

益生菌藤黃微球菌之特性測定及菌種鑑定

黃世鈴^{1*} · 黃麗玲² · 楊豐隆² · 冉繁華³ · 陳秀男⁴

¹ 行政院農業委員會水產試驗所企劃資訊組

² 行政院農業委員會水產試驗所淡水繁養殖研究中心

³ 國立臺灣海洋大學水產養殖系

⁴ 國立臺灣大學漁業科學研究所

摘要

由養殖池分離之菌株 LK1012W 進行各項形態、生理及生化分析測試，試驗結果顯示本細菌屬革蘭氏陽性球菌、觸酶反應陽性、不具氧化酶、不會產生內孢子、會生長在好氧的培養基、厭氧環境下不生長。形態、生理及生化特性試驗綜合結果顯示，LK1012W 與 *Micrococcus luteus* 及 *M. yunnanensis* 最接近；進行 16S rDNA 部份序列分析，結果與 *M. luteus*、*M. yunnanensis*、*M. endophyticus*、*M. antarcticus* 等 4 株微球菌相似度均達 98%。分析 LK1012W 之 DNA G+C content 為 72.8 mol%，顯示其分類可能落在 *M. luteus*、*M. yunnanensis*、*M. endophyticus* 等 3 株菌種。進行 DNA hybridization，結果顯示 LK1012W 與 *M. luteus* BCRC 11034 相似性為 89%，與 *M. yunnanensis* BCRC 80243 相似性為 80%。綜合以上的試驗結果，本研究將 LK1012W 鑑定為藤黃微球菌 *M. luteus*。

關鍵詞：生化特性、DNA 雜交、革蘭氏陽性、藤黃微球菌

前言

養殖環境水域妥善運用益生菌達到水質及底質的淨化，藉以去除大量累積的有機物質及防止池塘老化；消化道功能性益生菌的應用，以藉著強化消化道能力及安全以增強水產生物免疫力，主要的功能或作用機制，包括提供營養，幫助消化，改善與平衡消化道的微生物相，抑制不良的細菌或雜菌，最重要的是可以有效提高動物的免疫力「如增強吞噬細胞的吞噬能力，刺激產生干擾素或其它抗病因子等」，以養殖健康的養殖生物，種種的策略和技術均會成為未來重要的發展趨勢(黃等, 2012, 2015)。

LK1012W 菌株係從養殖白蝦的淡水池中分離出來，經過十幾年來的試驗研究，包括以水質益生菌的方式將大量培養的細菌添加在養殖池水中淨

化水質；以腸道益生菌的方式添加在飼料中餵食試驗魚，測量試驗魚的體成長和健康情形；以微粒包覆 (encapsulated) 的方式將微粒包覆存活 LK1012W、配合微粒包覆細菌疫苗混合免疫激活物等，以飼料添加物的方式餵食試驗魚，經細菌攻擊試驗後，觀察及測試試驗魚免疫的效力。如朱 (2014) 研究不同益生菌對密閉式養殖系統中水質與成長之影響，結果顯示，添加益生菌的處理組較控制組能顯著降低水中氨-氮與亞硝酸-氮的濃度，複合益生菌對水質的處理效果優於單一菌，複合益生菌包括藤黃球菌+光合菌混合組、枯草桿菌+光合菌混合組等；檢測白蝦成長情形，飼料轉換效率 FCR、日成長率 SGR 以藤黃球菌+光合菌混合組 (3.06 及 0.80) 最佳，系統水質總弧菌皆控制在 $8.80 \times 10^2 - 9.6 \times 10^2$ cfu/ml，顯著低於控制組。黃等 (2016) 應用 4 株細菌添加的試驗組加上疫苗免疫處理組，都有相當好的效果，48 hr 半致死濃度 (LC₅₀) > 10^8 cfu/ml，7 天 LC₅₀ > 10^8 cfu/ml，其中，白菌 (white bacteria) 顯示可以有效增強試驗魚免疫力，white bacteria 就是

*通訊作者/基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 24622101 ext. 2507; FAX: (02) 2462-4627; E-mail: slhuang@mail.tfrin.gov.tw

LK1012W；黃等 (2016) 將 LK1012W 應用口服途徑，口服微粒包覆 *Streptococcus iniae* 疫苗配合微粒包覆益生菌的飼料，結果顯示，試驗組均顯示有效增強魚體對抗 *S. iniae* 的能力，口服微粒包覆 *S. agalactiae* 疫苗配合微粒包覆益生菌的飼料，結果顯示 試驗組可增強魚體對 *Strep. agalactiae* 的抵抗力；黃等 (2012) 將 5 種益生菌添加在飼料中餵食吳郭魚，試驗魚的日成長率 (SGR) 和飼料轉換效率 (FCR) 都比單獨餵食鰻粉好，以有糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) > 微球菌 (LK1012W) > 枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) > 嗜酸乳桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*) > 光合菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) > 不添加益生菌組。上述研究結果顯示，LK1012W 在養殖池使用都具有正面的效果，應用在養殖環境中淨化水質，可以增加魚體成長率，也可以配合疫苗使用增強魚體免疫力。

本研究藉由 DNA G+C content、16S rDNA 部份序列分析和 DNA 雜交試驗等生化特性試驗結果，來鑑定 LK1012W 菌株分類位置。

材料與方法

一、細菌來源

細菌來源得自國立臺灣海洋大學水產養殖系和臺灣大學漁業科學研究所，將細菌進一步純化和編號為 LK1012W，細菌菌株 LK1012W 可以培養在 BHI (brain heart infusion)、TSA (tryptic soy agar)、NA (nutrient agar) 等培養基中，培養溫度為 25 - 33 °C。

二、生理生化特性試驗

進行 LK1012W 細菌品種鑑定，應用的方法技術和試驗以傳統細菌生化特性試驗為主，以 DNA G+C content、16S rDNA 序列分析、和 DNA 雜交試驗等輔助菌種鑑定，傳統細菌生化特性試驗包括革蘭氏染色、細菌形態學、在 TSA 培養基中生長的形狀和顏色、好氧培養基和厭氧培養基的生長情形、觸酶試驗、是否形成內孢子、細胞色素氧化酵素試驗、醣類利用試驗、酸類利用試驗、鹽度適應試驗、胺基酸利用試驗等 (黃, 1998; Huang *et al.*, 1999)，試驗總計 138 項目。生化特

性試驗鑑定比對鑑定之標準菌株為 *Micrococcus luteus* (BCRC 11034) 及 *Micrococcus yunnanensis* (BCRC80243)。

三、細菌菌種鑑定方法

依照 Baird-Parker (1963, 1965) 及 Schlerfer (1986) 革蘭氏陽性球菌分類法進行細菌初步定位，再根據 Koneman *et al.* (1992) 細菌分類原則，最後配合 16S rDNA、DNA G+C content 及 DNA hybridization 試驗等 (委託食品工業發展研究所分析) 來確定 LK1012W 的分類位置。DNA 雜交試驗應用的比對菌株為標準菌株 *M. luteus* BCRC 11034 菌株與 *M. yunnanensis* BCRC 80243 菌株。

結果與討論

從淡水養殖的白蝦池下層池水中分離出編號為 LK1012W 的菌株，培養在一般培養基中如 BHIA (brain heart infusion agar)、TSA (tryptic soy agar)、NA (nutrient agar)，其最適生長溫度為 25 - 33 °C。

針對 LK1012W 進行了 138 種生化特性試驗 (Table 1)，LK1012W 及比對用的標準菌株為 *M. luteus* (BCRC11034) 與 *M. yunnanensis* (BCRC80243)，細菌形狀呈球形、卵圓形或橢圓形，細菌會單一、成對、4 個一體或成簇排列，LK1012W 及 BCRC11034 細菌直徑大小平均約為 0.9 μm (Fig. 1)，BCRC80243 細菌直徑大小平均約為 1.2 μm，3 株細菌都可以在 TSA、BHIA、及 NA 等固態培養基長得很好，細菌培養在 TSA 固態培養基時呈黃色圓形菌落，外表平滑；LK1012W 經革蘭氏染色為陽性反應，沒有鞭毛或纖毛，不具運動性，不產生內孢子，LK1012W 可以生長在 0% NaCl TSA、1% NaCl TSA、4% NaCl TSA 培養基中，在 4% NaCl TSA 培養基中生長緩慢，要 2 - 3 天才出現細菌菌落，所以 LK1012W 屬於廣鹽性細菌。

依據 Schlerfer (1986) 和 Koneman (1992) 指出革蘭氏陽性球菌分類法，將革蘭氏陽性球菌區分為 catalase-negative group 與 catalase-positive group 二大類，catalase-negative group 細菌，包括葡萄球菌

屬 (*Staphylococcus*)、微球菌屬 (*Micrococcus*)、口腔球菌屬 (*Stomatococcus*) 及動球菌屬 (*Planococcus*)；catalase-positive group 細菌包括鏈球菌 (*Streptococcus*)、腸球菌屬 (*Enterococcus*)、乳酸球菌屬 (*Lactococcus*)、產氣球菌屬 (*Aerococcus*)、孳生球菌屬 (*Gemella*)、足球菌屬 (*Pediococcus*) 及白聯球菌屬 (*Leuconostoc*) 等。

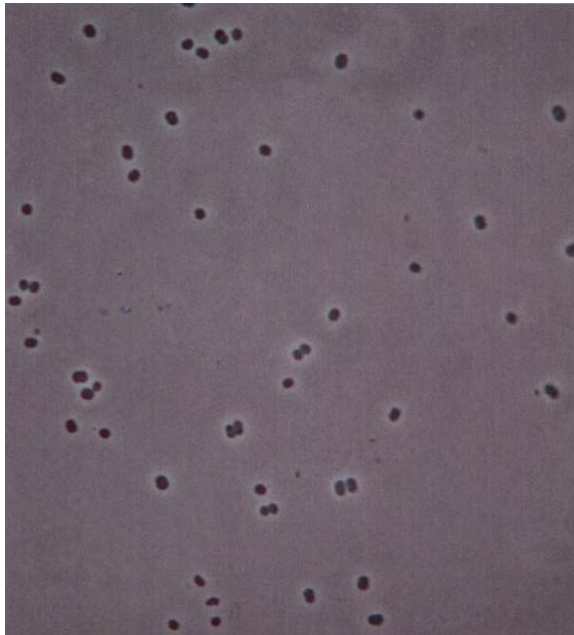


Fig. 1 SEM observation of the LK1012W strain; the bacterial morphology included an oval shape, and the diameter of the bacteria was 0.9 μm .

LK1012W 之 catalase 反應為陽性屬於 catalase-positive group 細菌，該群之細菌包括 4 屬，其中 *Planococcus* 具運動性，主要出現於海水水域，*Stomatococcus* 具鞘包被的革蘭氏陽性球菌 (encapsulated Gram-positive coccus)，在固體培養基中會產生透明的粘液，此 2 屬細菌特性明顯不符合都可排除，所以 LK1012W 可能為葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 或微球菌 (*Micrococcus*)，需要再進一步進行 Modified oxidase、Bacitracin 5 μg 及 Furazolidone 100 μg 等 3 種特性試驗 (Schlerfer, 1986)，葡萄球菌特性為 Modified oxidase ”-”、Bacitracin 5 μg ”-”、Furazolidone 100 μg ”+”，微球菌特性 Modified oxidase ”+”、Bacitracin 5 μg ”+”、Furazolidone 100 μg ”-”，生理生化特性試驗 (Table 1) 資料顯示 LK1012W 之特性為 Modified oxidase ”+”、Bacitracin 5 μg ”+”、Furazolidone 100 μg ”-”，可鑑定為微球菌屬細菌。

根據 Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, Volume II 革蘭氏陽性球菌篇所述，LK1012W 進行 138 種特性試驗，試驗結果顯示於 Table 1，將 LK1012W 歸類為 Family I 微球菌科細菌 (Micrococcaceae) 項下微球菌屬細菌，LK1012W 的生化特性與 *M. luteus* 最接近，其次為 *M. yunnanensis* 及 *M. endophyticus*，但是要確認 LK1012W 細菌鑑定，仍須進行 16S rDNA (DNA G+C content) 分析及定序。

Table 1 Morphological, physiological and biochemical test results of LK1012W strain

Characteristics	LK1012W	<i>M. luteus</i> BCRC11034	<i>M. yunnanensis</i> BCRC80243
Gram stain	+	+	+
Coccus	+	+	+
Catalase	+	+	+
Modified oxidase	+	+	+
Bacitracin 5 μg	+	+	+
Furazolidone 100 μg	-	-	-
Motility	-	-	-
Endospore	-	-	-
Bact. Diameter (μm)	0.9	0.9	1.2
Colony edge on TSA	entire	entire	entire
Colony pigment	Y	Y	Y
Growth on BHIA	+	+	+
Growth on NA	+	+	+
Dextrin	-	+	+

Table 1 Continued

Characteristics	LK1012W	<i>M. luteus</i> BCRC11034	<i>M. yunnanensis</i> BCRC80243
D-Maltose	—	—	+
D-Trehalose	—	—	+
D-Cellobiose	—	—	—
Gentiobiose	+	+	+
Sucrose	—	+	+
D-Turanose	—	+	—
Stachyose	—	—	—
pH6	+	+	+
pH5	—	—	—
D-Raffinose	—	+	+
α-D-Lactose	—	—	—
D-Milibiose	—	+	+
D-Methyl-D-Glucoside	—	—	—
D-Salicin	—	—	—
N-Acetyl-D-Glucosamine	—	—	—
N-Acetyl-β-D-Mannosamine	—	—	—
N-Acetyl Galactosamine	—	—	—
N-Acetyl Neuraminic acid	—	—	—
0% NaCl	+	+	+
1% NaCl	+	+	+
4% NaCl	+	+	+
8% NaCl	+	—	—
α-D-Glucose	—	+	+
D-Mannose	—	+	+
D-Fructose	—	+	—
D-Galactose	—	+	+
3-Methyl Glucose	—	+	+
D-Fucose	—	+	+
L-Fucose	+	+	+
L-Rhamnose	—	+	+
Inosine	—	—	—
1% Sodium Lactate	+	+	+
Fusidic acid	—	—	—
D-Serine	—	—	+
D-Sorbitol	—	—	—
D-Mannitol	—	—	—
D-Arabitol	—	—	—
myo-Inositol	—	—	—
Glycerol	—	—	—
D-Glucose-6-PO4	—	+	—
D-Fructose-6-PO4	—	+	+
D-Aspartic acid	—	—	—
D-Serine	—	—	—
Troleandomycin	—	—	—
Rifamycin SV	—	—	—

Table 1 Continued

Characteristics	LK1012W	<i>M. luteus</i> BCRC11034	<i>M. yunnanensis</i> BCRC80243
Minocycline	—	—	—
Gelatin	—	—	—
Glycyl-L-Proline	—	—	—
L-Alanine	—	+	—
L-Arginine	—	—	—
L-Aspartic acid	—	—	—
L-Glutamic acid	—	—	+
L-Histidine	—	—	—
L-Pyroglutamic acid	—	+	+
L-serine	—	—	—
Linomycin	—	—	—
Guanidine HCl	—	—	—
Niaproof4	—	—	—
Pectin	—	+	—
D-Galacturonic acid	+	+	+
L-Galactonic acid Lactone	—	—	—
D-Gluconic acid	—	—	—
D-Glucuronic acid	—	+	+
Glucuronamide	—	+	+
Mucic acid	—	+	—
Quinic acid	—	—	—
D-Saccharic acid	—	—	—
Vancomycin	—	—	—
Tetrazolium violet	—	—	—
Tetrazolium blue	—	—	—
p-Hydroxy-Phenylacetic acid	—	—	—
Methyl pyruvate	—	—	—
D-Lactic acid Methyl ester	—	—	—
L-Lactic acid	—	+	+
Cetric acid	—	—	—
α -Keto-Glutaric acid	—	—	—
D-Malic acid	—	—	—
L-Malic acid	—	—	—
Bromo-Succinic acid	—	—	—
Nalidixic acid	—	+	+
Lithium Chloride	—	+	+
Potassium tellurite	—	+	+
Tween 40	+	—	+
r-Amino-Butyric acid	—	—	—
α -Hydroxy butyric acid	—	—	—
β -Hydroxy-D,L-butyric acid	—	—	—
α -keto-Butyric acid	—	—	—
Acetoacetic acid	+	+	+
Propionic acid	+	+	+
Acetic acid	+	+	+

Table 1 Continued

Characteristics	LK1012W	<i>M. luteus</i> BCRC11034	<i>M. yunnanensis</i> BCRC80243
Fomic acid	—	—	—
Aztreonam	+	+	+
Sodium bronate	+	+	+
ONPG (β -galactosidase)	—	—	—
ADH (Arginine dihydrolase)	—	—	—
LDC (Lysine decarboxylase)	—	—	—
ODC (Ornithine decarboxylase)	—	—	—
CIT (Citrate utilization)	—	—	—
H ₂ S production	—	—	—
URE (Urease)	—	+	—
TDA (Tryptophane deaminase)	—	—	—
IND (Indole production)	—	—	—
VP (Acetoin production)	+	—	+
GELatinase	+	—	+
GLU (Glucose)	—	—	—
MAN (Mannitol)	—	—	—
INO (Inositol)	—	—	—
SOR (Sorbitol)	—	—	—
RHA (Rhamnose)	—	—	—
SAC (Saccharose)	—	—	—
MEL (Melibiose)	—	—	—
AMY (Amygdalin)	—	—	—
ARA (Arabinose)	—	—	—
D-Glucose (GLU)	—	+	+
D-Fructose (FRU)	—	—	—
D-Mannose (MNE)	—	—	—
Maltose (MAL)	—	—	—
Lactose (LAC)	—	—	—
D-Trehalose (TRE)	—	—	—
D-Mannitol (MAN)	—	—	—
Xylitol (XLT)	—	—	—
D-Melibiose (MEL)	—	—	—
Potassium nitrate (NIT)	—	—	—
β -Naphthyl acid Phosphate (PAL)	+	+	+
Sodium pyruvate (VP)	+	—	+
Raffinose (RAF)	—	—	—
Xylose (XYL)	—	—	—
Saccharose (SAC)	—	—	—
α -Acetyl-Glucosamine (NAG)	—	—	—
Arginine (ADH)	—	—	—
Urea (URE)	—	—	—

```

ATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGC
CCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAG
TAACCTGCCCTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATAC
CGGATAGGAGCGCCTACCGCATGGTGGGTGTTGAAAGATTATCCGG
TTTTGGATGGACTCGCGGCCTATGAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTC
ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCG
AAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCCGTAATACGTAGGGTGCGACGT
    
```

Fig. 2 Parial sequence analyzed of LK1012W rDNA.

將 LK1012W 進行 16S rDNA 部份序列的分析結果顯示於 Fig. 2，相似度與 *M. luteus*、*M. yunnanensis*、*M. endophyticus*、*M. antarcticus* 等 4 株微球菌均達 98% 以上，不易區分，在細菌分類上，不論生化特性試驗結果如何，細菌本身之 DNA G+C content 一定要落在正確的位置，必須進一步的分離測定，但生化特性試驗中顯示 LK1012W 與 *M. antarcticus* 的試驗結果差異很大，所以挑開此一菌種的可能性。

LK1012W 之 DNA G+C content 測定數值報告為 72.8 mol%，根據 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume II 革蘭氏陽性球菌 Family I, *Micrococcaceae* 篇所述，*Micrococcus* 屬之 DNA G+C content 為 65 - 75 mol%，*Stomatococcus* 屬之 DNA G+C content 為 5 - 60 mol%，*Planococcus* 屬之 DNA G+C content 為 39 - 52 mol%，*Staphylococcus* 屬之 DNA G+C content 為 30 - 39 mol% (Kocur *et al.*, 1971)，結果顯示，LK1012W DNA G+C content 為 72.8 mol%，分析結果落在 *Micrococcus* 屬之 DNA G+C content 為 65 - 75 mol% 中，將 LK1012W 分類為 *Micrococcus* 屬。

LK1012W DNA G+C content 為 72.8 mol%，依據 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume II 革蘭氏陽性球菌 Family I, *Micrococcaceae* 篇所述，及報告中顯示不同微球菌屬細菌之 DNA G+C content，其中，*M. luteus* 之 DNA G+C content 為 70 - 75 mol% (Kocur, *et al.*, 1971)，*M. lylae* 之 DNA G+C content 為 67.1 - 68.9 mol% (Kloos *et al.*, 1974)，*M. varians* 之 DNA G+C content 為 66 - 72 mol% (Kocur *et al.*, 1971)，*M. roseys* 之 DNA G+C content 為 66 - 75 mol% (Bohacek *et al.*, 1969)，*M. agilis* 之 DNA G+C content 為 67 - 69 mol% (Kloos

et al., 1974)，*M. kristinae* 之 DNA G+C content 為 66.6~67 mol% (Kloos *et al.*, 1974)，*M. nishinomiyaensis* 之 DNA G+C content 為 66.4 - 71.1 mol% (Kocur, *et al.*, 1975)，*M. sedentarius* 之 DNA G+C content 為 67.7 - 70.6 mol% (Kloos *et al.*, 1974)，*M. halobius* 之 DNA G+C content 為 70.0 - 71.5 mol% (Onishi and Kamekura, 1972)，*M. yunnanensis* 之 DNA G+C content 為 66 - 75 mol%，及 *M. endophyticus* 之 DNA G+C content 為 66.3 - 73.3 mol% 等，LK1012W 之 DNA G+C content 分析的結果，顯示 LK1012W 的分類與 *M. luteus*、*M. yunnanensis* 及 *M. roseys* 等 3 株微球菌屬細菌很接近，但是 LK1012W 與 *M. roseys* 的生化特性試驗結果差異很大，所以是 *M. roseys* 的可能性不大；實際上 LK1012W 之 DNA G+C content 分析的結果與 *M. luteus*、*M. yunnanensis* 等 2 株微球菌屬細菌接近；雖然 16S rDNA 部份序列分析和 DNA G+C content 都還不能完全確定 LK1012W 的分類位置或菌種，然而 LK1012W 的 138 種生化特性試驗的鑑定結果是正確無誤的。經過生化特性試驗鑑定、16S rDNA 部份序列分析和 DNA G+C content 等分析，縮小細菌可能的分類位置後，最後再進行 DNA 雜交試驗 (DNA hybridization) 就可以確定或區分 LK1012W 種類。

DNA 雜交試驗，旨在測試 LK1012W 與比對標準菌株的相似情形，本研究應用的比對菌株為標準菌株 *M. luteus* BCRC 11034 菌株與 *M. yunnanensis* BCRC 80243 菌株，試驗結果顯示，LK1012W 與標準菌株 *M. luteus* BCRC 11034 的相似度為 89%，與 *M. yunnanensis* BCRC 80243 的相似度為 80%，證實試驗菌株 LK1012W 與比對標準菌株 *M. luteus* BCRC 11034 最接近。

綜合上述之生化特性試驗的鑑定結果、DNA G+C content、16S rDNA 部份序列分析、DNA 雜交試驗等的綜合結果，本研究將 LK1012W 鑑定為藤黃微球菌 *M. luteus*。

參考文獻

- 黃世鈴 (1998) 吳郭魚病原性葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 之分離及其特性研究. 國立臺灣大學動物學研究所 博士論文, 臺北, 臺灣, 109 pp.
- 黃世鈴, 楊豐隆 (2012) 應用微生物增強魚類對抗疾病能力之研究. 水產試驗所 100 年度年報, 行政院農業委員會水產試驗所, p. 56.
- 黃世鈴, 楊豐隆, 黃麗玲 (2012) 應用微生物增強魚體免疫力的理論與應用技術. 水產動物防疫簡訊, 雲林縣家畜防治所, 16: 9-13.
- 黃世鈴, 楊豐隆, 黃麗玲 (2013) 在水產養殖場使用光合菌的益處. 水試專訊, 44: 48-50.
- 朱鈺婷 (2014) 不同益生菌對白蝦密閉式養殖系統中水質與成長之影響. 國立臺灣海洋大學水產養殖系碩士論文, 基隆, 臺灣, 51 pp.
- 黃世鈴, 楊豐隆, 黃麗玲 (2015) 枯草桿菌在農業與養殖漁業上的應用. 水試專訊, 52: 37-41.
- 黃世鈴, 楊豐隆, 黃麗玲 (2016) 免疫激活物質在水產養殖之應用—強化吳郭魚抗病力之研究. 水產試驗所 105 年度年報, 行政院農業委員會水產試驗所, p. 61.
- Baird-Parker, A. C. (1963) A classification of *Micrococci* and *Staphylococci* based on physiological and biochemical tests. *J. Gen. Microbiol.*, 30: 409-427.
- Baird-Parker, A. C. (1965) The Classification of *Staphylococci* and *Micrococci* from World-wide Sources. *J. Gen. Microbiol.*, 38: 363-387.
- Bohacek, J., M. Kocur and T. Martinec (1969) Deoxyribonucleic acid base composition of *M. roseus*. *Antoni van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.*, 35: 185-188.
- Huang, S. L., W. C. Chen, M. C. Shei, I C. Liao and S. N. Chen (1999) Studies on epizootiology and pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* in Tilapia (*Oreochromis* spp.) cultured in Taiwan. *Zool. Stud.*, 38(2): 178-188.
- Kloos, W. E., T. G. Tornabene and K. H. Schlerfer (1974) Isolation and characterization of *Micrococci* from human skin, including two new species: *M. lylae* and *M. kristinae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24: 79-101.
- Koneman E. W., S. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger and W. C. Winn Jr. (1992) The gram-positive cocci, part I: *Staphylococci* and related organisms. *In Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (4th ed.) J. B. Lippincott Company, 405-430.
- Kocur, M., T. Bergan and N. Mortensen (1971) DNA base composition of Gram-positive cocci. *J. Gen. Microbiol.*, 69: 167-183.
- Onishi, H. and M. Kamekura (1972) *M. halobius* sp. n. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 22: 233-236.
- Schlerfer, K. H. (1986) Gram-positive cocci. *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 2) (P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt eds.), Williams & Wildins, Baltimore, USA, 999-1035.

Characterization and Identification of a Probiotic Bacterium, *Micrococcus luteus*

Shih-Ling Huang^{1*}, Li-Ling Huang², Fong-Long Yang², Fan-Hua Nan³ and Shiu-Nan Chen⁴

¹Planning and Information Division, Fisheries Research Institute

²Freshwater Aquaculture Research Center, Fisheries Research Institute

³Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University

⁴Institute of Fisheries Science, National Taiwan University

ABSTRACT

Morphological, physiological and biochemical characterizations were conducted for the identification of an isolated bacterium LK1012W. The results showed that the characters of LK1012W were Gram positive (+) coccus, Catalase (+), Oxidase (-), endospore (-), able to grow up on aerobic medium (+) and unable to grow on anaerobic medium (-), with DNA G + C content (16S rDNA) of 72.8 mol%.

The LK1012W strain was similar to three species of *Micrococcus*: *M. luteus*, *M. yunnanensis* and *M. endophyticus*, based on 138 characteristics tested and 16s rDNA sequenced. The results of DNA hybridization showed that LK1012W vs *M. luteus* BCRC 11034 exhibited 89% similarity while that of LK1012W vs *M. yunnanensis* BCRC80243 was 80%. Upon the above results, the LK1012W strain was therefore identified as *M. luteus*.

Key words: biochemical characteristics, DNA hybridization, Gram positive, *Micrococcus luteus*

*Correspondence: 199 Hou-lh Road, Keelung 202, Taiwan. TEL: (02) 2462-2101 ext. 2507; FAX: (02) 2462-4627; E-mail: slhuang@mail.tfrin.gov.tw