

虱目魚紅斑病發生與噬菌體生物防治之研究

The Epizootic of Milkfish Vibriosis and Its Biological Control by Bacteriophage AS10

吳金洌 · 趙偉真

Jen-Leih Wu and Wei-Jen Chao

Abstract

The bacteriophage which infect and lyse *Vibrio anguillarum*, the pathogen of milkfish vibriosis, was isolated from the overwintering ponds and was named as AS10. Bacteriophage AS10 had wide spectrum of host range by showing 100% of the virulence in 18 strains of *Vibrio anguillarum* isolated from Taiwan area. The acridine orange staining study showed that AS10 virion contain single stranded DNA. The AS10 has the best survival rate in Mg⁺⁺ solution. The AS10 is stable in the temperature range of 4 to 20°C and easily inactivated by raising temperature to 30°C and above. The optimal stable pH values for AS10 is pH 6 to 9. The optimal stable salinity range of AS10 is 15 to 45‰. By exposing to ultraviolet irradiation, the lost of AS10 infectivity is linearly correlated with UV fluence. The pathogenicity of *Vibrio anguillarum* was almost completely eliminated after 4 hours by AS10 infection at an M. O. I.=1. In the field trial, we proved that the vibriosis can be inhibited by AS10 application in milkfish overwintering ponds.

緒 言

虱目魚養殖為本省最重要的養殖魚類，此魚屬熱帶性魚，而本省位處亞熱帶地區，所以冬季必須在具有防風及保溫能力的越冬溝或深水池中渡過^(3,19,20,22,23)。目前每年冬季約儲養上億尾的虱目魚以供翌年的需求。但是冬季溫度低，虱目魚不攝食、體力弱，易受到紅斑病菌 (*Vibrio anguillarum*)^(6-9,14-16,18,19,21) 的感染而致死，死亡率約 70%。在本省每年冬季虱目魚因病死損失達新臺幣一億元左右，損失頗鉅。所以本研究為解決漁民困難，便針對紅斑病進行生物防治研究。

以往處理魚病的方法：用化學藥品（如：San-O-Fec-50, Iodophor 及 Sulfonamides 等）、抗生素（如：Chloramphenicol, Streptomycin 及 Oxytetracycline）或以疫苗⁽¹⁰⁾作預防與治療。但是化學藥品及抗生素的使用會破壞水中微生物生態平衡，造成水源污染；並且有抗藥性之虞⁽¹¹⁾；殘留在魚體內的藥物也會造成公共衛生的隱憂。疫苗使用時，需搬動魚體浸泡，此易使魚受到驚嚇，可能會使免疫系統被抑制⁽¹⁷⁾，並且搬動魚體時，會相互摩擦易受傷，漁民又只在發病時才施用，但是疫苗需要一段時間才能在魚體內產生抗體，所以效果不彰。本實驗以紅斑病的噬菌體 (ϕ AS10) 施用於虱目魚水域中，以減少或消滅紅斑病菌，避免紅斑病的發生——此種方式稱為生物防治。

生物防治的優點：不會破壞水域中的其他生物，對魚體無不良副作用，施用噬菌體後不必換水，而

且製造成本低廉，噬菌體 AS10 在不換水的越冬溝經歷 46 天，尚有 1.7% 的存活率。因此很值得推廣。

實驗材料及方法

1. 細菌

以引起紅斑病的細菌 (*Vibrio anguillarum*) 為寄主，其中菌株主要用 801231-LD。菌種由臺大動物系郭光雄教授與鍾虎雲教授所提供。

2. 噬菌體

本實驗室由虱目魚養殖池中採水。經由 $12,100\times g$, $4^{\circ}C$, 20 分鐘離心，取上清液。以紅斑病菌與柔軟培養基傾倒於培養皿中，待凝固後，以 0.1 ml 的上清液沾於培養皿上，置於 $20^{\circ}C$ 恆溫培養箱內，第二天觀察培養皿上是有呈現透明溶菌現象，此表示有紅斑病菌的噬菌體的存在，命名的噬菌體 AS10。再在 10 ml 培養液中加入由溶菌區鈎取一白金耳的 $\phi AS10$ ，隨即加入濃度為 5×10^8 cell/ml 的紅斑病菌 0.1 ml，於 $20^{\circ}C$ 恆溫震盪培養箱中培養至透明澄清時，以 $12,100\times g$, $4^{\circ}C$, 10 分鐘離心，保留上清液。

3. 寄主範圍

以 18 株紅斑病菌作寄主，觀察噬菌體 AS10 是否對它們均有溶菌能力。並選取溶菌範圍最廣的噬菌體作為今後實驗材料。

4. 酵素

RNase 及 DNase 購自美國的 sigma 公司。

5. Acridine Orange 染色法⁽²⁾

載玻片四片，每片上點一滴噬菌體 AS10 ($5\mu l$)，另四片載玻片，每片上各點二滴噬菌體 AS10 (每點 $5\mu l$)，以吹風機吹乾，勿使擴散開，以免看結果時顏色不明顯。

(1) 固定：

以 Methanol ($2^{\circ}C$) 固定，浸 15~20 分鐘。簡稱 M-固定。

以 Carnoy's fluid 固定，在室溫中浸 5 分鐘，然後於 99.5% 乙醇中迅速浸泡移出，簡稱 C-固定。

(2) 染色：

兩種固定法載玻片各取一片，浸在 pH 3.8 Acridine Orange buffer (簡稱 A. O. buffer) 5 分鐘。再移到 pH 3.8 modified McIlvane buffer (簡稱 m-M buffer) 浸漬 2 次，各迅速潤濕，然後在 $Na_2 HPO_4$ 溶液浸泡 15 分鐘，吸去多餘液體，以紫外光線來觀察。

(3) 染色後處理：

兩種固定法載玻片各一片，浸在 tartaric acid 溶液中 2~5 分鐘，以紫外光觀察其顏色的變化。

(4) RNase 分解：

兩種固定法載玻片各一片，每片上有兩點，在 m-M buffer 中浸 5 分鐘，其中一點作對照組，另一點在 pH 3.8 時加 $3\mu l$, 0.1% RNase，將載玻片於 $37^{\circ}C$ 中恆溫 2 小時。再經 A. O. buffer，以及兩瓶 m-M buffer 中迅速浸一下，稍加吹乾，以紫外光觀察顏色。

(5) DNase 分解：

兩種固定法載玻片各一片，每片上有兩點，浸在 pH 5.5 (Phosphate+Acetate) 緩衝液 5~10 分鐘，每片上其中一點在 pH 3.8 時，加 $3\mu l$, 0.1% RNase，將載玻片在 $37^{\circ}C$ 裏恆溫兩小時。取出浸

在 m-M buffer 中 5~10 分鐘，經 A. O. 染色，在 2 瓶 m-M buffer 中潤濕，稍加吹乾，在紫外光下觀察顏色。再浸 Na_2HPO_4 中 15 分鐘，再於紫外光照射下觀察顏色。

6. 離子濃度對噬菌體 AS10 的影響：

以 CuCl_2 , CuSO_4 , MgCl_2 及 MgSO_4 各配成濃度為 0.001 M, 0.05 M, 0.3 M 的溶液。 ZnSO_4 , MnCl_2 及 CaCl_2 各配成 0.05 M 的溶液。將以上溶液與蒸餾水、M9 培養液及 T. S. Y. 培養液各取 9.9 ml，加入 0.1 ml 純化的噬菌體 AS10 (1.2×10^8 PFU/ml) 懸浮液，混合均勻，置入 20°C 恆溫培養箱，經 10, 30, 120, 240 分鐘後，測噬菌體 AS10 活存濃度。

7. 溫度對噬菌體 AS10 的影響

(1) 溫度安定性：

將噬菌體 AS10 (3×10^{10} PFU/ml) 的懸浮液 10 ml 分裝於試管內，各置於 4°C, 7°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C 及 28°C 恆溫培養箱中，在 1、2、3 及 4 天後，測定噬菌體 AS10 活存濃度的變化。

(2) 熱抵抗力：

將 10 ml 噬菌體 AS10 (1.2×10^8 PFU/ml) 的懸浮液盛於試管，各置於 30°C, 40°C, 50°C, 60°C 及 70°C 恆溫培養箱中，一小時後測定活存濃度。

8. 酸鹼度對噬菌體 AS10 的影響

以 0.1 N NaOH 及 0.1 N CH_3COOH 調配出 pH 3、4、5、6、7、8、9、10 的試液，各取 9.9 ml 加入 0.1 ml 噬菌體 AS10 (2.3×10^8 PFU/ml) 懸浮液，混合均勻，置入 20°C 恆溫箱中，於 3、6、24 小時，測噬菌體 AS10 的活存濃度。

9. 鹽度對噬菌體 AS10 的影響

以 9 ml 含 0.56%, 1.11%, 1.67%, 2.78%, 3.89%, 5.00% 濃度的氯化鈉溶液，使噬菌體 AS10 分別處在 5%, 10%, 15%, 25%, 35% 及 45% 之鹽度環境，置於 20°C 恆溫箱中，於 1、2、4 小時，測定噬菌體 AS10 的活存濃度。

10. 紫外線照射的影響

以半徑 4.5 cm 的培養皿，置入 2 ml 噬菌體 AS10 懸浮液 (6.2×10^8 PFU/ml)，10 W 紫外燈與培養皿的距離為 26.5 cm，照射時間分別為 20 秒 40 秒及 1、2、8、12、16、24、30 分鐘，並測噬菌體 AS10 的活存濃度。

11. 浸浴試驗⁽⁵⁾

紅斑病菌濃度 1×10^8 cell/ml，噬菌體 AS10 濃度 1×10^8 PFU/ml，等量混合於過濾的海水中，經過 1、2、4、8 小時後將虱目魚浸在混合液中，在 20°C 經半小時後再移到過濾海水中，不投餌，打氣觀察 6 天。

12. 田間試驗

本實驗是當紅斑病發生時，將噬菌體 AS10 以越冬溝水稀釋、均勻潑灑。平日則定期測定水質。

結果與討論

1. 寄主範圍

噬菌體 AS10 在 18 株紅斑病菌中具有 100% 的溶菌能力 (Table 1)。

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

Strains	Titer ($\times 10^7$ /ml)	plating efficiency (%)
820108-wt ₇	316	254.8
810129-8sk	218	226.6
801231-kf	136	109.7
820108-4G ₂	124	100
801231-LD	124	100
800123-1L	67	54
N-I-E-275	54	43.5
820124-2I	46	37.1
810129-2s	40	32.3
810129-2k	38	30.6
820108-3G	31	25
811220-MK	27	21.8
800129-2I	18	14.5
820121-4	8	6.5
800121-1	6	4.8
800124-3k	4	3.2
800123-4f ₁	+	
800127-5Lb	+	

Note: +: cell lysis

2. 染色試驗

噬菌體 AS10 在高速離心後，溶於 M9 培養液中，依 Acridine Orange 染色步驟操作。噬菌體 AS10 固定後，取一片載玻片浸在 Na_2HPO_4 ，15 分鐘後以紫外線照射呈紅色。另取一載玻片在 Molybdic acid 溶液中，稍浸一下，取出在 15~90 秒內以紫外線照射，顏色由紅色轉變為綠色。再取一載玻片浸在 Tartaric acid 溶液中，以紫外光照射，在 2~5 分鐘中顏色由紅色轉變為黃色再變為綠色 (Table 2)，依以上結果判定噬菌體 AS10 為單股核酸構造。另取有兩點噬菌體 AS10 的載玻片，其中一點作對照組，另一組加上核酸水解酵素 DNase 或 RNase，恆溫於 37°C，兩小時後，再依 Acridine Orange 染色法染色，觀察變化，結果以 RNase 處理後，在浸泡 Na_2HPO_4 前後，各以紫外光照射，以觀察其顏色時均為紅色 (Table 3)。另一組以 DNase 處理後，比較浸泡 Na_2HPO_4 之前後紫外光照射之顏色，則由紅色變成無色。依此可知噬菌體 AS10 為 1-DNA，也就是單股去氧核醣核酸 (Single stranded DNA)。

3. 離子濃度

噬菌體 AS10 分別置於 T.S.Y. 培養液、蒸餾水及濃度為 0.001 M 0.05 M, 0.3 M 的 CuSO_4 , CuCl_2 , MgCl_2 及 MgSO_4 的溶液，在 20°C 恆溫感作後，觀察其不同時間活存濃度之變化。噬菌體

Table 2. Nucleic acid colours of stained bacteriophage AS10

Treatment	C-fixed slide	M-fixed slide
after Na_2HPO_4	red	red
Molybdic acid	green	green
Tartaric acid	green	green

Table 3. Susceptibility of bacteriophage AS10 nucleic acid in the Carnoy's fluid and Methanol to RNase and DNase.

Treatment	RNase		DNase	
	control	treated	control	treated
C*-fixed	before	red	red	red
	after	red	red	nill
M**-fixed	before	red	red	nill
	after	red	red	nill

* C: Carnoy's fluid.

** M: Methanol.

AS10 置於 Mg^{++} , Ca^{++} , Mn^{++} 中均相當穩定，其中 0.3 M 及 0.05 M 的 Mg^{++} 及 0.05 M 的 Ca^{++} 均比存在蒸餾水中為好。噬菌體 AS10 在 Cu^{++} 溶液中裏失活率相當迅速，除了 0.001 M 的 $CuCl_2$ 外，其他濃度之含 Cu^{++} 溶液均在四小時測不到噬菌體 AS10 的活存濃度。因此可知 Mg^{++} , Ca^{++} , Mn^{++} 對噬菌體 AS10 的活性安定有利，其中又以 Mg^{++} 最佳，而 Cu^{++} 的存在相反地會迅速使噬菌體 AS10 失去活性 (Fig. 1)。

4. 溫度對噬菌體 AS10 的影響

(1) 溫度安定性：

噬菌體 AS10 在 4、7、10、15、20、25 及 28°C 恆溫培養箱中，觀察在四天之內之變化 (Fig. 2)。

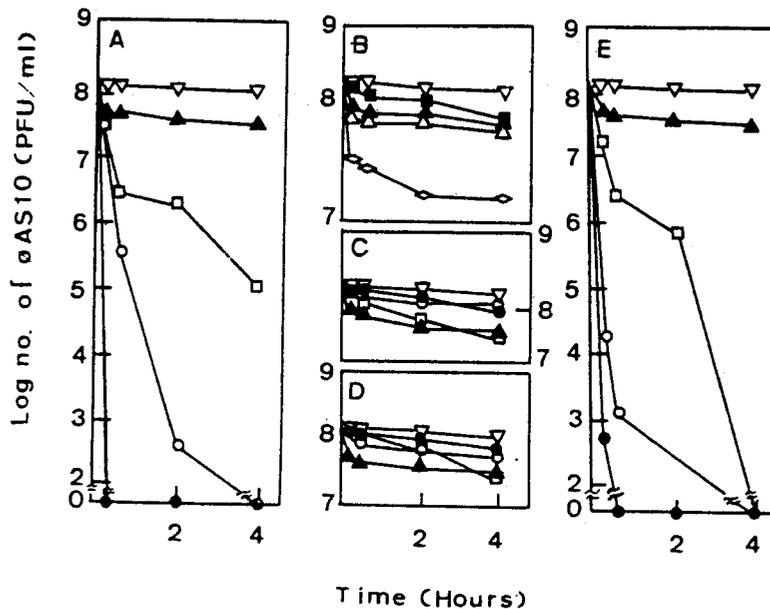


Fig. 1. Ion effects on bacteriophage AS10 stability.

▽ TSY medium; ▲ H₂O (dist.); □ 0.001 M;
○ 0.05 M; ● 0.3 M;

A: CuCl₂

B: ■ 0.05 M CaCl₂; ◇ 0.05 M ZnSO₄; △ 0.05 M MuCl₂

C: MgSO₄

D: MgCl₂

E: CuSO₄

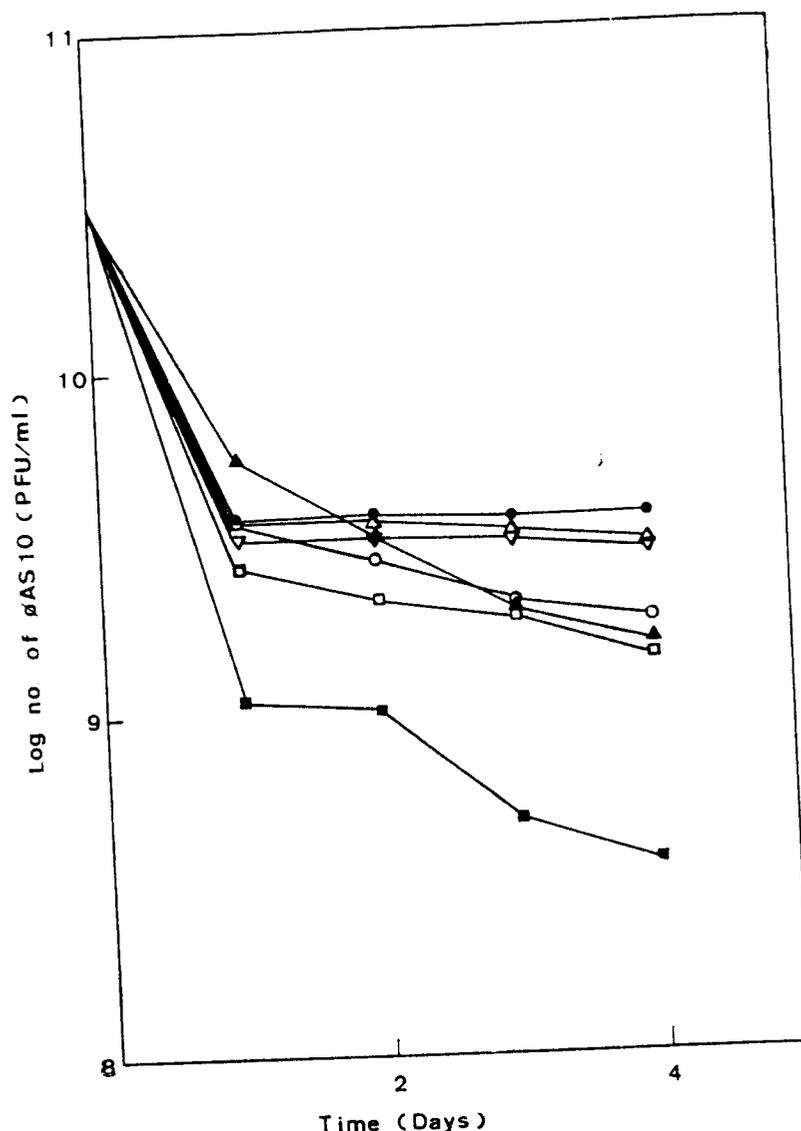


Fig. 2. Temperature effect on bacteriophage AS10 stability
 ● 4°C; ▽ 7°C; △ 10°C; ○ 15°C; ▲ 20°C; □ 25°C; ■ 28°C.

由四天的活存率可看出當溫度在 28°C 以上，噬菌體 AS10 的失活率相當快，溫度在 20°C 以下，溫度愈低噬菌體 AS10 的活存率愈高。在冬季一般水域溫度大約在 20°C 以下，此種條件非常適合噬菌體 AS10 的特性。

(2)熱抵抗性：

噬菌體 AS10 在 30、40、50、60 及 70°C 的恒溫狀況下，經一小時後測活存濃度。發現在 30、40 及 50°C 中活存率約為 0.1~0.6%，而 60°C 約 0.0025%，70°C 則無噬菌體 AS10 的活存濃度 (Fig. 3)。噬菌體 AS10 對高於 30°C 以上的環境下，熱抵抗性轉弱。

5. 酸鹼度對噬菌體 AS10 的影響

在 20°C 之溫度，噬菌體 AS10 在 pH 3~10 的不同酸鹼度條件下，在不同時間測定活存濃度的變化如下：經過 24 小時的觀察，發現噬菌體 AS10 存在於 pH 9 時活存率較其他 pH 值高。但噬菌體 AS10 在 pH 3 及 pH 4 的環境却無活存濃度，因此得知噬菌體 AS10 對酸性相當敏感 (Fig. 4)。海水的 pH 值約在 8.3~9.1 之間，因此噬菌體 AS10 在施用於海水虱目魚越冬溝應相當穩定。

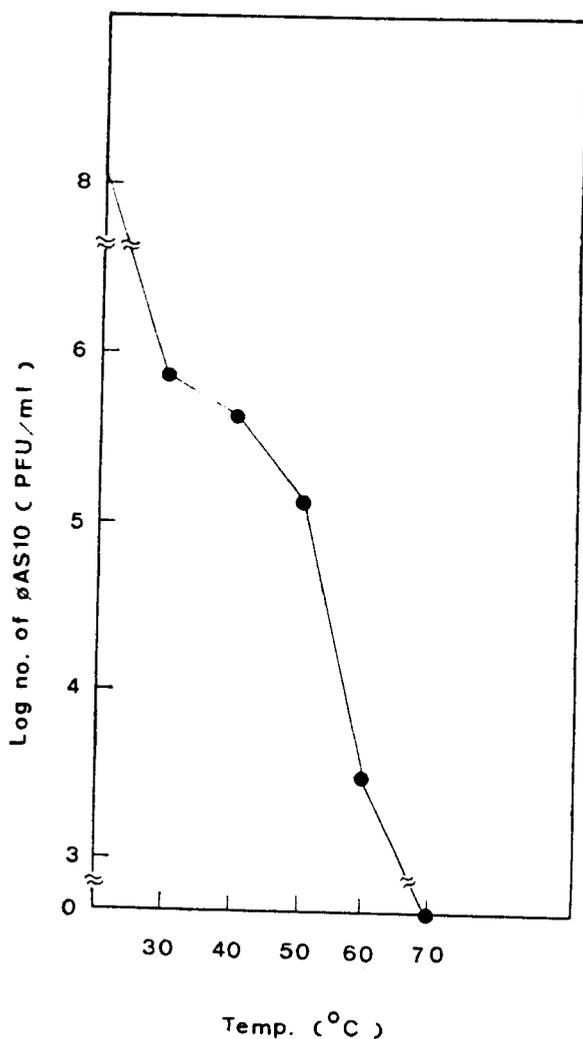


Fig. 3. Heat resistance of bacteriophage AS10

6. 鹽度對噬菌體 AS10 的影響

噬菌體 AS10 存在鹽度是為 5, 10, 15, 25, 35 及 45% 時，維持 20°C 的狀況下，觀察其在 1、2 及 4 天的活存濃度變化 (Fig. 5)。在第一天以 35% 的鹽度噬菌體 AS10 的活存率最高，其餘均稍微少些，以 10% 較低。第二天以 35% 的鹽度中的噬菌體 AS10 活存濃度高，而 45% 最低。第四天也是以 35% 中噬菌體 AS10 的活存量最高，10% 則最低。

噬菌體 AS10 存在於 35% 的鹽度溶液中最穩定，海水鹽度一般冬季約在 30~35‰。所以當冬季來臨前，在越冬溝或深水池中加入噬菌體 AS10 必定很穩定，可降低水域中紅斑病菌數量，待虱目魚入溝時，水質環境中的鹽度範圍對虱目魚很有利。

7. 紫外線的照射

噬菌體 AS10 以紫外線照射，依其活存率及紫外線照射的劑量製成半對數圖表 (Fig. 6)，得知噬菌體 AS10 活存率與紫外線照射的劑量具有直線關係特性。這種直線關係是對單股的核酸才有的生物特性⁽⁸⁾，而噬菌體 AS10 的 DNA 是單股。此直線方程式可以 $\log (\text{Survival rate}) = 0.923 - 7.14 \times 10^{-5} \times \text{Fluence (J} \cdot \text{m}^{-2})$, $r = -0.990^{***}$, $n = 10$ 。

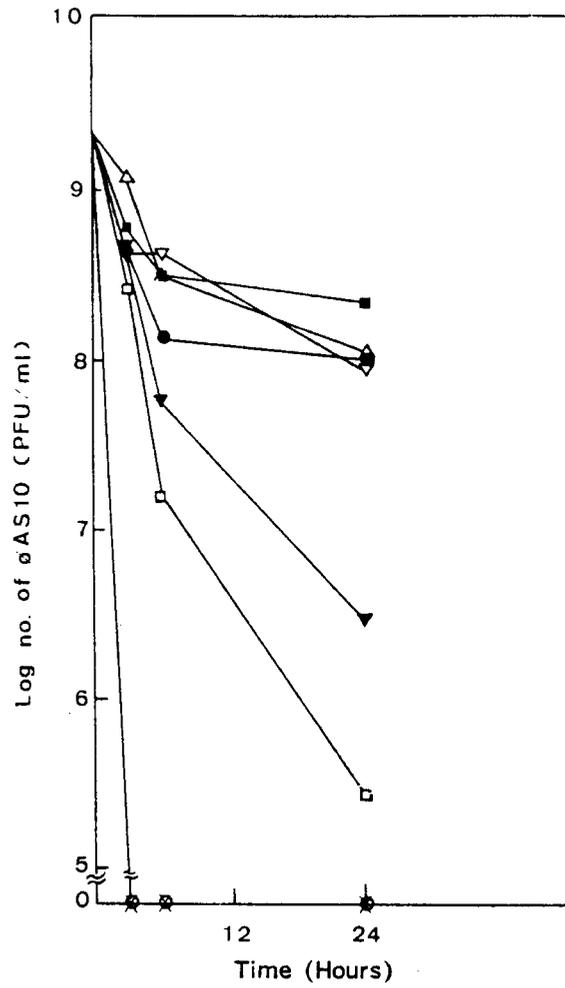


Fig. 4. pH effect of bacteriophage AS10.

○ pH 3; × pH 4; ▼ pH 5; ▽ pH 6; △ pH 7; ● pH 8; ■ pH 9; □ pH 10.

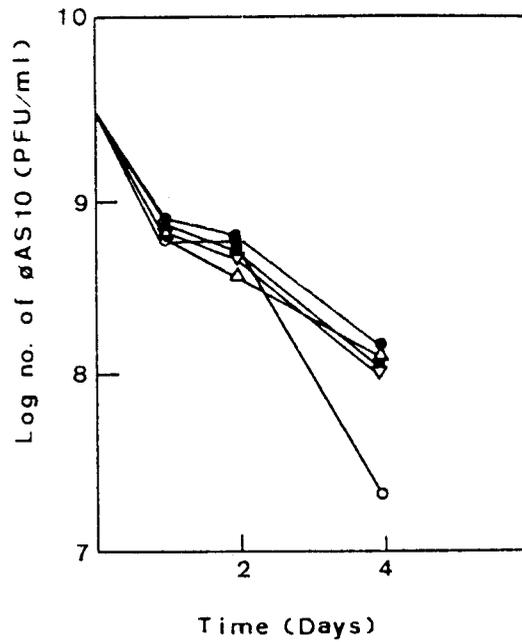


Fig. 5. Salinity effect of bacteriophage AS10 stability.

○ 10‰; ▽ 15‰; ■ 25‰; ● 35‰; △ 45‰.

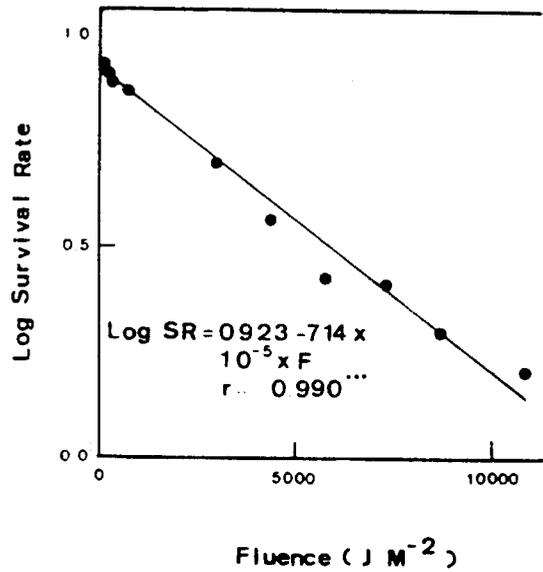


Fig. 6. Ultraviolet light effect on bacteriophage AS10 stability.
SR: Survival Rate
F: Fluence (J. M⁻²)

8. 浸浴試驗

將紅斑病菌 (*Vibrio anguillarum*) 1×10^8 cell/ml 與噬菌體 AS10 以 m. o. i.=1 時，混合於過濾海水中，在感染 1、2、4 及 8 小時後，將虱目魚置入，浸浴半小時，溫度 15°C，然後移入過濾海水，不投餌打氣觀察虱目魚活存率 (Fig. 7)。感染 4 及 8 小時經歷 5 天觀察，活存率 100%，對照組在五天中活存率的變化是 0.9, 0.6, 0.4, 0.3, 0.3, 0.3，但第五、六天魚已非常瘦且外觀已有脫鱗現象。噬菌體 AS10 與紅斑病菌在 m. o. i.=1 時，經四小時感染後便無致病能力，因此可預估噬菌體 AS10 施放於越冬的水域中，四小時後紅斑病菌便無致病效果。

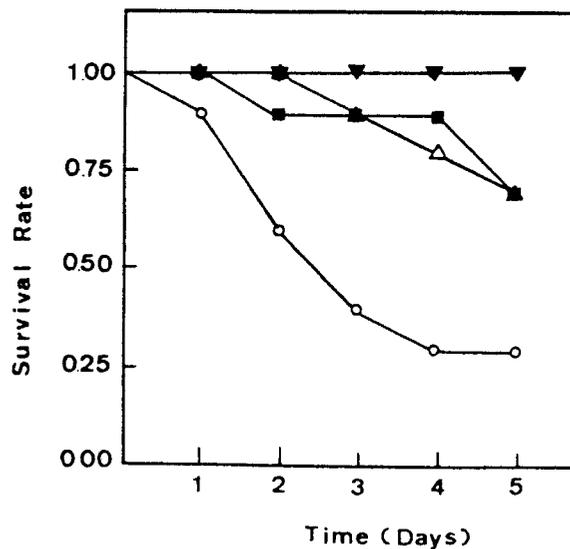


Fig. 7. Elimination of the pathogenicity of *Vibrio anguillarum* after bacteriophage AS10 infection with different times. The M. O. I. was 1 and the immersion time of milkfish 30 mins.
● 8 hours; ▽ 4 hours; ■ 2 hours; △ 1 hours; ○ control.

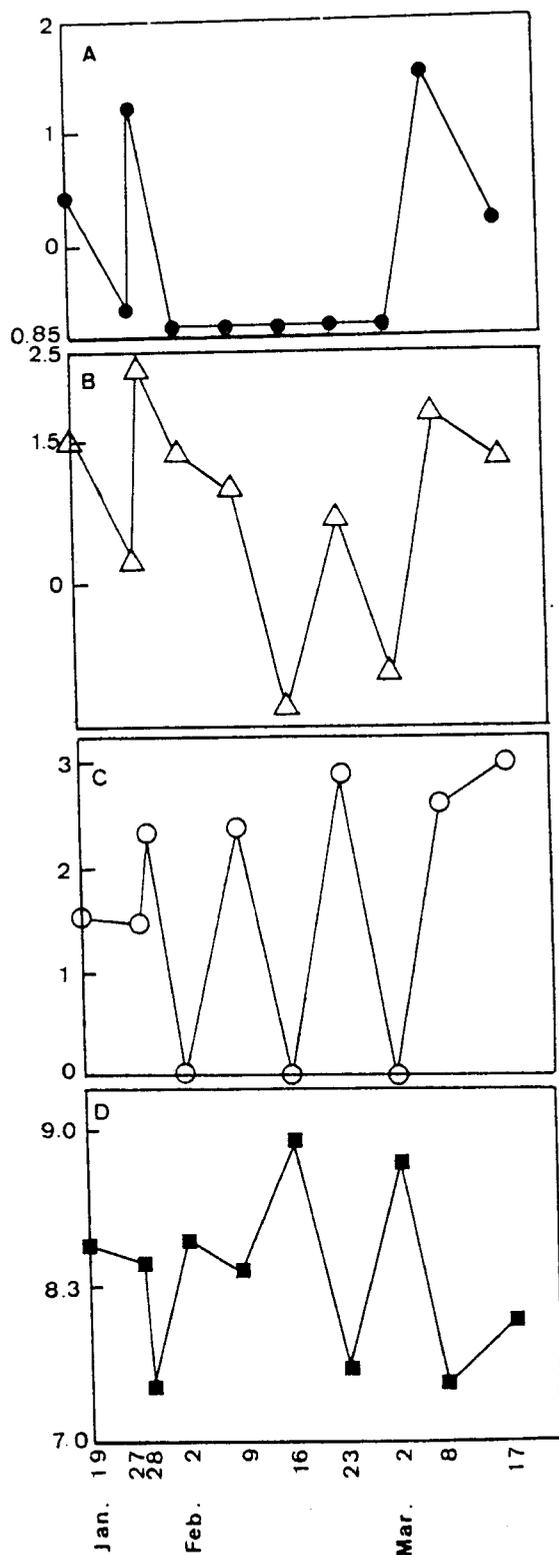


Fig. 8. Change of mortality, *V./AS10*, *V.* and pH in the overwintering pond.
 A: log number of mortality ($\times 10000$)
 B: log number of *V./AS10*
 C: log number of *V. anguillarum* (cell/ml)
 D: pH

9. 田間試驗

田間試驗定期測定項目中，水質 pH, *Vibrio anguillarum*, Log (*Vibrio anguillarum*/噬菌體 AS10) 及死亡率 (如 Fig. 8)，我們發現死亡率與 Log (*Vibrio anguillarum*/噬菌體 AS10) 或迴歸直線關係，此方程式 $\text{Log } M (\text{‰}) = 0.526 \times \text{Log} (\text{V.}/\phi\text{AS10}) - 0.539$, $r = 0.693^*$ ，也就是說當紅斑病菌與噬菌體 AS10 比值超過 10.5 倍時，就會發生虱目魚死亡情形。一般我們在水中測得紅斑病菌量約 1×10^2 cell/ml，所以當冬季來臨時，維持水中噬菌體 AS10 的濃度在 20 PFU/ml，應可避免紅斑病的發生。

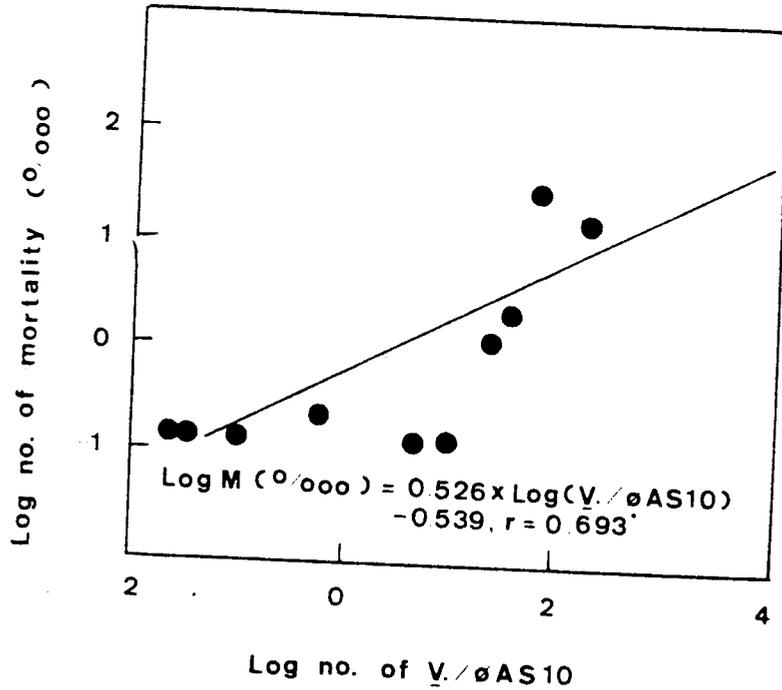


Fig. 9. Correlations between mortality of 9 cm milkfish vibriosis and *V./AS10* in wintering pond.

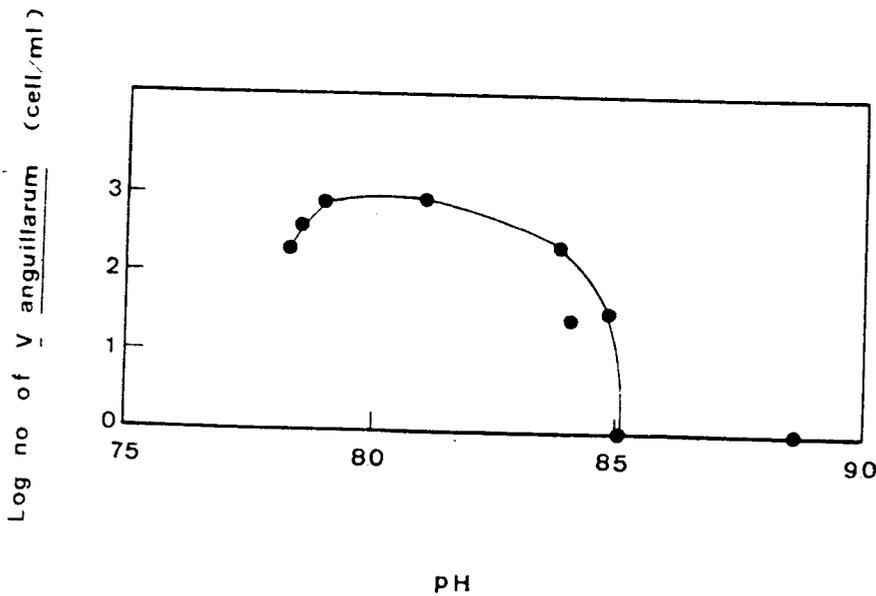


Fig. 10. Relationship between pH and *V. anguillarum* in the overwintering pond.

我們接着探討紅斑病菌在水質中含量與何者較有密切關係，結果發現在 pH 約 8.14 時，紅斑病菌的含量最高，此與 Evelyn⁽⁴⁾ 所探討紅斑病菌最適生長條件 pH 是 6.5 及 7.6 有所不同，此可能因海水中其他機質影響有關。但我們可以海水中之 pH 值作個大略指標，來決定施放噬菌體 AS10 的量。

曾有報告⁽³⁾ 指出當水溫低時添加淡水的地下水具有提高溫度效果。但事實上却會發生凍斃事件，此因虱目魚在深度約 1.5 公尺的越冬溝，上層水溫雖低，但下層因地熱所以較上層為高溫，此種溫度虱目魚還能忍受，但是加地下水時會破壞水層，魚的逆水性使虱目魚往上游，溫度的突變易造成凍傷，更甚者會立即凍斃。平日我們建議漁民在水溫達 17°C⁽¹⁾ 時才進行換水、加水的工作，如此可預防凍傷事件的發生。

摘 要

虱目魚每年越冬期間會發生紅斑病，由虱目魚越冬溝分離到對紅斑病菌具有感染及溶菌能力的噬菌體，並命名為 AS10。噬菌體 AS10 對臺灣所分離出 18 株紅斑病菌具有 100% 的溶菌能力。以 Acridine Orange 染色法知噬菌體 AS10 是單股 DNA。離子濃度試驗得知噬菌體 AS10 在 Mg^{++} 溶液中活存率最高。由熱抵抗效應發現當溫度超過 30°C 時，噬菌體 AS10 的熱抵抗安定性轉弱。在 4°C 到 20°C 噬菌體 AS10 穩定性良好。它的最適 pH 範圍在 6~9 之間。照紫外光的劑量和噬菌體 AS10 的活存率是呈直線關係。噬菌體 AS10 最適鹽度範圍是 15~45%。由浸浴試驗得知紅斑病菌與噬菌體 AS10，以 M.O.I.=1，混合後四小時，紅斑病菌對虱目魚便無致病能力。在越冬溝進行田間試驗，我們證實噬菌體 AS10 可抑制紅斑病的發生。

謝 辭

本研究承農業發展委員會漁業組經費補助，得以完成，謹此致謝。研究期間承蒙農發會袁柏偉組長、李健全技正與陳松堅先生多方面指正，臺灣大學動物系郭光雄教授及鍾虎雲教授的鼎力協助，臺南水產試驗分所丁雲源分所長全力支持，林清龍先生、吳慶麗小姐及黃明善先生提供諸多寶貴經驗，以及本所陳育賢先生的多方幫忙，順利進行本研究。在此謹致萬分謝意。

參 考 文 獻

1. Aoki, T., T. Litao and K. Kawano (1981). Changes in drug resistance of *Vibrio anguillarum* in cultured ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck and Schlegel, in Japan. *Journal of Fish Diseases* 4: 223-230.
2. Bradley, D. E. (1966). The Fluorescent Staining of Bacteriophage Nucleic Acids. *J. gen. Microbiol.* 44: 383-391.
3. Chen, H. C. and Chi-yang Liu (1972). Ecological Study of Milkfish Winten Wintering Pond. *J. C. R. R.* 12: 35-49.
4. Emmy, Egidius and Kari Andersen (1977). Norwegian reference strains of *Vibrio anguillarum*. 10: 215-219.
5. Evelyn, T. P. T. (1971). First records of Vibriosis in Pacific Salmon Cultured in Canada, and Taxonomix Status of the Responsible Bacterium, *Vibrio anguillarum*. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 28: 517-525.
6. Gould, R. W., R. Antipa and D. F. Amend (1979). Immersion vaccination of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) with two pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *J. Fish. Res. Board Can.* 36: 222-225.

7. Haastein, T. and G. Holt (1971). The occurrence of vibrio disease in wild Norwegian fish. *J. Fish Biol.* 4: 33-37.
8. Harm, W. (1980). Biological effects of ultraviolet radiation.
9. Huang, Yn-Her (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.
10. Lin, S. Y. (1968). Milkfish farming in Taiwan a review of practice and problems. The Taiwan Fisheries Research Institute.
11. Lin, H. S. (1969). Some aspects of milkfish ecology. *JCRR Fisheries Series: No. 7.*
12. Lin, C. C. (1980). Evaluation of HIVAX *Vibrio anguillarum* Bacterin in the Vaccination of Milkfish (*Chanos Chanos*) Fingerlings. *Bulletin of Taiwan Fisheries Research Institute* 32: 623-627.
13. Pacha, R. E. and W. D. Kiehn (1969). Characterization and Relatedness of Marine Vibrios Pathogenic to Fish: Physiology, Serology, and Epidemiology. *J. of Bacteriology*, vol. 100, 3: 1242-1247.
14. Schiewe, M. H. and J. H. Crosa (1981). Molecular characterization of *Vibrio anguillarum* biotype 2. *Can. J. Microbiol.* 27: 1011-1018.
15. Shotts, E. B. and S. F. Snieszko (1976). Selected bacterial fish diseases. *Wildlife Diseases*. pp. 143-151.
16. Smith, I. W. (1961). A Disease of Finnock Due to *Vibrio anguillarum*. *J. gen. Microbiol.* 24: 247-252.
17. Snieszko, S. F. (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish Biol.* 6: 197-208.
18. Strout, R. G., E. S. Sawyer and B. A. Coutermarch (1978). Pathogenic Vibrios in confinement-reared and feral fishes of the Mine-New Hampshire coast. *J. Fish Res. Board Can.* 35: 403-408.
19. Tsai, S. C., H. S. Lin and K. Y. Lin (1970) Some factors regarding the mortality of milkfish during overwinter period. *Aquiculture* 1: 9-30.
20. Tasi, S. C. (1970). Studies on Chironomid control in milkfish ponds. Part 1. Ecological aspects of the development and dispersion of chironomid midges in Tainan milkfish ponds. *Fisheries Series No. 9.*
21. Watkins, W. D., R. E. Wolke and V. J. Cabelli (1981). Pathogenicity of *Vibrio anguillarum* for juvenile winter flounder. *Pseudopleuronectes americanus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 1045-1051.
22. 唐允安、黃丁郎。虱目魚塭肥料試驗。臺灣省水產試驗所試驗報告第 12 號，33-48 頁。
23. 鄭鴻銓、司徒明利、黃茂春。利用深水（淡水）井灌注越冬池以防止虱目魚之凍斃。臺灣省水產試驗所試驗報告第 24 號，115-126 頁。