

塘虱魚精華液之祕密

投稿類別：生物類

篇名：

塘虱魚精華液之祕密

作者：

楊筑晴。國立東港高級海事水產職業學校。養三甲。
蔡美貞。國立東港高級海事水產職業學校。養三甲。

指導老師：

洪英女老師

壹●前言

海洋漁業因過漁現象嚴重，導致漁獲量銳減、漁獲個體小型化，更嚴重的是族群間的失衡或滅絕。因此，多數學者紛紛表示未來水產動物性蛋白將來自水產養殖業，但水產養殖業者為了提高產量產值，多採用高密度集約養殖，導致水產生物感染性疾病的爆發，常造成養殖生物大量死亡；又因藥物濫用而有藥物殘留與抗藥細菌產生等問題產生，為水產養殖業蒙上層層陰影。

為了減少藥物的濫用，我們希望能在自然環境中尋找能抑制病原菌的益生菌。在學校水產養殖課程中，得知塘虱魚可在極惡劣環境中成長，因此我們猜想其身上應具有抵抗惡劣環境及病原菌的祕密(能力)。

所以，我們試著從塘虱魚身上找出能抑制常見水產病原菌如產氣單孢菌、愛德華氏病及鏈球菌等細菌，希望將來能藉由生物防治的方法達到抑制水產病原菌的效果。

貳●正文

一、魚病對水產養殖業之影響

魚病會造成魚類大量死亡、影響生產量。然而養殖池可能因感染病菌，導致無法使用；若殘留病菌沒清理乾淨，下一批的魚貨也受到感染而無法出貨，導致惡性循環。近年來，由於環境污染日益嚴重，污染物如農藥及重金屬等毒害產生生物累積也漸漸受到重視。

就生產觀點來說，細菌性感染是最需要注意的魚病。自高密度集約養殖型態建立後，因養殖密度高，細菌性病害往往一發即不可收拾，造成極大的死亡及損失，因此感染性的魚病成為生產上的關鍵所在。

二、塘虱魚

「塘虱魚 (*Clarias fuscus*) 俗稱土鯰，可適應極低溶氧之環境，為廣溫性鯰科魚類，養殖成本低廉又具高抗病力，適應力強。」(註一)

塘虱魚通常棲息於沼澤、池塘、溝渠等污濁又充滿泥濘的水域。有特殊的呼吸器官，可直接吸入空氣，增加氧氣的攝取，因此能存活於低溶氧環境；然而，因台灣環境污染嚴重，導致原生種塘虱魚幾乎絕跡了，目前市面上以外來種為主，如泰國種塘虱魚及非洲塘虱魚，因為泰國塘虱魚的成長迅速且體型大，並沒有像臺灣原生種塘虱魚會有掘洞之習性，一般以泰國塘虱魚為主要養殖對象。

(一)塘虱魚的用途：

- 1.可直接供為食用，如臺灣夜市中可以品嚐到的「當歸土虱」。
- 2.製成魚丸等加工品。
- 3.塘虱魚的腦下垂體，常供魚類催熟用的激素。

本研究即希望藉由塘虱魚耐污染、適應力強等特點，期望能從牠們的身上找出抑制病原菌的方法。

三、常見病原菌簡介

(一)愛德華氏菌(*Edwardsiella tarda*)

為革蘭氏陰性短桿菌的兼性厭氧菌，腸道及受損的皮膚是病原菌最常侵入體內的位置。(註二)鰻魚主要疾病之一，病鰻在肝臟及腎臟會出現壞死病灶故又名肝腎病，鄰近肝臟附近的腹部軀幹組織會出現潰瘍病變，故又稱潰瘍病。

(二)親水性產氣單胞菌(*Aeromonas hydrophila*)

為革蘭氏陰性桿菌，具有移動性。(註三)是一種常在細菌，於魚隻健康狀態不佳時，如過度擁擠、水質不良、寄生蟲感染或受傷等，侵入魚體，在腸道或傷口大量增殖，造成腸炎或局部潰爛出血，甚致引起敗血症而死亡，常引起赤鰓病、腸炎、出血性敗血病、立鱗病等。

(三)鏈球菌(*Streptococcus iniae*)

為革蘭氏陽性球菌，常發生於吳郭魚及海鱸養殖。魚隻體色變黑、泳姿異常、倦躺於池邊等症狀。(註四)養殖魚類鏈球菌感染症常發生於夏季或高水溫之地區，造成養殖業者嚴重之經濟損失。除了養殖業的經濟損失外，鏈球菌亦具有感染人類的潛在危機。

上述三種病原菌均對台灣養殖漁業造成嚴重的經濟損失，亦因藥物濫用也都已出現抗藥菌種。

四、研究設備及器材

(一)材料與藥品

1.材料：

- | | |
|---|---|
| (1)塘虱魚
(<i>Clarias fuscus</i>) | (2)愛德華氏菌
(<i>Edwardsiella tarda</i>) |
| (3)產氣單胞菌
(<i>Aeromonas hydrophila</i>) | (4)鏈球菌
(<i>Streptococcus iniae</i>) |

2.藥品：

- | | |
|------------------------|------------|
| (1)AGAR(洋菜) | 革蘭氏染劑 |
| (2)TSA 固態培養基(TSB+AGAR) | (6)結晶紫 |
| (3)TSB 液態培養基 | (7)碘液 |
| (4)酒精(75%) | (8)酒精(95%) |
| (5)油鏡油 | (9)番紅 |

(二)實驗設備與器材

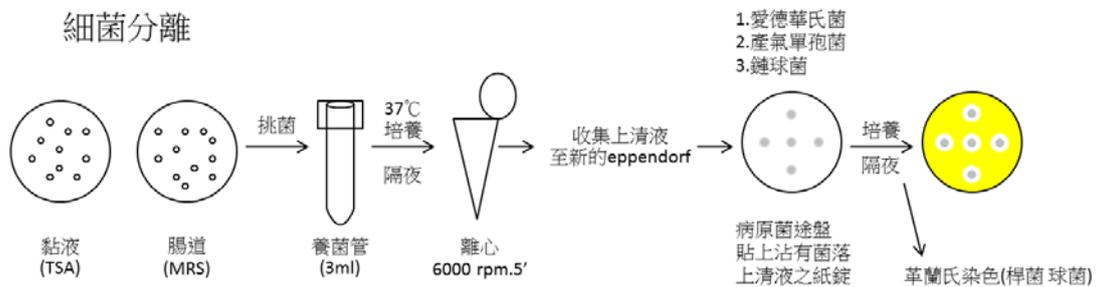
1.實驗設備：(附錄 1)

- | | | |
|----------|----------|----------|
| (1)震盪培養箱 | (2)光學顯微鏡 | (3)無菌操作台 |
| (4)高速離心機 | (5)微量電子秤 | (6)滅菌釜 |

2.實驗器具與耗材：

- | | | |
|----------------------|--------------------|---------------|
| (1)解剖器具
(解剖盤、解剖刀) | (2)玻璃珠
(塗盤用玻璃珠) | (3) 秤藥盒、秤藥紙 |
| (4)酒精燈 | (5)試管架 | (6)微量吸取器 |
| (7)血清瓶 | (8)石蠟封膜(Parafilm) | (9)培養皿 |
| (10)接種環 | (11)滅菌指示帶 | (12)計時器 |
| (13)離心管(15ml/50ml) | (14)手套 | (15)量筒 |
| (16)滅菌水 | (17)保鮮膜 | (18)紙巾 |
| (19)微量吸管 | (20)離心管架 | (21)塑膠吸管(3ml) |
| (22)玻璃吸管(5ml) | (23)燒杯 | (24)拭鏡紙 |
| (25)載玻片 | (26)電動吸取器 | (27)養菌管 |

五、研究過程及方法



圖一、塘虱魚體表黏液細菌分離流程圖

(一)前置準備

- 1.實驗開始前應確實穿著實驗衣及手套。

- 2.到市場購買塘虱魚(全長約 40 公分)。
- 3.無菌操作台用酒精擦拭乾淨開滅菌燈與車風 30 分鐘。(不可直視滅菌燈)
- 4.將要使用的器具設備如解剖器具(解剖刀、刀片)、養菌管、試管架、離心管、離心管架子事先放入滅菌釜滅菌。
- 5.放入無菌操作台前都須先噴過酒精。
- 6.將酒精噴灑解剖盤進行消毒後，用保鮮膜包覆再次噴酒精消毒。
- 7.將塘虱魚用清水清洗後，使用滅菌水再次沖洗再放到解剖盤上，一起放入無菌操作台。

(二) 配置 TSA 培養液與培養基

- 1.配置 TSA 培養液：使用電子秤秤取 6g 的 TSA 粉末，放入定容瓶再用量筒量取 200c.c 的滅菌水，加入定容瓶搖晃均勻，倒入血清瓶中，放至滅菌釜滅菌。

2.配置 TSA 培養基：

(1)做兩份 360mLTSA 培養液，用電子秤先秤取兩份 19.8g 的 TSA 粉末，再取 5.4g 的 AGAR 粉末，放入各自定容瓶中，用量筒取 360c.c 的滅菌水，加至定容瓶中搖晃均勻後，倒入血清瓶中，放至滅菌釜滅菌。

(2)在滅菌釜靜置 3~5 分鐘後拿出，在無菌操作台內，趁培養液還是熱的時候，快速倒入以避免冷掉凝固，倒入適中的量於培養皿中，放置一旁等其凝固後倒置。完成後用袋子裝起，再使用絕緣膠帶封好，寫上日期、培養基名稱，冰入冰箱。

(三)取得塘虱魚表皮黏液

用解剖刀輕刮塘虱魚表皮，取得兩份黏液後，放入不同的養菌管中，並各自加入 1 c.c.TSA 培養液均勻混和後，用微量吸取器吸取 0.1c.c 的表皮黏液平均分配在不同的 TSA 培養皿上，放入玻璃球搖晃使黏液平均分配在上面，放置室溫培養 24 小時。

(四)細菌的培養與製備

將上述平盤中的菌落個別挑出放於裝有 TSA(表皮黏液細菌)培養液的養菌管中，放置室溫培養 24~48 小時後，將細菌以 6000 rpm 離心 5 分鐘，分離為上清液及細菌本體離心完後再抽取 1c.c 的上清液，放入新的離心管，吸取前不可搖晃，吸取時須注意不可碰至管底菌落沉澱物。

(五)抑菌實驗

將三種病原菌培養隔夜後，各取 $100\ \mu\text{l}$ 塗於 TSA 平盤上後，將滅菌過的紙錠貼於平盤上(5 個 1 盤)，再取 $10\ \mu\text{l}$ 細菌的上清液滴於紙錠上室溫培養 1 天，測量抑菌環直徑。

(六)觀察離心後的菌物

將離心過的菌液倒乾，只留下沉澱物(菌)，再至無菌操作台內用酒精燈燒接種環，至圓環處呈紅色，繼續往內燒，接種前需再燒一次圓環。用接種環沾離心管中之菌物，塗於玻片中央，塗完菌後，玻片要再用酒精燈燒過使其熱固定。

(七)革蘭氏染色

取離心後之細菌本體進行革蘭氏染色。

- 1.塗片：取一乾淨載玻片，用挑菌環在凹處塗菌，菌不可過多。
- 2.熱固定：手拿玻片一端，讓塗菌處朝上，經過火 2-3 次熱固定。
- 3.結晶紫色染色：在玻片塗菌處加適量的結晶紫染色液 1 分鐘。
- 4.水洗：用水洗去染色液。
- 5.媒染：滴碘液，媒染 1 分鐘。
- 6.水洗：用水洗去碘液。
- 7.脫色：滴 95%乙醇脫色 45 秒後，用水沖洗。
- 8.複染：滴番紅複染 45 秒。
- 9.水洗：用水洗去玻片上的番紅染色液。
- 10.晾乾：將染好的玻片用吸水紙吸乾。
- 11.鏡檢：鏡檢時先滴一滴油鏡油，用低倍(4X10)找出菌體，再用油鏡觀察，並判斷菌體的革蘭氏染色反應性。
- 12.判斷方法：若為陰性菌，菌則呈粉紅色，若為陽性菌，則呈藍紫色。

(八)顯微鏡觀察完畢後的處理

將物鏡轉至最低倍率，載物台降到底，關閉燈源，粗調輪細調節輪均歸零，電源拔除，再用擦鏡紙向一個方向擦拭將油鏡頭上的油擦去。沾有油鏡油的載玻片取出後擦拭乾淨。

(九)實驗結果

1. 塘虱魚黏液細菌分類

為了確認塘虱魚體表黏液分離細菌的種類，我們將塘虱魚體表黏液分成兩部分刮下後塗盤並以革蘭氏染色初步分辨細菌種類。得知體表黏液 1 有 5 株革蘭氏陽性球菌、1 株革蘭氏陽性桿菌、13 株革蘭氏陰性桿菌；體表黏液 2 有 2 株革蘭氏陽性球菌、6 株革蘭氏陰性球菌。(表 1)

表一、塘虱魚體表黏液細菌分類表

名稱	體表黏液 1				體表黏液 2			
	G(+)		G(-)		G(+)		G(-)	
革蘭氏 陰/陽性								
細菌 型態	球 菌	桿 菌	球 菌	桿 菌	球 菌	桿 菌	球 菌	桿 菌
數量	5	1	0	13	2	0	6	0

2. 塘虱魚體表黏液之抑菌能力

為了檢驗塘虱魚體表黏液中是否具有能抑制產氣單胞菌、愛德華氏病及鏈球菌的細菌。我們將培養隔夜的菌液離心，將上清液以紙錠的方式貼於預先塗滿三種病原菌的平盤上培養，隔夜觀察抑菌環直徑，以評估抑菌能力。所有的細菌上清液對產氣單胞菌及鏈球菌都無抑制能力，黏液 1-1、黏液 2-6 對愛德華氏菌有抑制效用 (表 2)。接著我們進一步地測量益菌環直徑，以評估抑菌能力。體表黏液 1-1、體表黏液 2-6 的菌落抑菌環各為 1.1、1.5 cm(表 3、圖 2)

表二、抑菌能力表

	體表 黏液 1	體表 黏液 2
產氣單胞菌	0	0
鏈球菌	0	0
愛德華氏菌	1(1-1)	1(2-6)

表三、抑制愛德華氏菌的效果表

菌株編號	革蘭氏 染色	抑菌環 直徑(cm)
體表黏液 1-1	G(-)桿菌	1.1
體表黏液 2-6	G(+)桿菌	1.5

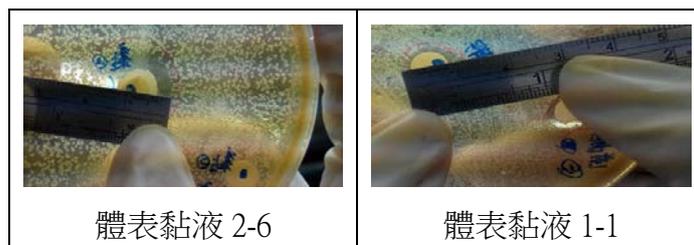


圖 2. 測量抑菌環直徑

參●結論

一、塘虱魚的體表黏液確實有抑制愛德華氏菌的功效。

經由觀察塗有病原菌培養皿中的抑菌環發現我們所做的菌對愛德華氏菌有抑制的效用。

二、黏液 2-6 菌落有明顯抑菌效果。

經由觀察對愛德華氏菌有抑菌效用之抗菌環體表黏液 1-1、體表黏液 2-6 其中以革蘭氏陽性桿菌之抑菌效果較為顯著，體表黏液 2-6 的菌落有明顯抑菌效果，其抑菌環直徑有 1.5 公分，若將其加以鑑種及實驗，興許將來可用在醫療漁業上。

三、菌種不新鮮可能導致實驗出現誤差。

由於有部分菌種我們並非當日觀察，菌體染色後部份呈紫色，部份呈粉色，然而當日觀察卻無此情況，故我們推判菌種不新鮮可能導致實驗出現誤差，導致菌體染色後部份呈藍紫色，部份呈粉紅色。

附錄 1.主要研究材料與設備

			
塘虱魚	震盪培養箱	光學顯微鏡	倒立顯微鏡
			
無菌操作台	高速離心機	微量電子秤	滅菌釜

肆●引註資料

註一、游昊鄴、莊智麟。(2003)塘虱魚人工繁殖及養殖現況之介紹。養魚世界。

註二、水生動物疾病診斷輔助系統。鏈球菌(2015)。

<http://aqua.nvri.gov.tw/disSheet.aspx?id=otl7RAA6EH8%3d>

註三、水生動物疾病診斷輔助系統。愛德華氏菌(2015)。

<http://aqua.nvri.gov.tw/disSheet.aspx?id=XOp%2byZJSIdk%3d>

註四、水生動物疾病診斷輔助系統。親水性產氣單胞菌(2015)。

<http://aqua.nvri.gov.tw/disSheet.aspx?id=UpAib4sD%2bNA%3d>