

臺灣養殖黑鯛爛尾病病原菌 *Aeromonas hydrophila* 之分離

陳林楊* · 簡秋源**

Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a Tail Rot Disease of Cultured Black Porgy in Taiwan

Ling-Yang Chen* and Chiu-Yuan Chien**

Abstract

Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a tail rot disease of cultured black porgy was studied. All isolated strains were only highly sensitive to neomycin among antimicrobial agents including chloramphenicol, furadantin, gantrisin, kanamycin, neomycin, novobiotin, penicillin G, streptomycin, and tetracycline. The optimum conditions for its growth were detected: salinity 0%~45%, pH 5~9. The rampency of this epidemic disease was occurred from Summer to Fall in 1977.

概 說

一九七七年八月至十二月，本省桃園縣觀音鄉發生體長 10~15 公分，體重 10~45 公克，約為五月齡左右之養殖黑鯛⁽⁴⁾大量死亡，病魚失去正常游泳能力，擱淺於池邊有水草處，不攝食、反應遲鈍、體色變黑、尾鰭腐爛，病情較嚴重者軟條組織亦腐爛，甚至膽囊腫大，鰓絲末端脹大。⁽⁵⁾

由罹病魚可以分離出一種桿菌，經病原性試驗結果知此菌可引起相同之病變，判定為病原菌，本文就此病菌之形態、病原性、生化學性狀、藥劑感受性及生理學性狀等方面所做的研究、結果，在此提出報告以供參考。

材 料 與 方 法

一、菌株的由來

自一九七七年十月至十二月，三次分別從桃園縣觀音鄉帶回瀕臨死亡的病魚，在實驗室中進行細菌之分離，先將患部以 70% 酒精擦拭表皮後，將患部剪下，放在普通液體培養基中^(9, 10, 11) (peptone 10g, beef ext. 5g, NaCl 5g, pH 7.5, dist. H₂O 1000ml) 在 28°C 下經 24 小時培養，然後將培養液接種於普通平板培養基，在 28°C 下經 24 小時培養後，檢取培養基上不同形態之菌落分別接種於斜面培養基上保存，以供形態、病原性、生化學性狀、藥劑感受性及生理學性狀等之檢查。

二、生化學性狀之檢查

各種生化學性狀之檢驗，乃採用一般腸內細菌鑑定之方法，即利用生長於 Rimler-Shotts 培養

* 臺灣省立海洋學院水產養殖學系
(Department of Aquaculture, Taiwan Provincial College of Marine Science and Technology)

** 國立臺灣師範大學生物研究所
(Institute of Biological Sciences, National Taiwan Normal University)

基上菌落之顏色，配合其對 Cytochrome oxidase 之反應，初步確定該菌是否為腸內菌羣，以 SIM 培養基測出 H_2S 之產生，利用 One-tube O-F test⁽⁸⁾ 測定其是否為厭氣性，利用 Brooker 的快速方法測出 Arginine dehydrolase, Lysine decarboxylase 之產生，各種醣類分解性乃利用測定醣類分解性之基礎培養基加上各種醣類 0.5~1.0% 以測定其醣類利用情形及是否有氣泡之產生。其餘生化學特性均按常法測定之，又各試驗均在 28°C 下進行。

三、病原性測驗

取在 28°C 下經 24 小時培養之濕菌溶於 0.85% 之無菌生理食鹽水中，使成菌懸浮液 (6mg/ml)，按每 100g 魚體重接種 6mg 濕菌重之比例，將菌之懸浮液接種入健康鯛魚之腹腔內，供試魚之大小與病魚同，注射前先用咪喃劑 10 ppm 藥浴 15 分鐘，並使用 Urethane 5g/l 之劑量做成水浴實施麻醉以利注射。注射後之鯛魚收容於 66×30×36 cm 之水槽中並注入海水後觀察 10 天，每天記錄病情發展，實驗期間不換水且不給餌料，充分打氣，水溫 14~17°C，實驗魚每組 6 隻，共 3 組。

四、藥劑感受性試驗

所使用之藥片為 DIFCO Dispens-O-Discs (Bacto-sensitivity discs)，利用 Kirby-Bauer method^(1, 2) (Surface-Swab method)，測定分離菌對於 Chloramphenical 等九種藥劑之感受性。

五、生理學性狀試驗

1. 鹽度：將 NaCl 加入普通培養液中，NaCl 之濃度為 0%，10%，20%……100% 經 28°C 下培養 24 小時。
 2. pH：將普通培養液之 pH 調成 3, 4……12 之不同值，經 28°C 下培養 48 小時。
 3. 溫度：將普通培養液置於 12, 20, 27, 37, 40°C 不同溫度下觀察細菌繁殖情形。
- 以上三種測定均以肉眼採用比濁法判定其生長情形，每根試管供試菌液均為 10 ml。

結 果

一、形態學及生理學性狀

由外觀判定為病魚之患部分離出一種革蘭氏染色陰性，大小為 $1\mu m \times 2.3\mu m$ 之短桿菌，具有運動性，於 28°C 下培養 24 小時之菌落為白色、圓形，其周邊平整，直徑約為 0.5mm，其生長之範圍為：pH 5~9，鹽度 0%~45%，溫度 20~37°C。

二、病原性測驗

將 3 株分離菌 (TC-1, TC-2, TC-3) 分別接種於鯛魚後，經 5~8 天，於接種部位起開始呈現紅塊，似出血狀，逐漸延及臀鰭，使臀鰭的軟條腐爛而與自然感染之病魚尾鰭腐爛之情形相同，在未擴及尾鰭前魚體即已死亡。由發病之魚體患部可以分離出與接種菌性狀相同之細菌。

三、生化學性狀

TC 等 3 株病原菌均呈相同之生化反應，如表 1 所示，其顯著的特性為：

極易產生 H_2S ，產生 Cytochrome oxidase，可分解 Glucose 並產生氣體，不分解 Gelatin, 2-3-butanediol，呈陰性反應，對 0/129 沒有感受性，Arginine 會被加水分解，硝酸鹽可被還原，有 Indole 之產生，MR-VP、Simmon citrate、Catalase 均呈陽性反應。對醣類的分解如 Glucose, Salicin, Meso-inosit, Galactose, Fructose, Dextrin, Maltose, D-Mannose, Xylose, p(—)-Sorbit, Saccharose 均具有分解性。

表1. 菌株的生化學性狀

Test	Result	Test	Result
Kligler test (H ₂ S)	-/A(H ₂ S)	Lactose	-
Cytochrome oxidase	+	Meso-Inositol	+
Hugh-Leifson's Glucose test	F	Raffinose	-
Hydrolysis of starch	+	Rhamnose	-
Gas production		L(+)-Arabinose	-
2, 3-butanediol	-	Galactose	+
0/129 sensitivity test	-	Fructose	+
Hydrolysis of gelatin	-	Dextrin	+
Arginine dihydrolase	+	Maltose	+
Lysine decarboxylase	-	D-Mannose	+
Nitrate Reduction	+	L-Sorbose	-
Production of Indole	+	Xylose	+
Methyl Red test	+	Mannitol	-
Voges-Proskauer test	+	Duicitol	-
Simmon citrate	+	P(-)-Sorbitol	+
Catalase	+	Saccharose	+
Utilization of carbohydrate		DEAE-Cellulose	-
Glucose	+	Salicin	+

Key: +, positive. -, negative. g, gas production. F, Fermentative.

四、藥劑感受性

檢驗九種藥劑中，僅有 Neomycin 對 TC-1 等 3 株病原菌具有顯著的抑制效果，其餘 Chlorphenical、Furadantin、Gantrisin、Kanamycin、Novobiocin、Penicillin、Streptomycin、Tetracyclin 等均無效果。

討 論

本研究所得結果諸性狀與 Davis, B. D. *et al* Microbiology 2nd ed. (1974) 及 Bergey's Manual 8th ed. (1974) 對 *Aeromonas hydrophila* 所列之檢索，比較如表 2 所示：

表2. Davis, Bergey's 檢索與研究所得結果性狀對照表

Characteristic	D	B	R	Characteristic	D	B	R
Growth in nutrient broth at 37°C		+	+	Lysine decarboxylase	-		-
Growth in nutrient broth containing 7.5% NaCl		-	-	Arginine hydrolase	+		+
Gram stain		-	-	gas from glucose	+ or -		+
Shape		SR	SR	Fermentation of Lactose	- or +		-
Size(μm)		1.0~4.4	1~2.2	Inositol	-		+
Motility		+	+	Raffinose	-		-
Pathogenic		+	+	Rhamnose	-		-
Temp. (°C)		20~30	20~37	Arabinose	+ or -		-
pH		5.5~9.0	5.0~9.0	Mannitol	+		-
Oxidase test	+		+	Dulcitol	-		-
Indole Production	+		+	Salicin	+		+
Methyl Red	+		+	Sorbitol	- or +		+
Voges-Proskauer	- or +		+	Nitrat to Nitrite	+		+
Citrate Utilized	+ or -		+	Glucose metabolism	F		F

Key: D, Davis. B, Bergey. R, Result. +, Positive. -, Negative. F, Fermentative. SR, Short Rod.

由表 2 可知，本分離菌株 (TC-1, TC-2, TC-3) 在諸性狀與上述兩氏之檢索完全一致，故 TC 等 3 菌株病原菌被鑑定為 *Aeromonas hydrophila*⁽⁶⁾。

從藥劑感受性試驗顯示，本菌僅對 Neomycin 有很高的被抑制效果，因此可望利用 Neomycin 對本病原細菌進行預防和治療，有待將來進一步的探討。

本分離菌株係使用一般病原細菌分離培養基 (含 0.5% NaCl) 所獲者，其與 Shotts 和 Rimler (1973)⁽⁹⁾ *Aeromonas hydrophila* 分離培養基中所含氯化鈉之百分率相同。

從生理學性狀顯示，本分離菌株之最適生長條件，以鹽度為 0 到 45% 和酸鹼度為 5 到 9，即其耐鹽度偏高，然而此菌從海水中被分離之報導却不多。

病原性測驗期間實施不換水亦不給餌料，並做充分之打氣，水溫亦保持在 18°C 左右。結果實驗組 (每組六尾) 均在初期呈現紅腫，出血，然後逐漸延及臀鰭。末期呈現腐爛而與自然感染之魚鰭腐爛之情形相同，且在未擴及尾鰭前魚體即已死亡，即發病到魚體死亡期間未曾超過 48 小時。根據 Groberg 等 (1978)⁽³⁾ 曾經報告鮭及鱒魚在致病性測驗時水溫對 *Aeromonas hydrophila* 和 *A. Salmonicida* 二種病原菌在人工感染發病時其死亡率隨著水溫之升高而增加，又死亡天數以高溫時為較短，反之，低溫時為較長。筆者等極為同意上述之提議而特別重視致病性測驗期間水溫之保持和記錄。按桃園縣觀音鄉內養殖黑鯛為本省首見者。從本次調查顯示，罹病魚初期遇逢夏季高溫時期，使得其死亡加快而呈嚴重，後期適遇秋季較低溫時期，其死亡呈緩慢而不甚嚴重。由此可以推測黑鯛爛尾病之發生與水溫似有其密切之關係。

一般認為 *Aeromonas* 和 *Vibrio*⁽⁷⁾ 兩屬之生化學性狀極為相似，但本分離菌株具有下面數點特徵予以區別之；(1) 其對 %₁₂₉ 沒有感受性，(2) Voges-Proskauer 測驗為 (-) 並極易產生 H₂S 和 (3) 有產生 Indole。再者，該菌株依 Kligler 測驗結果顯示培養基上部之顏色未改變，然而其下半部之顏色轉為黃色。

摘 要

本省養殖黑鯛爛尾病之病原菌為一種對 %₁₂₉ 具有感受性，Voges-Proskauer 測驗陰性，產生 Indole 及硫化氫之桿菌，初步鑑定為 *Aeromonas hydrophila*。本菌對 Chloramphenical 等九種藥劑除 Neomycin 外，感受性皆很低。在鹽度 0~45% 和酸鹼度 5~9 之範圍內皆可生長。

謝 詞

本研究工作承獲中國農村復興委員會在中央政府加強農村建設——魚病研究計劃 (編號 78-ARDP-5.3-0-158 號) 補助得以完成。研究期間承蒙臺灣大學理學院動物學系郭博士光雄教授之殷切指導，謹此致謝。又實驗進行中承獲臺灣大學動物學系魚病研究室諸位研究助理的協助一併申謝。

參 考 文 獻

- 1) Barry, et al. (1970). An improved single-disc method for testing the antibiotics susceptibility of rapidly growing pathogens. Amer. J. Clin. Path. 53: 149-158.
- 2) Bauer et al. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Amer. J. Clin. Path. 45: 493-496.
- 3) Groberg, W. J. Jr., R. H. McCoy, K. S. Pilcher, and J. L. Fryer. (1978). Relation of water temperature to infections of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), Chinook salmon (*O. tshawytscha*), and steelhead trout (*Salmo gairdneri*) with *Aeromonas salmonicida* and *A. hydrophila*. Jour. Fish. Res. Board Can. 35: 1-7.
- 4) JCRR, (1971). Common food fishes of Taiwan. Fisheries Ser. No. 10, 60 p. (in Chinese with English summary)

- 5) JCRR, (1977). Reports on fish disease research (I) Fisheries Ser. No. 29, 61 pp.
- 6) Kou, G. H. (1975). The effects of some factors on the pathogenic test of *Aeromonas hydrophila*. J. Fish. Soc. Taiwan 4: 1-6.
- 7) McCarthy, D. H. (1976). Vibrio disease in eels. J. Fish. Biol. 8: 317-320.
- 8) Porres, J. M., and R. E. Stanyon. (1974). One-tube oxidation fermentation test. Amer. J. Clin. Path. 61: 368-374.
- 9) Shotts, E. B., and R. B. Rimler. (1973). Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. Appl. Microbiol. 26: 550-553.
- 10) Shotts, E. B., and G. L. Bullock. (1975). Bacterial disease of fishes: Diagnostic procedures for Gram-Negative pathogens. J. Fish. Res. Board Can. 32: 1243-1247.
- 11) Shotts, E. B., and G. L. Bullock. (1976). Rapid diagnostic approaches in the identification of Gram-Negative bacterial diseases of fish. Fish. Pathol. 10: 187-190.