

# 發光菌次單位疫苗使用於海鱸之初步效果

張正芳、楊佳宏、許家惠、陳紫嫻

水產試驗所東港生技研究中心



## 前言

海鱸為目前已確立完全養殖技術之魚類中，成長最快速的魚種，比之鮭魚、青魷、紅魷 2 年才可成長達 3 kg，或嘉鱸、鱸魚 1 年成長不到 1 kg，在養殖上具有絕對的競爭優勢。目前台灣的外海箱網海鱸養殖，年產量已達 4,000 公噸左右，其中約有 500 公噸以冰鮮魚外銷日本，發展潛力很大，可望成為媲美挪威的海上箱網鮭魚養殖的產業，尤其在我國加入 WTO 之後，對強化我國水產養殖產業的國際競爭力，具有很大的助益。唯，在箱網養殖過程中，魚隻常因進行篩選、搬運、移動等工作或因搶食飼料相互擦撞而受傷，極易受發光菌 (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) 感染，而引起大量死亡。故為增進水產養殖產業之競爭力，克服箱網養殖海鱸遭受病原侵襲，發展適用之疫苗為必然之趨勢。

## 材料及方法

### 一、發光菌疫苗

本研究採用由新強生技股份有限公司的林政賢博士所研究開發之發光次菌單位疫苗。

### 二、試驗魚之篩選

依據本所的相關研究及與行政院農業委員會家畜衛生試驗所合作進行之海鱸發光菌疫苗試驗結果，選擇魚體重 40 g 以上之海鱸苗，作為本試驗用魚。試驗魚選擇外表光滑、活力佳、攝餌正常者。試驗進行前隨機採樣 10 尾，分別進行鰓部與體黏液鏡檢及將血液、肝、脾與腎臟以白金耳穿刺或取下一片組織塗抹於培養基上，分離判斷是否有細菌感染。

### 三、細菌株之篩選與活化

目前在台灣爆發病情之發光菌，於蒐尋各項學術報告後已知只有一種。雖然自屏東小琉球或澎湖海域分離出之發光菌，有不同的感染毒性，但是這只是因水域性之營養與環境條件而產生的差異而已，因此在其他學者專家尚未鑑定出其他發光菌亞種前，台灣目前只有這一種發光菌。試驗菌株來自行政院農業委員會家畜衛生試驗所之保存菌株，取回後以 BHI (Brain Heart Broth) + 2% NaCl，在 25°C 培養 24–48 小時，使之活化。再將培養之菌株混和生理食鹽水，注射菌液入健康海鱸魚體內，在該魚剛死亡時立即由其肝、脾、腎臟，再分離出菌株。經反覆培養、感染數次，使菌株之毒性增強之後，再進行各項的感染試驗。

### 四、配製供試菌液與攻毒菌量預備試驗

菌株由 BHI + 2% NaCl 轉接至 BHIA

(BHI + 10% Agar) + 2% NaCl，培養 24 小時後，以白金耳取出大量菌落，用已滅菌之生理食鹽水先調至  $OD_{540} = 1$  之細菌濃度，細菌數約為  $6.5 \times 10^9$  CFU/mL，試驗時再稀釋成不同濃度。

由於國內並無純種培養海鱸之標準試驗用魚，而且種魚之交配均採多尾多對方式，任其自由產卵與受精，故試驗魚苗之品質常會因來源地點、季節、氣候與種魚品質而受影響。因此除謹慎篩選試驗魚苗外，每批試驗魚在正式攻毒試驗前均需先進行攻毒菌量預備試驗。攻毒菌量預備試驗之方式參考 Alcorn et al. (2005)，並做部分修正。菌株由 BHI + 2% NaCl 轉接至 BHIA (BHI + 10% Agar) + 2% NaCl，培養 24 小時後，以白金耳取出大量菌落，用已滅菌之生理食鹽水調校成  $OD_{540} = 1$  之細菌濃度，再以生理食鹽水稀釋  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  等不同濃度，並以生理食鹽水作為空白組。注射 0.1 mL/fish 或浸泡 1 小時，未經試驗之同批海鱸苗各 10 尾，每濃度三重覆。以平板生菌計數法，計算各濃度之生菌數，求出  $LD_{50}$  之菌量，作為正式感染試驗之依據。

由於海鱸對蓄養水質要求較高，因此注射後每組魚均蓄養在 0.5 噸的玻璃纖維桶中，內含 200 L 石英砂過濾海水。採用流水式並加上打氣，流量為 100 L/小時，1 天觀察 2 次，每日依其活動情形變化投餌量。試驗期間為 15 天，每天記錄試驗魚之活動與攝餌情形。若有死亡試驗魚，分別取出肝、腎臟做細菌分離培養與 API 20E (BioMerieux, France) 鑑定，以確定其是否因注射病原菌所引起之感染而死亡。

## 結果

### 一、疫苗對於海鱸之安全劑量與安全性

海鱸疫苗施打劑量之選擇除參考 Lonnstrom et al. (2004)、Bakopoulos et al. (2003)、Afonso et al. (2005)、Arijo et al. (2005)、Santos et al. (2005) 等研究外，並考慮到 30–50 g 海鱸魚苗腹腔之大小，決定施打 0.1 mL/fish 為 1 劑量。進行疫苗對於海鱸之安全劑量與安全性試驗時，選取海鱸苗 (平均 50.9 g)，以 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 疫苗，分別以 0.4 mL/fish、0.2 mL/fish、0.1 mL/fish、0.05 mL/fish、0.025 mL/fish 注射處理，對照組以生理食鹽水 0.1 mL/fish 注射處理，每組 10 尾，各三重覆。注射後各組魚之處理方式同預備試驗，結果如表 1 所示。

表 1 發光菌疫苗對於海鱸之安全劑量與安全性試驗結果

注射量 (mL/fish)	試驗魚總數量	15 天期間死亡數	活存率 (%)
0.4	30	0	100*
0.2	30	0	100
0.1	30	0	100
0.05	30	0	100
0.025	30	0	100
對照組	30	0	100

\* 注射後 3 天內食慾不佳，4 天後恢復正常

### 二、疫苗之處理細菌感染攻擊試驗

隨機選取試驗魚 (體重 40–50 g) 300 尾，分為二組。一組 150 尾注射發光菌疫苗

0.1 mL/fish 為疫苗組，另 150 尾注射生理食鹽水 0.1 mL/fish 為對照組。注射後分別放入 2.5 噸的玻璃纖維桶中，採用流水式並加上打氣，流量為 300 L/小時，1 天觀察 2 次，每日依其活動情形變化投餌量，投餵市售人工配合飼料蓄養 21 天。

細菌注射感染攻擊試驗參考 Lonstrom et al. (2004)、Arijo et al. (2005)、Whittington et al. (2005) 等之研究，依海鱸魚之養殖特性做部分修正。每次感染攻擊試驗均先進行預備試驗，求出最適攻擊感染 LD<sub>50</sub> 之菌量。正式試驗時，將疫苗組與對照組之海鱸苗，隨機放入 0.5 噸的玻璃纖維桶中，內含 350 L 石英砂過濾海水中，每桶 30 尾，各四重覆。二組中有三重覆組分別以菌量為 OD<sub>540</sub> = 1 之細菌濃度，稀釋 200 倍（最適攻擊感染 LD<sub>50</sub> 之菌量），進行注射 0.1 mL/fish 攻擊感染試驗。另外 1 重覆組注射生理食鹽水 0.1 mL/fish 作為二組之空白組（表 2）。注射後，以手指輕按注射部位，防止菌液流出。

表 2 發光菌疫苗處理後之細菌注射攻擊試驗配置

組數	疫苗組	對照組	注射攻毒
重覆一	30	30	發光菌 0.1 mL/fish
重覆二	30	30	發光菌 0.1 mL/fish
重覆三	30	30	發光菌 0.1 mL/fish
重覆四	30	30	生理食鹽水 0.1 mL/fish

注射後每組魚均蓄養在 0.5 噸的玻璃纖維桶中，內含 350 L 石英砂過濾海水。採用流水式並加上打氣，流量為 150 L/小時，1 天觀察 2 次，每日依其活動情形變化投餌量。記錄試驗魚之活動與攝餌情形。若有死

亡試驗魚，分別取出肝、腎臟做細菌分離培養與 API 20E 鑑定，以確定是否為注射之疫苗或其他病原菌所引起之感染。觀察 7-10 天後，將未死亡之疫苗組與對照組之海鱸，隨機取 2-3 尾，分別取出肝、脾與腎臟做細菌培養，確定原先注射之細菌是否仍存在魚體內，以判斷活存魚之健康情況。

由於海鱸對於環境與水質條件要求較高，因此在細菌注射感染攻擊試驗中，若注射生理食鹽水 0.1 mL/fish 之空白組（重覆四）有試驗魚死亡，代表操作過程中有缺失，則立即終止該次試驗，並重新進行試驗。

浸泡感染攻擊試驗參考 Bakopoulos et al. (2003) 之研究，並依海鱸魚之養殖特性做部分修正。每次感染攻擊試驗均先進行預備試驗，求出最適攻擊感染 LD<sub>50</sub> 之菌量。正式試驗時，將疫苗組與對照組之海鱸苗，隨機放入 0.5 噸的玻璃纖維桶中，內含 200 L 石英砂過濾海水中，每桶 30 尾，各四重覆。二組中有三重覆組，分別以菌量為 OD<sub>540</sub> = 1 之細菌濃度，稀釋 10000 倍（最適攻擊感染 LD<sub>50</sub> 之菌量），進行浸泡 1 小時感染攻擊試驗。另外 1 重覆浸泡 1 小時生理食鹽水 0.1 mL/fish 作為二組之空白組（表 3）。浸泡 1 小時後立即將試驗魚移至另一新 0.5 噸的玻璃纖維桶中，內含 350 L 石英砂過濾海水。

表 3 發光菌疫苗處理後之細菌浸泡攻擊試驗配置

組數	疫苗組	對照組	浸泡攻毒
重覆一	30	30	發光菌浸泡 1 小時
重覆二	30	30	發光菌浸泡 1 小時
重覆三	30	30	發光菌浸泡 1 小時
重覆四	30	30	生理食鹽水浸泡 1 小時

浸泡後各組魚之處理方式及過程同注射試驗。

注射與浸泡感染試驗結果如圖 1-3，各試驗中之注射生理食鹽水 0.1 mL/fish 或浸泡生理食鹽水的空白組，試驗魚全數活存，故未標示於圖中。感染試驗期間死亡之試驗魚，均進行解剖與細菌培養檢查，結果肝、脾、腎臟器官分離培養出大量之發光菌菌株。

### 三、攻擊試驗結果

攻擊試驗一：經注射發光菌液 ( $3.75 \times 10^6$  CFU/mL) 進行人工感染後之試驗魚 (72.75 g)，活存結果如圖 1。感染後 2 天之抗菌能力，以疫苗處理組之活存率 (40.6%) 較對照組 (15%) 高。至試驗結束時，疫苗處理組之活存率平均為 32%，較對照組活存率 5% 為高。

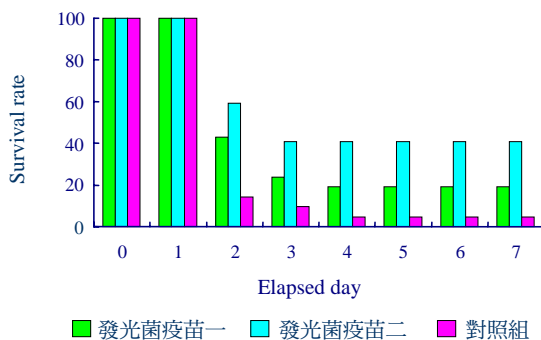


圖 1 發光菌疫苗處理海鱸魚(72.75 g) 3 週後，以發光菌( $3.75 \times 10^6$ CFU/mL)進行人工注射感染之結果

攻擊試驗二：經注射發光菌液 ( $1 \times 10^7$  CFU/mL) 進行人工感染後之試驗魚 (62.5 g)，活存結果如圖 2，感染後 3 天之抗菌能力，以疫苗處理組之活存率 (95%) 較對照組 (80%) 高 ( $p < 0.01$ )。至試驗結束時，疫苗處理組之活存率平均為 85%，較對照組活存率

60% 為高 ( $p < 0.01$ )。

攻擊試驗三：經浸泡發光菌液 ( $2.5 \times 10^4$  CFU/mL) 進行人工感染後之試驗魚 (56.5 g) 活存結果如圖 3，感染後 4 天之抗菌能力，以疫苗處理組之平均活存率 (85%) 較對照組 (60%) 高 ( $p < 0.01$ )。至試驗結束時，疫苗處理組之平均活存率為 60%，較對照組活存率 20% 為高 ( $p < 0.01$ )。

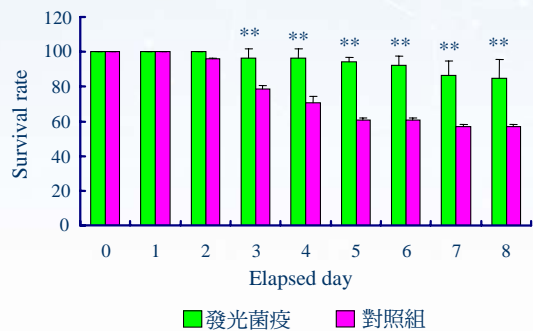


圖 2 發光菌疫苗處理海鱸魚(62.5 g) 3 週後，以發光菌( $1 \times 10^7$ CFU/mL)進行人工注射感染之結果。  
\*\* :  $p < 0.01$

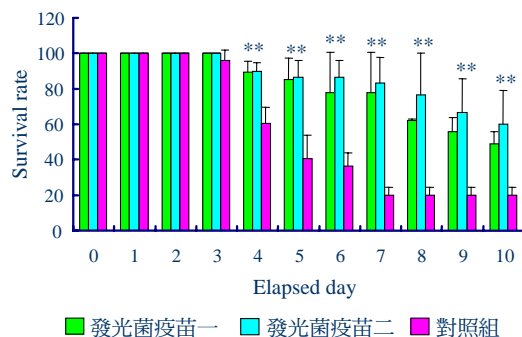


圖 3 發光菌疫苗處理海鱸魚(56.5 g) 3 週後，以發光菌( $2.5 \times 10^4$ CFU/mL)進行浸泡感染之結果。  
\*\* :  $p < 0.01$

由以上三個試驗之結果可得知，經發光菌疫苗處理之試驗魚對於發光菌感染之抵抗能力，較未經疫苗處理之試驗魚為強。

#### 四、田間試驗

田間試驗方式參考 Santos et al. (2005) 之研究，並做部分修正。因海鱸屬於快速成長魚類，當放入箱網內養殖 1 個月後，約成長為原來 3—4 倍大，若要再回實驗室進行攻毒試驗，已不易捕捉，倘以飼料誘餌捕撈，則會於運送過程中吐餌死亡。因此僅能依據相同條件下飼養一段時間後之活存率來計算，並且以監控分析養殖過程中試驗魚之死亡來補充試驗數據之準確性。本次試驗選取

40—50 g 小海鱸，以 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 疫苗 0.1 mL/fish 注射處理 2,500 尾，對照組以生理食鹽水 0.1 mL/fish 注射處理 2,500 尾。二組注射處理後，分別放入 30 噸的水泥池中，投餵市售人工配合飼料蓄養 3 週後，於 2005 年 1 月 22 日移至泛亞海洋生物科技事業股份有限公司之箱網進行養殖試驗 1 個月。至試驗結束時(圖 4)，疫苗處理組之活存率為 41.73%，較對照組活存率 17.4% 高。

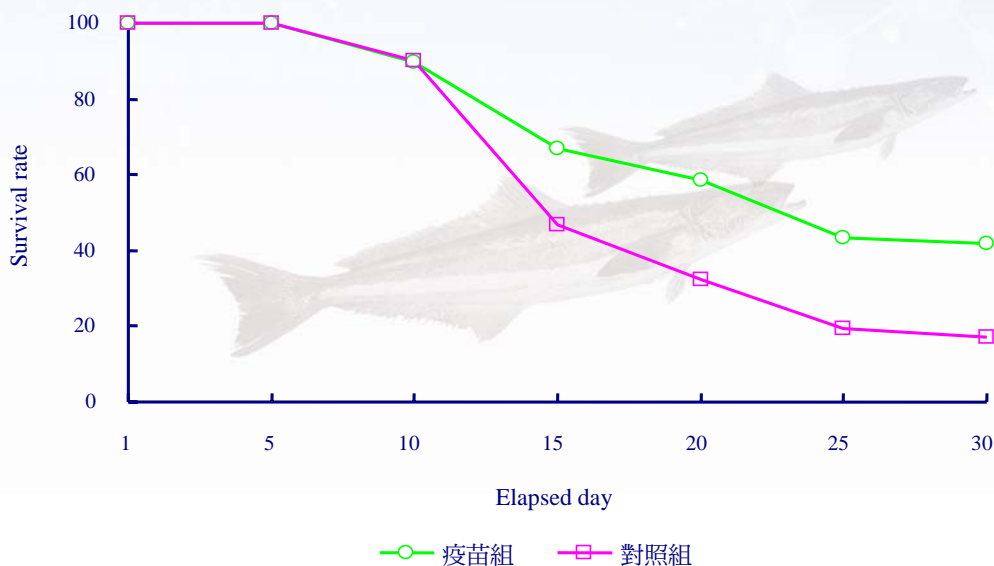


圖 4 發光菌疫苗處理海鱸魚(50.6g) 3 週後，移至泛亞海洋生物科技事業股份有限公司之箱網進行養殖試驗 1 個月後之結果

#### 結論

利用目前已開發之海鱸發光菌疫苗，使用於海鱸苗後，觀察海鱸苗抵抗發光菌之效果。根據試驗結果顯示，本種發光菌疫苗對於海鱸之安全劑量為 0.025—0.2 mL/fish，而實驗室攻毒結果，試驗組之活存率均比對照

組高出 25% 以上。田間試驗結束時，疫苗處理組之活存率亦較對照組高。除了感染發光菌造成海鱸死亡外，還發現有二株病原弧菌之隨機感染，其病原毒性強，養殖魚虛弱時會發生爆發性死亡。因此有必要研製多價疫苗或自家疫苗來增強海鱸對病原菌之抵抗能力。