

# 2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	200010
參展科別	環境工程
作品名稱	探討溫度和碳源對 <i>Pantoea sp.</i> 處理養殖廢水之 影響及應用
得獎獎項	二等獎 美國 ISEF 正選代表
就讀學校	高雄市立高雄女子高級中學
指導教師	王俊豪、黃胤唐
作者姓名	鍾亦葳、張伶禕
關鍵詞	<u><i>Pantoea sp.</i>、生物降解、養殖廢水</u>

## 作者簡介



大家好，我們是來自高雄女中的張伶禕和鍾亦葳，分別是三年級和二年級。我們發現養殖漁業目前在廢水處理上有許多問題，除了廢水會讓生物的健康受影響外，甚至也有可能導致地層下陷等環境災害，於是我們想利用微生物製劑進行研究來幫助改善漁民這方面的困擾。在整個準備科展的過程中我們成長了許多，舉凡邏輯思考、實驗設計再至文書處理和口語表達等方面都有所收穫，很開心也很榮幸有機會接觸科展，於我們而言，這段時間的一切是人生中難能可貴的故事與回憶。

## 摘要

本研究探討改善冬季養殖廢水中亞硝酸降解不良的問題。潘朵拉菌 *Pantoea* sp. 可在冬天生長並降解水體亞硝酸，不同於其他菌其在低溫時生長較好但降解較差，顯示兩者非正相關。進一步得知溫度會影響 *Pantoea* sp. 細胞內代謝機制，也發現氨濃度降低時降解能力上升，西方墨點法及酵素活性實驗得知 MDH 表現量和活性在低溫較高。水體中添加葡萄糖可使冬季亞硝酸降解能力提升 6 倍，且不影響其生長，與文獻添加碳源會促進益生菌生長不同。比較各式糖類後得知單醣和雙醣皆可提升降解能力，其中單醣較雙醣好，且此做法適用各鹽度環境，而碳源可提升降解能力，推測因其影響細胞內 TCA cycle 運作。最後實際到戶外採集養殖池水研究，結果顯示成本低的擴培方式可有效降解亞硝酸，對改善台灣冬季養殖廢水水質有高度應用價值。

## Abstract

This study explores how to improve the problem of poor degradation of nitrite in aquaculture wastewater in winter. *Pantoea* sp. can grow in winter and degrade nitrite. According to our data, it grows better at low temperatures but degrades nitrite poorly. Our results were shown a non-positive correlation between the two. Denitrification activity was inhibited at 22°C. We also found that when the ammonia concentration decreases, the degradation of nitrite increases. Western blotting and enzyme activity analysis were shown that MDH is higher at low temperatures. Adding glucose to the water can increase the degradation of nitrite by six times in winter without affecting its growth. Comparing various sugars, we found that both monosaccharides and disaccharides can improve the denitrification activity. Among them, monosaccharides have better effects than disaccharides, and this method is suitable for various salinity environments. Additionally, the carbon source can improve the denitrification activity that may affect the TCA cycle operation. To reduce farmer cost, we design an outdoor amplified system. Our results were shown that addition of bacteria for outdoor amplified system can effectively degrade nitrite from outdoor culture ponds. Our study has high application value for improving the water quality of winter aquaculture wastewater in Taiwan.

## 壹、研究動機

養殖漁業為台灣重要的一環，而養殖過程中不可避免會出現的養殖廢水往往造成漁民不小的困擾，飼養之大量魚蝦排放含氮廢物、過冬養殖期間又因藻相、菌相差而導致冬季魚池內含氮廢物無法降解，造成環境危害外也侵害生物健康。現今常見做法為換水，但此舉消耗大量水資源，於是我們好奇有無其他方法可解決。搜尋資料後發現微生物製劑為近年來興起的作法，故本研究使用潘朵拉菌 *Pantoea* sp. 做為研究對象，從最常見的變因—溫度開始探討其生長及降解情形，尋找能夠解決台灣養殖廢水處理的方法，最後實際擴培模擬應用，利用養殖池水進行實驗以確認 *Pantoea* sp. 解決養殖廢水問題的可行性。

## 貳、研究目的

- 一、探討 *Pantoea* sp. 在不同溫度下降解養殖廢水情形
- 二、探討 *Pantoea* sp. 細胞代謝情形對不同溫度降解能力之影響
- 三、探討 *Pantoea* sp. 不同溫度降解能力與蘋果酸脫氫酶 MDH 關聯
- 四、探討碳源提升 *Pantoea* sp. 在低溫降解能力的可行性
- 五、提升低溫降解能力方法的實際應用



圖 1 *Pantoea* sp.

## 參、研究器材與設備

### 一、研究器材與設備

無菌操作台、生物培養箱、離心機、低溫離心機、分光光度計、-20°C 及 4°C 冰箱、ELISA reader、超音波細胞破碎機、電子天平、試管震盪器 Vortex Mixer、燒杯、試管、離心管、微量滴管、比色管、ELISA 微量盤、倒立顯微鏡、玻片、搖擺式震盪器、膠體配製盒、電泳槽、溼式轉印槽、粗細海綿、NC 模、冷光照膠儀、虱目魚飼料

### 二、實驗藥品與細菌

(一)菌株來源：先前實驗室從市售的益生菌粉中所篩選出來(和平 2012)。

(二)培養相關：培養液 LB (Tryptone、Yeast extract、NaCl)。

(三)亞硝酸測量相關：亞硝酸(亞硝酸鈉、ddH<sub>2</sub>O、氯仿)、亞硝酸鹽呈色劑(85%磷酸、磺胺、ddH<sub>2</sub>O、N-1-萘基乙烯二胺二鹽酸鹽)、磷酸緩衝溶液 PBS(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、ddH<sub>2</sub>O)。

(四)氨氮量測相關：酚溶液(液態酚溶液、95%乙醇)、亞硝鹽鐵氰化鈉溶液(亞硝鹽鐵氰化鈉、ddH<sub>2</sub>O)、鹼性檸檬酸鹽溶液(檸檬酸三鈉鹽、氫氧化鈉、ddH<sub>2</sub>O)、次氯酸鈉、氧化劑溶液(鹼性檸檬酸鹽溶液、次氯酸鈉)、氨氮標準儲備液(NH<sub>4</sub>CL、ddH<sub>2</sub>O)

(五)蛋白質相關：Protein Assay dye Reagent Concentrate、牛血清白蛋白 BSA。

(六)西方墨點法相關：Lysis buffer(Tris-HCl pH7.6、NaCl、1% NP-40、1% Sodium deoxycholate、0.1% SDS)、Loading buffer(1M Tris-Cl pH6.8、1.25% bromophenol blue、25% SDS、10% β-mercaptoethanol、100% glycerol、Running buffer)、電泳膠片(H<sub>2</sub>O、30% acrylamide mix、1.5M Tris pH=8.0、10% SDS、10% ammonium persulfate、TEMED、1.0M Tris pH=6.8)、Transfer buffer (glycine、Tris base、SDS)、脫脂奶粉、1X TBST (1M Tris pH=8.0、5M NaCl、0.01 % Tween-20)、MDH 抗體、α-β-glutamate 抗體、ECL Reagent Ultima A&B、Biomat Stripping buffer

(七)酵素活性相關：磷酸鉀緩衝溶液 K-buffer (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、ddH<sub>2</sub>O)、OAA、NADH

(八)糖相關：C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>、C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>、二號砂糖、精緻特砂、冰糖、果糖。

(九)鹽度相關：NaCl。



圖 2 分光光度計



圖 3 ELISA reader



圖 4 超音波細胞破碎機

## 肆、研究過程與方法

### ◎查閱相關文獻

#### (一)*Pantoea* sp.基本資料

*Pantoea* sp.為細菌界-變形菌門- $\gamma$ -變形菌綱-腸桿菌目-腸桿菌科-泛菌屬生物，為革蘭氏陰性桿菌，為廣泛分布於自然界的化學異營性細菌。具有可以降解水中氨氮廢物和抑制病原菌生長等功能，此益生菌亦可增加養殖生物免疫力，為近幾年養殖界的新興菌種。

#### (二)文獻一、*Pantoea* sp.降解亞硝酸鹽和氨氮機轉之研究(林尚儒，2014)

1. 文獻中測量 22 及 37 度的降解情形，及 37 度的生長速率，發現 *Pantoea* sp.的細胞倍增時間為 36.9 分鐘，且可利用虱目魚飼料進行放大製程，以期未來應用於養殖漁業。
2. 添加碳源可以增加亞硝酸代謝，並使用 RT-PCR 觀察亞硝酸降解之相關基因-蘋果酸脫氫酶及 RNA 的表現量，發現兩者因添加碳源濃度增加而活性減少，
3. 研究中並無確認其機制，且未討論碳源與生長情形間的關係，故本研究期望可進一步進行相關研究。

#### (三)文獻二、希瓦氏菌降解亞硝酸機制之研究(蔡維如，2015)

1. 希瓦式菌(*Shewanella* sp., MB-1)細胞倍增時間為 36.9 分鐘，生長溫度範圍在 28~37 度間，並在 pH 6~9、鹽度為 1~8%具有亞硝酸降解能力。可知其無法於冬季生長，且在淡水應用上有困難，應用性較低。
2. MB-1 在不含 NaCl 的 LB 中無法降解亞硝酸，且在 PBS 或 NaCl 回溶溶液中培養在海水中發現，僅回溶在 PBS 回溶溶液中可降解亞硝酸，推測高濃度氯離子會抑制亞硝酸進入細胞內。田野實驗後其無溶血特質確保對養殖生物沒有危害，能進行實際應用。
3. 研究所使用的 MB-1 與 *Pantoea* sp.同樣可降解亞硝酸，但 MB-1 無法於冬季生長，且在淡水應用上有困難，故本研究期望 *Pantoea* sp.可克服 MB-1 這兩個應用的缺點。

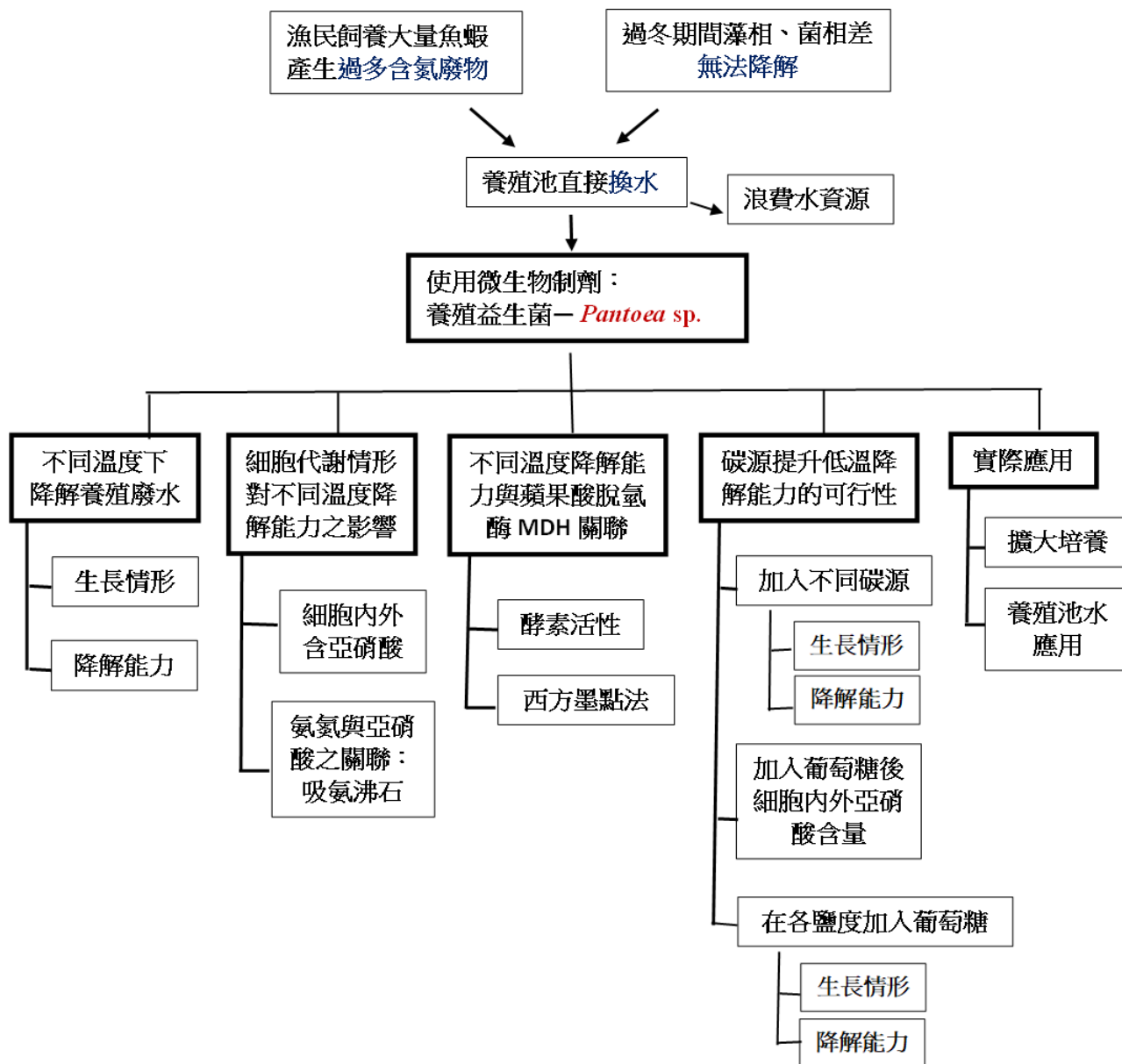


圖 5 研究流程圖

### 一、探討 *Pantoea* sp. 在不同溫度下降解養殖廢水情形

漁民的實際養殖是一整年甚至是數年之久，因此如果使用 *Pantoea* sp. 降解亞硝酸時，會面臨到季節不同，溫度就會不同的情況，因此其中最基本也最重要的問題便是 *Pantoea* sp. 在台灣較常見的 22-37°C 下能否能生長？又是否有降解亞硝酸的能力？於是我們便從在不同溫度培養 *Pantoea* sp. 開始，逐步了解 *Pantoea* sp. 與台灣養殖漁業之間的關聯。

#### (一) 測量 *Pantoea* sp. 在不同溫度下的生長情形

1. 以 Tryptone 10 gm/L、Yeast extract 5 gm/L、NaCL 10 gm/L 配製 LB 培養液。
2. 在無菌操作台上挑選單一菌落的 *Pantoea* sp. 於 5 ml LB 培養液，加入 100  $\mu$ l 亞硝酸儲備液，使其濃度成為 20ppm。
3. 分別將菌液震盪培養於 22、25、28、31、34、37°C 16 小時以上。

4. 將於不同溫度培養 16 小時以上的 *Pantoea* sp.菌液取出並於振盪器振盪。
5. 取 900  $\mu$ l 的菌到比色管中，並以石蠟膜封住比色管開口，上下輕晃搖勻。
6. 放入分光光度計測定 OD<sub>600</sub> 吸光值。以上實驗 N=3，三重複取平均。



圖 6 配製培養液



圖 7 細胞培養箱中震盪培養

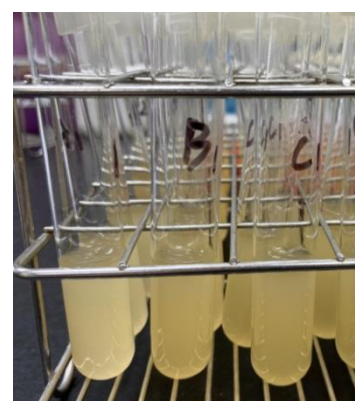


圖 8 培養 16 小時後的菌

## (二)建立亞硝酸鹽呈色劑標準曲線

查詢測定亞硝酸濃度的相關文獻後，發現環保署有公告氨氮靛酚比色法，參考後發現可藉添加呈色劑來測定亞硝酸濃度，為較精確得知樣本的亞硝酸濃度，我們利用已知濃度的亞硝酸建立標準曲線，以便之後實驗對照。

1. 以 0.4928g 的亞硝酸鈉溶於 ddH<sub>2</sub>O 中，並加入 0.4mL 氯仿，配製成 100mL 的亞硝酸儲備液，且其濃度為 1000ppm。
2. 將 8mL 85%磷酸及 0.8g 磺胺溶於 40 mL ddH<sub>2</sub>O，完全溶解後加入 0.08 g N-1-萘基乙烯二胺二鹽酸鹽，再以 ddH<sub>2</sub>O 稀釋至 50 mL，以配製亞硝酸呈色劑，配製完成後儲存於深色瓶避免產生反應。
3. 在各離心管內加入 1000  $\mu$ l 的呈色劑，並分別加入 0.01、0.05、0.1、0.25、0.5、1、2.5、5 ppm 的亞硝酸儲備液。
4. 取出 100  $\mu$ l 的溶液加入 ELISA 微量盤，並以 ELISA reader 以波長 543 nm 讀取數值。
5. 利用 excel 將濃度與 ELISA reader 數值做資料分析-迴歸，若 R 平方值大於 0.95，則此迴歸線即為標準曲線。

## (三)比較不同溫度下 *Pantoea* sp.降解養殖廢水情形

為了解 *Pantoea* sp.實際在自然環境會遇到的情形，也好奇其是否可在全年不同溫度下均可降解亞硝酸的能力，我們模擬台灣一年四季較常出現的 22-37°C 來進行實驗。



1. 在無菌操作台上挑選單一菌落的 *Pantoea* sp.於 5 ml LB 培養液，加入 100  $\mu$ l 亞硝酸儲備液，使其濃度成為 20ppm。
2. 分別將菌液震盪培養於 22、25、28、31、34、37°C 16 小時以上。
3. 將 1500  $\mu$ l 的菌液加入離心管內，並放入離心機以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
4. 取出 500  $\mu$ l 的上清液並加入 20  $\mu$ l 的亞硝酸呈色劑放置 3 分鐘進行反應。
5. 取出 100  $\mu$ l 的溶液加入 ELISA 微量盤，並用 ELISA reader 以波長 543 nm 讀取數值。
6. 利用前實驗中建立亞硝酸呈色劑標準曲線算出菌液亞硝酸含量，並比較在 22、25、28、31、34、37°C 下 *Pantoea* sp.降解亞硝酸情形。以上實驗 N=3，三重複取平均。  
註：若 500  $\mu$ l 的上清液並加入 20  $\mu$ l 的亞硝酸呈色劑顏色過深超出標準曲線範圍，則須將上清液稀釋十倍測量後再將數據乘以十倍。

## 二、探討 *Pantoea* sp.細胞代謝情形對不同溫度降解能力之影響

在研究目的中我們初步發現到 *Pantoea* sp.在高溫時有良好的降解亞硝酸能力，可在較低溫時便不具有降解能力，為了要更進一步了解溫度影響其降解能力的原因，我們便好奇是否會與細胞內的代謝有所關聯？

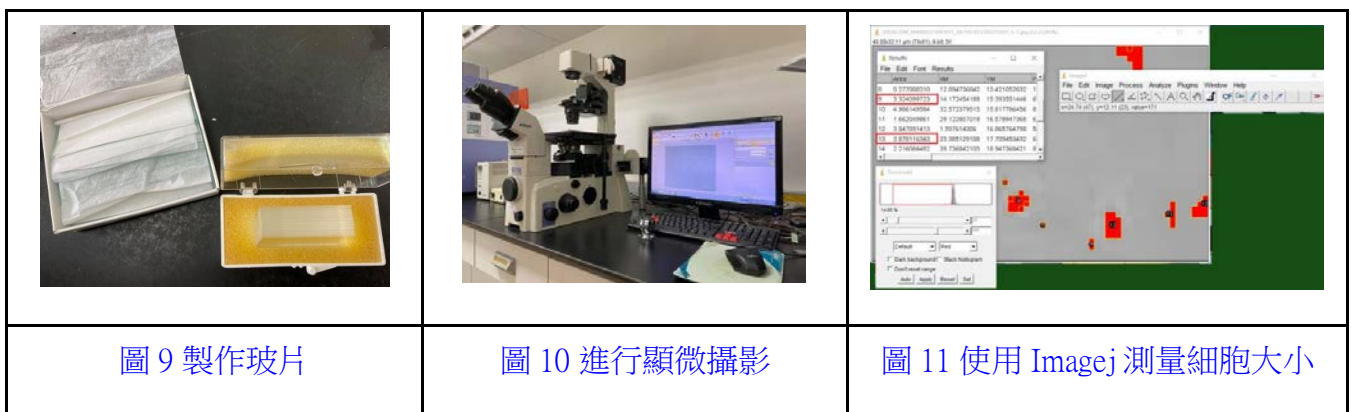
### (一)測量 *Pantoea* sp.於不同溫度培養 16 小時以上的細胞內亞硝酸濃度

1. 在無菌操作台上挑選單一菌落 *Pantoea* sp.於 5 ml LB 培養液，並添加 100  $\mu$ l 亞硝酸儲備液，使其濃度為 20ppm，震盪培養於 25、28、31、34°C 16 小時以上。
2. 取出 1500  $\mu$ l 的菌液於離心管內，並放入離心機以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
3. 以 1.396 g  $K_2HPO_4$ 和 0.2694 g  $KH_2PO_4$ 溶於 100mL 的 ddH<sub>2</sub>O 中配製磷酸緩衝溶液 PBS。
4. 將離心管內上清液抽掉，並用 PBS 1000  $\mu$ l 潤洗 2 次以去除細胞外的其餘蛋白質。
5. 加入 550  $\mu$ l 的一次水後利用超音波細胞破碎機破菌共 15 秒。
6. 將破菌後的離心管置於低溫離心機，以 14500 rpm 在 4°C 下離心 10 分鐘。
7. 取出 500  $\mu$ l 上清液並加入亞硝酸呈色劑 20  $\mu$ l 靜置 3 分鐘以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
8. 取出 100  $\mu$ l 上清液加入 ELISA 微量盤，並以 ELISA reader 以波長 543 nm 讀取數值。
9. 利用前實驗中建立的亞硝酸呈色劑的標準曲線算出細胞內的亞硝酸含量，並比較在 25、28、31、34°C 下細胞內的亞硝酸含量差異。以上實驗 N=3。

## (二)測量 *Pantoea* sp.細胞於顯微鏡下大小

初步實驗發現培養 16 小時以上的細胞內亞硝酸濃度過低，導致標準曲線換算後為負值，推測可能是培養時間過長，亞硝酸已分解完，於是我們改為分別測量 1、2、3 小時亞硝酸濃度。由於考量到細胞數可能影響亞硝酸代謝情形，於是我們希望藉由蛋白質濃度換算細胞數，為確保蛋白質濃度可正確換算細胞數，不會因細胞大小不同導致換算結果不正確，我們先利用顯微鏡測量 *Pantoea* sp.的大小，以便接下來的實驗換算。

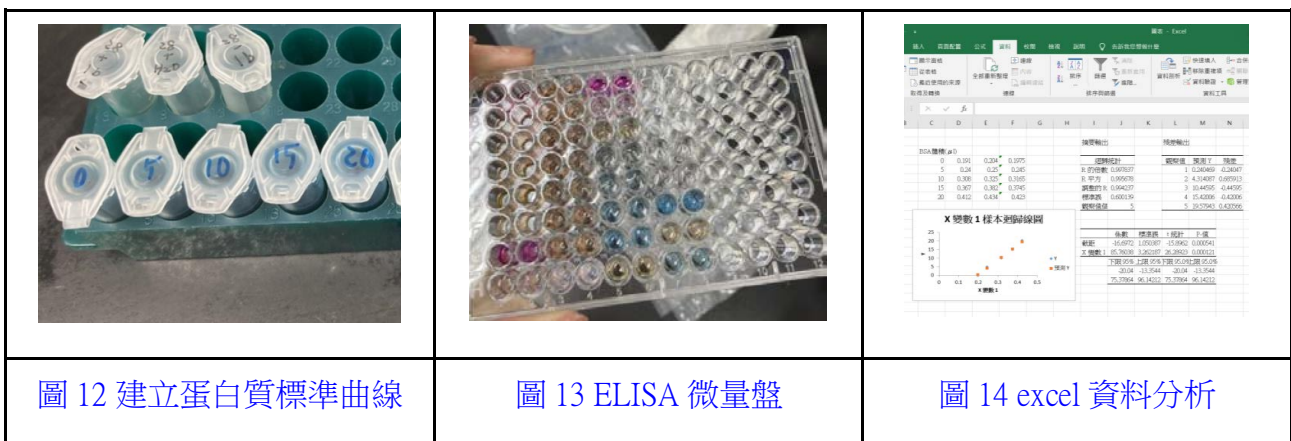
1. 在載玻片滴上  $10\ \mu\text{l}$  的菌液製作 *Pantoea* sp.玻片。
2. 將玻片放上直立式倒立顯微鏡，並利用軟體 Q-capture pro 7 進行顯微攝影。
3. 利用軟體 Image J 分析照片中單顆 *Pantoea* sp.細胞大小。以上實驗  $N=3$ 。



## (三)建立蛋白質標準曲線

後續實驗需要測量菌液的蛋白質濃度，查詢資料得知可利用 protein assay dye reagent 呈色情形換算，於是我們利用已知濃度牛血清白蛋白 BSA 建立標準曲線，以便實驗對照。

1. 將 Bio-Rad protein assay dye reagent 和一次水以 1 : 4 比例混和後，在各離心管內加入  $1000\ \mu\text{l}$  的混和溶液，並分別加入 0、5、10、15、20  $\mu\text{l}$  的 BSA 均勻混合。
2. 取出  $100\ \mu\text{l}$  的溶液加入 ELISA 微量盤，並用 ELISA reader 以波長 595 nm 讀取數值。
3. 利用 excel 將濃度與 ELISA reader 數值做資料分析-迴歸，若 R 平方值大於 0.99，則此迴歸線即為標準曲線。



#### (四)比較不同溫度培養的 *Pantoea* sp.細胞內所含亞硝酸濃度差異

由於我們懷疑 *Pantoea* sp.降解能力與其細胞內代謝情形有關，於是決定比較單位質量的 *Pantoea* sp.細胞所含亞硝酸濃度差異，來探討溫度是否影響亞硝酸在細胞內情形。

1. 在無菌操作台上挑選單一菌落的 *Pantoea* sp.於 5 ml LB 培養液，隔夜培養後，再添加 100  $\mu$ l 的亞硝酸儲備液，使其濃度為 20ppm，震盪培養於 22、28、34、37 $^{\circ}$ C，並分別於添加後 1、2、3 小時取出菌液進行實驗。
2. 取出 1500  $\mu$ l 的菌液於離心管內，並放入離心機以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
3. 將離心管內上清液抽掉，並用 PBS 500  $\mu$ l 潤洗 3 次以去除細胞外的其餘蛋白質。
4. 加入 250  $\mu$ l 的一次水後利用超音波細胞破碎機破菌共 25 秒。
5. 將破菌後的離心管置於低溫離心機，以 14500 rpm 在 4 $^{\circ}$ C 下離心 10 分鐘。
6. 取出 200  $\mu$ l 的上清液後加入 50  $\mu$ l 一次水及 10  $\mu$ l 亞硝酸呈色劑，接著靜置 3 分鐘後以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
7. 取出 100  $\mu$ l 上清液加入 ELISA 微量盤，並以 ELISA reader 以波長 543 nm 讀取數值。
8. 利用前實驗建立的亞硝酸呈色劑的標準曲線算出細胞內的亞硝酸含量。
9. 抽出步驟 5 的離心完的 2  $\mu$ l 上清液加入以 Bio-Rad protein assay dye reagent 和一次水 1：4 比例混和的 1000  $\mu$ l 混和溶液。
10. 取出 100  $\mu$ l 的溶液加入 ELISA 微量盤，並用 ELISA reader 以波長 595 nm 讀取數值。
11. 利用前實驗建立的蛋白質標準曲線算出 *Pantoea* sp.的細胞內蛋白質濃度。
12. 將前實驗所測得細胞內亞硝酸含量與蛋白質濃度計算，得出每 1  $\mu$ g 蛋白質所對應亞硝酸濃度，並比較 22、28、34、37 $^{\circ}$ C 單位質量細胞內所含亞硝酸濃度差異。以上實驗 N=3，六重複取平均。



圖 15 抽出上清液

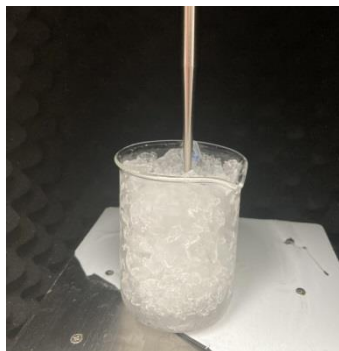


圖 16 超音波細胞破碎機破菌



圖 17 以低溫離心機離心

#### (五)比較不同溫度培養的 *Pantoea* sp.可降解亞硝酸濃度差異

測量完單位質量細胞內所含亞硝酸濃度差異後，我們很好奇此時細胞外，也就是水體中的亞硝酸濃度又是如何，不同溫度培養的細胞可降解的亞硝酸濃度是否有所不同？

1. 在無菌操作台上挑選單一菌落的 *Pantoea* sp.於 5 ml LB 培養液，隔夜培養後，再添加 100  $\mu$ l 的亞硝酸儲備液，使其濃度為 20ppm，震盪培養於 22、28、34、37 $^{\circ}$ C，並分別於添加後 1、2、3 小時取出菌液進行實驗。
2. 取出 1500  $\mu$ l 的菌液於離心管內，並放入離心機以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
3. 取出 500  $\mu$ l 的上清液並加入 20  $\mu$ l 的亞硝酸呈色劑放置 3 分鐘進行反應。
4. 取出 100  $\mu$ l 的溶液加入 ELISA 微量盤，並用 ELISA reader 以波長 543 nm 讀取數值。
5. 利用前實驗中建立的亞硝酸呈色劑的標準曲線算出 *Pantoea* sp.菌液的亞硝酸含量。
6. 利用前實驗所測蛋白質濃度數據，計算出每 1  $\mu$ g 蛋白質所對應的亞硝酸濃度。比較 22、28、34、37 $^{\circ}$ C 單位質量可降解亞硝酸濃度。以上實驗 N=3，三重複取平均。

#### (六)建立氨氮標準曲線

我們參考環保署公布之氨氮靛酚比色法，並修改成此實驗步驟。

1. 取 11.1 ml 液態酚溶液於 95% 乙醇(Ethyl alcohol)中混合至最終體積 100 mL，調配出酚溶液(Phenol solution)。
2. 將 0.5 g 亞硝醯鐵氰化鈉溶解於 100 mL ddH<sub>2</sub>O 中以配製 0.5%亞硝醯鐵氰化鈉溶液(Sodium nitroprusside)，配製完後存於棕色瓶避免照光反應。
3. 溶解 20 g 檸檬酸三鈉鹽(Trisodium citrate)和 1 g 氫氧化鈉於 ddH<sub>2</sub>O 中，以配製鹼性檸檬酸鹽溶液(Alkaline citrate solution)，再將其稀釋至 100 ml。
4. 使用市售次氯酸鈉(Sodium hypochlorite)，將其稀釋至約 5%之濃度。
5. 將上述配製完成之次氯酸鈉 200  $\mu$ l 和鹼性檸檬酸鹽溶液 800  $\mu$ l 混合成氧化劑溶液(Oxidizing solution)，此溶液為使用前配製，避免時間影響氨氮測量結果。
6. 取 0.3819 g NH<sub>4</sub>Cl 溶解於 ddH<sub>2</sub>O 中，並稀釋至 100 mL，以配製氨氮標準儲備溶液(Ammonium stock standard)，使其濃度為 1000 mg/L。
7. 將氨氮標準儲備液稀釋成 10、5、2.5、1、0.5、0.25、0.1、0.05、0.01 ppm，取 5  $\mu$ l 加入 980  $\mu$ l 二次水、15  $\mu$ l LB 培養液、40  $\mu$ l 酚溶液、40  $\mu$ l 亞硝醯鐵氰化鈉溶液、100  $\mu$ l 氧化劑溶液中，均勻混和後置於避光處 1 小時待其反應。
8. 取出 100  $\mu$ l 的溶液加入 ELISA 微量盤，並以 ELISA reader 以波長 590 nm 讀取數值。
9. 利用 excel 將濃度與 ELISA reader 數值做資料分析-迴歸，若 R 平方值大於 0.95 則此迴歸線即為標準曲線。以上實驗 N=3，三重複取平均。

### (七)測定使用吸氨沸石後氨氮吸附率

查閱文獻得知許多菌種如硝化菌的亞硝酸降解與氨有一定的關聯，我們好奇 *Pantoea* sp.在不同溫度的亞硝酸降解能力是否也與氨的量相關，於是我們利用沸石進行實驗。

1. 將吸氨沸石敲、磨碎，使其大小可放入試管內，並增加吸收面積。
  2. 分別於 5 ml LB 培養液中加入吸氨沸石 0.2、0.4、0.6 g 並滅菌。
  3. 在無菌操作台上挑選單一菌落的 *Pantoea* sp.於 5 ml LB 培養液，加入 100  $\mu$ l 亞硝酸儲備液，使其濃度成為 20ppm。
  4. 分別將菌液震盪培養於 22、37°C 16 小時以上。
  5. 取出後測量亞硝酸含量：將 1000  $\mu$ l 的菌液加入離心管內，並放入離心機以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
  6. 取上清液 5  $\mu$ l 加入 980  $\mu$ l 二次水、15  $\mu$ l 全新培養液、40  $\mu$ l 酚溶液、40  $\mu$ l 亞硝鹽鐵氰化鈉溶液、100  $\mu$ l 氧化劑溶液中，均勻混和並放置於陰暗避光處 1 小時待其反應。
  7. 取出 100  $\mu$ l 的溶液加入 ELISA 微量盤，並以 ELISA reader 以波長 590 nm 讀取數值。
- 以上實驗 N=3，三重複取平均。



圖 18 磨、敲碎沸石



圖 19 將沸石加入培養液中

### (八)探討使用吸氨沸石後亞硝酸降解率

由於文獻提及氨與亞硝酸降解的關聯，我們便利用沸石吸附氨，比較不同氨濃度時亞硝酸降解情形，以探討 *Pantoea* sp.降解亞硝酸的相關機制。

1. 分別於 5 ml LB 培養液中加入吸氨沸石 0.2、0.4、0.6 g 並滅菌。
2. 在無菌操作台上挑選單一菌落的 *Pantoea* sp.於上述培養液，加入 100  $\mu$ l 亞硝酸儲備液，使其濃度成為 20ppm。
3. 分別將菌液震盪培養於 22、37°C 16 小時以上。
4. 取出後測量亞硝酸含量：將 1000  $\mu$ l 的菌液加入離心管內，並放入離心機以 14800 rpm 離心 2 分鐘。

5. 取出 500  $\mu$ l 的上清液並加入 20  $\mu$ l 的亞硝酸呈色劑進行反應。
6. 取出 100  $\mu$ l 溶液加入 ELISA 微量盤，並用 ELISA reader 以波長 543 nm 讀取數值。
7. 利用前實驗中建立的亞硝酸呈色劑標準曲線算出 *Pantoea* sp.菌液的亞硝酸含量，並比較在 22、37°C 下 *Pantoea* sp.降解亞硝酸情形。以上實驗 N=3，三重複取平均。

### 三、探討 *Pantoea* sp.不同溫度降解能力與蘋果酸脫氫酶 MDH 關聯

在前面實驗得知不同溫度時 *Pantoea* sp.的降解能力不同，我們便好奇是否與其蛋白質和酵素有關，進行蛋白質電泳發現確實不同溫度時有許多蛋白質有表現的差異，查閱文獻後得知添加碳源後的降解能力與蘋果酸脫氫酶 MDH 有關，於是我們想知道溫度與降解能力是否也與 MDH 有關，便從 MDH 著手開始進行蛋白質與 *Pantoea* sp.降解能力的研究。

(一)以西方墨點法探討不同溫度下蘋果酸脫氫酶蛋白質 MDH 表現量

1. 處理樣本：將 22、28、34 度下有添加亞硝酸和無添加亞硝酸的 *Pantoea* sp.已萃取完成蛋白質樣本(同目的二實驗四方法，惟將破菌前加入一次水改為 Lysis buffer)加入 5X DNA sample loading buffer 均勻混合並加熱 5 分鐘，以破壞蛋白質雙硫鍵，
2. 製膠：同時，按照成分比例表配置電泳膠體。

上膠		下膠	
H <sub>2</sub> O	2.3 ml	H <sub>2</sub> O	2.1 ml
30% acrylamide mix	5 ml	30% acrylamide mix	0.5 ml
1.5 M Tris pH8.8	2.5 ml	1.0 M Tris pH6.8	0.38 ml
10% SDS	0.1 ml	10% SDS	0.03 ml
30% ammonium persulfate	0.1 ml	30% ammonium persulfate	0.03 ml
TEMED	0.004 ml	TEMED	0.003 ml

3. SDS-PAGE 蛋白質電泳 Running：將樣品注入 well，以電流 40 安培進行電泳 2 小時。
4. 轉印 Transfer：轉印夾板中依次序放入粗、細海綿、膠片、NC 膜、細海綿、粗海綿，放入裝滿 Transfer buffer 的轉印槽負電端接轉印夾版黑色面，正電端接白色面，盒內投進一顆攪拌子使 transfer buffer 持續攪動。裝置接電流 100V 1 小時。
5. 將 membrane 取出並用胭脂紅染色以確認蛋白質轉印情形，後用 TBST 洗清。

6. 封閉 Blocking：在 1 倍 TBST(4.1M Tween 20 加 1X TBS 至 1L)加入脫脂奶粉泡成 5%脫脂牛奶，將牛奶倒至 membrane 上方均勻搖晃 30 分鐘共 2 次，以將殘留之少許胭脂紅洗清，同時將 membrane 空白的位置封閉。
7. 潤洗 Washing：將 1 倍 TBST 蓋過 membrane，均勻搖晃 5 分鐘共 4 次。
8. 一級抗體反應：使用抗體 MDH2 Antibody #8610 調配成濃度 1:100 偵測目標蛋白質，在 4°C 冰箱以濃度均勻搖晃 16 小時以上。
9. 潤洗 Washing：將 1 倍 TBST 蓋過 NC 膜，均勻搖晃 5 分鐘共 4 次。
10. 二級抗體反應：使用 TBST 和抗體 Goat Anti-body IgG 配置成濃度 1：20000 放置在搖擺式振盪器均勻搖晃 1 小時。
11. 冷光儀紀錄成果：使用顯影劑 ECL Reagent Ultima A 和 B 各 500  $\mu$ l 將 membrane 全部浸濕，放入冷光儀進行呈色反應，利用電腦讀取冷光儀照片並紀錄成果。
12. 轉印膜抗體剝離再生 Stripping：使用 Stripping buffer 蓋過 membrane 後放置於搖擺式振盪器均勻搖晃 30 分鐘後重複步驟 1-9，替換使用一抗為  $\alpha$  -  $\beta$  -glutamate，以證明轉印確實，冷光讀取成果中的 band 為目標蛋白質。



圖 20 煮蛋白質

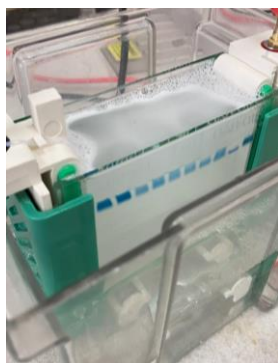


圖 21 SDS-PAGE 膠體電泳

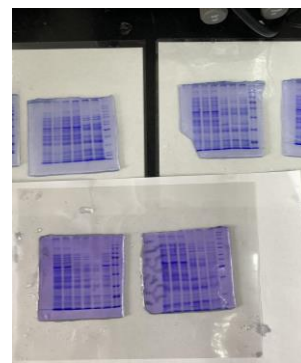


圖 22 電泳結果

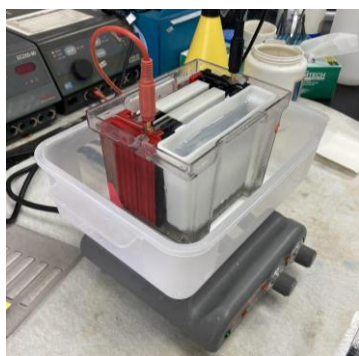


圖 23 轉印



圖 24 脫脂奶粉封閉



圖 25 冷光儀紀錄成果

## (二)比較不同溫度下蘋果酸脫氫酶酵素活性

由於生成蛋白質後細菌可能因生理機制等原因導致無法作用，為了更進一步確認 *Pantoea* sp. 和降解亞硝酸相關蛋白質在不同溫度的運作情形，我們測量 MDH 蘋果酸脫氫酶活性來推測酵素的實際執行狀況。

1. 在無菌操作台上挑選單一菌落的 *Pantoea* sp. 於 5 ml LB 培養液，隔夜培養後分為有添加和無添加亞硝酸組別，其中有添加組加入 100  $\mu$ l 的亞硝酸儲備液，使其濃度為 20ppm，在 22、28、34°C 震盪培養 16 小時以上。
2. 將 1.396 g  $K_2HPO_4$  和 0.2694 g  $KH_2PO_4$  溶於 100 mL 二次水配置 0.1 M 磷酸鉀緩衝溶液。
3. 取 2.0 mg oxaloacetate 溶於 1 mL 中 15 mM oxaloacetate solution 中製造 OAA；取 4.25 mg  $NADH \cdot Na_2$  溶於 1 mL 二次水配成 NADH solution，兩者皆為接下來進行反應的藥品。
4. 取出 2000  $\mu$ l 菌液於離心管內，放入離心機以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
5. 將離心管內上清液抽掉並用 K-buffer 500  $\mu$ l 潤洗回溶 3 次。
6. 加入 250  $\mu$ l 的 PBS 後利用超音波細胞破碎機破菌共 25 秒。
7. 將破菌後的離心管置於低溫離心機，以 14500 rpm 在 4°C 下離心 5 分鐘。
8. 將細胞萃取物抽出 2  $\mu$ l 上清液，並加入 Bio-Rad protein assay dye reagent 和一次水 1:4 比例混和的 1000  $\mu$ l 溶液，用 ELISA reader 波長 595 nm 讀取數值，計算蛋白質濃度後加一次水使其體積達 100  $\mu$ l。
9. 將 oxaloacetate 溶液、NADH 溶液和磷酸鉀緩衝溶液以 1:1:28 比例配成混和溶液。
10. 抽取 25  $\mu$ l 步驟 6 溶液加入 1000  $\mu$ l 步驟 7 混和液，搖晃均勻後以每兩分鐘以分光光度計波長 340nm 測量吸光值，重複測量 8 次以作為接下來換算的數據。
11. 將測量後各組別的 OD 值扣掉空白組(K-buffer)後，計算 OD 值與時間關係 X-Y 分布圖之斜率，將斜率乘以蛋白質稀釋倍率後即為 MDH 酵素活性。

註：酵素活性分析實驗反應式：
$$\text{Oxaloacetate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{MDH}} \text{L-Malate} + \text{NAD}^+$$

## 四、探討碳源提升 *Pantoea* sp. 在低溫降解能力的可行性

目的一中發現低溫時 *Pantoea* sp. 降解亞硝酸能力較差，造成漁民在冬季實際應用的困難，查詢資料後發現坊間流傳添加糖蜜的做法，文獻也提及加入碳源會提升細菌的生長能力，在細胞數增加的情況下，降解能力也隨之提升，於是我們以結構較簡單的葡萄糖進行初步模擬，從生長情形和降解能力開始，逐步探討葡萄糖與 *Pantoea* sp. 降解能力間的關聯。



(一)測量 *Pantoea* sp.在不同葡萄糖濃度培養後的生長情形

1. 於 LB 培養液加入葡萄糖，使培養液葡萄糖濃度為 0.05、0.1、0.5、1、2%。
2. 在無菌操作台上挑選單一菌落的 *Pantoea* sp.加入不同濃度的葡萄糖 LB 培養液中，並加入 100  $\mu$ l 的亞硝酸儲備液，使其濃度成為 20ppm，在 22°C 震盪培養 16 小時以上。
3. 取 900  $\mu$ l 的菌液到比色管中，並以石蠟膜封住比色管開口，上下輕晃搖勻。
4. 放入分光光度計測定 OD600 吸光值。以上實驗 N=3，三重複取平均。

(二)比較不同葡萄糖濃度培養 16 小時以上 *Pantoea* sp.降解亞硝酸情形

1. 在無菌操作台上挑選單一菌落 *Pantoea* sp.加入 0.05、0.1、0.5、1、2% 5 ml 葡萄糖 LB 培養液，加 100  $\mu$ l 亞硝酸儲備液使其濃度為 20ppm，在 22°C 震盪培養 16 小時以上。
2. 將 1500  $\mu$ l 的菌液加入離心管內，並放入離心機以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
3. 取出 500  $\mu$ l 的上清液並加入 20  $\mu$ l 的亞硝酸呈色劑放置 3 分鐘進行反應。
4. 取出 100  $\mu$ l 的溶液加入 ELISA 微量盤，並用 ELISA reader 以波長 543 nm 讀取數值。
5. 利用前實驗中建立的亞硝酸呈色劑的標準曲線算出 *Pantoea* sp.菌液的亞硝酸含量，並比較在 0.05、0.1、1、2%的葡萄糖濃度下 *Pantoea* sp.降解亞硝酸情形。
6. 註：若 500  $\mu$ l 的上清液並加入 20  $\mu$ l 的亞硝酸呈色劑顏色過深超出標準曲線範圍，則須將上清液稀釋十倍測量後再將數據乘以十倍。以上實驗 N=3，三重複取平均。

(三)比較不同葡萄糖濃度培養 *Pantoea* sp.細胞內所含亞硝酸濃度差異

目的二發現 *Pantoea* sp.降解能力與細胞內代謝情形有關，前實驗也發現添加葡萄糖可提升降解能力，於是我們好奇葡萄糖是否影響其細胞內代謝情形，導致其降解能力較好。

1. 在無菌操作台上挑選單一菌落的 *Pantoea* sp.於葡萄糖濃度分別為 0.05、1%的 5 ml LB 培養液，隔夜培養後，再添加 100  $\mu$ l 的亞硝酸儲備液，使其濃度為 20ppm，震盪培養於 22°C，並分別於添加後 1、2、3 小時取出菌液進行實驗。
2. 取出 1500  $\mu$ l 的菌液於離心管內，並放入離心機以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
3. 將離心管內上清液抽掉，並用 PBS 500  $\mu$ l 潤洗 3 次以去除細胞外的其餘蛋白質。
4. 加入 250  $\mu$ l 的一次水後利用超音波細胞破碎機破菌共 25 秒。
5. 將破菌後的離心管置於低溫離心機，以 14500 rpm 在 4°C 下離心 10 分鐘。
6. 取出 200  $\mu$ l 的上清液後加入 50  $\mu$ l 一次水及 10  $\mu$ l 亞硝酸呈色劑，接著靜置 3 分鐘後以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
7. 取出 100  $\mu$ l 上清液加入 ELISA 微量盤，並以 ELISA reader 以波長 543 nm 讀取數值。
8. 利用前實驗建立的亞硝酸呈色劑的標準曲線算出細胞內的亞硝酸含量。

9. 抽出步驟 5 的離心完的  $2\ \mu\text{l}$  上清液加入以 Bio-Rad protein assay dye reagent 和一次水 1 : 4 比例混和的  $1000\ \mu\text{l}$  混和溶液。
10. 取出  $100\ \mu\text{l}$  的溶液加入 ELISA 微量盤，並用 ELISA reader 以波長  $595\ \text{nm}$  讀取數值。
11. 利用前實驗建立的蛋白質標準曲線算出 *Pantoea* sp. 的細胞內蛋白質濃度。
12. 將前實驗所測得細胞內亞硝酸含量與蛋白質濃度計算，得出每  $1\ \mu\text{g}$  蛋白質所對應的亞硝酸濃度，並比較葡萄糖濃度 0.05、1% 的單位質量細胞內所含亞硝酸濃度差異。以上實驗  $N=3$ ，二重複取平均。

#### (四)比較不同葡萄糖濃度培養 *Pantoea* sp. 可降解亞硝酸濃度差異

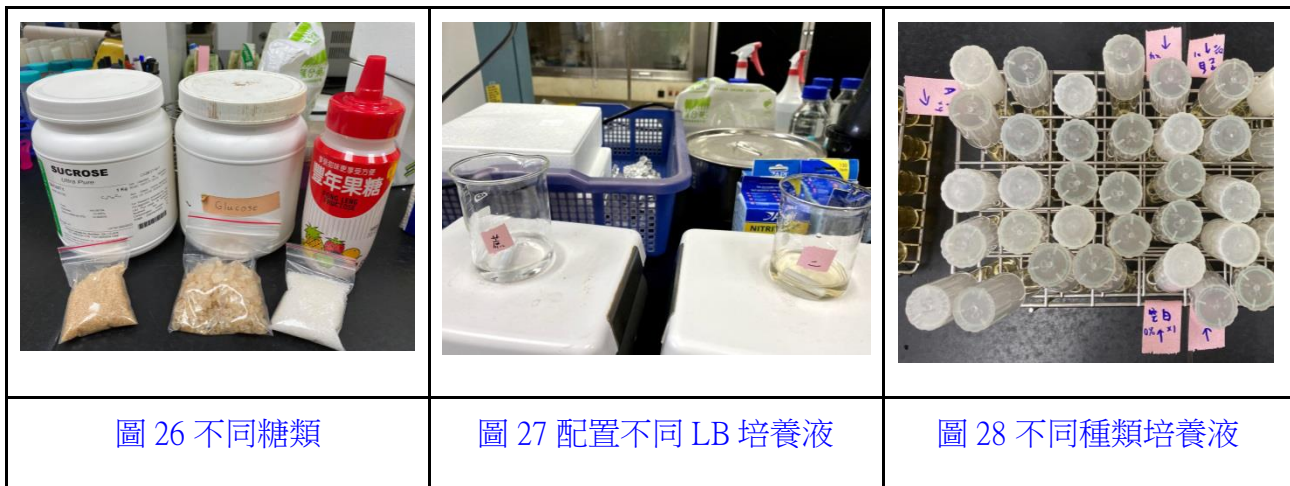
測量完添加葡萄糖對細胞內亞硝酸濃度影響後，我們也很好奇葡萄糖是否會影響 *Pantoea* sp. 水體降解情形，於是我們比較單位質量下 *Pantoea* sp. 可降解亞硝酸濃度差異。

1. 在無菌操作台上挑選單一菌落的 *Pantoea* sp. 於葡萄糖濃度分別為 0.05、1% 的 5 ml LB 培養液，隔夜培養後，再添加  $100\ \mu\text{l}$  的亞硝酸儲備液，使其濃度為 20ppm，震盪培養於  $22^\circ\text{C}$ ，並分別於添加後 1、2、3 小時取出菌液進行實驗。
2. 取出  $1500\ \mu\text{l}$  的菌液於離心管內，並放入離心機以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
3. 取出  $500\ \mu\text{l}$  的上清液並加入  $20\ \mu\text{l}$  的亞硝酸呈色劑放置 3 分鐘進行反應。
4. 取出  $100\ \mu\text{l}$  的溶液加入 ELISA 微量盤，並用 ELISA reader 以波長  $543\ \text{nm}$  讀取數值。
5. 利用前實驗中建立的亞硝酸呈色劑的標準曲線算出 *Pantoea* sp. 菌液的亞硝酸含量。
6. 利用前實驗所測蛋白質濃度數據，計算每  $1\ \mu\text{g}$  蛋白質所對應亞硝酸濃度。比較葡萄糖濃度 0.05、1% 單位質量下可降解亞硝酸濃度差異。以上實驗  $N=3$ ，二重複取平均。

#### (五)測量 *Pantoea* sp. 在不同糖種類培養後的生長情形

在初步以結構較簡單、實驗室較好取得的葡萄糖進行實驗後，考慮到漁民實際應用的方便性及可行性，再加上文獻多以葡萄糖進行實驗，我們挑選實驗室及市面較常見的其他糖類進行實驗，探討不同糖類對 *Pantoea* sp. 生長情形及降解能力的影響。

1. 於 LB 培養液加入實驗室葡萄糖、蔗糖、市售二號砂糖、精緻特砂、冰糖、果糖，濃度各為 1、2% 兩組。
2. 在無菌操作台上挑選單一菌落的 *Pantoea* sp. 加入不同糖類的 LB 培養液中，並加入  $100\ \mu\text{l}$  的亞硝酸儲備液，使其濃度成為 20ppm，在  $22^\circ\text{C}$  震盪培養 16 小時以上。
3. 取  $900\ \mu\text{l}$  的菌液到比色管中，並以石蠟膜封住比色管開口，上下輕晃搖勻。
4. 放入分光光度計測定 OD600 吸光值。以上實驗  $N=3$ ，三重複取平均。



#### (六)比較不同糖種類培養後 *Pantoea* sp.降解亞硝酸情形

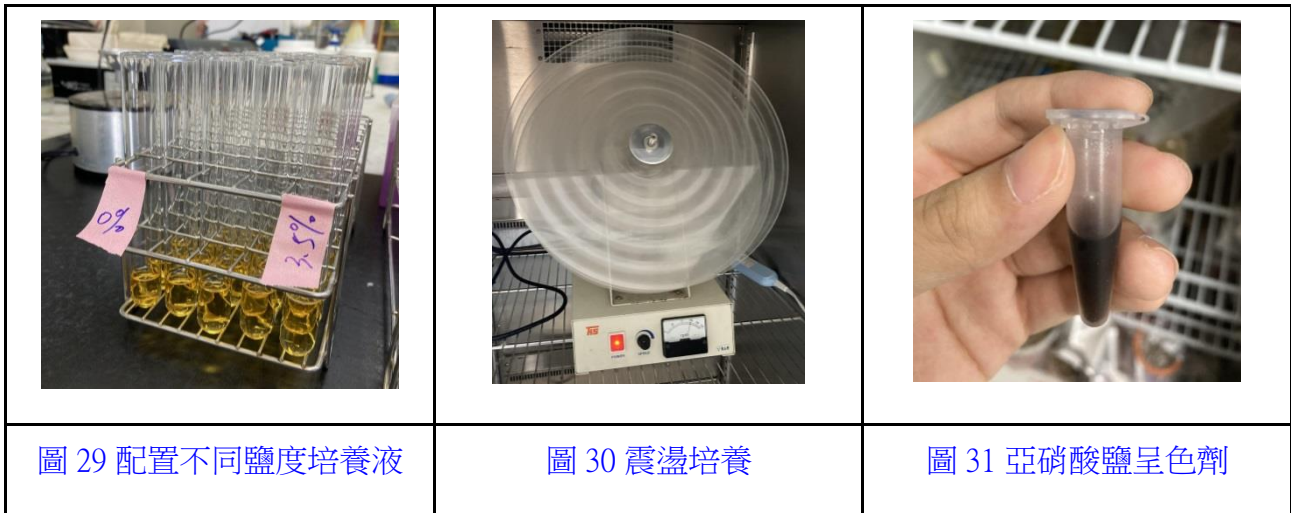
在無菌操作台上挑選單一菌落的 *Pantoea* sp.加入不同糖類的 LB 培養液中，並加入 100  $\mu$ l 的亞硝酸儲備液，使其濃度成為 20ppm，在 22 $^{\circ}$ C 震盪培養 16 小時以上。

1. 將 1500  $\mu$ l 的菌液加入離心管內，並放入離心機以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
2. 取出 500  $\mu$ l 的上清液並加入 20  $\mu$ l 的亞硝酸呈色劑放置 3 分鐘進行反應。
3. 取出 100  $\mu$ l 的溶液加入 ELISA 微量盤，並用 ELISA reader 以波長 543 nm 讀取數值。
4. 利用前實驗中建立的亞硝酸呈色劑的標準曲線算出 *Pantoea* sp.菌液的亞硝酸含量，並比較不同糖類培養下 *Pantoea* sp.降解亞硝酸情形。以上實驗 N=3，三重複取平均。

#### (七)測量 *Pantoea* sp.加入碳源後在不同鹽度下生長情形

前實驗確認葡萄糖能提升低溫降解亞硝酸能力，且葡萄糖為各糖類中提升效果最佳的組別，為模擬實際養殖可能遇到的鹽度變化，對葡萄糖幫助降解亞硝酸能力是否有影響，我們利用以下 5 種鹽度進行實驗，探討 *Pantoea* sp.在不同鹽度下生長情形與降解亞硝酸情形。

1. 配置葡萄糖濃度 1、2%，鹽度 0、1、2、3、3.5% 的 LB 培養液來模擬實際養殖情形。
2. 在無菌操作台上挑選單一菌落 *Pantoea* sp.加入不同濃度葡萄糖和鹽度 LB 培養液中，並加入 100  $\mu$ l 亞硝酸儲備液，使其濃度為 20ppm，在 22 $^{\circ}$ C 震盪培養 16 小時以上。
3. 取 900  $\mu$ l 的菌液到比色管中，並以石蠟膜封住比色管開口，上下輕晃搖勻。
4. 放入分光光度計測定 OD600 吸光值。以上實驗 N=3，三重複取平均。



#### (八)探討 *Pantoea* sp.加入碳源後在不同鹽度下降解亞硝酸情形

1. 在無菌操作台上挑選單一菌落 *Pantoea* sp.分別加入葡萄糖濃度 1、2%，鹽度 0、1、2、3、3.5%的 5 ml LB 培養液，加入 100  $\mu$ l 亞硝酸儲備液，使其濃度成為 20ppm，在 22°C 震盪培養 16 小時以上。
2. 將 1500  $\mu$ l 的菌液加入離心管內，並放入離心機以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
3. 取出 500  $\mu$ l 的上清液並加入 20  $\mu$ l 的亞硝酸呈色劑放置 3 分鐘進行反應。
4. 取出 100  $\mu$ l 的溶液加入 ELISA 微量盤，並用 ELISA reader 以波長 543 nm 讀取數值。
5. 利用前實驗建立的亞硝酸呈色劑標準曲線算出 *Pantoea* sp.菌液亞硝酸含量，比較不同葡萄糖濃度和鹽度下 *Pantoea* sp.降解亞硝酸情形。以上實驗 N=3，三重複取平均。

#### 五、提升低溫降解能力方法的實際應用

實際應用上，若直接在偌大的養殖池內加入碳源會需要大量的葡萄糖、糖蜜…等材料，除了實施有一定難度外，更會讓成本達到一分地需約三十多萬的金錢，導致此使用方法無法應用於產業中。但不論是增強魚蝦免疫力或幫助優化水體(如 *Pantoea* sp.)的益生菌都是漁民常用於改善養殖環境的方法，因此，現今多會使用「擴大培養」的方式讓最少的原料發揮最大的效果。以下實驗即為我們模擬坊間擴培的方式：

##### (一)探討 *Pantoea* sp.擴大培養方法

1. 使用 5ml 水和 1g 虱目魚飼料配置培養液，其中虱目魚飼料為提供生長之營養源。
2. 在培養液中分別加入不同濃度和種類之碳源作為應用的比較。實驗項目共 4 組，分別為：空白組(無添加任何菌種)、糖蜜 2.5%組、葡萄糖 1%組和葡萄糖 0.05%組，並將以上組別滅菌。

3. 在無菌操作台上挑選單一菌落的 *Pantoea* sp.和 Ph5-alpha 分別依實驗組別加入滅菌完全含有各濃度、種類碳源的培養液中，同時加入 100  $\mu$ l 的亞硝酸儲備液以便接下來觀察 *Pantoea* sp.是否生長好且開啟降解亞硝酸機制之指標。將添加完的菌液震動培養於 22 度 16 小時以上。
4. 取出培養液後再加入 100  $\mu$ l 的菌液並震動培養 16 小時以上。
5. 取出 100  $\mu$ l 菌液後加入 4  $\mu$ l 亞硝酸呈色劑觀察顏色變化：顏色為深紫色代表尚未擴培完成；顏色為較淡之淺紫色或粉紅色則代表培養液中亞硝酸已開始被降解，細胞亞硝酸降解機制開啟，擴培完成。

## (二)探討 *Pantoea* sp.對於養殖池水降解能力之應用

擴培完成之菌液即為加入養殖池之微生物製劑，故我們為模擬實際養殖池的水質和應用情形，實際到使用中的養殖池採樣回實驗室進行實驗。

1. 前往飼養鱸魚的養殖池取樣，取樣後將池水分裝放置在 22°C 環境中。
2. 每 6 天分別加入四組(空白、糖蜜 2.5%、葡萄糖 1%、葡萄糖 0.05%)擴培後的菌液於四個採集於不同池水的容器中，使其濃度為 100 ppm，並測量各組亞硝酸和氨氮的含量，觀察兩者的濃度變化。

## 伍、研究結果

### 一、探討 *Pantoea* sp. 在不同溫度下降解養殖廢水情形

#### (一) 測量 *Pantoea* sp. 在不同溫度下的生長情形

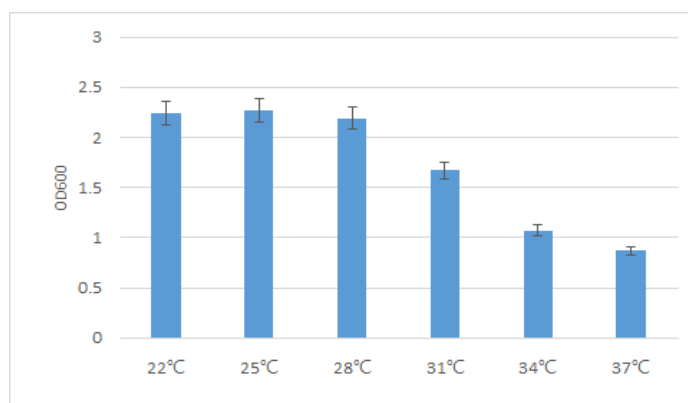


圖 32 不同溫度下的生長情形

從結果可以發現，*Pantoea* sp. 在台灣氣候中較常出現的 22-37°C 下皆可生長，顯示 *Pantoea* sp. 實際應用於台灣養殖環境時，不太會因溫度造成其無法生長。另外也發現較高溫環境下(31、34、37°C)生長時，OD<sub>600</sub> 數值較低，細菌量較少生長情形較差，而當 *Pantoea* sp. 生長在較低溫的環境(22、25、28°C)時，OD<sub>600</sub> 數值較高，細菌生長量較多，可知低溫較適合 *Pantoea* sp. 生長。31、34、37°C 分別與 22°C 之 t 檢定 p 值皆 < 0.05，達顯著差異。

#### (二) 建立亞硝酸鹽呈色劑標準曲線

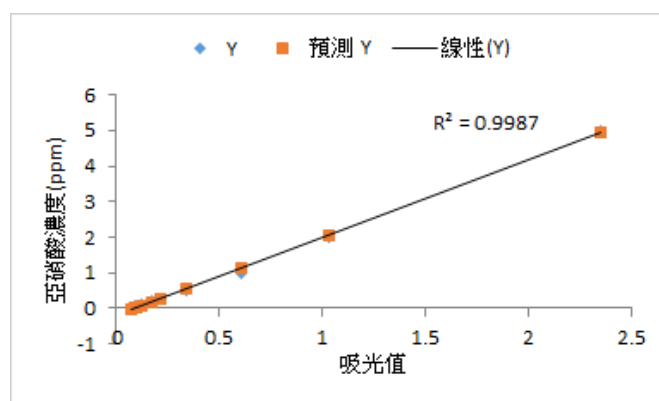


圖 33 亞硝酸鹽呈色劑標準曲線

參考氨基靛酚比色法後，我們利用亞硝酸鹽呈色劑與以知濃度亞硝酸儲備液建立標準曲線，從圖 33 來看，亞硝酸濃度 0 至 0.5 ppm 間的點較密集，是因為我們發現有些樣本溶液加入呈色劑後的顏色過淡，為了確保之後的實驗樣本可以使用內差法落在標準曲線內，我們多做幾個樣本加強此迴歸直線的準確度，使其 R<sup>2</sup> 值達到 0.99。接下來的實驗皆利用此標準曲線進行亞硝酸鹽濃度的換算。

### (三)比較不同溫度下 *Pantoea* sp.降解養殖廢水情形

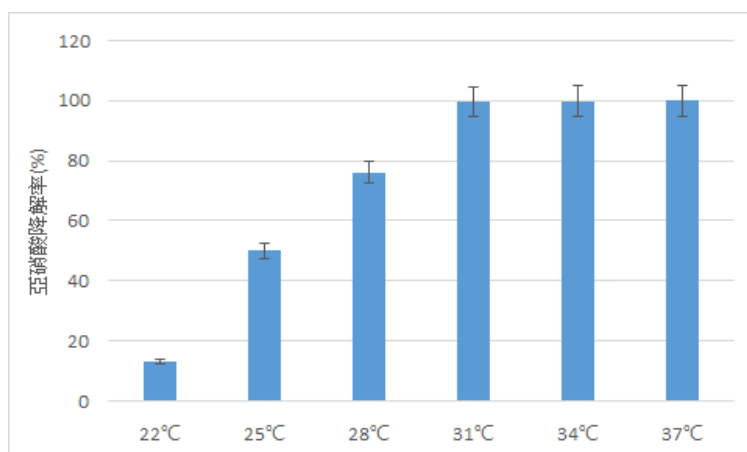


圖 34 不同溫度下的降解亞硝酸情形

根據圖 34 可知 31、34、37°C 培養時 *Pantoea* sp. 降解率皆將近 100%，有非常良好的降解能力，可隨著溫度下降，降解率也隨之下降，顯示溫度較低的環境中 *Pantoea* sp. 降解亞硝酸能力較差，推測冬季低溫期間較不適合 *Pantoea* sp. 利用。

### 二、探討 *Pantoea* sp. 細胞代謝情形對不同溫度降解能力之影響

從研究目的—亞硝酸降解結果來看，發現 *Pantoea* sp. 高溫時降解情形較佳，故我們好奇是否和細胞內代謝情形有關，所以我們嘗試將細胞打碎，測量細胞內亞硝酸含量差異。

#### (一)測量 *Pantoea* sp. 於不同溫度培養 16 小時以上的細胞內亞硝酸濃度

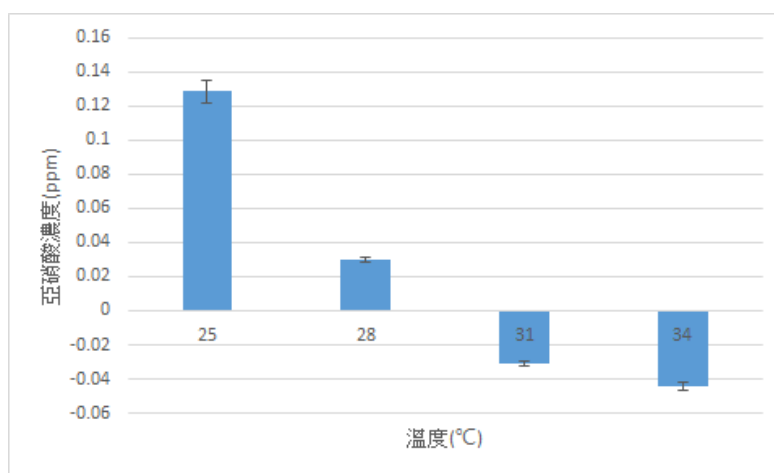


圖 35 亞硝酸添加後培養 16 小時以上的細胞內亞硝酸濃度

如圖 35 所示，在 31、34°C 時因為濃度過低，ELISA Reader 測出數值經標準曲線換算後為負值。我們懷疑是否因 16 小時的培養時間太長，細胞內的機制已降解完亞硝酸，造成測不到亞硝酸的情況。所以接下來的實驗中，我們探討添加亞硝酸後培養 1~3 小時的細胞內亞硝酸濃度的變化，以更加了解 *Pantoea* sp. 的降解機制。

## (二)測量 *Pantoea* sp.細胞於顯微鏡下大小



圖 36 顯微鏡下的 *Pantoea* sp.

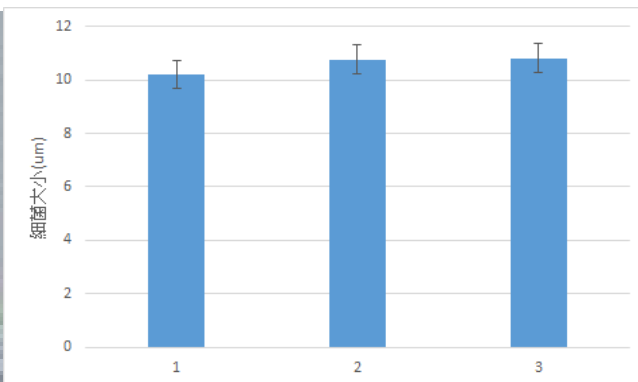


圖 37 *Pantoea* sp. 細菌大小

根據圖 37 中可以發現 *Pantoea* sp.大小多在  $10 \mu\text{m}$ ，且其數值經 t 檢定之  $p=0.39$ ，故可知 *Pantoea* sp.大小間無顯著差異，接下來的實驗以蛋白質濃度換算其細胞數，不會因細胞大小不同導致蛋白質含量無法代表細菌生長情形。

## (三)建立蛋白質標準曲線

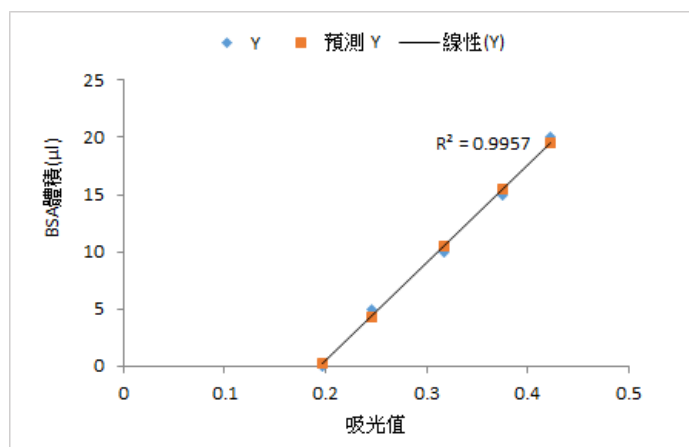


圖 38 蛋白質標準曲線

在圖 38 中可以看到 BSA 與蛋白質染劑的迴歸直線其  $R^2$  值達 0.99 以上，顯示此標準曲線有較高的準確度，後續實驗便利用此標準曲線來換算樣品的蛋白質濃度。



#### (四)比較不同溫度培養的 *Pantoea* sp.細胞內所含亞硝酸濃度差異

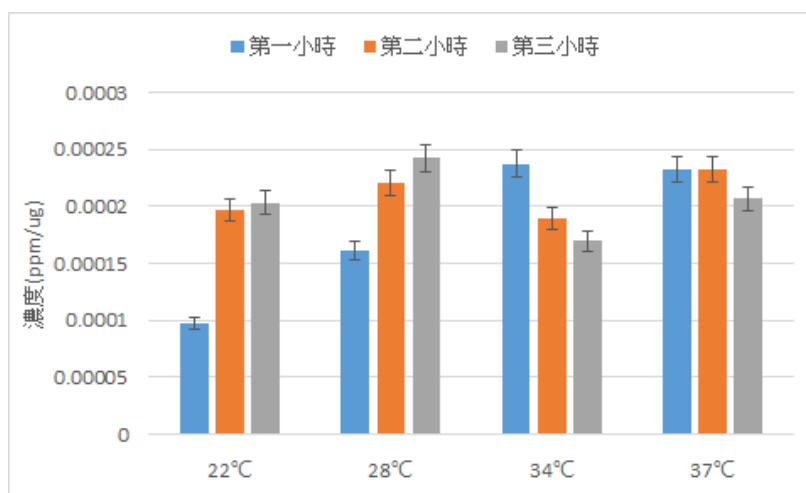


圖 39 不同溫度細胞內所含亞硝酸濃度差異

從圖 39 中則可看到較低溫(22、28°C)時第一到第三小時亞硝酸濃度有上升趨勢，高溫組別(34、37°C)則是下降，可知溫度確實影響其細胞內代謝情形。圖 39 可以發現第一小時的 22°C 濃度最低，而 28°C 為次低，第二三小時各溫度組別並無顯著差異，顯示溫度可能影響亞硝酸起始的運送速率。

#### (五)比較不同溫度培養的 *Pantoea* sp.可降解亞硝酸濃度差異

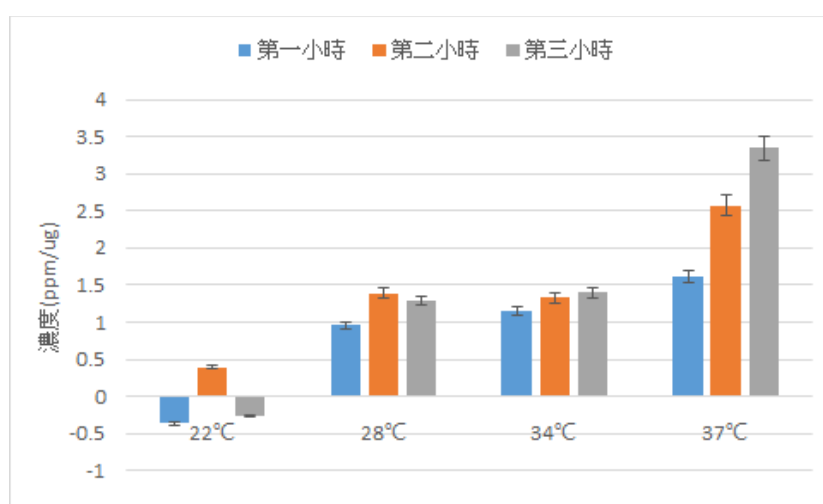


圖 40 單位質量下於不同溫度培養可降解亞硝酸濃度差異

根據圖 40 可知低溫(22°C)時，水體中的亞硝酸不被降解，甚至換算後出現負值，而 28°C 以上的 *Pantoea* sp.可降解亞硝酸，在圖中也發現 37°C 的第二、三小時數值明顯較其他組別高，顯示 *Pantoea* sp.可能要在一定溫度以上培養才具有良好降解能力。

## (六)建立氨氮標準曲線

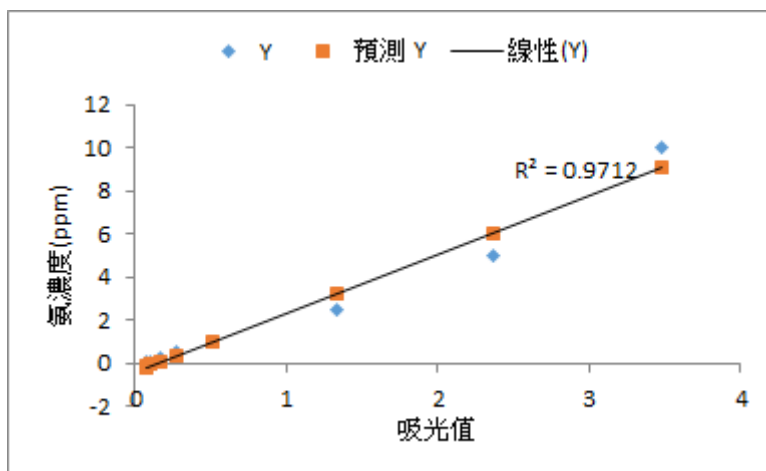


圖 41 氨氮標準曲線

根據圖 41 得知已知濃度的氨與氨呈色劑回歸直線的其  $R^2$  值達 0.95 以上，顯示此標準曲線有較高的準確度，後續實驗便利用此標準曲線來換算氨濃度。

## (七)測定使用吸氨沸石後氨氮吸附率

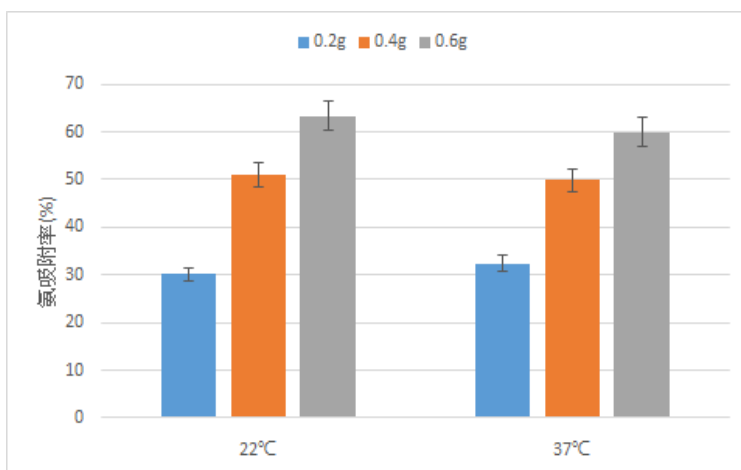


圖 42 不同重量的沸石培養後氨氮吸附率

從圖 42 發現不論在 22°C 或 37°C 時，隨著添加的沸石重量增加，氨的吸附率也越高，添加 0.2 克時吸附率約為 30%，當沸石重量提升至 0.6 克時則有約 60% 的吸附率，顯示沸石確實可吸附氨，後續實驗便利用沸石探討氨與 *Pantoea* sp. 降解亞硝酸相關機制。

### (八)探討使用吸氨沸石後亞硝酸降解率

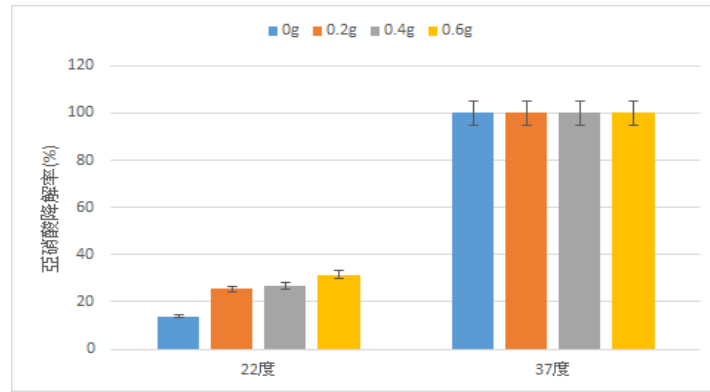


圖 43 不同重量的沸石培養後亞硝酸降解率

在圖 43 中得知在 22°C 添加沸石後，隨著沸石重量上升，亞硝酸降解能力也隨之上升。未添加沸石的降解率為 13%，而添加 0.6 克沸石組別則為 31%，提升約 138%。

### 三、探討 *Pantoea* sp. 不同溫度降解能力與蘋果酸脫氫酶 MDH 關聯

(一)以西方墨點法探討不同溫度下蘋果酸脫氫酶蛋白質表現量

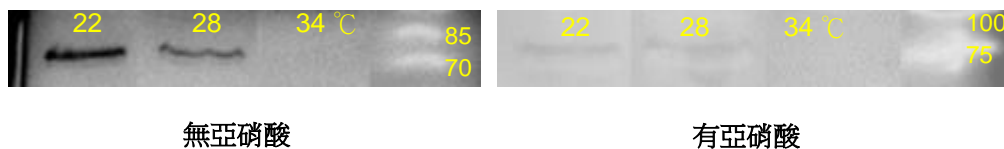


圖 44 以西方墨點法比較不同溫度及有無添加亞硝酸的 MDH 表現量

從結果的 band 可以發現，不論亞硝酸添加與否，在低溫時 band 顏色皆較深，代表低溫時 MDH 蛋白質表現量較高；高溫時 band 非常淡，幾乎無法辨識，表現量低。比較有沒有添加亞硝酸則能發現沒有加亞硝酸比有加亞硝酸的表現量高。

(二)比較不同溫度下蘋果酸脫氫酶酵素活性

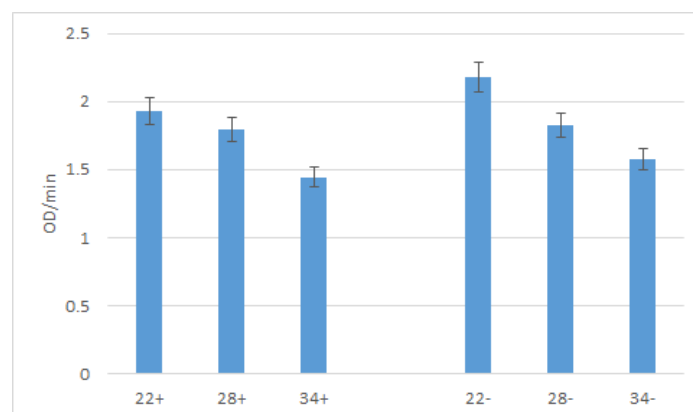


圖 45 利用酵素活性分析比較不同溫度及有無添加亞硝酸的 MDH 活性

從實驗結果可知溫度越高 MDH 活性越低，而有添加亞硝酸組別的活性較無添加組別低，顯示不同溫度及有無添加亞硝酸皆會對 *Pantoea* sp. 的 MDH 活性產生影響，其中 22+ 與 34+ 組別 p 值 < 0.05，達顯著差異。

#### 四、探討碳源提升 *Pantoea* sp.在低溫降解能力的可行性

(一)測量 *Pantoea* sp.在不同葡萄糖濃度培養後的生長情形

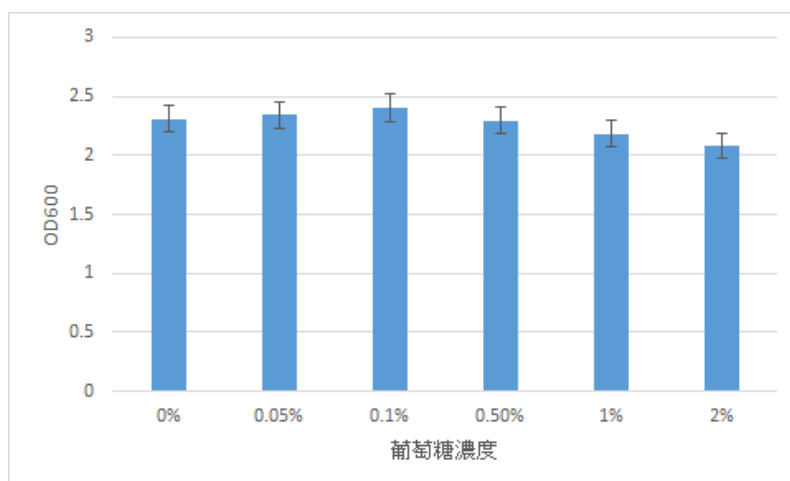


圖 46 不同葡萄糖濃度培養後的生長情形

在圖 46 中，我們可以得知 *Pantoea* sp.在添加 0.05、0.1、0.5、1、2%葡萄糖的環境中皆有良好的生長情形，且在這五種濃度下的生長情形並沒有顯著差異，從此實驗也證實若於實際養殖環境添加葡萄糖於水體，並不會影響 *Pantoea* sp.的生長情形，其中各組間 p 值 > 0.05，無顯著差異。

(二)比較不同葡萄糖濃度培養 16 小時以上 *Pantoea* sp.降解亞硝酸情形

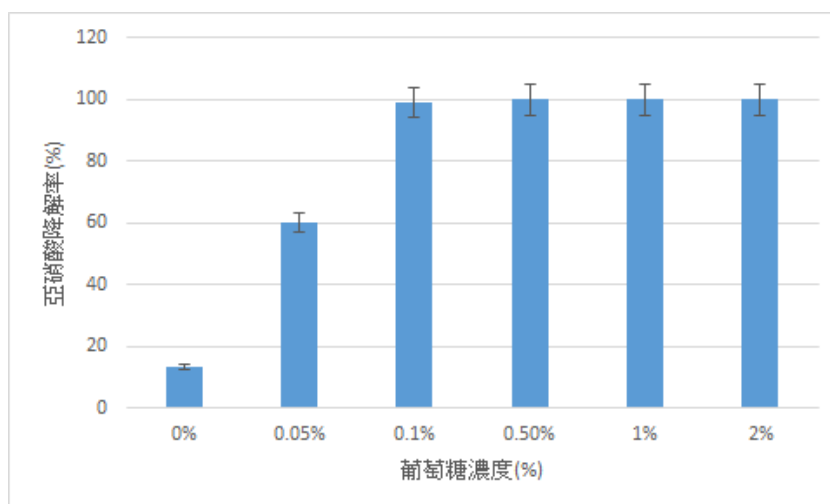


圖 47 不同葡萄糖濃度培養後降解亞硝酸情形

從圖 47 中得知添加葡萄糖可顯著提升 *Pantoea* sp.低溫的降解能力，而 0.05%組別降解率可提升至約 60%(較無添加高約 3 倍)，1、2%則可提升至 100%(較無添加高約 5 倍)，為五種濃度中對 *Pantoea* sp.最有幫助的，未來實際應用上添加 1 或 2%葡萄糖能發揮較大效益。

### (三)比較不同葡萄糖濃度培養 *Pantoea* sp.細胞內所含亞硝酸濃度差異

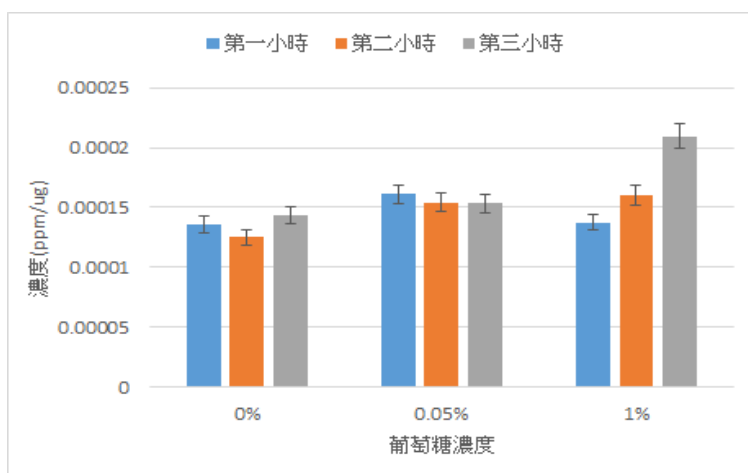


圖 48 單位質量下於不同葡萄糖濃度細胞內所含亞硝酸濃度差異

根據圖 48 的結果我們可以發現添加 1%葡萄糖的第三小時數值明顯較其他組別高，顯示添加一定濃度以上的葡萄糖可能會影響 *Pantoea* sp.細胞內代謝情形，進而使得細胞內亞硝酸濃度有所差異。

### (四)比較不同葡萄糖濃度培養 *Pantoea* sp.可降解亞硝酸濃度差異

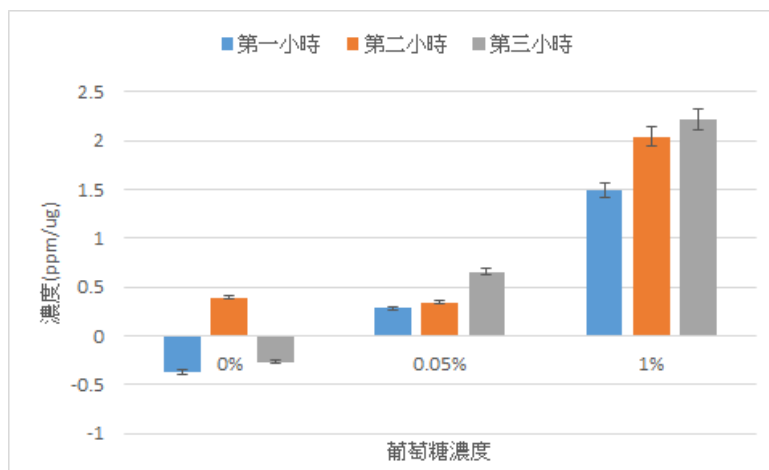


圖 49 單位質量不同葡萄糖濃度可降解亞硝酸濃度差異

從圖 49 發現在無添加葡萄糖時水體幾乎無法降解亞硝酸，一、三小時的可降解亞硝酸換算完甚至為負值，而添加 0.05%和 1%組別的濃度則顯著上升，顯示添加葡萄糖會提升 *Pantoea* sp.在低溫降解亞硝酸濃度的情形。

(五)測量 *Pantoea* sp.在不同糖種類培養後生長情形

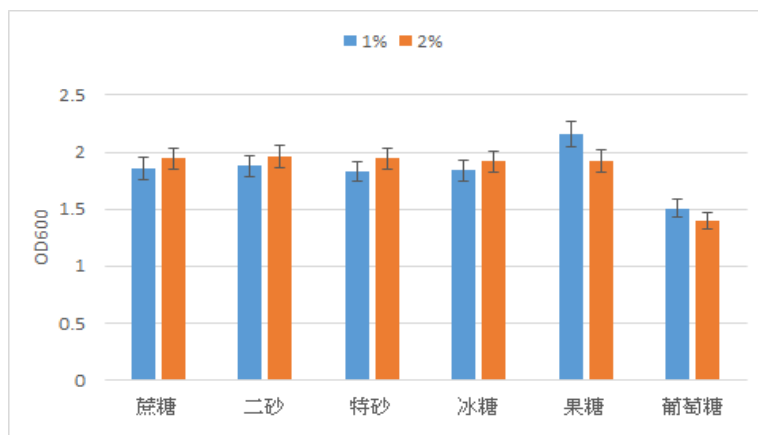


圖 50 不同糖種類培養後的生長情形

從圖 50 中可知濃度 1%時，以果糖生長情形最佳，除葡萄糖外其餘種類皆無明顯差異，而葡萄糖生長情形不論在 1%或 2%皆較其他組差。從整體來看，單醣(果糖及葡萄糖)在 1%濃度下較 2%數值更高，可知 1%較適合生長，而雙醣(蔗糖、二砂、特砂及冰糖)則相反。

(六)比較不同糖種類培養後 *Pantoea* sp.降解亞硝酸情形

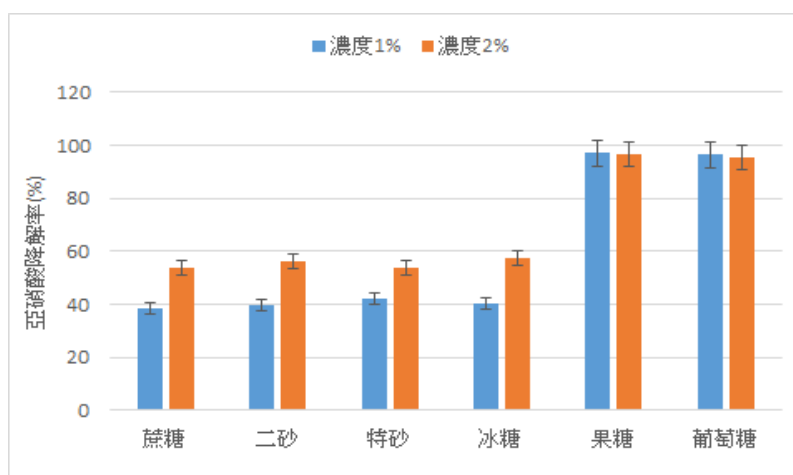


圖 51 不同糖種類培養後降解亞硝酸情形

從圖 51 中可發現單醣(果糖和葡萄糖)降解能力在 1%濃度下達到 97%和 96%、2%濃度下達到 96%和 95%，皆較無添加糖增加約 6 倍，降解能力較其餘雙醣更佳。而雙醣中，降解率又以 2%比 1%高約 10-20%，可知未來實際應用上使用濃度 2%的雙醣降解效果較 1%好。

(七)測量 *Pantoea* sp.加入碳源後在不同鹽度下生長情形

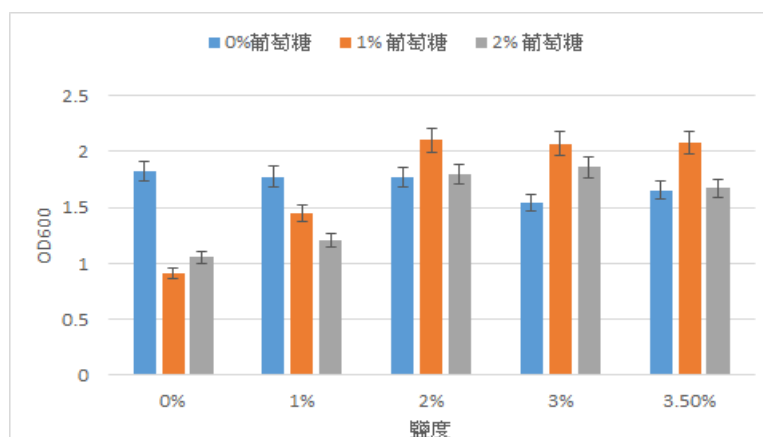


圖 52 不同鹽度培養後的生長情形

根據圖 52 可以發現，無加葡萄糖時於不同鹽度的生長情形無明顯變化，但添加葡萄糖後在較高鹽度 2、3、3.5%培養有較好生長情形，而在較低鹽度時生長情形較差，同時也發現除鹽度 0%時，為添加 2%葡萄糖組別有較佳的生長情形，在鹽度 1、2、3、3.5%培養下皆為 1%葡萄糖對 *Pantoea* sp.的生長有較大的幫助。

(八)探討 *Pantoea* sp.加入碳源後在不同鹽度下降解亞硝酸情形

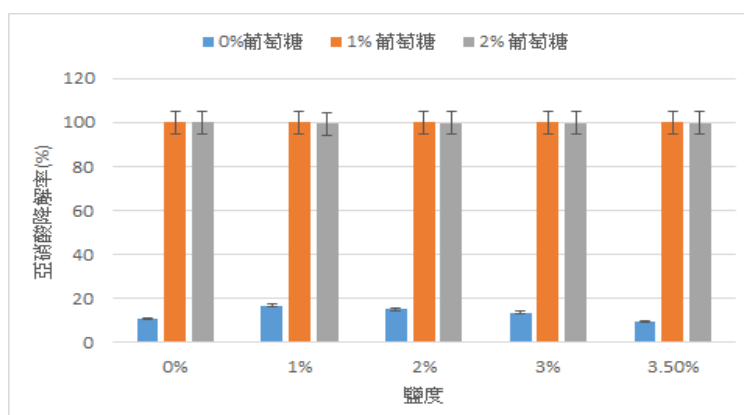

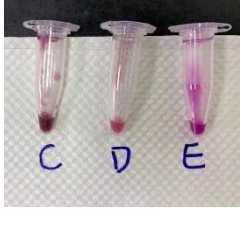


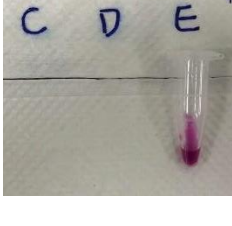


圖 53 不同鹽度培養後降解亞硝酸情形

從研究結果中可以發現於 22°C 的不同鹽濃度添加不論 1% 或 2% 葡萄糖皆能有效提升 *Pantoea* sp.的降解能力到約 100%，顯示從淡水到相當於海水的 3.5%環境下 *Pantoea* sp.都可有效降解亞硝酸，能夠實際應用於不同的養殖環境。

## 五、提升低溫降解能力方法的實際應用

### (一)探討 *Pantoea* sp.擴大培養方法

空白	第一天	第二天	第三天	第四天
				
圖 54	圖 55	圖 56	圖 57	圖 58

空白組為僅添加亞硝酸儲備液後空白培養液和亞硝酸呈色劑反應而得的顏色，表格內則為四天擴大培養加入亞硝酸呈色劑後的顏色變化。其中，C 為糖蜜 2.5%、D 為葡萄糖 1%、E 為葡萄糖 0.05%，由圖可得知 C、D、E 顏色漸漸變淡，代表其試管中 *Pantoea* sp.的亞硝酸降解系統已被開啟，具亞硝酸降解能力。而葡萄糖 1%又較 0.05% 開始降解的時間快。

### (二)探討 *Pantoea* sp.對於養殖池水降解能力之應用

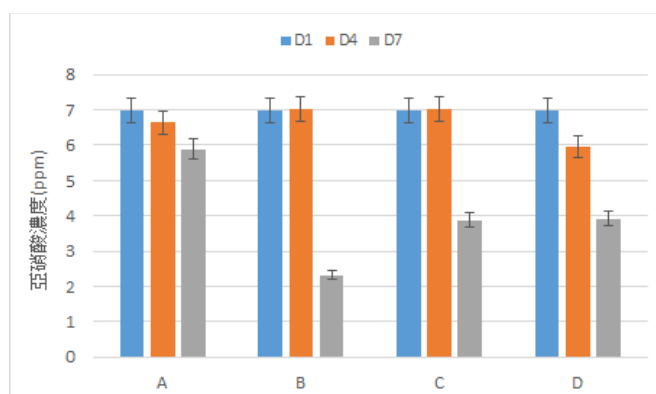


圖 59 不同擴培液對養殖池水亞硝酸濃度的影響

圖 59 中組別分別為 A 空白、B 糖蜜 2.5%、C 葡萄糖 1%、D 葡萄糖 0.05%。D1 為最初將池水從養殖池取回之測得亞硝酸濃度，將其作為對照以比較加入各碳源後的擴培成果。在圖 59 中可知各組別亞硝酸濃度皆隨時間延長而減少，代表水體之亞硝酸被 *Pantoea* sp.降解。在第 7 天時，B 組測出的亞硝酸殘留量最少，效果最好，其次為葡萄糖 1%、葡萄糖 0.05%；空白組雖亦有下降，亞硝酸濃度仍較其他組高出許多。



## 陸、討論

台灣有著高密度養殖的特色，但在養殖過程中產生的養殖廢水為漁民不可避免且十分棘手之問題，水體可能因池塘殘餌、排泄物、屍體腐敗等因素導致水體含氮廢物濃度過高，除了對環境造成危害外，也會造成養殖業的經濟損失，於是我們便想找出一種可有效改善水質且不對環境產生負面影響的解決方式。同時，台灣常有過冬養殖的情形，但在行政院農業委員會資料中提及硝化菌在冬季活性較差，導致冬季含氮廢物濃度比其他季節高，因此，我們便想找出一種在冬季既生長好、降解能力也好的菌來改善冬季養殖廢水處理困難的問題。養殖水體中的含氮廢物類型主要有氨、亞硝酸鹽和硝酸鹽；其中，過多亞硝酸鹽會使血液中運輸氧的能力降低，導致魚蝦類出現棕血症，甚至使魚蝦類窒息死亡。

在林尚儒(2014)提及台灣漁民常用降解亞硝酸鹽方法主要有換水、化學藥物處理、吸附、增氧和微生物製劑等方法，微生物製劑雖價格較其餘方式高，但考量功效後仍為近年較常被使用的方法之一。台灣目前用於改善水體水質的養殖益生菌常見種類有光合細菌、硝化細菌等，柯清水(2010)提及因硝化細菌為自營性細菌，會自行製造有機物以利生長、繁殖，但自行製造有機物需花費較多時間，導致其繁殖速度較慢；自營性細菌同時有會被環境中過多有機物抑制生長的特點，也限制硝化細菌可生存的環境。本研究使用的潘朵拉菌 *Pantoea* sp. 屬於硝酸/亞硝酸同化細菌，為異營性細菌無自營性細菌的缺點外，行政院農業委員會水產試驗所資料中也提及 *Pantoea* sp. 和硝化細菌進行硝化作用來降解亞硝酸的方式不同，*Pantoea* sp. 進行硝酸/亞硝酸同化作用，無硝化細菌有硝酸根累積在水體的問題，不會對養殖水體有直接負面影響，故適當添加 *Pantoea* sp. 可有效幫助水質控制且無明顯缺點。

本研究 *Pantoea* sp. 為未定種，查閱文獻後得知已建種的同屬菌種多與植株病害和人體疾病有關，如 Carrie L Brady(2011)提及 *Pantoea allii* 會造成葉枯萎和鱗莖腐爛，Jacek Dutkiewicz(2016)提及 *Pantoea agglomerans* 可與水稻共生，促進水稻生長，但會感染人類和脊椎動物骨骼、關節，引起滑膜的敗血性關節炎等疾病，Michael Jeger(2018)也提及 *Pantoea stewartii* 會造成疾病 "Stewart's wilt"，使玉米枯萎，鮮少提到養殖漁業的水體亞硝酸降解，而查閱文獻後，我們也利用以下表格呈現本研究與先前研究異同：

		本研究	文獻( <i>Pantoea</i> sp.)
溫度	生長情形	低溫(22-28°C)生長狀況佳	測量 37°C 生長速率
	降解情形	22、25、28、31、34、37°C 25°C 以下較差	22、37°C 22°C 較差
	MDH 調節	西方墨點法及酵素活性分析發現低溫 表現及活性較高	無
	氨氮	加入沸石吸附後比較氨氮濃度和亞硝 酸濃度之差異	測樣品氨氮濃度
葡萄 糖	生長情形	不影響生長	無
	降解情形	有加葡萄糖較好 1%、2%效果最佳	0.1%、1%、2% 16 小時後可達 100%降解率
	MDH 調節	嘗試西方墨點法	利用 RT-PCR
	氨氮	嘗試比較同時添加葡萄糖和沸石結果	測樣品氨氮濃度
碳 源	生長情形	比較不同糖類，其中葡萄糖最差	無
	降解情形	比較不同糖類，其中單糖較雙糖佳	添加葡萄糖

本研究從日常最容易遇到的溫度問題著手進行探討，初步發現低溫生長情形較好但降解能力差，進一步探討溫度影響的可能原因，同時聽說坊間流傳添加糖蜜可提升降解能力，我們便以葡萄糖及其他糖類模擬，最後為了進一步確認其應用性，我們也探討 *Pantoea* sp. 實際使用的方法和效果，期待一系列研究可以對 *Pantoea* sp. 性質、機制有更多了解，未來也能應用在實際環境中。以下是關於實驗的討論：

## 一、探討 *Pantoea* sp. 在不同溫度下降解養殖廢水情形

圖 60 得知 *Pantoea* sp. 在 31、34、37°C 生長情形較差，22、25、28°C 生長情形較好，可圖 60 結果發現 *Pantoea* sp. 在高溫(28、31、34、37°C)時有近 100% 降解率，反之 22、25°C 降解能力顯著下降，25°C 時降解率為 56%，22°C 僅剩 13%，顯示台灣冬季時 *Pantoea* sp. 較無法降解養殖廢水中的亞硝酸，有應用的困難，同時發現生長情形與降解能力非呈現正相關，高溫時生長情形較差，卻有較好降解能力，推測可能因冬季時 *Pantoea* sp. 有較大的生存壓力使得此時細菌將較多能量用於生長，而對其生長較無影響的亞硝酸傾向先不降解，而此結果也顯示 *Pantoea* sp. 生長情形和降解能力可分開討論。

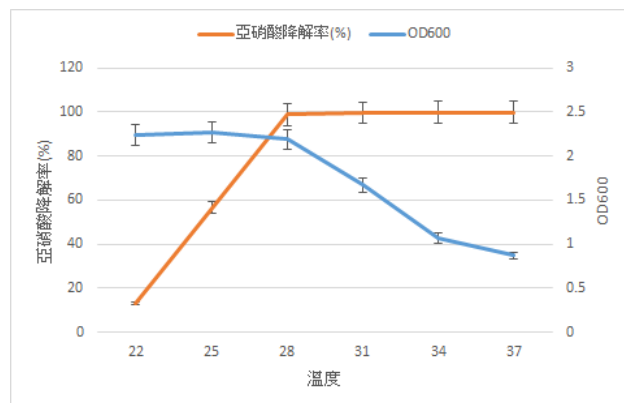


圖 60 不同溫度生長情形及亞硝酸降解率

行政院農業委員會資料提及硝化菌冬季活性較差，降解能力下降，蔡維如(2015)寫到可降解亞硝酸的希瓦氏菌可生長溫度為 28°C~37°C，較 *Pantoea* sp. 最適合生長溫度 22~28°C 高，顯示 *Pantoea* sp. 較其他可降解亞硝酸菌種更能適應台灣冬季環境，具有高應用性。

## 二、探討 *Pantoea* sp. 細胞代謝情形對不同溫度降解能力之影響

本研究初步針對 *Pantoea* sp. 在不同溫度降解能力不同進行原因探討，首先我們懷疑與其細胞內代謝情形，便比較圖 61 單位質量可降解的亞硝酸和圖 62 單位質量細胞內所含亞硝酸，發現 22°C 時細胞內含量有上升的趨勢，但細胞卻幾乎無法降解亞硝酸，推測低溫時亞硝酸雖可進入細胞內，可無法將其降解會累積在細胞內，故能在細胞內測得較高濃度的亞硝酸，反之，在高溫時細胞內亞硝酸趨勢微下降，但其仍有一定的亞硝酸降解能力，可能是亞硝酸進入細胞後可較快速的將其降解，導致在細胞內測得的亞硝酸含量下降。

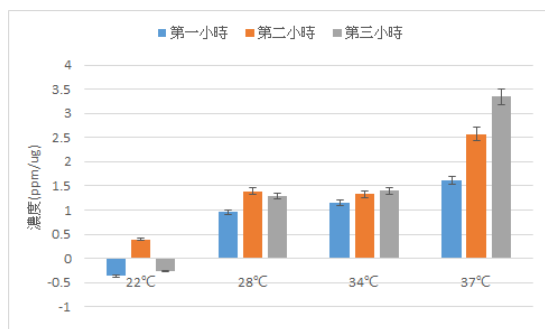


圖 61 不同溫度單位質量可降解亞硝酸

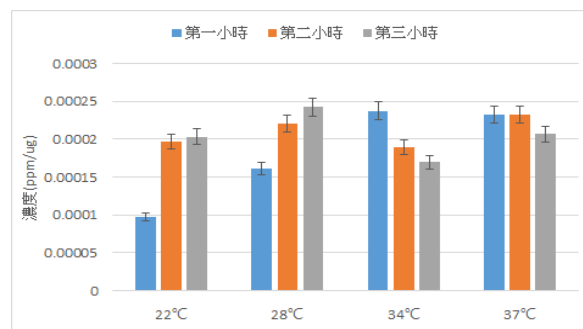


圖 62 不同溫度單位質量細胞內亞硝酸含量

由於文獻提及氨與亞硝酸之間的關聯，便令我們思考溫度與 *Pantoea* sp. 降解能力的關聯是否也與氨有關，於是我們利用沸石吸附氨，在圖 63 中對照氨氮和亞硝酸的數據，發現氨吸附率越高時，亞硝酸降解率也越高，推測在氨被吸附後，反應物亞硝酸會行還原作用而變成氨以補足被吸附的量，故測得亞硝酸含量降低，降解率高，故氨吸附率越高，亞硝酸降解率隨之提升。當沸石無法再吸附更多氨時， $\text{NH}_4^+$  就會行回饋作用使亞硝酸暫停轉變成氨氮，以免產生過多氨而對生物產生負面影響。

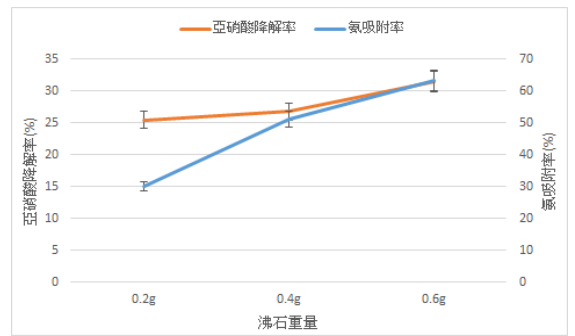


圖 63 沸石亞硝酸降解率及氨吸附率

### 三、探討 *Pantoea* sp. 不同溫度降解能力與蘋果酸脫氫酶 MDH 關聯

在西方墨點法實驗中我們得知 MDH 在低溫時表現量較高溫多，有添加亞硝酸的組別也較無添加的多，在 MDH 酵素活性分析實驗中結果同樣為低溫活性較高溫高，有添加亞硝酸較無添加高，兩者結果互相呼應，顯示 MDH 在影響 *Pantoea* sp. 降解能力扮演一定角色。

在本研究中得知高溫時 MDH 表現量較少、活性較低，Shaojuan Liu(2018)也提及酮戊二酸、麩胺酸、麩醯胺酸之間關聯，根據文獻及我們初步實驗結果，我們繪製 *Pantoea* sp. 代謝亞硝酸可能機制的示意圖：

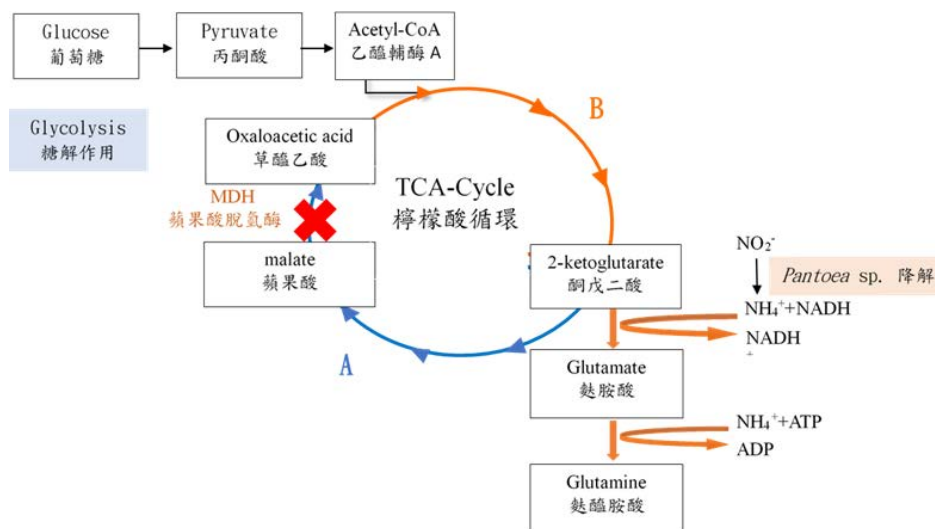


圖 64 *Pantoea* sp. 代謝亞硝酸可能機制示意圖

高溫時 MDH 活性較低，導致圖 64 中路徑 A(TCA cycle) 較無法進行，此時細胞則可能進行路徑 B，將酮戊二酸和亞硝酸經 *Pantoea* sp. 降解產物銨根離子反應得到麩胺酸和麩醯胺酸，我們推測 *Pantoea* sp. 溫度與降解能力關聯便是藉此機制完成，但其中過程仍有待更進一步實驗證實，如測量草醯乙酸、麩胺酸和麩醯胺酸。

#### 四、探討碳源提升 *Pantoea* sp.在低溫降解能力的可行性

根據 Mia Kim(2008)可知添加葡萄糖可使同樣與亞硝酸降解有關的菌種生長較為良好，若生長較為良好則可合理推斷其降解亞硝酸能力會上升，但根據圖 65 卻發現添加葡萄糖對 *Pantoea* sp.的生長情形並沒有顯著的影響，和文獻提及的不同，而添加葡萄糖卻提升 *Pantoea* sp.降解能力。我們便懷疑碳源可能啟動 *Pantoea* sp.降解亞硝酸的相關機制，於是我們嘗試打破細胞，並比較其細胞內亞硝酸含量的差異，而從圖 66 中得知添加葡萄糖確實改變其細胞內亞硝酸含量，顯示葡萄糖可能影響細胞內代謝情形，使得其此時的降解能力較未添加碳源好。

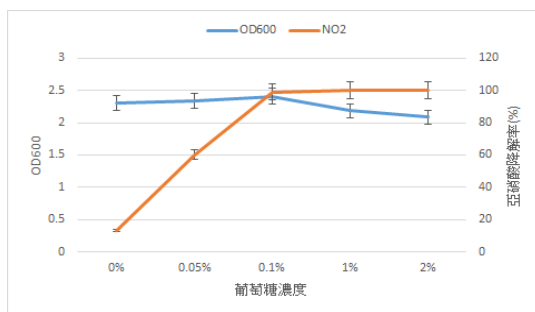


圖 65 葡萄糖生長情形和亞硝酸降解率

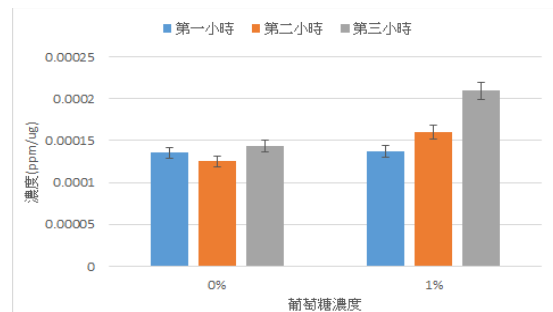


圖 66 添加葡萄糖細胞內亞硝酸含量

坊間流傳添加糖蜜可改善冬季養殖益生菌降解能力較差的問題，但由於糖蜜成分較複雜，一開始我們便先利用較簡單、實驗室好取得的葡萄糖進行實驗，可為更進一步確認不同醣類與亞硝酸降解的關聯，我們也嘗試添加實驗室蔗糖和市面上販售的二號砂糖、精緻特砂、冰糖、果糖，除了探討糖對 *Pantoea* sp.的影響外，也期待能降低成本，提高實際應用的可行性，根據圖 67 發現添加單醣(果糖及葡萄糖)的組別降解能力較雙醣(蔗糖、二砂、特砂及冰糖)組別高約 2 倍，顯示單醣對 *Pantoea* sp.降解較有幫助，推測和 *Pantoea* sp.原生存環境多在生物腸道內，吸收單醣機率較高而演化出此機制，而圖中葡萄糖的生長情形較差卻有較好降解能力，再次顯示 *Pantoea* sp.的生長情形與降解能力可分開討論。改善 *Pantoea* sp.降解能力最重要的目的便是希望可實際應用，而使用的成本多寡在一定程度上會影響漁民的使用，於是我們查詢資料後整理以下表格呈現不同糖的生長情形、降解能力及成本。

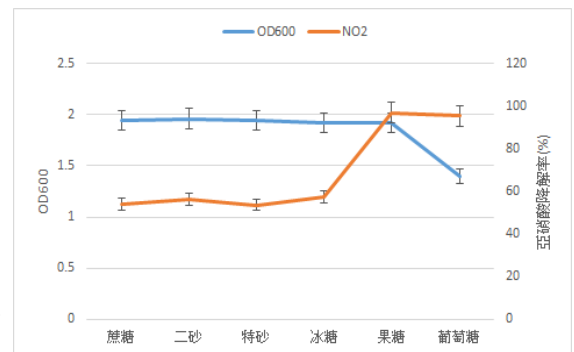


圖 67 不同糖類生長情形和降解率

糖種類	雙醣				單醣	
	蔗糖	二號砂糖	特級砂糖	冰糖	果糖	葡萄糖
成分	葡萄糖	蔗糖 (三者製作方式不同)			果糖	葡萄糖
生長情形	2%較佳	2%較佳	2%較佳	2%較佳	1%較佳	6種中最差
亞硝酸降解能力	2%較佳(增加3倍)	2%較佳(增加3倍)	2%較佳(增加3倍)	2%較佳(增加3倍)	較雙醣佳(增加6倍)	較雙醣佳(增加6倍)
價格(元/公斤)	63.5	23	23	66	114	34

根據表格可知單醣有較好的降解率，其中葡萄糖的成本在可接受範圍，若漁民有一定的資金，則建議選擇添加葡萄糖來改善冬季亞硝酸濃度過高的問題，而查閱文獻後得知坊間常用的糖蜜成本較上述任一糖類低，而其成分中含量最多的為蔗糖，雖蔗糖降解能力較葡萄糖低，但若考量成本，選擇添加糖蜜也不失為一個可行的方法。

此外，為了確保添加碳源做法可運用於不同鹽度養殖池，我們也比較 *Pantoea* sp. 在不同鹽度降解亞硝酸情形，結果顯示不論淡水、半淡鹹水、鹹水環境添加葡萄糖明顯較無添加組別降解能力好，而從蔡維如(2015)得知，同為可降解亞硝酸的養殖益生菌希瓦氏菌在 1-8% 的鹽度內皆可有效的降解亞硝酸，此實驗中所進行的濃度僅到相當於海水濃度的 3.5%，於是我們也好奇更高鹽度下 *Pantoea* sp. 是否仍有降解能力，*Pantoea* sp. 可否應用在更多不同條件的環境中，以上疑問都需更進一步的實驗證實。

## 五、提升低溫降解能力方法的實際應用

在一分地、水量需約 1000 公噸的養殖池內加入大量碳源會造成成本過高、應用困難。實驗中我們將水和虱目魚飼料放入試管中，再將菌株挑入放在 22°C 下模擬放置在室溫之狀況待其生長。後續養殖水實驗亦證明此擴培方法有效。實際擴培應用方法即可使用塑膠桶，倒入自來水及虱目魚飼料，後倒入液體菌液放在室溫下靜待擴培完成即可使用。成本方面，現今應用上漁民加擴培液入池水中，使其達 100ppm，經計算後一分地所需擴培液成本僅 2.5-3 塊，顯示確實可以此成本低的方法使菌液充分使用，改善養殖廢水水質。

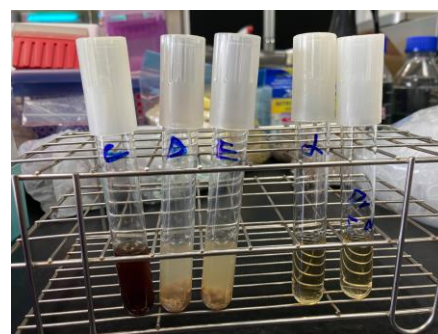


圖 68 擴大培養

根據圖 69 可以發現糖蜜(B組)的效果最好，推測是因糖蜜多樣的成分，除了一定比例(約 30%)的葡萄糖，更有單醣缺少、幫助生長的微量元素，如：鈉...，反之，葡萄糖為單醣，成分過於單一而缺乏生物生長所需營養源，故效果不如預期。在含氮廢物產出速度大於分解的狀況下，加入適量微生物製劑能有效延長換水時間、減少換水頻率，避免過多水資源浪費。我們的實驗也表示 *Pantoea* sp.具有一定降解能力，應用上農民亦能使用擴培之方法，是良好的選擇。

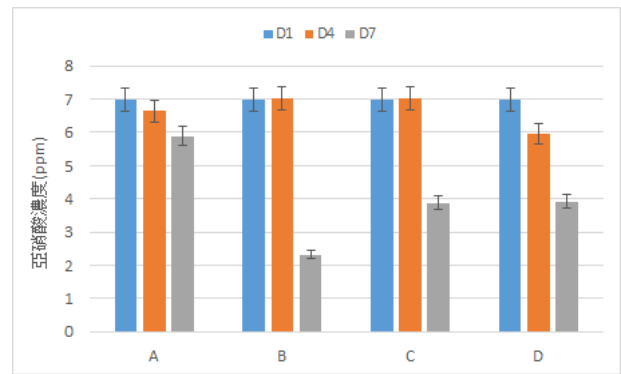


圖 69 不同擴培液對亞硝酸濃度影響

## 柒、結論

養殖過程中產生的廢水往往含有許多含氮廢物，對環境和漁民的利益都是一大威脅，查閱文獻後得知目前會使用微生物法來因應亞硝酸濃度過高的情形，故我們利用益生菌-潘朵拉菌 *Pantoea* sp.進行此項研究。嘗試分析及找尋 *Pantoea* sp.合適生長的溫度和其降解亞硝酸的能力，也探討影響降解能力的可能原因、提升其降解能力的方法並實際應用於養殖環境中。我們將實驗成果的結論整理如下：

1. 根據 OD<sub>600</sub> 數值可知 *Pantoea* sp.在台灣較常出現的氣溫下培養(22-37°C)都有不錯生長情形，同時發現高溫(31-37°C)生長情形較差，低溫(22-28°C)的生長情形較好。
2. *Pantoea* sp.降解亞硝酸能力會受溫度影響，發現高溫時(28、31、34、37°C)有不錯降解能力，反之 22、25°C時仍殘留較多亞硝酸，可見在溫度較低的環境降解亞硝酸能力較差，推測冬季低溫期間較不適合 *Pantoea* sp.的利用。
3. 從 *Pantoea* sp.在低溫時雖生長情況較佳，但其降解亞硝酸的能力較差，可知 *Pantoea* sp.的降解能力與生長情形並無直接的關聯。
4. 在 31、34°C時，培養 16 小時以上，測不到細胞內的亞硝酸濃度，推測可能是因為 16 小時的反應時間過長，進入細胞的亞硝酸已分解完。
5. 根據 1、2、3 小時單位質量細胞內亞硝酸含量結果得知溫度可能影響亞硝酸起始的運送速率，而其溫度的不同也顯示溫度確實影響細胞內代謝情形。
6. 吸氮沸石實驗中得知添加沸石可確實吸附氮，而在低溫環境下氮濃度降低時，其亞硝酸降解能力較好。
7. 從西方墨點法發現 MDH 在低溫及未添加亞硝酸時表現量較多，酵素活性分析實驗結果也發現酵素低溫及未添加亞硝酸時較有活性，兩者結果互相呼應。
8. *Pantoea* sp.在不同濃度(0.05、0.1、1、2%)的葡萄糖下培養環境皆有良好的生長情形，且其生長情形無顯著差異，和文獻提及的不同。
9. 低溫(22°C)時 *Pantoea* sp.在加入葡萄糖的環境可以恢復降解亞硝酸的能力，其中又以 1%及 2%濃度的葡萄糖效果最佳。但若以成本考量，0.1%的葡萄糖是可以被接受的。
10. 添加 1%葡萄糖的第三小時數值明顯較其他組別高，顯示葡萄糖可能會影響 *Pantoea* sp.細胞內代謝情形，進而使得細胞內亞硝酸濃度有所差異。
11. 選擇實驗室蔗糖、葡萄糖及市售二號砂糖、精緻特砂、冰糖和果糖進行生長情形和亞硝酸降解能力實驗，其中葡萄糖生長情形較其餘種類差，而降解能力則單糖效果較雙糖佳，且 1%和 2%皆能讓降解率接近 100%，應用上可考慮成本較低的低濃度單糖。



12. *Pantoea* sp.在加入 1%及 2%濃度的葡萄糖的各鹽度(1、2、3、3.5%)環境下都能穩定生長，且可降解亞硝酸。可知 *Pantoea* sp.具有廣鹽性，適合所有的養殖環境。
13. 根據擴大培養實驗結果得知在實驗室外可利用成本較低的虱目魚飼料及葡萄糖和糖蜜進行擴培，提升 *Pantoea* sp.在冬季時的降解能力。
14. 在實際取回養殖池的研究中發現經擴培後的菌液皆可確實改善養殖水體水質，其中糖蜜 2.5%組別的效果最好，未來實際於養殖池添加時可採用此作法。

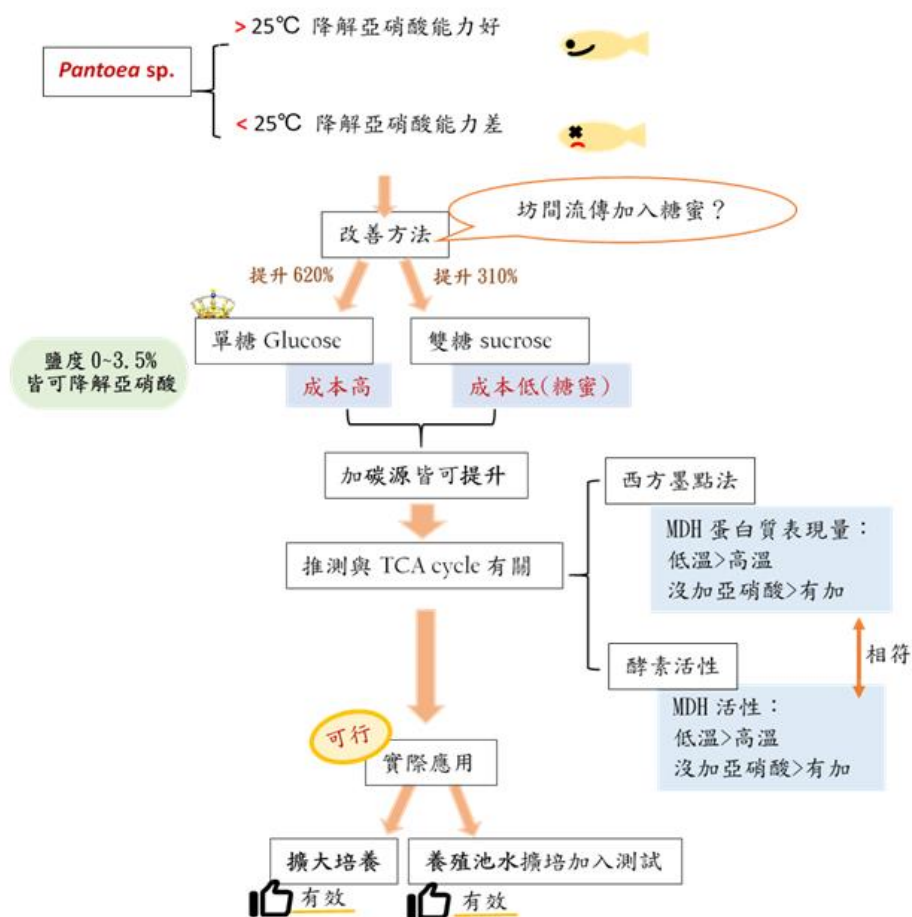




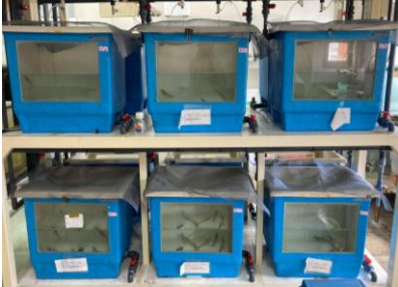



圖 70 *Pantoea* sp.在不同養殖環境下降解能力示意圖

根據以上一系列實驗，我們初步探討溫度和碳源對 *Pantoea* sp.處理養殖廢水之影響及應用，首先發現 25°C 以下雖有較好的生長情形，但其降解能力較差，原因可能與其細胞內代謝情形、氨濃度及 MDH 有關，查閱文獻後得知坊間有添加糖蜜或是碳源的做法，實驗過後得知添加單醣其降解能力可提升約 620%，而雙醣亦可提升 310%，雖單醣成本較高，應用時可依資金斟酌使用，可不論何種糖類，皆可確實增加 *Pantoea* sp.在冬季應用的可行性，且在不同鹽度下仍可降解，其背後機制我們則推測與 TCA cycle 有關，實際到戶外採集養殖池水研究中結果顯示成本低的擴培方式可有效降解亞硝酸，最後也期待後續實驗能對 *Pantoea* sp.機制、應用有更多了解。

## 捌、未來展望

整個研究過程中，我們測試 *Pantoea* sp. 在試管內的降解能力和加入碳源以幫助降解的可行性，再至實際測試應用方面上利用養殖池水進行的含氮廢物變化監測。我們也想了解使用 *Pantoea* sp. 應用於活體養殖的結果，故我們嘗試利用 50 公斤水箱養殖白蝦，並定期加入擴培後的碳源進行亞硝酸和氨氮的量測，希望藉此得知哪一種碳源才能最有效且便宜應用在現今的養殖漁業。但我們初步實驗並沒有獲得結果：我們將 10 隻白蝦養在水缸內，每日固定時間餵食飼料，但這些飼料和蝦子排放的含氮廢物過少導致我們亞硝酸和氨氮測量結果幾乎呈現接近 0 的數值，難以判斷各糖種擴培後的成效，且白蝦的養殖亦非易事，在實驗的第 10 天開始有零星白蝦死亡，時間至第 12 天已全數死亡，活體的不確定性造成亞硝酸和氨氮的測量誤差亦讓我們解釋實驗數據遇到困難。因此，我們希望可以改善我們目前實驗方法，更進一步確認 *Pantoea* sp. 改善養殖環境的應用性。以下為進行白蝦實驗的照片：

		
圖 71 欲加入之擴培液	圖 72 利用鹽度計測量水鹽度	圖 73 秤蝦之重量
		
圖 74 將蝦放入對應的水缸	圖 75 養殖模擬現場	圖 76 秤量所需飼料

## 玖、參考資料

1. 行政院農業委員會農業科技專案計畫服務網。
2. 林尚儒(2014)。 *Pantoea* sp.降解亞硝酸鹽和氨氮機轉之研究。國立高雄海洋科技大學海洋生物技術研究所碩士論文。
3. 柯清水(2010)。硝化細菌與水產養殖的關係如何？養魚世界九九年一期。
4. 蔡維如(2015)。希瓦氏菌降解亞硝酸機制之研究。國立高雄海洋科技大學海洋生物技術研究所碩士論文。
5. Ahmed Elshikh.(2012)。從市售降亞硝酸產品及草蝦腸道中分離及鑑定降亞硝酸之益生菌及其對白蝦生長之影響。國立高雄海洋科技大學海洋生物技術研究所碩士論文。
6. Carrie L Brady(2011). *Pantoea allii* sp. nov., isolated from onion plants and seed. Int J Syst Evol Microbiol. 2011 Apr;61(Pt 4).
7. Jacek Dutkiewicz(2016). *Pantoea* agglomerans: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. Ann Agric Environ Med. 2016 Jun 2;23(2).
8. Mia Kim(2008). Aerobic Denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at Different C/N Ratios. Journal of Bioscience and Bioengineering Volume 106, Issue 5, November 2008, Pages 498-502
9. Michael Jeger(2018). Pest categorisation of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. EFSA JOURNAL Volume16, Issue7 July 2018.
10. Shaojuan Liu(2018). The Antioxidative Function of Alpha-Ketoglutarate and Its Applications. Biomed Res Int. 2018 Mar 21.

## 【評語】 200010

本作品探討溫度與碳源對 *Pantoea* sp. 處理養殖池水中的亞硝酸鹽之影響，主題具應用性，研究架構完整，報告台風穩健有條理。期能進一步探討降解機制與主要降解酵素種類，使研究更有深度並探討未來商業應用之可能性。