

虱目魚越冬期間細菌疾病研究——初步報告

黃 銀 河

Preliminary Report of the Studies on Bacterial Disease of Milkfish,
Chanos Chanos During Winter

Yn-Her HUANG

The epidemic "Red-spot disease" which breaks out heavily among milkfish, *Chanos chanos* (Forsk.) during winter is described. The causative organism was found to be a Gram-negative, motile, curved rod bacterium. On the basis of biochemical characteristics, it was identified as *Vibrio anguillarum*. The organism grew well in the culture media containing 1~7% NaCl. The isolated strains were highly sensitive to chloramphenicol and tetracycline.

一、前 言

虱目魚是臺灣養殖漁業的重要種類之一，因屬熱帶魚類，不耐寒冷，爲了增加生產，其魚苗必須越冬。十五年來，此型越冬溝內魚苗死亡率平均達 15%⁽¹⁾。民國 64 年越冬期間，寒流來襲，加上細菌感染，越冬魚苗死亡率達 70% 以上。本研究的目的乃在探討引起越冬魚苗死亡的細菌性疾病，進而尋求有效的預防和治療方法。

二、材料與方法

病魚爲民國 64 年 11 月至 65 年 2 月間，在省水產試驗所臺南分所上鯤鯪及曾文海埔地兩處越冬溝採集得到。病魚的特徵爲食慾喪失，行爲恍惚，脫離羣體單獨游上寒冷的水面。鰓基部充血，體表皮膚或肌肉組織出血，逐漸形成潰瘍、肛門紅腫、充血（如 Fig. 1）。解剖病魚可發現肝、胰臟有充血現象，腸略腫大。

取得的病魚，先以消毒棉花擦拭體表，然後以滅菌過的解剖儀器和白金耳分別自魚體外表患部、鰓部、肝臟、胰臟、腎臟及腸等處取一小塊組織，接種於含 3% NaCl 的普通寒天平板培養基，如 Table 1 所示，置於 21°C 下，經 24 小時培養。檢取培養基上形態不同的菌落，接種於斜面培養基上保存，以供病原性，生化學特性及抗藥性等試驗之用。

耐鹽性試驗 (Test of NaCl tolerance)：經 24 小時培養之分離菌接種於含不同濃度 NaCl (0%, 1%, 3%, 5%, 7%, 9%) 之 1% peptone water (pH 7.0~7.2) 中，然後置於 21°C 中培養 48 小時，以肉眼觀察是否有接種菌繁殖。

病原性試驗 (Test of pathogenicity)：取於 21°C 經 24 小時培養之菌落於滅菌過之生理食鹽水 (NaCl 0.85%) 中，使成菌之懸浮液，而以每 100 g 魚體重接種 1 mg 濕菌重之比例，以肌肉接種之方式，將菌懸浮液注射入虱目魚苗之背肌肉中，並以生理食鹽水代替菌懸浮液，同法處理做爲對照羣

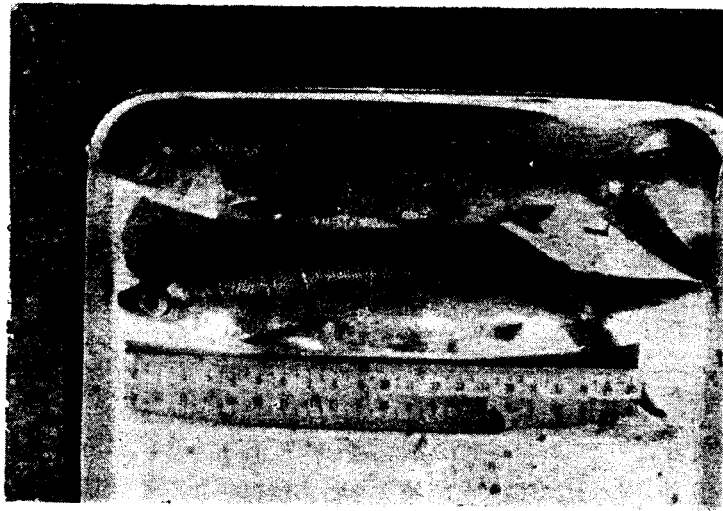


Fig. 1: Diseased Milkfish

。虱目魚苗經接種後放置於 13°C 水溫的水槽（水取自越冬溝）中，充分打氣，每天記錄接種魚之病情發展。試驗期間不給餌，不換水，觀察時間為 7 天。

藥物感受性試驗 (Test of drug sensitivity)：取一滴於 21°C，經 24 小時培養的菌培養液均勻接種於含 3% NaCl 的普通寒天培養基上，然後將 Sensitivity disc (美國 DIFCO) 置於此培養基上，於 21°C 經 24 小時培養後，檢定細菌對各藥物的抗性。

Table 1. Formula of Medium used for isolating Path. Bacteria of milkfish, *Chanos chanos* (Forsk.)

Polypeptone	15 g
Beef exrtact	7.5 g
NaCl	30 g
H ₂ O	1000 ml
pH	7.2
Agar	15 g (for plate or slant)
if absent	broth.

三、結 果

由病魚之患部、肝臟、腎臟、胰臟及腸中可分離出一種 Gram stain 陰性，大小為 1~1.5 μ × 0.5 μ 之短桿菌，略呈弧形，具端單鞭毛，有運動性，經較長時間之培養漸失弧形而呈短桿狀。於 21°C 在含 3% NaCl 的普通寒天培養基上，經 24 小時培養的菌落為淡黃色。於培養液（如 Table I 所示，不含 Agar）中，呈混濁狀，有少許沉澱，肉眼觀察之發育溫度為 5~35°C，發育鹽度為 1~7%。其他各種生化學特性及醣類之分解利用如 Table 2 和 3 所示；即本菌 gas 之產生為陰性，Cytochrome oxidase 之感受性及 Vibriostatic agent 之反應為陽性，對葡萄糖具有利用性，但對乳糖不具有利用性。除此以外，V-P Test 和 M-R Test 均為陰性，不產生 H₂S、對 Agrinine Dihydrolase、Lysine Decarboxylase 和 Ornithine Decarboxylase 之反應均為陰性。

病原性試驗：供試虱目魚受到上述分離菌攻擊時，皆在 3 天內死亡。且病徵與天然罹病虱目魚苗之症狀相似；即先在接種部位出現紅腫，紅腫逐漸擴大發展成潰瘍，肝臟、腎臟、腸呈現出血性炎症。

Table 2. Biochemical characteristics of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased milkfish, *Chanos chanos* (Forsk.) during winter.

Test	Result	Test	Result
Gram stain	—	Voges-Proskauer	—
Gas from carbohydrate	—	Methyl Red	—
Cytochrome oxidase	+	2, 3-butanediol	+
Sensitivity of O/129 (vibriostatic agent)	+	Production of H ₂ S	—
Catalase	+	Starch Hydrolysis	+
Nitrate reduction	—	Inhibit by Novobiocin	+
Gelatin liquefaction	+	Arginine Dihydrolase	—
Indole	+	Lysine Decarboxylase	—
		Ornithine Decarboxylase	—

+ : Positive, — : Negative.

Table 3. Utilization of carbohydrates of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased milkfish, *Chanos chanos* (Forsk.) during winter.

Carbohydrates	Result	Carbohydrates	Result
Glucose	+	Raffinose	-
Lactose	-	L-Rhamnose	-
L(+)-Arabinose	+	Sucrose	+
Inositol	-	Mannitol	+
Maltose	+	Starch	+
D-Mannose	+	Xylose	-

+: Positive, -: Negative.

藥物感受性試驗：由 Table 4 所示，此菌對 Penicillin 及 Oleandomycin 之感受性很低，Kanamycin 及 Novobiocin 次之，對 Chloramphenicol、Tetracycline 之感受性最高。

Table 4. Sensitivity of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased milkfish, *Chanos chanos* (Forsk.) to antibacterial agents.

Drug	Sensitivity	Drug	Sensitivity
Penicillin	-	Kanamycin	+
Oleandomycin	-	Novobiocin	+
Tetracycline	卅	Chloramphenicol	卅

+: Positive, -: Negative, 卅: High sensitivity.

四、討 論

Bergey's manual 第八版⁽²⁾所列出 *Vibrio* 屬菌之特徵為 Gram stain 陰性、端單鞭毛，對 0/129 的感受性為陽性，Oxidase 反應為陽性，碳水化合物之代謝為發酵性，不產生氣體。第八版中並指出對魚類具有病原性之 *Vibrio* 屬菌為 *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*、*V. piscium*。本分離菌依 Bergey's manual 第八版之分類應為 *Vibrio anguillarum*。

本菌與郭上卿等 (1976)⁽³⁾ 於淡水養殖香魚的病魚身上所分離出的 *Vibrio anguillarum* 除了發育鹽度稍有不同以外，其他各項特徵皆一致。本菌在含 7% NaCl 之培養液中仍能繁殖，應視為室賀 (1973)⁽⁴⁾ 等所指摘之海水菌株。

Vibrio anguillarum 為海產魚類常見的病原菌⁽⁵⁾。然而養殖虱目魚感染此菌不僅在國內為首次發現，在國外報告亦未曾發表過。

本菌存在於有機質多的泥中，適溫時浮游在海水中，特別是發病的池水中⁽²⁾。其感染的方式可能經由表皮或口⁽⁶⁾。本省虱目魚進入越冬溝時，常因驅趕或圍捕而使魚體受傷；進入越冬溝時，又因饑餓，營養不良及其他不良環境，如褐水⁽⁷⁾或高放養密度^(8,9)等，使魚體自身的生理機能減弱，極易受到魚虱 *Argulus japonicus* (Thiele) 侵襲^(9,10)，造成傷口，加速招致本菌的感染。

林晃生 (1969)⁽¹¹⁾ 指出虱目魚的致死低溫為 8.5°C 以下，9.5~11°C 時呈現昏迷狀態，11~13°C 時只有瞬間運動而已。陳弘成等 (1972)⁽¹⁾ 亦指出低溫為虱目魚苗致死的主要因素。根據現場記錄，民國 64 年冬季寒流來襲時，越冬溝的水溫曾多次低降至 10°C 以下，不用說，魚體的生理機能必然大減；且由筆者現場調查民國 64 年冬季，越冬溝的死亡虱目魚多數都出現鰭基部充血，體表皮膚或

肌肉組織出血，逐漸形成潰瘍、肛門紅腫、充血之症狀，即為受本菌感染引起之症狀。因此，筆者認為低溫加上本菌感染是越冬虱目魚苗大量死亡的主要原因。

依筆者觀察，本省越冬虱目魚苗受 *Vibrio anguillarum* 攻擊而造成死亡的水溫為 10~15°C 之間，至於為何不在越冬期間，虱目魚就不會受到本菌感染而呈現病徵或死亡？此項原因尚在研究中。

一般而言，預防工作要比治療來得有效。故越冬之前越冬溝污泥的清除，水路和飼育池用石灰消毒，以殺蟲劑驅除魚虱，適當的放養密度 (1.3 kg/m³)⁽⁶⁾。魚進入越冬溝時應避免使魚體受傷。越冬期間水質管理、飼育、越冬溝保溫能力的改進，越冬後期防止底質老化等減少被本菌感染的措施極為重要。

五、摘 要

造成本省南部虱目魚越冬魚苗大量死亡的紅斑病，由罹病魚分離出一種 Gram stain 陰性，有運動性，大小為 1~1.5 μ × 0.5 μ 之短桿菌，略呈弧形。由該菌之形態、生化學特性及對醣類利用特性鑑定為 *Vibrio anguillarum*。本菌的肉眼觀察之發育溫度及耐鹽度分別為 5~35°C 及 1~7%，對 chloramphenicol 及 tetracycline 具有高感受性。病原性試驗顯示本菌對虱目魚苗具有強的病原性，由接種魚出現的症狀可推斷本菌為造成虱目魚苗大量死亡的紅斑病之病原菌。

六、謝 辭

本文研究期間承郭光雄教授、鍾虎雲老師和臺大魚病室徐大全、郭上卿兩位研究生的懇切指導，黃主任仲嘉、農復會陳顧問同白、漁業組副組長壯狄、水產試驗所鄧所長火土、臺南分所黃分所長丁郎、陳代分所長世欽的鼓勵以及臺南分所全體同仁的從旁協助，提供資料，因是有成，特誌於此，以表謝忱。

七、參 考 文 獻

1. CHEN, H. C. and C. Y. LIU (1972). Ecological study of milkfish wintering pond. JCRR Fisheries Series No. 12: 35-49.
2. BREED, R. S., E. G. MURRAY, and N. R. SMITH (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Williams & Wilkins Co. Baltimore. 1094 pp.
3. 郭上卿、鍾虎雲、郭光雄 (1976). 淡水養殖香魚之 *Vibrio* 病原菌 *Vibrio anguillarum* 之分離，臺灣水產學會刊，4(2): 21-24。
4. 室賀清邦、江草周三 (1973). *Vibrio anguillarum* の性狀に關する考察。魚病研究，8(1): 10-25。
5. Borgstron (1961). Fish as food. Academic Press, New York. 487 pp.
6. 魚病診斷指針 (1975) 日本水產庁編。
7. SHEN, S. L. and Y. M. CHIANG (1972). Studies on the control of brown water in milkfish ponds. JCRR Fisheries Series No. 12: 50-53.
8. TSAI, S. C. H. S. LIN, and K. Y. LIN (1970). Some factors regarding the mortality of milkfish during overwinter period. Aquiculture I(1): 9-30.
9. LIN, S. Y. (1968). Milkfish farming in Taiwan. Taiwan. Fisheries Research Institute, Fish Culture Report No. 3: 57-62.
10. LIN, Y. P. and S. N. CHEN (1972). Some parasites found in pond fishes of Taiwan (1). JCRR Fisheries Series No. 12: 54-61.
11. LIN, H. S. (1969). Some aspects of milkfish ecology. JCRR Fisheries Series No. 7: 68-90.