

民國七十八年三月十七日 台灣省水產試驗所與行政院農業委員會漁業處、
台灣省漁業局合辦「養殖環境及魚類異味改善」研討會論文集143~159頁

屏東地區鰻池放射菌與草蝦池細菌相之研究

Studies of the off-flavor compounds and the dynamics of bacterial population in fish ponds of Pingtung area

黃文瑛，葉寶蓮

國立屏東農業專科學校，農業化學科

Abstract

Several studies indicated that Actinomycetes could produce geosmin, methylisoborneol or sesquiterpenol and caused muddy odor in fish. This study was conducted to investigate the relationship between Actinomycetes and muddy odor production. Five of the Actinomycetes isolated from eel ponds were studied, the tentative results showed that they could not produce methylisoborneol, but might be able to produce geosmin or sesquiterpenol.

The changes of the major and minor bacterial species in Grass shrimp ponds were also investigated. The results showed that even in the same area and the same month, different ponds still have different bacterial species, the major and minor bacterial species varied significantly with the seasonal change in the same pond.

前 言

屏東地區養殖之鰻魚常因魚體帶有泥土味而導致外銷冷凍廠拒收或降價求售之現象，使養殖業者蒙受重大之損失。泥土味之發生⁽¹⁾可能係由於養殖環境管理不當，池底堆積排泄物及飼料殘渣等，造成養殖池中有利於能產生泥土異味化合物之放射菌^(5, 8, 9, 14)或藻類^(11, 13, 16)生長所引致。目前已知具泥土味之主要化合物為 geosmin^(7, 8, 10, 17, 18)，2-methylisoborneol^(5, 7, 10, 18)及 mucidone⁽¹⁴⁾等，其中又以 geosmin 為最常見，每100克魚體內若含有超過0.6微克 geosmin 時，即可嚐出魚之泥土味。本研究乃欲分離鰻池土及水之放射菌，並探討其是否會產生具泥土味之化合物。

有鑑於屏東地區蝦類養殖面積日益增加，草蝦之外銷已為國家賺取大量之外匯，但是相對的卻對養殖池內微生物相的認識與瞭解相當少^(2-4, 15)為了對草蝦池水之微生物相及其變化有一全盤之瞭解，本計畫在75及76年度選擇八項細菌生理試驗，用以追蹤蝦池水中細菌族羣之消長狀況，77及78年度針對池中之主要及次要細菌進行75項細菌生理及生化試驗，將來擬採用數值分析法（numerical taxonomy）來鑑定蝦池水中主要及次要之細菌種類。此外，78年度亦同時進行草蝦及龍蝦池水之衛生條件檢驗，以評估其水質之污染情況。

材料與方法

(1) 鰻池放射菌之分離純化與培養

由鰻池土及水中利用分離培養基（2% agar 或 starch agar）分離放射菌，經多次純化後，配合感官方法選取具泥土味之菌株，在 yeast malt extract broth 中 30℃ 下大量培養之。每 8 公升之培養液經萃取、濃縮純化後，進行泥土味物質之分析。

(2) 泥土味物質之分析檢測

將 8 公升之培養液依 Gerber[®] 等人之方法進行蒸餾，二氯甲烷萃取（或 XAD-2 樹脂吸附及溶出）再濃縮至乾，以少量溶劑溶解之，注入氣相層析儀中進行分析。

氣相層析儀為日本 Shimadzu GC-7A，管柱長為 4 公尺，以 15% DEGS on Uniport B (mesh 80/100) 填充管柱。最初溫度為 70℃，以每分鐘上升 5℃ 之速度達到最終之 190℃。注射溫度為 200℃，以離子火焰偵測器（FID）來檢測泥土味化合物。

此外，濃縮物以二氯甲烷溶解後，亦依 Gerber[®] 之方法，先流經 Al₂O₃ 管柱以去除雜質，收集得之液體 30ml 再流過矽膠質管柱（矽膠先溶於二氯甲烷中），按體積分別收集不同部份之流出物（依序為前 60ml，10ml，10ml，10ml，10ml 及 50ml），各流出物分別濃縮並注入氣相層析儀中進行分析。

Geosmin 標準品係來自美國環境保護局，methylisoborneol 係由東海大學閻立平教授贈送。

(3) 蝦池水之細菌族羣分布調查

74 年 10 月至 75 年 7 月調查兩個草蝦池，其一為沙質地（已養殖 6 年），另一為水泥磚牆質（已養殖 10 年），每月採水一次，除了分析總生菌數及大腸桿菌羣數外，樣品在 1/5 強度之 TSA (tryptic soy agar) 做塗抹培養，在 25℃ 培養 48 小時後，每一樣品以系統法抽樣 50 個菌株，經純化培養後，分別移至含 1/5 TSB 的 microtiter plate，於 25℃ 培養 24 小時後，做下列生化試驗⁽¹²⁾：catalase, gelatin hydrolysis, lipase, oxidase, phosphatase, simmon's citrate, starch hydrolysis, urease 及 Gram stain, 其中 starch hydrolysis, catalase 及 gelatin hydrolysis 於 30 小時後讀結果，其餘則於 5 天後讀結果。

(4) 蝦池水中主要及次要細菌之生理及生化特性測定

在屏東地區選四個草蝦池，76 年 11 月至 78 年元月，每月採水一次，在含 2% NaCl 之 1/5 強度 TSA 上做塗抹培養，25℃ 下培養 72 小時後，測定總生菌數，並挑選主要（整個培養皿內出現頻率最高或在更高倍稀釋下仍存在之菌種）及次要（出現頻率較低及外表性狀不同之各種細菌）之細菌，分別做純化培養。純化後之細菌培養 24 小時後，進行菌落外型及微細內部構造觀察、生化試驗、溫度生長試驗、特殊培養基生長試驗、特殊物質分解試驗及不同物質之利用試驗等 75 項生理及生化試驗⁽¹²⁾。詳見表一。

(5) 蝦池水之衛生條件檢驗

77 年 7 月至 78 年元月，每月採草蝦池水（4 池）及龍蝦池水（2 池），分別進行總生菌數、大腸桿菌羣數、孢子數、酵母與黴菌數、糞便性大腸桿菌羣數、糞便性鏈球菌數、沙門氏菌及霍亂弧菌之檢驗⁽¹³⁾。

表一 菌株進行之生理試驗

Colony morphology	cream-white, opaque, yellow, orange, pink-red, diffusible brown pigment.
Micromorphology	G (+), motility, spore, rods.
Biochemical test	oxidase, catalase, fermentative metabolism, oxidative metabolism, Arginine decarboxylase, Lysine decarboxylase, Ornithin decarboxylase, H ₂ S, Indole production, MR, VP, Phenylalanine deaminase, Nitrate reduction (NO ₃ -- NO ₂), β-galactosidase, phosphatase, Antibiotic : 0/129, Urease, Simmon citrate.
Growth at	4 °C , 30°C , 37°C , 42°C.
Growth on	TCBS (yellow,green), MacConkey agar, Nacl (4% , 5% , 6% , 7%)
Degradation of	blood, casein , DNA , gelatin , starch , Tween 20. Tween 80.
Utilization of	Adonitol, Cellobiose, meso-erythritol, Fructose, Galactose, Glycerol, P- Hydroxybenzoic acid, meso-Inositol, Inulin, Lactose, Maltose, Mannitol, Mannose, Raffinose, Ribose, Sorbitol, Sorbose, Sucrose, Trehalose, Xylose, Sodium acetate, Sodium benzonate, Sodium citrate, Sodium formate, Sodium glutamate, Sodium malate, Sodium malonate, Sodium pyruvate, Sodium succinate.

結 果

(1) 具泥土味物質放射菌之篩選

鰻池土及水中挑得之放射菌，經多次純化後，以感官方法選取產生泥土味較濃之菌種 5 株，將其大量培養後，每 8 公升之培養液進行泥土味物質之分析。

(2) 泥土味物質之分析檢測

放射菌培養液進行蒸餾、萃取、濃縮後，直接注入氣相層析儀中，或濃縮物先經 Al₂O₃ 純化，再經矽膠管柱分離得之不同部份 (fraction)，分別濃縮後再進行分析。結果發現，若欲產生積分儀可積分之可偵測高峯 (peak)，一定要用 8 公升之培養液方能達到足夠之濃度，若只採用 4 公升之培養液，則幾乎無法產生有意義之高峯，因此所有實驗均以 8 公升培養液進行之。

放射菌株培養液之濃縮物若直接注入氣相層析儀中檢測，其雜質多，干擾大，不易判讀其中之主要物質，而經過 Al₂O₃ 純化，再經矽膠管柱分離之各部份，濃縮後注入氣相層析儀之效果較佳。實驗結果顯示，本研究所使用之 geosmin 標準品濃度太稀，無法在本實驗之氣相層析儀系統中檢測出。methylisoborneol (MIB) 在本實驗之分析條件下，滯留時間 (retention time) 為 8.15 分，但 5 株放射菌株之培養液均不含滯留時間為 8.15 分之物質，表示鰻池挑得之放射菌所產生之泥土味物質均不是 MIB，因此推判其產生之泥土味物質可能為 geosmin 或 sesquiterpenol 等。由於沒有 sesquiterpenol 標準品，所以無法進一步決定此等泥土味化合物之種類。

(3) 蝦池水之細菌族羣

草蝦池水之菌株，進行八項生化試驗，結果發現其中之細菌族羣變化相當大，它除了隨著溫度、季節而變動外，不同型態之養殖環境，亦有不同的細菌型態及消長之現象。由於沒有現場泥土味之調查數據相配合，因此無法歸納出何種特殊生理試驗之細菌族羣與泥土味之發生具有相關性。

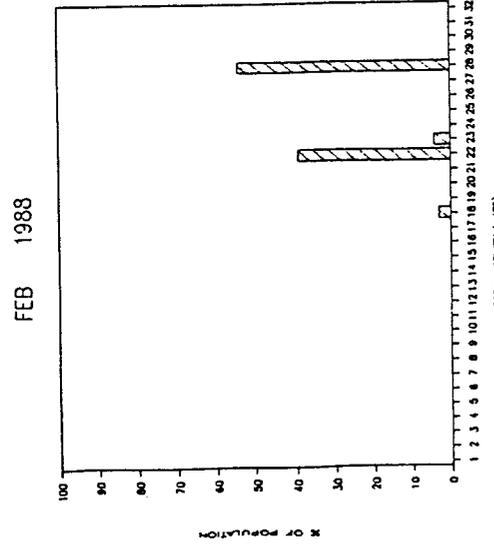
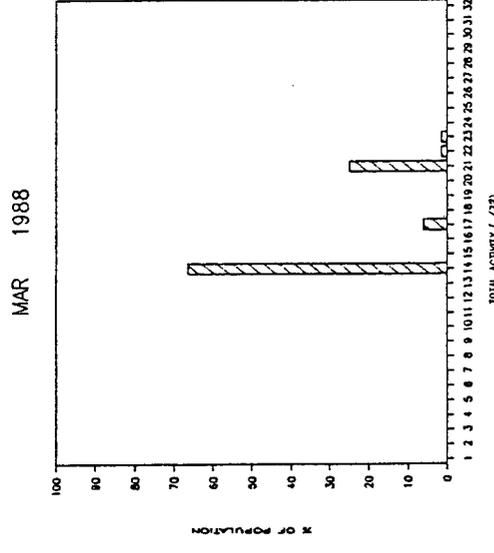
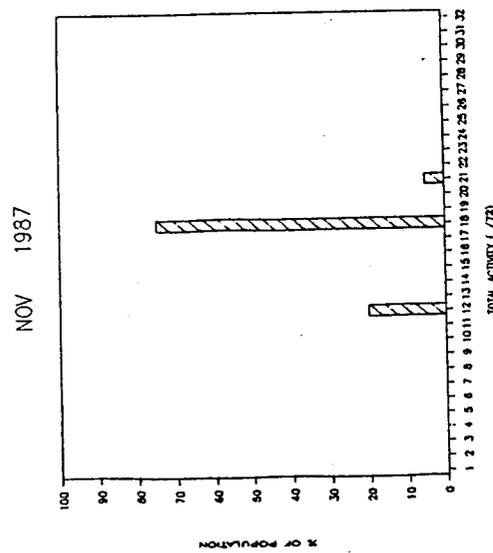
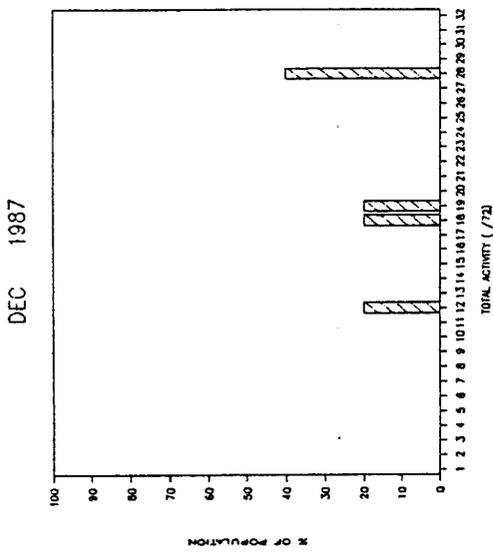
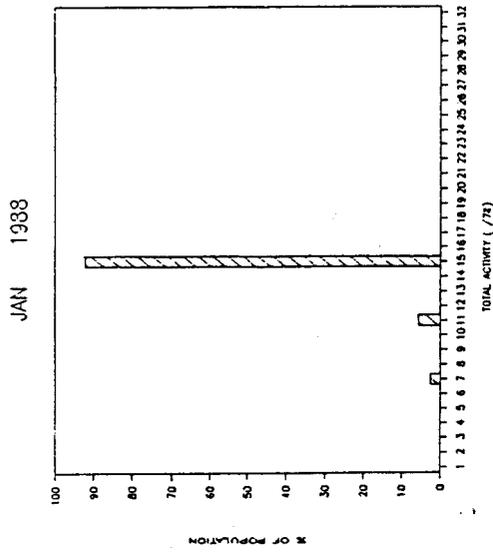
(4) 蝦池水中細菌之生理及生化特性測定

屏東地區之四個草蝦池水，挑得之主要及次要菌株，均進行75種特性測定。由於時間過於短促，目前尚無法配合標準菌株之特性及電腦軟體，利用數值分析法進行細菌種類之鑑定，因此乃將本研究之結果暫時以總活性（total activity）表示之，即75種特性試驗中，菌株呈現陽性反應之總數，表示為其總活性。例如菌種A在75種試驗中，有30件呈陽性反應，則表示其總活性為30（橫座標），而縱座標則表示菌種A在特定蝦池中，特定時間下在總細菌數中所占之百分率，因此柱狀圖中，最高者為該池中之主要細菌種類，其他則為次要細菌。

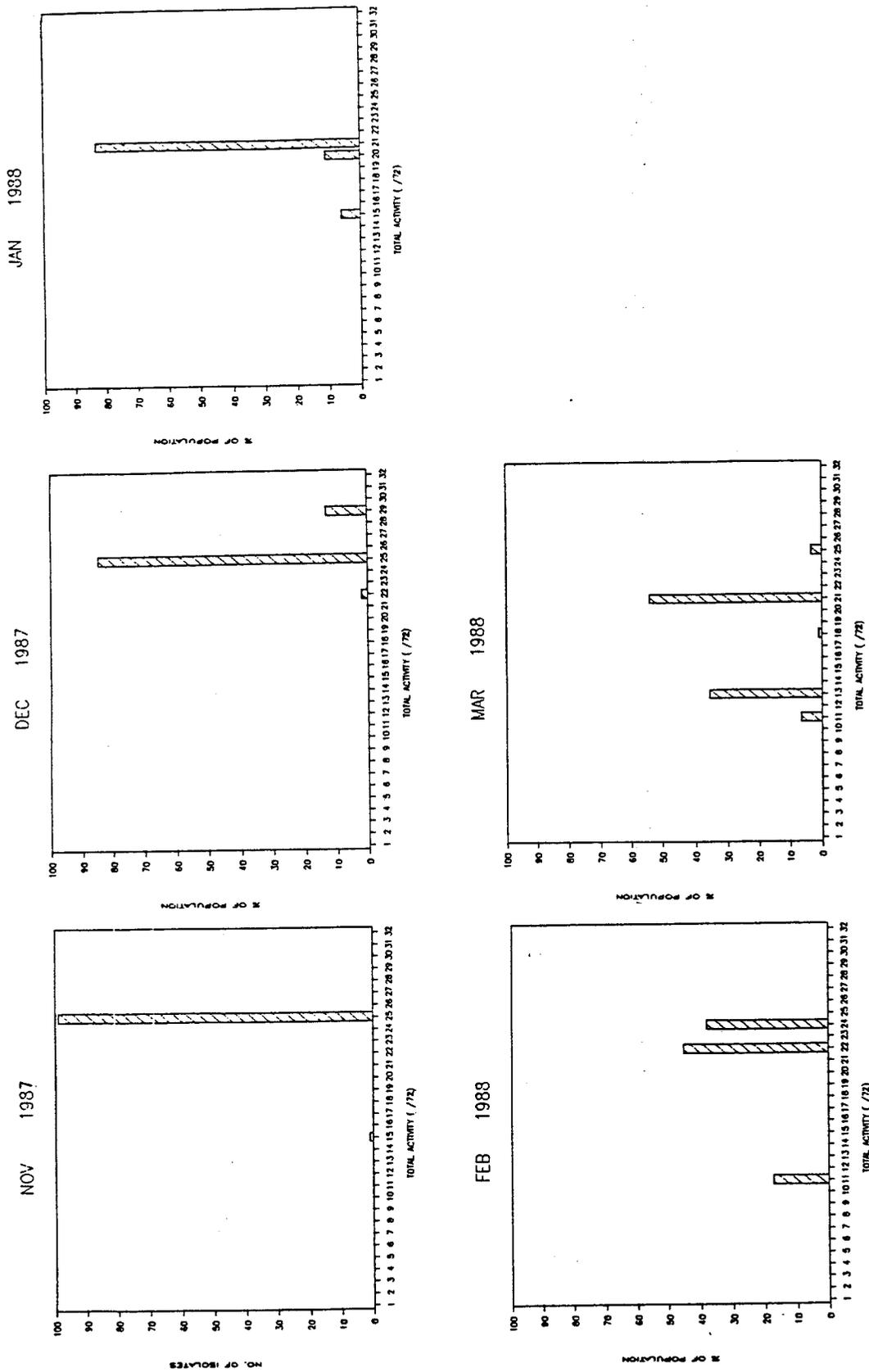
結果顯示蝦池水中之細菌種類隨著時間而有相當大之變化，不同蝦池在不同月份之細菌特性分別示於圖一至圖八。

(5) 蝦池水之衛生條件

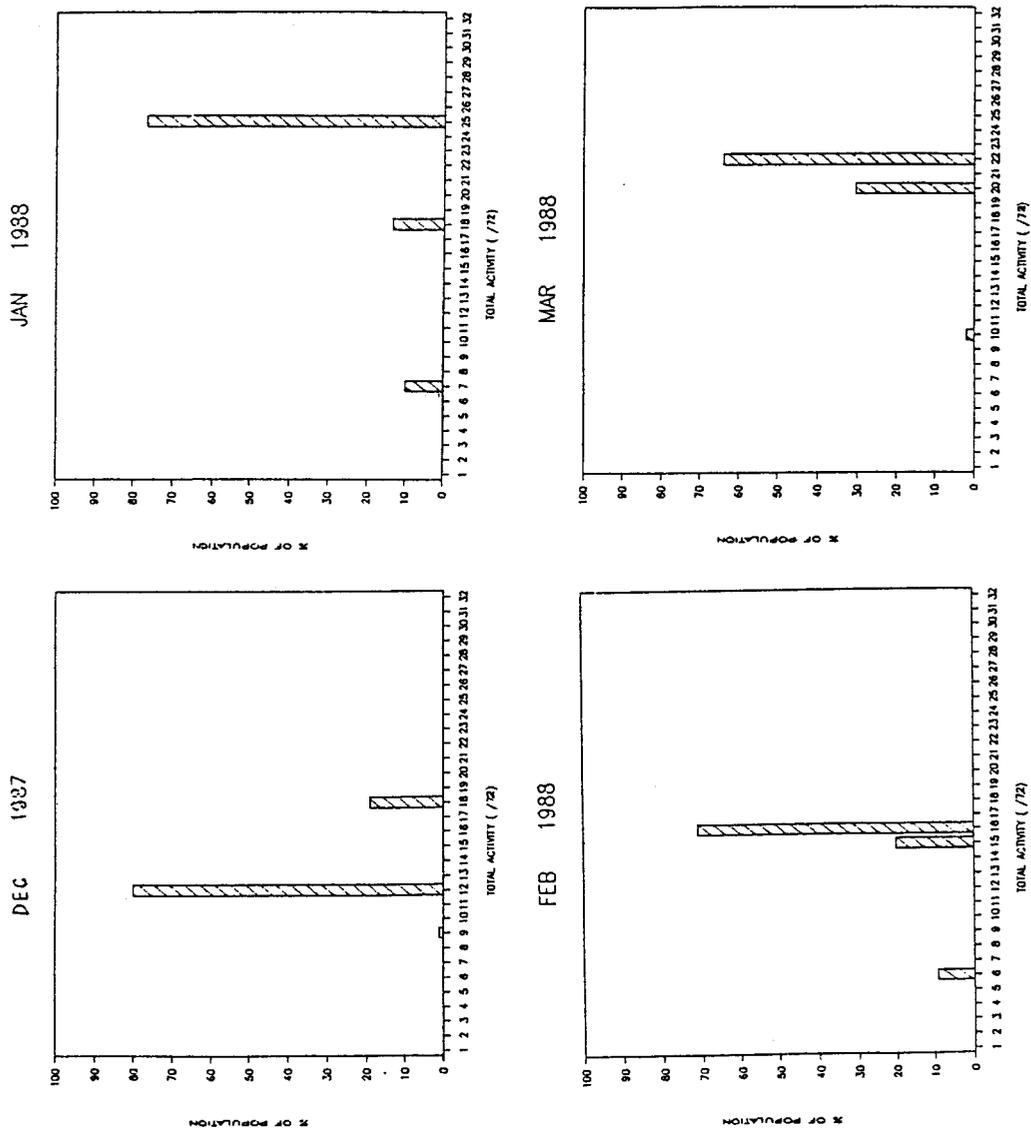
草蝦及龍蝦池水之衛生檢驗結果示於表二、表三及表四所有蝦池水在77年8月至78年1月間均未受沙門氏菌及霍亂弧菌之污染，而龍蝦池水除了77年11月及12月之總生菌數及糞便性鏈球菌偏高外，其他月份差異不大。此外，結果亦顯示77年11月之草蝦及龍蝦池水之糞便性大腸桿菌及鏈球菌之污染較為嚴重。



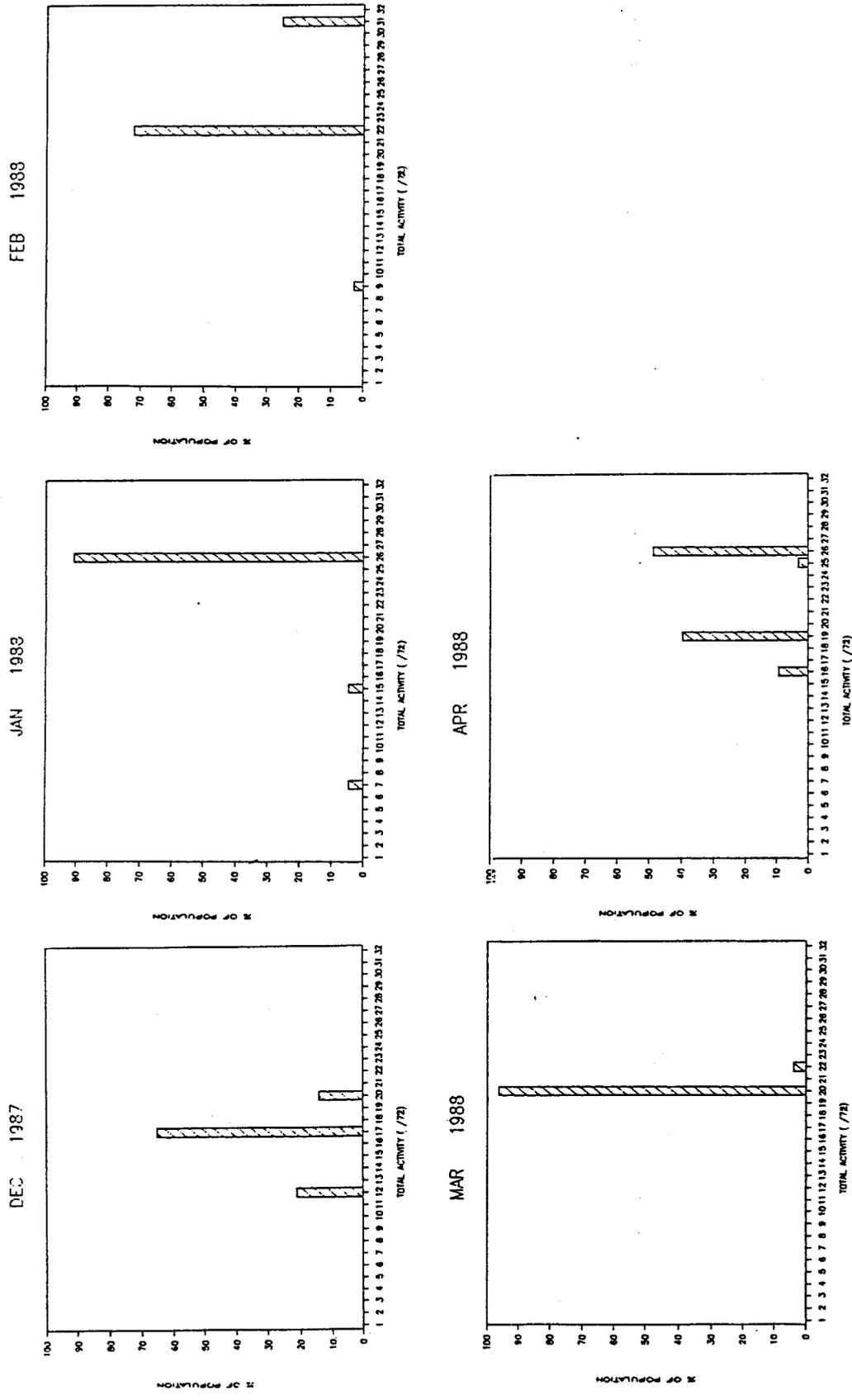
圖一 枋寮黃先生(-)草蝦池(側邊排水)之菌相



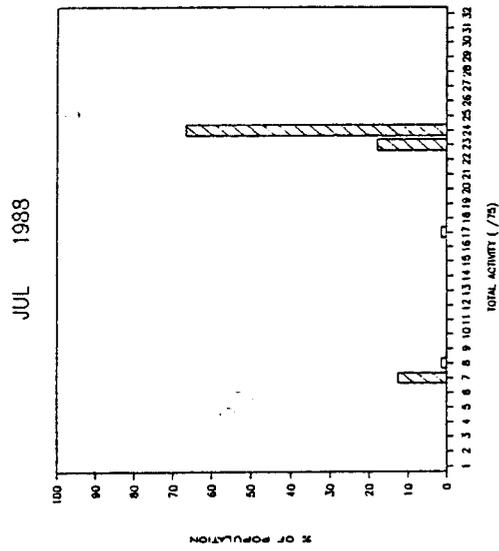
圖二 枋寮黃先生(○)草蝦池(中央排水)之菌相



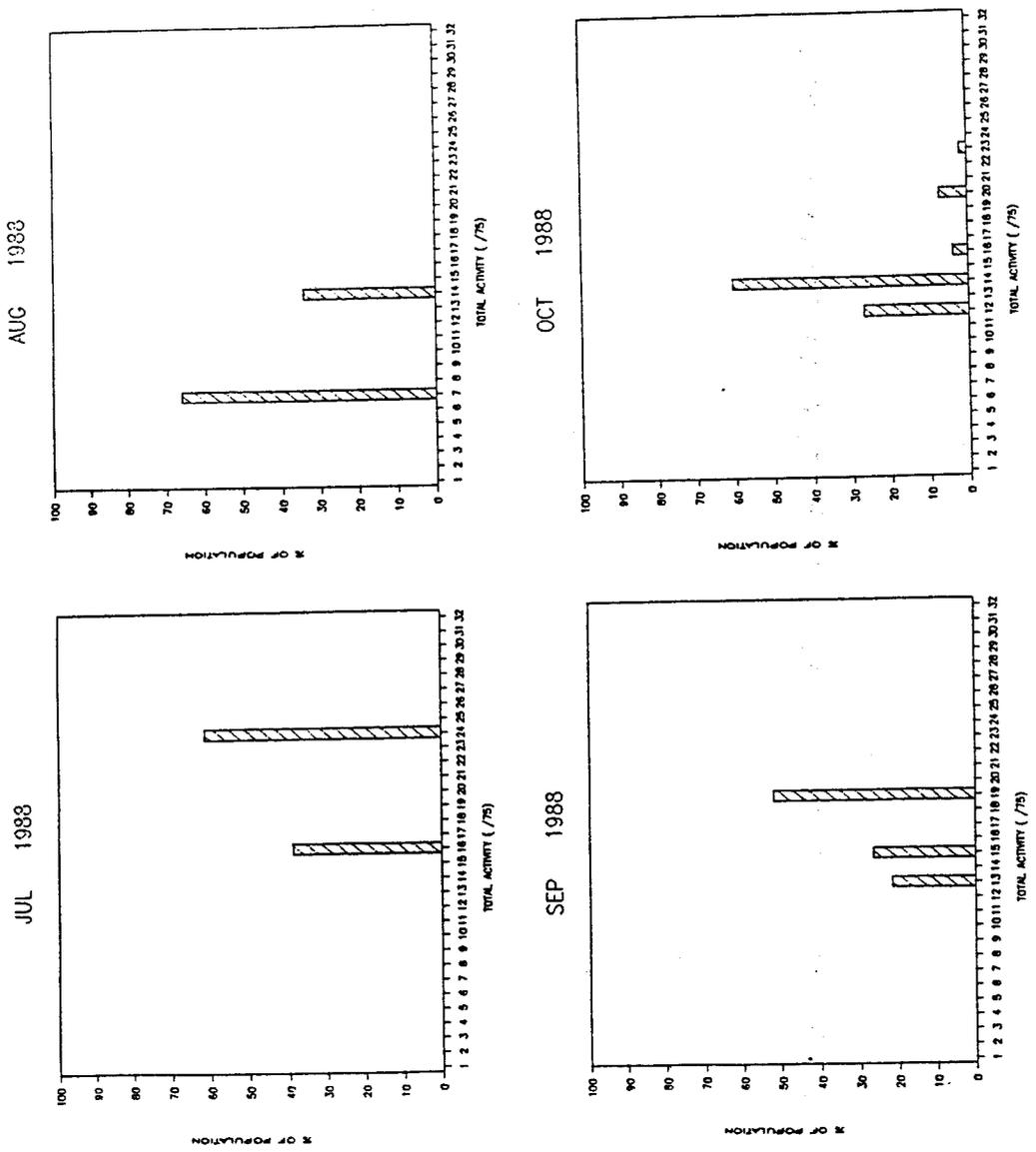
圖三 佳冬周先生草蝦池 (側邊排水) 之菌相



圖四 佳冬吳先生草蝦池（中央排水）之菌相

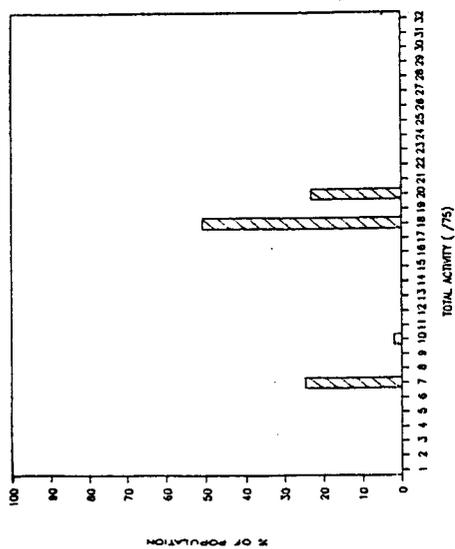


圖五 林邊劉先生(-)草蝦池水之菌相

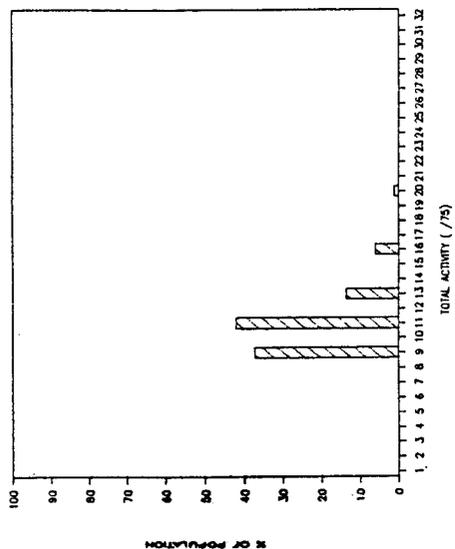


圖五 林邊劉先生(二)草蝦池水之菌相

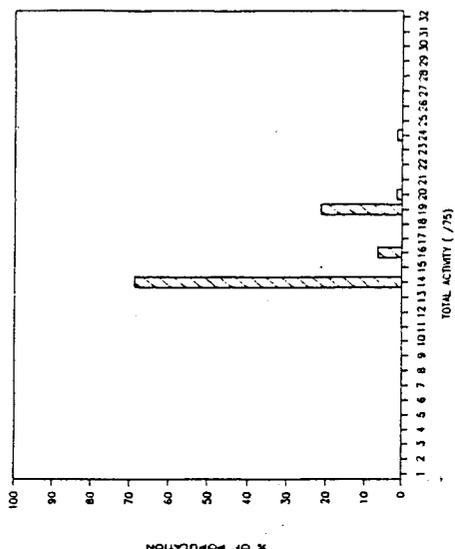
JUL 1988



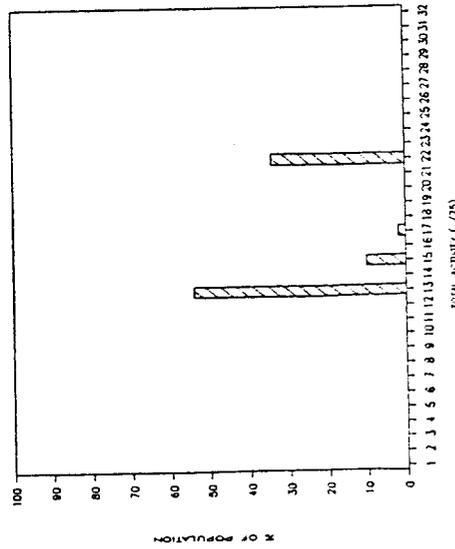
AUG 1988



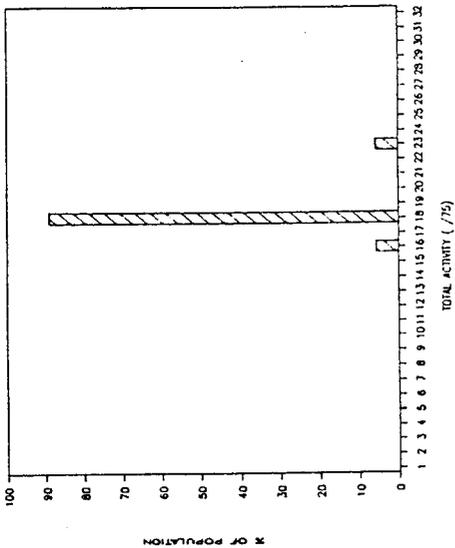
SEP 1988



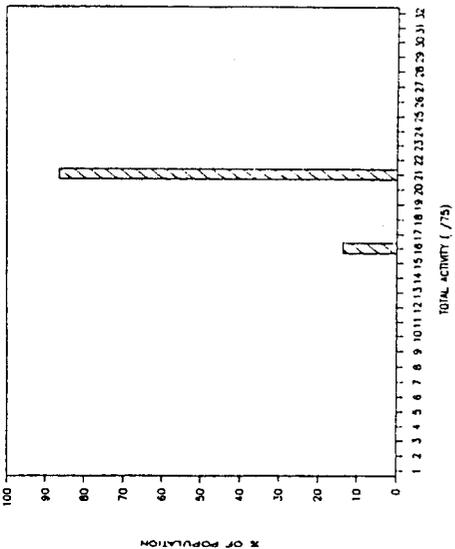
OCT 1988



NOV 1988

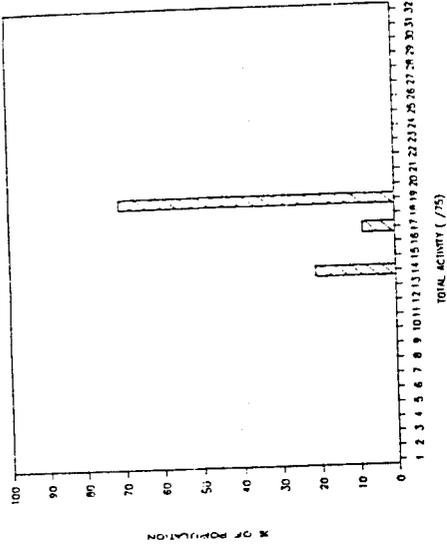


DEC 1988

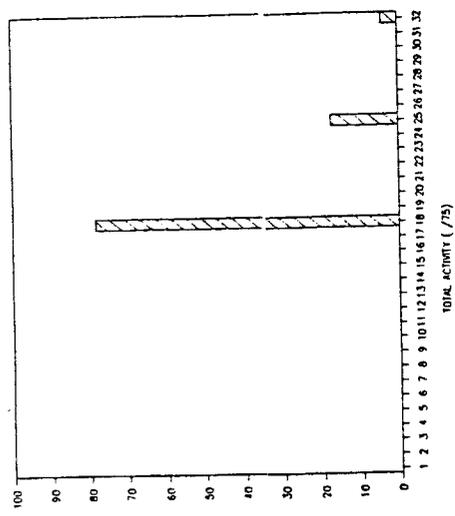


圖七枋寮龔先生草蝦池水之菌相

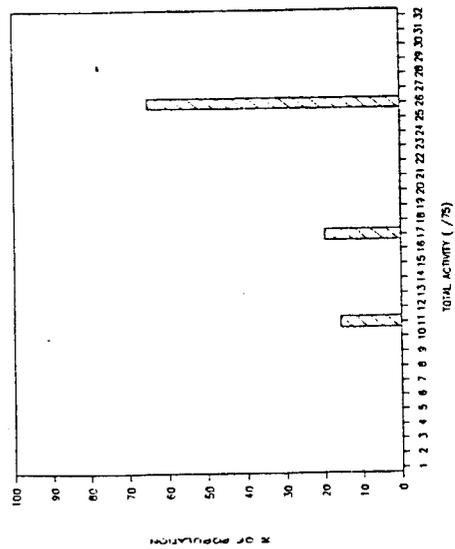
SEP 1988



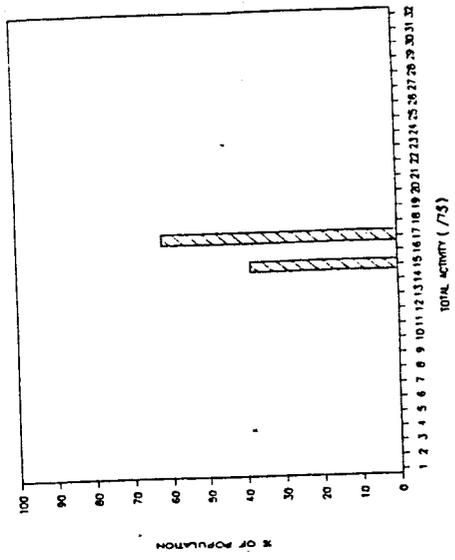
AUG 1988



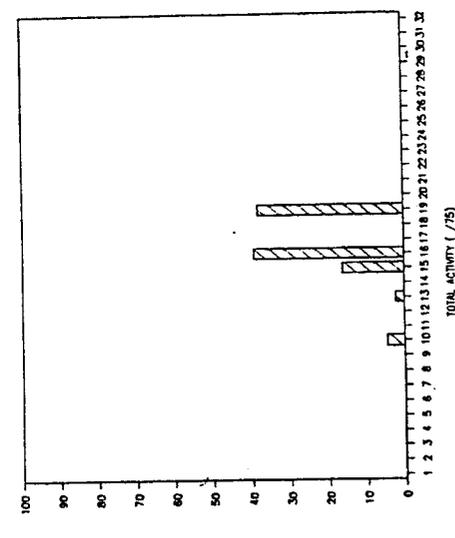
JUL 1988



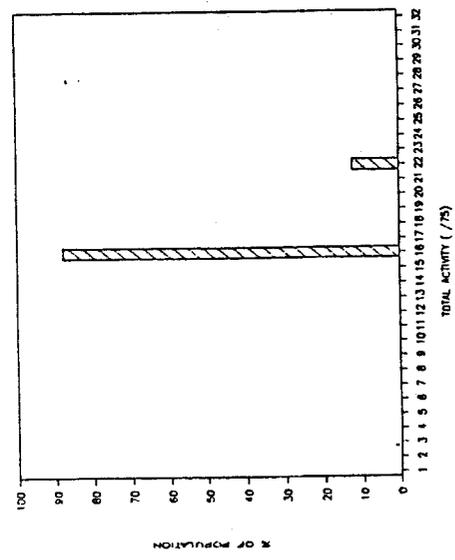
DEC 1988



NOV 1988



OCT 1988



圖八枋寮陳先生草蝦池水之菌相

表二 草蝦池之衛生條件

衛生條件	1987				1988				
	NOV	DEC	JAN	FEB	MAR	APR	MAY	JUN	
Total count (colony/ml)	1 200 2 256,000 3 × 4 ×	100 11,200 7,000 490	15,300 1,800 3,000 2,200	12,000 8,200 19,700 22,300	14,900 9,300 5,300 36,400	*	*	*	660
Coliform (colony/ml)	1 × 2 × 3 × 4 ×	× × × ×	0.04 0 0 0.43	11 11 >11 1.5	0.43 0.04 0 11	*	*	*	0
Spore count (colony/ml)	1 × 2 × 3 × 4 ×	× × × ×	254 164 280 133	640 740 610 410	270 5 130 67	*	*	*	94
Yeast & mold (colony/ml)	1 × 2 × 3 × 4 ×	× × × ×	7 16 11 13	× × × ×	7 0 1 1	*	*	*	1

說明：1. 2. 分別為枋寮黃先生草蝦池之側邊排水及中央排水，3. 4. 分別為佳冬周先生，吳先生草蝦池之側邊排水及中央排水。

×：未檢測。

*：收成。

表三 草蝦池之衛生條件

衛生條件	月份	1988	AUG	SEP	OCT	NOV	DEC	1989
		JUL						JAN
Total Count (colony/ml)	1	7,200	*	*	*	*	*	*
	2	1,030	41,000	11,700	5,600	*	*	*
	3	570	810	6,100	5,000	7,200	1,250	*
	4	770	23,000	1,300	3,300	8,700	57,600	*
Coliform (colony/ml)	1	0.43	*	*	*	*	*	*
	2	0.04	0.04	0.09	0.93	*	*	*
	3	0.93	0	>11	4.6	0.93	0.07	*
	4	2.1	0	4.6	0.93	0.23	11	*
Spore Count (colony/ml)	1	163	*	*	*	*	*	*
	2	190	336	207	119	*	*	*
	3	161	70	192	1,520	650	720	*
	4	326	204	194	246	6,210	6,100	*
Yeast & Mold (colony/ml)	1	29	*	*	*	*	*	*
	2	160	50	24	340	*	*	*
	3	44	3	670	36	11	15	*
	4	13	4	46	15	3	0	*
Fecal Coliform (colony/100ml)	1	×	*	*	*	*	*	*
	2	×	0	17	11	*	*	*
	3	×	0	3	15	35	4	*
	4	×	0	2	6	32	2	*
Fecal Streptococcus (colony/100ml)	1	×	*	*	*	*	*	*
	2	×	0	0	19	*	*	*
	3	×	0	27	2	1,452	1,220	*
	4	×	5	3	31	1,014	985	*
Salmonella	1	×	*	*	*	*	*	*
	2	×	—	—	—	*	*	*
	3	×	—	—	—	—	—	*
	4	×	—	—	—	—	—	*
Vibrio	1	×	*	*	*	*	*	*
	2	×	—	—	—	*	*	*
	3	×	—	—	—	—	—	*
	4	×	—	—	—	—	—	*

說明：1. 2. 均為林邊劉先生之草蝦池水，3. 4. 分別為枋寮龔先生、枋寮陳先生之草蝦池水。

×：未檢測。

*：收成。

—：陰性。

表四 龍蝦池之衛生條件

衛生條件	月 份	1988						1989
		JUL	AUG	SEP	OCT	NOV	DEC	JAN
Total Count (colony/ml)								
	L ₁	9,200	5,590	25,000	4,300	17,280	487,000	570
	L ₂	5,800	×	28,000	7,300	700	495,000	640
Coliform (colony/ml)								
	L ₁	0.43	0.23	2.4	0.23	2.4	0.09	0
	L ₂	0.43	×	>11	0.93	0.09	0.23	0
Spore Count (colony/ml)								
	L ₁	2,450	118	217	138	15,840	3,500	120
	L ₂	160	×	106	700	410	120	170
Yeast & Mold (colony/ml)								
	L ₁	11	1	250	26	3	0	9
	L ₂	85	×	280	42	3	0	4
Fecal Coliform (colony/100ml)								
	L ₂	×	0	3	9	97	0	0
	L ₂	×	×	8	8	85	0	0
Fecal Streptococcus (colony/100ml)								
	L ₁	×	0	1	1	1,014	1,020	642
	L ₂	×	×	1	3	1,692	1,330	255
Salmonella								
	L ₁	×	—	—	—	—	—	—
	L ₂	×	—	—	—	—	—	—
Vibrio								
	L ₁	×	—	—	—	—	—	—
	L ₂	×	—	—	—	—	—	—

說明：L₁，L₂均為林邊劉先生之龍蝦池水。

×：未檢測。

—：陰性。

討 論

養殖魚類泥土味之發生可能係由放射菌或藻類在水質優養化後，迅速生長與繁殖所引致的。屏東地區鰻池土及水中篩選得之放射菌，有五個菌株可產生泥土異味，由於標準品不易取得及受其濃度所限，本研究結果可確定此等泥土味物質不是 methylisoborneol，但尚無法確知其係為 geosmin 或其他泥土味物質。有待將來發展出不同之萃取檢驗方法或提高檢測感度，以協助解決泥土味物質之鑑定。

本計畫亦進行草蝦池中主要及次要細菌之分離與純化，並測定75項生理生化試驗，雖然目前尚未將蝦池水中之細菌種類鑑定出，但將來擬配合標準菌之特性，採用數值分析法來鑑定水中之細菌種類。因此本研究之結果可提供作為草蝦養殖池細菌相之參考，待將來完成菌種鑑定後，可用來建立蝦池水之基本細菌資料。

摘 要

前人之研究顯示，放射菌 (Actinomycetes) 會產生泥土味物質，諸如 geosmin, methylisoborneol 及 sesquiterpenol 等化合物而引致魚體之泥土異味。本計畫乃欲探討放射菌與泥土味物質產生之關連性，由鰻池挑得之五株放射菌，初步結果顯示，此等菌株無法產生 methylisoborneol，但可能產生 geosmin 或其他 sesquiterpenol 等物質。

本實驗亦進行草蝦池水細菌之分離純化，再從事75項生理試驗以追蹤草蝦池水之細菌相變化。結果發現同一地區、同一月份、不同養殖池之主要及次要細菌均不相同，而同一養殖池隨季節性的變動，水中細菌相之變化亦相當大。

參 考 文 獻

1. 湯弘吉(1983)，養殖魚類之異味問題。
中國水產，368：22-26.
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 bacteria isolated from a coastal, marine fish-rearing. *Unit. J. of Appl. Bacteriology* 53 : 253-268.
4. Gehlen, M. H. J., Trampisch and W. Dott, 1985. Physiological Characterization of heterotrophic bacterial communities from selected aquatic environments.
Microb. Ecol. 11:205-219.
5. Gerber, N.N., 1969. A volatile metabolite of actinomycetes, 2-methylisoborneol. *J. Antibiotics.* 22 : 508-509.
6. Gerber, N.N., 1974. Microbiological production of geosmin. EPA-67012-74-094. Environmental Protection Technology Series.
7. Gerber, N.N., 1977. Three highly odorous metabolites from an actinomycete, 2-isopropyl-3-methoxy pyrazine, methyl isoborneol and geosmin. *J. of Chem Ecology* 3 : 474-482.

8. Gerber, N.N., 1979. Volatile substances from actinomycetes : Their role in the odor pollution of water. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 7 : 191-214
9. Gerber, N.N. and H.A. Lechevalier, 1965. Geosmin, an earthy smelling substance isolated from actinomycetes. *Appl. Microbiol* 13 : 935-938.
10. 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. Environ. Microbiol.* 43 : 708-714.
11. Lovell, R.T. and L.A. Sackey, 1973. Absorption by channel catfish of earthy-musty flavor compounds synthesized by cultures of blue-green algae. *Trans. Amer. Fish Soc* 102 : 774-777.
12. Mac-Faddin, J.F., 1980 *Biochemical tests for identification of medical bacteria.* second Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Md, U.S.A.
13. Medsker, L.L. 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; 461-464.
14. Morris, R.L., 1962. Actinomycetes studied as taste and odor cause water sewage works. 109:76-84.
15. 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.
16. Tabachek, J.L., and M. Yurkowski, 1976. Isolation and identification of blue-green algae producing muddy odor metabolites, geosmin, and 2-methylisoborneol in saline lakes in Manitoba. *J. Fish. Res. Board Can.* 33 : 25-35
17. Yurkowski, M. and J.L. Tabachek, 1974. Identification, analysis, and removal of geosmin from muddy-flavored trout. *J. Fish. Res. Board Can.* 31 : 1851 ~ 1858.
18. Yurkowski, M. and J.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.
19. *Bacteriological Analytical Manual*, 1984. 6th Edition. Division of Microbiology, Center for Food Safety and Applied Nutrition, U.S. Food and Drug Administration.