

## 池水潑灑光合細菌及異營菌對文蛤養成效果之比較-成長、活存、肝醣含量及體成分差異

周昱翰 黃福銘 黃麗月 丁雲源

### 摘要

爲了解添加光合細菌(PSB)及異營菌(HB)對文蛤養成效果，而實施本試驗。試驗處理分爲不添加活菌的對照組(control)、添加異營菌的 HB 組、添加光合菌的 PSB 組及混合添加異營菌和光合菌的 PSB-HB 組，每組兩重覆。經過 7 個月的飼育，文蛤收穫之平均體重，以添加光合細菌之 PSB 組 6.17 g 最好，其次爲添加異營菌之 HB 組 6.05 g 及 PSB-HB 組 5.81 g，最差爲對照組 4.17 g，且四組間有顯著差異( $P < 0.05$ )。但活存率及肥滿度四組沒有差異。有添加活菌的試驗組文蛤蛋白質和脂質含量均高於對照組，文蛤肝醣含量四組間有顯著差異( $P < 0.05$ )，以 HB 組(64.92 mg/100g)和 PSB-HB 組(63.64 mg/100g)最好，其次爲 PSB 組(50.52 mg/100g)，對照組最差(29.82 mg/100g)。在養殖 4 個月後，對照組水中氨氮明顯高於其他 3 組，且氨氮濃度高於 300 ppb，因此對照組成長較差的原因，可能是因水質不良所引起。

關鍵詞：文蛤、光合細菌、異營菌、成長、肝醣

### 前言

文蛤養殖大都憑經驗以目測水色來投飼，易超量導致池底有機物堆積，使得底層因缺氧而形成還原態 (Moriarty and Pullin, 1987; Reeburgh, 1983)。在此環境下，厭氧分解的產物如氨、硫化氫、甲烷及有機酸，對養殖生物都有害處，尤其是與底土相依的底棲生物如蝦、蟹及貝類，所受影響最爲直接 (Patrick and Delaune, 1977)。生物製劑可分解有機質及轉換有毒物質，常被應用於水產養殖以改善養殖環境、

抑制有害細菌、控制魚病的發生及提高養殖生物的成長率及活存率 (Gatesoupe, 1999)。Gomez-Gil *et al.* (2000) 認爲添加生物製劑可以降低海水魚苗的死亡率。Sharma and Bhukhar (2000) 指出添加生物製劑 Aquazyn 可以增加池中浮游動物的產量，進而提高鯉魚的成長。Skjeremo and Vadstein (1999) 則認爲添加生物製劑可有效抑制水中病原菌，減少海水魚育苗期間的疾病。Meunpol *et al.* (2003) 應用臭氧及生物製劑可改善草蝦

的活存率。Elston *et al.* (2000)在貝類育苗期間添加生物製劑可以抑制弧菌症，提高育苗的活存率。而 Alabi (2000)也應用生物製劑以控制海水無脊椎動物繁殖場的疾病。Dalmin *et al.* (2001)發現草蝦池添加生物製劑可增加池中有益細菌數量以淨化水質，同時也會抑制病原菌的滋長。Uma *et al.* (1999)發現添加生物製劑 Lacto-sacc, 可以提高印度白蝦 (*Penaeus indicus*) 的成長、活存率及對疾病的抵抗力。Rengpipat *et al.* (1998)在飼料中添加一種從草蝦池分離出的細菌 *Bacillus S11*，可使草蝦有效抵抗病原菌 *Vibrio harveyi*。而且 Rengpipat *et al.* (2000)也證實 *Bacillus S11* 可提高草蝦的成長及活存率。Jory (1998)應用 *Vibrio alginolyticus* 可顯著提高 *Litopenaeus vannamei* 後期幼苗的成長及活存率。但生物製劑應用在文蛤養殖的資料尚缺乏，有詳加探討的必要。

## 材料與方法

### 實驗設計：

以八個室外水泥池(8 m × 4.2 m)經過填沙、曬池及作水後，逢機分為對照組(control)、添加異營菌(HB)、添加光合菌(PSB)及混合添加異營菌和光合菌(PSB-HB)等四組，每組兩重覆。於3月21日放養平均體重 1.3 g 的文蛤苗，放養密度為 120 粒/平方公尺，池水深度維持在 50 公分。每週投餵市售鰻粉 2 次，投餵量為文蛤總重的 2%。

### 實驗菌液備製：

1.光合細菌：試驗所用的光合細菌菌液為紫色不含硫光合細菌 (*Rhodospseudomonas sp.*)，自行由文蛤池之有機發酵池分離出來後，依據 Biebl and Truper (1981)以裝有 Sawad 培養基 10 L 透明塑膠瓶密封於室外進行大量培養，約一週後光合細菌大量增殖，而使整瓶呈紅褐色，在波長 589 nm 下測其吸光值在 1.081-1.152 之間，此時光合細菌密度約為  $7.9-8.5 \times 10^8$  cell/ml，以此作為實驗菌液。

2.異營菌：異營菌為市售粉狀活菌，含枯草桿菌、酵母菌、硝化細菌，每公克約有  $1 \times 10^6$  cell，使用前將粉狀活菌溶於水中打氣 2 小時活化。

生物製劑添加量：PSB 組每週一次以光合細菌菌液全池潑灑 15 ppm。HB 組每週一次以粉狀活菌溶於水中打氣 2 小時後，全池潑灑 3 ppm。PSB-HB 組異營菌組混合菌組則依據上述光合細菌及異營菌之半數施放。

成長、肥滿度及活存率測定：每個月採樣一次，測量文蛤之殼長、殼寬及體重，測量後將文蛤放回原試驗池。在飼育實驗結束時測量各試驗組文蛤之體重、肥滿度(肥滿度=濕肉重/全重 × 100%)及活存數以換算活存率。

肝醣及體成份分析：實驗結束時採樣分析文蛤肝醣含量(田中及佐藤, 1989)及體成份(AOAC, 1984)。

水質測定：每天測量水溫、pH、鹽度及溶氧量，每兩週分析試驗池之水質乙次，分析項目包括懸浮固體量(SS)、氨-氮(ammonia-N)、亞硝酸-氮(nitrite-N)、硝酸-氮(nitrate-N)、化學需氧量(COD)(陳, 1980)。

水中細菌分析：實驗結束時採水利用 TSA 分析水中總生菌數及以 MICROBACT 鑑定細菌相。

## 結果

成長及活存：

7 個月的飼育期間，在前 4 個月各文蛤的成長各組並無差異，之後對照組明顯低於其他 (Fig. 1)。收穫時之平均體重以添加光合細菌 (PSB) 15 ppm 組的 6.2 g 最好，PSB 與對照組有明顯差異 ( $P < 0.05$ )。其次為異營菌 (HB) 3 ppm 組的 6.1 g 及混合組 (PSB-HB) 的 5.8 g，最差為對照組僅有 4.2 g。各組活存率在 93.1-96.3%，肥滿度在 84.7-89.7% 之間，其間沒有差異 ( $P > 0.05$ ) (Table 1)。

體成份及肝醣含量：

蛋白質含量以 HB 組 10.1% 最高，其次為 PSB-HB 組 (9.6%) 及 PSB 組 (9.3%)，最低為對照組 (8.6%)，但之間沒有差異 ( $P > 0.05$ )。脂質含量以 PSB-HB 組 0.57% 最高，其次為 HB 組 (0.56%) 及 PSB 組 (0.42%)，最低為對照組僅 0.20%，但四組之間沒有差異 ( $P > 0.05$ ) (Table 2)。在肝醣含量上四組之間有顯著的差異 ( $P < 0.05$ )，以 HB 組和 PSB-HB 組最好，分別為 63.6 mg/100g 及 64.9 mg/100g。其次為 PSB 組，最差的是對照組僅 29.8 mg/100g (Table 2)。

Table 1. Body weight, survival rate and condition factor of hard clam in various treatments.

Item Treatment	Initial weight (g)	Final weight (g)	Survival rate (%)	Condition factor* (%)
Control	1.29 ± 0.3**	4.17 ± 0.78 <sup>b***</sup>	94.68 ± 3.21	84.70 ± 6.54
PSB	1.29 ± 0.3	6.17 ± 0.97 <sup>a</sup>	93.07 ± 2.45	87.78 ± 7.58
HB	1.29 ± 0.3	6.05 ± 2.37 <sup>ab</sup>	93.36 ± 1.51	87.68 ± 4.12
PSB-HB	1.29 ± 0.3	5.81 ± 0.18 <sup>ab</sup>	96.29 ± 0.89	89.72 ± 3.21

\*: Condition factor = wet weight of meat/total weight of hard clam × 100 %

\*\* : Mean ± SD

\*\*\*: Duncan's multiple-range test

Table 2. Composition and glycogen contain of hard clam meat in various treatments.

Item Treatment	Protein (%)	Lipid (%)	Moisture (%)	Glycogen (mg/100g)
Control	8.64 ± 0.36*	0.40 ± 0.10	85.84 ± 0.81	29.82 ± 14.01 <sup>c**</sup>
PSB	9.32 ± 0.30	0.42 ± 0.08	85.04 ± 0.90	50.52 ± 12.86 <sup>b</sup>
HB	10.13 ± 0.56	0.56 ± 0.07	86.36 ± 0.36	64.92 ± 9.08 <sup>a</sup>
PSB-HB	9.59 ± 0.77	0.57 ± 0.08	84.83 ± 0.68	63.64 ± 12.72 <sup>a</sup>

\*: Mean ± SD

\*\* : Duncan's multiple-range test

水質：

飼育期間水溫 21°C-32°C, pH 7.68-9.10, 鹽度 12-24 ppt, 溶氧量在 5.5 ppm 以上, 各組之間幾無差異。但 ammonia-N 在放養 4 個月後, 對照組明顯高於其他 3 組 (Fig.2), 且其濃度超過 300 ppb。Nitrite-N 及 nitrate-N 也是如此 (Fig.3-Fig.4)。化學需氧量方面, 也是在養殖 4 個月後有較明顯的差異, 添加活菌的 COD 均比對照組高 1-2 ppm (Fig.5)。SS 方面, 各組的變動情況有一致的趨勢 (Fig.6)。

總生菌數及弧菌濃度：

添加活菌各組水中總生菌數及弧菌屬的細菌數明顯比對照組多 (Table 3), 水中總生菌數以 PSB-HB 組 1915 CFU/ml 最多, 其次為 PSB 組 1650 CFU/ml 及 HB 組 1415 CFU/ml, 最少為對照組 1235 CFU/ml, 而弧菌屬的細菌數量多寡也如同水中總生菌數, 以 PSB-HB 組 614 CFU/ml 最多, 其次為 PSB 組 525 CFU/ml 及 HB 組 420 CFU/ml, 最少為對照組 390 CFU/ml。但弧菌屬細菌數佔總生菌數的比例各組間卻差異不大, PSB 組 33.2%、PSB-HB 組 31.9%、對照組 31.5% 及 HB 組 30.0%。

討論

Jeng *et al.* (1979) 對台灣的文蛤及牡蠣作化學組成分析時, 認為肝醣含量愈高風味愈好。本研究亦分析出添加活菌可提高文蛤

的肝醣含量, 不論是單獨添加光合菌或異營菌, 或則混合使用光合菌及異營菌, 均能顯著增加文蛤的肝醣含量 (Table 2)。

從體重的成長觀之, 在養殖 3 個月以前各組差異不大, 第 4 個月後對照組的成長明顯不如其他 3 組 (Fig.1)。而池水 ammonia-N 濃度量明顯高於其他 3 組, 且濃度高於 300 ppb (Fig.2)。水中非離子氨-氮濃度在 280 ppb 時會使文蛤幼貝的濾食率下降 50% (Colt and Armstong, 1981), 此為對照組成長不佳的主要原因。

枯草桿菌曾應用在養殖池水的處理, 具有很好的氨氮去除效果 (陳, 1992), 而紫色不含硫光合細菌能利用的氮源有氮氣、氨、尿素等 (Willison, 1993), 所以在養殖中期以後, 添加活菌可以降低 ammonia-N 的累積, 避免因 ammonia-N 濃度升高影響到文蛤的成長。Dalmin *et al.* (2001) 發現添加生物製劑可以改善水質, 且能提升草蝦的成長及活存率。Sharma and Bhukhar (2000) 則發現可促進草魚的成長與本研究中結果一致。

添加活菌之試驗組的 COD 均比對照組高 1-2 ppm 這與許多報告認為添加活菌可降低 COD 的結果相反 (彭等, 1993; 林及陳, 1994), 可能是試驗期間各組的 COD 均在 6 ppm 以下的低濃度幾無下降空間所致 (廢水為 10000 ppm), 且 SS 各組間並無差異 (Fig.6)。

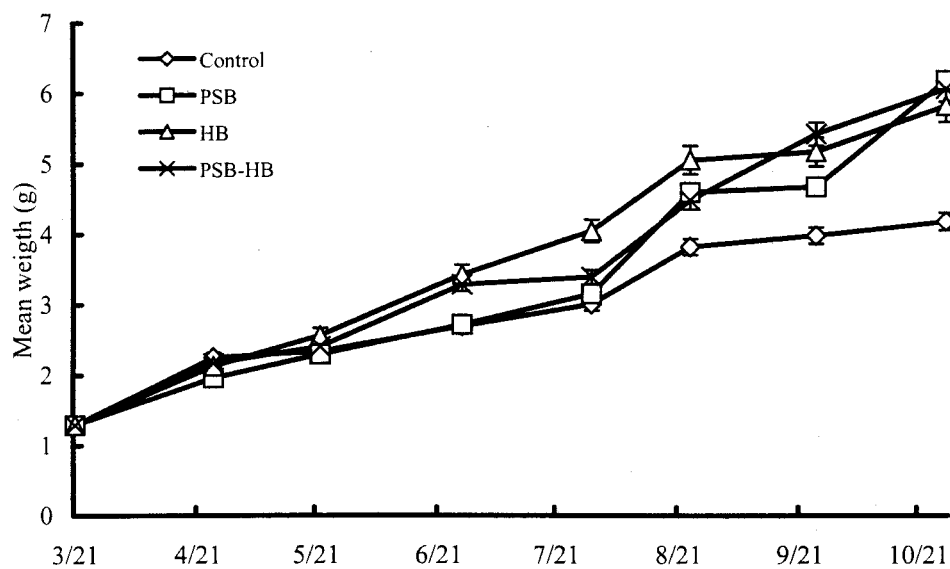


Fig. 1. Growth of hard clam.

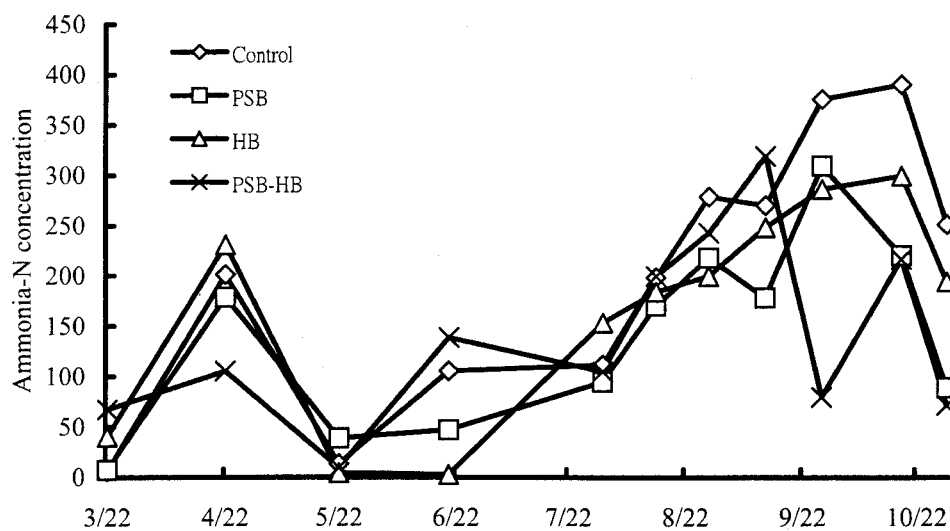


Fig. 2. Fluctuation of ammonia-N.

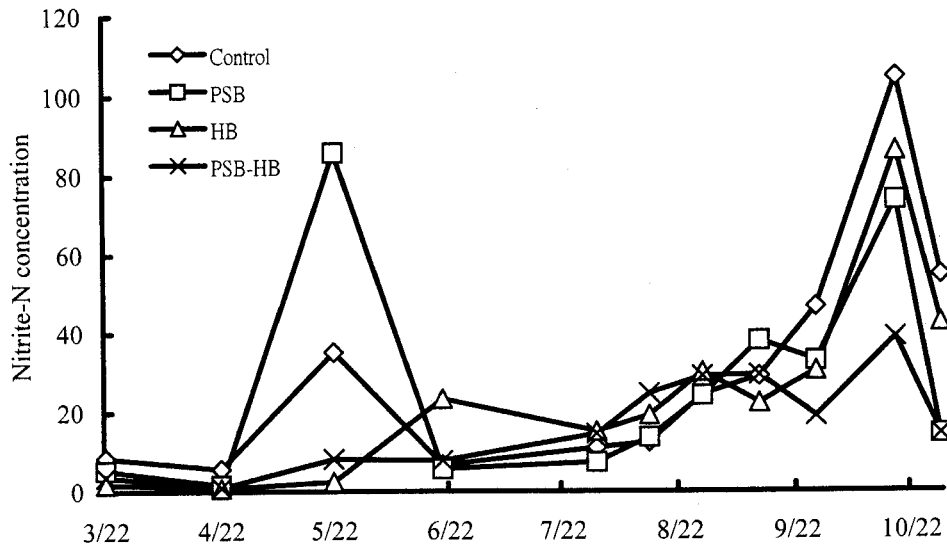


Fig. 3. Fluctuation of nitrite-N.

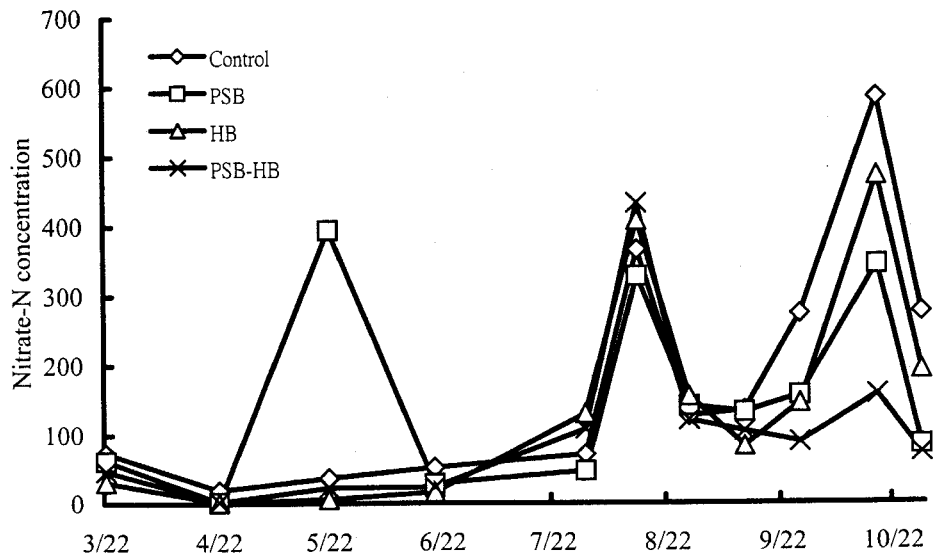


Fig. 4. Fluctuation of nitrite-N.

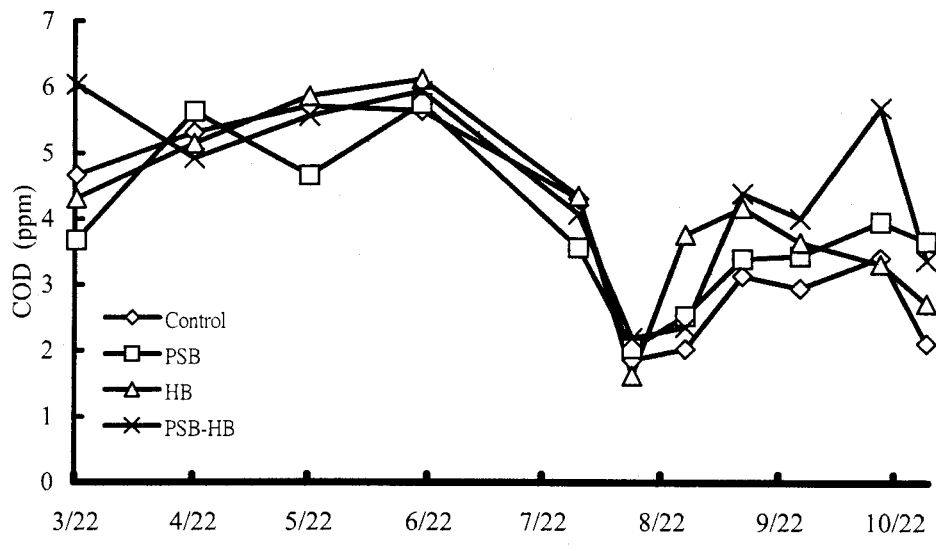


Fig. 5. Fluctuation of COD.

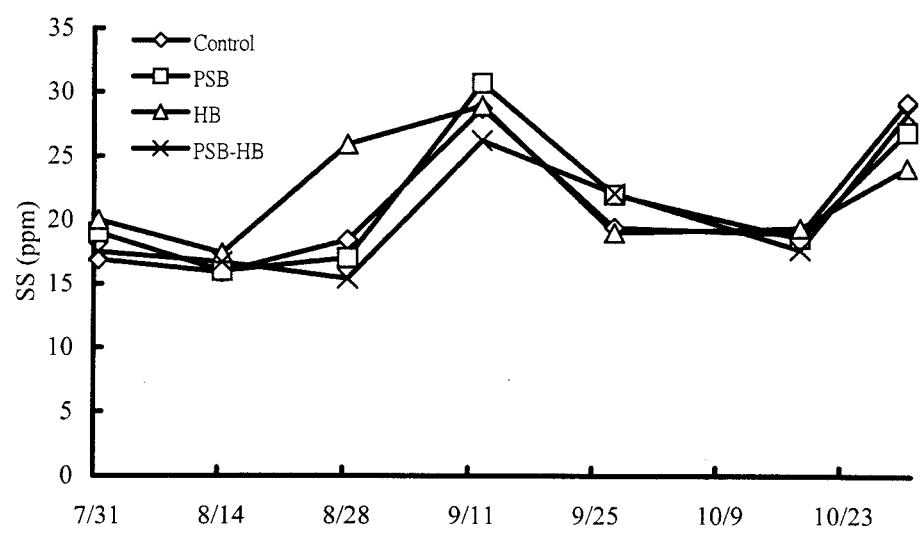


Fig. 6. Fluctuation of SS.

Table 3. Number of total bacteria and *Vibrio* spp in pond water.

Treatment \ Item	Total bacteria (CFU/ml)	<i>Vibrio</i> spp (CFU/ml)	<i>Vibrio</i> spp rate (%)
Control	1235	390	31.45
PSB	1650	525	33.22
HB	1415	420	29.96
PSB-HB	1915	614	31.92

添加活菌試驗組其總生菌數顯著高於對照組，而具病原性的 *Vibrio* 對雙枚貝之稚貝的威脅很大 (Lodeiros *et al.*, 1987; Nicolas *et al.*, 1996; Lamber *et al.*, 1998)。Kennedy *et al.* (1998) 找出添加 *Bacillus subtilis* 可以有效減少鋸蓋魚 (snook) 稚魚養殖過程中病原菌 *Vibrio* spp. 的數量。Chandrika (1999) 發現分離自養殖池底泥中的 *Bacillus* spp. 會抑制 *Vibrio*、*Aeromonas* 及 *E. coli* 等病原菌的生長。但是比較本研究所檢測之弧菌屬與總生菌數的比例，各組間差異不大，是否 *Rhodopseudomonas* sp. 較無效或施放次數或劑量不足則有待進一步追蹤探討。

#### 參考文獻

- 田中禮二、佐藤守 (1989) 魚類肝臟和筋肉中 Glycogen 的定量法。在：水產化學實驗法恒星社厚生閣，東京，日本，pp. 89-90。
- 林晉卿、陳貞秀 (1994) 含紫色光合細菌之生物製劑對豬糞尿廢水處理效果之研究。畜產研究，27: 69-80。
- 陳建志 (1992) 利用三種桿菌屬 *Bacillus subtilis*、*Bacillus cereus*、*Bacillus megaterium*，去除水中含氮化合物之研究。海洋大學養殖研究所碩士論文，基隆，88 pp。
- 陳建初 (1980) 水質分析。在：水質分析。九大圖書公司，台北，pp. 7-8。
- 彭耀寰、許船柏、王怡芬、張健雄 (1993) 於好氣接觸槽中 *Aspergillus niger* 對紙漿廢液木質素之消解。中國環境保護學會會誌，16: 2-8。
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1984) Official Methods of Analysis, 14th edition, AOAC, Washington, D.C.
- Alabi, A. O. (2000) The use of probiotic techniques for controlling bacterial diseases in marine invertebrate hatcheries. J. Shellfish Res., 19: 650.
- Biebl, H. and H. G. Truper (1981) Isolation of number of the family *Rhodospirillaceae*. In *The Prokaryotes*, Vol.1 (M. P. Starr *et al.*, eds.), Springer Verlag, Berlin, pp. 267-272.
- Chandrika, V. (1999) Incidence of antagonistic *Bacillus* spp.- An eco-friendly aquatic probiotic from aquaculture ponds. The Fourth Indian Fisheries Forum, Proceedings. 24-28 November, 1996, Kochi, Kerala, pp. 147-150.
- Colt J. E. and D. A. Armstrong (1981)



- Nitrogen toxicity to crustaceans, fish, and mollusks. Bio-Engineering Symposium for Fish Culture (FCS Publ. 1): 34-47.
- Dalmin, G., K. Kathiresan, and A. Purushothaman (2001) Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian J. Exp. Biol.*, 39: 939-942.
- Elston, R., A. Gee and R. P. Herwig (2000) Bacterial pathogens, diseases and their control in bivalve seed culture. *J. Shellfish Res.*, 19: 644.
- Gatesoupe, F. J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165.
- Gomez-Gil, B., A. Roque and J. F. Turnbull (2000) The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 187: 259-270.
- Jeng, S. S., S. Y. Hsu and G. S. Wang (1979) Chemical composition of Taiwan's oysters and clams. *Bull. Inst. Zool., Academic Sinica*, 18: 1-10.
- Jory, D. E. (1998) Use of probiotics in Penaeid shrimp growout. *Aquacult. Mag.*, 24(1): 62-67.
- Kennedy, S. B., J. W. Tucker, C. L. Neidig, G. K. Vermeer, V. R. Cooper, J. L. Jarrell and D. G. Sennet (1998) Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bull. Mar. Sci.* 62: 573-588.
- Lambert, C., J. L. Nicolas, V. Cilia and S. Corre (1998) *Vibrio pectinica* sp. Nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *Int. J. Syst. Bact.*, 71: 228-232.
- Lodeiros, C., J. Bolinches, C. Dopazo and A. Tozanzo (1987) Bacillar necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture*, 65: 15-69.
- Meunpol, O., K. Lopinyosiri and P. Menasveta (2003) The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 220: 437-448.
- Moriarty, D. J. and R. S. Pullin, eds. (1987) *Ditritus and microbial ecology in aquaculture*. Published by International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines. 420 pp.
- Nicolas, J. L., S. Corre, G. Gauthier, R. Robert and D. Ansquer (1996) Bacterial problems associated with the scallop *Pecten maximus* larvae culture. *Dis. Aquat. Org.*, 27: 67-76.
- Patrick, Jr. W. H. and R. D. Delaune (1977) Chemical and biological redox systems affecting nutrient availability in the coastal wetlands. *Geoscience and Man*, 18: 131-137.
- Reeburgh, W. (1983) Rates of biogeochemical processes in anoxic sediment. *Annu. Rev. Earth Planet Sci.*, 11: 269-298.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul and P. Menasveta (2000) Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11).

- Aquaculture, 188: 271-288.
- Rengpipat, S., W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul and P. Menasveta (1998) Effect of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture, 167: 301-313.
- Sharma, OP. and SKS. Bhukhar (2000) Effect of Aquazyn-TM-1000, a probiotic on the water quality and growth of *Cyprinus carpio* var. *communis* (L.). Indian J. Fish., 47: 209-213.
- Skjermo, J. and O. Vadstein (1999) Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. Aquaculture, 177: 333-343.
- Uma, A., T. J. Abraham and V. Sundararaj (1999) Effect of a probiotic bacterium, *Lactobacillus plantarum* on disease resistance of *Penaeus indicus* larvae. Indian J. Fish., 46: 367-373.
- Willison, J. C. (1993) Biochemical genetics revisited: the use of mutants to study carbon and nitrogen metabolism in the photosynthetic bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 104: 1-38.

Effects of photosynthetic bacteria and heterotrophic bacteria on the culture of hard clam (*Meretrix lusoria* Roding)-growth, survival, glycogen content and body composition

Yu-Han Chou, Fu-Ming Huang, Lie-Yueh Hwang and Yun-Yuan Ting

**Abstract**

Hard clam (*Meretrix lusoria*) were reared for 7 months when both photosynthetic bacteria and heterotrophic bacteria (PSB-HB), photosynthetic bacteria alone (PSB), heterotrophic bacteria alone (HB), and neither photosynthetic bacteria nor heterotrophic bacteria (control) were routinely applied to investigate growth, survival, glycogen content, and body composition of clam. Average final individual weight was 6.17, 6.05, 5.81, and 4.17 g for PSB-, HB-, PSB-HB-, and Control-clam, respectively. There was significant differences in individual weight among the treatments but not in survival rate and condition factor. Clam reared with probiotics, (PSB-HB, PSB, and HB) had higher protein, lipid, and glycogen content than the clam of Control. Glycogen content was 64.92, 63.64, 50.52, and 29.82 mg/100g for HB-, PSB-HB-, PSB-, and Control-clam, respectively. After 4 months' ammonia-N concentration in water of control-pond was greater than 0.3 ppm, higher than that in ponds of other treatments. Control-clam's poor growth could be attributed to poor water quality.

**Key word:** Hard clam, photosynthetic bacteria, heterotrophic bacteria, growth, glycogen.