

# 淡水養殖魚類產氣單胞菌不活化菌苗之研發與應用之評估

柯浩然<sup>1\*</sup>、陳清<sup>1</sup>、姜寶仁<sup>1</sup>、王進添<sup>3</sup>、  
張鴻猷<sup>3</sup>、李建霖<sup>3</sup>、余贊生<sup>4</sup>、翁有助<sup>4</sup>、陳秀男<sup>2</sup>

1 行政院農業委員會家畜衛生試驗所

3 雲林縣家畜疾病防治所

2 國立臺灣大學動物學系

4 嘉義縣家畜疾病防治所

**摘要** 以吳郭魚分離之產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 為種菌株，於腦心浸膏培養基 (Brain heart infusion broth) 30°C 培養 18 小時後，經集菌及不活化處理與添加佐劑，調製一批不活化菌苗供試。試製之不活化菌苗混於餌料後，以口服方式免疫 (每日 2 次，連續 14 天)，試驗魚於免疫 14 天後以相同菌株菌液感染攻擊，觀察 14 天以相對活存百分率 (Relative percent survival; R.P.S.) 評估其免疫效力。試驗結果試驗魚池與田間試驗池之 R.P.S 分別為 77% 及 40%，由以上成績顯示，研製之不活化菌苗對 *Aeromonas hydrophila* 感染症具有預防之效益。

**關鍵詞：**淡水魚類，產氣單胞菌，不活化菌苗

**緒言** 細菌性病原菌為魚類疾病中最重要的病原之一，特別是養殖魚類。由於放養密度高，易衍生細菌性疾病造成急速且重大的損失。這些引起魚類細菌疾病之病原菌，曾有學者報告大都是存在水中的好氣性細菌 (Aerobic bacteria)，且多屬二次性感染。近年來本省養殖事業日益發達，養殖技術日有改進，因養殖密度日漸提高，因此疾病的發生亦隨之增加。為預防疾病的發生及解決藥物殘留等公共衛生問題，故著手調查本省淡水養殖魚類細菌性疾病，以瞭解疾病的發生情況及病原菌，進而嘗試建立本省相關之細菌種原庫，研發不活化菌苗之應用，探討魚類細菌性菌苗免疫之途徑，落實疾病預防策略，期能減少養殖業者經濟上之損失。

## 材 料 與 方 法

一、**菌株來源：**自雲林縣某淡水養殖場吳郭魚病材，經分離及生化鑑定後確認為親水性產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)，作為研製不活化菌苗之種菌株。

二、**培養基：**腦心浸膏培養基 (Brain heart infusion broth, B.H.I.broth)。

三、**試驗動物：**

(一) 錦鯉：購自臺北縣某養殖場，每尾長約 5 cm。

(二) 吳郭魚：為中部某養殖場之吳郭魚，每尾重量約 30 gm，以 15 ppm 之福馬林 (Formalin) 浸泡 30 分鐘後放養供試。

#### 四、菌苗之調製：

將 *A. hydrophila* 培養在 B.H.I. broth，經 30°C 18 小時振盪培養後，集菌離心調整濃度為  $5 \times 10^{10}$  CFU/mL，依比例添加 0.3% 福馬林 (Formalin) 不活化處理及 0.01% Thimerosal 為防腐劑，再添加 1/10 量之 Aluminum hydroxide gel-Bentonite 為佐劑後，製成不活化菌苗。

#### 五、感染菌液調製：

將 *A. hydrophila* 培養在 B.H.I. broth，經 30°C 18 小時振盪培養後，集菌離心調整濃度將菌液調製為含  $6 \sim 8 \times 10^8$  CFU/mL 之菌液後供試。

#### 六、吳郭魚與錦鯉之免疫：

研製不活化菌苗混入餌料，進行吳郭魚及錦鯉魚口服免疫 14 天(每天 2 次，連續 14 天)。分別於本所試驗魚池及雲林縣、嘉義縣等養殖場實施口服免疫試驗。

#### 七、菌液感染攻擊：

免疫後經 14 天後，以  $6 \sim 8 \times 10^8$  CFU/mL 之 *Aeromonas hydrophila* 菌液分別於本所及臺西水試分所等試驗池，實施魚體刮傷及腹腔注射方式感染攻擊，對照組亦以同法作感染攻擊試驗，以評估研製不活化菌苗之效力。

#### 八、免疫效益評估：

(一) 相對活存百分率(Relative percent survival, R.P.S.) [7]：

$$R.P.S = 1 - (\text{免疫組攻擊後致死率} / \text{對照組攻擊後致死率}) \times 100\%$$

(二) 以 R.P.S 評估研發之疫苗是否具效益，其試驗魚數目至少有 25 尾以上，因該病原菌引起之罹患率需超過 60% 以上，或在對照組有相同的死亡率，試驗結果 R.P.S 超過 24% 則可判定其菌苗對其該病原之感染症有預防之效益。

(三) 該項試驗之非特異性感染致死率不得超過 10% 。

## 結果

試製 *A. hydrophila* 之不活化菌苗經安全性試驗後，於本所試驗魚池及雲林縣、嘉義縣等養殖場，分別進行口服免疫試驗。免疫後經 14 天，以  $6 \sim 8 \times 10^8$  CFU/mL 之 *Aeromonas hydrophila* 菌液，分別於本所及臺西水試分所等試驗池，實施魚體刮傷及腹腔注射方式感染攻擊。試驗結果，在本所吳郭魚之免疫組致死率為 12% (12/100)；對照組為 53% (53/100)，其 R.P.S. 為 77%。錦鯉之免疫組致死率為 21% (21/100)；對照組為 67% (67/100)，R.P.S. 為 68%。兩組均在 60% 以上。臺西水試分所供試吳郭魚之成績，免疫組與對照組之致死率分別為 60% (60/100) 及 87% (87/100)，其 R.P.S. 為 40%。由試驗成績顯示，試驗魚池與田間試驗池 R.P.S. 有 20% 之差異，且臺西水試分所成績不如預期，但如依其評估標準而言，所研發之不活化菌苗對 *A. hydrophila* 有預防效果，詳如表一成績。

表一、 研製 *Aeromonas hydrophila* 不活化菌苗免疫吳郭魚、錦鯉後，以同一菌株感染攻擊之相對存活百分率成績

供試場所	感染菌液濃度及方法	魚種	組別	致死率 <sup>a</sup> (%)	相對活存百分率 <sup>b</sup>
試驗魚池	6~8×10 <sup>8</sup> CFU/mL 刮傷魚體 浸泡	吳郭魚	免疫組	12/100 (12%)	77%
			對照組	53/100 (53%)	
		錦鯉	免疫組	21/100 (21%)	68%
			對照組	67/100 (67%)	
田間試驗 魚池	6~8×10 <sup>8</sup> CFU/mL 腹腔注射	吳郭魚	免疫組	60/100 (60%)	40%
		對照組	87/100 (87%)		

註 a 斃死尾數/實驗總尾數

b 相對活存百分率(Relative percent survival, R.P.S)

RPS= 1 - (免疫組攻擊後致死率/對照組攻擊後致死率) × 100%

## 討論

本年度試驗雖未對試驗魚採血測其抗 *A. hydrophila* 特異抗體，但依以往陳等 [3] 研究報告指出：以愛德華氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 及產氣單胞菌混合菌苗口服免疫，可產生特異抗體；且對肝腎病及赤鰭病具有預防效果。筆者 [2] 試驗亦得知研製之不活化混合菌苗，口服免疫與肌肉注射免疫，均可產生良好之免疫防禦效果。Fryer et.al. [8] 將不活化之 *Vibrio anguillarum* 菌苗冷凍乾燥後，加 1% 於餌料中，餵飼鱒魚(Chinook salmon; King salmon) 或銀鱒、銀鮭 (Coho salmon) 連續 15 天，證明菌苗對鮭魚確有保護作用。由此可知，抗原量達到刺激誘發免疫反應者仍可產生抗體反應。據宋等 (1975) 指出 *A. hydrophila* 抗原經口服免疫鰻魚，雖然在口服後兩個月內，血液中無法測出凝集抗體，但免疫過之鰻魚具有某種程度之保護。Salati et.al [9] 研究指出在愛德華氏菌菌苗開發方面，以脂多醣 (Lipopolysaccharide) 培養濾液及 Formalin 不活化菌苗為抗原作肌肉注射，均可使免疫鰻魚產生特異性抗體，但抗體的高低與攻擊保護力價似無相關性。故以有無特異性抗體評估其疫苗效益有待進一步研討之必要。據 Karunasagar (1994) 指出 *A. hydrophila* 症之有效疫苗開發，常受此菌 (*A. hydrophila*) 抗原多樣化的限制，因而朝向繼續發展水產動物多價疫苗之研究。

發展水產動物的疫苗，除應考慮是否兼具經濟效益及安全性外，尚必須考慮其飼養環境及魚體生理之相關性。據郭 [6] 研究指出，養殖水質環境係由生物性(飼養動物、浮游生物及水生動植物)、物理性(日光、溫度、養殖密度、養殖水色及懸浮固形物等)等因子所構成，這些因子錯綜複雜，各因子間變異大且會相互影響，若某一因子變動，將會導致養殖環境的失衡及破壞，輕者影響水產動物之繁殖與生長；重者將會使水產

動物受到緊迫、致病乃至於死亡。又據 Johnson & Amend (1983), Johnson, Flynn & Amend (1982), Tatner & Home (1985) 等研究指出：養殖魚類使用之疫苗獲得保護期之長短與給予途徑、魚體大小及環境、溫度對疫苗免疫反應有所影響。由以上文獻報告得知飼養環境、魚體生理、疫苗給予途徑等因素與菌苗之效益評估有相當之關聯性。

此次實驗結果，其 R.P.S.有差異，筆者認為在實驗魚池，除需顧慮到飼養管理與水質等因素變化外，也應儘量設法排除此等相關因素，因此所得成績應屬條件控制下之 R.P.S, 可供日後研究發展之參考。至於台西水試分所成績，推測可能因購入民間養殖場實施免疫後之試驗魚放入台西水試分所再實施感染攻擊試驗，因運輸過程及環境改變等因素造成緊迫，影響免疫效果。筆者認為產氣單胞菌為水中常在菌，且是條件性細菌，要預防，除應評估其可控制之環境(物理性、生物性等因素)外，如能於適當時機配合使用菌苗來預防，應有保護之效果。

## 誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會【88 科技-1.4-漁 2(2-7)】計畫之補助，及雲林縣、嘉義縣家畜疾病防治所所長及同仁之協助，得以順利進行，謹併誌萬分之謝忱。

## 參考文獻

1. 宋延齡、郭光雄。日本鰻魚(*Anguilla japonica*)對 *Edwardsiella anguillimortiferum* & *Aeromonas hydrophila* 抗原之免疫反應。台灣水產學會刊 6-1；p55-72，1977
2. 柯浩然、陳清、呂清泉、賴俊雄、郭乃維、詹益波、蕭澤民、陳秀男、王進添、張鴻猷。鰻魚愛德華氏菌、產氣單胞菌、滑走細菌等混合菌苗之研製及田間應用試驗。行政院農業委員會八十五年度生物技術在水產養殖之應用研究計畫報告。p163~172，1997
3. 陳清、柯浩然、盧泰志、呂清泉、賴俊雄、蕭澤民、陳秀男。愛德華氏菌與產氣單胞菌混合菌苗之研製及鰻魚口服免疫之試驗。魚病研究專集(十四)；p1-11，1994
4. 陳石柱。養殖魚類使用之疫苗簡介。水產動物防疫簡介(21)，p6~7，1997
5. 陳石柱。養殖魚類使用之疫苗簡介。水產動物防疫簡介(22)，p7~8，1997
6. 郭欽賢。養殖水對養殖魚類影響。水產動物防疫簡介(20)，p9~8，1997
7. A. E. Ellis Fish vaccination p16~17，1988
8. Fryer, J. L., J.S.Rohovec, G.L.Tebbit, J. S. McMichael and K. S. Pilcher Vaccination for control of infections diseases in pacific salmon. Fish Path.,10 (2) 155~164，1976
9. Salati, F., Kenji, Kawai and Kusuda R., Immune response of eel to *Edwardsiella tarda* Lipopolysaccharide. Fish pathology 19 (3) : p187~192，1984

## **Development of *Aeromonas hydrophila* bacterin for freshwater culture fishes and applied evaluation.**

H.J. Ko<sup>1\*</sup>, C. Chen<sup>1</sup>, B.R. Jiang<sup>1</sup>, J.T. Wang<sup>3</sup>, H.Y. Chang<sup>3</sup>, Z.S. Lu<sup>4</sup>, L.J. Wu<sup>4</sup>, S.N. Chen<sup>2</sup>

1. National Institute for Animal Health, Council of Agriculture, Executive Yuan.
2. Department of Zoology, National Taiwan University.
3. Yun-Lin Livestock Disease Control Center.
4. Chia-Yi Hsien Livestock Disease Control Center.

**SUMMARY** The *Aeromonas hydrophila* strain isolated from diseased tilapia was used as seed to produce inactivated bacterin. The inactivated bacterin was mixed with meals to immunize the tilapia. The vaccination program was performed two times per day during a period of 2 weeks. The results showed that the relative percent survival (R.P.S.) were 77% in the experimental pools and 40% in the field pools, respectively.

This result suggested that the inactivated bacterin had potency to prevent the *Aeromonas hydrophila* disease.

**Key words :** *Freshwater fishes, Aeromonas hydrophila, Inactivated bacterin*