

## 魚類滑動性細菌之鑑定與病原性之研究

郭上卿·鍾虎雲·郭光雄\*

### Studies on Identification and Pathogenicity of the Gliding Bacteria in Cultured Fishes

Shang-Ching Kuo, Hsu-Yun Chung and Guang-Hsiung Kou\*

#### Abstract

One hundred and twenty five strains of gliding bacteria were isolated mainly from eel with gill disease, branchionephritis and tail rot. Among these specimen, 68 strains were identified as *Flexibacter columnaris*. the others were belonged to genus *Flexibacter*. too, but the species is not yet determined.

The pathogenicity of these bacteria to eel and tilapia were examined. Method and condition for their infection were also studied. Incidence of pathogenic strains was higher in standing water than in flowing water. Infection of virulent strains of gliding bacteria by contact method was more effective than by intraperitoneal inoculation. In comparison, *F. columnaris* was more virulent on eel than on tilapia maintained in flowing water, while a reverse result was observed in *Flexibacter* spp.

#### 緒 言

本省之淡水養殖魚類，全年都有爛鰓、腫鰓或爛尾的病魚出現，雖然隨氣候之變化而有病情輕重之分，但全年為害之程度相當大，同時由病魚之患部常可分離出滑動性細菌（gliding bacteria）。最早 Davis (1922)<sup>(1)</sup> 在溫水性魚類中發現此類細菌，稱之為黏液性細菌（myxobacteria），列入 Myxobacteriales 目下<sup>(2,3)</sup>，其後陸續有人由魚體分離出此菌。直至 1974年 Bergey's manual 第八版<sup>(4)</sup>將之更改，列於 Cytophagales 目中，與 Myxobacteriales 同為滑動性細菌。

目前已知與魚類疾病有關之滑動性細菌均為 Cytophagaceae 科內之 *Cytophaga*, *Flexibacter* 及 *Sporocytophaga* 三屬。Pacha (1968)<sup>(5)</sup> 由冷水魚類之鮭身上分離出 *Cytophaga psychrophila*；Pacha 及 Porter (1967)<sup>(6)</sup> 由淡水魚類之體表分離到 *Cytophaga* spp.。 *Flexibacter columnaris* (*Chondrococcus columnaris*) 是最早被發現，感染最廣的滑動性魚類病原菌，可感染溫水性及冷水性魚類之鰻、泥鰍、鯉、鱒及鮭等<sup>(7-17)</sup>。增村及若林 (1977)<sup>(18)</sup> 由人工育成之幼鰻體表潰爛處亦分離出

\* 國立台灣大學理學院動物系

Department of zoology, College of Science, National Taiwan University

滑動性病原菌，但分離菌僅生長於以海水配製之培養基，爾後，Hikida 等 (1979)<sup>(19)</sup> 將其列為 *Flexibacter* sp.。另，*Sporocytophaga* sp. 可感染飼養於海水中之鮭<sup>(20)</sup>。又，滑動性細菌對魚類之病原性，在 *F. columnaris* 已知有高病原性、次病原性、中病原性及低病原性之分，且與水溫，感染方式及水質等有密切關係<sup>(17, 21-24)</sup>。

著者由鰻、吳郭魚、虹鱒、金魚、香魚、等之體表及體內分離出百餘株滑動性細菌，研究其形態，生理、生化之特性，對魚類之病原性及在分類上之地位，所得之結果，在此提出報告，以供參考。

## 材料與方法

### 一、細菌之分離與鑑定

#### (一) 細菌之分離：

由1979年3月至1980年3月間，至本省中、南部各養殖場採集病魚標本，特別是鰓部不正常及皮膚表面有潰爛者，以 *Cytophaga* 培養基由患部分離細菌。選取菌落有樹枝狀分枝，或具擴散性，邊

Table 1. Sources of 125 strains of gliding bacteria used in morphological, physiological and pathogenic studies.

Group and strain no.	No. of strains		Source of isolation	Location and date
	<i>F. columnaris</i>	<i>F. spp.</i>		
Gill disease				
791207	5	—	gills, eel	Pingtung, Dec. 1979
791208	2	—	gills, eel	Kaohsiung, Dec. 1979
791209	1	4	gills, eel	Pingtung, Dec. 1979
	—	4	gills, skin lesion, tilapia	
800129	—	2	gills, eel	Lukang, Jan. 1979
800209	—	1	gills, tilapia	Taipei, Feb. 1980
800319	—	4	gills, goldfish	Taipei, Mar. 1980
800325	1	5	gills, tilapia	Pingtung, Mar. 1980
Branchionephritis				
790320	2	1	gills, eel	Kaohsiung, Mar. 1979
790412	5	9*	gills, eel	Kaohsiung, April. 1979
790809	4	13	gills, eel	Tainan, Aug. 1979
791207	6	1	gills, kidney, eel	Pingtung, Dec. 1979
Fin rot, gill rot				
790920	15	—	gills, caudal lesion, eel	Lukang, Sept. 1979
791002	13	—	gills, fin lesion, color carp	Taipei, Oct. 1979
791031	3	—	skin lesion, rainbow trout	Chinshan, Oct. 1979
791205	7	—	gills, tail rot, eel	Lukang, Dec. 1979
800325	1	1	gills, eel	Pingtung, Mar. 1980
Edwardsiellosis				
791207	2	1	gills, eel	Pingtung, Dec. 1979
800123	—	4	gills, eel	Pingtung, Jan. 1980
Glugeosis				
800202	—	3	skin lesion, ayu	Luku, Feb. 1980
Red fin disease				
800325	1	4	skin lesion, tilapia	Chupei, Mar. 1980
Total	68	57		

\*: strains lost

緣不規則者，同時以 Hanging drop 方法在顯微鏡下觀察，若為長桿菌，且有滑動性者，則接種於 *Cytophaga* 半固體培養基中備用。共分離得 125 株細菌 (Table 1)，其中 9 株保存不慎死亡，餘下 116 株。

(一)細菌之保存：

所有菌株以兩種方式保存，其一為接種於 *Cytophaga* 半固體培養基內，在 28°C 下培養 3~4 天後之放入冰箱中 (5°~10°C) 保存，兩週後再重新接種於新的培養基。另一為將各菌株種於 *Cytophaga* 平板培養基，在 28°C 下培養 24 小時後，用 10~20% 脫脂牛奶洗下，真空冷凍乾燥後，放入超低溫冷凍箱 (-70°C) 內保存。

(二)細菌之鑑定：

各分離菌先進行對溫度及鹽度之耐性生理試驗 (Bullock, 1972)<sup>(25)</sup>，再依照 Pacha (1968)<sup>(6)</sup> 所列之方法進行各項生化學試驗。微孢子囊 (microcyst) 之誘生則依 Dworkin 及 Gibson (1968)<sup>(26)</sup> 所述之方法。另，同時進行 agar, tryptone 濃度對滑動性細菌之滑動性運動及菌落顏色之影響試驗<sup>(25)</sup>。

## 二、病原性試驗

選取剛分離或真空冷凍乾燥保存之菌株，共 55 株，以供本實驗之用。其中 30 株被鑑定為 *Flexibacter columnaris*，其餘 25 株被鑑定為 *Flexibacter* spp.。*F. columnaris* 之實驗中，10 株之實驗魚是以止水式蓄養，20 株之實驗魚是以流水式蓄養。*F. spp.* 實驗中亦有 5 株的實驗魚是以止水式蓄養，其餘之 20 株的實驗魚是以流水式蓄養。

(一)細菌之培養：

取一白金耳之供試菌接種於 5~10c.c. 之 *Cytophaga* 培養液中，在 28°C 下培養 24 小時後，再轉入 50c.c. 之 *Cytophaga* 培養液，培養 24 小時，此時濃度約為  $3\sim6\times 10^8$  cells/ml，取 1 c.c. 以接種供試魚。用蒸餾水 550c.c. 將餘下之菌液稀釋為 12 倍，此時濃度約為  $3\sim5\times 10^7$  cells/ml，供菌浴法 (contact method, Pacha & Ordal, 1963)<sup>(27)</sup> 感染魚體實驗之用。

(二)感染實驗：

選取外觀健康之鰻及吳郭魚為材料，鰻之體重為 10~20 g，吳郭魚之體重為 5~15 g。

(1)菌浴法：每一菌株之實驗，使用鰻及吳郭魚各 2 尾，將一邊之鰓用刷子磨擦破壞，再放入經稀釋之菌液中浸浴六十分鐘後，移入清水蓄養。對照組實驗為將鰓之一邊經擦傷破壞後，放入經稀釋之 *Cytophaga* 培養液中浸浴六十分鐘，再移入清水中蓄養。

(2)腹腔接種法：每一菌株之實驗僅使用鰻 2 尾，且鰓未經破壞，每 100 g 魚體重經腹腔注射 2c.c. 未經稀釋之菌液。對照組實驗為每 100 g 魚體重經腹腔注射 2 c.c. 之 *Cytophaga* 培養液。

實驗期間為 20 天，在此期間內，不給餌，實驗魚中有一尾死亡，即視為具有病原性。使實驗魚在 24 小時內死亡之菌株，為高病原性菌株 (high virulent strain)。在 24 小時至 96 小時間死亡者，為中病原性菌株 (median virulent strain)。在 96 小時以上才死亡者，為低病原性菌株 (low virulent strain)。在 20 天內不死亡者，則為非病原性菌株 (avirulent strain)。

(三)蓄養方式：

(1)止水式：水箱容量為 10 l，水溫為 17°~18°C 或 27~28°C，實驗期間不換水。

(2)流水式：水槽容量為 4.5 l，水流速度為每小時 1.5~3.6 l，水溫為 20°~26°C。

## 結 果

### 一、細菌之分離與鑑定

(一)細菌之分離：

共分離得 125 株具有滑動性之細菌，68 株為 *F. columnaris*，57 株為 *F. spp.*。其中由罹患爛尾 (tail rot)、爛鰓 (gill rot) 之病鰻 (Fig. 1) 體表潰爛處及鰓，患爛鰭 (fin rot) 之虹鱒、錦鯉之體表潰爛處均可分離到 *F. columnaris*。另，由患鰓病、鰓腎炎 (branchionephritis) (27) 病鰻之鰓 (Fig. 2、4)，患鰓病金魚 (Fig. 3)、吳郭魚之鰓，患孢子虫 (*Glugea sp.*) 症之香魚等之體表潰爛處可分離到 *F. spp.* (Table 1)。

(二)細菌之鑑定：

分離菌依其在 *Cytophaga* 培養基上生長之菌落形態可分為二類。其一之菌落為黃色、表面乾燥且具樹枝狀之分枝 (rhizoid) (Fig. 5)，為 *F. columnaris* (Fish Health section, AFS, 1975) (28)。此菌之大小為  $2 \sim 15 \mu \times 0.5 \mu$  (Fig. 6)，對鹽度之耐性窄，為 1 ~ 0% NaCl，28°C 及 37°C 下均可生長，但在 5°C 下有部分菌株不生長。其剛果紅試驗 (congo red test) 為陽性反應，不利用澱粉，不利用酪氨酸 (tyrosine)，不產生細胞色素氧化酶 (cytochrome oxidase)，但產生觸酶 (catalase)。

另一類之菌落為黃色、表面潮溼、邊緣不規則且有較高之擴散性 (Fig. 7、8)，菌之大小為  $2 \sim 13 \mu \times 0.7 \mu$ ，對鹽度之耐性較寬，為 0 ~ 3% NaCl，在 28°C 下可生長，但在 5°C 或 37°C 下有部分菌株不生長。其剛果紅試驗為陰性反應，利用澱粉，分解酪氨酸，不一定產生細胞色素氧化酶及觸酶 (Table 2、3)。此類細菌依 Bergey's manual 第八版 (1974) 暫定為 *F. spp.*。

Table 2. Comparison of morphological and physiological characteristics of Closely related gliding bacteria isolated from freshwater fishes organisms.

	<i>F. columnaris</i> (This author)	<i>Flexibacter</i> spp. (This author)	<i>Cytophaga</i> (Pacha & Porter, 1968)	myxobacteria (Wakabayashi & Egusa, 1974)	<i>Flexibacter sp.</i> (Hikida et al 1979)
Growth on <i>Cytophaga</i> medium					
Form	dry, disperse rhizoid	moist, disperse irregular	spreading, irregular	spreading, irregular	spreading, irregular
Color	yellow	yellow	yellow-orange	yellow-orange	yellowish-orange
Bell shape	long rod	long rod	long rod	long rod	long rod
Cell size ( $\mu\text{m}$ )	2-15×0.5	2-13×0.7	2-7×0.5	2-5×0.5	2-30×0.5
Gram stain	—	—	—	—	—
Heat tolerance					
Growth at 5°C	d	d	+	+	—
Growth at 28°C	+	+	d	+	+
Growth at 37°C	+	d	d	—	—
NaCl tolerance					
Growth in 0%	+	+	+	+	—
Growth in 0.5%	+	+	d	+	—
Growth in 1%	d	d	d	+	—
Growth in 2%	—	d	d	d	—
Growth in 3%	—	d	d	—	—
Growth in 4%	—	—	—	—	—

+: positive, -: negative, d: diverse,

Table 3. Comparison of biochemical characteristics of closely related gliding bacteria isolated from freshwater fish

	<i>F. columnaris</i> (This author)	<i>Flexibacter</i> spp. (This author)	<i>Cytophaga</i> (Pacha & Porter, 1968)	Myxobacteria (Wakabayashi & Egusa, 1974)	<i>Flexibacter</i> sp. (Hikida et. al 1979)
Production of					
Cytochrome oxidase	—	d	d	d	+
H <sub>2</sub> S	d	d	d	—	—
Indole	—	—	—	—	—
Catalase	+	d	+	+	+
Congo red test	+	—	—	—	+
Hydrolysis of					
Celatin	+	+	+	+	+
Casein	+	+	+	+	+
Starch	—	+	+	+	—
Tribuyrin	—	—	d	—	+
Degradation of					
Cellulose	—	—	—	—	—
Chitin	—	—	d	+	—
Tyrosine	—	+	d	+	+
Esculin	—	d	d	+	—
Nitrate reduction	—	d	d	d	+
Carbohydrate utilization					
Glucose	—	—	d	+	—
Lactose	—	—	d	—	—
Galactose	—	—	d	+	—
Fructose	—	—	—	—	—

+: positive, -: negative, d: diverse.

此二類滑動性細菌在誘發孢子囊之培養液 (Dworkin-Gibson soln) 中, 均無微孢子囊產生, 但培養液中形成許多球狀構造; 經長期培養後再重新種入新鮮之 *Cytophaga* 培養基, 並無菌落長出, 故認為是 *Spheroplast*<sup>(22,29)</sup>, 此現象在 *Cytophaga* 培養液內, 經長期培養亦可出現。

又, 在培養基上, 菌落之擴散性及顏色均受 agar 及 tryptone 二者濃度之影響, 二者之含量愈高, 菌落之擴散性愈小, 且顏色愈深 (Fig. 10、11、12)。

## 二、病原性實驗

55株實驗菌株中, *F. columnaris* 有30株, 均具病原性, 另 25 株 *F. spp.* 實驗菌株中, 19株具有病原性。由瀕臨死亡, 或剛死不久之實驗魚, 均可再分離出原感染菌, 此完全符合 Koch's postulate<sup>(30)</sup>。

由鰻、錦鯉、金魚及吳郭魚等患潰瘍症 (edwardsiellosis)、赤鰭病及其他非鰓病症狀的鰓與體表所分離之 *F. columnaris* 及 *F. spp.* 大部分均不具病原性, 既使具有病原性亦屬低病原性。在19株具病原性之 *F. spp.* 菌株中, 有15株是由患鰓病或鰓腎炎之吳郭魚或鰻之鰓及體表分離出來的。

(-) 不同蓄養方式之差異:

蓄養方式之不同, 對菌株病原性之影響, 不拘病原性之強弱, 而以有無區分, 則可得 (Table 4) 之結果。止水式之所有供試菌株中, 僅鰻之腹腔內接種之一菌株, 對鰻無病原性, 其餘菌株, 無論是

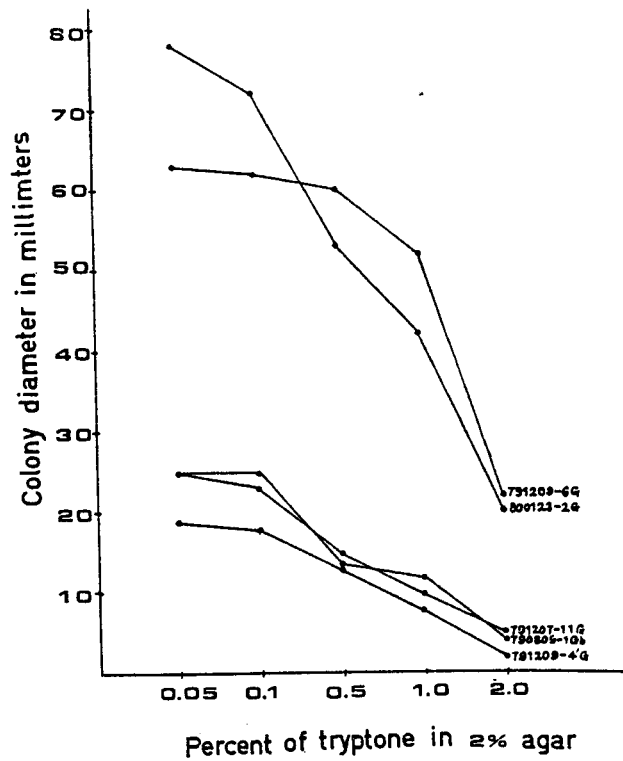


Fig 11. Effect of increasing tryptone concentrations on gliding motility of cultures incubated at 28°C for 5 days.

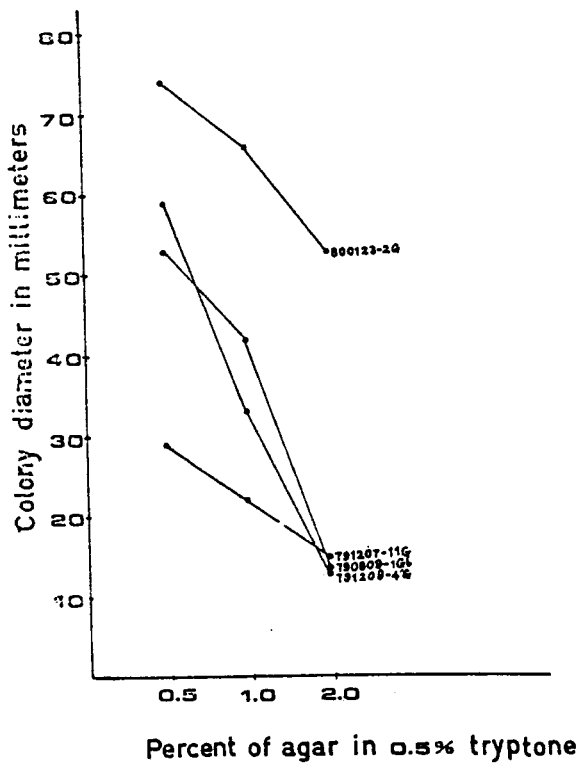


Fig 12. Effect of increasing agar concentrations on gliding motility of cultures incubated at 28°C for 5 days.

Table 4. Percentage of infection of gliding bacteria on eel and tilapia maintained in standing and flowing water.

Methods	Fishes	Standing water		Flowing water	
		<i>F. columnaris</i>	<i>F. spp.</i>	<i>F. columnaris</i>	<i>F. spp.</i>
Contact	Tilapia	100 (10)	100 (5)	71.4 (14)	66.8 (15)
	Eel	100 (9)	100 (5)	90.0 (20)	25.0 (20)
Intraperitoneal inoculation	Eel	90 (10)	100 (5)	60.0 (10)	25.0 (16)

The numbers given within parentheses indicate the mmmbers of strains tested.

*F. columnaris* 或是 *F. spp.* 皆對吳郭魚及鰻具有病原性。另一方面，流水式之供試菌株中，對吳郭魚之菌浴感染實驗而言，*F. columnaris* 病原性菌株之出現率為 71.4%，而 *F. spp.* 之出現率 66.8%，對鰻之菌浴感染及接種感染實驗而言，*F. columnaris* 之病原性菌株出現率分別為 90% 及 60%，而 *F. spp.* 之出現率均僅為 25%。因此不拘任何條件，止水式之病原性菌株出現率皆比流水式高。

(二)不同感染方式之差異。

以鰻為材料，在止水式之菌浴感染實驗中，*F. columnaris* 之菌株有 89% 為高病原性，11% 為中病原性。*F. spp.* 之菌株有 40% 為高病原性，60% 為中病原性。另一方面，接種感染之實驗中，*F. columnaris* 之高病原性菌株為 70%，較前法之結果為低。*F. spp.* 之結果與前法相同 (Table 5)。

Table 5. Infection frequencies of gliding bacteria on eel and tilapia maintained in standig water.

Species	Virulence	Contact method		Intraperitoneal inoculation Eel
		Tilapia	Eel	
<i>F. columnaris</i>	H	60 (10)	89 (9)	70 (10)
	M	40 (10)	11 (9)	10 (10)
	L	0 (10)	0 (9)	10 (10)
	A	0 (10)	0 (9)	10 (10)
<i>F. spp.</i>	H	20 (5)	40 (5)	40 (5)
	M	60 (5)	60 (5)	60 (5)
	L	20 (5)	0 (5)	0 (5)
	A	0 (5)	0 (5)	0 (5)

Abbr: H: high virulence, M: median virulence, L: low virulence, A: avirulence  
The numbers given within parentheses indicate the numbers of strains tested.

流水式之菌浴法感染實驗中，*F. columnaris* 之菌株有 70% 高病原性，20% 為中病原性，5% 為非病原性，而 *F. spp.* 之菌株有 15% 為高病原性，75% 為非病原性。接種感染之實驗，則 *F. columnaris* 之菌株中有 60% 為高病原性，較菌浴法之 70% 為低，同時非病原性菌株之出現率為 30%，較菌浴法之 5% 為高。而 *F. spp.* 之菌株無高病原性菌株出現，非病原性菌株佔 74.9% 與菌浴法之 75% 相較，可謂無差異。由上述之結果，一般而言，菌浴法中高病原性菌株所佔之比例較接種法為高，換言之，菌浴法較易使供試魚感染滑動性細菌 (Table 6)。

Table 6. Infection frequencies of gliding bacteria on eel and tilapia maintained in flowing water.

Species	Virulence	Contact method		Intraperitoneal inoculation Eel
		Tilapia	Eel	
<i>F. columnaris</i>	H	50.0 (14)	70.0 (20)	60.0 (10)
	M	21.4 (14)	20.0 (20)	0 (10)
	L	0 (14)	5.0 (20)	10.0 (10)
	A	28.6 (14)	5.0 (20)	30.0 (10)
<i>F. spp.</i>	H	26.7 (15)	15.0 (20)	0 (16)
	M	13.4 (15)	5.0 (20)	6.3 (16)
	L	26.7 (15)	5.0 (20)	18.8 (16)
	A	33.2 (15)	75.0 (20)	74.9 (16)

Abbr: H: high virulence, M: modian virulence, L: low virulence, A: avirulence  
The numbers given within parentheses indicate the numbers of strains tested.

⊖不同魚種之差異：

感染方式為菌浴法，在止水式之各實驗中，供試菌較易感染鰻。對鰻而言，*F. columnaris* 之菌株有89%為高病原性，11%為中病原性，而*F. spp.*之菌株有40%為高病原性，60%為中病原性。對吳郭魚而言，*F. columnaris* 之菌株有60%為高病原性，40%為中病原性。而*F. spp.*之菌株僅20%為高病原性 Table 5。另一方面，流水式之各實驗中，對鰻而言，*F. columnaris* 之供試菌株中僅5%為非病原性，對吳郭魚而言，則有28.6%之菌株為非病原性。然而*F. spp.*則與*F. columnaris*相反，較易感染吳郭魚。對鰻而言，有75%之菌株為非病原性，對吳郭魚而言則僅33.2%之菌株為非病原性 (Table 6)。

## 討 論

Bergey's manual 第八版 (1974) 將滑動性細菌分為二目 Myxobacteriales 及 Cytophagales，其區分為前者會產生微孢子囊 (microcyst) 及子實體 (fruiting body)，後者則不一定產生微孢子囊，且不產生子實體。Cytophagales 目中分為四科，僅 Cytophagaceae 科之菌株會產生胡蘿蔔之色素 (carotenoid pigment)，即細菌塊 (cell masses) 呈黃色、橙色或紅色，著者所分離之125株滑動性細菌之菌落均呈黃色，且不產生子實體，故可列入 Cytophagaceae 科中。因菌落為黃色，表面乾燥且具樹枝狀分枝，依 Shotts & Bullock (1975)<sup>(31)</sup> 及 Fish Health Section (AFS, 1975)<sup>(28)</sup> 記載之分類基準，125株分離菌中，有68株可鑑定為*F. columnaris*。另一方面，依 Bergey's manual 第八版之記載，Cytophagaceae 科中有四屬，其中三屬不會產生微孢子囊，即不分解 agar, cellulose 及 chitin，細胞外無鞘 (sheath) 之 *Flexibacter* 屬，不分解 agar 及 chitin，可能分解 cellulose，細胞外有鞘之 *Herpetosiphon* 屬，以及會分解 agar 或 cellulose 或 chitin，細胞外無鞘之 *Cytophaga* 屬。其他之57株分離菌之菌落為黃色，表面潮溼，邊緣不規則且有較高之擴散性，均不產生微孢子囊，且不分解 agar, cellulose 及 chitin，故應列入 *Flexibacter* 屬中，但異於 *F. columnaris*。因 *F. columnaris* 之剛果試驗為陽性反應，不利用澱粉及酪氨酸，此57株分離菌之剛果紅試驗則為陰性反應，且利用澱粉及酪氨酸，同時 Bergey's manual 第八版所列 *Flexibacter* 屬中，僅 *F. columnaris* 為魚類之病原菌。另 Pacha 及 Porter (1968)<sup>(6)</sup> 由淡水魚體表分離出之 myxobacteria



(gliding bacteria)，因不產生孢子囊及子實體，且可分解 Chitin，而將之列入 *Cytophaga* 屬，符合 Bergey's manual 第八版所記載之分類基準。Wakabayashi 及 Egusa (1974)<sup>(34)</sup> 認為其由患鰓腎炎之鰻及爛尾之鯉身上分離出之 myxobacteria 與 Bullock (1972)<sup>(25)</sup> 由鮭身上分離出之 myxobacteria 相似，但並未予以歸屬。因其所有菌株均可分解 Chitin，依 Bergey's manual 之記載，似應可列入 *Cytophaga*。又，Hikida 等 (1979)<sup>(19)</sup> 由幼鯛身上分離出之滑動性細菌，僅在含海水之培養基中才能生長，但因不產生子實體及微孢子囊，不分解 agar, cellulose，液化 gelatin，菌落為黃色等特性<sup>(32,33)</sup>，而將其列為 *Flexibacter*。著者所分離之 57 株 *Flexibacter* spp. 與 Pacha & Porter (1968)<sup>(6)</sup> 及 Wakabayashi & Egusa (1974)<sup>(34)</sup> 所分離之菌株最明顯之差異，在於前者不分解 Chitin，後二者則均分解 Chitin，同時依 Bergey's manual 之分類基準，實無法鑑定其種別，故暫列為 *Flexibacter* spp.，有關其分類上的確實位置，實有待進一步之究明。

125 株滑動性細菌均分離自病魚之鰓部或體表，其中僅一株 *F. columnaris* 及一株 *Flexibacter* spp. 分離自患鰓腎炎病鰻之腎臟。畑井及保科 (1971)<sup>(13)</sup>，徐及郭 (1977)<sup>(16)</sup> 均認為 *F. columnaris* 無法由內臟分離到。但 Johnson 及 Brice (1952)<sup>(3)</sup> 由患 columnaris disease 之鮭、鱒的腎臟、血液分離出 *F. columnaris*。Ajmal 及 Hobbs (1967)<sup>(35)</sup> 亦由患 columnaris disease 之泥鰍、鱸魚的肝臟、腎臟分離到 *F. columnaris*。若林等 (1970)<sup>(12)</sup> 由患鰓病之病鰻的腎臟亦分離到 *F. columnaris*。本研究之感染實驗中，被感染之鰻，不論是以注射或接觸法感染，常可自腹腔分離到原感染菌，因此本菌感染魚體體內臟器之可能性，不可謂絕對是不可能。

Snieszko (1964)<sup>(36)</sup> 認為引起 columnaris disease 或鰓病之 myxobacteria 為一種魚類條件性病原菌 (facultative fish pathogen)，即魚體之內外條件在正常的情況下，本菌只是一種腐生菌 (saprophyte)。當魚體受到水溫、污染或其他不適之環境壓力 (stress) 時，本菌才變成病原菌，即對魚體具有感染之能力。又，Pacha 及 Porter (1968)<sup>(6)</sup> 認為由淡水魚體表所分離到之非病原菌 *Cytophaga* spp. 為附於魚體表面之腐生菌。Bullock (1972)<sup>(25)</sup> 指出水中之 myxobacteria 除 *F. columnaris* 及 *Cytophaga psychrophila* 外，均為機會性病原菌 (opportunistic pathogen)，只在魚體受到惡劣環境或其他因子的壓力，才能感染魚體，使其致病。此可能說明本研究之部分菌株為何在不同的感染方式或不同的魚種下，表現出不同程度病原性的原因。另，Bullock (1972)<sup>(25)</sup> 以幼鮭為材料，進行 myxobacteria 之感染實驗，認為水流速度降低對魚而言是一種壓力。Fry (1969)<sup>(37)</sup> 提出在富營養 (eutrophic) 湖中，氧氣含量降低會對魚體造成壓力。Collins (1970)<sup>(38)</sup> 指出富營養的結果增加了細菌的種類，其中包括了魚類的病原菌，因此引起疾病，而貧營養 (oligotrophic) 湖則無此現象，並認為 myxobacteria 可為淡水湖中營養物增加的指標，同時指出 columnaris disease 在富營養湖中經常會突然發生。本感染實驗中，止水式之蓄養，頗似富營養湖之情況，溶氧低，有機質高，細菌量高，對魚體言為一壓力，此可說明本實驗之病原性菌株在止水蓄養中，出現之比例較流水式為高的結果。

徐及郭 (1977)<sup>(16)</sup> 用 *F. columnaris* 以腹腔接種、肌肉接種及菌浴法感染鰻、泥鰍、鯉魚及鮑魚，結果顯示菌浴法有較高之死亡率，且無法致使鰻感染本菌，但其實驗魚之鰓部未經任何處理。本實驗中，對鰻魚言，以菌浴法感染，供試菌株中出現病原性之菌株佔相當高之比例，此可能本實驗之供試魚的鰓部有經破壞之緣故。Pacha 及 Ordal (1970)<sup>(32)</sup> 提出高病原性菌株以菌浴法進行人工感染實驗，較腹腔或肌肉接種法易使魚體致病，此點與本研究之結果頗為一致。

## 摘 要

由 1979 年 3 月至 1980 年 3 月間，自本省各養殖場採得滑動性細菌 125 株，其中 68 株為 *Flexibacter columnaris*。其他之 57 株分離菌依其形態、生理及生化之特性，僅能鑑定為 *Flexibacter*，而無法確

定其種別。

人工感染結果顯示，在止水式環境中，供試菌之病原性菌株之出現率較流水式蓄養下者為高。另對鰻魚而言，菌浴法較腹腔接種法易使魚體感染滑動性細菌。流水式之菌浴感染實驗中，*F. columnaris* 較易感染鰻魚，*F. spp.* 則較易感染吳郭魚。

## 謝 辭

本研究承國科會之經費支持，實驗工作得魚病研究室諸位同仁之協助，以及臺灣大學動物系黃仲嘉教授之指正，謹此致謝。

## 參 考 文 獻

1. Davis, H. S. (1922). A new bacterial disease of freshwater fishes. U. S. Bur. Fish. Bull. 38: 261-280.
2. Ordal, E. J., and R. R. Rucker (1944). Pathogenic myxobacteria. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 56: 15-18.
3. Breed, R. S., E. G. M. Muray and N. R. Smith (1957). Bergey's manual of determinative bacteriology, 7th ed. Williams and Wilkins. Baltimore, Md.
4. Buchanan, R. E., and N. E. Gibbons (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Williams and Wilkins. Baltimore, Md.
5. Pacha, R. E. (1968). Characteristics of *Cytophaga psychrophila* (Brog) isolated during outbreaks of bacterial cold-water disease. Appl. Microbiol. 16 (1): 97-101.
6. Pacha, R. D., and S. Porter (1968). Characteristics of myxobacteria isolated from the surface of freshwater fish. Appl. Microbiol. 16 (12): 1901-1906.
7. Garnjobst, L. (1944). *Cytophaga columnaris* (Davis) in pure culture a myxobacterium pathogenic to fish. J. Bacteriol. 49: 113-128.
8. Johnson, H. E., and R. F. Brice (1952). Observations of columnaris in salmon and trout. Prog. Fish. Cult. 14: 104-109.
9. 若林久嗣、江草周三 (1966). ドシヨウから分離された病原性粘液細菌 *Chondrococcus columnaris* の性状。Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 32 (12); 1015-1022.
10. Pacha, R. E., and E. J. Ordal (1967). Histopathology of experimental columnaris disease in young salmon. J. Comp. Path. 77: 419-423.
11. Fujihara, M, P., and F. P. Hungate (1971). *Chondrococcus columnaris* disease of fishes: Influence of columnaris river fish ladders. J. Fish. Res. Board Can. 28 (4): 533-536.
12. 若林久嗣、吉良桂子、江草周三 (1970). 養殖ウナギ *Chondrococcus columnaris* 感染症に関する研究—I 養殖ウナギから分離された *C. columnaris* の細菌學の性状と病原性。Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 36: 147-155.
13. 畑井喜司雄、保科利一 (1971). 病原性粘液細菌に関する研究—I、菌の分離、培養と感染實驗。Fish Pathology 5 (2): 100-106.
14. Wobeser, G. (1973). An outbreak of redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Saskatchewan. J. Fish. Res. Board Can. 30: 571-575.

15. Bootsma, R., and J.P.M. Clerx (1976). Columnaris disease of cultured carp *Cyprinus carpio* L. characterization of the causative agent. *Aquaculture*, 7: 371-384.
16. 徐大全、郭光雄(1977). 魚類病原性黏液細菌*Flexibacter columnaris*之研究。J. Fish. Soc. Taiwan 5 (2): 41-54.
17. Becker, C. D., and M. P. Eujihara (1978). The bacterial pathogen *Flexibacter columnaris* and its epizootiology among columbia river fish. A review and synthesis. *Amer. Fish. Soci. Monograph No. 2*, 1-92.
18. 増村和彦、若林久嗣 (1977). 人工生産マダイ、クロダイ稚魚の滑走細菌感染症。Fish Pathology 12 (3): 171-177.
19. Hikida, M., H. Wakabayashi, S. Egusa, and K. Masumura (1979). *Flexibacter* sp., a gliding bacterium pathogenic to some marine fishes in Japan. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish* 45 (4): 421-428.
20. Wood, J. W. (1968). Diseases of Pacific salmon: their prevention and treatment. State of Washington Department of Fisheries Hatchery Division.
21. Pacha, R. E. and E. J. Ordal (1963). Epidemiology of columnaris disease in salmon. *Bacteriol. Proc.* 63:3.
22. Pacha, R. E., and E. J. Ordal (1970). Myxobacterial diseases of salmonids. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 5: 243-257.
23. Snieszko, S. F. (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish. Biol.* 6: 197-208.
24. Holt, R. A., J. E. Sanders, J.L. Zinn, J. L. Fryer, and K. S. Pilcher (1975). Relation of water temperature to *Flexibacter columnaris* infection in steelhead trout(*Salmo gairdneri*), coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook (*O. tshawytscha*) salmon. *J. Fish. Res. Board Can.* 32: 1553-1559.
25. Bullock, G.L. (1972). Studies on selected myxobacteria pathogenic for fishes and on bacterial gill disease in hatchery-reared salmonids. U. S. Fish. Wildl. Serv. Tech. Pap. 60, 30pp.
26. Dowrkin, M., and S. M. Gibson (1968). A system for studying microbial morphogenesis: Rapid formation of microcysts in *Myxococcus xanthus*. *Sci.* 146: 243-244.
27. 江草周三 (1970). 今冬 (1969-1970) 養殖ウナギに流行した元ら腎炎について。Fish Pathology 5 (1): 51-66.
28. American Fisheries Society, Fish Health Section (1975). Suggested procedures for the detection and identification of certain infectious diseases of fishes. D-14. 1-14. 2.
29. Chung, H. Y. (1979). Morphological and biochemical studies of selected gliding bacteria associated with fish diseases. M. S. Thesis, Univ. of Georgia, Athens, Georgia. 52pp.
30. Joklik, W. K. and H. P. Willett (1976). *Zinsser Microbiology*. 16th ed. p5.
31. Shotts, E. B. and G. L. Bullock (1975). *Bacterial diseases of fishes: Diagnostic*

- procedures for gram-negative pathogens. *J. Fish. Res. Board Can.* 32: 1243-1247.
32. Soriano, S. (1973). Flexibacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 27: 155-170.
  33. Lewin, R. A. (1969). A classification of Flexibacteria. *J. Gen. Microbiol.* 58: 189-206.
  34. Wakabayashi, H. and S. Egusa (1974). Characteristics of myxobacteria associated with some freshwater fish diseases in Japan. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 40: 751-757.
  35. Ajmal, M. and B. C. Hobbs (1967). Causes and effects of columnaris-type disease in fish. Columnaris disease in roach and perch from English waters. *Nature* 215: 141-142.
  36. Snieszko, S. F. (1964). Remarks on some facets of epizootiology of bacterial fish diseases. *Dev. Ind. Microbiol.* 5: 94-100.
  37. Fry, F.E.J. (1969). Some possible physiological stresses induced by eutrophication. In *Eutrophication: Causes, consequences, correctives*. Washington: National Academy of Science. p531-536.
  38. Collins, V. G. (1970). Recent studies of bacterial pathogens of freshwater fish. *Wat. Treat. Exam.* 19: 3-31.



1  
Fig. 1. : Gill rot of columnaris disease eel (*Anguilla japonica*) infected with *Flexibacter columnaris*.



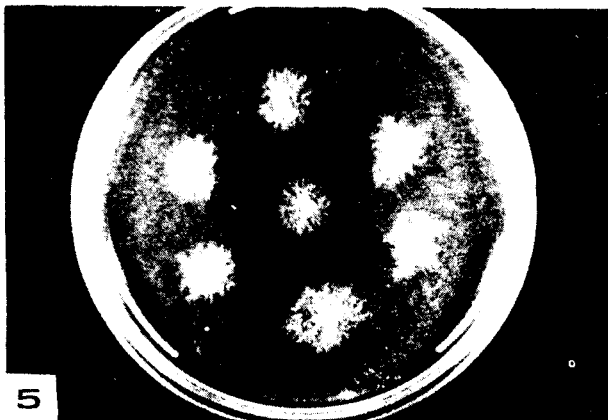
2  
Fig. 2 : Gill of eel (*A. japonica*) with bacterial gill disease showing hyperplasia and hemorrhage.



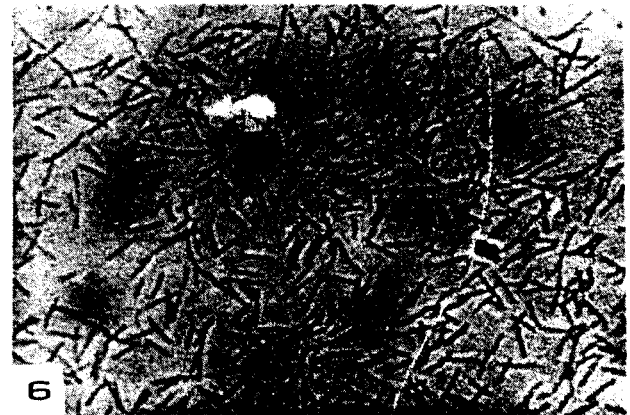
3  
Fig. 3 : Gold fish (*Cararrius auratus*) with gill disease.



4  
Fig. 4 : Eel (*A. japonica*) with branchionephritis. Arrows indicate body surface with stripes and the belly depressed.



5  
Fig. 5 : Colonies of *F. columnaris* isolated from eel with columnaris disease, 48 hrs at 28°C.



6  
Fig. 6 : Smear of *F. columnaris*, Gram stain, 600X

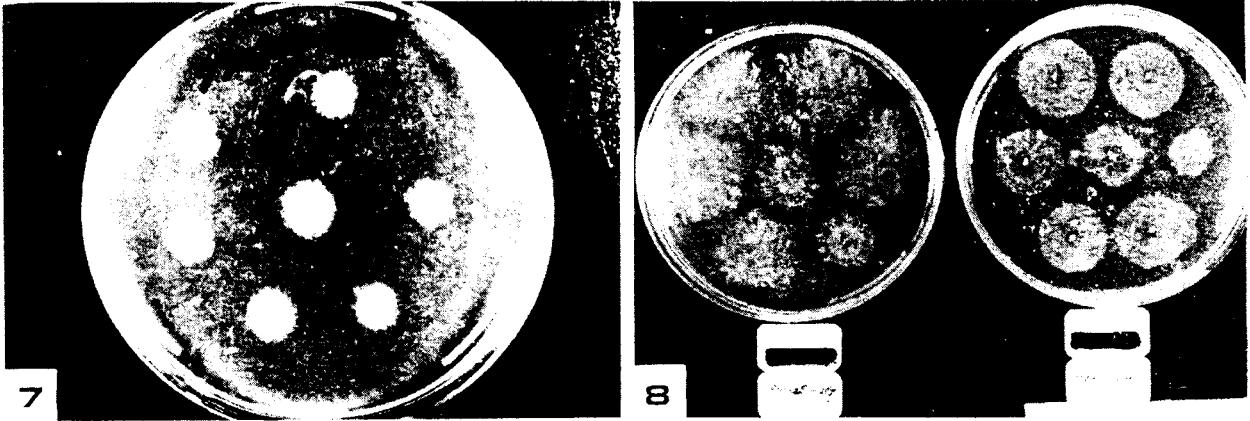


Fig. 7&8: Colony types of *Flexibacter* spp., strains isolated from eel and gold fish with gill disease, 48 hrs at 28°C.



Fig. 9 : Smear of *Flexibacter*, grown in microcyst induced solution for 3 days at 28°C. Arrow indicate spheroplast, Gram stain, 600X

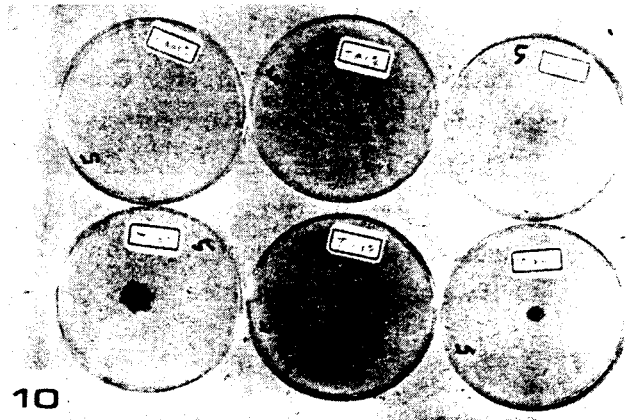


Fig. 10 : Effect of tryptone content in medium on gliding motility and pigment in *F. columnaris* incubated at 28°C for 3 days.