

高屏地區鰻池土放射菌之調查研究

Study and Investigation of Actinomycetes in Cultured Eel Ponds of Kao-Ping Area*

黃文瑛 · 溫惠美 · 陳景川

Wen-Ing Hwang** Hui-Mei Wen** Ching-Chuan Chen**

ABSTRACT

From December 1984 to May 1985, 13 Pond Soil or sewage pipe soil were examined for the presence of actinomycetes. Actinomycetes species could be isolated by either water agar or agar supplemented with simple C. N.K. sources. The pure cultures isolated will be investigated for the ability of producing muddy odour geosmin.

前 言

高屏地區養殖之鰻魚已隨著高度漁業科技之發展，而達到高密度的集約養殖方式，鰻魚成品外銷之總量亦高達每年二億之多，可說是高屏地區養殖特色之一。但由於集約養殖所引致的鰻體異味（off-flavor）則常常造成高單價鰻魚滯銷之情形，對養鰻業者帶來的損失相當大，所以高屏地區鰻體臭土味之去除，乃是目前重要課題之一。

目前已知臭土味是由 Geosmin (1)，2-methyl isoborneol (2) 及 mucidone (3) 等所引致的，這些化合物主要是放射菌 Actinomycetes (尤其是 Streptomycetes (4)) 與藍綠藻 (5)，(6) 所產生的。其中又以 Geosmin 最常見，通常魚體 100 g 內，Geosmin 含量若超過 0.6 μg 時，即可嚐出魚之臭土味。

為了防治臭土味之發生，以確保鰻魚之高經濟價值，本計畫乃針對高屏地區之鰻池土進行放射菌之分離純化工作，以期找出會產生 Geosmin 之放射菌，將來能有效的加以去除或防治。

材 料 與 方 法

(一) Geosmin 標準品之來源：

引致魚體異味的最重要化合物 Geosmin，為無色，具有臭土味之中性油類，其分子式為 $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}$ 。經由 Nancy Gerber 教授之介紹，美國環境保護局贈予一小瓶 Geosmin 標準品，此標準品乃作為將來本實驗分析樣品中 Geosmin 含量之參考標準。

* 73農建—4.1—產—244計劃

** 國立屏東農業專科學校

(二)放射菌分離與純化：

採取鰻魚池底之表土，每個鰻池採四點混合均勻，帶回實驗室，依下列步驟操作之：

取 0.5 g 土壤於無菌三角瓶中，加入 50 ml 無菌水，在 28°C 下振盪 20~30 分鐘，靜置 5 分鐘，取上澄液（即 10^{-2} 倍稀釋液）以無菌水稀釋至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 及 10^{-6} 等不同稀釋濃度，由各種不同稀釋液中取 0.1 ml 至分離培養基（表一、二）上，（每種稀釋濃度做三重覆），再以 L 棒塗勻，倒置於 28°C 或 37°C 培養。菌落長出時，觀察放射菌（一般為表面不光滑，具摺皺，有時肉眼即可見到孢子），或以倒立顯微鏡觀察其菌絲及孢子排列形狀。挑選單獨的放射菌落在增菌培養基上（表三）經純化培養多次後，保存純化菌種於冰箱中。

表 一：放射菌分離培養基 (1) (Water Agar)

Bacto Agar	20.0 g
蒸 餾 水	1.0 L

醫製方法：將 20.0 g 之 Bacto Agar 加入 1.0 L 蒸餾水，煮沸後，121°C 下滅菌 15 分鐘，分裝在培養皿中（15~20 ml）凝固。

表 二：放射菌分離培養基 (2)

Soluble starch	10.0 g
NH ₄ Cl	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
Bacto agar	15.0 g
蒸 餾 水	1.0 L

配製方法：稱取 agar 以外的各成分，溶於 1.0 L 的蒸餾水中調 pH，至 6.8 加入 agar 並煮沸，在 121°C 下滅菌 15 分鐘，分裝在培養皿中凝固。

表 三：放射菌增菌用培養基 (Yeast Malt Extract Agar)

Yeast Extract	4.0 g
Malt Extract	10.0 g
Glucose	4.0 g
Bacto Agar	20.0 g
蒸 餾 水	1.0 L

配製方法：稱取 agar 以外之各成分，溶於 1.0 L 的蒸餾水中，調 pH 至 7.3，加入 Agar 並煮沸，在 121°C 下滅菌 15 分鐘，分裝在培養皿中凝固。

結果與討論

高屏地區養殖之鰻魚，其臭土味之發生情形，一般而言是以秋天下雨季節較為嚴重，其原因可能是雨季時換水，晒池不易，過剩之飼料屯積而造成微生物及菌類聚積生長所造成的。本實驗在73年12月底至74年5月底，固定在潮州養鰻場採取不同池土的土壤做放射菌之分離，採土時係以養鰻時間較長，久未換水的鰻池為對象。

由實驗結果顯示出，分離培養基(1)及(2)均可分離出放射菌，由 water agar (分離培養基1)分離所需的時間較長，28°C 下需培養10~14天左右。分離出之結果列於表四。

分離得到的放射菌經多次純化培養以後，先用感官方法檢定菌體是否產生臭土味。打開菌種培養皿後可聞出臭土味之菌，將依照 Nancy Gerber (4) 等人之程序，在液體培養基內大量培養後，以 methylene Chloride 萃取之，萃取物濃縮後注射入氣相層析儀內，和標準 Geosmin 比較，鑑定此放射菌是否會產生 Geosmin。

表 四：放射菌分離純化結果

日期	取樣來源	放射菌種類*	培養溫度	分離培養基
73.12.30	64池土	1	28°C	1
74. 2. 5	50池水溝泥土	6	37°C	2
74. 2. 5	50池土	7	37°C	2
74. 2. 6	17池土	5	37°C	2
74. 2.28	50池水溝泥土	1	28°C	1
74. 2.28	50池土	2	28°C	1
74. 2.28	17池土	3	28°C	1
74. 3.31	20池土	1	37°C	2
74. 3.31	19池土	5	37°C	2
74. 4.30	19池排水管泥土	7	37°C	2
74. 4.30	20池土	3	37°C	2
74. 5.30	19池土	3	28°C	1
74. 5.30	19池排水管泥土	4	28°C	1

* 外表性狀不同之菌落

摘 要

由73年12月至74年5月，從13個鰻池表土或排水管、排水溝中分離放射菌。本實驗顯示2% water agar 或 agar 中添加簡單的 C. N. K. 來源，均可用來分離放射菌。分離純化之放射菌將進一步進行試驗，確定該菌種是否會產生引致臭土異味之代謝產物。

参 考 文 献

1. Gerber, N. N. 1977. Three highly odorous metabolites from an actinomycete, 2-isopropyl-3-methoxy pyrazine, methyl isoborneol and geosmin J. of Chemical Ecology 3: 474~482.
2. Gerber, N.N. 1969. A volatile metabolite of actinomycetes, 2-methylisoborneol J. Antibiotics 22: 508~509.
3. Morris, R.L., 1962. Actinomycetes studied as taste and odor cause Water sewage works 109: 76-84.
4. Gerber, N.N. and H.A. lechevalier 1977. Production of geosmin in fermentors and extraction with an ion-exchange resin. Applied and Environmental Microbiology. Vol 34. as. 6 857~858.
5. Kikuchi, T., T. Mimura, K. Harimaya, H. Yans, M. Arimoto, Y. Masada and T. Inoue 1973. Odorous metabolite of blue-green algae: Schizothrix muellen Nageli collected in the southern basin of Lake Biwa. Identification of geosmin. Chem. Pharm. Bull. 21: 2342~2343.
6. Medsker, L.L., D. Jenkins and J.F. Thomas, 1968. Odorous Compounds in natural water. An earthy-smelling compound associated with blue-green algae and actinomycetes. Environ. Sci. Technol. 2-461-466.