

# 養殖鰻細菌分佈之研究

陳昭德 · 郭光雄\*\*

Studies on Bacterial Distribution in Pond-Cultured Eels\*

Jau-Der Chen\* and Guang-Hsiung Kou\*\*

## Abstract

The purpose of this study was to understand the bacterial flora in eel-farms and the difference between *Aeromonas* and *Edwardsiella*. Five hundred and thirty-nine strains were isolated from two hundred and four eels and pond-water. The isolates were classified as *Edwardsiella*, Enterobacteriaceae, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* and unidentified Gram-negative rods. The number of isolates from intestine was more than those from viscera and pond-water and the number of isolates from diseased eels was more than that from healthy ones. The distribution of *Aeromonas* and *Edwardsiella* was rather different. The latter, unlike the former, was rarely found in healthy eels as well as in sediments and plankton of rearing pond. The investigation of the origin of *Edwardsiella* and the way it got into eel-pond indicated that feces of birds might be one of the possible infectious pathway, but the isolation of *Edwardsiella* did not succeed.

## 緒 言

近年來養鰻事業因養殖密度的提高，鰻池的老化，及飼料品質之不穩定，使疾病發生之種類及發生率增高，造成的損失也隨著增加，鰻病問題因而日益受人重視。據一九七六年臺灣養鰻戶之鰻病調查統計分析，發現由細菌性引起的赤鰓及潰瘍病為鰻罹病死亡之主因，佔鰻魚所有死亡病因的36%<sup>(1)</sup>，是以引起著者研究鰻池細菌相之興趣。

細菌性疾病中以赤鰓病之發生率及造成之損失為最大。過去赤鰓病係指由病原菌 *Aeromonas hydrophila* 及 *Edwardsiella anguillimortiferum* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) 共同引起或單獨引起之疾病<sup>(2, 3)</sup>，如今 *E. anguillimortiferum* 已被認為是引起潰瘍症之病原菌<sup>(4)</sup>，有關 *A. hydrophila* 的研究很多<sup>(5-9)</sup>，但關於 *E. anguillimortiferum* 之研究則甚少，且自一九五九年 Sakazaki 和 Murata 發現此菌以來，研究者大多著重在細菌之分離及分類上的工作<sup>(10-18)</sup>，而其他方面的研究則甚稀少。由過去之研究報告<sup>(9, 19, 20)</sup>，得知一些引起魚類疾病之病原菌，常存在於水中，由外觀上健康之魚體內，亦常常可以分離出來，如 *A. hydrophila*。因此當魚體內外條件惡化時，如魚體受寄生蟲寄生，營養不良，消化不良，氧氣缺乏，水溫激烈變化等等，此等病原菌容易在

\* 本文為作者臺大動物學研究所碩士論文

(This paper represents a Thesis that was submitted as fulfilment of the M.S. degree at the National Taiwan University)

\*\* 臺灣大學動物學研究所

(Institute of Zoology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, 107)

魚體內繁殖引起疾病，而被稱為條件性病原菌<sup>(21)</sup>，由於此種之了解，對於此等病原菌所引起疾病之防治就有了良策。而 *E. anguillimortiferum* 是否與 *A. hydrophila* 相同為條件性病原菌，且常存於池水中，甚或由外觀上健康鰻魚之內臟中亦可分離出，實有究明之必要。而水域為鰻魚之唯一生活環境，故欲了解此類細菌感染魚體之機制，除了究明此類細菌在魚體內存在之情況外，還得究明其在魚體生活之水域中之種種情況，諸如池水中各菌種之消長，季節變化，地域不同有無差異等。本研究則針對這些問題，特別有關 *E. anguillimortiferum* 之分佈，加以調查研究及分析，所得之一些見解在此提出，以供研究魚病者之參考。

### 材料及方法

使用材料及來源如 Table 1 所示，係自一九七七年四月起至一九七八年三月止，選臺灣中部彰化地區三家及南部高屏地區三家養鰻場，做為固定採樣池，每月採樣一次，除池鰻外，池水、底泥及浮游生物，亦一併採樣，供做細菌分離用。

Table 1. No. of eels examined from April, 1977 to March, 1978

		Southern Taiwan eel-culture ponds		Central Taiwan eel-culture ponds	
		Healthy	Diseased	Healthy	Diseased
1977	APR	4			
	MAY	5		5	
	JUN	5		5	
	JUL			5	
	AUG	15			
	SEP	10	5 (Water-mold)	14	1 (Red-fin)
	OCT	5	4 (Tail-rot)		5 (Red-fin)
	NOV	12	1 (Red-fin)	11	1 (Red-fin)
1978	DEC	12		5	4 (Red-fin)
	JAN	10	5 (Red-fin)	7	5 (Red-fin)
	FEB	11		5	
	MAR	12		13	2 (Plistophorosis)
	Total	101	15	70	18

#### 一、鰻體細菌之分離

每家養鰻場任取外觀健康，大小為150-200 g 之鰻魚5尾，用1.5% Urethane 麻醉後進行肝臟、腎臟、脾臟及腸之細菌分離，若採樣時有病鰻發生，亦同時進行採樣分離細菌。麻醉後再以70%的酒精棉花擦拭體表面，在無菌操作下解剖魚體，先由動脈球以滅菌針筒將血抽乾，然後取出肝臟、腎臟及腸，再將各組織分別合在一起，精確稱重後，加入十倍於組織重量之滅菌食鹽水(0.85% NaCl)，再以均質機(Homogenizer) 研磨5分鐘，使成組織懸浮液，然後以滅菌食鹽水稀釋五階段，每階段皆為十倍稀釋，自每階段稀釋液中吸取0.1 c.c. 接種在細菌培養基上(Pepton 15g, Beef extract 7.5g, NaCl 5g, Agar 15g, dist. H<sub>2</sub>O 1000 c.c. pH 7.0-7.2)，用滅菌之玻璃棒均勻塗抹培養基之表面後，置於28°C 培養箱中培養48小時，將發育在培養基上形態不同之菌落(Colony) 鈎出，轉培養於斜面培養基上保存，供各種實驗用，同時計算不同形態菌落之數目，求出每1g之內臟器官中所含各菌之菌數。

#### 二、池水細菌之分離

以針筒式採水器由鰻池投餌場之水面下15 cm 處採水，將採取之池水5 c.c.-10 c.c. 注入經高



2 之分類表，分出 *Edwardsiella*, Enterobacteriaceae, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* 及 Unidentified Gram-negative rods 等八菌羣。

#### 六、病原性試驗

將鑑定為 *Edwardsiella anguillimortiferum* 之分離菌，於 28°C 下，培養於普通培養基上 48 小時後取 10 mg 之培養菌溶入 1 c.c. 之滅菌食鹽水中，使成活菌懸浮液，依每 100 g 魚體接種 4 mg 濕菌之比例，以腹腔接種方式，接種於腹腔中，即每 100 g 魚體重，接種 0.4 c.c. 之菌液。每一菌株接種兩尾，大小為 150-200 g 之鰻，接種後之鰻收容含水 30 公升之方形水箱內觀察，每天換水一次，觀察兩星期，觀察期間不給餌，水溫與室溫同 (20-25°C)。同時以食鹽水腹腔接種法，接種兩尾鰻，同樣收容於含水 30 公升方形水箱內觀察，做為對照組。

## 結 果

自 1977 年 4 月起至 1978 年 3 月止，在臺灣中部彰化地區及南部高屏地區養鰻場進行鰻魚之腸，內臟及池水之細菌分離，總共採樣 204 尾鰻魚，分離到 539 株菌，另由浮游生物及底泥分離到 160 株菌，茲將所得資料加以整理，分述如下：

#### 一、季節變化

依 Table 2 分離菌可分成八個菌羣，南部養鰻場之每月各菌羣之出現分佈情況如 Table 3 所示，*Edwardsiella* 僅 12 月和 3 月由腎臟分離到，Enterobacteriaceae 及 *Aeromonas* 採樣幾乎都分離到，*Pseudomonas* 從 11 月起至 6 月止被分離到，*Achromobacter* 僅 3 月時被分離到，*Flavobacterium* 在 9 月、12 月及 3 月被分離到，*Alcaligenes* 在 5 月、11 月、2 月及 3 月被分離到。中部養鰻場之情形如 Table 4 所示，和南部養鰻場略有差異，*Edwardsiella* 僅在 5 月被分離到，Enterobacteriaceae 及 *Aeromonas* 與南部相同，採樣幾乎都有分離到，*Pseudomonas* 在 3 月至 7 月被分離到，*Achromobacter* 在 7 月、1 月及 3 月被分離到，*Flavobacterium* 在 7 月、11 月及 3 月被分離到，*Alcaligenes* 則在 5 月、7 月及 11 月被分離到。

腸、內臟及池水之總分離菌數之年分佈如 Table 5 所示，南部養鰻場之腸內菌數，每 1 g 之含菌量除 1 月在  $10^5$  cells，10 月及 12 月為  $10^6$  cells 外，其餘月份均達  $10^7$  cells，內臟 1 g 之含菌量 5 月及 1 月最少為  $10^4$  cells，10 月份高達  $10^7$  cells，其餘皆在  $10^{5-6}$  cells，中部養鰻場之腸內菌以 2 月為最低，每 1 g 之含菌量在  $10^3$  cells，5 月及 12 月達  $10^7$  cells 外，餘均在  $10^{4-6}$  cells，內臟 1 g 之含菌量 7 月及 9 月為最低僅  $10^3$  cells，6 月為最高達  $10^6$  cells，餘均在  $10^{4-5}$  cells。池水之含菌量，中部養鰻場除 12 月及 3 月每 c.c. 之含菌量在  $10^8$  cells 外，餘和南部養鰻場一致皆達  $10^4$  cells 以上，而南部養鰻場在 6 及 9 月為最高達  $10^5$  cells，中部養鰻場則在 6 月及 3 月為最高達  $10^5$  cells，由此可見不拘是內臟，腸內或池水之含菌量，中部之養鰻場有較南部者為低之現象。

比較腸、內臟與池水之總分離菌數，由 Fig. 1 可看出南部養鰻場之腸內及內臟之含菌數以 1 月為最低，中部則以 2 月份為最低，整年之最高及最低月平均水溫亦以 1 月至 2 月為最低。以每 1 g 相等於 1 c.c. 之單位來比較，除南部 10 月及 12 月，中部 11 月及 3 月，腸內之含菌數較內臟含菌數為低或略低外，其他月份皆腸內含菌數較內臟含菌數為高，池水之含菌數除南部 5 至 6 月，中部 9 月及 3 月較內臟及腸含菌數為高或略高外，其他各月皆較低 (Table 5)，又比較中南部之鰻魚體總分離菌數，如 Fig. 2 所示，南部養鰻場含菌數最高的月份為 2 月至 4 月及 9 月至 12 月，中部則為 5 月及 12 月，恰值水溫變動最劇之春初及秋初，而水溫最高之 7 至 8 月含菌數，反而不是最高。

#### 二、*Aeromonas*, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* 及 *Edwardsiella* 之出現

由鰻魚體及池水分出之 539 株菌如 Table 6 所示，除 Unidentified Gram-negative rods

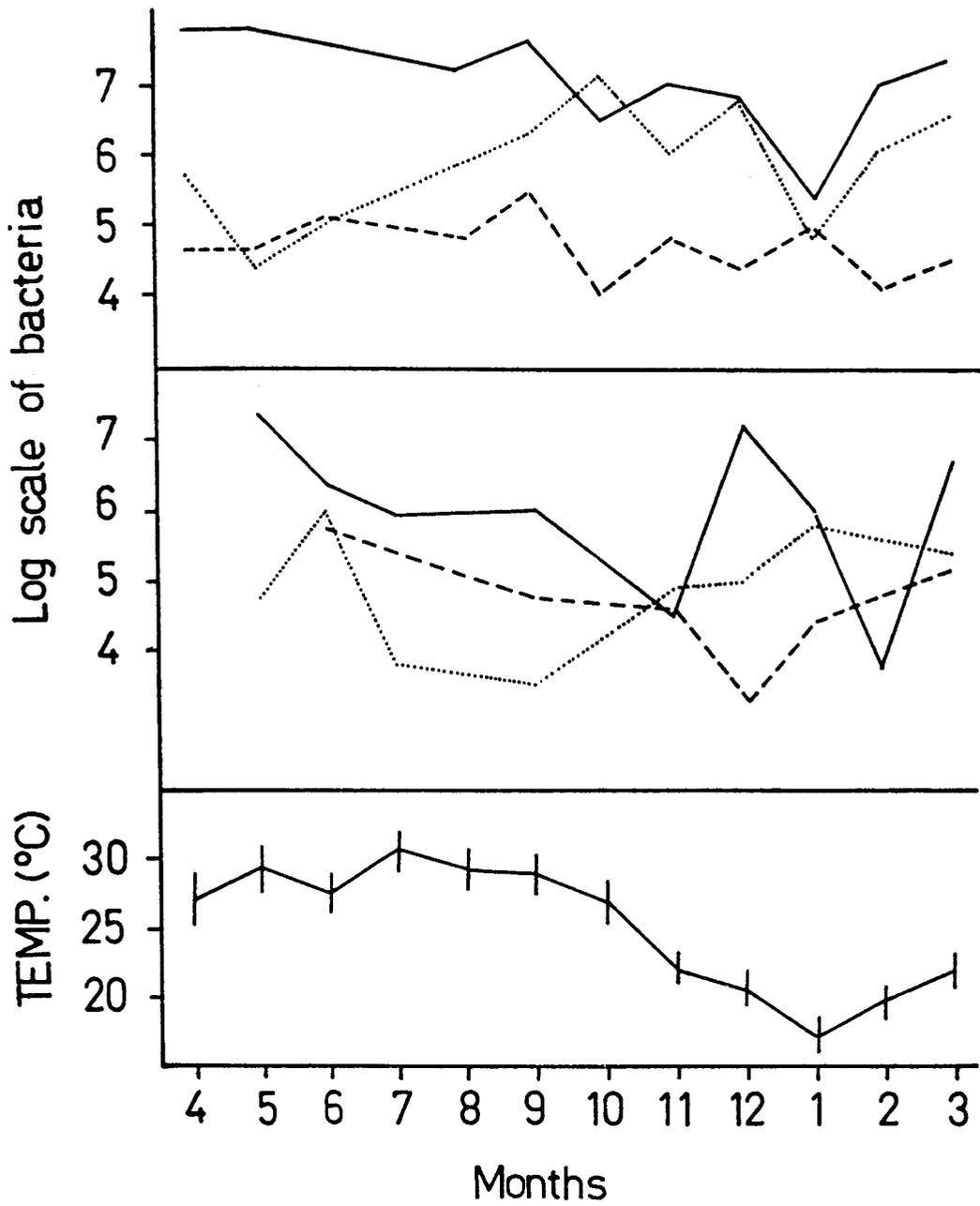


Fig. 1. The comparison of bacteria among Intestine ——— Viscera ······ and Pond-water - - - - -  
Upper: Southern Taiwan eel-culture ponds.  
Middle: Central Taiwan eel-culture ponds.  
Lower: Annual fluctuation of water temperature.

Table 3. The annual distribution of isolated bacteria ( $10^8$  cells/g) from Southern Taiwan eel-culture ponds

	Organ	APR	MAY	JUN	JUL	AUG	SEP	OCT	NOV	DEC	JAN	FEB	MAR
<i>Edwardiella</i>	{ I S K L }									7.5			746
Enterobacteriaceae	{ I S K L }	73	530 10 10 54	28		5673.3 26 23.9	520 3.5		710 12	15	180.95	319	15060 2135
						10000	1520 6900 47 7.63	61.95 14	26 150 208	67 55			10560 2304 6.5
<i>Aeromonas</i>	{ I S K L }	1500	3.7						598	96	100		508 1228
<i>Pseudomonas</i>	{ I S K L }		11000	310								1.65	
<i>Achromobacter</i>	{ I S K L }												500 4912 3.05
<i>Flavobacterium</i>	{ I S K L }						40620	30000	4204.35	21020			
							0.39		386.5 35.65				0.3
<i>Alcaligenes</i>	{ I S K L }		61000						8.7			1503.7	1228
Unidentified G <sup>-</sup> , rods	{ I S K L }	75080	10			1000 2200 24	4600	3000 15415	6600	6350	153	957	6058
		180	6.5					1800	1800	3.2	120	121.25	923.26
			0.1					180	3.2	280	300		

I: Intestine S: Spleen K: Kidney L: Liver

Table 4. The annual distribution of isolated bacteria ( $10^3$  cells/g) from Central Taiwan eel-culture ponds

	Organ	MAY	JUN	JUL	AUG	SEP	OCT	NOV	DEC	JAN	FEB	MAR
<i>Edwardsiella</i>	$\begin{Bmatrix} I \\ S \\ K \\ L \end{Bmatrix}$	2.7										
Enterobacteriaceae	$\begin{Bmatrix} I \\ S \\ K \\ L \end{Bmatrix}$	1400				370		14	18000	605		
<i>Aeromonas</i>	$\begin{Bmatrix} I \\ S \\ K \\ L \end{Bmatrix}$	1.9		0.71		117.6		6.75			5.37	579
		14	2490	360						1000		
		1.9		6.335								
		0.6		2.7								
				4.85								
<i>Pseudomonas</i>	$\begin{Bmatrix} I \\ S \\ K \\ L \end{Bmatrix}$	3359.5		39.4								
		4.5	2031	2.63								418.4
				0.78								27.4
<i>Achromobacter</i>	$\begin{Bmatrix} I \\ S \\ K \\ L \end{Bmatrix}$			111.1								1.38
				1.6						0.028		
				0.525								
<i>Flavobacterium</i>	$\begin{Bmatrix} I \\ S \\ K \\ L \end{Bmatrix}$			1.6				4.5				69.6
				0.33				230				
								2.334				
<i>Alcaligenes</i>	$\begin{Bmatrix} I \\ S \\ K \\ L \end{Bmatrix}$	3						3.2				
		0.23		0.22								
Unidentified G <sup>-</sup> , rods	$\begin{Bmatrix} I \\ S \\ K \\ L \end{Bmatrix}$	20337.87		386.3		660		18		443.75	1.54	53
		143.25	16	0.6		10.8		0.084	362	1000		
		7.05	1131					0.22				
		9.4	8.2									

I: Intestine    S: Spleen    K: Kidney    L: Liver

Table 5. The annual distribution of isolated bacteria ( $10^3$  cells/g or c. c.) among intestine (I), viscera (V), and pond-water (W)

		APR	MAY	JUN	JUL	AUG	SEP
Southern Taiwan eel-culture pond	I	75080	72540	—		16673.3	46740
	V	584.33	28.1	112.666		757.966	2318.34
	W	52	52.06	134.6		76.83	349.5
Central Taiwan eel-culture pond	I		25111.375	2490	896.8		1147.6
	V		58.176	1062.066	7.626		3.6
	W			610.8			70.95
Max. H <sub>2</sub> O Temp.		29.40	31.05	29.22	32.39	30.98	30.92
Min. H <sub>2</sub> O Temp.		25.46	28.05	26.80	29.40	28.59	28.19

		OCT	NOV	DEC	JAN	FEB	MAR
Southern Taiwan eel-culture pond	I	3591.95	11437.05	6446	333.95	11836	22126
	V	15204.166	1101.783	7822.166	73.75	1271.95	1508.55
	W	12.75	30.5	28		13.5	33.3
Central Taiwan eel-culture pond	I		32.45	18000	1048.75	6.91	58.79
	V		82.212	120.666	666.676		217.8
	W		47.5	2.2	31	7	450
Max. H <sub>2</sub> O Temp.		28.75	23.58	22.39	19.31	21.55	23.92
Min. H <sub>2</sub> O Temp.		26.34	21.69	20.15	16.96	19.58	21.51

外，以 *Aeromonas* 佔20.22%為最多，Enterobacteriaceae 佔12.98%次之 *Psuedomonas* 佔10.94%又次之，而以 *Edwardsiella* 佔 1.85%為最少。檢討 *Aeromonas* 及 Enterobacteriaceae 之出現，不拘健康魚或病魚之腸、內臟及池水皆可分離到，其出現之月份全年都可分離到，而 *Psuedomonas* 之出現也是不拘健康魚或病魚之腸、內臟及池水皆可分離到，但出現之月份則在11月至7月，而8月至10月則未分離到。*Edwardsiella* 之出現單就被分離出之器官來看，健康魚之脾臟分離出1菌株，腎臟分離出2菌株，由病鰻之脾臟分離出1菌株，腎臟2菌株及腸1菌株，不論由健康魚或病魚之肝臟均未分離出 *Edwardsiella*。再就出現的月別來看，分別在5月中部養鰻場健康鰻魚之脾臟 ( $2.7 \times 10^3$  cells/g)，9月南部養鰻場感染水黴菌之病鰻之脾臟 ( $85 \times 10^3$  cells/g)及腎臟( $120 \times 10^3$  cells/g)，中部養鰻場外觀呈現赤鰭病徵之腎臟 ( $30 \times 10^3$  cells/g) 腸 ( $11000 \times 10^3$  cells/g) 及同池池水 ( $2 \times 10^3$  cells/c.c.)，12月南部養鰻場之健康鰻魚之腎臟 ( $7.5 \times 10^3$  cells/g) 及中部養鰻之正常池水 ( $0.4 \times 10^3$  cells/c.c.)，2月南部養鰻場之正常池水 ( $0.3 \times 10^3$  cells/c.c.)，及3月南部養鰻場之健康鰻之腎臟 ( $746 \times 10^3$  cells/g) 出現，總共10菌株，此點顯示 *Edwardsiella* 和 *Aeromonas* 之生態分佈不同，前者非常存於池水中及健康鰻魚體內之常見細菌，且無一定在某月份特別佔優勢，又由健康鰻或非罹患潰瘍症之病鰻都可能分離出 *Edwardsiella*。

### 三、病魚之分離菌

如 Table 7 所示，南部養鰻場9月被水黴菌感染之病鰻被分離出 *Edwardsiella*, *Aeromonas*

Table 6. The no. of isolated strain and its range ( $10^8$  cells/g or c. c.) from pond water (W) and intestine (I), spleen (S), kidney (K), and liver (L) of 33 diseased fishes (D) and 171 healthy fishes (H)

	I	S	K	L	W	TOTAL
<i>Edwardstiella</i>	{ <sup>H</sup> { <sup>D</sup>	1 ( 2.7- ) 1 ( 85- )	2 ( 7.5-746 ) 2 ( 30-120 )		2 ( 0.3-0.4 ) 1 ( 2- )	10
Enterobacteriaceae	{ <sup>H</sup> { <sup>D</sup>	8 ( 10-4242 ) 2 ( 38-740 )	6 ( 3.5-26 ) 2 ( 113-240 )	6 ( 0.71-54 ) 3 ( 1.7-8.76 )	18 ( 0.2-524 )	69
<i>Aeromonas</i>	{ <sup>H</sup> { <sup>D</sup>	3 ( 0.67-6900 ) 1 ( 2.5- )	15 ( 2.7-1500 ) 5 ( 3.6-94.6 )	16 ( 0.1-550 ) 4 ( 0.73-12 )	23 ( 0.1-90 ) 8 ( 42-100 )	109
<i>Pseudomonas</i>	{ <sup>H</sup> { <sup>D</sup>	2 ( 100-1228 )	8 ( 0.43-2031 )	5 ( 0.78-310 ) 3 ( 0.057-32.8 )	20 ( 0.5-180 ) 8 ( 0.1-110 )	59
<i>Achromobacter</i>	{ <sup>H</sup> { <sup>D</sup>	3 ( 1.6-4912 )	4 ( 0.4-2.7 ) 1 ( 43.5- )	1 ( 0.28- )	4 ( 0.3-400 ) 2 ( 100-990 )	20
<i>Flavobacterium</i>	{ <sup>H</sup> { <sup>D</sup>	8 ( 1.6-30000 )	8 ( 0.084-730 ) 1 ( 7.6- )	6 ( 0.3-69.6 ) 3 ( 0.28-2.75 )	8 ( 1-26 ) 7 ( 0.2-20 )	51
<i>Alcaligenes</i>	{ <sup>H</sup> { <sup>D</sup>	2 ( 3-1228 )	2 ( 0.22-1503.7 )	1 ( 0.23- ) 2 ( 1.6-44 )	3 ( 0.2-8 )	13
Unidentified G -, rods	{ <sup>H</sup> { <sup>D</sup>	16 ( 4.8-3000 ) 6 ( 2.5-1100 )	27 ( 0.084-1800 ) 8 ( 5.4-470 )	21 ( 0.22-440 ) 6 ( 0.028-148.7 )	62 ( 0.1-1800 ) 14 ( 0.1-130 )	208
TOTAL	138	53	91	77	180	539

Table 7. The isolated bacteria ( $10^3$  cells/g) of intestine (I), spleen (S), kidney (K), and liver (L) from diseased fish

Organ	Southern Taiwan cel-culture ponds					Central Aaiwan cel-culture ponds						
	SEP	OCT	NOV	JAN	JAN	SEP	OCT	NOV	DEC	JAN	MAR	
<i>Edwardsiella</i>	85 120					11000 30						
Enterobacteriaceae						460	10	240	410	120 740	188 3.15 113 1.7	
<i>Aeromonas</i>		9400					8.76	66000	410	78	1187.5	
<i>Pseudomonas</i>	2.1 780	50		169.5			4300	0.73	9.4 4.9	3.6 12 79	98.9 1.2	
<i>Achromabacter</i>				0.057							48.4	
<i>Flavobacterium</i>			29	1694.9			7.6					43.5
<i>Alcaligenes</i>				0.028				0.043				275
Unidentified G -, rods		1100	232 297 5.4	508 337 77.4 0.055		690		470	820	44 120	679.5 6.95 130.3 1.3	
Symptoms	Watermold	Tail-rot	Red-fin*	Red-fin*	Red-fin*	Red-fin*	Red-fin*	Red-fin	Red-fin	Red-fin	Red-fin	Plistophorosis

\* Approximate to red fin disease

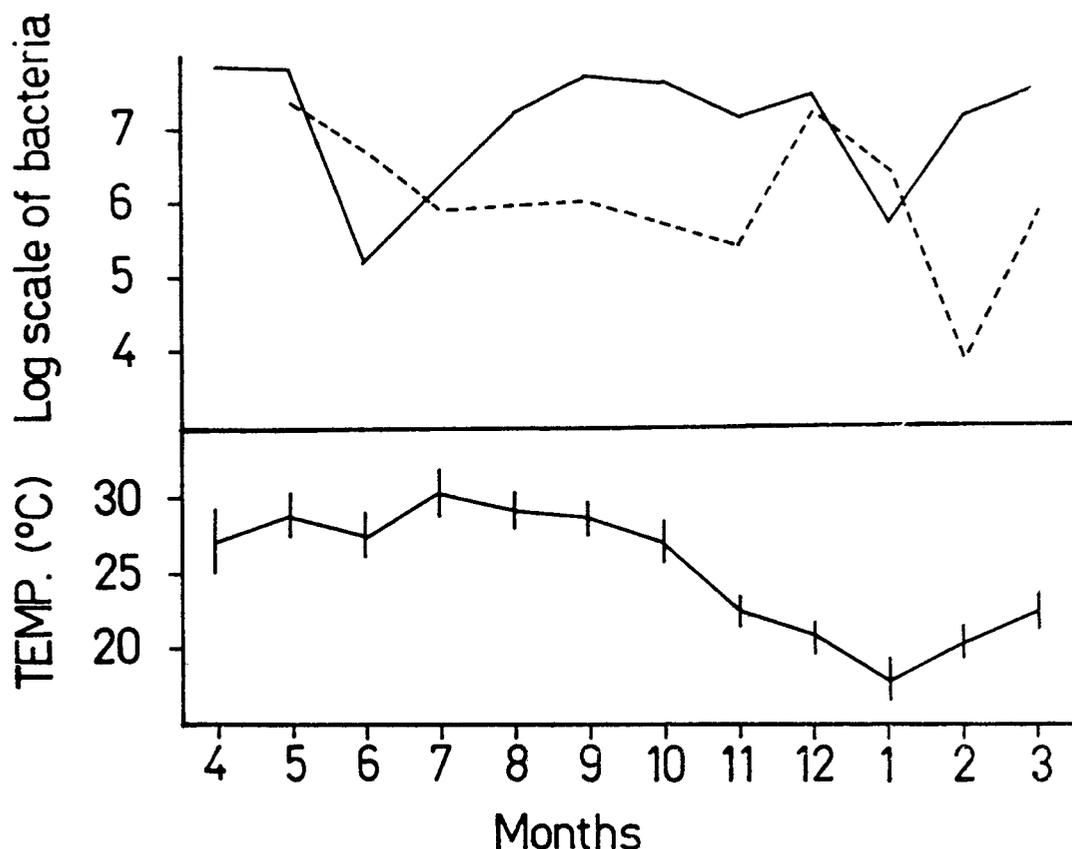


Fig. 2. The comparison of total bacteria between Southern Taiwan eel-culture ponds —— and Central Taiwan eel-culture ponds.....

及 *Pseudomonas*，10月患爛尾病之鰻魚被分離出 *Aeromonas*，11月及1月外觀呈現赤鰭病徵之病鰻，被分離到 *Pseudomonas* 及 *Flavobacterium*，中部養鰻場9月外觀呈現有赤鰭病之病鰻被分離到 *Edwardsiella*，*Enterobacteriaceae* 及 *Alcaligenes*，10月外觀呈現赤鰭病徵之病鰻被分離到 *Enterobacteriaceae*，*Pseudomonas* 及 *Flavobacterium*，11月至1月所採到的皆為典型赤鰭病病鰻，主要分離菌為 *Aeromonas* 及 *Enterobacteriaceae*，3月份採到之病鰻為患凹凸病 (*Plistophorosis*) 之病鰻，非細菌性疾病，除 *Edwardsiella* 及 *Alcaligenes* 外，各菌羣皆曾分離到。

比較健康魚與病魚之總分離菌數如 Fig. 3 所示，除南部養鰻場9月及11月與中部養鰻場之12月及1月為健康魚之含菌量較病魚為高外，病魚之含菌數要比健康魚之含菌數為高，不拘健康魚或病魚腸內含菌比內臟之含菌數為高。

#### 四、底泥、浮游生物及鳥糞之細菌分離

自1977年7月起至1978年2月止，由中部養鰻場之底泥分離出28株菌，南部養鰻場之底泥分離出60株菌，合計88株菌，又浮游生物之細菌分離由中部養鰻場分離出27株菌，南部養鰻場分離出45株菌，合計72株菌，經鑑定結果如 Table 8 所示，由底泥可分離到 *Enterobacteriaceae*，*Aeromonas*，*Pseudomonas*，*Achromobacter*，*Flavobacterium* 及 *Alcaligenes*，由浮游生物可分離到 *Enterobacteriaceae*，*Aeromonas*，*Pseudomonas*，*Achromobacter* 及 *Flavobacterium*，而未能鑑定的細菌則佔大多數，但無任一菌株為 *Edwardsiella*，又由南部養鰻場收集新鮮鳥糞，以 RS medium 分離細菌，亦無 *Edwardsiella* 之發現。

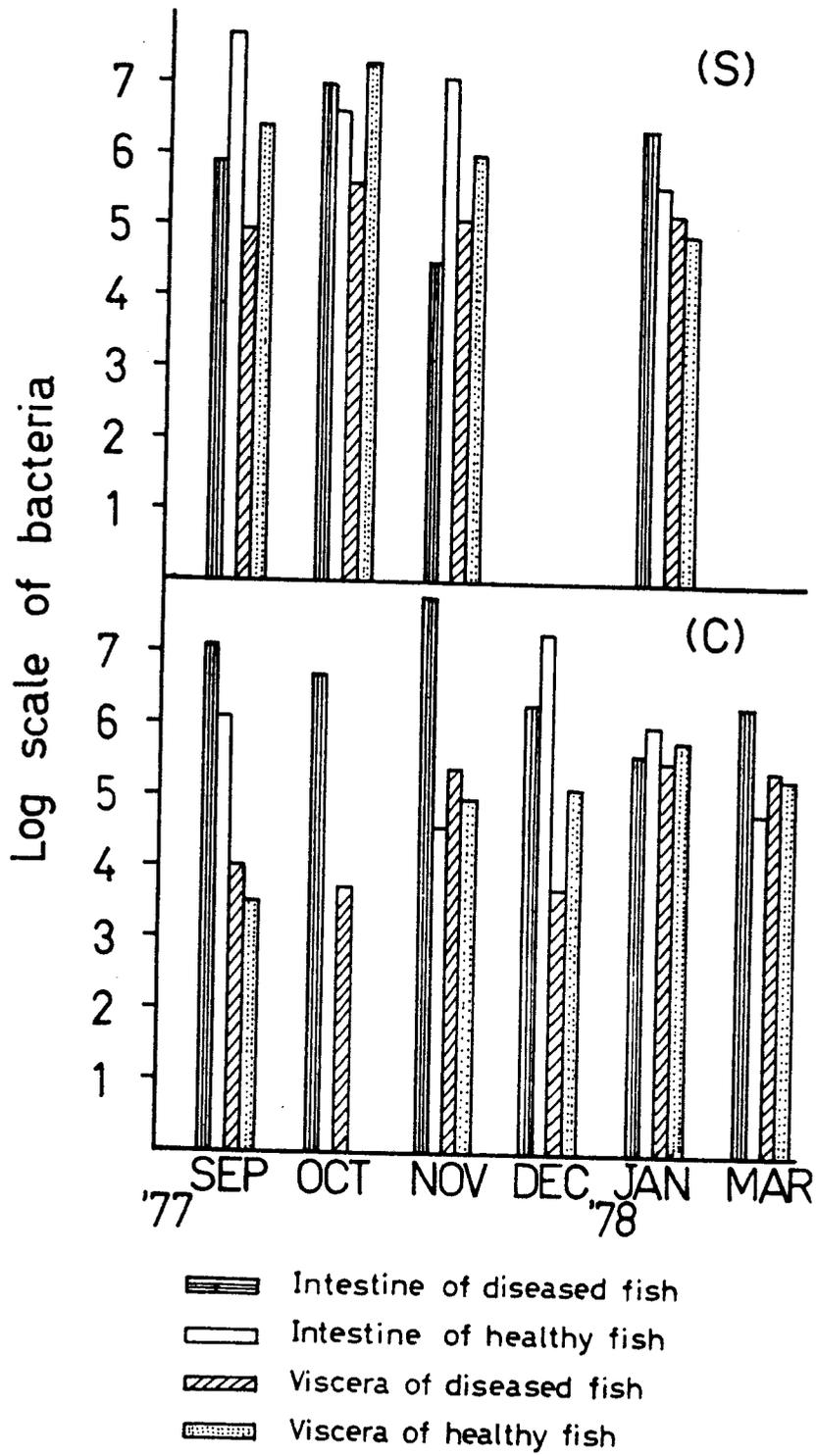


Fig. 3. The comparison of total bacteria between healthy and diseased eels of Southern (S) and Central (C) Taiwan eel-culture pond.

Table 8. The no. of isolates from sediments and plankton

	Sediments	Plankton		Sediments	Plankton
<i>Edwardsiella</i>	0	0	<i>Achromobacter</i>	2	14
Enterobacteriaceae	4	6	<i>Flavobacterium</i>	6	6
<i>Aeromonas</i>	7	19	<i>Alcaligenes</i>	2	0
<i>Pseudomonas</i>	13	14	Unidentified G- rods	54	23
Total				88	72

### 五、*Edwardsiella* 之病原性

由鰻魚之腸、脾、腎及池水分離出之10株 *Edwardsiella* 菌，經病原性試驗後，除9月份由南部養鰻場被水黴菌感染之病鰻的脾臟分離出 *Edwardsiella*，經腹腔注射外觀健康之鰻，於接種後24小時至第4天，體表出現微小紅斑，但於第5天就消失回復正常外，其餘9株菌於接種後兩週內皆未造成任何症狀，顯示分離之 *Edwardsiella* 無病原性。

## 討 論

鍾等 (1973, 1974) 提出有關本省淡水養殖魚類魚體常有細菌之研究報告，指出外觀健康之魚體不拘腸內或內臟之分離菌，以 *Aeromonas*, *Pseudomonas*, Enterobacteriaceae 及 *Flavobacterium* 最為常見<sup>(19,20)</sup>。郭 (1974) 調查日本之細菌相時，亦指出 *Aeromonas*, *Pseudomonas*, Enterobacteriaceae 及 *Flavobacterium* 為較常見之菌羣<sup>(9)</sup>。又鍾與郭將分離菌分為 *Aeromonas*, *Pseudomonas*, Enterobacteriaceae, *Flavobacterium*, *Achromobacter-Alcaligenes*, *Paracolobactrum* (*Edwardsiella*) 及 Unidentified Gram-negative rods 等7個菌羣，指出各菌皆有常年出現之趨勢。本研究結果顯示分離菌為 *Aeromonas* 等8菌羣，其中以 *Aeromonas*, *Pseudomonas*, Enterobacteriaceae 及 *Flavobacterium* 為最常見之菌，與上述鍾及郭之研究結果相同。但月份變化而言，本研究之結果顯示 *Aeromonas* 等8菌羣之出現，除1978年3月南部養鰻場及1977年7月中部養鰻場各菌羣皆可分離到外，其餘月份不拘南部或中部則時有某些菌羣未能分離出，與郭之調查結果不同。此種差異可能是地域不同所造成的。又分離菌中有38.38%為 Unidentified Gram-negative rods 所佔之比例相當高，若林等 (1976) 之研究報告，指出鰻池中未能鑑定之分離菌亦高達36%<sup>(28)</sup>，因此對於水中細菌之鑑定基準實有再詳細研討之必要。

本實驗所分離到的細菌全為革蘭氏陰性菌，鍾等 (1973) 進行本省鰻魚體細菌相之研究亦指出分離菌皆為革蘭氏陰性菌<sup>(19)</sup>，此可能魚體內細菌相受外界水域細菌相之支配，而外界水域存在之細菌幾乎全為革蘭氏陰性菌所致。早於1946 ZoBell 便指出細胞構造和生態環境有很密切的關係，池水中的環境適於對乾燥較敏感 (sensitive) 的革蘭氏陰性菌生存，且細菌成桿狀之表面積要比圓形之表面積為大，更有利其吸收養份，故水中菌幾乎全為革蘭氏陰性桿菌<sup>(29)</sup>。Bisset (1946, 1948) 進行 perch 及 powan 之鰓蓋腔的腹膜腔之菌分離，指出魚體內細菌相係受外圍環境水域中之細菌相支配<sup>(30, 31)</sup>。

比較外觀健康鰻的腸與內臟之分離菌，除少數之例子外，每1g所含菌數而言，腸比內臟高，與過去之研究結果相同，<sup>(19)</sup> 此可能因腸內有餌料富於營養，菌較易繁殖所致，內臟出現較高菌數之個體，腸內幾乎無餌料存在可為明顯的佐證，反町等 (1971) 研究絕食鰻之腸內存在菌之消長，指出腸內菌數因絕食而漸減，以致於幾乎達於零的地步<sup>(22)</sup>。又比較中部與南部之分離菌數，一般而言，不拘腸內或內臟，中部皆比南部略低，此可能因採樣的時間不一致，池水的更換等原因，或是和地理差異有關，則需做更多的調查比較才能了解。若比較健康魚與病魚之內臟分離菌數，除少數之例子外，

病魚皆比健康魚高，此可能因病魚之抵抗力較低，易受細菌之侵入，同時侵入內臟之細菌亦易繁殖所致。由鍾等 (1974) 所提出 *Aeromonas hydrophila* 在鰻體內消長之研究報告<sup>(20)</sup>，可明白侵入魚體內細菌消長之機制，即細菌侵入魚體內後，若魚體之防禦機能無法控制及消滅之，則侵入菌會繁殖，達到某一菌數時（腎臟及脾臟每 1 g 達  $10^7$  cells 而肝臟及血液每 1 g 或 1 c.c. 達  $10^6$  cells）魚體會致病死亡。至於少數之例子，病魚內臟之分離菌數較健康魚者為低，此與病魚發生之魚池撒佈及投與抗菌劑有密切的關連，因此時魚體內吸收入相當濃度之抗菌劑，使侵入體內繁殖之細菌受到控制及消滅。

Sakazaki 和 Murata (1959) 首先發現 *Edwardsiella* 菌，並暫定名為 Asakusa group<sup>(10)</sup>，後來 Hoshina (1962) 由病鰻分離出此菌，並定名為 *Paracolobactrum anguillimortiferum*<sup>(11)</sup>，至 1965 年 Ewing 才正式命名為 *Edwardsiella tarda*<sup>(12)</sup>，1975 年 Sakazaki 又根據命名法則之優先權重新定名為 *Edwardsiella anguillimortiferum*<sup>(13)</sup>，並為臺灣之研究者所採用<sup>(4)</sup>。此菌最早見於人類之臨床病例當為 1959 年有自腦膜炎之患者分離到此菌之報告<sup>(14)</sup>，而後 Bockemühl 等 (1971) 提出 *Edwardsiella* 和 Salmonellosis 有關之報告<sup>(17)</sup>，而引起許多研究者對此菌的重視。除此之外，1967 年 Sakazaki 證實此菌為蛇之常在細菌<sup>(15)</sup>，1970-1972 White 等在 Florida 的 Gainesville 四十公里半徑內的湖泊和溪流的水，分離出 *Edwardsiella*，並由生病的鱷 (*Alligator mississippiensis*) 鸕鶿 (*Pelecanus occidentalis carolinensis*) 禿鷹 (*Haliaeetus leucocephalus*) 海鷗 (*Larus delawarensis*) 蒼鷺 (*Ardea herodias*) 鶴 (*Grus canadensis*) 及普通水鳥 (*Gavia immer*) 和鱸 (*Micropterus salmoides*) 分離出此菌<sup>(16)</sup>，Dwight 等 (1974) 由豬的腸內分離出此菌<sup>(18)</sup>，Berg 等 (1972) 在 Oregon 的海岸檢查海鷗鳥糞之污染情形時，亦分離到 *Edwardsiella*<sup>(18)</sup>。至於此菌引起魚病研究者之注目，可謂自 Hoshina (1962) 提出報告指出此菌與 *Aeromonas hydrophila* 同為鰻赤鳍病之病原菌開始<sup>(28)</sup>，近年來本省養殖鰻受此菌之侵襲，發生很大的損失，更受到本省魚病研究者的重視，且 *Edwardsiella* 已被證實為引起潰瘍症之病原菌<sup>(4)</sup>。有關鰻池 *Aeromonas* 之分佈已有詳細的研究<sup>(9)</sup>，而 *Edwardsiella* 則甚少，郭 (1970) 調查日本愛知縣豐橋地區鰻池細菌相時，由池水分離到 *Edwardsiella*<sup>(9)</sup>，若林等 (1973—1975) 調查靜岡縣吉田地區之正常鰻池細菌相時，却僅於 1973 年 7, 9, 11 等 3 個月及 1974 年 5 月由池水分離到 9 株 *Edwardsiella* 菌<sup>(28)</sup>，彼等 (1976—1977) 調查發生潰瘍症狀之鰻魚池時，亦僅在 1976 年 8, 12 兩個月及 1977 年 2 月由池水分離<sup>(34)</sup>，由此可見本研究之結果與過去報告有共同的特徵，即不論正常或是發病池之池水，健康鰻或是非罹患潰瘍症之病鰻體，皆很少能分離到 *Edwardsiella*。此點與 *Aeromonas* 在鰻池之生態分佈，不論池水或是健康鰻皆可容易分離到有顯著的不同。又若林等 (1976) 由鰻池之底泥及浮游生物可分離出 *Edwardsiella*，並認為此菌似乎存活於池底及浮游生物中，因此不容易由池水分離到此菌<sup>(34)</sup>，此種認定似乎很牽強，探其分離細菌之方法，實無法排除池底底泥及池中浮游生物不受池水之影響。又本研究利用 7  $\mu\text{m}$  之 millipore 過濾池水，由池水能分離到此菌，由浮游生物反而無法分離到，因此著者認為 *Edwardsiella* 非如 *Aeromonas* 一樣為常存於鰻池之常見細菌。

既然 *Edwardsiella* 並非如 *Aeromonas* 常存於池水中，因此 *Edwardsiella* 菌如何進入鰻池則有究明之必要，推測此菌進入鰻池之原因，可能為水源及飼料受到污染而含有此菌，或是蛇及飛鳥排泄物中含有此菌而被排入池中等等，著者就其中最可能引入此菌入池中之飛鳥排泄物，先加以探討，因 Berg 等 (1972) 提出報告，指出飛鳥之排泄物中含有此菌<sup>(18)</sup>，同時著者發現有許多的飛鳥停棲於池邊，且池邊走道及排水溝等處散佈許多乾涸的鳥糞，因此著者便試由養鰻場採取飛鳥之排泄物進行細菌分離，自 1977 年 10 月起至 1978 年 2 月止，觀察南部養鰻場之飛鳥活動狀態，發現每天落日前 1 小時左右，飛鳥成羣飛來，或停留電線桿或低掠池面，待日落則全部飛離，僅留下四處可見的鳥糞，但由於池邊通常寬 30-40 cm 當作走道，因此鳥糞絕大部份皆落入池水中，可是細菌分離之結果却顯示無 *Edwardsiella* 存於鳥糞中，此可能由於種種之原因而無法分離到此菌，譬如採樣之數目太少，

採樣之時間不對，鳥糞已過乾 *Edwardsiella* 菌已死滅，或使用之 RS medium 不適於鳥糞中 *Edwardsiella* 之分離等等，或者鳥糞中根本無 *Edwardsiella* 菌存在，有關此些問題以及其他可能引入 *Edwardsiella* 之可能性，實有待將來進一步詳盡的探討。

Sneiszko (1964) 指出魚類的病原菌可分成兩種，一為絕對性病原菌(Obligate pathogen)<sup>(21)</sup>，另一為條件性病原菌 (Facultative pathogen), *Aeromonas hydrophila* 已經被許多研究者認為是條件性病原菌<sup>(19)</sup>，而 *Edwardsiella* 是否亦為條件性病原菌便成為魚病研究者探討之課題。依本研究之結果，10 株 *Edwardsiella* 菌，以郭 (1975—1976) 所提出之病原性試驗所需接種量之兩倍，接種鰻魚腹腔<sup>(4)</sup>，僅有 1 株 *Edwardsiella* 於注射鰻體 24 小時後至第 4 天，體表微顯紅斑至第 5 天消失外，其餘菌株注射後，供試鰻魚無任何的症狀出現，因此可認定此 9 株 *Edwardsiella* 菌為非病原性菌株。若林等 (1973, 1975) 分別自患潰瘍症之病鰻分離出 *Edwardsiella* 並證實具有病原性<sup>(28, 35, 36)</sup>，郭等 (1975—1976) 自罹患潰瘍症之病鰻分離出之 *Edwardsiella* 菌亦具有病原性<sup>(4)</sup>，因此可推斷 *Edwardsiella* 菌可分為病原性菌株及非病原性菌株兩種，至於本研究由鰻脾臟分離出而僅能引起接種鰻體表出現紅斑之 *Edwardsiella* 菌株，可否視為準病原性菌株，則有待進一步的探討，但郭 (1968) 由金魚分離到之 *Edwardsiella* (*Paracolobactrum*) 能引起接種金魚之接種部位組織崩壞，甚至使脊椎骨露出，而接種魚仍能活存之報告<sup>(37)</sup>，可推想準病原性菌株存在之可能極大，此點與 *Aeromonas* 可分為病原性菌株，準病原性菌株及非病原性菌株相似<sup>(6)</sup>。至於 *Edwardsiella* 是否與 *Aeromonas* 相同為條件性病原菌，則有待將來詳細的探討。又宮崎等 (1976) 報告潰瘍症之組織病理時，指出肝臟之病變最為明顯<sup>(38, 39, 40)</sup>，然本實驗僅從鰻魚之腸、脾臟、腎臟及池水分離出 *Edwardsiella*，由肝臟却未能分離到，其原因何在，實有待詳盡的探討。

## 摘 要

自 1977 年 4 月起至 1978 年 3 月止，自臺灣中部彰化及南部高屏兩地區各三家養鰻場採集大小約 150-200 g 罹病及外觀健康之鰻魚，進行腸、內臟、池水、底泥、浮游生物及鳥糞之細菌分離及分析，得下列之結果。

1. 由 204 尾鰻魚及池水共採 539 株菌，分成 *Edwardsiella*, *Aeromonas*, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* 及 Unidentified Gram-negative rods 等八菌羣，其中以 *Aeromonas* 佔 20.22% 為最多。
2. 腸、內臟及池水之含菌數而言，以腸為最高，內臟次之，池水最低。又不拘腸、內臟或池水，中部養鰻場之分離菌數有較南部者為低之現象。
3. 每克腸及內臟之含菌數，外觀健康鰻較罹病鰻低。
4. *Edwardsiella* 和 *Aeromonas* 之生態分佈不同，前者非常存於池中及健康鰻魚體內之常見細菌。
5. 由底泥及浮游生物共分離到 160 株菌，無一株為 *Edwardsiella*，此與若林等 (1977) 由底泥及浮游生物皆可分離到 *Edwardsiella* 之結果不同。
6. 10 株 *Edwardsiella* 經病原性試驗結果，其中一株由鰻魚脾臟分離出之 *Edwardsiella*，於注射健康鰻後 24 至 96 小時內，體表呈現微小紅斑外，其餘 9 菌株，皆無病原性。

## 謝 辭

本實驗承指導教授郭光雄博士之殷切指導，研究標本之採集及部份生物化學特性的試驗，得臺大動物系魚病研究室黃欣汝小姐之協助，得以順利完成，謹致以最大之謝忱。



参 考 文 献

- 1) LIN, Y. S. and S. M. HSIAO (1977). The statistic analysis of eel disease in Taiwan. JCRS Reports on Fish Disease Research (I) 57-61. (In Chinese)
- 2) HOSHINA, T. (1962). ウナギの鰭赤病に関する研究。東京水産大学特別研究報告 6(1): 1-104.
- 3) WAKABAYASHI, H. and S. EGUSA (1973). *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel disease. Bull. Jap. Soc. Fish. 39(9): 931-936.
- 4) KUO, S. C., H. Y. CHUNG and G. H. KOU (1977). *Edwardsiella anguillimortiferum* isolated from edwardsiellosis of cultured eel (*Anguilla japonica*). JCRS Reports on Fish Disease Research (I) 1-6. (In Chinese)
- 5) EGUSA, S. (1967). On the motile Aeromonads. Fish Path. 2(1): 36-49. (In Japanese)
- 6) KOU, G. H. (1972). Studies on the occurrence and biochemical properties of virulent and avirulent strains of freshwater fish pathogen, *Aeromonas liquefaciens*. J. Fish. Soc. Taiwan 1(2): 8-13. (In Chinese)
- 7) KOU, G. H. (1973). Studies on the pathogenicity of the fish pathogen, *Aeromonas liquefaciens*-III. Variation of pathogenicity caused by inoculation into fish. J. Fish. Soc. Taiwan 2(2): 16-19. (In Chinese)
- 8) CHUNG, H. Y. and G. H. KOU (1974). Studies on the change in number of cells of fish pathogen, *Aeromonas hydrophila* inoculated intramuscularly in eels. J. Fish. Soc. Taiwan 3(2): 15-20. (In Chinese)
- 9) KOU, G. H. (1974). Studies on the bacterial flora in eel-culturing ponds with special reference to *Aeromonas*. J. Fish. Soc. Taiwan 3(2): 21-27. (In Chinese)
- 10) SAKAZAKI, R. and Y. MURATA (1962). The new group of the Enterobacteriaceae, the Asakusa group. Japan. J. Bact. 17: 616-617.
- 11) HOSHINA, T. (1962). On a new bacterium, *Paracolobactrum anguillimortiferum* new species. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 28(2): 162-164.
- 12) EWING, W. H., A. C. MCWHORTER, M. R. ESCOBAR and A. H. LUBIN (1965). *Edwardsiella*, A new genus of Enterobacteriaceae based on a new species, *E. tarda* Internatl. Bull. Bact. Nomencl. Taxon. 15(1): 33-38.
- 13) SAKAZAKI, R. and K. TAMURA (1975). Priority of the specific epithet *anguillimortiferum* over the specific epithet *tarda* in the name of the organism presently known as *Edwardsiella tarda*. Internatl. J. Syst. Bacteriol. 25(2): 219-220.
- 14) SONNENWIRTH, A. C. and B. A. KALLUS (1968). Meningitis due to *Edwardsiella tarda*. Amer. J. Clin. 49(1): 92-95.
- 15) SAKAZAKI, R. (1967). Studies on the Asakusa group of Enterobacteriaceae (*Edwardsiella tarda*). Japan. J. Med. Sci. Biol. 20: 205-212.
- 16) WHITE, F. H., C. F. SIMPSON and L. E. WILLIAMS (1973). Isolation of *Edwardsiella tarda* from aquatic animal species and surface water in Florida. J.



- Wild. Dis. 9: 204-208.
- 17) BOCKEMÜHL, J., R. P. URAI and F. BURKHARDT (1971). *Edwardsiella tarda* associated with human disease. Path. Microbiol. 37: 393-401.
  - 18) BERG, R. W. and A. W. ANDERSON (1972). Salmonellae and *Edwardsiella tarda* in gull feces: a source of contamination in fish progressing plants. Appl. Microbiol. 24(3): 501-503.
  - 19) CHUNG, H. Y. and G. H. KOU (1973). Studies on the bacterial flora of fish body—I. Bacteria in gill, intestine, blood and viscera of apparently healthy pondcultured eels. J. Fish. Soc. Taiwan 2(2): 20-25. (In Chinese)
  - 20) CHUNG, H. Y. and G. H. KOU (1974). Studies on the bacterial flora of fish body—II. Bacteria isolated from viscera and blood of pond-cultured diseased eels. J. Fish. Soc. Taiwan 3(1): 23-28. (In Chinese)
  - 21) SNIESZKO, S. F. (1964). Remarks on some factors of epizootiology of bacterial fish disease. Rev. Ind. Microbiol. 5: 97-100.
  - 22) NAEGELI, V. (1957). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th ed., Williams and Wilkins Co. p. 33.
  - 23) GIBBS, B. M. and F. A. SKINNER (1969). Identification method for microbiologist part A. Academic Press. London and New York.
  - 24) SHEWAN, J. M., G. HOBBS and W. HODGKISS (1960). A determinative scheme for the identification of certain genera of Gram-negative with special reference to Pseudomonodaceae. J. Appl. Bact. 23: 379-390.
  - 25) DAVIS, B. D., R. DULBECCO, H. N. EISEN, H. S. GINSBERG and W. B. WOOD (1974). Microbiology 2nd ed., Harper & Row, Publishers. Hagerstown, Maryland. pp. 755-758.
  - 26) EMMETT, B. S. and G. L. BULLOCK (1976). Rapid diagnostic approaches in the identification of Gram-negative bacterial disease of fish. Fish Path. 10(2): 187-190.
  - 27) 飯塚廣、駒形和南 (1967). *Pseudomonas* 屬細菌なちびにその関連菌の分類検索について，第一回合連合微生物學シンポジウム報告，日本學術會議微生物學研究連絡委員會。
  - 28) WAKABAYASHI, H., K. KANAI and S. EGUSA (1976). Ecological studies of fish pathogenic bacteria in eel farm—I. Isolation of aerobic bacteria from pond water. Fish Path. 11(2): 63-66. (In Japanese)
  - 29) ZOBELL, C. E. (1946). Marine Microbiology. Chronica Botanica Co. Waltham, Mass. p. 240.
  - 30) BISSET, K. A. (1946). The effect of temperature on non-specific infections of fish. J. Path. Bact. 58: 251-258.
  - 31) BISSET, K. A. (1948). Seasonal changes in the normal flora of fresh water fish. J. Hyg. Camb. 46: 94-97.
  - 32) SORIMACH, M. and S. EGUSA (1971). Aerobic bacteria in the intestines of pond-cultured eels. Fish Path. 6(1): 1-7. (In Japanese)
  - 33) DWIGHT, R. O., S. L. NELSON and J. B. ADDISON (1974). Isolation of *Edwardsiella tarda* from swine. Appl. Microbiol. 27(4): 703-705.

- 34) 若林久嗣、山下潤、江草周三 (1977). 養鰻における魚病細菌の生態に関する研究 — II *Edwardsiella tarda* について昭和52年度日本水産學會春季大會演講要旨集。
- 35) WAKABYASHI, H. and S. EGUSA (1973). Seasonal changes of bacterial infections among pond-cultured eels (*Anguilla japonica*). Fish Path. 8(1): 91-97. (In Japanese)
- 36) WAKABYASHI, H. and S. EGUSA (1975). Seasonal changes of bacterial infections among pond-cultured eels, second series. Fish Path. 9(2): 193-198. (In Japanese)
- 37) KOU, G. H. and S. EGUSA (1968). A paracolon isolated from eels and gold fish. Fish Path. 3(1): 58-61. (In Japanese)
- 38) MIYAZAKI, T. and S. EGUSA (1976). Histopathological studies of edwardsiellosis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*)—I. Suppurative interstitial nephritis form. Fish Path. 11(1): 33-43. (In Japanese)
- 39) MIYAZAKI, T. and S. EGUSA (1976). Histopathological studies of edwardsiellosis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*)—II. Suppurative hepatitis form. Fish Path. 11(2): 67-75. (In Japanese)
- 40) MIYAZAKI, T. and S. EGUSA (1976). Histopathological studies of edwardsiellosis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*)—III. Elvers and anguilletes. Fish Path. 11(3): 127-131. (In Japanese)