

中華民國 第 50 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高職組 農業及生物科技科

佳作

091404

石斑魚腸道菌選殖與有益菌 NB1 之應用探討

學校名稱：高雄市私立樹德家事商業學校

作者：	指導老師：
職一 胡育慈	李冠徵
職一 張玉琳	李建宏
職一 章家誠	
職一 郭玫邵	

關鍵詞：石斑魚、益生菌、水質淨化

石斑魚腸道菌選殖與有益菌 NB1 之應用探討

摘要

集約式水產養殖過程中，過高的生物排泄量往往分解不及而積累在環境中，容易造成生物體弱化而發生各種病變，而以益生菌改善根本的養殖環境是一個近代熱門的研究方向。我們在點帶石斑魚消化道挑選出四組菌株可以提升石斑稚魚存活率，16S rRNA 之定序結果分別為光合細菌、希瓦氏菌、乳酸桿菌以及枯草芽孢桿菌。其中希瓦氏菌屬的 NB1 菌株具有良好的亞硝酸根與氨氮廢物降解能力，且非行一般硝化作用途徑。而在室內石斑魚孵化繁殖過程，添加 NB1 菌使石斑魚苗存活率明顯提高；室外白蝦育成池投放 NB1 菌，明顯改善水質與提升生物活力。因應世界的綠色思維，考量永續經營與對人體健康，有機養殖必成為新趨勢，也許 NB1 菌有希望在未來這波養殖漁業的演進中佔一席之地。

壹、 研究動機

台灣養殖漁業由於種苗生產與養殖技術精進，在周邊產業共榮發展結果，陸上魚塢養殖及海上箱網養殖魚類，成為國內外食用魚類的主要供應來源，每年年產值超過新台幣 300 餘億元。其中，石斑魚類更為華人地區節日婚慶宴客喜好食用的高級食材。依據聯合國糧食及農業組織統計資料顯示，2007 年產量台灣石斑魚產量即達世界總產量之 25%，產值為新台幣 38 億元，占全世界總產值的 58%。粗估計國產石斑每年未納入統計輸出約有 1.3 萬公噸，價值約新台幣 30 億元。隨著大陸地區經濟起飛，對於高價魚類需求與日俱增，因此石斑魚市場擁有極大成長空間。但在 2005 年 7 月，香港爆發台灣生產的石斑魚含有致癌的孔雀石綠，重創台灣魚產品的形象，也使許多無辜養殖戶受牽累，嚴重影響生計。



事實上，台灣許多養殖池由於常年放養密度高、投餵飼料多以及生物排泄物等有機物質堆積在池底，易導致水質惡化，病原菌叢生，使魚蝦遭受緊迫或因而罹病。過往多使用抗生素、殺菌劑來治療魚蝦病變及壓抑水中之病原菌，卻容易產生抗藥菌株或藥物殘留等問題，以致於現在新病原體層出不窮、投藥效果越來越差、而養殖環境也容易不穩定。為了瞭解這樣濫用藥物的情形是否依舊盛行，我們走訪數間位於台南與屏東的農藥行與飼料供應

商，發現許多漁民還是用這樣的方式在經營養殖。一些漁民私底下說，要檢測什麼項目他們知道，所以他們現在多改用許多較難偵測的抗生素衍生物或其他不在檢測之列的藥品，用起來有效又不怕過量被罰！真是一個讓人震驚又難過的消息！然而，這也不禁讓我們問問自己，對於這樣的狀況，我們可以做些什麼？

在查閱文獻之後，我們發現，近年來許多人已開始嘗試在養殖水體中施用有益微生物製劑來改善養殖生態環境、提高養殖動物的免疫力、抑制病原微生物，從而減少疾病發生。在歐美、日本及印尼、泰國等國家的水產養殖業中，微生物製劑得到日益廣泛的應用，並創造了巨大的經濟效益，有希望成為未來水產養殖動物病害防治的一個新方向。微生物製劑是由一些對人類和養殖物件無致病危害並能改良水質狀況，抑制水產病害的有益微生物製成。益生菌一般具有改良水質、增加溶氧、降低氨氮、抑制致病菌生長、改善動物體內水環境生態平衡、提高動物抗病與免疫力、促進養殖物件生長等功能。有趣的是，其中有數篇報告是使用乳酸菌、酵母菌與酪酸菌等人類常用的腸益菌來改善養殖，也有相當成效。於是，我們便聯想到，是否在魚身上也有類似的腸益菌存在呢？如果有，又是否可應用於改善養殖環境與提升養殖的產能呢？

貳、 研究目的

- 一、選殖石斑魚的腸道菌
- 二、探討腸道菌對於石斑稚魚存活率之影響
- 三、探討腸道菌對於水體淨化之成效
- 四、探討 NB1 在不同環境下之水體淨化能力
- 五、探討 NB1 對於室內繁殖場之實用性
- 六、探討 NB1 對於室外育成池之實用性



參、 研究器材與藥品

- 一、器材：魚缸、馬達、打氣機、解剖器材、離心機、無菌操作臺、微量滴管、培養皿、滅菌釜、酒精燈、顯微鏡、燒杯、試管、PH 檢測儀、恆溫培養槽、滴管、微量天平、秤量紙、震盪器
- 二、藥品：水質檢測套件(Tetra)、酵母萃取物(BD)、peptone(BD)、天然澳洲海鹽(台鹽)、石斑稚魚專用飼料、生理食鹽水、洋菜膠、 NH_4NO_2 、 HCl 、 NaOH

液態培養基	2%酵母萃取物、1%peptone、ddH ₂ O
固態培養基	2%酵母萃取物、1%peptone、1.5%洋菜膠、ddH ₂ O

圖一、實驗室設備



無菌操作臺



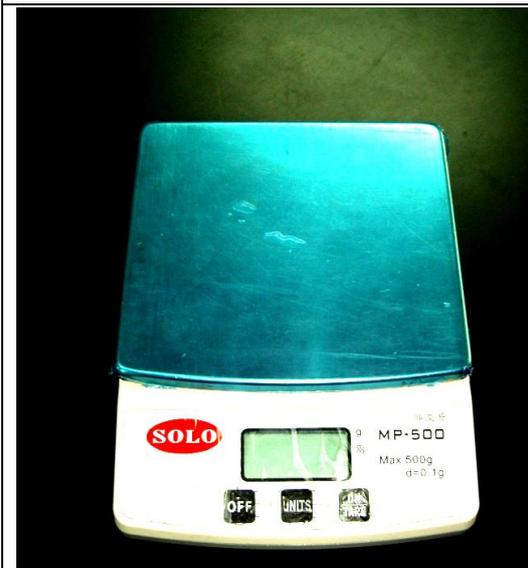
魚缸



分光光度計



菌液混搖機



電子秤



微量滴管

肆、 研究過程與結果

一、 選殖石斑魚的腸益菌

(一)將由漁民所提供的點帶石斑魚（見圖二）活體迅速置於冷凍庫中，令其昏迷死亡。取出後以酒精噴灑消毒體表，解剖腹腔並取出肛門與胃部之間的消化道。剪碎消化道後加入生理食鹽水，震盪 15 分鐘。並以 1000rpm 離心 10 分鐘，將上清液以 10 倍、100 倍、1000 倍等三種濃度稀釋。各取 0.2ml 的稀釋後溶液以 L 行玻棒均勻塗抹於製備好的固態培養基上（每種濃度皆塗三盤），在恆溫箱 30°C 中培養 24~48 小時；觀察菌落生長情況。



圖二、點帶石斑魚。圖為漁民在近海所捕獲的點帶石斑魚，但無法確定是否為野生種或是八八水災後逃離養殖環境的石斑。此圖已噴灑過酒精，準備進行解剖，黃色虛線處為解剖位置。

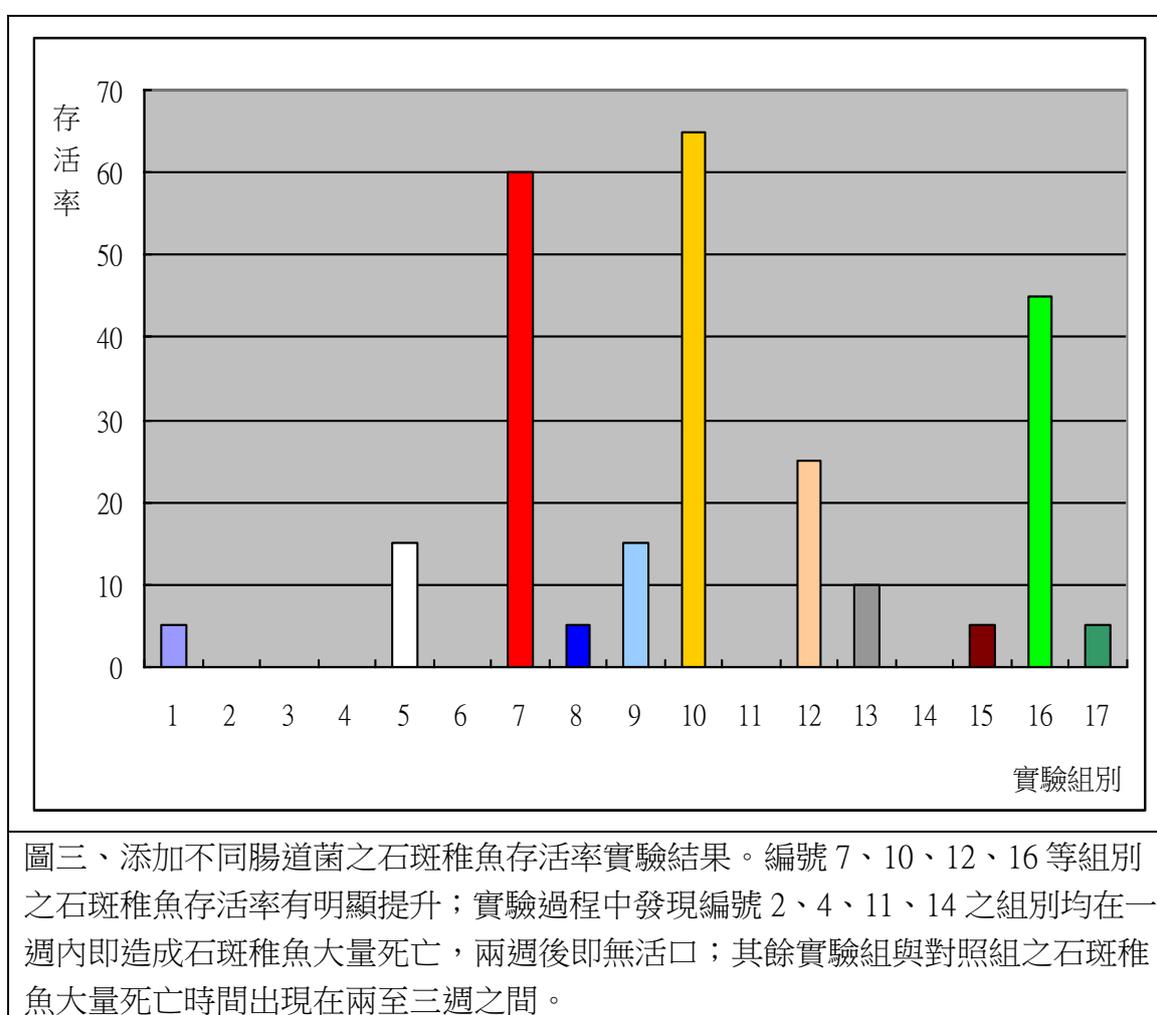
(二)因 1000 倍稀釋溶液所塗抹的培養皿之菌落密度較為適當（如右圖所示），在此培養皿上隨機挑選 16 個菌落。作記與各別接種至 10ml 的液態培養基內，於 30°C 的恆溫箱做 24h 混搖。將其產物取出 1ml 暫置於 -20°C 冰箱中保存，其餘的產物倒入 15ml 離心管，封口後置放於 4°C 備用。操作存活率實驗期間，每日取 0.15ml 的 4°C 備用菌液於 1.5ml 的新鮮培養基中，在 30°C 恆溫箱做隔夜混搖以重新活化、放大。



二、探討腸道菌對於石斑稚魚存活率之影響

(一) 將漁民所提供之石斑稚魚(白身，2.5~2.8 公分)分別放置於具循環系統的 28°C 恆溫魚缸(水量 40L)內，每缸內放置 10 隻稚魚。每日餵食稚魚專用飼料四次，餵食時間點分別為 8、12、16、20 時。

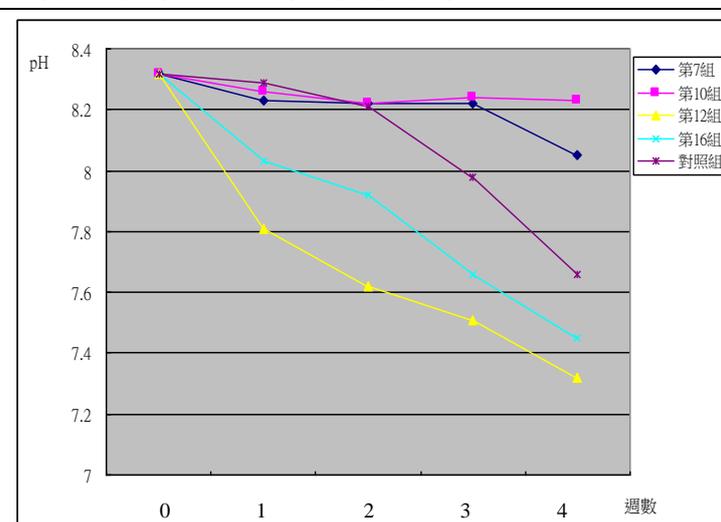
(二) 第一次餵食前將飼料浸泡在重新活化的菌液(取 0.2ml 的 4°C 菌液置放於 2ml 的新鮮培養基中，在恆溫箱 28°C 做隔夜混淆)中 5 分鐘，爾後將浸泡菌液與飼料倒入魚缸中。對照組使用新鮮培養基取代菌液。記錄四週後各組之存活率，重複兩次取其平均值，結果如下圖三所示。



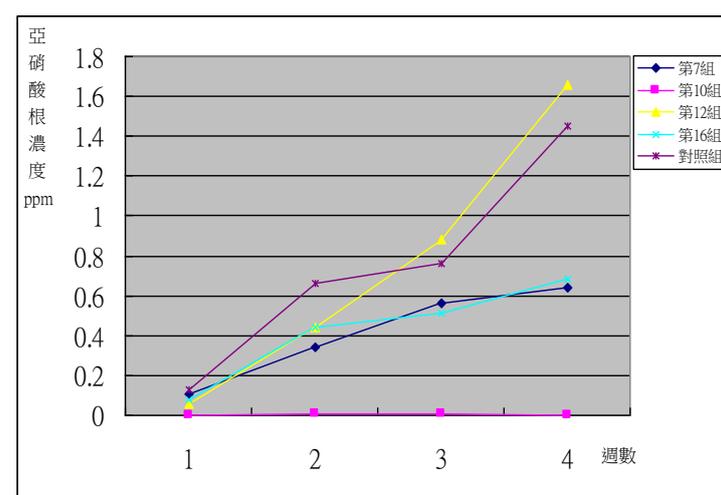
圖三、添加不同腸道菌之石斑稚魚存活率實驗結果。編號 7、10、12、16 等組別之石斑稚魚存活率有明顯提升；實驗過程中發現編號 2、4、11、14 之組別均在一週內即造成石斑稚魚大量死亡，兩週後即無活口；其餘實驗組與對照組之石斑稚魚大量死亡時間出現在兩至三週之間。

三、探討腸道菌對於水體淨化之成效

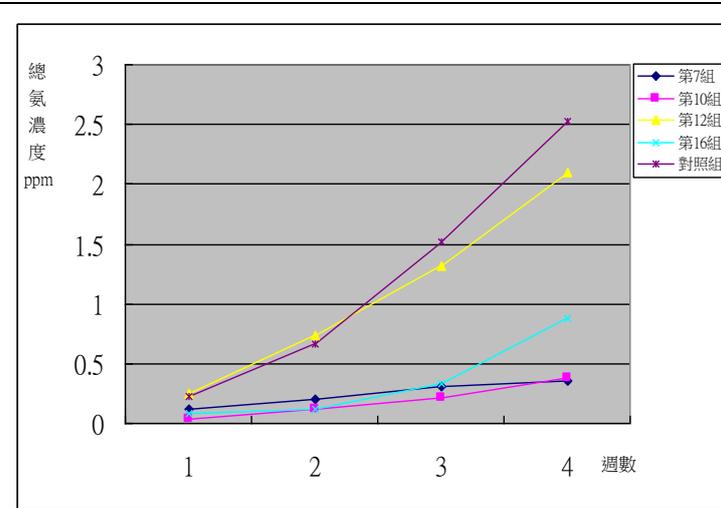
(一) 為了進一步探討腸道菌是否對水體具有淨化的功能，造成石斑稚魚存活率有所提升。我們挑選第石斑稚魚存活率較高之菌株重新操作石斑稚魚存活率的實驗，每週記錄其水質，檢測項目包含酸鹼值(圖四)、亞硝酸根濃度(圖五)與總氨(NH⁴⁺/NH₃)濃度(圖六)。



圖四、不同菌株對水體酸鹼值之影響。由此圖可發現在不添加任何菌種的對照組中，為期四週的養殖過程中會造成水質的酸化。第12與16組其酸化的情況更為明顯，皆降至pH7.5以下；第10組的酸鹼值相對穩定，仍保持在pH8.2左右，與新鮮海水之酸鹼值較為接近。



圖五、不同菌株對水體亞硝酸根之影響。由此圖可發現在不添加任何菌種的對照組與第12組中，為期四週的養殖過程中會造成亞硝酸根的快速累積。第7與16組的亞硝酸根濃度較低；第10組的亞硝酸根濃度十分穩定且無上升趨勢，與新鮮海水之0ppm最接近。



圖六、不同菌株對水體總氨濃度之影響。由此圖可發現在不添加任何菌種的對照組與第12組中，為期四週的養殖過程中會造成總氨的快速累積。第7與10組的總氨累積濃度較低；第16組的總氨濃度則稍高於第7與第10組。而無論快或慢，各組總氨濃度皆呈現上升趨勢。

(二)分子態的氨為親脂性分子，容易滲透到魚體內造成中毒。而總氨的檢測會將水中分子態的氨與離子態的銨一併計入，若要得知分子態的氨濃度則需要進一步換算。換算過程需要知道水溫與酸鹼值才能進行，我們節錄換算表(表一)並將各組四週後的總氨濃度換算成分子態的氨濃度(表二)。結果發現雖然總氨濃度相差殊異(約 0.3~2.5ppm)，但分子態的氨濃度卻是差異較少(0.01~0.04ppm)，而以對照組最高；第 16 組最低。

pH 值	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2	8.4
氨百分比%	0.96	1.50	2.36	3.70	5.74	8.80	13.26

表一、分子態氨濃度換算表(水溫 28°C)

	第 7 組	第 10 組	第 12 組	第 16 組	對照組
氨濃度 (單位: ppm)	0.02	0.03	0.03	0.01	0.04

表二、換算各組第四週之分子態氨濃度

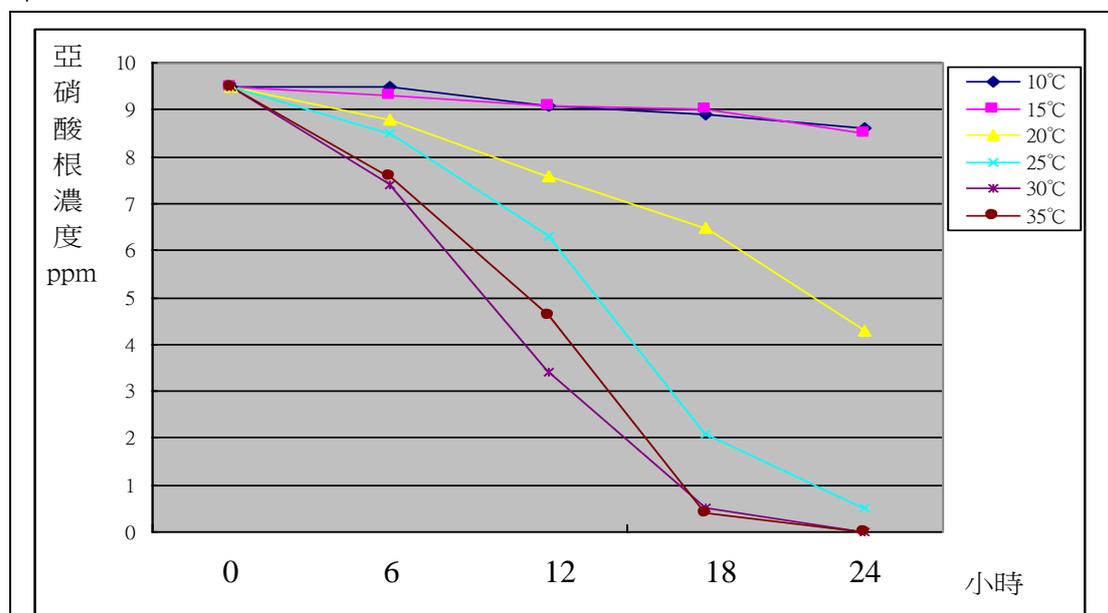
(三)在對此四組腸道菌進行初步的水質淨化能力分析之後，發現除第 12 組菌株之外，其餘各組菌株對於降低總氨濃度或亞硝酸根濃度皆有一定程度的作用。為了能更進一步探討這些各組腸道菌的特性，我們在做水質淨化試驗的同時也將此四組菌株送往生技公司，做 16S rRNA 之定序，定序結果則由實驗室學長姐協助比對序列與判別菌株。

初步的判別結果整理於表三。而在搜索文件資料後，發現第 7 組之光合細菌、第 12 組之乳酸桿菌、第 16 組之枯草芽孢桿菌等應用於水產養殖之資料相當多。相對之下，第 10 組之希瓦氏菌的研究普遍著重在微生物發電、脫色或是還原金屬等方面，水產養殖的應用與探討並不多。然而在我們的前述實驗結果中，發現添加第 10 組菌株的石斑稚魚存活率最高，活力也最好。唯一能將亞硝酸根濃度有效降低的也只有第 10 組。考量這些原因與有限的人力、物力資源，我們決定以下階段的實驗，將針對將第 10 組菌株進行較廣泛的探討。此外，為了操作方便，故將此菌株命名為「NB1」。

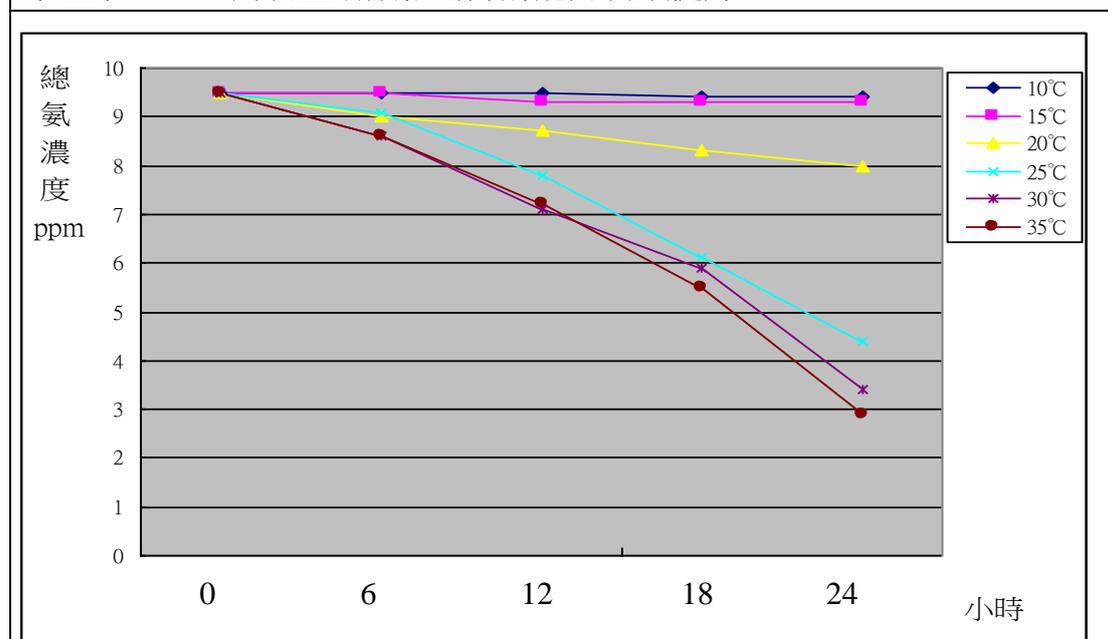
	第 7 組	第 10 組	第 12 組	第 16 組
種類	光合細菌 <i>Rhodospseudomonas sp.</i>	希瓦氏菌 <i>Shewanella sp.</i>	乳酸桿菌 <i>Lactobacillus sp.</i>	芽孢桿菌 <i>Bacillus sp.</i>

四、探討 NB1 在不同環境下之水體淨化能力

(一) 為了瞭解不同溫度的水質狀況下，NB1 對亞硝酸根與總氨濃度的降解能力是否有所改變，而改變的情形為何？我們將 0.5ml 的新鮮 NB1 菌液倒入 9.5ml 之亞硝酸銨標準液（10ppm），並於 10°C ~ 35°C 等養殖環境可能遭遇的水溫範圍內，每隔 6 小時記錄一次水質變化情形，其結果如下圖七、圖八所示。

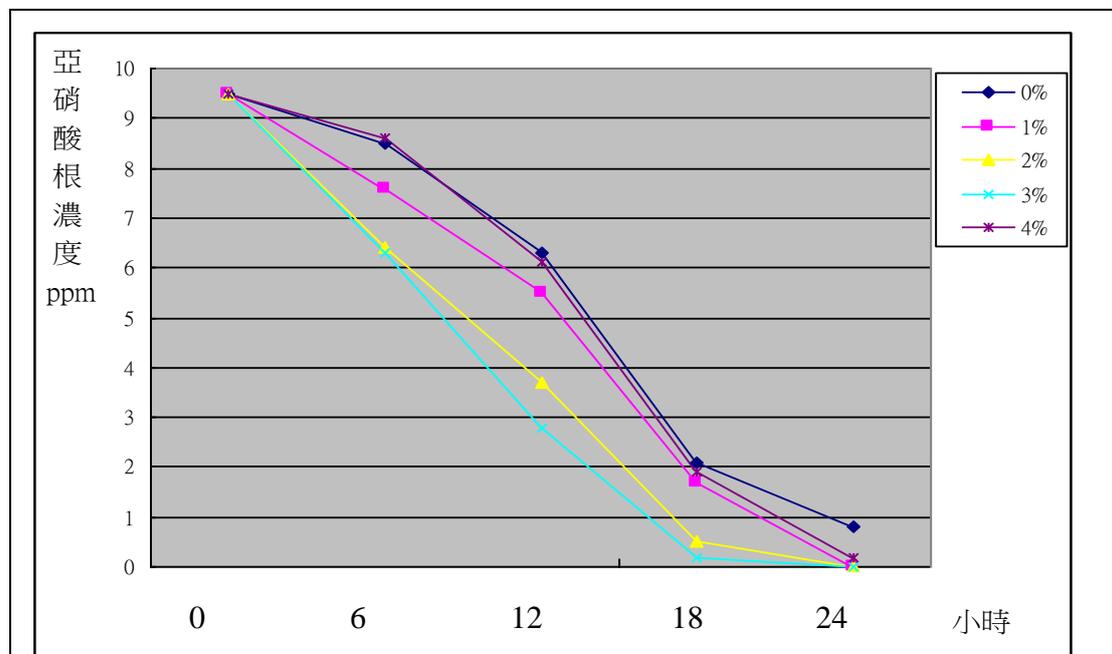


圖七、不同溫度對於 NB1 降解亞硝酸根之影響。結果顯示 15°C 以下的低溫環境對於 NB1 降解亞硝酸根的作用有強烈抑制作用；而在 25°C 以上的水溫中，NB1 對於亞硝酸根的降解能力明顯提升。

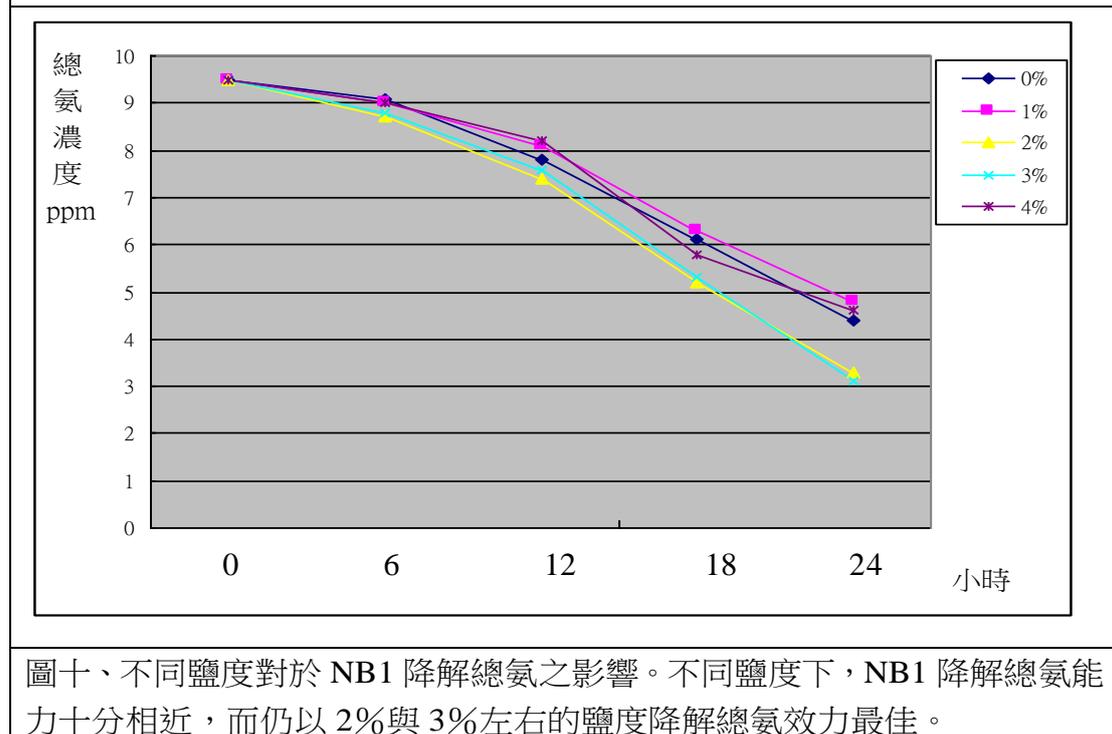


圖八、不同溫度對於 NB1 降解總氨之影響。結果顯示 15°C 以下的低溫環境對於 NB1 對於總氨幾乎無降解能力；而在 25°C 以上的水溫中，NB1 對於總氨的降解能力明顯提升，但其降解速率不若降解亞硝酸根快速。

(二) 為了瞭解不同鹽度的水質狀況下，NB1 對亞硝酸根與總氨濃度的降解能力是否有所改變，而改變的情形為何？我們將 0.5ml 的新鮮 NB1 菌液倒入不同鹽度（0%~4%等養殖環境可能遭遇的鹽度範圍）之 9.5ml 之亞硝酸鉍標準液（10ppm），於室溫下每隔 6 小時記錄一次水質變化情形，其結果如下圖九、圖十所示。

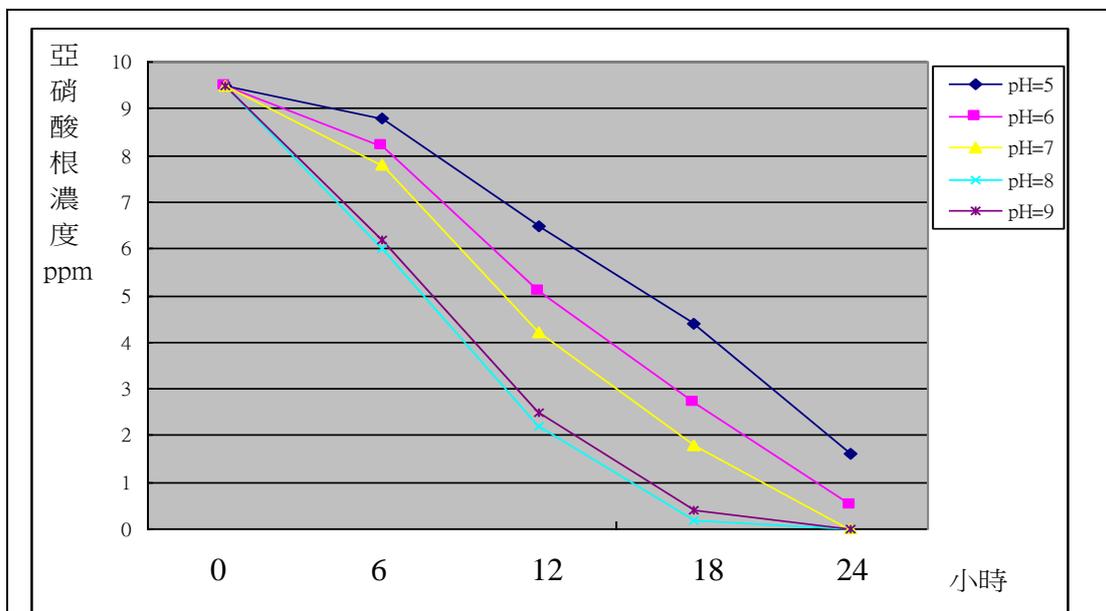


圖九、不同鹽度對於 NB1 降解亞硝酸根之影響。不同鹽度對於 NB1 降解亞硝酸根的能力影響較不同溫度的影響小，而在 2%與 3%左右的鹽度降解效力最佳。0%與 4%的鹽度下，NB1 降解亞硝酸鹽的能力稍差。

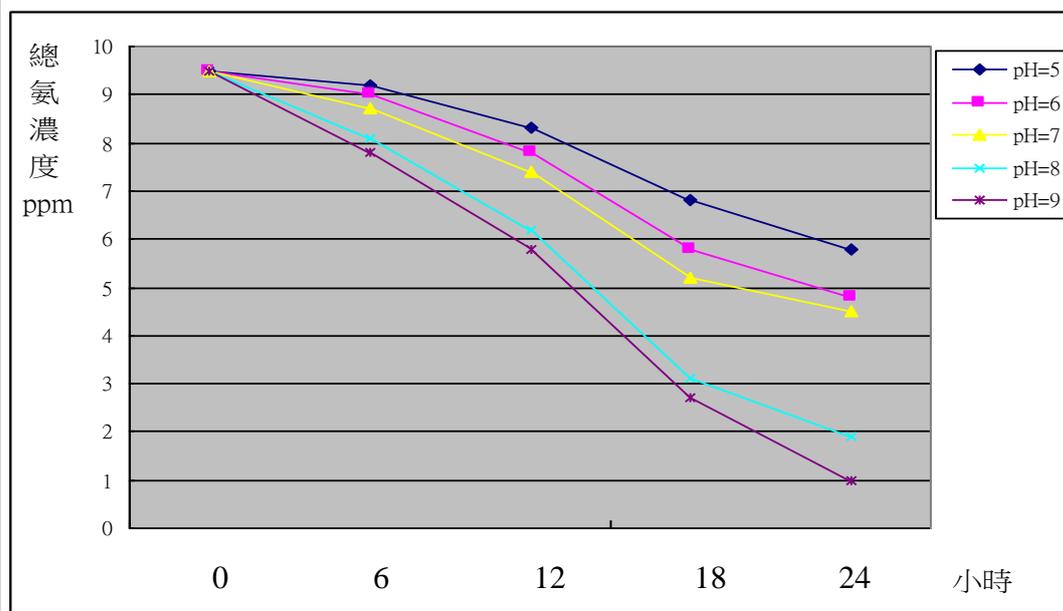


圖十、不同鹽度對於 NB1 降解總氨之影響。不同鹽度下，NB1 降解總氨能力十分相近，而仍以 2%與 3%左右的鹽度降解總氨效力最佳。

(三) 除了探討溫度與鹽度對 NB1 淨化水體的影響之外，我們也探討水質酸鹼對於 NB1 的影響。我們將 0.5ml 的新鮮 NB1 菌液倒入不同 pH 值 (pH=5~9 等養殖環境可能遭遇的酸鹼值範圍) 之 9.5ml 之亞硝酸銨標準液 (10ppm)，於室溫下每隔 6 小時記錄一次水質變化情形，其結果如下圖十一、圖十二所示。



圖十、不同酸鹼度對於 NB1 降解亞硝酸根之影響。由結果可見 NB1 在 pH 8 與 pH 9 鹼性的環境中，降解亞硝酸根較為迅速；反之，在較偏酸性的環境中，NB1 降解亞硝酸根相對緩慢。



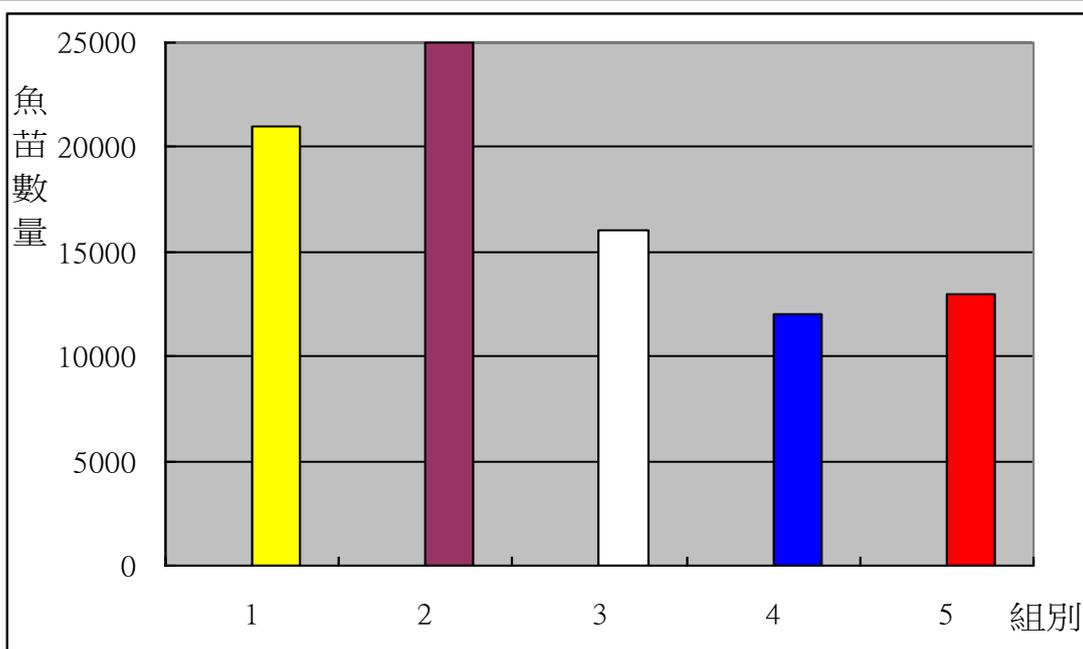
圖十一、不同酸鹼度對於 NB1 降解總氨之影響。由結果可見 NB1 在 pH 8 與 pH 9 鹼性的環境中，降解總氨較為迅速且降幅也較大；反之，在較偏酸性與中性的環境中，NB1 降解總氨較緩慢且降幅也明顯較小。

五、NB1 對於室內繁殖場之實用性

由於稚魚數量有限且十分脆弱，為了降低稚魚的緊迫與減少實驗變因的考量下，我們未進行稚魚體長與重量的測量。而在前述實驗中，我們發現菌株 NB1 對於稚魚的存活率與活力均有顯著的提升，且顯然對降解總氮與亞硝酸等有害魚體健康的物質具有一定成效。在小組討論後，決定先測試 NB1 在較大規模的室內養殖池中之效用。參與實驗的室內石斑繁殖場有台南永安、高雄林園以及屏東枋寮三處，而各養殖業者養殖方式、養殖環境與最終產量殊異，此階段實驗將以個別案例方式進行討論。

(一) 台南永安石斑繁殖場

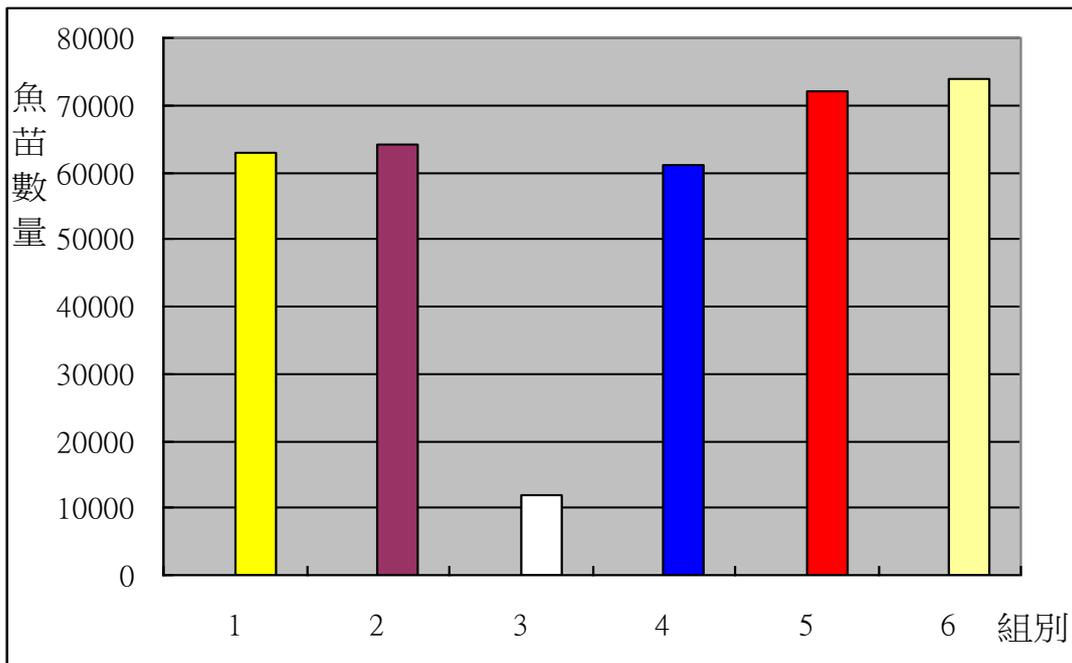
實驗記錄：室內水泥池 7 座，每座約 60 噸水，水溫 28°C，使用天然海水。兩座為蓄水池，其餘五座做為點帶石斑魚孵育場，茲編號為 1、2、3、4、5。其中 1 號、2 號與 3 號池分別在放卵前 3 日添加 NB1 菌液 0.6 公升、6 公升與 60 公升，對應的菌液投放濃度分別為 10ppm、100ppm 與 1000ppm。每週添加一次並記錄的魚苗狀況，添加五周後魚苗即進入寸苗階段，此時即可估算數量以及出貨。最後再將各組的魚苗產量整理如下（圖十一）。



圖十一、永安繁殖場之石斑魚苗產量。1 號池 (10ppm)、2 號池 (100ppm)、3 號池 (1000ppm) 等實驗組皆有相對較高的產量，其中 2 號池魚苗數量幾乎達對照組 (4、5 號池) 的兩倍。據場主表示，2 號池的吃餌狀況亦活躍，且少有發顛、打轉等病態行為出現。3 號池在受精卵孵化初期出現較大量折損，爾後飼養狀況與 2 號池相近。對照組 4 號與 5 號池在孵化後 20 餘天，部分魚苗陸續出現發黑、打轉等病態行為，場主表示這是石斑魚苗孵育過程中常發生的折損狀況。而各組出貨時的魚苗大小並無太大差異。

(二) 高雄林園石斑繁殖場

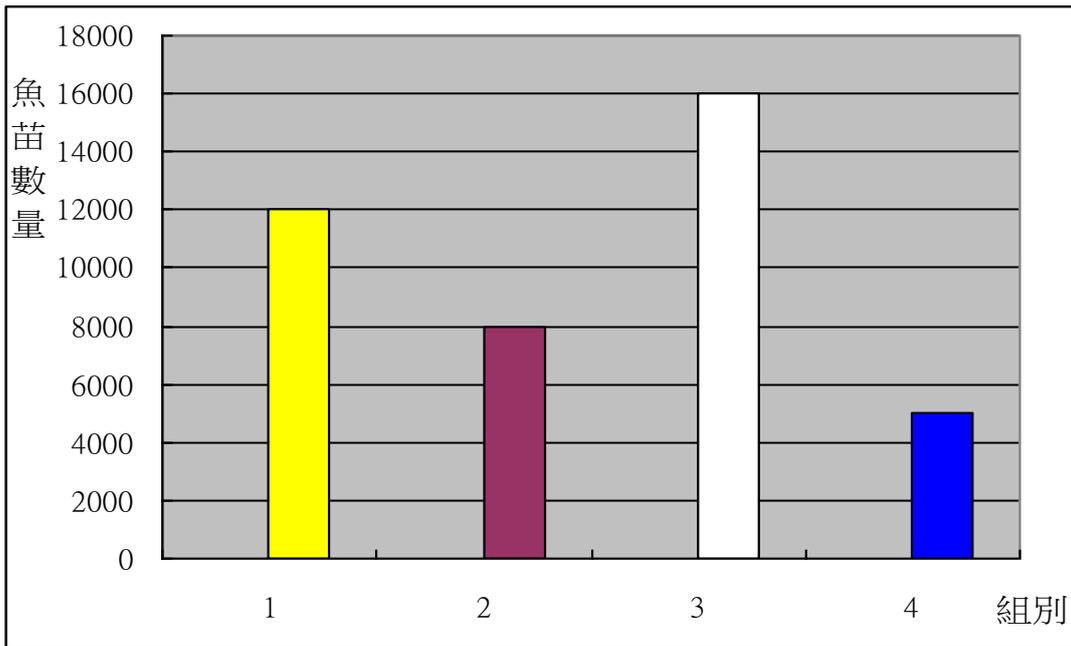
實驗記錄：室內水泥池 8 座，每座約 30 噸水，水溫 30℃，使用天然海水。兩座為蓄水池，其餘六座做為點帶石斑魚孵育場，茲編號為 1、2、3、4、5、6。與場主懇談許久，他只允許我們使用之前成效較好的投放濃度（100ppm）做實驗。故將其中 5 號、6 號分別在放卵前 3 日添加 NB1 菌液 3 公升，對應的菌液投放濃度為 100ppm。每週添加一次並記錄的魚苗狀況，添加五周後將各組的魚苗產量整理如下（圖十二）。



圖十二、林園繁殖場之石斑魚苗產量。5 號池、6 號池等實驗組皆有相對較高的產量，平均有 8 萬餘尾。其中 3 號池因飼養過程中（第 18 天）發生加熱器故障的意外，折損相當大，其餘各組產量平均有 6 萬尾左右。據場主表示，此批魚苗孵育過程中少有病態行為出現，5、6 號池索餌能力與活動力確實較好。而且在養殖中期（約 15 天左右），曾有做抽底清淤的動作，發現第 5、6 號池不僅沈積物少且也較無臭味。同時，第 5、6 池的池壁較為乾淨，不會生黏也不太會長黑斑。場主表示這是他們判別魚池狀況好壞的重要依據，而顯然實驗組的魚池狀況相當不錯。初步比較圖十一與圖十二，發現永安繁殖場雖水體較大卻是相對產量較少，針對此點，我們請教林園繁殖場場主。據場主分析結果，有以下幾種可能（一）餌料生物的品质：林園繁殖場的餌料生物皆有使用消毒與滋養等產品以提升餌料生物的品质，但永安繁殖場並無此動作。（二）卵的品质殊異：不同種魚的卵，不同批次的卵，其品质可能相去甚遠。卵質不夠好，發育不僅慢且易體弱、生病。（三）水質控管方式：水的來源與處理，如消毒、曝氣等步驟皆可能影響產量，而養殖中後期的水質控管更在於業者的經驗判斷。

(三) 屏東枋寮石斑繁殖場

實驗記錄：室內水泥池六座，每座約 25 噸水，水溫 27°C，使用天然海水。兩座為蓄水池，其餘四座做為點帶石斑魚孵育場，茲編號為 1、2、3、4。場主亦傾向我們使用之前成效較好的菌液投放濃度（100ppm）做實驗。故將其中 3 號在放卵前 3 日添加 NB1 菌液 2.5 公升，對應的菌液投放濃度為 100ppm。每週添加一次並記錄的魚苗狀況，五周後將各組的魚苗產量整理如下（圖十三）。



圖十三、枋寮繁殖場之石斑魚苗產量。由此圖可見 3 號池的石斑魚苗產量為最高，約有 16000 尾；而其他組別唯有第 1 組超過 10000 尾，其餘組別皆在 10000 尾之下。場主表示，在 3 號池添加 NB1 過程中，水體表面的泡沫量微微增加，初期擔心會造成不利魚苗的影響，所以中間第 2 週左右曾經停止使用一次。但後續觀察魚苗活力與池壁的狀況都顯然比其他組好，於是在第 3 週回復添加。

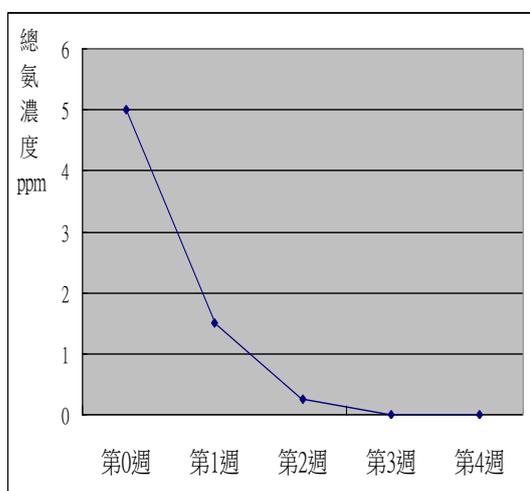
在此三組案例的試驗過程中，我們除了每週定期投放定量生菌之外，我們也同時也加以記錄每次投放菌前的水質（pH、總氨、亞硝酸根）狀況。因為通勤與課業問題，我們僅能一週記錄一次。考量養殖過程的水體狀況時時變化，這樣的紀錄週期可能無法提供深入的分析，僅記錄如下做一參考。案例一與案例二養殖過程，pH 動盪不大（pH8.1~pH8.3）之間，且其總氨與亞硝酸根的濃度一直保持趨近於零。但在案例三中，我們記錄到第一、二次投菌時，三組對照組的總氨濃度曾一度上升，而第四號池子總氨濃度曾達 0.25ppm 左右；但 pH 呈現穩定（pH8.1~pH8.3），亞硝酸根濃度也沒有上升。而在第三號的試驗池中，總氨與亞硝酸根的濃度保持趨近零。

六、NB1 對於室外育成池之實用性

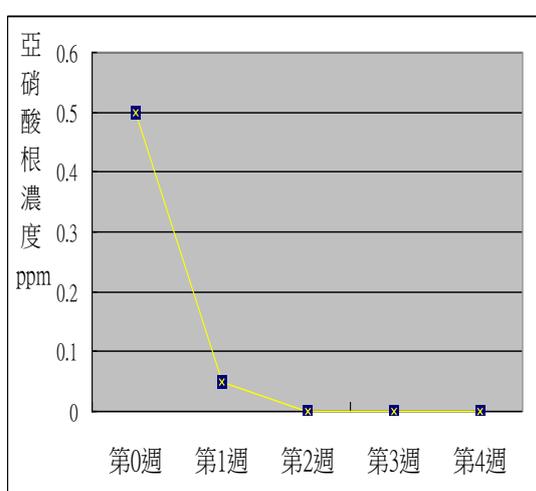
在與各室內養殖場的業者討論之後，建議我們可以在室外的育成池（土池）進行投放 NB1 菌的比較、測試。因為土池水體大，不易大量抽換水，所以往往會有總氮或亞硝酸根濃度過高的水質問題；若投放菌後能有效改善，則可進一步延伸實際應用的層面，熱心的室內養殖業者也提供兩位願意配合的白蝦養殖業者讓我們進行測試。在此階段的實驗中，考量室外養成池的水量、運輸與製作成本問題，我們將投放菌的稀釋比例調高至 1：100000，即投放菌濃度為 10ppm。投放的時間亦以一個月左右為期，每週投放一次。因室外秋冬育成時間長、育成池業者以間捕出貨等諸多原因，難以從產量上追蹤變化，僅將每週投菌前的水質作一記錄與探討（圖十四～十九）。

（一）台南土城室外育成池

業者育成池位於台南土城，養殖生物為白蝦與虱目魚。共有 6 池（5 尺水深），5 分地有四池，3 分地有兩池。據業者表示，其中一塊 3 分地水池連日來有臭土味與白鷺鷥在堤岸邊啄食病蝦，推測水質可能出了問題。因該處水源取得不易，養殖業者多半需在夏季豐與期間把水儲存起來，一旦到秋冬時節水質發生了變化，難有充足的水源以供替換，於是我們便以此池作為測驗，並將投放前後的水質變化記錄如下。



圖十四、土城室外育成池之總氮變化。



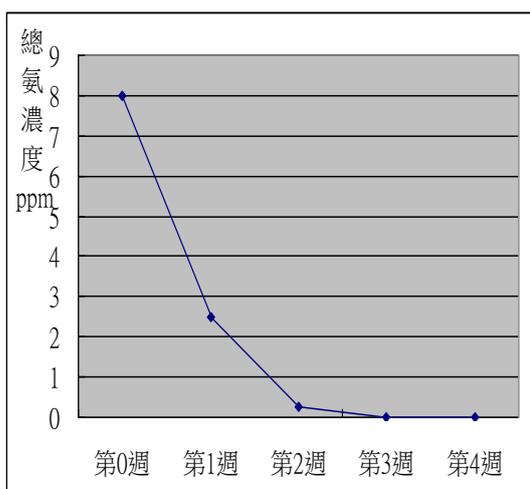
圖十五、土城室外育成池之 NO₂⁻變化。

初步換算試驗池水體體積約為 5000 公噸，根據 10ppm 的投菌濃度換算約需 50 公升的菌液。2009 年 11 月中起，連續投放 2 週即發現明顯的水質改善，總氮與亞硝酸根濃度都大幅下降，且穩定維持。業者表示，投放 5 日後，虱目魚吃餌料的狀況明顯改善，同時堤岸邊也沒有病蝦的出現。2 週後水色以由原先的黃濁轉綠，臭土味也減少許多。業者於 2010 年初陸續間捕出貨，並於 2 月初出貨完畢。期間水質保持穩定，養殖生物狀況也良好。

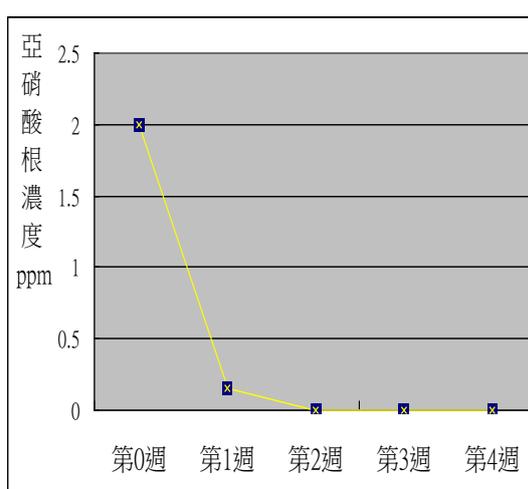
(一) 台南鹽水室外育成池

補充圖片

業者育成池位於台南鹽水，養殖生物為白蝦與鯽魚。共有 4 池，皆為 7 分地。據業者表示，該地地下水秋冬期間，總氨濃度高達 8ppm，亞硝酸根濃度亦約有 2ppm，故難以秋冬時節進行越冬放養。一般皆是在 11 月~12 月進行放乾池水與翻曬底土的工作。為了實驗的進行，業者特地在 11 月初出貨完的一池重新打入地下水（水深最深處約 7 尺）以供測試。如果能順利淨化水體，則考慮進行越冬放養。



圖十六、鹽水室外育成池之總氨變化。



圖十七、鹽水室外育成池之 NO₂⁻變化。

根據業者提供資料，試驗池水體體積約為 14000 公噸，根據 10ppm 的投菌濃度換算約需 140 公升的菌液。2009 年 11 月中起，連續投放 2 週發現總氨與亞硝酸根濃度都大幅下降，且穩定維持。業者表示，根據以往經驗在冬天進行養水的時間與此次實驗相較，投菌後水體淨化的速度快且穩定；而業者也在投菌後第 12 天左右開始放養白蝦苗，希望能趕在 2010 年的清明節前出貨。後續追蹤時，業者表示此次養殖的水質穩定且放養的白蝦生長穩定，所以會以專養方式進行養殖。在 2010 年 2 月底談話時，業者表示此批白蝦生長狀況良好，可比初春才進行大量放養動作的養殖戶提早 2 個月左右上市，避免供過於求的低價競爭，收益自然較好。

2010 年的春雨時間來的較晚卻下得集中，5 月中旬左右的降雨導致實驗池周圍的其他養殖戶爆發水質急速惡化與桃拉病毒蔓延，蝦隻出現倦怠，軟殼，身體紅色素增加而變淡紅。持續投菌的實驗池內總氨曾在雨後升高至 1ppm，但是隨即在兩天內歸零，亞硝酸根濃度則一直保持在 0ppm。實驗池內的新一批蝦隻活力正常、攝食積極且未有桃拉病毒爆發之症狀，並在 6 月上旬已有達上市出售之體型。據業者表示，以投菌養殖之蝦隻身體豐厚、肉質佳、口感較甜，無臭土味，與以往的養殖結果明顯不同。



台南土城白蝦育城池



台南鹽水白蝦育成池 (投菌中)



台南室外石斑育成池



進行間捕作業



枋寮繁殖場之石斑苗



間捕待售的白蝦

伍、討論

世界的水產品有 40% 來自水產養殖，產值高達美金 780 億元（世界農糧組織，2007）。在過度漁撈及水產品的需求增加等因素的影響下，水產養殖產品愈來愈重要。而影響水產養殖產量的主要因素為疾病導致的大量損失。當面臨疾病問題時，養殖戶常使用抗生素或是化學性藥劑加以治療，因而可能導致具有多重抗藥性的菌株出現與難以回復的環境衝擊。研究顯示，來自養殖動物的特定抗藥性的基因能夠以特殊方式進入與人體健康有關的細菌中。此過程意味著，來自養殖場的抗藥性細菌有可能將質體轉移到人體有關的細菌，進而造成人類的健康問題，這是目前備受爭議的議題。因此基於抗生素的施用及病菌對於養殖戶與人體健康的威脅，以及站在永續經營的考量，都必須尋求其他方式以維持養殖生物之健康，而益生菌是一項值得關注的方法。

益生菌（probiotics）的概念最早是由 Metchnikoff 於二十世紀初提出，係將乳酸菌引入人類的腸道中，以抑制其他有害的微生物。1989 年，Fuller 將益生菌定義為活微生物飼料的添加物，該添加物可以有效改善宿主的腸內微生物平衡，進而對宿主有利。水產方面之益生菌的使用必須考慮幾項與陸生動物不同的重要因素。一般來說，陸生動物的益生菌需到達腸胃道才能發揮作用，但水中生物的健康與外部環境息息相關，與其共生的微生物會隨著水溫、鹽分及水流等改變，且水中潛在的病原菌經常入侵。由於這些外在的影響，Verschuere 等建議將水中益生菌定義為有利於宿主（共生於宿主或存在四週環境）、改良外在環境或增加抗病能力的活體微生物。然而有研究顯示，不一定是活菌才有免疫功能，細菌的衍生物如：肽聚醣和脂多醣，也具有益生菌的功能。在我們的系列實驗中，想法的初衷只是想找尋石斑魚腸道中的可能益生菌。然而在一步步的實驗過程，許多未曾想像的後續發展也隨之開展。以下，我們將對各階段實驗之結果進行探討。

一、選殖「石斑魚」腸益菌與其作用之探討

石斑魚，分類上屬於硬骨魚綱鱸形目鮨科石斑魚屬之統稱，本省俗稱亦有"過魚"、"格也魚"、"過魚"、"鱸貓"等。石斑魚為肉食之暖水性魚類，分佈於熱帶及亞熱帶海域，種類繁多全世界約有 400 種，喜生活在近岸岩礁分佈的海域。此魚由於肉質細嫩豐美，自古以來就被視為桌上佳餚，也因其生活習性，過去無法以先進的科學技術增加漁獲量。由於市場價值高，所以目前許多東南亞國家如新加坡、印尼、馬來西亞、菲律賓也都盛行養殖石斑魚，因此相當迅速的成為主要養殖魚類，現為台灣與東南亞國家的最主要經濟養殖魚類。養殖石斑魚苗在以往皆須經由捕撈取得，再養殖成大魚出售。

多年來在台灣養殖業者不斷嘗試及研究改進之下，台灣於 1982 年首度有人以注射荷爾蒙的方式，成功繁殖馬拉巴石斑魚，自此開啟了台灣石斑魚的完全養殖時代，在飼養管理及種苗生產上，皆居於領先的地位，最大的養殖產地為台灣南部的嘉、南及高屏沿海。目前台灣約有十餘種石斑魚可供人工養殖，以馬拉巴石斑、點帶石斑、鞍帶石斑、及棕點石斑等已具完整發展之繁殖及飼養技術的魚種為主要種苗繁養殖大宗。然而，在整個石斑魚水產養殖產業結構中，死亡率高是養殖業未能突破之瓶頸。近年來，由於石斑魚在從卵孵化到吋苗的這段期間內，小魚經常會受到神經壞死病毒(Nervous Necrosis Virus, NNV)的感染，而造成極高的死亡率，往往 3、4 天之內死亡率高達 95 %，造成養殖業者的極大損失。

考量石斑魚對於我國水產養殖之重要性與其面臨的困境，於是我們選擇此物種作為實驗的起點。而許多文獻中，曾提及使用某些腸益菌（乳酸菌、酪酸菌）可以提升魚苗存活率；而健康的魚苗與生病的魚苗其腸道菌相也有不同。這讓我們聯想到在石斑魚腸道中使否會有可以讓石斑魚更健康的益生菌存在？於是我們使用漁民所提供的點帶石斑魚為材料，取其消化道並做稀釋與固態培養基培養。36 小時以後生長出大小不一的許多菌落，挑選其中 16 個明確的單獨菌落加以放大、保存。在此 16 組應用於石斑魚苗的存活率實驗中發現，編號 7、10、12、16 等組別之石斑稚魚存活率有明顯提升；實驗過程中發現編號 2、4、11、14 之組別均在一週內即造成石斑稚魚大量死亡，兩週後即無活口；其餘實驗組與對照組之石斑稚魚大量死亡時間出現在兩至三週之間。故推測編號 7、10、12、16 等組別之菌株是可能的益生菌，16S rRNA 之定序結果則第 7 組為光合細菌、第 10 組為希瓦氏菌、第 12 組為乳酸桿菌、以及第 16 組為枯草芽孢桿菌。以下我們將就各菌種之特性與應用報告做一概括整理，並與用以解釋我們的實驗結果。

（一）光合細菌

光合細菌(Photosynthetic bacteria, 簡稱 PSB)是廣泛分佈於水田、河川、海洋和土壤中的一種微生物類群。光合細菌為革蘭氏陰性細菌，可以在有光無氧的條件下生長、繁殖，也可在無光有氧的條件下生長。有光時菌體能利用光能，以 H₂S 和有機物作為氫供體，以 CO₂ 或有機物作為碳源而生長發育。當環境是有氧無光時，菌體則可以通過有氧呼吸，使有機物氧化，從中獲取能量。光合細菌能幫忙將水體中的殘餌、排泄物等分解，能改善水產養殖生態環境，降低氨氮、BOD，增溶氧等作用。此外，光合細菌含有豐富的蛋白質，與牛奶、雞蛋蛋白相比，其蛋白質氨基酸組成齊全，其組成接近動物蛋白質；不僅如此，光合細菌還含各種 B 族維生素、類胡蘿蔔素、葉酸、生物素、礦物元素等多種，促進動物生長發育的生理活性物質，提高機體的免疫

功能的物質，特別是動物幼體發育所需要的葉酸、VB12 和生物素的含量是酵母中的幾十倍，因此是一種營養價值極高的單細胞蛋白，可以增加營養，防禦病害，提高成活率。在我們實驗中也發現，光合細菌確實可以提升石斑魚苗的存活率，且養殖過程中添加光合細菌也使總氮與亞硝酸根濃度上升趨勢較為緩慢，顯然對於水質的改善確實具有一定成效。

（二）乳酸桿菌

乳酸菌指發酵糖類主要產物為乳酸的一類無芽孢、革蘭氏染色陽性細菌的總稱。凡是能從葡萄糖或乳糖的發酵過程中產生乳酸的細菌統稱為乳酸菌。這是一群相當龐雜的細菌。廣義的乳酸菌是凡可以產生乳酸的菌都稱為乳酸菌，其中含有部份球菌及桿菌。新生動物消化道處於無菌狀態，胃腸道 pH 值接近中性，利於腸道病原菌的生長，加入乳酸菌類微生態製劑後，形成乳酸菌優勢菌群，參與腸道正常菌生物屏障結構，通過生物奪氧及競爭性排斥抑制過路菌或侵襲菌等病原微生物在胃腸道黏膜上皮的定植和生長；同時，在腸道代謝過程中產生的乳酸、乙酸、丙酸等使 pH 值下降、抑制有害菌的生長，增強動物免疫力。報告指出，乳酸桿菌對於比目魚的生長以及感染產氣單胞菌的虹鱒存活率都有提升效果。而在我們的實驗中，發現乳酸桿菌對於抑制總氮與亞硝酸根的上升相對較無效果，但在提升石斑魚苗的存活率方面確實也能提升。推測原因可能是乳酸桿菌造成水體 pH 值下降，進而導致養殖過程中毒性較強的分子態氨比例下降，對魚體的毒性減緩所致。而另一可能原因是乳酸桿菌提升了石斑魚苗的抵抗力與魚體對水體惡化的耐受度，因而提升魚苗存活率。可惜的是，可能因乳酸菌對魚水體的淨化能力仍稍嫌不足，導致魚苗存活率雖有提升但仍相對較低。

（三）枯草芽孢桿菌

枯草芽孢桿菌原先篩選自枯乾的稻草，且為革蘭氏陽性、兼性厭氧之產孢桿菌，廣泛存在於自然界之土壤及水源中。枯草芽孢桿菌能防治植物病害，主因在於它所表現出來的功能是多重作用機制的結果，包括與病原菌競爭營養及空間、抗生物質的作用、促進土壤中大分子的分解與營養的有效吸收、改善土壤性質。多年來有關枯草桿菌的研究開發，大都著重在土壤傳播的病害方面。而近期在水產養殖方面的研究發現，添加枯草芽孢桿菌，證明可降解水中氨氮廢物、減少養殖池底的有機物沉積，避免水質在雨後或天候轉變時動盪。此外，枯草芽孢桿菌能產生多種消化酶，幫助動物消化吸收營養物質，從而減少養殖環境中因殘餌與排泄物所造成之有毒有害物質。在枯草芽孢桿菌能產生抑制其他病原菌生長的抗生物質與諸多酸類，降低動物腸道的 pH 值，有效抑制病原菌的生長。國內外研究使用枯草枯草桿菌來抑

制對病原弧菌的生長，效果明確顯著。雖然在我們的實驗中，未去證實枯草芽孢桿菌是否可以抑制病原菌的生長，因而提升石斑魚苗存活率；但從水質的數據上可以發現，添加枯草芽孢桿菌確實可以減緩總氨與亞硝酸根濃度的上升，同時也讓水的 pH 值下降至 7.5 左右，減少分子態氨的比例，減緩魚體的毒性迫害。

(四) 希瓦氏菌

革蘭氏陰性之桿狀細胞，沒有孢子產生，周身纖毛且具單鞭毛。廣泛存在於野生的水產生物消化道與水體環境中，並非養殖過程中人工添加所獲得。過去被分離純化的希瓦氏菌大都具有非常多且特殊的性能，能分解許多種芳香族化合物，也能利用許多種金屬離子，甚至許多種放射性與高污染性重金屬（如：鐳、鉻）元素；並將溶於水的此些金屬離子還原成不溶於水的金屬離子，便利這些金屬的回收。希瓦氏菌也具有很強的染劑分解能力，可以快速分解高濃度的偶氮染劑、三酚甲烷染劑、及瓏琨染劑。因此，有學者嘗試利用這種菌進行受污染地下水的淨化工作。此外，該菌在乳酸、丙酮酸、甲酸存在的環境下，有很好的產電能力。而另有報告指出，希瓦氏菌多數具有亞硝酸根還原酶，可以降解亞硝酸鹽，並在厭氧環境下完成脫氮作用。在我們的實驗結果中也顯示希瓦氏菌屬的 NB1 菌株對於亞硝酸根具有良好的降解作用，養殖過程幾乎無偵測到亞硝酸根的累積；同時對於抑制總氨濃度的上升也有相對明顯的效果。添加 NB1 菌液的石斑魚苗不僅存活率較高，在活力方面亦有相對好的表現。推測其原因除了水質較好之外，尚有其他文獻記載希瓦氏菌之不飽和脂肪酸 EPA 含量相當高，對於魚苗的生長發育可能有所助益。

二、探討 NB1 在不同環境下之水體淨化能力

在人為的水產養殖系統當中，由於放養高密度的水族生物、投餵大量飼料，而促使水中的有毒的氨氮和亞硝酸鹽持續累積，濃度上升，往往造成養殖生物中毒或使其抵抗力降低而生病死亡。雖然換水能夠降低養殖系統的含氮廢物，但長期而言，這不是一個生態上永續經營的方式。一般而言，水體中氨氮的去除往往需要亞硝化菌將氨轉換為亞硝酸根，接著再由硝化菌把亞硝酸根轉化為硝酸，最後在由厭氧環境中的脫氮菌把硝酸根轉化成氮氣離開水體。簡言之，此過程往往需要諸多菌種的協力作用。然而，根據我們的實驗結果與查閱前人文獻發現，希瓦氏菌屬的 NB1 菌株可能具有同屬菌的反硝化功能，可以廣泛的將硝酸、亞硝酸與氨氮進行一系列反應，行成 N_2O 或 N_2 離開水體，無須其他菌種之協助。許多研究中指出，希瓦氏菌屬的反硝化能力受菌種、培養基成分與培養環境等因素影響甚大，結果也殊異。為了進一步瞭解我們所挑選的 NB1 菌株的作用，我們設計以酸鹼度、溫度與鹽度等幾個環境因數的變化測試 NB1 菌株的水質淨化能力。

不同溫度對於 NB1 降解亞硝酸根之實驗中發現,15°C 以下的低溫環境對於 NB1 降解亞硝酸根與總氮的作用有強烈抑制作用；而在 25°C 以上的水溫中, NB1 之降解能力明顯提升, 顯然 NB1 菌株較適合在溫暖的環境 (25~35 °C) 下工作。不同鹽度對於 NB1 降解亞硝酸根與總氮的能力影響較小, 以 2 %與 3%左右的鹽度降解效力最佳。在酸鹼度的實驗中, NB1 在 pH 8 與 pH 9 微鹼性的環境中, 降解總氮與亞硝酸根較為迅速且降幅也較大；反之, 在較偏酸性與中性的環境中, NB1 降解緩慢且降幅也明顯較小。總體而言, NB1 菌株可以將亞硝酸根與總氮降解, 最適合的工作環境為帶有溫暖的、帶有鹽度的弱鹼性環境, 推想此工作條件可能較類似此菌的原生環境。在後續的實驗中, 我們發現在降解亞硝酸根與總氮的同時, 硝酸根的濃度並沒有隨之上升。顯然 NB1 菌可能不是走一般的硝化作用途徑, 而是進行如希瓦氏菌屬的反硝化作用路徑。

如前所述, 硝化過程需要的亞硝化菌、硝化菌與脫氮菌等進行一系列的降解才能完成。但每株菌的生長速度不一, 例如亞硝化菌一般生長、代謝皆較硝化菌迅速, 在養殖過程中, 往往會有看到由亞硝化菌降解氨氮所產生的亞硝酸根來不及被硝化菌降解, 因而累積在水體中, 對生物造成迫害。更有研究報告指出, 高於 1ppm 的分子態氮與 3ppm 的亞硝酸根即會抑制硝化菌的代謝。若在硝化菌快速作用的前提下, 水體所累積的硝酸根會隨即被藻類所利用, 一般來說這是有利藻水的培養。然而, 脫氮菌的作用若未能隨之跟上, 過高濃度的硝酸根往往易使藻類大量爆發, 造成夜間缺氧等可能問題的產生。顯然, 此單向的硝化過程易受到某階段的缺失而無法順利完成。而利用一些如 NB1 等具反硝化能力之菌種, 或許可以提供另一替代的降解氮廢物路徑, 在養殖的水質管理與污水處理方面存有許多想像空間。

三、探討 NB1 於室內外養殖場之實用性

高密度的孵化池中, 孵化過程折損的魚苗與其排泄物等皆易嚴重影響水質。魚卵孵化初期, 魚苗本身泳動能力不足且又易受驚嚇而發病, 實不宜做大量抽換水或濾水。所以如何在封閉的環境中, 維持良好水質以確保魚苗能順利成長, 就變成了一個育苗過程的難題。尤其在石斑魚苗孵化過程, 水質的良窳對石斑魚的神經壞死病毒發作與否有相當大的關連性。為了測試 NB1 在室內養殖池中之效用, 我們透過實驗室老師與飼料行的幫忙, 找到願意參與實驗的三所室內石斑繁殖場。實驗結果發現, 添加 NB1 菌液的石斑苗存活率都相對高於對照組, 但過高的菌液濃度 (1000ppm) 似乎對剛孵化的幼魚造成較高的折損。施用 100ppm 的菌液濃度各組石斑魚苗不僅存活率高, 且活力、攝餌能力也相對較佳, 亦少有發黑、打轉等病態行為。國內曾有報告指出, 希瓦氏菌屬具有直接抑制石斑魚神經壞死病毒之作用。雖此次大部分

參與實驗的池子在檢測過程中，未發現有總氮與亞硝酸根的累積情形。但因記錄時間為一週一次，難以追蹤養殖過程中的細微變化。所以，究竟 NB1 菌株對於石斑魚苗的存活率提升是導因於水質淨化，亦或其可能的營養成分與抑制神經壞死病毒等功能所造成，尚需更多實驗證實。無論如何，石斑魚苗的存活率提升確實帶給繁殖場經濟上的助益（石斑寸苗時價 1 尾 10~11.5 元台幣）。

在室內養殖場的業者介紹之下，我們找到願意配合試驗的室外白蝦養殖池進行投放 NB1 菌，以測試其效用。因為土池水體大，不易大量抽換水，加之集約養殖方式，往往導致水中總氮或亞硝酸根濃度過高的問題；尤其在秋冬時期，南台灣正值枯水期，水的來源減少與地下水的品質因少雨而劣化，要以換水的方式來達成淨化水體更是困難。許多地下水井在此時抽取出來的水往往帶有相當濃度的總氮與亞硝酸根，但是許多養殖戶並沒有檢測的習慣，再加上秋冬天候乍暖還寒，此時進行養水與放苗越冬往往失敗率較高。在此階段的實驗，考量室外養成池的水量、運輸與製作成本問題，我們將投放菌的稀釋比例調高至約 1:100000，以一個月左右為期做每週的投放。在兩個案例中，第一次投菌後的隔週即發現明顯的水質改善，總氮與亞硝酸根濃度都大幅下降，且穩定維持。案例一之混養的虱目魚吃餌料的狀況明顯改善，同時堤岸邊也沒有病蝦的出現，臭土味也減少許多。案例二的業者則因後續養殖狀況順利，將朝向白蝦專養方向進行，以獲取較高利益。

在此階段的實驗之末，另有位室外石斑魚育成的養殖業者透過飼料行與我們聯絡，表示願意提供養殖池測試。雖然時間上不足以做較完整記錄，但由於此兩位業者之水體總氮（4ppm）與亞硝酸根（2ppm）之濃度相當高，且魚隻已呈現收口、浮頭等現象，於是我們仍予以投菌並請業者自行檢測與記錄。經過兩次的投菌卻看不到明顯的總氮與亞硝酸根降解，這讓我們感覺到十分好奇。分析業者在投菌期間的紀錄，我們發現業者為了抑制石斑魚的白點病（體表寄生蟲引起），在投菌前後都有使用醋酸銅。這讓我們不禁聯想是否 NB1 菌株的降解能力會受影響？初步在實驗室裡操作結果顯示，銅離子的濃度越高，NB1 菌株對於含氮廢物的降解能力就越差。與師長們討論這個現象時，他們提供了我們一個可能的答案：「反硝化過程中的酵素常與銅離子結合以展現其正常活性，因此過多的銅離子確實很可能造成酵素作用的異常」。而我們實驗之初選擇的測試對象為白蝦養殖戶亦為幸運，因蝦類對銅離子敏感，故能養活白蝦養殖的池體必然較無過多的銅離子干擾，NB1 菌的水質淨化能力才明顯。而銅離子對 NB1 菌的影響的層面有哪些？以及影響的程度等問題仍須未來更多的實驗來解答。

陸、結論

在自然界中，微生物將生物的遺體、排泄物等加以分解以利物質的循環與生態的平衡，水生生物的環境亦需微生物的作用以將水淨化。然而地狹人稠的台灣，寸土寸金的先天條件之下，勢必將以集約方式來經營水產養殖。此過程中，過高生物排泄量往往使得池子原有的微生物不及分解，氨氮廢物等有害物質隨之累積在水體與底泥中，生物體弱化而發生各種病變或甚至整池被毒殺死亡。添加額外的益生菌來幫助集約養殖環境中的有害物質代謝化，以及幫助生物提高吸收力、免疫力在許多國家都已行之有年，在台灣卻尚未普及。因應世界的綠色思維，有機農產以成為一股風潮；對永續經營與對人體健康考量的立場來看，有機水產養殖也必成為新的趨勢，台灣當然也不免於外。當然，益生菌製劑也極可能在這波農漁業的演進當中扮演舉足輕重的角色。我們亦將這方面的研究成果整理與探討，並做成以下結論：

- (一) 選殖點帶石斑魚消化道菌種，挑選到 4 種明顯提升石斑魚吋苗存活率的菌株。16S rRNA 之定序結果光合細菌、希瓦氏菌、乳酸桿菌、以及枯草芽孢桿菌。
- (二) 在實驗室內的石斑魚存活率實驗中，添加光合細菌、枯草芽孢桿菌使魚苗存活率提高且氨氮廢物濃度上升趨勢較緩慢，顯然對於水質的改善確實具有一定成效。
- (三) 乳酸桿菌造成水體 pH 值下降，可能導致養殖過程中毒性較強的分子態氨比例下降，對魚體的毒性減緩。而另一可能原因是乳酸桿菌提升了石斑魚苗的抵抗力與魚體對水體惡化的耐受度，而提升魚苗存活率。
- (四) 希瓦氏菌屬的 NB1 菌株對於亞硝酸根具有良好的降解作用，同時對於抑制總氨濃度的上升也有相對明顯的效果。實驗組石斑魚苗不僅存活率較高，在活力方面亦有相對好的表現。
- (五) NB1 菌株在溫暖的環境（25~35℃），帶有鹽度（2~3%）的弱鹼性環境降解亞硝酸根與氨氮廢物的效果較佳。NB1 菌株在降解亞硝酸根與總氨的同時，硝酸根的濃度並沒有隨之上升，推測 NB1 菌可能不是走一般的硝化作用途徑。
- (六) 在較大規模的室內石斑魚孵化繁殖場的實驗中，添加 NB1 菌液的石斑苗存活率都相對高於對照組，但過高的菌液濃度（1000ppm）似乎對剛孵化的幼魚造成較高的折損。施用 100ppm 的菌液濃度各組石斑魚苗不僅存活率高，且活力、攝餌能力也相對較佳，亦少有發黑、打轉等病態行為。
- (七) 室外養成池實驗結果發現。投菌後發現明顯的水質改善，總氨與亞硝酸根濃度都大幅下降，且穩定維持。案例一之混養的虱目魚吃餌料的

狀況明顯改善，同時堤岸邊也沒有病蝦的出現，臭土味也減少許多。案例二的業者也因此解決秋冬地下水質不佳，難以越冬放養的問題。

(八) 急驟的降雨後，持續投菌的實驗池水質相對穩定。雖試驗池周遭養殖戶已發生水質惡化與蝦類病變，但試驗池之白蝦仍正常生長。

這系列實驗裡，奔波辛勞的老師與實驗室的學長姐，引領我們「做中學」，得到的不僅是實驗的數據結果，還有這份堅持求是的精神。更難得的是，走出實驗室與學校，訪談許多養殖戶與田野的實驗過程，看見的、聽見的與感受到的，是一種生命力，這份貼近我們這塊土地的心情是難以言喻。而 NB1 菌種後續的研究，也由高雄海洋科技大學與台灣大學的學長姐們持續進行，以探討未來實際應用的諸多可能。

柒、參考資料

(一)期刊論文

1. Brettar, I., and M. G. Hoffle. 1993. Nitrous oxide producing heterotrophic bacteria from the water column of the central Baltic: abundance and molecular identification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 94:253–265.
2. Carter, J. P., Y. H. Hsiao, S. Spiro, and D. J. Richardson. 1995. Soil and sediment bacteria capable of aerobic nitrate respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2852–2858.
3. Gao, H., Obraztova, A., Stewart, N., Popa, R., Fredrickson, J. K., Tiedje, J. M., Neelson, K. H. & Zhou, J. (2006). *Shewanella loihica* sp. nov., isolated from iron-rich microbial mats in the Pacific Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 1911–1916.
4. Rocca C D, Belgiorno V, Meriç S. Overview of in-situ applicable nitrate removal processes. *Desalination*, 2007, 204: 46—62
5. 張莉，2005，石斑魚消化道細菌分泌抗神經壞死症病毒物質之研究。國立台灣大學動物學研究所碩士論文
6. 邱莉璿，2007，石斑魚腸道菌抗神經壞死症病毒物質之分析與作用機制探討。國立台灣大學動物學研究所碩士論文

(二)網站資料

1. <http://www.tfrin.gov.tw/> 中華民國行政院農委會水產試驗所
2. <http://www.fish.org.tw/> 中華民國水產種苗協會
3. <http://www.fa.gov.tw/> 中華民國行政院農委會漁業署
4. <http://agbio.coa.gov.tw/> 中華民國行政院農委會農業生技產業資訊網

【評語】 091404

- 1.作品說明書及看板製作清晰完整。
- 2.對有益菌 NB1 的瞭解應加強，在水質淨化觀察應同時監測菌之生長狀態。
- 3.菌量使用的表達方式應使用正確單位，實驗單位需說明清楚。
- 4.實驗未來發展方向對產業具實用性。