

淺談發光桿菌之分類與檢測方法

朱惠真、廖哲宏、吳豐成

水產試驗所水產養殖組

發光桿菌之分類

水產養殖在全球糧食供應上一直佔有一席之地，卻因為疾病的爆發而造成重大的損失，尤其是細菌性疾病所佔比例最高，其中以弧菌為海水養殖的主要病源，除熟知的副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、哈維氏弧菌 (*V. heaveyi*)、鰻弧菌 (*V. anguillarum*)、創傷弧菌 (*V. vulnificus*) 等外，發光桿菌屬 (*Photobacterium* spp.) 所引起之疾病造成的養殖經濟損失也不容忽視。感染發光桿菌的幼魚，會導致急性敗血症，死亡率極高；而成魚部分則會引起較多的慢性病徵如肉芽腫 (granulomatous lesions) 的產生。

發光桿菌屬中，目前具有較強致病性的有 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (簡稱 PDSD) 及 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (簡稱 PDSP) 兩種，二者的 16S rDNA 基因序列相似度高達 98%，但特性方面卻截然不同 (表 1)。PDSD 廣泛的存在於沿岸海洋，可以由海水、海洋生物甚至是海草中分離出來 (Amable et al., 2013)，感染的對象包含魚、甲殼類、貝類，典型的病徵包含廣泛的出血及潰瘍性病變 (Carlos et al., 2018)。據 Kunikazu 在 2004 年的研究報告指出，PDSD 也可以感染哺乳動物，為人畜共通型疾病病源，在日本曾經有 PDSD 經

表 1 PDSD 及 PDSP 特性分析

特性種類別	PDSD	PDSP
細菌型態	革蘭氏陰性菌	革蘭氏陰性菌
鞭毛型態	單鞭毛桿菌	雙鞭毛桿菌
活動性	具有活動性	不具有活動性
酶類活性		
尿素酶	陽性	陰性
澱粉酶	陽性	陰性
脂肪酶	陽性	陰性
氧化酵素	陽性	陽性
過氧化氫酶	陽性	陽性
TCBS 培養基利用性	可形成綠色單一菌落	無菌落生成
血液培養基利用性	多數有溶血現象	無溶血現象
抗生素敏感性試驗		
ciprofloxacin	敏感性	敏感性
erythromycin	抵抗性	抵抗性
spectinomycin	抵抗性	抵抗性
lincomycin	抵抗性	敏感性
ampicillin	抵抗性	敏感性
novobiocin	抵抗性	敏感性
oxytetracycline	抵抗性	敏感性
人畜共通特性	有感染人之菌種	無感染人之菌種

資料參考 Eissa et al., 2017 ; Kunikazu et al., 2004 ; 水生動物疾病診斷系統

由傷口感染造成泡疹性浮腫，最後導致壞死筋膜炎 (necrotizing fasciitis) 而多重器官衰竭死亡的案例。

另一個亞種—PDSP 早期稱為巴斯德桿菌 (*Pasteurella piscicida*)，在 1994 年以基因

鑑定後正式命名為 *P. damsela* subsp. *piscicida*，其最適生長溫度為 23–30°C，除了表 1 所述的生化特性外，細胞膜上有類似菌毛 (pilus like) 的結構，並產生陽性抗菌肽 (cationic antimicrobial peptides, AMPs)，內含之質體會分泌一種胞外毒素蛋白 AIP56 (apoptosis inducing protein of 56 kDa)，造成宿主的巨噬細胞以及噬中性球產生細胞自殺而死亡，進而影響宿主的免疫能力而導致死亡 (Tasi et al., 2015)。PDSP 感染的組織及器官為內臟，特別是脾臟及腎臟，有急性及慢性兩種類型，急性可見體表、鰭基部及肛門周圍有皮膚出血，解剖後發現肝、腎、脾等器官有多發局部的壞死灶；慢性者則病魚之肝、脾、腎等出現許多 0.5–2 mm 大小的灰白色壞死結節。1969 年日本養殖黃尾鰺 (*Seriola quinqueradiata*) 及 香 魚 (*Plecoglossus altivelis*) 幼魚爆發嚴重感染，其病原便是 PDSP；1970–2000 年間，美國、日本及挪威等國之大西洋油鯪魚 (*Brevoortia tyrannus*)、烏 魚 (*Mugil cephalus*)、條紋狼鱸魚 (*Morone saxatilis*)、黑鯛 (*Acanthopagrus schlegelii*)、鞍帶石斑 (*Epinephelus lanceolatus*) 以及臺灣的海鱸 (*Rachycentron canadum*) 亦因感染本菌，陸續爆發大量死亡。

以分子生物方法鑑別發光桿菌

檢測發光桿菌的標準做法是先檢視臨床症狀、解剖後判斷病理學樣態，後取出病灶處病菌進行純化，再以分生方式進行確認。國內診斷 PDSD 及 PDSP 的方法眾多，包含

抗生素敏感性檢測、溶血性反應測試、選擇性培養基培養測試、API-20E、API-CH 50、發光桿菌快篩套組檢測、16S rDNA 檢測、real-time PCR 檢測及 urease gene 檢測等，每種方式均有其優缺點及實用度。在抗生素敏感性檢驗中，每一種發光桿菌對抗生素的敏感性大多有一致性卻不完全具有專一性，其試紙取得不易且價格昂貴，不常被應用。選擇性培養基培養測試、API-20E、API-CH 50 使用便利，但前者只能夠用來輔助分類上的判讀，無法直接使用，而 API-20E、API-CH 50 等套組在判斷細菌分類時有一定的限度，且判讀時間耗費 16–28 小時，因此本文選取上述幾種分子生物學方法進行分析比較。

本研究選擇 8 種發光桿菌 (表 2)，經海洋培養基 (Marine broth 2216) 純化 3 次後，將單一菌落於血液培養基和 TCBS 上、28°C 下培養 18–24 小時後，進行溶血及成長判定。結果發現，1–4 號菌在血液培養基培養的菌落有明顯的溶血現象，5–8 號則無；1、2、3、4 及 7 號菌在 TCBS 上培養 18 小時後會有綠色菌落生成，5、6、8 則無菌落生成，結果與先前研究相符。

表 2 發光桿菌菌種

試驗菌種編號	菌種來源	菌種名稱
1	標準菌株 (BCRC12906)	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
2	養殖草蝦(東港)	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
3	養殖草蝦	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
4	養殖石斑(澎湖)	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
5	標準菌株 (BCRC17065)	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
6	澎湖養殖池	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
7	養殖石斑	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
8	東港養殖池	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>

後參考中國專利申請號 CN103981270A 內容進行用發光桿菌快篩套組檢測：將樣本 1—8 號的發光桿菌，以市售 DNA 抽取套組 (Genomic DNA Isolation Kit) 進行抽取，並將抽取後之 DNA 定量 50 $\mu\text{g/ml}$ 後備用，將引子及樣本放入恆溫環狀擴增法套組 (Loopamp DNA Amplification Kit) 中，以 65°C 反應 1 小時後，以肉眼判斷結果。結果發現，參照專利條件所做出的結果，在試管的外觀無法以肉眼觀察到有明顯的白色沉澱，經由電泳分析後，則可精確的分離出發光桿菌及其他的細菌 (圖 1)，顯示其靈敏度仍有待改善。

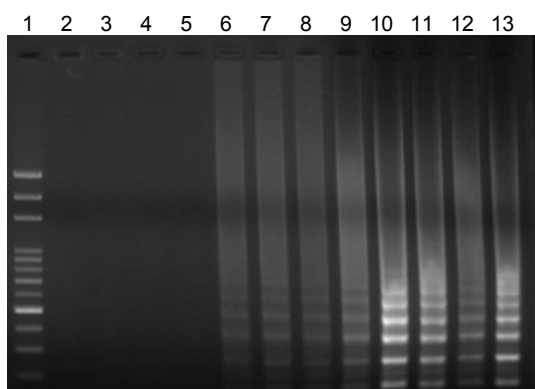


圖 1 以發光桿菌快篩套組鑑別發光桿菌

Lane 1 為 100 bp 標準液，Lane 2-5 為 *Aeromonas hydrophila*、*V. parahaemolyticus*、*V. anguillarum*、*V. vulnificus*，Lane 6-13 為樣本 1-8 號

接著以一般 16S rDNA 檢測，將樣本 1—8 號的發光桿菌，以市售 DNA 抽取套組進行 DNA 抽取，並將抽取後之 DNA 定量 50 $\mu\text{g/ml}$ 後備用，反應條件為 94°C、5 分鐘；再進行 94°C、30 秒鐘、56°C、45 秒鐘、72°C、1 分鐘，共進行 30 個循環；最後以 72°C 反應 8 分鐘。PCR 產物以 1.5% 瓊膠 (agarose gel) 進行分析後送生技公司定序。結果發現，將

大小約 1,500 bp DNA 片段回送生技公司定序後的結果，1—8 號皆為 *P. damsela* subsp. *damsela*，顯示一般性 16S 序列無法明確的區分出兩個不同的亞種 (表 3)。

最後利用 AIP56 specific primer、urease gene 及 *P. damsela*-specific 16S rDNA gene 多重 PCR 進行檢測，樣本除了原來的 1—8 號發光桿菌外，因發光桿菌屬細菌菌種和弧菌屬親緣性高，因此增加了 4 株弧菌菌株一起進行多重 PCR 檢測，並以市售 DNA 抽取套組進行 DNA 抽取，將抽取後之 DNA 定量 50 $\mu\text{g/ml}$ 後備用，反應條件為 95°C、4 分鐘；再進行 95°C、1 分鐘、60°C、1 分鐘、72°C、40 秒，共進行 30 個循環；最後以 72°C 反應 5 分鐘。PCR 產物以 1.5% 瓊膠進行分析。

結果發現，多重 PCR 檢測方法可以同時判斷出 PDSD 及 PDSP，且發現 6 號菌攜帶質體且會產生外毒素蛋白 AIP56 (圖 2)，亦即具有較強的致病能力。經由本次的試驗結果證明，多重 PCR 檢測具有高專一性，可區分其他的發光桿菌和其他的致病原，減少其他檢測繁瑣的程序。

結語

目前的研究上雖以多重 PCR 檢測診斷方式為最佳，但因為仍要借助儀器設備，不易在養殖現場使用，由此研發水產動物疾病快速檢測試劑仍是當前的重要工作。因此本所擬運用多重 PCR 檢測方式針對發光桿菌開發快篩試劑，希望可以在疾病爆發前先行檢出此病，進行疾病防治或淘汰以減少漁民的損失。

表 3 以 16S rDNA 序列定序結果鑑別發光桿菌 (圖中的樣本 1-8 號經由定序後，以 NCBI 之 blast 軟體進行序列筆對，5 號標準菌株及 6 號菌應為 *P. damsela* subsp. *piscicida*，而 7 號菌應為 *P. damsela* subsp. *damsela*，結果顯示定序結果並無法明確的分析出發光桿菌的 2 個亞種，只可鑑別種別)

編號	Description	Max score	Total score	Query cover (%)	E value	Per. Ident. (%)	Accession
1	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> strain KC-Na-1 chromosome I, complete sequence	1526	22800	100	0.0	99.76	CP021151.1
2	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> strain P001112Karwar 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1692	1692	100	0.0	99.26	MH423606.1
3	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> strain P001112Karwar 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1718	1718	99	0.0	99.16	MH423606.1
4	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> strain KC-Na-1 chromosome I, complete sequence	1663	24852	99	0.0	98.73	CP021151.1
5	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> strain P001112Karwar 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1583	1583	100	0.0	99.20	MH423606.1
6	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> strain P001112Karwar 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1609	1609	100	0.0	99.89	MH423606.1
7	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> strain SWZX5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1956	1956	98	0.0	97.18	EF643517.1
8	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> strain PN510 16S ribosomal RNA, partial sequence	1893	1893	93	0.0	98.34	AY147860.1

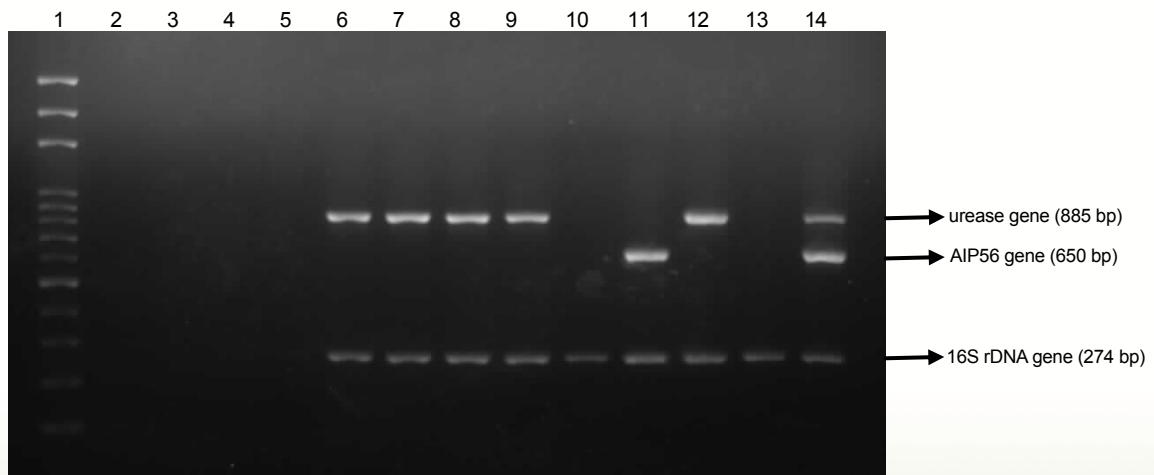


圖 2 以多重 PCR 方式鑑別發光桿菌

圖中之 Lane 1 為 100 bp 標準液，Lane 2-5 為 *A. hydrophila*、*V. parahaemolyticus*、*V. anguillarum*、*V. vulnificus*，Lane 6-13 為樣本 1-8 號，Lane 14 為同時添加 *V. parahaemolyticus*、*V. anguillarum*、樣本 1 號、5 號及 6 號的 DNA 進行 PCR 結果，274 bp DNA 片段為部分 *P. damsela*-specific 16S gene，650 bp DNA 片段為部分 AIP56 specific gene 而 885 bp DNA 片段則為部分 *P. damsela* subsp. *damsela* 之 urease gene