

第七章 水產有益微生物及其應用

一、前言

由近年來的研究發現，魚苗或蝦苗的大量死亡與水中的異營性細菌，尤其是與病原性弧菌的大量出現有關。在養殖的過程中，水中氨氮的濃度不會增高到立即使魚蝦苗產生急性大量死亡的現象，但是其濃度仍會隨著飼養期間的增加而不斷的提高。

為了解決病原性細菌大量出現的問題，一般蝦苗業者大多以藥物控制細菌的數量，或以高溫刺激蝦苗脫殼，縮短培育時間，以逃避病原菌的感染。因為育苗業者不斷的使用藥物，產生了抗藥性細菌，以致用藥效果逐漸降低，至於提高溫度則是一種非自然狀態下的助長方式，常使繁殖出來的幼苗體弱、畸形，無法適應外界的飼養環境。

一般業者多在蝦苗變態至後期幼蟲開始，才以換水方式控制逐漸惡化的水質，由於此時打氣量漸漸增大，沈澱在池底已久的殘餌及蝦苗的排泄物隨之懸浮在水中，常使水中病原菌的數量及含氮廢物的濃度迅速增高，影響蝦苗的存活率。如果能控制上述有害的病原性微生物，同時又能去除水中的有害的含氮廢物，自然能夠提高蝦苗的育成率。

在養殖池中的情況亦復如此，飼料無法完全利用及魚蝦的排泄物使魚池累積了相當大量的有機廢物，以致池塘變成一處高度優養化的特殊環境。前述及，池塘中的細菌相由水質良好時出現的代謝不活潑菌轉變成優養化之後的代謝活潑菌，後者之中尤以弧菌之競爭力最強，換言之，彼等形成優勢種的能力將比其他種類強。因此如何控制池塘水質、底質於最佳狀態及降低弧菌的數量，遂成為今後水產養殖的主要課題。

水產養殖由早期 (1950's) 的粗放逐漸轉變為集約式的形態 (1970's)，經過不到三十年，此類對環境不友善的養殖形態衍生出的問題開始浮現，例如過度使用人工飼料以致養殖環境逐漸惡化，其中包括養殖池底的老化、病原性微生物 (病毒及細菌) 成為養殖環境中的優勢種，加以外在環境污染，如工業污染產生的酸雨、污染物由河川排放進入沿岸養殖地區污染水源等。另一方面，種原的選擇不當，使用近親交配繁衍種苗，使子代原有的免疫功能出現衰退，造成種苗的罹病頻率增加，加以長期使用抗生素，導致出現了抗藥性菌株，使控制水產動物的疾病束手無策，這些棘手的問題使水產養殖永續發展面臨了空前的挑戰。

對於水產品的輸出，世貿組織 (WTO) 各會員國對水產品的藥物殘留均有嚴格的檢驗標準，如果違反規定，輸出後必定會遭受退貨，造成業者不可避免的損失。目前使用藥物控制疾病的空間日益窄小，一些代替藥物的商品品紛至沓來，如新近提倡的藉疫苗或免疫活性劑 (Beta 1,3-glucan) 等方法控制魚病及蝦病，可是水產動物的免疫系統多少與高等脊椎動物不同，因此利用生物製劑改善養殖環境、抑制病

原性微生物、增強水產動物的免疫功能等，遂成爲發展水產養殖下一世紀的重要研究課題。

利用微生物控制環境的方法已行之有年，如利用能分解苯環的微生物控制石油污染；利用特殊的微生物去除特殊污染源，如農藥、食品加工、染整、高球場廢水、工業廢水及下水道污水等。此外，微生物也可以用來控制植物或動物腸道內的病原菌。處理工業及有機廢水的微生物：如 *Flavobacterium*、*Pseudomonas* 及 *Bacillus* 等，可以降低水中的生化需氧量及去除有毒物質，這些物質包括有機磷、農藥、石油廢水、殺蟲劑等。

早年對於水產動物消化系統的的研究多偏向形態構造或生理機制，例如食道、胃、小腸、幽門垂等的細胞、組織及其構造，或是該等器官的分泌消化酵素種類及其功能的研究。柒零年代中期開始有學者著手研究有關魚類及蝦類體內的細菌數量及種類，目的在於魚體的保鮮，換言之，研究的目的與食品衛生有關。同時也有部份學者開始研究某些腸道內細菌的特殊功能，如消化幾丁質的細菌。

之後，在 70 年代末期及 80 年代間，研究者發現，細菌在水產動物的腸道中扮演了極爲重要的角色，這些細菌被認爲與消化吸收、甚至與成長都有密切的關係。在此之同時，因爲水產養殖事業的開始蓬勃發展，養殖技術不斷的更新，如集約式養殖及人工配合飼料的使用，導致魚病及蝦病不斷的發生，學者開始研究魚蝦類體內及環境中與病原性細菌彼此間的關係。這些水產動物體內的病原性細菌研究一直延續至今，此外，爲了控制這些病原性細菌，學者們也開始了有關利用細菌控制病原性細菌的適當種類及控制方法等的相關研究。

二、水產動物之細菌相

(一) 魚類腸道內的細菌相

魚腸道內之菌相有：*Achromobacter*、*Flavobacterium*、*Pseudomonas*、*Micrococcus*、*Vibrio*、*Alcaligenes* 等，其中 *Vibrio* 係極重要的種類。這些細菌以革蘭氏陰性的兼性厭氧或好氧性菌爲優勢種，海水魚腸道中以 *Vibrio*、*Achromobacter*、*Pseudomonas* 爲最主要的種類，其次爲 *Flavobacterium*、*Micrococcus* 及 *Bacillus* (Anand & Rudra Setty, 1977 ; Caria & Casellas, 1978 ; Huss & Pedersen, 1979 ; Lesel, 1979 ; Ringoe & Stroem, 1994)。而淡水魚類的消化道中則以腸內菌 (Enterobacteria) 中的種類：*Aeromonas*、*Bacillus*、Coryneform 菌、*Achromobacter* 及 *Flavobacterium* 等居多。

小型鮭魚 (charr) 小腸及大腸中細菌主要的種類有：*Enterobacteriaceae*、*Aeromonas*、*Micrococcus*、*Lactobacillus*；次要的種類有：*Acinetobacter*、*Cytophaga*、*Flavobacterium*、*Moraxella*、*Pseudomonas*、*Vibrio*、*Coryneforms*、*Streptococcus*。鯉魚、草魚消化道內的細菌數量與年齡、棲息地及食物種類有關；投餌量、食物的組成、魚種等均與細菌數量有關。在消化道的前段與中段細菌數比後段多 (Shivokene

& Tryapshene, 1985)。在鮭魚腸道內的優勢細菌大部分是好氧或兼性的厭氧菌，少有人研究絕對厭氧菌，少數報告指出，絕對厭氧菌的數目比兼性厭氧菌的數目低的很多。在鮭魚腸道中的原生細菌有：*Acinetobacter*、*Enterobacter* 及 *Pseudomonas* (Ringo, Stroem & Tabachek, 1995)。養殖尼羅吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*) 腸道中的優勢菌相主要可分為兩群，其一是：*Plesiomonos shigelloides*；另一是：*Aeromonas hydrophila* (Sakata & Koreeda, 1986)。

(二) 甲殼類消化道中的菌相

養殖白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 的腸球菌含量偏低，未發現有糞生鏈球菌或沙門氏桿菌；大腸菌 (*E. coli*) 及副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 亦未被發現存在於飼育水中或蝦體內。養殖草蝦 (*Penaeus monodon*) 體內的菌相以革蘭氏陽性菌為優勢菌種，如：*Micrococcus* (41.8%)、*Corynebacterium* (19.3%)、*Bacillus* (14.2%)；革蘭氏陰性菌則以弧菌 (*Vibrio*;19.2%)、*Pseudomonas* (5%) 等為優勢菌種 (Fonseka, 1988)。斑節蝦 (*Penaeus japonicus*) 消化道內的細菌相：野生斑節蝦腸道內以假單胞菌 (*Pseudomonas*) 為優勢菌種 (Yasuda & Kitao, 1980)；人工育苗時，在眼幼虫期及糠蝦期階段的優勢菌種為 *Vibrio*，飼養四個月後成蝦腸道內的菌相則改變為假單胞菌為優勢菌種。病蝦體內 (包括肝胰線及腸道) 的優勢菌種則為弧菌。

(三) 腸道內細菌的功能

具有分解纖維蛋白質及水解醣類、合成維生素、分解幾丁質及抗菌能力 (Okutani, Muzzarelli & Pariser, 1977)。

三、消化道正常菌相之破壞

由以上的分析來看，本來水產動物消化道內的菌相是一種平衡狀態，菌種間彼此並不相互干擾，換句話說，多樣化的菌相將有助於魚蝦的生長及提高活存率，反之，出現單一化的菌種則出現相反的效果。另外導致腸道內細菌相的改變的原因則來自飼育環境的惡化，當環境惡化時，病原性弧菌的毒性增加，其他原有的腸內細菌產生抗生物質的能力降低；換句話說這些在腸道中的弧菌增加了溶菌素的活性 (lysozymic activity)，能夠抵抗免疫細胞的吞噬作用，並且抑制了免疫細胞分泌抗溶菌素的能力 (Lubianskiene & Jastiuginiene, 1996)。

四、以有益微生物控制水產動物疾病

(一) 腸球菌及枯草桿菌對控制歐洲鰻感染愛德華氏症之功效

腸球菌 (*Enterococcus faecium* SF68) 原來自健康的小兒腸道，已經有許多相關的

研究證實，此菌對治療細菌引起的人類急性腸炎及控制動物腸道內的有害細菌有相當好的效果，而枯草桿菌 (*Bacillus toyoi*) 亦對動物體內的有害細菌有壓抑的效果，這兩種細菌已經分別在瑞士及日本開發出商業化的成品。本試驗針對養殖歐洲鰻 (*Anguilla anguilla*) 投飼此兩種生物製劑後，以鰻魚常罹患的愛德華氏 (*Edwardsiellosis*) 症之病原菌 (*Edwardsiella tarda*) 進行活體挑戰試驗，探究其抗病能力。

基本上三種菌的顏色及形態有非常明顯的不同，所以在培養基上表現的拮抗能力的大小，可用三種細菌的數量予以區別。本試驗以雙層培養基法或在培養液中混合後探討拮抗現象，結果均以枯草桿菌較佳，腸球菌幾乎對愛德華氏菌沒有出現任何拮抗現象；在液體培養基中如果愛德華氏菌的最初培養濃度為 $10^5 - 10^6$ 時，兩種生物製劑均無法對其產生拮抗作用，而愛德華氏菌的初培養濃度在 $10^3 - 10^4$ 時，則兩種生物製劑均對其有抑制作用 (圖 7.1)。

將兩種生物製劑各 1 g 溶於 100 ml 無菌水中，之後噴灑在 1,000 g 的歐洲鰻飼料 (Dana Feed A/S Ltd.) 上，並在烘箱中以 35°C 熱風風乾後噴灑 50 mL 魚油，將成品儲存於 4°C 冰箱中備用 (保存不得超過三天)，使用前須分析該飼料中的細菌種類，以確定生物製劑的活性，結果顯示每克飼料中兩種生物製劑的數量均可維持在 10^6 。

以上述飼料在試驗室的水槽中飼育平均重量 30 g 的歐洲鰻，一個月後分 3 組，每組 30 尾，其中兩組分別投飼含有兩種生物製劑之飼料，每天兩次，每次投飼體重的 1%。每天由各組中隨機選取三尾，飢餓 24 小時後解剖，取出腸道，粉碎之，取 1 克加入 0.85% 的生理食鹽水，進行連續稀釋、培養後，計算及鑑定菌數及菌種。結果顯示，投飼腸球菌 SF68 者第 4 天後開始著床，14 天後即可達 1.6×10^5 ，佔總腸內總菌數的 73%；反之，投飼枯草桿菌者，不僅未發現有枯草桿菌，腸內總生菌數還不斷下降至 3.3×10^4 ，剩下最初投飼數量的 1/10 而已 (表 7.1)。

分析控制組及飼育枯草桿菌組的腸內菌相，發現 80% 的菌相中均未出現有枯草桿菌，而在投飼腸球菌的鰻魚腸內的菌相有 73% 為腸球菌 (表 7.2)。以愛德華氏菌 7×10^6 g/fish 行腸道注射的挑戰試驗，發現飼餵腸球菌 SF68 的歐洲鰻活存率顯然高於投飼枯草桿菌及控制組 ($P < 0.05$)，其平均活存率分別為：73%、43% 及 45% (表 7.3)。

腸球菌及枯草桿菌因為有不同的特性，所以使用時要考慮對象，腸球菌一般都會存在於人類及水產動物體內，枯草桿菌則常在養殖環境及魚體內被發現，有許多研究者曾經利用這兩種細菌進行控制養殖環境及抗病能力的研究。

枯草桿菌能夠形成孢子，抵抗惡劣環境，因此可以通過胃酸的考驗進入腸道中，家畜一般都有反芻的現象，食物停留在消化道內的時間比較長，因此有機會發展成爲優勢種類，如果使用在魚類效果不佳經過此次試驗證明，枯草桿菌根本無法在鰻魚腸內停留或繁衍。一般鰻魚腸道不長，正常鰻魚攝食後八小時前後就會排糞，所以枯草桿菌的芽孢無法在此短時間內進行快速繁殖，因此無法壓抑腸道內其他細菌。

反之，腸球菌對腸道表面有極佳的親和力，在有充足的碳源及氮源的條件下，能夠迅速的以腸道表面做為棲地，並與其他腸道中的細菌發生拮抗作用，壓制其他腸道中有害的細菌。

因此，在使用生物製劑以前必須瞭解生物製劑本身的特性，及進入不同環境之後其作用機制，如此才可真正發揮生物製劑的功能，否則使用後完全沒有效果，反而對環境有不良的影響。

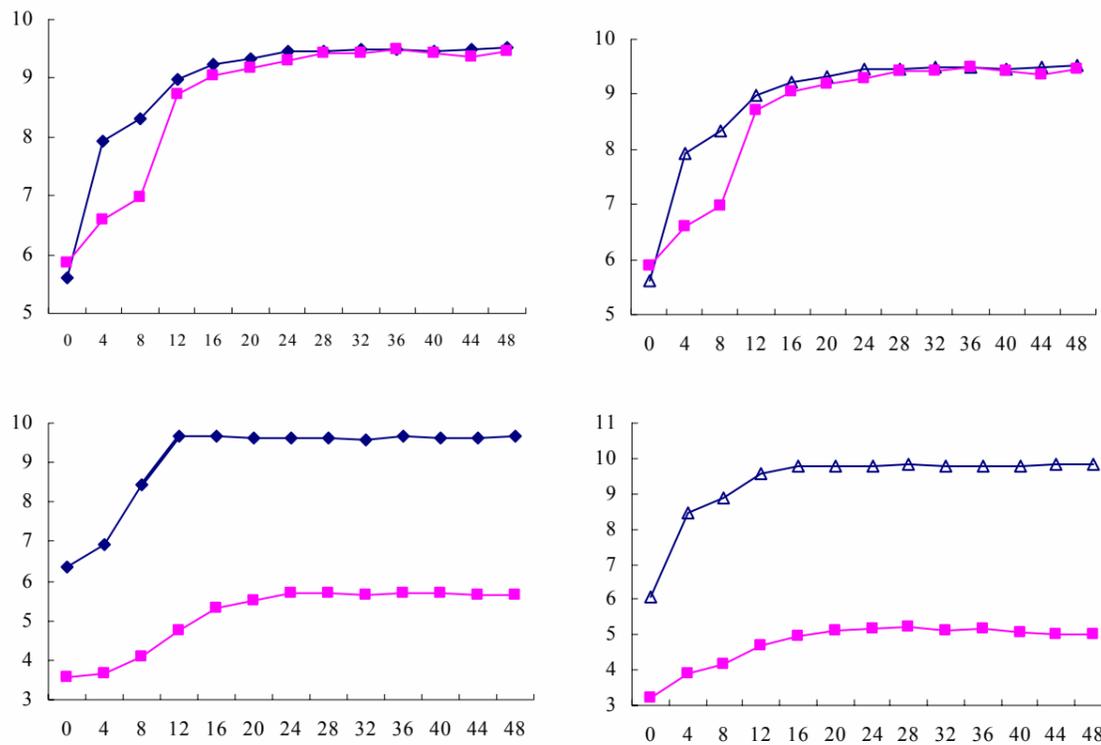


圖 7.1 不同初濃度的愛德華氏菌 (-◆-), 腸球菌 SF68 (-◆-)及枯草桿菌 (-△-) 混合培養時彼此之生長狀況, X軸代表時間, Y軸代表細菌對數數量 (Chang & Liu, 2002)

表 7.1 飼餵兩種生物製劑之後歐洲鰻腸中兩種生物製劑的數量及總生菌數的變化 (Chang & Liu, 2002)

飼餵天數 生物製劑種類	生物製劑菌數 / 總生菌數 (10^5 CFU/g)						
	2D	4D	6D	8D	10D	12D	14D
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	0/2.92	0.09/1.87	0.16/0.98	0.34/0.96	1.79/2.67	1.30/1.73	1.63/2.23
<i>Bacillus toyoi</i>	0/3.02	0/2.63	0/1.79	0/1.03	0/0.69	0/0.28	0/0.33

表 7.2 使用兩種生物製劑 *Bacillus toyoi* 及 *Enterococcus faecium* SF68 兩週後腸道內總菌數及菌相之變化 (Chang & Liu, 2002)

總菌數 (CFU/g)	control	<i>B. toyoi</i>	<i>E. faecium</i> SF68
菌種組成 (%)	2.8×10^5	3.3×10^4	2.2×10^5
<i>Aeromonas caviae</i>		4	4
<i>A. hydrophila</i>	18	14	2
<i>A. sobria</i>	6	8	1
<i>Alcaligenes</i> sp.			2
<i>Brevundimonas diminuta</i>			1
<i>Burkholderia cepacia</i>			1
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	3	8	1
<i>Enterococcus faecium</i>			73
<i>Mannheimia. haemolytica</i>	3	8	1
<i>Pasteurella multocida</i>	12	6	2
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	37	30	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	8	6
<i>P. stutzeri</i>	6	4	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6	8	1
<i>Vibrio</i> sp.	3		
<i>V. parahaemolyticus</i>	3	2	

表 7.3 歐洲鰻以愛德華氏菌 (7×10^6 CFU/g bw) 挑戰投餌兩種生物製劑後之活存率變化 (Chang & Liu, 2002)

添加區分*	組別	活存率 (%/天)								平均活存率 (%)
		2	3	4	5	6	8	10	14	
C	C1	78	63	56	52	48	44	44	44	45
	C2	93	79	66	59	55	52	52	52	
	C3	87	77	63	57	50	47	43	40	
E	E1	96	84	80	76	72	72	72	72	73
	E2	100	90	87	83	77	77	77	77	
	E3	97	87	80	77	73	70	70	70	
B	B1	93	86	72	66	55	45	38	38	43
	B2	97	90	83	70	57	50	47	47	
	B3	93	79	68	61	57	50	46	43	

*C：控制組未添加；E：添加腸球菌 SF68 組；B：添加枯草桿菌組

(二) 添加假單胞菌菌液對草蝦苗繁殖場水質及細菌相之影響

本研究嘗試利用養蝦池中分離出的一株假單胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 控制草蝦 (*Penaeus monodon*) 苗繁殖場池水中的氨氮濃度及抑制病原性弧菌的數量，藉以增加蝦苗的活存率。

在未使用藥物的情形下，飼水中的總生菌數為 $4.6 \times 10^4 - 2.56 \times 10^{12}$ CFU/mL 上，將假單胞菌投入試驗組的蝦苗池後與控制組比較，兩者飼育水中的總生菌數並無差異 ($P > 0.05$)，因此投入活菌後對水中的總生菌數並無影響。在未使用人工餌料之前，試驗組飼育水中的菌相大多以代謝不活潑菌為優勢種，其中最主要的菌屬包括：*Acinetobacter*，*Moraxella* 及 *Kingella* 等，但在使用人工餌料之後，水中的菌相開始轉變成代謝活潑型的菌屬，其中代表性的菌屬有：*Aeromonas*，*Vibrio*，*Alteromonas*，*Haemophilus* 及 *Salmonella* 等。

當蝦幼苗發生大量死亡之時，水中代謝活潑菌株中以病原性弧菌為優勢種，其中又以 *V. parahaemolyticus*，*V. alginolyticus* 出現最多。在試驗組中的弧菌數量明顯的低於控制組，因此，試驗菌株對於抑制弧菌的數量有明顯的功效 (表 7.4)。

表 7.4 使用一株假單胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 草蝦苗繁殖池中弧菌在不同蝦苗變態期中出現的數量 (Liu et al., 2000)

育苗池	蝦苗變態期								總和
	M3	PL1	PL2	PL3	PL4	PL5	PL6	PL8	
試驗組	2	2	1	3	-	4	4	2	17
試驗組	-	2	-	3	-	4	4	2	15
對照組	-	4	2	3	2	4	4	3	22

附註：空格內橫線代表未測出弧菌

自眼幼蟲第三期開始至後期幼苗第九期止，以 *Pseudomonas* sp. 菌液每日投入池中 300 毫升 (1.0×10^9)，可以降低試驗組後期幼苗第四期至第九期 (PL4-PL9) 時飼育水中非離子化氨 ($\text{NH}_3\text{-N}$) 的濃度 (圖 7.2)，其與控制組比較有明顯的差異 ($P < 0.05$)。此外，試驗組池水中非離子化氨的濃度與活存率間呈不完全負相關 ($r = 1 : -0.533$ & $1 : -0.5742$)；相反的，在控制組則呈完全負相關 ($r = 1 : -0.926$)。而且蝦苗的活存率在試驗組與控制組間雖無明顯的差異 ($P > 0.05$)，然而自後期幼苗第一期開始至第九期的活存率則有明顯差異 ($P < 0.05$)，試驗組的活存率明顯的高於控制組 (表 7.5)。

表 7.5 草蝦苗繁殖場添加假單胞菌液後各期蝦苗的存活率 (Liu et al., 2000)

組別	蝦苗變態期及活存率					
	M3	P2	P4	P6	P8	P9
試驗組	78	66	59	44	25	20
試驗組	65	47	42	24	14	7
控制組	61	33	26	19	9	0

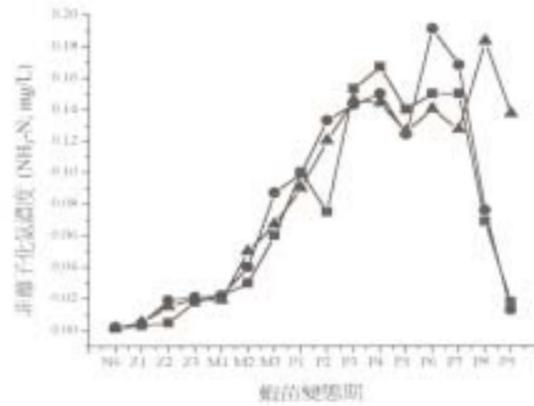


圖 7.2 使用一株假單胞菌處理草蝦苗養殖池飼育水中氨氮的效果 (Liu et al., 2000)；●及■表添加假單胞菌組，▲表未添加組

(三) 以光合細菌與硝化細菌控制養殖草蝦之疾病

草蝦養殖之細菌性疾病主要為弧菌病 (Vibriosis)，尤其以 *Vibrio Alginolyticus*、*V. parahaeomolyticus*、*V. anguillarum* 感染後，血淋巴的凝集作用減慢，血球細胞數目急遽下降，引發敗血症，死亡率往往高達 100% (Lightner & Lewis, 1975 ; Lightner, 1977 ; Song et al., 1992 ; Saulnier et al., 2000)。近幾年草蝦養殖受到白點病毒 (WSBV) 的普遍感染，造成養殖蝦免疫能力降低，導致弧菌的二次感染，使草蝦養殖業一蹶不振。因此使用有益微生物改善養殖生態環境，減低藥物的使用量，維持養殖環境微生物生態平衡，藉以抑制病原性微生物，達到病害防治目的，遂成為主要控制蝦類疾病的主流方式 (Sung et al., 1991 ; 劉等, 1997 ; 專, 1997 ; 陳等, 2002)。

有益微生物之主要功能有：靠微生物或其分泌之細胞酵素分解吸收有機污染物、含氮廢物等有毒害物質，改善池塘底質與水質；產生抑制致病菌的特殊物質，壓抑病原菌的成長；經食物鏈作用直接或間接提供營養物質，強化養殖生物之體質，增強防禦抗病能力 (王等, 1999)。

比較光合細菌 (*Rhodospseudomonas capsulata*) 與硝化細菌 (*Nitrosomonas* sp.) 及乳酸菌 (*Lactobacillus* sp.) 與酵母菌 (*Saccharomyces* sp.) 在草蝦養殖之效果，其中以添加光合細菌與硝化細菌者，其存活率與收成量均較添加乳酸菌與酵母菌及未使用者為佳 (圖 7.3)。因為光合細菌與硝化細菌之菌種係採自養殖池中，故適應性良好，添加後可在蝦池中維持一定的數量，而乳酸菌與酵母菌無法在養殖環境中存活。此外，微生物菌種有其適合生長之環境，使用前必須製造有利於添加之有益微生物生存的環境，否則投放後不適死亡的益生菌反而會污染養殖環境。

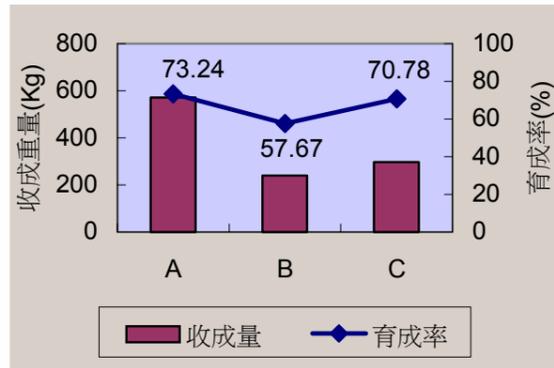


圖 7.3 室外草蝦池使用不同有益微生物其存活率與收成量之比較 (陳等未發表, 2003)

A: 添加光合細菌與硝化細菌

B: 添加乳酸菌與酵母菌

C: 未添加

(四) 光合細菌簡易大量培養方式

- (1) 簡單桶式培養: 1 噸水量 (魚池水或開放性水域之水) + 30 公斤下雜魚 (或 15 公斤魚粉), 微量打氣使水團攪動, 至於陽光下培養, 至水色為紅褐或紫紅色即可獲得很高力價之光合菌 (陽光充足情形下約 7 天可達成) (圖 7.4)。
- (2) 魚池直接培養方式: 每一公頃 (水深 15-30 公分) + 1,500 公斤魚粉及 1,500 公斤米糠, 於陽光充足情形下約一星期可達全池水為粉紅色至紫紅色之光合菌 (圖 7.5)。



圖 7.4 以 FRP 桶培養之光合細菌液



圖 7.5 室外田間池大量培養之光合細菌

表 7.6 光合細菌分離培養基 (from Bergey's manual of systematic bacteriology: 1663p)

KH_2PO_4	1.0 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
NH_4Cl	1.0 g
NaHCO_3	3.0 g
Na_2SO_4	0.7 g
NaCl	20 g
SLA ^a	1 mL
VA ^b	1 mL
$\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ^c	10 mM
Agar	15 g

a：微量元素溶液

b：維生素溶液

表 7.7 培養光合細菌所需之微量元素 (不含硫)

$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.8 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	250 mg
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	70 mg
ZnCl_2	100 mg
H_3BO_3	500 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	30 mg
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10 mg
Bidistilled water	1,000 mL
pH (add HCl)	2-3

表 7.8 培養光合細菌所需之維生素

Distilled water	100 mL
Biotin	10 mg
Niacin amide	35 mg
Thiamin dichloride	30 mg
P-aminobenzoic acid	20 mg
Pyridoxal hydrochloride	10 mg
Calcium pantothenate	10 mg
Vitamin B12	5 mg

(五) 硝化細菌的培養與應用

含氮廢物在養殖池中之累積易形成有毒物質的氨及亞硝酸，而去除氨及亞硝酸最有效快速之方法則為硝化細菌之硝化作用。參與硝化作用的細菌有兩類：亞硝酸菌 (*Nitrosomonas* sp.) – 主要作用係將氨轉換為毒性較低之亞硝酸鹽；及硝酸菌 (*Nitrobacter* sp.) – 主要作用係將亞硝酸鹽轉換為硝酸鹽。在池塘中培養硝化細菌時，必須提供其附著基，如沸石粉，否則硝化細菌不易存活。

表 7.9 大量培養亞硝酸菌之培養基

Sea water	1,000 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄	0.5 g
FeSO ₄	0.4 g
沸石粉	15 g

表 7.10 分離亞硝酸菌之培養基「取自 Bergey's manual of systematic bacteriology:1820p, (Watson, 1965)」

Sea water	1,000 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,320 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	20 mg
K ₂ HPO ₄	114 mg
Chelated iron (13%)	1 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1 μg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	2 μg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2 μg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	20 μg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	100 μg
Agar	15 g

表 7.11 大量培養硝酸菌之培養基

Sea water	1000 ml
NaNO ₂	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄	0.5 g
FeSO ₄	0.4 g
沸石粉 r	15 g

表 7.12 分離硝酸菌使用之培養基「取自 Bergey's manual of systematic bacteriology: 1811p, (Watson and Waterbury, 1971)」

Distilled water	300 mL
Sea water	700 mL
NaNO ₂	69 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	6 mg
K ₂ HPO ₄	1.74 mg
Chelated iron (13%)	1 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	30 µg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	66 µg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.6 µg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	6 µg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	30 µg
Agar	15 g

在硝化細菌之培養槽中偵測 NH₄⁺與 NO₂⁻之含量即可明顯了解硝化細菌之生長狀況，當硝化細菌數量多達一定標準時，就能迅速將所添加之銨鹽及硝酸鹽代謝分解完成，經過多次繼代培養即可提高硝化細菌純度與數量，且能於 24 小時內將銨鹽及硝酸鹽代謝分解完，即可作為養殖池之添加菌液。

(六) 如何正確使用益生菌

目前許多證據指出，病毒和細菌混合感染，將會導致養殖生物大量死亡，而消滅或控制養殖環境中的病毒並非易事，控制弧菌卻比較容易著手。目前養殖草蝦因白點病毒和弧菌混合感染而導致大量死亡的狀況，以添加光合細菌、有機活菌或其他有益微生物抑制養殖環境中的弧菌量，效果並不十分明顯，唯有徹底改善養殖環境，製造有利於益生菌生長之環境，形成絕對優勢之微生物菌群，完全阻斷病原弧菌之生存空間，才可有效的防止弧菌病。

由病變蝦池中可檢測到大量病原弧菌，養殖良好之蝦池中幾乎檢測不到病原性弧菌 (陳等，1998)。為使養殖環境中的細菌相完全改頭換面，可利用大量有機物質 (下雜魚、魚粉、糞肥、米糠等) 於池中發酵分解，產生大量有機物分解菌，隨後光

合細菌、硝化細菌因應而生。利用這些環境淨化微生物群改善被破壞之水質、底質後再放養蝦苗，此時水體中的有機物分解菌、光合細菌、硝化細菌等族群，除能抑制病原弧菌外，亦能適時分解水中污染物（如飼料殘餌、蝦類排泄物等），有效改善水質與底質。

(七) 如何增強蝦體抗病能力

蝦類若要對抗病毒性疾病應從增強蝦體本身免疫能力著手，這是目前最爲大家熱烈探討之問題，從許多免疫賦活物質（如前述之 Glucan、Vit. C、多醣類物質等）對蝦類免疫活性之增強效果到疫苗之開發應用等已獲得初步的效果，但仍無法廣泛的應用在蝦類養殖上（陳，1996）。

最方便、最簡單、最有效增強蝦免疫抗病力之方法爲充分有效的利用蝦池中之天然餌料生物，如藻類、橈腳類、蚊蟲幼生、底棲生物及多毛類等。上述於池中大量添加有機物質，除有培養大量微生物群的功能外，相形地也能提高池中生物量的產能，因爲微生物的代謝產物爲藻類吸收利用，微生物及藻類被浮游動物利用，浮游動物再被較大型底棲性動物利用，這些多樣性之天然餌料生物，自然可以強化池蝦之體質，增加抗病能力，其操作模式圖解如圖 7.6。

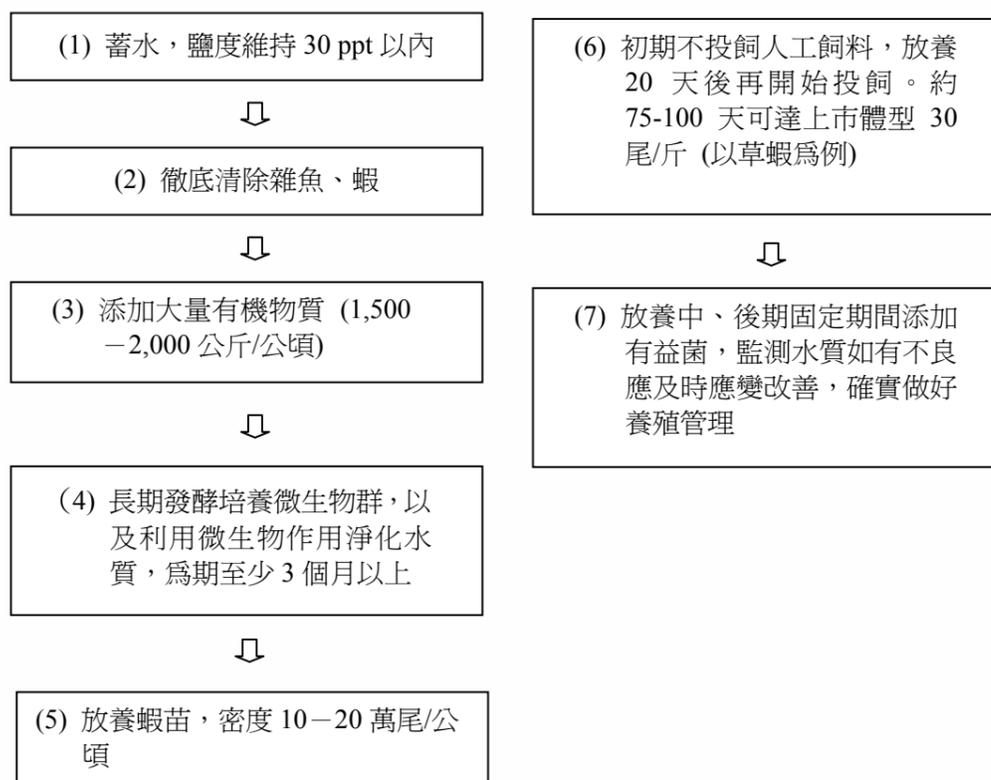


圖 7.6 增強蝦類疾病抵抗力的池塘管理操作模式（海水繁養殖研究中心蝦類養殖推廣模式）

參考文獻

- Anand, C. P. and T. M. Rudra Setty (1977) Chemical control of psychrophilic bacterial spoilage of fish (1). Isolation and identification of psychrophilic bacteria from marine fish. Fish Technol. Soc. Fish. Technol., Ernakulam, 14(2): 98-102.
- Caria, M. A. and J. M. Casellas (1978) Preliminary communication on the bacterial content of the fish skin and gut in the Argentine Sea. Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat. Bernardino Rivadavia, Inst. Nac. Invest. Cienc. Nat., 5(9): 219-288.
- Chang, C. I. and W. Y. Liu (2002) An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. J. Fish Dis., 25: 311-315.
- Fonseka, T. S. G. (1988) Microbial flora of pond cultured prawn (*Penaeus monodon*). In: the 7th session of the Indo-Pacific Fishery Commission Working Party on Fish Technology and Marketing, Bangkok, Thailand, 19-22, April, 1988. Paper published in FAO Fisheries Report, 401: 24-31.
- Huss, H. H. and A. Pedersen (1979) *Clostridium botulinum* in fish. Nord. Vet. Med., 31(5): 214-221.
- Lesel, R. (1979) Bacterial microflora of the digestive tract of fish. In: Fish Nutrition, Proceeding Collection. CNERNA, Paris, France, 1981: 89-100.
- Lightner, D. V. (1977) *Vibrio* disease of shrimp. 19-30. In: Sindermann, C. J. (ed.) Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture, Vol. 6. Elsevier, New York. 329.
- Lightner, D. V. and D. H. Lewis (1975) A septicemic bacterial disease syndrome of Penaeid shrimp. In: Disease of crustaceans. Mar. Fish. Rev., 37: 25-28.
- Liu, W. Y., G. H. Kou and S. N. Chen (2000) Effects of *Pseudomonas* sp. on the water quality and bacterial flora of a giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) hatchery. J. Fish. Soc. Taiwan, 27(4): 273-281.
- Lubianskiene, V. and R. Jastiuginiene (1996) Antibiotic and fermentative activity of bacteria found in water and digestive tract of fish from Lake Druksiai and Ignalina Nuclear Power Plant. Ecology (Vilnius, Lithuania), 2: 3-7.
- Okutani, K., R. A. A. Muzzarelli and E. R. Pariser (1977) Chitin digestion in the digestive tract of fish. In: Proceedings of the First Int. Conference on Chitin/Chitosan, held in Boston, MA (USA), on April 11-13, 1977, Rep. Mass. Inst. Tech. Sea Grant Program, Public. By: Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, 554-562.
- Ringo, E., E. Strom and J. A. Tabachek (1995) Intestinal microflora of salmonids: A review. Aquaculture Research, 26(10): 773-789.
- Ringoe, E. and E. Stroem (1994) Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): Gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. Aquacult. Fish. Manage, 25(6): 623-629.
- Sakata, T. and Y. Koreeda (1986) A numerical taxonomic study of the dominant bacteria isolated from tilapia intestines. Bull. Jap. Socie. Sci. Fish., 52(9): 1625-1634.
- Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy and D. Ansquer (2000) Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. Aquaculture, 191(1-3): 133-144.

- Shivokene, Y. S. and O. P. Tryapshene (1985) Bacterial numbers and biomass in the digestive tract of pond fish as a function of their diet. *Journal of Ichthyology*, 25(5): 95-102.
- Song, Y. L., S. P. Lee, Y. T. Lin and C. C. Chen (1992) Enzyme immunoassay for shrimp vibriosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 14(1): 43-50.
- Sung, H. H., Y. L. Song and G. H. Kou (1991) Potential uses of bacterin to prevent shrimp vibriosis. *Fish and shellfish Immunology*, 1(4): 311-312.
- Yasuda, K. and T. Kitao (1980) Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, 19: 229-234.
- 王祥紅、李軍、紀傳尚、徐懷恕、楊學宋 (1999) 有益微生物在水產養殖中的應用。歐盟歐洲委員會資助項目研究論文集，121-126。
- 專受慶 (1997) 光合細菌對防治斑節對蝦病害的作用。海洋通報，16(3): 92-96。
- 陳秀男 (1996) 蝦病之管理對策 (二)。養魚世界，226: 46-51。
- 陳秀男、冉繁華、黎錦超、呂仲倫、洪明欣、張景盛、劉育霖、廖述育、施亞男、張簡子輝 (2002) 白蝦養殖技術手冊。台灣省漁會漁業推廣叢書，55: 25-33。
- 陳敏隆、吳豐成、丁雲源 (1998) 白點病毒症草蝦之細菌學研究。臺灣省水產試驗所台南分所研究報告，2: 9-17。
- 劉文準、倪純治、葉德贊、周宗澄、林燕順、陳慶輝、姚瑞梅、曾活水、顧靜瑜 (1997) 光合細菌淨化對蝦養殖水質之研究。台灣海峽，16(4): 455-457。