

國立臺灣大學理學院海洋研究所



碩士論文

Institute of Oceanography

College of Science

National Taiwan University

Master Thesis

吳郭魚代謝性組織與耳石有機物之穩定性同位素分餞

Stable isotopic fractionation in metabolic tissue and
otolith organic matrix of tilapia (*Oreochromis
mossambicus*)

鄭力綺

Li-Chi Cheng

指導教授：蕭仁傑 博士

Advisor: Jen-Chieh Shiao, Ph.D.

中華民國 105 年 8 月

August, 2016

國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

吳郭魚代謝性組織與耳石有機物之穩定性同位素分餞
Stable isotopic fractionation in metabolic tissue and otolith
organic matrix of tilapia (*Oreochromis mossambicus*)

本論文係鄭力綺君 (R03241202) 在國立臺灣大學海洋研究所完成之碩士學位論文，於民國 105 年 08 月 01 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

蕭仁傑 (簽名)
(指導教授)

王佳惠

王佩玲

邊國彰

系主任、所長

李忠度琳 (簽名)

致謝



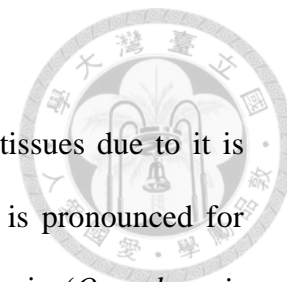
首先，謝謝蕭仁傑老師提供了如此新穎的題目，作為我的碩士論文。一開始聽到這實驗動機，興致勃勃地養了 200 多尾的吳郭魚，想著如果能完成這實驗，自己能有多開心多驕傲。直到碩一下，實驗一直在失敗迴圈中渡過，漸漸的喪失了對實驗的憧憬。直到碩一升碩二的暑假，感謝蕭老師遇到了我碩士實驗的貴人-蕭淞云學長，提供了新方法，並且願意給予我機會嘗試。整個氧化消解-細菌法的製備流程，可說是一路顛簸，從 POR 溶液無汙染，到能測到耳石有機物穩定性同位素組成，足足花了快一年的時間，非常感謝老天爺讓我在最後的 3 個月找出了失敗的原因，並且如期完成碩士論文。這兩年大概是我 24 年人生中，流過最多眼淚的一年，很慶幸的眼淚沒有白流，雖然離完美還有幾里路，但能完成碩士論文已心滿意足了。謝謝蕭仁傑老師在實驗上提供我資金、技術上的資源，謝謝王珮玲老師和玲雯學姊，願意幫我分析耳石和代謝性組織的樣本。謝謝淞云學長這一年不辭辛勞的，幫我分析那麼多耳石樣本，不論是分析技術、或是數據探討上，給予我很多建議，真的受益良多。實驗室的夥伴們，已畢業的馬交、達達、哥哥、小謙、廖峻，和遠在南美洲的尚恩，謝謝你們碩一的陪伴，我知道你們都很擔心我沒辦法如期畢業，雖然總是鼓勵著我，失敗很正常等等的話，碩一在校的晚上，如果沒有你們如動物園般的喧鬧，426 大概是一片死寂吧！碩一的蓁、瑀還有允信，謝謝你們在我最艱難的時候陪伴著我，尤其是許蓁，總是給我好多正面力量，讓我有勇氣在站起來面對。謝瑀，還要感謝你這美麗氣質兼備的車夫，往後還需要你載我一年啊。再來就是妮娜麻麻，謝謝妮娜在實驗上提供我那多的想法與建議，在胺基酸的同位素分析部分，因為你我學到好多好多，也因為有你給予的意見，我才能闖過多多關卡，謝謝我的寶貝妮娜。還有阿柏跟阿美，雖然你們兩個先溜了，但是還是好謝謝你們啊，柏柏謝謝你教我包錫囊，陪我去好多地方，但不要在那麼愛史迪奇了。最後，要謝謝我的爸爸、媽媽和兩個寶貝妹妹，以及我的好姊妹-姿慧、立琪，沒有你們，我想我熬不過這兩年，我愛你們!!

摘要

耳石屬於代謝惰性的結構，其穩定性氮同位素分餾程度可能與其他的代謝性組織不同，但欠缺相關研究。本論文以莫三比克種吳郭魚作為實驗對象，分別餵食五種同位素值不同的餌料一年多後，取代謝性組織(肌肉、鰓絲、肝臟、鱗片)，以元素分析儀聯結穩定性同位素質譜儀分析，而耳石有機物(非代謝性組織)則分別以元素分析儀聯結穩定性同位素質譜儀和氣相平台聯結穩定性同位素質譜儀進行分析，後者需先經過脫硝菌將有機氮轉化為氧化亞氮，分析結果指出氣相平台聯結穩定性同位素質譜儀所需的耳石粉末量僅佔元素分析儀聯結穩定性同位素質譜儀的 1/20，可提供更高時間解析度。此外，代謝性組織的穩定性碳、氮同位素與餌料間有明顯的同位素分餾，穩定性氮同位素部份，以肌肉、鰓絲的同位素分餾值最大(3.4-5.6‰)，肝臟則最小(2.1-3.5‰)。穩定性碳同位素部分，則以鱗片的同位素分餾值最大(4.7-6.4‰)，肝臟則最低(-0.5-0.9‰)。不同於代謝性組織，耳石有機物的穩定性氮同位素與餌料間無顯著差異，攝食不同餌料的吳郭魚個體間，分餾值範圍為 -0.51-0.69‰，且不論是耳石有機物的穩定性同位素值或是與餌料間同位素分餾，均與體重、標準體長間無顯著相關性。耳石中的氮同位素可能是直接來自攝食分解後且未經代謝過的胺基酸。此外，攝食不同餌料的吳郭魚耳石氮百分比，與個體攝入餌料的粗蛋白質百分比極為相似，但與標準體長、體重間，均無顯著相關性(除了餵食鰻魚粉的個體)。此研究提供往後研究的基礎，例如藉由分析耳石核心至邊緣的有機物穩定性同位素，將能追溯魚類在不同階段的攝食類別與食階轉變等生活史特徵。

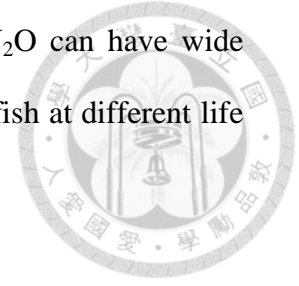
關鍵字：耳石有機物、代謝性組織、元素分析儀聯結穩定性同位素質譜儀、氣相平台聯結穩定性同位素質譜儀、穩定性同位素分餾

Abstract



Otolith isotopic fractionation may differ from other metabolic tissues due to it is metabolically inert calcified tissue. However, lack of knowledge is pronounced for stable isotopic values of otolith organic matrix. In this study tilapia (*Oreochromis mossambicus*) were fed with five different diets for up to one and half year under controlled conditions, then stable carbon and nitrogen isotope compositions of the metabolic tissues (muscle, liver, gill and scale) and otolith organic matrixes (metabolic inert) were measured by EA-IRMS and GasBench-IRMS, respectively. For the latter, otolith organic matrix had to be converted to N₂O by *Pseudomonas aureofaciens* and *P. chlororaphis* before the analysis. The results suggested that the minimal mass required for the analysis was lower (1/20) for the GasBench-IRMS compared with the conventional EA-IRMS. In addition, isotopic compositions were significantly different between metabolic tissues and the diets. For stable nitrogen isotopic fractionation, muscle and gill had the largest values (3.4-5.6‰), while liver had the lowest values (2.1-3.5‰). For stable carbon isotopic fractionation, scale had the largest values (4.7-6.4‰), while liver had the lowest values (-0.5-0.9‰). Nevertheless, the $\delta^{15}\text{N}$ compositions were not significantly different between otolith organic matrixes and the diets with the fractionation between -0.5-0.7‰. This result indicated that the source of nitrogen isotope in otolith organic matrix may be directly derived from amino acid without any metabolic transamination. There was no significant correlation among stable isotope values of otolith organic matrixes and somatic weight and standard length. Apart from these, the distribution of N% in otolith also showed similar pattern with crude protein percentage of the dies, except the tilapia fed on eel meal. N% of otolith in other individuals was not correlated to somatic weight and standard length of the fish. We conclude that high temporal

resolutions of $\delta^{15}\text{N}$ profiles analyzed by GasBench-IRMS and N_2O can have wide applications, in studying the food sources and trophic shift of the fish at different life stages.



Keywords: otolith organic matrix, metabolic tissue, EA-IRMS, GasBench-IRMS, stable isotopic fractionation

目錄



致謝.....	i
摘要.....	ii
Abstract.....	iii
目錄.....	v
表格目錄.....	vii
圖目錄.....	ix
附錄目錄.....	xi
壹、前言.....	1
1.1 耳石與生活史之研究.....	2
1.1.1 耳石的微細結構.....	3
1.1.2 耳石的化學組成.....	4
1.1.2.2 耳石有機物質組成.....	5
1.1.3 耳石的穩定性同位素應用.....	6
1.1.4 氧化消解-細菌法的穩定性氮同位素分析與應用.....	8
1.2 代謝性組織的穩定性同位素分析.....	9
1.3 研究目的.....	10
1.3.1 實驗假設.....	11
1.3.2 實驗設計與目的.....	11
貳、材料方法.....	12
2.1 魚類樣本採集.....	12
2.2 組織樣本處理及分析.....	13
2.2.1 組織樣本製備.....	13
2.2.2 穩定性碳、氮同位素分析.....	13
2.3 耳石樣本處理及分析.....	14
2.3.1 耳石樣本製備.....	14

2.3.2 耳石穩定性碳、氮穩定同位素分析	14
2.4 耳石氮含量估計	20
2.5 統計分析	20
叁、結果	22
3.1 樣本之成長差異	22
3.1.1 攝食不同餌料的個體成長差異比較	22
3.2 餌料及各代謝性組織間的穩定性碳、氮同位素	23
3.2.1 各餌料的穩定性同位素	24
3.2.2 攝食不同餌料的吳郭魚，各代謝性組織的穩定性同位素	24
3.2.3 各組織的穩定性碳、氮同位素與個體成長之相關性	26
3.2.4 各組織與餌料間的穩定性同位素分餾(isotopic fractionation)	26
3.3 耳石有機物之穩定性氮同位素值	28
3.3.1 以 EA-IRMS 和 GasBench-IRMS 分析耳石有機物穩定性同位素所需的 最少耳石粉末分析量比較	28
3.3.2 耳石有機物的穩定性氮同位素分析	29
3.3.3 耳石有機物與餌料間的穩定性氮同位素分餾	30
3.3.4 耳石有機物的穩定性氮同位素與個體成長差異間的相關性比較	31
3.4 耳石氮含量 (N% in otolith organic matrix)	31
3.4.1 攝食不同餌料的吳郭魚之耳石氮含量	31
3.4.2 耳石氮含量與個體間成長差異之相關性	32
肆、討論	33
4.1 攝食不同餌料的吳郭魚其成長差異探討	33
4.2 攝食不同餌料的吳郭魚，各代謝性組織與餌料間穩定性同位素探討	34
4.3 耳石有機物之穩定性氮同位素值分析方法比較	38
4.4 攝食不同餌料的吳郭魚其耳石有機物之穩定性氮同位素值探討	40
4.5 耳石有機物之穩定性同位素在魚類生理生態上的應用	45
五、結論	47
參考文獻	48



表格目錄



表 1、攝食不同餌料之吳郭魚組別、犧牲日期、日齡、樣本數、體重、標準體長、全長及單顆耳石平均重量。.....	58
表 2、攝食不同餌料的吳郭魚組別，其耳石重量與標準體長、體重間的相關係數及 p 值。.....	59
表 3、不同採樣時間點下的 EM1、EM2 個體，各代謝性組織的穩定性碳氮同位素及 K-W test 檢定結果。.....	60
表 4、不同採樣時間點下的 GF 個體，肌肉、鰓絲和鱗片組織的穩定性氮同位素值及 Wilcoxon rank sum test 檢定結果。.....	61
表 5、不同採樣時間點下的 EM1、EM2 個體，肌肉和鰓絲組織的穩定性碳同位素值及 K-W test 檢定結果。.....	62
表 6、不同採樣時間點下的 GF 個體，肌肉、鰓絲和鱗片組織的穩定性碳同位素值及 Wilcoxon rank sum test 檢定結果。.....	63
表 7、攝食不同餌料的吳郭魚組別，其肌肉、鰓絲、鱗片及肝臟，和各別餌料的穩定性氮同位素值。.....	64
表 8、攝食不同餌料的吳郭魚組別，其肌肉、鰓絲、鱗片及肝臟，和各別餌料的穩定性碳同位素值。.....	65
表 9、攝食不同餌料的吳郭魚組別，其肌肉、鰓絲、鱗片及肝臟與攝入餌料的穩定性碳同位素差值。.....	66
表 10、攝食不同餌料的吳郭魚組別，其肌肉、鰓絲、鱗片及肝臟與攝入餌料的穩定性碳同位素差值。.....	67
表 11、攝食不同餌料的吳郭魚組別，肌肉組織的穩定性碳、氮同位素與標準體長、體重間的相關性。.....	68
表 12、攝食不同餌料的吳郭魚組別，鰓絲組織的穩定性碳、氮同位素與標準體長、體重間的相關性。.....	69




表 13、攝食不同餌料的吳郭魚組別，鱗片組織的穩定性碳、氮同位素與標準體長、體重間的相關性。.....	70
表 14、攝食不同餌料的吳郭魚組別，肝臟組織的穩定性碳、氮同位素與標準體長、體重間的相關性。.....	71
表 15、白姑魚(<i>Pennahia argentata</i>)EA-IRMS 耳石最低分析粉末量分析。 ...	72
表 16、攝食不同餌料之吳郭魚組別，其耳石有機物和攝入餌料的穩定性氮同位素值、與兩者間的同位素分餾無母數檢定結果，以及耳石有機物與標準體長、體重間的相關係數和 p 值。.....	73
表 17、攝食不同餌料的吳郭魚組別，其耳石有機物的氮含量、攝入餌料的粗蛋白質含量，及耳石氮含量與個體間的體長、體重相關係數及 p 值。.....	74

圖目錄



圖 1、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其體重和耳石重量間的相關性。.....	75
圖 2、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其標準體長和耳石重量間的相關性。 .	76
圖 3、攝食不同餌料的吳郭魚，肌肉組織的穩定性氮同位素與體重間的相關性。	77
圖 4、攝食不同餌料的吳郭魚，肌肉組織的穩定性氮同位素與標準體長間的相 關性。	78
圖 5、攝食不同餌料的吳郭魚，肌肉組織的穩定性碳同位素與體重間的相關性。	79
圖 6、攝食不同餌料的吳郭魚，肌肉組織的穩定性碳同位素與標準體長間的相 關性。	80
圖 7、攝食不同餌料的吳郭魚，鰓絲組織的穩定性氮同位素與體重間的相關性。	81
圖 8、攝食不同餌料的吳郭魚，鰓絲組織的穩定性碳同位素與標準體長間的相 關性。	82
圖 9、攝食不同餌料的吳郭魚，鰓絲組織的穩定性碳同位素與體重間的相關性。	83
圖 10、攝食不同餌料的吳郭魚，鰓絲組織的穩定性碳同位素與標準體長間的 相關性。	84
圖 11、攝食不同餌料的吳郭魚，鱗片組織的穩定性氮同位素與體重間的相關 性。	85
圖 12、攝食不同餌料的吳郭魚，鱗片組織的穩定性氮同位素與標準體長間的 相關性。	86
圖 13、攝食不同餌料的吳郭魚，鱗片組織的穩定性碳同位素與體重間的相關 性。	87

圖 14、攝食不同餌料的吳郭魚，鱗片組織的穩定性碳同位素與標準體長間的相關性。	88
圖 15、攝食不同餌料的吳郭魚，肝臟組織的穩定性氮同位素與體重間的相關性。	89
圖 16、攝食不同餌料的吳郭魚，肝臟組織的穩定性氮同位素與標準體長間的相關性。	90
圖 17、攝食不同餌料的吳郭魚，肝臟組織的穩定性碳同位素與體重間的相關性。	91
圖 18、攝食不同餌料的吳郭魚，肝臟組織的穩定性氮同位素與標準體長間的相關性。	92
圖 19、以 GasBench-IRMS 分析不同重量耳石的誤差變化。	93
圖 20、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其成長速率(體重/日齡)和耳石有機物穩定性氮同位素間的散佈圖。	94
圖 21、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其成長速率(標準體長/日齡)和耳石有機物穩定性氮同位素間的散佈圖。	95
圖 22、攝食不同餌料的個體，其耳石有機物和餌料間的穩定性氮同位素散佈圖。	96
圖 23、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其耳石氮含量與體重間的相關性。 ...	97
圖 24、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其耳石氮含量與標準體長間的相關性。	98
圖 25、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其耳石氮含量與耳石重量間的相關性。	99
圖 26、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其耳石有機物、肌肉、鰓絲(Gill)、肝臟、鱗片和餌料間的穩定性氮同位素散佈圖。	100

附錄目錄

附錄 一、吳郭魚耳石有機物(非代謝性組織, metabolic inert tissue)和代謝性組織(metabolic tissue)的樣本製備、穩定性同位素測定流程圖。.....101





壹、前言

近年來因人為活動及全球環境變遷等衝擊，各生態系統中的物種組成及豐度均受影響，首當其衝的包括食物網結構及漁業資源利用的改變。有關生態系統中各物種間的相互作用等研究，過去多以魚類胃內容物組成作為研究基準，然而採集到的胃內容物樣本受個體消化程度影響，多半難以辨識，且胃內容物往往僅呈現較小時空間範圍的食物組成，分析費用亦較昂貴。

隨著魚類歷經環境之變異，各組織中的化學組成亦受影響，故許多學者改以代謝性組織(metabolic tissue)中的元素訊號，如肌肉組織的穩定性碳、氮同位素值等，探討生態系中不同物種間的交互作用，及食物網結構隨時間序列上的變化等。然而代謝性組織因其元素的轉化率(turnover rate)較快，滯留時間(residence time)相對較短，亦僅呈現近捕捉時間點前 150 – 200 天的攝食狀況(Heady and Moore 2013)，對各物種在早期生活史階段的攝餌狀況等探討上均有所限制，因此我們可能有必要去尋找一會隨時間序列增長的組織作為輔助工具。

隨著時間序列增長的組織，包括鱗片或骨骼等，均為常用的鈣化物組織。然而，骨骼或鱗片具元素再吸收(resorption)和再礦化(regeneration)等現象(Mugiya and Watabe 1977, Weiss and Watabe 1978)，測定之穩定性同位素值可能受不同時期再吸收或是再礦化所影響，故我們應選擇除了會隨時序性增長外，同時具代謝惰性等特徵的組織作為適當的輔助工具，而硬骨魚內耳中的耳石或許是可廣泛應用的鈣化物組織。不同於魚類的肌肉、肝臟、鰓絲及鱗片等代謝性組織，位於魚類內耳中的耳石，因具代謝惰性等特徵(Gronkjar et al. 2013)，故分析耳石的輪紋結構與元素組成，可用於解析硬骨魚類的生活史及迴游路徑推估(Tzeng and Tsai 1994, Elsdon and Gillanders 2003, Currey et al. 2014)。若能測得耳石中的有機氮元素訊號，以其穩定性同位素對應代謝性組織中的同位素組成等作為判定的依據，對於各魚種在不同生活史階段的食性組成等能有更深入的了解。然而，有關耳石

有機物與個體攝入餌料、代謝性組織間的穩定性同位素分餞(fractionation)等相關研究極少，故須透過更多的控制實驗進一步驗證，方能應用於野生物種間相互作用等生態研究上。



1.1 耳石與生活史之研究

耳石為硬骨魚類的硬組織，位於內耳系統中，隨著魚體成長所沉積的碳酸鈣結晶。碳酸鈣有三種不同的結晶型，分別為霏石(aragonite)、方解石(calcite)以及球霏石(vaterite)，結晶型不同會影響耳石內微量元素的沉積(Tzeng et al., 2007)，其中又以霏石為主要結晶型。內耳中共有三對耳石，包括矢狀石(sagitta)、扁狀石(lapillus)、和星狀石(asteriscus)，屬硬骨魚的平衡及聽覺器官(Campana 1999, Parmentier et al. 2001)。三對耳石在外觀型態及大小上均有很大的差異，大多數的硬骨魚類以矢狀石為最大，其次為礫石，星狀石則最小。鯰形目和鯉形目等骨鰾魚類的三對耳石大小，則以星狀石為最大者。就不同魚種間的耳石形態而言，以矢狀石差異性最大，礫石差異性最小，星狀石則介於兩者之間，故多數學者多以矢狀石的外觀形態，作為魚類的種類鑑定及種族辨別之依據。

耳石於胚胎時期即開始形成，隨著魚體的增長，會不斷的向外沉積，並且形成具時序性的明、暗帶。耳石的大小與魚體的體型大小間呈顯著正相關 (Hunt 1992)，因此透過耳石的大小，得以回推魚類的體長。耳石與魚體長間的迴歸關係，因不同種群或棲地環境不同會有所差異，因此藉由耳石和魚體長間的關係亦可用來判別不同種群間的生活史策略(Campana 1990)。此外，耳石具代謝惰性的特性，經沉澱後不會再吸收或受生理因素而改變(Campana and Neilson 1985)，因此我們可以根據耳石輪紋中的微量元素或穩定性同位素，重建魚類的生活史或其所經歷之環境特性，如洄游路徑(Tzeng and Tsai 1994, Elsdon and Gillanders 2003, Currey et al. 2014)、棲地利用(Secor et al. 1995, Pruell et al. 2010)及族群判別(Volk et al. 2000, Longmore et al. 2011)等。近年來，亦有學者利用耳石中胺基酸的穩定

性碳同位素值判定仔魚的孵育場(McMahon et al. 2012)，對魚類的資源加入量有更深入的了解。



1.1.1 耳石的微細結構

耳石的形成起點主要由魚類內耳上皮細胞發育出的特殊鈣化結構所構成，稱之為原基(primordium, Mann et al. 1983)，自原基至初成長輪間，稱之為核心(Nucleus)。隨著魚體增長，自核心向外延伸，形成具時間序列的成長輪(incremental zone)和不連續帶(discontinuous zone)。其中，成長輪的部分主要由碳酸鈣結晶組成，不連續帶的有機物(otolith organic matrix, OM)則較成長輪豐富(Pannella 1980, Morales-Nin 1987, Borelli et al. 2001)。依據輪紋形成週期，可分為日周輪、季節性輪及年輪。以日周輪為例，一般而言，魚類在日間新陳代謝速率較快時，耳石的增長速率也隨之增快，碳酸鈣大量沉澱於耳石上，形成日周輪的明帶，相反的當魚類的新陳代謝速率下降，耳石的沉積速率亦隨之減緩，此時有機質沉澱量增加，形成日周輪的暗帶，故一明一暗交替形成的週期約為一天。而季節性輪紋顧名思義，即因季節轉換時環境變化所造成的魚類成長速率差異，反映在耳石的明暗帶交替中，此週期可能包含一至兩個季節的時間，通常在溫帶性魚類的耳石中較為常見。年輪則以年為單位，明暗帶間的週期通常包含數個季節的變化，一般來說，春夏時因光照和水溫較適合魚類生長，攝餌量及代謝速率相對較高，耳石沉積速率亦相對較快，而形成明帶；相反的，在秋冬季節因光照減弱、水溫降低，魚類的攝餌量及新陳代謝速率亦減緩，耳石沉積速率下降而形成暗帶(Morales-Nin 1990)，此輪紋結構常見於溫帶性魚類，熱帶性魚類因冬季水溫下降幅度較小，因此輪紋通常沒有溫帶地區者來得顯著(Wilson & McCormick 1999)。



1.1.2 耳石的化學組成

耳石的成分中約 96 % 為碳酸鈣結晶，不同魚種，耳石有機物質僅佔 0.1-10 % (Degens et al. 1969)。一般而言，自仔魚時期，意即耳石核心處，主要由有機物質組成，鑲嵌部分較短的碳酸鈣結晶，與暗帶的結構十分相似，隨著魚體增長，耳石向外延伸，有機質佔的比例隨年齡增加減少，有機質中的胺基酸組成隨著年齡增加有明顯的變化(Morales-Nin 1986a, 1986b)。雖然耳石中的有機物質所佔的比例相對較少，但許多研究結果均指出耳石有機物質對耳石的碳酸鈣晶核形成、沉澱方向以及成長速率等均有重要的影響(Wheeler & Sikes 1984, Addadi & Weiner 1985, Belcher et al. 1996)。以下將針對耳石及囊內有機物質組成作簡單介紹。

1.1.2.1 耳石囊內淋巴液中的有機物質組成

耳石有機物的形成與組成成分，與耳石囊內淋巴液中的有機物有密切的關係。有機物質首先經耳石囊上的特化細胞轉化，透過耳石囊膜進入囊內的淋巴液，再沉澱至耳石上方。淋巴液中的有機物質組成及濃度，隨其在耳石周圍的位置不同有所差異，自耳石近端(proximal side)至遠端(distal side)有明顯的濃度梯度(Payan et al. 1999, Borelli et al. 2001)。在耳石溝槽(macula, proximal zone)附近的淋巴液，有機物主要由蛋白質(protein)、胺基酸(amino acid)、膠原蛋白(collagen)組成，且濃度分別比耳石遠端處(distal zone)淋巴液的蛋白質、胺基酸、膠原蛋白高 4、3、10 倍，在遠端處有機物則以蛋白聚醣體(proteoglycans) 為主要成分。根據 Gaudie & Nelson (1988)，在耳石近端的蛋白質和膠原蛋白應源自於耳石囊上表皮細胞所分泌。因此，多數學者也認為在耳石囊內淋巴液有機物質的分布與耳石的有機物組成、沉澱機制及形狀有關(Payan et al., 1999, Borelli et al., 2001)。



1.1.2.2 耳石有機物質組成

耳石增長是一種非細胞性的結晶形成之添加成長所造成的結果(Simkiss 1974)，具代謝惰性等特徵，不同於骨骼與鱗片，經沉積的元素組成不會有再吸收或再礦化等特性，故可透過輪紋中所含的元素組成或穩定性同位素值，探討不同生活史階段的棲地環境特性及食性轉換等特徵。

耳石有機物質組成，依目前已研究的魚類耳石，包括大西洋鮭魚(*Salmo salar*)、虹鱒(*Oncorhynchus mykiss*)及大菱魷(*Psetta maxima*)、吳郭魚(*Oreochromis niloticus*)等，主要由蛋白質(protein)、蛋白聚醣體(proteoglycans)及膠原蛋白(collagen)組成。

(1) 蛋白質(protein)：

蛋白質佔耳石有機物總重量約 50 %，可細分為溶解性(soluble protein)與非溶解性蛋白質(insoluble protein)，依使用的萃取方式不同，溶解性與非溶解性的蛋白質組成亦有所差異，目前使用的萃取溶劑包括鹽酸、EDTA、尿素(urea)、醋酸等。以溶解性蛋白質為例，透過離子交換層析法，可至少分離出五大類的蛋白質組成，主要由酸性胺基酸(acidic amino acid)組成(Degens et al. 1969, Borelli et al. 2001)，包括谷胺酸(glutamic acid)和天門冬氨酸(aspartic acid)。此外，部分蛋白質具相對較強的鈣離子鍵結能力(Ca-binding site)，能有效集中鈣離子，並使耳石周圍呈現過飽和態，促使形成碳酸鈣結晶，與霏石(aragonite)結晶的形成有密切的相關性(Simkiss and Wilbur, 1989, Borelli et al. 2001)。

(2) 蛋白聚醣體(proteoglycans)：

蛋白聚醣體是許多的生物礦化物的主要組成成分之一，如珊瑚、雞蛋殼以及脊椎骨等(Fisher et al. 1983, Arias et al. 1992, Allemand et al. 1994)，佔耳石有機物總重量約 30 %。有關蛋白聚醣體在耳石中的主要功能等相關研究較少，

部分學者指出蛋白聚醣體的陰離子性(anionic properties)，能促使耳石周圍的鈣離子靠近碳酸鈣結晶，對耳石沉積有一定的影響(Borelli et al. 2001)。

(3) 膠原蛋白(collagens)：

膠原蛋白佔耳石有機物總量約 20%，在硬骨魚類的骨骼、鱗片及哺乳類動物的牙齒和骨骼中亦為主要組成成分。在大多數的生物礦化物中，因膠原蛋白獨特的 3D 立體結構，扮演著鈣化作用(calcification process) 之角色，協助碳酸鈣以及羥基磷灰結晶(hydroxyapatite)沉積，並有效支撐結晶體(Glincher 1992, Plate et al. 1994, Arnold et al. 1997)，故多數學者認為膠原蛋白對於耳石碳酸鈣沉澱具有重要的影響。

此外，Borelli et al. (2001)發表的研究結果指出，耳石有機物質組成與周圍淋巴液有機混合物組成並不一致，由此得之耳石上方的有機沉積物，可能不僅是直接透過淋巴液沉積，有部分的有機物是在沉積過程中所產生的衍生物。

1.1.3 耳石的穩定性同位素應用

耳石主要由碳酸鈣組成，碳酸鈣結晶的穩定性同位素在沉澱過程中會受到海水中的穩定性同位素(Patterson et al. 1993, Thorrold et al. 1997)以及魚類個體的生理生化作用(Kalish 1991, Thorrold et al. 1997)所影響，因此可以利用耳石中的穩定性同位素值的變化探討魚類在不同生活史階段的棲息環境，如耳石中的穩定性氧同位素值被證實與魚類棲息水溫呈負相關(Patterson et al., 1993, Thorrold et al., 1997, Campana 1999, Trueman et al. 2013)，因此經常被用來推估環境溫度，進而推算魚類的洄游路徑(Thresher et al. 1994, Currey et al. 2011)、族群判別(Gao et al. 2010, Longmore et al. 2011)、以及追溯深海魚類垂直遷徙之深度(Lin et al. 2012, Trueman et al. 2013, Chang et al. 2015)等。此外，碳酸鈣中的碳主要受到環境水中的溶解性無機碳(Dissolved inorganic carbon, DIC)所影響，其次為代謝性碳源(metabolic carbon, Solomon et al. 2006)，兩者經血液進入淋巴液，最後沉澱於耳

石中，故耳石的穩定性碳同位素亦常被作為追溯魚類棲地、新陳代謝速率等研究的依據。

耳石中的有機物與碳酸鈣結晶一樣，會隨著魚體的增長而沉積，因此能呈現不同生活史階段、不同成長速率下沉積的穩定性氮同位素。此外，不同於其他生化礦化組織，如鱗片或骨骼，耳石有機物一旦沉澱後，不會有再生或再礦化的現象發生，故沉澱後的穩定性同位素值不會受到個體的代謝作用而產生同位素分餾(isotopic fractionation)。魚類隨著成長，其食物組成及相對食階均有可能產生改變，故假若我們能分析出耳石核心到邊緣間不同區段的有機物同位素組成，則可能藉此了解魚類的攝食基層，甚至是魚類於生態系的食物網結構中所扮演的角色，對魚類的生活史將有更深入的了解。

然而，有關耳石有機物的穩定性氮同位素研究，目前僅有一篇論文，Gronkjar et al. (2013)以大西洋鱈的耳石，進行耳石有機物的穩定性碳、氮同位素分析。Gronkjar et al. (2013)首先以 1980 年代採集的 350 尾，3-5 歲的大西洋鱈耳石，研磨成 100 g 的耳石粉末，以鹽酸水解後，將有機物離心分離成溶解態和非溶解態的氮化物，發現溶解態和非溶解態間的穩定性氮同位素值約有 2‰左右的差異，因此 Gronkjar et al. (2013)認為應當對溶解態和非溶解態的耳石有機氮化物進行個別穩定性同位素分析。接著透過飼養實驗，Gronkjar et al. (2013)同樣以大西洋鱈作為研究對象，分別投餵三種不同穩定性碳、氮同位素的餌料，進一步探測耳石有機物和餌料間的穩定性同位素分餾(fractionation)。因分析對象為大西洋鱈仔魚，受限於耳石大小，作者僅針對溶解態的耳石有機物進行穩定性同位素分析，元素分析儀(elemental analyzer, EA)聯結穩定性同位素質譜儀(stable isotope ratio mass spectrometryIRMS)分析結果發現溶解態的耳石有機物與餌料間的穩定性同位素值差異性很小，隨攝食餌料不同，穩定性氮同位素分餾範圍介於-0.2‰與 0.3‰之間，穩定性碳同位素分餾範圍則介於 0.09‰與 0.23‰之間，意即耳石溶解態的有機物其穩定性同位素值能反映出其攝入的餌料同位素組成。然而以此方法進行耳

石有機物的穩定性同位素探測，所需粉末量為 100 mg，若我們試圖分析耳石核心至邊緣不同階段的有機物穩定性同位素值變動，則耳石粉末可能不足分析所需的最少量門檻。因此本實驗將試著建立其他方法，降低耳石有機物穩定性同位素分析所需的最低粉末量，並同時測得溶解態和非溶解態的耳石有機物與餌料間的穩定性同位素分餞。

1.1.4 氧化消解-細菌法的穩定性氮同位素分析與應用

近年來許多海洋地化學家，以過硫酸鉀 ($K_2S_2O_8$) 等氧化劑，將海水中的氮化物，如溶解態和非溶解態的含氮顆粒、氨等，氧化消解成無機的硝酸鹽後，量測海水中的含氮量與同位素組成，對現今與古海域的氮循環有更深入的探討 (Nydahl 1978, Knapp et al. 2005)。氧化消解法亦應用於其他的生物礦化物中，如有孔蟲和耳石等，如 Morales-Nin (1986)發表的研究，即透過 Kjeldahl method，以硫酸鉀(K_2SO_4)作為氧化劑，硫酸(H_2SO_4)和氧化汞(HgO)為催化劑，將耳石有機物氧化消解成氨，進而推算耳石有機氮化物的氮含量。Ren et al. (2009)更將有孔蟲殼體內鑲嵌的有機氮化物，經過硫酸鉀氧化消解至無機硝酸鹽後，再透過脫硝菌，包括 *Pseudomonas aureofaciens* 和 *Pseudomonas chlororaphis*，將無機硝酸鹽酶解成氧化亞氮氣體，透過氣相平台聯結穩定性同位素質譜儀 (GasBench-IRMS) 進行分析氧化亞氮的穩定性氮同位素值，進而探討冰河時期的固氮作用 (Ren et al. 2009)，或是海水及底泥沉積物的氮源 (Ren et al. 2012) 等，所需的有孔蟲殼體粉末量僅約 3-5 mg。

耳石與有孔蟲殼體十分相似，雖然耳石有機物的含量與有孔蟲殼體的有機氮化物含量有所落差，若透過氧化消解法，能將耳石中的溶解態和非溶解態有機物完全消解成無機硝酸鹽，再透過氧化消解-細菌法將無機硝酸鹽酶解成氧化亞氮氣體，進樣至 GasBench-IRMS 進行穩定性氮同位素分析，如此一來，耳石有機

物的穩定性同位素所需最少粉末量應可降至 3-5 mg，甚至更低，如此一來，解析單顆耳石自核心到邊緣的穩定同位素時序變化的可行性亦提高。



1.2 代謝性組織的穩定性同位素分析

魚體肌肉、肝臟、鰓、鰭條以及黏液等組織中的穩定性碳、氮同位素在過去的研究中，多半扮演著重建食物網結構、食性轉換的角色。隨著食階的增加，每上升一個食階， $\delta^{13}\text{C}$ 約增加 1‰ (Peterson & Fry 1987, Hobson & Welch 1992), $\delta^{15}\text{N}$ 約增加 2‰到 4‰ (Peterson & Fry 1987, Michener & Schell 1994, Post 2002)。由於 $\delta^{13}\text{C}$ 隨著食階的增加變化幅度不大，多半僅作為判定食物來源的指標； $\delta^{15}\text{N}$ 則作為相對食階位置 (relative trophic level) 以及食性轉換時間點 (timing of diet-switch) 估算的依據。然而，各組織中的穩定性碳、氮同位素轉換率 (turnover rate) 較快、元素滯留時間 (residence time) 相對較短，往往僅呈現目標物種近期的攝食狀況，甚至有可能受到組織的穩定性同位素未與其食性轉換後的食物來源之同位素值達平衡，而出現誤判或低估相對食階等現象 (Heady et al. 2013)。

耳石屬代謝惰性之鈣化物，經沉澱之有機物不再進行分解作用，假設耳石中有機物之碳、氮源自其於攝入的食物來源 (Fablet et al. 2011)，依耳石核心至邊緣的輪紋結構，透過酸水解 (hydrolysis) 萃取出不同時期的有機物，探測到的穩定性同位素值則能呈現時序上的食性轉換、相對食階轉變等生活史特徵，藉此了解各生態系統中不同生物間的相互作用。然而有關耳石有機物的穩定性碳、氮同位素值分析的相關研究較少，受限於耳石中有機物質含量僅佔耳石總重量的 0.1-10% (Degens et al. 1969, Borelli et al. 2001)，因此需要的分析粉末量較其他組織來得多。目前僅一團隊 (Gronkjar et al. 2013) 以耳石粉末量 100 mg，進樣至 continuous flow isotope ratio mass spectrometry 進行溶解態有機物 (water-soluble protein, WSP) 並分析其穩定性同位素值。然而，此數值僅能代表部分耳石有機物的穩定性氮同位素值，且若需自耳石核心到邊緣刮取粉末，進而比較不同生活史階段的穩定性同

位素值變動，可能須將多個樣本的耳石混合成一個樣本，得到的數據可能受到個體間的成長差異，而不具可信度。此外，有關耳石有機氮化物與其他組織(如肌肉、鰓絲、肝臟、鱗片等)、食物來源間的穩定性同位素值相關性了解甚少，亦須透過更多飼養實驗進一步驗證，方以應用於野外樣本上。

1.3 研究目的

有關各物種在不同生活史階段的食性組成及相對食階轉變等研究，在過去受限於代謝性組織元素轉換率較快，成魚個體中的組織同位素組成僅呈現魚類近捕捉時間點下的攝食狀況，因此需透過捕獲各魚種，自仔魚到成魚等不同階段的個體，進行代謝性組織的穩定性同位素分析，以解決此問題。然而，受限於仔魚個體較小，在樣本取得以及組織粉末分析量、分析費用等限制下，困難度相對較高。故本研究欲以耳石屬代謝惰性之鈣化物，經沉澱之有機物不再參與分解作用等特性，且有機物之碳、氮源均來自於攝入的食物來源(Fablet et al. 2011)，依耳石核心至邊緣的輪紋結構分析其穩定性同位素值，測得的穩定性同位素值的變動應能呈現時序上的食性轉換、相對食階轉變等生活史特徵。

受限於耳石中有機物含量相對較低，可能須將多個樣本的耳石混合分析，得到的數據可能受個體間的成長差異影響而不具可信度。如何有效以相對較少的分析粉末量進行耳石有機物的穩定性同位素分析，為本實驗主要的課題之一。

藉以 Ren et al. (2009)發表的研究，以氧化消解-細菌法探測有孔蟲殼體內有機物的穩定性同位素之技術，期盼以相對較少的耳石粉末量偵測耳石有機物的穩定性同位素值，並將得到的數據與其他代謝性組織及攝入餌料的穩定性同位素值作比較，進一步探討以耳石有機物的穩定性同位素作為重建各生態系不同物種間的相互作用的可行性。



1.3.1 實驗假設

以耳石非細胞性的結晶增生及代謝惰性等特徵，假設耳石中的碳酸鈣結晶和有機物均來自攝食之餌料及個體歷經的水體環境，故耳石有機物的穩定性同位素值應能反映餌料的穩定性氮同位素值。根據 Grønkjær et al. (2013)發表的研究結果指出，耳石中的溶解態和非溶解態的有機物之穩定性同位素值有顯著的差異，且溶解態有機物和攝入餌料間的穩定性碳、氮同位素值差異性小，故本研究假設耳石有機物(bulk otolith organic matrix, bulk OM)中的穩定性同位素值與餌料間應無顯著差異。除此之外，本研究亦將耳石有機物(非代謝性組織)的穩定性同位素值與其他代謝性組織(如肌肉、鰓絲和肝臟等)作比較，因代謝性組織的代謝路徑不同，且具代謝、再生等特性，故預設耳石有機物與各代謝性組織間的穩定性同位素值應有明顯的差異。

1.3.2 實驗設計與目的

我們將透過飼養實驗，探討耳石中有機物與餌料、不同組織間的穩定性同位素值的差異性。首先，本研究首次以氧化消解-細菌法套用於耳石有機物穩定性同位素分析，根據重複測定樣本間的分析結果，我們將比較分別以元素分析儀聯結穩定性同位素質譜儀(EA-IRMS)和氧化消解-細菌法進樣氣相平台聯結穩定性同位素質譜儀(GasBench-IRMS)兩種分析技術，偵測耳石有機物同位素組成所需的最低分析粉末量和優缺點。其次，根據 EA-IRMS 分析結果，比較各組織分別與餌料間的穩定性碳、氮同位素分餾差異性。透過 EA-IRMS 和 GasBench-IRMS 偵測的耳石有機物同位素結果，將深入探討五組比較組組間及組內的個體成長差異，與耳石有機物穩定性氮同位素間之相關性，以及攝食不同餌料的吳郭魚個體，其耳石有機物的氮百分比變化狀況。最後，我們整合耳石有機物和代謝性組織的同位素值，比較不同餌料組間，耳石有機物和代謝性組織分別與餌料間的同位素分餾差異性，以及可能的影響原因為何。



貳、材料方法

2.1 魚類樣本採集

本實驗以莫三比克種吳郭魚(*Oreochromis mossambica*)具廣適應力、存活率高等特性選作為實驗魚種，自其尚帶有卵黃囊的仔稚魚時期開始進行飼養。除此之外，本研究不僅想透過飼養控制實驗，了解攝食不同餌料的個體，其耳石有機物和代謝性組織分別與餌料間的穩定性同位素分餾外，同時希望能進一步驗證隨著攝食餌料所屬的相對食階不同，偵測到的同位素分餾值是否也有顯著差異。故在飼養期間，我們選用五種不同穩定性同位素組成、餌料品質和粗蛋白質含量的飼料投餵，包括相對食階較高的鰻魚粉(eel meal (EM)，台南東元餌料廠)、豐年蝦(*Artemia salina* (AS), O.S.I PRO 80)、較低食階的紅蟲(*Tubifex* spp. (Tub))、屬植物性蛋白質組成的孔雀魚餌料(guppy food (GF)，宗洋水族有限公司)以及由 67% 海藻組成的海藻顆粒態飼料(seaweed EX pellet (SEP), KYORIN Food IND. LTD.)。其中，以鰻魚粉(eel meal)、豐年蝦(*Artemia salina*)以及紅蟲(*Tubifex* spp.)的粗蛋白質含量較高，分別為 45%、61% 和 63.3%。海藻顆粒態餌料(seaweed EX pellet)以及孔雀魚飼料(guppy food)的粗蛋白質含量相對較低，分別為 33% 和 40%(表 4)。

為了增加可分析耳石有機物同位素組成的樣本數，實驗期間共飼養了兩批不同時期孵化的吳郭魚。第一批於 2014 年 11 月 27 日開始飼養，待其可進食後，分為三獨立缸，投餵鰻魚粉、紅蟲及豐年蝦，樣本分別以 EM1、Tub 及 AS 作代表。第二批於 2015 年 4 月 16 日開始飼養，亦分為三獨立缸，分別投餵鰻魚粉、孔雀魚飼料及海藻顆粒態飼料，樣本分別以 EM2、GF 及 SEP 表示。此外，第一、二批的起始飼養樣本數及魚缸大小有所差異，第一批中 EM1、AS 和 Tub 的起始樣本數分別為 25、26 和 23 尾，魚缸體積較大，魚體活動空間約 0.025 m³；第二批中的 EM2、GF 和 SEP 起始飼養樣本數較第一缸多，分別為 50、51 和 44

尾，魚體活動空間約 0.01 m³。飼養期間水溫均調控在 20°C(冬季)至 24°C(夏季)之間，每日餵食一次，以餵食到吳郭魚飽食為止。

為了了解攝食不同餌料的吳郭魚，在飼養一段時間後，各組織的穩定性同位素是否與攝食的餌料之穩定性同位素值達平衡，以及耳石是否成長至足夠大小進行穩定性同位素值分析，依可分析樣本數多寡，分別於 2015 年 8 月 10 日及 2016 年 2 月 23 日自鰻魚缸(EM1, EM2)和孔雀魚飼料缸(GF)採集部分個體進行初步分析。其餘個體分別於 2016 年 5 月 13 日(豐年蝦缸, AS)和 2016 年 5 月 21 日(EM1、EM2、GF、SEP 和 Tub)犧牲，透過急速冷凍的方式將其犧牲，測量其標準體長(standard length)、全長(total length)和體重(somatic weight)，保存於-20°C，各樣本的犧牲日期、存活天數、樣本總數、體重、標準體長及全長等資料如表 1 所示。

2.2 組織樣本處理及分析

2.2.1 組織樣本製備

自吳郭魚背鰭下方，以解剖刀將魚鱗及魚皮掀開，利用鑷子取出約 1 cm³大小的肌肉，同時取其鰓和肝臟等組織，鰓的部分須先加鰓耙去除，以避免鰓耙中的碳影響穩定性碳同位素值分析。取出的組織分別放置於錶玻璃上方，以去離子水潤洗三次，去除組織上方的附著物及油脂，放入烘箱(50°C, 24 hours)將組織完全烘乾。待組織乾燥後，以研鉢將組織磨成粉末狀，倒入樣品瓶中旋緊，置於防潮箱中等待後續進行穩定性碳、氮同位素分析。

其中，因 Tub 和 SEP 的個體等待解剖的時間太久，導致胃內容物與肝臟等器官腐壞而無法辨別，故 Tub 和 SEP 的肝臟組織未作穩定性同位素分析。

各代謝性組織與非代謝性組織(耳石有機物)的樣本處理及穩定性同位素分析流程如附錄一所示。

2.2.2 穩定性碳、氮同位素分析

將研磨好的組織粉末，取 0.75 mg 至錫囊中，以鑷子將錫囊包成圓錠狀，進樣至元素分析儀 (Flash EA 2000 Automatic Elemental Analyzers, Thermo, Germany)，以高溫 (1800°C 以上) 將樣本燃燒產生氣體，經由層離管分離出 CO₂ 和 N₂，再送進質譜儀(Finnigan MAT 253, Thermo, Germany)進行穩定性碳、氮同位素值分析，分析進行中，每 7 個樣本穿插分析尿素(urea)、蛋白質(protein)及 USGS40 (Carbon and Nitrogen Isotopes in L-glutamic acid)等標準品，作為換算與校正，再以 VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite)國際標準品的參考值表示同位素值。穩定性碳、氮同位素值計算公式如下所示：

$$\delta = \left(\frac{R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} \right) \times 1000 (\text{‰})$$

其中，R 值為分析樣本之穩定性碳同位素比值 ¹³C: ¹²C 或穩定性氮同位素比值 ¹⁵N: ¹⁴N，而標準品 USGS40 的穩定性碳同位素值為-26.4‰；氮值為-4.5‰，標準品重複測定間精度為 0.02‰。

2.3 耳石樣本處理及分析

2.3.1 耳石樣本製備

此研究以吳郭魚矢狀石(sagitta)作為穩定性氮同位素值分析之對象。以解剖刀自吳郭魚頭骨背側，沿上枕骨突起後方切開至眼球後方，扳開額骨與上枕骨後，將腦部組織物取出。腦部組織取出後，可見基枕骨左右兩側有內耳組織，以及矢狀石，利用鑷子將其一併取出，浸泡在去離子水中，將包覆於耳石周圍的組織去除。耳石經數次潤洗後，將其放置在 1.5 ml 的離心管內，置入烘箱以 50°C 烘烤 24 小時，乾燥後室溫存放。

2.3.2 耳石穩定性碳、氮穩定同位素分析

本研究希望能同時分析到溶解與非溶解態的耳石有機物之穩定性碳、氮同位素值，故須利用 6 N 鹽酸將碳酸鈣結晶去除，以避免受到碳酸鈣中的穩定性碳同

位素值影響。耳石穩定性碳、氮同位素值測定以元素分析儀聯結穩定性同位素質譜儀(EA-IRMS)和氣相平台聯結穩定性同位素質譜儀(GasBench II-IRMS)進行分析。



2.3.2.1 元素分析儀聯結穩定同位素質譜儀(Elemental analyzer-IRMS)

在以 EA-IRMS 進行吳郭魚耳石有機物的穩定性同位素分析前，本研究先以白姑魚(*Pennahia argentata*)單顆耳石即達 150-200 mg 的樣本，作為 EA-IRMS 分析最少粉末量的測試物種。首先利用研鉢將耳石磨成粉末後，充分攪和均勻使其具同質性，分別取 25 mg 和 30 mg 的同質性耳石粉末為一單位，每顆耳石進行三至四重複測定，放置在經 500°C 烘烤過的錶玻璃上方，滴入 1 ml 的 6N 鹽酸，將耳石碳酸鈣結晶去除，反應時間約 3 個小時，此步驟需置於 110°C 的環境下操作以加速其反應。最後再滴入 100 μ l 的鹽酸，確定所有碳酸鈣溶解後，利用去離子水潤洗 3 次，將耳石有機物質移置錫囊(Tin foil cones, Elemental Microanalysis)中，放置在加熱器上方加熱(110°C)至完全乾燥。待其乾燥後，將錫囊密封成錠狀，置入元素分析儀進行穩定性碳、氮同位素值分析。

以白姑魚耳石有機物的三至四重複測定間穩定性同位素值的標準偏差，判定 EA-IRMS 耳石最低分析粉末量後，以此方法套用於本研究飼養的吳郭魚耳石有機物之穩定性同位素探測，但因飼養吳郭魚的耳石重量相對較小，依成長速率差異，耳石重量範圍自 0.82-6.08 mg，以成長速率最快的 EM1 個體為例，需混合 5-6 顆以上的耳石方能做分析，在判定成長速率與耳石有機物的穩定性同位素相關性分析上可能造成誤判，能相互比較的樣本數亦受限。因此本研究僅以 2015 年 8 月 10 日犧牲之 5 尾 EM1 個體中，統一選擇右邊的耳石，集成一個樣本進行穩定性同位素值分析，其餘耳石有機物均以氧化消解 - 細菌法進樣氣相平台聯結穩定性同位素質譜儀分析。

2.3.2.2 氣相平台聯結穩定同位素質譜儀(GasBench II-IRMS)

以 GasBench II-IRMS 進行耳石有機物中穩定性氮同位素分析前，須將有機物質(包括溶解態和非溶解態有機物)先轉換成硝酸鹽(NO_3^-)，再利用細菌法以脫硝菌(*Pseudomonas chlororaphis* ATCC13985)將硝酸鹽轉換成氧化亞氮(N_2O)，進樣至 GasBench-IRMS 進行穩定性氮同位素值分析。同於 EA-IRMS，在分析飼養吳郭魚耳石有機物的穩定性同位素之前，因 GF 樣本數較多，以其耳石作為氧化消解-細菌法最少分析粉末量的探測基準。

根據 Ren et al. (2009)年發表的研究結果指出，有孔蟲殼體中有機氮化物的分析粉末量約為 3-5 mg，故本研究以 1.5 mg 以下、1.5-2 mg、2-2.5 mg、2.5-3 mg 和 3 mg 以上等五個層級的耳石粉末量，每個樣本進行三重複的穩定性同位素分析。根據耳石有機物三重複間的穩定性同位素標準偏差值，判定最低耳石分析粉末量後，除了五尾 EM 個體外，其餘樣本的耳石均以氧化消解-細菌法進樣 GasBench-IRMS 進行同位素分析。以下將條列氧化消解-細菌法得製備步驟。

(1) 耳石有機物萃取

乾燥後的耳石，取其中一邊的矢狀石置入消解管中，滴入 0.2 ml 的 6 N HCl，將耳石碳酸鈣去除。待耳石碳酸鈣完全溶解後，再滴入 0.2 ml 的 6 N HCl，確保所有碳酸鈣結晶已溶解後，加入去離子水使耳石有機氮化物總體積達 4 ml。

(2) 鹼性濕法 - 氧化消解反應

此步驟須以 POR 溶液(過硫酸鉀：氫氧化鈉 = 1 : 1)將耳石有機物質轉換為無機氮化物(NO_3^-)，步驟如下所示：

(a) 氧化劑過硫酸鉀提純

將氧化劑 - 過硫酸鉀提純的原因在於耳石中有機物的含量很低，若有其他含氮污染源，容易使得受污染的背景液訊號遠大於耳石有機物之訊號，經校正後的數值亦不可靠，故須先將氧化劑的純度提高，純化方法有很多，在本研究中我們將透過重結晶的方式提純。秤量 30 g 過硫酸鉀試劑，將

其倒入 250 ml 血清瓶，放入磁轉子，再加入 200 ml 去離子水，開啟磁力加熱攪拌器，加熱攪拌至過硫酸鉀試劑完全溶解，溶液加熱的溫度不宜超過 50°C，以免試劑氧化分解變質。待其完全溶解後，將血清瓶放冰水混合物中冷卻結晶，提純後的過硫酸鉀晶體，利用藥勺將其放置在濾紙上方，用少量的去離子水沖洗，並置於抽風櫃中，待其完全乾燥。乾燥後的過硫酸鉀結晶，放入離心管中置入防潮箱保存。所有與試劑接觸的器皿，塑膠類必須以 1 N HCl 酸泡 24 小時，再用大量去離子水潤洗，玻璃器皿部分須以 500°C 烘烤 4 小時以上，將有機物完全揮發以減少污染機率發生。

(b) POR 溶液製備及純度、氮穩定同位素測定

取 6 g 的過硫酸鉀結晶和 6 g 的氫氧化鈉試劑，配成 100 ml POR 溶液。取 10 ml 的 POR 溶液至 pyrex 消解管中，旋緊蓋子，置入高壓滅菌釜中高壓滅菌(121°C，20 min)。氧化消解後，利用 6 N HCl 將其滴定至 pH 值 3-5 之間。接著打入脫硝菌(*Pseudomonas chlororaphis*, ATCC13985)，測定 POR 溶液的 nitrate 濃度及氮穩定同位素值。

(c) 耳石氮化物氧化消解反應

氧化消解反應依 Knapp et al. (2005)發表的文章指出，海水水樣體積與 POR 溶液體積比 6:1 的比例，即足夠進行氧化消解反應。然而，耳石的有機物與海水水樣狀況不太一樣，(1)海水的 pH 值維持在 pH = 8 的狀況下，而耳石有機氮化物須先透過 6 N HCl 進行水解，若以水樣體積和 POR 溶液比為 6:1 的方式進行實驗，會有 pH 值低於 11 的現象，可能導致氧化消解反應不完整。(2)耳石有機物在經酸水解後，加入 POR 的同時，亦會產生硫酸鈣等白色沉澱物，而有部分的非溶解態有機物可能會受硫酸鈣結晶體包覆，若參與反應的 POR 體積不足，亦可能造成反應不完全的現象。故在本實驗中，耳石有機物將以樣本體積與 POR 溶液體積比為 1:

1 的形式進行氧化消解。加入 POR 溶液 4 ml 後，旋緊蓋子，置入高壓滅菌釜高壓滅菌(121°C，20 min)。氧化消解反應後，以 6 N HCl 滴定至 pH 值 3-5 之間，放入 -20°C 冷凍庫中冷凍保存。



(3) 細菌法

(a) 製作平板培養基

將 23 g TSA 培養基粉末、0.5g KNO₃ 倒入 500 mL 蒸餾水，經滅菌後，冷卻 15 分鐘，倒入塑膠平板培養皿冷卻，於無菌操作台中待固化後，以塑膠袋封好保存。

(b) 大豆液體培養基製備

取 210 g DIFCO Tryptic soy broth (TSB)、7.0 g KNO₃、3.5 g (NH₄)₂SO₄、34.3 g potassium phosphate，注入 7000 ml 去離子水，放入磁轉子，開啟磁力攪拌機，將其充分混合。混合之培養基以 400 ml 作為一個單位，分裝至 500 ml 血清瓶中，置於高壓滅菌釜高壓滅菌(121°C，20 min)。

(c) 不含硝酸鹽之大豆液體培養基製備(NO₃⁻ free TSB medium)

取 30 g Tryptic soy broth (TSB)、0.5 g (NH₄)₂SO₄、4.9 g KH₂PO₄，注入 2000 ml 去離子水，放入磁轉子，開啟磁力攪拌機，將其充分混合。混合之培養基以 300 ml 作為一個單位，分裝至 300 ml 血清瓶中，置於高壓滅菌釜高壓滅菌(121°C，20 min)。

(d) 細菌培養

脫硝菌自冷凍保存管劃至平板培養基室溫培養兩天後，將單一菌落挑起至 10 mL 含硝酸根大豆液體培養基中室溫培養兩天，再接種至八瓶 400 mL 含硝酸根大豆液體培養基中密封，於室溫培養一星期。

(4) 完全脫硝試驗

此步驟目的為測試大豆培養基內的硝酸鹽(nitrate, NO₃⁻)，是否經脫硝菌完全脫硝至氧化亞氮(N₂O)。自 400 ml 的大豆培養基取 1 滴至測試燒杯中，

加入 40 μ l 對氨基苯磺醯胺(sulfanilamide)和 40 μ l N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NED)，以測定脫硝菌的反應效率。若測試結果呈紫紅色，則代表脫硝菌活性不足，未完全將培養基中的硝酸鹽轉化成氧化亞氮，仍有中間產物亞硝酸根殘留，該瓶培養液必須丟棄。

(5) 脫硝菌(*Pseudomonas chlororaphis* ATCC 13985)菌體收成

將脫硝反應效率足夠的脫硝菌培養液取 1600 ml 平均倒入 4 罐 500 ml 離心瓶中，放入離心機離心(3000 g, 15 分鐘)。離心後將上清液倒出，並將 300 ml 不含硝酸鹽的大豆培養基，倒入其中一瓶裝有脫硝菌菌落之離心瓶，充分搖晃使脫硝菌再懸浮。脫硝菌再懸浮後，將該瓶大豆培養基倒入第二瓶裝有沉澱之脫硝菌菌落的離心瓶中，將其充分搖晃使脫硝菌再懸浮，第三瓶與第四瓶大豆培養基再懸浮的做法亦同。將四瓶脫硝菌完全集中於一離心瓶後，以 3 ml 作為一單位，分裝入 100 管樣品瓶中，並在各樣品瓶中加入 1 滴消泡劑，用鐵氟龍矽膠墊片(Teflon-lined silicone septum)和鋁蓋(Aluminum crimps)將樣品瓶密封。密封之樣品瓶膠插入曝氣針頭(22G 1-1/2")後，將其倒掛並插入注氣針頭(26G 1/2")，注入 3-4 psi 氮氣曝氣 2 小時，以淨化瓶內氣體。

(6) 注入樣本

曝氣後的樣品瓶取下後，依待分析樣本之濃度，注入脫硝反應所需的樣本體積。耳石有機物部分，分別注入 2-3 ml 於三重複樣品瓶中。注入樣本前，須先插入輸出針(26G 1/2")，以避免注入樣本時，因瓶內壓力變化而有其他氣體進入樣品瓶的狀況發生。樣本經注射針筒及注入針(22G 1-1/2")，注入樣品瓶中。待樣本完全注入後，將其倒掛 3 天，使瓶內脫硝菌完全反應。在本步驟須特別注意，注入的樣本體積應當相近，以避免穩定性氮同位素值的訊號及數值大小受到影響，而有所波動。

(7) 穩定性氮同位素分析

待樣本與脫硝菌充分反應後，注入強鹼至水樣澄清，將脫硝菌殺死，經氣相平台進樣至穩定同位素質譜儀 (GasBench II-Thermo Finnigan isotope ratio mass spectrometry Delta V advantage) 進行穩定性氮同位素分析。



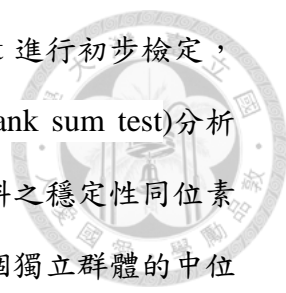
2.4 耳石氮含量估計

有關耳石中的氮含量分析等相關研究鮮少，故本研究透過 GasBench-IRMS 偵測到的 N_2O 訊號，轉換成每一樣品瓶內的硝酸鹽含量，進而推估每一瓶樣品瓶中耳石的氮含量。

首先，在每一次的穩定性同位素分析前，會分別取 10、20、30、40、50、60 等六個硝酸鹽含量(nmol) 等級的標準品，測定其產生的訊號面積(signal area) 大小。根據探測到的 N_2O 訊號面積，估算硝酸鹽含量與 N_2O 訊號面積間的迴歸關係式。接著將耳石樣本測得的 N_2O 訊號面積帶入此迴歸關係式，換算成每一樣品瓶中成功將耳石有機物轉換至硝酸鹽的含量，並進一步計算成每一樣品瓶的氮重。由於每顆耳石會進行三重複的穩定性同位素分析，因此根據三重複間的訊號面積相對百分比，回推成每一樣品瓶內注入的耳石粉末量，將估算出的氮重除以每一樣品瓶中的耳石粉末量($W_N / W_{\text{otolith weight per vial}}$)，由此估算平均每 1 mg 的耳石粉末中的 N %。

2.5 統計分析

根據耳石有機物之穩定性氮同位素值，以及肌肉、鰓絲、肝臟、魚鱗和餌料的穩定性碳、氮同位素值，與觀測到的體長、體重等資料作以下的統計分析，(1) 以皮爾森相關係數分析(Pearson's correlation coefficient analysis)計算(a)攝食不同餌料的吳郭魚個體其耳石的重量與體長、體重之間是否呈顯著相關，(b)攝食相同餌料的吳郭魚個體，其體長、體重及耳石重量分別與耳石有機物、各代謝性組織的穩定性同位素值間是否有顯著的相關性，(c)攝食相同餌料的吳郭魚個體，其耳石 N % 是否受其成長速率(體長、體重等)所影響。(2) 因各代謝性組織、餌料



和耳石有機物的分析樣本數不一致，故無法用 ANOVA 或 t-test 進行初步檢定，須以無母數分析來計算，在此以魏克生等級和檢定(Wilcoxon rank sum test)分析在五組比較組組內，代謝性組織和耳石有機物，分別與攝入餌料之穩定性同位素間是否有顯著差異。(3) Kruskal-Wallis Test (K-W test)是檢定 n 個獨立群體的中位數是否有顯著差異的無母數方法，且不需假設樣本成常態分布。本研究以 K-W test 分析(a)攝食不同餌料的吳郭魚個體，其各代謝性組織、耳石有機物與餌料間的穩定性同位素組成是否具顯著差異，以及(b)攝食不同餌料的吳郭魚個體，各代謝性組織、耳石有機物分別與餌料間的穩定性同位素分餾(isotopic fractionation)是否有顯著差異。最後亦比較(c)攝食不同餌料的吳郭魚個體，其耳石的 N %是否受其攝入的餌料不同，而有所差異。以上分析結果若有顯著差異，則以 multiple-comparison 作事後檢定，所有檢定均透過 matlab(R2010)進行統計分析計算。



叁、結果

3.1 樣本之成長差異

3.1.1 攝食不同餌料的個體成長差異比較

攝食不同餌料之吳郭魚，其體重(somatic weight)、標準體長(standard length)、全長(total length)以及單顆耳石平均重量(otolith weight)如表 1 所示。在飼養期間，為了確認魚體各組織與餌料的穩定性同位素值是否達平衡狀態，以及耳石大小是否足夠進行穩定性同位數值分析，因此樣本間的犧牲時間不一致，故首先對攝食相同餌料，不同時間採樣的個體先進行體重、標準體長等成長差異的比較。第一批三組獨立缸中，鰻魚粉缸個體(EM1)分別在 2015 年 8 月 10 日和 2016 年 5 月 21 日犧牲，存活天數分別為 257 天和 533 天，其體長、體重經 Wilcoxon rank sum test 分析顯示無顯著差異 ($h = 0, p = 0.571$)。此外，紅蟲的適口性較差，導致 Tub 在仔稚魚時期死亡率較高，至 2016 年 5 月 21 日樣本數僅存 3 尾，在體長(78.63 ± 5.24 mm)、體重(13.57 ± 1.92 g)上比鰻魚粉缸個體(EM1)(mean weight = 38.71 ± 14.95 g, mean standard length = 82.29 ± 23.43 mm)、豐年蝦缸個體(AS)(mean weight = 21.03 ± 3.55 g, mean standard length = 84.37 ± 8.63 mm)稍低，雖然 Tub 的成長狀況較 EM1 和 AS 差，但三者犧牲時的體長、體重資料經 K-W test 檢定後無顯著差異(chi-square = 6.54, $p = 0.088$)。

EM1 和 EM2 (同餵養鰻魚粉缸)為第一、二批之實驗組，EM2 分別於 2015 年 8 月 10 日及 2016 年 5 月 21 日犧牲，存活天數分別為 117 天和 402 天，經 Wilcoxon rank sum test 檢定顯示存活 402 天的個體在體長與體重上，均較 117 天的個體來得大(weight : $h = 1, p = 0.012$, standard length : $h = 1, p = 0.012$)。此外，雖然 EM2 飼養天數較 EM1 長，但成長速率上較 EM1 慢，測量到的體長、體重明顯比 EM1 低(chi-square = 11.43, $p = 0.001$)。孔雀魚餌料缸個體(GF)亦分別於

2016年2月23日和5月21日犧牲，存活天數分別為314天和402天，經Wilcoxon rank sum test 檢定顯示存活天數314天和402天的個體不論在體長或體重上均無顯著差異(weight : $h = 0$, $p = 0.057$, standard length : $h = 0$, $p = 0.26$)，故GF在後續不同飼料組間的成長比較上會合併討論。

第二批同樣飼養402天的個體，以鰻魚粉缸個體(EM2)成長速率最快，其次則為孔雀魚飼料缸個體(GF)(mean weight = 3.16 ± 1.52 g, mean standard length = 43.62 ± 7.91 mm)，海藻顆粒態飼料缸個體(SEP)(mean weight = 0.50 ± 0.26 g, mean standard length = 27.99 ± 3.99 mm)成長速率最慢，根據K-W test 分析結果顯示，EM2、GF和SEP犧牲時的體長、體重間均有顯著差異(weight : chi-square = 55.6, $p < 0.001$, length : chi-square = 52.33, $p < 0.001$)。根據K-W test 分析結果顯示第一批(EM1, AS, Tub)和第二批中的EM2的標準體長、體重與第二批的GF、SEP有顯著差異(weight : chi-square = 89.55, $p < 0.001$, standard length : chi-square = 86.35, $p < 0.001$)。

此外，本研究也對耳石重量與個體間的標準體長、體重進行相關係數(correlation coefficient)分析，根據分析結果顯示，攝食五種不同餌料的吳郭魚，除了紅蟲缸個體(Tub)的耳石重量未與體長、體重間呈顯著的相關性外，EM1、EM2、AS、GF和SEP的耳石重量均與體長、體重間具有顯著相關性。攝食不同餌料的吳郭魚其耳石重量與體長、體重間的相關係數、 p 值、迴歸線的斜率(b)以及截距等如表2和圖1、圖2所示。

3.2 餌料及各代謝組織間的穩定性碳、氮同位素

攝食不同餌料之吳郭魚其肌肉、鰓絲、肝臟、鱗片等組織以及食物來源的穩定性碳、氮同位素值如表7、8所示。



3.2.1 各餌料的穩定性同位素

餌料部分(表 7、8)，鰻魚粉(eel meal)之穩定性碳、氮同位素值分別為 $-19.9 \pm 0.1\text{‰}$ 、 $10.8 \pm 0.1\text{‰}$ ；豐年蝦(*Artemia salina*)之穩定性碳、氮同位素值分別為 $-22.7 \pm 0.1\text{‰}$ 、 $11.6 \pm 0.2\text{‰}$ ；紅蟲(*Tubifex* spp.)之穩定性碳、氮同位素值分別為 $-19.6 \pm 0.1\text{‰}$ 、 $4.4 \pm 0.1\text{‰}$ ；孔雀魚飼料(guppy food)之穩定性碳、氮同位素值分別為 $-23.3 \pm 0.1\text{‰}$ 、 $7.3 \pm 0.1\text{‰}$ ；海藻顆粒態飼料(seaweed EX pellet)之穩定性碳、氮同位素值分別為 $-21.7 \pm 0.2\text{‰}$ 、 $8.4 \pm 0.2\text{‰}$ 。

3.2.2 攝食不同餌料的吳郭魚，各代謝性組織的穩定性同位素

飼養期間為了確認吳郭魚是否成長至可分析之大小，鰻魚粉缸個體(EM1、EM2)和孔雀魚飼料缸個體(GF)在存活天數上有所差異，故首先比較不同採樣時間點的個體，各代謝性組織的穩定性同位素值是否有所差異，同位素分析及檢定結果如表 3-6 所示。分別飼養 257、533 天的 EM1 和 117、402 天的 EM2 個體，肌肉和鰓絲組織的穩定性氮同位素，以及肌肉的穩定性碳同位素(表 3、5)，經檢定結果分析顯示有顯著差異，但同位素差值僅約 0.2‰ – 1.5‰ ，差異性小，故後續將 EM1 和 EM2 在不同採樣時間點的個體，各代謝性組織的穩定性同位素值合併討論。孔雀魚飼料缸個體(GF)的部分如表 4、6 所示，分別飼養 314 天和 402 天的個體，除了肌肉的穩定性碳同位素和鰓絲的穩定性氮同位素外，其餘組織的穩定性碳、氮同位素值間均無顯著差異，其中肌肉組織的碳穩定性同位素和鰓絲的氮穩定性同位素組成在不同時間點下採集的個體間，值差異性小，僅差約 0.2‰ ，故在後續的穩定性同位素比較上亦合併討論。

攝食不同餌料的吳郭魚，各代謝性組織與餌料間的穩定性同位素值，隨著餌料不同有所差異。穩定性氮同位素部分，除了紅蟲缸(Tub)外，其餘各比較組(EM1、EM2、AS、GF 及 SEP)的代謝性組織與餌料間之穩定性氮同位素值有顯著差異 ($\delta^{15}\text{N}_{\text{EM1 \& EM2}}$: chi-square = 43.83, $p < 0.001$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{AS}}$: chi-square = 11.51, $p =$

0.0093, $\delta^{15}\text{N}_{\text{GF}}$: chi-square = 50.61, $p < 0.001$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{Tub}}$: chi-square = 5, $p = 0.082$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{SEP}}$: chi-square = 3.73, $p = 0.044$)。鰻魚粉缸(EM1, EM2)四種組織(肌肉、鰓絲、魚鱗和肝臟)中,以肌肉($14.7 \pm 0.4\text{‰}$)和鰓絲($14.2 \pm 0.7\text{‰}$)的同位素位值最高,其次則為鱗片($13.9 \pm 0.4\text{‰}$),肝臟($12.9 \pm 0.4\text{‰}$)的同位素值最低。孔雀魚飼料缸(GF)個體的結果與鰻魚粉缸相似,以肌肉($11.5 \pm 0.3\text{‰}$)和鰓絲($11.5 \pm 0.4\text{‰}$)的同位素位值最高,肝臟最低($10.3 \pm 0.3\text{‰}$)。豐年蝦缸(AS)與鰻魚粉缸之個體,和孔雀魚飼料缸的穩定性同位素值分佈趨勢不太一致,雖然一樣以肌肉($15.2 \pm 0.5\text{‰}$)和鰓絲($15.5 \pm 0.1\text{‰}$)的同位素值為四種組織中最高者,鱗片($15.1 \pm 0.2\text{‰}$)和肝臟($15.1 \pm 0.6\text{‰}$)間的同位素值相對較低但差異不大,且四種組織中穩定性氮同位素最高(鰓絲)與最低值(鱗片)間僅差 0.4‰ 。

穩定性碳同位素部分,除了孔雀魚飼料缸(GF)和海藻顆粒態飼料缸(SEP)之個體,其餘比較組中各組織間的穩定性碳同位素有顯著差異($\delta^{13}\text{C}_{\text{EM1 \& EM2}}$: chi-square = 20.88, $p < 0.001$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{AS}}$: chi-square = 32.63, $p < 0.001$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{GF}}$: chi-square = 87.65, $p = 0.23$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{Tub}}$: chi-square = 6.25, $p = 0.043$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{SEP}}$: chi-square = 2.94, $p = 0.23$)。不同於穩定性氮同位素,鰻魚粉缸(EM1, EM2)個體的四種組織間,以鱗片($-14.8 \pm 0.3\text{‰}$)的同位素值最高,其次則為肌肉($-17.3 \pm 0.3\text{‰}$)和鰓絲($-18.6 \pm 0.9\text{‰}$),肝臟明顯比其他三種組織來得低,約為 $-20.2 \pm 0.8\text{‰}$ 。紅蟲缸(Tub)個體的穩定性碳同位素值分佈與鰻魚粉缸相似,鱗片($-14.9 \pm 0.1\text{‰}$)的同位素值明顯大於鰓絲($-17.6 \pm 0.3\text{‰}$)和肌肉($-18.1 \pm 0.1\text{‰}$)組織。豐年蝦缸(AS)個體四種組織間的穩定性碳同位素組成不同於鰻魚粉缸和紅蟲缸,以鱗片($-16.3 \pm 0.2\text{‰}$)數值最高,其次為肌肉組織($-19.2 \pm 0.2\text{‰}$),鰓絲($-21.9 \pm 0.9\text{‰}$)和肝臟($-21.8 \pm 2.5\text{‰}$)組織間的同位素值最低。

整體而言,在五組比較組之間,四種代謝性組織中以肌肉和鰓絲的穩定性氮同位素值最高,其次為鱗片組織,最低為肝臟組織;而穩定性碳同位素部份,則以鱗片的數值最高,其次為肌肉組織,最低為肝臟組織。



3.2.3 各組織的穩定性碳、氮同位素與個體成長之相關性

攝食不同餌料的吳郭魚，各組織的穩定性碳、氮同位素與標準體長、體重間的相關性並不一致。肌肉組織部分(表 11、圖 3-6)，僅紅蟲缸(Tub)個體的穩定性氮同位素與標準體長間呈顯著正相關($\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle-Tub}}$ V.S. standard length : $r = 0.9996$, $p = 0.019$)。鰓絲組織部份(表 12、圖 7-10)，除了豐年蝦缸(AS)個體的穩定性碳同位素與體重間呈顯著正相關($r = 0.5504$, $p = 0.0079$)，其餘個體的穩定性同位素與標準體長、體重間均無顯著相關性($p > 0.05$ ，表 12)。鱗片組織部份(表 13、圖 11-14)，鰻魚粉缸(EM1, EM2)個體的穩定性氮同位素分別與體重間呈顯著負相關($\delta^{15}\text{N}_{\text{scale}}$ V.S. weight : $r = -0.6823$, $p = 0.0297$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{scale}}$ V.S. standard length : $r = -0.7199$, $p = 0.0189$)，而豐年蝦缸(AS)個體的穩定性氮同位素與體重間則呈顯著正相關($\delta^{15}\text{N}_{\text{scale}}$ V.S. weight : $r = 0.7465$, $p = 0.0083$)。其餘個體的鱗片穩定性同位素均與個體成長差異間無顯著相關性($p > 0.05$ ，表 13)。肝臟組織部份(表 14、圖 15-18)，僅豐年蝦缸(AS)個體的穩定性氮同位素與體重間呈顯著正相關($\delta^{15}\text{N}_{\text{liver}}$ V.S. weight : $r = 0.7465$, $p = 0.0083$)。

3.2.4 各組織與餌料間的穩定性同位素分餾(isotopic fractionation)

各組織與餌料間的穩定性同位素分餾如表 9、10 所示。穩定性氮同位素部分，攝食不同餌料的吳郭魚，各代謝性組織與餌料間的穩定性氮同位素分餾($\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{tissue-D}}$)均有顯著差異($\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle-D}}$: chi-square = 58.75, $p < 0.001$, $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{gill-D}}$: chi-square = 54.37, $p < 0.001$, $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{scale-D}}$: chi-square = 39.11, $p < 0.001$, $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{liver-D}}$: chi-square = 10.7, $p = 0.005$)。肌肉組織中，以紅蟲缸(Tub) ($5.6 \pm 0.2\%$)、孔雀魚飼料缸(GF, $4.2 \pm 0.3\%$)和海藻飼料缸(SEP, $4.3 \pm 0.6\%$)個體的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{M-D}}$ 值較高，鰻魚粉缸(EM1 & EM2, $3.9 \pm 0.4\%$)和豐年蝦缸(AS, $3.7 \pm 0.5\%$)個體的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{M-D}}$ 相對較低。鰓絲與肌肉的穩定性同位素分餾分佈相似，以紅

蟲缸(Tub, $5.5 \pm 0.1\%$)、海藻顆粒態飼料缸(SEP, $4.7 \pm 0.2\%$)和孔雀魚飼料缸(GF, $4.2 \pm 0.4\%$)個體的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{G-D}}$ 值較高，鰻魚粉缸(EM1 & EM2, $3.4 \pm 0.7\%$)和豐年蝦缸(AS, $3.9 \pm 0.1\%$)值相對較低。不同於肌肉和鰓絲組織，鱗片部分以紅蟲缸(Tub, $4.9 \pm 0.2\%$)個體的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{S-D}}$ 值最高，其次為孔雀魚飼料缸(GF, $3.6 \pm 0.2\%$)和豐年蝦缸(AS, $3.4 \pm 0.2\%$)，鰻魚粉缸(EM1 & EM2)比豐年蝦缸(AS)個體的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{S-D}}$ 稍低，約為 $3.2 \pm 0.4\%$ ，海藻顆粒態飼料缸(SEP)為五組比較組中最低者，約為 $2.6 \pm 0.1\%$ 。肝臟部分，豐年蝦缸(AS)個體的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{I-D}}$ 值最高，約為 $3.5 \pm 0.6\%$ ，其次為孔雀魚飼料缸(GF)，值約 $2.9 \pm 0.3\%$ ，鰻魚粉缸(EM1, EM2)為最低者，值約 $2.1 \pm 0.4\%$ 。

穩定性碳同位素分餾部分，五組比較組間，除了肝臟組織外，其餘組織與餌料間的穩定性碳同位素分餾 ($\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{tissue-D}}$) 均有顯著差異 ($\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle-D}}$: $\text{chi-square} = 13.56$, $p = 0.009$, $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{gill-D}}$: $\text{chi-square} = 17.38$, $p = 0.0016$, $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{scale-D}}$: $\text{chi-square} = 31.98$, $p < 0.001$, $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{liver-D}}$: $\text{chi-square} = 0.03$, $p = 0.99$)。肌肉部分，以豐年蝦缸(AS)個體的 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{M-D}}$ 值最高，值約 $3.5 \pm 0.2\%$ ，其次為孔雀魚飼料缸(GF, $2.7 \pm 0.4\%$)、海藻顆粒態飼料缸(SEP, $2.4 \pm 0.7\%$)、鰻魚粉缸(EM1 & EM2, $2.7 \pm 0.3\%$)，紅蟲缸(Tub)個體的 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{M-D}}$ 值最低，值僅約 $1.6 \pm 0.1\%$ 。鰓絲部分，以紅蟲缸(Tub, $2.1 \pm 0.3\%$)、海藻顆粒態飼料缸(SEP, $2.3 \pm 0.2\%$)個體的 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{G-D}}$ 值最高，其次為鰻魚粉缸(EM1, EM2)，值約 $1.3 \pm 0.9\%$ ，豐年蝦缸(AS)和孔雀魚飼料缸(GF)為五組比較組中 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{G-D}}$ 最低者，分別僅約 $0.9 \pm 1.0\%$ 、 $1.0 \pm 1.0\%$ 。鱗片的穩定性碳同位素分餾相較於其他三種組織，值顯著較高，其中以豐年蝦缸(AS)個體的 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{S-D}}$ 值最高，約為 $6.4 \pm 0.2\%$ ，其次則為孔雀魚飼料缸(GF, $5.7 \pm 0.2\%$)、海藻顆粒態餌料缸(SEP, $5.7 \pm 0.1\%$)、鰻魚粉缸(EM1 & EM2, $5.1 \pm 0.3\%$)，紅蟲缸(Tub)個體的 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{S-D}}$ 值最低，僅約 $4.7 \pm 0.1\%$ 。肝臟部分，攝食不同餌料的吳郭魚，其肝臟與餌料間的穩定性碳同位素分餾

($\Delta\delta^{13}\text{C}_{1-D}$) 差異甚小，豐年蝦缸(AS)個體的 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{1-D}$ 值約為 $0.9 \pm 2.5\%$ ，鰻魚粉缸(EM1 和 EM2)為 $-0.5 \pm 0.9\%$ ，孔雀魚飼料缸(GF)則為 $-0.6 \pm 0.4\%$ 。

整體而言，穩定性氮同位素部分，以鱗片和肝臟組織的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{tissue-D}}$ 為四種組織中最低者，穩定性碳同位素部分，則以鱗片的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{tissue-D}}$ 為最高者，肝臟最低者。除此之外，各組織隨著個體攝入餌料不同，其穩定性氮、碳同位素分餾分佈不一致，以常用的組織-肌肉為例，在豐年蝦缸(AS, 3.7‰)和紅蟲缸(Tub, 5.6‰)個體間約相差 2‰，鰓絲的穩定性氮同位素分餾分佈與肌肉組織相似，鱗片組織則以紅蟲缸(Tub)個體最高，以海藻顆粒態飼料缸(SEP)個體最低，兩者相差約 2.4‰。肝臟相較於其他組織而言，氮同位素分餾差異性相對較小，鰻魚粉缸(EM1, EM2)和豐年蝦缸(AS)個體間相差約 1.1‰。

3.3 耳石有機物之穩定性氮同位素值

3.3.1 以 EA-IRMS 和 GasBench-IRMS 分析耳石有機物穩定性同位素所需的最少耳石粉末分析量比較

在以 EA-IRMS 進行吳郭魚耳石有機物的穩定性同位素分析前，事先以白姑魚(*Pennahia argentata*)耳石測定該技術所需的最低耳石分析粉末量。白姑魚耳石有機物之穩定性同位素重複測定的分析結果顯示(表 15)，以 25 mg 為一單位(SM1-SM4)進行分析，測定到的穩定性氮同位素值為 $5.4 \pm 1.4\%$ ，穩定性碳同位素值為 $-17.43 \pm 1.7\%$ ，四重複測到的偏差值約 1-2‰；而以 30 mg (SS1-SS3)進行分析，測定到的穩定性氮同位素值為 $8.6 \pm 0.2\%$ ，穩定性碳同位素值為 $-14.4 \pm 0.3\%$ ，三重複測到的偏差僅 0.1-0.3 ‰，分析數值的精度相對較高，故後續若以元素分析儀進行穩定性同位素探測，應以 30 mg 的耳石粉末分析較佳。

同於 EA-IRMS，本研究事先以 GF 的耳石有機物進行 GasBench-IRMS 最低耳石分析粉末量測定。結果如圖 19 所示，當耳石粉末量達 1.5 mg 以上，三重複

間的標準偏差範圍自 0.0–0.4‰，當耳石粉末量降至 1.5 mg 以下，三重複間的標準偏差上升至 1.2–2.0‰ 間，數值的準度明顯較低。此外，攝食不同餌料的個體，其耳石的氮含量亦有所差異，以孔雀魚飼料缸(GF)個體為例，其耳石氮含量約 0.06%，為五種不同餌料個體間氮含量排序第四者，故後續所有耳石有機物的穩定性同位素值，均以 2.5-3 mg 為分析粉末量之基準。

受限於 EA-IRMS 分析粉末量最少須 30 mg 以上，此方法若套用於飼養的吳郭魚耳石有機物之穩定性同位素探測，依個體間的成長速率差異，至少需將 5–10 尾的吳郭魚耳石樣本合併分析。本研究僅以 2015 年 8 月 10 日犧牲的 5 尾鰻魚粉缸個體(EM1)左邊矢狀石，以 EA-IRMS 進行耳石有機物的穩定性碳、氮同位素分析，並將此結果與氧化消解–細菌法(GasBench-IRMS)分析結果作比較。

3.3.2 耳石有機物的穩定性氮同位素分析

首先以 EA-IRMS 測定五尾 鰻魚粉缸(EM1)個體，左側耳石有機物的穩定性碳、氮同位素值分別為-18.2‰、12.2‰；而同個體(EM1)右側耳石有機物，經 GasBench-IRMS 偵測到的穩定性氮同位素為 $11.5 \pm 0.8\%$ 。GB-IRMS測得的同位素組成範圍涵蓋了 EA-IRMS 的分析結果，故推論 EA-IRMS 和 GasBench-IRMS 兩分析技術均能測得耳石中所有有機物(溶解態和非溶解態有機物)的穩定性氮同位素，且分析數值間無顯著差異。

其餘個體以 GasBench-IRMS 測得的耳石有機物穩定性氮同位素值如表 16 所示。第一、二批同樣餵養鰻魚粉的個體(EM1 和 EM2)其耳石有機物穩定性氮同位素值間無顯著差異($h = 0, p = 0.26$)，這也代表耳石有機物的穩定性同位素值並不會受到飼養起始時間所影響。除此之外，EM1 和 EM2 分別於 2015 年 8 月 10 日和 2016 年 5 月 21 日犧牲之個體，其耳石有機物的穩定性氮同位素值經 Wilcoxon rank sum test 分析結果顯示無顯著差異($h = 0, p = 0.338$)；孔雀魚飼料缸(GF)亦分別在 2016 年 2 月 23 日和 5 月 21 日犧牲，不同時間犧牲的個體其耳石穩定性氮同位素值亦無顯著差異($h = 0, p = 0.177$)。故後續在耳石有機物穩定性同

位素比較上，EM1 和 EM2、以及 GF 在不同時間點下採集的個體將個別合併討論。

根據分析結果顯示，鰻魚粉缸個體(EM1、EM2)耳石有機物之穩定性氮同位素值範圍：9.2-11.4‰，平均值為 $10.3 \pm 1.4\%$ ；紅蟲缸個體(Tub)耳石有機物之穩定性氮同位素值範圍：2.6-4.5‰，平均值為 $3.0 \pm 0.4\%$ ；豐年蝦缸個體(AS)耳石有機物之穩定性氮同位素值範圍：10.3-12.0‰，平均值為 $11.1 \pm 0.7\%$ ；孔雀魚飼料缸個體(GF)中，耳石有機物之穩定性氮同位素值僅一個體數值較低，約 6.1‰，其餘範圍：7.5-8.9‰，平均值為 $8.1 \pm 0.4\%$ ；海藻顆粒態飼料缸個體(SEP)耳石有機物之穩定性氮同位素值範圍：6.9-9.1‰，平均值為 $8.4 \pm 0.6\%$ ，所有樣本的重複的標準偏差值介於 0.0-1.1‰。將攝食不同餌料的吳郭魚其耳石有機物之穩定性同位素值作初步的無母數分析(Kruskal-Wallis test)，五組比較組間的同位素組成具顯著差異 (chi-square = 54.85, $p < 0.001$)，事後檢定(multiple-compare)結果顯示，EM1 和 EM2、AS 的穩定性氮同位素值間無顯著差異，但與 GF、Tub 和 SEP 有顯著差異。

3.3.3 耳石有機物與餌料間的穩定性氮同位素分餞

耳石有機物與餌料間的穩定性氮同位素分餞部分，經 Wilcoxon rank sum test 分析結果顯示，五組比較組個體其耳石有機物，與其攝入的餌料之同位素值間無顯著差異，檢定結果如表 16 所示。耳石有機物與餌料間的穩定性氮同位素分餞 ($\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{OM-D}}$)，經 Kruskal-Wallis test 分析結果顯示有顯著差異(chi-square = 23.83, $p < 0.001$)。其中，鰻魚粉缸 (EM1, EM2) 個體的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{OM-D}}$ 值範圍為 -1-2.4‰，平均值為 $-0.5 \pm 1.4\%$ ，豐年蝦缸 (AS) 個體的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{OM-D}}$ 值為五比較組中最低者，範圍自 -1.3-0.5‰，平均值為 $-0.5 \pm 0.6\%$ ；孔雀魚飼料缸(GF) 個體的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{OM-D}}$ 值為五比較組中最高者，範圍自 -1.3-1.6‰，平均值為 $0.7 \pm 0.7\%$ ；紅蟲缸 (Tub) 個體的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{OM-D}}$ 值為範圍自 -0.3-0.6‰，平均值為 $0.2 \pm 0.4\%$ ；海藻顆粒態飼料缸

(SEP) 個體的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{OM-D}}$ 值範圍自-1.0–0.4‰，平均值為 $-0.3 \pm 0.6\%$ ，有關各樣本其 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{OM-D}}$ 值如表 16 和圖 22 所示。

3.3.4 耳石有機物的穩定性氮同位素與個體成長差異間的相關性比較

因攝食相同餌料 (同缸) 的個體間在體長和體重上有所差異，我們也針對耳石有機物的穩定性氮同位素值與個體間體長、體重等作相關性分析。經相關係數分析後，攝食五種不同餌料的吳郭魚，其耳石有機物的穩定性氮同位素值與體長、體重間均無顯著相關 ($p > 0.05$)，這結果證實了耳石有機物的穩定性氮同位素值，當個體長期攝入相同的餌料、且食物充足之狀況下，並不會受到個體間的成長差異所影響，同時能有效反映攝入餌料之同位素組成，分析測得的相關係數和 p 值如表 17、圖 20-21 所示。

3.4 耳石氮含量 (N% in otolith organic matrix)

有關耳石有機物的氮含量等相關研究較少，故本研究試著透過 GasBench-IRMS 偵測的氧化亞氮氣體訊號，推估成每一樣品瓶內的硝酸鹽含量 (nmol)，再透過硝酸鹽含量估算耳石中的氮佔平均每 1mg 耳石粉末中的重量百分比。

3.4.1 攝食不同餌料的吳郭魚之耳石氮含量

同樣餵食鰻魚粉之個體-EM1 和 EM2，每 1 mg 耳石中的 N % 為五比較組中最高者，範圍為 0.15%–0.23%，平均值為 $0.18 \pm 0.03\%$ ，豐年蝦缸 (AS) 個體中僅一尾吳郭魚的 N% 較低，值約 0.03%，其餘樣本氮百分比值範圍自 0.09–0.11%，平均值為： $0.10 \pm 0.02\%$ 。孔雀魚飼料缸 (GF) 個體的 N% 範圍自 0.04–0.09%，平均值為 $0.07 \pm 0.01\%$ 。紅蟲缸 (Tub) 個體為五比較組中耳石 N% 次高者，範圍自 0.10–0.13%，平均值為 $0.12 \pm 0.01\%$ 。海藻顆粒態飼料 (SEP) 個體則為五比較組中，耳石 N% 最低者，範圍自 0.01–0.02%，平均值為 $0.02 \pm 0.01\%$ ，經 Kruskal-Wallis

test 分析結果顯示五組比較組中所有樣本的耳石 N% 具有顯著差異(chi-square = 42.73, $p < 0.001$)。此外，研究結果顯示，耳石氮含量與餌料的粗蛋白質含量分佈極為相似，這也意謂著耳石氮含量可能會受到餌料的粗蛋白質含量所影響。

3.4.2 耳石氮含量與個體間成長差異之相關性

同耳石穩定性同位素，本實驗亦針對耳石氮含量與個體間的成長差異作相關係數分析，進而探討在長期攝食相同餌料且餌料量充足的狀況下，同缸的吳郭魚耳石氮含量是否受到個體間的成長差異(如體長、體重及耳石重量等)所影響。分析結果顯示，在五比較組中僅鰻魚粉缸個體(EM1 和 EM2)的耳石含氮量與其體重、體長和耳石重量間呈顯著的負相關(weight v.s. $N\%_{OM}$: $r = -0.76$, $p = 0.0025$, standard length v.s. $N\%_{OM}$: $r = -0.90$, $p < 0.001$, otolith weight v.s. $N\%_{OM}$: $r = -0.77$, $p = 0.0021$)，其餘各組的耳石氮含量與體長、體重和耳石重量間則無顯著相關性($p > 0.05$)，五組比較組的耳石氮含量與標準體長、體重和耳石重量間的相關係數及 p 值如表 17、圖 23、24、25 所示。

肆、討論



4.1 攝食不同餌料的吳郭魚其成長差異探討

為了增加耳石有機物穩定性氮同位素的分析樣本數，分別在 2014 年 11 月 27 日和 2015 年 4 月 16 日飼養了兩批莫三比克種的吳郭魚，因飼養起始時間不一致，在兩批中均投餵鰻魚粉的個體(EM1 & EM2)可作比較。飼養期間，投餵的鰻魚粉量一致，且 EM2 在 2016 年 5 月 21 日犧牲的個體存活天數為 402 天，日齡較 EM1 於 2015 年 8 月 10 日犧牲(存活天數為 257 天)的個體大，但犧牲時的體長和體重測量結果顯示，EM2 的體長、體重均顯著低於 EM1。EM1 的耳石平均重量約 6.08 ± 1.71 mg，而 EM2 的耳石平均重量僅 4.79 ± 1.19 mg。推估造成攝食相同餌料，且餌料量、水溫和光照時間等環境因子一致，成長速率上有明顯差異的原因可能為：(1) EM2 自開始飼養至 120 天間使用的魚缸尺寸較 EM1 的飼養缸小，當 EM2 成長至一定大小時，可能受到活動空間限制而抑制其體型的增長，(2) EM2 在起始飼養時的樣本數約為 52 尾，較 EM1 起始飼養樣本數(約 25 尾)多，樣本密度高可能會導致個體間因攝食餌料量有限，餌料資源分配不均的狀況發生。在活動空間以及餌料來源有限的環境壓力(environment stress)下，魚類會將大部分的能量轉換成體長、體重的增長，而轉換至耳石成長的能量會相對較少，這也是為什麼有些魚類棲息環境和體長大小一致，但成長速率較快的個體其耳石重量會較成長速率慢的個體來得小(Reznick et al. 1989, Otterlei et al. 2002)。此外，第一批餵食鰻魚飼料的個體中，存活 533 天的一尾 EM1 個體，其體長和體重均與存活 257 天的個體間無顯著差異，這可能也意味著 EM1 在兩百多天後已達極限體長，故體長、體重等增長幅度亦相對較小，或呈持平的狀況。

雖然第一批中的 Tub 因紅蟲對仔魚而言的適口性差，在仔魚時期的死亡率高，至 2016 年 5 月 21 日樣本僅剩 3 尾，但至飼養後期因增長至成魚大小，足以

攝食紅蟲，在體長和體重上呈快速增長的現象，至犧牲時不論是體長或體重均與 EM1 和 AS 無顯著差異。

第二批中的 EM2、GF 和 SEP 的成長差異較第一批明顯，EM2 的成長速率最快，其次則為 GF，SEP 最慢。推估此成長差異與個體攝入餌料的營養成分和粗蛋白質含量有密切的關係。GF 以孔雀魚飼料為食物來源，主要由黃豆粉、麵粉和少量魚粉、魚油組合而成，由於此飼料成分主要以觀賞用的孔雀魚為對象所設計，故其營養程度對吳郭魚而言可能相對不足。SEP 該飼料如品名所示，以草食性海水魚為對象，主要成分為海藻粉(占總重 67%)，少部分由魚粉、磷蝦粉和烏賊粉混合而成，適用於多數雀鯛科的魚類。然而吳郭魚屬雜食性魚類，雖然投餌量充足，但明顯的該餌料的營養成分不足以提供吳郭魚快速增長，飼養 402 天後其標準體長僅 27.99 ± 3.99 mm，為 EM2 標準體長的 36 %。此外，與 EM1 和 EM2 的狀況相似，第二批中三組獨立缸的體長和體重數值，均明顯比第一批低，推估與第二批使用的魚缸尺寸較小所造成的環境壓力和餌料營養成分不足等有密切的關係。

有關個體體重、體長和耳石重量間的相關性，根據表 2、圖 1 和圖 2 所示，鰻魚粉缸(EM1, EM2)、豐年蝦缸(AS)和孔雀魚飼料缸(GF)個體其耳石重量均與標準體長、體重間呈現顯著正相關，僅紅蟲缸(Tub)不具顯著相關性。此結果應受限於 Tub 的樣本數僅 3 尾，且 3 尾間的標準體長、體重和耳石重量上差異很小所致，此結果與前人提出的理論 - 耳石的成長速率應與個體間體長、體重的增加速率呈一定比例相符。

4.2 攝食不同餌料的吳郭魚，各代謝性組織與餌料間穩定性同位素探討

各組織的穩定性氮同位素分佈，在攝食不同餌料的個體間有些許差異，根據結果顯示，五組比較組中，以肌肉和鰓絲間的穩定性氮同位素差異較小，除了豐

年蝦缸個體(AS)的肝臟組織外，鰻魚粉缸(EM1, EM2)、紅蟲缸(Tub)、孔雀魚飼料缸(GF)和海藻顆粒態飼料缸(SEP)個體的鱗片，以及鰻魚粉缸(EM1, EM2)和孔雀魚飼料缸(GF)個體的肝臟之穩定性氮同位素值明顯比肌肉和鰓絲的數值來得低。穩定性碳同位素部分，以肌肉和鰓絲組織的數值最為相近，鱗片的穩定性碳同位素為四種組織中最高者，肝臟則為最低者。肌肉為最常見的同位素分析組織，因此我們將進一步比較鰓絲、鱗片和肝臟組織分別與肌肉組織的同位素組成差異。

首先鱗片與肌肉組織間的穩定性同位素部分，本研究結果與前人研究結果相似，鱗片的穩定性碳同位素值明顯比肌肉高，差值約 2.2–4.0‰ (Estep and Vigg 1985, Rounick and Hicks 1985, Satterfield and Finney 2002, Perga and Gerdeaux 2003, Kelly et al. 2006)，原因有以下兩種可能，(1)肌肉組織中的脂質含量較鱗片高。脂肪生成的過程中，葡萄糖經 EMP 途徑(Embden-Meyerhof pathway)轉換成丙酮酸，再經脫羧和氧化作用轉換成乙醯輔酶 A(acetyl coenzyme A)，乙醯輔酶 A 即為脂肪生成的碳源，而丙酮酸轉換成乙醯輔酶 A 前，會將組織中的 ^{13}C 耗盡，這也是造成脂肪含量較高的組織，其穩定性碳同位素值明顯較低的原因(DeNiro and Epstein 1977, Sinnatamby et al. 2008)。然而部分學者亦有將肌肉組織中的脂質去除，進行穩定性同位素標準化校正，依然出現此現象，故有可能是以下第二種機制所造成，(2)鱗片與肌肉組織的胺基酸組成不一致(Estrada et al. 2005)所致。Ikoma et al. (2003)的研究指出，鱗片中的胺基酸有 34 % 是由甘胺酸(glycine)組成，甘胺酸在鱗片和餌料間的穩定性碳同位素分餾(isotopic fractionation)較肌肉組織高，約為 8‰，這可能是導致鱗片的穩定性碳同位素較肌肉組織高的主要原因(Sinnatamby et al. 2008)。

穩定性氮同位素值部分，鱗片組織的同位素值較肌肉組織低，但兩組織間的穩定性氮同位素值差異相較於碳同位素值小，此結果與 Sinnatamby et al. (2008) 相似，可能的原因與兩組織(鱗片與肌肉)間的胺基酸組成不一致有關。鱗片中的

甘胺酸會對組織中的 ^{15}N 耗盡，導致鱗片中的穩定性氮同位素值相對較低(Hare et al. 1991, Sinnatamby et al. 2008)。此外，肌肉組織的胺基酸組成中，屬非必要性的胺基酸的牛磺酸(taurine)佔很高的比例，非必要性胺基酸與餌料來源間的穩定性同位素分餾(fractionation)通常較大，因此肌肉測得的穩定性氮同位素值亦相對較高(Pinnegar and Polunin 1999, Sinnatamby et al. 2008)。

肝臟組織部分，測得的穩定性碳、氮同位素值，除了豐年蝦缸(AS)個體外，其餘個體的肝臟同位素組成均為四種組織中最低者。肝臟的穩定性碳同位素值較低，與組織中的高脂質含量有密切的關係。硬骨魚類會將大部分的脂質儲存於肝臟和骨骼肌中(Robinson and Mead 1973)，如同鱗片的現象，脂肪的形成會耗盡組織中的 ^{13}C ，使得肝臟組織中的穩定性碳同位素相較於經脂質去除(lipid extraction)後的組織低(DeNiro and Epstein 1977, Pinnegar and Polunin 1999, Logan et al. 2008)。穩定性氮同位素值部分，肝臟主要由必須胺基酸組成，牛磺酸(taurine)所佔的比量相較於肌肉、心臟等組織較少，故測得的穩定性氮同位素值亦相對較低(Pinnegar and Polunin 1999, Sinnatamby et al. 2008)。

此外，各組織穩定性碳、氮同位素與個體間的成長差異，在五組比較組中，其相關性並不一致。Sweeting et al. (2007 a, b)以挪威齒舌鱸(*Dicentrarchus labrax*)進行控制飼養實驗，分別投餵不同同位素組成之餌料，測定齒舌鱸的肌肉、心臟和肝臟組織之穩定性碳、氮同位素與個體成長差異、攝食餌料和棲息環境間的相關性。Sweeting et al. (2007 a)研究結果指出，三種組織中，僅肝臟組織的穩定性氮同位素呈現個體增大而顯著下降的趨勢，此與本研究中餵食鰻魚粉(EM1, EM2)之個體，其鱗片組織的穩定性氮同位素與體長、體重間的相關性分佈極為相似。

穩定性碳同位素部份，Sweeting et al. (2007 b)研究中，三種組織(肌肉、心臟和肝臟)均受個體間成長差異所影響，且隨著組織型態不同，分佈趨勢亦不一致。其中，肌肉和心臟的變異相對較小，隨著個體體重增加，變異約 0.1-0.3‰，而肝臟組織變異較大，隨著個體體重增加，約下降 0.94‰。部份控制實驗則指出，玻

璃梭鱸(*Sander vitreus*)和兩種蝦類(*Mysis mixata* and *Neomysis integer*)其肌肉組織的穩定性碳同位素並未受到個體成長差異所影響(Gorokhova and Hansson 1999, Overman and Parrish 2001)。不同於 Sweeting et al. (2007 b)的研究結果，本研究中吳郭魚個體其肝臟組織的穩定性碳同位素即未隨著個體增長而有顯著的下降趨勢，僅豐年蝦缸個體(AS)的鰓絲穩定性碳同位素與體重間有顯著負相關。

推論造成各組織穩定性同位素組成，受個體成長差異所影響的可能性為：個體間各組織的蛋白質合成速率(protein synthesis rate)應明顯不同。以肝臟組織為例，肝臟組織為主要的胺基酸代謝器官，會產生大量的氨，透過排泄作用將不需要的含氮物排出體外，當個體發生代謝作用的同時，其體內各組織中的同位素組成即發生改變(Sweeting et al. 2007 a, b)，如本研究中的豐年蝦缸(AS)個體，其肝臟組織的穩定性氮同位素即隨著體重增加，呈現顯著上升的趨勢(表 14)。相較於肝臟組織，鰓絲和肌肉組織的蛋白質合成速率較慢(McMillan and Houlihan 1989)，在本研究中，吳郭魚個體該兩組織的同位素組成受個體間成長差異影響亦相對較小。因此，隨著個體間成長速率、胺基酸代謝率以及蛋白質合成率等差異，對各組織的同位素組成可能造成一定的影響。有關各組織的同位素組成，與個體間的成長差異，未來可能須透過更多實驗作進一步驗證。

因脂質含量、胺基酸組成不一致，五組比較組中各組織與餌料間的穩定性同位素分餾(isotopic fractionation)有顯著差異。過去我們在推算生物相對食階位置前，須事先假設食階間組織中穩定性氮同位素分餾為一定值，例如 3.4‰ (DeNiro and Epstein, 1978)，但近幾年的研究發現，隨著食階的增加，組織中的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{tissue-D}}$ 會隨之下降(Sweeting et al. 2007a)，本實驗亦發現類似現象。以本實驗的餌料位階來說，最低者為海藻顆粒態餌料(SEP)和紅蟲(Tub)，位階最高者應為豐年蝦(AS)及鰻魚粉(EM)。五組比較組間，肌肉和鰓絲組織，均以紅蟲缸(Tub)和海藻顆粒態飼料缸(SEP)個體的氮同位素分餾值最高，以鰻魚粉缸(EM1, EM2)和豐年蝦缸(AS)個體的分餾值最低。然而，Tub和SEP的氮同位素分餾在肌肉和鰓絲組織中，

均明顯大於 3.4‰，且隨著個體攝入餌料不同，各組織的氮同位素分餾差異甚大。故未來在估算相對食階位置，食階間的分餾係數(trophic enrichment factor)為 3.4‰的假設上，可能須透過更多控制實驗驗證，以減少食階換算上的誤差。

穩定性碳同位素分餾部份，與過去實驗假設也有明顯出入。過去學者認為，隨著食階的增加，穩定性碳同位素增加幅度小，僅約 0-1‰ (DeNiro and Epstein, 1978, Sweeting et al. 2007b)。而本研究結果顯示，隨著組織型態不同，約會產生 -0.62‰ (肝臟)至 6.43‰ (鱗片)的碳同位素分餾。同於穩定性氮同位素分餾，各組織隨個體攝入餌料不同，亦產生不同程度的穩定性碳同位素分餾，以肌肉和鰓絲的變異程度最大，約 1.9‰，肝臟組織在五比較組間則無顯著差異。Sweeting et al. (2007b)的研究結果中，亦指出齒舌鱸其肌肉和肝臟組織的穩定性碳同位素分餾明顯大於 1.5‰。

推論造成同一組織，隨個體攝入餌料不同，產生不同程度的同位素分餾可能性，與各組織的胺基酸組成和含量是否與餌料間相似，有明顯的關係。當組織中的粗蛋白質含量較低，且組織的胺基酸組成和含量明顯與餌料間不一致時，個體為了排除多餘的胺基酸，而產生相對較大的同位素分餾(McMahon et al. 2015)。故在後續控制實驗中，我們可以透過胺基酸自動分析儀，偵測各代謝性組織及餌料間的胺基酸相對組成百分比，進一步驗證造成各組織在不同比較組間，不同程度的同位素分餾可能性為何。

4.3 耳石有機物之穩定性氮同位素值分析方法比較

本研究以兩種儀器，EA-IRMS 和 GasBench-IRMS 進行耳石有機物的穩定性同位素值分析，以下將比較此兩種方法的優缺點：

(1) 以 EA-IRMS 進行耳石有機物的穩定性同位素值分析探討

EA-IRMS 較常用於各種生物組織、地質礦物中氮化物等樣本的穩定性碳、氮同位素值分析，以魚類組織如肌肉、鰓絲和肝臟等來說，一般取 0.7 - 0.75 mg 即足夠分析。然而，不同於肌肉組織，耳石中的有機物質，依魚種

不同，僅佔耳石總重量的 0.1-10%，以本實驗飼養的吳郭魚為例，耳石中的 N% 隨攝入餌料不同，僅約 0.06-0.1%，需要的耳石粉末量必定大於代謝性組織的測定粉末量。

除此之外，樣本事先以元素分析儀，透過高溫燃燒產生 N₂ 後，進樣至質譜儀進行同位素分析。N₂ 相較於 N₂O，其離子化效率較差，故所需的耳石粉末量，相較於 GasBench-IRMS 而言，應相對較多。

本實驗即透過白姑魚(*Pennahia argentata*)同質性耳石粉末(表 15)，分別取 25 mg 和 30 mg 的耳石粉末量進行測試。實驗結果顯示耳石粉末量以 30 mg 進行穩定性同位素值測定，三重複間的標準偏差相對較小，精度亦相對較高。然而此分析量，針對一些小型魚類而言，在測定不同生活史階段耳石有機物的同位素組成上，須將多個個體得耳石匯集成一樣本，方足夠分析。如此一來在探討個體間的成長差異與耳石有機物的穩定性同位素值的比較等，會增加誤差。

其次，本次實驗所使用的錫囊為固態樣本用之錫囊，在進行耳石有機物的穩定性同位素分析前，須先以 6 N HCl 水解碳酸鈣，將有機物質析出，水解反應式如下所示：



當碳酸鈣被溶解的同時，鈣離子與鹽酸中的氯離子會產生氯化鈣，氯化鈣在常溫下易潮解，為了避免潮解，本研究將樣本置入錫囊內酸化水解之後，需以加熱板加熱使氯化鈣維持固態直到穩定性同位素分析。而在等待樣本分析前，以加熱板加熱期間受到其他有機物的污染機率是相對較高的，且部份耳石溶解態有機物，在加熱反應期間有揮發的可能性，偵測的數據是否為所有耳石有機物的同位素組成，亦可能受到質疑。

雖然以 EA-IRMS 進行耳石有機物的穩定性碳、氮同位素值分析有上述的困難點，但也有其優點，包括在樣本前製備的步驟相對簡單、時間和分析

花費上較 GasBench-IRMS 低，且能同時測得耳石有機物的穩定性碳同位素值。

(2) 以 GasBench-IRMS 進行耳石有機物之穩定性同位素值分析探討

GasBench-IRMS 分析耳石有機物穩定性氮同位素，所需的最低耳石粉末量僅約 1.5 mg，為 EA-IRMS 所需耳石粉末量的 1/20 倍，特別是針對小型魚類的耳石有機物穩定性同位素組成分析上，此分析方法提高了適用物種之範圍。除此之外，以 GasBench-IRMS 分析耳石有機物之穩定性同位素組成，在樣本製備過程中，均在旋緊消解管蓋子的狀態下進行反應，故不受易揮發相的耳石溶解態有機物所影響，數據的可信度相對較高。

雖然 GasBench-IRMS 所需的耳石粉末量相對較少，因耳石有機物相對微量，首先須將氧化消解所需的氧化劑-過硫酸鉀提純，以減少氧化劑的氮源污染。耳石有機物經氧化消解至無機硝酸鹽後，需再透過反硝化菌將硝酸鹽酶解至 N_2O 氣體，方能進樣分析，前製備的步驟相較於 EA-IRMS 的樣本製備步驟繁複，此外，氧化消解和細菌法僅能將有機物中的氮化物轉換成氧化亞氮氣體，故無法同時測定耳石有機物中的穩定性碳同位素值。

4.4 攝食不同餌料的吳郭魚其耳石有機物之穩定性氮同位素值探討

根據表 16 和圖 26 結果顯示，不同於代謝性組織，如肌肉、鰓絲和鱗片等，耳石有機物與個體攝入餌料的穩定性氮同位素值間並無顯著差異，差值僅約 -0.51–0.67‰，意即耳石有機物的穩定性同位素值與餌料之間無分餾 (fractionation) 現象，且與各代謝性組織的同位素組成具顯著差異，這與本實驗假設相符。此外，耳石有機物的穩定性同位素與個體成長差異間無顯著相關性，意謂著耳石有機物的穩定性同位素值，在個體長期攝入相同餌料的情況下，耳石有機物的穩定性同位素並不會受個體間的成長差異所影響，且能有效反映餌料的同

位素組成。此現象與 Gronkjar et al. (2014)發表的研究結果一致，Gronkjar et al. (2014)透過飼養實驗飼養大西洋鱈幼魚，並分析耳石溶解態有機物的穩定性碳、氮同位素，發現測定結果與投餵餌料的同位素值間無顯著差異，Gronkjar et al. (2014)認為此結果與個體在成長速率較慢、或是飢餓的環境壓力下，耳石有機物的沉積速率相對減緩，又耳石缺乏元素轉換率(turnover rate)的特性，故能有效反映當下的攝入餌料的穩定性同位素值。本研究也針對耳石有機物與餌料間的穩定性同位素分餞作探討，推論有以下幾個原因：

(1) 耳石有機物與肌肉等組織中的胺基酸組成不一致。有關耳石有機物的胺基酸組成等研究較少，部分學者在過去曾針對不同物種的耳石有機物，進行胺基酸組成份分析和比較，透過檢定結果顯示，不論是溶解態、或非溶解態有機物，其胺基酸組成在不同物種間無顯著差異(Degens et al., 1969, Baba et al., 1991, Davis et al., 1995, Sasagawa and Mugiya 1996)。雖然過去有關吳郭魚耳石有機物的胺基酸組成份分析，僅侷限於溶解態部分，且過去研究的主要目的為探討耳石有機物中的蛋白質組成，故以 EDTA 進行水解以避免破壞蛋白質結構。然而，EDTA 水解析出的溶解態蛋白質組成與含量有低估的可能性，故本研究以 Hüseyin et al. (2004)發表的文章，透過控制實驗探討在不同水溫、餌料密度的環境下，大西洋鱈幼魚耳石有機物隨年齡變化趨勢的胺基酸組成之分析結果進一步探討。

假若各魚種間耳石有機物的胺基酸組成相似，耳石有機物的胺基酸組成中，約 27% 為酸性胺基酸(acidic amino acid)，包括谷胺酸(glutamic acid, Glu)、天冬胺酸(aspartic acid, Asp)，9% 為鹼基胺基酸 (basic amino acid)，包括精胺酸(arginine)、組胺酸(histidine)和賴胺酸(lysine)，其餘 64% 為中性胺基酸，包括 3% 硫基胺基酸，如半胱胺酸(cysteine, Cys) 和甲硫胺酸(methionine, Met)，9% 芳香族胺基酸，如苯丙胺酸(phenylalanine, Phe)和酪胺酸(tyrosine, Try)，7% 二級胺類(secondary amino group)，如脯胺酸(proline, Pro)，和 50 % 脂肪族胺

基酸(aliphatic amino acid)，如丙胺酸(alanine, Ala)、亮胺酸(leucine, Leu)、異亮胺酸(isoleucine, Ile)、纈胺酸(valine, Val)等。


其中谷胺酸(Glu)、天冬胺酸(Asp)、丙胺酸(Ala)、亮胺酸(Leu)、異亮胺酸(Ile)、纈胺酸(Val)屬 trophic amino acid，約佔總胺基酸重量的 57 %，苯丙胺酸(Phe)、甘胺酸(Gly)、甲硫胺酸(Met)、絲胺基(Ser)、賴胺酸(Lys)和蘇胺酸(Thr)等屬 source amino acid，約佔總胺基酸重量的 38 %。由於目前無耳石有機物各胺基酸與餌料的穩定性氮同位素分餞($\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{AA of OM-D}}$)等相關研究，在此以 McMahon et al. (2015)發表文獻-肌肉組織中各胺基酸與餌料間的穩定性氮同位素分餞($\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{AA of tissue-D}}$)來討論。不同胺基酸的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{tissue-D}}$ 因其在傳遞 N 端時的化學反應(轉氨基或脫氮作用等)不同， $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{tissue-D}}$ 亦有所差異，trophic amino acid 平均的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{tissue-D}}$ 值約為 6.5 – 7.8‰，而 source amino acid 中，除了 Threonine 的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{tissue-D}}$ 較低，平均值約為-6‰外，其餘 source amino acid 平均的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{tissue-D}}$ 值約為 0.5–2.1‰，以此結果推論，耳石有機物與餌料間的穩定性氮同位素應當有顯著差異，亦即 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{OM-D}}$ 應顯著大於 0，與本實驗結果不符，推估可能受耳石有機氮化物中的蘇胺酸(Thr)之穩定性氮同位素值所影響。

耳石有機物，不論是溶解態或非溶解態的蛋白質，或蛋白聚醣體、膠原蛋白等具協助耳石碳酸鈣沉積的功能，以溶解態蛋白質為例，根據 Asano & Mugiya (1993)發表的文章顯示，作者首先以離子交換透析法(ion-exchange chromatography)分離利用 EDTA 水解析出的溶解態蛋白質，再以電泳測定分離出的蛋白質其胺基酸組成，並利用 ^{45}Ca 測定不同蛋白質的鈣離子鍵結力(calcium-binding capacity)。Asano & Mugiya (1993)自 EDTA 水解析出的溶解態蛋白質中分離出五種不同的蛋白質中，兩種高鈣離子鍵結力的蛋白質中均有高濃度的谷胺酸(Glu)、天冬胺酸(Asp)、絲胺酸(Ser)和蘇氨酸(The)，其中蘇胺酸(The)在鈣離子鍵結力強的蛋白質中的相對濃度百分比明顯比其他蛋

白質高，相反的谷胺酸(Glu)、天冬胺酸(Asp)在不同蛋白質間的含量無太大的差異，此外甲硫胺酸(Met)僅於有鈣離子鍵結力的蛋白質中測得。由此得知蘇胺酸(The)對於耳石碳酸鈣沉積應有重要的影響，而蘇胺酸的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{OM-D}}$ 比其餘 source amino acid 低，隨餌料性質不同，同位素值範圍自-9‰到-6‰不等 (McMahon et al., 2015)，推估耳石有機物的穩定性同位素值可能受蘇胺酸的穩定性氮同位素值影響，使測得的數值與餌料間相對較近。然而，即便蘇胺酸(Thr)在具鈣離子鍵結力較強的蛋白質中含量較高，相較於谷胺酸和天冬胺酸等 trophic amino acid 而言，其佔耳石總胺基酸組成比例還是相對較低，故此影響應相對較小。

- (2) 耳石有機物的合成、沉積路徑及特性與代謝性組織不一致。不同於耳石有機物，肌肉等組織具代謝與再生等特性，隨個體年齡增長、食物組成的變化，各組織與餌料間的穩定性同位素分餾會隨之增加。耳石有機物的沉積路徑等研究較少，Takagi & Takahashi (1999) 以免疫組織化學染色法 (immunohistochemistry) 來推測耳石溶解態有機物 (otolith soluble material, OSM) 如何經血液自耳石囊膜 (sacculus membrane) 進入內淋巴液，進一步沉澱於耳石上方。

耳石囊膜主要由三種表皮細胞所構成，分別為靠近耳石溝槽處附近的感覺細胞 (sensory epithelium, SE)，以此為中心點向外延伸為過度型表皮細胞 (transitional epithelium, TE)，接著為距離溝槽處 (面對耳石背端) 最遠的扁平細胞 (squamous epithelium, SQE)，部分 TE 細胞中富含粒線體，簡稱為 MRC (mitochondrion-rich cells)，散佈於靠近 SE 的區域。抗體染色結果顯示，在 SE 外圍的管狀細胞 (columnar)、TE 和 SQE 頂端區域 (apical region) 與抗體呈主動免疫 (immunoreactivity)，SE 的毛細胞 (hair cells) 和 MRCs 則無免疫反應 (immunonegative)。分佈於 SE 外圍的管狀細胞點端處，有微絨毛結構 (microvilli)，胞內富含粗糙內質網 (rough endoplasmic reticulum, rER) 和高基氏



體(golgi)。同樣有主動免疫反應的 TE 細胞中，因其特殊的圓柱形囊膜，胞內空間較大，與 SE 的管狀細胞相似，富含高基氏體及粗糙內質網。SQE 為三種表皮細胞中，分佈範圍最大、細胞最為扁平，且染色後的主動免疫反應最為強烈，其中立方細胞(cuboidal cells)與 SE 和 TE 一樣，擁有高密度的粗糙內質網。作者透過顯微鏡發現，上述的表皮細胞周圍亦出現許多囊泡，且部分囊泡有破裂的現象，而這些囊泡應該是由表皮細胞內的高基氏體產生的。抗體染色和胞內細胞組成結果顯示，耳石溶解態氮化物首先可能自魚體攝入食物後，經消化系統將蛋白質分解成胺基酸片段，經血液運輸至耳石囊膜周圍，由 SE 外圍的管狀細胞、TE 和 SQE 立方細胞吸收，透過囊內的粗糙內質網和高基氏體合成蛋白質，並以囊泡的形式自囊膜分泌，運輸至內淋巴液中，再直接沉積於耳石上方。在這些運輸及合成過程中，各胺基酸並未參與尿素循環，故胺基酸的穩定性同位素值並未有分餾的現象，因此得以反映餌料的穩定性同位素值。

有關耳石有機物傳遞路徑的探討，Gronkjar et al. (2014)的研究結果也發現耳石溶解態有機物的 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{SOM-D}}$ 未有時序上的變異，推測耳石有機物的沉積作用應相當即時，故在傳遞路徑中未與餌料間的穩定性同位素組成有分餾現象。

- (3) 耳石有機物的胺基酸組成、含量與餌料間相似。各代謝性組織與餌料間的穩定性同位素分餾，會受到個體攝入餌料的蛋白質含量及胺基酸組成所影響。若攝入餌料的蛋白質含量高、且胺基酸組成與測定組織一致時，餌料中的胺基酸會完整的被組織所利用，同時含氮物排謝率降低， ^{14}N 耗盡量亦減少，故掠食者的組織與餌料間的穩定性氮同位素分餾($\text{bulk } \Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{tissue-D}}$)亦相對較小，如消耗率及代謝率相對較低的肉食性魚類；相反的，若餌料的蛋白質含量低且胺基酸組成與組織不一致，測得的穩定性氮同位素分餾

(bulk $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{tissue-D}}$)較大，如食階較低的草食性魚類(Roth and Hobson 2000, Robbins et al. 2010, Mill et al. 2007, Florin et al. 2011)。

然而，耳石的有機物氮含量，僅佔整顆耳石的 0.1-10%，故所需的胺基酸含量較其他組織少，易與餌料間的胺基酸組成和含量一致，由此推判 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{OM-D}}$ 應當會趨近於 0。在未來或許可針對餌料的胺基酸成分進一步分析，以驗證此推論是否正確。

4.5 耳石有機物之穩定性同位素在魚類生理生態上的應用

不同於肌肉等常用的代謝性組織，耳石不具代謝與再被吸收等特性，故耳石有機物應能呈現魚類早期的攝食來源之穩定性同位素組成。透過本研究結果顯示，隨個體攝入餌料不同，耳石有機物與餌料間無氮同位素分餾的現象，且氮同位素值不受個體間成長差異所影響，這意謂著我們可以透過耳石有機物和各代謝性組織的同位素組成，推判各物種在不同階段、以及近捕捉時間點下的攝餌組成、相對食階等變化。

此研究方法可應用於野生的底棲性 or 大規模洄游性等魚類在不同生活史階段的食物組成轉換或相對食階等研究上。以變態與沉降時間點相近蝶形目(pleuronectiformes)為例，透過耳石碳酸鈣結晶中的穩定性氧同位素以及耳石的微細結構，根據複核心分佈位置，可推判蝶形目魚類開始變態與沉降的時間點，以電腦自動化控制的微量刮取器(micromill)將對應到的耳石輪紋片段刮取下來，測定其中有機物的穩定性氮同位素，以了解沉降前後其食性轉換等特徵，沉降前的穩定性氮同位素值應當與表層水域中浮游動物的同位素組成相近。當比目魚沉降至一定水深(500-1500 m)，隨著個體體型增長，轉而掠捕一些小型魚類或雙枚貝等，測得的同位素值相對較高。在耳石邊緣處，受限於粉末量不足等限制，可以代謝性組織的同位素組成，推判比目魚在近捕捉時間點前後的攝食狀況，並進一步與近耳石邊緣處有機物同位素組成作比較，提供更確切的食性組成等資訊。

大型洄游性魚類，如太平洋黑鮪，往往我們以耳石碳酸鈣中穩定性氧同位素判定鮪類的產卵場位置。在不同海域，由於水體中的基礎生產者接收氮源(N_2 , ammonia, nitrate)之穩定性同位素差異很大，故各海域間基礎生產者的穩定性氮同位素值也會有顯著的差異，約 10‰左右(McMahon et al., 2013a, b)。因此我們可以透過各輪紋間的有機物穩定性氮同位素值，對應穩定性氧同位素，推判太平洋黑鮪的洄游路徑，以及產卵場位置，對太平洋黑鮪的資源量變動和生活史策略能有更深入的了解。

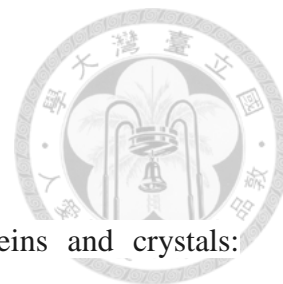
然而，有關耳石有機物的穩定性同位素分析，目前僅應用於大西洋鱈和吳郭魚兩魚種上，耳石有機物與餌料間的穩定性同位素分餾等，可能需要透過更多魚種來進一步驗證。此外，有關耳石有機物的穩定性同位素與餌料間極為相近的影響因子，亦須透過耳石有機物和餌料的胺基酸組成份分析、以及個別胺基酸組成的穩定性同位素值進一步探討。期盼在未來能以耳石有機物，結合代謝性組織的穩定性同位素組成，對各魚種在不同生活史策略有更進一步的了解，對漁業資源的永續利用與評估上，予以有利的貢獻。

五、結論



本研究透過飼養實驗，以穩定性同位素、粗蛋白質含量不同的餌料投餵飼養用吳郭魚，以 EA-IRMS 和 GasBench-IRMS 兩種儀器分析耳石有機物的穩定性同位素，同時與餌料、肌肉、鰓絲、肝臟和鱗片等組織的穩定性同位素值作比較，結果顯示當個體攝入餌料來源一致，耳石有機物與餌料間的穩定性氮同位素組成無顯著差異，但是其他組織(如肌肉、肝臟、鰓絲和鱗片等)則有不同程度的同位素分餾(fractionation)，且耳石有機物的穩定性同位素不會受個體間的成長差異所影響，能有效反映餌料的穩定性同位素值。此外，本研究亦對以 EA-IRMS 和 GasBench-IRMS 兩種分析技術的最低耳石分析粉末量、分析優缺點等比較，EA-IRMS 雖為常用的有機物探測儀器，但分析所需得耳石粉末量高達 30 mg，若以 GasBench-IRMS(氧化消解 - 細菌法)進行耳石有機物穩定性同位素分析，粉末量僅需 1.5 mg，且單一個體可進行三重複測定，意即未來研究者能以此方法建構高解析與高精準地耳石有機物穩定性同位素組成變化，有助於了解魚類在不同生活史階段的食性與食階變化。

參考文獻



- Addadi L, Weiner S (1985). Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(12), 4110-4114.
- Allemand D, Cuif JP, Watabe N, Oishi M, Kawaguchi T (1994). The organic matrix of skeletal structures of the Mediterranean red coral, *Corallium rubrum*. *Bulletin de l'Institut océanographique*, 129-139.
- Arias J, Carrino DA, Fernández MS, Rodríguez JP, Dennis JE, Caplan, AI (1992). Partial biochemical and immunochemical characterization of avian eggshell extracellular matrices. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 298(1), 293-302.
- Arnold S, Plate U, Wiesmann HP, Kohl H, Höhling HJ (1997). Quantitative electron-spectroscopic diffraction (ESD) and electron-spectroscopic imaging (ESI) analyses of dentine mineralisation in rat incisors. *Cell and tissue research*, 288(1), 185-190.
- Asano M, Mugiya Y (1993). Biochemical and calcium-binding properties of water-soluble proteins isolated from otoliths of the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 104(1), 201-205.
- Baba K, Shimizu M, Mugiya Y, Yamada J (1991). Otolith matrix proteins of walleye pollock; biochemical properties and immunohistochemical localization in the saccular tissue. In *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems* (pp. 57-61). Springer Japan.

Belcher AM, Wu XH, Christensen RJ, Hansma PK, Stucky, GD, Morse DE (1996).

Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Nature* 381:56-58

Borelli G, Mayer-Gostan N, De Pontual H, Boeuf G, Payan P (2001). Biochemical relationships between endolymph and otolith matrix in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Calcified Tissue International*, 69(6), 356-364.

Campana SE (1990). How reliable are growth back-calculations based on otoliths?. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2219-2227.

Campana SE (1999). Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology Progress Series*, 188, 263-297.

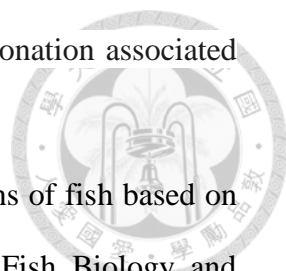
Campana SE & Neilson JD (1985). Microstructure of fish otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(5), 1014-1032.

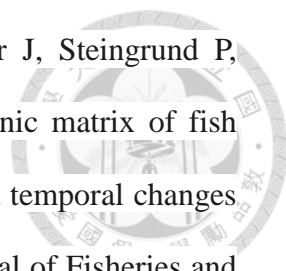
Chang N, Liu E, Liao Y, Shiao J (2015) Vertical habitat shift of viviparous and oviparous deep-sea cusk eels revealed by otolith microstructure and stable-isotope composition. *Journal of Fish Biology*, 86.2 (2015): 845-853.


Currey LM, Heupel MR, Simpfendorfer CA, Williams AJ (2014) Inferring movement patterns of a coral reef fish using oxygen and carbon isotopes in otolith carbonate. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 456:18-25.

Davis JG, Oberholtzer JC, Burns FR, Greene MI (1995). Molecular cloning and characterization of an inner ear-specific structural protein. *Science*, 267(5200), 1031.

Degens ET, Deuser WG, Haedrich RL (1969) Molecular structure and composition of fish otoliths. *Marine Biology* 2:105-113.

- 
- DeNiro MJ, Epstein S (1977). Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science*, 197(4300), 261-263.
- Elsdon TS, Gillanders BM (2003) Reconstructing migratory patterns of fish based on environmental influences on otolith chemistry. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13:217-235.
- Estep ML, Vigg S (1985). Stable carbon and nitrogen isotope tracers of trophic dynamics in natural populations and fisheries of the Lahontan Lake system, Nevada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(11), 1712-1719.
- Estrada JA, Lutcavage M, Thorrold SR (2005). Diet and trophic position of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) inferred from stable carbon and nitrogen isotope analysis. *Marine Biology*, 147(1), 37-45.
- Florin ST, Felicetti LA, Robbins CT (2011). The biological basis for understanding and predicting dietary-induced variation in nitrogen and sulphur isotope ratio discrimination. *Functional Ecology*, 25(3), 519-526.
- Fishe LW, Termine JD, Dejter SW, Whitson SW, Yanagishita M, Kimura JH, Nilsson B (1983). Proteoglycans of developing bone. *Journal of Biological Chemistry*, 258(10), 6588-6594.
- Gao Y, Dettman DL, Piner KR, Wallace FR (2010) Isotopic correlation ($\delta^{18}\text{O}$ versus $\delta^{13}\text{C}$) of otoliths in identification of groundfish stocks. *Transactions of the American Fisheries Society* 139:491-501.
- Gauldie RW, & Nelson DGA (1988). Aragonite twinning and neuroprotein secretion are the cause of daily growth rings in fish otoliths. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 90(3), 501-509.
- Glimcher MJ (1986). The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instructional course lectures*, 36, 49-69.

- 
- GrønkJær P, Pedersen JB, Ankjærø TT, Kjeldsen H, Heinemeier J, Steingrund P, Christensen JT (2013). Stable N and C isotopes in the organic matrix of fish otoliths: validation of a new approach for studying spatial and temporal changes in the trophic structure of aquatic ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(2), 143-146.
- Hare PE, Fogel ML, Stafford TW, Mitchell AD, Hoering TC (1991). The isotopic composition of carbon and nitrogen in individual amino acids isolated from modern and fossil proteins. *Journal of Archaeological Science*, 18(3), 277-292.
- Heady WN, Moore JW (2013). Tissue turnover and stable isotope clocks to quantify resource shifts in anadromous rainbow trout. *Oecologia*, 172(1), 21-34.
- Hunt JJ (1992). Morphological characteristics of otoliths for selected fish in the Northwest Atlantic. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 13, 63-75.
- Hüssy K., Mosegaard H, Jessen F (2004). Effect of age and temperature on amino acid composition and the content of different protein types of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61(6), 1012-1020.
- Ikoma T, Kobayashi H, Tanaka J, Walsh D, Mann S (2003). Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 32(3), 199-204.
- Kalish JM (1991) $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ isotopic disequilibria in fish otoliths: metabolic and kinetic effects. *Marine Ecology Progress Series* 75:191-203.
- Kelly B, Dempson JB, Power M (2006). The effects of preservation on fish tissue stable isotope signatures. *Journal of Fish Biology*, 69(6), 1595-1611.
- Knapp AN, Sigman DM, & Lipschultz F (2005). N isotopic composition of dissolved organic nitrogen and nitrate at the Bermuda Atlantic Time-series Study site. *Global Biogeochemical Cycles*, 19(1).

- 
- Lin HY, Shiao JC, Chen YG, Iizuka Y (2012) Ontogenetic vertical migration of grenadiers revealed by otolith microstructures and stable isotopic composition. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 61:123-130.
- Logan JM, Jardine TD, Miller TJ, Bunn SE, Cunjak RA, Lutcavage ME (2008). Lipid corrections in carbon and nitrogen stable isotope analyses: comparison of chemical extraction and modelling methods. *Journal of Animal Ecology*, 77(4), 838-846.
- Longmore C, Trueman C, Neat F, O'gorman E, Milton J, Mariani S (2011) Otolith geochemistry indicates life-long spatial population structuring in a deep-sea fish, *Coryphaenoides rupestris*. *Marine Ecology Progress Series* 435:209-224.
- Mann S, Parker SB, Ross MD, Skarnulis AJ, & Williams RJP (1983). The ultrastructure of the calcium carbonate balance organs of the inner ear: an ultra-high resolution electron microscopy study. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 218(1213), 415-424.
- McMahon KW, Hamady LL, Thorrold SR (2013). A review of ecogeochemistry approaches to estimating movements of marine animals. *Limnology and Oceanography*, 58(2), 697-714.
- McMillan DN, Houlihan DF (1989). Short-term responses of protein synthesis to re-feeding in rainbow trout. *Aquaculture*, 79(1-4), 37-46.
- Mill AC, Pinnegar JK, Polunin NVC (2007). Explaining isotope trophic-step fractionation: why herbivorous fish are different. *Functional Ecology*, 21(6), 1137-1145.
- Morales-Nin B (1986). Structure and composition of otoliths of Cape hake *Merluccius capensis*. *South African Journal of Marine Science*, 4(1), 3-10
- Morales-Nin, B (1986). Chemical composition of the otoliths of the sea-bass (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758)(Pisces, Serranidae). *Cybium*, 10:115-120

Morales-Nin B (1987) The influence of environmental factors on microstructure of otoliths of three demersal fish species caught off Namibia. *South African Journal of Marine Science* 5:255-262.



Mugiya Y, Watabe N (1977) Studies on fish scale formation and resorption—II. Effect of estradiol on calcium homeostasis and skeletal tissue resorption in the goldfish, *Carassius auratus*, and the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 57(2), 197-202.

Nydahl F (1978). On the peroxodisulphate oxidation of total nitrogen in waters to nitrate. *Water Research*, 12(12), 1123-1130.

Otterlei E, Folkvord A, & Nyhammer G (2002). Temperature dependent otolith growth of larval and early juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *ICES Journal of Marine Science*, 59(2), 401-410.

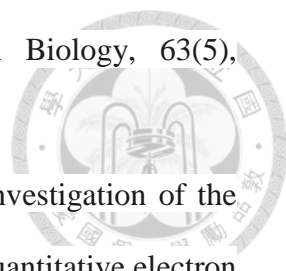
Pannella, G (1980). Growth patterns in fish sagittae. Skeletal growth of aquatic organisms, 519-560.


Parmentier E, Vandewalle P, Lagardère F (2001). Morpho-anatomy of the otic region in carapid fishes: eco-morphological study of their otoliths. *Journal of Fish Biology*, 58(4), 1046-1061.

Patterson WP, Smith GR, Lohmann KC (1993) Continental paleothermometry and seasonality using the isotopic composition of aragonitic otoliths of freshwater fishes. *Geophysical Monograph Series* 78:191-202.

Payan P, Edeyer A, De PH., Borelli G., Boeuf G, Mayer-Gostan N (1999). Chemical composition of saccular endolymph and otolith in fish inner ear: lack of spatial uniformity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 277(1), R123-R131.

Perga ME, Gerdeaux D (2003). Using the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of whitefish scales for retrospective ecological studies: changes in isotope signatures during the

- 
- restoration of Lake Geneva, 1980–2001. *Journal of Fish Biology*, 63(5), 1197-1207.
- Plate U, Arnold S, Reimer L, Höhling HJ, & Boyde A (1994). Investigation of the early mineralisation on collagen in dentine of rat incisors by quantitative electron spectroscopic diffraction (ESD). *Cell and Tissue Research*, 278(3), 543-547.
- Pinnegar JK, Polunin NVC (1999). Differential fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. *Functional Ecology*, 13(2), 225-231.
- Pruell RJ, Taplin BK, Karr JD (2010) Stable carbon and oxygen isotope ratios of otoliths differentiate juvenile winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) habitats. *Marine and Freshwater Research* 61:34-41.
- Ren H, Sigman DM, Meckler AN, Plessen B, Robinson RS, Rosenthal Y, Haug GH (2009). Foraminiferal isotope evidence of reduced nitrogen fixation in the ice age Atlantic Ocean. *Science*, 323(5911), 244-248.
- Ren H, Sigman DM, Thunell RC, Prokopenko MC (2012). Nitrogen isotopic composition of planktonic foraminifera from the modern ocean and recent sediments. *Limnology and Oceanography*, 57(4), 1011-1024.
- Reznick D, Lindbeck E, Bryga H (1989). Slower growth results in larger otoliths: an experimental test with guppies (*Poecilia reticulata*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(1), 108-112.
- Robbins CT, Felicetti LA, Florin ST (2010). The impact of protein quality on stable nitrogen isotope ratio discrimination and assimilated diet estimation. *Oecologia*, 162(3), 571-579.
- Robinson JS, Mead JF (1973). Lipid absorption and deposition in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Canadian journal of biochemistry*, 51(7), 1050-1058.

- 
- Roth JD, Hobson KA (2000). Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissue of captive red fox: implications for dietary reconstruction. *Canadian Journal of Zoology*, 78(5), 848-852.
- Rounick JS, Hicks BJ (1985). The stable carbon isotope ratios of fish and their invertebrate prey in four New Zealand rivers. *Freshwater Biology*, 15(2), 207-214.
- Sasagawa T, Mugiya Y (1996). Biochemical Properties of Water-Soluble Otolith Proteins and the Immunobiochemical Detection of the Proteins in Serum and Various Tissues in the Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries science*, 62(6), 970-976.
- Satterfield FR, Finney BP (2002). Stable isotope analysis of Pacific salmon: insight into trophic status and oceanographic conditions over the last 30 years. *Progress in Oceanography*, 53(2), 231-246.
- Secor DH, Henderson-Arzapalo A, Piccoli P (1995) Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 192:15-33.
- Simkiss K (1974). Calcium metabolism of fish in relation to ageing. In *International Symposium on the Ageing of Fish*. Reading (UK). 19 Jul 1973.
- Sinnatamby RN, Dempson JB, Power M (2008). A comparison of muscle-and scale-derived $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ across three life-history stages of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(18), 2773-2778.
- Solomon CT, Weber PK, Cech J, Joseph J, Ingram BL, Conrad ME, Machavaram MV, Pogodina AR, Franklin RL (2006) Experimental determination of the sources of otolith carbon and associated isotopic fractionation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63:79-89.

Sweeting CJ, Barry J, Barnes C, Polunin NVC, Jennings S (2007 a). Effects of body size and environment on diet-tissue $\delta^{15}\text{N}$ fractionation in fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 340(1), 1-10.

Sweeting CJ, Barry JT, Polunin NVC, Jennings S (2007 b). Effects of body size and environment on diet-tissue $\delta^{13}\text{C}$ fractionation in fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 352(1), 165-176.

Takagi Y, Takahashi A (1999). Characterization of otolith soluble-matrix producing cells in the saccular epithelium of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inner ear. *The Anatomical Record*, 254(3), 322-329.

Thorrold SR, Campana SE, Jones CM, Swart PK (1997) Factors determining $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ fractionation in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61:2909-2919.

Trueman C, Rickaby R, Shephard S (2013) Thermal, trophic and metabolic life histories of inaccessible fishes revealed from stable-isotope analyses: a case study using orange roughy *Hoplostethus atlanticus*. *Journal of Fish Biology* 83:1613-1636.

Tzeng W, Tsai Y (1994) Changes in otolith microchemistry of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, during its migration from the ocean to the rivers of Taiwan. *Journal of Fish Biology* 45:671-683.

Tzeng WN, Chang CW, Wang CH, Shiao JC, Iizuka Y, Yang YJ, You CF and Lozys L (2007) Misidentification of the migratory history of anguillid eels by Sr/Ca ratios of vaterite otoliths. *Marine Ecology Progress Series*, 348: 285-295.

Volk EC, Blakley A, Schroder SL, Kuehner SM (2000) Otolith chemistry reflects migratory characteristics of Pacific salmonids: Using otolith core chemistry to distinguish maternal associations with sea and freshwaters. *Fisheries Research* 46:251-266.

Weiss RE, Watabe N (1978) Studies on the biology of fish bone—I. Bone resorption after scale removal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 60(2), 207-211.

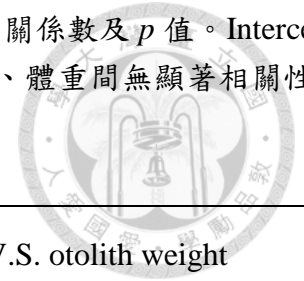
Wilson DT, McCormick MI (1999). Microstructure of settlement-marks in the otoliths of tropical reef fishes. *Marine Biology*, 134(1), 29-41.

Wheeler AP, Sikes CS (1984). Regulation of carbonate calcification by organic matrix. *American Zoologist*, 24(4), 933-944.

表 1、攝食不同餌料(diet)之吳郭魚組別(group)、犧牲日期(sampling date)、日齡(age)、樣本數(n)、體重(somatic weight)、標準體長(standard length)、全長(total length)及單顆耳石平均重量(otolith weight)。

Diet	Group	Sampling date	Age (days)	n	Somatic weight (mean \pm SD, g)	Standard length (mean \pm SD, mm)	Total length (mean \pm SD, mm)	Otolith weight (mean \pm SD, mg)
Eel meal	EM1	2015/08/10	257	7	38.71 \pm 14.95	82.29 \pm 23.43	115.12 \pm 27.68	6.08 \pm 1.71
		2016/05/21	533	1	29.25	85.35	113.36	8.05
	EM2	2015/8/10	117	11	8.55 \pm 3.30	60.09 \pm 8.76	75.82 \pm 20.69	2.03 \pm 0.50
		2016/05/21	402	9	14.97 \pm 5.68	73.87 \pm 11.52	96.72 \pm 16.34	4.79 \pm 1.19
<i>Tubifex</i> spp.	Tub	2016/05/21	542	3	13.57 \pm 1.92	78.63 \pm 5.24	102.93 \pm 5.19	5.56 \pm 0.16
<i>Artemia salina</i>	AS	2016/05/13	533	14	21.03 \pm 3.55	84.37 \pm 8.63	108 \pm 12.73	5.54 \pm 0.76
Guppy food	GF	2016/02/23	314	23	3.42 \pm 1.28	47.14 \pm 1.85	58.85 \pm 9.01	1.96 \pm 0.63
		2016/05/21	402	28	3.16 \pm 1.52	43.62 \pm 7.91	56.22 \pm 10.15	1.77 \pm 1.00
Seaweed EX pellet	SEP	2016/05/21	402	13	0.50 \pm 0.26	27.99 \pm 3.99	34.89 \pm 7.06	0.82 \pm 0.22

表 2、攝食不同餌料(diet)的吳郭魚組別(group)，其耳石重量與標準體長(standard length)、體重(somatic weight)間的相關係數及 p 值。Intercept 為迴歸線之截距，b 為迴歸線之斜率，n 為樣本數，r 為相關係數(correlation coefficient)。因 TRW 的耳石重量與體長、體重間無顯著相關性，故未計算其迴歸線之斜率、截距，以“-“表示。



diet	group	n	somatic weight t V.S. otolith weigh				standard length V.S. otolith weight			
			Intercept	b	r	p	Intercept	b	r	p
Eel meal	EM1, EM2	27	1.72	0.013	0.85	0.002	-2.46	0.09	0.82	1.22×10^{-7}
<i>Artemia salina</i>	AS	14	1.57	0.19	0.88	2.62×10^{-5}	0.76	0.06	0.64	0.01
<i>Tubifex</i> spp.	Tub	3	-	-	0.74	0.47	-	-	0.30	0.80
Guppy food	GF	51	0.36	0.36	0.83	2.79×10^{-14}	-1.08	0.06	0.84	5.94×10^{-15}
Seaweed EX pellet	SEP	11	0.34	0.84	0.90	1.51×10^{-4}	-0.17	0.03	0.60	0.05

表 3、不同採樣時間點下的 EM1、EM2 個體，各代謝性組織的穩定性碳氮同位素及 K-W test 檢定結果。EM1 為第一批樣本中，投餵鰻魚粉的個體，EM2 則為第二批投餵鰻魚粉的個體，n 為分析樣本數，age 為存活天數，同位素值為 mean ± SD。

Group	Diets	age (days)	n	$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{gill}}$ (‰)	K-W test			
						$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$		$\delta^{15}\text{N}_{\text{gill}}$	
						Chi-square	<i>p</i>	Chi-square	<i>p</i>
EM1	eel meal	257	6	14.6 ± 0.2	13.4 ± 0.1	18.77	< 0.001	21.03	0.014
		533	1	14.99	14.5				
EM2	eel meal	117	11	14.4 ± 0.2	13.8 ± 0.1	18.77	< 0.001	21.03	0.014
		402	9	15.1 ± 0.2	15.1 ± 0.2				

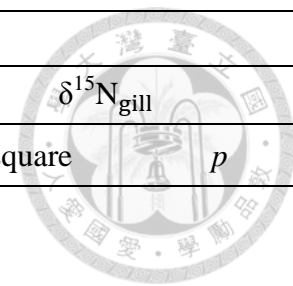


表 4、不同採樣時間點下的 GF 個體，肌肉、鰓絲和鱗片組織的穩定性氮同位素值及 Wilcoxon rank sum test 檢定結果。n 為分析樣本數，age 為存活天數。

Group	Diets	age (days)	n	$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{gill}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{scale}}$ (‰)	Wilcoxon rank sum test					
							$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$		$\delta^{15}\text{N}_{\text{gill}}$		$\delta^{15}\text{N}_{\text{scale}}$	
							h	p	h	p	h	p
GF	Guppy food	314	23	11.6 ± 0.3	11.7 ± 0.3	10.9 ± 0.2	0	0.52	1	< 0.001	0	0.11
		402	28	11.5 ± 0.2	11.5 ± 0.3	10.9 ± 0.1						

表 5、不同採樣時間點下的 EM1、EM2 個體，肌肉和鰓絲組織的穩定性碳同位素值及 K-W test 檢定結果。EM1 為第一批樣本中，投餵鰻魚粉的個體，EM2 則為第二批投餵鰻魚粉的個體，n 為分析樣本數，age 為存活天數，同位素值為 mean ± SD。

Group	Diets	age (days)	n	$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{gill}}$ (‰)	K-W test			
						$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$		$\delta^{15}\text{N}_{\text{gill}}$	
						Chi-square	<i>p</i>	Chi-square	<i>p</i>
EM1	eel meal	257	6	-16.9 ± 0.2	-18.6 ± 0.2	12.59	< 0.001	43.99	0.1259
		533	1	17.2	-18.7				
EM2	eel meal	117	11	-17.4 ± 0.1	-19.3 ± 0.9				
		402	9	-17.2 ± 0.2	-17.8 ± 0.6				

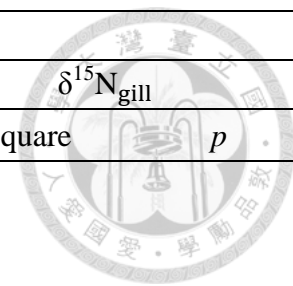


表 6、不同採樣時間點下的 GF 個體，肌肉、鰓絲和鱗片組織的穩定性碳同位素值及 Wilcoxon rank sum test 檢定結果。n 為分析樣本數，age 為存活天數，同位素值為 mean ± SD。

Group	Diets	age (days)	n	$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{gill}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{scale}}$ (‰)	Wilcoxon rank sum test					
							$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}}$		$\delta^{13}\text{C}_{\text{gill}}$		$\delta^{13}\text{C}_{\text{scale}}$	
							h	p	h	p	h	p
GF	Guppy food	314	23	-20.4 ± 0.2	-22.4 ± 1.1	-17.6 ± 0.2	1	< 0.001	0	0.86	0	0.11
		402	28	-20.6 ± 0.2	-22.5 ± 0.8	-17.6 ± 0.1						

表 7、攝食不同餌料的吳郭魚組別(group)，其肌肉、鰓絲、鱗片及肝臟，和各別餌料的穩定性氮同位素值。n 為樣本數，數值為 mean ± SD。

Group	n	$\delta^{15}\text{N}_{\text{diet}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{gill}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{scale}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{liver}}$ (‰)
EM1, EM2	27	10.8 ± 0.1	14.7 ± 0.4	14.2 ± 0.7	13.9 ± 0.4	12.9 ± 0.4
Tub	3	4.4 ± 0.1	8.9 ± 0.2	8.9 ± 0.1	8.4 ± 0.2	-
AS	14	11.6 ± 0.2	15.2 ± 0.5	15.5 ± 0.1	15.1 ± 0.2	15.1 ± 0.6
GF	51	7.3 ± 0.1	11.5 ± 0.3	11.5 ± 0.4	10.9 ± 0.2	10.3 ± 0.3
SEP	13	8.4 ± 0.2	12.8 ± 0.6	13.1 ± 0.2	11.1 ± 0.4	-

*因 TRW 和 TAS 犧牲後冷凍時間過久，肝臟與胃內容物腐壞，混合在一起，故未作進一步的穩定性同位素分析。

表 8、攝食不同餌料的吳郭魚組別(group)，其肌肉、鰓絲、鱗片及肝臟，和各別餌料的穩定性碳同位素值，n 為樣本數，數值為 mean ± SD。

Group	n	$\delta^{13}\text{C}_{\text{diet}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{gill}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{scale}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{liver}}$ (‰)
EM1, EM2	27	-19.9 ± 0.1	-17.3 ± 0.3	-18.6 ± 0.9	-14.8 ± 0.3	-20.2 ± 0.81
Tub	3	-19.6 ± 0.1	-18.1 ± 0.1	-17.6 ± 0.3	-14.9 ± 0.1	-
AS	14	-22.7 ± 0.1	-19.2 ± 0.2	-21.9 ± 0.9	-16.3 ± 0.2	-21.8 ± 2.5
GF	51	-23.3 ± 0.1	-20.6 ± 0.4	-22.3 ± 0.9	-17.6 ± 0.2	-23.9 ± 0.4
SEP	13	-21.7 ± 0.2	-19.3 ± 0.7	-19.4 ± 0.2	-16.0 ± 0.1	-

*因 TRW 和 TAS 犧牲後冷凍時間過久，肝臟與胃內容物腐壞，混合在一起，故未作進一步的穩定性同位素分析。

表 9、攝食不同餌料的吳郭魚組別(group)，其肌肉、鰓絲、鱗片及肝臟與攝入餌料的穩定性氮同位素分餞。n 為樣本數，肌肉、鰓絲、鱗片及肝臟與攝入餌料的穩定性氮同位素分餞，分別以 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{M-D}}$ (mean \pm SD)、 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{G-D}}$ (mean \pm SD)、 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{S-D}}$ (mean \pm SD)、 $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{I-D}}$ (mean \pm SD)表示。

Group	n	$\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{M-D}}$ (‰)	$\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{G-D}}$ (‰)	$\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{S-D}}$ (‰)	$\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{I-D}}$ (‰)
EM1, EM2	27	3.9 \pm 0.4	3.4 \pm 0.7	3.2 \pm 0.4	2.1 \pm 0.4
Tub	3	5.6 \pm 0.2	5.5 \pm 0.1	4.9 \pm 0.2	-
AS	14	3.7 \pm 0.5	3.9 \pm 0.1	3.4 \pm 0.2	3.5 \pm 0.6
GF	51	4.2 \pm 0.3	4.2 \pm 0.4	3.6 \pm 0.2	2.9 \pm 0.3
SEP	13	4.3 \pm 0.6	4.7 \pm 0.2	2.6 \pm 0.1	-

表 10、攝食不同餌料的吳郭魚組別(group)，其肌肉、鰓絲、鱗片及肝臟與攝入餌料的穩定性碳同位素分餞。n 為樣本數，肌肉、鰓絲、鱗片及肝臟與攝入餌料的穩定性碳同位素分餞，分別以 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{M-D}}$ (mean \pm SD)、 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{G-D}}$ (mean \pm SD)、 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{S-D}}$ (mean \pm SD)、 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{I-D}}$ (mean \pm SD)表示。

Group	n	$\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{M-D}}$ (‰)	$\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{G-D}}$ (‰)	$\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{S-D}}$ (‰)	$\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{I-D}}$ (‰)
EM1, EM2	27	2.7 \pm 0.3	1.3 \pm 0.9	5.1 \pm 0.3	-0.5 \pm 0.9
Tub	3	1.6 \pm 0.1	2.1 \pm 0.3	4.7 \pm 0.1	-
AS	14	3.5 \pm 0.2	0.9 \pm 1.0	6.4 \pm 0.2	0.9 \pm 2.5
GF	51	2.7 \pm 0.4	1.0 \pm 1.0	5.7 \pm 0.2	-0.6 \pm 0.4
SEP	13	2.4 \pm 0.7	2.3 \pm 0.2	5.7 \pm 0.1	-



表 11、攝食不同餌料的吳郭魚組別(group)，肌肉組織的穩定性碳($\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}}$)、氮($\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$)同位素與標準體長(standard length)、體重(weight)間的相關性。n 為各組織分析樣本數，r 為相關係數(correlation coefficient)。

		Correlation analysis							
Group	n	$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$ V.S. weight		$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$ V.S. standard length		$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}}$ V.S. weight		$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}}$ V.S. standard length	
		r	p	r	p	r	p	r	p
EM1, EM2	27	-0.0089	0.9647	0.0539	0.7895	0.3711	0.0567	0.3431	0.0798
Tub	3	0.8495	0.3538	0.9996	0.0188	-0.9065	0.2774	-0.9959	0.0575
AS	14	0.3425	0.3026	0.4421	0.1734	0.3004	0.3695	0.3649	0.2699
GF	51	-0.0615	0.6954	0.0324	0.8364	0.1622	0.2987	0.2837	0.0652
SEP	13	-0.0084	0.9816	-0.3184	0.3699	0.0410	0.9105	0.2796	0.4340



表 12、攝食不同餌料的吳郭魚組別(group)，鰓絲組織的穩定性碳($\delta^{13}\text{C}_{\text{gill}}$)、氮($\delta^{15}\text{N}_{\text{gill}}$)同位素與標準體長(standard length)、體重(weight)間的相關性。n 為鰓絲組織分析樣本數，r 為相關係數。

		Correlation analysis							
Group	n	$\delta^{15}\text{N}_{\text{gill}}$ V.S. weight		$\delta^{15}\text{N}_{\text{gill}}$ V.S. standard length		$\delta^{13}\text{C}_{\text{gill}}$ V.S. weight		$\delta^{13}\text{C}_{\text{gill}}$ V.S. standard length	
		r	p	r	p	r	p	r	p
EM1, EM2	27	-0.2484	0.2116	-0.1328	0.5089	0.2683	0.1760	0.3858	0.0469
Tub	3	-0.2085	0.8663	-0.6715	0.5313	0.3036	0.8036	-0.2159	0.8614
AS	14	0.0511	0.8814	-0.1417	0.6776	0.5504	0.0079	0.2056	0.5442
GF	51	0.2837	0.1791	0.2685	0.2047	0.1842	0.3889	0.2037	0.3398
SEP	13	-0.2085	0.1375	-0.4968	0.1440	0.3036	0.9053	0.0515	0.8877

表 13、攝食不同餌料的吳郭魚組別(group)，鱗片組織的穩定性碳($\delta^{13}\text{C}_{\text{scale}}$)、氮($\delta^{15}\text{N}_{\text{scale}}$)同位素與標準體長(standard length)、體重(weight)間的相關性。n 為鱗片分析樣本數，r 為相關係數(correlation coefficient)。



		Correlation analysis							
Group	n	$\delta^{15}\text{N}_{\text{scale}}$ V.S. weight		$\delta^{15}\text{N}_{\text{scale}}$ V.S. standard length		$\delta^{13}\text{C}_{\text{scale}}$ V.S. weight		$\delta^{13}\text{C}_{\text{scale}}$ V.S. standard length	
		r	p	r	p	r	p	r	p
EM1, EM2	17	-0.6823	0.0297	-0.7199	0.0189	0.1409	0.1760	0.0469	0.1300
Tub	3	-0.6583	0.5425	-0.9473	0.2075	0.2330	0.8503	0.6899	0.5153
AS	14	0.7465	0.0083	0.4536	0.1611	-0.4338	0.1826	-0.4717	0.1430
GF	51	-0.2343	0.4201	-0.2508	0.3870	-0.3758	0.1854	-0.5301	0.0512
SEP	13	-0.1039	0.1375	-0.1294	0.7216	-0.4365	0.9053	0.2052	0.5695

表 14、攝食不同餌料的吳郭魚組別(group)，肝臟組織的穩定性碳($\delta^{13}\text{C}_{\text{liver}}$)、氮($\delta^{15}\text{N}_{\text{liver}}$)同位素與標準體長(standard length)、體重間(weight)的相關性。n 為肝臟組織分析樣本數，r 為相關係數(correlation coefficient)。



		Correlation analysis							
Group	n	$\delta^{15}\text{N}_{\text{liver}}$ V.S. weight		$\delta^{15}\text{N}_{\text{liver}}$ V.S. standard length		$\delta^{13}\text{C}_{\text{liver}}$ V.S. weight		$\delta^{13}\text{C}_{\text{liver}}$ V.S. standard length	
		r	p	r	p	r	p	r	p
EM1, EM2	17	0.0276	0.9321	0.2740	0.3888	-0.3343	0.2882	-0.1758	0.5847
AS	14	0.7465	0.0083	0.4536	0.1611	-0.4338	0.1826	-0.4717	0.1430
GF	26	0.5428	0.0540	0.4139	0.1412	-0.1331	0.6552	-0.2314	0.4261

表 15、白姑魚(*Pennahia argentata*) EA-IRMS 耳石最低分析粉末量分析。 $\delta^{15}\text{N}_{\text{OM}}$ 為耳石有機物的穩定性氮同位素， $\delta^{13}\text{C}_{\text{OM}}$ 為耳石有機物的穩定性碳同位素，SD 分別為 25 mg 和 30 mg 重複測定樣本間同位素組成的標準偏差。

Sample	Otolith weight (mg)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{OM}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{OM}}$ (‰)	SD of $\delta^{15}\text{N}_{\text{OM}}$ (‰)	SD of $\delta^{13}\text{C}_{\text{OM}}$ (‰)
SM1	25.422	7.3	-16.5		
SM2	25.012	5.0	-19.2	1.4	1.7
SM3	25.313	5.3	-16.9		
SM4	25.111	4.1	-17.1		
SS1	30.206	8.5	-14.7		
SS2	30.012	8.8	-14.0	0.2	0.3
SS3	30.002	8.5	-14.4		

表 16、攝食不同餌料之吳郭魚組別(group)，其耳石有機物($\delta^{15}\text{N}_{\text{OM}}$)和攝入餌料的穩定性氮同位素值($\delta^{15}\text{N}_{\text{diet}}$)、與兩者間的同位素分餞($\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{OM-D}}$)無母數檢定結果，以及 $\delta^{15}\text{N}_{\text{OM}}$ 與標準體長、體重間的相關係數和 p 值。 n 為測定 $\delta^{15}\text{N}_{\text{OM}}$ 的樣本數， r 為相關係數(correlation coefficient)。

Group	Sampling date	n	Mean $\delta^{15}\text{N}_{\text{OM}}$ (mean \pm SD, ‰)	Mean $\delta^{15}\text{N}_{\text{diet}}$ (mean \pm SD, ‰)	$\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{OM-D}}$ (mean \pm SD, ‰)	Wilcoxon rank sum test		Correlation analysis		Correlation analysis	
						$\delta^{15}\text{N}_{\text{OM}}$ v.s. $\delta^{15}\text{N}_{\text{diet}}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{OM}}$ v.s. weight	$\delta^{15}\text{N}_{\text{OM}}$ v.s. length	$\delta^{15}\text{N}_{\text{OM}}$ v.s. length		
						h	p	r	p	r	p
EM1, EM2	2015/08/10	5	10.1 \pm 2.2								
	2016/05/21	8	10.4 \pm 0.7	10.8 \pm 0.1	-0.5 \pm 1.4	0	0.144	0.19	0.53	0.28	0.36
Tub	2016/05/21	3	3.0 \pm 0.4	2.9 \pm 0.3	0.2 \pm 0.4	0	0.189	-0.07	0.78	0.23	0.45
AS	2016/05/13	14	11.1 \pm 0.7	11.6 \pm 0.2	-0.5 \pm 0.6	0	0.700	0.00	0.81	0.50	0.45
GF	2016/02/23	10	8.3 \pm 0.5								
	2016/05/21	18	7.8 \pm 0.3	7.3 \pm 0.1	0.7 \pm 0.7	0	0.781	-0.05	0.81	-0.06	0.76
SEP	2016/05/21	11	8.4 \pm 0.6	8.4 \pm 0.2	-0.3 \pm 0.6	0	0.326	0.14	0.67	0.20	0.50

表 17、攝食不同餌料的吳郭魚組別(group)，其耳石有機物的氮含量(N%, mean \pm SD)、攝入餌料的粗蛋白質含量(crude protein content, %)，及耳石氮含量與個體間的體長、體重相關係數及 p 值。n 為樣本數

Group	n	Mean N % (W _N / W _{otolith} %)	Diet type	Diets crude protein content (%)	Correlation analysis					
					N % _{otolith} V.S. weight		N % _{otolith} V.S. standard length		N % _{otolith} V.S.otolith weight	
					r	p	r	p	r	p
EM1, EM2	13	0.18 \pm 0.03	eel meal	> 45	-0.7619	0.0025	-0.9020	2.49 \times 10 ⁻⁵	-0.7686	0.0021
Tub	3	0.12 \pm 0.01	<i>Tubifex</i> spp.	63.3	0.1169	0.7038	0.0030	0.9922	0.2416	0.4264
AS	14	0.01 \pm 0.02	<i>Artemia salina</i>	61	0.0642	0.7880	0.0096	0.9678	0.100	0.6748
GF	28	0.07 \pm 0.01	guppy food	40	0.3376	0.7807	0.7647	0.4458	-0.3833	0.7496
SEP	11	0.02 \pm 0.01	seaweed EX pellet	33	-0.3729	0.4666	0.1104	0.8350	-0.3464	0.5012

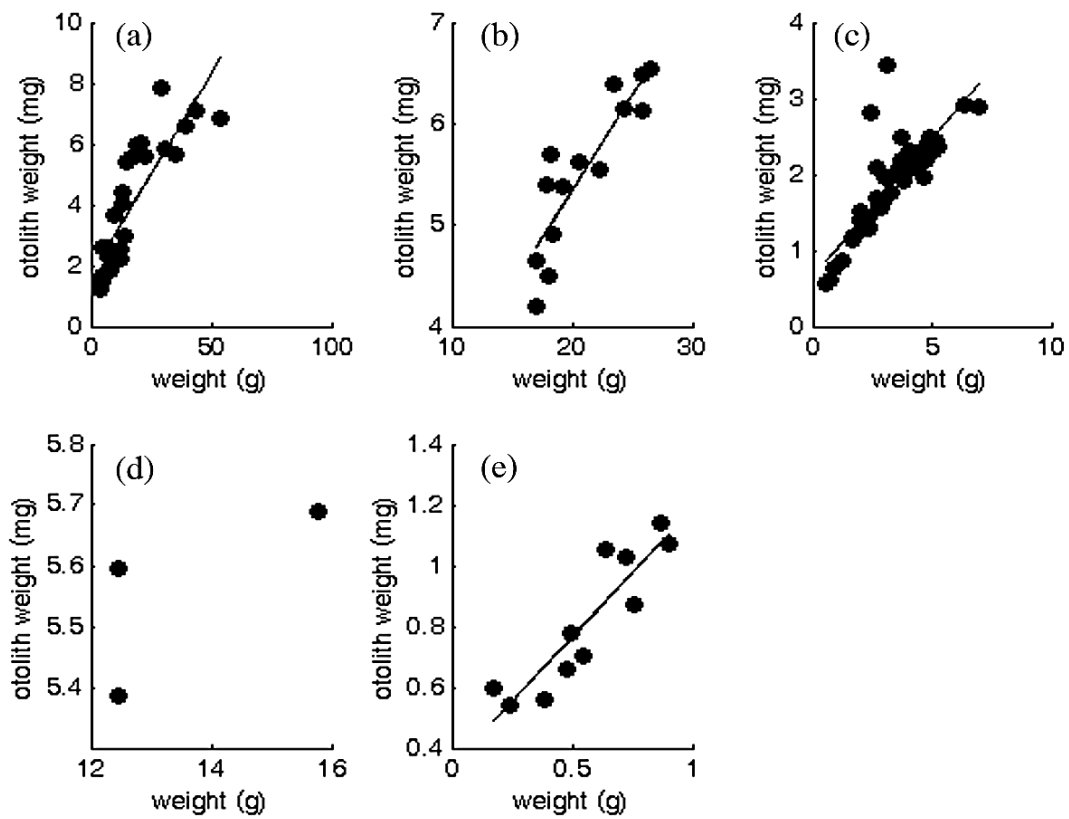


圖 1、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其體重(weight, g)和耳石重量(otolith weight, mg)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal) ($y = 1.72 + 0.013x$, $p = 0.002$)、(b) AS (*Artemia Salina*) ($y = 1.57 + 0.19x$, $p < 0.001$)、(c) GF (guppy food) ($y = 0.36 + 0.36x$, $p < 0.001$)、(d) Tub (*Tubifex* spp.)、(e) SEP (seaweed EX pellet) ($y = 0.34 + 0.84x$, $p < 0.001$)。

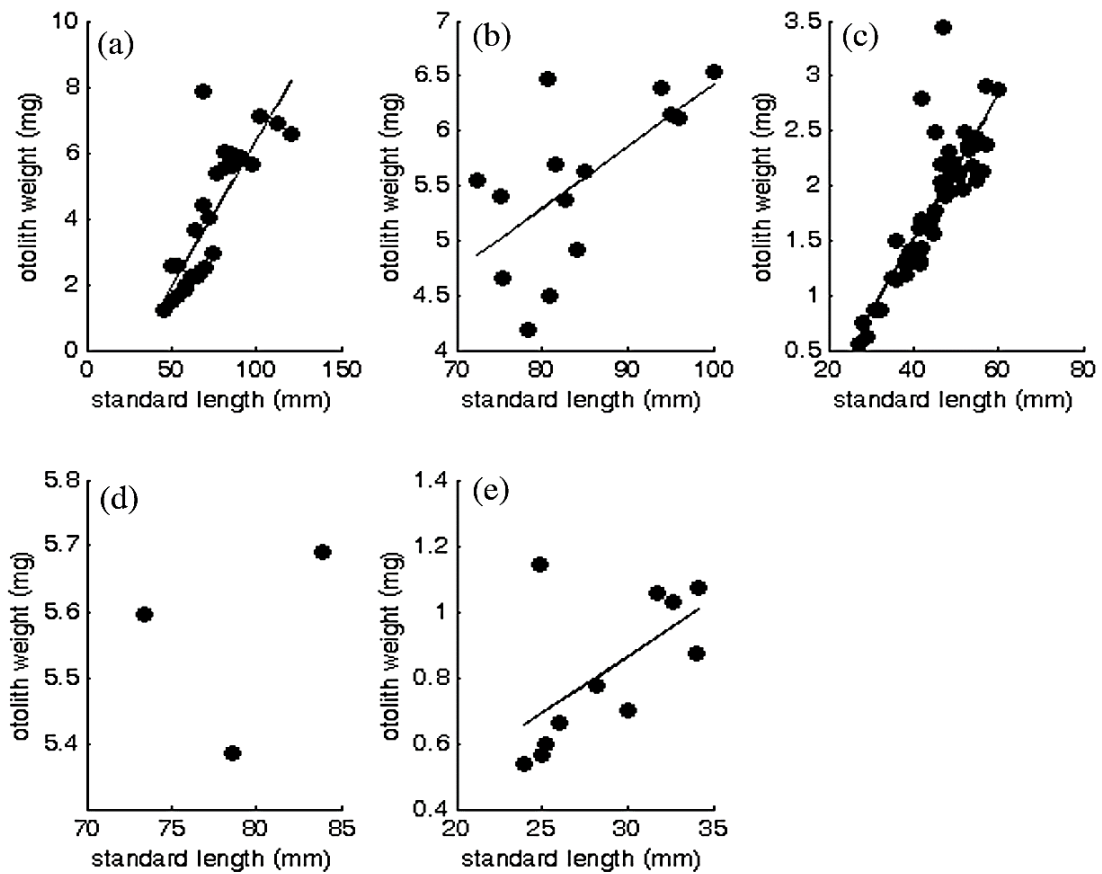


圖 2、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其標準體長(standard length, mm)和耳石重量 (otolith weight, mg)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal) ($y = -2.46 + 0.09x$, $p < 0.001$)、(b) AS (*Artemia salina*) ($y = 0.76 + 0.06x$, $p = 0.01$)、(c) GF (guppy food) ($y = -1.08 + 0.06x$, $p < 0.001$)、(d) Tub (*Tubifex* spp.)、(e) SEP (seaweed EX pellet) ($y = 0.03 + 0.6x$, $p = 0.05$)。

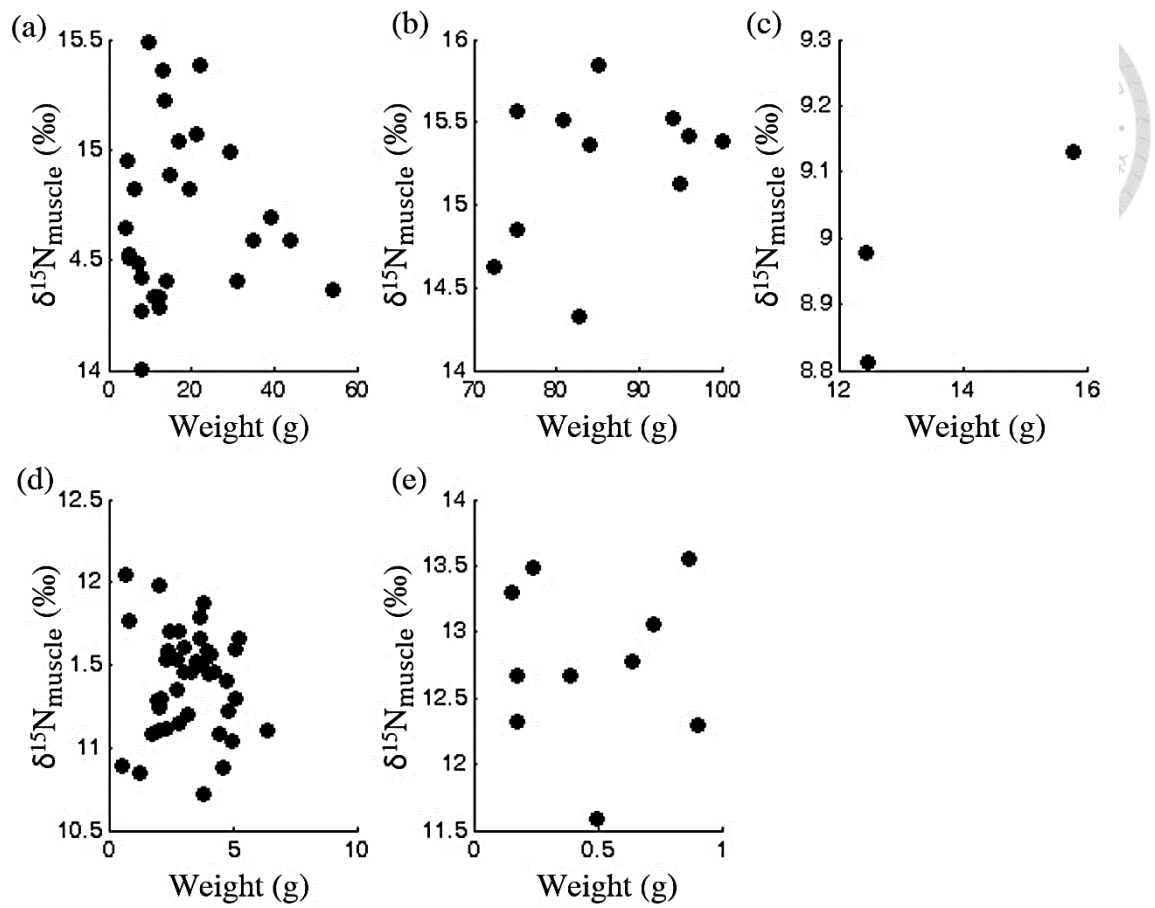


圖 3、攝食不同餌料的吳郭魚，肌肉組織的穩定性氮同位素($\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$)與體重間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) Tub (*Tubifex* spp.)、(d) GF (guppy food)、(e) SEP (seaweed EX pellet)。

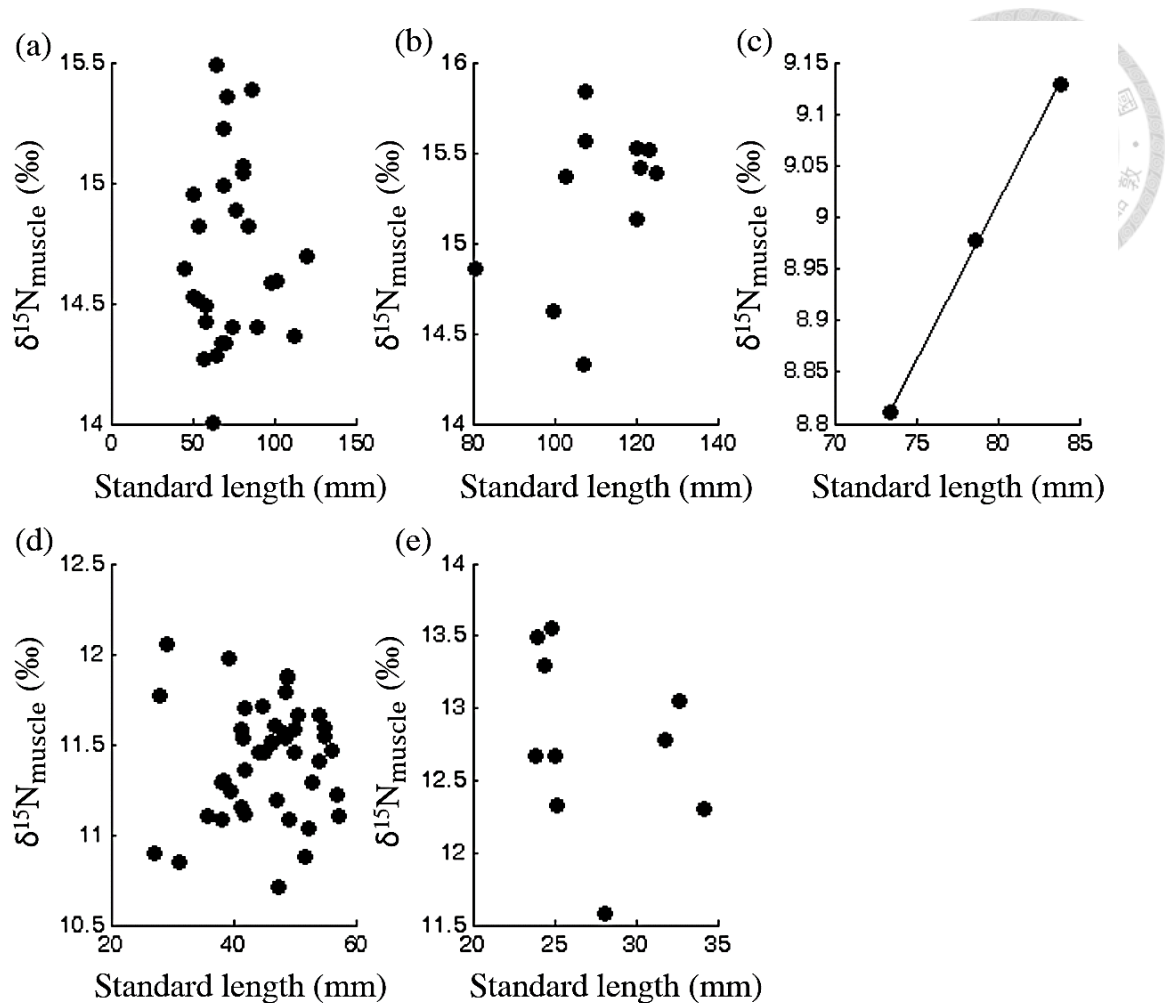


圖 4、攝食不同餌料的吳郭魚，肌肉組織的穩定性氮同位素($\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$)與標準體長(standard length)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) Tub (*Tubifex* spp.) ($y = 6.5847 + 0.0304x$, $p = 0.0188$)、(d) GF (guppy food)、(e) SEP (seaweed EX pellet)。

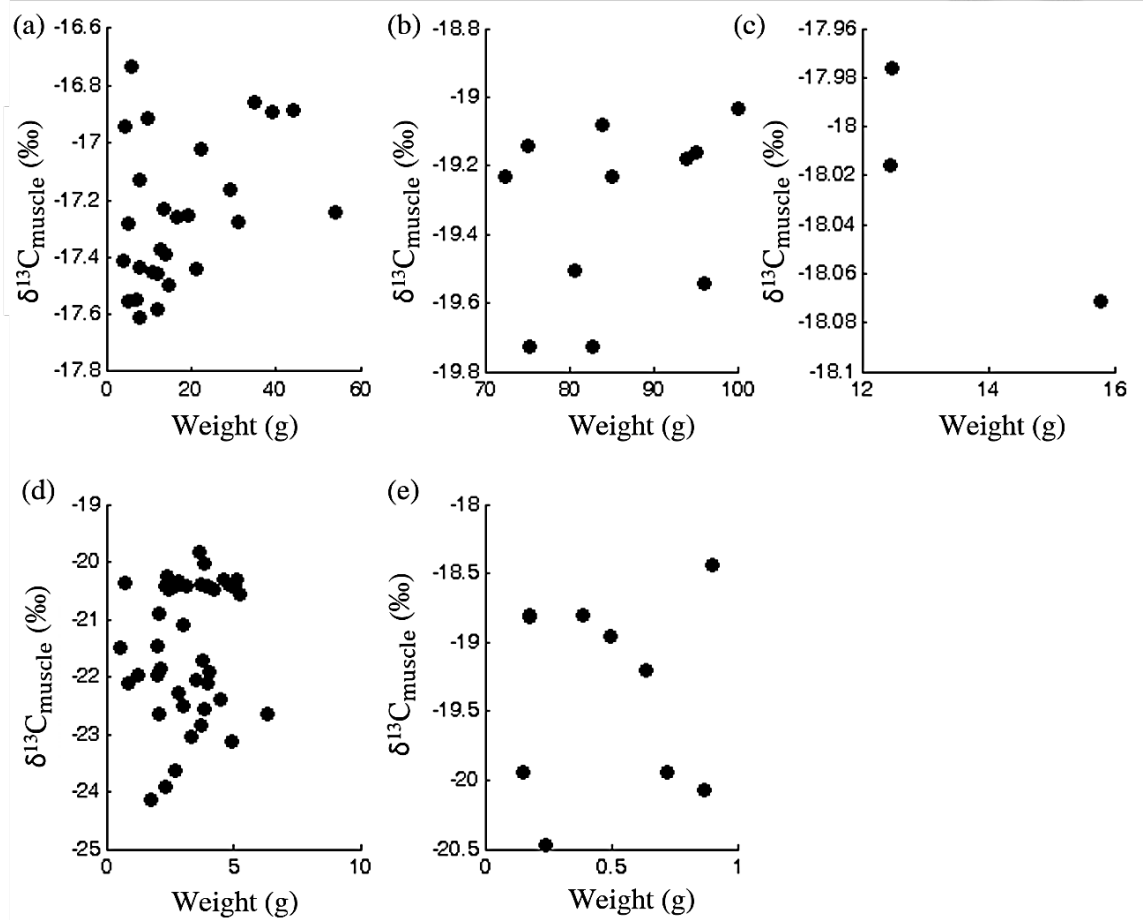


圖 5、攝食不同餌料的吳郭魚，肌肉組織的穩定性碳同位素($\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}}$)與體重 (weight)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) Tub (*Tubifex* spp.)、(d) GF (guppy food)、(e) SEP (seaweed EX pellet)。

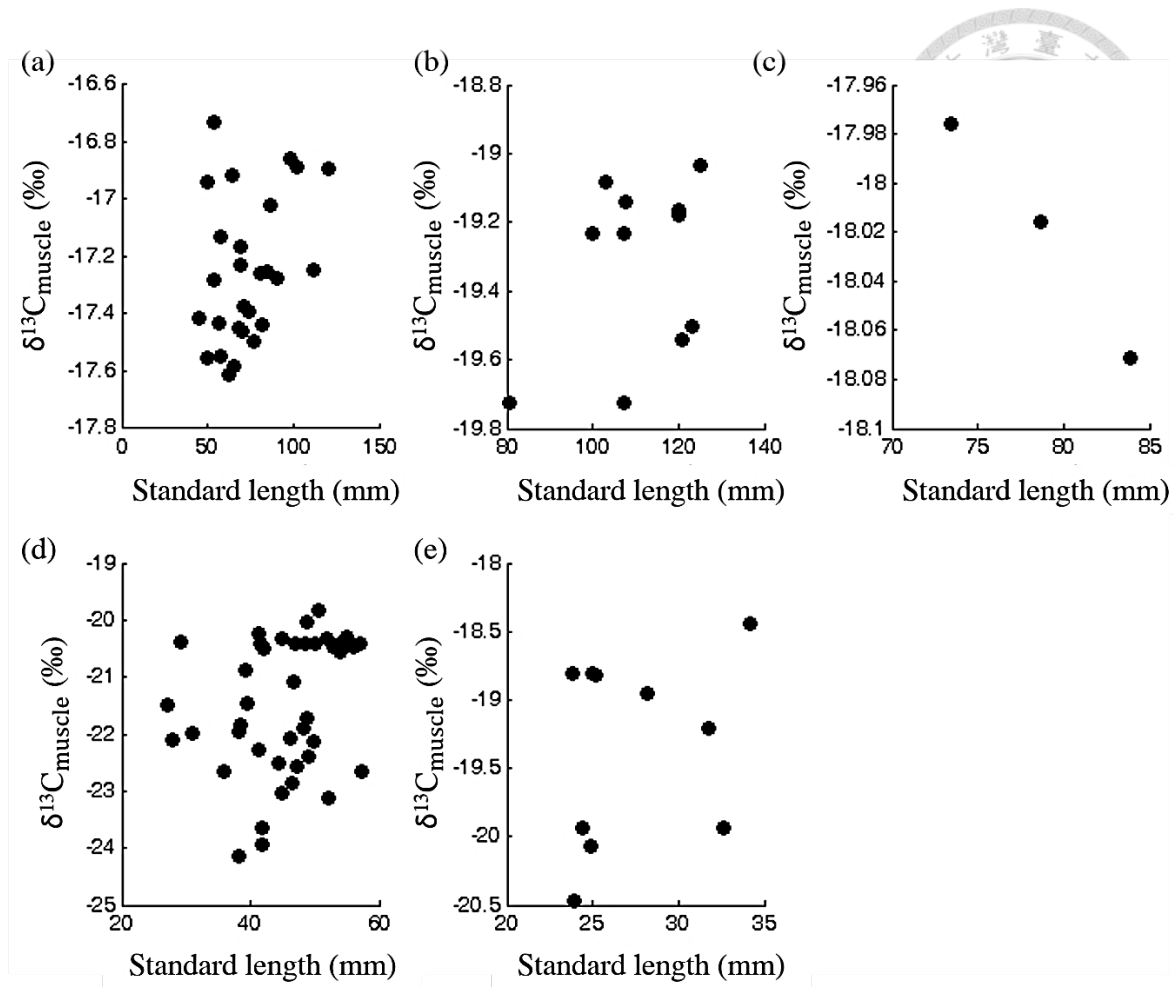


圖 6、攝食不同餌料的吳郭魚，肌肉組織的穩定性碳同位素($\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}}$)與標準體長(standard length)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) Tub (*Tubifex* spp.)、(d) GF (guppy food)、(e) SEP (seaweed EX pellet)。

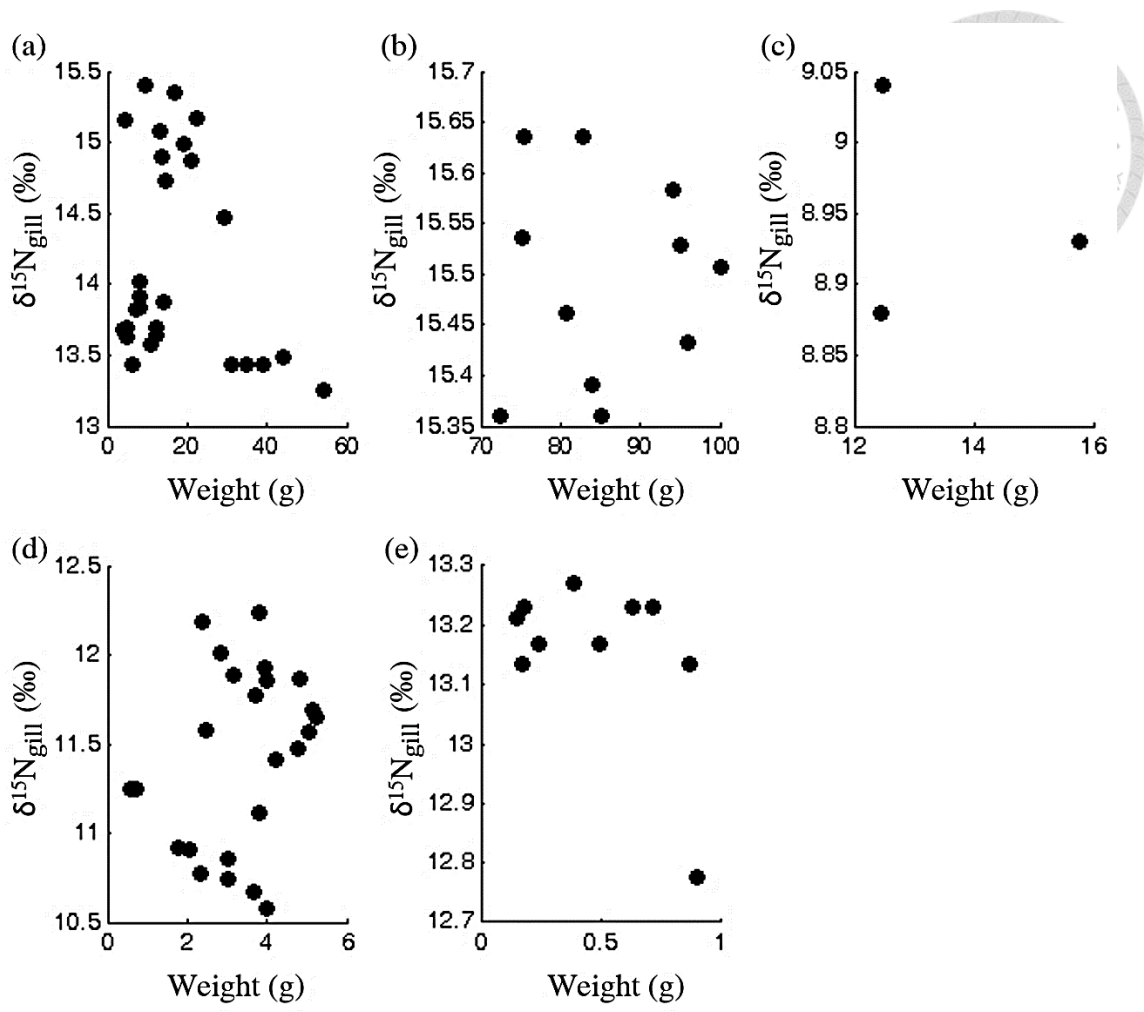


圖 7、攝食不同餌料的吳郭魚，鰓絲組織的穩定性氮同位素($\delta^{15}\text{N}_{\text{gill}}$)與體重 (weight)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) Tub (*Tubifex* spp.)、(d) GF (guppy food)、(e) SEP (seaweed EX pellet)。

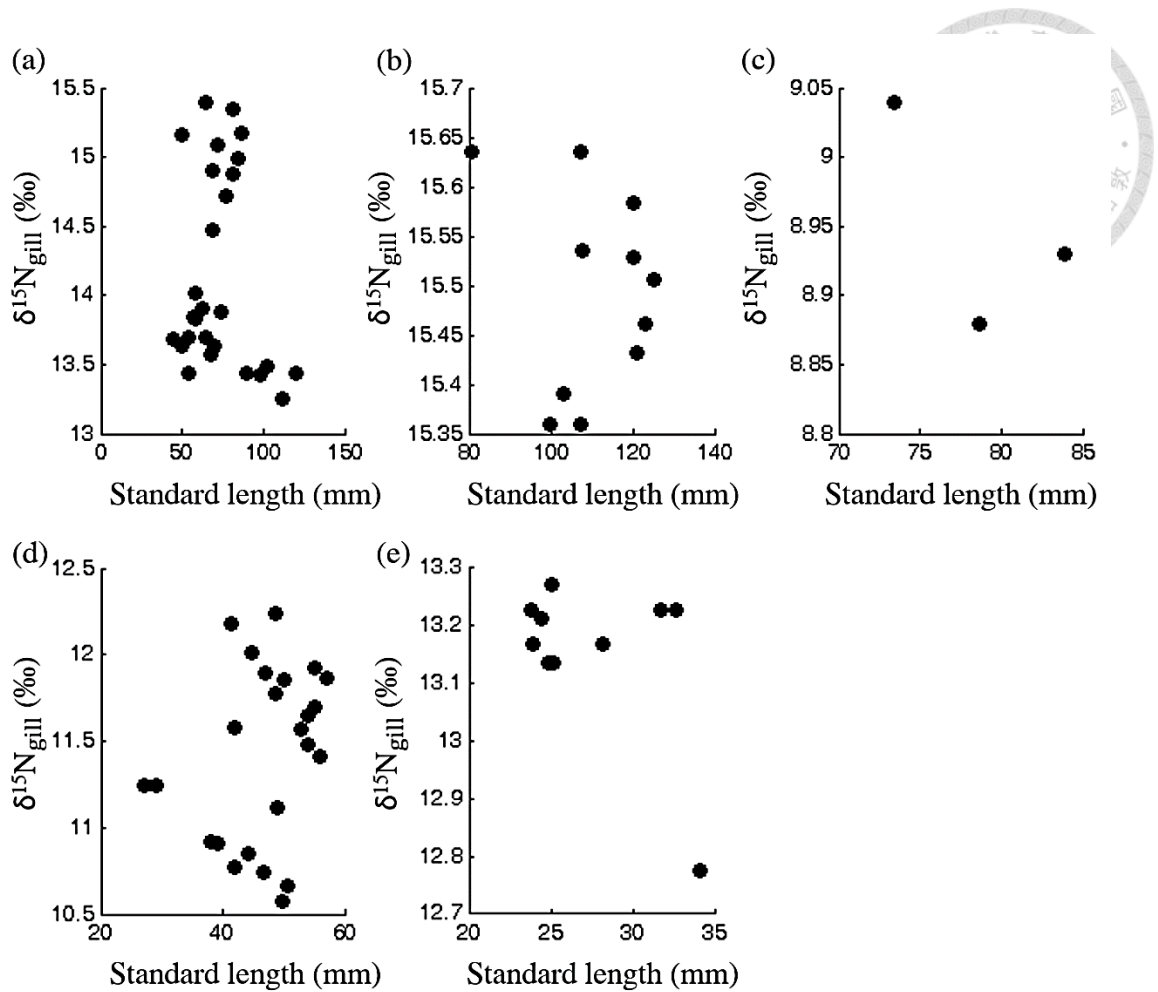


圖 8、攝食不同餌料的吳郭魚，鰓絲組織的穩定性氮同位素($\delta^{15}\text{N}_{\text{gill}}$)與標準體長 (standard length)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) Tub (*Tubifex* spp.)、(d) GF (guppy food)、(e) SEP (seaweed EX pellet)。

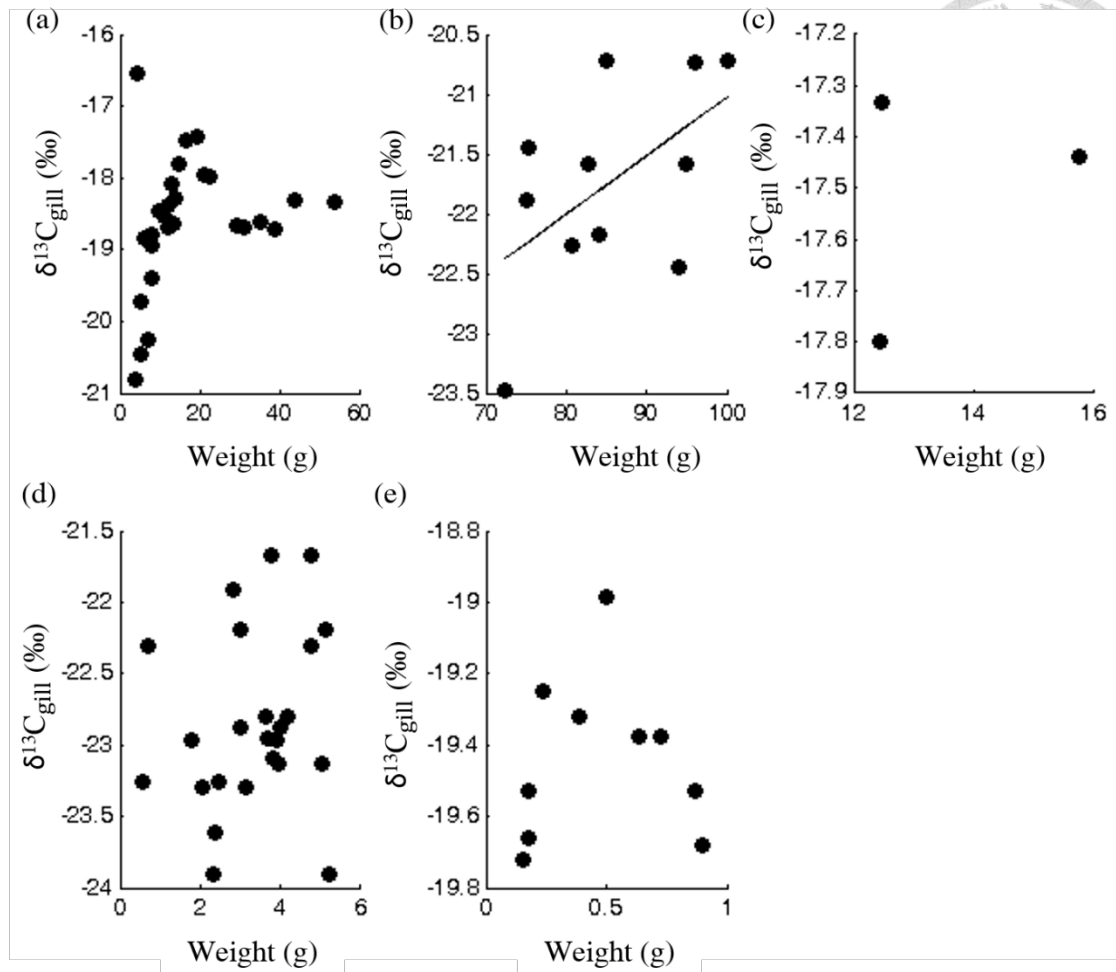


圖 9、攝食不同餌料的吳郭魚，鰓絲組織的穩定性碳同位素($\delta^{13}C_{gill}$)與體重 (weight)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal)、(b) AS (*Artemia salina*) ($y = -25.9565 + 0.0494x$, $r = 0.5504$, $p = 0.0079$)、(c) Tub (*Tubifex* spp.)、(d) GF (guppy food)、(e) SEP (seaweed EX pellet)。

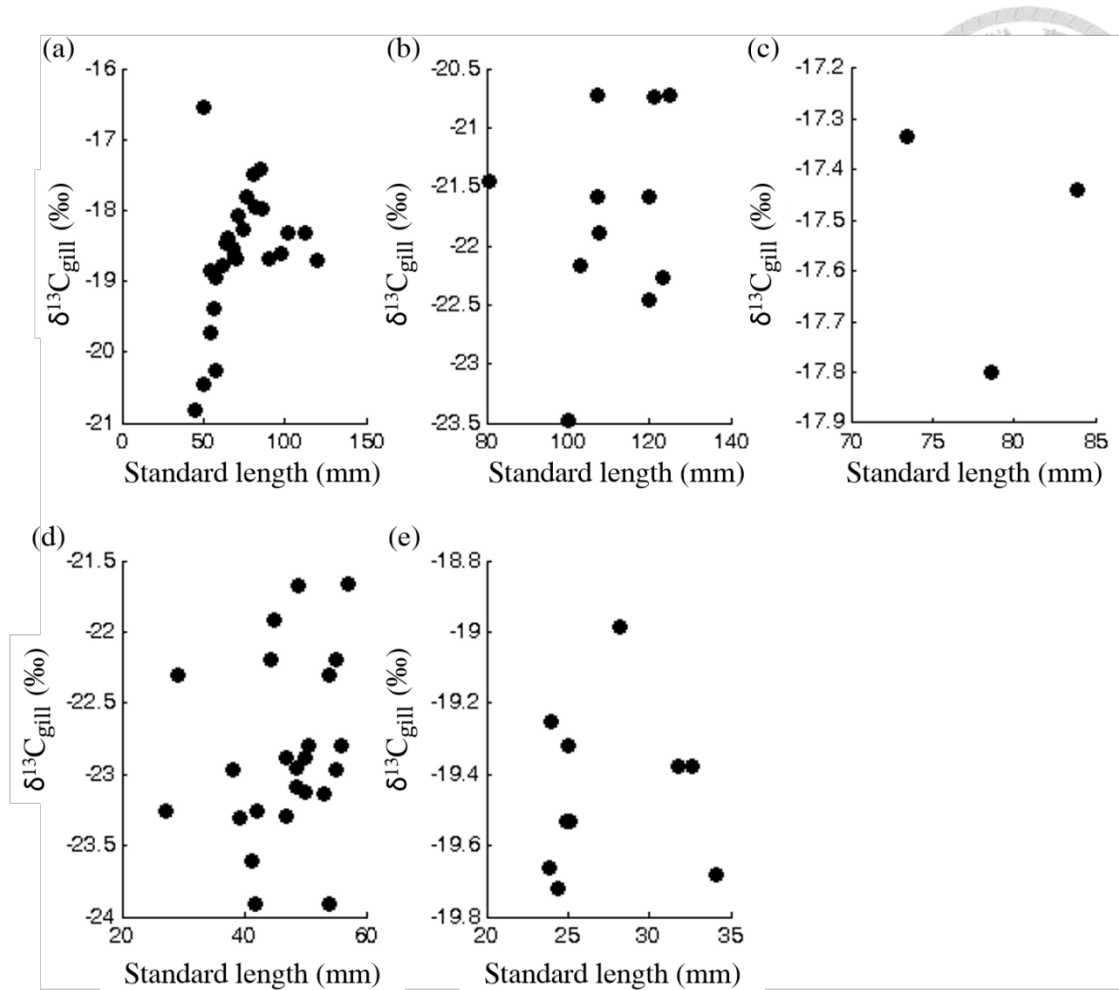


圖 10、攝食不同餌料的吳郭魚，鰓絲組織的穩定性碳同位素($\delta^{13}C_{gill}$)與標準體長 (standard length)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) Tub (*Tubifex* spp.)、(d) GF (guppy food)、(e) SEP (seaweed EX pellet)。

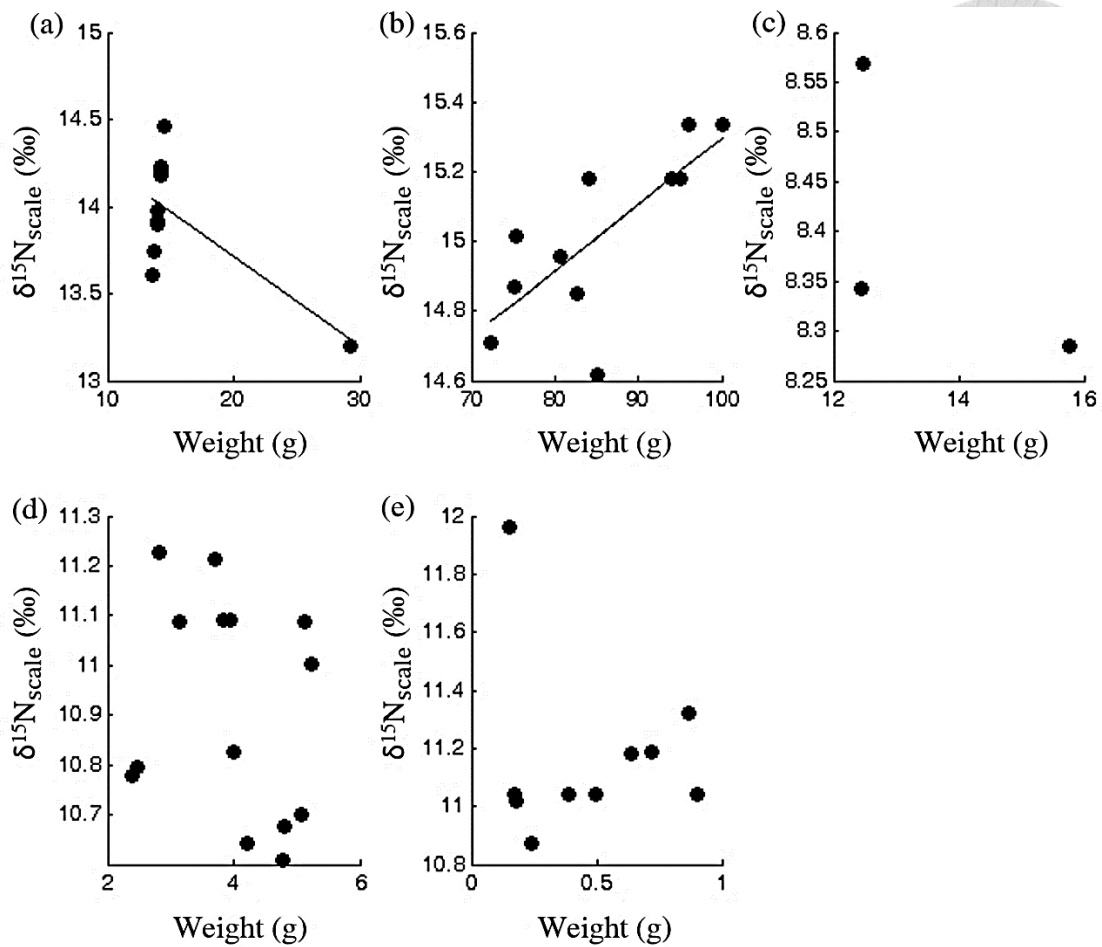


圖 11、攝食不同餌料的吳郭魚，鱗片組織的穩定性氮同位素($\delta^{15}\text{N}_{\text{scale}}$)與體重 (weight)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal) ($y = 14.7381 - 0.0511x$, $r = -0.6823$, $p = 0.0297$)、(b) AS (*Artemia salina*) ($y = 13.3838 + 0.0191x$, $r = 0.7465$, $p = 0.0083$)、(c) Tub (*Tubifex* spp.)、(d) GF (guppy food)、(e) SEP (seaweed EX pellet)。

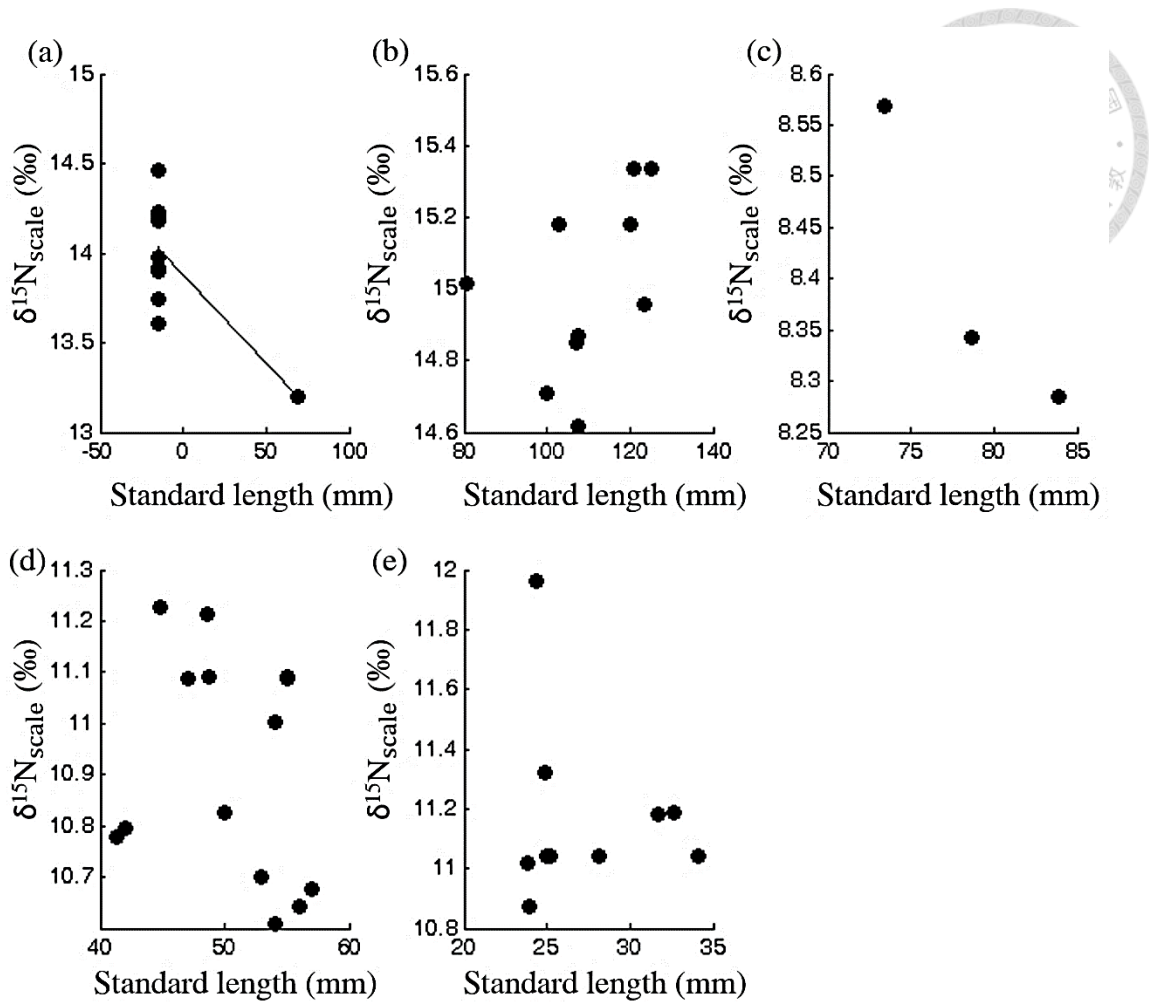


圖 12、攝食不同餌料的吳郭魚，鱗片組織的穩定性氮同位素($\delta^{15}\text{N}_{\text{scale}}$)與標準體長(standard length)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal) ($y = 13.88 - 0.0098x$, $r = -0.7199$, $p = 0.0189$)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) Tub (*Tubifex* spp.)、(d) GF (guppy food)、(e) SEP (seaweed EX pellet)。

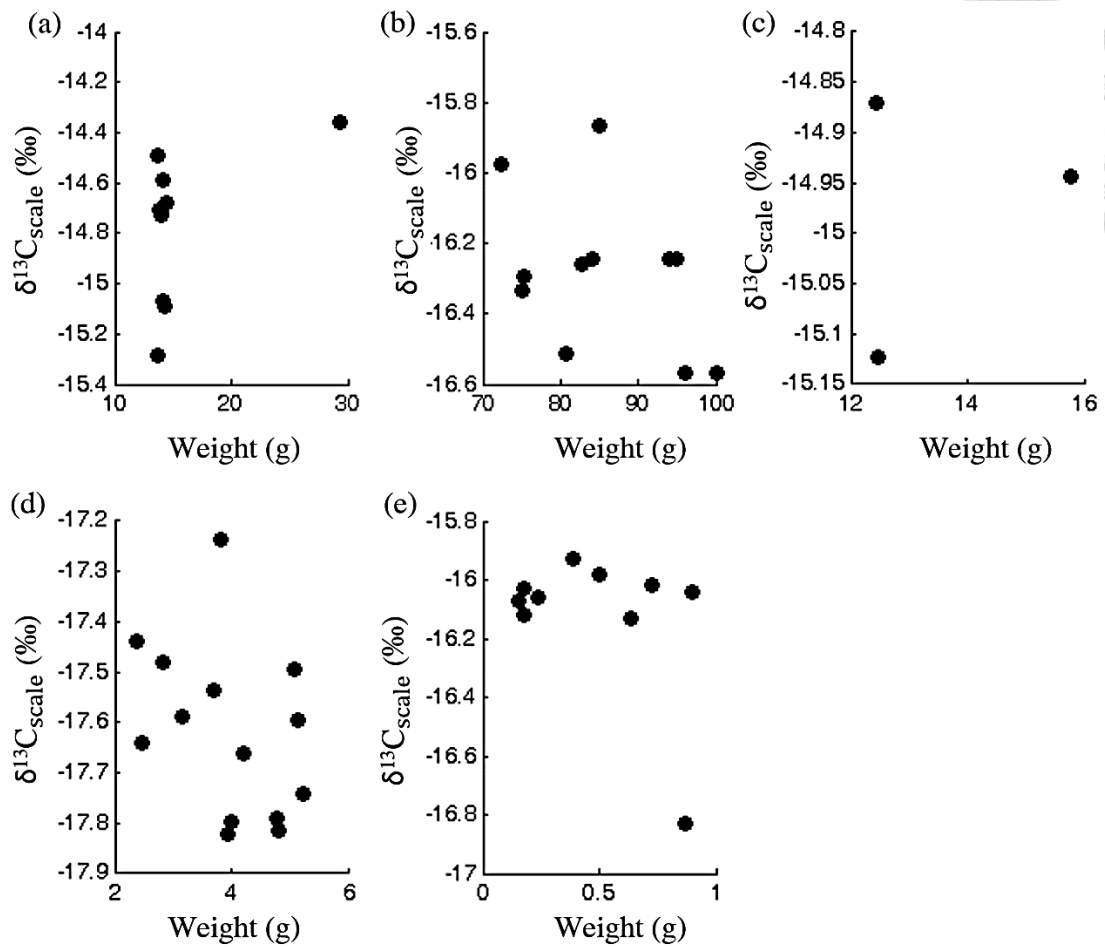


圖 13、攝食不同餌料的吳郭魚，鱗片組織的穩定性碳同位($\delta^{13}\text{C}_{\text{scale}}$)素與體重 (weight)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) Tub (*Tubifex* spp.)、(d) GF (guppy food)、(e) SEP (seaweed EX pellet)。

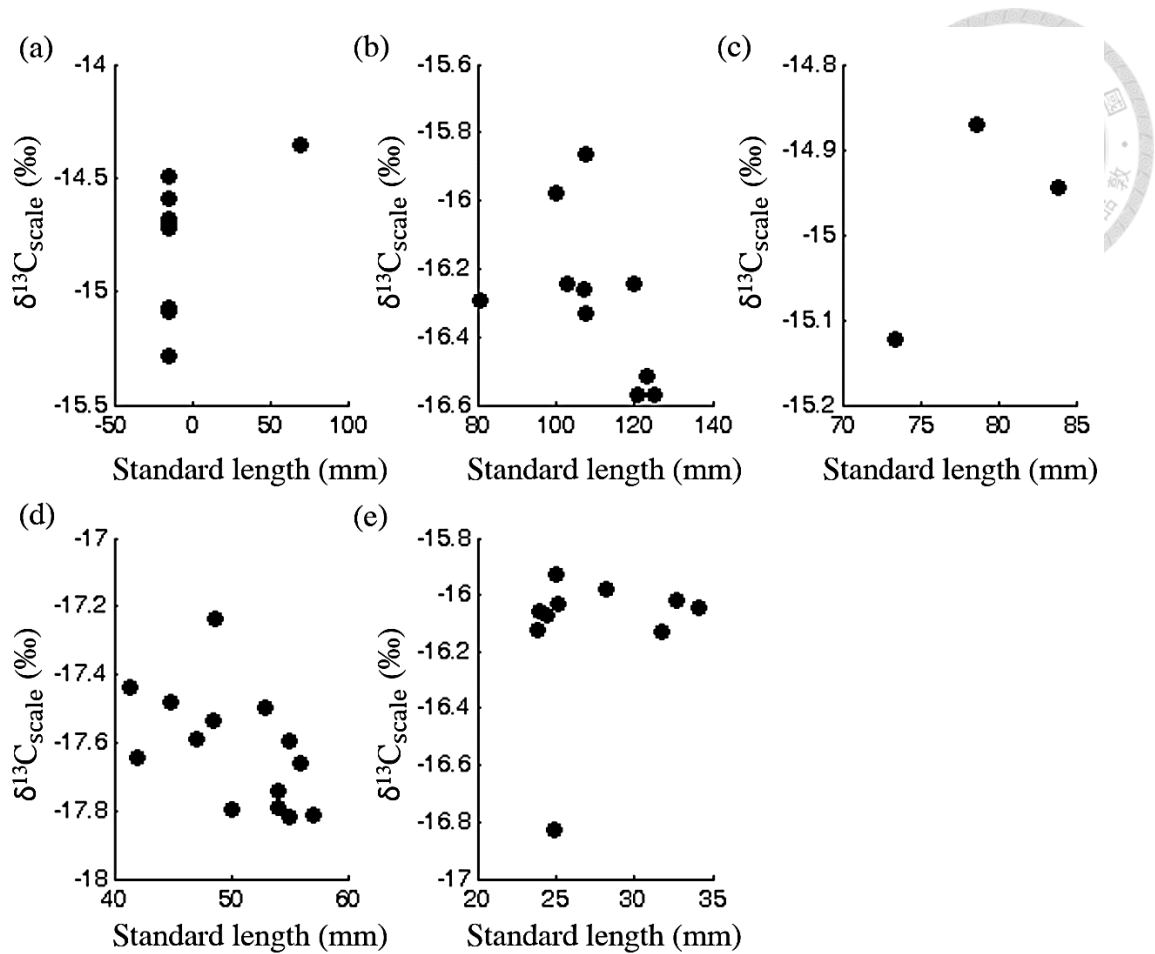


圖 14、攝食不同餌料的吳郭魚，鱗片組織的穩定性碳同位素($\delta^{13}C_{scale}$)與標準體長(standard length)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) Tub (*Tubifex* spp.)、(d) GF (guppy food)、(e) SEP (seaweed EX pellet)。

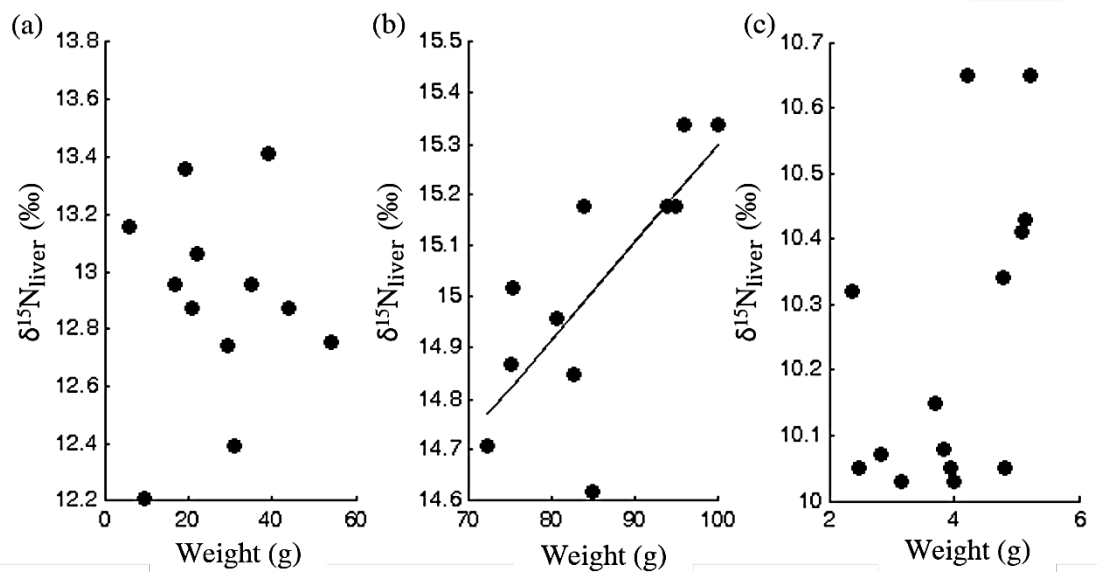


圖 15、攝食不同餌料的吳郭魚，肝臟組織的穩定性氮同位素($\delta^{15}\text{N}_{\text{liver}}$)與體重 (weight)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal)、(b) AS (*Artemia salina*) ($y = 13.3838 + 0.0191 x$, $r = 0.7465$, $p = 0.0083$)、(c) GF (guppy food)。

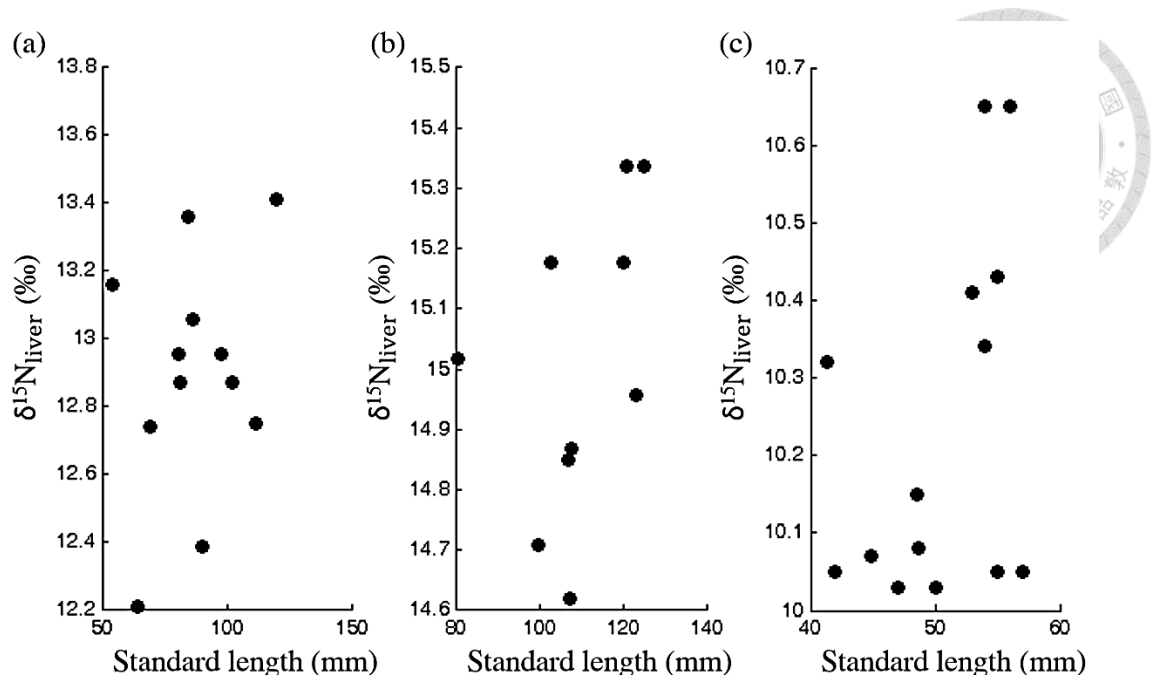


圖 16、攝食不同餌料的吳郭魚，肝臟組織的穩定性氮同位素($\delta^{15}\text{N}_{\text{liver}}$)與標準體長(standard length weight)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) GF (guppy food)。

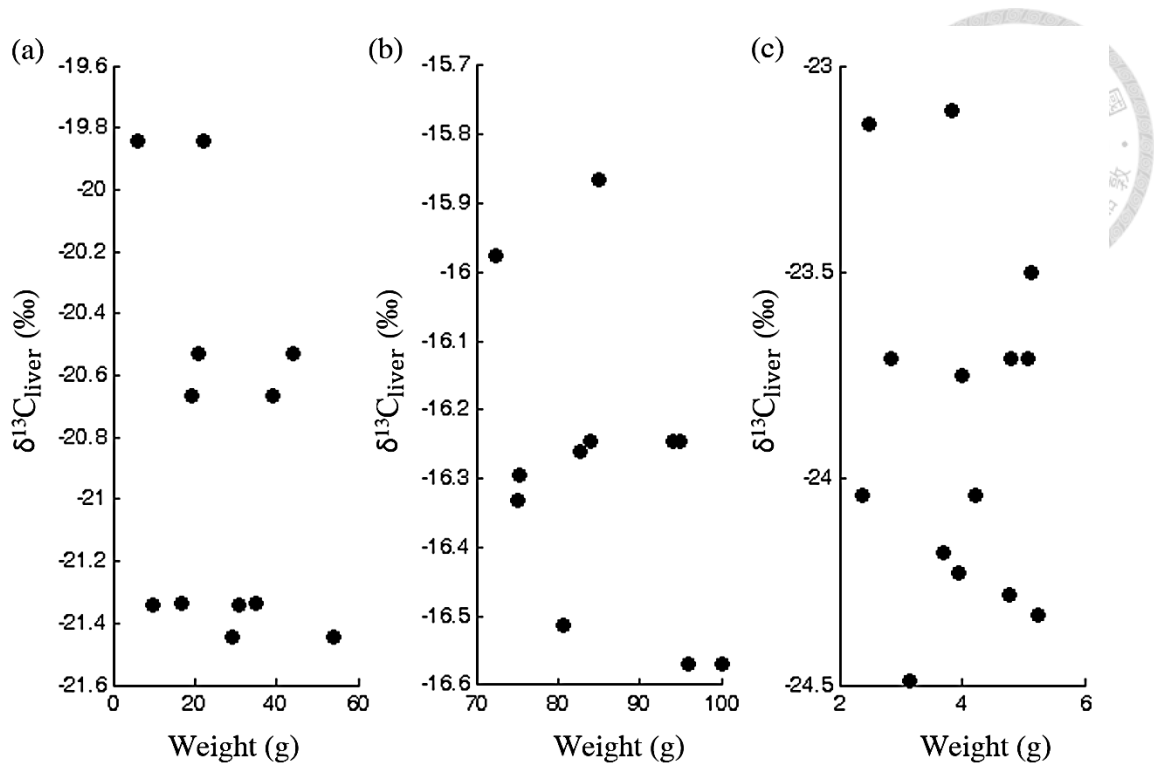


圖 17、攝食不同餌料的吳郭魚，肝臟組織的穩定性碳同位素($\delta^{13}\text{C}_{\text{liver}}$)與體重 (weight)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) GF (guppy food)。

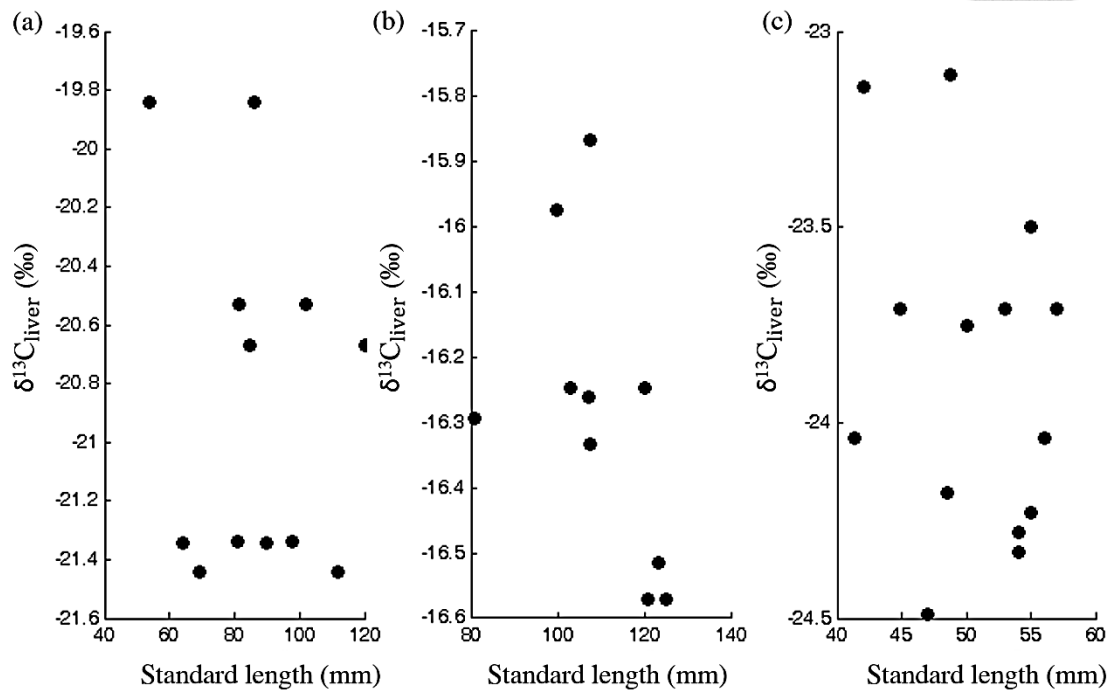


圖 18、攝食不同餌料的吳郭魚，肝臟組織的穩定性氮同位素($\delta^{13}\text{C}_{\text{liver}}$)與標準體長(standard length)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) GF (guppy food)。

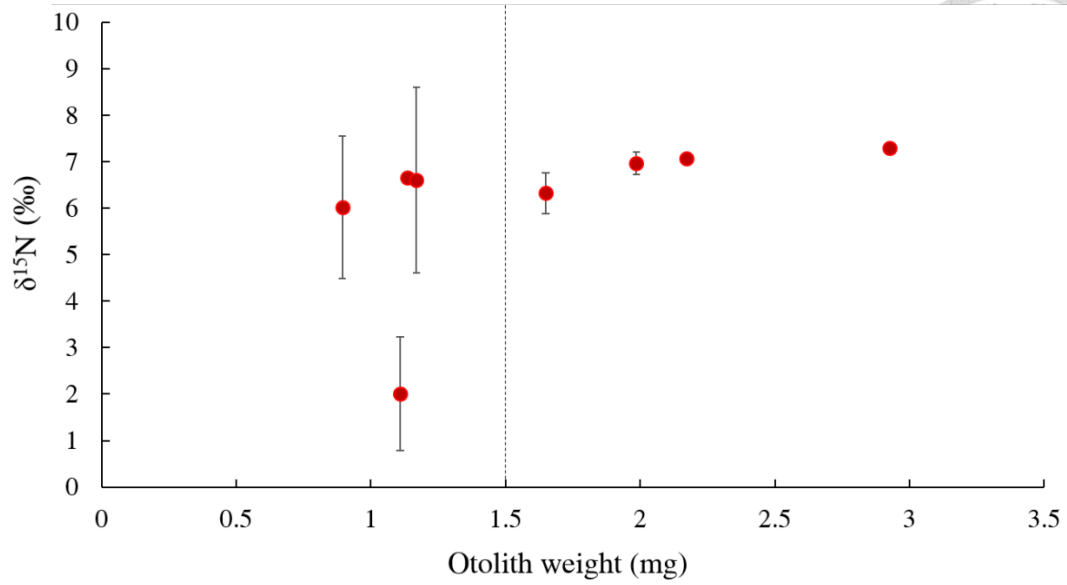


圖 19、以 GasBench-IRMS 分析不同重量耳石的誤差變化。當耳石粉末量高於 1.5 mg(虛線)以上時，三重複間的標準偏差(SD)範圍自 0.0 – 0.4‰，當粉末量低於 1.5 mg 時，三重複測定間的穩定性氮同位素之標準偏差，範圍自 1.2 – 2.0‰。

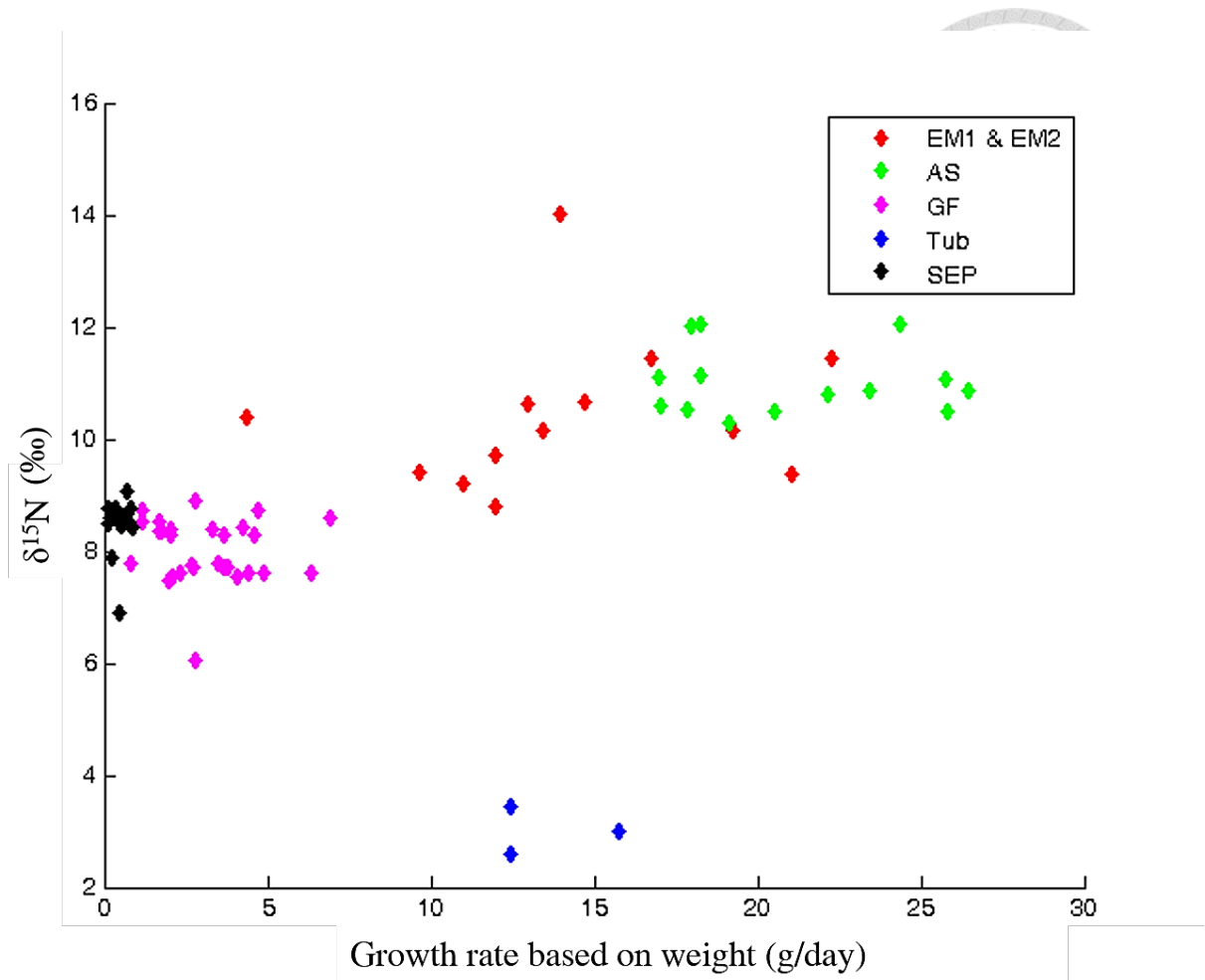


圖 20、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其成長速率(體重/日齡)和耳石有機物穩定性氮同位素間的散佈圖。紅色為 EM1 & EM2(eel meal)，綠色為 AS(*Artemia salina*)，粉紅色為 GF(guppy food)，藍色為 Tub(*Tubifex* spp.)，黑色為 SEP(seaweed EX pellet)。

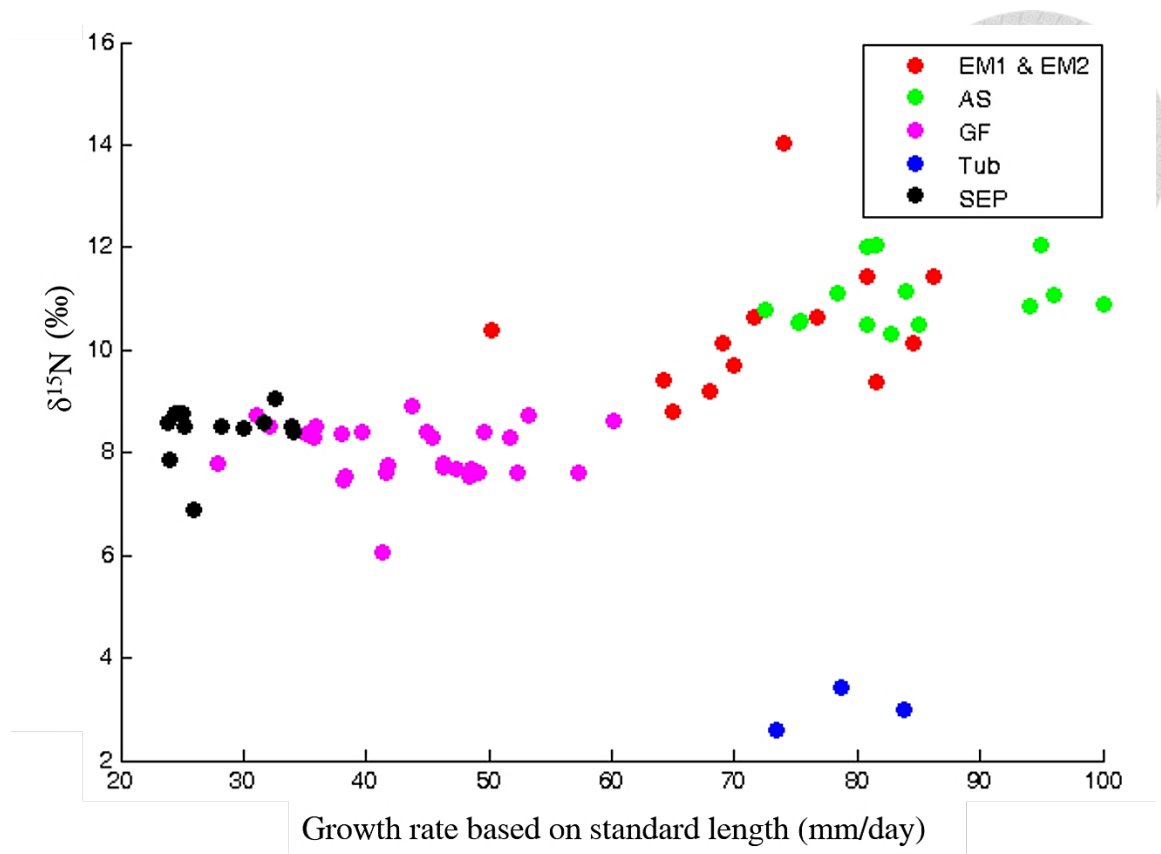


圖 21、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其成長速率(標準體長/日齡)和耳石有機物穩定性氮同位素間的散佈圖。紅色為 EM1 & EM2(eel meal)，綠色為 AS(*Artemia salina*)，粉紅色為 GF(guppy food)，藍色為 Tub(*Tubifex* spp.)，黑色為 SEP(seaweed EX pellet)。

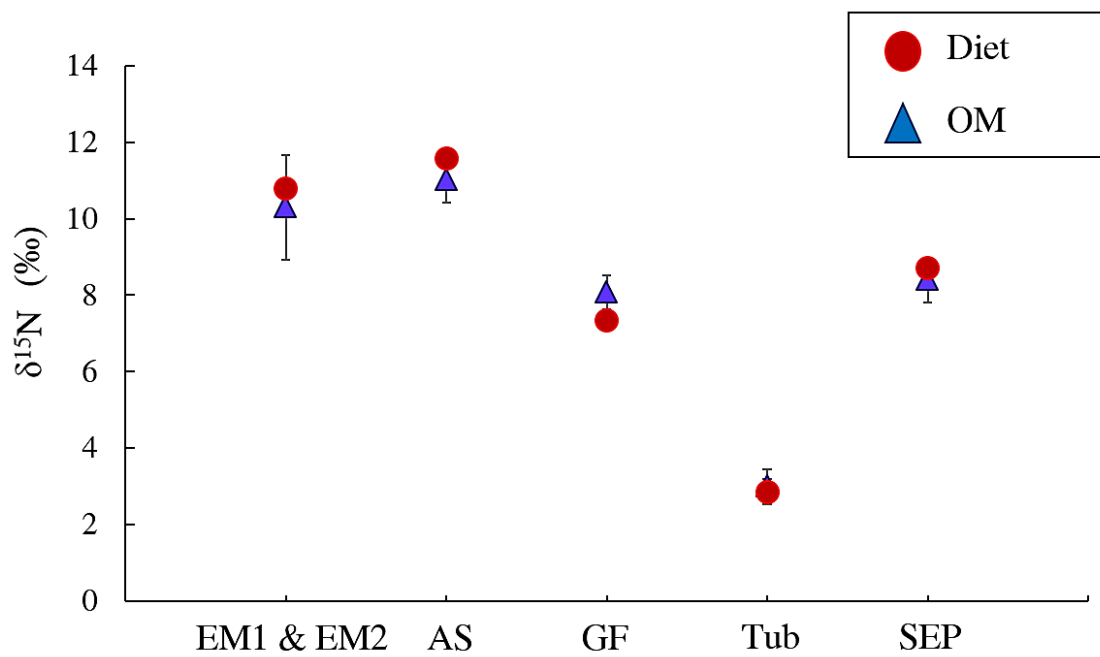


圖 22、攝食不同餌料的個體，其耳石有機物(OM)和餌料(Diet)間的穩定性氮同位素散佈圖。紅色實心圓為餌料的穩定性氮同位素值，藍色三角形為耳石有機物的穩定性氮同位素值。誤差線為餌料和耳石有機物的同位素標準偏差範圍。

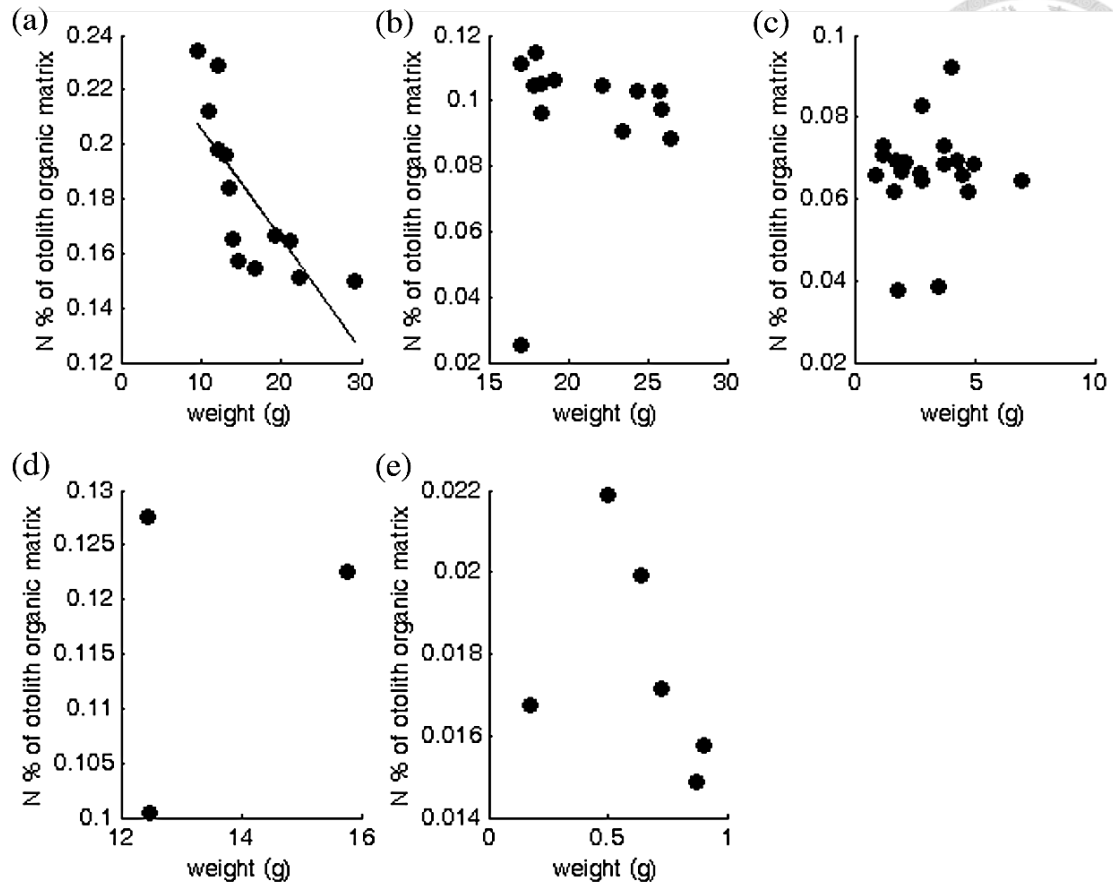


圖 23、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其耳石氮含量(N%， $W_N/W_{\text{otolith}}\%$)與體重 (weight, g)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal) ($y = 0.2470 - 0.0041 x$, $r = -0.7619$, $p = 0.0025$)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) GF (guppy food)、(d) Tub (*Tubifex* spp.)、(e) SEP (seaweed EX pellet)。

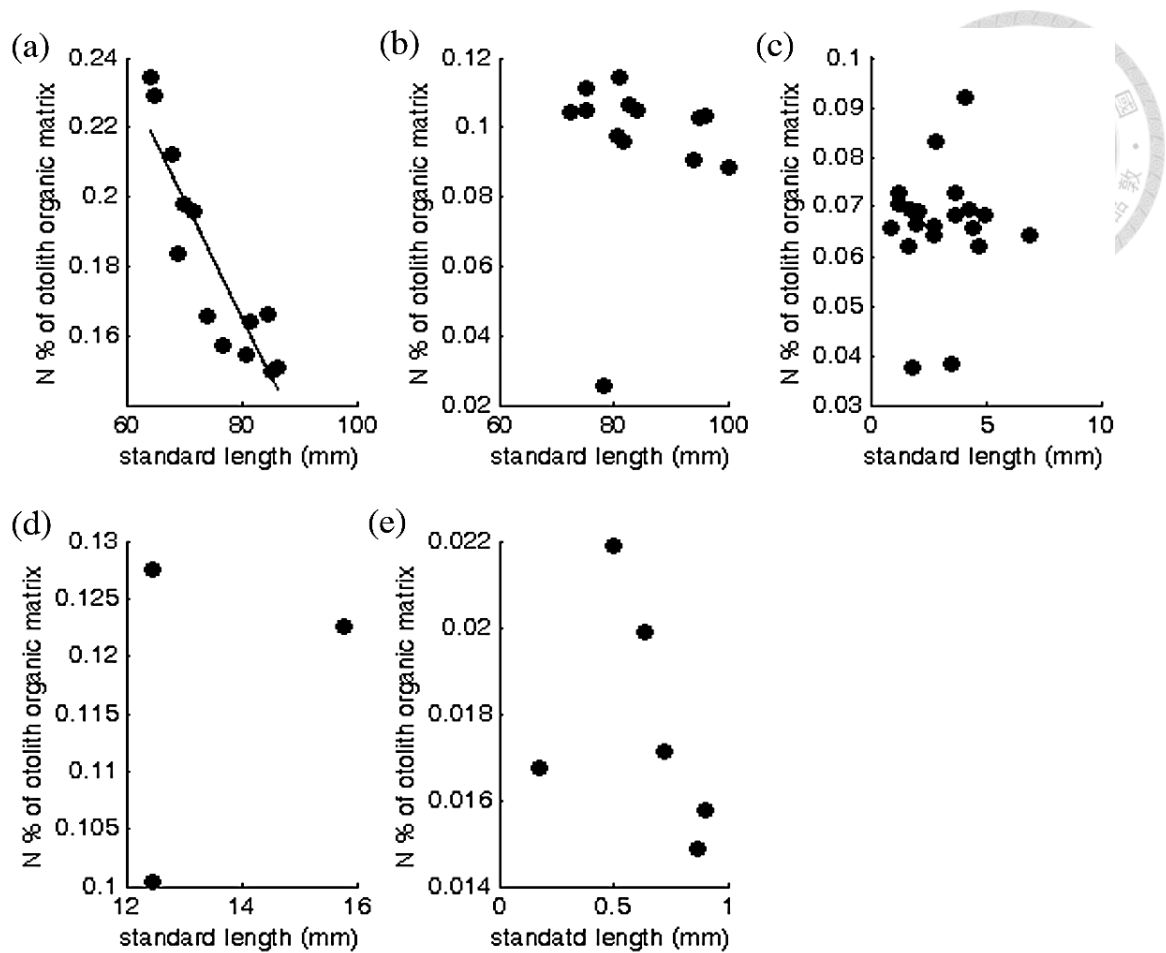


圖 24、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其耳石氮含量(N%, WN/Wotolith %)與標準體長(standard length, mm)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal) ($y = 0.4379 - 0.0034 x$, $r = -0.9020$, $r < 0.001$)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) GF (guppy food)、(d) Tub (*Tubifex* spp.)、(e) SEP (seaweed EX pellet)。

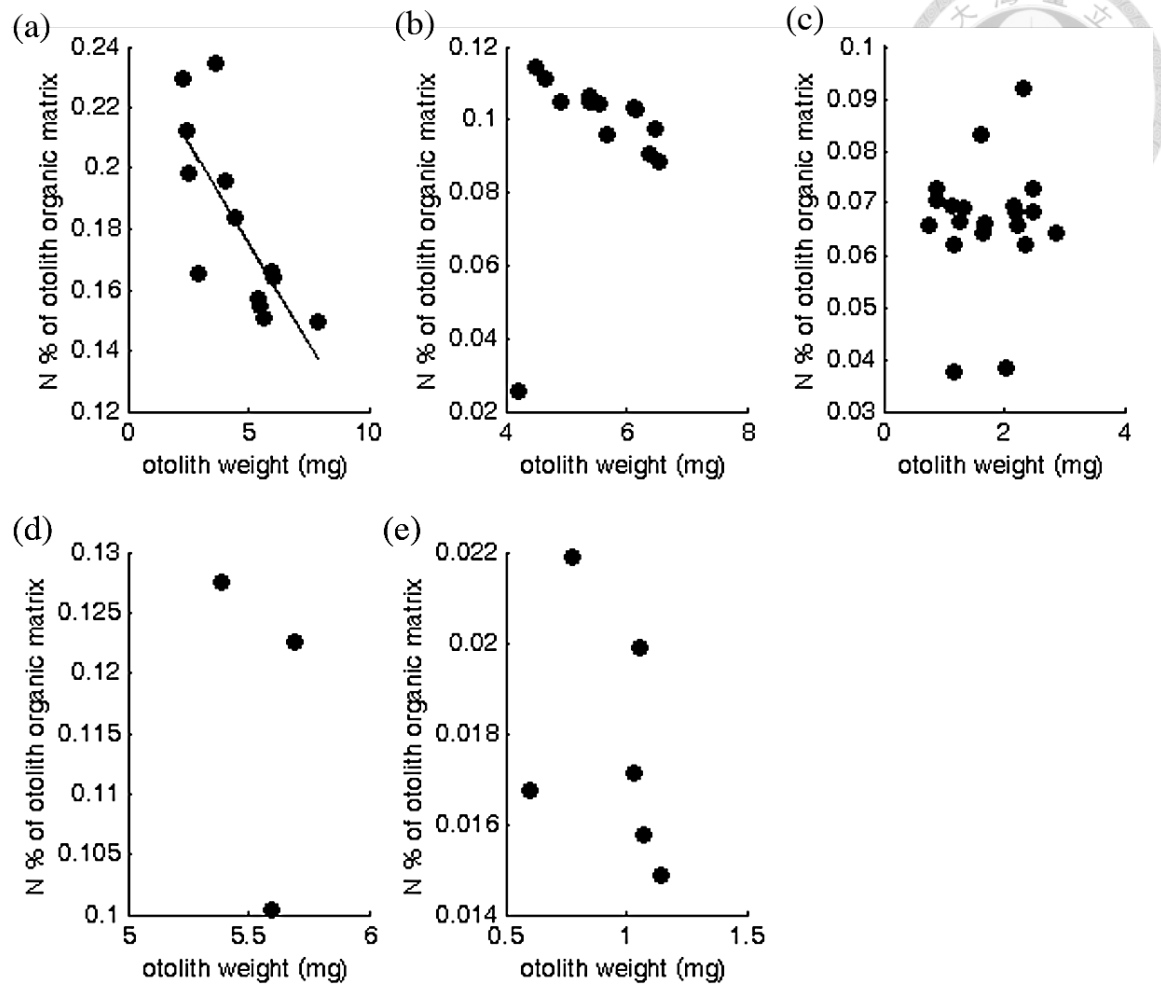


圖 25、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其耳石氮含量(N%, $W_N/W_{\text{otolith}}\%$)與耳石重量(otolith weight, mg)間的相關性。(a) EM1 & EM2 (eel meal) ($y = 0.2415 - 0.0133x$, $r = -0.7686$, $p = 0.0021$)、(b) AS (*Artemia salina*)、(c) GF (guppy food)、(d) Tub (tubifex)、(e) SEP (seaweed EX pellet)。

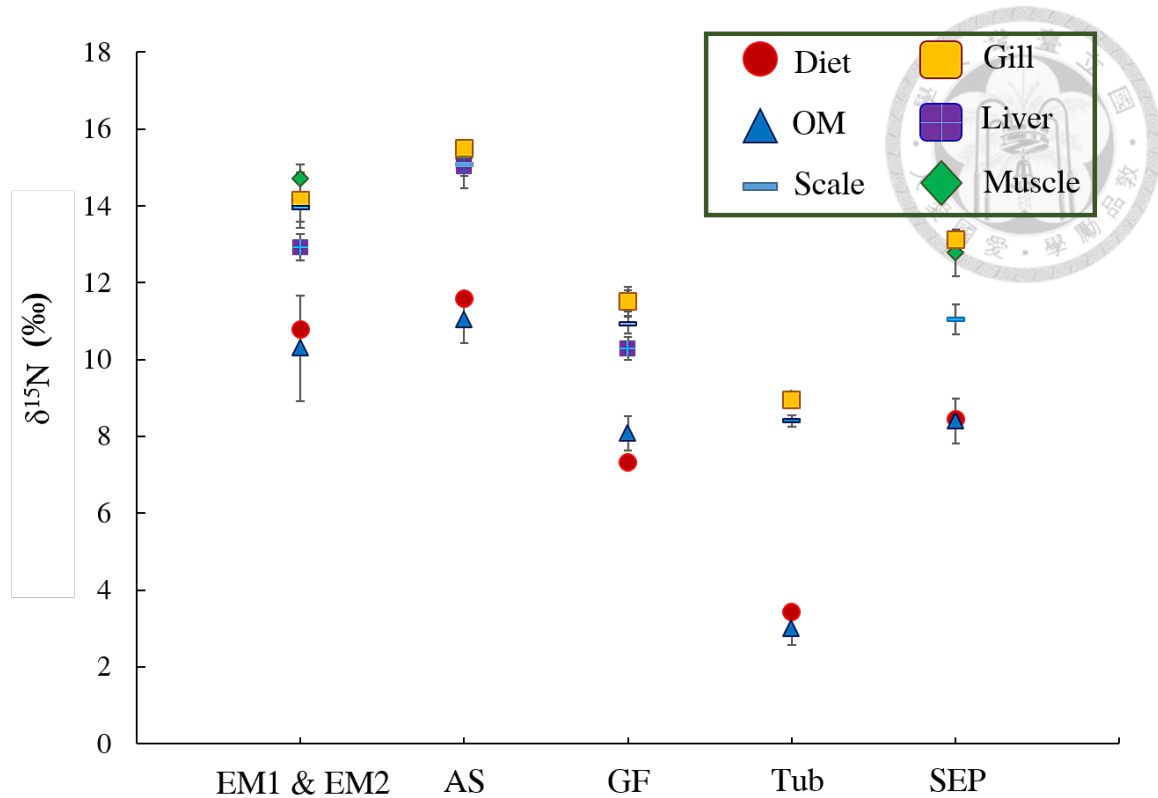
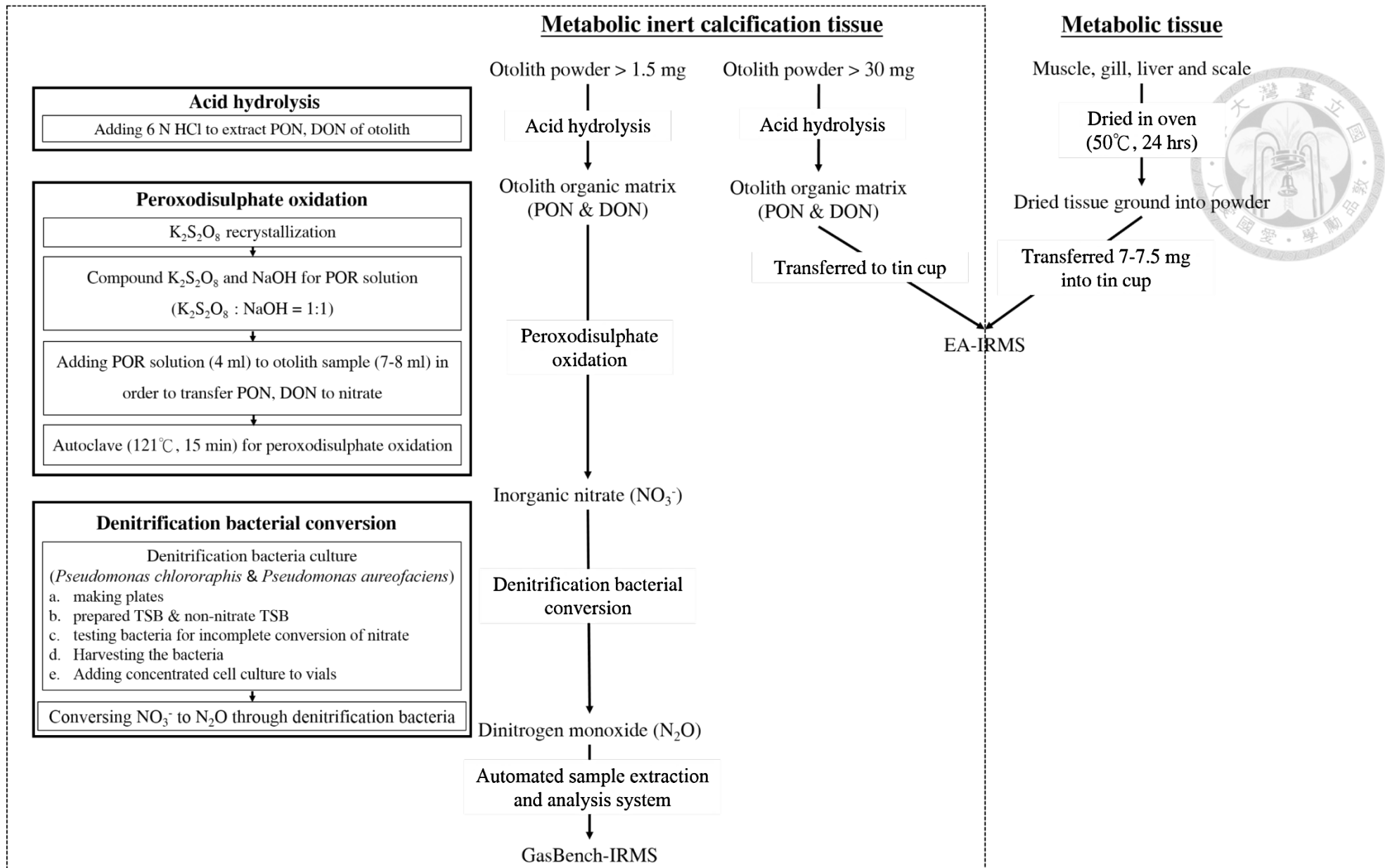


圖 26、攝食不同餌料的吳郭魚個體，其耳石有機物(OM)、肌肉(Muscle)、鰓絲(Gill)、肝臟(Liver)、鱗片(Scale)和餌料(Diet)間的穩定性氮同位素散佈圖。餌料以紅色實心圓標示，耳石有機物以藍色三角形，鰓絲以橘色方形標示，肝臟以紫色方塊標示，肌肉以綠色菱形標示，鱗片則藍色橫線標示。誤差線為各組織、耳石有機物和餌料的同位素標準偏差範圍。



附錄 一、吳郭魚耳石有機物(非代謝性組織，metabolic inert tissue)和代謝性組織(metabolic tissue)的樣本製備、穩定性同位素測定流程圖。