

鰻魚鰓黴菌 (*Branchiomyces* sp.) 的培養試驗

黃世鈴 · 余廷基

The Studies on the *Branchiomyces* sp. Cultured in Different Nutrient Media

Shih-Ling Huang and Ting-Chi Yi

Branchiomyces sp. only grow within the blood vessels of the gill filament and gill lamellae, Besides, the free spores can only be found in the laminar arterioles, and not in the other tissues. They can be cultured in the agar plate, agar slant and nutrient broth. Sabouraud medium, Basal semisynthetic medium and Mycotic medium can also be used to culture *Branchiomyces* sp. The fungi grow better in the medium which includes serum and blood than on the common medium. They did not grow, however, in the medium that includes blood cells only. They grow faster when cultured in the broth than in the agar medium. The hyphae may be obviously observed after 10 days in the broth medium, but only after 2 to 3 weeks in the agar medium.

關鍵字：鰓黴菌、菌絲、游離孢子、組織病理學、鰓薄板

Key words: *Branchiomyces* sp., Hyphae, Free spore, Histopathology, Gill lamellae.

前 言

魚類鰓黴病係由 *Branchiomyces* sp. 感染魚類鰓部組織而引起之鰓部病變，本省於1976年首次在屏東地區的養鰻場發現病例，並於1977年春、夏二季流行於中、南部養鰻場，引起重大損失。近幾年來鰓黴病有不斷蔓延傳染的趨向，每年都可發現多數鰻魚養殖場遭受嚴重感染。鰓黴菌主要寄生於鰓薄板之微血管內形成樹枝狀的分枝，造成血管阻塞，引起循環、呼吸障礙，並可導致鰓部缺損潰爛，直到目前為止尚無有效的治療方法。本試驗乃為持續性計劃之一部分，擬分期探討鰓黴病原菌之分離、培養與鑑定方法，及研究鰓黴菌的生長與環境、溫度、鹽度、pH、及其他營養鹽之利用等關係，再進行藥物人工感染試驗、藥物治療試驗等，以期能有效的防治鰓黴病。

材料與方法

一、材 料

(一)採取中部地區養鰻業者送檢之鰻魚，經由顯微鏡檢查，選擇罹患鰓黴病之鰻魚。

(二)以含有抗凝劑之 5 ml 注射針筒，由鰓弓抽取吳郭魚血液（全血，Blood），以 1000 rpm 之速度離心十分鐘，將上清液（Serum）及沉澱血球（Cell）分開。

(三) 1. 配置以下培養基：

Sabouraud agar plate

Mycotic agar plate

Semisynthetic agar plate

Sabouraud broth

Semisynthetic broth

Sabouraud agar slant

Semisynthetic agar slant

每個培養皿配置 20 毫升培養基，每支試管配置 5 毫升培養液，斜面培養基則為每支試管配置 10 毫升之培養基。

Sabouraud medium :

Glucose	40.0 g
Peptone	10.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1000.0 ml
pH = 5.6	

Basal semisynthetic medium (R. J. Roberts, 1978) :

Glucose	10.0 g
Asparagine	2.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0.5 g
Fe ⁺²	0.2 g
Zn ⁺²	0.2 g
Mn ⁺²	0.1 g
Biotin	5.0 μg
Thiamine	100.0 μg
Agar	20.0 g
Distilled water	1000.0 ml
pH = 7.0	

Mycobiotic agar :

Soytone	10.0 g
Dextrose	10.0 g
Agar	15.0 g
Cycloheximide	0.5 g
Chloramphenicol	0.005 g
Distilled water	1000.0 ml
pH = 6.5	

2. 每種培養基均分成以下四種情形：(a)不加添加物，(b)加入 5% v/v serum，(c)加入 5% v/v cell

, (d)加入 5 % v/v blood。

二、方 法

1. 切取罹患鰓黴菌病魚之鰓絲，並將鰓弓完全去除。
2. 以 0.5 % Cycloheximide 洗十次。
3. 以 1000 ppm Neomycin 洗十次。
4. 將鰓絲儘量剪碎。
5. 將剪碎的鰓絲置入培養膠及培養液中培養。
6. 培養期間隨時觀察並行轉菌培養。

結果與討論

鰓黴菌主要生長於鰓絲及鰓薄板的微血管內（圖一），鰓黴菌的感染隨著時間的增長，會在鰓薄板血管內及血管間形成樹枝狀的分枝（圖二），在嚴重感染病例，大部份的鰓絲都會嚴重的遭受鰓黴菌的寄生（圖三），在鰓魚鰓絲中或在營養基培養的狀態下，鰓黴菌可以發現有條狀或樹枝狀分歧等兩種型式（圖一），樹枝狀分叉會逐漸變得大叢。無論直條狀或樹枝狀之鰓黴菌，在高倍顯微鏡下，很容易看到菌絲、菌絲壁及鰓黴菌孢子（圖四）。

組織病理切片的觀察上，可以觀察到鰓黴菌菌絲充塞在鰓薄板的血管內（圖五），同樣有條狀及樹枝狀的鰓黴菌菌絲，菌絲內有大型、分離而清晰可見成熟孢子的成熟菌絲（圖六），及在菌絲內充塞胞漿尚無完全分離孢子的未成熟菌絲（圖七），充滿成熟孢子的大型菌絲充塞在血管內，會導致鰓薄板血管的膨脹（圖八），在實驗中，鰓黴菌菌絲只有在鰓絲及鰓薄板的血管中發現，在其他組織器官則均無發現，並且僅可在鰓絲及鰓薄板發現游離孢子，而在其他組織器官中均未發現鰓黴菌游離孢子，但簡（1978）曾在鰓魚的腎臟中發現鰓黴菌菌絲。

由於鰓黴菌在血管中生長，導致血管阻塞，所以鰓絲受寄生部位之血管末端血流受阻，鰓絲末端形成褪色（變白）及發生潰爛崩壞等情形，因此嚴重感染之池塘，容易產生嚴重之爛鰓病。在天氣悶熱、凌晨及傍晚無風時，養殖鰓魚容易發生浮頭及聚集在入水口的情形。在池水溶氧過低時，會產生大量死亡。

鰓黴菌在 Sabouraud medium 中生長的情形如表一。鰓黴菌可以生長在培養皿、培養基、斜面培養基和培養液中，並且可以培養在加入血清及全血的培養基中，但是在加入血球的培養基卻反而未發現鰓黴菌菌絲的生長。鰓黴菌在 Sabouraud medium 生長的情形如下：血清培養基 > 全血培養基 > 未

表1 鰓黴菌在 Sabouraud medium 中生長的情形

Table 1 Growth of *Branchiomyces* sp. cultured under the sabouraud medium.

Medium	None	Serum	Blood	Cell
		5 % v/v	5 % v/v	5 % v/w
Sabouraud agar plate	+	+	+	-
Sabouraud agar slant	+	+	+	-
Sabouraud broth	+	+	+	-

+ : growth

- : no growth

添加培養基 > 血球培養基。

鰓黴菌在 Basal Semisynthetic medium 中的培養情形如表二。鰓黴菌可以生長在培養皿、平面培養基、斜面培養基和培養液中，在添加血清及全血的培養基也可以生長，但不生長在添加血球的培養基。培養情形如下：血清培養基 > 全血培養基 > 未添加物質培養基 > 血球培養基。

鰓黴菌同樣也可以生長在含有制黴劑 Cycloheximide 的培養基中(表三)。生長情形為血清培養基 > 全血培養基 > 未添加培養基 > 血球培養基。

表 2 鰓黴菌在 Semisynthetic medium 中生長的情形

Table 2 Growth of *Branchiomyces* sp. cultured under the semisynthetic medium.

Medium	None	Serum	Blood	Cell
		5 % ₀ v/v	5 % ₀ v/v	5 % ₀ v/w
Semisynthetic agar plate	+	+	+	-
Semisynthetic agar slant	+	+	+	-
Semisynthetic broth	+	+	+	-

+ : growth

- : no growth

表 3 鰓黴菌在 Mycotic agar medium 中生長的情形

Table 3 Growth of *Branchiomyces* sp. cultured under the mycotic agar medium.

Medium	None	Serum	Blood	Cell
		5 % ₀ v/v	5 % ₀ v/v	5 % ₀ v/w
Mycotic agar plate	+	+	+	-

+ : growth

- : no growth

鰓黴菌生長的速度十分緩慢，所以在處理培養基及在培養時環境的控制須要十分小心否則很容易污染。在培養基中生長大約須要 2~3 星期才可以明顯看到營養體菌絲，菌絲形成叢狀、團狀及分枝狀等各種不同的外觀(圖九、圖十、圖十一、圖十二、圖十三)，不同菌絲中含有不同大小的孢子(圖九、圖十、圖十一)，或尚無分離孢子的胞漿(圖九)，但是同一條或同一團菌絲中孢子的大小則大致相似(圖十二、圖十三)，並且整團菌絲中菌絲的大小也有很大的差異，並非是均勻一致大小的菌絲(圖十二)。快速生長的鰓黴菌營養體菌絲及孢子會形成叢狀，並且菌絲壁較薄(圖十)，但是生長較慢的個體菌絲壁較厚，並且菌絲內的孢子較大且大小均勻。培養在培養液的鰓黴菌，每經 3~5 天的間隔必須更換新鮮培養液，否則鰓黴菌很容易死亡。同時在培養液中培養的鰓黴菌生長速度較培養在培養基的鰓黴菌為快，大約在 10 天左右即可明顯看到菌絲，但是長時間的培養(一個月以上)卻反而無法發現鰓黴菌菌絲，但是可以發現無數較菌絲內孢子為小的小型孢子，這種孢子是否同樣係為菌絲孢子或不同生長期(Stage)的孢子，尚有待進一步試驗。此外鰓黴菌培養在 Basal Semisynthetic medium 中的生長速度比培養在 Sabouraud medium 及 Mycotic medium 中為快，到底是因為生長素(Biotin)、維生素 B₁(Thiamine)或是其他鹽類的關係，也有待進一步研究。

未來鰓黴菌研究的方向如下：

1. 研究培養液中實驗發現的孢子，是否係為污染而來，或是鰓黴菌生活史中不同生活期的孢子。
2. 研究鰓黴菌生活史。
3. 研究鰓黴菌的生長因子。
4. 研究鰓黴菌的感染機制。
5. 研究鰓黴菌的抑制藥物。
6. 試驗用免疫法來防治鰓黴菌是否可行。
7. 研究鰓黴菌孢子型態、菌絲壁成份、孢子壁的成份。

摘 要

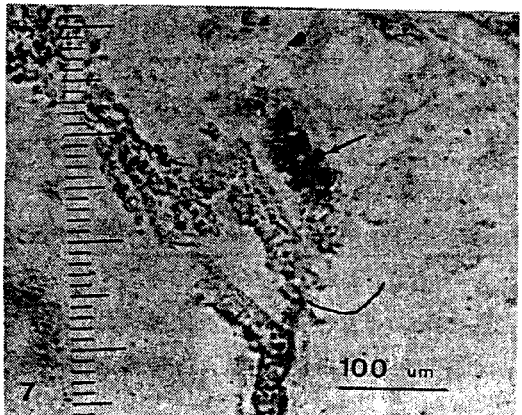
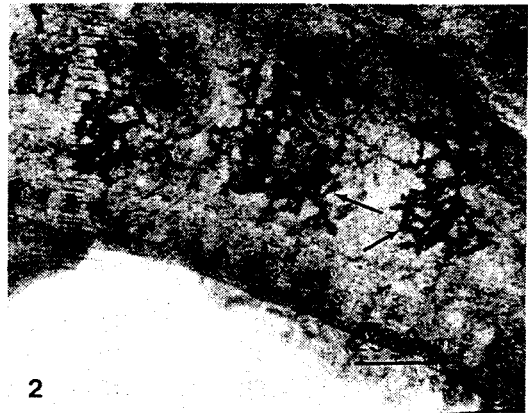
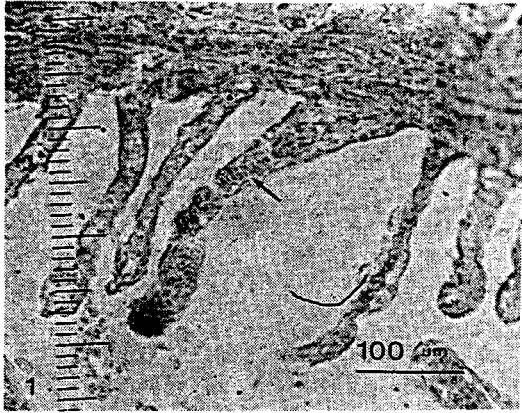
鰓黴菌主要生長在鰓絲及鰓薄板的血管中，在組織病理切片的觀察上，並未在其他組織器官發現，並且在鰓絲、鰓薄板可以發現游離孢子，但在其他組織器官中，均未發現游離的孢子。鰓黴菌無論在培養皿培養基、斜面培養基和培養液都可以生長。同時，可培養在 Sabouraud medium、Semisynthetic medium 及 Mycotic medium 等培養基中。鰓黴菌培養在含有血清及全血的培養基中生長較好，但不生長在加入血球的培養基。鰓黴菌培養在培養液中生長速度較快，大約在10天左右，即可明顯看到菌絲，但培養在固體培養基中的生長則較慢，須要2~3星期才可看到多數菌絲。

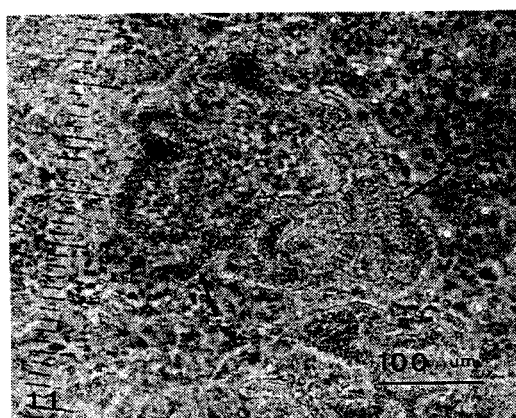
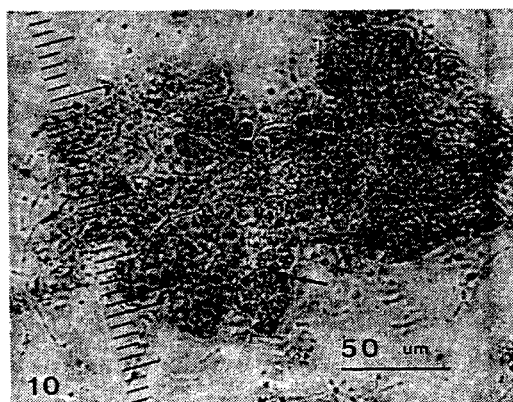
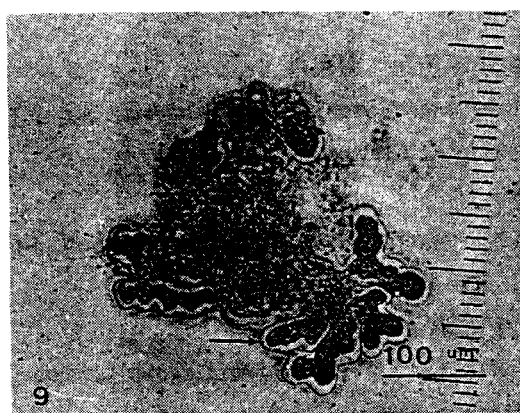
謝 辭

本試驗承蒙廖所長一久博士的支持與鼓勵，黃麗玲、陳美珠、丁絹芳等大力幫忙，實習生夏翠鳳、朱興梅的協助及其他分所同仁的大力幫忙，使本實驗得以順利完成，在此一併致謝。

參 考 文 獻

1. Amlacher, E., (1970). Textbook of fish diseases. T.F.H. Publications, Neptune City, New Jersey. 302 pp.
2. Reichenbach-Klinge H.H., (1973). Teinchenbach-Klinkes fish pathology. T.F.H. Publications.
3. Bauer, O.N., B.A. Musselius, and Y.A. Strelkov. (1973). Diseases of pondfishes. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem. 200 pp.
4. Sarig, S. (1971). The prevention and treatment of diseases of warmwater fishes under subtropical conditions, with special emphasis on intensive fish farming. Book 3. In S.F. Snieszko and H.R. Axelrod, eds., Diseases of fishes, T.F.H. Publications, Neptune City, New Jersey. 127 pp.
5. Egusa, S., and Y. Ohiwa, (1972). *Branchiomycosis* of pond cultured eels. Fish Pathol., 7, 79-83.
6. Elizabeth Moore-Landecker, (1982). Fundamentals of the Fungi.
7. 簡肇衡、宮崎照雄、窪田三朗 (1978). 臺灣鰻魚黴菌性鰓病 (*Branchiomycosis*) 之組織病理所見。JCRR Fisheries Series, 34, 97-98.
8. 江草周三 (1978). 魚之感染症。恒星社厚生閣, 325-327.
9. 黃世鈴、張正芳、余廷基 (1987). 鰻魚鰓黴病的初步研究，臺灣水產試驗所試驗報告, 42, 273-282.





圖片說明：

圖 1 組織病理學上，鰓黴菌主要生長於鰓絲及鰓薄板的微血管內（箭頭：菌絲）

Fig.1 Histopathology, hyphae of *Branchiomyces* sp. growing in the gill's blood vessel. (arrow : hyphae)

圖 2 會在鰓薄板血管內及血管間形成樹枝狀的分枝（箭頭：菌絲）

Fig.2 Branched hyphae extending within blood vessel of gill lamellae. (arrow : hyphae)

圖 3 在嚴重感染病例，大部分的鰓薄板都會嚴重的遭受鰓黴菌的寄生（箭頭：菌絲）

Fig.3 In severely infected fish, most gill filament were affected by *Branchiomyces* sp. (arrow

: hyphae)

圖 4 顯微鏡下，很容易看到菌絲、菌絲壁及鰓黴菌孢子（箭頭：菌絲）

Fig.4 Under the microscope, the hyphae, hyphae wall and spores of *Branchiomyces* sp. infecting the gill lamellae were easy to find. (arrow : hyphae)

圖 5 鰓黴菌菌絲充塞在鰓薄板的血管內（箭頭：菌絲）

Fig.5 Histopathology, the blood vessels are being blocked by the hyphae undergoing thrombosis. (arrow : hyphae)

圖 6 成熟的鰓黴菌菌絲，菌絲內有大型、分離的孢子（箭頭：菌絲）

Fig.6 Mature hyphae containing numerous large separated mature spore. (arrow : hyphae)

圖 7 樹枝狀的未成熟菌絲，充塞胞漿而無分離完全的孢子（箭頭：菌絲）

Fig.7 Immature hyphae, full of cytoplasm, containing undifferentiated spore. (arrow : hyphae)

圖 8 包含成熟孢子的大型菌絲充塞在血管內，會導致鰓薄板血管的膨脹（箭頭：菌絲）

Fig.8 Large hyphae with mature spore blocking the blood vessels resulting in swelling. (arrow : hyphae)

圖 9 培養之鰓黴菌，菌絲形成叢狀及分枝，菌絲內包括尚未分離孢子的胞漿（箭頭：菌絲）

Fig.9 In the medium, the hyphae are brushy and branched, with undifferentiated cytoplasm. (arrow : hyphae)

圖 10 培養基培養的狀態下，快速生長的鰓黴菌菌絲及會形成叢狀及分枝，並且菌絲壁較薄、菌絲中含有無數的孢子（箭頭：菌絲）

Fig.10 In the medium, rapid growth shows hyphae with brushy and branched, the hyphae wall is thin and with numerous spores. (arrow : hyphae , arrowhead : spore)

圖 11 培養基培養之鰓黴菌，菌絲形成叢狀及分枝，菌絲中包含無數的孢子（箭頭：菌絲）

Fig.11 In the medium, the hyphae cluster, and have numerous spores. (arrow : hyphae)

圖 12 培養基培養之鰓黴菌，菌絲形成叢狀及分枝同一條或同一團菌絲中孢子的大小則大致相似，整團菌絲中菌絲的大小也有很大的差別，並非是大小一致（箭頭：菌絲，矢頭：孢子）

Fig.12 In the medium, the hyphae cluster. The size of the spores in a hyphae or a cluster of hyphae was almost the same. But the size of hyphae in the same cluster was different. (arrow : hyphae ; arrowhead : spore)

圖 13 培養基培養之鰓黴菌，菌絲形成叢狀及分枝不同菌絲中含有不同大小的孢子同一條或同一團菌絲中孢子的大小則大致相似（箭頭：菌絲；矢頭：孢子）

Fig.13 In the medium, the hyphae have numerous spores. Spores in a hypha were almost of the same size, and each hypha has different sizes of spores. (arrow : hyphae ; arrowhead : spore)