
The Story for Coral Bacteria in Taiwan

Sen-Lin Tang

Research Fellow, Biodiversity Research Center, Academia Sinica

ABSTRACT

Bacteria are the most abundant and diverse members in coral holobiont; they play an important role in coral health, disease and nutrient supply. Because of the limitation of technology, it waited until two decades ago when PCR, molecular and sequencing techniques being available and some started investigations into the composition of and change in coral bacteria. The development for the study of coral-associated bacteria was much late in Taiwan. In 2006, we established the first laboratory of coral microbiology in Taiwan, and started the study of bacterial composition in corals at Kenting, South Taiwan using traditional culture-independent molecular cloning technique and Sanger-based sequencing. In 2010, we became the first group in the world to enable detection of temporal dynamics and changes in coral-associated bacterial community using next generation sequencing. After 2016, we identified functions of coral-associated bacteria using genomics, biochemistry and stable isotope approaches. Now we are one of the few, iconic laboratories of coral microbiology in Taiwan and the Indo-Pacific Ocean. Our main research was focused on a coral-health-associated bacterial group, called *Endozoicomonas*, and its interactions with coral hosts or environments. And we also uncovered several *Endozoicomonas* genomes and identified important metabolic functions and abilities of *Endozoicomonas*. Over the effort of 15 years, we have established the largest laboratory of *Endozoicomonas* collection in the world. We anticipate investigations into the molecular interactions between *Endozoicomonas* and coral, and furthermore hope to develop coral probiotics for applications on coral cultivation, health maintenance and restoration.

Key words: Coral-associated bacteria, *endozoicomonas*, coral probiotics.

* Corresponding author, E mail: sltang@gate.sinica.edu.tw

台灣珊瑚細菌紀事

湯森林

中央研究院生物多樣性研究中心 研究員

摘要

在珊瑚共生體中細菌是最多數目和種類的成員，珊瑚細菌普遍被認為在珊瑚健康、疾病和養分供應上扮演著重要角色。由於受到技術的限制，一直到二十年前 PCR、分子、和解序技術出現後，才有人開始探索珊瑚細菌群聚的組成和變動。台灣珊瑚細菌研究發展相當晚，在 2006 年我建立了第一間台灣珊瑚微生物實驗室，開始著手這方面的研究。早期我們利用傳統不培養式分子技術調查墾丁珊瑚細菌，到 2010 年，我們領先全世界利用次世代定序技術研究珊瑚細菌組成和變動，2016 年後，利用基因體、生化、穩定同位素等技術驗證珊瑚細菌的功能。目前我們實驗室是台灣和印度太平洋區研究珊瑚細菌的少數重要指標實驗室之一，我們主要的研究是珊瑚健康有關的內生桿菌和它的寄主珊瑚或周邊環境之關係，也解開數個內生桿菌基因體和偵測內生桿菌的重要代謝能力等，經過 15 年的努力，我們建立了全世界最大珊瑚內生桿菌分離和保存的實驗室，未來除了在基礎科學繼續研究珊瑚和內生桿菌互動的分子機制外，更冀望可以開發這些細菌為珊瑚益生菌，有利於珊瑚培養、維持健康、復育之用。

關鍵字：珊瑚共棲菌、內生桿菌、珊瑚益生菌

* 通訊作者 E mail: sltang@gate.sinica.edu.tw

一、前言

2006 年暑假赴中研院就職，沒有考慮繼續先前國外的研究題目，衷心盼望能在地問題為起點，開始新的研究旅程。陳昭倫老師外型總是令人印象深刻的珊瑚專家剛好出現在我尋覓研究題目的時刻，熱情的他劈劈啪啪地介紹珊瑚和共生藻的故事，他一再強調「珊瑚細菌」是個值得研究的方向，雖然已經研究微生物十幾年，「珊瑚細菌」這名詞還是第一次聽到。沒有花太多時間考慮，或許本對海洋的鍾愛，就決定以珊瑚礁為研究重心，以珊瑚細菌為研究主題，當時決定研究珊瑚細菌之際，在整個東亞沒有這樣的研究室，換言之，這是個冷的不能再冷的研究主題。

珊瑚細菌，顧名思義就是住在珊瑚上的細菌。在分子技術方法發明前，這些細菌的生態角色不清楚也不受重視，相關的研究報告主要都著重在珊瑚疾病調查，尋找可能造成珊瑚疾病的病原菌等。在 2001 年，Rohwer et al.(2001)利用非依賴培養的分子技術，發表一篇有關珊瑚細菌調查的報告，開啟了珊瑚細菌研究。所謂不依賴培養分子技術(culture-independent molecular approach)是指不利用培養細菌來調查細菌的組成，最普遍的技術是利用聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction)擴增 16S 核糖體核的核糖核酸基因(16S rRNA gene)序列，利用該基因序列的密碼來比對序列資料庫，鑑別細菌的種類。由於所有細菌都有這個基因，加上基因序列的異同關係和細菌分類也相當一致，因此成為調查細菌組成最常用的方法。

那珊瑚細菌的生態角色是什麼呢？目前仍缺乏直接科學證據，但是科學家們普遍有共識——珊瑚細菌在珊瑚疾病、健康和養分供應方面應扮演著重要角色。有關珊瑚疾病和細菌的關係研究比較普遍，不可否認這方面的研究目標清楚，容易撰寫計畫書和申請經費，然而台灣珊瑚疾病盛行率很低，珊瑚受到的威脅主要是來自人類的活動影響和衍生的環境變遷問題，因此我將研究重心放在非常少人研究的方面：珊瑚健康相關細菌。簡單說，是希望能找到可以幫忙珊瑚的有益菌，了解它們的生態學和微生物學，將來可用於珊瑚培養和復育。

很快地我就發現這個決定不是個好決定。前人的調查發現珊瑚細菌群聚非常多樣，可能超過 6000 種以上，而且不同珊瑚種類有不同種的細菌(Rohwer et al., 2002)，所以想要在這麼高多樣性的細菌群聚中找到對珊瑚健康有益的細菌，顯然並非易事。於是我決定先調查台灣珊瑚細菌組成和變化，期望先找到一些長駐菌，在長駐菌中再尋找珊瑚益生菌。利用當時最先進 454 Life Sciences 解序技術，和獨立建立的二步驟標示技術，為期一年，每月在綠島採集離枝軸孔珊瑚 (*Isopora palifera*)，調查其共棲細菌，結果發現珊瑚細菌群聚果然不僅多樣，在不同時間也不斷地變動，因此每個月都會出現不同主要菌群，因此僅是調查組成，很難知道哪群菌可能對珊瑚有利(Chen et al.,

2011)。

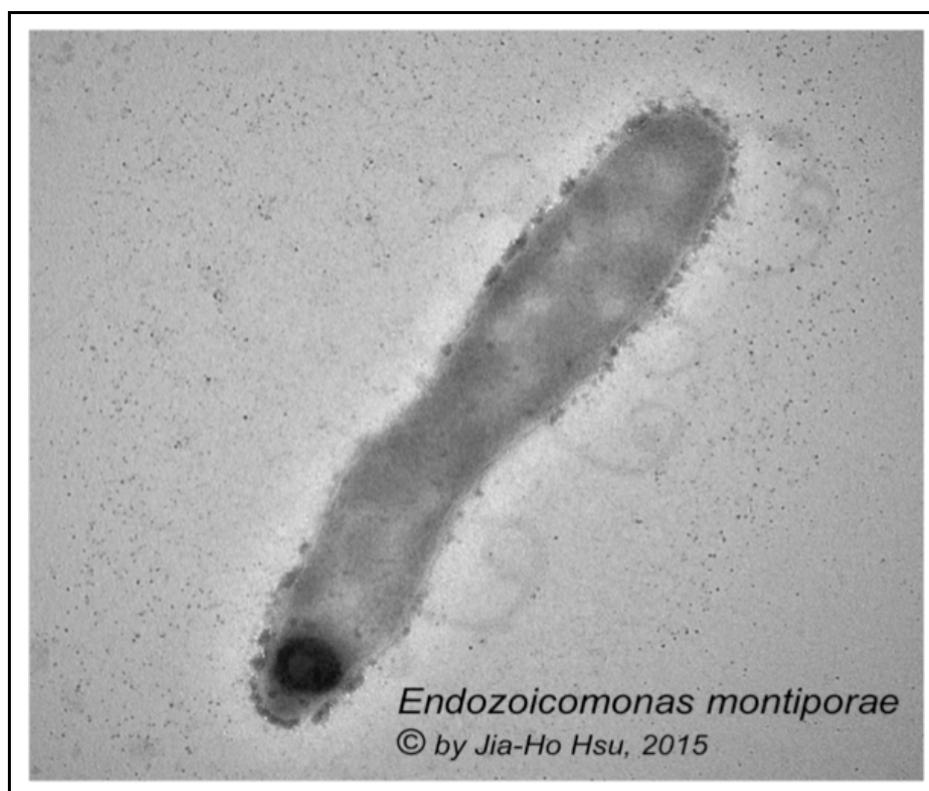


圖 1 表孔珊瑚內生桿菌電子顯微鏡圖(許嘉合博士攝影)。

再者，缺乏可培養的菌株，即便能找到所謂的長駐菌，也無法在實驗室裡進行更深入的研究。總的說，當時研究困境真的相當令人頭痛，此時我的第二貴人出現。在高雄海洋科技大學服務的陳文明教授剛好培養出數株來自墾丁的珊瑚細菌，經比對綠島調查的結果發現有一新菌株叫表孔珊瑚內生桿菌(*Endozoicomonas montiporae*；簡稱表桿菌，圖 1)時常出現，而且在數月樣品中也是主要的菌群之一，我覺得能獲得這株菌相當幸運，提供了一個新的研究方向，但是當時不知道這株菌會深深地影響我後來十幾年的研究。

內生桿菌最早在 2007 年從海蛞蝓分離而來，確立為一個新屬，後來陸陸續續在不同海洋無脊椎動物上包括海綿、軟珊瑚、硬珊瑚、海鞘等都有發現。更令人驚訝是這菌群在不同的珊瑚礁棲地、海域都相當常見，內生桿菌經常是這些生物體內的優勢菌群。在 2008 年 David Bourne 博士團隊發現這群菌和珊瑚健康有關，當珊瑚受高溫引發白化，該菌群和共生藻數目都會變少，然而當珊瑚在復原期間，該菌群和共生藻會重回珊瑚體內，這是一篇關鍵的報告顯示內生桿菌和珊瑚健康的關聯。由於報告是野外的觀察結果，因素繁多不易釐清，我決定在實驗室內確認內生桿菌對溫度引發的珊瑚白化的關係，藉由控制溫度變因，成功驗證了野外的觀察。受溫度引發白化的珊

瑚，體內的內生桿菌相對數目會大量減少，同時潛勢的病原菌卻大量增加。再者，除了高溫影響下內生桿菌會減少外，在低溫也是同樣情況，顯示溫度所引發的逆境不僅對珊瑚健康不利，內生桿菌也受到巨大影響(Lee et al., 2016; Shiu et al., 2017)。除了溫度逆境的影響，也發現只要珊瑚對溫度適應後，即便是偏高或偏低的溫度，適應後的珊瑚可以維持內生桿菌群聚在體內，顯然珊瑚的健康情況對內生桿菌是否能優勢存在珊瑚體內相當重要，這和珊瑚與共生藻的互動關係有些相似。

有趣的是這些珊瑚的內生桿菌群並非很多樣或多變，總是有少數特定菌群為優勢菌種，因此如果能了解這些菌群，將有助於釐清珊瑚和內生桿菌的關係，這也是我最感興趣的部分——找尋對珊瑚有益的菌，一旦確認它們身份，再想辦法將它們培養出來。經仔細比對這些優勢菌種類，意外地發現墾丁美麗軸孔珊瑚中的主要優勢菌群主要是表桿菌，即是從陳文明老師取得的菌株，對我來說，這「碰巧的命運」相當不可思議！因為當時我手上這一株菌不僅是全世界唯一可培養的造礁珊瑚內生桿菌，同時它也是優勢菌群的代表之一，由於可在實驗室中培養，讓我們有機會深入研究內生桿菌和珊瑚的關係。

首先我們將表桿菌的基因體完成解序，雖然解序過程歷經了 5~6 年，透過基因體組成的分析，取得更多的代謝或功能相關的資訊，甚至可推測生態功能。表桿菌的基因體內含約 9% 的重複序列(repeat sequences)、移動子(mobile elements)和大量的假基因(pseudogenes)等(圖 2)，這樣的基因體組成非常奇特。

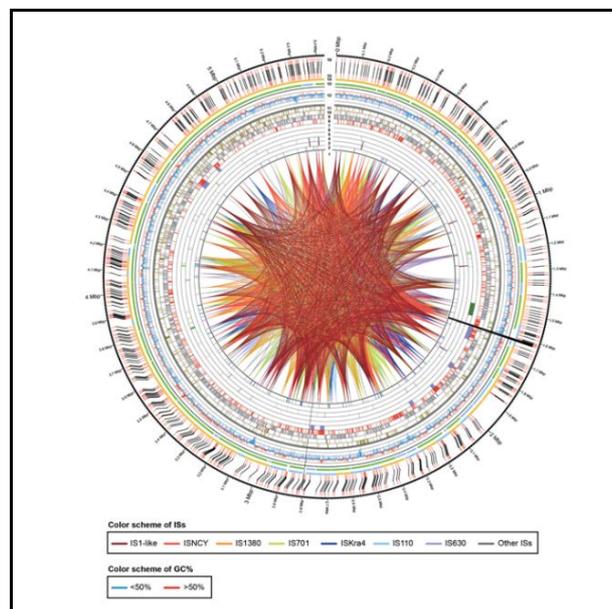


圖 2 表孔珊瑚內生桿菌基因圖譜

內部光芒狀為不同重複序列在基因體分佈的位置(鋒芒)，不同顏色則為不同重複序列(Ding et al., 2016)。

從細菌基因體演化而言，大量這樣的「序列」出現暗示著該細菌和寄主可能有某程度「依賴」的關係，如果持續演化有機會變成絕對共生或寄生關係，這是首次發現表桿菌與珊瑚共生的遺傳特徵。除了多重複序列的基因體外，有關這細菌是如何進入珊瑚體內，相關可能的基因也一一發現，我們推導出細菌如何進入珊瑚，利用賀爾蒙等物質為導引找到寄主，使用酵素鬆弛寄主粘液層進入珊瑚，再利用攜帶特有真核生物的基因 *Ephs-Ephrine* 啟動胞噬作用進入珊瑚細胞中，而後建立寄主酵素攻擊的防禦機制，同時利用數百個以上的第三型或第四型分泌型蛋白與寄主互動，其中包括可以幫寄主清除自由基的蛋白或可以協助寄主轉換脂肪酸成葡萄糖的酵素等(圖 3)。雖然這些推測功能仍尚未證實，但逐步已在驗證，然而基因體研究結果強烈地支持表桿菌是一株兼性共生菌(facultative bacterial symbiont)，這個說法後來也被國際接受。最近幾年，內生桿菌的聚菌體(coral associated microorganism aggregates)在珊瑚體內已被發現，也證實了該細菌確實可進入珊瑚體內(Bayer et al., 2013)，因此驗證這些「入侵」或「合作」生化途徑越顯的重要，珊瑚微生物學研究也朝向了更深入的分子微生物學或分子生態科學問題探索，提供更直接證據。

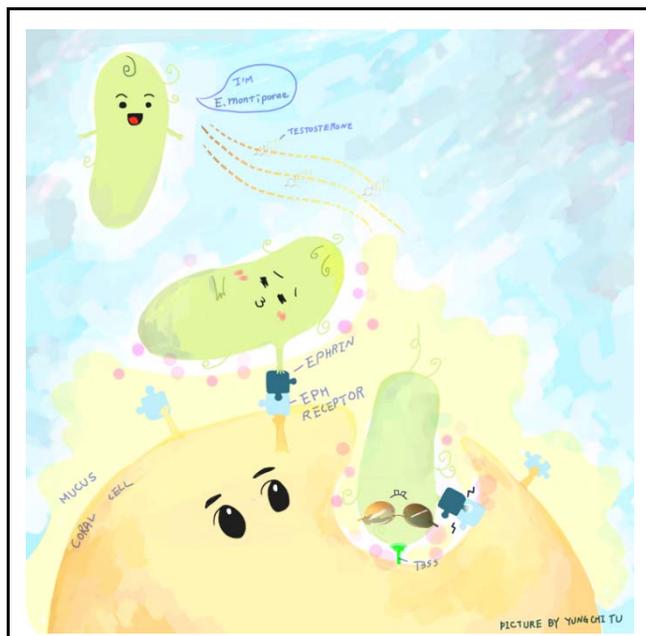


圖 3 表桿菌如何進入珊瑚細胞示意圖(涂詠琪繪製)。

更令人振奮的是在 2016 年底由澳洲團隊發表一份整理全球有關珊瑚細菌研究的報告(O'Brien et al., 2016)，列舉出已知自珊瑚分離的細菌株，並且將它們依不同生態功能分類，例如病原菌、固氮菌、共生菌等。表桿菌是唯一認為推定的共生菌(putative symbiont)，對我們長期的研究工作也是一份肯定，來自台灣墾丁的表桿菌，從某個角度看也是「台灣之光」！在 2017 年表桿菌的電顯圖出現在日本 NHK 的節目上，該節

目內容提及如何拯救珊瑚議題，有專家建議利用益生菌幫助珊瑚生長似乎也是一個可行手段，到這裡，我也覺得尋獲珊瑚益生菌的機會愈來愈靠近了。前年 Peixoto 博士團隊(Rosado et al., 2018)首度顯示接受益生菌後，珊瑚對病原菌抗性增強，這是第一篇使用珊瑚益生菌看到實際效果的研究報告，也讓珊瑚益生菌應用潛勢備受重視。

來到 2020 年，我的實驗室已分離出更多新珊瑚內生桿菌種，也是目前全世界分離內生桿菌最多的實驗室，除了逐一地研究個別的基因體和代謝功能特性，我們發現更多內生桿菌的功能，例如首度發現優勢軸孔珊瑚內生桿菌會分解二甲基巰基丙酸(Dimethylsulfoniopropionate)產生氣候冷化氣體二甲硫(Dimethyl sulfide)，可能可幫忙寄主去除多餘自由基或增強抗逆境能力，並扮演珊瑚礁硫循環的角色(Tandon et al., 2020)。更重要地，我們也著手測試內生桿菌對珊瑚是否有促進生長、抵抗逆境、抵禦病原菌等功能，希望不久將來可以運用這些細菌幫助珊瑚維持健康，對台灣珊瑚復育做出貢獻。

參考文獻

- [1] C. P. Chen et al. (2011), *ISEM J*, 5, pp. 728-740.
- [2] F. Rohwer et al. (2002), *Mar Ecol Prog Ser*, 243, pp. 1-10.
- [3] F. Rohwer et al. (2001), *Coral Reefs*, 20, pp. 85-91.
- [4] J.-H. Shiu et al. (2017), *Scientific Reports*, 7, pp. 14933.
- [5] J.-Y. Ding, et al. (2016), *Front. Microbiol.*, 7: Article 251.
- [6] K. Tandon et al. (2020), *ISME J.*, 14, pp. 1290-1303.
- [7] P. O'brien, et al. (2016), *Front. Mar. Sci.*, 3: Article 47.
- [8] P. Rosado, et al. (2018), *ISME J*, 13, pp. 912-936.
- [9] S. Lee et al. (2015), *FEMS Microbial Ecology*, 91: fiv142.
- [10] T. Bayer et al. (2013), *AEM*, 79, pp. 4759-4762.