

淡水河產臺灣文蛤 (*Meretrix taiwanica*) 腸道菌相分析

黃慶輝* · 吳嘉哲

農業部水產試驗所水產養殖組

摘 要

文蛤為臺灣重要的經濟性雙殼綱軟體動物。文蛤的生長和存活容易受到水溫、鹽度和病原體等各種環境因素的影響。本研究旨在利用奈米孔定序 (nanopore sequencing) 分析臺灣淡水河文蛤群體腸道菌的組成，解剖 10 個淡水河產文蛤樣本 (*Meretrix taiwanica*) 並採取腸道後，萃取細菌核酸並進行聚合酶連鎖反應、定序及菌相分析。由定序結果發現，文蛤腸道菌中的主要分類群包含具耐熱特性的地芽孢桿菌屬 (*Geobacillus*)、芽孢桿菌屬 (*Bacillus*)、尿素芽孢桿菌屬 (*Ureibacillus*) 及具固氮能力之硝化弓形菌 (*Arcobacter nitrofigilis*)。除此之外，也在文蛤腸道中發現另一種也在貽貝體內發現過的弓形菌屬種類 (*Arcobacter mytili*)。這些共生菌可能可以幫助文蛤個體適應野外劇烈變化的氣候環境並確保其生存能力。

關鍵詞：臺灣文蛤、腸道菌、奈米孔定序、總體基因組學

前 言

文蛤屬物種 (Genus *Meretrix*)，廣泛分布於東非、東亞及東南亞地區 (Yoosukh and Matsukuma, 2001)，在中央研究院建置的臺灣貝類資料庫中，目前臺灣有 5 種文蛤屬物種之記錄，分別為：臺灣文蛤 (*M. meretrix*)、中華文蛤 (*M. petechialis*)、麗文蛤 (*M. lusoria*)、韓國文蛤 (*M. lamarckii*) 以及皺肋文蛤 (*M. lyrata*)，但除貝殼輪廓形狀較為狹長之韓國文蛤及殼表具輪肋之皺肋文蛤外，僅由外觀等形態特徵進行臺灣產文蛤之鑑種有一定難度 (Huang, 1999)。過往研究一般認為，臺灣主要的文蛤物種為由日本引進之麗文蛤 (Chen, 1990; Jeng and Tyan, 1982)，近期有學者透過分子生物學研究以及遺傳學分析結果，認為中華文蛤分為北方群及南方族群，臺灣的文蛤主要為中華文蛤之南方群 (Wang *et al.*, 2017)，之後亦有學者採集臺灣淡水河產之文蛤，透過粒線體基因定序及演化樹分析，認為過往研究之中華文蛤南方群，實為文蛤屬

新種 *M. taiwanica* (Hsiao and Chuang, 2023)。

近年來，臺灣的文蛤養殖偶有突發性死亡的問題 (Chen, 1990; Han *et al.*, 1996)。導致這些死亡事件的原因可能包括溫度劇烈變化、短時間強降雨、污染、細菌或病毒感染、以及池水優養化等因素 (Kou *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 2001)。在病害研究方面，過去針對水產生物腸道環境中的細菌進行研究的方法通常是直接從水產生物的組織中萃取細菌，然後進行培養後進行種類辨識等分析，以了解腸道環境中細菌的多樣性 (Beeson and Johnson, 1967)。然而，這種方法存在一些缺點，其中一個主要缺點是許多細菌難以在人工環境中培養以及生長，這導致以細菌培養之方式難以準確反映環境中細菌的多樣性，造成判斷的偏誤 (Hugenholtz *et al.*, 1998)，且至今大多數有關水生動物細菌感染之研究，主要集中在動物感染後已死亡的情況下進行，對於水生動物在感染死亡前的體內細菌組成，我們的了解仍然有限。對生物體而言，要判斷高比例存在於死亡後生物體內的細菌是否是導致感染的主要原因，抑或僅是在生物體死亡後大量增殖的細菌，仍然具有一定的困難。

近年來，隨著分子生物學技術的迅速發展，對於腸道環境細菌多樣性的研究正逐漸轉向環境基

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

因體學的新方向，環境基因體學 (metagenomics) 的概念最早於 1998 年被提出 (Handelsman *et al.*, 1998)，其著重於直接研究環境中整個微生物群落的基因，而不是像過去那樣僅限於實驗室中對單一細菌物種進行純化和培養的研究方法 (Chen and Pachter, 2005)，隨著定序技術的不斷進步和成本的降低，相關研究得以在更廣的範圍以及更高的定序強度下進行。近年來，環境基因體學的研究方法主要包括基因霰彈槍 (shot gun) 和新型定序技術，旨在通過這些方法在單個環境樣本中獲取大量且較少偏誤的細菌群落序列資料 (Eisen, 2007)。以奈米孔定序進行腸道環境細菌研究之優缺點以及相關技術發展目前，主要用於研究細菌的定序方法有 Illumina 公司開發的 Illumina 定序法，以及在本研究中所使用的奈米孔定序法。這兩種方法有一些不同之處。Illumina 定序法的準確度相當高，通常超過 99%。它目前被廣泛應用，但由於其定序原理的限制，一次只能定序約 300 bp 左右的片段 (Goodwin *et al.*, 2016)。因此，通常人們會選擇在 16S 序列中歧異度最高的 V3-V4 片段進行定序，以獲得更好的結果 (Herlemann *et al.*, 2011)。然而，僅使用 16S 高歧異度片段的定序結果可能難以將細菌分類到物種層級 (Nygaard *et al.*, 2020)。相對而言，奈米孔定序法的定序準確率稍微較低，通常在 95% 以上，但理論上它沒有定序長度的限制，因此可以一次定序接近全長的 16S 序列 (約 1500 bp 左右)。這使得我們可以獲得更多的序列信息，並且在分類時更容易達到物種層級 (Benítez *et al.*, 2016)。儘管其準確度略低，但這一點可以依靠其軟體和硬體技術的持續發展更新，使其定序準確度也不斷提高，目前而言奈米孔定序法仍具有很大的潛力 (Heikema *et al.*, 2020)，另近年也有新的定序方式持續發展，如 PacBio 公司發展的單分子即時定序技術 (single molecule real-time, SMRT)，除與奈米孔定序一樣，可定序片段長外，根據定序模式的選擇，可進行重複定序環形序列結構模式，經由重複定序其準確率可超過 99.9%，該長片段定序稱作 HiFi (high-fidelity) reads，目前來說其相對價格較高，但針對細菌 16S 序列片段定序分析，已有許多相關研究開始使用該技術 (Ardui *et al.*, 2018)，期待後續技術成熟後價格下降，能在水產養殖領域作更廣泛的運用。

本研究所使用的定序技術為奈米孔定序 (nanopore sequencing)，奈米孔定序的核心技術於 2007 年完成專利註冊，並於 2010 年正式開始運用相關技術 (Deamer *et al.*, 2016)，與舊有的定序技術相比，這項技術的特點在於能夠讀取長序列、提高定序序列片段的長度、大幅提昇定序速度，且能夠直接對原始 DNA 樣本進行定序 (Jain *et al.*, 2016)，奈米孔技術的核心概念是在薄膜上嵌入跨膜蛋白，並在薄膜的兩側建立電位差，從而使溶液中的離子通過跨膜蛋白形成電流，跨膜蛋白上的解旋酶 (helicases) 會解開 DNA 的雙股結構，使其中的單股 DNA 通過跨膜蛋白。這時，通過奈米孔的 DNA 會影響離子流動，從而改變電流。由於不同的鹼基對電流的影響不同，通過量測已知序列引起的電流變化，可以根據電流變化的模式來推斷 DNA 的鹼基序列 (Jain *et al.*, 2016)。本研究以環境基因體學為基礎，對於臺灣淡水河產之野生文蛤之腸道菌其菌相及多樣性進行分析與探討，並討論定序結果中具有特殊功能性之相關細菌，以及這些細菌對於文蛤適應野生環境之可能作用。

材料與方法

一、實驗動物

本研究所使用之文蛤樣本共 10 個，於 2020 年 5 月採取自臺北市淡水河口，紅樹林自然保留區外區域，依 Hsiao and Chuang (2023) 之研究，淡水河所產文蛤應皆屬於新種 *M. taiwanica*，文蛤樣本殼長範圍約在 5 - 6 cm，捕撈後立即將樣本冷藏於已放置冰塊之攜帶式冰箱，並於當日帶回實驗室進行腸道採取以及核酸萃取。

二、文蛤腸道採取及核酸萃取

為分析文蛤腸道菌細菌相，文蛤從冰箱取出後放在保冷劑上維持低溫，並以解剖刀伸入殼中切斷閉殼肌以打開文蛤殼，文蛤肉身露出後，以解剖剪刀剪開文蛤外側肌肉層，並於文蛤內臟團中挑出腸道組織後，將腸道組織以 protein kinase K 溶解，並使用 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit 核酸萃取試劑組配合 Zinexts MagPurix 12A 核

酸自動萃取儀進行腸道菌相之核酸萃取，萃取完之核酸則運用 Qubit 4.0 Fluorometer 螢光核酸定量儀確認濃度及萃取過程是否成功。

三、運用聚合酶連鎖反應 (PCR) 將文蛤腸道菌 16S 核糖體序列擴增

萃取完成之文蛤腸道核酸以 PCR 方式將細菌 16S 核糖體基因序列擴增，使用之試劑為 Fast-Run Taq Master Mix with Dye (5X Master Mix, Protec)，所使用之引子對細菌 16S 核糖體序列具專一性，引子序列為 20F (5'-AGAGTTTGATCMTGGC TCAG-3') 及 1500R (5'-GGTACCTTGTTACGA CTT-3') (Eden *et al.*, 1991)，反應條件為 94°C 1 min；再進行 94°C 45 秒、52°C 45 秒、72°C 1 分鐘 30 秒，共進行 35 個循環；最後以 72°C 反應 10 分鐘，PCR 完成之產物序列長度約為 1480 bp 上下，已接近細菌 16S 核糖體序列全長。

四、奈米孔定序樣本前處理及上機

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

五、序列分析

本研究利用 Emu 物種分析工具 (<https://github.com/treangenlab/emu>) (Curry *et al.*, 2022) 對已定序的資料進行分析。分析過程包括以下步驟：序列長度篩選 (1000 bp 以上)、準確度測試、細菌物種比對分群和多樣性分析。我們使用了 NCBI 的 16S 序列資料庫 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) (O'Leary *et al.*, 2016; Schoch *et al.*, 2020) 以及美國密西根大學團隊編輯的核糖體 RNA 操縱子資料庫 rrnDB (<https://rrndb.umms.med.umich.edu/>) (Stoddard *et al.*, 2015) 來進行序列比對。

結 果

基本定序結果

本研究共定序淡水河口之野生 10 文蛤個體之腸道菌樣本 (TS01-TS10)，為增加細菌辨種之正確率，在定序完成之序列中，運用 Emu 分析軟體設定，僅取長度在 1000 bp 以上之序列進行分析，進行物種組成分析，各樣本成功辨識之有效 16S 序列數量為 12,265 – 131,486 條，結果列於 Table 1，各樣本菌屬組成如 Fig. 1 及 Table 2。

Table 1 Sequence reads generated per sample of gut microbiota from wild hard clams collected in the Tamsui River

Sample name	Reads	Percentage (%)
TS01	38,152	5.68
TS02	131,486	19.58
TS03	97,752	14.55
TS04	64,648	9.63
TS05	12,265	1.83
TS06	69,509	10.35
TS07	85,961	12.80
TS08	18,388	2.74
TS09	54,541	8.12
TS10	98,951	14.73
Total	671,653	100.00

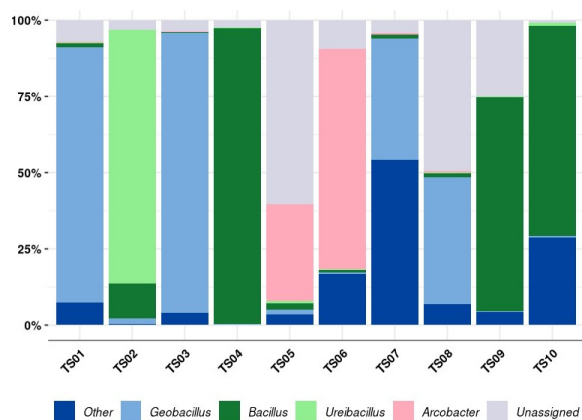


Fig. 1 Microbial community composition (genus level) of gut samples from 10 hard clams collected in the Tamsui River.

估算 alpha diversity (Shannon-Wiener's diversity index 及 Simpson's diversity index) 及 beta diversity 分別如 Table 3 及 Fig. 2, 各樣本之菌門組成如 Table 4; 其中可辨識至屬層級之序列共 671,653 條, 比例最高的 4 個屬 (4 屬合計共佔 84.45%) (Table 5), 依序分別為芽胞桿菌屬

(*Bacillus*, 30.20%)、地芽胞桿菌屬 (*Geobacillus*, 27.24%)、尿素芽胞桿菌屬 (*Ureibacillus*, 17.15%)、及弓形菌屬 (*Arcobacter*, 9.87%), 各屬細菌組成物種 (Table 6), 說明如下 (由於許多細菌尚無固定中文名稱, 為避免混淆以學名為主)。

Table 2 Genus-level taxonomic assignment of each sample (percentage, %) of gut microbiota from hard clams collected in the Tamsui River

Taxonomic	TS01	TS02	TS03	TS04	TS05	TS06	TS07	TS08	TS09	TS10
<i>Geobacillus</i>	83.75	1.97	91.64	0.25	1.74	0.60	39.90	41.60	0.30	0.56
<i>Bacillus</i>	1.34	11.29	0.36	97.09	2.11	0.83	1.07	1.10	70.34	68.75
<i>Ureibacillus</i>	0.26	83.15	0.15	0.10	0.73	0.27	0.24	0.42	0.11	1.08
<i>Arcobacter</i>	0.38	0.05	0.15	0.11	31.56	72.26	0.38	0.39	0.12	0.08
Other	7.29	0.36	4.04	0.09	3.38	16.74	54.18	6.96	4.20	28.80
Unassigned	6.98	3.17	3.67	2.36	60.48	9.30	4.23	49.53	24.92	0.72
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Table 3 Shannon-Wiener diversity index (Shannon_index) and Simpson's diversity index (Simpson_index) of gut microbiota from hard clams collected in the Tamsui River

Taxonomic	TS01	TS02	TS03	TS04	TS05	TS06	TS07	TS08	TS09	TS10
Shannon_index	0.93	0.76	0.56	0.17	1.35	1.86	3.53	1.29	0.90	1.42
Simpson_index	0.30	0.31	0.16	0.06	0.57	0.64	0.84	0.58	0.46	0.56

Table 4 Phylum-level taxonomic assignment of nanopore reads (percentage, %) of gut microbiota from individual hard clams collected in the Tamsui River

Taxonomic	TS01	TS02	TS03	TS04	TS05	TS06	TS07	TS08	TS09	TS10
Acidobacteria	—	—	—	—	—	—	0.07	0.21	—	—
Actinobacteria	—	—	—	—	—	—	0.04	—	—	—
Bacteroidetes	0.18	—	0.51	—	—	—	4.99	0.59	—	—
Chloroflexi	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.04
Cyanobacteria	1.63	0.13	2.42	—	0.35	0.16	29.57	2.98	0.13	—
Deferribacteres	—	—	—	—	—	0.58	0.07	—	—	—
Fibrobacteres	0.18	—	0.09	—	0.10	—	0.88	0.30	—	—
Firmicutes	92.01	99.67	95.72	99.83	12.32	2.02	47.74	86.18	99.56	72.93
Fusobacteria	—	—	—	—	—	—	1.13	—	—	—
Kiritimatiellaeota	—	—	—	—	—	—	0.06	—	—	—
Lentisphaerae	—	—	—	—	—	—	0.35	—	—	—
Planctomycetes	3.15	0.05	0.19	—	—	—	5.70	2.64	0.03	—
Proteobacteria	2.70	0.15	0.98	0.17	81.38	82.65	7.00	6.76	0.28	27.02
Spirochaetes	—	—	—	—	—	0.40	0.11	—	—	—
Tenericutes	0.08	—	0.05	—	5.85	14.20	0.63	0.12	—	—
Verrucomicrobia	—	—	0.03	—	—	—	1.41	0.11	—	—
Unassigned	0.08	—	0.01	—	—	—	0.23	0.12	—	—

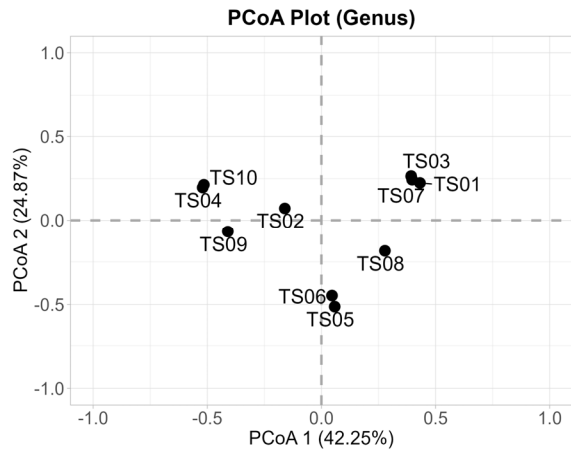


Fig. 2 Principal coordinate analysis (PCoA) based on the genus abundance of 16S rRNA sequencing. The PCoA plot illustrates the differences in microbial community composition across different samples, based on Bray-Curtis distances at the genus level. Each point represents a distinct sample (TS01 to TS10), with the points' positioning indicating the similarity or dissimilarity of microbial communities between the samples. The axes represent the first two principal coordinates, with PCoA 1 and PCoA 2 explaining 42.25% and 24.87% of the total variance, respectively, in the abundance of the gut microbial community at the genus level for the 10 hard clam samples. Clustering samples share similar microbial communities.

一、地芽孢桿菌屬 (*Geobacillus*)

以熱脫氮地芽孢桿菌 (*G. thermodenitrificans*) 所佔比例最高，達 99.45%，次高者依序為 *G. subterraneus* (0.22%)、*G. kaustophilus* (0.09%)、*G. stearothermophilus* (0.07%) 及 *G. thermoleovorans* (0.07%)。

二、芽孢桿菌屬 (*Bacillus*)

以阿尤海槽芽孢桿菌 (*B. alveayuensis*) 比例最高佔 32.32%，次高者依序為馬努司海槽芽孢桿菌 (*B. manusensis*, 32.02%) 及地衣芽孢桿菌 (*B. licheniformis*, 29.18%)、*B. borbori* (2.81%) 及 *B. aeolius* (1.97%)。

三、尿素芽孢桿菌屬 (*Ureibacillus*)

以熱球狀尿素芽孢桿菌 (*U. thermosphaericus*) 所佔比例最高，達 99.74%，其餘依序為 *U. composti* (0.24%)、*U. thermophilus* (0.01%)、*U. terrenus* (0.01%)。

四、弓形菌屬 (*Arcobacter*)

比例最高為貽貝弓形菌 *A. mytili* (80.53%)，其餘依序為硝化弓形菌 (*A. nitrofigilis*, 6.52%)、*A. butzleri* (4.99%)、*A. lekithochrous* (0.92%) 及 *A. suis* (0.34%)。

Table 5 Genus-level taxonomic assignment of total nanopore reads (percentage, %) of gut microbiota from hard clams collected in the Tamsui River

Genus	Counts	Percentage (%)
<i>Bacillus</i>	202,809	30.20
<i>Geobacillus</i>	182,931	27.24
<i>Ureibacillus</i>	115,203	17.15
<i>Arcobacter</i>	66,269	9.87
<i>Vibrio</i>	25,090	3.74
<i>Mycoplasma</i>	10,865	1.62
<i>Aliterella</i>	4,558	0.68
<i>Calothrix</i>	4,247	0.63
<i>Synechococcus</i>	3,826	0.57
<i>Dulcicalothrix</i>	3,824	0.57
<i>Candidatus</i>	2,994	0.45
<i>Brevibacillus</i>	2,806	0.42
<i>Parendozaicomonas</i>	1,900	0.28
<i>Sulfurovum</i>	1,788	0.27
<i>Carboxylicivirga</i>	1,734	0.26
<i>Aquisphaera</i>	1,667	0.25
<i>Romboutsia</i>	1,496	0.22
<i>Geitlerinema</i>	1,305	0.19
<i>Pseudoalteromonas</i>	1,295	0.19
<i>Aeribacillus</i>	1,267	0.19
Other	33,777	5.03
Total	671,653	100.00

討 論

一、定序結果基本評估

本研究由 10 個淡水河口文蛤腸道萃取細菌並進行定序及種類辨識，其中 TS05 及 TS08，這 2 樣本其讀出序列較少 (Table 1)，可能是因為此 2 樣本濃度較低，進行 nanopore 定序時與其他樣本競合所導致之結果，往後進行定序時會再更精確調整各樣本之濃度以達可讀出序列數更為平均之結果。另外由 Alpha (Table 3) 及 Beta (PCoA, Fig. 2) 分析發現，各樣本其間差異較大，且有分群之

情形，其中一個可能成因為，即使於同樣的淡水河自然保留區域，即於同一生態區位 (niche) 採集，但河口環境變化快速，在同一生態區位中形成不同的副生態區位 (sub-niche) (Houlicz *et al.*, 2021)，進而影響環境微生物以及文蛤腸道菌相組成，但倘要繼續研究這些因素對文蛤之影響，需對整個淡水河保留區之生態環境做更全面之瞭解，並進行較高頻度之環境菌相測試等，爰本研究先以定序結果之主要細菌種類進行探討。

Table 6 Species identified in four major genera of the gut microbiota from hard clams collected in the Tamsui River

Species	Percentage (%)
Genus <i>Geobacillus</i>	
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	99.45
<i>Geobacillus subterraneus</i>	0.22
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	0.09
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	0.07
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	0.07
Other <i>Geobacillus</i> species	0.10
Total	100.00
Genus <i>Bacillus</i>	
<i>Bacillus alveayuensis</i>	32.32
<i>Bacillus manusensis</i>	32.02
<i>Bacillus licheniformis</i>	29.18
<i>Bacillus borbori</i>	2.81
<i>Bacillus aeolius</i>	1.97
Other <i>Bacillus</i> species	1.70
Total	100.00
Genus <i>Ureibacillus</i>	
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	99.74
<i>Ureibacillus composti</i>	0.24
<i>Ureibacillus thermophilus</i>	0.01
<i>Ureibacillus terrenus</i>	0.01
Total	100.00
Genus <i>Arcobacter</i>	
<i>Arcobacter mytili</i>	80.53
<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	6.52
<i>Arcobacter butzleri</i>	4.99
<i>Arcobacter lekithochrous</i>	0.92
<i>Arcobacter suis</i>	0.34
Other <i>Arcobacter</i> species	6.70
Total	100.00

二、淡水河口文蛤腸道細菌主要菌種探討

定序結果發現，成功辨識至屬 (genus) 層級總計比例最高的地芽胞桿菌屬、芽胞桿菌屬、尿素芽胞桿菌屬及弓形菌屬，4 屬合計佔總可辨識序列之 84.45%，顯示這些種類在淡水河野生族群文蛤之腸道中佔有較大之優勢，一般認為造成文蛤等貝類養殖疾病或大量死亡的原因之一弧菌屬細菌 (Paillard *et al.*, 2004; Yue *et al.*, 2010)，其所佔整體可辨識比例僅有 3.74% (Table 5)，顯示弧菌屬細菌其數量較低，應不至於影響野生文蛤族群之生存，以下就本次定序之 4 個主要細菌屬中占比較高的細菌物種進行探討

(一) 地芽胞桿菌屬

該屬序列中熱脫氮地芽胞桿菌 (99.45%) 含量超過 9 成以上，本菌在 2001 年才被正式確認名稱並且發表，該研究經由序列以及演化樹分析，重新將該菌種自芽胞桿菌屬移至地芽胞桿菌屬，該屬細菌在各種不同的環境中被發現，且許多種類具嗜熱性 (thermophilic)，其耐溫程度可超過攝氏 45°C 以上 (Nazina *et al.*, 2001, Coorevits *et al.*, 2012)。著眼於熱脫氮地芽胞桿菌之嗜熱性，近期也有對其能產生的耐熱酵素進行相關研究 (McMullan *et al.*, 2004)，如該種細菌可產生在攝氏 50°C 以上環境也可以作用的澱粉酶 (amylase) 及葡萄糖苷酶 (glucosidase) (Thaddeus *et al.*, 2005)，甚至可以產生屬於羊毛硫抗生素 (lantibiotics) 類，在高溫下 (攝氏 50 – 80°C) 結構穩定仍具有抗菌作用的地芽胞桿菌素 (geobacillin) (Garg *et al.*, 2012)，在水產養殖方面有做為益生菌以及開發水產養殖或食品相關抗菌添加物的潛力。

(二) 芽胞桿菌屬

本次研究定序完成之芽胞桿菌屬中，以阿尤海槽芽胞桿菌 (32.32%)、馬努司海槽芽胞桿菌 (32.02%) 以及地衣芽胞桿菌 (29.18%) 佔大宗。顧名思義，阿尤海槽芽胞桿菌在西太平洋阿尤海槽之海底溫泉沈積物中被發現，也具有耐高溫 (最高可至攝氏 65°C) 之特性 (Bae *et al.*, 2005)。該菌也被用來分解蝦蟹殼等水產廢棄物，並可以生產具耐鹽性且耐高溫之鹼性蛋白酶 (alkaline

protease)，該蛋白酶在清潔劑中也可以保持結構穩定，作為洗滌劑中清除血跡等蛋白質污漬的添加物使用，同時製造過程中也可以將水產廢棄物進行循環利用 (Annamalai *et al.*, 2014)。馬努司海槽芽孢桿菌則於巴布亞紐幾內亞周圍馬努司海槽之海底溫泉沈積物中被發現，該菌也具有高溫下的代謝活性 (Sun *et al.*, 2019)。地衣芽孢桿菌目前在生技產業上已經是一種廣泛應用的細菌，具有高度的生物技術潛力，應用領域眾多，包括生產活性化合物，應用於水產養殖、農業、食品、生物醫學和製藥等廣泛領域 (Muras *et al.*, 2021)。在水產養殖方面，許多研究已經顯示，地衣芽孢桿菌可對病原性的細菌具有抑制性，可以作為添加劑加入飼料或添加到養殖用水中，並已應用在虹鱒、白蝦以及三角魴等種類的養殖 (Raida *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013)。

(三) 尿素芽孢桿菌屬

佔該屬序列中 99% 以上的熱球狀尿素芽孢桿菌，與前述熱脫氮地芽孢桿菌類似，經由分子生物學等鑑定後，由芽孢桿菌屬移至尿素芽孢桿菌屬 (Fortina, 2001)。該菌也具有嗜熱性，在攝氏 50 度左右具有最佳的成長速度 (Akita *et al.*, 2011)，且能產生之酵素在相對高溫下也十分穩定，在工業應用上非常重要，目前應用的有氨基酸脫氫酶 (amino acid dehydrogenase, Akita *et al.*, 2011)、過氧化氫酶 (catalase) (Jia *et al.*, 2017) 和酯酶 (esterase) (Gagné *et al.*, 2001)。此外，還可運用熱球狀尿素芽孢桿菌作為降解木質纖維素生物質的生物催化劑，這對於生產第二代生物燃料 (Asada *et al.*, 2015; Zainudin *et al.*, 2013) 十分有用。

(四) 弓形菌屬

本次研究定序完成之弓形菌屬細菌序列中，以最多的為貽貝弓形菌 (80.53%)，次多的為硝化弓形菌 (6.52%)。貽貝弓形菌在 2006 年從西班牙加泰羅尼亞的埃布羅河三角洲採集的淡菜中分離出來 (Collado *et al.*, 2009)，可能因為貝類體內適合其生長，所以本研究在淡水河的文蛤腸道中也有發現貽貝弓形菌，且在弓形菌屬中所佔比例超過一半。硝化弓形菌為弓形菌屬的模式種 (Vandamme *et al.*, 1991)，一開始是從加拿大東海

岸的鹹水沼澤地中的禾本科植物根部分離出來 (McClung and Patriquin, 1980)。由於其主要存在環境為海洋環境，這在演化以及分類學上引起了廣泛的興趣，因過往研究其他弓形菌屬物種通常在溫血動物身上發現 (McClung *et al.*, 1983, Pati *et al.*, 2010)。硝化弓形菌的其名稱也是因其強大的固氮硝化作用能力而來，在海水鹽度下具有尿素水解酶 (urease) 以及固氮酶 (nitrogenase) 的活性 (McClung *et al.*, 1983)。

結 論

環境基因體學的研究，對水產養殖技術發展提供了一個分子層級的窗口，可揭示水產生物腸道中的疾病傳播途徑、開發新型益生菌，以及深入探討水生生物體與細菌的共生關係。這種工具讓研究人員有機會深入研究不同尺度的生態系統。近年養殖水產物因為氣候變遷以及養殖密度提高等緣故，病害以及發生突發死亡的機會也逐漸提高，發展新型的水產益生菌或飼料添加物，以提升養殖水產生物抗逆境的能力也是一個十分重要的方向。

本次研究淡水河產文蛤之腸道菌相發現，許多耐高溫的細菌種類，如熱脫氮地芽孢桿菌、阿尤海槽芽孢桿菌以及熱球狀尿素芽孢桿菌等佔了文蛤腸道菌之大宗，這可能是因為採集時間點為初夏，河口環境因容易受潮汐變化影響，且因與一般河流相比，表面積較大，水溫容易受氣溫影響，而有夏天水溫更高，冬天相對低溫之情形，而這些細菌中筆者認為熱脫氮地芽孢桿菌是一開發新型水產養殖益生菌以及飼料添加物的有力候選，本研究發現其應可穩定在文蛤體內生存，有協助文蛤度過河口環境容易產生的劇烈高溫的可能性，且其可產生在高溫環境也可以作用的各種酵素，以及在高溫下結構穩定仍具有抗菌作用的地芽孢桿菌素，值得後續研究探討。

另外，隨著季節以及副生態區位變化，淡水河口文蛤其體內之腸道菌是否有發生變化，菌相是否更迭為可適應河口冬季較低水溫環境之種類，也是一個值得探討且有後續應用的研究方向，這些議題尚待後續更進一步的研究，也期待相關研究成果能協助改善文蛤養殖業相關問題。

參考文獻

- Akita, H., Y. Fujino, K. Doi and T. Ohshima (2011) Highly stable meso-diaminopimelate dehydrogenase from an *Ureibacillus thermosphaericus* strain A1 isolated from a Japanese compost: purification, characterization and sequencing. *AMB Express*, 1(1): 43.
- Annamalai, N., M. V. Rajeswari and T. Balasubramanian (2014) Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS 5 using marine wastes. *Food Bioprod. Process.*, 92(4): 335-342.
- Ardui, S., A. Ameer, J. R. Vermeesch and M. S. Hestand (2018) Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics. *Nucleic Acids Res.*, 46(5): 2159-2168.
- Asada, C., C. Sasaki, T. Takamatsu and Y. Nakamura (2015) Conversion of steam-exploded cedar into ethanol using simultaneous saccharification, fermentation and detoxification process. *Bioresour. Technol.*, 176: 203-209.
- Bae, S. S., J. H. Lee and S. J. Kim (2005) *Bacillus alveayuensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from deep-sea sediments of the Ayu Trough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55(3): 1211-1215.
- Beeson, R. J. and P. T. Johnson (1967) Natural bacterial flora of the bean clam, *Donax gouldi*. *J. Invertebr. Pathol.*, 9(1): 104-110.
- Chen, L. C. (1990). *Aquaculture in Taiwan*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Chen, K. and L. Pachter (2005) Bioinformatics for Whole-Genome Shotgun Sequencing of Microbial Communities. *PLoS Comput. Biol.*, 1(2): e24.
- Collado, L., I. Cleenwerck, S. Van Trappen, P. De Vos and M. J. Figueras (2009). *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59: 1391-1396.
- Coorevits, A., A. E. Dinsdale, G. Halket, L. Lebbe, P. De Vos, A. Van Landschoot and N. A. Logan (2012) Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. Corrig., formerly "*thermoglucosidasius*"); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 62: 1470-1485.
- Curry, K. D., Q. Wang, M. G. Nute, A. Tyshaieva, E. Reeves, S. Soriano, Q. Wu, E. Graeber, P. Finzer, W. Mendling, T. Savidge, S. Villapol, A. Diltthey and T. J. Treangen (2022) Emu: species-level microbial community profiling of full-length 16S rRNA Oxford Nanopore sequencing data. *Nat Methods*, 19: 845-853.
- Deamer, D., M. Akeson and D. Branton (2016) Three decades of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol.*, 34: 518-24.
- Eisen, J. A. (2007) Environmental Shotgun Sequencing: Its Potential and Challenges for Studying the Hidden World of Microbes. *PLoS Biol.*, 5(3): e82.
- Fortina, M. G., P. L. Manachini, R. Pukall, D. Mora, C. Parini, E. Stackebrandt and P. Schumann (2001) *Ureibacillus* gen. nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson et al. 1995), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51(2): 447-455.
- Gagné, A., M. Chicoine, A. Morin and A. Houde (2001) Phenotypic and genotypic characterization of esterase-producing *Ureibacillus thermosphaericus* isolated from an aerobic digester of swine waste. *Can. J. Microbiol.*, 47: 908-915.
- Garg, N., W. Tang, Y. Goto, S. K. Nair and W. A. Van Der Donk (2012) Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109(14): 5241-5246.
- Han, B. C., W. L. Jeng, T. C. Hung and M. Y. Wen (1996) Relationship between copper speciation in sediments and bioaccumulation by marine bivalves of Taiwan. *Environ. Pollut.*, 91(1): 35-39.
- Herlemann, D., M. Labrenz, K. Jürgens, S. Bertilsson, J. J. Waniek and A. F. Andersson (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME J.*, 5: 1571-1579.
- Hsiao, S. T. and S. C. Chuang (2023) *Meretrix taiwanica* (Bivalvia: Veneridae), a previously misidentified new species in Taiwan. *Molluscan Res.*, 43: 1, 12-21.
- Houliet, E., S. Lefebvre, A. Dessier, M. Huret, E. Marquis, M. Bréret and C. Dupuy (2021) Spatio-temporal drivers of microphytoplankton community in the Bay of Biscay: Do species ecological niches matter? *Prog. Oceanogr.*, 194: 102558.

- Huang, H. W. (1999) Ecological conservation strategy from the prosperity and decline of hard clam in estuary of Danshui River. *Fish. Exten.*, 151: 19-24.
- Hugenholtz, P., B. M. Goebel and N. R. Pace (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.*, 180(18): 4765-4774.
- Jain, M., H. E. Olsen, B. Paten and M. Akeson (2016) The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome. Biol.*, 17: 239.
- Jeng, S. S. and Y. M. Tyan (1982) Growth of the hard clam *Meretrix lusoria* in Taiwan. *Aquaculture*, 27(1): 19-28.
- Jia, X, X. Lin, Y. Tian, J. Chen and M. You (2017). High production, purification, biochemical characterization and gene analysis of a novel catalase from the thermophilic bacterium *Ureibacillus thermosphaericus* FZSF03. *Int. J. Biol. Macromol.*, 103: 89-98.
- Kou, G., S. Chen and C. Lo (1989) Fish and shellfish viral disease research in Taiwan. *J. Fish. Soc. Taiwan.*, 16: 303-312.
- Li, K., T. Zheng, Y. Tian, F. Xi, J. Yuan, G. Zhang and H. Hong (2007) Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnol. Lett.*, 29(4): 525-530.
- Liu, F. K., Y. D. Ho, J. C. Kuo, and I C. Liao (2001) High quality culture technique of hard clam, *Agriculture policy and review*, Council of Agriculture., 81-109.
- McClung, C. R. and D. G. Patriquin (1980) Isolation of a nitrogen-fixing *Campylobacter* species from the roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *Can. J. Microbiol.*, 26(8): 881-886.
- McClung, C. R., D. G. Patriquin and R. E. Davis (1983) *Campylobacter nitrofigilis* sp. nov. a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33: 605-612
- McMullan, G., J. M. Christie, T. J. Rahman, I. M. Banat, N. G. Ternan and R. Marchant (2004) Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*. *Biochem. Soc. Trans.*, 32: 214-217.
- Muras, A., M. Romero, C. Mayer and A. Otero (2021) Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 41(4): 609-627.
- Nazina, T. N., T. P. Tourova, A. B. Poltarau, E. V. Novikova, A. A. Grigoryan, A. E. Ivanova, A. M. Lysenko, V. V. Petrunka, G. A. Osipov, S. S. Belyaev and M. V. Ivanov (2001) Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 433-446.
- O'Leary, N. A., M.W. Wright, J. R. Brister, S. Ciufo, D. Haddad, R. McVeigh, B. Rajput, B. Robbertse, B. Smith-White, D. Ako-Adjei, A. Astashyn, A. Badretdin, Y. Bao, O. Blinkova, V. Brover, V. Chetvernin, J. Choi, E. Cox, O. Ermolaeva, C. M. Farrell, T. Goldfarb, T. Gupta, D. Haft, E. Hatcher, W. Hlavina, V. S. Joardar, V. K. Kodali, W. Li, D. Maglott, P. Masterson, K. M. McGarvey, M. R. Murphy, K. O'Neill, S. Pujar, S. H. Rangwala, D. Rausch, L. D. Riddick, C. Schoch, A. Shkeda, S. S. Storz, H. Sun, F. Thibaud-Nissen, I. Tolstoy, R. E. Tully, A. R. Vatsan, C. Wallin, D. Webb, W. Wu, M. J. Landrum, A. Kimchi, T. Tatusova, M. DiCuccio, P. Kitts, T. D. Murphy and K. D. Pruitt (2016) Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.*, 44(D1): D733-45.
- Paillard, C, F. L. Roux and J. J. Borrego (2004) Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquat. Living Resour.*, 17: 477-498.
- Pati, A., S. Gronow, A. Lapidus, A. Copeland, T. Glavina Del Rio, M. Nolan, S. Lucas, H. Tice, J.F. Cheng, C. Han, O. Chertkov, D. Bruce, R. Tapia, L. Goodwin, S. Pitluck, K. Liolios, N. Ivanova, K. Mavromatis, A. Chen, K. Palaniappan, M. Land, L. Hauser, Y. J. Chang, C. D. Jeffries, J. C. Detter, M. Rohde, M. Göker, J. Bristow, J.A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, H. P. Klenk and N. C. Kyrpides (2010) Complete genome sequence of *Arcobacter nitrofigilis* type strain (CI). *Stand. Genomic. Sci.*, 2(3): 300-308.
- Raida, M. K., J. L. Larsen, M. E. Nielsen and K. Buchmann (2003). Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *J. Fish. Dis.*, 26(8): 495-498.
- Schoch, C. L., S. Ciufo, M. Domrachev, C. L. Hutton, S. Kannan, R. Khovanskaya, D. Leipe, R. Mcveigh, K.

- O'Neill, B. Robbertse, S. Sharma, V. Soussov, J. P. Sullivan, L. Sun, S. Turner and I. Karsch-Mizrachi (2020) NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020 Jan 1;2020:baaa062.
- Stoddard, S. F., B. J. Smith, R. Hein, B. R. Roller and T. M. Schmidt (2015) rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. Nucl. Acids Res., 43: D593-D598.
- Sun, Q., Y. Sun, J. Zhang, Z. Luan, C. Lian, S. Liu and C. Yu (2019) High temperature-induced proteomic and metabolomic profiles of a thermophilic *Bacillus manuseensis* isolated from the deep-sea hydrothermal field of Manus Basin. J. Proteom., 203: 103380.
- Thaddeus, C. E., W. Arite and B. Hubert (2011) Isolation, characterization, and identification of *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10, an α -amylase and α -glucosidase producing thermophile. Can. J. Microbiol., 51(8): 685-693.
- Vandamme, P., E. Falsen, R. Rossau, B. Hoste, P. Segers, R. D. E. Tytgat and J. Ley (1991) Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 41: 88-103.
- Wang, X., L. Kong, J. Chen, A. Matsukuma, Q. Li (2017) Phylogeography of bivalve *Meretrix petechialis* in the Northwestern Pacific indicated by mitochondrial and nuclear DNA data. PLoS ONE, 12(1): e0183221.
- Winand R., B. Bogaerts, S. Hoffman, L. Lefevre, M. Delvoye, J. V. Braekel, Q. Fu, N. H. Roosens, S. C. Keersmaecker and K. Vanneste (2019) Targeting the 16S rRNA Gene for Bacterial Identification in Complex Mixed Samples: Comparative Evaluation of Second (Illumina) and Third (Oxford Nanopore Technologies) Generation Sequencing Technologies. Int. J. Mol. Sci., 21(1): 298.
- Yoosukh W. and A. Matsukuma (2001) Taxonomic study on *Meretrix* (Mollusca: Bivalvia) from Thailand. Phuket Mar. Biol. Center, Special Pub., 25: 451-460.
- Yue, X., B. Liu, J. Xiang and J. Jia (2010) Identification and characterization of the pathogenic effect of a *Vibrio parahaemolyticus*-related bacterium isolated from clam *Meretrix meretrix* with mass mortality. J. Invertebr. Pathol., 10 (2): 109-115.
- Zainudin, M. H., M. A. Hassan, M. Tokura and Y. Shirai (2013) Indigenous cellulolytic and hemicellulolytic bacteria enhanced rapid co-composting of lignocellulose oil palm empty fruit bunch with palm oil mill effluent anaerobic sludge. Bioresour. Technol., 147: 632-635.
- Zhang, C. N., X. F. Li., W. N. Xu, G. Z. Jiang, K. L. Lu, L. N. Wang and W. B. Liu (2013) Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). Fish Shellfish Immunol., 35(5): 1380-1386.

Bacteria Composition in the Gut of Asian Hard Clam (*Meretrix taiwanica*) from the Tamsui River, Taiwan

Ching-Huei Huang* and Chia-Che Wu

Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The Asian hard clam (*Meretrix taiwanica*) is a commercially important bivalve species in Taiwan. The clam's growth and survival are influenced by environmental factors such as water temperature, salinity, and pathogens. This study focuses on analyzing the composition of gut symbiotic bacteria in the hard clam population from the Tamsui River, Taiwan, using nanopore sequencing. The sequencing results indicate that thermophilic bacteria (specifically, the genera *Geobacillus*, *Bacillus*, and *Ureibacillus*) and nitrogen-fixing bacteria (*Arcobacter nitrofigilis*) predominate in the gut microbiota of hard clams. Furthermore, an *Arcobacter* species detected in hard clams was also found in mussels. These symbiotic bacteria may assist hard clams in adapting to their environment and ensuring their survival.

Key words: *Meretrix taiwanica*, gut bacteria, nanopore sequencing, metagenome

*Correspondence: 199 Hou-lh Rd, Keelung, Taiwan 202. TEL: (02)2462-2101 ext. 2803; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: chhuang02@mail.tfrin.gov.tw