

OAC-SCU-111-011

# 探討纖毛蟲形成珊瑚疾病的機制研究

期末報告

海洋委員會補助研究

中華民國 111 年 09 月

「本研究報告僅供海洋委員會施政參考，並不代表該會政策，該會保留採用與否之權利。」

OAC-SCU-111-011

## 探討纖毛蟲形成珊瑚疾病的機制研究

### 期末報告

學校：東吳大學

指導教授：詹雅帆 助理教授

學生：余秀萍

研究期程：中華民國 111 年 5 至 111 年 11 月

研究經費：新臺幣壹萬柒仟元

海洋委員會補助研究

中華民國 111 年 09 月

「本研究報告僅供海洋委員會施政參考，並不代表該會政

策，該會保留採用與否之權利。」

## 目次

表次 .....	(3)
圖次 .....	(4)
摘要 .....	(5)
第一章 前言 .....	(7)
第一節 研究緣起與問題背景 .....	(7)
第二節 現況分析 .....	(8)
第三節 研究目的及研究重點 .....	(9)
第四節 預期目標 .....	(10)
第二章 研究方法及過程 .....	(11)
第三章 結果與討論 .....	(14)
第四章 結論 .....	(21)
參考資料 .....	(22)

## 表次

表一 於 25 度下，無進行空腹的纖毛蟲感染珊瑚塊情況。.....	( 15 )
表二 海水溫度25 度下，以空腹纖毛蟲感染珊瑚塊情形。.....	( 15 )
表三 於 25 度下，以空腹纖毛蟲感染珊瑚塊情形。.....	( 16 )
表四 在製造人工傷口前與後珊瑚的情況。.....	( 16 )
表五 於 25 度下，以空腹纖毛蟲感染具有人工傷口的珊瑚塊情形。 .....	( 16 )
表六 於海水溫度 33 度下，以空腹纖毛蟲感染珊瑚塊情形。.....	( 17 )
表七、於 25 度下，以空腹纖毛蟲感染珊瑚塊情形。.....	( 17 )
表八、於 25 度下，以空腹纖毛蟲感染具有人工傷口的珊瑚塊情形。 .....	( 18 )
表九、於 33 度下，以空腹纖毛蟲感染珊瑚塊情形。.....	( 19 )

## 圖次

圖一 實驗架構。.....	( 10 )
圖二 單細胞分技術使用器具。.....	( 11 )
圖三、以單細胞分技術所分離的纖毛蟲。.....	( 11 )
圖四 NCBI 資料庫進行種類確認定序結果。.....	( 14 )
圖五、倒立式顯微鏡下，纖毛蟲空腹前(A)與後(B)的照片。.....	( 14 )
圖六 纖毛蟲聚集在珊瑚底部周圍現象。.....	( 15 )
圖七 纖毛蟲聚集珊瑚表面現象明顯時(A)，以及聚集現象減少時 (B)。.....	( 17 )

## 摘要

關鍵詞: 纖毛蟲、珊瑚疾病、感染實驗

纖毛蟲是造成珊瑚疾病的重要原因之一，遭受到纖毛蟲感染的珊瑚會在短時間內產生組織脫落以及死亡。在台灣周遭海域與在水族箱中所養殖的珊瑚皆經常觀察到纖毛蟲感染的現象。本研究目的希望能夠重現珊瑚遭受到纖毛蟲感染的事件，觀察在何種狀態的珊瑚較易遭受到纖毛蟲的感染。本研究分為兩部份，第一部分從正在發生疾病的珊瑚上以單細胞分離技術挑選出纖毛蟲，並且培養之，接著以萃取 DNA 和聚合酶連鎖反應進行詳細的鑑種。第二部分使用纖毛蟲對海水溫度 25 度下，無受人為傷害、受人為傷害珊瑚以及 33 度高溫下培養的珊瑚進行纖毛蟲的感染實驗。結果發現，在添加 72 至 143 cells mL<sup>-1</sup>的纖毛蟲數量下，於3種珊瑚況狀的條件皆會發生纖毛蟲感染狀況，這說明要感染的發生需要一定的纖毛蟲數量。且在 33 度高溫培養下的珊瑚塊，在第二天即發現有纖毛蟲感染現象。未來將測試其他的纖毛蟲感染條件，以更精確的掌握纖毛蟲感染的機制。並且測試其他纖毛蟲是否在同樣情形下，也有造成珊瑚的感染情況。

# 第一章、前言

## 第一節、研究緣起與問題背景

珊瑚礁生態系統 (Coral reef) 是具有高生物多樣性和高生產力的區域，此系統支持重要的海洋生態和文化價值，更同時為社會提供顯著的經濟利益 (Hughes et al, 2003; Moberg and Folke, 1999)，而珊瑚的疾病一直是重要的研究課題。更由於全球暖化使得海水溫度的升高，可能會增加珊瑚礁發病的機會。珊瑚的疾病中，有很多是為纖毛蟲感染所引起的。因此，本研究將使用台灣常見的珊瑚種類，針對引起的珊瑚疾病的纖毛蟲進行研究。

在過去的幾十年裡，世界各地的珊瑚礁在結構和功能上都發生了重大變化 (Harvell et al. 1999, 2004, Hayes et al. 2001, Jackson et al. 2001, Wilkinson 2002, 2004, Gardner et al, 2003、Hoghes et al, 2003、Pandolfi et al, 2003)。許多其他環境的壓力下，包括過度捕撈或珊瑚礁生態系統附近地區的過度沿海開發，正在產生累積效應，導致觀察到的珊瑚礁健康下降 (Ban et al, 2014; Cinner et al, 2016; Harborne et al, 2017; Uthicke et al, 2016)。這些對珊瑚礁生態系統造成壓力的外力也是推動疾病爆發的主因之一，在某些地區已記錄到進一步加劇珊瑚喪失和棲息地結構的變化 (Bruno et al, 2007; Ruiz -Moreno et al, 2012)。珊瑚疾病已成為全球珊瑚礁生態系統的主要威脅之一，且珊瑚疾病已經被確定是早成珊瑚分布大幅衰退的原因之一。因此識別與珊瑚疾病相關的微生物群落對於進一步了解環境和氣候變化如何影響珊瑚疾病的流行至關重要性。

## 第二節、現況分析

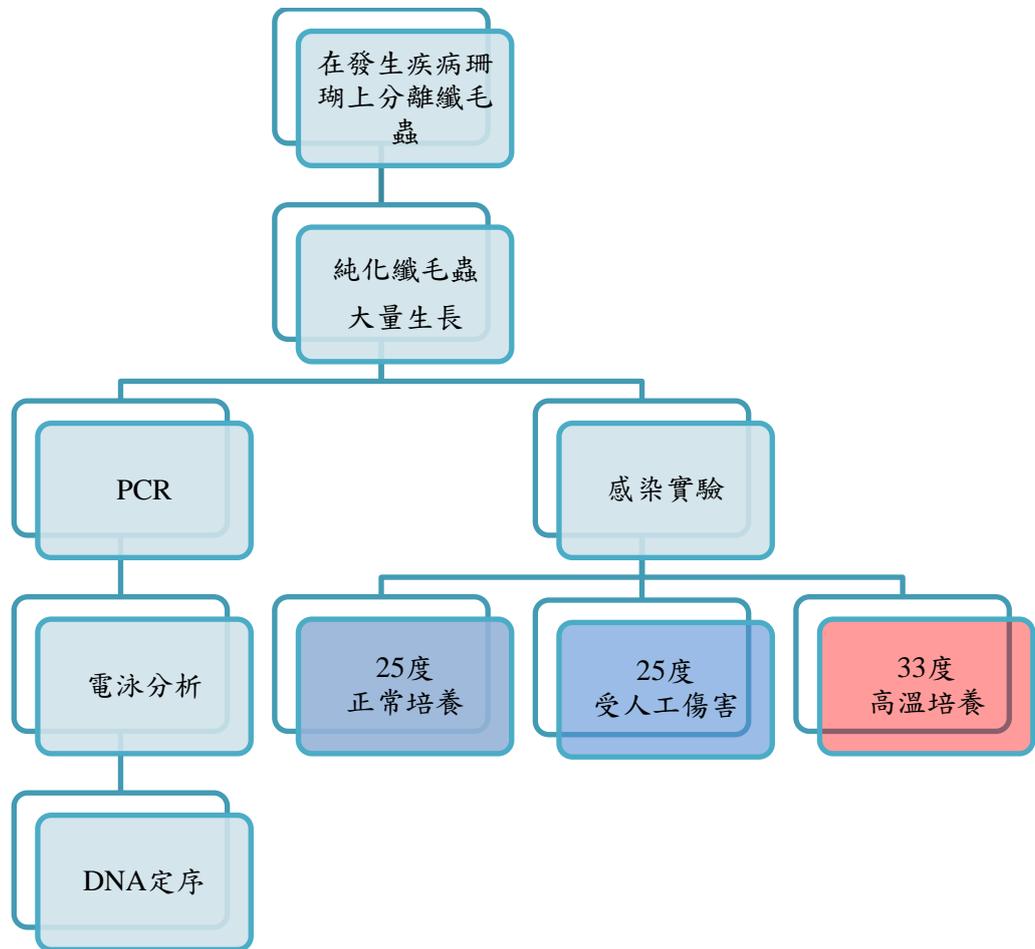
在過去的幾十年中，珊瑚礁數量下降的部分原因是突發性和高毒性珊瑚疾病的流行率增加（Goreau et al, 1998；Harvell et al, 1999；Richardson and Aronson, 2000）。珊瑚疾病被定義為宿主生理的暫時或永久性改變（Sutherland, Porter & Torres, 2004），通常與細菌（Garrett, & Ducklow, 1975；Ritchie & Smith, 1995；Richardson, 1998）、真菌有關（Le Champion-Alsumard, Golubic & Priess, 1995；Morrison-Gardiner, 2001；Ravindran, Raghukumar & Raghukumar, 2001）或不同微生物綜合體所產生的（Ducklow & Mitchell, 1979；Richardson, 1996）。然而，與原生生物(Protist)感染相關的疾病較少（Antonius & Lipscomb, 2000；Cróquer et, 2006）。在原生生物感染中，已經發現各種纖毛蟲所產生的珊瑚病相關疾病，例如骨骼侵蝕帶（skeletal eroding band）、棕帶病（Brown Band Disease）和加勒比纖毛蟲感染（Caribbean ciliate infections）。其中像是棕帶病的珊瑚疾病，會在珊瑚上形成一個棕色區域，棕色源自大量未知的纖毛蟲，通常夾在健康組織和暴露的白色骨骼之間，隨著珊瑚的健康狀況惡化，壞死組織可能會吸引纖毛蟲（Bourne et al.）。這表明纖毛蟲可能會在珊瑚健康受損後二次入侵，有研究指出纖毛蟲會在珊瑚外表面滑行並進入珊瑚蟲的腔腸和腔。纖毛蟲是在以活珊瑚組織為食的過程中攝取珊瑚的共生藻 *Symbiodinium*（即肉食性），因此在纖毛蟲體內會觀察到的高密度共生藻細胞，共生藻在纖毛蟲體內仍然具有光合作用能力，從而使原生動物能夠從光合產物中獲得額外的能量。被感染的珊瑚組織會發生腐爛甚至死亡。也有研究表明將不同品種的珊瑚同時保存在同一個魚缸中，如果發生纖毛蟲感染，珊瑚感染纖毛蟲後，會產生黃色或棕色的膠狀組織，纖毛蟲感染可在短時間內引起潰瘍、白化並且死亡，對珊瑚造成嚴重損害（Cheng et al. 2021）。

### 第三節、研究目的及研究重點

纖毛蟲是海洋中常見的原生生物，在許多其他海洋生物中都具有致病性 (Song 和 Wang, 1993; Bradbury, 1996年)，包括影響海洋哺乳動物如海豚和鯨魚的 Scuticociliatia ( Sniezek et al, 1995; Poynton et al, 2001; Song et al, 2009) 和影響蛤蜊等雙殼類 ( CremonTE and Figueras, 2004)。會對於珊瑚產生疾病的纖毛蟲種類至今已有一百餘種，在台灣發現被纖毛蟲所感染的珊瑚也時常發生，遭受到纖毛蟲感染的珊瑚會迅速的死亡，因此整個疾病的病程時間非常短暫 (二天至四天)，需要專業的研究人員進行精準的採樣以及培養。因此本研究希望從正在發生疾病的珊瑚身上迅速分離出纖毛蟲，並且進行詳細的鑑定。再進一步將纖毛蟲培養，對珊瑚重新進行感染實驗。檢視珊瑚在遭受到纖毛蟲感染的條件，並找出可能的感染機制。

#### 第四節、預期目標

實驗架構如圖一，包含兩個部分第一部分是以前單細胞分離技術挑選在珊瑚疾病發生中的纖毛蟲，並且進行辨認種類以及活體培養。第二部分是在針對不同狀態下的珊瑚（健康的珊瑚，高溫下的珊瑚以及受傷的珊瑚）進行纖毛蟲感染，找出纖毛蟲對珊瑚疾病的感染條件。期望未來能提出預防與提升對珊瑚礁生態系統健康的見解。

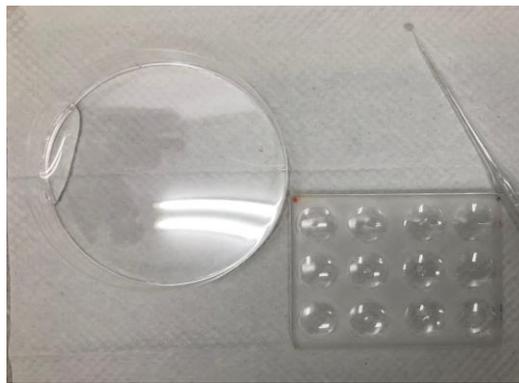


圖一、實驗架構

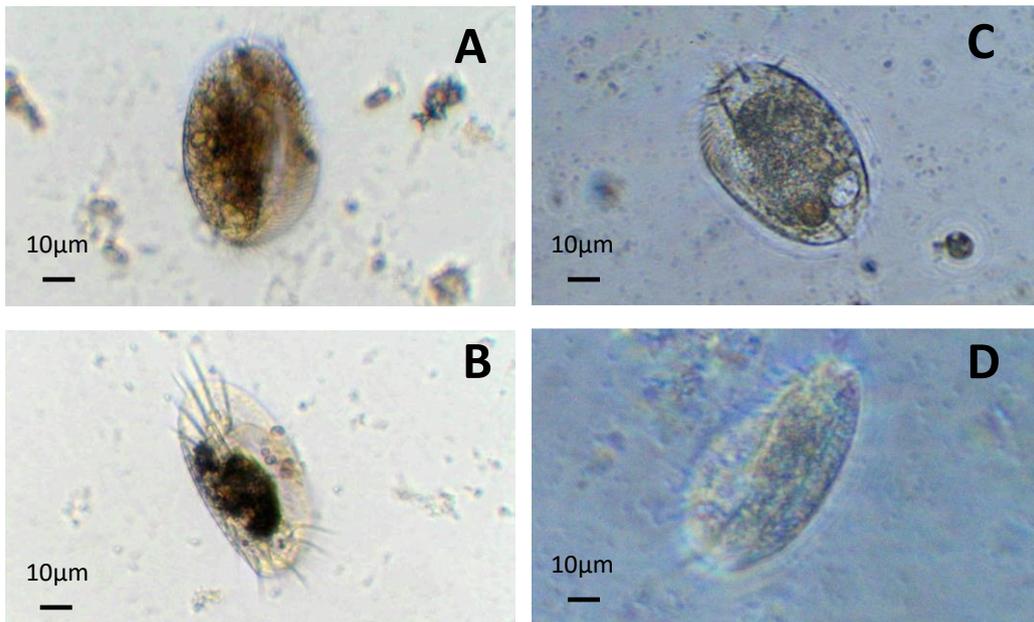
## 第二章、研究方法及過程

### 2.1、纖毛蟲純種培養

以單細胞分離技術挑選（圖二）在珊瑚疾病發生中的纖毛蟲，使用的方法是利用玻璃滴管將目標纖毛蟲（圖三）單隻挑出做培養。挑取出正在發生疾病珊瑚身上的纖毛蟲後，以海水素作為培養基，在 25 度下培養，在 12 小時光照與 12 小時黑暗狀況下，進行 14 天一次的繼代，到達一定數量後可以進行萃取 DNA 和聚合酶連鎖反應及珊瑚感染實驗。



圖二、單細胞分技術使用器具



圖三、以單細胞分技術所分離的纖毛蟲。

## 2.2 、DNA 萃取

將纖毛蟲培養液以 9,000 rpm 離心，去除上清液。將 pellet 加入 567  $\mu\text{L}$  的 TE buffer，再加入 30  $\mu\text{l}$  SDS ( sodium dodecyl sulfate, 最終濃度 0.25% ) 和 4  $\mu\text{L}$  RNase A ( 最終濃度  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  )，vortex 混合後，放入攝氏 37 度水浴槽一小時，水浴槽熱完後加入 3  $\mu\text{L}$  proteinase K ( $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ )，vortex 後攝氏 50 度水浴 30 分鐘，30 分鐘水浴完後將濾膜拿出，拿出後加入 100  $\mu\text{L}$  5M NaCl，再加入 80  $\mu\text{L}$  CTAB，混合後攝氏 65 度水浴 10 分鐘，10 分鐘水浴後加入 Chloroform 至八分滿，混合後，以攝氏 4 度 12,000 rpm 離心 5 分鐘，離心後取上清液至新的 1.5mL 離心管中，加入約 600  $\mu\text{L}$  的 phenol/Chloroform/isoamylalcohol (25:24:1)，vortex 混合，以攝氏 4 度 12,000 rpm 離心 5 分鐘，離心後再次取上清液至新的 1.5 mL 離心管中加入 360  $\mu\text{L}$  2-propanol 後，以室溫下 12,000 rpm 離心 5 分鐘，離心後去除上清液加入 70% ETOH 300  $\mu\text{L}$  再次以室溫下 12,000 rpm 離心 5 分鐘，離心後吸除多餘酒精，不再加入任何溶液以室溫 12,000 rpm 離心 5 分鐘，去除剩餘酒精，將離心管蓋子打開吸乾，風乾後加入 20  $\mu\text{L}$  sterilized  $\text{H}_2\text{O}$  保存於攝氏 4 度冰箱。使用超微量分光光度計 ( NanoDrop; Thermo Scientific ) 以波長 260 nm 和 280 nm 檢測 DNA 濃度與品質後即完成 DNA 產物樣品置備。

## 2.3 、聚合酶連鎖反應

接著進行聚合酶連鎖反應，先將 DNA 產物以 95 度 10 分鐘加熱。帶加熱完畢，加入已經配置好的 PCR mix ( 10X Tag buffer 5  $\mu\text{L}$ 、2.5 mM dNTP 4  $\mu\text{L}$ 、10 mM 1  $\mu\text{L}$ 、10mM R 1  $\mu\text{L}$ 、Tag enzyme 5v/ml 0.3  $\mu\text{L}$  )，最終體積為 50  $\mu\text{L}$  進行聚合酶連鎖反應。引子使用 EukA ( 5' AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT ) 以及 EukB ( TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC )，進行聚合酶連鎖反應的條件

為為: 95 °C 3 分鐘，進行 98°C 15 秒、 59°C 15 秒、72 °C 40 秒，32 個循環，最後 72 °C 10 分鐘，PCR 反應中止於 4°C。最後以 1.5% 的 Aragrose gel 以及 110 伏特進行 50 鐘。照膠檢視聚合酶連鎖反應的結果，發現有目標片段，將目標片段送交廠商進行定序。

#### 2.4、珊瑚感染實驗

將纖毛蟲過濾於 20 μm 濾網上，將 20 μm 濾網濾面朝下倒放至裝有 5 mL 過濾海水素六孔盤中，使纖毛蟲沉澱於過濾海水素中，隔天將濾網取出拍照觀察纖毛蟲空腹狀態，大約過 4 天即進行珊瑚感染。感染實驗錢，先進行纖毛蟲的計數，將 100 μL 的培養液置於載玻片上，加入 5 μL 固定液 Glutaraldehyde，等待 3-5 分鐘後進行計數。

珊瑚感染實驗將測試不同狀態下的珊瑚，被纖毛蟲感染的情況。第一、健康的珊瑚。第二、受傷的珊瑚。第三、高溫狀態下的珊瑚。感染實驗開始將一培養盤中的六個格子各放置一塊珊瑚塊，其中三個格子添加相等數量纖毛蟲，而另外三個格子不添加纖毛蟲，作為控制組。另一培養盤，同樣的各放入一塊珊瑚塊，其中三個格子的珊瑚塊以人為傷害方式為使用鑷子尖端尖銳的部分刮下珊瑚表共生藻、珊瑚組織等，使珊瑚表面呈不完整，再進行珊瑚感染。控制組同樣以人為傷害方式製造傷口，但不添加纖毛蟲。將此兩盤培養盤均培養在 25°C 的狀態下。第三組是為高溫下的珊瑚進行感染，將培養盤六個格子各放置一塊珊瑚塊後，其中三個格子添加相等數量纖毛蟲，接著將培養盤放入 33°C 中培養。所有感染實驗在第一天至第九天皆做拍照並紀錄變化。

### 第三章、結果與討論

#### 3.1、DNA定序

本次實驗成功分離出兩種纖毛蟲。經過 DNA 萃取與聚合酶連鎖反應，再將目標片段交付廠商進行定序。以 NCBI 資料庫進行種類確認後，單離出的纖毛蟲分別與 *Euplotes parkei* (圖四A) 和 *Euplotes vannus* (圖四B) 具有極高的相似的。

**A**

Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show	100
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession					
<input checked="" type="checkbox"/> Euplotes parkei macronuclear partial 18S rRNA gene, strain SM1	<a href="#">Euplotes parkei</a>	1888	1888	100%	0.0	99.90%	1836	<a href="#">AJ305247.1</a>					

**B**

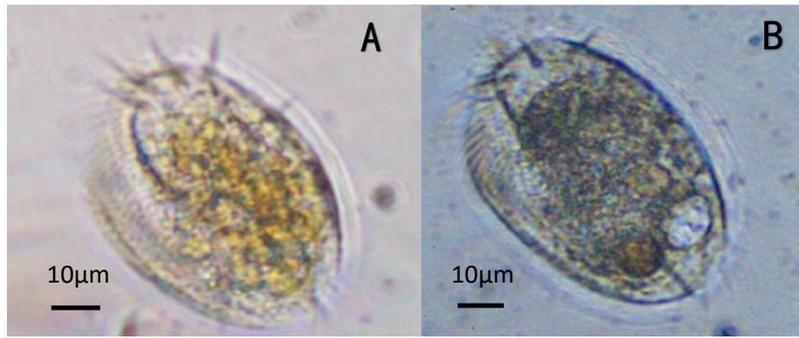
Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show	100
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession					
<input checked="" type="checkbox"/> Euplotes vannus strain CM4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">Euplotes vannus</a>	1727	1727	100%	0.0	97.10%	1847	<a href="#">AY361848.1</a>					

圖四、以定序結果進行 NCBI 資料庫的比對。

#### 3.2、珊瑚感染實驗

以倒立式顯微鏡檢視纖毛蟲空腹前後腹部的差別，結果顯示並沒有明顯的看到體內的內容物減少現象 (圖五)。未來可使用螢光顯微鏡，或許較能夠看出纖毛蟲是否有將所飼食的共生藻消化掉情形。

在進行第一次珊瑚感染實驗時候，經過 25 度下，分別兩次的無空腹 (表一) 和空腹纖毛蟲感染正常健康珊瑚 (表二) 皆未發現纖毛蟲有造成珊瑚礁疾病的現象，添加纖毛蟲數量在 46 至 50 cells mL<sup>-1</sup>。但有發現纖毛蟲會聚集在珊瑚底部周圍的現象 (圖六)，顯示珊瑚帶給纖毛蟲某些營養，但是珊瑚本身具有對抗纖毛蟲的能力，因而在正常的健康珊瑚上並未看纖毛蟲。



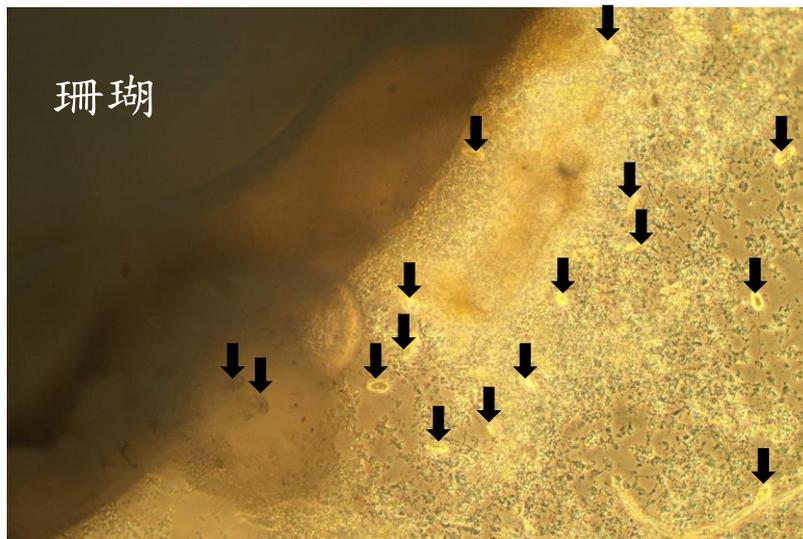
圖五、倒立式顯微鏡下，纖毛蟲空腹前 (A) 與後 (B) 的照片。

表一、於 25 度下，無進行空腹的纖毛蟲感染珊瑚塊情況。

實驗方法/感染天數	第一天	第三天	第五天
Control			
25度+纖毛蟲			

表二、海水溫度25度下，以空腹纖毛蟲感染珊瑚塊情形。

實驗方法/感染天數	第一天	第三天	第五天
Control			
25度+纖毛蟲			

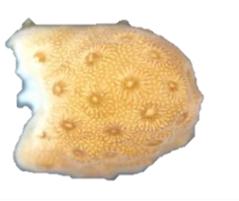
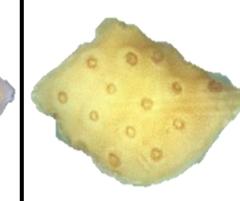


圖六、纖毛蟲(黑色箭頭)有聚集在珊瑚底部周圍現象。

第二次實驗，改以空腹纖毛蟲感染 25 度正常健康珊瑚（表三）和受人工傷害珊瑚（表五）以及 33 度下未受人工傷害的珊瑚塊（表六）。在表三中，至第五天並沒有觀察到珊瑚塊具有感染現象，且珊瑚狀況與控制組（無添加纖毛蟲）相同。

在受人工傷害的組別，在傷口處理過後，珊瑚表面具有明顯的傷痕（表四）。但培養至第五天，珊瑚傷口復合，且無纖毛蟲感染現象（表五）。最後一組的加溫組別（表六），珊瑚在控制組（無添加纖毛蟲）中，在第五天有明顯白化，且組織脫落現象，實驗組亦相同。且並未發現纖毛蟲有造成珊瑚礁疾病的現象。此次添加纖毛蟲數量  $5 \text{ cells mL}^{-1}$ ，推測可能是纖毛蟲數量添加過少，以致於並未看到感染現象。

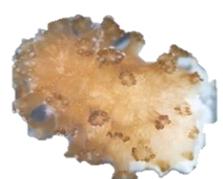
表三、於 25 度下，以空腹纖毛蟲感染珊瑚塊情形。

實驗方法/感染天數	第一天	第三天	第五天
Control			
25度+纖毛蟲			

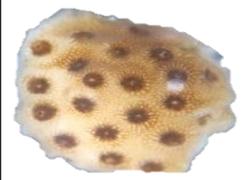
表四、在製造人工傷口前與後珊瑚的情況。



表五、於 25 度下，以空腹纖毛蟲感染具有人工傷口的珊瑚塊情形。

實驗方法/感染天數	第一天	第三天	第五天
Control			
25度+纖毛蟲			

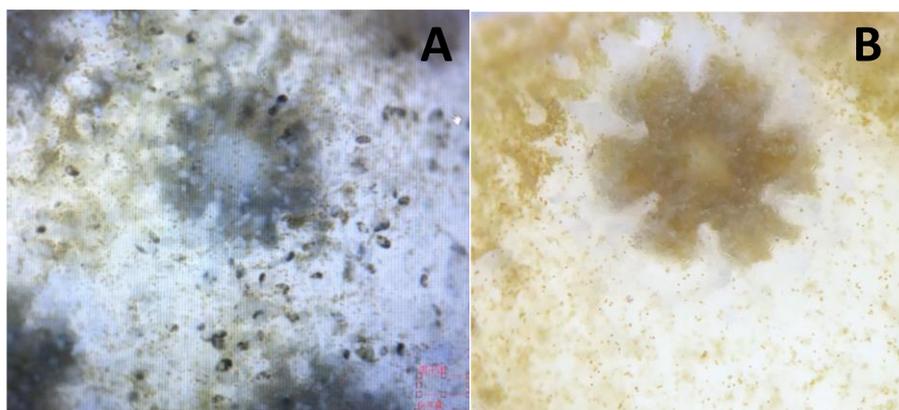
表六、於海水溫度 33 度下，以空腹纖毛蟲感染珊瑚塊情形。

實驗方法/感染天數	第一天	第三天	第五天
Control			
33度+纖毛蟲			

因此，在後續實驗，試著增加感染實驗中所添加的纖毛蟲數量。調整至添加 72 至 143 cells mL<sup>-1</sup>的纖毛蟲數量。結果發現，以25度的海水溫度培養的珊瑚塊，添加纖毛蟲後，於第五天觀察到感染現象。控制組珊瑚塊則是情況良好。而在受人工傷害的珊瑚塊於第三天觀察到感染現象（表七）。與控制組相比，珊瑚白化程度高。且控制組中，珊瑚塊的人共傷口有復原現象，但實驗組的珊瑚塊傷口無復原現象（表八）。

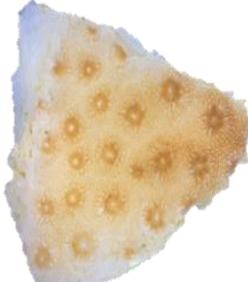
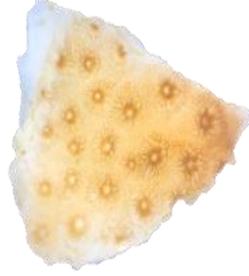
最後，在高溫 33 度下，實驗組的珊瑚塊在第二天即發生纖毛蟲感染現象（表九）。第三天時，珊瑚明顯的有組織脫落與白化現象。而控制組中，珊瑚在第五天才有明顯的白化現象。

在整個珊瑚感染時期中，本研究發現在開始纖毛蟲感染現象初期時，會有明顯的纖毛蟲聚集在珊瑚組織上方現象（圖七），但在大約離開始感染的兩天至三天後，此聚集現象就會減少（圖八）。



圖七、纖毛蟲聚集珊瑚表面現象明顯時 (A)，以及聚集現象減少時 (B)。

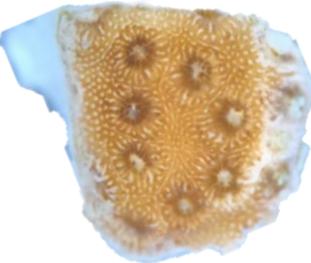
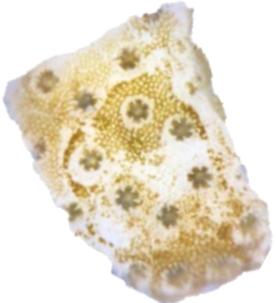
表七、於 25 度下，以空腹纖毛蟲感染珊瑚塊情形。

實驗方法/感染天數	第一天	第三天	第五天	第七天	第九天
Control					
25度+纖毛蟲					

表八、於 25 度下，以空腹纖毛蟲感染具有人工傷口的珊瑚塊情形。

實驗方法/感染天數	第一天	第三天	第五天	第七天	第九天
Control					
25度+纖毛蟲 +人工傷傷害					

表九、於 33 度下，以空腹纖毛蟲感染珊瑚塊情形。

實驗方法/感染天數	第一天	第三天	第五天	第七天	第九天
Control					
33度+纖毛蟲					

## 第四章 、結論

本實驗成功將兩種在珊瑚感染情況發生時的纖毛蟲做單離培養、為兩種未曾具有紀錄過，且具有感染珊瑚現象的纖毛蟲。按照原定計畫，本實驗成功讓珊瑚產生纖毛蟲的感染現象。

經過空腹四天後，纖毛蟲體內雖然沒有明顯的內容物減少現象，但在添加 72 至 143 cells mL<sup>-1</sup> 的纖毛蟲數量下，於 3 種珊瑚況狀的條件下（健康的珊瑚，高溫下的珊瑚以及受傷的珊瑚），皆會發生纖毛蟲感染狀況，這說明要感染需要一定的纖毛蟲數量。未來將測試更多的纖毛蟲感染條件，以更精確的掌握纖毛蟲感染的機制。並進行其他種類纖毛蟲的珊瑚感染實驗。

## 第五章、參考資料

Acosta, A. "Disease in zoanths: dynamics in space and time." *Hydrobiologia* (2001)460:113-130.

Alejandra Verde, Carolina Bastidas, and Aldo Croquer. "Tissue mortality by Caribbean ciliate infection and white band disease in three reef-building coral species eerJ." (2016): 4: e2196.

Bradbury PC. Pathogenic ciliates. In: Hausmann K, Bradbury PC, editors. "Ciliates: Cells as Organisms. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag" (1996): 463–477.

Cremonte F, Figueras A. (Parasites as possible cause of mass mortalities of the critically endangered clam *Mesodesma mactroides* on the Atlantic coast of Argentina.) *Bull Eur Assoc Fish Pathol.* (2004):24:166–171.

Chan Y-F, Moestrup Ø, Chang J. "On *Keelungia pulex* nov. gen. et nov. sp., a heterotrophic euglenoid flagellate that lacks pellicular plates (Euglenophyceae, Euglenida)." *Eur J Protistol*(2013) 49: 15-31.

Chiu-Min Cheng, Yu-Rong Cheng, De-Sing Ding, Ya-Ting Chen, Wei-Ting Sun, and Chih-Hung Pan. "Effects of Ciliate Infection on the Activities of Two Antioxidant Enzymes (SOD and CAT) in Captive Coral (*Goniopora columna*) and Evaluation of Drug Therapy *Biology (Basel)*." (Nov. 2021): 1216.

Ducklow & Mitchell Ducklow HW, Mitchell R. "Bacterial populations and adaptations in the mucus layers on living corals1." *Limnology and Oceanography.* (1979);24(4):715–725.

David G. Bourne, Holly V. Boyett, Meegan E. Henderson, Andrew Muirhead, and Bette L. Willis "Identification of a Ciliate (Oligohymenophorea: Scuticociliatia) Associated with Brown Band Disease on Corals of the Great Barrier Reef ." *Appl Environ Microbiol.* 2008 Feb; 74(3): 883–888.

Dajun Qiu, Liangmin Huang, Hui Huang, Jianhui Yang, and Senjie Lin. “Two Functionally Distinct Ciliates Dwelling in *Acropora* Corals in the South China Sea near Sanya, Hainan Province, China.” Appl Environ Microbiol. 2010 Aug; 76: 5639–5643.

Green & Bruckner (2000) Green EP, Bruckner AW. “The significance of coral disease epizootiology for coral reef conservation.: *Biological Conservation*. 2000;96(3):347–361. doi: 10.1016/S0006-3207(00)00073-2.

Goreau et al. (1998) Goreau T, Cervino J, Goreau M, Hayes R, Hayes M, Richardson L, Smith G, DeMeyer K, Nagelkerken I, Garzon-Ferrera J, Gil D, Garrison G, Williams EH, Bunkley-Williams L, Quirolo C, Patterson K, Porter JW, Porter K. “Rapid spread of diseases in Caribbean coral reefs.” *Revista de Biología Tropical*. 1998;46:151–171.

Garrett, & Ducklow (1975) Garrett P, Ducklow H.: Coral diseases in Bermuda.” *Nature*. 1975;253:349–350. doi: 10.1038/253349a0.

Gil-Agudelo, Smith & Weil (2006) Gil-Agudelo DL, Smith GW, Weil E. “The white band disease type II pathogen in Puerto Rico.” *Revista de Biología Tropical*. 2006;54:59–67.

Hanaka Mera and David G.” Bourne .Disentangling causation: complex roles of coral-associated microorganisms in disease *Environmental Microbiology*.” (2018)20(2), 431–449 doi:10.1111/1462-2920.13958

Harvell, C. D., C. E. Mitchell, J. R. Ward, S. Altizer, A. P. Dobson, R. S. Ostfeld, and M. D. Samuel. 2002.” Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota”. *Science* 296:2158-2162.

Hoegh-Guldberg, O. 1999. “Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs.” *Mar. Freshw. Res.* 50:839-866.

Harvell et al. (1999) Harvell CD, Kim K, Burkholder JM, Colwell RR, Epstein PR, Grimes DJ, Hofmann EE, Lipp EK, Osterhaus ADME, Overstreet RM, Porter JW, Smith GW, Vasta GR.” Emerging marine diseases-climate links and anthropogenic

factors.” *Science*. 1999;285:1505–1510. doi: 10.1126/science.285.5433.1505.

Hughes, T. P., A. H. Baird, D. R. Bellwood, M. Card, S. R. Connolly, C. Folke, R. Grosberg, O. Hoegh-Guldberg, J. B. C. Jackson, J. Kleypas, J. M. Lough, P. Marshall, M. Nystrom, S. R. Palumbi, J. M. Pandolfi, B. Rosen, and J. Roughgarden. 2003. “Climate change, human impacts and the resilience of coral reefs.” *Science* 301:929-933.

Michael Sweet and John Bythell. “Ciliate and bacterial communities associated with White Syndrome and Brown Band Disease in reef-building corals.” *Environ Microbiol.* 2012 Aug; 14: 2184–2199.

Poynton SL, Whitaker BR, Heinrich AB. A novel trypanoplasm-like flagellate *Jarrellia atramenti* ng., nsp (Kinetoplastida: Bodonidae) and ciliates from the blowhole of a stranded pygmy sperm whale *Kogia breviceps* (Physeteridae): morphology, life cycle and potential pathogenicity.” *Dis Aquat Organ.* 2001;44:191–201.

Ritchie & Smith (1995) Ritchie KB, Smith GW. “Preferential carbon utilization by surface bacterial communities from water mass, normal, and white-band diseased *Acropora cervicornis*.” *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1995;4(4):345-352.

Ravindran, Raghukumar & Raghukumar (2001) Ravindran J, Raghukumar C, Raghukumar S. “Fungi in *Porites lutea*: association with healthy and diseased corals.” *Diseases of Aquatic Organisms*. 2001;47(3):219–228. doi: 10.3354/dao047219.

Richardson (1996) Richardson LL. “Horizontal and vertical migration patterns of *Phormidium corallyticum* and *Beggiatoa spp.* associated with black-band disease of corals”. *Microbial Ecology*. 1996;32(3):323–335.

Sutherland, Porter & Torres (2004) Sutherland KP, Porter JW, Torres C. “Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellate corals.” *Marine Ecology Progress Series*. 2004;266:273–302. doi: 10.3354/meps266273

Song W, Wang M. “A brief revision of disease-causing ciliates (Protozoa: Ciliophora)

from marine culture water bodies.” *Mar Sci (Beijing)* 1993;4:41–47.

Snieszek JH, Coats DW, Small EB. *Kyaroikeus-Cetarius* N-G, N-Sp – “a parasitic ciliate from the respiratory-tract of Odonticete Cetacea.” *J Eukaryot Microbiol.* 1995;42:260–268.

Song JY, Kitamura SI, Oh MJ, Kang HS, Lee JH, Tanaka SJ, Jung SJ. “Pathogenicity of *Miamiensis avidus* (syn. *Philasterides dicentrarchi* *Pseudocohnilembus persalinus*, *Pseudocohnilembus hargisi* and *Uronema marinum* (Ciliophora, Scuticociliatida)” *Dis Aquat Organ.* 2009;83:133–143.

OAC-SCU-111-011

探討纖毛蟲形成珊瑚疾病的機制研究

期末報告

海洋委員會