

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

台灣北部沿岸海域中海綿附存型和浮游型發光細菌之多樣
性

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-002-060-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學海洋研究所

計畫主持人：謝文陽

計畫參與人員：林育德、邱秀慧、范嵐楓、劉東岩、吳俊毅

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 8 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

台灣北部沿岸海域中海綿附存型和浮游型發光細菌之多樣性

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 93-2313-B-002-060

執行期間：93 年 08 月 1 日至 94 年 07 月 31 日

計畫主持人：謝文陽教授

共同主持人：

計畫參與人員：林育德、邱秀慧、范嵐楓、劉東岩、吳俊毅

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：台灣大學海洋研究所

中華民國 94 年 8 月 18 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號: NSC 93-2313-B-002-060

執行期限: 93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31

主持人: 謝文陽 執行機構及單位名稱: 台大海洋所

一、中文摘要

本研究在台灣北部沿海不同地區採集了海水和海綿樣本，針對這些樣本所含發光細菌進行了計數及分離。平板計數結果顯示，有八個海綿樣本發光細菌之生菌數介於 $10^4 \sim 10^5$ CFU/g wet wt，其他樣品生菌數大多小於 10^2 CFU/ml 或 CFU/g wet wt。發光細菌和異營細菌生菌數比值，除三個海綿樣本超過 9% (9.0%~18.2%)，其他都小於百分之五。

從各類樣本分離出之發光細菌共計 41 株，這些分離株都是屬於需鹽性兼性嫌氣性革蘭氏陰性桿菌，都可歸類為弧菌科(Vibrionaceae)菌種。分離株依其在 4°C、40°C 與 8%NaCl 的增殖情形，及是否利用甘露醇或蔗糖為唯一碳源特性、可粗分為六群。經 16S rRNA 基因序列分析比對發現，第一菌群代表株之最相似菌種為 *Photobacterium leiognathi* (相似度 99.4%)。其餘五群代表株都與 *Vibrio harveyi* 或其近緣種，具有 98% 以上序列相似度；它們的表型特性也都與 *Vibrio harveyi* 吻合。利用 *HhaI*、*DdeI*、*RsaI* 和 *ScaI* 四種限制酶於 16S rDNA 限制型分析，可將六群菌株區分為二個 16S rDNA 基因型群，第一菌群菌株與其最相似菌種 *Photobacterium leiognathi* 都屬於第一個基因型，第二至第六菌群菌株與 *Vibrio harveyi* 都屬於第二個基因型。研究結果顯示，台灣北部沿岸海水中發光菌的菌種組成不外 *Photobacterium leiognathi* 和 *Vibrio harveyi* 或其近緣種。海綿共存發光菌則以 *Vibrio harveyi* 或其近緣種為主。

Abstract

Enumeration and isolation of luminous bacteria from seawater and sponges collected from the coastal regions of northern Taiwan were performed in the present study. Plate counts indicated that luminous bacteria in

mostly sponge samples (8 out of 13) were in the range between 10^4 and 10^5 CFU/g wet wt; others were less than 10^2 CFU/ml or CFU/g wet wt. Luminous bacteria accounted for 9.0 to 18.2% of heterotrophic bacteria in some sponge samples (3 out of 13), while only less than 5% of heterotrophic bacteria in the other samples were found to be luminous.

Forty-one strains of luminous bacteria were isolated. All of them were halophilic, facultatively anaerobic, Gram-negative rods, and could be identified as the family of Vibrionaceae. According to morphological and physiological characteristics, these isolates were divided into six groups. The first group had the highest similarity with *Photobacterium leiognathi* (99.4%). The other 5 groups had higher than 98% similarity with *Vibrio harveyi* or its closely related species. It was found that these *V. harveyi* or its closely related species and *P. leiognathi* represented the entire luminous bacterial flora in the shallow coastal waters of Taiwan during the sampling period. The sponge-associated luminous bacteria were predominated by *Vibrio harveyi* or its closely related species.

二、緣由與目的

細菌和真核生物都包含具有發光能力的種類，發光細菌的發光反應，係藉由細胞所含發光酵素 (luciferase) 之催化，進行氧化長鏈醛類所產生的結果，反應物另包括氧氣與核黃素單磷酸 (riboflavin monophosphate, FMNH₂)，反應後發出波長約為 490 nm 之黃綠色冷光 (Hastings, 1985)。

現知具有發光能力的細菌不到十種，包

括：*Vibrio harveyi*、*Vibrio fisheri*、*Vibrio logei*、*Photobacterium leiognathi*、*Photobacterium phosphoreum*、*Shewanella hanedai*、*Shewanella woodyi*、*Photobacterium luminescens*。另外，屬於 *Vibrio cholerae*、*Vibrio mediterranei*、*Vibrio orientalis*、*Vibrio splendidus*、*Vibrio salmonicida*、*Vibrio vulnificus* 等菌種的一些特例性菌株，也曾被檢測出具有發光能力 (Baumann & Baumann, 1984; Baumann & Schubert, 1984; Baumann *et al.*, 1984; Caccamo, 1999; Fidopiastis *et al.*, 1999; Makemson *et al.*, 1997; Satomi *et al.*, 2003)。*Photobacterium luminescens* 是一種共生於土壤線蟲 *Heterorhabditis bacteriophora* 腸道內的發光細菌，其他種類發光細菌則都是屬於海洋原生細菌。現知發光細菌都是屬於具有運動能力的異營性革蘭氏陰性桿菌，根據 16S rDNA 鹽基序列比對重建之親緣系統顯示，它們都是屬於 γ -*Proteobacteria*。

有些發光細菌已被開發利用於作為毒物污染檢測的指標生物。例如利用 *P. phosphoreum* 進行微毒性試驗 (microtox test)，即是一個已經實用化的生物檢測法 (McFerts *et al.*, 1983; Plotkin & Ram, 1984; Ribo & Kaiser, 1983; Ribo *et al.*, 1985)。發光細菌之能被用於作為污染檢測之指標生物，是因為發光細菌的發光強度對毒性物質具敏感性；研究顯示，環境中毒物濃度與菌株發光強度呈線性相關，毒物濃度愈高，菌株發光強度愈弱 (Perego *et al.*, 2002)。

海洋發光細菌依其生態棲位 (niche)，可分為浮游、附存 (含附著、寄生、腐生)、共生等類型。浮游型海洋發光細菌的地理分布受水溫、鹽分、日照等環境因子之影響，且其密度低於其他生態棲位發光細菌之密度 (Nealson & Hasting, 1991)。附生型發光細菌常附著於海洋動物體表造成養殖魚蝦或人類病原菌的來源 (Caccamo, 1999; Hastings, 1976; Moriaty, 1998; 揭, 1993; 張, 1995)。寄生型發光細菌，有些除了寄生於南極蝦等甲殼類和一些外洋中深層性魚類體表的發光細菌，往往於寄主死後迅速生長，隨而出現明顯發光現象 (Wada *et al.*, 1995)，另外尚有些寄生型發光細菌的發光，則

容易導致寄主 (如南極蝦和一些中深層性魚類) 被魚類補食；一同被攝入魚類腸道的發光細菌，不只能生存，還能藉此機會，在魚之腸道內生長繁衍，成為宿主腸道內共生細菌 (Ruby & Morin, 1979)。共生型發光細菌常居住於特殊發光器官，除可幫助宿主招來同伴，並可具驚嚇與驅退補食者，或誘捕可作為餌料之生物的作用。有證據顯示魚類和頭足類發光器官中之共生發光細菌，並非得自親代傳承，而是子代於成長過程中，從環境海水中獲得 (Wada *et al.*, 1999)。

海綿是粗具組織分化層級的濾食性動物，在其濾食過程中，常會從外界攝入大量微生物；隨著攝入微生物之定棲和生長，海綿與微生物間形成所謂 'sponge-microbe associations'。已知這類海綿和微生物結合體所含原核生物種類相當多樣，包括古生菌、光合性和化學合成性自營細菌、以及形形色色好氣性和兼性嫌氣性異營細菌 (Shieh & Lin, 1994; Vacelet *et al.*, 1996; Victoria *et al.*, 2002)，都可在海綿體找到，然而有關海綿附存發光細菌多樣性之研究仍然闕如。

本計畫擬於台灣北部沿岸海域採集各類型海綿樣本，進行其附存發光細菌生菌數和種多樣性之探討。為了比較海綿附存型及浮游型發光細菌多樣性之異同，本計畫也擬同時針對台灣北部沿岸海水中浮游型發光細菌，進行生菌數和種多樣性之探討。

三、結果

1. 發光細菌之生菌數

本研究於春、夏月份 (四至九月) 在宜蘭、東北角、八斗子及基隆中油場旁各採集了一次海水樣本，並在淡水及卯澳灣共採集了 13 個海綿樣本。以 PY 平板計數法估得這四處樣區海水的發光細菌生菌數為 7-250 CFU/ml，其中只有一次宜蘭的生菌數高達 250 CFU/ml。一般而言，海水中浮游性發光細菌的生菌數約占總異營菌數的 0.5-2.5%。由海綿之潤洗液經稀釋後塗抹於 PY 平板培養基上所估得海綿體表之發光細菌生菌數為 1.2×10^3 - 7.7×10^5 CFU/g wet wt，二樣

區各有二個海綿樣本無觀察到發光細菌。概言之，海綿體表之發光細菌生菌數約占總異營細菌數量的 1.2-18.2%。

2.發光細菌菌株之分離和收集

從七次計數用海水中發光菌生菌數的培養基中分離了發光菌株共 18 株，從 13 個海綿樣品計數發光菌的培養基分離了發光菌有 23 株。研究期間共篩選出 41 株發光細菌，將甚培養於 PY 平板培養基上，其發光現象約可維持數小時至數十天，其強度會漸轉弱至內眼無法觀察，在繼代培養的過程中，計有 9 株分離株失去其發光特性。

3.發光菌菌株之特性檢測和分群

所分離出來的 41 株分離菌，皆為無色圓形菌落，具運動能力的革蘭氏陰性桿菌，觸酶與氧化酶為正反應，洋水水解酶為負反應，能以半乳糖、葡萄糖、甘露糖為唯一碳源，但纖維二糖、乳糖、衛矛醇、肌醇、木糖則無法作為唯一碳源，能發酵葡萄糖、甘露糖產酸，在不含納鹽的培養基中無法生長。依其在 4°C、40°C 與 8%NaCl 的增殖情形，及是否利用甘露醇、蔗糖為唯一碳源特性、將其區分為六群，第一群包含 5 菌株，此群是六群中唯一無法利用甘露醇(mannitol)者；第二群僅含一株，是唯一可生長於 4°C 之分離株；第三群所含之唯一菌株特性與第一群之區分為利用甘露醇當作唯一碳源能力。第四群含 13 菌株在 4°C 與 40°C 皆不能生長。第五群包含 6 株分離株可在 40°C 生長，但無法發酵蔗糖產酸。第六群含 16 菌株能在 40°C 生長，且具有發酵蔗糖產酸之特性。

4.發光細菌分離株之 16S rRNA 之序列分析

所獲得各菌群代表株的 16S rRNA 序列長度介於 1426-1446 個鹼基之間。經由與 GenBank 現存菌株 16S rRNA 序列資料比對，其結果如下：第一群代表株定出鹼基長度 1433bp，經比對結果，最相似菌種為屬於發光菌屬(*Photobacterium*) 中有發光特性的 *P. leiognathi* (ATCC 25521^T)，相似度為 99.4%。

第二群僅含一菌株定出鹼基長度為 1427 bp，經比對結果，最相似菌種為無發光特性的 *Vibrio campbellii*，相似度為 99.9%，而與弧菌屬中的

發光細菌 *V. harveyi* 相似度為 99.2%。

第三群只含一分離株，其最相似菌種為無發光特性的 *Vibrio alginolyticus* 相似度為 99.2%，而與弧菌屬中的發光細菌 *V. harveyi* 相似度為 98.5%。

第四群共包含 13 菌株代表株之最相似菌種為無發光特性的 *Vibrio natriegens*，相似度為 98.9%，而與弧菌屬中的發光細菌 *V. harveyi* 相似度為 98.2%

第五群其代表株之最相似菌種為 *V. campbellii*，相似度為 98.9%，而與弧菌屬中的發光細菌 *V. harveyi* 相似度為 99.1%。

第六群之代表株之最相似菌種為 *V. campbellii*，相似度為 99.4，與發光菌 *V. harveyi* 相度為 98.9%。

4.發光細菌分離株之 16S rRNA 之限制型分析

將所有完成表型及 16S rRNA 序列分析的發光細菌分離株經過 16S rRNA (約 1.5kp)的 PCR 的增幅及純化後，利用四種限制酶進行限制型分析，經由 *HhaI*、*DdeI*、*RsaI* 和 *ScaI* 四種限制酶剪切（或模擬剪切）後，由限制型可分為二基因型，僅第一群菌株之基因型屬第一基因型，第二至第六菌群之菌株皆屬於第二基因型。

5.發光基因的偵測

本研究利用已知發光菌 *Photobacterium leiognathi* 所設計之發光基因(*LuxA*)引子，可以將第一菌群之發光基因利用 PCR 增幅而以電泳膠檢測出，另外第二至第六群的菌株則可以由 *Vibrio harveyi* 之發光基因序列所設計的引子檢測，受測菌株之基因片段，會出現在電泳膠 400~500 bp 位置。

四、討論

發光細菌之細胞懸浮液密度須達到 10^7 CFU/ml 時，菌體才能發出生物光，而海洋中自由生存之發光細菌，因密度大多低於 10^2 CFU/ml，並未能達到發光之最低之菌量 (Greenberg, 1997)。本研究估得台灣北部海水樣本中發光細菌數均小於 10^2 CFU/ml，符合海海微生物學者之認知而生物樣本之菌量，最亦不多於 10^6 CFU/g wet wt，因此，所有樣本並無法

直接觀察到發光現象之產生。

第一群的細菌是本實驗中唯一無法利用甘露醇之分離株，代表株之之比對結果顯示，與 *P. leiognathi* 最為近緣，其相似度高達 99.4%。而且在 16S rRNA 限制型的分析，第一群菌株之限制型亦與 *P. leiognathi* 之限制型具相同類型。第二、三、四、五與第六群菌株，雖在表現型互有差異，但其 16S rRNA 限制型卻屬同一型，自這些菌群菌株之 16S rRNA 序列與基因庫的資料比對，其最相似之菌種為，*Vibrio campbellii*、*Vibrio alginolyticus*、*Vibrio natriegens*、*Vibrio campbellii* 和 *Vibrio campbellii*，而與已知的發光弧菌 *Vibrio harveyi* 其相似度均大於 98.2%，而且這些與發光菌分離株最相似的菌株之 16S rRNA 模擬基因型，都同屬於一種基因型，並將此同基因型及限制型的菌群統稱為 *Vibrio harveyi*-like 菌群。

本研究所採集分離之發光菌的種類，若非 *P. leiognathi* 亦即 *Vibrio harveyi*-like 菌群，而且此類 *Vibrio harveyi*-like 細菌不僅占多數且較為優勢。而自沿岸淺海海水浮游性的發光細菌均為 *P. leiognathi* 與 *Vibrio harveyi*-like 菌群；而自海綿生物樣本所分離之發光菌株均屬於 *Vibrio harveyi*-like 菌群，並沒有 *Vibrio fischeri* 之類似菌群。一般而言，寄生或共生性之海洋發光細菌大多屬於 *Vibrio* 屬菌種(Dunlap *et al.*, 1995; Wada *et al.*, 1999; Nishguchi, 2000)，本研究從海綿樣本分離出高比例之 *Vibrio* 屬發光細菌，它們是否與海綿間形成共生或寄生之關係，則尚待累積更多資料驗證。

五、計畫成果自評

(A) 執行本計畫已完成：

1. 海水及海綿中對象菌（發光細菌）的菌數之調查。
2. 分離出 41 株對象菌，全數行以繼代保存。
3. 針對 41 株分離株完成以下各項：
 - (1) 分離株最適增殖條件之探討。
 - (2) 依其生理生化特性將之分群。
 - (3) 完成菌株之 16S rRNA 序列分析。
 - (4) 測知菌株之限制型與已知菌種之

基因型之比對與分析。

(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. & Baumann, L. (1984).** Genus II. *Photobacterium* Beijerinck 1889, 401^{AL}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 539-545. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Baumann, P. & Schubert, R. H. W. (1984).** Family II. *Vibrionaceae* Veron 1965, 5245^{AL}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 516-517. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Baumann, P., Furniss, A. L., & Lee, J. V. (1984).** Genus I. *Vibrio* Pacini 1854, 411^{AL}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 518-538. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Caccamo, D., Cello, D. F., Fani, F., Giugliandolo, C. & Maugeri, T. (1999).** Polyphasic approach to the characterisation of marine luminous bacteria. *Research in Microbiology* **150**, 221-230.
- Dunlap, P. V., Kita-Tsukamoto, K., Waterbury, J. B. & Callahan, S. M. (1995).** Isolation and characterization of a visibly luminous variant of *Vibrio fischeri* strain ES114 from the sepiolid squid *Euprymna scolopes*. *Archives of Microbiology* **164**, 194-202.
- Fidopiastis, P. M., Sorom, H. & Ruby, E. G. (1999).** Cryptic luminescence in the cold-water fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Archives of Microbiology* **171**, 205-209.
- Greenburg, E. P. (1997).** Quorum sensing in gram-negative bacteria. *ASM News* **60**, 371-377.
- Hastings, J. W. (1976).** Bioluminescence. *Oceanus* **19**, 17-27.

- Hastings, J. W. (1985).** Bioluminescence and Chemiluminescence – luciferases are not evolutionary conserved – chemiexcitation in solution by electron exchange. In *Photobiology*, pp. 45-47. Edited by J. W. Longworth, J. Jagger & W. Shropshire. Praeger, New York.
- Makemson, J. C., Fulayfil, N. R., Landry, W., van Ert, L. M., Wimpee, C. F., Widder, E. A. & Case, J. F. (1997).** *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacteria isolated from the the Alboran Sea. *International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology* **47**, 1034-1039.
- McFerts, G. A., Bond, P. J., Olson, S. B. and Tehan, Y. T. (1983).** A comparison of microbial assays for the detection of aquatic toxicants. *Water Research* **17**, 1757-1762.
- Moriarty, D. J. W. (1998).** Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* **164**, 351-358.
- Nealson, K. & Hastings, J. W. (1991).** The luminous bacteria. In *The Prokaryotes*, 2nd edn, pp. 625-639. Edited by Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K. H.. Springer, New York.
- Nishiguchi, M. K. (2000).** Temperature affects species distribution in symbiotic populations of *Vibrio* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3550-3555.
- Perego, P., Fanara, L., Zilli, M. & Borghi, D. M. (2002).** Applications of luminous bacteria on environmental monitoring. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **16**, 87-92.
- Plokin, S. & Ram, N. M. (1984).** Multiple assays to assess the toxicity of a sanitary landfill leachate. *Archives of Environmental and Contamination and Toxicology* **13**, 197-206.
- Ribo, J. M. & Kaiser, K. L. E. (1983).** Effects of selected chemicals to photoluminescent bacteria and their correlations with acute and sublethal effects on other organisms. *Chemosphere* **12**, 1421-1442.
- Ribo, J. M., Zaruk, B. M., Hunter, H. & Kaiser, K. L. E. (1985).** Microtox toxicity test results for water samples from the Detroit River. *Journal of Great lakes Research* **11**, 297-304.
- Ruby, E. G. & Morin, J. G. (1979).** Luminous enteric bacteria of marine fishes: a study of their distribution, densities and dispersion. *Applied and Environmental Microbiology* **38**, 406-411.
- Satomi, M., Oikawa, H. & Yano, Y. (2003).** *Shewanella marinintestina* sp. nov., *Shewanella schlegeliana* sp. nov. and *Shewanella sairae* sp. nov. novel eicosapentaenoic-acid-producing marine bacteria isolated from sea-animal intestines. *International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology* **53**, 491-499.
- Shieh, W. Y. & Lin, Y. M. (1994).** Association of heterotrophic nitrogen-fixing bacteria with a marine sponge of *Halichondria* sp. *Bulletin of Marine Science* **54**, 557-564.
- Vacelet, J., Aline, F. M., Fisfer, C. R. & Nicole, B. E. (1996).** Symbiosis between methane-oxidizing bacteria and a deep-sea carnivorous cladorhizid sponge. *Marine Ecology Progress Series* **145**, 77-85.
- Victoria, L. W. & Maas, E. W. (2002).** Sequence analysis of 16S rRNA gene of cyanobacteria associated with the marine sponge *Mycale (Carmia) hentscheli*. *FEMS Microbiology Letters* **207**, 43-47.
- Wada, M., Yamamoto, I., Nagasawa, M., Kogure, K. & Ohwada, K. (1995).** Photon emission from dead marine organisms monitored using a video recording system. *Journal of Marine Biotechnology* **2**, 205-209.
- Wada, M., Azuma, N., Mizuno, N. & Kurokura, H. (1999).** Transfer of symbiotic luminous bacteria from parental *Leiognathus nuchalis*

to their offspring. *Marine Biology* **135**,
683-687.

揭維邦 (1993). 海洋生物附生性發光細菌之研

究。中山大學碩士論文。

張震宇 (1995). 海洋發光細菌的生理研究。中
山大學碩士論文。