

海洋國家公園管理處補(捐)助研究生進行專題計畫

東沙環礁之海洋微生物資源探索 成果報告



中華民國 103 年 12 月

(本報告內容及建議,不代表本機關意見)

海洋國家公園管理處補(捐)助研究生進行專題計畫

東沙環礁之海洋微生物資源探索 成果報告



海洋國家公園管理處成果報告

中華民國 103 年 12 月

(本報告內容及建議,不代表本機關意見)

目錄

目錄.....	i
圖目錄.....	iii
表目錄.....	v
中文摘要.....	iv
Abstract.....	vi
一、前言.....	1
二、研究背景及有關研究之檢討.....	3
三、研究方法及過程.....	4
3-1. 採集方法.....	4
3-2. 採集工具.....	4
3-3. 採集要點.....	4
3-4. 採集記錄及步驟.....	4
四、材料與方法.....	7
樣品採集.....	7
五、需鹽性測試結果.....	8
1. 樣品.....	8
2. 菌種收集及需鹽性篩選.....	8
3. 菌種需鹽性篩選結果與討論.....	10

六、細菌活性測試	11
1. 活性測試目的.....	11
2. 活性測試方法.....	11
3. 致病菌簡易介紹.....	13
4. 菌株活性測驗結果.....	14
5. 活性菌株需鹽性測試.....	22
6. 定序與親緣樹狀圖.....	23
七、結論.....	31
八、參考文獻.....	36



圖目錄

- 圖 1: 上圖為底泥沉積物和無脊椎生物之採集地點7
- 圖 2: 上圖為東沙環礁群島之海草床分布圖。7
- 圖 3: 東沙島菌種需鹽測試結果10
- 圖 5: Leaf 06 對於包氏不動桿菌(*A. baumannii*, *A.b.*)和仙人掌桿菌(*B. cereus*, *B.c.*)具有抑制效果.....14
- 圖 6: Scleractinia 04 對於金黃色葡萄球菌(*S. aureus*, *S.a.*)具有抑制效果.....15
- 圖 7: Fungia 01 對於仙人掌桿菌(*B. cereus*, *B.c.*)、金黃色葡萄球菌(*S. aureus*, *S.a.*)、綠膿桿菌(*P. aeruginosa*, *P.a.*)、大腸桿菌(*E. coli*, *E.c.*)具有抑制效果.....16
- 圖 8: N2-2 對於仙人掌桿菌(*B. cereus*, *B.c.*)、金黃色葡萄球菌(*S. aureus*, *S.a.*)、腸道沙門氏菌(*S. typhimurium*, *S.t.*)具有抑制效果.....17
- 圖 9: N2-4 對於仙人掌桿菌(*B. cereus*, *B.c.*)、金黃色葡萄球菌(*S. aureus*, *S.a.*)具有抑制效果18
- 圖 10: AS-3 對於仙人掌桿菌(*B. cereus*, *B.c.*)、腸道沙門氏菌(*S. typhimurium*, *S.t.*)、大腸桿菌(*E. coli*, *E.c.*)、哈維氏弧菌(*V. harveyi*, *V.h.*)、克雷伯氏肺炎菌(*K. pneumonia*, *K.p.*)、白色念珠菌(*C. albicans*, *C.a.*)具

有抑制效果.....	19
圖 11 : t2-3 對於哈維氏弧菌(<i>V. harveyi</i> , <i>V. h.</i>)具有抑制效果	20
圖 12 : Strain Lagoon 01 之親緣關係分析圖	24
圖 13 : Strain Cotton 01 之親緣關係分析圖	25
圖 14 : Strain AS-3、AS-5 以及 E1-5 之親緣關係分析圖	26
圖 15 : Strain Sponge 01、Scleractinia II 08 之親緣關係分析圖	27
圖 16 : Strain N2-2、N2-4、N2-7、N2-8 之親緣關係分析圖	28
圖 17 : <i>Microbulbifer</i> spp.之親緣關係分析圖	29
圖 18 : Strain t2-3 之親緣關係分析圖	30
圖 19 :比較台灣周遭沿海與東沙島所分離出的活性菌株	32
圖 20 : 比較台灣周遭沿海與東沙島所分離出的需鹽菌株(海洋菌)..	32



表目錄

表 1 : Marine Agar 組成成分.....	9
表 2 : PYE 組成成分.....	9
表 3 : 致病菌的簡易介紹.....	13
表 4 : 具有抑制致病菌之生物活性菌.....	21
表 5 : 生物活性菌之需鹽測試.....	22
表 6 : <i>Microbulbifer spp.</i> 於 Reaxys 結果顯示共有 9 個化合物被分離出.....	33
表 7 : <i>Ruegeria spp.</i> 於 Reaxys 結果顯示共有 8 個化合物被分離出.....	33
表 8 : <i>Halobacillus spp.</i> 於 Reaxys 結果顯示共有 6 個化合物被分離出.....	34
表 9 : <i>Brevibacillus spp.</i> 於 Reaxys 結果顯示共有 8 個化合物被分離出.....	35

中文摘要

海洋微生物被認為是海洋生物活性物質主要來源之潛在資源，先前已有許多海洋天然物研究者從海洋微生物中分離獲得許多具有特殊活性及新穎結構的二次代謝物，並進一步以這些活性海洋天然物作為開發新型藥物的來源。

東沙島基於生態保育的理由，並未開放一般民眾觀光，讓東沙島保持最自然的環境。東沙島位於特殊的地理位置，冬季黑潮支流流經台灣南岸到東沙島，從台灣南岸微生物相可隨著黑潮支流流入東沙島。然而台灣南端因豐富的人為活動造成環境與微生物相的改變，此改變對東沙島的微生物相影響為何，並不知曉。本次研究希望探索較少人為活動的東沙環礁自然環境下，所存在的海洋微生物之種類、性質，並利用其生產的二次代謝物作為快速篩選指標，建立基礎微生物相生物與相關化學資料，希望能架構起東沙島的微生物資料庫，除進一步探索其未來應用於活性二次代謝物開發的可能性，並且如能再與台灣南岸所採集到的海洋微生物進行其間差異比較，或許能提供上述生態環流的釐清。

目前研究結果發現從東沙島的底泥(沉積物)、海草、軟體動物等，分離出的 193 隻菌株，有 26 株菌對致病菌有良好的抑制效果；在具抗致病菌能力的菌株中，21 株菌株僅能在海水環境下生長，故推斷這些菌株為絕對需鹽之海洋菌；相對的，比較本實驗室先前自萬里桐、後壁湖和南灣地區之採集具抗致病菌能力的菌株經驗，東沙島的微生物相似乎較少陸源性來源之活性菌株入侵，即意謂當地之人為活動於微生物相的干擾較小。目前從東沙島的菌株篩選獲得需鹽性活性菌株

所佔比例較高，而期盼能應用於未來黑潮支流與微生物相之間的關係研究上。



Abstract

Marine microorganisms were considered as potential sources of bioactive compounds. Many natural products researchers found lots of bioactive secondary metabolites with novel skeletons from marine microorganisms, of which some have been developed as new drugs.

Dongsha Atoll is considered of ecological conservation, it is not open for general tourists to remain it's the nature environment. Dongsha Atoll is located in the special position. In winter, Kuroshio tributary current goes through the south of Taiwan to Dongsha Atoll. Following Kuroshio tributary current, the microbes in the south coast of Taiwan could be immigrated to Dongsha Atoll. However, the impacts of human activities have largely changed the microbiota of the southern coast of Taiwan. But we don't know how such impacts affect to that of Dongsha Atoll. Herein, we want to study the microbiota on Dongsha Atoll, to build the database about the microbial specimens for their taxonomic characteristics and secondary metabolites. Besides exploring the medicinal application of microbial secondary metabolites, we would like to provide more evidence of geomicrobiology to clarify the effect of the Kuroshio tributary current in winter in contrast to the microbiota between Dongsha Atoll and the southern Taiwan.

In this study, we isolated 193 bacterial strains from sediments, seaweeds and mollusks at Dongsha Atoll, in which 26 strains showed anti-microbial activities against bacterial indicators. Among those anti-microbial strains, 21 strains only grow in seawater medium, inferring that most of those strains belong to marine halophiles. Compared with our previous experience for marine halophiles sampling from Wanlitong, Houbihu and Nanwan, the microbiota in Dongsha Atoll has less affected by human activities. In summary, the proportion of marine halophiles

with anti-microbial activity from Dongsha Atoll is higher, which we hope to further apply to clarify the relationship of microbiota between Taiwan and Dongsha Atoll.



一、前言

微生物意指很小的生物，一般需要利用顯微鏡來觀察。其包含真菌界、原生生物界、原核界，例如：細菌、真菌、病毒等。微生物的適應範圍極為廣闊，從寒冷到炙熱，高山到深海都可以看見微生物的足跡。在不同的環境，微生物為了適應、對抗環境會產生或是分泌出特殊的代謝物，稱之為二次代謝物(Secondary metabolites)。二次代謝物為除了生物體基本組成結構(又稱一次代謝物)，如：胺基酸、脂質、醣類、含氮鹼基及作用於維持生物體能量以外的物質，例如：蛇的毒液、花的香味等。將不同種微生物體內所含的二次代謝物進行萃取、純化、分析^[1]，會發現某些二次代謝物可能具有生物活性。以往陸生微生物已被研究較為廣泛，如盤尼西林等抗生素的開發；近年來，根據文獻整理得知海洋生物共生之微生物在海洋生物製造其特有活性二次代謝物的過程中扮演了相當重要的角色，除了提供其生物特有結構骨架外，亦能在提供其多元的化學修飾，增加其化學結構變異度與多樣性。

東沙環礁國家公園為台灣於 2007 年成立的第七座國家公園屬中華民國內政部營建署，並於該年的 10 月 4 日成立海洋國家公園管理處管理之。基於國家公園管理策略，並未開放一般民眾觀光。正因如此，較少的人為開發與破壞，造就其生物資源研究的重要性。除了人為因素外，東沙環礁為圓型環礁，四面環海。東沙島位於東沙環礁之西側，島形如馬蹄狀，中間的海水部分也因此形成內海，是東沙環礁中唯一露出海面之陸礁島嶼。正因為其地形如此的多變，造就了生物的多樣性，也提供了研究生物的一個好的平台。目前已知的珊瑚有三百餘種，海藻也有一百二十種，另有甲殼類動物、棘皮動物、軟體動

物等無脊椎動物^{[2][3]}，然而可惜的是微生物的資料相對較少，付之闕如^[4]。東沙島位於冬季黑潮支流流經路線。從台灣南岸隨著黑潮支流流入東沙島的微生物相，在經過多年演化後，會讓台灣南岸與東沙島生態為生物相有何差異？故本次研究希望能從東沙島環境獲取海洋微生物，探討東沙島上海洋微生物的種類及其特性，且比較東沙島與台灣南部微生物相的差異，並進一步探索其未來應用於微生物活性二次代謝物開發的價值。



二、研究背景及有關研究之檢討

自東沙環礁國家公園成立，就以嚴格的監控和管理，維護東沙環礁的自然環境。海洋國家公園管理處也實施多種不同計畫，讓各個領域的研究室至東沙島進行研究，以收集更加完整的資訊，例如研究東沙環礁的生態、魚群分布、珊瑚研究、水質分析等^[5]。然而在先前的研究中，探討在東沙環礁生存的微生物資料較少。於東沙環礁的生物，少了人工性的污染源，也就少了由污染所產生的微生物，故想要探討在最為乾淨的自然環境下，所長出的海洋微生物，其種類、性質、所產出的二次代謝物與台灣沿海所採集到的海洋微生物有何不同。希望能架構起東沙環礁的生態資料庫，讓東沙環礁的維護更加完善。

海洋微生物所涵蓋的範圍極廣，從海底底泥、水草、無脊椎動物、脊椎動物等皆可以在附近找到不同種微生物。在龐大的樣品資料收集裡，底泥^[6]為此環境中的有機物、各種礦物的沉積物，其物種豐富度應為最佳。無脊椎動物的生物結構比脊椎動物來的簡單，所取得的部位也較單一。故我們先以東沙環礁海底底泥與無脊椎動物，並以從中分離出細菌為主。

三、研究方法及過程

3-1. 採集方法

- 以滅菌過之工具(刮杓、鑷子等)進行採集:
 - I. 採集海草碎片、海洋無脊椎動物(軟珊瑚、軟體動物等)之生物碎片，約兩指幅大小。
 - II. 採集海洋底泥沉積物

3-2. 採集工具

無菌採樣袋、吸水紙、修枝剪、手套、刮勺、酒精

3-3. 採集要點

本主要為提供鑑定、保存及研究之用，故採集微生物時需注意取得時的過程，避免汙染；採集微生物時幾個要領：

- I. 採樣的地點，為沿海及近海，希望得到與海洋生物共生之海洋微生物。
- II. 採集海底底泥中的微生物。

3-4. 採集記錄及步驟

- A. 將採集到的樣本，裝入無菌採樣袋，帶回至實驗室保存(於-20°C)。
 - I. 採集泥沙時，需要戴上手套，過程盡量以無菌的方式進行，以避免汙染
 - II. 採集無脊椎動物時，需要戴上手套，過程同採集泥沙。將樣

品帶回後，會爭對所想探討之部位(例如:胃)進行取樣，或是將其打碎，直接探討樣品體內的內共生菌。

III. 裝入無菌採樣袋後，要一直保持低溫，避免菌死亡或其他變故。

B. 將採回的菌進行稀釋、挑選單株、篩選、鑑屬^{[7][8]}。

I. 無菌採樣袋混和均勻，用 pipetman 吸取 100 μ L 加入 900 μ L 3-salts seawater 於試管 A。將試管 A 用 vortexer 混和均勻後，用 pipetman 吸取 100 μ L 加入 900 μ L 3-salts seawater 於試管 B，以此類推，將採樣袋中的菌以 1 倍、10 倍、100 倍進行稀釋。

II. 將試管 A 吸取 10 μ L 滴至培養皿(marine agar plate)上，用玻璃塗抹棒均勻塗開後，放 25°C 培養箱進行培養 1~2 天。

III. 將長至培養皿上的菌，依照大小、外觀、顏色等差異，將不同的菌株挑出，並畫四區(four way)確認為單一菌落。若有長出兩種以上外觀無法分辨的菌株，則重新挑單一菌株畫四區。必定確認為單一菌株。

IV. 挑取分化後的單一菌落於 broth 中進行液態培養。

V. 抽取 500 μ L 的 broth 混和 500 μ L 的 50% 甘油(甘油與人工海水 1:1)，進行保存。

VI. 利用無鹽份的 MSWYE(PYE) plate 進行需鹽性測試。若在 PYE 上得以生長，則初步判斷此菌需不需鹽份。(海洋菌多已推測為需鹽菌)

C. 使用 Viogene 公司的 Blood and Tissue Genomic DNA Extraction Miniprep System(DNA 萃取套組)，萃取出 broth 中的菌體 DNA。

I. 取 broth 之菌液約至 10^9 CFU/ mL (最多取 3 mL 菌液)。

- II. 以 7500rpm 離心十分鐘，去除上清液。
 - III. 加入 20 μ L Lysozyme reaction solution，並且與 pellet 混合均勻，保持在 37°C 下，三十分鐘。
 - IV. 加入 200 μ L EX buffer 和 20 μ L proteinase 震盪 20 分鐘。
 - V. 加入 200 μ L isopropanol 震盪均勻，將混和液體取到 kit 所附之 column 和 collection tube 中，以 8000rpm 離心，移除 collection tube 之液體。
 - VI. 取 0.5 mL WS buffer 至 column 中以 8000rpm 離心。
 - VII. 加入預熱過的無菌二次去離子水 50-100 μ L，靜置 1~5 分鐘，即完成 DNA 萃取。(可以保存於-20°C 冰箱)
 - VIII. 加入引子 16s-F 和 16s-R 引子。本次研究所使用的聚合酶連鎖反應器為 ABI 公司的 2720 Thermal Cycle,將特定片段放大。利用電泳確定 DNA 確實有接上引子
 - IX. 確定 single band 的位置確定，將 PCR 產物送至基隆米克斯生物科技有限公司進行序列分析。
- D. 推斷此菌種的特性以及二次代謝物的研究，並探討其二次代謝物對於周遭環境的影響^[9]。
- I. 利用對抗致病菌的實驗，以活性指引的方式，進行菌種的塞選^[10]。
 - II. 將上述步驟第 B 項長出不同菌株的培養皿，進行翻面，用滅過菌之棉棒沾取致病菌的 broth，均勻塗開。將產生抑制圈的菌種以挖洞的方式挑出併純化為單一菌種。在經由步驟 C 進行菌種鑑定。

四、材料與方法

樣品採集

樣品採集前，準備無菌採樣袋以及已高溫高壓滅菌之工具(刮勺、鑷子、修枝剪...等)進行採集，樣品主要以海草床、底泥沉積物、無脊椎動物(軟珊瑚、軟體動物...等)之生物進行研究。



圖 1：上圖為底泥沉積物和無脊椎生物之採集地點，分別為 1-11 作為標示。

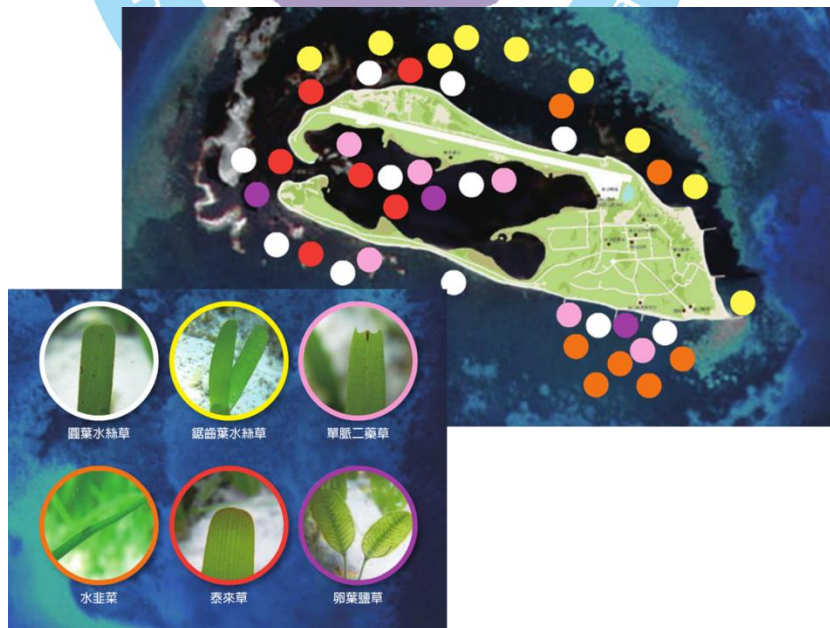


圖 2：上圖為東沙環礁群島之海草床分布圖。

五、需鹽性測試結果

1. 樣品

本研究針對東沙環礁群島內部採集地點進行研究，樣品取得 10 個沉積物、6 種海草、3 個石珊瑚、6 個海綿、1 個海鞘，共 26 個樣品，海草床分別取得 6 種屬，為泰來草(*Thalassia hemprichii*)、單脈二藥草(*Halodule uninervis*)、圓葉水絲草(*Cymodocea rotundata*)、鋸齒葉水絲草(*Cymodocea serrulata*)、水韭菜(*Syringodium isoetifolium*)、鏹葉叢草(*Thalassodendron ciliatum*)及卵葉鹽草(*Halophila ovalis*)，進行細菌分離及需鹽性篩選測驗。

2. 菌種收集及需鹽性篩選

陸生細菌為廣鹽性菌，可在無任何鹽分或含有鹽分的環境生存；但由於海洋環境平均鹽分為 3.5 %，故直接接觸海洋之細菌皆生長在含有鹽分的環境中，在無任何鹽分的環境下無法生長，不同於陸生細菌。在本次實驗中，我們以 MA (Marine Agar，表 1)和 PYE (Peptone Yeast Extract Agar，表 2)做需鹽性的測驗。將純化後的菌株培養在這兩種培養基上，若 MA 上有生長，而在 PYE 上沒有生長，則代表此菌株則需要鹽分才可生長，即為需鹽菌。

針對東沙環礁群島 26 個樣品，進行樣品處理及培養後，以肉眼觀察菌株型態外觀，分別取菌株型態外觀和顏色相異之細菌，以四區劃法分離純化。從 26 個樣品中總共分離到 193 株細菌，將 193 株菌株進行需鹽性篩選測驗，利用 PYE 培養基進行培養，篩選出需要鹽分才可以生長的菌株，193 株細菌中共篩選出 71 株為需鹽性之細菌。確定為需鹽性之細菌後，再利用 50 % 甘油保存菌種，存放於 -80°C，

其菌種命名方式皆以地點之縮寫然後依序編號。

表 1 : Marine Agar 組成成分

Difco™ Marine Agar 2216 - 55.1 g/L

Approximate Formula* Per Liter

Peptone.....	5.0 g
Yeast Extract.....	1.0 g
Ferric Citrate.....	0.1 g
Sodium Chloride.....	19.45 g
Magnesium Chloride.....	8.8 g
Sodium Sulfate.....	3.24 g
Calcium Chloride.....	1.8 g
Potassium Chloride.....	0.55 g
Sodium Bicarbonate.....	0.16 g
Potassium Bromide.....	0.08 g
Strontium Chloride.....	34.0 mg
Boric Acid.....	22.0 mg
Sodium Silicate.....	4.0 mg
Sodium Fluoride.....	2.4 mg
Ammonium Nitrate.....	1.6 mg
Disodium Phosphate.....	8.0 mg
Agar.....	15.0 g

表 2 : PYE 組成成分

Approximate Formula* Per Liter

Protose peptone.....	5.0 g
Yeast extract.....	3.0 mg
Agar.....	15.0 g

3. 菌種需鹽性篩選結果與討論

我們依照菌種的需鹽性，判斷是否此菌種為海洋菌指標之一。從東沙環礁群島 26 個樣品中篩選出需鹽性之細菌佔總樣品數約 40 %。從結果可以推論東沙島所採集的菌種，海洋菌相較於台灣南岸所佔比例較高(第七章)，也可以推論東沙島受到陸源性汙染較低。

圖 3：東沙島菌種需鹽測試結果



六、細菌活性測試

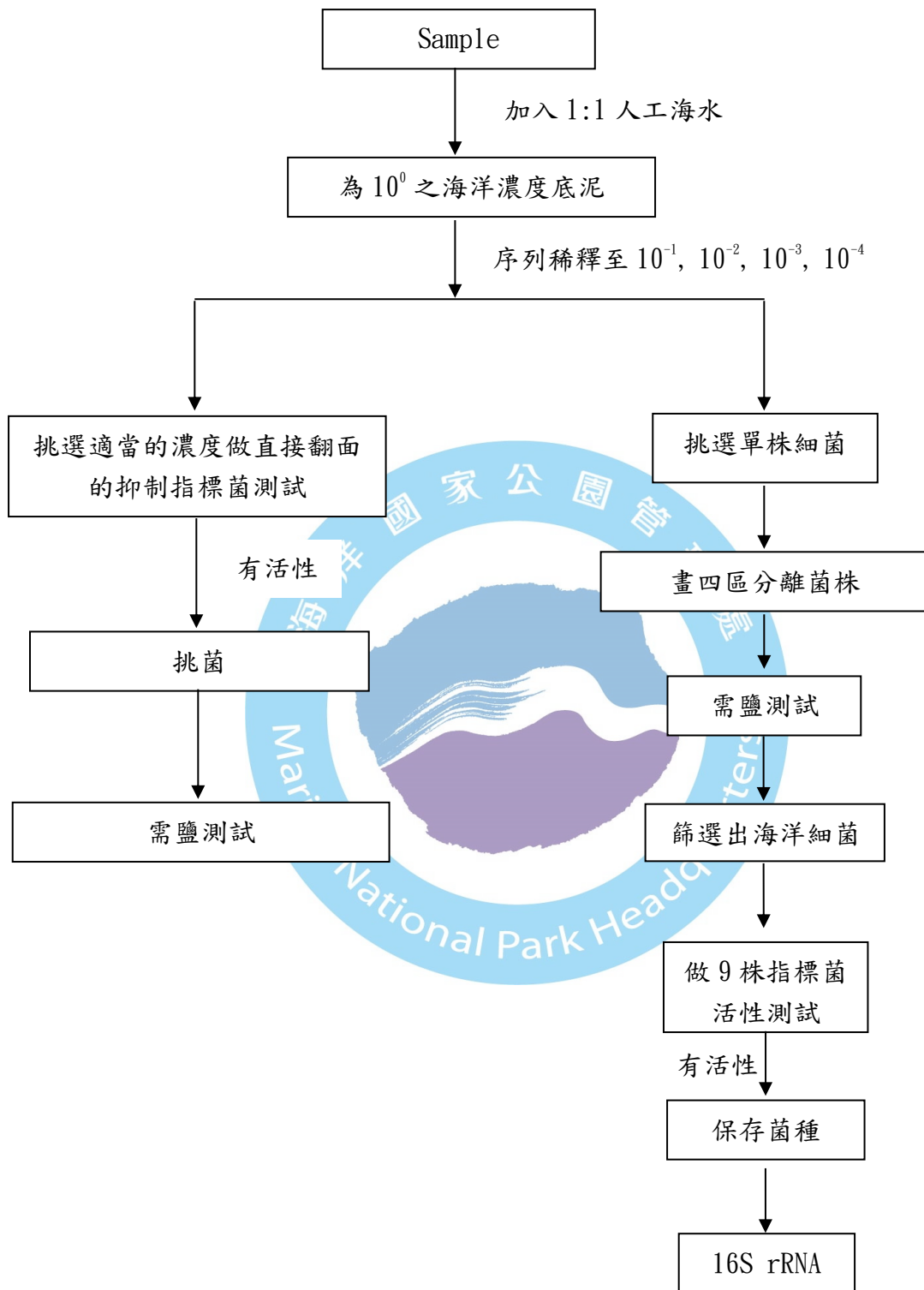
1. 活性測試目的

由微生物所產生的二次代謝物，其生物活性多樣性高。自從 1940 年，盤尼西林(penicillin)被應用在臨床上，眾多研究學者開始研究抗生素，並對於許多人類性疾病的治療有突破性的發現。因此，越來越多的科學家參與了抗生素的研究並嘗試開發不同的純化和分析方法，以獲得更多的不同抗生素或以化學合成方式合成有效果的抗生素。具有生物活性的二次代謝物不斷被發現。然而目前藥物的使用，使得部分菌種有抗藥性(例如:金黃色葡萄球菌和鮑氏不動桿菌等)，或是藥物的服用，使患者產生不良的副作用(例如:兩性黴素 B 等)。故尋找具有顯著效果的二次代謝物，為眾多天然物學者的研究方向之一。

2. 活性測試方法

本實驗室是利用“flip-flop” agar-diffusion (paper disc agar diffusion assay)之方式進行生物活性測驗。挑選已純化的單株菌體，將其進行液態培養一天後，以濾紙(直徑 0.6 cm 的圓型)沾取菌液貼附在培養基上，培養一天。將培養基翻面，塗上致病菌，在進行培養一天。此次實驗的致病菌為金黃色葡萄球菌、仙人掌桿菌、腸道沙門氏菌、克雷伯氏肺炎菌、綠膿桿菌、哈維氏弧菌、大腸桿菌、鮑氏不動桿菌、白色念珠菌。若從東沙島所採集到的菌株具有抑制以上致病菌的效果，則會產生透明的抑制圈。

圖 4：簡易菌株分離大綱



3. 致病菌簡易介紹

此實驗主要以九隻致病菌(又稱指標菌)做活性的篩選，其中白色念珠菌為真菌，另外八隻為細菌。又以金黃色葡萄球菌與鮑氏不動桿菌為主要篩選目標。希望能從東沙島中所分離出的海洋菌株中，找出能夠抑制此九隻致病菌的活性菌株，後續期盼能夠進行活性菌株的二次代謝物分析。九隻菌株的簡易致病病因如表 3。

表 3：致病菌的簡易介紹

致病菌(指標菌)	造成人類的病因
<i>Bacillus cereus</i> 仙人掌桿菌 ^[11]	嘔吐、腹瀉
<i>Staphylococcus aureus</i> 金黃色葡萄球菌 ^[12]	中耳炎、鼻竇炎、骨髓炎
<i>Salmonella typhimurium</i> 腸道沙門氏菌 ^[13]	發燒、腹痛、腸胃炎
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 克雷伯氏肺炎菌 ^[14]	肺炎、尿路感染
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 綠膿桿菌 ^[15]	化膿、發炎
<i>Vibrio harveyi</i> 哈維氏弧菌 ^[16]	肌肉潰爛、對海洋生物有害
<i>Escherichia coli</i> 大腸桿菌 ^[17]	新生兒腦炎、腹瀉
<i>Acinetobacter baumannii</i> 鮑氏不動桿菌 ^[18]	肺炎、菌血症、腦膜炎
<i>Candida albicans</i> 白色念珠菌 ^[19]	陰道紅腫出血、發燒、心跳過快

4. 菌株活性測驗結果

針對東沙環礁群島 26 個樣品，進行樣品處理及培養後，以肉眼觀察菌株型態外觀，分別取菌株型態外觀和顏色相異之細菌，以四區劃法分離純化。從 26 個樣品中總共分離到 193 株細菌，將 193 株菌株進行抗菌活性測試，利用“flip-flop” agar-diffusion 之方式，篩選出具有抑制致病菌生長之活性細菌，193 株細菌中共篩選出 33 株具有生物活性之細菌。確定為有活性之單株菌後，再利用 50 % 甘油保存菌種，存放於-80°C，其菌種命名方式皆以地點之縮寫然後依序編號。將東沙黨所採集到的樣品和分離出的菌株進行統整如表 4。

在此取七個實驗結果：

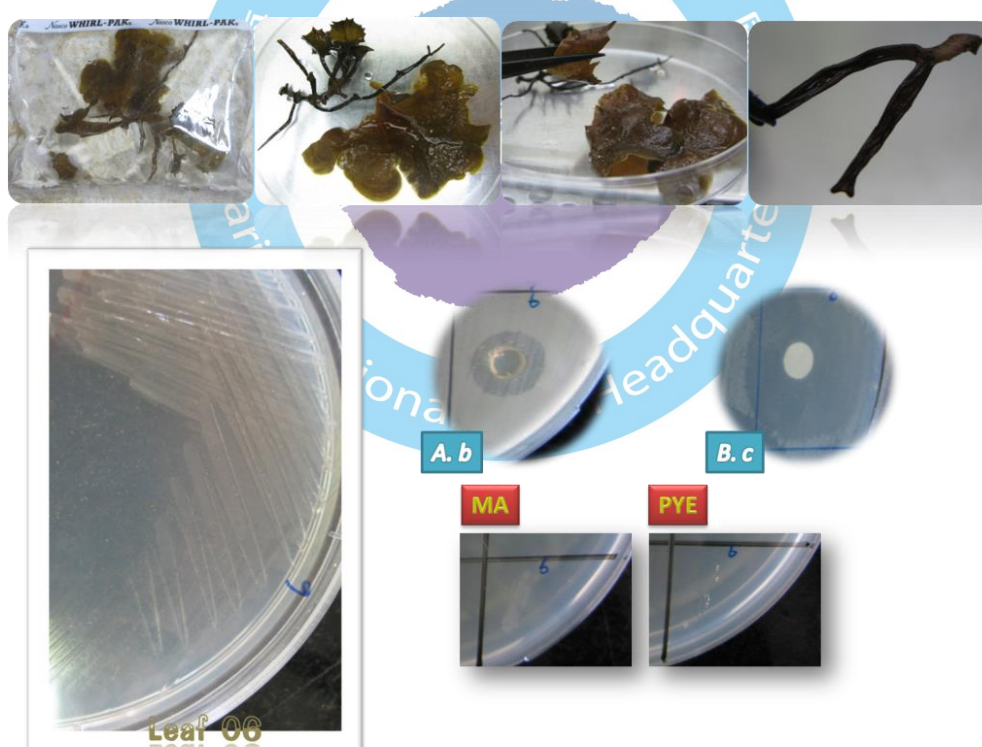


圖 5 : Leaf 06 對於包氏不動桿菌(*A. baumannii*, A.b.)和仙人掌桿菌(*B. cereus*, B.c.)具有抑制效果，且在 PYE 上沒有明顯生長(詳情見第三部分需鹽性)，推斷可能為海洋菌。

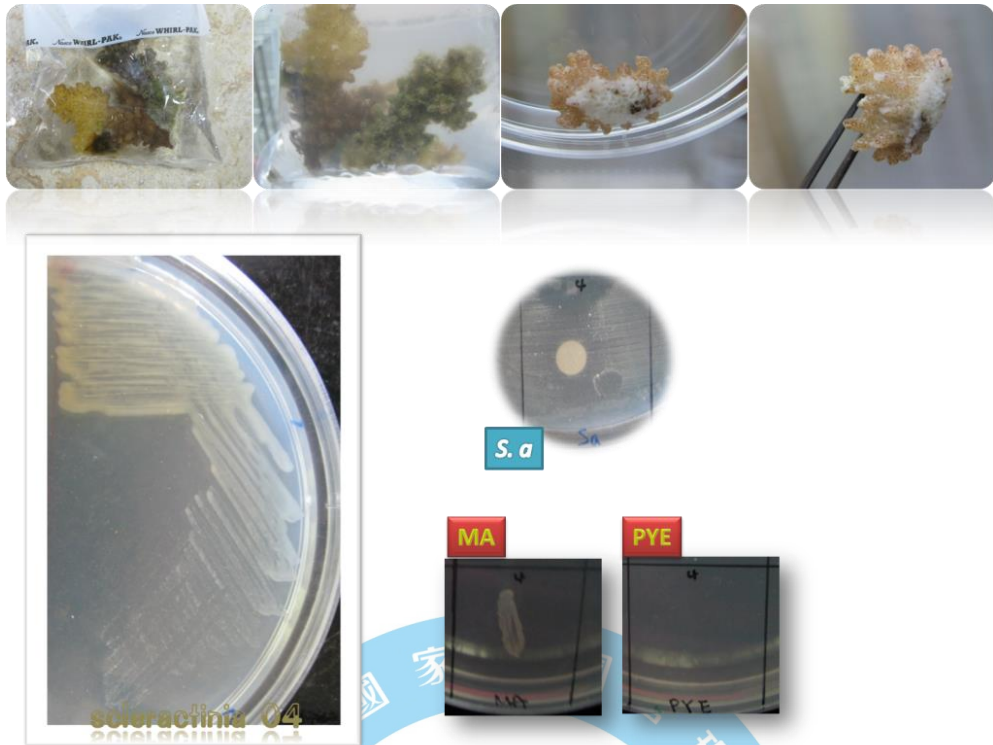


圖 6 : Scleractinia 04 對於金黃色葡萄球菌(*S. aureus*, *S.a.*)具有抑制效果，且在 PYE 上沒有生長(詳情見第三部分需鹽性)，推斷可能為海洋菌。

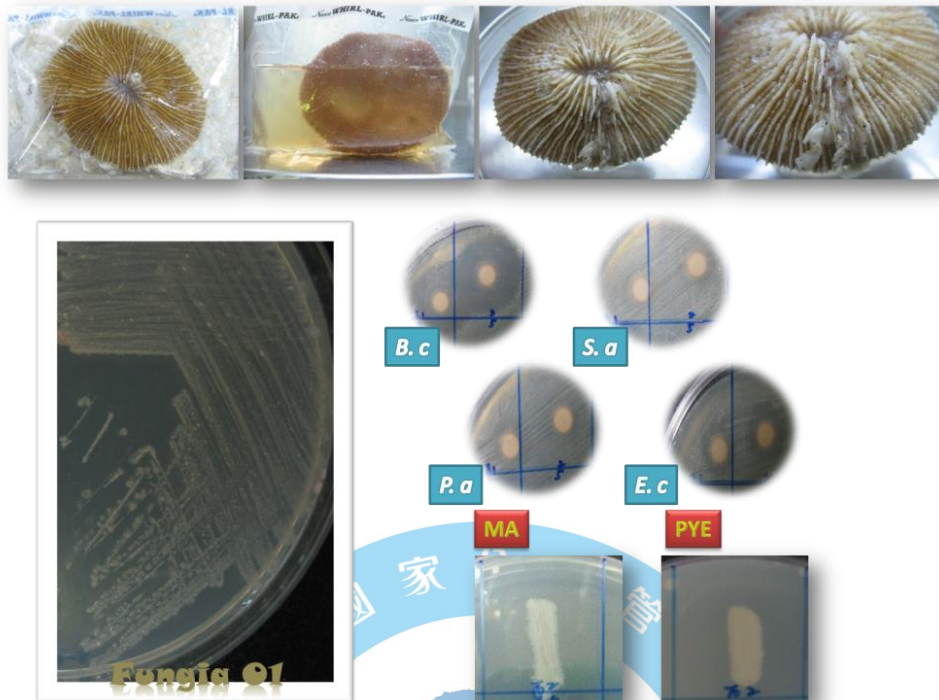


圖 7 : Fungia 01 對於仙人掌桿菌(*B. cereus*, *B.c.*)、金黃色葡萄球菌(*S. aureus*, *S.a.*)、綠膿桿菌(*P. aeruginosa*, *P.a.*)、大腸桿菌(*E. coli*, *E.c.*) 具有抑制效果，且在 PYE 上有明顯生長(詳情見第三部分需鹽性)，對於是否為海洋菌的判斷，要進一步的探討。

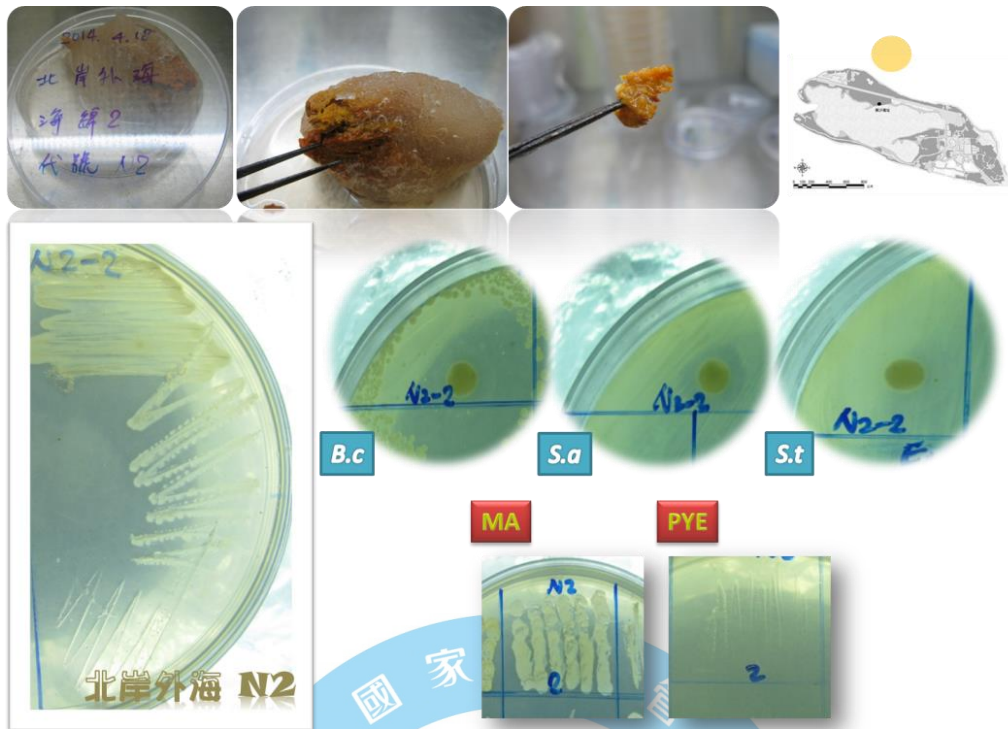


圖 8 : N2-2 對於仙人掌桿菌(*B. cereus*, *B.c.*)、金黃色葡萄球菌(*S. aureus*, *S.a.*)、腸道沙門氏菌(*S. typhimurium*, *S.t.*)具有抑制效果，且在 PYE 上沒有生長(詳情見第三部分需鹽性)，推斷可能為海洋菌。

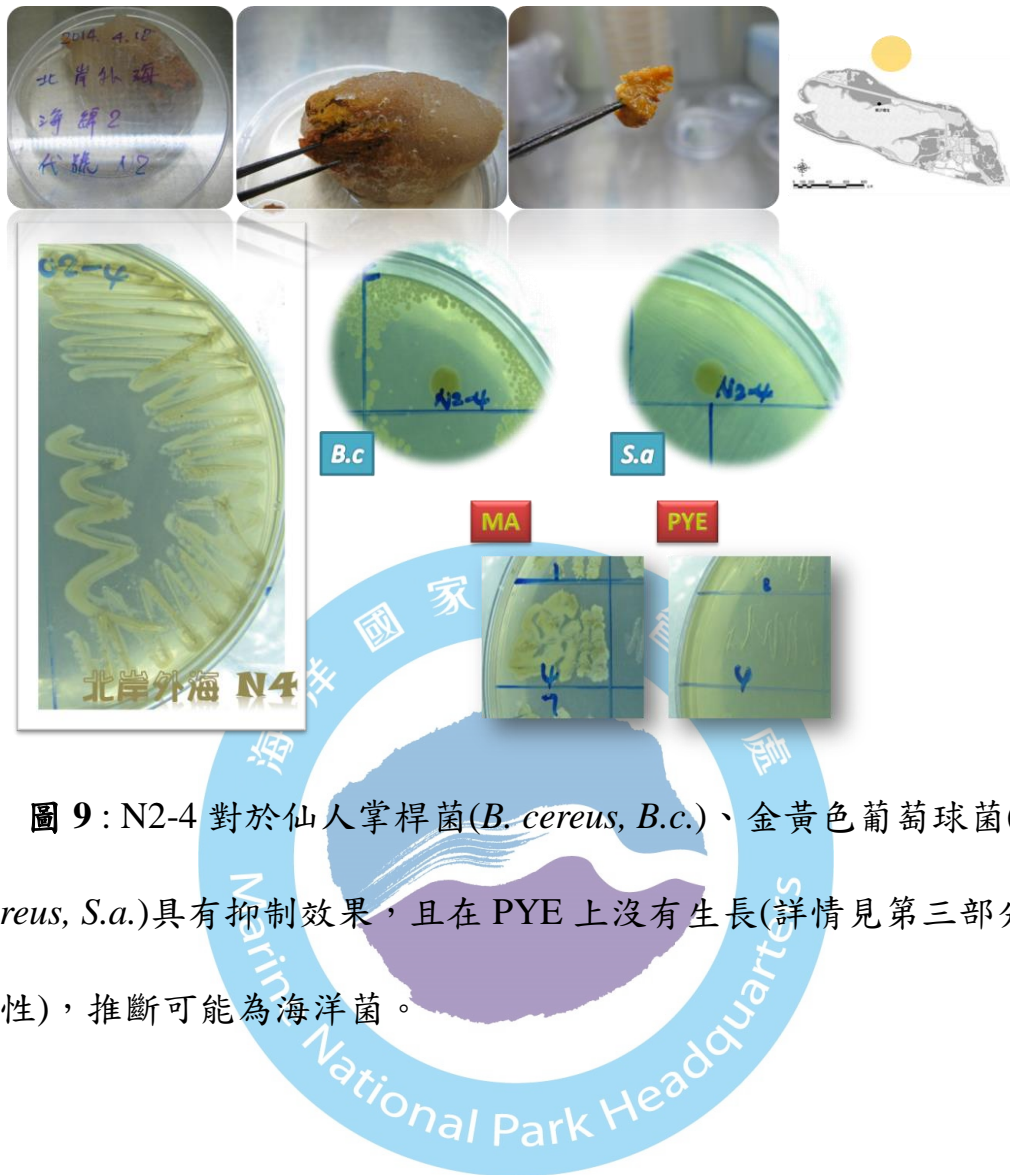


圖 9：N2-4 對於仙人掌桿菌(*B. cereus*, *B.c.*)、金黃色葡萄球菌(*S. aureus*, *S.a.*)具有抑制效果，且在 PYE 上沒有生長(詳情見第三部分需鹽性)，推斷可能為海洋菌。

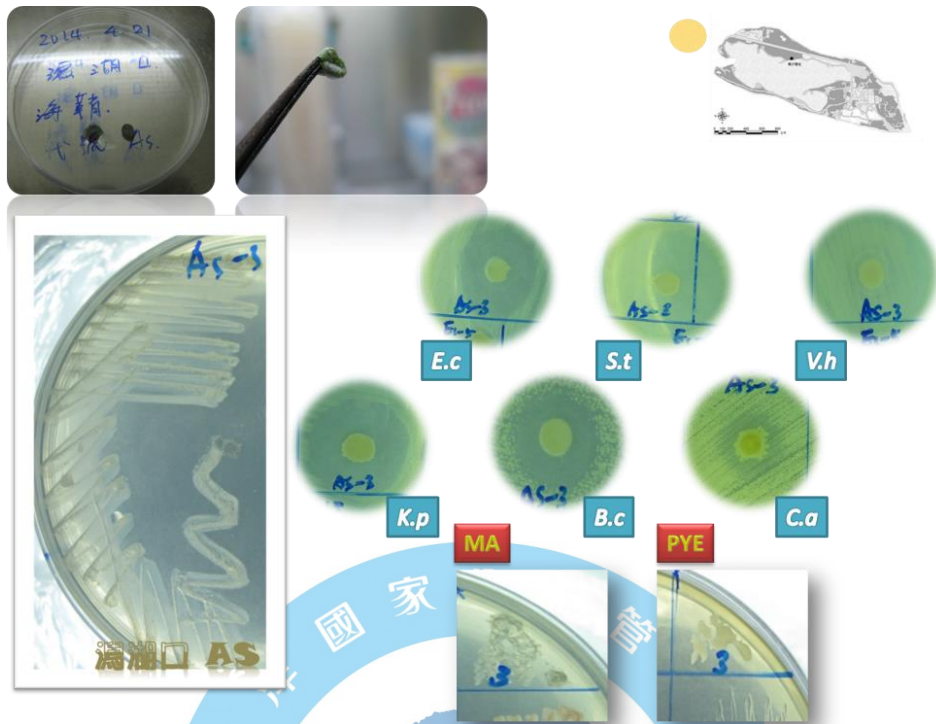


圖 10 : AS-3 對於仙人掌桿菌(*B. cereus*, *B.c.*)、腸道沙門氏菌(*S. typhimurium*, *S.t.*)、大腸桿菌(*E. coli*, *E.c.*)、哈維氏弧菌(*V. harveyi*, *V.h.*)、克雷伯氏肺炎菌(*K. pneumoniae*, *K.p.*)、白色念珠菌(*C. albicans*, *C.a.*)具有抑制效果，且在 PYE 上有明顯生長(詳情見第三部分需鹽性)，對於是否為海洋菌的判斷，要進一步的探討。

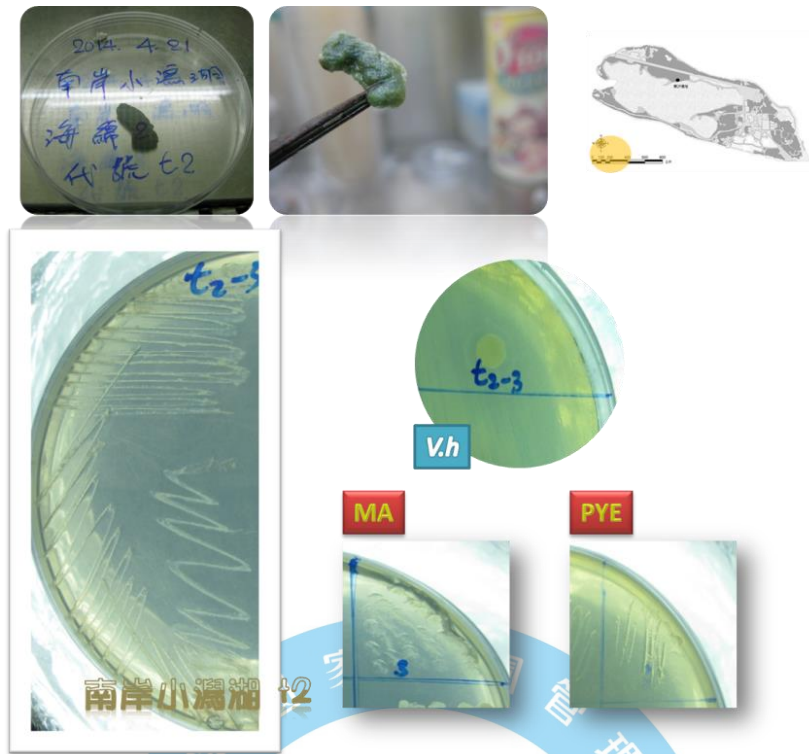


圖 11 : t2-3 對於哈維氏弧菌(*V. harveyi*, *V. h.*)具有抑制效果，且在 PYE 上沒有生長(詳情見第三部分需鹽性)，推斷可能為海洋菌。

表 4：具有抑制致病菌之生物活性菌

樣品	菌株名稱\測試菌株	<i>S.a.</i> ^a	<i>B.c.</i> ^a	<i>V.h.</i> ^a	<i>E.c.</i> ^a	<i>K.p.</i> ^a	<i>Pa.</i> ^a	<i>S.t.</i> ^a	<i>A.b.</i> ^a	<i>C.a.</i> ^a
沉積物	Leaf 06		+++						++	
海綿	sponge 01	++	+++			+	++	+++	+	
海綿	sponge 03		++							
海綿	sponge 05	+++	+++		++		+++			
海綿	sponge 09	+	+		++					
海綿	sponge 10		++		+++					
沉積物	Lagoon 01		++							
海綿	Cotton 01								+	
石珊瑚	scleractinia 04	+								
石珊瑚	scleractinia II 04	+++	+++				+++			
石珊瑚	scleractinia II 08	++	+++				++	+		
海草	Cymodocea serrulata 02						+++			
海草	Cymodocea serrulata 04		+							
海草	Cymodocea serrulata 07		+							
海草	Cymodocea serrulata 09		+							
海草	Syringodium isoetifolium 09		+							
海草	Syringodium isoetifolium 12						+			
沉積物	Lagoon 2-12								++	
海綿	東岸外海 E1-3		+++							+
海綿	東岸外海 E1-5	+++								++
海綿	東岸外海 E1-6		+++							
海綿	東岸外海 E1-9	+++								
海綿	北岸外海 N2-2	++	+++					++		
海綿	北岸外海 N2-4	++	+++							
海綿	北岸外海 N2-6	++	+++							
海綿	北岸外海 N2-7	++	+++							
海綿	北岸外海 N2-8	++	+++							
海鞘	瀉湖口 AS-3	+++	++	++	+++	+++				++
海鞘	瀉湖口 AS-5	+	++	++						
海綿	南岸外海 t2-3			++						
海綿	南岸外海 t2-4		++							
海綿	南岸外海 t2-9			++						
海綿	南岸外海 t2-14	++	+							

^a *S.a.* : *Staphylococcus aureus*, *B.c.* : *Bacillus cereus*, *V.h.* : *Vibrio harveyi*, *P.a.* : *Pseudomonas aeruginosa*, *K.p.* :

Klebsiella pneumonia, *S. t.* : *Salmonella typhimurium*, *E. c.* : *Escherichia coli*, *A.b.* : *Acinetobacter baumannii*, *C.a.* :

Candida albicans ; + : weak inhibition (zone of <10 mm of diameter) ; ++ : Moderate inhibition (zone of 10-20 mm) ;

+++ : High inhibition (zone of >20 mm).

5. 活性菌株需鹽性測試

33 株具有抗菌活性之細菌中，26 隻以 16S rRNA 進行定序鑑種，結果如下表 5，其中有 21 株在無鹽分的培養基中無法生長(無法在 PYE plate 生長)，故此可推測為海洋菌。

表 5：生物活性菌之需鹽測試

菌株名稱	Affiliation	NaCl requirement
Leaf 06	<i>Microbulbifer sp.</i>	Yes
sponge 01	<i>Microbulbifer sp.</i>	Yes
sponge 03	<i>Pseudovibrio sp.</i>	Yes
sponge 05	<i>Microbulbifer sp.</i>	Yes
sponge 09	<i>Microbulbifer sp.</i>	Yes
sponge 10	<i>Microbulbifer sp.</i>	Yes
Lagoon 01	<i>Halobacillus sp.</i>	Yes
Cotton 01	<i>Bacillus sp.</i>	No
scleractinia 04	<i>Microbulbifer sp.</i>	Yes
scleractinia II 04	<i>Microbulbifer sp.</i>	Yes
scleractinia II 08	<i>Pseudovibrio sp.</i>	Yes
Cymodocea serrulata 02	<i>Microbulbifer sp.</i>	Yes
Cymodocea serrulata 04	<i>Microbulbifer sp.</i>	Yes
Cymodocea serrulata 07	<i>Microbulbifer sp.</i>	Yes
Cymodocea serrulata 09	<i>Bacillus sp.</i>	Yes
Syringodium isoetifolium 09	<i>Ruegeria sp.</i>	Yes
Syringodium isoetifolium 12	<i>Ruegeria sp.</i>	Yes
Lagoon 2-12	<i>Brevibacillus sp.</i>	No
東岸外海 E1-5	<i>Bacillus sp.</i>	No
北岸外海 N2-2	<i>Pseudovibrio sp.</i>	Yes
北岸外海 N2-4	<i>Pseudovibrio sp.</i>	Yes
北岸外海 N2-7	<i>Pseudovibrio sp.</i>	Yes
北岸外海 N2-8	<i>Pseudovibrio sp.</i>	Yes
瀉湖口 AS-3	<i>Bacillus sp.</i>	No
瀉湖口 AS-5	<i>Bacillus sp.</i>	No
南岸外海 t2-3	<i>Virgibacillus sp.</i>	Yes

需鹽性測試結果，No：可在無鹽分（PYE plate）培養基上生長，為廣鹽性菌；

Yes：無法在無鹽分（PYE plate）培養基上生長，為需鹽性菌。

6. 定序與親緣樹狀圖

鑑定菌種可利用外觀型態以及生化特性來做區別，還可利用分子生物技術，從基因角度探討演化分類。原核生物可使用23S rRNA、16S rRNA、5S rRNA基因序列設計引子做演化分析，通常選用16S rRNA基因，不僅具有高度保留性，而且基因演化速率慢、長度較為適當分析(1500 bp)，此外，16S rRNA具有普遍性，基因資料庫在National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站上，已經有相當豐富資訊以便分析。

33株具有生物活性之菌種，挑出獨特性菌株進行定序，共有26株菌進行後續實驗。取單一菌落萃取DNA，之後使用普遍性16S rRNA primers進行PCR增幅，以電泳確認是否為single band在1.5 K bp的位置，再將PCR產物純化後送基龍米克斯生物科技股份有限公司定序，定序結果用NCBI進行比對後，共分離到7屬，分別為10株*Microbulbifer spp.*、6株*Pseudovibrio spp.*、2株*Ruegeria spp.*、5株*Bacillus spp.*、1株*Halobacillus sp.*、1株*Brevibacillus sp.*、1株*Virgibacillus sp.*，並且下載相似性較高之不同strain菌株的序列，再利用Bioedit軟體編輯序列，將序列CLUSTALW排出其相對位置，將前後端序列切齊，然後使用MEGA軟體進行親緣關係分析。

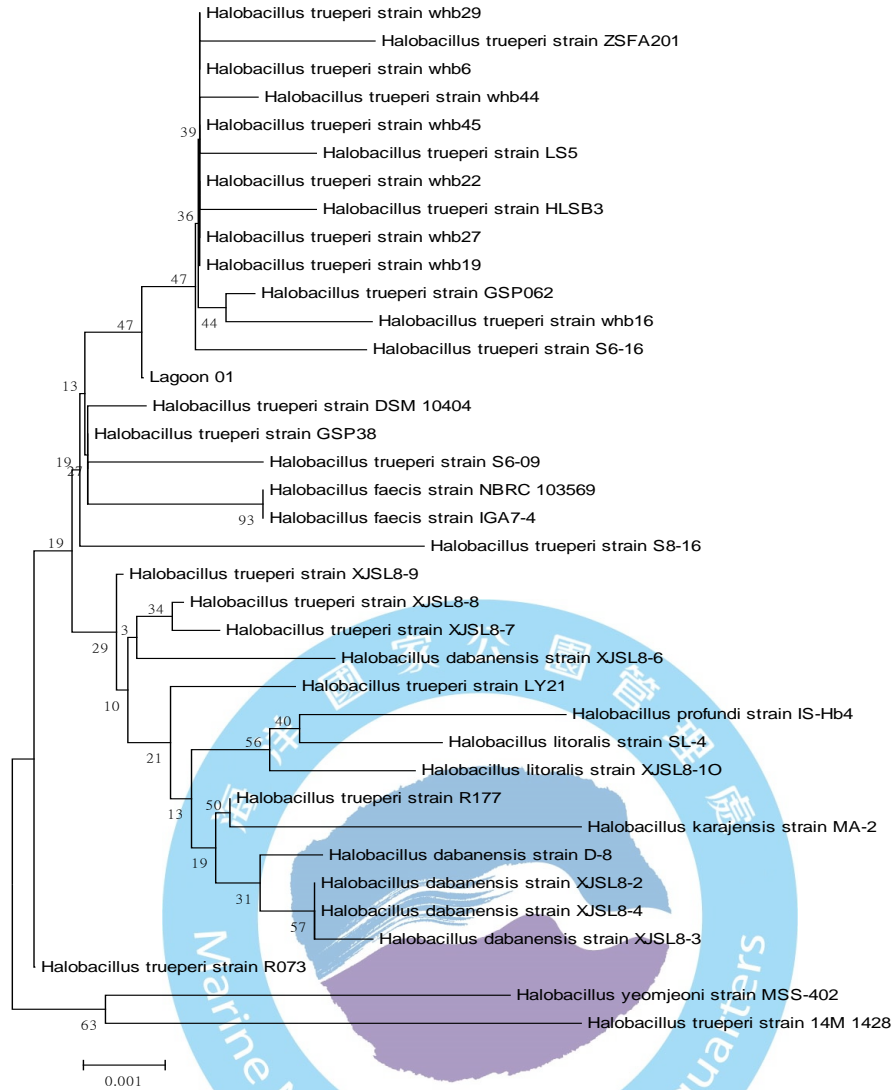


圖 12 : Strain Lagoon 01 之親緣關係分析圖，經由 NCBI 資料庫比對，與 *Halobacillus trueperi* 有 99.7% 相似性。

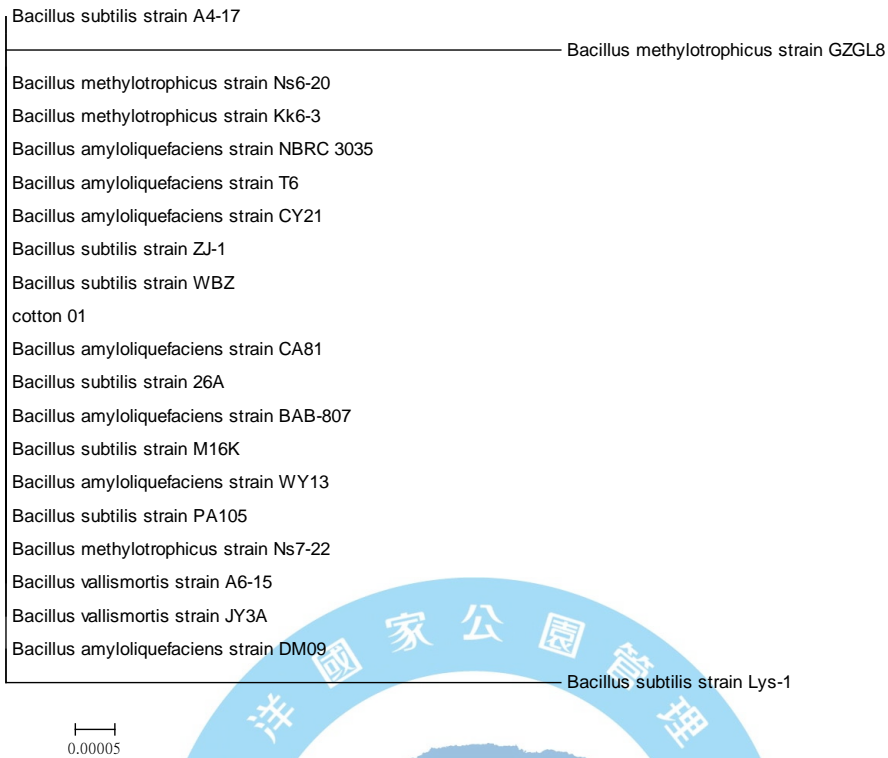


圖13：Strain Cotton 01之親緣關係分析圖，經由NCBI資料庫比對，與*Bacillus amyloliquefaciens*有將近100%相似性。

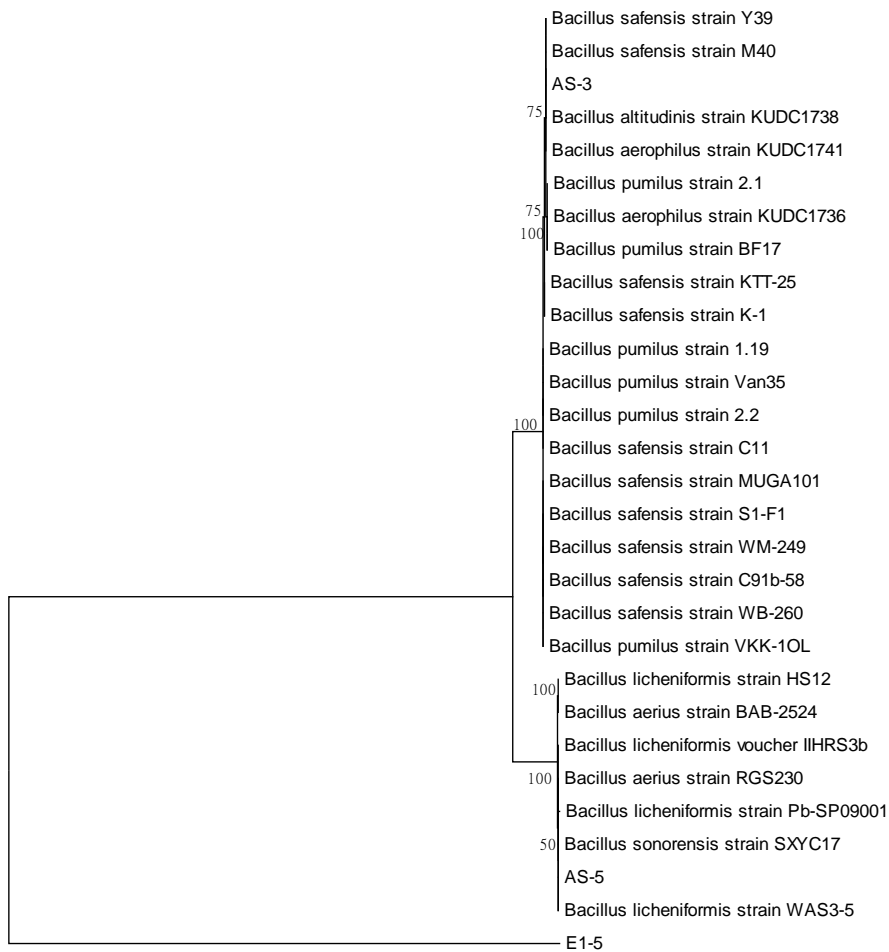


圖 14 : Strain AS-3、AS-5 以及 E1-5 之親緣關係分析圖，經由 NCBI 資料庫比對，AS-3 與 *Bacillus safensis* 有將近 99% 相似性。而 AS-5 與 *B. licheniformis* 有將近 97.5% 相似性。而 E1-5 與 *B. pumilus* 有將近 99% 相似性於 NCBI 資料庫上，卻與樹狀圖中不明顯顯示，E1-5 要再進一步研究。

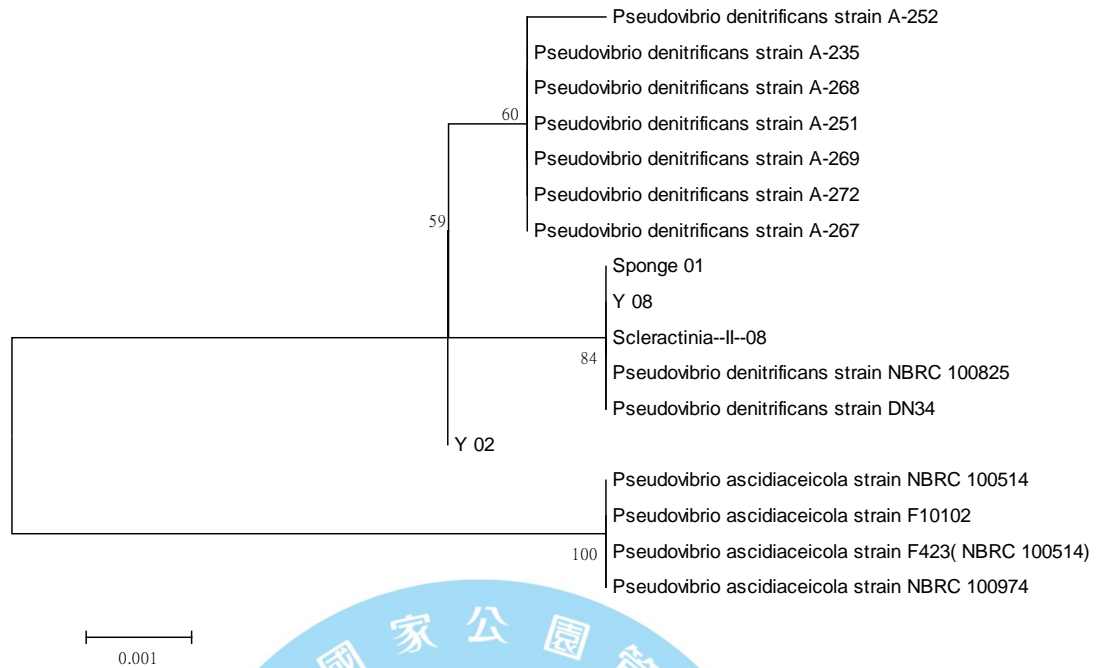


圖15：Strain Sponge 01、Scleractinia II 08之親緣關係分析圖，經由NCBI資料庫比對，與*Pseudovibrio denitrificans*相似性高達99.9%。Scleractinia II 08之親緣關係分析圖，經由NCBI資料庫比對，與*P. denitrificans*相似性高達99.9%。

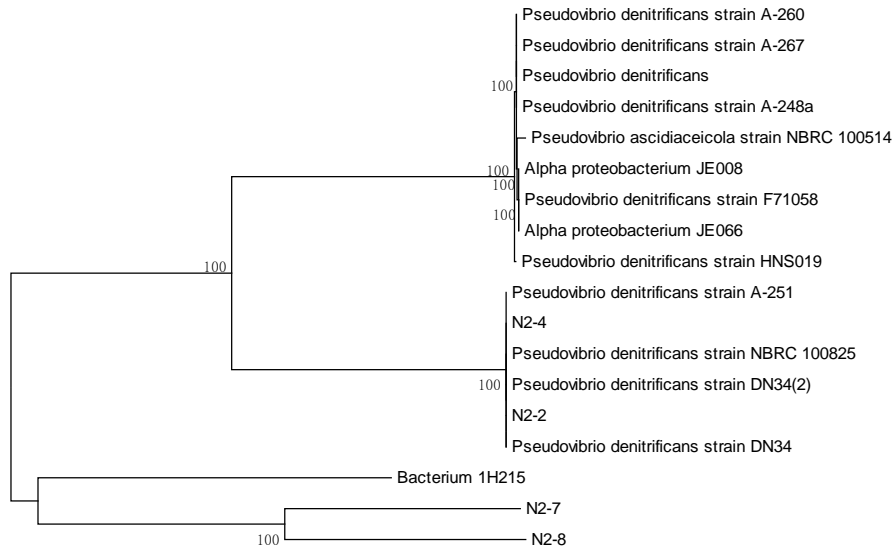


圖16：Strain N2-2、N2-4、N2-7、N2-8之親緣關係分析圖，經由NCBI資料庫比對，N2-2和N2-4與*Pseudovibrio denitrificans*相似性高達99%。而N2-7、N2-8與*P. denitrificans*有將近99%相似性於NCBI資料庫上，卻與樹狀圖中不明顯顯示，N2-7、N2-8要再進一步研究。N2-7、N2-8在親緣關係分析圖顯示，兩個可能較為相近的屬種。

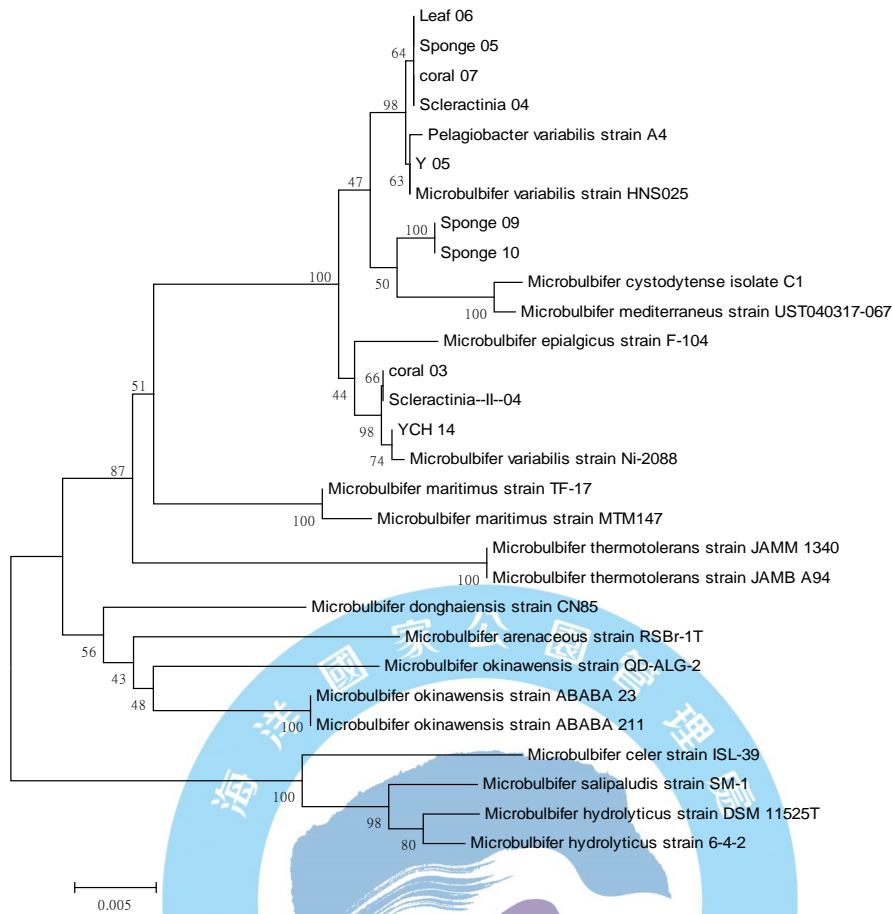


圖17：*Microbulbifer* spp.之親緣關係分析圖，經由NCBI資料庫比對，Strain Leaf 06與*M. variabilis*有99.9%相似性；Strain Sponge 05與*M. variabilis*有99.8%相似性；Strain Sponge 09與*M. variabilis*有99.1%相似性；Strain Sponge 10與*M. variabilis*有99.1%相似性；Strain Scleractinia 04與*M. variabilis*有99.9%相似性；Strain Scleractinia II 04與*M. variabilis*有99.8%相似性。

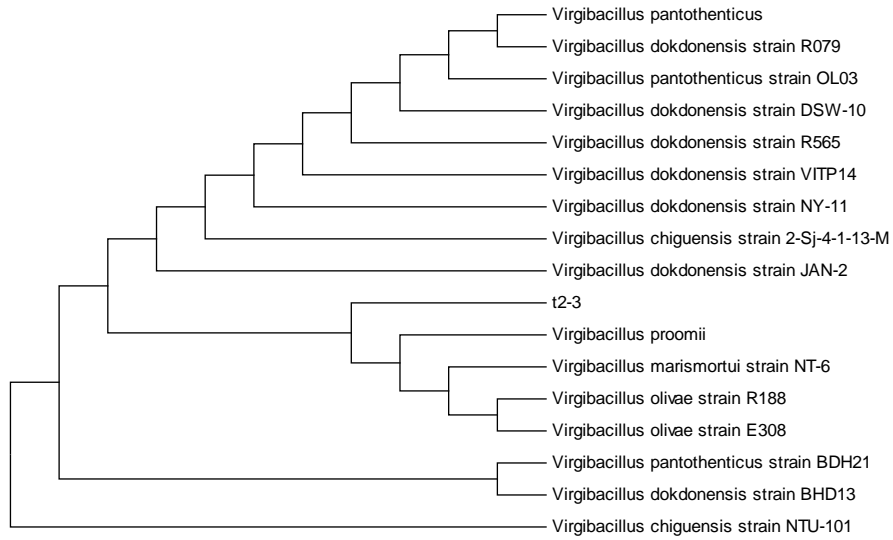
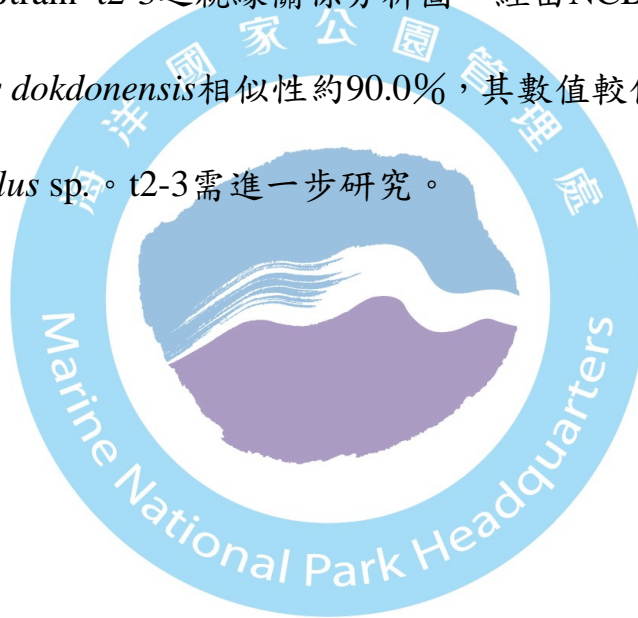


圖18：Strain t2-3之親緣關係分析圖，經由NCBI資料庫比對，與*Virgibacillus dokdonensis*相似性約90.0%，其數值較低，目前只能判定為*Virgibacillus* sp.。t2-3需進一步研究。



七、結論

這次研究結果顯示出，在東沙島沿岸(北岸、東岸、南岸外海、瀉湖口)大約有 80% 所分離到的菌株為海洋菌，相對於台灣南岸分離出的海洋菌大約佔總菌株數的 30%，有較高機率分離到海洋菌(圖 19 和圖 20)。推測在台灣南岸所分離的海洋菌可能因為海域受到人為汙染而無法有效地確認具有活性效果之菌株，在需鹽測試結果為不需鹽細菌下，判斷是否為海洋細菌或是陸源細菌。東沙島總共分離出 193 隻細菌，有 26 隻菌具有良好活性而有作延續實驗。其中僅 5 隻難以判斷是否為海洋菌(表 5)。將這 26 隻活性菌以 16S rRNA 定序，用 NCBI 進行比對後，共分離到 7 屬，分別為 10 株 *Microbulbifer spp.*、6 株 *Pseudovibrio spp.*、2 株 *Ruegeria spp.*、5 株 *Bacillus spp.*、1 株 *Halobacillus sp.*、1 株 *Brevibacillus sp.*、1 株 *Virgibacillus sp.* 其種類特殊多樣性高。利用 Reaxys 做資料搜尋所得: *Microbulbifer spp.* 結果顯示共有 9 個化合物被分離出(表 6)，*Ruegeria spp.* 結果顯示共有 8 個化合物被分離出(表 7)，*Halobacillus spp.* 結果顯示共有 6 個化合物被分離出(表 8)，*Brevibacillus spp.* 結果顯示共有 8 個化合物被分離出(表 9)。代表這以上屬種尚未有完整的資料庫，具有開發潛能。且這 7 屬皆可在文獻搜尋到為海洋菌屬。

從東沙島所獲取的海洋細菌，無論在海洋菌的分離機率，或是在菌種的特殊性，都給予很大的研究動力與探索資源。往後可以更進一步討論，在此特別的自然環境中，所產生的二次代謝物，其骨架和特徵官能基變異程度，是否與台灣南岸分離出的二次代謝物有明顯不同。探討東沙島海洋細菌的特殊性為未來值得研究的主題。

圖 19 : 比較台灣周遭沿海與東沙島所分離出的活性菌株

墾丁國家公園採集菌株之分析圖

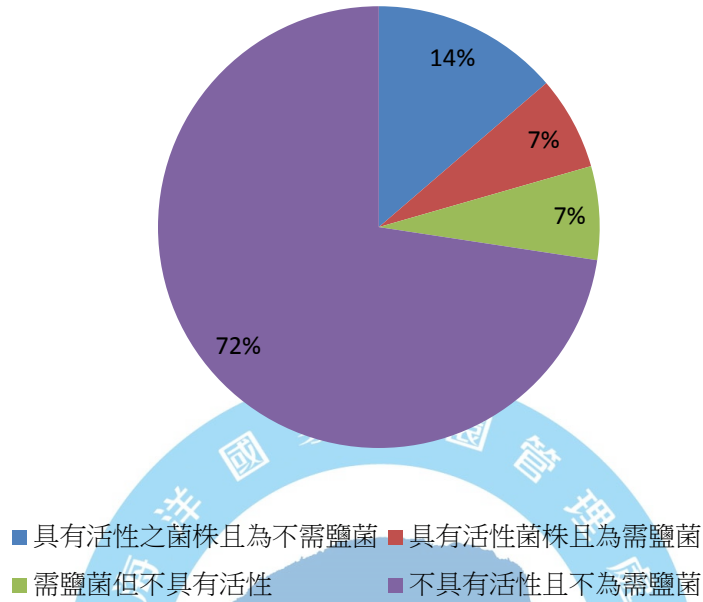


圖 20 : 比較台灣周遭沿海與東沙島所分離出的需鹽菌株(海洋菌)

東沙群島採集菌株之分析圖

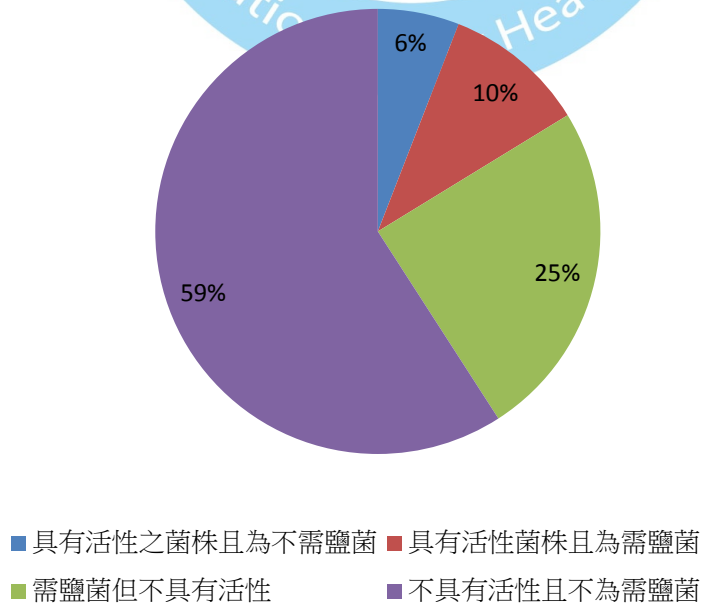


表 6 : *Microbulbifer spp.* 於 Reaxys 結果顯示共有 9 個化合物被分離出

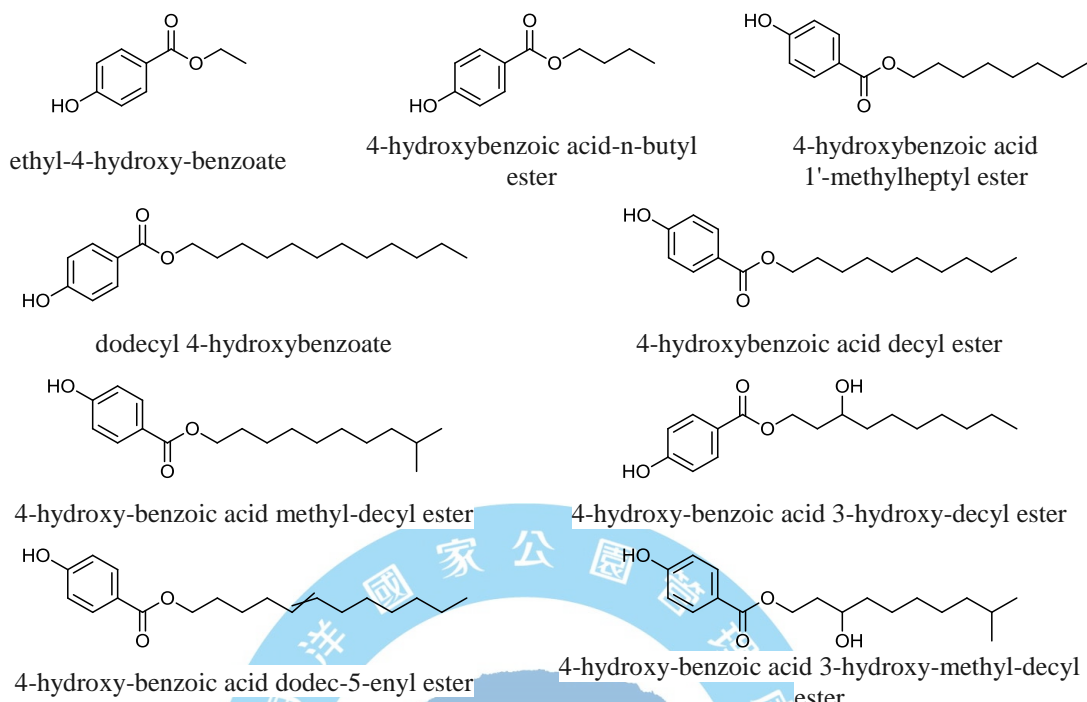


表 7 : *Ruegeria spp.* 於 Reaxys 結果顯示共有 8 個化合物被分離出

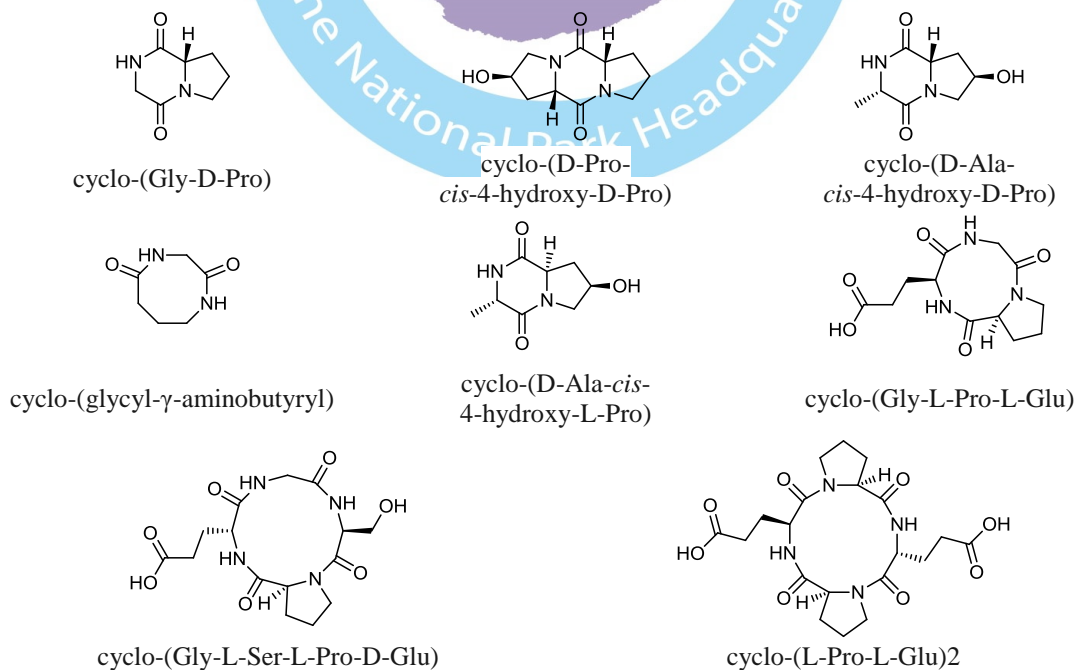
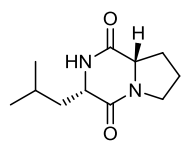
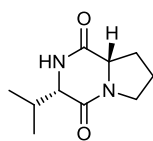


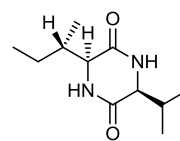
表 8 : *Halobacillus spp.* 於 Reaxys 結果顯示共有 6 個化合物被分離出



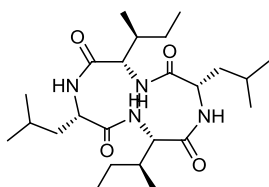
cyclo(D-Leu-D-Pro)



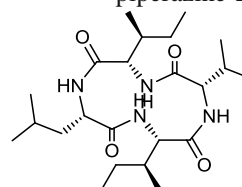
cyclo(D-pro-D-Val)



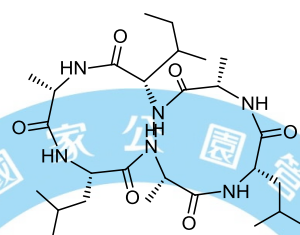
(3*S*,6*S*)-3-*sec*-butyl-6-isopropyl
piperazine-2,5-dione



cyclo(L-Leu-L-Ile)₂



halolitoralin C



halolitoralin A

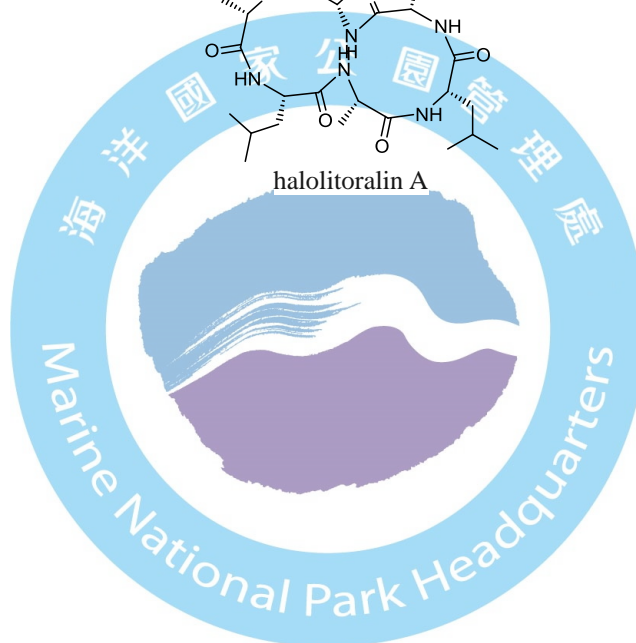
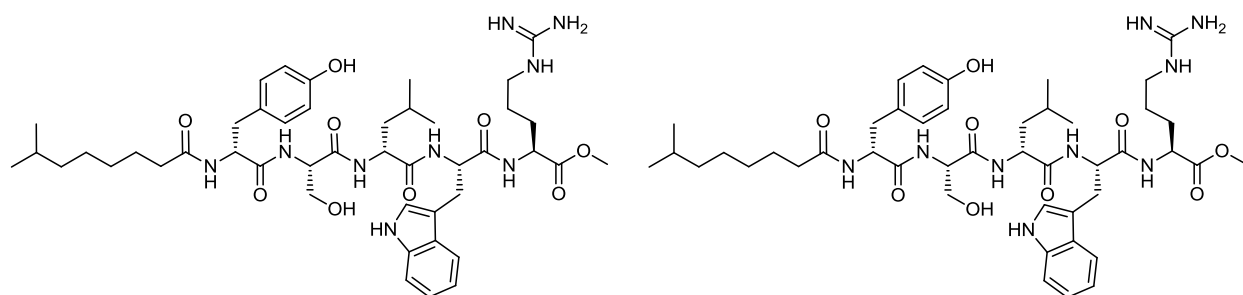
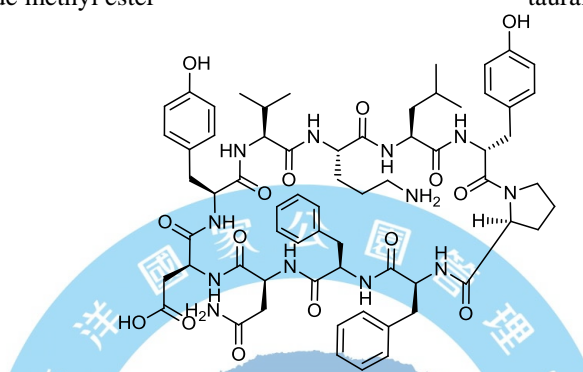


表 9 : *Brevibacillus spp.* 於 Reaxys 結果顯示共有 8 個化合物被分離出

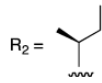
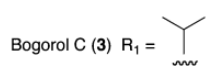
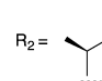
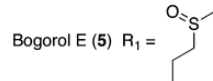
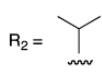
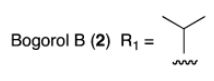
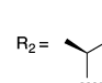
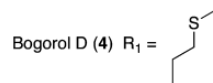
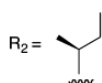
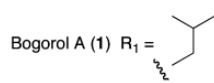
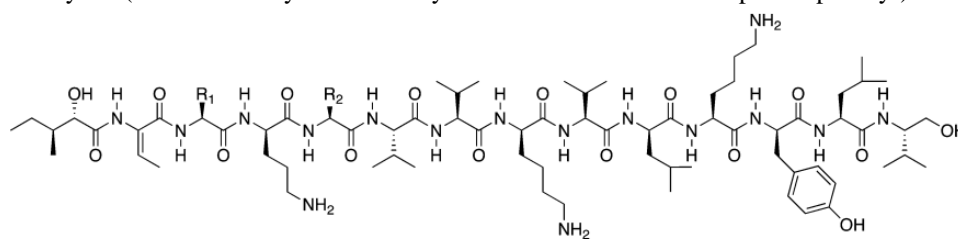


tauramide methyl ester

tauramide ethyl ester



cyclic (L-Va-L-ornithyl-L-Leu-D-Tyr-L-Pro-L-Phe-D-Phe-L-Asp-L-Asp-L-Tyr)



八、參考文獻

1. 鄭明修等, 東沙海域生態資源基礎調查研究. 中華民國珊瑚學會: **2005**.
2. Fraenkel.; Gottfried S., The raison d'etre of secondary plant substances. *Scienc*, **1959**, 129, 1466–1470
3. 宋克義等, 東沙環礁北側礁台生物多樣性及棲地組成調查. 國立中山大學: **2012**.
4. 林幸助等, 東沙海域海草床生物群及調查與指標物種評估. 國立中興大學: **2011**.
5. 戴昌鳳等, 東沙環礁國家公園自然資料與經營管理策略評析成果報告. 國立台灣大學: **2012**.
6. 行政院環境保護署公告訂定「底泥採樣方法 (NIEA S104.31B)」: **2012**.
7. Keller, N.P., G.Turner and J.W. Bennett.; Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.*,**2005**, 3, 937-947
8. Kumar, S., K.Tamura and M. Nei. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, **2004**, 5, 150-163
9. DerMarderosian, A.; Beutler, J. A. *The review of natural products: the most complete source of natural product information*. Lippincott Williams & Wilkins; Third edition, **2002**.
10. Edwin J. Debeer and Marion B. Sherwood, The Paper-disc Agar-plate

Method for the Assay of Antibiotic Substances. New York, **1945**

11. Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M "Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections". *Microbes Infect*, **2000**, 2, 189–198
12. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H; Van Belkum; Verbrugh."Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks". *Clin. Microbiol. Rev*, **1997**, 10, 505–520.
13. Everest, Paul, et al. "Evaluation of *Salmonella typhimurium* Mutants in a Model of Experimental Gastroenteritis." *Infection and Immunity* 67.6 (June 1999): 2815-2821. *Infection and Immunity*, American Society for Microbiology, **2007**.
14. Podschun, R. and Ullmann U. "*Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors". *Clin. Microbiol. Rev.*, **1998**, 11, 589-603.
15. alcht, Aldona; Smith, Raymond (1994). *Pseudomonas aeruginosa: Infections and Treatment*. *Informa Health Care*.1994, 83–84.
16. Austin B & Zhang X-H. "*Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates". *Lett. Appl. Microbiol.*, **2006**, 43, 19–214
17. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. "Diversity of the human intestinal microbial flora" *Science*, **2005**, 308, 1635–1638
18. Sullivan, DR; Shields, J; Netzer, G "Fatal case of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* necrotizing fasciitis." . *Am. Surg.*, **2010**, 76, 651–653.

19. Watts, C. J.; Wagner, D. K.; Sohnle, P. G., Fungal Infections, Cutaneous. In *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, Editor-in-Chief: Moselio, S., Ed. Academic Press: Oxford, **2009**, 382-388.

