

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

發酵糖類釋出氣體的兼氣性海洋細菌之研究（二）

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC - 89 - 2313 - B - 002 - 086

執行期間：88年8月1日至89年7月31日

計畫主持人：謝文陽

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立臺灣大學海洋所

中華民國 89 年 9 月 25 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

發酵糖類釋出氣體的兼氣性海洋細菌之研究 (二)

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-086

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：謝文陽 國立臺灣大學海洋所

計畫參與人員：陳怡文 周青慧 徐昭龍 邱秀慧 林育德

一、中文摘要

本研究在台灣北部沿海設立 11 個採樣點，針對分布於此間的好鹽性兼性嫌氣性發酵產氣細菌之生菌數和種多樣性進行調查，並期待能發掘出前所未見的種類。調查結果發現在各採樣點中，對象菌的密度介於 10^1 至 10^4 cells/100 ml 之間。篩選出的四十三株好鹽性兼性嫌氣性發酵產氣菌中，有十二株在繼代培養過程中，失去於發酵醱類時產氣的性質，其餘分離株，皆為以極性鞭毛運動之革蘭氏陰性桿菌，它們都能以葡萄糖作為生長所需之唯一碳源，且都無法生長於不含鈉鹽的培養基中。這三十一株分離株依其表型特性，可區分成五群。第一群：僅有一株；菌落呈紅色，圓形；細胞為弧形桿狀；氧化反應為負；可還原硝酸鹽；能利用 mannitol 為唯一碳源。第二群：共六株；菌落呈白色，稍透明，圓形；細胞呈弧形桿狀；氧化反應為負；可還原硝酸鹽；能利用 mannitol 為唯一碳源。第三群：共三株；菌落呈白色，稍透明，圓形；細胞為弧形桿狀；氧化反應為正；無還原硝酸鹽能力；能利用 mannitol 為唯一碳源。第四群：共三株；菌落呈白色，不透明，圓形；細胞呈短直桿狀；氧化反應為正；可還原硝酸鹽；無法利用 mannitol 為唯一碳源。第五群：共十八株；菌落呈白色，稍透明，圓形；細胞呈弧形桿狀；氧化反應為正；可還原硝酸鹽；能利用 mannitol 為唯一碳源。這五群之代表株經 16S rDNA 定序與親緣分析後發現，它們都是屬於弧菌科 (Vibrionaceae) 中的弧菌屬 (*Vibrio*) 或發光

菌屬 (*Photobacterium*)。就 16S rRNA 序列之相似度而言，與第一群唯一菌株 NFG1 最相似之菌種為無產氣能力的 *Vibrio fluvialis* (相似度 93.7%) 及亦具有紅色色素和產氣能力的 *Vibrio gazogenes* (相似度 93.6%)。第二群的代表株 NFG2 之最相似菌種為 *Vibrio furnissii* (相似度 97.8%)。第三群代表株 NFG3 之最相似菌種為無產氣能力的 *Vibrio tubiashi* (相似度 96.6%)。第四群代表株 NFG4 之最相似菌種為 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (相似度 98.8%)。第五群的代表株 NFG5 之最相似菌種為 *Vibrio furnissii* (相似度 96.7%)。依照表型與 16S rDNA 序列分析的結果，NFG1 與 NFG3 可確定為新種，NFG4 應可歸類於 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*，至於其他二株代表株之分類地位，則有待進一步確認。

關鍵詞：好鹽性、發酵產氣、16S rDNA 序列

Abstract

A search for halophilic, facultatively anaerobic bacteria that ferment carbohydrates with gas production has been made in the present study. The most-probable-number (MPN) counting values of these bacteria in the coastal seawater collected from northern Taiwan were estimated to be in the range of 10^1 to 10^4 cells/100 ml. Forty-three bacterial strains that ferment carbohydrates with gas production were isolated from the MPN counting tubes.

Twelve lost the gas-producing property after subculture among them. All the other isolates were Gram-negative, and motile by polar flagella. They were able to grow in a mineral medium containing D-glucose, and could ferment carbohydrates with gas production. These isolates required Na^+ for growth. According to phenotypes, thirty-one strains were divided into five groups. Group 1 contained only one strain, which produced red colonies. The cells were curved rods in shape and oxidase-negative. The strain was able to assimilate mannitol as sole carbon source, and reduced nitrate. Group 2 contained six strains, which produced white and transparent colonies. The cells were curved rods in shape and oxidase-negative. The strains were able to assimilate mannitol as sole carbon source, and reduced nitrate. Group 3 contained three strains, which also produced white and transparent colonies. The cells were curved rods in shape and oxidase-positive. The strains were able to assimilate mannitol as sole carbon source, and couldn't reduce nitrate. Group 4 contained three strains, which produced white and opaque colonies. The cells were short and straight rods in shape and oxidase-positive. The strains weren't able to assimilate mannitol as sole carbon source, and reduced nitrate. Group 5 contained eighteen strains, which produced white and transparent colonies. The cells were curved rods in shape and oxidase-positive. The strains were able to assimilate mannitol as sole carbon source, and reduced nitrate. The levels of 16S rDNA sequence similarity compared with any sequences available in the GeneBank database revealed that the representative strains NFG1 and NFG3 of Group 1 and Group 3 could be considered to represent various new

species. The representative strain NFG4 of Group 4 was identified as *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. The taxonomic status of NFG2 and NFG5 that representative strains of Group 2 and Group 5 couldn't be determined.

Keywords: halophilic, ferment carbohydrates with gas production, 16S rDNA sequence

二、緣由與目的

棲息於海洋環境中的細菌包含好鹽菌與非好鹽菌，一般只有好鹽菌才被認為是真正的海洋細菌。能在嫌氣條件下生存與繁殖之海洋好鹽性細菌多為具有發酵醣類能力的兼性嫌氣性細菌(facultative anaerobes)。目前已知的此類海洋細菌皆被納入弧菌科(Vibrionaceae)。弧菌科為海洋環境中最重要之細菌群之一，普遍見之於各類海洋棲地中，為海洋魚類腸道中的主要生物。部份種類為人類、魚類、鰻魚與蛙類及其他脊椎與無脊椎動物的病原菌。

發酵葡萄糖過程中伴生產氣之性質，普遍見之於非好鹽的腸內細菌科(Enterobacteriaceae)與產氣單胞菌科(Aeromonadaceae)之菌種，而在幾乎全為好鹽性菌種的弧菌科中卻僅少數具此特性。弧菌科中已知在發酵時產氣的菌種僅有 3 屬 8 種。

曾被報告能在發酵醣類過程中伴隨產氣之兼性嫌氣性海洋原生細菌種類並不多。本實驗室曾於墾丁國家公園的南灣海岸沈積物中針對好鹽性兼性嫌氣性發酵產氣菌進行分離，發現了一株未知菌種，經命名為 *Vibrio aerogenes*。吾人認為海洋中應尚有許多菌種未被發現，因此本研究首先針對分布於台灣北部沿海的好鹽性兼性嫌氣性發酵產氣細菌進行了種多樣性的調查，並希望能發現前所未見的種類。其次吾人進一步將分離株進行親緣分析，以得知其分類地位與演化關係。本研究除了形態、生化與生理等表型測試外，由於 16S rRNA 基因序列資訊的獲得較其他基因來得容易，因此特選擇 16S rRNA 基因做親緣關係之分析，希望能整合基因序列的資訊與表型的分析，而獲得較客觀且正確的鑑定結果。

三、結果

計數與分離

以 MPN 法估得台灣北部沿岸各測站海水中之發酵產氣菌數目約介於 10^1 至 10^4 cells/100 ml 之間。在海水中密度以白沙灣 B 最低，翡翠灣 A 最高。共篩選出 43 株好鹽性兼性嫌氣性發酵產氣菌，但有 12 株於保存過程中失去發酵醱類時產氣的能力，僅以其餘 31 株繼續進行實驗。

形態、生理與生化特性檢測

31 株對象菌，皆為革蘭氏陰性菌，以極性鞭毛運動，能以葡萄糖為唯一碳源，具發酵葡萄糖時產氣的能力，無法生長於不含鈉鹽的培養基中，共區分為五群。

第一群：菌落呈紅色圓形；細胞弧形桿狀；氧化反應為負；無 arginine dihydrolase、lysine decarboxylase 與 ornithine decarboxylase 等活性；可還原硝酸鹽；對 O/129 不具感受性；能利用 mannitol 為唯一碳源。第二群菌落呈白色圓形，稍透明；細胞弧形桿狀；氧化反應為負；無 arginine dihydrolase 與 ornithine decarboxylase 之活性，lysine decarboxylase 活性則具變異性；可還原硝酸鹽；對 O/129 之感受性具變異；能利用 mannitol 為唯一碳源。第三群菌落呈白色圓形，稍透明；細胞弧形桿狀；氧化反應為正；無 arginine dihydrolase、lysine decarboxylase 與 ornithine decarboxylase 等活性；無還原硝酸鹽能力；對 O/129 不具感受性；能利用 mannitol 為唯一碳源。第四群菌落呈白色圓形，不透明；細胞短直桿狀；氧化反應為正；具 arginine dihydrolase 與 lysine decarboxylase，但無 ornithine decarboxylase 之活性；可還原硝酸鹽；對 O/129 之感受性具變異性；無法利用 mannitol 為唯一碳源。第五群菌落呈白色圓形，稍透明；細胞弧形桿狀；氧化反應為正；無 arginine dihydrolase、lysine decarboxylase 與 ornithine decarboxylase 等活性；可還原硝酸鹽；對 O/129 感受性具變異性；能利用 mannitol 為唯一碳源。

發酵產氣測試

除第四群，其餘菌株皆可以 mannitol 發

酵產氣；僅第二群與第五群中各一株分離株能利用 dulcitol 發酵產氣；僅第四群可發酵 trehalose 並產氣；無可以 inositol 進行發酵者；除第二群中一株菌株外，所有群皆具發酵 galactose 並產氣的能力；除第三群中一株菌株外，餘皆可利用 cellobiose 發酵產氣；所有群皆可以 sucrose 發酵產氣。

穿透式電子顯微鏡鏡檢

NFG1 具有單根具鞘極性鞭毛，細胞為弧形桿狀。培養於 PY broth 培養基中 2 日，長度約 $2.2\mu\text{m}$ 。NFG3 具有單根具鞘極性鞭毛，細胞為弧形短桿狀。培養於 PY broth 培養基中 2 日，長度約 $1.7\mu\text{m}$ 。

16S rRNA 基因序列比對

第一群的 NFG1 最相似菌種為無產氣能力的 *Vibrio fluvialis*，相似度為 93.7%，而弧菌屬中亦具有紅色色素與產氣能力的 *Vibrio gazogenes*，與其相似度僅有 93.6%。第二群的代表株 NFG2，最相似菌種為 *Vibrio furnissii*，相似度為 97.8%。第三群代表株為 NFG3，經比對，與其最相似菌種為無產氣能力的 *Vibrio tubiashi*，相似度為 96.6%。其次與 *Vibrio nereis* 相似度為 96.1%。第四群的菌株 NFG4，比對後之最相似菌種為 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*，相似度為 98.8%。第五群的代表株 NFG5，比對結果最相似菌種為 *Vibrio furnissii*，其相似度為 96.7%。

親緣關係的決定

Maximum-parsimony 與 neighbor-joining 所重建出的親緣關係樹狀圖共分六群，第 I 群由所有的 *Photobacterium* 菌種所構成，其餘皆由 *Vibrio* 菌種組成。NFG4 落入第 I 群中，NFG1 屬於第 群，NFG2 與 NFG5 則和 NFG3 分屬於第 群的二個小群。

NFG4 與 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* 及 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 落在第 群中的同一小群，此小群與其他 *Photobacterium* 菌種距離較遠，而 NFG4 顯然與 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* 有較近的親緣關係。NFG1 與 *Vibrio gazogenes* 及 *Vibrio aerogenes* 落入第 群，顯示其彼此較其他菌種接近，但仍顯示出有一段距離。NFG3 與 *Vibrio nereis* 及 *Vibrio*

tubiashi 共同落入第 群的一小群，親緣關係雖近於其他菌種，仍顯示出明顯差距。NFG5 與 NFG2 落入第 群中另一小群，與 *Vibrio fluvialis* 及 *Vibrio furnissii* 聚在一起，NFG5 與 NFG2 彼此的親緣關係比與 *Vibrio fluvialis* 及 *Vibrio furnissii* 的親緣關係來得近，但仍有一定的差異存在。

四、討論

由細菌計數的結果看來，發酵產氣菌在海洋中所佔比例並不高。

第一群的 NFG1 為 *Vibrio* 中的一個新種。第二、第五兩群的代表株 NFG2、NFG5 兩者之關係仍待進一步實驗確認。但不排除 NFG2 與 NFG5 為新種，目前可斷定的是兩者屬於 *Vibrio* 之菌種，且與 *Vibrio furnissii* 親緣極為接近。第三群的代表株 NFG3 可確認其為弧菌屬之新種 第四群的代表株 NFG4 應為 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*。

五、計畫成果自評

(A) 執行本計畫已完成：

1. 沿岸海水中對象菌(在發酵糖類時能產生氣體的兼氣性異營細菌)的菌數及菌種之調查。
2. 分離出 43 株對象菌，其中 31 株行以繼代保存。
3. 檢測了 31 株分離株之多項形態、生理與生化特性。
4. 完成代表株之 16S rDNA 之定序及其與所有已知細菌的 16S rDNA 序列之比對。
5. 根據 4 之結果建立其與已知的近緣細菌種間之親緣關係樹。
6. 確定分離株至少可區分為 5 個菌種，而其中至少二分離株為未知菌種。

(B) 參與本計畫的工作人員已習得細菌的培養、計數、純化、分離、保存和鑑定等種種技術。

六、參考文獻

Baumann, P. and R. H. W. Schubert. 1984. Vibrionaceae, p. 516-575. In N. R. Krieg and

J. G. Holt (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.

Brenner, D. J., F. W. Hickman-Brenner, J. V. Lee, A. G. Steigerwalt, G. R. Fanning, D. G. Hollis, J. J. Farmer III, R. E. Weaver, S. W. Joseph, and R. J. Seidler. 1983. *Vibrio furnissii* (Formerly Aerogenic Biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment. Journal of Clinical Microbiology 18:816-824.

Harwood, C. S. 1978. *Beneckeia gazogenes* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, marine bacterium. Current Microbiology 1:233-238.

Kita-Tsukamoto, K., H. Oyaizu, K. Nanba, and U. Simidu. 1993. Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family Vibrionaceae, determined on the basis of 16S rRNA sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 43:8-19.

Love, M., D. Teebken-Fisher, J. E. Hose, J. J. Farmer III, and G. R. Fanning. 1981. *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. Science 214:1139-1140.

Ruimy, R., V. Breittmayer, P. Elbaze, B. Lafay, O. Boussemart, M. Gauthier, and R. Christen. 1994. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 44:416-426.

Shieh, W. Y., A. L. Chen, and H. H. Chiu. 2000. *Vibrio aerogenes* sp. nov., a facultatively anaerobic marine bacterium that ferments glucose with gas production. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50:321-329.

Stackebrandt, E. and B. M. Goebel. 1994. Taxonomic note : a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. International Journal of Systematic Bacteriology 44:846-849