

# 珊瑚骨骼細菌的研究

文·圖/楊姍樺

珊瑚礁生態系在生態與經濟面皆十分重要，但日漸嚴重的氣候變遷所引發海洋暖化與酸化問題，正急速改變珊瑚生態系的功能。因此，隨著珊瑚礁保育逐漸受到重視，珊瑚礁與珊瑚共生體的研究也變得熱門。「珊瑚共生體」指的是珊瑚與其所有共生的微生物，如共生藻、細菌、真菌、病毒等。過去珊瑚共生體的研究多偏重於珊瑚的組織部位，較少探究珊瑚骨骼的區域。且過去對珊瑚骨骼的研究與應用，多偏向於利用骨骼中的化學成分來探究海洋環境的變化，卻忽略骨骼內的「微」環境，對於什麼樣的微生物會存在於此，並不清楚。

若將珊瑚骨骼剖開，可發現珊瑚骨骼並非如想像中，僅呈現碳酸鈣的白色，在較貼近組織的骨骼部位常能看到綠色條帶狀的色塊，且在不同種類珊瑚的骨骼中都可看見，只是顏色上略有不同。看到這樣的現象不免會好奇，這綠色的部位是否是為微生物造成？是什麼樣的微生物呢？為什麼有的顏色特別綠？（圖1）

筆者查閱前人用顯微鏡觀察的結果發現，珊瑚骨骼的綠層是來自絲狀的藻類或藍綠菌。牠們都是使用葉綠素（chlorophyll）進行光合作用來產生碳源的自營性微生物。然而，在2007年時，一研究團隊分析了珊瑚骨骼中的蛋白成分，發現了菌綠素（bacteriochlorophyll）的存在。菌綠素與葉綠素結構相似，存在在許多光合細菌中，這也意味著，還有別的光合細菌存在。只是很可惜，當時沒有任何相關資訊。於是，引起



圖1：同孔珊瑚團塊剖面圖。圖中咖啡色部位為珊瑚組織，組織下方為珊瑚碳酸鈣骨骼，在骨骼內有綠色條帶狀的綠層。

當時在中央研究院念博士班的筆者興趣，遂以珊瑚骨骼中的細菌組成以及細菌可能扮演的功能為研究主題。儘管這是個冷門的領域。

為了釐清骨骼內的細菌組成，筆者隨指導教授的研究團隊至臺灣珊瑚研究熱點綠島進行樣本採集，我們選擇臺灣東部與南部常見的同孔珊瑚（*Isopora*）作為研究對象。透過電子顯微鏡觀察發現，同孔珊瑚骨骼裡單細胞的細菌數量相當多，反而前人所觀察到的絲狀結構極少，這樣的現象已經與前人所發現的有所不同了。經計數後，細胞數超過每公克1.5億個；尤其在前述所提及的綠層中，數量高達每公克2.7億個。這個數量超出了想像，原來碳酸鈣骨骼中，竟能涵養如此多的細菌。

這些細菌是誰呢？在利用次世代定序方法，揭示了這些細菌成員。他們是「綠硫菌」，一種不喜歡氧氣的光合細菌。在綠層中會高達七成以上。綠硫菌是綠菌門（*Chlorobi*）的俗稱，其俗名是根據這些細菌共同的外觀與功能而來的：因綠菌門的細菌多利用菌綠素進行光合作用產生能量，而菌綠素會讓這類的細菌呈現綠色或棕綠色，所以俗名中有「綠」；綠硫菌產生的能量被用來合成有機碳的過程中，不像藻類或是藍綠菌使用水當電子供應者，他們使用周遭環境中的氫或硫化氫，同時會產生硫化物在體外，也是為什麼名稱中有「硫」的原因。

接下來，從生物資訊分析總基因體的結果，也發現了珊瑚骨骼中的固氮基因主要是來自於這些綠硫菌，這結果吸引了我們的目光。怎麼說呢？因為海洋中，氮源相較於陸地來說，是匱乏的，加上自然界中能執行固氮作用的僅有少數細菌。而這些以驚人的數量存在於珊瑚骨骼中的綠硫菌有這樣的能力，暗示綠硫菌在骨骼中的氮循環代謝上有著不可忽視的角色。

只是，為了確認在珊瑚骨骼中的綠硫菌是否會執行固氮作用，讓我們吃足了苦頭。一方面綠硫菌是厭氧菌，在沒有氧氣的條件下進行實驗操作相當困難；二方面，野外的珊瑚不像觀賞珊瑚般地好培養；又加上分子生物學使用在珊瑚身上，也不像使用在模式動物般純熟，因此無法使用常見的基因表現的方法，來探究這些細菌的固氮功能。經過無數次的測試與討論，我們決定先從將珊瑚骨骼的細菌養出來這一步開始。

要養出特定的細菌，不是件容易的事。我們從台北出發，直奔綠島潛水採集同孔珊瑚樣本，需立刻放進厭氧缸中，在一天半之內要將樣本帶到具有完善厭氧操作環境的新

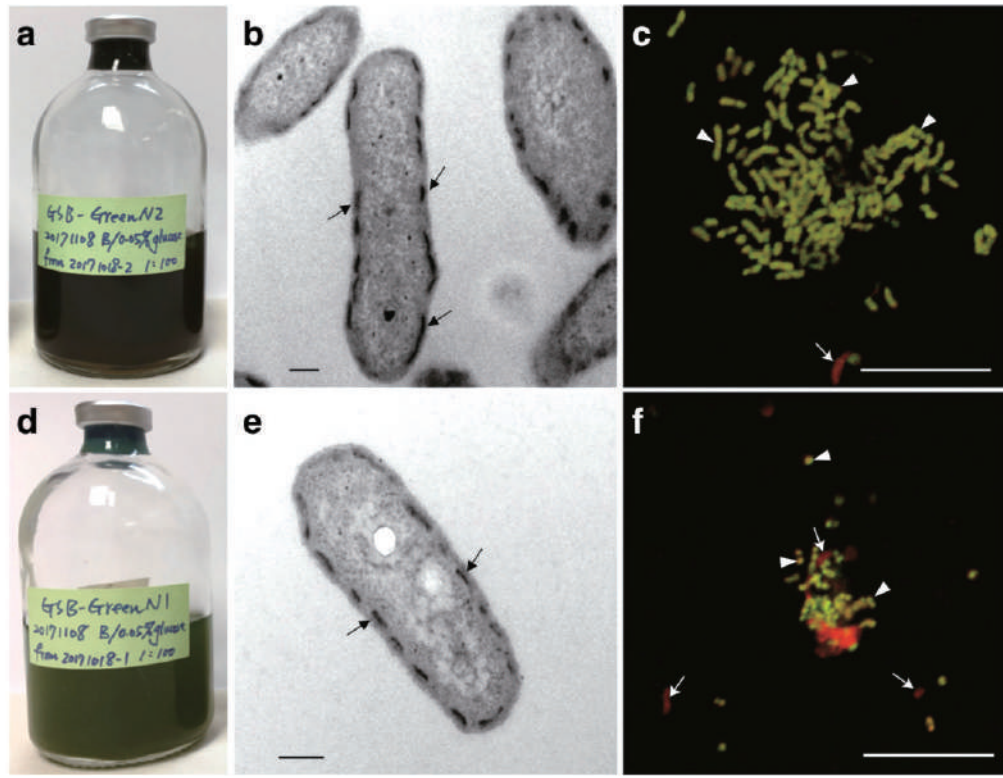


圖2：培養出之骨骼中優勢菌綠硫菌。(a)為培養之菌液。(b)為電子顯微鏡下觀察之綠硫菌的結構，箭頭所指處為綠硫菌特徵chlorosome結構。(Yang et al. 2019)

竹食品工業發展研究所。經操作專員的指導，在絕對厭氧的條件下將骨骼取出後磨碎，再置放於綠硫菌專屬選擇性培養基中，並在不同的光照條件下培養。接著便是近一個月的漫長等待，才能曉得是否培養成功。(圖2)

運氣不錯，我們將珊瑚骨骼的綠硫菌拿到手了！綠硫菌到手固然開心，要回答問題的實驗才正要準備開始。為了知道珊瑚骨骼中的綠硫菌是否有固氮能力，我們除了採用可間接回答問題的「乙炔還原法」，也挑戰了可直接看到綠硫菌固氮表現的新方法「螢光原位雜交 - 奈米二次離子質譜技術 (fluorescence in situ hybridization-Nano secondary ion mass spectroscopy, FISHNanoSIMS)」。雖然這個新方法技術門檻高，牽扯的實驗與計算又複雜，我們仍互相砥礪不斷挑戰，終於在一年後，證明了珊瑚骨骼的綠硫菌確實會固氮(圖3)。而這些綠硫菌幾乎是新種，並在海洋已知的綠硫菌群中自成一格。這表示，住在珊瑚內的這群綠硫菌，可能與珊瑚有著緊密的關係長達一段時間，以至於在演化上，足以與其他海洋綠硫菌有親緣關係的差異。但仍需日後更深入的探究才能確認。

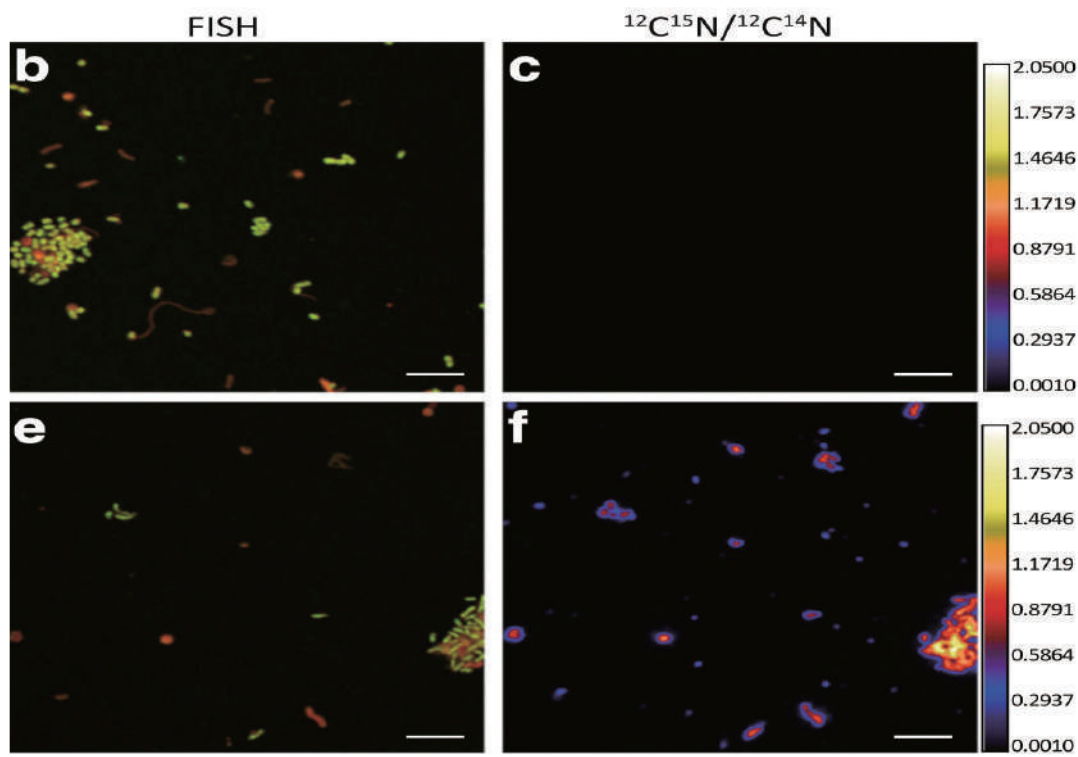


圖3：使用FISHNanoSIMS技術證明珊瑚骨骼的綠硫菌可執行固氮作用。（Yang et al. 2019）

研究結果也透露，對骨骼內的細菌而言，光線與氧氣為兩個重要的因子。有些珊瑚骨骼質地較鬆散，能涵養的微生物是需要氧氣與光照較多的藻類或藍綠菌；有的珊瑚骨骼質地緊實，裡面的微環境呈現厭氧與微光，只能讓綠硫菌這類厭氧生物生存。換言之，珊瑚物種差異會決定細菌在珊瑚骨骼中的組成。

除了珊瑚物種會影響骨骼質地之外，外在的海水環境，像是海水的pH值，也會改變骨骼的質地。由於珊瑚骨骼主成分是碳酸鈣，當水中pH比較低，意味著水體中氫離子較多，會搶骨骼碳酸鈣的碳酸根離子，形成碳酸氫根，便會破壞珊瑚骨骼的結構。Tambutté等人在2015年時曾觀察到，珊瑚的骨骼在比海洋環境更酸的水體中一段時間，骨骼結構變鬆散，內部孔徑會變大。那是否意味著，當珊瑚骨骼環境受到外在環境影響後，裡面的微生物族群也會改變呢？

為了證實這件事，筆者於日本進行博士後研究期間，利用沖繩瀨底島海洋研究站之精密海水酸化設備，進行了一項簡單的試驗。筆者使用同孔珊瑚與微孔珊瑚兩類骨質密度不同的珊瑚，置放於酸化與非酸化的海水中，來看看珊瑚組織健康程

度與骨骼中細菌組成的變化。經過兩個月的測試，發現同孔珊瑚本身不耐酸，將近一半的組織皆壞死；而微孔珊瑚彷彿不受海水酸化影響，組織外觀健康無礙。有趣的是，骨骼密度較高的同孔珊瑚組織雖然壞死了，但骨骼內部的菌群卻不受影響；相反的，看起來健康的微孔珊瑚，骨骼中的細菌組成，已經從厭氧的細菌轉換成好氧的，表示微孔珊瑚骨質已經疏鬆了。這個結果確定了海水酸化對珊瑚骨骼的微生物族群的影響，會因珊瑚物種而異。另外也透露了件很重要的事，那就是當逆境來的時候，珊瑚骨質疏鬆這件事，是從外表看不出來的，也揭露了現行珊瑚觀測方法上的盲點。而如何解決這個盲點，正是筆者團隊正在努力的目標。

現在我們知道了，珊瑚骨骼微生物的組成，會反映珊瑚物種差異與海水環境的變化。在筆者進入臺大服務後，持續與中研院、琉球大學以及嘉義大學合作，以「珊瑚內岩生細菌族群」為系統，來探究從沖繩到東沙群島，跨季風帶地點的海水環境是否珊瑚骨骼的影響。透過這個測試，我們也觀察到，洋流中不同的物理化學與生物因子，可能都會對珊瑚骨骼內細菌的族群有著不同程度的影響。

這個「珊瑚骨骼的細菌」一系列研究，從筆者念博士班開始，直到進入臺大服務，投入了整整十年的時光。這過程百感交集，困難重重卻也成就感非凡。因為這樣的研究要接觸到的技術包羅萬象，除了實驗室裡的分子生物學與微生物學實驗，接觸生物資訊分析的程式語言，為了能在海面下工作，也得學習潛水並取得執照（圖4、圖5）。在不同團隊合作時，如何將想法與不同背景的人溝通，是學問；怎麼與人協調，是藝術。珊瑚骨骼細菌的研究始於冷門，而今成為珊瑚共生體學的不可能被忽略的一



圖4：在海面下工作，拍攝珊瑚生態。



圖5：採集樣品後上岸，立刻進行保存處理，分秒必爭。

塊，筆者身為該領域的前期探索者之一，亦感到十分榮幸。（本專題策畫／生命科學系鄭貽生教授兼系主任）

## 參考文獻：

- [1] PY Liu, SY Yang, CY Lu, N Wada, S De Palmas, SS Yeh, H Yamashiro, SL Tang, SH Yang. 2022. Ocean Currents May Influence the Endolithic Bacterial Composition in Coral Skeletons. *Frontiers in Marine Science* 9:850984.
- [2] YH Chen, SH Yang, K Tandon, CY Lu, HJ Chen, CJ Shih, SL Tang. 2021. Potential syntrophic relationship between coral-associated *Prosthecochloris* and its companion sulfate-reducing bacterium unveiled by genomic analysis. *Microbial Genomics* 7:000574
- [3] SY Yang, CY Lu, SL Tang, R Ramen Das, K Sakai, H Yamashiro, SH Yang. 2020. Effects of Ocean Acidification on Coral Endolithic Bacterial Communities in *Isopora palifera* and *Porites lobata*. *Frontiers in Marine Science* 7:603293
- [4] SH Yang, K Tandon, CY Lu, N Wada, CJ Shih, SSY Hsiao, WN Jane, TC Lee, CM Yang, CT Liu, V Denis, YT Wu, LT Wang, L Huang, DC Lee, YW Wu, H Yamashiro, SL Tang. 2019. Metagenomic, phylogenetic and functional characterization of endolithic green sulfur bacteria in the coral, *Isopora palifera*. *Microbiome* 7:3
- [5] SH Yang, STM Lee, CR Huang, CH Tseng, PW Chiang, CP Chen, HJ Chen, SL Tang. 2016. Prevalence of potential nitrogen-fixing, green sulphur bacteria in the skeleton of reef-building coral *Isopora palifera*. *Limnology and Oceanography* 61(3): 1078-1086



### 楊姍樺 小檔案

中央研究院 TIGP 國際研究生學程 / 中興大學生物科技學研究所博士。現任臺大漁業科學研究所副教授。專長為微生物學、基因體學與珊瑚礁生態學。研究興趣是探討微生物在珊瑚礁環境中的變動，以及微生物在珊瑚上所扮演的角色。除了透過總基因體學一探究竟那些尚無法培養的微生物，也改良微生物分離與培養的技術，得到更多樣的海洋微生物資源。珊瑚礁生態系提供了人類重要的漁業資源，健康的珊瑚是維持珊瑚礁生態系功能的基礎，希望能透過了解微生物與珊瑚之間的關係，對珊瑚復育有更多的幫助。