消化系統中，有相當多的菌以共生的方式存在，它們幫助人體吸收養分且抑制壞菌的生長。其中，乳酸菌就是一個很好的例子。然而有些壞菌卻會影響人體健康，如胃幽門螺旋桿菌。既然，不同的微生物能對人體產生不同影響，那對其他生物應該也是如此。因此我們想到若能將這種抑制壞菌的概念，同樣運用於其他生物上，一定能有新發現。

此時，我們恰巧看到了一篇有關吳郭魚的新聞，知道吳郭魚為台灣養殖漁業中，相當普遍的魚類，然而其長期受到微生物的感染，而有濫用抗生素的現象，使得那段期間吳郭魚的銷售受到影響。所以我們想，若能分離出一些本身就存在於吳郭魚腸道內之菌株，並將這些菌株混入飼料，觀察其對吳郭魚之影響，以求找到一種能協助吳郭魚吸收養分之菌株。那便是為吳郭魚製造了一種專屬牠們的益菌多，盼能使吳郭魚的養殖更有效率、生長狀況更加優良，且也能使民眾吃得更加安心。

貳、研究目的

- 一. 分離出吳郭魚腸中可能含有的菌種
- 二. 培養並純化出單一菌種
- 三. 觀察並分析菌種對斑馬魚的影響

參、研究設備及器材

1. 滅菌釜(圖 3-1)	2. 離心機(圖 3-2)	3. 恆溫水浴槽(圖 3-3)
4. 乾浴槽(圖 3-4)	5. 平面震盪器(圖 3-5)	6. 震盪器(圖 3-6)
7. 無菌操作臺 (圖 3-7)	8. 電子天平	9. 培養皿
10. 養菌管	11. 錐形瓶	12. 無菌離心管(1.5ml/50ml) (圖 3-8)
13. PCR 離心管	14. 抽風櫃	15. 微量吸取器(圖 3-9)

16. 組織均質機 (圖 3-10)	17. -80°C/-20°C/4°C 冰箱	18. 紫外線攝影裝置 (圖 3-11)
19. 電泳裝置(圖 3-12)	20. PCR 機(圖 3-13)	21. 接種環
22. 塗菌玻棒	23. Bacto Agar	24. Agarose(圖 3-14)
25. chelex(圖 3-15)	26. EtBr	27. 甘油 glycerol
28. TAE buffer	29. TE buffer	30. Lysogeny broth (LB) (圖 3-16)
31. primer(cEcoR1C05)	32. polymerase premix	33. 無菌水
34. 小型飼養箱	35. 塑膠桶(養魚用)	36. 統一寶多福魚飼料
37. 斑馬魚		



圖 3-1：滅菌釜



圖 3-2：離心機

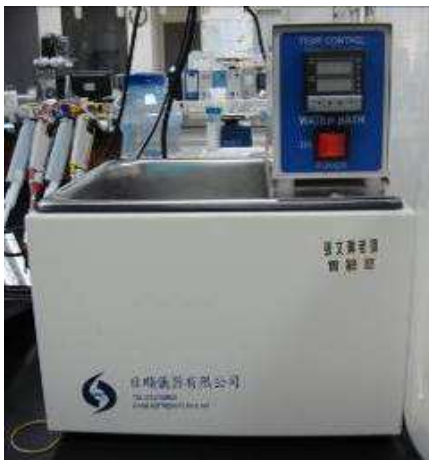


圖 3-3：恆溫水浴槽

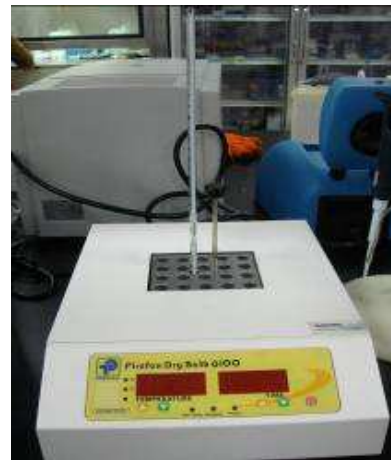


圖 3-4：乾浴槽



圖 3-5：平面震盪器



圖 3-6：震盪器



圖 3-7：無菌操作臺



圖 3-8：無菌離心管(1.5ml/50ml)



圖 3-9：微量吸取器



圖 3-10：組織均質機



圖 3-11：紫外線攝影裝置



圖 3-12：電泳裝置



圖 3-13：PCR 機



圖 3-14：Agarose



圖 3-15：chelex

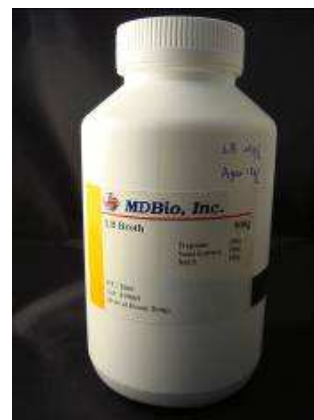


圖 3-16：Lysogeny broth (LB)

肆、研究過程或方法

一. 藥品配置及儀器操作

(一)滅菌

- 1.將錐形瓶以鋁箔封口
- 2.將二次水加入滅菌釜內，放入錐形瓶，以 3kg/cm^2 進行 75 分鐘滅菌。

(二)凝膠電泳

- 1.以 1X TAE 配置 1.5% agarose 溶液，並加熱至其完全溶解
- 2.倒入製膠槽、插上樣品齒模槽，靜待 40 分鐘
- 3.將已凝固的膠置入電泳槽中，並加 1X TAE 入電泳槽
- 4.在其中一個齒模槽中加 1Kb Marker(約 $10\ \mu\text{l}$)，其他齒模槽依序注入 DNA 樣本+ dye(約 5 : 1)
- 5.蓋上蓋子，以 100V 進行電泳約 25 分鐘
- 6.將膠片由電泳槽取出，浸泡在染劑 EtBr 中 5~10 秒
- 7.以清水漂洗一次後，置水中退染約 15 分鐘
- 8.將膠片置於紫外光攝影機，進行拍照。

(三)操作組織均質機

- 1.先使機器以二次水為欲均質物運轉一次
- 2.以拭鏡紙擦拭後，再以同樣步驟均質欲均質物
- 3.均質完畢後，重複步驟 1。

(四)5%chelex

- 1.將 TE buffer 放入 45°C 烘乾機加熱，再放回室溫冷卻，加入適量 chelex 使比例為 5%。

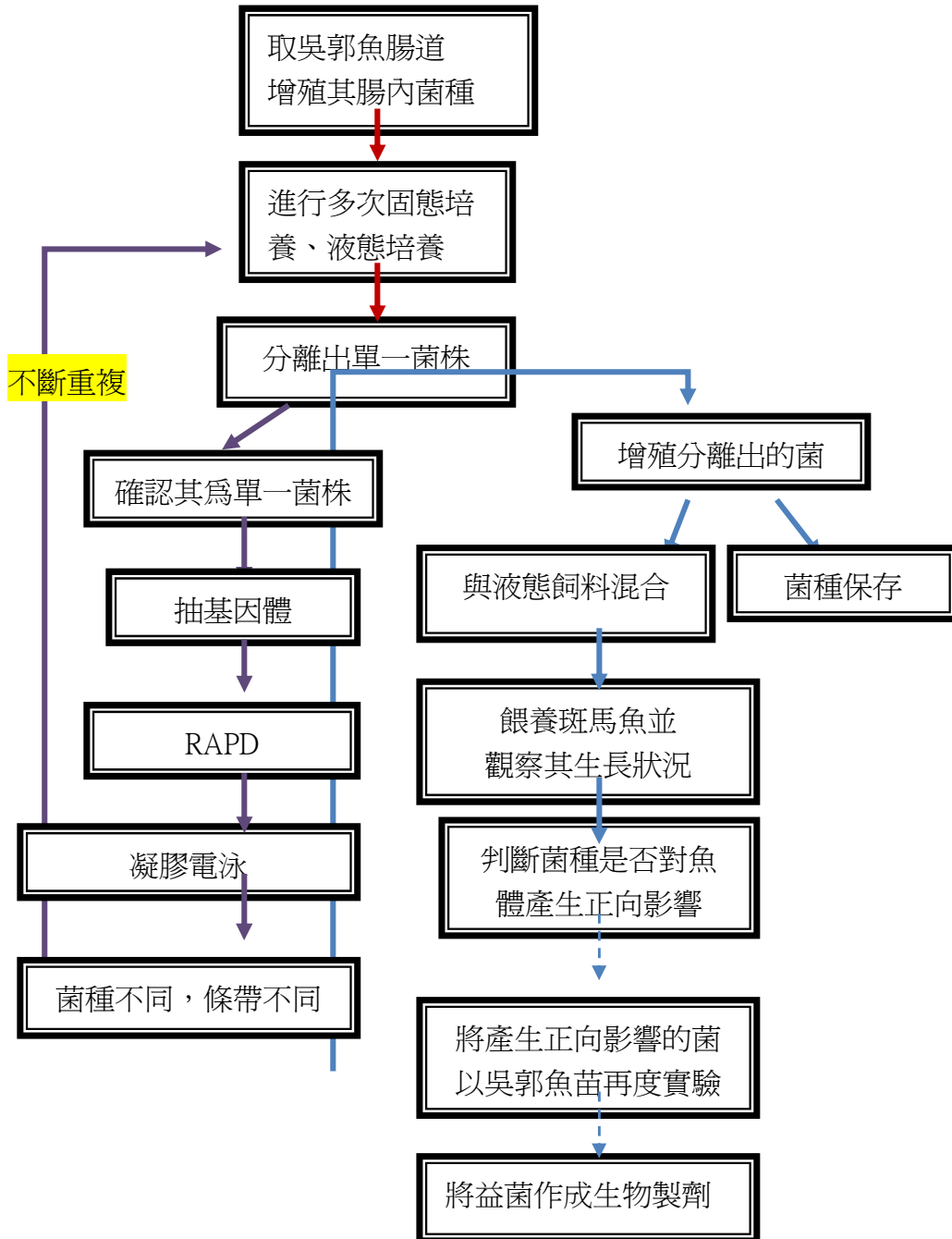
(五)固態培養基

- 1.以 LB broth 25g/l、Bacto Agar 15g/l 的濃度配製培養基
- 2.將其放入滅菌釜滅菌，滅菌後放入設定溫度為 55°C 水浴槽 10 分鐘
- 3.自水浴槽拿出，倒入培養皿中，待其凝固。(貯存： 4°C 冰箱)

(六)液態培養基(LB)

- 1.以 LB broth 25g/l 的濃度配製 LB
- 2.將其放入滅菌釜滅菌，滅菌後置室溫待其回溫即可使用
- 3.以 2ml/管 分裝入養菌管中。
(貯存： 4°C 冰箱)

二、實驗設計流程圖



三、實驗步驟

(一)取出魚腸

- 1.將吳郭魚置於一濕抹布上，以另一抹布蓋住其鰓蓋
- 2.以手握拳大力敲擊抹布覆蓋處，將之擊昏
- 3.將魚體自瀉殖孔剪開，以鑷子夾出魚腸

註：藉過程的迅速將傷害減至最低。

(二)吳郭魚腸的處理與保存

- 1.取出吳郭魚腸
- 2.將其置入無菌離心管(50ml)中，以無菌水沖洗兩次
- 3.配 12ml LB+8ml 50%甘油溶液，將魚腸剪為數小段置入並搖晃均勻
- 4.將其分裝進入 25 管無菌離心管(ependorf)中(1000 μ l/管)，冰入 -80°C 冰箱保存。

(三)分離吳郭魚的腸內菌

大致流程：固態培養→液態培養→抽基因體→隨機擴增多態性 DNA(RAPD)→凝膠電泳
→比照條帶。

1.第一次分離

- (1)從 -80°C 冰箱中取出步驟(二)之 ependorf 數管，以接種環沾之，在事先製好的固態培養基上分別進行第一次固態培養，操作完畢後再將 ependorf 冰入 -80°C 冰箱保存，固態培養基則置於室溫培養
- (2)固態培養基置於室溫培養 4-5 天後，只要有肉眼可見的菌落生成，即可進行挑菌，將欲選用的菌以 tip 挑起轉至 LB 中進行第一次液態培養，並將養菌管置於平面震盪器上，在室溫下使其均勻生長，而固態培養基則冰入 4°C 冰箱保存
- (3)液態培養 3-4 天，待 LB 呈混濁狀，再次以接種環沾第一次液態培養的菌液在固態培養基上進行第二次固態培養，同樣置於室溫下 4-5 天後，冰入 4°C 冰箱
- (4)抽第一次液態培養之菌株之基因體(genomic DNA)
 - a.將已進行液態培養 3-4 天的菌液，由試管中抽出 1500 μ l 菌液，加入 ependorf 中
 - b.以 14000rpm，進行 3 分鐘離心，離心後將上層廢液倒掉
 - c.加入 200 μ l chelex
 - d.用震盪器均質，確定完全無沉澱後，夾防爆夾
 - e.將乾浴槽調至 95°C，將 ependorf 放入其中，靜置 20 分鐘
 - f.取出 ependorf，置於常溫，待其回溫 5 分鐘，再度均質
 - g.以 12000rpm，進行 5 分鐘離心，離心後上清液即為其欲進行 RAPD 的 DNA 樣本
- (5)隨機擴增多態性 DNA(RAPD)
 - a.將各 DNA 樣本依以下比例和 primer、polymerase premix、TE buffer 混合

表 4-1

	DNA 樣本	primer	premix	TE buffer	總和
每管量(μ l)	1	0.5	7.5	6	15

註：1. primer 的序列為 cEcoR1C05 5' CGAATTCGATGACCGCC 3'

2. premix 貯放於 -20°C 冰箱

3.因為 premix 含酵素，所以在使用時不用手增加其回溫速度，以免破壞酵素活性。

4. premix 成分：Taq DNA 聚合酶、dNTPs、7.5mM MgCl₂、Loading dye

b.放入小型離心機中，運轉一下(約 10 秒)。運轉後，以手指輕彈 PCR 離心管底部，

使其混合。再度運轉約 10 秒

c.取出 PCR 離心管，放入 PCR 機器中，以下列條件進行 RAPD 後，即為其電泳的 DNA 樣本

表 4-2

溫度(°C)	94	94	49.3	72	72	4
時間(min)	10 : 00	0 : 20	01 : 30	04 : 00	10 : 00	∞
				35cycle		

(6)凝膠電泳

(7)紫外光攝影機拍照

2.第二次分離

(1)取出第二次劃菌之固態培養基，以肉眼觀察所生長出之菌株是否為單一菌種

(2)取出以肉眼觀察為單一菌種之固態培養基，並從中選出第一次分離時電泳條帶清楚之菌株，從固態培養基上任取一菌落，進行第二次液態培養於室溫下 3-4 天

(3)重複步驟 1.(4)-(7)

(4)比照第一次分離與第二次分離之電泳條帶，兩次條帶一樣之菌株進入步驟 3.

3.第三次確認

(1)從第二次劃菌之固態培養基上，任取三處菌落，分別進行液態培養 3-4 天。

(2)重複步驟 1.(4)-(7)

(3)比對此三處菌株所產生之電泳條帶是否相同，若相同則將此菌株用於斑馬魚試驗。

(四)菌種保存

1.將依上述步驟挑出之菌種液態培養數日，至 LB 成混濁狀

2.以每 eppendorf 20% 甘油、80% 菌液的比例保存於 -80°C 冰箱。

(五)以 CFU 法計算菌落數

1.取 1 μ l 之菌液，加入 ddH₂O 到總量為 1ml

2.接種 10 μ l 到已先行製好之固態培養基上，置於室溫下培養 48hr 以上

3.計算其菌落數，再乘以稀釋倍數 10³。

(六)飼養斑馬魚

1.製作液態飼料

(1)將飼料以 10% 的比例與水混合後以組織均質機進行均質

(2)分裝至 eppendorf 中(500 μ l/管)，保存於 -20°C 冰箱。

2.環境與餵養

(1)最後選出的 7 種菌，以每種菌 3 組(對照組亦為 3 組)，每組 8 隻由水族館購得的斑馬魚，進行菌對魚體生長的研究

(2)將自來水置於一大缸中，養水 3-4 日後，方開始養魚。每組實驗前的養魚環境為約 2.5 公升的水加 10cm 的水草

(3)每週換水 1/4 桶。我們以一大水缸持續進行養水以供換水之用

(4)一週餵魚兩次，每次每組餵 500 μ l 液態飼料+10 μ l 菌液。(對照組不加菌液，加等量 ddH₂O)。

註：菌液來源：將保存於-80°C 冰箱的 eppendorf(含 80%菌液、20%甘油)取出，抽 125 μ l 入養菌管中(內含 2ml 的 LB)，進行液態培養約 100hr。液態培養後之菌液為此處液態培養來源。

(七)觀察菌種對斑馬魚的影響

1.一般觀察

(1)每次餵養前記錄其水質、魚活力、活動位置等生活狀況

(2)餵養時調配好上述比例之飼料，快速倒入魚缸中，記錄魚吃飼料的速度、位置及是否有其他異常現象發生等餵養時情況。

註：水質：以水面是否產生油狀物、水的顏色是否正常為判斷依據，供討論數據時參考用

2.測量

(1)在一小型飼養箱中，加入約 1.5cm 高的水，並在箱底放置 2 段尺，彼此垂直放置

(2)以魚網撈起在桶中的 8 隻魚，放進飼養箱中。將相機置於飼養箱中心的投影區加以拍照

註：在測量時，組與組間需以酒精噴拭各測量用具，以免污染。

(3)將相片傳至電腦，由魚兩眼中間，沿脊椎畫數線段至魚尾部(但不含其尾鰭)
(例：圖 4-1)

(4)測量螢幕上尺的長度、線段的長度，以所測得的線段長度除以尺上 1cm 的刻度長度即為魚體長(單位：cm)



圖 4-1

(八)數據的選取及分析

1.計算出每種菌 24 隻魚的魚體平均增長量、標準差、其和對照組的 P 值及計算實驗組之變化量為對照組的多少百分比

註：本實驗進行 42 天，增長量為第 42 天魚體長減實驗開始日魚體長

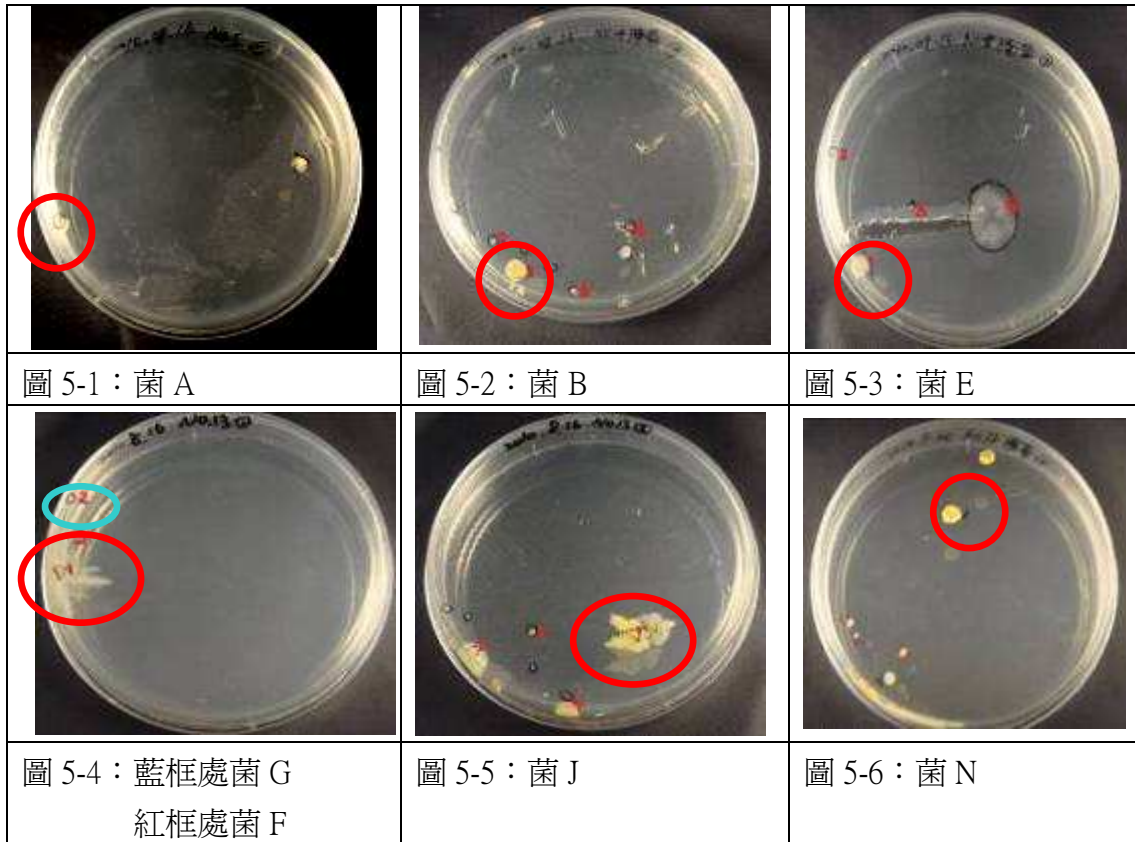
2.挑選出魚體增長量距平均增長量最近的 15 隻魚，代表該菌株對魚體的生長狀況，並重複步驟 1.

3.分析選 24 隻與 15 隻的差別

伍、研究結果

一、分離出之菌種

(一)第一次固態培養後 4-5 天(以下所呈現之培養基為之後會用於斑馬魚實驗之菌株)



- 1.由圖可知，魚的腸道中也有真菌，因為有出現長有菌絲的菌種
- 2.從第一次分離，分離出 39 株菌

(二)二次劃菌後四到五天



圖 5-7：菌 A



圖 5-8：菌 B



圖 5-9：菌 E



圖 5-10：菌 F



圖 5-11：菌 G

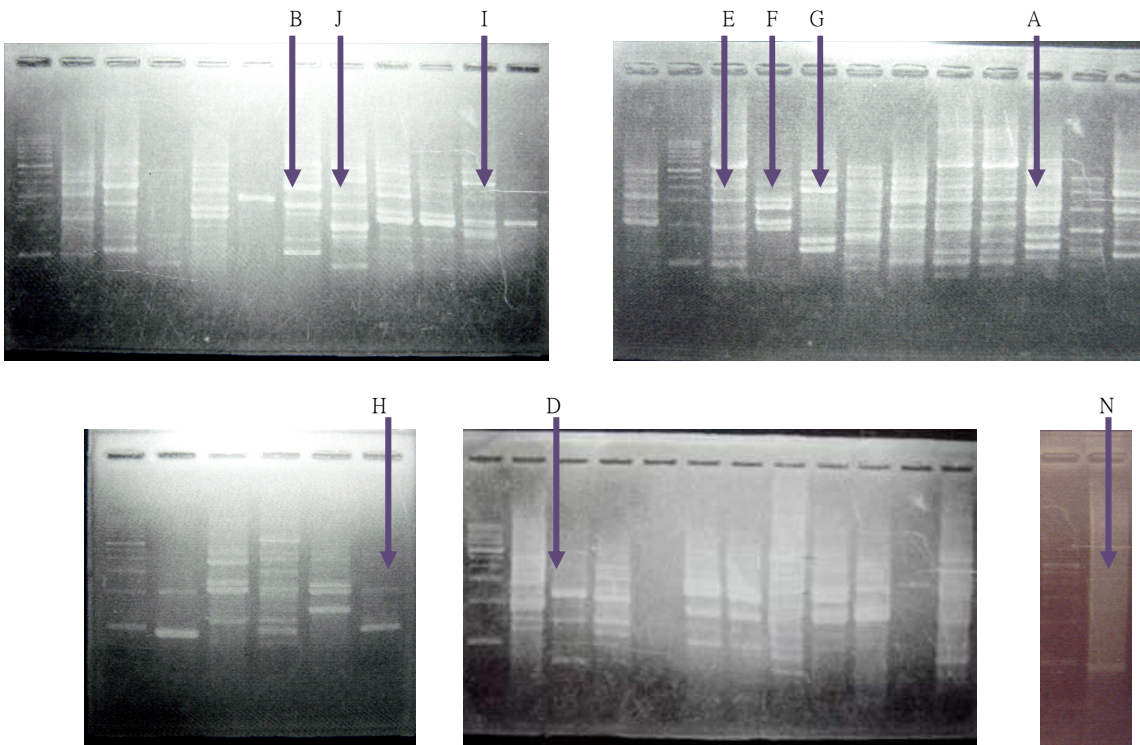


圖 5-12：菌 J



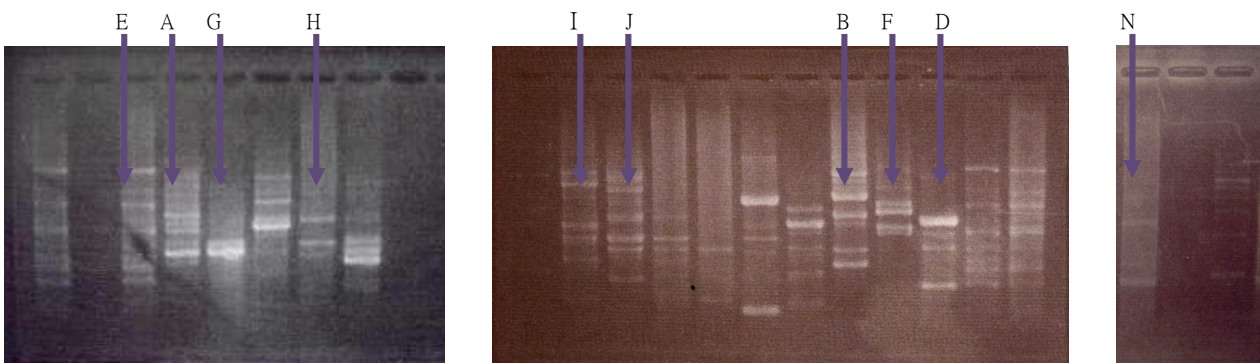
圖 5-13：菌 N

(三)一次分離後，菌種之膠圖



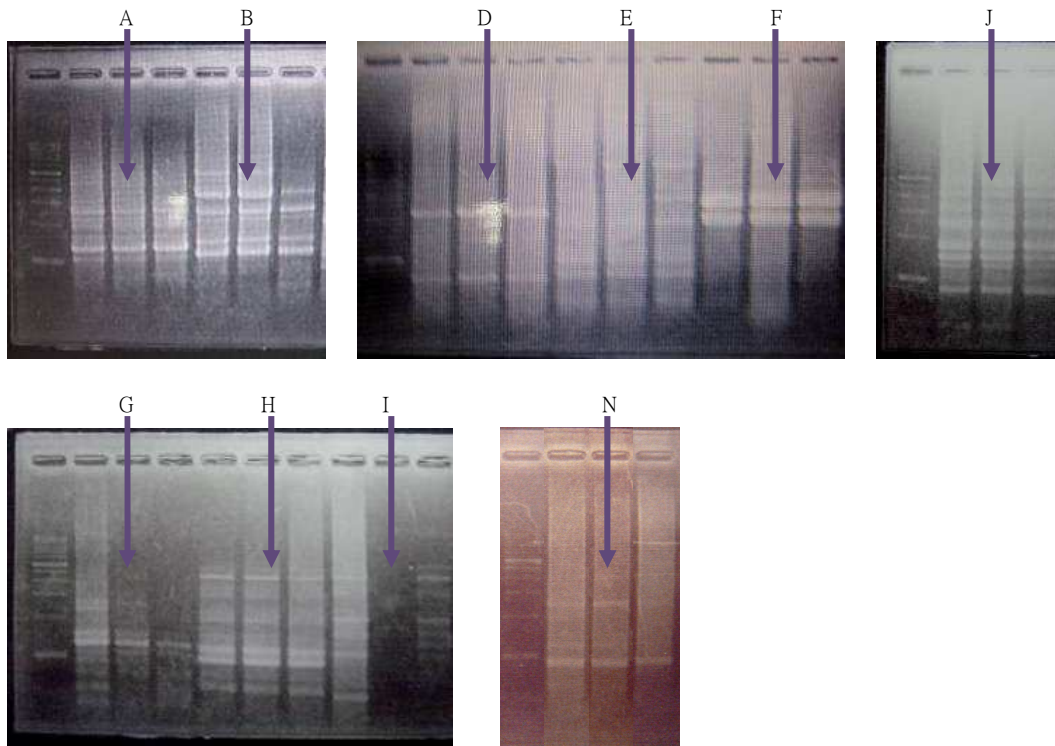
第一次分離後，篩選出了 39 種菌株，經 RAPD 和電泳條帶可知有 32 種不同之菌株

(四)二次分離後，菌種之電泳圖



比對第一次電泳圖與第二次電泳圖，只有 10 株菌其電泳圖相似

(五)第三次確認之電泳圖(每 3 個為同一菌株)

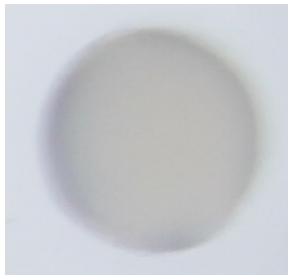


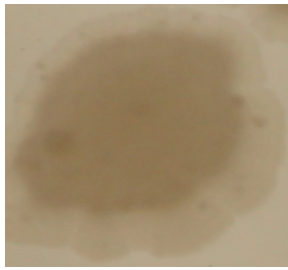
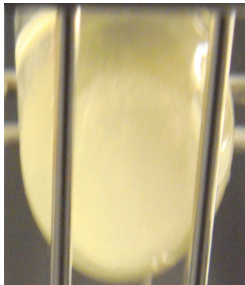



以上 10 菌株中，只有 A、B、D、E、F、G、J、N 彼此間一樣且與前兩次電泳圖之條帶也一樣，又後來發現 D 有受污染現象，故實驗菌株剩下其餘 7 種

(六)確定要實驗之菌種外觀與膠圖之總整理

膠圖部分左為 1Kb Marker，右為實驗菌種

表 5-1：確定要實驗之菌種外觀與膠圖

	固態培養	液態培養	膠圖
A			
B			


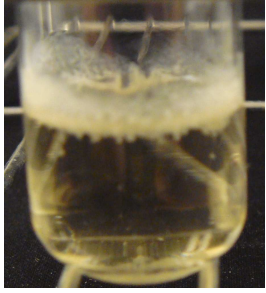
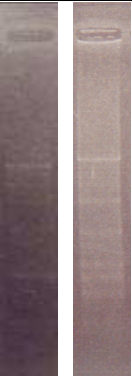

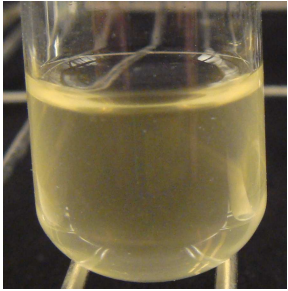

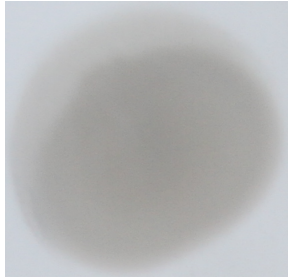

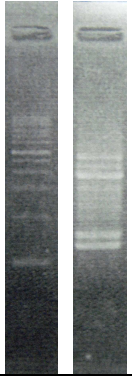
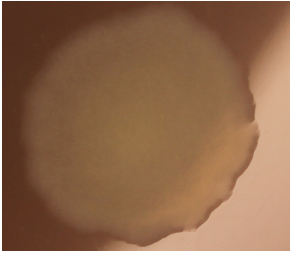
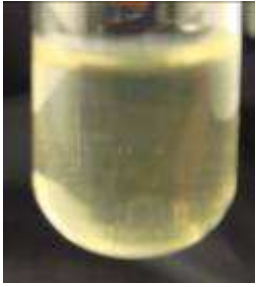

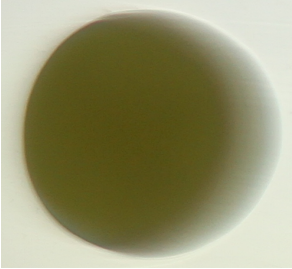

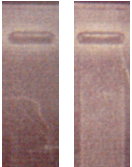
E			
F			
G			
J			
N			

表 5-2：確定要實驗之菌種外觀敘述

	固態培養	液態培養
A	白色，圓點狀	溶液變混濁，有沉澱，幾乎在底部
B	白色偏黃，不規則形，周圍呈現雪花狀	溶液變混濁，有沉澱，幾乎在底部
E	紅色，同心圓中央突起	白色偏淡紅，絲狀，幾乎在上層，下層有一些沉積
F	白色絲狀	溶液變混濁，有乳白色沉澱，生長較均勻
G	乳白色，均勻的白點，圓形	白色，菌在 LB 溶液上層，片狀
J	黃色，不規則	深黃色(較 N 淡)，沉於底部
N	黃色，菌落為圓點，較 A 小	深黃色，沉於底部

(七)測量確定要實驗之菌種之濃度

以 CFU 法

稀釋倍數： 10^{-3} 接種量：0.01ml 培養時間：48hr 以上

表 5-3

	A	B	E	F	G	J	N
數目	52	139	614	389	506	65	62

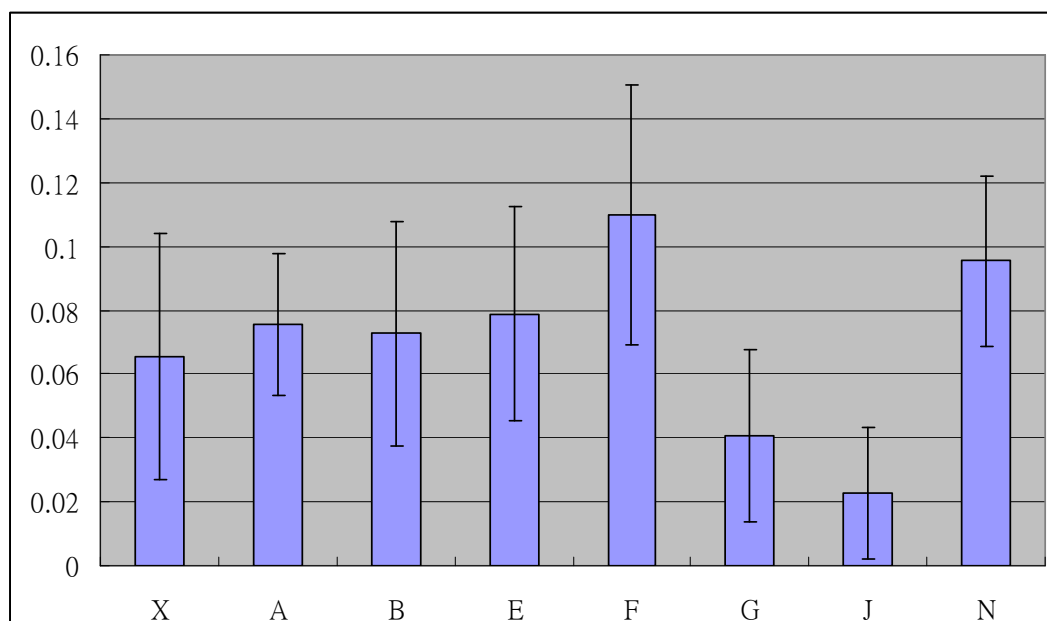
總菌落數(菌落數(CFU)/ml)皆在 10^6 以上

二、以不同菌種餵食斑馬魚產生之影響

(一)魚體長之變化

1. 每種菌取增長量最接近平均增長量的 15 隻魚代表該菌種對魚體的生長狀況，並以此 15 隻魚之體長變化量取標準差，繪成以下圖表 5-1

(縱軸為平均體長變化量，單位為 cm，橫軸為組別；線段為標準差)



圖表 5-1

2.24 隻魚的結果與 15 隻魚的結果之比較

- (1) 2 者除了在標準差、P 值之外，其餘都相當相近
- (2) 24 隻魚雖然能代表每隻魚的生長狀況，但也易受極端值的影響
- (3) 由於選取 15 隻魚標準差較小，可看出所選取的 15 隻魚的魚體變化量較相近

表 5-4

	15 隻	24 隻	15 隻	24 隻	15 隻	24 隻	15 隻	24 隻
	體長變化量平均(單位：cm)		標準差		與對照組之增長比例		P Value	
X	0.0655	0.0664	0.038344	0.07956	/	/	/	/
A	0.0756	0.0712	0.022138	0.05345	115%	107%	0.384107	0.806105
B	0.0726	0.0796	0.035241	0.069152	111%	120%	0.601773	0.5429
E	0.0789	0.0795	0.033712	0.074459	120%	120%	0.317913	0.559198
F	0.1099	0.1069	0.040856	0.082683	168%	161%	0.004772	0.014702
G	0.0402	0.0416	0.030525	0.070795	61%	63%	0.055077	0.335267
J	0.0227	0.0242	0.020837	0.061691	35%	36%	0.000716	0.046096
N	0.0954	0.1003	0.026783	0.079628	146%	151%	0.019761	0.146994

3. P Value：藉此與對照組比較，若 P Value < 0.1 表示有顯著差異，其餘則無

P Value 在取樣時，可能因取樣較多，使實驗結果 P 值較大。

而，當取樣為 15 隻魚時：F、G、J、N 組 P 值 < 0.1。

4. 若 $|(實驗組平均 - 對照組平均) / 對照組平均| > 15\%$ ，判定非實驗誤差所致。

(1) 平均增長量 > 1.15 倍對照組增長量的菌種：E、F、N

(2) 平均增長量 < 0.85 倍對照組增長量的菌種：G、J

(二) 吃飼料處

1. 判斷分布方式：將水桶約略分成 3 層，令上層為 A 層，中層為 B 層，下層為 C 層

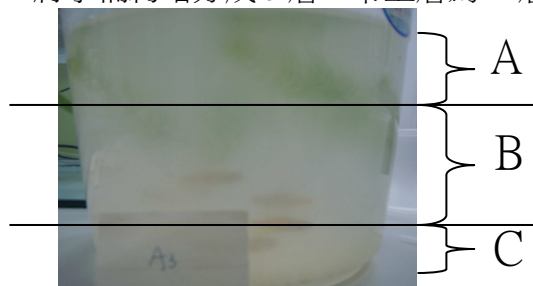


圖 5-17

註：以下數據表該桶內大部份魚攝食位置。由於部分桶內魚攝食處相近，故詳列該桶魚攝食處(ex: 下表 A5B3 表有 5 隻魚在 A 層，3 隻魚在 B 層攝食)

表 5-5

	1 月 8 日 (第 7 日)	1 月 15 日 (第 14 日)	1 月 23 日 (第 22 日)	1 月 29 日 (第 28 日)	2 月 5 日 (第 35 日)
X1	C	C	B	B	B
X2	C	A5B3	A	A	A
X3	C	A2B3C3	A	A	A
A1	C	C	A	A	B
A2	C	A1B4C3	C	A	A
A3	C	A4B3C1	A	A	A
B1	C	B4C4	A1B4C3	C	B
B2	B	A	A4	A	A
B3	A	A	A	A	A
E1	C	C	C	B3C5	C
E2	C	C	B5C3	B4C4	B
E3	C	B3C5	C	C	C
F1	C	A	A4B4	A	A
F2	C	A4B4	A	A	A
F3	C	A3B4C1	A5B3	A	A
G1	C	A	B	A	A
G2	C	A4B3C1	A	A	A
G3	C	B3C5	B	A	A
J1	A	A5B3	A	A5B3	A
J2	A	A	A	A	A
J3	C	A	A	A	A
N1	C	A	A	B	A
N2	C	A	A5B3	A	A
N3	C	A4B4	A	A1B3C4	A

2.由食用飼料處看出魚的饑餓程度、對飼料的敏感度

判斷依據：比對對照組，對照組在實驗後約兩至三周，對液態飼料的敏感度上升，食用飼料位置由中下層轉為上層，所以若較對照組快轉為上層食用飼料的組別，則有增強魚對飼料的敏感度的效果

(1)B2、B3、J 組原食用處就在上層，故 B、J 組暫不討論

(2)E 組一直在下層，對飼料的反應不佳

(3)G、F、N 組對飼料的敏感度上升

(4)A 組因三實驗組狀況不甚相同，所以無法確定

(三)搶食現象的有無

表 5-6

	1月8日 (第7日)	1月15日 (第14日)	1月23日 (第22日)	1月29日 (第28日)	2月5日 (第35日)
X1			○		
X2	○	○	○	○	○
X3	○	○	○		○
A1			○	○	
A2				○	
A3				○	○
B1		○			○
B2	○	○		○	○
B3	○	○		○	○
E1					
E2			○		
E3					
F1	○	○		○	○
F2	○	○	○	○	○
F3		○	○	○	○
G1		○		○	○
G2	○	○		○	○
G3		○		○	○
J1	○	○	○	○	○
J2	○	○	○	○	○
J3		○	○	○	○
N1	○	○	○	○	○
N2	○	○	○	○	○
N3	○	○	○		○

1.藉搶食與否看出魚的活力及饑餓程度

- (1)A 組和 E 組普遍沒有搶食
- (2)B 組、G 組和對照組表現較為相近
- (3)F、J、N 組不僅有搶食現象的發生、搶食速度也相當快

陸、討論

一、使用非仔稚魚時期之斑馬魚為實驗對象之原因

(一)斑馬魚為常見實驗魚種，飼養方式較為簡單

(二)縱使非仔稚魚時期之斑馬魚魚體增長幅度較小，但對環境適應力較高，因而較不易因環境變異而死亡，故本實驗選擇以此為實驗對象

二、菌種篩選時的做法

(一)需要重複菌種分離實驗之原因

1.從一次劃菌和一次膠圖，無法確定電泳圖的條帶為只由單一菌種產生

(二)一次劃菌到二次劃菌的菌種挑選標準

1.條帶清楚者，因為由清楚之條帶可以確定其為單一菌種，若非單一菌種，可能條帶會較雜亂

(三)選擇作為魚體實驗之菌種的挑選標準

1.培養基上為單一菌種者

2.一次膠圖與二次膠圖相同者

3.最後確認時，任取 3 處菌株所呈現之條帶一樣者

(四)進行 RAPD 時使用具 17 個鹼基之 primer 的原因

1.其序列較長，可提高其專一性

三、飼料製作

(一)選用液態飼料的原因

1.混菌容易

2.固態飼料與菌液混合後不易餵食

(二)以 10 μ l 菌液加入 500 μ l 飼料餵養魚之原因

1.過多的飼料會導致飼料殘留、水質變差

2.過多的菌液會使水產生乳白色黏稠物，而過少菌液對魚所產生之影響可能較小

四、菌種對魚體長變化量之影響

(一)選取 15 隻魚與 24 隻何者較具代表性(表 5-4)

15 隻，因為個體先天的差異性使得魚的生長非隻隻相等，體長增長量分散，取樣愈多雖愈能形成似常態分布的曲線，但常態分布會產生一些極端值，為避免極端值影響，本實驗認為只選取最接近平均值的 15 隻魚作為討論依據，能有效使數據之離散性縮小，也較能看出菌種對魚體影響的整體趨勢

(二)菌種對魚體長變化量之影響

1.因為能藉 P 值觀察實驗組數值是否和對照組有顯著差異。所以，應以 P 值輔助判斷該菌對魚體增長量是否產生顯著影響。

2.平均增長量 > 1.15 倍對照組增長量的菌種(E、F、N)，經 P 值輔助判斷(P 值 < 0.1)後，判定 F、N 菌對魚體增長量有正向影響，可能為益生菌，將來有機會幫助水產養殖業的發展。而若增長量 < 0.85 倍對照組增長量且 P 值 < 0.1，則判定該菌(G、J)對魚體增長量有抑制效果。

(三)魚的體長變化量出現負值的原因 (附錄 10-1)

魚體長度之變化量甚小，加上可能因為魚體並未完全伸直，故測量時有可能導致誤差，以至於測量出負值。

五、菌種對斑馬魚搶食現象之影響 (表 5-6)

(一)各組搶食現象的討論

1. A 組和 E 組普遍沒有搶食。對照相關記錄，A 組喜歡生活於水缸底部、水草下方，不常表現飢餓。E 組則因易受驚嚇，在有人靠近後會繞著水缸打轉、在缸內亂游進而激起糞便，我們推斷在緊張的情況下，牠們無法辨別飼料與糞便，所以不能依無搶食現象即判斷 E 組活力不佳。
2. B 組、G 組和對照組表現較為相近，但由於 1 月 23 日 B、G 組水質不甚佳，我們推測水質的不佳影響了魚對飼料的積極度，所以當天搶食現象並未發生。
X1 組相對於 X2、X3 組搶食不明顯，在餵食時反應亦較慢，但對照水質資料，未受汙染，推測應為魚體本身差異。
3. F、J、N 組不僅搶食現象發生、搶食速度也快，推測 F、J、N 菌有增進魚飢餓程度。

(二)搶食現象與魚體增長量綜合討論

F、J、N 組對飼料皆反應良好，但以魚體增長量而言，F、N 為促進，而 J 組卻為抑制之原因

推測 J 菌可能造成斑馬魚養份吸收能力下降，所以雖其食慾增加，但卻抑制其生長。日後可設計實驗：先餵食 J 菌一段時間後，改餵食不混菌液的飼料，觀測其搶食現象是否因而改變，藉以判斷飢餓程度是否下降。

六、由食用飼料處討論菌種對斑馬魚的影響 (表 5-5)

(一)特殊情況討論

1. B1 原先在下層，但實驗三週後，水質變差，我們認為已影響其對飼料敏感度。
2. N 組整體而言對飼料的敏感度上升，但中途有一次在中下層食用飼料，可能是飼料倒下後快速下沉造成的影響。

(二)食用飼料處與魚體增長量綜合討論

G、F、N 組對飼料的敏感度皆增加，但菌 F、N 促進魚體增長，而 G 組卻抑制之原因推測可能因為 G 組中途受水質影響，水質不佳或是水中出現其他雜菌對其生長造成負面的影響，導致其無法出現似益生菌的效果。為了避免這樣的情況再度發生，日後可以設計實驗：餵食的過程將每組分開，餵食完成後，再將各組魚放回同一大缸養殖，可使變因減少，增加實驗的準確性。

七、各菌種在不同方面對魚影響之整理

	體長變化量 (圖表 5-1)	搶食 (表 5-6)	食用飼料處 (表 5-5)
A	與對照組相比無顯著差異	不明顯，不常表現飢餓	反應差異大，難以判別
B	與對照組相比無顯著差異	搶食情形與對照組相似	在本實驗中，B 組狀況有差異，且在水質方面 B 組一直受到影響
E	與對照組相比無顯著差異	易緊張亂游，難以以搶食與否判別	菌種對其影響不大，或可能該菌有抑制魚對飼料

			敏感度的效果
F	與對照組有顯著正向差異。增長量為對照組的 1.68 倍	搶食明顯，且速度快	原先在下層，後轉為上層，菌種對其有正向影響
G	增長量為對照組的 0.61 倍	搶食情形與對照組相似	反應較對照組佳
J	與對照組有顯著負向差異。增長量為對照組的 0.35 倍	搶食明顯，且速度快	從第一次實驗開始，就在上層食用飼料，推測菌種對其影響不大，暫不討論
N	與對照組有顯著正向差異。增長量為對照組的 1.46 倍	搶食明顯，且速度快	原先在下層，後轉為上層，菌種對其有正向影響

柒、結論

- 一、在實驗過程中，經一次劃菌初步分離出 39 種吳郭魚腸道內之菌株，而經 RAPD 法確認後其中共有 32 種不同之菌種。
- 二、經二次劃菌、RAPD 後，本實驗選出 7 種菌株對斑馬魚進行餵食測試。
- 三、由搶食現象的有無，推測餵食 F、J、N 菌有增加斑馬魚活力、饑餓程度的趨勢。
- 四、由食用飼料處，推測餵食 F、G、N 菌可增進斑馬魚對飼料的敏感度。
- 五、以斑馬魚魚體增長量作為主要統計分析依據，輔以 P value 值測實驗組與對照組有顯著差異。可將該 7 種菌對斑馬魚魚體影響分為以下 3 類：

(一)抑制：G、J 組。體長增長速度變慢。但若要將其定為致病菌，則需再作攻毒測試，才能知道是否為斑馬魚之致病菌。

(二)促進：F、N 組。可能為益生菌，故可再擴展到商業測試，將來有機會能幫助水產養殖業的發展。

(三) P 值 > 0.1：有 A、B、E 組。這幾組 15 隻魚增長量的數值範圍與對照組的數值範圍重複區域較多。因而無法確定該菌對斑馬魚體長為促進或抑制。

捌、展望

- 一、希望能將我們汰出對斑馬魚成正向反應之菌種，以吳郭魚幼苗為實驗對象再度進行實驗。
- 二、鑑別對斑馬魚體長有促進效果之菌 F、N 的種類。
- 三、設計實驗以確定菌種確實為斑馬魚所食。
- 四、希望能將所增殖出的菌在不大幅影響活性的前提下，利用冷凍乾燥或其他方法將其變為固態，以方便混合一般養殖漁業所用的飼料。並進一步探討混菌後的飼料對吳郭魚活性、重量、體長，甚至肉質上產生的影響。

玖、參考文獻

- 一、Neil A.Campbell。生物學。偉明圖書。
- 二、選修生物 第 13 章(172、183-188 頁)。康熙出版。
- 三、高二生物 第 7 章(98-105 頁)。全華出版
- 四、Robert.F.Weaver。分子生物學(78-80、665 頁)。偉明圖書。
- 五、蔡文城。微生物學。藝軒出版。
- 六、王進琦。微生物學實驗。藝軒出版。
- 七、楊惠齡、林明德。生物統計學。新文京出版。
- 八、陳政忻〈2008 年 10 月 8 日〉。專訪中央研究院細胞與個體生物學研究所 吳金洌 特聘研究員。農業生技產業資訊網。2010 年 8 月 31 日，取自
http://agbio.coa.gov.tw/information_detail.aspx?dno=31237&ito=30&item=
- 九、蕭世民〈2011 年 3 月 15 日〉。蕭世民博士的教學網站。2011 年 3 月 17 日，取自
<http://web.idv.nkmu.edu.tw/~tomhsiao/>
- 十、Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).NCBI. January 25, 2011, from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

拾、附錄

- 一、每組 24 隻魚每隻的變化量(單位：cm)

表 10-1

X1	0.104804	0.143034	0.187905	0.088199	0.084878	0.123108	0.123108	-0.12118
X2	-0.02011	0.037716	0.081466	0.008046	0.015086	0.022126	0.076437	0.130747
X3	0.000685	0.086957	0.099852	0.096656	0.240272	0.046503	0.010841	-0.07423
A1	-0.00049	0.071972	0.116433	0.127241	0.104028	0.055146	0.064726	0.133382
A2	0.076836	0.041872	0.004041	0.006908	-0.02232	0.067672	0.11697	0.215565
A3	0.108677	0.048194	0.072032	-0.00677	0.059226	0.072097	0.097774	0.077613
B1	0.190764	0.208276	0.149663	0.113798	-0.01733	0.082326	0.034276	-0.05821
B2	0.123438	0.095392	0.062963	0.18903	0.153803	0.088889	0.022222	-0.00735
B3	0.011667	0.056667	0.06	0.031667	0.035	0.048333	0.110833	0.123333
E1	0.233899	0.207235	0.146864	0.116167	0.075418	0.086975	0.023053	0.063741
E2	0.092624	0.112557	0.167701	0.067797	0.041179	-0.00239	-0.03891	0.046073
E3	-0.0408	0.058537	0.121049	0.066362	0.011674	-0.01607	0.065357	0.200871
F1	0.146401	0.173187	0.258329	0.034801	0.170324	0.201895	0.157893	0.295011
F2	0.163789	0.112842	0.088211	0.066947	0.019368	0.021053	-0.03158	0.109053
F3	0.008333	0.097051	0.130256	-0.02756	0.116667	0.116667	0.092179	0.044872
G1	0.079787	0.164894	-0.000887	-0.00089	-0.02172	-0.03989	-0.07801	0.133865
G2	0.032941	0.008235	0.031373	0.078039	0.030588	0.053725	0.169804	0.026667
G3	0.051852	-0.13276	0.052564	0.052707	0.006695	0.099288	0.09943	0.09943
J1	-0.00968	0.036521	0.009908	0.078802	-0.00104	0.035369	-0.0159	-0.06129
J2	-0.16293	0.105359	0.054007	0.080732	0.056104	0.116892	-0.03611	-0.00834
J3	0.02804	0.028808	0.02996	0.030345	0.005378	0.135975	0.008066	0.036874
N1	0.105556	0.130688	0.081217	0.170635	0.006878	-0.07249	0.077513	0.181217
N2	0.261119	0.134765	0.084922	0.084922	-0.04027	0.053691	0.057181	0.062998
N3	0.017625	0.107535	0.115453	0.129502	0.089144	0.253129	0.197957	0.115453

【評語】 040717

分離吳郭魚腸道細菌，經培養及 RAPD 之 DNA 鑑定，進一步餵食斑馬魚再測定對成長促進及抑制之作用，以發展養殖魚類之益生菌功效研究。採用吳郭魚本土產量最大之養殖魚，可以從菌種鑑定，基因體定序及分析基因，作為學術及應用研究，加強後半部之探討，具有創新性。吳郭魚為雲南養殖重要區域，具鄉土材料及研究課題。