

OAC-114-017 (研究報告)

**魚類抗菌胜肽應用在珊瑚纖毛蟲疾病防治之研究**  
**(成果報告)**

**海洋委員會補助研究**

**中華民國 114 年 8 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-114-017 (研究報告)

**魚類抗菌胜肽應用在珊瑚纖毛蟲疾病防治之研究**  
**(成果報告)**

學校：國立高雄科技大學

指導教授：潘婕玉

學生：江伯鴻

研究期程：中華民國 114 年 4 月至 114 年 10 月

研究經費：新臺幣 101,000 元

**海洋委員會補助研究**

**中華民國 114 年 8 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」

「本研究報告絕無侵害他人智慧財產權之情事，如有違背自負民、刑事責任」

# 目錄

目錄.....	i
表次.....	iii
圖次.....	iv
摘要.....	v
第一章 前言.....	1
第一節 研究緣起與問題背景.....	1
1-1 研究緣起.....	1
1-2 問題背景.....	2
第二節 現況分析.....	4
第三節 研究目的.....	6
第四節 研究重點及預期目標.....	7
4-1 計畫建立珊瑚纖毛蟲病原純化與抗菌胜肽備製平台.....	7
4-2 驗證魚類抗菌胜肽在珊瑚纖毛蟲病防治之應用可行性.....	7
第二章 研究方法及過程.....	8
第一節 研究方法與原因.....	8
第二節 纖毛蟲純化培養與鑑定.....	9
2-1 纖毛蟲純化培養.....	9
2-2 纖毛蟲鑑定.....	10
2-3 珊瑚纖毛蟲生長實驗.....	11
第三節 抗菌胜肽.....	12
第四節 珊瑚樣本.....	13
4-1 第一階段：珊瑚纖毛蟲短時間毒殺實驗.....	13
4-2 第二階段：珊瑚纖毛蟲長時間毒殺實驗.....	13
第五節 組織切片.....	14

第六節 統計分析 .....	14
第三章 結果與討論 .....	15
第一節 珊瑚纖毛蟲之鑑定與形態學觀察 .....	15
第二節 草皮珊瑚 poly p 餵食數量多寡於 <i>Scuticociliatia</i> sp. 的生長差異 .....	17
第三節 <i>Scuticociliatia</i> sp. 短時間毒殺實驗 .....	19
第四節 <i>Scuticociliatia</i> sp. 長時間毒殺實驗 .....	21
第四章 結論 .....	23
參考文獻 .....	24

## 表次

表 1、水質參數.....	9
表 2、引子序列.....	10
表 3、投餵一顆珊瑚蟲 (poly p) 之增殖數量.....	18
表 4、投餵三顆珊瑚蟲 (poly p) 之增殖數量.....	18
表 5、不同濃度抗菌勝肽 TP3 對珊瑚纖毛蟲之完全致死時間結果表 .....	19

## 圖次

圖 1、珊瑚纖毛蟲攝食前後型態 .....	15
圖 2、 <i>Scuticociliatia</i> sp.細胞膜表面破裂示意圖 .....	20
圖 3、抗菌胜肽 TP3 之於珊瑚纖毛蟲 LC <sub>50</sub> 統計結果圖 .....	22

## 摘要

珊瑚礁是最具生物多樣性的海洋生態系，近年受到氣候變遷、污染及病原體感染等多重壓力威脅，其中由纖毛蟲 (*Scuticociliatia* sp.) 引起的疾病已成為珊瑚大規模衰退與死亡的重要因素。

本研究旨在評估魚類抗菌肽 (Tilapia piscidin 3, TP3) 於珊瑚纖毛蟲防治上的應用潛力。本文成功從患病珊瑚組織中分離並純化鑑定與 *Scuticociliatia* sp. 相近的珊瑚纖毛蟲，並建立其培養與感染模式。透過不同暴露時間的毒殺實驗，評估不同濃度 TP3 對纖毛蟲的抑制效果，結果顯示，TP3 在高濃度下可於 2 分鐘內迅速破壞纖毛蟲細胞膜並致死；低濃度條件下亦可於數小時內完全致死。進一步分析計算得到 TP3 對 *Scuticociliatia* sp. 的半致死濃度 (LC<sub>50</sub>) 為 614.60 ppm。組織切片結果顯示，以 LC<sub>50</sub> 濃度處理後，受感染的草皮珊瑚 (*Briareum violacea*) 組織壞死顯著減輕，證實了 TP3 具有抑制纖毛蟲感染及降低珊瑚損傷的效果。

整體而言，本研究證實來自吳郭魚的抗菌肽 TP3 具備高效、快速且具專一性的殺滅珊瑚纖毛蟲能力，展現其作為天然抗纖毛蟲候選藥物的應用潛力，並為未來珊瑚疾病防治及水族健康管理提供新方向與應用前景。

關鍵詞：珊瑚、抗菌肽、寄生蟲、纖毛蟲

# 第一章 前言

## 第一節 研究緣起與問題背景

### 1-1 研究緣起

珊瑚礁生態系是全球生物多樣性最豐富的海洋生態系之一，不僅為超過四分之一的海洋物種提供棲息地，更具有極高的生態、經濟與科學價值。然而，近年來全球氣候變遷、海洋污染及海洋酸化等環境壓力持續加劇，導致珊瑚面臨前所未有的威脅。其中，疾病的流行已成為珊瑚衰退的主要因素之一。珊瑚疾病不僅限於細菌感染，還包括多種低等無脊椎動物如扁形動物、海蛞蝓、寄生蟲，以及高等掠食者如部分魚類等造成的組織傷害與繼發性感染（Sella and Benayahu 2010；Rocha *et al.*, 2013；Sun *et al.*, 2024）。這些病原體的作用不僅削弱了珊瑚的免疫能力，更加速其退化與死亡，進一步擴大對整體珊瑚礁系統的負面影響。

## 1-2 問題背景

於眾多病原體中以纖毛蟲 (Ciliates) 為主的寄生性原生動物對珊瑚所造成的感染為最大宗，此現象已成為全球性關注的重大議題。根據 Ruiz-Moreno 等人 (2012) 的研究顯示，在加勒比海與太平洋地區約有超過 10% 的珊瑚礁受到纖毛蟲感染。當纖毛蟲入侵珊瑚組織後，會以共生藻 (*Symbiodinium*, 即蟲黃藻) 為食，造成珊瑚體內藻數快速下降，進而影響珊瑚的營養來源與光合作用之效率。Ulstrup 等人 (2007) 證實，纖毛蟲體內可偵測到共生藻細胞，為其攝食行為提供直接證據。此種寄生關係若再合併細菌等次級感染，將對珊瑚健康產生疊加性的破壞作用，導致組織潰爛，進而快速死亡。

纖毛蟲相關的珊瑚疾病種類繁多，最早報導的為骨骼侵蝕帶症 (Skeleton Eroding Band, SEB) (Antonius, 2000)，其後相繼發現如白帶病 (White Band Disease, WBD)、褐帶病 (Brown Band Disease, BB) 及加勒比纖毛蟲感染症 (Caribbean Ciliate Infections, CCI) 等病徵 (Sweet *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2021)。這些疾病往往在短時間內快速進展，其中感染後 72 小時內即可能導致珊瑚組織廣泛潰爛並死亡，速度遠高於珊瑚自身的修復與再生能力 (Page and Willis, 2008)。

此外，纖毛蟲的寄生能力具高度非專一性，能感染多種珊瑚種類。例如，*Philaster lucinda* 已被證實可寄生於 *Acropora muricata*、*Goniopora columna*、*Lemnalia flava*、*Heteroxenia pinnata* 與 *Briareum violacea* 等多種硬、軟珊瑚，顯示其感染範圍之廣 (Cheng *et al.*, 2021)。受到感染後的珊瑚經組織學切片觀察，可見其組織內產生嚴重空泡化 (vacuolization) 現象，此為典型的病理特徵之一。根據澳洲大堡礁的最新調查結果顯示，約 2% 的石珊瑚與軟珊瑚遭受 SEB 病變影響，造成珊瑚組織潰爛與死亡，顯示此類疾病的實際流程度可能被低估。

纖毛蟲的高度傳播性與致死性不僅對野外珊瑚礁系統構成威脅，在人工養殖系統中亦造成相當大的損失。隨著珊瑚養殖技術的發展，珊瑚已廣泛應用於水族造景、復育移植與珊瑚藥用物質開發等領域。然而，纖毛蟲疾病的發生常導致整缸珊瑚迅速死亡，不僅對產業發展造成衝擊，也使復育計畫功虧一簣。因此，尋找有效且環境友善的治療方式，成為目前珊瑚健康管理的迫切需求。

傳統上對抗珊瑚寄生蟲的處理方式多仰賴化學藥劑，如高濃度碘、氯化物或福馬林等，但這些藥物往往具珊瑚毒性，可能導致色素流失、組織壞死甚至整體死亡，且易對缸體中其他生物或環境造成二次污染。此外，部分病原體已出現抗藥性現象，使得傳統藥劑的療效逐漸下降。因此，開發兼具「高專一性」、「低毒性」與「環境相容性」的新型療法，已成為珊瑚疾病防治的核心課題之一。

近年來，抗菌勝肽（Antimicrobial Peptides, AMPs）因其廣泛的抗微生物作用、低抗藥性風險及良好的生物相容性，被視為新世代的生物製劑選項。在魚類、蝦類等水產動物上已有應用案例，皆展現出良好之免疫促進與抗寄生蟲效果。而陽離子型抗菌勝肽因其能與病原體的細胞膜結合並導致膜破裂，更被認為具有潛在的抗纖毛蟲活性。若能成功導入 AMPs 作為珊瑚抗寄生蟲的應用材料，將可能開創一條生物安全性高且具商品化潛力的新型治療模式，對珊瑚產業與海洋生態保育皆具有深遠意義。

## 第二節 現況分析

珊瑚因其繽紛色彩與特殊外觀，廣泛應用於海水觀賞缸與水族造景，具有極高的觀賞性與經濟價值。然而，纖毛蟲感染已成為珊瑚養殖過程中最具破壞性的疾病之一，可在短時間內導致組織潰爛甚至整體死亡，對人工養殖系統造成嚴重損失，更對自然珊瑚礁生態系造成潛在威脅，進而影響生物多樣性與海洋生態平衡。目前市面上雖有部分化學藥劑用於治療寄生蟲感染，但常伴隨對珊瑚本體的毒性、副作用或對色澤與型態造成不可逆的損害，限制其實務應用。

珊瑚礁被譽為「海洋中的熱帶雨林」，在全球海洋生態系中扮演極為關鍵的角色。儘管珊瑚礁僅覆蓋全球海底面積的約 0.1% 至 0.5%，卻孕育了超過 25% 的海洋生物物種，包括魚類、甲殼類、軟體動物與棘皮動物等，是地球上物種多樣性最為集中的生態系統之一 (Moberg and Folke, 1999)。目前全球約有三分之一的已知海洋魚類與珊瑚礁生境相關，顯示其對維持生物多樣性與食物網結構的重要性。

在漁業資源方面，珊瑚礁區域每年提供全球約 10% 的海洋漁獲量，為沿海社區提供重要的經濟收益與蛋白質來源。全球超過 100 個國家擁有珊瑚礁沿岸，當中許多發展中的國家更是依賴珊瑚礁作為主要的生計基礎與糧食來源。珊瑚礁同時也為大量幼魚與浮游生物提供庇護與育成場域，具有重要的「育幼場」功能，有效促進魚類族群更新與維持區域性漁業穩定。

除了漁業價值外，珊瑚礁在沿岸防護與災害緩衝方面亦發揮不可忽視的作用。其立體結構能有效消散海浪能量，減緩颱風、海嘯與風暴潮對海岸線的直接衝擊，進而減少土壤侵蝕與基礎建設的損壞風險。根據近年研究指出，健全的珊瑚礁系統可減少高達 97% 的波浪能量，有效保護島嶼與低窪沿海地區 (Huang *et al.*, 2024)。

隨著海洋生物活性物質研究的蓬勃發展，在醫藥與生物科技方面，珊瑚及其共生微生物逐漸成為天然藥物開發的重要來源。珊瑚體內或附著於其表面的微生物可產生多種具有抗菌、抗病毒、抗癌與抗發炎活性的化合物，已被應用於癌症藥物、免疫調節劑及抗老化產品的開發，展現極高的商業潛力與學術價值。此外，某些石珊瑚的骨骼因具良

好的生物相容性與孔隙結構，也被用於牙科與骨科移植材料的替代來源。

若從生態保育與永續發展的觀點來頗析，珊瑚礁具備重要的「自然資本」功能，不僅支撐全球上億人的生活與經濟活動，也對氣候調節、水質淨化與碳循環具有深遠影響。健康的珊瑚礁系統能協助吸收二氧化碳、穩定海洋碳平衡，並與紅樹林、海草床共同構築藍碳（Blue Carbon）儲存體系，有助於全球氣候變遷的調適與減緩。

綜上所述，珊瑚及其構築的珊瑚礁系統在生態、經濟、科技與環境保護等層面皆具有不可替代的重要性。面對日益加劇的氣候變遷與病害威脅，對珊瑚健康的維護與疾病防治研究不僅具有保育價值，更關乎全球海洋資源與人類永續發展的核心利益。

### 第三節 研究目的

故本研究旨在探討陽離子型抗菌胜肽 (Antimicrobial Peptides, AMPs) 作為替代性防治手段的可行性。AMPs 具備廣譜抗微生物特性，近年亦顯示出對多種原蟲與寄生性纖毛蟲的抑制潛力，且相較於傳統藥劑，更具專一性與環境友善性。

同時本研究將評估特定陽離子抗菌胜肽對珊瑚纖毛蟲的抑制效果，同時針對珊瑚個體的生理反應、安全性與外觀維持進行系統性分析，期能建立一套兼具療效與觀賞價值維護之新型珊瑚殺蟲劑應用模式，為未來珊瑚疾病防治提供可行且具商品化潛力的創新策略。

## 第四節 研究重點及預期目標

### 4-1 計畫建立珊瑚纖毛蟲病原純化與抗菌胜肽備製平台

本研究首要目標為建立珊瑚纖毛蟲病原的純化、鑑定與穩定培養技術。透過分離自患病珊瑚組織之纖毛蟲 (*Philaster lucinda*)，對其進行顯微觀察與委託生技公司進行基因鑑定 (18S rRNA 及纖毛蟲特異性引子 nested PCR)

### 4-2 驗證魚類抗菌胜肽在珊瑚纖毛蟲病防治之應用可行性

本研究第二項預期目標為針對魚類抗菌胜肽於珊瑚病原感染模型中的實際應用潛力進行驗證。首先，將建立人工感染模式，利用純化之珊瑚纖毛蟲感染代表性珊瑚物種 (如 *Briareum violacea*、*Acropora muricata*)，模擬自然病害過程。接續分組施用不同濃度之抗菌胜肽，觀察其在感染後各時間點對珊瑚纖毛蟲密度抑制率、珊瑚組織壞死延緩程度、共生藻恢復與珊瑚色澤等生理指標的影響。

最終目標為驗證此類胜肽是否能作為低毒性、非抗藥性且具專一性的珊瑚專用殺蟲劑候選物，提供未來珊瑚疾病管理一條全新且可實務化的生物製劑路徑，並有助於海洋生態系保育與人工珊瑚養殖之永續發展。

## 第二章 研究方法及過程

### 第一節 研究方法與原因

迄今為止，已在人工環境下成功繁殖及養殖多種珊瑚，本研究將選用 *Briareum violacea* 珊瑚來做試驗。目的是為了探討魚類抗菌胜肽是否可應用在珊瑚纖毛蟲疾病預防以應用在海洋珊瑚礁疾病防治應用上。

在魚類抗菌胜肽的選用方面，本團隊採用先前研究證實源自吳郭魚之可有效毒殺病原的抗菌胜肽。本實驗分為二部分進行，第一部分為纖毛蟲之鑑定與純化，第二部分為魚類抗菌胜肽對珊瑚纖毛蟲毒殺之效果，以此評估珊瑚組織損傷與緊迫之應用，以達到有效的疾病控管與珊瑚礁生態永續。

## 第二節 纖毛蟲純化培養與鑑定

### 2-1 纖毛蟲純化培養

樣本來自 TCK 珊瑚繁殖場（臺灣屏東）的草皮珊瑚（*B.violacea*）。纖毛蟲自珊瑚患病組織使用無菌海水沖洗後放置在 50 mL 的無菌海水中，分離方法參照先前文獻（Ding *et al.*, 2022；Sweet & Séré, 2016）。於滅菌試管中加入 10 mL 滅菌海水以培養珊瑚纖毛蟲，每天餵食 *B.violacea* 的珊瑚蟲（poly p）或無菌培養的蟲黃藻（*Zooxanthella*），投餵量為  $5 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$ （Cheng *et al.*, 2021）。於培養過程中使用顯微鏡（Leica DM500，400 倍）觀察珊瑚纖毛蟲體內是否有蟲黃藻殘留及其密度。每週使用滅菌海水置換一半水量，以確保水質穩定。期間使用顯微鏡觀察純化培養的珊瑚纖毛蟲形態，並拍攝記錄；培養珊瑚纖毛蟲所用之水質參數如表 1 所示（Cheng *et al.*, 2021）。

最後，將已純化的珊瑚纖毛蟲擴大培養。自含有純化珊瑚纖毛蟲的海水中取出 5 mL 液體，移至 25 mL 錐形瓶並加入 15 mL 的滅菌海水，每天投餵 *B.violacea* 的 poly p 並使用光學顯微鏡（Leica DM500）進行觀察，每週使用滅菌海水置換一半水量，以確保水質穩定。

表 1、水質參數

Water Quality Conditions	Ciliates	Coral
Temperature (°C)	26.5 ± 0.50	26.5 ± 0.50
pH	8.0 ± 0.50	8.0 ± 0.10
Dissolved oxygen (ppm)	5.00 ± 0.05	5.00 ± 0.05
Nitrous acid (ppm)	0.01 ± 0.05	0.01 ± 0.01
Nitric acid (ppm)	0.05 ± 0.05	0.01 ± 0.01
Calcium (ppm)	425 ± 40.00	450 ± 50.00
Magnesium (ppm)	1345 ± 50.00	1350 ± 50.00
Ammonia nitrogen (ppm)	0.01 ± 0.05	0.01 ± 0.05
Phosphate (ppm)	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01

## 2-2 纖毛蟲鑑定

接續使用基因組 DNA 分離試劑盒 (Protech Technology Enterprise Co., Ltd., Taipei, Taiwan) 萃取珊瑚纖毛蟲樣品中的 Total DNA。使用引子 (primer) 4,617f 和 4,618r 擴增通用真核 18S rRNA gene。PCR 條件參考 Ding *et al.* (2023)。接下來利用纖毛蟲特異性引子 384f-cil 和 1,147r-cil (ciliate-specific primers 384f-cil and 1,147r-cil) 將 1  $\mu$ L PCR 產物用於巢式 PCR (nested PCR); PCR 的黏合 (annealing) 溫度為 60°C。將 PCR 產物複製到 pCR™-Blunt (Zero Blunt™ PCR Cloning Kit; Invitrogen), 委託生物技術公司進行定序。使用之引子序列如表 2 所示。

表 2、引子序列

序列名稱	5' -- 3'
4,617f	TCCTGCCAGTAGTCATATGC
4,618r	GATCCTTCTGCAGGTTACCTAC
384f-cil	YTBGATGGTAGTGTATTGGA
1,147r-cil	GACGGTATCTRATCGTCTTT

### 2-3 珊瑚纖毛蟲生長實驗

純化後的珊瑚纖毛蟲以滅菌海水於 10 mL 試管中培養，初始培養密度為 25 cell/mL，數量為  $2.5 \times 10^2$  隻。起初投餵 1 個與 3 個 *B.violacea* 珊瑚蟲 (polyp)。每 6 小時使用血球計數盤進行計數，直到珊瑚纖毛蟲死亡為止。參照 Ding *et al.* (2025) 和 Ding *et al.* (2022) 的方法來計算指數生長期 (The exponential grown phase according) 的生長率和珊瑚纖毛蟲密度 (1 cell/mL)，以確定珊瑚纖毛蟲的特定生長率。

珊瑚纖毛蟲指數生長期的生長率 ( $\mu$ ) 公式 (Ding *et al.*, 2022)：

$$\mu = \frac{\ln N2 - \ln N1}{t}$$

註：N2 與 N1 分別代表在 t2 (終止時間) 與 t1 (起始時間) 時的纖毛蟲密度 (cell/mL)。t 則為 t1 至 t2 之間的時間間隔，單位為小時 (h)。

### 第三節 抗菌胜肽

抗菌胜肽 (Antimicrobial peptides, AMPs) 大多由數十個胺基酸所組成之小分子蛋白質，廣泛存在於多細胞生物體內。其殺菌活性與其結構和胺基酸組成有極大關聯，不同結構的抗菌胜肽對於不同的微生物抑制效果大有不同。

殺菌機制主要是透過物理性方式與細菌等微生物之細胞膜接觸後，破壞細胞膜的完整性，進而影響細胞膜流體鑲嵌結構 (fluid - mosaic structure)，甚至直接形成孔洞使細胞內胞器損傷，最終導致細菌死亡 (Fjell *et al.*, 2012)。

目前藥物治療的手段常會導致抗藥性產生，魚類抗菌胜肽能作為取代抗生素的抗菌製劑。本團隊以先前研究之有效毒殺病原之吳郭魚抗菌胜肽 3 (Tilapia piscidins 3; TP3) 來進行珊瑚纖毛蟲病的防治研究。TP3 由吉爾生化 (上海) 有限公司 (GL Biochem (Shanghai) Ltd.) 合成，使用高效液相層吸法進行純化；分子量為 2.557 kDa，胺基酸序列為 FIHHIIGGLFSVGKHIHSLIHGH。

實驗進行前以微量天平秤取適量 TP3 粉末溶解至滅菌水中，最終濃度為 2.5 mg/mL，配置完成後放置於 - 20°C 保存備用。

## 第四節 珊瑚樣本

本研究珊瑚樣本皆取自合法 CITES 珊瑚農場所產的人工養殖珊瑚來進行珊瑚纖毛蟲感染試驗，選擇的珊瑚種類為 *B. violacea* (n=30 colonies) 做為感染研究之目標。實驗過程中水質參數參照表 1。本研究旨在探討珊瑚受纖毛蟲感染後使用魚類抗菌肽治療，以評估纖毛蟲病的防治功效。實驗期間以宏觀觀察受感染的珊瑚型態與微觀組織病理學研究之方式來探討組織受損情況。 先前本團隊研究發現，受纖毛蟲感染的珊瑚 72 小時內將引起潰爛或死亡，為避免珊瑚潰爛影響檢測結果，總共分為兩個階段進行。

### 4-1 第一階段：珊瑚纖毛蟲短時間毒殺實驗

本階段實驗所使用之珊瑚纖毛蟲密度為 1 cell/mL。以滅菌海水將 TP3 稀釋成不同濃度，分別為 39.06 ppm、78.13 ppm、156.25 ppm、312.50 ppm、625.00 ppm 以及 1,250.00 ppm，紀錄 5 種不同濃度於 600 秒內珊瑚纖毛蟲的活動力減弱與死亡時間，直至完全死亡為止。計算 LC<sub>50</sub>，作為第二階段的毒殺濃度。

### 4-2 第二階段：珊瑚纖毛蟲長時間毒殺實驗

依據第一階段所得結果，當 TP3 濃度為 312.50 ppm 時，珊瑚纖毛蟲在 10 分鐘內會完全死亡。為了順利接續珊瑚纖毛蟲長時間毒殺實驗，故將 TP3 濃度稀釋成 39.06 ppm 以及 78.13 ppm，並紀錄 2 種濃度的最終死亡時間。

## 第五節 組織切片

組織切片操作步驟參考自 Ding *et al.* (2023)。珊瑚樣本經處理實驗結束後，以 4% 福馬林 (Formalin) 將珊瑚組織進行 48 小時固定，再用 5% 甲酸 (Methanoic acid) 浸泡至骨骼完全溶解，然後用酒精脫水進行石蠟包埋和組織切片。以組織學、組織切片以及蘇木精-伊紅染色 (H&E Staining) 進行常規組織檢視。

## 第六節 統計分析

本實驗經毒殺所得之纖毛蟲活存率、珊瑚活存率、SOD 及 CAT 等數據利用 SPSS (Statistical Package for Social Science 統計套裝軟體，以單因子變異數分析 One-way ANOVA) 及鄧肯氏多變域測驗 (Duncan's Multiple Range Test, DMRT) 來檢視抗菌胜肽對纖毛蟲病防治效益之評估。顯著水準設定為  $P < 0.05$ 。

### 第三章 結果與討論

#### 第一節 珊瑚纖毛蟲之鑑定與形態學觀察

將採集的患病珊瑚組織樣本進行 18S rRNA 基因鑑定，結果顯示 99% 的序列與 *Scuticociliatia* sp. 相似；基因序列結果經 BLAST 比對後提交至 GenBank (登錄號 OR573490)。

本團隊觀察到，感染的珊瑚會出現息肉萎縮，而感染較為嚴重的組織會呈現白色，並出現完全擴展的潰瘍病變。使用光學顯微鏡對純化的珊瑚纖毛蟲進行形態學的觀察，如圖 1 所示，此種珊瑚纖毛蟲的體型修長呈細長的橢圓狀，進食前體長約長 80  $\mu\text{m}$ ，經過餵食珊瑚蟲 poly p，其體內充滿蟲黃藻後體長大幅增加至 200  $\mu\text{m}$ ，增長約 2.5 倍。體色為褐色到深棕色不等，主要的色素來源為蟲黃藻，纖毛 (cilia) 大約長 5  $\mu\text{m}$ ，口部纖毛 (oral cilia) 約 8  $\mu\text{m}$ ，尾纖毛 (caudal cilia) 約 7  $\mu\text{m}$ 。

珊瑚纖毛蟲攝食口位於側面，於蟲體中段有一大核 (macronucleus)，並於大核周遭可見幾個微核 (micronucleus)，攝食珊瑚的方式採前端收縮露出口腔以伸縮方式攝食，珊瑚纖毛蟲的運動特徵是以迅速螺旋的方式前進，同時朝向不規則的方向移動，進食過程緩慢移動靜止，本研究觀察到，在珊瑚纖毛蟲未進食之前，其移動速度快於進食後的速度。

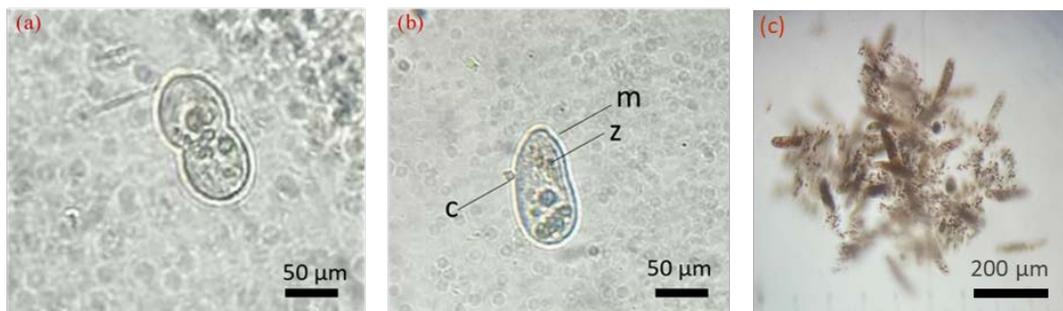


圖 1、珊瑚纖毛蟲攝食前後型態。(a) 分裂中的珊瑚纖毛蟲 (b) 未攝食 *Scuticociliatia* sp. 之珊瑚纖毛蟲型態 (c) 攝食 *Scuticociliatia* sp. 後之珊瑚纖毛蟲型態。

註：c 所指之處為纖毛 (cilia)、m 所指之處為腹側頰腔 (ventral side buccal cavity)、z 所指之處為蟲黃藻 (zooxanthellae)

經純化後的珊瑚纖毛蟲可於培養過程中發現，*Scuticociliatia* sp. 會吞食草皮珊瑚的組織與蟲黃藻，導致珊瑚在 24 小時內組織潰爛造成死亡。根據目前研究，多數在珊瑚體內檢測出的珊瑚纖毛蟲可能是屬於二次感染 (secondary invaders)，但仍有部分珊瑚纖毛蟲會由珊瑚口器入侵珊瑚內部，從內胚層開始吞噬蟲黃藻與組織，造成珊瑚組織空泡化與潰瘍，最後導致珊瑚死亡，這與 Ding *et al.* (2022) 所得到的結果是相符的，珊瑚纖毛蟲會鑽入珊瑚體內並造成珊瑚迅速潰爛後死亡。

## 第二節 草皮珊瑚 poly p 餵食數量多寡於 *Scuticociliatia* sp. 的生長差異

以 *B.violacea* poly p 餵養的 *Scuticociliatia* sp. 成長數量每 6 小時以光學顯微鏡計數增殖數量，共計培養 96 小時。

投餵一顆珊瑚 poly p 的成長結果如表 3，*Scuticociliatia* sp. 的數量自 0 小時開始為  $253.4 \pm 41.3$  隻、6 小時  $367.5 \pm 45.1$  隻、12 小時  $422.5 \pm 99.8$  隻、24 小時  $847.5 \pm 87.8$  隻、48 小時  $1,627.5 \pm 156.2$  隻、54 小時  $2,169.1 \pm 394.8$  隻、60 小時  $182,242.5 \pm 548.7$  隻、72 小時  $2,625 \pm 201.2$  隻、96 小時  $2,945 \pm 79.2$  隻。經 96 個小時培養後，*Scuticociliatia* sp. 的數量分別是 0、12、24、48、72 小時的 11.6 倍、6.9 倍、3.47 倍、1.8 倍和 1.12 倍。

投餵三顆珊瑚 poly ps 結果如表 4 所示，*Scuticociliatia* sp. 的數量自 0 小時起為  $253.4 \pm 41.3$  隻、6 小時  $312.50 \pm 28.5$  隻、12 小時  $407.5 \pm 54$  隻、24 小時  $750 \pm 233.1$  隻、48 小時  $1,737.5 \pm 256.4$  隻、54 小時  $2,291.7 \pm 87.3$  隻、60 小時  $3,605 \pm 488.7$  隻、72 小時  $3,443.3 \pm 289$  隻、96 小時  $3,295 \pm 346.2$  隻，經 96 個小時的培養後，*Scuticociliatia* sp. 的數量分別是 0、12、24、48、72 小時的 13 倍、8.09 倍、4.39 倍、1.9 倍和 0.96 倍。

從實驗結果計算得知，當投餵一顆珊瑚 poly p 的 *Scuticociliatia* sp. 其每 24 小時之增殖率(表 3) 第 0 - 24 小時為  $24.83 \pm 1.83\%$ 、第 24 - 48 小時為  $31.94 \pm 1.97\%$ 、第 48 - 72 小時為  $41.70 \pm 1.26\%$ 、第 72 - 96 小時為  $20.83 \pm 7.26\%$ ；而投餵 3 顆珊瑚 poly p 的 *Scuticociliatia* sp. 在每 24 個小時的循環中，增殖率(表 4) 於第 0 - 24 小時為  $18.40 \pm 2.67\%$ 、第 24 - 48 小時為  $41.15 \pm 2.39\%$ 、第 48 - 72 小時為  $61.39 \pm 5.66\%$ 、第 72 - 96 小時為  $0.00 \pm 11.67$ ，可以發現在第三天到第四天成長率有明顯下降。

從結果推斷，本次研究雖與前人實驗結果略有不同，*Scuticociliatia* sp. 並沒有如其他實驗所呈現出於最初 24 小時後數量縮減，但其他實驗卻有此趨勢，比如嗜熱四膜蟲在培養時會陷入比較長時間的準備間期後才會進入指數期 (Randall *et al.*, 2015)，並不是一開始就開始增殖，這與本次研究結果相符。本次研究經過 12 小時後珊瑚纖毛蟲才開始大量增殖，這與其他研究結果具有相似之處 (Sun *et al.*, 2024)，而根據培養過程中所發現，珊瑚纖毛蟲攝食珊瑚蟲後，體型會變大，此發現與前人實驗獲得相同結果，但珊瑚

纖毛蟲在成長後期並沒有急速衰弱，推測原因可能與水質以及當下環境溫度有關 (Sun *et al.*, 2024)。

表 3、投餵一顆珊瑚蟲 (poly p) 之增殖數量

時間 (h)	初始密度 (cell mL <sup>-1</sup> )	最終密度 (cell mL <sup>-1</sup> )	比生長率 (μ)
0-6	25.34 ± 4.33	36.75 ± 5.05	17.36 ± 1.20
6-12	36.75 ± 5.05	42.25 ± 11.16	4.17 ± 2.08
12-24	42.25 ± 11.16	84.75 ± 9.82	38.19 ± 3.66
24-48	84.75 ± 9.82	162.75 ± 17.46	31.94 ± 1.97
48-72	162.75 ± 17.46	262.50 ± 23.23	42.88 ± 1.53
72-96	262.50 ± 3.23	294.50 ± 91.47	11.04 ± 2.35

表 4、投餵三顆珊瑚蟲 (poly p) 之增殖數量

時間 (h)	初始密度 (cell mL <sup>-1</sup> )	最終密度 (cell mL <sup>-1</sup> )	比生長率 (μ)
0-6	25.34 ± 4.33	31.250 ± 2.85	11.11 ± 2.41
6-12	31.25 ± 2.85	40.75 ± 5.40	11.81 ± 4.81
12-24	40.75 ± 5.40	75.00 ± 23.31	28.47 ± 6.94
24-48	75.00 ± 23.31	173.75 ± 25.64	41.15 ± 2.39
48-72	173.75 ± 25.64	344.33 ± 28.90	72.54 ± 5.31
72-96	344.33 ± 28.90	329.5 ± 34.62	-6.50 ± 11.80

### 第三節 *Scuticociliatia* sp.短時間毒殺實驗

本階段為期 10 分鐘 (600 秒) 的毒殺實驗，分別使用了 1,250.00 ppm、625.00 ppm、312.50 ppm、156.25 ppm、78.13 ppm 以及 39.06 ppm 之 TP3，綜合結果如表 5 所示，於 1,250.00 ppm 濃度下，TP3 完全殺死 *Scuticociliatia* sp. 的時間為  $101.00 \pm 64.21$  秒。625.00 ppm 的濃度環境下結果顯示，TP3 於  $296.67 \pm 160.13$  秒可將 *Scuticociliatia* sp. 完全殺死。312.50 ppm 的濃度下，完全殺死 *Scuticociliatia* sp. 的時間為  $327.33 \pm 42.19$  秒。當濃度稀釋至 156.25 ppm，TP3 已無法在 600 秒內將 *Scuticociliatia* sp. 完全殺死，所需時間增至  $1,190.00 \pm 115.18$  秒；接著繼續稀釋至 78.13 ppm 和 39.06 ppm 皆無法在 600 秒內將 *Scuticociliatia* sp. 成功殺死，且結果與對照組 (C) 無顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

由上述結果顯示，當 TP3 濃度越高殺死 *Scuticociliatia* sp. 所需的時間越短，當濃度提高，吳郭魚抗菌胜肽越容易造成 *Scuticociliatia* sp. 的細胞膜表面破裂，細胞膜破裂後 *Scuticociliatia* sp. 狀態可參考圖 2，此現象將導致細胞質流出，進而使蟲體萎縮死亡，在低濃度下則可以觀察到 *Scuticociliatia* sp. 逐漸出現活動力降低，蟲體不規則收縮、運動直到細胞膜表面破裂，從而導致體內細胞質流出死亡。

表 5、不同濃度抗菌胜肽 TP3 對珊瑚纖毛蟲之完全致死時間結果表

組別 (ppm)	死亡時間 (sec)
Control (C)	—
1,250.00	$101.00 \pm 64.21$
625.00	$296.67 \pm 160.13$
312.50	$337.33 \pm 38.76$
156.25	$1,190.00 \pm 115.18$
78.13	$2,442.86 \pm 801.78$
39.06	$12,000.00 \pm 946.00$

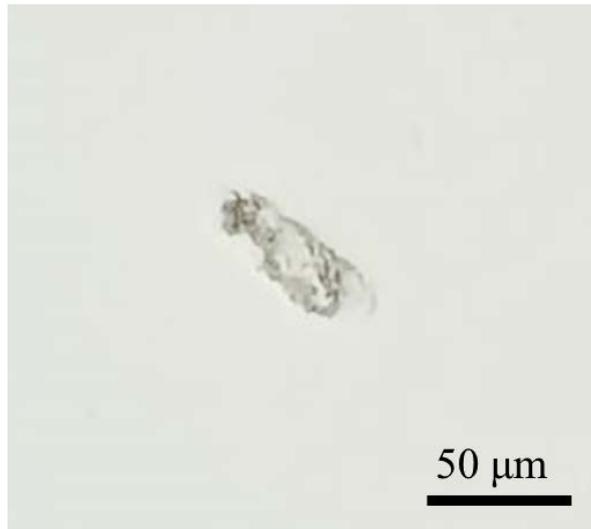


圖 2、*Scuticociliatia* sp.細胞膜表面破裂示意圖。抗菌胜肽毒殺纖毛蟲時，會使其細胞膜表面破裂，進而導致纖毛蟲細胞液流出造成死亡。

#### 第四節 *Scuticociliatia* sp.長時間毒殺實驗

本階段探討不同濃度的吳郭魚抗菌胜肽 TP3 於長時間的毒殺實驗，從 600 秒的毒殺實驗結果中延伸，當濃度為 156.25 ppm、78.13 ppm 和 39.06 ppm 時對 *Scuticociliatia* sp. 的影響。研究結果如表 5 所示，當 TP3 濃度為 156.25 ppm 時於  $1,190.00 \pm 115.18$  秒造成 *Scuticociliatia* sp. 完全死亡，濃度降至 78.13 ppm 時於  $2,442.86 \pm 801.78$  秒造成 *Scuticociliatia* sp. 完全死亡，上述兩種濃度皆在 1 小時內造成珊瑚纖毛蟲完全死亡。自表 5 的結果可知加入 39.06 ppm 的 TP3 於  $12,000.00 \pm 946.00$  秒時會造成珊瑚纖毛蟲完全死亡。

結合上述結果可得到 4 小時內使用不同濃度的吳郭魚抗菌胜肽 TP3 皆會造成 *Scuticociliatia* sp. 死亡，經由統計分析後如圖 3 所呈現，得知吳郭魚抗菌胜肽 TP3 在 600 秒內對珊瑚纖毛蟲的  $LC_{50}$  濃度為 614.60 ppm。

再以  $LC_{50}$  614.60 ppm 進行實驗測試並利用組織切片觀察珊瑚病變的結果圖，切片結果如圖 4 所示。圖 4 (a) 為受到珊瑚纖毛蟲感染的珊瑚，圖 4 (b) 為感染後經過 TP3 處理的實驗組，圖 4 (c) 為經珊瑚纖毛蟲感染未處理組別，從組織切片結果可以清楚得知受到珊瑚纖毛蟲感染的珊瑚經過 TP3 的治療後可以有效降低珊瑚纖毛蟲於感染後的破壞，降低其所帶來對珊瑚的損傷。

故本研究發現，在高濃度的抗菌胜肽 TP3 環境下，可以發現珊瑚纖毛蟲的細胞膜會急速瓦解破裂，其結果與 *Bandeira et al.* (2018) 以及 *Giovati et al.* (2018) 結果相似，皆會造成細胞膜破裂的效果，濃度越高對於珊瑚纖毛蟲細胞膜的親和力越大，所需瓦解珊瑚纖毛蟲的時間越短。儘管寄生蟲屬於多細胞生物，但抗菌胜肽依然可透過直接與細胞膜相互作用的模式來殺死細胞 (*Park et al.*, 2004)。

實驗最後珊瑚纖毛蟲數量仍回復上升，使用 TP3  $LC_{50}$  的濃度，在初期確實成功將珊瑚纖毛蟲數量降低，但因胜肽作用後即會水解且不殘留的特性，導致殘存的 *Scuticociliatia* sp. 可以持續生長，因此本文證實 TP3 在抵禦珊瑚纖毛蟲的感染上具有一定作用，而在類似珊瑚纖毛蟲與其他抗菌胜肽上，先前 *Zheng et al.* (2021) 研究中顯示，

大黃魚 piscidin 5 like 能使纖毛蟲的鞭毛無法運動並停滯，在抗菌胜肽大量聚集於細胞膜表面後會導致細胞膜破裂最終造成纖毛蟲死亡，此點在來自紅擬石首魚的 Lc-P5L 上也有相似的效果，也會造成纖毛蟲無法運動進而聚集導致細胞膜破裂死亡 (Zheng *et al.*, 2020)，雖為不同魚類的抗菌胜肽，但在對抗纖毛蟲感染方面具相似的结果，可以針對纖毛蟲發揮特定的作用。

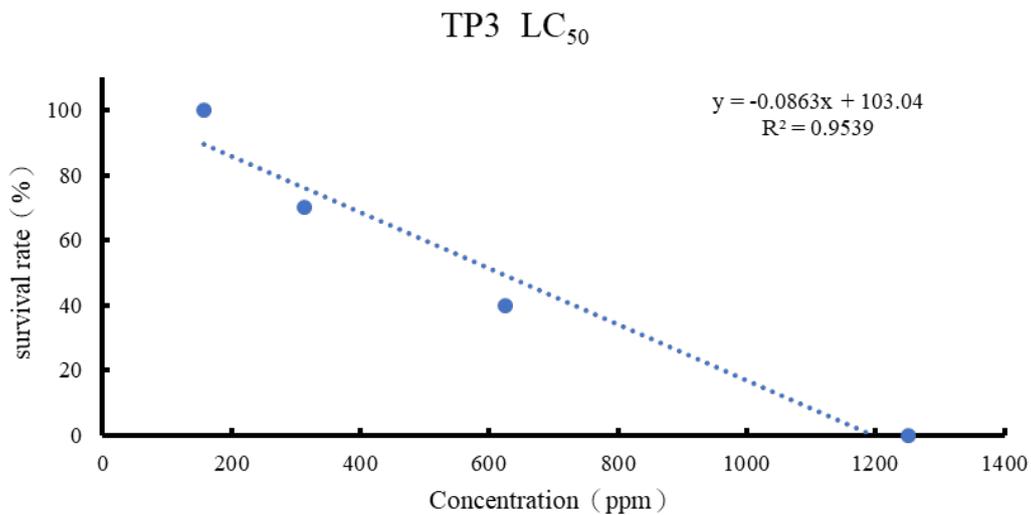


圖 3、抗菌胜肽 TP3 之於珊瑚纖毛蟲 LC<sub>50</sub> 統計結果圖。先取珊瑚纖毛蟲進行計數後以 TP3 進行 600 秒毒殺實驗，並於不同時間段記錄珊瑚纖毛蟲的存活數，最終計算出 LC<sub>50</sub> 濃度為 614.60 ppm。

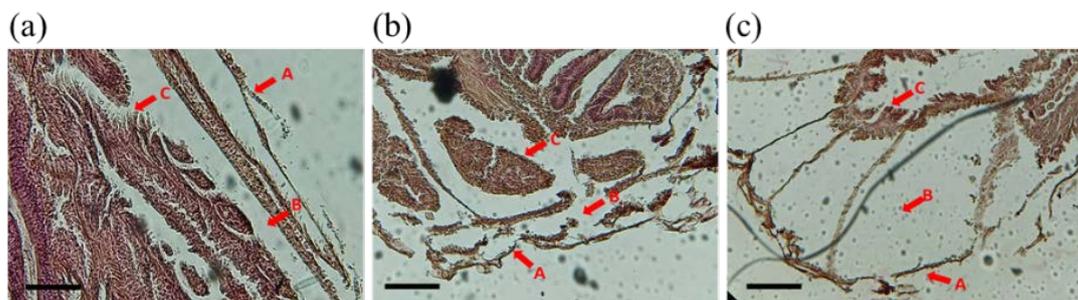


圖 4、以蘇木精-伊紅 (H&E) 染色觀察由纖毛蟲感染及抗菌胜肽處理組所造成之珊瑚病變的組織切片結果圖。(a) 受感染的珊瑚 (b) 感染後處理組 (c) 感染未處理組

註：A 所指之處為外胚層；B 所指之處為中膠層；C 所指之處為內胚層及蟲黃藻。

## 第四章 結論

本文研究成果包含

(一) 成功鑑種及純化培養出珊瑚纖毛蟲，確定其與 *Scuticociliatia* sp.相似並已將基因序列比對結果提交至 GenBank (登錄號 OR573490)。

(二) 珊瑚纖毛蟲 *Scuticociliatia* sp.會感染草皮珊瑚 (*Briareum violacea*) 造成珊瑚組織潰爛死亡。生長實驗中不論投餵一顆或三顆草皮珊瑚 poly p，於最後的 96 小時區間 *Scuticociliatia* sp.的數量並無明顯差異；此外投餵三顆珊瑚 poly p 僅在培養過程中的 48 到 72 小時之間 *Scuticociliatia* sp.的數量有大幅上升，更快達到平穩期。

(三) 證實吳郭魚抗菌胜肽 TP3 對 *Scuticociliatia* sp.具顯著致死效果，於 1,250 ppm 高濃度時，可在 2 分鐘內快速破壞珊瑚纖毛蟲細胞膜並致死，展現出顯著且即時的殺蟲效能。以  $LC_{50}$  614.60 ppm 作為防治 *Scuticociliatia* sp.攻擊 *Briareum violacea* 的測試濃度，組織切片結果顯示，TP3 處理組能有效抑制 *Scuticociliatia* sp.的感染，減輕珊瑚纖毛蟲在感染後造成的破壞，從而降低對珊瑚組織的損傷。

綜上所述，來自吳郭魚的抗菌胜肽 TP3 展現出高效、迅速且具選擇性的殺滅珊瑚纖毛蟲效果，凸顯其作為天然候選藥物的應用潛力，並為珊瑚疾病防治與水族健康管理開拓新的研究方向與應用前景。

## 參考文獻

- Antonius, A., 2000. First protozoan coral-killer identified in the Indo-Pacific. *Atoll Research Bulletin*, 481.
- Bandeira, I. C. J., Bandeira-Lima, D., Mello, C. P., Pereira, T. P., De Menezes, R. R. P. P. B., Sampaio, T. L., Falcão, C. B., Rádis-Baptista, G., & Martins, A. M. C., 2018. Antichagasic effect of crotalicidin, a cathelicidin-like vipericin, found in *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake's venom gland. *Parasitology*, 145 ( 8 ) , 1059-1064.
- Cheng, C.-M., Cheng, Y.-R., Ding, D.-S., Chen, Y.-T., Sun, W.-T., Pan, C.-H., 2021. 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*. 10, 1216.
- Diego Ruiz-Moreno, Bette L. Willis, A. Cathie Page, Ernesto Weil, Aldo Cróquer, Bernardo Vargas-Angel, Adán Guillermo Jordan-Garza, Eric Jordán-Dahlgren, Laurie Raymundo, C. Drew Harvell, 2012. Global coral disease prevalence associated with sea temperature anomalies and local factors. *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS Dis Aquat Org*. Vol. 100: 249–261.
- Ding, D.-S., Pan, C.-Y., Sun, W.-T., Pan, C.-H., 2023. Evaluation of *Forsythia suspensa* extract for drug therapy of ciliate infection in coral (*Goniopora columna*). *Aquaculture*. 573, 739581.
- Ding, D.-S., Sun, W.-T., & Pan, C.-H. ( 2025 ) . Extract of the natural botanical *Melia toosendan* prevents and treats coral ciliate disease. *Aquaculture*, 599, 742136.
- Ding, D.-S., Sun, W.-T., Patel, A.K., Singhania, R.R., Pan, C.-H., Dong, C.-D., 2022. Parasitic pathways and evaluation of non-specific parasitism of ciliate infected captive corals. *Aquaculture*. 560, 738610.
- Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W., & Schneider, G. ( 2012 ) . Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11 ( 1 ) , 37-

51.

- Fredrik Moberg, Carl Folke, 1999. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecological Economics*. Volume 29, Issue 2, Pages 215-233.
- Giovati, L., Santinoli, C., Mangia, C., Vismarra, A., Belletti, S., D'Adda, T., Fumarola, C., Ciociola, T., Bacci, C., Magliani, W., Polonelli, L., Conti, S., & Kramer, L.H., 2018. Novel Activity of a Synthetic Decapeptide Against *Toxoplasma gondii* Tachyzoites. *Frontiers in Microbiology*, Volume 9.
- Huang, R., He, Z., Yu, K., Yao, Z., Zou, B., & Xiao, J., 2024. Development of a coral and competitive alga-related index using historical multi-spectral satellite imagery to assess ecological status of coral reefs. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 134, 104194.
- Page, C., Willis, B., 2008. Epidemiology of skeletal eroding band on the Great Barrier Reef and the role of injury in the initiation of this widespread coral disease. *Coral Reefs*. 27, 257-272.
- Park, Y., Jang, S.-H., Lee, D. G., & Hahm, K.-S. (2004). Antinematodal effect of antimicrobial peptide, PMAP-23, isolated from porcine myeloid against *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Peptide Science*, 10 (5), 304-311.
- Randall, C. J., Jordán-Garza, A. G., & van Woesik, R. (2015). Ciliates associated with signs of disease on two Caribbean corals. *Coral Reefs*, 34 (1), 243-247.
- Rocha, R.J., Pimentel, T., Serôdio, J., Rosa, R., Calado, R., 2013. Comparative performance of light emitting plasma (LEP) and light emitting diode (LED) in ex situ aquaculture of scleractinian corals. *Aquaculture*. 402, 38-45.
- Sella, I., Benayahu, Y., 2010. Rearing cuttings of the soft coral *Sarcophyton glaucum* (Octocorallia, Alcyonacea): Towards mass production in a closed seawater system. *Aquaculture research*. 41, 1748-1758.
- Sun, Y., & Ellwood, M., 2024. The Role of Acantharia in Southern Ocean Strontium Cycling

and Carbon Export: Insights from Dissolved Strontium Concentrations and Seasonal Flux Patterns". *Mendeley Data*, version 2. DOI: 10.17632/pr9vxg94gd.2

- Sweet, M.J., Croquer, A., Bythell, J.C., 2014. Experimental antibiotic treatment identifies potential pathogens of white band disease in the endangered Caribbean coral *Acropora cervicornis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 281, 20140094.
- Ulstrup Karin, E., Kühn, M., & Bourne David, G., 2007. Zooxanthellae Harvested by Ciliates Associated with Brown Band Syndrome of Corals Remain Photosynthetically Competent. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 ( 6 ) , 1968-1975.
- Zheng, L., Qiu, J., Liu, H., Shi, H., Chi, C., & Pan, Y., 2021. Molecular characterization and antiparasitic activity analysis of a novel piscidin 5-like type 4 from *Larimichthys crocea*. *Molecular Immunology*, 129, 12-20.
- Zheng, L.-B., Hong, Y.-Q., Sun, K.-H., Wang, J., & Hong, Y.-j., 2020. Characteristics delineation of piscidin 5 like from *Larimichthys crocea* with evidence for the potent antiparasitic activity. *Developmental & Comparative Immunology*, 113, 103778.