

南海 SEATS 站及東沙環礁異營性浮游細菌的群聚組成

Bacterial community structures in the SEATS station and the Dong-Sha atoll of the South China Sea

研究生：汪谷威
指導教授：夏復國

Student : Ku-Wai Wang
Advisor : Fuh-Kwo Shiah

國立臺灣海洋大學
海洋環境化學與生態研究所
碩士論文

A Thesis (Dissertation)
Institute of Marine Environmental Chemistry and Ecology
College of Ocean Science and Resource
National Taiwan Ocean University
In Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Master of Science
in
Institute of Marine Environmental Chemistry and Ecology
July 2011
Keelung, Taiwan, Republic of China

中華民國 100 年 7 月



摘要

本研究採用 CAtalyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization (簡稱 CARD-FISH) 法分析秋季寡營養鹽南海 SEATS 站(18 °N, 116 °E; 2010/10/13~17)與東沙環礁 (2010/9/14~22)的細菌群聚組成，以瞭解細菌群聚結構在不同生態系統中之差異。研究結果顯示，兩研究區域的細菌群聚組成明顯不同。南海 SEATS 站優勢種為 α -proteobacteria (佔全部細胞數 35%)，東沙環礁內的優勢種為 γ -proteobacteria (佔全部細胞數 34%)。 β -proteobacteria 及 Actinobacteria 的百分比在東沙環礁高於南海 SEATS 站。東沙環礁內的細菌生產力 (BP, $10.7 \pm 7.2 \text{ mgC m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) 明顯高於南海 SEATS 站 ($0.9 \pm 0.3 \text{ mgC m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)，但兩研究區域的細菌生產力與總細胞數皆無正相關。主成份分析結果指出，南海 SEAT 站中各菌群之間相關性低且它們與細菌生產力無相關；相反的，東沙環礁內 α -、 β -及 γ -proteobacteria 三菌群間相關性高且皆與細菌生產力相關。複迴歸分析的偏迴歸係數 (partial regression coefficient) 的分析顯示，在東沙環礁內 β -proteobacteria (0.63)對 BP 的影響最大； α -proteobacteria (0.13) 及 γ - proteobacteria (0.11) 對 BP 的影響力相若，僅為 β - proteobacteria 的 20%。



Abstract

To compare bacterial community composition of two distinct biomes in the South China Sea, the CARD-FISH (CAtalyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization) analysis were conducted at a station located in oligo-trophic open ocean (i.e. the SEATS station; 18 °N, 116 °E) and stations located inside a shallow meso-trophic atoll (i.e. the Dong-Sha atoll) during autumn 2010. The results indicated significant differences of community structure and bacterial production (BP) in these two study sites. The Dong-Sha atoll was characterized with high BP ($10.7 \pm 7.2 \text{ mgC m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) and was dominated by γ -proteobacteria (34 % of total cell counts). The SEATS station was characterized with low BP ($0.9 \pm 0.3 \text{ mgC m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) and was dominated by α -proteobacteria (35 % of total cell counts). Bacterial production in both sites showed no correlation with total cell counts. Principal component analysis indicated that in the SEATS station, there was no correlation among α -, β - and γ -proteobacteria, and none of them were correlated with BP. However, all there above mentioned bacterial groups in the Dong-Sha atoll were highly correlated with each other, and all showed positive correlations with BP. The partial regression coefficient of β -proteobacteria (0.63) on BP was ~5-fold of those of α - (0.13) and γ -proteobacteria (0.11), indicating that the variation of BP was primarily determined by β -proteobacteria in the Dong-Sha atoll.



致謝

這篇論文能夠完成，首先要感謝我的指導老師 夏復國教授，在求學的兩年間，老師提供給我極大的研究思考空間，並且在學生困惑時，及時以宏觀、清晰且獨到的見解為學生解惑，讓我受益良多。感謝口試委員 陳仲吉老師、湯森林老師與蔣國平老師，謝謝老師們對論文仔細地審閱，同時提供許多寶貴的建議及鼓勵，使它更加完整及嚴謹。另外也要感謝環境所的龔國慶所長、周文臣老師、洪慶章老師、蔡安益老師和鐘至青老師，是他們使我有機會踏進海洋研究這個領域，以及在課堂上用心教導，讓我在專業知識上有更深入的了解。

謝謝這兩年來與我相處時間最久的實驗室夥伴們，佩蓉總是在行政事務上給予協助，讓我不需要為實驗以外的事擔心；國源、于芳、昭成、庭彰、季謙、宜龍、家榕、香宜、小嫻、怡雯等學長姐以耐心教導剛進入海洋界的我，並且在實驗與論文寫作上都不厭其煩地給我幫助，讓我在學術知識上有所增長，至希、玫欣兩位學妹則陪伴我出海時期，讓我在暈船時還有娛樂。感謝環態所的助理、學長姐、同學、學弟妹們，你們對我的關懷與照顧令我沒齒難忘。還有那些一起出海的同仁們，出海的經驗與革命情感是外人難以理解且相當難得的，另外感謝在東沙島上幫助過我的人—東沙指揮部、海管處及船長阿萬，是你們讓我的實驗能夠順利進行。感謝我大學時代的好友和學長們，在煩悶時鼓勵我，聽我抱怨，真的還好有你們在！！

最後我要感謝親愛的家人們，爸媽謝謝你們把我養育到這麼大，很抱歉總是讓你們擔心，接下來的日子，我會努力為自己的人生負責。姊姊及弟弟，謝謝你們陪著我瘋，不給我壓力，我愛你們！！未來的日子裡，請繼續陪伴我吧！

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
致謝.....	iii
目錄.....	iv
表目錄.....	v
圖目錄.....	vi
附錄目錄.....	vii
前言.....	1
材料與方法.....	6
結果.....	12
討論.....	19
結論.....	25
參考文獻.....	26
表列.....	34
圖列.....	40
附錄列.....	50



表目錄

表一	南海 SEATS 站的各參數之相關分析矩陣表	34
表二	南海 SEATS 站的主成份分析變數之主成份得點相關性	35
表三	東沙環礁的各參數之相關分析矩陣表	36
表四	東沙環礁內的主成份分析變數之主成份得點相關性	37
表五	東沙環礁內三種 Proteobacteria 豐度與細菌生產力之線性及複 迴歸分析	38
表六	各類型水域環境的細菌組成分佈	39



圖目錄

圖一	海洋生態系統內物質循環及微生物環	40
圖二	主要細菌及古細菌分類的示意圖	40
圖三	北南海採樣站點圖	41
圖四	南海 SEATS 站各測量參數的時序變化圖	42
圖五	南海 SEATS 站細菌群聚組成及環境因子之主成份分析	43
圖六	東沙環礁內各參數之空間分佈	44
圖七	東沙環礁細菌群聚組成及環境因子之主成份分析	47
圖八	東沙環礁航道口區、滯留區、內波影響區及南海 SEATS 時 序站各類細菌組成百分比平均數值之比較	48



附錄目錄

附錄一	本研究選用的探針	50
附錄二	本研究使用螢光染劑的偵測波長範圍	50
附錄三	以 DAPI 及 Alexa ₄₈₈ (CARD-FISH) 染色呈現之影像.....	51



前言

異營性浮游細菌 (heterotrophic bacterioplankton；以下簡稱細菌)是原核類 (prokaryotic)的單細胞生物。除病毒 (virus)外，細菌是地球各類生態系統中數量及密度最高的生物。在海洋系統中，細菌在貧營養鹽的外海，其每毫升的密度約為 10^5 隻，而在近岸約為 10^6 隻，在有機物污染較嚴重的河口區則可達 10^{7-8} 隻。細菌與人類的的生活及歷史發展息息相關。最主要的是有些細菌具有致病性 (pathogen)，如金黃色葡萄球菌、沙門氏桿菌、大腸桿菌及霍亂弧菌...等，都是大眾耳熟能詳的例子。事實上，百分之九十以上的異營性細菌都是非致病性的，並且在自然界中扮演重要的功能。

在水域生態學的範疇內 (圖一)，細菌是被歸類成分解者 (decomposer)，它們以分解溶解態有機物質 (dissolved organic matter)來做為生長時的物質及能量來源並將部分的有機物轉化成為無機物 (Cole et al. 1988；Carlson et al. 1994；Fuhrman 1992)。另外，在有關微生物環 (microbial loop；Pomeroy 1974；Azam et al. 1983) 的報告中指出，細菌是鞭毛蟲 (flagellate)、纖毛蟲 (ciliate) 等異營性原生生物 (protozoa) 的食物來源之一，經由此捕食作用，可以再次將物質與能量傳回傳統的食物鏈 (grazing food chain)中。微生物生態學自 80 年代以後的重點是在了解不同水域控制細菌生產力的機制，以及細菌生產力在食物網 (food-web) 及生地化循環 (biogeochemical cycling) 中扮演的重要性。90 年代後，隨著生物多樣性的重視，利用分子生物學研究細菌的群聚組成及其組成與環境因子之間的互動關係，也開始逐步興起。

以分類觀之(圖二)，變形菌門 (Proteobacteria)為細菌中最大的一

門，依據核糖體 rRNA 序列以及生理、生化特性分成 α -、 β -、 γ -、 δ -、 ε -及 σ -proteobacteria 六類 (Kerster et al. 2006； Emerson et al. 2007)。在水域系統中，更以 α -、 β -和 γ -proteobacteria 占多數。另外 Cyanobacteria、Planctobacteria、Actinobacteria 和 Bacteroidetes 也都存在於水域生態中。Cyanobacteria 和 γ - 的 SAR86 (圖二，金色字體) 代表光合菌。Fibrobacter、Chloroflexi 和 Lentisphaerae 出現在極冷冬天時的中、表層水。而 β -的 OM43-則屬於沿岸的特有菌群 (Giovannoni & Stingl 2005)。更有研究直接指出， α -為海洋環境中的優勢種，淡水系統則是廣泛存在於 β - 和 Actinobacteria (Crump et al. 1999; Kirchman 2002)。這些研究結果再次顯示不同的生態條件會造就出不同的細菌的群聚組成。

α -proteobacteria 此類菌群包含 140 屬 425 種，型態和生理方式極具多樣性，其中包括大部分的光合菌屬、一些代謝 C1 化合物的菌屬 (*Methylobacterium* spp.)、植物的共生菌 (*Rhizobium* spp.) 與一群病原菌 (*Rickettsiaceae* spp.)。光合菌在海洋中占據浮游生物的 10 % 以上，其特徵為具有細菌葉綠素 (bacteriochlorophyll, BChl)，並以陽光當做能量來源、有機物質當作碳源進行光合異營作用。Giovannoni et al. (1990) 研究指出，開放式海洋環境以 SAR11 數量居多且廣泛分佈，其中 *Pelagibacter ubiquus* 更因為基因組中缺乏隨時間累積的冗餘鹼基對，使基因複製效率高，進而在各海域均擁有極高的豐度 (Rappé et al. 2002)。

β -proteobacteria 此類菌群包含有 75 屬和 220 種，從生理、型態及生態的角度來看非常複雜。其中包括許多好氧或兼性厭氧並具有高度降解能力的細菌及一些化學自營菌 (*Nitrosomonadales* spp.)。其中 R-BT065 為淡水系統中最常出現的菌屬，此菌屬為機會主義者，在任何環境中增長速度非常快、細胞大小一致且較易被原生生物攝食

(Simek et al. 2005)。

γ -proteobacteria為Proteobacteria中最大的分支，最少有180屬和750種，其為醫學及科學研究中最重要的一群，如：腸桿菌、弧菌及假單胞菌等...，因此常與人為活動有密切的關係。此外，近期的文獻中以Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 分析法發現到，在白化期間，弧菌會出現並成為珊瑚體內的優勢菌種 (Bourne et al. 2008)。

Actinobacteria是一群可以陸生也可以水生的細菌。在生態方面，其中的*Streptomyces* spp.為一種腐生的菌種，其能分泌酵素到細胞外頭，把蛋白質、脂肪、澱粉等有機物質分解，成為將有機物質傳回碳循環系統中的重要角色 (Coombs & Franco 2003)。

珊瑚礁海域是全世界物種最豐富、生物多樣性(歧異度)最高的海洋生態系。近期研究顯示東沙環礁海域擁有形形色色的各類物種，包括魚類 577 種、棘皮動物 30 種、軟體動物 204 種、甲殼類 42 種、石珊瑚 229 種、八放珊瑚 47 種、水螅珊瑚 5 種、海草 6 種、大型藻類 35 種 (鄭明修等, 2008)。但對於水體系統內細菌的群聚組成尚一無所知。

南海陸棚為一開放式海洋，以具有全球最顯著內波聞名於世 (Hsu et al. 2000)。內波源自於呂宋海峽 (Liu et al. 2006；Chao et al. 2007)。當內波來到東沙附近，會因地形產生淺化效應而轉呈上舉波 (elevation wave)，導致東沙島附近有冷水團的湧升現象 (Wang et al. 2007)，甚至可能將環礁東側外之海水推入東沙環礁。東沙環礁是位於南海中一個面積達 5 萬公頃的半封閉環礁生態環境，在西側有兩個水道口和外部海水進行交換，使其內部海水交換率不佳，進而產生一個和南海完全不同的系統。南海 SEAT 站位處於開放性之大洋為一 open system，上層水體在夏季層化現象顯著，混合層 (約水下 40~50m, Chen et al. 2006)

以下之營養鹽僅能透過極為緩慢的滲透作用，上升至表水供生物生長。反觀東沙環礁為一半封閉 (semi-enclosed) 的淺水系統，珊瑚礁本身構成歧異度極高的生態棲所 (habitat)，為底棲的各種初級生產者 (海藻、海草及珊瑚共生藻) 提供附著之環礁。當無機營養鹽經由潮水底部或內波抬升作用進入環礁內時，就會迅速地被底棲及水體內 (指浮游植物) 的初級生產者吸收。加上水體循環及交換因半封閉地形而減緩，大大的增加無機營養鹽停滯在礁體內，進而被吸收的機會。由於無機營養鹽不斷的湧入，加上水體滯留時間較長，因而造就了高生物量及高生產力。生物死亡後會因分解 (或礦化) 作用而放出無機營養鹽 (如硝酸鹽...等)，如果是在開放性的環境，這些富含硝酸鹽的海水很快的會被外部貧營養鹽水所稀釋。也正由於半封閉性礁體構造的保護作用，讓這些營養鹽保留在礁體內造成了中優養化 (硝酸鹽 1~2 μMN) 的狀態。此即生態學上所謂的 nutrient trapping。

東沙環礁內之水溫在春、夏、秋季比環礁外高；冬天則環礁內溫度較低 (陳陽益 等. 2008)。東沙環礁內由營養鹽添加實驗得知異營性細菌的生長為磷限制 (陳仲吉 等. 2011)，北南海深水 SEATS 站 150m 處由氮：磷莫耳比值小於 16 推測為氮限制 (Wong et al. 2007b)。生物量和生產力明顯是東沙環礁內高於南海 SEATS 站 (陳仲吉 等. 2011)。浮游生物的優勢種在兩地亦有極大的不同，東沙環礁內為矽藻、隱藻與藍綠藻，南海 SEATS 站只有藍綠藻而已 (陳仲吉 等. 2011；Wong et al. 2007a)。

研究細菌群聚組成的方法有許多種，螢光原位雜合法 (Fluorescence In Situ Hybridization，簡稱 FISH) 為較快速的方法之一，本研究使用 CAlyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ

Hybridization (簡稱 CARD-FISH; Pernthaler et al. 2002) 進行檢測。一般的 FISH 對於水域環境中許多極微小以及生理活性低的細菌偵測靈敏度較低，很難將螢光訊號與雜訊區分開。故將 FISH 結合訊號放大的技術，即可改善此缺點，並增加其靈敏度。原理為利用標定辣根過氧化物酶(horseradish peroxidase，簡稱 HRP) 的探針與 rRNA 互補之特性，進行專一性雜合，再讓帶有螢光的 Tyramide 分子沉積於 HRP 附近的分子上，形成穩定的共價鍵結，一個探針可以把很多螢光分子沉積在細胞內，達到放大訊號的作用，同時仍可維持高解析度和低背景值。

因此本研究將比較兩個極度不同的生態系統於相同季節時 α -proteobacteria、 β -proteobacteria、 γ -proteobacteria 和 Actinobacteria 的菌群組成差異。並利用上述 CARD-FISH 的方法，於 2010 年秋季分別在東沙環礁內以及南海貧營養海域 SEATS 站進行異營性細菌群聚組成分佈之比較，以得知不同生態系統下細菌群聚結構的差異及對細菌生產力之影響。



材料與方法

研究區域與採樣

本研究利用秋季於東沙環礁內規劃24個測站(2010/09)及南海 SEATS站(18 °N, 116 °E; 2010/10)進行調查(圖三)。南海站是進行定點的24小時連續採樣，錨碇作業期間每一小時取得一次CTD的基本水文資料，每三小時採一次水樣，進行各種手測參數的測量。基本水文參數的獲取是使用溫鹽深儀(CTD, Sea-Bird Electronics Inc. SBE 911 plus)。東沙環礁內水樣的採集是使用內壁為鐵氟龍被覆Niskin採水瓶；在南海則是以輪盤採水器(General Oceanic Inc. Model 1015)上加掛20公升Go-Flo採水瓶進行採樣。每個站點均選擇表水(2m)進行研究。

CARD-FISH

實驗方法是依據相關研究文獻(Reinthal et al. 2006)所提供的流程步驟來執行。總共有 8 個步驟，分述於下：

1. **探針的選用**：已知原核生物核糖體中的大次單元具有 23S rRNA 分子，而小次單元則具有 16S rRNA 分子，故探針均針對這兩者的序列來設計。本實驗選用幾種常見於偵測海水系統細菌群的代表性探針(附錄一)，分別為 EUB338、ALF968、BET42a、GAM42a、HGC236，都針對 16S rRNA 或 23S rRNA 設計且在探針 5'端上標定一個 Horseradish peroxidase(以下簡稱 HRP)，使帶有螢光的 Tyramide 沉積在探針表面。
2. **樣本的保存**：取 5 ml 的水樣以 Para-formaldehyde (final conc. 2%)進行固定，室溫下反應時間至少 1 小時，並過濾在 0.2- μ m 白色濾膜 (25 mm Polycarbonate)上，以等體積 Milli-Q 水潤洗兩次於室溫下乾燥以及用 2B 鉛筆於濾膜邊緣處標記，可保存在-20°C 冰箱中數個月。

3. **濾膜的包埋**：為防止實驗過程中濾膜上的細菌流失，濾膜需進行包埋處理。將 low gelling point agarose (final conc. 0.075% w/v, Sigma-Aldrich) 煮沸後降溫至 40°C 左右。取 30 μ l 於培養皿上，將濾膜兩面均沾上 agarose 後，於室溫下乾燥，可保存在 -20°C 冰箱中。
4. **細胞通透性處理**：將濾膜浸泡在 37°C 的 Lysozyme 溶液(10 mg/ml) 中 1 小時，以 Milli-Q 水潤洗一次，移至 0.01M HCl 中 20~25 分鐘。再以 Milli-Q 水潤洗兩次，絕對酒精潤洗一次，待其乾燥後，可保存在 -20°C 冰箱中。
5. **探針雜交反應與清洗處理**：各探針選用不同的 FA 及搭配的 NaCl 濃度(Erhart et al. 1997; Neef 1997; Zhang et al. 2006)。先把濾膜切成適當片數，放入直徑 22 mm 的 microplate (Polystyrene, IWAKI) 中，加入雜合液與探針，以 20:1 的比例混合，於 35°C 的恆溫培養箱中反應 12~15 小時，移至清洗液中，浸泡於 37°C 下 15 分鐘後，倒至布赫納漏斗中待其微乾。
6. **螢光訊號放大處理**：之後的實驗步驟皆須避光處理。將濾膜浸泡在 PBS-T-mix buffer 中 10~15 分鐘後，移至 Amplification buffer、H₂O₂ 稀釋液和標有螢光分子(Alexa₄₈₈, Molecular Probes Inc., USA)的 Tyramide 混合工作液且放入 37°C 恆溫培養箱中反應 45 分鐘後，以 PBS-T-mix buffer 潤洗 10 分鐘，再以 Milli-Q 水潤洗兩次，絕對酒精潤洗一次。
7. **DAPI 染色處理**：以 DAPI-mix 進行染色，再製成玻片。避光保存於 -20°C 冰箱中。
8. **影像處理與分析**：使用型號 Zeiss Axiovert 200M 的倒立式螢光顯微鏡 (Carl Zeiss, Jena, Germany) 且配合 CCD 照像系統與影像處理軟體

(Metamorph)，藉由不同的濾光組可以同時進行不同波長(附錄二)的螢光訊號觀測。玻片倒放在載物台上，使用100X物鏡，滴上些許鏡油(Carl Zeiss)，調整至最佳視野後即可切換DAPI和FITC濾片，以觀測DAPI與Alexa₄₈₈之螢光訊號。每個濾膜在兩種濾片下均拍攝10個視野。使用Daime影像處理軟體(Daime et al., 2006)進行螢光訊號計數之分析。

無機營養鹽濃度

無機營養鹽參數包括硝酸鹽(NO_3^-)和磷酸鹽(PO_4^{3-})，東沙環礁的硝酸鹽及磷酸鹽的測量是使用三同步營養鹽分析裝置 (Trident-222 Simultaneous Nutrient Analyzer)注入分析 (Gong 1992)，分別以cadmium, ascorbic acid/oxalate及ascorbic acid還原比色法測定濃度 (Parsons et al. 1984)偵測極限為0.05及0.03 μM 。南海的硝酸鹽測量和東沙的相同，但磷酸鹽的測量是先使用MAGIC法 (MaGnesum Induced Coprecipitation) (Karl & Tien 1992；Rimmelin & Moutin 2005)將樣本濃縮後，再利用磷鉬鉬藍複合物法(phospho-anti-mono-molybdenum blue complex method; Grasshoff 1976；Parsons et al. 1984)，偵測極限為5 nM。

葉綠素a濃度

葉綠素a(chlorophyll a)濃度在南海是利用高壓液相層析法 (Reverse-phase high performance liquid chromatography; Wright et al. 1991)，此一數據由中央研究院環境變遷中心何東垣老師實驗室提供。東沙環礁的葉綠素a濃度則是利用玻璃纖維 (GF/F) 濾紙過濾後以10 ml, 95% 丙酮 (acetone)於暗處4 °C下萃取 24小時。萃取液葉綠素濃度以fluorometer (Turner；10-AU-005)測量 (Strickland & Parsons 1972)。

初級生產力

將水樣分裝至9個250 ml乾淨的polycarbonate瓶中，於每個水樣瓶中

添加100 μ l的 $\text{NaH}_2^{14}\text{CO}_3$ 溶液 (final conc. 10 μCi ; Parsons et al. 1984)，搖晃使藥品均勻混合並將水樣瓶分別放入八種不同遮光效果的遮光盒中，最後一瓶以鋁箔紙包裹作為全暗瓶，放入溢流式人工光源 (最強光照 $\sim 2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)培養桶內培養2小時，培養後的水樣以GF/F濾紙抽氣過濾。測定時先加入0.5 ml的1 N HCl酸化以去除無機碳，待濾紙乾燥之後加入閃爍液 (scintillation cocktail. Ultima Gold, Packard)靜置一天，最後放入液相閃爍計數器 (Liquid Scintillation Analyzer, Packard 1600)讀取 ^{14}C 的放射強度。代入下列公式換算為初級生產力： $PP = (R_s - R_b) \times W / R / N$

其中 PP：初級生產力 ($\text{mgC m}^{-3} \text{h}^{-1}$); R_s ：培養後水樣的dpm讀值

R_b ：背景空白的dpm讀值; W ：培養水樣所含的無機碳重量，可由鹽度計算

$W = 12000 \times (\text{Salinity} \times 0.067 - 0.05)$; R ：培養前實際添加 ^{14}C 的劑量 (dpm)

N ：水樣培養時間 (hr)

求得之初級生產力除以葉綠素 a 濃度則為標準化後的“單位葉綠素甲生產力”(P^B)，並利用光初級生產力模式 (Webb et al. 1974)，進一步建立起 P^B 與光照強度 (E)之間的相互關係。初級生產力與光照強度的關係如下：

$$P^B = P_B^{\text{MAX}} \times [1 - \exp(-\alpha \times E / P_B^{\text{MAX}})]$$

其中 P^B ：單位葉綠素 a 生產力 ($\text{mgC mgChl}^{-1} \text{h}^{-1}$)

P_B^{MAX} ：單位葉綠素 a 之最大初級生產力 ($\text{mgC mgChl}^{-1} \text{h}^{-1}$)

α ：起始斜率 (initial slope; $\text{mgC mgChl}^{-1} \text{h}^{-1} \mu\text{E}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$); E ：光照強度 ($\mu\text{E}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

之後以全天光照量及葉綠素 a 濃度逐時推算初級生產力值，然後將當日

所有光照時間的初級生產力值積分求得各站的初級生產力。

異營性細菌生產力

異營性細菌生產力(bacterial production, BP)是利用胸腺嘧啶(^3H -thymidine)吸收法測得(Fuhrman & Azam 1982)。取1.7 mL三重複的海水樣本，加入已事先裝有胸腺嘧啶(^3H -[methyl]-thymidine, specific activity 6.7 Ci mmol^{-1} , final concs., 20 nM)的2 mL培養管中，並以現場水溫將培養管置入保溫瓶中培養。約培養3小時後，取出培養管，且在各管中滴入2~3滴福馬林(formaldehyde, final concs., 1%)以終止培養，最後將樣本置入4 °C冰箱中保存，待其測定。

將培養管置入已預冷的高速冷凍離心機(eppendorf centrifuge 5804R)中，於4 °C下離心 (14,000 rpm, 7 min.)後，以抽氣幫浦抽取上清液，留下細胞的pellet。接著加入1.7 ml的5 %冰三氯醋酸(trichloroacetic acid, TCA)，以分離出細胞中不溶於TCA的DNA pellet，且再次重複進行離心與抽取上清液之動作。接著加入1.7 ml的80 %冰乙醇(ethyl alcohol)，再次進行離心及抽取上清液。最後在培養管中加入1.7 mL的閃爍液(scintillation cocktail, Ultima Gold, Packard)，使用震盪器震盪，放置約48小時後，使用液相閃爍計數器(liquid scintillation analyzer, Packard 1600)中測量放射活度(dpm; disintegrations per minute)。

胸腺嘧啶吸收率(thymidine incorporation rate)之計算公式如下：

$$\text{TI} = (\text{DPMs} - \text{DPMb}) / (\text{T} \times \text{SA} \times \text{V})$$

TI：thymidine incorporation，胸腺嘧啶吸收率 ($\text{pmol}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

DPMs：樣本放射活度讀值 (dpm)； DPMb：空白式樣放射活度讀值 (dpm)

T：培養時間 (h)； SA：specific activity ($6.7 \text{ Ci mmol}^{-1} = 6.7 \times 2222 \text{ dpm}$)

pmol⁻¹)

V=過濾體積 (liter)

利用胸腺嘧啶吸收轉換參數(1.18×10^{18} cells mol thymidine⁻¹; Cho & Azam 1988)和細胞含碳量轉換係數(2×10^{-14} gC cell⁻¹; Lancelot & Billen 1984)，將TI值轉換成以碳為單位的細菌生產力(BP, mgC m⁻³ d⁻¹)。

數據統計分析

參數之分析均以 2 m 表水做處理，利用統計軟體 SPSS 和 Statistica 進行相關分析、複迴歸(multiple linear regression)以及主成份分析(principal component analysis)。主成份分析主要目的是簡化各細菌群聚組成的資料成為互相獨立的主成份，來概述變數之間的關係。本文所使用之變數分為兩組：第一、各細菌群聚結構，共五種細菌群為分析之主要參數 (Active variable)；第二、物化生因子變數，包括溫度、鹽度、硝酸鹽、磷酸鹽、葉綠素 *a*、初級生產力以及細菌生產力，做為補充變數 (Supplementary variable)。以上變數都經過標準化 (Mean-centered 以及 Standard deviation-normalized)的處理，以共變數矩陣 S 做出主成份得點分析，取得主成份 (PC1、PC2...等)之後，補充變數將依據第一組分析出來的主成分進行再次演算，以得到物化生因子之主成份得點，此分析可以幫助解釋菌群與物化生因子的關係。演算規則可參考 (Legendre 1998)。複迴歸是探討變數之間的關係，將變數分成兩類—自變數及應變數，用以探討自變數有兩個或以上時，自變數如何影響應變數的問題。本文中的自變數有 α -、 β - 及 γ -proteobacteria，應變數為細菌生產力，以得知此三種 Proteobacteria 對細菌生產力的影響為何。



結果

南海 SEATS 站

水文生化參數

南海 SEATS 站的 24 小時連續採樣共取得八個 cast 的水樣。在錨碇作業期間，表水溫度(圖四 A)介於 29.2-29.4 °C 之間，最低溫為 10/14 上午 09:00，最高溫為 10/14 下午 06:00。表水鹽度(圖四 A)介於 33.22-33.24 psu 之間，基本上與水溫變化同步。硝酸鹽(圖四 B)的濃度變化介於 0.8-1.0 μMN 之間，而表水磷酸鹽(圖四 B)在錨碇作業期間的濃度最低值低於偵測極限，最高值僅為 0.03 μMP ，硝酸鹽和磷酸鹽的分佈並沒有相同的趨勢存在。葉綠素 *a*(圖四 C)的濃度變化為 0.03-0.12 $\mu\text{g/l}$ 之間，呈現白天高夜晚低之分佈。初級生產力(圖四 C)與葉綠素 *a* 同步，最高值($36 \text{ mgC m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)出現在 10/14 正中午。

細菌參數

細菌生產力(圖四 D)介於 $0.5\text{-}1.3 \text{ mgC m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ 之間，在錨碇作業期間的趨勢大致上呈現夜晚高白天低，此趨勢和溶解態有機碳(dissolved organic carbon, DOC)相似，且 BP 和 DOC 間有顯著正相關($r = +0.93$, $p < 0.01$, $n = 8$)。總細胞數(圖四 D)的範圍介於 $1.30\text{-}1.60 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 之間，分佈為白天高夜晚低，此一趨勢和細菌生產力相反，兩者間呈現負相關(表一)。

細菌群聚結構方面，大部分的細菌 (EUB338) 占總細胞數的 $63.7 \pm 4.3 \%$ 。 α -proteobacteria(圖四 E) 占總細胞數的 26.9-42.9%，此菌群是南海 SEATS 站的優勢菌種，最低比例值出現在 10/14 上午 09:00，最高比例值則在 10/14 下午 06:00，其細胞數目與溫度間呈正相關(表三)。 β -proteobacteria(圖四 E) 占總細胞數的極低(2.1-4.3%)的比例，且

其細胞數目沒有明顯的趨勢。 γ -proteobacteria(圖四 F) 占總細胞數的 7.3-16.1 %，同樣其細胞數目沒有明顯的趨勢存在。Total Proteobacteria (圖四 F) 占總細胞數的 49 ± 10 %，其趨勢與 α -proteobacteria 相似 (表一)。Actinobacteria(圖四 G)占總細胞數的 1.2-1.5 %，此菌群皆占極低的比例，且其細胞數目沒有明顯的趨勢。”其他細菌”(圖四 G)占總細胞數的 36.4-60.8 %，其細胞數目和溫度兩者間為負相關(表一)。細菌群聚中的任何一類在南海 SEATS 站與均細菌生產力沒有相關 (表一)。

主成份分析結果顯示，第一主成份(PC1)及第二主成份(PC2)合計可以解釋 93.4%之總變異量。由主成份分析變數之主成份得點相關性(表二)得知，第一主成份主要與 α -、 β -及 γ -proteobacteria 和 Actinobacteria 呈正相關，並與”其他細菌”呈負相關；第二主成份主要與 α -proteobacteria 呈正相關，而與 β -、 γ -proteobacteria、Actinobacteria 及”其他細菌”呈負相關。主成分與環境因子的關係則顯示第一主成份與磷酸鹽和細菌生產力呈負相關，與溫度、鹽度、硝酸鹽、葉綠素 *a* 和初級生產力呈正相關。第二主成份與硝酸鹽、葉綠素 *a* 和初級生產力呈負相關，與溫度、鹽度、磷酸鹽和細菌生產力呈正相關。由主成分散佈圖(圖五)可以再次確認此研究站中的各菌群均與細菌生產力無關，並可看出各菌群分佈的方位不一致，表示彼此之間的相關性低。藉由環境因子可幫助解釋細菌群聚組成所得主成份散佈圖的關係，其結果呈現 α -proteobacteria 與溫度、鹽度分佈的方位相似，Actinobacteria 與葉綠素 *a* 有較多成份的關連性。

東沙環礁

水文生化參數

採樣期間，東沙環礁內表水的溫度(圖六 A)介於 28.6-29.7 °C 之

間，空間上呈現環礁中間高，而東、西兩側低，水溫最高值出現在第 14 站。東側冷水可能是受到內波或是漲退潮而使外圍海水進入，西側冷水則是受到航道口影響所導致。表水鹽度(圖六 B)介於 32.60-33.65 psu，由西南向東北遞減，並且南航道口對東沙環礁內的影響可到達第 17 站。

表水硝酸鹽(圖六 C)於第 13 站最高，平均為 2.5 μMN 。而磷酸鹽(圖六 D)的高值出現在第 17 和 19 站，濃度分別為 0.18 和 0.19 μMP ，在其餘測站的濃度皆低，當中最低值出現在環礁東側，均低於偵測極限(0.03 μMP)。

表水葉綠素 *a*(Chl *a*；圖六 E)濃度介於 0.13-0.95 $\mu\text{g/l}$ 之間，最高值出現在第 10 站，並在兩個航道口有低值出現。初級生產力(PP；圖六 F)介於 13-200 $\text{mgC m}^{-3} \text{d}^{-1}$ 之間，最高值出現在第 21 站，呈現環礁中間高，往東、西兩側遞減之現象。初級生產者的生物量(葉綠素 *a*)和初級生產力有顯著正相關(表三)。

細菌參數

表水細菌生產力(圖六 G)的數值介於 1.2-23.7 $\text{mgC m}^{-3} \text{d}^{-1}$ 之間，最高值出現在第 25 站，在空間的分佈上，大致呈現東側往西側遞減的狀況，較低值分佈在環礁中間的第 15、19、20 站及兩個航道口最外面的第 3、7 站。總細胞數(圖六 H)介於 $1.03\text{-}2.95 \times 10^6$ cells/ml 之間，大致為環礁中間高，東、西兩側低之情形，與流式細胞儀得到的細菌生物量呈顯著正相關($r = +0.71$, $p < 0.01$, $n = 24$)。細菌生產力和總細胞數並無相關係存在(表三)，且具有完全不同的分佈趨勢，因此可以得知，在東沙環礁內，當總細胞數有高值存在時，並不會相對有高的細菌生產力。

細菌群聚結構方面，大部分的細菌 (EUB338) 占總細胞數的 $66.5 \pm 9.9\%$ 。 α -proteobacteria (圖六 I) 占總細胞數的 $14.4\text{--}36.5\%$ ，最高值出現在第 23 站，呈現環礁中間高向東、西兩側遞減之現象。 β -proteobacteria (圖六 J) 占總細胞數的 $2.7\text{--}41.7\%$ ，只有在第 4 和 23 站出現高比例值，分別為 $\sim 40\%$ 和 $\sim 42\%$ ，而在兩航道口均呈現低於 5% 的情況。 γ -proteobacteria (圖六 K) 占總細胞數的 $12.6\text{--}60.5\%$ ，在多數的測站為優勢種，高比例值出現在東側，而低比例值則分佈在兩個航道口以及第 21 站。Total Proteobacteria (圖六 L) 占總細胞數的 $70 \pm 22\%$ ，其中以第 23 站最高，最低的 Total Proteobacteria 比例則出現在兩航道口影響區的第 3、7、12 站及環礁中間的第 14、21 站(皆低於 50%)。Actinobacteria (圖六 M) 占總細胞數的 $1.9\text{--}27.7\%$ ，大致上呈現環礁東、西兩側往中間遞增的現象，與上述 α -、 β -及 γ -proteobacteria 皆呈不相同的趨勢，Actinobacteria 最高比例值出現在第 16 站。“其它(未偵測出之)細菌”(圖六 N) 占總細胞數的 $0\text{--}45.5\%$ ，呈現與 Total Proteobacteria 相反之情況，高比例值出現在兩航道口影響區的第 3、7、12 站及環礁中間的第 14、15、21 站(皆高於 30%)。

相關分析

鹽度 ($32.60\text{--}33.65$ psu) 在環礁內變化可高達 1 個 psu (注，鹽度的變化是以小數點三位以下為基準)，顯示東沙水體在物理結構上具有極高之空間歧異度。許多化學 (如硝酸鹽) 及生物生物量 (葉綠素 a 、細菌總豐度及各分類細菌豐度) 參數與鹽度的負相關 (表三)，意味著水體混合對於這些參數的空間分佈有著決定性的作用。Total Proteobacteria 內的 α -、 β -及 γ -proteobacteria 彼此都呈現正相關，表示它們三者在空間的分佈上基本上是同步的。Actinobacteria 與“其它細菌”二者互成正相

關，但它們與 Total Proteobacteria 及其下的任一種均無相關。

主成份分析結果顯示，第一主成份(PC1)及第二主成份(PC2)合計可以解釋 74.4%之總變異量。由主成份分析變數之主成份得點相關性(表四)得知，第一主成份主要與 α -、 β -及 γ -proteobacteria 呈正相關，並與 Actinobacteria 和“其他細菌”呈負相關；第二主成份則與各菌群均呈正相關。主成分與環境因子的關係則顯示第一主成份與鹽度、磷酸鹽和初級生產力呈負相關，與溫度、硝酸鹽、葉綠素 *a* 和細菌生產力呈正相關。第二主成份與鹽度、硝酸鹽和細菌生產力呈負相關，與溫度、磷酸鹽、葉綠素 *a* 和初級生產力呈正相關。

由主成分散佈圖(圖七)可以看出 α -、 β -及 γ -proteobacteria 分佈的方位一致，表示三菌群之間相關性高，結果與相關分析一致。並且由環境因子可幫助獲得細菌群聚組成主成份散佈圖的關係，其結果呈現 α -、 β -及 γ -proteobacteria 與細菌生產力有較多成份的關連性，Actinobacteria 和“其它細菌”則與初級生產力有較多成份的相關性存在。整體而言，主成份分析簡化出來的結果與相關分析一致，優點在於可以減化描述各因子與細菌群聚組成之間的關係。在各項分析(表三、四，圖七)中，有二個現象值得注意。(1). 細菌的活性、細菌總豐度及各類細菌 (Actinobacteria 除外) 之豐度與初級生產力 (有機物質供應者) 之間皆無正相關，顯示有機物質的供應該不是控制細菌活性及種類組成的重要支配因子。(2). Total Proteobacteria 及其下屬的三種細菌皆與細菌生產力呈現極高之正相關，而三種菌種又呈現同步的情形。這表示此三菌種是構成細菌生產力空間變化的主要成分。由複迴歸分析(表五)中三種菌種的偏迴歸係數 (partial regression coefficient; prc) 可以判定 β -proteobacteria (prc= 0.63) 對細菌生產力的空間分佈影

響最大； α -proteobacteria (prc= 0.13) 及 γ -proteobacteria (prc= 0.11) 的影響力相若，它們對細菌生產力的影響僅為 β -proteobacteria 的 20%。

東沙環礁內和南海 SEATS 站的比較

水文生化參數

東沙環礁與南海深水站兼具高溫 ($>28.9^{\circ}\text{C}$)及高鹽 (>32.80 psu) 的物理特性，但東沙環礁內溫度及鹽度的變異係數均為南海 SEATS 站的 2 倍以上。因此依據溫度(圖八 A)將東沙環礁由西向東，分別定義為航道口區(第 3、4、5、6、7、12、17 站；Navigation Area)、滯留區(第 8、9、10、11、13、14、15、16、19、20、21、22 站；Stagnation Area)、內波影響區(第 18、23、24、25、26 站；Internal Wave Area)，並與南海 SEATS 深水站(SCS)進行比較。

硝酸鹽在東沙環礁內明顯高出南海 SEATS 站 2 倍以上 (ANOVA, $p<0.05$ ，圖八 C)，其中又以內波影響區中的濃度最高($2.9\ \mu\text{MN}$)。磷酸鹽雖無差異，但磷酸鹽在東沙的航道口區及滯留區變異度都很大，變異係數 $>99\%$ (圖八 D)。浮游生物的生物量，如葉綠素 a (圖八 E)及細菌豐度(圖八 H)在東沙環礁皆高於南海深水站，而滯留區和內波影響區更是明顯高過航道口區(ANOVA, $P<0.05$)。初級生產力在東沙環礁約為南海 SEATS 站的 4 倍，但細菌生產力在東沙環礁與南海 SEATS 站的差異竟達 11 倍之多。初級生產力在東沙環礁內沒有差異性存在(圖八 F)，不過細菌生產力則是在內波區出現極高值(圖八 G)。由以上各項生化參數更可以清楚發現航道口區的生態環境與南海 SEATS 站最為接近。

細菌參數

二地之細菌組成亦呈現極大的差異(圖八 I~N)。東沙環礁的 Total Proteobacteria 占細菌總數的 $\sim 70\%$ ，其中以 γ -所占比例最高($\sim 34\%$)， α -

(~21 %)次之， β - (~15 %)最少。南海 SEATS 站的 Total Proteobacteria 占細菌總數的~50 %，其中以 α -之比重 (~35 %)最大， γ - (~11 %) 次之， β - (~3 %)最少。此外，東沙環礁內的 Actinobacteria 約占細菌總數的 16 %，但在 SEATS 站卻只有 1% 的比重。“未偵測之菌種”在東沙環礁約有總數的 16 %，但在 SEATS 站卻幾乎占了一半(~49 %)。

除了在南海 SEATS 站的 α -proteobacteria (圖八 I)占最多比例以外，航道口區和內波影響區中平均所含的 α -proteobacteria 比滯留區還要高。 β -與 γ -proteobacteria (圖八 J、K)皆以南海 SEATS 站中占四個區域裡最低的比例，且內波影響區更是遠高於航道口區及滯留區，因此 Total Proteobacteria (圖八 L)亦呈現相同上述之結果。在滯留區中 Actinobacteria (圖八 M)占的比例(~19 %)高於內波影響區且更是遠高於南海 SEATS 站(~1%)，而“未偵測之菌種”(圖八 N)呈現內波影響區最少，航道口區和滯留區次之，南海 SEATS 站最高的狀態。有關本調查在 SEATS 站所得之結果與賴 (2010)在同是 SEATS 站表水分析 (DNA 定序)的結果十分相近。二種不同的方法，顯示出十分相近的結果(圖八 I~N)。



討論

南海及東沙環礁內的水文特性

南海 SEATS 站位於南海北部中央，較不易受到陸源以及內波的影響，在 24 小時連續採樣中發現，表水溫度 (圖四 A) 變化與 2003 年秋季航次 OR1-CR696 的結果相同，最高溫皆出現在下午 6:00，顯示太陽輻射為影響的重要因素，而鹽度變化 (圖四 A) 則與溫度同步，但因為僅有 0.02 psu 的變化，代表確實無任何大量的淡水來源能到影響此測站，而 Shaw & Chao (1994) 指出南海上層海水的季節變化主要受到東亞季風控制，但僅在 24 小時的錨定期間內觀察到並沒有太大的改變。東沙環礁是一個位於南海的半封閉式潟湖，由於此處的水深及各項環境因子皆不同於開放式海洋，在內部進行調查時，顯示大部分的物化生參數及各細菌群聚組成結構有明顯空間上的變化 (圖六 A-N)，和全球各處的環礁潟湖情形相同 (Le Borgne et al. 1989; Torrèton & Dufour 1996; Charpy et al. 1997; Charpy & Blanchot 1998; González et al. 1998)。環礁西側兩航道口位於最容易和外部海水交換的地區，呈現低溫高鹽的現象，環礁中部海水交換不易，觀察到高溫滯留區出現。在此次調查時期之前，東沙環礁受到颱風的影響而大量降雨，使鹽度呈現比之前研究低的情形 (陳陽益 等. 2008; 陳仲吉 等. 2011)。水體動態 (hydrodynamics) 對許多生物參數 (葉綠素 *a*、細菌總豐度及各分類細菌豐度) 有著決定性的作用 (Delesalle & Sournia 1992; Charpy et al. 1997; Torrèton et al. 2007)，而使這些生物參數的空間分佈與鹽度呈負相關 (表三)。

即使東沙環礁內的硝酸鹽高出南海 SEATS 站的兩倍以上，但是兩者的硝酸鹽和磷酸鹽 (圖四 B，圖六 C、D) 之間並沒有存在同樣的趨

勢，且氮：磷莫耳比值皆大於 16，此結果可能與在過去的文獻中發現北南海表水裡具有固氮作用，會導致海水中增加額外的氮以及磷酸鹽耗盡之情形相同 (Wu et al. 2003)。

南海 SEATS 站的細菌總細胞數的趨勢和細菌生產力(圖四 D)相反且呈現負相關 (表一)，與 Smith et al. (2003) 發現每種細菌活性均不相同的結果一致。雖然細菌生產力與初級生產力 (有機物質供應者) 之間無正相關存在，卻和 DOC 呈現顯著正相關 ($r = +0.93$, $p < 0.01$, $n = 8$)，表示於此測站中，溶解性有機物質應該是控制細菌活性的重要支配因子之一，可能原因為此處溶解態有機碳以來自浮游植物、浮游動物產生與病毒裂解的生物利用度 (bioavailability) 高類型為主 (Søndergaard 1997)。東沙環礁中，從細菌生產力 (圖六 G) 和總細胞數 (圖六 H) 可以觀察到，當總細胞數有高值存在時，並不會相對有高的細菌生產力，兩者的空間分佈並不一致，此現象代表了東沙環礁內的某些菌群為低的生產力，但另一些菌群則產生極高的生產力，每種細菌活性皆不相同之狀況又再次得到驗證 (Smith et al. 2003)。細菌生產力與初級生產力 (有機物質供應者) 之間皆無正相關，顯示除了浮游植物外，珊瑚礁分泌出的黏液及其他有機化合物亦會成為控制細菌活性及數目的重要支配因子 (Moriarty et al. 1985)。

南海及東沙環礁內的細菌群聚結構與相關分析

α -proteobacteria 為南海 SEATS 站的優勢細菌群，平均約占全部細菌的 35%，和其他各開放型海洋與沿岸的表水結果相符 (Cottrell & Kirchman 2000；Yokokawa & Nagata 2005；Zhang et al. 2006；Brown et al. 2009)，推測可能如同東海黑潮中有一屬於 α -proteobacteria 的遠洋桿菌屬 (*Pelagibacter*)，具有高效率的基因複製方法，只需較少的能量就

能進行 DNA 複製，因此會在各海域中擁有極高的豐度（謝懷貞 2009）。 β -、 γ -proteobacteria 及 Actinobacteria 所占的比例為 3%、11%及 1%。另外水體中約有 11%的 cyanobacteria（夏復國 未發表）以及依然有一些菌群沒有分析，如 Zhang (2006)年發現南海中約有 18%的 Cytophaga-Flavobacterium cluster，故造成仍有極高比例的”其他細菌”存在。只有 α -proteobacteria 與溫度呈現正相關（表一），且兩者在主成份散佈圖(圖五)中分佈的方位相似，推測可能原因為此深水站的溫度僅受到太陽輻射的影響，而 α -proteobacteria 包括大部分的光合菌屬，且光合菌屬會依照光照而影響生長。東沙環礁內細菌優勢群聚組成為 γ -proteobacteria，占全部菌群中的 34%，可能與珊瑚礁生理情況不佳而共棲菌釋出 (Rohwer et al.2001；宋克義 & 陳昭倫 2010) 或添加珊瑚黏液到海水中會讓 γ -快速增加的原因相同 (Allers et al. 2008)，其他細菌群有 α -、 β -proteobacteria 及 Actinobacteria 分別占 21、15 及 16%。

本研究認為東沙環礁內 β -proteobacteria和 Actinobacteria比例較南海 SEATS 站高的原因分別是，*Nitrosomonas* 和 *Nitrosospira* 是 β -proteobacteria中能生存在海水裡的細菌種類 (Nold et al. 2000, Freitag & Prosser 2004, Sekar et al. 2004)。此類菌種具有鞭毛而能自由移動，另外還有外加許多次單元排列而成的細胞膜層以保護自己。最適生長環境為25-30°C且富有氨鹽 (ammonia)的環境中，同時亦可氧化氨鹽成為硝酸鹽，故能使較封閉的海水系統不會因為累積大量的排泄物（氨鹽）而造成危害。由於東沙環礁為一氨鹽濃度較高的系統（夏復國 未發表），且內波影響區裡含有最高的 β -proteobacteria比例和硝酸鹽濃度，這可能就是 *Nitrosomonas* 和 *Nitrosospira* 氧化氨鹽的結果。此外 *Nitrosomonas*是由大氣中固定二氧化碳以獲得所需的碳源，這也可能成

為促使東沙環礁內DOC高過於南海SEATS站的原因 (Jahnke et al. 1984; 夏復國 未發表; 陳仲吉等. 2011)。Actinobacteria在分解有機物質 (纖維素和幾丁質...) 上扮演一個極重要的角色，更是提供腐植質的重要關鍵 (Stackebrandt et al. 2006)，而東沙環礁內存在許多的大型藻類 (林幸助 & 蕭淑娟 2010)，當然有可能具有較高比例的Actinobacteria。

東沙環礁、南海SEATS站及各類水體細菌群聚結構與細菌生產力之間的關係

很多添加實驗都已經證實營養鹽濃度會影響到細菌生長速率的現象 (Shiah et al. 1994; Shiah 1999; van Duyl & Gast 2001; Scheffers et al. 2005)，這可能就是東沙環礁內 (硝酸鹽平均濃度, 2.5 μMN) 與南海SEATS站 (硝酸鹽 $<1 \mu\text{MN}$) 的細菌生產力相差 11 倍之多的原因。更有許多文獻指出營養鹽的供應亦會影響細菌群聚組成 (Lebaron et al. 1999; Fisher et al. 2000; Schafer et al. 2001)，這可以讓兩研究區域的優勢菌群產生差異。賴虹君 (2010) 利用 DNA 定序發現在南海SEATS站 γ -proteobacteria 會隨著水層下降而比例增加，推測亦可能是因為營養鹽增加。珊瑚體內的共棲菌以 γ -Proteobacteria 居多 (Rohwer et al. 2001)，在珊瑚死亡後會將其共棲菌釋放至周圍水體中。東沙環礁內有大量的死亡珊瑚骨骼散佈在潟湖區，比例約占總底質的 30% (戴昌鳳 2005, 2006, 2008; 宋克義 & 陳昭倫 2010)，此亦有可能造成東沙環礁內的優勢菌群為 γ -proteobacteria。而新喀裏多尼亞 (New Caledonia) 的 SW lagoon 則可能因為地形較開放與活珊瑚群比例極高，使珊瑚內部的共棲菌不會釋放至周圍海水中，導致當地海水會如同世界各地多處的開放式海洋和沿岸海域之表水一般，以 α -proteobacteria 為優勢菌種。謝懷貞 (2009) 利用 PCR-RFLP 發現，

在黑潮中 γ - proteobacteria 比例最高，其中更以泛菌屬 (*Pantoea*)為優勢種，本菌屬 γ - proteobacteria，最適生長環境為溫度 30 °C，pH 值中性，是廣泛分佈於自然界的兼性化學異營菌，而本研究認為此菌屬亦可能存在於表水最高溫達 29.8°C 的東沙環礁中。

和前人所做的研究相比 (表六)，發現不論是哪種水域環境，Total Proteobacteria確實占全部細菌中的多數，不同的環境系統仍具有不同的細菌群聚組成。淡水系統中以 β -proteobacteria和Actinobacteria是優勢菌種 (Pérez et al. 2010)，開放式海洋和沿岸海域的表水則為 α -proteobacteria占大多數 (>30%，Cotterll et al. 2000；Yokokawa et al. 2005；Zhang et al. 2006；Brown et al. 2009；賴虹君 2010；本研究)。唯有在黑潮表水中觀察到 γ -proteobacteria為優勢菌群的現象，推測可能是黑潮海域的高溫和氮鹽貧乏狀況，符合 γ -proteobacteria中泛菌屬 (*Pantoea*) 最適生長溫度為30°C，且有固氮能力所致 (謝懷貞 2009)。但同樣為珊瑚礁環境卻發現位於新喀裏多尼亞 (New Caledonia) 的SW-lagoon是以 α -proteobacteria為主 (Weinbauer et al. 2010)，而本研究的東沙環礁則以 γ -proteobacteria為優勢種，認為可能和兩地生態環境開放與否有極大的關係，因此顯示即使同為珊瑚礁環境，也會因為不同的環境情況使優勢菌群有明顯之差異。

由南海SEATS站的各細菌群聚組成和細菌生產力之間的相關分析 (表一) 和主成份分析 (表二)可得知，各菌群與細菌生產力皆無關，可能因為優勢菌種 α -proteobacteria中又分為兩大主要的海洋菌屬 (*Roseobacter*及SAR11)，這兩菌屬又會因為不同環境而有不一樣的活性 (Alonso-Sa´ez & Gasol 2007)，使本研究無法得知何者對細菌生產力有最大的影響。另外Malmstrom et al (2005) 發現到當往沿岸靠近時，

SAR11僅增加不到一倍的生物量，但其生產力可以增加到高過於兩倍的數值，這可能代表營養鹽增加時，有活性的SAR11能夠占其生物量中較高的比例，使得細菌量不需要大幅增加，即可產生極大改變的生產力。因此可能在寡營養鹽的南海深水站中，有活性的細菌均占各菌群中較低的比例，而無法直接用數量得知何種菌群對細菌生產力有相關性存在。

東沙環礁內 α -， β -及 γ -proteobacteria的分佈趨勢大致上皆為東、西兩側高往中間遞減，且由主成分散佈圖(圖七)可以看出三菌群之間相關性高以及與細菌生產力有較多成份的關連性，均呈現正相關(表三)，代表此三種細菌是控制細菌生產力分佈的主要原因。利用複迴歸分析的偏迴歸係數 (partial regression coefficient; prc)判定 β -Proteobacteria (prc= 0.63) 對細菌生產力的影響最大(表五)。Actinobacteria與“其它細菌”的空間分佈大略為東、西兩側高往中間遞增，但是與細菌生產力的分佈無關或負相關(表三)，顯示此兩類菌群並非此處細菌生產力的主要貢獻者。而東沙環礁能直接用各生物量得知何種菌群對細菌生產力有最大的影響，或許是此處具有較高之營養鹽(硝酸鹽)，以致有活性的細菌皆占各菌群中極高的比例之緣故。



結論

在2010年秋季南海SEATS深水站以及東沙環礁細菌群聚組成呈現明顯之差異，前者的優勢菌群為 α -proteobacteria，占全部細胞數的35%，且會因為溫度而變化；後者的優勢菌群大多為 γ -proteobacteria，占全部細胞數的34%，且明顯有空間上的變化。推測是營養鹽（硝酸鹽）濃度多寡、珊瑚礁生理情況和泛菌屬（*Pantoea*）是機會菌屬等原因。由複迴歸分析顯示，東沙環礁內 β -proteobacteria對細菌生產力的分佈影響最大，但南海SEATS站各菌群卻無此現象，可能原因在於營養鹽的高低會導致有活性的細菌占有各菌群中不一樣的比例。在本研究已經把CARD-FISH法妥善利用於檢測不同生態系統中的細菌群聚結構，並與賴（2010）的結果確認無誤，因此未來將運用此方法結合Micro-auto-radiography直接得知各菌群之生產力為何，將有助於驗證我們的推論及更深入瞭解各菌群生產力與環境因子之間的互動關係。



參考文獻

- Allers, E., C. Niesner, C. Wild, and J. Pernthaler. 2008. Microbes enriched in seawater after addition of coral mucus. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 3274.
- Alonso-Saez, L., and J. M. Gasol. 2007. Seasonal variations in the contributions of different bacterial groups to the uptake of low-molecular-weight compounds in northwestern Mediterranean coastal waters. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 3528.
- Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 1919.
- Azam, F., T. Fenchel, J. Field, J. Gray, L. Meyer-Reil, and F. Thingstad. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series* **10**: 257-263.
- Azam, F., and F. Malfatti. 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 782-791.
- Borgne, R., J. Blanchot, and L. Charpy. 1989. Zooplankton of Tikehau atoll (Tuamotu archipelago) and its relationship to particulate matter. *Marine Biology* **102**: 341-353.
- Bourne, D., Y. Iida, S. Uthicke, and C. Smith-Keune. 2007. Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. *The International Society for Microbial Ecology Journal* **2**: 350-363.
- Brown, M. V. and others 2009. Microbial community structure in the North Pacific ocean. *The International Society for Microbial Ecology Journal* **3**: 1374-1386.
- Carlson, C. A., H. W. Ducklow, and A. F. Michaels. 1994. Annual flux of dissolved organic carbon from the euphotic zone in the northwestern Sargasso Sea. *Nature* **371**: 405-408.
- Chao, S. Y. 2007. Assessing the west ridge of Luzon Strait as an internal wave mediator. Defense Technical Information Center Document.
- Charpy, L., and J. Blanchot. 1998. Photosynthetic picoplankton in French Polynesian atoll lagoons: estimation of taxa contribution to biomass and production by flow cytometry. *Marine Ecology Progress Series*

162: 57-70.

- Charpy, L., P. Dufour, and N. Garcia. 1997. Particulate organic matter in sixteen Tuamotu atoll lagoons (French Polynesia). *Marine Ecology Progress Series* **151**: 55-65.
- Chen, C. C., F. K. Shiah, S. W. Chung, and K. K. Liu. 2006. Winter phytoplankton blooms in the shallow mixed layer of the South China Sea enhanced by upwelling. *Journal of Marine Systems* **59**: 97-110.
- Cho, B. C., and F. Azam. 1988. Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Nature* **332**: 441-443.
- Cole, J. J., S. Findlay, and M. L. Pace. 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Marine Ecology Progress Series* **43**: 1-10.
- Coombs, J. T., and C. M. M. Franco. 2003. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5603.
- Cottrell, M. T., and D. L. Kirchman. 2000. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low-and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1692.
- Crump, B. C., E. Armbrust, and J. A. Baross. 1999. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3192.
- Daims, H., S. Lucker, and M. Wagner. 2006. Daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environmental Microbiology* **8**: 200-213.
- Delesalle, B., and A. Sournia. 1992. Residence time of water and phytoplankton biomass in coral reef lagoons. *Continental Shelf Research* **12**: 939-949.
- Emerson, D. and others 2007. A novel lineage of proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *Publibrary of Science One* **2**: e667.
- Erhart, R., D. Bradford, R. Seviour, R. Amann, and L. Blackall. 1997. Development and use of fluorescent in situ hybridization probes for the detection and identification of *Microthrix parvicella* in activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology* **20**: 310-318.

- Fisher, M., J. Klug, G. Lauster, M. Newton, and E. Triplett. 2000. Effects of resources and trophic interactions on freshwater bacterioplankton diversity. *Microbial Ecology* **40**: 125-138.
- Freitag, T. E., and J. I. Prosser. 2004. Differences between betaproteobacterial ammonia-oxidizing communities in marine sediments and those in overlying water. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 3789.
- Fuhrman, J. 1992. Bacterioplankton roles in cycling of organic matter: the microbial food web. Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea: 361-383.
- Fuhrman, J., and F. Azam. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Marine Biology* **66**: 109-120.
- Giovannoni, S. J., and U. Stingl. 2005. Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* **437**: 343-348.
- Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer, and K. G. Field. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**: 60-63.
- Gong, G.C. 1992. Chemical hydrography of the Kuroshio front in the sea northeast of Taiwan. Ph. D., National Taiwan University.
- Gonzalez, J., J. P. Torretón, P. Dufour, and L. Charpy. 1998. Temporal and spatial dynamics of the pelagic microbial food web in an atoll lagoon. *Aquatic Microbial Ecology* **16**: 53-64.
- Grasshoff, K., M. Ehrhardt, K. Kremling, and T. Almgren. 1976. Methods of seawater analysis. Wiley Online Library.
- Hsu, M. K., A. K. Liu, and N. A. A. S. A. G. M. G. S. F. Center. 2000. Nonlinear internal waves in the South China Sea. *Canadian Journal of Remote Sensing* **26**: 72-81.
- Jahnke, L. S., C. Lyman, and A. B. Hooper. 1984. Carbonic anhydrase, carbondioxide levels and growth of *Nitrosomonas*. *Archives of Microbiology* **140**: 291-293.
- Karl, D. M., and G. Tien. 1992. MAGIC: A sensitive and precise method for measuring dissolved phosphorus in aquatic environments. *Limnology and Oceanography* **37**: 105-116.
- Kersters, K., P. De Vos, M. Gillis, J. Swings, P. Vandamme, and E. Stackebrandt. 2006. Introduction to the Proteobacteria. The

- Prokaryotes **5**: 3-37.
- Kirchman, D. L. 2002. The ecology of Cytophaga–Flavobacteria in aquatic environments. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* **39**: 91-100.
- Lancelot, C., and G. Billen. 1984. Activity of heterotrophic bacteria and its coupling to primary production during the spring phytoplankton bloom in the southern bight of the North Sea. *Limnology and Oceanography* **29**: 721-730.
- Lebaron, P. and others 1999. Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquatic Microbial Ecology* **19**: 255-267.
- Legendre, P., and L. Legendre. 1998. Numerical ecology. Elsevier Science.
- Le Borgne, R. P., J. Blanchot, and L. Charpy. 1989. Zooplankton of the atoll of Tikehau (Tuamotu Archipelago) and its relationship to particulate matter. *Marine Biology* **102**: 341-353.
- Liu, C. T., R. Pinkel, M. Hsu, J. Klymak, H. W. Chen, and C. Villanoy. 2006. Nonlinear internal waves from the Luzon Strait. *Eos Trans. American Geophysical Union* **87**: 449.
- Malmstrom, R. R., M. T. Cottrell, H. Elifantz, and D. L. Kirchman. 2005. Biomass production and assimilation of dissolved organic matter by SAR11 bacteria in the Northwest Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 2979.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K. H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* **15**: 593-600.
- Moriarty, D., P. Pollard, and W. Hunt. 1985. Temporal and spatial variation in bacterial production in the water column over a coral reef. *Marine Biology* **85**: 285-292.
- Neef, A. 1997. Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozosen. Technische Universität München, München, Germany.
- Nold, S. C., J. Zhou, A. H. Devol, and J. M. Tiedje. 2000. Pacific Northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the β subdivision of the Proteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4532.

- Parsons, T. R., Y. Maita, and C. M. Lalli. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis.
- Perez, M. T., P. Hortnagl, and R. Sommaruga. 2010. Contrasting ability to take up leucine and thymidine among freshwater bacterial groups: implications for bacterial production measurements. *Environmental Microbiology* **12**: 74-82.
- Pernthaler, A., J. Pernthaler, and R. Amann. 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3094.
- Pomeroy, L. R. 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience* **24**: 499-504.
- Reinthal, T., E. Teira, and E. Sintes. 2006. Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence in situ Hybridization (CARD-FISH) Protocol for Bacteria and Archaea.
- Rappe, M. S., S. A. Connon, K. L. Vergin, and S. J. Giovannoni. 2002. Cultivation of the ubiquitous SARI 1 marine bacterioplankton clade. *Nature* **418**: 630-633.
- Rimmelin, P., and T. Moutin. 2005. Re-examination of the MAGIC method to determine low orthophosphate concentration in seawater. *Analytica Chimica Acta* **548**: 174-182.
- Rohwer, F., M. Breitbart, J. Jara, F. Azam, and N. Knowlton. 2001. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. *Coral Reefs* **20**: 85-91.
- Schafer, H. and others 2001. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* **34**: 243-253.
- Scheffers, S., R. Bak, and F. Van Duyl. 2005. Why is bacterioplankton growth in coral reef framework cavities enhanced? *Marine Ecology-Progress Series* **299**: 89.
- Sekar, R., B. M. Fuchs, R. Amann, and J. Pernthaler. 2004. Flow sorting of marine bacterioplankton after fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 6210.
- Shaw, P. T., and S. Y. Chao. 1994. Surface circulation in the South China Sea. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **41**:

- 1663-1683.
- Shiah, F. K. 1999. Diel cycles of heterotrophic bacterioplankton abundance and production in the ocean surface waters. *Aquatic Microbial Ecology* **17**: 239-246.
- Shiah, F. K., and H. W. Ducklow. 1994. Temperature and substrate regulation of bacterial abundance, production and specific growth rate in Chesapeake Bay, USA. *Marine Ecology-Progress Series* **103**: 297-297.
- Simek, K. and others 2005. Influence of top-down and bottom-up manipulations on the R-BT065 subcluster of {beta}-Proteobacteria, an abundant group in bacterioplankton of a freshwater reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 2381.
- Smith, E. M., and P. A. Del Giorgio. 2003. Low fractions of active bacteria in natural aquatic communities? *Aquatic Microbial Ecology* **31**: 203-208.
- Sondergaard, M. 1997. Bacteria and dissolved organic carbon in lakes. *Fresh. Biol.: Priorities and Development in Danish Research*. [Links]: 138-161.
- Stackebrandt, E., P. Schumann, and M. Dworkin. 2006. Introduction to the taxonomy of actinobacteria. *Prokaryotes* **3**: 297-321.
- Strickland, J., and T. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis, vol. 167. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada, Ottawa: 310.
- Torreton, J. P., and P. Dufour. 1996. Temporal and spatial stability of bacterioplankton biomass and productivity in an atoll lagoon. *Aquatic Microbial Ecology* **11**: 251-261.
- Torreton, J. P., E. Rochelle-Newall, A. Jouon, V. Faure, S. Jacquet, and P. Douillet. 2007. Correspondence between the distribution of hydrodynamic time parameters and the distribution of biological and chemical variables in a semi-enclosed coral reef lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **74**: 766-776.
- Van Duyl, F. C., and G. J. Gast. 2001. Linkage of small-scale spatial variations in DOC, inorganic nutrients and bacterioplankton growth with different coral reef water types. *Aquatic Microbial Ecology* **24**: 17-26.
- Wang, Y. H., C. F. Dai, and Y. Y. Chen. 2007. Physical and ecological

- processes of internal waves on an isolated reef ecosystem in the South China Sea. *Geophysical Research Letters* **34**: L18609.
- Webb, W. L., M. Newton, and D. Starr. 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*. *Oecologia* **17**: 281-291.
- Weinbauer, M. G. and others 2010. Bacterial community composition and potential controlling mechanisms along a trophic gradient in a barrier reef system. *Aquatic Microbial Ecology* **60**: 15-28.
- Wong, G. T. F., T. L. Ku, M. Mulholland, C. M. Tseng, and D. P. Wang. 2007a. The SouthEast Asian Time-series Study (SEATS) and the biogeochemistry of the South China Sea--An overview. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **54**: 1434-1447.
- Wong, G. T. F., C. M. Tseng, L. S. Wen, and S. W. Chung. 2007b. Nutrient dynamics and N-anomaly at the SEATS station. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **54**: 1528-1545.
- Wright, S. and others 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* **77**: 183-196.
- Wu, J. and others 2003. Dissolved inorganic phosphorus, dissolved iron, and Trichodesmium in the oligotrophic South China Sea. *Global Biogeochemical Cycles* **17**: 8-1.
- Yokokawa, T., and T. Nagata. 2005. Growth and grazing mortality rates of phylogenetic groups of bacterioplankton in coastal marine environments. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 6799.
- Zhang, Y., N. Jiao, M. T. Cottrell, and D. L. Kirchman. 2006. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production along a salinity gradient in the South China Sea. *Aquatic Microbial Ecology* **43**: 233-241.
- 林幸助, 蕭淑娟. 2010. 東沙海域大型藻類生物量與海草物候、生產力調查. 海洋國家公園管理處委託辦理報告.
- 宋克義, 陳昭倫. 2010. 東沙環礁珊瑚復原指標研究. 海洋國家公園管理處委託辦理報告.
- 陳仲吉, 夏復國, 詹森, 許世傑. 2011. 東沙環礁潟湖生態系統研究 (一). 海洋國家公園管理處委託辦理報告.
- 陳陽益, 王玉懷, 李忠潘. 2008. 東沙內環礁海域海流、水深與棲地調查. 海洋國家公園管理處委託辦理報告.

- 賴虹君. 2010. 南海北部不同深度的菌相與多樣性研究. 國立臺灣大學海洋研究所碩士論文.
- 謝懷貞. 2009. 春夏季貧營養鹽黑潮海域浮游細菌群聚組成之變化. 國立師範大學生命科學系論文.
- 戴昌鳳. 2005. 東沙海域生態基礎調查研究, 第肆章 珊瑚類資源的調查. 內政部營建署委託辦理報告.
- 戴昌鳳. 2006. 東沙海域珊瑚礁生態資源調查與監測 (一). 內政部營建署委託辦理報告.
- 戴昌鳳. 2008. 東沙海域珊瑚礁生態資源調查與監測 (二). 內政部營建署委託辦理報告.



表一 南海 SEATS 站的各參數[@]之相關分析矩陣表。上標**表示 $p < 0.01$ ，*表示 $p < 0.05$ ，空白表示不顯著。

	Unit	T	S	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	Chla	PP	BP	DAPI	α-	β-	γ-	Proteo	Actino	Other
S	psu	0.92**													
NO ₃ ⁻	μM														
PO ₄ ³⁻	μM														
Chla	μg/l														
PP	mgC m ⁻³ d ⁻¹														
BP	mgC m ⁻³ d ⁻¹														
DAPI	10 ⁶ cells/ml					0.76*		-0.77*							
α-	10 ⁵ cells/ml	0.73*													
β-	10 ⁵ cells/ml						0.96**								
γ-	10 ⁵ cells/ml										0.79*				
Proteo	10 ⁵ cells/ml									0.93**		0.84**			
Actino	10 ⁵ cells/ml					0.82*			0.80*		-0.85**				
Other	10 ⁵ cells/ml	-0.85**	-0.83**						0.78*	-0.86**			-0.71*		

@, T、S、NO₃⁻、PO₄³⁻、Chla、PP、BP、DAPI、α-、β-、γ-、Proteo、Actino 及 Others 分別代表溫度、鹽度、硝酸鹽、磷酸鹽、葉綠素 *a*、初級生產力、細菌生產力、總細胞數、α-Proteobacteria 的細胞數、β-Proteobacteria 的細胞數、γ-Proteobacteria 的細胞數、α、β、γ 三種 Proteobacteria 的細胞數、Actinobacteria 的細胞數及其他剩餘未偵測出細菌的細胞數。



表二 南海 SEATS 站的主成份[@]分析變數之主成份得點相關性。

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
α -	0.69	0.68	0.09	0.23	-0.04
β -	0.89	-0.38	0.16	-0.16	-0.08
γ -	0.93	-0.03	-0.36	-0.02	0.01
Actino-	0.63	-0.75	0.14	0.10	0.09
Other	-0.42	-0.88	-0.11	0.16	-0.08
*T	0.46	0.73	-0.31	-0.20	0.18
*S	0.49	0.63	-0.05	-0.31	0.44
*NO ₃ ⁻	0.11	-0.20	0.58	0.56	0.49
*PO ₄ ³⁻	-0.15	0.53	-0.09	-0.06	-1.29
*Chl <i>a</i>	0.12	-0.90	-0.16	-0.03	-0.38
*PP	0.25	-0.44	0.08	0.05	-0.62
*BP	-0.51	0.41	0.40	-0.54	0.30

@, T、S、NO₃、PO₄、Chl*a*、PP、BP、 α -、 β -、 γ -、Actino-及 Other 分別代表溫度、鹽度、硝酸鹽、磷酸鹽、葉綠素 *a*、初級生產力、細菌生產力、 α -Proteobacteria 的細胞數、 β -Proteobacteria 的細胞數、 γ -Proteobacteria 的細胞數、Actinobacteria 的細胞數及“其他剩餘未偵測出”細菌的細胞數。*Supplementary variable，補充變數。



表三 東沙環礁的各參數[@]之相關分析矩陣表。上標**表示 $p < 0.01$ ，*表示 $p < 0.05$ ，空白表示不顯著。

	Unit	T	S	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	Chla	PP	BP	DAPI	α -	β -	γ -	Proteo	Actino	Other
S	psu	-0.41*													
NO ₃ ⁻	μ M		-0.46*												
PO ₄ ³⁻	μ M														
Chla	μ g/l		-0.64**												
PP	mgC m ⁻³ d ⁻¹					0.57**									
BP	mgC m ⁻³ d ⁻¹		-0.50*	0.67**											
DAPI	10 ⁶ cells/ml		-0.51*			0.53**									
α -	10 ⁵ cells/ml							0.56**	0.49*						
β -	10 ⁵ cells/ml		-0.46*					0.70**		0.73**					
γ -	10 ⁵ cells/ml		-0.44*			0.42*		0.66**	0.64**	0.74**	0.55**				
Proteo	10 ⁵ cells/ml		-0.49*					0.74**	0.61**	0.89**	0.82**	0.92**			
Actino	10 ⁵ cells/ml			-0.41*		0.43*	0.58**								
Other	10 ⁵ cells/ml			-0.56*				-0.60**	0.43*					0.42*	

@,同表一。



表四 東沙環礁內的主成份[@]分析變數之主成份得點相關性。

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
α -	0.95	0.26	0.05	0.19	-0.31
β -	0.94	0.19	0.49	-0.43	0.11
γ -	0.97	0.28	-0.57	0.10	0.18
Actino-	-0.48	0.37	-0.37	-0.56	-0.13
Other	-0.60	0.86	0.22	0.24	0.07
*T	0.36	0.22	-0.36	-0.47	-0.50
*S	-0.41	-0.35	-0.01	0.28	0.23
*NO ₃ ⁻	0.41	-0.48	0.26	-0.05	-0.03
*PO ₄ ³⁻	-0.05	0.28	-0.49	-0.29	0.44
*Chl <i>a</i>	0.19	0.55	-0.21	-0.31	0.02
*PP	-0.31	0.51	0.01	-0.29	-0.24
*BP	0.89	-0.34	0.10	-0.07	0.20

[@],同表二。*Supplementary variable，補充變數。



表五 東沙環礁內三種 Proteobacteria 豐度與細菌生產力之線性及複迴歸分析。

菌群種類	斜率	相關係數	偏迴歸係數 [@]
α -	2.92	0.32	
β -	2.35	0.49	
γ -	1.38	0.43	
$\alpha + \beta + \gamma$		0.61	$0.13 + 0.63 + 0.11$

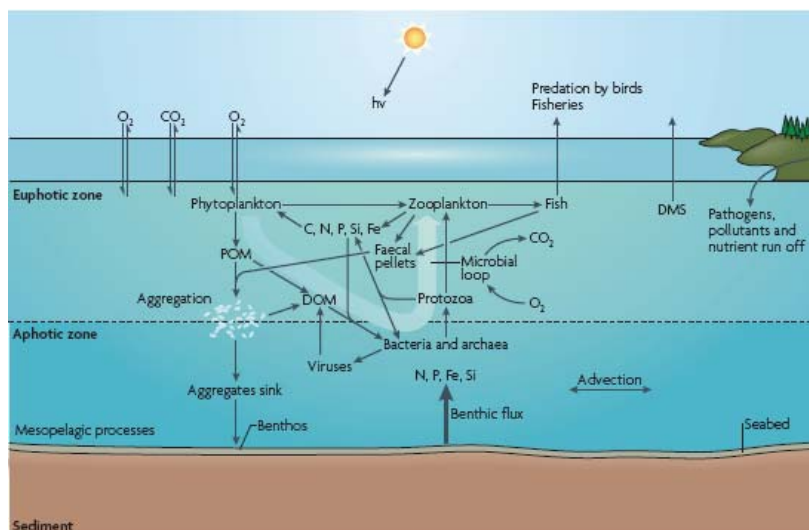
@, =斜率/平均值。



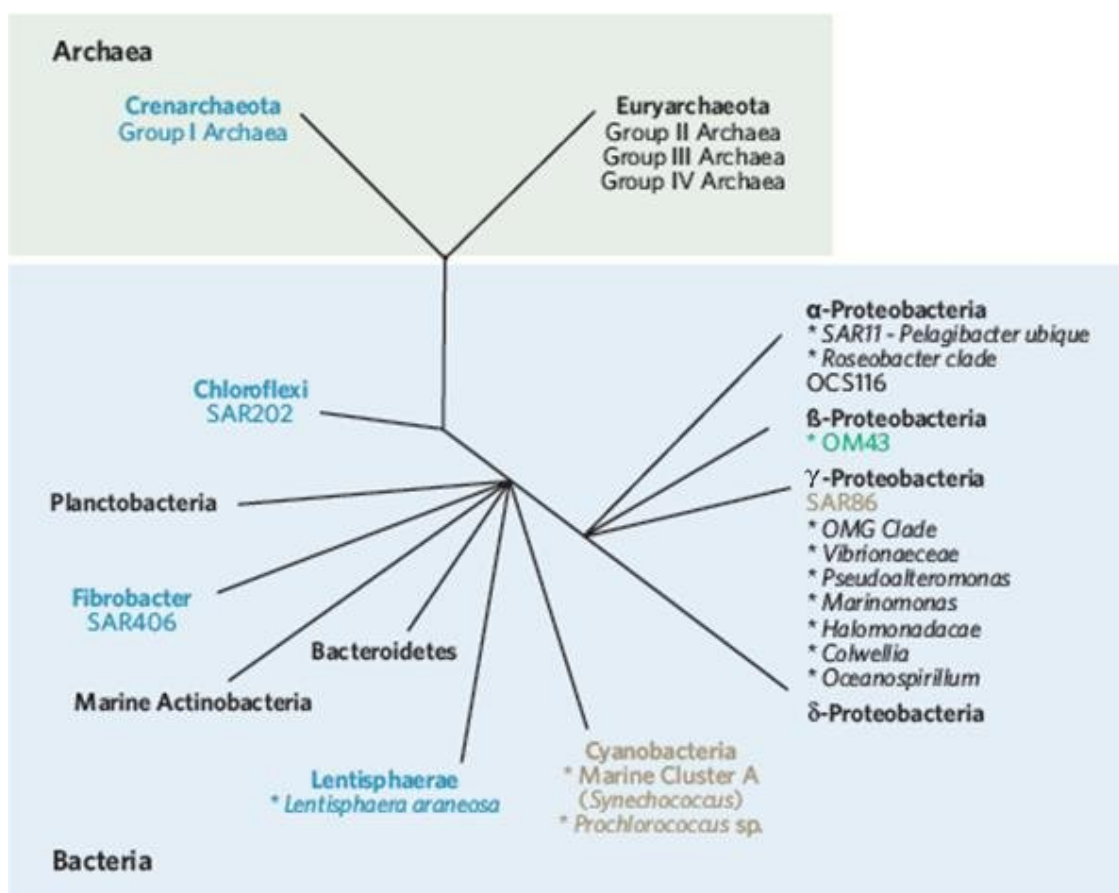
表六 各類型水域環境的細菌[@]組成分佈。D, I 及 m 表優勢，中間及少數種。 nd 為無進行該菌種之檢測或低於偵測極限。粗體字為本研究之成果。

Site	Methods	α -	β -	γ -	Actino-	Others	References
Western Ghats Lakes	DNA 定序		58%		13%	29%	Ruckmani et al. 2011
Austrian Alps Lakes	CARD-FISH	6%	27%	nd	25%	nd	Pérez et al., 2010
Arctic Ocean	DNA 定序	36%	nd	32%	nd	nd	Bano et al. 2002
Delaware Bay, USA	FISH	D	m	I	nd	nd	Cotterll et al. 2000
Otsuchi Bay, Japan	FISH	32%	1%	5%	nd	nd	Yokokawa et al. 2005
North Pacific	DNA 定序	D	m	I	m	nd	Brown et al. 2009
The Kuroshio	PCR-RFLP	24%	1%	52%	1%	22%	謝懷貞 2009
Lagoon, Caledonia	DGGE	D	nd	I	nd	nd	Weinbauer et al., 2010
Dong-Sha Atoll	CARD-FISH	21%	15%	34%	16%	16%	This study
South China Sea	FISH	31%	5%	10%	nd	nd	Zhang et al. 2006
South China Sea (10m)	DNA 定序	42%	6%	20%	0%	33%	賴虹君 2010
South China Sea (100m)	DNA 定序	46%	9%	35%	3%	8%	賴虹君 2010
South China Sea (1000m)	DNA 定序	23%	8%	66%	0%	11%	賴虹君 2010
South China Sea	CARD-FISH	35%	3%	11%	1%	49%	This study

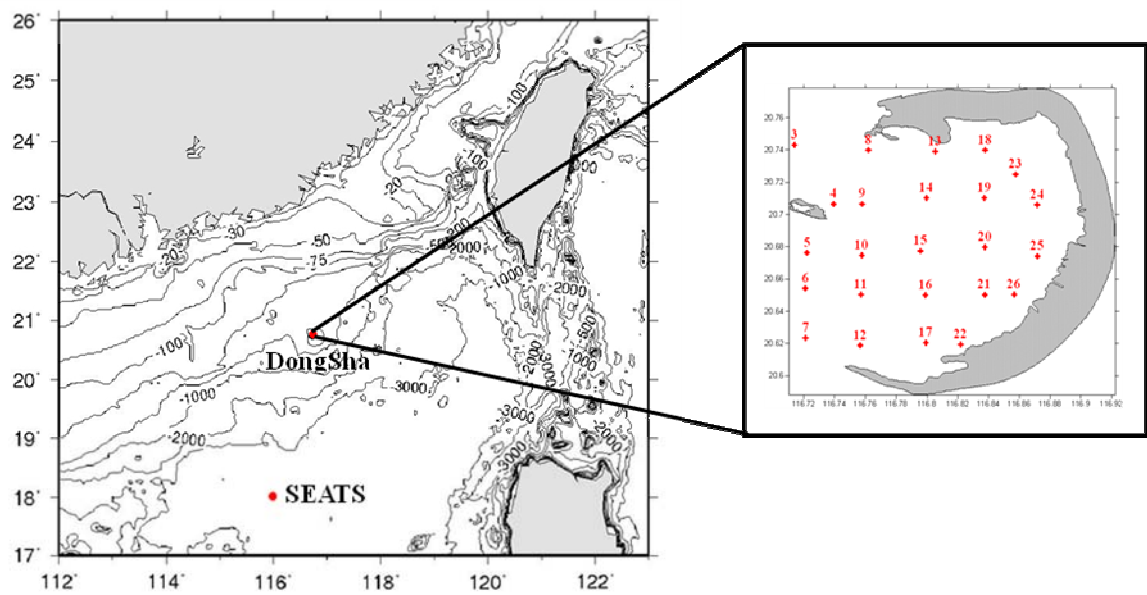
[@], α -、 β -、 γ -、Actino 及 Others 分別代表 α -Proteobacteria、 β -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria、Actinobacteria 及“其他剩餘未偵測出”細菌。



圖一・海洋生態系統內物質生地化循環(biogeochemical cycling)及微生物環 (microbial loop)示意圖。資料來源、Azam & Malfatti (2007).

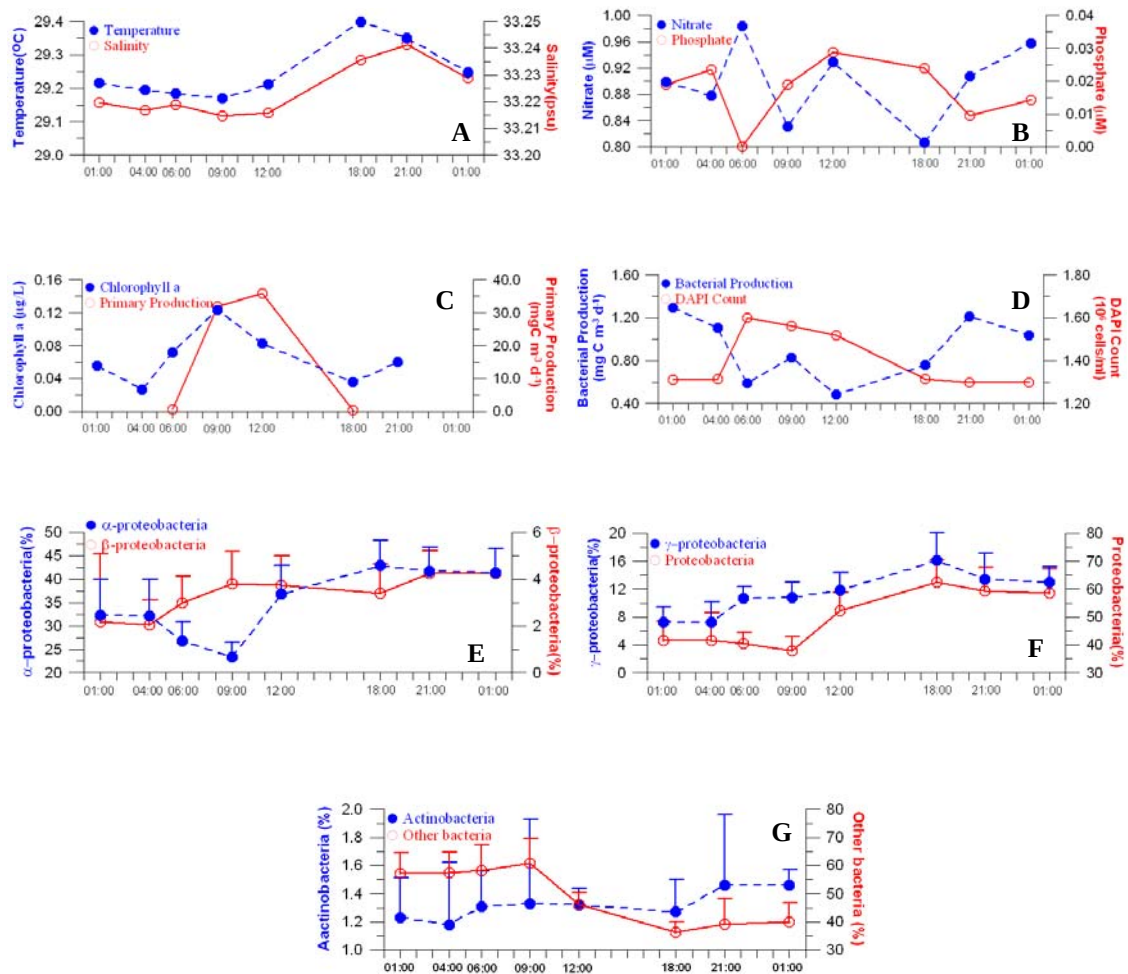


圖二 主要細菌(Bacteria)及古細菌(Archaea)分類的示意圖(Giovannoni & Stingl 2005)。



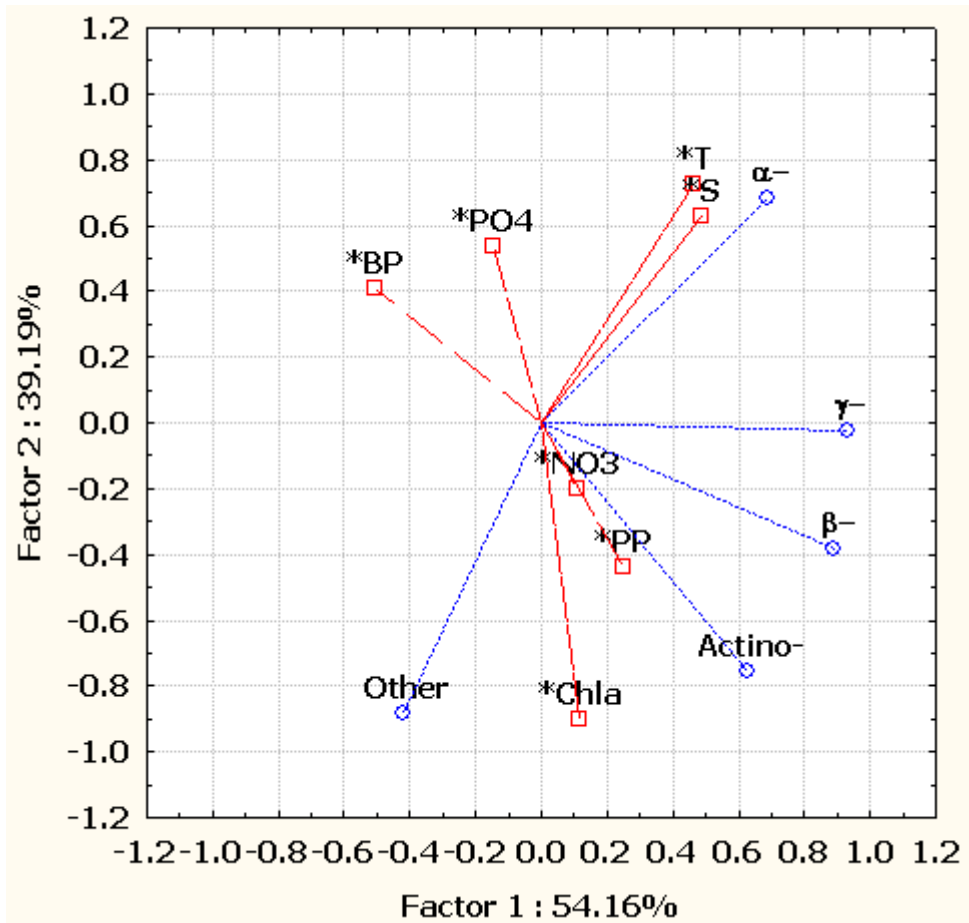
圖三 北南海採樣站點圖。東沙(Dong-Sha)環礁共有24個站，南海SEATS站(18 °N; 116 °E)進行24小時蹲站連續採樣。





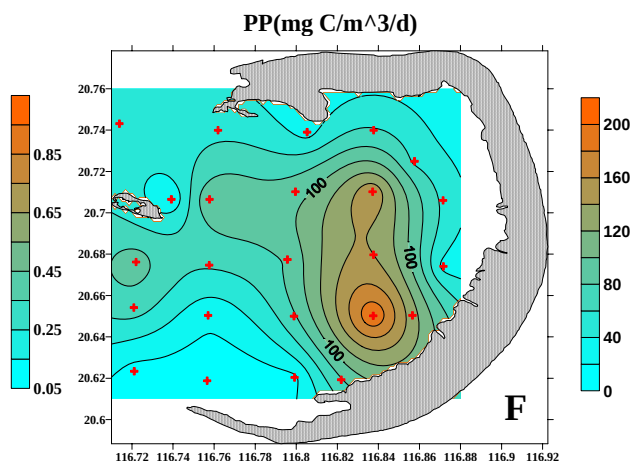
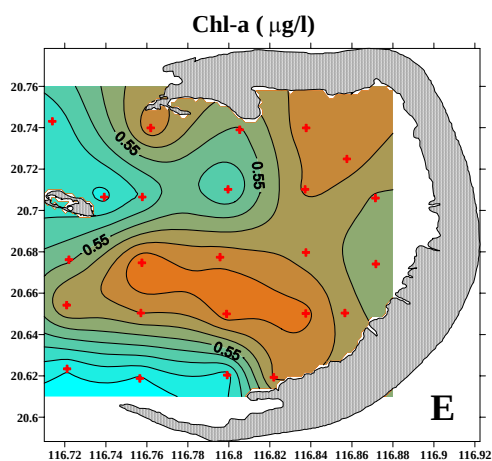
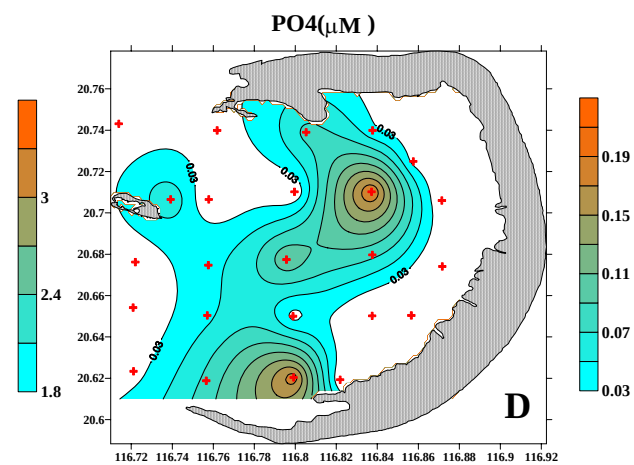
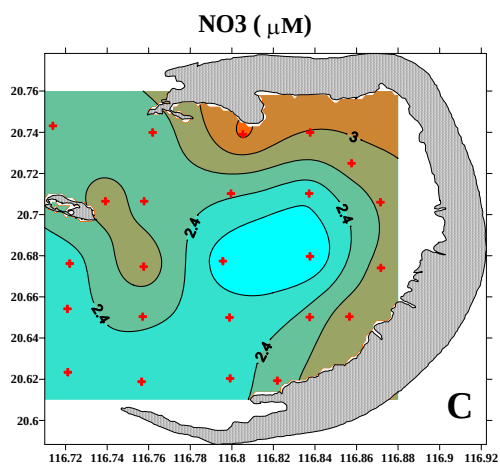
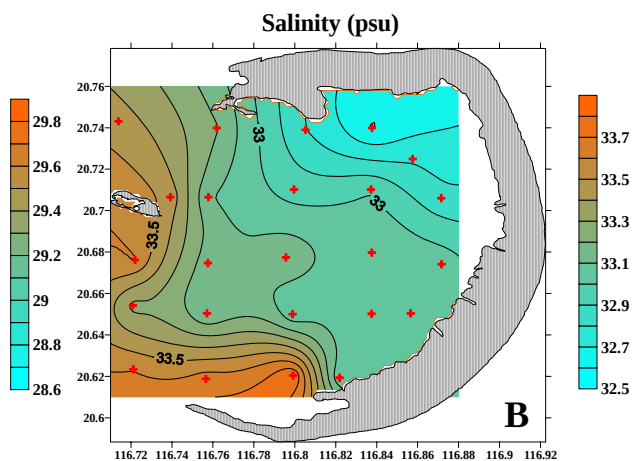
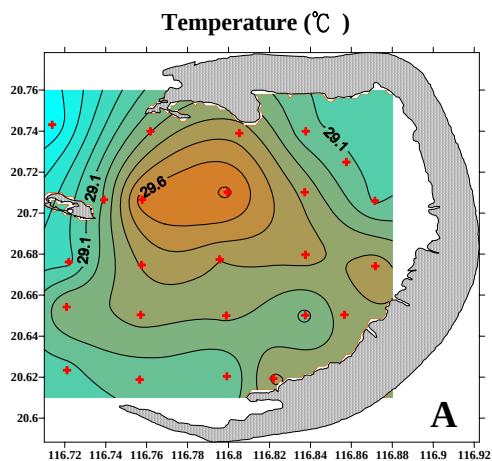
圖四 南海 SEATS 站各測量參數的時序變化圖。溫度與鹽度(A, °C、psu), 硝酸鹽與磷酸鹽 (B, μM), 葉綠素 *a* 與初級生產力 (C, $\mu\text{g/l}$ 、 $\text{mgC m}^{-3} \text{d}^{-1}$), 細菌生產力與總細胞數(D, $\text{mgC m}^{-3} \text{d}^{-1}$ 、 10^6 cells/ml), α -Proteobacteria 與 β -Proteobacteria 的百分比(E, %), γ -Proteobacteria 與 Total Proteobacteria 的百分比(F, %), Actinobacteria 與“其它未偵測出之細菌”的百分比(G, %). 垂直線代表標準偏差。

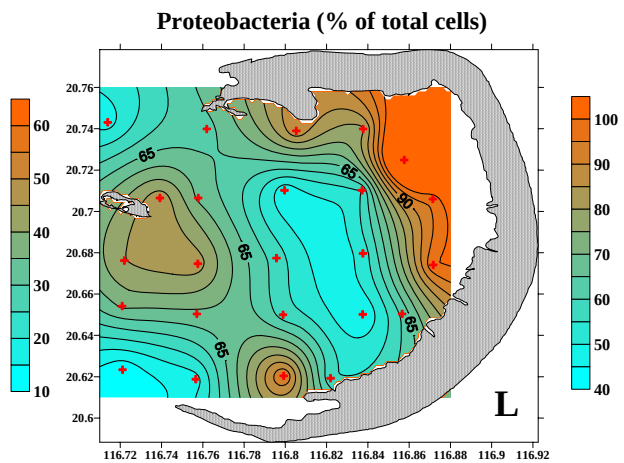
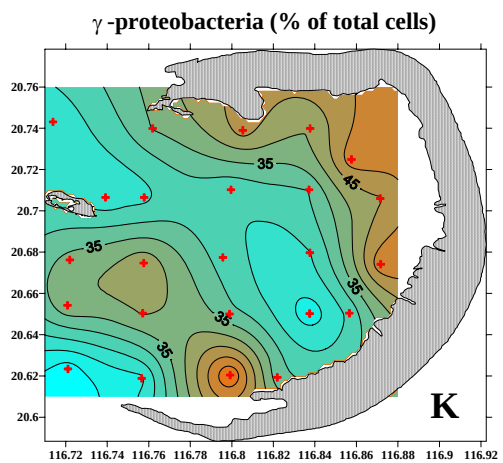
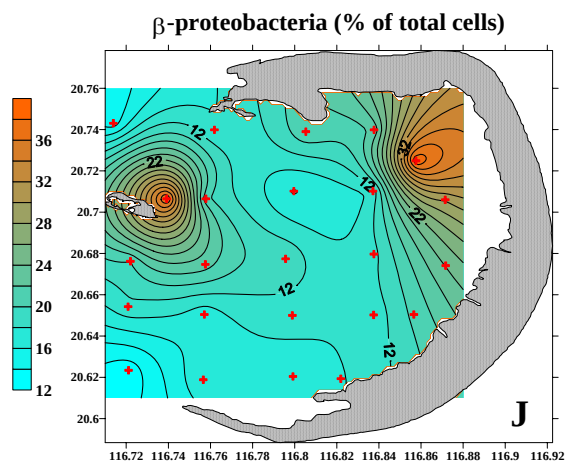
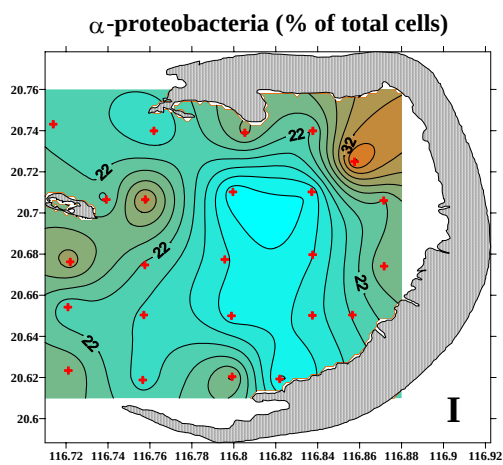
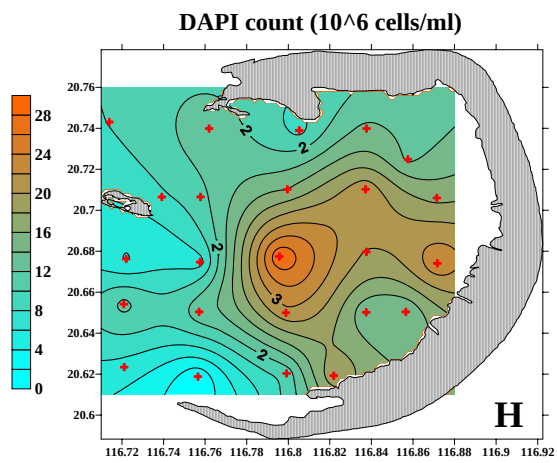
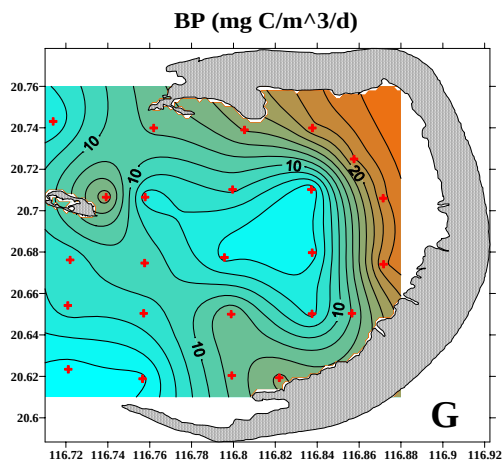


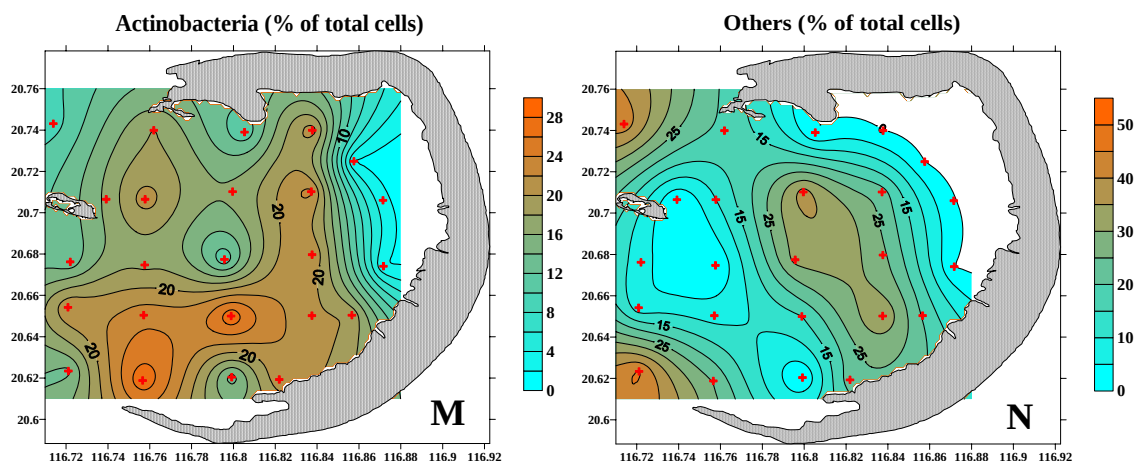


圖五 南海 SEATS 站細菌群聚組成及環境因子[@]之主成份分析。累積解釋變異量為 93%，藍線為細菌群聚組成參數，紅線為環境因子參數。[@], T、S、NO₃、PO₄、Chla、PP、BP、α-、β-、γ-、Actino-及 Other 分別代表溫度、鹽度、硝酸鹽、磷酸鹽、葉綠素 a、初級生產力、細菌生產力、α-Proteobacteria 的細胞數、β-Proteobacteria 的細胞數、γ-Proteobacteria 的細胞數、Actinobacteria 的細胞數及“其他剩餘未偵測出”細菌的細胞數。*Supplementary variable，補充變數。



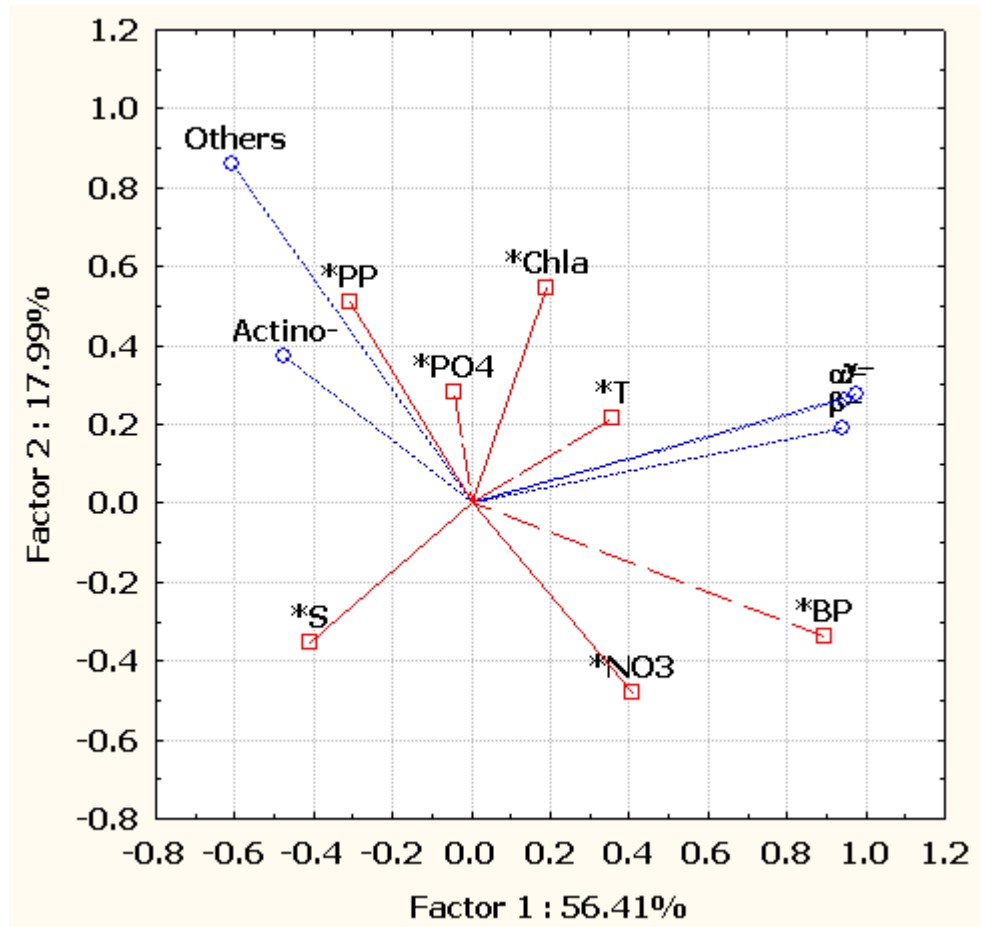






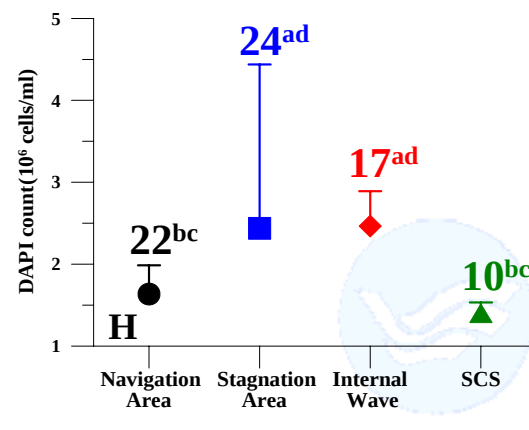
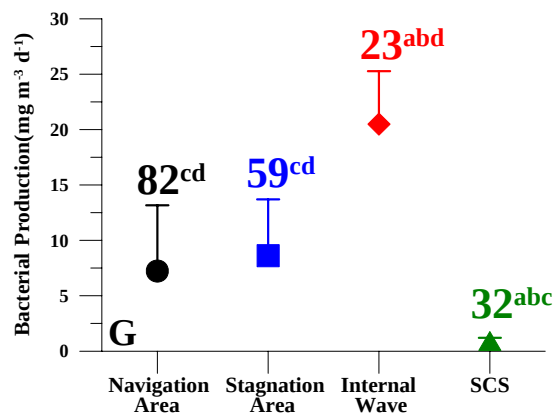
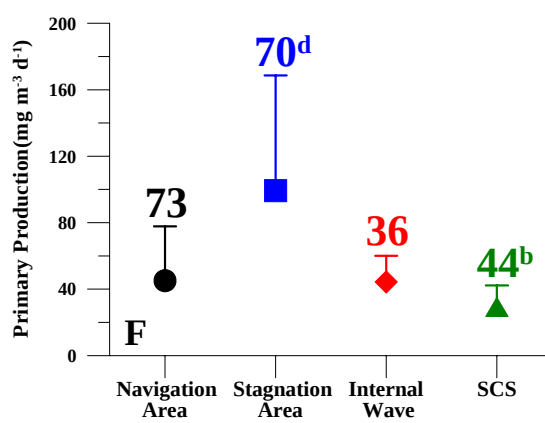
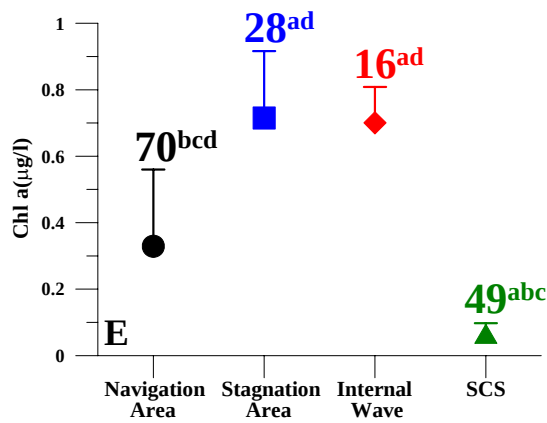
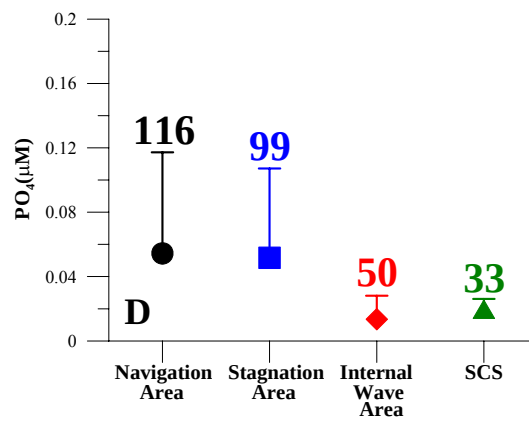
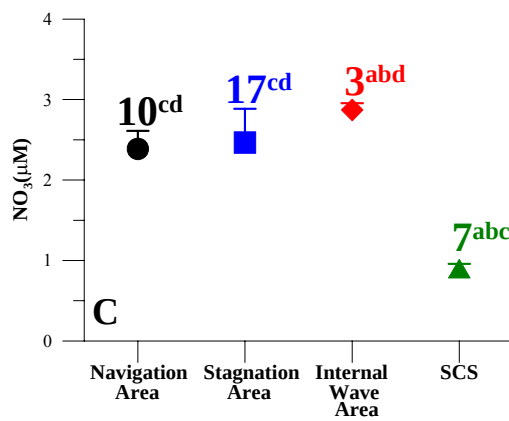
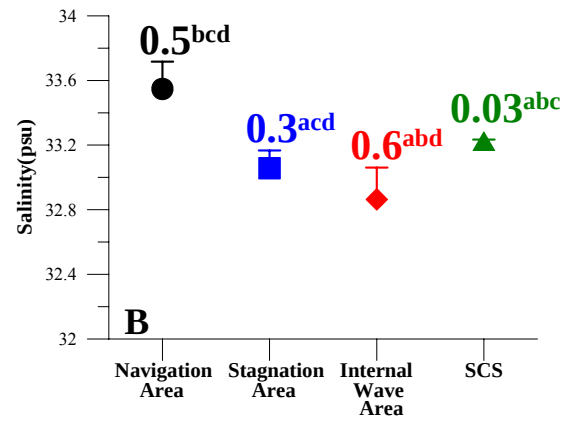
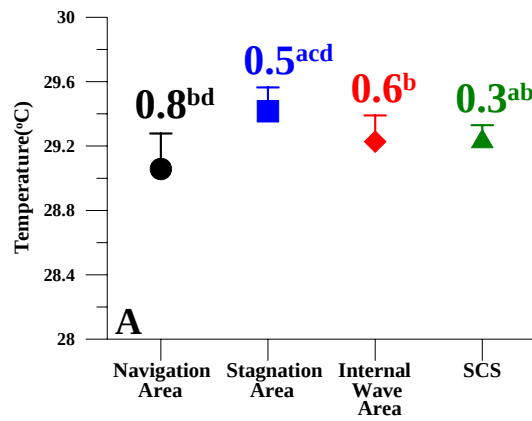
圖六 東沙環礁內各參數之空間分佈。溫度(A, °C)，鹽度(B, psu)，硝酸鹽 (C, μM)，磷酸鹽 (D, μM)，葉綠素 *a* (E, $\mu\text{g/l}$)，初級生產力 (F, $\text{mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)，細菌生產力(G, $\text{mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)，總細胞數 (H, $\times 10^6 \text{ cells/ml}$)， α -Proteobacteria 佔的百分比 (I, %)， β -Proteobacteria 佔的百分比(J, %)， γ -Proteobacteria 佔的百分比 (K, %)， α, β, γ (Total) 三種 Proteobacteria 佔的百分比(L, %)，Actinobacteria 佔的百分比(M, %)及其他未偵測出之細菌佔的百分比(N, %)。

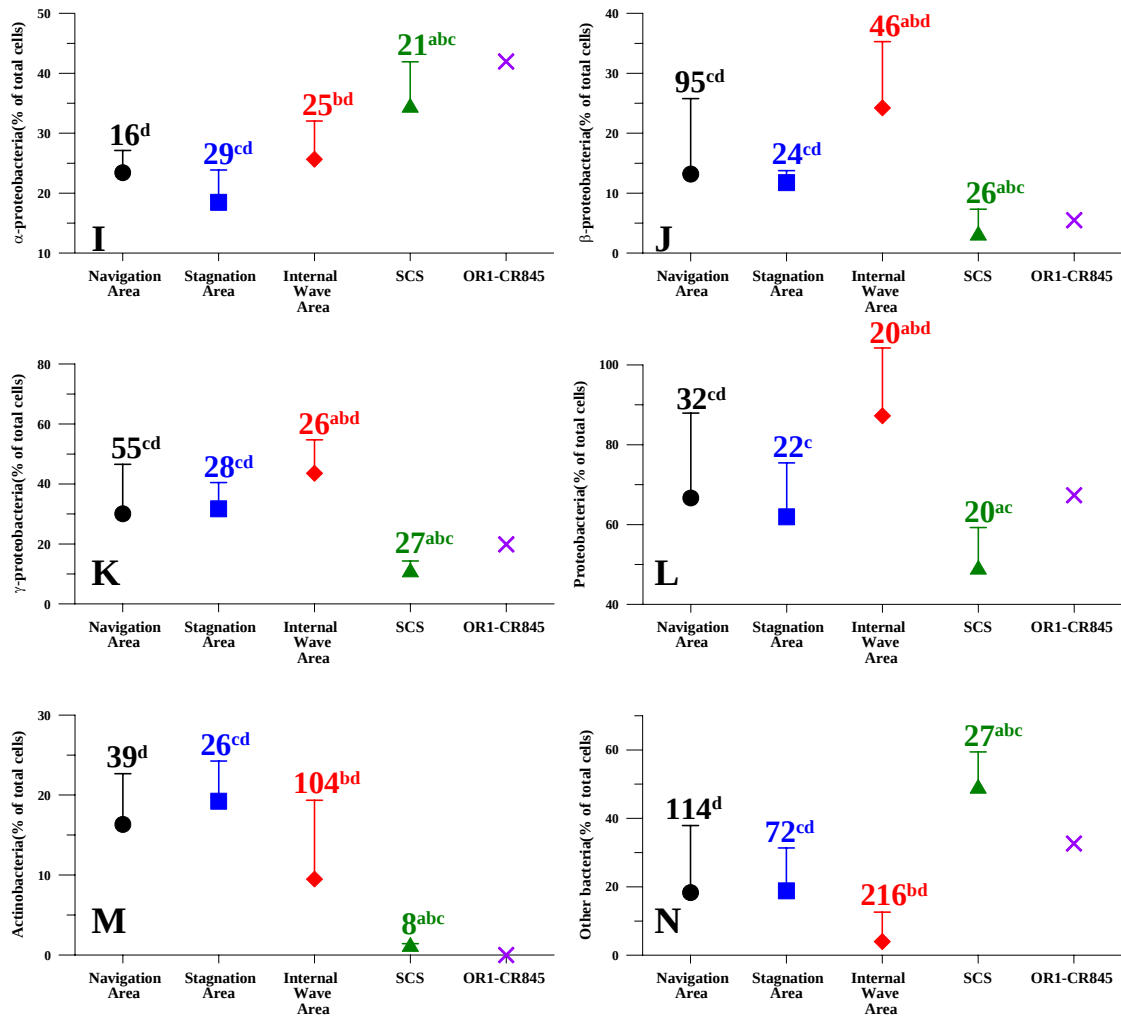




圖七 東沙環礁細菌群聚組成及環境因子[@]之主成份分析。累積解釋變異量為 74%，藍線為細菌群聚組成參數，紅線為環境因子參數。
[@]，同圖五。*Supplementary variable，補充變數。







圖八 東沙環礁航道口區 (Navigation Area)、滯留區 (Stagnation Area)、內波影響區 (Internal Wave Area)及南海 SEATS 時序站 (SCS)各類細菌組成百分比平均數值之比較。垂直線代表標準偏差(std)。上方的數字代表變異係數(CV=std/mean; %)。上標之 a, b, c, d 字母代表各分區間呈現顯著差異(ANOVA, $p < 0.05$)。溫度 (A, $^{\circ}\text{C}$)，鹽度(B, psu)，硝酸鹽 (C, μM)，磷酸鹽 (D, μM)，葉綠素 *a* (E, $\mu\text{g/l}$)，初級生產力 (F, $\text{mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)，細菌生產力 (G, $\text{mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)，總細胞數 (H, $\times 10^6 \text{ cells/ml}$)， α -Proteobacteria 佔的百分比 (I, %)， β -Proteobacteria 佔的百分比(J, %)， γ -Proteobacteria 佔的百分比(K, %)， α 、 β 、 γ (Total) 三種 Proteobacteria 佔的百分比(L, %)，Actinobacteria 佔的百分比(M, %)及其他未偵測出之細菌佔的百分比(N, %)。OR1-CR845 為賴 (2010)之調查結果。

附錄一 本研究選用的探針(HRP 標定在 5'的位置)

Probe	Target	Sequence	Target molecule	Reference
EUB338	Most bacteria	5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'	16S rRNA, 338-355	Amann et al. 1990
ALF968	α -proteobacteria	5'- GGT AAG GTT CTG CGC GTT -3'	16S rRNA, 968-985	Neef 1997
BET42a	β -proteobacteria	5'- GCC TTC CCA CTT CGT TT -3'	23S rRNA, 1027-1043	Manz et al. 1992
GAM42a	γ -roteobacteria	5'- GCC TTC CCA CAT CGT TT -3'	23S rRNA, 1027-1043	Manz et al. 1992
HGC236	Actinobacteria	5'- AAC AAG CTG ATA GGC CGC -3'	16S rRNA, 236-253	Erhart et al. 1997

附錄二 本研究使用螢光染劑的偵測波長範圍

染劑名稱	激發光波長 (nm)	散射光最大波長 (nm)	呈色範圍
Alexa ₄₈₈	495	519	黃-綠
DAPI	358	461	藍



附錄三 以 DAPI 及 Alexa₄₈₈ (CARD-FISH)染色呈現之影像。

