

中華民國第 62 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

052008

滄海一希—溫鹽度對希瓦氏菌特性探討

學校名稱：國立彰化高級中學

作者： 高二 蔡馥謙 高二 謝翊平	指導老師： 鄭乃彧
-------------------------	--------------

關鍵詞：脫色希瓦氏菌、溫鹽度、環境

摘要

脫色希瓦氏菌是一種海淡水中皆可分離出的細菌，更是部分魚類的益生菌。相關文獻指出該菌對石斑魚、金目鱸有抑制體內病毒生長的效果。本研究主要探討不同溫鹽度對其生理變化的影響，包括生長曲線、泳動能力、抗藥性。以添加海鹽濃度 0%、0.1%、0.5%、1%、2%的 LB 培養基，以及 28°C、37°C 下的培養條件，模擬不同情況下該菌的適應能力。研究顯示隨著鹽度上升，該菌生長速度與泳動範圍有隨之增加的趨勢，但若加入過量鹽類則會抑制其生長。此外，在四級胺(BKC)作用下，該菌具備較高存活率，而二氧化氯會使其與病原菌一併殺死，不利產生益菌效果。為了進一步探討脫色希瓦氏菌對於其他本土魚類的效益，未來會著重於觀察不同魚群與該菌的相互作用關係。

壹、前言

一、研究動機

我們所處的實驗室為環境生理實驗室，主要探討魚類與環境的關聯性。魚類生活的主要環境就是魚缸中的海、淡水。在某次採樣時，恰巧看見學長在魚缸中加入藥劑，困惑其原因的我們在請教過學長後得知那是殺菌劑，用來抑制魚類致病菌的生長。此時我們心想，既然水中有魚類致病菌，那是否也有對魚兒有益的益生菌呢?正好我們研究的範圍與課程選修生物 IV 第二章——生物與環境有所連結。於是我們在魚房及溫室的海水、淡水以及半淡水大量採樣，並藉由分析樣本基因序列確認菌種，希望能從中分離出本土的水產益生菌，增進魚類福祉。

二、目的

- (一) 從淡海水中採樣並分析菌種
- (二) 分析溫度、鹽度對脫色希瓦氏菌生長生長曲線之影響
- (三) 分析溫度、鹽度對脫色希瓦氏菌泳動能力之影響
- (四) 脫色希瓦氏菌 對不同殺菌劑抗藥性之差異

三、文獻回顧

(一) 微生物特性分析

在王庭（2018）《耐鹽性乳酸菌細菌素的生物活性評估及應用性評估》提到許多乳酸菌（LAB）作為益生菌最常見的微生物在不同環境下的特性分析，包括生長能力、酸性 pH 和耐鹽性以及對模擬胃和腸液的抗性。

1. 鑑種方法

16s rRNA sequencing 常被拿來當作鑑定微生物種類的指標序列。如下圖 2，其序列包含 9 個高變異區(V1~V9)及 10 個保守區(Conserved Regions)，藍色、紅色分別為保守區段和高變區段，以細菌保守區的相同片段設計 primer，再以 PCR 放大 primer 所夾出的變異片段（以 V3、V4 為主），定序這些變異區段能鑑定不同的菌種。

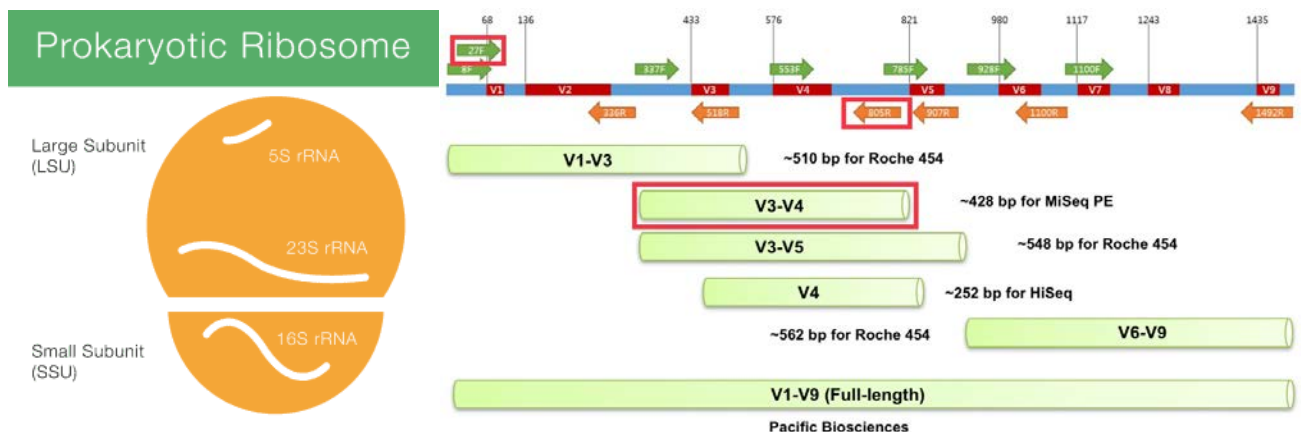


圖 1：16s rRNA 示意圖

圖 2：16s rRNA sequencing 作用機制

2. 生長能力

(1) 生長曲線

可以分成四個部分，遲滯期、指數期、穩定期、衰亡期，如下圖 3。遲滯期是細菌在適應環境，接著突然快速上升（OD 值約 0.6），稱為指數生長期，再來是一段平平的穩定期，接下來因為養分不足以供給細菌，所以細菌開始死亡，稱為衰亡期。細菌變少之後，還是有可能回到前面的時期一直循環。測量生長曲線可知道細菌在該環境下的生長狀況。

(2) 測量方式

使用分光光度計(如下圖 4)測 OD₆₀₀ 吸光值。沒有細菌時培養基澄清，細菌濃度愈高，培養基看起來愈混濁，故可以吸光值判定細菌的量。

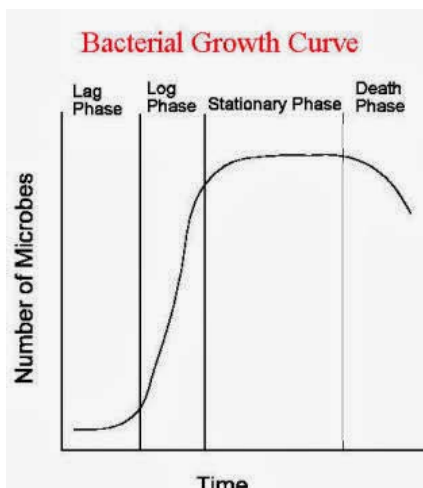


圖 3：細菌的生長曲線



圖 4：分光光度計

3. 泳動能力

(1) 泳動構造

鞭毛 (Flagella)，長在某些細菌上細長而彎曲，且具有運動功能的蛋白質附屬絲狀物。其長度常超過菌體若干倍。少則 1、2 根，多則可達數百根。細菌的鞭毛有以下四種類型：偏端單毛(monotrichous)、偏端叢毛(lophotrichous)、兩端鞭毛(amphitrichous)、周鞭毛(peritrichous)，如下圖 5。

(2) 泳動方式

鞭毛像螺旋槳一樣旋轉，且其位置與旋轉方向可以控制泳動方向，如下圖 6。泳動可細分為 swimming 與 swarming。使用 agar 比例較低 (0.25%~0.3%) 的培養基可看出細菌向外擴散一圈圓形，為一隻個體 swimming 的結果。提高 agar 比例 (0.5%)，泳動結果為不完整的圓，甚至為放射狀，是一群細菌一起向外的結果。

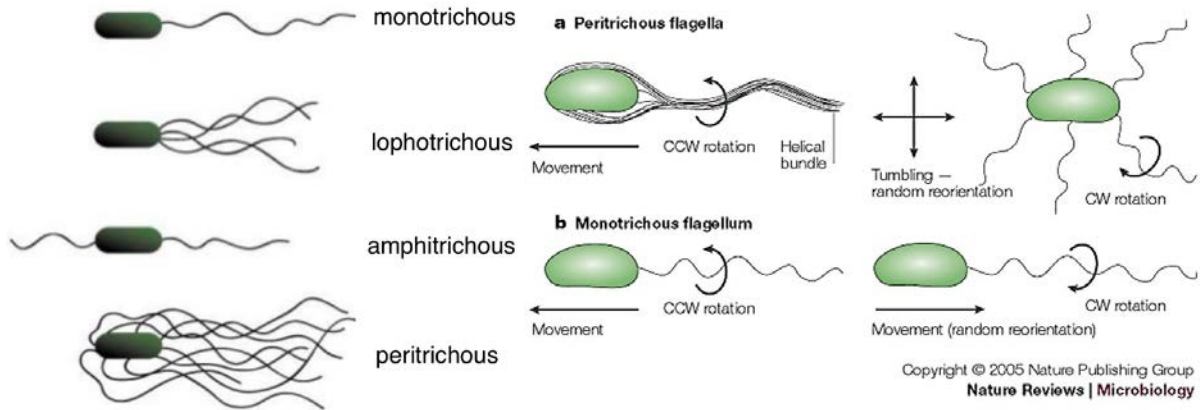


圖 5：鞭毛類型

圖 6：泳動方式

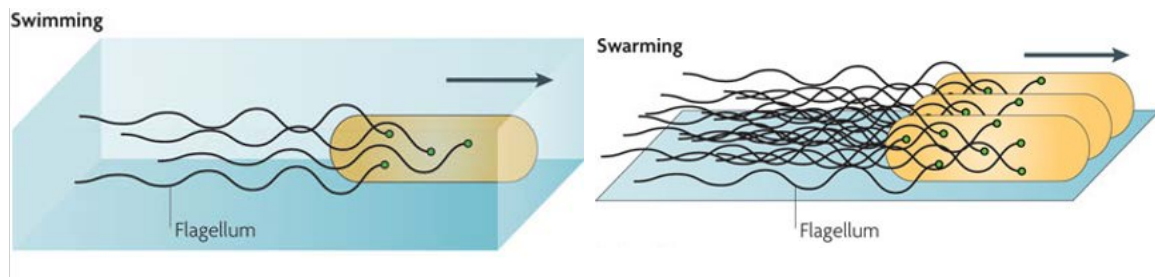


圖 7：swimming、swarming 示意圖

看過《耐鹽性乳酸菌細菌素的生物活性評估及應用性評估》以後，我們運用了論文提及的以上三種技巧，而對脫色希瓦氏菌 (*Shewanella decolorationis*) 分析在不同溫鹽度的差異，以及對四級胺(BKC)以及二氧化氯的抗藥性差異。

貳、研究設備及器材

一、用具

培養皿（直徑 9cm、15cm）、試管、試管架、微量滴管（tip）、過濾器（口徑 $0.22\mu\text{L}$ ）、溫度計

二、設備

滅菌釜、無菌操作台、恆溫震盪培養箱、分光光度計、試管振盪器（Vortex）

三、藥品

（一）配製培養基所需藥品：LB broth、agar、海鹽

（二）PCR 所需藥品：DNA 模板、引子、dNTP、DNA 聚合酶、緩衝液




（三）膠體電泳所需藥品：marker、瓊脂糖（agarose）、TAE buffer

（四）抗藥性實驗所需藥品：BKC（四級胺）、 ClO_2

四、菌種

脫色希瓦氏菌（*Shewanella decolorationis*）

表 1：實驗常用器材與設備

		
培養皿（直徑 9cm、15cm）	試管、試管架	微量滴管

		
<p>抽氣過濾裝置及濾紙 filter (0.22 um)</p>	<p>滅菌釜</p>	<p>無菌操作台</p>
		
<p>恆溫震盪培養箱</p>	<p>分光光度計 (OD_{600nm})</p>	<p>試管振盪器 (Vortex)</p>
		
<p>PCR 儀</p>	<p>跑膠顯影器</p>	<p>電泳槽</p>

參、研究過程或方法

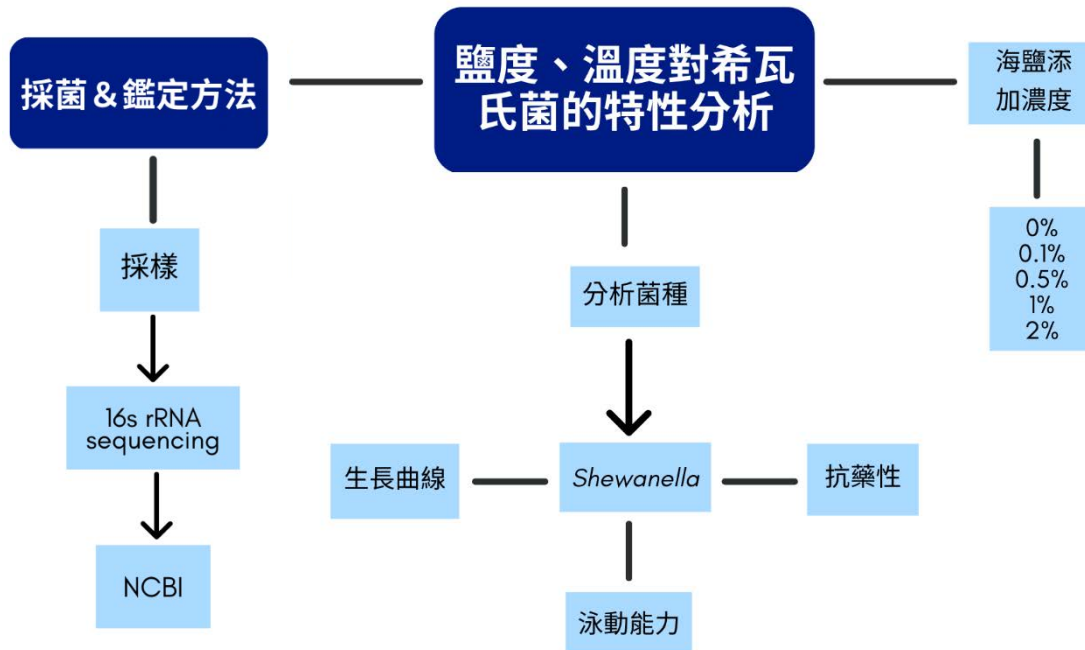






圖 8：實驗流程圖

一、分析菌種基因序列

(一) 採樣

1. 從溫室淡水、半淡水、海水魚缸中的過濾棉採樣，約取 200ml 原液。
2. 將採得樣本進行過濾，並把濾紙放入 10mL LB 試管中，震盪約 10~15 秒。
3. 吸取樣本並塗盤
4. 放入恆溫培養箱以 37°C 培養約 12 小時。

表 2：採樣地點

	
魚房虱目魚缸	魚房下層過濾棉
	
溫室	溫室過濾棉

(二) 分析菌種

1. 隨機採取樣本內菌落

2. 進行聚合酶連鎖反應(PCR)

(1) 加入水、buffer、dNTP、primer(forward、reverse)、DNA 聚合酶(polymerase)

(2) DNA 變性(Denaturation)：利用高溫(約 95°C)，破菌後使 DNA 模板變由雙股單股

(3) 引子黏合(Annealing)：降低溫度讓引子黏合到模板上，適當溫度稱為為 T_m 值(DNA 熔解溫度)，指把 DNA 的雙螺旋結構降解一半時的溫度。不同序列的 DNA， T_m 值不同。DNA 中 G-C 含量越高， T_m 值越高。實驗中為使序列較易辨識，通常選用

55°C~65°C（本次實驗選用 55°C）

(4) 引子延長(Extension)：以適當溫度讓聚合酶沿模板合成新股，通常為 72°C。

3. 瓊脂糖凝膠電泳（agarose gel electrophoresis）的配製

(1) 量取 20mL 的 1X TAE buffer 至錐形瓶，再加入 agarose powder 0.2g 至錐形瓶，使濃度為 1%

(2) 將血清瓶放在微波爐，加熱約 30 秒，使其完全溶解。並靜置約十五分鐘。

(3) 注膠器裝製完成置將膠液緩緩倒入注膠器，避免有氣泡，若有任何氣泡出現，以 tip 尖端刺破。最後將尺梳插上，注意尺梳與底盤的距離，避免碰底。等到膠片凝固後，將所要進行電泳之膠片連同底盤放在電泳槽。

4. 委請源資公司定序引子 27 F 至 805 R 間約 800bp 的序列。

5. 基因分析

(1) NCBI — 為美國國家生物技術資訊中心 National Center for Biotechnology Information 的簡稱，設置有與生物技術和生物醫學相關的一系列資料庫，是生物資訊學工具和服務的重要資源。

(2) Blast — Basic Local Alignment Search Tool 的縮寫，它是一個用來比對生物序列的一級結構（如不同蛋白質的胺基酸序列或不同基因的 DNA 序列）的算法。已知一個包含若干序列的資料庫，BLAST 可以讓研究者在其中尋找與其感興趣的序列相同或類似的序列，運用 BLAST 可以使我們得知樣本可能為何種菌類。

6. 比對發現輸入序列在 NCBI 只能確認屬名，序列與同屬不同種之細菌亦可能達高度相似。

7. 將欲深入研究的樣本做全長 16s rRNA sequencing 分析。

8. 委請源資公司定序引子 27F 至 1492R 間約 1400bp 的序列。

9. 輸入 NCBI 鑑種。

表 3：使用引子及其序列

引子名稱	引子序列
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
805R	GACTACHVGGGTATCTAATCC
1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT

二、分析鹽度對脫色希瓦氏菌生長曲線之影響

- (一) 取培養 24 小時菌株(OD 值大於 2)之菌液 200 μ L，再加入 4mL LB 液(分別為添加海鹽濃度 0%、0.1%、0.5%、1%、2%)，並震盪使其混合均勻，每組皆檢測三管避免實驗疏失，並進行三次實驗。
- (二) 置入恆溫培養箱以 28°C、37°C、200rpm 培養，並隔半小時紀錄 OD 值，共紀錄 6 小時。因過 6 小時後樣本吸光值會超過儀器測量上限，故只記錄至 6 小時。
- (三) 繪製不同鹽度(0%、0.1%、0.5%、1%、2%)下的生長曲線。

三、分析鹽度、溫度對脫色希瓦氏菌泳動能力之影響

(一) 配置 swimming plate

1. 配置方法

- (1) 每片培養皿加入 100ml LB 液，並加入 0.25% agar(0.25 克)，藥品添加量經過調整(降低營養原以及膠體凝固程度)，確保測試時各鹽度菌株會因養分不足而向外擴張
- (2) 添加海鹽使其濃度調整為 0%、0.1%、0.5%、1%、2%，模擬該菌在不同鹽度之環境生長，並各濃度皆配置三盤，以避免操作失誤造成誤差。

(二) 實驗方法

1. 一片培養皿點 3 滴已達飽和菌液，一滴 2 μ L，共 3*2=6 mL
2. 分別比較不同溫度下之生長情形(28°C、37°C)

3. 培養約 20 小時後，測量細菌泳動（向外擴張）的直徑，若樣本泳動範圍不為完整圓形則以最長直徑為測量基準。

四、脫色希瓦氏菌對不同殺菌劑抗藥性之差異

（一）檢測抗藥性試劑：

選用兩種常見魚缸殺菌物質：BKC(四級胺)、二氧化氯(ClO₂)

（二）實驗方法

1. 培養至 OD 值為 0.8(置於恆溫培養箱，37°C、200rpm)
2. 分成三組條件控制比對實驗，分別為：
 - (1) 震盪培養後的控制組
 - (2) 加入 ClO₂
 - (3) 加入 BKC
3. 將三組放入恆溫培養箱培養，以 37°C、200rpm 培養 1 小時
4. 將菌液序列稀釋成 10⁻²、10⁻⁴、10⁻⁶、10⁻⁸ 倍
5. 各取 10 μL 滴在 LB 培養皿上
6. 觀察可明顯數出菌株個數之樣本，回推原液 1mL 之菌落總數

肆、研究結果

一、分析菌種基因序列

（一）在多次採樣與測試後，將各樣本 DNA 序列與基因資料庫進行對比，發現在魚房、溫室的海水、淡水、以及半淡水中含有 *Bacillus*、*Staphylococcus*、*Pseudomonas* 以及 *Shewanella* 等菌種。因採得樣本種類繁多，為節省篇幅不多加贅述，僅以對應編號 1-18 菌樣本分析結果顯示。透過比對約 800bp 長度序列後可以初步判斷樣本 1-18 及極可能為 *Shewanella* 屬，基因相似度約為 99%左右(如下圖 9)。但也發現僅輸入 800bp 長度的序列無發得知確切種小名，其序列與資料庫中多種同屬的菌仍高度相似，故本組隨後對樣本 1-18 進行約

1400bp 的全長 16S rRNA sequencing。最終確認該樣本為脫色希瓦氏菌 (*Shewanella decolorationis*)。進一步分析樣本 1-18 與 *Shewanella decolorationis* 前 600 核苷酸序列後可以看出除了在 7bp 的位置(紅色標示部分)以外之序列皆相以外之序列皆相同(如下圖 10)。

<input checked="" type="checkbox"/>	Shewanella decolorationis strain sesselensis chromosome	Shewanella dec...	1382	2761	97%	0.0	99.48%	4719362	CP037898.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Shewanella decolorationis strain S1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Shewanella dec...	1382	1382	97%	0.0	99.48%	1535	FJ589032.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Shewanella decolorationis strain NSSD01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Shewanella dec...	1371	1371	96%	0.0	99.60%	1459	KT361198.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Shewanella putrefaciens strain SA70 chromosome, complete genome	Shewanella putr...	1371	12137	97%	0.0	99.21%	4857212	CP078038.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured Shewanella sp. clone NSBac19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured She...	1371	1371	97%	0.0	99.21%	1505	JX462537.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Shewanella sp. strain BN_2062 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Shewanella sp...	1365	1365	97%	0.0	99.08%	1505	MG438519.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Shewanella sp. FJAT-51649 chromosome, complete genome	Shewanella sp...	1365	12209	97%	0.0	99.08%	4833526	CP080411.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured bacterium clone JFR0701_jaa41h10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacte...	1365	1365	97%	0.0	99.08%	815	HM779799.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured Alteromonadales bacterium clone MS11-63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Alter...	1365	1365	97%	0.0	99.08%	1509	GQ355045.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Shewanella sp. ANA-3 chromosome 1, complete sequence	Shewanella sp...	1365	12076	97%	0.0	99.08%	4972204	CP000469.1

圖 9：編號 1-18 菌樣本分析部分結果

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1382 bits(748)	0.0	758/762(99%)	3/762(0%)	Plus/Plus
Query 15	TTCCGCTGCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAG	73		
Sbjct 4425333	TTCCGCTGCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAG	4425392		
Query 74	ATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCTCTACAAGACTCTAGTTT	133		
Sbjct 4425393	ATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCTCTACAAGACTCTAGTTT	4425452		
Query 134	GCCAGTTCGAAATGCAATTCACAGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCTCGCTTAACAAC	193		
Sbjct 4425453	GCCAGTTCGAAATGCAATTCACAGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCTCGCTTAACAAC	4425512		
Query 194	CGCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGGACCTCCGTATTACCG	253		
Sbjct 4425513	CGCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGGACCTCCGTATTACCG	4425572		
Query 254	CGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTCTTCTTCTGTAGGTAACGTACAGCTGCAAGGT	313		
Sbjct 4425573	CGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTCTTCTTCTGTAGGTAACGTACAGCTGCAAGGT	4425632		

圖 10：樣本 1-18 與 *Shewanella decolorationis* 之基因序列相互比對結果

(二) 統整樣本對應序列，發現對應主要樣本有 *Citrobacter*、*Pseudomonas*、*Shewanella*、*Klebsiella* 等菌。SW、FW、BW 分別對應海水、淡水與半淡水。其中 BW1-18(初步判定為 *Shewanella decolorationis*) 為在溫室半淡水採得樣本，*Shewanella* (希瓦氏菌屬) 為交替單胞菌目希瓦氏菌科的一屬，多為厭氧發酵型革蘭氏陰性桿菌。

表 4：所有樣本之序列分析與菌種 RG level 比對結果

name	identification		RG level
SW-1	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter</i> sp.	2/?
SW-2	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter</i> sp.	2/?
SW-3	<i>Chromobacterium rhizoryzae</i>	<i>Chromobacterium</i> sp.	?/?
SW-4	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter</i> sp.	2/?
SW-5	<i>Chromobacterium rhizoryzae</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	?/2
SW-6	<i>Chromobacterium rhizoryzae</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	?/2
FW-1	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter portucalensis</i>	2/?
FW-2	<i>Chryseobacterium</i> sp.	<i>Chryseobacterium cucumeris</i>	?/?
FW-3	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter portucalensis</i>	2/?
FW-4	<i>Chromobacterium rhizoryzae</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	?/2
FW-5	<i>Chromobacterium rhizoryzae</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	?/2
FW-6	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	?/2
MRS-SW-2	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2/?
MRS-FW-1	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2/?
MRS-FW-2	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.	?/?
1-5	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	?/?
1-18	<i>Shewanella decolorationis</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>	?/1
1-23	<i>Pseudomonas guguanensis</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	?/2
2-1	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Vibrio furnissii</i>	2/2
2-3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	2
2-5	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	2

二、分析鹽度對脫色希瓦氏菌 生長曲線之影響

經過三次實驗，每次用三組樣本取平均值比較添加鹽度為 0%、0.1%、0.5%、1%及 2%的 *Shewanella* 之生長情形，可得三次測試結果近乎雷同(下圖 11、12 為最明顯的一次)，在 28°C 與 37°C 時皆為添加鹽度 0.1%、0.5% 時有最佳的生長狀況，而鹽度 2% 時則最差。比較兩溫度下的實驗結果，可得知 *Shewanella* 在 28°C 下培養時，生長較佳，推測原因是 28°C 為樣本原來生活環境的溫度（溫室半淡），因較適應而長的較好。

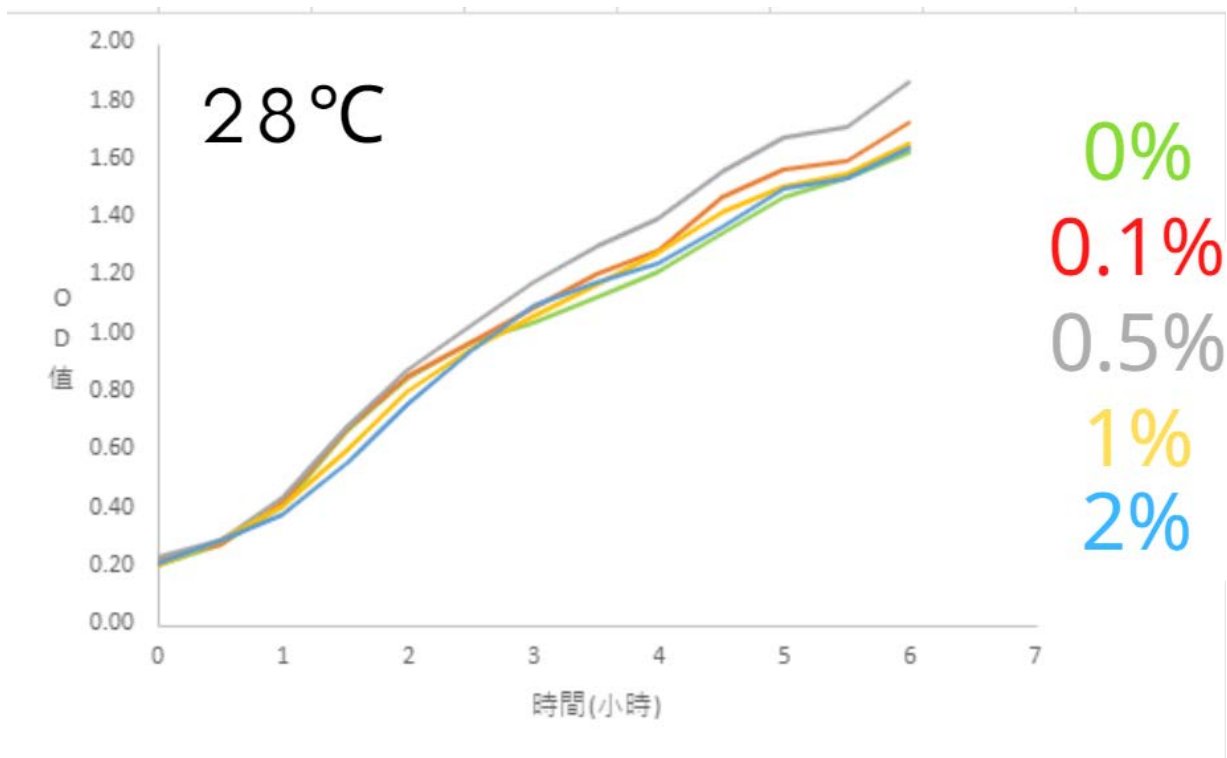


圖 11：28°C 下各鹽度生長曲線結果(前 6 小時)

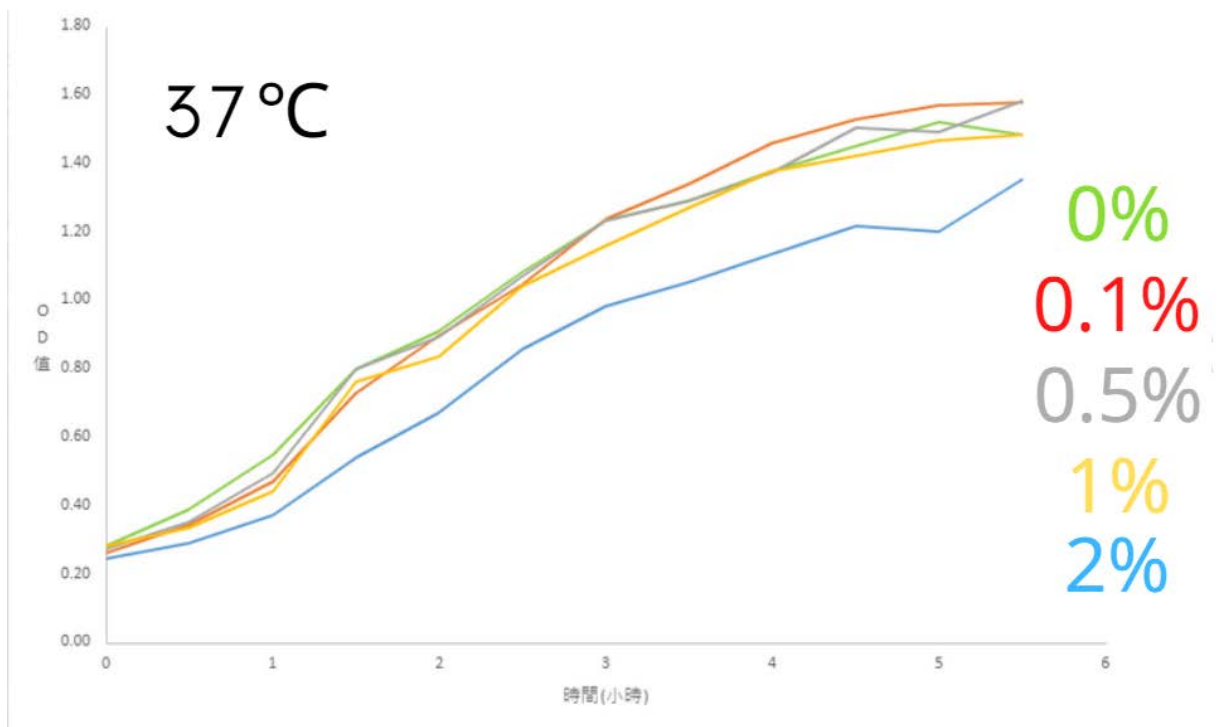


圖 12：37°C 下各鹽度生長曲線結果(前 6 小時)

(註：由於儀器為簡易版的分光光度計，OD 值的測量值得測量上限為 2，根據測試結果，大約在 8 小時後，即開始有組別 OD 值達儀器測量上限，繼續測量只是各管皆達 OD 值 2 的水平線，意義不大，且因時間關係，不方便測得 6 小時的數據，故圖表只呈現 0 至 6 小時的生長曲線，而只欲得知 *Shewanella* 在不同鹽度下的生長狀況，6 小時已經足夠看出趨勢。)

三、分析鹽度對脫色希瓦氏菌泳動能力之影響

(一)測量 20 小時後 *Shewanella* 菌在海鹽添加濃度 0%、0.1%、0.5%、1%及 2%、溫度 28°C 及 37°C 下的泳動半徑大小。由結果得知，在兩個溫度條件下，添加海鹽濃度 0.5%時泳動能力最強，鹽度上升與下降，泳動能力皆隨之減弱，如下圖 13、14 所示。

(二)在 28°C 的培養情況下，0%、0.1%、0.5%、1%、2%添加海鹽鹽度之平均泳動半徑分別為 1.5cm、2.0cm、2.5cm、1.9cm 與 1.4cm。先用 anova 確認 5 組之間有差異，再使用 T-test 作統計分析，得出海鹽添加濃度 0.5%下之泳動半徑在統計上與其他鹽度達顯著差異(*代表 $P < 0.05$ 、**代表 $P < 0.01$)。而在 37°C 培養情況下，0%、0.1%、0.5%、1%、2%添加海鹽鹽度之平均泳動半徑分別為 1.8cm、2.8cm、3.3cm、2.8cm、1.7cm。先用 anova 確認 5 組之間有差異，在使用 T-test 作統計分析，得出海鹽添加濃度 0.5%下之泳動半徑在統計上與其他鹽度達顯著差異。

(三)比較兩溫度下的泳動實驗數據，可得知 37°C 在實驗的各鹽度下皆游的比 28°C 遠，推測原因與先前提及的 28°C 下生長較好有關。泳動實為細菌遇逆境時的表現，欲離開當下的位置，前往更友善的環境。生長曲線實驗顯示 *Shewanella* 比較適應 28°C，而 37°C 對它而言不友善，在此逆境下，*Shewanella* 就更發揮游泳能力，所以在 37°C 下將游的比在 28°C 下遠。

(四)以 anova 比對 28°C 和 37°C 在不同鹽度下泳動能力的差異。海鹽添加濃度 0%、0.1%、0.5%、1%、2%中，0%在 anova 統計上沒有達顯著差異，但其餘鹽度皆達顯著差異。

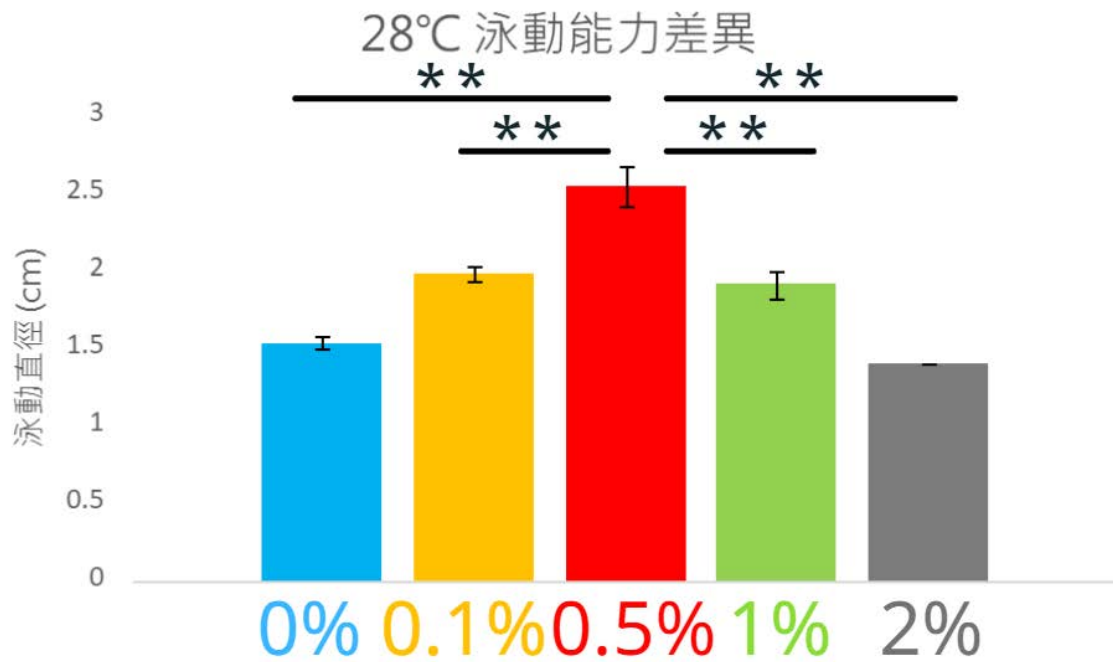


圖 13：不同鹽度下脫色希瓦氏菌之泳動能力差異(28°C)

(*代表 $P < 0.05$ 、**代表 $P < 0.01$)

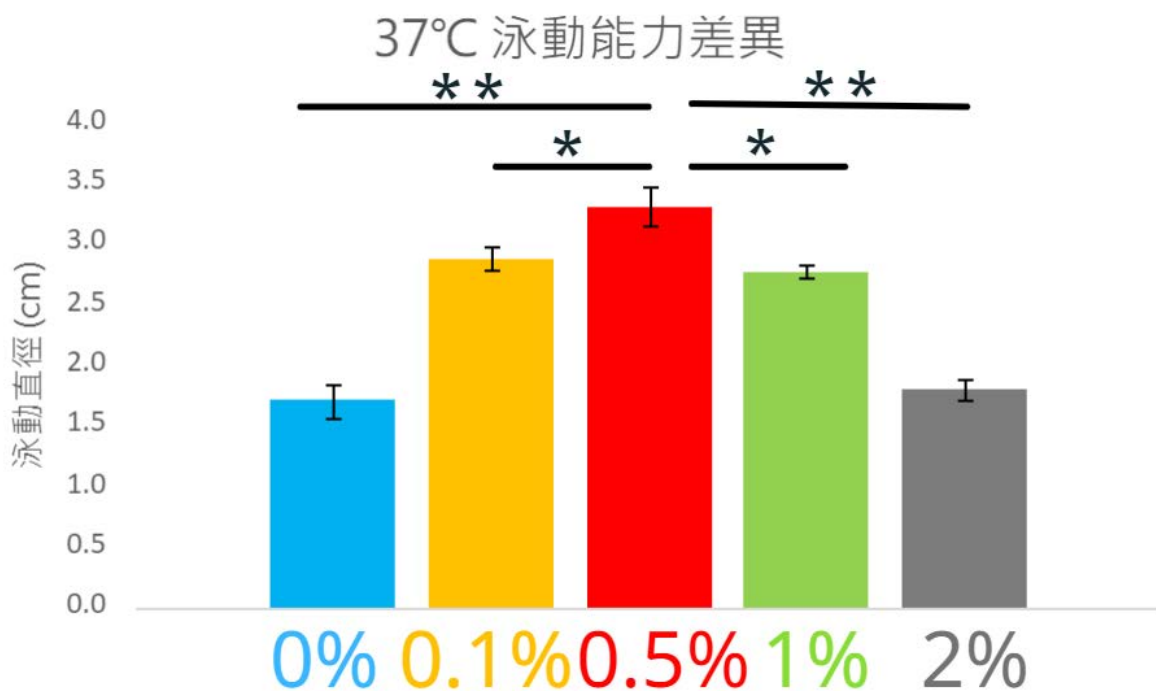


圖 14：不同鹽度下脫色希瓦氏菌之泳動能力差異(37°C)

(註：雖然只有做三重複，數據不算多，但仔細分析得知各組的 3 筆數據差異不大，故以平均數呈現並不會因極端值造成過大的誤差。)

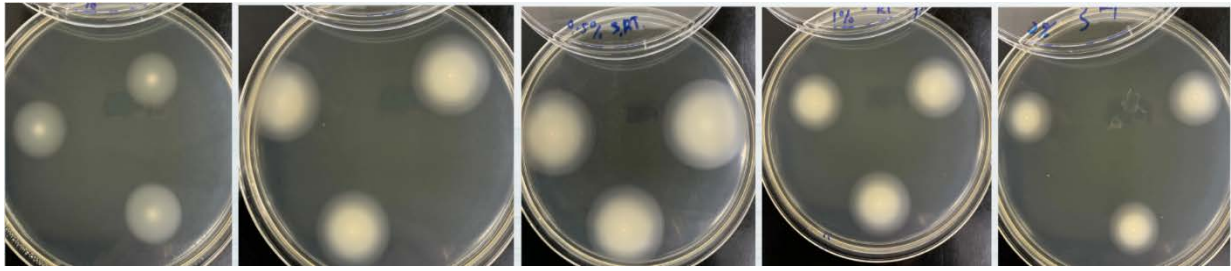


圖 15: 28°C 下，0%、0.1%、0.5%、1%、2%添加海鹽鹽度泳動情形

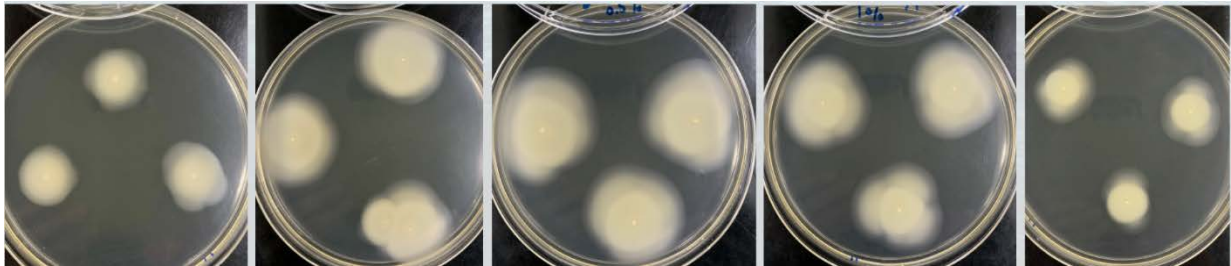


圖 16: 37°C 下，0%、0.1%、0.5%、1%、2%添加海鹽鹽度泳動情形

四、脫色希瓦氏菌對不同殺菌劑抗藥性之差異

- (一) 在 37°C 的生長條件下，以 CFU 回推每毫升之菌落數量，可得控制組(未添加藥劑)在 0%、0.5% 以及 1% 鹽度菌株數量約為 7.5×10^8 個/mL、 9.5×10^8 個/mL、 9×10^8 個/mL；加入 BKC 後在 0%、0.5% 以及 1% 鹽度菌落數約為 1.55×10^7 個/mL、 6×10^6 個/mL、 1.05×10^7 個/mL；而加入 ClO_2 後在 0%、0.5% 以及 1% 鹽度菌落總數約為 7.5×10^8 個/mL、 10^9 個/mL、 5×10^8 個/mL
- (二) 將數據以菌株存活率表示，控制組(未添加藥劑)菌株數量定為 100%、可得在 37°C 培養條件下加入 BKC 後，在 0%、0.5% 以及 1% 鹽度存活率分別為 2.5%、0.65%、1.30%；而加入 ClO_2 後，在 0%、0.5% 以及 1% 鹽度生存率菌約為 10.5%、116%、57.5%，如圖 17、18。
- (三) 若整合各鹽度在四級胺與二氧化氯之抗藥性效果，可得在四級胺殺菌下之存活率為 1.48%；置於二氧化氯下之存活率為 92.83%，如圖 19 所示。由此可得脫色希瓦氏菌對兩種不同殺菌劑之抗藥性成顯著差異($p=0.00704$)，。

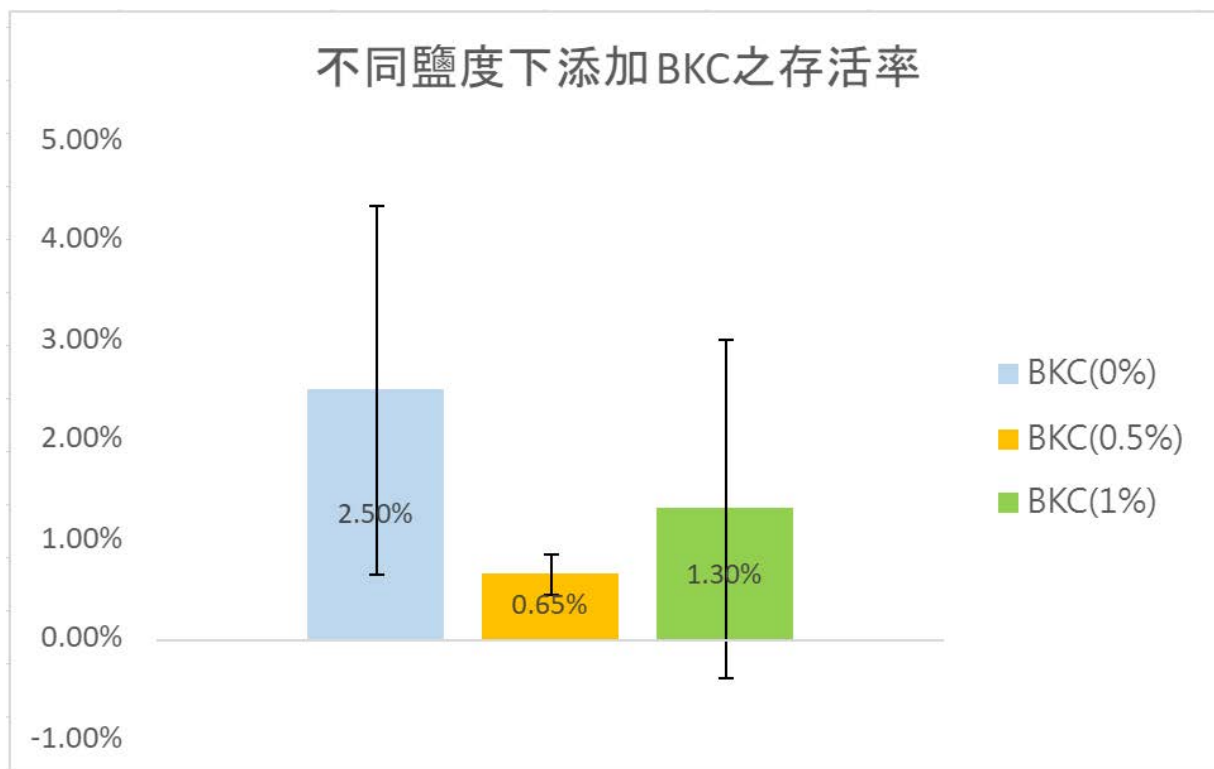


圖 17：BKC 對 *Shewanella decolorationis* 菌落數量在不同鹽度下之影響(37°C 下培養)

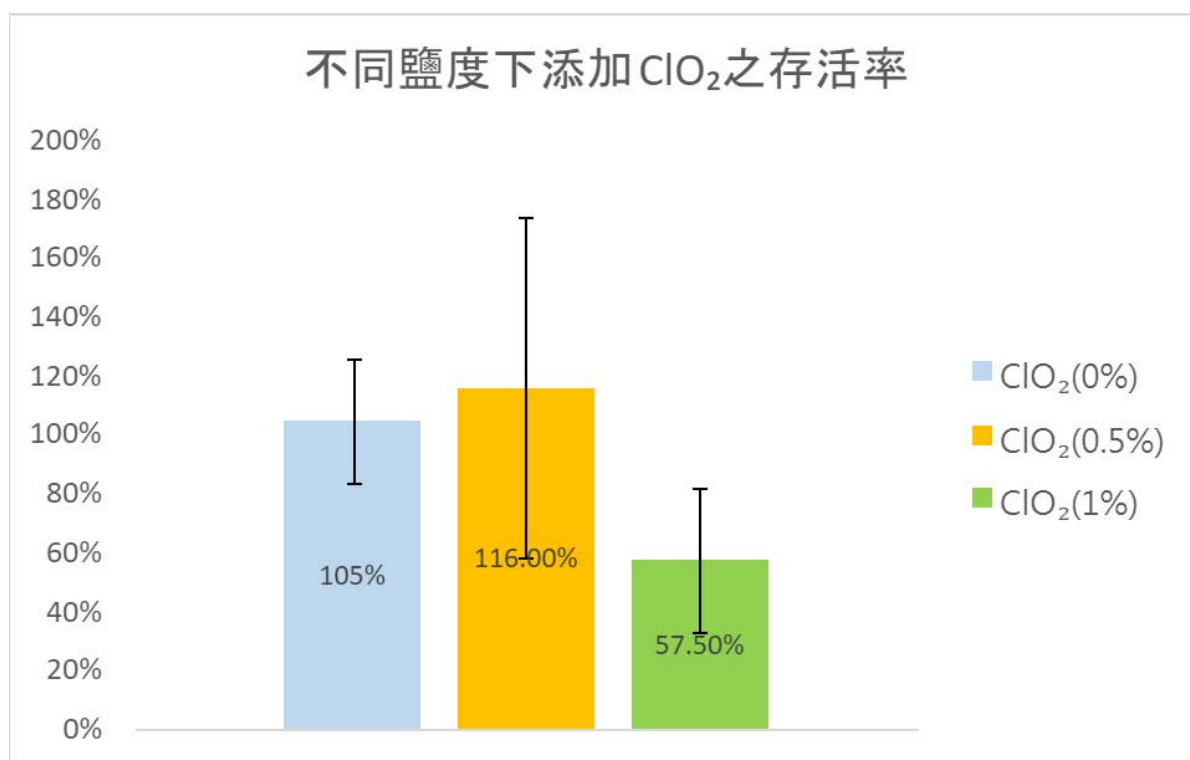


圖 18：ClO₂ 對 *Shewanella decolorationis* 菌落數量在不同鹽度下之影響(37°C 下培養)

兩殺菌劑比對結果

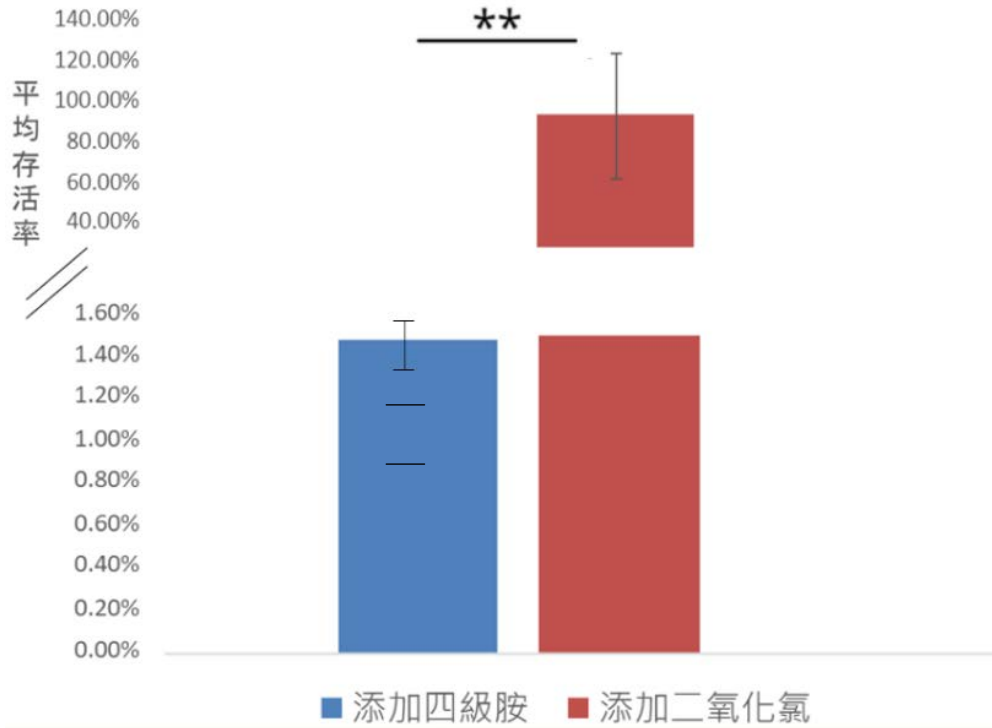


圖 19:添加不同殺菌劑的平均存活率

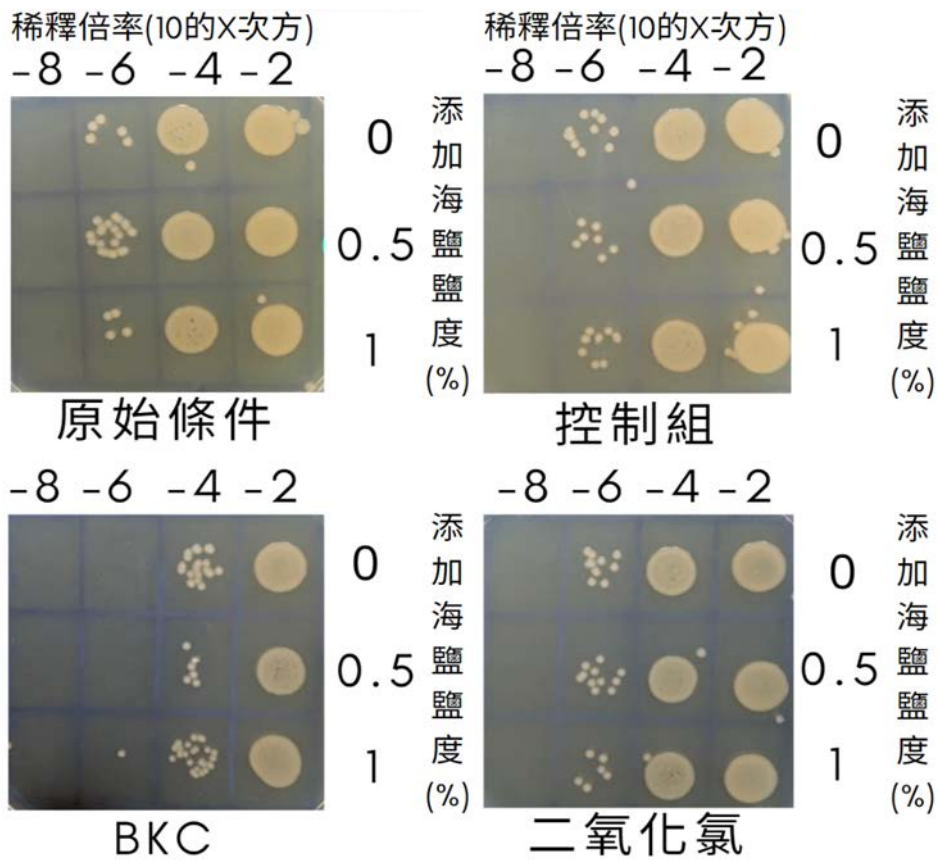


圖 20：實際塗盤結果。

伍、討論

一、挑選脫色希瓦氏菌主因 (*Shewanella decolorationis*)

起初我們並未針對特定菌種進行分析，而是直接採取水中樣本，分析其可能菌種。採樣地點分為於魚房及溫室，而在這兩個採樣區塊中，又細分為淡水、海水以及半淡三種採樣點。我們總共採樣 23 個樣本，包含不同環境、抑或是相同環境下但時間不同之樣本。經過一系列分析，最終我們找出 9 種菌種，但並非所有菌皆被允許進行操作，核心實驗室因設備未達標準只能操作第一級危險群 (RG1) 病原體，而我們用美國國家生物技術資訊中心的內建連結 (NCBI blast) 比對後，發現大部分樣本皆屬於第二級危險群

(RG2)，甚至有些樣本在行政院公布的菌類分級名單中 (圖 21)，1~3 級皆有分布。因此採用樣本編號 1-18 *Shewanella decolorationis* (不會對人體造成危害菌種) 進行研究。下圖 34 為行政院病原菌分級名單，以 *Bacillus* 為例，編號 24-28 為第一級危險群 (RG1) 病原體，可供一般實驗室進行研究；編號 39 為第二級危險群 (RG2)，需經申請才可進行操作。

此外，根據多篇研究指出 (參考資料 6、7) 希瓦氏菌為部分魚類益生菌，具備多重益生功能，以下列舉三點：

- (一) 加速修復金目鱸皮膚傷口及對腸道發炎反應具屏障功能
- (二) 促進塞內加爾鱒編碼蛋白酶的基因表現，使其加速生長
- (三) 抑制石斑魚體內病毒 RNA 聚合酶轉錄，有效降低發病率及死亡率

附表一、第一級危險群 (RG1) 病原體名單

項次	品項 ¹	運送包裝指示 ²		說明
		P620	P650	
1	<i>Acinetobacter</i> spp.		v	
2	<i>Actinobolus</i> spp.		v	
3	<i>Actinosynnema mirum</i>		v	
4	Adeno-associated virus (all serotypes) 腺相關病毒		v	
5	<i>Aeromicrobium</i> spp.		v	
6	<i>Aeromonas</i> spp.		v	
7	<i>Alicyclobacillus</i> spp.		v	
8	<i>Alishewanella</i> spp.		v	
9	<i>Alistipes onderdonkii</i>		v	
10	<i>Anaerococcus hydrogondis</i>		v	
11	<i>Anaerococcus tetradius</i>		v	
12	<i>Ancylostoma braziliense</i>		v	
13	<i>Ancylostoma caninum</i>		v	
14	<i>Aneurinibacillus</i> spp.		v	
15	<i>Aquabacterium commune</i>		v	
16	<i>Aquabacterium citratiphilum</i>		v	
17	<i>Aquabacterium parvum</i>		v	
18	<i>Aquaspirillum itersonii</i>		v	
19	<i>Aquifex aeolicus</i>		v	
20	<i>Aquifex pyrophilus</i>		v	
21	<i>Arthrobacter globiformis</i>		v	
22	<i>Aspergillus niger</i>		v	
23	<i>Azomonas macrocytogenes</i>		v	
24	<i>Bacillus choshinensis</i>		v	
25	<i>Bacillus coagulans</i>		v	
26	<i>Bacillus cohnii</i>		v	
27	<i>Bacillus formosus</i>		v	
28	<i>Bacillus parabrevis</i>		v	
27	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>		v	
28	<i>Ancylostoma duodenale</i>		v	
29	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>		v	舊稱 <i>Corynebacterium haemolyticum</i>
30	<i>Arizona hinshawii</i>		v	
31	<i>Ascaris</i> spp.		v	
32	<i>Ascaris lumbricoides</i>		v	
33	<i>Ascaris suum</i>		v	
34	<i>Aspergillus flavus</i>		v	<i>Aspergillus flavus</i> var. <i>columnaris</i> 除外
35	<i>Aspergillus fumigatus</i>		v	
36	<i>Aspergillus hongkongensis</i>		v	
37	<i>Babesia divergens</i>		v	
38	<i>Babesia microti</i>		v	
39	<i>Bacillus cereus</i>		v	
40	<i>Bacteroides capillosus</i>		v	
41	<i>Bacteroides eggertii</i>		v	
42	<i>Bacteroides fragilis</i>		v	
43	<i>Bacteroides ovatus</i>		v	
44	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>		v	
45	<i>Bacteroides ureolyticus</i>		v	
46	<i>Bacteroides vulgatus</i>		v	
47	<i>Balantidium coli</i>		v	
48	<i>Bartonella</i> spp.		v	
49	<i>Bartonella bigemina</i>		v	
50	<i>Bartonella bovis</i>		v	
51	<i>Bartonella henselae</i>		v	
52	<i>Bartonella quintana</i>		v	
53	<i>Bartonella vinsonii</i>		v	

圖 21：行政院病原菌分級名單

二、鹽度對脫色希瓦氏菌生長所造成影響

脫色希瓦氏菌原先是從廢水處理廠分離出的菌種，在我們分析的樣本中則是在半海水中找到，在第一次測試時，基於所有狀況皆為未知，我們預設各鹽類濃度進行觀察，包含添加 0.01%、0.1%、0.5%、1% 海鹽的 LB 培養基等條件，值得注意的是 LB 培養基組成中已含有 1% NaCl，而從測試中可發現：添加 0.1% 海鹽有最好的生長狀況。推測可能的原因是，在 LB 培養基中添加 0.1% 的海鹽所造成的滲透壓與廢水處理廠或半海水較接近，比較符合原本的生長條件。

若之後要大量生產脫色希瓦氏菌做魚類養殖的益生菌，選擇較適合其生長的條件培養，能提升效率，以較短的時間得到所需的量。

三、泳動能力與脫色希瓦氏菌益菌效果之關聯性

脫色希瓦氏菌是從半淡水中採得，泳動為其生存之基本能力。根據鹽度對其泳動能力影響的實驗，發現添加海鹽濃度 0.5% 泳動能力最佳，1% 次之，2% 最差。意即泳動能力趨勢約為半淡 > 淡水 > 海水。脫色希瓦氏菌為部分魚類益生菌，泳動能力愈強，擴張範圍則越大，進而提升益菌效果。反之，泳動能力弱代表擴散能力較差。因此推論生存於半海水的魚從 *Shewanella* 中獲益較在海水魚多。

四、不同殺菌劑作用於脫色希瓦氏菌之差異

原先本組檢驗抗藥性的方法為紙錠擴散試驗 (disk diffusion method)。將培養約 16 小時的脫色希瓦氏菌菌液 (生長達飽和) 均勻塗在 LB 培養基上，放上滴有 BKC、ClO₂ 的小紙錠，在恆溫培養箱中以 37°C 培養約 20 小時。BKC、ClO₂ 會向外釋放形成抑菌圈。愈往紙片外圍，BKC、ClO₂ 濃度愈低，殺菌能力也就愈弱，因此測量抑菌圈的直徑可以比對細菌對殺菌物質的抗藥性差異。此實驗重複二次皆只有 BKC 組產生抑菌圈，初步判斷因為 ClO₂ 為揮發性物質，放入恆溫培養箱後因高溫揮發影響抑菌效果。因此，我們改將 BKC 與 ClO₂ 加入試管中與該菌直接作用。由實驗結果可得脫色希瓦氏菌經過四級胺殺菌後存活率極低，而二氧化氯作用後可使其保留並殺死其他魚類致病菌。

至於造成兩種殺菌既有如此顯著差異的原因，我們初步推斷是四級胺與二氧化氯殺菌機制不同導致，四級胺殺菌機制是破壞分子間的交互作用，進一步導致細胞膜脂質雙層的瓦解，影響細胞質滲透性的控制使鉀離子流出，進而抑制菌種的排泄作用；二氧化氯則是利用氧原子本身的強氧化作用及滲透壓差，穿透細菌細胞膜以抑制其呼吸作用，藉以殺滅細菌。因此若將來欲分離脫色希瓦氏菌，可利用 ClO₂ 進行篩選，不僅可以保留益生菌，更可以消除其他水中致病菌。

五、脫色希瓦氏菌的應用層面

雖有許多研究指出脫色希瓦氏菌對特定種類魚類具益生效果，但仍未廣泛應用於魚類養殖以及普遍適用於各類魚種。現階段礙於實驗規範(不得傷害脊椎動物、不得操作人類致病菌)及設備問題，延伸實驗無法得以順利進行。以下列出兩點未來著重討論方向及實驗雛形，以供未來進行後續實驗。

(一)探討脫色希瓦氏菌對金目鱸皮膚表層傷口及腸道之修復及屏障效果:

將兩個水族箱內分別加入固定數量金目鱸，並在實驗組中加入脫色希瓦氏菌進行比對。觀察加入脫色希瓦氏菌後，內部魚群在皮膚受傷後是否會有較快修復效果，並進一步解剖比對腸道內組織狀況，腸道內菌種分布等現象。

(二)檢測採樣水體內，脫色希瓦氏菌占比及與其他魚類益生菌、致病菌之作用關係。

陸、結論

- 一、在樣本中可分析出含 *Citrobacter*、*Chromobacterium*、*Bacillus* 等菌，其中多為魚類致病菌或第二級危險群(RG2)病原體，而脫色希瓦氏菌 (*Shewanella decolorationis*) 不會對人體造成危害，更為部分魚類益生菌。
- 二、添加海鹽濃度 0.1%、0.5% 有最佳生長情形，隨著鹽度上升則有逐漸變差的趨勢。
- 三、添加海鹽濃度為 0.5% 時有最大平均泳動半徑，可在相同水體產生較大範圍影響，推論此現象與脫色希瓦氏菌對魚類產生益生效果可能有關。
- 四、脫色希瓦氏菌在測試鹽度下對二氧化氯具有較高抗藥性，在二氧化氯作用下則較不易存活。

柒、參考資料及其他

- 一、 王庭、耐鹽性乳酸菌細菌素的生物活性評估及應用性評估、國立高雄科技大學海洋生物技術研究所、中華民國一零七年五月
- 二、 Holt J G, Krieg N R , Sneath P H A ,Staley J T , Bergy' s manual of determinative bacteriology, Williams and Wilkins, USA, pp.175-189, (1994).
- 三、 Sirilun S, Chiyasut C, Kantachote D,Luxananil P, Characterisation of non-human origin probiotic *Lactobacillus plantarum* with cholesterol-lowering property, *African Journal of Microbiology Research*, 4(10): 994-1000,(2010).
- 四、 Irianto A, Austin B. Probiotics in aquaculture. *J Fish Dis* 2002;25:633e42.
- 五、 Nikoskelainen S, Ouwehand AC, Bylund G, Salminen S, Lilius EM. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol* 2003;15:443e52.
- 六、 Probiotic *Shewanella putrefaciens* (SpPdp11) as a Fish Health Modulator: A Review María Cámara-Ruiz 1, María Carmen Balebona , Miguel Ángel Moriñigo and María Ángeles Esteban
- 七、石斑魚腸道菌抗魚類結病毒物質之特性及其抗病毒機制 Characteristics and Anti-betnodavirus Mechanism of One Intestinal Bacterium Derived from Grouper , 鄭謹和

【評語】 052008

脫色希瓦氏菌是一種海淡水中皆可分離出的細菌，更是部分魚類的益生菌。該菌對石斑魚、金目鱸有抑制體內病毒生長的效果。本研究主要探討不同溫鹽度對其生理變化的影響，包括生長曲線、泳動能力、抗藥性。

1. 探討脫色希瓦氏菌各種不同條件的影響中規中矩，並沒有太多意外的發現。研究稍嫌初步觀察，並沒有更進一步的探討，這些條件對於脫色希瓦氏菌造成哪一種蛋白的影響生長曲線、泳動能力、抗藥性。
2. 實驗設計過於簡化，可再增加一些控制組實驗，海水的鹽度大約為 3.5%，鹽度低於 0.5% 的水為淡水，實驗設計可再涵蓋廣一點。

作品簡報

滄海一希——溫鹽度對希瓦氏菌特性探討

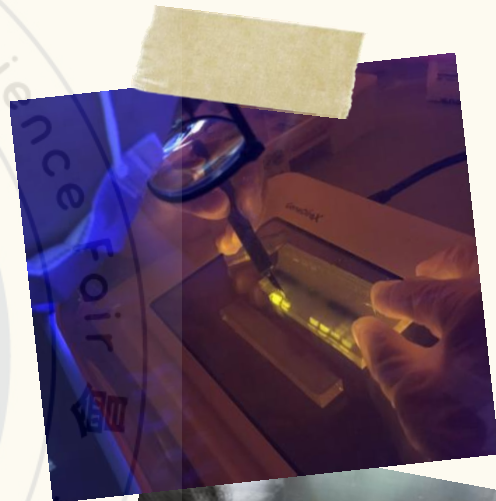
科別：動物與醫學學科

組別：高級中等學校組

關鍵詞：脫色希瓦氏菌、溫鹽度、環境

編號：052008

目標：分離出本土水產益生菌，增進魚類福祉！



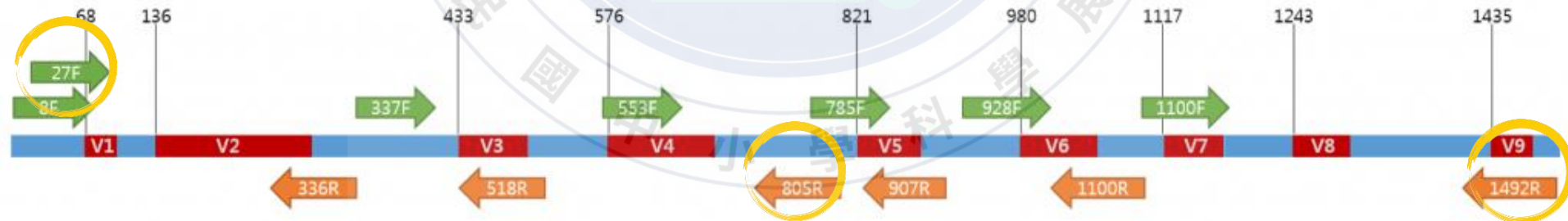
一、分析菌種基因序列

大量採樣，以16s rRNA 定序分析

- 在各採樣點中，可從基因資料庫分析出含有多種菌株，其中多為第二級危險群 (RG2) 病原體。
- 選樣本1-18 *Shewanella*菌觀察

挑選 *Shewanella* (希瓦氏菌) 主因

- 部分菌種為魚類益生菌
- 不會造成人類疾病





脫色希瓦氏菌 (*Shewanella decolorationis*)



多篇研究指出希瓦氏菌為部分魚類益生菌，具備多重益生功能

- 加速修復金目鱸皮膚傷口及對腸道發炎反應具屏障功能
- 促進塞內加爾鰯編碼蛋白酶的基因表現，使其加速生長
- 抑制石斑魚體內病毒RNA聚合酶轉錄，有效降低發病率及死亡率

二、分析鹽度、溫度對 *Shewanella* 生長曲線之影響

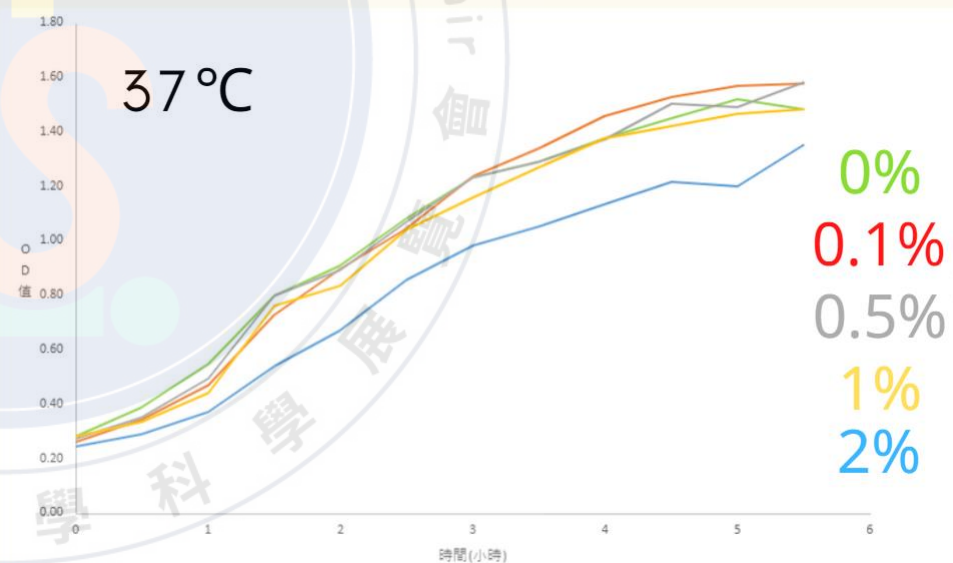
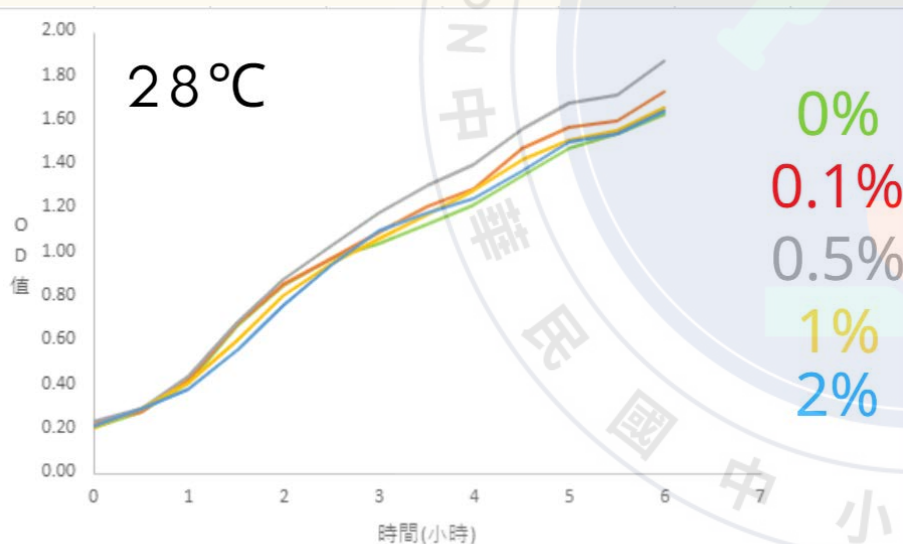
測量OD值，繪製生長曲線

- 隔夜培養 *Shewanella*
- 加200 μ L菌液至4mL LB澄清液
- 測量OD值
- 繪製生長曲線



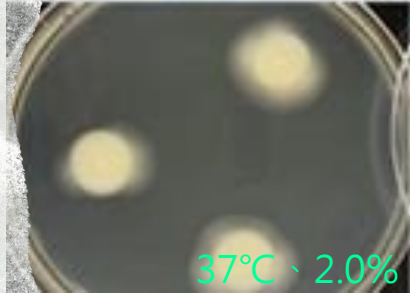
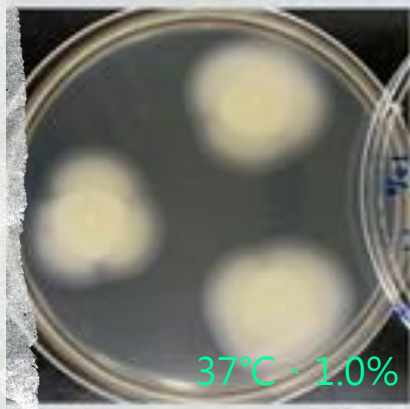
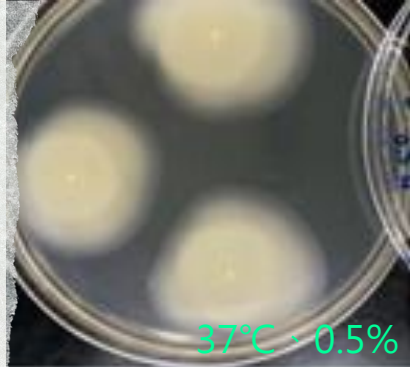
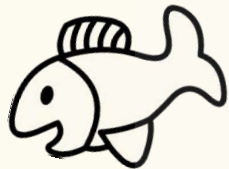
不同溫鹽度希瓦氏菌的生長曲線

- 添加鹽度0.1%、0.5%時有最佳的生長狀況，而其他鹽度下則較差。
- 28°C下培養之生長情形較37°C時佳

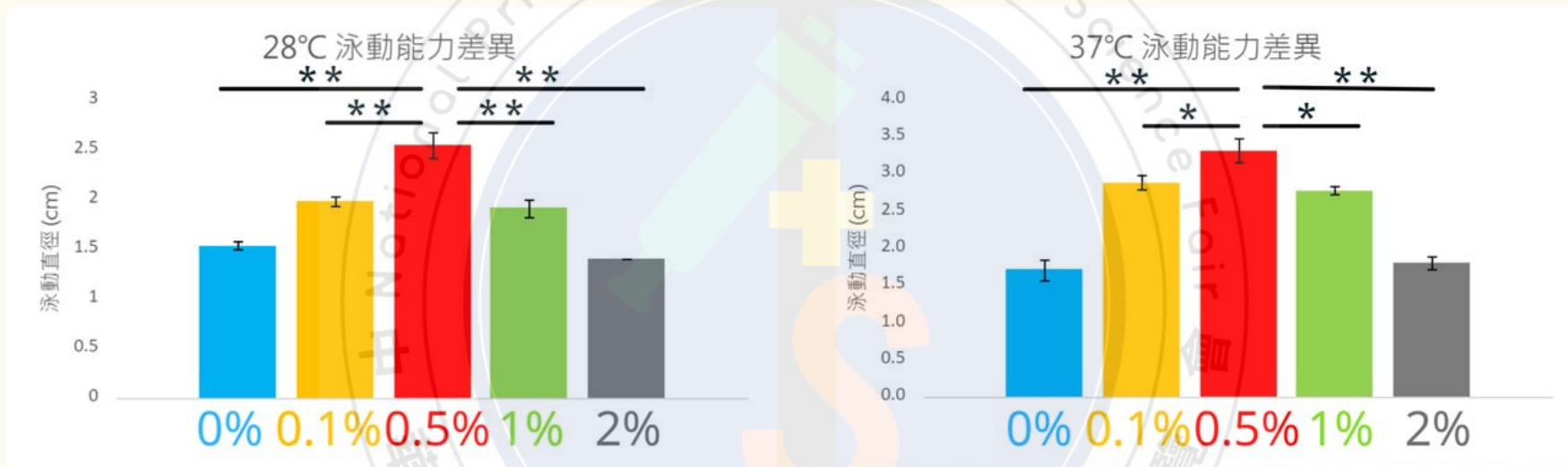


三、分析鹽度、溫度對 脫色希瓦氏菌泳動能力之影響

- 配置 swimming plate (降低濃度)
- 添加各測試鹽度菌液(3次 $2\mu\text{L}$)
- 在定溫(28°C 、 37°C)下培養(20hr)
- 測量泳動直徑



不同溫鹽度希瓦氏菌的泳動半徑

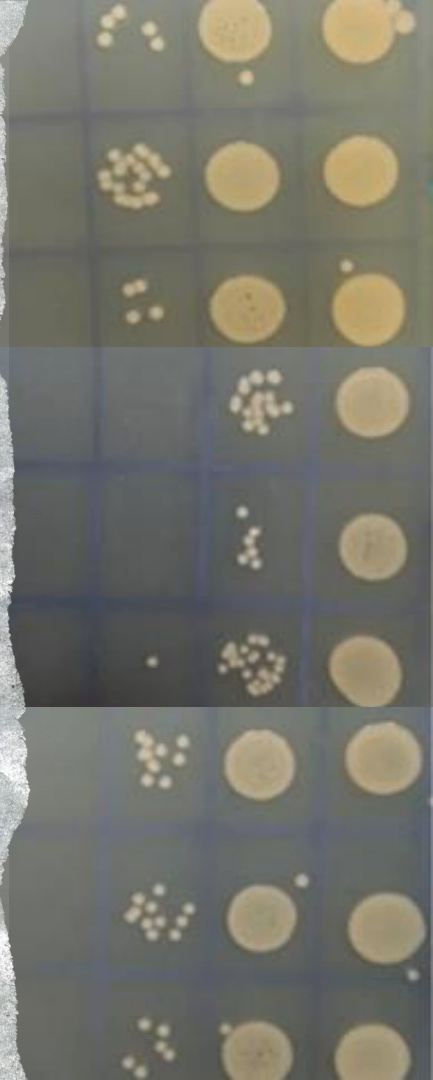


- 以ANOVA分析28°C和37°C培養下達顯著差異
- 在添加鹽度為0.5%時有最大平均泳動半徑

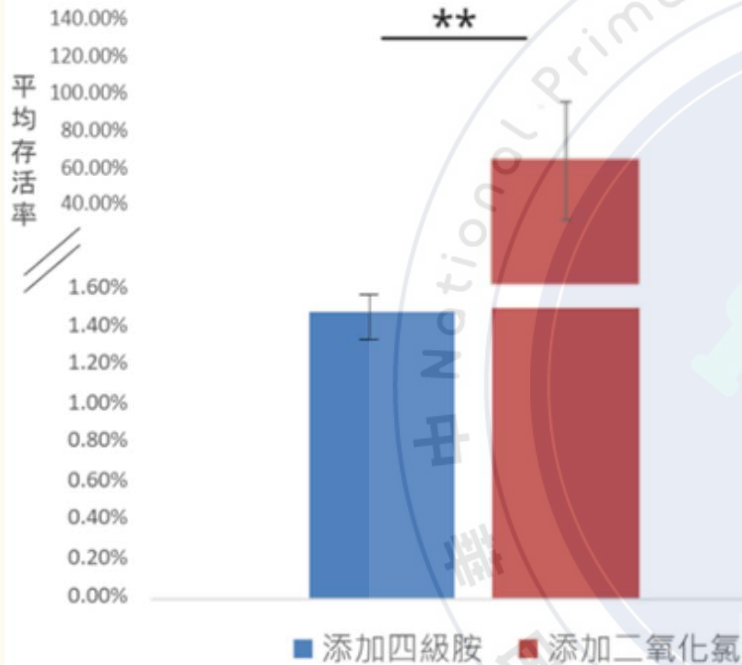
(三次三重複數據比對結果 *代表P < 0.05、**代表P < 0.01)

四、脫色希瓦氏菌對不同 殺菌劑抗藥性之差異

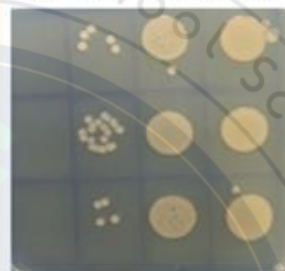
- 選用BKC(四級胺)、二氧化氯(ClO_2)
- 將菌培養至OD值0.8
- 加入兩種殺菌劑1hr
- 序列稀釋並比較抑菌圈大小



兩殺菌劑比對結果

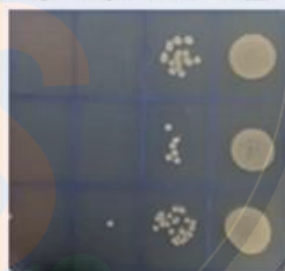


稀釋倍率(10的X次方)
-8 -6 -4 -2



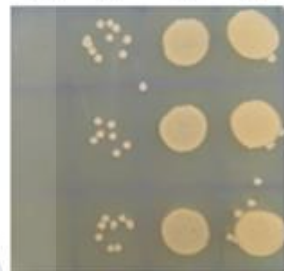
原始條件

稀釋倍率(10的X次方)
-8 -6 -4 -2



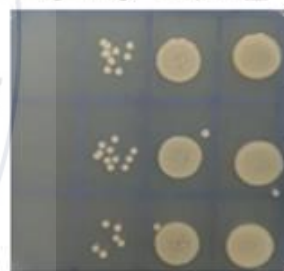
BKC

稀釋倍率(10的X次方)
-8 -6 -4 -2



控制組

稀釋倍率(10的X次方)
-8 -6 -4 -2



二氧化氯

脫色希瓦氏菌在二氧化氯殺菌情況下有較佳存活率

泳動能力

泳動(擴散)
能力差異



影響範圍大小



範圍愈大，提升益生菌效果



生長環境鹽度與添加0.5%海鹽培養基相仿的魚受益最佳

討論

抗藥性

四級胺：抑制其生長(存活率1.48%)

二氧化氯：存活率高(92.83%)



消滅魚類致病菌
(如 *Shewanella putrefaciens*) 等



促使分離魚類益生菌
(如 *Shewanella putrefaciens*(SpPdp11))



脫色希瓦氏菌

未來展望

- 作用於水體魚類實際效益
- 水中占有比例
- 與其他微生物作用影響



結論

- 脫色希瓦氏菌為部分魚類益生菌
- 添加海鹽濃度0.1%、0.5%有最佳生長情形
- 添加海鹽濃度為0.5%時有最大平均泳動半徑
- 脫色希瓦氏菌對二氧化氯具有較高抗藥性

部分參考資料:

- 石斑魚腸道菌抗魚類結病毒物質之特性及其抗病毒機制 Characteristics and Anti-betanodavirus Mechanism of One Intestinal Bacterium Derived from Grouper · 鄭謹和
- Nikoskelainen S, Ouwehand AC, Bylund G, Salminen S, Lilius EM. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by
- potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol* 2003;15:443e52.

簡報製作、插圖來源:Canva