

鰻線感染水黴菌 *Saprolegnia ferax* 之因子

郭上卿 郭光雄*

Conditions for the Artificial Infection of *Saprolegnia ferax* in Elver

Shang-Ching Kuo and Guang-Hsiung Kou*

Abstract

Observations on the mycology and pathology of saprolegniasis of elver are herein reported. The water mold, *Saprolegnia ferax*, was invariably isolated from the diseased elver *Anguilla japonica*.

Elvers with skin lesions or pretreated with bacterial pathogens, *Edwardsiella anguillimortifera* and *Flexibacter columnaris*, were readily infected with *S. ferax*. However, healthy elvers were resistant to artificial *S. ferax* infection. The infection and accumulative mortality rates in various test conditions were decreased by the supplement of chloramphenicol in the aquarium.

It is suggested that *S. ferax* is a secondary invader to damaged or necrotic tissues on the elver.

緒 言

本省在冬季寒流來襲，水溫驟降時，養殖鰻極易受水黴菌侵襲，而造成重大之損失，尤以鰻線為甚。此因鰻線與成鰻不同，水黴菌之菌絲容易侵入鰻線之皮下組織，而侵犯體內重要器官，故一旦遭受寄生，極易死亡⁽¹⁾。又，每年由沿岸水域所捕獲之鰻線皆不敷養鰻業之需求，而由日本、韓國及關島等地進口為數頗多之鰻苗。同時鰻苗之飼養皆在冬末春初之際，時值氣溫變化多端，水黴病流行之季節。因此防治鰻線水黴病發生之研究，為相當重要的課題。

Egusa (1965 a,b)^(2,3)，以健康幼鰻為材料，使之與水黴菌 *Saprolegnia parasitica* 接觸，仍無法感染水黴病，若經 *Aeromonas hydrophila* 之肌肉注射，再使之與 *S. parasitica* 接觸，則易受感染。翌年 (1966)⁽⁴⁾，他用鰻線為材料，以直接及間接的方法，使之與 *S. parasitica* 接觸，亦均無法使鰻線感染水黴病。又，Neish (1977)⁽⁵⁾ 由 sockeye salmon 病魚身上分離出 *Saprolegnia* spp.，同時認為水黴菌為機會性寄生菌 (Opportunistic parasite)。由簡 (1979)⁽⁶⁾ 之報告，知本省養殖鰻之水黴病主要是由 *Saprolegnia* 屬水黴菌所引起的，因此瞭解 *Saprolegnia* 屬水黴菌的感染機制，尤其是其可能之感染誘因，為防止本省水黴病之發生，不可缺失之步驟。本研究以鰻線為材料，進行水黴菌之感染實驗，檢討其感染誘因，茲將所得之結果在此提出，以供水黴病防治之參考。

* 國立台灣大學理學院動物系

Department of Zoology, College of Science, National Taiwan University

材料與方法

(一) 水黴菌之分離與鑑定

至養鰻池採集外觀有水黴菌寄生之病鰻 (Fig 1.)，取其菌絲接種於 Sabround dextrose agar 上，在 22°C 下培養 24 至 48 小時後，割取一塊長有菌絲之 Sabround dextrose agar 放入無菌蒸餾水中，同時投入煮沸過，去殼之亞麻種子 (Hemp seed)，以誘導游孢子 (Zoospore) 的着生。此步驟分為二組進行，一組之培養溫度為 22°~24°C，隨時鏡檢其游孢囊 (Zoosporangium) 之形態及游孢子的釋放情形，做為屬之鑑定。另一組之溫度為 5°~10°C，刺激其產生藏卵器 (Oogonium) 及藏精器 (Antheridium)，由其形狀、構造，做為種之鑑定。

(二) 人工感染實驗

由病鰻體表分離出之水黴菌株，先進行吳郭魚之感染實驗。吳郭魚之體長為 5~8 公分，將其尾部兩側鱗片用鑷子拔去數片，蓄養於冰箱中，每隔 2~4 天即投入經 24~48 小時培養，滿佈具有游孢子囊菌絲之亞麻種子。

選取對吳郭魚有感染力之菌株，做為進行鰻線感染實驗之材料。將健康鰻線分成 13 組，每組 9~11 尾，各組供試魚均先經過處理後，才進行感染實驗，其處理方式分別詳述如下：

- 第一組：為對照組，與其他各組之實驗同時進行，即將外觀健康之鰻線放養於水箱內，同時加入水黴菌。
- 第二組：於鰻線背部肌肉，注射微量滅菌過之 0.85% NaCl 後，放養於水箱內，同時加入水黴菌。本組與第一組同為進行注射細菌之各組實驗時之對照組。
- 第三組：在鰻線之背部或尾部，用解剖刀割一傷口後，放養於水箱內，同時加入水黴菌。
- 第四組：於鰻線背部肌肉，注射微量之 *Edwardsiella anguillimortifera* 菌液 (1×10^8 cells/ml) 後，放養於水箱內，並加入水黴菌。
- 第五組：在鰻線之背部，用解剖刀割一傷口，於傷口處塗上微量之細菌 *E. anguillimortifera* 後，放養於水箱內，同時加入水黴菌。
- 第六組：在鰻線之背部，用解剖刀割一傷口後，在 *Flexibacter columnaris* 菌液 (4×10^8 cells/ml) 中浸十分鐘，再放養於水箱內，同時加入水黴菌。
- 第七組：鰻線在 *F. columnaris* 菌液中浸十分鐘後，放養於水箱內，同時加入水黴菌。
- 第八組：鰻線在 *F. columnaris* 菌液中浸十分鐘後，放養於水箱內蓄養一天，第二天再加入水黴菌。
- 第九組：於鰻線背部肌肉，注射微量之 *E. anguillimortifera* 後，放養於水箱內蓄養一天，第二天加入氯黴素 (Chloramphenicol)，使蓄養水中之濃度為 45ppm，同時加入水黴菌。
- 第十組：於鰻線背部肌肉，注射微量之 *E. anguillimortifera* 菌液後，放養於水箱內，同時加入水黴菌蓄養一天，第二天再加入氯黴素 (45ppm)。
- 第十一組：在鰻線之背部或尾部，用解剖刀割一傷口後，放養於水箱內蓄養一天，第二天再加入氯黴素 (45ppm) 及水黴菌。
- 第十二組：在鰻線之背部或尾部，用解剖刀割一傷口後，放養於水箱內，同時加入水黴菌蓄養一天，第二天再加入氯黴素 (45ppm)。
- 第十三組：在鰻線之背部或尾部，用解剖刀割一傷口後，放養於水箱內，同時加入水黴菌及鏈黴素 (Streptomycin sulfate, 100ppm)。

各組實驗均在 16°~18° C 下進行，鰻線之體長約 6 公分，實驗期間為 10 天，期間內不換水，不給餌，同時每隔 2~4 天即加入長有水黴菌之亞麻種子數粒。

ㄟ 病鰻線之組織觀察

人工感染實驗之鰻線中，經由肉眼觀察，可辨認體表已感染水黴菌菌絲者，選取其剛死亡或瀕臨死亡者，整隻固定於 Bouin's soln 中，做成切片，以 Hematoxylin-eosin 染色，再以顯微鏡觀察之。

結 果

ㄟ 水黴菌之分離與鑑定

水黴菌接種於含有亞麻種子的蒸餾水中，在 22° C 下經 24~48 小時後，即可見游孢子囊成紡錘形 (Fusiform) 或棍棒狀 (Clavate) (Fig. 2)，並可於成熟者之囊內觀察到游孢子，其游孢子之釋放方式是由囊的頂端開口，游孢子一個個由此游出 (Saprolegnoid) (Fig. 3)，偶爾可觀察到游孢子囊側端開口之現象 (Lateral exit papilla) (Fig. 4)，空游孢子囊之更新為內部出芽法 (Internal proliferation) (Fig. 6)。另有厚膜孢子 (Chlamyospore, gemma) 在菌絲的頂端或中間處形成，形狀不規則 (Fig. 5)，能耐惡劣環境，但在環境良好的情況下，可發芽形成游孢子囊，產生游孢子。

在 22° C 下培養之水黴菌，菌絲生長雖然比較迅速，但無藏卵器產生。在 5°~10° C 下培養之水黴菌，菌絲生長則較緩慢，但經 48 小時培養，即可觀察到藏卵器 (Fig. 7) 其形狀為球形或倒梨形，內有一至數個不等之卵孢子 (Oospore)。由游孢子之釋放方式及藏卵器之形狀，依 Seymour (1970)⁽⁷⁾，畑井和江草 (1976)⁽⁸⁾ 及簡 (1979)⁽⁶⁾ 之報告，本實驗所使用之水黴菌可鑑定為 *Saprolegnia ferax*。

ㄟ 人工感染實驗

前八組實驗 (Table I) 中，即實驗期間內，蓄養水中未投入任何抗生素者，健康鰻線及經注射

Table I. Mortality and infection rates of healthy and injured elvers treated by different microorganisms.

Group	Treatments	Mortality rate	Infection rate
1	healthy elver + fungus	0 (0/10)*	0 (0/10)**
2	0.85% NaCl injection + fungus	0 (0/10)	0 (0/10)
3	injured elver (A.I.)*** + fungus	90 (9/10)	90 (9/10)
4	<i>E. anguillimortifera</i> injection + fungus	80 (8/10)	80 (8/10)
5	injured elver (A.I.) + smeared with <i>E. anguillimortifera</i> + fungus	20 (2/10)	10 (1/10)
6	injured elver (A.I.) + immersed in <i>F. columnaris</i> suspension for 10 mins + fungus	90 (9/10)	80 (8/10)
7	immersed in <i>F. columnaris</i> suspension for 10 mins + fungus	56 (5/9)	44 (4/9)
8	immersed in <i>F. columnaris</i> suspension for 10 mins + fungus (2nd day)	90 (9/10)	80 (8/10)

*: no. of dead fish/no. of experimental fish
 **: no. of infected fish/no. of experimental fish
 ***: Artificial injury

0.85% NaCl 之鰻線均無法被水黴菌感染，而割傷組（第三組），割傷後再浸過 *F. columnaris* 菌液組（第六組）及浸 *F. columnaris* 菌液組（第八組）等三組的鰻線累積死亡率均達 90%，若以肉眼可觀察到鰻線體表感染菌絲者為基準，則前者之感染率為 90%，後二者為 80%。另，注射 *E. anguillimortifera* 菌液組之鰻線累積死亡率較低，為 80%，感染率亦為 80%。浸 *F. columnaris* 菌液組之第七組及第八組中，第七組在第一天即加入水黴菌，第八組在第二天才加入水黴菌，結果第八組之累積死亡率較高，為 90%，感染率亦較高為 80%。

後五組實驗（Table II）中，即實驗期間內，蓄養水中，投入抗生素。注射 *E. anguillimortifera* 菌液之第九組及第十組均加入氯黴素，第九組是第二天才加入水黴菌，第十組則於第一天即加入水黴菌，前者之累積死亡率較高，為 30%，後者較低為 10%，感染率則均為 0%；另，割傷之各組

Table II. Mortality and infection rates of healthy and injured elvers treated by different microorganisms and antibiotics.

Group	Treatments		Mortality rate	Infection rate
	1st day	2nd day		
9	<i>E. anguillimortifera</i> injection	45ppm CP+fungus	10 (1/10)*	0 (0/10)**
10	<i>E. anguillimortifera</i> injection +fungus	45ppm CP	30 (3/10)	0 (0/10)
11	injured elver (A.I.)***	45ppm CP+fungus	50 (5/10)	20 (2/10)
12	injured elver (A.I.) +fungus	45ppm CP	45 (5/11)	18 (2/11)
13	injured elver (A.I.) +fungus+100ppm S	—	56 (5/9)	33 (3/9)

CP: chloramphenicol, S: streptomycin sulfate

*: no. of dead fish/no. of experimental fish

** : no. of infected fish/no. of experimental fish

***: Artificial injury

（第十一、十二、十三組），亦分別加入氯黴素或鏈黴素，其累積死亡率均較第九、十組之死亡率高，為 50%、45%、56% 感染率亦較高，為 20%、18%、33%，其中第十一、十二組，雖加入水黴菌之時間不同，但累積死亡率及感染率均無明顯之差異。

（三）病鰻線之組織觀察

在鰻線體表着生水黴菌菌絲處，有細胞增生（Proliferation）及細胞溶解（Lysis）之現象（Fig. 8.9），同時亦可觀察到水黴菌之菌絲穿入肌肉（Fig. 10,11），有的甚至深入肌肉內部，靠近結締組織（Fig. 12）。

討 論

Hoshina (1960)⁽⁹⁾曾對鰻魚之水黴病加以研究，由養鰻池中分離出十三種屬於 *Saprolegniaceae* 科之黴菌，發現僅有四種具有感染性，其中包括 *Saprolegnia parasitica* 及 *S. ferax*，但由病鰻體上則僅分離到 *S. parasitica*，而未分離到 *S. ferax*。鍾 (1973)⁽¹⁰⁾由患水黴病之鰻線體表及養鰻池之池水分離出 *S. ferax*。Neish (1977)⁽⁶⁾在患水黴病之鮭魚身上亦分離出 *Saprolegnia* spp.。著者分離到之水黴菌的游孢子釋放方式，為一個個由孢子囊之開口排出游走，此即為 *Saprolegnia* 屬之特徵⁽⁷⁾，同時其藏卵器之形狀為球形或倒梨形且生長旺盛。Seymour (1970)⁽⁷⁾指出 *S. ferax*

之藏卵器壁通常都有凹入之孔隙 (Pit)，只有極少數的不具有，本實驗所分離的水黴菌之藏卵器雖在高倍顯微鏡下，亦無法觀察到壁上的孔隙，但依其藏卵器之形狀及生長情形，著者認為仍應列為 *S. ferax* ^(6,7,8)。

由人工感染實驗結果 (Table I) 顯示健康之鰻線及經 0.85% NaCl 注射之鰻線，都無法被水黴菌感染，而經機械性破壞有外傷或細菌 (*E. anguillimortifera* 或 *F. columnaris*) 處理之鰻線容易受水黴菌感染，其累積率及感染率均高，此誘使水黴菌之孢子能着生於受到外傷或細菌感染之皮膚，進而感染魚體。在先經 *F. columnaris* 菌液處理的實驗中，一組是第一日即加入水黴菌，一組是第二天才加入水黴菌，結果第二天加入水黴菌者之累積死亡率及感染率均較高，此可能是第二天才加入水黴菌組，因鰻線受 *F. columnaris* 感染後之時間較長，其體內生理及體表皮膚已發生變化，在此情況下水黴菌之孢子較易着生、發芽，關於此點仍有待進一步的究明。Egusa (1965a, b) ^(2,3) 提出在成鰻中，水黴菌為二次感染 (Secondary infection) 因子，而細菌 (*A. hydrophila*) 為初次感染 (Primary infection) 因子；江草 (1966) ⁽⁴⁾ 又提出引起鰻線受水黴菌感染之三可能原因：(1) 體內器官受 *Aeromonas* 感染。(2) 皮膚受細菌感染。(3) 誘因不明，可能與細菌無關，而為寄生蟲之外部寄生或其他特殊生理障礙。Willoughby (1970) ⁽¹¹⁾ 稱魚類受水黴菌感染前之時期為 "Pre-fungal stage"，此一時期內魚體體表具可被游孢子着生、發芽之條件。Wolke (1975) ⁽¹²⁾ 亦認為水黴菌常為二次侵襲者，即魚體受到機械性外傷或初次性的細菌、寄生蟲、濾過性病毒的感染，使得組織壞死後，水黴菌再感染之。另 Willoughby (1972) ⁽¹³⁾ 提出魚體之黏液具有抗黴菌之作用，若魚體表皮發生病變受到破壞，血液循環受阻，粘液之產生異常，則易受水黴菌寄生，這些論點與本研究之結果頗為一致。

著者在感染實驗中加入抗生素，則鰻線之累積死亡率及感染率均顯著下降。其中注射 *E. anguillimortifera* 菌液之各組與割傷之各組受水黴菌之感染情形不同，後者之累積死亡率及感染率均較前者高，此可能是氯黴素抑制了 *E. anguillimortifera* 之生長，使其無法感染魚體，造成魚體皮膚及生理上之異常，故水黴菌之孢子無法寄生；而被割傷之鰻線雖因投入抗生素可減少傷口被細菌侵襲，但傷口四周之組織因割傷而發生變化，仍易受水黴菌之寄生。Egusa (1965a) ⁽²⁾ 提到加入抗生素 Dihydrostreptomycin 於出現罹患水黴病病魚的池水中，可抑制水黴病之傳播。鍾 (1973) ⁽¹⁰⁾ 指出使用抗生素 Streptomycin 時，可減低患水黴病鰻線的死亡率，此均與本實驗之結果一致，亦即抗生素抑制了細菌對魚體之侵害，因而提高魚體對水黴菌之抵抗力。

江草 (1966) ⁽⁴⁾ 指出幼鰻在頭胸部受到水黴菌之寄生時，菌絲會侵入腦、心臟、血管、肝臟及其他主要器官，造成極大的影響。Nolard-Tintigner (1973) ⁽¹⁴⁾ 認為水黴病為內部寄生症，菌絲侵入脊髓及血管，此為魚體死亡之直接原因。Neish (1977) ⁽⁵⁾ 又指出水黴菌菌絲會穿過表皮、真皮進入肌肉，但被侵入之組織並無炎性反應 (Inflammatory response) 產生，且組織之構造與健康者無異。本實驗之組織觀察，水黴菌寄生之表皮細胞有增生及被溶解之現象，而菌絲雖侵入肌肉或內臟，但組織構造並無任何異常，亦即無炎性反應。此點與 Neish (1977) ⁽⁵⁾ 之指摘一致，至於魚體之致死機制，則有待進一步之探討。

摘 要

由罹患水黴菌鰻線之體表分離出 *Saprolegnia ferax*。人工感染實驗之結果，顯示水黴菌無法感染健康之鰻線，但若經割傷皮膚或接種 *E. anguillimortifera* 或 *F. columnaris* 菌液，則極易受到感染。各感染實驗中，若投入氯黴素，則鰻線之累積死亡率及感染率均下降。因此推斷水黴菌為二次感染因子，其孢子能着生於受到外傷及細菌感染之皮膚。

謝 辭

本研究得農發會 79(ARDP)-3.3-0-194魚病研究計劃之經費支持，師大生物研究所簡秋源教授，臺大獸醫系劉朝鑫副教授對水黴菌之鑑定及組織切片之觀察提供寶貴的意見以及臺大動物系魚病研究室各位同仁之協助，特此致謝。

參 考 文 獻

1. 江草周三 (1978). 魚の感染症. p292-307, 恒星社厚生閣。
2. Egusa, S. (1965a). The existence of a primary infectious disease in the so-called fungus disease in pond-reared eels. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 31(7): 517-526.
3. Egusa, S., and T. Nishikawa (1965b). Studies of a primary infectious disease in the so-called fungus disease of eels. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 31(10): 804-813.
4. 江草周三 (1966). シラスウナギの水オビ病に関する研究中間報告。Fish Pathology 1(1): 23-36.
5. Neish, G. (1977). Observations on saprolegniasis of adult sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum). J. Fish. Biol. 10, 513-522.
6. 簡秋源 (1979). 感染性水黴菌引起之魚病。生物研究中心專刊第9號p.15-25.
7. Seymour, R.L. (1970). The genus *Saprolegnia*. Nova Hedwigia 19, 1-124.
8. 畑井喜司雄、江草周三 (1976). 魚類寄生ミズカビ。Fish Pathology 11(1): 45-56.
9. Hoshina, T., T. Sano, and M. Sunayama (1960) Studies on the saprolegniasis of eel. J. Tokyo Univ. Fish. 47(1): 59-79.
10. 鍾虎雲 (1973) 臺灣淡水魚類水黴病之初步研究。J. Fish. Soc. Taiwan 2(1): 47-55.
11. Willoughby, L. G. (1970). Mycological aspects of a disease of young perch in Windermere. J. Fish. Biol. 2, 113-116.
12. Wolke, R.E. (1975). Pathology of bacterial and fungal diseases affecting fish. p.33-116 in W.E. Ribelin and G. Migaki (eds.) The pathology of fishes. Univ. of Wisconsin Press, Madison, London. 1004pp.
13. Willoughby, L.G. (1972). U.D.N. of lake district trout and char: outward signs of infection and defence barriers examined further. Salm. Trout Mag. No. 195, 149-158.
14. Nolard-Tintigner, N. (1973). Etude expérimentale sur l'épidémiologie et la pathogénie de la saprolégniose chez *Lebistes reticulatus* Peters et *Xiphophorus helleri* Heckel. Acta zool. Path. Antverp. 57, 1-127.



Fig. 1: Elver infected with *Saprolegnia ferax*.



Fig. 2: Zoosporangium and released zoospore, 150X

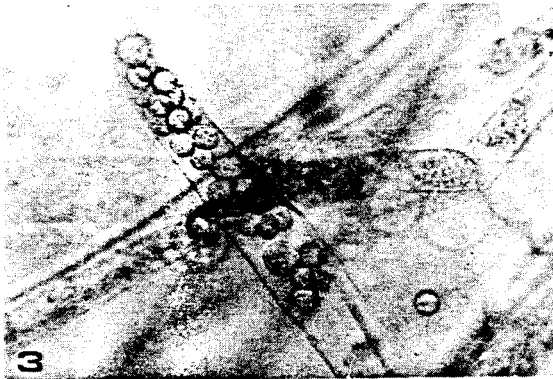


Fig. 3: Zoospore discharged in saprolegnoid form, 300X

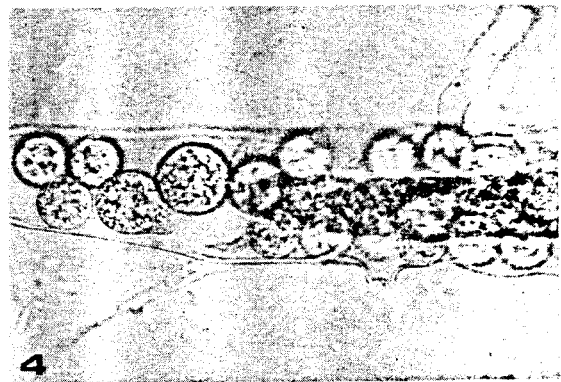


Fig. 4: Zoosporangium with a lateral exit papilla, 600X



Fig. 5: Gemmae in different shape, 150X



Fig. 6: Internal proliferation, the development of secondary zoosporangium within a previously emptied primary one, 300X

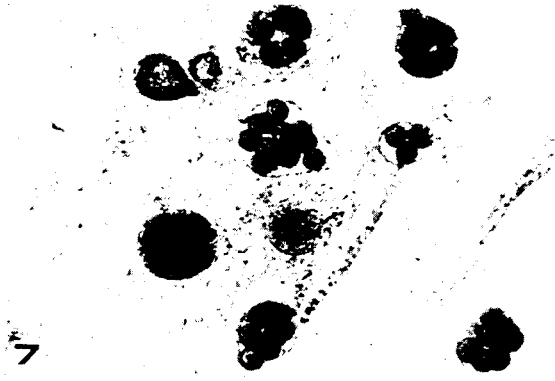


Fig. 7: Oogonia of *S. ferax*, 150X

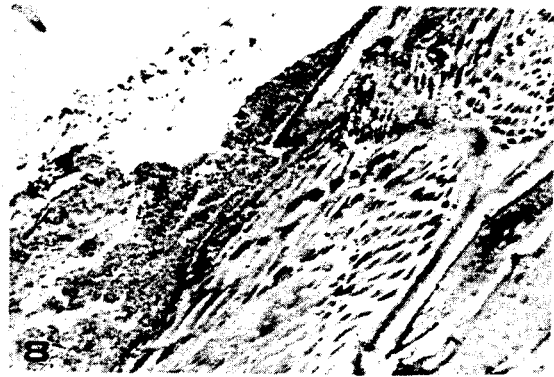


Fig. 8: Cell proliferation of epidermis in the infected site, H&E, 60X

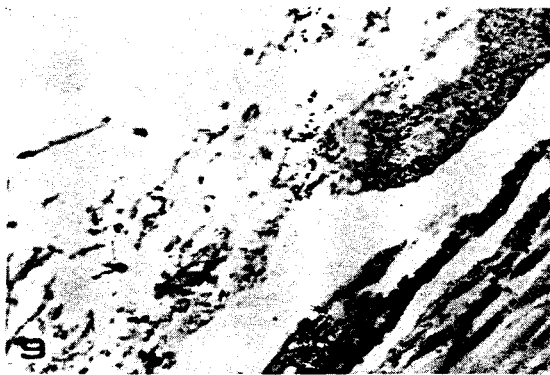


Fig. 9: Fungal hyphae, lyzed cells and debris in the infected site, H&E, 150X

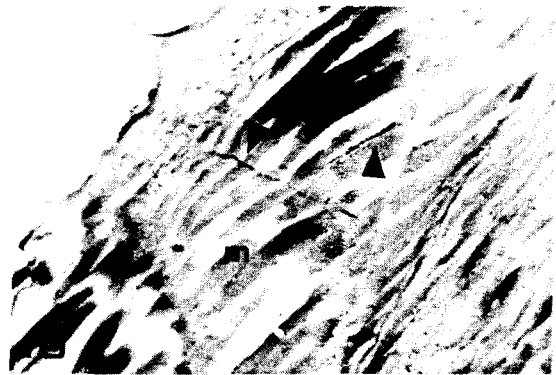


Fig. 10: Muscle tissue (m) showing penetrated by hyphae-like structure. Arrows indicate the position of some of the hyphae-like structure, H&E, 150X



Fig. 11: Higher magnification of Fig. 10, 600X



Fig. 12: Penetration of the hyphae-like structure into the inner part of muscle tissue, H&E, 600X