

水產(發生)臭土味與養殖池中細菌相之研究

趙 維 良

ABSTRACT

In the past couple of years, a rapid expansion of aquaculture in Taiwan was observed. However, very little is known about the microbial composition of the various cultural systems. Microorganisms are known to be responsible for causing diseases and earthy-odor in fish. The purpose of this study was to determine the relationships between the occurrence of earthy-odor and the changes of specific bacterial groups (e.g., capable of producing amylase or urease, etc.). Throughout the year, we had followed the changes of the selected bacterial groups in ten different ponds. The results showed that besides seasonal influence, the microbial composition in the pond water will also varies with geological location, management, and type of fish raised. The earthy-odor of the fish was found to be related to the increase of the amylase-producing bacterial populations. The changes of bacterial populations in the mud was less obvious.

前 言

近年來，國內水產養殖業，有如雨後春筍般的蓬勃發展。由於它所得到的利益遠比經營農業為高，很多農家紛紛把地力較差的農田，或者利用海埔新生地，闢成魚塭，使得養殖面積直線上升⁽¹⁾。

爲了生產更多、更有經濟價值的養殖魚類，對於飼料成份、種魚栽培，以及品種改良的研究，我們國內投入了相當多的心力，也得到相當輝煌的成果。儘管這些研究的高度發展，但是，對於養殖池內微生物相的狀況的認知，却相當的有限^(2, 3, 5, 12)。養魚池在連續飼養多年之後，池底就會堆積魚類的推泄物、飼料殘渣、腐植質及污泥等，不但成爲細菌的溫床，同時在微生物分解的過程中，也會產生黏液與惡臭，直接或間接影響魚類的風味，導致售價降低，使得業者蒙受到重大的損失。因此，對於養殖水池中微生物相、及其變化的了解是非常必須的。

本實驗的目的，在研究養殖池內（水中及土中）微生物相的變化與臭土味發生的相關性。一般而言，研究環境中細菌族群的組成，不外：分離、培養、及鑑定。但是目前用以鑑定細菌的生理試驗，大多針對幾種重要的菌（例如：病原菌）而設計的，若用以鑑定水環境中細菌的種類，並不適合⁽⁴⁾；但是，若採用數值分析法（numerical taxonomy），又過於費時、費力，不易達到預測的效果，失去了實驗的意義。因此，本實驗選擇了八項細菌生理試驗，用以追蹤細菌群聚的消長狀況，與養殖

魚類臭土味發生的相關性。藉著所得的結果，以找出與臭土味消長最相關的生理特性，當做以後預測、及追蹤臭土味發生的指標。

材 料 與 方 法

(一)採樣地點及時間

自民國75年7月起，每月在竹北、台南、屏東等地區，各選三個魚塢，進行採樣。(附表一)

圖表一：採樣魚池分佈圖

地 區	編 號		養 殖 池 別	圖 表 符 號
	水	土		
竹 北	A	a	吳 郭 魚 (漁牧合營)	○
			吳 郭 魚	□
			吳 郭 魚	△
台 南	B	b	不 固 定	△
			虱 目 魚	□
			鱸 魚 (註 1)	○
屏 東	C	c	鰻 魚	△
			鰻 魚	□
			牛 蛙	○
			牛 蛙	×

註 1：鱸魚養殖戶，於民國75年1月，因寒流來襲，致使池魚大量暴斃；於當月分採樣時，養殖戶已行放水、清池，因此無法採樣。

(二)採樣方法

每個魚塢採樣池，各於池周緣、及池中央共取五點，進行池水及底土的收集。

池水採水面下手可及之深度(約20公分)，以消毒過的12 ml一冷凍乾燥瓶，裝滿水樣。底土則以竹槓插入底土，以消毒好的冷凍乾燥瓶裝好。

樣本(池水及底土)採好之後，立即放入冰箱中，直到檢驗時(2~6小時內)，才取出。

(三) 細菌的分離與純化

同一魚塢內五個採樣點的水，各取10 ml，加在一起，混合均勻後，以0.85% NaCl 生理食鹽水稀釋。同一池內的底土，每瓶各取等重量的土（約2克左右），混勻後加0.85%的生理食鹽水稀釋。池水取 0 、 10^{-1} 、 10^{-2} ，底土取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的稀釋度，以 $1/4$ 強度的 TSA 做塗抹培養（spread plate），分為好氧及厭氧兩組，置於 25°C 的恒溫箱中，培養72小時後，測定總生菌數，並且挑菌落做純化培養（pure culture）。每個採樣池的純化菌數，都以系統抽樣法取56個菌落，於 $1/4$ 強度 TSA 做純化培養。

(四) 細菌生理特性的測定

細菌純化後，將之分別移植到含 $1/3$ TSB 的 Microtiter Plate 於 25°C 下培養24小時後，做下列生化試驗：amylase, catalase, citrase, Gram's stain, lypase, oxidase, phosphotase, protease, urease^(4, 8)。其中 amylase, catatase, protease 於30小時後讀結果，其它則於5天後讀結果。

結 果

根據本實驗所選定的九項生化試驗，分別將每一池在每箇月中，細菌族群呈陽性反應的百分比，做成圖表（附表二、三、四、五、六、七、八、九、十）。由結果可以看出，養殖魚塢中的微生物相，隨著不同區域、不同養殖環境、及不同的月份，都有不同的型態及消長的現象。

在追蹤的養殖池中，發現泥土味的發生與產生 Amylase 的族群，有相當的關係；但是，其它八項生理試驗中，則未發現與魚類臭土味的發生，有何密切的關係。但是，由這幾項生理試驗中，我們可以看出，細菌的消長與季節的變動，有著相當關係；但是，地域性的差異，對細菌的族群，也有相當的影響力。

討 論

微生物（細菌、真菌、藻類）是活的酶體，完可以催化水中、土中大部分的化學反應。尤其是細菌，在環境中大部分有機物的分解，及無機物的氧化還原，都得經由它們的作用。自然界中，很多重要元素（例如：碳、氮、硫）的循環，均有賴細菌的作用，才得以完成⁽¹⁰⁾。在一個封閉的魚塢中，如果殘餘飼料及魚體排泄物堆積的速率大於微生物分解的速率，便會造成大量有機物的累積，久而久之，會使得水質惡化，而導致池魚病害叢生或有臭土味之發生⁽¹⁾。目前已知養殖池中病害與臭土味的產生與池中微生物的組成有密切的關係。

養殖池中細菌族群是呈動態的，它可能因人為或非人為因素，而有所消長⁽¹²⁾。在本實驗中，我們總共追蹤了十個不同的養殖池，觀察其中微生物組成的變化。發現在同一地區、同一月份、不同養殖池其中細菌族群的組成，均不相同。例如就新竹地區而言，該地區都是飼養吳郭魚，但是比較漁牧合營的池子與同地區其它兩個採樣池，不管在池水或底土中，對 urease test 呈陽性反應細菌的比率均有明顯的差異。推其原因不外養殖池中水質有所不同，而影響池中水質的因素以下列三點為主：(1) 養殖密度，(2) 飼料成份，(3) 飼料使用方式及施用量。如就同一月份、不同地區的養殖池來比較，其池中細菌族群的組成，也有顯著的不同。推究其原因，除了上述三點外，還受到下列因素的影驗，(1) 放養的魚種，(2) 水溫的不同（例如：七十五年三月份，台南地區的氣溫為 28°C ，而竹北地區却只有 14°C 左右），(3) 經營方式的不同（如：竹北地區為淡水養殖而台南地區為半鹹水養殖）。季節性的變動，對水中細菌的消長，具有相當的影響力。由圖表二(A)為例，在竹北地區三個不同採樣池，其水中對 amylase test 呈陽性反應的細菌數目，會隨著月份而有消長。從民國七十四年八月份，至七十

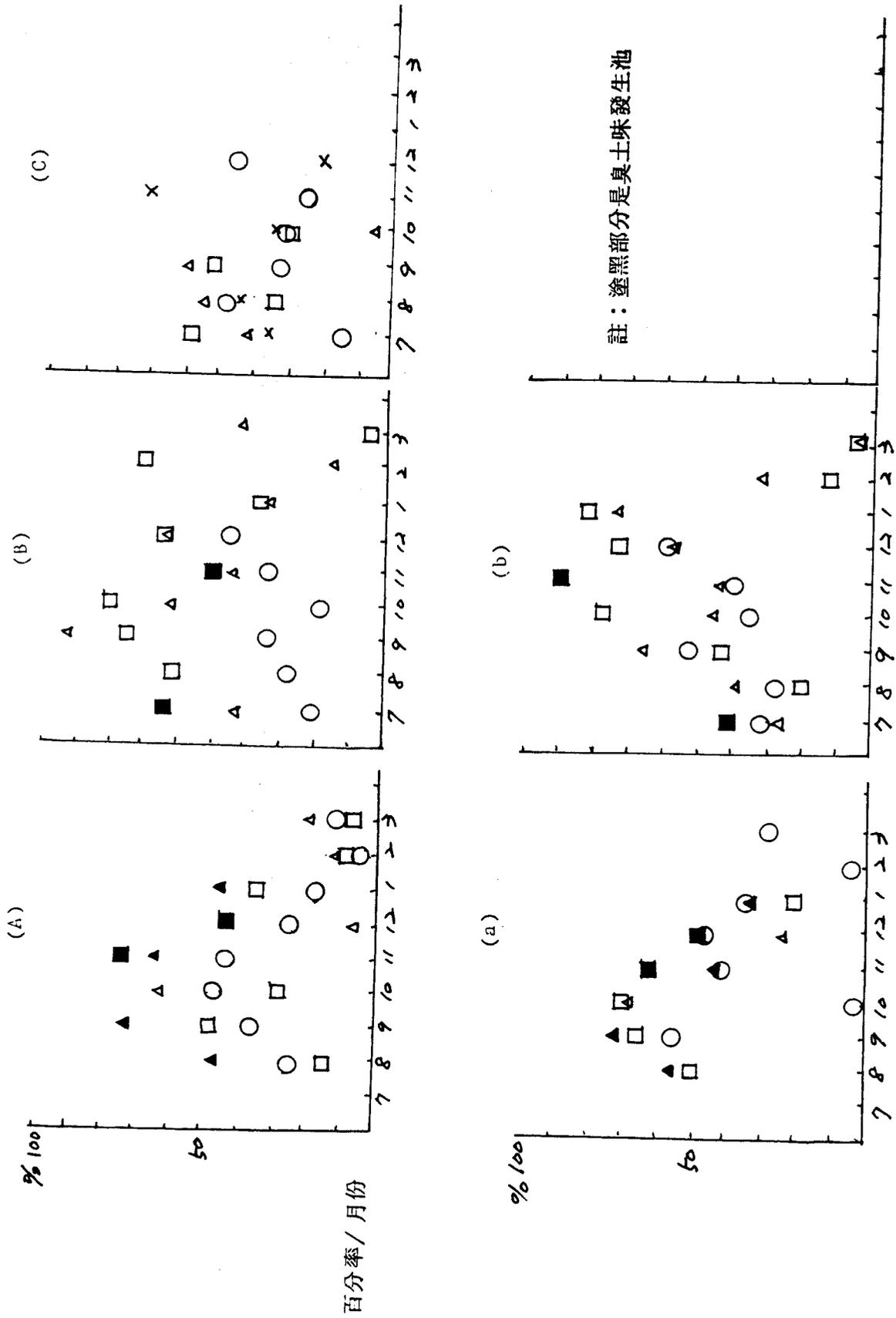
五年三月份，在這三個不同池的池水中，其對 *amylase test* 呈陽性反應細菌族群的消長，幾乎趨於一致。但是就底土而言，季節變化對其中細菌族群的消長，影響並不大，以圖表四(b)、五(b)為例，季節變化的影響力幾乎為零，即使就較富變化的圖表七(a)(b)、八(a)來比較，它們所呈現的變化性，與季節的變遷，並沒有很明顯的相關性。由這些結果顯示，養殖池中，底土的含細菌族群較穩定，而水中細菌族群較富變化。根據竹北及台南水試分所的報告，養殖魚臭土味之發生是有季節性的，故我們如能了解臭土味的發生與水中細菌族群變化間之關係，將有助於我們對此一問題之防範。

根據前人的研究，養殖魚類臭土味的發生，係由藍綠藻或放射菌生長時所分泌的 *geosmin* 或 *2-methylisoborneol* 所引起的^(6, 7, 11, 13, 14)。在一般正常的水域中，養分（例如：碳、氮、磷等）的含量都很低，不論藍綠藻或放射菌均無法與細菌從事有效的競爭，使得生長受到抑制，但是當水中養分增加而使水質優養化（*eutrophied*）後，它們便能迅速生長與繁殖，故可知魚類臭土味的發生是由水質優養化所造成的結果之一。由於細菌的世代（*generation*）較短，故每當環境發生變化（如因水溫改變，養分濃度改變等），往往最先造成其中細菌族群的變遷。本實驗結果顯示，養殖池魚類臭土味之發生與池中能產生 *amylase* 細菌族群的大小有密切的關係，由表二(A)(B)中顯示在發生臭土味的池水中，能產生 *amylase* 的細菌比率比同月份、同地區，其它正常魚塢中的比率要高。但是光是水質的優養化並不代表臭土味一定會發生，必須水中有能分泌 *geosmin* 或 *2-methylisoborneol* 的藍綠藻或放射菌生長方可。由此解釋為何有些池中，有相當高比例的細菌可產生 *amylase*（見圖表二(A)(B)），但卻沒有臭土味的問題。然而呈陽性反應細菌數，到達某一個百分比以上時（例如：50%），該養殖池是不是就有發生臭土味的可能，則因目前祇有一年的數據，無法下此斷論。

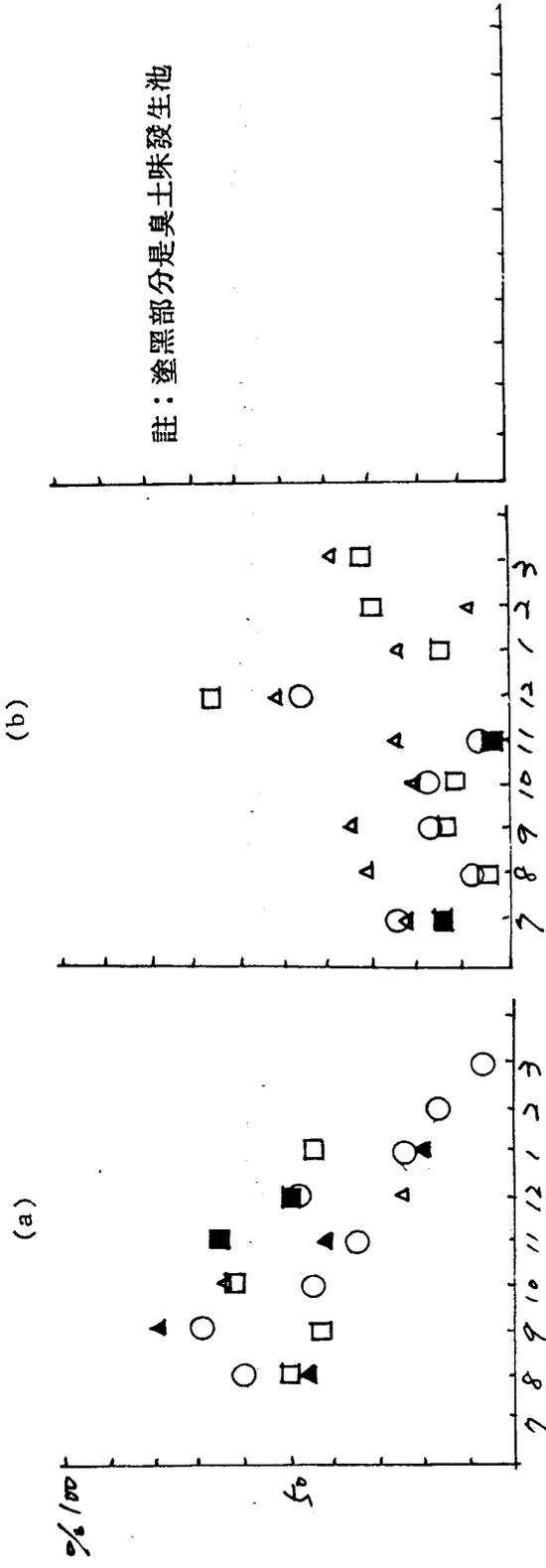
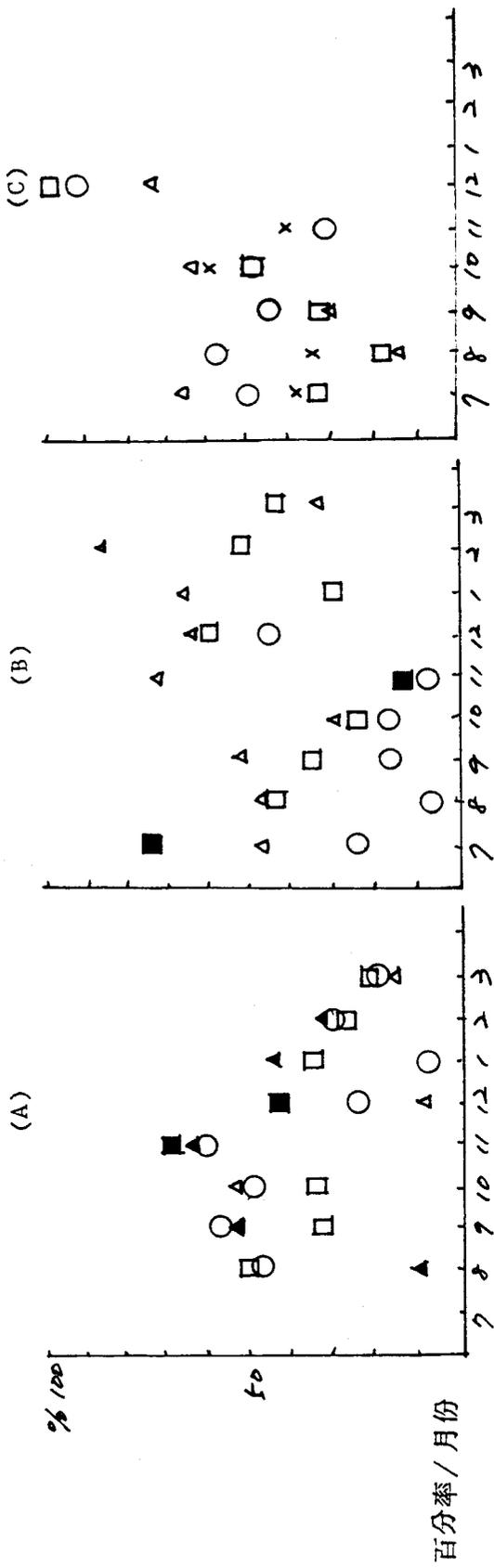
摘 要

近年來，國內水產養殖業蓬勃發展，養殖面積直線上升，然而，對於養殖池內微生物相的了解，却相當有限。另一方面，養殖池中微生物的代謝物亦能直接或間接地影響魚類的風味，因此，本實驗即欲研究養殖池內（水中及土中）微生物相的變化與魚類臭土味發生的相關性。

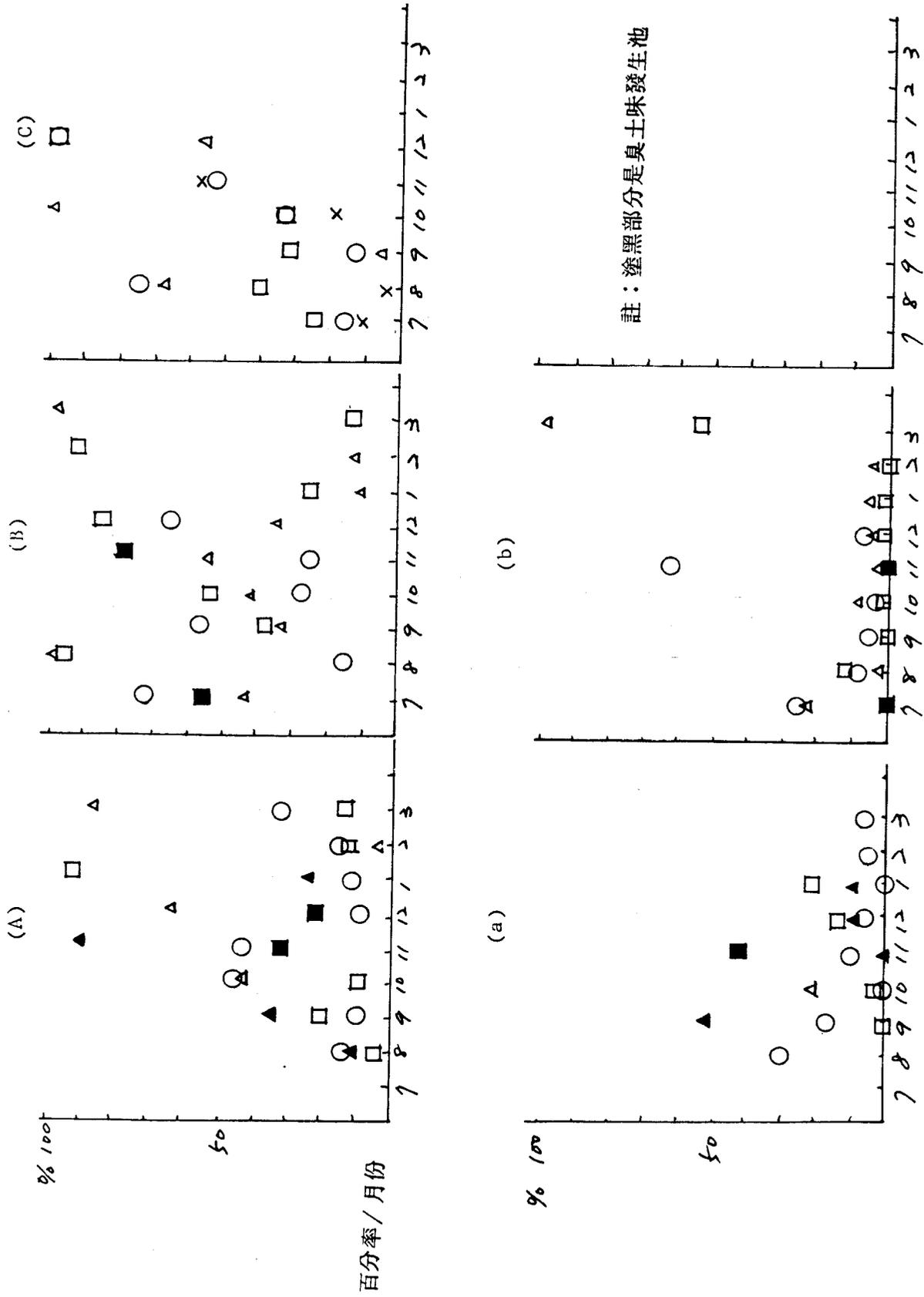
在本實驗中，我們共追蹤了十個不同的養殖池，發現在同一地區、同一月份、不同養殖池，其中細菌族群的組成均不相同，同時，在同一月份，不同地區的養殖池，其細菌族群的組成亦有顯著的差異。至於季節性的變動，對水中細菌的消長，具有相當的影響力，却幾乎不會影響到底土中的細菌消長。另外，由本實驗結果顯示，養殖池魚類臭土味之發生與池中能產生 *Amylase* 細菌族群的大小有密切的關係，惟因一年之數據有限，仍待進一步的探討。



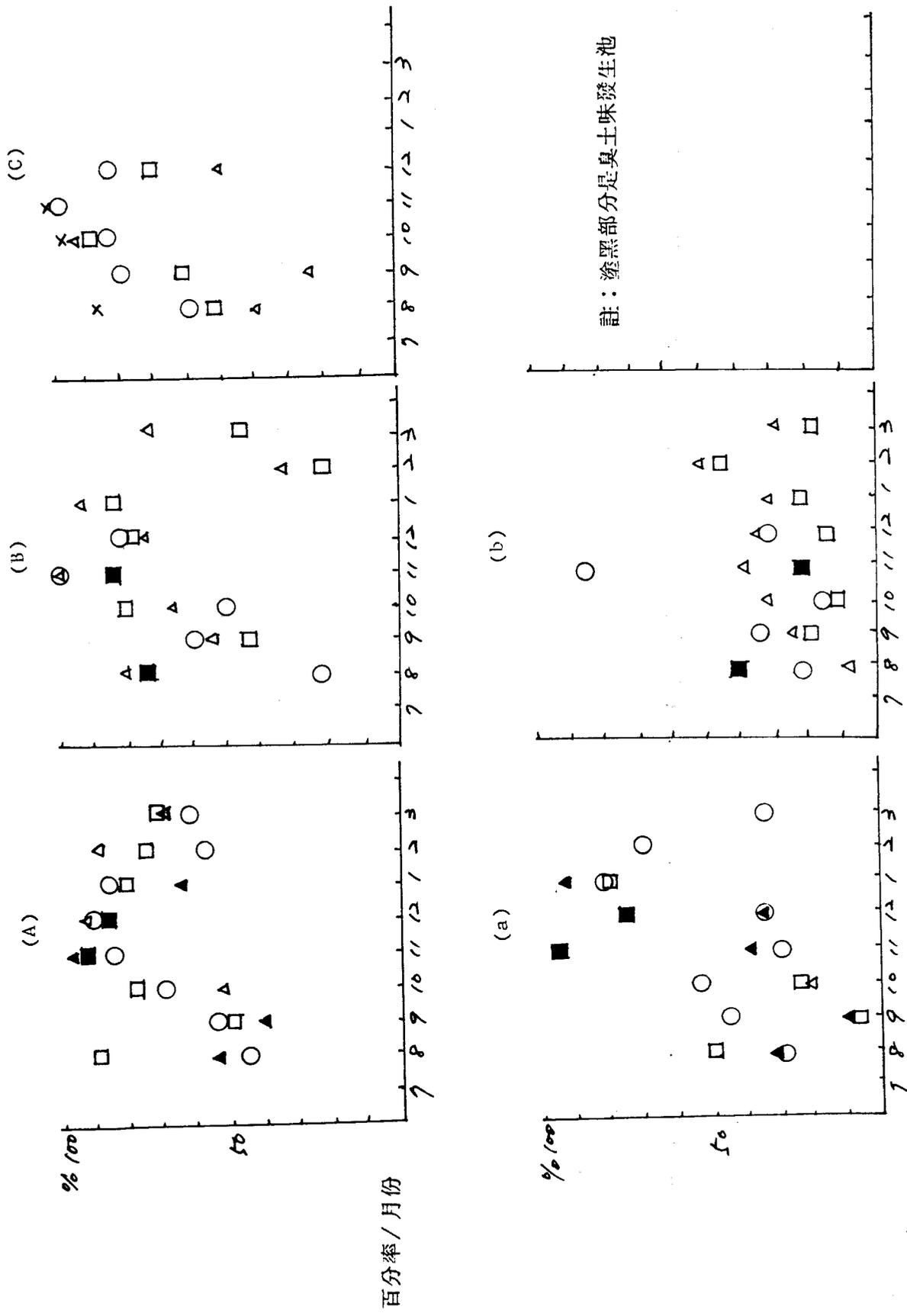
圖表二：Amylase Test(+)



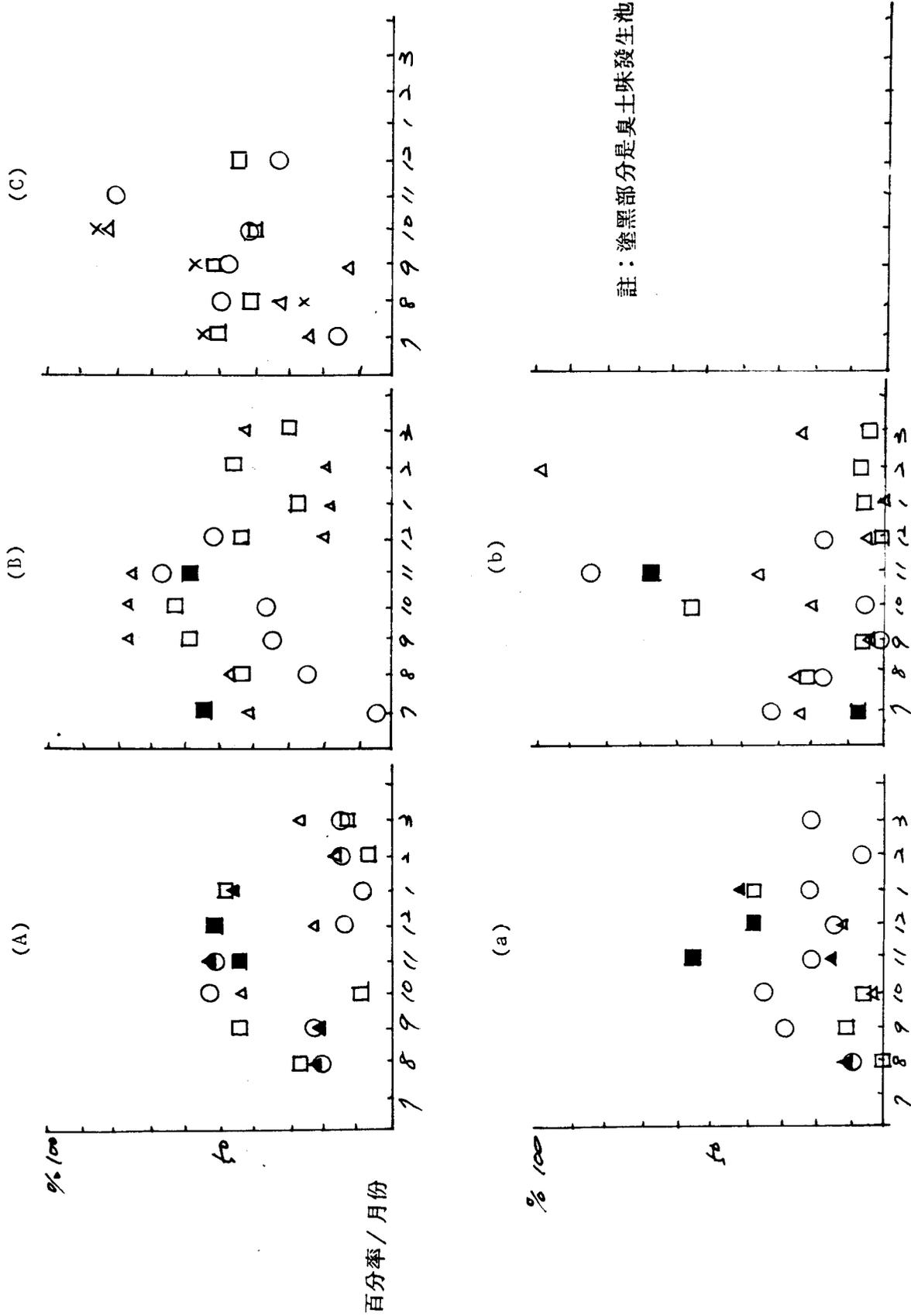
圖表三：Catalase Test(+)



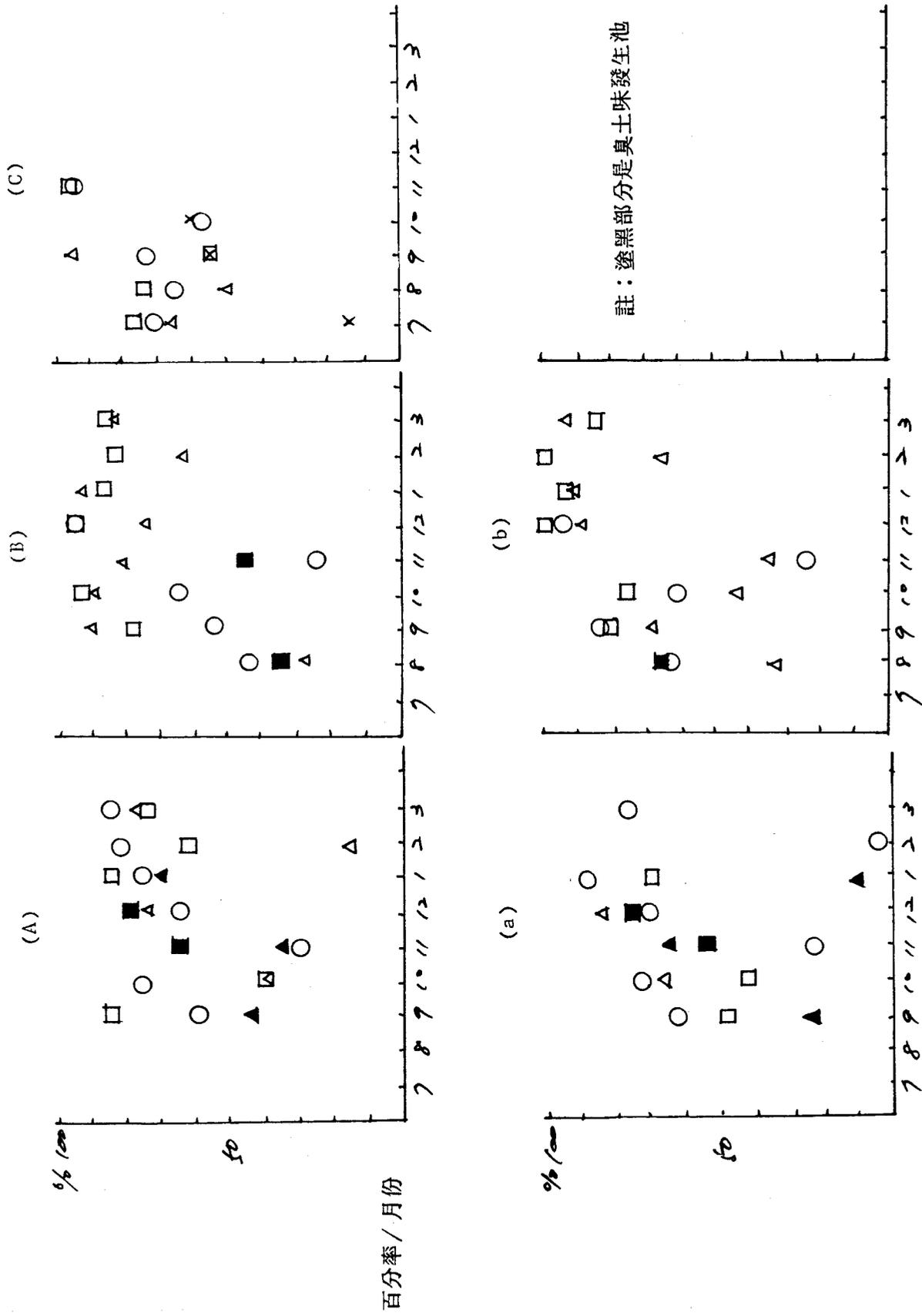
圖表四：Citrase Test(+)



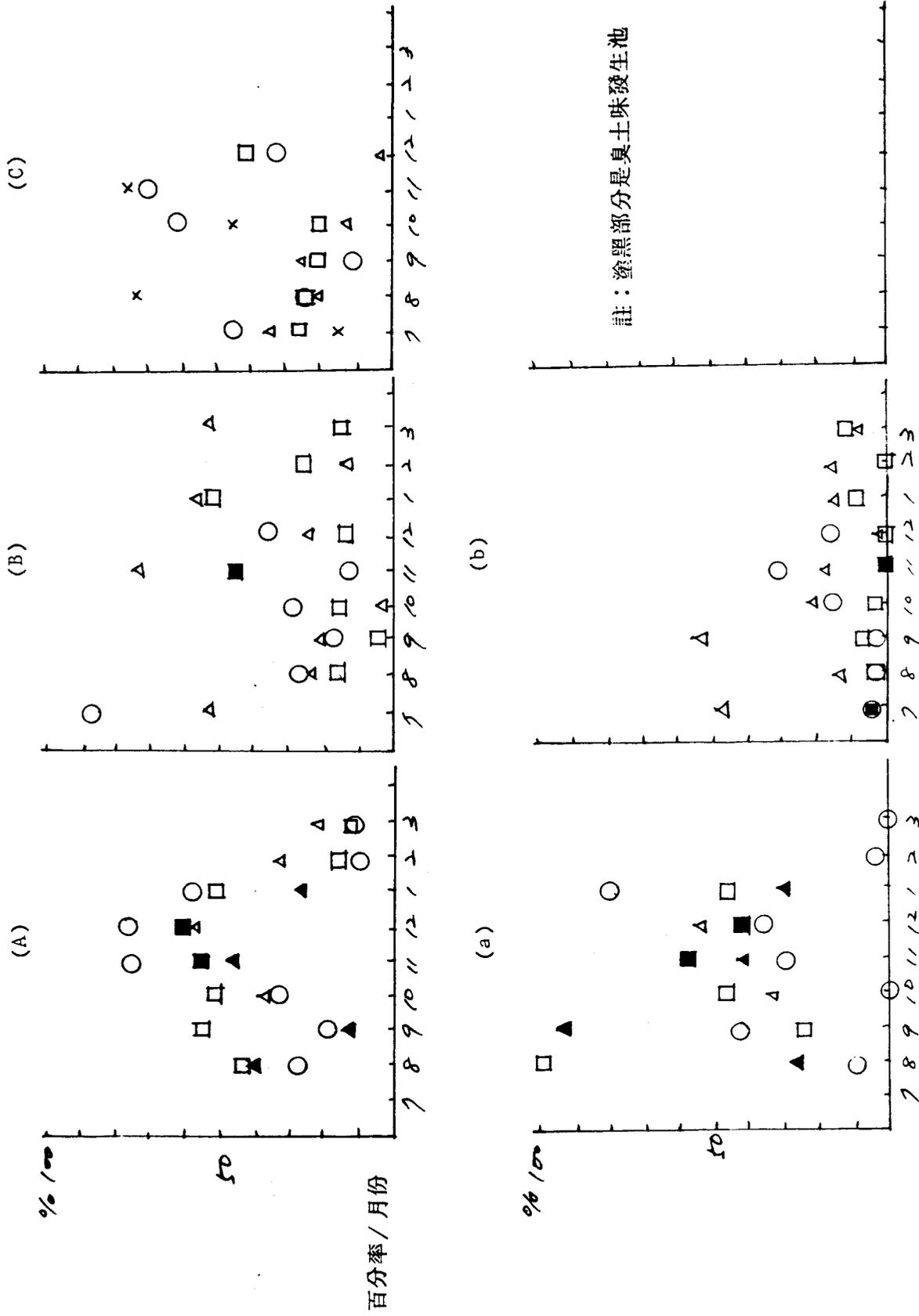
圖表五：Gram's Stain(一)



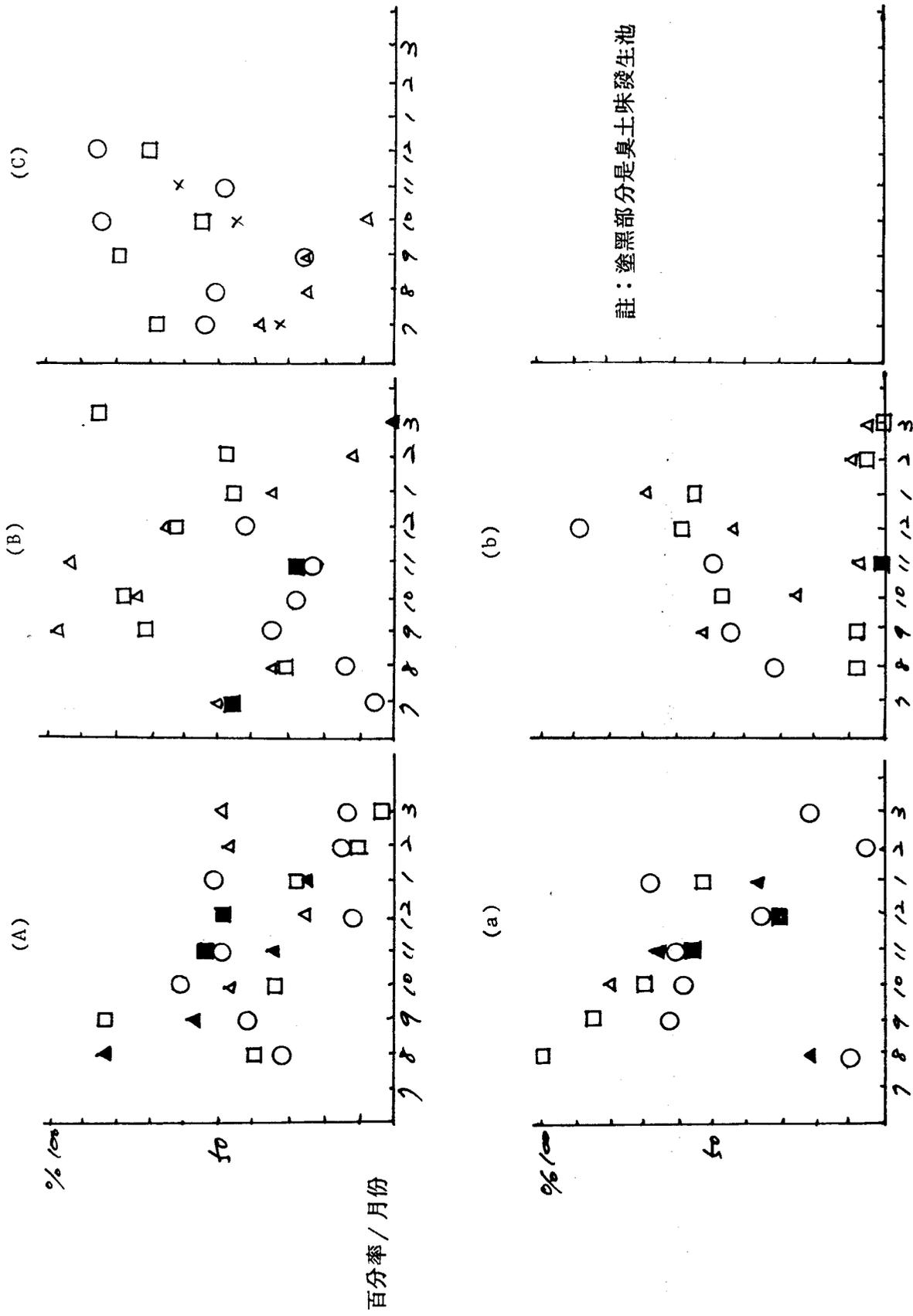
圖表六：Lypase Test(+)



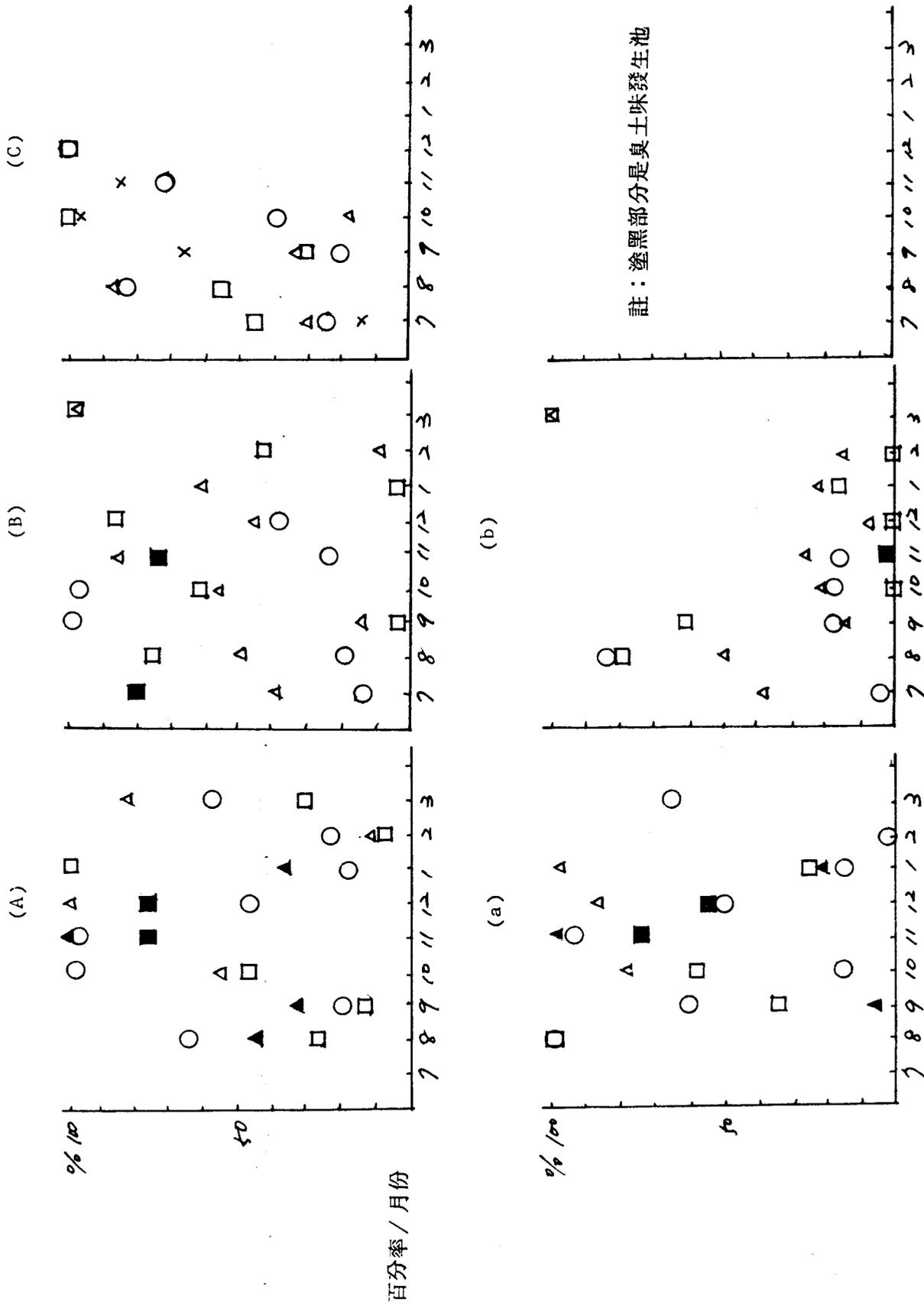
圖表七：Oxidase Test(+)



圖表八：Phosphotase Test(+)



圖表九：Protease Test(+)



圖表十：Urease Test(+)

參 考 文 獻

1. 鄧火土 (1983) , 水產養殖, 豐年社。
2. Allen, D.A., B. Austin and R.R. Colwell, 1983, Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a fresh water fishery. *J. of General Microb.* 129: 2043-2063.
3. Austin, B., 1982, Taxonomy of bacteria isolated from a coastal, marine fish-rearing Unit. *J. of Appl. Bacteriology.* 53: 253-268.
4. Burns, R. G. and J. H. Slater (1982), *Experimental Microbial Ecology.* Blackwell Scientific Publications.
5. Gehlen, M. H. J. Trampisch, and W. Dott, 1985, Physiological characterization of heterotrophic bacterial communities from selected aquatic environments. *Microb. Ecol.* 11: 205-219.
6. Izaguirre, G., C.J. Hwang, S.W. Krasner and M.J. McGuire. 1982. Geosmin and 2-methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply systems. *Appl. Environm. Microbiol.*, 43: 708-714.
7. Krasner, S.W., C.J. Hwang and M.J. McGuire, 1983, A standard method for quantification of earthy-musty odorants in water, Sediments, and algal cultures. *Wat. Sci. Tech.*, 15: 311-321.
8. Mac. Faddin, J. F. (1980), *Biochemical test for identification of medical bacteria.* Williams & Wilkins.
9. Mallory, L. M. and G. S. Sayler, 1983, Heterotrophic bacterial guild structure: relationship to biodegradative populations. *Microb. Ecol.* 9: 41-55.
10. Manahan, S. E., 1984, *Environmental Chemistry*, PWS.
11. Persson, P-E. 1979. The source of muddy odor in bream (*Abramis brama*) from the Provo Sea area (Gulf of Finland). *J. Fish Res. Board Can.* 36: 883-890.
12. Sohler, L. P. and M. A. G. Bianchi, 1985, Development of a heterotrophic bacterial community within a closed prawn aquaculture system. *Microb. Ecol.* 11: 353-369.
13. Tabachek, J.L. and M. Yurkowski, 1976, Isolation and identification of blue-green producing muddy odor metabolites, geosmin and 2-methylisoborneol in saline lake in Manitoba. *J. Fish Res. Board Can.* 33: 25-35.
14. Yurkowski, M. and J-A. L. Tabachek, 1980, Geosmin and 2-methylisoborneol implicated as a cause of muddy odor and flavor in commercial fish from Cedar Lake, Manitoba. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 37: 1449-1450.