

銀離子的殺菌功效及其對鰻魚 受精卵和仔魚的影響

林天生、劉富光 摘譯

水產試驗所淡水繁養殖研究中心



日本鰻仔魚(陳冠如攝)

前言

銅是最早被知道具殺菌作用的金屬離子，從很久以前就被利用作為殺菌劑。另有研究發現，銀離子對很多細菌如大腸菌、黃色葡萄球菌等也具有很強的殺菌作用 (山中等，2006；檜山等，1995；林等，1996；Zhao, 1996)，因此近年來銀化合物被溶入纖維等各種物質，形成聚乙烯薄膜 (Polyethylenefilm)，廣泛應用於農業 (草刈等，1998) 及醫療領域 (Lansdown, 2004)。另外在水產領域，金屬離子的利用正受到關注。中津和山田 (2001) 指出銀離子對琵琶鱒等淡水魚的病原菌具殺菌作用。藤本和岩本 (2005) 則利用銅離子的作用機制，進行

虎河豚的病害防治。

近年來，日本鰻 (*Anguilla japonica*) 的採卵及飼育技術已明顯進步，雖然能用人工方法培育出鰻線 (Tanaka et al., 2001；Tanaka et al., 2003；田中等，2006)，但尚未能進行商業生產。為了擴大生產規模，尚有很多的問題亟待解決。例如，從孵化至長成鰻線需耗時 200 天以上，初期活存率很低 (田中等，2006)。另外，目前的飼育方法，是使用以鯊魚卵為主要成分製成的膏狀飼料，此餌料可簡單的粘附在池壁，但容易污染水槽，每天需更換一次水槽，耗費很多人力與物力。另外，隨著餌料的附著，造成水槽壁面細菌滋生，可能影響仔魚的活存。岡村等 (未發表) 將作為殺菌劑的硝酸銀加入

飼育水中，發現飼育水槽污染物大為減少，雖然水槽每週需進行 2—3 次的更換，但初步證實不會影響仔魚的初期活存率。

本報告中，將作為離子添加劑的硝酸銀，加入飼育水中，探討對鰻魚受精卵孵化和仔魚活存的影響，以及對飼育水和飼育水槽壁面的殺菌作用。

材料與方法

試驗用的雌魚是使用伊良湖研究所經 2 年育成的雌性化鰻 (體重 500—800 g)，雄鰻是購自愛知縣內養殖場，體重 250—350 g。分別在鹽度 32 psu，水溫 20℃ 中進行催熟。雌鰻每公斤體重注射換算成乾重為 40 mg 的鮭魚腦下垂體，每週注射 1 次，前後共 8—10 次。雄鰻每公斤體重注射 1,000 IU 人類絨毛膜促性腺激素 (HCG)，每週注射 1 次。另外在採卵的 12 小時前，為了誘發雌鰻產卵，每公斤體重注射 2 mg DHP (17, 20-dihydroxy-4-pregnen-3-one, SIGMA)；而為了促進精子活性化，雄鰻每公斤體重注射 1000 IU HCG。然後，將水溫提升至 22℃ 促進產卵，所得到的受精卵及仔魚收集到容量 18 L 的水槽，飼育水溫 25℃，鹽度 34.5 psu。

孵化率、活存率：將硝酸銀以 34.5 psu 海水先行溶解，再配成 6 種濃度 (0、0.01、0.1、1、10 及 100 ppm)。在本試驗，因為只著眼於瞭解銀離子對卵及仔魚的毒性，為了排除因細菌增殖產生的影響，每公升的水中加入作為防腐劑用的青黴素 G ($C_{16}H_{17}N_2O_4SK$ ，白色結晶粉末) 100,000 IU

及硫酸鏈黴素 (Streptomycin sulfate) 0.1 g。

首先，調查銀離子對鰻魚受精卵孵化的影響。在裝有 1 L 海水的燒杯中加入各種濃度硝酸銀，分別放入授精後 6 小時的卵粒 100 個，然後靜置於 25℃ 恆溫箱中培養，30 小時後計算孵化的仔魚數，求出孵化率 (孵化仔魚數/授精數 $\times$ 100)。本試驗是由 3 尾種魚所獲得的卵，分別進行，求出 3 組的平均值。

其次，調查銀離子對仔魚活存率的影響，在各種濃度的燒杯中，分別放入 0 日齡 (剛孵化)，或 6 日齡 (開口時) 的仔魚 50 尾，求出每 24 小時後的活存率，分析不同時間的變化情形，本試驗使用的仔魚，是得自同一尾雌鰻。

生菌數：為了探討抑制飼育海水中細菌增殖所需要的硝酸銀濃度，採集伊良湖研究所仔魚飼育水槽所排出的海水，進行以下的試驗。在 6 個燒杯，各加入 100 mL 的供試海水，分別加入設定的硝酸銀濃度 (0、0.01、0.1、1、10 及 100 mg/L)。然後靜置於室溫 22℃ 環境，1 小時及 24 小時後從各燒杯取一部分的水，比較每一條件下的生菌數。另外也測定未處理海水的生菌數。生菌數的計算是以海洋細菌為對象，將細菌試料接種於 ZoBell Marine 洋菜培養基中 (0.5% Bactpeptone，1% Yeast extract，0.015 g $FePO_4 \cdot 4H_2O/L$ ，3% 人工海水粉末，1.5% Agar)，在 22℃ 培養 48 小時後，計算出現的菌落數，但不進行菌種的鑑定。

仔魚的長期飼育：要抑制飼育水體內的菌數，硝酸銀的添加須達到一定的濃度 (1 mg/L 以上)，連續暴露於高濃度的銀離子中

會對仔魚產生毒害。因此，需探討每隔一段時間飼育水中提高銀離子濃度的方法 (斷續添加法)。銀離子每隔 3 小時達到最大濃度，之後隨換水緩慢的稀釋。在飼育水中添加銀離子，是配合 1 天 4 次，每次停止注水 15—20 分鐘的給餌時間。注水停止後，將高濃度的硝酸銀直接加入水槽，此時水中的銀離子達最大濃度。開始注水後，銀離子濃度隨著 $S = S_0 \exp(-0.079 t)$ 的公式減少。在此， S_0 是換水前的銀離子濃度 (硝酸銀 1 ppm)， t 是時間，0.079 是表示試驗時水槽每單位時間的換水率。

供試的仔魚由 3 尾雌鰻產出，各設定硝酸銀添加區和無添加區 (對照組)。各組收容 2,000 尾 5 日齡仔魚，3 次試驗分別進行到 60 日齡 (55 天) 後，其中 1 次延長飼育至 270 日齡。飼育是採用容量 19 L 壓克力製黑色電解槽，每分鐘供給 1.5 L 海水 (22°C，30 psu)，每天於 8:30、11:30、14:30、17:30 共進行 4 次 15—20 分鐘給餌。餌料是以棘角鯊 (*Squalus acanthias*) 的卵為主要成分，再按照 Tanaka 的配方作一些改良。組成是鯊魚卵 48 g、南極蝦萃取液 45 mL、卵白縮氨酸 12 g、綜合維他命 0.25 g。每週 2 次，於星期一、四，以虹吸管將仔魚移至已充分清洗乾淨的另一同型水槽。為了調查銀離子的殺菌效果，在 3 次試驗中選擇 1 次觀察飼育系統內的生菌數變化。分別於水槽更換時及 24、48、72 小時共進行 4 次採樣。飼育水是取一部分作為樣品，而水槽壁面是水位以下壁面的上部偶而會露出的位置，以滅菌後的棉花棒擦拭面積約 1 cm² 的壁面，此棉花棒經由滅菌海水沖洗成懸濁液。以上的測

定是從飼育試驗開始至第二週，反覆進行 3 次，生菌數的計算，是使用上述 ZoBell 培養基。

另外，每天觀察計算水槽內仔魚的死亡尾數。對於成長，在 3 次試驗中選 1 次，分別在孵化後 9、30、60 天後，隨機各捕 15 尾，以 50 ppm MS-222 麻醉後，用游表尺量取全長，測定後放回原水槽。

統計處理

資料的統計處理，二組間差異分析是以 Mann-Whitney 的 U 檢定，3 組以上的則經 Kruskal-Wallis 檢定，進行 Scheffe 型的多重比較分析。以上計算，是使用 2008 Excel 統計軟體 (SSRI)。

結果

孵化率、活存率：在含硝酸銀海水中，進行受精卵孵化時，孵化率隨著濃度的上升而下降。在試驗開始後約 30 小時，硝酸銀濃度 0—0.01 ppm 組，孵化率達 80% 以上，但 0.1 ppm 組明顯減少，只約 10% ($p < 0.01$)，1 ppm 以上的各組全部沒有孵出，卵粒白濁下沉。

同樣的，在含硝酸銀海水中飼育仔魚時，其活存率隨濃度的上升而下降，孵化 0—5 日齡的仔魚，在硝酸銀濃度 0—0.1 ppm 組的活存率，經常接近 100%，開口後的仔魚 (6—11 日齡) 活存也相當良好。硝酸銀 1 ppm 組，在試驗開始後 24 小時，活存率 100%，之後逐漸下降。另一方面，10 ppm

以上時，仔魚在2天內全部死亡。

生菌數：從伊良湖研究所仔魚飼育設備的排水系統取得未處理海水，驗出細菌數將近 10^3 cfu/mL。加入硝酸銀靜置1小時後，濃度 0—0.1 ppm 組的生菌數大致沒有變化；1 ppm 組生菌數減少 70%；10 ppm 以上時，僅可測出 1% 的生菌數。靜置 24 小時後，0—0.1 ppm 組，生菌數大幅增加 10—100 倍，1 ppm 以上者，則未驗出生菌數，顯示海水中的生菌數會隨著硝酸銀添加濃度的提高與時間的拉長而減少。

仔魚長期飼育的生菌數：飼育水中的生菌數經 24、48、72 小時後，在 3 個時間點，硝酸銀添加區與對照區之間都沒有顯著差異。另一方面，水槽壁面的生菌數，在每個時間點都有顯著差異，硝酸銀添加區明顯較少。另外經 2 天的連續飼育，硝酸銀添加區的水槽壁面有透明感覺，有異於對照區的白濁狀態。

仔魚長期飼育的活存、成長：在長期飼育方面，添加硝酸銀時，仔魚初期活存率明顯增加。由 25 到 60 日齡仔魚的活存率有顯著差異 ($p < 0.05$)，硝酸銀添加區高達 10—20%。但是，60 日齡之後再延長飼育的水槽，則兩區沒有差異，活存率都偏低，養殖至 270 日齡的活存率，兩區都是 0.5%。

仔魚的全長，在整個試驗期間，硝酸銀添加區和對照區並沒有顯著差異 ($p > 0.05$)。另外，再延長飼育的水槽，兩區都有完全變態個體出現，對照區活存的個體中每 10 尾有 5 尾，硝酸銀添加區每 10 尾有 6 尾成為鰻線。從 5 日齡到鰻線的活存率，對照區是 0.25%，硝酸銀添加區是 0.3%。兩區產出的

鰻線，外部型態都沒有異常現象。

討論

本研究結果顯示，定期使用硝酸銀可有效殺除飼育水槽內的細菌，另外，由於能提升仔魚初期的活存率，顯示能有助於鰻線的生產。

目前有關銀離子的應用研究，很少觸及水產領域。銀離子對海洋性細菌的效果，深入調查的實例很少，只有針對熱泉噴出口附近生活的環節動物和耐高溫細菌對硝酸銀的忍受性作過調查。另外，雖然有幾個例子從環境、生態的觀點，進行銀離子對淡水魚類的急性毒試驗，但針對海水魚的研究很少。有報告指出，鰵科的寡杜父魚 (*Oligocottus maculosus*) (平均 1.33 g)，硝酸銀 96 小時之半致死濃度 (LC_{50}) 為 0.664 ppm。大西洋牙鯡 (*Paralichthys dentatus*)、美洲鰈 (*Pleuronectes americanus*) 的仔魚，96 小時之 LC_{50} 分別為 0.2—0.45 ppm 和 0.005—0.048 ppm，虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) 仔魚為 0.013—0.023 ppm；歐洲鰻 (*A. Anguilla*) 幼魚 (Yellow ell) 為 0.034 ppm。本試驗結果，孵化後及開口後的仔魚，其 96 小時之 LC_{50} 分別為約 0.6 ppm 及 1 ppm。與淡水魚相比，日本鰻較具忍受性，而與海水鰵科魚類大致相同。一般而言，硝酸銀在海水中的毒性較淡水低，這可能是海水中的氯化物很容易與銀離子結合成對魚類比較無害的氯化銀，或許這是鰻仔魚忍受性較高的原因之一。

銀離子使用於魚類的飼育水中，必需兼

顧其對養殖魚種的毒性與殺菌作用。根據本次試驗得到的結果，飼育水添加硝酸銀濃度需達 1 ppm 以上才具有殺菌作用，而且持續處理 1—24 小時都有效果。另外，先前的研究，淡水魚病原細菌在 0.41—0.94 ppm 銀離子中，增殖受到抑制，而在熱泉噴出口發現的海洋細菌，於 3 ppm 銀離子培養液中，增殖受到抑制，接近本試驗確認具殺菌效果的濃度。

另一方面，鰻魚受精卵感受性較高，0.1 ppm 就會產生影響，但孵化後的仔魚則不受影響。另外，即使在 1 ppm 濃度，經 24 小時亦不受影響。因此使用於鰻仔魚時，以 1 ppm 硝酸銀浸浴 24 小時，應是對仔魚不具毒性又能兼顧殺菌作用的方法。但是應避免使用於受精卵孵化過程。

在長期飼育時，每天施用 4 次的 1 ppm 硝酸銀，浸浴時間 15—20 分鐘。由於鰻仔魚飼育期間達 200 天以上，因此長期的影響也要考量。但是由成長及正常變態個體的產生來看，似乎沒有因長期使用硝酸銀而出現影響。達 60 日齡的初期活存率，硝酸銀添加區明顯較好。這種情形，坂見等也有提出，可能與水槽壁面的生菌數有關。其推論是可能因幼齡仔魚游泳能力較弱，受注水沖擊，接觸受污染的水槽壁面，而受傷致死的可能性更大。此時水槽壁面如果乾淨，即使遭受外傷也不一定會死。

在飼育期間使用銀離子能達到實用化時，一定要考慮銀離子在魚體內的蓄積、食品的安全性及排水中的濃度等。目前已有報告針對銀離子在魚體內的蓄積進行探討，將鰈魚 (*Pleuronectes platessa*) 在含 0.04 ppm

硝酸銀的海水中飼育 2 個月後，腸道內會大量蓄積 (0.49 mg/kg)，肌肉等其他的組織則低於 0.05 mg/kg。在相同條件下，背棘鰻 (*Raja clavata*) 在肝臟和腸道大量蓄積 (各為 1.5 mg/kg、0.6 mg/kg)，藍鰓太陽魚 (*Lepomis macrochirus*) 則幾乎沒有蓄積。有報告指出，老鼠經口投，硝酸銀的半致死量 LD_{50} 為 50 mg/kg。投餵經硝酸銀處理過的魚作為餌料，也不會有立即致死毒性。長時間曝露在含硝酸銀的飼育水中，鰻魚體內有多少的銀蓄積，或是作為食品時，殘留量需在容許範圍內，都是今後需檢討的課題。有報告指出，在美國飲料水中銀離子濃度的容許值為 0.01 ppm。鰻仔魚飼育過程中，有效銀離子比這高出很多。另外，銀化合物也廣泛存在於一般環境中，每公升河川水中有 0.3 μg ，海水中有 0.1 μg 存在。從以上來考量，硝酸銀處理過的飼育水，必須充分稀釋再排出。另外，大規模設施長期使用時，應考慮設置相關廢水處理設備。

以往進行鰻仔魚飼育時，由於水槽很容易受污染，必需經常換水。添加銀離子的飼育方法，保持水槽清潔，可提高仔魚初期的活存率，可減少換水的頻率。換水需耗費大量的勞力，這樣的處理方式對減輕人力極具意義。另外，培育 60 天以上的活存率，跟以往相較，具有同樣的水準。

本篇摘譯自：

岡村明浩、山田祥朗、堀江則行、三河直美、宇藤朋子、田中 悟、塚本勝己 (2009) わぎ卵・仔魚の飼育における銀イオンの添加：毒性と抗菌作用。日本水産學會誌，75(5): 786-792。