

## 鰻魚鰓黴病的初步研究

黃世鈴·張正芳·余廷基

### Preliminary Studies on Branchiomyces Infected to Eel (*Anguilla japonica*)

Shyh-Ling Hwang Cheng-Fang Chang and Ting-Chi Yu

In central region of Taiwan, the infecting period of Branchiomyces on cultured eels (*Anguilla japonica*) is primarily from March to July. Branchiomyces mostly parasite in blood vessels of gills, especially in capillaries of gill lamella. The color of gill filament was no more bright-red, there were brown or grey over the infected area, and the gill filament would be necrosis and ulcer.

Branchiomyces can be cultured in Sabouraud glucose agar and Basal Semisynthetic medium. The hyphae grew in the medium, not on the surface. The size of hyphae found in the gill is 8 to 37 and average 19 microns. Its large spore is 5-14 and average 8 microns. The size of hyphae growing in the medium is 7 to 26 and average 19 microns. Its large spore is 5 to 10 and average 7 microns. The growth mode of hyphae is bifurcate.

### 前 言

鰻魚罹患鰓黴病 (Branchiomyces) 經 (Plehn 1911, 1912) 報導以後, 世界各地陸續有鰓黴病病例的報導, 繼而引起廣泛的重視 (Neish & Hughes 1980) 認為在最近幾年來, 無論從流行病學或經濟學的觀點來看, 鰓黴病已經是東歐地區魚類養殖的重要魚病之一。

1977 年春夏兩季, 流行於台灣中南部之養殖場, 引起養殖鰻鰓部腐爛、缺損, 甚至造成病鰻死亡, 經 (簡 1978) 鑑定為發生於歐、美及日本等地之 Branchiomyces 屬黴菌所造成, 從此喚起學術機構廣泛的注意。近幾年來, 本省中部地區, 在每年 3~7 月間都可大量發現此項病例, 嚴重者甚至全養殖場都被感染, 雖然感染情形輕重不一, 但却造成養殖業者的心理恐慌。況且本省養殖業者有購放中、小型鰻魚養成情形, 勢必增長鰓黴病病害的蔓延, 因此有必要作一系列的試驗, 藉以了解鰓黴菌的特性、感染途徑等等, 俾能有效控制此病。

### 材料與方法

一在中部地區 (台中縣、彰化縣、雲林縣) 養鰻場檢查不正常病鰻, 並收集罹患鰓黴病 Branchiomyces 之病鰻鰓部。

二培養基 (I) 抽取鰻魚血液

培養基 (II) Sabouraud glucose agar;  
glucose 40g

peptone	10g
agar	15g
distilled water	1ℓ

培養基 (III) Basal semisynthetic medium:

glucose	10g
asparagine	2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5g
Fe <sup>++</sup>	0.2g
Zn <sup>++</sup>	0.2g
Mn <sup>++</sup>	0.1g
Biotin	5μg
Thiamine	100μg
agar	20g
distilled water	1ℓ

三種培養基分別加入 100 g/ml 比率之 chloramphenicol。

培養基 (I) 將塑膠針筒直接刺入心臟採血，加 heparin 儘量避免污染，採血後注入已消毒好試管中。培養基 (II、III) 及其他培養用具在殺菌釜中進行高溫高壓殺菌，殺菌條件設定為 1.2 ~ 1.5 kg / cm<sup>2</sup> 之壓力 15 分鐘，殺菌後分別製成培養皿平板培養基及試管半斜面培養基。

培養皿平板培養基厚度約 0.3 ~ 0.5 cm 試管半斜面培養基約 5 ~ 10ml，高度約 2 ~ 3 cm。

步驟：

(一) 將具有鰓黴菌之鰓絲置入組織研磨器磨碎，以砂布過濾後離心，將底層沈澱物直接注入培養基 (I)，並在培養基 (II、III) 作粗劃線培養。

(二) 將具有鰓黴菌之鰓絲置於試管，密封後，任其腐爛，然後重複步驟(一)。

(三) 將 Sabouraud glucose agar 及 Basal semisynthetic medium 分別製成斜面固體培養基，然後將具有鰓黴菌之鰓絲用蒸餾水洗滌後，以白金絲輕壓入培養基中培養，試管之棉花封口。

(四) 試驗係在溫室下進行。

鰓黴菌培養成功與否係以菌絲存在與否判定。

計算新鮮標本及培養狀態下鰓黴菌菌絲及大型孢子的大小。

## 結 果

本省中部所養殖鰻魚罹患鰓黴病 Branchiomycosis 有愈來愈嚴重的趨勢，在每年 3 月 ~ 7 月間，可大量發現罹病鰻魚，尤其以五月以後，氣溫回升，易見大量鰻魚浮游於池水裏層，魚體明顯虛弱無力，剪開病魚鰓部，有缺損、潰爛、褪色的情形 (Neish & Hughes 1980) 病魚鰓部已經不再是正常的鮮紅色，而是轉變成為由於出血 hemorrhage 和血栓 thrombosis 導致的局部棕色區域，和局部缺血 (ischemia) 呈現淡白和灰色區域。

雖然 (簡 1978) 曾經發現鰓黴菌侵入心臟及脾臟的病例，但是鰓黴菌還是以鰓部為最主要寄生部位，也是目前發生的最大問題。鰻魚感染之鰓黴菌主要生長於鰓部血管內，「尚未在血管以外之組織發現」。檢查鰻魚是否罹患此病極為簡單，切下一部份鰓部鰓絲置於顯微鏡下檢查，若在微細血管內發現有一條或是一叢樹枝狀分叉的菌絲，菌絲內充滿孢子，即可確定罹患鰓黴病 (圖 1-2、3、4、5)。

鰓黴菌的培養較為困難，培養的時間也較長，約須 2 ~ 3 星期以上，才容易看到大量菌絲，本試

驗中鰓黴菌的培養方式有三種（表 1）

- 1 type : 罹患鰓黴菌之鰓部以組織研磨器磨碎，用紗布過濾，把大型組織碎片取出，濾液經離心後，將底層沈澱物及底層液取出培養，結果如（表 1），注入鰓魚血液培養基中培養結果未發現有鰓黴菌之菌絲，在 Sabouraud glucose agar 及 Basal semisynthetic medium 製成之培養皿平板培養基及試管半斜面培養基中作粗劃線培養，也未發現菌絲的存在。
- 2 type : 取患病鰓魚鰓部置於試管中任其腐敗後以紗布過濾，離心後將上部液體抽掉，再注入 400  $\mu\text{g} / \text{ml}$  之 chlramphenicol 再離心，重複數次後，在血液及培養基中培養，結果無論在血液中或在 Sabouraud glucose agar 及 Basal semisynthetic medium 之平板或半斜面培養基中皆未發現菌絲存在（表 1），取 1 type 及 2 type 培養在血液中 2~3 星期後，再取出於 Sabouraud glucose agar 及 Basal semisynthetic medium 重複作粗劃線培養，結果亦未發現鰓黴菌菌絲。
- 3 type : 取罹患鰓魚鰓部，用蒸餾水洗滌多次，將培養基製成試管半斜面培養基，每枝試管植入 2~3 片鰓絲，經 2~3 星期之培養後，在鰓絲周圍出現一圈雲疊狀物質。經壓片檢查可以檢查出有縱橫交錯的菌絲、菌絲生長方向呈不規凸起，可長成一簇或一團（圖 6、7、8、9），但在培養基表面，亦未發現有菌絲的存在。

表 1 鰓黴菌在各種培養基培養的情形

Table 1 The cultural conditions of *Branchiomycetes* sp. of eel in the various medium

	Blood broth	Babourand glucose agar		Basal semisynthetic medium	
		Plate	Semislant	Plate	Semislant
I type	-	-	-	-	-
II type	-	-	-	-	-
III type			+		+

I type : Gill lamellae was broken by glass homogenizer.

II type : Gill lamellae was broken by naturally putrefied.

III type : Gill filament was buried in the agar.

鰓黴菌菌絲並非呈現很規則的大小，而是有些部位較粗，而有些部位較細（圖 10），培養中菌絲內孢子的存在情形，有些菌絲內佈滿孢子，有些菌絲內則僅有少數孢子存在，菌絲生長的方向不定，所以很容易形成縱橫交錯的一團或一簇，菌絲生長的模式如下：

在菌絲末端直徑先漸漸增大，然後分叉形成二方向生長的菌絲（圖 11、12、13、14、15），一般菌絲的生長呈二分叉，有時也可呈現三分叉（圖 16），菌絲內孢子大小差異極大（圖 17），孢子（圖 18）大小的計算係以大型孢子之平均值為主。

切取罹病魚鰓部鏡檢，計算出菌絲直徑為 8-37 microns，平均為 19 microns，大型孢子直徑為 5-14 microns，平均為 8 microns，而在培養基中培養的鰓黴菌菌絲直徑為 7-26 microns，平均為

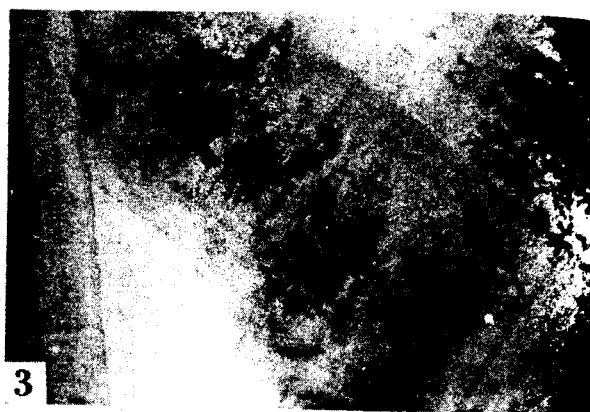
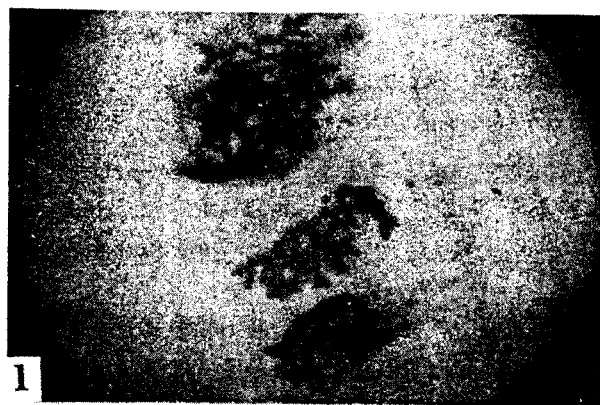


圖 1 罹病魚鰓部顯微鏡檢查，可見有如樹枝狀分岐的菌絲，菌絲內密佈孢子，160 x

Fig.1 Infected to gills, branched hyphae of Branchiomyces filling with spores. 160 x

圖 2 罹病魚鰓部檢查，可見尚未分岐的一條條菌絲，200 x

Fig.2 Hyphae of Branchiomyces, not yet branch. 200 x

圖 3 嚴重罹病魚，鰓部嚴重感染鰓黴菌，100 x

Fig.3 Branchiomyces severely parasiting in the gills. 100 x

圖 4 由鰓部血管流出的鰓黴菌，160 x

Fig.4 Hyphae of Branchiomyces Flow out of the blood vessel. 160 x

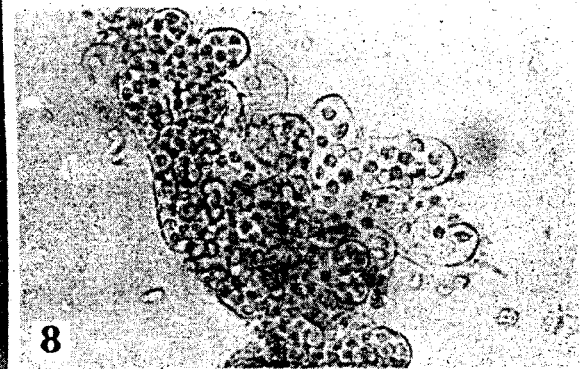
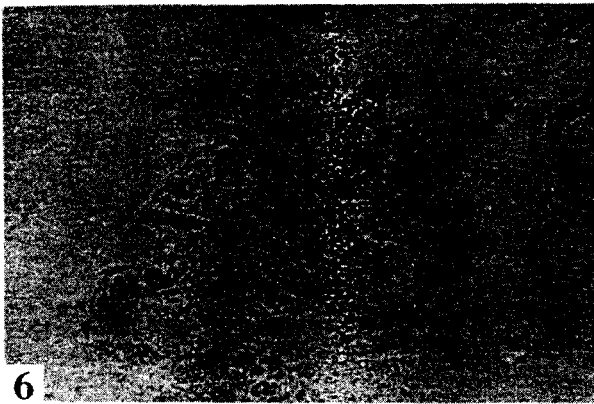
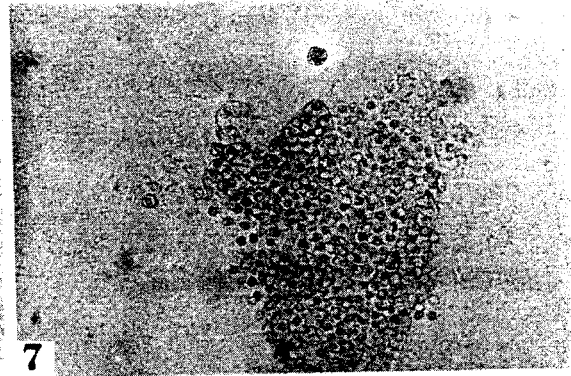
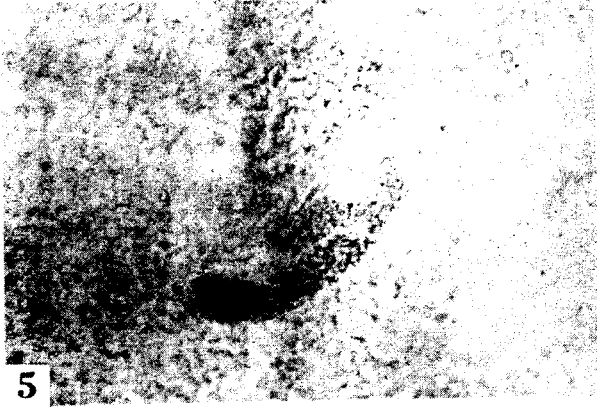


圖 5 由鰓部血管流出的鰓黴菌，200x

Fig.5 Hyphae of Branchiomyces Flow out of the blood vessel. 200x

圖 6 鰓黴菌菌絲呈不規則生長方向，可長成一團或一簇，200x

Fig.6 The growth type of hyphae is irregular. 200x

圖 7 鰓黴菌菌絲呈不規則生長方向，可長成一團或一簇，320x

Fig.7 The growth type of hyphae is irregular. 320x

圖 8 鰓黴菌菌絲呈不規則生長方向，可長成一團或一簇，800x

Fig.8 The growth type of hyphae is irregular. 800x

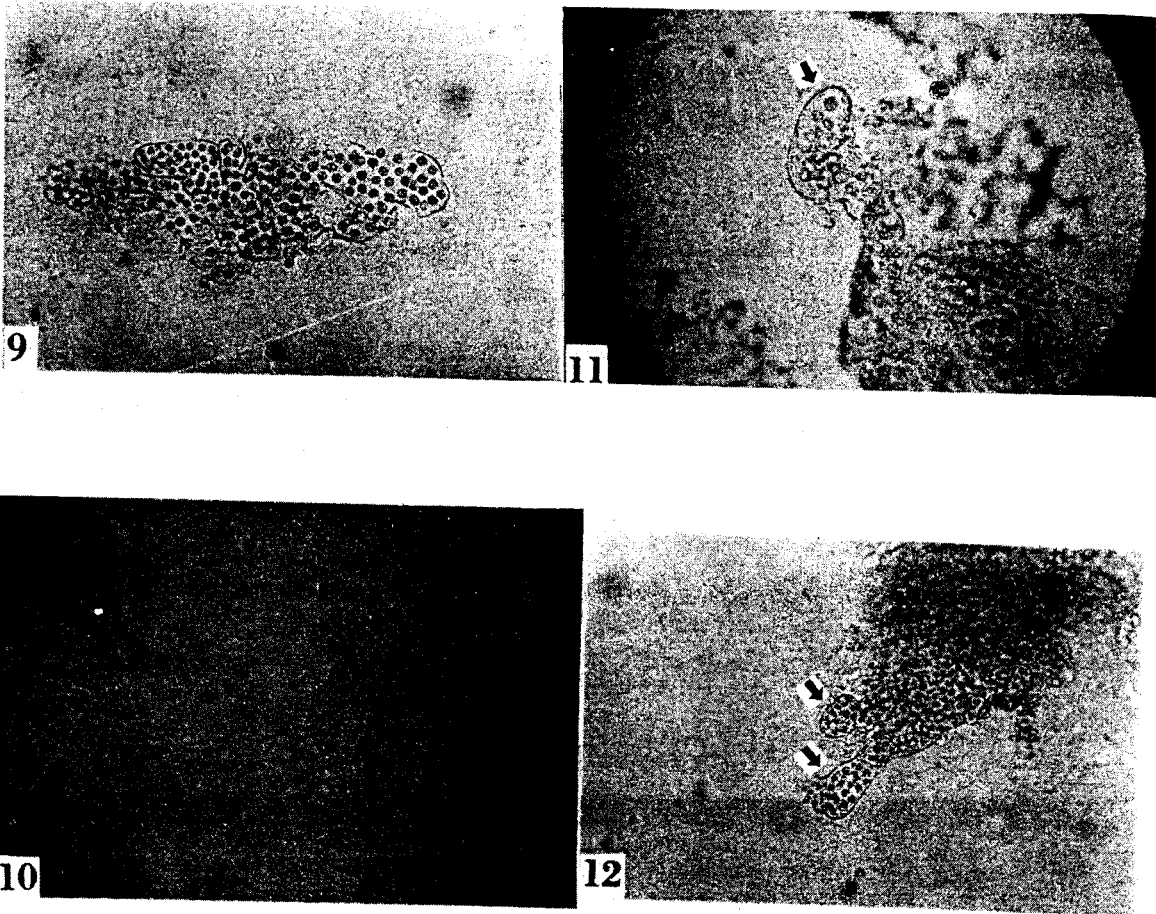


圖 9 鰓黴菌菌絲呈不規則生長方向，可長成一團或一簇，320x

Fig.9 The growth type of hyphae is irregular. 320x

圖 10 全株菌絲並非大小一定，而是有些部位較粗，有些部位較細，320x

Fig.10 Diameter of hyphae are not even, some areas wide, some areas narrow. 320x

圖 11 即將分枝的菌絲，菌絲末端增寬（箭頭），320x

Fig.11 Hyphae of Branchiomyces just before branching.

Not the widening tip (arrow). 320x

圖 12 即將分枝的菌絲，菌絲末端增寬（箭頭），200x

Fig.12 Hyphae of Branchiomyces just before branching.

Not the widening tip (arrow). 200x

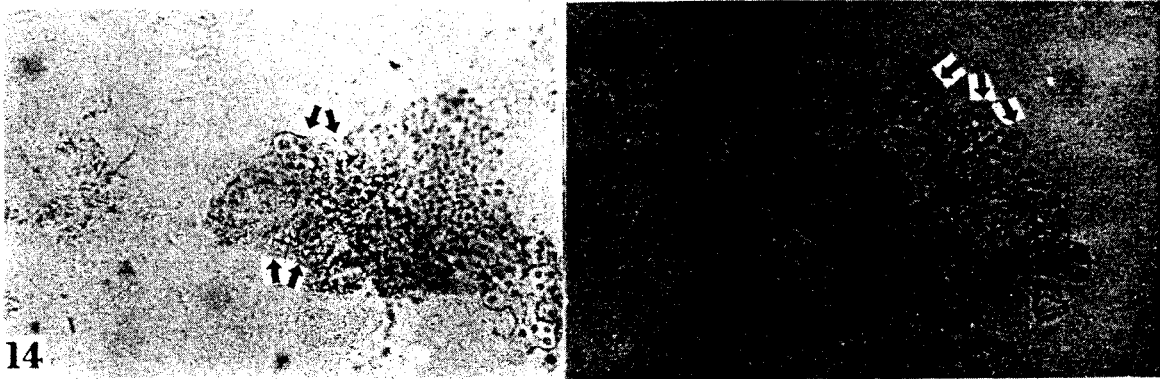
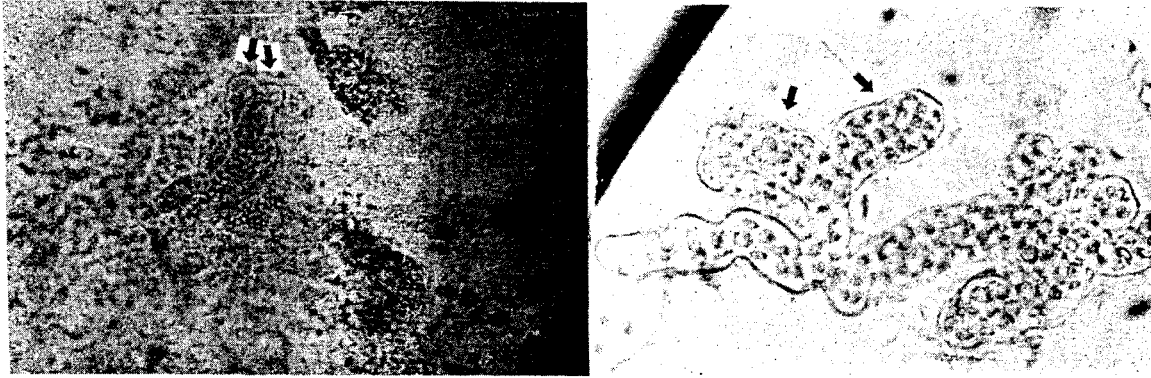


圖 13 已略分枝的菌絲，已可見兩端略微突出（箭頭），200 x

Fig.13 Hyphae of Branchiomyces Beginning to branch.

The tip dividing to two parts (arrow). 200 x

圖 14 已略分枝的菌絲，已可見兩端略微突出（箭頭），200x

Fig.14 Hyphae of Branchiomyces Beginning to branch.

The tip dividing to two parts (arrow). 200 x

圖 15 分枝的菌絲（箭頭），800x

Fig.15 Branched hyphae of Branchiomyces (arrow). 800x

圖 16 菌絲生長呈三分枝生長（箭頭），400 x

Fig.16 The tip of hyphae dividing to three parts to grow (arrow). 400 x

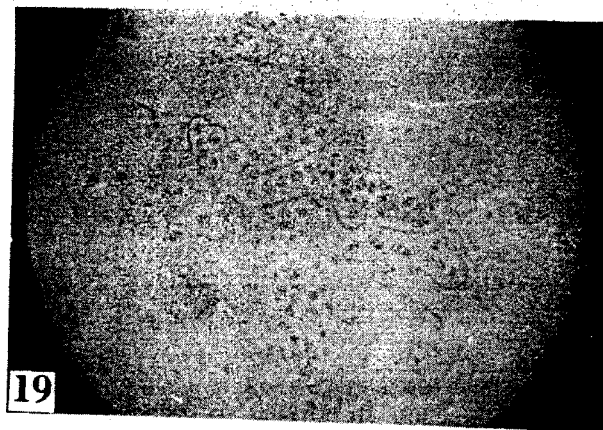
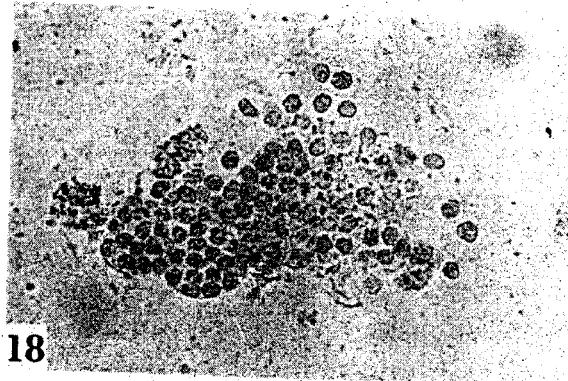
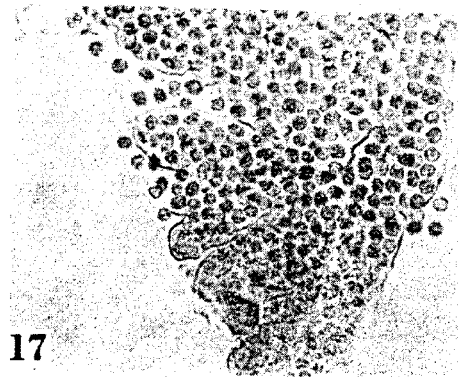


圖 17 菌絲內孢子大小差異極大，圖上端為小型孢子，下方則為大型孢子， 640x

Fig.17 The size of spores is hyphae of Branchiomyces are various.

Large spores (upper), small spores (below). 640x

圖 18 孢子的形態，800x

Fig.18 Spores of Branchiomyces. 800x

圖 19 菌絲內孢子分佈較疏，400x

Fig.19 Distribution of spores is sparse in some hyphae of Branchiomyces. 400x



19 microns, 大型孢子直徑為 5-10 microns 平均為 7 microns (表 2), 培養出來的鰓黴菌菌絲及大型孢子的大小與新鮮標本略有不同, 可能係因營養基質及生長時間長短不同所致, 尚待進一步探討。

表 2 鰓黴菌特徵之研究

Table 2 Studies on the diagnostic features of Branchiomyces

Host	Diagnostic features of <i>B. Sanguinis</i> and <i>B. demigrans</i> (based on Neish & Hughes 1980)			Our work
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Esox Lucius Tinca tinca</i>	<i>Anguilla japonica</i>	
Occurrence	Usually localized in blood vessels of the gill arch, gill filaments and lamellae	Hyphae can penetrate the gill filament and occur on the surface of the filament.	Localized in the blood vessels of the gill	Cultural conditions in the medium
Hyphae diameter	8-30 microns	Usually 13-14 microns; up to 22-28 microns at the tip	8-37 micron average 19 micron	7-26 micron average 19 micron
Spore diameter	5-9 microns	12-17 microns	5-14 micron average 8 micron	5-10 micron average 7 micron

## 討 論

鰓黴菌 Branchiomycosis 可以被分為兩種, *Branchiomyces sanguinis* 主要感染於 Carp *Branchiomyces dermigrans* 則感染於 Pike & Tench。同時此兩種均寄生於鰓部為主, 且有同樣分歧的菌絲, 及菌絲內密佈孢子(Neish & Hughes 1980)這兩種鰓黴菌的區別在於形態學及生長特徵, 摘敘於表二。(Neish & Hughes 1980), 在本試驗中, 所看到的鰓黴菌, 無論是新鮮標本壓片觀察或是組織切片檢查, 菌絲的生長都是在鰓薄板細小血管內, 而未發現有穿出血管外的例證。就生長特徵而言, 較類似於 *B. sanguinis* 新鮮標本檢查之菌絲直徑為 8-37 microns, 培養狀態中菌絲直徑為 7-26 microns, 菌絲大小與 *B. sanguinis* 相似, 而大於 *B. dermigrans* 13-14 microns 新鮮標本計算大型孢子大小為 5-14 microns, 培養狀態中之大型孢子為 5-10 microns, 類似於 *B. sanguinis* 5-9 microns, 而較 *B. dermigrans* 12-17 microns 為小, 鰓魚感染之鰓黴菌無論就生長部位、形態或菌絲大小, 大型孢子大小而言, 均類似於 *B. sanguinis*, 至於進一步生化學上的確定有待進一步的研究。此外, 亦曾發現本省養殖鰓魚鰓部似乎罹患另外一種黴菌, 此種黴菌有分歧的菌絲, 菌絲內佈滿大小較為均勻的孢子, 光學顯微鏡下孢子的透光率較高且較為均勻一致。其孢子大小與本試驗所檢查之鰓黴菌孢子比較則稍大, 是否屬於另一種鰓黴菌還有待確認。(Neish & Hughes 1980)表示 ( Danko, Szabo & Szokolzai 1967 ) 和 ( Peduzzi 1973 ), 可以在一般黴菌培養基中培養鰓黴菌, 並且表示 ( Danko, Szabo & Szokolzai 1967 ), 在接種後一星期即可在

Sabourand maltose agar 表面看到棕色薄層狀菌落，菌絲明顯的匍伏在培養基表面，並且產生既非氣生也非潛入型菌絲，孢子是在老的菌絲中產生，菌絲和孢子的大小就如同在魚體上，以上論點與本試驗略有差異。本試驗中，鰓黴菌生長較慢約需 2 - 3 星期才可明顯看到，並且在培養基表面並無菌絲存在的發現，菌絲均在培養基內部，由於鰓黴菌似乎在乾燥的表面不容易生長，而在水分較多的內部較易滋生，對於孢子的產生，無論在老或幼的菌絲均可被發現，僅有多少或大或小的區別而已（圖17-18），此外，在培養基培養下的菌絲及孢子大小較為均勻，而在鰓薄板血管內生長的菌絲及孢子大小差異較大（表 2）。

鰓黴菌菌絲壁極薄且易破裂，於壓片檢查時，如水分不足或觀察時間過長極易破裂，而導致孢子的流失，在低速離心處理時亦將導致菌絲壁破裂，孢子一部分流失或全部流失，所以在處理上儘量不用離心法取得菌絲，而以自然沈澱法取得為佳，無論如何，鰓黴菌無論在觀察上或是在處理上都須十分小心且快速，易則易影響到菌絲的完整性。

鰓黴菌培養時，須儘量防止受細菌或黴菌污染，尤其是黴菌生長快速將導致失敗，尤其遭受需求量大水分生長之他種黴菌污染時，亦因培養基之水分大量失去，導致鰓黴菌即無法生長，所以在前處理上須十分小心，如遭污染即須迅速移殖。

在 Sabouraud glucose agar 及 Basal semisynthetic medium 培養鰓黴菌時兩者比較，則鰓黴菌在 Basal semisynthetic medium 中生長較 Sabouraud glucose agar 快速。

## 摘 要

本省中部養殖鰻魚鰓黴病的主要發病期為 3 - 7 月，鰓黴菌主要係寄生於鰓部血管內，尤其是在鰓薄板之微細血管，罹病魚鰓部鰓絲不再是均勻的鮮紅色，而有局部棕色和局部灰白色區域，鰓絲亦將壞死、潰瘍而致缺損。

鰓黴菌可以在 Sabouraud glucose agar 及 Basal semisynthetic medium 中培養，菌絲係生長於培養基之內部，在培養基表面並未發現菌絲，在鰓部組織中菌絲大小為 8-37 microns 平均為 8 microns，而在培養狀態中，菌絲大小為 7-26 microns，平均為 19 microns，大型孢子 5-10 microns 平均 7 microns。

菌絲生長模式主要為二分叉生長。

## 謝 辭

本試驗承蒙李所長燦然博士的鼓勵，分所同仁的大力幫忙，使本試驗得以順利完成，在此一併致謝。

## 參考文獻

1. 簡肇衡、宮崎照雄、窪田三朗（1978）。台灣鰻魚黴菌性鰓病（Branchiomycosis）之組織病理所見，JCRF Fisheries Series, 34, 97 - 98.
2. 游世規（1974）。臨床細菌學，文鐘出版社 203 - 309, 461 - 476.
3. 江草周三（1978）。魚之感染症，恒星社厚生閣，325 - 327.
4. Elizabeth Moore-Landecker（1982），Fundamentals of the Fungi. 華西書局 578pp.
5. Ronald J. Roberts（1978）。Fish Pathology, Cassell Ltd. 205 - 216.
6. Stanislas F. Snieszko, Herbert R. Axelrod（1980），Disease of Fish Book 6. Fungal Diseases of Fishes, T. F. H. 159pp.