

研究報告

綠島珊瑚黑病與星野黑皮海綿單離出之弧菌 病原關係之探討

王志騰^{1,4}，陳文明²，陳昭倫³

¹大仁科技大學生物科技系；²國立高雄海洋科技大學水產食品系；³中央研究院生物多樣性中心；
⁴通訊作者 (jtw@mail.tajen.edu.tw)

[摘要] 從珊瑚黑病(black disease)上黑色的海綿樣品中，共分離得 45 株純化菌株，經分析形態特徵、革蘭氏染色、弧菌選擇性培養基測試(TCBS agar)、生化反應特徵、16S rRNA 基因等，結果顯示 44 株菌株為革蘭氏陰性反應，僅有 1 株菌株為革蘭氏陽性反應。由於 93.3%可培養的細菌都是弧菌，顯然這些細菌與固氮作用並無關係，而由於星野黑皮海綿無法於實驗室中馴養，單離培養星野黑皮海綿中主要的藍綠菌無法成功，因此本實驗固氮作用與星野黑皮海綿的關係並無法順利進行。但於 44 株弧菌中，根據優勢性及特殊性選擇 3 株(Sponge- 12、Sponge- 19、Sponge- 41)進行致病能力測試，結果發現在 24 個樣品中，只在海水的銨-[氮]增加至 0.1ppm 時，於 25°C 下，Sponge- 12 造成 2 次，Sponge- 19 會造成 1 次表孔珊瑚(*Montipora* sp.) 白化死亡，而高溫(29°C)或低溫(21°C)並不會提高珊瑚受此三株弧菌感染的死亡率，經採集黑病海域的健康與被海綿部分侵襲的表孔珊瑚，進行弧菌 Sponge- 12 的免疫染色分析，結果顯示沒有海綿感染的珊瑚也可偵測到此弧菌，而且在被海綿部分感染的珊瑚上，其近海綿端並沒有比遠離海綿端有較多的弧菌被偵測出來，因此海綿侵襲珊瑚是經由海綿體表(或體內)所含的弧菌先殺死珊瑚，再由海綿佔領珊瑚表面的假設，似乎是無法成立。

關鍵字：珊瑚、星野黑皮海綿、弧菌、黑病

A Study on the Relationship between *Vibrio* spp. Isolated from Sponge *Terpios hoshinota* and the Cause of Black Disease in Corals around Green Island

Jih-Terng Wang^{1,4}, Wen-Ming Chen² and Chaolun Allen Chen³

¹Department of Biotechnology, Tajen University, ²Department of Sea Food Science, National Kaohsiung Marine University, ³Research Center for Biodiversity, Academia Sinica, ⁴Corresponding author (jtw@mail.tajen.edu.tw)

ABSTRACT In this study, in total 45 strains of *Vibrio* spp. were isolated from sponge infected corals to examine their morphological characteristics, Gram stain, *Vibrio* selective agar, biochemical activities, and 16S rRNA. Results indicate that 44 strains were Gram negative and only one strain was Gram positive. All 44 Gram negative strains belonged to *Vibrio* spp. Examination of pathogenicity of the dominant strains (Sponge- 12、Sponge- 19、Sponge- 41) reveal that only when ammonium

concentration was increased to 0.1ppm and at 25°C, strain Sponge-12 had caused death of *Montipora aequituberculata* twice and Sponge-19 once. High (29°C) or low temperature (21°C) did not increase the mortality of coral infected by *Vibrio* spp. An immuno-histochemical examination showed that almost all including healthy coral contained *Vibrio* spp. Moreover, coral tissue close to infecting sponge did not display higher content of *Vibrio* spp. Detected *Vibrio* spp. was found in the digestive cavity but not inside the coral cells. Results in this study suggest that *Vibrio* spp. isolated from *T. hoshinota* might not be the cause of infection in coral.

Keywords: coral, *Terpios*, *Vibrio*, black disease

前言

於 2006 年珊瑚總體檢發現綠島的珊瑚礁有近 30% 為黑色薄膜狀物質覆蓋，經本團隊初步的調查發現為一類黑色的海綿覆生在珊瑚上所造成，簡稱為黑病(black disease)。其造成原因與致病的機制不明仍待進一步的研究與監測。本研究擬就珊瑚黑病病體之微生物培養、鑑定分析可能之病原菌與珊瑚被星野黑皮海綿侵襲的原因，並配合海水之物理化學性質的分析，建構出綠島珊瑚黑病形成的原因與康復珊瑚生態的可能方案。

已有許多文獻指出，珊瑚的死亡通常是由於環境的改變和惡化(如溫度過高、接觸污染物)或是感染病原微生物所導致。文獻上已有數種珊瑚疾病是被證實與微生物感染有關，如在 1990 年代中期，在加勒比海與佛羅里達海域發生大規模海扇(*Gorgonia* spp.)組織的分解病徵，病灶為類似擦傷的紫色組織，造成海扇族群死亡。目前已知分離出一新種的真菌 *Aspergillus sydowii* (Geiser et al. 1998)。Alker 等於 2001 年發現，*Aspergillus sydowii* 可分成由陸地分離的菌株但非海扇致病菌株與由海扇菌病分離的海扇致病菌株。

此外，珊瑚亦有所謂白斑病、白帶病和有關珊瑚白化之疾病(White plague, white band, and other “white” disease)，此類病徵有許多名稱，但病徵大致特徵類似，只是進展速度不同，此病之特徵為珊瑚出現一條裸露白色骨骼的區塊，而慢慢往健康珊瑚方向移動。大致為每天擴展數公厘。造成此類白化之疾病之微生

物種類眾多，以異營性海洋菌為主，包括主要的弧菌屬(*Vibrio*)、腸道菌科的 *Serratia marcescens* 和 *Sphingomonas* sp. 以及新發現的 *Aurantimonas corallicida* 與 *Thalassomonas loyana*。

弧菌科(*Vibrionaceae*)之弧菌屬(*Vibrio*)細菌為海水常見之細菌。弧菌屬(*Vibrio*)細菌亦是珊瑚常見的感染菌，例如 *Vibrio coralliilyticus*、*Vibrio shilonii*、*Vibrio carchariae* 與 *Vibrio alginolyticus* 等被報告與珊瑚白化有關。*Vibrio shilonii* 為 Kushmaro 等人於 2001 年報告之一新種弧菌，造成東地中海地區之珊瑚 *Oculina patagonica* 之白化疾病。*Vibrio coralliilyticus* 為 Ben-Haim 等人於 2003 年報告之一新種弧菌，可造成印度洋與海洋地區之珊瑚 *Pocillopora damicornis* 之白化與溶解疾病。*Vibrio carchariae* 為 Grimes 等人於 1984 年報告的一種鯊魚分離出之弧菌，其後證實即為語 *Vibrio harveyi* 同名，造成加勒比海洋地區之珊瑚 *Acropora* spp. 之白帶(White band)病 (Gil-Angudelo et al. 2006)。*Vibrio alginolyticus* 弧菌具有洋菜溶解能力，Cervino 等人於 2004 年報告，*Vibrio alginolyticus* 與其他三種未命名弧菌可造成加勒比海洋地區之珊瑚 *Montastraea* spp. 之 Yellow blotch 病。Patterson 等人於 2002 年報告在加勒比海之珊瑚 *Acropora palmate*，是由一常見的糞便腸道桿菌科 *Serratia marcescens* 造成白痘病(white pox)，此發現也是首次證實人類腸道菌亦可造成海洋無脊椎動物致病，但 *Vibrio* 與珊瑚白化的關係能有爭議。



王志騰，陳文明，陳昭倫

除弧菌屬 (*Vibrio*) 細菌與腸道菌科的 *Serratia marcescens* 外，尚有 *Sphingomonas* sp. 及新發現的 *Aurantimonas coralicida* 與 *Thalassomonas loyana* 亦可造成珊瑚白化。Richardson 等人於 1998 年報告佛羅里達州海域神秘的珊瑚死亡是由一未知的新種 *Sphingomonas* sp. 造成。Denner 等人於 2003 年報告一新屬新種細菌 *Aurantimonas coralicida* 為革蘭氏陰性菌，屬於甲型變形桿菌綱，接近於根瘤菌目 *Rhizobiales* 的一群海洋菌，造成 *Dichocoenia stokesi* 第二型白斑病。Thompson 等人於 2006 年報告一新種細菌 *Thalassomonas loyana*，該菌屬於丙型變形桿菌綱 *Colwelliaceae* 科，造成紅海之珊瑚 *Favia favaus* 類似於白斑病的病症。

最早於 1973 年 Bryan 即曾報導珊瑚的黑色帶狀病，此黑帶會不斷向健康珊瑚端擴展，使珊瑚蟲死亡。此疾病移動速率可達到每天 2 cm，並且於較溫暖的夏季快速感染惡化。此疾病過去主要在加勒比海被觀察到，但現在已經有許多研究指出在大西洋、印度太平洋、紅海等，都有其蹤跡。

此黑帶病之顯微鏡檢觀察發現疾病組織中存有異營性與光合菌。許多微生物被懷疑與黑帶病有關，包括了可能的致病菌 *Phormidium coraliticum*，與硫還原菌 *Desulfovibrio* 與 *Beggiatoa* spp. (Cooney, et al. 2002, Frias-Lopez, et al. 2003, Rosenberg, et al. 2007, Voss, et al. 2007)。

學界對此疾病之瞭解不多，需進一步研究。在海洋中存在許多不同的細菌可能會使珊瑚弱化甚至進而白化死亡的機制應該是存在著，因此研究的目的即是探討星野黑皮海綿是否利用本身所含的某種珊瑚的病原菌，在與珊瑚接觸時，使珊瑚生理機能弱化，進而占據死去珊瑚的地盤，同時也探討海水的銨態氮（海水最常見的污染源）是否為珊瑚受病原菌感染的輔助因子。

材料與方法

60

一、採樣與前處理

分離純化細菌用之黑病珊瑚樣品於 2007 年 7 月 18 日採樣，免疫組織染色用之珊瑚樣本於 2008 年 8 月 6 日採樣，採樣點於綠島公館海域水深 1-3 米珊瑚黑病感染區，利用水肺潛水，使用潛水刀及鏟子採集覆蓋於珊瑚各 3 個重複樣品，分離純化細菌用之黑病珊瑚樣品樣品約 2 cm³ 大小，各放入無菌 50 ml 離心管中，帶回岸上後，倒掉海水，用過濾滅菌海水沖洗兩次（避免海水中微生物或表面沉積物），放入 4 °C 低溫冷藏送回實驗室，於實驗室中，將樣品到入杵鉢中磨碎，取 1 mL 壓碎後樣品漿倒入 10 mL 離心管，經連續稀釋法，進行傳統微生物培養法。免疫組織染色用之表孔珊瑚樣本約 4×10cm 大小，分別為健康與部份受星野黑皮海綿感染的表孔珊瑚，每種樣本作三重複，珊瑚離水後立即用滅過菌的解剖剪（部分被星野黑皮海綿感染珊瑚的採樣如圖 1 所示）取下約 1×1cm 的珊瑚放入現泡之 4% 溶於 0.1M 磷酸緩衝溶液之 paraformaldehyde (pH 7.2) 4°C 固定隔夜，用自來水洗去 paraformaldehyde 後，將樣品轉換到 70% 酒精後 -20°C 保存以待進一部作免疫染色分析。弧菌致病力分析之表孔珊瑚則採自墾丁核三廠的出水口海域。

二、培養基之使用與分離菌株的保存

根據不同種類的微生物採取 2 種培養基進行培養，包括 Marine agar 2216 和 Marine salt basic agar，單離純化之菌株分別以冷凍保存法與冷凍乾燥保存法保存。

三、菌株形態特徵鑑定

包括菌落形態特徵、菌體形態特徵、革蘭氏染色。

四、菌株生生化特徵鑑定

在生化分析方面，採用 API-20NE system；API-20E system；API-ZYM system 與 Biolog-GN2 system 等生化套組鑑定進行，另

國家公園學報二〇〇九年第十九卷第三期



圖 1. 部分被黑海綿感染的表孔珊瑚採樣位置以進行 Sponge-12 弧菌組織免疫染色的示意圖(黑色星號指遠海綿端；箭頭指近海綿端；白色星號指海綿樣品)

外，對 Sponge-12、Sponge-19 和 Sponge-41 也進行水解脂質、澱粉、核酸與溶血的能力的測試。

五、菌株遺傳特徵鑑定

包括細胞 16S rRNA 基因序列分析與鑑定、資料比對、演化樹建構等鑑定。

六、三種弧菌對表孔珊瑚感染力的測試

1. 表孔珊瑚受三種弧菌感染白化死亡的測試

將表孔珊瑚以滅菌的解剖剪從整株表孔珊瑚上剪下約 2×2cm 大小的片段，經滅菌海水沖洗三次後，放入裝有 200 mL 滅菌海水中，並打氣以及維持 12 小時光照 12 小時黑暗的恆溫培養箱中，一共測試三種溫度，分別為 21°C、25°C 與 29°C。滅菌海水以海水鹽(Red Sea Salt)配製成鹽度 33‰，銨基態氮添加的海水則在海水鹽中加入氯化銨到最後含量為 0.1ppm，海水滅菌條件為 121°C 加熱 20 分鐘。待珊瑚放入海水中穩定後(約經 1 小時)，然後加入菌液，使最後菌液濃度達 10⁵CFU/mL，沒有加菌液的珊瑚為控制組。然後每 24 小時，取 1mL 海水以無菌稀釋，並用弧菌專一培養基(TCBS agar)計算弧菌的濃度。實驗進行 7 天或至珊瑚白化死亡後停止。

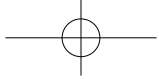
2. 三種弧菌吸附到表孔珊瑚的能力

為了解三種弧菌在感染前是否會被表孔珊瑚吸附，如同上述的裝置，並於加入菌液後，每 0、2、5、8、11、24 小時吸取 1 mL 海水分析弧菌濃度。只裝 200 mL 無菌海水的燒杯為空白組，作為扣除細菌被燒杯壁吸附的部分。

七、以組織免疫染色法分析珊瑚 SPONGE-12 弧菌的分布

珊瑚組織先於 paraformaldehyde 固定並儲存於 -20°C 的 70% 酒精中，然後以 5% 甲酸脫鈣，經清水洗去甲酸後，進一步以 80、90、100% 的甲醇脫水，各 1 小時，然後經過 xylene、xylene/wax (1/1)、wax 等滲蠟過程，最後至成蠟模，以 Shandon 切片機切成 6 或 7μm 厚的切片以進行後續免疫染色。

免疫染色是利用全菌(Sponge-12 弧菌)免疫兔子所得的抗血清為一次抗體，免疫 Sponge-12 弧菌前的兔子血清作為對照組，以 Novocastra 之 Peroxidase Detection System 來偵測 Sponge-12 弧菌的分布，基本上是以 biotin 連結的抗兔子的山羊血清為二次抗體，結合 streptavidin 的 horse radish peroxidase 來標記抗原位置，最後以 3,3'-diaminobenzidine



王志騰，陳文明，陳昭倫

(DAB)呈色，如果有 Sponge- 12 存在的位置就會呈現咖啡色。

結果與討論

一、星野黑皮海綿樣本中單離出之細菌的基本分析

以綠島海域為黑病珊瑚樣品為來源，培養純化菌株，第一次採樣共分離純化 45 株純化菌株。此 45 株純化菌株經形態特徵鑑定，包括菌落形態特徵、菌體形態特徵、革蘭氏染色特徵，結果顯示 44 株菌株為菌株革蘭氏陰性反應(Gram negative reaction)，僅有 1 株菌株為革蘭氏陽性反應(Gram positive reaction)。44 株革蘭氏陰性反應菌株之菌體形態特徵為直或微彎曲之桿菌(圖 2)。

TCBS 弧菌選擇性培養基試驗(Vibrio selection agar test)測試結果在 45 株純化菌株中有 93%的菌株(44 株菌株)可能是為 *Vibrio* spp.，此結果並與菌株革蘭氏陰性反應結果符合。在生化分析方面，採用 API-20NE system；API-20E system；API-ZYM system；Biolog-GN2 system(如表 1)生化套組鑑定進行，結果顯示 93%的菌株(44 株菌株)為 *Vibrio* spp.。另外，對 Sponge- 12、Sponge- 19 和 Sponge- 41 也進行水解能力的測試，結果發現這三株菌都可以水解脂質、澱粉與核酸(如表 1)，而且都有溶血的能力(如表 1)。

二、單離出之弧菌的 16S rRNA 基因分析

利用 rRNA 基因分析進行海綿微生物鑑定，在 45 株純化菌株中可分為 4 群(Group I、II、III 和其他)，其中 Group I、II、III 在 16S rRNA 基因分析結果均為 *Vibrio* spp.，佔有比率分別為 53%、31%和 9%，其中 Group I 的弧菌和 *V. rotiferianus*、*V. campbellii*、*V. harveyi* 和 *V. alginolyticus* 都有 99%以上的相似度；Group II 的弧菌則與 *V. fortis* 有 99.9%的相似度；Group III 的弧菌則與 *V. fluvialis* 有 99.5%的相似度；另外其他的部份則有一株與

Bacillus nealsonii 有 98.3%的相似度，另兩株則與 *Microbulbifer maritimus* 有 96.9%的相似度。經由微生物培養、形態、生化、16S rRNA 基因分析的結果，在綠島海域黑病珊瑚樣品中所分離的可培養微生物中，以 *Vibrio* spp.為主，佔有絕大的比例，而且經與其他已發表珊瑚病原菌比對，結果如圖 3 所示，發現 Group I 中的 Sponge- 12 與 Sponge- 19 和造成珊瑚黃斑病的弧菌非常接近，Group II 的 Sponge-34 與 Sponge- 41 和造成珊瑚白化的弧菌比較相近，因此綜合生化特性與 16S rRNA 基因比對的結果，選擇 Sponge- 12、Sponge- 19 和 Sponge- 41 這三株弧菌作為病原菌的條件的探討。

三、三種弧菌對表孔珊瑚致病力的測試

1. 表孔珊瑚受三種弧菌感染白化死亡的測試

以三種從海綿分離得之弧菌(10^5 CFU/mL)分別加入含有表孔珊瑚的海水中，其每 24 小時的弧菌濃度變化如圖 4 所示。結果發現，於第一天時，沒有加入弧菌的控制組仍有少量的弧菌被偵測出，加入 Sponge- 12 弧菌的實驗組，其海水中弧菌濃度在第一天已經下降了 2 個指數，到與控制組相當，而加入 Sponge- 19 與 Sponge- 41 的弧菌實驗組則與第 0 天幾乎沒有差別。但不管加入哪一種弧菌，在實驗期間，海水中弧菌的數量是下降的趨勢，但其中加入 Sponge- 12 弧菌的實驗組中，有一個樣品在在 4 天於海水中開始顯著有弧菌在海水中被測得，同時這個也是唯一在本實驗中於第 6 天發現珊瑚死亡的樣品，而分析潰爛組織的弧菌數量更高達 3×10^6 CFU/cm² 以上。本測試弧菌感染表孔珊瑚白化致死的實驗共分別測試 24 個珊瑚樣本，6 個於 25°C 人工海水中(「氨」氮: <0.01 ppm)，18 個樣本在人工海水中添加 NH₄Cl 使「氨」氮濃度達 0.1 ppm (綠島公館海域的「氨」氮濃度)，並分別有 3 個樣本是在 21°C 和 29°C 進行，12 個樣本在 25°C 進行，結果統計的白化死亡率如表 2 所示，感染 Sponge- 41 的珊瑚都沒有死亡的紀錄，而感

表 1. 各種商業套組分析星野黑皮海綿單離出之菌種生化特性的結果

	Sponge-12	Sponge -19	Sponge -41
API 套組反應			
NO3 reduction, oxidase, β -glucosidase, gelatinase, β -galactosidase, alkaline phosphatase, acid phosphatase, fermentation of mannitol, amygdalin, sucrose	+	+	+
Urease, arginine dihydrolase, ornithine decarboxylase, tryptophan deaminase, C14 lipase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, α -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, α -mannosidase, α -fucosidase, acetoin production, H ₂ S production, assimilation of adipic acid, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, phenylacetic acid, gluconate, capric acid, fermentation of melibiose, inositol	-	-	-
Catalase, lysine decarboxylase, α -chymotrypsin, fermentation of D-glucose, rhamnose, arabinose	+	+	-
Leucine arylamidase	+	+	W
N-acetyl- β -glucosaminidase, C8 esterase, assimilation of maile acid	W	W	+
Indole production	W	W	-
Naphthol-AS-B1-phosphohydrolase	W	+	+
C4 esterase	-	W	W
Assimilation of D-glucose, D-maltose	-	-	+
Assimilation of trisodium citrate	-	-	W
Biolog GN2 套組反應			
Oxidation of α -Cyclodextrin, D-fructose, inosine, dextrin, uridine, glycogen, D-gluconic acid, L-alanyl-glycine, tween 40, N-acetyl-D-glucosamine, L-aspartic acid, glycerol, maltose, L-glutamic acid, L-threonine, D,L- α -glycerol phosphate, D-mannitol, D-cellobiose, D-mannose, succinic acid, glycy-L-glutamic acid, D-trehalose, thymidine, α -D-glucose, D-psicose, acetic acid, L-proline, D-galactose	+	+	+
Oxidation of i-Erythritol, D-melibiose, p-hydroxy phenylacetic acid, L-histidine, urocanic acid, itaconic acid, succinamic acid, L-fucose, citric acid, α -keto butyric acid, L-leucine, D-raffinose, formic acid, L-rhamnose, D-galactonic acid lactone, α -keto valeric acid, L-phenylalanine, phenylethylamine, D-sorbitol, D-galacturonic acid, N-acetyl-D-galactosamine, m-inositol, malonic acid, L-pyroglutamic acid, 2-aminoethanol, D-glucosaminic acid, 2,3-butanediol, adonitol, lactulose, turanose, L-arabinose, xylitol, α -hydroxybutyric acid, D-saccharic acid, D-arabitol, β -hydroxybutyric acid, sebamic acid, D,L-carnitine, α -D-glucose-1-phosphate, γ -hydroxybutyric acid, γ -amino butyric acid	-	-	-
Oxidation of gentiobiose, bromosuccinic acid, glycy-L-aspartic acid, D-glucuronic acid, L-alaninamide, glucuronamide, pyruvic acid methyl ester	+	+	-

表 1. 各種商業套組分析星野黑皮海綿單離出之菌種生化特性的結果 (續)

	Sponge-12	Sponge -19	Sponge -41
Oxidation of β -methyl-D-glucoside	+	-	-
Oxidation of D-alanine, D,L-lactic acid, L-alanine, sucrose, L-asparagine, D-serine, L-serine, α -D-lactose, propionic acid, succinic acid mono-methyl-ester	-	+	+
Oxidation of α -Keto glutaric acid, cis-aconitic acid, hydroxy-L-proline, D-glucose-6-phosphate	-	+	-
Oxidation of quinic acid, L-ornithine, tween 80, putrescine	-	-	+
水解能力反應			
Tween 20, Tween 40, Tween 60, DNA, starch, skim milk,	+	+	+
Tween 80	+	+	-
Corn oil	w	w	w
溶血測試反應	β 型	β 型	β 型

+: 代表有反應能力； -: 代表無反應能力； w: 代表有微弱反應能力

表 2. 表孔珊瑚 (*Montipora* sp.)於三種不同弧菌接種後之死亡率

	SW + 0.1 ppm NH_4^+ -N			SW
	21°C	25°C	29°C	25°C
Sponge-12	0/3	2/12	0/3	0/6
Sponge-19	0/3	1/12	0/3	0/6
Sponge-41	0/3	0/12	0/3	0/6

註 1：SW 為人工海水， NH_4^+ -N<0.01 ppm。

註 2：表中數字分母為實驗個數，分子為死亡個數

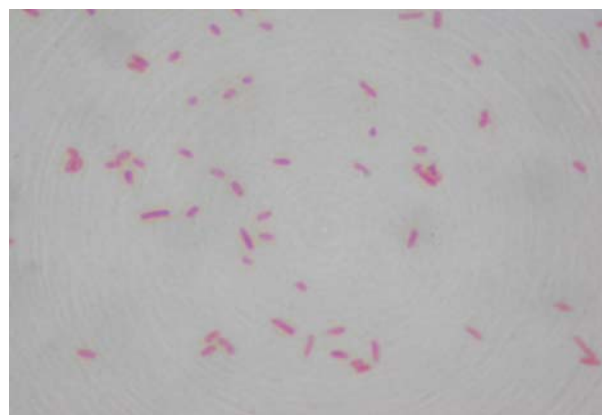


圖 2. 革蘭氏陰性反應菌株之 1000x 光學顯微鏡照片

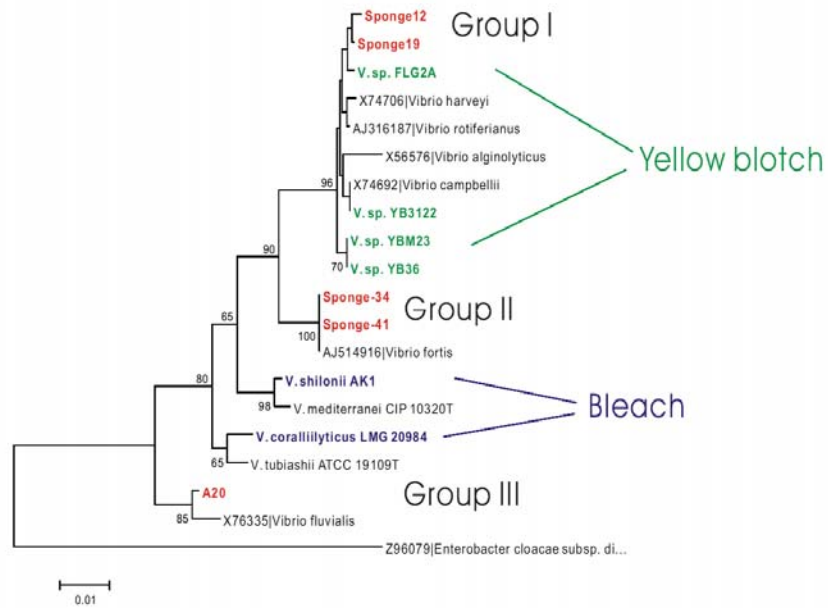


圖 3. 幾種由海綿分離出之微生物與已知珊瑚疾病病原菌之親緣關係。親源樹(phylogenetic tree) 是以 MEGA, version 3.1 程式的 neighbor-joining (NJ)方法製作，並且經過 bootstrap 分析(重複 1000 次，結果以百分比表示) 以 NJ 樹型 (Jukes-Cantor 為核苷酸替換模式) 呈現

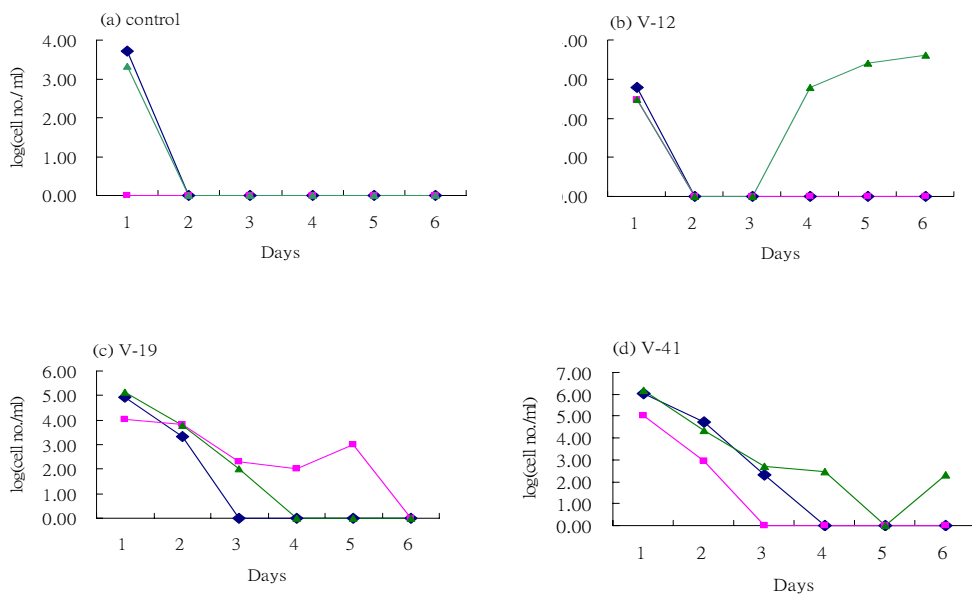
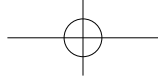


圖 4. 表孔珊瑚於分別接種三種弧菌後海水中弧菌濃度變化 (◆、▲和■代表三個重複組)



王志騰，陳文明，陳昭倫

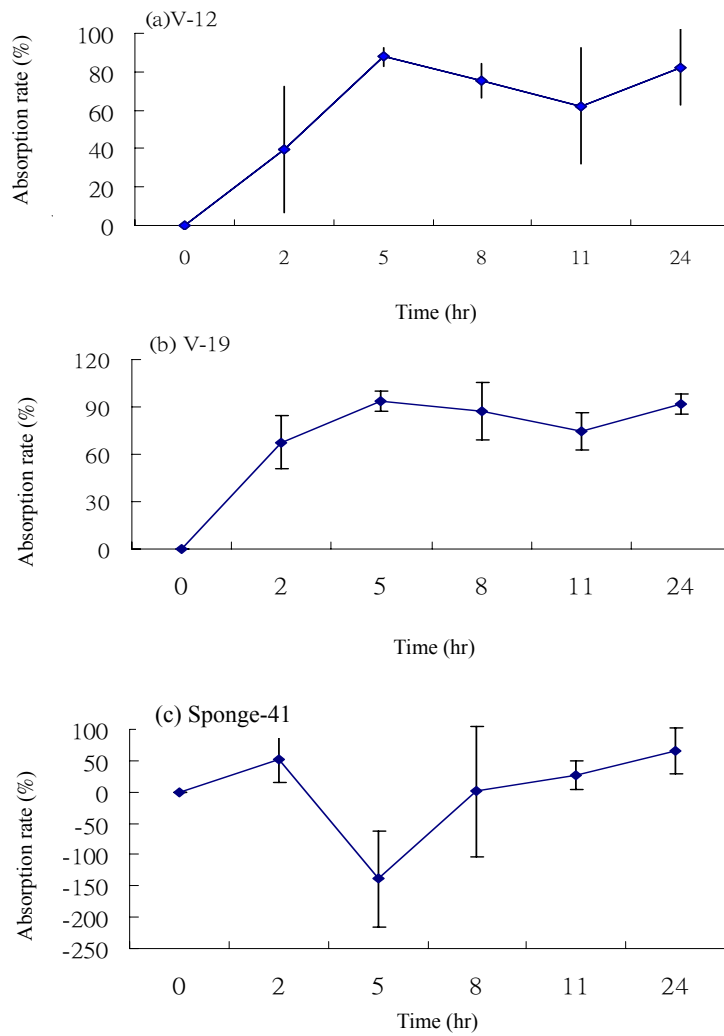
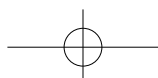


圖 5. 表孔珊瑚於分別接種三種弧菌後珊瑚吸附細菌的時間變化(樣本重複次數為 9)



圖 6. 表孔珊瑚感染 Sponge- 12 弧菌 24 小時後菌體分布的免疫染色分析結果。A: 免疫前兔子血清的對照組；B: Sponge- 12 弧菌免疫兔子血清的實驗組(×400 倍)



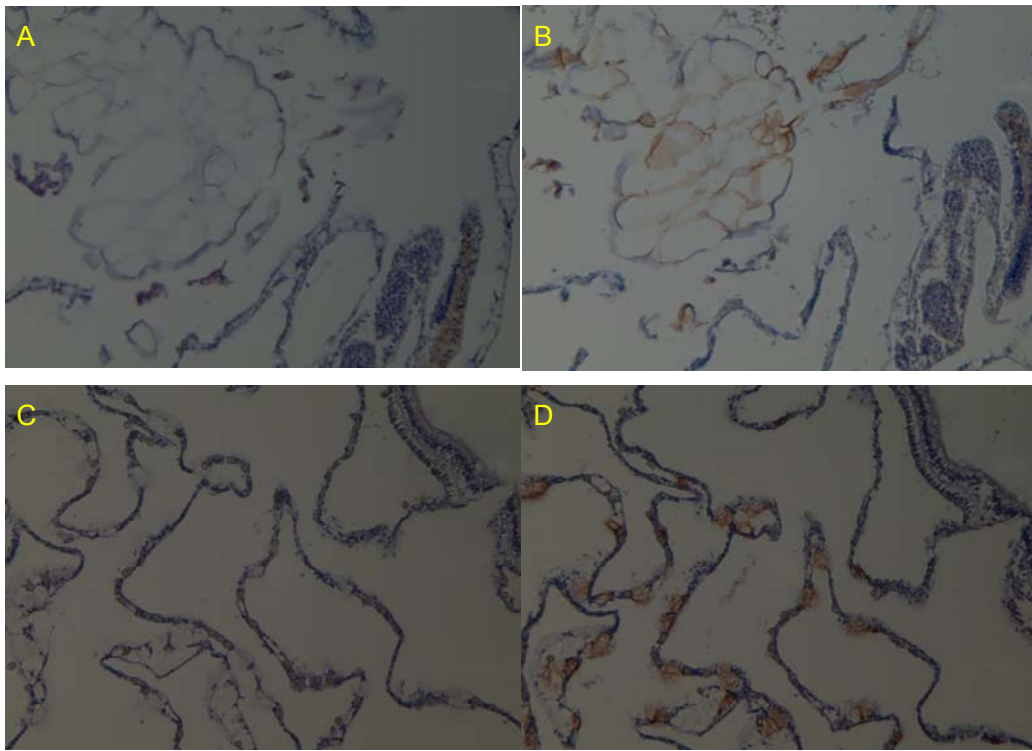


圖 7. 健康表孔珊瑚組織中 *Sponge-12* 弧菌的分布情形。AB 與 CD 是兩組不同株的樣品。A 與 C 是免疫前的兔血清為第一抗體的對照組；B 與 D 是以 *Sponge-12* 免疫所的血清為第一抗體的實驗組 ($\times 400$ 倍)

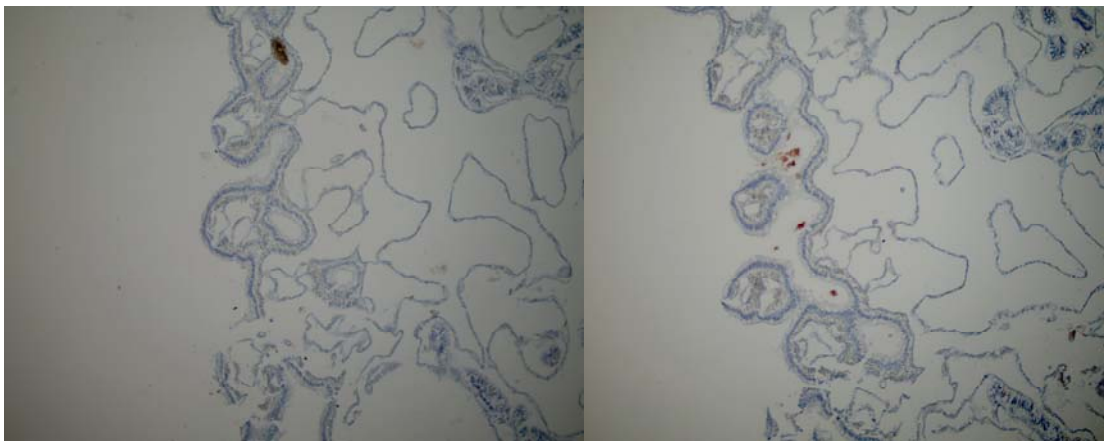
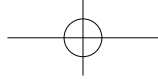


圖 8. 部份星野黑皮海綿感染表孔珊瑚近海綿端組織中 *Sponge-12* 弧菌的分布情形。A 是免疫前的兔血清為第一抗體的對照組；B 是以 *Sponge-12* 免疫所的血清為第一抗體的實驗組 ($\times 200$ 倍)



王志騰，陳文明，陳昭倫



圖 9. 部份星野黑皮海綿感染表孔珊瑚遠海綿端組織中 Sponge-12 弧菌的分布情形。A 是免疫前的兔血清為第一抗體的對照組；B 是以 Sponge-12 免疫所的血清為第一抗體的實驗組 ($\times 200$ 倍)

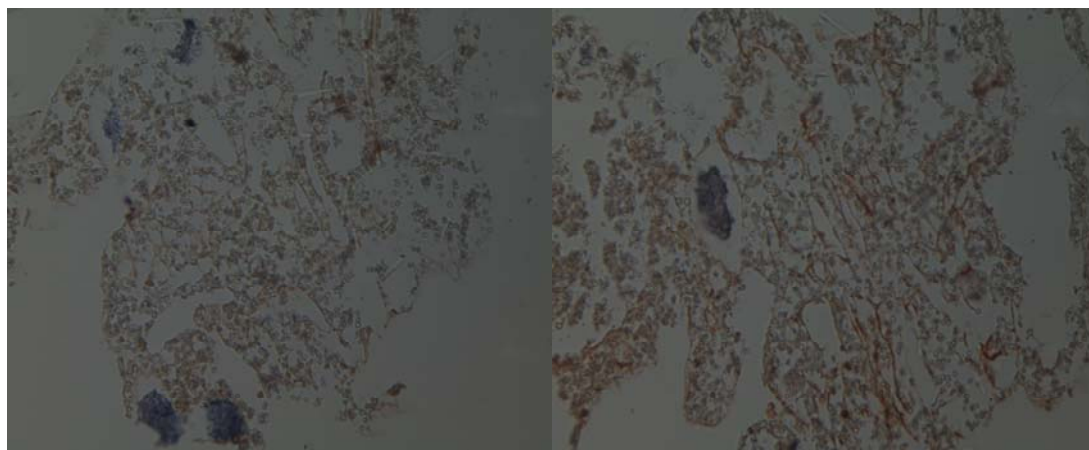


圖 10. 星野黑皮海綿感組織中 Sponge-12 弧菌的分布情形。A 是免疫前的兔血清為第一抗體的對照組；B 是以 Sponge-12 免疫所的血清為第一抗體的實驗組 ($\times 400$ 倍)

染 Sponge-12 的珊瑚只有在高「氮」氮下出現 2 次死亡結果，感染 Sponge-19 則只有一次。

綜合以上結果，由於接種三種弧菌後珊瑚白化死亡的比率相當低 (0-8%) (表 2)，而且白化死亡的型態並不一致，此結果顯示，目前篩選測試的弧菌應該不會是表孔珊瑚的病原菌，因接種弧菌而死亡的珊瑚有可能本身抵抗力較弱，進而造成在實驗室的培養中 (200 mL 海水) 因緊迫而弱化，海水與珊瑚組織中弧菌的大量產生，可能是珊瑚組織潰爛釋放出有機質間接造成，利用實驗室的培養條件來研究珊

瑚的疾病先天上就有這種問題，因此在獲得結論時要非常小心，必須有野外的直接證據輔助才比較可靠 (Ainsworth et al. 2008)。

2. 三種弧菌吸附到表孔珊瑚的能力與在珊瑚組織內的分布

由於接種 Sponge-12 弧菌 24 小時之後，海水中的弧菌濃度下降 100 倍，顯示海水中的弧菌可能會很快吸附到到珊瑚組織上，這種現象也被出現在 *Vibrio shiloi* 感染 *Oculina patagonia* 的例子 (Toren et al. 1998, Banin et al. 2001)，因此本計劃也進行上述三株弧菌的

對標孔珊瑚的吸附實驗，結果如圖 5 所示。由圖 5 顯示，除了 Sponge-41 弧菌無顯著吸附到表孔珊瑚外，Sponge-12 和 Sponge-19 弧菌都有顯著的能力吸附到表孔珊瑚上，但吸附的情形誤差相當大（有時甚至高達 83%），會吸附到珊瑚組織的弧菌基本上會在 5 小時左右就達到最高值，顯示如果海水中含有 Sponge-12 或 Sponge-19 弧菌時，會很快吸附到珊瑚組織中。

被吸附到表孔珊瑚上的弧菌到底分布在哪裡，本實驗利用 Sponge-12 弧菌去免疫兔子，以獲得兔子的抗 Sponge-12 弧菌抗體，此抗體的效力有經以標準菌確定，經免疫染色的結果，短桿狀的弧菌可被染成咖啡色，但以相同抗體也可以將 Sponge-19 與 Sponge-41 的弧菌抹片染色，顯示此針對 Sponge-12 的多株抗體對這三種弧菌沒有區別能力，換言之，這三種弧菌是相當接近的種。經由 Sponge-12 弧菌的抗體追蹤 Sponge-12 在表孔珊瑚的分布，結果如圖 6 所示。由圖 6 顯示經 24 小時後，弧菌並不在珊瑚的表面，而是存在內腔（coelenteron）中，這可能與有些珊瑚會利用 mucus 來沾黏海水中微生物作為食物的情形相似（Wild et al. 2004）。

四、Sponge-12 弧菌在星野黑皮海綿感染海域中珊瑚體內的分布

在黑病蔓延的海域中，珊瑚組織中的弧菌分布情形可直接反應弧菌與珊瑚黑病的關係，因此本實驗即是以組織免疫染色法追蹤健康珊瑚（即沒有星野黑皮海綿感染的珊瑚），以及部分星野黑皮海綿感染珊瑚的近海綿端與遠海綿端弧菌分布的情形，以作為評估弧菌與星野黑皮海綿攻擊珊瑚的相關性，結果如圖 7 至 9 所示。不論健康或星野黑皮海綿感染的表孔珊瑚組織中都可偵測到 Sponge-12 弧菌的存在，其存在的位置與直接感染大量 Sponge-12 弧菌的情形一樣，都是存在內腔中的縫隙中（參考圖 6），而且近海綿端並沒有發現比遠海綿端有更多的弧菌分布。Sponge-12

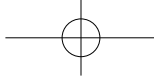
弧菌在海綿組織的分布如圖 10 所示。海綿組織中主要的細胞是藍綠菌，而弧菌被發現的地方都是在包圍藍綠菌的外鞘結構上，很特別的是，經過很多切片的觀察，屬於真核的可能海綿細胞非常少見，甚至在星野黑皮海綿與被攻擊珊瑚的界面附近的星野黑皮海綿切片也不容易找到屬於真核細胞的存在，顯示所謂的星野黑皮海綿其實只有骨針比較明顯外，其實是由充滿藍綠菌的結構組成，而包圍藍綠菌的外鞘是藍綠菌或是海綿所分泌，目前仍是一個謎。

誌謝

本研究係由內政部營建署計畫支持（契約編號：96 營屬 A-058 號），特此致謝。

引用文獻

- Ainsworth TD, M Fine, G Roff, O Hoegh-Guldberg. 2008. Bacteria are not the primary cause of bleaching in the Mediterranean coral *Oculina Patagonica*. *International Society for Microbial Ecology Journal* 2: 67-73.
- Alker AP, GW Smith and K Kim. 2001. Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals. *Hydrobiologia* 460: 105-111.
- Banin E, T Israely, M Fine, Y Loya and E Rosenberg. 2001. Roles of endosymbiotic zooxanthellae and coral mucus in the adhesion of the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi* to its host. *FEMS Microbiology Letters* 199: 33-37.
- Ben-Haim Y, FL Thompson, CC Thompson, MC Cnockaert, B Hoste, J Swings and E Rosenberg. 2003. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 309-315.
- Bryan PG. 1973. Growth rate, toxicity and distribution of the encrusting sponge *Terpios* sp. (Haromerida: Suberitidae) in Guam, Mariana Islands. *Micronessica* 9: 237-242.
- Cervino JM, R Hayes, S Polson, SC Polson, TJ Goreau, RJ Martinez and GW Smith. 2004. Relationship of *Vibrio* species infection and elevated temperatures to yellow blotch band disease in Caribbean corals. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6855-6864.
- Cooney RP, O Pantos, MD Le Tissier, MR Barer, AG



王志騰，陳文明，陳昭倫

- O'Donnell and JC Bythell. 2002. Characterization of the bacterial consortium associated with black band disease in coral using molecular microbiological techniques. *Environmental microbiology* 4: 401-413.
- Denner EB, GW Smith, HJ Busse, P Schumann, T Narzt, SW Polson, W Lubitz and LL Richardson. 2003. *Aurantimonas corallicida* gen. nov., sp. nov., the causative agent of white plague type II on Caribbean scleractinian corals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1115-1122.
- Frias-Lopez J, GT Bonheyo, Q Jin and BW Foue. 2003. Cyanobacteria associated with coral black band disease in Caribbean and Indo-Pacific Reefs. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2409-2413.
- Geiser DM, JW Taylor, KB Ritchie and GW Smith. 1998. Cause of sea fan death in the West Indies. *Nature* 394: 137-138.
- Gil-Agudelo DL, GW Smith and E Weil. 2006. The white band disease type II pathogen in Puerto Rico. *Revista de Biología Tropical* 54: 59-71.
- Grimes DJ, J Stemmler, H Hada, EB May, D Maneval, FM Hetrick, RT Jones, M Stoskopf and RR Colwell. 1984. *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. *Microbiology Ecology* 10: 271-282.
- Kanamori K, RL Weies and JD Roberts. 1987. Ammonia assimilation in *Bacillus polymyxa* 15N NMR and enzymatic studies. *Journal of Biological Chemistry* 262: 11038-11045.
- Kushmaro A, E Banin, Y Loya, E Stackebrandt and E Rosenberg. 2001. *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1383-1388.
- Patterson KL, JW Porter, KB Ritchie, SW Polson, E Mueller, EC Peters, DL Santavy and GW Smith. 2002. The etiology of white pox a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 8725-8730.
- Richardson LL. 1996. Horizontal and Vertical Migration Patterns of *Phormidium corallyticum* and *Beggiatoa* spp. Associated with Black-Band Disease of Corals. *Microbiology Ecology* 132: 323-335.
- Richardson LL, WM Goldberg, KG Kuta, RB Aroson, GW Smith and KB Ritchie. 1998. Florida's mystery coral-killer identified. *Nature* 392: 557-558.
- Rosenberg E, O Koren, L Reshef, R Efrony and I Zilber-Rosenberg. 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology* Mar 26; [Epub ahead of print].
- Thompson FL, Y Barash, T Sawabe, G Sharon, J Swings and E Rosenberg. 2006. *Thalassomonas loyana* sp. nov., a causative agent of the white plague-like disease of corals on the Eilat coral reef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 365-368.
- Toren A, Landau, A Kushimaro, Y Lpya and E Rosenberg. 1998. Effect of temperature on adhesion of *Vibrio* strain AK-1 to *Oculina patagonica* and on coral bleaching. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1379-1384.
- Voss JD, DK Mills, JL Myers, ER Remily and LL Richardson. 2007. Black Band Disease Microbial Community Variation on Corals in Three Regions of the Wider Caribbean. *Microbiology Ecology*. Mar 28; [Epub ahead of print]
- Wild C, M Huettel, A Klueter, SG Kremb, MYM. Rasheed and BB Jørgensen. 2004. Coral mucus functions as an energy carrier and particle trap in the reef ecosystem. *Nature* 428: 66-70.