

中華民國第 61 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組 農業與食品學科

佳作

052210

探討不同養殖環境對 *Pantoea* sp. 降解亞硝酸
鹽能力之影響

學校名稱：高雄市立高雄女子高級中學

作者： 高二 張伶禕 高二 鍾亦葳	指導老師： 王俊豪 陳佳琪
-------------------------	---------------------

關鍵詞：亞硝酸、*Pantoea* sp.

摘要

本研究探討如何提升養殖於冬季降解亞硝酸不良的問題。養殖益生菌中潘朵拉菌 *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，顯示兩者無直接關聯，進一步得知溫度會影響 *Pantoea* sp.細胞內代謝機制。水體中添加葡萄糖可使冬季亞硝酸降解能力多 7 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(單醣 50%、雙醣 95%)，而碳源可提升降解能力，推測因其影響細胞內 TCA cycle 運作。最後添加碳源做法適用各鹽度環境，具廣鹽性，對改善台灣冬季亞硝酸過高問題有高度應用價值。

壹、研究動機

養殖漁業為台灣漁業重要的一環，因台灣土地狹小，為求最高的經濟效益，故台灣養殖漁業漸趨從粗放轉變為集約養殖，但在利益背後卻產生許多問題，較高密度的養殖方式也代表較高的含氮廢物濃度，其中又以過冬養殖期間，因藻相及菌相差而導致冬季魚池內亞硝酸無法降解，含氮廢物濃度高，而過多的亞硝酸會造成魚蝦棕血症，進而使魚蝦死亡，故我們想要尋找生長狀況好，同時降解能力也好的方法。查詢資料後發現目前台灣養殖漁業流傳許多解決辦法，其中微生物法是近年來較常使用的方式。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，尋找能夠解決台灣冬季的養殖問題，並討論其在各個鹽度水域間的使用狀況。

貳、研究目的

- 一、探討 *Pantoea* sp.在不同溫度下降解亞硝酸情形
- 二、探討溫度影響 *Pantoea* sp.降解亞硝酸能力的原因
- 三、探討可提升 *Pantoea* sp.在低溫降解能力的方法
- 四、探討 *Pantoea* sp.在不同鹽度下降解亞硝酸情形

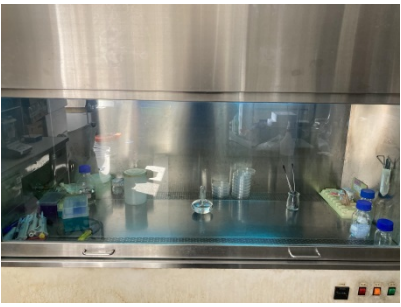



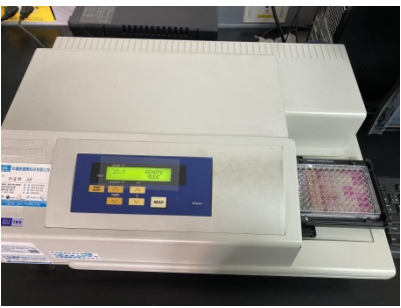
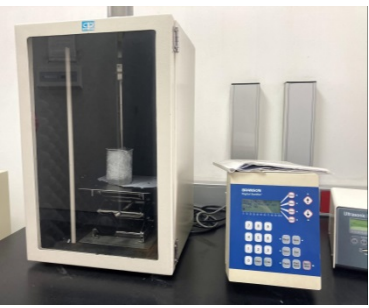


圖 1 *Pantoea* sp.

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、震盪器、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

		
圖 2 無菌操作台	圖 3 離心機	圖 4 低溫離心機
		
圖 5 分光光度計	圖 6 ELISA reader	圖 7 超音波細胞破碎機

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、ddH₂O、氯仿)、亞硝酸鹽呈色劑(85%磷酸、磺胺、ddH₂O、N-1-萘基乙烯二胺二鹽酸鹽)、磷酸緩衝溶液 PBS(K₂HPO₄、KH₂PO₄、ddH₂O)。

(四) 蛋白質相關：Bio-Rad Protein Assay dye Reagent Concentrate、牛血清白蛋白 BSA。

(五) 糖相關：C₆H₁₂O₆、C₁₂H₂₂O₁₁、二號砂糖、精緻特砂、冰糖、果糖。

(六) 鹽度相關：NaCl。

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- γ -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. 本研究測量 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。

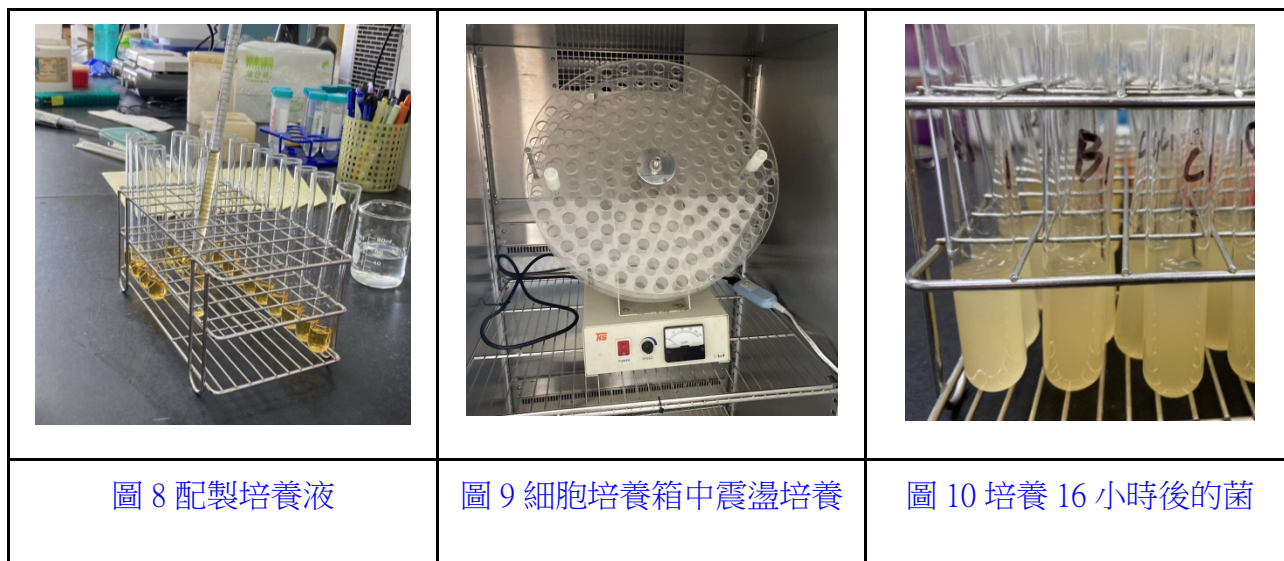
一、探討 *Pantoea* sp.在不同溫度下降解亞硝酸情形

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 μ 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 μ 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 OD₆₀₀ 吸光值。以上實驗 N=3，三重複取平均。



(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。

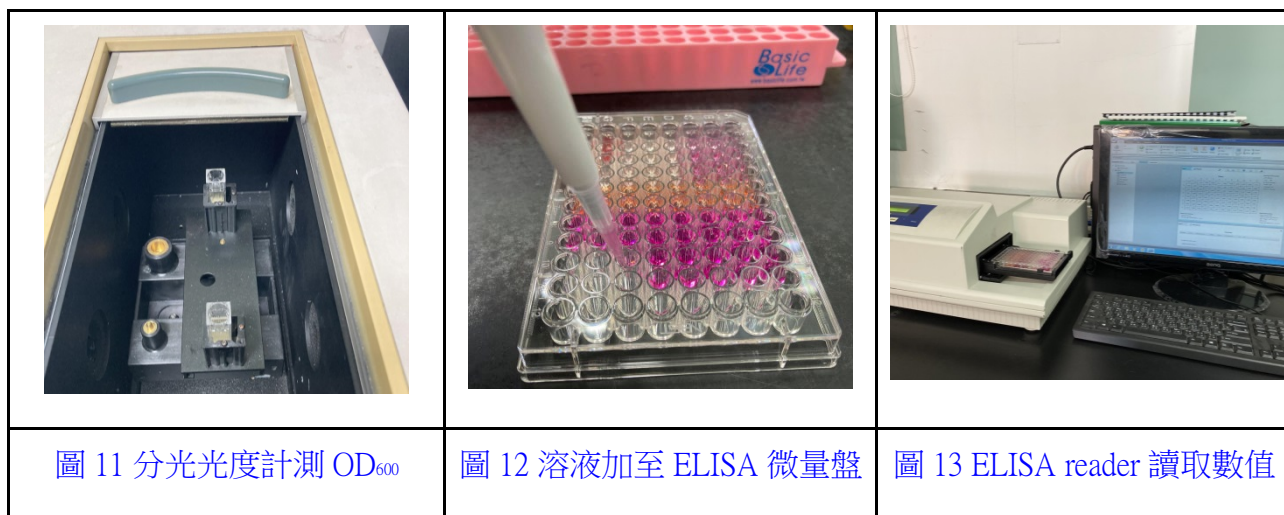
1. 以 0.4928g 的亞硝酸鈉溶於 ddH₂O 中，並加入 0.4mL 氯仿，配製成 100mL 的亞硝酸儲備液，且其濃度為 1000ppm。
2. 將 8mL 85%磷酸及 0.8g 磺胺溶於 40 mL ddH₂O，完全溶解後加入 0.08 g N-1-萘基乙烯二胺二鹽酸鹽，再以 ddH₂O 稀釋至 50 mL，以配製亞硝酸呈色劑，配製完成後儲存於深色瓶避免產生反應。
3. 在各離心管內加入 1000 μ l 的呈色劑，並分別加入 0.01、0.05、0.1、0.25、0.5、1、2.5、5 ppm 的亞硝酸儲備液。
4. 取出 100 μ l 的溶液加入 ELISA 微量盤，並以 ELISA 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.降解亞硝酸情形

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 μ 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 μ 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 μ l 的上清液並加入 20 μ l 的亞硝酸呈色劑放置 3 分鐘進行反應。
5. 取出 100 μ 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 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 μ l 的上清液並加入 20 μ 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、探討溫度影響 *Pantoea* sp.降解亞硝酸能力的原因

在研究目的一中我們初步發現到 *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.在亞硝酸添加後於不同溫度培養 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 μ l 亞硝酸儲備液，使其濃度為 20ppm，震盪培養於 25、28、31、34 $^{\circ}$ C 16 小時以上。
2. 取出 1500 μ 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 ddH₂O 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 μ l 潤洗 2 次以去除細胞外的其餘蛋白質。
5. 加入 550 μ 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 $^{\circ}$ C 下離心 10 分鐘。
7. 取出 500 μ l 上清液並加入亞硝酸呈色劑 20 μ l 靜置 3 分鐘以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
8. 取出 100 μ 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 $^{\circ}$ 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 μ 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。

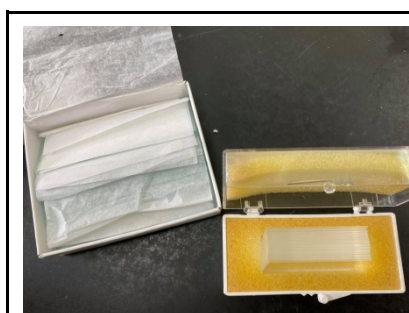


圖 14 製作玻片



圖 15 進行顯微攝影

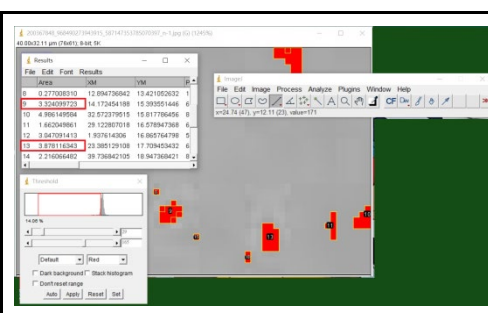


圖 16 使用 Imagej 測量細胞大小

(三)建立蛋白質標準曲線

由於接下來的實驗需要測量菌液的蛋白質濃度，查詢資料後得知可利用 Bio-Rad protein assay dye reagent 不同的呈色情形來換算，於是我們利用已知濃度的牛血清白蛋白 BSA 來建立標準曲線，以便後續實驗對照。

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 μ l 的混和溶液，並分別加入 0、5、10、15、20 μ l 的 BSA 均勻混合。
2. 取出 100 μ 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。

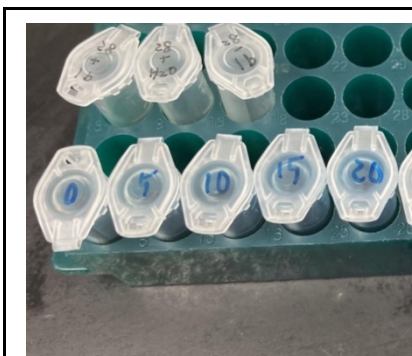


圖 17 建立蛋白質標準曲線

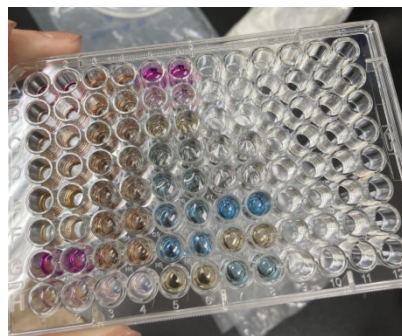


圖 18 ELISA 微量盤



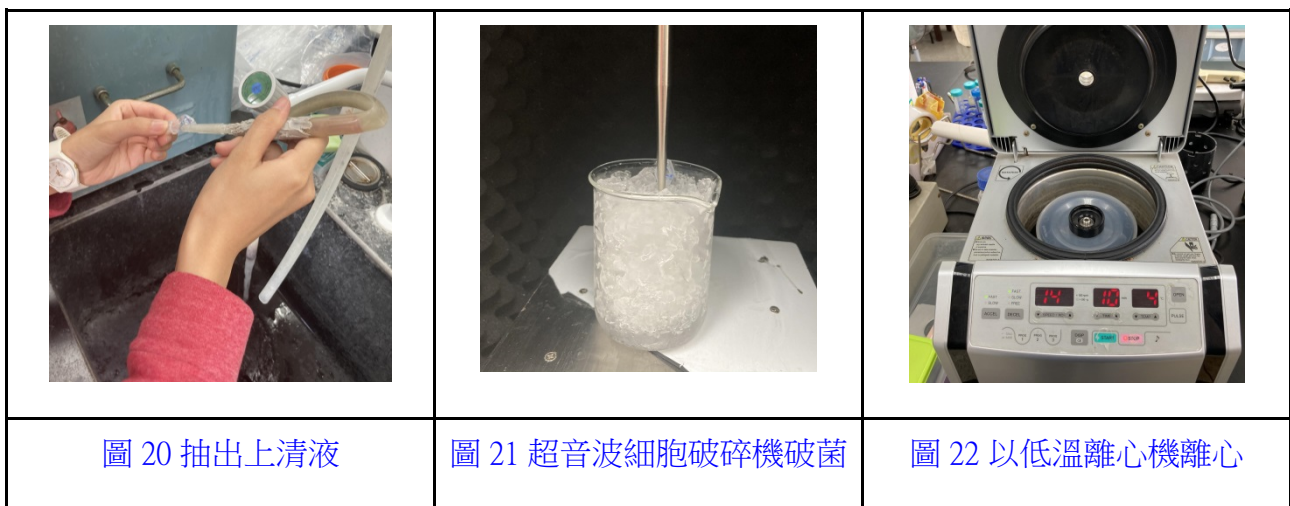
圖 19 excel 資料分析

(四)比較單位質量下於不同溫度培養的 *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 μ 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 μ 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 μ l 潤洗 3 次以去除細胞外的其餘蛋白質。
4. 加入 250 μ 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。

- 取出 200 μ l 的上清液後加入 50 μ l 一次水及 10 μ l 亞硝酸呈色劑，接著靜置 3 分鐘後以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
- 取出 100 μ l 上清液加入 ELISA 微量盤，並以 ELISA reader 以波長 543 nm 讀取數值。
- 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。
- 抽出步驟 5 的離心完的 2 μ 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 μ l 混和溶液。
- 取出 100 μ l 的溶液加入 ELISA 微量盤，並用 ELISA reader 以波長 595 nm 讀取數值。
- 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。
- 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 μ g 蛋白質所對應亞硝酸濃度，並比較 22、28、34、37°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。



(五)比較單位質量下於不同溫度培養的 *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？

- 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 μ l 的亞硝酸儲備液，使其濃度為 20ppm，震盪培養於 22、28、34、37°C，並分別於添加後 1、2、3 小時取出菌液進行實驗。
- 取出 1500 μ l 的菌液於離心管內，並放入離心機以 14800 rpm 離心 2 分鐘。
- 取出 500 μ l 的上清液並加入 20 μ l 的亞硝酸呈色劑放置 3 分鐘進行反應。
- 取出 100 μ l 的溶液加入 ELISA 微量盤，並用 ELISA reader 以波長 543 nm 讀取數值。
- 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。
- 利用前實驗所測蛋白質濃度數據，計算出每 1 μ g 蛋白質所對應的亞硝酸濃度。比較 22、28、34、37°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。

三、探討可提升 *Pantoea* sp.在低溫降解能力的方法

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、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 μ 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 μ 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的 *Pantoea* sp.加入 0.05、0.1、1、2% 的 5 ml 葡萄糖 LB 培養液，並加入 100 μ 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。
2. 將 1500 μ 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 μ l 的上清液並加入 20 μ l 的亞硝酸呈色劑放置 3 分鐘進行反應。
4. 取出 100 μ 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。

註：若 500 μ l 的上清液並加入 20 μ 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)比較單位質量下於不同葡萄糖濃度培養的 *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 μ 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 μ 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 μ l 潤洗 3 次以去除細胞外的其餘蛋白質。
4. 加入 250 μ 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 μ l 的上清液後加入 50 μ l 一次水及 10 μ 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 μ 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 μ 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 μ l 混和溶液。
10. 取出 100 μ 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 μ 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)比較單位質量下於不同葡萄糖濃度培養的 *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 μ 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 μ 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 μ l 的上清液並加入 20 μ l 的亞硝酸呈色劑放置 3 分鐘進行反應。
4. 取出 100 μ 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，計算每 1 μ 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 μ 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 μ 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

1. 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 μ 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。
2. 將 1500 μ 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 μ l 的上清液並加入 20 μ l 的亞硝酸呈色劑放置 3 分鐘進行反應。
4. 取出 100 μ 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，並比較不同糖種類培養下 *Pantoea* sp.降解亞硝酸情形。以上實驗 N=3，三重複取平均。

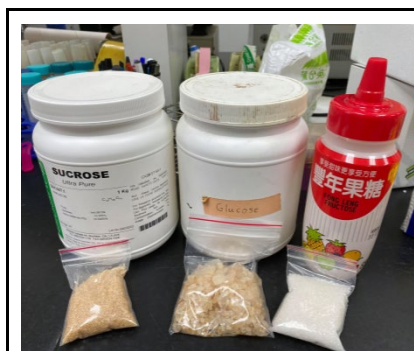


圖 23 不同糖類



圖 24 配置不同 LB 培養液

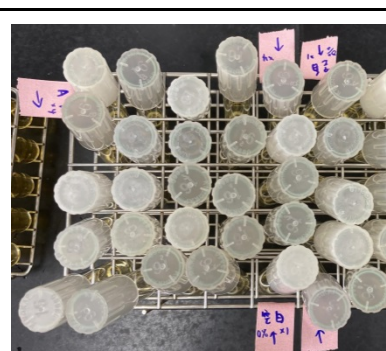


圖 25 不同種類培養液

四、探討 *Pantoea* sp. 在不同鹽度下降解亞硝酸情形

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，為模擬實際養殖時可能遇到的水體鹽度變化，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. 在不同鹽度下降解亞硝酸情形。

(一) 測量 *Pantoea* sp. 在不同鹽度培養後的生長情形

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 μ 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。
3. 取 900 μ 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) 比較不同鹽度下 *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. 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 μ 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 μ 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 μ l 的上清液並加入 20 μ l 的亞硝酸呈色劑放置 3 分鐘進行反應。
4. 取出 100 μ 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。

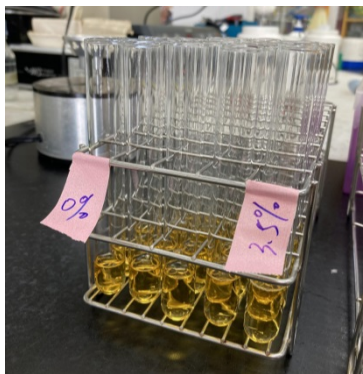


圖 26 配置不同鹽度培養液



圖 27 震盪培養



圖 28 亞硝酸鹽呈色劑

伍、研究結果

一、探討 *Pantoea* sp. 在不同溫度下降解亞硝酸情形

(一) 測量 *Pantoea* sp. 在不同溫度下的生長情形

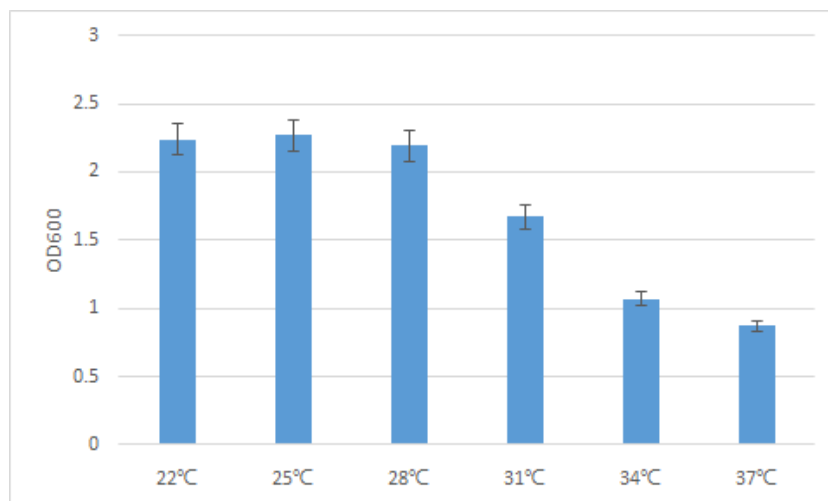


圖 29 不同溫度下的生長情形

從不同溫度下生長情形的結果可以發現，*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 *Pantoea* sp. 在較高溫的環境下(31、34、37°C)生長時，OD₆₀₀ 數值較低，細菌量較少，表示其生長情形較差，而當 *Pantoea* sp. 生長在較低溫的環境(22、25、28°C)時，OD₆₀₀ 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

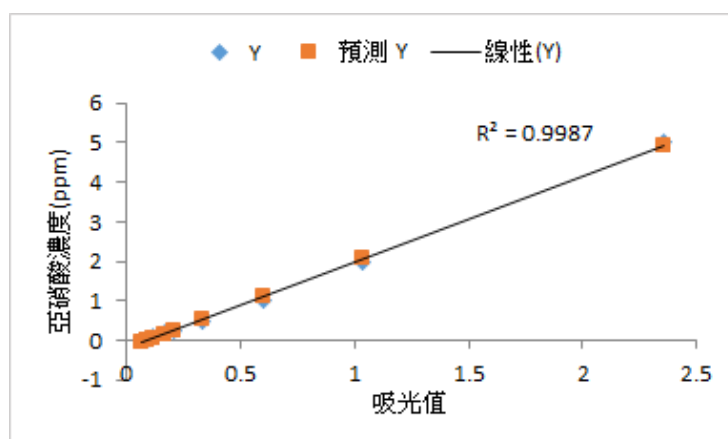


圖 30 亞硝酸鹽呈色劑標準曲線

在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的亞硝酸儲備液建立標準曲線，從圖 24 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，使其的 R^2 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.降解亞硝酸情形

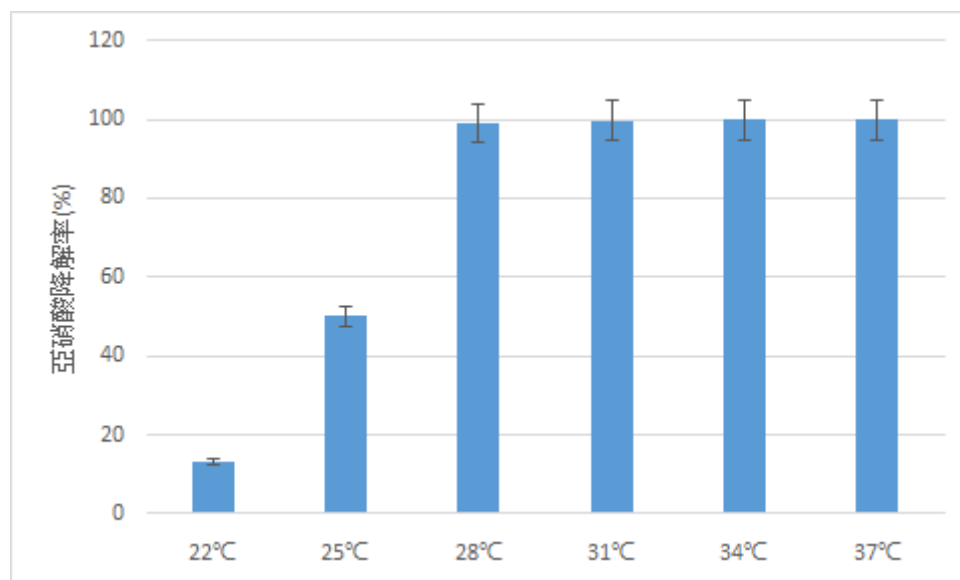


圖 31 不同溫度下的降解亞硝酸情形

根據圖 31 可知 28、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，在 25°C 時降解率約為 50%，22°C 更是僅有 13%，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、探討溫度影響 *Pantoea* sp. 降解亞硝酸能力的原因

從研究目的一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.在亞硝酸添加後於不同溫度培養 16 小時以上的細胞內亞硝酸濃度

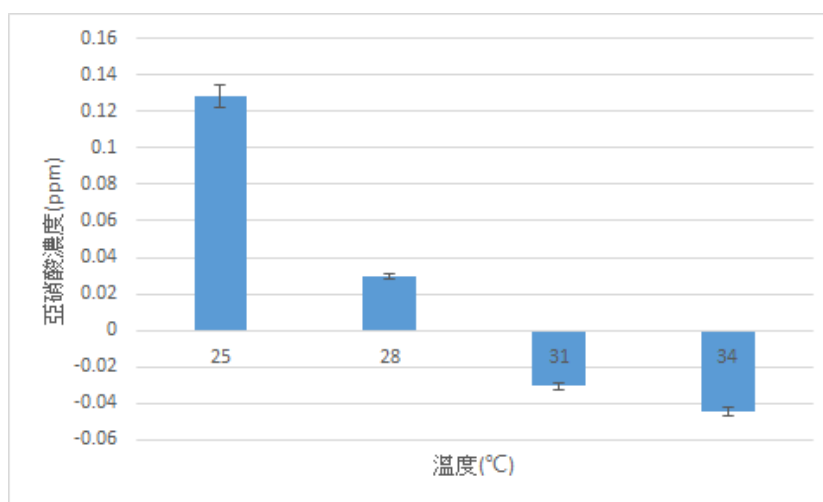


圖 32 亞硝酸添加後培養 16 小時以上的細胞內亞硝酸濃度

如圖 32 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 33 顯微鏡下的 *Pantoea* sp.

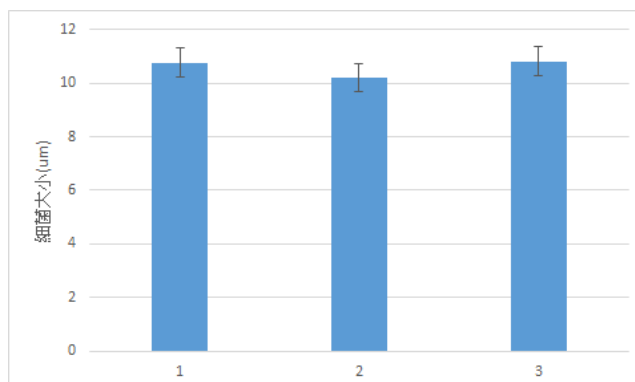


圖 34 *Pantoea* sp. 細菌大小

根據圖 34 中可以發現 *Pantoea* sp.大小多在 10 μ 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

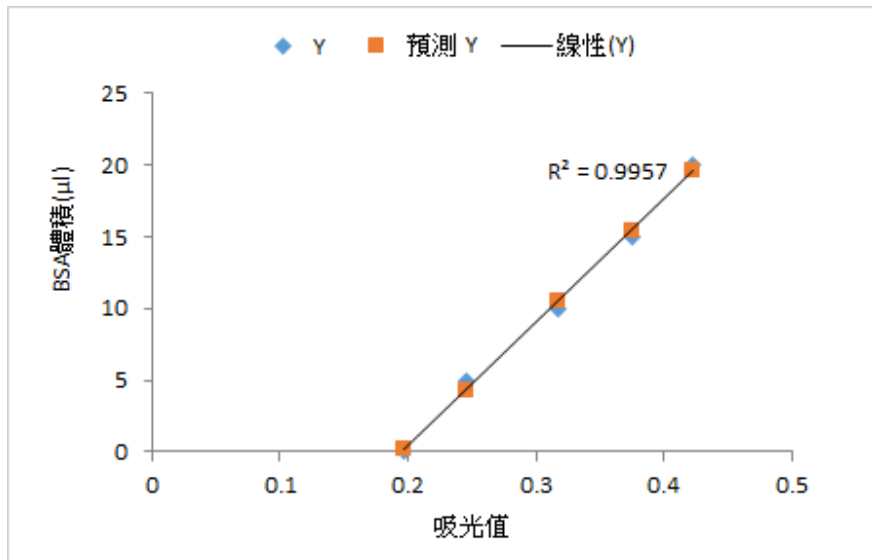


圖 35 蛋白質標準曲線

由於接下來實驗需測量蛋白質濃度，我們利用已知濃度的 BSA 與 Bio-Rad protein assay dye reagent 來建立蛋白質標準曲線，在圖 35 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)比較單位質量下於不同溫度培養的 *Pantoea* sp.細胞內所含亞硝酸濃度差異

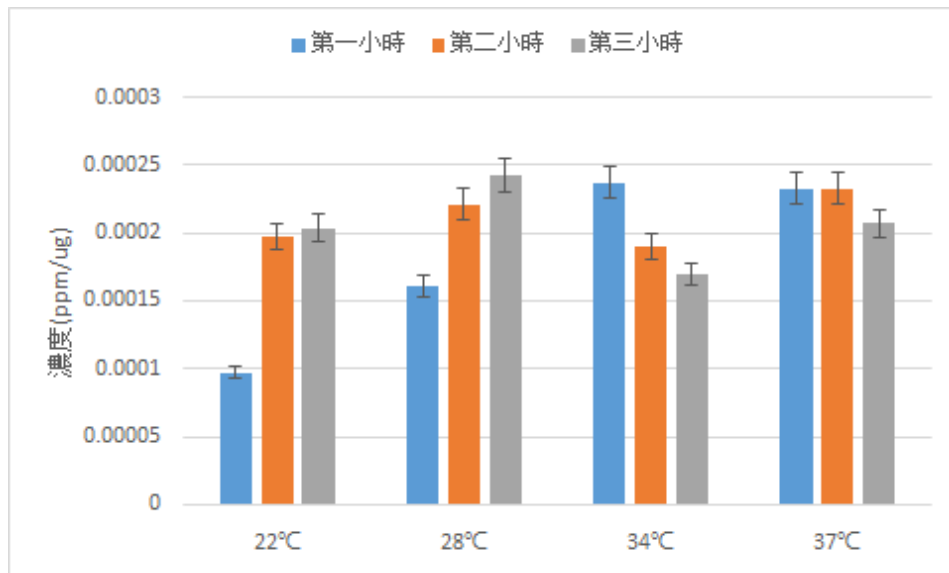


圖 36a 不同溫度細胞內所含亞硝酸濃度差異

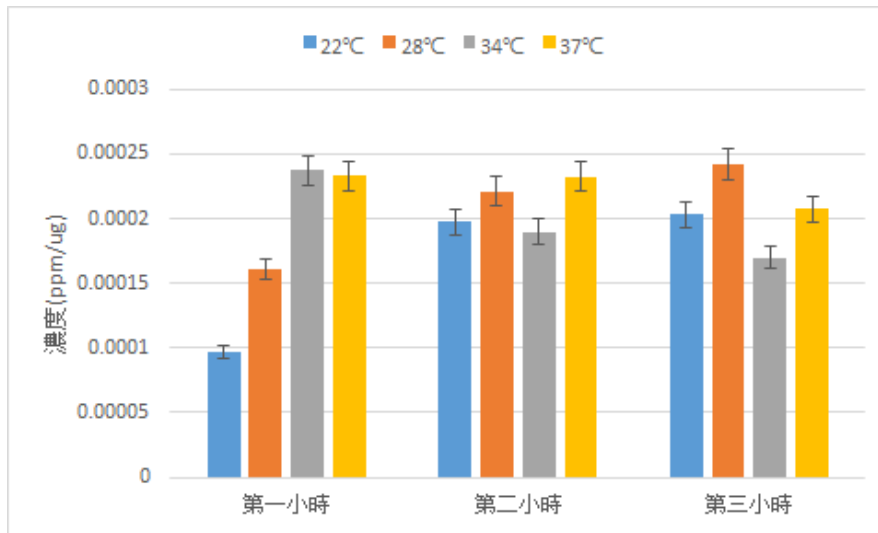


圖 36b 不同溫度細胞內所含亞硝酸濃度差異

從圖 36a 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。在圖 36b 可以發現第一小時的 22°C 濃度最低，而 28°C 為次低，第二小時各溫度組別並無顯著差異，第三小時則僅有 28 和 34°C 有顯著差異($p=0.22$)，顯示溫度可能影響亞硝酸起始的運送速率。

(五)比較單位質量下於不同溫度培養的 *Pantoea* sp.可降解亞硝酸濃度差異

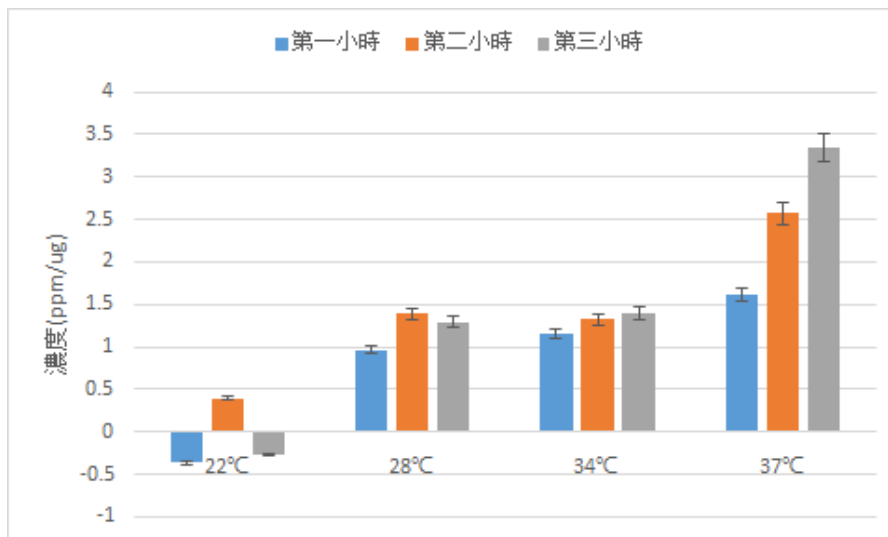


圖 37 單位質量下於不同溫度培養可降解亞硝酸濃度差異

根據圖 37 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。

三、探討可提升 *Pantoea* sp.在低溫降解能力的方法

(一)測量 *Pantoea* sp.在不同葡萄糖濃度培養後的生長情形

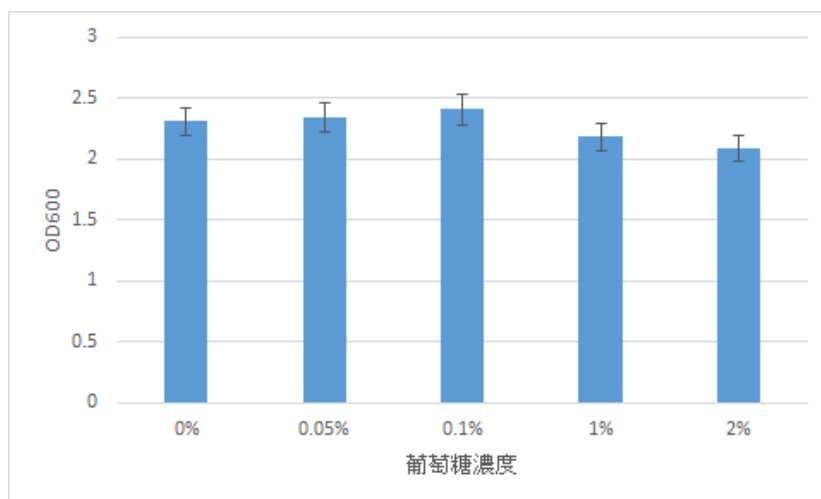


圖 38 不同葡萄糖濃度培養後的生長情形

在圖 38 中，我們可以得知 *Pantoea* sp.在添加 0.05、0.1、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。

(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

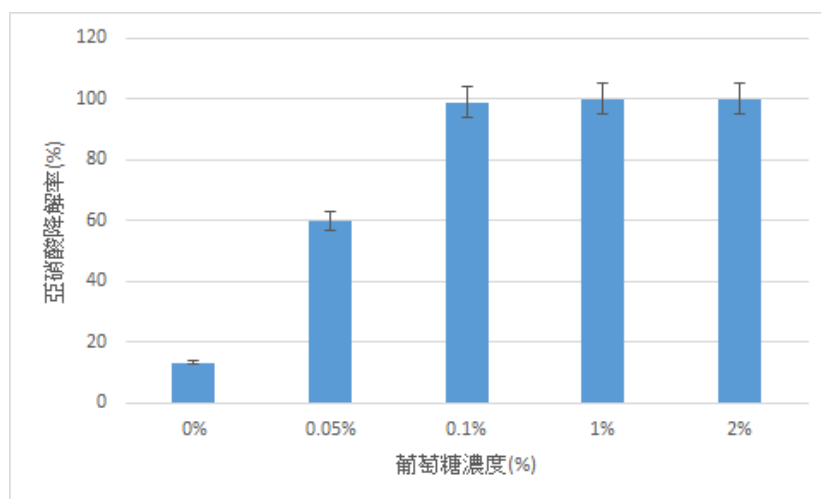


圖 39 不同葡萄糖濃度培養後降解亞硝酸情形

從圖 39 中得知添加葡萄糖可顯著提升 *Pantoea* sp.低溫的降解能力，而 0.5%組別降解率可提升至約 60%(較無添加高約 4.5 倍)，1、2%則可提升至 100%(較無添加高約 7.5 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)比較單位質量下於不同葡萄糖濃度培養的 *Pantoea* sp.細胞內所含亞硝酸濃度差異

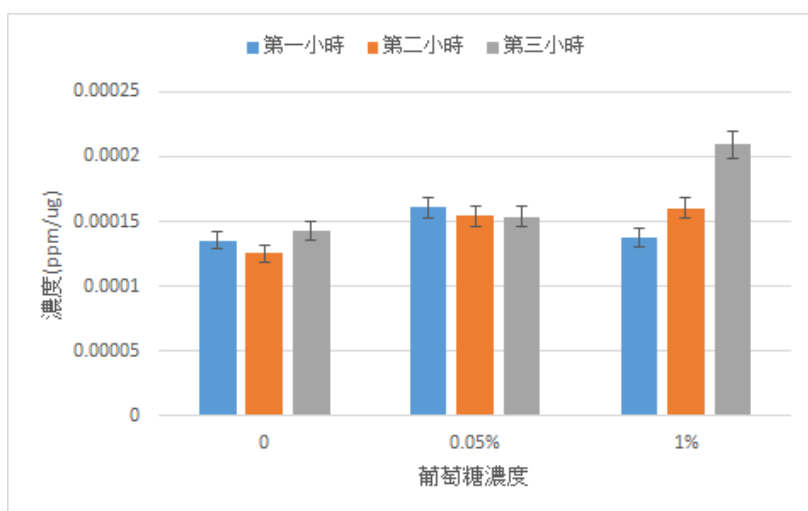


圖 40 單位質量下於不同葡萄糖濃度細胞內所含亞硝酸濃度差異

根據圖 40 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)比較單位質量下於不同葡萄糖濃度培養的 *Pantoea* sp.可降解亞硝酸濃度差異

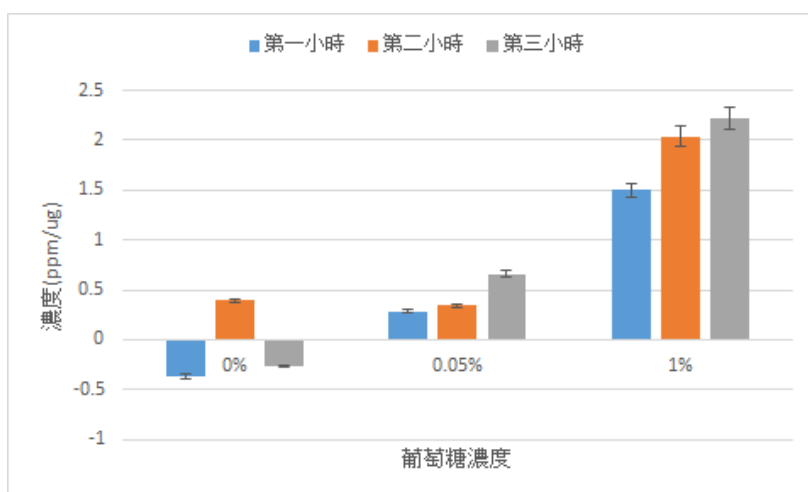


圖 41 單位質量不同葡萄糖濃度可降解亞硝酸濃度差異

從圖 41 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。

(七)測量 *Pantoea* sp.在不同糖種類培養後的生長情形

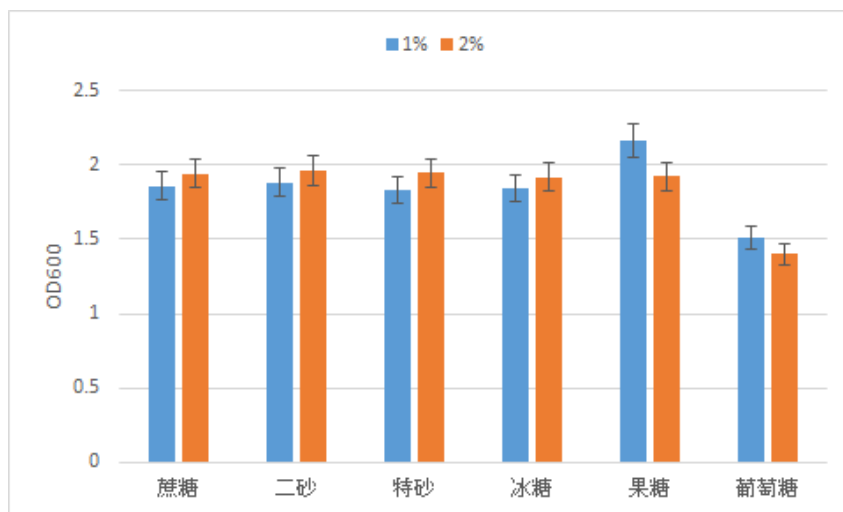


圖 42 不同糖種類培養後的生長情形

從圖 42 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。

(八)比較不同糖種類培養後 *Pantoea* sp.降解亞硝酸情形

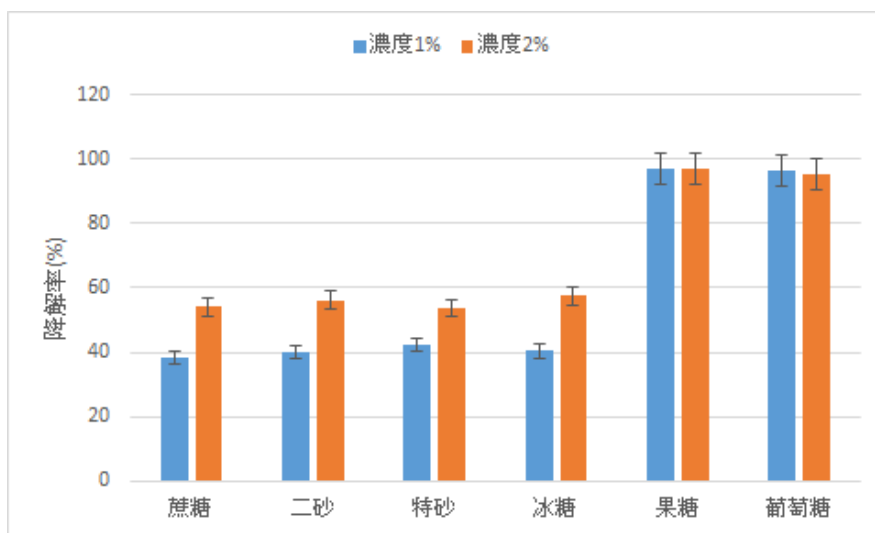


圖 43 不同糖種類培養後降解亞硝酸情形

從圖 43 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 7.5 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。

四、探討 *Pantoea* sp.在不同鹽度下降解亞硝酸情形

(一)測量 *Pantoea* sp.在不同鹽度培養後的生長情形

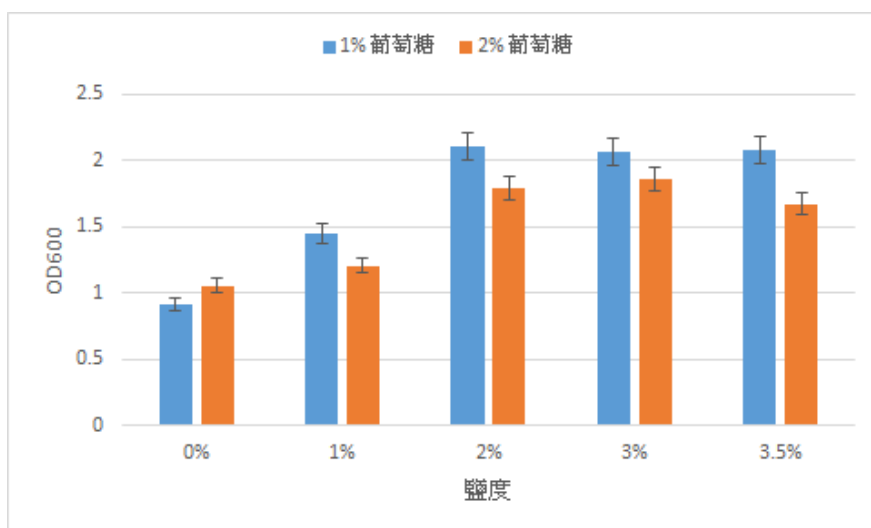


圖 44 不同鹽度培養後的生長情形

根據圖 44 可以發現，在較高鹽度 2、3、3.5% 培養下 *Pantoea* sp. 有較好的生長情形，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。

(二)比較不同鹽度下 *Pantoea* sp. 降解亞硝酸情形

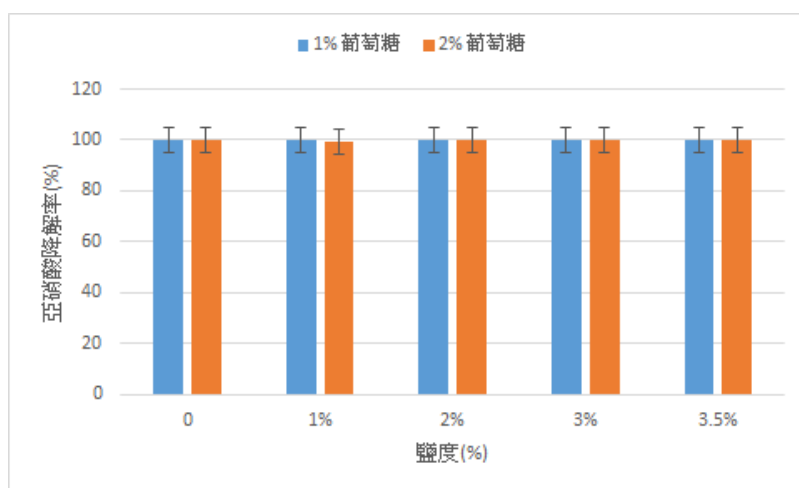


圖 45 不同鹽度培養後降解亞硝酸情形

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。

陸、討論

根據行政院農業委員會農業科技專案計畫服務網的台灣漁業生產總值統計表可知養殖漁業為台灣漁業十分重要的一環，約占 36%，僅次於遠洋漁業。近年由於台灣土地資源有限，漁民為求更高經濟利益，由早期粗放轉變為集約養殖，高密度養殖也會因池塘殘餌、排泄物、屍體腐敗等因素，使水體含氮廢物濃度過高；同時，台灣養殖業常有過冬養殖的情形，在行政院農業委員會資料中提及硝化菌在冬季活性較差，使得降解亞硝酸能力下降，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漁民冬季含氮廢物過高的問題。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，造成漁民經濟上的損失。

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。同時，台灣漁民長期使用抗生素和化學藥物避免生物受感染，可如此易使生物產生抗藥性和藥物殘留，而微生物製劑常由養殖益生菌所組成，除了能夠改善養殖水體的含氮廢物濃度外，更可以有增加生物免疫力的功效，一舉數得。

台灣漁民用於養殖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	嘗試西方墨點法	無
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
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

本研究從漁民最常遇到溫度開始探討，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，同時聽說養殖界流傳添加糖蜜可提升降解能力，我們以葡萄糖及其他糖類模擬，最後也好奇 *Pantoea* sp. 是否有廣鹽性，期待一系列研究可以對 *Pantoea* sp. 性質、機制有更多了解，也能應用在實際養殖中。以下是關於實驗的討論：

一、探討 *Pantoea* sp. 在不同溫度下降解亞硝酸情形

圖 46 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 46 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 *Pantoea* sp. 較無法降解亞硝酸，有應用的困難，同時發現生長情形與降解能力無直接關聯，高溫時生長情形較差，卻有較好降解能力，顯示 *Pantoea* sp. 生長情形和降解能力可分開討論。

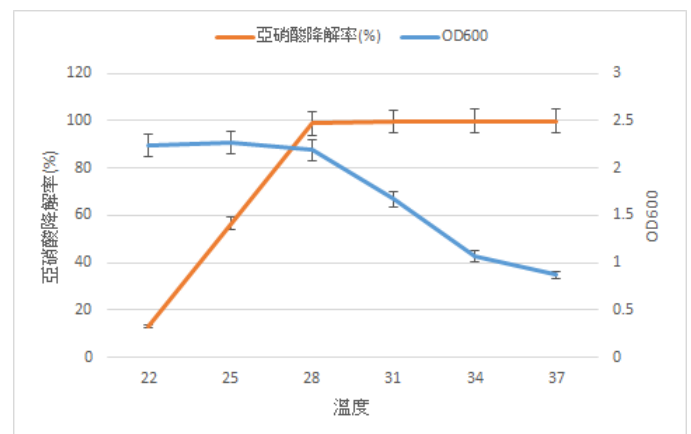


圖 46 不同溫度生長情形及亞硝酸降解率

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、探討溫度影響 *Pantoea* sp. 降解亞硝酸能力的原因

本實驗初步對溫度和 *Pantoea* sp. 細胞內代謝進行探討，在圖 47 中可知 22°C 起始時會稍微降解亞硝酸，但目的—結果 16 小時降解率可知其降解亞硝酸不多，而 28°C 第二小時濃度高過第三小時制，可能因 *Pantoea* sp. 經亞硝酸同化作用的產物 NH_4^+ ，而會對代謝機制產生負回饋抑制作用，但其中更詳細代謝機制有待更進一步實驗證實這樣的推論。

若將圖 48 單位質量可降解的亞硝酸和圖單位質量細胞內所含亞硝酸進行比對，可以發現 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，故能在細胞內側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。

三、探討可提升 *Pantoea* sp. 低溫降解能力的方法

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 49 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，令我們思考葡萄糖是否啟動 *Pantoea* sp. 代謝的相關機制，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，從圖 50 中得知添加葡萄糖確實

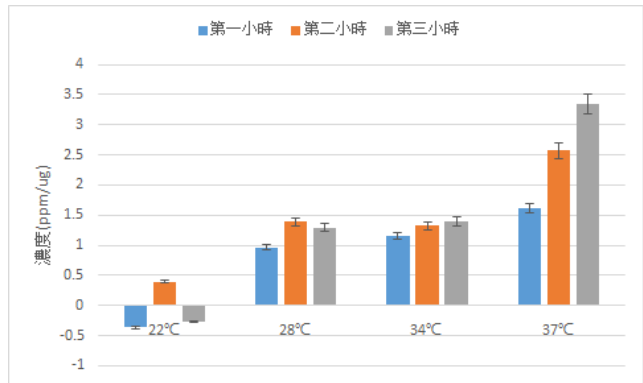


圖 47 不同溫度單位質量可降解亞硝酸

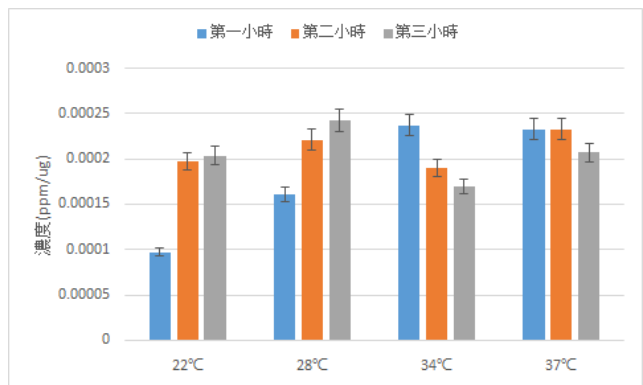


圖 48 不同溫度單位質量細胞內亞硝酸含量

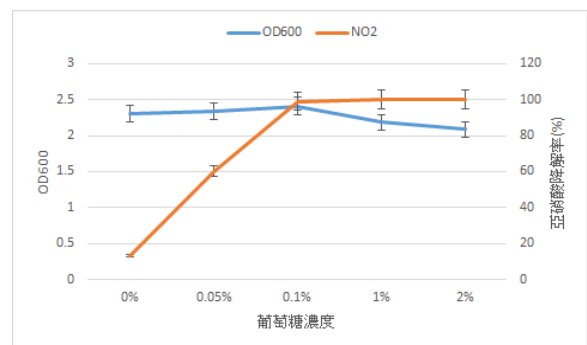


圖 49 葡萄糖生長情形和亞硝酸降解率

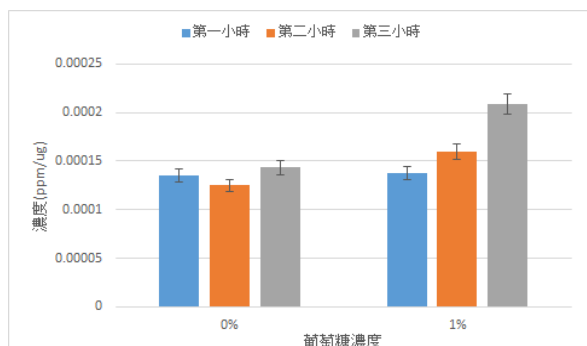


圖 50 添加葡萄糖細胞內亞硝酸含量

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。

從 SOON-JUNG PARK(1995)可知添加葡萄糖會影響大腸桿菌的 MDH 表現量，在 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

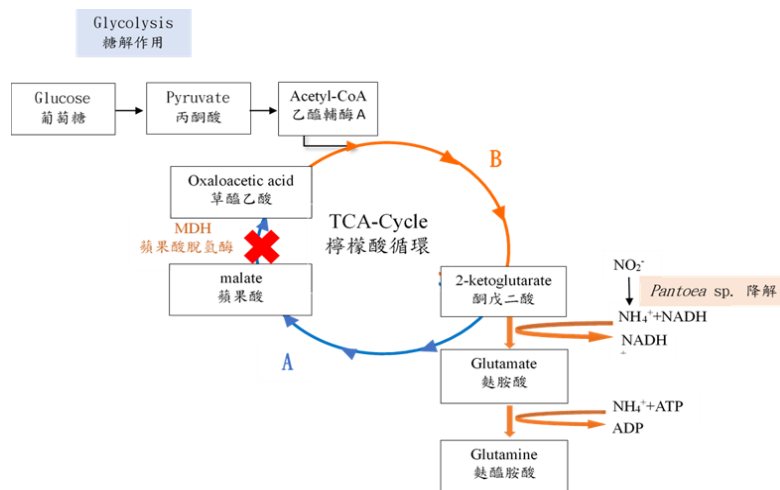


圖 51 *Pantoea* sp.代謝亞硝酸可能機制示意圖

文獻提及添加葡萄糖會使 MDH 表現下降，導致圖 51 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.葡萄糖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，而我們也嘗試進行西方墨點法證實 MDH 存在，期待未來可完成相關實驗來證實相關蛋白質基因。

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、

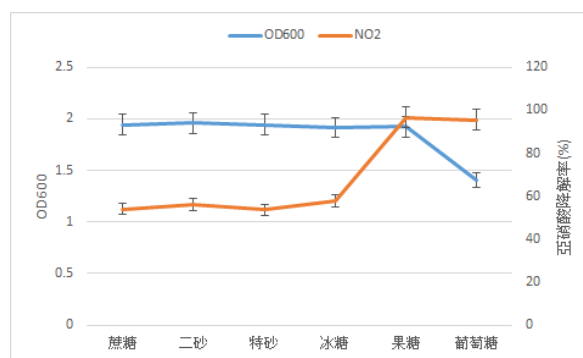


圖 52 不同糖類生長情形和亞硝酸降解率

果糖，除了探討糖對 *Pantoea* sp.的影響外，以期待能降低成本，提高漁民實際應用的可行性，根據圖 52 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

的便是希望漁民可實際應用，而使用的成本多寡再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。

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4倍)	2%較佳(增加4倍)	2%較佳(增加4倍)	2%較佳(增加4倍)	較雙醣佳(增加7倍)	較雙醣佳(增加7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。

四、探討 *Pantoea* sp. 在不同鹽度下降解亞硝酸情形

在不同鹽度培養下的亞硝酸濃度可以發現，有鹽度的組別添加 1% 或 2% 葡萄糖後皆仍可降解亞硝酸，甚至 1% 組別的降解率較 2% 高出些許，而此結果也對養殖戶非常有利因添加 1% 的葡萄糖所需成本較 2% 少，且同時亦可得到較好的降解效果，無疑為一大福音，既省成本又有更好的成果。

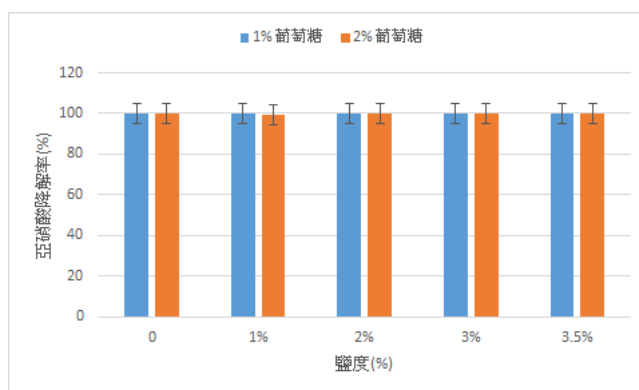


圖 53 不同鹽度亞硝酸降解率

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%，但發現 *Pantoea* sp. 在 0-3.5% 添加葡萄糖時皆可降解亞硝酸，我們便好奇更高鹽度下 *Pantoea* sp. 是否仍有降解能力，此外，我們同樣也好奇有鹽度的環境下若未添加葡萄糖的亞硝酸降解情形又是如何，以上疑問都需更進一步的實驗證實。

柒、結論

近年來台灣的養殖產業發達，但追求利益及產量的同時，也潛在著許多風險，例如本研究目的探討的亞硝酸及其病徵－棕血症。在查閱文獻過後得知漁民會用微生物法來因應亞硝酸濃度過高的情形，故我們利用養殖益生菌-潘朵拉菌 *Pantoea* sp.進行此項研究。我們嘗試分析及找尋 *Pantoea* sp.合適生長的溫度和其降解亞硝酸的能力，也探討提升其降解能力的方法及可能遇到的養殖環境。我們將實驗成果的結論整理如下：

1. 根據 OD₆₀₀ 的數值可知 *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，同時也發現在高溫(31-37°C)的生長情形較差，低溫(22-28°C)的生長情形較好。
2. *Pantoea* sp.可以幫助降解氨氮廢物，其中包含亞硝酸，而其降解亞硝酸的能力會受溫度影響，發現在高溫時(28、31、34、37°C)有不錯的降解能力，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. *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。
7. 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。
8. 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。
9. 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，而降解能力則單醣效果較雙醣佳，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醣。
10. *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，其中在鹽度較高的環境中，以 1%葡萄糖濃度協助培養的生長量較多；鹽度為 0%時，則為 2%葡萄糖濃度的環境更適合 *Pantoea* sp.的生長。可知 *Pantoea* sp.具有廣鹽性，適合所有的養殖環境。

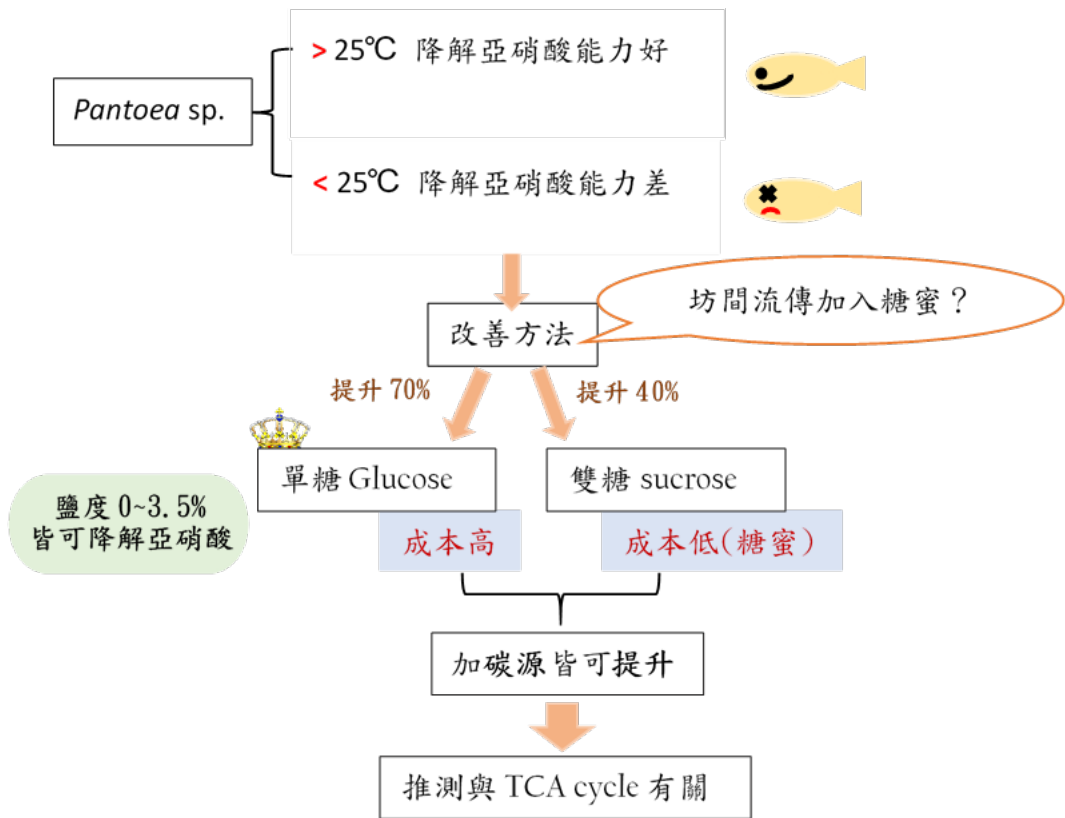


圖 54 *Pantoea* sp.在不同養殖環境下降解能力示意圖

根據以上一系列實驗，我們初步探討 *Pantoea* sp.在不同養殖環境中降解亞硝酸的情形，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，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 70%，而雙醣亦可提升 40%，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，也期待後續實驗能對 *Pantoea* sp.機制、應用有更多了解。

根據本研究我們整理出 *Pantoea* sp.具有以下三優點，具有改善台灣冬季養殖水體中亞硝酸過高問題的高度應用性：

1. 並無許多其他菌種冬季生長狀況差的問題，在低溫環境下仍能維持良好的生長情形。
2. 在添加葡萄糖後不會影響生長，更能提升低溫降解能力。
3. 具有廣鹽性，在海水、半淡鹹水及淡水皆能生長。

捌、未來展望

表觀遺傳學說明後天環境改變或刺激不會直接改變基因序列、組成，但通過一些蛋白質結構改變，可能影響某些基因的開啟、關閉或活性大小等，造成後天外觀或功能上的差異。研究中我們可知 *Pantoea* sp. 降解亞硝酸能力受外界影

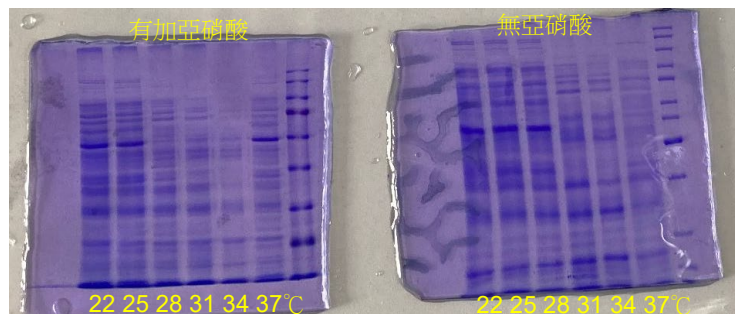


圖 55 蛋白質電泳結果

響，故我們執行蛋白質電泳試著分析影響的蛋白質種類。結果發現做出來的蛋白質電泳結果型態不一樣。所以我們藉由此發現和表觀遺傳學理論推斷：溫度可能會影響 *Pantoea* sp. 負責降解亞硝酸的蛋白質種類，未來可進行二維蛋白質電泳和定序來做更進一步的確認。

查閱文獻後得知蘋果酸脫氫酶為影響 *Pantoea* sp. 降解能力的可能原因，故我們嘗試利用西方墨點法以測定是否 MDH 蘋果酸脫氫酶溫度越低，其活性越高，造成各溫度降解情況的不同，也期望分析 *Pantoea* sp. 蛋白質及基因序列。但實驗中沒有獲得結果，二次抗體反應時並無測得訊號。另外葡萄糖或坊間流傳糖蜜可幫助 *Pantoea* sp. 恢復低溫降解能力的機轉也令我們十分好奇，討論後推測：糖可以改善溫度對 *Pantoea* sp. 造成的負面影響，是否除了蘋果酸脫氫酶外尚有其他分子參與其中？而 TCA cycle 的機轉在添加葡萄糖後受到影響，乙醯輔酶轉變為麩胺酸 Glutamate 和麩醯胺酸 Glutamine 進行同化作用，因此我們希望利用試劑量測 Glutamate 和 Glutamine 含量，以證實添加碳源能提升 *Pantoea* sp. 降解能力的原因。

實際應用方面，本研究雖發現添加葡萄糖可使 *Pantoea* sp. 降解能力提升最多，但考量到成本仍較糖蜜(主要成分蔗糖)高，若想進一步確認漁民使用時究竟選擇何種最符合經濟效益，我們期待進行添加同成本糖類比較降解情形以及實際於養殖池操作，來確認應用價值。

以下為進行蛋白質電泳與西方墨點法的照片：

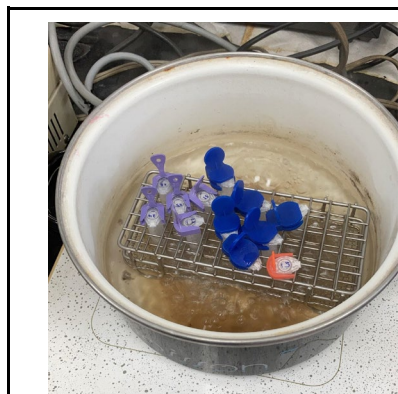


圖 56 煮蛋白質

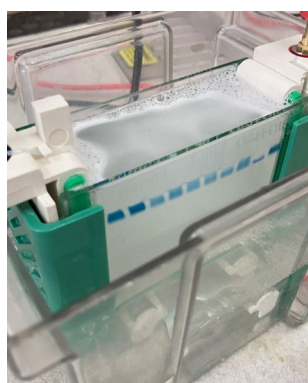


圖 57 SDS-PAGE 膠體電泳

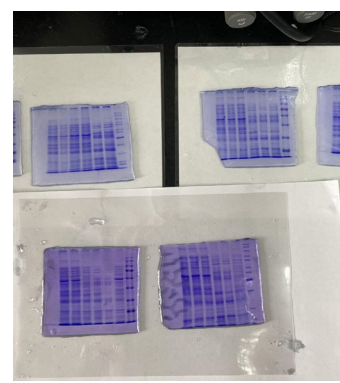
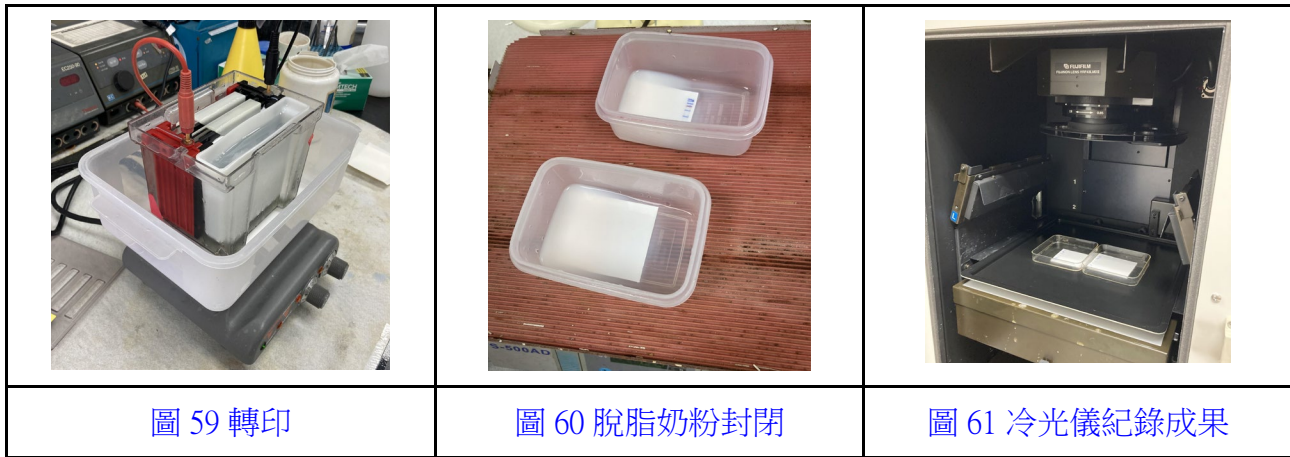


圖 58 電泳結果



玖、參考資料

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 行政院農業委員會農業科技專案計畫服務網
5. 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。
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. Michael Jeger(2018). Pest categorisation of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. EFSA JOURNAL Volume16, Issue7 July 2018.
9. 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
10. SOON-JUNG PARK(1995). Regulation of malate dehydrogenase (*mdh*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, carbon, and heme availability. J Bacteriol. 1995 Nov;177(22).
11. Shaojuan Liu(2018). The Antioxidative Function of Alpha-Ketoglutarate and Its Applications. Biomed Res Int. 2018 Mar 21.

【評語】 052210

1. 本作品探討不同溫度、糖種類及濃度、鹽度對 *Pantoea* 菌株降解亞爾酸能力的影響。
2. 本研究觀察到 *Pantoea* sp. 低溫(22-28°C)的生長情形較好但在 22、25°C 時降解亞硝酸能力較差。進一步觀察到低溫(22°C)時 *Pantoea* sp. 在外加入葡萄糖的環境可以恢復降解亞硝酸的能力。細菌成長情況良好亦表示菌體代謝能力狀況佳，但為何無法反映到分解亞硝酸能力？報告中應述明實驗使用菌株之來源，是否可合法使用於養殖環境。
3. 本試驗結果對於冬季養殖環境之改善有所幫助，但若以池水深 50 cm 為計算標準，則每分地需增加 17 萬元，若非高價魚類養殖在實務上可行性較差，且經濟上可能影響漁民之使用意願。若採用換水法，亦可達到降低亞硝酸鹽之功效，且僅需極少之經費即可。
4. 討論充分且深入，並有適當使用統計方法，惟在解讀上，部分有所誤解。參考文獻豐富，惟未按照字母順序排列，也不宜中英文獻穿插排列，部分文獻書寫不完整。
5. 添加 0.1%、1% 或 2% 葡萄糖三濃度間在統計上似乎並未有顯著差異，為何推薦應用上使用高濃度？
6. 利用蛋白質電泳分析方法或可以看到蛋白質的表達量，但無法推估酵素活性高低或效能。另外建議圖表均應置於結果項目中。

作品簡報

高級中等學校組-農業與食品學科

探討不同養殖環境

對 *Pantoea* sp.

降解亞硝酸鹽能力之影響

前言



過高的亞硝酸
魚蝦棕血症

集約養殖
亞硝酸濃度過高

過冬養殖
冬天藻、菌相差

養殖漁業
台灣漁業重要的一環

尋找 冬季生長好、降解能力也好的菌

市面上販售降解亞硝酸 *Pantoea sp.*



- 抑制病原菌
- 強化循環系統
- 促進餌料分解
- 抑制水質老化
- 通過安全檢測
- 提升魚蝦代謝率
- 降低營養鹽含量
- 促進種苗存活率
- 降低營養鹽含量
- 提升水產生物免疫力

冬季生長情形好
降解能力差

開始研究！

資料來源：
行政院農業委員會農業科技專案計畫服務網
<https://reurl.cc/zBR91Q>

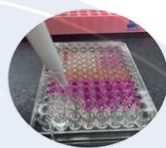
研究目的&流程



生長情形 分光光度計

降解能力 ELISA Reader

在不同溫度下
降解亞硝酸情形



不同碳源影響 生長情形、降解能力

加入葡萄糖後細胞內外亞硝酸含量

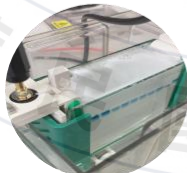
提升低溫降解
能力的方法



溫度影響降解
能力的原因

細胞內外亞硝酸含量

西方墨點法 MDH



不同鹽度下降
解亞硝酸情形

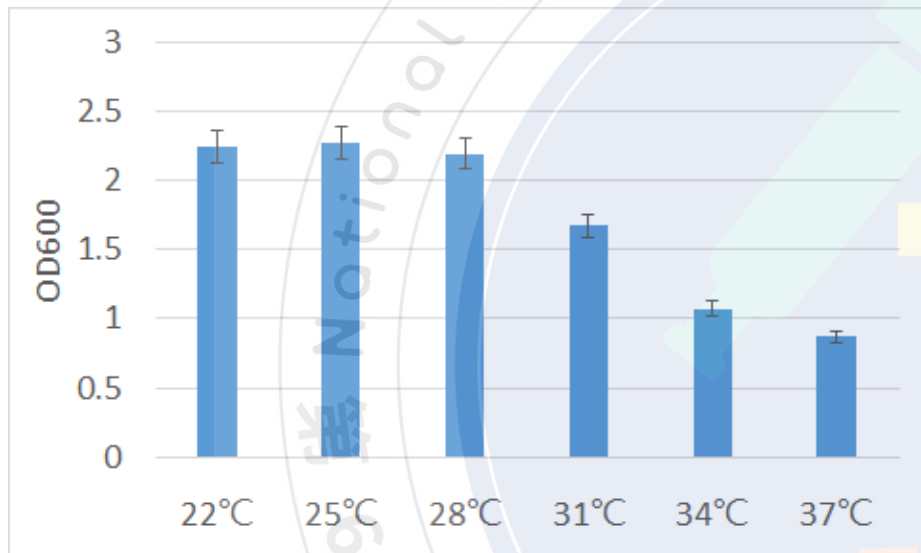
不同鹽度(淡水到鹹水)加碳源
生長情形、降解能力



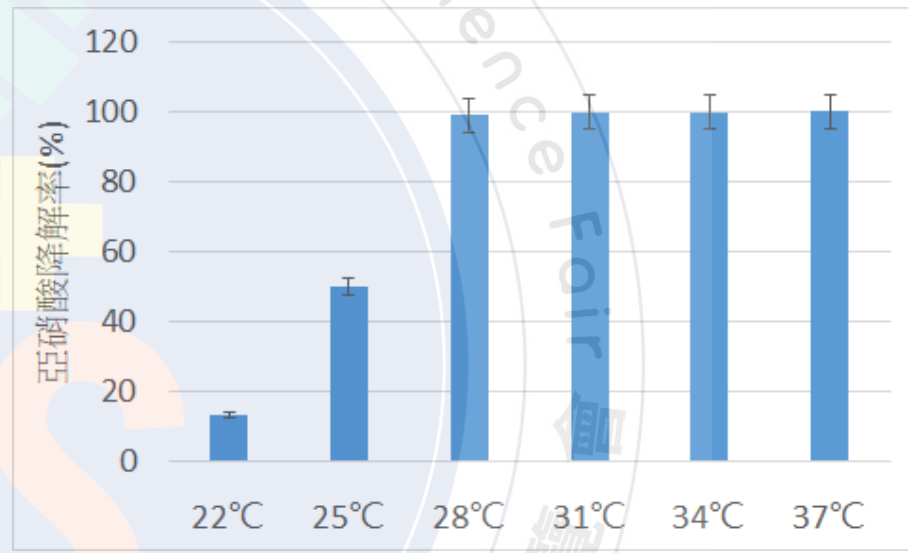
改硝
善酸
冬過
季高
亞?

研究結果

一、探討 *Pantoea* sp. 在不同溫度下降解亞硝酸情形



不同溫度下的生長情形



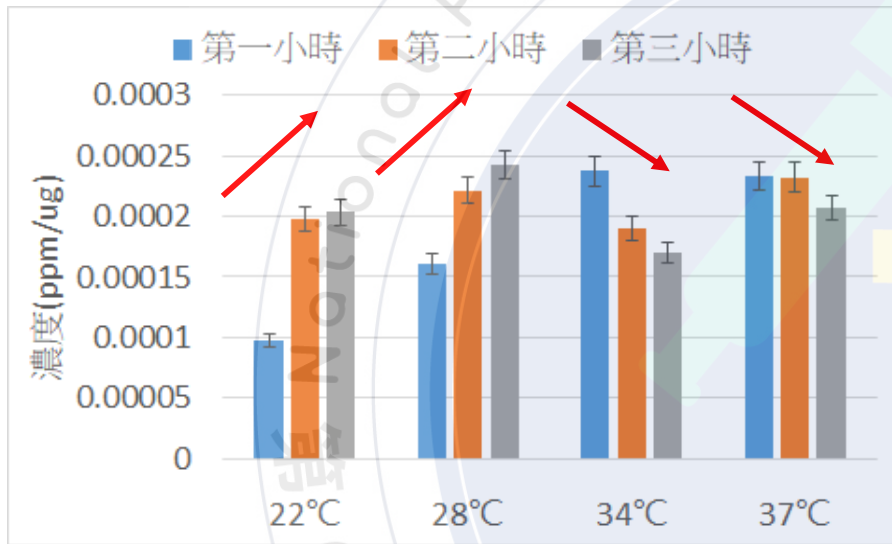
不同溫度下亞硝酸降解情形

- 低溫(22-28°C)生長情形較好，高溫(31-37°C)較差。
- 低溫(22、25°C)降解能力較差，高溫(28-37°C)較佳。
- 生長情形和降解能力非正相關。

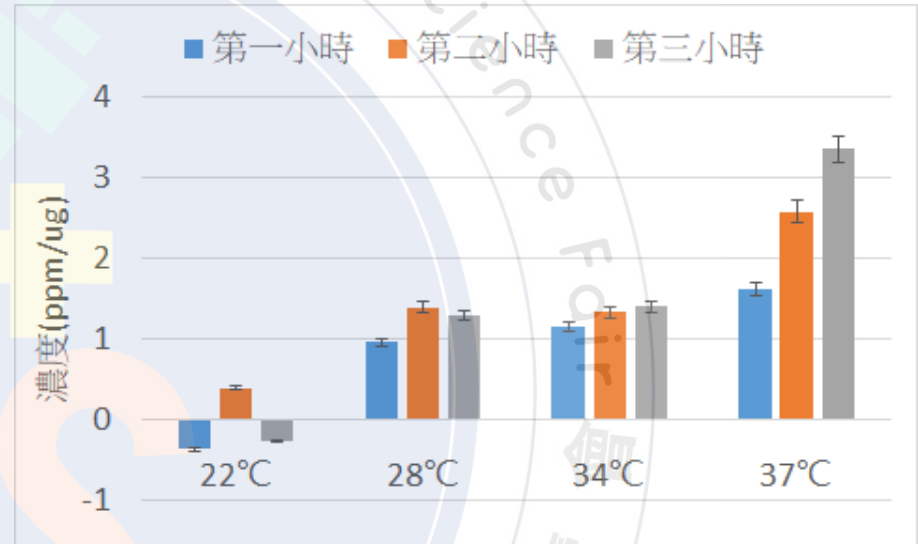
應用困難

研究結果

二、探討溫度影響 *Pantoea* sp. 降解亞硝酸能力的原因



不同溫度對細胞內所含亞硝酸的影響



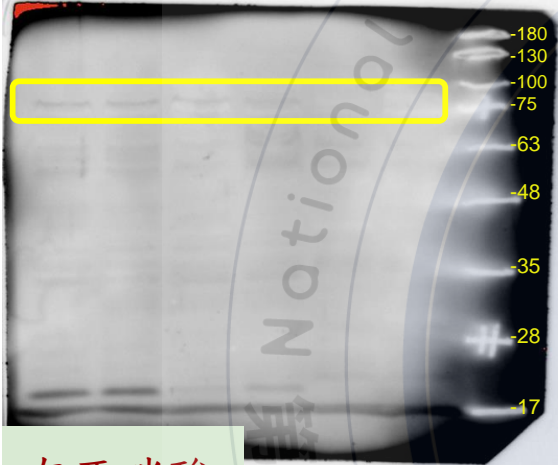
不同溫度對細胞降解亞硝酸的影響

- 22、28°C 一到三小時有上升趨勢，34、37°C 則下降，第一小時 22、25°C 濃度較低，可知溫度影響細胞內代謝和起始運送速率。
- 22°C 時細胞內含量有上升趨勢，但無法降解亞硝酸，推測亞硝酸可進入細胞但無法降解會累積在細胞內。

研究結果

二、探討溫度影響 *Pantoea* sp. 降解亞硝酸能力的原因

22 25 28 31 34 37°C



有亞硝酸

不同溫度的MDH表現量

22 25 28 31 34 37°C



無亞硝酸

- 低溫時MDH表現

量較高溫多

- 無添加亞硝酸的

MDH表現量較有

添加組別多

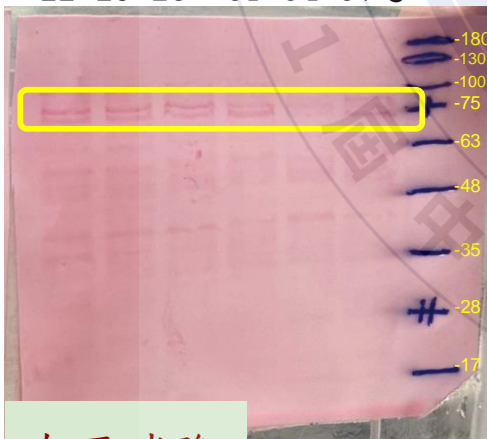
- 由上下圖比對可

確認其MDH表現

不同非因蛋白質

濃度不同所造成

22 25 28 31 34 37°C



有亞硝酸

不同溫度的蛋白質含量

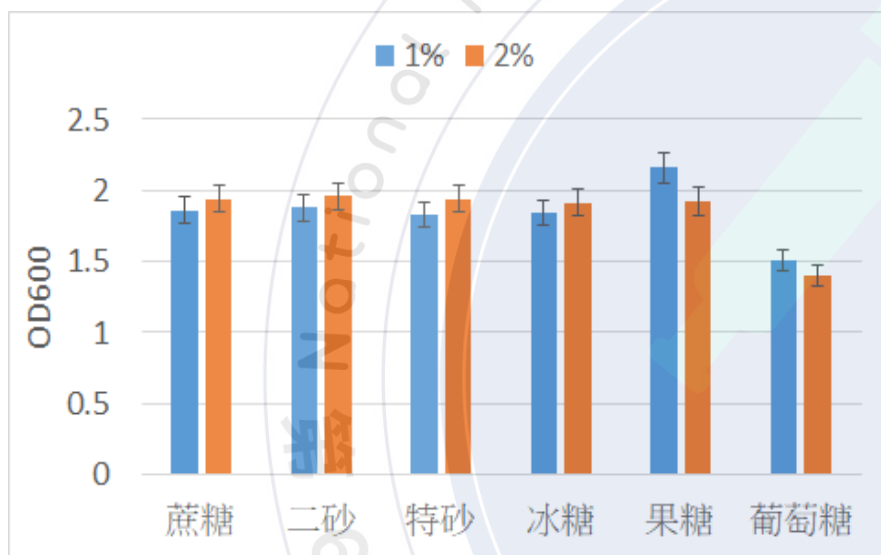
22 25 28 31 34 37°C



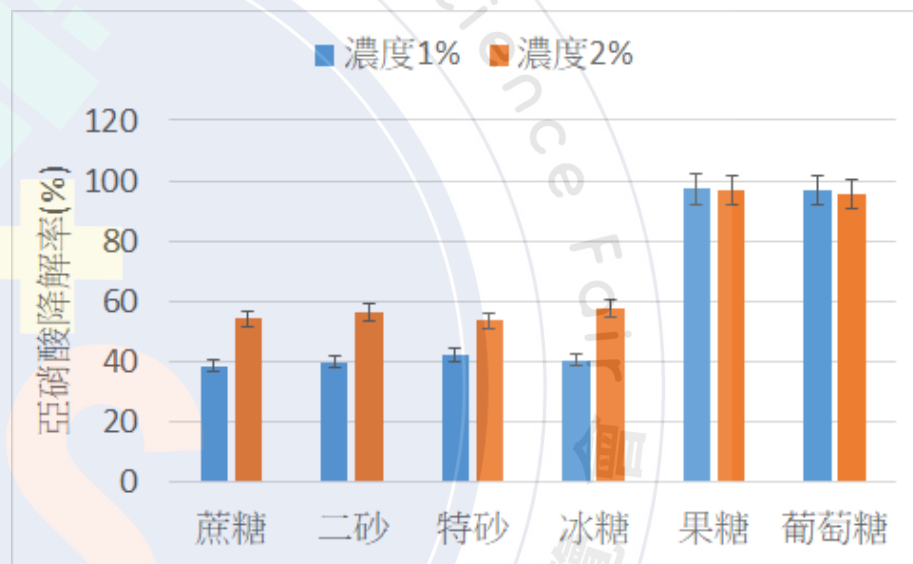
無亞硝酸

研究結果

三、探討可提升 *Pantoea* sp. 在低溫降解能力的方法



不同糖種類培養後的生長情形

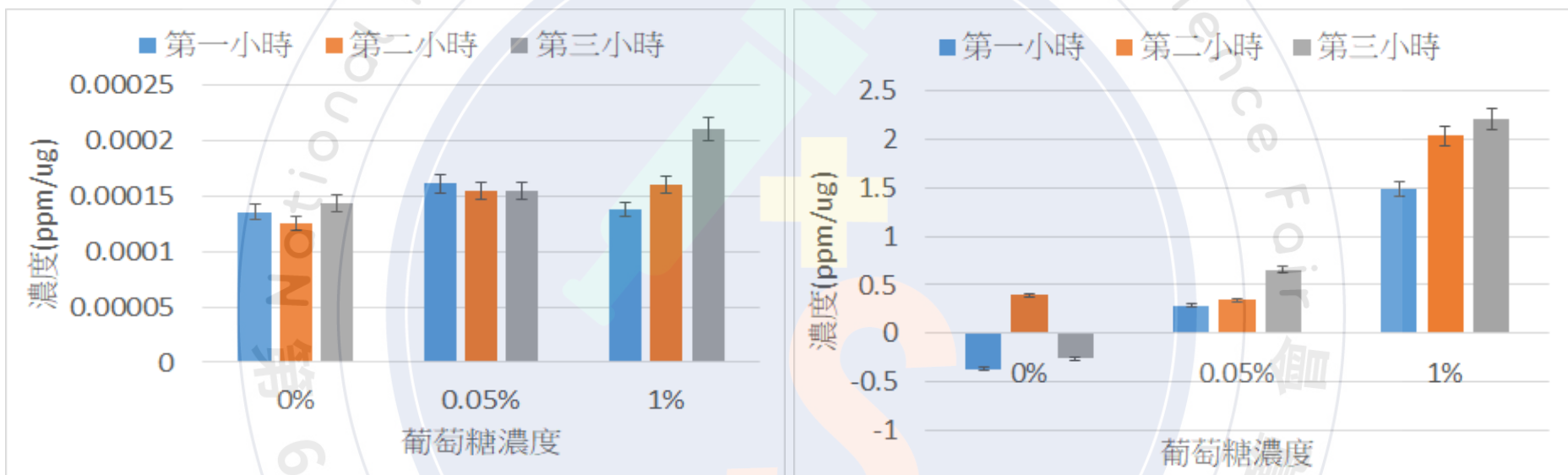


不同糖種類培養後降解亞硝酸情形

- **生長情形**除葡萄糖外**無明顯差異**。
- **單糖**降解能力95%以上，且**單糖**降解能力較**雙糖**佳。
- 葡萄糖成本34元/公斤，坊間常用**糖蜜**(主要成分蔗糖)**成本**6.45元/公斤，可斟酌成本添加。

研究結果

三、探討可提升 *Pantoea* sp. 在低溫降解能力的方法



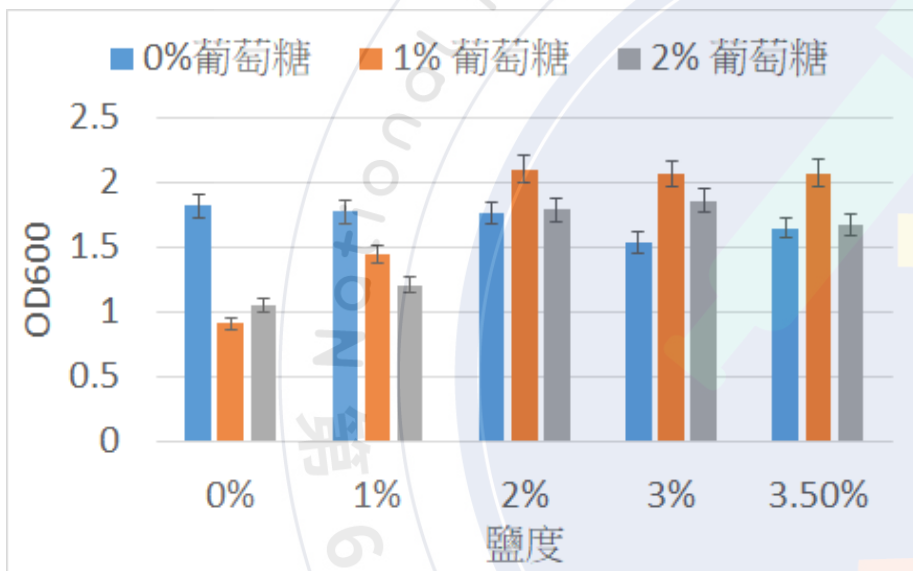
不同葡萄糖濃度對細胞內所含亞硝酸的影響

不同葡萄糖濃度對細胞降解亞硝酸的影響

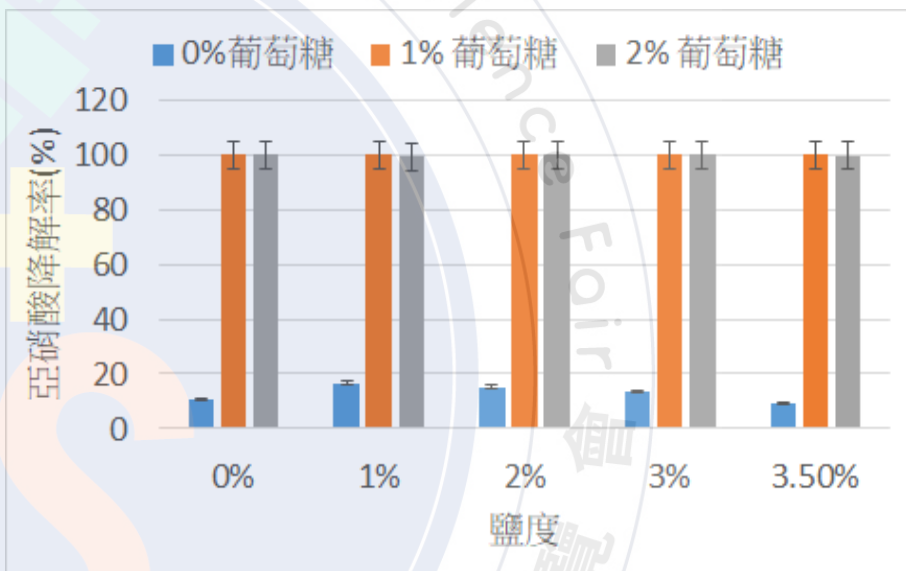
- 1%第三小時明顯較其他組高，顯示一定濃度葡萄糖會影響細胞內代謝情形。
- 無添加葡萄糖幾乎無法降解亞硝酸，0.05%和1%組別濃度顯著上升，顯示添加葡萄糖會提升低溫降解亞硝酸能力。

研究結果

四、探討 *Pantoea* sp. 在不同鹽度下降解亞硝酸情形



不同鹽度培養後的生長情形



不同鹽度培養後降解亞硝酸情形

- 無添加葡萄糖時生長情形無明顯差異，添加1、2%葡萄糖時高鹽(2、3、3.5%)生長情形較佳。
- 不同鹽度添加1%或2%葡萄糖皆能顯著提升降解能力到近100%，顯示淡水到海水(3.3%)都可降解亞硝酸。

討論

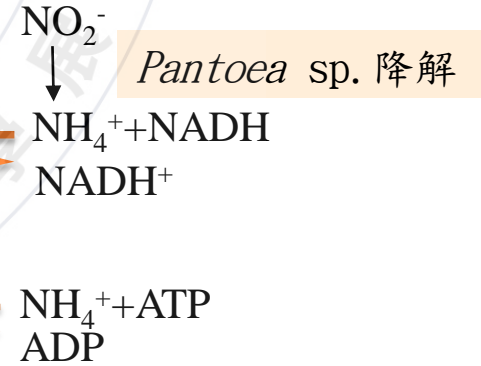
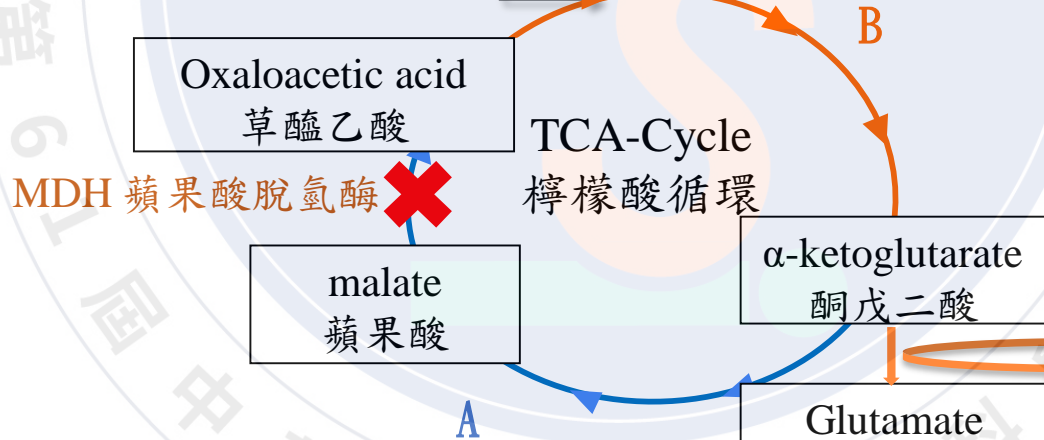
22 25 28 31 34 37°C



不同溫度的MDH表現量

	高溫	加葡萄糖
降解率	↑	↑
MDH	↓ (本研究)	↓ (文獻)

Glycolysis
糖解作用



Pantoea sp. 代謝亞硝酸可能機制示意圖

結論

Pantoea sp.

無許多菌冬季生長情形差的問題！

- > 25°C 降解能力好
- < 25°C 降解能力差



原因

改善方法

細胞內代謝情形

單糖會提升

MDH

單糖會降低

單糖 Glucose

成本高

雙糖 Sucrose

成本低 (糖蜜)

提升約6倍

提升約3倍

加碳源皆可提升

鹽度
0-3.5%
皆可降解
亞硝酸

推測與TCA cycle有關

未來展望

學理

西方墨點法

為何有其餘Bands?

二維蛋白質電泳&定序

進一步分析影響降解能力原因

測OAA & Glu & Gln

確認TCA cycle

單醣&雙醣

單醣和雙醣降解能力不同的原因

應用

養殖池

實際於養殖池成效?

成本

添加同成本碳源降解能力?

參考文獻

1. 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。
2. 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 498-502¹²