

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	土	及	博士主講
陳	幸	臣	協助
王	文	亮	筆
顏	聰	瑩	錄



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：關壯秋、莊健隆、陳慶三。

訓練班學員：吳金耀、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 土 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	魚鱗粘液之細菌群落 (Bacterial flora of fish pen slime)	31
第一節	魚鱗粘液的細菌數與種類 (Bacterial count and species of fish pen slime).....	31
第二節	魚鱗粘液中細菌的細胞形態 (Cell morphology of fish pen slime bacteria).....	33
第三節	魚鱗粘液細菌的酵素 (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、有系統的生產個體，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。

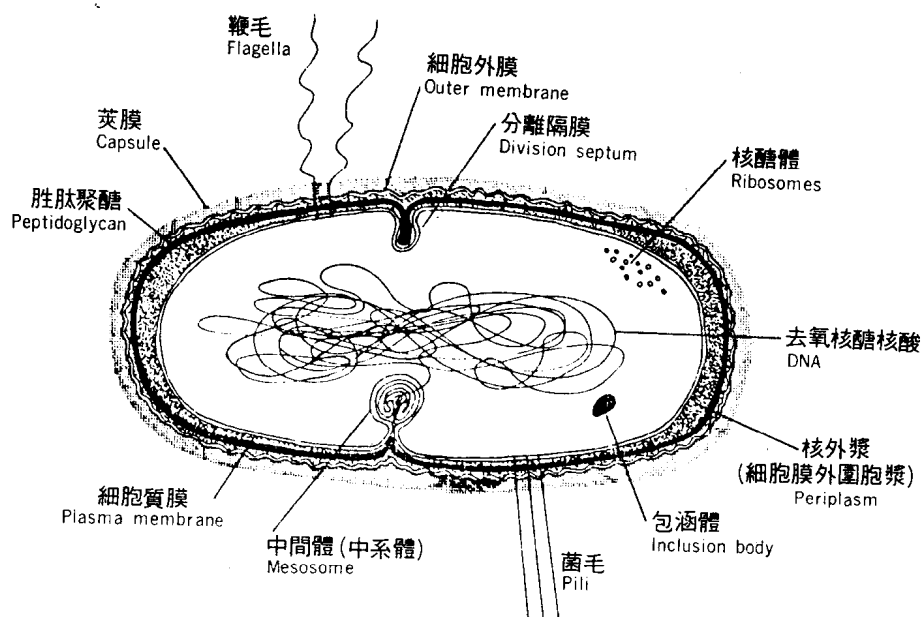


圖 1~1 一般 Gram 陰性菌細胞之構造

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	毛	直徑10~20nm, 長度不定, 可達15~20 μ m	運動性 (motility)
菌 毛	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	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	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	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	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)	膜	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)	因	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)	壁	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 (Cytoplasma)	質		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	造	簡 單	複 雜
厚 薄	薄	厚 (20~80nm)	薄 (10nm)
脂 肪 酸	肪 酸	少 (痕 跡)	多
臺 口 (Teichoic acid)	口	有	無
糖 脂 類 (Lipopolysaccharides)	脂 類	無	有
對青黴素之感受性		+	— (高濃度時有感受性)
能被溶菌酵素 (Lysozyme) 分解		+	— [僅在 Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 之前處理下才能被分解]
細胞壁之層數		1	2
細胞壁含胺基酸之種類		少	多
肽 聚 糖 含 量		多	少
細 胞 壁 之 成 分		肽聚糖、臺口酸	蛋白質、磷脂質、脂蛋白與肽聚糖

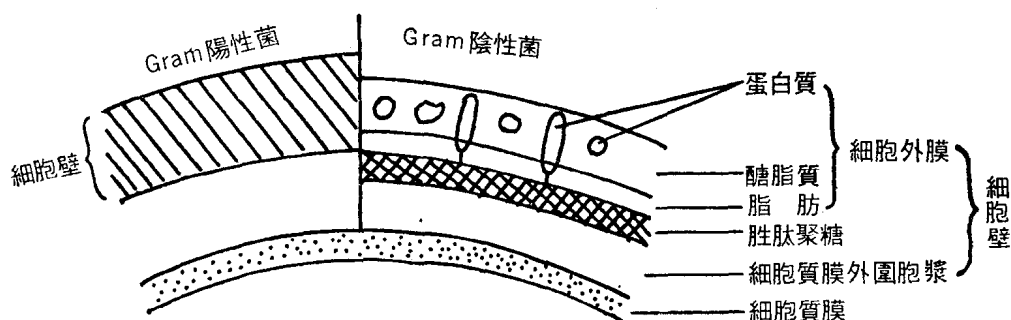


圖 1~2 Gram 陽性菌與 Gram 陰性菌細胞壁之分別

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)，因牢於 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圈，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。

因細胞圈包含外膜和內膜，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 , ϕ 80 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。

為何一般水中細菌大多是 Gram 陰性？其主要原因可能為細胞壁之不同。因 Gram 陰性菌細胞壁的構造較為複雜，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。若為 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，可分為：

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，因為此時 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* 為主。其中 *Vibrio marinus* 之生長溫度為 1°C ~ 9°C ，最適溫度為 4°C 。*Vibrio psychroerythrus* 生長溫度範圍為 0°C ~ 19°C ，最適溫度為 15°C 。

又如 Hess 分離的 *Pseudomonas fluorescens* 之一世代時間 (Generation time) 在 0.5°C 為 6.68 小時，而在 0°C 時則為 30 小時；另一種 *Pseudomonas fluorescens* 的世代在 5°C 時為 10.5 小時，在 0°C 時則為 26.5 小時。*Bacillus psychrophillus* 的世代則為 28 小時 (0°C)，*Micrococcus cryophilus* 亦為 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為難的原因之一。

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 μ m 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够耐寒？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醣蛋白，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够耐寒。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。

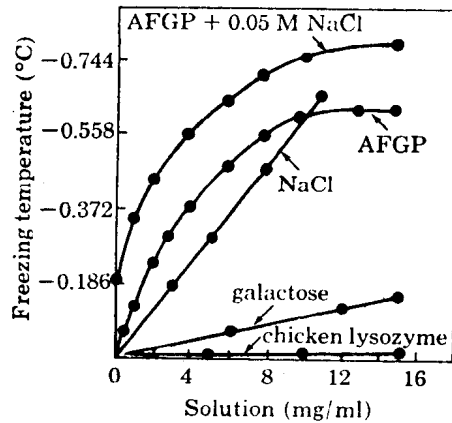


圖 2~1 AFGP 與 NaCl 之抗結冰能力