

甲魚之仙人掌桿菌感染症及生物防治策略探討



劉旭展、朱惠真、黃美瑩、鄧晶瑩、張錦宜

水產試驗所水產養殖組

鰈俗稱甲魚，是龜鰈目 (Testudines) 鰈科 (Trionychidae) 軟殼水生龜的統稱，又名水魚、泥龜，共有 20 多個品種。主要分布於非洲、亞洲、北美洲等地區，臺灣以中華鰈 (*Pelodiscus sinensis*) 最為常見。鰈為棲息於淡水環境中的兩棲類爬行動物，喜歡生活在淡水池塘、江河、湖泊、水庫及山澗溪流之中，常潛伏在泥沙底下和岩石洞中，捕食魚、蝦、螺、蚌等，也常爬出水面，獵食蚯蚓等小動物，屬雜食性動物。在東亞地區，尤其是臺灣與日韓等國，認為鰈不僅富含維他命、不飽和脂肪酸及蛋白質，更有強精壯體之功效，而將甲魚視為上等食材，自古以來就是貴族與饕客的養生首選，為高經濟價值的養殖物種。在臺灣，甲魚養殖業主要分布於中南部，屏東為甲魚養殖重鎮區，其他尚有台南、彰化、雲林、高雄等縣市。國內飼養之甲魚除了部分供國人食用外，主要是生產甲魚受精蛋提供外銷用，平均每年銷往中國之甲魚蛋約有 3—5 億顆，產值高達 10 億元以上，目前甲魚受精蛋被列為兩岸經濟合作架構協議 (ECFA) 早收清單之一，由此可窺見此產業之重要性，因此如何提升臺灣甲魚養殖管理技術，增加台灣甲魚產業競爭力，是不容忽視的。

仙人掌桿菌 (*Bacillus cereus*) 感染症為

甲魚的新興疾病，2013 年在中國浙江省數個甲魚養殖場首次爆發，造成嚴重的經濟損失。感染此症之甲魚出現的臨床症狀為泳姿遲緩、脖子呈現伸直或異常扭轉及四肢僵直等，並伴隨著食慾減退與大量死亡 (圖 1)。以肉眼檢視，可看出眼睛與脖子腫脹，解剖檢查後則可發現喉部黏膜充血、肝臟鬱血、脾臟腫大與腸黏膜潮紅等病變。取病變臟器直接塗抹於玻片，經革蘭氏染色後於鏡下觀察，可看到大量革蘭氏陽性桿菌 (圖 2)。組織病理學檢查，在肝臟、脾臟、腎臟及肺臟可發現多發局部壞死灶並伴隨有細菌團塊，腸管黏膜下層則有水腫病變。應用血液培養基於病變區進行微生物培養，可以分離出 β 溶血之灰白色菌落 (圖 3)，將細菌塗抹經革蘭氏染色後，鏡下可見與前述臟器抹片相同之藍色桿菌。將此藍色桿菌純化後，以聚合酶連鎖反應擴增其 16S rRNA 基因，將所得 1,574bp 產物進行基因定序及比對，結果證實為仙人掌桿菌。

仙人掌桿菌為芽胞桿菌科之芽胞桿菌屬，因周邊布滿短鞭毛，形如仙人掌而得名，又稱為蠟樣芽胞桿菌。仙人掌桿菌可由細菌本身或細菌產生之毒素導致食物中毒，炒飯綜合症 (Fried Rice Syndrome) 即是此病原所造成的。此菌產生之耐熱芽胞，能廣泛分



圖 1 罹病甲魚出現脖子伸長或扭曲症狀

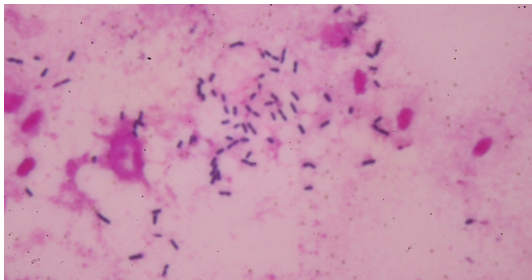


圖 2 病變區抹片染色可見藍色陽性桿菌 (Gram stain, 1000X)

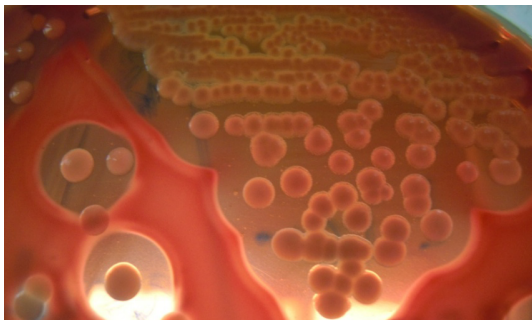


圖 3 在血液培養基上仙人掌桿菌 (*B. cereus*) 菌落型態

布於環境中，於土壤存活，極易由灰塵及昆蟲的傳播污染食品。養殖甲魚時常以下雜魚為主要飼料，下雜魚本身就容易攜帶病原菌，且較易受到仙人掌桿菌污染，為避免衛生菌藉下雜魚污染養殖場，應選擇新鮮餌料或將下雜魚先行加熱，以降低污染或殺死仙人掌桿菌。

水產生物遭細菌感染導致疾病發生時，

養殖戶常使用抗生素來治療，但濫用抗生素除容易產生抗藥性外，也會殘留藥物，造成環境污染，並危害人體健康。在水產動物用藥品使用規範中，可合法使用於龜鱉目之藥物只有歐索林酸 (OA)、羥四環黴素 (OTC) 及磺胺一甲嘧啶 (Sulfadimethoxine) 3 種。葉等 (2013) 從爆發病變之甲魚養殖場分離仙人掌桿菌及蘇雲金芽胞桿菌 (*B. thuringiensis*)，並進行抗生素敏感試驗，結果龜鱉目的合法用藥中僅 OTC 有效，其餘兩種則已產生抗藥性。Tan et al. (2011) 以中國甲魚仙人掌桿菌藥物敏感性試驗，結果 Streptomycin、Tobramycin、Gentamicin、Erythromycin、Tetracyclines、Norfloxacin、Ofloxacin 與 Amikacin 均具抑菌效果，但都不是臺灣法令可允許使用於龜鱉目之藥物。本次甲魚病材於實驗室分離到的仙人掌桿菌，其抗生素藥物敏感性試驗結果只有羥四脫氧羥四環黴素 (Doxycycline) 及氟甲磺氯黴素 (Florfenicol) 2 種藥物對菌株有效，但均非合法可用於甲魚的藥物；對紅黴素 (Erythromycin)、阿默西林 (Amoxycillin)、OTC、OA 等 5 種藥物則均產生抗藥性，這使感染仙人掌桿菌症的甲魚面臨無藥可用之窘況。

益生菌生物防治法已廣泛應用於植物、禽畜養殖及水產養殖上，植物方面大都著重在防止病害由土壤傳播，其可與病原菌競爭根系中的營養及空間，進而成為優勢菌種，降低病原菌的危害，並可加速土壤中大分子有機物的分解、改善土質、促進作物生長及增強抗病性等；在禽畜養殖方面，利用其孢子可耐高溫及強酸鹼的特性，於動物腸道中

可發展成優勢菌，抑制有害細菌生長，進而預防胃腸道疾病，益生菌亦可分解飼料中有機物，提高飼料利用率及增強動物免疫力；而在水產養殖方面，益生菌具有降解水中氨氮廢物的功用，能減少養殖池底的有機物沉積，避免水質在雨後或氣候轉變時的急遽變動，對於淨化水質、改善生態環境及提升魚隻健康都有顯著效益。另有研究指出，使用益生菌來抑制對蝦池中的弧菌及對抗鰻池的水黴感染，也有顯著效果。鑒於上述原因，本研究測試數種益生菌及水產試驗所發表之可抗水產病原弧菌之 *B. pumilus* D5 菌對仙人掌桿菌之抑菌效果，探討可否取代抗生素治療此疾病，並進一步控制此病於現場之發生。

芽胞桿菌抑菌實驗參考自 Tagg and McGiven (1971) 之洋菜孔洞擴散法：將純化之仙人掌桿菌鈎菌於蛋白陳大豆液態培養基 (TSB) 中，於 28°C 培養 24 小時後，使用簡易分光光度計於 600 nm 測定吸光值為 0.5 (菌數為 10^8 CFU/ml)，培養皿預先放入直徑約 0.9 cm 之鐵環以形成凹槽，進行混菌法抗菌試驗。再取不同種類的芽胞桿菌 (*Bacillus* spp.) 50 μ l 放入凹槽中，置於 28°C、培養 24 小時後觀察結果，並測量凹槽附近所出現的透明圈大小 (mm)。結果顯示，益生菌 10-1 (*B. amyloliquefaciens*)、10-2 (*B. subtilis*) 及 D5 (*B. pumilus*) 之抑菌圈分別為 3 mm、1.5 mm 及 4 mm，以 D5 對仙人掌桿菌抑菌能力最佳 (圖 4)。

據行政院衛生福利部食品藥物管理署 2015 年抽驗市售畜禽水產品，檢驗結果有 6 件甲魚樣本藥物殘留不符規定，因此研究應用生物防治方法來控制疾病之發生與蔓延，

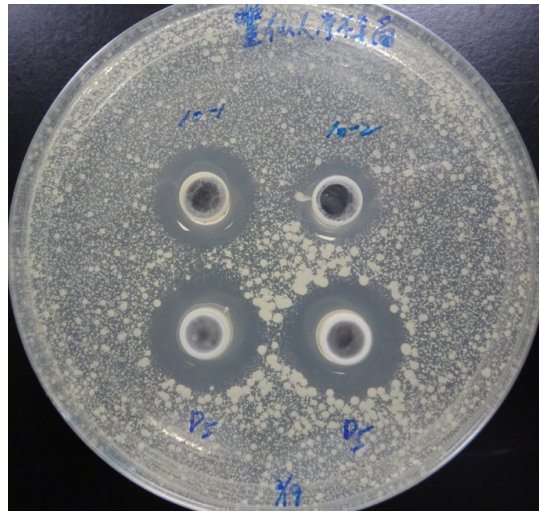


圖 4 *Bacillus pumilus* D5 菌株對仙人掌桿菌 (*B. cereus*) 之抑菌試驗

將是未來減少抗生素使用的有效方法之一。本研究中，抑制仙人掌桿菌效果最佳之 *B. pumilus* D5 菌係自魚蝦體內分離之菌種，實驗證明其除可抑制溶藻弧菌、哈維氏弧菌、腸炎弧菌外，對鰻弧菌、霍亂弧菌、創傷弧菌、大腸桿菌及鼠傷寒沙門氏菌亦有抑制能力。將 *B. pumilus* D5 菌對 15 種水產常用抗生素進行耐受性試驗，結果顯示其對 14 種抗生素均為敏感性，因此 *B. pumilus* D5 菌具有發展為抗水產病原弧菌之益生菌的潛力，可提供養殖業者抗生素之外的防治策略，減少因濫用抗生素而造成藥物殘留之風險。國人對於食安問題日益重視，如何有效提高魚池的健康管理及減少養殖用藥，進而建構安全且有效率的水產養殖體系，促進水產養殖產業升級，一直是政府機構、研究單位與產業界所殷切期盼的，如能在強化生物防治效能之益生菌種多做研發努力，開發適用之商品供養殖漁民使用，將是水產養殖產業的一大福祉。