

# 雙殼類細菌性疾病研究之探討

鄧晶瑩<sup>1</sup>、朱惠真<sup>1</sup>、盧彥伶<sup>2</sup>、劉旭展<sup>3</sup>、許晉榮<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 水產試驗所水產養殖組、<sup>2</sup> 嘉義縣家畜疾病防治所、<sup>3</sup> 宜蘭縣冬山鄉公所

## 前言

在全世界，貝類養殖已是發展成熟的傳統產業，多數飼養於沿海地區，對各國經濟都做出了重大貢獻，報告指出，爆發貝類疾病和大規模死亡對此產業造成嚴重影響。疾病會影響貝類各階段包括幼苗、幼貝及成貝期的生長，使得越來越多人力投入其疾病防治的相關研究。

貝類突然爆發大量死亡的原因，被認為可能經由易感染的種原傳染而導致疾病散播，加上水產養殖物種的多樣化以及種苗產量的增加，都提高了貝類種原跨境和活體運輸上的頻率，精準可靠的檢測試劑和實用的診斷方法的研發，對於疾病的預防和控制就變得非常重要。

近年來許多研究報告證實，大多數雙殼類 (Bivalves) 的疾病是由原生動物 (protozoa) 如波納米亞原蟲 (*Bonamia* spp.)、單孢子蟲 (*Haplosporidium* spp.)、馬爾太蟲 (*Marteilia refringens*)、微囊蟲 (*Mikrocytos mackini*) 和柏金絲蟲 (*Perkinsus* spp.) 以及真菌或病毒所引起的 (Lauckner, 1983; Sindermann, 1990; Bower et al., 1994; McGladdery, 1999)。

細菌性疾病通常在幼貝階段發生且死亡率極高 (Lauckner, 1983; Sparker, 1985; Sindermann, 1990)。發生於成貝的細菌性疾

病有下列幾種，分別是貝類的棕環病 (brown ring disease, BRD) (Paillard et al., 1989; Paillard and Mass, 1990)、太平洋牡蠣 (*Crassostrea gigas*) 的奴卡氏菌病 (Nocardiosis) (Friedman et al., 1991a, b)、東方牡蠣 (*Crassostrea virginica*) 的幼貝牡蠣病 (juvenile oyster disease, JOD) (Paillard et al., 1996; Boettcher et al., 1999, 2000; Ford and Borrero, 2001) 以及珍珠牡蠣 (*Pterioda* spp.) 的殼病 (shell disease)。另外，最近導致太平洋牡蠣發生“夏季死亡”的現象也被懷疑與弧菌感染有關 (Lacoste et al., 2001a, b; Waechter et al., 2002)。氣候變遷、海洋暖化和外來物種入侵可能更有助於病原菌的傳播，弧菌屬 (*Vibrio* spp.) 被認為是引發養殖雙殼類疾病的主要病原菌，因此，通過深入研究以瞭解弧菌與水產生物間相互作用及可能對養殖造成之風險是迫切的課題。由於科技的進步，目前已可應用分子生物學、遺傳學、分析化學等來檢測以往較難以監測的感染病原、污染物，以及貝類體內輕微的生物學變化，對於貝類疾病的防治無異增添了更有力的工具。

## 雙殼類細菌性疾病之研究：以牡蠣為例

早在 60 年代，即有雙殼類病例報告指

出，細菌性疾病會影響不同發育階段的雙殼類，尤其容易感染幼貝並造成嚴重死亡。這些細菌大部分屬於弧菌屬細菌，如溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、鰻弧菌 (*V. anguillarum*)、*V. tubiashii* 與其他種類弧菌、假單胞菌屬 (*Pseudomonas* spp.) 和產氣胞菌屬 (*Aeromonas* spp.)。Tubiash (1960) 和 Elston et al. (1980) 在太平洋牡蠣 (*C. gigas*) 和硬殼蛤 (*Mercenaria mercenaria*) 中描述了瀕死幼貝的病徵，並命名為細菌性壞死症 (baccillary necrosis)。壞死的特徵在於絨毛上皮細胞的溶解和消失，細菌會沿著內殼和外套膜生長，壞死區內殼表面可見黑色沉積物堆積 (圖 1)，臨床上罹病幼貝會出現異常泳姿及下沉後死亡。將分離到的細菌進行接種試驗，接種細菌之牡蠣會在 48 小時後即快速死亡 (Elston, 1993)。國外對於貝類疾病之研究以蛤蠣及牡蠣較多，如 1987 年法國布列塔尼沿海養殖之蛤蠣 (*Ruditapes philippinarum*) 曾爆發 *Vibrio tapetis* 感染引致大量死亡之棕環病，此病原菌沿著蛤蠣海洋牧場逐漸蔓延



圖 1 文蛤細菌性壞死症，細菌沿著內殼和外套膜生長，肉眼可見內殼有黑色幾丁基質沉積物 (箭頭處)

至歐洲大西洋海岸，造成重大的經濟損失。棕環病主要症狀是棕色沉積物出現在內殼壁及外殼的邊緣 (Paillard and Meas, 1989)。因牡蠣是臺灣養殖貝類中產量與產量皆為第一名的漁產品，故以國外文獻對可造成牡蠣死亡之細菌性病原為例進行深入探討。

目前研究都認為會引致牡蠣之幼貝和成貝死亡的細菌及臨床病變有以下 4 種：

### 一、東方牡蠣的幼貝牡蠣病

感染此病之牡蠣非常小，殼高不會超過 1 cm，又以殼高為 2—6 mm 牡蠣苗居多，病原為牡蠣玫瑰變色菌 (*Roseovarius crassostreae*)，是一種海洋  $\alpha$  變形細菌，會產生粉紅米黃色至黃綠色菌落，適合細菌生長的條件為水溫 21—26°C，鹽度為 25—32 psu，低鹽度會使此病停止發病。在發病前一周，牡蠣會停止生長，為本病發生前兆。臨床上牡蠣會出現生長遲緩，兩殼瓣生長不平均，左瓣形成杯狀，檢查貝殼可見殼內表面有棕色素沉積。顯微鏡檢查可見外套膜瓣和殼出現膿瘍。雖然好發於幼貝，但成貝若經常處於緊迫環境下也會有類似症狀 (Elston et al., 1999; Boechter, 1999, 2000)。

### 二、太平洋牡蠣的絞鏈韌帶病 (hinge ligament disease)

病原為類滑走桿菌 (*Cytophaga* sp.-like)，病貝的絞鏈韌帶會被破壞，經常可在幼齡養殖雙殼類中被檢測到。本病曾發生在美國華盛頓州塞奎姆附近之開放水域中的成年太平洋牡蠣。發病牡蠣之絞鏈韌帶中可分離出一些造成絞鏈韌帶溶解的細菌，硬殼蛤也有相關的病例報告 (Dungan and Elston, 1988; Dungan et al., 1989)。



### 三、太平洋牡蠣的慢性膿腫症候群

在太平洋牡蠣幼貝高密度養殖場中進行長期調查得知，受影響之牡蠣幼貝殼高約 1.0—2.4 mm 之間。膿腫的形成是由奴卡分枝桿菌 (*Nocardia crassostreae*) 沿著內殼侵入外套膜腔表面，膿腫之組成包含有宿主細胞和細菌菌體，病徵似乎呈現慢性感染狀態，因細菌量相對較少，導致下層外套膜壞死及殼面有機基質異常沉積。經過慢性炎症反應作用後，宿主細胞將感染碎片吞噬，新殼生長時將細菌螯合沉積，和外套膜因感染壞死呈現慢性死亡現象 (Elston et al., 1999; Lacoste et al., 2001; Waechter et al., 2002)。

### 四、太平洋牡蠣的夏季死亡症

夏季死亡綜合症首次被揭露是發生於四十年代日本的太平洋牡蠣。除了在太平洋牡蠣外，東方牡蠣、歐洲牡蠣 (*Ostrea edulis*) 也曾爆發此症。病牡蠣的臨床症狀為外套膜損傷、殼出現碳酸鈣有機基質沉積及絞韌帶結構改變等。日本之外，美國、加拿大、中國和法國等地的太平洋牡蠣和其他雙殼類陸續出現大量死亡現象，被認為應該是夏季牡蠣死亡症所造成。早年對其致死原因並不清楚，但症狀顯示應該是許多不同因素所形成之綜合病因。很多研究證明，夏季死亡症涉及許多內在和外因素，最重要的外在因素似乎是溫度的上升。內在因素則為卵子形成並產卵時或動物處於相對不穩定的生理條件時，若再出現任何其他外部因素，都可能加劇這種不穩定性，包括餌料供應過多、物理壓力或病原體侵入，皆會造成動物生理超出負荷而無法自行修復。自瀕死牡蠣中曾分離出不同的病原體，檢測在高溫環境下大量死

亡的牡蠣幼貝，結果以疱疹病毒 (OsHV-1) 最常被檢測到，其次為不同種類的弧菌 (Le Roux et al., 2002, 2004)。應用分子技術進行菌種鑑定及動物接種實驗測試細菌毒力，可證實其為鰻弧菌和錦繡弧菌 (*V. splendidus*) (Waechter et al., 2002; Labreuche et al., 2005)。Ford et al. (2001) 研究指出，發生於美國東北部養殖東方牡蠣之夏季死亡綜合症，主要發生在快速生長之牡蠣，且當水溫超過 20—22℃ 以上時，此病在幾週內死亡率達 90% 以上 (Bricelj et al., 1992; Ford and Borrero, 2001)。多數研究結果都強調病原體在不同環境和不同宿主條件下，毒力的表現亦不同。由此可知，牡蠣生理與環境參數間之相互作用，對夏季死亡症的發生具有一定的影響。Leibovitz (1989) 曾報導海灣扇貝孵化場中，變態後期之幼苗及幼齡貝出現披衣菌 (*Chlamydia* spp.) 感染時，臨床上不會出現病徵及死亡率，只有在成貝細胞中觀察到有包涵體的存在。1964 年日本牡蠣死亡病例中，發現一種革蘭氏陽性細菌奴卡氏菌 (*Nocardia crassostreae*) 會造成閉殼肌的壞死、膿腫和棕色斑點，最後出現大量死亡。立克次體 (*Rickettsia* spp.) 黴漿菌 (*Mycoplasma* spp.) 和披衣菌可感染各種雙殼類，通常被認為是潛在性病原菌。組織病變在鰓、外套膜及瓣閥上皮細胞內形成革蘭氏陰性包涵體 (圖 2)，大多數不具病原性，除了某些與弧菌混合感染時會對宿主形成傷害，其餘細胞內寄生菌如類立克次體、類披衣菌等對文蛤並無病原性，但感染牡蠣或其他種貝類時則會造成嚴重死亡。

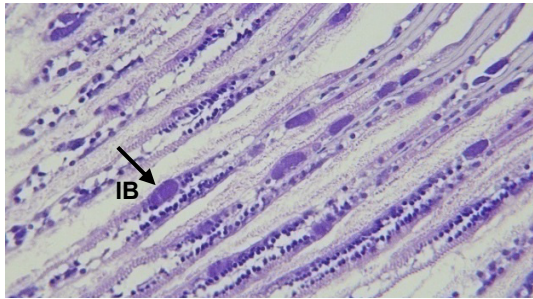


圖 2 文蛤鰓上皮細胞內可見許多革蘭氏陰性質內包涵體 (IB)

### 國內養殖文蛤細菌性疾病研究近況

本所自 2015 年開始針對雲林、嘉義、臺南地區之異常死亡文蛤進行病因探討，希望能深入瞭解並分析致病原，以減少文蛤非季節性大量斃死狀況之發生。針對中、西南部沿海文蛤養殖區樣本採集結果進行分析後發現，夏季大量死亡原因可能是文蛤已感染病原性弧菌後，養殖環境溫度出現劇烈變化造成緊迫，若養殖池水質及土質出現惡化情形，即會爆發疾病。養殖業者若不能早期發現提早處理，一旦出現零星死亡情形，又逢夏季颱風季節時池水溫度於數天內相差 10℃ 以上，便會逐漸蔓延而導致大量死亡情形。目前由發病死亡之文蛤所分離之細菌經鑑定後，顯示有多種弧菌屬細菌，如哈維弧菌 (*V. harveyi*)、創傷弧菌 (*V. vulnificus*)、巴西弧菌 (*V. brasiliensis*)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 及河口弧菌 (*V. aestuarianus*) 等。同時也可分離到其他種類的革蘭氏陰性單胞桿菌，如產黃桿菌屬 (*Flavobacterium* spp.)、假單胞菌屬和產氣胞菌屬。有關環境因素對疾病之影響部分，則是經由現場監測及檢驗結果發現，多數發病死亡之文蛤養殖

池皆呈現水質不良 (如氨、亞硝酸濃度增高，尤其是硫化氫的濃度明顯偏高)，且在夏季高溫、颱風過後或者季節轉換時期，文蛤死亡率均顯著偏高。如果剛死亡之文蛤即會散發惡臭，肉眼可見到蛤肉變黃或偏紅，伴隨著體液增加之情形，則多為細菌性病原感染所引致。在實驗室內將分離到之弧菌進行文蛤接種試驗，分別將  $10^4$  及  $10^7$  cfu/ml 之疑似病原弧菌注射於文蛤體腔內，以比較在不同水溫時弧菌對文蛤之死亡率是否有差異，結果顯示在 28℃ 時，文蛤之死亡率顯著高於 22℃ 組；此外由病蛤之組織病理變化，亦可觀察到高溫組的文蛤因細菌快速增殖，細菌毒素導致組織細胞溶解及壞死 (圖 3)。再以不同濃度的硫化物進行測試，亦顯示當溫度超過 28℃ 時，已經感染病菌的文蛤會因為硫化氫濃度的增高而在 1—3 天內就出現大量死亡現象。綜上結果，或許可說明目前養殖文蛤出現季節性或偶發性大量斃死的部分原因，亦與國外對於牡蠣夏季死亡綜合症的眾多研究綜合論述結果相符。也就是說，當某些因素導致文蛤感染病原菌 (以弧菌為主要病原) 後，會先形成潛在性感染造成文蛤殼病變 (圖 4)，當環境開始惡化 (例如氨、亞

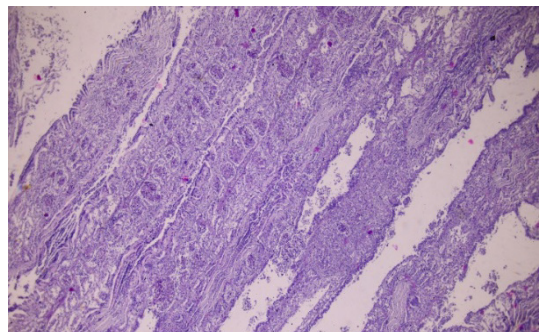


圖 3 文蛤細菌性壞死症，因細菌快速增殖，導致鰓上皮細胞之溶解及嚴重壞死





圖 4 文蛤因細菌性感染而引起之殼病 (A：殼畸形；B：外殼無光澤、粗糙及表皮剝落)

硝酸和硫化氫濃度太高或溶氧太低等水質不良因素) 或養殖管理不良 (投餌過量、底土有機質過量)，再加上養殖密度過高，都會先出現零星死亡情形，一旦季節轉換造成日夜溫差劇烈升降、颱風季節下大雨或吹南風時，因氣壓過低池水中之溶氧驟降，就會進一步導致文蛤細菌性壞死症爆發而引起大量死亡 (圖 5)。

## 結語

臺灣目前除了養殖文蛤經常出現異常大量死亡情形外，牡蠣也常發生不明原因的死亡。貝類養殖場之管理方法在於如何提早發現養殖池或野外環境是否開始惡化，為避免大量死亡情形發生，應在未受到氣候變化影響前，即先行做好養殖管理以防患未然。但改善方法依養殖池環境與飼養方式而有所不



圖 5 文蛤細菌性壞死症爆發而引起大量死亡

同。定期監測水質及每日觀察養殖池中貝類生長狀態、使用何種餌料、肥料、益生菌及其投放量多寡及時間等須詳實記錄。養殖池排換水時機之決定或進水後之消毒工作，皆須根據這些紀錄進行綜合分析，進而規劃一套預測和防範病害風險的策略，進而有助於疾病之控制與預防。