

2025 年【科學探究競賽-這樣教我就懂】

高中 (職) 組 成果報告表單

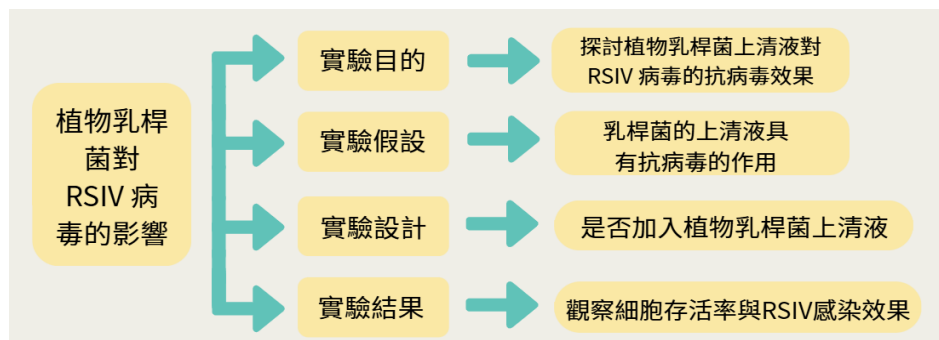
題目名稱： 益生菌能抗病毒？植物乳桿菌對 RSIV 的影響
一、摘要
我們在參觀魚類相關實驗室時，認識了 Rsiv 病毒（嘉納虹彩病毒），是一種常見且對台灣漁業造成重大損失的魚類病毒。同時，我們發現植物乳桿菌常用於魚類保健食品中，因此設計實驗，探討植物乳桿菌是否具有抗 Rsiv 病毒的效果，我們將植物乳桿菌上清液與 rsiv 病毒液混合，利用 96 孔盤觀察感染效果。初步結果顯示植物乳桿菌上清液有抑制 Rsiv 病毒感染的效果，抑制率約為 53.2%，推測上清液中含有具抑制病毒功能的蛋白，未來可進一步研究其活性成分與作用機制。
二、探究題目與動機
日常生活中優酪乳和發酵食品中常含有益生菌，它能夠維持腸道健康。而益生菌不僅對人類健康有幫助，對於魚類養殖也有益處。台灣漁業中，養殖魚常受到魚類病毒的威脅，而在參觀魚類實驗室時，認識了 Rsiv 病毒（嘉納虹彩病毒），是一種死亡率高、可感染超過三十種魚類的病毒，也被 WOA H 列入重點的動物及魚類病毒。目前防治 Rsiv 病毒的方法有商品化福馬林不活化 Rsiv 疫苗、避免引進污染的魚苗、改善飼養管理等。而益生菌作為一種自然的免疫增強劑，可成為對抗這類病毒的手段。因此，我們想利用實驗探討益生菌防治 Rsiv 病毒的效果，如果有效，將能防範此病毒的傳播途徑，並減少對環境的負面影響。這將對魚類養殖業帶來很大的幫助。
三、探究目的與假設
(一) 目的： 分析與觀察植物乳桿菌的上清液對於 Rsiv 病毒是否有抗病毒效果 (二) 假設： 植物乳桿菌的上清液具有抗病毒的作用 名詞定義： 植物乳桿菌(Lactiplantibacillus plantarum) LP 菌 在生活中很常見，不僅在人類的食品與疾病治療上有所應用，也常被用於魚類養殖的保健食品，能促進魚類的生長、增強魚類免疫系統、保健魚類的腸道等等功能。 嘉納虹彩病毒(Red sea bream iridovirus) Rsiv 是一種常見的魚類病毒，好發於脾、心、腸、鰓與腎臟，且幼魚比成魚更易感染，對於受感染魚類死亡率為 30%。而這種病毒被 WOA H 列入重點的動物及魚類病毒，感染大約三十種的養殖魚類，目前本病毒地理分佈在東亞地區，包含日本、臺灣、泰國、新加坡等等地區。 鱸魚的腎臟細胞 SK cells 因取得與培養較於方便，且 Rsiv 細胞好發於魚類腎臟，所以選用此細胞。 乳酸菌屬的培養基 MRS 培養植物乳酸菌的培養基底，也做於本次實驗的對照組。

四、探究方法與驗證步驟

一、研究設備與器材:

植物乳桿菌菌株、嘉納虹彩病毒株 Rsiv、鱸魚腎臟細胞 SK cells、固態細菌培養基 (agar)、液態細菌培養基(MRS)、細胞培養液 (L15 medium)、微量吸管 + pit、pH 感測器、細胞培養箱、細菌培養箱、離心機、0.45 μm 過濾膜、針筒、生物安全櫃、96 孔盤、倒立式顯微鏡、微量離心管、血清瓶、手套

二、研究架構：



三、實驗流程介紹:

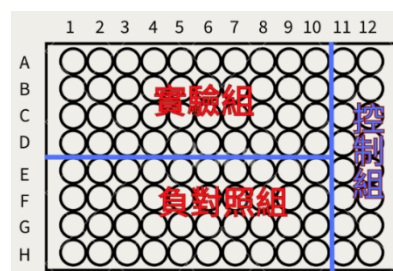
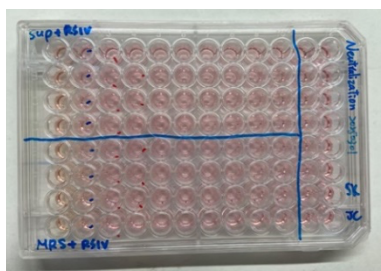
(一) 實驗概念:

操縱變因: 是否加入植物乳桿菌 (*Lactobacillus plantarum*, LP) 上清液

應變變因: RSIV 的感染程度與 SK 細胞存活率: 透過倒立式顯微鏡觀察細胞病變效應(CPE, Cytopathic Effect) , 並透過公式計算植物乳酸菌上清液對 rsiv 病毒的抑制效果。

(二) 簡介 96 孔盤

96 孔盤是本實驗中重要的實驗器材, 讓我們同時進行多組條件的處理與觀察。藉由每個小孔作為獨立的實驗單位, 可以有效進行病毒測試與細胞毒性分析, 提高實驗準確性與效率。



在我們的實驗中 96 孔盤主要分為三組, 實驗組、負對照組、與控制組, 分配方法如圖所示

四、實驗前置作業

1. 植物乳酸菌上清液製作

將植物乳桿菌從冷凍庫解凍後, 先接種於固體培養基中, 培養 24 小時, 挑取單一菌落, 使用液態培養基 (MRs)進行兩次擴大培養, 培養完成後。使用離心機, 將菌液離心, 再使用 0.45 μm 濾膜過濾上清液, 去除細菌與雜質, 再以氫氧化鈉調整 pH 至 pH 7.0, 避免過酸的

上清液破壞細胞。最後在無菌操作台內再次過濾，並且分裝冷凍。



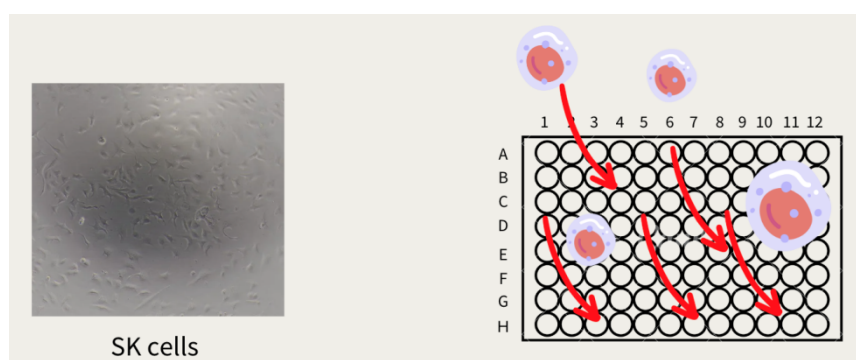
圖（四）離心後的植物乳桿菌上清液



圖（五）用濾膜過濾的植物乳桿菌上清液

2. SK 細胞培養與種植於 96 孔盤中：

將成熟的 SK 細胞（鱸魚的腎臟細胞）以八爪微量吸管將固定體積的細胞液種入 96 孔盤的每一個孔中，將 96 孔盤放值於細胞培養箱，培養 24 小時。



圖（六）：將 SK 細胞種入 96 孔盤的示意圖

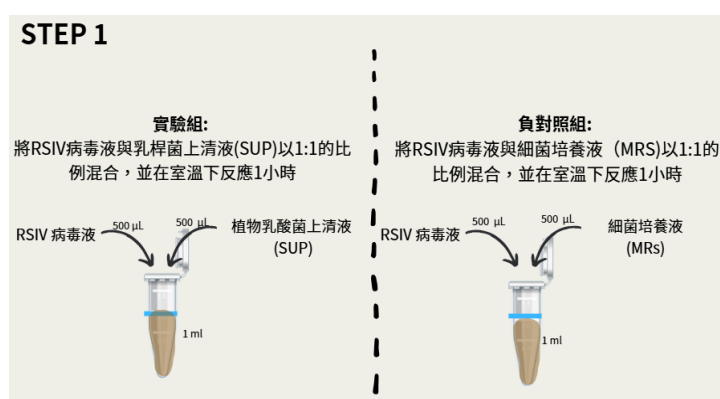
五、實驗方法與步驟:

步驟一：

這一步的是為後續實驗準備實驗組與負對照組的混合液。

實驗組：我們將 RSIV 病毒與植物乳桿菌上清液以 1:1 的體積比例(各 500 μ L)混合。

負對照組：將 RSIV 與 MRS 培養基等比例混合。混合後放置室溫一小時，讓混合液充分反應。



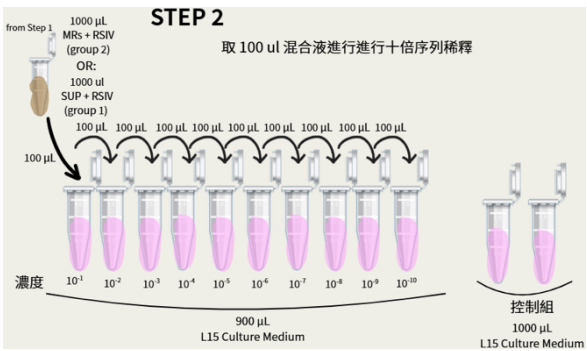
圖（七）：實驗步驟一的示意圖

* 使用 MRS 培養基是因為它是植物乳桿菌的基底培養基，確保對照組和實驗組僅差在是否含有 LP 上清液。

步驟二：

這一步是將前一步準備好的 RSIV 混合液進行十倍序列稀釋，目的是觀察不同濃度病毒對細胞的影響，進而評估植物乳桿菌上清液的抑制病毒效果。稀釋時使用 L15 細胞培養基，使

用與細胞相容的培養基能確保病毒稀釋後能安全加入細胞中，不會因培養液不相容而影響細胞生長或實驗結果。

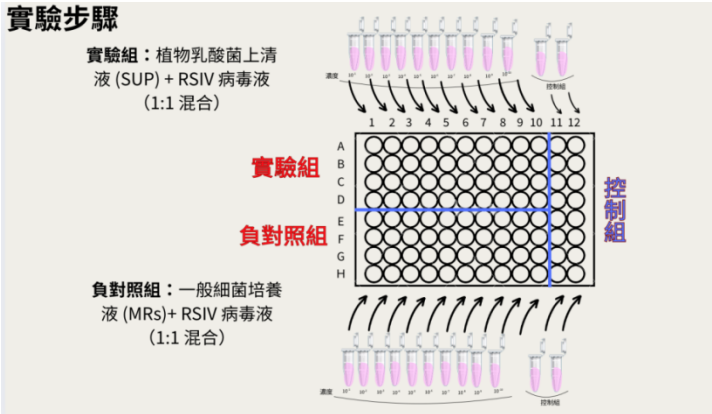


圖（八）實驗步驟二的示意圖

步驟三

實驗組：將稀釋後的 12 管溶液依序加入 96 孔盤的 A 至 D 排中（每孔 0.1 ml），依濃度由高至低排列於第 1 至 10 孔，11 與 12 孔為控制組。

負對照組則同樣操作，分配至 E 至 H 排中，依濃度高至低排列，而 11 與 12 孔為控制組。



圖（九）實驗步驟三的示意圖

六：實驗預期效果

實驗組：主要用來測試植物乳桿菌上清液 (SUP) 的抗病毒效果。此區預期 SK 細胞會受 RSIV 病毒感染，但植物乳桿菌上清液 (SUP)應有抗病毒之效果，因此感染量會減少。

負對照組：此區預期 SK 細胞會受 RSIV 病毒感染，但無植物乳桿菌上清液進行病毒中和，因此可用於和實驗組比較與計算 RSIV 感染效果。

控制組：使用統一濃度的細胞培養液 L15，無加入病毒液和植物乳桿菌，此區預期 SK 細胞應正常生長，確保培養環境是否合宜。

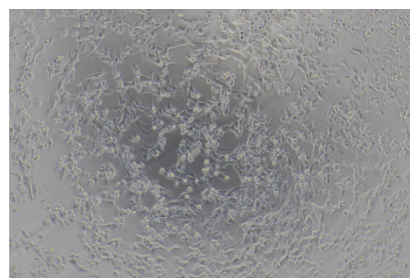
七、檢測方式:

（一）記錄方式

由於各個孔洞的病毒液濃度不同，細胞會在不同的天數出現感染狀態(CPE, Cytopathic Effects)。因此我們每天固定時間以倒立式顯微鏡觀察細胞狀態、感染狀態與數量。

（二）正常與受感染細胞判讀：

正常細胞 (200 倍下拍攝)	受感染細胞 (200 倍下拍攝)
-----------------	------------------



正常細胞：正常鱸魚腎臟細胞呈多邊形或長方形狀態，使得他們可以緊密的貼合，具有中央球形細胞核和明顯的核仁。

受 RSIV 感染細胞：受感染的鱸魚腎臟細胞會有兩個明顯的特徵，細胞脹大與空泡化，細胞脹大是由於 RSIV 病毒使用細胞的蛋白質工廠進行快速地複製，因而影響細胞胞器正常運作而造成脹大，空泡化則是因為細胞自噬作用，以及細胞粒線體破壞所形成的腫大與滲漏。

(三) 為何於第四天結束實驗並計算數據：

觀察時，我們會確認控制組中的細胞是否正常生長，以確保培養的環境是否合宜。在實驗第四天時，發現控制組的細胞出現空泡化，推測是因為營養物質不足所造成的細胞凋亡現象，因此，我們決定在實驗第四天時收集實驗數據。

八、實驗結果

(一)：感染表格

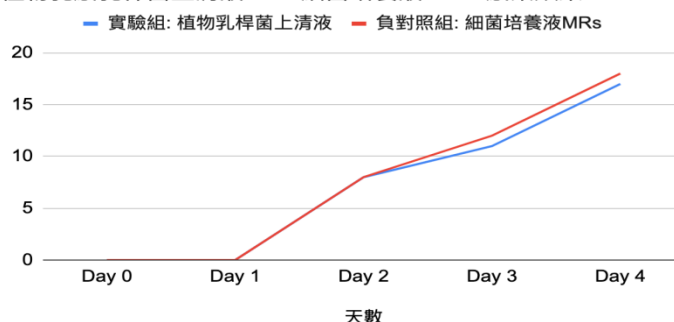
根據第四天採集的結果，我們可以繪製出以下感染格數的圖表：

表 (一)：實驗組與負對照組感染格數的紀錄 Day 0 - Day 4

組別 / 天數	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
實驗組: (感染格數：個)	0	0	8	11	17
負對照組: (感染格數)	0	0	8	12	18

根據表格我們可以了解在第二天時，濃度在 10^{-1} 和 10^{-2} 的 8 格細胞受到感染並產生病變效應，而在 Day 3 與 Day 4 時，實驗組與負對照組皆有細胞受感染，並有差距一格的感染效果。

植物乳感桿菌上清液 V.S. 細菌培養液 MRs 感染效果



(二) 實驗結果計算與判讀：

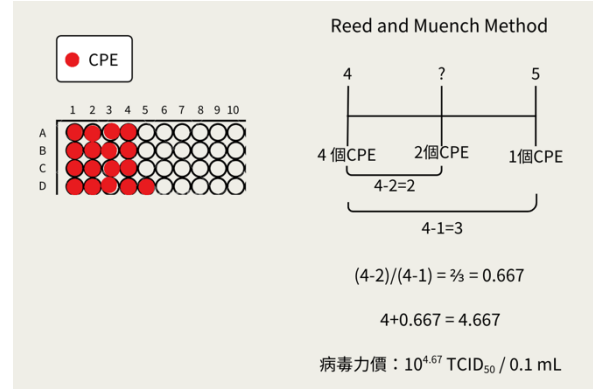
1.：計算病毒力價

病毒力價計算是用來計算病毒感染細胞的強度，當病毒力價的數值越高，代表病毒感染宿主的能力越強。

根據以上結果，我們可以使用 Reed and Muench method 計算病毒力價，計算方式如圖(十五)所示：

a.實驗組：病毒力價為 $10^{4.67}$ TCID₅₀/ 0.1 ml

b.負對照組：病毒力價為 10^5 TCID₅₀/ 0.1 ml



因此，負對照組有更強的病毒力價，也就是說其病毒感染能力更強，而實驗組有較低的病毒力價，也就是更低的病毒感染能力。

2.計算植物乳酸菌上清液抑制效果：

圖(十五)病毒力價計算公式。

得到上述結果後，我們將實驗組的數據除上負對照組之數據，即可得到病毒抑制效果： $10^{4.67} / 10^5 = 10^{-0.33} = 0.468$, = 46.8 %，此結果為實驗組的病毒存量為 46.8%，與對照組相比，病毒數量減少了 $100\% - 46.8\% = 53.2\%$ ，為此實驗的抑制效果。

此結果初步證實植物乳酸菌上清液具有抗病毒的效果，而根據計算得知，53.2% 為植物乳酸菌上清液的病毒抑制效果。

五、結論與生活應用

九十六孔盤之實驗結果顯示，有加入植物乳酸菌上清液的部分相較未加的有更好的抗病毒效果，在病毒濃度 10^{-5} 下，有加入植物乳酸菌上清液的部分有一格的抑制病毒效果，並根據相關公式計算，得抑制比例為 53.2 %，證實植物乳酸菌的上清液確實具有抗病毒的效果，與我們的實驗假設一致。我們認為植物乳酸菌上清液有抑制 rsiv 病毒生長效果，因為上清液中含有許多種類的蛋白質，對細菌生存至關重要，舉例來說，某些細菌能夠產生抗微生物肽 (AMPs)，能抑制病毒、真菌等微生物的生長，而未來實驗中，可在更細部的分析植物乳酸菌上清液中的成分與濃度，確認其中的抗病毒成分，也能探討植物乳酸菌上清液是否有預防感染、治療等效果。

參考資料

1. 黃淑敏 (2008.3) 水產動物疾病防疫新概念-魚類疫苗使用情形簡介. 農業部,農政與農情 <https://www.moa.gov.tw/ws.php?id=13988>
2. 涂堅 (2012.7.16). 嘉納虹彩病毒病, 水生動物疾病診斷輔助系統 <https://aqua.nvri.gov.tw/disSheet.aspx?id=3iIt9TLkBzY%3D>
3. Woah. (n.d.). https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/International_Standard_Setting/docs/pdf/2.3.07_RSI_VD.pdf
4. (Sept. 1, 2007). Cytopathic Effects of Viruses. American Society for Microbiology . <https://asm.org/protocols/cytopathic-effects-of-viruses-protocols>