

草蝦 (*Peneaus monodon*) 繁殖場異營性細菌相之研究

劉文御 陳秀男 郭光雄

國立臺灣大學動物學系

草蝦繁殖場之水源總生菌數在 10^3 (CFU/ml)，海水儲存池雖經漂白粉 2 ppm 處理及曝氣 24 小時後，生菌數仍提高至 10^4 (CFU/ml)。蝦苗培育池中，由眼幼蟲六期到後期幼蟲三期，總生菌數在 10^3 - 10^6 CFU/ml 之間變化。培育初期之總生菌較低，之後逐漸升高，在 Zoea II 至 Mysis II 期達到最高，而此時正是培育蝦苗發生大量死亡之時。

其次在菌相的變化上，海水水源並沒有出現弧菌，海水儲存池也很少，可是母蝦繁殖池的含量就很高，佔 70% 左右。在培育初期水中菌相，以 G(+) 菌株出現的頻率較高，但自 Zoea II 期開始，G(+) 菌株的數量下降，G(-) 菌株開始突增，其中的 *Vibrio* 轉變成優勢，其數量佔總菌量的 68% 以上，同時蝦苗發生大量死亡。

蝦苗池水中的細菌相和池底沉澱物中的相同，兩者均在糠蝦期時弧菌的含量達到最高。弧菌的來源仍以種蝦池或蝦苗池本身殘留的可能性較高。弧菌種類似 *V. parahaemolyticus* 及 *V. alginolyticus* 出現為最多。

前 言

本省草蝦養殖在 1987 年以前曾經風光一時，養殖面積擴增到十萬公頃，年產量四萬公噸，外銷 4 億餘萬美元（農委會，1988）。之後，草蝦養殖即開始發生病變大量死亡，許多學者專家紛紛展開研究，探究的範圍十分廣泛，其中包括有蝦池水質、生態、藻類、底泥、浮游動物相、底棲動物相及細菌相調查等等（農委會，1991）。不過之其中最讓人懷疑的草蝦苗繁殖場，因為長期使用高溫及藥物，造成蝦苗品質不良，無法適應放養的新環境，抑或成長一段時間後即開始大量死亡的原因，一直未有人做過確切的調查研究，因此，本研究即以南部地區一家民間的草蝦繁殖場做為對象，做一次細菌相變動的分析。

早期有關對蝦苗繁殖過程中，研究菌相變化的報告有數篇，如最早的 Llobrera and Gacutan (1977) 針對草蝦無節幼蟲 (Nauplii) 期做過菌相分析；Lewis *et al.*, (1982) 曾對

藍蝦 (*P. stylirostris*) 的幼苗附肢表面的沾粘異物做過細菌相分析。同時 Austin and Allen (1982) 對豐年蝦孵化的水體及無節幼蟲等研究其菌相之變化。之後, Colomi (1985), 研究淡水長臂大蝦 (*M. rosenbergi*) 飼育豐年蝦的無節幼蟲後對其死亡率的影響, 並分析其細菌相之變化; 進一步在 Anderson *et al.*, 1989 年的研究下, 了解到了淡水長臂大蝦的水體, 池底及蝦體之者間異營性細菌變化的情形。Igarashi *et al.*, (1991) 也曾對斑節蝦 (*P. japonicus*) 的孵化過程研究過生菌數及細菌相的變化。國內則有林清龍等 (1988) 分析過以 FRP 桶孵化草蝦苗時之生菌數變化。

材 料 及 方 法

一、採樣地點:

高雄縣市交界, 林園鄉中門路之三合蝦苗繁殖場, 時間自民國 80 年 9 月 6 日起至 80 年 9 月 27 日止。

二、材料:

1. 繁殖場水源之水樣:

繁殖場水源係抽取距海邊空 200 公尺之沙岸、深度 5 公尺之沙層中。

2. 種蝦池之水樣:

蝦母係自東南亞進口, 飼以新鮮之文蛤及冷凍之蟹肉, 約一週後剪眼柄, 剪眼柄前採水樣供分析。

3. 海水貯存池:

以 2 ppm 之漂白粉 (Cholorine) 處理後加硫代硫酸鈉 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 中和, 投放量為每噸 3.5g, 曝氣 24 小時後測總生菌數。

4. 蝦苗池之水樣:

飼育蝦苗期間每日定時採集水樣, 分別自 A、B、C、D 4 池採樣; A 池由 Nauplius VI 至 Mysis II 期, B 池由 Zoea I 至 Mysis II 期, C 池由 Zoea II 至 Post larvae I 期, D 池則由 $P_2 - P_3$ 。

5. 蝦苗池底之沉澱物樣本:

以表面積為 8.8 cm 無菌細胞培養皿 (Nunc, No. 153066) 沉入蝦池排水口附近, 搜集蝦苗池池底沉澱物。

以上材料均為現場立即分析, 2 小時之內全部處理完畢。

三、 方法：

1. 總生菌數分析

- (1) 水樣總生菌數分析：每日固定時間所採之水樣，以 1 ml 無菌針筒抽取 1 c.c. 注入含 9 c.c. 0.85% 的生理食鹽水中，做十倍的連續稀釋，後以 10 ml 無菌針筒取 10^{-1} 至 10^{-10} 的稀釋液 10 ml，通過滅菌後之 0.2 m 濾膜 (Gelman Science)，後將此濾膜置於 Marine agar (Difco) 上，並於 23°C 下培養 5 天後，計算總生菌數。
- (2) 由連續稀釋的最高倍數下挑出菌落數在不低於 20 個的上述平板培養基，逢機取 16 株，進一步純化後，進行一般的外形及生化測試。
- (3) 池底沉澱物之分析：每隔一日取出上述沉底之培養皿，以 1 c.c. 0.85% 之 saline 注入其中，無菌棉花棒先以無菌 Saline 沾濕，再將粘附於培養皿上之沉澱物均勻括落，後做 10 倍連續稀釋。計算總生菌數及取菌株分離純化的方法均如前述。

2. 細菌相之鑑定：

純化後之菌株進行一般之外型及基礎生化項目測試，測試項目如 Table 1。本研究以鑑定至屬 (Genus) 為最主要目的。並逢機取樣，以 Biolog G(-)，及 API 20 NE 自動鑑定系統鑑定弧菌之種類。

結 果

一、 總生菌數 (CFU/c.c.)

1. 繁殖場水源

其總生菌數如 Table 2，四次採樣之總生菌數均不超過 4.7×10^3 。

2. 種蝦池水樣：剪眼柄前，種蝦池之總生菌數為 2.8×10^4 。

3. 海水貯存池：以 2 ppm 之漂白粉 (chlorine) 處理後，加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 3.5g/噸水中和後，曝氣 24 小時測總生菌數為 2.6×10^4 。

4. 培育過程中池總生菌數之變動：以 Table 3 表示，其各期蝦苗以活存率估計則以 Table 4 列出。活存率之估算以 100 c.c. 燒杯，在池中三點取樣，以

200~400/cm 網目濾除池水，倒入 9 cm 之培養皿中，並置於解剖顯微鏡下計數。

5. 蝦苗池底總生菌數之變化情形有 A、B、C 三池曾採底泥分析其總生菌數，A 池採樣三次，B 池兩次，C 池兩次，採樣期分別在蝦菌發育之不同階段，其結果列於 Table 5。

Table 1 : The traditional biochemical tests for aerobic and facultatively anaerobic heterotrophic bacteria.

1. Colony color			
2. Micromorphology: Grain stain(+)(-); flagella stain			
3. Motility: Semi-soft agar; under microscopy.			
4. Biochemical tests:			
Oxidase	Catalase	Indole production	H ₂ S
OF test	ONPG	Arginine dehydrolase	
Phenylalanine deaminase		Ornithin decarboxylase	
Lysine decarboxylase		Antibiotic: 0/129; Penicillin	
Dnase	Simmon citrite	MR/VP	
Nitrate reduction		Urase	
5. Growth at: 0, 5, 15, 30, 100 ppt salinity.			
6. Growth at: TSI, TCBS (yellow or green). MacConkey, SIM, EMB agar.			
7. Degradation of: Blood (sheep), Casien, Gelatin, Starch, Tween 80.			
8. Utilization of:			
Adonital	Glactose	Raffinose	Mannose
Arabinose	Inositol	Rhamnose	Glycogen
Dextrin	Inulin	Dulcitol	Lactose
Esculin	Maltose	Sorbital	Sucrose
Mannitol	Fructose	Salicin	

Table 2 : Total bacterial number (CFU/ml) of seawater pumped from sandy shore.

Sampl. Date	CFU No	10 Fold diluted	
		10 ¹	10 ²
Sep. 22, 91		10 ¹	-
Sep. 23, 91		-	47

草蝦繁殖場異營性細菌相之研究

Table 3 : The variation of total bacteria number (CFU/ml) from rearing pond water.

P \ M	N6	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	P1	P2	P3
A	7.2×10^4	8.5×10^5	8.7×10^5	8.8×10^5	1.7×10^5	7.0×10^4	-	-	-	-
B	5.9×10^3	1.6×10^5	6.1×10^5	3.8×10^5	3.3×10^5	1.0×10^5	4.1×10^3	-	-	-
C	-	-	4.2×10^4	2.4×10^5	4.7×10^4	5.3×10^5	1.6×10^5	7.2×10^4	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	6.3×10^4	2.2×10^5

Remarks: M: metamorphosis stage; P: pond.

Table 4 : The different survival rates occurred in the procedures of ten metamorphosis stages.

P \ M	N6	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	P1	P2	P3
A	100*	95	85	75	10	0.5	0	-	-	-
B	100*	90	80	70	60	5	0	-	-	-
C	100*	95	65	50	20	10	3	1.5	0	-
D	100*	-	-	-	-	-	-	-	5	1

Remarks : M: metamorphosis; P: pond. * : Stocked 400 thousand nauplii in 30 tons pond water.

Survival rate: %.

Table 5 : Total bacterial number (CFU/ml) counted from the sediment of three hatching ponds.

P \ M	Z1	Z2	Z3	M2
A	8.5×10^5	-	3.8×10^5	3.0×10^6
B	-	2.8×10^6	-	2.6×10^5
C	-	-	2.9×10^5	6.4×10^5

Remarks: M: metamorphosis stage; P: pond.

二、水中細菌相變動之情形

1. 海水水源之細菌相：海水水源所有之菌相，分析如 Table 6。

由 Table 6A 可以看出，水源直接由沙中抽出者以 *Kingella* 為優勢菌種，而革蘭氏染色 G(+) 者僅發現一株，而且未發現有弧菌；但經過氯處理後，G(+) 的菌株躍居第一位，佔菌株數之 56.25% (Table 6B)。Gram(-) 者，各屬分佈十分平均，不過 *Vibrio* 之出現，暗示了繁殖場實際已有弧菌潛伏；其次使用氯來殺菌可以抑制某些菌株，造成其它種類變成優勢種，或者形成較為平衡的菌相，但仍然無法有效的去除可能潛在的病原菌，而這些病原菌極可能在以後的繁殖過程中轉變成優勢種。

Table 6 : The existed bacterial genus in water source for hatching pond.

A. Original water source pumped from sandy bottom of seashore.

Gram stain	Genus	Volume	Total	Vol./total(%)
+	<i>Deinococcus</i>	1	1	6.25
				6.25
-	<i>Moraxella</i>	1	15	6.25
	<i>Aeromonas</i>	1		6.25
	<i>Pseudomonas</i>	6		37.5
	<i>Kingella</i>	7		43.75
			93.75	

B. Stored pond water treated by 2 ppm chloride.

Gram stain	Genus	Volume	Total	Vol./total(%)
+	<i>Deinococcus</i>	8	9	50
	<i>Micrococcus</i>	1		6.25
			56.25	
-	<i>Pasturella</i>	1	7	6.25
	<i>Pseudomonas</i>	1		6.25
	<i>Aeromonas</i>	1		6.25
	<i>Vibrio</i>	1		6.25
	<i>Yersinia</i>	2		12.5
			43.75	

2. 種蝦繁殖池之菌相：如 Table 7 所列。

放入種蝦之第一天採集所得之菌屬中，革蘭氏染色為正的有 4 株，陰性者有 10 株；前者以 *Deinococcus* 居多，佔總菌株數 21.42%，後者以 *Kingella* 及 *Vibrio* 量較多，各佔總菌株數 21.42%。到種蝦移入產卵池前，即

於放養第 7 天時所採之水體標本，情況已大大改觀了。弧菌屬的菌株已一躍佔全數菌株之 71.42%，轉變成了最主要的優勢菌種。我們判斷這這些弧菌的源可能有四：一為原來種蝦即為帶原者，二為投飼種蝦所使用的二枚貝或是蟹類 (*Portunus* sp.)，三為近海海水中所含，四為繁殖場本身所隱藏無法消滅者。不過，此次海水水源經分析其菌相，結果並未出現有 *Vibrio* 的情形。海產二枚貝及蟹類菌相未見有報告發表，但一般新鮮魚介或冷凍魚蝦類 *Vibrio* 出現的機率均很少 (Lee and Pfeifer, 1977; Vanderzant *et al.*, 1970; Heinsz *et al.*, 1988; Zuberi *et al.*, 1987; Kawabata *et al.*, 1975; 鍾及陳, 1977; Gennari and Tomaselli, 1988)。可是本實驗室分析罹患變紅症之母蝦體內之肝胰腺、血液等組織之菌相，大部份仍以弧菌為主，而且是以具病原性之 *Vibrio alginolyticus* 佔大多數 (林及陳, 1993; 未發表)。因此可以了解進口東南亞母蝦，實際已為弧菌主要帶原者。

3. 蝦苗繁殖池各期菌相之變化：

(1) Nauplius 6th 期：

A 池放入蝦苗第一天所採得之菌相，其中有 G(+) 桿菌 1 株，G(+) 球菌有 *Deinococcus* 3 株，*Staphylococcus* 1 株，共 5 株；G(-) 共有 7 株，其中 *Alcaligenes* 2 株，*Pseudomonas* 3 株，*Aeromonas*，*Vibrio* 各一株，保存時死亡 4 株，其中之弧菌屬僅佔 8.3%。屬之總數為 7 個，比較未放無節幼蟲前之數目，變動不大，亦未出現有特殊顯著優勢之菌種。

(2) Zoea I 期之菌相變化：

在 A 池 G(+) 已不復出現，取而代之的全為 G(-)，其中包括 *Kingella* 7 株，*Pseudomonas* 4 株，*Photobacterium* 3 株，*Plesiomonas* 及 *Moraxella* 各 1 株。在 B 池出現的亦同，僅出現 G(-)，包括有 *Acinetobacter* 13 株，佔 81.25%，成為優勢菌種，其餘為 *Kingella* 1 株及 *Proteus* 1 株，死亡一株。屬之總數在 A 池亦降成 5 個，B 池僅有 3 個，而且以 *Acinetobacter* 為優勢種。

(3) Zoea II 期之菌相變化：

A 池之 G(+) 再度出現，但僅兩屬 3 株而已，分別為 *Staphylococcus* 1 及 *Micrococcus* 2；餘為 G(-)，其中有 *Acinetobacter* 4 株，*Pseudomonas* 4 株，*Kingella* 2 株，*Neisseria* 1 株，*Vibrio* 1 株及 *Moraxella* 1 株。屬的總數增為 8 個，並未出現特別之優勢種，*Vibrio* 亦僅出現 1 株。

B 池 G(+) 重新出現，僅有：*Micrococcus* 1 株；G(-) 則有：*Pseudomonas* 3，*Kingella* 4，及 *Acinetobacter* 1 等。有 7 株在保存的過程中死亡。

(4) Zoea III 期菌相之變化：

A 池之 G(+) 重新出現，有 *Micrococcus* 4，*Deinococcus* 2 及一株酵母菌，G(-) 則有：*Pseudomonas* 2，*Neisseria* 2，*Alteromonas* 1，*Kingella* 1，*Edwardsella* 1 及 *Acinetobacter* 1 等，其屬的數目增為 8 個，而且並未出現 *Vibrio*。酵母菌之來源係投飼餌料中之添加物。菌株保存時死亡一株。

B 池之 G(+) 仍維持一屬二株，為 *Micrococcus* 2，而 G(-) 中，*Kingella* 有 9 株成為優勢種，其餘有 *Acinetobacter* 1 及 *Pseudomonas* 3 株，保存時死亡一株，屬的數目與前日比較變化不大。

(5) Mysis I 期菌相之變化：

A 池在此時之菌相變化十分大 G(+) 除了一株酵母菌外，其餘均為 G(-)。G(-) 則包括了：*Acinetobacter* 2，*Aeromonas* 2，*Vibrio* 則變成了優勢種，共有 11 株，佔採樣數之 68.75%。

B 池之 G(+) 稍為增加成 5 株，包括 *Micrococcus* 4 株，*Deinococcus* 1，另一株無法鑑定；G(-) 則包括 *Kingella* 1，*Pseudomonas* 2，*Moraxella* 2，*Neisseria* 2，*Flavobacterium* 3，菌株死亡兩株。屬之總數維持 9 個，*Vibrio* 未出現。

(6) Mysis II 期菌相之變化：

A 池之菌相與 Mysis I 比較，相差不多；G(+) 之菌均未出現，而全數為 G(-) 者，其中 *Alteromonas* 及 *Aeromonas* 各有一株，*Kingella* 3 株，*Vibrio* 的數量有 11 株，佔了 68.75%，與 Mysis I 期相同。

B 池之菌相亦起了很大的變化，G(+) 消失不見，G(-) 則有：*Alcaligenes* 1，*Aeromonas* 1，*Pseudomonas* 1，*Kingella* 2，*Vibrio* 的數量則提升至與 A 池相同有 11 株，佔 68.75%，一躍而成爲優勢菌種。

以上 A、B 兩池到 Mysis II 均已死亡而棄養。

(7) 蝦苗培育池 C 及 D 池水菌相之變化：

- (a) C 池 Zoea II 期之菌相：G(+) 只有 *Deinococcus* 1 株，其餘均爲 G(-)，其中包含有 *Pseudomonas* 2 株，*Acinetobacter* 1 株，*Vibrio* 4 株，*Kingella* 8 株，其屬的數目維持在 5 個，*Vibrio* 僅佔分析菌數之 25%。
- (b) C 池 Zoea III 期之菌相：G(+) 變化不大，僅有兩株，一株無法鑑定，爲 G(+) 長桿菌，另株爲 *Deinococcus*。餘爲 G(-)，包括有 *Enterobacter* 1，*Salmonella* 1，*Plesiomonas* 3，*Vibrio* 2 及 *Kingella* 7。屬維持 7 個，*Kingella* 爲優勢菌種，弧菌量不多，前者佔 43.75%，後者僅 12.5%。
- (c) C 池 Mysis I 期菌相變化：G(+) 仍然維持在 2 株，*Deinococcus* 2，G(-) 則有 *Edwardseilla* 1，*Yersinia* 1，*Kingella* 5，*Vibrio* 則提高爲 7 株，佔 43.75%，成爲優勢種。屬之總數維持在 5 個。
- (d) C 池 Mysis II 期之菌相變化：G(+) 全數消失；G(-) 包括了 *Pasturella* 1，*Shigella* 2，*Pseudomonas* 2，*Kingella* 9，*Vibrio* 2。此期屬仍維持在 5 個，此時弧菌的數量仍然不高。
- (e) C 池 Mysis III 期之菌相變化：同樣的 G(+) 消失不見，G(-) 的屬減爲 2 個，除了 *Kingella* 3 株之外，其餘的全數成爲 *Vibrio* 的天下，佔菌株數的 81.25%。
- (f) C 池 Post larvae I 時之菌相變化：G(+) 依然無法再生，G(-) 中有 *Plesiomonas* 1，*Phytobacterium* 1，*Kingella* 2，而 *Vibrio* 的數目卻突然降至 4 株 (25%)，取而代之的卻是 *Pseudomonas*，佔了 8 株 (50%)。因爲此時 C 池已棄養。

- (g) D 池 Post larvae II 時之菌相變化：G(+) 出現一株，為 *Micrococcus* G(-) 則有 *Edwardseilla* 1, *Salmonella* 1, *Haemophilus* 1, *Kingella* 5, 餘為 *Vibrio*, 共 7 株, 佔 43.75%。
- (h) D 池 Post larvae III 時之菌相變化：G(+) 消失, G(-) 中 *Kingella* 2, *Actinobacillus* 1, 其餘均為 *Vibrio*, 有 13 株, 佔採樣菌株標本數之 81.25%。

三、繁殖池池底細菌相之變動情形：

1. A 池 Zoea I 期池底之菌相變化：

此時之池底菌相中未發現有 G(+), 全部為 G(-), 其中 *Photobacterium* 1, *Kingella* 2, *Yersinia* 2, *Aeromonas* 2, *Vibrio* 2, *Pseudomonas* 為優勢種, 有六株, 佔分離菌株數之 37.5%, 弧菌佔 12.5%, 保存過程中死亡一株。

2. A 池 Zoea III 期池底之菌相變化：

此時 A 池池底菌相出現一株 G(+), 為 *Deinococcus*, 餘均為 G(-), 其中包括有 *Aeromonas* 1, *Neisseria* 1, *Salmonella* 1, *Vibrio* 2, *Kingella* 4, *Pseudomonas* 6, 其中以假單胞菌為優勢種, 弧菌量與 Zoea I 無差異。

3. A 池 Mysis II 期池底之菌相變化：

G(+) 已消失, 菌株全為 G(-), 其中包括 *Acinetobacter* 1, *Moraxella* 1, *Kingella* 2, 而其餘全為 *Vibrio*, 共有 12 株, 佔採樣數之 75%。

4. B 池 Zoea III 期池底之菌相變化：

G(+) 的菌株有一株為 *Rods*, 其餘為 *Planococcus* 2, *Deinococcus* 2, *Micrococcus* 5; G(-) 則僅包括 *Pseudomonas* 4 株而已, 故此時 B 池底為 G(+) 菌株佔優勢, 佔 62.5%。

5. B 池 Mysis II 期池底之菌相變化：

G(+) 全數消失, G(-) 包括有 *Photobacterium* 1, *Alcaligenes* 2, *Kingella* 4, *Vibrio* 9 株, 已增至採樣菌數之 56.25%, 變成了主要的優勢種。

6. C 池 Mysis II 期池底之菌相變化：

G(+) 全數消失，G(-) 包括有 *Photobacterium* 1，*Shigella* 1，*Pseudomonas* 2，*Kingella* 4，*Vibrio* 8 株，屬總數為 5，*Vibrio* 已增至採樣菌數之 56.25%，變成了主要的優勢種。

Table 7 : The isolated bacterial genus from water of brood stocking ponds.

A. The first day after spawners stocked.

Gram stain	Genus	Volume	Total	Vol./total(%)
+	<i>Gemella</i>	1	4	7.14
	<i>Deinococcus</i>	3		21.42
				28.57
-	<i>Haemophilus</i>	1	10	7.14
	<i>Pasturella</i>	1		7.14
	<i>Aeromonas</i>	1		7.14
	<i>Moraxella</i>	1		7.14
	<i>Kingella</i>	3		21.42
	<i>Vibrio</i>	3		21.42
				71.42

B. Water sample collected before spawners to move spawning pond.

Gram stain	Genus	Volume	Total	Vol./total(%)
+	<i>Deinococcus</i>	1	1	7.14
-	<i>Moraxella</i>	1	13	7.14
	<i>Kingella</i>	1		7.14
	<i>Pseudomonas</i>	1		7.14
	<i>Vibrio</i>	10		71.42
				92.85

討 論

一、總生菌數變化

1. 海水水源之總生菌數：在 1.0×10^3 到 4.7×10^3 間，是在整個繁殖過程中，菌數處在較低狀態的時候，而且其菌相之分佈以 *Pseudomonas* 及 *Kingella* 為優勢種，這兩種並非是甲殼類之主要病原菌，不過當海水進入了儲存池之後，雖然以 2 ppm 氯處理，但其屬的總數增加至 8 個，G(+) 球菌當主要優勢菌種，此是否意味繁殖場中隱藏之細菌種類較多，甚至也出現了弧菌 (*Vibrio*)，所以利用氯液來處理繁殖場，其持續效果是否真正有效值得商榷。

2. 在培育過程中水中總生菌數：ABC 三個池子中，從無節幼蟲起之 1.0×10^3 逐漸增加；以 B 池在眼幼蟲期 II, III 及 C 池在 Zoea III 之總生菌數達最高點，有 10^6 。對照死亡率，總生菌數往往在 Zoea II 期至 Mysis I 期時，達到高峰，而此時蝦苗也開始大量死亡，尤其以 Zoea III 期轉變 Mysis I (A 及 C 池) 或 Mysis I 轉變成 Mysis II 時 (B 池) 死亡率最高。圖一表示總生菌數與活存率之關係。

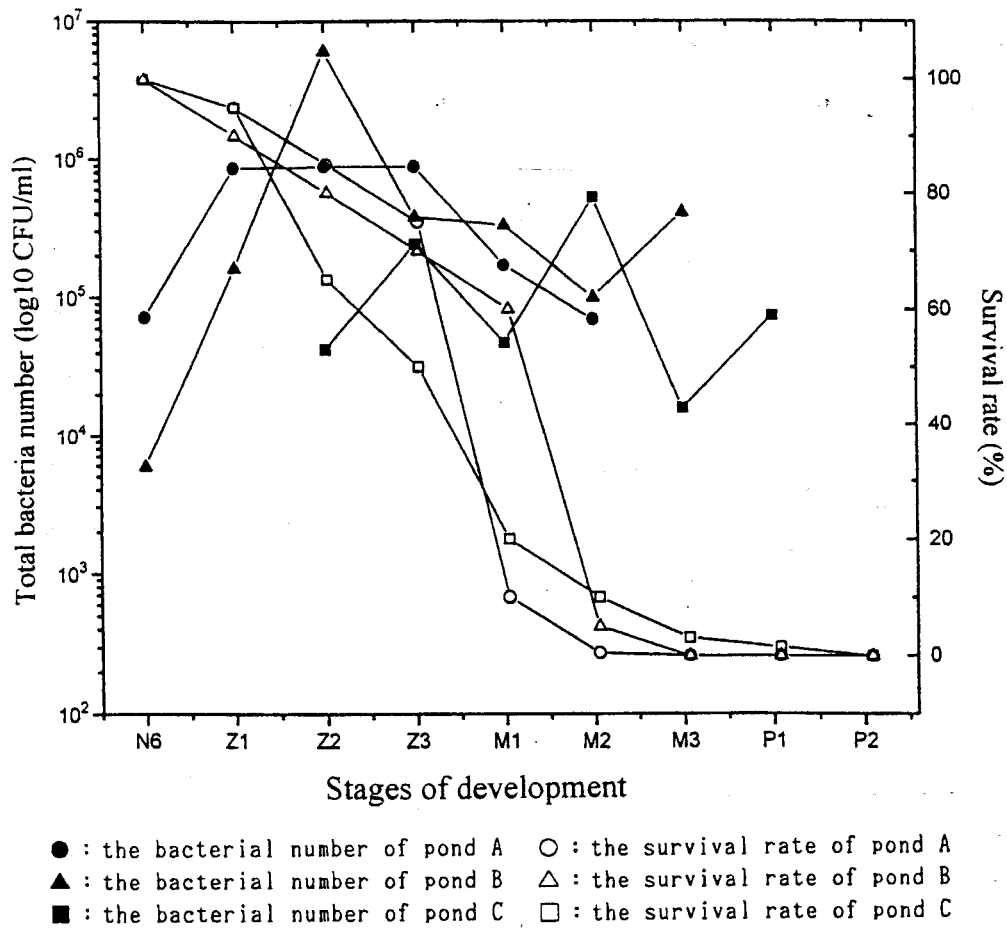


Fig. 1. The relationship between total bacterial number and survival rate.

有關總生菌數在前人之研究報告中，草蝦在 Nauplius 時之水中有 $1 \times 10^2 - 1 \times 10^5$ (Llobrera and Gacutan, 1977)，變化很大；而日本培育斑節蝦 (*P. japonicus*) 之水中總生菌數在 $1 \times 10^4 - 10^6$ ，變化也不少 (Igarashi, 1991)；在淡水蝦的孵化過程中，變化也不

小，在 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$ (Anderson et al., 1989)。總觀以上報告與此次研究結果，水中細菌總數大同小異，林園附近沙岸抽出之海水總生菌數在 $\times 10^3$ ；繁殖場內，無論種蝦池或經漂白粉處理過後的池水則在 10^4 ，增高了一些，繁殖過程中則如前述在 $1 \times 10^3 - 10^6$ 間，而池底沉澱物總生菌數則在 $1 \times 10^5 - 10^6$ 間變化，與水中無大差異。與國外蝦場比較，由東北亞到東南亞均相差無幾。不過與日本斑節蝦孵化場比較，其大量死亡變態期與本地草蝦不盡相同，是在 N 期轉變成 Zoea I 期死亡率最高 (Igariashi, 1991)。此可能與技術不同有關，本地繁殖技術多在 Zoea II 開始做「肥水」，自此投予各種不同品牌之高營養飼料，如蝦片等，所以才造成了 Zoea II 及 III 期時之總生菌數高居不下之故。

由圖二可以看出，蝦苗發生大量死亡時，其 G(+) 之菌株數往往下降到很低，相反的 G(-) 的數目會迅速的提升到 90% 以上，甚至 100%。至於池底沉澱物之菌相中屬 G(+) 或 (-)，則相同於水中所出現者，如在 A 池 Mysis II 期 G(+) 全部消失菌株全為 (-)；如 B 池在 Mysis II 期 G(+) 亦無，全為 G(-)。Llobrea 及 Gacutan (1977) 所做的 Nauplius 期之菌株，亦以 G(+) 所佔的比例較高，有 76%；G(-) 則佔 24%。淡水長臂大蝦繁殖場之水中 G(+) 平均佔 31%，G(-) 則佔 59.4%，沉澱物 G(+) 僅佔 8.8%，餘均為 G(-) (Anderson 等, 1989)，結果亦和此次研究相同：G(+) 將會逐漸消失，而由 G(-) 取而代之。

二、 G(-) 的菌株中所含 *Vibrio* 的比例與蝦苗死亡率的關係

在本次研究中我們亦發現當蝦苗發生大量死亡之時，往往水中或池底沉澱物中的弧菌所佔比例有增加的趨勢。由圖三可以看出，蝦苗發生大量死亡之時，弧菌佔的比例均超過了 68.75%，只不過 4 個試驗池最初發生的期別不同，如 A 池在 M I 期，B 池在 M II 期，C 池在 M III 期，D 池棄養前亦超過了 81.25%。因此，蝦苗的死亡與弧菌之發生有十分密切的關係，而且與糠蝦期開始大量投飼人工餌料也有關係。

由圖四更可以了解各期蝦苗發生大量死亡時與弧菌的發生量有十分密切的關係。

三、 蝦苗池底沉澱物弧菌發生之變化

與水中發生情形極為類似，以 A 及 B 池為例，在 Mysis II 期分析弧菌的百分比分別在 56.25% 及 75%。雖然 Mysis I 時池底沉澱物並未分析，但相信與水中情形類似。發生大量死亡的池子，池底沉澱物中 *Vibrio* 含量業已提高。

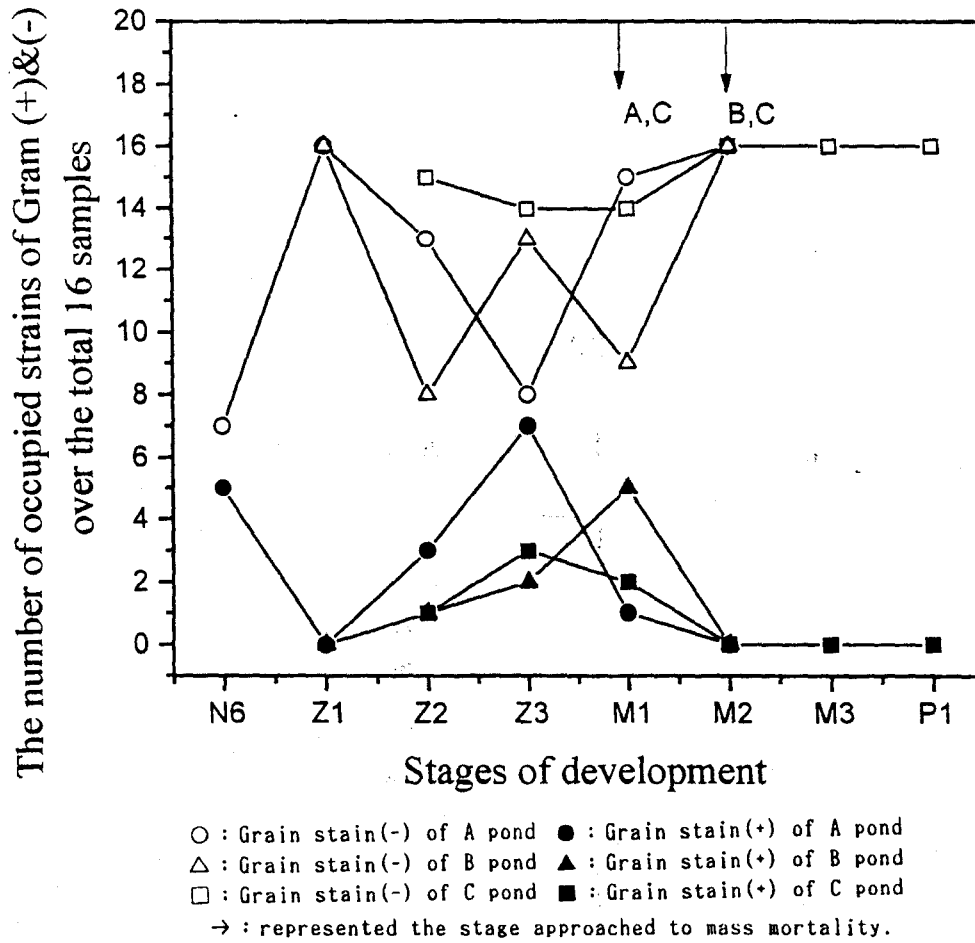


Fig. 2. Mass mortality occurred at different developing stages of *P. monodon* larval depended on appeared Gram stain positive or negative volume of bacterial strains.

不過，在 Anderson (1989) 所做淡水長臂大蝦之人工養殖時，分水與底部析沉澱物之菌相時指出，水中之弧菌僅佔 3.2%，而沉澱物中高有 13.6%，蝦苗體內則更高有 25%，此是否意味水中弧菌量與池底污物所含的無關？但我們要說明，安氏的採樣方法是不定點或不定時，故很難做連續比對及探究其菌相之每日變化。不過倒可以證明池底污物和蝦苗體內的弧菌量都很高。

在本次研究中，D 池在 Mysis III 轉變成 Post larva 時，爲了提高水中溶氧量而將打氣增大，此時往往將池底的污物滾動而揚至水體中，此時蝦苗即靠這些沉澱物的顆粒做爲餌

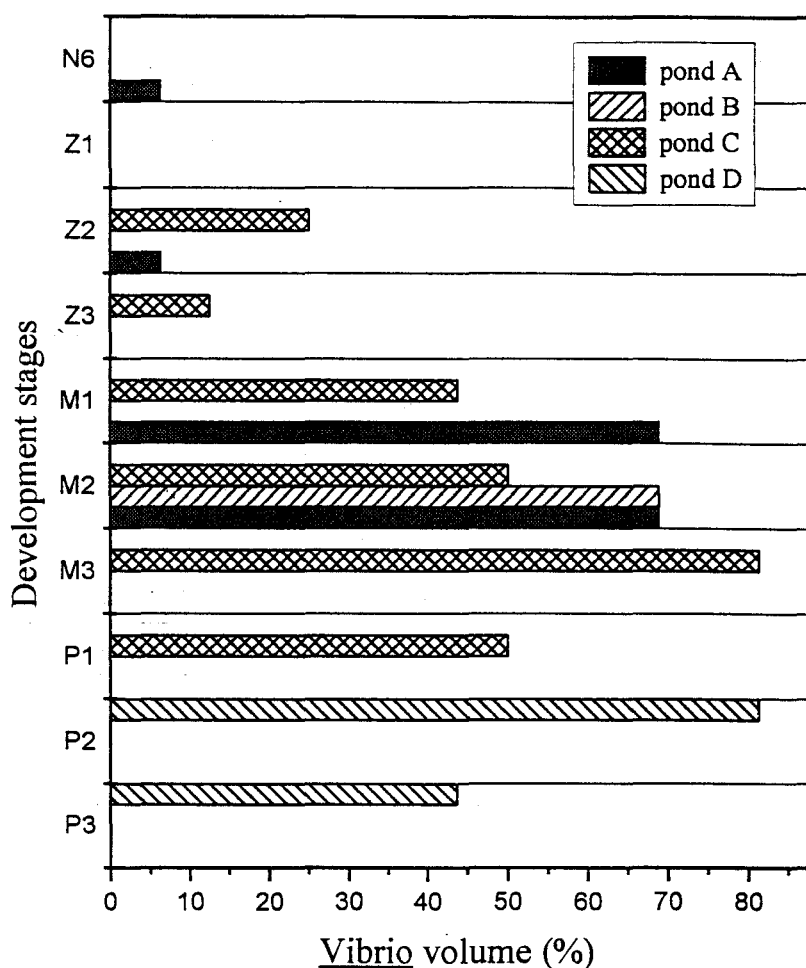


Fig. 3. The genus of *Vibrio* occupied over percentages (%) within the total genera of heterotrophic bacteria at different developing stages in *P. monodon* hatching system.

料，依此次試驗結果，如其中含有高量弧菌，且為病原菌，則後期蝦苗之死亡是可以預料得到的。

此外，我們討論的是，做肥水時是從 Zoea II 期開始，不過往往從 Mysis I 開始有兩種重要的現象發生，其一即是水中已有輪蟲產生 (Rotifer)，其二是蝦苗身體表面逐漸有棉絮狀污物粘附 (即所謂鬚腳)。輪蟲可以說是 Mysis 期主要的餌料，所以輪蟲品質數量的好壞直接影響了魚蝦幼苗的活存率 (Madea and Hino, 未發表)，而 Suzuki *et al.*, (1990) 指出，輪蟲帶有病原性弧菌，而影響蟹苗的存活率。本次研究顯示水中弧菌量增高即在 Mysis 期，咸信水中的有機粒子 (Organic particles) 亦粘附了許多病原性弧菌，輪蟲

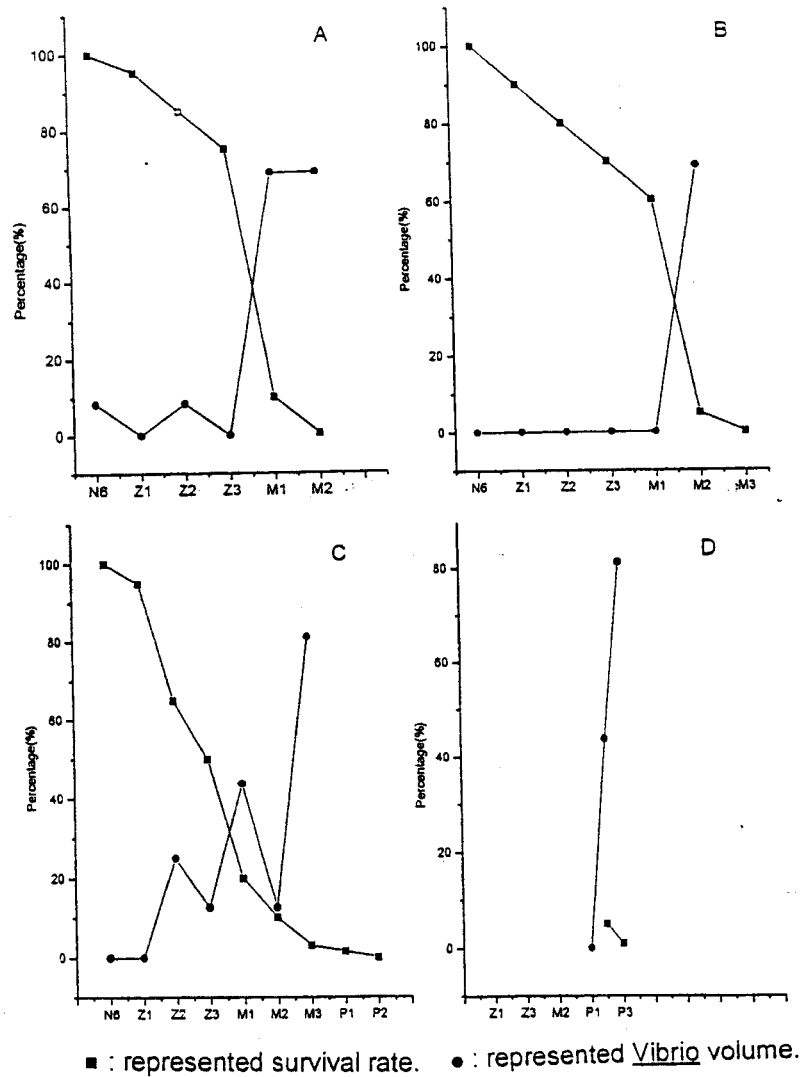


Fig. 4. The survival and *Vibrio* volume rate on different hatching stages of *P. monodon*.

卻以此有機粒子為食，蝦苗體內自然吃入不少病原性細菌。同時，Yamanoi (1990) 指出每小時換水之後，弧菌之數量不會減少，反而是其他異營性細菌之 *Pseudomonas* 及 *Moraxella* 減少了，所以換水反倒使輪蟲之活性降低了。因此，當蝦苗變態到 Post larvae 以後，少量的流水方為正確的處理方法。

當蝦苗發生大量死亡之時，體表均會沾附污物，有關此點 Lewis et al., (1982) 指出，導致藍蝦 (*P. stylirostris*) 人工孵化的蝦苗體表粘附污物的主要細菌有三種，包括 *Pseudomonas piscicida*, *Aeromonas formicans* 及 *Flavobacteria* sp., 而且只要水中達到 10^4

l/ml 即會發生此一現象。在本次研究中，上述三種菌屬均曾在蝦苗發生污物粘附的現象時出現，但這些菌種並非為當時之優勢種，因此吾人認為蝦苗發生大量死亡之時，乃是因為蝦苗被病原性弧菌感染後，無法正常攝食，脫殼及變態，才導致體表發生粘附污物之現象。

最後我們要討論的是病原性弧菌由何處而來？本次研究顯示，剛從海邊沙層中抽出來的大海並沒有弧菌，海水儲存池雖經漂白粉處理過，仍出現弧菌；種蝦繁殖池之種蝦及池水，所含的弧菌量都非常高。其次的可能為蝦苗各期所投飼的餌料，如眼幼蟲期為矽藻，矽藻並未分析菌相，不過 Zoea I-II 並未發生大量死亡情事，其次為 Mysis 期之蝦片，這些蝦片均經高溫處理過再封罐保存，弧菌之滯留及污染機會亦不大。

最後一個來源即是從 Z III 或 M I 期開始投飼之豐年蝦 (*Artemia*)；當蝦苗開始發生死亡時，也可能正是我們投飼豐年蝦無節幼蟲之時，Austin and Allen (1982) 分析了舊金山灣牌 (San Francisco Bay Brand) 之耐久卵。孵化期間，在卵的表面分離出 *Vibrio parahaemolyticus* (1/190) 及在孵化出來的無節幼蟲體表分離出 *Vibrio* sp. (1/190)，但在其體內並未分離出弧菌。另外，Colomi (1985) 指出，在淡水長臂大蝦的腸道中主要分離出來的菌株為 *Aeromonas liquefaciens* 及 *Vibrio auguillarum*，而豐年蝦體內卻沒有這兩種菌，所以他認為淡水蝦苗所帶的這些病原菌是一種原發性的 (Autochthonous)，而且是十分穩定的 (Homeostatic)，並不會隨著食物而改變。就本次研究來看，吾人並不否認蝦苗自種蝦池會帶菌入池，但因為草蝦苗飼養的方式與柯氏僅投豐年蝦給予淡水蝦苗的方法而言，其對蝦池內菌相之影響自然不可同等而語了。而且本次研究所用的豐年蝦耐久卵在孵化前均用氯處理過，此番抑菌結果亦可提高孵化率及減低病原性細菌的附著。但是豐年蝦耐久卵帶有弧菌可由上述報告可以得知，這些病原菌有可能隨著環境的改變而成為優勢種。

因此弧菌的來源，仍以母蝦為最主要的帶原者，其次就是繁殖場本身所隱藏無法殺滅著。

謝 辭

本研究報告承蒙行政院農業委員會補助計劃 (82 科技-2·11- 漁 05(1)) 給予經費上的支援，及三合水產種苗繁殖場的負責人張啓清先生在各方面的的大力支持與協助。

參 考 資 料

- 林勇助、陳秀男。1993。母蝦變紅症之研究。(投稿中)
- 林清龍、吳慶麗、丁雲源。1988。草蝦、紅尾蝦、蟳人工繁殖期間水中之細菌數。省水產試驗所研究報告, 44:233-238.
- 鍾忠勇、陳幸臣。1977。外銷冷凍蝦肉質變敗防止方法研究(I)—肉質變敗原因之探討。科學發展月刊, 5(6):534-541.
- 農產貿易統計要覽。1988。行政院農業委員會。
- 蝦類養殖池環境調查及改養研究。1991。蝦池環境研究與改善研討會論文集, 農業委員會漁業特刊第28號。
- Anderson, I.G., M.N. Shamsudin and G. Nash (1989) A preliminary study on the aerobic heterotrophic bacterial flora in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, hatcheries in Malaysia. *Aquaculture*, 81:213-223.
- Austin, B. and A.D. Allen (1981) Microbiology of laboratory Hatched brine shrimp (*Artemia*). *Aquaculture*, 26:369-383.
- Colorni, A. (1985) A study on the bacterial flora of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, larvae fed with *Artemia salina* nauplii. *Aquaculture*, 49:1-10.
- Gennari M. and S. Tomaselli (1988) Changes in aerobic microflora of skin and gills of Mediterranean sardines (*Sardina pilchardus*) during storage in ice. *Intl. J. Food Microbiol.*, 6:341-347.
- Heinsz L. J., Harrison M.A. and Leiting V.A., 1988. Microflora of brown shrimp (*Peneus aztecus*) from Georgia coastal water. *Food Microbiol.*, 5:141-145.
- Igarashi, M.A., S.F. Romero and J. Kittaka (1991) Bacteriological character in the culture water of Penaeid, Homarid and Palinurid larvae. *Noppon Suisan Gakkaishi*, 57(12):2255-2260.
- Kawabata, T., T. Mizukami, R. Ohara and J. Shinohara (1975) Microbiological quality of frozen shrimps imported from tropical areas. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 41(6): 667-674.
- Lee, J.S. and D. K. Pfeifer (1977) Microbiological characteristics of Pacific shrimp (*Pandalus jordani*). *Appl. Environ. Microbiology*, 33:853-859.

- Lewis, D.H., J.K. Leong and C. Mock (1982) Aggregation of penaeid shrimp larvae due to microbial epibionts. *Aquaculture*, **27**:149-155.
- Llobrera, A.T. and R.Q. Gacutan (1977) Bacteria from sea water used in *Peneaus monodon* larval cultures. Quarterly Research Report, Aquaculture Department, SEAFDEC, **1(2)**:38-40.
- Maeda M. and A. Hino. Environmental Management for mass culture of rotifer, *Brachionus plicatilis*. (未發表)
- Suzuki, K., K. Muroga, K. Nogomi and K. Maruyama (1990) Bacterial flora of cultured swimming crab (*Portunus trituberculatus*) larvae. *Fish pathol*, **25**:29-36.
- Vanderzant, C., E. Mroz and R. Nickelson (1970) Microbial flora of Gulf of Mexico and pond shrimp. *J. Milk Food Technol.*, **33**:346-450.
- Yamanoi H., T. Odax and K. Ukida (1990) Growth response of *Vibrio*, *Pseudomonas* and *Moraxella* in rotifer (*Branchinus plicatilis*). *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56(3)**:461-466.
- Zuberi R., S.I. Shamsad and R.B. Qadri (1987) Effect of elevated temperature of storage on the bacteriological quality of tropical shrimp (*Peneaus merguensis*). *Pak. J. Sci. Ind. Res.* **30(9)**:695-699.

Studies on the Flora Variation of Heterotrophic Bacteria in Giant Tiger Prawn (*Penaeus Monodon*) Hatchery

Wen-Yu Liu Shiu-Nan Chen and Guang-Hsiung Kou

Department of Zoology, National Taiwan University

The total bacterial number of water source, sampled from 5 meters depth of sandy bottom of seashore at Lin-Yuan district, was demonstrated to be 10^3 (CFU/ml). Although seawater treated by 2ppm chloride and aerated for 24 hours, the CFU/ml number were elevated to 10^4 . In the rearing ponds, with larvae ranging from nauplius VI to post-larvae stages, showed CFU/ml number of $10^3 \sim 10^6$. In early stages, the CFU number was maintained at low level but at mid-stages, CFU number increased suddenly to peak that was 10^6 which it appeared on stages of Zoea II and Mysis. Meanwhile, mass mortality also occurred coincidentally as same as those stages.

Aspect of bacterial flora variation, *Vibrio* was not discovered from seawater source, otherwise, very few number of *Vibrio* existed in stored pond water. However, the *Vibrio* volume was elevated to 71.4% in spawners stocked pond. At prior stages the major bacterial flora intended to appear Gram positive strains, but after Zoea III stage, the Gram negative bacteria had to become the main strains of which the *Vibrio* were turned into dominant species. It was 68% occupied from sampled strains.

Both water body and sediment possessed the high *Vibrio* volume including on three stages of Mysis.