

台東附近海域不同深度海水中的好氣及兼氣性 異營細菌組成

張錦宜^{1*} 黃美瑩¹ 吳嘉哲¹ 林富家² 王文政³ 林金榮¹

¹ 行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

² 行政院農業委員會漁業署漁政組

³ 行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

摘 要

本研究以試驗船進行台東知本附近海域不同深度海水的採樣，並利用試驗船上的微生物實驗室即時進行海水中好氣及兼氣性異營細菌之計量、分離及純化工作，最後以 16S rRNA 基因序列進行各分離株之鑑定。水深 5、285、740 及 912 m 海水中好氣及兼氣性異營細菌生菌數分別為 285 ± 13 、 69 ± 21 、 90 ± 19 及 32 ± 7 CFU/ml，自 4 組不同深度海水樣本中隨機分離 15 株細菌進行細菌鑑定，總計 60 株細菌分離株共包括 3 個門、4 個綱、7 個目、10 個科、18 個屬及 29 個種，尚有 3 株細菌無法以 16S rRNA 基因序列進行鑑定。研究結果亦顯示，台東附近海域不同深度海水中均未檢測出 APHA 所列的有害細菌，但即使是深達 912 m 的海域，亦可檢出諸如 *Vibrio harveyi*、*V. fortis* 及 *V. splendidus* 等曾被發表為病原菌的水中常在菌。另外，水中可分離到如 *Agarivorans albus*、*Alteromonas luteoviolacea* 及 *Pseudoalteromonas haloplanktis* 等具特殊酵素活性，可能具開發潛力的菌株。

關鍵字：深層海水、微生物組成、16S rRNA

前 言

深層海水係指 200 m 深度以下、陽光照射不到的海水 (Tsuchiya *et al.*, 2003)，具有純淨、富含無機營養鹽、無有害病原菌及低溫安定等特性 (藤田與高橋, 2006)。早在 1970 年代，夏威夷即開發深層海水進行熱能轉換相關的研究，近年則朝培育藻類、魚、貝、甲殼類等高經濟性水產種類發展。繼夏威夷之後，日本亦投入深層海水之開發利用，除發展水產養殖外，更應用在多種食品加工及包裝飲品之中 (Tsuchiya *et al.*, 2004; Uehigashi *et al.*, 2006)。台灣東部沿海海底地形陡峭，離岸 3 ~ 5 km，水深即可達 500 m 以上 (Yu and Song, 1993)，具有發展深層海水的環境優勢。近年來，政府已陸續推動「台灣深層海水多目標利用

前期研究」、「台東縣設置深層海水生物技術園區」及「宜蘭縣大南澳深層海水科技園區」等多項計畫，多家民間企業亦積極投入此一新興產業。

無有害病原菌為深層海水的必要條件之一，因為深層海水的取水管線為固定設施，鋪設後即無法變更位置，其所涉及的工程經費極為龐大，故取水點的決定須事前經過周延的計畫，水中潛在病原微生物的數量，亦為評估的重要項目之一。日本發展較久、較具規模的深層海水取水站均曾提出微生物相分析報告；矢田等 (2003) 利用高知縣深層海水研究所的取水設施，分析水深 320 m 處好氣性異營細菌組成，綿引等 (2005) 則是以試驗船進行富山灣深層海水 0 ~ 700 m 不同深度的採樣及細菌相調查，台灣雖然有多家民間企業已投入深層海水的商業活動，但相關取水點不同深度的微生物組成報告仍付之闕如。

迥異於陸地環境、地面及海洋表層水域的深層海洋，很可能是孕育多樣性微生物的生物寶庫 (林等, 2005)。深層海域是一個終年低溫、黑暗且

* 通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 2462-2101 轉 2808; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: cichang@mail.tfrin.gov.tw

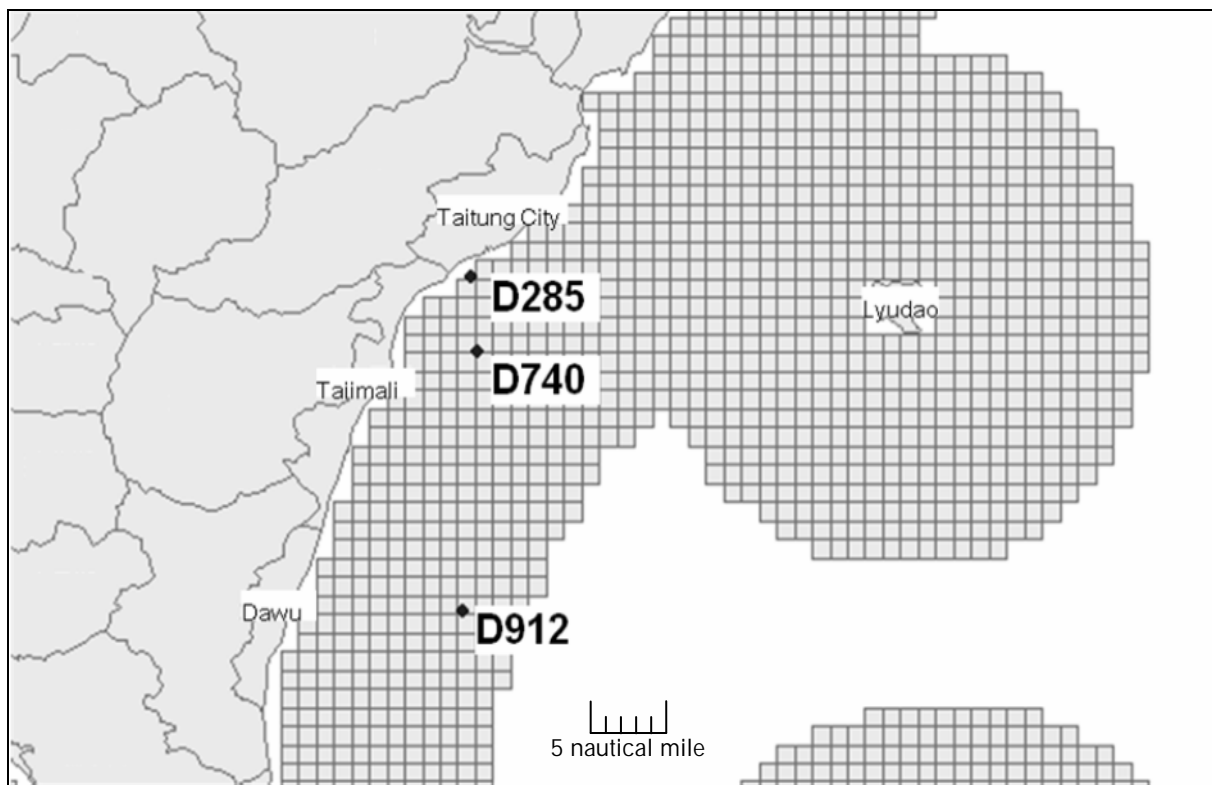


Fig. 1 Sites and depth of sampled seawater off Taitung.

無法自大氣層中獲得充足的碳及氮源的環境 (Morgan and Dow, 1986)。表、中層的海洋微生物無法分解的代謝產物，最終受到重力影響沉降於此，成為深層海底彌足珍貴的有機物來源。在此生態系經過長時間演化的微生物，因而發展出效率極高的酵素系統。有關低溫蛋白酶 (陳等, 2001)、澱粉酶 (張等, 2002) 及脂肪酶 (張與曾, 2006) 的研究，是目前微生物學的重要課題之一，深層海水中的新種微生物 (Yoon *et al.*, 2004)、新酶或潛在新藥物 (方與黃, 1996) 等生物資源，更亟待研究與開發。

行政院農業委員會水產試驗所現正進行台東海域深層海水的開發利用計畫。為瞭解預定取水點的海洋微生物數量、組成與特性，本研究利用水產試驗所的試驗船航經台東知本附近海域，採集不同深度的海水，並於採樣後立即利用試驗船上的微生物實驗室，進行好氣及兼氣性異營細菌的計量、分離、純化及培養等工作，旨在分析不同深度海域的微生物組成狀況，並探討具開發價值的微生物特性，俾為後續研究之參考。

材料與方法

一、海水樣品的採集

本研究於 2005 年 4 月 9、10 兩日，利用水產試驗所水試一號試驗船航經台東知本附近海域時 (Fig. 1)，進行不同深度的海水採樣。採樣深度係以溫深鹽測定儀 (conductivity, temperature and depth profiler, Model: 911-Plus, Sea-Bird Electronics, Inc. USA) 探測後，採集距離海底約 2 m 的水樣，測定水質所需的水樣以輪盤式採水瓶 (Rosette sampler, General Oceanics, Inc. USA) 採集，細菌分析所需的海水樣本則以無菌採水器 (Sterile bag sampler, General Oceanics, Inc. USA) 採集。依所需採樣深度，共設有水深分別為 285 m、740 m 與 912 m 等 3 個採水站 (以下簡稱為 D285, D740 與 D912)，另為比較表層海水中的細菌組成，於 D285 採水站亦採集了海平面下 5 m 的海水樣本，採水站的經緯度及採水作業時間詳如 Table 1。

Table 1 Sampling and analytical data of different depth seawaters off Taitung

Station	D-285	D-285	D-740	D-912
Sampling depth (m)	5	285	740	912
Sampling date	09 Apr. 2005	09 Apr. 2005	09 Apr. 2005	10 Apr. 2005
Sampling time	15:30	15:30	20:15	04:20
Latitude (N)	22°41.05'	22°41.05'	22°37.09'	22°23.10'
Longitude (E)	121°04.77'	121°04.77'	121°05.17'	121°04.30'
Temperature (°C)	25.05±0.21	12.60±0.14	4.95±0.21	4.05±0.07
pH	8.22±0.02	7.91±0.01	7.79±0.08	7.81±0.07
DOC* (μM)	81.71±4.02	41.51±6.85	67.70±3.88	64.29±5.39
(NH ₃ +NH ₄ ⁺)-N (μM)	0	0.19±0.21	0	0
NO ₂ ⁻ -N (μM)	0	0	0	0
PO ₄ ³⁻ -P (μM)	0	0.98±0.56	2.27±0.07	2.71±0.02
SiO ₂ -Si (μM)	0	31.13±1.73	69.59±3.63	92.58±1.82
Bacterial TVC** (CFU/ml)	285±13	69±21	90±19	32±7

*Dissolved organic carbon

**Total viable count

二、水質測定

海水的 pH 值以 pH meter (Mettler Delta 350, Mettler-Toledo Inc. USA) 測定。氮採用 Phenol hypochlorite 法 (APHA, 1998a), 亞硝酸採用 Ultraviolet spectrophotometric 法 (APHA, 1998b), 磷酸採用 Molybdenum blue-Ascorbic acid 法 (APHA *et al.*, 1998c), 矽酸採用 Molybdosilicate 法 (氣象廳, 1985), 上述四種化學組成均以分光光度計 (UV-Visible spectrophotometer, UV-1601, Shimadzu Corp. Japan) 進行測定。海水中溶解有機碳則採用燃燒/紅外線測定法 (APHA, 1998d), 以總有機碳分析儀 (total organic carbon analyzer, TOC-5000A, Shimadzu Corp. Japan) 測定。

三、海水中細菌的分離、計數與純化

量取 100、10 與 1 ml 的樣水, 分別以 0.45μm 之過濾膜 (mixed cellulose ester, Advantec MFS, Inc. USA) 過濾後, 再將過濾膜貼覆於 PPES-II 瓊

脂培養皿上 (yeast extract 1 g, peptone 5 g, ferric phosphate 0.01 g, agar powder 15 g, distilled water 250 ml, aged seawater 750 ml, adjust pH to 7.6), 於 20 °C 培養 7 天。

7 天後依平板計數法 (plate count method) 選取菌落數介於 25 ~ 250 個的培養皿, 計數肉眼清晰可見之菌落, 再依過濾之樣水體積換算為樣本中的細菌數。另於不同深度可計數的培養皿中, 隨機挑選 15 個單一菌落, 於 PPES-II 瓊脂培養皿上經 3 次純化後, 以 16S rRNA 基因序列進行菌種之鑑定與組成分析。

四、16S rRNA 基因序列測定與菌種鑑定

細菌總 DNA 的萃取係參考黃等 (2007) 的方法, 純化後的 DNA 溶於 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 中, 調整濃度至 0.25 mg/ml 備用。

細菌 16S rRNA 基因序列以通用引子 (16S_F: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' 及 16S_R:

5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 經 PCR 方式擴增 (黃等, 2007)。PCR 反應條件為先執行一次 94 °C、2 分鐘; 再進行 94 °C、2 分鐘, 46 °C、1 分鐘 30 秒, 72 °C、2 分鐘共 35 個循環; 最後以 72 °C 延伸 2 分鐘。PCR 產物經 QIA quick PCR 純化套組 (Qiagen) 純化後, 連接到 pGEM-T easy 載體 (Promega) 並轉化到 *E. coli* 上, 以 M-13_F (5'-TGAAAACGGCCAGT-3') 及 M-13_R (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3') 為引子進行分子選殖, 隨機篩選 3 個插入片段大小與 16S_F/16S_R 擴充片段相仿 (約 1.5 k) 的菌株進行 DNA 定序, 定序結果利用 BLAST 程式 (Pearson and Lipman, 1988) 與 GenBank 資料庫的基因進行比對, 選取相似度最高的物種為細菌鑑定之依據。

五、細菌系統發生分析

本研究有關生物資訊學的運算係使用 Accelrys Gene v2.5 (Accelrys, Inc. USA) 套裝軟體進行分析。各菌株的 16S rRNA 基因序列先以 Clustal W program (Thompson *et al.*, 1994) 進行相似序列區塊的排比, 系統發生樹 (phylogenetic tree) 的建構採用 Neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987), 以電腦計算而得。

結 果

採樣地點及不同深度的水質資料詳如 Table 1。海水溫度隨深度遞減, 採樣當時表層海水的平均水溫為 25.05 ± 0.21 , 而 912 m 深度的海水均溫則為 4.05 ± 0.07 。表層海水的 pH 值較高, 為 8.22 ± 0.02 , 隨深度增加 pH 值逐漸遞減並趨向穩定, 深度 285 m、740 m 及 912 m 的海水 pH 值較低, 分別為 7.91 ± 0.01 、 7.79 ± 0.08 及 7.81 ± 0.07 。除了在 D-285 測站的底層海水中可測得 0.19 ± 0.21 μM 的總氨氮($\text{NH}_3^+\text{NH}_4^+$)-N 濃度, 在其餘樣本中均測不出總氨氮及亞硝酸氮 (NO_2^- -N) 的含量。表層水中測不出磷酸及矽酸, 超過 285 m 深度的海水中則均可測出磷酸及矽酸的濃度, 且濃度隨深度遞增; 自深度 285 ~ 912 m 海水中, 磷酸濃度的變化為 0.98 ± 0.56 (285 m)、 2.27 ± 0.07

(740 m)、 2.71 ± 0.02 (912 m) μM , 矽酸濃度的變化則為 31.13 ± 1.73 (285 m)、 69.59 ± 3.63 (740 m)、 92.58 ± 1.82 (912 m) μM 。表層海水中的總生菌數為 285 ± 13 CFU/ml, 深度 285 m、740 m 及 912 m 的海水中的總生菌數則依序為 69 ± 21 CFU/ml、 90 ± 19 CFU/ml 與 32 ± 7 CFU/ml。

本研究自台東附近不同深度海域 (5 m、285 m、740 m 與 912 m) 共分離了 60 株可培養的好氧性及兼性異營 (culturable aerobic and facultatively anaerobic heterotrophic) 海水細菌, 並以 16S rRNA 基因序列進行細菌鑑定與類群分析 (Table 2 及 Fig. 2)。所有分離菌株均以細菌 16S rRNA 基因序列通用引子進行 PCR 擴增, 擴增出的核酸片段大小超過 1.4K 的比例佔 72% (43/60), 介於 1.3K~1.4K 的比例佔 22% (13/60), 介於 1.2K~1.3K 的比例佔 5% (3/60), 60 株細菌中僅有 1 株的擴增片段大小不到 1K。上述 60 株細菌的 16S rRNA 基因序列擴增片段經定序後利用 BLAST 程式與 GenBank 資料庫進行比對, 有 4 株 (約 7%) 與基因庫中登錄的細菌 16S rRNA 基因序列完全相符, 35 株 (約 58%) 與基因庫中登錄的細菌 16S rRNA 基因序列相似程度 > 99%, 15 株 (約 25%) 與基因庫中登錄的細菌 16S rRNA 基因序列相似程度介於 95 ~ 99%, 其餘 6 株 (約 10%) 與基因庫中登錄的細菌 16S rRNA 基因序列相似程度則介於 90 ~ 95%。

根據 16S rRNA 基因序列與 GenBank 現存序列比對的結果, 本研究所分離到的 60 株細菌包括 3 個門 (Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes)、4 個綱 (Flavobacteria, α -Proteobacterium, γ -Proteobacterium, Bacilli)、7 個目 (Flavobacteriales, Rhodobacterales, Alteromonadales, Pseudomonadales, Vibrionales, Oceanospirillales, Bacillales)、10 個科 (Flavobacteriaceae, Rhodobacteraceae, Alteromonadaceae, Pseudoalteromonadaceae, Shewanellaceae, Pseudomonadaceae, Vibrionaceae, Halomonadaceae, Oceanospirillaceae, Bacillaceae)、18 個屬及 29 個種, 另有 3 株細菌 (D-285-9、D-285-11、D-912-9) 無法以 16S rRNA 基因序列進行鑑定 (Table 2)。

分析不同深度海水中好氧性異營細菌的組成 (Table 3), D-285 測站 5 m 深度的細菌包括 9 個

屬 (*Alteromonas*, *Bacillus*, *Maribacter*, *Nautella*, *Pseudoalteromonas*, *Roseobacter*, *Sulfitobacter*, *Tenacibaculum* , *Vibrio*) 和 1 株 γ -Proteobacterium , 其中以 *Vibrio* 屬較多, 佔樣本總細菌組成的27%。D-285 測站 285 m 深度的細菌包括了 6 個屬 (*Alteromonas*, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*)、1 株屬於 *Alteromonadaceae* 的 unclassified marine bacterium 和 2 株 arctic seawater bacterium , 其中以 *Pseudoalteromonas* 屬

較多, 佔樣本總細菌組成的 40%。D-740 測站 740 m 深度的細菌包括 4 個屬 (*Agarivorans* , *Amphritea* , *Photobacterium* , *Vibrio*) 和 1 株 γ -Proteobacterium , 其中以 *Vibrio* 屬較多, 佔樣本總細菌組成的 60%。D-912 測站912 m 深度的細菌包括了 6 個屬 (*Amphritea* , *Dasania* , *Marinobacter* , *Photobacterium* , *Shewanella* , *Vibrio*)、1 株 mucus bacterium 和 2 株 γ -Proteobacterium, 其中以 *Vibrio* 和 *Photobacterium* 屬較多, 分別佔樣本總細菌組成的 27%。

Table 2 Bacterial isolates from different depth seawaters off Taitung

Strain	Order	Closest species (GenBank accession no.)	Matched (bp) / Reference (bp)	Matched (%)
D-5-1	Alteromonadales	<i>Alteromonas</i> sp. SHY1-1 (AB078014)	1472/1476	99
D-5-2	Rhodobacterales	<i>Roseobacter gallaeciensis</i> SCH0407 (AY881240)	1362/1405	96
D-5-3		γ -Proteobacterium NEP2 (AB212801)	1394/1455	95
D-5-4	Vibrionales	<i>Vibrio harveyi</i> CM3 (EU660320)	1503/1513	99
D-5-5	Rhodobacterales	<i>Sulfitobacter</i> sp. ARCTIC-P49 (AY573043)	1364/1413	96
D-5-6	Flavobacteriales	<i>Maribacter dokdonensis</i> DSW-9 (AY960750)	1467/1472	99
D-5-7	Flavobacteriales	<i>Tenacibaculum mesophilum</i> MBIC4357 (AB032504)	1439/1444	99
D-5-8	Rhodobacterales	<i>Sulfitobacter</i> sp. ARCTIC-P49 (AY573043)	1366/1413	96
D-5-9	Bacillales	<i>Bacillus firmus</i> (DQ118015)	1377/1379	99
D-5-10	Vibrionales	<i>Vibrio harveyi</i> S20 (AY750577)	1484/1492	99
D-5-11	Vibrionales	<i>Vibrio harveyi</i> S35 (AY750578)	1490/1493	99
D-5-12	Vibrionales	<i>Vibrio fortis</i> LMG21562 (AJ514915)	1489/1494	99
D-5-13	Rhodobacterales	<i>Roseobacter gallaeciensis</i> SCH0407 (AY881240)	1393/1405	99
D-5-14	Alteromonadales	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. MACL07 (EF198247)	1497/1503	99
D-5-15		<i>Nautella italica</i> R-28753 (AM944522)	1402/1408	99
D-285-1	Alteromonadales	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. BSi20316 (DQ492738)	1427/1429	99
D-285-2	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas</i> sp. NJ319 (EF605267)	1495/1495	100
D-285-3	Alteromonadales	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> BSi20582 (DQ520895)	1404/1407	99
D-285-4	Alteromonadales	Marine bacterium Tw-5 (AY028200)	1450/1455	99
D-285-5	Alteromonadales	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. BSw20010 (EU365568)	1410/1415	99

Table 2 (continued)

Strain	Order	Closest species (GenBank accession no.)	Matched (bp) / Reference (bp)	Matched (%)
D-285-6	Vibrionales	<i>Vibrio</i> sp. EN276 (AB038023)	1329/1379	96
D-285-7	Alteromonadales	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. MOLA9 (AM990785)	1461/1461	100
D-285-8	Alteromonadales	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> BSi20582 (DQ520895)	1400/1402	99
D-285-9		Arctic seawater bacterium Bsw20449 (DQ064619)	1402/1407	99
D-285-10	Alteromonadales	<i>Alteromonas luteoviolacea</i> (X82144)	1409/1437	98
D-285-11		Arctic seawater bacterium Bsw20449 (DQ064619)	1402/1407	99
D-285-12	Alteromonadales	<i>Marinobacter bacchus</i> FB3 (DQ282120)	1403/1406	99
D-285-13	Oceanospirillales	<i>Halomonas aquamarina</i> 751 (EU430083)	1401/1403	99
D-285-14	Alteromonadales	<i>Alteromonas</i> sp. SPB-5 (DQ412075)	1403/1405	99
D-285-15	Alteromonadales	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> NCIMB2033 (AF297958)	1404/1408	99
D-740-1	Vibrionales	<i>Vibrio sinaloensis</i> CAIM695 (DQ451210)	1412/1435	98
D-740-2	Vibrionales	<i>Vibrio harveyi</i> LB4 (DQ146935)	1421/1422	99
D-740-3	Alteromonadales	<i>Agarivorans albus</i> MKT87 (AB076559)	1472/1472	100
D-740-4	Vibrionales	<i>Vibrio sinaloensis</i> CAIM695 (DQ451210)	1403/1427	98
D-740-5	Vibrionales	<i>Vibrio</i> sp. BLI-41 (AY217772)	1403/1428	98
D-740-6	Vibrionales	<i>Vibrio</i> sp. R-14968 (AJ316168)	1408/1428	98
D-740-7	Oceanospirillales	<i>Amphritea japonica</i> JAMM1548 (AB330882)	1286/1392	92
D-740-8	Vibrionales	<i>Photobacterium leiognathi</i> LN101 (AY292944)	1410/1416	99
D-740-9	Vibrionales	<i>Photobacterium leiognathi</i> SN2B (AY292951)	1409/1415	99
D-740-10	Vibrionales	<i>Photobacterium leiognathi</i> LN101 (AY292944)	1397/1406	99
D-740-11	Vibrionales	<i>Vibrio splendidus</i> 2J12 (AJ885026)	612/614	99
D-740-12	Vibrionales	<i>Vibrio</i> sp. EN276 (AB038023)	1321/1371	96
D-740-13	Vibrionales	<i>Vibrio</i> sp. TUNT (EF584084)	1447/1447	100
D-740-14	Vibrionales	<i>Photobacterium</i> sp. Asur-1 (AB055784)	1505/1507	99
D-740-15	Vibrionales	<i>Vibrio</i> sp. R-14968 (AJ316168)	1401/1420	98
D-912-1	Vibrionales	<i>Photobacterium leiognathi</i> SN2B (AY292951)	1412/1427	98
D-912-2	Vibrionales	<i>Vibrio sinaloensis</i> CAIM695 (DQ451210)	1413/1436	98
D-912-3	Alteromonadales	<i>Shewanella marinus</i> C4 (EU290154)	1414/1419	99
D-912-4	Oceanospirillales	<i>Amphritea japonica</i> JAMM1548 (AB330882)	1318/1432	92
D-912-5	Pseudomonadales	<i>Dasania marina</i> KOPRI20902 (AY771747)	1274/1377	92
D-912-6	Alteromonadales	<i>Marinobacterium jannaschii</i> IFO15466 (AB006765)	1347/1463	92

Table 2 (continued)

Strain	Order	Closest species (GenBank accession no.)	Matched (bp) / Reference (bp)	Matched (%)
D-912-7		Unidentified γ -Proteobacterium BD1-7 (AB015519)	1284/1383	93
D-912-8	Vibrionales	<i>Photobacterium leiognathi</i> SN2B (AY292951)	1408/1416	99
D-912-9		Mucus bacterium 14 (AY654750)	1421/1425	99
D-912-10	Vibrionales	<i>Vibrio shilonii</i> SW-2 (AY911395)	1427/1430	99
D-912-11	Vibrionales	<i>Photobacterium leiognathi</i> SN2B (AY292951)	1408/1416	99
D-912-12		Marine γ -Proteobacterium HTCC2143 (AY386333)	1216/1307	93
D-912-13	Vibrionales	<i>Vibrio splendidus</i> biovar II (AB038030)	1405/1423	98
D-912-14	Vibrionales	<i>Photobacterium leiognathi</i> SN2B (AY292951)	1416/1422	99
D-912-15	Vibrionales	<i>Vibrio splendidus</i> biovar II (AB038030)	1405/1431	98

Table 3 Bacterial composition in different depth seawaters off Taitung

Genus	Station/depth (m)			
	D-285/5	D-285/285	D-740/740	D-912/912
<i>Agarivorans</i>			1	
<i>Alteromonas</i>	1	2		
<i>Amphritea</i>			1	1
Arctic seawater bacterium		2		
<i>Bacillus</i>	1			
<i>Dasania</i>				1
γ -Proteobacterium	1			2
<i>Halomonas</i>		1		
<i>Maribacter</i>	1			
<i>Marinobacter</i>		1		
<i>Marinobacterium</i>				1
Marine bacterium		1		
Mucus bacterium				1
<i>Nautella</i>	1			
<i>Photobacterium</i>			4	4
<i>Pseudoalteromonas</i>	1	6		
<i>Pseudomonas</i>		1		
<i>Roseobacter</i>	2			
<i>Shewanella</i>				1
<i>Sulfitobacter</i>	2			
<i>Tenacibaculum</i>	1			
<i>Vibrio</i>	4	1	9	4

討 論

海水中總細菌數 (total bacteria count) 一般以 AO (Hobbie *et al.*, 1977) 或 DAPI (Porter and Feig, 1980) 螢光染色法進行檢測, 在台灣東部海域深層海水總細菌數量的調查報告 (經濟部標準檢驗局, 2008) 中, 採用 DAPI 染色法, 結果表層海水所測得總細菌數介於 $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml, 水深 200 m 測得總細菌數則為 $10^1 \sim 10^2$ CFU/ml。依檢測樣本的不同, 螢光染色法計數出的總細菌數量約是總生菌數法 (total viable count) 計數所得的 10 ~ 1000 倍 (Fry, 1988)。本研究採用總生菌數法, 旨在探討台灣東部海域不同深度的好氣性及兼性異營細菌之組成, 係以有害病原菌數量及具開發潛力之微生物性狀為主要研究對象, 測得表層水中總生菌數介於 $10^2 \sim 10^3$ CFU/ml 之間, 水深 285 m 以下總生菌數則介於 $10^1 \sim 10^2$ CFU/ml 之間。至於其他亦使用總生菌數法的相關研究顯示, 在日本富山灣深層水的調查報告中, 採用總生菌菌落計數法測定, 結果表層海水所測得菌數約為 $10^1 \sim 10^3$ CFU/ml, 超過 300 m 水深的生菌數則為 $10^0 \sim 10^2$ CFU/ml (綿引等, 2005), 高知縣室戶海洋深層水研究所測得表層海總生菌數約為 $10^3 \sim 10^4$ CFU/ml, 300 m 水深的總生菌數則為 $10^1 \sim 10^2$ CFU/ml (西島等, 1993), 皆與本研究針對台灣東部海域深層海水所做的總生菌數測定結果類似。

海洋微生物歧異度大, 以傳統微生物生理生化方法鑑定其組成微生物, 不僅費時耗工, 更常常發生鑑定率偏低的情況。Genbank 中收錄了極其龐大的細菌 16S rRNA 基因序列資料庫, 而且不斷更新, 卒為研究海洋微生物的一大利器。本研究雖然在 60 株細菌中仍有 3 株 (D-285-9, D-285-11, D-912-9) 無法以 16S rRNA 基因序列進行鑑定 (Table 2), 但 D-285-9 及 D-285-11 的 16S rRNA 基因序列其實與 Genbank 中登錄的 Arctic seawater bacterium Bsw20448 (登錄號為 DQ064619) 有 99% 以上的相似度, 而 D-912-9 的 16S rRNA 基因序列亦與 Genbank 中登錄的 Mucus bacterium 14 (登錄號為 AY654750) 有 99% 以上的相似度, 只是因為這些菌株尚未有正式的分類位階, 所以才無法以 16S rRNA 基因序列進行鑑定。類似的情形同樣發生在矢田等 (2003) 利用 16S rRNA 基因序

列分析室戶海洋深層水中細菌組成時, 該研究於 85 株分離菌中本有 10 株無法鑑定, 但因 Genbank 不斷更新其登錄菌株, 登錄號為 AF396670 的菌株, 在 2003 年文章發表時無法鑑定, 而今已有正式的分類位階 (*Colwellia psychrerythraea*); 鑑定結果能與時俱進, 此亦為以 16S rRNA 基因序列分析海洋微生物的優點之一。

深層海水取水深度的決定, 需考量各利用領域所需的水質條件及水管的設置成本 (中島, 2002)。一般而言, 深層海水強調的「清淨性」係指以現有之分析方法檢驗不到有害細菌。所謂「有害細菌」並無明確定義, 依據美國公共衛生協會 (American Public Health Association, APHA) 的建議, 水中有害微生物的檢驗標的為 coliform bacteria、enterococci group、fecal streptococcus group、staphylococci group、*Campylobacter jejuni*、enteropathogenic *Escherichia coli*、*Legionella* spp.、*Leptospira* spp.、*Pseudomonas aeruginosa*、*Salmonella* spp.、*Shigella* spp.、*Vibrio cholera*、*Yersinia enterocolitica* (APHA, 1998e); 但若所抽取的深層海水未經殺菌處理, 即直接做為高經濟水產種類的種原保存及繁殖用水, 則有害微生物尚應包括已知的水產病原菌。矢田等 (2003) 利用高知縣深層海水研究所的取水設施採樣, 分析水深 320 m 處 85 株好氣性及兼性異營細菌組成, 其中有 7 株為與水產生物疾病關係密切的 *V. anguillarum* (Wiik *et al.*, 1989), 5 株 *V. splendidus* 可能與養殖蝦、貝類的疾病有關 (陳等, 2000), 另有 1 株 *V. campbellii* 亦曾有研究指其為導致養殖皺紋盤鮑膿毒敗血症的病原菌 (馬等, 1996), 總計有害微生物的組成比例約佔 15%。綿引等 (2005) 則是以試驗船進行富山灣深層海水定點不同深度的採樣及細菌組成研究, 結果在水深 50 ~ 300 m 的海水中分離 38 株細菌, 其中有 2 株 *V. campbellii*、3 株 *V. harveyi* (Defoirdt *et al.*, 2008)、1 株 *Pasteurella testudinis* (Jang and Biberstein, 1991) 及 1 株 *Staphylococcus* sp. (Huang *et al.*, 1999) 等與水產有關的病原菌, 有害微生物比例為 18%。本研究自不同水深的樣本中各分離 15 株細菌, 結果不論在表層或深層海水中, 均未檢出 APHA 所列的有害細菌, 但在 5m 處的表層水中, 可檢出 3 株 *V. harveyi*, 1 株 *V. fortis* (Thompson *et al.*, 2003),

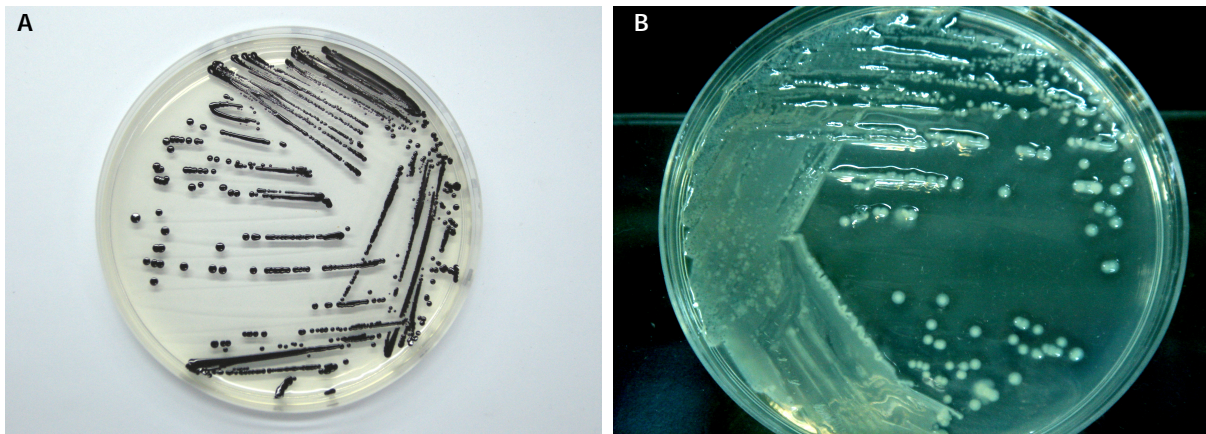


Fig. 3 Surface of Marine agar 2216 illustrating unique characteristics of marine bacteria isolated from deep sea waters off Taitung. A. Purple colonies of *Alteromonas luteoviolacea* D-285-10; B. Depressions of the agar adjacent to the colonies of *Agarivorans albus* D-740-3, indicating hydrolysis of the agar.

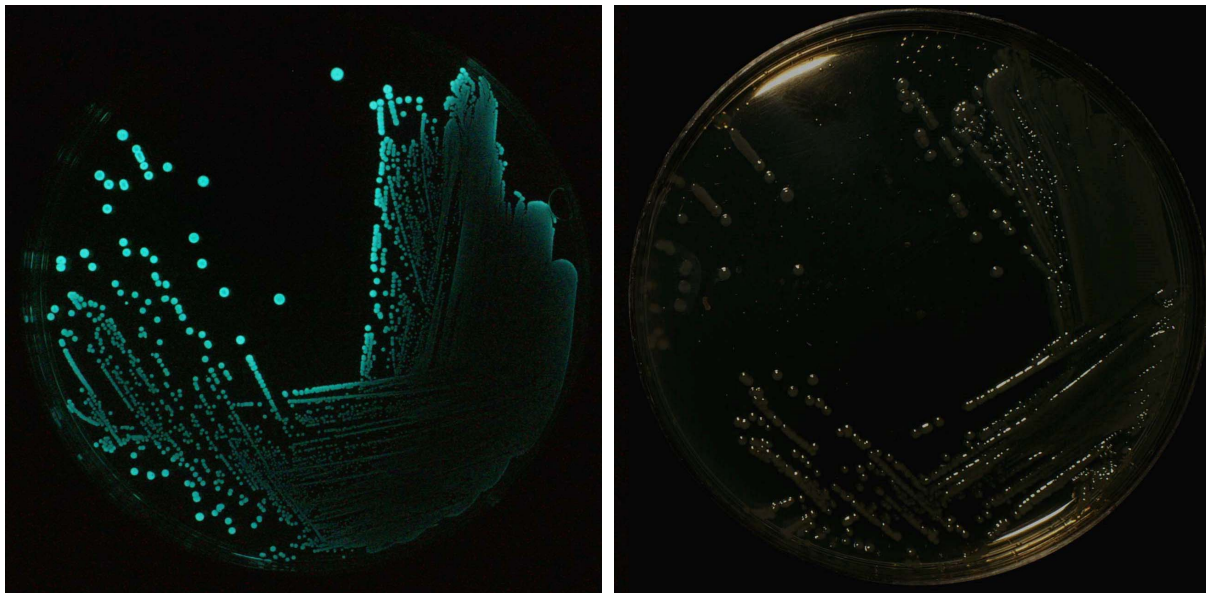


Fig. 4 Colonies of *Photobacterium leiognathi* D-912-1 on Trypticase Soy agar with 3% (left) and 0.5% (right) sodium chloride showing obviously different luminescence in the dark.

與水產有關的病原菌檢出率為 27%。在水深 740 m 有 1 株 *V. harveyi* 和 1 株 *V. splendidus*，在水深 912 m 處，則檢出 2 株 *V. splendidus*，與水產相關的有害微生物檢出率分別為 13% 及 13%。研究結果顯示，即使在水深達 912 m 的海域中仍可檢出曾經被發表過的水產病原菌，因為許多所謂的水產病原菌亦是水中的常在菌 (Austin and Austin, 1987)，因此，與其嚴苛地定義深層海水中「不得檢出」有害微生物，不如將評估的標準訂為「檢出率」的高低。以本研究為例，表層海水中潛在病原菌的檢出率就遠高於深層海水，而若單以細

菌為指標，台灣東部海域水深 300 m 的深層海水之清淨度並不亞於在日本已富盛名的室戶及富山灣海洋深層水。

深層海水中微生物的開發與利用，近年來愈受重視。本研究自台灣東部深層海水中，初步發現不少具研究價值與市場潛力的海洋微生物。D-285-3 及 D-285-8 是在 285 m 分離到的 2 株 *Pseudoalteromonas haloplanktis* (16S rRNA 相似度為 99%)，此一菌種能適應低溫的環境，近年來許多適低溫 (cold-adapted) 酵素，如 pectate lyase (Truong *et al.*, 2001) β -galactosidase (Hoyoux *et al.*,

2001)、aspartate aminotransferase (Birolo *et al.*, 2000)、DNA ligase (Georlette *et al.*, 2000) 等, 陸續從 *Pseudoalteromonas haloplanktis* 被純化出來; 低溫酵素的開發利用, 例如在低溫、不破壞風味的反應條件下去除牛乳中的乳糖等加工製程, 正逐漸發展出酵素工業的另一個新方向。D-285-10 經 16S rRNA 鑑定與 *Alteromonas luteoviolacea* (McCarthy *et al.*, 1985) 有 98% 的相似度, 其能產生紫色色素 violacein (Fig. 3a), 根據 Melo *et al.* (2000) 的研究, violacein 的細胞毒性能誘發腫瘤細胞株 V79 的細胞凋亡 (apoptosis) 現象, 此外, McCarthy *et al.* (1994) 及 Kamei *et al.* (1986) 亦發現 *Alteromonas luteoviolacea* 能生產抗生素, 極具新藥物的開發潛力。D-740-3 經 16S rRNA 鑑定為 *Agarivorans albus* (相似度 100%), 具有很強的瓊膠 (agar) 水解能力 (Fig. 3b)。瓊膠被 agarase 水解後產生的 neoagarooligosaccharide 及 neoagarobiose 是食品、化妝品及醫藥工業上備受矚目的原料 (Fu *et al.*, 2008), neoagarooligosaccharide 可抑制細菌生長, 減緩澱粉降解 (starch degradation) 速率, 降低食物熱量, 還具有抗癌、抗氧化的活性 (Giordano *et al.*, 2006); neoagarobiose 則具有保濕、美白的功效 (Kobayashi *et al.*, 1997)。水深 740 m 以下的深層海水, 存在著為數不少的發光細菌 (檢出率為 27%), 經 16S rRNA 鑑定與 *Photobacterium leiognathi* 有 98~99% 的相似度。有趣的是, 根據文獻報導, *P. leiognathi* 發光酵素 (luciferase) 的基因表達受到滲透壓的負調控 (Dunlap, 1985), 以低滲透壓 (400 mOsm) 培養時發光強度是以高滲透壓 (800 mOsm) 培養時的 8~10 倍; Meighen (1999) 的研究也有類似的結果, 在含 1% 鹽度的培養基中生長的 *P. leiognathi*, 其發光強度約為在含 3% 鹽度培養基中生長的 10 倍。不過本研究分離到的 D-912-1 卻有完全相反的發光調控機轉, 環境鹽度愈高, 其發光強度反而愈高 (Fig. 4), 詳細比較兩者 *lux* operon 序列上的異同, 將是分子調控研究中的一個有趣課題。

本研究之結果顯示, 水深 285~912 m 的深層海水中, 仍可檢出曾被發表為水產病原菌的海洋細菌, 故深層海水中「無有害微生物」的說法有待商榷。不過若以潛在性有害微生物的檢出率為比較的標準, 則台灣東部深層海水的清淨度與日

本室戶、富山灣海洋深層水相當, 適合進行各種開發利用。而深層海水除了目前市面已見的多種衍生商品外, 更孕育了無比豐富的寶貴生物資源, 朝此方向研究, 不論在酵素、食品、化妝品、藥物或生技產業的發展中, 都將佔有舉足輕重的地位。

謝辭

感謝水試一號陳船長林耀及全體船員協助採樣工作; 並以此文紀念本航次之領隊, 英年早逝的李祐竑先生。

參考文獻

- 方金瑞, 黃維真 (1996) 海洋極端微生物的分離及其開發研究: 嗜鹼、嗜冷微生物的分離及其產生的活性物質. 中國海洋藥物, 16(1): 5-9.
- 中島敏光 (2002) 21 世紀の循環型資源 - 海洋深層水の利用. 株式會社綠書房, 東京, 日本, 116-157.
- 矢田修一, 大場雅行, 榎本惠一 (2003) 「室戶海洋深層水」中の細菌種の分析. 海洋深層水研究, 4(2): 47-56.
- 西島敏隆, 高橋正征, 楠田理一 (1993) 深層水 - 豊かな海の資源をいかに利用するか -. 黒潮のめぐみ, 高知大學編, 高知新聞社, 高知, 日本, 161-175.
- 林學政, 楊秀霞, 邊際, 黃曉航 (2005) 南大洋深海嗜冷菌 2-5-10-1 及其低溫脂肪酶的研究. 海洋學報, 27(3): 154-158.
- 氣象廳 (1985) 海水の化學分析. 海洋觀測指針, 日本海洋學會, 東京, 日本, 178-179.
- 馬健民, 王琦, 馬福恆, 劉明清 (1996) 皺紋盤鮑膿毒敗血症病原菌的發現與初步研究. 水產學報, 20(4): 332-336.
- 陳秀蘭, 張玉忠, 王運濤 (2001) 深海適冷菌 SM9913 產生的低溫蛋白酶. 海洋科學, 25(1): 4-8.
- 陳志勝, 呂軍儀, 吳金英, 曾華 (2000) 雜色鮑 *Haliotis diversicolor* 潰瘍症病原菌的研究. 熱帶海洋, 19(3): 72-77.
- 黃美瑩, 張錦宜, 張慎恩, 洪珮馨, 林金榮 (2007) 深層海水中乳酸菌的分離與鑑定. 水產研究, 15(1): 45-54.
- 張金偉, 曾潤穎 (2006) 南極深海沉積物宏基因組 DNA 中低溫脂肪酶基因的克隆、表達及性質分析. 生物化學與生物物理進展, 33(12): 1207-1214.
- 張剛, 汪天虹, 張臻峰 (2002) 產低溫澱粉酶的海洋真菌篩選及研究. 海洋科學, 26(2): 3-5.

- 經濟部標準檢驗局 (2008) 深層海水檢驗法-總細菌數之測定(DAPI 染色法), 總號 CNS 15091-18, 類號 N7001-18. 97 年 3 月 28 日公告.
- 綿引正則, 清水美和子, 嶋智子, 磯部順子, 田中大祐, 木全恵子, 松永明信, 永井美之 (2005) 富山灣海洋水の細菌學的特性に関する調査研究. 富山縣衛生研究所年報, 28: 110-119.
- 藤田大介, 高橋正征 (2006) 海洋深層水利用学. 成山堂書店, 東京, 日本, 4-9.
- APHA (American Public Health Association), American Water Works Association & Water Environment Federation (1998a) Method 4500-NH₃ -F. *In* Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed., APHA, Washington, D.C., U.S.A. 4-108 - 4-109.
- APHA (American Public Health Association), American Water Works Association & Water Environment Federation (1998b) Method 4500-NO₂ -B. *In* Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed., APHA, Washington, D.C., U.S.A. 4-112 - 4-114.
- APHA (American Public Health Association), American Water Works Association & Water Environment Federation (1998c) Method 4500-P-E. *In* Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed., APHA, Washington, D.C., U.S.A. 4-146 - 4-147.
- APHA (American Public Health Association), American Water Works Association & Water Environment Federation (1998d) Method 5310-Total organic carbon. *In* Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed., APHA, Washington, D.C., U.S.A. 5-18 - 5-22.
- APHA (American Public Health Association), American Water Works Association & Water Environment Federation (1998e) Part 9000-Microbiological examination. *In* Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed., APHA, Washington, D.C., U.S.A. 9-1 - 9-140.
- Austin, B. and D. A. Austin (1987) 1. Introduction. *In* Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. Ellis Horwood Ltd., Chichester, U.K. 13-16.
- Birolo, L., M. L. Tutino, B. Fontanella, C. Gerday, K. Mainolfi, S. Pascarella, G. Sannia, F. Vinci and G. Marino (2000) Aspartate aminotransferase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. *Eur. J. Biochem.*, 267(9): 2790-2802.
- Defoirdt, T., W. Verstraete and P. Bossier (2008) Luminescence, virulence and quorum sensing signal production by pathogenic *Vibrio campbellii* and *Vibrio harveyi* isolates. *J. Appl. Microbiol.*, 104(5): 1480-1487.
- Dunlap, P. V. (1985) Osmotic control of luminescence and growth in *Photobacterium leiognathi* from ponyfish light organs. *Arch. Microbiol.*, 141(1): 44-50.
- Fry, J. C. (1988) Determination of Biomass. *In* Methods in Aquatic Bacteriology (R. Austin ed.), John Wiley & Sons Ltd., New York, U. S. A. 27-72.
- Fu, X. T., H. Lin and S. M. Kim (2008) Purification and characterization of a novel β -agarase, AgaA34, from *Agarivorans albus* YKW-34s. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78(2): 265-273.
- Georgette, D., Z. O. Jónsson, F. Van Petegem, J. -P. Chessa, J. Van Beeuman, U. Hübscher and C. Gerday (2000) A DNA ligase from the psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis* gives insights into the adaptation of proteins to low temperatures. *Eur. J. Biochem.*, 267(12): 3502-3512.
- Giordano, A., G. Andreotti, A. Tramice and A. Trincone (2006) Marine glycosyl hydrolases in the hydrolysis and synthesis of oligosaccharides. *Biotechnol. J.*, 1(5): 511-530.
- Hobbie, J. E., R. J. Daley and S. Jasper (1977) Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33(5): 1225-1228.
- Hoyoux, A., I. Jennes, P. Dubois, S. Genicot, F. Dubail, J. M. Francois, E. Baise, G. Feller and C. Gerday (2001) Cold-adapted β -galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(4): 1529-1535.
- Huang, S. L., W. C. Chen, M. C. Shei, I. C. Liao and S. N. Chen (1999) Studies on Epizootiology and Pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* in Tilapia (*Oreochromis* spp.) Cultured in Taiwan. *Zool. Stud.*, 38(2): 178-188.
- Jang, S. S. and E. L. Biberstein (1991) Observations on the occurrence of *Pasteurella testudinis* in clinical specimens from animals. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 3(2): 174-176.
- Kamei, Y., S. A. McCarthy, D. Kakimoto and R. M. Johnson (1986) Inhibition of *Paramecium caudatum* by an *Alteromonas luteoviolacea* antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 30(2): 301-303.
- Kobayashi, R., M. Takisada, T. Suzuki, K. Kirimura and S. Usami (1997) Neogagarbiose as a novel

- moisturizer with whitening effect. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61(1): 162-163.
- McCarthy, S. A., T. Sakata, D. Kakimoto and R. M. Johnson (1985) Production and isolation of purple pigment by *Alteromonas luteoviolacea*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 51(3): 479-484.
- McCarthy, S. A., R. M. Johnson and D. Kakimoto (1994) Characterization of an antibiotic produced by *Alteromonas luteoviolacea* Gauthier 1982, 85 isolated from Kinko Bay, Japan. *J. Appl. Bacteriol.*, 77(4): 426-432.
- Meighen, E. A. (1999) Autoinduction of light emission in different species of bioluminescent bacteria. *Luminescence*, 14(1): 3-9.
- Melo, P. S., S. S. Maria, B. C. Vidal, M. Huan and N. Duran (2000) Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 36(8): 539-543.
- Morgan, P. and C. S. Dow (1986) Bacterial adaptations for growth in low nutrient environments. *In Microbes in Extreme Environments* (R. A. Herbert and G. A. Codd eds.), Academic Press Inc., London, U. K., 187-214.
- Pearson, W. R. and D. I. Lipman (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(8): 2444-2448.
- Porter, K. G. and Y. S. Feig (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25(5): 943-948.
- Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4): 406-425.
- Thompson, F. L., C. C. Thompson, B. Hoste, K. Vandemeulebroecke, M. Gullian and J. Swings (2003) *Vibrio fortis* sp. nov. and *SVibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment. *Int. Syst. Evol. Microbiol.*, 53(5): 1495-1501.
- Thompson J. D., D. C. Higgins and T. J. Gibson (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, 22(22): 4673-4680.
- Truong, L. V., H. Tuyen, E. Helmke, L. T. Binh and T. Schweder (2001) Cloning of two pectate lyase genes from the marine Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain ANT/505 and characterization of the enzymes. *Extremophiles*, 5(1): 35-44.
- Tsuchiya Y., T. Shimizu, T. Tazawa, K. Nakamura and M. Yamamoto (2003) Effects of hot deep seawater bathing on the immune cell distribution in peripheral blood from healthy young men. *Environ. Health. Prev. Med.*, 8(5): 161-165.
- Tsuchiya Y., A. Watanabe, N. Fujisawa, T. Kaneko, T. Ishizu, T. Fujimoto, K. Nakamura and M. Yamamoto (2004) Effects of desalted deep seawater on hematologic and blood chemical values in mice. *Tohoku J. Exp. Med.*, 203(3): 175-182.
- Uehigashi, H., R. Katoh, H. Sugiyama, H. Uwagami, M. Nakao and M. Sami (2006) Effect of deep seawater on sake yeast. *J. Brew. Soc. Japan*, 101(2): 117-124.
- Wiik, R., K. A. Hoff, K. Andersen and F. L. Daae (1989) Relationships between plasmids and phenotypes of presumptive strain of *Vibrio anguillarum* isolated from different fish species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(4): 826-831.
- Yoon, J.-H., S.-H. Yeo, I.-G. Kim and T.-K. Oh (2004) *Shewanella marisflavi* sp. nov. and *Shewanella aquimarina* sp. nov., slightly halophilic organisms isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea. *Int. Syst. Evol. Microbiol.*, 54(6): 2347-2352.
- Yu, H.- S. and G.- S. Song (1993) Submarine physiography around Taiwan and its relation to tectonic setting. *J. Geolog. Soc. China*, 36(2): 139-156.

Compositions of Aerobic and Facultatively Anaerobic-heterotrophic Bacteria in Different Depths of Seawater off Taitung

Chin-I Chang^{1*}, Mei-Ying Huang¹, Chia-Che Wu¹, Fu-Chia Lin², Wen-Cheng Wang³ and King-Jung Lin¹

¹Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

²Planning and Programming Department, Fisheries Agency

³Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

Seawater samples were collected from different sites and depths off Taitung. The aerobic and facultatively anaerobic, heterotrophic bacteria were counted, isolated and purified immediately in a microbial laboratory of the research vessel. Isolated bacteria were identified according to the 16S rRNA gene sequences. The total viable bacterial counts in depths of 285, 740 and 912 m were 285 ± 13 , 69 ± 21 , 90 ± 19 and 32 ± 7 CFU/ml, respectively. To analyze the bacteria composition, 60 bacteria were selected randomly from samples of the four depths (15 for each) and purified. They were classified to 3 phyla, 4 classes, 7 orders, 10 families, 18 genera and 29 species. There were 3 strains that could not identify by 16S rRNA gene sequence. The so called "harmful bacteria" according to APHA were not detected. However, the ones which have been previously published as pathogens, such as *Vibrio harveyi*, *V. fortis* and *V. splendidus* can be found even in the depth of 912 m. The bacteria with unusual enzyme activities, such as *Agarivorans albus*, *Alteromonas luteoviolacea*, and *Pseudoalteromonas haloplanktis* can also be isolated from the deep seawater off Taitung.

Key words : deep sea water, bacterial composition, 16S rRNA

*Correspondence: Aquaculture Division, Fisheries Research Institute, 199 Hou-Ih Rd., Keelung 202, Taiwan. TEL: (02) 24633101; FAX: (02)24628138; E-mail: cichang@mail.tfrin.gov.tw