

# 中華大學生物資訊學系系統開發專題報告

## 納豆菌 rt 株的鑑定與培養

### Identification and culture of *Bacillus natto* rt strain

專題組員: B10220301 蕭聞佐、B10420046 翟容慈、B10420036 耿以庭

專題編號: PROJ2017-BIOINFO-103011

指導老師:張慧玫老師

#### 1. 摘要

由於過高的氮含量，對於水中生物是有毒害的，為了降低水中的氮值，可透過清洗水體淤泥、調控放養密度、合理的搭配養殖模式、管理飼料成份的投入、增加水體含氧量、定期放入生物製劑等方式，以加速硝化反應。

這次的專題是測試納豆菌 rt 株的單一菌種的生物特性，以便將來作為改善水質的生物製劑。本專題要了解，納豆菌 rt 株在不同的培養環境下的生長情形以及菌株的生化性質，鑑定菌株，並測試其生長曲線特徵。

#### 2. 簡介

##### (一) 納豆菌

納豆枯草桿菌 rt 株 (*Bacillus subtilis natto* rt strain)，是一種益生菌，可以淨化水質、穩定水色。

##### (二) 氮值

水中的氮主要是以游離氨(NH<sub>3</sub>)和銨離子(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)形式存在；氮的來源主要以水產物的鰓和水中浮游生物分泌而產生。當水體含氧量不足時，厭氧菌會與含氮的有機物、硝酸鹽、亞硝酸鹽，發生反硝化作用，產生大量的氮。過高的氮含量，對於水中生物是有毒害的，並且會因水中的 PH 值和水溫變高，毒性會變得更強。

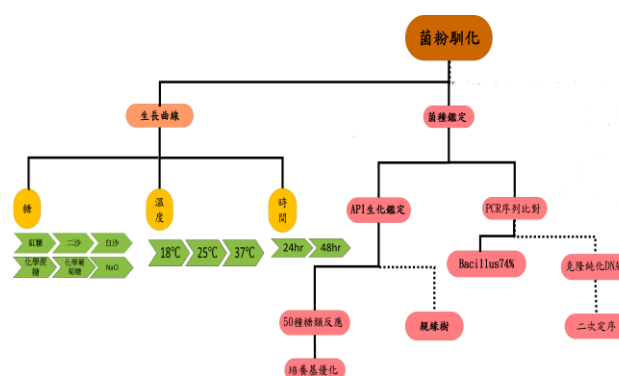
##### (三) 主要預期效益

- 利用 PCR 與 API 鑑定納豆菌 rt 株
- 加入不同的糖類到培養基，以算單菌落的方式推算是否有助納豆

菌 rt 株培養時數量的增加。

- 做連續稀釋培養不同時間點的細菌族群，以便做生長曲線時，可算單菌落數量，以反推各時間點之細菌濃度。
- 做納豆菌 rt 株生長曲線圖，掌握其生長速度，以便後續的應用。

#### 3. 專題進行方式



##### (一) 實驗材料:

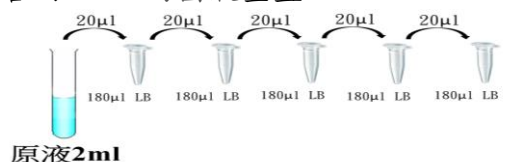
菌種來源: 本研究納豆枯草桿菌 rt 株 (*Bacillus subtilis natto* rt strain) 菌種由東莞賽勒斯醫學材料公司經產學合作計畫提供。

##### (二) 實驗方法

###### (A) 連續稀釋

取出在旋轉震盪器上培養 24 小時菌液管，用酒精燈快速燒過試管管口及試管蓋，微微傾斜試管的方式抽取 20 λ 的菌液加到 1.5ml 微量離心管中 180 λ 的 LB 液裡，再次重複燒試管的動作，然後從已加入 20λ 原液的 1.5ml 微量離心(20λ 原液+180λ LB)裡，抽取 20 λ 菌液加到下一個 180 λ LB 液 L 中，重覆如下圖(一)的動作直到合乎實

驗所需稀釋倍數，便可抽取最反後一管內 200 $\mu$ l 的菌液塗盤。



圖(一) 連續稀釋

(B) 不同溫度下的培養:

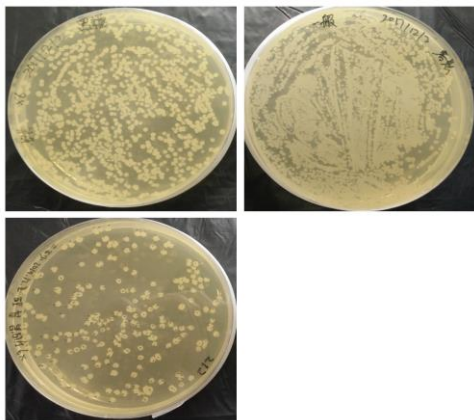
因水產養殖會受四季變化的影響，因此必須考慮納豆枯草桿菌 rt 株的可接受的培養溫度的範圍，實驗分別在 18 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 進行培養，實驗結果如下圖。

溫度	生長速度	菌落大小	菌落數
18 $^{\circ}$ C	慢	小	不變
25 $^{\circ}$ C	正常	正常	不變
37 $^{\circ}$ C	快	大	不變

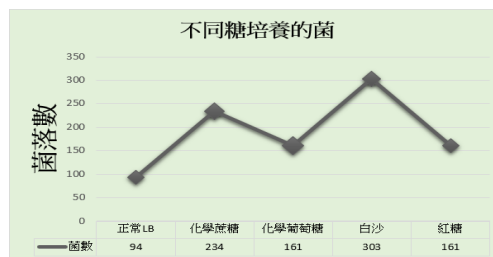
(C) 不同的培養基:

最初是以白糖、紅糖、二號砂糖做測試，預估加入糖類有助增加菌落數，而得到第一次的結果，加入二號砂糖培養的結果與正常 LB 培養結果相似，因此後續的實驗並無二號砂糖。

第二次實驗有四管 2ml 的液態培養基分別加入等量的化學葡萄糖、化學蔗糖、白糖、紅糖，四種糖類培養基與正常 LB 比較菌落數有明顯的倍增，由圖(三)可知白糖培養基的菌落數更是遠超出其餘三種糖的培養基。



圖(二) 白糖、紅糖、二號砂糖培養結果，圖中均是六倍稀釋結果。

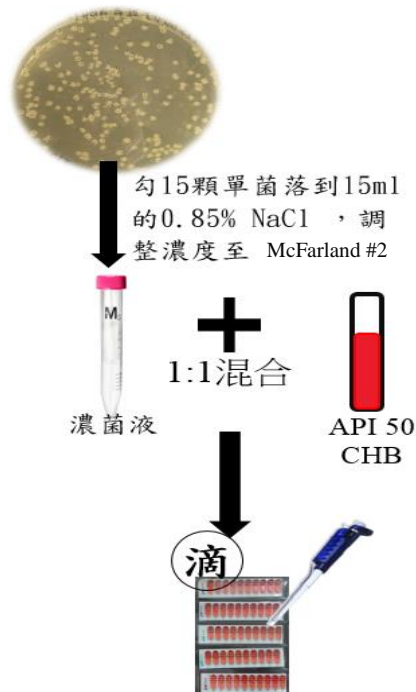


圖(三) 各種糖的培養結果

(D) 菌種鑑定

1. API 菌種鑑定:

Biomerieux(購自啟新公司)的 API $\text{\textcircled{R}}$  鑑定產品為全球公認 30 多年來權威的微生物生化鑑定標準檢驗技術，廣泛在臨床、製藥工業、食品，研究等方面，用來鑑定革蘭氏陽性和陰性菌、酵母菌等相關菌種。API 利用 20 到 50 個小生化呈色反應之結果，與該系統龐大的菌種資料庫，涵蓋大於 600 多種菌株做比對，依據菌種分類區分為 15 種藥劑套組。



圖(四) API 的操作方式

我們選用 API 50 CHB 以糖類為主軸的藥劑套組，菌種鑑定要確保菌株是純菌，不可使用保存在 4 $^{\circ}$ C 超過一個月，納豆枯草桿菌 rt 株測試時要調整菌液濃度至麥氏比濁管(McFarland) #2 如圖(四)紅框所標示<sup>2</sup>。



統計結果		
菌種名稱	相同呈色	相似度%
B. racemilacticus	20	83.3%
B. subtilis	19	79.2%
B. macerans	19	79.2%
B. insolitus	18	75%
B. megaterium	18	75%

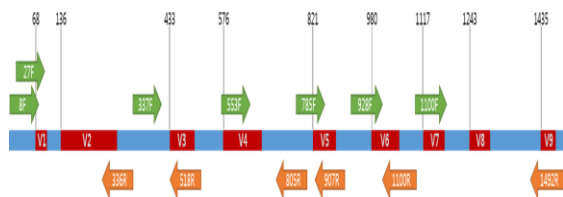
圖(九) 與納豆枯草桿菌 rt株相似的前 5 名 *Bacillus* 家族，*B. subtilis* 排行第二，符合預期納豆枯草桿菌 rt 株為 *B. subtilis* 的一員的結果。

## 2. PCR 16S rRNA 物種檢測

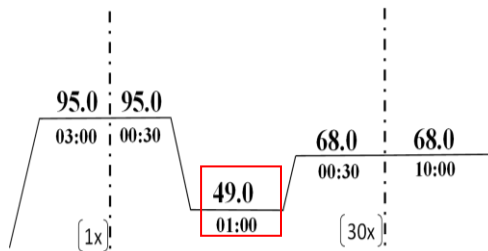
菌種通常以 3 區作序列鑑定：

- (1)16s rRNA 區、(2)gyrB 基因區、
- (3)ITS 區，開始比對其 DNA 序列。

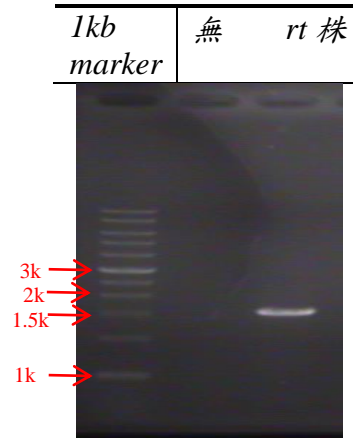
此實驗目的以鑑定 DNA 序列的方式，驗證 rt 株是否為 *Bacillus subtilis* 的一員，參考多數論文，選擇 27F(5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3');1492R(5'CGGTTACCTTGTTACG ACTT3')為引子，一般片段長度為 1000kb，退火反應時間應設 1 分鐘。由圖(十)可知 27F 和 1492R 片段長度為 1367kb，因此 PCR 退火步驟的反應時間要調整為 1 分鐘<sup>1</sup>。



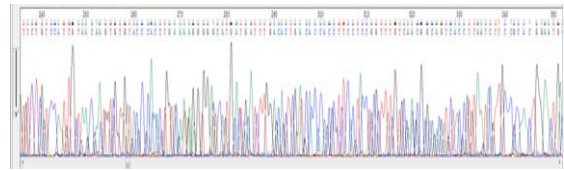
圖(十) 引子 27F 和 1492R 的擴增片段長度<sup>1</sup>



圖(十一) PCR 流程圖



圖(十二) 電泳結果圖 band 帶位置約為 1.3kb，與引子擴增片段長相符，可做定序。



圖(十三) 定序波峰圖



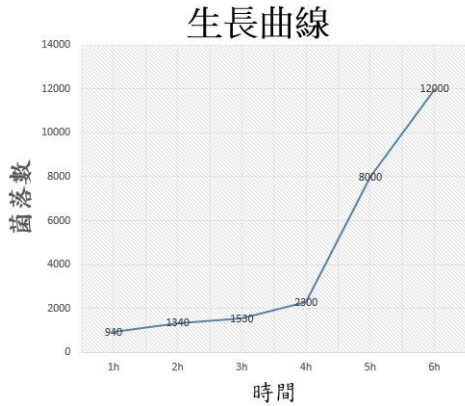
圖(十四) NCBI 序列比對結果，共 113 筆資料



圖(十五) NCBI 序列比對結果，第一筆資料是確實為 *B. subtilis* (相似 74%)，與 API 鑑定結果相符。

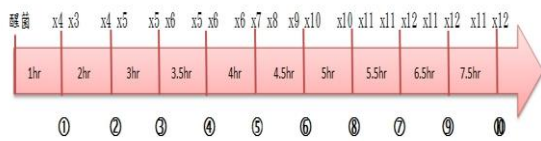
(E) 生長曲線:

在做生長曲線前，先做了一個前期的測試，勾一顆單菌落到 2ml LB 試管，跳過 24 培養的過程，設定六個時間點，每一小時塗盤一次，前三小時均取源液塗盤，後三小時均稀釋  $10^3$  倍塗盤，數菌落得出如圖(十六)的結果，因此初步評估納豆枯草桿菌 rt 株在第四個小時開始快速生長。

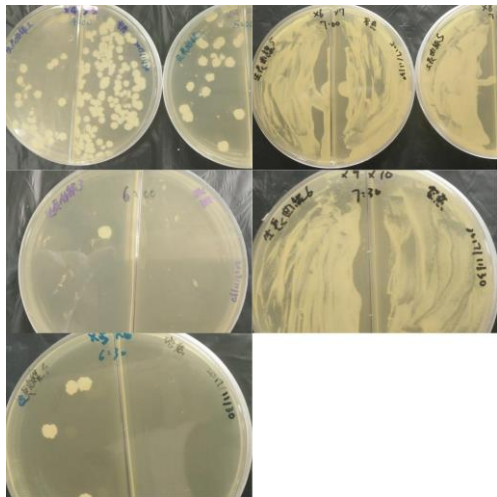


圖(十六) 初步評估生長曲線倍率

按照預估的結果，去做完整的生長曲線實驗，勾一顆單菌落到 2ml LB 試管，培養 24 小時，抽 200 $\mu$ l 轉到 200ml LB 的錐形瓶，如圖(十七)培養 7.5 個小時，設 10 個點稀釋塗盤。



圖(十七) 生長曲線十個時間點和稀釋倍率。



圖(十八) 生長曲線取樣

結果確實如初步估計結果相同，在第四個小時，納豆枯草桿菌 rt 株急速生長，菌量更是遠超過預設倍率，而納豆枯草桿菌 rt 株是環境菌，分別記錄了 12 小時，24 小時和 48 小時的菌落數如圖(十九)所示，評估 rt 株在 12 小時開始進入穩定期。

時間	菌落數
12 小時	$1.9 \times 10^8$
24 小時	$4.8 \times 10^9$
48 小時	$2.9 \times 10^{10}$

4. 未來擴展方向

流程圖中虛線是下學期預期要完成的目標，在此說明親緣樹製作目的是用於證明 rt 株與其他納豆菌有市場區隔，如何分析 rt 株與其他納豆菌的市場區隔，在於生化特性（如消化某些醣類）、氮代謝能力(基因)、共生菌群結構上等等的差異性。單菌是不穩定且活不久的，益生菌需要共生的團隊一起，才能更長久、更有功效，因此共生菌群結構的分析可評估什麼細菌與 rt 株是共生且有助優化養殖業水質的重要依據，目前的實驗數據仍有不精確的地方，可做進一步的改

5. 改善計劃:

- (1) 前期 API 鑑定結果為 79% *B. subtilis*，應檢討是否麥氏比濁管  $6 \times 10^8$  濃度的推算不夠準確。
- (2) 目前 PCR 片段已驗證 rt 株是 *B. subtilis*，但 DNA 未經純化，應進行克隆實驗後，再 PCR 定序。
- (3) 飽和濃度只檢測到 48 小時，可多檢測 72 小時的結果，推算 rt 株的活性時間，便可評估每月投放生物製劑的次數。
- (4) 生長曲線可修正稀釋倍率，統計出更明確的菌落數，畫出準確的生長曲線圖表，才可決定擴培收菌的時間。

- (5) 已獲得醣類數據的部分可進行第二階段優化擴培養基的目標。

6. 結語:

對於這次專題實驗，共生菌是目前最大的難題，在水中，有許多的要境菌，我們在未來的實驗計劃，可利用菌種鑑定的方式去評估其是否同樣據有降氮或對水質有助益。最後，在這短短的幾個月內，學習良多，讓我們更有實力、能力、計畫性地去完成這次的產學合作。

7. 銘謝:

感謝東莞賽勒斯醫學材料公司和中華大學生物資訊系合作研究，培育日後生技人材。感激張慧玫老師長時間的指導，授予學生更多的知識，學生獲益良多。

8. 參考文獻(Nature styl)

- 1 BIOiPLUG Help center. 16s rna and 16s rna gene  
<<https://goo.gl/hRxFwZ>>
- 2 細菌之家 Bacteria.cn--麥氏濁度法和光密度 (OD 值) 法測量細菌數量的特點和區別<<https://goo.gl/vqngGk>>  
(2015).
- 3 REGNUM PROKARYOTAE-- API Colors Reading  
<<https://goo.gl/YQ7sGu>>