

農復會特刊



第三十三號

水產細菌學

Fishery Bacteriology



水 產 細 菌 學
Fishery Bacteriology

蔡 士 及 博 士 主 講
陳 幸 臣 協 助
王 文 亮 } 筆 錄
顏 聰 榮 }



行政院農業發展委員會
圖書室
COUNCIL FOR AGRICULTURAL PLANNING AND
DEVELOPMENT, EXECUTIVE YUAN
TECHNICAL LIBRARY

中華民國六十八年三月
中國農村復興聯合委員會印行

謹以此冊敬獻
陳技正金城先生

THIS VOLUME IS DEDICATED TO MR. G. C. CHEN

陳金城師長畢生獻身水產製造業，生平輕利樂道，好學不倦，致力於研究、推廣教育、行政以及現場技術指導，終為樂業而捐軀，為臺灣水產製造工業樹立規範，願望同仁繼往開來，以不負這位先師之典範。

In memory of Mr. G. C. Chen, (Jan. 6, 1924~Dec. 29, 1978) renowned expert in fishery technology who contributed his whole life and his wisdom to the research and development of fishery product processing industry in Taiwan.

本冊係由蔡土及博士於民國66年7月12日至14日在農復會三天之講授為主稿，並加在中央研究院植物研究所所主持之水產微生物分離鑑定訓練班（民國66年7月18日至8月13日）的部份講稿而編成。

蔡土及博士係省立農業專科學校農化科畢業，於海洋學院任教七年後，前往美國麻州州立大學就讀食品科學專攻水產微生物，得到碩士（1970）及博士（1972），後就職於康州州立大學醫學院研究基礎微生物兩年，現為美國國立健康研究院研究員，主要研究蛋白質性抗生素（Bacteriocin）與細菌之細胞膜學。

訓練班教授：蔡土及、陳幸臣。

輔導：關壯狄、莊健隆、陳慶三。

訓練班學員：吳全耀、陳秀香（高雄海專），黃幸彥（商品檢驗局），吳克慧、蘇淑珠（省衛生試驗所），顏聰榮、高淑文（中研院植研所）、許順堯、黃登福、張清風（海洋學院水製研究所），王文政、王文亮、郭世榮、張士軒（省水產試驗所）。

緒 言

這次能利用休假期間，和國內各位從事水產微生物工作的同仁，一同討論有關水產微生物方面的問題，覺得非常高興。這個水產微生物研討會給我們一個良好機會，能夠讓我們就這方面之新知識以及目前所遭遇之困難，共同提出討論。對於參加中研院植物研究所之水產微生物訓練班，全體學員的一致優良表現，本人更感欣慰與鼓勵。

水產微生物包括很廣，其中以細菌為主要之一類微生物，我們僅就水產細菌方面提出幾個重點而加以研討。一般水產細菌主要以腐敗有關之細菌與公共衛生有關之細菌為討論之重點。其他諸如 Gram 陰性細菌之細胞壁及細菌遺傳學等之新近發展與觀念，也簡略述之。

此次研討會及訓練班能夠圓滿結束，首先應感謝農復會之全力資助，高雄海專水製科陳主任幸臣之規劃、準備與指導，以及中研院植物所陳慶三博士之熱心支持與協助。農復會漁業組關組長壯狄和莊技正健隆之輔導，當是促成本計劃成功之不可缺之因素。臺大海洋研究所林教授良平之關懷與指導，王文亮技士之記錄負責整理與校對，沒有他之努力，即沒有本冊之問世，以及吳金耀講師與陳秀香助教對實驗之協助，也一併致謝。

蔡 士 及

FOREWORD

It was my pleasure to have the opportunity during my vacation to meet all the fishery microbiologists and the related specialists from academic, governmental and industrial institutions in Taiwan. The Conference on Fishery Microbiology held at the Joint Commission on Rural Reconstruction in Taipei on July 12 to 14, 1977 was a nice occasion for the review of the updated information in fishery microbiology and for the discussion of the current problems in this area. I am especially pleased and proud of those fishery technologists who attended in the following workshop (July 18 to August 13, 1977), with an excellent demonstration, held at the Institute of Botany, Academia Sinica.

Fishery Microbiology covers a broad spectrum of microorganisms in which bacteria are the major organisms encountered in fish and shellfish. Only major subjects which were considered especially pertinent were selected for discussion under the limited time schedule. The identification of bacteria commonly present in seafood, especially those which are associated with spoilage and organisms of public health significance, were emphasized. Several new concepts, e.g., the cell membrane of Gramnegative bacteria and bacterial genetics, established in recent years in bacteriology were also briefly described.

This volume contains mainly the contents of the lectures to the conference and, partially, certain materials described in the workshop. The last three added papers, Appendices III-1, III-2 and III-3 are contributed respectively by Prof. H. C. Chen, Dr. L. P. Lin and Dr. C. C. Tsai.

I am deeply grateful to the Joint Commission on Rural Reconstruction for sponsoring the entire program, Prof. H. C. Chen, Head of the Fishery Technology, Kaohsiung Jr. College of Marine Technology for his organization and instruction of the laboratory workshop. Particular gratitude is extended to Mr. C. T. Chueh, Chief of Fisheries Division and Mr. J. L. Chung, JCRR for their advisory role in this project, and Dr. C. S. Chen, Institute of Botany, Academia Sinica for his arrangement of the workshop and his indispensable help. I am also appreciative of Dr. L. P. Lin, National Taiwan University, for his encouragement and suggestions, and Mr. W. L. Wang for his careful work on the manuscript and reading the proofs. Assistance from Mr. C. Y. Wu and Miss S. S. Chen in the laboratory work is also gratefully acknowledged.

Tuu-jyi Chai

水產細菌學

Fishery Bacteriology

目 錄

緒 言 (Foreword).....	iii(iv)
第一章 細菌的細胞 (Bacterial cells)	1
第一節 構造 (Structure)	1
第二節 組成 (Composition)	2
第三節 細胞成分之區分 (Fractionation of cell components)	3
第四節 細胞外膜蛋白質之分離及其功能 (Isolations and functions of outer membrane proteins).....	3
第二章 好冷細菌與海水中的細菌 (Psychrophiles and bacteria in sea water)	6
第一節 海水細菌的特性 (Characteristics of sea water bacteria).....	6
第二節 好冷性細菌 (Psychrophiles)	6
第三節 高溫對好冷細菌的影響 (Effect of high temperature on psychrophiles)	6
第四節 環境因素對好冷菌的影響 (Ecological factors affecting psychrophiles)	7
第三章 海水魚之細菌群落 (Bacterial flora of sea-water fish)	9
第一節 新鮮魚類之細菌 (Bacteria of fresh fish).....	9
第二節 培養基與培養溫度之不同對細菌數之影響 (Effect of medium and temperature on bacteria count)	9
第三節 季節與地區不同對細菌之變化 (Bacterial count changes with seasonal and geographical variations)	10
第四章 魚類在冷藏中細菌群落的變化 (Changes in bacterial flora of fish during cold storage)	11
第一節 貯藏溫度對細菌數的影響 (Effect of temperature on bacterial population during storage).....	11
第二節 腐敗細菌與魚介類之腐敗 (Spoilage bacteria and spoilage of fish and shellfish).....	11

第三節	腐敗能力之測定 (Tests of spoilage activity).....	12
第四節	魚類冷藏中細菌種類與數量之變化 (Quantitative and qualitative changes in bacteria flora of fish during cold storage).....	15
第五章	有關衛生方面的微生物 (Microorganisms of public health significance)	17
第一節	大腸菌羣 (Coliforms).....	17
第二節	沙門氏桿菌 (<i>Salmonella</i>).....	20
第三節	腸炎弧菌 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	24
第四節	金黃色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	26
第五節	腸球菌 (Enterococci)	28
第六節	梭菌屬 (<i>Clostridium</i>)	28
第七節	黴與酵母 (Molds and Yeasts)	29
第六章	魚脛粘液之細菌群落 (Bacterial flora of fish pen slime)	31
第一節	魚脛粘液的細菌數與種類 (Bacterial count and species of fish pen slime).....	31
第二節	魚脛粘液中細菌的細胞形態 (Cell morphology of fish pen slime bacteria).....	33
第三節	魚脛粘液細菌的酵素 (Enzymes of fish pen slime bacteria).....	35
第四節	生長溫度與耐鹽性 (Cardinal growth temperature and salt tolerance)	38
第五節	對醣類之作用以及對抗生素之敏感性 (Reaction on carbohydrate and sensitivity to antibiotics)	40
第六節	DNA 鹽基之組成成份 (DNA base composition)	43
第七章	有關水產細菌之噬菌體、蛋白質性抗生素及輔基因 (Bacteriophages, bacteriocins and plasmids associated with fishery bacteria)	45
第一節	水產細菌與噬菌體 (Bacteriophage and fishery bacteria).....	45
第二節	蛋白質性抗生素 (Bacteriocins).....	46
第三節	輔基因與額外基因體 (Plasmids and Episomes)	47
第八章	細菌的遺傳學及突變 (Bacterial genetics and mutations)	48
第一節	細菌之突變 (Bacterial mutation).....	48
第二節	DNA 的分離 (Isolation of DNA)	49
第三節	基因的傳遞 (Gene transfer)	49
第四節	DNA 的混成 (DNA hybridization).....	51
第五節	遺傳基因的位置 (Genetic mapping)	51

第六節	DNA 的再結合 (DNA Recombination).....	52
第九章	細菌的分類學和鑑定 (Taxonomy and identification of bacteria).....	54
第一節	魚類和海洋微生物在鑑定上的困難 (Difficulties in classifica- tion and identification of fishery and marine bacteria).....	54
第二節	慣用之分類鑑定法 (Conventional taxonomy and identification)	54
第三節	鑑定計畫 (Identification scheme).....	55
第四節	DNA 鹽基成分 (DNA base composition)	59
第五節	數字表示分類學 (Numerical taxonomy).....	60
第六節	電子顯微鏡之異種二重技術 (Electron microscope heteroduplex technique).....	60
第七節	蛋白質性抗生素和噬菌體的定型法 (Bacteriocin and Bacteri- ophage typing).....	60
第八節	快速鑑定法 (Rapid identification).....	62
附錄一	培養基之配方 (Composition of culture media)	66
附錄二	參考文獻 (References)	76
附錄三	77
1.	漁業衛生 (Fishery Sanitation) : 陳幸臣 (高雄海專水產製造科主任)	77
2.	微生物與水污染 (Micro-organisms and Water Pollution) : 林良平 (臺大農化系教授)	84
3.	臺灣肉毒桿菌之生態學研究 (Ecological Studies of Clostridium Botulinum in Soils of Taiwan) : 蔡季重、丁雪清 (臺灣大學醫學院 公共衛生系)	89

第一章 細菌的細胞 (Bacterial cells)

一般生物的細胞概分為兩類：真核細胞 (Eucaryotic cells) 與原核細胞 (Procaryotic cells)。前者包括高等動植物細胞、原生動物 (Protozoa)、真菌類 (Fungi) 與大多數的藻類 (Algae)，後者主要為細菌與藍綠藻等。

這兩類細胞之主要不同處為：真核細胞有細胞核膜、組織蛋白、類固醇 (Steroids)、高爾基體 (Golgi apparatus)、空胞 (Vacuole)、粒線體 (Mitochondria)；而原核細胞則不含之。此外，DNA 的複製 (Replication) 真核細胞需行間接核分裂 (Mitosis)，原核細胞行簡單分裂 (Simple division)；真核細胞之核苷 (Nucleoside) 中含多個染色體 (Chromosomes)，而原核細胞則僅含1個。

細菌細胞具有各種不同的形態，桿菌是一般水產食品中之主要細菌，水中細菌以 Gram 陰性菌居多，而一般桿菌可以大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 為典型的例子，其每個細胞的大小約為 $1 \times 2 \mu\text{m}$ ，體積約 10^{-12}ml ，重量約 10^{-12}g (濕重) 或 $2.5 \times 10^{-13} \text{g}$ (乾重) [一般細菌在洋菜培養基表面繁殖時，其菌體約含75%水分，但在液體繁殖的幼壯細胞則約含90%水分]，比重約為1.07，因此用液體培養基培養細菌時，可把細菌用簡單的離心機沉澱下來。

第一節 構造 (Structure)

細菌細胞雖然如此微小，其構造與組成却是非常複雜，由各種不同的物質形成極有組織、有系統的生產品體，這些各種不同的組成與構造都能協調合作，每個細菌才能形成獨立的生長與繁殖個體，一般細菌的構造如圖1~1所示，其功用簡述如表1~1。

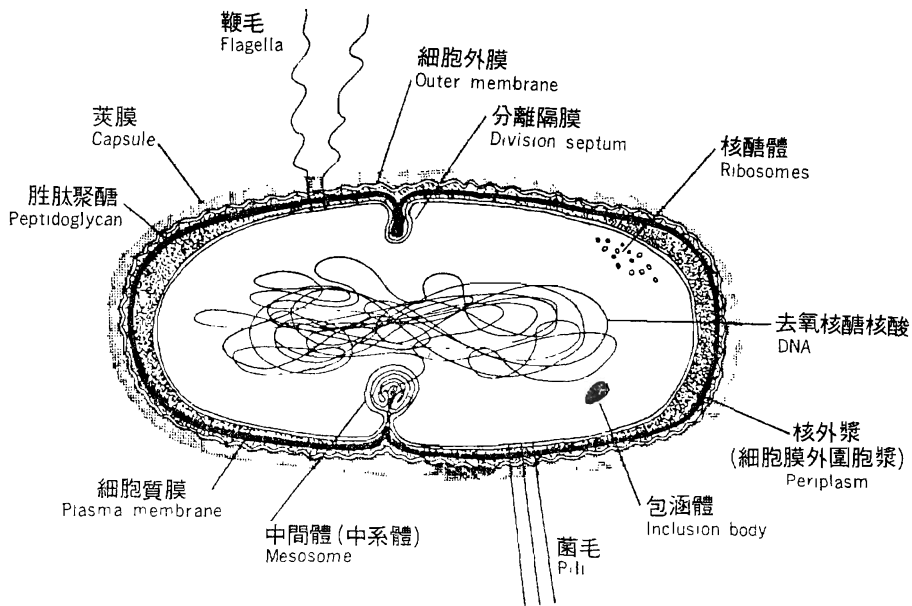


圖 1~1 一般 Gram 陰性菌細胞之構造

表 1~1 細菌細胞中各部構造之功能

構造名稱	大	小	功 能
鞭 毛	直徑10~20nm, 長度不定, 可達15~20 μ m		運動性 (motility)
菌 毛	比鞭毛細小而短, 直徑 3~7nm, 長度 0.5~5 μ m		接合生殖 (conjugation)、輔基因 (plasmids) 的傳送, RNA 噬菌體的受體 (receptor)
莢 膜	厚度不等可達細菌直徑之數倍		保護細胞防止噬菌作用 (phagocytosis)
肽 聚 糖	Gram 陽性者厚度達 20~80nm Gram 陰性者為 2~3 nm.		是細胞組織中較堅硬者, 與維持細胞固定的形狀及大小有關。
外 膜	僅 Gram 陰性菌有此構造		與維持細胞之大小及形狀有關, 具營養物質之吸收及輸送功能, 為噬菌體、蛋白質性抗生素及某些養分之受體。
核 外 漿	為內、外膜間之空隙		為貯藏某些酵素的地方, 只有 Gram 陰性菌才有此項構造。
細胞質膜 (Cytoplasmic membrane)	厚約 5~8nm		維持滲透壓及含有呼吸酵素 (供給能量) 與合成細胞壁酵素, 與 DNA 的固着與細胞之分離有關, 選擇及控制營養之吸收等。
DNA	長約 1,000 μ m 分子量約 2.5×10^9		主宰遺傳因子
輔 基 因 (Plasmids)	分子量約 10^6		主宰細菌本身 DNA 以外之遺傳因子
細 胞 壁 (Cell wall)	厚約 10~20nm		保持細菌形狀 (因形成 Glycosamine peptide, 故細胞壁得以保持堅韌)。
細 胞 質 (Cytoplasm)			合成核糖體及 m-RNA, t-RNA, r-RNA 等, 為合成蛋白質之主體。

第二節 組 成 (Composition)

細菌以 Gram 染色概可分為 Gram 陽性菌與 Gram 陰性菌, 兩者在組成分之區別如表 1~2 所示:

表 1~2 Gram 陽性菌與陰性菌在細胞壁成分上的差異

細 胞 圍 (cell envelope)	Gram 陽 性 菌	Gram 陰 性 菌
構 造	簡 單	複 雜
厚 薄	厚 (20~80nm)	薄 (10nm)
脂 肪 酸 (Teichoic acid)	少 (痕 跡)	多
脂 類 (Lipopolysaccharides)	有	無
對青黴素之感受性	無	有
能被溶菌酵素 (Lysozyme) 分解	+	— (高濃度時有感受性)
細 胞 壁 之 層 數	+	— [僅在 Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 之前處理下才能被分解]
細 胞 壁 含 胺 基 酸 之 種 類	1	2
肽 聚 糖 含 量	少	多
細 胞 壁 之 成 分	多	少
	肽聚糖、臺口酸	蛋白質、磷脂質、脂蛋白與肽聚糖

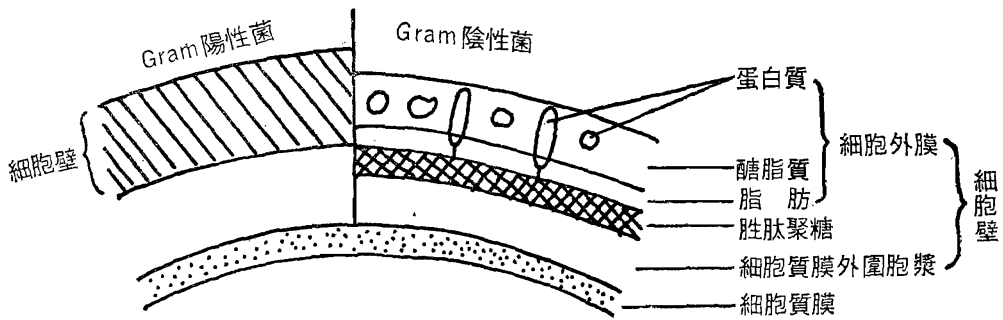


圖 1~2 Gram 陽性菌與 Gram 陰性菌細胞壁之分別

Gram 陽性與陰性菌對結晶紫 (Crystal violet) 具有不同的染色程度，其原理尚未能完全了解，主要者可能在於細胞壁的透過性 (Permeability)，當Gram染色時，結晶紫與碘之複合物 (Complex)，困牢於 Gram 陽性菌的細胞壁內，用 95 % 酒精浸洗時，在一定時間內無法將此色素複合物洗掉，因此細胞壁呈紫色，但是 Gram 陰性菌之細胞壁含有多量脂肪及少量胜肽聚糖，在酒精浸洗下，此等細胞壁中有些物質 (含磷物質) 被洗失，致色素複合物能自細胞壁被洗出，使細胞呈無色。

第三節 細胞成分之區分 (Fraction of cell components)

以 *E. Coli* 為例，其細胞經各種分離操作，可分別如下幾種組成：(佔乾物%)

蛋白質：55~60，核酸：15~19 { RNA 佔 5~15
DNA 佔 3

脂質：10~15，低分子量貯藏物質 (Low molecular weight pool material): 3

碳水化合物：5~10。

細菌的蛋白質平均分子量約為 40,000，每一個細胞中約含有 2.0×10^6 個分子，而蛋白質之種類約在 1,000~5,000 種之間，其中以脂蛋白 (Lipoprotein) 在細胞壁中含量最多，約有 7.5×10^5 個分子。而外膜蛋白經分析結果具有脂蛋白 (lipoprotein)、Ia、Ib、3a、III 與 IV 等主要種類，此等外膜蛋白質約各含 10^5 個分子。核糖體具有 1.0×10^4 個分子，訊息 RNA (m-RNA) 有 9.0×10^2 個分子，傳遞 RNA (t-RNA) 有 1.2×10^5 個分子。

通常細菌的成分受外圍環境的影響很大，尤其是營養分，例如有些細菌在低養分培養基 (Minimal medium) 時，一世代 (generation time) 約需 1.2 小時，但在富營養培養液 (Nutrient broth) 中，一世代僅需 20 分鐘，因此每個細胞的蛋白質、RNA 及 DNA 量之比率也會隨環境而改變。

當細菌由低養分培養基突然移到富營養培養液時，並不馬上行分裂增殖，而是先增加 RNA 之量，再增加蛋白質量，然後增加 DNA 量，最後細胞才行分裂增加個數。反之，細菌若於良好培養基繁殖時，突然移到低養分培養基，RNA 及蛋白質量減少最厲害，DNA 減少了一些，但是最初的幾分鐘，細菌仍繼續行分裂，並不受太大的影響。

第四節 細胞外膜蛋白質之分離及其功能 (Isolation and functions of outer membrane protein)

細菌的細胞壁、核外漿、細胞質膜之總合稱為細胞圍 (Envelope)，亦即原形質 (Protoplasm) 以外之所有外圍物質之總稱。Gram 陰性菌之所以能抵抗相當濃度的抗生素及其他化學物質，和在水

中能利用濃度極低的營養分（能利用比原形質稀薄 1,000 倍以上的養料），以及對蛋白質性抗生素（Bacteriocins），某些養分（例如維生素B₁₂）的吸附及專一性（Specificity）等性質均與細胞外膜有關。

如欲分離細胞之細胞圍，可將細菌細胞懸浮於溶液中，然後破壞細胞壁，使其中所含細胞質流出，再利用比重不同的原理加以離心，使細胞壁和細胞質分離。

破壞（Disruption）細胞常用的方法有：

1. French press：將細胞置於極高壓的容器中，使其通過細孔突然減低壓力逐漸放出於常壓中，可將 99.9 % 以上的細胞破壞。
2. Sonication：利用高週波的頻率使細胞壁及膜震破。
3. Glass bead 法：利用玻璃珠之摩擦而使細胞壁及膜破裂。
4. 化學方法：利用洗滌劑（Detergents）、溶菌酵素（Lysozyme）及蛋白分解酵素（Proteases）等以破壞細胞壁。

因細胞圍包含外膜和內膜，分離此二膜的方法有：

1. 糖液密度梯度離心分離法（Isopycnic sucrose density gradient centrifugation）

即將細菌細胞懸浮於緩衝液中，加入適量之溶菌酵素，然後緩慢加入二倍量之稀薄 EDTA 溶液，一般 Gram 陰性菌有 95% 以上的細胞會變成球狀漿胞（Spheroplast），並稍施以 Sonication，以破裂尚未破之球狀漿胞，然後加入 25 至 55% 不等濃度之密度梯度糖液分離管中行離心分離，當達平衡時，因細胞內膜的比重（約 1.15）比外膜的比重（約 1.22）輕而分離，內膜層停留於離心管的上半部，外膜層沉移於較下部，未分離的內外膜混合層，停留於內、外膜層之間。

2. 分別抽取法（Differential extraction）

以 2% Triton 抽取之，則內膜可溶而外膜不溶，高速離心之以除去溶解之內膜，若以 5% Triton 加 5mM EDTA 再次自沉澱物抽出時，則外膜蛋白質亦可溶，因而可將內膜與外膜分離。再將分離出之外膜或內膜蛋白質，用 2 倍體積的 95% 酒精沉澱析出。

細胞外膜蛋白質，以大腸菌為例經分析結果，已知由約 20 種不同的蛋白質所組成，但是大多數（約 75%）的外膜蛋白質，則係由少數 4、5 種主要蛋白質所構成，對於這些蛋白質的種類、性質及功用，已成為目前細菌學及分子生物學之主要研究對象，這些主要外膜蛋白質除了脂蛋白（Lipoprotein）的分子量約為 7,000 以外，其餘蛋白質（例如 Ia、Ib、2 及 3a 等）的分子量都在 25,000~78,000 之間如表 1—3 所示。

我們要了解細菌如何適應外界之環境，如何抵抗各種不同之外來藥劑，以及為何同一種菌株之細菌，某些細胞對某種藥劑特別敏感，某些細胞卻沒有反應。一種噬菌體加入同一種細菌時，有些會被殺死，有些卻不會，要了解上述種種的根本原因，我們就需要對細胞外膜的構造，組成及其蛋白質之性質先行了解，這些常識將有助於食品微生物學之研究，用來控制食品中細菌之生長，以期能延長食品之貯藏及保持成品之品質。

一般海水中之細菌（不包括底層泥漿中之細菌）約有 95% 為 Gram 陰性，此等細菌之所以吸收利用水中濃度極稀之養分，概認為係由於其具有特殊功用之細胞膜組成成分所致。又水中之污染，工業廢水及人獸之排泄物等混入水中所造成之微生物群落之改變與消長，此等細胞膜之組成與功用也是構成水中細菌能否生存的一個條件。

蛋白質名稱	大約分子量	功用及受體
ton A	78,000	噬菌體 T ₁ , T ₅ , ϕ80 及 Colicin M 之受體，主宰鐵質之輸送吸收。
bfe	60,000	Colicin E 及噬菌體 BF23 之受體，主宰維他命 B ₁₂ 之吸收。
lam B	55,000	噬菌體之受體，主宰麥芽糖之輸送與吸收。
I _a (PG1)	38,000	噬菌體 T ₂ 及 T _u I _a 之受體，構成核苷酸、胺基酸、醣類等營養物（分子量 800 以下）輸送吸收之通道。為一般小分子營養物進入細胞內之通道
I _b (PG2)	37,000	噬菌體 T _u I _b 及 PA2 之受體功用與蛋白質 I _a 相類似。
II* (HM1)	29,000	噬菌體 K3 及 T _u II* 之受體，主宰細菌體之結合作用與 Colicin L 之感受性。
tsx	25,000	噬菌體 T ₆ 與 Colicin K 之受體，核苷輸送吸收之通道。
lipoprotein	7,000	是細菌外膜蛋白質分子數最多之蛋白質 (7 × 10 ⁵ molecules/cell) 有游離型及與 Peptidoglycan 聯合之結合型 (bound form) 兩類，後者可能與蛋白質 I _a 共同形成輸送營養料之通道。脂蛋白與 I _a 之複合物可能與細菌細胞之固定形狀（桿狀）有關。

圖 1~3 *E. coli* 之主要外膜蛋白質

第二章 好冷細菌與海水中的細菌 (Psychrophiles and bacteria in sea water)

第一節 海水細菌的特性 (Characteristics of sea water bacteria)

主要的海水細菌大多為 Gram 陰性，且多數為桿菌，能利用無機物，不需要高營養，以好冷性、好鹽性或偏性好鹽性為主，能耐一定壓力，喜歡附着在固體之表面上。

爲何一般水中細菌大多是 Gram 陰性？其主要原因可能爲細胞壁之不同。因 Gram 陰性菌細胞壁的構造較爲複雜，細胞圍具有明顯之三層（參閱第一章第二節），細胞外膜負有特殊功用，分解物質以供應細菌生存之營養所需的酵素，可固定附着於此外膜層。例如 Protease、Nucleases 等酵素將水中濃度極稀薄的營養物質分解後，即刻被運送進入細胞內，此時細菌就能利用這些營養而供應生長之需。若爲 Gram 陽性菌，則細胞壁構造簡單，沒有細胞外膜，分解酵素被分泌於細胞外，很快就被水稀釋而流失，所以就難以生存於水中。

第二節 好冷性細菌 (Psychrophiles)

好冷性細菌大都能生長在 15°C 以下，最低可達 0°C 左右，某些菌種甚至可達 -5°C 以下，一般因其對溫度之適應能力，可分爲：

1. 偏性好冷性細菌 (Obligate psychrophiles)：只能在低溫生長，而不能在高於 20°C 生長者。
2. 通性好冷性或耐冷細菌 (Psychrotrophiles)：即使高於 20°C 也能生長，低於 15°C 亦能生長者。

分離好冷性細菌應注意事項：

(1) 由於好冷性細菌對溫度敏感，所以培養時不能用 Pour plate，因爲此時 Agar 的溫度約在 45°C 左右，可能會殺滅好冷菌，故只能用 Spread plate，等待培養基冷卻至 5°C 後再塗抹之。

(2) 任何所使用的器具，都需先預冷至 5°C 才能使用。例如分離南極蝦之好冷菌，需先預冷至 5°C，同時需要在 5°C 之冷室操作。

(3) 分離出來的菌株要經常接種更新。

一般的好冷菌以 *Pseudomonas*、*Moraxella*—*Acinetobacter*、*Flavobacterium* 與 *Vibrio* 爲主。其中 *Vibrio marinus* 之生長溫度爲 1°~9°C，最適溫度爲 4°C。*Vibrio psychroerythus* 生長溫度範圍爲 0°~19°C，最適溫度爲 15°C。

又如 Hess 分離的 *Pseudomonas fluorescens* 之一世代時間 (Generation time) 在 0.5°C 爲 6.68 小時，而在 0°C 時則爲 30 小時；另一種 *Pseudomonas fluorescens* 的世代在 5°C 時爲 10.5 小時，在 0°C 時則爲 26.5 小時。*Bacillus psychrophillus* 的世代則爲 28 小時 (0°C)，*Micrococcus cryophilus* 亦爲 28 小時 (0°C)。可見好冷菌之繁殖需要很長時間，這也是好冷菌的研究較一般細菌爲難的原因之一。

第三節 高溫對好冷細菌的影響 (Effect of high temperature on psychrophiles)

好冷細菌因對溫度非常敏感，故置於其最高生長溫度以上時，則有如下之影響：

1. 減少呼吸作用 (Reduce respiration)
2. 熱促使細胞膜產生裂縫 (Thermally induced leakage)，原生質即由此裂縫流出而使細菌致死，

因此培養液中含有蛋白質、DNA、RNA 及各種胺基酸等細菌體之組成分，同時細菌細胞之構造也會因溫度而改變。

3. 熱促使細胞解離 (Thermally induced lysis)：由於溫度升高，消化酵素活性增加，使整個細胞膜解離。
4. 細胞膜之滲透力減低，以致攝食營養的能力，因溫度高於最高生長溫度而減低。

第四節 環境因素對好冷菌的影響 (Ecological factors affecting psychrophiles)

好冷性細菌需要一定量的鹽分，才能使物質由細胞膜輸送進入體內，而且有些好冷菌也需要一定的壓力才能正常生長。例如：*Vibrio marinus* MP-1 於 3°C 時在 100 及 200 大氣壓下生長繁殖要比在一大氣壓下良好，但在 300 大氣壓以上時則生長速率降低，在 1,000 大氣壓以上則開始死亡。壓力有促進與抑制 L- 絲胺酸脫胺基作用 (L-serine deamination) 之效用，在 200 大氣壓下，蛋白質、RNA 與 DNA 等高分子行正常之合成作用；在 400 大氣壓下，蛋白質與 RNA 之合成尚正常，但 DNA 之合成則受抑制；在 500 大氣壓下，高分子之合成作用則有明顯的降低，到 1,000 大氣壓時，則所有高分子的合成作用則完全停止。

有些好冷細菌，例如 *Vibrio Ant-300* 在實驗室正常繁殖時為典型桿菌，但若將此菌之細胞洗滌，而懸浮於緩衝溶液中，在完全無養分之飢餓下時，形狀則變小而呈圓形，同時生活細菌數增加可達 6 倍之多。在此飢餓狀況下，有 50% 的細胞能通過 0.4 μm 膜過濾器 (membrane filter)，而正常之桿菌完全不能通過此過濾器。

此種事實是非常罕見的現象，這種細菌在自然的大海中是否本來就是球形，抑或在實驗室的人工培養時才呈桿狀，尚需更進一步的研究才能澄清。

低溫冷凍對一般細菌之殺傷能力很輕，但是凍結解凍 (Freezing-Thawing) 反復施行則能將細菌殺死，此操作能將細菌殺死之可能原因有二：1. 在急速凍結時，因細胞內冰的再結晶而致死。2. 在緩慢凍結時，因細胞內某處溶質濃度之升高而致脫水死亡。在前者之情況時，細菌之殘存數係依解凍速度的快慢而定。在冰完全融解前，需要快速解凍到防止冰的再結晶，才能防止細胞的死亡。後者則與解凍速度之關係較小，殘存率要看停留於高濃度溶質之時間長短而定。因此要低溫保持菌種時，宜用急速冷凍；要使用菌種時，宜用急速解凍。

至於好冷微生物何以能夠耐寒？一般推測如下：

1. 因菌體內含有鹽類及無機物，可使凝固點下降。
2. 生存於低溫者，其不飽和脂肪酸含量多，可以耐較低溫度而不凍結，如下表所示 *Leucosporidium* 在不同溫度下繁殖時，其脂肪酸種類及含量亦異。

表2—1 培養溫度之改變對脂肪酸種類及含量之影響

溫度 °C	C _{16:0} %	C _{18:3} %
-1	9	49
17	16	7
8	12	27
18	20	8

3. 具有抗凍結糖蛋白 (AFGP, Antifreeze glycoprotein)。

在南極海域漁獲的魚，其血液經分析結果，含有9種能抗凍結具不同分子量之糖蛋白，其分子量約為8,000~20,000之間，若以摩爾/毫升 (mole/ml) 來計算，則 AFGP 之抗結冰能力為氯化鈉 (NaCl) 的600倍，且 AFGP 與 NaCl 具有加成作用，這也說明了何以雪地魚能夠耐寒。AFGP 與 NaCl 之抗結冰能力如圖 2—1 所示，好冷細胞可能也含有此類物質，但至今尚未有報告。

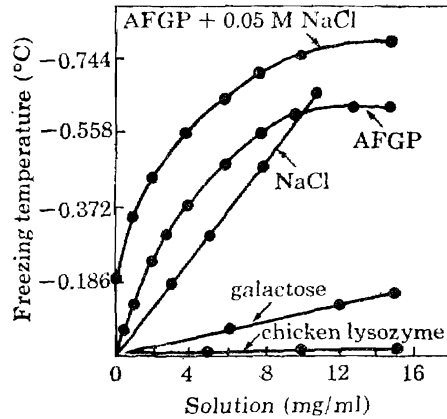


圖 2~1 AFGP 與 NaCl 之抗結冰能力

第三章 海水魚之細菌羣落 (Bacterial flora of sea-water fish)

第一節 新鮮魚類之細菌 (Bacteria of fresh fish)

剛捕獲的新鮮魚類，細菌主要分佈在魚體表面 ($10^2 \sim 10^5/cm^2$)，腸胃消化液 ($10^3 \sim 10^8/ml$) 以及鰓 ($10^3 \sim 10^7/g$) 等部位，新鮮魚類之細菌如表 3—1 所示。

表 3—1 新鮮魚類之細菌相

Species	Medium	Sample								
			Pseudomonas	Moraxella-acinetobacter (Achromobacter)	Corynebacteria	Flavobacter	Micrococci (Incl. Sarcina)	Bacillus	Vibrio	Miscellaneous
Norwegian winter herring	Fish agar and nutrient agar at 22°C	Skin (slime)	40.0	24.5	—	17.7	16.7	—	—	1.1
		Gills	47.0	33.4	—	13.7	3.9	—	—	3.0
		Intestines	24.1	72.5	—	—	3.4	—	—	—
Canadian-Atlantic cod	Tap water at 20°C	Skin (slime)	4.5	3.6	—	1.8	78.5	—	—	11.5 ¹
		Intestines	5.6	3.7	—	5.6	65.0	—	—	1.8 ²
N. Sea lemon	Salt water	Intestines	34.6	7.7	5.8	9.6	—	—	34.6	1.9 ⁴ 5.8 ³
N. sea sole	Tap water	Intestines	6.1	7.6	13.6	1.5	—	—	59.1	7.6 ⁴ 4.5 ³
W. Coast S. African hake	Sea water at 20°C	Slime	27.8	52.5 ¹	8.2	6.6	3.3	0	0	1.6
E. Coast S. African hake	Sea water at 20°C	Slime	4.2	4.2	33.3	—	37.5	0	0	20.8
Indian shark	Sea water	Slime	0	8.6	28.5	2.9	28.5	25.7	2.9	2.9
Australian mullet	Salt water	Whole fish	18.0	9.0 ¹	12.0	8.0	51.0	2.0	1.0	—

1. Yeasts 2. Proteus 3. Others 4. Alcaligenes

這些細菌之多寡受內在與外在之因素而改變，內在因素如漁場、季節及魚種等，外在因素如取樣技術、漁獲方法、培養基之成分與培養溫度等。魚種之不同所含細菌種類之多寡也不一樣，例如澳洲的真骨魚類 (Teleosts) 含有多數的 *Micrococci*，板鰓魚類 (elasmobranches) 含有多數的 *Corynebacteria*。拖網的漁獲物由於在漁撈時被拖曳，有時會混雜海底的泥土，所以此類漁獲物比其他漁法 (如延繩釣、一支釣) 所漁獲者之細菌數要高 10~100 倍。

第二節 培養基與培養溫度之不同對細菌數之影響 (Effect of medium and temperatures on bacterial count)

魚介類所含細菌數之多寡、培養基之成分與培養溫度有很大的關係，於寒冷地帶 ($-2 \sim 12^\circ C$) 捕獲的魚，在 $37^\circ C$ 培養所得的細菌數只有在 $20^\circ C$ 培養時的 5%；一般在 $20^\circ C$ 培養時 *Corynebacteria* 與 *Flavobacterium* 含量較多；在 $0^\circ C$ 時 *Moraxella-Acinetobacter* 比在 $20^\circ C$ 培養時為多。北海鱈魚 (North Sea cod) 表皮的細菌相，在 $20^\circ C$ 與 $0^\circ C$ 培養時 pseudomonads 各為 44% 與 51.5%，*Moraxella-Acinetobacter* 各為 32.4% 與 41.3%，*Corynebacteria* 為 8.7% 與 1.0%，*Flavobacterium* 為 6.0% 與

1.5%，*Micrococci* 爲 1.1%與 0.7%，*Vibriosis* 則爲5.9與 3.3%，由此可知在20°C培養時 *Corynebacteria*、*Flavobacterium* 與 *Vibriosis* 之數量比在0°C 培養時爲多。*pseudomonads* 與 *moraxella-Acinetobacter* 則培養於0°C 比 20°C 稍多。

用海水培養基與淡水培養基來培養北海鱈魚 (North Sea skate) 表皮細菌時，*pseudomonads* 各爲 63 %與 22.3 %，*Moraxella-Acinetobacter* 爲8.6%與 38.3%，*corynebacteria* 爲 3.4 %與 2.1 % *flavobacteria* 爲 10.2%與4.3%，*Alcaligenes* 爲6.4%與 17.5%，其他細菌則爲 6.4%與 11.3%，這些結果說明以海水配成的培養基來培養時，所得 *pseudomonas* 與 *flavobacteria* 之細菌數比用淡水培養基培養時爲多，*Moraxella-Acinetobacteria* 則用淡水培養基比海水培養基培養時爲多。

總之，培養水產細菌時，使用培養基之種類與培養溫度之選擇，爲決定結果之主要因素，一般宜用含有鹽分，礦物質及高營養之培養基，可得較高之細菌數，同時水產細菌多爲好冷菌，培養溫度以 20°C 爲宜。

第三節 季節與地區不同對細菌之變化

(Bacterial count changes with seasonal and geographical variations)

同一種魚類在同一地區內，因漁獲時期之不同細菌數常有不同，例如在蘇格蘭的 Aberdeen 所捕獲的鱈魚 (Skate) 與鰈 (Sole) 在一年內各季節中帶有不同之細菌數，每月測定其表皮、消化器官與鰓之細菌數結果，表皮含有 6×10^3 至 $6 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的細菌，消化器官含有 7×10^8 至 $1 \times 10^7/\text{g}$ ，鰓部則含有 7×10^3 至 $3 \times 10^6/\text{g}$ 之細菌，細菌數依季節而變化。一年中有兩高峯，一次爲晚春，一次在秋季，尤其鰓部之細菌數變化最爲顯著，而這二次細菌數之高峯，均發生在浮游生物高峯過後之衰退時期。有些浮游生物曾被認爲具有抗菌作用，因此魚類細菌數因季節之消長推測可能與浮游生物有關。

北半球寒冷地區所捕獲之魚類，所含細菌大多爲好冷細菌，例如 *pseudomonads*，*Moraxella-Acinetobacter*，*flavobacteria* 及 *Vibriosis* 等，在非洲、印度洋、澳洲沿海地區所捕獲之魚類含有大量的好溫細菌，例如 *bacilli*，*corynebacteria* 以及 *micrococci* 等。

第四章 魚類在冷藏中細菌羣落的變化 (Changes in bacterial flora of fish during cold storage)

第一節 貯藏溫度對細菌數的影響 (Effect of temperature on bacterial population during storage)

健康的魚被捕獲後，若其後之各過程不再污染（或稱二次污染），魚肉中應該是不會帶有細菌。但魚經貯藏一段時間後，原先體表、鰓、內臟所附着的細菌，即逐漸向腹腔等組織軟弱部位蔓延而進入魚筋肉中。

溫度的變化與細菌的增殖有密切的關係，貯藏溫度對細菌數的消長如圖4—1，可知於25°C時只要2天，其總菌數即達 4×10^8 /kg，而於7°C下貯藏時，則需6天才會達到此菌數，若貯藏於更低的溫度下，欲達與此相當的細菌數，所需時間則更長。亦即說明低溫可抑制細菌的生長，而有助於食物或魚的保存。一般魚介類原有細菌之最適生長溫度約在20°C左右，漁獲物在陸地上所污染之細菌的最適生長溫度大致為35°C左右，因此當漁獲物解凍或碎冰溶解後，由於溫度之上升，造成細菌數量的直線上升，而加速魚肉之腐敗。

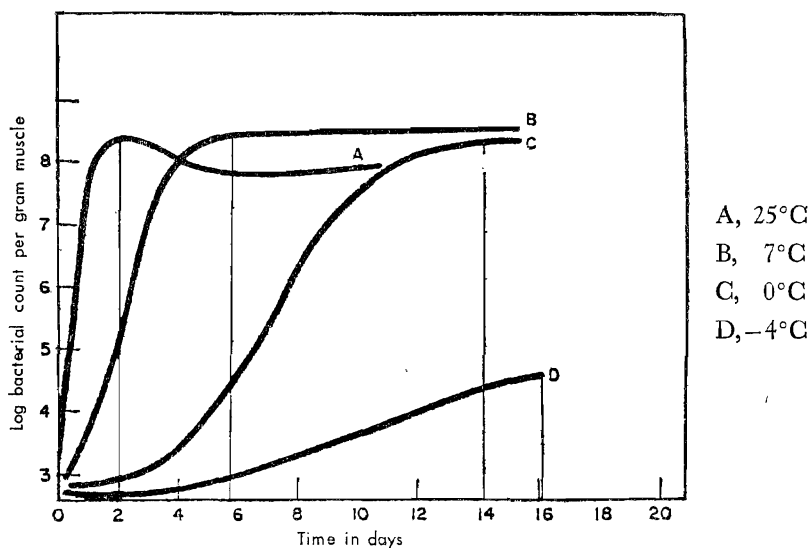


圖 4~1 貯藏溫度與時間對細菌數增長之關係

第二節 腐敗細菌與魚介類之腐敗 (Spoilage bacteria and Spoilage of fish and shellfish)

生菌數或總菌數嚴格說來，對魚肉腐敗並沒有多大意義，不能供給吾人有關魚體新鮮或腐敗分解 (Decomposition) 的準確資料。追究魚肉的腐敗分解，應以具有分泌蛋白質、脂肪或核酸分解酵素的細菌為主。而以此等細菌之多寡、性質、種類作為判斷魚肉新鮮度的指標。有些魚體雖然含有多量的 *flavobacterium*，但因其並非主要腐敗菌，不足以造成魚肉之腐敗分解。

當魚類死後即起僵直，繼之自家消化，在魚體軟化後細菌即開始大量繁殖，尤其魚體自身的酵素行自家消化所生成之蛋白質分解物質，是細菌之良好營養分，更促進細菌的加速繁殖，若魚體置於室溫而未加冷凍或冷藏處理時，則細菌繁殖更快，不久即可達 $10^7 \sim 10^8/g$ 之高的細菌數。細菌體所含有各種不同的酵素，尤其蛋白質分解酵素，亦在此際參與作用，即加速進行魚體蛋白質之分解。其他細菌可能含有的脂肪分解酵素及核酸分解酵素亦並行進行分解，使得魚肉更加軟化，增加水溶性物質，之後分解生成各種不同的腐敗生成物，即使魚體冷藏雖然變化較慢，但是好冷菌仍然繼續繁殖，最後仍致腐敗。

蛋白質 $\xrightarrow{\text{自家消化}}$ 蛋白質衍生物 $\xrightarrow{\text{細菌之分解作用}}$ 腐敗生成物（例如三甲胺、氨、Indole、糞臭素、甜菜鹼、組織胺、硫醇、腐敗毒（Putrecine）及其他含氮最後分解物）。

脂肪 $\xrightarrow{\text{細菌之分解作用}}$ 分解生成物（脂肪酸、膽鹼、神經鹼（Neurine）、二氧化碳及其他腐敗生成物，尤其氧化作用之併行進行，更加速此等腐敗生成物之形成。）

DNA、RNA $\xrightarrow{\text{細菌之分解作用}}$ 核酸分解生成物。

魚體之腐敗就如上述腐敗細菌分解之各種不同酵素之綜合並行作用，加以氧化作用之進行，促成魚體之腐化，最後形成有毒腐敗生成物，當然細菌之各種酵素各有其專長作用，例如 trimethylamine

oxide $\xrightarrow{\text{細菌之 TMAO reductase}}$ TMA, Histidine $\xrightarrow{\text{細菌之 histidine decarboxylase}}$ Histamine。

一般人均認為細菌數越高表示魚的鮮度越差，即細菌數達 $10^7/g$ 以上就以為開始腐敗，但這並不完全準確；有時候總細菌數高鮮度並不太壞；有時候總菌數低，鮮度反而差，這是由於細菌種類之不同及漁獲物處理方法之不同的緣故。腐敗細菌與非腐敗細菌對魚體之作用差別很大，例如 *Pseudomonas* 高時就易腐敗，但是若 *Flavobacterium* 及 *Cytophaga* 高而 *Pseudomonas* 低時魚肉經常很新鮮。

貝類之腐敗除其體成分與魚類稍有不同外，最後之腐敗情況相差不大，不過腐敗時發現 *Moraxella* 之數量比 *Pseudomonas* 高。

總之，魚介類之腐敗細菌很難下定義，能够引起魚介類腐敗之細菌種類很多，凡是能致使魚介類產生異臭，生成腐敗分解物以及引起魚介類外觀改變之細菌，均列為腐敗細菌。如以魚汁來培養時，能够產生 $\geq 1.0mg$ TMA-N/100ml 培養液或 ≥ 15 microequivalents/5 ml 培養液的 VRS（Volatile reducing substances）的細菌都是腐敗細菌。一般言之，主要魚介類的腐敗細菌為 *Pseudomonas* 屬（其中以 *Pseud. putrefaciens* 與 fluorescent pseudomonads 為常見之腐敗細菌。），其次為 *Moraxella*，及其他少數之 *Aeromonas*、*Vibrio* 與 *Flavobacterium* 等。

第三節 腐敗能力之測定 (Tests of spoilage activity)

腐敗能力之測定是用來檢查細菌對食物或魚體腐敗分解能力的程度。細菌能分泌酵素來分解蛋白質、脂肪及核酸等高分子物質，吾人即測定這些高分子物質被分解的程度，做為該細菌腐敗能力大小的判定。這些腐敗能力之測定不但是對水產物或其他食品之細菌所要做的檢定，同時也是細菌鑑定上需要測定之主要項目。一般都是測定細菌所分泌的酵素是否能分解某一基質（Substrate），即把此一基質加入於培養基中，使其作用，再觀察分解生成物而致之 pH 的變化，作用基質的消失與否，或特殊物質之生成，以致改變培養基的外觀、狀態與顏色而指示出來，或者用其他方法簡便測出者。常用的方法有下列數項：

1. 測定硫化氫氣體的產生：

有些細菌能分解含硫的胺基酸，如半胱氨酸 (Cysteine) 等，而產生硫化氫氣體或含硫化合物。此硫化氫或含硫化合物與鐵作用即產生黑色的硫化鐵，因此若在培養基中加入含鐵物質（例如硫酸銨鐵或檸檬酸銨鐵等）而有硫化鐵之產生，即表示該細菌有產生硫化氫之能力。

Peptone iron agar (Difco) 可用來測定細菌是否有產生硫化氫的能力，測定時以穿刺培養最為明顯，其次為重層培養或接種被測定菌種後，於培養基上加蓋一層 Peptone Fe agar，於 20°C 培養 4 天以上，觀察之，若有黑色的菌落或黑色的中心點而周圍是白色或棕色，都認為具有產生硫化氫的能力。

硫化氫的產生與所接種的細菌種類，培養的時間及嫌氣狀態與否等均有關係。

2. 明膠酵素之測定：

將明膠加於培養液中，可測定細菌是否有分解明膠的能力。Soft agar-gelatin overlayer plate 是用來檢查細菌對明膠（作為蛋白質之一種）分解能力最敏感之一種方法。其培養基之配製法如下：先倒入普通培養基 (0.005% MnSO₄, 0.5% NaCl, 0.8% Nutrient broth 及 1.5% agar)，待凝固後再加入約 5 ml 的 Soft agar-gelatin medium，使平均分佈在表層上 (Overlayer)。Soft agar-gelatin medium 之成分為 0.005% MnSO₄, 0.5% NaCl, 0.8% Nutrient broth, 0.8% agar 及 1.5% gelatin。被測細菌自斜面培養基上以白金耳點在 Soft agar-gelatin overlayer 的二重皿上，培養 2 天，等菌體大量成長後，加入約 5 ml 的 5% 醋酸，放置 5 分鐘，倒棄多餘的醋酸，若細菌能分泌酵素分解明膠，則在塗抹細菌部位周圍形成透明圈，未作用的培養基表面則呈混濁現象。

另一種蛋白質——酪蛋白 (Casein) 也可作為測定細菌是否有分解蛋白質之能力，於培養基中加入奶粉，即有此等性質。

3. 核糖核酸酵素 (RNase) 之測定：

核糖核酸酵素之測定是檢查細菌是否有分解核糖核酸 (RNA) 的能力。此種培養基的配方如下：於 1ℓ 水中加入 20g tryptose, 2g RNA, 5g NaCl，混合溶解後調整 pH 至 7.3，然後加入 15g 洋菜，以殺菌釜 (Autoclave) 加熱殺菌後，倒入二重培養皿中。

測定時先倒入一層培養基於二重皿中，每一個二重皿用白金耳點上適當菌量之欲測菌株，於 20°C 培養 3~5 天後，倒入約 5ml 的 1N HCl，靜置 5 分鐘後倒棄多餘的鹽酸，因加酸可使培養基中的 RNA 沉澱，所以表面會呈混濁，若被測菌種能分解 RNA，則在接種菌落周圍會有一透明的外圈，可由這圓圈之直徑大小表示其分泌 RNase 活性的大小。

若被試菌種的 RNase 活性小，很難分辨是否有活性時，宜以一隻藥杓撥開培養基上的菌叢，由二重皿底部觀察是否出現澄清的透明圈，即可判斷該菌是否分泌 RNase。

4. 去氧核糖核酸酵素 (DNase) 之測定：

DNase 活性之測定與 RNase 活性的測定法相同，只是基質以 DNA 取代 RNA。一般細菌若具有 DNase 活性亦常具有 RNase 活性。

DNase 或 RNase 活性的大小與培養的時間及接種在培養基上之菌種、數量有很大的關係，故若培養基充裕時，則同一菌株可接種三種不同量以比較，並另做不同培養時間來比較其活性的差異。

5. 澱粉水解酵素 (Amylase) 的測定：

澱粉水解酵素的測定是檢查細菌是否具有分解澱粉的能力。

一般陸地上的細菌多具有澱粉分解的能力，但由水中分離出的細菌對澱粉則很少有分解的能力。澱粉水解酶的測定法如下：

一般營養洋菜 (Nutrient agar) 加2.0%水可溶性澱粉 (Soluble starch)，殺菌後倒入二重皿，測定法與 RNase 或 DNase 測定法相同，即在培養基上塗上欲檢菌株，於 20°C 培養 5 天後，加 5ml 30% Lugol's iodine 溶液 (30 ml Lugol's iodine 加於 70 ml 水中)，若澱粉未被分解則會與碘作用而呈藍色。若澱粉已被分解成小分子的寡醣類或單醣類，則顏色不變或呈淡紫色，因而由菌落周圍的顏色與培養基本身的顏色比較，即可判斷是否具有分解澱粉的能力。

6. 脂肪分解酶 (Lipase) 之測定：

脂肪分解酶種類繁雜，水產細菌所具有者，對短碳鏈的脂質比對長碳鏈的脂質具更強的活性。故可以甘油三丁三酸酯 (Tributyrin) 及橄欖油 (Olive oil) 二種基質來代表所有脂肪。

(1) 橄欖油洋菜培養基

a. 橄欖油乳化液 (Olive oil emulsion)

取 100ml 橄欖油加 10g 的阿拉伯膠 (Arabic gum)，以攪拌機 (Blender) 打勻後，加400ml 溫水 (50~60°C) 再打勻，若很均勻則應為乳白色的液體。

b. Spirit blue solution:

取 0.3g Spirit blue 加入於 100 ml 的95%酒精中。培養基的配法如下：Tryptone 10g、Yeast extract 5g、Olive oil emulsion 25 ml、Spirit blue solution 50 ml，加水到 1ℓ 後充分攪拌混合，再調 pH 值至 7.0，然後加入 30 g 的洋菜，以殺菌釜加熱殺菌後倒入二重皿中。

(2) 甘油三丁三酸酯洋菜培養基

將殺菌過的營養洋菜 (N.A) (含 0.5% NaCl) 冷卻至 45~48°C，立即添加 10 ml/ℓ 的甘油三丁三酸酯，旋轉搖動勿使產生氣泡，倒入於二重皿中。

主要用於測定脂肪分解酶之活性，方法與前述各種酶測定法相同，即先於培養基塗上欲測菌種，於 20°C 培養10天，培養期間經常觀察。脂質在甘油三丁三酸酯洋菜培養基上呈細小油滴而使培養基呈混濁，若細菌能分泌脂肪分解酶則脂質即被水解，菌落周圍變澄清。若在橄欖油培養基上，則因脂肪被分解後，Spirit blue 即顯出藍色，故由菌落周圍是否有藍色的圈，即可判斷是否具有脂質分解能力。

7. 三甲胺 (TMA) 生成之測定

新鮮海魚之體中含有氧化三甲胺 (TMAO)，若經氧化三甲胺還原酶的作用即變成三甲胺，此三甲胺為海魚特有腥臭的主成分。三甲胺之測定法如下：於 8 ml 含有 0.1% TMAO 的 Nutrient broth (含 0.5% NaCl) 中，接種一白金耳的菌種，在20°C下培養48小時後即可抽取 TMA。即取 1 ml 培養後之含菌培養液，加入 4 ml 水及 5 ml 7.5%三氯化醋酸 (TCA)，經振盪後，取上層液 1 ml，加 3 ml 水，1 ml 4%甲醛 (HCHO)、10 ml 無水甲苯 (Toluene) 和 3 ml 之 50%碳酸鉀 (K₂CO₃)，再經激烈振盪使 TMA 溶於甲苯層，然後取 4 ml 的甲苯層加 0.9 g 的無水硫酸鈉，隨即傾入一乾燥的試管，加入 4 ml 0.02%苦味酸 (Picric acid) 呈色劑，於 420 nm 波長下測定其吸光度，由標準曲線 (已知量的 TMA-N 對 O.D 值所做的曲線) 換算 TMA 的含量。因此可判斷 TMAO 還原酶活性的大小。

8. 魚肉汁液之測定：

把魚體加一定量的水，經攪拌後以 Millipore 過濾器過濾 (可加一層紙墊，以防止蛋白質等大

分子粒子之阻塞濾孔)，所得的濾液即為無菌魚肉汁，用此汁液來接種各種細菌，培養一定時間後測定揮發性鹽基態氮（VBN）及其他分解生成物，由此可以瞭解該菌對此類魚肉是否具有腐敗能力。

9. 魚片 (Fish fillet) 之直接測定法：

取極新鮮的魚體將之去皮後，用殺菌過的刀除去表面肉，再將魚肉切成小方塊（約 $1\sim 1.5\text{ in}^3$ ），挾取一小塊魚肉於其表面塗抹多量的被試菌種（菌種可先在二重皿上大量培養），然後裝入塑膠袋中，包紮起來但不要密封，置於一定溫度經一定時間聞其味道，則可測出該菌種對此魚是否有致腐敗之能力以及產生之氣味種類，但是這些刺激性的味道會由於菌種經數次之轉移而減輕，所以只能做為官能上粗略的判斷。

10. 形成醋酸的測定：

有些微生物能對醇類氧化生成酸類，為要測定能否氧化酒精形成醋酸，可用如下方法：將含1%碳酸鈣（ CaCO_3 ）的 Nutrient agar 殺菌後，冷卻至 45°C 時加入酒精使成1%之濃度，旋轉振盪均勻後，倒入二重皿。將多量欲測菌種塗抹於含乙醇之上述培養基上，培養一週以後（ 20°C ），觀察塗抹菌落的周圍或培養基底層是否變為透明，若有時即表示該細菌能形成醋酸。

第四節 魚類冷藏中細菌種類與數量之變化 (Quantitative and qualitative changes in bacteria flora of fish during cold storage)

魚類剛捕獲後細菌數並不會太高，隨貯藏時間之延長，不但總細菌數增加，細菌種類及其數量之比也隨之而改變，同時因貯藏溫度之不同，細菌種類及其數量比亦異。例如某種鱈魚（Cod）貯藏在 20°C 時，corynebacteria 逐漸增加，但是當貯藏於 20°C 以下之低溫時，則 *Moraxella-Acinetobacter* 逐漸成為主要細菌。

漁獲物於處理或貯藏過程中所感染的細菌，成為左右細菌種類與數量之主要因素，例如一般寒帶剛漁獲的魚其所含的好溫細菌數很低（約0~5%），但經過加工製成魚片後，則好溫細菌大大的增加（3~28%）。又漁獲物在處理過程中所污染的衛生有關細菌，經常決定水產製品（尤其是冷凍或冷藏品）品質的主要關鍵。

在良好的冷藏情況下，漁獲物到達漁港時，應該是很新鮮，細菌數不會很高，如表4—1所示，新鮮鱈魚（Haddock）自魚艙卸下後，細菌數為 $3.1\times 10^5/\text{g}$ ，將之貯藏於 1°C ，隨貯藏期間之增加細菌數隨之增高，10天後即增高到 $2.1\times 10^8/\text{g}$ ，14天後即呈腐敗不能食用。在這些總菌數中，蛋白質分解菌數及 H_2S 產生菌數最初很低，但隨總菌數之增加而成正比例升高（圖4—2）。經鑑定結果，這些蛋白質分解菌主要為 fluorescent pseudomonads 及 *Pseudomonas putrefaciens*， H_2S 產生菌為 *P. putrefaciens*，圖4—3表示這兩類細菌數之變化與總菌數增加之關係。由此結果證明 *P. putrefaciens* 與 fluorescent pseudomonads 為鱈魚之腐敗細菌。此類細菌在魚肉新鮮時數量很低，佔總菌數1%以下，但是這類腐敗細菌却隨貯藏時間之延長而增加菌數，當菌數達總菌數之30%時魚肉即開始腐敗。因此以腐敗菌佔總菌數之百分比來作為魚肉鮮度的指標，似較以總菌數來表示為可靠。

表 4—1 鱈魚片貯藏中 (1°C) 蛋白質分解菌與 H₂S 產

生菌 *Pseud. putrefaciens* 與總菌數之關係 (細菌數/公克)

No. of days fillet stored at 1°C	Soft agar-gelatin overlay			Peptone iron agar		
	Total count	Proteolytic count	Proteolytic colonies %	Total count	H ₂ S colonies	H ₂ S-producing %
0	3.1×10 ⁵	8.5×10 ⁴	27.4	3.2×10 ⁵	1.1×10 ⁴	3.4
2	2.4×10 ⁶	6.0×10 ⁵	25.0	3.8×10 ⁶	5.8×10 ⁵	15.3
4	1.9×10 ⁷	6.5×10 ⁶	34.2	1.8×10 ⁷	4.7×10 ⁶	26.0
6	7.3×10 ⁷	3.0×10 ⁷	41.2	6.7×10 ⁷	1.5×10 ⁷	22.4
8	1.2×10 ⁸	4.5×10 ⁷	37.5	1.2×10 ⁸	4.1×10 ⁷	34.2
10	2.1×10 ⁸	8.5×10 ⁷	40.5	2.5×10 ⁸	7.4×10 ⁷	29.6

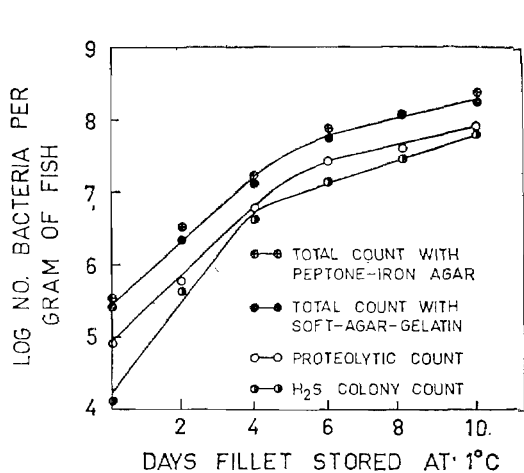


圖 4~2 鱈魚片冷藏中蛋白質分解菌、H₂S 產生菌與總菌數增加之關係

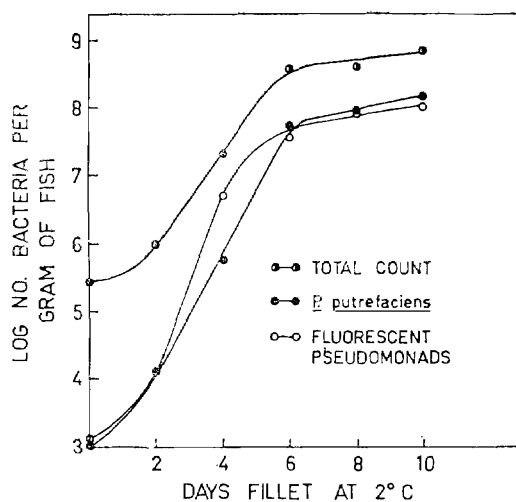


圖 4~3 鱈魚片冷藏中總菌數、*P. putrefaciens* 及 fluorescent pseudomonads 菌數間之關係

第五章 有關衛生方面的細菌 (Microorganisms of public health significance)

一般食品尤其是水產食品含有豐富的營養及多量的水分(75~85%)，因此各種細菌都很容易污染乃至繁殖，故水產食品中含有之細菌種類與數量，可作為其品質與衛生安全之指標，有些細菌雖然不會引起嚴重的食物中毒，但却可表示該食品之原料，製造過程以及貯藏中污染的情形，這些受二次污染情形之輕重，即可作為對公共衛生與健康是否構成威脅之標示。

一般食品經常檢查之細菌項目概為：(1)總生菌數 (APC; Aerobic plate count); (2)大腸菌羣及大腸菌之最確數 (MPN; Most probable number)及(3)血液凝固酵素(Coagulase)陽性之金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。不過水產食品中腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 及沙門氏桿菌 (*Salmonella*)，也常列為檢查項目。

食品中毒在世界各國都很普遍，其中以細菌性食物中毒佔絕大多數，例如美國食品中毒事件中有98%係由細菌污染所引起，以發生之場所來分：公共食物供應場所(例如餐廳、餐館及零售販賣等)佔65%，家庭佔23%，食品工廠佔12%。由此可見食物中毒大多發生於一般民衆對有關衛生之細菌的疏忽與不了解所致。依細菌中毒之症狀來分，則以沙門氏菌症 (Salmonellosis)，產氣莢膜桿菌食物中毒 (*Clostridium perfringens* food poisoning) 及葡萄球菌食物中毒 (Staphylococcal food poisoning) 為主。

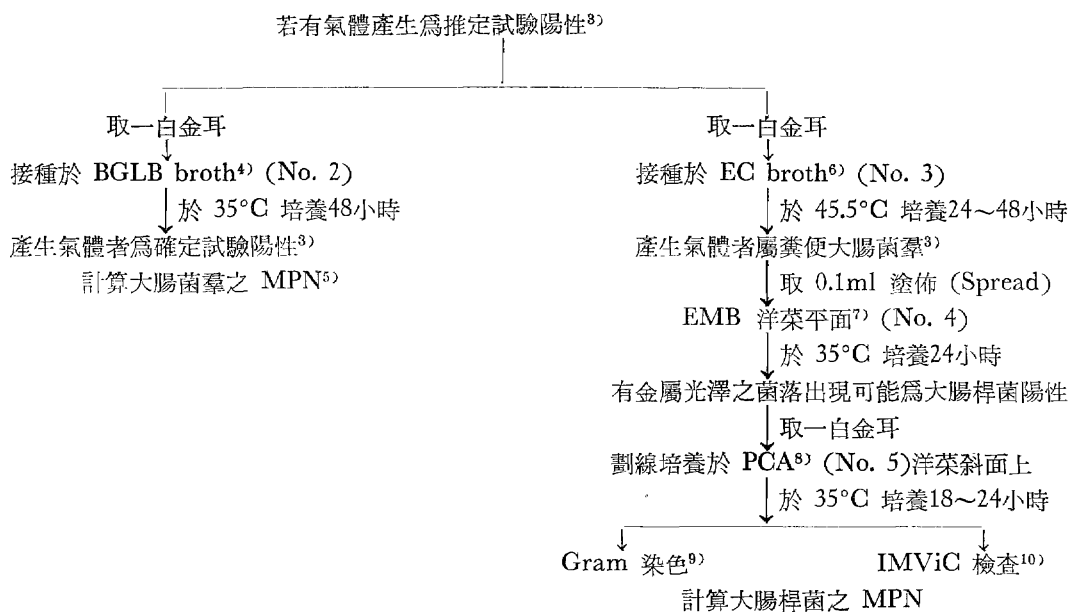
食品中之有關衛生方面的細菌，在普通培養基培養時，常被其他優勢之食品細菌所抑制，因此不易培養出來，一般的檢查需先用增菌培養基 (Enrichment medium) 及選擇培養基 (Selective medium)，使欲檢查之目的菌大量增殖，同時把原先佔優勢之其他細菌抑制下來。為達成此一目的，通常利用含特殊成分之培養基，配合 pH 的控制及培養溫度之不同來淘汰其他非目的菌，待目的菌繁殖後即用判別培養基 (Differential media) 培養，以選擇嫌疑之細菌，再經化學檢測法，必要時利用血清反應鑑定之。本章就食品衛生之有關細菌的檢查方法分述如下：

第一節 大腸菌羣 (Coliforms)

大腸菌羣為一羣在24至 48 小時內於胆汁存在下能分解乳糖產生氣體之好氣性及通性嫌氣性、Gram陰性、不形成孢子之桿菌的總稱。可包括糞便大腸菌羣 (Fecal coliform) 及非糞便大腸菌羣 (Non-fecal coliform)，後者廣泛存在於土壤，水中等自然環境中，而前者屬於溫血動物之腸內細菌，在食品衛生法規上常以此類細菌作為食品受污染之指標。以我國冷凍食品衛生標準為例，冷凍生食用魚介類，應為大腸菌羣陰性，而冷凍鮮魚介類(包括加熱後始供食用者及水產加工原料)均不得含有大腸桿菌 (*E. coli*) (冷凍生食用牡蠣准許每 100g 中最確數在230以下)。又如美國貝類養殖場之衛生標準為：每 100ml 海水之大腸菌羣為70個，大腸桿菌為14個。

大腸菌羣檢查法

試料 25g+肉汁¹⁾ (225ml)
↓均質
以 Lauryl sulfate tryptose broth²⁾ (No. 1)
稀釋成 $\frac{1}{10}$ 、 $\frac{1}{100}$ 、 $\frac{1}{1,000}$ 、 $\frac{1}{10,000}$ ……至適當稀釋倍數
↓於 35°C 培養48小時



註釋：

- 1) 除特別說明者外所有培養基或肉汁、採樣及實驗器具等，均需預先以殺菌釜 (Autoclave) 於 121°C 殺菌15分鐘，但二重皿、吸管等玻璃器皿得以 180°C 乾熱殺菌2小時。
- 2) 取 10ml LST broth 於 20×150mm 試管 (內含 10×75mm 之倒立發酵管) 先殺菌後使用，僅讓能發酵乳糖產生氣體者增殖並抑制雜菌之增殖。本 broth 中含 Sodium lauryl sulfate 之目的為對大腸菌羣具有選擇性；2% 的 tryptose 係使大腸菌羣在對數期的初期繁殖速率增加。而磷酸鹽緩衝液則促使大腸菌羣在對數期的末期加速繁殖，同時提高誘導期之繁殖速率。總之，整個培養基在使大腸菌羣中某些發酵乳糖之速率較慢者，能在短時間內產生大量的氣體。
- 3) 所產生之氣體量需佔發酵管的 $\frac{1}{10}$ 以上才為推定試驗陽性。
- 4) 本培養基為選擇性培養基，所含之胆汁和煌綠 (Brilliant green) 可抑制孢子形成菌及糞便鏈球菌 (Fecal streptococci) 之繁殖。
- 5) 最確數表之使用法：

試料克數 每支試管	1g	0.1g	0.01g	0.001g	0.0001g	MPN/g (Most probable number)
呈陽性之管數	3	3	1			46
	3	3	2	1		15 × 10 = 150
	3	3	2	1	←----- 1	21 × 10 = 210
	3	2	0	←----- 1		15

- 6) EC broth 亦含有胆汁可抑制孢子形成菌及糞便鏈球菌之繁殖，專用在以 45.5°C 培養檢測大腸桿菌。
- 7) EMB 為判別培養基。所含曙紅 (eosin) 和甲基藍 (methylene blue) 混合指示劑對能發酵

乳糖產生酸者有敏銳的顏色變化。本培養基對 Gram 陽性菌有很強的抑制作用，專供 Gram 陰性致病性腸內桿菌判別用。大腸桿菌和 *Enterobacter aerogenes* 呈現黑色或暗色中心之無色透明菌落，若僅為紫色金屬光澤則可能為大腸桿菌陽性。

8) 保存菌種用。

9) Gram 染色法：

- A. 取一白金耳之磷酸鹽緩衝液 (pH 7.0) 或生理食鹽水於乾潔之載玻片上。
- B. 取一白金耳之菌落，混合均勻塗抹 (Smear) 於載玻片上。
- C. 自然乾燥或加溫乾燥後，再通過火焰3~4次 (需離開火焰至不燙手之程度)。主要目的在於固定菌體。
- D. 以結晶紫染色 1 分鐘不水洗。
- E. 再以 Gram's 碘液媒染 1 分鐘。
- F. 以95%酒精脫色 (約10秒鐘)。
- G. 水洗之 (此時 Gram 陽性為紫色，Gram 陰性為無色)。
- H. 以番紅 (Safranin) 複染15秒並水洗之。
- I. 經對比染色後 Gram 陽性呈紫色，而 Gram 陰性呈紅色。

10) IMViC 檢查法：

A. Indole test:

a. 原理：有些細菌會分解色胺酸 (Tryptophan) 產生 Indole, 用乙醚抽取後加入發色劑即可測定之。

b. 方法：

(a) 接種一白金耳菌種於1% Tryptone broth (5ml/每支試管) (No. 6)，以 35°C 培養24小時。

(b) 加入 1 ml 乙醚振盪之。

(c) 加入 0.5ml 的 Kovac's 試劑振盪之

Kovac's 試劑	P-dimethyl benzaldehyde	5g
	Butyl alcohol	75ml
	Conc. HCl	25ml

(d) 若有 Indole 產生，則與 Kovac's 試劑在乙醚層呈現玫瑰紅色。

B. Methyl red test:

a. 原理：*Escherichia* 等屬細菌會分解葡萄糖形成酸，可以簡單指示劑測出之。

b. 方法：

(a) 接種一白金耳菌種於 MR-VP medium (5ml/每支試管) (No. 7) 於 35°C 培養 48~72小時。

(b) 加數滴 0.04% 甲基紅指示劑振盪之。

(c) 若呈紅色為陽性，黃色為陰性。

C. Voges-Proskauer test:

a. 原理：*Escherichia* 等屬細菌不能分解葡萄糖產生 Acetylmethyl carbinol (Acetoin)，此等物質與呈色劑反應即可測出。

b. 方法：

(a) 接種一白金耳菌種於 MR-VP medium (No. 7) (5ml/每支試管)，在 35°C 培養 48~72小時。

(b) 取 1ml 培養液，加入等量的 Leifson's 試劑振盪之。

Leifson's 試劑 { (1) 10ml 蒸餾水溶解 1g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 加 40ml Conc. NH_4OH 。
(2) 加 950ml 10% KOH Soln.

(c) 經20分鐘後觀察，若呈桃紅色為陽性。

* FDA 法：

(a) 取一白金耳菌種於 MR-VP medium，在 35°C 培養48小時。

(b) 取 0.7ml 培養液於點滴板 (Spot plate) 上，加0.2ml 之5% α -naphthal alcohol soln。

(c) 加 0.1ml 的 40% KOH soln. 及 數粒肌酸結晶 (Creatine crystal) 在 2 小時內呈桃紅色者為陽性。

D. Citrate test:

a. 原理：*Escherichia* 不能利用檸檬酸鈉做為唯一碳源而繁殖。

b. 方法：

(a) 接種一白金耳菌種於 Koser citrate medium (No. 8)，在 35°C 培養96小時。(注意：避免檸檬酸鈉以外之碳化合物污染，以免被 *Escherichia* 利用為碳源)

(b) 若呈混濁表示目的菌增殖判為陽性。

		Indole	MR	VP	Citrate
<i>Escherichia coli</i>	I	+	+	-	-
	II	-	+	-	-
<i>Escherichia freundii</i>	I	-	+	-	±*
	II	+	+	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	I	-	-	+	±*
	II	+	-	+	+

* 輕微 【註】美國正在試驗直接培養法，能在24小時內鑑定糞便大腸菌群。

第二節 沙門氏桿菌 (*Salmonella*)

沙門氏菌是一羣 Gram 陰性，不形成孢子之桿菌，經常存於脊椎動物之大小腸內，此等細菌具有周毛而運動，會分解含硫胺基酸如半胱胺酸 (Cystein) 而產生硫化氫，作用於葡萄糖、麥芽糖 (Maltose) 及甘露蜜糖 (Mannitose) 等糖類會產生酸，不發酵蔗糖及乳糖，不產生 Indole 以及能還原硝酸鹽成亞硝酸鹽。沙門氏桿菌症 (Salmonellosis) 為主要細菌性食物中毒之一，世界各地發生此症年有增加之趨勢。淡水養殖貝類，甲壳類及蛙、爬蟲類等經常含有本菌。由於本菌對人類具有病原性，能引起腸管疾病，故所有食品均不得含有之。

沙門氏桿菌檢查法

試料25g + Lactose broth¹⁾ 225ml (No. 9)

↓ 均質化

調整 pH 為 6.8

↓ 稀釋至適當稀釋倍數

↓ 各取 1ml 接種於

Selenite cystein broth²⁾ (No. 10)

Brilliant green tetrathionite broth³⁾ (No. 11)
 或 Tetrathionite broth³⁾ (No. 12)
 ↓ 於 35°C 培養24小時
 將呈混濁者劃線培養於
 Brilliant green agar⁴⁾ (B. G agar) (No. 13)
 Bismuth sulfite agar⁵⁾ (B. S agar) (No. 14)
 Salmonella-Shigella agar⁶⁾ (S. S agar) (No. 15)
 ↓ 於 35°C 培養24小時
 鈎取可疑菌落行斜面及高層穿刺培養於
 T. S. I agar⁷⁾ (No. 16)
 L. I agar⁸⁾ (No. 17)
 ↓ 於 35°C 培養24小時
 選取一種嫌疑最大的菌株，移至 T.S.I⁹⁾ 斜面上
 ↓ 於 35°C 培養24小時

(一)化學檢查：

尿素分解酵素¹⁰⁾ (Urease)：陰性
 離胺酸脫羧基酵素¹¹⁾ (Lysine decarboxylase)：陽性
 精胺酸二水解酵素¹²⁾ (Arginine dihydrolase)：陰性
 Dulcitol broth (No. 18)：陽性
 蔗糖¹³⁾：陰性，Indole：陰性，V-P：陰性。
 乳糖¹³⁾：陰性，甲基紅：陽性，

註釋：

- 1) 一般水分多之水產樣品可省略此一步驟，而將樣品直接加入 No. 10 及 No. 11 之培養基中。
- 2) 為分離沙門氏菌用之增菌培養基，主要特性在加入半胱胺酸使沙門氏菌增菌。
- 3) 為分離沙門氏菌之增菌及選擇性培養基，尤其是針對 *Salmonella typhosa*、*Salmonella paratyphoid* 等。
- 4) 為沙門氏菌之選擇培養基，其他細菌之繁殖幾乎均被抑制。典型沙門氏菌之菌落為稍帶粉紅色無光澤者。少數能醱酵乳糖之非目的菌會產生黃綠色菌落或帶有黃綠色圈。某些變形桿菌屬 (*Proteus*) 之菌種會在本培養基上產生紅色菌落。
- 5) 為沙門氏菌之選擇培養基，尤其是對 *Salmonella typhosa* 具最佳選擇性。可抑制 Gram 陽性菌和大腸菌羣，使沙門氏菌形成典型黑色菌落。
- 6) 對赤痢菌屬 (*Shigella*) 和沙門菌屬具有高度選擇性，且容易判別出醱酵乳糖與不醱酵乳糖者，並抑制大腸菌羣之繁殖。赤痢菌屬和沙門菌屬及其他不能醱酵乳糖者在本培養基形成透明或半透明之無光澤無色平滑菌落，少數能醱酵乳糖之非目的菌形成紅色菌落，大腸菌羣形成粉紅色或接近無色之中心粉紅菌落，有時好氣型 (*Aerogenes* type) 會形成大的白色或米黃色無光澤粘液狀菌落。某些赤痢菌和沙門氏菌在特殊狀況下，會形成黑色中心之菌落。
- 7) 為 Gram 陰性腸內病原菌之鑑定用培養基，TSI medium 判讀法如下表所示：

表 5~1 TSI 反應之判讀

反應	醱酵糖類	可能細菌
底部：黃色 斜部：黃色 底部：有氣體 不產生 H ₂ S	葡萄糖~酸及氣體	<i>Escherichia</i>
	乳糖、蔗糖~酸及氣體	<i>Proteus</i> 、 <i>Providencia</i> 、 <i>Klebsiella</i> 、 <i>Enterobacter</i> 、 <i>Escherichia freundii</i>
底部：黃色 斜部：紅色 底部：有氣體 產生 H ₂ S	葡萄糖~酸及氣體	<i>Salmonella</i>
	不醱酵乳糖及蔗糖	<i>Proteus</i> 、 <i>Arizona</i> (某些菌種)、 <i>Citrobacter</i> (某些菌種) <i>Edwardsiella</i>
底部：黃色 斜部：紅色 底部：無氣體 不產生 H ₂ S	葡萄糖~僅酸	<i>Salmonella</i> *
	不醱酵乳糖及蔗糖	<i>Shigella</i> 、 <i>Proteus</i> 、 <i>Providencia</i> 、 <i>Serratia</i>
底部：黃色 斜部：黃色 底部：有氣體 產生 H ₂ S	葡萄糖~酸及氣體	<i>Arizona</i>
	乳糖或蔗糖~酸及氣體	<i>Citrobacter</i>
底部：紅或橙色 斜部：紅色 不產生 H ₂ S	無	<i>Alcaligenes</i> ** <i>Pseudomonas</i> ** <i>Herella</i> **

* *Salmonella typhi* 產生少量的 H₂S，但鮮有氣體。

** 菌落極易與不分解乳糖的腸內桿菌科 (Enterobacteriaceae) 的某些菌屬混淆。

總之，本培養基不但表示細菌醱酵乳糖、蔗糖和葡萄糖產生酸及氣體之能力，同時也表示產生 H₂S 之能力。

8) 在 Lysine iron agar 中 *Salmonella* 和 *Arizona* 能迅速產生離胺酸脫羧基酵素並形成大量的 H₂S。通常與 TSI agar 並行做，以便與 *Shigella* 區別。若培養基呈紫色則為產生離胺酸脫羧基酵素產生鹼性之證。

9) 保存菌種用。

10) 尿素分解酵素試驗：

a. 原理：某些細菌會分泌尿素分解酵素，將尿素分解而產生氨變成鹼性，由 pH 之變化可測定之。

b. 試劑：

(a) Basal medium: 0.02% Casitone, 1.0% Yeast extract, 0.05% Dextrose, 0.02% K₂HPO₄, 0.03% NaCl, 調整 pH 為 7.4。

(b) 指示劑：加 100ml 水至下列各溶液

I. 0.2g Bromthymol blue 溶於 6.4ml 0.05N NaOH

II. 0.2g Cresol red 溶於 10.6ml 0.05N NaOH

III. 0.2g Thymol blue 溶於 8.6ml 0.05N NaOH

取 12.5ml (I)、4.0ml (II) 及 10.0 ml (III) 混合之

本指示劑依 pH 改變，顏色之變化相當敏銳，pH 7.4 時為綠色，pH 8.2 時為藍色，pH 9.0 時為紫色。

(c) 步驟：

取一滿滿白金耳之菌落 (新鮮者)，接種於 2ml 的 Basal medium 中，於 37°C

(二)血清型測定¹⁴⁾ (Serology typing)

14) Kauffman White 之抗原分析

先以菌體性抗原 (O-Antigen) 測定，區分為 A、B、C、D……等，再以鞭毛性抗原 (H-Antigen) 來檢查，測定是屬於 phase 1 的 a、b、c、d……或 phase 2 的 1、2、3、4……等的何種類型。

一般菌體性抗原的檢查大致如下：在乾淨的載玻片上，分別滴上一滴 Antiserum 及一滴比較 Serum (Rabbit serum)，各加一白金耳菌種，將載玻片左右傾斜，以使 Antiserum 與被試菌種混合均勻，若有正反應時會呈現粒狀凝集 (Particle agglutination)，陰性反應則沒有變化。

若有螢光顯微鏡，利用螢光抗體檢查沙門氏菌，當是一種快速且簡便之檢查法。其原理為用一種螢光染料 (Fluorescein isothiocyanate dye) 能跟 Antiserum 的 H 和 O 抗體結合 (Conjugate)，此種 Fluorescein-labelled antiserum 直接加到被試菌種的載玻片上，經 30 分鐘後水洗，乾燥後用紫外燈在螢光顯微鏡下檢查，若有正反應的 *Salmonella* 菌體存在，在黑暗的視野中即呈明亮黃綠色的桿狀，其他細菌則難以觀察出。此法可檢查不純的混合細菌，但是沙門氏菌之數量需在 $10^5/\text{ml}$ 以上才能檢查出來，由於有些其他細菌對螢光抗血清 (Fluorescein conjugated antisera) 仍然有反應，因此使用螢光抗血清檢查的 *Salmonella* 尚需做其他培養之鑑定試驗。

第三節 腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)

腸炎弧菌是一種 Gram 陰性的好鹽弧菌，廣存於海水中，貝類及魚類也經常存有本菌，世界各國最普遍及最常發生的水產食物細菌性中毒是由本菌所引起；在日本由本菌所引起之中毒事件，佔全部細菌性食物中毒的 50~70%，該國每年因本菌所引起之中毒達 10,000 件以上，一九七二年即有 13,000 件之多；美國因本菌所引起之中毒發現多係食用螃蟹、蝦與龍蝦等介類所引起，因此發生地點只發生於近海岸的沿海地區。本省亦極為普遍分佈有本菌，佔所採貝介類樣品的 18%，但中毒案件並不多，可能係調查不詳抑或病人因中毒不深而遭忽略。

一般人要攝取 $10^6 \sim 10^8$ 的腸炎弧菌才會引起食物中毒，當然依個人體質及健康狀況之不同而感染有難易之分，有些腸炎弧菌在血液培養基上繁殖時具有溶血作用 (Haemolysis)，稱為 Kanagawa 陽性 (Kanagawa positive or Kanagawa phenomenon)，不具溶血現象者稱為 Kanagawa 陰性。一般由本菌中毒之患者糞便中所分離出來的腸炎弧菌都為 Kanagawa 陽性，但是由致使中毒的水產食品中所分離出來的都是 Kanagawa 陰性，這個原因尚不清楚。據最近之研究發現 Kanagawa 陽性菌含有 Plasmid，而在陰性菌則未發現 Plasmid，故推測 Kanagawa 陽性菌與 Plasmid 有關。

腸炎弧菌之檢查法

1. 試料：取 50g 水產食品之試料於均質機之攪拌容器內。
 - (1) 魚類：採取表面筋肉、內臟或鰓。
 - (2) 貝類：整體 (殼除外)。
 - (3) 甲殼類：整體，可能的話取中心部位 (包括鰓和內臟)。
2. 加 450ml 3% NaCl 稀釋液 (No. 21)。
3. 以 8,000 rpm 攪拌 1 分鐘，此時為 1:10 之稀釋度。
4. 稀釋成 $\frac{1}{100}$ 、 $\frac{1}{1,000}$ 、 $\frac{1}{10,000}$ 或更高之稀釋倍數。
5. 自 $\frac{1}{10}$ 稀釋倍數者取 3 管 10ml 至每管含有 10ml 之 2 倍強度 (Double strength) 的 GSTB¹⁾ (

- No. 22) (此時每管含 1g 試料)。
6. 自 $\frac{1}{10}$ 、 $\frac{1}{100}$ 、 $\frac{1}{1,000}$ 和 $\frac{1}{10,000}$ 之稀釋倍數者取3管 1 ml 至 GSTB 管中。
 7. 將所有各試管在 35°C 培養一夜。
 8. 以直徑 3mm 大之白金耳自顯示繁殖之3個最大稀釋倍數者取一白金耳劃線培養於 TCBS²⁾ (No. 23) 洋菜平面上 (若懷疑沒有繁殖時，則自最初 3 個稀釋倍數鉤取菌種)。
 9. 於 35°C 培養18小時。
 10. 若出現腸炎弧菌之典型菌落，則鉤取 2 個以上可疑菌落移至
 - (1) TSI 洋菜斜面 (No. 16)
 - a. 劃線及穿刺培養。
 - b. 於 35°C 培養一夜。
 - c. 腸炎弧菌產生鹼性的斜面、底部酸性、不產生氣體及硫化氫 (這是典型 Shigella like 反應)。
 - (2) TSB³⁾ (3% NaCl) (No. 24) 和 TSA³⁾ (3% NaCl) (No. 25) 斜面。
 - a. 接種後於 35°C 培養一夜。
 - b. 由此斜面做 Gram 染色和顯微鏡檢查。
 - c. 腸炎弧菌為 Gram 陰性、具極毛之彎曲或直桿狀之多種形狀外觀。
 - (3) 運動性檢查
 - a. 接種至含 Motility test medium (No. 26) 之試管，穿刺至大約 5mm 的深度。
 - b. 於 35°C 培養24小時後，若沿穿刺線呈圓型擴散繁殖者為陽性。
 - c. 腸炎弧菌是具運動性的。
 - (4) Hugh-Leifson glucose broth (HLGB; No. 27)
 - a. 自 TSA 斜面上鉤取菌種穿刺於2支 HLGB medium 試管。
 - b. 一支試管覆蓋一層約 1吋厚殺菌過的石臘油 (Paraffin oil)，另一支不必覆蓋。
 - c. 於 35°C 培養2天，必要時可延長。
 - d. 若各試管之顏色由藍變黃，表示能發酵碳水化合物。
 - e. 若未覆蓋石臘油那支試管顏色變黃，但覆蓋之試管沒改變，表示它氧化碳水化合物 (亦即好氣型)。
 - f. 腸炎弧菌能發酵葡萄糖，但不產生氣體。
 - (5) 細胞色素氧化酵素測定 (Cytochrome oxidase test)
 - a. 自 TSA 斜面上取一白金耳之菌種，再接再種於 TSA 斜面上。
 - b. 於 35°C 培養24小時。
 - c. 加2~3滴 α -naphthol 溶液 (No. 28)，使流遍整個斜面。
 - d. 再加2~3滴 phenylene diamine 溶液 (No. 29)。
 - e. 於 2 分鐘內產生暗藍色者為陽性。
 - f. 腸炎弧菌為細胞色素氧化酵素陽性。
 - (6) 精胺酸二水解酵素測定 (見本章第2節註釋)：陰性。
 - (7) 離胺酸脫羧基酵素測定 (見本章第2節註釋)：陽性。
 - (8) 營養明膠 (Nutrient gelatin) (Gelatin hydrolysis)。
 - a. 自 TSA 洋菜斜面上取一白金耳之菌種，接種於 Nutrient Gelatin (No. 30)。
 - b. 於 35°C 培養1~7天。

- c. 冷却至 20°C 供蛋白質水解之測定，若培養基尚未固化，gelatin 會呈液狀樣，讓它繼續充分繁殖再觀察之。
 - d. 腸炎弧菌會使 Gelatin 迅速液化。
- (9) Salt trypticase broth (STB)；好鹽現象 (halophilism)
- a. 自 TSA 洋菜斜面上，接種4管各含 0、6、8、10% NaCl 之 STB base (No. 31)。
 - b. 於 35°C 培養24小時。
 - c. 腸炎弧菌可以在6及8% NaCl 中繁殖，但不能在0和10% NaCl中繁殖，若為混濁即判為陽性。
- (10) 繁殖於42°C。
- a. 自 TSB 取培養24小時內之新鮮菌種一白金耳，接種於 STB 試管。
 - b. 於水浴中以 42°C 培養4小時。
 - c. 若旺量的繁殖時則為陽性。
 - d. 腸炎弧菌在本測定為陽性。
- (11) MR-VP medium (Voges-Proskauer test；見本章第一節)，腸炎弧菌為陰性。
- (12) Indole test (tryptone broth) (見本章第一節)，腸炎弧菌為陽性。
- (13) 碳水化合物發酵測定 (Cellobiose, Sucrose, Maltose, Mannitol 和 Trehalose)。
- a. 自 TSA 洋菜斜面各取一白金耳，分別接種於纖維雙糖 (Cellobiose)、蔗糖、麥芽糖、甘露糖醇 (Mannitol)、海藻糖 (Trehalose) 等各培養液 (No. 31) 中。
 - b. 於 35°C 培養4~5天。
 - c. 若培養液之顏色由紫變黃表示有酸性產生。
 - d. 腸炎弧菌在24小時內發酵纖維雙糖產酸，不發酵蔗糖，但發酵麥芽糖、甘露糖醇和海藻糖。
- (14) 其他：如 Kanagawa phenomenon 測定等。

註 釋：

- 1) Glucose salt teepol broth (GSTB) 中的 teepol 現因美國 Shell Chemical company 已不再生產，可用 neodol 代替之。因腸炎弧菌好鹽故加 3% NaCl，又 teepol 可以抑制其他雜菌之生長，為選擇性培養基。且因對 Glucose 有發酵能力，故在本培養基可成為優勢菌種。
- 2) Thiosulfate-Citrate-Biles salt-sucrose agar (TCBS) 對腸炎弧菌具高度選擇性，故本法做為判別培養基。*Vibrio cholerae* (*V. comma*) 會在18~24小時內形成黃色菌落。*Vibrio parahaemolyticus* 形成藍色至帶綠色之中心，*V. alginolyticus* 為大的黃色菌落且發酵蔗糖，某些大腸菌、變形桿菌、腸球菌 (Enterococci) 也許會繁殖，但其菌落均小且呈透明狀。然而會發酵蔗糖的變形桿菌之菌種產生黃色菌落，假單胞菌屬 (*Pseudomonas*) 和產氣單胞菌屬 (*Aeromonas*) 則形成藍色菌落。所含膽汁鹽可抑制孢子形成菌及糞便鏈球菌之繁殖。

第四節 金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)

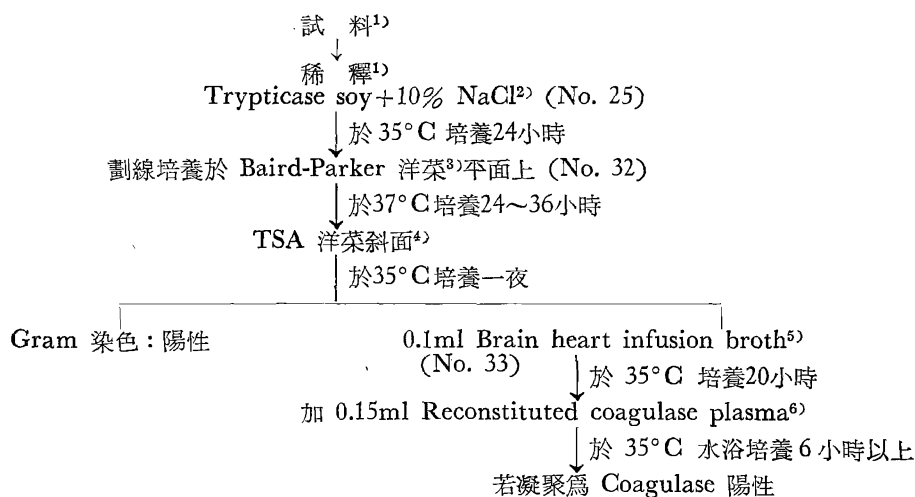
葡萄狀球菌 (*Staphylococcus*) 是好氣性、通性嫌氣性、Gram 陽性不產生孢子、不具鞭毛的一羣小球菌。菌體經常呈單個、一對、數個聯成一體以及呈葡萄狀，這類細菌種類很多。其中以好鹽性的金黃色葡萄球菌，對食品的衛生關係最大，因其容易被加熱處理及一般消毒劑 (Sanitary agents) 所殺滅，所以本菌或其所分泌的腸毒素 (Enterotoxin) 之存在，可作為一般食品是否受二次污染或製造操作與貯藏上不妥當之證明，所以本菌被列入食品衛生有關細菌之主要檢查項目之一。本菌能引起嚴重之食物中毒，其腸毒素比菌體耐熱，即使菌體被殺死有時仍會引起中毒現象，有 A、B、C、

D及E等血清型。據報告這種腸毒素主要是由噬菌型III及IV所產生的；此外本菌會分泌血液凝固酵素 (Coagulase) 會使宿主之血液凝固，故血液凝固酵素之有無亦為鑑別本菌之主要依據。

金黃色葡萄球菌之檢查法

一、MPN 法：

適用於含本菌在 $<100/g$ 的食品



二、直接計數法 (Direct plate count)：

適用於含本菌 $>100/g$ 的食品。

1. 吸取 0.1~0.3ml 之適當稀釋倍數試料液，塗佈培養於 Baird-Parker 洋菜平面上，待表面乾後倒置恒溫箱，於 35°C 培養 48 小時。
2. 選擇並計算可疑菌落，若有不同類型之菌落，則分開計算各可疑類型之數目。
3. 選出不同類型之菌落各 1 個作 Coagulase test (如上述)。
4. 其他測定：Gram 染色 (陽性)，觸媒酵素 (Catalase；陽性)，葡萄糖與甘露糖醇 (Mannitol) 發酵能力之測定 (前者為陽性，後者為陰性)。

註 釋：

- 1) a. 若試料為凍結者，在原容器或採樣器具內於 2~5°C 解凍 ≤ 18 小時，若試料易於粉碎則可免解凍。
 - b. 取 $50 \pm 0.1g$ 之代表性試料。
 - c. 加 450ml 磷酸鹽緩衝液，攪拌數秒鐘 (8,000~10,000 rpm)，再以較高之速率攪拌 2 分鐘，此時為 $\frac{1}{10}$ 之稀釋度。
 - d. 繼續稀釋成 $\frac{1}{100}$ 、 $\frac{1}{1,000}$ 、 $\frac{1}{10,000}$ 或更高之稀釋倍數。
- 2) 為好鹽細菌之增菌培養基，在 10% 之食鹽濃度中腸炎弧菌無法繁殖，故得抑制之。
 - 3) 為 Coagulase 陽性的金黃色葡萄球菌之選擇及鑑別培養基，典型菌落為 2~5mm，正圓呈灰色或黑色，邊緣常呈淡色 (Off-white) 或帶有外圈 (Clear zone)。Coagulase 陰性菌在本培養基會被抑制，有時候像 *Micrococci* 會出現呈棕色至黑色之菌落，酵母則呈白色，*Bacillus* 呈棕色菌落但均不帶淡色之外圈。

- 4) 保存菌種用。(Trypticase soy agar, No. 25)
- 5) 廣用於各種微生物之培養液，包括 *Streptococci*, *Pneumococci* 等病原菌。
- 6) 爲兔血漿 (Rabbit plasma) 加 0.15% EDTA 和約 0.85% NaCl 所組成，需貯於 -20°C $\sim +8^{\circ}\text{C}$ ，打開後若貯於 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 須於 72 小時內使用。

第五節 腸 球 菌 (*Enterococci*)

腸球菌是一羣 Gram 陽性、觸媒酵素陰性，呈長短不定鏈狀的鏈球菌屬 (*Streptococcus*)，此菌亦指 Lancefield 的血清型 D 羣的鏈球菌。一般本菌包括 *Streptococcus faecalis*, *Strep. faecium*, *Strep. bovis*, *Strep. equinus* 和 *Strep. avium*。食品中若有本菌即認爲受糞便污染，本菌能在 6.5% NaCl 存在下及 pH 9.5 下繁殖，在 60°C 下能耐 30 分鐘，對低溫冷凍有相當抵抗力，存在並分佈於人類及動物的腸道中。

腸 球 菌 之 檢 查 法

一、MPN 法：適用於含本菌量少之食品

1. 由各種不同稀釋倍數之稀釋液，各取 1ml 於各 3 支試管組中 [內含 10ml 之 KF Streptococcal broth¹⁾ (No. 34) 或 Azide dextrose broth²⁾ (No. 35)]
2. 於 35°C 培養 48 小時。
3. 若 35°C KF Streptococcal broth 呈明亮黃色爲陽性，Azide dextrose broth 呈混濁亦爲陽性。
4. 計算 MPN

二、直接計數法：適用於含本菌量多之食品

1. 自適當稀釋倍數之稀釋液，取 1ml 於二重皿中。
2. 倒入 15ml 左右之 KF Streptococcal agar³⁾ (No. 36)。
3. 搖動均勻。
4. 待培養基凝固後，倒置於恒溫箱以 35°C 培養 48 小時。
5. 腸球菌呈暗紅色菌落或菌落中心呈紅色乃至粉紅色。
6. 計數之。

註 釋：

- 1) 一般用在 *Streptococci* 的選擇及鑑別，呈黃色表示產酸。
- 2) 呈混濁表示可能爲 *Streptococci* 或 Gram 陽性桿菌，本培養液爲增菌用。
- 3) 紅色或粉紅色菌落才可計數，橙色、黃色、白色或其他顏色之菌落均不可計數。能在 KF 培養基繁殖之 *Streptococci* 計有 *S. mitis*, *S. salivarius* 和 *S. faecalis*，而 *S. cremoris*, *S. lactis*, *S. pyogenes* 和 *S. uberis* 則未被發現繁殖於本培養基，*Pediococcus cerevisiae* 和 *L. plantarum* 則稍能繁殖，但不呈紅色或粉紅色。

第六節 梭 菌 屬 (*Clostridium*)

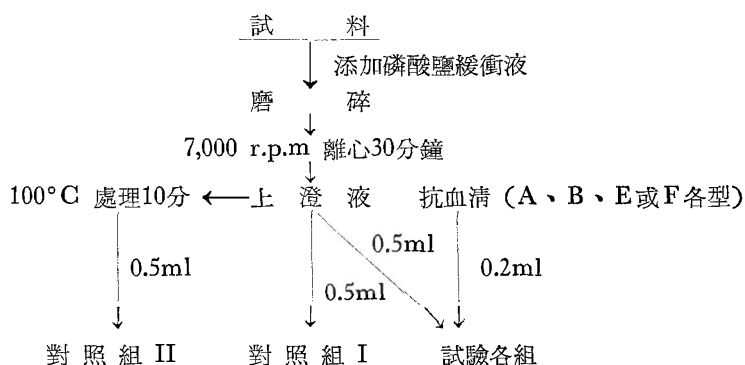
梭菌屬中與衛生有關者以肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*) 及產氣荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 最爲重要。肉毒梭菌爲嫌氣性產芽胞菌，能產生致神經中毒之神經毒素 (Neurotoxin)，此類中毒之機會不大，但是死亡率却很高，是細菌性食物中毒死亡率最高者，其毒性甚強，一公克

的純肉毒梭菌可殺死五億人之衆。

美國自一八九九年至一九七二年共有 672 次此種中毒事件發生，計有 1,731 案件，而死亡者竟達 963 人（148 件 A 型，39 件 B 型，19 件 E 型和 1 件 F 型）。

肉毒毒素型之鑑定係依據被測定之毒素完全被同型之抗毒素中和，但不被異型抗毒素所中和，其測定方法如下：

將試料磨碎加入少量的抽出液（0.1M pH 6.2 之磷酸鹽緩衝液，並加入 0.2% 的 Gelatin），充分攪拌離心（7,000 rpm 30 分）後，取上澄液以小白鼠（mouse）做毒性試驗，每組配以小白鼠 2 隻以上。A、B、E 或 F 各型抗血清各以 0.2ml 做腹腔注射，經抗血清注射的各組及 1 對照組各以 0.5ml 的樣品抽出液施以腹腔注射（對照組 I），另設 1 對照組以經 100°C 加熱處理 10 分鐘的樣品抽出液 0.5ml 施以同法注射（對照組 II）。



動物注射後經 4 日的觀察，若發現對照組 I 及經抗血清保護的其中幾組有麻痺症狀，尤其是呼吸困難而死，同時對照組 II 生存，則可斷定試料中有肉毒毒素的存在。至於毒素型的判別是由經某型抗血清保護的試驗組來判定，例如經 A 型抗血清保護的試驗組生存，而 B、E、F 型抗血清保護的各組皆死亡，則可判定試料中的毒素為 A 型。食品尤其是腐敗食品的抽出液如不經稀釋（通常稀釋 5~10 倍）就施以打針的話，雖然沒有毒素存在也常可使動物致死。但如果試料是病患的血清，就不必稀釋可直接以 0.25ml 注射。又 E 型的毒素通常是以毒素的前驅體（Precursor）的形態產生，毒性很弱所以在打針前得添加 Trypsin 使其活性化，即在 pH 6.2 時添加 Trypsin 的粗製品 1.0%（如 1:250 activity 的 Difco trypsin），在 37°C 保溫 30~60 分鐘後才施以打針。至於檢定病患血清中的毒素，因攝取後在消化管內已被活性化不必再經 Trypsin 的處理。

此外也有嘗試利用簡便的凝集試驗（Agglutination test）法檢驗毒素，但感度差（需要毒素的濃度高），且 A、B、F 型毒素分子之無毒成分有共同的抗原性，因此型別之判定非常困難。

由於本菌尚未有高效率的選擇培養基，欲從食品或土壤試料中分離出比較困難。通常是將試料接種於 Cooked meat medium (No. 37) 後，經 80°C 處理 30 分鐘以淘汰一部份非耐熱性的無孢子微生物再行培養。但如此對耐熱性弱的 E 型菌孢子也會被淘汰掉，所以 E 型菌之分離通常採用 60°C 處理 30~60 分鐘。經適當條件培養後才以培養液做動物毒性試驗，再以抗血清做動物試驗以判別菌型。

第七節 黴菌與酵母 (Molds and Yeasts)

黴菌與酵母屬於真核細胞類，此二類微生物均與細菌之生長環境略有不同，一般喜好以醣類為主之植物性養料及在低水分、低 pH（酸性）較易繁殖，而一般細菌則以蛋白質為主之動物性養料、高水分及較高 pH（中性或微鹼性）較易繁殖。

黴類是主要腐敗微生物，也是水果、蔬菜及澱粉食品的主要變敗微生物，其分佈很廣，一般植物

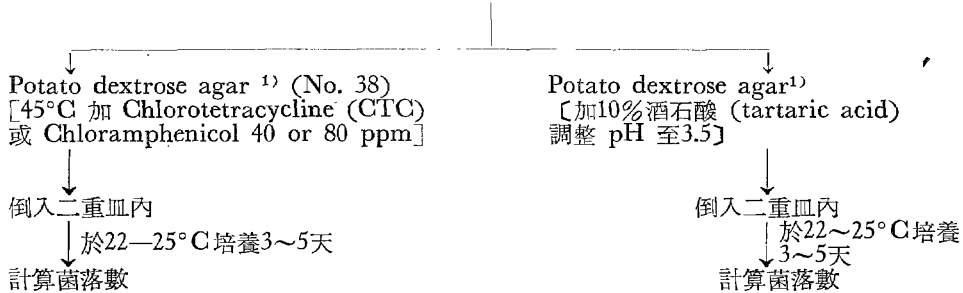
、土壤及水中均含有；繁殖比一般細菌慢，因此多數食品在未長出黴類之前即已被各種細菌大量繁殖而告腐敗，終至將此食品丟棄，反之，黴類繁殖的食品大多數是一般細菌不易繁殖者。

除腐敗作用外，有些黴類能引起人類的食物中毒與產生疾病，例如 *Aspergillus flavus* 是黃麴毒素 (Aflatoxin; Mycotoxin 的一種) 的主要生產者，有些黴菌也會引起魚介類之疾病，常見且普遍的黴菌有 *Aspergillus*、*Mucor*、*Rhizopus*、*Penicillium*、*Morilia*、*Alternaria*、*Cladosporium*、*Oospora* 和 *Fusarium* 等。

酵母之分佈類似黴菌，除一般植物（主要為葉子之表面、水果、穀類）及土壤外，水中及水產物亦含有之，一般新鮮水也往往有酵母之出現，自然界中最常見的酵母有 *Saccharomyces*、*Candida*、*Cryptococcus*、*Rhodotorula*、*Trichosporon* 等。

檢 查 方 法

稀 釋 試 料



註 釋：

1) 黴和酵母鑑別用培養基，由於加酸或抗生素，其他微生物不易繁殖。

第六章 魚艙粘液之細菌群落 (Bacterial flora of fish pen slime)

魚介類於漁獲後與碎冰混合貯藏於魚艙時，由於漁場距漁港十分遙遠，需要相當時間的航程，因此粘液逐漸累積，尤其是不用箱裝之統艙冰藏 (Bulking) 來貯藏漁獲物時，此種粘液之形成更加嚴重，如果冰塊沒有融解，粘液不被融解的冰水流失時，在漁獲物卸下後，魚艙底部常累積一層相當厚的魚艙粘液 (fish pen slime)，在以往一般人及漁民均認為此等粘液係來自魚體表皮。一般魚類在活的時候，其表皮上之粘液 (mucous)，被認為有防止細菌侵染之作用，但此種累積在魚艙中是粘液或者是一種粘液細菌呢？頗值商榷！本章就本人在美國波士頓漁港，由鱈魚 (Haddock) 漁船採樣所做的結果，簡單討論如下：

第一節 魚艙粘液的細菌數與種類 (Bacterial count and species of fish pen slime)

首先由五隻船次，在不同時間內採取 5 批粘液樣品，第 4 及第 5 次採樣時，在同一魚艙內，同時採取三處不同地點（即船艙的前部、後部及中部）的樣品，此等粘液用三種不同培養基，在 20°C 培養後，結果如表 6—1 所示：每 g 的粘液含有總菌數在 $1.4 \times 10^9 \sim 2.5 \times 10^{10}$ 之間（因培養基之不同而稍有差異）所有粘液樣品都比一般魚類腐敗時所含有的細菌數還高，達 100~1,000 倍之鉅，因此推斷這種粘液並非魚體在活的時候所分泌於體表粘液的化學物質，經進一步分離培養，發現了粘液中含有一類莢膜 (Capsule) 極厚的典型粘液細菌（如圖 6—1 及 6—2），這些證明了船艙的粘液，大致是由細菌尤其是粘液細胞所形成。

粘液中的細菌經鑑定後，各種細菌佔總菌數的百分率列於表 6—2，這些細菌中以 *Moraxella* 含量最高，*Flavobacterium* 居次，再次為 *Pseudomonas*，在 *Pseudomonas* 屬中以 *Pseudomonas* group IV, fluorescent pseudomonads 及 *Pseudomonas putrefaciens* 居多。典型粘液細菌經鑑定為 *Corynebacterium*，此類粘液細菌，雖然所佔百分比不高，但因每個細胞的莢膜特別的厚，所以其所佔的空間也是相當可觀的。

表 6~1 魚艙粘液之好氣及通性嫌氣性細菌數

Vessel no.	Bacterial count per gram of fish pen slime					
	Nutrient Agar Total count	Peptone Iron Agar		Pseudomonas Agar F		
		Total count	<i>P. putrefaciens</i>	Total count	Flavobacteria	Fluorescent pseudomonads
1	1.7×10^{10}	$*2.5 \times 10^{10}$	7.5×10^7	1.8×10^{10}	6.7×10^9	1.5×10^9
2	$*1.4 \times 10^9$	$**1.3 \times 10^9$	—	1.1×10^9	—	8.0×10^7
3	7.6×10^9	$*1.2 \times 10^{10}$	5.3×10^8	9.4×10^9	—	5.0×10^8
4A	2.6×10^9	5.4×10^9	2.1×10^8	$*6.1 \times 10^9$	2.1×10^9	1.5×10^8
4B	1.5×10^9	1.3×10^9	4.5×10^7	$*8.4 \times 10^9$	5.1×10^9	3.5×10^8
4C	3.6×10^9	4.5×10^9	8.0×10^7	$*6.8 \times 10^9$	2.6×10^9	1.5×10^8
5A	—	2.9×10^9	8.0×10^7	$*7.4 \times 10^9$	1.1×10^9	1.5×10^8
5B	—	1.7×10^9	1.2×10^8	$*4.5 \times 10^9$	6.5×10^8	5.0×10^7
5C	1.1×10^9	2.4×10^9	1.1×10^8	$*7.0 \times 10^9$	9.0×10^8	2.0×10^8

* Indicates value taken as total count of sample

** Number which were counted on Trypticase Soy Agar plates

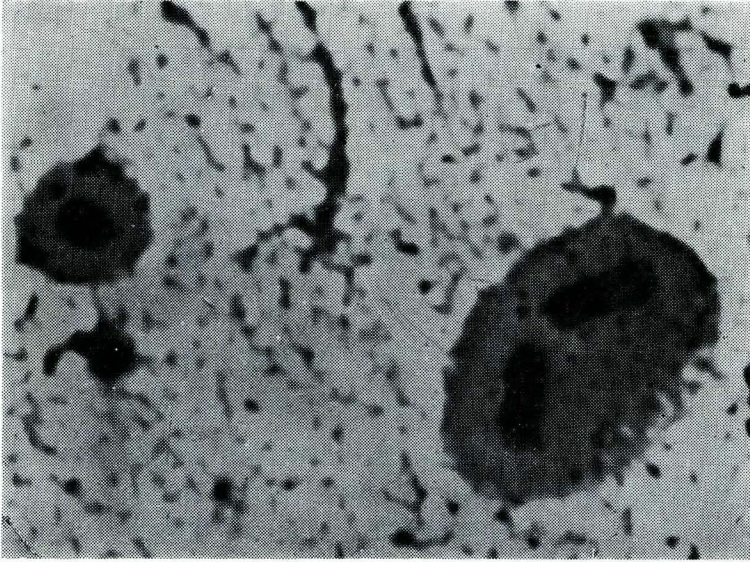


圖 6~1 粘液細菌之莢膜

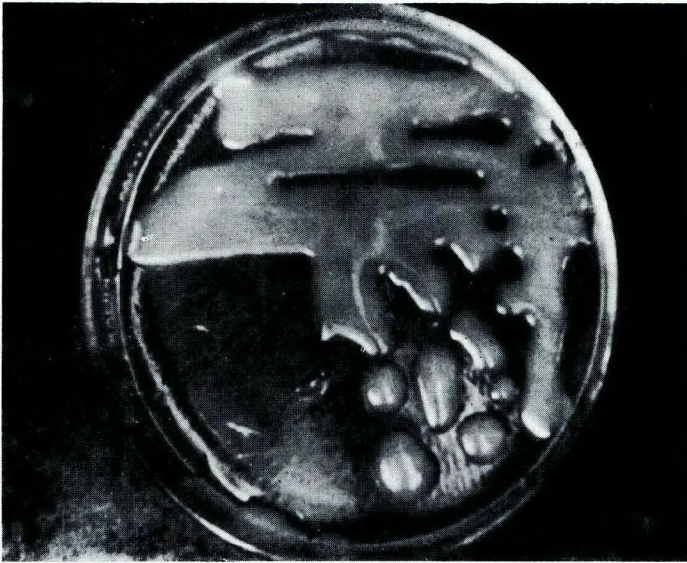


圖 6~2 粘液細菌之菌落

表 6~2 魚艙粘液中細菌種類之組成 (%)

Vessel no.	Mora-xella	Acineto-bacter	Flavo-bact.	Pseudomonads						Heavily mucoid bacteria
				Total Pseuds.	Fluor. pseuds.	<i>P. Put.</i>	Pseud. group II exc. <i>P. put.</i>	Pseud. group III	Pseud. group IV	
1	60.19	<1.00	26.80	12.97	6.00	0.30	< 1.00	<1.00	6.67	0.04
4A	44.09	<1.00	34.40	20.69	2.50	3.50	< 1.00	<1.00	14.69	0.82
4B	32.38	<1.00	59.50	7.52	0.04	0.54	< 1.00	<1.00	6.94	0.60
4C	37.47	3.75	38.20	18.38	2.20	1.20	5.99	<1.00	8.99	2.20
5A	64.43	4.30	14.86	16.00	2.03	1.08	12.89	<1.00	<1.00	0.41
5B	49.44	<1.00	14.44	35.24	1.11	2.66	26.98	4.49	<1.00	0.88
5C	32.23	21.48	12.86	31.29	2.86	1.57	26.86	<1.00	<1.00	2.14

a <1.00 indicates organisms were not encountered

第二節 魚艙粘液中細菌的細胞形態

(Cell morphology of fish pen slime bacteria)

假單胞菌屬 (*Pseudomonas*) 為正常之桿菌，有時候呈長鏈（尤其是 *Pseudomonas putrefaciens*），*Pseudomonas fluorescens* 含有端毛 (polar flagella) 生長在菌體的一端，且有許多支鞭毛形成束毛（圖6—3），*Pseud. putrefaciens* 則為單毛，且每支單毛都生長菌體頂端（圖6—4），這是鑑定上最重要的因子，有些 *Pseudomonas* 含有很長的單毛，如圖6—5。

Moraxella-Acinetobacter 是短桿菌 (Coccobacilli)，沒有鞭毛，大多呈單體，少數呈鏈狀，衰老者有些腫脹而呈稀鬆的膨大細胞 (pleomorphic cell) 如圖6—6所示。

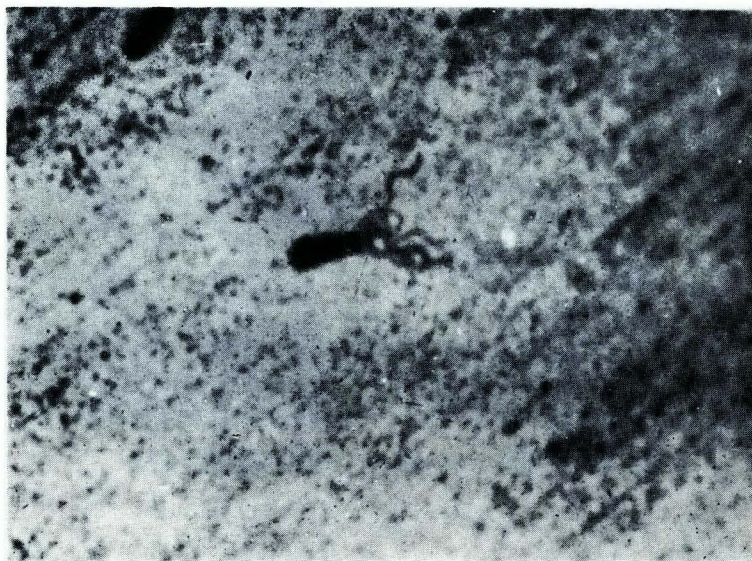


圖 6~3 *Pseudomonas fluorescens* 的鞭毛

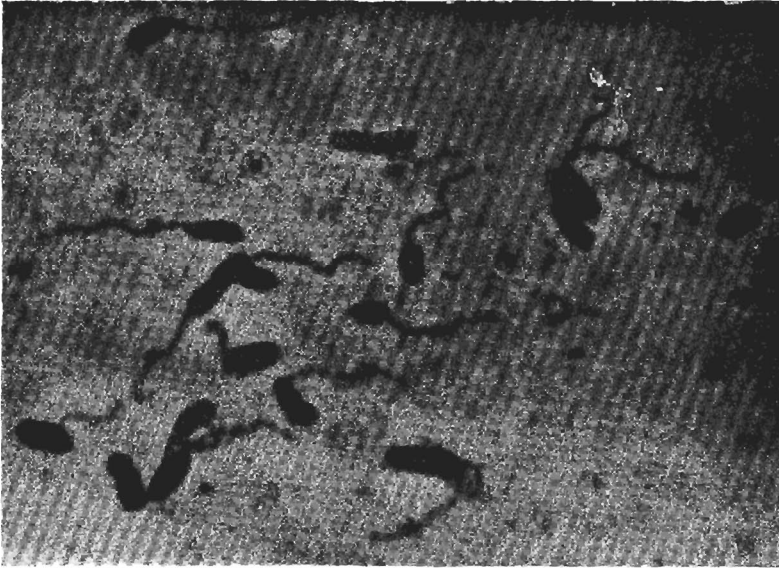


圖 6~4 *Pseu. putrefaciens* 的鞭毛

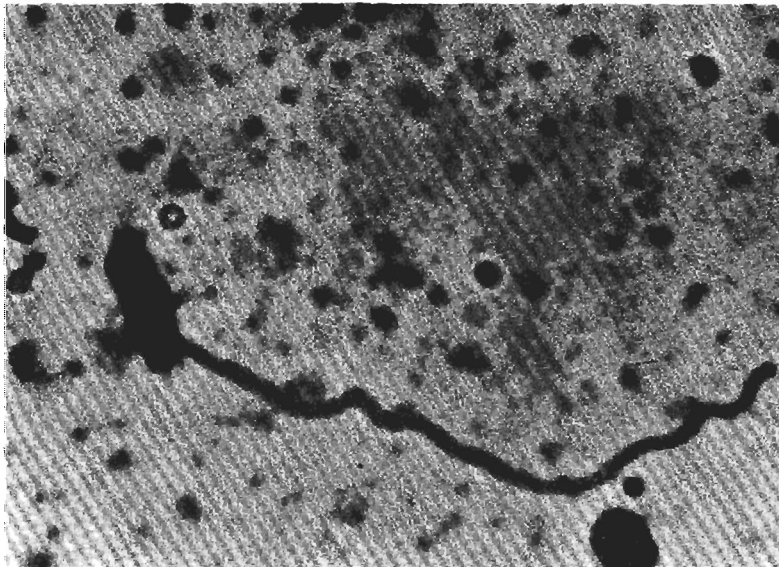


圖 6~5 *Pseudomonas* 屬中的長鞭毛細菌

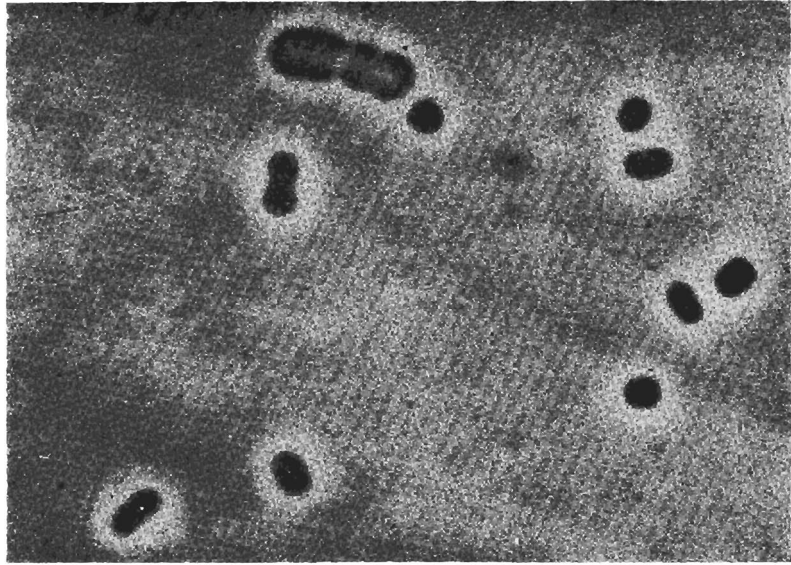


圖 6~6 *Moraxella* 的細胞

Flavobacterium 則稍呈不定型的桿菌，但也有形狀較為均勻者，沒有鞭毛，多數細胞呈桿形，而兩端為圓形，有些細菌呈卵形、長桿形或瓜形，菌落顏色為黃色或金黃色（圖6—7）。

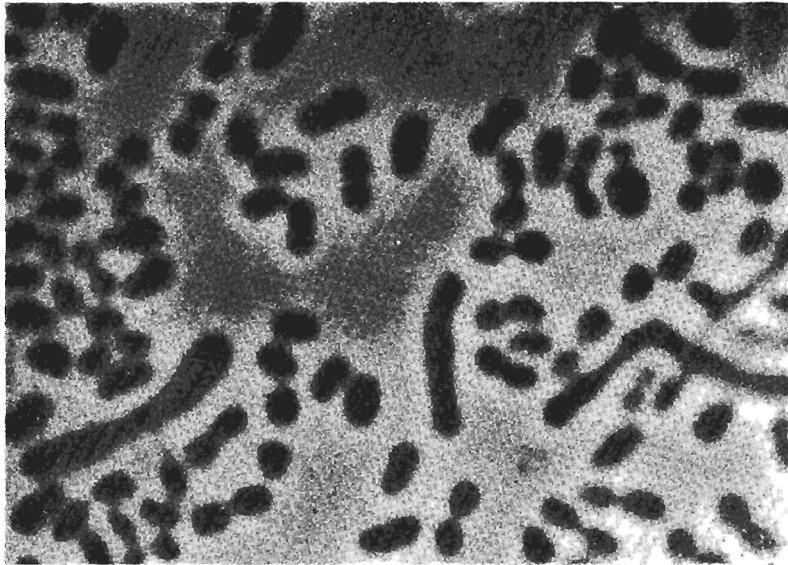


圖 6~7 *Flavobacterium* 的細胞

第三節 魚脛粘液細菌的酵素 (Enzymes of fish pen slime bacteria)

細菌所分泌酵素，不但是研究腐敗細菌所必需測定的項目，同時也是鑑定細菌方面的主要因子之一，一般粘液上所分離細菌之各種酵素列於表6—3。

表 6~3 魚 鱸 粘 液 中 細 菌 所 分 泌 的 各 種 酵 素¹⁾

Culture ²⁾	Cytochrome oxidase	Catalase	Gelatinase	DNase	RNase	Amylase	Nitrate Reductase	Lipase		Urease	**
								Tributyrin	Olive Oil		
<i>P. fluorescens</i> (12)	+	+	-[+]	-	-	-	###	+	+	+	2
Fluorescent pseudomonad (1)	+	+	-	-	-	-	-	+	±	+	
<i>P. Putrefaciens</i> (3)	+	+	##[+]	+	##	-	##	±	-	+	1
<i>P. Putrefaciens</i> (12)	+	±[+]	##	+	##	-	##	+	-	##[+]	4
<i>Moroxella</i> (1)	+	+	-	+	-	-	##	+	-	+	
<i>Moroxella</i> (8)	+	+	-	-	-	-	##[+]	+	-[+]	##	1
<i>Flavobacterium</i> (2)	-	+	-	##	+	-	##	+	-	±	
<i>Flavobacterium</i> (2)	+	+	-[+]	-[+]	##[+]	-	##[+]	±[+]	-	±[-]	1
Pseudomonad IV (1)	+	+	-	-	-	-	±	+	-	±	
Heavily mucoid <i>Corynebacterium</i> (6)	-	+	-	-[+]	-[+]	-	-[+]	+	-	##	2
Heavily mucoid <i>pseudomonad</i> (3)	+	+	-	-	-	-	-	±[+]	±[+]	+	1

¹ - : negative activity; ±, +, ##, ### and ###: positive activity in ascending order from weakly positive to very strong positive

² Number in parenthesis indicates the number of isolates tested.

** Indicates the number of cultures which exhibited the results shown in [].

細胞色素氧化酵素 (Cytochrome oxidase) 是細胞色素 a 與 a₃ 的總稱，這類黃色素是電子傳送 (electron transport) 系中最後能利用氧氣或其他物質做為最後氫離子的受體，也是好氣性及通性嫌氣性菌中電子傳送以獲取能源的重要酵素。一般好氣性菌能利用還原氣體當成氫離子的受體而變成水，如果通性嫌氣性菌在無氧氣下，則能利用化合物中的氧 (例如 NaNO₃) 當氫離子的受體，以獲取能源。

測定 Cytochrome oxidase 有個簡單的方法，即將濾紙浸潤於 1% 的 tetramethyl-p-phenylene diamine (需於使用前調配，新調配者為無色，配完 1 小時後即慢慢變成藍色此時即不能使用)，由斜面上鉤取菌種一白金耳量，點在浸潤過上述試劑的濾紙上，若整點菌體變藍則為 Cytochrome oxidase 陽性，不變色 (白色或稍帶黃色) 即為陰性，大多數的粘液中之細菌 (除某些 flavobacteria 及典型粘液菌 *corynebacterium* 外) 都為 Cytochrome oxidase 陽性。

Catalase (觸媒酵素) 能將 3% 的 H₂O₂ 還原成 H₂，因此將菌體浸入 H₂O₂ 中觀察是否有旺盛的氣泡冒出，即可測知是否含 catalase，所有自魚鱸粘液所分離出的細菌都為 catalase 陽性。

細菌能否分解高分子化合物 (如核酸、蛋白質及脂肪等)，亦即細菌是否有致魚介類腐敗的能力之測定，同時也是鑑定細菌種類的主要因子之一，此等酵素活性之測定已在第四章討論過不另贅述。魚鱸粘液中的細菌只有 *Pseud. putrefaciens* 及少數的 *Flavobacterium* 對明膠有分解能力，而大多數菌種則沒有分解能力；所有 *Pseud. putrefaciens* 都會分泌核酸分解酵素 (RNase 及 DNase)，大多數 *Flavobacterium* 也會分泌此類酵素，9 種 *Moraxella* 中只有一種能分解 DNA；所有測定的細菌都沒有分解澱粉的能力，同時也都有各種不同程度的尿素分解力。大多數細菌能分解較低級脂肪酸所組成的脂肪，除 *Pseud. fluorescens* 及少數的 *Moraxella* 與 *Pseudomonas* 外其餘都不能分解複雜及大分子所組成的脂肪。除少數的 *Corynebacterium* 及 3 種典型粘液生成之 *Pseudomonas* 菌外，其餘皆有強烈的硝酸還原能力。

三甲胺 (Trimethylamine) 是水產物臭味之主要成分也是魚類鮮度測定揮發性鹽基態氮成分之一，所有 15 種測定之 *Pseud. putrefaciens*、其他一些 *Moraxella* 及一種 *Pseudomonas* 與 *Flavobacterium* 有產生三甲胺之能力，這些細菌能還原氧化三甲胺成三甲胺 (表 6—4)，表 6—4 同時指示這些細菌中只有 *Pseud. putrefaciens* 才有生成 H₂S 的能力，少數魚鱸粘液中之細菌也有還原酒精生成醋酸的能力。

表 6~4 魚鱸粘液中細菌生成三甲胺、硫化氫及醋酸之能力

Cultures ¹	TMA (mg TMA-N/100 ml of Broth)	H ₂ S	HAc	**
Fluorescent pseudomonad (13)	0	—	—	
<i>P. putrefaciens</i> (15)	6-13	++ to +++	-[+]	6
<i>Moroxella</i> (6)	0	—	-[±]	1
<i>Moroxella</i> (3)	1- 6	—	—	
<i>Flavobacterium</i> (3)	0	—	-[+]	1
<i>Flavobacterium</i> (1)	3	—	+	
Pseudomonad IV (1)	11	—	-[±]	1
Heavily mucoid <i>corynebacterium</i> (6)	0	—	-[±]	1
Heavily mucoid pseudomonad (3)	0	—	±	

¹ Number in parenthesis indicates the number of isolates tested

** Indicates the number of cultures which exhibited the results shown in [].

前章已提過，細菌能否產生 H₂S 是判斷其能否引起魚肉腐敗之一因素，魚鱸粘液中 *Pseud. putrefaciens* 是唯一具有強烈的 H₂S 生成力的一屬，一般 *Pseudomonas* 及某些 flavobacteria 能

生產微量醋酸。絕大多數魚鱗細菌都有尿素分解能力。

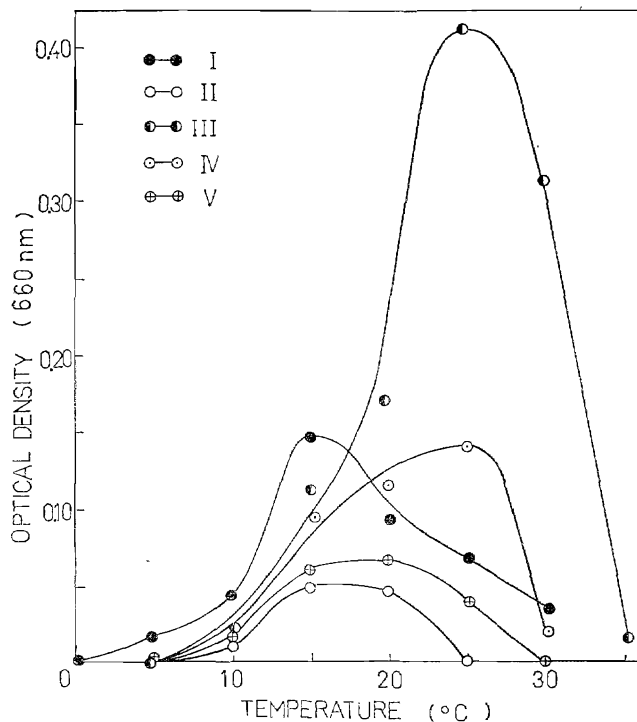
以上所測定各種能使食品腐敗的酵素之結果，證明 *Pseud. putrefaciens* 是主要的腐敗細菌，因其能分泌各種不同引起腐敗的酵素，其次為 *Pseud. fluorescens* 及少數的 *Flavobacterium* 與 *Moraxellas* 此等也有某程度之腐敗作用。

第四節 生長溫度與耐鹽性

(Cardinal growth temperature and salt tolerance)

(一) 生長溫度

多數魚鱗粘液細菌為好冷細菌，最適生長溫度為 15 或 20°C，典型的粘液細菌之最適生長溫度較高，為 25°C。15 株的 *Pseud. putrefaciens* 菌種的最適生長溫度為 15°C，最低生長溫度為 -5°C，最高為 30°C。多數的 *Moraxella* 生長溫度範圍為 15°C 到 30°C。有三種粘液菌 *Pseudomonas* 之最低生長溫度低到 -9°C，作此低溫之培養時，為防止培養基之結冰，可將 Nutrient Broth 加入 3% NaCl 及 8% glycerol；由此可證明魚鱗細菌多為好冷性及通性好冷性之細菌，此等細菌在 5°C 時均可繁殖，圖 6—8 表示一些這類細菌在各種不同溫度下之生長曲線。



- I. *Moraxella* M-1, M-2, M-3, M-4, M-6, M-7, M-8, and M-9.
- II. *Moraxella* M-5.
- III. Heavily mucoid *Corynebacterium* C-2, C-3, C-5 C-6
- IV. Heavily mucoid *Corynebacterium* C-1
- V. Heavily mucoid *Corynebacterium* C-4

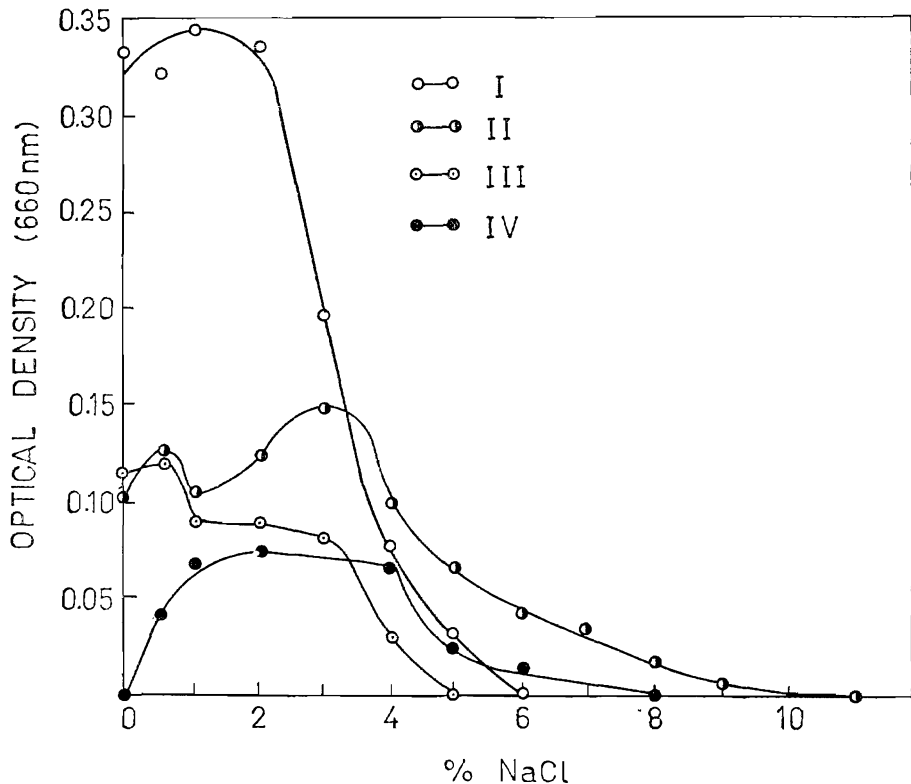
圖 6~8 魚鱗粘液中 *Moraxella* 及典型粘液中 *Corynebacterium* 在各種不同溫度下之生長能力

(二)耐鹽性：

魚鱗粘液之細菌多為耐鹽或好鹽細菌，一般最適濃度之食鹽濃度為 2.5 到 3%，這正好接近海水鹽分之濃度。大多數此類細菌能耐5—7%之食鹽，有半數以上之 *Moraxella* 能耐10—11%的食鹽（表6—5）。此等細菌之耐鹽能力表示於表6—5，圖6—9說明某些這類細菌在各種不同食鹽濃度下之生

表 6~5 魚鱗粘液中細菌之耐鹽能力

Culture ¹⁾	Salt Tolerance (% NaCl)
Fluorescent pseudomonad (13)	6-7
<i>P. putrefaciens</i> (15)	5-7
<i>Moraxella</i> (9)	5-11
<i>Flavobacterium</i> (4)	3-5
Heavily mucoid <i>Corynebacterium</i> (2)	3
Heavily mucoid <i>Corynebacterium</i> (2)	7
Heavily mucoid pseudomonad (3)	7



- I. *P. fluorescens* Pf-1 to Pf-12.
- II. *Moraxella* M-1, M-3, M-6, M-7; and M-8.
- III. *Moraxella* M-1
- IV. *Moraxella* M-5.

圖 6—9 魚鱗粘液中 *Moraxella* 及 *Pseud. fluorescens* 在不同食鹽濃度下之生長能力

長曲線。由此曲線說明絕大多數的魚脰粘液的細菌為耐鹽細菌，即鹽份之有無對其生長不發生太大影響。而 *Moraxella* M-5 是絕對需要食鹽，沒有食鹽即不能生長。許多冰藏用之冰塊係用海水製造而成，因此可見其所含的鹽分對細菌並不發生抑制作用，而只能降低冰塊之冰點而已。

第五節 對醣類之作用以及對抗生素之敏感性 (Reaction on carbohydrates and sensitivity to antibiotics)

(一)對菌類之作用

利用 Hugh and Leifson 培養基來測定細菌對各種不同醣類之作用情形是細菌鑑定上不可欠缺的一項試驗。每種細菌接種於兩支試管之同種醣類，一支覆蓋礦物油及石蠟的混合物以保持嫌氣狀態，另一支不覆蓋礦物油石蠟保持有氧氣狀態。培養後如果被測細菌為發酵該醣類，則不論嫌氣或好氣兩試管均變黃色，如果該細菌為氧化作用該醣類，則只有好氣狀態之試管變黃色，嫌氣試管不變。Hugh and Leifson 含醣培養基不但能測定細菌能否分解醣類生成酸，(即培養基 pH 降低而變黃色)同時因只含 0.3% 洋菜，其培養基很軟呈半流動，因此可測細菌有否運動性，若有運動性則培養基變色時即整支變成同一個顏色。若沒有運動性，則變色時只限於劃線接種之處。對醣類沒有分解的細菌如果對蛋白質分解力強則產生胺類，致使培養基呈鹼性，所得菌種在嫌氣狀態下均不能改變培養基之 pH 值。同時也可測出是否有氣體發生(有小氣泡)。表6—6說明了各種不同的菌種在氧氣下對各種醣類之作用情形。

在各種不同菌種中，fluorescent, pseudomonads 對各種不同之醣類作用力最強，此等螢光菌 pseudomonads 能分解所有的單醣類，對雙醣類以上之醣類的作用即漸漸減少(表6—6)。*Pseud. putrefaciens* 則對多數醣類不起分解，同時因培養基中含有氮化合物(蛋白質等)之分解而呈鹼性。絕大多數的 *Moraxella* 對28種醣類(有些醣類未列入表內)均不起作用而呈鹼性。*Corynebacterium* 則對大多數的醣沒有作用，因此培養基的 pH 沒有改變。所有魚脰粘液被測定之菌株都沒有發酵或產生氣體的能力(即對所含各種醣類的嫌氣性試管都不能變黃色，也不能產生氣體)。

(二)對抗生素之反應

抗生素對細菌有殺傷能力，曾被用於新鮮水產及其他食品之保存，現仍為醫療上使用之主要醫治殺菌劑。抗生素對細菌之殺菌原理有幾類：(1)防止細胞壁之形成，例如 penicillin, ampicillin, bacitracin 及 vancomycin 等。(2)破壞細胞膜，例如 polymyxin, colistin 及 gramicidin 等。(3)與 ribosome 結合而破壞蛋白質之合成，例如 chloramphenicol, erythromycin, lincomycin, streptomycin, neomycin 及 kanamycin 等。(4)與 RNase 結合而阻礙 RNA 之合成，例如 rifampicin 與 rifampicin。(5)破壞 DNA 之合成與複製，例如 nalidixic acid, mitomycin 及 actinomycin D 等。

細菌對抗生素之反應，可做為鑑定其種類之一因素。雖然抗生素對魚介類之保鮮，大多數國家現已不使用，然其對細菌生理與化學性質之研究以及鑑定方面之功用，仍是大家研究之主題。如表6—7所列，“+”表示生長(即細菌對抗生素有抵抗能力)，“-”表示不生長(即對該抗生素敏感而被殺死)，每種抗生素後面()內之數字，即為該種抗生素測定所使用之濃度，單位為 μg (即每 disk 所含 μg 之數量)。例如 ampicillin 所使用之單位為 $10\mu\text{g}/\text{disk}$, chlorotetracycline 則為 $5\mu\text{g}/\text{disk}$, bacitracin 則為 $10\text{ units}/\text{disk}$ ，菌種後面()之數字則為被測之菌株數量。

如表6—7所示，魚脰粘液細菌中一般 *Pseudomonas* 對28種測定的抗生素(有三種抗生素因其殺菌作用能力不大，沒列入表內)，呈現較有抵抗能力，尤其 *Pseud. fluorescens* 及粘液 *Pseudomonas*

表 6~6 魚膽粘液中細菌對各種不同醣類之作用

Culture ¹⁾	Glucose	Fructose	Galactose	Mannose	Rhamnose	Arabinose	Ribose	Xylose	Lactose	Maltose	Sucrose	Raffinose	Glycogen	Inulin	Dextrin	Starch	Glycerol	Sorbitol	Mannitol	Adonitol	Inositol	Salicin	
<i>P. fluorescens</i> (12)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fluorescent pseudomonad (1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. putrefaciens</i> (5)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. putrefaciens</i> (4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. putrefaciens</i> (6)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Moroxella</i> (5)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Moroxella</i> (4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Flaobacterium</i> (2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Flaobacterium</i> (2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Corynebacterium</i> (2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Corynebacterium</i> (4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mucoid pseudomonad (3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

¹⁾ Number in parenthesis indicates the number of isolates tested.

+ Indicates acid reaction; - indicates basic reaction; ± indicates neutral reaction

表 6—7 魚槍粘液中各種細菌對各種抗生素之反應

Organisms	Ampicillin (10)	Chlorotetracycline (5)	Bactracin (10 U)	Chloromycetin (5)	Colimycin (10)	Erythromycin (15)	Furacin (100)	Furazone (100)	Furoxone (100)	Gantrcin (2 mg)	Kanamycin (5)	Nalidixic acid (5)	Mandelamine (3 mg)	Neomycin (5)	Novobiocin (5)	Oleandomycin (15)	Penicillin (10 U)	Phenethicillin (2)	Polymyxin B (50 U)	Streptomycin (10)	Sonilyn (250)	Dihydrostreptomycin (10)	Terramycin (3)	Tetracycline (5)	Vancomycin (5)	
<i>P. fluorescens</i> (12)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. putrefaciens</i> (7)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. putrefaciens</i> (8)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Moraxella</i> (9)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Flavobacterium</i> (2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Flavobacterium</i> (2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> IV (1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Corynebacterium</i> (2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Corynebacterium</i> (4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mucoid pseudomonad (3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

對這些抗生素比其他細菌有抵抗能力。*Pseud. putrefaciens* 是 *Pseudomonas* 一屬中對各種抗生素較有反應之一種細菌。*Moraxella* 是這類粘液細菌中對抗生素最敏感之一屬細菌。所有 9 種測驗過的 *Moraxella* 均對所用 28 種抗生素有極強的敏感性而被殺滅。*Flavobacterium* 與 *Corynebacterium* 則對此等抗生素因種類之不同而有不同的反應。

以抗生素種類來說，Chlorotetracycline, mandelanime 及 streptomycin 是最有效之抗生素，50 種測定過的細菌中全部被此等藥物所殺死。erythromycin 次之，除 12 種 *Pseud. flourescens* 外其餘均被殺死。除 *P. flourescens* 及粘液 *Pseudomonas* 外均被 ampicillin 殺死。其他抗生素例如 tetracycline, terramycin, dihydrostreptomycin, neomycin, kanamycin 也是具有相當大的作用。

作用不太強的抗生素（即某些種類的細菌會被殺死，有些不會）常用來做為鑑定細菌種類之用。例如 2.5 I.U 的 penicillin（表內所列者為 10 I.U）可殺死 *Moraxella*，但不能殺死 *Acinetobacters*，因此 2.5 I. U 的 penicillin 即被用於分辨性質極類似的 *Moraxellas* 與 *Acinetobacters* 兩類細菌，又如 penicillin, vancomycin, novobiocin 及 madribon（沒列入表內）對 *Moraxella* 有很強的殺死能力，但對 *Pseudomonas* 則沒作用，此四種抗生素也可作為鑑別 *Moraxellas* 與 *Pseudomonas* 兩屬細菌之用。（*Achromobacter* 以前曾被廣用，但因其包括許多性質不同的細菌種類，同時其中有許多種類後來被檢定為別屬，所謂 *Achromobacter* 標準菌株也沒有存在，是否有 *Achromobacter* 這屬細菌，當令人懷疑，因此 *Achromobacter* 一屬已不被採用，許多原來的 *Achromobacter*，現已被認定應屬於 *Moraxella* 或 *Acinetobacter*）。

第六節 DNA 鹽基之組成成份 (DNA base composition)

DNA 中鹽基成份亦即鳥糞嘌呤 (guanine) 與胞嘧啶 (cytosine) 的高低 (GC%) 是判斷細菌種類之一大因子（參考第九章細菌之鑑定）。尤其許多細菌之生理化學性質非常相近之細菌羣 GC% 成為其主要鑑別分類之因素。上節提過 *Achromobacter* 曾被廣用，此類是主要之水產細菌，而一向使用 *Achromobacter* 屬名，但是為要證明水產細菌中類似此類的細菌並非 *Achromobacter*，而是 *Moraxella* 或 *Acinetobacter*，則 DNA 鹽基組成成為主要之決定因子。

魚艙粘液中平均總菌數約有 50% 的細菌是屬於 *Moraxella*。這些細菌之許多生理化學性質與 *Achromobacter* 很類似，但測定 DNA base 成份時，則有明顯的差異。表 6—8 是比較 Collection) 魚艙粘液細菌中的 *Moraxellas*，魚肉分離的 *Moraxellas* 與一些 ATCC (American Type Culture 標準菌株的 DNA 鹽基中 G.C 含量。

由表所示，所有水產物 *Moraxella*（包括由魚艙粘液及鱈肉片所分離者）其 GC 含量都在 47.2 至 49.4% 之間，與 ATCC *Moraxella* 的菌株含量相似。但是與 ATCC *Achromobacter* 的 GC 含量却完全不同，不是高於 *Moraxella* 的 GC 含量就是低於其含量。這證明水產方面分離的 *Moraxella* 與 *Achromobacter* 完全不同一屬，同時 *Achromobacter* 顯然不是一個屬 (genus)，因其同屬中不同種間的 GC 含量差異相當大，這就是為何 *Achromobacter* 被取銷不能成為一屬名原因之一。魚艙中的典型粘液細菌鑑定為 *Corynebacterium*，其 GC 含量為 64.3 到 68.2%，這數字符合標準的 *Corynebacterium*。

總之，魚艙粘液中的細菌係由各種不同細菌所組成。其生菌數每公克含有 1.4×10^9 至 2.5×10^{10} 之高。其中主要之細菌為 *Moraxella* (32—68%)，*Flavobacteria* (13—59%)，fluorescent pseudomonads (1—6%)，*Pseud. putrifaciens* (0.5—3%)，group IV *Pseudomonas* (<1—14.7%) 及 group III pseudomonads (<1—27%)，典型粘液細菌為 0.04 至 6.6%，這類細菌為 *Corynebacterium* 及某些 pseudomonads。魚艙粘液之細菌有各種不同之腐敗能力，尤其 *Pseud. putrefa-*

ciens 與 fluorescent pseudomonads。爲要改進魚艙之衛生以及減低漁獲物之腐敗，每當漁獲物卸獲物卸下後，魚艙一定要澈底洗滌乾淨，可使用消毒劑沖洗後，最後宜用自來水清洗之（最後的清洗不能使用漁港的海水，因其含有相當高的各種不同之細菌），木質魚艙宜用不銹鋼片或鋁金片把艙底鋪蓋，以改進魚艙之衛生及便利清洗工作。

表 6~8 水產 *Moraxellas*, *Corynebacteria* 與 *Achromobacters* 的 DNA 鹽基成分之比較

Culture	Source	G+C%
<i>Moraxella</i> M-1	Fish pen slime	48.3
<i>Moraxella</i> M-2	Fish pen slime	47.7
<i>Moraxella</i> M-3	Fish pen slime	49.4
<i>Moraxella</i> M-4	Fish pen slime	48.6
<i>Moraxella</i> M-5	Fisp pen slime	47.4
<i>Moraxella</i> M-6	Fish pen slime	47.6
<i>Moraxella</i> M-7	Fish pen slime	47.7
<i>Moraxella</i> M-8	Fish pen slime	47.5
<i>Moraxella</i> F-13	Haddock fillet	47.2
<i>Moraxella</i> F-58	Haddock fillet	47.3
<i>Maraxella</i> F-59	Haddock fillet	48.0
<i>Moraxella livoffii</i> var <i>Brevis</i> 17968	ATCC	47.5
<i>Moraxella glucidolytica liquefaciens</i> 17979	ATCC	46.1
<i>Achromobacter mucosus</i>	Staatliche Bakteriologische Germang ATCC	43.4
<i>Achromobacter lipolyticum</i> 11367	ATCC	57.9
<i>Achromobacter superficialis</i>	Bacteriology Dept., U mass	61.1
<i>Corynebacterium</i> C-1	Fish pen slime	64.3
<i>Corynebacterium</i> C-2	Fish pen slime	65.7
<i>Corynebacterium</i> C-3	Fish pen slime	65.0
<i>Corynebacterium</i> C-4	Fish pen slime	64.7
<i>Corynebacterium</i> C-5	Fish pen slime	68.2
<i>Corynebacterium</i> C-6	Fish pen slime	66.5

第七章 有關水產細菌之噬菌體、蛋白質性 抗生素及輔基因 (Bacteriophages, bacteriocins and plasmids associated with fishery bacteria)

第一節 水產細菌與噬菌體 (Bacteriophage and fishery bacteria)

噬菌體是一種寄生在細菌的病毒 (Virus)，它的體型極小，能通過細菌過濾器 (例如 Millipore membrane filter)，須以電子顯微鏡才能觀察出之超顯微鏡微生物，噬菌體與病毒之主要不同點係前者以細菌為宿主，後者則以動植物細胞為宿主。

如前述病毒與噬菌體同為超顯微鏡的個體，而水中能引起魚病以及對吾人健康有威脅的病毒很多，例如鮭魚的胰壞疽 (Pancreatic necrosis) 能引起鮭魚的嚴重疾病，其他如呼吸道及腸道之濾過性病毒 (Reovirus) 及腺病毒 (Adenovirus) 等均屬之，牡蠣也含有腸道濾過性病毒。感染性肝炎 (Infectious hepatitis) 是水質污染的一個嚴重問題，各國對此均相當重視，養鴨池塘及禽類養殖場附近的水域可能為較嚴重之污染源，受污染的水會屢次發生肝炎之蔓延，但因不易檢查故難以求證。

兩枚貝 (Bivalve molluscs) 依其採用過濾飼養 (Filter feeding) 攝取餌料，而累積為數不少的病毒 (Virus)，以 Poliovirus 為例，若吾人將 3% 的粘質懸浮液 (Mucous suspension) 加入相等容量但含不同數量之 Poliovirus 時，在 5°C 下放置 75 分鐘，其粘液中就含有 60% 以上的 Poliovirus，易言之水中所含之 Poliovirus 有 60% 被粘液所吸附，其情況之嚴重可想而知。

噬菌體可分為：

一、Temperate bacteriophage：

噬菌體寄生在細菌細胞時，將其 DNA 基因注入細胞後，不干擾細胞之染色體，對細菌本身沒有影響，此種噬菌體寄生在細胞時，吾人甚難檢出，一般必需以紫外光、化學藥劑及其他方法誘發 (Induce) 後，使噬菌體游離出來才能測出。

二、Virulent bacteriophage：

此種噬菌體進入細胞後，控制細胞染色體之 DNA 並利用之，此際細胞即受噬菌體所主宰，待噬菌體在細胞內成熟後 (每個細菌可形成數十至四個噬菌體)，細胞即解離 (Lysis) 而噬菌體也隨而游離出來，若是用液體培養基培養時，本來混濁的菌液即呈透明。

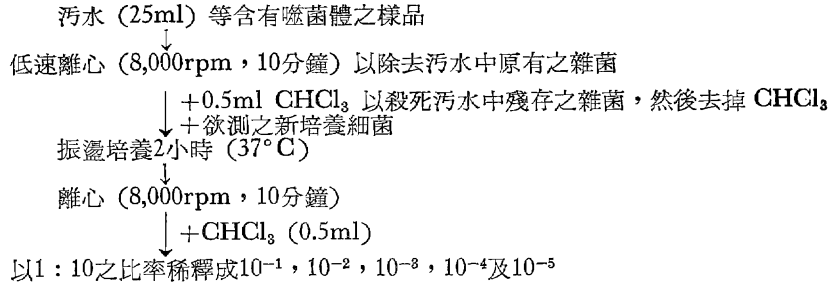
水中因含許多噬菌體，因此與水產細菌本身及我們的衛生、健康上關係甚大，例如海水中含 Coliphage T₄ 時，若螃蟹在此海水中生長，於捕獲後加以蒸煮，發現此螃蟹肉含有 2.5~20% 殘存的 Coliphage T₄，因此若在污染的水域捕撈螃蟹，就有可能傳染此等有關之噬菌體。

貝介類靠其過濾大量的海水以攝取必要之養料，因此貝介類能累積相當多的噬菌體及病毒 (能達貝介類乾重的 1/3)。

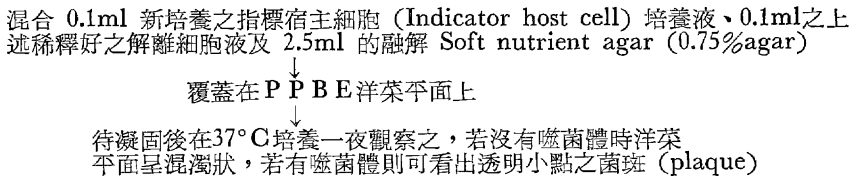
有些水產細菌的噬菌體只能在低溫繁殖，例如有些 *Pseudomonas putrefaciens* 的噬菌體只能在 2°C 時感染細菌，但不能在 20°C 感染 (雖然宿主細胞可在 27°C 生長)。

噬菌體可用來攻擊、控制腐敗細菌，以防止魚介類腐敗細菌的生長，延長魚介類保藏期間，例如吾人若將所有能攻擊魚介類腐敗細菌之各種噬菌體加入冰塊中，以此噬菌體冰來保藏漁獲物，但由於有許多抗噬菌體細菌 (Phage resistant bacteria) 之出現，致使吾人目前尚難收到預期之結果。

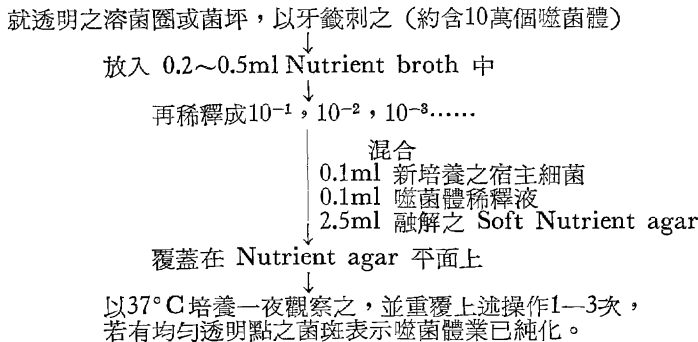
噬菌體的分離方法 (以大腸菌之噬菌體為例)



噬菌體的檢測法



噬菌體的純化



第二節 蛋白質性抗生素 (Bacteriocins)

Bacteriocin 是由細菌所分泌出來的一類蛋白質性抗生素 (Proteinous antibiotics), 能殺死類似或同類菌種, 但對不相關之不同屬 (Genus) 的細菌通常不發生作用, 例如: Colicins 只能對 *E. Coli* 有關之細菌有殺傷能力。

有的細菌會對 Bacteriocin 產生抵抗力 (Resistance), 但此種抵抗力卻不會像對抗生素之抵抗力那樣會傳給其他細菌, 亦即對 Bacteriocin 具有抵抗力之細胞, 並非像抵抗抗生素細菌之由 R-factor 所引起的。

Colicin 是由 *E. Coli* 所產生的一種具有高度專一性的 Bacteriocin, 會對腸道細菌產生殺傷作用, 可能有助於成人腸道菌叢之穩定與平衡。當 Bacteriocin 產生細菌在分泌 Bacteriocin 後, 把其他指標細菌殺死時, 在洋菜平面上的 Bacteriocin 產生細菌之聚落周圍形成透明圓圈。

Colicin 對大腸菌之殺菌原理主要係防止高分子有機物之合成, 例如 Colicin A 能抑制 DNA 與 RNA 之合成, Colicins E_1 , E_3 , K 與 L 等則能抑制 DNA, RNA 與蛋白質之形成。

表7~1 Colicins 殺死細菌之作用機構

Colicin 之 種 類	A	E ₁	E ₂	E ₃	K	L
抑制 DNA 之 合成	+	+	+	+	+	+
抑制 RNA 之 合成	+	+	-	+	+	+
抑制蛋白質之 合成	-	+	-	+	+	+

Bacteriocin 殺死細菌時需要受體 (Receptor)，若無受體則不會作用，故必需同類或類似之細菌，組成分或構造相近，才有相近之受體，此為 Colicin 之殺菌有其高度專一性之理由。細菌若含有 Colicin 之受體，但不会被 Colicin 所殺死時稱為耐性細胞 (Tolerant cells)，耐性細胞有各種不同型之耐性變異株 (Tolerant mutant)，此耐性變異株在研究藥物殺死細菌之機構及細菌之外膜構造所含的高分子化合物上之貢獻甚大。

第三節 輔基因與額外基因體 (Plasmids and Episomes)

輔基因是一種細胞核以外的有遺傳性之核物質 (Genetic element)，此類核物質存在於原生質內，有些與細菌染色體連成一體，有些與細菌細胞核完全分開而各自複製遺傳基因。額外基因體是輔基因中的一類，此類輔基因靠接合生殖作用 (Conjugation) 與導變作用 (transduction)，能由一個細胞傳遞到另一個細胞。輔基因中比較重要而較明瞭的有：(1)合成 Bacteriocin 的輔基因。(2) R (Resistance transfer) factor (抵制藥物之傳送因子) 與(3)合成毒素之輔基因。

R-factor 類似 F-factor，跟傳遞性因子一樣作用，能傳遞抵制抗生素的決定因子，抵制抗生素的決定因子能在腸內細菌的各屬中由一種細菌傳遞到另一種細菌，使一種本來對抗生素有敏感性的細菌能抵制相當濃度的抗生素，這類 R-factor 能使細菌對磺胺 (Sulfonamides) 或四環素 (Tetracycline)、鏈黴素 (Streptomycin) 及氯黴素 (Chloramphenicol) 等抗生素失去敏感性，而能抵抗這些藥品。有些 *Staphylococcus* 含有 Penicillinase 輔基因，此 Penicillinase 能分解 Penicillin 而使 Penicillin 對細菌無作用。R-factor 又被發現帶有其他基因，能抵抗重金屬離子的抑制作用及乳酸發酵與 H₂S 的形成。

R-factor 將會在醫學治療方面產生嚴重的問題，因含有 R-factor 抵抗抗生素的細菌之蔓延，而使許多常用的抗生素失去效力，目前由於抗生素大量的被使用，造成自然界中帶有 R-factor 細菌之比例增加，這種現象對水中細菌以及環境衛生有關細菌之影響相當嚴重，因其蔓延之廣濶，細菌之 R-factor 之傳遞所形成對藥物的抵抗力不但威脅了魚介類本身的健康問題，並間接威脅到人類的健康與衛生，因此抗生素的應用，尤其對重病者之大量使用不得不慎重考慮，否則後果甚堪憂慮。

今日我們在發展水產養殖業，對於魚病之使用抗生素，不得不特別警惕。如果大量使用此等藥劑，也許在短時間內救活了少數養殖魚類，但若因而使對藥物具抵抗力之細菌大量蔓延，最後我們整個環境都會滿佈了這類細菌，其後患之嚴重，當難以預計的。

第八章 細菌的遺傳學和及突變 (Bacterial genetics and mutations)

第一節 細菌之突變 (Bacterial mutation)

細菌遺傳之特性係由 DNA 的遺傳基因所控制，通常 DNA 的構造甚為穩定，但若在繁殖的過程中，其遺傳基因的 DNA 其核苷酸的性質、數量或秩序發生變動，則會失去原有的特性或獲得新的特性，這就是所謂的突變 (Mutation)。突變依發生的條件可分為：

(一)自然突變 (Spontaneous mutation)：

即在正常狀態下所發生的突變，亦即突變原因不明者，其突變率較低約為 10^{-7} 。

(二)誘發突變 (Induced mutation)：

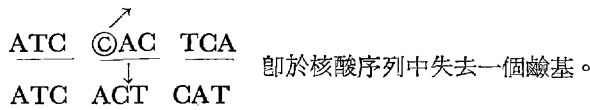
有些突變可經由人為因素而加速其突變。例如用熱、紫外線照射， x -射線， γ -射線等破壞 DNA 構造的物理誘導劑。另外利用化學物質，如有些核酸中鹼基的類似物來取代鹼基的位置，破壞原有 DNA 之構造，造成 DNA 基因無法傳遞或改變基因的性質，這類較常用的化學物質有 5-bromouracil (BU)、Ethylmethane Sulfonate (EMS)、芥子氣 (Nitrogen mustard) 和 Nitrosoguanidine (NTG) 其中以 EMS 及 NTG 較普遍被採用。此種由物理或化學誘發劑所造成的差異性很大，對細菌之致死率可達 90% 以上，剩餘未被殺死之細菌，其突變率可達很高，但因其突變種類很多，並無一定之規則。

細菌突變的應用很廣，不但是理論細菌學上之主要研究項目，也是應用細菌學上之主要研究對象。例如釀酵微生物之應用上，可利用突變分離出釀酵力很强的微生物，在水產微生物方面，我們也可利用突變來研究魚介類腐敗細菌的生理性質與腐敗之關係，進而追求防止腐敗的方法。

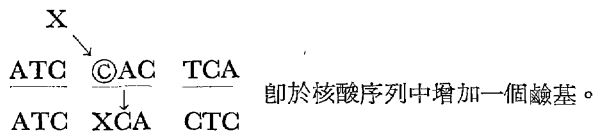
菌株之突變法，最有效且效果最佳者推人工的誘發突變，突變率依變異之性質而異，通常所使用的突變劑，使菌株死滅率在 90% 以上時突變率最高。

一般而言，突變係因 DNA 之改變，而 ATC.....之突變有如下數種：

(一)失缺：(Deletion)：



(二)增添 (Addition)：



上述(一)(二)二項均可能有 reverse (只要產生突變之因素除去即可恢復正常)。

(三)失缺與增添 (Deletion + Addition)：

失去了一個鹼基，而又增加了一個鹼基。

(四)失去一大段之核苷酸：

核酸序列中遺失了一大段的鹼基造成骨架移動 (Frame shift) 而不能回復原狀。

第二節 DNA 的分離 (Isolation of DNA)

細菌 DNA 的分離有各種不同的抽出方法，所抽出純度的高低，也因實驗目的不同所採取不同之純化操作。Marmur 氏 DNA 分離法最爲一般所採用，其步驟爲：

(一)細胞壁之解離 (Lysis)：

將自離心機採收後之細菌細胞懸浮於食鹽EDTA溶液中，加入洗滌劑(Deterget) Sodium dodecyl sulfate (S.D.S) (必要時可預先以溶菌酵素處理)，然後在 60°C 保溫10分鐘，此時原呈混濁的細菌液，則因細胞壁被溶解而呈透明，同時由於 DNA 的流出，使整個溶液呈現膠粘狀態，若原來的細菌懸浮液過濃時，則在加入 SDS 後，整個細菌液即呈膠狀固體，如果濃度太稀薄，則會導致DNA的收率太低，因此宜調整適當的細菌濃度。

(二)蛋白質之除去 (Deproteinization)：

蛋白質與 DNA 絞纏在一起，很難分離除淨，如何把絞纏在一起的蛋白質除淨，是 DNA 分離抽出之主要工作。一般係將細胞壁溶解後的透明黏質液體，加入一倍量的氯仿——異戊醇 (4:1, v/v)，然後置於振盪器振盪30分鐘 (20°C)，經離心後 DNA 即溶於上澄液中，吸取上澄液加入酒精，即可將沉澱出的 DNA 纏繞在玻璃棒上，將 DNA 洗淨後，再溶解於 Saline citrate (檸檬酸鹽—食鹽) 溶液中，加入過氯酸鈉 (NaClO₄)，而以氯仿——異戊醇再行振盪抽出，如同上述以酒精沉澱法收取DNA。

(三)除淨 RNA (Removal of RNA)：

加入 50μg/ml RNase，在 37°C 保溫10分鐘，則可溶解清除殘留於 DNA 分子中的 RNA。

(四)蛋白質的再除去：

與(二)項同，再行蛋白質的清除，必要時可增加酚之抽出法，除去蛋白質後之 DNA，再以酒精沉澱收回，待所得 DNA 相當純化後，溶於醋酸鹽—EDTA溶液中加入異丙醇 (Isopropyl alcohol) 沉澱析出 DNA，溶解後再加入過氯酸鈉，以酒精沉澱之，收回之 DNA 以各種濃度不同之酒精脫水後即可置於小容器內，貯存於冷藏庫 (或冰箱中)。

第三節 基因的傳遞 (Gene transfer)

這裡所謂基因的傳遞，是指並非在正常狀態下由母細胞經分裂而傳遞基因到子細胞，而是在細胞並沒有繁殖之下，細胞的 DNA 由一個細胞傳給另一個細胞，其方式有下述三項：

(一) Transformation：

由某一細胞分離出之純 DNA 物質能把其基因標誌 (marker) 帶入另一細胞中，使另一細胞之 DNA 也具有此一特性者稱之轉換現象 (Transformation)。

Transformation 必需是兩者爲同類細菌而不同型者，或爲相近之菌種才能發生。具有轉換能力之細菌稱爲 Competent cell (勝任者)，其菌體已發現有75個吸附點 (Adsorption site)，可吸附外來之 DNA，此 DNA 被吸附後，即滲入菌體，與菌體內之 DNA (Recipient DNA) 結合，而此

後其後代即具有此項新特性。

簡言之，即細菌直接地將外來之 DNA 傳送到細胞內使其帶有新基因之現象稱為 Transformation，例如將 Wild type (假設它不需精胺酸可以繁殖者) 之 DNA 抽出後，加入需要精胺酸之突變菌株中，混合培養於沒有精胺酸的培養基上，則本來需要精胺酸才能繁殖者亦可繁殖，此即所謂基因的 Transformation。

(二) Transduction :

某一細菌的遺傳物質，可由噬菌體做為攜帶媒體 (Carrier)，傳給另一相近之菌株，而產生新的變異菌株，此種現象稱為 Transduction。

例如某種 *Salmonella typhimurium* 菌株，其生長需要色胺酸，但不需要組胺酸，而另一菌株則不需色胺酸，但需要組胺酸才能生長，若將此二種不同菌株，分別置入 U 型管之兩邊培養，此 U 型管中間隔著一層毛玻璃濾過板 (Fritted glass filter)，以防止兩邊細菌之穿透，經培養一段時間後，在一邊的培養液中，發現有不同之菌株，其生長既不需組胺酸也不需色胺酸，後來發現噬菌體與其宿主係以共棲狀態存在，但有時可溶解少數之正常宿主細胞 (比例甚少，約為 10^{-6}) 而通過濾過器感染相近之菌株，並與其染色體上 DNA 之某部位結合。此噬菌體增殖後即帶著宿主部份的 DNA 破細胞壁而出，再通過濾過器而感染到另一邊的菌株。

能傳遞基因的噬菌體是一種 Defective phage。有些噬菌體並能攜帶細菌的任何基因傳到另一個細菌，此種噬菌體叫做 Generalized transduction phage，只能攜帶某種基因到另一個菌體內者叫做 Restricted or localized transduction phage。

(三) Conjugation (接合生殖)

即雌雄細菌體需要接觸，以菌毛為橋架 (Bridge)，基因傳送方式是單向的由雄細胞 (Male) 向雌細胞 (Female) 傳送，亦即 F^+ (Donor) \rightarrow F^- (Receptor)，因 F-factor 與染色體 (Chromosome) 結合而成 Hfr (High frequency of recombination)，促使 Hfr 細胞的基因 DNA 傳送到雌細胞，可以 $F^+ \times F^-$ 接交 (Mating) 或 $Hfr \times F^-$ 表示。

接合生殖有幾項特徵：(1)要有菌毛為橋架。(2)要有 2 個完整細胞的接觸，(3)只是單一條 DNA 進入雌細胞內，且是單向的由雄細胞傳至雌細胞。

關於接合生殖研究資料最多的乃是大腸菌，如上所述基因供應者之雄細胞叫做授給體 (Donor)，接受基因的雌細胞叫做接受體 (Receptor)，含有性因子 (F-factor) 的細胞就是雄細胞，不含性因子者為雌細胞。 F^+ 在細胞漿內有自行複製之能力，同時能傳遞此性質給下一代，若與染色體結合成 Hfr 細胞時，則隨同染色體而行動，亦即性因子成為染色體 DNA 之一小部份。

若將 F^+ 和 F^- 的二種不同菌株混合培養，經過短時間後，發現培養液很少有 F^- 的菌體存在，若再將已變為 F^+ 的菌體和 F^- 混合培養亦復如是，即 F-factor 在 F^+ 細胞漿質內能自行複製，若在接合時，即可藉菌毛之溝通，基因從 F^+ 傳遞給 F^- 細胞。

被稱為 Hfr 的菌體行接合時，環型的染色體其中一線 (One strand) DNA 在 F-factor 所在的地方斷裂而呈線狀，當與 F^- 菌體接觸時，F-factor 在最後推送，沿著這一線的基因乃一個個的進入 F^- 菌體內，進入雌細胞內之 Hfr DNA 基因能與雌細胞 DNA 接觸再結合 (Recombination)，因此彌補了雌細胞所欠缺的基因，亦即雌細胞也帶有雄細胞的基因。Hfr 與 F^- 間的結合率要比 F^+ 與 F^- 間的結合率大得多。另一方面，若在菌體尚未分開前，在各個不同時間以人工振盪，則此接合過程即刻中止，因此進入之基因量的多少與種類、次序的不同亦因振盪的時間而異。接合生殖不僅限於大腸菌，像傷寒桿菌 (*Salmonella typhosa*)、假單胞菌屬 (*Pseudomonas*) 亦可發生。

以上各種不同基因之傳遞方式是由人工實驗所得之結果，但是自然界中尤其水中細菌可能也會有

此類現象，這將是水產細菌學上之研究對象之一。

第四節 DNA 的混成 (DNA hybridization)

雙線 (Double strain) DNA 呈螺旋狀 (Helix)，結構是因核酸的鹽基對 (Base-pair) 以氫鍵連結而成者，若將雙線之 DNA 加熱使其變性，其氫鍵即被破壞而變成單線 (Single strain)，此時若加入另一已變成小段的同序列 (Sequence) DNA，使二者又再復原 (Renaturation)，則小段的 DNA 若其鹼基恰能與長的單線 DNA 成對時，此際二者間會以互補 (Complementary) 方式結合是為混成 (或稱雜交)，小段的 DNA 可來自各種不同的生物體。

測定混成的方法很多，茲舉三個方法說明之：

(一) 比重梯度法 (Density gradient method)：

即以同位素 ^{15}N 標示的胸腺嘧啶 (Thymine) 來培養被試的一個菌種，使其 DNA 帶 ^{15}N ，另一被試菌種之 DNA 為 ^{14}N -DNA，當二種不同 DNA 分別由不同菌株抽出分離後，二種 DNA 之混成，可利用氯化銫 (CsCl) 梯度離心方式使密度不同的物質分離。即原有 ^{14}N -DNA 要比以同位素 ^{15}N 標示的 DNA 為輕，當離心到平衡時，離心管中有三層 DNA 出現，下層比重較重者為 ^{15}N -DNA，上層為 ^{14}N -DNA，中間層為 ^{15}N -DNA 與 ^{14}N -DNA 混成所形成，即比重介於前述二者之間的混成 DNA，如果沒有混成就沒有中間那一層。

(二) DNA 洋菜培養基法：

將要混成的二種 DNA，一種保持大分子，一種設法切成小分子，大分子雙線 DNA 施以熱變性，使之成為單線，在洋菜未凝固之前加入於洋菜內，經急速冷卻後大分子單線 DNA 即被困牢於洋菜液中，再加入經同位素標示的小段單線 DNA 於洋菜中，用緩衝液洗洋菜數次後，剩下的洋菜再以 Scintillation Counter 去測定放射線量，若放射線量多，則表示混成程度提高，反之則少。

(三) Nitrocellulose membrane filter

這種過濾膜能吸附雙線互補的 DNA-RNA，適用於 DNA-RNA 的混成，而單線的 DNA 或 RNA，小段的 DNA 或 RNA 都會被洗掉而濾過。若是二種混成的核酸，有一種以同位素標示時，則由膜上的放射線量可測出混成的程度。

第五節 遺傳基因的位置 (Genetic mapping)

細菌之遺傳學以大腸菌研究最為深入且廣泛，尤其是大腸菌 K-12 菌株的資料更為完整，大腸菌 K-12 染色體上許多基因的位置業經確定，目前已知其位置的基因有 600 多個，利用 Transduction 與 Conjugation 的技術可將 DNA 上的每個基因的位置、序列 (Sequence) 及每個基因間的距離測出來，基因的命名是用三個英文字母斜體字表示，這些基因包括各種細菌本身構造之生成及活動的控制，代謝物酵素之控制，營養物質的合成與利用，抗菌物質有關之控制以及生活機能之控制等等。整個染色體 DNA 要轉移 (Transfer) 一圈需費時約 100 分鐘，圖 8-1 是 *E. coli* K-12 染色體之幾個代表性基因的位置，例如在 9 分鐘位置的 *tsx* 是控制對噬菌體 T_6 及 Colicin K 敏感度的基因，在 20 分鐘的 *aro A* 基因是控制 3-enolpyruvyl shikimate-5-phosphate synthetase 的酵素，在 65 分鐘附近的 *tol C* 是控制 Colicin E_1 敏感度的基因，在 88 分鐘是控制精胺酸代謝中 acetylornithine deacetylase 的基因。

疾叢生而無法治療。也許本來可以利用造成新生物，但在突然間因產生突變而形成永遠無法收拾的禍害。因此目前對此類之研究，有遠見之科學家已經大聲呼籲，希望能有效的控制，對此種研究希望有法律上之規範來約束，以避免此種合成的新生命蔓延出來，更進一步對於實驗的項目也要約束管制，以避免作有害方面的實驗。

第九章 細菌的分類學和鑑定

(Taxonomy and identification of bacteria)

第一節 魚類和海洋微生物在分類和鑑定上的困難

(Difficulties in classification and identification of fishery and marine bacteria)

目前人類對陸上微生物了解的較爲透澈，美國及其他國家所保存的標準微生物菌株，也大都屬於陸上的，而對海洋微生物研究的資料則較少，由於沒有標準菌株是爲造成分類和鑑定上的困難之一。其次，海洋因其幅度頗廣，細菌種類常因地域而不同，即使同屬太平洋，北太平洋之細菌也與南太平洋的細菌有很大的差異，此爲困難點之二。而海洋中之細菌大多屬好冷性細菌，此好冷性細菌在培養和菌種的保存皆屬不易，且培養時間長，是爲海洋微生物分類鑑定的困難點之三。又研究這方面的工作人員比研究陸上者遠爲稀少，此爲困難點之四。

由於上述四種困難，使得目前海洋微生物的分類鑑定無法有顯著的進步。

第二節 慣用之分類鑑定法

(Conventional taxonomy and identification)

一般常被採用的鑑定方法包括如下項目：

(一)細胞形態學 (Cell morphology)：

例如細菌細胞之形狀、大小、Gram 染色、莢膜、鞭毛、孢子之有無以及其他含有物體等。

(二)菌落形態學 (Colony morphology)：

形狀、大小、色澤及質地 (texture) 等。

(三)培養上之性質 (Cultural characterization)：

細菌在液體培養基培養時所呈現之各種性質，如混濁之程度、莢膜之形成結塊以及菌體之沉積等可作爲鑑定細菌之參考。經常觀察者如：

1. 選擇判斷培養基：

許多有關衛生方面的細菌之選擇及判別培養基，即利用某種目的菌之特性，以特殊的培養基來培養，以淘汰其他細菌或抑制其生長，並判斷目的菌。如 Mac Conkey 培養基爲一般 Gram 陰性菌，尤其是腸內細菌的選擇培養基，Gram 陽性菌在其上就不易生長。

2. 牛奶培養基之性狀：

培養後 pH 之變化及乳酪蛋白之分解情形。

3. 營養之要求及碳、氮源之利用情形：

有些細菌需要特別之營養或生長素才能行正常發育。

4. 生長溫度：

各種細菌均有其最適、最高及最低之生長溫度，此爲各種細菌特徵之一，有些細菌之生長溫度範

圍很狹，有的却很廣；由細菌之生長溫度也可大略判定其來源。

5. 色素：

細菌在固體培養基時能否產生色素及其色素之顏色種類、性質（如能否擴散於培養基中等）。

6. 耐鹽程度：

細菌有好鹽與耐鹽細菌，所謂偏性好鹽細菌是一定要有相當濃度之食鹽才能生長，一般海水細菌約需2~3%才能行正常之繁殖。

四、化學性質 (Chemical characteristics)

本項包括很廣，是鑑定細菌之主要因子，例如：

- (1) Cytochrome oxidase：自洋菜斜面上取一白金耳之新培養菌種，塗於浸過1%的 Tetramethyl-p-phenylene diamine 之濾紙，如變藍色即為 Cytochrome oxidase 陽性。
- (2) Catalase：取一小白金耳之菌叢浸入3%之 H_2O_2 中，若有旺盛之氣泡冒出即為 Catalase 陽性。
- (3) Gelatinase：參閱第四章
- (4) DNase 及 RNase：參閱第四章
- (5) TMA production：參閱第四章
- (6) Lipase：參閱第四章
- (7) Nitrate reductase：將細菌接種於含硝酸鹽之培養基中，經 24~72 小時之培養後，測定其是否還原硝酸鹽成為亞硝酸鹽或氮氣。
- (8) Urease：將細菌接種於尿素培養基中，如能分解尿素則其培養基會變成鹼性 pH 會升高。
- (9) IMViC test：參閱第五章
- (10) H_2S production：參閱第四章
- (11) Acetic acid production：參閱第四章
- (12) 對醱類之作用 (Hugh & Leifson 培養基)
將每種細菌各接種於 2 支含 Hugh & Leifson 培養基之試管中 (1% 之被試醱類, 0.2% Peptone, 0.03% K_2HPO_4 , 0.003% Bromthymol blue, 0.5% NaCl 及 0.3% Agar, pH 7.1), 其中1支以石臘油混合物封閉, 另 1 支則保持好氣狀態, 此種培養基可測①細菌需要醱類與否, 若是需要則觀察是好氣性的呼吸作用或嫌氣性的醱酵作用。②運動性。③對每種醱類的不同作用 (各種細菌利用醱類之種類)。
- (13) 對抗生素之作用：各種細菌對各種抗生素皆有不同之抵抗力，一般水產細菌以 *Moraxella* 最為敏感，*Pseudomonas* 之抵抗力則較強。
- (14) 血清型 (Serology typing) 之決定：有些細菌如 *Salmonella*、*Clostridium* 等有毒性之細菌，可用標準抗血清 (Antiserum) 來測定其型屬 (type)。

第三節 鑑定計劃 (Identification scheme)

當多次取樣分離鑑定細菌之後，對各種細菌之性質已明瞭在鑑定上沒有問題時，即可利用各種細菌不同之少數性質加以歸納，包括可能含有的細菌，作成一分類系統圖表，根據這些少數之性質即可把大部份細菌鑑定出來，例如表9—2及表9—3就是利用此原則而作成，俾能將我們所需要分離的本省水產細菌，以較簡單且迅速的方法分離鑑定出來 (本 Scheme 係陳幸臣教授參照 Kazanas 原有的 Scheme 改編並補充更正而成)。

有關衛生方面的細菌，除了在特殊情況之下，當一般細菌加速繁殖而達相當高之菌數時，均不易

用普通培養基培養出來，例如 *Vibrio parahaemolyticus* 需在3%之食鹽濃度下才能正常生長，所以此類細菌之檢查均各自行之（如表9—1），其操作已分述於第五章。

要分離鑑定水產物之細菌相，可將樣品稀釋處理後與作總菌數一樣，培養於三種培養基，同時宜作表面塗抹培養（Spread plate）和傾倒培養（pour plate）以比較其總菌數。由於水產細菌多為好冷菌。用傾倒培養因融溶之培養基的溫度可能會殺死某些不耐溫之細菌，一般在20°C 培養後，選擇生菌數最高的一種培養基，再由此培養基上任意挑取100個完全分離之菌落（可用統計用之任意數表），經3次以上之純粹分離後，即可進行如表9—2及表9—3之鑑定工作，首先施以 Gram 染色，將此100株細菌分為 Gram 陽性及陰性二大類，然後 Gram 陽性菌依表9—2，Gram 陰性菌依表9—3施行鑑定。

Proteose peptone beef extract agar (PPBE) 是一種營養最豐富的培養基，對一般水產細菌都會有良好之生長，因本培養基可得較高之總生菌數，同時此培養基也是良好的螢光細菌檢查培養基，由本培養基作初次之生菌數培養時，可將螢光菌檢測出來。

Gram 陰性菌是魚類的主要細菌，因此在正常之情形下（即新鮮水產物不受漁獲後之外界污染，以及在拖網時不受海底泥漿長時間之接觸混合），大多數菌種多屬此類。

在 Gram 陰性菌中 *Flavobacterium* 與 *Cytophaga* 是新鮮魚類的主要細菌，雖然此類細菌在細菌分類學上之位置尚未有明確的歸屬，但由於其菌落顏色之特殊，在第一次總生菌數之培養時即可先行挑選出來。凡是 Gram 陰性黃色或金黃色菌落、Cytochrome oxidase 陽性，沒有鞭毛（少數有運動性之菌種呈周毛），細胞常呈不規則桿狀者即為本類細菌。

其次非屬 *Flavobacterium*、*Cytophaga* 之細菌再依 Oxidase 分為兩類。*Pseudomonas* 為極毛能抵抗 Penicillin 的 Oxidase 陽性菌，再依照 Shewan 的分類（以作用於 Hugh & Leifson 培養基上之性質為主），將 *Pseudomonas* 分為 I、II、III、IV 等四類。*Moraxella* 與 *Acinetobacter* 之主要判別法為：後者係 Cytochrome 陽性及對 Penicillin (2.5IU) 有高度敏感性。*Vibrio* 對 0/129 (Pteridine) 有高度的敏感性，而其餘細菌則均有抵抗力。產生 H₂S 的細菌主要為 *Pseud. putrefaciens* 及某些 *Proteus* 但此二屬可用 Oxidase 與鞭毛輕易分辨出來，Gram 陰性菌之鑑別並可參考表9—4判別之。

表 9~1

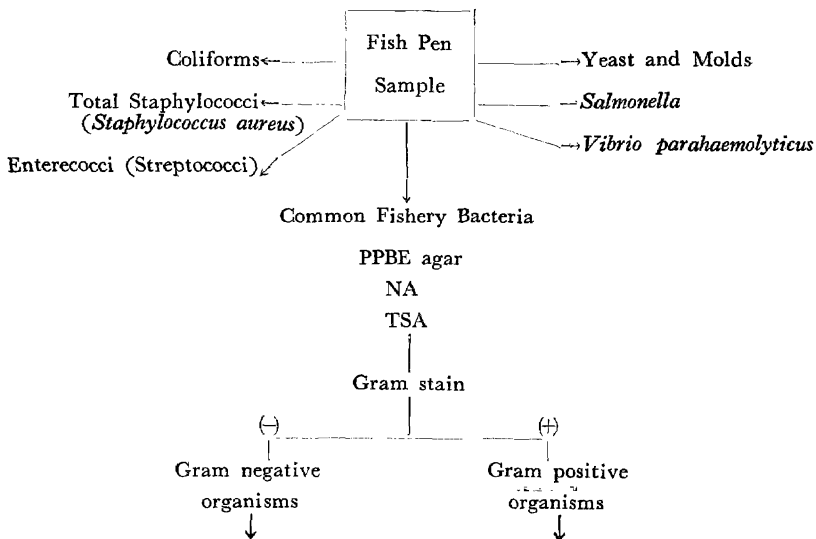


表 9~2

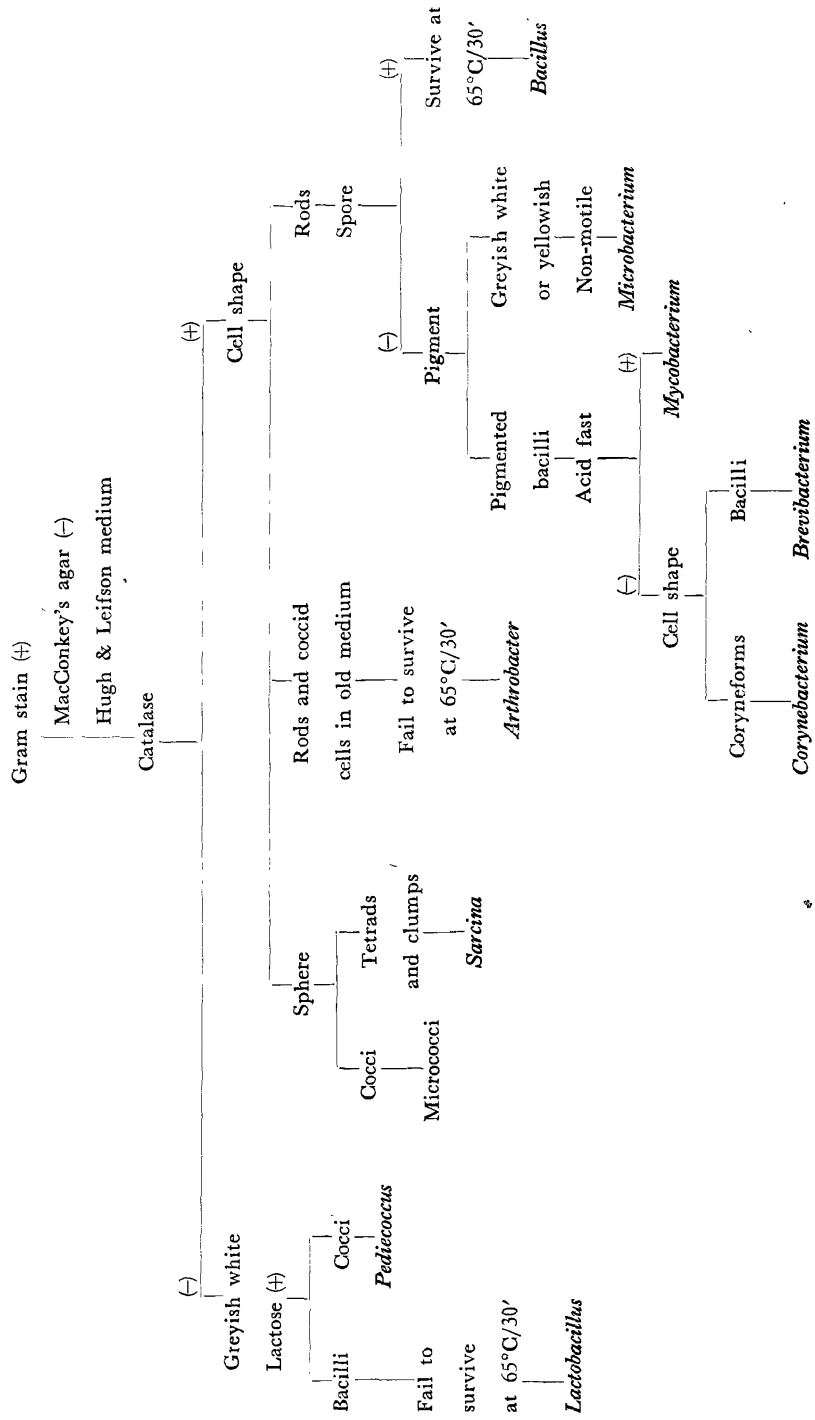


表 9~3

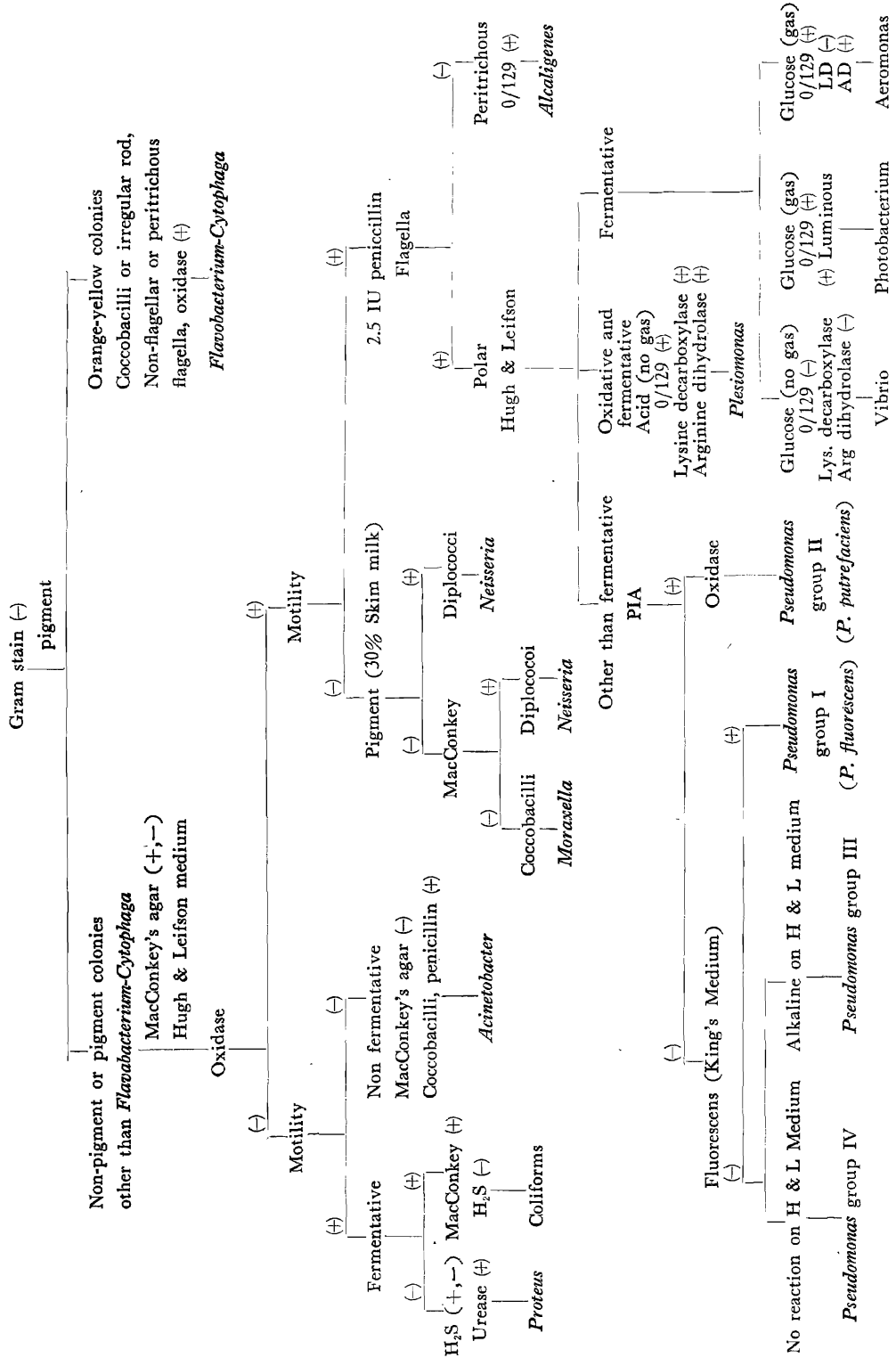


表 9~4 水產 Gram 陰性菌之主要特性

	H. & L. test	Oxidase	Catalase	Arginine dihydrolase	Lysine decarboxylase	Gelatin Liquefaction	Aerobic dextrose	Growth on MacConkey	Sensitivity to 0/129*	Motility	Indol
<i>Acinetobacter</i>	V (ox)	-		-(+)		-(+)	-	+(-)		-(<i>A. mallei</i>)	
<i>Aeromonas</i>	F	+	+	+	V	+	+	+	R	V	
<i>Alcaligenes</i>	Alk.	+		-	-	V	-	+	R	+ Peritrichous	
<i>Chromobacterium</i>	V	+		V		+		V		+ Polar (1-4/cell)	
<i>Enterobacter</i>	F	-		V		V		+		V Peritrichous	
<i>Flavobacterium</i>	Ox	+	+	-	-	+	V	V	R	-	
<i>Moraxella</i>	Alk.	+	+	-		V	-	V		-	
<i>Pseudomonas</i>	Ox or None	+	+	+		V	-	+	R	+ Polar (≥ 1 /cell)	-
<i>Vibrio</i>	F	+		-	+	+	+	+	S	+ Peritrichous	-

V: Variable (有些菌種+, 有些-)

Ox: Oxidative

F: Fermentive

R: Resistant

Alk: Alkaline

S: Sensitive

Blank: No test

* 0/129: Dissolve 150mg of 2, 4--diamino-6, 7--diisopropyl pteridine (0/129) in 10ml of 1:1 industrial alcohol-diethyl ether (1.5%)

第四節 DNA 鹽基成分 (DNA base composition)

因細菌之屬 (Genus) 之不同, 其 DNA 所含的鹽基成分有很大的差異, 一般以 Guanine + Cytosine 的百分比 (G.C%) 表示之, 同屬之細菌其 G.C% 應該差不多, 表 9-5 為常見各屬細菌之 GC 含量。

表 9~5 各種細菌之鹽基成分

微 生 物	GC%
<i>Clostridium perfringens, C. tetani</i>	30-32
<i>Staphylococcus aureus</i>	32-34
<i>Bacillus cereus, B. anthracis, S. faecalis</i>	34-36
<i>Streptococcus, Lactobacillus, Proteus vulgaris</i>	38-40
<i>P. mirabilis, Moraxella bovis</i>	40-42
<i>Vibrio comma, Corynebacterium acnes</i>	46-48
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	48-50
<i>Neisseria meningitidis, Escherichia coli</i>	50-52
<i>Enterobacter aerogenes, Corynebacterium diphtheriae</i>	52-54
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	54-56
<i>Lactobacillus bifidis</i>	56-58
<i>Serratia marcescens</i>	58-60
<i>Pseudomonas aeruginosa, Mycobacterium tuber culosis</i>	66-68
<i>Micrococcus luteus</i>	70-80

當不同種細菌之形態、生理及化學性質非常類似而無法判別時，GC% 即成爲極重要之決定因子，如果有二種細菌，其 GC %不同且相差在 10 %以上，則此二種菌株顯然不是同一屬之細菌，當然 GC% 若相同未必屬於同一屬，因此尚需作其他生理、化學等性質之檢查。

第五節 數字表示分類學 (Numerical taxonomy)

一般的分類都以屬和種爲基礎，其缺點是分類非常繁雜，而數字上的分類，不採用種別而是用相似性 (Similarity) 來分類，即先測定50種以上的生態、生理、化學特性，每一特性僅有正或負，不論該性質之重要性如何，均一視同仁，用電腦 (Computer) 來計算有多少的相似性而分類。這種以數字的分類的好處是：

- 1.不必因菌種之繁多而困擾。
- 2.可以除去偏見、錯誤的標示。
- 3.由電腦操作省時、省力。
- 4.具有系統性與科學性。

缺點：1.每一試驗不論其重要性與否均視爲相等。

- 2.需要測定的性質太多，要超過50種以上才可。

第六節 電子顯微鏡之異種二重技術 (Electron microscope heteroduplex technique)

凡是分子量較小之 DNA，例如輔基因或噬菌體在電子顯微鏡下，其 DNA 整個分子可觀察者，即可用此法來判定其異同，其方法如下：

以測定 Hfr 菌株與其他任何性決定因子 (F-factor) 之間的關係爲例來說明，當 F-factor 與細菌的染色體連結在一起成爲 Hfr 時，利用 x 射線把連結之 Hfr 之 DNA 切斷，因 x 射線切的差異，可造成各種不同之大小 DNA，有者可能只切性決定因子之一部位，有者可能把染色體之一部份也切下來，把切下來的小 DNA 經加熱使之變性，再混入不同之 F-factor 令其復原 (Renaturation) 之後，相同的 DNA 是有鹽基對 (Base-pair) 的鹼基，即令互補而成雙線 (double strain)，在電子顯微鏡下成爲較粗的一條，若不是相同的 DNA 則無法構成鹽基對的互補情形，因而仍是單線 (Single strain)，會成分歧在電子顯微鏡下呈較細的一條，因爲雙線在電子顯微鏡下觀察應顯得比較粗，而單線則較細，由電子顯微鏡觀察可判斷二種 DNA 有多少相類似，是爲最完整之證明法。

例如把 A、B 二細菌的輔基因分離之後，先使其變性，再使之復原，在電子顯微鏡下觀察，由雙線的所佔比例之多少判定其類似的程度，若完全爲相同之雙線，即可說是同一種 DNA。

第七節 蛋白質性抗生素和噬菌體定型法 (Bacteriocin and Bacteriophage typing)

蛋白質性抗生素及噬菌體都具有專一性 (Specificity) 已於前面敘述過，本節乃就蛋白質性抗生素及噬菌體對細菌的專一性來做爲分類鑑定的方法。

(一) 噬菌體之定型 (Bacteriophage typing)

本省的環境因各種細菌相可能都有，爲分離噬菌體之最適當之場所，不但分離容易且分離的方法簡便，所使用的儀器設備也很簡單，若能建立一套有系統的噬菌體類型，當可達成簡便的分離鑑定體系。

茲舉 *Pseudomonas* 之鑑定為例來說明。

- (1)先分離所有的 *Pseudomonas* 的噬菌體：即用所有各種不同已知菌株 *Pseudomonas* 加噬菌體來源來培養，以分離各種不同之噬菌體，又由菌斑 (plaque) 的大小、形狀、外觀來分辨噬菌體的種類，故同一種 *Pseudomonas* 可能有數種型式之噬菌體可以解離 (lysis) 其細胞，然後加以編號。
- (2)各種不同的 *Pseudomonas* 分別以各種的噬菌體來定型 (typing)，即把分離出的所有的 *Pseudomonas* 噬菌體來定型每一已知 *Pseudomonas* 菌株，可作成一表如下：

表 9~6 噬菌體定型之例子

菌 株 \ 噬 菌 體	A ₁	A ₂	A ₃	B ₁	B ₂	C ₁	C ₂	D	E
A	+	+	+	+	+	+	-	+	+
B	+	+	+	+	+	+	+	+	-
C	+	+	-	+	-	-	+	-	-
D	+	-	-	-	+	-	+	+	-
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	

註：要再用此等噬菌體測定是否作用 *Pseudomonas* 以外的菌體，若這些噬菌體不作用於 *Pseudomonas* 以外的細菌，才算是 *Pseudomonas* 的噬菌體

先計算每一種 *Pseudomonas* 被這一羣噬菌體解離的百分比，由此百分比以及所作用之噬菌體種類，可以測出各種菌株彼此間的關係。例如噬菌體 A₁, A₂ 與 A₃ 是由 *Pseudomonas* A 所分離出來的，噬菌體 B₁ 與 B₂ 是由 *Pseudomonas* B 分離出來的，用此各種不同之噬菌體來定型各種不同菌株時，假設得到如表9—6之結果，三種A噬菌體都對 *Pseudomonas* A與B有作用，但是有二種對細菌C有作用，却只有一種對細菌D有作用，依此類推，即可得如表9—6之各種不同噬菌體對各種不同標準 *Pseudomonas* 菌株之作用能力。

- (3)未知菌株之鑑定：若自所採樣品分離出來之菌種，經純化後，如上述以同一組的噬菌體來定型，觀其作用噬菌體的種類，再跟標準菌株的噬菌體定型比較，若未知菌種之有作用的噬菌模樣 (Phage pattern) 與標準菌株相同或相類似者，則該未知菌種即與標準菌種相同或相類似。

(二)蛋白質性抗生素 (Bacteriocin) :

第七章已討論過，蛋白質性抗生素是由細菌所分泌出來的一類蛋白質性抗生素，對相同種類或類似之細菌具有殺滅之作用，因其具有專一性，故亦可用之為鑑定菌種之工具。

欲尋求某菌種是否具有產生蛋白質性抗生素之能力，可依下述方法行之：

- (1)交叉劃線法 (Cross streaking)：即在一般培養基上，劃上一線之菌種，培養一個晚上後，以平直玻棒除去其菌種，再把二重皿倒置，下裝氣仿若菌種未除盡，即被氣仿蒸氣殺死，故培養基上應無原來之菌種。再將二重皿平放，然後垂直與原來菌種所劃的線劃上各種菌種，經培養後，若新接種者在第一次接種處有抑制生長現象，就說明了後來的菌種受到原先菌種分泌的物質所抑制而不能生長，因而可概略的推測原菌種具有產生蛋白質性抗生素的能力。
- (2)雙層法 (double layer)：先把欲測菌種塗抹在培養基上 (每二重皿100個細菌以下) 然後再加一層培養基 (約 4ml) 以覆蓋之，待培養基凝固後再塗抹指示菌種 (Indicator strain) (10⁷/plate)，使在培養基上層長得很旺盛而成菌環 (lawn)，若底層菌能產生蛋白質性抗生素，則會使上層菌無法生長，即會在上層形成一透明的溶菌圈，這種現象叫做缺損 (lacunae)。能產生透明圈之菌落即表示能分泌蛋白質性抗生素。

分離蛋白質性抗生素的簡單步驟：細菌在液體培養基培養一段時間（在對數期之中期最好）後，以 1M NaCl 抽取並離心分離之，將混濁之淺紅色上澄液以各種濃度之 $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 沉澱，求其不同 $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 濃度所沉澱出來之蛋白質的有效殺菌強度，最高強度之分割 (fraction) 即為蛋白質性抗生素之分割。

第八節 快速鑑定法 (Rapid identification)

微生物鑑定相當費時，經常延誤正確之處理，以致造成莫大的損失，如何縮短鑑定之時間，為一般醫學、食品以及其他有關微生物界共同所研究的對象。近年來已有幾家公司出產商品化之快速鑑定用具。此類用具主要原理係利用細菌之種、屬之間的主要不同之生理及化學性質，因此利用各種細菌對各種不同試劑作用所產生之不同顏色變化，能否產生氣體或沉澱以及細胞之運動性等等。

將測定這些性質所需之培養基及試藥，一起分裝在一個簡單的容器內，同時在短時間培養後即可測知結果。鑑定時將單離後之菌落接種於此等特製之鑑定用具，經短時間培養後記錄結果，然後檢索「鑑定對照表」或打入「電腦」，即可查出或指出所鑑定之細菌名稱。這些剛出品的商品化鑑定用具雖然主要是針對醫學微生物而設計者，但是如果由增殖及選擇培養基上之聚落來接種，則對食品微生物之鑑定，仍大有參考應用之價值（必要時鑑定用具也可改進修改，以適合食品微生物鑑定之用），因此將最近出廠之主要幾種細菌鑑定用具簡述於下：

1. Enterotube and Oxi-Ferm tube (腸桿菌管及氧化還原菌管) —Roche 公司出品的此等快速鑑定培養基，適用於所有 Gram 陰性菌，首先測定單離的 Oxidase，再將 oxidase 陰性者接於 Enterotube, Oxidase 陽性者接種於 Oxi-Ferm tube，茲以 Enterotube 為例說明如下：

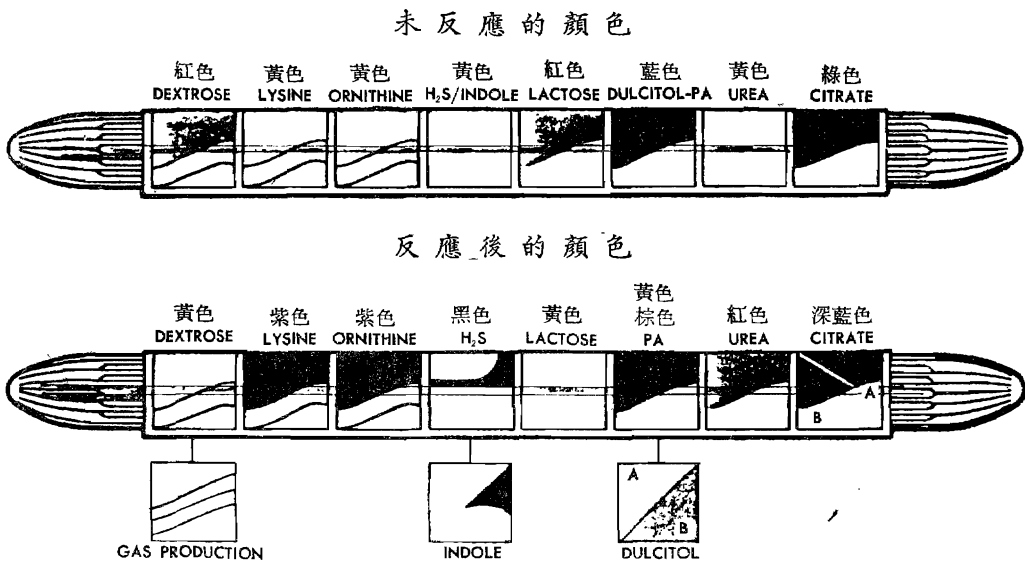


圖 9—1 Enterotube

此等鑑定培養基係用透明塑膠製成一小管（如圖9—1），管之一面為平面，故可置放於桌上而不致滑動，管內共分八室，各室裝入不同之鑑定培養基，同時管中裝有一條貫穿八室的接種用之鐵絲，兩端蓋子旋緊以防污染。這種管子所裝八種培養基之測定項目及接種前後顏色之變化列於下表：

表 9~7 接種 Enterotube 之變色反應

各室之培養基	Dextrose (含 phenol red 測有否氣體產生)	Lysine (含 brom cresol purple)	Ornithine (含 brom cresol purple)	H ₂ S/indole (測 H ₂ S 及 indole)	Lactose (含 phenol red)	Dulcitol/PA (測 dulcitol 及 phenylamine deaminase)	Urea (含 phenol red)	Citrate
未接種之顏色	紅色	黃色	黃色	黃色	紅色	藍色	黃色	綠色
接種後正反應之顏色	黃色	紫色	紫色	H ₂ S: 黑色帶, indole: 紅色顯現於另外加入試劑處	黃色	Ducitol: 黃色 PA: 棕色	紅色	深藍色

接種時打開兩端之蓋子，將管上所附的接種鐵絲之尖端接種單離之菌落，再將另一端之鐵絲向後輕輕拉出，如此沾有菌種之鐵絲尖端即通過所有八室的培養基，則所有八種培養基在一拉之下同時都接種了，然後再將鐵絲放至 H₂S/indole 室，拆斷多餘之鐵絲，蓋回兩端之蓋子，培養24小時即可檢查結果，而查出所鑑定之細菌。

Oxi-Ferm tube 與 Enterotube 構造類似，此等管的八室中所含培養基係測定 action on anaerobic dextrose, arginine dihydrolase, N₂ gas production, H₂S 與 indole, OF Xylose, OF aerobic dextrose, Urea 以及 Citrate。Oxi-Ferm tube 主要用於鑑定 *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Vibrio* 以及 *Chromobacterium* 等。

表 9~8 列舉幾種細菌之結果

Organisms	Dextrose	Gas production	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Indole	Lactose	Dulcitol	PA	Urea	Citrate
<i>Herellea vaginicola</i>	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	±	-	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Serratia marcescense</i>	+	±	+	+	-	-	-	-	-	±	-

+ : positive reaction; - : negative reaction; ± : weak or negative reaction

2. R/B tube—Corning Diagnostics 公司所出品之 R/B tube (圖9—2) 係專用於鑑定腸桿菌類之各種細菌，此種試管有上、下兩節，中間以小頸連接，此兩節試管含多種培養基及試劑，可同時測定多種性質，下管為嫌氣性狀態，上管為好氣性，例如基本組的 R/B 管係由長短兩支管所組成：(1)長管之下節可測 Lysine decarboxylase，上節可測 phenylamine deaminase、lactose 之分解性，H₂S 以及對 glucose 之分解性。(2)短管可測 indole、ornithine decarboxylase 與 motility。鑑定時將單離之聚落穿刺於此二支試管內，培養24小時後即可鑑定何種細菌（必要時尚有其他二支補助管子，以測定其他性質）。Corning 公司尚出品一種鑑定酵母的簡便用具叫做“Uni-Yeast-Tek”。

3. Entero-set 1, Entero-set 2 及 Entero-set 20—Fisher 公司出品之此等快速細菌鑑定板係專為鑑定腸桿菌用，Entero-set 1 及 Entero-set 2 各含有10類不同之試劑 (圖9—3)。Entero-set 20 係包括 Entero-set 1 與 2，此用具主要原理為將鑑定腸內細菌所需要的幾類試劑 (含培養基) 吸附於濾紙而上而乾燥之，然後夾於塑膠層內，而試藥濾紙片與塑膠之間留有空間，每片試藥濾紙片上之

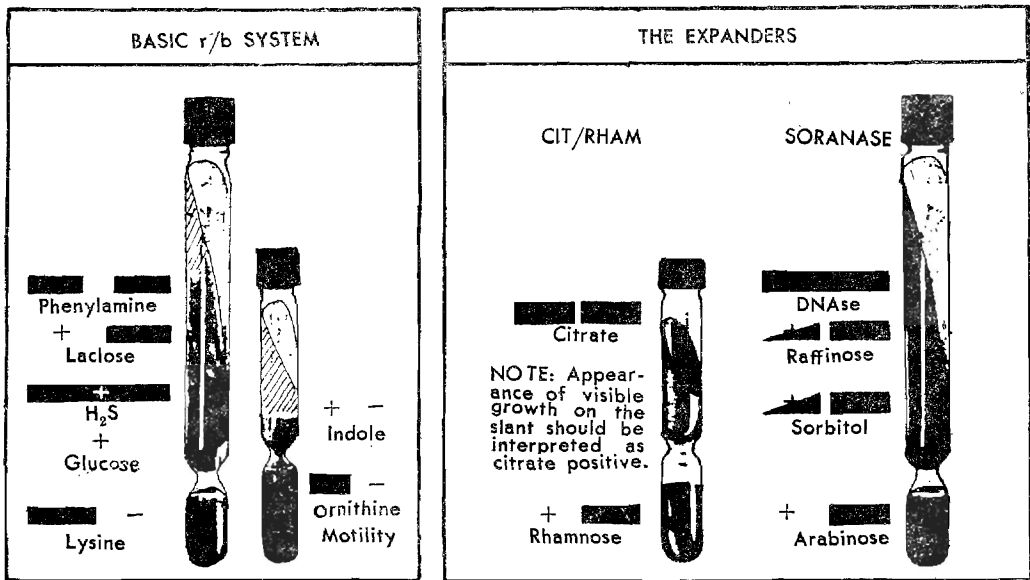


圖 9—2 R/B tube

REACTIONS	+Blue Pink Dk. Green			Yellow Pink Brown-Black			Gray-Green to Purple Gray-Green to Dk. Pink			Yellow
	--Green Blue Yellow			Colorless Colorless Beige			Yellow-Green Yellow-Green Orange Yellow			
	MAL M ①	GLU V ②	PH P ④	ONPG O ①	IND I ②	H ₂ S H ④	LYS L ①	ORN R ②	UR U ④	SUC S ①
	3			3			5			1

圖 9—3 Entero set

塑膠層留 2 個洞，較大的洞接種用，下面較小之洞係通氣之用。使用時將單離之菌落懸浮於 2ml 之食鹽水，然後每片試藥濾紙片加入 5 滴菌液，整個鑑定板放入小塑膠盒內（內放 5ml 水以保持濕度）培養 24 小時後即可觀察結果，決定細菌之名稱，如果改用其他接種法時則培養 7 小時即可鑑定。

【附註】快速之總菌數測定法：

慣用之總生菌數 (Standard plate count) 之測定需培養 2~3 天才會有結果，為縮短培養時間以應某些急待結果之食品與加工廠之需要，則有各種不同之快速檢查法，例如直接顯微鏡檢查法、小扁平皿法、片狀洋菜培養基法，以及過濾膜 (membrane) 法等，其中以過濾膜法較為普遍被採用。此

法係先將食品上之微生物移至過濾膜上，然後重疊於培養基墊上，而短時間培養之，過濾膜上如有微生物細胞體時即繁殖，在短時間內形成微小聚落 (micro colony) 再經固定染色，加 immersion oil 使過濾膜成透明狀，在顯微鏡下時，可計算有染色之微小聚落。操作法大致為：食品樣品加生理食鹽水 (10倍) → 振盪 → 用大孔 (8 μ m) 濾膜過濾 (除掉食品大塊粒子) → 濾液 → 以特製細孔 (0.45 μ m) 過濾膜過濾重疊於培養基墊上培養 → 將附有菌體之過濾膜乾燥 (105°C, 5分鐘) → 染色 (Janus green) → 固定 → 加 immersion oil 使過濾膜成透明 → 顯微鏡觀察求菌體數，以此法檢查只需4~6小時即可得總菌數。

附錄一：各種培養基之成分

No. 1. Lauryl sulfate tryptose (LST) broth

Tryptose or trypticase (pancreatic digest of casein)	20g
Lactose	5g
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	2.75g
Monopotassium phosphate (KH_2PO_4)	2.75g
Sodium chloride	5g
Sodium lauryl sulfate	0.1g
distilled water	1ℓ

溶解上列各成分，分裝 10ml 於 20×150mm 內含倒置 10×75mm 醱酵管之試管，以殺菌釜在 121°C 殺菌15分鐘，最後 pH 為 6.8±0.2

No. 2. Brilliant green lactose bile broth, 2%

Peptone	10g
Lactose	10g
Oxgall (or Bile salt)	20g
Brilliant green	0.0133g
Distilled water	1ℓ

溶解 peptone 和 lactose 於約 50ml 之蒸餾水，加 20g 之無水 oxgall 於 200ml 蒸餾水並溶解之。此時各溶液之 pH 在 7.0~7.5 之間，混合上述二種溶液加水至約 750ml，調整 pH 至 7.4 (殺菌後的 pH 應為 7.2)。加 13.3ml 之 0.1% brilliant green 溶液於蒸餾水中，與上述混合液再混合之，並加水至 1ℓ，分裝入盛有醱酵管之試管，務使溶液覆蓋著倒轉的醱酵管，於殺菌釜在 121°C 殺菌15分鐘。

No. 3. EC broth

Trypticase or peptone (pancreatic digest of casein)	20g
Bacto bile salt No. 3 (or bile salt mixture)	1.5g
Lactose	5g
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	4g
Monopotassium phosphate (KH_2PO_4)	1.5g
Sodium chloride	5.0g
Distilled water	1ℓ

溶解各成分，取 15ml 分裝於 16×150mm 內含倒置 10×75mm 醱酵管之試管中，溶液務需浸滿醱酵管，於殺菌釜以 121°C 殺菌15分鐘，最後 pH 為 6.9±0.1。

No. 4. Eosin-Methylene Blue agar (Levine) (EMB agar)

Peptone	10g
Lactose	10g
Dipotassium phosphate (K_2PO_4)	2g
Agar (Bacto)	15g
Eosin Y	0.4g

Methylene blue	0.065g
distilled water	1ℓ

取 peptone、phosphate 和 agar 於 1ℓ 水中，煮沸溶解之，並加水至原來體積。分裝成 100ml 或 200ml 在 121°C 以下殺菌（不可以超過 121°C）15分鐘，最後 pH 為 7.1±0.2，於使用前每 100ml 中加 (a) 5ml 殺菌的 20% Lactose 溶液 (b) 2.0ml 之 2% eosin Y 溶液，(c) 4.3ml 0.15% Methylene blue 溶液。

若使用完全配合好的無水製品，則溶解全部成分於 1ℓ 水中分裝成 100ml 或 200ml，於殺菌釜以 121°C 殺菌15分鐘最後 pH 為 7.1±0.1。

No. 5. Standard Method Agar (plate count agar)

Tryptone	5g
Yeast extract	2.5g
Glucose	1g
Agar	15g
Distilled water	1ℓ

煮沸溶解各成分，分裝於試管或三角瓶在殺菌釜以 121°C 殺菌15分鐘，最後 pH 為 7.0±0.1。

No. 6. Tryptone broth (Trypticase Soy-Tryptose Broth)

Trypticase Soy Broth (Commercial Dehydrated)	15g
Tryptose Broth (Commercial Dehydrated)	13.5g
Yeast extract	3.0g
Distilled water	1000ml
Formula for Trypticase Soy Broth	
Trypticase peptone	17.0g
Phytone peptone	3.0g
Sodium chloride	5.0g
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	2.5g
Dextrose	2.5g
Distilled water	1000ml
Formula for Tryptose Broth	
Bacto-tryptose	20.0g
Sodium chloride	5.0g
Bacto-dextrose	1.0g
Distilled water	1000ml

取 15ml 現成的無水 trypticase soy broth 13.5g、現成的無水 tryptose broth 及 3g yeast extract 混合溶於 1ℓ 的蒸餾水中，若有需要時以溫火加熱溶解。分裝 5ml 於 16mm 的試管內，在殺菌釜中以 121°C，15分鐘殺菌。最後 pH 為 7.2±0.2。

No. 7. MR-VP medium (Glucose broth)—Buffered

Proteose peptone	7g
Glucose	5g
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	5g

distilled water 1ℓ

以文火溶解 peptone, glucose 及 potassium phosphate 於 800ml 之水中；過濾冷至 20°C 並且稀釋至 1000ml，分裝 10ml 於試管中以 121°C 殺菌12~15分鐘。最後 pH 為 6.9±0.2。

No. 8. Koser's citrate broth

Sodium ammonium hydrogen phosphate ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 1.5g
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) 1g
Magnesium Sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.2g
Sodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 3g
Distilled water 1ℓ

溶解，分裝 10ml 於試管中，以 121°C 殺菌15分鐘，最後 pH 為 6.7±0.2。

No. 9. Lactose broth

Beef extract 3g
Peptone 5g
Lactose 5g
Distilled water 1ℓ

以65°C溶解之，分裝於裝有倒置醱酵管的試管中，以121°C殺菌15分鐘，最後pH應為6.9±0.2

No. 10. Selenite cystine broth

Tryptone or polypeptone 5g
Lactose 4g
Sodium selenite (NaHSeO_3) 4g
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) 10g
Cystine 0.01g
Distilled water 1ℓ

加熱振盪溶解之，分裝 10ml 於殺菌的 16×15mm 試管，於流通之蒸汽中加熱10分鐘，不能在殺菌釜殺菌，最後 pH 為 7.0±0.1。本培養基因不殺菌須於配完當天使用。

No. 11. Brilliant green tetrathionate broth

Polypeptone 5g
Bile salts 1g
Calcium carbonate (CaCO_3) 10g
Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 30g
Distilled water 1ℓ

澈底混合，並加熱至沸騰，冷至 45°C 時，貯於 5~8°C。另溶 0.1g brilliant green 於殺菌過之蒸餾水中，稀釋至 100ml，於使用當天加 20ml I-KI 溶液和 10ml brilliant green solution 於上培養液 1000ml 中，分裝 10ml 於 20×150mm 殺菌過的試管。注意：在加入 I-KI 和染料溶液後絕不能加熱。未加染料及 I-KI 之前，培養液需先分裝 10ml 於試管 121°C 以殺菌15分鐘。

I-KI 溶液：溶 5g KI 於 5ml 之無菌水中，加 6g I_2 溶解之，以無菌水稀釋至 20ml，待用。

No. 12.

與 No. 11 同，但不加 I-KI 及 Brilliant green

No. 13. Brilliant green agar

Proteose peptone No. 3 or polypeptone	10g
Yeast extract	3g
Sodium chloride	5g
Lactose	10g
Sucrose	10g
Phenol red	0.08g
Brilliant green (5ml of 0.25% Solution)	0.0125g
Agar	20g

溶於 1ℓ 水後，澈底混合間歇振盪加熱之，沸騰 1 分鐘使溶液，以 21°C 殺菌 12 分鐘，冷至 45~50°C 分裝 20ml 於二重皿，將蓋稍移開使其乾燥 2 小時。最後 pH 為 6.9±0.2。

No. 14. Bismuth Sulfite agar (Wilson and Blair) (B.G agar)

Polypeptone (or peptone)	10g
Beef extract	5g
Glucose (dextrose)	5g
Disodium phosphate (Anhydrous)	4g
Ferrous sulfate (Anhydrous)	0.3g
Bismuth sulfite, $\text{Bi}_3(\text{SO}_3)_3$ (indicator)	8g
Brilliant green	0.025g
Agar	20g
Distilled water	1ℓ

充分混合，振搖加熱之，沸騰 1 分鐘得到懸浮液（沉澱將不會溶解），待冷至 45~50°C，分取 20ml 傾入二重皿中，將蓋稍移開乾燥 2 小時再覆上蓋，最後 pH 為 7.6±0.2，不能以殺菌釜殺菌。

No. 15. Salmonella-Shigella agar (S.S agar)

Beef extract	5g
Polypeptone or proteose peptone	5g
Lactose	10g
Bile salts mixture	8.5g
Sodium citrate	8.5g
Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	8.5g
Ferric citrate	1g
Agar	13.5g
Brilliant green (0.33ml of 0.1% Solution)	0.33mg
Neutral red (2.5ml of 1% Solution)	25mg
Distilled water	1ℓ

充分混合直至均勻狀，振盪加熱並沸騰 1~2 分鐘，直至成分溶解，待冷卻至 45~50°C，傾 20ml 於各二重皿中，移開蓋子使其乾燥 2 小時再覆蓋，最後 pH 為 7.0±0.2，不能以殺菌釜殺菌。

No. 16. Triple sugar iron agar (TSI agar) (Difco)

Beef extract	3g
--------------	----

Yeast extract	3g
Peptone	15g
Proteose peptone	5g
Lactose	10g
Sucrose	10g
Dextrose	1g
Ferrous sulfate (FeSO_4)	0.2g
Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.3g
Sodium chloride	5g
Agar	12g
Phenol red	0.024g

懸浮成分於 1ℓ 水中，混合振搖加熱之，沸騰至成分溶解（約 1 分鐘），充填於 16×150mm 試管至 $\frac{1}{3}$ 程度，以 121°C 殺菌 15 分，將凝固前做成高層斜面（斜面長約 4~5 cm），高層深約 2—3 公分，最後 pH 為 7.3±0.2。

No. 17. Lysine Iron agar (Edwards 和 Fife)

Gelysate or peptone	5g
Yeast extract	3g
Glucose	1g
L-lysine	10g
Ferric ammonium citrate	0.5g
Sodium thiosulfate anhydrous ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.04g
Bromcresol purple	0.02g
Agar	15g
Distilled water	1ℓ

加熱至溶解，分裝 4ml 於 12×100mm 之試管，以 121°C 殺菌 12 分鐘，未凝固前做成斜面（約 1 吋）；底深約 1— $\frac{1}{2}$ 吋，最後 pH 為 6.7±0.1。

No. 18. Dulcitol broth (Phenol Red Carbohydrate Both)

Trypticase or peptose peptone No. 3	10g
Sodium chloride	5g
Beef extract (Optional)	1g
Phenol red (or 7.2ml of 0.25% solution of phenol red)	0.018g
Distilled water	1ℓ

溶解 5g ducitol、10g Lactose 或 10g sucrose 於上液中，分裝 2.5ml 於 13×100mm 含 6×50mm 倒置之發酵管的試管，以 118°C 殺菌 10 min，最後 pH 為 7.3±0.2。

No. 19. Lysine decarboxylase broth (Falkow)

Gelysate or peptone	5g
Yeast extract	3g
Glucose	1g
L-lysine	5g

Bromocresol purple	0.02g
Distilled water	1ℓ

加熱至溶解，分裝 5ml 於 16×125mm 試管，於 121°C 殺菌15分鐘，最後 pH 6.5~6.8。

No. 20. Arginine dihydrolase broth

Peptone	5g
Yeast extract	3g
NaCl	30g
Glucose	30g
Bromocresol purple (1.6% Solution)	1ml
Distilled water	1ℓ

調整 pH 至 6.7~6.8 加 0.5% L-arginine 分裝於 13×100mm 試管，於 121°C 殺菌10分。

No. 21. Sodium chloride dilution water (3%)

Sodium chloride (NaCl)	30g
Distilled water	1000 ml

以 121°C 殺菌15分鐘，最後 pH 為 7.0。

No. 22. Glucose salt teepol broth (GSTB)

	single strength	double strength
Beef extract	3g	6g
Peptone	10g	20g
NaCl	30g	60g
Glucose	5g	10g
Methyl Violet	0.002g	0.004g
Teepol	4ml	8ml
Distilled water	1ℓ	1ℓ

分裝 10ml 於試管，以 121°C 殺菌15分鐘，最後 pH 為7.4。

No. 23. Thiosulfate-citrate-bile salt-sucrose agar (TCBS)

Yast extract	5g
Peptone	10g
Sucrose	20g
Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	10g
Sodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	10g
Sodium cholate	3g
Oxgall (or Bile salts)	5g
Sodium chloride	10g
Ferric citrate	1g
Bromthymol blue	0.04g
Thymol blue	0.04g
Agar	15g

Distilled water 1ℓ

溶解並沸騰1~1分鐘，最後 pH 爲8.6，不必殺菌。

No. 24. Trypticase Soy Broth (TSB) (3% NaCl)

Trypticase peptone 17g

Phytone peptone 3g

NaCl 30g

Dipotassium phosphate (K_2HPO_4) 2.5g

Dextrose 2.5g

Distilled water 1ℓ

溶解並沸騰1~2分鐘，以 121°C 殺菌15分鐘，最後 pH 爲 7.3±0.2。

No. 25. Trypticase soy agar (TSA、3% NaCl)

Trypticase peptone 15g

Phytone peptone 5g

NaCl 30g

Agar 15g

Distilled water 1ℓ

溶解並沸騰 1 分鐘，以 121°C 殺菌15分，最後 pH 爲 7.3±0.2。

No. 26. Motility test medium (Semisolid medium)

Beef extract 3g

Peptone or gelysate 10g

NaCl 5g

Agar 4g

Distilled water 1ℓ

先文火加熱並振搖之，然後沸騰1~2分鐘使溶解，分裝 8ml 於試管，以 121°C 殺菌15分鐘，最後爲 pH 7.4。

No. 27. Hugh-Liefson glucose broth (HLGB)

Peptone 2g

Yeast extract 0.5g

Sodium chloride 30g

Glucose 10g

Bromocresol purple 0.015g

Agar 3g

Distilled water 1ℓ

溶解並調整 pH 爲7.4，以 121°C 殺菌15分鐘，除 Glucose 之外，可各加 10ml 10% 殺菌過的 sucrose、cellobiose、mannitol、maltose 或 trehalose 於上液以測定菌對各種糖類的發酵性質。

No. 28. α -Naphthol Sol:

依一般配製法

No. 29. Cytochrome oxidase test reagent

N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine 2HCl	1g
Distilled water	100ml

本液最好為新配製（即配完後即刻使用），Oxidase test 陽性為藍紫色。
本液若盛於褐色瓶貯於冰箱中，在 7 天內可使用之。

No. 30. Nutrient Gelatin

Beef extract	3g
Peptone	5g
Gelatin	120g
Distilled water	1ℓ

溶解成分，以 121°C 殺菌12分鐘，最後 pH 為 6.8±0.2。

No. 31. Salt trypticase broth (STB)

Trypticase	10g
Yeast extract	3g
Distilled water	1ℓ

各加 0, 60, 80, 100g NaCl 於 1ℓ 水中，使成 0,6,8, 及 10% NaCl trypticase broth 供耐鹽性測定，以 121°C 殺菌15分鐘最後 pH 為 7.5。

No. 32. Baird-Parker medium

Tryptone	10g
Beef extract	5g
Yeast extract	1g
Sodium pyruvate	10g
Glycine	12g
Lithium chloride (LiCl · 6H ₂ O)	5g
Agar	20g

加於 950ml 水，加熱沸騰至完全溶解，分裝 95ml 於瓶中以 121°C 殺菌15分鐘，最後 pH 為 7.0±0.2(25°C)，在 4±1°C 貯藏時不得超過 1 個月。

No. 33. Brain heart infusion broth (BHI)

Calf brain infusion	200g
Beef heart infusion	250g
Proteose peptone or gelysate	10g
NaCl	5g
Disodium phosphate (anhydrous)	2.5g
Dextrose	2g

溶解成分於 1ℓ 水中，若有必要以文火加熱，以 121°C 殺菌15分，最後 pH 為 7.4±0.1

No. 34. KF Streptococcal broth

Polypeptone (Peptone)	10g
-----------------------	-----

Yeast extract	10g
Sodium glycerophosphate	10g
NaCl	5g
Sodium carbonate	0.636g
Maltose	20g
Lactose	1g
Sodium azide	0.4g
Phenol red	0.018g
Distilled water	1ℓ

最後 pH 爲 7.2 ± 0.2 ，分裝 10ml 於試管，以 121°C 殺菌10分鐘。

No. 35. Azide dextrose broth

Polypeptone (Peptone)	15g
Beef extract	4.5g
Dextrose	7.5g
NaCl	7.5g
Sodium azide	0.2g
Distilled water	1ℓ

溶解後分裝 10ml 於試管中以 118°C 殺菌15分鐘最後之 pH 爲 7.2 ± 0.2 。

No. 36. KF Streptococcal Agar

Polypeptone (Peptone)	10g
Yeast extract	10g
Sodium chloride	5g
Sodium glycerophosphate	10g
Maltose	20g
Lactose	1g
Sodium azide	0.4g
agar	20g
Distilled water	1ℓ

溶解於水中沸騰 5 分鐘，待冷至 $50 \sim 60^\circ\text{C}$ 加 1ml 1% TTC Solution (2, 3, 5—triphenyl tetrazolium chloride) 於每 100ml 培養基中，以 121°C 殺菌10分鐘。

No. 37. Cooked meat medium

Beef heart	454g
Dextrose peptone	20g
Dextrose	2g
NaCl	5g

取 12.5g 無水 Cooked meat medium 懸浮於 100ml 冷蒸餾水充分混合之，放置15分鐘使顆粒充分潤濕或取 1.25g 於試管加 10ml 冷蒸餾水充分混合，以 121°C 殺菌15分鐘，最後 pH 爲7.2。

No. 38. Potato dextrose agar (PD)

Potato infusion	200g
-----------------	------

Dextrose	20g
Agar	15g
Distilled water	1ℓ

以 121°C 殺菌 15分鐘，最後 pH 為 5.6 ± 0.3 (若加酒石酸調整 pH 後之培養基勿再度加熱使用)。

附錄二 參考文獻 References

1. Buchanan, R. E., and N. E. Gibbons. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
2. BBL. 1973. *BBL Manual of Products and Laboratory Procedures*, 5th ed. BBL, Cockeysville.
3. Borgstrom, G. 1961. *Fish as Food, I*. Academic Press, New York.
4. Borgstrom, G. 1962. *Fish as Food, III*. Academic Press, New York.
5. Colwell, R. R., R. Y. Morita, S. D. van Valkenburg, and R. T. Wright. 1975. *Marine and Estuarine Microbiology Laboratory Manual*. University Park Press, Baltimore.
6. de Figueiredo, M. D., and D. F. Splittstoesser. 1976. *Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects*. AVI Publishing Co., Westport.
7. Difco. 1977. *Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures*, 9th ed., Difco Laboratory, Detroit.
8. FDA. 1976. *Bacterial Analytical Manual for Foods*, 4th ed. AOAC, Washington.
9. Frazier, W. C. 1967. *Food Microbiology*, 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York.
10. Gibbs, B. M. and F. A. Skinner. 1966. *Identification Methods for Microbiologists*. Parts A and B. Academic Press, New York.
11. Levy, J., J. J. R. Campbell, and T. H. Blackburn. 1973. *Introductory Microbiology*.
12. Society of American Bacteriologists. 1957. *Manual of Microbiological Methods*.
13. Stanier, R. Y., M. Doudoroff, and E. A. Adelberg. 1970. *The Microbial World*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs.

附錄三之一 漁業衛生

• 陳 幸 臣 •

1. 漁業衛生的涵義

一九三八年美國食品、藥物與化粧品法案記載：食物若含有任何污穢的、腐敗的或分解的物質，即為混假的 (adulterated) 或不衛生的。最近我國食品衛生管理法規定食品若變質、腐敗；有毒或含有有害人體健康之物質或異物；染有病原菌者，不得製造、調配、加工、販賣、貯存等。可見，衛生的食品不可含有有害人體健康的微生物與物質。但是微生物的污染與有害物質的存在並非在加工時才發生，就水產原料而言，自漁獲開始即有微生物的污染。因此，維持漁獲物的鮮度及保持衛生的處理加工場所等均為漁業衛生的範圍。

2. 魚介類肌肉之一般組成

依種類與季節的不同，魚介類的肌肉組成常有變化，但一般化學組成為水份佔70—80%，蛋白質佔15—20%，脂肪佔1~10%，碳水化合物佔0.5~1%，以及少量的無機鹽類。這些成分中在衛生上引起變化時，以蛋白質與脂肪的變化較為顯著。

蛋白質是由二十多種胺基酸經肽鍵 (Peptide bond) 連結而成的大分子物質。由於不同的組合與構形，蛋白質的種類亦多，但魚介類所含的此等物質主要包括硬蛋白質，肌球蛋白類與肌蛋白類，其中以肌球蛋白類含量最多。

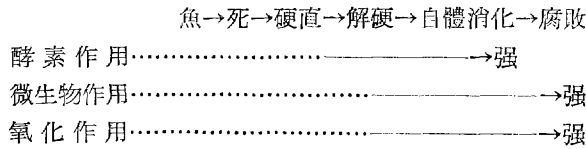
在魚介類的體內尚存有以蛋白質為主要成分的生物催化劑，稱為酵素；這一羣物質擔任魚介類新陳代謝作用的催化，諸如對蛋白質、脂肪、碳水化合物、核酸等的分解與合成的催化。由於生物體活著時，酵素的催化系統達到自身調節與抑制，因此腸道雖然是蛋白質構成，也不會被腸液酵素所分解。但是魚介類一旦死亡，則平衡破壞，抑制作用消失，所以體成分會逐漸被分解。

脂肪的主要成分為脂肪酸，當魚介類脂肪表脂肪分解酵素作用時即被分解出來。它們包括飽和與不飽和的種類。魚類所含的脂肪酸以不飽和的為多，因此魚類脂肪容易被氧化，產生臭油味，或與血紅素及其他成分作用，而產生變色的現象。魚類的脂肪比陸上動物的容易被氧化，就因為其中不飽和脂肪酸含量比陸上動物多，不飽和程度也比較高之故。

還有必須提到的其他成分為魚肉的水可溶物，這些是許多會溶解在水中的物質，但水溶性蛋白質及一些較大的分子除外。這些水可溶物包括胺基酸、肽、核酸化合物、氧化三甲基胺等。此等物質的存在使魚介肉具有鮮味。這些物質因分子小，容易受細菌作用而分解。因此魚類死後這些物質受細菌作用，就轉變成其他物質，其中最主要的為三甲基胺與氨氣。這兩種都是鹽基性揮發性物質，有腥、臭味，其含量越多魚越不新鮮。

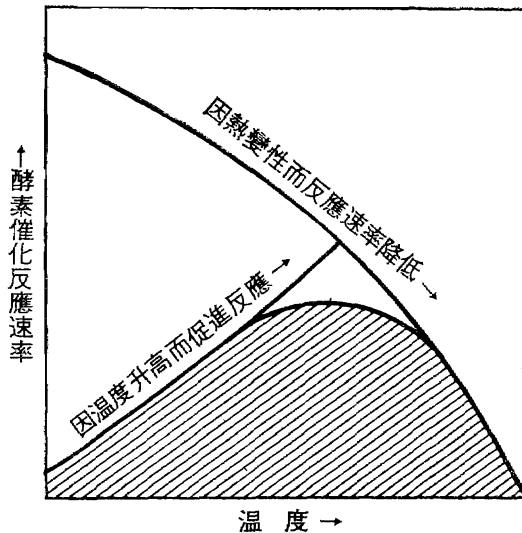
2.1 魚類死後的變化與衛生保持的原理

依魚類與漁法不同，魚死後經1至7小時即開始硬直，再經5至22小時便會解硬而自體消化，最後腐敗（如圖一所示）。魚在死後到硬直期算相當新鮮，到自體消化時期已稍不新鮮，但尚可食用。



魚類死後，酵素平衡系統破壞，因此酵素開始分解體質，使魚體變敗。所以保持魚介肉良好衛生的方法之一是抑制或降低酵素的催化作用。在魚肉中混入酵素抑制劑（如烷化劑）或調整魚肉酸鹼度，可抑制酵素的作用，但是必得將魚肉打碎，且所加入的藥劑很多不能做為食品添加物，因此這些方法不可提倡。但溫度對酵素的催化作用有密切的關係，如圖二所示。

圖一、魚類死後的變化與變敗作用

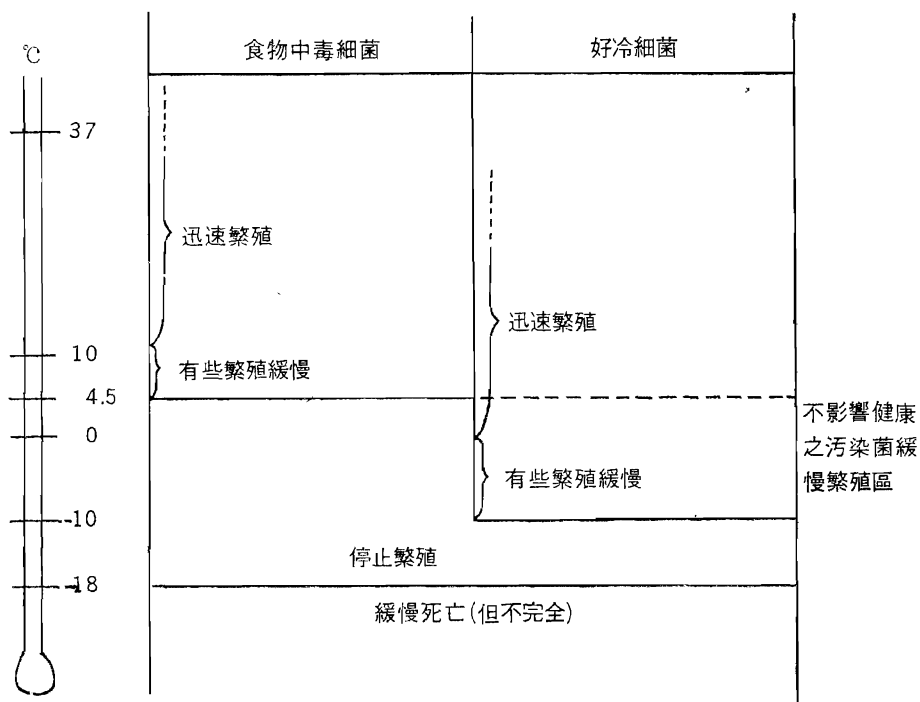


圖二、溫度與酵素催化反應速率的關係

溫度升高會促進酵素的催化反應，但却會使酵素變性而降低反應速率。綜合此二作用得到溫度與酵素催化反應的關係如斜線部份所示。一般酵素在 45°C 時反應速率最大，溫度太高（如超過 55°C ）則被抑制，這是熟魚可保存的原因之一；但溫度降低不能完全抑制酵素的作用，只能使作用大為降低，這也就是凍藏的魚還會慢慢變敗的原因。雖然如此，低溫已是保存魚介類最好的方法。

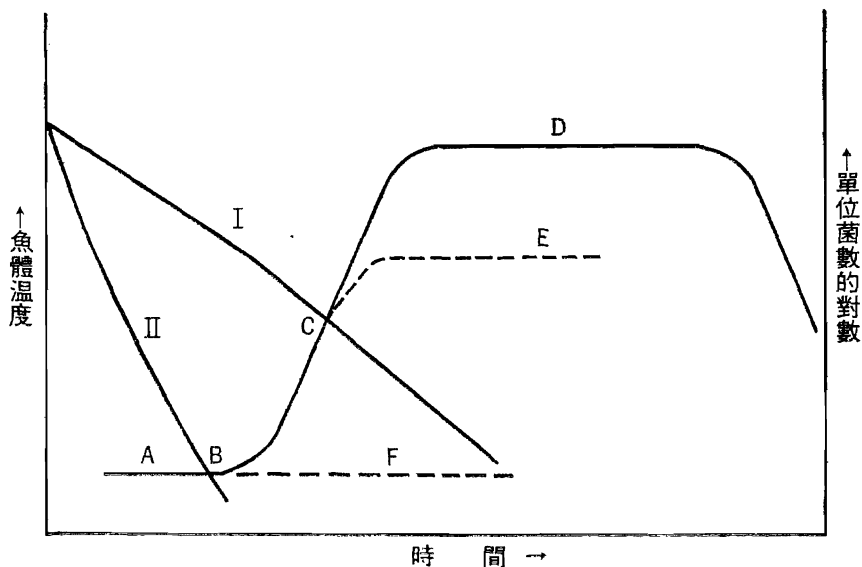
活魚的肌肉與血液中是不含有微生物的，因為當微生物侵入活魚的肉或血液時，即被白血球吞食。可是活魚的體表粘液、鰓因與外界接觸，而附有微生物；又因攝取食物，因此腸道中亦有微生物存在。一旦魚類死後，白血球失去滅菌作用，因正在體表（尤其是傷口）、腸道、鰓等處的微生物就侵入肌肉中，先利用水可溶性物質繁殖、生存，然後再利用酵素分解蛋白質後的小分子而大量增殖，同時也一面分泌酵素破壞肌肉組織。

微生物包括細菌、黴與酵母，而以細菌對魚介類的變敗最密切。儘量減少微生物的污染是減輕微生物作用的有效方法，所以漁獲物及與其接觸的器物的洗滌與消毒非常重要。雖然如此，存於魚體內的微生物只能以溫度來控制。高溫可以殺菌，而低溫只能限制微生物的繁殖，其情形如圖三所示：



圖三、溫度對食物中毒細菌與好冷細菌生長的影响

如此，食物中毒細菌與好冷細菌分別在 4.5°C 與 -10°C 以下的溫度已停止增殖，即已達到靜菌作用，而 -18°C 以下已使細菌緩慢死亡，但不會完全，因此低溫不能殺菌。魚體的冷却速度會影響其所附的菌數。如圖四所示：



圖四、魚體的冷却速度與所附菌數的關係

圖中 A B C D 表示某細菌在繁殖適當的繁殖曲線，但當魚體以曲線 I 被緩慢冷卻時，細菌的繁殖曲線變為 A B C E，又當魚體以曲線 II 被急速冷卻時，細菌的繁殖曲線變為 A B F。因此急速冷卻（或冷凍）能有效的提高魚介肉在微生物學上的品質。

魚死後露在空氣中，脂肪的氧化自解硬後即有微弱的發生，但通常因細菌作用較顯著，所以不易覺察氧化作用，只有在冷凍或冷藏中，因為微生物作用較輕微，氧化作用才容易被看出。隔絕空氣與魚體接觸是防止氧化的根本辦法。降低貯藏溫度與使用抗氧化劑，均可減輕氧化。

3. 漁業衛生作業

3.1 在漁船上的作業與一般處理

(1) 注意起網時間與作業日程

漁場水溫的不同，會影響微生物繁殖的速率，因此依漁場水溫的差異，應注意起網時間，以避免死亡或受傷漁獲物在拖曳期間的過份污染。譬如水溫在 4.5°C 以下最少 5 天要起網一次，在 $4.5\sim 10^{\circ}\text{C}$ 最少 3 天要起網一次，在 15°C 以上最少 1 天要起網一次。

出漁作業，很快滿載時，魚介的品質必佳。但若捕獲量稀少時，先捕獲的魚必須放置魚艙，等候繼續捕捉，至艙滿方回，此時先捕的魚，鮮度即已降低。或是海況不好，作業受到影響，且捕獲的魚容易在船上受傷而使品質變差。因此，船長應考慮這些因素，而決定作業日程，不要為多捕些魚而致使魚的品質下降，得不償失，徒費勞力、物力。

(2) 將魚儘速殺死

欲延長魚的鮮度，應將捕獲的魚儘快置死，因為如此，則開始硬直與解硬的時間均會延長。所以魚捕上甲板後應儘速將其置死，如體型大一點的應立刻放血，或用木槌擊斃，不要任其在甲板掙扎，苦悶而死。

(3) 選別與沖洗

為了不使微生物過份污染，活的、死的、受傷的魚應立刻分開，並將下雜魚放在一定的地方，然後以含 100 ppm 有效氯的海水（如使用抽水幫浦抽取清淨的海水，以自動加氯器加入氯，水壓宜在 15~20 psi）沖洗。

(4) 除去鰓與內臟

體型大一點並值得費勞力的，應除去鰓與內臟（此時亦同時放血），因為這些部份除含有許多酵素外，是細菌繁殖的良好培地，應儘快除去，並要除淨，然後再以含 100 ppm 有效氯的海水洗淨。

(5) 避免損傷魚體

魚被捕上船，裝箱及搬運時，要注意避免無謂受傷，例如不可使用手鈎釣魚，因為魚體受傷，不僅外觀不良，影響售價，而且細菌容易侵入肌肉中，易起腐敗。

(6) 避免日晒

魚捕上船後，應避免日晒，若能以蓬布遮蓋作業的甲板最好，否則應儘快處理，避免日晒太久。因為魚體溫度上升有助於酵素的作用，脂肪的氧化與細菌的繁殖。

(7) 注意漁船清潔及船員的各人衛生

每次起網、卸鈎將魚處理後，應使用含 100 ppm 有效氯的海水沖洗甲板。當船靠岸卸完魚後

，應用非肥皂洗刷魚艙，再用 100 ppm 有效氯的淡水或海水沖洗，或噴洒 200 倍稀釋的安期消毒液。船員儘可能穿著乾淨的工作服，便後要洗手，指甲要常修等。

(8) 注意魚箱的清潔

使用木製魚箱應特別注意清潔，因為使用過的魚箱細菌會侵入木質的內部。因此使用前必須浸泡含 100 ppm 有效氯的水或 200 倍稀釋的安期消毒液，再沖以淨水。如果能使用鋁或塑膠製的魚箱更好，因為細菌無法侵入內部，且易於洗滌。

3.2 在船上的冰藏作業

用碎冰保鮮的優點是冰可與魚體密切接觸，在適合條件下魚體溫度可降至 0° 至 4°C，減低細菌繁殖與酵素、氧化的作用；同時，冰融化後可洗除魚體的細菌，血液及粘液。其缺點是碎冰易融解成塊，如此則冰會刺破魚體、造成空隙，無法使冰與魚完全密著，但此缺點可使用 -15°C 的過冷卻冰塊克服，使用時應注意下列幾點：

- (1) 魚與冰的用量應相等。
- (2) 魚四周均應有冰包圍。
- (3) 不能堆放太多的冰和魚，以免壓傷。
- (4) 除去鰓與內臟的魚，腹腔與鰓均應填塞碎冰。
- (5) 融解的冰水應匯入艙底排除。
- (6) 要用飲用水製冰，舊冰不能再使用。

3.3 在船上的凍藏作業

冷凍不僅有靜菌作用，而且會使細菌凍傷而緩慢死亡。除此之外，酵素與氧化的作用也為之大減。因此，凍藏可有效地保持魚介類的鮮度。

實施凍藏前須先預冷及處理：殺死後的魚應立刻該於冰水或冰海水中，使魚體的溫度充分下降。預冷後再依魚體的大小及種類而實施處理，如除鰓、除內臟、除頭、除內臟，或切片等。

冷凍的施行應在死後硬直前，其公稱凍結速度應大於每小時 0.6 公分，凍藏時應使魚肉的中心溫度低於 -18°C，為防止氧化及水分蒸發，魚體在凍結完了應施以包冰（冰重為魚重的 2—3%），水中尚可加入抗氧化劑（如 B.H.A.），以防止魚肉的氧化。

3.4 魚市場的衛生作業

魚市場應有足够的防日晒設備，以避免日光直射於漁獲物上，並應有充分的水源以便沖洗場地或漁獲物，切勿使用魚市場近旁的海水沖洗，場內的地面及空氣應時常保持清潔，勿讓畜牲進入場內。人員如廁，在廁外應有消毒用踏腳池。

3.5 水產品加工廠的衛生作業

(1) 原料要儘快處理

水產原料在可處理的狀態下一般均在冰點以上。由於在一定溫度界限內，溫度愈高，酵素、氧化和微生物作用愈激烈。有人做過試為，發現溫度每升高 10°C，酵素催化與氧化作用速率均增加 2 倍，而微生物繁殖速率增加 10 倍。因此為避免溫度上升所引起的不良影響，原料應儘快處理。如果不立刻處理，應該貯放冷藏庫或凍藏庫中，不可任意放置日晒或讓蒼蠅停留。

(2) 注意調理臺、輸送帶、器皿等的清潔

(a) 消毒劑的使用

消毒劑的種類繁多，效果各異，本省冷凍食品廠以使用次氯酸鈉、氯氣、安期消毒液為最多，少數也有使用 Tego-51 的。這些消毒劑的殺菌效果如表一所示：

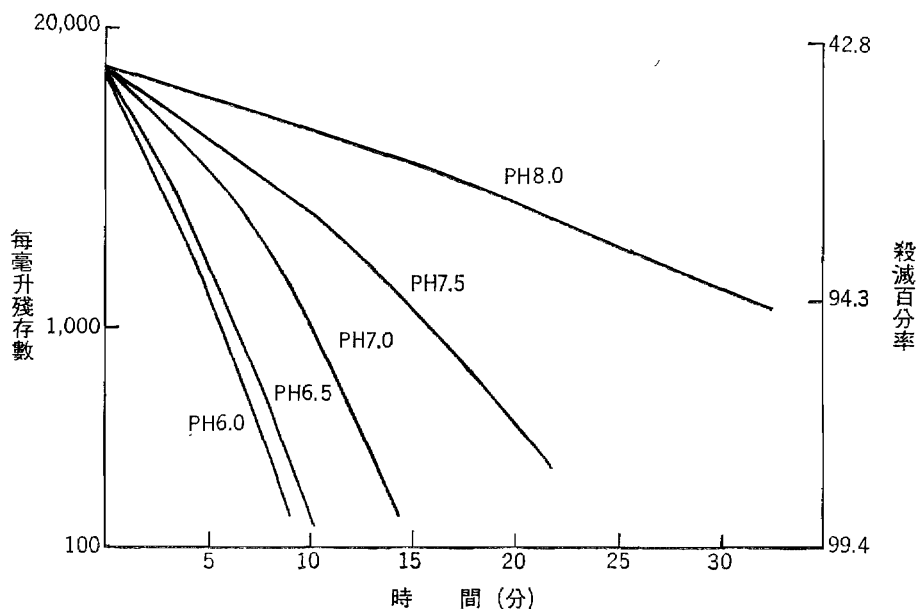
表一、次氯酸鈉、安期消毒液與 Tego-51 中含有全脂奶粉 0.03% (W/V) 時對 *E. coli*, *A. hydrophila* 及 *Sta. aureus* 的殺菌效果

消毒劑	濃度	pH	試驗菌		
			<i>E. coli</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>Sta. aureus</i>
NaOCl	100 ppm* ¹	8.6	+	+	+
Tego-51	1/200	7.6	+	-	-
Antiseptol	1/200	7.6	-	-	-

* 1 有效氯量。

可見 100 ppm 的次氯酸鈉溶液含有約 0.03% 有機質時即已完全失去對三種試驗菌的殺菌效果，Tego-51 略遜，但由市售安期消毒液稀釋 200 倍時，殺菌效果最好。

雖然如此，有些工廠還一直喜歡使用次氯酸鈉，而且認為濃度愈高殺菌效果愈好。其實如果以氯氣或酸化氯胺 (acidified chloramine) 將水氯化時，濃度愈高殺菌效果愈好是事實；使使用次氯酸鈉則不然，有人做過試驗，含次氯酸鈉 1000 ppm 的水溶液得到同樣殺菌效果的時間為含 25 ppm 的 5 倍，因為鹼性較高，使殺菌效果變差。氯化水的 pH 也會影響殺菌效果，一般低 pH 有利氯的殺菌（如圖五）。



圖五、氯化 pH 水的對孢子殘存的教果

因此，工廠用水的氯化，最好使用氯氣，方便且效果好。

(b) 清潔法

在一日的作業中，要時時注意場所、設備、用具等的清潔，例如原料處理場或前處理臺，這些最容易堆積廢棄物的地方，在伏息的時間要有專人負責清理的工作，如使用高壓的水或混有水與洗滌劑的蒸汽槍，將臺上的廢棄物沖除，再從地面移棄。對於處理臺，器皿等之清洗或可先用非肥皂洗滌，再用清水（不含氯亦可）沖掉非肥皂，然後再淋蓋或浸泡 200 倍稀釋的安期消毒液 5 分鐘以上，最後再用含 10 ppm 有效氯的水沖淨。在一日的作業完畢後，為便以清洗，要盡可能拆卸污穢的機件洗滌。當使用高壓水、蒸汽槍或刷子將廢棄物洗除後，須再檢查一次，時常有粘液或碎屑尚留存著，應再沖刷。若使用洗滌劑要在乾燥之前用水沖淋。清洗後對於調理臺、輸送帶、器皿等要淋蓋消毒劑，待第二天作業前再以冷水或溫水沖除。

(3) 足够的熱處理

這是專為冷凍調理食品而言。因為一定的熱處理，對微生物有一定的熱滅率時間，例如培養（37°C）在鰻魚抽出液的大腸菌，在 55、60 及 65°C 的熱滅率時間各為 17.59、2.91 及 0.66 分鐘。因此，例如白烤鰻的加工為合乎要求的衛生標準，可調整烤鰻機輸送帶的速度與火焰的大小，使在 3.5 至 4.5 分鐘烤燒時間內鰻魚片的中心溫度最低達 78°C 較為安全。

(4) 足够的凍結與凍藏溫度

水產品凍結時，凍結室的溫度應有公稱凍結速度，在每小時 0.6 公分以上；凍藏庫的溫度應能使水產品的中心溫度在 -18°C 以下，而且要避免溫度的波動。

(5) 注意凍結室與凍藏庫的清潔

這些 -18°C 以下的低溫場所，微生物是不容易生長的，但是凍結室因受尚未凍結的產品氣味的影響，所以常帶有異味。但是有些水產品如沙魚、劍旗魚等縱使凍結了，也會有氣味放出；如此，凍藏庫也有同樣異味。包冰雖可防止一些氣味的散發，但是如果能在這些地方安置活性炭過濾器或紫外燈（不要直接照射到產品），使空氣循環通過這些裝置，則更能除臭。此外，要定期（如一個月或當產品完全出完時）進行清掃與消毒的工作。那些靠近產品的牆壁與地面，在洗刷後還要淋上消毒劑（如安期消毒劑），過一段時間（如 1 小時）後再將其沖除。久未使用的這些低溫場所，除要如上法清洗之外，還要用氧化乙烯燻過。

附錄三之二 微生物與水污染

• 林 良 平 •

國立臺灣大學農業化學系教授

水中的微生物羣落 (microbial flora) 受到許多種廢棄物與污水的影響，許多微生物特別是經由家庭污水進水河水、湖水、海岸水中，家庭污水中含有大量的有機與無機養分，導致細菌與真菌的大量繁殖，相反地，微生物羣落經常遭受到有現物質菌抑制甚或被其大量的破壞，病原性細菌與真菌亦是經由污水進入水中並可引起傳染病，藉著有機廢棄物的分解，微生物對水的自然自淨有決定性的貢獻。在污水淨化中它們具有相似的功能，而淨化的這些過程中，有機養分的濃度降低，終使水中的細菌含量相對的減少。

1. 污水的微生物羣落

在許多例子中污水具有其代表性的微生物羣落。家庭污水含有大量的糞便、廢水及食物殘渣，細菌含量特別豐富，德國 kiel 市區污水在一九六八至一九六九年每月測定的結果顯示每毫升中有三百萬至一千六百萬的應生微生物數，大部分為腐敗菌，如 *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Aerobacter cloacae*, *Zoogloea ramigera* 等。此外尚有衆多為數不同的其他各種生理羣，特別是會分解糖類、澱粉、脂肪、尿素與纖維素的微生物。桿狀細菌 (coliform bacteria) 的比例相當高，是水質受糞便物質污染的一個重要指標，kiel 市的污水中，大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 的數量介於每毫升數萬至數十萬間，*Aerobacter aerogenes* 與 *Escherichia* 相似同屬於 *Enterobacteriaceae* 目，經常與 *Streptococcus faecalis* 一起被發現，*Streptococcus faecalis* 也是人類腸道中的寄生性微生物，更甚者，污水中亦存有大量的噬菌體。

在富含有機質的污水中，*Chlamydothrix* 相當重要，尤其是經常被誤稱為「污水真菌」的 *Sphaerotilus natans*，它是典型的污水生物，經常形成肉眼可見的厚氈覆蓋在嚴重污染水域的底部，河流中，細菌絲狀物及束狀物常遭撕裂，大量的漂浮於水中，此稱為「菌絲漂浮」(mycelial drifting)，如果氧氣的供給情形良好，*Sphaerotilus natans* 不僅生長於家庭污水中並且生長於纖維工廠及各種食品工業的污水中，尤其在春秋季節，水溫約 10°C 時，*Sphaerotilus natans* 在適度污染的流水中呈現大量繁殖現象，它最適合於在那種溫度生長 (圖 1)，由此菌較污水中其他的競爭者佔有較大的優勢，當其急速生長時會消耗大量的氧氣，因此在不流動的水域中如果有大量的 *Sphaerotilus* 生長，會迅速導致氧的消失，*Sphaerotilus* 菌體終因缺氧而死亡並腐敗生成 H_2S 等產物。污水中經常含有豐富的脫硫細菌 (desulfurizing)——最重要者為 *Desulphovibrio desulphuricans*——因為有充分的養分供給，促進細菌性硫酸鹽還原作用而加速硫化氫的形成，許多污水亦含有硫化細菌，特別是 *Thiobacillus*, *Thiothrix*, *Beggiatoa* 等屬，當 H_2S 形成時，它們可以迅速的繁殖，脫氮細菌，如 *Thiobacillus denitrificans*, *Micrococcus denitrificans* 及甲烷生產菌與 “knallgas” bacteria，與各種鐵細菌如 *Leptothrix ochracea* 與 *Thiobacillus ferrooxydans* 皆大量存在於家庭與某些工業污水中。在含油污的污水中，能分解碳氫化合物的細菌會聚集，這些主要為 *Pseudomonas* 與 *Nocardia* 屬的細菌。

在有機污水中，除了細菌外尚有許多的真菌。市區的污水通常富含酵母及酵母狀的真菌。例如 kiel 市的污水中每升酵母細胞數在 4,000 至 200,000 之間，一般主要為 *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* 屬的菌及少量其他的菌。某些食品與釀造工業的污水中經常發現酵母的

菌數非常高。

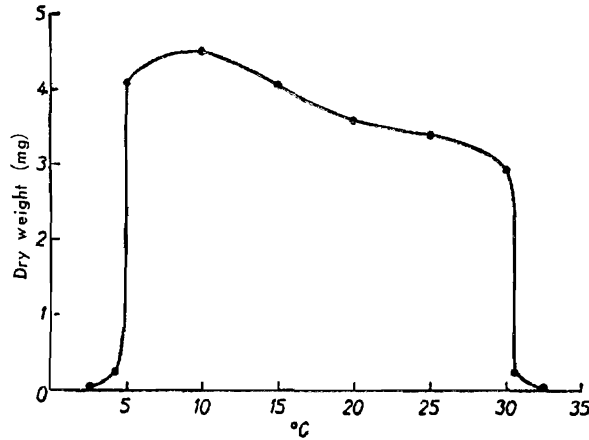


圖1. *Sphaerotilus natans* 的生長與溫度的關係

通常家庭污水中也含有大量的真菌孢子與菌絲。嚴格的說污水真菌為 *Leptomitius lacteus* 及 *Fusarium aquaeductuum*，它們可以在嚴重的污染水域中大量繁殖——與 *Sphaerotilus natans* 相似——並導致可怕的菌絲漂浮。這類真菌最適合生長於被纖維工業排出的亞硫酸廢液污染的水域中，它們主要的食物為碳水化合物，在一升的亞硫酸廢棄乳液中約有 35~35g。這些碳水化合物主要為葡萄糖，甘露糖和木質糖，其相對含量依各種工業使用木材種類而異。真正的污水真菌生長在 pH 3~pH9，它們與 *Sphaerotilus natans* 不同，可以在相當酸性的水域中大量繁殖。

2. 污水微生物之檢定

定期檢查受廢物污染水中所含之細菌，可減少因使用污水而致病的可能性；根據學理水中可能含許多無害的寄生菌種，這些寄生菌一般生存於土中或水、空氣中；雖然如此，水質可能受家庭污水的污染而帶自人類的病原菌，如傷寒、副傷寒、痢疾、肝炎、霍亂等致病菌。這些病菌乃隨糞便排出為致病根源，所以水質檢查中以糞便污染為最基本且最重要的。但水質檢定，一般只做總菌數之定量或測較普遍的腸道糞便微生物之存在與否。

(1) 糞便污染之指標微生物

①大腸菌類：在腸道菌或糞便菌中最普通的細菌乃是大腸菌一類的細菌。這類細菌包括所有好氣性或通性嫌氣性格蘭氏陰性，不產生孢子的桿菌，於 35°C，48小時內會將乳糖發酵產生酸和氣體。其中以 *Escherichia coli* 分佈最廣。*Enterobacter (Aerobacter) aerogenes* 次之。測定這類微生物較測定特殊的病原菌有下列優點；第一，這類微生物大量存在於健康人體及病人的腸道中，平均每一個人一天排出數百萬的大腸菌。所以大腸菌於污水中數量眾多是污染指標的第一個優點。第二、大腸菌於水中的殘存時間（較其他腸道菌）久，因此可測定最近或早期的污染。第三，大腸菌很容易測定出來，只要短時間內即可檢定，不像其他特殊的病原菌之檢出費時間。因此一旦某水域受了污染，該水域的飲用者可於24小時後接到警告通知，避免感染病菌。

②其他指標微生物：除了大腸菌類，三個其他經常存於人體或動物糞便的細菌羣是一、fecal streptococci，尤指 *S. faecalis*。二、*Clostridium*，尤指 *Cl. perfringens*。三、*Bifidobacterium bifidus*。這些種類的細菌都很容易從水中，食物中或乳酸產品中分離出來（利用很簡單的選種培養），而且容易鑑定。尤其是前二者經常做為水質或糞便污染的指標。

(2) 污染指標微生物於水域之殘存時間

水域中污染指標微生物的存活時間（圖 2）是很重要的。例如 fecal streptococci 於開放水中無法增殖且殘存不久，又如 *B. bilidus* 也不能增殖，只能短期殘存。所以污水中若存有大量的這二種微生物的話，則表示最近幾小時或幾天當中，水質遭受污染。大腸菌數量較 Streptococci 多，於被污染之開放水域中可有某限度的增殖，殘存期隨環境而異在數星期至數月間。*Cl. perfringens* 因具有孢子可無限期存活，若於水域中只間現 *Cl. perfringens* 的孢子而沒有別的腸道微生物則表示被污染時間在相當早之前。這些微生物都不是人體污染的最佳指標，因為它們普遍存在於土壤或動物糞便，人體排泄物中，而非侷限於人體內。

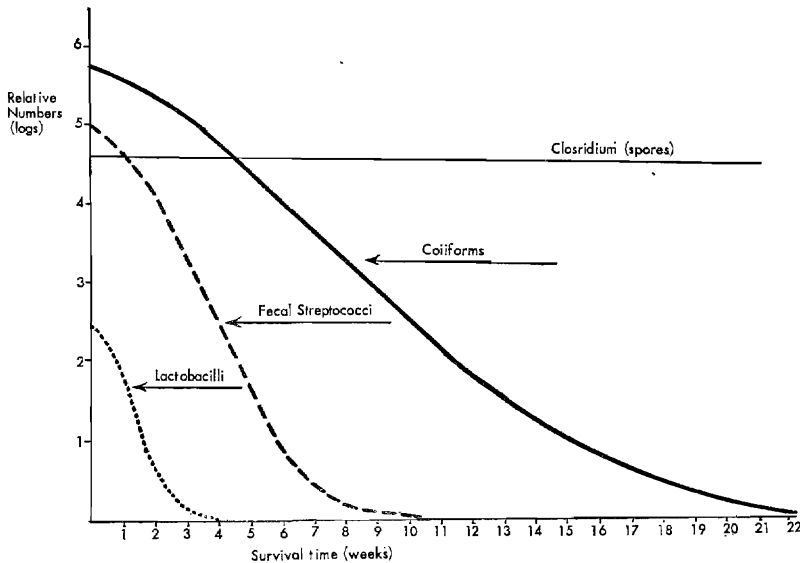


圖 2. 各種當做水污染指標微生物的大致殘存曲線

3. 水中的病原菌

人類的病原性細菌與真菌主要經由家庭污水進入水域中。這些病原菌無法永遠生長，在內陸水域或海水中終會死滅，但是視水的種類及一般的狀況，各種病原菌都可存活一段時期。它們仍具有致病的能力，因此遭受污水污染的湖泊，河川和海域可能是傳染病的危險來源。在被污染的水域中經常發現的是病原性的腸內微生物，如 *Salmenella typhi* 和 *S. paratyphi* 可以引發腸熱病 (enteric fever)。然而，*Salmonella* 傳染病並不只是由這種污水引起，食用污水污染水域中的牡蠣及其他貝殼類也會發生這種傳染病，較少發現的為 *Shigellae* (赤痢的病原菌)。在熱帶國家，霍亂的病原菌 *Vibrio comma* 流行性的發生且通常經由水污染而傳播。病原性 Clostridia，尤其是導致氣壞疽 (gas gangrene) 的 *Cl. perfringens*, *Cl. novyi* 與 *Cl. septicum* 等的孢子，可在污染的水域中發現，這些孢子可以在沉澱物中存活相當長的時間，甚至可以大量繁殖。

在病原性真菌中，特別是酵母狀的 *Candida albicans* 及相關的種類可以在污水中發現。屬於不完全真菌且會引起皮膚傳染病，高度發育的 dermatophytes 也可經常發現。例如 *Trichophyton* 種發生於海灘的沙土中。

除了真菌與細菌外，家庭污水亦含有許多的人類病原性病毒。在這種環境下可保持一段時間的致病力。據說被污染的水域具有重複性的 poliomyelitis viruses 之傳染性。在城市污水中，幾乎每個

夏季都可發現 polio viruses。飲用被污染的水後更常發現的是濾過性病毒的腸道感染病，同樣是在夏季特別多。這種感染重複的發生於被污染的戶外游泳池中。這些感染病由經常在溫暖季節的污水中污發現的 Corsackie 或 Echo Viruses 引起。某些肝炎濾過性病毒也可隨著水轉移，這種病例在食用被污染水域中的蠔類 (molluscus) 時偶而會發生。

大部分病原細菌在新鮮水域的湖泊或河川中的存活時間比在海水中的長，因海水是非海洋細菌 (non-marine bacteria) 的殺菌劑。通常在沉澱物中的存活時間比自由水中長，同樣的，在海洋沉澱物中的存活時間短於內陸水域中的沈積物。因此在沐浴中受感染的危險性通常僅存在於污水進口的附近。然而，經由鳥類丟棄的小片魚肉或漂浮的肉片，傳染的危險性則可延伸相當長的距離，因為病原菌在這種蛋白性物質中絕大部分可以抵禦海水的殺菌作用，甚至可繁殖。

除了人類病原微生物，污水也含有動物與植物的病原菌。這些病原菌不僅可導致水生動物的疾病，也可導致家畜與野生動物的疾病。植物疾病可能經由澆灑表面水而轉移至蔬菜與水果上。當污水以土壤過濾處理時，遭受感染的危險性仍很大。

4. 微生物在水的自淨作用中所扮演的角色

大部分的河川，湖泊及某些海域，幾乎都是連續不斷的受到廢棄物與污水的污染。因此水的自然自淨作用是非常重要的。這種淨化過程不斷的將水中的污染物移除，使得在污水進口處下方數公里的河川，仍能保持相當的潔淨。沈澱及氧化等物理與化學過程雖然也扮演著重要的角色，但決定性的角色仍應屬於生物過程。許多生物參與此種過程，從鳥類、魚類下至微生物。不純淨的污水出現的地方就有海鷗及其他海鳥的聚集，魚類並撿拾最粗糙的碎片。通常，它們僅能利用污染物質中極小的一部分為食物。低等動物的重要性較大，尤其是各種昆蟲的幼蟲、蠕蟲及原生動物，它們可以攝取較小的顆粒，決定性的角色則由細菌與真菌扮演。細菌與真菌可以分解固態或溶液態的有機化合物，在最合適的性形下，有機物會被分解成二氧化碳、水和少數的無機鹽，因此細菌與真菌能夠完全實現許多有機污染劑的再礦化 (remineralization)。蛋白質、糖類與澱粉的分解尤其迅速、脂肪、臘質、纖維素與木質素則緩慢地多，有時分解也不完全。隨著自淨作用的進行、蛋白質分解菌的比例慢慢降低，纖維素分解菌的比例則慢慢升高。

然而，自然的自淨作用僅在污染物質的組成與量不超過該水域接受體的自淨能力時方有作用。即使是最合適的條件下，進入水域的廢棄物與污水通常比該水域能夠處理的高出很多，自淨過程受到干擾，續而發生非常不合理的結果。氧氣的急劇消耗，導致完全嫌氣狀態後，腐敗過程與細菌性硫酸鹽還原作用，便引導硫化氫的產生。結果不僅導致幾乎所有高等生物的死亡，許多微生物亦然，僅有少數種類的微生物能夠發展，進行有機污染物質的部分分解。硫化鐵形成，形成惡臭的黑色“sapropel”，導致水域底部原有生物相的死滅。如果在暴風雨後，湖泊或海岸水中帶有硫化氫的污水由深處突然上升至表面，則危險性特別大，可導致魚類的大量死亡，且對被感染水域的水產業具有相當的危害性。

直接引入有毒物質也會干擾自淨過程，這些有毒物質主要經由工廠的污水與廢棄物進入水域中，且此有毒物質會導致再礦化過程中微生物的死滅。重金屬、氧化物及有機毒劑特別容易發生這種情形。

5. 臺西沿海養殖貝介類區域之微生物分布

海洋中無脊椎動物如牡蠣、蛤、貝、蟹、大蝦和小蝦等繁殖很快，具有很高的經濟價值。這些無脊椎動物大部棲生於近海或河口，臺灣西海岸各地區已有大量的養殖。最近西海岸都市地區或附近的

河川，皆被都市污水及工廠廢水所污染，明顯地改變了河川及河口的生物生長環境。

微生物檢查在全世界貝介類生長地區的衛生研究上已具有明確的意義，可幫助估計撈獲後或在市場上販賣的貝介類等的衛生品質。將本省養殖貝介類地區在環境污染下微生物羣之變化，分佈及其活性於對環境污染及貝介類死亡率的相互關係摘要如下。

取樣時間為一九七四年三月至一九七五年十月。取樣地點包括養殖貝介類的河口地區（東石、金湖）以及朴子，北港及牛屎等溪流之上游地區。ZoBell's Marine Broth 2216 (Difco) 培養基用於異營細菌之活菌數測定，分離及形態鑑定。總大腸桿菌型依照標準法 (APHA) 利用薄膜過濾技術測定。酵母菌及真菌類以 yeast peptone glucose medium 測定及分離。

在各種不同季節的海水及沉澱物中相關的好氧性之活異營細菌數經測定結果，發現在4月至5月之雨季期間，有較多異營細菌之存在。在水及沉澱物中總異營細菌數各為 $10\sim 10^9/\text{ml}$ 及 $10^2\sim 10^8/\text{g}$ ，而總大腸桿菌型菌數各為 $10\sim 10^4/\text{ml}$ 及 $10\sim 10^2/\text{g}$ 。每一地方取樣中隨意選出約 50 株細菌依照 Simidu 和 Aiso 氏所提出之分類表進行一般性的鑑定，結果發現革蘭氏陰性細菌之存在量，要比革蘭氏陽性細菌多。屬於革蘭氏陽性細菌包括 *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Arthrobacter* 及 *Dactobacillus*，而屬於革蘭氏陰性細菌有 *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Flavobacteria*, *Acinetobacter* 及 *Cytophaga*。水分及沉澱物中好氧性總活酵母菌各為 $10\sim 10^8/\text{ml}$ 及 $10^2\sim 10^4/\text{g}$ 。12 株酵母菌分離菌經初步鑑定係屬於 *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera* 及 *Cryptococcus*。在分離培養基上亦常發現有 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Labyrinthula* 及 *Lageidium* 等真菌類。

依照美國對各種用途之水所允許微生物之量，在其允許養殖貝介類地區，大腸桿菌含量，最大或然數 (median MPN) 不得超過 70，而在取樣數目中不得有 10% 以上超過 230。管制區的貝介類僅經清洗後可販賣，最大或然數不得超過 700，而在取樣數目中不得有 10% 以上超過 2,300。由上述研究測定所得大腸桿菌型數目觀之，廢水已污染到臺灣西海岸養殖貝介類之地區，但所幸的是臺灣居民在食用所產的貝介類時，不是生吃而是先經煮熟烹調後再食用。

參 考 文 獻

1. APHA (1970): Recommended Procedure for the Examination of Seawater and Shellfish, 13th ed. APHA, N.Y.
2. APHA (1971): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater APHA, N.Y.
3. APHA (1976): Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, APHA, Washington, D.C.
4. Ingram M. et al. (1969): Microorganisms in Foods I & II, ICMSF, Tronto, Canada
5. Rheinheimer G. (1974): Aquatic Microbiology, John Wiley & Sono, N.Y.
6. 洪楚璋等 (1975): 臺灣西南沿海貝類死亡原因之研究，國立臺灣大學理學院海洋研究所專刊第 6 號。
7. 洪楚璋等 (1976): 林園海域環境調查報告，國立臺灣大學理學院海洋研究所專刊第 7 號。

附錄三之三 ECOLOGICAL STUDIES OF *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* IN SOILS OF TAIWAN

Che-Chung TSAI* and Sheue-Ching TING*

Soil samples from cultivated fields were examined for toxigenic *Clostridium botulinum*. Ten culture attempts were made on each soil sample. Detection was based on identification of botulinum toxins in enrichment cultures. The number of cultures containing toxins were variable in positive soil samples, ranging from 1 to 9 per ten tests. One hundred and five (78%) of 134 soil samples were positive for toxigenic *C. botulinum*. Seventy percent of positive samples had multiple types of toxins. Types A and B were found predominantly followed by type E, types C and F were found least frequently. The existence of toxigenic *C. botulinum* in inland soils of Taiwan indicates the potential risk of botulism.

Key words: *C. botulinum* in soils, botulinum toxins.

The public health importance of *Clostridium botulinum* is well-known because of its spectacular nature and high case-fatality rate. *C. botulinum* has been isolated from many countries in the world. Spores of *C. botulinum* are widely distributed in the surface layers of virgin and cultivated soils, and in mud or sediment of aqueous environments.

The absence of reports of human and animal botulism from the literature in Taiwan is probably due to neglect of differential diagnoses in patients and lack of laboratory findings of the causative organism and/or its toxin. The distribution of spores of *C. botulinum* in Taiwan has not been investigated. The principal habitat of *C. botulinum* is the soil, particularly in agricultural areas. The main agricultural soils of Taiwan are latosols and alluvial soils. The reddish brown latosols of the tablelands are suitable for the growth of tea, banana, citrus fruits, pineapple, citronella, etc. The alluvial soils of the plains are the most important soils for agriculture; there are planted rice, sugar cane, sweet potato, soybean, peanut, corn, green vegetables, and fiber crops. What is the distribution of *C. botulinum* in the agricultural soils of Taiwan? Because of the spectacular nature of *C. botulinum*, its spores may be present in almost any food that is exposed to soil, dust, mud, sediment, etc. Inadequate preparation and preservation of vegetables, fruits, and animal foods create the potential risk of botulinum food poisoning (botulism). Therefore, this investigation was undertaken to detect the prevalence of *C. botulinum* in the main agricultural soils of Taiwan. The results of ecological studies of *C. botulinum*

* Institute of Public Health, College of Medicine, National Taiwan University, Taipei, Republic of China.

are described. The potential health problem of botulism is also evaluated for precaution and prevention.

MATERIALS AND METHODS

Soil samples

During the periods of June 1975 and July 1976, one hundred and thirty-four soil samples were obtained from various agricultural areas. The source, pH and other characteristics of the soil samples were recorded. They were obtained by removing the top 10 to 15 cm and sampling the soil to about 20 to 30 cm, and were transported in double layers of polyethylene bags to the laboratory.

Culture media

For primary growth and toxin production of *C. botulinum*, the cooked meat medium (CM) with modification was used for enrichment cultures. The modified CM medium consisted of ground beef heart, 454 g; trypticase (BBL), 15 g; proteose peptone (Difco), 10g; yeast extract, 4 g; soluble starch, 3 g; glucose, 2.5 g; sodium chloride, 5 g; potassium phosphate, 5 g; and sodium thiglycollate, 1 g. Meat particles were obtained from ground beef heart which had been boiled and cooled in order to remove fat and to separate meat broth by filtration. The other components were dissolved in 1 liter of original meat broth, with distilled water added, and the pH was adjusted to 7.3 to 7.4. Eight ml of broth were dispensed into pyrex screwed-capped tubes (16×125 mm) containing meat particles (1 part meat particles to 8 parts fluid). Other media used for subculture, isolation, and biochemical tests were prepared according to the method of Holdeman and Moore⁽¹⁾.

Culture procedures

For demonstration of the presence of *C. botulinum* in soil specimens, ten 1-gram samples of each soil specimen were inoculated into a series of tubes of the modified CM media which had been heated in boiling water and cooled immediately in ice water before inoculation. After inoculation, the ninth and tenth tubes were again heated in 75°C water bath for 30 min, and cooled. The inoculated cultures were then incubated anaerobically at 25°C to 28°C for 5 to 7 days. Unless otherwise stated, cultural procedures were performed under anaerobic gassing with 90% CO₂-10% N₂; and anaerobic incubation was carried out in the same atmosphere in anaerobic jar (BBL) or anaerobic incubator (National Appliance Co., Portland, Oregon).

Toxins

Type A crystalline toxin was provided by the courtesy of Dr.E.J. Schantz, Food Research Institute, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin. The cultural fluids used as the crude toxins were obtained from the organisms of types A, B, C, D, E, and F

which were kindly supplied by Dr. Louis DS Smith, VPI Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia. These organisms were grown in the modified CM medium for 5 to 7 days at 25 to 28°C. The crude toxins obtained from the reference strains were used for positive control purposes.

Detection of botulinum toxin

After incubation, the culture fluids obtained from the modified CM medium were transferred to centrifuge tubes and kept frozen overnight or longer in order to reduce nonbotulinic deaths^{2,3}. The contents were then thawed and centrifuged. The supernatant fluids were used for detecting the presence of botulinum toxins by mouse toxicity (lethality); the toxin type was determined by neutralization test with known antitoxic sera. The double gel immunodiffusion test was also used for detecting type specific toxins from those reference strains⁴. Mouse toxicity and neutralization tests were performed as below. Two Swiss-Webster mice weighing 19 to 22 g were injected intraperitoneally with 0.5 ml of the supernatant fluid from each cultured tube and held for 3 to 4 days for observation. If the mice died, the mouse test was repeated using the same supernatant fluid which had been neutralized with type specific antitoxin, types A or B. If the toxic material could not be neutralized by type A and B antitoxins, further neutralizations with other antitoxins of *C. perfringens*, *C. tetani*, and *C. botulinum* types E, F, C, and D etc were tested. Trypsinization of supernatant fluid was used on samples to strengthen the weak toxins when two or more toxic types were presented in single culture. The trypsinized toxic materials were subjected to repetition of the mouse lethality and neutralization tests for identification of toxin.

Isolation and identification of *C. botulinum*

Toxic soil enrichment cultures were used for the isolation, purification, and identification of *C. botulinum*. The enrichment cultures were also heated at 75°C for 15 minutes. Small samples (a loopful) of the unheated and heated specimens were plated in egg yolk agar or trypticase-soy blood agar with sheep red cells, respectively. The lipase positive colonies which were considered morphologically typical were picked and transferred to the modified CM medium. The purified bacteria were subjected to a series of biochemical tests, mouse toxicity, and neutralization tests. The final identification of *C. botulinum* is based on specific neutralization (toxi-antitoxin) tests on mice.

RESULTS

Prevalence studies of toxigenic *C. botulinum* in soil samples are shown in Fig. 1 and Table 1. *C. botulinum* was found all over the island of Taiwan. One hundred and five (78%) of 134 soil samples were positive for the existence of toxigenic *C. botulinum*. The percentage of soil samples positive for toxigenic *C. botulinum* ranged from 50 to 89, depending upon geographical differences. More positive soil samples were detected north of Tropic of Cancer than in the southern areas.

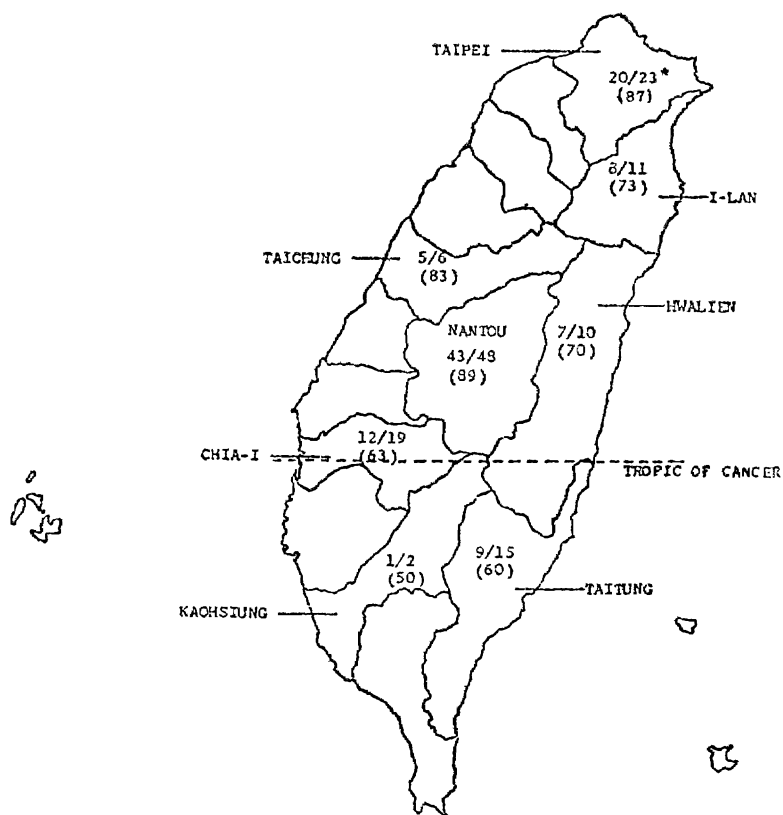


Fig. 1. Prevalence of toxigenic *C. botulinum* in soil samples in Taiwan. *No. pos./no. tested (percent)

Table 1. Ecological Conditions of Soil Samples

Areas	Sources	pH	Organic matter (%)
I-lan County	Vegetable & fruit gardens; grassland & bamboo soils.	6.2-7.1+ (6.5)	ND#
Hualien County	Vegetable & fruit gardens; tea field, rice field.	4.6-8.1 (6.9)	1.02-3.52+ (1.40)
Taitung County	Vegetable & fruit gardens; asparagus & corn fields.	5.0-7.4 (6.2)	0.96-3.70* (1.38)
Kaohsiung County	Sugar cane field.	6.2-6.4 (6.3)	0.98-1.32 (1.15)
Chia-i County	Vegetable & fruit gardens; corn & asparagus fields.	4.7-7.7 (6.3)	0.76-4.62* (1.58)
Nantou County	Vegetable & fruit gardens; potato, corn, & bamboo fields.	4.5-8.2 (6.7)	0.86-4.71* (1.85)
Taichung County	Vegetable gardens.	5.4-6.5 (6.2)	ND
Taipei	Vegetable & fruit gardens; potato & corn fields.	4.7-7.9 (6.4)	ND

+Range (average)

ND, not done.

* Ten samples in each area were selected randomly for determination.

The frequency distribution of types of toxigenic *C. botulinum* cultured from soil samples is shown in Table 2. A total of 352 positive cultures for types of *C. botulinum* were obtained from 105 out of 134 soil samples. Type B was found most frequently (37%) followed by type E (20%), whereas type F (5%) and type C (4%) were found less frequently. No types D and G were detected. Types A, B, and E were widely distributed in the soil environments of both the west and east coast of Taiwan.

Table 2. Frequency Distribution of Types of Toxigenic *C. botulinum* Cultured from Soil Samples

Areas	Soil samples		No. pos. cultures for toxin types*					
	No. total	No. pos.	A	B	C	E	F	Total
I-lan County	11	8	13	6	1	7	1	28
Hualien County	10	7	5	5	0	3	0	13
Taitung County	15	9	9	11	0	4	3	27
Kaohsiung County	2	1	0	0	0	2	0	2
Chia-i County	19	12	8	9	2	5	0	24
Nantou County	48	43	56	63	10	21	9	159
Taichung County	6	5	5	3	0	10	1	19
Taipei County	23	20	24	31	2	19	4	80
Total	134	105+ (78)	120 (34)	128 (37)	15 (4)	71 (20)	18 (5)	352* (100)

* Ten culture attempts were made on each soil sample. Positive cultures (352) of types of *C. botulinum* were those in which single or multiple toxins were detected.

+ Number (percent).

The percentages of types of *C. botulinum* in 105 positive soil samples are given in Table 3. Thirty-one samples (29.5%) had a single type and 74 samples (70.5%) had multiple types. Among samples that had a single type, soils with type A or type B were found predominately. Among samples with multiple types of *C. botulinum*, soils with

Table 3. Percentages of Types of Toxigenic *C. botulinum* in 105 Positive Soil Samples

Toxin types*	No. positive	percent	Toxin types*	No. positive	percent	Toxin types*	No. positive	percent
A	12	11.4	AB	23	22.0	ABE	15	14.3
B	14	13.3	AE	10	9.5	ABF	2	1.9
E	4	3.8	AF	3	2.8	ACE	2	1.9
F	1	0.9	BC	2	1.9	BCE	3	2.8
			BE	6	5.7	BEF	1	0.9
			BF	3	2.8	ABCE	1	0.9
			EF	1	0.9	ABCF	1	0.9
						ABEF	1	0.9

Grand total: 105 soil samples (100 percent)

* Soil samples were determined to have single or multiple types of botulinum toxins.

mixed type AB (22%) were most frequent, followed by those with mixed type ABE (14%), type AE (9.5%), and type BE (5.7%), whereas the remaining positive soils with either single or multiple types were least frequent.

As shown in Table 4, the number of cultures containing botulinum toxins were variable in positive soil samples, ranging from 1 to 9. Among 105 positive soil samples, 40 (38%) had 4 or more cultures of toxigenic *C. botulinum*, and consisted of a total of 228 (65%) positive culture. The remaining soil samples were as follows: 25 (24%) had 1, 21 (20%) had 2, and 19 (18%) had 3 cultures containing botulinum toxins. These results indicate that 59 (56%) had at least 3 or 80 (76%) had at least 2 toxigenic cultures per 10 tests.

Table 4. Frequency of Cultures of Toxigenic *C. botulinum* in Soil Samples

No. pos. per 10 tests ⁺	No. pos. soil samples	No. pos. cultures ⁺
1	25(24)*	25(7)*
2	21(20)	42 (12)
3	19(18)	57 (16)
4-9	40(38)	228(65)
Total	105(100)	352(100)

⁺ Refer to Materials and Methods in the text. Ten 1-g specimen cultures were tested for each soil sample.

* Number (percent)

Soil samples containing toxigenic *C. botulinum* tested by heated and unheated specimen cultures are analyzed in Table 5. Ten 1-g specimen cultures consisting of 2 with and 8 without heat treatment, were tested for each soil sample. One hundred of 134 unheated samples revealed toxigenic *C. botulinum* whereas 42 heated soil samples were positive.

Table 5. Soil Samples Containing Toxigenic *C. botulinum* Tested by Heated and Unheated Specimen Cultures⁺

Unheated specimen cultures			
Soil samples	No. pos.	No. neg.	Total
Heated specimen cultures			
No. pos.	37	5	42*
No. neg.	63	29	92
Total	100	34	134

⁺ Refer to Materials and Methods in the test. Ten 1-g specimen cultures consisting of 2 with and 8 without heat treatment, were tested for each soil sample.

* X² test: P:<0.05.

Five soil samples were positive only by 2-heated specimen cultures. There were significant differences in detection of toxigenic *C. botulinum* in soil samples tested by heated and unheated specimen cultures ($p < 0.05$). Spores of toxigenic *C. botulinum* in soil samples tested by heated specimen cultures, were predominantly of types A and B, but a few of type F.

DISCUSSION

Because of different treatment of samples, different methods of cultivation, and different sample sizes and sources, the results of soil samples containing *C. botulinum* are variable. A high prevalence of toxigenic *C. botulinum* was demonstrated in soil samples in this investigation. Such a high prevalence may be attributed to the following reasons: (i) the use of enrichment culture medium containing trypticase and yeast extract plainly yielded better toxin production of the reference strains of types A, B, C, D, E, and F than those with the cooked meat medium under the same incubation conditions. This enrichment culture medium may eliminate inhibition of toxin production of toxin production by the toxigenic *C. botulinum* in soil samples⁽⁵⁾; (ii) the use of ten 1-g specimen cultures for each soil sample decreases the chances of missing organisms because of uneven distribution of the spores in soils, and (iii) the use of heated and unheated specimen cultures increases the total positive numbers of toxigenic *C. botulinum* in soils.

Toxigenic *C. botulinum* was found to be widespread in the soils of Taiwan. Types B and A were predominant, followed by type E, whereas types C and F were less frequent. All soils of type E were obtained from inland areas. It is obviously expected to have high prevalence of type E in waters and marine animals in Taiwan. The reasons for high incidence of multiple types (A, B and E) of toxigenic *C. botulinum* in soils of Taiwan (Table 3) may be explained as follows: (i) geographic characteristics together with subtropical climate may be favourable to the existence of spores of types A, B, and E; (ii) violent summer thunderstorms bring intense rainfall to all parts of the island, occasionally resulting in floods which spread out *C. botulinum* types in the cultivated land; (iii) man-made contamination of *C. botulinum* types in the cultivated land is due to fertilizing with sewage, and manure (especially kitchen garbages and animal wastes) which originated from foods and/or feeds by island-wide transportation; and (iv) higher invertebrate debris, especially insect carrion in the soil may provide a better natural niche for certain *C. botulinum* types⁽⁶⁾.

Among 105 positive soil samples, 40 (38%) revealed 4 to 9 cultures of toxigenic *C. botulinum*, and 80 (76%) had at least 2 toxigenic cultures per 10 tests. For detection of at least 1 toxigenic culture in soil samples, 5 culture attempts consisting of 2-with and 3-without heat treatment may be used for each soil sample. Heat treatment of samples is necessary to eliminate nonspore forming aerobes and undesirable anaerobes, and to obtain heat resistant spores of types A, B, and F. Unheated specimen cultures favour the heat sensitive spores of types C, D, and E.

The general consensus is that spores of *C. botulinum* may be distributed less commonly in soils containing animal manure, and that extensive cultivation of soils may suppress types A and B⁽⁶⁾. Though the soils of Taiwan are fertilized sometimes with sewage, manure and animal feces, content of organic matter is low, possibly due to being washed away by rain, water, and irrigation. Most soil samples obtained from cultivated fields were weakly acid to alkaline in reaction (overall average pH 6.43), and low in organic matter (average 1.47%). Organic matter content of soils might also influence its pH value. Most types A, B, and E were detected in soil samples which were weakly acid to neutral in pH and had a low content of organic matter. These findings show that the ecological conditions are an important factor in the existence of *C. botulinum*^(5,6).

During this investigation, a proven outbreak of botulism occurred in Taipei. Diagnoses of 5 patients were based on the clinical manifestations and isolation of *C. botulinum* type A from feces. However, the incriminated food was unknown. The clinical diagnosis of botulism is somewhat difficult but the risk of botulism exists in Taiwan and through the world. Epidemiological information of botulism is often caused by home-processed foods, especially home bottling and home canning. Our survey indicates that *C. botulinum*, especially types A and B, is indeed prevalent in many areas of Taiwan. This prevalence makes it imperative that the public be aware of proper preventive measures and that physicians be aware of the diagnosis.

ACKNOWLEDGEMENTS: This study was supported by the National Science Council, Republic of China, for project No.: NSC-64-0412-02(52). The authors are greatly indebted to Dr. P.F.D. Van Peenen, Commanding Officer, U. S. NAMRU-2, for constant encouragement. They are also grateful to Dr. J.C. Coolbaugh, U.S. NAMRU-2, for review of the manuscript, and to Miss Lian-I Hor for laboratory assistance.

REFERENCES

- (1) Hordeman, L. V. and Moore, W. E. C.; Anaerobe laboratory manual. V. P. I. Anaerobe Laboratory, Blacksburg, Virginia. p. 132, 1972.
- (2) Bott, T. L., Johnson, Jr. J. Foster, E. M., and Sugiyama, H.: Possible origin of the high incidence of *Clostridium botulinum* type E in an inland bay (Green Bay of Lake Michigan). J. Bacteriol., 95; 1542-154, 1968.
- (3) Smith, L. DS.: Common mesophilic anaerobes, including *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*, in 21 soil specimens. Appl. Microbiol., 29; 590-594, 1975.
- (4) Sakaguchi, G., Sakaguchi, S., Kozaki, S., Such, S., and Ohishi, I.: Cross reaction in reversed passive hemagglutination between *Clostridium botulinum* type A and B toxins and its avoidance by the use of antitoxic component immunoglobulin isolated by affinity chromatography. Jap. J. Med. Sci. Biol., 27; 161-172, 1974.
- (5) Smith, L. DS., Inhibitor of *Clostridium botulinum* by strains of *Clostridium perfringens* isolated from soil. Appl. Microbiol., 30; 319-323, 1975.
- (6) Riemann, H.: Botulinum food poisoning. In: Microbial Foodborne Infections and Intoxication, (HURST, A. and deMAN, J.M., ed.) The 1972 Symposium of Health Protection Branch, Department of National Health and Welfare, Ottawa, Canada. pp. 49-63, 1973.

臺灣肉毒桿菌之生態學研究

蔡季重 丁雪青

中文摘要

肉毒桿菌之芽胞廣泛分佈於自然界之土壤、塵埃、泥滓及水域沉澱物等，容易污染農產物。若食品之製備過程之粗疏或貯存不適，致使污染之芽胞得以繁殖並產生毒素。由於肉毒桿菌芽胞在農作地域之分佈與其產地作物（農產品）之被污染關係極為密切，所以本文報告由農業地區之土壤從事該病原菌之生態學研究，藉以確認該菌之存在，分佈，與病原性等概況。

由農業地域採集134檢體，應用強化培養基及嫌氣性細菌培養技術，將每一檢體做10個細菌培養之方法。然後由細菌培養液中作鼠毒性試驗（Mouse toxicity）及特異性之中和試驗（Specific neutralization tests）來鑑定肉毒桿菌之毒素與其型別。陽性檢體在10個試驗培養中其呈現有毒素者之數目不一，有出現1個至9個之別。在134檢體中有105（78%）呈現陽性反應（有肉毒毒素），又其中70%陽性檢體具有二種或以上之毒素型別（Toxin types），毒素型別以A和B兩型最多，其次為E型，而C和F型最少。臺灣已確認肉毒桿菌之存在，尤其A、B兩型分佈最廣，又具有抗熱性芽胞，顯示有肉毒桿菌中毒之潛伏危害性，並藉以呼籲民衆注意食品衛生和預防中毒。

本研究部份經費由國家科學委員會補助（NSC-64B-0412-02(52)），謹此致謝。國立臺灣大學醫學院公共衛生研究所。

行政院農委會圖書室



0011250