

農發會魚病研究專集(二)

3

GRRR



魚病研究專集(II)

Reports on Fish Disease
Research (II)

69.75083
201

Taipei, Taiwan, Republic of China
December 1978

序 言

近年來本省養殖漁業發展至為迅速，單位面積放養量及生產量隨之增加。然而，隨着集約養殖的進展，魚病問題日趨嚴重。一般養殖業者缺乏對魚病發生，預防及治療知識，故養殖魚罹病日增，藥物使用不當情形時有所聞。農復會有鑒於此，自六十三年起開始資助臺灣大學漁業生物試驗所，獸醫系，師範大學生物研究所，臺灣養豬科學研究所，屏東農專，輔仁大學生物系，以及臺灣省水產試驗所等研究機構共同進行魚病防治研究工作。數年來經各機構研究人員之共同努力，魚病防治基礎研究已略具規模，初步研究成果亦經於六十六年彙編為魚病研究專集第一集出版。

魚病專集之問世已普遍引起國內外學者對本省魚病防治研究之關注與重視，原有研究人員，亦孜孜不倦，加強研究，時隔一年研究成果陸續發表，經郭光雄博士收集彙編成冊，是為魚病研究專集第二集欣見其成，對魚病研究人員之辛勞至感欽佩，更冀望以此為基礎進一步在魚病研究學理及應用方面有進一步的成就。

農復會漁業組袁柏偉

魚病研究專集 (II)

目 錄 Contents

頁 數
Page

- 1 水產養殖抗藥細菌之研究—I, 養殖鰻抗藥菌之抗藥性..... 陳宏遠·郭光雄
Studies on Bacterial Drug-Resistant in Aquaculture-I. Drug Resistance of
Bacteria in Pond-Reared Eels (*Anguilla japonica*)
Houng-Yung Chen and Guang-Hsiung Kou
- 15 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
- 33 水產藥物對於鰻魚毒理學之研究..... 劉朝益·王金和
Toxicological Studies of Some Drugs in Cultured Eels (*Anguilla japonica*)
C. K. Liu and C. H. Wang
- 45 養殖鰻鰓病之病理研究..... 劉正義
The Pathological Study on Gill Diseases in Eel
Chen-I Liu
- 59 新竹區養殖文蛤病原菌 *Vibrio parahaemolyticus* 之分離... 楊美桂·羅竹芳·扈伯爾·郭光雄
Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from Cultured Hard Clam, *Meretrix*
lusoring in Hsin-Chu Areas
Mei-Kwei Yang, Chu-Fang Lo, Rev. F. Huber and Guang-Hsiung Kou
- 69 Sodium Sulfamonomethoxine 藥浴之鰻體內吸收情形..... 李明仁·郭光雄
Absorption of Sulfamonomethoxine by Eels in Medicated Bath
Min-Jin Lee and Guang-Hsiung Kou
- 77 文蛤寄生蟲 *Tylocephalum* 之球形幼蟲之研究..... 羅竹芳·王重雄·扈伯爾
The Coracidium of the Cestode *Tylocephalum* in Hard Clam, *Meretrix*
lusoring
Chu-Fang Lo, Chung-Hsung Wang and Rev. F. Huber
- 83 日本鰻 (*Anguilla japonica*) 的黴菌 *Ichthyophonus* sp. 感染..... 簡肇衡·余廷基
Infection of *Ichthyophonus* sp. (Fungus) in Japanese Eel (*Anguilla japonica*)
Chau-Heng Chien and Ting-Chi Yu
- 89 Panfuran-S 藥浴對虱目魚苗存活及其成長之影響試驗 (預報) 廖一久·楊富榮·羅秀旋
Preliminary Report of Effect of Panfuran-S Bath on the Survival and
Growth of Milkfish Fry
I-Chiu Liao, Fu-Rong Yang and Shou-Wan Lou

- 97 臺灣鰻魚黴菌性鰓病 (Branchiomycosis) 之組織病理所見……簡肇衡·宮崎照雄·窪田三朗
 The Histopathology of Branchiomycosis of Eel in Taiwan
 Chau-Heng Chien, Teruo Miyazaki, Saburoh S. Kubota
- 99 臺灣養殖黑鰻爛尾病病原菌 *Aeromonas hydrophila* 之分離……陳林揚·簡秋源
 Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a Tail Rot Disease of Cultured
 Black Porgy in Taiwan
 Ling-Yang Chen and Chiu-Yuan Chien
- 105 南非及美國東北岸產鰻線寄生蟲病之初報……王元隆·余廷基
 A Preliminary Report on Parasitic Diseases of South Africa's Glass Eels
 (*Anguilla mossambica*) and Northeastern America's Glass Eels (*Anguilla
 rostrata*)
 Yuan-Loong Wang and Ting-Chi Yu

水產養殖抗藥細菌之研究—I 養殖鰻抗藥菌之抗藥性

陳宏遠* · 郭光雄**

Studies on Bacterial Drug-Resistant in Aquaculture—I
Drug Resistance of Bacteria in Pond-Reared Eels (*Anguilla japonica*)

Houng-Yung Chen* and Guang-Hsiung Kou**

Abstract

The occurrence of drug-resistant bacteria isolated from internal organs of cultured eel (*Anguilla japonica*) was surveyed by plate counting and their conjugative drug resistant plasmid was detected to estimate the drug resistant status in eel farms in Taiwan. Sulfamonomethoxine(Su), tetracycline (Tc), chloramphenicol(Cm) and nitrofurantoin(Nf) were applied to select resistant bacteria. Microflora in every organ, regardless when and where the fishes were sampled, were composed of a certain quantity of resistant bacteria. In average, 10 percent of total population was resistant to Su, 8-6 percent resistant to Cm and Tc, only 1 percent was resistant to Nf.

Among the 649 drug-resistant strains randomly examined, 39 percent belonged to Enterobacteriaceae, 18.2 percent to *Aeromonas* and 10.2 percent to *Pseudomonas*. *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* and other G(-) rods were also detected. 145 strains (22.4%) were found to have carried R factors. 45 percent of Su-resistant bacteria, 24 percent of Cm-resistant bacteria, 8 percent of Tc-resistant and 2 percent of Nf-resistant bacteria were R⁺ strains. 33.9 percent of *Aeromonas*, 24.1 percent of Enterobacteriaceae and 16.7 percent *Pseudomonas* examined carried R factor. All the evidences studied in this research indicated that high incidence of drug-resistant and R factor-carrying bacteria in cultured eel was encountered and was assumed to have resulted from the abundant and frequent use of antibiotics and chemotherapeutics.

緒 言

細菌對各種抗菌劑產生抗性，其機制不外乎產生各種藥劑之分解酶（如 penicillinase），改變生化代謝之途徑，或降低細胞壁對抗菌劑之通透性（permeability）(Pollock, 1967; Anderson, 1968)。

* 國立臺灣大學海洋研究所海洋生物及漁業組
(Institute of Oceanography, National Taiwan University)
現址：竹南23信箱，臺灣養豬科學研究所病理系
(Present address: Department of Pathology, PRIT, P.O. Box 23, Chunan, Miaoli, Taiwan.)
** 國立臺灣大學動物學系
(Department of Zoology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan.)

這種生理或形態的改變是由於細菌本身分子層次 (molecular level) 之突變，同時突變後之抗藥性具有遺傳性，可以代代相傳。1940 年代初期，細菌產生抗藥性的事實初次被發現 (Abraham & Chain, 1940) 以來，各種新抗生素及化學療劑之迅速發展及廣泛使用，使抗各種藥劑之細菌大量產生。此種抗藥菌之抗藥基因能藉著細菌之結合 (conjugation) 與噬菌體的傳遞 (transduction)，進入新的細菌體中，而造成新抗藥菌的產生。

1959 年日本研究者 (Watanabe, 1963) 發現抗藥決定基因羣 (drug-resistant determinant gene)，能藉抗藥傳遞因子 (Resistant Transfer Factor, RTF) 之攜帶，將抗藥性自 *Shigellae* 傳至原無抗藥能力之 *E. coli*，並將此基因羣與傳遞因子合稱為 R 因子 (Resistant Factor, R factor)。R 因子為攜帶抗藥基因之質體 (plasmid)，由雙螺旋 DNA 所構成，獨立存在於細胞質中，使細菌產生藥物抗性，並控制菌毛 (pili) 之生成。R 因子之傳遞是藉著細菌接合時，進行複製並沿菌毛由給菌 (donor) 進入受容菌 (recipient) 造成受容菌的「被感染」 (Watanabe, 1967)。

目前，各種抗菌劑除已廣泛被使用於人類疾病之預防與治療外，畜牧業及水產養殖的疾病控制上，也大量使用它們。除此之外，亦有添加於飼料中，以促進動物之生長 (Stokstad, 1954)，此種大量並長期使用抗藥劑的結果，遂導致具多種抗藥性細菌 (multiple drug-resistant bacteria) 的產生 (青木, 1974)。根據 Aoki *et al.* (1971, 1973) 對日本各種淡水及海水魚類所做的廣泛調查，發現日本養殖魚類及野生魚類攜帶 R 因子之抗藥菌比率相當高，認為是由於經常及大量使用藥物的緣故。Shotts (1976) 亦調查自東南亞輸往美國之熱帶魚體及池水之細菌，也發現分離之 *Aeromonas hydrophila* 菌株中，有 22.5% 具一種或多種藥劑之抗性，而其中 14.1% 之菌株為 R⁺ 菌株。本省畜產水產養殖有關資料則完全缺如。

本省位處亞熱帶，水溫經年皆很高，養殖魚類疾病時常發生，養殖業者多不諳藥理，又缺乏對疾病診斷之知識，常常不適當的濫施藥物 (林和蕪, 1977)。被業者使用之抗菌藥劑種類很多，其中以磺胺藥劑 (sulfa drugs)，四環黴素 (tetracycline)、氯黴素 (chloramphenicol) 及呋喃劑 (Nitrofurans) 等四者最為普遍。本研究即選擇此四種抗菌劑為研究對象，除調查養殖鯉魚體內細菌對此四種抗菌劑產生抗性及抗藥菌在各器官之分布情形外，並研究 R 因子出現之頻率，以了解本省養殖魚類之重要細菌對常用抗菌藥劑產生抗性之情形，供防治疾病時藥劑使用及藥劑管制時之參考。

材料及方法

一、養殖場與鯉

自 1977 年 5 月至 1978 年 3 月，分別自鹿港地區 3 家 (L₁, L₂ 和 L₃)，高雄地區 1 家 (K₁) 和屏東地區 2 家養殖場 (K₂ 和 K₃) 採取鯉魚樣本，每家採樣之月份略有不同，每次採樣均以外觀正常之鯉為主，若採樣時有病鯉發現亦同時採樣 (Table 1)。每次每家各取 4—5 尾鯉魚，放置於塑膠袋或塑膠桶中，充分灌入氧氣後，2 小時內携回實驗室進行細菌分離。分離前，先詳細觀察，記錄魚體外觀是否具有異狀，解剖檢視各內臟組織是否發生病變。除此之外，並詳記各養殖場使用藥劑之情形 (Table 2)。

Table 1. Sampled fishes from six culturists

Month	Culturist					
	L ₁	L ₂	L ₃	K ₁	K ₂	K ₃
May, 1977	0/5*	—	—	0/5	—	—
Jun	0/5	—	—	0/5	—	—
Jul	0/5	—	—	—	—	—
Aug	0/5	—	—	0/5	0/5	0/5
Sep	1/5 ^r **	0/5	0/5	5/5 ^w	0/5	0/5
Oct	5/5 ^r	—	—	4/4 ^t	0/4	0/1
Nov	1/4 ^r	0/4	0/4	1/5 ^r	0/5	0/3
Dec	0/4	—	0/5	0/3	0/5	0/4
Jan, 1978	5/5 ^{r,w}	0/5	0/2	5/5 ^r	0/5	0/5
Feb	0/5	—	—	5/5 ^{r,t}	0/5	0/6
Mar	1/5 ^p	1/5 ^p	0/5	0/4	0/4	0/4

* Number of diseased fish/Number of experiment fish

** Symptoms of apparently diseased fish

p: plistophorosis

r: red-fin disease or Edwardsielliosis

t: tail-rot

w: water mold

Table 2. Prophylactic and remedial drugs administrated by six culturists

Culturist	prophylac- tic drugs	Remedial drugs										
		1977 May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	1978 Jan.	Feb.	Mar.
L ₁	Nf, Tc	—	Nf	—	—	—	Nf, Tc	Nf, Tc	Nf, Tc	Nf, Tc	—	Tc
L ₂	—	•	•	•	•	—	—	—	•	—	•	—
L ₃	—	•	•	•	•	—	•	—	—	—	•	—
K ₁	Nf	—	Tc	—	—	Tc	Nf	—	Cm	Tc	—	Cm
K ₂	Cm	•	•	•	—	—	—	Tc, Su	—	—	—	—
K ₃	—	•	•	•	Nf, Tc	—	—	—	—	—	—	—

Abbreviations: Nf, Nitrofurantoin

Tc, Tetracycline and its derivatives

Cm, Chloramphenicol

Su, Sulfa drugs (mainly sulfamonomethoxine)

—, No drug treatment

•, No sampling in that month

二、培养基和抗菌剂

本研究所使用分離抗藥性細菌之抗菌劑為本省水產養殖常用之 Sulfamonomethoxine (Su), Tetracycline (Tc), Chloramphenicol (Cm) 及 P-7138 (Nf) 等四種藥劑。Nf 須先溶於 Dimethylformamide, Cm 則先溶於微鹼性無菌蒸餾水，而後四種藥劑再各自溶入無菌蒸餾水中，做成貯備溶液 (stock solution)，取其定量加入已滅菌之 60°C Nutrient Agar (Beef extract 5g, Peptone 15g, NaCl 5g, Agar 15g, Distill water 1000 ml, pH 7.0-7.2)，使藥劑濃度分別為 Su 500 μg/ml, Tc 25 μg/ml, Cm 25 μg/ml, Nf 12.5 μg/ml (青木和渡邊, 1973; 青木, 1974; Petersdore & Sherris, 1965)，充份混合後，分別注入直徑9公分之塑膠平板中，厚度約為0.4公分，待培養基凝固烘乾後，即可供使用。

三、抗藥菌之分離與計數

各養殖場採得之 4~5 尾鯪為一組材料，以 urethane 或 MS-222 麻醉後，在無菌操作下，取出腸、腎、肝及脾等四臟器，將此 4~5 尾鯪之臟器分別合在一起，每 1 g 重量加 10 ml 無菌生理食鹽水 (0.85% NaCl)，而後以均質機 (Homogenizer) 打碎 3 分鐘，均勻混合，取 1 ml 臟器懸浮液作 5 階段之 10 倍稀釋 (ten-folds serial dilution) 系列，所使用之稀釋液為無菌生理食鹽水，取每階段稀釋液 0.1 ml，接種於預備好的含藥與不含藥的平板培養基上，以 conradi's stick 均勻塗抹，置於室溫下或 28°C 之恒溫箱中，經 48 小時培養後，以肉眼計算培養基上之菌落，求出 1 g 內臟含抗藥菌與一般菌之個數。每個平板培養基上生長之菌落若超過 400 個，則不予計算平均。此外，分別觀察培養基上形態不同之菌落並鈎出轉培養於斜面培養基上保存，以供各種試驗之用。

四、分離菌之鑑定

依水生細菌測定法，測定分離菌之形態及生化特性，參考 Bergey's manual (Krieg, 1974)，Davis et al. (1973)，鍾與郭(1973)等之分類基準，將分離菌分為 Enterobacteriaceae, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* 及 Unidentified G(-)rods 等七類菌羣。

五、R 因子

將分離菌接種於 penassay broth (Difco) 上，於 37°C 下培養至透光度 (O.D.) 為 0.4，並在相同情況下培養受容菌 (*Escherichia coli* K12 之 substrain RC 85: iac⁺, Nal^r, Tc^s, Cm^s, Su^r, Nf^s) 之 Penassay broth 菌液。取等量 (1~2 ml) 分離菌與受容菌之培養液，於 37°C 下混合培養 24 小時後，以白金線鈎將此混合培養液接種於含有 nalidixic acid 100 µg/ml 和各該分離菌之抗菌劑 (藥劑濃度與前述相同) 之 MacConkey 平板培養基 (Difco) 上，置於 37°C 恒溫箱中培養 24 小時，觀察發育在培養基上菌落之顏色。若分離菌為 lactose positive，而 MacConkey 平板上菌落顏色為磚紅色，則將該等菌落接種於 EMB 平板培養基 (Difco) 上，37°C 下培養 24 小時，觀察菌落，此時若其表面出現金屬光澤，則判定該分離菌為 R⁺，若分離菌為 lactose negative 且 MacConkey 培養基上菌落為磚紅色時，則無需 EMB 培養基之培養觀察，即可判定分離菌為 R⁺ 菌。其他在 MacConkey 培養基上菌落不為磚紅色或在 EMB 培養基上不呈金屬光澤者均判斷為不具 R 因子 (R⁻) (Shotts, 1976)。抗藥分離菌 649 株中，有二株在實驗時失去，故進行 R 因子檢出者僅為 647 株。

結 果

一、抗藥菌之出現與分布

將 6 家養殖場鯪魚之全年各器官所含一般細菌與抗藥菌菌數 (每 g 內臟器官所含活菌的數目)，轉換成對數值後，經複因子變方分析 (Factorial analyses of variance)，其結果如 Table 3 所示。各場鯪魚之含菌量在器官間，各月份間，及抗菌劑間均有顯著的不同，即鯪之腸、腎、肝與脾四臟器間單位重量含菌量 (包括抗藥菌) 有顯著差異，而且隨著月份之不同，器官之含菌量亦呈現明顯的變化。一般菌、抗 Su 菌、抗 Tc 菌、抗 Cm 菌與抗 Nf 菌間出現率亦呈顯著之差異。

器官與藥劑間之交互 (Organ × Drug)，除了 L₃ 養殖場外之 5 家鯪場均不顯著，表示一般菌及各抗藥菌在各器官的數目變化趨勢相似。而 L₃ 養殖場之器官與藥劑之交互在 5% 水準下呈顯著差異

* +: Positive; r: Resistant; s: Sensitive; RC85 菌株係日本宮崎大學水產學科青木宙博士所提供

Table 3. Factorial analyses of variance for logarithmic numbers of drug-resistant bacteria per gram of viscera from six sampling culturists' eels during 1977-1978

Culturist	Source of variation	Analysis of variance			
		Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F
L ₁	Organ	3	289.27	96.42	102.48**
	Drug	4	173.66	43.42	46.14**
	Month	10	104.55	10.45	11.11**
	Organ × Drug	12	23.57	1.96	2.09
	Organ × Month	30	109.58	3.65	3.88**
	Drug × Month	40	138.05	3.45	3.67**
	Residual	120	112.90	0.94	
L ₂	Organ	3	53.05	17.68	21.23*
	Drug	4	32.18	8.04	9.65*
	Month	3	32.82	10.94	13.13*
	Organ × Drug	12	22.42	1.87	2.24
	Organ × Month	9	31.27	3.48	4.17*
	Drug × Month	12	13.30	1.11	1.20
	Residual	36	29.99	0.83	
L ₃	Organ	3	130.19	43.40	30.07**
	Drug	4	46.51	11.63	8.06*
	Month	5	48.84	9.77	6.77*
	Organ × Drug	12	43.05	3.59	2.49*
	Organ × Month	15	79.82	5.32	3.69**
	Drug × Month	20	19.08	0.95	0.66
	Residual	60	86.59	1.44	
K ₁	Organ	3	85.38	28.46	14.23*
	Drug	4	197.04	49.26	24.63**
	Month	8	105.31	13.16	6.58**
	Organ × Drug	12	47.08	3.92	1.96
	Organ × Month	24	101.74	4.24	2.12*
	Drug × Month	32	63.53	2.61	1.31
	Residual	96	181.46	1.89	
K ₂	Organ	3	350.27	116.75	107.47**
	Drug	4	74.35	18.59	17.11**
	Month	6	52.56	8.76	8.06**
	Organ × Drug	12	29.02	2.42	2.22
	Organ × Month	18	99.02	5.50	5.06**
	Drug × Month	24	39.91	1.66	1.53
	Residual	72	78.22	1.09	
K ₃	Organ	3	134.11	44.70	18.21*
	Drug	4	107.19	26.80	10.92*
	Month	7	203.42	29.06	11.84**
	Organ × Drug	12	40.24	3.35	1.36
	Organ × Month	21	315.91	15.04	6.13**
	Drug × Month	28	53.30	1.90	0.77
	Residual	84	206.17	2.45	

* P < .05; ** P < .01

，說明該場鯪魚之一般菌及各抗藥菌在各器官之變化並無相同的傾向。器官與月份的交感 (Organ × Month) 在各場均顯著，此即顯示在各月份各器官含菌量的變化，隨著器官而有顯著的不同。除了 L₁ 養殖場下，其他 5 場藥劑與月份之交感 (Drug × Month) 均呈現不顯著，這種不顯著說明了月份間，4 種抗藥菌和一般菌之出現率無顯著差異。

鯪之四種臟器中，以腸管之含菌量最高 (Table 4)，由鄧肯氏新多變域測驗 (Duncan's new multiple range test) 結果可推知鯪魚的腸管含菌量較其他器官高很多。腎臟的含菌量次多，但有時與肝臟之含菌量相較，並無顯著差異 (如養殖場 L₁ 與 K₁)，在養殖場 K₁，脾臟之平均含菌反而比腎臟高。肝臟與脾臟之含菌量並無明顯的差異，6 養殖場中有 4 家脾臟含菌量較高，有 2 家肝臟含菌量較高，經測驗結果後，發現 L₂, L₃ 與 K₃ 3 場之肝與脾含菌量並無顯著差別。由上述結果可知鯪體臟器中之抗藥菌與一般菌之含量，以腸管最多，腎、肝及脾等 3 器官而言，則大部分情況，以腎之含菌量為最高，肝、脾兩器官之差別並無一定的傾向。

Table 5 指出各養殖場鯪魚所含一般菌與抗藥菌間的關係。鄧肯氏新多變域測驗結果顯示，除了 L₁ 與 K₁ 兩場外，其餘各場之抗 Su 菌、抗 Tc 菌、抗 Cm 菌與抗 Nf 菌之出現率並無顯著

Table 4. Results of Duncan's new multiple range tests for logarithmic numbers of bacteria from intestine, kidney, liver and spleen

Culturist	Mean logarithmic no. of bacteria in			
	Intestine	Kidney	Liver	Spleen
L ₁	4.245	<u>1.979</u>	<u>1.971</u>	1.171
L ₂	2.960	<u>1.333</u>	<u>0.868</u>	1.156
L ₃	3.358	2.095	<u>0.752</u>	<u>0.946</u>
K ₁	2.672	<u>1.186</u>	<u>0.872</u>	1.830
K ₂	4.846	2.186	0.732	1.243
K ₃	3.488	1.957	<u>1.475</u>	1.071

Any two means underscores by the same line are not significantly different.

Table 5. Duncan's new multiple range tests for logarithmic numbers of bacteria under the selection of Sulfamonomethoxine (Su), Tetracycline (Tc), Chloramphenicol (Cm), P-7138 (Nf) and no drug selection (Nt).

Culturist	Mean logarithmic no. of bacteria resistant to				
	Nt	Su	Tc	Cm	Nf
L ₁	3.783	2.880	<u>1.952</u>	<u>1.829</u>	1.263
L ₂	2.641	<u>1.756</u>	<u>1.603</u>	<u>1.122</u>	0.777
L ₃	2.934	<u>1.735</u>	<u>1.788</u>	<u>1.354</u>	1.129
K ₁	3.642	1.018	1.712	<u>1.017</u>	<u>0.811</u>
K ₂	3.662	2.158	2.025	1.711	1.691
K ₃	3.548	<u>1.852</u>	<u>1.922</u>	<u>1.468</u>	1.198

Any two means underscored by the same line are not significantly different.

的不同，抗 Su 菌平均約佔總菌數的10%弱，但有的時候可達總菌數之94%（養殖場 L₁，6 月份），抗 Tc 菌受四環黴素及其衍生物大量施用的影響，在各場之出現率有時並不比抗 Su 菌少。又，該二抗藥菌出現率之差距在統計上並不顯著。抗 Nf 菌之出現率較低，平均約佔總菌數之數 1%，但亦曾達總菌數之37%，比率相當高。抗 Cm 菌出現率與抗 Tc 菌相近，二者的出現率約在抗 Su 菌與抗 Nf 菌出現率之間。

由 Table 3-5 之變方分析及其擬說測驗的結果顯示：各種抗藥菌數之月份變化，就總菌數而言，並非獨立變異的因子，而是隨著總菌數之增減呈正相關。但藥物之局部處理會使抗藥菌之出現率在短期內發生明顯的波動，例如在1977年5月及10月，L₁ 場抗 Nf 菌之出現率顯著的增加，則因該兩月份大量添加 Furanzolidone 以控制疾病（Table 2）而使該時期之抗 Nf 菌有激增的現象。

二、抗藥菌的種類

由含抗菌劑的平板培養基逢機取得各種抗藥菌，計649菌株，其中抗 Su 菌204株，抗 Tc 菌162株，抗 Cm 菌 156株，抗 Nf 菌127株（Table 6）。抗 Su 菌 204 株中，有27%為 *Aeromonas*，抗 Tc 菌中亦有 27%為 *Aeromonas*，然而，抗 Cm 菌與抗 Nf 菌中 *Aeromonas* 只佔 7%；*Pseudomonas* 佔抗 Su 菌之 5%，佔抗 Tc 菌之9%，然而却佔抗 Cm 菌之15%，抗 Nf 菌之13%。*Enterobacteriaceae* 佔抗 Su 菌之 31%，佔抗 Tc 菌之35%，佔抗 Cm 菌之43%，佔抗 Nf 菌之 51%。這些結果說明 *Aeromonas* 對 Su 與 Tc 之藥物敏感性 (sensitivity) 比對 Cm 與 Nf 要低些，亦即 Cm 與 Nf 兩藥劑在處理 *Aeromonas* 引起的疾病上比較有效。相反的，*Pseudomonas* 對 Su 與 Tc 之敏感性比對 Cm 與 Nf 要高些。*Enterobacteriaceae* 對於抗菌劑之敏感性隨 Su, Tc, Cm, Nf 之次序漸次減低。

Table 6. Bacteria groups of drug-resistant bacteria selected by Sulfamonomethoxine(Su), Tetracycline(Tc), Chloramphenicol(Cm) and P-7138(Nf)

Groups of bacteria	Number (percentage) of isolates resistant to			
	Su	Tc	Cm	Nf
<i>Aeromonas</i>	55(27)	43(27)	11(7)	9(7)
<i>Pseudomonas</i>	10(5)	15(9)	24(15)	17(13)
<i>Flavobacterium</i>	16(8)	10(6)	12(8)	8(6)
<i>Enterobacteriaceae</i>	64(31)	57(35)	67(43)	65(51)
<i>Achromobacter</i>	13(6)	9(6)	11(7)	8(7)
<i>Alcaligenes</i>	4(2)	3(2)	3(2)	3(2)
Other G(-) rods	42(21)	25(12)	28(18)	17(13)
Total number	204(100)	162(100)	156(100)	127(100)

若將各養殖場之四種抗菌合併考慮（Table 7）具抗藥性 *Aeromonas* 佔全部抗藥菌之 18%，*Pseudomonas* 約佔 10%，*Enterobacteriaceae* 約佔 39%，其他菌約佔 32%。這種比例與未經藥劑篩選之一般菌略有差距，一般菌中 *Aeromonas* 佔 21.7%，*Pseudomonas* 佔 8.6%，而 *Enterobacteriaceae* 只佔15%左右。

Table 7. Occurrence of major drug-resistant groups of bacteria isolates from six culturists

Groups	Culturist						Total
	L ₁	L ₂	L ₃	K ₁	K ₂	K ₃	
<i>Aeromonas</i>	45(18.4)	15(36.6)	11(14.7)	10(13.3)	16(16.7)	21(17.9)	118(18.2)
<i>Pseudomonas</i>	30(12.2)	3(7.2)	7(9.3)	8(10.7)	6(6.3)	12(10.3)	66(10.2)
<i>Fluobacterium</i>	13(5.4)	0	5(6.7)	9(12.0)	10(10.4)	9(7.7)	46(7.1)
Enterobacteriaceae	107(43.7)	17(41.6)	33(44.0)	23(30.7)	33(34.4)	40(34.2)	253(39.0)
<i>Achromobacter</i>	14(5.7)	1(2.4)	3(4.0)	8(10.7)	7(7.2)	8(6.8)	41(6.3)
<i>Alcaligenes</i>	7(2.9)	1(2.4)	1(1.3)	0	4(4.2)	0	13(2.0)
Other G(-) rods	29(10.2)	4(9.8)	15(20.0)	17(22.8)	20(20.8)	27(23.1)	112(17.3)
Total	245(100.0)	41(100.0)	75(100.0)	75(100.0)	96(100.0)	117(100.0)	649(100.0)

* Number of isolates (percentage)

三、抗藥性 R 因子

自210尾鯉分離所得之647株抗藥菌中，有141株(22%)為攜帶 R 因子之 R⁺ 菌株 (Table 8)。其中，抗 Su 菌204株中有91株(45%)攜帶 R 因子，約佔所有 R⁺ 菌株中之 62.8%，為四種抗藥菌中比例最高者，抗 Tc 菌162株中有13株(8%)為 R⁺ 菌株，抗 Cm 菌156株中有38株(24%)攜帶 R 因子，抗 Nf 菌之 R⁺ 菌株出現率最低，在127株抗 Nf 菌中僅有3株(2%)為 R⁺ 菌株。

由各場 R 因子出現之頻率來看，施藥頻度較多之 L₁, K₁, 及 K₂ 三家養殖場抗藥菌中 R⁺ 菌株出現率分別為26%，30%，25% (Table 8)，比施藥頻度較少之 K₃ 及 L₂ 2 養殖場之11%與17%為高。從未施用抗菌藥物之 L₂ 養殖場，雖 R 因子之出現率為24%，與其臨近之 L₃ 場(17%)比較，以二項分布測驗分析，顯示 t 值為0.91，小於5%之顯著界限，說明其差異並不顯著。又對 Su 等四種抗藥劑而言，除 L₂ 與 K₂ 2 養殖場外，其餘4場均是抗 Su 之 R⁺ 菌出現比率高於其他抗藥菌。K₂ 與 L₂ 養殖場之 R⁺ 抗藥菌則以抗 Cm 菌之出現率為最高。

Table 8. Incidence of R⁺ bacterial strains selected by Sulfamonomethoxine(Su), Tetracycline(Tc), Chloramphenicol(Cm) and P-7138(Nf)

Culturist	Bacterial strains selected by,				Subtotal
	Su	Tc	Cm	Nf	
L ₁	41/65*	7/68	12/57	3/54	63/244(25.8%)
L ₂	5/13	1/15	4/9	0/4	10/41(24.4%)
L ₃	11/34	0/13	2/15	0/13	13/75(17.3%)
K ₁	18/34	2/16	2/9	0/15	22/74(29.7%)
K ₂	9/25	3/21	12/30	0/20	24/96(25.0%)
K ₃	7/33	0/29	6/34	0/21	13/117(11.1%)
Subtotal	91/204(44.6%)	13/162(8.0%)	38/154(24.4%)	3/127(2.4%)	145/647(22.4%)

* Number of R⁺ isolates/Number of isolates examined

按照月份來考察，6養殖場 R⁺ 菌出現之頻率，各場間之變異頗大 (Fig. 1)，但仍可看出1977年10月份與11月份間，6場均呈高的趨勢，及1978年，有4家養殖場1月份出現率為最高。

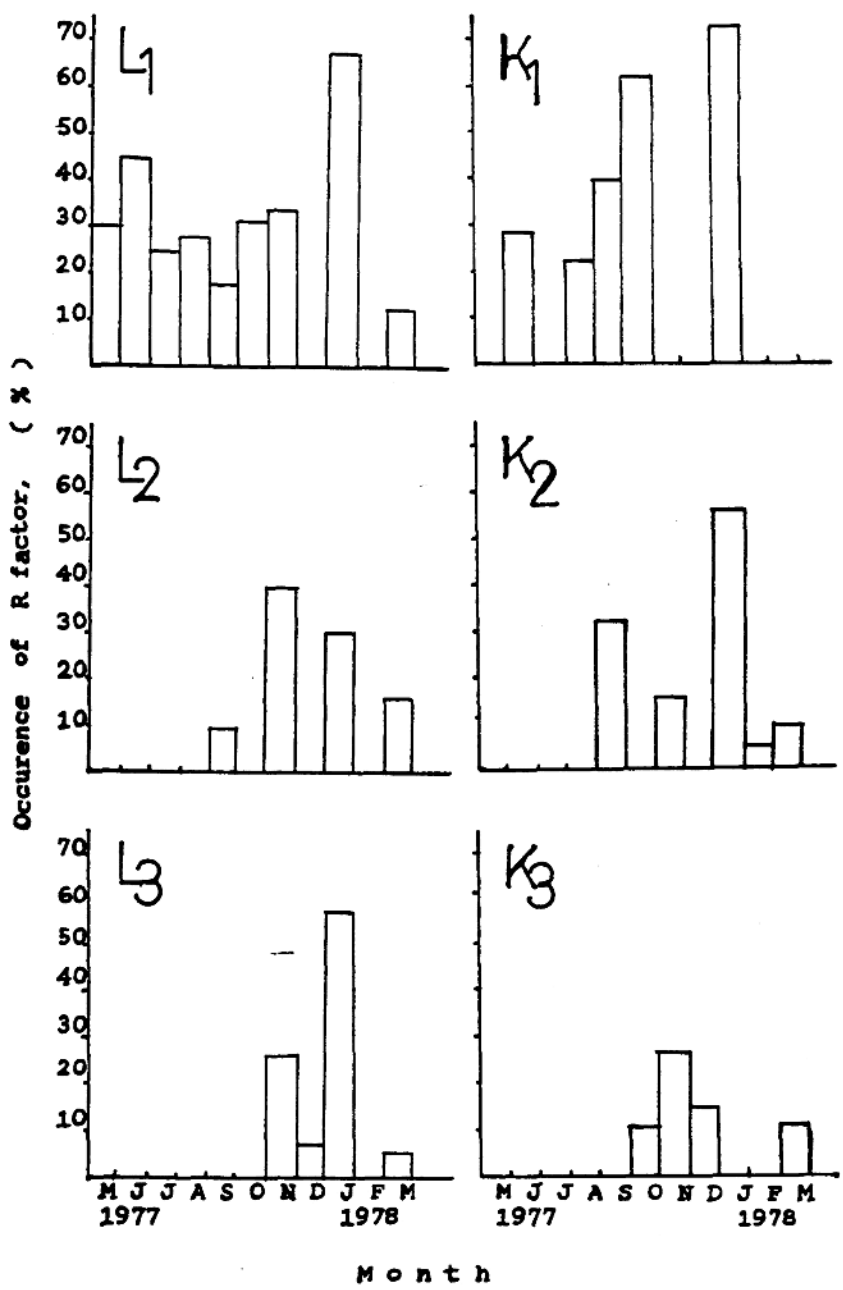


Fig. 1: Incidence of R+ drug-resistant bacteria strains isolated from six culturists, 1977-1978.

不同種類的抗藥菌，攜帶 R 因子的比率不同 (Table 9), *Aeromonas* 携 R 因子之比率最高，在118株具抗藥性 *Aeromonas* 菌中有40株 (33.9%) 携帶 R 因子；Enterobacteriaceae 次之，253株抗藥菌中有61株 (24.1%) 為 R⁺ 菌株，再其次為 *Pseudomonas* 之16.7%，66株抗藥菌中有11株具有R因子。*Flavobacterium*, *Achromobacter* 與 *Alcaligenes* 等3菌種中，無一菌株携帶R因子。

Table 9. Incidence of R plasmid in major groups of bacteria isolated from eels of six culturists

Groups	Culturist						Total
	L ₁	L ₂	L ₃	K ₁	K ₂	K ₃	
<i>Aeromonas</i>	19/45*(42)	4/15(29)	4/11(36)	4/10(40)	4/16(25)	5/21(24)	40/118(34)
<i>Pseudomonas</i>	10/30 (33)	0/3	0/7	1/8 (13)	0/6	0/12	11/66 (17)
<i>Flavobacterium</i>	0/13	0/0	0/5	0/9	0/10	0/9	0/46
Enterobacteriaceae	27/107(25)	3/17(18)	5/33(15)	9/23(40)	11/33(33)	6/40(15)	61/253(24)
<i>Achromobacter</i>	0/14	0/1	0/3	0/8	0/7	0/8	0/41
<i>Alcaligenes</i>	0/7	0/1	0/1	0/0	0/4	0/0	0/13

* Number of R⁺ strains/Number of strains examined (Percentage of R factor incidence)

討 論

本省養殖鰻腸管和其他器官內抗藥菌之分布，均具有相當的規則，通常抗 Su 菌最多，約佔總細菌族羣數目的十之一，抗 Nf 菌最少，只佔百分之一，抗 Tc 菌抗 Cm 菌之出現率則介於上述二者之間。在施放藥物的魚池，魚體抗施用藥物的細菌數有顯著的增加，但藥物處理中止後，抗藥菌數會漸漸減低，此現象與 Richmend (1972) 指出相同，即藥物的處理把不具抗藥性的細菌淘汰，因此，抗藥菌所佔的比率增加，一旦藥物的壓力移去，則非抗藥菌漸次繁殖，同時抗藥菌漸失其抗藥力，使抗藥菌的出現率又慢慢下降。青木與渡邊 (1973) 調查日本鰻魚腸管內抗 Tc 菌與抗 Cm 菌之分布指出抗 Tc 菌與抗 Cm 菌約佔總菌數的十分之一，與本研究之結果相比，高出很多，此可能是由於日本鰻魚養殖歷史悠久，各種藥物之使用相沿已久之故，同時顯示日本之 Tc 及 Cm 之使用於鰻養殖之頻率及數量較本省為劇。

青木與渡邊同時指出抗 Cm 菌出現率比抗 Tc 菌低，且抗 Cm 菌中 R 因子之出現率也較抗 Tc 菌者為低。本研究之結果顯示，抗 Tc 菌與抗 Cm 菌之出現率無顯顯著的不同。按理本省水產養殖上 Tc 之使用比 Cm 普遍，抗 Tc 菌之出現率應較抗 Cm 菌為高。這可能與本省抗 Cm 菌携帶 R 因子的比率比抗 Tc 菌者為高，有密切的關連。因 R 因子具有抗 Cm 藥性之 Cm marker (即 Cm determinant) 出現率可能比 Tc marker 要高出很多，因此致使抗 Tc 菌與抗 Cm 菌之出現率，不因 Tc 之使用頻率及數量較 Cm 多，而有顯著的差異。又，R 因子 Cm marker 與 Tc marker 之基因不穩定 (genetic instability) (Abe *et al.*, 1966)，或 Cm marker 在聯會與圖 (linkage map) 上之相對位置較 Tc marker 接近藥抗傳遞因子(RTF) (Watanabe, 1967)，亦會導致如此的結果。日本的結果，Watanabe *et al.* (1972) 認為是R因子 Cm marker 比較少出現的緣故。因此，本省 R 因子抗藥樣態 (drug-resistant pattern) 究竟如何，實有待進一步的探討。

抗 Su 菌中有 27% 為 *Aeromonas*，抗 Tc 菌中亦有 27% 為 *Aeromonas*，而抗 Cm 菌中却只有 7% 為 *Aeromonas*，抗 Nf 菌者亦只有 7%。又，而抗 Su 及抗 Tc 菌之具有 R 因子者，除抗 Nf 菌僅有 3 株菌，可以忽視外，抗 Su 及抗 Tc 之 *Aeromonas* 均佔 30.7% 為最大。這些結果可能與本省每年由日本進口大量鱘線及黑仔 (每公斤 500 尾左右) 有關。青木與渡邊 (1973) 和 Aoki *et al.* (1971) 分離鰻魚 (*Anguilla* spp.)，香魚 (*Plecoglossus altivelis*) 和鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 等魚

體之 *Aeromonas hydrophila* 指出分離菌普遍携有具 Su 與 Tc 兩 marker 之 R 因子，但具 Cm, Nf marker 之 R 因子却很少出現。因此本省每年自日本進口鰻苗時，同時也將具有 Su 與 Tc marker R 因子之 *A. hydrophila* 引入，廣泛流通至全省各地。

比較 Enterobacteriaceae 與 *Aeromonas* 二者，在一般菌與抗藥菌中所佔的比率，及携帶 R 因子的情形時，可以了解此兩類細菌抗藥性的發生，R 因子所扮演的地位有所差異。Enterobacteriaceae 約佔全部抗藥菌之39%，而佔一般菌的百分比却僅為 15%~18%，又抗藥之 Enterobacteriaceae 中有24%携帶 R 因子，另一方面，*Aeromonas* 在抗藥菌中約佔18%，一般菌中之出現率為 22%，其抗藥菌中 R 因子菌株之出現率約為34%。由此可推測 *Aeromonas* 抗藥性的產生，R 因子所佔的地位較其在 Enterobacteriaceae 中的地位重要。此與青木等 (1972) 的指摘一致。而對携 R 因子比率較小，却有大量抗藥菌存在的 Enterobacteriaceae 而言，其抗藥性之產生，則可能源於母族羣基因庫 (population gene pool) 具有較多抗藥決定基因 (resistance determinant)，亦即 Enterobacteriaceae 的抗藥性多為自然抗藥性 (natural resistance) (Aoki *et al.*, 1971) 是以 R 因子傳遞所佔的比重，便居於次要的地位。

R 因子出現率與養殖場使用抗菌劑之頻度有明顯的關係，在使用藥物較頻繁之 L_1 , K_1 與 K_2 三家養殖場，R 因子出現率分別為26%，30%，25%，很明顯的高於較少以藥物處理的 L_3 (17%) 與 K_3 (11%) 兩場，至於從未處置藥物之 L_2 場， R^+ 株出現率僅24%，此可能是抗藥性 *Aeromonas* 的出現率，比其他養殖場高出甚多所引起的。因 *Aeromonas* 本身携帶 R 因子的比率相當高。抗 Nf 菌中 R 因子出現頻度相當低，僅有2%，這和多數研究報告的結果 (Watanabe *et al.*, 1971; 青木等, 1972) 相同。 L_1 養殖場顯示携帶 R 因子之抗 Nf 菌出現率較高，應是該場常使用 Nf 藥劑之故。本省鰻魚抗菌以具 Su marker, Cm marker 及 Tc marker 之 R 因子為多，Nf marker 很少出現。因此，今後在魚類細菌性感染之防治上，似可以 Nf 為主，以減少因抗藥菌產生所造成疾病治療上的困難。

由各養殖場各月份 R 因子出現的情形顯示各養殖場出現高頻度 R^+ 菌株，均為藥物處理較頻繁時期。在1977年10月份及11月份間，6家養殖場均有偏高的趨勢，而在1978年1月份也有3家養殖場 R 因子出現率達全年最高點，考其原因，當是10月份氣溫不穩定，而一月份氣溫太低，致各養殖場疾病常發生，藥物添加頻繁所導致。

日本的報告指出由養殖魚類所分離出之抗藥 *Pseudomonas* 中，很少發現携帶 R 因子的情形 (Watanabe, 1971)。本實驗却發現本省抗藥 *Pseudomonas* 中，有17%携帶 R 因子，此可能由於近年來中南部地區，養殖鰻發生嚴重的 *Pseudomonas anguilliseptica* 感染症，尤其是與1977年春季大量流行 (郭等，未發表)，各養殖場均大量投放抗菌劑有密切的關連性，換言之，本研究分離之携帶 R 因子之 *Pseudomonas* 可能為過去流行抗藥之殘留 (Richmond, 1972)。

R 因子能將藥物抗性 marker，貯存於 R 因子的基因庫 (gene pool) 中，從而長期影響細菌族羣之抗藥性。又，多種抗藥性 (multiple drug-resistance) 可藉 R 因子傳遞，由無害於人類之細菌感染給人類疾病之病原菌上，因此使常用之廣效性抗菌劑失去效用，造成治療上嚴重的困擾 (渡邊1972^b)。但防止 R 因子之傳遞，除了消極的減少藥物的使用之外，並無積極可行的辦法 (Brinton, 1971) 針對此點，英國在最近已採取立法之程序，強制將動物用藥與人類醫學用藥加以分隔 (渡邊1972^a)，使動物用藥所產生之抗藥性，雖經 R 因子的傳遞，亦不致影響人類疾病的治療。

本省的水產養殖環境中，曾一再發現多種抗藥性的病原菌株 (徐和郭, 1977; 郭等, 1976; 郭等, 1977; 郭和郭, 未發表)，造成這種現象的原因，是否由於 R 因子的感染所致，尚未敢加以斷言，而由本報告所顯示的結果，却使吾人不得不相信，本省鰻魚養殖的環境中，抗藥菌出現頻度之高，可能是受到 R 因子及廣泛使用抗菌劑之影響。因此，不管從公共衛生的立足點，或是水產養殖魚類疾病防治的觀點而言，對於 R 因子所具之抗藥樣態 (pattern) 有待進一步的探討，長期對細菌抗藥性之檢查，能給吾人充份資料以檢討各種抗菌藥劑的使用，而達到雖多而不濫的境界。

摘 要

自1977年5月至1978年3月，進行研究及檢討本省6家養鰻場，鰻魚體中磺胺劑(Su)，四環黴素(Tc)，氯黴素(Cm)及呋喃劑(Nf)四種藥劑之抗藥性細菌之出現，及分離出之抗藥菌649株中，R因子之出現情形。得下列之結果：(1)各種抗藥菌就數目而言，隨魚體內之總細菌數呈正相關變化；就藥劑的種類而言，以抗Su菌出現率最高，抗Tc菌與抗Cm菌次之，抗Nf菌最少；就細菌種類而言，抗藥菌中有39%為Enterobacteriaceae為最高，比一般菌中Enterobacteriaceae所佔15%之比率高出甚多，其次為Aeromonas之18.2%，再其次為Pseudomonas之10.2%，以Alcaligenes之2%為最低。(2)各養殖場抗藥菌及其R因子之出現率依藥物使用頻度提高及施用時間之增長，有增大的趨勢。(3)抗Su菌中有45%為R⁺菌株，抗Cm菌有24%，抗Tc菌有8%，而抗Nf菌只有2%攜帶R因子。(4)具抗藥性之Aeromonas攜帶R因子的比率最高，為33.9%，其次為Enterobacteriaceae有24.1%，再其次為Pseudomonas的16.7%，其他如Flavobacterium, Achromobacter和Alcaligenes等三類抗藥菌中無R因子檢出的情形。

謝 詞

本研究蒙農復會78-ARDP-5-3-0-158計劃之經費支持。省水試所鹿港分所及東港分所慷慨場地設備及諸位同仁的幫忙，臺大魚病室郭上卿小姐、黃欣汝小姐給予鼎力協助，臺大動物系李玉玲小姐對統計分析及電腦操作提供寶貴意見，謹致以最大謝忱。

參 考 文 獻

- 1) Abe, H., S. Goto and S. Kuwabara. 1966. Transmission of multiple drug-resistance from *Shigella* to *Aeromonas* and non-agglutinable *Vibrio* through conjugation. *Japan J. Bacteriol.*, 21: 266-273.
- 2) Abraham, E. P., and E. Chain. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, Lond. 146: 837.
- 3) Aoki, T., S. Egusa, T. Kimura and T. Watanabe. 1971. Detection of resistance factors in fish pathogen *Aeromonas liquefaciens*. *J. Gen. Microbiol.*, 65: 343-349.
- 4) Aoki, T., S. Egusa and T. Watanabe. 1973. Detection of R⁺ bacteria in cultured marine fish, yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Japan J. Microbiol.*, 17 (1): 7-12.
- 5) Anderson, E. S. 1968. The ecology of transferable drug resistance in Enterobacteriaceae. *Ann. Rev. Microbiol.*, 22: 131
- 6) Brinton, C. C. 1971. The properties of sex pili. the viral nature of conjugal genetic transfer systems and some possible approaches to the control of bacterial drug resistance. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* pp. 105-160.
- 7) Davis, B. D., R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg and W.B. Wood. 1973. *Microbiology*, 2nd Ed. Harper & Row, Publishers; Hagerstown, Maryland. p. 755.
- 8) Krieg, N. R. 1974. Family Enterobacteriaceae Rahn. In Buchanan and Gibbons (Editors), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 9) Petersdore, R. G. and J. C. Sherris. 1965. Methods and significance of *in vitro* testing of bacterial sensitivity to drugs. *Am. J. Med.*, 39: 766-779.
- 10) Pollock, M. R. 1967. Origin and function of penicillinase: a problem in biochemical evolution. *Br. Med. J.*, 4: 71-77.