



1996

## Characterization of aeromonad isolated from aquatic foods

Follow this and additional works at: <https://www.jfda-online.com/journal>

---

### Recommended Citation

Shih, D.Y.-C.; Lai, C.-L.; Chu, S.-Y.; and Wang, J.-Y. (1996) "Characterization of aeromonad isolated from aquatic foods," *Journal of Food and Drug Analysis*: Vol. 4 : Iss. 3 , Article 2.  
Available at: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2978>

This Original Article is brought to you for free and open access by Journal of Food and Drug Analysis. It has been accepted for inclusion in Journal of Food and Drug Analysis by an authorized editor of Journal of Food and Drug Analysis.



## 由生鮮水產品中所分離氣單胞菌之特性

施養志 賴昭伶 朱淑儀 王貞懿\*

行政院衛生署藥物食品檢驗局

### 摘 要

由生鮮水產品中分離所得之氣單胞菌 (aeromonad) 計 222 株, 測驗其對十四種抗生素之耐受性, 其中以對 penicillin A 之耐性株最多 (95%)。所有受測驗之氣單胞菌均對 10  $\mu$ g 之 vibriostat O/129 (2, 4-diamino-6, 7-diisopropylpteridine phosphate) 具耐受性, 至於對 150  $\mu$ g 者則有 67-100% 菌株具耐性。除 *A. hydrophila* DNA group 1 以溶血性強者佔大部份之外, 其它菌均以弱溶血性佔多數。在細胞毒性試驗方面, *A. trota* DNA group 13 未具細胞毒性, *A. media* DNA group 5 B 則為部份具細胞毒性, 其它受測試的菌株均具細胞毒性。*A. hydrophila* DNA group 1, *A. media* DNA group 5 B 及 *A. hydrophila* like DNA group 2 發生血球凝集現象的比率最高, 其它菌株則較少。蛋白質分解酵素之測驗結果, 其中以 *A. hydrophila* DNA group 1 之活性強者佔大多數, 其它菌株則較少。卵磷脂分解酵素活性, 以 *A. trota* DNA group 13 所占比率最低, 其它菌較多。*A. hydrophila* DNA group 1 具有核酸分解酵素活性強者佔最多, 且澱粉分解酵素活性亦較強。

**關鍵詞:** 氣單胞菌, 抗生素, 溶血性, 細胞毒性, 血球凝集作用, 酵素。

### 前 言

氣單胞菌為革蘭氏陰性桿菌, 具兼性厭氧性, 該菌雖為中溫菌, 但也能在冰箱之冷藏溫度生長, 故可廣泛存在水、環境檢體及各類食品, 包括低溫保存、調氣或真空包裝之食品<sup>(1)</sup>, 分佈甚廣, 增加污染機會; 另有一污染途徑則為人類帶原者調理食品時污染所造成<sup>(2)</sup>, 可見其對食品安全所造成的潛在危害。造成人類致病的氣單胞菌除了 *A. hydrophila* 之外, 尚有 *A. caviae*、*A. sobria*、*A. veronii*、*A. schubertii*、*A. jandaei* 和 *A. trota*<sup>(3-7)</sup>。一般而言, 這屬菌造成的腸胃炎較溫和, 但也有嚴重威脅生命的報告, 如敗血病和腦膜炎是常見的腸胃外感染疾病<sup>(8,9)</sup>。在國內馬偕醫院曾報告和氣單胞菌有關之下痢病; 台大醫院則發表過數十例由氣單胞菌引起菌血症的報告<sup>(10-12)</sup>。

目前 *A. hydrophila* 由於流行病學證據及各

方面之研究結果, 已被列為重要之食品中毒菌<sup>(13-14)</sup>。1990 年在瑞典南方由於井水受 *A. hydrophila* 污染導致 180 人發生急性腸胃炎之疾病 (Stenstrom T. A., 未發表), 其它涉及該菌之疑似食品中毒例子尚很多<sup>(15)</sup>。氣單胞菌之毒力因子及其致病性尚未知, 或所知有限, 已知可能之毒力因子有腸毒素、吸附素 (adhesin)、溶血素、血球凝集素 (hemagglutinin)、sodium channel inhibitor, 和各種細胞外分解酵素 (protease, lecithinase, nuclease 等)<sup>(1, 14, 16, 17)</sup>。很多養殖魚類利用一些藥物以預防細菌的感染, 可能形成細菌的耐性株, 這對臨床微生物和食品衛生造成了嚴重問題<sup>(18-19)</sup>。故本研究除了探討不同檢體來源所分離之菌株, 進行抗生素耐性試驗之外, 也進一步進行可能之毒力因子及各種酵素活性測定, 包括這些分離菌株之細胞毒性測驗, 溶血性測驗, 血球凝集檢驗及各種細胞外酵素之活性測驗。

## 材料與方法

### 一、檢體之收集與處理

自民國 82 年 8 月至 12 月，在台北市四個地區，即漁產批發中心、傳統市場、超級市場及其生鮮處理中心，共抽購 285 件生鮮水產品，其中養殖與漁獲水產品之檢體量在這四個地區大約相等。檢體均於上午抽購冷藏帶回實驗室立即展開檢驗工作，檢驗抽購種類如下

#### (一) 養殖水產品

草蝦、七星鱸魚、加州鱸魚、金目鱸魚、吳郭魚、草魚、鰱魚、白鰻魚、牛蛙、麗魚、鯉魚、鯽魚、泥鰍、螺類、蜆、尼羅紅魚、蚵仔、文蛤、紅尾蝦、虱目魚、九孔、石斑魚、蟳及烏魚。

#### (二) 海洋漁獲

白鯧、白帶魚、市仔、花枝、透抽、白刺魚、肉魚、赤宗魚、蝦姑、耳烏賊、黃花魚、秋刀魚、鳳螺、金線魚、四破魚、馬頭魚、白口魚、海螺、比目魚、鮫魚、黑鯛魚、白腹魚、剥皮魚及花身魚。

### 二、培養與鑑定方法

取生鮮水產樣品 50g ( 鰓、內臟等可能污染程度較高之部位 )，加入 450ml 之增菌培養基 ( alkaline peptone water ) 在 30°C 增菌 24 小時<sup>(20)</sup>，將增菌液劃線在選擇性分離培養基 (starch ampicillin agar)<sup>(4)</sup>，經 30°C 培養 24 小時，挑選在菌落周圍有一透明環帶之黃色菌落，穿刺接種於 *Aeromonas hydrophila* 培養基<sup>(21)</sup>，於 30°C，24 小時培養，取底部黃色，上部為紫色者，以胰化酪蛋白大豆洋菜培養基 ( trypticase soy agar, 簡稱 TSA ) 純化，於 30°C 培養 24 小時，最後用 Biolog 系統進行菌種之鑑定<sup>(22)</sup>。

### 三、去氧核糖核酸分解酵素之測定

甲苯胺藍去氧核糖核酸(洋菜)培養基 ( toluidine blue deoxyribonucleic acid agar ) 依 Bennett<sup>(23)</sup> 所述方法調配。

先將三甲醇鉍基甲烷溶解於 1000 ml 蒸餾水中，調整 pH 值至 9.0 後，加入其它成分 ( 甲苯胺藍除外 )，加熱使之完全溶解，再加入甲苯胺藍，混合均勻。培養基製成平板，俟凝固後將菌點在上面，置 30 °C 培養 24 小時，觀察菌落周圍形成紅色圈之大小。

### 四、澱粉分解酵素之測定

培養基組成為 soluble starch 20 g, distilled water 1 l, proteose peptone No.3 10 g。此培養基製成平板，將菌點在上面，經 30°C 培養 24 小時後，加入革蘭氏碘液，觀察菌落周圍形成透明環之大小。

### 五、蛋白質分解酵素之測定<sup>(24)</sup>

培養基組成為 1.5 % skimmed milk, 1.0 % NaCl 和 1.5 % agar。此培養基製成平板，俟凝固後將菌點在上面，置 30°C 培養 18-24 小時，觀察菌落周圍透明環形成之大小，記錄蛋白質分解酵素之活性強弱。

### 六、卵磷脂分解酵素之測定

培養基組成為 1 l TSA 俟溫度降至約 50 °C 加蛋黃液 60 ml。製成平板，接種後於 30°C 培養 18-24 小時，記錄菌落周圍產生之沉澱環及透明 ( 半透明 ) 環。

### 七、溶血作用之測定<sup>(4)</sup>

將菌接種在血液瓊脂培養基 ( 5 % 羊血的 TSA )，經 30°C 好氣培養 18-24 小時後觀察其溶血現象。

### 八、血球凝集作用之測定<sup>(4)</sup>

以磷酸生理食鹽水緩衝液處理過之綿羊血，與菌體懸浮液混合後，置於 96 個孔之盤中，於 4 °C 培養隔夜，觀察是否發生血球凝集現象。

### 九、細胞毒素試驗<sup>(24)</sup>

菌體培養在 trypticase soy broth 後，取其上澄液，測試對 Chinese hamster ovary (CHO) 細胞之影響。每個試驗作三重覆，正反應控制組用 *Vibrio cholerae*，負反應控制組用 trypticase soy broth。

### 十、抗生素耐性之測定

#### (-)O/129

滅菌後之 TSA 培養基冷卻至 45 °C，添加適量菌液，取 15~20 ml 倒入平面培養皿中，凝固後放置 10 μg 及 150 μg O/129 之 disc ( creative microbiologicals, LTD, Taipei, Taiwan, Republic of China ) 於 30 °C 24 小時培

養後，觀察其抑制圈之產生。  
 (二)其它抗生素

1.測定抗生素係採用商品化的 ATB G(-)  
 (Marcy-1' Etoile, France)，其抗生素之種類及

**Table 1.** The percent incidence of antibiotics resistance in aeromonad isolates from aquatic foods

Antibiotics <sup>b</sup>	8 <sup>a</sup> n=52	5A n=58	1 n=42	13 n=4	5B n=7	4 n=9	12 n=1	10 n=10	3 n=5	2 n=1	SS n=1	A n=32	total n=222
PEN-A	100	100	100	100	29 (43) <sup>c</sup>	100	100	80	100	100	100	84	95
AMC	4 (92)	2 (86)	2 (98)	100	14 (57)	0 (100)	0 (100)	10 (70)	0 (100)	0	0 (100)	0 (91)	5 (88)
PEN-U	0 (6)	0 (3)	0	0	0	0	0	0	0 (20)	0	0	0 (3)	0 (3)
CEF-1	17 (2)	59 (2)	95 (2)	25	43 (57)	100	0	30	40	0	0	50 (16)	53 (5)
CEF-3	0	0	0	0 (25)	0	0	0	0	0	0	0	6 (6)	1 (1)
CAZ	0	0	0 (2)	0	0 (14)	0	0	0	0	0	0	0 (6)	0 (2)
TOB	2 (4)	3 (3)	0 (7)	0	14	0	0	10	0	0	0	6	3 (3)
AKN	2 (2)	0 (2)	2 (2)	0	14	0	0	0	0	0	0	6	2 (1)
GEN	0 (2)	0 (3)	0 (2)	0	14	0	0	0 (10)	0	0	0	6	1 (2)
NET	2	0 (2)	0 (2)	0	14	0	0	0	0	0	0	6	2 (1)
CYCLN	40	28	31	50	0	11	0	30	0	100 (20)	0	31 (3)	30 (1)
QUN-1	17	52	12	25	0	11	0	40	0	0	0	6 (3)	11 (<1)
QUN-2	0	0 (2)	0 (2)	0	0	0 (11)	0	0	0	0	0	0 (6)	0 (2)
TSU	13	7	7	0	0 (14)	0	0	10	0	0	0	3	6 (<1)

<sup>a</sup>: A. veronii-like DNA group 8, 5A:A. media-like DNA group 5A, 1:A. hydrophila DNA group 1, 13:A. trota DNA group 13, 5B:A. media DNA group 5B, 10:A. veronii DNA group 10, 4:A. caviae DNA group 4, 3:A. hydrophila-like DNA group 3, 12:A. schubertii DNA group 12, 2:A. hydrophila-like DNA group 2, sal:A. salmonicida subsp. masoucida, A:unidentified Aeromonas spp.

<sup>b</sup> PEN-A: penicillin gr. A, AMC: amoxicillin-ac. clavulanique, PEN-U: ureidopenicillin, CEF-1: cefalosporins 1 ° G, CEF-3: cefalosporins 3 ° G, CAZ: ceftazidime, TOB: tobramycin, AKN: amikacin, GEN: gentamicin, NET: netilmicin, CYCLN: tetracycline, QUN-1: quinolones 1 ° G, QUN-2: quinolones 2 ° G, TSU: cotrimoxazole. TOB : Tobramycin.

<sup>c</sup> ( ): intermediate resistant.

濃度分別為 penicillin A 及 amoxicillin ac. clavulanicque 為 4-16 mg/l ; ureidopenicillin 和 cefalosporins 1 ° G 為 8-32 mg/l ; cefalosporins 3 ° G 及 ceftazidime 為 4-32 mg/l ; tobramycin 、 gentamicin 、 netilmicin 及 tetracy-

cline 為 4-8 mg/l , amikacin 和 quinolones 1 ° G 為 8-16 mg/l ; quinolones 2 ° G , 1-4 mg/l ; cotrimoxazole , 2-8 mg/l °

2. ATB medium : Mueller-Hinton 1000 ml 添加 glucose 2g , Ca 鹽 50 mg , Mg 鹽 20 mg

**Table 2.** The percent incidence of antibiotics resistance in aeromonad isolates from aquatic foods

Antibiotics	Traditional market				Supermarket				Total	
	Wholesale		Retail		Wholesale		Retail		n=222	
	a <sup>a</sup> n=23	c n=17	a n=27	c n=38	a n=41	c n=19	a n=31	c n=24	a n=124	c n=98
PEN-A <sup>b</sup>	87 (4) <sup>c</sup>	76 (6)	97 (83)	97 (82)	97 (98)	94 (84)	100 (97)	96 (92)	96 (93)	93 (85)
AMC	0 (91)	6 (82)	7 (83)	5 (82)	0 (98)	0 (84)	0 (97)	0 (92)	2 (93)	3 (85)
PEN-U	0	0 (12)	0 (10)	0	0	0 (5)	0 (3)	0	0 (3)	0 (3)
CEF-1	43 (9)	59 (6)	55	63 (11)	63 (2)	42	39	46 (4)	52 (2)	54 (6)
CEF-3	0	0 (6)	0	0	0	0	0 (3)	0 (4)	0 (1)	0 (2)
CAZ	0	0 (6)	0	0	0	0	0 (3)	0 (4)	0 (1)	0 (2)
TOB	4	6 (6)	7	3 (3)	0 (7)	5	0 (3)	4 (4)	2 (3)	4 (4)
AKN	0	6 (6)	3	0	0 (2)	5 (5)	3	4	2 (1)	3 (2)
GEN	0 (4)	6	3 (3)	0 (3)	0 (2)	5	0	4	1 (2)	3 (1)
NET	0	6	3	0 (3)	0	5	0 (3)	4	1 (1)	3 (1)
CYCLN	17	24	48 (3)	29	20	32	42 (3)	29	31 (2)	29 (0)
QUN-1	0	6	10	3	24	32	10	4	13 (0)	9 (0)
QUN-2	0 (4)	0 (6)	0	0	0 (2)	0 (5)	0 (3)	0 (4)	0 (2)	0 (3)
TSU	0	6	7	5	5	26	6	0	5 (0)	8 (0)

<sup>a</sup> a:aquacultured, c:captured

<sup>b</sup> See Table 1

<sup>c</sup> ( ): intermediate resistants

**Table 3.** Resistance of aeromonad isolates to 10 and 150  $\mu$ g vibriostat (O/129)

Species (No.)	Vibriostat ( O/129 ) resistants ( % )	
	10 $\mu$ g	150 $\mu$ g
<i>A. veronii</i> -like DNA group 8(65)	65(100)	55( 85)
<i>A. media</i> -like DNA group 5A(64)	64(100)	52( 81)
<i>A. hydrophila</i> DNA group 1(42)	42(100)	35( 83)
<i>A. trota</i> DNA group 13(4)	4(100)	4(100)
<i>A. media</i> DNA group 5B(9)	1(100)	6( 67)
<i>A. veronii</i> DNA group 10(8)	8(100)	6( 75)
<i>A. caviae</i> DNA group 4(12)	12(100)	12(100)
<i>A. hydrophila</i> -like DNA group 3(5)	5(100)	5(100)
<i>A. schubertii</i> DNA group 12(1)	1(100)	1(100)
<i>A. hydrophila</i> -like DNA group 2(1)	1(100)	1(100)
<i>A. salmonicida</i> ss <i>masoucida</i> (1)	1(100)	1(100)
unidentified <i>Aeromonas</i> spp. (29)	29(100)	22( 76)

**Table 4.** Hemolytic activities of aeromonads isolated from aquatic foods

Species	No. of positive strains / No. of strains examined (%)		
	Strong	Weak	Negative
<i>A. veronii</i> -like DNA group 8	22/60 (37)	37/60 ( 62)	1/60 ( 2)
<i>A. media</i> -like DNA group 5A	9/53 (17)	43/53 ( 81)	1/53 ( 2)
<i>A. hydrophila</i> DNA group 1	14/21 (67)	6/21 ( 29)	1/21 ( 5)
<i>A. trota</i> DNA group 13	1/ 2 (50)	1/ 2 ( 50)	0/ 2 ( 0)
<i>A. media</i> DNA group 5B	1/ 4 (25)	3/ 4 ( 75)	0/ 4 ( 0)
<i>A. veronii</i> DNA group 10	1/ 5 (20)	3/ 5 ( 60)	1/ 5 (20)
<i>A. caviae</i> DNA group 4	1/ 9 (11)	8/ 9 ( 89)	0/ 9 ( 0)
<i>A. hydrophila</i> -like DNA group 3	1/ 4 (25)	3/ 4 ( 75)	0/ 4 ( 0)
<i>A. schubertii</i> DNA group 12	0/ 1 ( 0)	1/ 1 (100)	0/ 1 ( 0)
<i>A. hydrophila</i> -like DNA group 2	0/ 1 ( 0)	1/ 1 (100)	0/ 1 ( 0)
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	0/ 1 ( 0)	1/ 1 (100)	0/ 1 ( 0)
unidentified <i>Aeromonas</i> spp.	11/32 (34)	20/32 ( 63)	1/32 ( 3)

及 agar 1.5 g，溶解後最後調整 pH 7.2-7.4。

3. 方法：將菌株接種至 suspension medium (或 0.85 % NaCl) 調製為 0.5 McFarland 單位，接種 10  $\mu$ l 至 ATB medium，取 135  $\mu$ l 自動加入 ATB strip 中，置 30  $^{\circ}$ C 培養 18-24 小時，以 ATB Reader 自動判讀，結果若兩個濃度均混濁則判為對抗生素具耐性，若低濃度混濁，高濃度澄清則為中間型，兩者皆澄清者為

可接受性，即不具耐性<sup>(25)</sup>。

## 結果與討論

### 一、分離的菌株

由市售生鮮水產品中分離之氣單胞菌，包括 *Aeromonas veronii*-like DNA group 8 有 52 株，*A. media*-like DNA group 5A 有 58 株，*A.*

**Table 5.** Cytotoxic activity of aeromonad isolates assayed by Chinese hamster ovary cells

Species ( No. )	Cytotoxic activity <sup>a</sup>
<i>A.veronii</i> -like DNA group 8(3)	+
<i>A.media</i> -like DNA group 5A(5)	+
<i>A.hydrophila</i> DNA group 1(5)	+
<i>A.trota</i> DNA group 13(1)	-
<i>A.media</i> DNA group 5B(2)	+/-
<i>A.caviae</i> DNA group 4(1)	+
<i>A.hydrophila</i> -like DNA group 3(2)	+
<i>A.hydrophila</i> -like DNA group 2(2)	+

<sup>a</sup> triplicate, +:positive reaction, -:negative reaction ; positive control: *Vibrio cholerae* ; negative control: trypticase soy broth

*hydrophila* DNA group 有 42 株，另尚有 70 株其它之氣單胞菌，包括 *A. veronii* DNA group 10，*A. caviae* DNA group 4，*A. media* DNA group 5B，*A. hydrophila* like DNA group 3，*A. trota* DNA group 13，*A. hydrophila* like DNA group 2，*A. salmonicida* subsp. *masoucida*，*A. schubertii* DNA group 12，及其他未鑑定種名之氣單胞菌，共計 222 株。

## 二、抗生素之耐性

將分離出之菌株進行對 14 種抗生素之耐性測驗，結果表示於表一。所有菌株中，以對 penicillin A 之耐性株最多 ( 95 % )，其次為 cefalosporins 1。G ( 53 % ) 和 tetracycline ( 30 % )，而對 ureidopenicillin、ceftazidime 和 quinolones 2。G，則無任何耐性株；其他種類的抗生素只有少數的菌株具耐性 ( 1-11 % )。

在受測試的各菌株中，除了 *A. media* DNA group 5B 之外，均以 penicillin A 之耐性株佔最多，至於抗生素 amoxicillin-ac. clavulanicum，除了 *A. hydrophila*-like DNA group 2 之外，其他菌株以中間型耐性者佔多數 ( 57-100 % )。而對 cefalosporins 1。G 具耐性菌株較多者 ( 59-100% )，包括 *A. media*-like DNA group 5A，*A. hydrophila* DNA group 1 和 *A. caviae* DNA group 4。另外 *A. veronii*-like DNA group 8 和 *A. hydrophila*-like DNA group 2 對 tetracycline 之耐性菌株分別佔 40 % 及 100 %。*A. veronii* DNA group 10 和 *A. media*-like DNA group 5A

對 quinolones 1。G 之耐性株分別為 40 % 及 52 %。除此之外，對其他抗生素具耐性之菌株均不多。就所有試驗之氣單胞菌而言，以對 penicillin A，cefalosporins 1。G 和 tetracycline 之耐性株最多，分別為 95、53 及 30 %，其中間型耐性程度者以 amoxicillin-ac. clavulanicum 最多 ( 88 % ) ( 表一 )。

將所分離之氣單胞菌，以養殖水產品與捕獲水產品區分為兩大類，探討其抗生素耐性 ( 表二 )。結果養殖水產品分離之氣單胞菌共 124 株，其中有 119 株對 penicillin A 具耐性 ( 96 % )，64 株對 cefalosporins 1。G 具耐性 ( 52 % )，39 株對 tetracycline 具耐性 ( 31 % )，而對 ureidopenicillin、cefalosporins 3。G、ceftazidime 和 quinolones 2。G 均無耐性菌株，對其它種類抗生素之耐性株則不多 ( 1-13 % )，然而具 amoxicillin - ac. clavulanicum 具中間型耐性的有 115 株 ( 93 % )，佔最多。捕獲水產品分離之氣單胞菌，共 98 株，其中 91 株 ( 93 % ) 對 penicillin A 具耐性，cefalosporins 1。G 有 54% 的菌株具耐性，tetracycline 則有 29 % 的菌株具耐性，而對 amoxicillin-ac. clavulanicum 具中間型耐性者佔 85 %，但所有菌株對於 ureidopenicillin、cefalosporin 3。G、ceftazidime 和 quinolones 2。G 均不具耐性，至於其它種類抗生素之耐性株則較少，佔 3 - 8 %，總之，不論來自養殖水產品或捕獲水產品之菌株均以對 penicillin A 之耐性株最多，其次為 cefalosporins 1。G，和 tetracycline，然而二

**Table 6.** Hemagglutination of aeromonads isolated from aquatic foods

Species (No.)	Hemagglutination (%)
<i>A. veronii</i> -like DNA group 8(65)	21 ( 32)
<i>A. media</i> -like DNA group 5A(64)	13 ( 20)
<i>A. hydrophila</i> DNA group 1(42)	19 ( 45)
<i>A. trota</i> DNA group 13(4)	0 ( 0)
<i>A. media</i> DNA group 5B(9)	4 ( 44)
<i>A. veronii</i> DNA group 10(8)	2 ( 25)
<i>A. caviae</i> DNA group 4(12)	2 ( 17)
<i>A. hydrophila</i> -like DNA group 3(5)	1 ( 20)
<i>A. schubertii</i> DNA group 12(1)	0 ( 0)
<i>A. hydrophila</i> -like DNA group 2(1)	1 (100)
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> (1)	0 ( 0)
unidentified <i>Aeromonas</i> spp.(29)	6 ( 21)

者對 ureidopenicillin, cefalosporins 3。G, cephtazidime 和 quinolone 2。G 均無耐性株(表二)。

所有氣單胞菌均對 10  $\mu$ g 之 O/129 具耐性, 至於對 150  $\mu$ g 之耐性程度則依菌種不同而有差異(表三), 實驗結果顯示: *A. media* DNA group 5B, *A. veronii* DNA group 10, *A. veronii* like DNA group 8, *A. media*-like DNA group 5A, *A. hydrophila* DNA group 1 和 unidentified *Aeromonas* spp. 有 67-85% 之菌株具耐性, 其它菌株具耐性者均達 100%。一般認為 *Aeromonas* 不受 150  $\mu$ g 之 O/129 的抑制, 而 *Vibrio* 和 *Plesiomonas* 則受其抑制, 故可藉此試驗區分這三屬菌<sup>(1)</sup>, 然而本實驗結果卻非如此; 可能與地域、時間及環境等之差異有關。

Barnhart 和 Pancorbo<sup>(26)</sup>進行 *A. hydrophila* 對九種抗生素耐性試驗, 在 119 株菌中有 46.2% 對抗生素有耐性。其中有 76.4% 是同時對 ampicillin 和 cefalothin 產生耐性。在很多菌株, 微生物之抗生素耐性與質體 (plasmid) 有關, 革蘭氏陰性細菌之抗生素耐性 (resistance) 質體也能同時展現對重金屬離子的抗性, 這可能受環境中重金屬之污染所造成, 故如何預防環境之污染是必要的<sup>(19)</sup>。

### 三、溶血性作用

由表四資料顯示, 除 *A. hydrophila* DNA group 1 之溶血活性強者 (67%) 多於活性弱者

(29%) 外, 其它則不然, 其中活性弱者所佔之百分比在 *A. schubertii* DNA group 12, *A. hydrophila* like DNA group 2 和 *A. salmonicida* subsp. *masoucid* 均為 100%, *A. caviae* DNA group 4 為 89%, *A. media* like DNA group 5A 為 81%, *A. media* DNA group 5B 和 *A. hydrophila* like DNA group 3 均為 75%, *A. veronii* DNA group 8 佔 62%, *A. veronii* DNA group 10 有 60%, 而 *A. trota* DNA group 13 有 50%。至於他人研究氣單胞菌之溶血性所使用之菌株種類較少, 但結果均顯示 *A. hydrophila* 具有較高比率的溶血現象。至於溶血性強度大多無等級之區分, 雖有以  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  不同的溶血型態區分者, 但本研究顯示以相對溶血性強弱區分較為適當。溶血性強弱或許與其毒性強弱有關。Monfort 和 Baleu<sup>(27)</sup> 認為 *Aeromonas* spp. 之溶血現象與其腸毒素的產生有關。Altwegg 等<sup>(28)</sup> 在有氧及無氧情形下測得 *A. hydrophila* 具溶血現象者, 分別為 75% 和 79%; 而 *A. sobria* 在有氧下為 64%, 無氧狀態為 32% 具溶血能力。Paniagua 等<sup>(4)</sup> 報告指出有 92% 之 *A. hydrophila* 和 69% 之 *A. sobria* 具溶血現象。Stelmo<sup>(16)</sup> 也提到 *A. sobria* 具有高度的溶血現象。Wong 等<sup>(24)</sup> 測試氣單胞菌之溶血性強(弱)度, 在 *A. caviae* 為 0% (85%), 但在 *A. hydrophila* 和 *A. sobria* 均為 20% (69%), 不具溶血活性者分別為 15%, 10% 和 11%。另 Nomura 等<sup>(29)</sup> 純化出 *A. salmonicida* 之細胞外溶血毒素, 命名為



**Table 7.** Protease activity of aeromonads isolated from aquatic foods

Species <sup>a</sup> ( No. )	Protease activity (%)		
	Weak	Moderate	Strong
8 (62)	5 ( 8)	43 ( 70)	14 (21)
5A (58)	8 (14)	28 ( 48)	22 (38)
1 (40)	0 ( 0)	7 ( 18)	33 (83)
13 ( 4)	1 (25)	1 ( 25)	2 (50)
5B ( 8)	1 (13)	4 ( 50)	3 (38)
10 ( 7)	1 (14)	5 ( 72)	1 (14)
4 ( 9)	1 (11)	4 ( 44)	4 (44)
3 ( 5)	0 ( 0)	4 ( 80)	1 (20)
12 ( 1)	0 ( 0)	1 (100)	0 ( 0)
Sm ( 1)	0 ( 0)	1 (100)	0 ( 0)
A (29)	2 ( 7)	11 ( 38)	16 (55)

<sup>a</sup> See Table 1

salmolysin。

#### 四、細胞毒素

在細胞毒素測驗中, *A. trota* DNA group 13 未具細胞毒性, *A. media* DNA group 5B 只部分有毒性。其他菌株則均具細胞毒性(表五)。由此可知大部分的氣單胞菌具有細胞毒性。Barnhart 和 Pancorbo<sup>(26)</sup> 曾進行 *A. hydrophila* 之細胞毒性試驗, 結果在 119 株菌中有 64% 具細胞毒性。

#### 五、血球凝集作用

由表六得知, *A. hydrophila* DNA group 1 和 *A. media* DNA group 5B 發生血球凝集作用的百分比最高, 分別為 45 % 和 44 %, 其次為 *A. veronii*-like DNA group 8, *A. media*-like DNA group 5A, *A. veronii* DNA group 10, *A. caviae* DNA group 4, *A. hydrophila* like DNA group 3 和 unidentified *Aeromonas* spp., 其發生血球凝集之比率為 17-32 %。另外 *A. trota* DNA group 13, *A. schubertii* DNA group 12 及 *A. salmonicida* subsp. *masoucida* 並沒有發生血球凝集現象。有報告指出血球凝集素亦可能是氣單胞菌的毒力因子之一<sup>(1, 14, 16, 17)</sup>。

#### 六、各種細胞外分解酵素

各種細胞外分解酵素亦被認為是氣單胞菌的毒力因子之一<sup>(1, 14, 16, 17)</sup>。

##### (一)蛋白質分解酵素活性

由表七得知, 所有菌株均能產生蛋白質分解酵素, 並以中度活性者佔最多, 包括 *A. veronii*-like DNA group 8 ( 70 % ); *A. veronii* DNA group 10 ( 72 % ) 和 *A. hydrophila*-like DNA group 3 ( 80 % ); 強度活性佔最多者為 *A. hydrophila* DNA group 1 ( 83 % )。以活性弱者佔最多的為 *A. trota* DNA group 13 ( 25 % )。

##### (二)卵磷脂分解酵素活性

由表八得知菌落邊之沉澱環(疑似 phospholipase C 之作用)以 *A. trota* DNA group 13 所佔比率最少(50%), 而 *A. media* DNA group 5B 及 unidentified *Aeromonas* spp. 分別為 63 及 68 %。*A. media*-like DNA group 5A, *A. hydrophila* DNA group 1 及 *A. veronii*-like DNA group 8 則有較高比率菌株疑似具 phospholipase C 之活性, 分別為 81 %, 88 % 及 94 %, 其他則有全部菌株具疑似 phospholipase C 之活性。

至於沉澱環邊另有透明環者(疑似 phospholipase A 之作用)仍以 *A. trota* DNA group 13 所佔比率最少(50%)。而 *A. media* DNA group 5B, unidentified *Aeromonas* spp., *A. media*-like DNA group 5A 分別為 63 %, 72 %

**Table 8.** Lecithinase activity of aeromonads isolated from aquatic foods

Species <sup>a</sup> ( No. )	Lecithinase activity ( % ) <sup>b</sup>		
	C	A	D
8 ( 64 )	60 ( 94 )	57 ( 89 )	54 ( 84 )
5A ( 57 )	46 ( 81 )	45 ( 79 )	51 ( 89 )
1 ( 40 )	35 ( 88 )	37 ( 93 )	37 ( 93 )
13 ( 4 )	2 ( 50 )	2 ( 50 )	3 ( 75 )
5B ( 8 )	5 ( 63 )	5 ( 63 )	8 ( 100 )
10 ( 7 )	7 ( 100 )	7 ( 100 )	7 ( 100 )
4 ( 12 )	12 ( 100 )	12 ( 100 )	12 ( 100 )
3 ( 5 )	5 ( 100 )	5 ( 100 )	5 ( 100 )
12 ( 1 )	1 ( 100 )	1 ( 100 )	1 ( 100 )
Sm ( 1 )	1 ( 100 )	1 ( 100 )	1 ( 100 )
A ( 25 )	17 ( 68 )	18 ( 72 )	24 ( 96 )

<sup>a</sup> See Table 1

<sup>b</sup> C: suspect lecithinase C,  
D: suspect lecithinase D.

A: suspect lecithinase A,

及 79 %。 *A. hydrophila* DNA group 1 及 *A. veronii*-like DNA group 8 則有較高比率菌株疑似具有 phospholipase A 之活性，分別為 93 % 及 89 %。其他則全部菌株具疑似 phospholipase A 之活性。

菌落最外圍之半透明環疑似 phospholipase D 之作用者，依所佔比率多寡順序為 unidentified *Aeromonas* spp.，*A. hydrophila* DNA group 1，*A. media*-like DNA group 5A，*A. veronii*-like DNA group 8 及 *A. trota* DNA group 13，分別為 96 %，93 %，89 %，84 % 及 75 %，其他均為 100 %。

#### (三) 核酸分解酵素活性

由表九得知，*A. trota* DNA group 13 大部份為無核酸分解酵素活性者 ( 50 % ) 及活性弱者 ( 25 % )。在中度活性佔較多的有 *A. veronii*-like DNA group 8 ( 50 % )，*A. hydrophila*-like DNA group 3 ( 60 % )，*A. schubertii* DNA group 12 ( 100 % )。在強活性佔最多的為 *A. hydrophila* DNA group 1 ( 55 % )。

#### (四) 澱粉分解酵素活性

由表十得知，所有菌株均具有澱粉分解酵素活性，其中全部為弱活性及中度活性者有 *A. trota* DNA group 13，*A. hydrophila*-like DNA

group 3 及 *A. salmonicida* subsp. *masoucida*。 *A. hydrophila* DNA group 1 則大部份為中度活性 ( 48 % ) 及強活性 ( 43 % )。中度活性較多的有 *A. veronii*-like DNA group 8 ( 49 % )，*A. media*-like DNA group 5A ( 52 % ) 和 *A. salmonicida* subsp. *masoucida* ( 100 % )。強活性者除 *A. hydrophila* DNA group 1 ( 43 % ) 之外，尚有 *A. media* DNA group 5B ( 50 % )，*A. caviae* DNA group 4 ( 63 % )。

## 結 論

所有測試之氣單胞菌以對 penicillin A 之耐性株最多 ( 95 % )，其次為 cephalosporins 1。G ( 53 % ) 和 tetracycline ( 30 % )，而對 ureidopenicillin，ceftazidime 和 quinolones 2。G 則無任何耐性株，其它種類的抗生素只有少數具耐性 ( 1-11 % )。試驗中所有氣單胞菌均對 10  $\mu$ g 之 O/129 具耐性，至於對 150  $\mu$ g 之耐性程度則依菌種不同而有差異，與酵素毒素產生能力並無特定的相關性。在各種可能的毒性因子測試時，發現 *A. hydrophila* DNA group 1 溶血性強者 ( 67 % ) 大於弱者 ( 29 % )，具細胞毒性且多數具血球凝集素。*A. hydrophila* DNA

**Table 9.** Nuclease activity of aeromonads isolated from aquatic foods

Species <sup>a</sup> (No.)	Nuclease activity ( % )			
	Negative	Weak	Moderate	Strong
8 ( 63)	10 (16)	17 ( 27)	31 ( 50)	5 ( 8)
5A ( 59)	16 (27)	12 ( 20)	27 ( 46)	4 ( 7)
1 ( 40)	1 ( 3)	1 ( 3)	16 ( 41)	22 ( 55)
13 ( 4)	2 (50)	1 ( 25)	1 ( 25)	0 ( 0)
5B ( 8)	6 (75)	1 ( 13)	0 ( 0)	1 ( 13)
10 ( 7)	3 (43)	0 ( 0)	3 ( 43)	1 ( 14)
4 ( 8)	3 (38)	2 ( 25)	3 ( 38)	0 ( 0)
3 ( 5)	1 (20)	0 ( 0)	3 ( 60)	1 ( 20)
12 ( 1)	0 ( 0)	0 ( 0)	1 (100)	0 ( 0)
Sm ( 1)	0 ( 0)	1 (100)	0 ( 0)	0 ( 0)
A ( 29)	12 (41)	6 ( 21)	8 ( 28)	3 ( 10)

<sup>a</sup> See Table 1**Table 10.** Amylase activity of aeromonads isolated from aquatic foods

Species <sup>a</sup> (No.)	Nuclease activity ( % )		
	Weak	Moderate	Strong
8 (53)	17 ( 32)	26 ( 49)	10 ( 19)
5A (56)	14 ( 25)	29 ( 52)	13 ( 23)
1 (40)	4 ( 10)	19 ( 48)	17 ( 43)
13 ( 4)	2 ( 50)	2 ( 50)	0 ( 0)
5B ( 4)	1 ( 25)	1 ( 25)	2 ( 50)
10 ( 6)	3 ( 50)	2 ( 34)	1 ( 17)
4 ( 8)	2 ( 25)	1 ( 13)	5 ( 63)
3 ( 5)	3 ( 60)	2 ( 40)	0 ( 0)
Sm ( 1)	0 ( 0)	1 (100)	0 ( 0)
A (27)	7 ( 26)	10 ( 38)	10 ( 37)

<sup>a</sup> See Table 1

group 1 具活性強之蛋白質分解酵素 ( 83 % ) 較其他菌株多，且大多數具卵磷脂分解酵素 ( 88-93 % )，具活性強之核酸分解酵素者 ( 55 % )，亦多於其它菌株，同時澱粉分解酵素活性亦較強，且對抗生素具耐性之種類亦最多。然而 *A. trola* DNA group 13 具強溶血性者較少，不具細胞毒性，亦無血球凝集現象，蛋白質分解酵素活性強者亦較少，具卵磷脂分解酵素活性者，在所有檢測之氣單胞菌中佔最少，不具核

酸分解酵素活性，至於澱粉分解酵素全部均為活性弱者。綜合上述，氣單胞菌中具細胞毒性及溶血性比率均高，且與一些細胞外酵素之活性似乎有某些程度的相關性。故我們應提高注意，以避免氣單胞菌引起食品中毒之發生。

## 誌 謝

本計畫中之細胞毒性試驗，承蒙生物技術

開發中心產程開發組之協助；另本局第五組張淑文小姐協助繕打，謹此致謝。

### 參考文獻

1. Varnam, A. H. and Evans, M. G. 1991. Foodborne Pathogens. pp.157-208. Wolfe, England.
2. Abeyta, C. Jr. and Wekell, M. M. 1988. Potential Source of *Aeromonas hydrophila*. J. Food Prot.9:11-22.
3. Namdari H. and Bottone, E. J. 1990. Microbiological and Clinical Evidence Supporting the Role of *Aeromonas caviae* as a Pediatric Enteric Pathogen. J. Clin. Microbiol. 28(5): 837-840.
4. Paniagua, C., Rivero, O., Anguita, J. and Naharro, G. 1990. Pathogenicity Factors and Virulence for Rainbow Trout of Motile *Aeromonas* spp. Isolated from a River. J. Clin. Microbiol. 28 (2):350-355.
5. Carnahan, A., Fanning, G. R. and Joseph, S. W. 1991. *Aeromonas jandaei*, a New Sucrose-negative Species Isolated from Clinical Specimens. J. Clin. Microbiol. 29(3):560-564.
6. Carnahan, A. M., Chakraborty, T., Fanning, G. R., Verma, D., Ali, A., Junds, J. M. and Joseph, S. W. 1991. *Aeromonas trota* sp. nov., an Ampicillin-susceptible Species Isolated from Clinical Specimens. Clin. Microbiol. 29(6):1206-1210.
7. Eley, A., Geary, I. and Wilcox, M. H. 1993. Growth of *Aeromonas* spp. at 4 °C and Related Toxin Production. Lett. Appl. Microbiol. 16: 36-39.
8. Joseph, S. W., Janda, M. and Carnahan, A. 1988. Isolation, Enumeration and Identification of *Aeromonas* sp.. Food Safety. 9: 23-35.
9. Graevenitz, A. V. and Altwegg, M. 1991. Chapter 38. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In Balows, A. W., Hausler, Jr. J., Herrmann, K. L., Isenberg, H. D. and Shadomy, H. J. (ed.). Manual of Clinical Microbiology. fifth edition. American Society for Microbiology Washington, D. C., U. S. A.
10. Lee, L. N., Luh, K. T. and Hsieh, C. 1986. Bacteremia due to *Aeromonas hydrophila*: a Report of 40 Episodes. Formosan Medicine Association. 85:123-132.
11. Lin, S. P., Chyou, J. C., Huang, F. Y., Lee, H. C., Wu, W. H. and Yang, D. I. 1986. *Aeromonas* Associated Diarrheal Disease. Acta Paed. Sin. 27: 216-222.
12. Hong, J. Y., Lee, C. Y. and Liu, C. C. 1988. *Aeromonas hydrophila* Infections in Children. Acta Paed. Sin. 29: 235-241.
13. Buchanan, R. L. 1984. The "New" Pathogens: an Update of Selected Examples. Association of Food and Drug Officials, Quarterly Bulletin. 48:142-155.
14. Morgan, D. R. and Wood, L. V. 1988. Is *Aeromonas* sp. a Foodborne Pathogen ? Review of the Clinical Data. Food Safety. 9:59-72.
15. Todd, L. S., Hardy, J. C., Stringer, M. F. and Bartholomew, B. A. 1989. Toxin Production by Strains of *Aeromonas hydrophila* Grown in Laboratory Media and Prawn Puree. Int J. Food Microbiol. 9:145-156.
16. Stelma, Jr. G. N. 1988. Virulence Factors Associated with Pathogenicity of *Aeromonas* Isolates. J. Food Prot. 9:1-10.
17. Chopra, A. K. and Houston, C. W. 1989. Purification and Partial Characterization of a Cytotoxic Enterotoxin Produced by *Aeromonas hydrophila*. Can. Microbiol. 35:719-727.
18. Threlfall, E. J. 1992. Antibiotics and the Selection of Food-borne Pathogens. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement. 73:96s-102s.
19. Hayashi, F., Fuse, A., Inoue, M., Ishii, H., Barcs, I. and Mitsushashi, S. 1993. Frequency of Drug Resistance in *Vibrio* spp. in Japan. Lett. Appl. Microbiol. 16:28-31.
20. Van Damme, L. R., and Vandepitte, J. 1980. Frequent Isolation of *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* from Healthy Zairese Freshwater Fish: a Possible Source of Sporadic Diarrhea in the Tropics. Appl. Environ. Microbiol. 39:475-479.
21. Kaper, J., Seidler, R. J., Lockman, H. and

- Colwell, R. R. 1979. Medium for the Presumptive Identification of *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacteriaceae*. Appl. Environ. Microbiol. 38:1023-1026.
22. Biolog Inc. 1992. Biolog Microstation System Release 3.01.3938. Trust Way Hayward, CA94545 U.S.A.
23. Bennett, R. W. 1985. Chapter 14. *Staphylococcus aureus*. In Bacteriological Analytical Manual. 6th. ed. P.14.02. Food and Drug Administration. Washington D. C.
24. Wong, H. C., Ting, S. H. and Shieh, W. R. 1992. Incidence of Toxigenic Vibrios in Foods Available in Taiwan. Appl. Bacteriol. 73:197-202.
25. Altwegg, M. and Zollinger-Iten, J. 1987. Antimicrobial Susceptibility Testing of Enterobacteriaceae, *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides* with the ATB System. J. Microbiol. Methods. 7:111-114.
26. Barnhart, H. M. and Pancorbo, O. C. 1992. Cytotoxicity and Antibiotic Resistance Profiles of *Aeromonas hydrophila* Isolates from a Broiler Processing Operation. Food Prot. 55(2):108-112.
27. Monfort, P. and Baleux, B. 1990. Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* and *Aeromonas caviae* in a Sewage Treatment Pond. Appl. Environ. Microbiol. 56(7):1999-2006.
28. Altwegg M., Steigerwalt, A. G., Altwegg-Bissig, R., Luthy Hottenstein, J. and Brenner, D. J. 1990. Biochemical Identification of *Aeromonas* genospecies Isolated from Humans. Clin. Microbiol. 28(2):258-264.
29. Nomura, S., Fujino, M., Yamakawa, M. and Kawahara, E. 1988. Purification and Characterization of Salmolysin, an Extracellular Hemolytic Toxin from *Aeromonas salmonicida*. J. Bacteriol. 170(8):3694-3702.

## Characterization of Aeromonad Isolated from Aquatic Foods

DANIEL YANG-CHIH SHIH, CHAO-LING LAI, SU-YI CHU AND JAN-YI WANG\*

*National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health, Executive Yuan, Taipei, R. O. C.*

### ABSTRACT

Various characteristics were determined for 222 aeromonads isolated from aquatic foods. Isolates were tested for resistance to 14 antimicrobial agents. Most of the isolates were resistant to penicillin A (95 %). All strains were resistant to 10  $\mu$ g/129, and 67-100 % of the strains were resistant to 150  $\mu$ g/129. Most strains (50-100%) had weak hemolysis, except for *A. hydrophila* DNA group 1. Cytotoxic activity was found in most of the aeromonad, with the exception of some *A. trota* DNA group 13 and some *A. media* DNA group 5B strains. A higher occur-

rence of hemagglutination was found in *A. hydrophila* DNA group 1, *A. media* DNA group 5B and *A. hydrophila* like DNA group 2 strains. Most of *A. hydrophila* DNA group 1 (83 %) showed a strong protease activity, but lower frequencies were found in other strains. *A. trota* DNA group 13 had the lowest lecithinase activity, while the other strains all demonstrated a high activity. *A. hydrophila* DNA group 1 demonstrated the highest nuclease activity and had a higher amylase activity than the others.

**Key words:** Aeromonad, antibiotics, hemolytic, cytotoxic, hemagglutination, enzymes.