

OAC-114-023 (研究報告)

珊瑚纖毛蟲疾病中指標性微生物調查與疾病防治之研究

(成果報告)

海洋委員會補助研究

中華民國 114 年 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-114-023 (研究報告)

珊瑚纖毛蟲疾病中指標性微生物調
查與疾病防治之研究

(成果報告)

學校：東吳大學

指導教授：詹雅帆

學生：高芷怡

研究期程：中華民國 114 年 4 月至 114 年 10 月

研究經費：新臺幣 9 萬 6 千 500 元

海洋委員會補助研究

中華民國 114 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。」

「本研究報告絕無侵害他人智慧財產權之情事，如有違背願自負民、刑事責任。」

OAC-114-023 珊瑚纖毛蟲疾病中指標性微生物調查與

疾病防治之研究 成果報告 海洋委員會

目 次

圖 次

表 次

摘 要.....	0
第一章 前言.....	1~4
第一節 研究緣起與問題背景.....	1~3
第二節 研究目的.....	4
第二章 研究方法與過程.....	5~9
第一節 纖毛蟲單細胞培養與鑑種.....	5~7
第二節 不同珊瑚健康狀態下的樣本採集.....	7~8
第三節 Genomic DNA 萃取與大規模定序.....	8~9
第四節 數據分析.....	9
第三章 結果與討論.....	10~27
第一節 纖毛蟲大小型態.....	10
第二節 纖毛蟲親緣關係樹狀圖.....	11~12
第三節 纖毛蟲生長曲線.....	12~16
第四節 不同珊瑚健康狀態下的樣本.....	17~20
第五節 不同珊瑚健康狀態下的海水中樣本纖毛蟲計數.....	21~22
第六節 不同珊瑚健康狀態下的海水樣本細菌計數.....	23~24
第七節 不同珊瑚健康狀態下的海水樣本共生藻計數.....	25~26
第八節 珊瑚樣本的大規模定序.....	27
第四章 結論.....	28
第五章 參考資料.....	29~31

圖 次

圖一	單離纖毛蟲個體方法之示意圖.....	5
圖二	細菌記數方式之示意圖.....	7
圖三	纖毛蟲於 1000 倍正立式顯微鏡下的外部型態.....	10
圖四	纖毛蟲 A 與纖毛蟲 B 之親緣關係樹(ML tree).....	11
圖五	纖毛蟲 <i>Aspidisca aculeata</i> 於三次觀察生長曲線實驗(A~C)，添加米粒與 yeast extraction 作為營養來源.....	15
圖六	纖毛蟲 <i>Euplotes vannus</i> 於三次觀察生長曲線實驗(A~C)，僅添加米粒作為營養來源.....	15~16
圖七	纖毛蟲 <i>Euplotes vannus</i> 於三次觀察生長曲線實驗(A~C)，添加米粒與 yeast extraction 作為營養來源.....	16
圖八	珊瑚(control、1~5)於解剖顯微鏡下 Day0-Day12 的照片.....	18
圖九	珊瑚(control、6~10)於解剖顯微鏡下 Day0-Day12 的照片.....	19
圖十	珊瑚樣本 10 於 Day1 觀察到原生纖毛蟲聚集.....	20
圖十一	將纖毛蟲 <i>Euplotes vannus</i> 接種至同株珊瑚的八個小塊(3、4、5、6、7、8、9、10)中後，纖毛蟲數量隨天數的變化關係圖.....	22
圖十二	將纖毛蟲 <i>Euplotes vannus</i> 接種至同株珊瑚的八個小塊(3、4、5、6、7、8、9、10)中後，細菌數量隨天數的變化關係圖.....	24
圖十三	將纖毛蟲 <i>Euplotes vannus</i> 接種至同株珊瑚的八個小塊(3、4、5、6、7、8、9、10)中後，共生藻數量隨天數的變化關係圖.....	26

表 次

表一	珊瑚樣本經由萃取過後，所量測的 DNA 濃度.....	27
----	-----------------------------	----

摘要

關鍵詞:珊瑚纖毛蟲疾病、細菌群落變化、纖毛蟲

本研究旨在探討纖毛蟲感染對珊瑚及其周圍水體細菌群落的影響，並進一步分析這些微生物群落變化與珊瑚健康之間的關聯。研究首先透過單細胞培養與分子生物學技術，成功分離並鑑定兩種纖毛蟲：纖毛蟲 A (*Aspidisca aculeata*) 和 纖毛蟲 B (*Euplotes vannus*)。透過生長曲線實驗，我們發現 *Euplotes vannus* 的生長週期較長且對環境耐受性較高，因此選擇其作為後續珊瑚感染實驗的主要研究對象。在珊瑚感染實驗中，我們觀察到不同的珊瑚樣本對纖毛蟲感染的反應各不相同。多數樣本在接種纖毛蟲後，珊瑚健康狀態維持良好，而周圍水體中的纖毛蟲、細菌及共生藻數量也呈現低密度或週期性波動。然而，樣本 10 表現出顯著的爆發性反應：在接種後的第三天，珊瑚迅速白化，而周圍水體中的纖毛蟲、細菌和共生藻數量均呈現顯著的爆發式增長。這項重要發現暗示了在特定條件下，纖毛蟲、細菌和共生藻三者之間可能存在著協同作用，共同加劇了珊瑚的健康惡化。未來，我們將透過大規模定序技術，進一步分析不同狀態下的珊瑚及其水體細菌組成，以期系統性地揭示在纖毛蟲感染過程中，哪些細菌類群扮演了關鍵角色，並評估其作為疾病預防或治療潛力指標的可能性，為珊瑚礁的保護與疾病防治提供具體的科學依據。

第一章 前言

第一節 研究緣起與問題背景

一、研究緣起

珊瑚礁生態系統是海洋生物多樣性的重要堡壘，但目前正受到多重威脅，纖毛蟲感染便是其中之一。纖毛蟲疾病導致珊瑚健康迅速惡化，引發白化現象甚至死亡，這不僅影響珊瑚個體的存活，更可能損害整個生態系統的穩定性。儘管珊瑚健康與微生物群落之間的相互作用已被部分研究揭示，但在疾病發生時，水體細菌群落的具體變化與其在疾病進展中的角色仍未完全明確。因此，本研究透過對纖毛蟲感染期間細菌組成的分析，探討其變化與珊瑚健康的關聯性，以期填補這一科學知識的空白。

二、背景與現況分析

珊瑚礁生態系統是全球生物多樣性最豐富的區域之一，具備高度的生態和經濟價值(Benk Witt *et al.*, 2020)。雖然珊瑚礁僅佔全球海洋表面積的0.1%，卻支持了約25%的海洋物種，是重要的生物多樣性熱點(Reaka-Kudla, 1997, Shin *et al.*, 2022)。此外，珊瑚礁提供的生態系統服務價值高達每年數十億美元，包括漁業資源、觀光旅遊及保護海岸線免受侵蝕，是提供地球非常重要的生態系統(Cesar *et al.*, 2003, Bruno *et al.*, 2019)。然而，隨著全球氣候變遷的加劇，珊瑚礁面臨著前所未有的壓力。海水溫度的上升是導致珊瑚白化的主要原因，溫度變異使得珊瑚礁容易遭受病原體感染，尤其是在海洋酸化和污染增加的情況下(Hughes *et al.*, 2017, Hughes *et al.*, 2018)。在人類活動影響下，包括過度捕撈、棲息地破壞及污染物排放，全球珊瑚礁的健康狀態正快速惡化。在台灣周邊海域，珊瑚礁同樣受到嚴重的生態威脅，氣候變遷引發的白化事件頻繁發生，對珊瑚群落的穩定性及其多樣性構成嚴峻挑戰 (Fan & Dai, 1999, Loya *et al.*,

2001)。

珊瑚疾病的增加是全球珊瑚礁衰退的重要原因之一，而纖毛蟲感染被視為其中一個主要威脅(Sweet & Bythell, 2012)。在多數案例中，纖毛蟲感染會破壞珊瑚的組織結構，導致其健康惡化，甚至死亡 (Cheng *et al.*, 2021, Ravindran *et al.*, 2022)。一些常見的纖毛蟲疾病，如棕帶病和骨骼侵蝕帶，會在健康組織和裸露骨骼之間形成一層棕色的病灶區域，這些區域由大量未知的纖毛蟲引起，隨著疾病的發展，受感染的組織逐漸壞死 (Bourne *et al.*, 2008, Ravindran *et al.*, 2022)。

棕帶病的形成機制可能涉及纖毛蟲在珊瑚組織中的移動與侵蝕，並通過捕食珊瑚的共生藻 (*Symbiodinium*) 來獲取額外的營養 (Sweet & Bythell, 2012)。研究指出，在感染期間，纖毛蟲可深入珊瑚組織，在其腔腸細胞內攝食共生藻，而攝食後的共生藻在纖毛蟲內仍能進行光合作用，這為纖毛蟲提供了額外的能量來源，進一步加劇珊瑚健康的惡化(Harvell *et al.*, 2007)。

珊瑚共生體圈(Coral holobiont)中包括了高多樣性的細菌群落，這些群落在維護珊瑚健康和生態平衡中扮演了關鍵角色 (Rohwer *et al.*, 2002)。健康珊瑚的微生物組在促進營養交換、調節宿主免疫力及抑制病原體入侵方面發揮了重要作用。但是，當珊瑚遭受壓力時（如溫度上升、疾病發生或污染增加），其細菌群落會發生結構性改變，許多病原性細菌可能在此環境下增殖，進一步削弱珊瑚的免疫防禦 (Ritchie, 2006)。

珊瑚於纖毛蟲感染期間，水體中的細菌組成也會發生變化。這些變化可能與病原體的增殖有關，從而促進疾病的發展或加重珊瑚健康的衰退 (Vega Thurber *et al.*, 2020)。總的來說，細菌組成的動態變化無論在珊瑚本身或是在周圍水體中，可能不僅是疾病狀態的反映，還可能進一步加劇疾病的進程(Sweet & Bythell, 2012)。儘管已有研究探討細菌在珊瑚健康中的多樣性角色，但關於

細菌在纖毛蟲感染背景下的具體作用和影響，仍缺乏深入了解，這為本研究奠定了探索的基礎。過去研究已揭示細菌感染在珊瑚疾病中的重要性，但對於纖毛蟲等原生生物的研究相對有限(Vega Thurber *et al.*, 2020)。此外，已有研究觀察到纖毛蟲感染期間珊瑚周圍水體中的細菌組成變化，但其具體動態、關鍵致病細菌的角色及其潛在的預測指標價值，仍然存在知識空缺(Sweet *et al.*, 2011, Sweet & Bythell, 2012)。本研究擬針對此知識空缺展開調查，分析珊瑚感染纖毛蟲疾病時，珊瑚與水體中細菌群落的變化，系統性調查纖毛蟲疾病中的指標性微生物，進而探討這些微生物在疾病進程中的作用，並評估其作為疾病預防或治療的潛力，為珊瑚礁的保護和疾病防治提供科學依據。

第二節 研究目的

一、研究目的

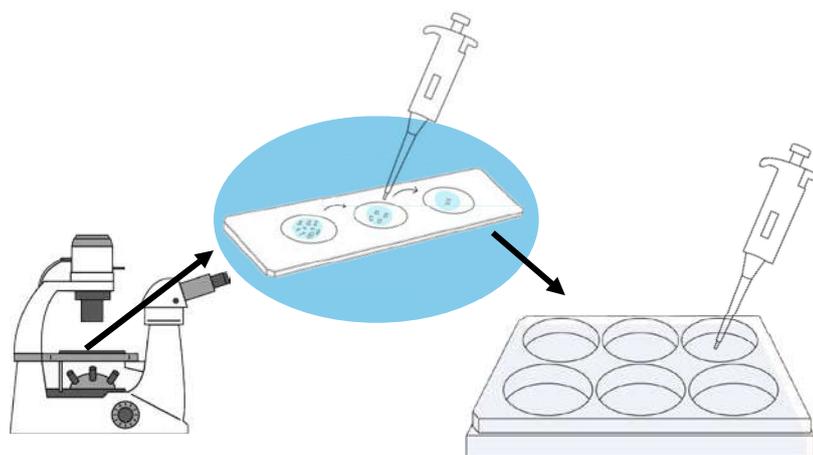
本研究計畫旨在調查珊瑚感染纖毛蟲疾病期間，珊瑚本身與周圍水體中細菌組成的變化，並進一步分析細菌群落的改變如何影響珊瑚疾病的發展。藉由深入了解此變化過程，期望揭示微生物在珊瑚疾病中的潛在作用機制。

第二章 研究方法與過程

1. 纖毛蟲單細胞培養與鑑種

(1) 纖毛蟲單細胞培養

將感染纖毛蟲的珊瑚樣本置於倒立式顯微鏡下，以微量吸管挑取纖毛蟲個體，反覆清洗直到分離出單一纖毛蟲個體（圖一）。在這些纖毛蟲個體被移至六孔培養盤，盤中含有經過濾滅菌的海水。在 25°C、16 小時光照與黑暗條件下培養，每隔幾日觀察纖毛蟲數量是否增加。



圖一，單離纖毛蟲個體方法之示意圖。(圖示來源：google)

(2) 纖毛蟲鑑種

將纖毛蟲培養液以 12,000 rpm 轉離心，去除上清液。將 pellet 加入 20 μL sterilized H_2O ，並以 95 度 10 分鐘加熱，待加熱完畢，加入已經配置好的 PCR mix (10X Tag buffer 5 μl 、2.5mM dNTP 1 μl 、primerF 1.5 μl 、primerR 1.5 μl 、Taq enzyme 0.3 μl 、 dH_2O 30.7 μl)，最終體積為 50 μl 進行聚合酶連鎖反應。使用引子為 4617f (5'-TCCTGCCAGTAGTCATAT GC-3') 與 4618r (5'-GATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3')(Michael Sweet and John Bythell, 2012)。進行聚合酶連鎖反應的條件為為: 95 °C 3 分鐘，進行 95 °C 30 秒、55 °C 30 秒、72 °C 1 分鐘，35 個循環，最後 72 °C 5 分鐘，PCR

反應中止於 4°C。再以 2 µl 的 PCR 產物加入 PCR mix (10X Tag buffer 5µl、2.5mM dNTP 1µl、primer 384f-cil 1.5 µl、primer 1147r-cil 1.5 µl、Tag enzyme 5v/ml 0.3 µl、dH₂O 38.7 µl)，進行第二次聚合酶連鎖反應，反應的條件為: 95 °C 3 分鐘，進行 95 °C 30 秒、60°C 30 秒、72 °C 1 分鐘，35 個循環，最後 72 °C 5 分鐘，反應中止於 4°C。引子為 384F (5'-YTB GAT GGT AGT GTA TTG GA-3') 與 1147R (5'-GAC GGT ATC TRA TCG TCT TT-3') (Michael Sweet and John Bythell, 2012)。將 PCR 產物以 1.5% 的 Agarose gel 以及 100 伏特進行 30 分鐘電泳，確立結果。照膠檢視聚合酶連鎖反應的結果，如具有目標片段則送交廠商進行定序。

(3) 纖毛蟲親緣關係圖繪製

於 NCBI 資料庫中，擷取相近種類的纖毛蟲基因序列，並將資料以 FASTA 格式儲存於文字檔中，將檔案導入 MEGA 12 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 中進行序列比對，再經 IQ-TREE web server (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>)、Figtree v1.4.4 等軟體畫出親緣關係圖，調整編輯。

(4) 纖毛蟲生長曲線量測

待纖毛蟲成長至數量穩定。準備一個 50 mL 的船型瓶，加入 5g 米粒、100 µL 0.1% yeast extraction 以及過濾滅菌海水 20 mL。再添加 3 mL 纖毛蟲原水樣，最後將船型瓶加過濾滅菌海水至刻線 30 mL。製作三重複的船型瓶。另一組三重複的船型瓶，按上述添加，但進行不添加 yeast extraction，作為比較。在原條件下，於培養箱中培養。在第 0、3、6、8、10、12、14、16、18、24 天，每瓶船型瓶取 100 µL 水樣於玻片，加固定液 (25% 戊二醛) 5 µL，混勻後以倒立式顯微鏡觀察計數，每次進行 3 重複的記數。

除纖毛蟲外，並記數其餌料(細菌)的數量。在記數細菌方面，取一片 0.2 μm 孔徑的濾膜放於抽氣過濾裝置上，加入 300 μL 水樣，並加入 700 μL 過濾海水混勻，抽乾液體使細菌均勻的附著在濾膜上，再加入 500 μL DAPI 染劑(4',6-diamidino-2-phenylindole)，避光染色 10 分鐘(圖二)。10 分鐘後，抽乾液體。準備一個玻片，放上染色完的濾膜，在濾膜上滴上鏡油，並以正立式螢光顯微鏡觀察(圖二)。在 UV 光下，被 DAPI 染劑所染色到的細菌會發出亮藍色的光，記數每個鏡頭下光點的數量，觀察 10 至 20 個視野，每瓶樣本做 2 重複的記數。整個實驗流程進行多次重複，以確保數據的可靠性。



圖二，細菌記數方式之示意圖。(圖示來源：google)

2. 不同珊瑚健康狀態下的樣本採集

將健康的鹿角珊瑚 (*Pocillopora*)，先行剪成 2-5 公分長的 nubbin，以溫度 25 度的海水缸進行 7 天的適應。接著將 10 個 nubbin 放入已經添加純種纖毛蟲(400 cells mL^{-1})，另外 1 個 nubbin 放入未添加纖毛蟲的水缸中，不添加纖毛蟲，作為控制組。在第 0 天時採珊瑚樣本二重複，入 100%酒精

中，於-20 度冰箱中保存。

3. Genomic DNA 萃取與大規模定序

於無菌操作台使用 DNeasy PowerSoil Pro Kits(50)萃取珊瑚組織液 DNA：將珊瑚組織液離心後之上清液倒入廢液杯，並以 pipetman 吸走剩餘液體，以 800 μ L CD1 沖散 pellet 後將其吸入 Powerbead Pro tube，用 parafilm 封口後，水平震盪 10 分鐘，再以攝氏 4 度 12,000 rpm 離心 10 分鐘，將上清液移至 2mL 離心管，加入 200 μ L CD2，震盪 5 秒，以攝氏 4 度 13,000 rpm 離心 1 分鐘，取 700 μ L 上清液至新的 2mL 離心管，加入 600 μ L CD3，震盪 5 秒，取 650 μ L 震盪後液體至 MB Spin Column，以攝氏 4 度 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將過濾下來之液體倒掉，再取 650 μ L 震盪後液體至 MB Spin Column，以攝氏 4 度 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將過濾下來之液體倒掉，換新的 2mL Collection tube，加入 500 μ L EA 至 MB Spin Column，以攝氏 4 度 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將過濾下來之液體倒掉，加入 500 μ L C5 至 MB Spin Column，以攝氏 4 度 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將過濾下來之液體倒掉，換新的 2mL Collection tube，離心 2 分鐘甩乾剩餘液體，將 MB Spin Column 移至新的 1.5mL Elution tube，加入 20 μ L Q 水至 MB Spin Column 濾膜中間，以攝氏 4 度 15,000 rpm 離心 2 分鐘，收集到的液體為珊瑚 DNA，保存於攝氏-20 度。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。接著使用引子 U968F (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') 和 U1391R (5'-ACGGGCGGTGWGTRC-3') 引子從 DNA 產物中擴增細菌 16S rRNA 基因 V6-V8 高變異區，產生 424 bp 片段。PCR 混合物含有 4 μ L 2.5 mM dNTP、1 μ L 每種引子 (10 μ M)、0.5 μ L 5 U TaKaRa Ex Taq (Takara Bio, 日本)、5 μ L 10 \times Ex Taq 緩衝液和 5 μ L (10–20 ng) 模板

DNA。PCR 過程為 initiation 在 94°C 下持續 5 分鐘，然後進行 30 個循環，即在 94°C 下 denaturation 30 秒，在 58°C 下 annealing 20 秒，在 72°C 下 extension 30 秒，最後在 72°C 下 extension 10 分鐘。按照製造商的建議，以 1.5% agarose gel 和 QIAEX II Agarose Gel Extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 純化 PCR 產物。純化的 PCR 產物的品質透過 NanoDrop 分光光度計(Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA)進行檢查。PCR 產物的長度在 1.5% agarose gel 上檢查。接著送以廠商進行後續步驟，並使用 Illumina MiSeq 進行 2×300 雙端讀長定序。

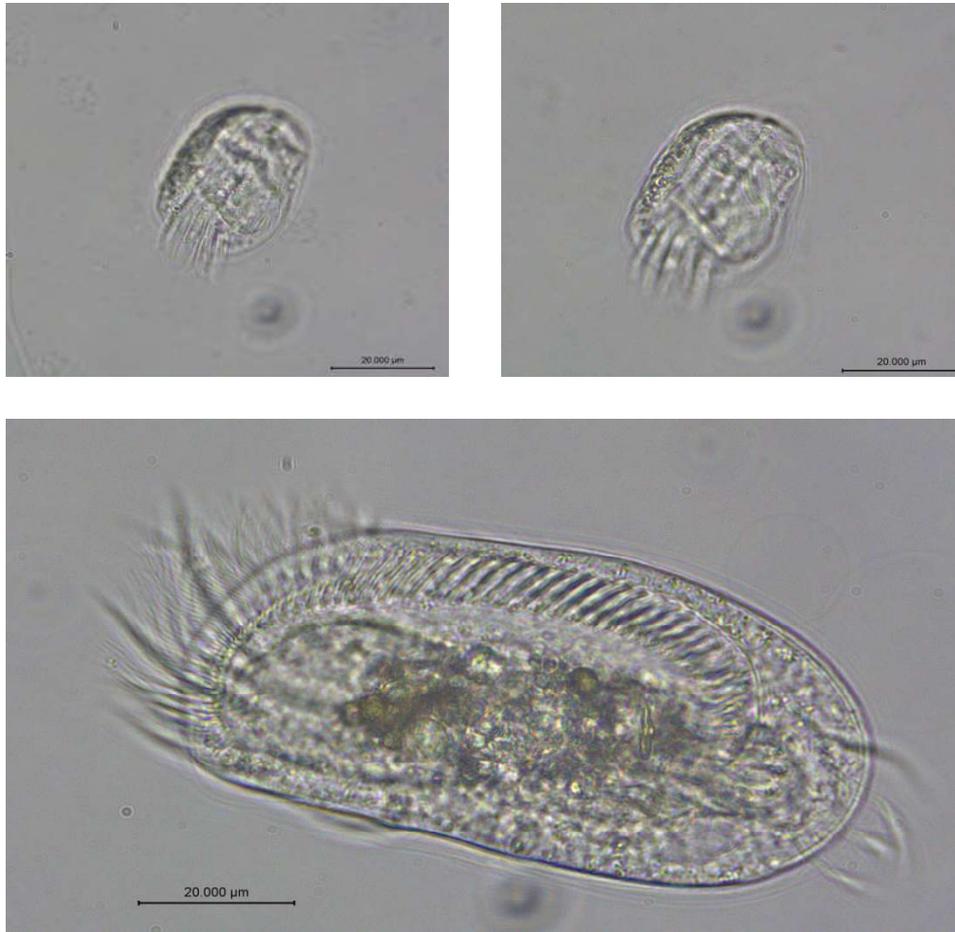
4. 數據分析

Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME2) 流程處理從 16S rRNA 基因擴增子定序獲得的原始 FASTq 格式文件(Bolyen *et al.*, 2019)。隨後應用 DADA2 外掛程式(版本 2019.1.0)來去除 chimeras、denoise 和修剪配對末端序列(Callahan *et al.*, 2016)。在 amplicon sequence variants (ASV) 層級檢查序列。相對豐度低於 0.005% 且對應於葉綠體或粒線體的 ASV 以及定序對照組中發現的任何萃取試劑盒污染物均被去除。使用 classify-sklearn 根據 SILVA v138 資料庫分配分類法(Quast *et al.*, 2013)。使用 R 軟體，進行後續的 alpha-以及 beta- diversity 分析。

第三章 結果與討論

1. 纖毛蟲型態

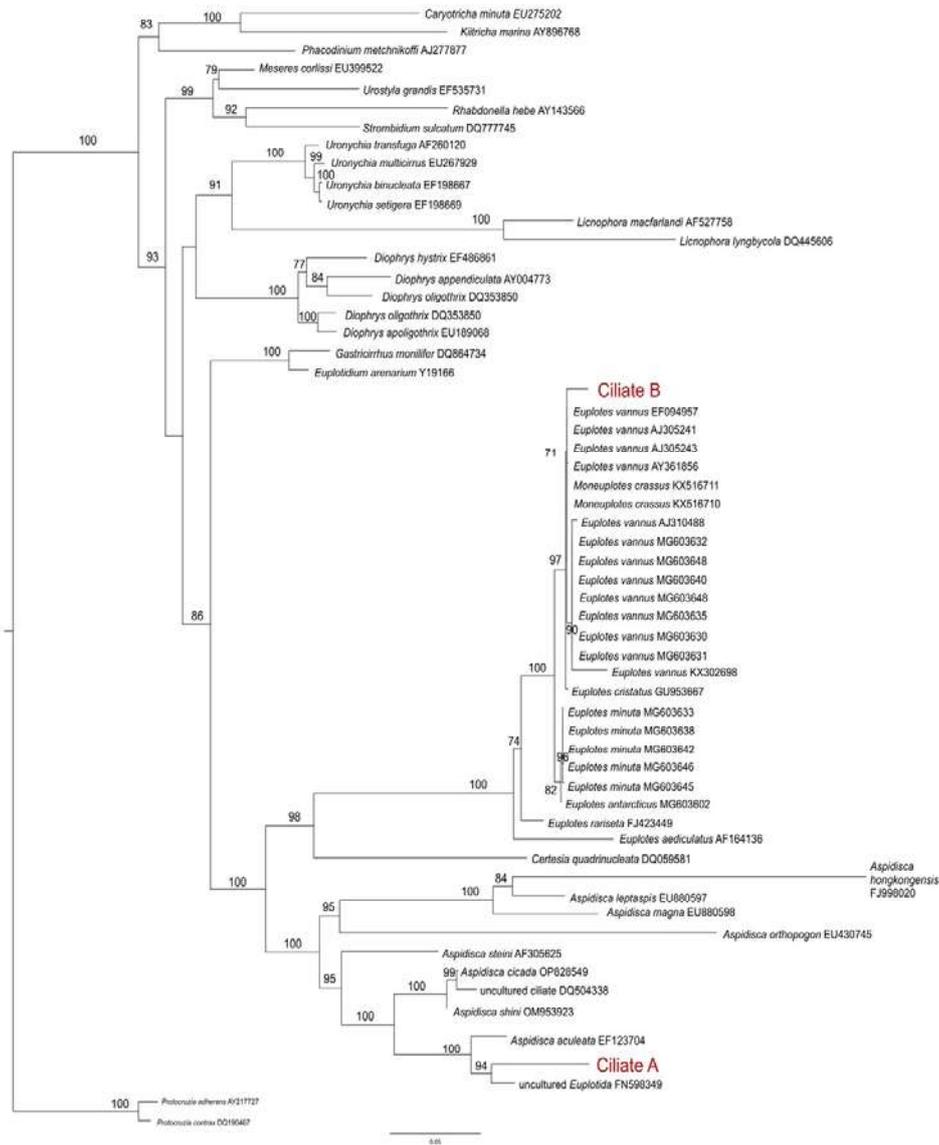
以顯微鏡下，手挑單離的方式在感染珊瑚之水樣中，成功培養出兩種的纖毛蟲，第一種分離到的纖毛蟲表示為纖毛蟲 A，體型橢圓，大小長約為 30 μm ，寬約為 20 μm ，具有針狀纖毛在尾部。第二種為纖毛蟲 B，體型橢圓，大小長為 80 μm ，寬 40 μm ，具有明顯的針狀纖毛在頭部與尾部，於底部游動爬行(圖三)。細胞體表面還具有明顯的纖毛排列。



圖三、纖毛蟲於 1000 倍正立式顯微鏡下的外部型態。

2. 纖毛蟲親緣關係樹狀圖

根據圖四所示之分子親緣關係樹結果，樣本中之纖毛蟲 A 與已知種 *Aspidisca aculeata* 具高度親緣相似性，顯示其可能屬於同一屬或近緣類群；而纖毛蟲 B 則與 *Euplotes vannus* 呈現較高相似度，推測其歸屬於 *Euplotes* 屬或與其具有相近的演化關係。此結果有助於後續進一步確認物種分類與生態功能探討。



圖四、纖毛蟲 A(Ciliate A)與纖毛蟲 B (Ciliate B)之親緣關係樹(ML tree)，數字表示 bootstrap value ，其中>60 才會顯示。

3. 纖毛蟲生長曲線

在纖毛蟲 *Aspidisca aculeata* 生長曲線方面，進行具有米粒與 yeast extraction 作為營養來源的實驗瓶(圖五)。生長期 (Day 0-Day 4)：纖毛蟲的數量從 40 cells/mL 增至 1105 cells/mL，增長幅度極大，呈現快速的指數型增長(圖五 A)；緩慢增長至高峰 (Day 4-Day 7)：從 Day4 的 1105 cells/mL 增長到 Day7 的 1405 cells/mL，增長速率明顯減緩並達到高峰；急遽下降 (Day 7-Day 10)：從 Day7 的峰值 1405 降至 Day10 的 585 cells/mL，下降幅度明顯；恢復期 (Day 10-Day 13)：從 Day10 的 585 cells/mL 回升至 Day13 的 810 cells/mL。第二次生長曲線結果顯示，快速生長期 (Day 0-Day 4)：纖毛蟲的數量從 40 cells/mL 增至 930 cells/mL，增長幅度極大，呈現快速的指數型增長；緩慢增長至高峰 (Day 4-Day 7) (圖五 B)。從 Day4 的 930 cells/mL 增長到 Day7 的 1040 cells/mL，增長速率明顯減緩並達到高峰；急遽下降 (Day 7-Day 13)：從 Day7 的峰值 1040 cells/mL 降至 Day13 的 660 cells/mL。第三次生長曲線結果顯示，生長期 (Day 0-Day 4)：纖毛蟲的數量從 40 cells/mL 增至 950 cells/mL，增長幅度極大，呈現快速的指數型增長；緩慢增長至高峰 (Day 4-Day 7)：從 Day4 的 950 cells/mL 增長到 Day7 的 1295 cells/mL，增長速率明顯減緩並達到高峰；急遽下降 (Day 7-Day 13)：從 Day7 的峰值 1295 降至 Day13 的 25 cells/mL(圖五 C)。

在纖毛蟲 *Euplotes vannus* 的生長曲線部分，以具有米粒與 yeast extraction 作為營養來源的實驗瓶進行，生長曲線方面表現於圖六~七。圖六為僅具有米粒作為營養來源的實驗瓶。第一次的生長曲線顯示，纖毛蟲生長數量表現，約可以分為三個階段。生長期 (Day 0-Day 8)：初始數量為 65 cells/mL，Day6 增至 150 cells/mL，Day8 為 220 cells/mL，生長平

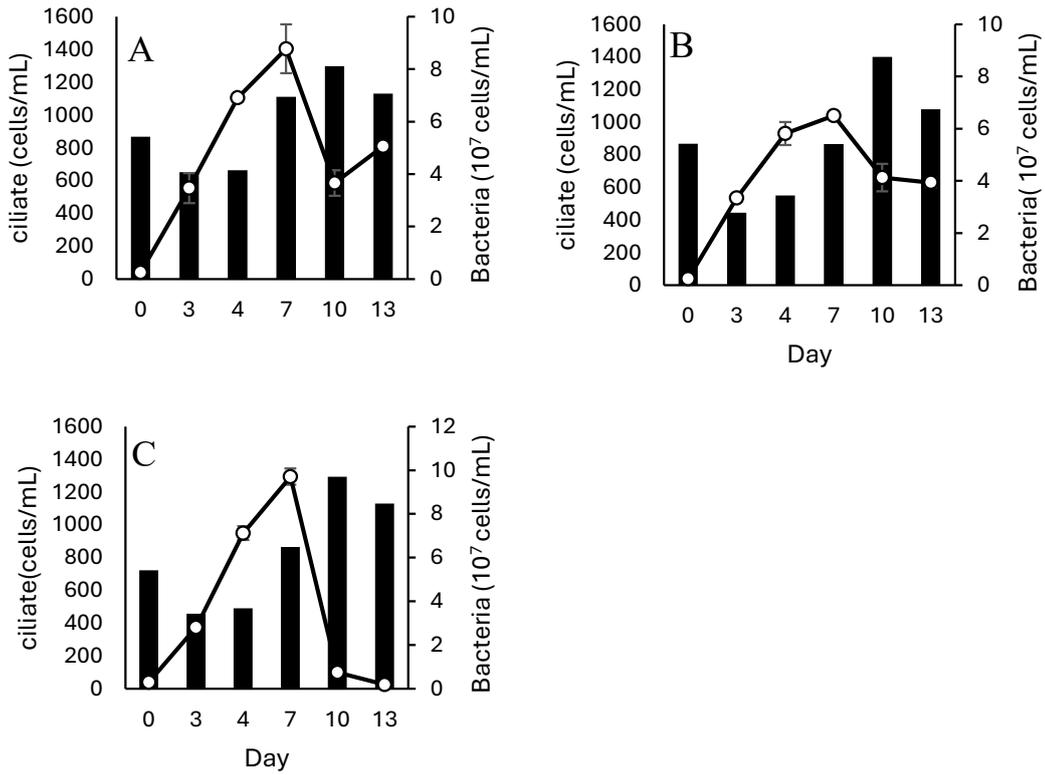
緩；快速增長期 (Day 8-Day 16)：到 Day16 達到峰值 313 cells/mL，增長速度明顯加快；下降期 (Day 16-Day 24)：從 Day16 的 313 cells/mL 降至 Day24 的 250cells/mL(圖六 A)。第二次的生長曲線顯示，纖毛蟲 A 生長數量表現，整體數量較第一次觀察的低，但是同樣約可以分為三個階段。生長初期 (Day 0-Day 6)：初始數量為 60 cells/mL，增長平穩，Day6 為 155 cells/mL；快速增長期 (Day 6-Day 12)：Day12 達到峰值 435，增長速度明顯加快；下降期 (Day 12-Day 16)：從 Day12 的峰值 435 cells/mL 降至 Day16 的 346 cells/mL；Day 16 開始數量有略回升，Day24 達到 505 cells/mL(圖六 B)。第三次的生長曲線顯示，生長期 (Day 0-Day 6)：初始數量為 65 cells/mL，Day6 增至 165 cells/mL；快速增長期 (Day 6-Day 12)：Day12 達到峰值 410 cells/mL；下降期 (Day 12-Day 16)：從 Day12 的峰值 410 cells/mL 降至 Day16 的 330 cells/mL；穩定期 (Day 16-Day 24)：後期數量穩定在 400 cells/mL 附近(圖六 C)。

圖七為具有米粒與 yeast extraction 作為營養來源的實驗瓶，由第一次生長曲線結果看出，生長期 (Day 0-Day10)：從初始數量 65 cells/mL 增加到 305 cells/mL，整體呈穩定增長。下降期 (Day 10-Day24)：Day10 達到峰值後逐步下降，並在 Day16 出現下降趨勢，隨後 Day18 有短暫回升到 273 cells/mL，之後持續下降到 150 cells/mL(圖七 A)。第二次生長曲線結果顯示，生長初期 (Day 0-Day 8)：數量從 Day0 的 55 cells/mL 增長至 Day8 的 245 cells/mL，穩定增長；第一次下降 (Day 8-Day 10)：Day 8 達到 245 cells/mL 後，數量下降至 Day10 的 170 cells/mL，顯示短暫的下降趨勢；恢復期 (Day 10-Day 14)：從 Day10 的 170 迅速增長至 Day 14 的 280 cells/mL，接近之前的高點；第二次下降 (Day 14-Day 16)：數量從 Day 14 的 280 cells/mL 減少到 Day 16 的 223 cells/mL；第二次恢復 (Day 16-Day 24)：在 Day 16 後恢復增長，至 Day 18 達到 320 cells/mL，最終在 Day24

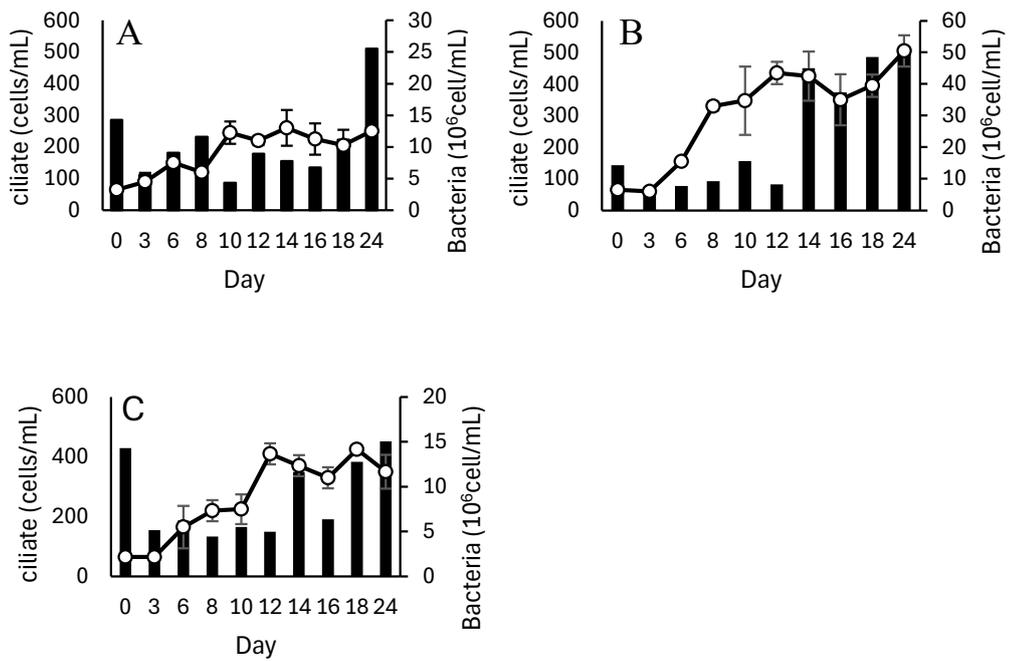
達到 380 cells/mL(圖七 B)。

第三次生長曲線結果顯示，生長初期 (Day 0-Day 8)：數量從 Day0 的 75 cells/mL 增長至 Day8 的 265 cells/mL，表現出穩定增長；第一次下降 (Day 8-Day 10)：Day8 達到 265 cells/mL 後，數量下降至 Day10 的 160 cells/mL，顯示明顯的下降趨勢；恢復期 (Day 10-Day 14)：從 Day10 的 160 迅速增長至 Day14 的 383 cells/mL，超過之前的高點；第二次下降 (Day 14-Day 16)：數量從 Day14 的 383 cells/mL 減少到 Day16 的 223 cells/mL；第二次恢復 (Day 16-Day 24)：在 Day16 後恢復增長，並在 Day18 達到 465 cells/mL，最終於 Day24 達到 520 cells/mL(圖七 C)。

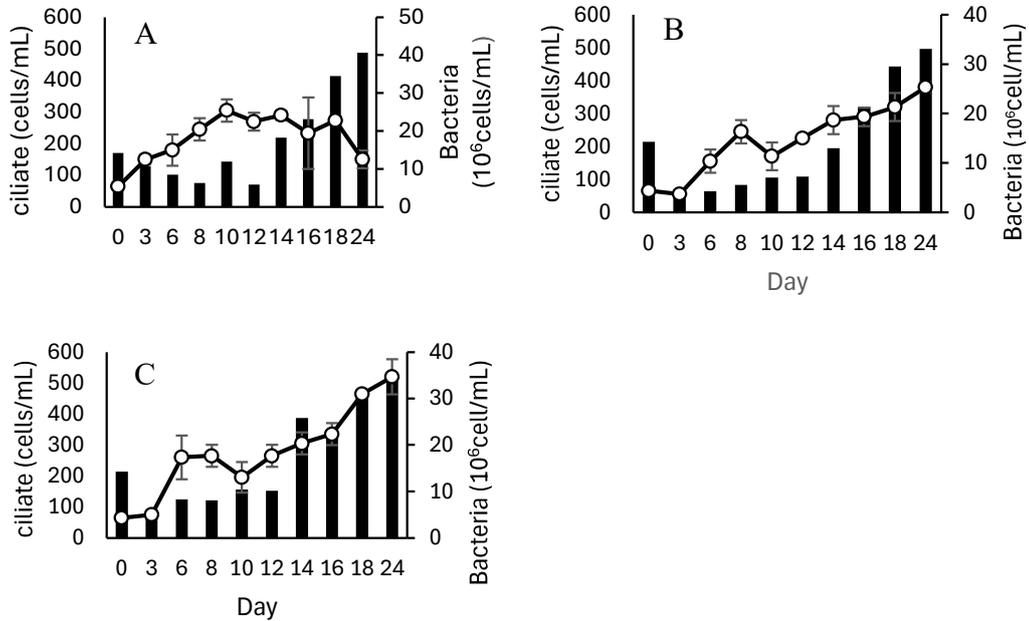
細菌的生長趨勢(圖五~七)，圖五 A~C 的細菌數皆在纖毛蟲 *Aspidisca aculeata* 快速增加時有些微下降，而後逐步上升，在 Day10 到達高峰。在圖六~七的細菌數在纖毛蟲 *Euplotes vannus* 數量增加時也有稍微下降，Day10 開始逐步上升，在 Day24 到達高峰。



圖五: 纖毛蟲 *Aspidisca aculeata* 細胞數量(cells/mL)與細菌數量(10^7 cells/mL)於三次觀察生長曲線實驗(A~C), 添加米粒與 yeast extraction 作為營養來源。



圖六、纖毛蟲 *Euplotes vannus* 細胞數量(cells/mL)與細菌數(10^6 cells/mL)於三次生長曲線實驗，僅添加米粒作為營養來源。



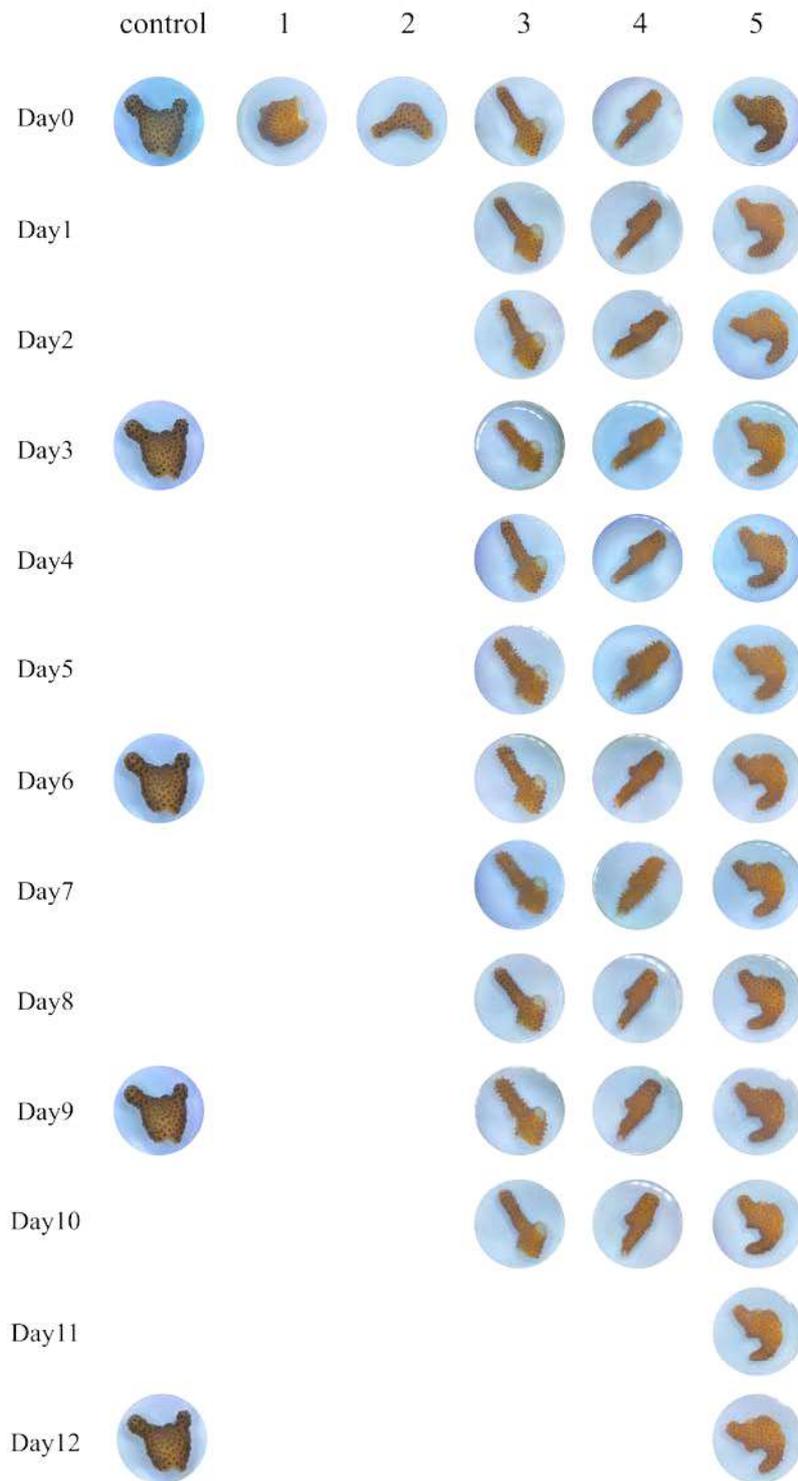
圖七、纖毛蟲 *Euplotes vannus* 細胞數量(cells/mL)與細菌數(10^6 cells/mL)於三次生長曲線實驗，添加米粒與 yeast extraction 作為營養來源。

由圖五~七可得知，纖毛蟲 *Euplotes vannus* 的生長週期較纖毛蟲 *Aspidisca aculeata* 長，對環境的耐受性與適應能力較高，其穩定期可持續至第 18 天左右，並進入緩慢的衰退期；纖毛蟲 *Aspidisca aculeata* 的生長週期則大約落在 4-7 天。纖毛蟲 *Euplotes vannus* 對環境的適應能力和穩定性較強，適合進行長期實驗；纖毛蟲 *Aspidisca aculeata* 則適合研究快速增長和快速回落的生物動態。因此後續珊瑚感染實驗，以穩定力較佳的纖毛蟲 *Euplotes vannus* 為主。

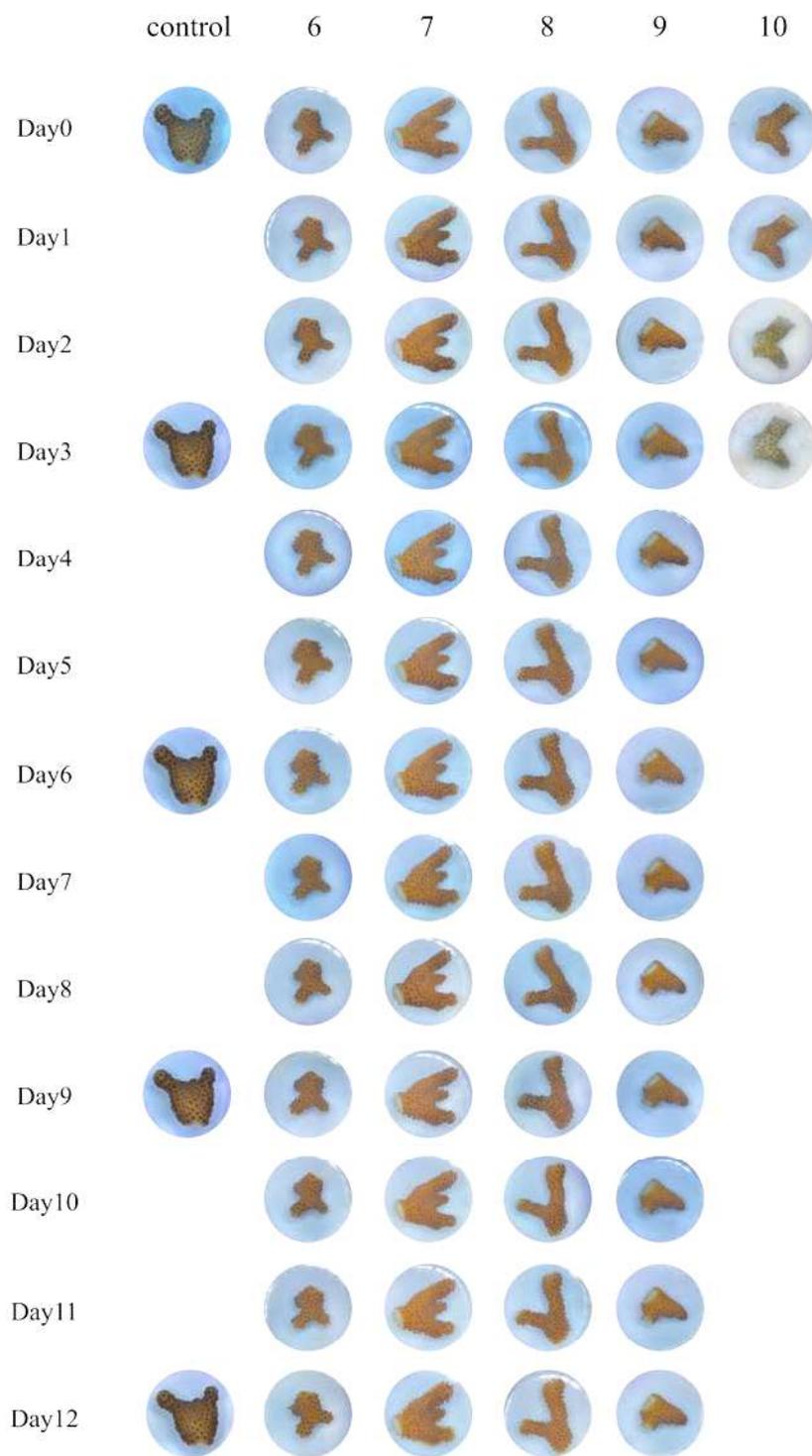
4. 不同珊瑚健康狀態下的樣本

圖八為控制組(不添加纖毛蟲 *Euplotes vannus*)以及將纖毛蟲 *Euplotes vannus* 接種至同株珊瑚的五個小塊(1、2、3、4、5)中後，珊瑚於解剖顯微鏡下 Day0-Day12 的照片。由圖八可得知控制組珊瑚於 Day0、Day3、Day6、Day9、Day12 生長狀態良好，於 Day12 採集保存；樣本 1、2 於 Day0 採集保存；樣本 3、4 於 Day0-Day10 生長情況良好，於 Day10 採集保存；樣本 5 於 Day0-Day12 之生長狀態亦無明顯區別，並於 Day12 採集保存。

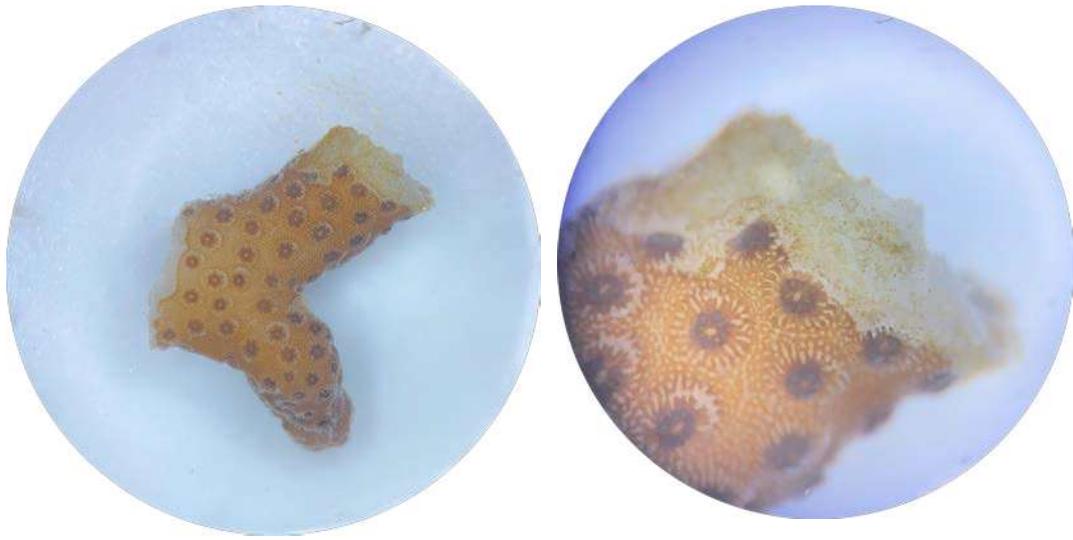
圖九為控制組(不添加纖毛蟲 *Euplotes vannus*)以及將纖毛蟲 *Euplotes vannus* 接種至同株珊瑚的五個小塊(6、7、8、9、10)中後，珊瑚於解剖顯微鏡下 Day0-Day12 的照片。由圖九可得知控制組珊瑚於 Day0、Day3、Day6、Day9、Day12 生長狀態良好，於 Day12 採集保存；樣本 6、7、8、9 於 Day0-Day12 生長良好，於 Day12 採集保存；而樣本 10 與其他樣本有十分顯著之差異，在 Day1 觀察到有纖毛蟲聚集現象(圖十)，而後 Day2-Day3 珊瑚迅速白化，因此於 Day3 採集保存樣本。



圖八、控制組(不添加纖毛蟲 *Euplotes vannus*)以及將纖毛蟲 *Euplotes vannus* 接種至同株珊瑚的五個小塊(1、2、3、4、5)中後，珊瑚於解剖顯微鏡下紀錄 Day0-Day12 珊瑚的照片。



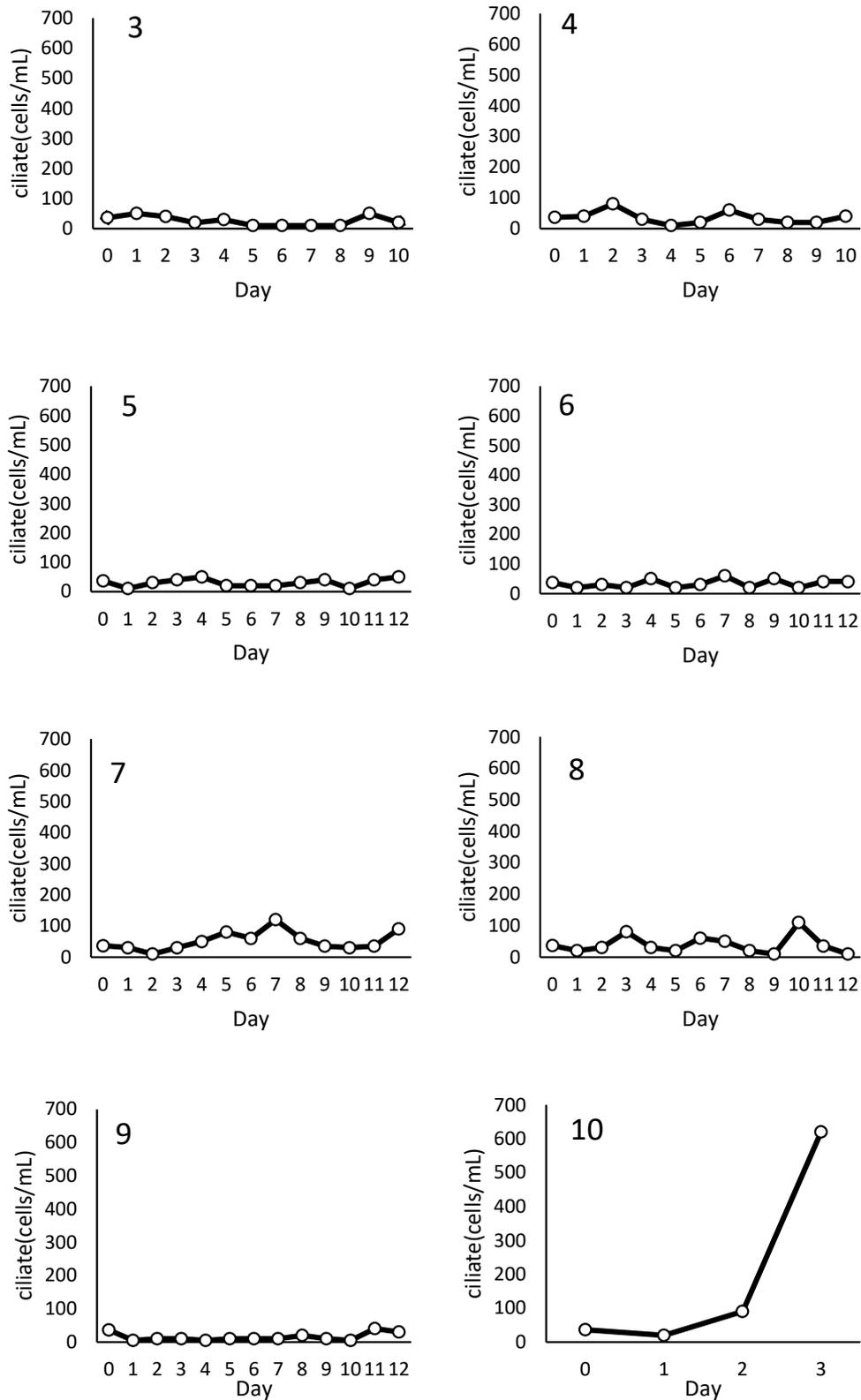
圖九、控制組(不添加纖毛蟲 *Euplotes vannus*)以及將纖毛蟲 *Euplotes vannus* 接種至同株珊瑚的五個小塊(6、7、8、9、10)中後，珊瑚於解剖顯微鏡下紀錄 Day0-Day12 珊瑚的照片。



圖十、珊瑚樣本 10 於 Day1 觀察到原生纖毛蟲聚集。

5. 不同珊瑚健康狀態下的海水中樣本纖毛蟲計數

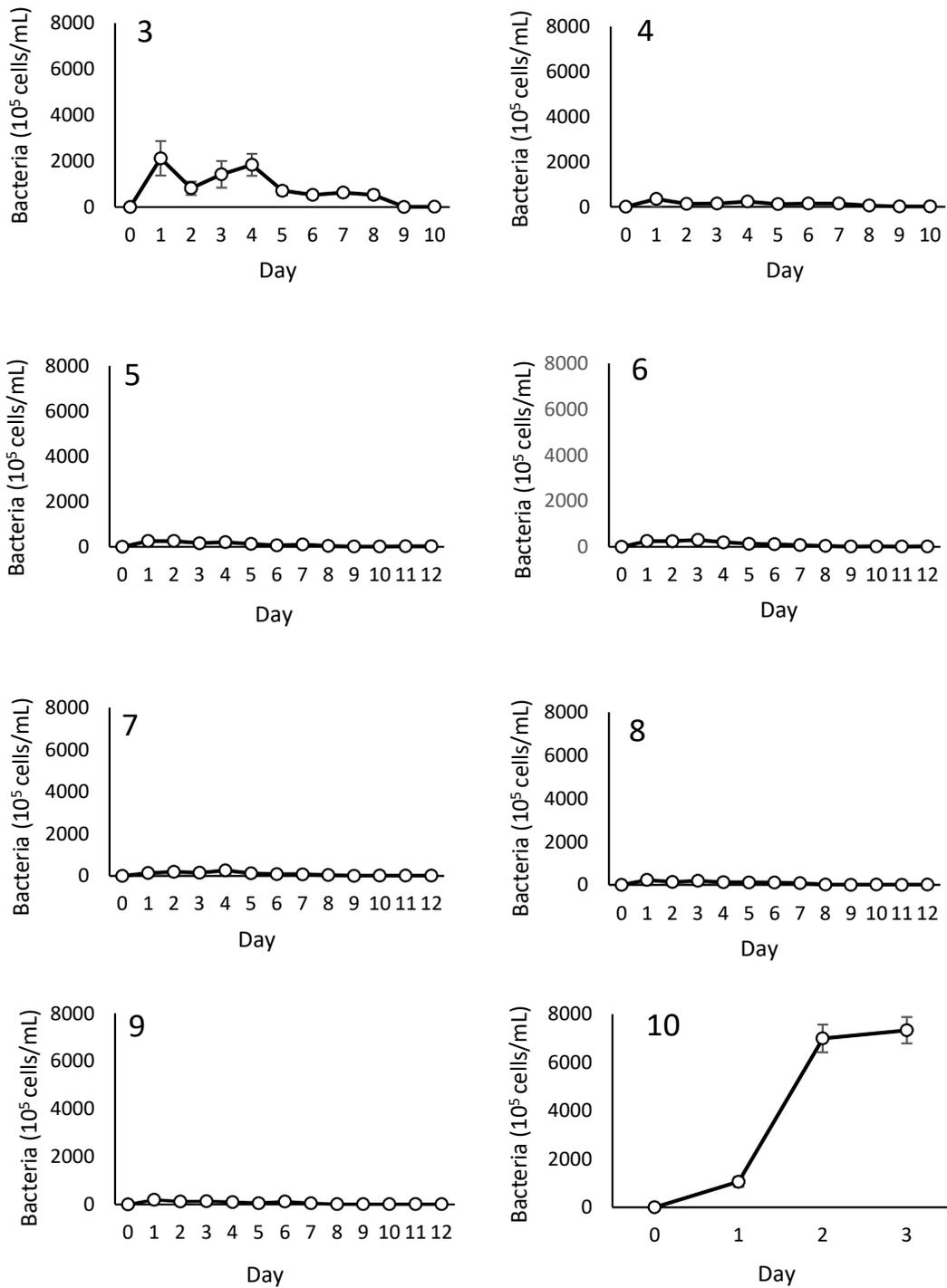
圖十一為在相同條件下，將纖毛蟲 *Euplotes vannus* 接種至同株珊瑚的八個小塊(3、4、5、6、7、8、9、10)後，纖毛蟲數量隨天數的變化的關係圖。可歸納為三種主要模式，穩定低密度型：樣本 3、4、5、6 與 9 的纖毛蟲數量整體偏低，多數時間維持在 100 cells/mL 以下。雖然在個別天數 (Day2、Day7) 曾出現小幅上升，但變化幅度有限，且並未形成持續性增殖。這些樣本的族群動態以輕微波動為主，顯示纖毛蟲在其中無法有效繁殖，族群結構趨於穩定。週期性增長型：樣本 7 與 8 則呈現不同的模式。這兩個樣本在 Day5-7 及 Day10-11 觀察到數量高峰，約 200-300 cells/mL。然後，高峰過後數量迅速下降，再度回到低值。顯示纖毛蟲無法長時間維持高密度，而是呈現週期性的「增殖—衰退」循環。爆發型：樣本 10 的纖毛蟲數量變化最為特殊。在前兩天與其他樣本相似，數量維持在低值，但於 Day3 出現劇烈上升，密度突破 600 cells/mL，遠高於其他樣本的最大值，Day3 的爆發式增殖顯示其具備在特定條件下短期內快速增殖的能力。



圖十一、在相同條件下，將纖毛蟲 *Euplotes vannus* 接種至同株珊瑚的八個小塊 (3、4、5、6、7、8、9、10) 中後，纖毛蟲數量隨天數的變化關係圖。

6. 不同珊瑚健康狀態下的海水樣本細菌計數

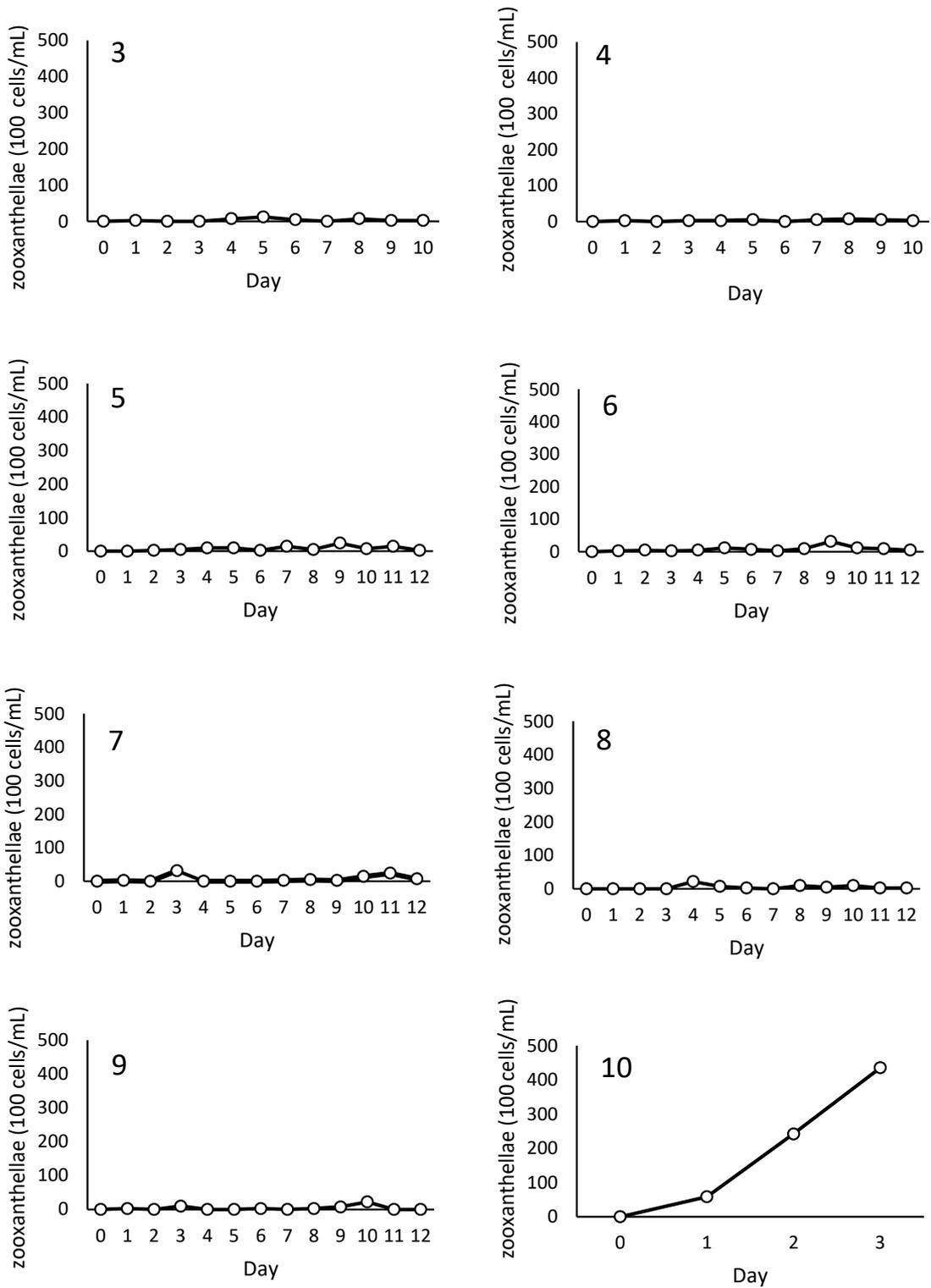
圖十二為上述相同八個樣本中，細菌數量與天數的關係圖，發現之間亦存在顯著差異，可歸納為三種類型。低度穩定型：樣本 3-9 的細菌數量長期維持在低數量（約 10^5 cells/mL），變化幅度不大，呈現相對穩定的狀態，這些樣本未出現顯著增殖，顯示細菌在樣本 3-9 中維持平衡。中度波動型：樣本 3 在前期（Day1-4）細菌數量出現高峰，最高達約 4000×10^5 cells/mL，之後逐漸下降並趨於穩定，此顯示細菌族群在樣本 3 中能快速繁殖，但高峰後無法長期維持。爆發型：樣本 10 的變化最為明顯。細菌在初期仍維持低值，但於 Day2-3 急遽上升至超過 6000×10^5 cells/mL，遠高於其他樣本，顯示細菌在樣本 10 中爆發性繁殖，與前述纖毛蟲的增殖趨勢相呼應。



圖十二、在相同條件下，將纖毛蟲 *Euplotes vannus* 接種至同株珊瑚的八個小塊 (3、4、5、6、7、8、9、10) 中後，其中細菌數量隨天數的變化關係圖。

7. 不同珊瑚健康狀態下的海水樣本共生藻計數

圖十三為上述相同八個樣本中，共生藻(zooxanthellae)數量與天數的關係圖，樣本 3、4、9 中的共生藻數量始終維持在低數量，幾乎沒有變化。樣本 5 與 6 中的共生藻數量雖有些微波動(如 Day 9)，但整體仍處於低值。樣本 7 與 8 中的共生藻數量在 Day3、Day 數量也有些微上升，隨後則持續下降。樣本 10 共生藻數量變化最為明顯，自 Day0 起持續增加，至 Day3 達到近 40000 cells/mL，顯示共生藻快速累積，與前述纖毛蟲與細菌在樣本 10 中的增殖趨勢相呼應。



圖十三、在相同條件下，將纖毛蟲 *Euplotes vannus* 接種至同株珊瑚的八個小塊 (3、4、5、6、7、8、9、10) 中後，其中共生藻數量隨天數的變化關係圖。

8. 珊瑚樣本的大規模定序

本實驗將珊瑚進行 genomic DNA 抽取，以 Nanodrop 量測過後，其濃度值介在 13-245 ng/ul 之間。預計將所有樣本進行 genomic DNA 抽取過後，再進行針對 16s rRNA V6-V8 region 的 PCR 與純化等步驟，未來送入廠商後，則可獲得首批大規模定序的結果。

表一、珊瑚樣本經由萃取過後，所量測的 DNA 濃度

	Abs (260/280)	Concentration (ng/ul)
樣本 3	1.84	245
樣本 5	1.87	98.8
樣本 8	1.87	68.4
樣本 10	1.67	13.1

第四章、結 論

本研究初步成功地分離與培養了兩種與珊瑚疾病相關的纖毛蟲，並以實驗證明了纖毛蟲 *Euplotes vannus* 具備在特定條件下引發珊瑚白化及周圍微生物群落爆發性增殖的能力。這一發現不僅確立了纖毛蟲在珊瑚健康惡化中的潛在角色，更重要的是，它揭示了珊瑚疾病的發生可能並非單一病原體所致，而是由纖毛蟲、細菌、甚至共生藻等微生物群落相互作用所驅動的複雜過程。在模擬感染實驗中，我們觀察到大多數樣本雖然接種了纖毛蟲，但珊瑚並未出現顯著病變。然而，在單一樣本（樣本 10）中，纖毛蟲的數量呈現爆發性增長，並伴隨珊瑚的迅速白化。樣本 10 的結果顯示，纖毛蟲數量的激增與周圍水體中細菌和共生藻的爆發性增長高度同步。這強烈暗示了在珊瑚疾病的發生過程中，纖毛蟲與其周圍的細菌及共生藻之間可能存在著一種正向回饋機制 (positive feedback loop)，共同加速了珊瑚的健康崩潰。例如，纖毛蟲可能以細菌或共生藻為食，其增殖反過來又促進了這些微生物的生長，形成惡性循環。

第五章、參考資料

Michael Sweet and John Bythell(2012) Ciliate and bacterial communities associated with White Syndrome and Brown Band Disease in reef-building corals. *Environmental Microbiology* 14, 2184–2199.

Zhe Wang, Tong Wu, Borong Lu, Yong Chi, Xue Zhang, Saleh A. Al-Farraj, Weibo Song, Alan Warren, Lifang Li, Chundi Wang(2021) Integrative Studies on a New Ciliate *Campanella sinica* n. sp. (Protista, Ciliophora, Peritrichia) Based on the Morphological and Molecular Data, With Notes on the Phylogeny and Systematics of the Family Epistylididae. *Frontiers in Microbiology* 12:718757

Benkwitt CE, Wilson SK & Graham NA (2020) Biodiversity increases ecosystem functions despite multiple stressors on coral reefs. *Nature Ecology & Evolution* 4: 919-926.

Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M & Asnicar F (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology* 37: 852-857.

Bourne DG, Boyett HV, Henderson ME, Muirhead A & Willis BL (2008) Identification of a ciliate (Oligohymenophorea: Scuticociliatia) associated with brown band disease on corals of the Great Barrier Reef. *Appl Environ Microb* 74: 883-888.

Bruno JF, Côté IM & Toth LT (2019) Climate change, coral loss, and the curious case of the parrotfish paradigm: why don't marine protected areas improve reef resilience? *Annual review of marine science* 11: 307-334.

Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA & Holmes SP (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods* 13: 581-583.

Cesar H, Burke L & Pet-Soede L (2003) The economics of worldwide coral reef

degradation.

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.

Fan T-Y & Dai C-F (1999) Reproductive plasticity in the reef coral *Echinopora lamellosa*. *Mar Ecol Prog Ser* **190**: 297-301.

Harvell D, Jordán-Dahlgren E, Merkel S, Rosenberg E, Raymundo L, Smith G, Weil E & Willis B (2007) Coral disease, environmental drivers, and the balance between coral and microbial associates. *Oceanography* **20**: 172-195.

Hughes TP, Kerry JT, Álvarez-Noriega M, Álvarez-Romero JG, Anderson KD, Baird AH, Babcock RC, Beger M, Bellwood DR & Berkelmans R (2017) Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature* **543**: 373-377.

Hughes TP, Kerry JT, Baird AH, Connolly SR, Dietzel A, Eakin CM, Heron SF, Hoey AS, Hoogenboom MO & Liu G (2018) Global warming transforms coral reef assemblages. *Nature* **556**: 492-496.

Loya Y, Sakai K, Yamazato K, Nakano Y, Sambali H & Van Woesik R (2001) Coral bleaching: the winners and the losers. *Ecol Lett* **4**: 122-131.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T & Yarza P (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**: D590-D596.

Ravindran C, Raveendran HP & Irudayarajan L (2022) Ciliated protozoan occurrence and association in the pathogenesis of coral disease. *Microbial Pathogenesis* **162**: 105211.

Reaka-Kudla ML (1997) The global biodiversity of coral reefs: a comparison with rain forests. *Biodiversity II: Understanding and protecting our biological resources* **2**:

551.

Ritchie KB (2006) Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* **322**: 1-14.

Rohwer F, Seguritan V, Azam F & Knowlton N (2002) Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* **243**: 1-10.

Shin YJ, Midgley GF, Archer ER, Arneith A, Barnes DK, Chan L, Hashimoto S, Hoegh-Guldberg O, Insarov G & Leadley P (2022) Actions to halt biodiversity loss generally benefit the climate. *Global change biology* **28**: 2846-2874.

Sweet M & Bythell J (2012) Ciliate and bacterial communities associated with White Syndrome and Brown Band Disease in reef-building corals. *Environ Microbiol* **14**: 2184-2199.

Sweet M, Croquer A & Bythell J (2011) Bacterial assemblages differ between compartments within the coral holobiont. *Coral Reefs* **30**: 39-52.

Vega Thurber R, Mydlarz LD, Brandt M, Harvell D, Weil E, Raymundo L, Willis BL, Langevin S, Tracy AM & Littman R (2020) Deciphering coral disease dynamics: integrating host, microbiome, and the changing environment. *Frontiers in Ecology and Evolution* **8**: 575927.