

弧菌對養殖蝦類致病性之研究

蔣先冲^{1,3} 鍾虎雲² 郭光雄² 趙蓉華³

1. 國立臺灣大學漁業科學研究所
2. 國立臺灣大學動物學系
3. 臺北市家畜衛生檢驗所

摘 要

利用六株不同來源的四種弧菌 *Vibrio damsela*, *V. anguillarum* (type I) *V. alginolyticus* and *V. vulnificus* 對草蝦及斑節蝦分別進行病原性試驗，並觀察肉眼及組織切片下的病變。

肌肉注射結果顯示對草蝦之 LD₅₀ (Log₁₀ cfu/10 g B.W.) 為 5.71~6.74，對斑節蝦為 5.67~6.89，與菌株來源，蝦種及菌種均無顯著關係。

草蝦以全菌接種時均無肉眼可見之症狀。斑節蝦則會在接種部位產生白濁壞死病灶。組織切片中則所有接種試驗蝦的肌肉及類淋巴器官均出現壞死或肉芽腫病灶。肝胰腺則僅有部份出現壞死及肉芽腫病灶，其它器官則多未出現病變。

前 言

對蝦類 (Penaeid prawn) 的細菌性病害極為普遍 (Sindermann *et al.*, 1988; 廖等, 1985)，其中又以弧菌感染引起的病例最多 (Lightner & Redman, 1985; Sindermann *et al.*, 1988; 黃, 1986; 張及劉, 1986; 鄭, 1989)。關於弧菌的病原性及致病機轉已有很多研究 (Austin & Austin, 1985; Egusa *et al.*, 1988; Lightner, 1978; Liu & Chen, 1988; 李, 1990; 黃, 1989; 鄭, 1989)，但這些研究中所用的弧菌菌株都是由病魚 (蝦) 所分離。一般認為感染魚蝦的病原菌都是條件性病原菌 (facultative pathogen)，魚蝦體上即使帶菌也不一定發病。

本研究旨在比較不同來源之同種弧菌對蝦類的病原性高低及其在蝦體上所引起的病變，以做為進一步分析蝦類病原性弧菌致病機轉的基礎。

材 料 與 方 法

供試菌株：

選用六株弧菌 (後附代號為本研究中之編號) 進行全菌接種試驗，菌株來源見 Table 1。

供試動物：

草蝦分別購自宜蘭壯圍，高雄援中港及屏東佳冬之養殖場，大小約在 10~15 g，斑節蝦係購自臺北市零售市場，大小約在 15~20 g，購回後，先放入大型塑膠桶 (80×80×100 cm) 蓄養於 20~25°C，鹽度 30‰ 之海水中一週，確定其活力無異後才提供實驗接種用。

供試菌株培養及濃度之計算：

將六株弧菌由保存菌管中鈎入 Brain heart infusion agar (BHI agar, Difco)，經 28°C 24 小時培養後，刮下菌落以 0.85% NaCl 將細菌調至 McFarland's nephelometer standards No.

Table 1. Sources of *Vibrio* strains used in this experiment

No.	Species	Source	Location	Date	Note
1. UAH-1	<i>V. damsela</i>	Hepatopancreas of diseased <i>P. monodon</i>	Ping-Tung	1990, May	
2. UAH-2	<i>V. anguillarum</i>	Diseased <i>Plecoglossus altivelis</i>	Japan	1990, July	Donated by PRIAH*
3. UAH-3	<i>V. anguillarum</i>	Hepatopancreas of healthy <i>P. monodon</i>	I-Lan	1990, June	
4. UAH-4	<i>V. alginolyticus</i>	Hepatopancreas of healthy <i>P. monodon</i>	I-Lan	1990, May	
5. UAH-5	<i>V. alginolyticus</i>	Midgut of healthy <i>P. monodon</i>	I-Lan	1990, July	
6. UAH-6	<i>V. vulnificus</i>	Midgut of healthy <i>P. monodon</i>	I-Lan	1990, May	

* PRIAH: Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

1 濃度的懸濁菌液，並依此作十倍連續稀釋，取適當稀釋倍數的菌液，以 Spiral plate model D (Spiral System) 塗劃於 BHI agar，正確的計算出實際細菌濃度，供做接種菌量之依據。

細菌之病原性試驗：

草蝦，斑節蝦養於 30×30×45 cm 之長方形水族缸中。每缸放六尾為一組，每一株菌以兩倍連續稀釋分成六個實驗組及 BHI broth，生理食鹽水兩對照組。以 1 c. c. 注射針抽取各組菌液 0.1 c. c. 分別接種在蝦體左側第四、五腹節間肌肉。每日並做一次水質檢測，使水溫維持在 20~25°C，酸鹼質在 pH 7.0~8.0 之間，溶氧 6~8 ppm，總氮量不超過 0.5 ppm。並於早晚各餵食乙次每次 1 pellet/尾（約為體重 0.001%）。連續 14 天觀察其生理反應及記錄死亡蝦隻數目，並依據 Reed & Muench (1938) 方法計算半致死劑量。

組織病理變化：

組織病理變化的觀察，將實驗中死亡及觀察 14 天後仍存活的蝦隻均剖檢，觀察肉眼病變而後再採集肌肉，肝胰腺，類淋巴器官、心臟、鰓、腸管等組織以 Davison's 固定液固定 24 小時以上。固定好的組織經脫水，浸潤，石蠟包埋後製作成 2 μ 厚石蠟切片，以 Hematoxylin & Eosin 染色，參考 Bell & Lightner (1988) 之對蝦組織圖譜，在顯微鏡下觀察組織病變。

結 果

臨床症狀方面，草蝦及斑節蝦以全菌接種後，死亡前在臨床症狀上只能看到蝦子活力減低，對外界刺激反應極差，而在實驗觀察期滿仍存活的蝦隻，不論其肉眼下是否出現病變，其活力及反應均正常。在攝餌的表現上，實驗組及空白對照組皆有攝食減低的相同反應，顯示實驗操作本身對蝦造成壓力 (stress)。

草蝦以 UAH-1, UAH-2, UAH-3, UAH-4, UAH-5, UAH-6，全菌 0.1 ml 菌液做肌肉注射，LD₅₀ (cfu/10 g body weight) 分別為 2.5×10⁶, 5.6×10⁶, 1.5×10⁶, 8.8×10⁵, 5.2×10⁵ 及 6.2×10⁵ (Table 2)。

Table 2. Experimental infection of *Penaeus monodon* to six *Vibrio* strains

<i>Vibrio</i> strain	Dose (cfu/10 g body weight)	No. of death/total	Accumulated mortality (%)	LD ₅₀ (cfu/10 g body weight)* _a
UAH-1	1.4×10 ⁷	6/6	100	2.5×10 ⁶ (6.39* _b)
	7.0×10 ⁶	6/6	100	
	3.5×10 ⁶	5/6	83.3	
	1.8×10 ⁶	3/6	50	
	9.0×10 ⁵	1/6	16.7	
	4.5×10 ⁵	0/6	0	
UAH-2	5.6×10 ⁷	6/6	100	5.6×10 ⁶ (6.74* _b)
	2.8×10 ⁷	6/6	100	
	1.4×10 ⁷	6/6	100	
	7.0×10 ⁶	4/6	66.7	
	3.5×10 ⁶	3/6	50	
	1.8×10 ⁶	1/6	16.7	
UAH-3	1.5×10 ⁷	6/6	100	1.5×10 ⁶ (6.17* _b)
	7.3×10 ⁶	6/6	100	
	3.7×10 ⁶	5/6	83.3	
	1.9×10 ⁶	4/6	66.7	
	1.0×10 ⁶	1/6	16.7	
	5.0×10 ⁵	0/6	0	
UAH-4	1.1×10 ⁷	6/6	100	8.8×10 ⁵ (5.94* _b)
	5.6×10 ⁶	6/6	100	
	2.8×10 ⁶	6/6	100	
	1.4×10 ⁶	5/6	83.3	
	7.0×10 ⁵	2/6	33.3	
	3.5×10 ⁵	0/6	0	
UAH-5	5.8×10 ⁶	6/6	100	5.2×10 ⁵ (5.71* _b)
	2.9×10 ⁶	6/6	100	
	1.5×10 ⁶	4/6	66.7	
	7.5×10 ⁵	4/6	66.7	
	3.8×10 ⁵	2/6	33.3	
	1.9×10 ⁵	1/5	16.7	
UAH-6	7.8×10 ⁶	6/6	100	6.2×10 ⁵ (5.79* _b)
	3.9×10 ⁶	6/6	100	
	2.0×10 ⁶	5/6	83.3	
	1.0×10 ⁶	5/6	83.3	
	5.0×10 ⁵	2/6	33.3	
	2.5×10 ⁵	0/6	0	
BHI broth	—	0/6	0	
0.85% NaCl	—	0/6	0	

*_a LD₅₀ are determined by Reed & Muench method at 14th post injection day.

*_b Log number of LD₅₀.

*_c Temperature: 20-25C°.

*_d Salinity: 30‰.

Table 3. Experimental infection of *Penaeus japonicus* to six *Vibrio* strains

<i>Vibrio</i> strain	Dose (cfu/10 g body weight)	No. of death/total	Accumulated mortality (%)	LD ₅₀ (cfu/10 g body weight)* ₂
UAH-1	1.9×10 ⁷	6/6	100	6.9×10 ⁶ (6.83* _b)
	9.7×10 ⁶	4/6	66.7	
	4.8×10 ⁶	2/6	33.3	
	2.4×10 ⁶	2/6	33.3	
	1.3×10 ⁶	0/6	0	
	5.6×10 ⁵	0/6	0	
UAH-2	2.8×10 ⁷	6/6	100	4.5×10 ⁶ (6.65* _b)
	1.4×10 ⁷	5/6	83.3	
	7.0×10 ⁶	5/6	83.3	
	3.5×10 ⁶	2/6	33.3	
	1.8×10 ⁶	1/6	16.7	
	9.0×10 ⁵	0/6	0	
UAH-3	7.9×10 ⁷	6/6	100	7.9×10 ⁶ (6.89* _b)
	4.0×10 ⁷	5/6	83.3	
	2.0×10 ⁷	5/6	83.3	
	1.0×10 ⁷	4/6	66.7	
	5.0×10 ⁶	1/6	16.7	
	2.5×10 ⁶	1/6	16.7	
UAH-4	5.3×10 ⁶	6/6	100	4.7×10 ⁵ (5.67* _b)
	2.6×10 ⁶	6/6	100	
	1.3×10 ⁶	5/6	83.3	
	6.6×10 ⁵	4/6	66.7	
	3.3×10 ⁵	2/6	33.3	
	1.7×10 ⁵	1/6	16.7	
UAH-5	1.7×10 ⁷	6/6	100	3.0×10 ⁵ (6.47* _b)
	8.5×10 ⁶	6/6	100	
	4.3×10 ⁶	4/6	66.7	
	2.2×10 ⁶	2/6	33.3	
	1.1×10 ⁶	2/6	33.3	
	6.0×10 ⁵	0/6	0	
UAH-6	1.1×10 ⁷	6/6	100	2.0×10 ⁶ (6.3* _b)
	5.6×10 ⁶	6/6	100	
	2.8×10 ⁶	4/6	66.7	
	1.4×10 ⁶	3/6	50	
	7.0×10 ⁵	2/6	33.3	
	3.5×10 ⁵	1/6	16.7	
BHI broth	—	0/6	0	
0.85% NaCl	—	0/6	0	

*₂ LD₅₀ are determined by Reed & Muench method at 14th post injection day.

*_b Log number of LD₅₀.

*_c Temperature: 20-25°C.

*_d Salinity: 30‰.

斑節蝦以 UAH-1, UAH-2, UAH-3, UAH-4, UAH-6, 全菌 0.1 ml 菌液做肌肉注射, LD_{50} (cfu/10 g body weight) 分別為 6.9×10^6 , 4.5×10^6 , 7.9×10^6 , 4.7×10^5 , 3.0×10^6 , 2.0×10^6 (Table 3)。

肉眼病變, 各菌株經以全菌接種草蝦後, 所有死亡蝦隻經剖檢後都未能看到明顯可見的肉眼病變。即使在實驗觀察期滿後仍存活的蝦做剖檢也未能看出任何肉眼病變。斑節蝦經以全菌接種, UAH-1 接種後死亡的蝦隻均未見任何肉眼病變, 但是 UAH-2, UAH-3, UAH-4, UAH-5, UAH-6 各組死亡蝦隻都可在接種部位發現肌肉白濁變化 (Fig. 1)。實驗結束存活蝦隻經剖檢, 均可在接種部位肌肉深層看到黑色壞死病灶 (Fig. 2)。

組織病變, 草蝦經以全菌接種後, 除於 8 小時內死亡的蝦隻外, 都可在鏡下見到接種部位肌纖維由變性到壞死不同程壞度的病變, 同時並能看到許多菌塊 (Fig. 3) 散佈於壞死的肌纖維間, 隨接種時間的增加在壞死的蝦體肌肉病灶中還可見到血淋細胞浸潤 (Fig. 4)。類淋巴器官為另一重要病變部位, 全部菌株均可見壞死病灶 (Fig. 5)。其它器官組織的病變則僅出現於部份菌株, UAH-3 接種組蝦隻心肌局部炎症細胞浸潤 (Fig. 6)。UAH-3, UAH-5, UAH-6 等接種組的鰓薄板血淋竇內形成細菌栓塞 (Fig. 7)。斑節蝦全菌接種後, 肌肉早期病變如同草蝦呈退性變化到壞死, 後期則出現大量血淋細胞及膠原纖維結締組織包被的肉芽腫病灶。類淋巴器官的壞死同樣出現於所有菌株, 其中在 UAH-1 組還有肉芽腫病變的形成 (Fig. 8)。UAH-1 及 UAH-5 兩組蝦隻肝胰腺可見壞死病灶, UAH-1 並有小區域的肉芽腫 (Fig. 9)。心肌在 UAH-2 組可見血淋細胞浸潤 (Fig. 10)。UAH-6 組的 Neurosecretory cell 壞死 (Fig. 11)。BHI broth 及生理食鹽水兩對照組均無病變產生。



Fig. 1. *P. japonicus*, intramuscular inoculated by *V. anguillarum* whole cell. Indicated marked opaque necrotic lesion near by injected site.



Fig. 2. Cross section of *P. japonicus* intramuscular inoculated by *V. alginolyticus* whole cell. Indicated black necrotic lesion at injected site.

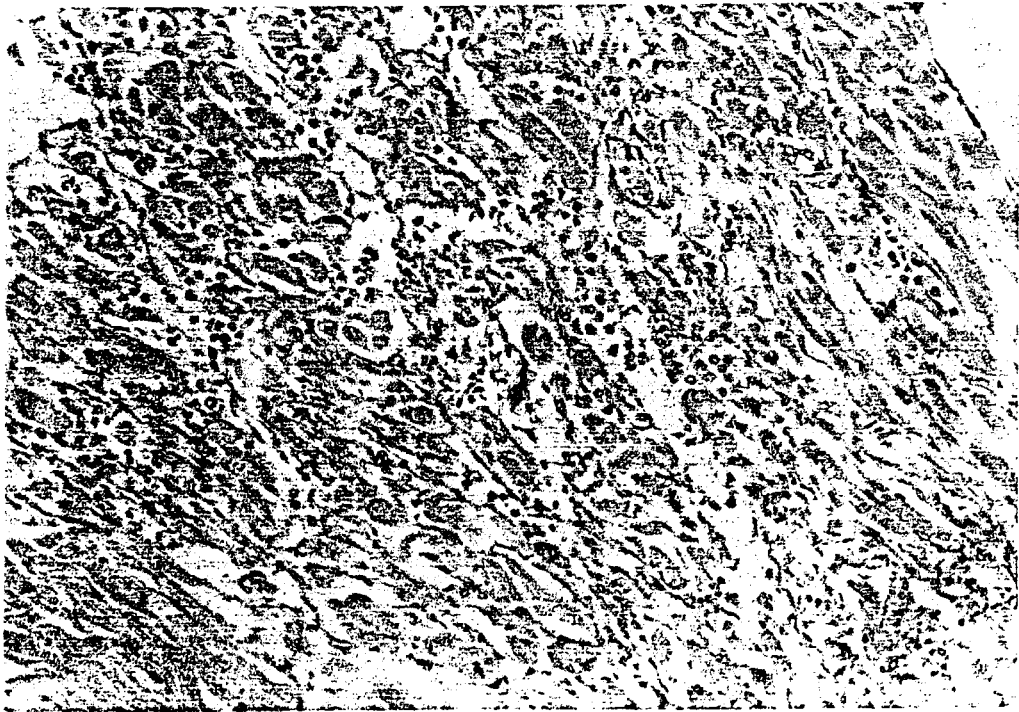


Fig. 3. Lysis of muscle fiber in *P. monodon* inoculated by *V. anguillarum* whole cell. H & E. $\times 125$.

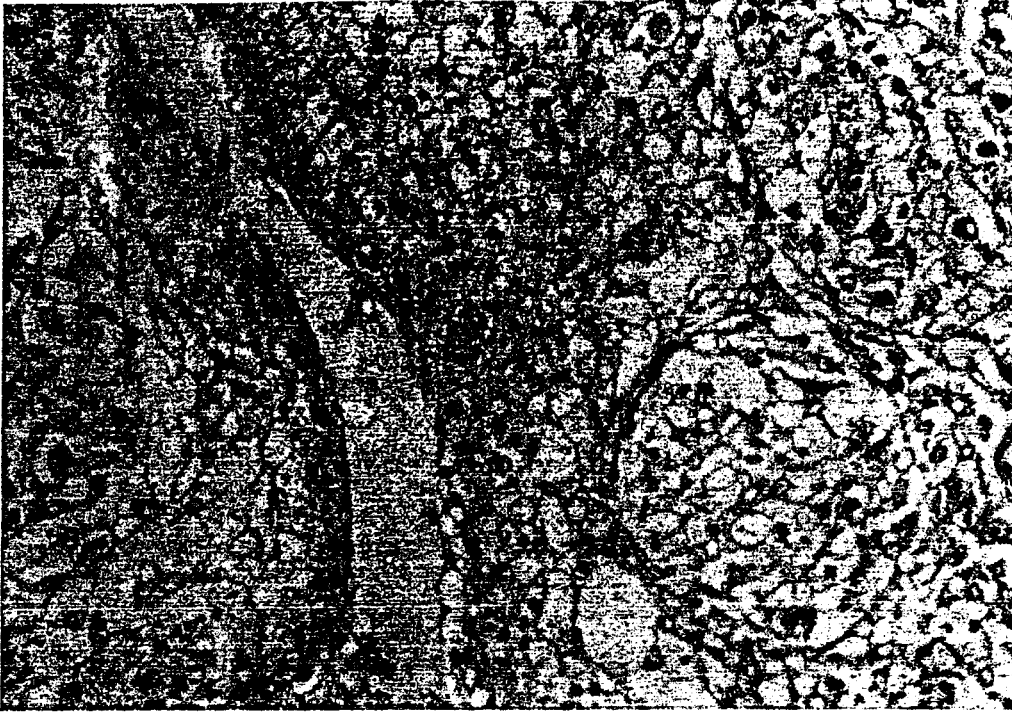


Fig. 4. Lymphoid organ of *P. monodon* inoculated by *V. vulnificus* whole cell. Shows multifocal necrosis and lysis of tubules. H & E. $\times 125$.

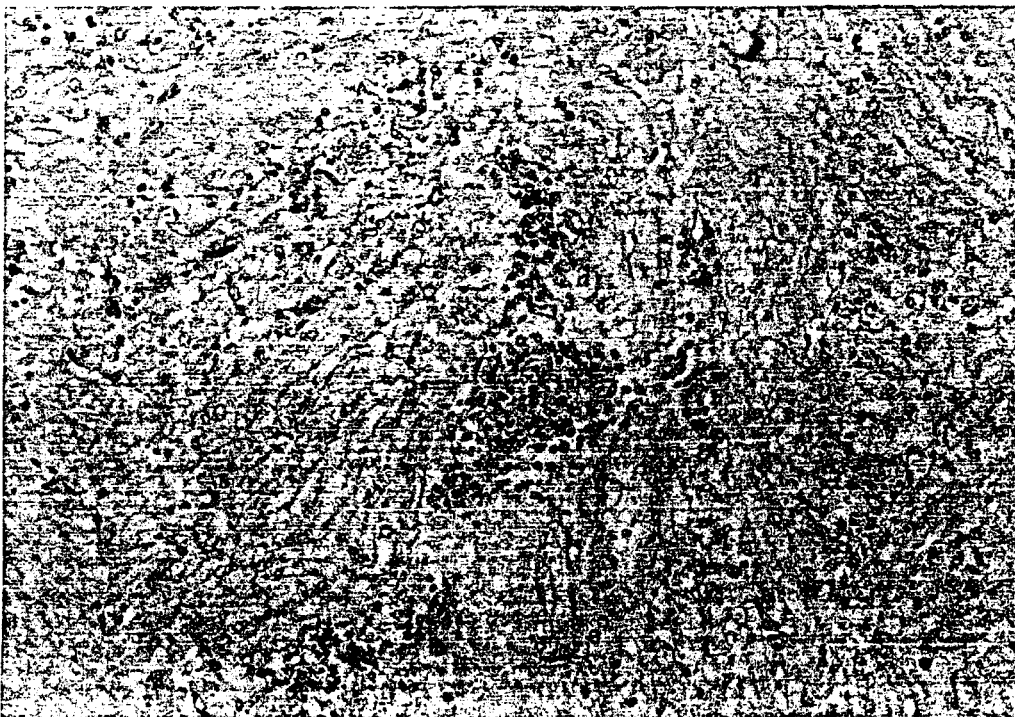


Fig. 5. Hemocyte infiltration in heart muscle of *P. monodon* inoculated by *V. alginolyticus* whole cell. H & E. $\times 250$.



Fig. 6. Gill of *P. monodon* inoculated by *V. vulnificus* whole cell. Indicated bacteria clump in secondary laminae. H & E. $\times 250$.



Fig. 7. Late stage lesion, showing granulomatosis encapsulated by connective tissue and hemocytes in muscle of *P. japonicus* inoculated by *V. alginolyticus* whole cell. H & E. $\times 50$.

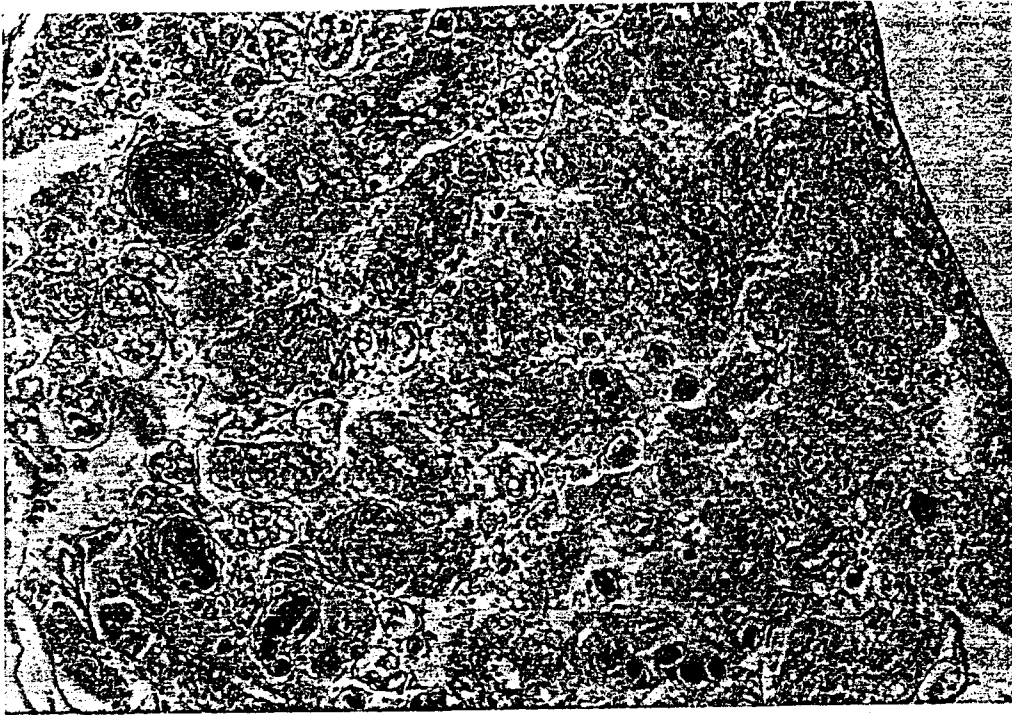


Fig. 8. Lymphoid organ of *P. japonicus* inoculated by *V. damsela* whole cell, showing slightly granulomatosis reaction. H & E. $\times 250$.



Fig. 9. Hepatopancrea of *P. japonicus* inoculated by *V. damsela* whole cell. Shows glandular necrosis and granulomatosis reaction with cell debris in lumen and encapsulated by connective tissue and hemocytes. H & E. $\times 250$.

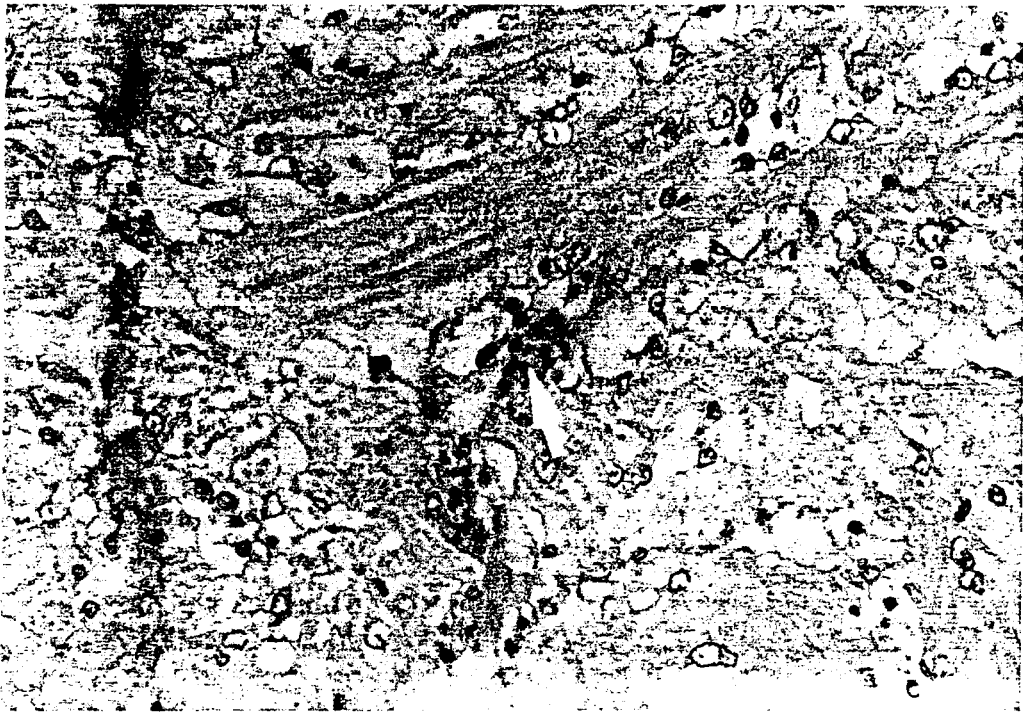


Fig. 10. Hemocyte infiltration in heart muscle of *P. japonicus* inoculated by *V. anguillarum* whole cell. H & E. $\times 125$.



Fig. 11. *P. japonicus* inoculated by *V. alginolyticus* whole cell. Shows neural cell necrosis and hemocytes infiltration. H & E. $\times 250$.

討 論

本實驗所選擇的菌株來源有：(1) 發病草蝦病原菌，(2) 香魚病原菌，(3) 健康草蝦肝胰腺分離菌，(4) 健康草蝦消化道內分離菌，由實驗結果顯示，選用的菌株中，病原菌與正常菌間，以半致死劑量高低比較，兩者間並無太大差異，與國內過去對草蝦（黃，1989；鄭，1989），斑節蝦（李，1990）病原性試驗結果也無太大差異來看，細菌的致病在蝦類應如以前研究者所說為二次性病原（Sindermann, 1988）。至於原發性的誘因則尚待進一步探討。

斑節蝦以全菌接種後，肉眼所見的病變都是肌肉接種部位附近出現白濁壞死病灶，這種病變與國內近幾年來自然感染發病的草蝦及斑節蝦病變相同，草蝦雖未見肉眼病變，但以鏡下所產生的病變與斑節蝦相似來看，細菌感染致病應無疑問。至於兩蝦種在病變產生上的差異，應該是品種不同及菌株來源不同以至於感受性不一致。

Egusa (1988) 研究弧菌對斑節蝦組織病變時在類淋巴器官發現有瀰漫性血淋細胞包圍之壞死灶，因此認為其是感受性最高的器官，本實驗中所有菌株對草蝦，斑節蝦都可產生壞死到肉芽腫病變，顯見類淋巴器官如前述報告為一高感受性器官。肝胰腺的蒼白，萎縮等肉眼病變在過去的許多報告中皆被提出（Lightner & Redman, 1985; Liu & Chen, 1988; 李，1990; 黃，1989; 鄭，1989），在本實驗中均未能見到，但鏡下所見的組織病變却與其它報告相似，只是出現比率不高，有可能是感染時間過短，尚未及產生肉眼可見病變，蝦隻已死亡的緣故。Takahashi 等 (1985) 對發菌斑節蝦症狀觀察時發現鰓部出現褐色淋點，李 (1990) 所做之實驗則未見此病變，在本實驗中鏡下也僅在少數實驗組見次級鰓薄板內有細菌團塊聚集而無其它病變。心臟血淋細胞浸潤與黃 (1989) 及 Liu 等 (1988) 結果相同，但與李 (1990) 所做斑節蝦的感染實驗在心臟則未產生病變。本實驗與前述報告之另一不同為部份蝦隻精神細胞發生壞死病變。

由本實驗結果及前述的各篇報告顯示，無論細菌來源，自然感染或人工接種感染其病變的出現都以肌肉及類淋巴器官為主，其它組織器官病變出現率並不一致來看，以後在作蝦病診斷時，對此感受性高的器官應特別注意，以免誤導診斷結果。

誌 謝

本研究經費部份承農委會 80-農建-17.1-漁-10(2) 號計畫經費資助，實驗期間蒙本所郭培芬小姐及葉進有先生多方協助，謹此致謝。

參 考 文 獻

- Austin, B. and D.A. Austin (1985) A review: bacteria pathogens of fish. *J. Appl. Bacteriol.* 58: 483-506.
- Bell, T.A. and D.V. Lightner (1988) A handbook of normal penaeid shrimp Histology. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. pp. 114.
- Egusa, S., Y. Takahashi, T. Itami and K. Momoyama (1988) Histopathology of Vibriosis in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate. *Fish pathol.* 23(1): 59-65.
- Fisher, W. S., E. H. Nilson, J. F. Steenbergen and D. V. Lightner (1978) Microbial diseases of cultured lobsters: A review. *Aquaculture.* 14: 115-140.
- Lightner, D.V. and R.M. Redman (1985) Necrosis of the hepatopancreas in *Penaeus monodon* and *P. stylirostris* (arthropoda, decapoda) with red disease, *J. Fish Dis.* 8: 181-188.
- Liu, C.I. and M.S. Chen (1988) Experimental infection of *Vibrio* spp. to induce shell

- disease in grass shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). 132. In: Vancouver, B.C. International Fish Health Conference, Fish Health Section. AFS. pp. 215.
- Reed, L. J. and H. Muench (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hygiene. 27(3): 493-497.
- Sindermann, C. J. and D. V. Lightner (1988) Disease diagnosis and control in north american marine aquaculture. pp. 431. Elsevier science publishing company inc. New York.
- Takahashi, Y., Y. Shimoyama, and K. Momoyama. (1985) Pathogenicity and characteristics of *Vibrio* sp. isolated from cultured Kuruma prawn *Penaeus japonicus* bate. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 51(5): 721-730.
- 李武忠。1990。臺灣養殖斑節蝦細菌性疾病研究。國立臺灣大學漁業科學研究所。碩士論文。pp. 80.
- 黃世鈴。1989。養殖草蝦細菌疾病之研究。國立臺灣大學漁業科定研究所。碩士論文。pp. 77.
- 張聰洲、劉正義。1986。養殖草蝦 (*Penaeus monodon* Fabricius) 主要疾病之病理學研究。魚病研究專集 (六) : 75-86。
- 廖一久、郭光雄、陳秀男、賴靜宜。1985。屏東地區之養殖蝦類疾病初步調查。魚病研究專集 (七) : 86-94。
- 鄭文騰。1989。臺灣養殖蝦類病原細菌 *Vibrio damsela* 之分離與鑑定。國立臺灣大學漁業科學研究所。碩士論文。pp. 46.

Study on Pathogenicity of *Vibrio* to Culture Prawn (*Penaeus monodon* and *P. japonicus*)

Hshien-Choung Chiang^{1,3}, Hun-Yuu Chung², Guang-Hsiung Kou²
and Pan-Hwa Chao³

1. Institute of Fisheries Science, National Taiwan University
2. Department of Zoology, National Taiwan University
3. Taipei Municipal Institute for Animal Health

ARSTRACT

Six strains of different sources of *V. damsela*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* and *V. vulnificus* were collected for study on pathogenicity to giant tiger prawn and kuruma prawn.

LD₅₀ of whole cell injection (Log₁₀ cfu/10 g B.W.) to giant tiger prawn and kuruma prawn were 5.71 to 6.74 and 5.67 to 6.89 respectively.

In the whole cell IM injected experiment, no gross finding could be observed in giant tiger prawn. While it is evident in kuruma prawn, all developed opaque necrosis in site of injection. Histopathologic observation showed that necrosis and/or granulomatosis developed in muscle of all experiment prawn. It also occasionally noted in hepatopancrea, but it were not found in other organs in most cases.