

2013 臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號	070002
參展科別	微生物學
作品名稱	暗「腸」玄機!-魚腸腸內菌的拮抗作用
得獎獎項	二等獎

就讀學校 臺中市私立明道高級中學

指導教師 王姍佩、黃介辰

作者姓名 陳聖仁、何庭昀、邱鈺惠

關 鍵 字 益生菌(probiotic)、乳酸菌、拮抗作用

作者簡介

一、陳聖仁

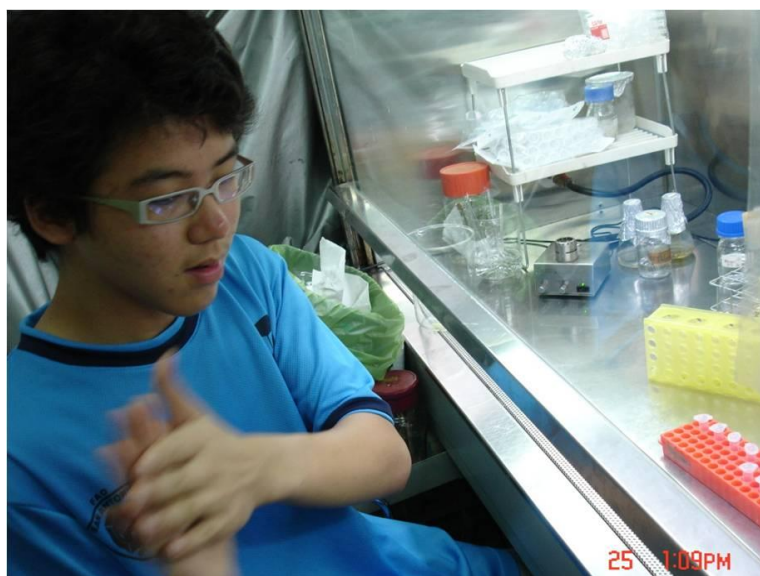


現在的我就讀明道中學數理實驗班。高中的兩大好朋友是鋼琴和生物，所以常常徘徊於蕭邦貝多芬以及林奈達爾文之間，也是這兩樣興趣兼專長讓我的高中生涯豐富了不少。

我永遠都不會忘記那十個多月的科展歲月，幾乎每天一下課就必須趕公車到實驗室，直到八點九點才能回家，然後提筆面對學校的課業。雖然苦，卻絲毫不減我對生物的興趣，如今能通過初審，參加國際科展，更是對我生物熱愛的肯定。

圖中是我，和 DNA，不過他不是華生和克利克發現的那種喔！您知道問題在哪裡嗎？

二、何庭昀



我目前就讀明道高級中學數理實驗班，除了對於科學實驗與新知抱有高度的熱忱，也積極參與各式學科與課外活動。從國中開始，便對生物產生極大的興趣，並多方攝取生物相關知識。上高中之後，積極參與生物增廣課程與實驗訓練，以實現我的目標——生物科學展覽會。即使在專題研究的一開始有一些挫折，但仍不減我對生物的興趣。經過了一年多的努力，讓我更加確信科學實驗將是我未來的目標。

三、邱鈺惠



我就讀明道高級中學數理實驗班，右手托住下巴，兩眼凝視遠方，若有所思的樣子是我最佳的生活寫照。我喜愛科學、喜愛生物，時常思索自然知識並搜尋答案。經過學校增廣班的培訓，我和兩位好友組隊投入科展，並以微生物作為研究主題。在實驗室學姊的指導，學會了 PCR、電泳等分子生物學中常見的實驗方法。因細菌微小難以掌握，過程中我們遇到了不少瓶頸，透過與老師、學長姐的密切討論，我們修改實驗步驟並不斷練習，終於有所斬獲，也因此越做越有心得。科展是我高中生涯中很重要的經驗，我很高興能將書本上的知識實際應用，這份研究報告書是我們三人熱愛生物的體現，希望評審們會喜歡。

摘要

我們從校園生態池吳郭魚的腸內挑選出二十二個菌落，並透過含 1% 碳酸鈣的 MRS 培養基篩出五株可產酸的細菌，藉由基因體定序並比對序列，我們確定篩到了四種不同的乳酸菌。分別為 *Streptococcus anginosus* MD1, *Lactobacillus casei* MD10, *Lactococcus lactis* MD14 和 *Enterococcus raffinosus* MD18。經由培養基上的拮抗圈實驗，證實了此四株乳酸菌皆具有拮抗嗜水性產氣單胞菌(*Aeromonas hydrophila*) 的能力。實際將乳酸菌和嗜水性產氣單胞菌投餵到斑馬魚幼魚時，則以 *Streptococcus anginosus* MD1 與 *Enterococcus raffinosus* MD18 有明顯的拮抗效果，其中 *Streptococcus anginosus* MD1 對斑馬魚幼魚生長影響最小且拮抗效果最久。所以，我們認為 *Enterococcus raffinosus* MD18 在未來最有發展成生物製劑的潛力，可運用於魚苗存活率的提升，代替抗生素來對抗嗜水性產氣單胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。

Abstract

Twenty-two individual colonies were isolated from *Oreochromis niloticus* collected in the ecology pond of our school. They were plated on MRS agar with 1% Calcium carbonate to distinguish the acid-producing colonies from those of others. Through nucleotide sequencing, four acid-producing species were identified, respectively *Streptococcus anginosus* MD1, *Lactobacillus casei* MD10, *Lactococcus lactis* MD14, and *Enterococcus raffinosus* MD18. It was proved that the four Lactic Acid Bacteria(LAB) strains have an antagonistic effect on fish pathogen, *Aeromonas hydrophila*, in vitro. In further experimentation in vivo, *Streptococcus anginosus* MD1 and *Enterococcus raffinosus* MD18 were found to have better inhibition against *Aeromonas hydrophila* than the other two. Among this, *Streptococcus anginosus* MD1 has the least negative influence on zebrafish and its inhibitory activity lasted for the longest time. Therefore, we are of the opinion that *Streptococcus anginosus* MD1 has potential for being made into biological agents, to enhance the survival of fish fries in pond and to perform as a substitute for antibiotics to resist *Aeromonas hydrophila*.

壹、研究動機

動物可藉由益生菌維持正常的生理機能，從生物課程—養分的攝取中，我們知道人類的腸道裡面有許多共生性乳酸菌可以抑制雜菌滋生，保持菌相的平衡，魚體內的共生關係也是如此。魚類是我們日常生活中常見的佳餚，但是許多高經濟價值魚種的魚苗易受環境影響導致存活率降低。淡水養殖魚類容易感染許多細菌性疾病，如腹水病、赤鰭病等，魚得了主要由嗜水性產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)引起的腹水病會有呼吸急促、腹部腫脹、積水等症狀，是一種致死率高的魚病。為了防止與治癒魚病，養殖業者多會在魚飼料裡加入許多抗生素，如：氯黴素、富來頓等，這些抗生素不僅會影響魚類腸內原本平衡的菌相，且經由生物累積作用放大之後，更會間接影響人體的健康，因此我們希望能找出替代抗生素的方法來防止魚病的發生。

我們先從校園生態池的吳郭魚和市場上的白鯽、吳郭魚進行實驗，比較養殖魚以及自然環境生長之吳郭魚的腸胃道菌相是否不同。我們觀察到校內生態池的吳郭魚因生態池豐富和天然的环境，以及不受到人為的影響，除了生命力和適應力都很好之外，腸胃道裡的菌相更能保持完整。我們進一步希望能從腸道中篩選出具有拮抗特定病原菌——嗜水性產氣單胞菌——的乳酸菌，並對斑馬魚幼苗實際實驗，若能以這些共生的乳酸菌來提高魚苗存活率，或許可以找出替代抗生素的方法，減緩現下抗生素濫用的問題。

貳、研究目的

(一) 從校園生態池吳郭魚的腸道取得腸內菌，進一步篩選具產酸能力的細菌

(二) 藉由 16S rDNA PCR 和基因體定序來鑑定吳郭魚腸內產酸細菌的





菌種

(三) 檢測吳郭魚腸內乳酸菌對嗜水性產氣單胞菌的拮抗作用

(四) 檢測吳郭魚腸內乳酸菌協助斑馬魚幼魚對抗嗜水性產氣單胞菌的能力

參、研究設備及器材

一、研究設備

垂直式無菌操作台		水平電泳槽		續上頁
				
圖 3-1、垂直式無菌操作台 (LS JW-5N)		圖 3-2、水平電泳槽 (BIO-RAD)		
全波長分光光度		鑄膠組		
				
圖 3-3、全波長分光光度計 (GeneQuant1300)		圖 3-4、鑄膠組		

續下頁

梯度核酸連鎖反應儀	恆溫培養箱
	
圖 3-5、梯度核酸連鎖反應儀（Veriti）	圖 3-6、恆溫培養箱（L-100）
桌上型冷凍離心機	其它器材
	剪刀 培養皿 血清瓶 微量吸管和 tip 接種環 煤氣燈 Eppendorf 三角玻棒 培養皿轉盤 錐形瓶 石英管 高壓滅菌釜 Vortex Rack 製冰機 乾浴器
圖 3-7、高速離心機（HERMLE/德 Z233MK2）	

二、實驗藥品與耗材

(一) 培養基

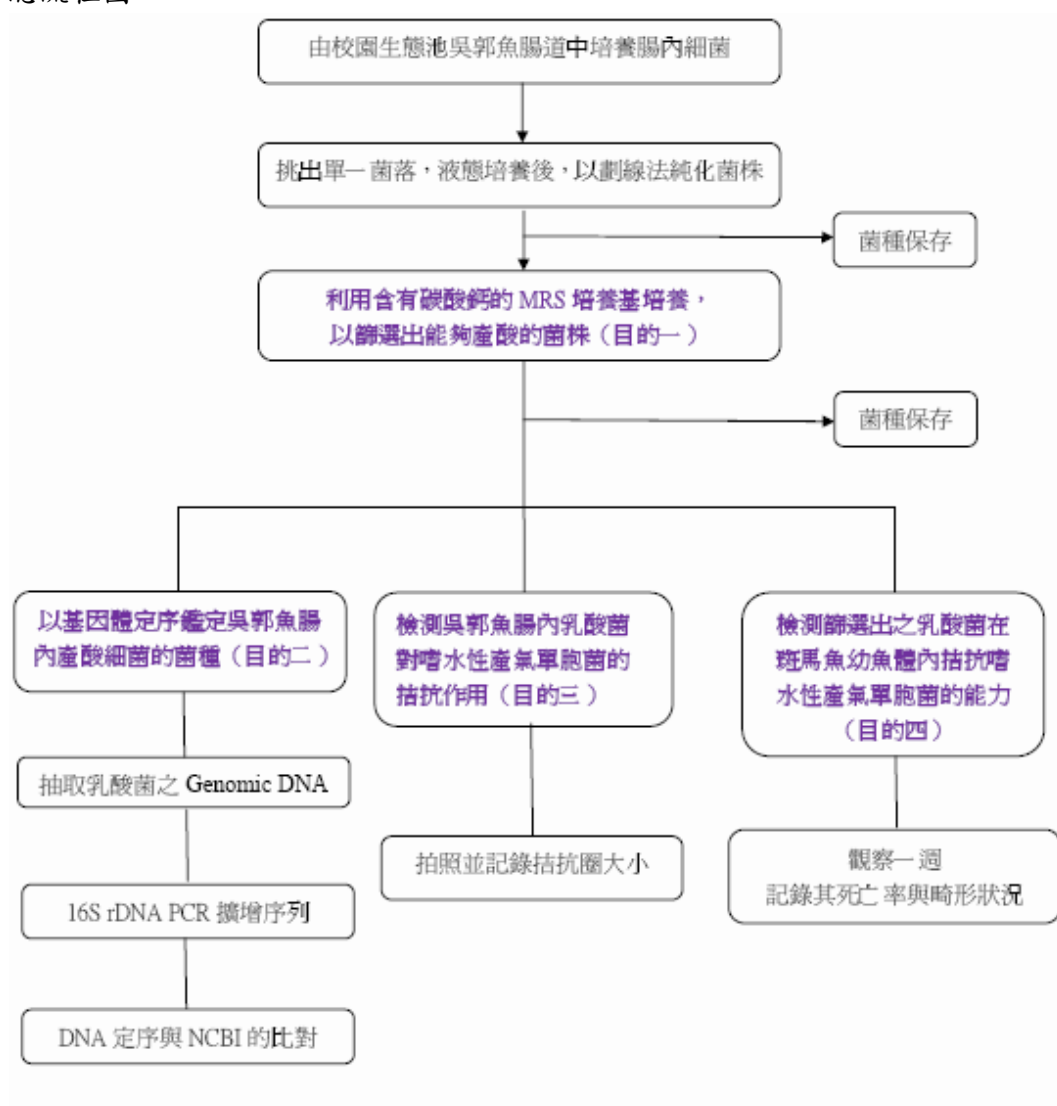
MRS broth		LB broth	
1. 配方 (每公升)		1. 配方 (每 500g)	
Proteose Peptone No.3	10.0g	Tryptone.....	200g
Beef Extract	10.0g	Yeast Extract	100g
Yeast Extract	5.0g	NaCl	200g
Dextrose	20g	2. 配法	
Polysorbate 80	1.0g	(1) 每 1L 水加入 25 g LB 粉末	
Ammonium Citrate	2.0g	(2) 以 5ml pipetman 分裝到試管	
Sodium Acetate	5.0g	(3) 蓋上試管蓋	
Magnesium	0.1g	(4) 滅菌 121 °C、1.2kg/cm ² 、20min	
Manganese Sulfate	0.05g	(5) 待冷卻後，放進無菌操作台	
Dipotassium Phosphate	2.0g		
2. 配法			
(1) 每 1L 水加入 55g MRS 粉末			
(2) 以 5ml pipetman 分裝到試管			
(3) 蓋上試管蓋			
(4) 滅菌 121 °C、1.2kg/cm ² 、15min			
(5) 待冷卻後，放進無菌操作台備用			
MRS agar		LB agar	
1.配法		1.配法	
(1) 在血清瓶裡放入 400ml 的 ddH ₂ O、22g MRS broth 粉末和 6g Agar		(1) 在血清瓶裡放入 400ml 的 ddH ₂ O 和 10g LB broth 粉末和 6g Agar	
(2) 蓋上蓋子，包上鋁箔並貼上滅菌膠帶		(2) 蓋上蓋子，包上鋁箔並貼上滅菌膠帶	
(3) 滅菌 121 °C、1.2kg/cm ² 、15min		(3) 滅菌 121 °C、1.2kg/cm ² 、20min	
(4) 放在冷水裡冷卻至約 40-50 °C		(4) 放在冷水裡冷卻至約 40-50 °C	
(5) 傾倒至塑膠培養皿，每盤約 20ml		(5) 傾倒至塑膠培養皿，每盤約 20ml	
(6) 開 UV，並且蒸發培養基的水蒸氣 30min		(6) 開 UV，並且蒸發培養基的水蒸氣 30min	
(7) 寫上日期及名稱，儲存於 4 °C 冰箱		(7) 寫上日期及名稱，儲存於 4 °C 冰箱	
含碳酸鈣之 MRS agar			
1.配法			
(1) 在血清瓶裡放入 400ml 的 ddH ₂ O、22g MRS broth 粉末、4gCaCO ₃ 粉末和 6g Agar			
(2) 其餘步驟與 MRS agar 相同			
(3) 在傾倒培養基前，須再搖晃均勻，使碳酸鈣懸浮於培養基中			

(二) 藥品

1. MRS broth	2. LB broth	3. Agar
4. Lysozyme	5. Extraction Solution	6. Proteinase K Stock Solution
7. Protein Precipitation Solution	8. Isopropanol	9. 75% Ethanol
10. Taq Polymerase	11. Taq Buffer	12. Forward Primer
13. Reverse Primer	14. dNTP	15. Agarose
16. 0.5X TAE	17. 6X dye	18. 1000bp DNA ladder
19. EtBr	20. Glycerol	21. 氯黴素(0.2µg/10ml)

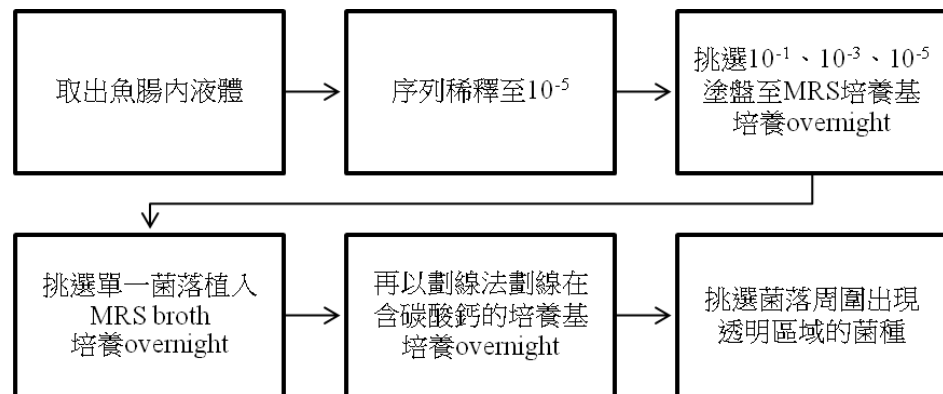
肆、實驗步驟或方法

總流程圖



一、從校園生態池吳郭魚的腸道取得腸內菌，進一步篩選具產酸能力的細菌

(一) 流程圖



(二) 原理及目的

篩選出菌種的第一步就是要從一條完整的魚中取出腸內的液體，魚腸內除了有消化中的食物和糞便之外，還有我們最大的目標——乳酸菌。取出腸液後，為了要盡量排除非乳酸菌的菌種，我們用 MRS 培養基來塗盤，再進一步用含有 1%碳酸鈣的 MRS 培養基來篩選出會產生有機酸的菌落，碳酸鈣在接觸到酸性溶液時會分解產生透明區域，最後我們挑選菌落周圍有透明區域的菌種來抽取 DNA。

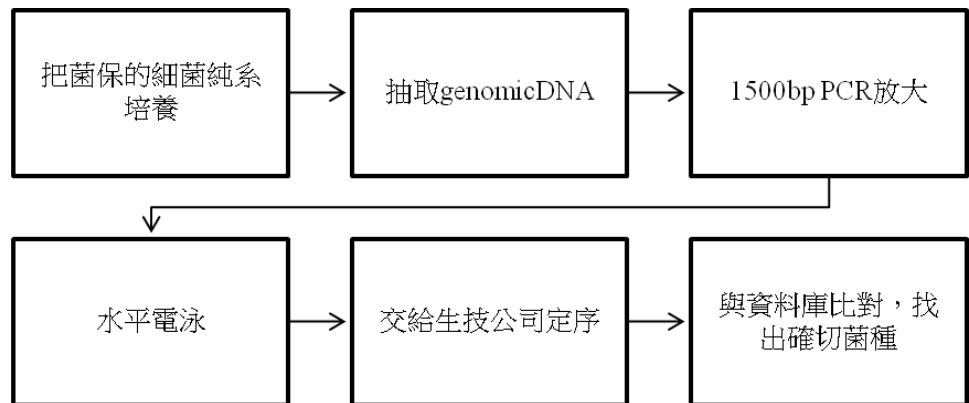
(三) 實驗操作步驟

1. 解剖魚的肚子，取出腸子並盡量維持其完整，小心不弄破
2. 清除魚的組織，並以無菌水及酒精交替沖洗魚腸表面數次殺菌
3. 移入無菌操作台
4. 以剪刀剪開腸子末端，使腸液和腸內物體自然流出
5. 取出腸液作為原始濃度，序列稀釋到 10⁻⁵ 倍並塗盤至 MRS Agar
6. 培養 overnight

7. 挑出單一菌落並植入 MRS broth
8. 培養 overnight
9. 菌保後，以劃線法劃到含有 1%碳酸鈣的 MRS Agar
10. 培養 overnight
11. 選取菌落周圍產生透明區域的菌種，每一盤挑選兩個 single colony 作為二重複，再植回 MRS broth
12. 吸取 100μl 的菌液到 100μl、50%的甘油製作甘油菌保

二、藉由 16S rDNA PCR 和基因體定序來鑑定吳郭魚腸內產酸細菌的菌種

(一) 流程圖



(二) 原理及目的

此實驗旨在取得並鑑定出腸內的乳酸菌，故抽取具產酸能力的菌種 DNA，再以 PCR 的方式來放大 16S rDNA，以便送交定序。PCR 分成三個步驟，首先在 95°C 下進行 DNA 變性 (denaturing)；第二步驟在 58°C 進行引子黏合 (annealing)；最後一步驟為 DNA 延伸 (extension)，約在 72°C 可使聚合酶開始作用，成功的完成複製。此三步驟需約進行 35 個循環，最終 DNA 會擴增為 2 的 35 次方倍。

16S rDNA 為轉錄出 16S rRNA 的基因片段。之所以選定 16S rDNA 來放大是歸因於 16S rDNA 在不同菌種之間有所差異。因此可以透過具有 16S rDNA 保守片段的引子（E8FE9 為 forward primer 和 U1510 為 reverse primer）來標記我們所要複製的基因片段，經 PCR 放大之後，就可以藉比對資料庫辨別出某個擁有特定 16S rDNA 序列的細菌種類。

在 PCR 之後，我們藉水平電泳來檢測 PCR 的產物大小。膠體電泳可根據各個大小之 DNA 片段的移動速度來將之分離。對核酸而言，因其磷酸基帶有負電荷，所以 DNA 在電場之下會移往正極。DNA 之移動速度與其大小成反比，並由 Marker 來判斷其 DNA 大小。在電泳時，於電泳槽內加入 EtBr（一種 DNA 嵌合染劑），此染劑在紫外光下可呈現顏色，再利用拍照設備照相即可得到條帶圖。

（三）實驗操作步驟

1. 活化前一步驟的菌保並培養於 MRS broth overnight
2. 於無菌操作台分裝 1500 μ l 的菌液至 eppendorf
3. 以 6000rpm 10 分鐘離心 1500 μ l 的菌液
4. 去除上清液之後加入 180 μ l 的 Lysozyme，培養在 37 oC 30 分鐘
（每隔十分鐘取出並 Vortex，使其均勻混合）
5. 加入 600 μ l 的 Extraction Solution
6. 加入 20 μ l 的 Proteinase K Stock Solution 後 Vortex
7. 放置於在 56 度乾浴器 1 至 3 小時使細胞的蛋白質完全溶解，（每隔十分鐘取出 Vortex，使其均勻混合）
8. 加入 200 μ l 的 Protein Precipitation Solution，Vortex
9. 以最高速（14000rpm）離心 10 分鐘沉降蛋白質
10. 把上清液換到新的 Eppendorf 並加入 600 μ l 的 isopropanol 上下顛

倒 Eppendorf 來均勻混合，以 10000rpm 離心 3 分鐘，移除上清液，加入 70% 乙醇清洗沉澱的 DNA

11. 再以 10000rpm 離心 3 分鐘，移除上清液，並再加入 70% 乙醇清洗一次 DNA

12. 以 10000rpm 離心 3 分鐘後移除上清液，用 pipetman 吸乾剩下的乙醇，自然風乾 10-15 分鐘

13. 加入無菌水 40 μ l 回溶 DNA。完成抽取 DNA

14. 於 eppendorf 內加入 5 μ l 10Xbuffer, 4 μ l dNTP, 1 μ l Forward primer, 1 μ l Reverse primer, 0.5 μ l Taq polymerase, Vortex 後離心

(Forward primer: E8FE9: AGAGTTGATCATGGCTCAG

Reverse primer: U1510: CGGTTACCTTGTTACGACTT)

15. 加入 2 μ l DNA, 後加水至 50 μ l, 此時需多配一管不含 DNA 之 negative control, 以確認藥品沒有被其他核酸污染

16. PCR 溫度: denaturing 為 95 $^{\circ}$ C, annealing 為 58 $^{\circ}$ C, extension 為 72 $^{\circ}$ C, cycle 35 次

17. 用錐形瓶配置 1% Agarose (1g Agarose+100ml 0.5XTAE)

18. 加熱至完全滾沸

19. 將略為冷卻的 Agarose 倒入鑄膠模，插入齒梳，用 tip 將氣泡趕往旁邊

20. 放置約 30 分鐘使其完全凝固

21. 將齒梳拔出，去除殘膠，檢查有無破裂

22. 浸在含 1L 0.5XTAE 和 2.5 μ l EtBr 的水平電泳槽

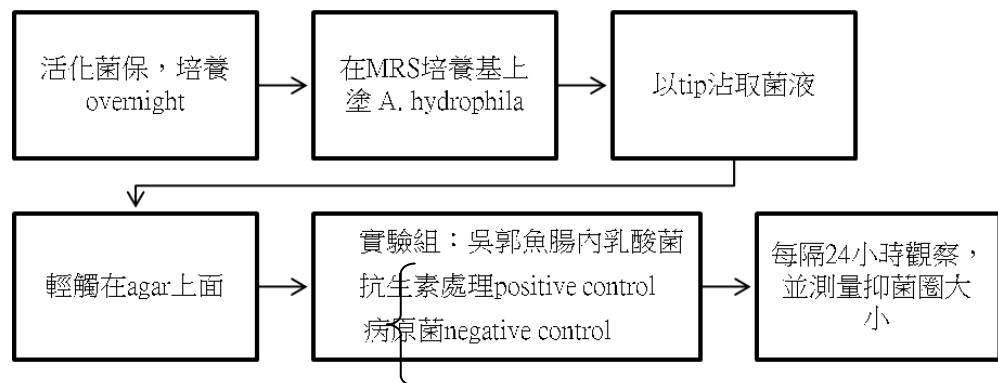
23. 將 0.5 μ l 6xDye 與 1.5 μ l DNA 樣品 pipetting 均勻混合，滴到膠片之洞中

24. 把 1 μ l Marker 滴在膠左右兩端的孔洞中

25. 跑電泳 100V，25 分鐘
26. 將膠片移至 UV，拍照並觀察結果
27. 將成功的 sample 交給生技公司定序

三、檢測吳郭魚腸內乳酸菌對嗜水性產氣單胞菌的拮抗作用

(一) 流程圖



(二) 原理及目的

為了知道培養出的乳酸菌是否具有拮抗 *Aeromonas hydrophila* 的能力，我們選擇了氯黴素做為實驗的 positive control，氯黴素為一種常用來治療魚病的抗生素。在塗滿 *Aeromonas hydrophila* 的 MRS 上以 tip 點上少許菌液。最後藉由記錄其拮抗圈的直徑的縮小情形來了解其拮抗失效的期限。微生物的拮抗作用分為：競爭作用、抗生作用、重複寄生、捕食作用、靜菌作用等。經由拮抗作用，較強勢的一方便會使另一方停止生長或死亡。如果乳酸菌為強勢的一方，便會形成抑菌圈；反之則否。

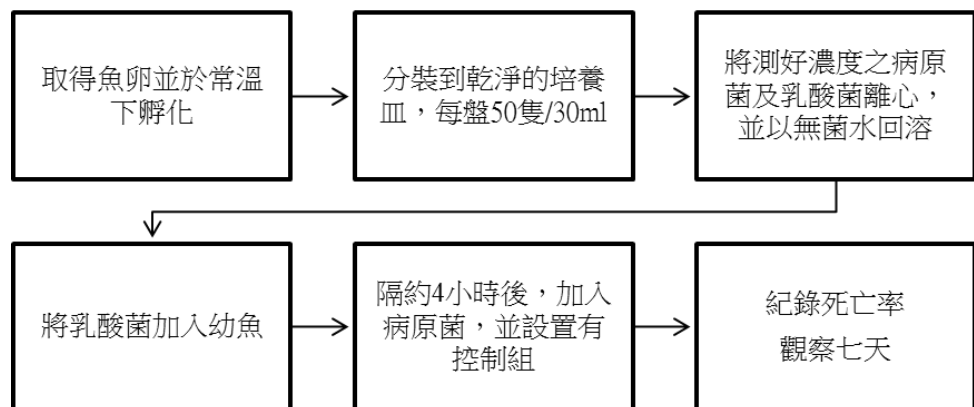
(三) 實驗操作步驟

1. 先將 *A. hydrophila* 及乳酸菌分別放在 LB 培養液和 MRS 培養液中，皆以 37°C 培養 24 小時
2. 測定 *A. hydrophila* 的 OD 值並記錄下來
3. 將 100 μ l 的 *A. hydrophila* 塗盤於 MRS 培養基

4. 以 tip 沾取液態的菌液
5. 再以 tip 輕觸培養基的中央
6. 另有一盤只塗上 *A. hydrophila* 菌液作為 negative control
7. 另有一盤中心點上抗生素作為 positive control
8. 每隔 24 小時紀錄抑菌圈直徑，並比較其拮抗能力

四、檢測吳郭魚腸內乳酸菌在斑馬魚幼魚體內拮抗嗜水性產氣單胞菌的能力

(一) 流程圖



(二) 原理及目的

在培養基上看到細菌的拮抗之後，接下來要證明乳酸菌在斑馬魚身上內仍具有拮抗的能力。我們委託專門研究斑馬魚的實驗室幫我們生產魚卵，再自行孵化。分裝到培養皿之後，我們先在水中放入一定量的乳酸菌，靜置約四小時使其在魚體內建立起菌落，四小時後，在水中放下病原菌 *A. hydrophila*，每隔 24 小時觀察並記錄死亡率一次，同時以解剖顯微鏡觀察病徵，包括心包膜腫大、脊椎彎曲、腹水，甚至死亡，總共觀察 7 天，因為孵化一週內的斑馬魚尚可以依賴自身卵黃囊內的養分存活，故不考慮飼料餵食問題。另外我們也有只放入乳酸菌的組別來對照其死

亡情形。

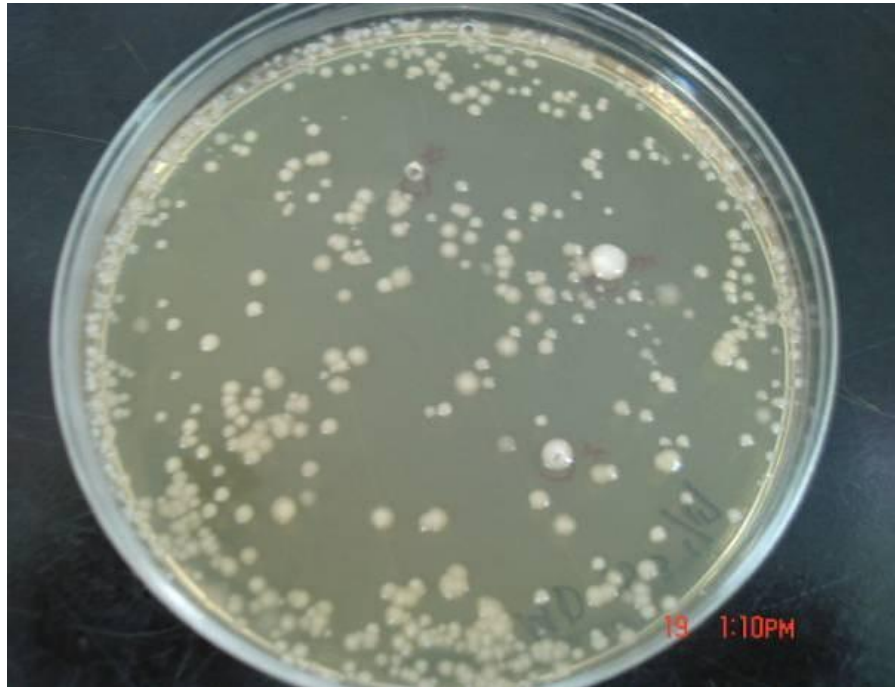
(三) 實驗操作步驟

1. 孵化魚卵之後，以滴管吸除卵殼，並在無菌操作台外以無菌水清洗三次
2. 移入無菌操作台，再以無菌水清洗三次
3. 分裝到培養皿中，並固定每一盤的水量（30ml）及魚的數量（50 隻／盤）
4. 吸除 30 μ l 的水，並加入 30 μ l、OD0.6 的乳酸菌，靜置四小時
5. 吸除 30 μ l 的水，再加入 30 μ l、OD0.6 的病原菌，
6. 加上蓋子後，移出無菌操作台
7. 每隔 24 小時記錄死亡數

伍、研究結果

一、從校園生態池吳郭魚的腸道取得腸內菌，進一步篩選具產酸能力的細菌

(一) 吳郭魚腸液在 MRS 培養下之腸內菌相



圖一 吳郭魚腸液稀釋成 10^{-3} 倍得到之菌相

由圖一觀察菌落外觀、顏色、大小，我們挑選出 22 個單一菌落，編號 1~22，以液態培養於 MRS broth，另外進行菌種保存。

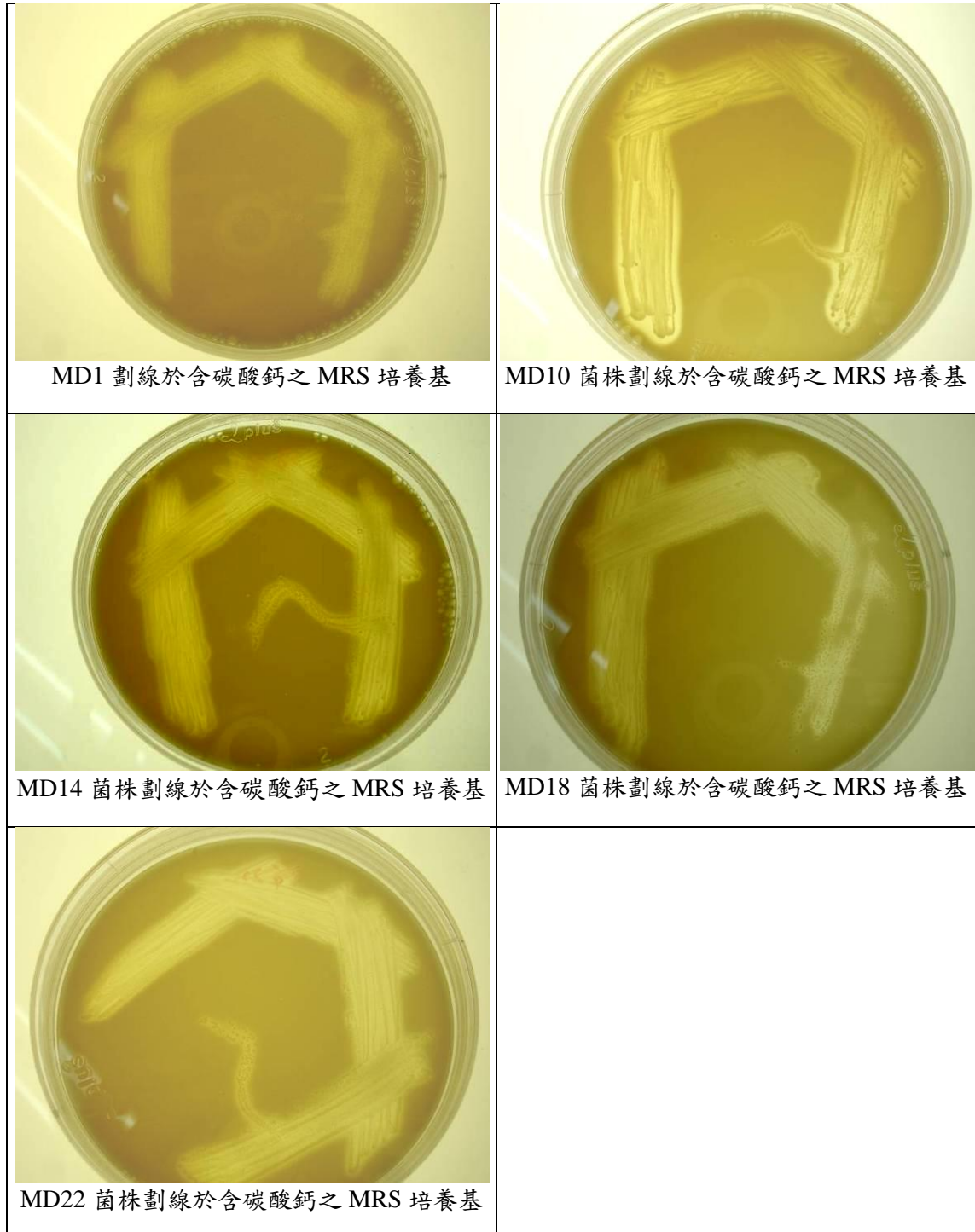
(二) 由吳郭魚腸內細菌中篩選出能產生有機酸的細菌

我們將編號 1~22 的菌株，以劃線法培養在含有 1% 碳酸鈣的 MRS 培養基一天，此培養基為米色混濁狀，若在菌落周圍產生透明區域，則表示該株細菌產生的有機酸溶解了 MRS 裡懸浮的碳酸鈣，因此得以篩選出具有產酸能力的細菌。

表一、利用 1% 碳酸鈣 MRS agar，培養吳郭魚腸內菌的情形（+者為菌落周圍產生透明環，-者為菌落周圍沒有產生透明環）

菌株	編號 1	編號 2	編號 3	編號 4	編號 5	編號 6	編號 7	編號 8
透明環	+	-	-	-	-	-	-	-
菌株	編號 9	編號 10	編號 11	編號 12	編號 13	編號 14	編號 15	編號 16
透明環	-	+	-	-	-	+	-	-
菌株	編號 17	編號 18	編號 19	編號 20	編號 21	編號 22		
透明環	-	+	-	-	-	+		

由表一可知由生態池吳郭魚腸道所篩出的 22 種腸內菌中，編號 1、10、14、18、22 等五株細菌可產生有機酸溶解培養基中的碳酸鈣，而在菌落周圍產生透明環（如圖二）我們將此五株細菌標示為 MD1、MD10、MD14、MD18、MD22。



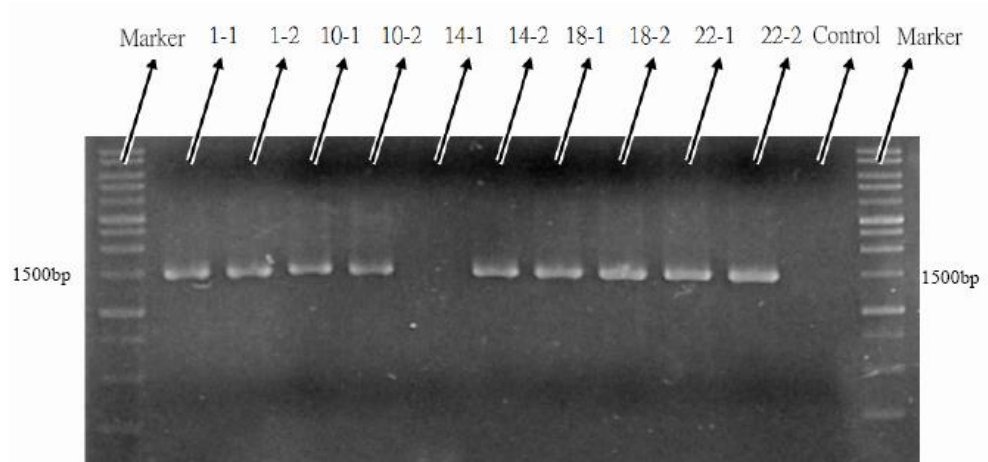
圖二 在含碳酸鈣之 MRS 培養基篩選吳郭魚腸內可產酸的菌株

由圖二可明顯觀察到 MD1、MD10、MD14、MD18、MD22 等五株細菌，菌落周圍有透明區域的產生，我們進一步由此培養基上挑出單一菌落進行液態培養和菌種保存，並進行接下來的實驗。

二、藉由 16S rDNA PCR 和基因體定序來鑑定吳郭魚腸內產酸細菌的菌種

(一) 16S rDNA PCR 後的水平電泳

為避免自塗盤後挑取的菌落並非純菌，劃線之後可能產生兩種以上的細菌，我們每一盤的菌落都挑選兩個菌落為代表，理想情形為此二重複的比對名稱相同。由右數來第二行為沒有加入 DNA 的 negative control 組，左右兩旁則為 1000bp 的 marker，藉以對照大小。



圖三 產酸細菌的 DNA 經 PCR 放大後的水平電泳條帶圖

電泳的結果顯示 DNA 大小符合兩 primer 間的距離 1500bp，且 negative control 沒有條帶，表示實驗的藥品並無受到其他核酸汙染，而 14-1 的部分並沒有條帶，推測為 DNA 樣品沒有正確的加入 tube 內，因此沒有 14-1 的定序資料。

(二) 吳郭魚腸內產酸細菌的基因體定序之 DNA 序列

表二 吳郭魚腸內產酸細菌的基因體定序資料

MD1-1 菌株	MD1-2 菌株
<p>ORIGIN</p> <p>1 gagtttgatc ctggctcagg acgaacgctg gggcgctgcc taatacatgc aagtaggaacg 61 cacagtttat acogtagctt gctacacocat agactgtgag ttgogaacgg gtgagtaacg 121 cgtagtgtaac ctgcctatta gagggggata actatttgaa acgatagcta ataccgcata 181 acagtatgta acacatgtga gatgcttgaa agatgcaatt gcatcgtaga tagatggacc 241 tgcgttgtag taactagtga gtagggtaat ggctactacta ggcgacgata catagccgac 301 ctgagagggt gatccggcac actgggaactg agacacggcc cagacttcta cgggagcgacg 361 cagtagggaa ttctcggcaa tggggggaaac cctgacggag caacgcgcgc tgagtgaaga 421 aggttttcgg atctgaaagc tctgttggtta aggaagaacg agtgtgaga ttgaaagtct 481 atactgtgac ggtacttaac cagaaaggga cggctaacta cgtgccagca gccgcggttaa 541 taactagctc cagagctgtg tccgatttta ttggcgttaa agcagcgcca gccggttaga 601 aaagctctgaa gtgaaggcca gtggctcaac cattgtaggc tttagaaact gtttaacttg 661 agtgcaaga ggagagtggt aattccatgt gtacggtga atgcgtaga tatatggagg 721 aacacccgtg gcgaagcgcg ctctctgttc tgttaactgac gtgaggtctc gaacgcgttg 781 ggagcgaa ca gattagata cctctgtagt ccacgcgcta aacgtatggt gctagtggtt 841 agtctcttc cggacttagt tgcgcagct aacgacttaa gcaactccgc tgggagtagc 901 gacgcgaag ttgaactca aaggaattga cggggggccc cacaagcggt ggagcatgtg 961 gtttaattcg aagcaacgcg agaaacttta ccaggtcttg acatcccgat gctatttcta 1021 gagtaggaa gttttcttgg aacatcggtg acaggtgttg catggttgc tgcacgtcgt 1081 gtgctgaggt aagcaacgcg tcctccgcaac gagcgcaacc ctatttgtaa ttgcccatca 1141 ttgagttggg caactctagc agactgcggg taataaacgc gaggaaggtt gggatgagct 1201 caaatcatca tgcctcttat gactctggct acacacgtgc tacaatggct ggtacaacga 1261 gtgcgaagcc ggtgagcca agctaacttc tgaagccag ttctcatgtc gatbtaggc 1321 tgcactctgc ctacatgcgc tcggaatcgc tagtaatgc ggaatcagac gccgcggtga 1381 atagcttccc ggcctctgtg cacacgcgcc ctacacacac gagagtttgt aacaccggaa 1441 gctgtgaggt tggcctaag gagccagcgc cctaaagttg gatagatgt ttgggttgaa 1501 tggtaacag gtacgctgat cgggaaggtc ggctgatgca cctctctt</p>	<p>ORIGIN</p> <p>1 gaagaaacgt gggcgctgct ctaatacatg caagtaggac gcacagttta taocgtagct 61 tgctacacca tagactgtga gtggcgaaac gttgagtaac cgttaggtaa cctgctattt 121 agagggggga aactattgga aacgatagct aataccgat aacagtatgt aacacatggt 181 agatgcttga aagatgcaat tgcactgcta gtatagtgac ctgctgtgta ttacttagta 241 ggttaggttaa aggcctacat aggcacagat acatagccga cctgagaggg tgatcggcca 301 cactgggact gagacaagcc caagactctc acgggaggca gcagtaggga atcttcggca 361 atggggggaa cctgaccca gcaacgcgcg gtgagtgaag aaggttttgc gatcgtaaag 421 ctctgttgtt aaggaagaa gagtgtgaga atggaaagt catactgtga cgtactctaa 481 ccagaaaggg acgctaact acgtgccagc agccgcggtg atactaggt ccgcagcgtt 541 gtccgatttt attggcgcta aagcagcgcg agccggttag aaaagtctga agtgaaggc 601 agtggtctca ccatgtagg ctttggaaac tgtttaactt gactgcagaa ggggagagtg 661 gaattccatg tgtagcgttg aaatgcgtag atatatggag gaacacgggt ggcgaagcg 721 gctctctggt ctgtaactga cgtcaggtg cgaaagcgtg gggagcgaac aggtatgat 781 acctcgttag tcaacgcgct aaactgatg tcttaggtgt tagtctctt ccggactta 841 gtgcgcagc taacgactta agactccgc cttgggagta gcacgcgaag gttgaaactc 901 aaaggaattg acggggggcc gcaacagcgg tggagcatgt ggttaattc gaagcaacgc 961 gaagaacctt accaggtctt gcaatccgga tgcattttct agagatagga agtttcttg 1021 gaactcgtg gacagtggtt gcatgtgtg cgtcagctcg tctgtgaga tgttggtgta 1081 agtcccgcaa cagagccgaac cttatttgtt agttggcatc attgagttg gcaacttagc 1141 gagactgcg gtaataaacc ggaagaaagt gggtagagc tcaaatcatc atgcocctta 1201 tgaactgggc tacacaagtg ctacaatggt gttgaaacgc agtcgcaagc cgtgacggc 1261 aagctaactc ctgaagacca gtctcagtc ggtttagtag ctgcaactcg ctacactgat 1321 gtccgaatcg ctagttaatg cggatagcca cgcgcggtg ataacgtctc cgggctctga 1381 acacacccgc cgtcaaccca cagagttgtg taacaccgca agctcgtgag gtaacggtaa 1441 ggagccagcc cctaaaggtg gtagatagta ttggggtg</p>
MD 10-1 菌株	MD 10-2 菌株
<p>ORIGIN</p> <p>1 gggcgctgct ctaatacatg caagtgaaac gagttctcgt tgatgatcgg tgcttgcacc 61 gagattcaac atggaacgag tggcggaagg gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcccctaa 121 gtgggggata acatttgaa acagatgcta ataccgcta gatccaaaga ccgcattggt 181 cttgctgtaa agatggcgta agctactcgt tttgatgga cccgcggcgt attagctagt 241 tggtaggata atggctcaac aaggcgatga taactgagcc aactgagagg ttgactggcc 301 acattgggac tgagacagc ccacaaatc tcaggagagg agcagtaggg aattctccac 361 aatgagcca agtctgatg agcaacggcg cgtgagga gaaggtcttc ggtctgtaa 421 actctgtgtg tgagagaaga tggtcggcag agtaactgtt gtcgcgtgta cgttatccaa 481 ccagaagaac accgttaact acgtgcagc agccgcgcta atactaggtt ggcaagcgtt 541 atccgggatt tattygctgt aaagcgagc cagcggtttt tttaagctg atgtgaaagc 601 cctcggtta acggaggaag cgcactgcaa actgggaac ttgagtcag aagagacag 661 tgaactcca ttgttagcgg tgaattcgtt agatatatg aagaacacca gtggcgaaag 721 cggctgtctg gtcgttaact gacgctgagg ctgcaagca ttggtagca acagattag 781 ataccctgtt agctactgoc gtaaacgtag aatgcaggtt atctggaggt ttccgcctt 841 cagtcgcga gctaacgat taagcattcc gctcggggag taacgacgca aggttgaac 901 tcaagggaat tgaagggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggttaact tgaagcaac 961 gcgaagaacc ttacaggttc ttgacattct ttgatacact gagagatcag gtttccctt 1021 cgggggcaaa atgacaggtt gtgcattggt tgcgtcagct cgtgtcgtga gatgttggt 1081 taagtcocgc aacgagcgca acccttatga ctagtgcga gaatttagtt gggaactcta 1141 gtaagactcg cgtgacaaa ccggagggaag gttgggatga cgtcaactca tcatgcctt 1201 tatgactcgg gctacacagc tgcataactg gatgtgaca cgaattgga gccgcgagg 1261 tcaagctaat ctcttaagca cattctcagt tcgaactgta ggtgaaact cgtcacaag 1321 aagtcggaat cgtagttaac cgcgagtaac cagccgcgga tgaatacgtt cccggcctt 1381 gtacacacgc cccgtcacac catgagagtt tgaataccgc gaagccggtg gcgttaacct 1441 tttagggagc gagcgtctta agtggggaca aatgattagg gtgaa</p>	<p>ORIGIN</p> <p>1 gggcgctgct ctaatacatg caagtgaaac gagttctcgt tgatgatcgg tgcttgcacc 61 gagattcaac atggaacgag tggcggaagg gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcccctaa 121 gtgggggata acatttgaa acagatgcta ataccgcta gatccaaaga ccgcattggt 181 cttgctgtaa agatggcgta agctactcgt tttgatgga cccgcggcgt attagctagt 241 tggtaggata atggctcaac aaggcgatga taactgagcc aactgagagg ttgactggcc 301 acattgggac tgagacagc ccacaaatc tcaggagagg agcagtaggg aattctccac 361 aatgagcca agtctgatg agcaacggcg cgtgagga gaaggtcttc ggtctgtaa 421 actctgtgtg tgagagaaga tggtcggcag agtaactgtt gtcgcgtgta cgttatccaa 481 ccagaagaac accgttaact acgtgcagc agccgcgcta atactaggtt ggcaagcgtt 541 atccgggatt tattygctgt aaagcgagc cagcggtttt tttaagctg atgtgaaagc 601 cctcggtta acggaggaag cgcactgcaa actgggaac ttgagtcag aagagacag 661 tgaactcca ttgttagcgg tgaattcgtt agatatatg aagaacacca gtggcgaaag 721 cggctgtctg gtcgttaact gacgctgagg cgtcagagca ttggtagca acagattag 781 ataccctgtt agctactgoc gtaaacgtag aatgcaggtt atctggaggt ttccgcctt 841 cagtcgcga gctaacgat taagcattcc gctcggggag taacgacgca aggttgaac 901 tcaagggaat tgaagggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggttaact tgaagcaac 961 gcgaagaacc ttacaggttc ttgacattct ttgatacact gagagatcag gtttccctt 1021 cgggggcaaa atgacaggtt gtgcattggt tgcgtcagct cgtgtcgtga gatgttggt 1081 taagtcocgc aacgagcgca acccttatga ctagtgcga gaatttagtt gggaactcta 1141 gtaagactcg cgtgacaaa ccggagggaag gttgggatga cgtcaactca tcatgcctt 1201 tatgactcgg gctacacagc tgcataactg gatgtgaca cgaattgga gccgcgagg 1261 tcaagctaat ctcttaagca cattctcagt tcgaactgta ggtgaaact cgtcacaag 1321 aagtcggaat cgtagttaac cgcgagtaac cagccgcgga tgaatacgtt cccggcctt 1381 gtacacacgc cccgtcacac catgagagtt tgaataccgc gaagccggtg gcgttaacct 1441 tttagggagc gagcgtctta agtggggaca aatgattagg gtgaa</p>
MD 14-2 菌株	
<p>ORIGIN</p> <p>1 cgcagctata atgcagttga ggcgtgaggt tggtagctgt accaactgga tgagcagcgc 61 acgggtgaggt aacgcgtggg gaatctgcct tttagcgggg gacaacattt ggaaacgaa 121 gctaataacc cataaaaaact ttaaacacaa gttttaagtt tgaaagatgc aattgcatc 181 ctcaaaagatg atccccgctt gtattagcta gttggtgagg taaaggctca ccaaggcgat 241 gatacatagc cgacctgaga gggtagatcg ccacattggg actgagacac ggccccaaac 301 cctacgggag gcagcagtag ggaattcttc gcaatggagc aaagtctgac cgagcaacgc 361 cgcgtgagtg aagaaggttt tcggatcgta aaactctggt ggtagagaag aacgcttggt 421 agagtggaaa gctcatcaag tgacggtaac taccagaaa gggacggcta actacgtgc 481 agcagccgcg gtaatacgtg ggtcccgagc gttgtccgga tttattgggg gtaaagcga 541 cgcaggtggt ttattaaagt tgggtgtaaaa ggcaggtggt caaccattgt atgcattg 601 aactggtaga cttgagtgca ggagaggaga gtggaattcc atgtgtagcg gtgaaatgc 661 tagatatatg gaggaacacc ggtgcgaaa gcggtctctt ggccgtgtaac tgacactga 721 gctcgaaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaaacga 781 gagtgtctaga ttaggggagc taaaagttct ctgtatcgca gctaacgcaa taagcaactc 841 gcctggggag tacgaccgca aggttgaaac tcaaaggaa tgacgggggc ccgcacaag 901 ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatac 961 cgtgctattc ctagagatag gaagttcctt cgggacacgg gatacaggtg gtgcattggt 1021 gtctgcagct cgtgtcgtga gatgtgggt taagtccgc aacgagcgca acccctatt 1081 ttagtgtcca tcattaagtt gggcactcta acgagactgc cgtgtataaa ccggaggga 1141 gtggggatga cgtcaaatca tcatgcccc tatgacctgg gctacacacg tgctacaat 1201 gatgtctaca cagctcgca gacagtgat tttagctaact ctcttaaaac cattctcag 1261 tcggattgta ggctgcaact cgctacatg aagtcggaat cgctagtaat cgcggatca 1321 cagcccgcg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacacgc cccgtcacac cagcggagtt 1381 gggagtaccc gaagttaggt gcctaaccgc aaggaggggc ctcttaagta gacca</p>	

MD 18-1 菌株	MD 18-2 菌株
<p>ORIGIN</p> <pre> 1 gacgaacgct ggccggctgc ctaatacatg caagtgcgaac gcnntttntt tcacoggagc 61 ttgtctccac gaagaagaag gactggcgaa cgggtgagta acacgtgggt aacctgccca 121 tcagaagggy ataacacttg gaaacaggty ctaatacogt ataacatag aaacogcatg 181 gtttctattt naaaggcgct ttgtgctcac tgatggatgg aacocggtyg catagctag 241 ttggtgaggt aacggctcac caaggcaacg atgcatagcc gacotgagag ggtgatcgcc 301 cacattggga ctgagacacg gcccaaacct ctacgggagc cagcagtagg gaatcttcgg 361 caatggacga aagnttgacc gagcaacgcc gogtgagtga agaaggtttt cggatcgtaa 421 aactctgttg tttagagaaga acaaggatga gactagaatg ttcatccott gacggtatct 481 aaccagaaga ccacggtctaa ctacgtgcca gcaagccggc taatacgtag gtggcaagcg 541 ttgtccggat ttattggggc taaagcgagc gcaaggcggt tcttaagtct gatgtgaaag 601 cccocggctc aacoggggag ggtcatgga aactgggaaa cttgagtcca gaagaggaga 661 gtggaaatcc atgtgtagcg gtgaaatgoc tagatataat gaggaaacac agtggcgaa 721 goggtctctt ggtctgtaac tgacgtcgag gctcgaaagc gtggggagca aacaggatta 781 gataccctgg tagtccacgc cgttaaagat gactgctaa gttgtggagg ttccgcct 841 tcaatgtctg agttaaagca ttaagcactc cgcctgggga gtacgacgcg aaggttgaaa 901 ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcgcacaag cgggtggagca tgggttttaa ttcgaaagca 961 cgggaagaa cttacacagt cttgacatcc ttgacacact ctagagatag agcttccctc 1021 tcggggcgaa agtgacaggt ggtgcatggt ttgtctcagc ttgtctcgtg agatgttggg 1081 ttaagtcccg caacgagcgc aacccctatt gttagtgcgc atcatttagt tgggcaactc 1141 agcgagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc 1201 ttatgacctg ggctacacac gtgtctacaat ggggaagtaca acgagtgcgc aagtgcggag 1261 gctaaagtaa ttctctaaag ttctgtctag ttggagtgtt aggttgcaac tgcgttaact 1321 gaagcgggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcaagccggc gtgaataagt tcccgggcct 1381 tgtacacacc gccgtgaca ccacgagagt ttgtacaccc cgaagtccgt gaggttaact 1441 tttagagcca gccgcctaag gtgggataga tgattggggg gaag </pre>	<p>ORIGIN</p> <pre> 1 gacgaacgct ggccggctgc ctaatacatg caagtgcgaac gcnntttntt tcacoggagc 61 ttgtctccac gaagaagaag gactggcgaa cgggtgagta acacgtgggt aacctgccca 121 tcagaagggy ataacacttg gaaacaggty ctaatacogt ataacatag aaacogcatg 181 gtttctattt naaaggcgct ttgtgctcac tgatggatgg aacocggtyg catagctag 241 ttggtgaggt aacggctcac caaggcaacg atgcatagcc gacotgagag ggtgatcgcc 301 cacattggga ctgagacacg gcccaaacct ctacgggagc cagcagtagg gaatcttcgg 361 caatggacga aagnttgacc gagcaacgcc gogtgagtga agaaggtttt cggatcgtaa 421 aactctgttg tttagagaaga acaaggatga gactagaatg ttcatccott gacggtatct 481 aaccagaaga ccacggtctaa ctacgtgcca gcaagccggc taatacgtag gtggcaagcg 541 ttgtccggat ttattggggc taaagcgagc gcaaggcggt tcttaagtct gatgtgaaag 601 cccocggctc aacoggggag ggtcatgga aactgggaaa cttgagtcca gaagaggaga 661 gtggaaatcc atgtgtagcg gtgaaatgoc tagatataat gaggaaacac agtggcgaa 721 goggtctctt ggtctgtaac tgacgtcgag gctcgaaagc gtggggagca aacaggatta 781 gataccctgg tagtccacgc cgttaaagat gactgctaa gttgtggagg ttccgcct 841 tcaatgtctg agttaaagca ttaagcactc cgcctgggga gtacgacgcg aaggttgaaa 901 ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcgcacaag cgggtggagca tgggttttaa ttcgaaagca 961 cgggaagaa cttacacagt cttgacatcc ttgacacact ctagagatag agcttccctc 1021 tcggggcgaa agtgacaggt ggtgcatggt ttgtctcagc ttgtctcgtg agatgttggg 1081 ttaagtcccg caacgagcgc aacccctatt gttagtgcgc atcatttagt tgggcaactc 1141 agcgagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc 1201 ttatgacctg ggctacacac gtgtctacaat ggggaagtaca acgagtgcgc aagtgcggag 1261 gctaaagtaa ttctctaaag ttctgtctag ttggagtgtt aggttgcaac tgcgttaact 1321 gaagcgggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcaagccggc gtgaataagt tcccgggcct 1381 tgtacacacc gccgtgaca ccacgagagt ttgtacaccc cgaagtccgt gaggttaact 1441 tttagagcca gccgcctaag gtgggataga tgattggggg gaag </pre>
MD 22-1 菌株	MD 22-2 菌株
<p>ORIGIN</p> <pre> 1 gacgaacgct ggccggctgc ctaatacatg caagtgcgaac gcnntttntt tcacoggagc 61 ttgtctccac gaagaagaag gactggcgaa cgggtgagta acacgtgggt aacctgccca 121 tcagaagggy ataacacttg gaaacaggty ctaatacogt ataacatag aaacogcatg 181 gtttctattt naaaggcgct ttgtgctcac tgatggatgg aacocggtyg catagctag 241 ttggtgaggt aacggctcac caaggcaacg atgcatagcc gacotgagag ggtgatcgcc 301 cacattggga ctgagacacg gcccaaacct ctacgggagc cagcagtagg gaatcttcgg 361 caatggacga aagnttgacc gagcaacgcc gogtgagtga agaaggtttt cggatcgtaa 421 aactctgttg tttagagaaga acaaggatga gactagaatg ttcatccott gacggtatct 481 aaccagaaga ccacggtctaa ctacgtgcca gcaagccggc taatacgtag gtggcaagcg 541 ttgtccggat ttattggggc taaagcgagc gcaaggcggt tcttaagtct gatgtgaaag 601 cccocggctc aacoggggag ggtcatgga aactgggaaa cttgagtcca gaagaggaga 661 gtggaaatcc atgtgtagcg gtgaaatgoc tagatataat gaggaaacac agtggcgaa 721 goggtctctt ggtctgtaac tgacgtcgag gctcgaaagc gtggggagca aacaggatta 781 gataccctgg tagtccacgc cgttaaagat gactgctaa gttgtggagg ttccgcct 841 tcaatgtctg agttaaagca ttaagcactc cgcctgggga gtacgacgcg aaggttgaaa 901 ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcgcacaag cgggtggagca tgggttttaa ttcgaaagca 961 cgggaagaa cttacacagt cttgacatcc ttgacacact ctagagatag agcttccctc 1021 tcggggcgaa agtgacaggt ggtgcatggt ttgtctcagc ttgtctcgtg agatgttggg 1081 ttaagtcccg caacgagcgc aacccctatt gttagtgcgc atcatttagt tgggcaactc 1141 agcgagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc 1201 ttatgacctg ggctacacac gtgtctacaat ggggaagtaca acgagtgcgc aagtgcggag 1261 gctaaagtaa ttctctaaag ttctgtctag ttggagtgtt aggttgcaac tgcgttaact 1321 gaagcgggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcaagccggc gtgaataagt tcccgggcct 1381 tgtacacacc gccgtgaca ccacgagagt ttgtacaccc cgaagtccgt gaggttaact 1441 tttagagcca gccgcctaag gtgggataga tgattggggg gaag </pre>	<p>ORIGIN</p> <pre> 1 gacgaacgct ggccggctgc ctaatacatg caagtgcgaac gcnntttntt tcacoggagc 61 ttgtctccac gaagaagaag gactggcgaa cgggtgagta acacgtgggt aacctgccca 121 tcagaagggy ataacacttg gaaacaggty ctaatacogt ataacatag aaacogcatg 181 gtttctattt naaaggcgct ttgtgctcac tgatggatgg aacocggtyg catagctag 241 ttggtgaggt aacggctcac caaggcaacg atgcatagcc gacotgagag ggtgatcgcc 301 cacattggga ctgagacacg gcccaaacct ctacgggagc cagcagtagg gaatcttcgg 361 caatggacga aagnttgacc gagcaacgcc gogtgagtga agaaggtttt cggatcgtaa 421 aactctgttg tttagagaaga acaaggatga gactagaatg ttcatccott gacggtatct 481 aaccagaaga ccacggtctaa ctacgtgcca gcaagccggc gtgataatg gtggcaagcg 541 ttgtccggat ttattggggc taaagcgagc gcaaggcggt tcttaagtct gatgtgaaag 601 cccocggctc aacoggggag ggtcatgga aactgggaaa cttgagtcca gaagaggaga 661 gtggaaatcc atgtgtagcg gtgaaatgoc tagatataat gaggaaacac agtggcgaa 721 goggtctctt ggtctgtaac tgacgtcgag gctcgaaagc gtggggagca aacaggatta 781 gataccctgg tagtccacgc cgttaaagat gactgctaa gttgtggagg ttccgcct 841 tcaatgtctg agttaaagca ttaagcactc cgcctgggga gtacgacgcg aaggttgaaa 901 ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcgcacaag cgggtggagca tgggttttaa ttcgaaagca 961 cgggaagaa cttacacagt cttgacatcc ttgacacact ctagagatag agcttccctc 1021 tcggggcgaa agtgacaggt ggtgcatggt ttgtctcagc ttgtctcgtg agatgttggg 1081 ttaagtcccg caacgagcgc aacccctatt gttagtgcgc atcatttagt tgggcaactc 1141 agcgagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc 1201 ttatgacctg ggctacacac gtgtctacaat ggggaagtaca acgagtgcgc aagtgcggag 1261 gctaaagtaa ttctctaaag ttctgtctag ttggagtgtt aggttgcaac tgcgttaact 1321 gaagcgggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcaagccggc gtgaataagt tcccgggcct 1381 tgtacacacc gccgtgaca ccacgagagt ttgtacaccc cgaagtccgt gaggttaact 1441 tttagagcca gccgcctaag gtgggataga tgattggggg gaag </pre>

表三 NCBI Blast Nucleotide collection 比對出的菌種結果

Number	Strain	Identities	Gaps
MD 1_1	Streptococcus sp. 2397 16S ribosomal RNA gene	1023/1024 (99%)	1/1024 (0%)
MD 1_2	Streptococcus sp. 2397 16S ribosomal RNA gene	1042/1043 (99%)	1/1043 (0%)
MD 10_1	Lactobacillus casei BD-II complete genome	1029/1033 (99%)	4/1033 (0%)
MD 10_2	Lactobacillus casei BD-II complete genome	1070/1089 (98%)	17/1089 (2%)
MD 14_2	Lactococcus lactis strain LC 16S ribosomal RNA gene	1035/1037 (99%)	2/1037 (0%)
MD 18_1	Enterococcus raffinosus gene for 16S rRNA	1072/1079 (99%)	6/1079 (1%)
MD 18_2	Enterococcus raffinosus gene for 16S rRNA	1046/1046 (100%)	0/1046 (0%)
MD 22_1	Enterococcus raffinosus gene for 16S rRNA	1053/1060 (99%)	7/1060 (1%)
MD 22_2	Enterococcus raffinosus gene for 16S rRNA	1048/1050 (99%)	0/1050 (0%)

由 NCBI 的比對結果、對照文獻資料和顯微鏡觀察得知，MD1 為 *Streptococcus anginosus*、MD10 為 *Lactobacillus casei*、MD14 為

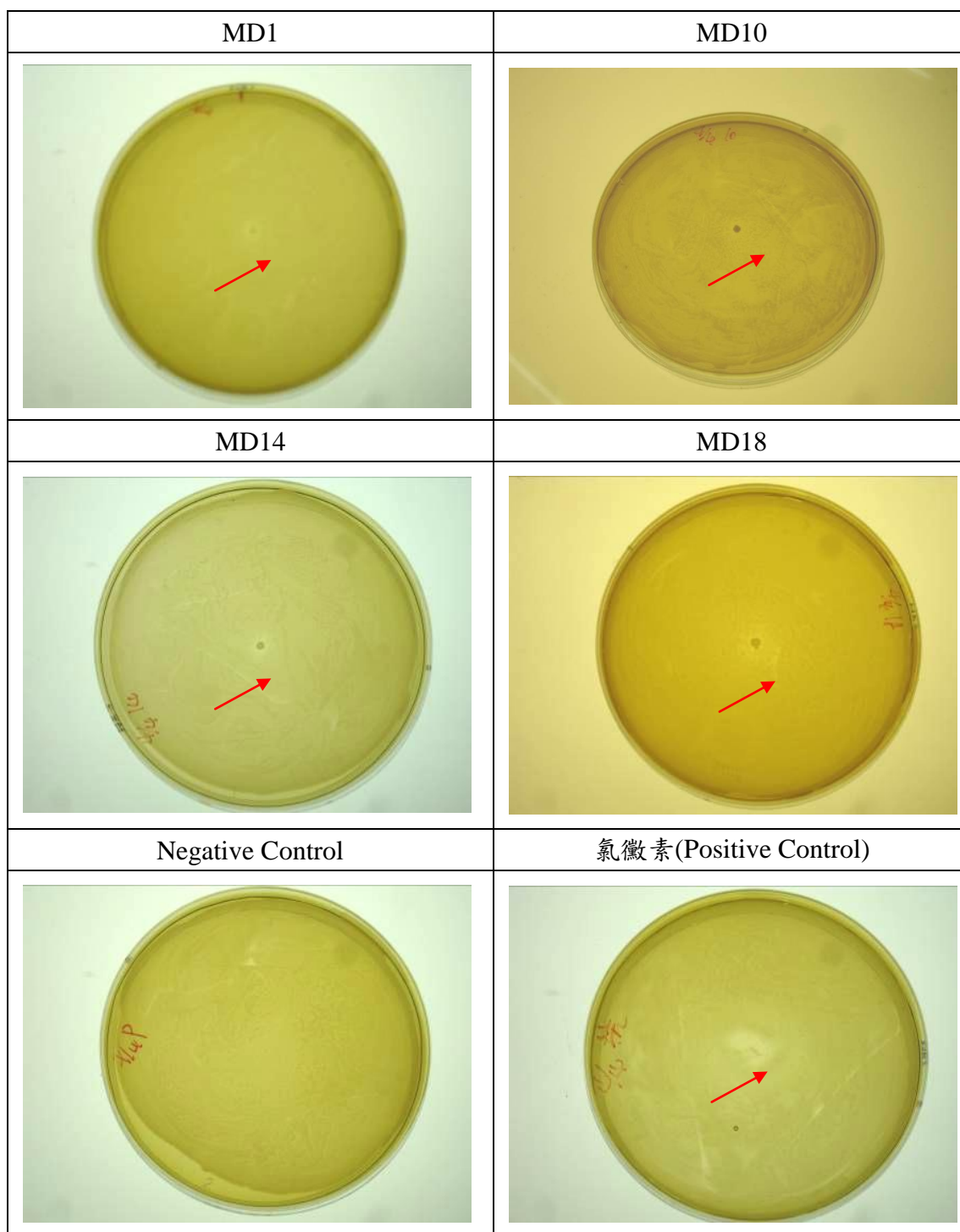
Lactococcus lactis、MD18 和 MD22 皆為 *Enterococcus raffinosus*。我們一共篩到了四株菌，每一個編號的二重複都得到了相符合的結果，MD18 和 MD22 經由 DNA 比對，顯示其為同一株菌，此四種細菌都屬於乳桿菌目以下的分支（如圖四），故可以乳酸菌概稱此四株菌。



圖四 乳桿菌目分支圖（來源：NCBI, Taxonomy Browser）

我們將其命名為 *Streptococcus anginosus MD1*、*Lactobacillus casei MD10*、*Lactococcus lactis MD14*、*Enterococcus raffinosus MD18*。

三、檢測吳郭魚腸內乳酸菌對嗜水性產氣單胞菌的拮抗作用



圖五 吳郭魚腸內乳酸菌及抗生素拮抗嗜水性產氣單胞菌結果（紅色箭頭處為拮抗圈）

由圖五可知，四株乳酸菌與氯黴素皆出現抑制嗜水性產氣單胞菌的

拮抗環。

表四 培養五天的腸內乳酸菌對嗜水性產氣單胞菌的拮抗環大小變化(單位:mm)

菌種編號 天數	MD 1 細菌	MD 10 細菌	MD 14 細菌	MD 18 細菌	氯黴素	Negative control
第一天	8.5±2	5.0±1	4.0±0	8.0±2	17.5±3	0.00
第二天	6.5±1	5.0±1	3.5±0.5	6±1	8.4±3	0.00
第三天	4.0±1	0.00	0.00	1.5±0	7.0±1	0.00
第四天	4.0±1	0.00	0.00	0.00	6.0±0	0.00
第五天	3.0±1	0.00	0.00	0.00	2.0±0	0.00

表四的拮抗環在第一、二天都可明顯看出拮抗環，但直徑隨著培養時間增長而縮小，其中 MD10 和 MD14，在第三天時，先前的拮抗環上已長滿了嗜水性產氣單胞菌；MD18 的拮抗環也在第四天時也消失了；而 MD1 在拮抗能力的維持上，有著相當不錯的表現，雖然拮抗環的變化趨勢仍為慢慢遞減，但在第五天仍然有較小圈的拮抗圈存在。

四、吳郭魚腸內乳酸菌在斑馬魚幼魚拮抗嗜水性產氣單胞菌的能力

(一) 斑馬魚幼魚在不同菌株處理下的死亡率統計

表五 斑馬魚幼魚在不同處理下的死亡率（單位：死亡數/50*100%）
（A 菌處理：單獨添加嗜水性產氣單胞菌之處理）

	時間（天）							
	0	1	2	3	4	5	6	7
負控制	0.00%	0.00%	0.00%	1.33±1%	1.33±1%	1.33±1%	1.33±1%	1.33±1%
A 菌處理	0.00%	17.33±4%	18.00±4%	21.33±7%	33.33±6%	36.00±5%	38.67±5%	41.33±3%
MD 1	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
MD 1+A 菌	0.00%	0.00%	1.00%±1%	1.00%±1%	1.00%±1%	1.00%±1%	1.00%±1%	1.00%±1%
MD 10	0.00%	4.00±2%	4.00±2%	4.00±2%	5.33±2%	5.33±2%	9.33±3%	20.00±6%
MD 10+A 菌	0.00%	17.33±4%	17.33±4%	21.33±5%	32.00±4%	42.00±5%	48.00±4%	49.33±3%
MD 14	0.00%	0.67±1%	4.00±2%	4.67±3%	5.33±2%	6.00±2%	9.33±5%	10.67±6%
MD 14+A 菌	0.00%	13.33±2%	17.33±2%	21.33±3%	30.67±4%	37.33±8%	45.33±7%	48.00±10%
MD 18	0.00%	0.00%	0.00%	1.33±1%	1.33±1%	6.67±2%	10.00±4%	13.33±7%
MD 18+A 菌	0.00%	0.00%	0.00%	9.33±2%	36.00±4%	36.00±4%	40.00±4%	41.33±7%

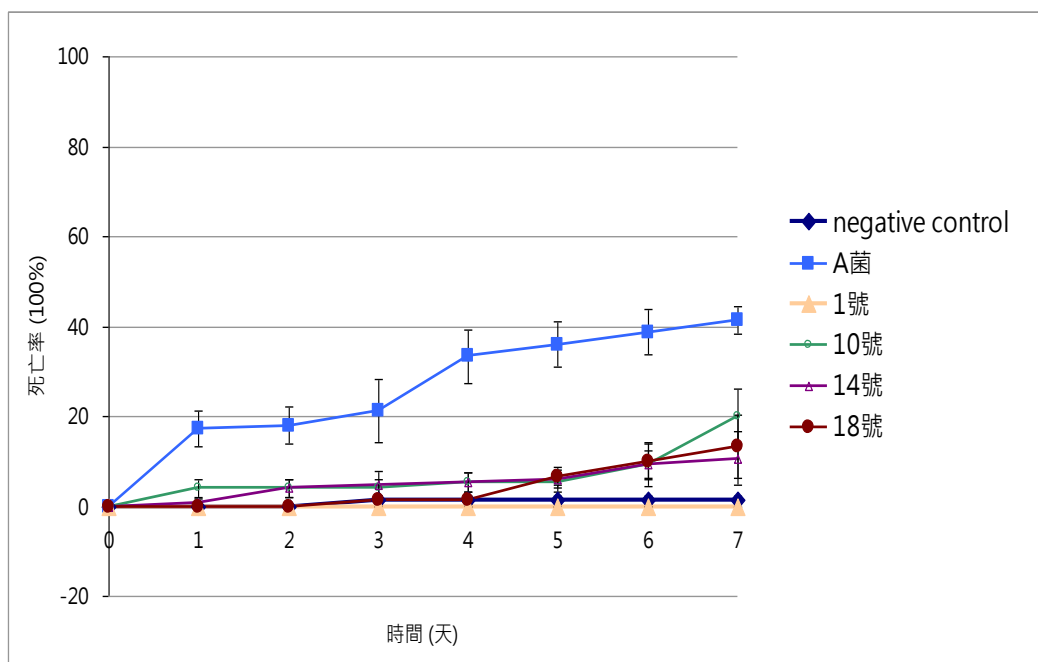
A 菌處理和負控制組的 P 值約為=0.000015 故可得知 A 菌處理和不做任何處理的負向控制組相比，有非常顯著的致死現象。在孵化後的七天內，幼魚還可以依靠卵黃囊的養分來存活，所以就算沒有餵食，也沒有因飢餓而死亡的幼魚。以下就吳郭魚腸內乳酸菌對斑馬魚幼魚生長，以及與嗜水性產氣單胞菌的拮抗作用對斑馬魚幼魚生長的影響分別進行比較。

（二）吳郭魚腸內乳酸菌及嗜水性產氣單胞菌對斑馬魚幼魚生長的影響

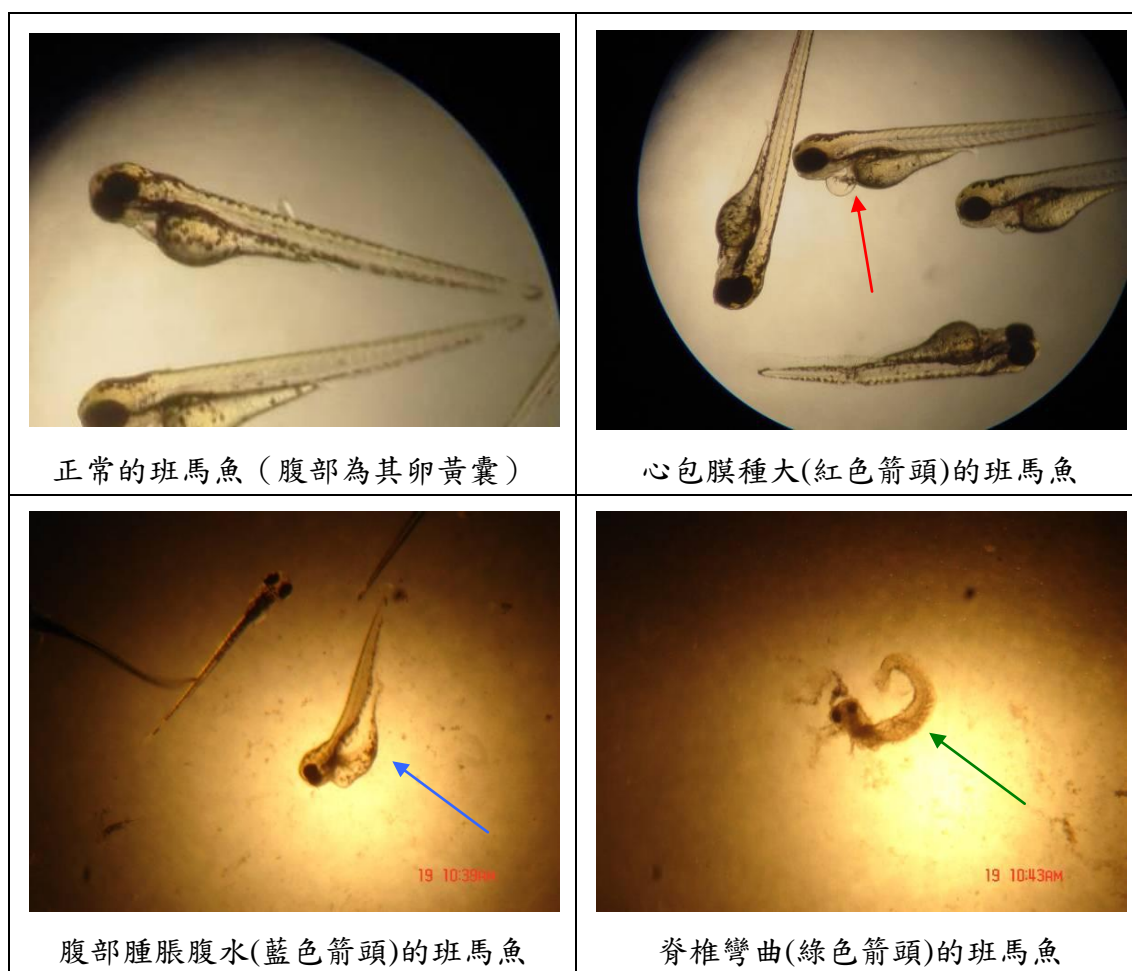
表六 斑馬魚幼魚在四種乳酸菌和 A 菌處理下的死亡率（單位：死亡數/50*100%）

	時間（天）							
	0	1	2	3	4	5	6	7
負控制	0.00%	0.00%	0.00%	1.33±1%	1.33±1%	1.33±1%	1.33±1%	1.33±1%
A 菌處理**	0.00%	17.33±4%	18.00±4%	21.33±7%	33.33±6%	36.00±5%	38.67±5%	41.33±3%
MD 1	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
MD 10*	0.00%	4.00±2%	4.00±2%	4.00±2%	5.33±2%	5.33±2%	9.33±3%	20.00±6%
MD 14*	0.00%	0.67±1%	4.00±2%	4.67±3%	5.33±2%	6.00±2%	9.33±5%	10.67±6%
MD 18	0.00%	0.00%	0.00%	1.33±1%	1.33±1%	6.67±2%	10.00±4%	13.33±7%

（*：和負控制組比較的 P 值<0.01；**：和負控制組比較的 P 值<0.001）



圖六、添加乳酸菌及嗜水性產氣單胞菌的死亡率折線圖



圖七 斑馬魚幼魚在嗜水性產氣單胞菌處理下出現的病徵

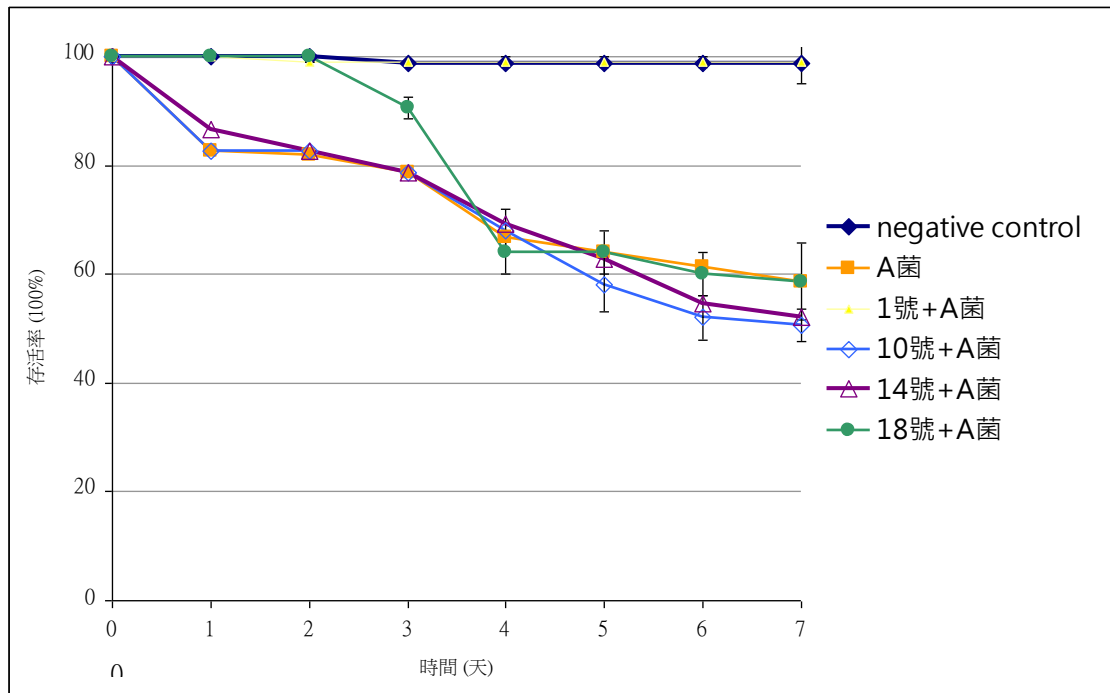
由實驗結果得知，單獨添加乳酸菌 MD 10、MD 14、MD18 的死亡率與控制組處理的死亡率趨勢接近，其中 MD18 在前四天的死亡情形與控制組完全相同，但在第五天後死亡率明顯提高，而 MD 1 乳酸菌在七天的實驗中，其死亡趨勢與控制組相同，可知此乳酸菌不會造成幼魚的死亡。另外，在嗜水性產氣單胞菌處理下的幼魚，很快就受到嗜水性產氣單胞菌的感染，產生心包膜腫大、腹部水腫、脊椎彎曲（如圖七）等病徵，死亡數也遠遠超過控制組，我們推測幼魚的抵抗力比較低，所以很快就病徵的產生，因此我們可以確定嗜水性產氣單胞菌會對斑馬魚幼魚造成嚴重致病性，可以作為實驗病理模式。由於此實驗所添加的乳酸菌 MD 1、MD 10、MD 14、MD18，並未造成幼魚死亡率及畸形率的增加，尤其 MD1 對斑馬魚幼魚的影響最小，因此我們進一步在斑馬魚幼魚身上做乳酸菌與嗜水性產氣單胞菌的拮抗實驗。

(三) 吳郭魚腸內乳酸菌與嗜水性產氣單胞菌的拮抗作用對斑馬魚幼魚生長的影响

表七 斑馬魚幼魚在乳酸菌與嗜水性產氣單胞菌的拮抗作用的存活率（單位：死亡數/50*100%）

	時間（天）							
	0	1	2	3	4	5	6	7
負控制**	100.00%	100.00%	100.00%	98.67%	98.67%	98.67%	98.67%	98.67%
A 菌處理	100.00%	82.67%	82.00%	78.67%	66.67%	64.00%	61.33%	58.67%
MD 1+A 菌	100.00%	100.00%	99.00±1%	99.00±1%	99.00±1%	99.00±1%	99.00±1%	99.00±1%
MD 10+A 菌	100.00%	82.67±4%	82.67±4%	78.67±5%	68.00±4%	58.00±5%	52.00±4%	50.67±3%
MD 14+A 菌	100.00%	86.67±2%	82.67±2%	78.67±3%	69.33±4%	62.67±8%	54.67±7%	52.00±10%
MD 18+A 菌	100.00%	100.00%	100.00%	90.67±2%	64.00±4%	64.00±4%	60.00±4%	58.67±7%

（**：和嗜水性產氣單胞菌處理比較的 P 值<0.001）



圖八 斑馬魚幼魚在乳酸菌與嗜水性產氣單胞菌的拮抗作用的死亡率折線圖

由實驗結果得知，MD 10、MD14 添加嗜水性產氣單胞菌的處理組，趨勢非常接近於單獨添加嗜水性產氣單胞菌的處理組。MD18 添加嗜水性產氣單胞菌的處理組在前兩天與控制組結果相同，而第三天後存活率開始下降，到第四天就與其他組別無差異。其中，MD1 添加嗜水性產氣單胞菌的處理組，存活率趨勢和控制組相同，對嗜水性產氣單胞菌有非常明顯的拮抗效果，同時，對斑馬魚幼魚的生長情形也未造成負面影響。由結果得知，在吳郭魚腸內所篩到的四株菌株中，以 MD 1 乳酸菌對斑馬魚幼魚生長影響最小，並且在斑馬魚身上對嗜水性產氣單胞菌也有顯著的拮抗作用。

陸、討論

一、為何會鎖定校園生態池內吳郭魚的腸道做為我們篩菌的來源？

我們推測適應力強的魚類其腸道內應該存在著某些益生菌，協助它們對抗水中的病菌。一開始我們由市場買來的新鮮白鯽魚和活的吳郭魚進行實驗，實驗結果顯示其腸道的菌落數目不多，且菌落的型態極為單調，重覆了數次仍然得到相同的結果。經過討論，我們推測人工養殖的鯽魚和吳郭魚可能是攝取了含有抗生素的飼料，破壞了腸內菌相，只剩下具有抗藥性的一些細菌。

後來，我們觀察到校園生態池中的吳郭魚生命力強且沒有餵食抗生素，經過解剖、塗盤並與市售魚類的菌相來比較差異，我們發現生態池吳郭魚的腸道菌落較多且形態外觀多樣，菌相豐富，再經過碳酸鈣的初步篩選，再抽取DNA，最後確認篩出四株乳酸菌。

二、乳酸菌的拮抗機制

拮抗微生物的機制分為：競爭作用、抗生作用、重複寄生、捕食作用、靜菌作用等，一般而言，病原菌被乳酸菌所拮抗應屬於抗生作用，此作用是指一個微生物受到另外一種微生物之代謝產物——如：抗生素、醇類、有機酸所抑制。根據黃文鈴（2005），乳酸鏈球菌素與 EDTA 對腸炎弧菌等革蘭氏陰性菌抗菌效果之探討，我們推斷是乳酸菌代謝產生的乳酸或是細菌素造成的抗生作用，而由我們一開始的碳酸鈣測試法，我們也能看到這五株菌的有機酸擴散到培養基而產生的透明環，所以我們認為是乳酸菌代謝產生的乳酸比較有可能是拮抗主因。改變 PH 並非抗菌的主要因素，而是由

於乳酸是小分子弱酸，故在正常情況下仍有許多未解離的分子，因而不帶電荷，可直接通過細胞膜進入 PH 較高的細胞質，在進行解離，進而影響細胞的代謝，故未解離的有機酸才是乳酸這類弱酸的主要抗菌因素。

另一項推測則是細菌素的產生，我們篩到的 *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* 在文獻（黃文鈴；2005）中，都有記載著細菌素的產生，且有些乳酸菌的細菌素對於食品中的病原菌和腐敗菌有廣泛的抑制效果，此類的乳酸菌具有相當的潛力發展成天然防腐劑或保鮮劑，故細菌素也可能是乳酸菌拮抗嗜水性產氣單胞菌的原因之一。

三、拮抗方法的選擇

我們選擇了兩種拮抗的方式，第一種方法，我們直接用 tip 沾取菌液，輕輕接觸在已經塗完病原菌菌液的 MRS Agar，讓它們共同在 MRS Agar 上生長，結果我們清楚觀察到乳酸菌周圍產生了透明環，第二種方法則是最常見的濾紙錠片法，但是我們利用濾紙錠片法的結果，我們觀察到拮抗效果也隨著消失，我們推測乳酸菌用來拮抗病原菌的有機酸，被累積在濾紙片上，無法擴散到培養基。

四、篩得之乳酸菌介紹

Streptococcus anginosus MD1 是鏈球菌，具有產生有機酸和拮抗嗜水性產氣單胞菌的能力。*Lactobacillus casei MD10* 則是人類很常用以製作發酵乳的 C 菌，凱氏乳酸菌，但是在斑馬魚幼魚實驗中，並沒有表現出在培養基上的拮抗效果，可能是由於它在腸道裡的功能並不負責抵禦外敵的部分，而是有其他的益生作用。*Enterococcus raffinosus MD18* 是腸球菌屬的細菌，在斑馬魚幼魚實驗裡的拮抗效果較佳，此一屬的細菌功能落差非常大，從抗萬古黴素的菌種、歐洲拿來做乳酪的菌種、益生菌、病原菌都有，但我

們推測這個應該是屬於益生菌的範疇，因為我們在健康的吳郭魚身上得到了此菌，而且出現多次，顯示其在腸道的優勢地位，且在培養基和斑馬魚幼魚的實驗中皆具有拮抗嗜水性產氣單胞菌的能力，所以我們推論它應該是屬於吳郭魚腸道內的益生乳酸菌。

五、*Enterococcus raffinosus* MD18 的抗藥性測試

由於我們在文獻資料中看到 *Enterococcus raffinosus* 不少有抗藥性，所以我們想要進一步了解 *Enterococcus raffinosus* MD18 的抗藥性，我們將篩到此菌株送交醫院並經過醫院的標準程序測試後，顯示其對 Ampicillin, Gentamicin (HLAR), Vancomycin, Teicoplanin 等抗生素具敏感性，即不具有抗藥性。若將來實際投餵時，影響到他處的生態，則可以用抗生素來控制它，使影響範圍不再擴大。

六、給魚吃了抗生素之後，人類有何影響？

養殖業者在魚身上使用大量的抗生素，雖然使魚不容易生病但有些魚類無法代謝的抗生素會累積在魚的體內，經由生物累積作用後，對人會有很大的影響。例如有些人可能會對抗生素有過敏反應，有些抗生素則可能會影響胎兒或嬰兒，對準備懷孕、已懷孕或哺乳婦女有嚴重的影響。

若部分隨著糞便排出體外的抗生素會釋放到環境當中，也會加速抗藥性細菌的篩選，根據陳右儒（2006）畜牧業抗生素使用與微生物對人用抗生素產生抗藥性之關聯性初探，許多養殖廢水雖經過標準處理流程，但放流水中仍然有高抗藥性的微生物，而且隨著抗藥性細菌的比例變高，失效的抗生素會越來越多，再加上質體傳遞抗藥性基因，最終產生抗多種抗生素的菌種。

柒、結論

1. 從校園生態池吳郭魚的腸內挑選出 22 個單一菌落，再以劃線法培養在含有 1%碳酸鈣的 MRS 培養基，篩選出五種具有產酸能力的細菌，分別是 MD1、MD10、MD14、MD18、MD22 菌株。
2. 藉由 16s rDNA PCR、基因體定序以及 NCBI 的比對結果得知，我們一共篩選出四株乳酸菌，分別為 *Streptococcus anginosus* MD1、*Lactobacillus casei* MD10、*Lactococcus lactis* MD14、*Enterococcus raffinosus* MD18。
3. 透過在培養基上的拮抗圈實驗證實了此四株乳酸菌能夠拮抗嗜水性產氣單胞菌(*Aeromonas hydrophila*)，其拮抗環直徑隨著時間增加而有縮小的趨勢，其中以 *Streptococcus anginosus* MD1 的拮抗能力可維持最久。
4. 在嗜水性產氣單胞對斑馬魚幼魚生長影響的實驗中，由於幼魚的抵抗力比較低，在加了嗜水性產氣單胞菌之後，很快地受到感染，產生心包膜腫、腹部水腫等病徵，死亡數遠遠超過控制組。而在斑馬魚幼魚身上做乳酸菌與嗜水性產氣單胞菌的拮抗結果，以 *Streptococcus anginosus* MD1 與 *Enterococcus raffinosus* MD18 有明顯的拮抗效果，其中又以 *Streptococcus anginosus* MD1 對斑馬魚幼魚生長影響最小且拮抗效果最持久。

綜合以上結果，*Streptococcus anginosus* MD1 在培養基上以及斑馬魚幼魚實驗中，都有最好的拮抗效果，所以，我們認為 *Streptococcus anginosus* MD1 在未來最有發展成生物製劑的潛力，運用於魚苗存活率的提升。

捌、未來展望

許多經濟價值高的魚種，魚苗期的死亡率較高，如何增加魚苗的存活率成了

養殖業者最關心的議題之一。在斑馬魚的胚胎活體實驗裡我們看到了乳酸菌的拮抗效果，未來能夠將益生菌的概念實際加入經濟魚種的魚苗，增加魚苗的的生存率。另外，我們也希望能將此乳酸菌製成成魚用的生物製劑，並在不同魚病的好發季節投予適當的益生菌來增強魚的抵抗力，達到以乳酸菌代替抗生素的效果。

乳酸菌雖然好處多，不過與抗生素相比，對嗜水性產氣單胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的拮抗能力依舊遜色了一點，而且成本考量以及效果的差別，抗生素的使用仍然遠遠超過益生菌。由於台灣人「有病治病，沒病防身」的錯誤觀念，業者常常在魚病未發生之前投以高劑量的抗生素來預防魚病，因此台灣的養殖魚體內多殘留超標的抗生素，嚴重影響到我國魚類的出口信譽，所以加強益生菌的能力及普及度是最好的解決方法，未來可以提高投餌益生菌的比例，幫助魚類抵抗疾病，從而解決台灣濫用抗生素的問題。

玖、參考文獻

1. 沈雅茹 (2004)。淡水養殖池中嗜水性產氣單胞菌與愛德華氏菌致病基因表現之調查研究。國立臺灣海洋大學水產養殖學系，已出版，基隆市。
2. 江兆弘 (2004)。親水性產氣單胞菌(*Aeromonas hydrophila*)之 hemolysin 基因分子選殖之研究。屏東科技大學獸醫學系，已出版，屏東縣。
3. 顏賢棟 (2001)。嗜水性產氣單胞桿菌環境株 P1611 溶血性及溶血基因之研究。國立臺灣大學農業化學研究所，已出版，台北市。
4. 黃惠宇 (2006)。腸道系統守護神——乳酸菌。科學月刊，37，104-107。
5. P.Vijayabaskar and S.T.somasundaram(2008). Isolation of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria from Fish Gut Probiotic Activity Against Common Fresh Water Fish Pathogen *Aeromonas hydrophila*。Biotechnology, 7(1), 124-128.
6. L, Nazef, Y. Belguesmia, A. Tani, H.Prévost, and D. Drider (2008) Identification of Lactic Acid Bacteria from Poultry Feces: Evidence on

Anti-Campylobacter and Anti-Listeria Activities, Poultry Science, 87 (2).
329-334

7. Khalil Azizpour (2009). Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Intestines of Common Carp of West Azarbaijn, Iran 。 Journal of Animal and Veterinary Advances, 8(6), 1162-1164
8. Ingolf F. Nes(2006). Bacteriocin Diversity in Streptococcus and Enterococcus[▽] 。 Journal of Bacteriology , 189(4), 1189-1198.
9. G.Rajaram(2010). Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by Lactobacillus Isolated from Marine Environment. Advanced Journal of Food Science and Technology, 2 (2) , 138-144
10. 鍾緩蓉 (2006)。乳酸菌與其細胞外產物對溶藻弧菌和巴斯德桿菌生長之影響。國立台灣海洋大學水產養殖學系碩士學位論文，已出版，基隆市。
11. 張效銘 (2008)。益生性乳酸菌之篩選及穿梭載體系統之建構。大同大學生物工程研究所博士學位論文，已出版，台北市。
12. 胡逸廷 (2009)。從環境分離和分析鑑定在水產養殖應用上具抑菌能力之益生菌。慈濟大學生命科學研究所碩士論文，已出版，花蓮市。
13. 龍湘美 (2004)。乳酸菌細菌素抗菌作用及其在食品上應用之回顧。國立海洋大學食品科學系碩士在職專班學位論文，已出版，基隆市。
14. 江靜雯 (2000)。Lactobacillus acidophilus LC1 細菌素之生產及其在牛乳保鮮上之應用。國立海洋大學食品科學系，已出版，基隆市。
15. 粘曉芳 (2007)。嗜水性產氣單胞菌與愛德華氏菌對養殖日本鰻之病理研究。國立台灣海洋大學水產養殖學系碩士論文，已出版，基隆市。
16. 郭郁芳 (2003)。乳酸鏈球菌之分離與生理特性之研究。國立台灣師範大學生物學系碩士論文，已出版，台北市。
17. 黃文鈴 (2005)。乳酸鏈球菌素與 EDTA 對腸炎弧菌等革蘭氏陰性菌抗菌效果之探討。國立台灣海洋大學食品科學系碩士學位論文，已出版，基隆市。

評語

1. 本研究的實驗設計與要探討的問題，整體說服力有完整性，是一有趣的研究，研究成果有應用價值。
2. 雖然所篩到的 4 株乳酸菌皆具有拮抗嗜水性產氣單胞菌能力，但 1 號與 18 號乳酸菌有較明顯的效果，而真正抗菌能力機制，還有研究的必要。