

Flexibacter columnaris 病原性之研究-I. 溶氧及氨影響 *Flexibacter columnaris* 對鰻之病原性

Studies on the Pathogenicity of *Flexibacter columnaris*-I. Effect of Dissolved Oxygen and Ammonia on the Pathogenicity of *Flexibacter columnaris* to Eel (*Anguilla japonica*)

柳家瑞·鍾虎雲·郭光雄*

Chia-Reiy L. Chen, Hsu-Yun Chung and Guang-Hsiung Kuo

Abstract

Mortality rates of the eel bathed in *Flexibacter columnaris* suspension for one hour were studied in three different holding conditions: stagnant, aerated & running waters. Dissolved oxygen, ammonia and pH were determined daily during 9 days of the experiment. The least mortality rate was observed in running water condition, the highest in stagnant water, and aerated water in between. It appeared that the 24-hour mortality rate correlated inversely with the dissolved oxygen. At adequate dissolved oxygen, the total mortality rate increased with the elevation of the ammonia level.

前 言

魚類的病原菌，多數為條件性病原菌 (facultative pathogen)，一旦魚體的內外條件發生變化，例如水溫驟變，池中氧氣不足、寄生蟲大量發生、魚體受到擦傷、投飼不良餌料、養殖密度過高……等等，不利於魚體或有利於病原菌之繁殖時，則病原菌容易侵入魚體內而繁殖，引發疾病，甚而致使罹病魚死亡^(6,12,13)。鰻魚的赤鰭病病原菌 *Aeromonas hydrophila* 及一般淡水魚類常見的柱狀病病原菌 *Flexibacter columnaris* 為典型的條件性病原菌^(2,7)。若林等 (1973)⁽¹⁵⁾，(1975)⁽¹⁶⁾ 及 Plumb 等 (1976)⁽⁹⁾ 指出影響 *A. hydrophila* 的環境因子，為季節、餌料、水質、水溫等。Pacha 及 Ordal (1970)⁽⁸⁾ 發現 *F. columnaris* 對鮭魚類的病原性與魚羣的密度以及水溫變化有密切的關係。江草 (1978)⁽¹⁴⁾ 檢討影響病原性之水溫、損傷、水中病原菌濃度、水質、養殖密度以及抗體等 6 種因子。其中水質因子之檢討，指出水質與 *F. columnaris* 之病原性關係密切，池水之水質若保持良好，則可避免疾病之發生，甚至可以由水質之測定而預測疾病之發生，進而採取預防措施。在影響水質之各種因子中，以水中溶氧量及氨量最為重要，因其易於發生變化，產生巨大的影響，且易於控制。因此著者針對此二因子，進行試驗，探討其與 *F. columnaris* 的病原性關係，在此提出結果，以供參考。

材 料 與 方 法

供 試 魚

本試驗所用之鰻魚購自中部養殖場，體長為 21~27 公分，體重為 5~24 公克。進行試驗前，蓄

*國立臺灣大學理學院動物系 (Department of Zoology, College of Science, National Taiwan University)

養於小水泥池中約 1~2 週，以觀察是否有帶菌而未發病者存在。

供試菌株

本試驗所用 3 菌株，分別分離自罹患爛尾的錦鯉尾部 (791002-1Ta 菌株)，鰓病之金魚鰓部 (801129-G 菌株) 及爛鰓爛尾之泥鰍尾部 (801213-1T 菌株)，(Table 1)。此 3 菌株之形態、生理及生化特性均與郭等⁽⁹⁾分離之 *F. columnaris* 相同。以菌浴法測定本分離菌之病原性，結果顯示此 3 分離菌均具病原性。菌株以真空冷凍乾燥法，保存於零下 80°C 之冰櫃中，以備各種試驗之用。

Table 1. Sources of the three strains of *Flexibacter columnaris* used in the pathogenicity study*

Strain No.	Source of isolation	Location	Date
791002-1Ta	tail, carp with tail rot and red mouth	Taipei	Oct, 2, 79
801129-G	gill, goldfish with gill rot	Taipei	Nov, 29, 80
801213-1T	tail, loach with skin ulcer	Taipei	Dec, 13, 80

* The three strains were classified as high virulent strains on the bases that eels were 100% killed in 24 hours after swimming for 1 hour in 2×10^7 cells/ml broth culture, then maintained at 25°C with no aeration.

菌懸浮液

取保存於真空冷凍乾燥瓶之菌株，經解凍後，以 Cytophaga broth 培養於 28°C 下 24~48 小時，再取 5 ml 之培養液接種於 Cytophaga broth 50 ml 中，培養 24 小時後，以滅菌蒸餾水調製成濃度為 2×10^7 /ml 之菌懸浮液，作為測定病原性時，魚體浸浴之用。

水中溶氧量及氨量影響 *F. columnaris* 對鰻病原性試驗

試驗方式分為止水式、打氣式及流水式等三種，止水式水槽內盛約 24 公升經活性炭處理之自來水，試驗期間不打氣不換水，打氣式水槽與止水式水槽處理相同，僅試驗期間進行打氣，至於流水式水槽，則不斷引經活性炭處理過之自來水進入水槽內，流速為每小時約 10 公升，水槽內水量保持一定，約 24 公升。取供試鰻 40 尾，經 1.5% Urethane 溶液麻醉後，以毛刷輕輕破壞一邊之鰓部，然後每 10 尾一組，分成 4 組，一組不作任何處理，放養於止水式水槽中作為對照組，其他三組分別浸浴製備好的 3 株菌懸浮液 (791002-1Ta, 81129-G 與 801213-1T 菌株)，一小時後，再各放養於止水式水槽內，進行觀察。打氣式與流水式水槽試驗之處理與止水式相同。試驗期間為 9 天，期間內不給餌，每天記錄水溫、測定溶氧量、pH 值及氨含量，同時詳記發病及死亡之情形，如有死亡魚發生，則由鰓部進行接種菌之分離，以確定其死亡原因。

水中溶氧量等之測定方法如下：

溶氧量是以溶氧量計 (YSI Model 57) 測定。

pH 值是以 pH 計 (Corning-eel 7 或 Philips PW 9409) 測定。

氨量之測定是將試水以 Nessler's 試藥發色後，以分光儀 (Turner 350) 測定 425 m μ 的吸光度，依標準曲線換算求出⁽¹⁰⁾。

結 果

實驗結果如 Table 2 所示，茲分別說明如下：

1. 止水式水槽：3 組實驗組之接種鰻，皆於 24 小時內，全部死亡，對照組則無死亡。水中溶氧

Table 2. Mortality rates of the eel bathed for 1 hour with strains of *Flexibacter columnaris*, and water qualities of three different holding conditions

Holding condition	Bacterial strains†	Mortality rate %		DO (ppm)		pH		Ammonia (ppm NH ₄ -N)	
		24 hr	9 days	24 hr	9 days mean	24 hr	9 days mean	24 hr	9 days mean
Stagnant water	1	100	100	1.6		6.7		1.0	
	2	100	100	1.6		6.8		1.2	
	3	100	100	1.6		6.7		1.0	
	Control	0	30	1.6	1.8(1.0-2.1)*	6.9	7.0(6.6-7.2)*	1.0	4.2(1.0-7.1)*
Aerated water	1	50	100	5.3	7.0(5.3-7.7)	7.2	7.7(7.2-7.9)	1.6	6.2(1.6-8.4)
	2	20	40	6.6	7.3(6.6-7.7)	7.4	7.6(7.4-7.8)	1.1	5.2(1.1-7.8)
	3	20	100	6.3	6.5(6.3-6.7)	7.6	7.6	1.1	4.5(1.1-8.0)
	Control	0	10	6.3	7.0(6.3-7.7)	7.7	7.5(7.0-7.8)	1.0	2.3(1.0-3.5)
Running water	1	50	70	3.5	6.5(3.5-7.7)	7.1	7.1(6.6-7.4)	0.6	0.3(0-0.6)
	2	30	30	6.2	6.8(6.2-7.2)	7.1	7.1(6.6-7.2)	0.3	0.3(0.1-0.7)
	3	20	70	5.7	6.6(5.1-7.9)	7.0	7.1(6.6-7.3)	0.3	0.4(0-1.8)
	Control	0	10	5.4	6.2(4.4-7.6)	7.1	7.0(6.6-7.2)	0.3	0.3(0.1-0.8)

Temperature range: 25-28°C

* Range in parenthesis

† 1: 801213-1T, 2: 801129-G, 3: 791002-1Ta

量實驗組與對照組皆為 1.6 ppm，氮量則除一組實驗組為 1.2 ppm 外，其他各組皆為 1.0 ppm。槽水之 pH 值為 6.7~6.9。

2. 打氣式水槽：3 組實驗鰻之 24 小時內死亡率分別為 50, 20, 20%，但第 9 天之累積死亡率則分別為 100, 40 及 100%。水中溶氧量在 5.3~7.7 ppm 間，實驗組之平均溶氧量分別為 7.0, 7.3 與 6.5 ppm，氮量則在 1.0~8.4 ppm 間，實驗組之平均值分別為 6.2, 5.2 與 4.5 ppm，對照組則僅為 2.3 ppm。槽水之平均 pH 值，對照組為 7.5，實驗組為 7.7, 7.6 及 7.6。

3. 流水式水槽：24 小時內，3 組實驗鰻之死亡率為 50, 30 及 20%，第 9 天之累積死亡率則為 70, 30 與 70%，皆較打氣組為低。水中溶氧量在 3.5~7.9 ppm 間，實驗組之平均值分別為 6.5, 6.8 及 6.6 ppm，較打氣組稍低，氮量則在 0~1.8 ppm 間，實驗組之平均值，則分別為 0.3, 0.3 與 0.4 ppm，遠較打氣組為低。槽水之平均 pH 值則實驗組皆為 7.1，對照組為 7.0。

討 論

Snieszko (1974)⁽¹²⁾ 認為低溶氧對魚類而言，為一種壓迫 (stress)，在低溶氧的環境中，魚類之抵抗力降低，容易受病原菌侵襲而罹病。Plumb 等 (1976)⁽⁹⁾ 曾詳細描述池中藻類大量死亡引起缺氧的現象，致使鯰魚受 *Aeromonas hydrophila* 侵襲，而發病死亡的例子。鰻的最低安全溶氧濃度為 1 ppm⁽⁴⁾，低於此值，鰻即不能行正常生理活動。本試驗之結果顯示，感染後之供試鰻在止水式水槽中，於 24 小時內全部死亡，而打氣式水槽與流水式水槽之供試鰻，其死亡率均不超過 50%。此時對照組之溶氧量與實驗組相同，均低於 2 ppm，但對照組並無鰻死亡，顯然，正常鰻魚在此種低溶氧下仍可活存，若受本菌感染則容易發病死亡。由各感染菌組 24 小時之死亡率對溶氧量求迴歸直線及相關係數，得線如 Fig. 1 所示。死亡率與溶氧之相關係數為 -0.969，顯示溶氧量與此菌致病力關係密切。

打氣式和流水式水槽中之供試鰻，其累積死亡率，打氣組較流水組稍高，而溶氧量則打氣組較流水組稍高。此二組之水中溶氧量，均遠在安全溶氧量之 1 ppm 以上，這種累積死亡率的差異，可能與氮之含量有密切的關係。打氣式水槽中所含的未解離氮約為 0.1 ppm，流水式水槽中則僅為 0.002 ppm⁽³⁾。

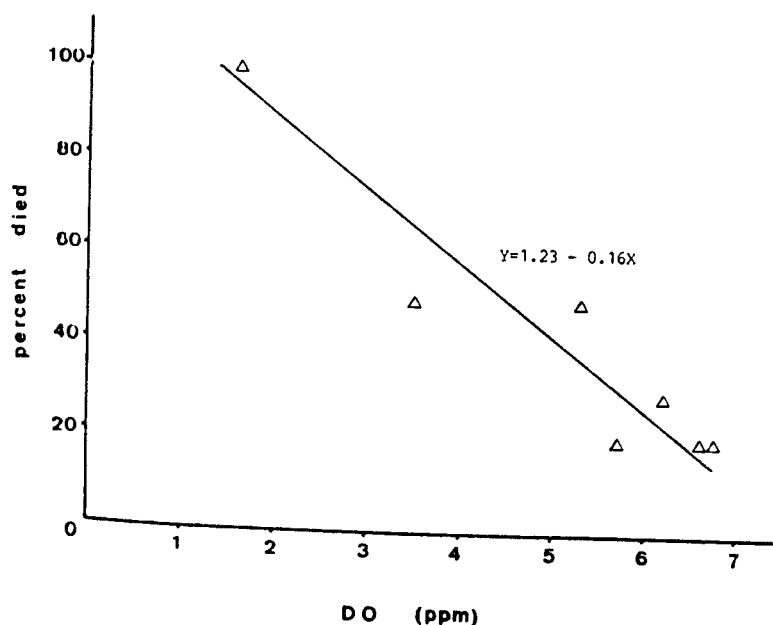


Fig. 1. Correlation of the first day mortality rates of the eels and the dissolved oxygen concentrations in the holding aquariums.

Roberts (1978)⁽¹¹⁾ 指出，對一般硬骨魚而言，池水中的未解離氨之安全濃度為 0.02 ppm。在本試驗中，打氣組水中之氨已超過此基準。Bullock (1972)⁽¹²⁾ 以鱒為試驗材料，指出水中溶氧量為 4~5 ppm，氨量為 0.5~1.5 ppm，在高養殖密度的條件下，養殖魚易受 *F. columnaris* 感染發病。Walter (1980)⁽¹³⁾ 以鯰作試驗，發現水中溶氧量在 1.5~1.7 ppm，氨量為 1.0~1.2 ppm (未解離氨量 0.1 ppm) 時，則鯰易受 *A. hydrophila* 感染發病而死亡。如此，由本實驗之結果，可以指出，養殖鰻在低溶氧下易受病原菌之侵襲，若水中氨量超過某種濃度，則更易受病原菌之感染發病，至於養殖鰻受 *F. columnaris* 侵襲後，會發病死亡之最低溶氧量及最高水中氨量為何？則有待更進一步的探討。

摘 要

經柱狀病原菌 (*Flexibacter columnaris*) 浸浴後的鰻 (*Anguilla japonica*)，蕃養於止水式，打氣式及流水式水槽中，以比較其死亡率。在流水式水槽 24 小時內鰻死亡率最低，打氣式居次，而止水式最高，文中討論溶氧及溶氨與死亡率之關係。

謝 辭

本研究是農發會經費支持之 70 農建 -5.1- 產 -15(9) 號魚貝病害防治研究計劃，實驗工作得臺大動物系魚病研究室諸位同仁之協助，謹此致謝。

參 考 文 獻

1. Bullock, G. L. (1972). Studies on selected myxobacteria pathogen for fishes and on bacterial gill disease in hatchery-reared salmonids. U. S. Fish. Wildl. Serv. Tech. Pap. 60, 30pp.
2. Chung, Hsu-Yun and Guang-Hsiung Kou. (1973). Studies on the bacterial flora of fish body-I, Bacteria in gill, intestine, blood and viscera of apparently healthy pond cultured eels. J. Fish. Soc. Taiwan. 2(2): 20-25.

3. Emerson, K., R. C. Russo, R. E. Lund and R. V. Thurston. (1975). Aqueous ammonia equilibrium calculations: Effect of pH and temperature. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 32: 2379-2383.
4. Jaw, Gwo-Shiaw (1980). Studies on oxygen consumption of some aquatic animals. Master thesis.
5. Kuo, S. C., H. Y. Chung and G. H. Kou. (1980). Studies on identification and pathogenicity of gliding bacteria in cultured fishes. *CAPD Fisheries Series No. 3*, 52-65.
6. Lewis, D. H. and J. A. Plumb. (1979). Bacterial diseases, Principal diseases of farm-raised catfish. *Southern Cooperative Series No. 225*, p. 15-24.
7. Pacha, R. E. and E. J. Ordal. (1963). Epidermiology of columnaris disease in salmon. *Bacteriol. Pro.* 63: 3.
8. Pacha, R. E. and E. J. Ordal. (1970). Myxobacterial diseases of salmonids. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 5: 243-257.
9. Plumb, J. A., J. M. Grizzli and J. Defignredo. (1976). Necrosis and bacterial infection in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) following hypoxia. *J. Wildl. Dis.* 12: 247-253.
10. Rand, M. C. (1976). Standard methods for the examination of water and wastewater. 14ed. American Public Health Association, 1193pp.
11. Roberts, R. J. (1978). Fish pathology. Baillere Tindall. London, 318pp.
12. Snieszko, S. F. (1974). The effect of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish. Biol.* 6: 197-208.
13. Walter, G. R. and J. A. Plumb. (1980). Environmental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish. Biol.* 17: 177-185.
14. 江草周三 (1978). 魚の感染症。恒星社厚生閣，東京，p. 210-215。
15. 若林久嗣、江草周三 (1973). 静岡県吉田地区における養殖ウナギの細菌感染について。魚病研究，8: 91-97。
16. 若林久嗣、江草周三 (1975). 再び静岡県吉田地区における養殖ウナギの細菌感染について—とくに鰓病菌について。魚病研究，9: 193-198。