

水產病原弧菌之拮抗菌 - *Bacillus pumilus* D5 抗菌物質之探討

黃美瑩¹ · 朱惠真^{1*} · 廖哲宏¹ · 曾福生¹ · 林泓廷²

¹ 行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

² 國立臺灣海洋大學食品科學系

摘要

Bacillus pumilus D5 為多種水產病原弧菌之強力拮抗菌，本研究藉由其全基因體基因資料的深度挖掘，預測 *B. pumilus* D5 可產生的抗菌物質，再由高效液相層析 (high performance liquid chromatography, HPLC) 及串聯式質譜儀 (MS/MS) 分析 *B. pumilus* D5 上清液中的抗菌物質，並以標準品進行抗菌物質之抗菌試驗。結果顯示，將菌株 *B. pumilus* D5 之全基因體資料與抗菌物質合成途徑資料庫進行交叉分析，共預測得到 *B. pumilus* D5 含有與 3 種抗菌物質合成途徑的基因群高度吻合，分別是 kanosamine、bacilysin 及 toxoflavin。藉由高效液相層析及串聯式質譜儀分析 *B. pumilus* D5 上清液顯示，*B. pumilus* D5 上清液中存在 kanosamine、bacilysin 及 toxoflavin 抗菌物質。將樣品層析之波峰所得的面積帶入 kanosamine 及 toxoflavin 製得之標準曲線，*B. pumilus* D5 上清液中 kanosamine 及 toxoflavin 的濃度分別為 2,800.00 及 1.23 ng/ml。由於市面上無法購得 bacilysin 標準品，暫無法估算樣品中 bacilysin 之濃度。標準品 kanosamine 及 toxoflavin 抗菌試驗結果顯示，25.0 - 100.0 µg/mL 的 toxoflavin 就會抑制霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*)、哈維氏弧菌 (*V. harveyi*) 及創傷弧菌 (*V. vulnificus*)；500.0 µg/mL 的 toxoflavin 會抑制無乳鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 及瓶鼻海豚鏈球菌 (*S. iniae*)。而 kanosamine 在高達 5,000.0 µg/mL 時，對所有上述測試菌株均無抑制作用；因此推測 *B. pumilus* D5 所產的 toxoflavin 是造成該菌具有抵抗多種水產病原弧菌及鏈球菌之主要抗菌成分之一。

關鍵詞： *Bacillus pumilus* D5、抗菌物質、kanosamine、bacilysin、toxoflavin

前言

芽孢桿菌 (*Bacillus* spp.) 廣泛存在環境中，屬於革蘭氏陽性菌，具有鞭毛、好氣性及活動力強的細菌；近年來，芽孢桿菌常被使用在動植物的病害防治，作為益生菌之應用，防治的機制是以多重作用呈現，包含利用族群優勢與病原菌競爭營養及空間，可產生抗生物質、複合揮發性物質或多種分解酵素而抑制病原菌的生長、促進動植物的生長及誘導動植物產生抗病反應等作用 (Laurent *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2009; Cawoy *et al.*, 2011; Aweeda *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015)，且芽孢桿菌會形成孢子，易製成商品，較一般益生菌的繁

殖體耐受不良環境，孢子可以通過動物體腸胃道之障蔽，有一定比例會在動物的腸道定殖，發揮益生菌之作用 (Gao *et al.*, 2017)。

短小芽孢桿菌 (*B. pumilus*) 為芽孢桿菌的一種，Hasan *et al.* (2019) 指出，*B. pumilus* SAF1 可以抵抗藤黃微球菌 (*Micrococcus luteus*) 及金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)；Freitas-Silva *et al.* (2020) 報導，*B. pumilus* 可以抑制多種抵抗萬古黴菌 (vancomycin) 的細菌。Irkutova *et al.* (2021) 指出，*B. pumilus* 可以抵抗大腸桿菌 (*Escherichia coli*)。*B. pumilus* 會產生許多不同種類之抗菌物質，Bhate (1955) 報導，*B. pumilus* 會產生抵抗革蘭氏陽性菌的抗菌物質 pumilin，並推測其為非肽類物質，對金黃色葡萄球菌的有效抑制濃度較盤尼西林類 (penicillin) 抗生素為低。

Itoh *et al.* (1982) 指出，*B. pumilus* 產生 amicoumacin A、B 及 C，該類物質具有抗菌及抗

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號; TEL: (02)2463-3101; 轉 2819; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: jhjen@mail.tfrin.gov.tw

發炎之作用。Gao *et al.* (2017) 報導, *B. pumilus* H2 產生抗 29 種弧菌的抗菌物質-amicoumacin A, 分子量為 423 Da。amicoumacin A 濃度在 0.5 – 64 µg/ml 均有抑菌作用, 電子顯微鏡照片顯示, 該抗菌物質會造成細胞膜穿孔, 導致細胞死亡。amicoumacin A 與創傷弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 共培養, 可以有效抑制弧菌數量。

Melo *et al.* (2009) 指出, 分離自植物的 *B. pumilus* 產生抗真菌物質-pumilacidin, 為環狀胜肽加上脂肪酸的物質, 具有抗菌及病毒之作用, *B. pumilus* 可以在植物的根及莖生長, 可以用以防治植物病害。Saggese *et al.* (2018) 報導, 分離自海洋的 *B. pumilus* SF214 會產生 2 種抗菌物質, 第 1 種為 pumilacidin, 分子量>3 KDa, 具有抑制金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的能力。Saggese *et al.* (2022) 指出, 第 2 種為<10 KDa 的胜肽類抗菌物質, 具有抵抗李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 的特性, 在細菌的對數生長期產生, 對人類的表皮細胞 (Caco-2) 無毒性。

Aunpad *et al.* (2007) 提及 *B. pumilus* 是人類商業益生菌, 並報導 *B. pumilus* 產生 pumilicin 4, 為蛋白質類的抑菌物質, 分子量為 1,994 Da。pumilicin 4 只會抑制革蘭氏陽性菌, 在低濃度具靜菌作用, 而高濃度則具抑菌效應, 可以抑制抗藥性的金黃色葡萄球菌及糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*), 主要機理為 pumilicin 4 造成細胞膜不穩定, 或是菌體自行分解, 導致細菌死亡。

Nayak *et al.* (2017) 報導, *B. pumilus* (B2) 產生抗 8 種弧菌的類抑菌素 (bacteriocin-like) 的蛋白質 (部分純化), 分子量為 17 KDa, 將培養 *B. pumilus* (B2) 的上清液進行電泳分析, 在電泳膠片切下特定的條帶 (band), 置於塗有弧菌的培養基上, 可以看到抗弧菌效果。

Yan *et al.* (2018) 指出, *B. pumilus* HN-10 產生 2 種胜肽類的抗生物質, PLSSPATLNSR 及 GGSGGGSSGGSIGGR, 具有抑制植物病原真菌-粉紅單端胞黴 (*Trichothecium roseum*) 之特性, 在 1.0 µg/ml 就有抑菌作用, 破壞真菌的細胞膜及細胞壁; 應用在瓜果類, 防治真菌類之病害。

Chu *et al.* (2019) 報導, 以高效液相層析儀分析出 *B. pumilus* 所產生的 3 種抗生物質, 為脂肪醇類, 新的抗菌物質, 3,4-dipentylhexane-2,5-diol、1,1'-(4,5-dibutylcyclohexane-1,2-diyl)bis(ethan-1-ol)

及 1,1'-(4,5-dibutyl-3,6-dimethylcyclohexane-1,2-diyl) bis (ethan-1-one); 該 3 種抗生物質可能是破壞細胞膜或抑制蛋白質合成, 具有抑制金黃色葡萄球菌、雞沙氏桿菌 (*Salmonella gallinarum*) 及大腸菌等多種病原菌之能力。Morita *et al.* (2019) 指出, *B. pumilus* TM-R 產生 4 種強的揮發性有機物質, methyl isobutyl ketone、ethanol、5-methyl-2-heptanone 及 S-(-)-2-methylbutylamine, 可以抵抗黴菌, 抑制黴菌菌絲體 (mycelia) 的成長。

此外, 有些研究尚未將 *B. pumilus* 之抗菌物質完全純化, Leifert *et al.* (1995) 報導, *B. pumilus* CL45 會產生抵抗真菌 (植物病原菌-灰色葡萄孢菌, *Botrytis cinerea*) 之非蛋白質物質, 無詳細資料。Munimbazi and Bullerman (1998) 提及, *B. pumilus* 產生抵抗真菌的代謝物, 可能是環狀胜肽或是非胜肽類之物質, 該代謝物可以抑制多種真菌, 包括麴菌 (*Aspergillus* spp.)、青黴菌 (*Penicillium* spp.) 及鐮孢菌 (*Fusarium* spp.)。此外, 也會抑制寄生麴黴 (*Aspergillus parasiticus*) 產生黃麴毒素 (aflatoxin)。

Bottone and Peluso (2003) 指出, *B. pumilus* (MSH) 產生抗真菌之物質, 該抗菌物質可以抵抗毛黴 (*Mucor* spp.) 及麴菌, 分子量為 500-3,000 Da, 未完全純化, 該抗菌物質抑制真菌之孢子的發芽, 阻止菌絲 (hyphae) 增長, 導致細胞壁受損。

Huang *et al.* (2012) 報導, 以泥土中分離之 *B. pumilus* SQR -N43 生物防治小黃瓜的立枯核菌 (*Rhizoctonia solani*) 所造成苗立枯病 (damping-off), *B. pumilus* SQR-N43 可以造成真菌菌絲變形 (hyphal deformation)、細胞質液胞 (cytoplasmic vacuoles) 增大、細胞質滲漏, 但未說明抗菌物質之特性。

也有研究是以 *B. pumilus* 全基因體中會生合成抗菌物質的基因進行預測, Steinborn *et al.* (2005) 指出, *B. pumilus* 帶有生合成 bacilysin 之基因; Toymentseva *et al.* (2019) 報導, *B. pumilus* 具有生合成 bacilysin 之基因; 此外, Nannan *et al.* (2021) 也指出, 多株 *B. pumilus* 具有生合成 bacilysin 之基因, 同時 *B. pumilus* 培養液中也有 bacilysin 產物, 該 bacilysin 可以抑制大腸菌、腸道沙門氏菌 (*Salmonella enterica*)、綿羊李斯特桿菌 (*Listeria ivanovii*) 及仙人掌桿菌 (*Bacillus cereus*) 等多種導致食物中毒之細菌。Freitas-Silva *et al.* (2021) 指

出, *B. pumilus* 64-1 具有產生 bacilysin 及其他抑菌素 (bacteriocin) 之基因。Wu *et al.* (2015) 報導, bacilysin 有很強的抗菌作用, 可以抵抗 2 種植物病原菌, 包括解澱粉歐文菌 (*Erwinia amylovora*) 及稻白葉枯黃桿菌 (*Xanthomonas oryzae*)。

Riera *et al.* (2017) 提及, 分離自健康柑橘類的 *B. pumilus* 104, 具有抵抗植物真菌之病原菌之能力, 包括柑橘根部病原体 - 蠶豆疫病菌 (*Phytophthora nicotianae*) 及棕櫚疫霉 (*Phytophthora nicotianae*); 可能是抑制真菌的孢子萌發; *B. pumilus* 104 基因中與 *B. pumilus* 104 7p 的 lychensyn 生物合成基因有 95% 相似, lychensyn 是一種環狀脂肪蛋白, 具有抵抗真菌及細菌, 調節植物免疫之功能; 與 bacilysin 基因有 85% 的相似度, 也有預測出微黴素 (microcin) 及抑菌素之基因, 為具有生合成抗菌物質的基因。

Hao *et al.* (2019) 指出, *B. pumilus* PDSLZg-1 具有產生促進植物成長的荷爾蒙之能力, 可以提升植物生長, 也具有抵抗病原真菌之效果。*B. pumilus* PDSLZg-1 具有生合成 24 個植物荷爾蒙之基因, 有 bacilysin、表面素 (surfactin) 及桿菌素 (bacillibactin) 等生合成之基因, 及生合成其他抵抗真菌及細菌物質之基因; 也具有生合成蛋白酶 (proteinase)、幾丁質酶 (chitinase) 及纖維酶 (cellulase) 之基因, 可以抑制真菌之生長。

朱等 (2016) 自白蝦分離出的 *B. pumilus* D5, 為水產病原弧菌之強力拮抗菌, 具有抑制溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、腸炎弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、哈維氏弧菌 (*V. harveyi*)、鰻弧菌 (*V. anguillarum*)、霍亂弧菌 (*V. cholerae*) 及創傷弧菌等 6 種常見水產病原弧菌之能力。黃等 (2016) 報導, 添加 *B. pumilus* D5 於飼料中 (10^7 CFU/g) 餵食白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 8 週, 具有降低白蝦之缸內水與肝胰腺之弧菌數, 提升白蝦之免疫反應及抵抗腸炎弧菌感染之功能。朱等 (2021) 指出, 文蛤 (*Meretrix spp.*) 飼料中每週添加 2 次定量的 *B. pumilus* D5 (10^6 CFU/g) 6 個月, 可以有效促進文蛤成長、改善養殖環境並增加文蛤抵抗弧菌之能力。

沈 (2018) 報導, *B. pumilus* D5 培養上層液經 $0.45 \mu\text{m}$ 的濾紙過濾後, 濾液對於鰻弧菌、創傷弧菌、無乳鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 及瓶鼻海豚鏈球菌 (*S. iniae*) 有很強的抑菌效果, 顯示 *B.*

pumilus D5 會產生胞外的抗菌物質, 但, 尚未完成該抗菌物質之純化。本研究藉由基因資料庫比對, 預測 *B. pumilus* D5 是否有參與抗生素生合成途徑的基因群, 再由高效液相層析 (high performance liquid chromatography, HPLC) 及串聯式質譜儀 (MS/MS) 分析 *B. pumilus* D5 上清液中的抗菌物質, 並以該類抗菌物質之標準品進行抗菌試驗, 以探討 *B. pumilus* D5 所產之主要抗菌物質, 以建立該菌抗菌特性之基礎資料。

材料與方法

一、抗菌物質分析

B. pumilus D5 全基因體資料之抗菌物質生合成預測係委託益農有限公司 (Inong Agriculture Co., Ltd) 執行。

從 KEGG 資料庫 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.genome.jp/kegg/>) 搜尋個別抗菌物質之生合成途徑基因群組成, 再由 UniProt 資料庫 (<https://www.uniprot.org/>) 取得相關功效基因之資料。使用 phmmer v3.3.2 (<http://hmmer.org/>) 將 *B. pumilus* D5 全基因體資料與生成功效基因資料進行序列比對, 並以序列 E-value 作為判定目標功效基因是否存在之依據。

將 *B. pumilus* D5 接種於胰化蛋白大豆培養液 (tryptic soy broth, TSB, 購自 Difco), 28°C 、150 rpm 振盪培養 36 hr, 經過離心 ($9000 \times g$, 10 min, 4°C) 後, 取上清液, 經 $0.22 \mu\text{m}$ 濾膜過濾, 取樣品 (100 μl) 加入同體積甲醇沉澱蛋白質, 經離心 ($15,000 \times g$, 10 min, 4°C) 後, 取上清液上機分析。

參考 Araujo *et al.* (2005) 方法, 將處理過之樣品各取 5 μl 注入高效液相層析 (HPLC) (Agilent 1260 G1312B Binary Pump), 以管柱 Phenomenex Kinetex-Phenyl-Hexyl-100A (100 mm \times 2.1 mm; i.d., $2.6 \mu\text{m}$) 進行梯度分析, 配製 A : 0.1% (v/v) formic acid / water ; B : 0.1% (v/v) formic acid / acetonitrile 為移動相; 0.1 - 2 min 以 85% A, 10 min 以 30% A, 13 - 15 min 以 5% A, 16 - 20 min 以 85% A, 流速 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。

Kanosamine、bacilysin 及 toxoflavin 之分子量分別為 179.2、270.2 及 193.2 Da。以吳等 (2016) 及網站查閱之條件, 利用 HPLC 及串聯式

質譜儀 (MS/MS; AB Sciex Instruments QTRAP 5500) 的多重反應監測模式 (multiple reaction monitor)，以正、負離子模式進行質譜掃描比對分析。選擇 kanosamine、bacilysin 及 toxoflavin 清楚明顯且專一的波峰 (peak)，作為確認樣品中存在 kanosamine、bacilysin 及 toxoflavin 之依據。

二、Kanosamine 及 toxoflavin 含量分析

以購自 Sigma-Aldrich 之純度 97% kanosamine 及純度 98% toxoflavin 為標準品，至於 bacilysin 因目前無法購買到標準品，因此暫時無法定量與進行後續之抗菌試驗。

參考與修改 Phister *et al.* (2004) 方法，將處理過之樣品與 kanosamine 及 toxoflavin 標準溶液以串聯式質譜儀 (MS/MS; AB Sciex Instruments QTRAP 5500) 進行質譜掃描，以正、負離子模式進行比對分析。

以甲醇稀釋標準品 kanosamine，分別配製成濃度 2、8、10、40、100、200、500、1,000、5,000 及 10,000 ng/mL；toxoflavin 則分別配製成濃度 2、8、10、40、100、200、500、1,000 及 5,000 ng/mL。以 HPLC (Agilent 1260 G1312B Binary Pump) 分析並建立 kanosamine 及 toxoflavin 標準曲線。參考 Araujo *et al.* (2005) 之方法，將 kanosamine 及 toxoflavin 標準溶液及處理過之樣品各取 5 μ l 注入 HPLC 內分析，以 C8 管柱 (Agilent zorbax eclipse XDB-C8, 150 x 4.6 mm, i.d., 5.0 μ m) 進行梯度分析，配製 A：0.1% (v/v) formic acid / water；B：0.1% (v/v) formic acid / acetonitrile 為移動相；0.1 - 2 min 以 85% A，5 min 以 70% A，7 - 10 min 以 10% A，11 - 15 min 以 85% A，流速 400 μ l/min，測定 kanosamine 及 toxoflavin 含量，最後將樣品波峰所得的面積總和帶入標準曲線所求得的公式計算，即可算出 kanosamine 及 toxoflavin 的濃度。

三、標準品 kanosamine 及 toxoflavin 抗菌試驗

測試之菌株包括 3 種水產病原弧菌：霍亂弧菌、哈維氏弧菌及創傷弧菌；2 種鏈球菌：瓶鼻海豚鏈球菌及無乳鏈球菌；1 株大腸桿菌 (BCRC 11634)；1 株金黃色葡萄球菌作為對照。3 種水產

病原弧菌分別於額外添加 2% 氯化鈉之 TSB 中，在 28°C 下培養 24 hr，以生理食鹽水調整菌株至 OD_{600nm} 為 0.5 (菌數為 10⁸ CFU/mL)，再稀釋為 10 分之 1 到千分之 1 備用。鏈球菌、大腸桿菌及金黃色葡萄球菌分別於 TSB 中，以 28°C 培養 24 hr，以生理食鹽水調整至 OD_{600nm} 為 0.5 (菌數為 10⁸ CFU/mL)，再稀釋為 10 分之 1 到千分之 1 備用。標準品 kanosamine 及 toxoflavin 以無菌水稀釋為 10.0 - 5,000.0 μ g/mL 備用。

培養皿預先放入直徑約 0.9 cm 之鐵環以形成凹槽，取 20 mL 已滅菌、未凝固 (溫度 45°C)、額外添加 2% 氯化鈉之 TSA (tryptic soy broth, Agar, 購自 Difco)，分別加入 6 μ l 備用的水產病原弧菌菌液混合均勻後，倒入培養皿中，待 TSA 凝固後將鐵環拔除。在凹槽中分別加入 50 μ l 待測之不同濃度的 kanosamine 及 toxoflavin；並將 *B. pumilus* D5 接種於 TSB，28°C、150 rpm 振盪培養 36 hr，經過離心 (9000 \times g, 10 min, 4°C) 後，取上清液，經 0.22 μ m 濾膜過濾之濾液作為對照組。將該含有樣品之培養皿置於 28°C 培養 24 hr 後觀察結果，並測量凹槽附近所出現的透明圈之大小 (mm)。

培養皿預先放入直徑約 0.9 cm 之鐵環以形成凹槽，取 20 mL 已滅菌、未凝固 (溫度 45°C) 之 TSA，分別加入 6 μ l 鏈球菌、大腸桿菌及金黃色葡萄球菌菌液混合均勻後，倒入培養皿中，待 TSA 凝固後將鐵環拔除。在凹槽中分別加入 50 μ l 待測之不同濃度的 kanosamine 及 toxoflavin，並將 *B. pumilus* D5 接種於 TSB，在 28°C、150 rpm 振盪培養 36 hr，經過離心 (9000 \times g, 10 min, 4°C) 後，取經 0.22 μ m 濾膜過濾之上清液濾液作為對照組。將該含有樣品之培養皿置於 28°C 培養 24 hr 後觀察結果，並測量凹槽附近所出現的透明圈之大小 (mm)。

結 果

一、抗菌物質分析

使用 KEGG 資料庫，將組裝完成的菌株 *B. pumilus* D5 全基因體序列資料與 105 種抗菌物質功效基因資料進行比對，共有 3 種抗菌物質 - kanosamine、bacilysin 及 toxoflavin 的功效基因群與 *B. pumilus* D5 全基因體呈現高度吻合，判定菌

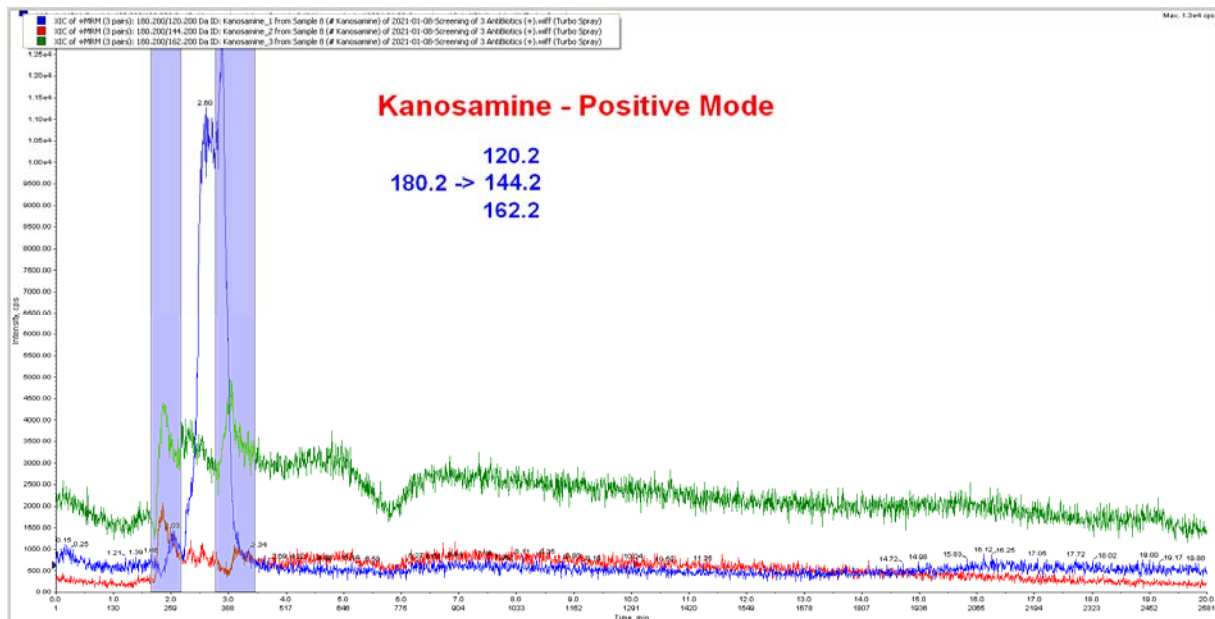


Fig. 1 In the positive mode of kanosamine, the predominant m/z values of the fragmented product ion fragments are 120.2, 144.2, and 162.2, and the three groups of product ions serve as transitions. In the multiple reaction monitoring mode for the *B. pumilus* D5 supernatant sample, the blue stripe represents the peak of high performance liquid chromatography.

株 *B. pumilus* D5 具有產生 kanosamine、bacilysin 及 toxoflavin 等 3 種抗菌物質的功效。此外，*B. pumilus* D5 全基因體序列資料與桿菌黴素 (bacillomycin D) 等 26 種抗生素的生合成基因群部分吻合 (Table 1)，另外，依據參考文獻找到包括超氧化物歧化酶 (superoxide dismutases) 等 7 種具有抗菌功效的功能蛋白質之基因 (Table 2)。

Table 1 Using whole genome data from *Bacillus pumilus* D5 to predict partially consistent antibacterial substances

1	Aurachin	14	Kanamycin A
2	Avermectin	15	Lichenysin D
3	Bacillomycin D	16	Megalomicin
4	Butirosin A	17	Mithramycin
5	Cycloserine	18	Penicillin N
6	Dapdiamide	19	Pristinamycin IA
7	2,4-diacetylphloroglucinol	20	Proansamitocin
8	Epithienamycin E	21	Reutericyclin
9	Epithienamycin F	22	Reuterin
10	Erythromycin A	23	Soraphen A
11	Gentamicin A	24	Tabtoxin
12	Gentamicin X	25	Tobramycin
13	Iturin A	26	Tylosin

以相關網站及文獻查閱之條件，利用多重反

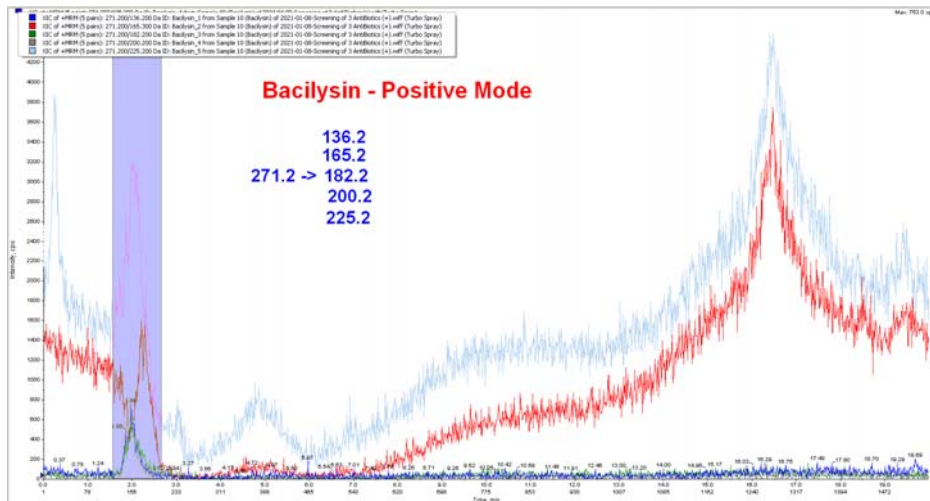
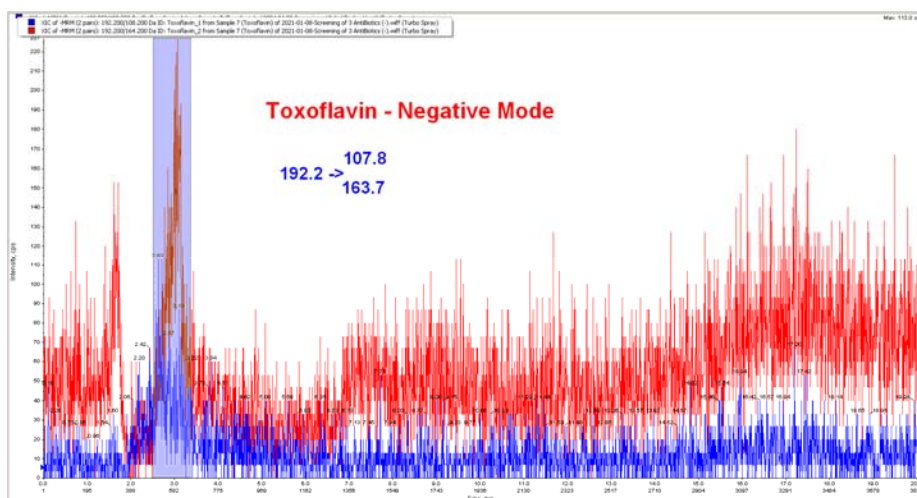
應監測模式，檢測 kanosamine、bacilysin 及 toxoflavin。於 mzcloud 資料庫中，kanosamine 有 MS/MS 圖譜，顯示在正電模式下，碎裂的子離子片段 m/z 值主要為 120.2、144.2 及 162.2。以此 3 組子離子作為離子對 (transitions)，*B. pumilus* D5 上清液樣品之多重反應監測模式結果如 Fig. 1，顯示 3 組離子對均能在高效液相層析相同的滯留時間 (retention time) 出現波峰，惟出現 2 個波峰，這 2 個波峰中，所選用之 3 組離子對均同時出現於波峰，顯示其有專一性。

Bacilysin 於 Phister *et al.* (2004) 中的 MS/MS 圖譜，顯示在正電模式下，碎裂的子離子片段 m/z 值主要為 136.2、165.2、182.2、200.2 及 225.2，以此 5 組子離子作為離子對，樣品之多重反應監測模式結果如 Fig. 2，高效液相層析之波峰出現時間一致，所選用之 5 組離子對均會同時出現於波峰，顯示其有專一性。

Toxoflavin 於吳等 (2016) 中有其使用之多重反應監測模式離子對，顯示在負電模式下，碎裂的子離子片段 m/z 值主要為 107.8 及 163.7，以此 2 組子離子作為離子對，*B. pumilus* D5 上清液樣品多重反應監測模式結果如 Fig. 3，高效液相層析之波峰出現時間一致，所選用之 2 組離子對均會同時出現波峰，顯示其有專一性。

Table 2 Using the complete genome sequence of *Bacillus pumilus* D5 to predict functional proteins with antibacterial effects

Protein	Function	Gene ID	Reference
Superoxide dismutases	Oxidoreductase	MHHHKEFG_01895	10.3389/fmicb.2015.00883.eCollection 2015
Glucose methanol choline oxidoreductase	Oxidoreductase	MHHHKEFG_01147	10.2323/jgam.57.207
Metallo-beta-lactamase	Quorum sensing inhibitor	MHHHKEFG_01602	10.3390/md17050275
N-acyl homoserine lactonase	Quorum sensing inhibitor	MHHHKEFG_01259	10.1128/AEM.68.4.1754-1759.2002
Enoyl-acyl carrier reductase	Quorum sensing inhibitor	MHHHKEFG_00319	10.3390/molecules15020780
MBL fold metallo-hydrolase	Quorum sensing inhibitor	MHHHKEFG_02148	10.3390/ijms140917477
1H-3-hydroxy-4-oxoquinaldine 2,4-dioxygenase	Quorum sensing inhibitor	MHHHKEFG_00147	10.1093/femsre/fuv038

**Fig. 2** In the positive charge mode of bacilysin, the m/z values of the fragmented product ion fragments are 136.2, 165.2, 182.2, 200.2, and 225.2. The five groups of product ions are used as ion pairs, and the sample is monitored using a multiple reaction mode. The peak of high-pressure liquid chromatography is denoted by the blue stripe region.**Fig. 3** Under toxoflavin negative charge mode, the m/z values of the fragmented product ion fragments are predominantly 107.8 and 163.7, and the 2 sets of product ions are used as ion pairs, *B. pumilus* D5 supernatant sample multiple reaction monitoring mode, and the blue striped areas are the peaks of high performance liquid chromatography.

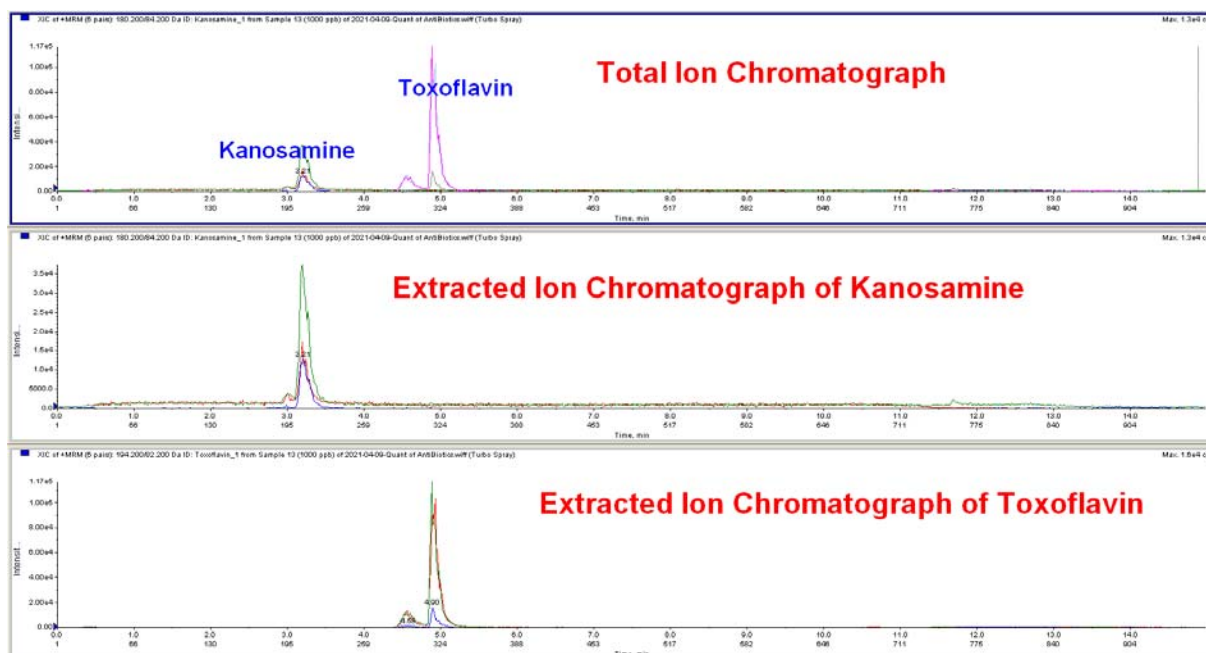


Fig. 4 From the toxoflavin and kanosamine chromatograms, it is evident that the selected ion pair can exhibit the toxoflavin and kanosamine signals at the same residence time.

二、Kanosamine 及 toxoflavin 含量分析

利用高效液相層析及質譜儀進一步分析樣品中 kanosamine 及 toxoflavin 之含量。kanosamine 之分子量為 179.2 Da，在負電模式下其 m/z 值應為 $[M - H]^- 178.2$ ，於圖譜中並無法偵測到相應訊號；而在正電模式下，其 m/z 值應為 $[M + H]^+ 180.2$ ，於圖譜中可見到相當強之相應訊號，將此波峰作 MS/MS，由圖譜可見將 kanosamine 碎裂後，可以產生數個訊號較強之片段，將其調校參數後作分析之用。

Toxoflavin 之分子量為 193.2 Da，在負電模式下，其 m/z 值應為 $[M - H]^- 192.2$ ，於圖譜中可偵測到相應訊號；而在正電模式下，其 m/z 值應為 $[M + H]^+ 194.2$ ，於圖譜中可見到相當強之相應訊號。考量正電模式之訊號較強，且可以與 kanosamine 合併分析。

後續分別選定離子對 84.2 及 137.2 作為 kanosamine 及 toxoflavin 定量分析用。由標準品 kanosamine 及 toxoflavin 之層析圖 (Fig. 4)，所選擇的離子對皆可以很顯著地在相同滯留時間呈現出各自訊號，顯示其具有專一性。

以 HPLC 分析並建立 kanosamine 及 toxoflavin

標準曲線，將樣品波峰 (Fig. 5 及 Fig. 6) 所得的面積總和分別帶入 kanosamine 及 toxoflavin 之標準曲線所求得的公式計算，可算出 kanosamine 及 toxoflavin 的濃度分別為 1,400.00 及 0.61 ng/ml，另，由於樣品於前處理時稀釋 2 倍，因此，*B. pumilus* D5 上清液樣品中，kanosamine 及 toxoflavin 的濃度分別為 2,800.00 及 1.23 ng/ml。

三、標準品 kanosamine 及 toxoflavin 的抗菌試驗

標準品 kanosamine 的抗菌試驗結果顯示，在 500.0 $\mu\text{g/mL}$ 濃度時，對金黃色葡萄球菌的抑制圈為 2.0 mm，但是對於 3 種水產病原弧菌、2 種鏈球菌及大腸菌均沒有抑制圈；在 1,000.0 $\mu\text{g/mL}$ 濃度時，對金黃色葡萄球菌的抑制圈為 3.0 mm，但是對於 3 種水產病原弧菌、2 種鏈球菌及大腸菌亦均沒有抑制圈；當濃度提升為 5,000.0 $\mu\text{g/mL}$ 時，仍然都沒有抑制現象 (Table 3)。

Toxoflavin 在 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 濃度時，對 3 種水產病原弧菌、2 種鏈球菌及大腸菌均沒有抑制圈出現；濃度提高至 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 時，對霍亂弧菌、哈維氏弧菌及創傷弧菌之抑菌圈分別為 0、2.0 及 2.0 mm，

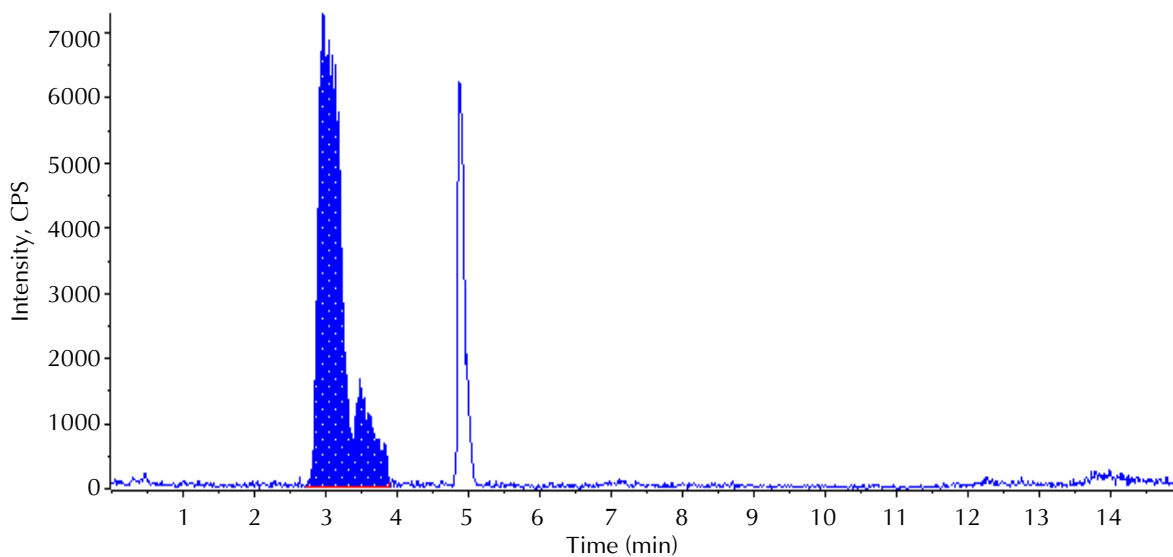


Fig. 5 Kanosamine chromatogram in *B. pumilus* D5 supernatant sample.

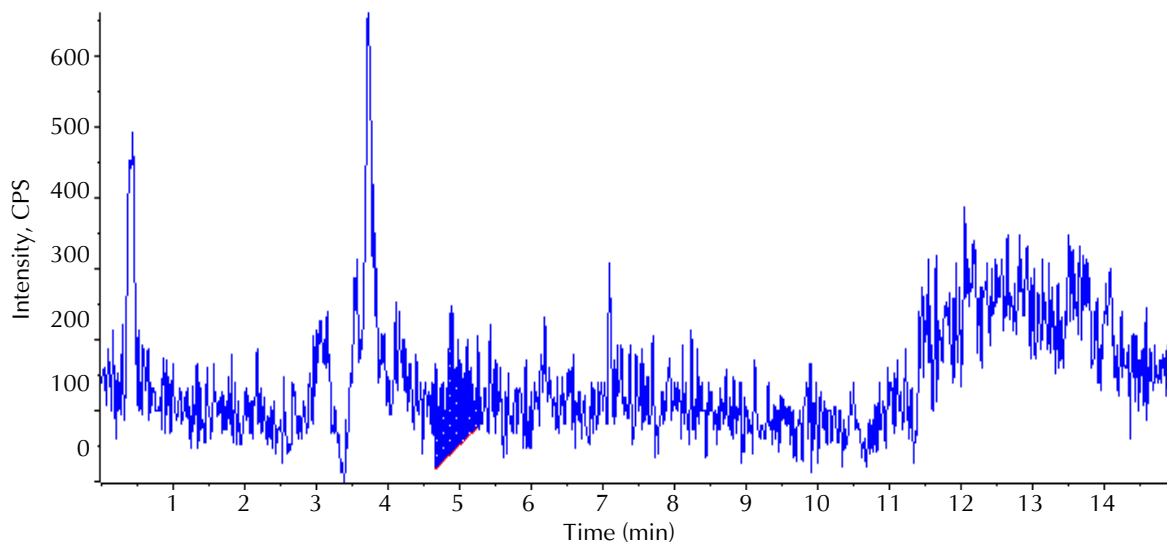


Fig. 6 Kanosamine chromatogram in *B. pumilus* D5 supernatant sample.

對 2 種鏈球菌及大腸菌則無抑制圈出現；濃度為 50.0 與 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，對霍亂弧菌、哈維氏弧菌及創傷弧菌之抑菌圈各分別為 0、3.0 及 4.0 mm 及 3.0、5.0 及 4.0 mm，但對 2 種鏈球菌及大腸菌並沒有抑制圈出現。當濃度提高至 250.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，對瓶鼻海豚鏈球菌、無乳鏈球菌及大腸菌之抑菌圈分別為 0、0 及 7.0 mm；濃度為 500.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，對瓶鼻海豚鏈球菌、無乳鏈球菌及大腸菌之抑菌圈分別為 5.0、5.0 及 10.0 mm；濃度為 1000.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，對瓶鼻海豚鏈球菌及無乳鏈球菌之抑菌圈均為 10.0 mm (Table 3)。

綜合上述試驗結果顯示，toxoflavin 對於霍亂

弧菌、哈維氏弧菌及創傷弧菌之最低抑制濃度分別為 100.0、25.0 及 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，對於瓶鼻海豚鏈球菌、無乳鏈球菌及大腸菌之最低抑制濃度分別為 500.0、500.0 及 250.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

討 論

根據文獻記載，*B. pumilus* 所產生之抗菌物包括：pumilin (Bhate, 1955)、amicoumacin A、B 及 C (Itoh *et al.*, 1982; Gao *et al.*, 2017)、kanosamine (Umezawa *et al.* 1967a)、pumilacidin (Melo *et al.*, 2009; Saggese *et al.*, 2018)、pumilicin 4 (Aunpad *et*

Table 3 Kanosamine and toxoflavin have antibacterial activity against a variety of aquatic pathogens. *Vibrio* spp., *Streptococcus* spp., and *Escherichia coli* (inhibitory zone diameter, mm)

Indicator strains	Kanosamine (µg/mL)			Toxoflavin (µg/mL)							Supernatant of <i>Bacillus pumilus</i> D5
	500.0	1,000.0	5,000.0	10.0	25.0	50.0	100.0	250.0	500.0	1000.0	
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 19264	0	0	0	0	0	0	3.0	-	-	-	2.0
<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	0	0	0	0	2.0	3.0	5.0	-	-	-	3.0
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	0	0	0	0	2.0	4.0	4.0	-	-	-	3.0
<i>Streptococcus iniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	5.0	10.0	8.0
<i>S. agalactiae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	5.0	10.0	5.0
<i>Escherichia coli</i> BCRC 11634	0	0	0	0	0	0	0	7.0	10.0	-	1.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.0	3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

al., 2007)、胜肽類的抗生物質(Yan *et al.*, 2018)、脂肪醇類的抗生物質(Chu *et al.*, 2019)、bacilysin (Nannan *et al.*, 2021)、類抑菌素(Nayak *et al.*, 2017)、環狀胜肽或非胜肽的抗生物質(Munimbazi and Bullerman, 1998)等。

朱等 (2016) 自白蝦分離出的 *B. pumilus* D5, 為水產病原弧菌之強力拮抗菌, 具有抑制溶藻弧菌等 6 種常見水產病原弧菌之能力。本研究結果顯示, 將菌株 *B. pumilus* D5 之全基因體資料與抗生物質合成途徑資料庫進行交叉分析, 共得到 *B. pumilus* D5 含有 kanosamine、bacilysin 及 toxoflavin 等 3 種抗菌物質合成途徑的基因群。經利用 HPLC 及串聯式質譜儀分析 *B. pumilus* D5 上清液, 結果亦顯示其上清液中確實存在 kanosamine、bacilysin 及 toxoflavin。

Bacilysin 是最簡單的抗生素, N 端為 L-丙氨酸 (L-alanine), C 端為抗莢膜菌素 (anticapsin) (Kenig *et al.*, 1976; Hilton *et al.*, 1988); bacilysin 之抗菌作用來自進入細胞內, 受到蛋白酶作用後, 放出抗莢膜菌素, 阻斷細胞壁主要成分-胜肽聚糖 (peptidoglycan) 合成的必須酵素-葡萄糖胺合成酶 (glucosamine synthetase) 之作用, 影響細胞壁之完整性, 導致細胞碎裂 (Kenig *et al.*, 1976)。Bacilysin 進入細菌細胞後發揮抑制細菌之功效, 但水解後之抗莢膜菌素抗菌之效果較差;

bacilysin 較抗莢膜菌素易進入細菌細胞, 發揮抑制細菌之功效。Bacilysin 活性會受到葡萄糖胺 (glucosamine) 及 N-乙醯葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine) 影響 (Kenig and Abraham, 1976)。Özcengiz and Alaeddinoglu (1991) 指出, bacilysin 耐受 100°C、15 min 不影響抗菌活性, 在 pH 1.4 - 12.0 的條件下均安定。

Phister *et al.* (2004) 研究顯示, 發酵玉米糰主要是乳酸菌, 也有 *Bacillus* spp., 發酵初期以乳酸球菌 (*Lactococcus* spp.) 及明串珠菌 (*Leuconostoc* spp.) 為主, 發酵末期則以乳酸桿菌 (*Lactobacillus* spp.) 及鏈球菌 (*Streptococcus* spp.) 為主。分離自發酵玉米糰的 *Bacillus* sp. 會生產 bacilysin、chlorotetaine 及伊枯草菌素 A (iturin A), 有助於發酵玉米糰之保鮮。該 bacilysin 受到鏈黴蛋白酶 E (pronase E) 影響活性, 且抑制真菌-犁頭霉 (*Absidia* spp.) 之效果較大腸菌 (*Escherichia coli*) 佳, 可以作為食品抑菌劑。

Chen *et al.* (2009) 指出, 植物來源的液化澱粉芽孢桿菌 FZB42 (*B. amyloliquefaciens* FZB42) 產生之 bacilysin 可以有效控制解澱粉歐文菌 (*Erwinia amylovora*) 所造成之蘋果及梨子的枯萎病 (fire blight disease)。Wu *et al.* (2015) 證實液化澱粉芽孢桿菌 FZB42 具有促進植物成長, 抑制植物病原菌之功效; 所產生之 bacilysin 及地非西丁

(difficidin) 可以有效控制稻米的病原菌 - 稻白葉枯黃桿菌；以掃描式及穿透式電子顯微鏡觀察，發現 bacilysin 及地非西丁會造成稻白葉枯黃桿菌細胞膜及細胞壁型態改變，濃度 10 - 50 $\mu\text{g/ml}$ 就可以造成稻白葉枯黃桿菌死亡 (87 - 88%)。Bacilysin 及地非西丁除了造成稻白葉枯黃桿菌的毒性外，並可調降稻白葉枯黃桿菌的細胞分裂、蛋白質及細胞壁合成相關之基因。實驗也顯示，液化澱粉芽孢桿菌 FZB42 可以生物防治稻米的疾病，而 bacilysin 及地非西丁可以當作抗菌物質。此外，液化澱粉芽孢桿菌 FZB42 之全基因體定序，也發現有許多會生合成抗菌物質之基因。

Steinborn *et al.* (2005) 指出，*B. pumilus* 帶有生合成 bacilysin 之基因；Riera *et al.* (2017) 提及，*B. pumilus* 104 有與生合成 bacilysin 85% 的相似度之基因。

Hao *et al.* (2019) 研究顯示，*B. pumilus* PDSLzg-1 具有生合成 bacilysin、表面素及桿菌素等合成之基因，也具有生合成蛋白酶、幾丁質酶及纖維酶之基因，可以抑制真菌之生長。

Toymentseva *et al.* (2019) 指出，*B. pumilus* 具有生合成 bacilysin 之基因；此外，Nannan *et al.* (2021) 也提及，多株 *B. pumilus* 具有生合成 bacilysin 之基因，同時 *B. pumilus* 培養液中也有 bacilysin 產物，該 bacilysin 可以抑制大腸菌、腸道沙門氏菌、綿羊李斯特桿菌及仙人掌桿菌等多種食物中毒細菌。

本研究將菌株 *B. pumilus* D5 之全基因體資料與抗菌物質生合成途徑資料庫進行交叉分析，得到 *B. pumilus* D5 含有 bacilysin 生合成途徑的基因群，與 Steinborn *et al.* (2005)、Riera *et al.* (2017)、Hao *et al.* (2019)、Toymentseva *et al.* (2019) 及 Nannan *et al.* (2021) 等之研究結果一致。

藉由 HPLC 及串聯式質譜儀分析 *B. pumilus* D5 上清液顯示，*B. pumilus* D5 上清液中存在 bacilysin，與 Nannan *et al.* (2021) 之研究，*B. pumilus* 帶有生合成 bacilysin 之基因，*B. pumilus* 培養液中也有 bacilysin 產物之結果相同。但，由於市面上無法購得 bacilysin 標準品，暫無法估算樣品中 bacilysin 之濃度及進行抗菌試驗。

Umezawa *et al.* (1967a) 指出，氨基葡萄糖芽孢桿菌 (*B. aminoglucosidicus*) 會產生 kanosamine

(3-amino-3-deoxy-D-glucose)，可抑制化膿性細菌 (*Micrococcus pyogenes*)，kanosamine 是卡納黴素 (kanamycin) 的水解產物。氨基葡萄糖芽孢桿菌後來被更名為 *B. pumilus*。

Milner *et al.* (1996) 指出，仙人掌桿菌 UW85 (*B. cereus* UW85) 所產之 kanosamine 可以抑制多種植物病原菌，kanosamine 可抑制細菌的細胞壁形成，酸鹼度較高 (pH 8.0) 時效果尤佳。仙人掌桿菌 UW85 在孢子大量產生前，約 48 hr，同步產生 kanosamine；培養基中添加鐵 (0.5 mM FeCl_3)，可以增加仙人掌桿菌 UW85 的 kanosamine 之產量，但磷酸卻會降低 kanosamine 的生成量。

Janiak and Milewski (2001) 指出，*B. aminoglucosidicus* A-4722 所產 kanosamine 會抑制多株釀酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 及人類病原真菌 - 白色念珠菌 (*Candida albicans*)，其抑制機制為 kanosamine 經由葡萄糖轉換系統 (glucose transport system) 進入白色念珠菌細胞內，被磷酸化成為 kanosamine-6-phosphate，抑制葡萄糖胺-6-磷酸合成酶 (glucosamine-6-phosphate synthase) 的作用，干擾幾丁質及甘露糖蛋白 (mannoprotein) 生物合成，影響細胞壁之形成，阻斷隔膜 (septum) 生成，造成細胞凝集 (agglutination)，導致白色念珠菌型態改變。此外，電子顯微鏡也觀察到，酵母以 kanosamine 處理後，造成菌體型態變化，細胞不完整，因此 kanosamine 影響細胞壁之形成，抑制植物的病原細菌及真菌。

本研究將菌株 *B. pumilus* D5 之全基因體資料與抗菌物質生合成途徑資料庫進行交叉分析，預測得到 *B. pumilus* D5 含有 kanosamine 生合成途徑的基因群，藉由 HPLC 及串聯式質譜儀分析 *B. pumilus* D5 上清液，顯示其中存在 2,800.00 ng/ml 的 kanosamine。Umezawa *et al.* (1967a) 及 Janiak and Milewski (2001) 研究顯示，氨基葡萄糖芽孢桿菌會產生 kanosamine，因為氨基葡萄糖芽孢桿菌後來被更名為 *B. pumilus*，因此本研究與 Umezawa *et al.* (1967a) 及 Janiak and Milewski (2001) 的報告，*B. pumilus* 會產生 kanosamine 結果一致，但，Umezawa *et al.* (1967a) 及 Janiak and Milewski (2001) 並沒有進行 kanosamine 的定量，因此本研究無法與其進行比較。

Janiak and Milewski (2001) 指出，*B. aminoglucoisidicus* A -4722 所產 kanosamine 會抑制多株釀酒酵母菌及白色念珠菌，最小抑制濃度為 1.25 – 10 mg/mL。Milner *et al.* (1996) 指出，仙人掌桿菌 UW85 所產 kanosamine 中對多種細菌之抗菌資料顯示，kanosamine (300 µg/ml) 可以拮抗強生氏噬纖維菌 (*Cytophaga johnsonae*) 及大腸菌，而 kanosamine (400 µg/ml) 可以拮抗金黃色葡萄球菌、嗜酸乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 及草生歐文氏菌 (*Erwinia herbicola*)；但是，仍然有 15 種細菌，包括桿菌 (bacilli)、假單孢菌 (pseudomonads)、腸內菌 (enterics) 及根瘤菌 (rhizobia) 等，對於 kanosamine (400 µg/ml) 並沒有感受性。

本研究顯示，kanosamine 濃度 500.0 µg/mL 時，對金黃色葡萄球菌具有抑制效果，但對於 3 種水產病原弧菌、2 種鏈球菌及大腸菌並沒有抑制作用；濃度提高為 5,000.0 µg/mL 時，對 3 種水產病原弧菌、2 種鏈球菌及大腸菌仍然不具抑制現象，與 Milner *et al.* (1996) 研究，300 及 400 µg/ml 分別對於強生氏噬纖維菌與大腸菌及金黃色葡萄球菌、嗜酸乳酸桿菌與草生歐文氏菌具有抑制作用，但是，仍然有 15 種細菌並無感受性之結果相近；Janiak and Milewski (2001) 指出，高達 1.25 – 10 mg/mL 的 kanosamine 才會抑制多株釀酒酵母菌及白色念珠菌；Umezawa *et al.* (1967b) 提及，kanosamine 對於某些細菌具有抑制作用，但是最低抑制濃度很高，且抗菌種類之範圍較窄；推測係不同細菌對於 kanosamine 之感受性不同所致，本研究 3 種水產病原弧菌、2 種鏈球菌及大腸菌對於 kanosamine 之感受性很低，本研究可能是首次以 kanosamine 對水產生物之病原菌進行抑菌試驗者。

Toxoflavin 分子量為 <1,000 Da，會抑制細菌及真菌，對於植物及動物也有毒性 (Choi *et al.*, 2018)，在細胞很多代謝反應中，菸鹼醯腺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)，是一種轉遞質子的輔酶，toxoflavin 可以當電子攜帶者，干擾 NADH 及氧分子之間的反應，造成細胞內細胞色素 (cytochrome) 系統進行不同途徑，產生有毒性的過氧化氫 (H₂O₂)，因此可以抑制細菌及真菌 (Latuasan and Berends, 1961;

Naughton *et al.*, 2016)。

Nagamatsu *et al.* (1993) 指出，toxoflavin 抑制革蘭氏陽性菌的能力強於陰性菌，包括：藤黃微球菌 (*Micrococcus lutea*) 及金黃色葡萄球菌；抵抗真菌的效果方面，抑制酵母的能力強於麴菌，可以抑制釀酒酵母菌及白色念珠菌。

Jeong *et al.* (2003) 研究顯示，分離自生病植物之水稻細菌性谷枯病菌 (*Burkholderia glumae*)，會產生 toxoflavin，造成多種植物生病，10 µg/ml 即會造成細菌性萎凋病 (bacterial wilt)。

Li *et al.* (2019) 指出，分離自藥用植物的唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 所產生的 toxoflavin 為抗真菌劑，可以抵抗植物及人類真菌病原菌-薰煙色麴菌 (*Aspergillus fumigatus*)，toxoflavin 會抑制薰煙色麴菌的分生孢子 (conidial) 發芽及分生孢子柄 (conidiophore) 的發展。Toxoflavin 也會抑制大腸菌、枯草桿菌及酵母菌。*B. glumae* 可大量產生 toxoflavin (1,533 mg/ml)，明顯高於大部分菌之產量之 20 mg/ml；*B. glumae* 產生 toxoflavin 與細菌生長同步；增加培養基內的葡萄糖及蛋白胨有助於該菌產生 toxoflavin。

Cui *et al.* (2020) 指出，自甘蔗葉片分離的唐菖蒲伯克氏菌 CGB10 (*B. gladioli* CGB10)，會產生 toxoflavin，toxoflavin 抵抗多種植物真菌病原菌，該抗菌物質主要壓制真菌病原菌之菌絲的成長，抑制之菌種包括甘蔗黑穗病 (sugarcane smut) 之致病菌-甘蔗鞭黑粉菌 (*Sporisorium scitamineum*)，唐菖蒲伯克氏菌 CGB10 可以有效抑制甘蔗鞭黑粉菌有性交配後，雙核菌絲 (dikaryotic hyphae) 和冬孢子 (teliospore) 萌發過程中原菌絲的形成，進而影響甘蔗鞭黑粉菌的生長。

本研究將菌株 *B. pumilus* D5 之全基因體資料與抗菌物質生合成途徑資料庫進行交叉分析，預測得到 *B. pumilus* D5 含有 toxoflavin 生合成途徑的基因群，藉由 HPLC 及串聯式質譜儀分析 *B. pumilus* D5 上清液顯示，*B. pumilus* D5 上清液中存在 1.23 ng/ml 的 toxoflavin，目前所收集之文獻中，缺乏 *B. pumilus* 有產生 toxoflavin 之相關報告，本研究可能是首次發現 *B. pumilus* 會產生 toxoflavin。

Toxoflavin 的抗菌試驗結果顯示，toxoflavin 對於霍亂弧菌、哈維氏弧菌及創傷弧菌之最低抑

制濃度分別為 100.0、25.0 及 25.0 $\mu\text{g/mL}$ ，對於瓶鼻海豚鏈球菌、無乳鏈球菌及大腸菌之最低抑制濃度分別為 500.0、500.0 及 250.0 $\mu\text{g/mL}$ 。Li *et al.* (2019) 指出，分離自藥用植物的唐菖蒲伯克氏菌所產生的 toxoflavin (200 $\mu\text{g/ml}$)，可以抵抗植物及人類真菌病原菌-薰煙色麴菌，最低抑菌濃度為 64 $\mu\text{g/ml}$ ，本研究結果顯示，25.0 - 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 toxoflavin 就會抑制霍亂弧菌、哈維氏弧菌及創傷弧菌，250.0 $\mu\text{g/mL}$ 濃度時，對大腸菌產生抑制作用，與 Li *et al.* (2019) 報導，toxoflavin 的濃度為 64 $\mu\text{g/mL}$ 可以抵抗薰煙色麴菌之結果接近；而 500.0 $\mu\text{g/mL}$ 濃度時，才會對瓶鼻海豚鏈球菌及無乳鏈球菌產生抑制作用，稍高於 Li *et al.* (2019) 之試驗結果；此外，本研究可能是首次證實 toxoflavin 對水產生物之病原菌具有抑菌作用。

本研究顯示 kanosamine 在高達 5,000.0 $\mu\text{g/mL}$ 時，對 3 種水產病原弧菌、2 種鏈球菌及大腸菌仍沒有抑制作用。25.0 - 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 toxoflavin 就會抑制霍亂弧菌、哈維氏弧菌及創傷弧菌，250.0 $\mu\text{g/mL}$ 濃度時，對大腸菌產生抑制作用，500.0 $\mu\text{g/mL}$ 濃度時，對瓶鼻海豚鏈球菌及無乳鏈球菌產生抑制作用；雖然 *B. pumilus* D5 上清液中只存在 1.23 ng/ml 的 toxoflavin，由於該菌除了產生 toxoflavin 外，也會分泌 kanosamine 及 bacilysin，此外，*B. pumilus* D5 全基因體序列資料與桿菌黴素等 26 種抗生素的生合成基因群部分吻合，另外，也發現包括超氧化物歧化酶等 7 種具有抗菌功效的功能蛋白質之基因，推測 toxoflavin 在 *B. pumilus* D5 上清液之抗菌效果可能受到這些成分的加乘作用，這部分有待進一步試驗。因此，推測 *B. pumilus* D5 所產的 toxoflavin 是該菌具有抵抗多種水產病原弧菌、鏈球菌及大腸菌的主要抗菌成分之一。

參考文獻

- 朱惠真, 黃美瑩, 劉旭展, 曾亮璋, 潘崇良, 張錦宜 (2016) 自海水魚蝦篩選抗水產病原弧菌之拮抗菌. 水產研究, 24 (1): 37-50.
- 朱惠真, 鄧晶瑩, 周昱翰, 林泓廷, 廖哲宏, 曾福生, 黃美瑩 (2021) 以短小芽孢桿菌 *Bacillus pumilus* D5 及其突變株提高文蛤成長免疫和改善其養殖環境之研究. 水產研究, 29(1): 25-36.
- 沈佳穎 (2018) 探討 *Bacillus pumilus* D5 抑制水產養殖病原菌之能力及其抗菌物質特性分析. 國立臺灣海洋大學食品科學系碩士論文.
- 吳振興, 趙準梅, 吳興海, 靜平, 曹文卿, 許艷麗 (2016) 一種毒黃素的液相色譜-串聯質譜檢測方法. 中華人民共和國發明專利 CN 105329313 A.
- 黃美瑩, 朱惠真, 陳力豪, 劉旭展, 曾亮璋, 潘崇良, 張錦宜 (2016) 飼料中添加益生菌 *Bacillus pumilus* D5 對於白蝦成長、免疫反應及抗腸炎弧菌效率之影響. 水產研究, 24(2): 37-49.
- Araujo, F. F., A. A. Henning and M. Hungria (2005) Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. World J. Microbiol. Biotechnol., 21: 1639-1645.
- Aunpad, R. and K. Na-Bangchang (2007) Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. Curr. Microbiol., 55: 308-313.
- Aweeda N. F., A. H. Al-Harbi and B. Austin (2014) Review: developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aquaculture, 413(20): 1-11.
- Bhate, D. S. (1955) Pumilin, a new antibiotic from *Bacillus pumilus*. Nature, 175(4462): 816-817.
- Bottone, E. J. and R. W. Peluso (2003) Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and Aspergillus species: preliminary report. J. Med. Microbiol., 52(1): 69-74.
- Cawoy, H., W. Bettiol, P. Fickers and M. Ongena (2011) *Bacillus*-based biological control of plant diseases. In Chap. 13: Pesticides in the Modern World -Pesticides Use and Management, 273-303.
- Chen, X. H., R. Scholz, M. Borriss, H. Junge, G. Mögel, S. Kunz and R. Borriss (2009) Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. J. Biotechnol., 140(1-2): 38-44.
- Choi, J. E., C. M. Nguyen, B. Lee, J. H. Park, J. Y. Oh, J. S. Choi, J. C. Kim and J. K. Song (2018) Isolation and characterization of a novel metagenomic enzyme capable of degrading bacterial phytotoxin toxoflavin. PloS one, 13(1): e0183893.
- Chu J., Y Wang, B. Zhao, X. M. Zhang, K. Liu, L. Mao and E. Kalamiyets (2019) Isolation and identification of new antibacterial compounds from *Bacillus pumilus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 103(20): 8375-8381.

- Cui, G., K. Yin, N. Lin, M. Liang, C. Huang, C. Chang, P. Xi and Y. Z. Deng (2020) *Burkholderia gladioli* CGB10: A Novel Strain Biocontrolling the Sugarcane Smut Disease. *Microorganisms*, 8(12): 1943.
- Freitas-Silva, J., T. Silva-Oliveira, G. Muricy and M. S. Laport (2020) *Bacillus* strains associated to homoscleromorpha sponges are highly active against multidrug resistant bacteria. *Curr. Microbiol.*, 77(5): 807-815.
- Freitas-Silva, J., B. F. R. de Oliveira, F. D. M. Vigoder, G. Muricy, A. D. Dobson and M. S. Laport (2021) Peeling the layers away: the genomic characterization of *Bacillus pumilus* 64-1, an isolate with antimicrobial activity from the marine sponge *Plakina cyanorosea* (Porifera, Homoscleromorpha). *Front. Microbiol.*, 3402.
- Gao X. Y., Y. Liu, L. L. Miao, E. W. Li, T. T. Hou and Z. P. Liu (2017) Mechanism of anti-*vibrio* activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance. *AMB express*, 7(23): 1-10.
- Hao, K., H. Ullah, X. Qin, H. Li, F. Li and P. Guo (2019) Effectiveness of *Bacillus pumilus* PDSLZg-1, an innovative hydrocarbon-degrading bacterium conferring antifungal and plant growth-promoting function. *3 Biotechnol.*, 9(8): 1-10.
- Hasan, F., S. Khan, A. A. Shah and A. Hameed (2009) Production of antibacterial compounds by free and immobilized *Bacillus pumilus* SAF1. *Pak. J. Bot.*, 41(3): 1499-1510.
- Hilton, M. D., N. G. Alaeddinoglu and A. L. Demain (1988) Synthesis of bacilysin by *Bacillus subtilis* branches from prephenate of the aromatic amino acid pathway. *J. Bacteriol.*, 170(1): 482-484.
- Huang, X., N. Zhang, X. Yong, X. Yang and Q. Shen (2012) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiol. Res.*, 167(3): 135-143.
- Irkitova, A. N., A. V. Malkova and D. E. Dudnik (2021) A natural bacterial strain *Bacillus pumilus* 16: Identification and antibiotic resistance evaluation. *Acta Biologica Sibirica*, 7: 391.
- Itoh, J., S. Omoto, N. Nishizawa, Y. Kodama and S. Inouye (1982) Chemical structures of amicoumacins produced by *Bacillus pumilus*. *Agric. Biol. Chem.*, 46(11): 2659-2665.
- Janiak, A. M. and S. Milewski (2001) Mechanism of antifungal action of kanosamine. *Med. Mycol.*, 39(5): 401-408.
- Jeong, Y., J. Kim, S. Kim, Y. Kang, T. Nagamatsu and I. Hwang (2003) Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. *Plant Dis.*, 87(8): 890-895.
- Kenig, M., E. Vandamme and E. P. Abraham (1976) The mode of action of bacilysin and anticapsin and biochemical properties of bacilysin -resistant mutants. *Microbiology*, 94(1): 46-54.
- Kenig, M. and E. P. Abraham (1976) Antimicrobial activities and antagonists of bacilysin and anticapsin. *Microbiology*, 94(1): 37-45.
- Laurent V., G. Rombaut, P. Sorgeloos and W. Verstraete (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(4): 655-671.
- Latuasan H. E. and W. Berends (1961) On the origin of the toxicity of toxoflavin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 30: 502-508.
- Leifert, C., H. Li, S. Chidburee, S. Hampson, S. Workman, D. Sigee, H. A. S. Epton and A. Harbour (1995) Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *J. Appl. Microbiol.*, 78(2): 97-108.
- Li, X., Y. Li, R. Wang, Q. Wang and L. Lu (2019) Toxoflavin produced by *Burkholderia gladioli* from *Lycoris aurea* is a new broad-spectrum fungicide. *Appl. Environ. Microbiol.*, 85(9): e00106-19.
- Melo, F. M. P. D., M. F. Fiore, L. A. B. D. Moraes, M. E. Silva-Stenico, S. Scramin, M. D. A. Teixeira and I. S. D. Melo (2009) Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. *Sci. Agric.*, 66(5): 583-592.
- Milner, J. L., L. A. U. R. A. Silo-Suh, J. C. Lee, H. He, J. Clardy and J. O. Handelsman (1996) Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(8): 3061-3065.
- Morita, T., I. Tanaka, N. Ryuda, M. Ikari, D. Ueno and T. Someya (2019) Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds produced by *Bacillus pumilus* TM-R. *Heliyon*, 5(6): e01817.
- Munimbazi, C. and L. B. Bullerman (1998) Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *J. Appl. Microbiol.*, 84(6): 959-968.
- Nagamatsu, T., H. Yamasaki, T. Hirota, M. Yamato, Y. Kido, M. Shibata and F. Yoneda (1993) Syntheses of 3-substituted 1-methyl-6-phenylpyrimido [5, 4-

- e]-1, 2, 4-triazine-5, 7 (1H, 6H)-diones (6-phenyl analogs of toxoflavin) and their 4-oxides, and evaluation of antimicrobial activity of toxoflavins and their analogs. *Chem. Pharm. Bull.*, 41(2): 362-368.
- Nannan, C., H. Q. Vu, A. Gillis, S. Caulier, T. T. T. Nguyen and J. Mahillon (2021). Bacilysin within the *Bacillus subtilis* group: gene prevalence versus antagonistic activity against Gram-negative foodborne pathogens. *J. Biotechnol.*, 327: 28-35.
- Naughton L.M., S. Q. An, I. Hwang, S. H. Chou, Y. Q. He, J. L. Tang, R. P. Ryan and J. M. Dow (2016) Functional and genomic insights into the pathogenesis of *Burkholderia* species to rice. *Environ Microbiol.*, 18: 780-790.
- Nayak S., C. Limsuwan, N. Chichurd, K. J. Kühlmann and S. Pungpang (2017) Antimicrobial activity of partially characterized analytes from *Bacillus pumilus* (B2). *Aquac. Res.*, 48(11): 5606-5613.
- Özcengiz, G. and N. G. Alaeddinoglu (1991) Bacilysin production by *Bacillus subtilis*: Effects of bacilysin, pH and temperature. *Folia Microbiol.*, 36(6): 522-526.
- Phister, T. G., D. J. O'Sullivan and L. L. McKay (2004) Identification of bacilysin, Chlorotetaine, and Iturin A produced by *Bacillus* sp. strain CS93 isolated from Pozol, a Mexican fermented maize dough. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 631-634.
- Riera, N., U. Handique, Y. Zhang, M. M. Dewdney and N. Wang (2017) Characterization of antimicrobial-producing beneficial bacteria isolated from Huanglongbing Escape citrus trees. *Front. Microbiol.*, 8: 2415.
- Saggese, A., R. Culurciello, A. Casillo, M. M. Corsaro, E. Ricca and L. Baccigalupi (2018) A marine isolate of *Bacillus pumilus* secretes a pumilacidin active against *Staphylococcus aureus*. *Mar. Drugs*, 16(6): 180.
- Saggese, A., Y. De Luca, L. Baccigalupi and E. Ricca (2022) An antimicrobial peptide specifically active against *Listeria monocytogenes* is secreted by *Bacillus pumilus* SF214. *BMC Microbiol.*, 22(1): 1-11.
- Steinborn, G., M. R. Hajirezaei and J. Hofemeister (2005) *bac* genes for recombinant bacilysin and anticapsin production in *Bacillus* host strains. *Arch. Microbiol.*, 183(2): 71-79.
- Toymentseva, A. A., D. S. Pudova and M. R. Sharipova (2019) Identification of secondary metabolite gene clusters in the genome of *Bacillus pumilus* strains 7P and 3-19. *BioNanoScience*, 9(2): 313-316.
- Umezawa, S., K. Umino, S. Shibahara and S. Omoto (1967a) Studies of aminosugars. XVII. Production of 3-amino-3-deoxy-D-glucose by *Bacillus* species. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 40(10): 2419-2421.
- Umezawa, S., K. Umino, S. Shibahara, M. Hamada and S. Omoto (1967b) Fermentation of 3-Amino-3-Deoxy-D-Glucose 1. *J. Antibiot.*, 20(6): 355-360.
- Wu, L., H. Wu, L. Chen, X. Yu, R. Borriess and X. Gao (2015) Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Sci. Rep.*, 5(1): 1-9.
- Yan, H., J. Yun, D. Ai, W. Zhang, J. Bai and J. Guo (2018) Two novel cationic antifungal peptides isolated from *Bacillus pumilus* HN-10 and their inhibitory activity against *Trichothecium roseum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 34(2): 1-10.

Examining the Antibacterial Substances of *Bacillus pumilus* D5 in Relation to Aquatic Pathogenic *Vibrio* spp.

Mei-Ying Huang¹, Huei-Jen Ju^{1*}, Che-Hung Liao¹, Fu-Sheng Tseng¹ and Hung-Ting Lin²

¹Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

²Department of Food Science, National Taiwan Ocean University

ABSTRACT

A potent antagonistic bacterium for many aquatic pathogens, including *Vibrio* species, is *Bacillus pumilus* D5. A thorough analysis of the genetic information contained in *B. pumilus* D5's entire genome led to the discovery of genes involved in the production of antibacterial compounds. High performance liquid chromatography (HPLC) and tandem mass spectrometer (MS/MS) were used to analyze the antibacterial compounds in the supernatant of cultured *B. pumilus* D5, and an antibacterial test was conducted using the corresponding purified reference materials. *B. pumilus* D5 has genes that are highly consistent with the three biosynthetic pathways of antibacterial substances, including kanosamine, bacilysin, and toxoflavin, according to a cross-analysis of the whole genome data of the strain with the biosynthetic pathway database of antibacterial substances. The culture supernatant of *B. pumilus* D5 contained kanosamine, bacilysin, and toxoflavin, according to HPLC and MS/MS analysis. By comparing the peak area of the sample in chromatography with the standard curve created by standard kanosamine and toxoflavin, the concentration of kanosamine (2,800.00 ng/ml) and toxoflavin (1.23 ng/ml) in the culture supernatant was determined, while the content of bacilysin was undetermined because the standard sample for this substance is not available on the market. The antibacterial tests were conducted using the standard kanosamine and toxoflavin and results revealed that toxoflavin can inhibit the growth of *Vibrio cholerae*, *V. harveyi*, and *V. vulnificus* at dose between 25.0-100.0 µg/mL, while 500.0 µg/mL toxoflavin can inhibit the growth of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae*; however, kanosamine has no inhibitory effect on all tested strains up to 5,000.0 µg/mL. Therefore, it is hypothesized that one of the primary antibacterial elements responsible for *B. pumilus* D5's ability to resist a variety of aquatic pathogens, such as *Vibrio* spp. and *Streptococcus* spp., is the toxoflavin it produces.

Key words: *Bacillus pumilus* D5, antibacterial substances, kanosamine, bacilysin, toxoflavin

*Correspondence: Division of Aquaculture, Fisheries Research Institute, 199 Hou-Ih Rd, Keelung, Taiwan 202. TEL: (02)2463-3101; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: jhjen@mail. tfrin.gov.tw