

奈米孔定序技術於文蛤腸道菌分析之應用

黃慶輝* · 吳嘉哲

行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

摘要

本研究運用奈米孔定序技術對於臺灣養殖文蛤之腸道菌相進行分析與探討，經由 Epi2me 平臺分析，於 12 個七股養殖文蛤之腸道樣本中，成功定序之有效 16S 序列數量共有 415,881 條，這些序列中可辨識至屬 (genus) 層級之序列共 314,348 條，比例最高的 5 個屬依序分別為弧菌屬、黴漿菌屬、內生桿菌屬、芽孢桿菌屬及厭氧桿菌屬，奈米孔定序法所能提供之序列解析度較次世代定序法如 illumina 定序法為高，且相比之下略低之定序正確度並不會對分析造成太大影響，且奈米孔定序技術其軟體及硬體技術皆持續發展中，其定序準確率也持續上升，十分具有發展潛力。

關鍵詞：文蛤、腸道菌、奈米孔定序、總體基因組學、養殖

前言

臺灣養殖文蛤目前主要為文蛤屬 (*Meretrix* spp.)，該屬物種廣泛分布於東非、東亞及東南亞 (Yoosukh and Matsukuma, 2001)，在臺灣分布有 5 種，臺灣文蛤 (*M. meretrix*)、中華文蛤 (*M. petechialis*)、麗文蛤 (*M. lusoria*)、韓國文蛤 (*M. lamarckii*) 及皺肋文蛤 (*M. lyrata*)，但除皺肋文蛤外，僅由外觀等形態特徵分辨這 5 種文蛤有一定難度 (Huang, 1999)。以往認為主要養殖文蛤物種為麗文蛤 (Chen, 1990; Jeng and Tyan, 1982)，但近年有學者透過分子生物學研究認為，臺灣主要養殖文蛤應為中華文蛤 (Wang *et al.*, 2017)，有關臺灣文蛤養殖物種究竟何者為主，尚待更進一步之研究與分析。臺灣文蛤養殖近年常遭遇突發性死亡的問題 (Chen 1990, Han *et al.*, 1996)，造成死亡的可能原因可能有高溫、強降雨、疾病、污染、優養化及細菌感染等 (Kou *et al.*, 1989, Liu *et al.*, 2001)，但水生動物細菌感染之相關研究大多於水生動物感染死亡後進行，對水生動物尚未感染死亡時的體內細菌組成並無太多了解，對於活存生物體，難以判斷死亡

後生物體內高比例存在之細菌是造成感染之主因，或者是僅為生物體死亡後大量增生之細菌。

傳統上對於水產生物的腸道環境細菌之研究，以直接從水產生物組織萃取細菌後進行培養，再以種類辨識等方式以瞭解腸道環境細菌的多樣性 (Beeson and Johnson, 1967)。此方式之缺點在於，有許多細菌難以於人工環境內培養，造成以細菌培養為主軸之研究方式難以反應環境中之細菌多樣性 (Hugenholtz *et al.*, 1998)。近年因應分子生物學技術之進展，腸道環境細菌多樣性之研究逐漸朝向總體基因體學的方式，總體基因體學之名詞概念最早於 1998 年提出 (Handelsman *et al.*, 1998)，意指直接研究環境中全部微生物群落之基因，而非於實驗室中進行單一細菌物種純化與培養的研究方式 (Chen and Pachter, 2005)，隨著定序技術的進步及費用的降低，相關研究能比以前更大規模且深入的方式進行，近期總體基因學之研究方式主要是運用基因霰彈槍 (shot gun) 及基因定序之方式，以期能在一個環境樣本中獲得大量且偏誤較少之細菌群體序列資料 (Eisen, 2007)。

本研究所使用之定序工具為奈米孔定序 (nanopore sequencing)，奈米孔定序的核心技術專利註冊於 2007 年，並於 2010 年正式開始運用相關技術 (Deamer *et al.*, 2016)，其特點在於能夠讀取長序列、提高連續序列片段長度、定序速度快，

*通訊作者 / 202 基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 2462-2101 轉 2803; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: chhuang02@mail.tfrin.gov.tw

且能直接對原始 DNA 樣本進行定序 (Jain *et al.*, 2016)，奈米孔技術的核心為插在薄膜上的跨膜蛋白，並在薄膜的兩端加上電位差，使溶液的離子通過蛋白形成電流。解旋酶 (helicase) 將 DNA 兩股解旋，使其中單股 DNA 通過跨膜蛋白。此時通過奈米孔的 DNA 會對離子流動造成影響，使電流改變。因為不同鹼基會對電流改變產生不同影響，藉由量測大量已知序列造成的電流大小變化，可以用電流改變的模式來回推 DNA 的鹼基 (Jain *et al.*, 2016)。本研究以總體基因學為基礎，對於臺灣養殖文蛤之腸道菌相及多樣性進行分析與探討，並嘗試討論比較奈米孔定序用於水產生物腸道菌研究的優劣性。

材料與方法

一、試驗動物

本研究所使用之文蛤，樣本數共 12 個，取自臺南市七股區之養殖場，殼長範圍約在 3 - 5 cm 左右，捕撈後冷藏運送至實驗室後立即進行採樣。

二、文蛤腸道採取及核酸萃取

為分析文蛤腸道菌細菌相，文蛤以解剖刀伸入殼中切斷閉殼肌之方式解剖文蛤，剪開文蛤外側肌肉層後於文蛤內臟團中挑出腸道置入 95% 酒精保存。包含腸道菌核酸之腸道核酸萃取則運用 MagPurix Tissue DNA Extraction Kit，將文蛤腸道組織以 protein kinase K (MagPurix) 將蛋白溶解後以 Zinexts MagPurix 12A 核酸自動萃取儀進行核酸萃取。

三、運用聚合酶連鎖反應 (PCR) 將文蛤腸道菌 16S 序列放大

萃取完之文蛤腸道核酸以 PCR 方式將細菌 16S 序列之擴增，使用之試劑為 Fast-Run Taq Master Mix with Dye (5X Master Mix, Protec)，所使用之細菌 16S 專一性之引子序列為 20F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 及 1500R (5'-

GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Eden *et al.*, 1991)，反應條件為 9°C 1 min；再進行 94°C 45 sec、52°C 45 sec、72°C 1 min 30 sec，共進行 40 個循環；最後以 72°C 反應 10 min，反應產物長度約為 1480 bp 上下，已接近細菌 16S 序列全長。

四、奈米孔定序樣本前處理及上機

將 PCR 產物以電泳確認成功擴增 16S 序列後，以 Kapa HyperPure beads (Roche)、KAPA HyperPrep Kits (Roche)、Ligation Sequencing Kit (Oxford Nanopore) 及 Native Barcoding Expansion (Oxford Nanopore)，依照流原廠程將樣本進行製備，製備好之樣本注入專用定序晶片 (SpotON Flow Cell, Oxford Nanopore)，並以 MinION 奈米孔定序儀配合電腦進行定序。

五、序列分析

定序後的資料運用 Oxford Nanopore 所提供的平臺 Epi2me (<https://epi2me.nanoporetech.com/>) 將定序好的資料進行分析，分析過程包含序列準確度測試、細菌物種比對分群。序列比對之資料庫為 NCBI 之 16S 序列資料庫 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>)。

結 果

一、基本定序結果

本研究共定序臺南七股 12 文蛤個體之腸道菌樣本 (Cigu01-Cigu12)，為增加細菌辨種之正確率，僅取長度在 1000 bp 以上之序列，經由 Epi2me 平臺分析，各樣本成功辨識之有效 16S 序列數量為 17,565 - 52,486，共成功辨識 415,881 條有效 16S 序列，結果列於 Table 1，這些序列中可辨識至屬 (genus) 層級之序列共 314,348 條，各樣本間有所差異，但比例最高的 5 個屬依序分別為弧菌屬 (*Vibrio*, 31.13 ± 24.86%)、黴漿菌屬 (*Mycoplasma*, 19.47 ± 18.59%)、內生桿菌屬 (*Endozoicomonas*, 14.60 ± 13.57%)、芽孢桿菌屬 (*Bacillus*, 7.40 ± 18.84%) 及厭氧桿菌屬 (*Anoxybacillus*, 1.56 ± 4.55%) (Table 2)，

各屬細菌組成物種如 Table 3，說明如下：

(一) 弧菌屬 (*Vibrio*)

以地中海弧菌 (*V. mediterranei*) 所佔比例最高，達 $58.69 \pm 16.59\%$ ，次高者依序為 *V. splendidus* ($5.38 \pm 4.36\%$)、*V. aestuarianus* ($4.66 \pm 0.96\%$)、*V. gigantis* ($4.00 \pm 3.25\%$) 及 *V. artabrorum* ($3.96 \pm 3.32\%$)。

(二) 黴漿菌屬 (*Mycoplasma*)

以 *M. pirum* 比例最高佔 $15.63 \pm 11.54\%$ ，次高者依序為 *M. gypis* ($14.01 \pm 6.83\%$)、*M. anseris* ($7.51 \pm 5.72\%$)、*M. mobile* ($5.63 \pm 4.99\%$) 及 *M. hyorhinis* ($5.24 \pm 3.42\%$)。

(三) 內生桿菌屬 (*Endozoicomonas*)

以 *E. elysicola* 所佔比例最高，達 $51.50 \pm 5.52\%$ ，其餘依序為 *E. ascidiicola* ($22.53 \pm 3.06\%$)、*E. atrinae* ($19.05 \pm 3.10\%$)、*E. montiporae* ($3.38 \pm 0.89\%$) 及 *E. numazuensis* ($0.43 \pm 0.24\%$)。

(四) 芽孢桿菌屬 (*Bacillus*)

比例最高為 *B. manusensis* ($39.13 \pm 11.80\%$)，其餘依序為 *B. aeolius* ($16.14 \pm 6.64\%$)、*B. smithii* ($10.79 \pm 2.89\%$)、*B. firmus* ($6.07 \pm 2.04\%$) 及 *B. alveayuensis* ($2.31 \pm 1.19\%$)。

(五) 厭氧桿菌屬 (*Anoxybacillus*)

比例最高為 *A. caldiproteolyticus* (70.06 ± 7.83)，其餘依序為 *A. geothermalis* ($15.45 \pm 6.22\%$)、*A. vitaminiphilus* ($10.10 \pm 4.83\%$)、*A. calidus* ($2.21 \pm 2.92\%$) 及 *A. rupiensis* ($1.04 \pm 1.13\%$)。

二、各樣本定序圖形化結果

本研究之 12 個文蛤腸道菌樣本 (Cigu01-Cigu12)，各樣本經由 Epi2me 平臺分析後其屬層級之比例結果如 Fig. 1，為檢視方便，未列入無法分類至屬層級之序列，其中大多數樣本仍以弧菌屬、黴漿菌屬、內生桿菌屬之細菌比例佔多數，惟

Cigu05 其芽孢桿菌屬細菌之佔比高，另 Cigu12 其厭氧桿菌屬及芽孢桿菌屬之佔比亦高。

Table 1 Sequence reads generated per sample of gut microbiota from cultured hard clam

Sample	Reads	Percentage (%)
Cigu01	40,253	9.68
Cigu02	46,652	11.22
Cigu03	17,565	4.22
Cigu04	35,051	8.43
Cigu05	46,835	11.26
Cigu06	31,124	7.48
Cigu07	34,295	8.25
Cigu08	49,153	11.82
Cigu09	18,931	4.55
Cigu10	24,183	5.81
Cigu11	19,353	4.65
Cigu12	52,486	12.62
Total	415,881	100.00

討 論

一、腸道菌種類與文蛤健康之關係

本研究所檢測的 12 個七股養殖池之文蛤腸道菌樣本中，其中有 9 個樣本弧菌屬 (*Vibrio*) 皆為優勢群 ($18.39 - 65.96\%$) (Table 1)，一般認為弧菌屬細菌是造成文蛤等貝類養殖大量死亡的原因之一 (Paillard *et al.*, 2004, Yue *et al.*, 2010)，但以本研究在文蛤腸道所發現之弧菌屬中佔比例最高之種類為 *V. mediterranei*，佔比接近 6 成 (Table 3)，*V. mediterranei* 曾有感染大江珧蛤 (*Pinna nobilis*) 之記錄 (Andree *et al.*, 2020)，但經過實際訪查，本研究採樣文蛤來源之臺南七股養殖池其養殖過程情況良好，至收成為止並無發生大量死亡之情形，因此初步推測 *V. mediterranei* 應不是文蛤之主要致病菌種。此外，弧菌屬的物種並非皆會造成水產生物疾病，某些由菲律賓簾蛤 (*Ruditapes philippinarum*) 體內分離的弧菌屬物種，其分泌物具有抑菌活性，能抑制同樣為弧菌屬之重要水產生物致病菌 *V. tapetis* 生長 (Castro *et al.*, 2002)，除本研究之文蛤之外經定序方式分析日本北海道所

養殖之盤鮑 (*Haliotis discus*) 其腸道菌相中弧菌屬亦佔 40% 以上，為優勢群 (Tanaka *et al.*, 2004)，綜上，貝類腸道中弧菌屬物種與貝體本身的交互作用應十分複雜，非單純病原體及寄主之關係，惟仍待進一步的研究釐清。其它於文蛤腸道菌相中所佔比例較高之屬分別為黴漿菌屬及內生桿菌屬，黴漿菌屬在中國大陸所養殖的九孔 (*Haliotis*

diversicolor) 亦為腸道菌之優勢群 (Huang *et al.*, 2010)，內生桿菌屬是一廣泛存在之海洋生物共生菌，在魚類 (Katharios *et al.*, 2015)、貝類 (Beinart *et al.*, 2014) 及珊瑚 (Yang *et al.*, 2010) 等物種皆有發現，其作用不十分明瞭，有的會造成疾病，有的亦具促進生物體健康之能力 (Neave *et al.*, 2016)。

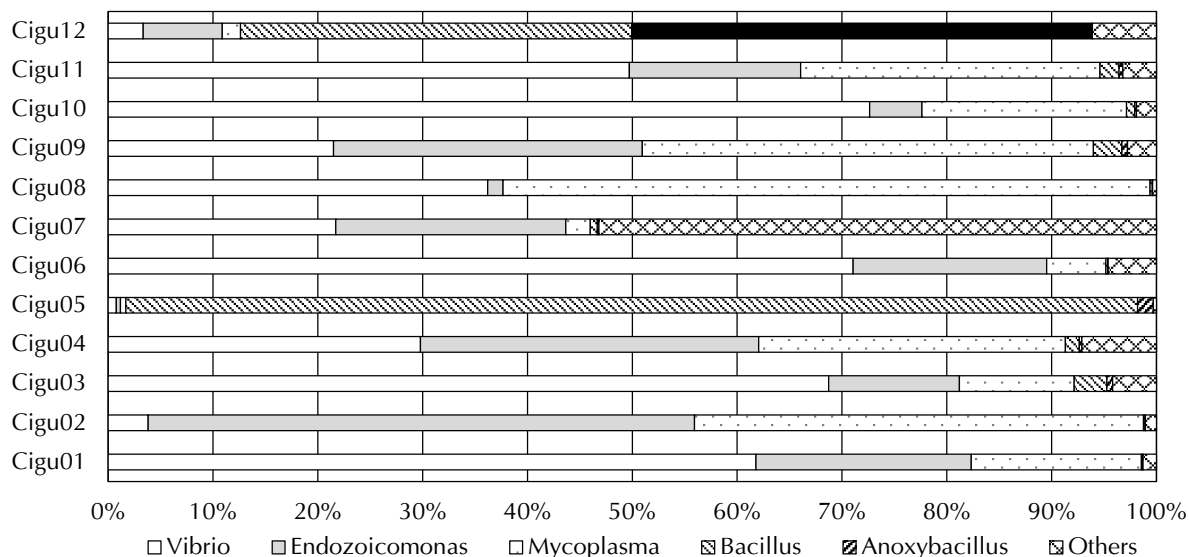


Fig. 1 Relative abundance levels (percentages of each phylum with respect to all valid sequences) of different bacterial genera associated with the gut microbiota of hard clam.

Table 2 Taxonomic assignment of nanopore reads (%) of gut microbiota from cultured hard clam using the Epi2me platform

	<i>Vibrio</i>	<i>Mycoplasma</i>	<i>Endozoicomonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Anoxybacillus</i>	<i>Umboniibacter</i>
Cigu01	57.52	15.10	19.11	0.12	0.03	0.03
Cigu02	3.43	38.59	46.95	0.14	0.03	0.02
Cigu03	55.90	8.90	10.15	2.53	0.45	0.21
Cigu04	25.13	24.68	27.22	1.12	0.20	0.08
Cigu05	0.53	0.36	0.28	66.03	1.02	0.02
Cigu06	58.59	4.65	15.22	0.14	0.04	0.50
Cigu07	7.77	0.83	7.86	0.24	0.06	
Cigu08	35.29	60.15	1.43	0.21	0.04	
Cigu09	18.39	36.83	25.23	2.33	0.44	
Cigu10	65.96	17.73	4.54	0.70	0.15	
Cigu11	43.85	25.20	14.42	1.61	0.33	
Cigu12	1.22	0.63	2.75	13.58	15.89	
Average	31.13	19.47	14.60	7.40	1.56	0.71
Satandard error	24.86	18.59	13.57	18.84	4.55	1.98

Table 2 Continued

	<i>Alkalispirochaeta</i>	<i>Sulfurimonas</i>	<i>Spirochaeta</i>	<i>Arocbacter</i>	Other genus	No classification	Total (Reads)
Cigu01	0.24	0.01	0.24	0.04	1.51	6.04	100 (40,253)
Cigu02	0.00	0.01	0.02	0.00	2.79	8.01	100 (46,652)
Cigu03	0.13	0.07	0.13	0.08	3.21	18.25	100 (17,565)
Cigu04	2.28	0.05	1.98	0.04	2.83	14.38	100 (35,051)
Cigu05	0.00	0.01	0.00	0.00	0.47	31.28	100 (46,835)
Cigu06	0.21	0.50	0.10	0.81	3.18	16.06	100 (31,124)
Cigu07	0.01	2.11	0.01	1.28	9.09	63.74	100 (34,295)
Cigu08	0.02	0.00	0.02	0.01	0.34	2.48	100 (49,153)
Cigu09	0.07	0.12	0.05	0.07	3.46	12.83	100 (18,931)
Cigu10	0.08	0.22	0.09	0.08	1.55	8.84	100 (24,183)
Cigu11	0.73	0.08	0.56	0.08	2.26	10.80	100 (19,353)
Cigu12	0.02	0.05	0.00	0.06	2.29	63.07	100 (52,486)
Average	0.32	0.27	0.27	0.21	2.75	21.31	
Standard error	0.65	0.60	0.56	0.40	2.25	20.96	

Table 3 Species identified (%) in five dominant genera of gut microbiota from cultured hard clam

 (A) Genus *Vibrio*

	<i>V. mediterranei</i>	<i>V. splendidus</i>	<i>V. aestuarianus</i>	<i>V. artabrorum</i>	<i>V. gigantis</i>	Other species
Cigu01	63.38	4.19	4.76	3.38	2.64	21.66
Cigu02	50.62	6.74	4.93	5.18	5.68	26.84
Cigu03	68.39	3.08	4.43	2.26	2.49	19.35
Cigu04	72.79	1.15	3.55	0.90	0.76	20.85
Cigu05	55.65	7.66	3.23	4.44	6.05	22.98
Cigu06	23.24	16.49	6.85	13.26	11.81	28.35
Cigu07	38.31	5.78	5.18	4.80	4.05	41.88
Cigu08	78.83	0.69	3.96	0.65	0.45	15.42
Cigu09	68.32	3.13	4.22	2.44	2.33	19.56
Cigu10	69.72	3.23	4.73	2.48	2.40	17.44
Cigu11	70.60	2.99	4.39	2.39	1.99	17.63
Cigu12	44.36	9.40	5.64	5.33	7.37	27.90
Average	58.69	5.38	4.66	3.96	4.00	23.32
Standard error	16.59	4.36	0.96	3.32	3.25	7.21

Table 3 Continued(B) Genus *Mycoplasma*

	<i>M. pirum</i>	<i>M. gypis</i>	<i>M. anseris</i>	<i>M. mobile</i>	<i>M. hyorhinis</i>	Other species
Cigu01	2.93	13.26	4.72	2.01	5.02	72.07
Cigu02	38.37	1.18	0.47	13.43	0.22	46.32
Cigu03	19.90	12.80	6.53	3.71	4.09	52.98
Cigu04	24.97	9.57	4.80	2.68	7.71	50.28
Cigu05	18.56	13.17	8.98	5.39	1.20	52.69
Cigu06	25.57	17.69	4.63	2.76	4.28	45.06
Cigu07	16.78	10.49	6.29	5.24	4.90	56.29
Cigu08	0.10	24.06	19.43	2.10	11.43	42.87
Cigu09	6.35	21.04	17.60	3.23	9.77	42.01
Cigu10	21.13	5.97	1.28	18.05	1.75	51.81
Cigu11	1.64	15.87	7.85	3.14	7.96	63.54
Cigu12	11.21	23.03	7.58	5.76	4.55	47.88
Average	15.63	14.01	7.51	5.63	5.24	51.98
Standard error	11.54	6.83	5.72	4.99	3.42	8.74

(C) Genus *Endozoicomonas*

	<i>E. elysicola</i>	<i>E. ascidiicola</i>	<i>E. atrinae</i>	<i>E. montiporae</i>	<i>E. numazuensis</i>	Other species
Cigu01	52.99	24.39	18.07	3.81	0.61	0.13
Cigu02	52.44	25.97	19.52	1.51	0.49	0.06
Cigu03	50.70	22.27	22.32	4.04	0.56	0.11
Cigu04	52.39	24.01	20.35	2.86	0.36	0.03
Cigu05	56.59	17.83	22.48	3.10	0.00	0.00
Cigu06	34.66	15.14	11.40	2.02	0.35	0.12
Cigu07	52.19	22.46	21.20	3.30	0.71	0.15
Cigu08	55.27	24.64	15.53	4.42	0.14	0.00
Cigu09	52.39	23.99	19.70	3.43	0.44	0.04
Cigu10	52.55	23.95	18.49	4.10	0.82	0.09
Cigu11	52.15	22.90	21.00	3.76	0.18	0.00
Cigu12	53.68	22.75	18.52	4.23	0.55	0.28
Average	51.50	22.53	19.05	3.38	0.43	0.08
Standard error	5.52	3.06	3.10	0.89	0.24	0.08

(D) Genus *Bacillus*

	<i>B. manuseensis</i>	<i>B. aeolius</i>	<i>B. smithii</i>	<i>B. firmus</i>	<i>B. alveayuensis</i>	Other species
Cigu01	34.00	32.00	8.00	6.00	2.00	18.00
Cigu02	38.81	16.42	11.94	5.97	2.99	23.88
Cigu03	43.92	17.34	11.04	4.50	2.48	20.72
Cigu04	45.18	13.45	11.93	4.57	1.27	23.60
Cigu05	50.48	19.06	10.60	5.88	1.86	12.14
Cigu06	39.53	16.28	13.95	9.30	0.00	20.93
Cigu07	36.59	13.41	13.41	10.98	2.44	23.17
Cigu08	43.14	16.67	6.86	5.88	1.96	25.49
Cigu09	44.80	16.74	7.92	4.98	2.04	23.53
Cigu10	46.15	16.57	6.51	5.92	3.55	21.30
Cigu11	42.44	13.83	11.90	4.18	2.25	25.40
Cigu12	4.48	1.91	15.38	4.72	4.87	68.65
Average	39.13	16.14	10.79	6.07	2.31	25.57
Standard error	11.80	6.64	2.89	2.04	1.19	14.06

Table 3 Continued

(E) Genus *Anoxybacillus*

	<i>A. caldiproteolyticus</i>	<i>A. geothermalis</i>	<i>A. vitaminiphilus</i>	<i>A. calidus</i>	<i>A. rupiensis</i>	Other species
Cigu01	66.67	16.67	8.33	8.33	0.00	0.00
Cigu02	91.67	0.00	8.33	0.00	0.00	0.00
Cigu03	65.82	12.66	16.46	2.53	0.00	2.53
Cigu04	67.61	8.45	18.31	0.00	2.82	2.82
Cigu05	64.58	14.58	13.13	3.13	2.71	2.71
Cigu06	69.23	23.08	7.69	0.00	0.00	0.00
Cigu07	75.00	20.00	5.00	0.00	0.00	0.00
Cigu08	75.00	20.00	5.00	0.00	0.00	0.00
Cigu09	61.90	21.43	10.71	2.38	1.19	1.19
Cigu10	64.86	13.51	8.11	2.70	2.70	2.70
Cigu11	74.60	20.63	3.17	1.59	0.00	0.00
Cigu12	63.82	14.37	16.90	1.09	1.74	1.74
Average	70.06	15.45	10.10	1.04	1.14	1.14
Standard error	7.83	6.22	4.83	1.13	1.22	1.22

二、以奈米孔定序進行腸道環境細菌研究 與其他定序方式相比之優缺點

目前環境細菌研究主流之定序方式有 Illumina 公司所開發的定序法 (以下簡稱 Illumina 定序法) 以及本研究所使用之奈米孔定序法。兩者相比, Illumina 定序法其準確度相當高 (>99%), 目前也被廣泛使用, 但因其定序原理之限制, 一次能定序之長度最高約為 300bp 左右 (Goodwin *et al.* 2016), 因此一般皆以不同細菌間於 16S 序列中歧異度最高的片段 V3-V4 進行定序以達較佳結果 (Herlemann *et al.*, 2011), 但僅以 16S 部分高歧異度片段之定序結果較難將細菌分類至物種 (species) 層級 (Nygaard *et al.*, 2020), 與之相比, 奈米孔定序法其定序準確率稍微較低 (>95%), 但其可定序長度理論上是沒有限制的, 因此以奈米孔定序可一次定序接近全長之 16S 序列 (1500 bp 左右), 因此有更多的序列資訊可供分析, 且分類時較容易達到物種層級 (Benítez *et al.*, 2016), 換句話說, 奈米孔定序法所能提供之序列解析度較 Illumina 定序法為高, 提供了一個新的可信分析方式, 且相比之下略微低之解析度並不會對分析造成太大影響, 除此之外, 奈米孔定序法之軟體及硬體技術皆持續發展中, 其定序準確率也持續上升, 十分具有潛力 (Heikema *et al.*, 2020)。

結論與展望

近年因為氣候變遷等緣故, 養殖水產物病害發生的機會也顯著提高, 水產生物腸道菌等環境基因體學研究對於疾病傳染途徑的發現、新型益生菌的發展、及水生生物體與細菌的共生關係等方面提供了一座分子層級之顯微鏡, 研究者可藉由這樣的工具去窺探其中的奧秘, 且經由相關研究可得知, 不論大至海洋環境菌相, 小至生物體之腸道菌相等環境基因體學研究, 奈米孔定序皆為一強而有力之工具, 且因腸道菌與生物體內之共存關係十分複雜, 以往僅能定序至細菌屬層級之定序方式可能不足以對往後之研究提供足夠的資訊, 奈米孔定序法之出現使得定序至種層級之門檻大幅降低, 也提供了更多有用序列資訊, 隨著技術發展, 奈米孔定序法的潛力是不可限量的。

參考文獻

- Andree, K. B., N. Carrasco, F. Carella, D. Furones and P. Prado (2020) *Vibrio mediterranei*, a potential emerging pathogen of marine fauna: investigation of pathogenicity using a bacterial challenge in *Pinna nobilis* and development of a species-specific PCR.

- J. Appl. Microbiol., 93(3): 438-447.
- Beeson, R. J. and P. T. Johnson (1967) Natural bacterial flora of the bean clam, *Donax gouldi*. J. Invertebr. Pathol., 9(1): 104-110.
- Beinart, R., S. Nyholm, N. Dubilier and P. Girguis (2014) Intracellular oceanospirillales inhabit the gills of the hydrothermal vent snail *Alviniconcha* with chemosynthetic, γ -proteobacterial symbionts. Environ. Microbiol. Rep., 6:656-664.
- Benítez-Páez, A., K. J. Portune and Y. Sanz (2016) Species-level resolution of 16S rRNA gene amplicons sequenced through the MinION portable nanopore sequencer. GigaScience, 5: 4.
- Castro, D., M. J. Pujalte, L. Lopez-Cortes, E. Garay and J. J. Borrego (2002) Vibrios isolated from the cultured manila clam (*Ruditapes philippinarum*): numerical taxonomy and antibacterial activities. J. Appl. Microbiol., 93(3): 438-447.
- Chen, L. C. (1990) Aquaculture in Taiwan. Blackwell Scientific Pub., Oxford, UK.
- Chen, K. and L. Pachter (2005) Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. PLoS Comput. Biol., 1(2): e24.
- Deamer, D., M. Akeson and D. Branton (2016) Three decades of nanopore sequencing. Nat. Biotechnol., 34: 518-524.
- Eden, P. A., T. M. Schmidt, R. P. Blakemore and N. R. Pace (1991) Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 41(2): 324-325.
- Eisen, J. A. (2007) Environmental shotgun sequencing: Its potential and challenges for studying the hidden world of microbes. PLoS Biol., 5(3): e82.
- Goodwin, S, J. D. McPherson and W. R. McCombie (2016) Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nat. Rev. Genet., 17: 333-351.
- Han, B. C., W. L. Jeng, T. C. Hung and M. Y. Wen (1996) Relationship between copper speciation in sediments and bioaccumulation by marine bivalves of Taiwan. Environ. Pollut., 91(1): 35-39.
- Handelsman, J., M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy and R. M. Goodman (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. Chem. Biol., 5 (10): R245.
- Heikema, A. P., D. Horst-Kreft, S. A. Boers, R. Jansen, S. D. Hiltemann, W. de Koning, R. Kraaij, M. A. J. de Ridder, C. B. van Houten, L. J. Bont, A. P. Stubbs and J. P. Hays (2020) Comparison of illumina versus nanopore 16S rRNA gene sequencing of the human nasal microbiota. Genes, 11: 1105.
- Herlemann, D., M. Labrenz, K. Jürgens, S. Bertilsson, J. J. Waniek and A. F. Andersson (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. The ISME J., 5: 1571-1579.
- Huang, Z. B., F. Guo, J. Zhao, W. D. Li and C. H. Ke. (2010) Molecular analysis of the intestinal bacterial flora in cage-cultured adult small abalone, *Haliotis diversicolor*. Aquac. Res., 41(11): e760-769.
- Huang, H. W. (1999) Ecological conservation strategy from the prosperity and decline of hard clam in estuary of Danshui River. Fish. Extension, 151: 19-24.
- Hugenholtz, P., B. M. Goebel and N. R. Pace (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. J. Bacteriol., 180 (18) : 4765-74.
- Jain, M., H. E. Olsen, B. Paten and M. Akeson (2016) The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. Genome Biol., 17: 239.
- Jeng, S. S. and Y. M. Tyan (1982) Growth of the hard clam *Meretrix lusoria* in Taiwan. Aquaculture, 27(1): 19-28.
- Katharios, P., H. M. B. Seth-Smith, A. Fehr, J. M. Mateos, W. Qi, D. Richter, L. Nufer, M. Ruetten, M. G. Soto, U. Ziegler, N. R. Thomson, R. Schlapbach, L. Vaughan (2015) Environmental marine pathogen isolation using mesocosm culture of sharpnose seabream: striking genomic and morphological features of novel *Endozoicomonas* sp. Sci. Rep., 5: 17609 (<https://doi.org/10.1038/srep17609>).
- Kou, G., S. Chen and C. Lo. (1989) Fish and shellfish viral disease research in Taiwan. J. Fish. Soc. Taiwan, 16: 303-312.
- Liu, F. K., Y. D. Ho, J. C. Kuo and I. C. Liao (2001) High quality culture technique of hard clam: agriculture policy and review. Council of Agriculture. 81-109.
- Neave, M. J., A. Apprill, C. Ferrier-Pagès, C. R. Voolstra (2016) Diversity and function of prevalent symbiotic marine bacteria in the genus *Endozoicomonas*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 100(19): 8315-8324.
- Nygaard, A. B., H. S. Tunsjø, R. Meisal, C. Charnock (2020) A preliminary study on the potential of Nanopore MinION and Illumina MiSeq 16S rRNA

- gene sequencing to characterize building-dust microbiomes. *Sci. Rep.*, 10: 3209.
- C. Paillard, F.L. Roux, J.J. Borrego. (2004) Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquat. Living Resour.*, 17: 477-498.
- Tanaka, R., M. Ootsubo, T. Sawabe, Y. Ezura, K. Tajima. (2004) Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture-independent techniques. *Aquaculture*, 241(1-4): 453-463.
- Wang, X., L. Kong, J. Chen, A. Matsukuma and Q. Li (2017) Phylogeography of bivalve *Meretrix petechialis* in the northwestern Pacific indicated by mitochondrial and nuclear DNA data. *PLoS ONE*, 12(1): e0183221.
- Yoosukh, W. and A. Matsukuma (2001) Taxonomic study on *Meretrix* (Mollusca: Bivalvia) from Thailand. *Phuket Marine Biological Center, Special Pub.*, 25: 451-460.
- Yang, C. S., M. H. Chen, A. B. Arun, C. A. Chen, J. T. Wang and W. M. Chen (2010) *Endozoicomonas montiporae* sp. nov., isolated from the encrusting pore coral *Montipora aequituberculata*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60: 1158-1162.
- Yue, X., B. Liu, J. Xiang and J. Jia (2010) Identification and characterization of the pathogenic effect of a *Vibrio parahaemolyticus*-related bacterium isolated from clam *Meretrix meretrix* with mass mortality. *J. Invertebr. Pathol.*, 103(2): 109-115.

Application of Nanopore Sequencing Technology in Gut Bacteria Analysis of Hard Clam

Ching-Huei Huang* and Chia-Che Wu

Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

This study used nanopore sequencing technology to analyze the gut bacterial flora composition of Taiwanese cultured clams. Through an analysis of 12 gut microbiota samples of cultured clams from Cigu, Tainan, performed with the Epi2me platform, a total of 415,881 valid 16S sequences were successfully sequenced, and 314,348 of these sequences could be identified to the genus level. The 5 bacteria genera with the highest proportions in the clam gut bacterial flora were *Vibrio*, *Mycoplasma*, *Endozoicomonas*, *Bacillus*, and *Anoxybacillus*. The nanopore sequencing revealed greater taxonomic resolution than illumina sequencing platforms, and its slightly lower per read accuracy did not seem to affect the analysis very much. Both the software and hardware of nanopore sequencing technology is under continuous development, and its sequencing accuracy is also continuously increasing, meaning that the technology has great potential for gut bacterial flora analysis.

Key words: hard clam, gut bacteria, nanopore sequencing, metagenome, aquaculture

*Correspondence: No. 199, Hou-lh Rd., Keelung 202, Taiwan. TEL: (02) 2462-2101 ext. 2803; FAX: (02) 2462-8138;
E-mail: chhuang02@mail.tfrin.gov.tw