

水產病原乳酸球菌選別性培養基之研發

L. garvieae selective and differential medium

張錦宜、吳嘉哲、陳力豪

水產試驗所水產養殖組

前言

乳酸球菌 (*Lactococcus garvieae*) 又稱格氏乳球菌，是一種兼性厭氧、不具運動性亦不會形成孢子的革蘭氏陽性球菌。早期臺灣養殖魚、蝦類常見的水產鏈球菌感染症，學者一般都認為係因 *Streptococcus* spp. 感染所致；但自 1988 年 *L. garvieae* 由 *Streptococcus* 屬獨立成一屬後，愈來愈多的本土研究發現，臺灣養殖虹鱒、泰國蝦、烏魚、金目鱸及吳郭魚的水產鏈球菌感染症，其致病的禍首有相當大的比例（約四分之一）其實是乳酸球菌。而日本的紅魷鰯，歐洲、澳洲及南非的虹鱒和地中海周邊地區的鯛科魚類養殖業者，更是早就將水產病原性乳酸球菌視為頭號大敵。水產動物遭病原性乳酸球菌感染後會導致嚴重的溶血性敗血症，病魚出現凸眼、角膜白濁或充血，腹部皮下出血，肛門周圍潮紅（圖 1）等病徵；病

蝦則會有肌肉組織白化及肝胰腺腫大等病變，罹病後死亡率高，往往造成養殖業者極大的損失。此外乳酸球菌成長緩慢，以傳統微生物方法分離培養不易，常常因為其他細菌的污染，導致誤診或延誤疫情。

本研究旨在開發出一個對病原性乳酸球菌具高專一性的選別性培養基 (*L. garvieae* selective and differential medium，以下簡稱 LG 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、分離得到純化的乳酸球菌菌株，俾利快速研判警訊，進而擬定適當的防治對策。

LG 培養基開發之供試菌株

本研究採用 41 株標準菌株及 121 株養殖環境常在菌，計有 14 屬、39 種、162 株不同細菌作為供試菌株（如表），其中包括 14 株不同來源的乳酸球菌（12 株為具莢膜的病原



圖 1 乳酸球菌感染之金目鱸外觀出現眼紅腫凸起，腹部皮下出血，肛門周圍潮紅等明顯病徵

162 株水產細菌在不同革蘭氏陽性球菌選別性培養基上的生長情形及菌落外觀

菌名 (供試菌株數)	標準菌株來源 ^a	可生長於培養基之菌株數		
		LG ^b	Ent	MS
<i>Aeromonas hydrophila</i> (13)	ATCC7966	0	0	0
<i>A. salmonicida</i> (1)	MT423	0	0	1(Bu) ^c
<i>A. sobria</i> (1)	ATCC43979	0	0	0
<i>Edwardsiella tarda</i> (16)	ATCC15947	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> (1)	ATCC19433	1(Bk)	1(Bk)	1(Bu)
<i>E. faecium</i> (2)	ATCC19434	2(W)	2(Bk)	2(Bu)
<i>Escherichia coli</i> (6)	ATCC25922	0	0	3(Br)
<i>Flavobacterium columnare</i> (1)	NCIMB2248	0	0	0
<i>Lactococcus garvieae</i> capsulated (12)	ATCC43921	12(Bk/R)	0	12(Bu)
non-capsulated (2)	MT2055	2(W)	0	2(Bu)
<i>L. lactis</i> (1)	ATCC19264	1(W)	1(W)	1(Bu)
<i>L. raffinolactis</i> (1)	ATCC25916	0	0	1(W)
<i>Mycobacterium fortuitum</i> (1)	ATCC19709	0	0	0
<i>Nocardia asteroides</i> (1)	ATCC3308	0	0	0
<i>N. seriolae</i> (1)	ATCC43993	0	0	0
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (10)	ATCC33539	0	0	3(Bu)
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (18)	ATCC51736	0	0	0
<i>P. leiognathi</i> (2)	ATCC25521	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	ATCC10145	0	0	2(Br)
<i>P. anguilliseptica</i> (1)	NCIMB2248	0	0	0
<i>Salmonella enteric</i> (1)	ATCC14028	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	ATCC6538	0	2(W)	0
<i>Sta. epidermidis</i> (2)	ATCC12228	0	2(W)	0
<i>Streptococcus iniae</i> (6)	ATCC29178	0	0	6(Bu)
<i>Str. mutans</i> (1)	ATCC33402	0	1(Bk)	1(Bu)
<i>Vibrio aestuarianus</i> (1)	ATCC35048	0	0	0
<i>V. alginolyticus</i> (26)	ATCC17749	0	0	0
<i>V. anguillarum</i> (5)	ATCC19265	0	0	0
<i>V. campbellii</i> (1)	ATCC25920	0	0	0
<i>V. diazotrophicus</i> (1)	ATCC33466	0	0	1(Bu)
<i>V. fluvialis</i> (2)	ATCC33809	2(W)	0	2(Bu)
<i>V. furnissii</i> (1)	NCTC11218	1(W)	0	0
<i>V. harveyi</i> (6)	ATCC14126	0	0	0
<i>V. mimicus</i> (1)	ATCC33653	1(W)	0	1(Bu)
<i>V. natriegens</i> (1)	ATCC14048	0	0	0
<i>V. nereis</i> (1)	ATCC25917	0	0	0
<i>V. parahaemolyticus</i> (4)	ATCC27969	0	0	1(Bu)
<i>V. proteolyticus</i> (1)	ATCC15338	0	0	1(Bu)
<i>V. salmonicida</i> (1)	ATCC43839	1(W)	0	0
<i>V. splendidus</i> (1)	ATCC33125	0	0	0
<i>V. vulnificus</i> (4)	ATCC27562	0	0	1(Bu)

^a ATCC: American Type Culture Collection、MT: FRS Marine Laboratory, Aberdeen, UK、NCIMB: National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria, UK、NCTC: National Collection of Type Cultures, UK.

^b LG: 本研究研發之乳酸球菌選別性培養基、MS: Mitis Salivarius agar、Ent: EnterococcoselTM agar, 後二者均為商品, 購自美商 BD 公司

^c 在培養基上形成的菌落顏色 (Bk: 黑色、Bk/R: 黑色菌落並有紅色光暈、Br: 棕色、Bu: 藍色、W: 白色)

性菌株，2 株為不具莢膜的非病原株)，以比較 LG 培養基與其他商用選別性培養基對乳酸球菌的專一性及適用性。

LG 培養基之製備

LG 培養基之製備係於 1,000 ml 蒸餾水中加入 50 g sucrose、30 g Difco™ Oxgall、9 g proteose peptone No.3、6 g pancreatic digest of casein、5 g proteose peptone、1 g dextrose 及 15 g Bacto agar，完全溶解後，將 pH 值調整至 7.0 ± 0.2 ，以 121°C 、15 min 滅菌並冷卻至 55°C ，再加入 8 ml 經 $0.45\ \mu\text{m}$ 過濾滅菌的 1% tetrazolium mixture (以 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride 與 tetrazolium blue chloride 依 9:1 比例調製)，均勻混合後到入平板培養皿中，冷卻後使用。

製備完成的 LG 培養基呈現琥珀色，病原性乳酸球菌在此培養基上會形成黑色菌落，並在菌落周邊出現紅色光暈，肉眼清晰可辨 (圖 2A 及 D)。

LG 培養基與其他選別性培養基的比較

將前述菌株分別接種於本研究新開發之 LG 培養基以及市售的腸球菌培養基 (Enterococcosel™ agar，以下簡稱 Ent 培養基，係一商品化的革蘭氏陽性球菌選別性培養基) 與輕型唾液鏈球菌培養基 (Mitis Salivarius agar，以下簡稱 MS 培養基，係 Chapman 等人研發，用以分離鏈球菌與腸球菌的選別性培養基，亦已商品化) 上，於 37°C

培養 48 小時。結果顯示 (如表)，本研究新開發之 LG 培養基對乳酸球菌之選別性明顯優於 Ent 及 MS 培養基；所有的乳酸球菌 (14 株) 均能在 LG 培養基上形成菌落，至於其他 148 株分屬 38 種非乳酸球菌的供試菌株中，僅有 9 株菌 (7 種) 能在 LG 培養基上形成菌落，且菌落特徵均明顯與乳酸球菌的菌落不同，用肉眼可以輕易判別。

14 株乳酸球菌也都可以 MS 培養基上生長，但其他 148 株非乳酸球菌，接種於 MS 培養基上時有 28 株菌 (16 種) 可形成菌落，而其中的 22 株會形成與乳酸球菌外觀相似的藍色菌落，用肉眼難以區別；另一方面，全部的乳酸球菌均無法在 Ent 培養基上形成菌落 (如表)。結果顯示，MS 與 Ent 這兩種商品化之培養基均不適合作為乳酸球菌的選別性培養基。

從檢體中分離病原性乳酸球菌

以 9 種水產常見病原菌 (*Aeromonas hydrophila*、*Edwardsiella tarda*、*Enterococcus faecalis*、*E. faecium*、*Staphylococcus epidermidis*、*Streptococcus iniae*、*Vibrio anguillarum*、*V. harveyi* 及 *V. vulnificus*) 與乳酸球菌等量懸浮於生理食鹽水中，製成混合菌液檢體，再以 LG 培養基分離檢體中的菌株，純化後的分離菌株，則以 16S rRNA 鑑定技術加以驗證。結果如圖 2D 所示，大部分的水產常見病原菌均無法在 LG 培養基上生長，僅腸球菌屬的菌株能在 LG 培養基上形成菌落，其中 *E. faecalis* 形成黑色菌落 (圖 2C)，*E. faecium* 形成白色菌落，均與病原性

乳酸球菌之具紅色光暈的黑色菌落有明顯之區別。

另據研究顯示，乳酸球菌的病原性與其莢膜關係密切；具莢膜的乳酸球菌因為能對抗宿主巨噬細胞的吞噬作用，所以具有極高的致病能力，而不具莢膜的乳酸球菌則被認為不具病原性。但傳統微生物學判定莢膜的方法不外以特殊染劑（如印度墨）將莢膜染色後在高倍顯微鏡或電子顯微鏡下觀察，無法適用於需大量篩選病原菌的預警式防治用途，本研究開發之 LG 培養基則可讓使用者輕易以肉眼判讀乳酸球菌的病原性：有莢膜之病原性乳酸球菌在 LG 培養基上形成黑色、周邊具紅色光暈的菌落（圖 2A 及 D），無莢膜之非病原性乳酸球菌在 LG 培養基上

則形成白色、周邊無光暈的菌落（圖 2B）。

結語

本研究所開發的 LG 培養基，對病原性乳酸球菌有極佳的專一性及鑑別率，是目前已知的選別性培養基中，最適合快速檢測、篩選或分離病原性乳酸球菌的有效工具。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操作訓練，均能輕易熟練 LG 培養基的使用與判讀。未來將推廣以此培養基進行養殖環境的菌相監控及疾病防治，期能有效提升檢診效率，發展出更快速、準確，且能大幅減少檢測時間與研究人力的養殖健康管理模式。

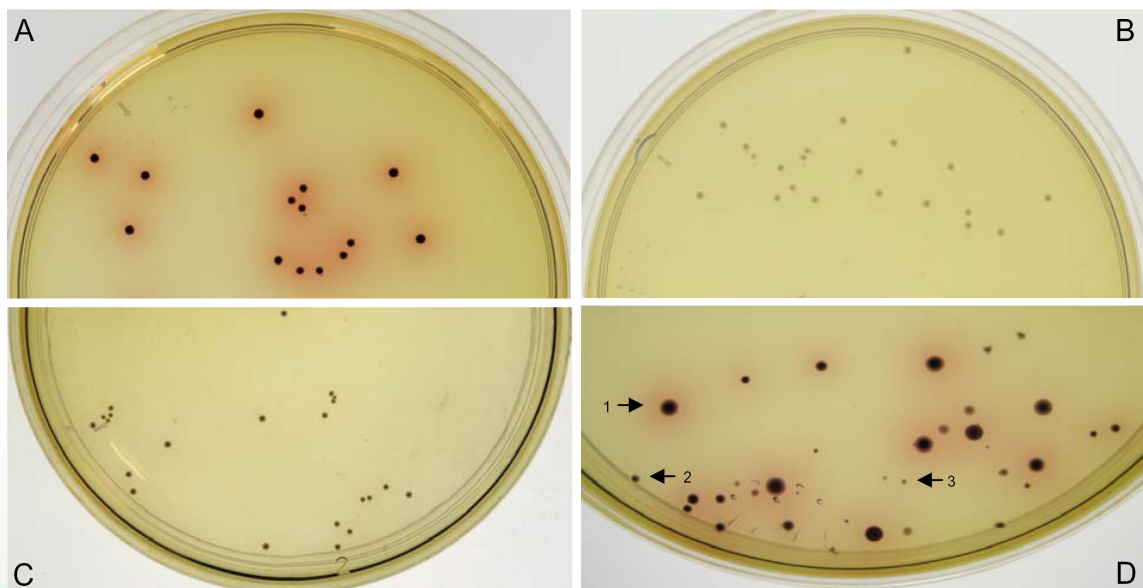


圖 2 不同菌株在 LG 培養基上呈現的菌落外觀（以 30°C 培養 48 小時）。(A)有莢膜之 *Lactococcus garvieae*；(B)無莢膜之 *L. garvieae*；(C)*Enterococcus faecalis*；(D)以 10 種常見水生細菌混合液測試 LG 培養基的選別性；僅 *L. garvieae*（箭頭 1），*E. faecalis*（箭頭 2）及 *E. faecium*（箭頭 3）能長出菌落，其他包含 *Aeromonas hydrophila*、*Edwardsiella tarda*、*Staphylococcus epidermidis*、*Streptococcus iniae*、*Vibrio anguillarum*、*V. harveyi* 及 *V. vulnificus* 均無法在 LG 培養基上生長