

草蝦弧菌 *Vibrio damsela* 之致病性研究

李國誥 陳逢叡

國立台灣海洋大學水產養殖學系

本研究以自罹病草蝦分離之弧菌 *Vibrio damsela* (VD1 strain) 進行其細胞外產物生化特性及毒性的研究，以了解本菌株對蝦類的可能致病機制。

經肌肉注射結果顯示本菌株對草蝦之最小致死量為 4.96×10^5 CFU/g 蝦體重。以 cellophane-overlay 方法培養製備之細胞外產物對草蝦及斑節蝦之最小致死量分別為 0.53 及 9.21 mg protein /g 蝦體重，由此結果可知草蝦較斑節蝦具感受性。細胞外產物對綿羊及草蝦血球皆具有溶血活性，以 trypan blue 為染色劑，在改良之 citrate/EDTA buffer 中測試對蝦血球溶血活性，結果顯示細胞外產物對草蝦血球溶血活性為 71.7 hemocytolytic units/mg protein。此外具磷脂酵素活性但僅具有微弱的蛋白分解酵素活性。

細胞外產物經膠過濾層析 (Gel filtration) 作部分分離純化，其中所得的部分純化毒素 (G I fraction) 具有溶血活性及磷脂酵素活性。以聚丙烯醯胺膠體電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 作純度鑑定，在 native-PAGE 的膠片上以硝酸銀染色，部分純化毒素具有 4 條分離帶。此部分純化毒素能使斑節蝦迅速致死。草蝦以活菌接種時在接種部位出現肌肉白濁，但注射細胞外產物及部分純化毒素則未出現此現象。

前 言

台灣的養殖業自從走向集約式養殖以來，常發生大量死亡。水產行政及學術研究等單位曾對致死原因展開調查，結果至目前為止尚未有確切結論及防治對策，而氣候、水源、水質、底質、飼料、幼苗、病毒、細菌及寄生蟲等因子均被探討過。細菌相中則以弧菌最常被檢出。

弧菌症為海洋生物最重要感染性疾病之一，且係世界性分佈，對於海水及半鹹水甚至淡水養殖事業造成嚴重的威脅。*Vibrio damsela* 首次由溫水魚類 damselfish (*Chromis punctipinnis*) 表皮潰瘍 (ulcers) 處分離到 (Love et al., 1981)。經由人工感染實驗證實會產

生相同病灶。Kothary 和 Kreger 在 1985 年將 *V. damsela* 細胞外產物中所含的細胞溶解素純化出來。分子量約為 69 KD，有溶血活性，對 CHO (Chinese hamster ovary cells) 具有毒性，能使老鼠致死。本菌後來陸續在 oyster (Rodrigues and Hofer, 1987)，turtle (Obendorf *et al.*, 1987)，dolphin (Fujioka *et al.*, 1988)，以及 cultured turbot (Fouz *et al.*, 1991, 1992) 中被分離出來。Song 等人 (1993) 在 1988 年 3 月至 10 月，自肝胰腺病變或肌肉白濁的草蝦分離到 12 株 *V. damsela*，並認為 *V. damsela* 在緊迫 (stress) 狀態下是草蝦死亡的病原菌。

至於 *V. damsela* 的細胞外產物是否含有對草蝦的致病因子，則尚未有文獻報告，本試驗乃研究其細胞外產物之生化特性及毒性，以瞭解本菌株與草蝦致病之間的關係。

材 料 與 方 法

菌株活化與保存

本菌株 *Vibrio damsela* (VD 1) 由台大動物系陳秀男教授提供，係於民國七十七年 3-10 月間國內養殖草蝦發生大量死亡時，分離自罹病草蝦之肝胰腺。並經凍乾保存。菌株活化係以無菌吸管吸取 1 ml 滅菌生理食鹽水 (PBS, pH 7.4)，滴入保存菌管內，待冷凍乾燥的菌種粉末溶解均勻後，取 0.1 ml 之菌體懸浮液於 tryptone soya agar (TSA+2.5% NaCl, Oxoid) 上，做劃線培養或用無菌玻璃棒均勻塗抹，培養於 26°C、24 小時，用滅菌棉花棒刮取 2 swabs 的細菌溶於 1 ml PBS 中，加入 10% 甘油混合均勻後，裝入滅菌過的 1.5 ml eppendorf 中，於 -70°C 保存。

細胞外產物之製備

將菌株培養於 TSA (+2.5% NaCl)，26°C，24 小時後，將 2 swabs 的細菌以 5 ml PBS 配成菌體懸浮液，再傾倒並均勻塗佈於覆蓋有無菌 cellophane 之 TSA (+2.5% NaCl) 上。在 26°C 下，培養 24 小時後，以 PBS 收取菌懸液。在 4 °C 下，以 6,000 rpm 離心 1 小時，將上澄液以 0.22 μm 過濾膜過濾除菌。將 ammonium sulfate 緩慢加入所收集之上澄液中至 70 % 飽和濃度，2-3 小時後，以 15,000rpm 離心 30 分鐘，取沉澱物溶於 5 ml 去離子水，裝入透析膜，在去離子水中透析兩天。以 eppendorf 分裝後，於 10,000 rpm 下離心 10 分鐘，以除去不溶物。最後貯存於 -20 °C 備用。

蛋白質含量測定

採用 Bradford method 測定細胞外產物及部分純化毒素中蛋白質含量。將樣品 0.1 ml 加入 5 ml 之 Bio-Rad Protein Assay Kit，在 595 nm 波長測定吸光值，以牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 為標準蛋白質繪製標準曲線，再以內插法求出欲測之蛋白質含量。

溶血活性測定

血液處理方法

綿羊紅血球懸浮液製備，將購入之綿羊血以 Alsever's solution buffers 混合均勻後以 1,000 rpm 離心 10 分鐘，去除上澄液，此步驟重複三次後置於 4°C 備用。使用前再以 PBS 配成 1% 紅血球懸浮液。

草蝦血淋巴的製備，採用 citrate/EDTA buffer (0.45M NaCl; 0.1 M glucose; 30 mM trisodium citrate; 26 mM citric acid and 10 mM EDTA, pH 4.6) (Soderhall and Smith, 1983) 為抗凝血劑，其中之 0.45 M NaCl 則改為鹽度 2% 無菌海水 (Lee et al., 1994)，並以 Micro-osmometer model 3MO plus (Advanced Instruments, Inc. Norwood, Ma, USA) 測定其滲透壓。將購自養殖場或市場的草蝦，體重約 10-20 克間，置於內裝海水之二噸半 FRP 桶中蓄養一周後，再選取活力良好的蝦隻進行實驗。將抗凝血劑以 1:1 (v/v) 與蝦血淋巴混合均勻，置於 eppendorf 中觀察凝集程度。另外先置 0.5 ml 之抗凝血劑於 1.5ml eppendorff 中，以 25Gx1" 1 ml 針筒先抽取 0.2 ml 抗凝血劑後，自蝦體腹部胸腔抽血淋巴至 1 ml，抽出之血置於先前之 eppendorf 中，混合均勻備用。

菌株溶血試驗

將 TSA 以 PBS 配成，滅菌後置於 50°C 恆溫水槽中，當培養基溫度降至 50°C 左右時，加入 3% 處理過的綿羊紅血球混合均勻，倒入培養皿作成血液平板 (blood agar plate)。劃菌培養後，觀察其菌落旁是否出現溶血環。

溶血活性之測定方法

加 100 μ l sample 於 96 well microtitration plate (U bottom) 第一格內，然後以 PBS 進行兩倍連續稀釋，最後在每一格內各加入 100 μ l 1% 綿羊紅血球。25°C、2 小時

後觀察溶血現象，溶血活性單位 (hemolytic units) 以造成 50% 溶血之最後稀釋倍數表示。

加 50 μ l 細胞外產物於 microplate (\square bottom) 第一格內，然後以抗凝血劑進行兩倍連續稀釋，最後在每一格內各加入 50 μ l 蝦血淋巴 (溶於抗凝血劑中)。室溫下放置半小時後移去血淋巴，附著於 plate 上的血球細胞再以 0.4% trypan blue (in 2% sterile seawater) 染色，2-3 min 後移去染液，置於倒立顯微鏡下 (x400) 觀察血球是否染上顏色，若細胞核及細胞質均染上藍色則表示此血球已破裂，以 50% 藍色血球為判斷基準 (Lee *et al.*, 1994)。

細胞外產物的熱安定性

將菌株培養在 TSA (+0.5% NaCl) 生產所得細胞外產物，分別在 4°C、37°C、56°C、100°C 溫度下 30 分鐘後，以綿羊血測定溶血活性。

細胞外產物中酵素活性測定

蛋白質分解酵素 (protease)

(一) 酪蛋白分解試驗

將 0.4 g 酪蛋白 (casein) 與 1 g agar 加入 100 ml PBS 中，加熱煮沸後倒入培養皿中，打洞後加入 20 μ l 細胞外產物，在室溫 24 小時後觀察是否有透明環出現。

(二) 蛋白質分解酵素活性測定

分別以 azocasein 及 hide powder azure (HPA) 為受質來測定蛋白質分解酵素活性。

將 5 mg azocasein 溶於 1 ml 的 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.5 為 substrate solution，取 1 ml 與 0.5 ml 細胞外產物混勻後，於 37°C 作用 30 分鐘，然後加入 1.5 ml 10% TCA 中止反應，於 3000 rpm 離心 15 分鐘，取 2 ml 上澄液加 2 ml 0.5 M NaOH，在 440 nm 波長測定吸光值，以吸光值 0.01 為 1 unit。

將 25 mg HPA 溶於 2.4 ml PBS 中，與 0.1 ml 細胞外產物在 37°C incubate 30 分鐘後，加入 2.5 ml 10% trichloroacetic acid (TCA) 中止反應，再於 1000 rpm 離心 5 分鐘，取上澄液於 600 nm 波長測吸光值，以吸光值 0.01 為 1 unit。

(三) 磷脂酵素 (phospholipase)

草蝦弧菌之致病性研究

將 0.2 g 卵磷脂 (lecithin) 與 1 g agar 加入 100 ml PBS 中，加熱煮沸後倒入培養皿中，打洞後加入 20 μ l 細胞外產物及部分純化毒素，在室溫 24 小時後觀察是否有霧狀環出現。

細胞外產物活性成分之部分分離純化-膠過濾層析法

將 Sephacryl S-300 HR (pre-swollen) 填充於管柱中 (XK 16/70, Pharmacia)，以 PBS 平衡之，再注入 1 ml 細胞外產物，用 PBS 以 0.5 ml/min 的流速將蛋白質溶出，一定體積收集一次，分別測定活性及波長 280 nm 吸光值，將有活性部分收集，並測定酵素及溶血活性。

蛋白質成分分析

在快速電泳系統中 (Phast system, Pharmacia)，以聚丙烯胺膠體電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 作細胞外產物及部分純化成分之純度鑑定。Native-PAGE 的膠片使用 PhastGel gradient 8-25%，running buffer 使用膠體的 native buffer strips，標準蛋白採用 high molecular weight (HMW) calibration kit (Pharmacia) 分子量分別為 thyroglobulin (669 KD)，ferritin (440 KD)，catalase (232 KD)，lactate dehydrogenase (140 KD)，albumin (67 KD)，以 1 μ l sample applicator 直接將 sample 置于膠片上作電泳。電泳結束後再以銀染劑進行銀染色。

溶血因子之鑑定

將 1% agar 以 PBS 配成，煮沸後待溫度降至 50°C 時，加入 3% 處理過的綿羊血混合均勻，倒入培養皿作成血液平板。將細胞外產物在快速電泳 (Phast system) 上，以 native-PAGE 進行電泳，結束後將膠片以 PBS 洗數次再覆蓋至血液平板上，室溫下作用 4 小時，壓血後的膠片以 PBS 再洗數次，作 Coomassie blue (Staining solution: 2.5 g Coomassie Brilliant Blue, 500 ml methanol, 100 ml acetic acid, in 1 L distilled water; Destaining solution: 25% methanol, 7% acetic acid) 染色。將溶血透明帶與蛋白質帶相對應以找出溶血毒素位置。

部分純化毒素分子量估算

將填充有 Sephacryl S-300 HR 的管柱 (XK 16/70, Pharmacia), 以 PBS 平衡之, 再注入 1 ml Calibration Kit proteins (Pharmacia) 含有 blue dextran 2,000, ferritin (440 KD), aldolase (158 KD), ovalbumin (43 KD), 用 PBS 以 0.5 ml/min 的流速將標準蛋白質溶出, 1 ml 收集一次, 測定波長 280nm 吸光值, 部分純化毒素濃縮以同樣條件進行後, 與標準蛋白比對後估算出分子量。

毒性試驗

取草蝦及斑節蝦為實驗動物, 以肌肉注射方式接種菌體及細胞外產物定出最小致死量。採二尺水族箱為實驗缸, 以全海水每缸放六尾草蝦為一組, 接種劑量以兩倍連續稀釋, 各取出六種稀釋濃度, 以 100 μ l 注射針於蝦體側第四、五腹節間肌肉注射 0.1 ml。除上述實驗組外, 另取滅菌之生理食鹽水做為空白對照接種組, 連續觀察七天以導致至少 50% 死亡率的劑量來計算最小致死劑量 (Lee and Ellis, 1990; Nieto *et al.*, 1992)。對於部分純化之毒素直接以肌肉注射方式注射斑節蝦, 以初步瞭解其中所含成分特性, 並以 native-PAGE 鑑定其純度, 來了解疾病感染過程中所扮演的角色。將實驗中死亡及實驗結束後仍存活的蝦隻均解剖, 以肉眼觀察病變。

結 果

溶血活性測定

在 3% 綿羊血血液平板上劃菌培養, 26°C、24 小時後, 可在菌落旁看見 α -溶血型溶血環 (Fig.1)。細胞外產物 (培養於 TSA +2.5% NaCl, 未經硫酸銨分劃) 對綿羊血溶血性力價為 1264.2 hemolytic units/mg protein。

本實驗採用改良 citrate/EDTA buffer (滲透壓為 950 mOsm/kg) 做為測定溶血活性的緩衝溶液, 可得完整草蝦血球 (Fig. 2)。細胞外產物 (培養於 TSA +2.5% NaCl, 以鹽度 2% 過濾滅菌海水收取) 對草蝦血球的溶血力價為 71.7 hemocytolytic units/mg protein。未經稀釋的細胞外產物加入草蝦血球中, 結果顯示草蝦血球完全被破壞 (Fig. 3)。

細胞外產物溶血物質的熱安定性

細胞外產物 (培養於 TSA+0.5% NaCl) 隨著溫度的升高, 其溶血活性逐漸減低。經

草蝦弧菌之致病性研究

4°C處理的溶血力價有 8192 hemolytic units，37°C 處理的為 4096 hemolytic units，56°C 處理的則降至 32 hemolytic units，100°C 處理的雖然還有 16 hemolytic units，但其溶血形態則明顯不同 (Fig.4)。

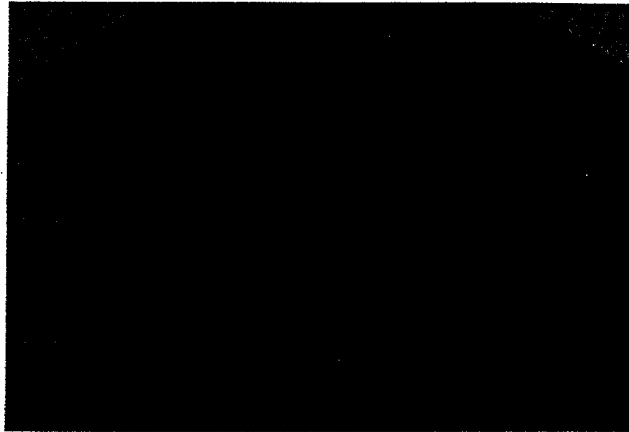


Fig 1. *V. damsela* 在綿羊血液平板上產生 α -溶血型溶血環。

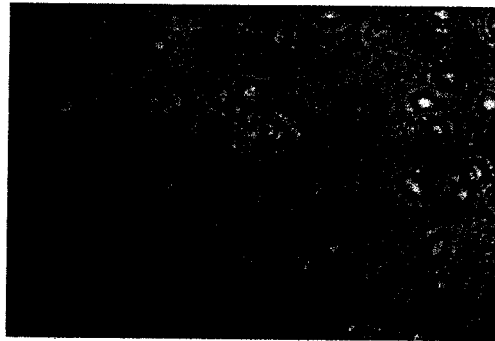


Fig 2. 完整的草蝦血球。(x400)

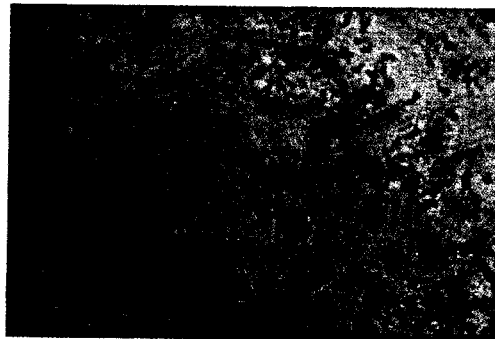


Fig 3. 被完全破壞的草蝦血球。(x400)

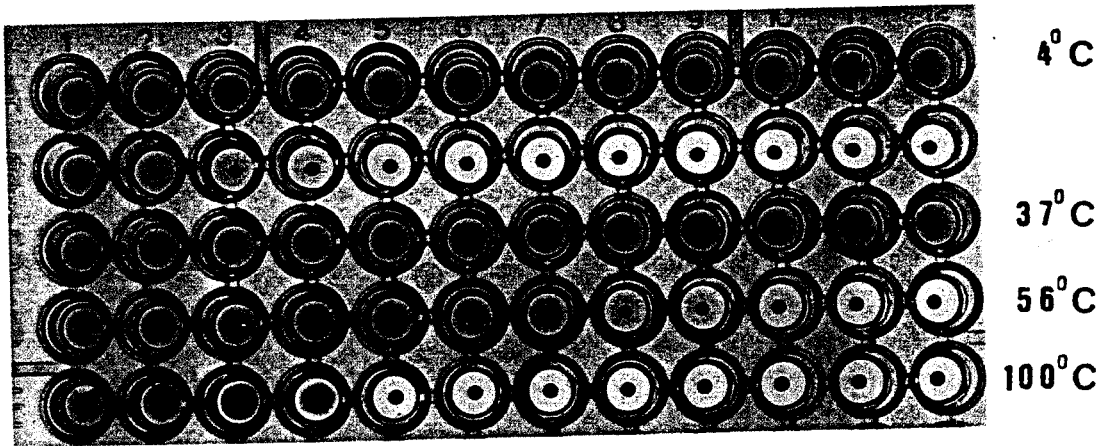


Fig 4. *V. damsela* 細胞外產物經不同溫度處理後對綿羊血的溶血活性。

細胞外產物酵素活性測定

V. damsela 細胞外產物在含酪蛋白 agar 上，無法看到透明環，以 azocasein 測定蛋白質分解酵素，細胞外產物的蛋白質含量為 0.89 mg/ml，1 ml 細胞外產物的蛋白質分解酵素活性為 7.6 units。以 HPA 測定蛋白質分解酵素，吸光值與空白組相若，結果顯示細胞外產物僅含有微弱的蛋白質分解酵素活性。卵磷脂經細胞外產物作用後產生霧狀環，顯示細胞外產物含有磷脂酵素活性。

溶血活性成分之部分純化

細胞外產物由膠過濾層析管柱分離所得分佈圖如 (Fig. 5) 所示。在 280 nm 吸光值下，細胞外產物被分離成兩個主要吸收峰 (G I, G II)。每個收集管經測定溶血性及酵素活性後，得知只有 G I 具有溶血性及磷脂酵素活性。

蛋白質成分分析

將細胞外產物以膠過濾層析法溶出所得溶血性較強的 G I，選擇第 18, 19 管進行 native-PAGE 電泳，結果仍具有 4 條蛋白質帶 (Fig.6)。

溶血因子鑑定

將細胞外產物與部分純化毒素在 native-PAGE 電泳後，進行溶血壓片，結果只有細胞外產物在綿羊血血液平板上產生兩條溶血帶 (Fig. 7b)。用來壓片的電泳膠片以

Coomassie blue 染色後，可在相對位置看到兩個藍色團 (Fig. 7a)。部分純化毒素可能由於濃度太低無法產生明顯溶血帶 (Fig. 7b)。

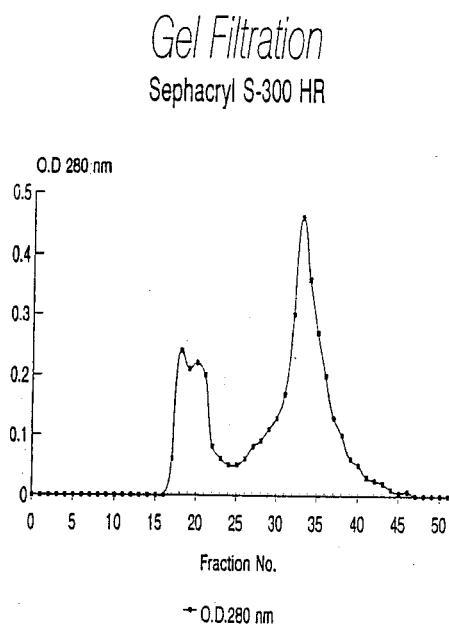


Fig 5. *V. damsela* 細胞外產物經膠過濾層析圖。

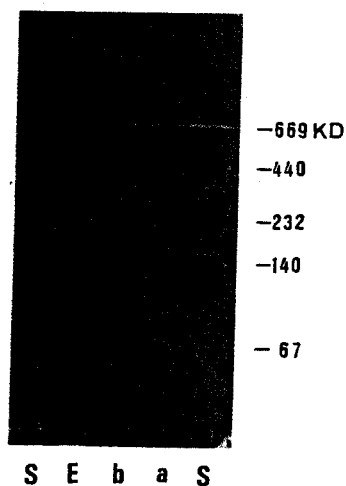


Fig 6. Native-PAGE, silver stain, *V. damsela* 細胞外產物經膠過濾層析 G I 第 19 管 (lane a)、G I 第 18 管 (lane b)，S 為 HMW 標準蛋白 (lane S)，E 為細胞外產物 (lane E)

部分純化毒素分子量估算

以 Calibration kit proteins 經膠過濾層析後其分布圖如 Fig 8，根據所得結果畫出 Calibration curve，部分純化毒素經由膠過濾層析法可得知其在 native 狀態分子量約為 800 KD (Fig. 9)。

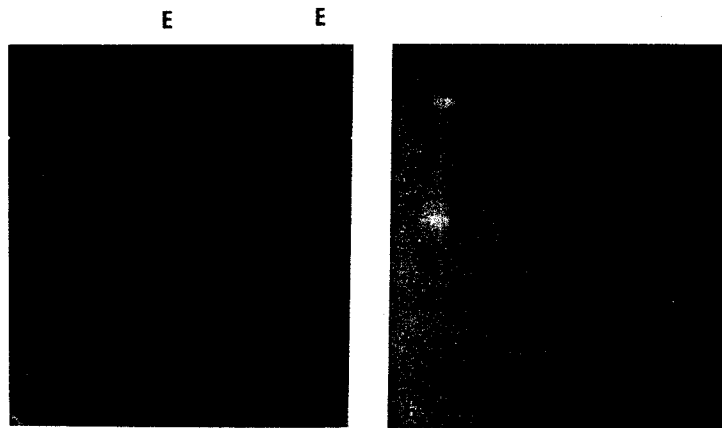


Fig 7a. 覆蓋至血液平板的電泳膠片 lane E 為細胞外產物，膠片以 Coomassie blue 染色。 7b. 綿羊血血液平板。

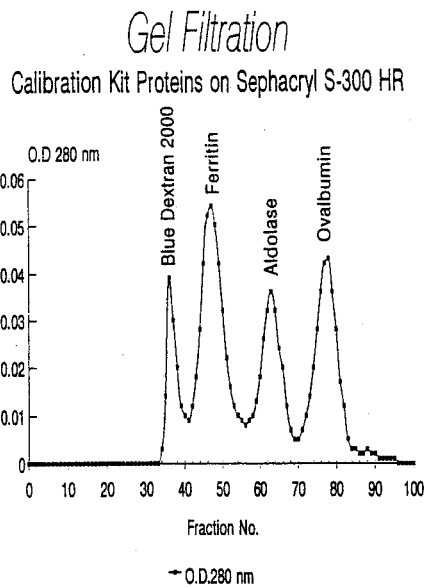


Fig 8 標準蛋白經膠過濾層析圖，calibration kit proteins 含有 blue dextran 2000, ferritin (440 KD), aldolase (158 KD), ovalbumin (43 KD)。

草蝦弧菌之致病性研究

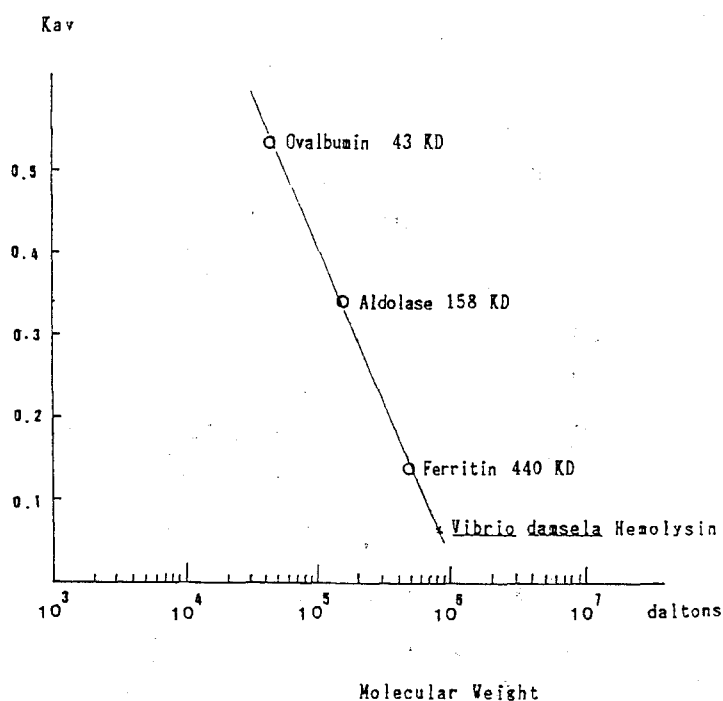


Fig 9. The calibration curve for molecular weight determination using gel filtration.

毒性試驗

活菌對草蝦的最小致死量為 4.96×10^5 CFU/g 蝦體重。細胞外產物對草蝦的最小致死量為 $0.53 \mu\text{g protein/g}$ 蝦體重，對斑節蝦為 $9.21 \mu\text{g protein/g}$ 蝦體重。部分純化毒素 G I 第 18 管能使斑節蝦迅速致死 (Table 1)。

Table 1. Lethal tests of partially purified toxin. *Penaeus japonicus*, 10-15 g, were injected intramuscularly with 0.1 ml sample.

Sample	injection dose ($\mu\text{g/g}$ prawn)	No. killed/ total no.	mortality
G I 18	1.73	5/6	83%
33	3.36	2/6	33%
PBS	-	0/6	0%

討 論

由於本實驗乃針對 *V. damsela* 細胞外產物對草蝦的致病性作研究，因此有必要就細胞外產物中的成分對草蝦造成何種傷害進行了解。草蝦的細胞培養至今尚未有所突破，所以嚐試以蝦血球為指標作溶血性試驗。因蝦血球不像紅血球般有血紅素，在被破壞產生溶血時不能立即判斷，因此在本研究中以 trypan blue 為染劑，利用在蝦血球完整時染劑無法進入的性質，來判定溶血成分對蝦血球的溶血性。由於蝦血球很脆弱，在蝦血球離開蝦體後極易迅速破裂凝集，所以需使用有效的抗凝血劑。一般抗凝血劑的原理是將促進凝集的 Ca^{++} 螯合，以防止血淋巴凝集，但若要維持血球的完整性，則可能尚需解決滲透壓問題。Martin 等人 (1991) 測試了八種抗凝血劑，其中以 N-ethylmaleimide (NEM) 效果最好，不僅能防止 Ridgeback prawns (*Sicyonia ingentis*) 血球的破裂且能維持其原來形態，但應用於草蝦血球測試時則沒有此效果，Oyster Tris buffer 亦是如此 (Lee et al., 1994)。只有 Soderhall 等人 (1983) 使用於 shore crab (*Carcinus maenas*) 的抗凝血劑能防止 95% 以上的血球破裂，但由於採用估算方式計算血球破裂率誤差較大，且需考慮部分純化毒素的滲透壓問題。因此，不適於作為細胞外產物純化步驟上的判定指標，只用來證明 *V. damsela* 的細胞外產物對草蝦血球有溶血性，因此在純化毒素步驟上還是以方便取得且易觀察的綿羊紅血球作溶血指標。

細胞外產物經 4 組溫度處理結果顯示，在 56°C 時溶血性明顯下降，證實其具熱不安定性。但在 100°C 處理組所產生的不同形態溶血，或許是具有較耐熱的成分所造成的。Fouz 等人 (1992) 指出 *V. damsela* 菌株細胞外產物中含有脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS)，且含有 LPS 的細胞外產物被認為有較好的耐熱性 (Chart and Trust, 1984; Evelyn, 1984; Lee and Ellis, 1990)，因此在本研究中細胞外產物經 100 °C 加熱所產生的不同形態溶血現象是否係因 LPS 的影響所致，尚待進一步證實。

細胞外產物酵素活性測定僅具有微弱的蛋白質分解酵素活性，但蔣 (1991) 以及 Song (1993) 則指出 *V. damsela* 菌株卻皆含較強的蛋白質分解酵素活性，或許係由於菌株間的差異及使用的培養條件不同所致。此外細胞外產物以及部分純化毒素皆含有磷脂酵素活性，由於具溶血活性之革蘭氏陰性病原菌，其外毒素中的溶血因子以破壞細胞膜磷脂的水解酵素為主 (Linder, 1984)，因此本菌株 *V. damsela* 的溶血性可能與磷脂酵素有關。通常這些磷脂酵素對磷脂的特異性以細胞膜外層的磷脂為主，因此若欲了解細胞外產物對草蝦血球細胞膜如何造成破壞，有必要深入去了解蝦血球細胞膜的磷脂成分。Kreger (1984) 以部分純化毒素對 16 種動物紅血球作溶血活性試驗，結果只有小白鼠和大白鼠的紅血球

較爲敏感，顯示出其溶血性範圍較窄。*V. vulnificus* (Gray and Kreger, 1985) 和 *V. cholerae* biotype El Tor (Honda and Finkelstein, 1979) 的細胞溶解素則具有廣範圍的溶血活性。

本菌株細胞外產物在電泳圖上的蛋白質帶與 Kreger 等人 (1985) 對 *V. damsela* 所做的實驗結果不同，且電泳膠片經與血球平板作用後所顯現的溶血分子亦不同，本菌株的溶血分子爲高分子蛋白質，而 Kreger 等人所純化出之溶血蛋白質分子量只約爲 69 KD。而且本菌株細胞外產物具有兩個溶血因子，泳動較快的分子比泳動較慢的分子具有較強溶血活性，兩者之間是否有相關性，則有待進一步證實。

本實驗以活菌注射草蝦後，在接種部位出現白濁病灶，但注射細胞外產物不論是草蝦或斑節蝦外觀上皆沒有變化，這可能是注射細胞外產物後迅速致死未有明顯病灶產生。以部分純化毒素 (G I 第 18 管) 注射斑節蝦，注射後 5 個小時開始迅速死亡，至 24 小時死亡率高達 83%，而較不具毒性的部分 (G II 第 33 管) 死亡率僅 33%，注射 PBS 者則未有死亡發生。由此可知出主要致死因子應位於膠過濾層析的 G I 部分。由於磷脂醇素，溶血活性以及致死性皆位於 G I 部分因此溶血性與致死性之間可能具有相關性。蔣 (1991) 指出 *V. damsela* 比其它弧菌雖具有較高溶血活性，但病原性則較低，因而推論病原致病性不在溶血活性。但 Kreger 等 (1985) 所純化出來的 *V. damsela* 細胞溶解素具有溶血活性，且證明其爲致死因子。因此 *V. damsela* (VD1) 溶血活性是否確爲致死因子仍待將此毒素進一步純化來加以證實。

誌 謝

本研究承蒙農委會資助研究經費 (82 科技-2.11-漁-05 (16))，特申謝忱；又於實驗期間，承蒙臺大動物系陳秀男教授研究室提供菌種，謹此致謝。

參 考 文 獻

- 蔣先沖。(1991)。四種弧菌對養殖草蝦及斑節蝦之致病性研究，國立臺灣大學漁業科學研究所，碩士論文。74pp.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

- Chart, H. and Trust, T. J. (1984) Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Can. J. Microbiol.* 30:703-710.
- Evelyn, T. P. T. (1984) Immunization against pathogenic vibrios. In: De Kindelin, P.(ed.), *Symposium on Fish Vaccination*. Paris, Office International des Epizooties, p.121-150.
- Fouz, B., Larsin, J. L., Nielsen, B., Barja, J. J. and Toranzo, A. E. (1992) Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. *Dis. Aquat. Org.* 12: 155-166.
- Fouz, B., Larsen, J. L. and Toranzo, A. E. (1991) *Vibrio damsela* as a pathogenic agent causing mortalities in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 11:80-81.
- Fujioka, S. R., Greco, S. B., Cates, M. B. and Schroeder, J. P. 1988 *Vibrio damsela* from wounds in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Dis. Aquat. Org.* 4:1-8.
- Gray, L. D. and Kreger, A. S. (1985) Purification and characterization of an extracellular cytotoxin produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 48: 62-72.
- Honda, T. and Finkelstein, R. A. (1979) Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio cholerae* biotype El Tor: Another toxic substance produced by cholera Vibrios. *Infect. Immun.* 26: 1020-1027.
- Kothary, M. H., and Kreger, A. S. (1985) Purification and characterization of an extracellular cytotoxin produced by *Vibrio damsela*. *Infect. Immun.* 49: 25-31.
- Kreger, A. S. (1984) Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. *Infect. Immun.* 44: 326-331.
- Lee, K. K., Chen, F. R. and Liu, P. C. (1994) A novel haemocytolytic assay for tiger prawn, *Penaeus monodon* (submitted)
- Lee, K. K. and Ellis, A. E. (1990) Glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytotoxin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *J. Bacteriol.* 172:5382-5393.

- Linder, R. (1984) Alteration of mammalian membranes by the cooperative and antagonistic actions of bacterial proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 779:423-435.
- Love, M., Teebken-Fisher, D., Hose, J. E., Farmer III, J. J., Hickman, F. W. and Fanning, G. R. (1981) *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish (*Chromis pumctipinnis*). *Science* 214: 1139-1140.
- Martin, G. M., Hose, J. E., Omori, S., Chong, C., Hoodbhoy, T. and McKrell N. (1991) Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol.* 3: 517-522.
- Nieto, T. P., Santos, Y., Rodriguez, L. A. and Ellis, A. E. (1991) An extracellular acetylcholinesterase produced by *Aeromonas hydrophila* is a major lethal toxin for fish. *Microb. Pathogen.* 11:101-110.
- Obendorf, D.L., Carson, J., and McManus, T. j. (1987) *Vibrio damsela* infection in a stranded leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *J. Wildl. Dis.* 23: 666-668.
- Rodrigues, D. D. P., and Hofer, E. (1987) *Vibrio* species from the water-oyster ecosystem of Sepetiba Bay in Rioo de Janeiro State Brazil. *Rev. Microbiol.* 71: 332-338.
- Soderhall, K. and Smith, V. J. (1983) Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* 7: 229-239.
- Song, Y. L., Cheng, W. and Wang C. H. (1993) Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. *J. Invert. Pathol.* 61: 24-31.

Studies on the Pathogenicity of *Vibrio damsela* Isolated from Diseased Tiger Prawn (*Penaeus monodon*)

Lee, Kuo-Kau Ferng-Ruey Chen

Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University

This study describes the characteristics and toxicities of extracellular products (ECP) produced by *Vibrio damsela* (VD1 strain) isolated from diseased tiger prawn (*Penaeus monodon*). The VD1 strain was pathogenic to tiger prawn after intramuscular (i.m.) injection, and the minimum lethal dose was 4.96×10^5 CFU/g body weight. The minimum lethal doses of ECP in tiger prawn and kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) were 0.53 and 9.21 ug protein/g body weight, respectively. These results suggested that tiger prawn was more susceptible to the ECP of VD1 strain than kuruma prawn. ECP was cytolytic when incubated with sheep red blood cells and tiger prawn hemocytes. The hemocytolytic activity of ECP was 71.7 hemocytolytic units/mg protein after incubation with tiger prawn hemocytes which being withdrawn in a modified citrate/EDTA buffer and furtherly stained with trypan blue. Phospholipase and weak protease activities could also be detected in the ECP.

A partially purified fraction (GI fraction) seperated by gel filtration in liquid chromatography possessed toxic, hemolytic and phospholipase activities. This fraction contained 4 bands in native-PAGE stained with silver kits. GI fraction was lethal to kuruma prawn after i.m. injection with a dose of 1.73 mg/g prawn. Opaueness of muscle was observed on the sites i.m. injected with bacterial suspension rather than those injected with ECP, and GI fraction.