

農發會漁業特刊第三號

CAPD Fisheries Series No.3

# 魚病研究專集(三)

Reports on Fish Disease Research (Ⅲ)

行政院農業發展委員會編印

中華民國六十九年十二月

目 錄  
Contents

|  | Page |
|--|------|
| 養鰻池之 R <sup>+</sup> 抗藥細菌.....郭光雄 • 鍾虎雲<br>Drug Resistant R <sup>+</sup> Bacteria in Eel-Cultured Pond ..... G. H. Kou and<br>H. Y. Chung   | 1    |
| 黃吸虫 <i>Clinostomum comoplanatum</i> Rudolphi, 1819 之研究.....<br>..... 羅竹芳 • 郭光雄 • 扈伯爾 • 劉富光<br>The study of <i>Clinostomum comoplanatum</i> Rudolphi, 1819 ..... C. F. Lo,<br>G. H. Kou, F. Huber <sup>1</sup> and F. G. Liu                  | 9    |
| 噬菌體 AH1 在不同環境之效價.....林慧明 • 詹 璐 • 吳金洌<br>Titer Change of Bacteriophage AH1 in Different Environments. ....<br>Hui-Ming Lin, Lu Jan and Jen-Leih Wu  | 17   |
| 臺灣蚵螺 <i>Thais clavigera</i> Küster 鑽孔器之研究 .....<br>..... 羅竹芳 • 王重雄 • 扈伯爾 • 沈振中<br>The study of the Boring Organs in Oyster Drill <i>Thais clavigera</i> Küster<br>(Gastropoda: Muricidae).....C.F. Lo, C. H. Wang, F. Huber and C.C.<br>Shen | 25   |
| 危害牡蠣之扁虫 ( <i>Stylochus inimicus</i> ) 的生物學研究.....徐瑞雲 • 林曜松<br>Biological Studies on the Oyster Predator, <i>Stylochus inimicus</i> .....Juei-<br>Un Shu and Yao-Sung Lin   | 39   |
| 魚類滑動性細菌之鑑定與病原性之研究 ..... 郭上卿 • 鍾虎雲 • 郭光雄<br>Studies on Identification and Pathogenecity of the Gliding Bacteria in<br>Cultured Fishes ..... Shang-Ching kuo, Huu-Yun Chung and Guang-<br>Hsiung Kou   | 52   |
| 硫酸新黴素在鰻魚體內之吸收分佈與排泄 ..... 劉朝鑫<br>A Study on the Absorption Distribution and Elimination of Neomycin<br>Sulfate in Eels.....Chaw King Liu  | 66   |
| 甲基藍與孔雀綠對鰻池生物之毒性研究 ..... 陳弘成 • 張金豐<br>Studies on the Toxicity of Methylene Blue and Malachite Green to Some<br>Aquatic Organisms in Eel Ponds ..... Hon-Cheng Chen and Chin-Feng<br>Chang   | 74   |
| 鰻線感染水黴菌 <i>Saprolegnia ferax</i> 之因子.....郭上卿 • 郭光雄<br>Conditions for the Artificial Infection of <i>Saprolegnia ferax</i> in Elver...  | 86   |

---Shang-Ching Kuo and Guang-Hsiung Kou

數種虹鱒寄生水黴菌的分離 .....簡秋源 94  
Some water molds isolated from rainbow trout (*Salmo gairdneri*)  
associated with fish saprolegniasis.....Chiu-Yuan Chien

HIVAX *Vibrio anguillarum* 疫苗免疫虱目魚魚苗 *Chanos chanos* 的效果  
..... 宋延齡 • 陳秀男 • 郭光雄 • 林清龍 • 丁雲源 101

Evaluation of HIVAX *Vibrio anguillarum* Bacterin in the Vaccination  
of Milkfish (*Chanos chanos*) Fingerlings .....Yen-Ling Song, Shiu-Nan  
Chen, Guang-Hsiung Kou, Ching-Lung Lin, and Yun-Yuan Ting

台灣養殖鰻之潰瘍病 .....劉正義 • 蔡信雄 109  
Edwardsiellosis in Pond-Cultured Eel in Taiwan.....Cheng-I Liu and S.  
S. Tsai

福壽魚胸腺淋巴肉瘤之病例報告 .....簡肇衡 • 余廷基 118  
A Spontaneous Thymic Lymphosarcoma in a Hybrid Tilapia.....Chau-  
Heng Chien and Ting-Chi Yu

# 養鰻池之 R<sup>+</sup> 抗藥細菌

郭光雄 · 鍾虎雲\*

## Drug Resistant R<sup>+</sup> Bacteria in Eel-Cultured Pond

G. H. Kou and H. Y. Chung\*

### Abstract

A total of 748 strains of drug-resistant gram-negative bacteria were isolated from the viscera of cultured eels and pond-water. One hundred and two strains were demonstrated to possess R factor (R<sup>+</sup>). Among the R<sup>+</sup> strains there were 23.4% Sulfamonomethoxine (Su) resistant strains, 9.6% Tetracycline (Tc) resistant strains, 15.4% Chloramphenicol (Cm) resistant strains and 2.9% P-7138 (Nf) resistant strains. The incidences of R<sup>+</sup> strains in *Salmonella*, *A. hydrophila* and *E. anguillimortifera* were 88.9%, 20.6% and 22.2%, respectively. No R<sup>+</sup> strains were detected in *Proteus*, *Hafnia*, *Alcaligenes* and several unidentified bacteria. Most R<sup>+</sup> strains (68 of 102) possess 2 (Su, Tc) or 3 (Su, Sm, Tc) resistant markers.

### 緒 言

近年來，本省養鰻業突飛猛進，年產量已超過二萬公噸，但由於本省位處亞熱帶，水溫終年偏高，加上高養殖密度，魚池老化，給餌之不適當及其他各種不良之環境因子，常常造成各種疾病之發生，尤以細菌性疾病為甚。在疾病之防治上，業者每每皆使用抗生素等化學藥劑，由於業者不諳藥理，又缺乏對疾病診斷之智識，常常濫施藥物<sup>(1)</sup>。除此之外，飼料中亦常有添加藥劑以促進生長預防疾病者。如此，大量並長期使用抗生素等化學藥劑之結果，遂導致抗藥性細菌的大量產生<sup>(7,14)</sup>。抗藥細菌若具有R因子，則由於細菌之接合作用，能將抗藥性傳遞給受容菌 (Recipient)，造成多種抗藥細菌之產生及廣泛流傳。

本省養鰻池抗藥細菌出現頻度極高<sup>(14)</sup>，可能是受到R因子及廣泛使用抗菌劑之影響。不管從公共衛生之立足點，或是養殖鰻魚疾病防治之觀點來看，具R因子之抗藥細菌之出現情況及其抗藥樣態，實有究明之必要，以利檢討各種抗菌劑之使用。本研究就本省養鰻業者常用之藥物：磺胺劑 Sulfamonomethoxine (Su)，四環素 Tetracycline (TC) 氯黴素 Chloramphenicol (Cm) 及 P-7138 (Nf) 四種抗菌劑，針對上述之問題加以檢討，將所得之結果在此提出，以供參考。

\* 國立台灣大學理學院動物學研究所  
(Department of Zoology, College of Science, N.T.U.)

## 材料與方法

### 1. 抗藥細菌之分離

自1977年5月至1978年3月間，分別自鹿港地區，及高雄與屏東地區之養蝦場、由鰻體內臟及池水中分離抗藥細菌、分離之方法及抗菌劑之種類與濃度均與前報<sup>(14)</sup>相同，分離菌之鑑定及分類係按 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th ed (1974)<sup>(15)</sup> 為基準。

### 2. 傳遞性R因子之檢出

分離菌 R factor 之檢出，係以 *Escherichia coli* RC-85nal (methionine requiring, nalidixic acid-resistant F-derivative of *E. coli* K-12，對於 Su, Tc, Cm 及 Nf 均具敏感性) 為受容菌。將分離菌與受容菌分別培養於 Penassay broth (Difco) 中、於 37°C 下培養至吸光度 (OD) 為 0.4 (約  $4 \times 10^8$  cells/ml)，然後各取等量培養液混合後，再於 37°C 下培養 24 小時，再轉種於含 Nalidixic acid 100  $\mu$ g/ml 及各該分離菌之抗菌劑 (濃度與上述相同) 之 MacConkey 平板培養基 (Difco) 上，於 37°C 下培養 24 小時，若分離菌為 Lactose negative，且菌落之顏色為磚紅，則可判定分離菌為 R<sup>+</sup> 菌。若分離菌受容菌同為 Lactose fermentative 時，則須將菌落鉤出接種於 EMB 平板培養基 (Difco) 上；於 37°C 下培養 24 小時長出之菌落若表面具有金屬光澤，亦可判定此分離菌為 R<sup>+</sup> 菌。其他在 MacConkey 平板培養基上菌落不呈磚紅色者或是在 EMB 平板培養基上菌落不呈金屬光澤者皆為 R<sup>-</sup> 菌。

### 3. R factor 之抗藥性標記

受容菌接受 R factor 後，於 37°C 下以振盪法培養於 Penassay broth 中至吸光度 (O.D) 為 0.3 時，取 0.1 ml 之培養液接種於普通平板培養基上，以 Conradi's stick 均勻塗抹後，將 Streptomycin (Sm), Cm, Tc, Nf, Aminobenzyl-penicillin (ABP), Kanamycin (Km) 及 Su 之藥餅 (昭和) 放置其上，於 37°C 下培養 18-24 小時。取 R<sup>-</sup> 菌株依同法進行實驗，比較二者之抑制範圍，以決定抗藥標記 (Resistance marker) 之樣態 (Pattern)。此一項目在日本宮崎大學進行。

## 結 果

### 1. 抗藥細菌之分離

由含抗菌劑之平板培養基所分離之抗 Su 等四種藥劑之細菌計有 748 株，其中抗 Su 者 214 株，抗 Tc 者 219 株，抗 Cm 者 175 株，抗 Nf 者 140 株。按種類可分為 *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella anguillimortifera*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, Unidentified Enterobacteriaceae, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* 及 Unidentified gram negative strains 等 13 類別 (Table I)。其中大腸菌 *E. coli* 約佔四分之一 (190 株)，水中常有細菌之 *A. hydrophila* 亦達 126 株，數目僅次於 *E. coli*。除 *A. hydrophila* 及 *Pseudomonas* 外，絕大部份的抗藥細菌都是腸內細菌科的細菌。

Table 1. Incidence of R<sup>+</sup> resistant strains in medium supplemented with Sulfamonomethoxine (Su), Tetracycline (Tc), Chloramphenicol (Cm) or P-7138 (Nf).

| Species or genus                      | R <sup>+</sup> resistant strains selected by |             |              |            | Total (%)     |
|---------------------------------------|--|-------------|--------------|------------|---------------|
|                                       | Su (%)                                       | Tc (%)      | Cm (%)       | Nf (%)     |               |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>           | 16/58 (27.6)                                 | 4/41 (9.8)  | 5/16 (31.3)  | 1/12 (9.1) | 26/126 (20.6) |
| <i>Edwardsiella anguillimortifera</i> | 0/4 (0)                                      | 1/6 (16.7)  | 3/14 (21.4)  | 2/3 (66.7) | 6/27 (22.2)   |
| <i>Citrobacter freundii</i>           | 8/21 (38.1)                                  | 2/26 (7.7)  | 3/24 (12.5)  | 0/22 (0)   | 13/93 (14.0)  |
| <i>Enterobacter cloacae</i>           | 1/5 (20.0)                                   | 1/19 (5.3)  | 2/12 (16.7)  | 0/14 (0)   | 4/50 (8.0)    |
| <i>Escherichia coli</i>               | 10/65 (15.4)                                 | 1/47 (2.1)  | 6/32 (18.8)  | 1/46 (2.2) | 18/190 (9.5)  |
| <i>Hafnia</i>                         | 0/7 (0)                                      | 0/9 (0)     | 0/7 (0)      | 0/6 (0)    | 0/29 (0)      |
| <i>Klebsiella</i>                     | 0/10 (0)                                     | 1/7 (14.3)  | 0/9 (0)      | 0/6 (0)    | 1/32 (3.1)    |
| <i>Proteus</i>                        | —  | 0/8 (0)     | 0/3 (0)      | —          | 0/11 (0)      |
| <i>Salmonella</i>                     | 5/6 (83.3)                                   | 7/8 (87.5)  | 4/4 (100)    | —          | 16/18 (88.9)  |
| Unidentified Enterobacteriaceae       | 4/13 (30.8)                                  | 0/15 (0)    | 3/10 (30.0)  | 0/4 (0)    | 7/42 (16.7)   |
| <i>Alcaligenes</i>                    | 0/9 (0)                                      | 0/8 (0)     | 0/11 (0)     | 0/3 (0)    | 0/31 (0)      |
| <i>Pseudomonas</i>                    | 6/9 (66.7)                                   | 4/21 (19.0) | 1/30 (33.3)  | 0/24 (0)   | 11/84 (13.1)  |
| Unidentified strains                  | 0/7 (0)                                      | 0/4 (0)     | 0/3 (0)      | 0/1 (0)    | 0/15 (0)      |
| Total                                 | 50/214(23.4)                                 | 21/219(9.6) | 27/175(15.4) | 4/140(2.9) | 102/748(13.6) |

## 2. R factor 菌株之檢出

在748株抗藥菌中具有R因子者有102株(13.6%)，其中抗Su菌株之214株中有50株具有R factor，所佔百分率最高，達23.4%。140株抗 Nf 菌株中僅4株具有R factor，僅佔2.9%，其餘抗 Tc及 Cm 者均在10%左右。就細菌種類而言，*Hafnia*，*Proteus*，*Alcaligenes* 及 Unidentified strains 等四類分離菌均未發現R<sup>+</sup>菌株。R<sup>+</sup>抗藥菌株出現率最高者為 *Salmonella* 菌，達88.9%，*Klebsiella* R<sup>+</sup>菌之出現率則僅有3.1%。魚類條件性病原菌 *A. hydrophila* 及 *E. anguillimortifera* 之R<sup>+</sup>抗藥菌之出現率均達20%左右，而且在3株抗 Nf 之 *E. anguillimortifera* 中有2株具有R<sup>+</sup> factor，其餘分離菌R<sup>+</sup>之出現率則在10%上下。

由池水分離出之269株抗藥細菌中有27株具有R因子，佔10%，由鰻魚內臟分離出來之479株抗藥細菌中，75株具有R因子，佔15.7%，較池水略高。由腸以外的內臟分離出來之抗藥細菌中，具有R因子者之出現率，以脾臟之7.7%最低，腎與肝幾無差異，前者為15%，後者為14.6%。依分離菌之類別而言內臟中具有R因子之抗藥細菌主要為 *A. hydrophila*，*E. anguillimortifera*，*Salmonella* 及 *Citrobacter* 與 Unidentified Enterobacteriaceae 五類。但 *Salmonella* 及 *Citrobacter* 二屬之R<sup>+</sup>菌僅出現於腸中。*Salmonella* 之R<sup>+</sup>菌出現率高達88.9%，水中及腸中出現的比例略同。魚類條件性病原菌之 *A. hydrophila* 由內臟分離之72株抗藥菌中亦有26.4%為R<sup>+</sup>菌，其中由腎臟分離之12株中有9株具R因子，比例達75.0%，由脾臟分離之20株菌中僅1株(5%)具有R因子。但是由池水中分離之 *A. hydrophila* 抗藥菌54株中，僅7株具有R因

Table 2. Incidence of R<sup>+</sup> resistant strains isolated from the viscera of cultured eels and pond-water

| Species or genus                      | Cultured eels    |              |              |             |               |               | Subtotal       | Pond-water | Total |
|---------------------------------------|------------------|--------------|--------------|-------------|---------------|---------------|----------------|------------|-------|
|                                       | Intestinal tract | Kidney       | Liver        | Spleen      |               |               |                |            |       |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>           | 7/16 (43.8)      | 9/12 (75.0)  | 2/24 (8.3)   | 1/20 (5.0)  | 19/72 (26.4)  | 7/54 (13.0)   | 26/126 (20.6)  |            |       |
| <i>Edwardsiella anguillimortifera</i> | 3/10 (30.0)      | 1/8 (12.5)   | 2/6 (33.3)   | 0/3 (0)     | 6/27 (22.2)   | —             | 6/27 (22.2)    |            |       |
| <i>Citrobacter freundii</i>           | 6/24 (25.0)      | 0/6 (0)      | 0/9 (0)      | —           | 6/39 (15.4)   | 7/54 (13.0)   | 13/93 (14.0)   |            |       |
| <i>Enterobacter cloacae</i>           | 0/8 (0)          | —            | —            | —           | 0/8 (0)       | 4/42 (9.5)    | 4/50 (8.0)     |            |       |
| <i>Escherichia coli</i>               | 11/116 (9.5)     | 0/18 (0)     | 4/21 (19.1)  | 2/14 (14.3) | 17/169 (10.1) | 1/21 (4.8)    | 18/190 (9.5)   |            |       |
| <i>Hafnia</i>                         | 0/8 (0)          | 0/3 (0)      | 0/2 (0)      | 0/2 (0)     | 0/15 (0)      | 0/15 (0)      | 0/29 (0)       |            |       |
| <i>Klebsiella</i>                     | 1/9 (11.1)       | 0/5 (0)      | 0/4 (0)      | 0/2 (0)     | 1/20 (5.0)    | 0/12 (0)      | 1/32 (3.1)     |            |       |
| <i>Protus</i>                         | 0/6 (0)          | —            | —            | —           | 0/6 (0)       | 0/5 (0)       | 0/11 (0)       |            |       |
| <i>Salmonella</i>                     | 14/16 (87.5)     | —            | —            | —           | 14/16 (87.5)  | 2/2 (100)     | 16/18 (88.9)   |            |       |
| Unidentified Enterobacteriaceae       | 1/11 (9.1)       | 1/9 (11.1)   | 5/12 (41.7)  | 0/7 (0)     | 7/39 (17.9)   | 0/3 (0)       | 7/42 (16.7)    |            |       |
| <i>Alcaligenes</i>                    | 0/2 (0)          | 0/8 (0)      | 0/4 (0)      | 0/1 (0)     | 0/15 (0)      | 0/15 (0)      | 0/31 (0)       |            |       |
| <i>Pseudomonas</i>                    | 3/27 (11.1)      | 1/9 (11.1)   | 0/7 (0)      | 1/3 (33.3)  | 5/46 (10.9)   | 6/38 (15.8)   | 11/84 (13.1)   |            |       |
| Unidentified strains                  | 0/5 (0)          | 0/2 (0)      | —            | —           | 0/7 (0)       | 0/8 (0)       | 0/15 (0)       |            |       |
| Total                                 | 46/258 (17.8)    | 12/80 (15.0) | 13/89 (14.6) | 4/52 (7.7)  | 75/479 (15.7) | 27/269 (10.0) | 102/748 (13.1) |            |       |

子 (13.0%)，出現率為內臟之半。另一病原菌 *E. anguillimortifera* 則與 *A. hydrophila* 之情形略有不同，R<sup>+</sup>菌出現率以肝臟之 33.3% 為最高，腸之 30.0% 次之，而脾臟則完全無 R<sup>+</sup> 菌出現。又，令人注意的是由池水無法分離出 *E. anguillimortifera* 之抗藥菌 (Table 2)。

### 3. R factor 之抗藥性標記樣態 (marker pattern)

102 株 R<sup>+</sup> 抗藥菌之抗藥性樣態共有 8 種，即 Su.Tc., Su.Cm., Sm.Cm., Su.Sm.Cm., Su.Sm.Tc., Su.Tc.Nf., Su.Cm.Tc., 以及 Su.Sm.Cm.Tc., (Table 3)。就細菌種類言，以

Table 3 Drug Resistance pattern of R plasmids isolated from the viscera of cultured eels and pond-water.

| Category of bacteria                  | Resistance pattern of R plasmid | No. of strains from |            | Total      |
|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------|------------|------------|
|                                       |                                 | Eelviscera          | pond-water |            |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>           | Su, Tc                          | 3                   | 3          | 6          |
|                                       | Su, Sm, Tc                      | 12                  | 4          | 16         |
|                                       | Su, Sm, Cm                      | 3                   | 0          | 3          |
|                                       | Su, Tc, Nf                      | 1                   | 0          | 1          |
| <i>Edwardsiella anguillimortifera</i> | Su, Cm                          | 1                   | 0          | 1          |
|                                       | Su, Cm, Tc                      | 2                   | 0          | 2          |
|                                       | Su, Tc, Nf                      | 2                   | 0          | 2          |
|                                       | Su, Sm, Cm, Tc                  | 1                   | 0          | 1          |
| <i>Citrobacter freundii</i>           | Su, Tc                          | 4                   | 2          | 6          |
|                                       | Su, Cm, Tc                      | 0                   | 5          | 5          |
|                                       | Su, Sm, Cm, Tc                  | 2                   | 0          | 2          |
| <i>Enterobacter cloacae</i>           | Su, Tc                          | 0                   | 1          | 1          |
|                                       | Su, Sm, Cm                      | 0                   | 1          | 1          |
|                                       | Su, Sm, Tc                      | 0                   | 2          | 2          |
| <i>Escherichia coli</i>               | Su, Tc                          | 2                   | 0          | 2          |
|                                       | Su, Cm                          | 2                   | 0          | 2          |
|                                       | Su, Sm, Tc                      | 6                   | 1          | 7          |
|                                       | Su, Sm, Cm                      | 3                   | 0          | 3          |
|                                       | Su, Tc, Nf                      | 1                   | 0          | 1          |
|                                       | Su, Sm, Cm, Tc                  | 3                   | 0          | 3          |
| <i>Klebsiella</i>                     | Su, Tc                          | 1                   | 0          | 1          |
| <i>Salmonella</i>                     | Su, Sm, Tc                      | 1                   | L          | 1          |
|                                       | Su, Sm, Cm, Tc                  | 15                  |            | 15         |
| Unidentified<br>Enterobacteriaceae    | Su, Tc                          | 1                   | 0          | 1          |
|                                       | Su, Sm, Tc                      | 3                   | 0          | 3          |
|                                       | Su, Sm, Cm, Tc                  | 1                   | 0          | 3          |
| <i>Pseudomonas</i>                    | Su, Tc                          | 1                   | 1          | 2          |
|                                       | Su, Sm, Tc                      | 3                   | 3          | 6          |
|                                       | Su, Sm, Cm                      | 1                   | 2          | 3          |
| <b>Total</b>                          |                                 | <b>77</b>           | <b>25</b>  | <b>102</b> |

Su: Sulfamonomethoxine, Sm: Streptomycin, Cm: Chloramphenicol, Nf: P-7138.  
Tc: Tetracycline, L: 2 strains lost.



*Klebsiella* 菌所具有之標記樣態最少，僅一種 (Su. Tc.)，而 *E. coli* 之標記樣態則多達五種，其餘細菌之大部份則在三至四種間。在供試之 102 株 R<sup>+</sup> 菌株中具有 3 個抗藥標記者有 56 株，具有 2 個及 4 個抗藥標記者則幾乎相同，各為 22 株及 24 株。又具有 3 個標記之 56 株 R<sup>+</sup> 菌中，以具有 Su. Sm. Tc. 樣態之菌株最多，計 40 株，佔 71%。就藥的種類而言，所有供試之 R<sup>+</sup> 菌株，均有 Su 之標記，具 Tc 標記者有 89 株，具 Sm 標記者為 74 株，具 Cm 標記者為 39 株，具 Nf 標記者却僅有 4 株。而且 Nf 標記僅在 Su. Tc. Nf. 之樣態中出現。

## 討 論

自從 1959 年，日本學者因研究人類痢疾而發現 R 因子可傳遞抗藥性後<sup>(9)</sup>，不帶 R 因子之非病原性菌如 R<sup>-</sup> 之 *E. coli* 雖然在疫病的發生上扮演了平衡的作用，而間接的減低了病原性抗藥菌單獨存在時所造成的損害<sup>(8)</sup>，但是因為抗菌劑使用不當等因素所誘發抗藥菌大量的增加，所造成的問題是愈來愈嚴重。在水產界中也已形成嚴重的問題，而受到廣泛的注意<sup>(10,12,13,14)</sup>。1973 年 Smith 氏曾著文指出<sup>(7)</sup>，長期低劑量的使用抗生素的結果，會誘發抗藥菌的產生，此現象在腸內細菌及相關的革蘭氏陰性菌更為常見。Davis 等<sup>(4)</sup>指出抗四氫環素 (Tc) 的質體，在 R 因子的 Episomal DNA 上的位置，緊臨控制細菌性別的位置，所以抗 Tc 的菌株也最容易產生，Watanabe 等也認為抗 Tc 藥劑之細菌中，攜帶 R 因子的比例特別高<sup>(10)</sup>。本研究所得之結果，亦顯示抗 Tc 之菌株最多，高達 219 株，佔所有抗藥菌 784 株之 29.3%，與 Watanabe 等之指摘頗為一致。另抗 Su 之菌株亦達 214 株之多，為 28.6% 與抗 Tc 菌之 29.3% 出現率相近。在前報中亦指出抗 Su 菌株之出現率與抗 Tc 菌株之出現率，在統計學上二者無顯著之差異<sup>(14)</sup>。Aoki 等<sup>(2)</sup> 研究日本養殖魚類之抗藥菌時，也發現抗磺胺劑 Sulphanilamide 與抗 Tc 之菌株，在出現率上二者皆高於他菌，且在統計學上無顯著差異，與本研究所得之結果一致。

在本研究中，抗藥菌中 R<sup>+</sup> 菌出現之比例，以沙氏桿菌為最高，達 88.9%，不過沙氏桿菌之出現率相當低，所有分離菌之 748 株中僅 18 株為沙氏桿菌，出現率為 2.4%，顯示其在抗藥性之散佈上所佔之位置並不顯著。大腸菌 *E. coli* 之分離菌株為 190，出現率為 25.4% 較他菌為高，不過其中具有 R 因子之菌株却很少，僅 18 株，出現率為 9.5%，故與沙氏桿菌相同，在抗菌性之傳播上所佔之位置並不顯著，關於此點在前報中已做詳細之討論，請參照。魚類病原菌 *A. hydrophila* 的抗藥菌及其 R<sup>+</sup> 菌株之出現率皆不低，為 16.8% (126/748) 及 20.6% (26/126)，而且由魚體分離之抗藥菌株中 R<sup>+</sup> 菌株之比例為 26.4% (19/72)，較水中所分離之 13% (7/54) 高出甚多，Shotts 等<sup>(5)</sup> 由觀賞魚及其飼育水，進行 *A. hydrophila* 抗藥菌之 R<sup>+</sup> 菌分析，亦提出相同之結果。如此提示以化學療法防治鱒魚赤鮭病的發生，必然漸趨困難。另一魚類病原菌，*E. anguillimortifera* 的出現率相當低，為 3.6% (27/748)，但是其 R<sup>+</sup> 菌的出現率却相當高，為 22.2% (6/27)。Aoki 等<sup>(1)</sup> 曾指出由魚類、蛇類水生動物及人類等所分離出的 *E. anguillimortifera* 菌中 R<sup>+</sup> 菌僅出現於由魚類所分離之菌株中，而且比例高達抗藥菌之半數以上。但是由蛇類及人類所分離之菌株中從未發現 R<sup>+</sup> 菌，故鱒魚池中 *E. anguillimortifera* 之 R<sup>+</sup> 菌株比例偏高與濫施藥物的關連性最大，今後有關此點除有待進一步的瞭解外，對於鱒病之藥物施用應多加注意。

又，Shotts 等<sup>(15)</sup> 指出各種抗藥菌中，多數帶有二個以上的抗藥標記，本研究結果，亦顯示各種抗藥菌中所帶有之抗藥 marker 皆在 2 個以上，以具 3~4 種標記者為最多。不過本研究中所分離出來之 R<sup>+</sup> 抗藥菌株中，都帶有抗 Su 之標記，頗堪玩味，實有待進一步究明之必要。

## 摘 要

由鱒池池水及鱒魚內臟共分離出 748 株抗藥菌，計十三類別；*A. hydrophila*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, Unidentified Gram negative strain 及九屬腸內細菌，其中具有 R 因子者 102 株，抗各類藥劑菌株中 R<sup>+</sup> 菌株之出現率，分別為抗 Sulfamonomethoxine 者為 23.4%，抗 Tetracycline 者為 9.6%，抗 Chloramphenicol 者為 15.4% 及抗 P-7138 者之 2.9%。十三類別之抗藥菌中，九類出現 R<sup>+</sup> 菌，其中以 *Salmonella* 之 R<sup>+</sup> 菌株出現率最高，達 88.9%，其次為 *A. hydrophila* 及 *E. anguillimortifera*，分別為 20.6% 及 22.2%。*Hafnia*, *Proteus*, *Alcaligenes* 及 Unidentified strains 中無 R<sup>+</sup> 菌出現。除 *Enterobacter cloacea* 外，內臟分離菌之樣態較由水中分離者為多。又各種 R<sup>+</sup> 抗藥菌中，以帶 2 至 3 個抗藥標記之菌株最多。具 2 個標記者以 Su, Tc 之樣態最多，具 3 個標記者則以 Su, Sm, Tc 之樣態最多。

## 參 考 文 獻

1. Aoki, T., T. Arai, and S. Egusa. (1977). Detection of R plasmids in naturally occurring fish-pathogenic bacteria, *Edwardsiella tarda*. Microbiol. Immunol. 21 (2): 77-83.
2. Aoki, T., S. Egusa, Y. Ogata, and T. Watanabe. (1971). Detection of resistance factors in fish pathogen *Aeromonas liquensfaciens*. J. Gen. Microbiol. 65: 343-349.
3. Buchaman, R.E., and N.E. Gibbons. (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology 8th ed. Williams and Wilkins. Baltimore, Md. 1246 pp.
4. Davies, J.E., and R. Rownd. (1972). Transmissible multiple drug resistance in Enterobacteriaceae. Science. 176: 758-768.
5. Shotts, E.B., V.L. Vanderwork, and L.M. Campell. (1976). Occurrence of R factors associated with *Aeromonas hydrophila* isolated from aquarium fish and waters. J. Fish. Res. Board Can. 33(4)736-740.
6. Smith, H.W. (1969). Veterinary implications of transfer activity. P. 213-226 in B. W. Wolstenholme and M. O. Conner (ed.) Ciba Found Symp. Bacterial Episomes and Plasmids J.A. Churchill Ltd. London.
7. ——— (1973). The effect of the use of drug resistant bacteria in animals. P.67-100 in Advances in Veterinary Science. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
8. Sonnenwirth, A.C. (1973). Bacteria indigenous to man. P. 954-959 in Davis, B. D., R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, W.B. Wood and M. McCarty (ed.) Microbiology. Haprer and Row. Hogerstown, Maryland.
9. Watanabe, T., and T. Fukasawa. (1960). Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae 1. Transfer of Resistance Factors by conjugation.
10. Watanabe, T., T. Aoki, Y. Ogata, and S. Egusa. (1971). R factors related to fish culturing. Annuals of The New York Academy of Sciences Vol. 182. pp 383-410.
11. Watanabe, T., and T. Fukasawa. (1961). Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae 1. Transfer of resistance factors by conjugation.

J. Bacteriol 81: 669-678.

12. 青木宙、江草周三、渡邊力。(1972). 水産養殖における薬剤耐性R因子, 日本細菌學雜誌, 27(6)/ 762-767.。
13. 青木宙。(1974). コイの養殖池水および腸管より分離された薬剤耐性菌の研究, 日水誌40 (3):247-254.。
14. 陳宏遠、郭光雄。(1978). 水産養殖抗藥細菌之研究—I. 養殖鰻魚抗藥菌之抗藥性, JCRF Fish Series No. 34. P. 1-13. Taipei. Taiwan.

# 黃吸虫 *Clinostomum complanatum* Rudolphi, 1819 之研究

## I. 寄生香魚 (*Plecoglossus alivelis*) 之後搖尾幼虫

羅竹芳<sup>1</sup> 郭光雄<sup>2</sup> 扈伯爾<sup>1</sup> 劉富光<sup>3</sup>

The study of *Clinostomum complanatum* Rudolphi, 1819

### I. The metacercaria of *C. complanatum* in the sweet fish (*Plecoglossus alivelis*)

C. F. Lo<sup>1</sup>, G. H. Kou<sup>2</sup>, F. Huber<sup>1</sup> and F. G. Liu<sup>3</sup>

#### Abstract

Following the treatment of 1 ppm of Dipperex, the metacercaria of yellow grub (*Clinostomum complanatum* Rud. 1819) which parasitized in the cultivated ayu in Taiwan could excyst from the muscle, penetrate into the internal organs and initiate a death of fish.

Loach and ayu were demonstrated to be the 2nd intermediate host.

In the *in vitro* culture system, the metacercaria could maintain their activity up to three months and will possess infectivity, but, didn't reach the mature stage. Following 2-3 days ingestion of metacercaria by herons, the final host, the adults were found in the esophagus and mouth cavity.

#### 緒 言

1979年10月中旬，臺灣省水產試驗所竹北分所養殖之香魚，*Plecoglossus alivelis* 發生大量死亡，死魚表面有蠕動之複殖類吸虫 (Digenea) 皮下及肌肉中出現許多白色囊胞 (Cyst)。經鑑定後，該寄生虫為吸虫 *Clinostomum complanatum* 之後搖尾幼虫 (Metacercaria)，與劉 (1979) 所報導之泥鰍 loach *Misgurnus anguillicaudatus* 之黃泡病病原虫 (Yellow grub) 相似<sup>(1)</sup>。一般吸虫若感染寄主消化道，不致造成寄主之嚴重損傷<sup>(2)</sup>但黃吸虫則不同，因其體形大，蔓延速度快，故常對寄主造成嚴重傷害<sup>(3,4,5,6,7)</sup>。Hunter and Hunter 曾對另一種黃吸虫 *Clinostomum marginatum* 的形態和生活史做詳細的報導，認為其第一中間寄主為淡水螺 *Helisoma antrosom* 和 *H. campanulatum* 第二中間寄主為孔雀魚 (Guppy) 最終寄主為食魚鳥類如大藍鷺 (Big blue heron) 和麻鴉 (Bittern)<sup>(8,9,10,11)</sup>，Roberts (1978) 和江草 (1978) 亦曾描述過黃吸虫之特徵及生活史<sup>(5,6)</sup>。

1. 私立輔仁大學生物系 (Dept. of Biology, Fu-Jen U.)

2. 國立台灣大學動物系 (Department of Zoology, College of Science, National Taiwan University)

3. 台灣省水產試驗所竹北分所 (Chu-pei Fish Culture station, Taiwan Fisheries Research Institute)

Cheng (1973) 報導，至少有三十種淡水魚可被 *C. complanatum* 之後搖尾幼虫寄生，其中包括多種重要養殖魚及熱帶魚類，因此黃吸虫一直引起養殖業者 and 熱帶魚繁殖業者之注意<sup>(4)</sup>。臺灣養殖業發達，食魚鳥類亦有多種，且養殖池內遍佈螺螄，魚類極易受此種寄生虫之感染。魚一旦被寄生，則生長遲緩，體弱，外觀不佳，失去經濟價值。且此種病症尚無良好的治療方法，所以預防重於治療，雖然目前僅發生於竹北一帶，但有蔓延之可能，為防患未然，必須找出其在臺灣之各期寄生範圍及生存年限，研究出打斷其生活史之方法，以斷絕魚類遭受感染之機會。本文為有關黃吸虫一連串研究的初步結果，其他諸如生活史及藥物試驗等研究結果，將另撰文報導。

## 材料與方法

### 一、寄生於香魚之黃吸虫 *Clinostomum complanatum*:

自臺灣省水產試驗所竹北分所採回死亡和活的香魚 (*Plecoglossus alivelis*)，做如下的觀察和實驗：

1. 香魚死亡原因之鑑定：將死亡香魚逐一解剖觀察，並固定肌肉及各臟器，以備組織切片觀察。
2. 罹病率之調查：自該所各香魚池撈取香魚，逐一解剖觀察，計算罹病率及寄生虫數。
3. 黃吸虫內部構造之觀察：以鑷子將囊鞘內之後搖尾幼虫 (*Metacercaria*) 取出，置於二玻片之間壓平，加入固定液 (Formol-alcohol) 固定 6~12 小時後，經 70% 酒精洗去固定液，以硼砂洋紅及不褪綠 (Borax Carmine-fast green) 染色，使用光學顯微鏡觀察虫之構造。
4. 寄生部位切片觀察：將寄生部位切下置於 Zenker's 固定液 12 小時後，經沖水，去結晶、脫水、透明、浸膠包埋後，切成 5  $\mu\text{m}$  的切片後，以蘇木紫和伊紅 (Hematoxylin-Eosin) 及馬樂禮三色染法 (Mallory triple stain) 染色觀察。
5. 最終寄主範圍 (Final host range) 之初步調查試驗：以病魚分別餵飼大白鼠、雞、鴨各 10 隻，及夜鷺、小白鷺各一隻後，除夜鷺及小白鷺外，於第二天起每天解剖一隻，以檢查實驗動物被寄生的情況。
6. 寄生虫體外培養試驗：(1) 使用消毒過之器皿和工具取出香魚肌肉中之後搖尾幼虫，將這些吸虫先用平衡鹽液 (Earl's balanced salt solution, 內加 penicillin 200 units  $\text{ml}^{-1}$  和 streptomycin 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) 加以洗滌，再選擇未受損傷之吸虫 150 隻，分別置於 30 根 10 公分長之試管中，每一試管內含 2 ml 培養液。培養液採用 Medium 199 (Gibco)，內含 1.25 gm/L 之  $\text{NaHCO}_3$  及 penicillin 200 unit  $\text{ml}^{-1}$ , streptomycin 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 20% 牛胚胎血清，pH 7.4。將上述 30 根試管分成六組，每組 10 根共 50 隻吸虫，分置於 25°C、30°C、38°C 培養箱中培養，每星期換一次培養液，每天觀察結果。(2) 體外培養之虫體感染性鑑定：將培養於 25°C 培養箱 60 天的後搖尾幼虫連同培養液一起倒入鷺鷥口中，第二天開始檢查鷺鷥口中成虫數目。

### 二、寄生於泥鰍中之黃吸虫

將感染黃泡病之泥鰍以同樣之方法實驗觀察，並與香魚實驗之結果互相對照。

## 結果與討論

### 1. 1979年10月竹北水試所香魚死亡原因鑑定

竹北分所研究人員於香魚大量死亡前日，曾在兩香魚養殖池中發現有少數魚蟲出現，因而施用 1PPm 地特松 (Dipperex; 'O-O-dimethyl-2'-2-2-Trichloro-e-hydroethyl phosphonate) 以

驅除，不意第二天該二池香魚全部死亡，魚體全身佈滿紅斑，經仔細解剖及切片觀察，魚體壁內外有多處穿孔，體壁及內臟爬滿肉眼即可見的吸虫，經切片檢視體壁未穿孔處之肌肉，發現有許多白色囊鞘（White cyst）內有尚未出鞘的吸虫，經整體染色切片觀察，這些吸虫為複殖類（Digenea）已具成體雛形，唯生殖腺尚未發育（圖7、8），因此可知寄生在魚肉上的吸虫為後搖尾幼虫（Metacercaria）由於一般吸虫之後搖尾幼虫係生活在囊胞內，伺機等待最終寄主吃下後再出囊鞘，因此在死魚體表及內臟中爬行之吸虫，應屬不正常的竄出者，可見體壁之穿孔係由蟲體受1ppm地特松之刺激破囊而出的，魚體因而受嚴重損傷而死亡。

在香魚肌肉中發現的大型後搖尾幼虫為舌型（圖7、8），長3~6mm，寬1~2mm，運動時體型不定；一般運動時前端圓鈍而後端細長（圖3）。具口吸盤（Oral sucker）及直徑為0.5mm的腹吸盤（Ventral acetabulum），腹吸盤位於體前 $\frac{1}{3}$ 的位置，消化道由口下來就分叉成二支無旁枝的腸子，因此咽、食道皆不明顯，腸一直到體末端會合，開口於排泄囊中（excretory vesicle），腸內物質為白色。原始生殖系統（primordia of reproductive system）位於身體中段後端，包括兩個三角形構造及一個位於上述二者中央之不規則構造。因此本種應為*Clinostomum complanatum* Rud. 1891<sup>(3,4,5,6,12,13)</sup>。又一般*Clinostomum*的後搖尾幼虫之腸會吸收寄主色素而呈黃色，故一般俗稱之為黃吸虫（Yellow grub）根據Van Duijn（1956）及Hoffman（1979）所述，此種黃吸虫寄生在極少數寄主時，其腸子則不會積聚色素，而產生白色的囊胞（White cyst）<sup>(3,7)</sup>，香魚正是會使黃吸虫產生白色囊胞的魚種。

## 2. 罹病率之調查及寄生狀況

為瞭解竹北水試所黃吸虫之寄生率，自該所取香魚40尾逐一檢查，發現感染率為100%，而未曾施藥之魚池中之病魚外型上無明顯之症候，僅於體表出現小凸起（圖2），有些微凸處因魚體上之銀白色消失而呈暗色，但多數不會產生色素沉積。若將魚之皮膚與肌肉分離，則可見魚體皮下及肌肉上佈滿直徑約2~3mm之囊胞，每尾香魚約有500~1,000隻吸虫寄生，感染位置遍佈全身，以下頰及鰭基部之囊胞密度特別高，由寄生部位之切片觀察，瞭解本吸虫可寄生於任一深度之體壁中（圖5），且為寄主的結締組織所包圍，囊鞘厚度大小不等。

## 3. 最終寄主範圍之初步試驗

實驗動物於餵飼病魚後，大白鼠及鴨的消化系統於每日解剖觀察中都無吸虫之蹤跡。至於10隻實驗雞中，其中一隻於65小時後解剖時，在其口腔舌部部位發現一隻吸虫，腸已帶棕色，顯然已吸過雞血，但生殖腺仍未發育。至於小白鷺（*Egretta gazetta*）和夜鷺（*Nycticorax nycticorax*）於餵飼第二天後就於口中發現大量吸虫，第三天由於小白鷺意外死亡，經解剖後發現口中有50隻吸虫成虫，另外在食道之前10公分亦有75隻。成虫都已吸血，腸道呈棕色，體內有卵。

已感染之夜鷺則繼續留下，從事螺螄之感染試驗。有關黃吸虫之生活史及各階段之生活年限將另撰文報告。

由上述結果可知一般家禽如雞、鴨、及哺乳類如大白鼠，不可能是黃吸虫之最終寄主，雖然曾於雞中發現一隻吸虫成虫，但經65小時後其生殖腺仍未發育，應為偶發性感染。根據Cheng（1973）及Hoffman（1979）所述如吃到含黃吸虫之魚肉，對人體並無影響，但足以令人厭惡，而影響其經濟價值<sup>(47)</sup>。若鷺鷥類（Hérons）食入病魚之肉，則虫體在其胃中自囊鞘出出來，沿消化道向前移動，最後寄生於食道及口腔中。

至於黃吸虫僅寄生於鷺鷥之口腔及食道之前半部，是否與該處之體溫較低有關。再則黃吸虫只於鷺鷥體內方能成熟，因此鷺鷥體內應有誘發黃吸虫成熟之因素，這些都有待進一步之研究，以供黃吸虫體外培養之參考。

#### 4. 黃吸蟲之後搖尾幼蟲體外培養試驗

(1) 在25°C、30°C、38°C三種溫度下黃吸蟲體外培養之生長情況：在25°C、30°C、38°C三種溫度下，吸蟲的活存率相去甚遠，在25°C下培養之吸蟲活存率可達100%，而且三個月後活動仍極活躍，而30°C者於24小時後僅存50%，60小時後蟲體全死亡。在38°C下培養之吸蟲，於24小時後仍有20%活存，但蟲體由培養箱中拿出後，觀察不到一小時，就死亡。且培養於30°C或38°C下之蟲體，其活動皆甚遲緩。

雖然過去之吸蟲體外培養研究已能使數種吸蟲之後搖尾幼蟲成熟<sup>(14)</sup>，但是本蟲之幼蟲於三個月體外培養後，生殖腺仍無任何進一步之發育。吸蟲成蟲之體外培養與培養液有密切的關係，而本實驗之培養液僅可供長期保存黃吸蟲之後搖尾幼蟲之用，故欲利用培養液以培養成熟的本蟲，則有待進一步的研究，求出能使黃吸之後搖尾幼蟲成熟之培養液。

##### (2) 經體外培養60天之黃吸蟲感染性試驗：

於25°C下培養60天之後搖尾幼蟲25隻，連同培養液倒入夜鷺幼鳥口中，結果第二天即在其口中發現25隻吸蟲，可見黃吸蟲之後搖尾幼蟲並不因長期間魚體外培養而喪失其感染性。

#### 5. 寄生於泥鰱之黃吸蟲

為找出傳染源，因此對泥鰱之黃吸蟲也做和香魚相同的調查與實驗，結果發現該所泥鰱受到黃吸蟲侵害已有多年，但罹患此病之比率不若香魚高。經調查該所六個泥鰱養殖池中泥鰱罹患黃泡病之比率分別為13%、40.6%、31%、50%、36.7%、32.4%。這可能是泥鰱多數時間生活在泥底中，因而減低了受黃吸蟲之搖尾幼蟲（*Cercaria*）侵襲的機會。

寄生於泥鰱之黃吸蟲數目較少，每尾約可發現75~100個囊胞，寄生部位並非遍佈全身，而侷限於頭部，鰓基及腹部，而以頷下之寄生最為嚴重。囊胞看起來呈黃色，由於囊胞的積聚，而造成魚體，尤其是頭部，嚴重的變形，出現不規則的瘤狀物，極為可怖，毫無經濟價值。

由活體及壓片觀察，得知寄生於泥鰱之黃吸蟲和寄生於香魚中的為同一種類，只是寄生於泥鰱之黃吸蟲腸子呈現典型的黃色，不過若將其置於培養基中做體外培養，兩星期後其腸中黃色素則會消失，與寄生於香魚之黃吸蟲完全一樣。因推斷黃吸蟲侵入香魚體內之途徑可能如下：罹病之泥鰱→鷺鷥→螺螄→香魚。如此，鷺鷥則為黃吸蟲之最終寄主，而香魚和泥鰱則為其第二中間寄主。綜觀上述結果，新竹地區最好暫時停養黃吸蟲之第二中間寄主魚種（香魚及泥鰱），並清除池中之螺螄以除去其第一中間寄主。俟黃吸蟲之成體於鷺鷥體內死亡及池中螺螄清除乾淨後，再進行香魚之養殖，否則黃泡病一旦蔓延起來，必至不可收拾之地步。

### 摘 要

寄生於本省養殖香魚（*Plecoglossus alivelis*）之黃吸蟲（*Clinostomum complanatum* Rud. 1819）之後搖尾幼蟲，經1 ppm地特松處理後會破囊胞而出，穿透魚體全身肌肉，造成魚體嚴重損傷而死亡。

泥鰱（*Misgurnus anguillicaudatus*）與香魚同為本蟲之第二中間寄主。

本蟲於25°C下，經三個月之體外培養後，活存率達100%且仍具感染能力，但無法生長為成蟲。

鷺鷥類為本蟲之最終寄主，破囊而出之後搖尾幼蟲寄生於其食道及口腔中，經2~3天即能生長為成蟲。

## 謝 辭

本研究承竹北分所劉嘉剛所長傾全力協助始得完成，又臺大陳秀男教授協助吸虫體外培養及修閱本文，在此一併致謝。

## 參 考 文 獻

1. 劉富光 (1979)，臺灣養殖泥鰱之疾病。中國水產。304：14-18。
2. Hoffman G. L. (1975). Lesions due to Internal Helminths of Freshwater fishes. In "The Pathology of Fish". Edited by W. E. Rifelin and G Migaki. The University of Wisconsin Press. p. 151-188.
3. Van Duizn, C. Jnr. (1956). Diseases of Fishes. London Iliffe Books LTD.
4. Cheng, T. C. (1973). General Parasitology. Sec. 4. Platyhelminthes. Academic Press, New York and London. p 371-463.
5. Roberts, R. J. (1978). Fish Pathology. Bailliere Tindall London.
6. 江草周三 (1979)，魚の感染症。恒星社厚生閣出版。
7. Hoffman, G. L. (1979). Helminthic parasite. In "Principal Disease of Farmed-raised Catfish". Southern Cooperative seires. No. 225, Feb.
8. Hunter, W. S. and Hunter, G. W. III (1934). The miracidium of *Clinostomum marginatum* (Rud). J. Par. 20 (2): 132.
9. Hunter, G. W. III and W. S. Hunter. (1934). The life cycle of the yellow grub of fish. J. Par. 20 (6): 325.
10. Hunter, W. S. and G. W. Hunter (1935). Studies on *Clinostomum*. II The miracidium of *C. marginatum* (Rud). J. Par. 21 (3): 186-189.
11. Hunter, G. W. III and W. S. Hunter (1939). Studies on *Clinostomum* VI. The penetration and post-cercarial development of *Clinostomum marginatum* (Rud). J. Par. 25 (6). Suppl: 19.
12. Hyman, L. H. (1951). The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela; The Acoelomate Bilateria, vol. 2. New York, Mcgaw-Hill Book Co, Inc.
13. Yamaguti, S. (1958). Systema Helminthum. Vol. 1. The digenetic trematodes of vertebrates. Part I, II. Interscience Publishers, New York. 1575pp.
14. Taylor, A. R. and J. R. Baker (1978). Methods of cultivating parasites in vitro. Academic Press. London, New York, San Francisco.





Fig. 1. Dead Sweet Fish with lesions caused by the excysted metacercaria of *Clinostomum complanatum* (yellow grub) in response to the treatment 0.1 ppm Dipperex. Arrows point to the areas where the body wall had burst.

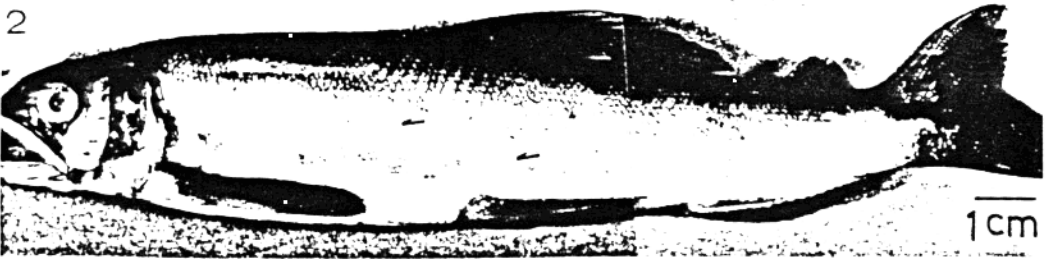


Fig. 2. A Sweet Fish with slight swellings (arrows) on the skin due to the infection of yellow grubs.



Fig. 3. An infected Sweet Fish with skin removed, showing a lot of white cysts (arrow) of yellow grubs in the muscle.