

國立嘉義大學生命科學院
學生學術研究成果優良海報評選獲獎名單

時間：103 年 6 月 4 日

大學部

水生生物科學系					
第一名	蔡怡安	第二名	張又文		
生物資源學系					
第一名	張凱筌	第二名	林彥瑜	第三名	陸田奇
生化科技學系					
第一名	黃儀真	第二名	吳映錡、劉怡君		
微生物免疫與生物藥學系					
第一名	林威漢	第二名	趙珮雯	第三名	陳柔瑞



研究所

食品科學系					
第一名	薛吉成	第二名	林愷翔		
水生生物科學系					
第一名	王振宇	第二名	龔學偉		
生物資源學系					
第一名	謝彤珮	第二名	廖晟宏	第三名	楊建宏
生化科技學系					
第一名	李妍慧	第二名	邱憲君、郭鎮彰		
微生物免疫與生物藥學系					
第一名	陳佩青	第二名	馮吉振	第三名	沈縵

水生生物科學系



Streptococcus dysgalactiae bacteremia occurring in Chiayi, Yulin Counties and Penghu fish farm, during 2007-2013

I-An Tsai¹ (蔡怡安), Yen-Ling Lu² (盧彥伶), Chishih Chu³ (朱紀實), Chen-Chun Ku⁴ (古鎮鈞), Chun-Che Chen¹ (陳哲俊)

1. Department of Aquatic Biosciences, National Chiayi University;
2. Animal Disease Control Center of Chiayi County
3. Department of Microbiology, Immunology and Biopharmaceuticals, National Chiayi University
4. Department of Aquaculture, National Penghu University

Abstract

The Gram positive *Streptococcus* spp. often causes fish's streptococcosis in aquaculture farming. *S. dysgalactiae* is one of the main pathogens to cause streptococcosis in Taiwan. In the present study, *S. dysgalactiae* was collected from the diseased fish from 2007, 2011, 2012 and 2013 in Chiayi, Yulin and Penghu Counties and was identified by Multiplex PCR. Differences in the resistance to 12 antimicrobials and genetic relatedness were investigated by disc diffusion method and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis, respectively. Except 2 isolates from Penghu were resistance to doxycycline, oxytetracycline and tetracycline, all 16 *S. dysgalactiae* strains were sensitive to remaining antimicrobials. PFGE analysis of the *Sma*I-digested DNAs showed three PFGE patterns for all isolates, which differed between southern Taiwan and Penghu. Additionally, pulsotype I was major clone to disseminate in southern Taiwan.

Isolate identification by multiplex PCR

14 isolates were collected from the diseased fish in Chiayi, Yulin 2007 (7) and 2011 (7), while two strains were collected from Penghu 2012 (1) and 2013 (1). Multiplex PCR identified that all 16 strains were *S. dysgalactiae*, which was the major diseases for mullet (Table 1).

Table 1. The host species and place of *S. dysgalactiae*

Year	Host	Place	Counties
2007	Mullet (4)	Dongshih (2)	Chiayi
		Kouhu (2)	Yulin
	Tilapia (1)	Lutsao	Chiayi
		Big scale liza (2)	Dongshih
2011	Mullet (5)	Budai	Chiayi
		Kouhu	Yulin
	Tilapia (1)	Dongshih	Chiayi
2012, 2013	Amberjack (2)	Dongshih	Chiayi
		Erkan	Penghu

The genotypes determined by PFGE analysis

Three pulsotypes were identified in 16 strains. Pulsotype I of I, Ia and Ib was the major genotype (13/16) in *S. dysgalactiae*. Pulsotype Ia and Ib were isolated in 2007 and 2011 respectively. Pulsotype II was observed in 2011. Pulsotype III were identified in two strains from Penghu.

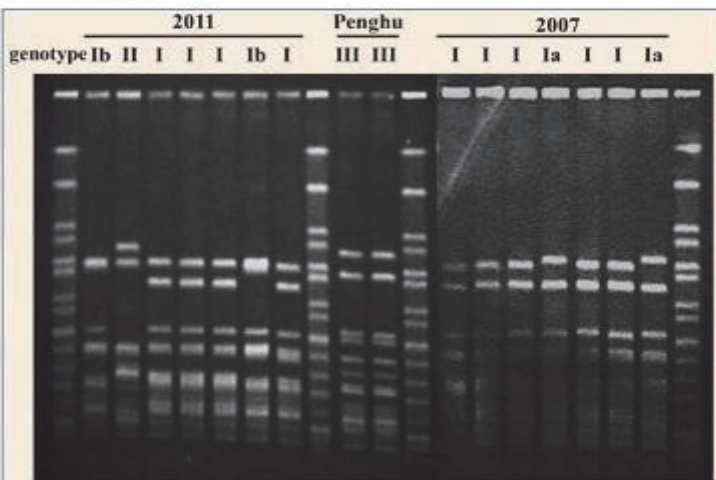


Figure 1. *Sma*I-digested pulsotypes of the 16 *S. dysgalactiae* isolates determined by PFGE analysis.

Antimicrobial susceptibility

Susceptibility of 16 isolates to levofloxacin, oxifloxacin, erythromycin, zithromycin, clindamycin, penicillin, ceftriaxone, doxycycline, oxytetracycline, tetracycline, ciprofloxacin and florfenicol was investigated by the disc diffusion method. All isolates were sensitive levofloxacin, oxifloxacin, erythromycin, zithromycin, clindamycin, penicillin, ceftriaxone, ciprofloxacin and florfenicol. Except 2 strains collected from Penghu were resistant to doxycycline, oxytetracycline and tetracycline, all *S. dysgalactiae* isolates were susceptible to 12 antimicrobials examined.

Table 2. Antimicrobial susceptibility of four bacterial species to 12 antimicrobials in 2007 and 2011.

Species	Year	Tetracyclines*			Total
		DO	OTC	TET	
<i>S. dysgalactiae</i>	2007	0	0	0	7
	2011	0	0	0	7
	Penghu	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2
Total		2 (12.5%)	2 (12.5%)	2 (12.5%)	16

*DO : doxycyclin ; OTC : oxytetracycline ; TET : tetracycline

Conclusion

1. All isolates from Taiwan were more susceptible to antimicrobial than the isolates from Penghu.
2. Three pulsotypes were identified.
 - a. Pulsotypes differed between Taiwan and Penghu.
 - b. Clonal dissemination of pulsotype I was observed in Taiwan and change in subgenotypes was determined between two periods.
 - c. New pulsotype II emerged in Taiwan.



市售養殖及捕撈魚類之Cd及Pb含量與健康風險分析

張又文¹ 秦宗顯¹

國立嘉義大學水生生物科學系¹

前言

在水產養殖中，鎘和鉛可能從飼料原料及水源的污染進入養殖生物體；野外生物則會因為生物累積作用而蓄積在生物體。國際癌症研究總署 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 分別將鎘及其化合物、鉛化合物及無機鉛列為人體致癌物和人體極有可能致癌物。本研究主要在探討市售養殖及捕撈魚類之Cd和Pb含量與健康風險分析。

材料及方法

採集的生物樣品為市售之養殖吳郭魚與午仔魚及捕撈鯖魚與旗魚。

樣品前處理、消化及分析：精稱1.0g的肌肉和肝臟組織，進行消化步驟，再使用石墨式原子吸收光譜儀測定樣品中Cd和Pb的濃度。

根據我國環保署公告之「環境檢測方法偵測極限測定指引」，計算出方法偵測極限(MDL)。並計算回收率。

健康風險評估依據美國環保署「風險基礎濃度規範表」中的法規背景資訊來評估消費者的標的危害商數(THQ)， $THQ < 1$ 判定這樣的攝取量不會對消費者的健康產生危害。

結果

結果生物樣品的Cd和Pb偵測極限分別為 $0.04\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $0.08\mu\text{g}/\text{kg}$ 。Cd的回收率範圍介於88-94%之間，平均回收率為91%；Pb的回收率範圍介於92-101%之間，平均回收率為96.3%，符合我國環保署、歐盟和美國環保署的相關規定 (European Communities, 2001; 中華民國環保署, 2003; U. S. EPA, 2007)。

表1數據中顯示，肌肉中測得之鎘和鉛含量皆符合台灣食品規範 ($Cd \leq 0.3\text{mg}/\text{kg}$; $Pb \leq 0.3\text{mg}/\text{kg}$)。

依實驗數據計算出的THQ皆小於1(表2)，表示消費所攝取魚肉中的Cd和Pb不會對消費的健康產生危害。

在肌肉組織中，養殖魚種的鎘和鉛含量較野生魚種低。在養殖魚種中肝臟組織的濃度明顯高於肌肉組織。

討論

將實驗中的測定結果與表3做對照，Pb和Cd的含量皆符合表中各國限量標準。肝臟組織中重金屬含量高於肌肉組織，可能是因為肝臟為主要的代謝和解毒器官，導致重金屬的蓄積量較多。

表1 肌肉及肝臟組織中鎘和鉛的分析結果

		Pb($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Cd($\mu\text{g}/\text{kg}$)
吳郭魚		-126.055	-7.701
	肌肉	未檢出	5.904
吳仔魚		618.417	19.184
	肝臟	97.425	71.489
旗魚		61.361	-10.722
	肌肉	200.347	-13.109
鯖魚		59.651	350.432
	肝臟	173.380	328.695
旗魚		94.335	69.982
	肌肉	-358.331	-10.043
鯖魚		69.052	-5.147
	肌肉	75.955	3.774

表2 以每人每日魚肉攝取量52.97mg(中華民國糧食供需年報, 2012)計算出THQ。

	Pb的THQ	Cd的THQ
吳郭魚肌肉	—	—
吳郭魚肌肉	—	0.005
午仔魚肌肉	0.012	—
午仔魚肌肉	0.039	—
旗魚肌肉	0.018	0.055
旗魚肌肉	—	—
鯖魚肌肉	0.013	—
鯖魚肌肉	0.015	0.003

表3 各國水產品重金屬限量標準。

	Pb(mg/kg)	Cd(mg/kg)
台灣	0.3	0.3
歐盟	0.3	旗魚 ≤ 0.3 鯖魚 ≤ 0.1 其他 ≤ 0.05
香港	6(固體食品)	2
澳洲	0.5	—
韓國	2.0	—
中國	0.5	0.1
CODEX	0.3	—

(CODEX: 食品法典)

結論

FAO/WHO食品添加劑聯合專家委員會(JECFA)在2010年取消了Pb的暫定每周可容許攝入量(PTWI)；在同年將Cd的PTWI改為PTMI(暫訂每月可容許攝入量)並下修數值。雖然實驗中四種市售水產魚貨(養殖及捕撈)皆符合台灣及國際食品法規，但兩相比較養殖魚種中重金屬含量較捕撈魚種低(除了午仔魚肌肉的Pb濃度)，在攝取魚肉時盡量選購養殖魚種，且食用時去除內臟。

The coupling of membrane bioreactor with aquaponic system in tilapia culture

Chen-Yu Wang*, Hong-Thih Lai
Department of Aquatic Biosciences, National Chiayi University

Aims

Investigates the effects of membrane bioreactor (MBR) in coupling with aquaponic system on

1. growth of fish and plant
2. water quality parameter

Abstract

This study investigates the effects of membrane bioreactor (MBR) in coupling with aquaponic recirculation system (ARS) in tilapia (*Tilapia nilotica* ♂ × *T. mossambica* ♀) culture on yield of fish and water spinach (*Ipomoea aquatica*), and on water quality.

The results shows that the MBR with ARS effectively increased growths of tilapia and plant, and also reduced the concentration of turbidity, total bacterial count and COD.

Introduction

Membrane bioreactor (MBR)

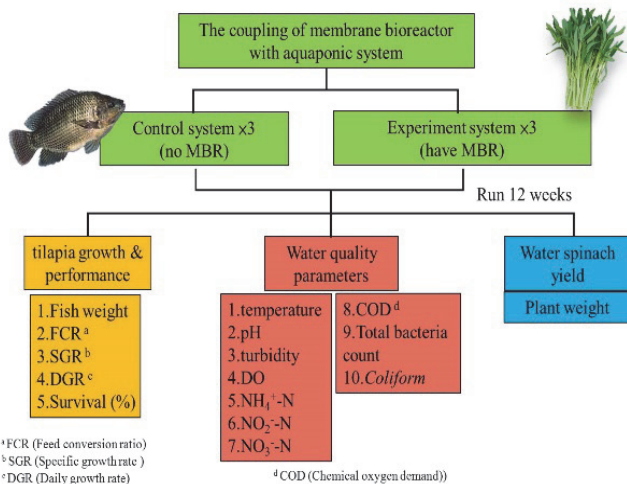
- Membrane bioreactor (MBR) is a combination of membrane process with activated sludge process.
- MBR systems eliminate the need for secondary clarifiers treatment. This allows for increased performance with a small footprint.

Experiment design

Species densities

- The culture of tilapia densities were 6 g/L.
- The planting of water spinach densities were 141 g/m².

The coupling of membrane bioreactor with aquaponic system



*FCR (Feed conversion ratio)
 †SGR (Specific growth rate)
 ‡DGR (Daily growth rate)

^dCOD (Chemical oxygen demand)



Sludge tank fish tank hydroponic tank

Results



The growth of tilapia and water spinach

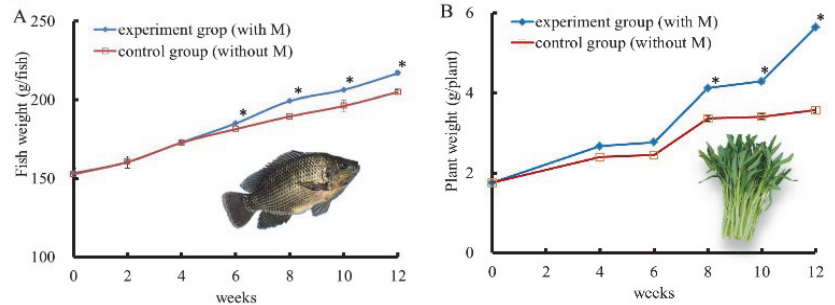


Fig 1. Growth of (A) tilapia and (B) water spinach. The growths of fish and plant in the **experiment** group were **6%** and **36%** significant **higher** than the control group, respectively.



Water quality parameter

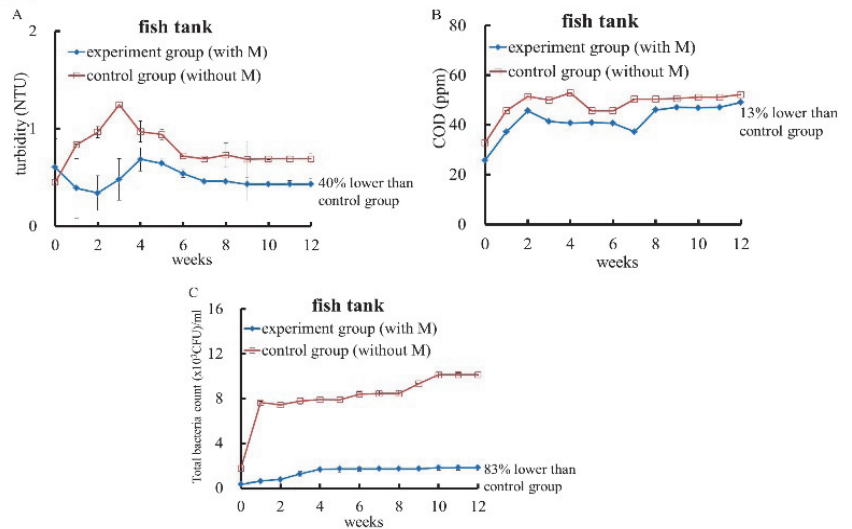


Fig 2. In fish culture tank, concentrations of (A) turbidity (B) COD, and (C) total bacterial count with the **membrane** treatment were significant **lower** than the control.

Conclusion

Membrane bioreactor (MBR) coupling aquaponic system significantly increased growths of tilapia and plant, and reduced turbidity, total bacterial count and COD.

四型文蛤(*Meretrix meretrix*)超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase)的基因定序與免疫刺激表現

龔學偉*、陳哲俊

國立嘉義大學水生生物科學研究所

摘要

本研究共選殖四型文蛤(*Meretrix meretrix*)超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)的基因序列。研究中將文蛤EST資料庫中類SOD的基因片段序列進行定序與功能性區域比對。實驗中分別選殖片段分別具有Cu/Zn、Cu、Mn、Mn/Fe等四型不同金屬輔基的超氧化物歧化酶功能區域，並在攻擊試驗中確認選殖序列表現與病原刺激中有不同應變表現情況。

研究背景與目的

台灣養殖業興盛，不論魚類、甲殼類、貝類都有數種的養殖種類，貝類當中又以牡蠣及文蛤為最大宗的養殖食用貝類。根據行政院農業委員會的統計指出，在台灣所放養的水產養殖貝類當中，在養殖面積的部份，文蛤排名第二，占總養殖面積約39%；在產量方面，文蛤則是排名第一，占總產量的60%；在產值部份，文蛤同樣排名第一，占總產值的46%。由此可見，不論從養殖面積、產值、產量來看，皆可顯示文蛤在台灣水產養殖貝類經濟的重要性。本研究希望透過超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase)基因選殖及表現，對文蛤(*Meretrix meretrix*)的免疫機制與免疫反應有更進一步的了解，期望未來能增進養殖管理的改進以及對文蛤免疫機制相關研究建立基礎資料。

簡介

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, 簡稱SOD)

超氧化物歧化酶是體內對抗自由基的第一道防線，是一種重要的抗氧化劑，廣泛存在於各類動物、植物、微生物中，保護暴露於氧氣中的細胞。當我們身體吸入氧氣進行新陳代謝時就會產生超氧陰離子(O₂⁻)自由基，若不予以消除會在體內產生連鎖反應，破壞我們的細胞，是生物體老化及疾病的元兇，SOD在體內的機能就是消除超氧離子，使它們變成對生物體無害的水及氧氣。

材料方法

實驗一 文蛤SOD基因確認

1.1 總RNA萃取

組織之Total RNA以Trizol reagent (Invitrogen)抽取。自-80°C取出備妥之組織，加入1 ml Trizol 試劑，以均質棒均質。加入0.2 ml Chloroform，均勻搖晃15秒，室溫靜置3分鐘後，再加入0.12 ml 3M NaOAc，接著於4°C下以12000×g離心15分鐘，取最上層的透明液體移至另一個無菌1.5 ml微量離心管中，加入0.5 ml 2-isopropanol，均勻搖晃15秒，置於-80°C中30分鐘使RNA沉澱，再於4°C下以13000×g離心10分鐘，倒去上清液，加入1 ml 75% EtOH(-20°C)，於4°C下以7500×g離心5分鐘，倒去上清液，微量離心管底部之白色沉澱物為RNA，風乾至殘餘酒精完全蒸發，加入50µl TE buffer (TE buffer使用量視RNA沉澱量而定)將RNA溶解，利用分光光譜儀於260nm波長下測吸光值，並保存於-80°C備用。

1.2 RT-PCR

轉錄酶聚合酶連鎖反應(Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)依照MMLV Reverse Transcription Kit Protocol進行轉錄成cDNA，並保存於-20°C備用。

1.3 primer設計

依照EST資料庫的序列片段設計Cu/Zn SOD、Cu SOD-like、Mn/Fe SOD-like、Mn SOD-like的primer。

1.4 聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction)

將萃取出來的模板DNA、primer、polymerase依照kit指示劑量在tube混合均勻後進行PCR反應，從cDNA擴增出特定的片段。

1.5 膠體電泳

利用膠體電泳和EtBr染色法以確認PCR反應的結果是否為目標的片段大小。以100V、25 min 進行電泳。電泳結束後用EDTA染色10分鐘，照紫外燈進行觀察與拍照紀錄。

實驗二 SOD免疫刺激表現

2.1 文蛤免疫刺激

將挑選好的文蛤用牡蠣刀小心撬開適當大小的縫隙，接著使用微量注射器注射50 µl的溶藻弧菌*Vibrio alginolyticus* (7x10⁸ CFU/ml)以及50 µl的PBS分別作為實驗組和對照組。

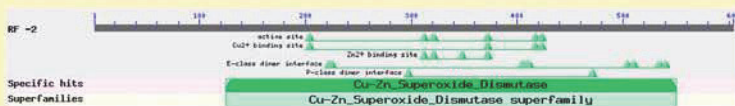
將分別注射好的文蛤隨機分組，注射溶藻弧菌的文蛤隨機分成實驗組一、實驗組二、實驗組三，三個重複組；注射PBS的文蛤，同樣隨機分成對照組一、對照組二、對照組三，三個重複組，全部總共六組。接著在0小時、12小時、24小時、48小時，各個時間點分別對每一組的文蛤進行採樣，每一個採樣文蛤各取外套膜、鰓、斧足、肝胰臟、閉殼肌等五個組織，並將組織放入Trizol保存中置於-80°C下保存，以備後續使用。

2.2即時定量聚合酶連鎖反應(Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction, rtqPCR)

先將利用MMLV Reverse Transcription Kit (Protech Technology Enterprise, Taiwan)反轉錄好的cDNA產物進行十倍稀釋，作為模板使用。取1 µl稀釋過後的 template cDNA, 0.5 µl primer F, 0.5 µl primer R, Smart Quant Green Master Mix 12.5 µl, 10.5 µl ddH₂O在QPCR專用的八連排微量離心管中混合均勻，放進QPCR機器中進行反應。反應溫度流程為：50°C兩分鐘、95°C十分鐘，接著進行四十次循環擴增，每個循環為：95°C十五秒、55°C一分鐘(此溫度視引子Tm不同而調整，見表一)。四十個循環結束後，接著進行檢測單一產物的溫度流程95°C十五秒、60°C一分鐘、95°C十五秒。反應結束後收集Ct值進行分析並統計。

結果

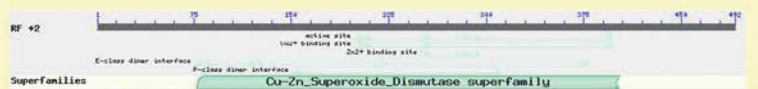
選殖Cu/Zn SOD片段共有602個核苷酸鹼基對，可編譯出153個胺基酸，在NCBI資料庫中BLAST到相似度最高的三個物種依序為*Meretrix meretrix*(ACZ95447.1)，Ident : 99%、E value : 4e-102。 *Crassostrea hongkongensis*(ADR70998.1)，Ident : 69%、E value : 3e-68。 *Crassostrea madrasensis*(AFV52312.1)，Ident : 69%、E value : 2e-67。



選殖SOD-like序列共有419個核苷酸鹼基對，編譯出67個胺基酸，在NCBI資料庫中BLAST到相似度最高的三個物種依序為*Lottia gigantea*(ESO85652.1)，Ident : 55%、E value : 7e-41。 *Ciona intestinalis*(XP_002122009.1)，Ident : 42%、E value : 5e-32。 *Capitella teleta*(ELU12420.1)，Ident : 44%、E value : 7e-32。



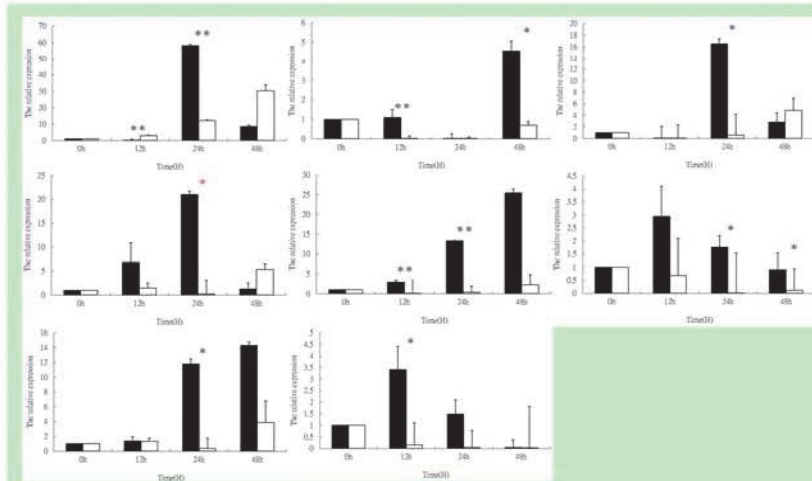
選殖Mn/Fe SOD-like序列共有168個核苷酸鹼基對，編譯出48個胺基酸，在NCBI資料庫中BLAST到相似度最高的三個物種依序為*Capitella teleta*(ELT92303.1)，E value : 6e-08、Ident : 66%。 *Endozoicomonas elysicola*(WP_020581248.1)，Ident : 68%、E value : 1e-07。 *Agarivorans albus* MKT 106(WP_016401880.1)，Ident : 68%、E value : 2e-07。



選殖Mn SOD-like序列共有404個核苷酸鹼基對，編譯出87個胺基酸，在NCBI資料庫中BLAST到相似度最高的三個物種依序為*Ruditapes philippinarum*(AFO64928.1)，Ident : 81%、E value : 2e-69。 *Cyclina sinensis*(AFI24612.1)，Ident : 80%、E value : 2e-68。 *Aphysia californica* (XP_005104703.1)，Ident : 78%、E value : 8e-66。



由比對的結果得知Mn/Fe SOD的差異較其他SOD來得大，可推測其起源可能較其他SOD早或是在演化過程中可能較早獨立分離成一單獨SOD蛋白質家族。



黑色為注射溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的實驗組；白色為注射PBS的對照組；*表示顯著差異(P<0.05)；**表示極顯著差異(P<0.01)；*表示幾近顯著差異(P=0.051)。

從上面的實驗結果可以看到，文蛤在受到注射溶藻弧菌的免疫刺激後，各型的SOD皆在數小時內即會與對照組有顯著的差異，符合SOD在短時間內就會受到免疫反應影響的特性，而且各型SOD在不同組織間的各個時間點有不同的表現消長情況，不論是同一型SOD在不同組織間的表現情況或是各型SOD在同一組織的表現情況，都可以明顯看出這四型SOD隨著時間點的推進會有不同的消長情形，顯示這幾段SOD序列應是各自獨立的，而非相同基因的前後段序列。