

# 探討夜光蟲與副溶血弧菌生長關係

張叡挺<sup>1</sup>、蔡昇芳<sup>2</sup>

<sup>1</sup>國立臺灣海洋大學生命科學暨生物科技學系

<sup>2</sup>國立臺灣海洋大學海洋環境與生態研究所

## 前言

自從2009開始，養殖蝦面對了一個嚴重的感染病--由副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)所造成的急性肝胰臟壞死綜合症(Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome; AHPNS)。初次在中國傳出疫情後，到目前已有好幾個亞洲國家的養殖草蝦與白蝦接連發生大量死亡的情形。感染AHPNS的蝦會出現不好動或螺旋式游泳，其胃與中腸是形成無內容物的空腔狀況，肝胰臟蒼白萎縮且常帶有黑色條紋。研究發現雙鞭毛蟲門生物對弧菌有抑制作用。由於夜光蟲(*Noctiluca scintillans*)食性相當廣泛且屬於雙鞭毛蟲門之一員，因此本研究將夜光蟲(*N. scintillans*)和副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)培養在同個空間中，並觀察彼此的生長變化。

## 材料與方法

生物：  
夜光藻(*Noctiluca scintillans*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)

方法：  
分離細菌與偵測濃度  
1.將副溶血弧菌菌株經純化單一培養，並液態養菌2~3天  
2.取菌液1ul加ddH2O至1000ul  
3.將0.2um濾膜放置真空過濾機上，並加入稀釋後菌液  
4.加入固定液以及DAPI，避光5分鐘  
5.將馬達開啟抽氣30秒  
6.將膜片放置於玻片上，並上顯微鏡觀察  
7.在顯微鏡下經紫外光激發後，觀察大小約為0.2 um藍點  
8.紀錄十個區域，並計算細菌濃度

副溶血弧菌與夜光蟲生長關係  
六孔盤，每盤一個濃度，濃度有 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$  cells/ml共計4(盤)組實驗  
每六孔盤上方三孔為細菌+夜光蟲混和培養組、下方為細菌單一培養組  
三重覆、在25度下、12:12光暗週期、培養五天

## 結果

培養期間細菌濃度變化

Date	No.	filter vol. (ml)	field	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Average	(cells/ml)	final con.	增加量	
8月18日	$10^5$ 100000	2	0.25	41	52	34	31	24	27	41	24	61	31	32.9	386311.8			
		2	0.25	17	13	21	14	16	25	41	47	12	11	21.7	254801.4			
		2	0.25	56	47	46	64	57	12	65	35	24	17	42.3	496686.6	379266.6	279266.6	
		2	0.25	12	24	16	14	24	26	24	26	19	7	19.2	225446.4	3.8*10 <sup>5</sup>		
		2	0.25	16	19	25	27	11	24	16	28	14	24	20.4	2217.933333			
		2	0.25	3	24	17	4	11	24	14	17	11	21	14	15.7	15362.45	81008.93	-18991.0722
		2	0.25	2	14	16	12	4	28	14	16	24	23	15.3	179652.6			
		2	0.25	7	7	24	15	3	19	8	14	64	29	22.4	263020.8			
		2	0.25	67	72	84	64	72	61	24	34	25	64	56.7	665771.4	369481.6	-630518.4	
		1	0.25	14	64	17	17	49	78	16	64	27	64	41	962844	3.7*10 <sup>5</sup>		
$10^6$ 1000000	2	0.25	73	24	94	64	20	84	28	72	68	71	59.8	1404343.2				
	1	0.25	10	7	11	13	21	17	3	11	24	13	13	305292	890826.4	-109173.6		
	2	0.25	7	10	11	24	21	15	13	24	21	24	17	199614				
	2	0.25	9	11	11	24	13	21	17	3	11	24	14.4	169084.8				
	2	0.25	7	10	24	13	21	24	7	4	13	21	14.4	169084.8	179261.2	-9820738.8		
	0.2	0.25	177	94	63	69	142	112	152	142	117	121	118.9	13961238	1.8*10 <sup>5</sup>			
	0.2	0.25	164	121	96	113	132	111	141	162	142	121	130.3	15299826				
	0.2	0.25	141	127	111	134	127	104	87	164	127	116	123.8	14536596	14599220	4599220		
	2	0.25	32	61	42	63	51	64	27	35	47	41	46.3	543654.6	1.5*10 <sup>7</sup>			
	2	0.25	46	52	64	56	31	72	64	27	52	31	49.5	581229				
$10^8$ 100000000	2	0.25	8	14	6	10	11	14	96	13	6	14	19.2	225446.4	450110	-99549890		
	0.02	0.25	334	446	327	340	279	295	547	269	334	423	359.4	422007480	4.5*10 <sup>5</sup>			
	0.02	0.25	410	442	527	410	396	295	547	441	417	758	464.3	545181060				
	0.02	0.25	169	72	112	64	98	167	240	514	67	112	161.5	189633300	3.86E+08	285607280		

培養期間夜光蟲數量變化

濃度	$10^5$			$10^6$			$10^7$			$10^8$		
數量	4	4	6	8	4	5	0	0	0	0	0	0

## 討論

儘管實驗培養五天後，觀察到水體有藻類汙染，並大量生長。但是數據顯示弧菌起始濃度在 $10^5 \sim 10^6$  cells/ml之間，有夜光蟲的實驗組培養五天後弧菌數量明顯增加，介在 $\sim 4 \times 10^5$  cells/ml之間；而沒加夜光蟲的控制組弧菌數量略低於培養起始濃度，並沒明顯成長現象。然而當弧菌濃度高於 $10^7$  cells/ml以上時，實驗組細菌數量明顯下降，濃度依舊被抑制在 $2 \sim 5 \times 10^5$  cells/ml之間；控制組之弧菌在培養後則有明顯的增長。

### 夜光蟲的生長

在 $10^5 \sim 10^6$  cells/ml之間夜光蟲有半數以上存活，但濃度高於 $10^7$  cells/ml之後，數據顯示無一夜光蟲能存活。

### 夜光蟲對細菌的抑制能力

由以上數據推測夜光蟲似乎可以抑制弧菌的現存量，尤其在弧菌濃度超過 $10^7$  cells/ml以上時最明顯。並推測 $2 \sim 5 \times 10^5$  cells/ml為夜光蟲能攝食弧菌的最低濃度。