

噬菌體 AS10 控制虱目魚紅斑病菌 *Vibrio anguillarum* 之研究

Control of Milkfish Vibriosis by Bacteriophage AS10 which
infect *Vibrio anguillarum*

吳金洌·林錫杰·徐亞莉·鄒助揭

Jen-Leih Wu, Hsi-Chieh Lin, Ya-Li Hsu and Shiuh-Jie Tzou

Abstract

The characters of bacteriophage AS10 which infect and lyse *Vibrio anguillarum*, the pathogen of milkfish vibriosis are that had a wide spectrum of host range by showing 100% of virulence in 16 strains of *Vibrio anguillarum* isolated in 1986 from Tainan area. The pathogenicity of *Vibrio anguillarum* was almost completely eliminated at an M. O. I. ≥ 1 after bacteriophage AS10 infection for 4 hours. In the field test, the mortality due to milkfish vibriosis of the prevention groups were much lower than the control groups by 18.0% and 28.8% individually in the overwintering ditch of Tainan Branch Station, Taiwan Fisheries Research Institute and Chi-Cu area, Tainan. The bacteriophage AS10 also showed a very effective therapeutic result by this biological control system for milkfish vibriosis. The death number of milkfish in the overwintering ditch decreased evidently after bacteriophage AS10 addition.

緒 言

虱目魚 *Chanos chanos* (FORSKAL) 是為本省養殖魚類之大宗，其養殖面積共一萬三千餘公頃，年產量三萬多公噸，佔總養殖魚類 12.6% 強 (Fisheries Year Book, 1985)，虱目魚為熱帶、廣鹽性魚類，主要分佈於太平洋、印度洋之熱帶、亞熱帶水域 (Lin, 1969)，而本省緣於虱目魚生產區之北端 (Lin, 1968)，除南部東港地區外，冬季常在虱目魚致死溫度 (15°C) 以下，故每年從 11 月至翌年四月初，必需將虱目魚趕入加蓋防風棚之深溝 (越冬溝) 越冬，此為隔年虱目魚之主要來源，而越冬魚佔全年產量的 42~75% 之多，故越冬情形良否其重要性由此可知。在虱目魚越冬期間，由於氣候不穩定、水質不良及放養密度過度等因素，易使虱目魚罹患由紅斑病菌所引起的紅斑病 (Wu and Chao, 1984; Hung, 1977; Johnson and Amend, 1983; Tsai *et al.*, 1970) 致使本省虱目魚養殖年損失在 15% 左右，損失金額亦高達億元以上。本研究乃針對噬菌體 AS10 對於紅斑病菌具有高度的溶菌作用，且專一性高、寄主範圍廣而且不會破壞水域中微生物的生態及造成水源染污等優點，因此以噬菌體 AS10 來防治虱目魚的紅斑病發生，以解決虱目魚養殖戶在虱目魚越冬期間的困擾。

本研究在實驗室中大量培養噬菌體 AS10 (Wu and Chao 1984)，然後施放到越冬溝內，以便能

夠達到虱目魚紅斑病生物防治的功效。繼民國七十二年田間試驗 (Wu and Chao, 1984)，現在進一步試驗，藉以建立國內以噬菌體來防治魚病的新模式。

實驗材料與方法

1. 細菌

以引起紅斑病的細菌 (*Vibrio anguillarum*) 為寄主，本實驗使用的 17 株紅斑病菌，其中 16 株是在臺南水產試驗分所，從罹患紅斑病之虱目魚體內分離出來。而另一株則是由臺大動物系郭光雄教授鍾虎雲教授所提供。

2. 噬菌體 AS10 之分離、純化及大量培養

(1)由虱目魚養殖池中採水，經由 $12,000\times g$, $4^{\circ}C$ 離心 20 分鐘。取上清液 0.1 ml 注入已製備含 TSA 培養基之培養皿中，再加入 0.1 ml 之生長期 (log phase) 紅斑病菌液，其次加入 3 ml 的柔軟培養基 (soft agar medium)，充分混合均勻，待凝固後放入 $20^{\circ}C$ 恆溫箱中培養。次日培養皿上則出現溶菌斑 (plaque) 透明小圓點。取 10 ml TSY 培養基加入生長期的紅斑病菌液 0.1 ml，再以白金耳在培養皿產生之溶菌斑勾取噬菌體 AS10 加入培養液中，置於 $20^{\circ}C$ 恆溫振盪培養箱中至透明澄清時，以 $12,100\times g$, $4^{\circ}C$ ，離心 10 分鐘。保留上清液，再以 $34,800\times g$, $4^{\circ}C$ ，離心 60 分鐘，將噬菌體沉澱下來，以 $4^{\circ}C$, M₀ 培養液將沈澱物析出，然後以 $12,100\times g$, $4^{\circ}C$ ，離心 10 分鐘，取上清液，即為所分離出的噬菌體 AS10。

(2)取 2 升三角瓶，內裝 1 升已滅菌之 TSY 培養基，加入 10 ml 的生長期紅斑病菌液和 0.1 ml 已製備的噬菌體 AS10 濃縮液，置放入 $20^{\circ}C$ 恆溫振盪培養箱中，培養至菌液澄清，接着噬菌體 AS10 的純化步驟如前所述。

3. 寄主範圍

以 17 株紅斑病菌做寄主，觀察噬菌體 AS10 對它們的溶菌情形。

4. 浸浴試驗

(1)病原增強：紅斑病菌經三區劃線純化後，取單一菌落，在 TSA 培養基上塗滿，置放入 $28^{\circ}C$ 恆溫培養箱培養，次日以白金耳勾取培養基上的紅斑病菌，加到 0.85% 的生理食鹽水中，振盪均勻。將此均勻液以每 100 克的魚體重注入 8 毫克的量 (注射入健康虱目魚的腹腔)，再將魚放入過濾海水中蓄養，觀察兩天，再從垂死虱目魚的肝臟、腎臟中分離出紅斑病菌，繼續純化培養後再注射入另一健康虱目魚，如此反覆幾次。

(2)培養已經病原性增強的紅斑病菌到生長期 $O. D._{500}=0.85$ 濃度約為 5.0×10^8 cells/ml，共分 6 組進行試驗，1 到 5 組以過濾海水將菌液調至 1.0×10^8 cells/ml 的濃度；其中 1 到 4 組分別加入不同 m. o. i. (multiplicity of infection) 1, 0.1, 0.01, 0.001 之噬菌體 AS10，第 5 組不加入噬菌體為負對照組 (negative control)，第 6 組則只以過濾的海水做正對照組 (positive control)，然後將各組置入 $15^{\circ}C$ 恆溫箱中，讓紅斑病菌和噬菌體 AS10 充分作用後，再將各組放入 20 尾虱目魚 (2.0~6.0 克)，浸浴 30 分鐘後再移到一般過濾海水中蓄養、打氣不投餌，觀察 6 天。逐日記錄各組虱目魚的死亡數目。

5. 田間試驗

分成預防組和治療組，預防組平日即注意添加噬菌體 AS10 放溝水中。治療組則於虱目魚病發後才添加 AS10，觀察其治療效果。AS10 的施放方式是將 AS10 濃縮液泡入越冬溝水中稀釋後使用，均勻潑灑到越冬溝中。

6. 培養基

TSY 培養基：

A 液		B 液	
KH ₂ PO ₄	4.5 g	MgSO ₄	0.3 g
Na ₂ HPO ₄	10.5 g	CaCl ₂	0.03 g
Bactotryptone	10.0 g	Glucose	10.0 g
NaCl	10.0 g	(溶於 100 ml 蒸餾水)	
Yeast extract	5.0 g		
Glycerol	13.0 g		
Gelatin	30.0 mg		
(溶於 900 ml 蒸餾水)			

A、B 液液要使用前再混合

TSA 培養基 (Bottom agar medium):

Bacto-agar	15.0 g
Tryptic soy broth	30.0 g
NaCl	10.0 g (溶於 1 升蒸餾)

Soft agar 培養基：

Bacto-agar	7.0 g
Bacto-tryptone	13.0 g
NaCl	8.0 g
Glucose	3.0 g
Sodium citrate·2H ₂ O	2.0 g (溶於 1 升蒸餾水)

M₀ 培養液：

A 液		B 液	
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	7.0 g	MgSO ₄	10 ⁻³ M
KH ₂ PO ₄	3.0 g	CaCl ₂	10 ⁻⁴ M
NaCl	0.5 g	Glucose	4.0 g
NH ₄ Cl	1.0 g		

A 液調 pH 到 7.4，滅菌，冷卻，然後再加入 B 液（已滅菌、冷卻）。

結果與討論

1. 寄主範圍

噬菌體 AS10 對 17 株紅斑病菌具有 100% 的溶菌能力，其 plating efficiency 從 33% 至 138% (Table 1)。

2. 浸浴試驗

以紅斑病菌 1×10⁸ cells/ml 與不同 m. o. i. 之噬菌體 AS10，於 15°C 下作用 4 小時後，再將各組虱目魚浸浴半小時，移入過濾海水，打氣不投餌，經過 5 天後各組魚的存活變化情形 (Fig. 1)。由此存活變化可得知，施用於越冬溝的噬菌體 AS10 的量在 m. o. i. ≥ 1 即有顯著效果 (Table 2)。

3. 田間試驗

預防組平日加入噬菌體 AS10，定期測定池水中噬菌體 AS10 的力價，使其維持在 50 PFU/ml 以上。以臺南水產試驗分所的 1, 2, 3 號越冬溝進行試驗；2, 3 號溝為實驗組，1 號溝為對照組，其中 1, 2

Table 1. Host range of bacteriophage AS10 which infect *Vibrio anguillarum*

Strains	Titer $\times 10^9$	Plating efficiency
860130-k ₂	155	138.4
860306-L ₂	115	102.7
801231-LD	112	100
860306-k ₃	112	100
860306-k ₂	108	96.4
860111-k ₄	95	84.8
860122-k ₃	93	83.0
860121-k ₁	87	77.7
860306-k ₁	86	76.9
860227-k	27	33.0
860211-k ₄	+	
860306-L ₁	+	
860306-L ₃	+	
860306-L ₄	+	
860211-k ₂	÷	
860306-k ₄	+	
860111-k ₂	+	

Note: +: Cell lysis.

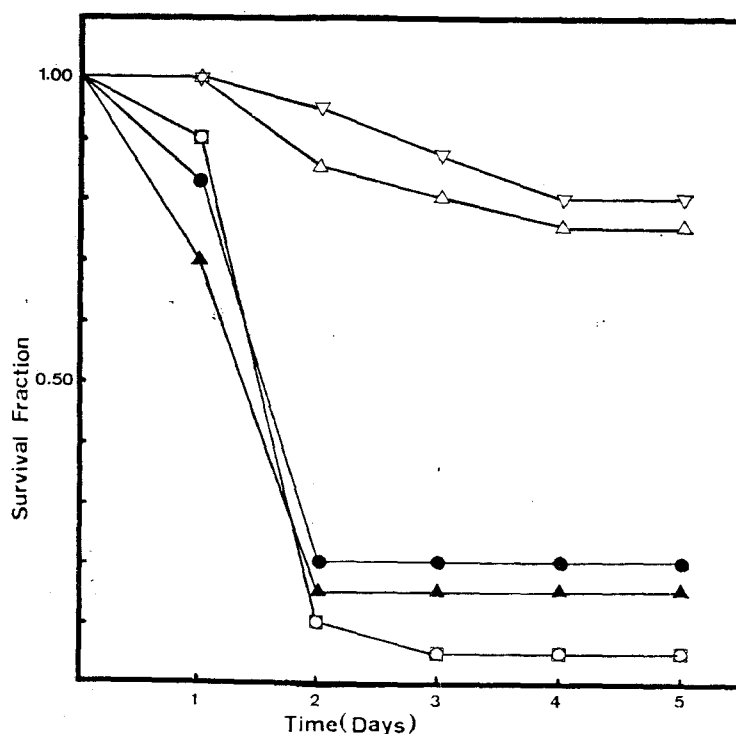


Fig. 1. Elimination of the pathogenicity of *Vibrio anguillarum* after bacteriophage AS10 infection with different m.o.i. The infection time was 4 hrs and the immersion time of milkfish was 30 mins.

△ m.o.i.=1.0 ● m.o.i.=0.01 □ negative control
 ▲ m.o.i.=0.1 ○ m.o.i.=0.001 ▽ positive control

Table 2. The survival fraction of milkfish at different m. o. i. by immersion test

Treatment	AS10				Control	
	1	2	3	4	5*	6**
m. o. i.	1.0	0.1	0.01	0.001	—	—
Survival fraction	0.75	0.15	0.20	0.05	0.05	0.80

* Negative control: add *Vibrio anguillarum*.

** Positive control: without *Vibrio anguillarum* and AS10

號溝皆加入適量的 Benilin-50 (化學藥劑)。另以七股虱目魚越冬溝進行試驗，分 A、B、C 三條越冬溝，A 溝加入噬菌體 AS10 (實驗組)，B 溝加入 Benilin-50 (對照組)，C 溝加入 Fungicide (化學藥劑，對照組)。歷經 45 天的試驗結果 (Table 3)，噬菌體 AS10 確有相當抑制紅斑病發生的作用。

Table 3. The protection of milkfish survival in Tainan Branch Station, Taiwan Fisheries Research Institute and Chi-Cu area Taiwan by bacteriophage AS10 and chemicals

Ditch no.	Fish size (cm)	Stocking density (kg/m ³)	Treatment	Slope of wind shield	Total mortality (%)	Mortality due to vibriosis & others (%)
1	15	0.72	Benilin-50	15°	64.7	29.8
2	27	2.04	AS10 Benilin-50	60°	18.1	15.0
3	27	2.10	AS10	60°	13.3	7.6
A	24	1.28	AS10	60°	11.7	2.4
B	21	0.54	Benilin-50	60°	32.4	31.2
C	24	2.17	Fungicide	60°	47.3	38.0

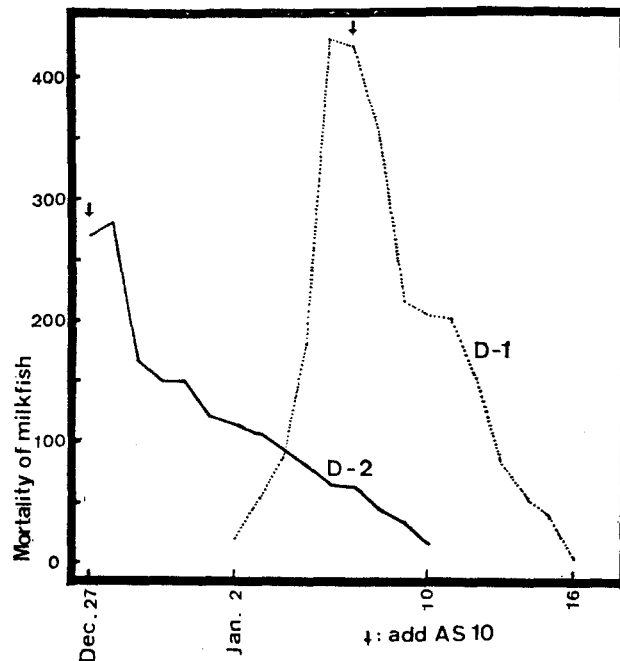


Fig. 2. The therapeutic effect for biological control on the vibriosis of milkfish by bacteriophage AS10 from 27, Dec. 1985 to 16, Jan. 1986. D-1, D-2: The overwintering ditches in the field test.

治療組方面，治虱目魚病發後加入噬菌體 AS10 治療。在 D-1, D-2 兩條越冬溝試驗中，結果虱目魚的死亡數目逐日降低 (Fig. 2)。

噬菌體的耐熱性不佳 (Wu and Chao, 1984)，很容易因為溫度過高而降低活性，故一般保存在 4°C 冷藏庫中，在越冬溝施放時要避免過高的溫度，施放時間安排在早晨或黃昏為佳。另外，最好平常就要做好預防工作，尤其寒流來襲之前，如能事先換好溝水，再添加適量的噬菌體 AS10，更能確保虱目魚的安全。

摘 要

噬菌體 AS10 對在臺南水產試驗分所魚病室所分離的 16 株紅斑病菌，具有 100% 的溶菌能力。由浸浴試驗得知，噬菌體 AS10 和紅斑病菌混合 4 小時後，當 m. o. i. ≥ 1 時則紅斑病菌對虱目魚的感染率大為降低。再由田間試驗中，在臺南水產試驗分所和臺南縣七股鄉的越冬溝試驗，其結果由紅斑病引起的死亡率，預防組比對照組分別減少約 18.0% 和 28.8%。治療組方面，加入噬菌體 AS10 後，虱目魚死亡數目亦有顯著降低的效果。

謝 辭

本研究承農委會漁業組經費補助得以完成，謹此致謝。研究期間承蒙農委會陳松堅技正的指導，臺大動物系郭光雄教授和鍾虎雲教授提供菌株和指正，臺大農化系黃健雄老師和潘文輝先生的協助。臺南水產試驗分所丁雲源分所長全力支持，以及林清龍先生、吳慶麗小姐、張朴性先生、施用齊先生、林吉本先生的幫忙；七股虱目魚養殖戶吳清標先生、陳輝協先生的熱心參與試驗工作。另外趙偉真小姐的熱心指導，以致順利進行本研究，在此謹致萬分謝意。

參 考 文 獻

- Chang, H. S. C., M. H. Huang and T. C. Lu (1972). Experiment on improvement of milkfish wintering ponds. *China Fisheries Monthly* 237: 1-4.
- Fisheries Year Book Taiwan Area (1985). Taiwan Fisheries Bureau Department of Agriculture and Forestry Provincial Government of Taiwan.
- Hung, Y. H. (1977). Preliminary report of the studies on bacterial disease of milkfish (*Chanos chanos*) during winter. *JCRR Reports of Fish Disease Research (I)* pp. 50-54.
- Johnson, K. A. and D. F. Amend (1983). Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins applied by oral and anal intubation of salmonids. *Journal of Fish Disease* 6: 473-476.
- Lin, H. S. (1969). Some aspects of milkfish ecology. *JCRR Fisheries No. 7*.
- Lin, S. Y. (1968). Milkfish farming in Taiwan a review of practice and problems. The Taiwan Fisheries Research Institute.
- Tsai, S. C., H. S. Lin and K. Y. Lin (1970). Some factors regarding the mortality of milkfish during overwinter period. *Agriculture* 1: 9-30.
- Wu, J. L. and W. J. Chao (1984). The epizootic of milkfish vibriosis and its biological control by bacteriophage AS10. COA Fisheries Series No. 10. *Fish Disease Research (VI)* 34-46.