

溶藻弧菌選別性培養基之研發

張錦宜、張志堅、吳嘉哲、林金榮

水產試驗所水產養殖組

前言

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 是海水養殖的主要病原菌之一，其所造成的普遍病癥是出血性敗血症，嚴重感染的病魚外觀上可見凸眼、角膜白濁 (圖 1A)，體表、腹腔、消化道及腎臟潰瘍或出血 (圖 1B)；感染對象除魚類外，海水養殖的無脊椎動物如九孔、對蝦等，亦均曾因溶藻弧菌感染造成大量死

亡。溶藻弧菌疫情盛行的地區遍及全球，除了亞洲重要養殖國家外，歐洲許多高經濟價值的養殖魚種，例如在地中海地區養殖的高級料理用鯛魚，也一直深受溶藻弧菌所苦。近年來台灣方興未艾的石斑魚養殖產業，其所面臨的疾病威脅，除病毒感染症之外，溶藻弧菌亦是不容忽視的危險因子。

細菌性疾病與病毒性疾病的防疫對策明顯不同，前者若能及早預警，是可以早期防治、對症下藥的，然而目前微生物學者常用的弧菌培養基並不能專一地選別出溶藻弧菌，使用分子生物技術雖然能快速且專一地檢測特定病原菌，卻無法進行後續的藥物敏感性試驗。本研究的目的，即在開發對溶藻弧菌具高專一性的選別性培養基，可供第一線防疫人員、水產獸醫師或魚病研究者快速篩選、分離得到純化的溶藻弧菌菌株，俾利後續藥物試驗及防治對策擬定之用。

選別性培養基開發之供試菌株

本研究採用 32 株標準菌株及 93 株養殖環境常在菌，計有 13 屬、32 種、125 株不同細菌做為供試菌株，其中包括 26 株不同來源的溶藻弧菌，19 種 (52 株) 在分類上與溶藻弧菌相近的弧菌科菌株 (表 1)，以比較各選別性培養基的專一性及適用性。

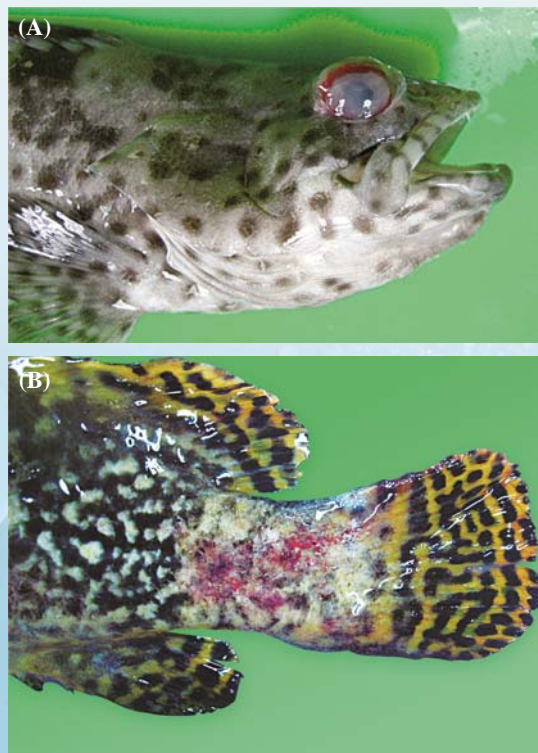


圖 1 溶藻弧菌感染之石斑魚外觀
(A)凸眼、角膜白濁；(B)體表潰瘍、出血

表 1 本研究所使用的 125 株供試菌株及不同培養基的選別性比較

菌 種 (菌株數)	菌 株 編 號	形成菌落的菌株數 (菌落顏色 ^a)		
		VAL	TCBS	TSAT
<i>Aeromonas hydrophila</i> (13)	ATCC7966	0	8(Y)	13(W)
<i>Aliivibrio logei</i> (1)	ATCC15382	0	1(G)	1(R)
<i>Edwardsiella tarda</i> (16)	ATCC15947	0	6(Y)2(G)	16(W)
<i>Enterococcus faecalis</i> (1)	ATCC19433	0	1(Y)	0
<i>E. faecium</i> (2)	ATCC19434	0	1(Y)	0
<i>Escherichia coli</i> (2)	ATCC25922	0	0	1(W)
<i>Bacterium columnaris</i> (1)	NCIMB2248	0	0	0
<i>Lactococcus garvieae</i> (5)	MT2055	0	0	0
<i>Listonella anguillarum</i> (4)	ATCC19264	0	4(Y)	4(W)
<i>L. pelagia</i> (1)	ATCC25916	0	0	1(W)
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (4)	ATCC33539	0	4(G)	4(R)
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (14)	ATCC51736	0	0	3(W)1(R)
<i>P. leiognathi</i> (2)	ATCC25521	0	2(G)	2(R)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	ATCC10145	0	0	2(W)
<i>P. anguilliseptica</i> (1)	NCIMB2248	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (2)	ATCC12228	2(GY)	0	0
<i>Streptococcus iniae</i> (2)	ATCC29178	0	0	0
<i>Vibrio aestuarianus</i> (1)	ATCC35048	0	1(Y)	1(W)
<i>V. alginolyticus</i> (26)	ATCC17749	26(GY)	26(Y)	26(W)
<i>V. campbellii</i> (1)	ATCC25920	0	0	1(W)
<i>V. diazotrophicus</i> (1)	ATCC33466	0	1(Y)	1(W)
<i>V. fluvialis</i> (2)	ATCC33809	0	1(Y)	1(W)
<i>V. furnissii</i> (1)	NCTC11218	0	1(Y)	1(W)
<i>V. harveyi</i> (6)	ATCC14126	0	6(Y)	6(W)
<i>V. mimicus</i> (1)	ATCC33653	0	1(G)	1(R)
<i>V. natriegens</i> (1)	ATCC14048	0	1(Y)	1(W)
<i>V. nereis</i> (1)	ATCC25917	0	0	0
<i>V. parahaemolyticus</i> (4)	ATCC27969	0	4(G)	4(R)
<i>V. proteolyticus</i> (1)	ATCC15338	1(B)	1(G)	1(R)
<i>V. salmonicida</i> (1)	ATCC43839	0	1(G)	1(R)
<i>V. splendidus</i> (1)	ATCC33125	0	1(G)	1(R)
<i>V. vulnificus</i> (4)	ATCC27562	0	3(G)	4(R)

^a 菌落顏色 (B：藍色、G：綠色、GY：黃綠色、R：紅色、Y：黃色、W：白色)

溶藻弧菌培養基與其他選別性培養基的比較

上述菌株分別接種於本研究新開發之溶藻弧菌培養基 (*Vibrio alginolyticus* medium, 以下簡稱 VAL, 培養基配方如表 2)、硫代硫酸鹽-檸檬酸鹽-膽鹽-蔗糖洋菜培養基

(Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar, 簡稱 TCBS 培養基, 係一商品化的弧菌選別性培養基) 與胰化酪蛋白-大豆-三苯基四氮唑培養基 (Trypticase-Soy-Triphenyltetrazolium agar, 簡稱 TSAT 培養基, 係 Kourany 等研發用以區別溶藻弧菌與腸炎弧菌的選別性培養基) 等 3 種選別性培養基上, 於 37℃ 培養 48

小時。結果顯示 (表 1)，本研究新開發之 VAL 對溶藻弧菌之選別性明顯優於 TCBS 及 TSAT；所有溶藻弧菌 (26 株) 均能在 VAL 上形成黃綠色的圓扁型菌落 (圖 2A)，至於其他 99 株分屬 31 種非溶藻弧菌的供試菌株中，僅有 3 菌株能在 VAL 上形成菌落，其中 1 株 *Vibrio proteolyticus* 形成藍色菌落 (圖 2B)，明顯與 *V. alginolyticus* 的黃綠色菌落不同。另有 2 株 *Staphylococcus epidermidis* 雖然也能形成黃綠色菌落，但其於 37℃ 培養 48 小時在 VAL 上形成的菌落直徑 < 1 mm，而 *V. alginolyticus* 形成的菌落直徑約 2–3 mm，兩者用肉眼也可以輕易區別。

上述 26 株 *V. alginolyticus* 也可以在 TCBS 及 TSAT 上生長，但其他 99 株非 *V. alginolyticus* 菌株，接種於 TCBS 上時，有 50 株可形成菌落，其中 30 株形成與 *V. alginolyticus* 外觀相似的黃色菌落；接種於 TSAT 上時，有 72 株可形成菌落，其中 50 株形成與 *V. alginolyticus* 外觀相似的白色菌落 (表 1)，兩者均不適合做為 *V. alginolyticus* 的選別性培養基。

從檢體中分離溶藻弧菌

以 8 株水產常見病原菌 (*Aeromonas hydrophila*, *Listonella anguillarum*, *Staphylococcus epidermidis*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. vulnificus*) 分別與溶藻弧菌等量懸浮於生理食鹽水中，製成混合菌液檢體，再依傳統微生物學方法，分別以 VAL 及 TCBS 分離檢體中的菌株，純化後的分離菌株，則以 16S

表 2 溶藻弧菌培養基組成* (每 1 公升中的含量)

Sodium Chloride	90.0 g
Proteose Peptone	10.0 g
Sucrose	15.0 g
Agar	15.0 g
Beef Heart, Infusion from 250 g	9.8 g
Calf Brains, Infusion from 200 g	7.7 g
Disodium Phosphate	2.5 g
Dextrose	2.0 g
Difco™ Oxgall	1.0 g
Bromocresol Purple	0.02 g

* 加熱至沸騰並持續 1 分鐘，最終 pH 值為 7.4 ± 0.2

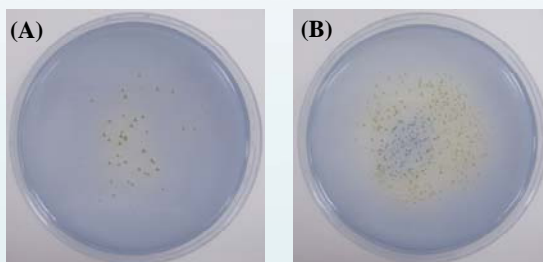


圖 2 不同細菌在溶藻弧菌培養基形成的菌落外觀。(A)單純的 *V. alginolyticus* 形成黃綠色菌落；(B)混合菌液接種後形成的菌落可依顏色區分，黃綠色菌落為 *V. alginolyticus*，藍色菌落為 *V. proteolyticus*

rRNA 鑑定技術加以驗證。結果如表 3 所示，大部分的革蘭氏陰性菌無法在 VAL 上生長，偶有非溶藻弧菌的菌株形成菌落，又可依菌落顏色、大小再加以區別；而許多種類的革蘭氏陰性菌 (尤其是弧菌科的細菌) 都可以在 TCBS 上生長，形成的菌落只能分成黃色或綠色兩大群，因此，有相當多種水產常見病原菌無法以 TCBS 與溶藻弧菌區別。此外，將九孔的肌肉或石斑的頭腎、肝臟等檢體與混合菌株懸浮液一起均質處理，其結果並無不同，顯見 VAL 的選別能力並不受動物性檢體的影響。

另一方面，研究人員以人工注射溶藻弧菌的方法感染白蝦，再從罹病蝦的肝胰臟中分別以 VAL 及 TCBS 分離細菌，結果在 VAL 上長出的黃綠色菌落經後續生化試驗與 16S rRNA 確認均為溶藻弧菌；而 TCBS 上疑似溶藻弧菌形成的黃色菌落經鑑定後有超過 1/3 為非溶藻弧菌的海洋常在弧菌。

VAL 的細菌回收效率 (Recovery efficiency)

將溶藻弧菌參考菌株配製成 10 倍連續稀釋懸浮液，再分別以無選別性的海水培養基 (Marine Agar, Difco)、TCBS 及 VAL 進行細菌計數 (plate count)，結果顯示，三者的細菌回收效率依序為 1 : 0.09 : 0.04。一般而言，選別性培養基因為對細菌有緊迫效應 (stressing effect)，回收效率在 1/100 以內均是

可接受的範圍，本研究結果顯示，VAL 的選別效能 (selective efficiency) 優於 TCBS，但回收效率則不及 TCBS。

結論

本研究所開發的 VAL 培養基對於溶藻弧菌有極佳的專一性及鑑別性，是目前已知的選別性培養基中最適合快速檢測、篩選或分離溶藻弧菌的有效工具。作者等曾以此培養基進行生鮮牡蠣的衛生監控及養殖九孔的菌相調查，結果均比傳統方法更為快速、準確，能大幅減少檢測時間與研究人力。第一線防疫人員、水產獸醫師或魚病研究者只要具備簡單的微生物試驗設備及基礎的人員訓練，亦能輕易熟練 VAL 的使用與判讀，卒能有效提升工作效率與研究成果，落實養殖現場之健康管理。

表 3 以 VAL 及 TCBS 培養基分離混合菌液檢體中的溶藻弧菌 (於 37°C 培養 48 小時)

混合菌液檢體	不同培養基對溶藻弧菌的區別效果	
	VAL	TCBS
Va + A	可明確區分，所有菌落均是 Va	無法區分，部分 A 的菌株形成與 Va 類似的黃色菌落
Va + La	可明確區分，所有菌落均是 Va	無法區分，La 與 Va 均形成類似的黃色菌落
Va + Se	不易明確區分，Va 菌落直徑約 2-3 mm，Se 菌落直徑小於 1 mm	可明確區分，所有菌落均是 Va
Va + Vf	可明確區分，所有菌落均是 Va	無法區分，Vf 與 Va 均形成類似的黃色菌落
Va + Vh	可明確區分，所有菌落均是 Va	無法區分，Vh 與 Va 均形成類似的黃色菌落
Va + Vpa	可明確區分，所有菌落均是 Va	可明確區分，Va 形成黃綠色菌落，Vpa 形成綠色菌落
Va + Vpr	可明確區分，Va 形成黃綠色菌落，Vpr 形成藍色菌落	可明確區分，Va 形成黃綠色菌落，Vpr 形成綠色菌落
Va + Vv	可明確區分，所有菌落均是 Va	可明確區分，Va 形成黃綠色菌落，Vv 形成綠色菌落

Va: *V. alginolyticus*; A: *Aeromonas hydrophila*; La: *Listonella anguillarum*; Se: *Staphylococcus epidermidis*; Vf: *V. fluvialis*; Vh: *V. harveyi*; Vpa: *V. parahaemolyticus*; Vpr: *V. proteolyticus*; Vv: *V. vulnificus*