



國立台灣大學理學院海洋所

碩士論文

Institute of Oceanography

College of Science

National Taiwan University

Master Thesis

兩株台灣軸孔珊瑚內生桿菌屬新種

之特性與基因體分析

Characterization and Genomic Analysis of Two Novel
Endozoicomonas Species from Coral *Acropora* in
Taiwan

邱育敬

Yu-Jing Chiou

指導教授：湯森林 博士、謝志豪 博士

Advisor: Sen-Lin Tang, Ph.D., Chih-hao Hsieh, Ph.D.

中華民國 109 年 7 月

July, 2020



誌謝

終於繳交論文了，實在很難令人想像兩年的時光就這樣過去了，想到一開始進實驗的時候從每一天都過的很有壓力到漸漸發現研究的快樂甚至有想要念博班的想法，這一切都要感謝身邊的貴人們。首先是我的父母，感謝他們在這兩年來讓我衣食無缺，不用擔心生活可以專心的唸書。感謝資翰在一旁鼓勵我，即使我們走的專業不同，你也不清楚我的研究內容，但當我心情低落的時候你總是會鼓勵我，讓我繼續往前。感謝湯森林老師總是在討論的時候給我靈感，也適時的提點我，老師總是讓我做我想做的試驗，不用擔心實驗金費的問題。感謝實驗室的同事 Mia 、星儒、志穎、雅帆在實驗上的幫助與指導，感謝聖平增進我的潛水氣瓶數，感謝 Nao 都會與我討論我發現的結果，即使都是一些初淺的發現，感謝 Kshitij 把手把的教我生物資訊的知識，即使你們看不懂中文，我也想要在我的誌謝寫到你們兩個，最後感謝我的同學，實驗室好夥伴 Bug，一起去學校一起當台大邊緣人、FQ (豐錡) 一起講幹話、還有可愛的學妹琪琪，好潛伴冠言、莞謙，還有一起聊天的小羽，感謝你們豐富我的實驗室生活，最後我終於畢業了～希望這不是我最後一本論文，再一次謝謝大家。



摘要

珊瑚擁有不同的微生物夥伴，比如真菌、藻類及細菌等，且彼此有著複雜的交互作用。珊瑚的不同部位居住著不同的微生物，其中有一屬的細菌被稱為內生桿菌，常被發現在珊瑚的黏液及組織中。內生桿菌群集的豐度會隨著珊瑚的健康程度而有所不同，相比於生病的或受環境壓迫的珊瑚，健康的珊瑚體具有較高豐度的內生桿菌，因此內生桿菌被認為與珊瑚健康有關係，並且被認為是一群珊瑚健康的益生菌。近年來，環境快速變遷導致珊瑚大量死亡，益生菌成為其中一個拯救或復育珊瑚的手段。內生桿菌為珊瑚益生菌的重要候選菌種之一，但目前由石珊瑚分離的可培養內生桿菌只有兩株，其中 *Endozoicomonas montiporae* CL-33^T 為第一株具有基因體序列的內生桿菌，並且在基因體分析中發現 *E. montiporae* CL-33^T 具有與宿主互動的基因而且可能在珊瑚遇到逆境時保護宿主的粒線體，來防止其失去功能，並且當珊瑚沒有足夠的葡萄糖時可以促使宿主轉而利用脂質，促進糖質新生。今年另一個研究從基因體方面證實了內生桿菌藉由代謝二甲基硫基丙酸(dimethylsulfoniopropionate, DMSP)，產生氣候調節化合物，二甲基醚(dimethyl sulfide, DMS)參與珊瑚的硫循環。

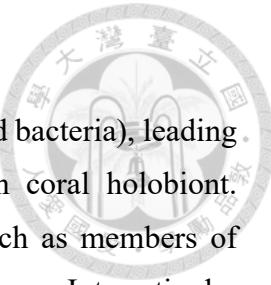
鑑於目前只有兩株由珊瑚分離的內生桿菌，分離更多可培養的內生桿菌可以幫助我們更瞭解其與珊瑚可能的互動關係。在這個研究中，我們分別由澎湖及墾丁分離兩株新的內生桿菌，*E. penghunesis* 4G 與 *E. ruthgatesii* 8E，兩株菌與最近的內生桿菌 *E. euniceicola* 16S rRNA 的親緣關係相似性分別為 96.68% 及 96.99%。兩株菌在最適生長溫度、鹽度及酸鹼值上展現了不同的特性，*E. ruthgatesii* 8E 的最適生長溫度為 25°C、pH 值 7、鹽度 1-2%，而 *E. penghunesis* 4G 則最適合生長於 20 至 25°C，pH 值 8、鹽度 1-2%。除此之外，我們也將兩株新菌進行基因體定序，並且獲得低污染(污染<1%)，接近完整(>97%)的基因體。在基因體大小上，*E. penghunesis* 4G 為 5.73 Mb，*E. ruthgatesii* 8E 則具有目前內生桿菌中最大的基因體，7.1Mb，也具有假定可以將 DMSP 當成碳源並代謝成 DMS 的基因操縱組。進一步我們量化從珊瑚分離出的這四株內生桿菌消耗 DMSP 與產生 DMS 的濃度，並發現 *E. ruthgatesii* 8E 相比於 *E. acropora* Acr-14^T 可以消

耗更多的 DMSP。最後本論文提出兩株內生桿菌屬新種，並首度量化珊瑚優勢共棲菌的 DMSP 消耗量及 DMS 產生量。



關鍵字：內生桿菌、軸孔珊瑚、基因體分析、生理特性分析

Abstract

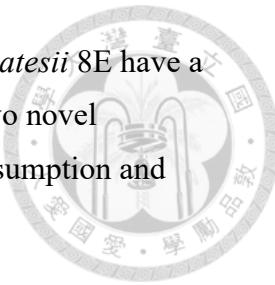


Corals harbor diverse microbial partners (e.g., fungi, algae, and bacteria), leading to complex yet intriguing mesh of interactions among and within coral holobiont. Different organs of coral harbor diverse microbial communities, such as members of genus *Endozoicomonas* are abundant in coral mucus and epidermal tissues. Interestingly, *Endozoicomonas* are often abundant in healthy corals and their abundance declines in diseased or stressed corals, consequently, members of this genus are hypothesized to be potential probiotics of coral health. Recently, the identification of beneficial microorganisms for coral has been at the center of developing probiotics for coral reefs to mitigate stress from heat-induced coral bleaching. *Endozoicomonas* species which are potential candidates for coral probiotics lack cultured isolates with only two species isolated from scleractinian corals. *Endozoicomonas montiporae* CL-33^T the first cultured and genome sequenced isolate has been shown to have the potential to internalize and interact with host cells and harbor genes to protect mitochondrial dysfunction and promote gluconeogenesis in the host. A recent study provided first genomic and functional evidence of the role of *Endozoicomonas* in the coral sulfur cycle by metabolizing dimethylsulfoniopropionate (DMSP) to climate active gas dimethylsulfide (DMS).

With only two cultured isolates to date, it becomes important to identify and culture new species from this diverse genus in order to ascertain its role in coral reefs. In this study, we isolated and cultured two novel bacteria species, *E. penghuensis* 4G and *E. ruthgatesii* 8E from dominant coral *Acropora* sp. of the coast of Penghu Archipelago and Kenting, Taiwan, respectively. The nearest neighbor of these new species is *E. eunicicola* (16S rRNA gene identity: 96.68%, 96.99% respectively).

The two isolates exhibit different physiological and biochemical characteristics (optimal pH, temperature and salinity). *E. ruthgatesii* 8E grows in on optimal temperature of 25 °C, with an optimal pH of 7 and salinity 1-2 %, whereas *E. penghuensis* 4G grows at a temperature of 20-25 °C, a pH, and salinity of 8 and 1-2%, respectively. Furthermore, we sequenced and assembled high-quality (contamination <1%) near-complete (>97%) draft genomes of the two species. *E. ruthgatesii* 8E has the largest genome (7.1 Mb) in cultured species of *Endozoicomonas* to date, but *E. penghuensis* 4G has a genome size (5.73 Mb) comparable other species. *E. ruthgatesii* 8E harbors a putative operon to metabolize DMSP to DMS and use it as a carbon source. Quantification of DMSP usage by *E. ruthgatesii* 8E shows that it can metabolize more DMSP than previously characterized *E. acroporae*. Further, genomic analysis is

being conducted to answer the intriguing question, why does *E. ruthgatesii* 8E have a disproportionate genome size. Overall, in this study we discovered two novel *Endozoicomonas* species and is the first study to quantify DMSP consumption and DMS production by a coral-associated dominant bacterium.

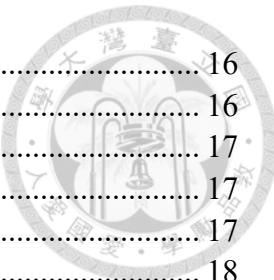


Keywords: *Endozoicomonas*, *Acropora* sp., genomic analysis, physiological analysis.

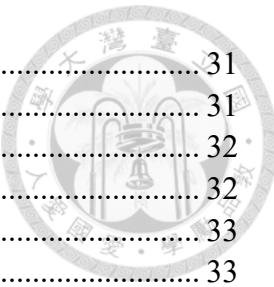
目錄



誌謝	i
摘要	ii
Abstract.....	iv
目錄	vi
圖目錄	ix
表目錄	xi
中英文對照表	xii
一、前人研究	1
1.1 珊瑚簡介	1
1.1.1 珊瑚礁生態系	1
1.1.2 造礁珊瑚	1
1.2 珊瑚與其微生物	2
1.2.1 珊瑚共生體	2
1.2.2 珊瑚不同部位的共棲菌	3
1.3 內生桿菌	5
1.3.1 內生桿菌與其宿主的關係	6
1.3.2 內生桿菌之區域性	7
1.3.3 內生桿菌基因體特性	7
1.4 內生桿菌屬與珊瑚之間的互動	8
1.5 研究動機與目的	10
二、材料與方法	11
2.1 採樣時間、地點及物種	11
2.2.1 富營養培養基配方	11
2.2.2 基本培養基配方	11
2.2 內生桿菌分離培養	11
2.2.1 菌種純化	11
2.2.2 菌株保存	12
2.2.3 富營養培養基配方	12
2.2.4 聚合酶連鎖反應	13
2.2.5 基本培養基配方	13
2.3 微生物形態觀察	14
2.3.1 穿透式電子顯微鏡菌體觀察	14
2.3.2 穿透式電子顯微鏡菌體切片觀察	14
2.3.3 場發射掃描式電子顯微鏡菌落觀察	15
2.3.4 解剖式顯微鏡菌落形態觀察	16
2.3.5 革蘭氏染色	16



2.4 生長與生理生化特性分析	16
2.4.1 生長曲線	16
2.4.2 最佳溫度生長測試	17
2.4.3 最佳鹽度生長測試	17
2.4.4 最佳酸鹼值生長測試	17
2.4.5 氧氣需求測試	18
2.4.6 氧化酶測試	18
2.4.7 觸酶測試	18
2.4.8 運動性觀察-軟洋菜運動性觀察	19
2.4.9 API ZYM 套組試驗	19
2.4 基因體分析	19
2.5.1 全基因體次世代定序	19
2.5.2 基因體序列組裝	20
2.5.3 基因體組裝品質鑑定	20
2.5.4 基因體註解	20
2.5.5 原噬菌體分析	21
2.5.6 第三型分泌蛋白 (Type III Secretion System proteins, T3SS)	21
2.5.7 16S rRNA 親緣關係樹	22
2.5.8 DddD 親緣關係樹	22
2.6 DMSP 代謝成 DMS 的能力	22
2.6.1 DMSP 共培養	22
2.6.2 鹼調控裂解 DMSP 減量線製備	23
2.6.3 DMS 減量線製備	23
2.6.4 鹼調控裂解 DMSP 及 DMS 定量	24
三、結果	26
3.1 菌種分離及初步鑑定	26
3.1.1 PCR 初步鑑定結果	26
3.2 形態學分析	26
3.2.1 菌落形態	26
3.2.2 草蘭氏染色	27
3.2.3 穿透式電子顯微鏡菌體形態	27
3.2.4 超薄切片穿透式電子顯微鏡鏡檢	27
3.2.5 場發式發射掃描式電子顯微鏡菌落觀察	28
3.3 生理生化特性分析	28
3.3.1 最適生長鹽度	28
3.3.2 最適生長 pH	28
3.3.3 最適生長溫度	29
3.3.4 生長曲線	29
3.3.5 氧氣耐受性	29
3.3.6 氧化酶與催化酶測定	30
3.3.7 軟培養基運動性觀察	30
3.3.8 API ZYM 酵素活性反應套組反應結果	30
3.4 基因體分析	31
3.4.1 全基因體次世代定序	31



3.4.2	基因體組裝結果	31
3.4.3	基因體品質鑑定	31
3.4.4	基因體註解及基因預測	32
3.4.5	原噬菌體分析	32
3.4.6	第三型分泌系統分析 (T3SS) 分析	33
3.4.7	16S rRNA 親緣關係樹	33
3.4.8	DddD 親緣關係樹	34
3-5	DMSP 分解成 DMS 的活性	34
3.5.1	DMSP 不同濃度試驗	34
3.5.2	鹼調控裂解 DMSP 減量線	35
3.5.3	鹼調控裂解 DMSP 定量	35
3.5.4	DMS 減量線	36
3.5.5	DMS 定量	36
四、討論		38
4.1	電子顯微鏡觀察的菌體形態學	38
4.2	生理生化特徵	39
4.3	基因體功能	41
4.3.1	原噬菌體	41
4.3.2	移動能力及化學趨性	42
4.3.3	滲透壓調節物質	43
4.4	DMSP 與 DMS 定量	43
4.4.1	DMSP 消耗量	44
結論與展望		46
圖與表		47
參考文獻		98

圖目錄

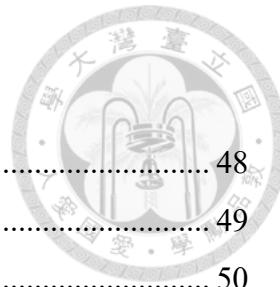


圖 2-1 採樣地點與軸孔珊瑚	48
圖 2-2 厭氧培養盒	49
圖 2-3 定量 DMSP 及 DMS 使用的器材	50
圖 3-1 <i>E. ruthgatesii</i> 8E 內生桿菌專一性引子增幅結果	51
圖 3-2 <i>E. penghuensis</i> 4G 內生桿菌專一性引子增幅結果	52
圖 3-3 內生桿菌菌落型態	53
圖 3-4 <i>E. ruthgatesii</i> 8E 草蘭氏染色結果	54
圖 3-5 <i>E. ruthgatesii</i> 8E 與 <i>E. penghuensis</i> 4G 的形態觀察	55
圖 3-6 <i>E. ruthgatesii</i> 8E & <i>E. penghuensis</i> 4G 切片觀察	56
圖 3-7 <i>E. penghuensis</i> 4G 菌體切片特殊結構	57
圖 3-8 <i>E. ruthgatesii</i> 8E & <i>E. penghuensis</i> 4G 菌落觀察	58
圖 3-9 鹽度生長試驗	59
圖 3-10 酸鹼值生長試驗	60
圖 3-11 溫度生長試驗	61
圖 3-12 內生桿菌 72hr 生長曲線	62
圖 3-13 氧氣耐受性	63
圖 3-14 催化酶試驗	64
圖 3-15 氧化酶試驗	65
圖 3-16 軟洋菜運動性觀察	66
圖 3-17 <i>E. penghuensis</i> 4G 軟洋菜運動性觀察	67
圖 3-18 基因體序列品質	68
圖 3-19 內生桿菌的 RAST 次系統比例	69
圖 3-20 RAST 註釋次系統中與胺基酸相關基因比例	70
圖 3-21 RAST 註釋次系統中與壓力反應相關基因比例	71
圖 3-22 內生桿菌化學趨性、鞭毛合成及運動能力相關基因數量	72
圖 3-23 DMSP 代謝操縱組	73
圖 3-24 內生桿菌屬 16S rRNA 親緣關係樹	74
圖 3-25 DddD 蛋白親緣關係樹	75
圖 3-26 不同 DMSP 濃度下的生長情形	76
圖 3-27 鹼調控裂解 DMSP 減量線	77

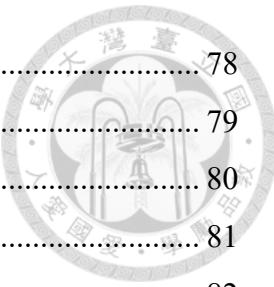


圖 3-28 DMS 減量線	78
圖 3-29 內生桿菌 DMS 產生量	79
圖 3-30 內生桿菌 DMSP 消耗量。	80
圖 3-31 DMSP 及 DMS 定量實驗細菌生長情形	81
圖 3-32 鹼調控 DMSP 定量的 DMS 訊號	82
圖 3-33 DMS 定量訊號	83
圖 3-34 內生桿菌原噬菌體註解	84
圖 3-35 Glycine Betaine 合成及催化途徑	85

表目錄



表 2.1 MMBV4 培養基配方.....	86
表 2.2 基本培養基配方	87
表 2.3 API ZYM 套組反應結果對照表	88
表 3-1 已知內生桿菌的生理特性與分離來源及地點.....	89
表 3-2 API ZYM 套組結果.....	90
表 3-3 內生桿菌序列去除 adapter 前後結果	91
表 3-4 基因體組裝參數.....	92
表 3-5 基因體組裝品質	93
表 3-6 內生桿菌之基因體特徵.....	94
表 3-7 內生桿菌屬原噬菌體.....	95
表 3-8 內生桿菌屬第三型分泌系統基因數量	96
表 3-9 已知內生桿菌屬菌種與 <i>E. ruthgatesii</i> 8E 及 <i>E. penghunesis</i> 4G 的相似性....	97

中英文對照表



多孔軸孔珊瑚	<i>Acropora millepora</i>
指型軟珊瑚	<i>Alcyonecean octocorals</i>
楊氏軸孔珊瑚	<i>Acropora yongei</i>
萼形柱珊瑚	<i>Stylophora pistillata</i>
隱藏角菊珊瑚	<i>Favia abdita</i>
美麗軸孔珊瑚	<i>Acropora muricata</i>
地中海珊瑚	<i>Oculina patagonica</i>
細枝鹿角珊瑚	<i>Pocillopora damicornis</i>
束真葉珊瑚	<i>Euphyllia glabrescens</i>
輻板軸孔珊瑚	<i>Acropora cytherea</i>
手指珊瑚	<i>Porites compressa</i>
麋鹿角珊瑚	<i>Acropora palmata</i>
鹿角軸孔珊瑚	<i>Acropora cervicornis</i>
桌形軸孔珊瑚	<i>Acropora hyacinthus</i>
叢生棘杯珊瑚	<i>Galaxea fascicularis</i>
突星表孔珊瑚	<i>Montipora monasteriata</i>
籬枝軸孔珊瑚	<i>Isopora palifera</i>
癟葉表孔珊瑚	<i>Montipora aequituberculata</i>
枝狀多目珊瑚	<i>Madrepora oculata</i>
柳珊瑚	<i>Eunicella cavolini</i>
柔枝軸孔珊瑚	<i>Acropora tenuis</i>
變異軸孔珊瑚	<i>Acropora valida</i>
疣鹿角珊瑚	<i>Pocillopora verrucose</i>
矛枝軸孔珊瑚	<i>Acropora aspera</i>
趾形軸孔珊瑚	<i>Acropora humilis</i>
珊瑚共生藻	<i>Symbiodiniaceae</i>
二甲基巯基丙酸	Dimethylsulfoniopropionate, DMSP
二甲硫醚	Dimethyl sulfide, DMS



一、前人研究

1.1 珊瑚簡介

1.1.1 珊瑚礁生態系

珊瑚礁生態系是海洋中生產力最高，生物多樣性最豐富的生態系之一，儘管珊瑚礁的面積僅佔全球約 0.05% ($255,000 \text{ km}^2$)(Spalding & Grenfell 1997)，卻容納了世界上約四分之一的海洋生物。珊瑚礁主要由珊瑚分泌的碳酸鈣骨骼經長時間堆積形成。因地質作用，地形的抬升或海平面的上升使珊瑚礁與陸地之間的相對位置不同，可分為裙礁(fringing reefs)、堡礁(barrier reefs)及環礁(atoll)。這些不同形態的珊瑚礁，可以減緩海浪直接侵蝕，間接保護沿岸地區的其他生態系，如紅樹林、海草床等等，形成一個物理性的阻隔(Daly et al. 2003)。珊瑚形成的複雜三維結構，除了保護沿岸生態外還提供了不同海洋生物棲息地和庇護的場所，珊瑚礁生態系具有很高的初級生產力(Carpenter 1985)，可支持不同生物在這裡生活。綜合不同的特色和因素，使珊瑚礁擁有豐富的生物多樣性。

這個豐富的生態系卻受全球暖化嚴重的影響，二十世紀初，海水平均溫度已經上升 0.74°C ，海洋酸鹼值也增加了 0.1 pH (Solomon et al. 2007)，因為海水溫度上升(Brown 1997)及海洋酸化導致珊瑚礁生態系正逐漸瓦解。從 1980 年代起，印度太平洋至加勒比海開始發生珊瑚白化事件(Glynn 1991)，而後珊瑚白化的情形在世界各地未曾停歇，近年於 2014 年至 2017 年間發生全球規模的珊瑚白化事件(Eakin et al. 2019)，間接性的珊瑚白化事件使澳洲大堡礁在 2017 年已經有約 $2/3$ 的珊瑚白化(McDermott 2020)，同樣非常嚴重的珊瑚白化在 2016 年日本南部的西石(Sekisei)瀉湖約有 94.8% 的珊瑚白化(Nakamura 2017)，可見全世界的珊瑚礁生態系正面臨著生存上的考驗，全球的珊瑚礁生態系正面臨著嚴苛的生存壓力。。

1.1.2 造礁珊瑚

主要的造礁珊瑚為六放珊瑚(hexacoral)，六放珊瑚在現今的分類系統中屬於刺絲胞動物門(Cnidaria)，花蟲亞門(Anthozoa)的六放珊瑚亞綱(Hexacorallia)。六放珊瑚因為珊瑚蟲觸手與腸腔分隔皆為六或是六的倍數

而被稱作六放珊瑚，其中六放珊瑚綱的成員有石珊瑚目(*Scleractinia*)、菟葵(*Zoantharia*)、角珊瑚(*Antipatharia*)等等共六個目。石珊瑚目則為主要造礁的珊瑚種類，不同的種類的石珊瑚具有不同的鈣化速率，其中生長快速的多孔軸孔珊瑚，當環境條件適合時每小時可以產生 0.11 至 0.30 mg 的碳酸鈣骨骼 (Wijgerde et al. 2014)。除了六放珊瑚外，被歸類為非造礁珊瑚的八放珊瑚，不會形成實體的硬骨骼，只具有鈣化骨針，但有研究發現在墾丁南灣中的指型軟珊瑚會於基部將鈣質骨針膠結形成柱形骨針岩(Jeng et al. 2011)，顯示軟珊瑚對造礁仍具有一定的貢獻。

1.2 珊瑚與其微生物

1.2.1 珊瑚共生體

珊瑚本身與生活在珊瑚內的微生物，整體稱為珊瑚共生體(coral holobiont) (Thompson et al. 2015)，這些微生物主要成員包括共生藻(*Symbiodiniaceae*)、細菌、古菌及病毒等，彼此之間有著複雜的交互作用，分別對珊瑚可能提供不同的功能(Peixoto et al. 2017)。其中最廣為人知的微生物為共生藻，藉由光合作用提供珊瑚生長所需主要能量來源，與珊瑚已共同演化發展出特別的共生關係(Pollock et al. 2018)，例如 Barott 等人在楊氏軸孔珊瑚與萼形柱珊瑚發現珊瑚與共生藻皆有 V-type proton ATPase 藉由運輸氫離子來酸化珊瑚組織中共生藻居住的微環境，來增加共生藻行光合作用的效率(Barott et al. 2015)。細菌則是珊瑚重要且最多的微生物群，從 2002 年後，利用非培養法來探討珊瑚相關細菌的研究於 PubMed 上至今已累積約 900 篇相關的研究，至 2016 年後每年約有 90 篇以上的發表，可見珊瑚共棲的細菌的研究受到高度重視。除了共生藻及細菌外，珊瑚也具有高密度的病毒量，隱藏角菊珊瑚與美麗軸孔珊瑚黏液中病毒密度約為 10^8 viruses/ml，是周圍海水的 3 倍(Nguyen-Kim et al. 2014)。這些高密度的病毒被提出在珊瑚身上除了扮演控制細菌數量的角色之外還可能影響珊瑚或共生藻的健康(Sweet & Bythell 2017)。而珊瑚與其不同共棲微生物之間確切的互動關係與如何維持巧妙的平衡都仍有待未來研究證實，而本論文主要研究目標為石珊瑚的共棲菌，因此將會在下一小節詳細介紹珊瑚共棲菌。



1.2.2 珊瑚不同部位的共棲菌

珊瑚的黏膜、組織與骨骼具有不同的細菌種類、組成和數目(Pollock et al. 2018)。早於 1986 年藉由直接計數細菌、檢測溶解去氧核醣核酸酶(deoxyribonuclease)等方法，發現相較於周圍海水，珊瑚的黏液有著非常豐富的細菌活性(Paul et al. 1986)。細菌組成也因珊瑚種類而有所不同，例如 Koren 及 Rosenberg 利用 SYBR Gold 染色發現地中海珊瑚黏液每平方公分有約 6.2×10^7 個細菌細胞，而其中豐度最高的菌種為 *Vibrio splendidus* (Koren & Rosenberg 2006)。另外，在細枝鹿角珊瑚及東真葉珊瑚黏液中主要菌群由 alphaproteobacteria 構成(Bourne & Munn 2005, Chiu et al. 2012)。隨著科學的發展，分子生物學的進步，可藉由全長 16S rRNA 分析輻板軸孔珊瑚黏液的細菌組成，主要組成為 Firmicutes、Proteobacteria、Acidobacteria 及 Actinobacteria (Rajasabapathy et al. 2020)與早期研究相比除了變形菌門外多出三種不同的細菌群，藉由科技的進步，對珊瑚的了解也更加深入。

黏液底下緊接著的為珊瑚組織，Jonston 及 Rohwer 利用掃描式電子顯微鏡發現手指珊瑚的上表皮層幾乎為無菌狀態(Johnston & Rohwer 2007)，相反的同樣利用顯微鏡觀察，Chiu 等人使用 CARD-FISH 觀察東真葉珊瑚的上表皮層，發現每平方公分約有 2.5×10^6 個細菌細胞，而同種珊瑚的上表皮層細菌的密度則會因為不同環境而有所不同(Chiu et al. 2012)。珊瑚組織中的細菌群集組成相較於黏液比較單一，萼形柱珊瑚、美麗軸孔珊瑚、細枝鹿角珊瑚及東真葉珊瑚組織中的細菌組成皆為 Gammaproteobacteria(Ainsworth et al. 2006, Koren & Rosenberg 2006, Chiu et al. 2012)。早在 1983 年就有紀錄指出，位於麋鹿角珊瑚及鹿角軸孔珊瑚組織最底層的內皮層的細菌聚集情形，研究報告描述在組織底部有 $40 \mu\text{m}$ 由細菌聚集而形成卵形狀的團塊，經革蘭氏染色結果顯示該細菌組成為革蘭氏陰性菌(Peters et al. 1983)而類似情形在萼形柱珊瑚及美麗軸孔珊瑚的內皮層中也被發現且證實其細菌組成為 Gammaproteobacteria (Ainsworth et al. 2006)。但並非所有的珊瑚組織都有細菌聚集的情形發生，Aeby 與 Work 在印度太平洋上六個不同地點調查 57 種珊瑚其中只有 24 種珊瑚組織中有細菌聚集(coral-associated microbial aggregate, CAMA)的情形。

形(Work & Aeby 2014)。另外 Neave 等人發現在萼形柱珊瑚組織中的 CAMA 可能是由內生桿菌屬的細菌所組成(Neave et al. 2016)，而 CAMA 在珊瑚組織中的大小及數量有所不同，Wada 等人使用螢光原位雜合技術(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)觀察桌形軸孔珊瑚組織中的 CAMA，發現同種珊瑚身上的 CAMA 則會因為環境的不同而有不同的數量及大小(Wada et al. 2019)，目前僅了解有些珊瑚組織中有 CAMA 的出現，具體了解 CAMA 對珊瑚造成的影响及形成的原因仍需探討。而目前對於珊瑚的細菌群集主要聚焦在珊瑚的黏液及組織中，而其中在大部分珊瑚的組織及黏液中，內生桿菌為常見及主要出現的細菌菌屬之一，尤其在同種珊瑚中，健康珊瑚身上的內生桿菌相對豐度，與生病珊瑚相比來得高。

珊瑚腔腸的溶氧、pH 值及養分含量等與珊瑚的黏液、組織的溶氧、pH 值及養分含量有明顯的不同，在叢生棘杯珊瑚腔腸的前 35%也就是珊瑚口向內約 3mm 處所測得的光與氧氣皆為 0、pH 值約為 7，明顯低於周圍海水的酸鹼值(pH 值約為 8)，珊瑚的腔腸擁有每毫升 10^7 的細菌密度，而由於與其他脊椎生物或無脊椎生物的胃腔皆為厭氧環境，因此導致親緣關係相差很大的物種有著相似的細菌組成 (Agostini et al. 2012)。

組織底下緊接著的珊瑚骨骼具有特殊的物理化學特性，突星表孔珊瑚的骨骼表層只有約 0.1~10% 的光合有效輻射 (photosynthetically available radiation, PRA 400-700 nm)，約有 90~99%的入射光會在到達珊瑚骨骼之前被散射掉(Magnusson et al. 2007)。另外氧氣幅度在日夜也有明顯的不同，早上因為有藻類行光合作用，因此在具有藻類居住的淺層骨骼為有氧狀態，但在夜晚氧氣濃度則幾乎降到零，即使有著嚴苛的環境條件，珊瑚骨骼卻有著最高的細菌多樣性(Pollock et al. 2018)，籬枝軸孔珊瑚緊接著組織下的綠色骨骼層中每公克具有約 2.5×10^8 細菌密度而緊鄰而下的白色層每公克骨骼中也具有約 1.75×10^8 的細菌密度(Yang et al. 2019)。藉由 16S rRNA 定序發現綠色骨骼層中的優勢菌種為厭氧綠硫菌，並且被假設具有固氮與行光合作用的能力(Yang et al. 2016)。除了綠硫菌具有固氮相關的基因外，Yang 等人發現骨骼其他優勢菌種 *Gemmatimonadetes* 及 *Chloroflexi*，在總體基因體(metagenome)的結果中同樣具有固氮相關的基



因，由於珊瑚骨骼中具有高密度固氮功能的細菌，因此推測這些細菌可能提供珊瑚氮源給珊瑚(Yang et al. 2019)。

1.3 內生桿菌

內生桿菌在分類地位屬於細菌域(*Bacteria*)、變形菌門(*Proteobacteria*)、 γ -變形菌綱(*Gammaproteobacteria*)、海洋螺菌目(*Oceanospirillales*)、河氏菌科(*Hahellaceae*)也有研究使用內生桿菌科(*Endozoicomonaceae*)、內生桿菌屬(*Endozoicomonas*)。內生桿菌的科名及屬名常被混淆，在 Kurahashi 與 Yokota 於 2007 提出內生桿菌科 *Endozoicomonas* (Kurahashi & Yokota 2007)之前，序列與內生桿菌屬相似的菌種被歸類至另一個屬名 *Spongiobacter*，但這個屬名並未被正式於分類學上註冊為正式的屬名，且並沒有正式的國際文獻描述該菌的特徵與特性，也沒有菌種寄存於任何官方菌種寄存機構(Shiu & Tang 2019)。而除了內生桿菌科 *Endozoicomonaceae* 另一個拼字相似的科名，*Endozoicimonaceae* 也被使用在近年的多篇發表中(Dishaw et al. 2014, Hofer 2016, Woo et al. 2017, Besson 2018, Gong et al. 2020)，為避免混淆，未來統一內生桿菌的科名及屬名有其必要。此外原本只有一屬的內生桿菌科，在 2018 年有研究提出除了內生桿菌屬外，應該新增其他三個親緣關係相近，16S rRNA 親緣關係相似性約 92-94% 的 *Parendozoicmonas* 、 *Kistimonas* 及暫定屬 *Candidatus Endonucleobacter* 的細菌(Bartz et al. 2018)。*Endozoicomonas* 中文翻譯為內生桿菌，意思為住在動物身上的細菌，由湯森林博士定名。目前現生內生桿菌屬具有 10 種，分別分離自不同的無脊椎動物，其中具有全基因體定序者有 7 種，從石珊瑚，軸孔珊瑚及瓊葉表孔珊瑚中分離出來的有三種，分別為 *E. acroporae* 、 *E. montiporae* 、 *E. coralii* 。。

從 2007 年 Kurahashi 及 Yokota 從海蛞蝓分離出第一株內生桿菌 *Endozoicomonas elysicola* 後，提及內生桿菌的發表漸漸增加，但直到 2013 年，內生桿菌的基因體才被定序(Neave et al. 2014)。隨著 2016 年藉由分析完整的基因體(Ding et al. 2016)，提出了一些內生桿菌的假設性



功能之後，與內生桿菌相關的研究逐漸增加，在 2016 年後 PubMed 上每年平均有十篇以上的研究發表。

1.3.1 內生桿菌與其宿主的關係

內生桿菌屬的宿主相當多樣，在不同的海洋生物身上都可以發現它們，尤其在無脊椎動物身上，例如海綿(Nishijima et al. 2013)、海鞘(Schreiber et al. 2016a, Schreiber et al. 2016b)海蛞蝓(Kurahashi & Yokota 2007)、海葵(Du et al. 2010)、雙殼類(Hyun et al. 2014, Hooper et al. 2019)等等，但也有少數被發現在魚的鰓及鰭中(Katharios et al. 2015, Besson 2018)。

內生桿菌是否具有宿主專一性尚未有清楚的定論。在五種不同的海鞘 *Ascidia aspersa*、*Ascidia scabra*、*Botryllus schlosseri*、*Ciona intestinalis* 及 *Styela clava* 中皆發現內生桿菌的存在，Schreiber 等人利用 16S rRNA 比較這些來自不同地理環境，不同種海鞘中的內生桿菌，發現彼此之間在親緣關係樹上形成一個海鞘專一的旁支(subclade)，因此 Schreiber 等人認為海鞘中的內生桿菌與海鞘之間的關係為宿主專一性的兼性共生菌(Schreiber et al. 2016a)。在不同深度不具有共生藻的冷水珊瑚，枝狀多目珊瑚也具有內生桿菌的存在。使用變性梯度膠體電泳(denaturing gradient gel electrophoresis)來萃取枝狀多目珊瑚組織中的 DNA，發現不同深度具有相同的內生桿菌，因此認為其身上的內生桿菌具有專一性。另一個內生桿菌具有宿主專一性的研究報告為地中海的優勢八放珊瑚，柳珊瑚，不同深度的柳珊瑚組織中的細菌組成約有 60% 為同一種內生桿菌(Bayer et al. 2013)。另外在三種六放珊瑚，多孔軸孔珊瑚、柔枝軸孔珊瑚與變異軸孔珊瑚，同種珊瑚在不同環境具有不同的內生桿菌群集，因此在這三種六放珊瑚身上的內生桿菌並不具有宿主專一性(Littman et al. 2009)。不同種的六放珊瑚具有不同的有性生殖方式，因此 Neave 等人認為，不同的有性生殖方式會影響六放珊瑚中的內生桿菌是否具有宿主專一性。在同一个地區的孵育型珊瑚 (brooding coral)，萼形柱珊瑚中的內生桿菌具有明顯的地區性，指出內生桿菌可能與珊瑚共演化，根據不同的地點環境演



化出具地理位置專一性的內生桿菌。而不同地區的同種產卵型珊瑚(spawning coral)，疣鹿角珊瑚卻具有基因型態相似的內生桿菌，指出生殖型態影響細菌群集的獲得方式，間接影響內生桿菌與宿主的關係(Neave et al. 2017b)。

1.3.2 內生桿菌之區域性

內生桿菌存在於不同的海洋無脊椎動物身上，也因為不同的海洋無脊椎動物分佈於不同經緯度，不同氣候條件的環境，使內生桿菌幾乎遍佈全球，從赤道附近的熱帶珊瑚礁生態系到高緯度寒帶的軟體動物中都可以發現它們的存在(圖 1-2)(Neave et al. 2016)。除了分佈範圍橫跨經緯度外，在同一經緯度不同深度，同樣有著不同的內生桿菌存在。水深 10m 的熱帶珊瑚礁至深海 300m 深的冷水珊瑚(Meistertzheim et al. 2016)甚至到水深 2000m，平均水溫高達 40°C 之海底熱泉生態系(Forget & Juniper 2013)皆有內生桿菌的存在。

1.3.3 內生桿菌基因體特性

目前分離的內生桿菌具有較大的基因體，最小的為 *E. montiporae* 5.43 Mbp，最大的為 *E. atriniae* 6.69 Mbp，平均大小約為 6.09 Mbp。細菌基因體大小曾被認為與寄主依賴程度或互動有關係，這個理論稱為基因體精簡化(genome streamlining) (Martínez-Cano et al. 2015)，細菌藉由與宿主之間的交互作用或與其他共生細菌共同演化，形成可以互補代謝的互利模式，用不到的基因則漸漸地失去功能，因此最終導致基因體大小越來越小。

Neave 等人藉由分析內生桿菌的基因體發現，內生桿菌具有完整合成所有胺基酸的基因，為內生桿菌可能不為專一性內共生菌的另一個原因，因此假設內生桿菌具有游離的生活方式(Neave et al. 2017a)。除了可以合成自身所必需的養分外，運動能力及化學趨性為具有游離型生活方式的共棲細菌找到宿主的重要能力。在內生桿菌的基因體註釋結果發現，所有已知的內生桿菌模式菌株皆有不同數量與運動能力及化學趨性相關的基因(Tandon et al. 2020)。珊瑚礁細菌的化學趨性在珊瑚礁生態系上具有重要意義，珊瑚的病原菌 *Vibrio corallilyticus* 被證實對珊瑚分泌之 DMSP 具有

化學趨性，對病原菌來說 DMSP 為珊瑚衰弱的訊號，而 *V. corallyticus* 則根據這點來尋找適合的宿主 (Meron et al. 2009, Garren et al. 2014)。矛枝軸孔珊瑚表面的細菌群集被證實大多對胺基酸及 DMSP 具有化學趨性，對於海洋細菌來說胺基酸為非常重要的碳及氮源，而內生桿菌也發現同樣對胺基酸與碳水化合物有化學趨性(Tout et al. 2015)，Ding 等人從 *E. montiporae* 的基因體中發現 *E. montiporae* 可以代謝睪固酮的基因，因此珊瑚分泌的睪固酮推測可能作為游離型 *E. montiporae* 在海水中找尋宿主的重要訊號(Ding et al. 2016)。

1.4 內生桿菌屬與珊瑚之間的互動

要直接觀察珊瑚與其特定微生物的互動關係非常困難，由於分子生物技術日益精進，成為我們研究專一微生物與其宿主互動的研究利器，且又因為分離內生桿菌菌株的條件多樣而耗時，許多研究選擇使用非培養法的分子技術來研究內生桿菌。Neave 等人藉由微生物總基因體分裝 (metagenomic binning) 及單細胞基因體(single-cell genomics)分析來自三種常見的石珊瑚，包括萼形柱珊瑚、疣鹿角珊瑚與趾形軸孔珊瑚取得四個新的內生桿菌基因體，並與已知的模式菌株 *E. elysicola*、*E. montiporae* 及 *E. numazuensis* 比較這七個基因體獨有或共有的功能性基因和分析內生桿菌的功能及角色。在這個研究中發現內生桿菌具有豐富的運輸蛋白，主要是醣類運輸蛋白，另外也發現許多與細胞分泌等相關基因，因此假設內生桿菌具有提供蛋白質與碳水化合物給宿主的功能，除此之外內生桿菌也有豐富的轉位酶活性，可能使內生桿菌可以快速適應不同宿主或在新的棲地取得優勢 (Neave et al. 2017a)。

第一株由六放珊瑚分離培養的內生桿菌 *E. montiporae* CL-33^T，Ding 等人利用 Illumina 454 與 PacBio 全基因定序獲得近乎完整 (99.8%) 的基因體，與已知的其他兩株模式菌株 *E. elysicola* 與 *E. numazuensis* 比較發現，此三株內生桿菌皆具有可分解睪固酮的基因，且藉由降解測試，證實三株內生桿菌可完全分解睪固酮，但在珊瑚礁海水中睪固酮的濃度非常低，因此假設睪固酮並不是內生桿菌的主要養分來源更可能是作為



一種”宿主”的訊號，使內生桿菌在海水中可以找到宿主。至於內生桿菌找到宿主後是如何進入宿主的，*E. montiporae* CL-33^T 基因體中具有的 ephrin 配體蛋白(EfnB2_1, EfnB2_2)被假設可以幫助 *E. montiporae* CL-33^T 進入宿主，使其存在於宿主細胞中。在人類病原菌 *Neisseria gonorrhoeae*(Wu et al. 2005))身上也具有與 ephrin 配體結構相似的天青蛋白(azurin)，可使其存活於宿主身上。由於在指形軸孔珊瑚的基因體中發現 ephrin 配體的受器基因(ephrin/Eph receptor genes)，因此假設具有 ephrin 配體的 *E. montiporae* CL-33T 可以藉由結合指形軸孔珊瑚的受器蛋白來進入其細胞中。在 *E. montiporae* CL-33T 突破宿主黏液層進入宿主細胞後，除了可以利用宿主或共生藻產生的葡萄糖作為養分外，當宿主受到不同的外在生存壓力時，*E. montiporae* CL-33^T 還可以藉由第三型分泌系統分泌 MTH_{EMO}(7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase)至宿主的粒線體中，水解受損的核昔三磷酸進而防止粒線體瓦解。(Ding et al. 2016)。

內生桿菌被假設參與珊瑚的硫循環且為降解 DMS 形成 DMS 的主要細菌之一(Raina et al. 2009)。Tandon 等人證實了在印度太平洋中不同珊瑚物種身上的優勢內生桿菌模式菌株 *E. acroporae* Acr-14^T 具有 DMSP Co-A transferase/lyase，可以裂解 DMSP 產生 DMS 的蛋白(DddD)。並藉由共培養實驗，證實 DMSP 可以幫助 *E. acroporae*Acr-14^T 生長。另外在 *E. acroporae* Acr-14^T 的基因體辨別了，一組完整的操縱組(operon)，經過三階段不同的酵素 DddD Co-A transferase/lyase，3-HP dehydrogenase 及 malonate-semialdehyde dehydrogenase 反應後將 DMSP 代謝成醋酸鹽，進入細菌的檸檬酸循環，產生能量(Tandon et al. 2020)。



1.5 研究動機與目的

珊瑚的細菌群集主要由 *Gammaproteobacteria* 與 *Alphaproteobacteria* 構成且與周圍海水的細菌組成明顯不同 (Bayer et al. 2013, Gajigan et al. 2017, Shiu et al. 2017) 而內生桿菌在大部分珊瑚的黏液與組織中常被發現屬於優勢菌群 (Neave et al. 2017b)，且其相對豐度與珊瑚的健康呈正相關，因此被認為是珊瑚的健康指標菌群，甚至有研究提及內生桿菌與珊瑚歷經四百多萬年的共同演化，發展出非常密切的關係 (Pollock et al. 2018)，自從第一隻由海蛞蝓分離出的內生桿菌於 2007 年被提出後，內生桿菌逐漸受到重視，於 2013 年第一個內生桿菌基因體釋出後，每年提及內生桿菌之研究平均約有十五篇 (Neave et al. 2016)，而上傳至基因體資料庫的內生桿菌基因序列，目前有 26 個組裝基因體 (assembly genome)，其中具有全基因體定序有 7 株，然而由石珊瑚分離出的菌株卻只有 2 種 (*E. montiporae*、*E. acroporae*)。由於目前研究主要聚焦在珊瑚的細菌群集，而珊瑚身上的細菌群集會隨著珊瑚的生理狀況、生長情形及周圍環境而有所改變。即使在同一種珊瑚，不同環境之下，內生桿菌的群集結構也會有所不同。目前分離出兩株可培養的內生桿菌，從基因體分析及生理特性分析可以明顯得知兩株內生桿菌非常不同，可能在珊瑚身上提供不同的功能，可見內生桿菌多樣性非常高，因此只有兩株是不足的，因此本論文的研究目的是(一)從石珊瑚分離新的內生桿菌、(二)了解其基礎生理生化特性外、(三)藉由基因體分析來得知新的內生桿菌可能具有的功能、(四)與已知的內生桿菌模式菌株進行比較。



二、材料與方法

2.1 採樣時間、地點及物種

本論文的菌株分離來自(1) 2018 年 7 月至墾丁核三廠出水口採集軸孔珊瑚 (圖 2-1,a)。(2) 2018 年至澎湖內灣的珊瑚礁區採集美麗軸孔珊瑚 (圖 2-1,b)。每種珊瑚物種選擇外表健康，無白化或生病跡象的一群體 (colony)並採取一片段做後續內生桿菌分離。採樣工作由湯森林老師實驗室研究技術員陳星儒與江培汶完成。

2.2.1 富營養培養基配方

富營養培養基 mmbv4(modified marine broth version 4)為更改海洋培養基的配方，專為內生桿菌設計的高營養培養基，配方如表 2-1。主要使用於內生桿菌菌株富集(enrichment)及生理生化特性試驗。

2.2.2 基本培養基配方

基本培養基(minimum medium)為只有無機養分的培養基，因此主要作為測試特定有機物質對目標細菌的影響，配方如表 2-2。本論文使用此培養基進行內生桿菌與 DMSP 共培養實驗、定量 DMSP 消耗量和 DMS 產生量實驗。

2.2 內生桿菌分離培養

採下目標珊瑚後由於目標訂於 25°C 培養，噴下組織後直接稀釋 10ml，十倍連續稀釋至 10^{-4} (含原液共五個稀釋度)。每個稀釋度取 100 μ l 藉由稀釋塗抹法培養於 MMBV4 固態培養基上。每組稀釋度進行五重複。內生桿菌初步分離是與徐銘從及暑期實習生 Amor Damatac 協力進行。

2.2.1 菌種純化

每個稀釋度隨機取 10 至 15 個單一菌落，培養於 96 孔盤(每孔具有 300 μ l 液態 mmbv4 培養基)，25°C 下，一天後觀察是否有混濁狀，有混濁狀則判斷為生



長，接著利用聚合酶連鎖反應來增幅目標基因序列 (polymerase chain reaction, PCR)，引子使用 27F-En771R，正對照組使用 *E. acroporae* Acr-14T。27F-En771 為 Shiu 等人設計，為內生桿菌專一性引子，目標為細菌 16S rRNA 的 V3-V4 區域，專一性可達 95.6 % (Shiu et al. 2018) 並藉由電泳膠照相系統觀察在瓊膠電泳之目標片段是否與正控制位置相同來判斷是否為目標內生桿菌菌種，作為第一階段的篩選。將所有與正控制位置相同的菌種利用四區劃線方法分離單一菌落，再一次藉由 PCR，使用 Frank 等人設計的泛用型細菌引子 27F & 1492R，增幅細菌的 16S rRNA 近全長序列 (Frank et al. 2008)，來判斷菌種相似性，同樣藉由電泳膠照相系統觀察瓊膠電泳之目標位置後切下條帶 (band) 位於 1.4 kbp 的未純化瓊膠送基龍米克斯公司進行定序。定序結果去除訊號不穩定的片段後利用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站上的 BLAST (basic local alignment search tool)blastn 功能，比對標準資料庫(standard databases)，去除無法培養及環境樣本的序列並使用 megablast，選擇最高相似度的序列來藉由與已知內生桿菌模式菌株相似度 $\leq 98.7\%$ (Kim et al. 2014) 來初步篩選內生桿菌的新種候選菌株。初步定序結果從墾丁及澎湖各分離出一株新種 (墾丁: *E. sp. nov. 8E*，澎湖: *E. sp. nov. 4G*)。定序結果經 BLAST 判定相似度後確認 *E. sp. nov. 8E* (*E. montiporae* 相似度 97 %) 與 *E. sp. nov. 4G* (*E. montiporae* 相似度 98 %) 作為初步判斷新的內生桿菌屬菌株。湯森林博士將 *E. sp. nov. 8E* 命名為 *Endozoicomonas ruthgatesii* sp. nov. 8E，*E. spp. nov. 4G* 命名為 *Endozoicomonas penghunesis* sp. nov. 4G。

2.2.2 菌株保存

首先相菌株培養於 mmbv4 富營養固態培養基上，取單一菌落再次培養於 mmbv4 富營養液態培養基，培養至對數生長階段後取 750 μ l 新鮮菌液與 250 μ l 80% 無菌甘油於 1.5ml 微量離心管中均勻混合，並確切標示後保存於 -80°C 冰箱中。

2.2.3 富營養培養基配方

富營養培養基 mmvb4(modified marine broth version 4)為更改海洋
培養基的配方，專為內生桿菌設計的高營養培養基，配方如表 2-1。主要使
用於內生桿菌菌株富集(enrich)及生理生化特性試驗。



2.2.4 聚合酶連鎖反應

初步的細菌鑑定是使用泛用型細菌前置引子 27F 與內生桿菌專一性反置引子 En771R。首先挖取目標菌種的單一菌落，加入 10 μl 的無菌水中使用溫度梯度型聚(BIO-RAD T100 Thermal Cycler)於 94 °C 下反應三分鐘進行破菌後再依序加入 14.2 μl 無菌水、1 μl 已破菌的目標菌液、10×TaKaRa 緩衝溶液 2 μl 、2.5 mM dNTP 混合液 1.6 μl 、10 μM 27F 前置引子 0.5 μl 、10 μM En771R 反置引子 0.5 μl ，最後再將 5 U Taq TaKaRa 酵素由-20 °C 取出 0.2 μl 加入 PCR 管中，總反應體積為 20 μl 。PCR 溫度流程第一個循環為 94 °C 30 秒、54 °C 30 秒及 72 °C 45 秒，共 35 個循環後於 72 °C 停留十分鐘後結束，最後將樣品靜置於 10 °C 下。在初步的細菌鑑定中於瓊膠電泳上與正控制位置相同的細菌會再一次進行第二次 PCR。再次鑑定則是使用細菌 16S rRNA 前置及反置引子 27F&1492R，預估片段長度為 1.4 kbp。首先挖取目標菌種的單一菌落，加入 10 μl 的無菌水中使用溫度梯度型聚(BIO-RAD T100 Thermal Cycler)於 94 °C 下反應五分鐘進行破菌。取破菌後的樣品 1 μl 加入 37.7 μl 無菌水、10×TaKaRa 緩衝溶液 5 μl 、2.5 mM dNTP 混合液 4 μl 、10 μM 27F 前置引子 1 μl 、10 μM 1492R 反置引子 1 μl ，最後再將 5 U Taq TaKaRa 酵素由-20 °C 取出 0.3 μl 加入 PCR 管中，總反應體積為 50 μl 。PCR 反應流程第一循環為 94 °C 30 秒、54 °C 30 秒及 72 °C 90 秒，共 30 個循環後於 72 °C 停留十分鐘後結束，最後將樣品靜置於 10 °C 下。

2.2.5 基本培養基配方

基本培養基(minimum medium)為只有無機養分的培養基，因此主要作為測試特定有機物質對目標細菌的影響，配方如表 2-2。本論文使用此培

養基進行內生桿菌與 DMSP 共培養實驗及定量 DMSP 消耗量及 DMS 產生量實驗。



2.3 微生物形態觀察

2.3.1 穿透式電子顯微鏡菌體觀察

利用負染色法(negative staining)來觀察目標細菌完整的外部形態。在進行負染色前首先要將樣品前處理，將目標菌種培養至對數生長期後為了保留細菌外圍構造，比如鞭毛或纖毛等容易在前處理階段掉落的脆弱構造，需要先使用固定液(2.5% glutaraldehyde + 4% paraformaldehyde/0.1M PBS)來保留纖毛或鞭毛等結構，固定液與菌液的比例為 1:1，由於細胞在 37°C 下 polymerase 活性會大於 depolymerase 因此使細胞骨架的結構更完整，因此將調配好的菌液與固定液放置於 37°C 的水浴十分鐘後，利用高速離心，離心力 4500×g, 10 分鐘，目的為去除原有的培養基來降低顯微鏡背景的雜訊。離心後利用磷酸鹽緩衝生理鹽水(phosphate-buffered saline, PBS)回溶後，重複以上步驟四次，最後使用無菌水回溶清洗兩次後則完成前處理。

進行負染前，需將放置樣品的銅製金屬網環使用鍍碳機(Cressington 208C) 將直徑 3.05mm, 200 mesh 的網環上一層碳膜後，利用覆膜機(Hitachi E-1010 Ion sputter)對碳膜表面進行親水性處理，根據不同稀釋度取 10μl 的樣品滴至網膜上停留 30 秒，再用濾膜將尚未下沉及多餘的樣品去除，加入負染劑 2% 磷鎢酸鹽(2% phosphotungstate; PTA) 五秒後將多餘染劑利用濾紙去除，最後將負染後的樣品放置乾燥箱，兩小時後，使用中研院植微所簡萬能老師電子顯微鏡實驗室的穿透式電子顯微鏡(FEI Tecniai TWIN G2 spirit)進行觀察。

2.3.2 穿透式電子顯微鏡菌體切片觀察

以下步驟為中研院植微所簡萬能老師提供及操作。使用對數生長期的細菌進行菌體切片觀察，在進行切片之前要先使用化學固定法固定菌體結構，首先將菌體以 2.5% 戊二醛(glutaraldehyde, GA) +4% 多聚甲醛

(paraformaldehyde, PFA)於室溫下浸泡 4 小時，接著使用磷酸鹽緩衝溶液潤洗，每 20 分鐘潤洗一次，共潤洗三次後於室溫下浸泡 1% 四氧化鐵 (OsO_4)/ 0.1M 磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffer)四小時，接著再使用磷酸鹽緩衝溶液潤洗，每 20 分鐘洗一次，共三次。將潤洗後的菌體依序浸泡於不同濃度(30、50、70、85、95、100%)的丙酮 (Acetone)各三十分鐘後依序浸泡於不同比例的 Spurr's resin/丙酮(1:3、1:1、3:1)各一天，最後浸泡於純 Spurr's resin 一天又四小時。將固定好的菌體進行包埋(使樣品於 70°C 下進行聚合反應 (polymerization)，約 12 至 24 小時)及完成前處理所以步驟。

前處理完畢後，進行切片。化學固定後的樣品使用超薄切片機(Leica Reichert Ultracut S)切片至樣品厚度達 70nm-90nm 後使用 5 % 醋酸鈾醯 (uranyl acetate, UA)與 0.4 % 檸檬酸鉛(lead citrate)染色。樣品製備完成後使用中研院植微所簡萬能老師電子顯微鏡實驗室的穿透式電子顯微鏡(FEI Tecnai TWIN G2 spirit) 搭配工業用 3K× 4K 工業用 CCD (Gatan ORIUS) 與 Gatan digital micrograph 軟體進行觀察。進行觀察。

2.3.3 場發射掃描式電子顯微鏡菌落觀察

以下步驟為中研院植微所簡萬能老師提供及操作。將菌株培養於固態 MMBV4 培養基上三至四天後觀察菌落型態。首先將菌落從培養上切下後於浸泡於含 2.5 % 戊二醛(glutaraldehyde, GA) + 4 % 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA)的 pH 7.0 , 0.1 M sodium phosphate buffer 1 小時，接著使用磷酸鹽緩衝溶液潤洗菌落，每 15 分鐘潤洗一次，共潤洗三次，最後將樣品浸泡於 1 % OsO_4 /0.1 M sodium phosphate buffer 一小時後浸泡於不同濃度(30、50、70、85、90 %)的酒精各三十分浸泡接著浸泡於 100 % 得酒精三十分鐘以去除水分。完成固定的樣品藉由臨界點乾燥機 (Hitachi HCP-2) 乾燥後，使用覆膜機(Hitachi E-1010 ion sputter)將樣品附上一層離子膜及完成樣品製備。使用中研院植微所簡萬能老師電子顯微鏡實驗室的場發射掃描式電子顯微鏡 (FEI Quanta 200 scanning electron microscope, SEM)使用 xT microscope server 軟體，將菌落放大一萬至兩萬倍以觀察菌落表面的菌體結構。



觀察樣品。

2.3.4 解剖式顯微鏡菌落形態觀察

首先將菌株培養至液態 MMBV4 液態培養基中，至對數生長期後，利用四區畫線法將菌株培養至 MMBV4 固體培養基上，培養至第四區有單一菌落產生後使用解剖式顯微鏡 (Leica E45) 觀察其形狀、顏色、邊緣、質地等。

2.3.5 草蘭氏染色

丹麥生物學家於 1884 年創立，藉由染色流程將附著於特定細胞壁之染劑用於鑑別細菌種類分為草蘭氏陽性菌(細胞壁上附著的結晶紫無法被酒精脫色)及草蘭氏陰性菌(細胞壁上附著的結晶紫可以被酒精脫色)的方法，流程概括為初染－媒染－脫色－複染。以下流程參考(Cappuccino & Sherman 2004)，首先將細菌滴在玻片上，使其風乾後，熱固定後，以初染劑(primary stain) 結晶紫染色 60 秒，將細菌染成紫色，接著使用無菌水沖洗多餘的染劑，再以媒染劑 (mordant) 碘液染色一分鐘使加強結晶紫附著於細菌細胞壁上，並接著使用 95% 酒精潤洗，使細胞壁脂肪含量較低的草蘭氏陽性菌經酒精作用快速溶解後，藉由酒精的脫水作用使結晶紫緊黏在細孔的細胞壁上保持紫色，而使細胞壁脂肪含量較高的草蘭氏陰性菌細胞壁中的大孔脫掉結晶紫。同樣使用無菌水緩緩沖洗約三秒，最後利用複染劑(secondary stain)番紅(safranin)染色一分鐘，由於經過酒精脫水將草蘭氏陰性菌脫色，藉由複染劑使無色的草蘭氏陰性菌呈粉紅色，最後將多餘染劑使用無菌水去除後，風乾，使用螢光光學顯微鏡 (Zeiss AxioskopD2) 以一千倍率油鏡觀察並紀錄細菌顏色及外型。菌體若呈紫色則為草蘭氏陽性菌；菌體若呈紅色則為草蘭氏陰性菌。

2.4 生長與生理生化特性分析

2.4.1 生長曲線

利用吸光值 (OD_{600}) 判斷細菌數量在不同時間及條件下，經歷的四個階段。一開始為延滯期 (lag phase) 此時細菌處於適應環境的階段，指數期

(log phase) 細菌數量以二的 n 次方快速增長，當培養基中的養分消耗完畢，或細菌死亡釋出的有毒代謝物累積，使細菌生長速度下降後進入停滯期 (stationary phase) 為細菌生長與死亡的動態平衡，當最後死亡數量大於生長數量時則進入死亡期(death phase)。先將菌株由-80°C 菌保中取出活化一天後，取 50 μ l 加入液態 mmbv4 培養基，培養於 25°C，並於每一個預定時間點取 1mL，利用分光光度計(Analytikjena ScanDrop 250) 紀錄 OD₆₀₀ 吸光值，若吸光值超過 OD₆₀₀ 1.00 則進行稀釋以符合機器偵測極限。

2.4.2 最佳溫度生長測試

由菌保取菌株進行活化培養一天後，取已活化的菌液 50 μ l，加入經高壓高溫滅菌過的 50mL MMBV4 液態培養基 (1:1000)，分別培養於 10°C、15°C、20°C、25°C、28°C、30°C、33°C、35°C、40°C 不同溫度下(每個菌株皆有三重複)，共培養 72 小時，每日固定時間取 1mL 利用分光光度計(Gene Quant pro) 測吸光值並記錄。

2.4.3 最佳鹽度生長測試

由菌保取菌株進行活化培養一天後取已活化之菌液 50 μ l，分別加入經高壓高溫滅菌過，含不同濃度的 0%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5% NaCl 50mL 液態培養基(每個菌株皆有三重複)，培養於最適溫度 25°C 下，共培養 72 小時，每日固定時間取 1mL 利用微量體積分光光度計(Analytikjena ScanDrop 250) 測吸光值並記錄。

2.4.4 最佳酸鹼值生長測試

由菌保取菌株進行活化培養一天後取已活化之菌液 50 μ l，分別加入配好，使用 0.22 μ m 濾杯滅菌(使用高溫高壓滅菌會改變培養基酸鹼值)，不同酸鹼值 pH4、pH5、pH6、pH7、pH8、pH9、pH10 的液態 MMBV4 培養基(每個菌株皆有三重複)。而低 pH 值的培養基經高溫高壓滅菌後會改變調配後的 pH 值，使培養基有大於 0.5 pH 的誤差，因此不使用高溫高壓滅菌，改用 0.22 μ m 濾杯來去除培養基中的細菌。同樣將菌液培養於最適溫



度 25°C 下，總共培養 72 小時，每日固定時間取 1mL 菌液，使用微量體積分光光度計(Analytikjena ScanDrop 250)測吸光值並記錄。

2.4.5 氧氣需求測試

將已活化培養並處於對數生長期的菌株利用接種棒塗抹於培養於 mmbv4 固態培養基並額外添加 0.1% 的麥芽糖目的是促進內生桿菌生長，培養後放入厭氧培養盒 (Thermo oxoid anaerobic rectangle jar 2.5L) 中，每個菌株皆有三重複，控制組為培養於好氧環境來確定菌株生長狀況。為建立和監視厭氧環境，將厭氧產氣包(MGC Anaeropack)及厭氧指示劑放入厭氧培養盒扣上後立刻扣上，大約需等待 12 小時，厭氧指示紙才會由紅轉為白(圖 2-2)，表示厭氧培養盒中的氧氣含量少於 1 %。培養於最適生長溫度 25°C 下 7 天觀察是否有菌落生長並使用解剖顯微鏡觀察菌落。

2.4.6 氧化酶測試

為了測試目標菌株是否具有細胞色素氧化酶 (cytochrome oxidase) 的試驗。細胞色素氧化酶為行氧呼吸的細菌在呼吸作用系統中的最終酵素，若具有氧化酶的細菌會藉由細胞色素氧化酶來氧化苯二胺，形成紫色的醌類。首先將菌株培養於固態培養基上，使用配置好的 0.1% (w/v) tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)，取 100μl 直接滴於菌落上，或滴在玻片上再將菌落抹上觀察是否有變色。若成藍紫色則為陽性反應，無色則為陰性反應。

2.4.7 觸酶測試

大部分的好氧菌與兼性厭氧菌在使用氧氣時會產生過氧化氫 (H_2O_2)，由於過氧化氫對細菌有害，所以大部分細菌擁有觸酶可以將有害的過氧化氫轉換成無害的水與氧氣。首先將菌株培養於固態培養基上，使用配置好的 35% 的過氧化氫溶液直接滴於菌落上或滴於菌落塗抹的玻片上，產生氣泡則為陽性反應表示具有觸酶，反之則為陰性反應。



2.4.8 運動性觀察-軟洋菜運動性觀察

首先將菌株活化培養於 MMBV4 液態培養基後，配製含 0.5% agar 的無菌固態培養基，並趁培養基還是液態時分裝至玻璃試管中以方便觀察紀錄。待培養基凝固後利用接種針沾取處於對數生長期之目標菌株，以穿刺方式接種至試管中。培養於 25°C 下，並每日紀錄生長狀況。若目標菌株有運動性則在生長線周圍具有毛刷狀，表示菌株運動向外擴散生長；若無運動性則只會在生長線上生長。本實驗使用珊瑚病原菌 *V. corallilyticus* 及具有鞭毛的內生桿菌模式菌株 *E. elysicola* 作為正對照組。

2.4.9 API ZYM 套組試驗

使用 Biomerieux 之 API ZYM 試驗套組，此套組目的是藉由試驗組中含有的 19 種酵素反應來鑑定細菌是否具有這 19 種酵素的活性。首先將菌株培養於固態培養基上，準備套組的培養盒並加入約 5mL 無菌水來創造濕潤的環境，接著使用滅過菌的接種棒將菌落刮下加入 2mL 0.85% NaCl 溶液中，並調整菌量至 OD₆₀₀ 0.75(McFarland 5-6)，在每一個試驗孔加入 65μl OD₆₀₀ 0.75 的菌液，蓋上蓋子後培養於 35°C。4 小時後加入 ZYM A 及 ZYM B 試劑各一滴，藉由顏色改變判斷結果(表 2-3)。

2.4 基因體分析

2.5.1 全基因體次世代定序

細菌 DNA 分離和純化是由湯森林老師實驗室研究技術員江培汶完成 *E. ruthgatesii* 8E 與 *E. penghunesis* 4G 的 DNA 濃度與存度測定是利用超微量分光光度計(NanoDrop) 測得核酸的純度，並確認樣品中無蛋白質等污染，再使用螢光定量儀(Qubit Fluorometer)再次確認 DNA 含量後，送至有勁生物科技公司進行次世代定序 (Illumina Hiseq 2500 platform)。定序品質鑑定方法是使用次世代定序後得到的原始數據(raw read)，首先利用 FastQC 來判斷定序品質，利用 CLC bio-workbench 去除次世代定序殘留的 adapter (Illumina Universal Adapter)，去除每一條序列上的 adapter 序列，

最後使用 CLC bio-workbench 的 QC 報表，藉由 Phred score 來鑑定定序品質



2.5.2 基因體序列組裝

將已去除 adapter，且 Phred score 大於 30 的序列進行新序列組裝 (de novo assembly)。本研究是使用 CLC genomics workbench 組妝序列，其中使用不同設定值(word size 40，bubble size 70，最小 contig 長度:100)來進行組裝測試。N50 大小及 contig 數量則是用來判斷基因序列組裝品質，利用不同參數設定和測試，選擇的條件是最大 N50(將所有的重疊群按照長到短進行排序，排到最後一個重疊群即為 N50)及最小重疊群 contig (在全基因組重測序中拼接於序列中之重疊區，拼接成中間沒有空格之序列)，同時也注意組合後的基因體尺寸是否接近其他已知內生桿菌的基因體尺寸，最後 *E. ruthgatesii* 8E 參數選擇 word size 60，bubble size 70，*E. penghunesis* 4G 參數選擇 word size 40，bubble size 70。

2.5.3 基因體組裝品質鑑定

組裝完成之基因體序列利用 CheckM (v1.0.18) (Parks et al. 2015) ，藉由輸入指令>checkm lineage_wf< bin floder> <output folder>，來自動比較現存已知資料庫在親緣關係上相對位的基因來預估基因體的完整性及污染程度。

2.5.4 基因體註解

使用 Prokka (Seemann 2014) 及 Prokka RAST (rapid annotation using subsystems technology)(Cappuccino & Sherman 2004, Overbeek et al. 2014)來為組裝完成的基因體功能註解。Prokka 使用外來的預測工具如 Prodigal (Coding sequence)、RNAmmer (rRNA gene)、Aragorn (tRNA gene)、SignalP(single leader peptide)、Infernal(Non-coding RNA)來辨認片段重疊組之間的基因協調特徵。編碼蛋白質基因經由兩步驟來完成註解，藉由搜尋不同已知基因庫的最高相似度基因，進行層層比較，E 值閾值設定為 10^{-6} 。RAST 為設計給完整或接近完整(>97%)的細菌基因體，主要



將未知基因體與 FIGfams 資料庫進行比較後分類成不同功能性的蛋白家族 (protein family)，這些不同功能的分類稱為次系統(subsystem)，RAST 會藉由收集不同使用者上傳公開的基因體註解結果來擴增其資料庫並建立更完整的代謝網絡，當註解完成，則藉由 SEED 瀏覽介面瀏覽註解結果，SEED 瀏覽網站可以直接連結目標蛋白至 NCBI 的 CDD 資料庫或 KEGG 的酵素資料庫，並具有 PubMed ID 連結來解釋目標基因的功能。

2.5.5 原噬菌體分析

使用 PHASTER (phage search tool enhamced release) (Arndt et al. 2016)線上分析軟體來快速辨認且註釋在細菌基因體中潛在的原噬菌體序列，PHASTER 使用 BLAST 快速搜尋 GeneBank 及 NCBI 噬菌體及原嗜菌體資料庫，藉由 DBSCAN 將像噬菌體的基因分類成原噬菌體區域，並辨識這些被分類至原噬菌體的基因比例給予分類，有三種分類標準，第一種為這些原噬菌體基因是否與已知的一種噬菌體有關，第二種為這些原噬菌體基因有一半以上與已知一種噬菌體有關，第三種為這些原噬菌體基因中只有小於一半以上與已知一種噬菌體有關。若被歸類成第一類則為 150 分(滿分)，若被歸類為第二或第三種則視基因大小(平均基因大小 $>30\text{kb}$ ，平均基因數量 40)，最後依據三種分數間隔分為不完整(incomplete) <60 分，有問題的(questionable)60~90 分及完整(intact) >90 分。

2.5.6 第三型分泌蛋白 (Type III Secretion System proteins, T3SS)

蛋白質分泌系統對於了解共棲細菌與宿主之間的互動扮演重要的角色。EffectiveDB 具有從 EggNOG 4.0 資料庫與其餘從 NCBI RefSeq 得到的基因體，經計算過後，使用已知 1677 種細菌的基因體來預測細菌基因體中與第三型分泌系統相關之基因(Eichinger, V et al., 2015)，而本次分析使用動物分類模組(animal classification module)且選擇限制值設定為 0.9999。



2.5.7 16S rRNA 親緣關係樹

從 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 資料庫下載已知內生桿菌的 16S rRNA 序列，藉此了解兩株新菌株與其他已知內生桿菌屬的親緣關係。使用 MEGA7 來建構親緣關係樹，序列排比使用 MUSCLE (Edgar, R. C. et al., 2004) 利用模式選擇 (Model Selection) 分析最佳使用模式為 K2 (Kimura 2-parameter) + G (Gamma distribution) ，建構親緣關係樹則使用 Maximum-likelihood (ML), 1000 bootstraps，最後完成的親緣關係樹使用 iTOL v4 進行編排。

2.5.8 DddD 親緣關係樹

由從 Prokka 註釋得到的 gff (GFF v3 file containing sequences and annotations) 結果中找到 DddD (DMSP dependence DMS releasing D) 蛋白質序列，並在 UniPort 蛋白質序列資料庫上比對(blast)找尋前 20 個符合 E 值小於 $1e-5$ ，且相似度大於 50%，的細菌蛋白質序列。使用 MEGA7 來建構親緣關係樹，序列排比使用 MUSCLE，演化關係模組使用 LG (Le Gascuel) +I + G4，建構親緣關係樹使用 Maximum-likelihood (ML), 1000 bootstraps。完成的親緣關係樹利用 iTOL v4 進行編排。

2.6 DMSP 代謝成 DMS 的能力

2.6.1 DMSP 共培養

挖取保存於-80°C的目標菌株菌保培養於 MMBV4 液態培養基中，由於不同菌株需要不同的培養時間因此從-80°C菌保中活化菌株需花兩至三天，再取 10 μ l 的菌液培養於液態的 MMBV4 (總培養體積 10ml) 一天後再取 100 μ l 的菌液加入含有 0.1mM DMSP 的 10ml MMBV4 中。在先前的試驗中發現 *E. acroporae* Acr-14^T 如果沒有在含有 DMSP 的 MMBV4 液態培養基中適應一天的話，使用基本培養基進行試驗時則會出現生長不佳，甚至無法生長的情狀，而 *E. ruthgatesii* 8E 則不需要先在含有 DMSP 的

MMBV4 中適應則可以直接進行實驗，因此實驗前統一將所有的內生桿菌菌株先於含有 0.1mM DMSP 的 MMBV4 液態培養基中適應一天。

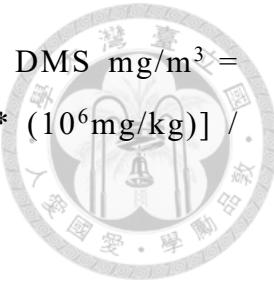
將適應過的菌株進行高速離心(2000xg 10min) 以去除原本的培養基，目的為減少富含養份的培養基的殘留所導致的生長誤差，並使用無添加其餘有機養分的基礎培養基置換原本營養豐富的 mmbv4 培養基，重複清洗兩次。預定培養基中的起始菌量為 OD₆₀₀: 0.08 (10ml 的總培養體積中具有 OD₆₀₀: 0.08 的菌量)，培養於無菌的 50ml 離心管中，總培養體積為 10ml, 實驗組 DMSP 濃度為 0.1mM，控制組則無添加 DMSP。任何組別皆添加 0.2% 酪蛋白氨基酸 (casamino acid) 作為氮源。培養於 25°C，每日使用分光光度計來紀錄吸光值，作為評斷生長情況的依據。本實驗使用 *E. acroporae Acr-14^T* (已知具有代謝 DMSP 產生 DMS 之能力)作為正對照組。

2.6.2 鹼調控裂解 DMSP 減量線製備

利用基礎培養基來稀釋 50mM 的 DMSP 原液，使用連續稀釋來減少配置不同濃度的 DMSP 標準品的誤差，配置五個不同濃度 DMSP 標準品 (0.01mM、0.025mM、0.05mM、0.1mM、0.15mM)，每一個濃度皆為三重複。將 1mL 配置好的標準品加入 20mL 的厭氧培養瓶中，同時加入 0.1mL，5M 氢氧化鈉後立刻蓋上橡膠蓋加壓密封。放置於 25°C 下，轉速 200 rpm，30 分鐘，目的為使 DMSP 與氫氧化鈉完全反應，裂解成 DMS 與丙烯酸甲酯(acrylate)。使用微量氣密針(圖 2-3b)抽取 20 ml 厥氧培養瓶中的 500μl 氣體打入氣相色譜質譜儀 (Agilent GC-MS 5975) 並記錄已知會出現於 1.678 分鐘的 DMS 訊號面積用於減量線製作。

2.6.3 DMS 減量線製備

使用 1μl 的微量氣密針(圖 2-3a)注射兩次，共 2μl 的 DMS 標準品進入 500ml 氣體稀釋瓶(圖 2-3c)，接著將氣體稀釋瓶放入 80°C的烘箱中 30min，目的為使 DMS 完全氣化。藉由吸取不同體積的 DMS(0.06 ml、0.12 ml、0.18 ml、0.24 ml、0.3 ml) 作為濃度區別，總共吸取五個不同體積的氣化 DMS，每個濃度皆三重複，將不同體積的 DMS 氣體打入氣相色譜質譜儀 (Agilent GC-MS 5975) 後紀錄在 1.678 分鐘出現的 DMS 訊號



面積做成減量線。使用公式將注射的 DMS 體積換算濃度； $DMS\ mg/m^3 = \frac{DMS\ 液體量\ (uL) * DMS\ 密度\ 0.846\ (kg/L) * (L/10^6uL) * (10^6mg/kg)}{[稀釋瓶體積\ 500\ (mL) * (m^3/10^6mL)]}$ 。

2.6.4 鹼調控裂解 DMSP 及 DMS 定量

挖取保存於-80°C的目標菌株菌保培養於 MMBV4 液態培養基中，由於不同菌株需要不同的培養時間因此從-80 °C菌保中活化菌株需花兩至三天，再取 10 μ l 的菌液培養於液態的 MMBV4 (總培養體積 10 ml) 一天後再取 100 μ l 的菌液加入含有 0.1 mM DMSP 的 10 ml MMBV4 中。將適應過的菌株進行高速離心(離心力 2000xg ,10min)目的為減少富含養份的培養基所導致的生長誤差，並使用無添加其餘有機養分的基礎培養基來置換原本營養豐富的 mmbv4 富營養培養基，重複以上步驟兩次。預定起始菌量為 OD₆₀₀: 0.08，培養於 30ml 厥氧培養瓶，培養體積為 6 ml (6ml 的總培養體積中具有 OD₆₀₀: 0.08 的菌量)。實驗組 DMSP 濃度為 0.1mM，控制組則無添加 DMSP，任何組別皆添加 0.2% 酪蛋白氨基酸作為氮源。實驗總共進行三天，共三個時間點，分別為第零天、第一天、第二天。三個時間點總共有九瓶厥氧培養瓶，來減少實驗中體積減少而導致後續天數的定量誤差。從培養第 0 天開始進行 DMSP 定量來確定培養基中的 DMSP 濃度，培養一天後(實驗第一天)先進行 DMS 濃度定量後再進行 DMSP 消耗量定量。

DMS 定量方法為，使用氣密針抽取 500 μ l (圖 3-3, b) 培養瓶中的氣體後直接打入 GC-MS 定量目標菌種產生的 DMS。紀錄在 1.678 分鐘得到的 DMS 面積帶入先前製備好的減量線公式 $y = 2 \times 10^{-5}x - 6.5649$ 做 DMS 的定量(x 帶入訊號面積，得到 y 值為 DMS 濃度)。

DMSP 定量方法為，利用無菌針頭(Terumo, 0.7 × 32 mm)抽出厥氧培養瓶中的菌液，利用高速離心來分離細菌與培養基，只取上清液 1mL，加入 20ml 厥氧培養瓶接著再加 0.1mL 之 5M 氢氧化鈉後立刻蓋上橡膠蓋加壓密封，以防氣體散出，放置於 25°C 轉速 200 rpm，30 分鐘目的使 DMSP 與氫氧化鈉完全反應，裂解成二甲硫醚 (DMS) 與丙烯酸甲酯(acrylate)。使用微量氣密針抽取 500 μ l 氣體打入氣相層析質譜儀後紀錄在 1.678 分鐘出現的 DMS 訊號面積。將 DMS 訊號面積帶入先前製備完成的減量線公式

$y = 9 \times 10^6 x - 50984$ (y 帶入訊號面積，得到 x 值 DMSP 濃度)換算出 DMSP 濃度。





三、結果

3.1 菌種分離及初步鑑定

3.1.1 PCR 初步鑑定結果

分離出的獨立菌落使用 27F-En771R (圖 3-1)，內生桿菌屬專一引子進行初步鑑定，若電泳結果片段位置與陽性控制組差不多，則假設該獨立菌落為內生桿菌屬，將陽性的分離株進一步培養後再使用泛用型細菌 16S rRNA 引子 27F-1492R 確認 (圖 3-2)，其增幅的片段大小約 1465 鹼基對，將在電泳膠中的增幅片段切下後送定序公司進行桑格定序 (Sanger sequencing)。取得的定序結果，首先去除前後較雜亂之鹼基對，於 NCBI 上的 BLAST 搜尋工具比對，*E. penghunesis* 4G 與 *E. ruthgatesii* 8E 與內生桿菌模式菌株 *E. montiporae* CL-33^T 的相似度分別為 98% 及 97% (表 3-1)，根據 16S rRNA 序列相似度來判斷其親緣關係，即序列同源性 $\leq 98.7\%$ 時則為同屬不同種 (Kim et al. 2014)，經由初步鑑定，兩株內生桿菌分離株可能為新種，再透過生理特性分析及次世代定序確立了這兩株菌確實是新種。

3.2 形態學分析

3.2.1 菌落形態

菌株 *E. ruthgatesii* 8E 在 MMBV4 固態培養基培養三天後，可於第四區觀察到明顯的菌落生成。使用解剖顯微鏡放大 56 倍後可見其菌落形狀為圓型，且中間明顯較周圍厚 (圖 3-3d)，表面有光澤感 (圖 3-3e)。使用倒立式顯微鏡觀察後發現菌落中間與使用解剖顯微鏡觀察的結果類似，菌落中間較周圍厚，但在菌落中間有凹陷，與火山形狀相似 (圖 3-3f)。在四區畫線第四區域選取較大的十個細菌菌落做測量，菌落平均大小約為 0.6 公分。

菌株 *E. penghunesis* 4G 在 MMBV4 固態培養基培養四天後，可於第四區觀察到明顯的菌落生成。使用解剖顯微鏡放大 56 倍後可見其菌落形狀較不規則，形狀類似橢圓形，且中間明顯較周圍厚 (圖 3-3a)，表面有光澤感 (圖 3-3b)。使用倒立式顯微鏡觀察後發現菌落中間與使用解剖顯微鏡觀



察的結果類似，菌落中間較周圍厚，但在菌落中間有凹陷，與 *E. ruthgatesii* 8E 一樣，與火山相似（圖 3-3c）。*E. penghunesis* 4G 十個菌落平均大小為 0.38 公分。

3.2.2 草蘭氏染色

由草蘭氏染色經顯微鏡觀察後得到兩菌株皆呈現紅色（圖 3-4），因此為草蘭氏陰性菌。與內生桿菌屬其他模式菌株結果相同。除了皆為格蘭氏陰性外，從菌株長短可以明顯判斷兩者的差異，*E. ruthgatesii* 8E 菌株之間會彼此相連（圖 3-4,a），因此長度相比於 *E. penghunesis* 4G 明顯較長（圖 3-4,b）。

3.2.3 穿透式電子顯微鏡菌體形態

藉由穿透式電子顯微鏡觀察菌株 *E. ruthgatesii* 8E，可以明顯地看出 *E. ruthgatesii* 8E 為桿菌（圖 3-5b）。菌體外圍有疑似線毛的構造（圖 3-5b），菌株與菌株之間有相連的情形，可能為細菌分裂的過程或是菌體有特別的相連特性（圖 3-5d）。使用 ImageJ 統計 20 隻 *E. ruthgatesii* 8E 菌體的大小，其平均大小約為 $2.40 \mu\text{m} \times 0.65 \mu\text{m}$ 。

內生桿菌 *E. penghunesis* 4G 也同樣為桿菌（圖 3-5a），在 *E. penghunesis* 4G 菌體外圍有疑似染劑沾黏或細菌分泌的物質（圖 3-5a），菌體之間也具有相連的情形（圖 3-5c）。藉由 ImageJ 統計 20 隻 *E. penghunesis* 4G，平均大小約為 $2.14 \mu\text{m} \times 0.66 \mu\text{m}$ 。

3.2.4 超薄切片穿透式電子顯微鏡鏡檢

藉由超薄切片和電子顯微鏡來觀察菌體的內部結構，由於切片的角度不同，無法每一隻細菌都可以剛好切到橫切面，因此進行觀察時會先挑選形狀接近桿狀的細菌來觀察（圖 3-6a）。從 *E. ruthgatesii* 8E 的切片結果可以看到細胞外膜、細胞內膜、細胞間質等結構（圖 3-6b）。而在 *E. penghunesis* 4G（圖 3-6c）的菌體切片結果相比於 *E. ruthgatesii* 8E 的切片結果，細胞外膜與細胞內膜的界線比較模糊，但其他構造，例如細胞間質、核糖體及中間的核酸都可以分辨，其中較特別的地方為 *E.*



penghunesis 4G 菌體中間靠近核酸的部分有疑似顆粒的結構，幾乎於每一個 *E. penghunesis* 4G 菌體都可以觀察到，但是大小與數量不一（圖 3-7）。

3.2.5 場發式發射掃描式電子顯微鏡菌落觀察

藉由掃描式電子顯微鏡觀察 *E. ruthgatesii* 8E 菌落表面的菌體結構，經放大 9,461 倍下菌體長短不一且彎曲幅度皆不相同（圖 3-8a），在放大倍率 24,000 倍下可看到菌體與菌體之間有絲狀電子束可聚焦的物質，但無法確定是什麼結構。菌株 *E. penghunesis* 4G 的菌落表面在放大 8,000 倍後可以發現菌體形狀多樣，有些接近球型但大部分仍為桿狀，再進一步放大至約 24,000 倍後可以發現在 8,000 倍所觀察到接近球型的細菌並非球型，而是較短的桿菌。值得注意是 *E. penghunesis* 4G 菌體表面黏附著較 *E. ruthgatesii* 8E 密集的絲狀電子束可聚焦的物質。

3.3 生理生化特性分析

3.3.1 最適生長鹽度

在實驗中六組鹽度中，*E. penghunesis* 4G 可生長範圍為鹽度 0.5 % ~ 3 % (圖 3-9, a)，*E. ruthgatesii* 8E 可生長範圍為鹽度 0.5~4 % (圖 3-9, b)，且 *E. ruthgatesii* 8E 及 *E. penghunesis* 4G 在鹽度 1% 及 2% 皆有最佳的生長情形，但在鹽度 0.5 % (OD_{600} 0.037) 及 4 %(OD_{600} 0.115) 生長情形不佳。

3.3.2 最適生長 pH

E. ruthgatesii 8E 及 *E. penghunesis* 4G 可生長範圍的 pH 值皆為 pH6~pH9，兩株菌於第二天，培養於 pH7 及 pH8 有最佳的生長情形， OD_{600} 值分別為 *E. penghunesis* 4G pH7 (OD_{600} 1.83), pH8(OD_{600} 1.88) (圖 3-10, a) , *E. ruthgatesii* 8E pH7 (OD_{600} 2.16), pH8(OD_{600} 1.92)(圖 3-10, b)。



3.3.3 最適生長溫度

E. ruthgatesii 8E 可生長溫度範圍為 20 °C ~ 35 °C (圖 3-11a)，*E. penghunesis* 4G 可生長範圍為 15 °C ~ 35 °C (圖 3-11b)。兩菌株皆無法生長於 40 °C。經過一天的培養後，*E. penghunesis* 4G 在 30 °C 及 35 °C 有最高的OD₆₀₀，分別為 OD₆₀₀ 0.709 及 OD₆₀₀ 0.811，第二天 25 °C 有高的 OD₆₀₀ 0.932，在第三天 20 °C 的組別則有最高的 OD₆₀₀ 0.934。
E. ruthgatesii 8E 在經過一天的培養後，30 °C 的組別有最高的OD₆₀₀ 0.745，而在第二天時 25 °C 則有最高的 OD₆₀₀ 0.914，培養第三天則 20 °C 則有最高的OD₆₀₀ 0.934。高溫可能可加速細菌分裂速度，但無法增加細菌的數量，兩株內生桿菌在高溫的組別 30 °C 皆於第一天有較高的 OD₆₀₀ 值。但 OD₆₀₀ 值在第二天則明顯下降，可能原因是細菌死亡或細菌生理特性受影響所導致，而培養於低溫的組別 25 °C、20 °C 則生長速度則較培養於高溫 30 °C 還要來的緩慢，在培養第二天才達到最高的 OD₆₀₀ 值。

3.3.4 生長曲線

兩株菌株之適應期 (lag phase) 約為 12 小時，在接種 12 小時後進入對數生長期(log phase)，36 小時後進入穩定期(stationary phase)，*E. ruthgatesii* 8E 相較 *E. penghunesis* 4G 有微幅度生長，*E. penghunesis* 4G 有 OD₆₀₀ 值下降的趨勢，可能表示已經有細菌死亡的情形發生，約 48 小時，*E. ruthgatesii* 8E 死亡明顯大於生長(圖 3-12,a)*E. penghunesis* 4G 則沒有明顯的 OD₆₀₀ 值下降(圖 3-12,b)，可能由於 OD₆₀₀ 是藉由吸光值來估算菌量，因此並無法直接反應真實的數量，*E. penghunesis* 4G 沒有明顯 OD₆₀₀ 值下降可能原因為電子顯微鏡觀察的結果，猜測 *E. penghunesis* 4G 會分泌黏液於菌體外因此造成吸光值之誤判。此生長曲線結果僅代表培養於 25°C 50mL 之 mmbv4 液態培養基中，培養三天的生長情形。

3.3.5 氧氣耐受性

E. ruthgatesii 8E 為好氧菌而 *E. penghunesis* 4G 則為兼性厭氧菌。
E. penghunesis 4G 經過七天的低氧 (<1 %) 培養，可以在培養基上看到非

常小的菌落(圖 3-13 a,b)，*E. ruthgatesii* 8E 則沒有任何菌落生長，而另外也在負控制組 *E. montiporae* 觀察到非常小的菌落(圖 3-13b)。

3.3.6 氧化酶與催化酶測定

大多數好氧菌或兼性厭氧菌在利用氧氣時會產生有毒之過氧化氫，因此需要催化酶使過氧化氫分解成氧氣與水($H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$)。*E. ruthgatesii* 8E 與過氧化氫有強烈反應，滴 $100\mu l$ 35% 過氧化氫於生長於固體培養基上之菌落時產生強烈泡泡，故判定為正反應。相較於 *E. ruthgatesii* 8E(圖 3-14a)，*E. penghuensis* 4G 却沒有任何氣泡產生，明顯為負反應(圖 3-14b)。氧化酶試驗 *E. ruthgatesii* 8E 與 *E. penghuensis* 4G 在滴入 TMPD 後，兩者皆有變色，因此判斷 *E. ruthgatesii* 8E 與 *E. penghuensis* 4G 兩者皆具有氧化酶活性(圖 3-15)。

3.3.7 軟培養基運動性觀察

利用接種針將目標菌株穿刺入軟培養基中，觀察是否有向外擴散來判斷運動性。本次試驗使用已知為珊瑚病原菌之 *Vibrio coralliilyticus* 及內生桿菌屬中已知具有鞭毛的模式菌種 *E. elysicola* (Kurahashi, M et al., 2007) 作為正對照組。實驗第一天海洋弧菌即展現明顯的運動性(圖 3-16 左 1)，生長較慢的內生桿菌屬還未觀察到運動性表現，但經過五天生長後，*E. penghunesis* 4G 有向外擴散的趨勢，在第七天(圖 3-17)可以明顯看到運動性表現，而且相比於正對照組 *E. elysicola*，*E. penghunesis* 4G 有更明顯的運動性，*E. ruthgatesii* 8E 則沒有觀察到運動表現(圖 3-16 右一)。

3.3.8 API ZYM 酶素活性反應套組反應結果

E. ruthgatesii 8E 與 *E. penghunesis* 4G 皆對相同的酵素有反應，分別有鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase)、可以將酯類切割成酸及醇類的酯酶(esterase)、解酯酶(lipase)、將蛋白水解成肽進而分解成胺基酸的胰蛋白酶(trypsin)(表 3-2)。



3.4 基因體分析

3.4.1 全基因體次世代定序

將遺留在定序資料中的 Illumina universal adapter 剪切後 *E. penghunesis* 4G 與 *E. ruthgatesii* 8E 的序列品質大大提升(表 3-3)，*E. penghunesis* 4G 在去掉 adpater 之前序列數有 10,930,204 bp，去掉 adpater 之後讀數剩餘 7,668,228 bp，有 70.16%的序列數有被去掉 adapter，平均讀數也從 301bp 減少成 256.9 bp。*E. ruthgatesii* 8E 在去掉 adpater 之前讀數有 9,294,508 bp，去掉 adpater 之後讀數剩餘 6,636,060 bp，有 71.4%的讀數有被去掉 adapter，平均讀數也從 301bp 減少成 257.3 bp。由平均 Phred 分數可得知在去掉 adapter 後，序列的平均得分皆大於 30，也就是可能錯誤的鹼基 1000 個只可能有一個因此正確率達 99.9 %。事實上，在修整後序列的平均 Phred 得分約在 35 至 40，正確率約在 99.9~99.99%之間(表 3-3)。

3.4.2 基因體組裝結果

利用 CLC genomic workbench 來組裝 illumina 定序的原始資料，使用去掉 adapter，平均 Phred 分數達 30 以上之序列品質進行基因體序列組裝。bubble size 60, word size 60 時 *E. penghunesis* 4G 有最大的 N50 57,212 bp 及最小 contig 數 334。基因體大小為 5.74 Mb。當 bubble size 60, word size 70 時 *E. ruthgatesii* 8E 有最大的 N50 33,666 及最小的 contig 數 501，基因體大小為 7.17 Mb (表 3-4)。

3.4.3 基因體品質鑑定

利用 CheckM 程式 (Parks, D et al., 2015) 鑑定不同參數組裝之基因體的完整性 (completeness)、污染率 (contamination) 及基因異值性 (heterogeneity)，*E. penghunesis* 4G 與 *E. ruthgatesii* 8E 組裝後的基因異值性皆為 0，兩株菌的完整性皆大於 97%，污染率皆小於 1% (表 3-18)。



3.4.4 基因體註解及基因預測

使用 Prokka 預測組裝完的基因體的基因，*E. ruthgatesii* 8E 具有已知內生桿菌菌株中最大的基因體(7.17Mbp)，具有 5,421 個基因、5174 個蛋白質、7 條 rRNA 和 77 條 tRNA (表 3-6)。*E. penghunesis* 4G 基因體為 5.83Mbp，具有 4,861 個基因、4,719 個蛋白質、9 條 rRNA 和 78 條 tRNA (表 3-6)。

RAST 的次系統內包含所有不同細胞機制的模組(圖 3-19)，將註釋的目標基因分類至不同功能分類的次系統中。其中 *E. penghunesis* 4G 有 1,732 基因屬於次系統，其中 83 個基因为假設基因，總共有 1,649 個基因被註釋。*E. ruthgatesii* 8E 有 1,963 個基因屬於次系統，其中 95 個基因为假設基因，總共有 1,868 個基因被註釋。兩株內生桿菌在不同的次系統分類中有類似比例的基因，*E. penghunesis* 4G 與 *E. ruthgatesii* 8E 約有 15% (*E. penghunesis* 4G: 14.24%，*E. ruthgatesii* 8E: 13.5%) 的基因與胺基酸及其相關功能有關(圖 3-19)，與碳水化合物相關的基因也佔了約 10% (*E. penghunesis* 4G: 10.88%，*E. ruthgatesii* 8E: 8.845%)，與壓力反應相關的次系統中與氧化壓力相關的基因最多(*E. penghunesis* 4G: 46%，*E. ruthgatesii* 8E: 51%)(圖 3-21)，其中特別的是 *E. ruthgatesii* 8E 具有合成珊瑚體內重要調節滲透壓的物質 glycine betaine 的基因。比較四株由石珊瑚分離出來的內生桿菌屬細菌，發現多數細胞功能的比例皆很相近(圖 3-19)，但也有些不同，例如與硫代謝相關的基因只佔四株內生桿菌約 0.5% (*E. penghunesis* 4G: 0.528%；*E. ruthgatesii* 8E: 0.592%，*E. acroporae* Acr-14^T: 0.515%，*E. montiporae* CL-33^T: 0.495%)，但看似相差 0.08% 的基因數量，*E. ruthgatesii* 8E 可以代謝 DMSP 產生 DMS 而 *E. penghunesis* 4G 則無法代謝 DMSP (圖 3-23)。

3.4.5 原噬菌體分析

利用 PHASTER(Arndt et al. 2016)來偵測兩株內生桿菌基因體中是否具有原噬菌體。我們根據三階段的評分方法判斷基因體中的原噬菌體是否為完整(score>90)、有問題的(score 70-90)或未完整(score<70)。*E.*

ruthgatesii 8E 沒有完整(score>90) 的原噬菌體(圖 3-34)，但有一個有問題及一個未完整的噬菌體，兩者註解為 *E.coli* 的噬菌體 (Phage_Escher)。*E.penghunesis* 4G 有一個完整的原噬菌體及一個有問題的噬菌體，兩者皆註解為海洋弧菌的噬菌體(Phage_Vibro)。表 3-7 為使用 PHASTER 分析所有已知內生桿菌基因體可能的原噬菌體，其中只選擇完整註解的原噬菌體，比較下發現所有內生桿菌的原噬菌體數量約為 0~4，其中最多潛在原噬菌體的菌株是 *E.acroporae* Acr-1，基因體中具有四個原噬菌體。

3.4.6 第三型分泌系統分析 (T3SS) 分析

細菌可以藉由第三型分泌系統(Type III secretion systems)透過由三層細胞膜、肽聚醣組成之特殊奈米導管直接將效應蛋白傳輸至其他原核與真核生物中，因此第三型分泌系統對於研究珊瑚共棲菌與珊瑚之間的互動具有重要之參考價值。*E.ruthgatesii* 8E 與 *E.pengunesis* 4G 預測的 T3SS 基因數量分別為 424 及 250。若比較所有內生桿菌屬 T3SS 基因數量可以發現(表 3-8) *E.acroporae* Acr-1^T 具有最多的 T3SS 基因 (523)，三株 *E.acroporae*(Acr-1, Acr-5, Acr-14^T)皆有大約 500 個 T3SS 基因，另外具有最少 T3SS 基因為由潮間帶分離的內生桿菌 *Endozoicomonas*. sp. AB1(基因體尺寸為 4.0 Mb)。若只與珊瑚分離出之內生桿菌發現，同樣由軸孔珊瑚(*Acropora* sp.) 分離出的 *E.ruthgatesii* 8E 與 *E.acroporae* Acr-1、Acr-5、Acr-14^T 有明顯較多的 T3SS 基因數量(表 3-8)。

3.4.7 16S rRNA 親緣關係樹

利用 16S rRNA 了解 *E.ruthgatesii* 8E 與 *E.pengunesis* 4G 在所有內生桿菌屬中的親緣關係 (圖 3-24)。與 *E.ruthgatesii* 8E 及 *E.pengunesis* 4G 親緣關係最近的為 *E.euniceicola*，並與 *E.numazuensis*, *E.montiporae*, *E.gorgoniicola* 在同一個分支中，另一個分支則由 *E.elysicola*, *E.ascidiicola*, *E.atrinae*, *E.acroporae* Acr-12, Acr-14, Acr-1, Acr-5 組成。從親緣關係樹(圖 3-24)可以發現內生桿菌之間的親緣關係與分離來源的寄主沒有直接的關係，分離來源皆為軸孔珊瑚的 *E.ruthgatesii* 8E、*E.pengunesis* 4G 與 *E.acroporae* Acr-12^T、*E.acroporae* Acr-1、*E.*

acroporae Acr-5 及 E. acroporae Acr-14^T 分別位於兩個不同的分支，E. ruthgatesii 8E 與 E. acroporae 四株菌株相似程度只有 94.46~96.26%，E. penghunesis 4G 則為 95.78~96.01%，另外兩株菌株 E. ruthgatesii 8E 及 E. penghunesis 4G 與分離來源為瓊葉表孔珊瑚的 E. montiporae 相似程度分別為 97.23% 及 97.09%，而與兩株菌親緣關係最近的則為分離自軟珊瑚的 E. euniceicola，相似度為 E. ruthgatesii 8E: 96.99%，E. penghunesis 4G: 96.68% (表 4-7)。

3.4.8 DddD 親緣關係樹

除了內生桿菌屬外，有許多海洋細菌具有 dddD 基因，能分解 DMSP 產生 DMS，為了檢驗不同海洋細菌的 dddD 基因的親緣關係，我們挑選 20 株細菌，包括已知具有 DddD 蛋白的 *E. acroporae* Acr-14^T、Acr-1 及 Acr-5 和 *E. ruthgatesii*。*E. ruthgatesii* 8E 的 DddD 蛋白自成一類群，與 *Paraglacicola* sp. 及 *Marinomonas spartinae* 親緣關係最接近。*E. acroporae* Acr-14^T、Acr-1 及 Acr-5 彼此之間的 DddD 蛋白相似度為 99.76%，而 *E. ruthgatesii* 8E 與這三株 *E. acroporae* 菌株之間的相似度只有 68.23%，在親緣關係樹上最近的細菌為 *Paraglacicola* sp. 及 *Marinomonas spartinae* 相似程度分別為 69.21% 與 69.41% (圖 3-25)。

3-5 DMSP 分解成 DMS 的活性

3.5.1 DMSP 不同濃度試驗

在 *E. ruthgatesii* 8E 的基因體中發現可以代謝 DMSP 的操縱組(圖 3-23)，因此推測 *E. ruthgatesii* 8E 可以利用 DMSP 作為碳氮源促進其生長，生長條件請參照方法 (2.6)。三株內生桿菌 *E. ruthgatesii* 8E (圖 3-26b)、*E. penghunesis* 4G (圖 3-26a) 及 *E. acroporae* Acr-14^T(圖 3-26c) 在不同濃度(0mM、0.1mM、1mM、3mM、5mM)的 DMSP 下培養三天的生長情形，根據 OD₆₀₀ 值判斷，發現 *E. ruthgatesii* 8E 生長得最好，其生長最好的組別是第三天的 0.1mM DMSP OD₆₀₀ 1.25 ± 0.219，*E. acroporae* Acr-14^T 生長最佳的組別是第三天 0.1mM DMSP，OD₆₀₀ 為 0.65 ± 0.090。值得注意的是三株內生桿菌的 OD₆₀₀ 值皆隨著添加的 DMSP 濃度上升而下降，按照這

個結果初步推測，高濃度的 DMSP 可能會影響細菌生長。*E.ruthgatesii* 8E 與 *E. penghunesis* 4G 在有添加 DMSP 的培養條件下 OD₆₀₀ 值皆低於沒有添加 DMSP 的控制組，但 *E. acroporae* Acr-14^T 則在添加 0.1mM 及 1mM DMSP 的培養條件下有相比於控制組更高的 OD₆₀₀ 值。藉由將內生桿菌培養於不同濃度的 DMSP 試驗，發現內生桿菌在不同 DMSP 濃度下有著不同的生長情形，顯示三株內生桿菌的差異性。

3.5.2 鹽調控裂解 DMSP 減量線

根據 DMSP 濃度梯度試驗後得到內生桿菌在 0.1mM DMSP 濃度下生長情形較測試的其他濃度好，因此在接下來 DMSP 消耗量與 DMS 產生量的定量實驗中，將選擇 0.1mM 來做試驗，為了將從 GC-MS 得到的 DMS 訊號面積轉換成 DMSP 的濃度，需製備鹹調控裂解 DMSP 減量線，根據實驗設計濃度來選擇五個濃度，分別為 0.01mM、0.025mM、0.05mM、0.1mM 及 0.15mM。檢量線製作是收集不同濃度的標準品下 GC-MS 偵測到的 DMS 訊號面積，來反應標準品在 GC-MS 中反應下的函數關係，並可藉由內插法來定量代測定之未知濃度的 DMSP 樣品。若不同濃度之間得到的面積越接近線性($R^2=1$)表示減量線準確度越高，由於本實驗使用的 GC-MS 進樣方式為手動進樣(相較於自動進樣有較高的偏差值)，因此設定減量線 R^2 目標為 $R^2>0.99$ 。最終利用這五個不同濃度的 DMSP 最終得到 $R^2=0.9941$ (圖 3-27)。

3.5.3 鹹調控裂解 DMSP 定量

在實驗第零天時，四種不同內生桿菌的組別中都含有 0.1mM 的 DMSP，經過一天的培養後，*E. ruthgatesii* 8E 約消耗了 60% 的 DMSP (從 $0.111\text{mM} \pm 0.002$ 減少至 $0.039\text{mM} \pm 0.003$)(圖 3-30a)，而正控制組 *E. acroporae* Acr-14^T 則幾乎沒有消耗 DMSP (從 $0.106\text{mM} \pm 0.0008$ 減少至 $0.101\text{mM} \pm 0.0020$)(圖 3-30b)。培養第二天 *E. ruthgatesii* 8E 培養基中的 DMSP 平均為 $0.051\text{mM} \pm 0.0022$ ，相比於培養一天的 $0.039\text{mM} \pm 0.003$ 增加了約 0.01mM ，另外 *E. acroporae* Acr-14^T 培養第二天的平均 DMSP

濃度竟然上升回 $0.106\text{mM} \pm 0.0029$ 。至於其他兩株內生桿菌在基因體中沒有發現具裂解 DMSP 產生 DMS 的基因與代謝相關操縱組(圖 3-23)，實驗中也沒有 DMSP 明顯減少或增加的現象，*E. penghunesis* 4G 實驗第 0 天培養基中平均 DMSP 的濃度為 $0.095\text{mM} \pm 0.0019$ ，培養一天後減少至 $0.088\text{mM} \pm 0.0073$ ，至第三天上升回 $0.098\text{mM} \pm 0.0069$ ，另外 *E. montiporae* CL-33^T 第 0 天培養基中平均濃度為 $0.106\text{mM} \pm 0.0030$ ，第二天為 $0.112\text{mM} \pm 0.0073$ 至第三天為 $0.107\text{mM} \pm 0.0014$ ，濃度皆與 0.1mM 相近，沒有明顯消耗或增加的情形，符合基因體分析的結果。

3.5.4 DMS 減量線

原本實驗設計預定注射 $1\mu\text{l}$ DMS 99%的標準品，由於在進行減量線時三重複的抽取後濃度偏差大，導致減量線無法達到 $R^2>0.99$ 的標準，因此增加注射量至 $2\mu\text{l}$ DMS。與製備 DMSP 減量線不同的是，藉由注射不同體積(0.06ml 、 0.12ml 、 0.18ml 、 0.24ml 及 0.3ml)來進行濃度梯度，最後將 GC-MS 偵測到的 DMS 訊號面積換算成濃度單位(圖 3-28)。藉由計算 500ml 的氣體稀釋瓶中 DMS 總濃度來得到不同注射體積 DMS 的濃度。 500ml 的氣體稀釋瓶中總共具有 3384 mg/m^3 的 DMS $\text{mg/m}^3=2(\mu\text{L})*0.846(\text{kg/L})*(L/10^6\mu\text{L})*(10^6\text{mg/kg})/[500(\text{mL})*(m^3/10^6\text{mL})]$ ，因此得到 0.06ml 、 0.12ml 、 0.18ml 、 0.24ml 及 0.3ml 濃度分別為 203 mg/m^3 、 406 mg/m^3 、 609 mg/m^3 、 812 mg/m^3 及 1015 mg/m^3 。

同樣的收集 GC-MS DMS 的訊號面積，若彼此之間的關係越接近線性($R^2=1$)表示減量線準確度越高，由於本實驗使用的 GC-MS 進樣方式為手動進樣(相較於自動進樣有較高的偏差值)，因此設定減量線目標為 $R^2>0.99$ ，最終得到 $R^2=0.9924$ 的減量線(圖 3-28)。

3.5.5 DMS 定量

在實驗的第 0 天，剛培養的四株內生桿菌(*E. ruthgatesii* 8E、*E. penghunesis* 4G、*E. acroporae* Acr-14^T、*E. montiporae* CL-33^T)由於還在適應因此並沒有偵測到 DMS 訊號。經過一天的培養後，*E. ruthgatesii* 8E

及 *E. acroporae* Acr-14^T 皆有 DMS 訊號(圖 3-32)，換算濃度後兩株內生桿菌分別產生平均 56.8 ppm ± 0.905 及 0.36 ppm ± 0.069 的 DMS。培養第二天(圖 3-29)，*E. ruthgatesii* 8E 產生平均 52.6 ± 2.126 ppm 的 DMS，*E. acroporae* Acr-14^T 則產生平均 2.83 ± 0.676 ppm 的 DMS，*E. ruthgatesii* 8E 產生的 DMS 濃度為 *E. acroporae* Acr-14^T 的 18.6 倍。至於其他兩株內生桿菌 *E. penghunesis* 4G 及 *E. montiporae* CL-33^T 則無偵測到任何 DMS 的訊號(圖 3-29b)。



四、討論

4.1 電子顯微鏡觀察的菌體形態學

藉由穿透式電子顯微鏡、掃描式電子顯微鏡及光學顯微鏡來觀察兩株新的內生桿菌發現 *E. ruthgatesii* 8E 菌體的形態相較於 *E. penghunesis* 4G 的變化更大。舉例來說，在革蘭氏染色試驗的結果(圖 3-4a)發現 *E. ruthgatesii* 8E 菌體之間有明顯的相連，但同樣的情形在其他兩株內生桿菌的革蘭氏染色試驗結果並無發現，證據雖然薄弱，但我們猜測 *E. ruthgatesii* 8E 或許可以在珊瑚組織中形成 CAMA。而若比較穿透式電子顯微鏡與掃描式電子顯微鏡的觀察結果發現兩株新的內生桿菌在不同觀察方法之下菌體形態差異明顯，藉由穿透式電子顯微鏡觀察後統計兩株內生桿菌的大小($n=25$)發現兩株細菌相差不大，分別為 *E. ruthgatesii* 8E， $2.4 \times 0.65 \mu\text{m}$ 及 *E. penghunesis* 4G， $2.14 \times 0.66 \mu\text{m}$ 。但藉由掃描式電子顯微鏡(圖 3-8 c,d)放大 24,000 倍下觀察菌落上的菌體形態明顯發現同一個菌落上的 *E. ruthgatesii* 8E 彼此之間的形態差異大，有的細菌較長但有的細菌較短，而 *E. penghunesis* 4G 在同一個菌落之下的菌體形態皆相似，沒有在 *E. ruthgatesii* 8E 菌落上明顯的形態差異。而 *E. ruthgatesii* 的多變外形有什麼生理或生態功能呢？仍屬未知，但在 2006 年的一篇導讀論文中提到當桿菌在養分不足的環境下，會延伸其長度變成絲狀，來增加表面積以利養分吸收(Young 2006)，因此推論多變外形或許可以增加 *E. ruthgatesii* 的吸收能力。另一篇 2017 年的導讀論文則整理出，細菌外型結構的可塑性，會因為外在條件改變，而有不同的形態，比如當細菌分裂時或在宿主細胞中，處於不同的化學環境下、貧養環境、富養環境等，皆會改變細菌的外型結構，但這些改變多為可逆的(van Teeseling et al. 2017)因此 *E. ruthgatesii* 8E 多變的外型也可能是培養環境不同或是在使用不同顯微鏡觀察時不同的前處理而導致的菌體形態改變。

另外在 *E. penghunesis* 4G 的切片結果中(圖 3-7，白色箭頭處)，無論細菌被縱切還是橫切，皆可以看到明顯的白色點，電子顯微鏡下出現

的白色視野成因是電子束無法穿透而導致影像呈現白色，因此 *E. penghunesis* 4G 菌體中的白色點成因可能為電子束穿透所造成的破洞，或是那些白色點是細菌體內的顆粒(granule)結構。菌體內的顆粒結構著名的例子是 *Azobacter chroococcum* 體內的 PHB(poly(3-hydroxybutyrate))顆粒(dos Santos et al. 2017)，與嗜鹽菌 *Halomonas hydrothermalis* 及嗜溫菌 *Cupriavidus necator* H16 中的 PHA(polyhydroxyalkanoates) 顆粒(Obruca et al. 2020)，若將 *E. penghunesis* 4G 細胞中疑似顆粒的結構與 PHB 或 PHA 相比可以發現 *E. penghunesis* 4G 細胞中疑似顆粒的結構數量較少，並沒有像 PHB 或 PHA 在 *Azobacter chroococcum* 及 *Cupriavidus necator* 的切片結果一樣幾乎佔據所有細菌，不同的是 *E. penghunesis* 4G 疑似顆粒的結構則主要集中於遺傳物質的附近。而觀察到白色顆粒的另一個原因可能是，進行前處理時所造成的人為誤差，但由於在同樣的操作手之下並沒有在 *E. ruthgatesii* 8E 的切片結果觀察到白色顆粒的出現，因此排除操作過程所導致的人為影響。由於本研究為目前為止首度進行內生桿菌的菌體切片觀察，而其他內生桿菌菌體中是否同樣具有白色顆粒結構及其功能可能為何？目前仍無法確認，仍有待未來研究探討。

4.2 生理生化特徵

E. ruthgatesii 8E 最佳可生長的 pH 值為 7, *E. penghunesis* 4G 則為 pH 8，若比較其他可培養的內生桿菌發現內生桿菌最佳的生長 pH 值範圍為 6~8，兩株內生桿菌的最佳可生長 pH 值也在這個範圍中。細菌喜好的 pH 值或許會導致其居住於宿主身體不同的部位，而珊瑚不同部位也具有不同的 pH 值，舉例來說，多孔軸孔珊瑚的黏液約為 pH7.7 (Wild et al. 2005)，楊氏軸孔珊瑚及萼形柱珊瑚珊瑚細胞的 pH 值約為 7(Barott et al. 2015)，叢生棘杯珊瑚的腸腔區 pH 值隨著時間變動但範圍約為 pH6.5~7.25 (Agostini et al. 2012)，而不同種的珊瑚可能在同個部位會具有不同的 pH 值，但根據以上的例子可以發現珊瑚不同部位的 pH 值範圍約為 6.5~7.7，在內生桿菌最佳生長的 pH 值範圍內。而若根據細菌最

佳生長的 pH 值來判斷細菌可能居住在宿主的哪個部位，則 *E. ruthgatesii* 8E 則可能生長於珊瑚的組織細胞中，*E. penghunesis* 4G 則可能生長於珊瑚的黏液中。在真正宿主身上由於有不同且複雜的環境條件，因此細菌會選擇在哪裡生長可能會有不同的結果。境，可以合理推論內生桿菌在自然環境的宿主身上可能會有不同的結果。

我們在 RAST 基因體註釋的結果中發現，兩隻新的內生桿菌 *E. ruthgatesii* 8E 與 *E. penghunesis* 4G 皆有吸收與合成滲透壓調節物質，甜菜鹼(Betaine)的相關基因。而為什麼內生桿菌需要合成或吸收滲透壓調節物質呢？從生理特性測試的結果得知兩株內生桿菌的最佳生長鹽度為 10-20 PSU，其他已知可培養的內生桿菌的最佳生長鹽度則為 10-30 PSU，但目前已知的內生桿菌的分離來源皆是海洋中的無脊椎生物，而這些無脊椎生物大多都是滲透壓調節者，也就是他們組織中的鹽度與周圍海洋的鹽度一致。海洋的鹽度範圍為 33~41 PSU (Piola & Gordon 1984) (Van Der Merwe et al. 2014)與內生桿菌最佳生長鹽度比較可以發現，海洋的鹽度對於內生桿菌來說偏高，因此可以吸收與合成滲透壓調節物質的內生桿菌則因此可以生長於不同鹽度之下，而可能也是因為如此，內生桿菌幾乎存在於所有的海洋無脊椎動物身上。除了內生桿菌之外，*E. coli* 與 *S. typhimurium* 在面臨滲透壓壓力下也會吸收周圍環境具有的滲透調節物質，累積海藻糖(trehalose)、甜菜鹼或脯胺酸(proline)(Burg & Ferraris 2008)，而除了細菌之外，珊瑚體內的共生藻則會藉由產生 DMSP、甜菜鹼(betaines)(Yancey et al. 2010) 或 floridoside (2-O-glycerol- α -d-galactopyranoside)(Ochsenkühn et al. 2017)來減緩滲透壓力。

同樣的藉由生理特性分析得知兩株新的內生桿菌可生長溫度範圍分別為，*E. ruthgatesii* 8E 20~35 °C，*E. penghunesis* 4G 15~35 °C，*E. penghunesis* 4G 可生長的範圍則較 *E. ruthgatesii* 8E 來的廣，可能原因為何？若比較兩株內生桿菌分離地點(墾丁與澎湖)的海水溫度則可以發現分離環境可能會影響菌株的生理特性。墾丁後壁湖的海水表面溫度(sea surface temperature, SST)，冬天(11-2 月)平均為 23.2 °C，平均 SST

則為 7 月 29.8°C ，曾經在 2016 年 5 月最高溫紀錄 35.6°C ，另外澎湖海水表面溫度，冬天(11-2 月)平均為 19.7°C ，夏天在八月則可以到達 28.0°C ，在 2012 年一月記錄到最低海水表面溫度為 12.1°C ，墾丁的海水溫度即使在冬天也不會低於 20°C ，而澎湖則是在冬天會有較低的海水溫度，且甚至可以低至 12 度，因此推論 *E. penghunesis* 4G 可在 15°C 下生長而 *E. ruthgatesii* 8E 則不能在低於 20°C 的海水下生長，其原因可能與分離地點的環境特性有關係。

4.3 基因體功能

4.3.1 原噬菌體

我們在兩株新的內生桿菌 *E. ruthgatesii* 8E 及 *E. penghunesis* 4G 的基因體中分別發現 0 個及 1 個完整的原噬菌體，而值得注意的是基因體大小為 7.1 Mb 的 *E. ruthgatesii* 8E 的基因體中沒有一個完整的原噬菌體，但基因體大小為 5.7 Mb 的 *E. penghunesis* 4G 則有一個原噬菌體。原噬菌體的數量是否與細菌的基因體大小有直接的關係？Casjeans 等人發現大約有 60% 的細菌基因體中具有原噬菌體，從細菌的基因體大小與基因體中具有的原噬菌體數量發現，兩者並不成正比，基因體大於 6 Mb 的細菌（內生桿菌平均基因體大小為 6.09 Mb ），基因體中具有的原噬菌體數量與基因體大小成反比，反之基因體大小介於 $3-6\text{ Mb}$ 的細菌，基因體中具有的原噬菌體數量則與基因體大小成正比(Casjens 2003)。因此基因體大小為 7.1 Mb 的 *E. ruthgatesii* 8E 基因體中沒有原噬菌體是符合他們的統計結果的。而另一個影響細菌基因體中原噬菌體的數量的是細菌具有的防禦功能，常間回文重複序列叢集關聯蛋白系統 (Clustered Regulated Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-Cas Type)可能也會影響細菌基因體中的原噬菌體數量，初步使用網站上的細菌基因體註釋工具-DFAST 來預測內生桿菌基因體中具有的 CRISPRS 數量發現，有最多 CRISPRS 蛋白的 *E. acropora* Acr-1 基因體中的原噬菌體數量並不是最少的，且 CRISPRS 蛋白的數量與基因體大小或原噬菌體數量沒有關係，但目前僅初步知道內生桿菌基因體中具有與 CRISPR-Cas 相關蛋白數量，並沒有仔細探討內生桿菌

普遍具有第幾型的 CRISPR-Cas，因此未來可以針對此方面進行研究討論，更進一步了解內生桿菌的預防機制與原噬菌體之間的關係。

4.3.2 移動能力及化學趨性

Neave 等人曾提出內生桿菌可能具有游離性的生活型態(Neave et al. 2017a)，而是否具有運動能力對於游離性細菌找尋宿主來說是很重要的能力，但無論是藉由軟培養基運動能力測試或藉由穿透式電子顯微鏡及掃描式電子顯微鏡，皆沒有觀察到 *E. ruthgatesii* 8E 及 *E. penghunesis* 4G 明顯的運動能力及疑似鞭毛的構造。但值得注意的是在兩株內生桿菌的基因體中皆發現與鞭毛移動能力、鞭毛合成及細菌化學趨性相關的基因。至於為什麼都沒有觀察到兩株內生桿菌具有移動能力的證據，可能因為一、菌株的培養條件使其不需要鞭毛基因的表現，二、兩株內生桿菌與鞭毛移動能力、鞭毛合成及細菌化學趨性相關的基因不完整，或無法表現，因此使我們無法觀察到兩株內生桿菌明顯的運動行為。而目前已知大部分的內生桿菌皆具有移動能力，分別為 *E. arenosclerae* AB112T(Appolinario et al. 2016)、*E. ascidiicola* AVMART05T (Schreiber et al. 2016c)、*E. elysicola* (Kurahashi & Yokota 2007)、*E. euniceicola* EF212^T、*E. gorgoniicola* PS125^T (Pike et al. 2013) 及 *E. montiporae* CL-33^T(Yang et al. 2010)，而若將這些已知具有運動能力的內生桿菌帶有的基因進行比較，可以發現在所有已知具有運動能力的內生桿菌中只有 *E. ascidiicola* AVMART05^T 不具有與細菌化學趨性相關的基因，而在 2007 年發表的第一株內生桿菌 *E. elysicola* (Kurahashi & Yokota 2007)，其穿透式電子顯微鏡結果明顯具有鞭毛的結構，但卻在 *E. elysicola* 的基因體註釋結果中沒有發現任何與鞭毛合成或鞭毛運動性相關的基因，而可能的原因為基因體完整性不足，使某些基因未被成功註釋導致，而由於目前大部分內生桿菌的基因體皆具有鞭毛運動性相關的基因，因此可合理推測內生桿菌可能有游離性的生活型態。



4.3.3 滲透壓調節物質

在 PROKKA 基因體註釋的結果中發現 *E. ruthgatesii* 8E 具有將 choline 合成常見的滲透壓調節物質 glycine betaine (GB) 的 BetA 及 BetB 酵素，而從生理特性分析結果得知內生桿菌在自然環境下需承受宿主體內的滲透壓壓力，因此推論 *E. ruthgatesii* 8E 可能因此藉由分泌 GB 來調節周圍的滲透壓。而從珊瑚分離出的內生桿菌除了 *E. ruthgatesii* 8E 可以合成 GB 之外，*E. montiporae* CL-33^T 則具有將 glycine 催化成 GB 的 GSMDT(glycine sarcosine dimethylglycine N-methyltransferase) 酵素 (Ngugi et al. 2020)。兩者分別具有不同的途徑，*E. montiporae* CL-33^T 可將 glycine 轉變成 GB，而 *E. ruthgatesii* 8E 則是可將 Choline 合成 GB。除了兩株從珊瑚分離的內生桿菌之外，分離來源為海鞘的 *E. atrinea*、*E. ascidiiicola*、海蛞蝓的 *E. elysicola* 及海綿的 *E. numazuensis* 皆具有合成 GB 的酵素(Ngugi et al. 2020)，且皆具有相關的 transporter，因此可假設內生桿菌在不同宿主身上為提供 GB 的來源之一。

4.4 DMSP 與 DMS 定量

目前已知兩株內生桿菌 *E. acroporae* Acr-14^T 及 *E. ruthgatesii* 8E 具有使用 acetyl-Coenzyme A 作為輔受質 (cosubstrate) 的 *dddD* 基因 (Alcolombri et al. 2014)，可以將 DMSP 裂解產生 DMS。而什麼是 DMSP? DMSP 是重要的氣候調節物質 DMS 的前導物質，而每年有約 10⁹ 公噸的 DMSP 產生(Curson et al. 2011)，其中珊瑚礁為 DMSP 產生的熱點之一。珊瑚礁的 DMSP 除了珊瑚本身會產生之外，主要由珊瑚的共生藻所製造。其中籐枝軸孔珊瑚的共生藻可產生高濃度的 DMSP (3341 fmol/zooxanthellae)(Broadbent et al. 2002)，而 DMSP 除了是海洋中豐富的含硫化合物之外，對於藻類則是重要的抗氧化、滲透壓調節物質(Sunda et al. 2002, Yancey et al. 2010)，對於細菌來說則是可以作為碳源及硫源的化合物。已知 *E. acroporae* Acr-14^T 的基因體中具有可以將 DMSP 作為能量來源的完整操縱組，同樣的情形在 *E. ruthgatesii* 8E 的基因體中也同

樣發現完整的 DMSP 操縱組(圖 3-23)。值得注意的是兩株內生桿菌的分離來源皆為可產生高濃度 DMSP 的軸孔珊瑚(Broadbent et al. 2002)，由於目前對於內生桿菌消耗 DMSP 及產生 DMS 的能力仍然未知，因此本篇論文想藉由定量這兩株內生桿菌消耗 DMSP 及產生 DMS 的量來更加了解內生桿菌與珊瑚之間的可能互動關係，將於下一小節詳細討論。

4.4.1 DMSP 消耗量

本次實驗設計使用的 DMSP 濃度為 0.1mM，遠遠高於自然珊瑚表面的 DMSP 濃度，珊瑚表面的 DMSP 濃度會根據珊瑚種類及珊瑚體內具有的共生藻種類及在珊瑚組織細胞中的密度而有所不同，濃度約為 4-409 nmol/cm² (Frade et al. 2016)，而有些軸孔珊瑚甚至可以產生高達 900-1600 nmol/cm² 的 DMSP(Hopkins et al. 2016)，換算濃度單位則約為 $9 \times 10^{-4} \sim 1.6 \times 10^{-3}$ mM，遠遠低於本次實驗使用的濃度。將內生桿菌培養於不同濃度的 DMSP 中發現高濃度的 DMSP (>1mM) 會抑制內生桿菌生長且不同的內生桿菌在具有 DMSP 的培養基中生長情形皆不同(圖 3-26)，而珊瑚在遭受逆境的時候會增加 DMSP 的分泌，來減少氧化壓力對細胞造成的傷害(Raina et al. 2013)，DMSP 濃度的增加可能是珊瑚在逆境之下控制其體內細菌群集結構的一種策略，無法適應較高濃度 DMSP 環境的細菌則無法生長，進而留下可以在較高濃度 DMSP 環境下生長的細菌。由於 *E. ruthgatesii* 8E 在高濃度的 DMSP(1mM) 生長情形較其他三株內生桿菌來的好，因此推論 *E. ruthgatesii* 8E 可能是珊瑚遇到逆境，DMSP 濃度增加後存活的細菌之一，並且藉由裂解 DMSP 產生更強的抗氧化物質 DMS 來幫助珊瑚順利度過逆境。

藉由 GC-MS 得知內生桿菌的 DMSP 消耗量，在同樣的培養條件下，*E. ruthgatesii* 8E 經過一天可以消耗約 50% 培養基中的 DMSP，而 *E. acroporae* Acr-14^T 則只有消耗約 5% 培養基中的 DMSP，可能原因為 *E. ruthgatesii* 8E 在含有 DMSP 的培養基中生長的速度高於 *E. acroporae* Acr-14^T，因此較多的細菌則可以消耗更多的 DMSP，另一個可能原因為，*E. acroporae* Acr-14^T 在含有 DMSP 的基本培養基中需要較長時間的適應期，

才會進入對數生长期。由於本次試驗的實驗天數只有兩天，因此可以明顯的觀察到生長較快速的 *E. ruthgatesii* 8E 消耗 DMSP 的量。未來則考慮增加初始細菌濃度，且縮短實驗時間希望可以更明顯的觀察到內生桿菌消耗 DMSP 的情形。





結論與展望

本篇研究分離了兩株可培養的內生桿菌新種 *E. ruthgatesii* 8E 及 *E. penghunesis* 4G，除了分析基本的生理特性外，藉由組裝高品質(完整度大於 97%及污染率<1%)的基因體來解析內生桿菌基因體中可能具有的功能，發現分離來源多樣的內生桿菌，藉由基因體註解，不同功能的基因皆具有相似比例，彼此之間對於碳水化合物的代謝及胺基酸合成皆佔了次系統約四分之一的基因量，但這些不同的內生桿菌也各具有不同的特性，*E. ruthgatesii* 8E 具有可代謝 DMSP 產生 DMS 的基因但 *E. penghunesis* 4G 則缺乏這個基因，因此 *E. ruthgatesii* 8E 參與宿主的硫循環，而 *E. penghunesis* 4G 在與去毒性相關的基因多於其他三株從珊瑚分離的內生桿菌，可能具有提高珊瑚對有害物質的耐受性，最後本篇論文對於兩株具有裂解 DMSP 產生 DMS 的內生桿菌進行 DMSP 消耗及 DMS 產生量的定量，希望可以更了解內生桿菌在宿主身上具有的影響力。在未來研究中將使用 nanopore 進行長序列定序，希望可以獲得完整(1 contig)的內生桿菌基因體，了解 *E. ruthgatesii* 8E 為什麼擁有最大基因體卻沒有任何完整原噬菌體的原因，並從兩株內生桿菌的 T3SS 及 T4SS 基因下手來進一步了解可能與宿主之間可能的互動關係。最後以 *E. ruthgatesii* 8E 紀念於 2018 年逝世的夏威夷海洋研究中心執行長 Ruth Deborah Gates，感謝她對珊瑚礁復育的所有貢獻。

圖與表



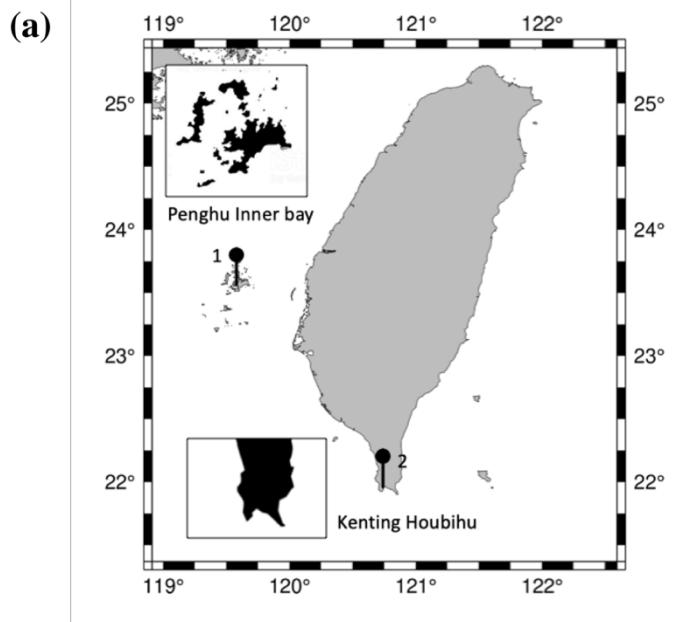
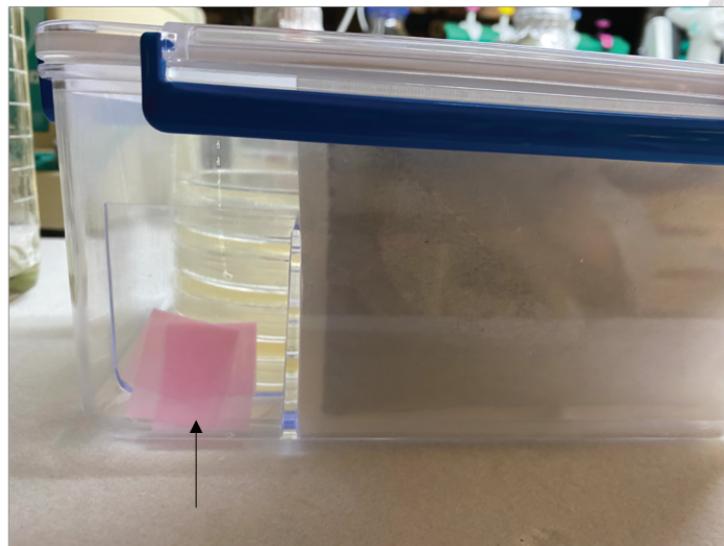


圖 2-1 採樣地點與軸孔珊瑚

(a)採樣地點，1 為澎湖內灣，2 為墾丁後壁湖。(b)墾丁的軸孔珊瑚 (c)澎湖的美麗軸孔珊瑚，*E. ruthgatesii* 8E 分離自墾丁的軸孔珊瑚; *E. penghunesis* 4G 分離自澎湖的美麗軸孔珊瑚，照片由湯森林老師助理：陳星儒與江培汶提供。



(a)



(b)



圖 2-2 厥氧培養盒

(a) 氧氣濃度 $>1\%$ ，(b) 氧氣濃度 $<1\%$ ，箭頭為氧氣濃度試紙，白色表示氧氣濃度小於 1% ，紅色為氧氣濃度 $>1\%$ 。



(a)



(b)



(c)

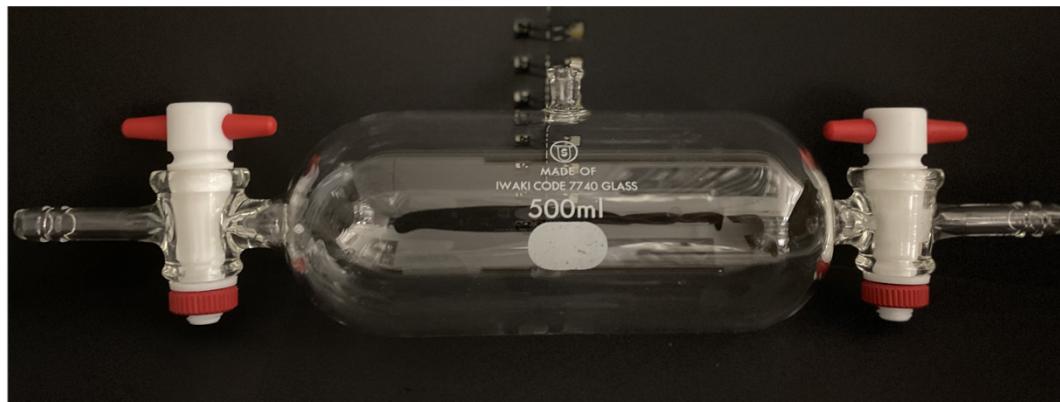
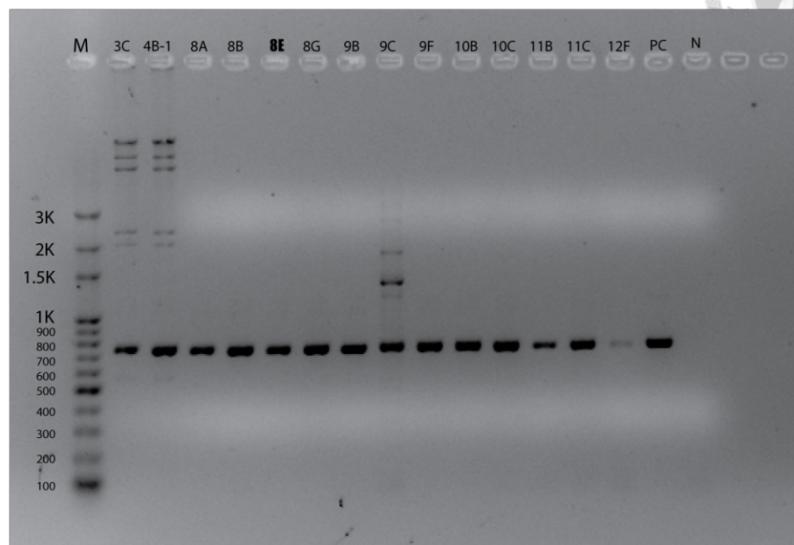


圖 2-3 定量 DMSP 及 DMS 使用的器材

(a) 1 μ l 微量針 (b) 500 μ l 氣密針 (c) 500ml 氣體稀釋瓶。



(a)



(b)

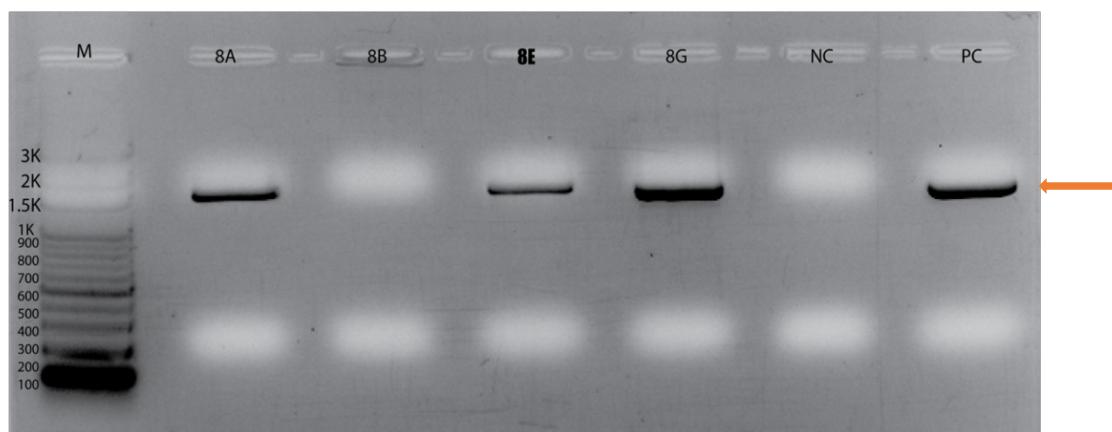
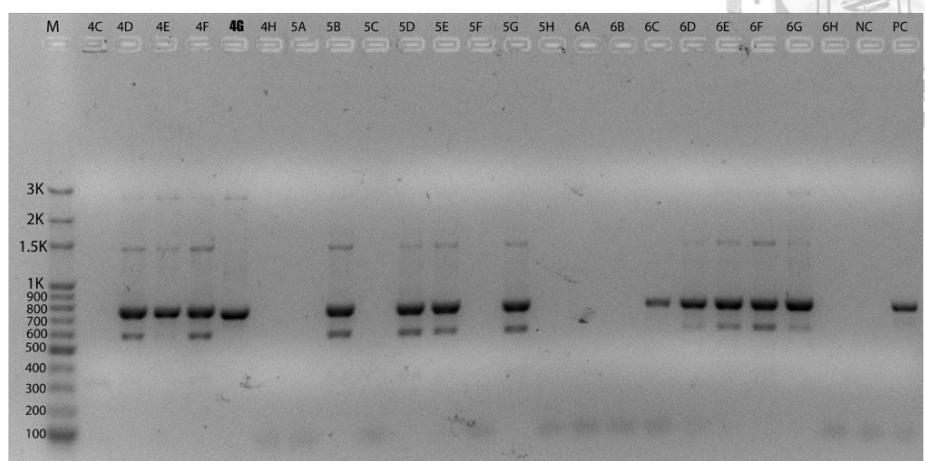


圖 3-1 *E. ruthgatesii* 8E 內生桿菌專一性引子增幅結果

(a) 27F-En771R，箭頭之外的條帶屬於非專一性增幅結果 (b) 27F-1492R 。 M (marker): 100bp DNA ladder，陽性對照組為 *E. acroporae* Acr-14^T，陰性對照組為無菌去離子水，1.5% 洋菜膠，粗體 8E 代表 *E. ruthgatesii* 8E，箭頭處為目標位置。



(a)



(b)

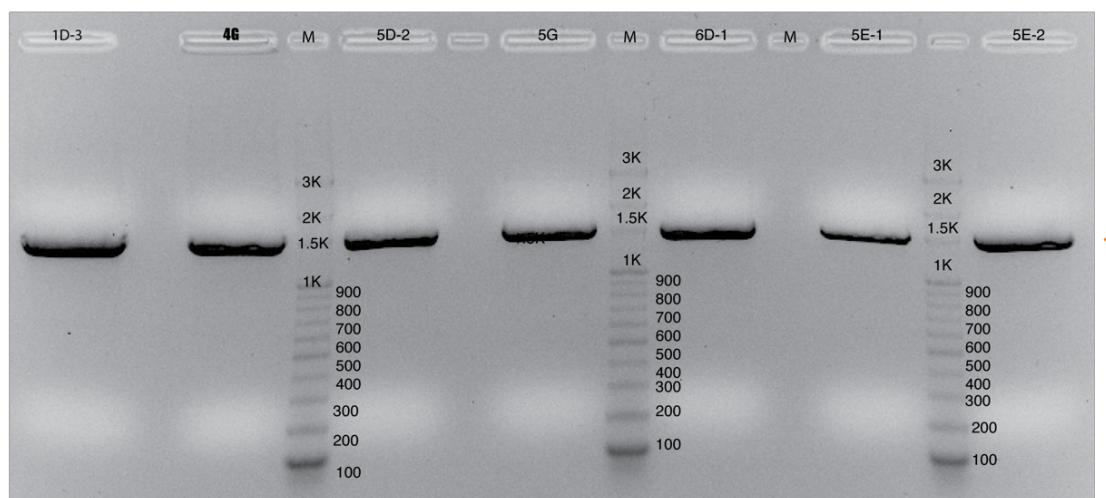


圖 3-2 *E. penghunesis* 4G 內生桿菌專一性引子增幅結果

(a) 27F-En771，箭頭之外的條帶屬於非專一性增幅結果 (b) 27F-1492R。

M(marker) : 100bp DNA ladder; 陽性對照組為 *E. acroporae* Acr-14T，陰性對照組為無菌去離子水，1.5% 洋菜膠，4G 代表 *E. penghunesis* 4G，箭頭處為目標位置。

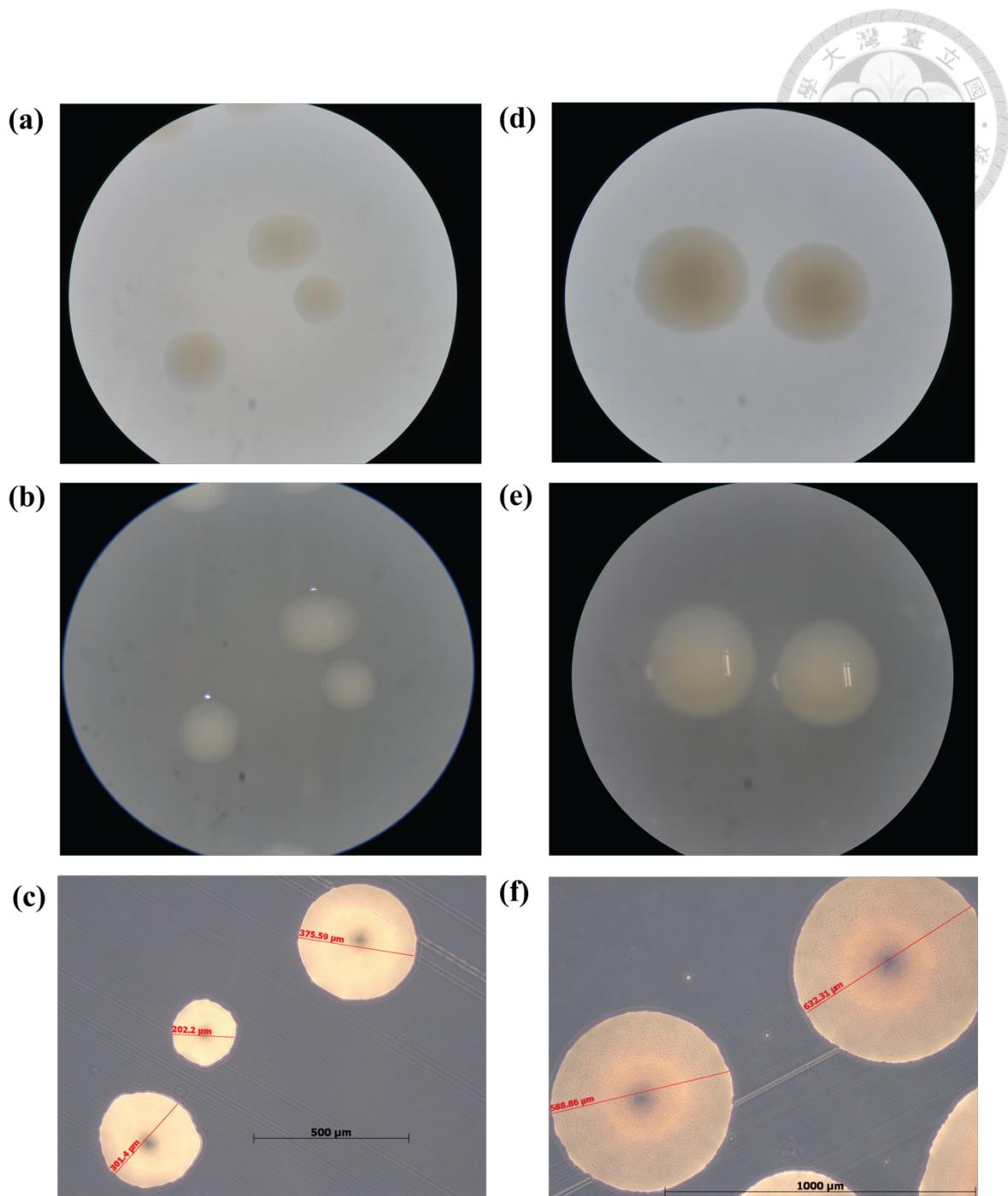
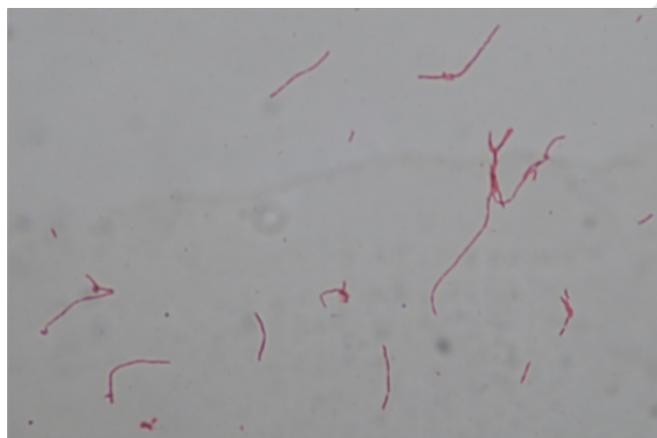


圖 3-3 內生桿菌菌落型態

(a)解剖顯微光源從下而上的 *E. penghunesis* 4G (b)解剖顯微光源從上而下的 *E. penghunesis* 4G (c)使用 Nikon 倒立式顯微鏡觀察的 *E. penghunesis* 4G (d)解剖顯微光源從下而上的 *E. ruthgatesii* 8E (e)解剖顯微光源從上而下的 *E. ruthgatesii* 8E (f)使用 Nikon 倒立式顯微鏡觀察的 *E. ruthgatesii* 8E。兩株內生桿菌皆培養 3 天，使用解剖顯微鏡放大 56 倍，*E. ruthgatesii* 8E 具有較大且顏色較深的菌落。



(a)



(b)



(c)

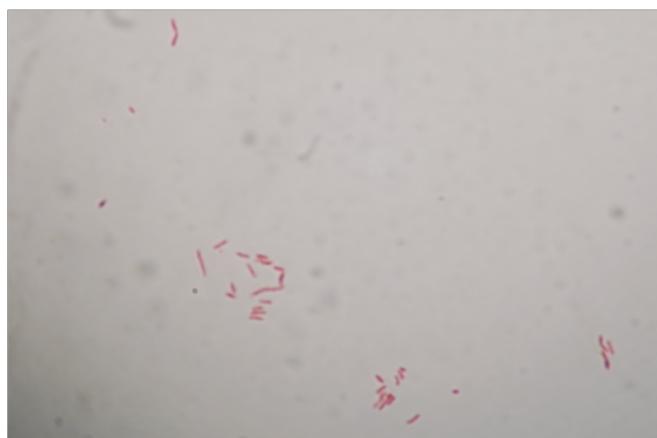


圖 3-4 *E. ruthgatesii* 8E 革蘭氏染色結果

(a)*E. ruthgatesii* 8E , (b) *E. penghunesis* 4G , (c) *E. montiporae* Cl-33^T (正控制組)

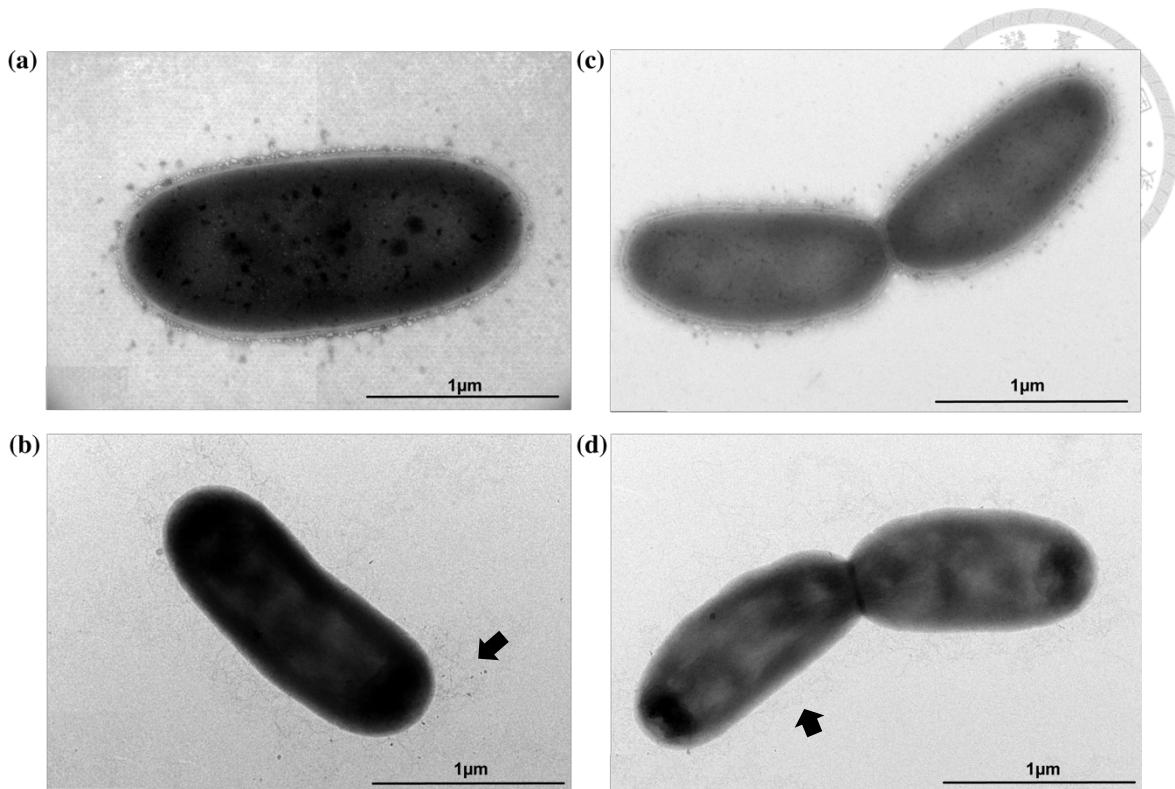


圖 3-5 *E. ruthgatesii* 8E 與 *E. penghuensis* 4G 的形態觀察

(a) *E. penghuensis* 4G。(b) *E. ruthgatesii* 8E。(c) *E. penghuensis* 4G 菌體相連的情形。(d) *E. ruthgatesii* 8E 菌體相連的情形。將培養於液態 MMBV4 培養基， 25°C ，一天的 *E. ruthgatesii* 8E 及 *E. penghuensis* 4G 經 2% 磷鎢酸，染色 5 秒。使用穿透式電子顯微鏡觀察；兩者皆有菌體相連的情形，箭頭：*E. ruthgatesii* 8E 外圍有疑似線毛構造。*E. ruthgatesii* 8E 平均大小為： $2.4\mu\text{m} \times 0.65\mu\text{m}$ ，*E. penghuensis* 4G: $2.14\mu\text{m} \times 0.66\mu\text{m}$

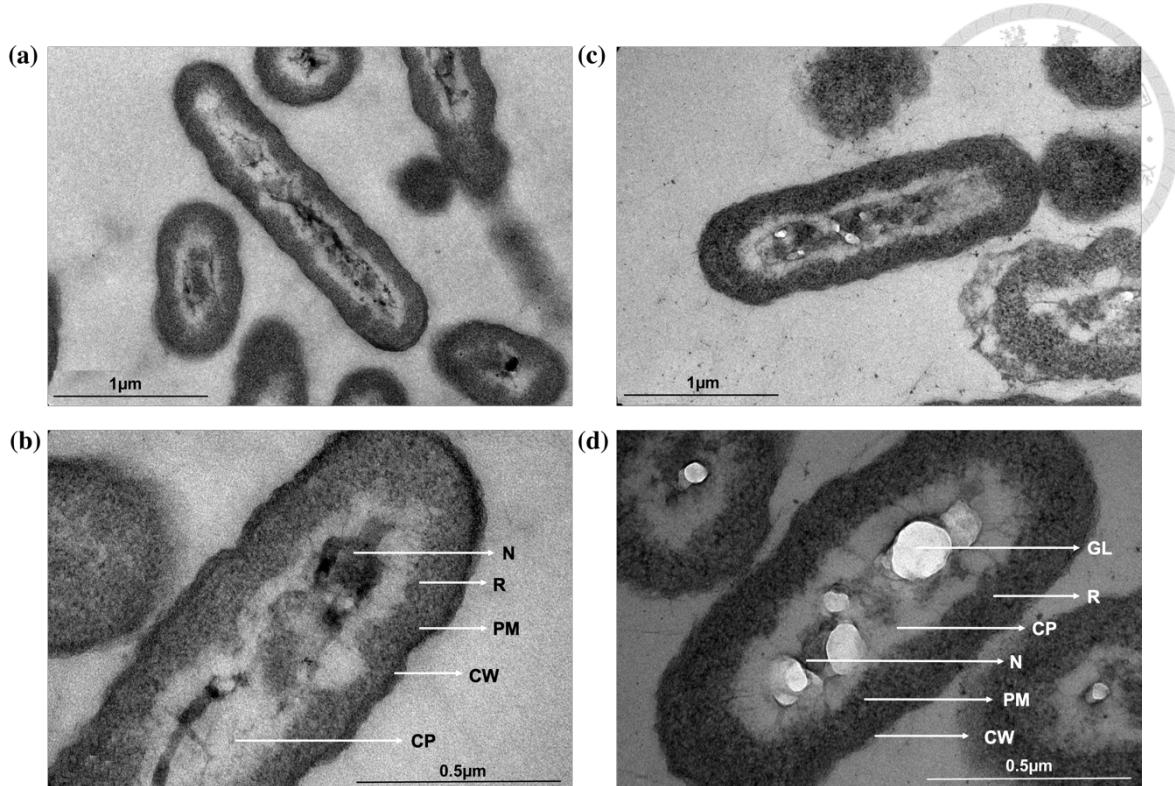


圖 3-6 *E. ruthgatesii* 8E & *E. penghuensis* 4G 切片觀察

(a, b) *E. ruthgatesii* 8E。 (c, d) *E. penghuensis* 4G。 將培養於液態 MMBV4 培養基，
25°C，一天的 *E. ruthgatesii* 8E 及 *E. penghuensis* 4G 經超薄切片厚度達 70nm-90nm
後使用 5% 醋酸鈾醯與 0.4% 檸檬酸鉛染色，最後使用穿透式電子顯微鏡觀察。

CW: cell wall, PM: plasma membrane, R: ribosomes, CP: cytoplasm, GL:
granule-like, N: nucleotide。

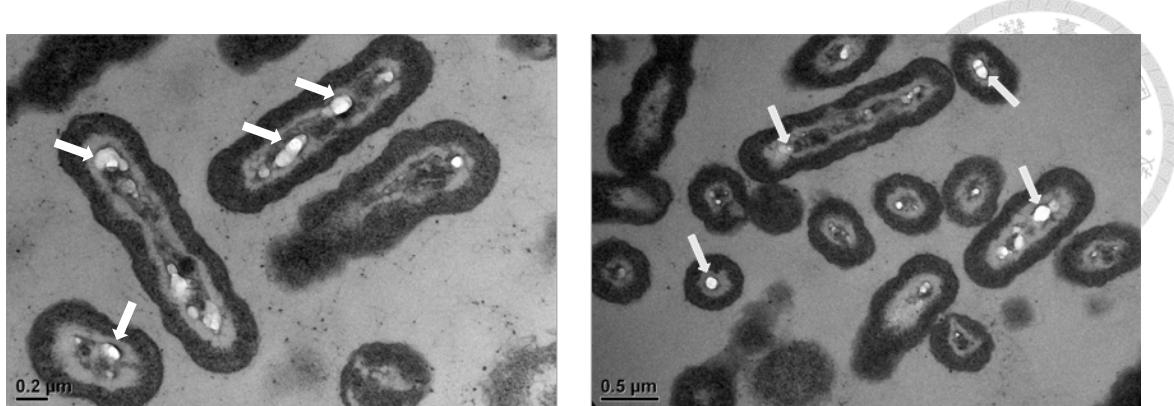


圖 3-7 *E. penghunesis* 4G 菌體切片特殊結構

白色箭頭為 *E. penghunesis* 4G 菌體中利用穿透式電子顯微鏡觀察結果中電子束無法穿越的結構

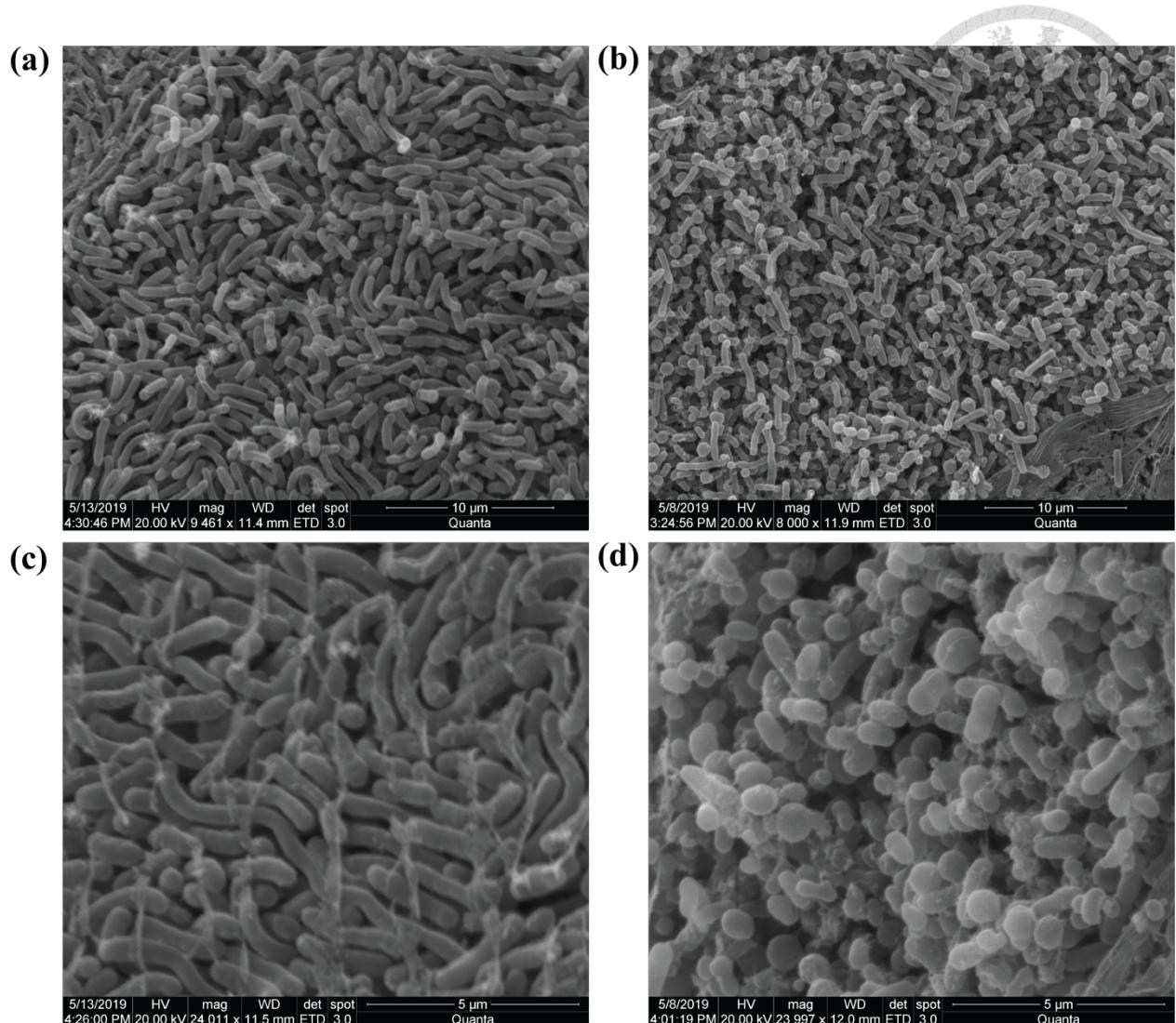


圖 3-8 *E. ruthgatesii* 8E & *E. penghuensis* 4G 菌落觀察

(a,c) *E. ruthgatesii* 8E , (b,d) *E. penghuensis* 4G 。 培養三天的單一菌落利用場發式
發射掃描式電子顯微鏡觀察。Bar 分別為 10μm 與 5μm 。

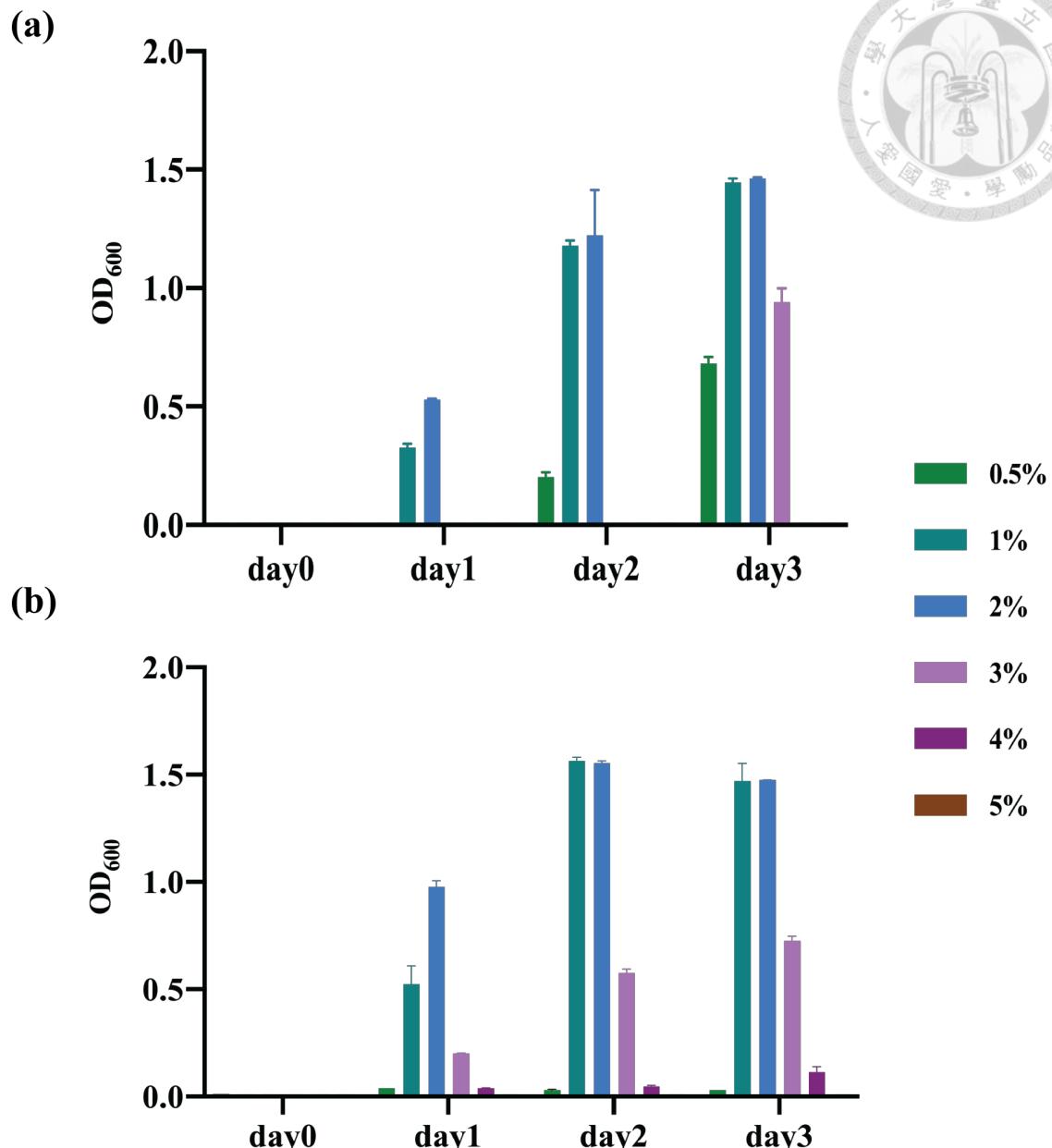


圖 3-9 鹽度生長試驗

(a) *E. penghunesis* 4G, (b) *E. ruthgatesii* 8E。每個組別皆有三重複。以 1:1000 的比例接種對數生長期的菌至不同氯化鈉含量的 mmbv4 富營養培養基培養三天，氯化鈉比例為 0.5%、1%、3%、4%、5%。*E. penghunesis* 及 *E. ruthgatesii* 8E 於 1%、2% 有最好的生長情形。

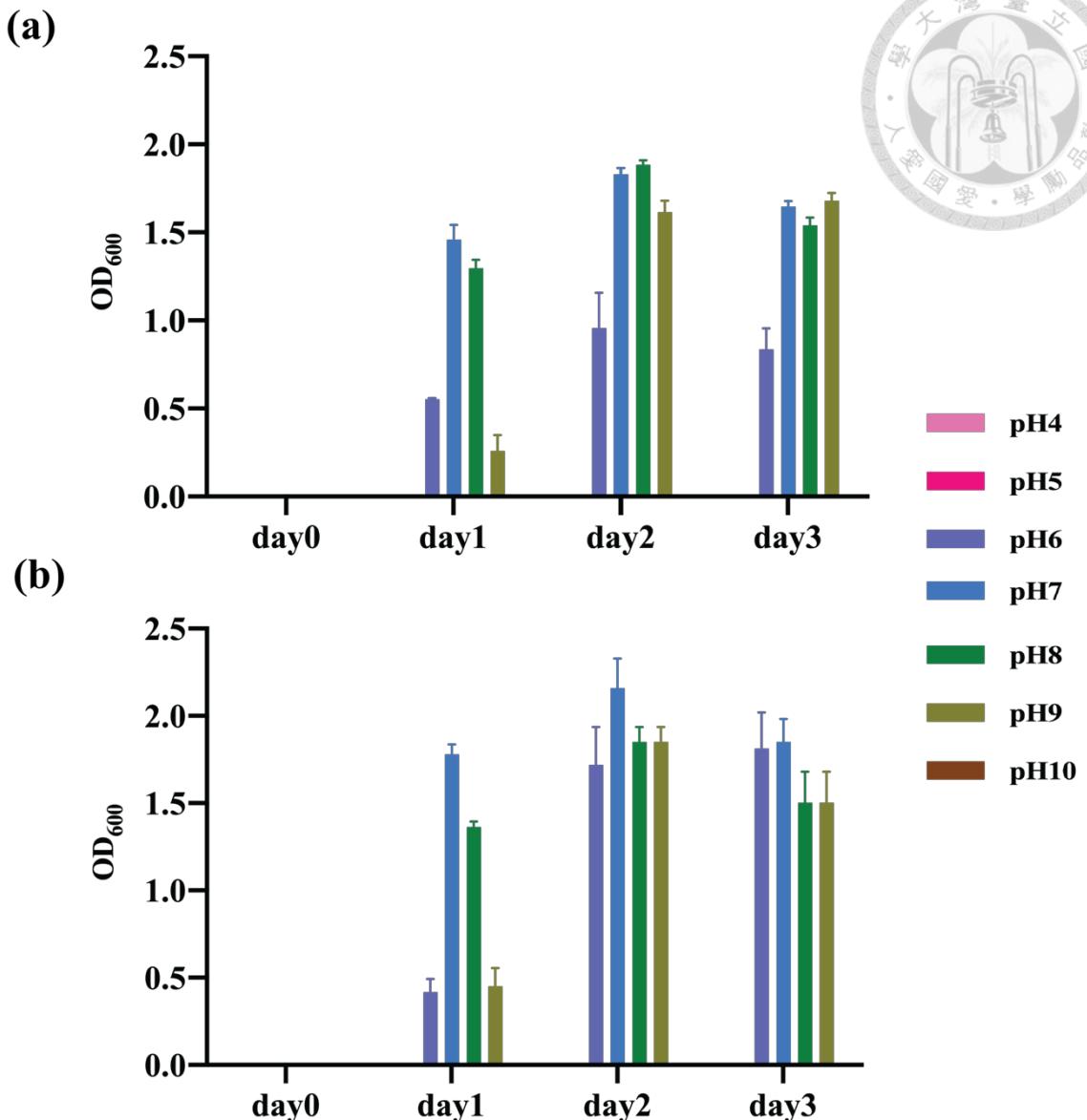
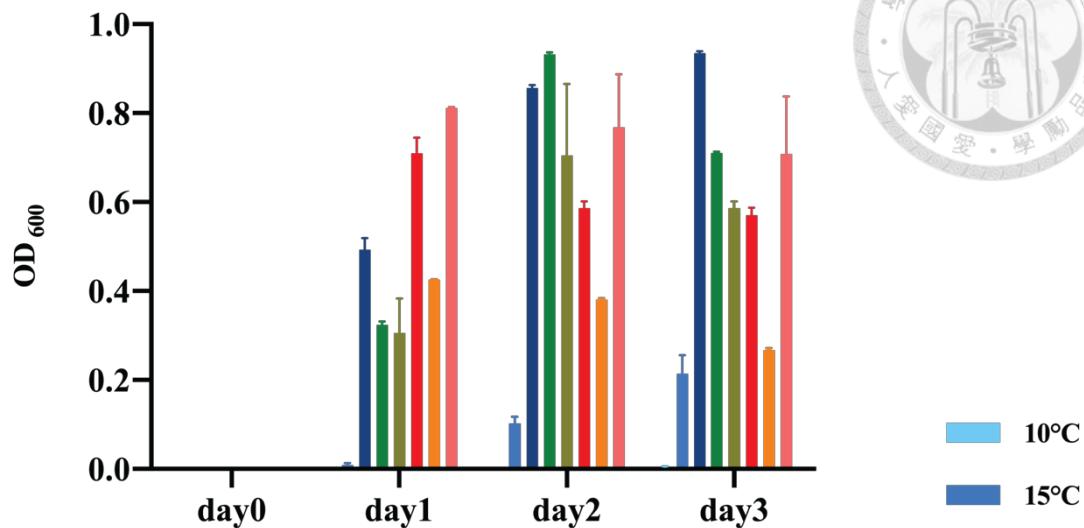


圖 3-10 酸鹼值生長試驗

(a) *E. penghunesis* 4G, (b) *E. ruthgatesii* 8E。每個組別皆有三重複。以 1:1000 的比例接種對數生長期的菌至不同酸鹼值的 mmbv4 富營養培養基培養三天，酸鹼值分別為 pH4、pH5、pH6、pH7、pH8、pH9、pH10，*E. penghunesis* 4G 於 pH8 生長略好於 pH7，*E. ruthgatesii* 8E 於 pH7 有最佳的生長情形。



(a)



(b)

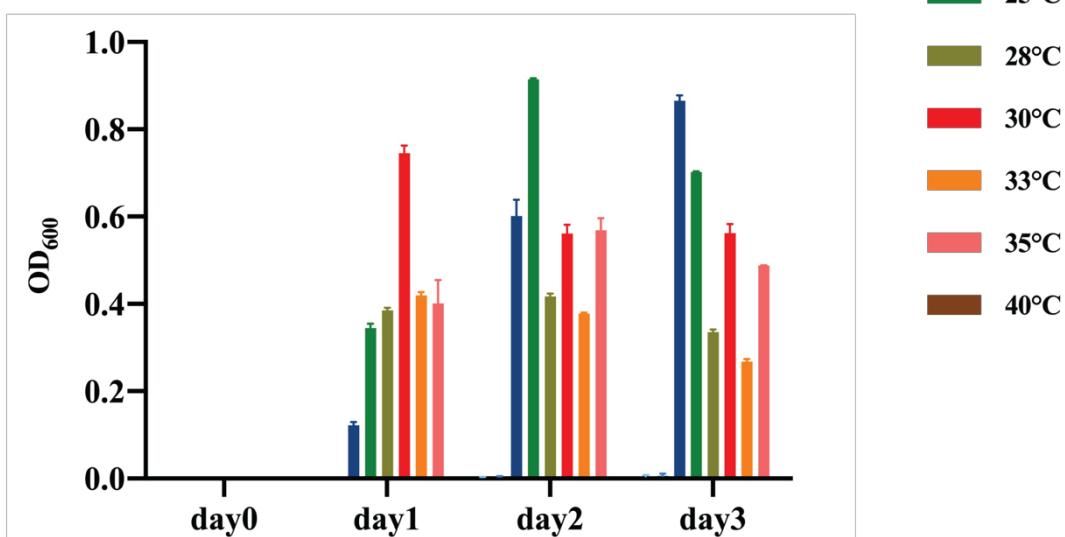
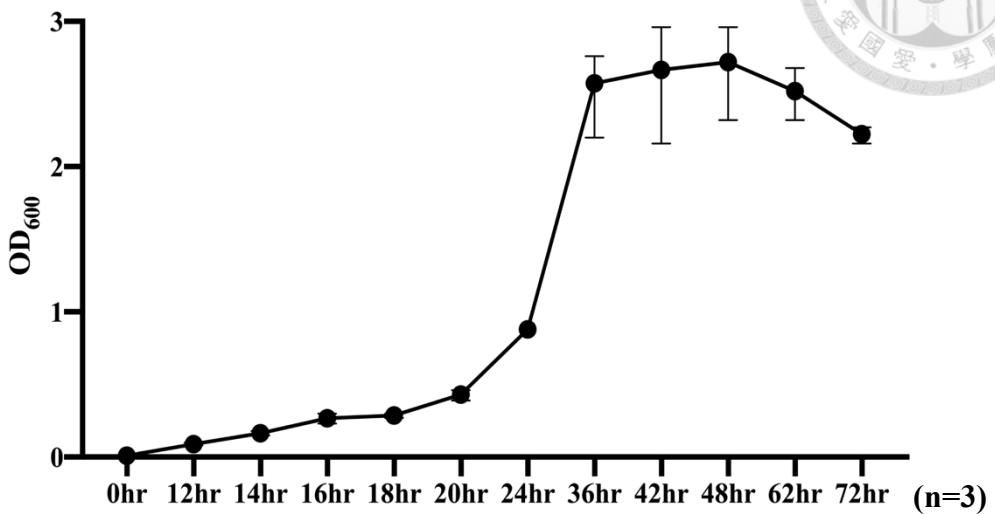


圖 3-11 溫度生長試驗

(a) *E. penghunesis* 4G, (b) *E. ruthgatesii* 8E。每個組別皆有三重複。以 1:1000 的比例接種對數生長期的菌至 mmbv4 富營養培養基中於不同溫度下培養三天，溫度分別為 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 28°C, 30°C, 33°C, 35°C, 40°C。*E. penghunesis* 4G 在 20°C, 25°C 有最佳的生長情形，*E. ruthgatesii* 8E 則於 25°C 有明顯最佳的生長情形，與鹽度及酸鹼值生長使用不同的分光光度計。



(a)



(b)

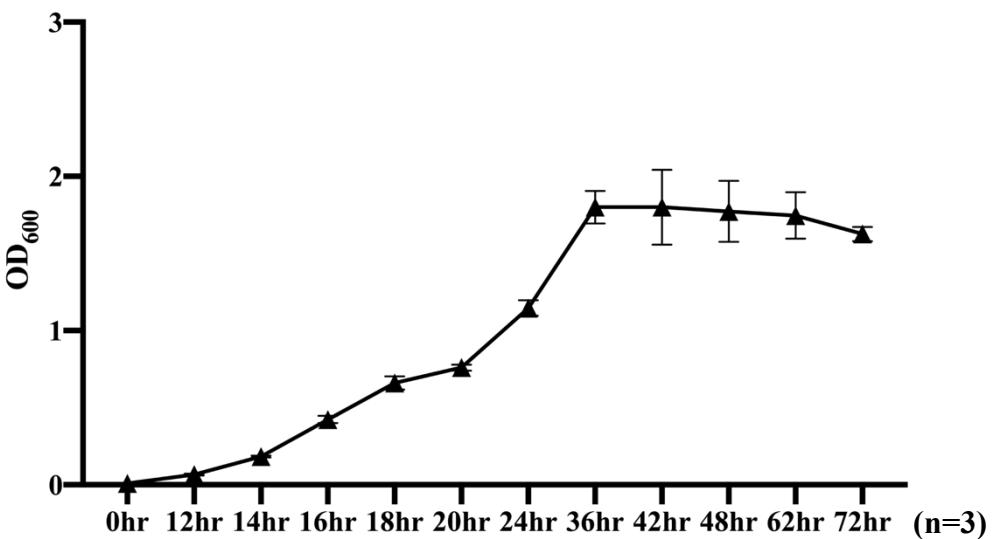


圖 3-12 內生桿菌 72hr 生長曲線

(a)*E. ruthgatesii* 8E (b)*E. penghunesis* 4G。n=3，使用 mmbv4 富營養培養基，培養於 50mL 錐形瓶，25°C，轉速 200 rpm。

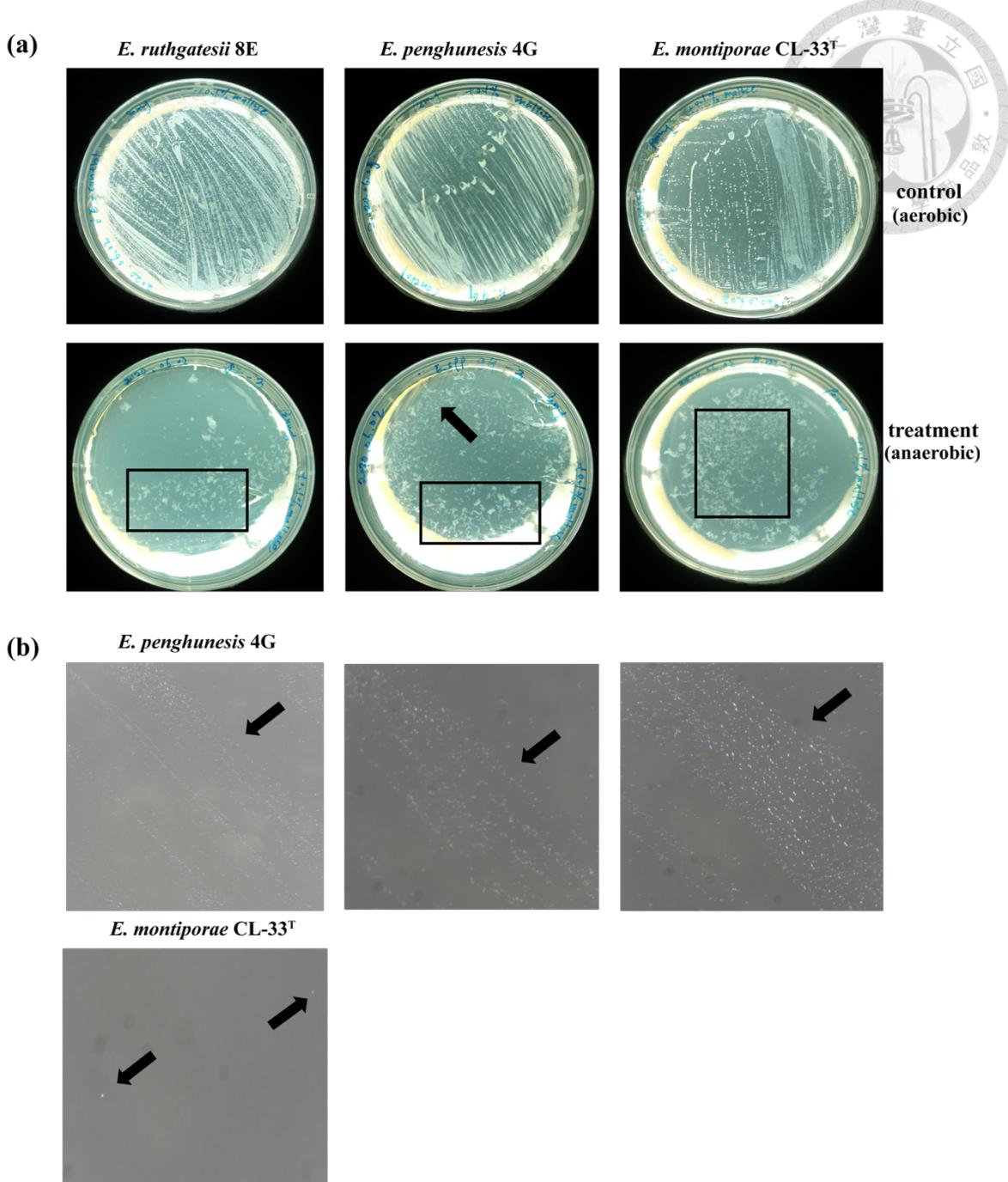


圖 3-13 氧氣耐受性

(a) 內生桿菌生長於液態 MMBV4 培養基 + 0.1 % 麥芽糖於有氧及低氧($<1\% O_2$)環境下的生長情形。(b)低氧($<1\% O_2$)培養結果，箭頭處為 *E. penghunesis* 4G 及 *E. montiporae* CL-33^T 的菌落。使用解剖顯微鏡放大 36 倍觀察結果，培養於 25 °C。負控制：*E. montiporae* CL-33^T。每個組別皆有三重複。方格為培養基本身沈積現象。三株內生桿菌皆在有氧情況下生長良好，其中 *E. penghunesis* 4G 可生長於低氧環境下，*E. ruthgatesii* 8E 則只能生長於有氧環境。

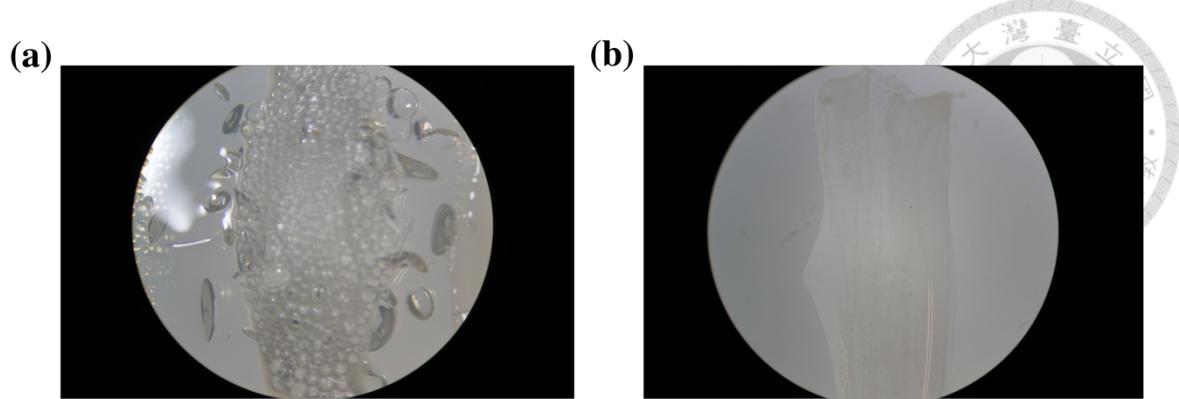


圖 3-14 催化酶試驗

(a) *E. ruthgatesii* 8E, (b) *E. penghunesis* 4G。每個組別皆有三重複，滴 $100\mu\text{l}$ 35% 過氧化氫在培養基上的菌體，起泡表示正反應，沒起泡表示負反應; *E. ruthgatesii* 8E 為正反應; *E. penghunesis* 4G 為負反應。

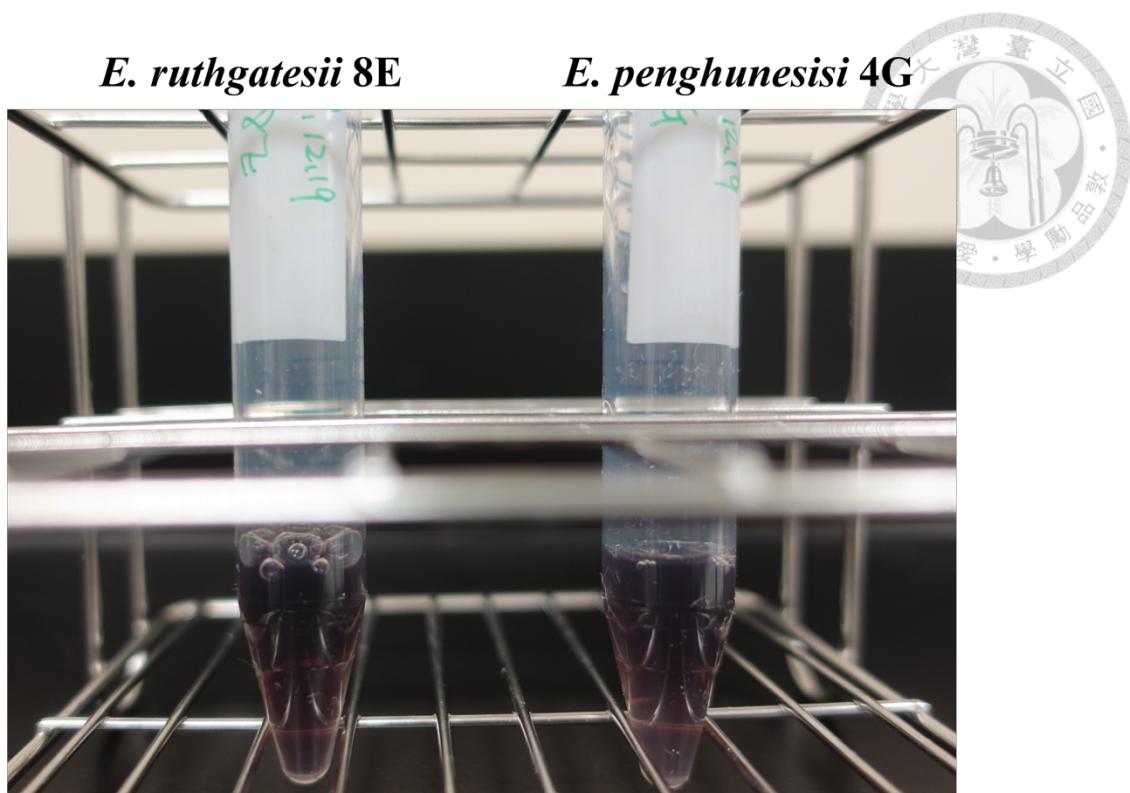
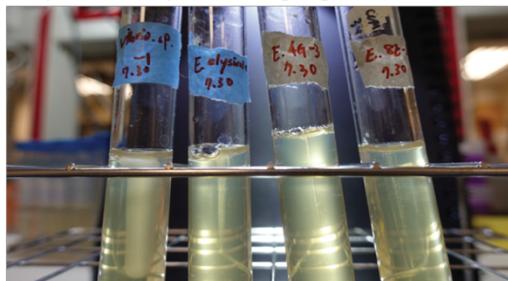


圖 3-15 氧化酶試驗

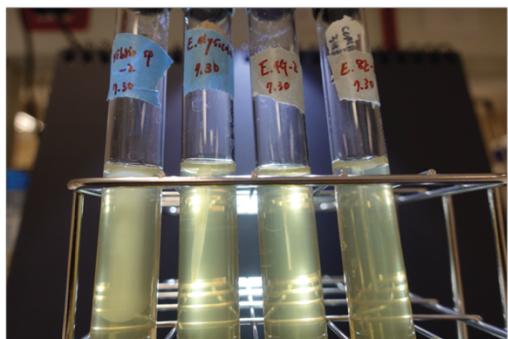
直接將 $100\mu\text{l}$ 0.1% (W/V) 鹽酸二甲基對苯二胺滴入生長於液態 MMBV4 培養基中的內生桿菌。每個組別皆有三重複。紫色為正反應，無色為負反應；*E. ruthgatesii* 8E 為正反應；*E. penghunesis* 4G 有微弱正反應。

(n=3)

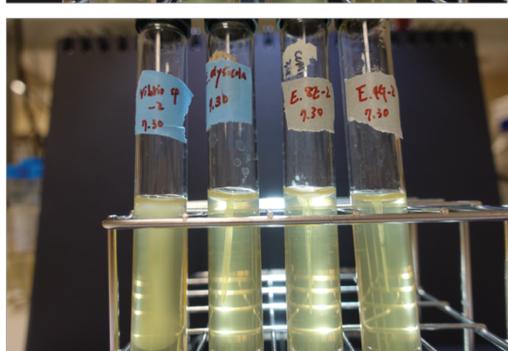
V. coralliiylyticus *E. elysicola* *E. penghunesis* 4G *E. ruthgatesii* 8E
day1



day2



day3



day4



圖 3-16 軟洋菜運動性觀察

由左至右為 *V. coralliiylyticus* (正控制組), *E. elysicola* (第二正控制組), *E. penghunesis* 4G, *E. ruthgatesii* 8E。n=3，使用 0.5% mmbv4 agar 培養 7 天，分別紀錄第 1、2、3、5 及 7 天。*V. coralliiylyticus* 培養一天即可見明顯運動性，*E. elysicola* 及 *E. ruthgatesii* 8E 相比於 *V. coralliiylyticus* 沒有明顯運動性，*E. penghunesis* 4G 展現輕微運動性。

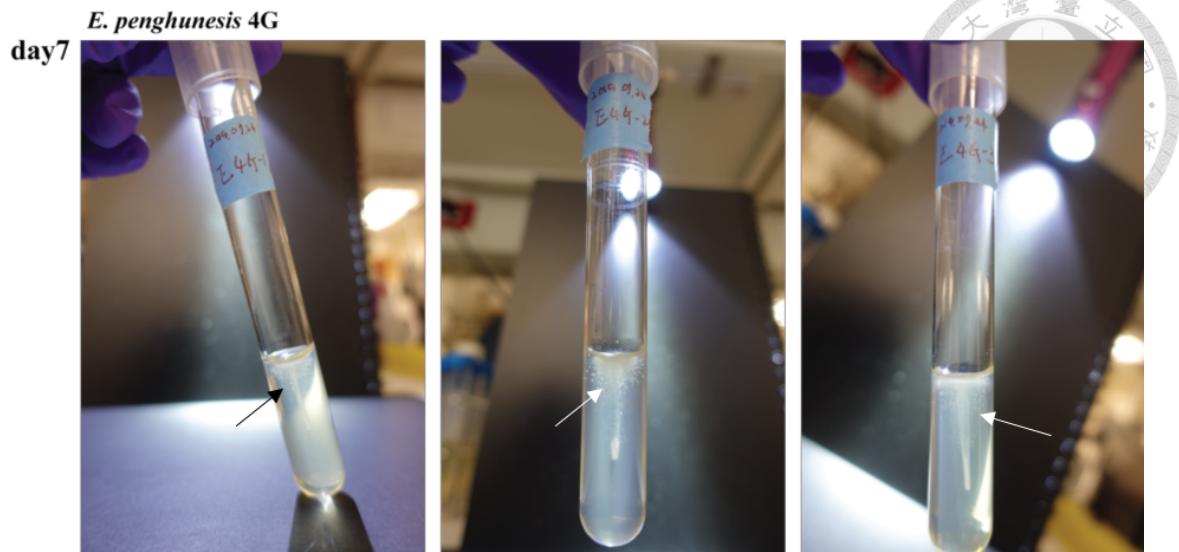
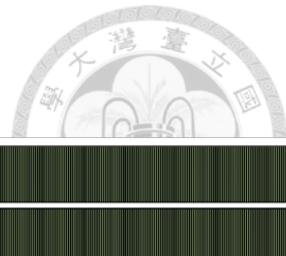


圖 3-17 *E. penghunesis* 4G 軟洋菜運動性觀察

使用 0.5% mmbv4 agar 培養 7 天，向外擴散生長表示具有運動性。箭頭為擴散生長情形。



E. penghunesis 4G

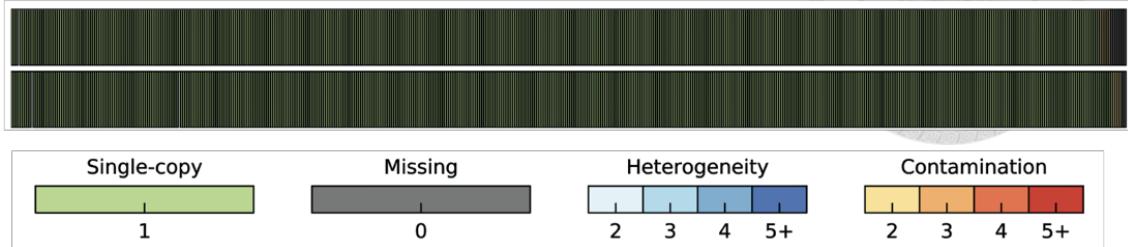


圖 3-18 基因體序列品質

E. penghunesis 4G 汚染率為 0.98% , 異質性為 0 , 完整性 97.63%; *E. ruthgatesii* 8E

污染率為 0.59% , 異質性為 0 , 完整性 99.14%

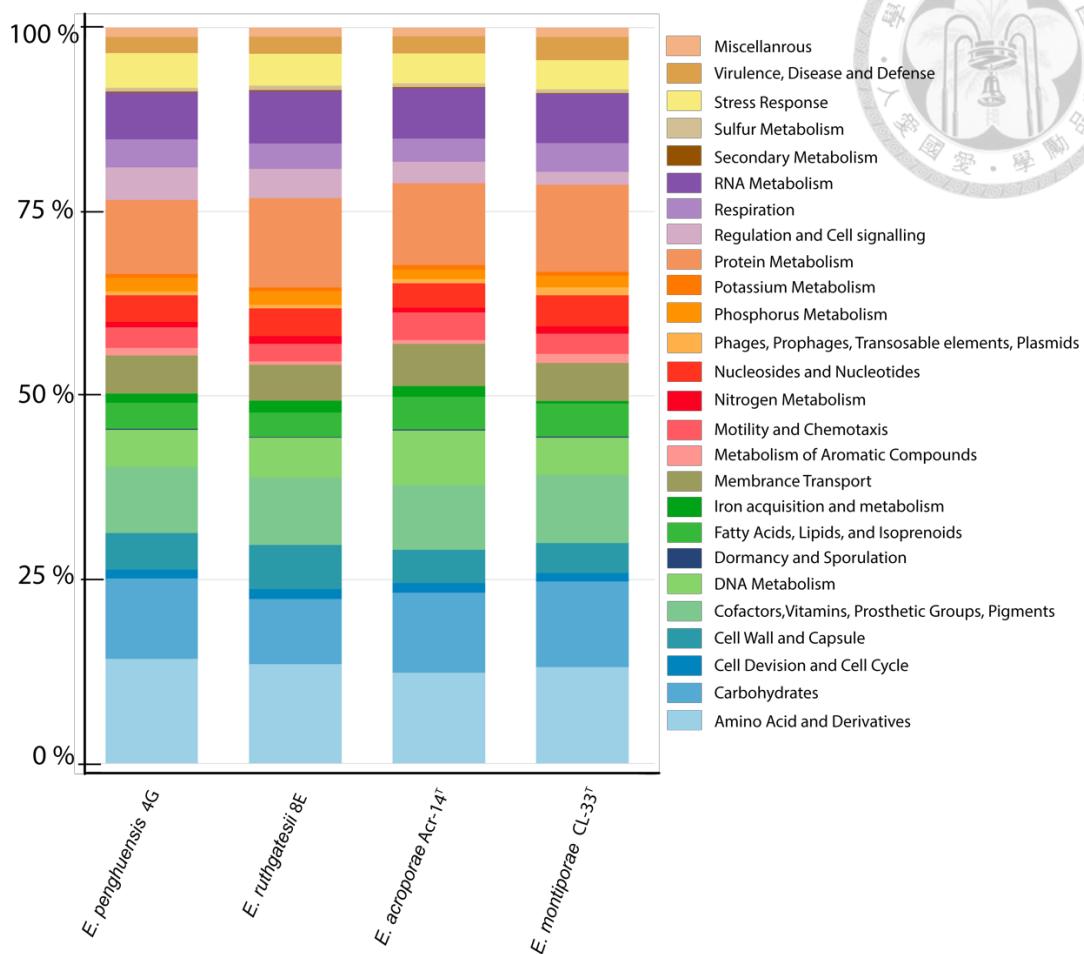


圖 3-19 內生桿菌的 RAST 次系統比例

從左到右分別為 *E. penghunesis* 4G、*E. ruthgatesii* 8E、*E. acroporae* Acr-14^T 及 *E. montiporae* CL-33^T，不同顏色代表不同次系統功能，y 軸為比例 (%)。四株內生桿菌皆有約有四分之一為與碳水化合物及胺基酸有關的基因。

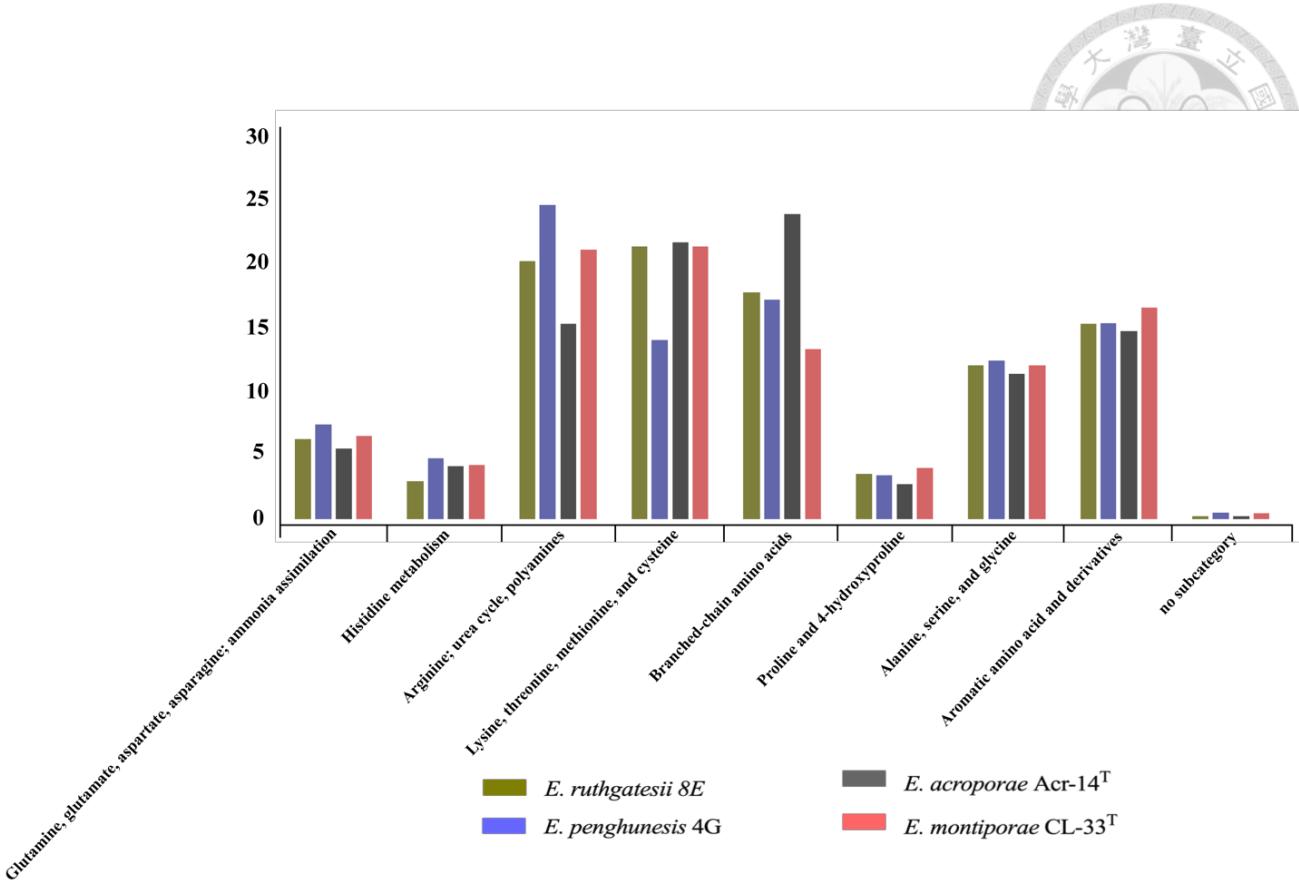


圖 3-20 RAST 註釋次系統中與胺基酸相關基因比例

基因數量來源為 RAST 基因註釋次系統中與胺基酸降解有關的分類; *E. acroporae* Acr-14^T 及 *E. montiporae* CL-33^T 基因體來源為 NCBI; 縮寫代表不同胺基酸; 四株內生桿菌具有最多與合成 Arginie 及 Lysin 相關的基因; 四株內生桿菌對於合成或代謝不同胺基酸相關的基因數量有明顯差異。

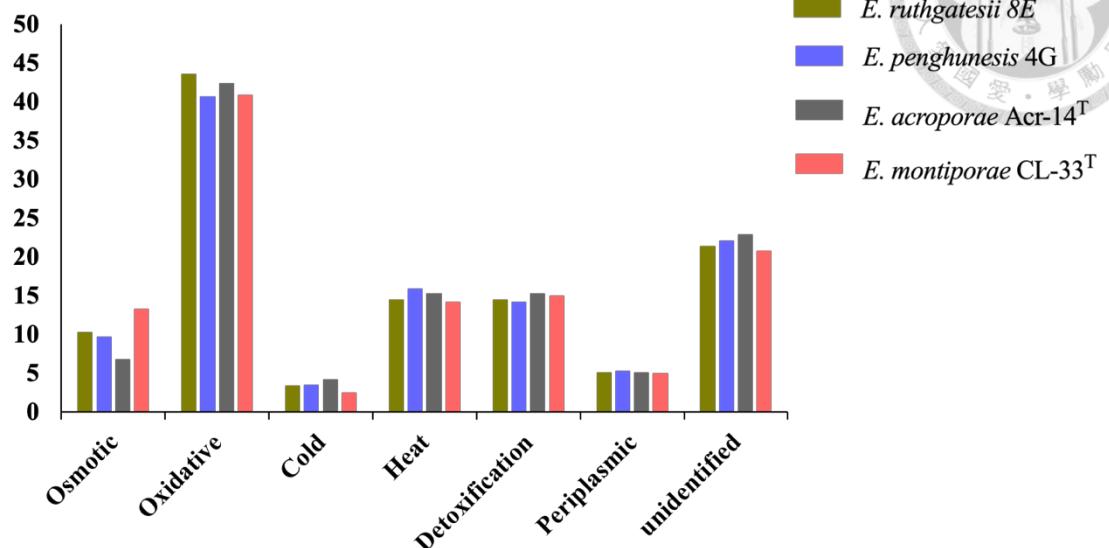


圖 3-21 RAST 註釋次系統中與壓力反應相關基因比例

基因數量來源為 RAST 基因註釋次系統中與胺基酸降解有關的分類; *E. acroporae* Acr-14^T 及 *E. montiporae* CL-33^T 基因體來源為 NCBI; 不同顏色背景代表不同壓力相關基因，其中與氧化壓力相關的基因最多。

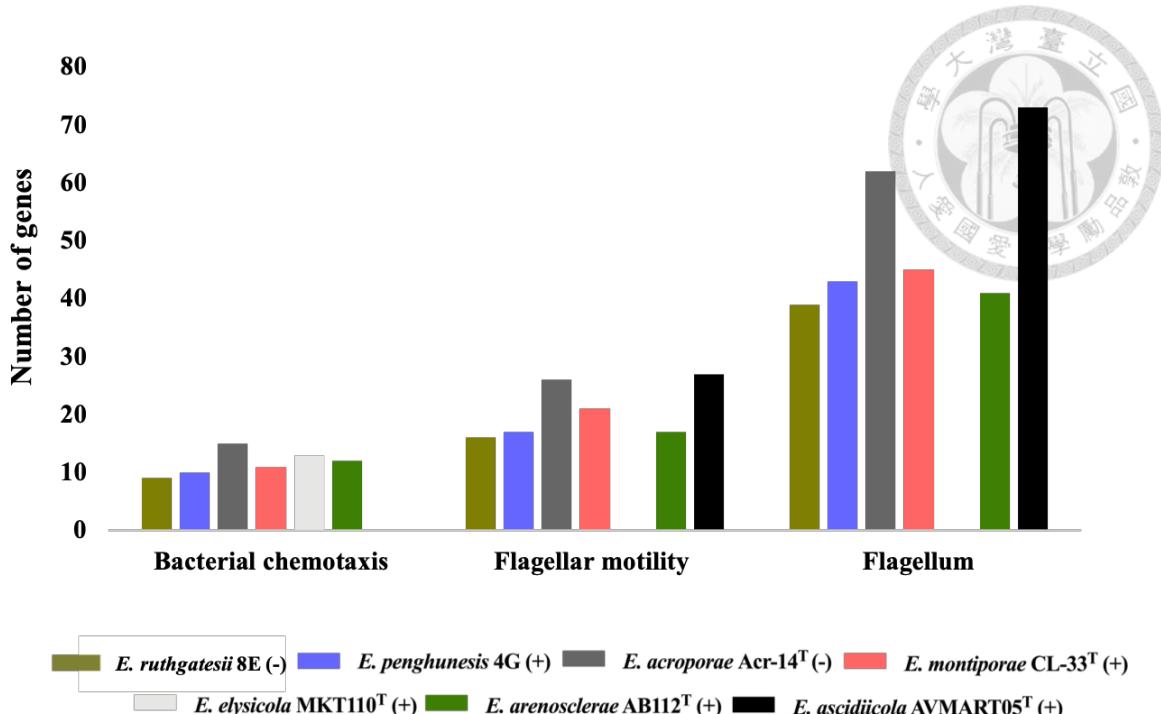
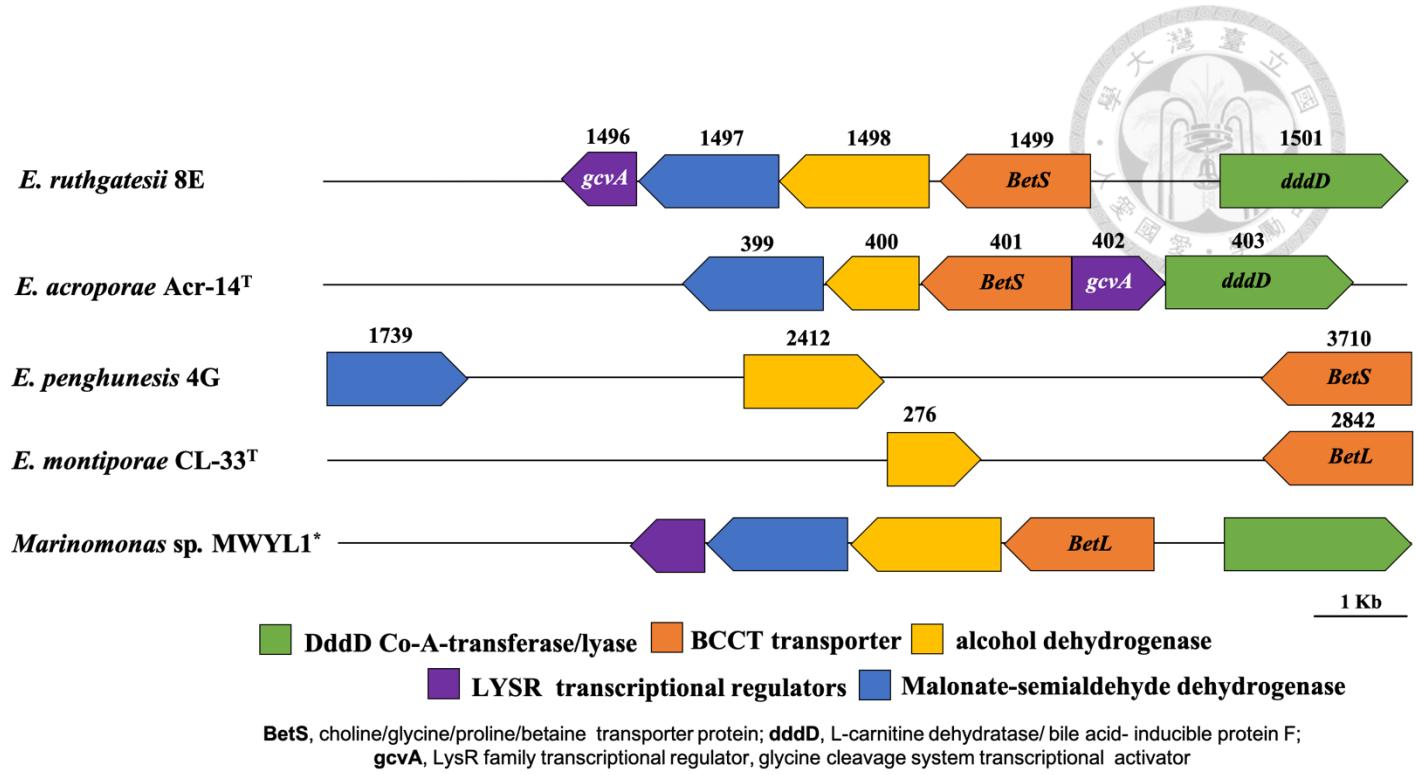


圖 3-22 內生桿菌化學趨性、鞭毛合成及運動能力相關基因數量

(+)表示經生理試驗證實具有運動性，(-)表示經生理試驗證實不具有運動性，基因數量來源為 RAST 基因註釋次系統中與移動能力及化學趨性有關的分類。*E. acroporae* Acr-14^T、*E. montiporae* CL-33^T、*E. elysicola* MKT110^T、*E. arenosclerae* AB112^T、*E. ascidiicola* AVMART05^T 基因體來源為 NCBI，七株內生桿菌分別具有不同數量與化學趨性、邊毛移動能力及合成鞭毛相關的基因，其中 *E. ascidiicola* AVMART05^T 不具有化學趨性相關基因，*E. elysicola* 不具有鞭毛相關基因。



* data from : Tandon et al. 2020

圖 3-23 DMSP 代謝操縱組

使用基因順序來排列，四株內生桿菌具有相同的 BCCT transporter (*BetS*)，與 *Marinomonas* sp. MWYL1 不同 (*BetL*)。*E. ruthgatesii* 8E 與 *E. acroporae* Acr-14^T 基因排列不同但卻與 *Marinomonas* sp. MWYL1 排列順序相同。*E. montiporae* CL-33^T 與 *E. penghunesis* 4G 不具有完整的 DMSP 代謝操縱組。

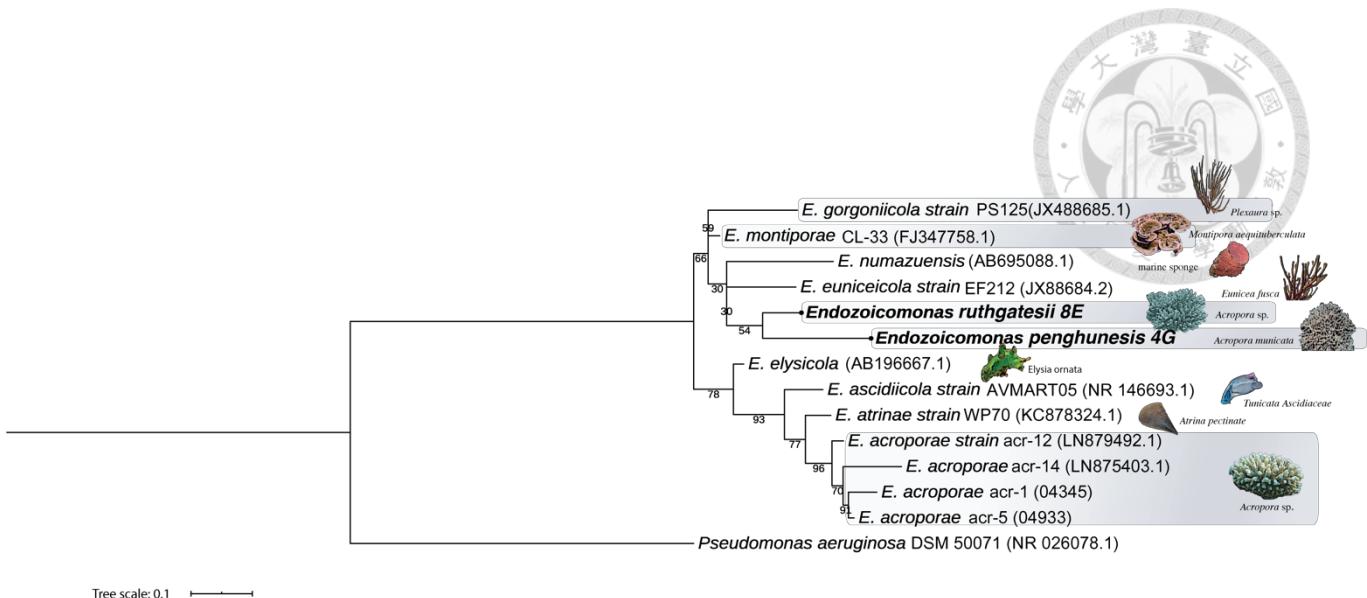


圖 3-24 內生桿菌屬 16S rRNA 親緣關係樹

菌株名稱後為分離來源使用，最大似然估計搭配演化模型 K2 (Kimura2-parameter)+G (Gamma distribution)，bootstrap:1000，bootstrap 值位於支點處。*E. ruthgatesii* 8E 及 *E. penghunesis* 4G 與 *E. euniceicola* 親緣關係最相近。



Tree scale: 0.01 ↗

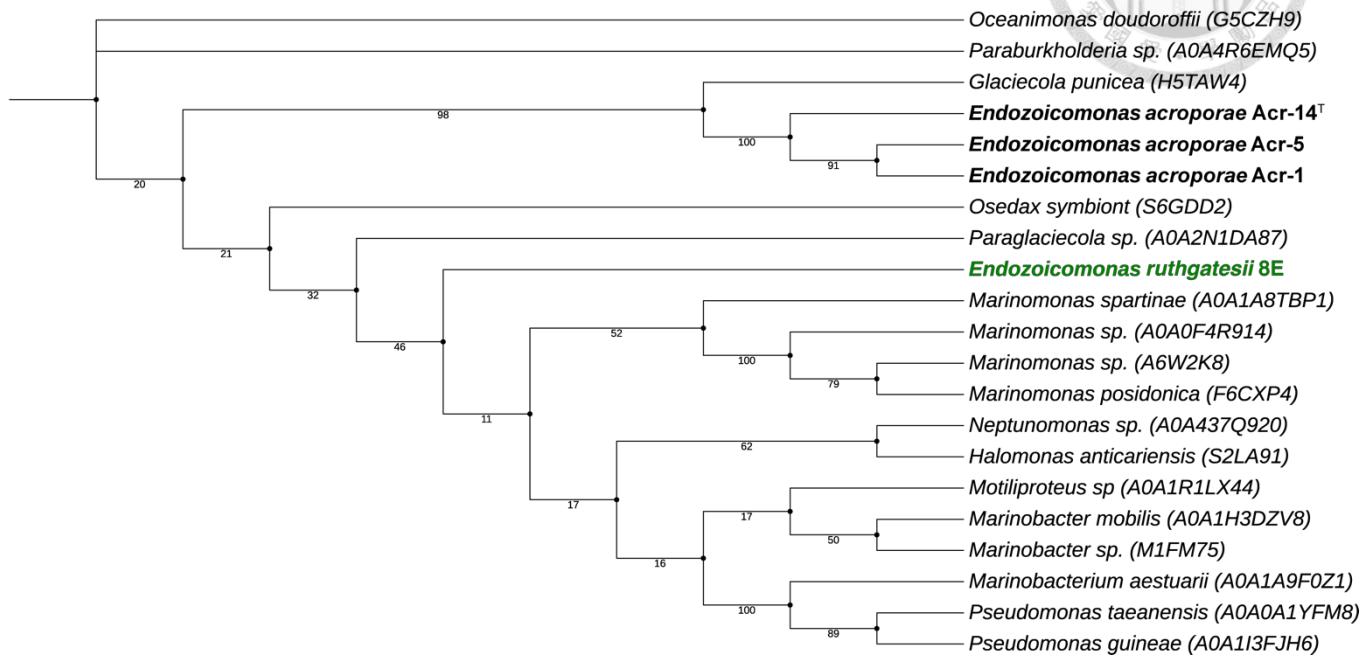


圖 3-25 DddD 蛋白親緣關係樹

使用最大似然估計搭配模型 LG (Le Gascuel) + I + G4 , bootstrap 1000 , bootstrap 值位於支點處。*E. ruthgatesii* 8E 與 *E. acroporae* Acr-14^T 的 DddD 蛋白具有明顯的差異性。

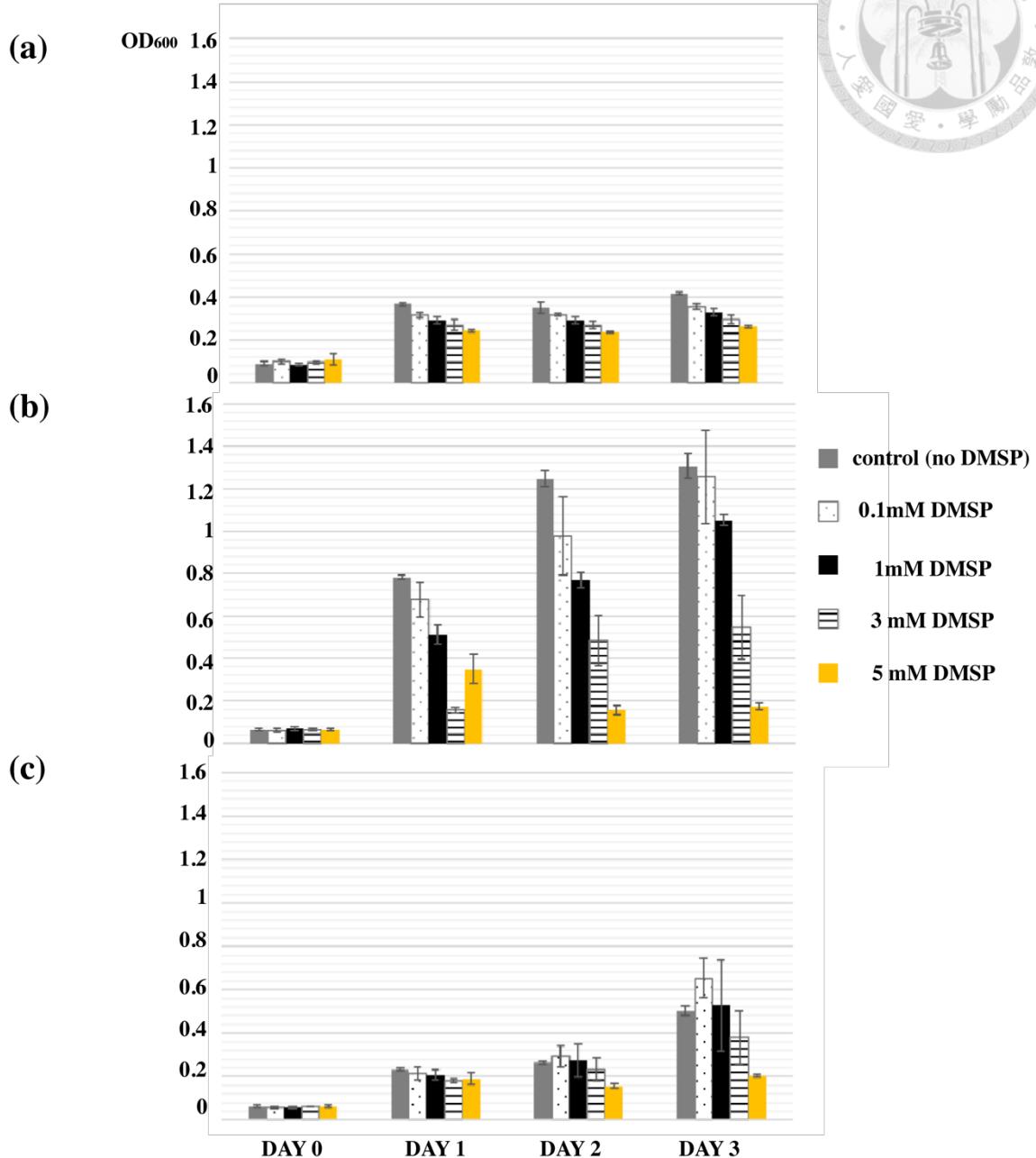


圖 3-26 不同 DMSP 濃度下的生長情形

(a) *E. penhugensis* 4G , (b) *E. ruthgatesii* 8E , (c) *E. acroporae* Acr-14^T。灰色: control , 點點 : 0.1mM DMSP , 黑色: 1mM DMSP , 條紋: 3mM DMSP , 黃色: 5mM DMSP 。n=3 , x 軸為實驗天數 , y 軸為 OD₆₀₀ 吸光值 , 三株內生桿菌的生長情形隨著 DMSP 濃度增加而遞減 , 0.1mM 具有最佳的生長情形 。

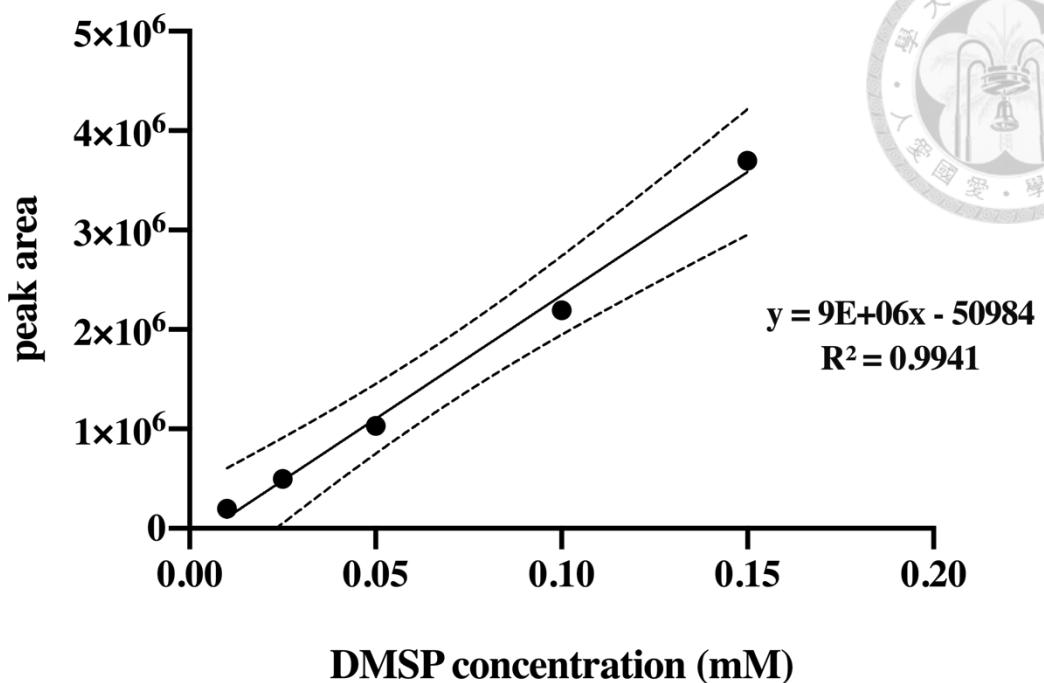


圖 3-27 鹼調控裂解 DMSP 減量線

五個不同濃度的 DMSP 分別為 0.01mM、0.025mM、0.05mM、0.1mM、0.15mM。n=3，添加 0.1ml 5M 氢氧化鈉 (DMS) 使 DMSP 裂解成 DMS 及 acrylate，利用 GC-MS 得知 DMS 的訊號面積，厭氧培養瓶體積 20ml，R 平方 0.9941。

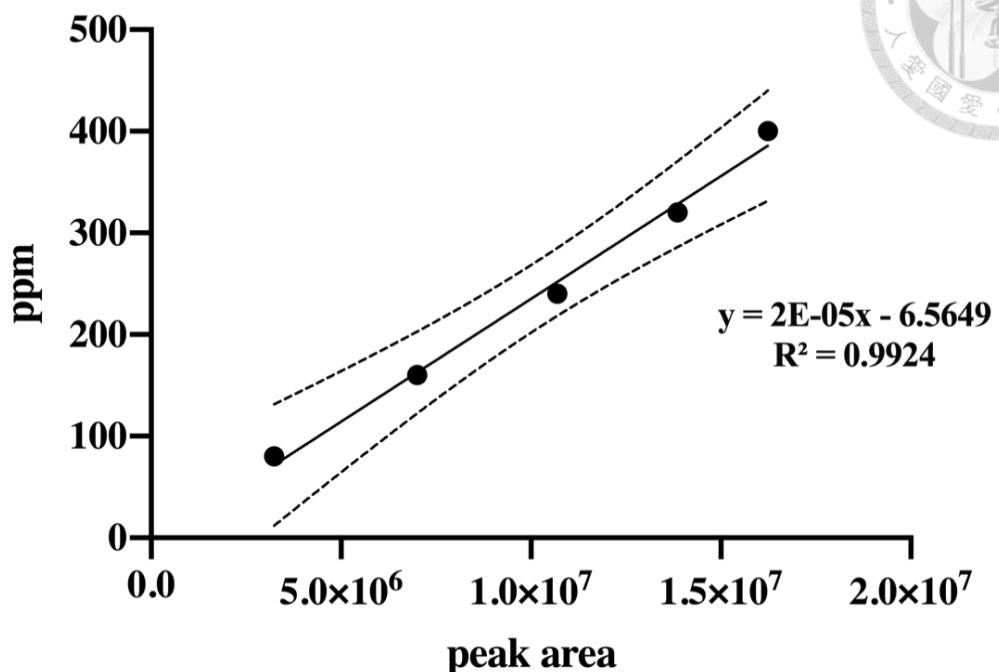


圖 3-28 DMS 減量線

利用注射五個不同體積(0.06ml、0.12ml、0.18ml、0.24ml、0.3ml)相同濃度的DMS 標準品作為濃度區分。n=3，x 軸：DMS 訊號面積，y 軸 DMS 濃度(ppm)，R 平方：0.9924

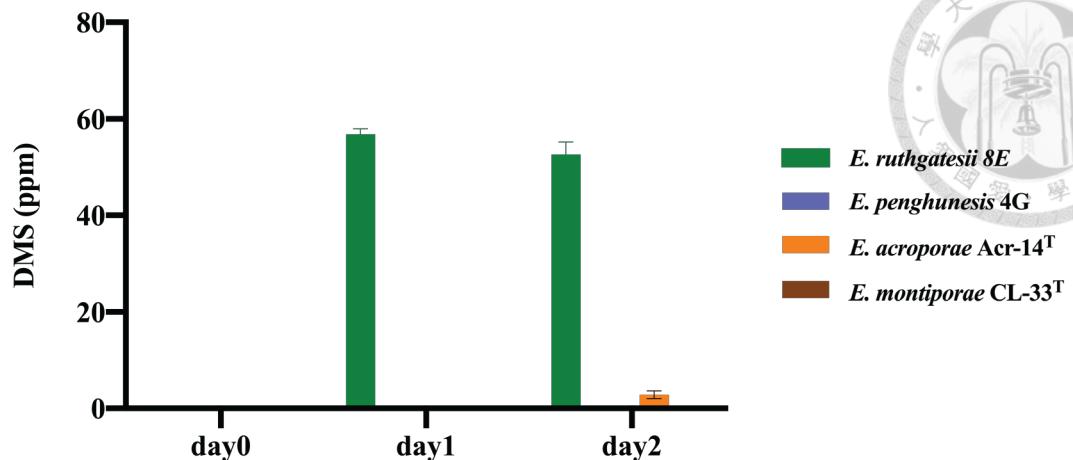


圖 3-29 內生桿菌 DMS 產生量

四株內生桿菌 DMS 產生量。正對照組: *E. acroporae* Acr-14^T，負對照組: *E. montiporae* CL-33^T。每個組別皆有三重複，*E. ruthgatesii* 8E 相較於 *E. acroporae* Acr-14^T 產生更多的 DMS。

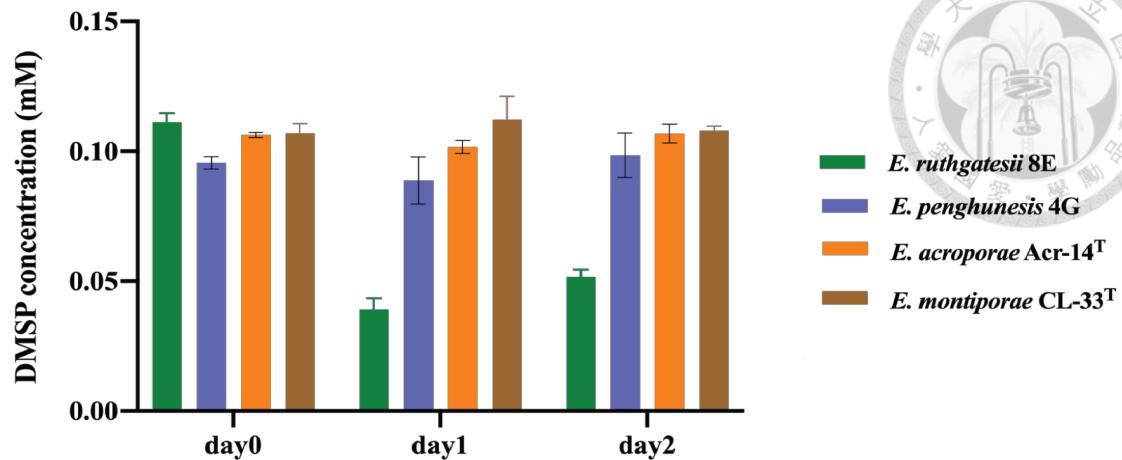


圖 3-30 內生桿菌 DMSP 消耗量。

四株內生桿菌 DMSP 消耗量。正對照組：*E. acroporae* Acr-14^T，負對照組：*E. montiporae* CL-33T。每個組別皆有三重複，*E. ruthgatesii* 8E 相比於 *E. acroporae* Acr-14^T 消耗更多 DMSP。

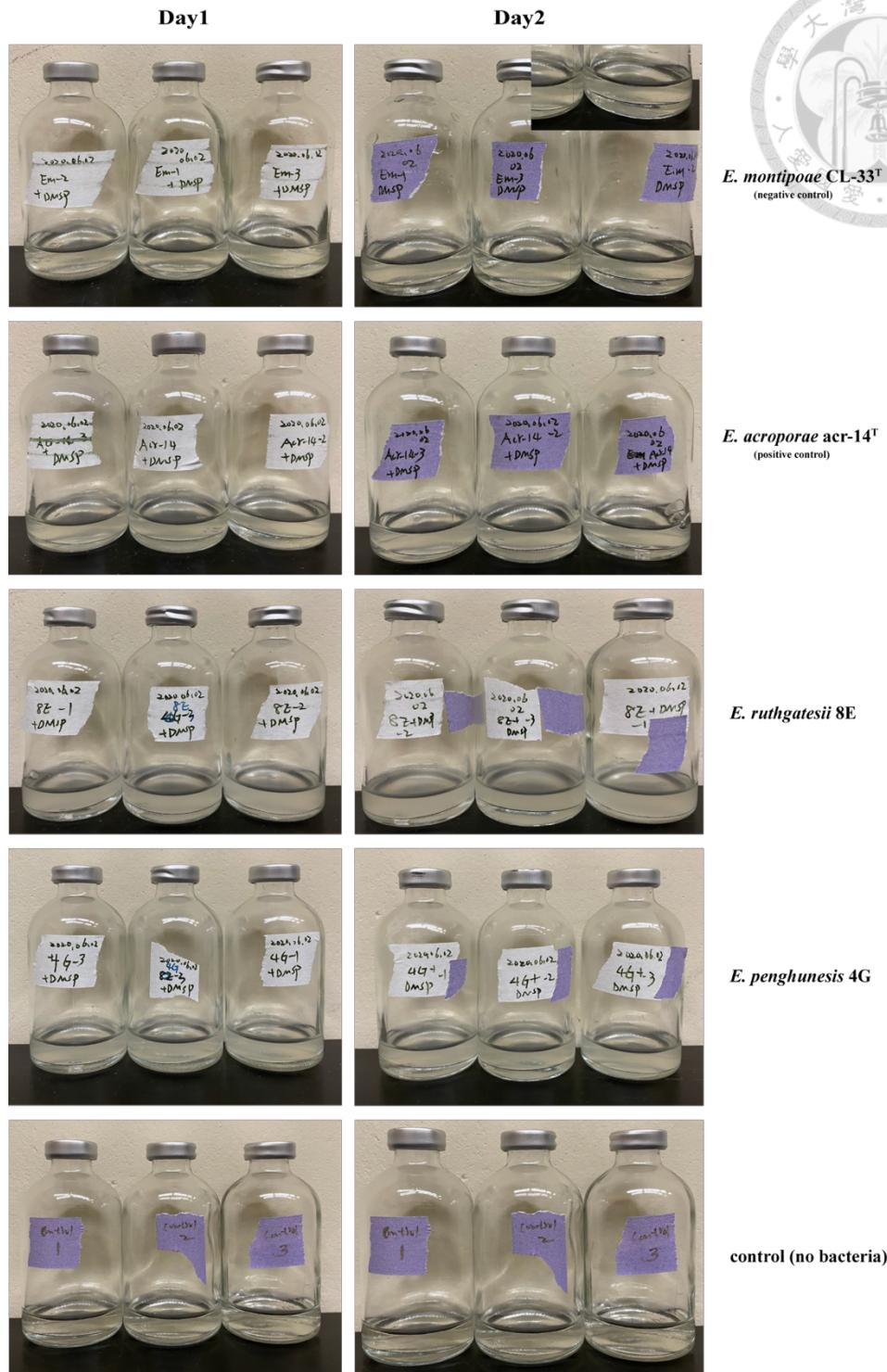


圖 3-31 DMSP 及 DMS 定量實驗細菌生長情形

左為培養一天的五個組別生長情形；右為培養二天五個組別生長情形。*E. montiporae* CL-33^T 與 DMSP 共培養會出現顆粒狀(箭頭指出)。n=3，除了 *E. montiporae* CL-33^T 有聚集情形 (death phase) 外其他三株內生桿菌皆正常生長 (混濁情形)。控制組目的為排除污染可能。



E. penghuensis 4G

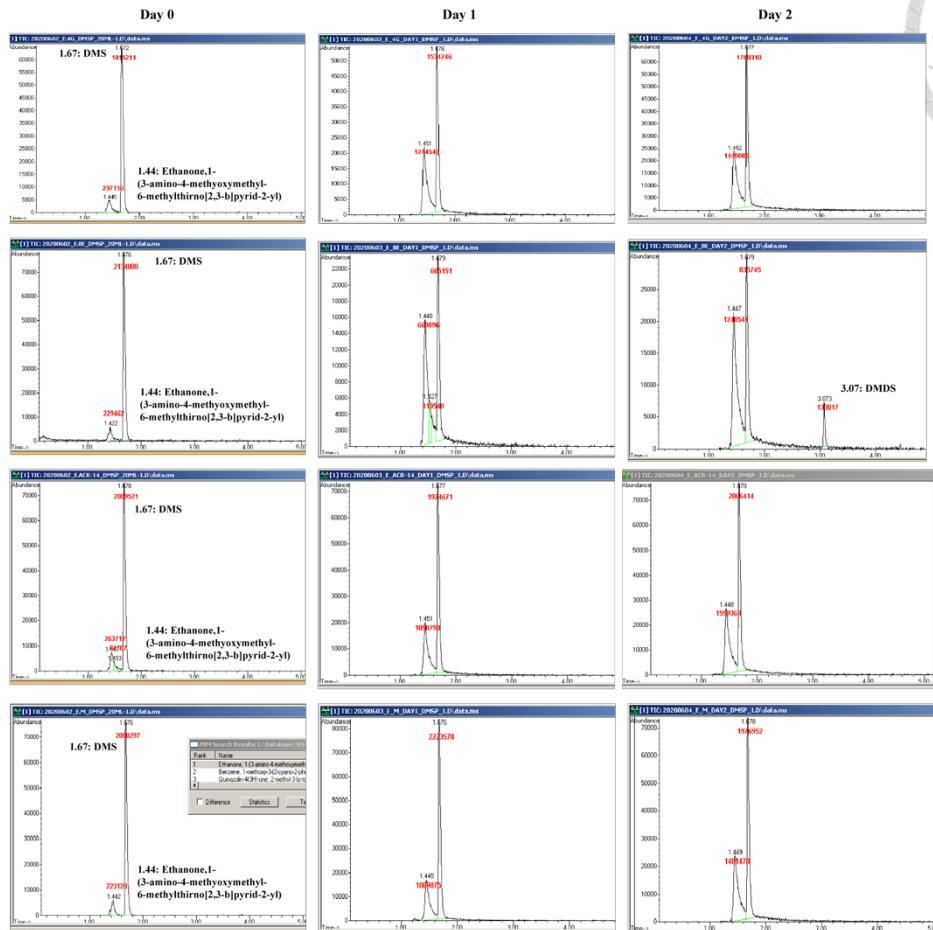


圖 3-32 鹼調控 DMSP 定量的 DMS 訊號

由左至右分別為實驗第零天至實驗第二天，藉由鹼調控裂解二甲基巯基丙酸來偵測培養基中二甲基巯基丙酸的濃度。n=3，訊號於 1.4 分鐘左右偵測到背景物質 Ethanone, 1-(3-amino-4-methoxymethyl-6-methythirno[2,3-b]pyrid-2-yl) ，訊號於 1.67 分鐘偵測到目標物質 DMS，訊號於 3.07 分鐘偵測到二甲基二硫 (Dimethyl disulfide, DMDS)。紅色數字代表化學物質訊號面積，其中只有在 *E. ruthgatesii* 8E 培養基中偵測到 DMDS 產生。

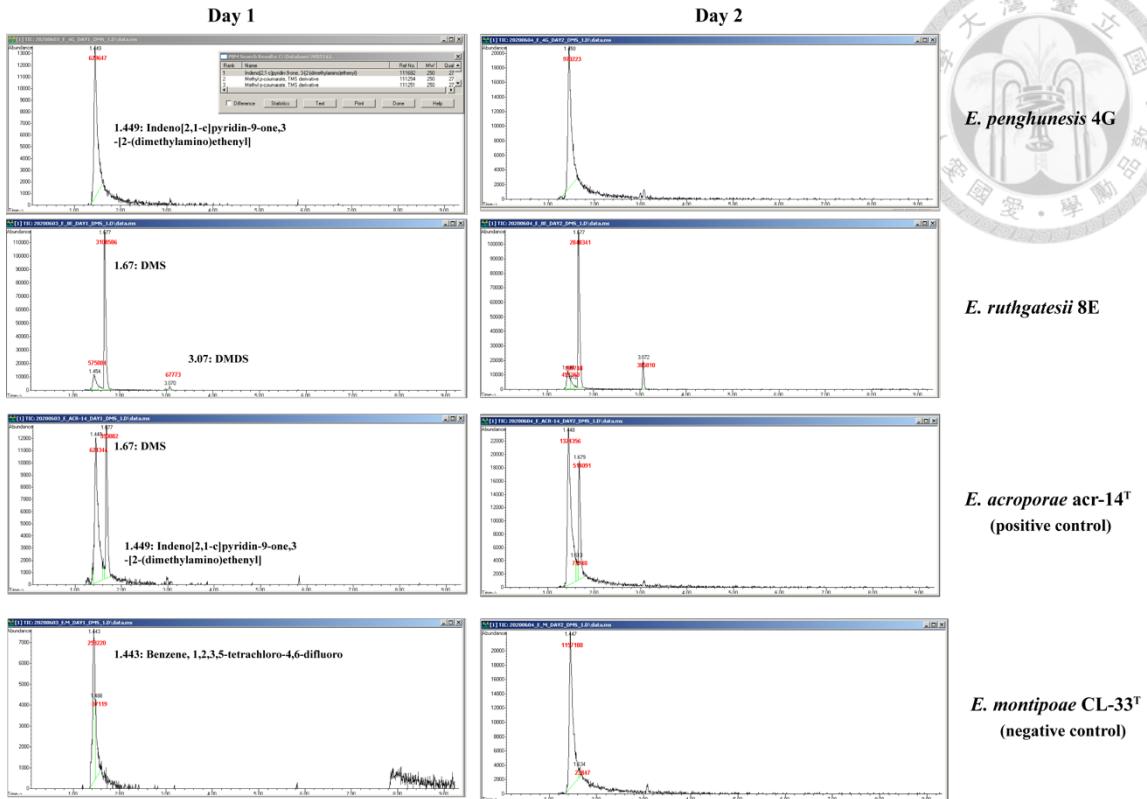


圖 3-33 DMS 定量訊號

圖片由左至右為實驗第一天至第二天，直接抽取厭氧培養瓶中的氣體 500 μ l 偵測 DMS 訊號，訊號於 1.44 分鐘左右偵測到 Indeno[2,3-c]pyridine-9-one,3-[3-(dimethylamino)ethenyl]，訊號於 1.443 分鐘偵測到 Benzene,1,2,3,5-tetrachloro-4,6-difluoro，n=3，訊號於 1.67 分鐘偵測到目標物質 DMS，訊號於 3.07 分鐘偵測到 DMDS，紅色數字代表化學物質訊號面積，只有 *E. ruthgatesii* 8E 與 *E. acroporae* Acr-14^T 有 DMS 產生。



Region	Region Length	Completeness	Score	Total Proteins	Region Position	Most Common Phage	GC%
E. penghunesis 4G							
1	16.2 Kb	questionable	80	16	36771-52998	PHAGE_Vibrio_v8_019722(3)	52.83%
2	23 Kb	intact	120	30	14335-37365	PHAGE_Vibrio_v8_019722(5)	52.89%
E. ruthgatesii 8E							
1	21.4 Kb	incomplete	30	21	23395-44870	PHAGE_Escher_v8_EcoM_027995(2)	50.54%
2	18.5 Kb	questionable	70	26	2287-20793	PHAGE_Escher_phAPECB_020079(5)	41.48%

Intact (score > 90) Questionable (score 70-90) Incomplete (score < 70)

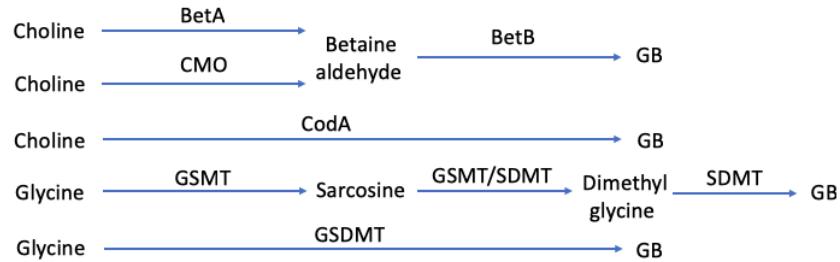
Region:	The number assigned to the region.
Region Length :	The length of the sequence of that region (in bp).
Completeness:	A prediction of whether the region contains a intact or incomplete prophage based on the above criteria.
Score:	The score of the region based on the above criteria
Total Proteins:	The number of ORFs present in the region.
Region Position:	The start and end positions of the region on the bacterial chromosome.
Most Common Phage:	The phage(s) with the highest number of proteins most similar to those in the region.
GC%:	The percentage of GC nucleotides of the region.

圖 3-34 內生桿菌原噬菌體註解

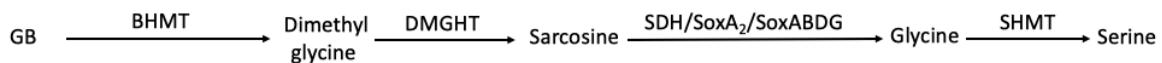
E. penghunesis 4G 有 1 個完整原噬菌體，1 個有問題的原噬菌體。*E. ruthgatesii* 8E 沒有完整原噬菌體，有 1 個有問題的原噬菌體及未完整的原噬菌體。



Biosynthesis



Catabolism



GB, glycine betaine; BetA, Choline dehydrogenase; BetB, betaine aldehyde dehydrogenase; CMO, Choline monooxygenase; CodA, Choline oxidase; GSMT, glycine-sarcosine methyltransferase; SDMT, sarcosine dimethyltransferase; GSDMT, glycine sarcosine dimethylglycine N-methyltransferase; BHMT, betaine-homocysteine methyltransferase; DMGHT, dimethylglycine dehydrogenase; SDH, eukaryotic sarcosine dehydrogenase; SoxA₂, monomeric sarcosine oxidase; SoxABDG, heterotetrameric sarcosine oxidase; SHMT, glycine hydroxymethyltransferase;

圖 3-35 Glycine Betaine 合成及催化途徑

(Ngugi et al. 2020)



表 2.1 MMBV4 培養基配方

MMBV4 液體培養基(modified marine broth version 4, mmbv4)為修改海洋培養基(marine broth)的配方，主要用來富集內生桿菌。

MMBV4

HEPES	5.950 g/L
NaCl	19.45 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	18.79 g/L
Na ₂ SO ₄	3.240 g/L
KCl	0.550 g/L
CaCl ₂	0.120 g/L
NaHCO ₃	0.160 g/L
Peptone	5.000 g/L
Yeast extract	1.000 g/L
Trace element solution*	1.000 ml/L
NP cocktail stock	1.000 ml/L
pH	7.200

Trace element solution

FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.150 g/L
Na ₂ EDTA	4.360 g/L
CuSO ₄ primary stock	1.000 ml/L
Na ₂ MoO ₄ primary stock	1.000 ml/L
ZnSO ₄ primary stock	1.000 ml/L
CoCl ₂ primary stock	1.000 ml/L
MnCl ₂ primary stock	1.000 ml/L

Primary stock for preparing the trace element solution

CuSO ₄ ·5H ₂ O	9.800 g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180.0 g/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6.300 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22.00 g/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	10.0 0g/L



表 2.2 基本培養基配方

主要用於單一碳源測試，與 MMBV4 培養基相同的配方，但去除了 NaHPO_4 、
peptone、yeast extract，並添加了 1ml 1M K-phosphate buffer 與 100 μg Cyanocobalamin。

Minimum medium

5X ASW stock	200.00 mL
CaCl_2	1.00 g/L (9 mM)
NaHCO_3	168.00 mg/L (2 mM)
$\text{NO}_3\text{-Pi}$ stock	1.00 mL
Trace metal solution	1.00 mL
f/2 vitamin solution	1.00 mL
Sodium glutamate	4.00 g/L (23.64 mM)
Asparagine	132.00 mg/L (1 mM)
Histidine	223.00 mg/L (1.44 mM)
HEPES	2.38 g/L (10 mM)
pH	7.40
Maltose	1.00 g/L

5X ASW stock

NaCl	122.72 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	35.04 g/L
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	23.38 g/L
KCl	3.35 g/L

$\text{NO}_3\text{-Pi}$ stock

KNO_3	89.21 g/L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4.35 g/L

f/2 vitamin solution

Thiamine HCl (vit. B1)	200 mg
Biotin (vit. H) stock	1 mL
Cyanocobalamin (vit. B12) stock	1 mL

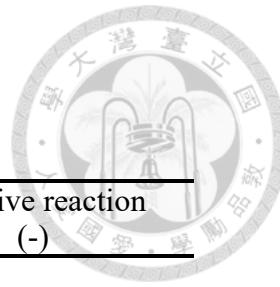


表 2.3 API ZYM 套組反應結果對照表

Enzyme	Positive reaction (+)	Negative reaction (-)
Alkaline phosphatase	purple	
Esterase	purple	
Lipase	purple	
Leucine arylamidase	orange	
Valine arylamidase	orange	
Cystine arylamidase	orange	
Trypsin	orange	
α -chymotrypsin	orange	
Acid phosphatase	purple	colorless or light
Naphtol-AS-BI-phosphophydrolase	blue	yellow
α -galactosidase	purple	
β -galactosidase	purple	
β -glucuronidase	blue	
α -glucuronidase	purple	
β -glucosidase	purple	
N-acetyl- β -glucosaminidase	brown	
α -mannosidase	purple	
α -fucosidase	purple	



表 3-1 已知內生桿菌的生理特性與分離來源及地點

粗體:分離來源為六放珊瑚， A:好氧; FAN: 兼性厭氧， ND: 沒有測量

Strain /Characteristics	Isolation location	Isolated source	Optimum/growth temperature (°C)	Optimum/growth salinity (PSU)	Optimum/growth pH	Relation to O ₂
<i>E. ruthgatesii</i> 8E	Kenting, (Taiwan)	Hexacoral (Acropora sp.)	25 / 20~35	10,20 / 5~40	7 / 6~9	A
<i>E. penghunesis</i> 4G	Penghu, (Taiwan)	Hexacoral (Acropora muricate)	20,25 / 15~35	10,20 / 5~30	8 / 6~9	FAN
<i>E. acroporae</i> * (Acr-14^T)	Kenting, (Taiwan)	Hexacoral (Acropora sp.)	30 / 20~35	20 / 10~50	7 / 5~10	A
<i>E. arenosclerae*</i> (Ab112^T)	Rio de Janeiro, (Brazil)	Marine sponge (<i>Arenosclera brasiliensis</i>)	20~30 / 12~35	30 / 20~50	ND	A
<i>E. ascidiicola*</i> (AVMART05^T)	Gullmarsfjord, (Sweden)	Tunicata (Scandinavian ascidians)	23~25 / 5~27	10~20 / 5~50	6~7 / 6.2~8.3	FAN
<i>E. atrinae</i> * (WP70^T)	Yeosu, (Korea)	Comb pen shell (<i>Atrina pectinata</i>)	30 / 15~37	20 / 10~40	7 / 6~9	A
<i>E. elysicola*</i>	Izu-Miyake, (DSM22380 ^T) (Japan)	Sea slug (<i>Elysia ornata</i>)	25~30 / 4~37	>0 / >0	ND	A
<i>E. euniceicola</i> *	Florida, (EF212 ^T) (USA)	Octocorals (<i>Eunicea fusca</i>)	22~30 / 15~30	20~30 / 10~40	8 / 7~8	FAN
<i>E. gorgoniicola</i> *	Bimini, (PS125 ^T) (Bahama)	Octocorals (<i>Plexaura</i> sp.)	22~30 / 15~30	20~30 / 10~40	8 / 7~9	FAN
<i>E. montiporae*</i> (CL-33^T)	Southern (Taiwan)	Hexacoral (<i>Montiporae aequituberculata</i>)	25 / 15~35	20~30 / 10~30	8 / 6~10	A
<i>E. numazuensis</i> * (HC50^T)	Namazu, (Japan)	Marine sponge	25 / 15~37	20 / 10~50	7.5~8 / 5.5~9	FAN



表 3-2 API ZYM 套組結果

Enzyme	<i>E. ruthgatesii</i> 8E	<i>E. penghunesis</i> 4G
Alkaline phosphatase	+	+
Esterase	+	+
Lipase	+	+
Leucine arylamidase	+	+
Valine arylamidase	+	+
Cystine arylamidase	+	+
Trypsin	+	+
α -chymotrypsin	-	-
Acid phosphatase	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphophydrolase	-	-
α -galactosidase	-	-
β -galactosidase	-	-
β -glucuronidase	-	-
α -glucuronidase	-	-
β -glucosidase	-	-
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-
α -mannosidase	-	-
α -fucosidase	-	-

(n=3)

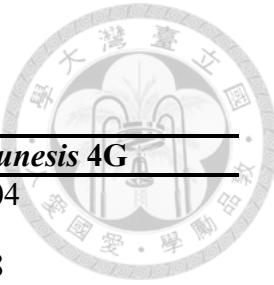


表 3-3 內生桿菌序列去除 adapter 前後結果

Strain	<i>E. ruthgatesii</i> 8E	<i>E. penghunesis</i> 4G
Number of reads	9,294,508	10,930,204
Average length	301	301
Number of reads after trim	6,636,060	7,668,228
Percentage trimmed	71.4%	70.16%
Average length after trim	257.3	256.9



表 3-4 基因體組裝參數

	<i>E. penghunesis</i> 4G	<i>E. ruthgatesii</i> 8E
Bubble	60	60
Word	60	70
N50	57,212	33,666
Contig number	334	501
Maximum length	511,678	184,738
Size	5,738,999	7,178,049

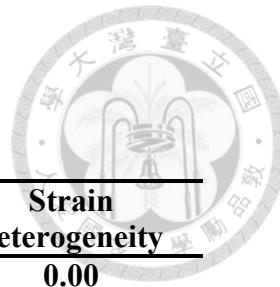


表 3-5 基因體組裝品質

Strain	Completeness	Contamination	Strain heterogeneity
<i>E. penghunesis</i> 4G	97.63	0.98	0.00
<i>E. ruthgatesii</i> 8E	99.14	0.59	0.00



表 3-6 內生桿菌之基因體特徵

E. penghunesis 4G 與 *E. ruthgatesii* 8E 使用 Prokka 的基因體預測結果，*E. acroporae* Acr-14T 及 *E. montiporae* CL-33T 資料來源為 NCBI 資料庫

Genome Characteristics	<i>E. penghunesis</i> 4G	<i>E. ruthgatesii</i> 8E	<i>E. acroporae</i> Acr-14T*	<i>E. montiporae</i> CL-33T*
Size (Mbp)	5.73	7.17	6.04	5.43
GC content	49.24%	48.49%	49.2%	48.5%
N50	57,212 (bp)	30,526 (bp)	47,658 (bp)	1,612,341
No. of rRNA	9	7	18	22
No. of tRNA	78	77	79	114
No. of Genes	4,861	5,421	4,934	4,938
No. of CDS	4,719	5,174	4,636	4,647
Gene density (genes/Mb)	848	756	816	909

* data from NCBI

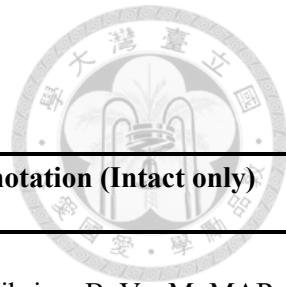


表 3-7 內生桿菌屬原噬菌體

Genome (Isolated from stony coral)	Intact	Incomplete	Questionable	Phage Annotation (Intact only)
<i>E. ruthgatesii</i> 8E	0	0	1	None
<i>E. penghunesis</i> 4G	1	1	0	PHAGE_Vibrio_vB_VpaM_MAR_NC_01 9722(5)
<i>E. acroporae</i> Acr-14 ^{T*}	2	2	1	PHAGE_Pseudo_MD8_NC_031091, PHAGE_Paenib_Tripp_NC_028930
<i>E. acroporae</i> Acr-5 [*]	3	3	1	PHAGE_Bacill_SP_15_NC_031245, PHAGE_Salmon_phSE_2_NC_031026, PHAGE_Enter_Arya_NC_03148
<i>E. acroporae</i> Acr-1 [*]	4	1	2	PHAGE_Enter_Arya_NC031048, PHAGE_Propio_PFR2_NC_031108, PHAGE_Enter_UAB_Phi20_NC_031019, PHAGE_Stx2_vB_EcoP_NC_027984
<i>E. montiporae</i> CL-33 ^T	2	4	1	PHAGE_Clostr_phiCT453B_NC_029004, PHAGE_Salmon_SJ46_NC_031129
Genomes *				
(Isolated from others invertebrates)				
<i>E. sp.</i> AB1-5	0	4	1	None
<i>E. arenosclerae</i> Ab112 ^T	1	2	2	PHAGE_Clostr_c_st_NC_007581
<i>E. areonsclerae</i> E-MC227	1	3	1	PHAGE_Enter_Phi27_NC_003356
<i>E. elysicola</i> DSM22380 ^T	0	1	0	None
<i>E. ascidiicola</i> AVMART05 ^T	3	2	1	PHAGE_Mesorh_phagevB_MloP_Lo5R7A NS_NC_02543, PHAGE_Escher_vB_ECO1230_10_NC_02 7995, PHAGE_Pseudo_NP1_NC_031058
<i>E. ascidiicola</i> KASP37	0	5	2	None
<i>E. atrinae</i> WP70 ^T	0	16	3	None
<i>E. numazuensis</i> DSM25634 ^T	1	1	1	PHAGE_Escher_D108_NC_013594

表 3-8 內生桿菌屬第三型分泌系統基因數量

粗體為本論文兩株新種 *E. ruthgatesii* 8E 與 *E. pengunesis* 4G; 藉由 EffectiveDB 中的 EffectiveT3 辨識第三型分泌系統基因數量。



Genomes (Isolated from stony corals)	T3SS gene count	Genomes * (Isolated from others invertebrates)	T3SS gene count
<i>E. ruthgatesii</i> 8E	424	<i>E. atrinae</i> WP70 ^T	381
<i>E. pengunesis</i> 4G	250	<i>E. elysicola</i> DSM22380 ^T	314
<i>E. acroporae</i> Acr-1	499	<i>E. sp.</i> AB1	165
<i>E. acroporae</i> Acr-5	499	<i>E. ascidiicola</i> AVMART05 ^T	343
<i>E. acroporae</i> Acr-14 ^T	523	<i>E. ascidiicola</i> KASP37	360
<i>E. montiporae</i> CL-33 ^T	249	<i>E. numazuensis</i> DSM25634 ^T	301
<i>E. montiporae</i> LMG24815	258	<i>E. arenosclerae</i> Ab112 ^T	297
		<i>E. arenosclerae</i> E-MC227	309



表 3-9 已知內生桿菌屬菌種與 *E. ruthgatesii* 8E 及 *E. penghunesis* 4G 的相似性

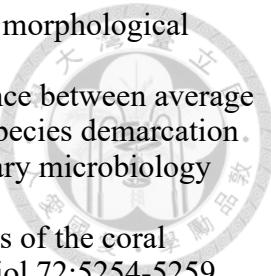
使用 BLAST 的 blastn suite-2sequences 比較 16S rRNA 相似性。

<i>Endozoicomonas</i> strains	<i>E. ruthgatesii</i> 8E	<i>E. penghunesis</i> 4G
<i>E. ruthgatesii</i> 8E	100.00%	98.01%
<i>E. penghunesis</i> 4G	98.01%	100.00%
<i>E. acroporae</i> Acr-14 ^T	95.61%	95.51%
<i>E. acroporae</i> Acr-12	96.08%	95.78%
<i>E. acroporae</i> Acr-1	96.26%	96.01%
<i>E. acroporae</i> Acr-5	94.46%	95.64%
<i>E. montiporae</i> CL-33 ^T	97.23%	97.09%
<i>E. euniceicola</i> EF212 ^T	96.99%	96.68%
<i>E. gorgoniicola</i> PS125 ^T	96.67%	95.70%
<i>E. elysicola</i> MKT110 ^T	97.24%	96.73%
<i>E. ascidiicola</i> AVMART05 ^T	96.34%	95.56%
<i>E. atrinae</i> WP70 ^T	96.34%	95.67%
<i>E. numazuensis</i>	97.23%	97.16%

參考文獻

- Agostini S, Suzuki Y, Higuchi T, Casareto BE, Yoshinaga K, Nakano Y, Fujimura H (2012) Biological and chemical characteristics of the coral gastric cavity. *Coral Reefs* 31:147-156
- Ainsworth T, Fine M, Blackall L, Hoegh-Guldberg O (2006) Fluorescence in situ hybridization and spectral imaging of coral-associated bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 72:3016-3020
- Alcolombri U, Laurino P, Lara-Astiaso P, Vardi A, Tawfik DS (2014) DddD is a CoA-transferase/lyase producing dimethyl sulfide in the marine environment. *Biochemistry* 53:5473-5475
- Appolinario LR, Tschoeke DA, Rua CPJ, Venas T, Campeao ME, Amaral GRS, Leomil L, de Oliveira L, Vieira VV, Otsuki K, Swings J, Thompson FL, Thompson CC (2016) Description of *Endozoicomonas arenosclerae* sp nov using a genomic taxonomy approach. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 109:431-438
- Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS (2016) PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic acids research* 44:W16-W21
- Barott KL, Venn AA, Perez SO, Tambutte S, Tresguerres M (2015) Coral host cells acidify symbiotic algal microenvironment to promote photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:607-612
- Bartz J-O, Blom J, Busse H-J, Mvie JB, Hardt M, Schubert P, Wilke T, Goessmann A, Wilharm G, Bender J (2018) *Parendozoicomonas haliclonae* gen. nov. sp. nov. isolated from a marine sponge of the genus *Haliclona* and description of the family *Endozoicomonadaceae* fam. nov. comprising the genera *Endozoicomonas*, *Parendozoicomonas*, and *Kistimonas*. *Systematic and applied microbiology* 41:73-84
- Bayer T, Arif C, Ferrier-Pages C, Zoccola D, Aranda M, Voolstra CR (2013) Bacteria of the genus *Endozoicomonas* dominate the microbiome of the Mediterranean gorgonian coral *Eunicella cavolini*. *Mar Ecol-Prog Ser* 479:75-+
- Besson M (2018) The Gills of Reef Fish Support a Distinct Microbiome Influenced by Host-Specific Factors. *Applied and Environmental Microbiology* 84
- Bourne DG, Munn CB (2005) Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. *Environmental microbiology* 7:1162-1174
- Broadbent AD, Jones GB, Jones RJ (2002) DMSP in corals and benthic algae from the Great Barrier Reef. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 55:547-555
- Brown B (1997) Coral bleaching: causes and consequences. *Coral reefs* 16:S129-S138
- Burg MB, Ferraris JD (2008) Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *Journal of Biological Chemistry* 283:7309-7313
- Cappuccino J, Sherman N (2004) *Microbiology*, Laboratory manual. Person education. INC, New Delhi:282-283
- Carpenter RC (1985) Relationships between primary production and ii radiance in coral reef algal communities 1. Limnology and Oceanography 30:784-793
- Casjens S (2003) Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Molecular microbiology* 49:277-300
- Chiu H-H, Mette A, Shiu J-H, Tang S-L (2012) Bacterial Distribution in the Epidermis and Mucus of the Coral *Euphyllia glabrescens* by CARD-FISH. *Zool Stud* 11
- Curson AR, Todd JD, Sullivan MJ, Johnston AW (2011) Catabolism of dimethylsulphoniopropionate: microorganisms, enzymes and genes. *Nature Reviews Microbiology* 9:849-859
- Daly M, Fautin DG, Cappola VA (2003) Systematics of the hexacorallia (Cnidaria: Anthozoa). *Zoological Journal of the Linnean Society* 139:419-437

- Ding J-Y, Shiu J-H, Chen W-M, Chiang Y-R, Tang S-L (2016) Genomic insight into the host–endosymbiont relationship of endozoicomonas montiporae CL-33T with its Coral Host. *Frontiers in microbiology* 7:251
- Dishaw LJ, Flores-Torres J, Lax S, Gemayel K, Leigh B, Melillo D, Mueller MG, Natale L, Zucchetti I, De Santis R (2014) The gut of geographically disparate *Ciona intestinalis* harbors a core microbiota. *PLoS One* 9
- dos Santos AJ, Dalla Valentina O, Veriano L, Schulz H, Alayo A, Tomaz Duarte MA (2017) From Obtaining to Degradation of PHB: Material Properties. Part I. *Ingeniería y Ciencia* 13:269-298
- Du Z, Zhang W, Xia H, Lü G, Chen G (2010) Isolation and diversity analysis of heterotrophic bacteria associated with sea anemones. *Acta Oceanologica Sinica* 29:62-69
- Eakin CM, Sweatman HP, Brainard RE (2019) The 2014–2017 global-scale coral bleaching event: insights and impacts. *Coral Reefs* 38:539-545
- Forget NL, Juniper K (2013) Free-living bacterial communities associated with tubeworm (*Ridgeia piscesae*) aggregations in contrasting diffuse flow hydrothermal vent habitats at the Main Endeavour Field, Juan de Fuca Ridge. *Microbiologyopen* 2:259-275
- Frade P, Schwaninger V, Glasl B, Sintes E, Hill R, Simó R, Herndl GJ (2016) Dimethylsulfoniopropionate in corals and its interrelations with bacterial assemblages in coral surface mucus. *Environ Chem* 13:252-265
- Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ (2008) Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology* 74:2461-2470
- Gajigan AP, Diaz LA, Conaco C (2017) Resilience of the prokaryotic microbial community of *Acropora digitifera* to elevated temperature. *MicrobiologyOpen* 6:e00478
- Garren M, Son K, Raina J-B, Rusconi R, Menolascina F, Shapiro OH, Tout J, Bourne DG, Seymour JR, Stocker R (2014) A bacterial pathogen uses dimethylsulfoniopropionate as a cue to target heat-stressed corals. *The ISME journal* 8:999-1007
- Glynn PW (1991) Coral reef bleaching in the 1980s and possible connections with global warming. *Trends in Ecology & Evolution* 6:175-179
- Gong S, Jin X, Ren L, Tan Y, Xia X (2020) Unraveling Heterogeneity of Coral Microbiome Assemblages in Tropical and Subtropical Corals in the South China Sea. *Microorganisms* 8:604
- Hofer U (2016) Marine microbiology: Microbiome'coral'ations. *Nature Reviews Microbiology* 14:266
- Hooper PM, Ross SH, Feist SW, Cano I (2019) Shedding and survival of an intracellular pathogenic Endozoicomonas-like organism infecting king scallop *Pecten maximus*. *Diseases of aquatic organisms* 134:167-173
- Hopkins FE, Bell TG, Yang M, Suggett DJ, Steinke M (2016) Air exposure of coral is a significant source of dimethylsulfide (DMS) to the atmosphere. *Scientific reports* 6:36031
- Hyun DW, Shin NR, Kim MS, Oh SJ, Kim PS, Whon TW, Bae JW (2014) Endozoicomonas atriniae sp nov., isolated from the intestine of a comb pen shell *Atrina pectinata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:2312-2318
- Jeng M-S, Huang H-D, Dai C-F, Hsiao Y-C, Benayahu Y (2011) Sclerite calcification and reef-building in the fleshy octocoral genus *Sinularia* (Octocorallia: Alcyonacea). *Coral reefs* 30:925-933
- Johnston I, Rohwer F (2007) Microbial landscapes on the outer tissue surfaces of the reef-building coral *Porites compressa*. *Coral Reefs* 26:375-383
- Katharios P, Seth-Smith HM, Fehr A, Mateos JM, Qi W, Richter D, Nufer L, Ruetten M, Soto MG, Ziegler U (2015) Environmental marine pathogen isolation using



- mesocosm culture of sharpsnout seabream: striking genomic and morphological features of novel *Endozoicomonas* sp. *Scientific reports* 5:1-13
- Kim M, Oh H-S, Park S-C, Chun J (2014) Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 64:346-351
- Koren O, Rosenberg E (2006) Bacteria associated with mucus and tissues of the coral *Oculina patagonica* in summer and winter. *Appl Environ Microbiol* 72:5254-5259
- Kurahashi M, Yokota A (2007) *Endozoicomonas elysicola* gen. nov., sp nov., a gamma-proteobacterium isolated from the sea slug *Elysia ornata*. *Systematic and Applied Microbiology* 30:202-206
- Littman RA, Willis BL, Pfeffer C, Bourne DG (2009) Diversities of coral-associated bacteria differ with location, but not species, for three acroporid corals on the Great Barrier Reef. *FEMS microbiology ecology* 68:152-163
- Magnusson SH, Fine M, Kühl M (2007) Light microclimate of endolithic phototrophs in the scleractinian corals *Montipora monasteriata* and *Porites cylindrica*. *Mar Ecol-Prog Ser* 332:119-128
- Martínez-Cano DJ, Reyes-Prieto M, Martínez-Romero E, Partida-Martínez LP, Latorre A, Moya A, Delaye L (2015) Evolution of small prokaryotic genomes. *Frontiers in microbiology* 5:742
- McDermott A (2020) Inner Workings: A microscopic mystery at the heart of mass-coral bleaching. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117:2232-2235
- Meistertzheim AL, Lartaud F, Arnaud-Haond S, Kalenitchenko D, Bessalam M, Le Bris N, Galand PE (2016) Patterns of bacteria-host associations suggest different ecological strategies between two reef building cold-water coral species. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* 114:12-22
- Meron D, Efrony R, Johnson WR, Schaefer AL, Morris PJ, Rosenberg E, Greenberg EP, Banin E (2009) Role of flagella in virulence of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Appl Environ Microbiol* 75:5704-5707
- Nakamura T (2017) Mass coral bleaching event in Sekisei lagoon observed in the summer of 2016. *Journal of the Japanese Coral Reef Society* 19:29-40
- Neave MJ, Apprill A, Ferrier-Pages C, Voolstra CR (2016) Diversity and function of prevalent symbiotic marine bacteria in the genus *Endozoicomonas*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100:8315-8324
- Neave MJ, Michell CT, Apprill A, Voolstra CR (2014) Whole-genome sequences of three symbiotic *Endozoicomonas* strains. *Genome Announc* 2:e00802-00814
- Neave MJ, Michell CT, Apprill A, Voolstra CR (2017a) *Endozoicomonas* genomes reveal functional adaptation and plasticity in bacterial strains symbiotically associated with diverse marine hosts. *Scientific reports* 7:40579
- Neave MJ, Rachmawati R, Xun LP, Michell CT, Bourne DG, Apprill A, Voolstra CR (2017b) Differential specificity between closely related corals and abundant *Endozoicomonas* endosymbionts across global scales. *Isme Journal* 11:186-200
- Ngugi DK, Ziegler M, Duarte CM, Voolstra CR (2020) Genomic blueprint of glycine betaine metabolism in coral metaorganisms and their contribution to reef nitrogen budgets. *Iscience*:101120
- Nguyen-Kim H, Bouvier T, Bouvier C, Doan-Nhu H, Nguyen-Ngoc L, Rochelle-Newall E, Baudoux AC, Desnues C, Reynaud S, Ferrier-Pages C (2014) High occurrence of viruses in the mucus layer of scleractinian corals. *Environmental Microbiology Reports* 6:675-682
- Nishijima M, Adachi K, Katsuta A, Shizuri Y, Yamasato K (2013) *Endozoicomonas numazuensis* sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from marine sponges, and

- emended description of the genus *Endozoicomonas* Kurahashi and Yokota 2007. International journal of systematic and evolutionary microbiology 63:709-714
- Obruca S, Sedlacek P, Slaninova E, Fritz I, Daffert C, Meixner K, Sedrlova Z, Koller M (2020) Novel unexpected functions of PHA granules. Applied Microbiology and Biotechnology:1-16
- Ochsenkühn MA, Röthig T, D'Angelo C, Wiedenmann J, Voolstra CR (2017) The role of floridoside in osmoadaptation of coral-associated algal endosymbionts to high-salinity conditions. Science Advances 3:e1602047
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M (2014) The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic acids research 42:D206-D214
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome research 25:1043-1055
- Paul JH, DeFlaun MF, Jeffrey WH (1986) Elevated levels of microbial activity in the coral surface microlayer. Mar Ecol-Prog Ser 33:29
- Peixoto RS, Rosado PM, Leite DCD, Rosado AS, Bourne DG (2017) Beneficial Microorganisms for Corals (BMC): Proposed Mechanisms for Coral Health and Resilience. Frontiers in Microbiology 8
- Peters EC, Oprandy JJ, Yevich PP (1983) Possible causal agent of “white band disease” in Caribbean acroporid corals. Journal of Invertebrate Pathology 41:394-396
- Pike RE, Haltli B, Kerr RG (2013) Description of *Endozoicomonas euniceicola* sp nov and *Endozoicomonas gorgoniicola* sp nov., bacteria isolated from the octocorals *Eunicea fusca* and *Plexaura* sp., and an emended description of the genus *Endozoicomonas*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63:4294-4302
- Piola AR, Gordon AL (1984) Pacific and Indian Ocean upper-layer salinity budget. Journal of Physical Oceanography 14:747-753
- Pollock FJ, McMinds R, Smith S, Bourne DG, Willis BL, Medina M, Thurber RV, Zaneveld JR (2018) Coral-associated bacteria demonstrate phylosymbiosis and cophylogeny. Nature Communications 9
- Raina J-B, Tapiolas D, Willis BL, Bourne DG (2009) Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur. Appl Environ Microbiol 75:3492-3501
- Raina J-B, Tapiolas DM, Forêt S, Lutz A, Abrego D, Ceh J, Seneca FO, Clode PL, Bourne DG, Willis BL (2013) DMSP biosynthesis by an animal and its role in coral thermal stress response. Nature 502:677-680
- Rajasabapathy R, Ramasamy KP, Manikandan B, Mohandass C, James RA (2020) Bacterial Communities Associated With Healthy and Diseased (Skeletal Growth Anomaly) Reef Coral *Acropora cytherea* From Palk Bay, India. Frontiers in Marine Science
- Schreiber L, Kjeldsen KU, Funch P, Jensen J, Obst M, López-Legentil S, Schramm A (2016a) *Endozoicomonas* are specific, facultative symbionts of sea squirts. Frontiers in microbiology 7:1042
- Schreiber L, Kjeldsen KU, Obst M, Funch P, Schramm A (2016b) Description of *Endozoicomonas ascidiicola* sp nov., isolated from Scandinavian ascidians. Systematic and Applied Microbiology 39:313-318
- Schreiber L, Kjeldsen KU, Obst M, Funch P, Schramm A (2016c) Description of *Endozoicomonas ascidiicola* sp. nov., isolated from Scandinavian ascidians. Systematic and applied microbiology 39:313-318
- Seemann T (2014) Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30:2068-2069

- Shiu J-H, Keshavmurthy S, Chiang P-W, Chen H-J, Lou S-P, Tseng C-H, Hsieh HJ, Chen CA, Tang S-L (2017) Dynamics of coral-associated bacterial communities acclimated to temperature stress based on recent thermal history. *Scientific reports* 7:1-13
- Shiu J-H, Tang S-L (2019) The bacteria Endozoicomonas: community dynamics, diversity, genomes, and potential impacts on corals. *Symbiotic microbiomes of coral reefs sponges and corals*. Springer
- Shiu JH, Ding JY, Tseng CH, Lou SP, Mezaki T, Wu YT, Wang HI, Tang SL (2018) A Newly Designed Primer Revealed High Phylogenetic Diversity of Endozoicomonas in Coral Reefs. *Microbes and Environments* 33:172-185
- Solomon S, Qin D, Manning M (2007) Climate change 2007: the physical science basis- Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *IPCC Working Groups Reports*
- Spalding M, Grenfell A (1997) New estimates of global and regional coral reef areas. *Coral reefs* 16:225-230
- Sunda W, Kieber D, Kiene R, Huntsman S (2002) An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. *Nature* 418:317-320
- Sweet M, Bythell J (2017) The role of viruses in coral health and disease. *Journal of invertebrate pathology* 147:136-144
- Tandon K, Lu CY, Chiang PW, Wada N, Yang SH, Chan YF, Chen PY, Chang HY, Chiou YJ, Chou MS, Chen WM, Tang SL (2020) Comparative genomics: Dominant coral-bacterium Endozoicomonas acroporae metabolizes dimethylsulfoniopropionate (DMSP). *Isme Journal*
- Thompson JR, Rivera HE, Closek CJ, Medina M (2015) Microbes in the coral holobiont: partners through evolution, development, and ecological interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4
- Tout J, Jeffries TC, Petrou K, Tyson GW, Webster NS, Garren M, Stocker R, Ralph PJ, Seymour JR (2015) Chemotaxis by natural populations of coral reef bacteria. *The ISME journal* 9:1764-1777
- Van Der Merwe R, Röthig T, Voolstra CR, Ochsenkühn MA, Lattemann S, Amy GL (2014) High salinity tolerance of the Red Sea coral *Fungia granulosa* under desalination concentrate discharge conditions: an in situ photophysiology experiment. *Frontiers in Marine Science* 1:58
- van Teeseling MC, de Pedro MA, Cava F (2017) Determinants of bacterial morphology: from fundamentals to possibilities for antimicrobial targeting. *Frontiers in microbiology* 8:1264
- Wada N, Ishimochi M, Matsui T, Pollock FJ, Tang SL, Ainsworth TD, Willis BL, Mano N, Bourne DG (2019) Characterization of coral-associated microbial aggregates (CAMAs) within tissues of the coral *Acropora hyacinthus*. *Scientific Reports* 9
- Wijgerde T, Silva CI, Scherders V, van Bleijswijk J, Osinga R (2014) Coral calcification under daily oxygen saturation and pH dynamics reveals the important role of oxygen. *Biology open* 3:489-493
- Wild C, Woyt H, Huettel M (2005) Influence of coral mucus on nutrient fluxes in carbonate sands. *Mar Ecol-Prog Ser* 287:87-98
- Woo S, Yang S-H, Chen H-J, Tseng Y-F, Hwang S-J, De Palmas S, Denis V, Imahara Y, Iwase F, Yum S (2017) Geographical variations in bacterial communities associated with soft coral *Scleronephthya gracillimum*. *PloS one* 12
- Work TM, Aeby GS (2014) Microbial aggregates within tissues infect a diversity of corals throughout the Indo-Pacific. *Mar Ecol-Prog Ser* 500:1-9
- Wu H-J, Seib KL, Edwards JL, Apicella MA, McEwan AG, Jennings MP (2005) Azurin of pathogenic *Neisseria* spp. is involved in defense against hydrogen peroxide and survival within cervical epithelial cells. *Infection and immunity* 73:8444-8448

- Yancey PH, Heppenstall M, Ly S, Andrell RM, Gates RD, Carter VL, Hagedorn M (2010) Betaines and dimethylsulfoniopropionate as major osmolytes in cnidaria with endosymbiotic dinoflagellates. *Physiological and Biochemical Zoology* 83:167-173
- Yang CS, Chen MH, Arun AB, Chen CA, Wang JT, Chen WM (2010) Endozoicomonas montiporae sp nov., isolated from the encrusting pore coral Montipora aequituberculata. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:1158-1162
- Yang S-H, Tandon K, Lu C-Y, Wada N, Shih C-J, Hsiao SS-Y, Jane W-N, Lee T-C, Yang C-M, Liu C-T (2019) Metagenomic, phylogenetic, and functional characterization of predominant endolithic green sulfur bacteria in the coral *Isopora palifera*. *Microbiome* 7:1-13
- Yang SH, Lee ST, Huang CR, Tseng CH, Chiang PW, Chen CP, Chen HJ, Tang SL (2016) Prevalence of potential nitrogen-fixing, green sulfur bacteria in the skeleton of reef-building coral *I sopora palifera*. *Limnology and oceanography* 61:1078-1086
- Young KD (2006) The selective value of bacterial shape. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:660-703