

## 新竹區養殖文蛤病原菌 *Vibrio parahaemolyticus* 之分離

楊美桂\* · 羅竹芳\* · 扈伯爾\* · 郭光雄\*\*

Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from Cultured Hard Clam,  
*Meretrix lusoring* in Hsin-Chu Areas

Mei-Kwei Yang\*, Chu-Fang Lo\*, Rev. F. Huber\* & Guang-Hsiung Kou\*\*

### Abstract

An asporogenous, Gram-negative, short, curved bacillus was isolated in pure culture from numerous moribund hard clams, *Meretrix lusoring* in the Hsin-Chu areas. Morphological and biochemical characteristics of 8 isolates conform to those described for the *Vibrio parahaemolyticus* in the literature. All isolates grow well on general culture media and were active in the production of gelatinase, indole, cytochrome oxidase and starch hydrolysis. Acid but no gas was produced from fermentation of carbohydrates. Very sensitive to a vibriostatic agent and novobiocin and chloramphenicol. Growth occurred at 10°C-45°C and the optimum temperature appeared to be 20°C-37°C. Optimum salt concentration for growth was 3% and 5% NaCl and growth occurred at the concentration range of 0.5-15% NaCl. Growth occurred at the PH range of 5.0-10.0.

Another study was also performed to determine the pathogenicity of all isolates of *Vibrio Parahaemolyticus* on healthy clams. Clam mortality occurred after inoculation with this pathogen, for 90 hrs at 28°C.

### 前 言

一九七七年四月與十二月在臺灣北部新竹香山海邊之貝類養殖場，曾連續發生養殖文蛤之大量死亡，造成重大的損失，極受各方的注意，著者於是進行詳細的調查與研究。雖然造成貝類死亡的可能原因很多，但不外乎外界環境的改變，如氧的缺乏、溫度與鹽度過度或急驟的提高、海水污染，或寄生蟲、黴菌及細菌、病毒體之感染所致。(3)

有關臺灣貝類大量死亡原因之研究，目前已有多篇報導。曾文陽<sup>(1)</sup>將一九七四年四月本省西南沿海一帶養殖場貝類大量死亡之原因歸為以下四點：(1)放養密度過高致使環境突變時，導致大量死亡。(2)海水污染。(3)種苗養殖區先天條件不良亦或人工施肥不當、氧氣不足、泛池等。(4)種苗由於長途搬運與棲息環境之改變，造成放養數日後即開始死亡。鄭森雄於一九七五年指出自一九六九年以來，臺灣西南部淺海地區每年養殖貝類死亡之主要原因，是由於未經處理的工業廢水造成水質污染所引起的<sup>(2)</sup>。香山文蛤養殖場已有七年之歷史，據漁民所言，在此七年中，雖偶有死亡發生但情況都不嚴重，但一九七七年所放養之貝類其密度極高，貝類生長迅速，原指望豐收，却不意發生大量死亡。香山

\* 輔仁大學生物學系 (Department of Biology, Fu-Jen Catholic University)

\*\* 臺灣大學動物學系 (Department of Zoology, National Taiwan University)

地區與臺灣西南部之環境不同，死亡原因顯然有所差異，因此著者由疾病方面著手研究。

關於細菌性疾病，在魚類疾病中被研究得很多，但到目前為止，吾人對於養殖貝類之細菌性疾病所知有限。Takeuch 等<sup>(4)</sup> 於一九六〇年曾發現一種革蘭氏陰性、具運動性之小桿菌，大小約為1—3毫米的 *Achromobacter*，是造成日本廣島 (Hiroshima) 海灣的太平洋牡蠣 (Pacific Oyster) 大量死亡的主因，指出在將死的牡蠣體內會有細胞浸出 (cell filtration) 細菌繁殖與組織潰瘍 (tissue necrosis) 等現象。Numachi等<sup>(5)</sup> 於一九六五年發現，造成一九六〇年代日本松島 (Matsushima) 海灣之牡蠣大量死亡，百分之二十是由一種革蘭氏陽性細菌引起的，稱這種疾病為 multiple abscesses，由於不是造成大量死亡之主因，故未加以詳細的研究。而在一九五九年，Guillard<sup>(6)</sup> 由臨死之貝類 *Venus mercenaria* 幼體培養池中分離出幾種病原菌，分別屬於 *Pseudomonas* 與 *Vibrio*。同樣的，在一九六五年，Tubiash<sup>(7)</sup> 也由 Milford 實驗室之貝類 *Mercenaria mercenaria* 幼蟲培養池中分離出多種細菌，分別屬於 *Aeromonas* 與 *Vibrio*，是造成培養貝類幼體死亡之原因，他稱之為 Bacillary Necrosis。一九七三年 Brown<sup>(8)</sup> 由將死之美國牡蠣 (*Crassostrea Virginia*) 幼體中分離出165種菌株，發現其中大部份屬於 *Pseudomonas* 與 *Vibrio*，發現其中有二十種菌株可影響幼蠔之死亡率並引起明顯的型態異常及生長遲緩。

為明瞭細菌性疾病造成香山地區貝類大量死亡之可能性，於是進行病原菌之分離工作，並配合病原性試驗、以及其形態、生理及生化特性之研究，將所得之結果在此提出報告，以供研究者之參考。

## 材料與方法

### 甲、細菌之分離 (Isolation of bacteria)

由香山貝類死亡區取回罹病類臨死亡之文蛤，以清水洗淨外殼後，在無菌操作下以刀子小心將外殼剝開，以無菌棉花棒吸取體液於乾淨玻片上做塗抹，同時做革蘭氏染色，以觀察細菌之存在情形。並吸取少量體液並取一小片鰓絲及消化道組織於 Tryptic Soy Broth (Bacto-Typtone, 15 g; Bacto-Soytone, 5 g; Sodium Chloride, 5 g; Sea Water, 1 ℓ; pH=7.4) 中培養，將培養液置於 28°C 溫度下培養 24 小時後，取少許菌液於 Tryptic Soy Agar (以下簡稱 TSA 培養基) 上做塗抹，同樣於 28°C 下培養 24 小時至 48 小時，觀察菌落之形成，選取外形、顏色上形態不同之菌落，分別以三區劃線法多次分離以得純培養，然後再接種至斜面培養基上保存，供病原性、生化特性及藥物感受性試驗之用。

除外也將體液與組織接種於 Thioglycollate 培養基中 (D-glucose, 5 g; Sodium thioglycollate, 1 g; 1% aqueous Methylene Blue, 0.2 ml; Tryptic Soy Broth, 1ℓ PH=7.2) 利用 Gas Pak 裝置，於無氧狀態下做厭氧培養，以分離出絕對厭氧菌。

### 乙、病原性試驗 (Pathogenicity test)

將供試菌接種於 Tryptic Soy Broth 中於 28°C 培養 24 小時後，經離心法除去培養液及新陳代謝產物，再以無菌海水洗三次，最後配成一定濃度之細菌懸浮液備用。實驗時取健康文蛤 (4×3 cm)，由外套腔注射 0.2 ml 之菌液，其濃度分別為每毫升含有 10<sup>7</sup> 10<sup>8</sup> 及 10<sup>9</sup> 個菌數三種，每種濃度注射 25 隻文蛤。對照組分為兩組，對照組 I 是以等量 (0.2 ml) 之無菌海水取代菌液，依同法注射，對照組 II 則完全不注射。注射後，將文蛤收容於塑膠盤中，上下覆以濕的紗布以保持濕潤環境，放於 28°C 培養箱內，每隔一定時間觀察死亡情形，外殼張開死亡之文蛤，則先除去，以免干擾其他未死者。

### 丙、病原菌之鑑定 (Identification of pathogen)

(1) 形態與培養特性之觀察 (Morphological examination)。

將分離菌於普通液體培養基中培養 24 小時後，取少量塗抹於玻片上，在顯微鏡下觀察其運動性，同時以 Leifson 方法做鞭毛染色<sup>(9)</sup>，觀察鞭毛所在之位置及分佈情形，利用革蘭氏染色法觀察其形狀，大小與染色特性。並培養於 TSA 固體培養基上，觀察其菌落之形狀、顏色、大小等外表特性。

(2) 生化特性試驗 (Characteristics of biochemical test)。

將分離菌接種於 Hugh & Leifson 培養基中，測其利用葡萄糖情形，依照 Harrigan 方法<sup>(9)</sup>測定其他特性，如氧化醯試驗 (cytochrome oxidase test)，硝酸鹽還原性 (nitrate reduction)，明膠之液化性 (gelatin liquefaction)，吲哚之形成 (indole formation)，醣類之發酵性 (carbohydrate fermentation)，澱粉及酪蛋白之分解性 (starch and casein hydrolysis) 等。利用 Brooker 方法<sup>(10)</sup>測離氨酸羧酶 (lysine decarboxylase) 之存在。以 Fay 方法<sup>(11)</sup>測鳥氨酸之脫羧酶 (ornithine decarboxylase)。並接種於 Simmon's citrate agar 上，觀察其利用檸檬鹽 (citrate) 的情形，利用 TSI (Triple Sugar Iron) 培養基測定是否有硫化氫之產生。

(3) 耐鹽性試驗 (Tolerance of NaCl)

將經 24 小時培養之分離菌，接種於含不同濃度氯化鈉之 peptone yeast Extract Broth (內含 1% proteose peptone, 1% yeast Extract, pH=7.2) 中，氯化鈉之濃度分別為 1%，3%，5%，8%，10%，15% 與 20%，於 28°C 下培養 24 小時，由培養液之混濁度可知其生長情形，而判斷其對不同鹽度之忍受力。

(4) pH 之忍受範圍試驗 (Tolerance of pH)。

將 PYE 培養液以 1% 之氫氧化鈉與 1 N 之氯化氫調成各種不同酸鹼度之培養液，其 pH 值分別為 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 與 11.0。將經過 24 小時培養之新鮮菌 1 白金耳量接種於內，於 28°C 溫度下培養，隔天觀察其生長情形。

(5) 溫度忍受度試驗 (Tolerance of temperature)

將 24 小時培養之新鮮菌 1 白金耳量接種於 PYE 培養液中，於 5°C, 10°C, 25°C, 28°C, 37°C, 42°C 與 45°C 溫度下培養，隔天觀察其生長情形。

(6) 藥物感受性試驗 (Drug Sensitivity Test)。

為試驗分離而得之病原菌，對於藥物之感受性程度，將菌接種於 TSA 培養基上，於上灑上少許 Vibriostatic agent ( $0/_{125}$ -2, 4-diamino-7-diisopropylpteridine)，觀察其抑制細菌生長的情形，同時以各種不同之抗生素紙環置於已接種菌的 TSA 培養基上，隔天觀察抑制環的產生，所用抗生素有：Chloramphenicol, Kanamycin, Neomycin, Penicillin, Novobiocin, Tetracycline, Erythromycin, 及 Streptomycin。

## 結果與討論

### 甲、細菌之分離 (Isolation of the bacteria)

由患病之文蛤體腔與組織中，可分離出 11 種不同菌株之革蘭氏染色陰性之桿菌，經過病原性試驗知其中 8 種菌株皆可造成文蛤之死亡。經染色觀察，其大小均為 1—2 微米  $\times$  0.5 微米之短桿菌，略微彎曲，具有端鞭毛運動性強，有時彎度不明顯，而呈直狀、球狀甚或菌體膨大，亦即表現出多形性 (pleomorphic)。通常為單個體存在，有時會成對在一起，不產生芽胞 (endospore)。於 TSA 培養基上，在 28°C 下經過 24 小時之培養，產生菌落呈灰黃色、黏狀、圓形突起、光滑而周圍完整，直徑約為 2 到 3 毫米，生長快速，很快彌散整個培養基，若以側光照射，可見綠色之發亮現象；若於 PYE 液體培養 24 小時後，菌液混濁，並有白色菌體沉澱下來。於 TSA 培養基內加入定量之 crystal violet 及 sodium azide 試驗分離菌之感受性<sup>(9)</sup>的結果，顯示於含 2.5ppm 濃度之 crystal violet 的培養基內還可生長，但在含 sodium azide 250 ppm 濃度下則不生長，同時革蘭氏染色為紅色，而判定分離菌確屬革蘭氏陰性菌。分離菌於無氧狀況下 Thioglycollate 培養基上之良好生長

可認定為一種兼性需氧菌。

另外有可產生芽胞，革蘭氏陽性，不發酵醣類，於 TSA 培養基上形成白色黏狀菌落，類似 *Bacillus*，由於不具病原性，故未做詳細的鑑定。同時亦分離出一種革蘭氏陰性，具運動性，不具芽胞的短桿菌，於 TSA 固體培養基上呈現鮮黃色的菌落，較乾不具黏性，圓形、光滑而突起，依初步鑑定，可能為 *Flavobacterium*，但自分離後，經幾次培養就不容易再維持，由於此一特性，未能做更進一步之鑑定，依著者的看法，分離而得之 *Bacillus* 與 *Flavobacterium* 可能存在於文蛤體內或海水內之原有非病原菌，由於缺乏貝類體內及其生活環境水域之常有菌叢之生態的資料，無法做深入之研討，關於此一問題，有待將來進一步的探討。

### 乙、形態、生理及生化學之特性 (Morphological, physiological and biochemical characteristics)

分離菌之形態、生化學特性及醣類利用性如表一及表二所示，即具有運動性，可利用醣類不產生氣體，不產生硫化氫，可產生氧化酶 (Oxidase) 並有觸酶 (Catalase) 之存在，可將明膠液化，並分解澱粉與酪蛋白，不具有 Arginine dihydrolase，可將硝酸鹽還原為亞硝酸鹽，對抑制劑 (Vibriostatic agent,  $\frac{0}{129}$ ) 有感受性，可產生吡啶。可利用多種醣類，但不利用 Xylose, Inositol, Lactose 與 Raffinose。

分離菌對於鹽度的忍受力很強，為 0.5%~15%，最適鹽度為 3%~5%。於 pH 值 5.0—10.0 範圍內皆可生長，可在 10°C~45°C 下生長，但最適溫為 20°C~37°C。

Table 1. Physiological Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*  
Isolated from Moribund Bivalves

Catalase: Weakly positive
Cytochrome oxidase: positive
Hugh-Leifson's medium (O/F medium): Fermentation of glucose
Ammonia: Not produced from peptone water, urea or Thornley's semi-solid arginine medium
Nitrate reduction: Nitrite produced from nitrate
Urease: Negative
Litmus milk: Slight acid production but no other visible change
Indole: is produced
Methyl-red test: Negative
Voges-Proskauer test: Positive
Simmon's Citrate agar: Sodium citrate may be utilized as sole source of carbon
Hydrogen sulfide: Not produced
Hydrolysis of starch: Positive
Gelatin liquified: Positive
Gas from carbohydrate: Negative
Hydrolysis of casein: Positive
Hydrolysis of Tween 80: Positive
Lecithinase: Is produced
Relation to free oxygen: Aerobic or Facultatively anaerobic
PH range: PH 5.0-10.0, scant growth at PH 5.0 and 10.0
Tolerance to NaCl: Good growth in 3% and 5% NaCl, scant growth in 15% NaCl
Temperature relation: Range 10°C-45°C, optimum 20°C-37°C

Table 2. Utilization of Carbohydrate of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Moribund Bivalves

Carbohydrate	Result	Carbohydrate	Result	Carbohydrate	Result
Glucose	+	Sucrose	+	Inulin	+
Maltose	+	Xylose	-	Inositol	-
Lactose	-	Mannitol	+	Glycogen	+
Dextrin	+	Mannose	+	Raffinose	-
Fructose	+	Cellubiose	+	Rhamnose	+
Galactose	+	Arabinose	+	Trehalose	+

Table 3. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Moribund Bivalves to Antibacterial Agents

Drug	Sensitivity	Drug	Sensitivity
Chloramphenicol	‡‡	Novobiocin	+
Streptomycin	+	Neomycin	+
Penicillin	-	Kanamycin	+
Erythromycin	+	Vibriostatic Agent ( <sup>0</sup> / <sub>129</sub> )	‡‡
Tetracycline	+		

-: Negative +: Positive ‡‡: High sensitivity

### 丙、細菌之鑑定 (Bacterial identification)

依 Harrigan<sup>(9)</sup> 及 Shotts<sup>(12)</sup> 之革蘭氏陰性反應菌之分類基準，知分離菌屬於 *Vibrio*，即此菌具氧化酶，可分解明膠，非腸內細菌羣 (Enterobacteriaceae) 或 *Plesiomonas* 屬，可產生鳥氨酸脫羧酶與離氨酸脫羧酶 (Ornithinase decarboxylase & Lysine decarboxylase)，對 Novobiocin 及 Vibriostatic agent <sup>0</sup>/<sub>129</sub> 極為敏感，非 *Aeromonas* 或 *Pseudomonas*，而應屬於 *Vibrio*。

依照 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 一書之第八版<sup>(14)</sup> 之分類為基準，並參考 Vanderzant 之分類法<sup>(15)</sup>，由於分離菌可產生吲哚 (Indole)，利用檸檬酸鹽，於不含鹽之狀況下不易生長，於 42°C 下還可生長良好，但 5°C 時則不長，可產生卵磷脂酶 (lecithinase)，分解 Tween 80 等特性，加上以上描述之生化特性，可鑑定為 *Vibrio parahaemolyticus*。

### 丁、病原性之判定 (Determination of pathogenicity)

當以培養之菌液，進行外套腔之注射，結果顯示所有供試菌皆可造成貝體之死亡，經過重覆六次實驗的結果，發現注射後時間與累積死亡率有一定關係，可以劃出一死亡曲線，如圖一所示。即當以每一毫升含有 10<sup>8</sup> 個菌數之濃度進行注射時，18 小時後就有百分之八左右的貝體死亡，繼續觀察 42 小時，發現死亡速率緩慢，其死亡率並不十分顯著。但在 42 小時之後，則死亡個數呈直線上升，90 小時的累積死亡率已達百分之五十以上。對照組 II- 亦即完全未經注射者，於一星期內發現死亡，對照組 I- 注射 0.2ml 之人造海水於外套腔中，接種後 42 小時內未發現任何貝體之死亡，直到 42 小時後，始偶有少數個體之死亡，唯其累積死亡曲線並不顯著，可見注射入之菌液，確實可造成貝體之損害，引起其死亡。

而以不同濃度之菌液注射，觀察其造成死亡之差異時，發現含菌量為每一毫升中有 10<sup>7</sup> 個細菌之濃度對貝體影響較慢，而 10<sup>8</sup> 個菌液次之，需要五十小時後才有明顯損害出現，可見注射之菌量可以影響病原性試驗之結果。

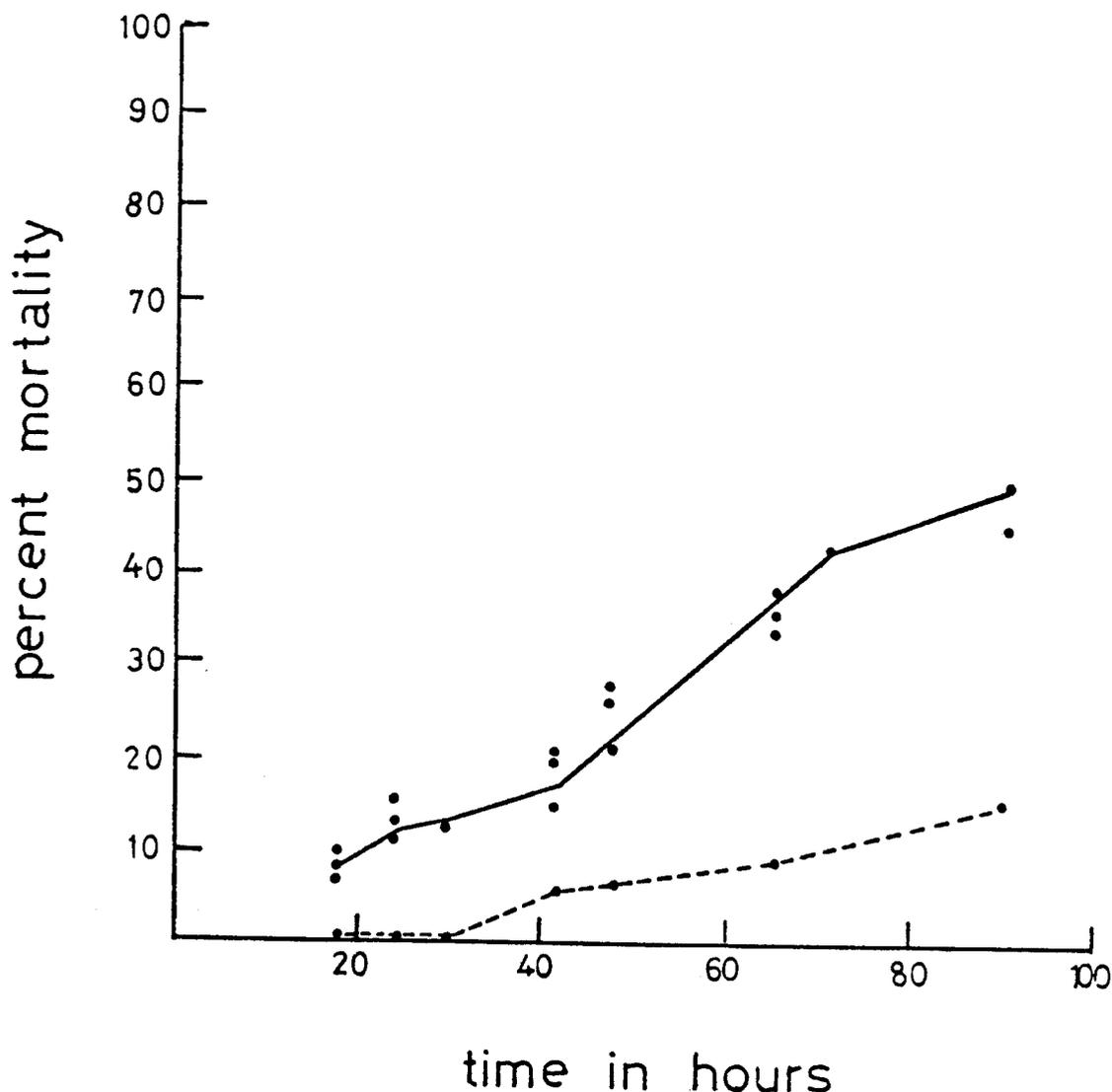


Fig. 1. Mortality of bivalve after challenge with pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. Note first signs of mortality on 18 hours inoculation. Solid line,  $1 \times 10^9$  organisms/ml; broken line, sterilized sea water.

由分離出之八菌株之病原性試驗的結果及其他特性，依照“Bergey's Manual of Determinative Bacteriology”一書之第七版及第八版<sup>(13,14)</sup>所敘述，將之歸於 *Vibrio parahaemolyticus*。此菌一般皆認為來自海洋，許多微生物學家曾做各方面研究，想探討其在自然界之分佈範圍。最先由日本一羣科學家在日本東京灣附近，由海水及海中生物體內分離出此菌，而在美國也有多人做這方面的研究，如 Baross 與 Liston 兩人曾在美國華盛頓州沿岸及太平洋西北岸之海水、海中沈積物及貝類體內分離出此菌<sup>(16,17)</sup>；Kaneto 與 Colwell 兩人亦曾做一連續的研究，調查 *Vibrio parahaemolyticus* 於 Chesapeake Bay 之沿岸及外海中之分布狀況<sup>(18,19,20)</sup> Krantz 甚至由罹病之蟹類 (Blue Crabs) 分離出此菌<sup>(21)</sup>；另外佛羅里達州、阿拉斯加等地亦有此菌之分離報告<sup>(22,23)</sup>；Bartley 於一九七一年曾由美國新罕斯州 (New Hampshire) 海岸中之海水及牡蠣體中分離出 *V. parahaemolyticus*<sup>(24)</sup>；而在一九七五年，Earle 也曾由軟殼貝類 (*Mya arenaria*) 分得這種海中病原菌<sup>(25)</sup>，由此可推想 *Vibrio parahaemolyticus* 是廣泛存在於海水中，但其感染海中生物造成疾病，却可能由於生物生活環境的改變，導致此菌大量的繁殖或生物受到壓迫 (Stress) 降低了抵抗力所引起的，

例如溫度的突然變化，海水含鹽度的改變或其他物理因素如含氧量的降低。根據 Kaneto 氏指出<sup>(20)</sup> 冬季時 *V. parahaemolytica* 存在於 Chesapeake Bay 中羅得河 (Rhode River) 出海口處之河底沈積物上，但當四月左右，水溫上升至 14°C 15°C 時，此菌還能存在於海中浮游動物 (zooplankton) 上，此時由於細菌數目不很多，不易測得；若溫度再上升至 19°C~20°C，則菌體大量繁殖，充滿於海水中，這種菌數的消長，於一年中有一定的週期性，被稱之為年週期 (annual cycle)，除溫度是主要決定因素外，水中含鹽度的變化也具有相同的影響作用。

由實驗結果知分離菌 *Vibrio parahaemolyticus* 可忍受溫度之範圍很廣，水溫達攝氏 45 度之狀況下還能生長；含鹽度達 15% 亦能存在，而 pH 雖高至 10 或低至 5.0 也不受影響；而在有氣、無氣狀態下生長一樣快速，換句話說，外界環境之變化不影響此菌生長，有時反而促進其繁殖，但另一方面，環境改變所造對貝類等生物之壓迫 (stress) 却使貝類降低了抵抗力，此可能是貝類受本菌感染，造成死亡之原因之一。至於此菌藉由何種途徑侵入貝體，造成貝類那一部位之損害，產生何種病變，需做更進一步有關組織病理學的研究。又感染之機制，究竟是菌體本身之增殖，造成貝類生理之不平衡，或因為此菌繁殖後其代謝產物或毒素所作用的結果，亦有待更進一步的探討。

Tubiash 等人<sup>(7)</sup>，由患病之貝類幼體分離出 *Vibrio* 與 *Aeromonas* 兩種病原菌之報告中，指出幼體會受此二種病原菌之感染而罹病，但成體則不受影響，可能成體外有硬殼保護，雖經 24 小時之浸泡，病原菌亦不易進入。因此本實驗進行病原性試驗時，採取直接注射外套腔 (Mantle cavity) 法，並且連續做數日的觀察，或許侵入之細菌，須經過一段時間的繁殖，當達到一定數目後才能致使貝類罹病，使之呈現病徵。又，病原性有無之判定，在以成體為供試材料時，僅能由其外殼之開啓情況而判定其死亡，而以幼體為材料時，除藉外殼之開啓情況來判定死亡與否外，還可藉閃爍現象 (scintillation) 來判定貝體是否受病原菌的感染。Tubiash 與 Guillard<sup>(6,7)</sup> 於貝類幼體之培養池中加入欲試之病原菌，幾小時後可見大量細菌聚積於貝體四周，他稱之為 "Swarming of bacteria"，於一百倍放大下觀察，可見幼體組織受病原菌侵入後會有閃爍現象 (Scintillation) 產生。

由於一般海中生存之貝類，雖離開海水，但仍可維持一段時間而不死，如文蛤於濕潤環境下，仍可生存一星期以上，利用此一特性，當進行病原性試驗時，取定量欲試菌液注射後，將之放於塑膠盤內，保持一定濕度以觀察其活存狀況。此法所得效果較將文蛤泡於一定濃度之菌液內所做試驗為好，因為健康之文蛤泡於不加處理之海水中，亦時時可見死亡情形，因此易造成實驗之誤差。同時實驗時為避免可能造成貝體之直接損害，很小心地將外殼打開一小縫，使注射針插於外套腔內而不觸及體內任何部位，以期儘可能保持原有之生理狀況。對照組注射同量海水做比較時，發現注射人造海水之死亡率較未經注射者為高，其原因可能是因為文蛤對實驗中所注射入之人造海水有所反應，或因注射時，外殼打開後使保存於外套腔內之海水流失，造成外套膜所餘水份太少，因而影響其生長，但確實原因值得做更進一步的研究。

觀察分離菌 *Vibrio parahemolyticus* 之致病力時，發現注射 42 小時後，文蛤之累積死亡率相當高，而對照組雖亦有死亡，但累積死亡率相當低；但在 90 小時的時候，對照組之累積死亡率已接近百分之十，雖仍較處理組之累積死亡率為低，但已影響著者對病原性有無之判定，有關病原性之判斷基準，實有待進一步的探討。

#### 戊、藥物之感受性 (Drug Sensitivity)

分離菌對藥物之感受性如表三所示，除對青黴素 (penicillin) 具有抗性外，對多種藥劑皆有感受性，其中對氯黴素 (Chloramphenicol) 最敏感，其次為 Erythromycin, Tetracycline, Kanamycin, Novobiocin, Neomycin 及 Sareptomycin。由此顯示大部份的抗生素皆有抑制此菌生長的效果，尤其是氯黴素。因此，香山地區文蛤大量死亡之原因純為 *V. parahaemolytica* 之感染所引起的話，即可投放藥劑以收防治之效果。祇是要以投藥方式防治此菌引起的疾病，於自然狀況下尤其

是廣大海水中，實在有其難點，如果能夠對此菌侵犯貝類之途徑及引起病變的原因有所瞭解，或許能找出較為切合實際之防治方法。

### 摘 要

由新竹香山地區貝類養殖場，文蛤大量死亡時採回之標本，分離出一種不帶芽胞、革蘭氏陰性具運動性之桿菌，經形態、生理及生化特性之研究鑑定為 *Vibrio parahaemolyticus*。此菌可在普通培養基內生長，具有產生明膠酶、吲哚、氧化酶，及分解澱粉之特性，當發酵醣類時產酸不產氣體，對於抗弧菌劑如  $\text{O}/129$  及抗生素 Novobiocin 與氯黴素極為敏感，可在  $10^{\circ}\text{C}\sim 45^{\circ}\text{C}$  下生長，但最適溫為  $20^{\circ}\text{C}\sim 37^{\circ}\text{C}$ 。可忍受鹽度之範圍很大，為  $0.5\sim 15\%$ ，但最適當濃度是  $3\%\sim 5\%$ 。於  $\text{pH}=5.0\sim 10.0$  範圍內皆可生長。

以健康文蛤做病原性試驗時，發現所有分離之 *Vibrio parahaemolyticus* 菌株皆具病原性，90 小時內可造成試驗貝類嚴重的死亡。

### 謝 詞

本研究承農復會漁業組之資助得以完成，實驗期間，承輔大生物系王重雄副教授之協助，提供資料，因是有成，將誌於此，以表謝忱！

### 參 考 資 料

- 1) 曾文陽 臺灣海產養殖貝類大量死亡之調查。中國貝誌 1: 76—85 (1974)
- 2) 鄭森雄 養殖貝類之大量死亡。科學月刊第六卷第七期民國64年7月
- 3) Rosenfield, A. (1969). Oyster Diseases in North America and Some Methods for their Control. Proc. Conf. Artificial Progr. Comm. Valu. Shellfish. October 22-23, 67-78.
- 4) Takeuchi, T., Takeuchi, Y., and Natsubara, T. (1960). Haematological Study of Bacterial Affected Oysters. Rept. Hiroshima Prefect. Fish. Expt. Sta. 22, No. 1, 1-7.
- 5) Numachi, K., 1965. Studies on the Mass Mortality of the Oyster in Matsushima Bay. III. The Pathological Changes of the Oyster Caused by G(+) Bacteria and the Frequency of their Infection. Bull. Tohoku. Regional Fisheries. Res. Lab. 25, 39-48.
- 6) Guillard, R. R. L. (1959). Further Evidence of the Destruction of Bivalve Larvae by Bacteria. Biol. Bull. 117, 258-266.
- 7) Tubiash, H.S., Chanley, P.E., and Leifson, E. (1965). Bacillary Necrosis, a Disease of Larval and Juvenile Bivalve Mollusks. I. Etiology and Epizootiology. J. Bacteriol. 90, 1036-1044.
- 8) Brown, C. (1973). The Effects of Some Selected Bacteria on Embryos and Larvae of the American Oyster, *Crassostrea virginica*. J. Invertebr. Pathol. 21, 215-223.
- 9) Harrigan, W. F., and McCance. Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press, New York, 1966.
- 10) Brooker, D. C., Lund, M. E., and Blazevic, D. J. (1973). Rapid Test for Lysine Decarboxylase Activity in Enterobacteriaceae. Appl. Microbiol. 26, 622-623.

- 11) Fay, G.D., and Barry, A. L. (1972). Rapid Ornithine Decarboxylase Test for the Identification of Enterobacteriaceae. *Appl. Microbiol.* 23, 710-713.
- 12) Shotts, E.B., and Bullock, G. L. (1975). Bacterial Diseases of Fishes: Diagnostic Procedures for Gram-Negative Pathogens. *J. Fish. Res. Bd. Canada.* 32(8), 1244-1247.
- 13) Breed, R.S., Murray, E. G. D., and Smith, N. R. (1957). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 7th ed. Williams and Wilkinsons Co.,
- 14) Buchanan, R. E., and Gibbons, N.E. (1974). *Bergey's manual of Detdrminative Bacteriology.* 8th ed. Williams & Wilkinsons Co.,
- 15) Vanderzant, C., and Nickelson, R. (1972). Procedure for Isolation and enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Microbiol.* 23, 26-33.
- 16) Baross, J., and Liston, J. (1968). Isolation of *Vibrio paralacmolyticus* from the Northwest Pacific. *Nature (London)* 217, 1263-1264.
- 17) Baross, J., and Liston, J. (1970). Occurrence of *Vibrio parahacmolyticus* and Related Hemolytic Vibrioss in the Marine Environments of Washington State. *Appl. Microbiol.* 20, 179-186.
- 18) Kaneko, T., and Colwell, R. R. (1973). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J. Bacteriol.* 113, 24-32.
- 19) Kaneko, T., and Colwell, R. R. (1974). Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* and Related organisms in the Altantic Ocean of South Carolina and Carolia. *Appl. Microbiol.* 28, 1009-1017.
- 20) Kaneko, and Colwell, R. R. (1975). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Appl. Microbiol.* 30, 251-257.
- 21) Krantz, G. E., Colwell, R. R., and Lovelace, E. (1969). *Vibrio parahaemolyticus* from the Blue Crab, *Callinectes sapidus*, in Chesapeake Bay. *Science* 164, 1286-1287.
- 22) Koburger, J. A., and Lazarus, C. R. (1974). Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from Salt Springs in Florida. *Appl. Microbiol.* 27, 435-436.
- 23) Vasconcelos, G. J., Stang, W. J., and Laidlaw, R. H. (1975). Isolation of *Vibrio parahemolyticis* and *Vibrio alginolyticus* from Estuarine Areas of Southeastern Alaska. *Appl. Microbiolo.* 29, 557-559.
- 24) Bartley, C. H., and Slanetz, L.W. (1971). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in Estuarine Waters and Oysters of New Hampshire. *Appl. Microbiol.* 21, 965-966.
- 25) Earle, P. H., and Crisley, F. D. (1975). Isolation and Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from Cape Cod Soft-Shell Clams (*Myu arenaria*). *Appl. Microbiol.* 29, 635-640.
- 26) Udey, L. R., Young, E., and Sallman, B. (1977). Isolation and Characterization of an anaerobic bacterium, *Eubacterium tetrantellus* sp. nov., associated with striped Mullet (*Mugil cephalus*) motality in Biscayne Bay, Florida. *J. Fish. Res. Bd. Canada.* 34(3), 402-409.