

養殖牛蛙細菌性病害研究

鍾虎雲^{1,2} 郭光雄^{1,2}

1. 國立臺灣大學理學院動物學研究所
2. 國立臺灣大學理學院漁業生物試驗所

臺灣養殖牛蛙 (*Rana catesbeiana*) 的病害，全部都是感染所致。在 1980 年代初期以前，牛蛙飼料全為生餌，放養密度極低，病害只有 *Aeromonas hydrophila* 引起的兩種症狀：紅腿病及另一較少見之頭部皮膚潰瘍症。

1982 年中開始發生鏈球菌感染症，感染率及死亡率均極高。此時期為高密度養殖，餵飼人工飼料與生餌合用。由病蛙分離之 *Streptococcus* spp. 其形態為扁球形及錐體狀與一般鏈球菌不同。其生理、生化學特性分歧，非溶血性而且不屬於 Lancefield grouping system 之 A, B, C, D, E 及 G 之任一組，顯示其組成為異源性 (heterogenic)。由數值分析及血清學反應則顯示牛蛙分離鏈球菌與養殖魚類來源者及糞球菌 *S. faecalis* 與 *S. faecium* 的差異性大於牛蛙株自身間之差異。牛蛙分離 *Streptococcus* 對牛蛙之病原性比對於虎皮蛙之病原性強。對於鯉魚、吳郭魚及小白鼠則均無致病性。

1987 年初以後牛蛙發生新的病症，其最大特徵為頭部歪斜，眼球白濁突出，有時有腹水，內臟器官紅腫發炎。除了頭部歪斜之症狀外幾乎與鏈球菌症相同。此種病蛙全身，包括神經系統中均可分離到產黃桿菌 *Flavobacterium*。

牛蛙分離之 *Flavobacterium* 按其生理生化學特性無法歸於現有已知種內，其與生理生化學特性最為接近之 *F. meningosepticum* 間亦有相當差異，暫定種名為 *F. ranacida* sp. nov.。但尚待核酸同源性之分析確定。

牛蛙病害種類隨養殖型態而變，其最主要影響因子為養殖密度、飼料及養殖過程之藥物施用。未來之病害趨勢及病害的控制均應從此著手。

前 言

臺灣的牛蛙養殖試驗早在 1924 年的日治時代即已開始 (臺灣總督府, 1943)，但並未成功。1951 年水產試驗所再次引進試養，經民間 30 餘年的嘗試摸索終於在 1980 年代成功地發展成小型養殖產業。此後因衛生，市場及病害等諸多主客觀因素影響，並未繼續擴大反而萎縮，在此諸多影響牛蛙養殖發展之因子中，市場為最主要之間接因素而病害則為最主要之直接因素。

不管是野生或養殖牛蛙的病害，主要都是細菌的感染所引起，黴菌或病毒的感染均屬罕見 (Amborski *et al.*, 1974a; Glorioso *et al.*, 1974b)，寄生蟲的感染亦只發生於某些特殊生態情況下，從未造成大規模的流行性疫病。

感染牛蛙的細菌性病原已知者相當有限 (Carr *et al.*, 1976; Chung, 1990)，最常見，分佈最廣者為 *Aeromonas hydrophila* (按新的分類系統 (Holt *et al.*, 1994) 可能應屬運動性 *Aeromonas* 屬中之數種)，其他只有 *Pseudomonas aeruginosa*，*P. fluorescens*，*P. putida*，*P. sp.*，*Acinetobacter calcoaceticus*，*Flavobacterium sp.* 以及變形桿菌 *Proteus* 中之 *P. mirabilis*，*P. vulgaris*，*P. morgani* (*Morganella morgani*)，*P. rettgers* (*Providencia rettgers*) 與 *Citrobacter freundii* 等。至於 *Streptococcus* spp. 及 *Flavobacterium ranacida* sp. nov. 之暫定種則為臺灣所首見。

臺灣養殖牛蛙的病害與時而變。蕭與陳首次報告 (1977) *A. hydrophila* 感染牛蛙發生的紅腿病及皮膚潰瘍症。Liu (1983) 由組織病理探討牛蛙病害；主要為全身性菌血症 (general septicemia) 及各內臟器官的炎症反應。1984 年後鍾等陸續發現鏈球菌症 (鍾和郭，1984) 及黃色桿菌症 (鍾等，1987)。至 1989 年以後則常有多種細菌同時在一病蛙之組織抹片中發現，症狀亦趨複雜。細菌分離則尚未完全鑑定出來。分離菌在藥物感受性試驗中雖有適當藥物可抑制，但是田間施用時則全屬罔然，不但影響養蛙業本身而且對環境衛生及生態均有可能造成衝激，亟須解決。

本文從歷年牛蛙的病害作細菌學上的探討，以為病害控制的參考及進一步研究的基礎。

材 料 及 方 法

疫情調查及病材採集

約自 1980 年代初期開始，每月或二個月 1~2 次前往各地蛙場調查疫情，記錄病蛙外觀症狀、發病及死亡比例，並採集病材攜回試驗室中解剖觀察，分離細菌，其較特殊或有代表性者則製作病理組織切片。

細菌之分離鑑定分類及保存

病材保持活的狀態帶回研究室後立即由體表患部採菌，然後解剖觀察並由內臟器官採菌以劃線法劃於 TSA 或 BHI, BA 等培養基上，置 28~35°C 之溫箱中經 24 及 48 小時之生長後由此培養基上分離不同型態之菌落純化之。

已確定純化之菌，則進行一般形態、生理、生化學形質之測定。生化學形質之測定方法除註明外係依 MacFaddin J. F. (1980) 之方法進行。抗藥性試驗則依 National Committee for Clinical Laboratory Standard (1984) 之 disk diffusion susceptibility test method，但使用之 Muller-Hinton agar 則以 TSA 取代。各項形質測定之菌株均為 35°C、24 小時之繼代培養菌。

核酸中 G + C mole ratio 之測定方法分別應用 Marmur and Doty 的間接法 (Marmur, 1961) 及 HPLC 的直接法 (Katayama et al., 1984)。以間接法測定之 Tm 值，用 DeLay method (DeLay, 1970) 計算。

鏈球菌之數值分類方法中使用菌株除牛蛙分離菌外尚加入由養殖魚所分離以及二 ATCC 糞球菌株合計 35 株。聚類分析之形質數值法採用 two-state data，符合所定標準或描述或反應為陽性者定為 1，反之則為 0 (弱反應視為 0)，共計使用 51 形質。聚類方法應用 Romebug 1984 套裝軟體，以 Rogerot & Tanimoto, Taccard, Sorensen, Yule 及 Hamann 等 5 種相似係數與 UPGMA 聚類方法，得樹形圖再求出表形相關係數 (CPCC)，取此值為最高者解釋聚類分析結果。

細菌純化後以 24 小時之培養菌製備 lyophilized 的永久保存菌株。

病原性測定

分離菌的病原性測定以 28°C 或 35°C 培養 24 小時 TSA 上生長之菌體以 0.85% 無菌生理鹽水配成適當濃度後分別以注射法、菌浴法或經口法做人工感染。所使用的菌株、試驗動物及詳細方法與感染後動物之畜養法如下：

使用之菌株共 7 株，分別為 *Streptococcus* sp. strains KA-41, KA-45, KA-46 及 KA-40 均為宜蘭地區病牛蛙所分離，*S. faecalis* ATCC 19433 及 *S. faecium* ATCC 19434 則為 ATCC 參考菌株。*Flavobacterium ranacida* sp. nov. (暫定種) 870424-1L 為屏東地區病牛蛙所分離。

試驗動物之選擇，*Streptococcus* sp. 菌株所用者為牛蛙 (*R. catesbeiana*) (約 200 g)，虎皮蛙 (*R. tigrina*) (約 15 g)，鯉魚 (*Cyprinus carpio*) (約 200 g)，吳郭魚

(*Oreochromis niloticus*) (約 100 g) 及小白鼠 (I.C.R.) (約 20 g)。*F. ranacida* sp. nov. 則利用牛蛙(60~70 g)，虎皮蛙 (50~60 g)，澤蛙 (*R. limnocharis*)(10~20 g)，貢德氏蛙 (*R. guntheri*) (40~60g)，日本鰻 (*Anguilla japonicum*) (10~20 g)，吳郭魚 (*Sorotherodon* sp.)(20~30 g)，泥鰱 (*Misgurnus anguillicaudatus*) (10~25 g) 及小白鼠 (I.C.R.) (20 g)。

感染方法主要採用注射法。蛙類之注射部位為 IP，但牛蛙除 IP 外，*Streptococcus* sp. KA-41 菌株尚以菌浴及經口灌入之方法將菌液注入其胃中。鰻魚及其它動物則以 IM 方式注射。感染後之動物均畜養於約 18~30°C 之變動室溫中，觀察 2 週，觀察期間小白鼠餵飼市販飼料，其它動物不餵食。

結 果

疫情調查

臺灣的牛蛙養殖雖然嘗試數十年，但是直至 1980 年代初期前養殖數量尚少，放養密度亦低，此一時期所發現之牛蛙疾病，其症狀主要均呈現典型出血性敗血症，外觀上身體腹面因淤血出血而變紅為最顯著特徵，是為久已知悉之紅腿症。紅腿症病原菌 *A. hydrophila* 尚可造成另一種較少見之頭部皮膚潰瘍症，此種症狀之病蛙其內臟器官通常不會有明顯之淤血發炎現象，與紅腿症者有異。虎皮蛙感染 *Aeromonas* 也會引起頭部皮膚的潰瘍症狀。

自 1982 年中開始牛蛙病害出現新的症狀 (Chung and Kou, 1984)，死亡率很高，尤其是變態中及剛變態的幼蛙，常常整個養殖場全數死亡。症狀是腹水，眼球淤血變白突出，內臟器官發炎出血，嚴重者壓迫腹部，淤血即自喉部溢入口中。身體不能保持平衡，因此常見在水中打轉現象。少數病蛙則有皮膚顏色轉深或變淺。症狀出現後約經 3~6 週即死亡。由病蛙全身器官包括腦及脊髓抹片鏡檢可見革蘭氏染色陽性之鏈狀球菌。

1983~1984 年間大牛蛙前或後肢之腫瘤症狀者病例不少，其內臟器官則未見異狀，腫瘤至潰瘍腐爛後才發生死亡。此腫瘤經證實為纖維瘤 (fibroma)(Liu et al., 1985)，原因不明。

1986 年底至 87 年初，屏東地區的牛蛙又出現新的疫病 (鍾等, 1987)，發病及死亡率也非常高。幼蛙、中蛙病發約經 2~4 週間常造成全場死亡之記錄。病蛙的症狀先是停止攝餌，甚至吐出已半消化之餌料，繼而眼球變紅再轉白突出，一如前述鏈球菌感染

者，但是頭部顯著歪斜一邊則為鏈球菌症病蛙所無。少數病蛙之體色亦會顯著轉變，內臟器官亦有紅腫發炎現象，有時也會見到腹水現象。

1989 年以後疫情更形複雜。大牛蛙，尤其性腺成熟蛙的發病死亡率有顯著增加的現象。除了上述各種症狀常同時在一病蛙上發現外，腹水不僅限於腹部，而四肢內或僅二後肢或僅一後肢之水腫常較腹水更為顯著。亦有單一後肢之脛部變紅腫，而其它部位外觀正常者，在成熟雌蛙更有背部圓隆弓起形成所謂“駱駝背”症狀者，均屬屢見不鮮，而且均為從前所未見者。取病蛙之病灶或內臟器官抹片鏡檢多半可同時看到桿菌，球菌同時存在，球菌之革蘭氏染色反應為陽性、弱陽性甚至陰性者同時存在一鏈上。

分離菌之鑑定分類及保存

由病牛蛙所分離之病原菌主要有三類：*motile Aeromonas group*，*Streptococcus spp.* 及暫定新種 *Flavobacterium ranacida sp. nov.*。其性狀及分類檢討如下：

Motile *Aeromonas group* :

1982 年以前由病蛙分離之病原菌以運動性 *Aeromonas* 為主。此細菌原來都鑑定為 *A. hydrophila*，但是重新檢討其原記錄之性狀後因為各菌株產生 H_2S 的程度有相當差異，而且對 L-Arabinose，Cellobiose，Salicin，Sorbitol，Sucrose 及 Esculin 等醣類的利用能力也不盡一致，按照 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 第 9 版 (Holt *et al.*, 1994)，則此等分離菌株中屬 *A. sobria group* 之菌株尚較 *A. hydrophila* 為多，此外亦有 *A. caviae group* 之存在，但是因為原來保存之菌株多數佚失無法重新測定其確實比例。

Streptococcus spp. :

1984 年間由病蛙所分離之 *Streptococcus spp.* 之形態及生化等各項特性主要如 Chung and Kou (1985) 所述。在 BA，BHI 及 TSA 培養基上均可生長，28°C 24 小時的菌落呈針尖狀，但是 TSA 上則約需 36 小時，上才可見到菌落。22 株分離菌中有 3 株菌落較大，約為 1 mm。對兔血及羊血為不溶血性。全部分離菌均不能在糞球菌選別培養基 SF 及 KF 上生長，僅有菌落較大之 3 株可在鏈球菌選別性培養基 StreptoseI 上生長。在 Todd Hewitt agar 上則全部發育良好。細胞小形 0.4~0.8 × 0.5~1.0 μm，形態多呈扁球

形及錐狀，革蘭氏染色陽性或弱陽性反應。細胞表面有一層薄膜在 TEM 電子顯微鏡下可看到。

生化學特性反應多半為陰性，在 Hugh-Leifson medium 中不生長，但是在 Staph OF medium 中則為發酵性。測試之醣類中僅 Dextrose 及 Sucrose 為可被氧化性及發酵性利用之醣類，利用之菌株比例為 22/22 及 21/22。此外只有少數菌株可弱利用 Mannitol, Trehalose, 及 Salicin, 但是繼代培養後之菌株顯示對 Fructose, Galactose 及 Maltose 亦有近半數之菌株可以利用。在抗藥性試驗中對於 12 種抗生素中僅有 penicillin 對所有測試菌株均具抑制性。

從牛蛙分離出的 22 株鏈球菌間對於 KA-41 菌株之抗血清之凝集反應約可分為三群，與分離地區並無相關關係，與兩株 ATCC 之糞球菌間則顯然有別 (Chung and Kou, 1985)。

由 51 種形質對 24 株牛蛙分離 11 株非牛蛙來源之鏈球菌之聚類分析顯示 (褚, 1987)，牛蛙株亦可分為三群，絕大多數 (18/24) 之相似係數超過 0.7 以上，又牛蛙來源株與非牛蛙來源株之間則有較大差異 (圖一)。

24 株牛蛙分離菌株之 G + C mole ratio 以 De Ley (1970) 法計算值為 35.1~40.5。

Flavobacterium ranacida sp. nov. (暫定種)

1986 年底至 87 年初開始流行之病害所分離之細菌在 TSA 及 BHI 培養基上經 28°C、24 h 培養的菌落呈半透明狀，直徑小於 1 mm 之圓形隆起，但繼代培養後菌落顯然增大。在 MacConkey agar 及 Cetrimide agar 上生長不良。菌體為桿狀， $0.6-0.8 \times 1.6-5.3 \mu\text{m}$ 。革蘭氏染色陰性，無鞭毛，沒有運動性。其一般形質如 Table 1。生長條件範圍，溫度為 10~42°C，鹽度 0~4%，但 4% 時發育顯然不良，pH 5-9。

117 株分離菌株在所有測試生化學特性中反應幾乎完全一致 (林, 1990)。此菌為好氣性，但是經 9~16 天以上的培養後亦可弱發酵利用 glucose。此分離菌之藥物敏感性只有 Oxolinic acid, Erythromycin 及 Spiramycine 三種，其餘皆無作用。

由病蛙所分離 17 株 *Flavobacterium* 以 autoclaved 熱殺製成之全抗原與 870424-1L 菌株經福馬林處理後免疫兔子所製成之抗血清間之凝集效價完全一致 (效價為 64) 但與已知近似種 *F. meningosepticum* CCRC 10677 間之凝集反應則顯然不同 (效價為 16)。經吸附處理後所得結果亦完全符合。

養殖石斑魚及嘉臘魚之病毒性疾病調查研究

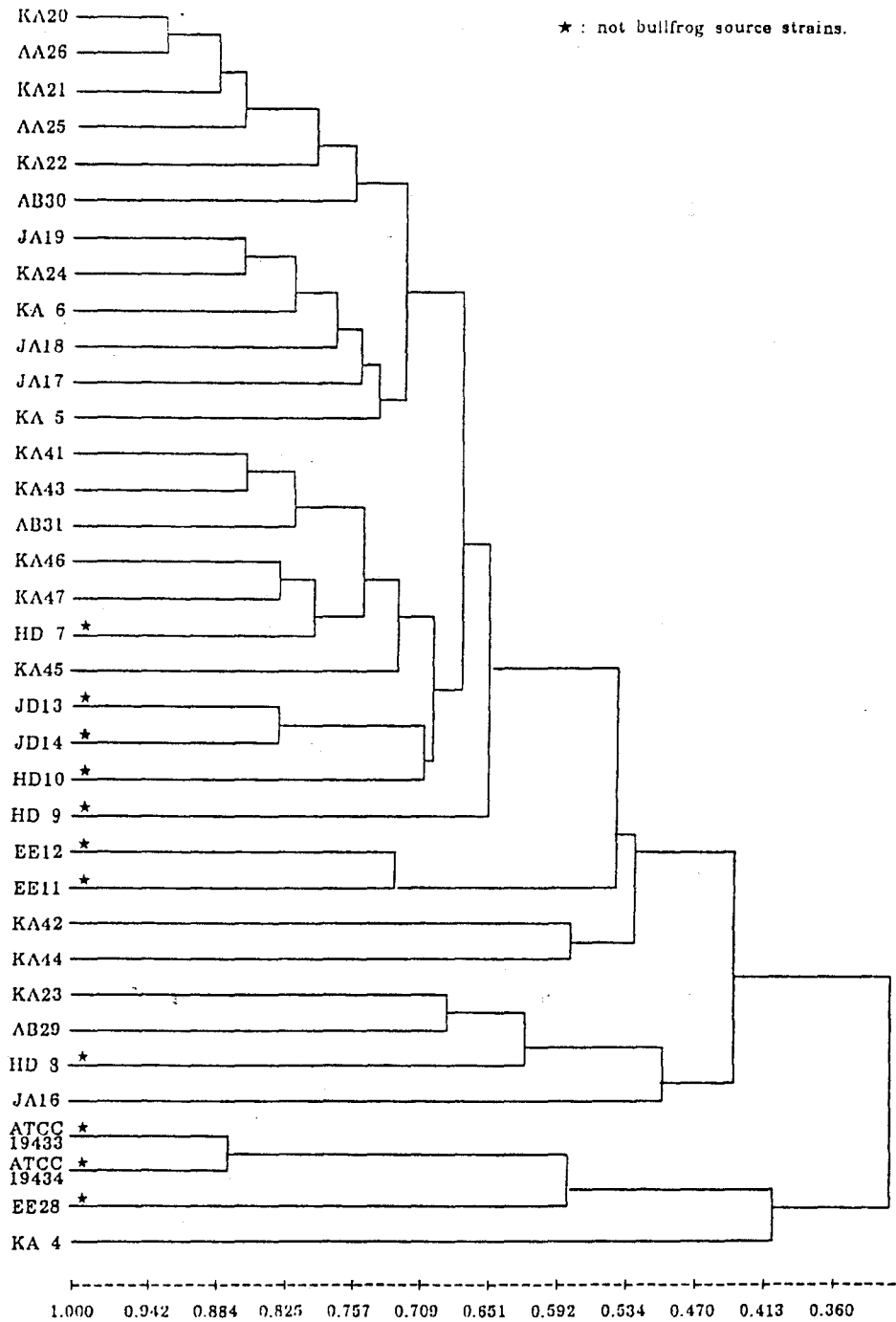


Figure 1 : Phenogram of 35 strains (OTUs) of streptococci isolated from bullfrog and fish, based on UPGMA cluster analysis of Rogero and Tanimoto correlation coefficient on 51 characters. The correction coefficient was 0.9300.

Table 1 General characteristics of *Flavobacterium ranacida* sp. nov. isolated from *Rana catesbeiana* and *R. tigrina*.

Characteristics	Result	Characteristics	Result
Motility	- ^a	H ₂ S production	-
Growth on :		Arginine dihydrase	-
MacConkey agar	w ^b	Lysine decarboxylase	-
Cetrimide agar	w	Ornithine decarboxylase	-
Cytophaga agar	w	Phenylalanine	
Deaminase	-	MR	-
Growth at 10 and 42°C	+	VP	-
Growth in 0-4.0% NaCl	+ ^c	Gas from glucose	-
Growth in TSB, pH5-9	+	Gluconate oxidation	-
Hemolysis 5% SBA	^b	Hydrolysis of :	
Catalase	+	Starch	-
Cytochrome oxidase	+	Chitin	-
Phosphatase	+	Esculin	+
Indole production :		Tributylin	+
Kovac's reagent	-	Gelatin	+
Chloroform Ehrlich's reagent	+	Tween 20	+
Xylene Ehrlich's reagent	-	Tween 80	+
Deoxyribonuclease	+	Casein	+
Urease	+	Litmus milk	+
Nitrate reduction	-	(peptonization)	
Yellow pigment formation	-	ONPG	+
Pigmentation on tyrosine agar	+	Citrate, Simmon's	+
Fluorescent pigment	-	Citrate, Christensen's	+
production on King's B medium		G+C % (17 strains)	33.62
		(HPLC method)	-35.56

比較此分離菌與二已知近似種之生化學特性及血清特性均有相當差別，故其可能為一新種，暫時命名為 *Flavobacterium ranacida* sp. nov. 其 type strain 為 870424-1L。
(林，1990；Chung et al., 1990)

Table 1 (continued)

Acid produced aerobically from :	Reaction in	
	Ammonium salt medium	Phenol red base medium
Glucose (1%)	-	+
Glucose (10%)	-	+
Fructose	-	+
Mannose	+	+
Galactose	-	-
Glycerol	+	+
Lactose (1%)	-	-
Lactose (10%)	-	-
Melibiose	-	+
Maltose	-	-
Sorbitol	-	-
Rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	-	-
Adonitol	-	-
Xylose	-	-
Cellobiose	-	-
Sucrose	-	-
Raffinose	-	-
Salicin	-	-
Inulin	-	-
Sorbose	-	-
Trehalose	-	-
Ethanol	+	+

a : negative reaction
 b : weakly growth
 c : positive reaction

鏈球菌之病原性

4 株牛蛙分離鏈球菌及 2 株 ATCC 菌株對於試驗動物之病原性測定結果 (Table 2) 顯示病牛蛙來源之鏈球菌對牛蛙有高病原性， 9×10^7 CFU，0.1 mL 之 IP 即可 100% 致死

試驗蛙。就感染途徑而言，以腹腔注射之感染方式致病性最強，菌浴次之，而經口徑路最弱。對於虎皮蛙之病原性較低，而且不同菌株間有差異。對於鰻魚、吳郭魚及小白鼠則全無病原性。二株 ATCC 糞球菌株則對所有測試動物均不致病。KA-41 菌株以 9×10^8 CFU/mL 的濃度注射 (0.1 ml 的劑量) 或浸泡 (30 分鐘) 牛蛙，在 24~72 h 的期間內，其血液，肝臟，腎臟及腦中的細菌數量變化並無規則性或關連性，但以腎臟中帶菌數最高，其值約為 10^4 CFU/g。病原性試驗，蛙誘發之症狀與池中自然發生者相同，唯身體扭曲，打轉之行爲則不出現。

Table 2 : Mortality of experimental infection of four bullfrog source streptococcal strains and two ATCC enterococci strains on five kind of animalsa.

Test animal & admin. procedure		Bullfrog			Tigrinaris frog	Common carp	Tilapia	Mouse
Strain	Dosage ^h	IP ^b	B ^c	F ^d	IP	IM ^e	IM	IM
KA41	9×10^8	10/10 ^f	6/10	1/10	3/10	0/10	0/10	0/10
KA41	9×10^7	10/10	- ^g	-	-	-	-	-
KA41	9×10^6	8/10	-	-	-	-	-	-
KA41	9×10^5	7/10	-	-	-	-	-	-
KA41	9×10^4	2/10	-	-	-	-	-	-
KA41	9×10^3	0/10	-	-	-	-	-	-
KA45	9×10^8	10/10	-	-	7/10	0/10	0/10	0/5
KA46	9×10^8	10/10	-	-	5/10	0/10	0/10	0/5
KA40	9×10^8	10/10	-	-	2/10	0/10	0/10	0/5
<i>S. faecalis</i> ATCC 19433	9×10^8	0/5	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>S. faecium</i> ATCC 19434	9×10^8	0/5	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5
Control	0.1 ml saline	0/5	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5

a: all tested animals were maintained in ambient temperature (18-30°C), observed for two weeks, without feeding.

b: IP: intraperitoneal injection

c: B: bathing method

d: F: feeding forcely

e: IM: intra muscular injection

f: 10/10: No. of death/No. of tested, in two weeks

g: -: not tested

h: CFU/animal

Flavobacterium ranacida sp. nov. 之病原性

病牛蛙分離之 *F. ranacida* sp. nov. strain 870424-1L 菌株對於所有四種試驗蛙類之病原性都很高 $10^7 \sim 10^8$ CFU/animal 之劑量即可在 2 週內完全致死 (Table 3)，約於感染 4 天後症狀開始出現。人工感染症狀與池中發生症狀完全相同。2 週內全部試驗蛙死亡。對於日本鰻、吳郭魚、泥鰍及小白鼠則全無致病性，此病顯為蛙類專一性病原菌。此菌對於牛蛙之組織病理已於前述 (鍾等，1987)。

Table 3: Experimental infection of *Flavobacterium ranacida* sp. nov. on frogs, fish and mouse^a.

Common name	Scientific name	Animal size (gm)	No. of tested animal	Administ. ^b dosage CFU/animal	Result ^c
Bullfrog	<i>Rana catesbeiana</i>	61-72	10	8×10^7	10/10 (100%)
Tigrinaris frog	<i>Rana tigrina</i>	45-62	8	7×10^7	8/8 (100%)
Rice frog	<i>Rana limnocharis</i>	11-17	8	2×10^7	8/8 (100%)
Guntheri's frog	<i>Rana guntheri</i>	44-58	8	7×10^7	8/8 (100%)
Eel	<i>Anguilla japonicum</i>	10-20	8	2×10^7	0/8 (0%)
Tilapia	<i>Sorotheodon</i> sp.	18-32	8	4×10^7	0/8 (0%)
Loach	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	11-25	8	3×10^7	0/8 (0%)
Mouse	I. C. R.	20-23	8	8×10^7	0/8 (0%)

a : all tested animals were maintained in ambient temperature (18-30°C), four animals of each species, IP injected with 0.1 ml.

sterilized 0.85% saline, used as control groups were all survived.

b : Intraperitoneal injection (IP)

c : No. of dead/ No. of tested and mortality in 2 weeks. (in parenthesis)

新病例檢討

1989 年以後所發現之病例中，細菌分離之結果除已知之鏈球菌及黃色桿菌外，亦常見其他革蘭氏陰性菌以及黴菌，這些細菌有的是一直被認為非病原菌的常見菌種，有的則

尚未鑑定出種別。由病蛙血液抹片及組織病理切片亦有同樣現象，但亦有完全不見病原菌者（圖 2 A、B 及圖 3 A、B）。這些細菌或黴菌與疾病發生之關係則尚待進行。

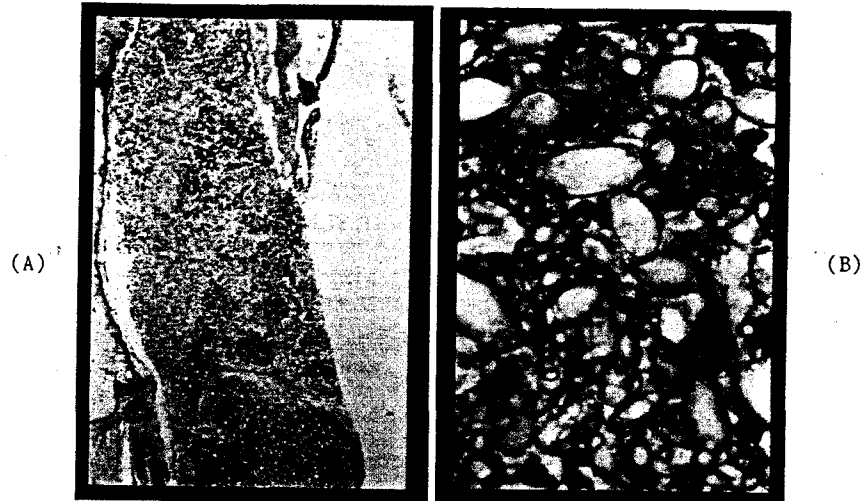


Figure 2 : Histopathological preparation of a young bullfrog with askew head pose. (A). Granuloma in endolymphatic sacs (PAS x40) (B). Yeast like organism in the granulomas (PAS x1000)

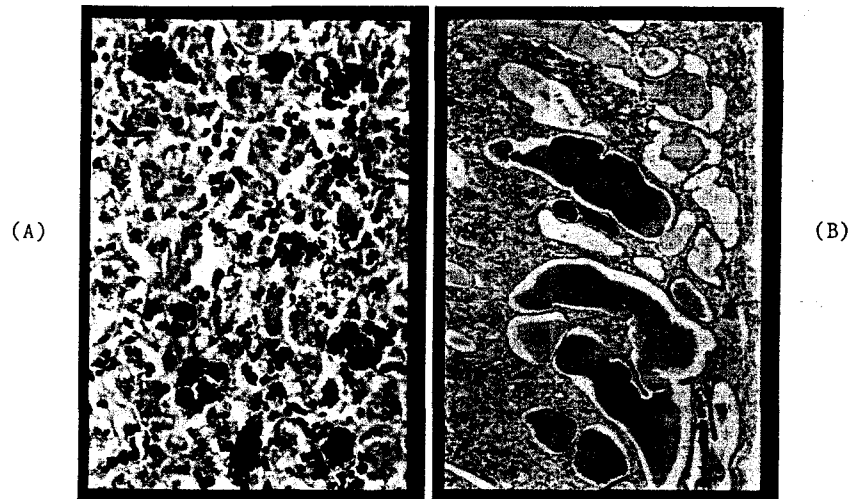


Figure 3 : Histopathological preparation of an adult bullfrog with hydropsy in only one hind leg. (A). Malanomacrophage center in the liver (Giemsa x1000). (B). Kidney with hyperplasia in glomerulus and colloid substance in collecting tubules (HE x 1000)

討 論

檢討所有牛蛙或蛙類病害的文獻，可知非細菌性引起的病害非常少見。而細菌性的病原菌則僅有 *Aeromonas hydrophila* 等為數有限的種類。這些種類中除了 *Morganella morgani* 以外全部都是水域中的常有菌種。對於牛蛙而言都是機會性病原菌，殆無疑問，僅在牛蛙受到壓迫 (stress)，免疫機能低落時引發感染。文獻中所載牛蛙的紅腿症多在野生種或試驗的小環境中放養密度低的狀況下發生。而在高密度的蛙養殖池中，池水又多蛙排洩的有機質反而少見。可見紅腿病的發生與鏈球菌症，產黃桿菌症或一般水產養殖病害發生的條件迥異，值得深入探討。*A. hydrophila* 在低密度養殖的蛙池池水中較高密度之池水中容易分離 (Chung and Kou, 1986)，可能與此現象有關。

運動性 *Aeromonas* 細菌之分類自 1987 後變更很大，由病牛蛙及其環境中所分離之 *A. hydrophila* 中，有很多菌株之性狀更接近於 *A. sobria* group。對於此類菌確實之分類及其與病原性之關係亟須重新檢討。多種 *Streptococcus* spp. 及 *Flavobacterium* spp. 亦為水中常有細菌種類，不過病牛蛙所分離種類是否亦屬水中正常菌相則因這些分離菌之分類歸屬及其生態未完全確定，尙待進一步探討。

牛蛙分離 *Streptococcus* spp. 之形質與一般人畜來源者有相當差異，其扁球形與錐狀為主的形態在 *Streptococcus* 屬內為僅見者 (Sneath et al., 1986)。病蛙分離與魚類來源者就數值分析及血清學凝集反應之數據看來亦屬不同群。顯示其 heterogenic 之組成。其溶血性及 Lancefield 之 C substance grouping 及 M substance 之 typing system 也都尙無法應用這些分離菌之區分，牛蛙病原性鏈球菌株之確實診斷鑑定，現有之系統、技術均無法應用，亟須發展其它方法。

牛蛙分離 *Streptococcus* spp. 無溶血性，其蛋白質分解及醣類利用能力均低，故推測其病原性與細胞本身構造關連性可能較為密切，而與細胞外產物關係較小。

Flavobacterium 屬桿菌之生態分佈甚廣，已知種類雖少，但尙乏定論 (Holmes et al., 1984; McMeekin, 1978; Shewan et al., 1983)。牛蛙分離產黃桿菌與 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology -9 (Holt et al., 1994) 所列已知 8 種，比較其生理生化學特性均有相當差異，與最接近之 *F. meningosepticum* 之 ATCC 13253 (CCRC 16077) 菌株比較亦有 14 項形質差異，而且 G + C mole ratio 亦略有不同 (Table 3)，故暫定為新種，種名 *F. ranacida* sp. nov.。 *F. meningosepticum* 種內各菌株之生理生化特性已知有相當歧

異性，故此分離菌是否有必要另立新種，或僅為 *F. meningocepticum* 之一異型 (type)，正進行核酸雜交同源試驗以釐清真相。

F. ranacida sp. nov. 暫定種對於 *Rana* 屬蛙類之專一性病原性為此新種命名之考量。由病魚分離之 *Flavobacterium* sp. 可引起魚類鰓感染症及肉芽腫性全眼球炎 (granulomatous panophthalmitis) (Ferguson, 1989)，但在本牛蛙病例中以及人工誘發的病例中，眼球組織之病變只見 conjunctiva 等處有炎症細胞浸潤 (鍾等，1987)，而不見肉芽腫之形成。

此分離菌之兔子免疫抗血清力價不高 (林，1990)。用福馬林處理初步製成之初步全菌疫苗免疫牛蛙之保護作用亦缺乏應用價值。電子顯微鏡下可發現此菌之外膜有一薄層 S layer 存在 (楊，1989, 1990)，顯然與此等現象有關。其病原性高則主要可能與其具溶血作用 (房1989)，及外膜所含 lipid A 及 lipid A 中富含 12 碳醇 (楊，1989, 1990) 有關。此菌之感染在冬季盛行可能也是此原因。不過何以此分離菌僅對 *Rana* 屬蛙有高病變性而對其它試驗魚類及小白鼠全無病原性則未明。

馬來西亞及印尼等東南亞國家目前也開始較小規模之牛蛙養殖，也發現產黃桿菌感染的症狀，當地獸醫人員分離鑑定結果及送到本研究室檢查的結果證實確為相同細菌所引起。

臺灣養牛蛙病害之變遷現象推測是由於養殖過程之措施所引起，其中關係最密切者顯然是養殖密度及飼料種類與品質。此外養殖期間的管理及施用化學藥物也是重要影響因子，因此養殖牛蛙未來病害的趨勢，端看這三方面的因素而定，而要控制病害的發生也要從這三方面著手。

謝 辭

本研究承國立臺灣大學動物學研究所魚病研究室同仁同學，屏東地區牛蛙養殖業者方輝明，方錦標，劉秋賢等多位之協助得以完成，僅此致謝。

參 考 資 料

臺灣總督府殖產局編。1943。臺灣水產要覽。大正十四年至昭和十五年。

- 肅世民，陳孝瑀。1977。臺灣地區牛蛙 (*Rana catesbeiana*)，淡水長臂大蝦 (*Macrobrachium rosenbergii*) 及淡水養殖魚類發現之細菌及寄生蟲病。農委會漁業特刊第 29 號。魚病研究專集 I: 13~21。
- 鍾虎雲，林義雄，許國憲，劉朝鑫，溫明澄，郭光雄。1987。 *Flavobacterium* sp. 感染引起牛蛙敗血症之研究。農委會漁業特刊第 8 號。魚病研究專集 VIII: 18~27。
- 褚紹英。1987。魚類及牛蛙分離鏈球菌分類與病原性之研究。私立中國文化大學海洋研究所資源組碩士論文。
- 楊文君，謝宗甫，王成德。1990。 *Flavobacterium* sp. 脂多醣之純化與分析。農委會漁業特刊第 8 號。魚病研究專集(10): 70~79。
- 楊文君。1989。 *Flavobacterium* sp. 之細胞膜蛋白及脂多醣的分析。國立清華大學生命科學研究所碩士論文。
- 房錫廷。1989。 *Flavobacterium* sp. 細胞內外膜成份分析暨溶血能力研究。國立清華大學生命科學研究所碩士論文。
- 林義雄。1990。養殖蛙類黃色桿菌 *Flavobacterium ranacida* sp. nov. 感染症之研究。國立臺灣大學漁業科學研究所碩士論文。
- Amborski G.F., Amborski R.L. and Glorioso, J.G. III 1974a. Factors influencing the bacterial diseases of poikilothermic aquatic animals. 1974 Proceedings Gulf Coast Regional Symposium on Diseases of Aquatic Animals. R.L. Amborski, M.A. Hood, and R.R. Miller (eds). Center for Wetland Resources LSU Baton Rouge LA 70803 P.19~33。
- Carr, A. II, Amvoiski, R.L., Culley Jr.D.D. and Amboiski, C.F. 1976. Aerobic bacteria in the intestinal tracts of bullfrogs (*Rana catesbeiana*) maintained at low temperatures. Herpetologia. 32(3): 239~244。
- Chung, H.Y. 1990 On the bacterial diseases of captive bullfrog. PP. 81~89 in Proc. ROC-JAP. Sym. Fish. Dis. Taipei. Taiwan. 1989。
- Chung, H.Y. and G.H. Kou 1984. A new coccus disease of cultured bullfrog. (Note) CAPD Fish. Ser. No.10 Rep. on Fish Dis. Res. IV: 107~109。

- Chung, H.Y. and G.H. Kou 1985. Characteristics of non-hemolytic streptococci isolated from infected captive bullfrog (*Rana catesbeiana*). CAPD Fish. Ser. No.4 Rep. on Fish Dis. VII : 9~21 .
- Chung, H.Y. and G.H. Kou 1986. Study on bacterial flora of cultured bullfrog - II . Sources and quantitative investigation of *Streptococcus* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio cholerae* and *Edwardsiella tarda* in cultured environments. CAPD Fish. Ser. No.8 Rep. on Fish Dis. Res. VIII : 1~5 (in Chinese) .
- Chung, H.Y., I.H. Lin. and G.H. Kou 1990. *Flavobacterium ranacida* sp. nov. isolated from captive bullfrog (*Rana catesbeiana*) and Tiger frog (*R. tigrina*). In JAP-ROC Sym. Fish Dis. Oct. 27~27, 1990 Tokyo, Japan.
- DeLey, J., 1970. Reexamination of the association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 101 : 738~754 .
- Ferguson, H.W. 1989. Systemic pathology of fish. P190. Iowa State University Press/Ames .
- Glorioso, J.G., Amborski, R.L., Amborski, G.F., and Culley, D.D. 1974b. Microbiological studies on septicemic bullfrogs (*Rana catesbeiana*). Am. J. Vet. Res. 35(9) : 1241~1245 .
- Holmes, B., Owen, R.J. and Mcmeekin, T.A. 1984. Genus *Flavobacterium* Bergey et al., 1923, 97. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1, ed. Krieg, N.R. and Holt, J.G. pp. 353~361. Baltimore. Williams & Wilkins .
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams (ed). 1994. Bergey's manual of Determinative Bacteriology. 9th Ed. Baltimore. Williams & Wilkins .
- Katayama-Fujimura Y, Komatsu Y., Kuraishi H and Kaneko T. 1984. Estimation of DNA base composition by high performance liquid chromatography of its nuclease P1 hydrolysate. Agric. Biol. Chem. 48(12), 3169-3172.
- Liu, C.I. Pathological studies on the major disease of bullfrog (*Rana catesbeiana*) in Taiwan. 1983. Proc. ROC-Japan Coop. Sci. Seminar on Fish Disease. NSC, Taipei, Taiwan.

- Liu, K.C., H.Y. Chung, S.F. Tsay and G.H. Kou. 1985. Diagnostic study of fibromatous tissue of reared bullfrog *Rana catesbeiana*. Proc. of the six ROC Symposium of electron microscopy 1985. 30~31 .
- MacFaddin, J.F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2nd Ed. Williams & Wilkins. Baltimore US. 527pp .
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of DNA from microorganisms. J. Mol. Biol. 3 : 208~218 .
- McMeekin, T.A. and Shewan, J.M. 1978. A review taxonomic strateries for *Flavobacterium* and related genera. J. Appl. Bacteriol. 45 : 321~332 .
- National Committee for clinical laboratory standards : performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 3rd ed, publication M2-A3. Villanova, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards 1984.
- Shewan, J.M. and McMeekin, T.A. 1983. Taxonomic and ecology of *Flavobacterium* and related genera. Annu. Rev. Microbiol. 37 : 233~252 .
- Sneath P.H.A., S.M. Nicholas, M.E. Sharpe and J.G. Holt (ed). 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. PP 999~1103 .

Study on Bacterial Diseases of Captive Bullfrog (*Rana catesbeiana*) in Taiwan

Huu-Yun Chung Guang-Hsiung Kou

Department of Zoology, National Taiwan University

Disease of captive bullfrog (*Rana catesbeiana*) in Taiwan was exclusively caused by bacterial infection. Before 1980's the bullfrog was culture in extensive type system. General septicemia caused by *A. hydrophila* was the observed noticed disease in the stage. There were two types of clinical sign induced by this etiological agent; red leg and skin lesion on head.

Since mid 1982, streptococcal-induced epizootics occurred and caused mass mortality. The bullfrog culture in this stage was intensive type, fed both formular and living or fresh feed. The isolated *Streptococcus* spp. were quite different from that of medical and other sources. The peculiar cone or flat spherical shape of the cells is unusual among streptococci. Not haemolysis on sheep or rabbit blood, not belong to Lancefield sero groups A, B, C, D, E or G. According to numerical analysis and agglutination tests, bullfrog source streptococcal strains are more closely related to each other than to that of fish source or fecal streptococci.

Streptococci of bullfrog source are heterogenic, impossible to be grouped according to present classified systems. Bullfrog isolated streptococcus showed higher pathogenicity on bullfrog than on tigrinaris frog, and completely no pathogenicity on common carp, tilapia and while mouse.

Epizootic caused by Flavobacterial species was first began in 1987. The prominent clinical signs including cloudy and protruded eye, viseral organs became red and edema, and askew head position. All these signs, except the last, were shared by the streptococcicosis bullfrog. *Flavobacterium* sp. was isolated from all visceral organs of the diseased frog. The organism differed from all recognized flavobacterial species, and was tentatively named as *Flavobacterium ranacida* sp. nov. due to its highly specific pathogenicity on genus *Rana* frog. Final exact taxonomic relationship depend on DNA homology of the isolates remains to be determined.

Transition of the kinds of bacterial epizootics in captive bullfrog was supposed to be impacted by the cultural managements. The three most important factors, are stocking intensity, feed type and chemical prophylaxis and therapeutics.