

以曝氣移除殘氯對藻類、草蝦受精卵和幼苗之毒性

郭錦朱* · 劉冠甫 · 許月娥 · 陳紫嫻

行政院農業委員會水產試驗所 東港生技研究中心

摘 要

本研究以氯消毒繁殖用水，藉由大量曝氣方式減少及去除水中殘氯後，清洗草蝦受精卵、培育草蝦苗和餌料生物，在此過程評估曝氣對水中殘氯去除之效果，以及殘氯對草蝦受精卵、幼苗及餌料生物培育之影響。結果顯示，以氯消毒之海水經曝氣方式處理，確可減少水中殘氯，曝氣時間與殘氯量呈顯著的線性負相關。此外，養殖水以 1.8 mg/L 的有效氯消毒，經 24 hr 的曝氣，殘氯檢測不出，且可應用於藻類培養、蝦苗清洗或繁殖上。由於各種生物對氯的忍受濃度不同，以曝氣方式減少殘氯供消毒或清洗所需時間亦有差異；對無節幼蟲期至糠蝦期的草蝦苗而言，需 24 hr 的曝氣，使殘氯量低於 0.05 mg/L，而骨藻及擬球藻則分別需 12 及 2 hr 的曝氣時間，使殘氯量各低於 0.8 及 1.5 mg/L。若以 1.8 mg/L 的有效氯直接消毒草蝦受精卵，則時間宜低於 20 min。

關鍵字：氯、毒性、草蝦、骨藻、擬球藻

前 言

草蝦是經濟效益最高的養殖蝦類之一。蝦苗品質的好壞是養殖成功與否的重要關鍵，在繁殖期間易受弧菌、病毒等感染，而發生大量死亡 (Boonyaratpalin, 1990; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990; Lightner, 1992; Brock and LeaMaster, 1992)。因此，為防治疾病，提高活存率，藥物大量被使用，常因濫用而影響蝦苗品質 (陳, 1994)。又，病原大多存於繁殖用水、母蝦及繁殖設備中，為預防疾病的發生，業者常使用紫外線、臭氧、碘、氯等消毒繁殖用水及設備，其中以氯的使用最為頻繁，高達 50% 以上 (Wilkenfeld, 1992)。氯是全球使用最普遍的消毒劑，對細菌、病毒、寄生蟲等病原具殺除效果，常用的商品有漂白粉、漂白水、二氧化氯、次氯酸等 (Schnick, 1988; Lin, 2001; Andrews *et al.*, 2002; Petrucci and Rosellini, 2005; Moreno *et al.*, 2007)，它們的共同點為溶於水產生氯，且氯在水中的衰減情形會隨溫度、鹽度及光

線等因素的不同而改變 (Wong and Davidson, 1977; Chien and Chou, 1989a,b)。唯，因其毒性甚強，一般需在無生物狀態下或經曝氣或以硫代硫酸鈉等處理去除殘氯後再使用，以確保養殖生物的安全。本研究是將繁殖用水以氯消毒，經曝氣處理後，清洗或培育草蝦受精卵、蝦苗及餌料生物，探討不同曝氣時間對殘氯量之影響，以及氯在育苗過程對草蝦幼生及餌料生物之毒性，期能建立氯在草蝦苗繁殖過程中之最適使用方法，以供繁殖業者參考應用。

材料與方法

一、材料

(一) 供試氯：

以商品名為台鎔青藍次氯酸 (ACL) 做為氯源，其為有效氯含量 90% 的白色結晶體，與水反應立即產生次氯酸。由於 0.5 ~ 1.8 mg/L 的有效氯在 2 hr 內對大腸桿菌、糞便鏈球菌、金黃色葡萄球菌、綠膿桿菌等具強殺菌力；因此，以 1.8 mg/L 的有效氯做為本研究的供試濃度。

*通訊作者 / 屏東縣東港鎮豐漁里 67 號, TEL: (08) 832-4121 ext. 270; FAX: (08) 832-0234; E-mail: jjguo@mail.tfrin.gov.tw

(二) 供試藻類：

擬球藻 (*Nannochloropsis oculata*)、骨藻 (*Skeletonema costatum*)。

(三) 供試蝦：

西南沿岸海域捕獲之母草蝦生產之受精卵、無節幼蟲期及眼幼蟲期蝦苗。

(四) 供試海水：

鹽度 33 ± 1 ppt, pH 8.0 ± 0.5 , 溫度 30 ± 1 °C。

二、方法

(一) 氯的測定

以 DPD 色析法 (DPD colorimetric method) 測定氯濃度 (APHA, 1998)。原理是利用 DPD (N,N-diethyl-phenylenediamine) 為指示劑, 和氯作用產生桃紅色, 再用分光光度計, 在波長 515 nm 測吸光值, 求出氯濃度與吸光值間的標準曲線, 作為氯濃度測定標準。

(二) 曝氣對殘氯量的影響

以 1.8 mg/L 的有效氯消毒海水後, 進行不同時間的曝氣; 曝氣量以自底部打出大量水花, 但不使溶液噴出容器外為原則。在曝氣時間到達時, 以分光光度計測定殘氯量, 並分析曝氣時間與殘氯量的關係。

(三) 氯對草蝦受精卵的毒性

草蝦受精卵在產下約 1.5 hr (即 16 細胞期) 時, 以吸管定量取三次, 置於 50 ml 的燒杯, 添加有效氯至 1.8 mg/L, 分別浸浴 1、5、10、15、20 及 25 min, 於消毒時間終止時, 快速移除氯溶液, 並加過濾海水清洗三次, 再將卵移至含清潔海水的 600 ml 燒杯中, 在培養箱孵育, 溫度為 30 ± 1 °C, 隔日觀察孵化率。各組均三重覆, 並以過濾海水取代氯消毒海水進行上述操作做為對照組。

(四) 殘氯對眼幼蟲期草蝦苗的毒性

將 6 組海水以 1.8 mg/L 的有效氯消毒後, 分別曝氣 0、2、4、9、16 及 24 hr 後, 放入眼幼蟲

期蝦苗, 在培養箱培育, 溫度為 30 ± 1 °C, 每組三重覆。試驗期間打氣, 浸浴 4 及 21 hr, 分別記錄各組蝦苗之活存率, 並觀察蝦體的游動能力, 以評估其活力。

(五) 氯消毒海水培育草蝦苗的可行性

由上述殘氯對眼幼蟲期草蝦苗的毒性試驗, 得到去除殘氯的最適曝氣時間。以此法處理繁殖用水, 並測定水中的總生菌數 (Atlas, 1995)。然後將孵化約一天的無節幼蟲期蝦苗放入, 或將蝦苗以氯消毒水清洗後, 移至過濾海水培育; 另以過濾海水直接培育蝦苗為對照組。各處理三重覆。在 0.5 ton 的 FRP 桶培育, 溫度維持 30 ± 1 °C。在無節幼蟲期末期, 每天投餵骨藻, 至糠蝦期幼蟲時加餵輪蟲 (廖, 1983)。試驗期間打氣, 不換水, 分別記錄眼幼蟲期及糠蝦期蝦苗之活存與變態情形。

(六) 氯對擬球藻的毒性

將 6 組海水以 1.8 mg/L 的有效氯消毒後, 分別曝氣 0、1、2、4、6 及 24 hr, 再加入尿素、硫氨、過磷酸鈣等肥料及適量的擬球藻, 置入 1 L 的扁形玻璃瓶, 放在 2 支 40W 的日光燈前 10 cm 處培養, 採 12L/12D 光照, 打氣。另以滅菌海水取代氯消毒海水為對照組。觀測與記錄試驗前後藻類之增長情形, 並依公式 $K = \ln(N_t/N_0)/t$, 計算各組的增殖率; 在公式中, K 值是增殖率, N_t 為經 t 天培養後藻類的細胞數, N_0 為起始藻類細胞數 (蘇等, 1990; 蘇, 1999)。接著以變方分析統計, 比較不同的曝氣時間及殘氯量對藻類增長的影響。

(七) 氯對骨藻的毒性

將 7 組海水以 1.8 mg/L 的有效氯消毒後, 分別曝氣 4、6、8、12、16、20 及 24 hr, 再加入培養液 I、矽酸鈉等肥料及適量的骨藻, 置於 1L 的扁形玻璃瓶中, 培養與分析方法皆和前述的擬球藻同 (蘇等, 1990; 蘇, 1999)。

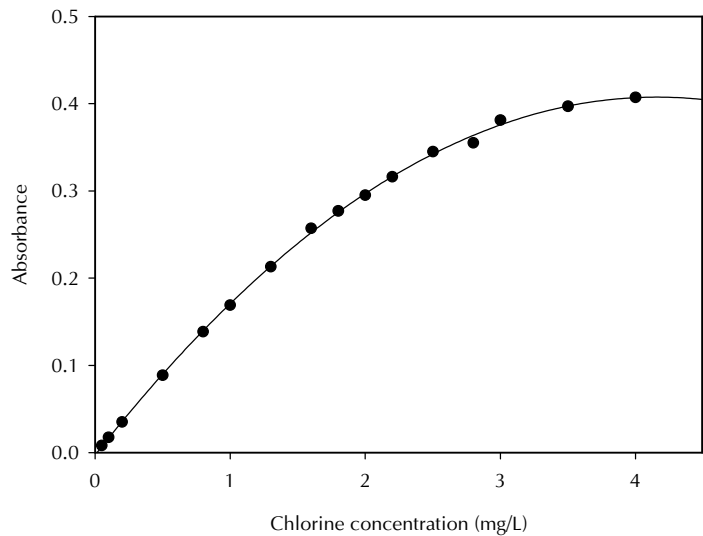


Fig. 1 Standard curve for chlorine determination by DPD colorimetric method.

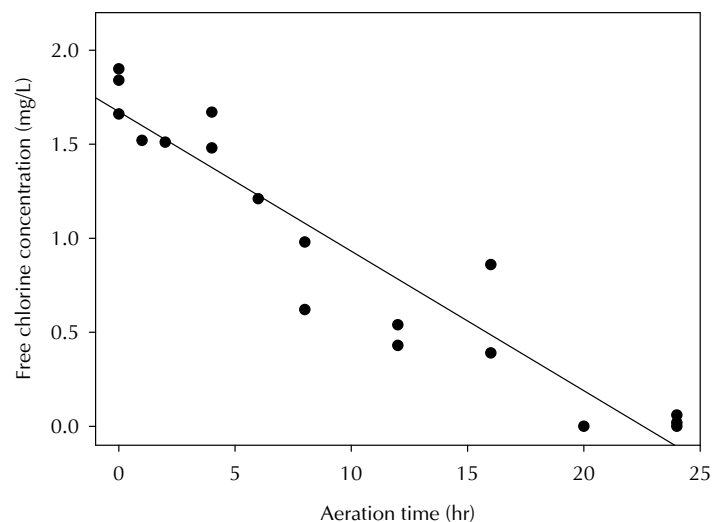


Fig. 2 Relationship between aeration time and chlorine concentration.

結果與討論

一、氯的測定

由 DPD 色析法測定氯濃度的標準曲線，如 Fig. 1 所示。此法測定之氯型態有四種，即自由氯、一氯氨、二氯氨及三氯氨，氯衍生物產生的種類與量受水質的影響至鉅。在本試驗中，經砂層過濾的海水，氨氮、亞硝酸氮及有機質含量皆很低，氯存於水中以自由氯的型態最多，其餘三種皆很微量，因此，氯濃度以自由氯表示；其間的相關性，經線性迴歸分析，氯濃度與吸光值間呈正相關之二次迴歸模式， $Y = -0.0029 + 0.1974X - 0.0237X^2$ ， r^2 為 1.0 (Fig. 1)，檢測範圍由 0.05 mg/L 至 4 mg/L (APHA, 1998)。

二、曝氣對殘氯量的影響

本研究之目的是以大量曝氣方式去除殘氯，然曝氣量會隨水量變化，不易定量，因此，以固定的方式曝氣，分析不同曝氣時間與殘氯量的關係，做為進行其他試驗之基礎。由 Fig. 2 可知，曝氣時間與殘氯濃度的關係，呈直線負相關， $Y = 1.67291 - 0.07416X$ ， r^2 為 0.9 (Fig. 2)，即殘氯量隨曝氣時間的增加而漸減；以 1.8 mg/L 有效氯消毒海水，經 24 hr 的曝氣則可完全去除殘氯，提供蝦苗培育或清洗之用。依據 Chien and Chou (1989a, b) 的報告顯示，氯在海水中的濃度會隨溫度、鹽度或氯起始濃度的增加而加速衰減；對虱目魚苗的毒性，在不同環境下亦有差異。Hua *et al.* (1999) 也發現氯在淡水的衰減速率同樣地隨水溫或氯起始

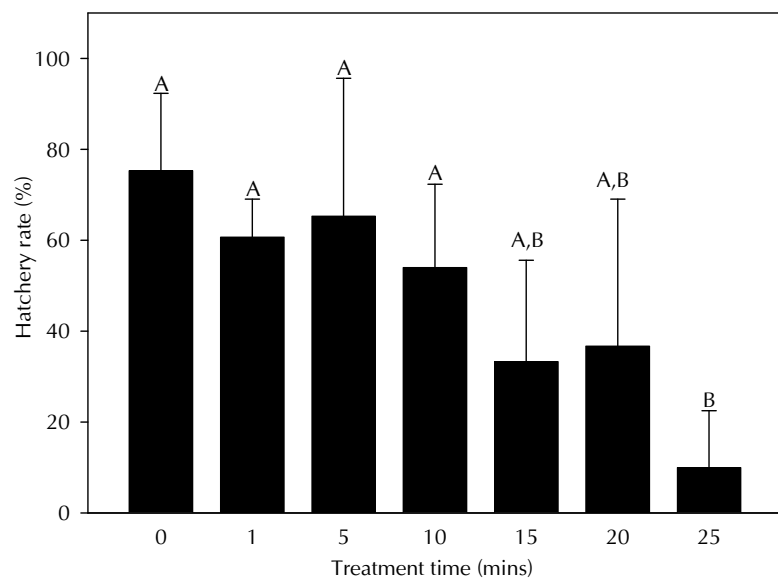


Fig. 3 Hatching rate of *Penaeus monodon* eggs exposed to 1.8 mg/L available chlorine at various duration (Different letters indicate significant difference, $p < 0.05$).

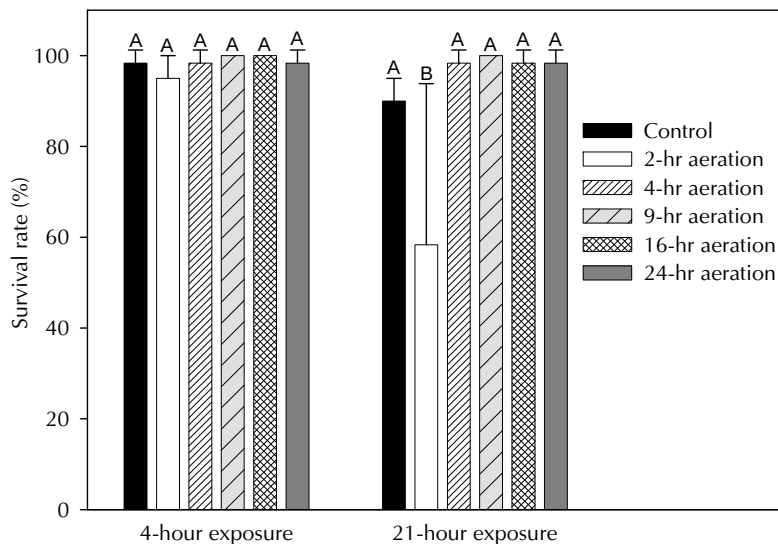


Fig. 4 Survival rate of *Penaeus monodon* zoea reared in chlorinated seawater pretreated with various aeration time (Different letters indicate significant difference, $p < 0.05$).

濃度的增加而快速衰減，且氯在新鮮淡水衰減的速率比再次氯化處理的淡水快。總之，氯在水中為極端複雜又不穩定的元素，易因環境的變遷而以不同型態衰減；因此，以氯為消毒劑，在去除殘氯方面，曝氣可謂最佳的物理方法，若再配合加溫或提高鹽度等處理，效果更顯著，值得進一步研討。

三、氯對草蝦受精卵的毒性

草蝦受精卵以 1.8 mg/L 的有效氯消毒，處理時間與孵化率的關係，如 Fig. 3 所示，藥浴時間越長，孵化率越差。以鄧肯氏變方分析，發現 25 min

處理組，孵化率和對照組具差異 ($P < 0.05$)，因此，安全的消毒時間在 20 分鐘以內。另外，消毒蝦卵宜於卵外膜形成後進行，因該時的蝦卵對化學藥品的防禦能力強，較不易受到傷害。

四、殘氯對眼幼蟲期草蝦苗的毒性

為確保養殖生物的安全，考量氯在海水中的化學變化與生物對氯及其衍生物的忍受度，應用前，需瞭解曝氣時間與殘氯對蝦苗培育的影響。結果示如 Fig. 4，繁殖水以 1.8 mg/L 的有效氯消毒，僅曝氣 2 hr 且浸浴 21 hr 組，蝦苗活存率較差，與其他處理組具差異 ($P < 0.05$)。若觀察蝦體的游

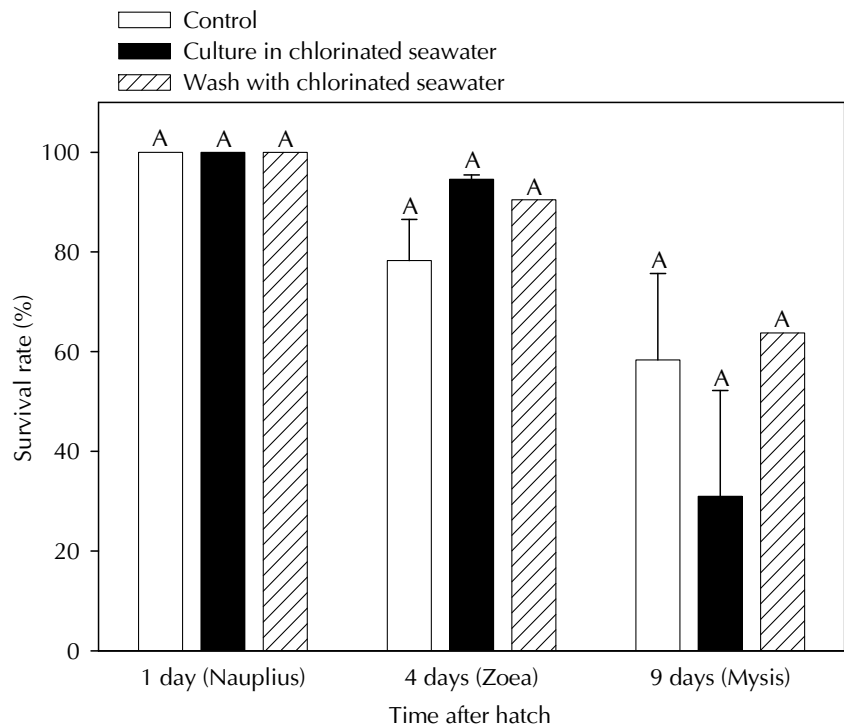


Fig. 5 Survival rate of *Penaeus monodon* nauplii reared in or washed by chlorinated seawater pretreated with 24-hour aeration (Same letters indicate no significant difference, $p>0.05$).

動力，則發現曝氣 2、4、9 hr 組，於 4 hr 已呈活力較差現象；而曝氣 16 hr 組，僅蝦苗經 21 hr 浸浴者稍有不佳；曝氣 24 hr 組與對照組則相同，蝦的游動力一直很好。綜上可知，氯對眼幼蟲期蝦苗的毒性高，氯消毒海水曝氣 16 hr，水中殘氯量約 0.5 mg/L，對蝦苗仍具不良影響。所以，欲利用 1.8 mg/L 有效氯消毒海水供眼幼蟲期草蝦苗培育用，需先曝氣 24 hr，使氯含量低於 0.05 mg/L。Bamber and Seaby (2004) 曾進行殘氯對蝦苗之毒性研究，結果發現剛孵化 2 ~ 3 天的 *Crangon crangon* 幼蝦對殘氯的忍受度為 0.4 mg/L，而孵化 2 ~ 4 天的龍蝦 (*Homarus gammarus*) 幼苗對殘氯的忍受度高達 1 mg/L；此外，Husnah and Lin (2002) 亦曾探討氯對 0.02、2.75、8.47 及 23.65 g 草蝦之急性毒，建立的 24 hr 半致死濃度分別為 0.91、1.39、1.74 及 1.98 mg/L，其中，大小為 0.02 g 者為後期幼蟲第 20 天 (P20) 的蝦苗；若以 48 hr 半致死濃度的 0.1 倍推估安全濃度 (APHA, 1989; Renwick, 1995)，則後期幼蟲期草蝦苗對氯的忍受度低於 0.09 mg/L。若與本研究結果比較，則殘氯對蝦類之毒性具種間差異，對同種生物之毒性則與個體大小成反比。

五、氯消毒海水培育草蝦苗的應用

由前述結果已確知，以 1.8 mg/L 有效氯消毒繁殖用水，在曝氣 24 hr 後，不會影響眼幼蟲期蝦苗的活存與游動力，殘氯量亦低至檢測不出，且經總生菌數的測定，氯消毒海水為無菌狀態。因此，利用此法消毒繁殖用水，培育無節幼蟲期蝦苗至糠蝦期，由活存率與變態率的變化來探討氯消毒海水對蝦苗之慢性毒。結果顯示，以氯消毒海水培育或清洗無節幼蟲期蝦苗，其眼幼蟲期與糠蝦期的活存率 (Fig. 5) 和變態率 (Fig. 6)，與對照組並無差異。換言之，以 1.8 mg/L 的有效氯消毒繁殖用水，經 24 hr 的曝氣，殘氯低於 0.05 mg/L 時，對草蝦苗不具毒性。

六、氯對擬球藻及骨藻的毒性

由 Fig. 7 可知，以氯消毒之海水培養擬球藻，結果僅未曝氣及曝氣 1 hr 組之增殖率與對照組有顯著差異 ($P < 0.01$)，其餘各組則無不同；亦即以 1.8 mg/L 有效氯消毒海水，再經 2 hr 以上的曝氣，使殘氯量降至 1.5 mg/L 以下，對擬球藻即不具毒性。骨藻以氯消毒海水培養，曝氣 4、

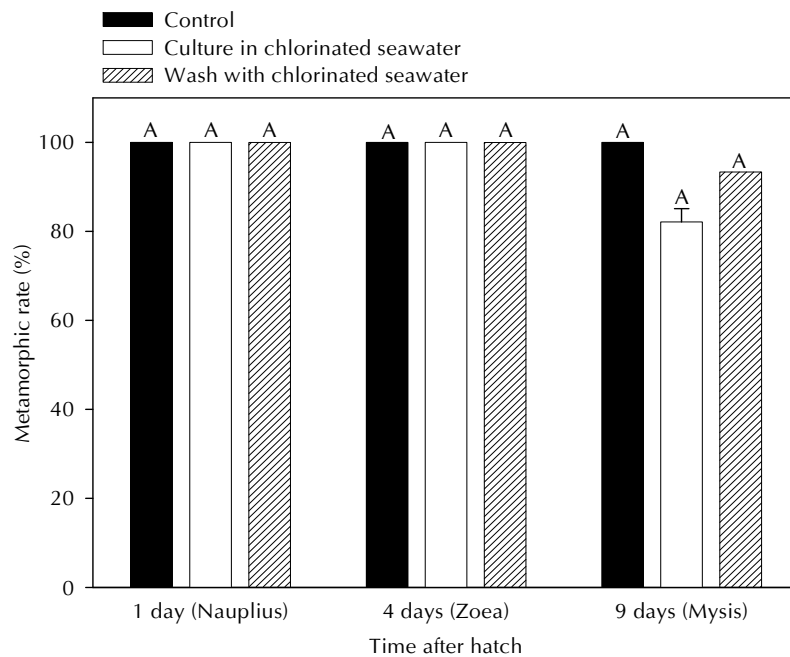


Fig. 6 Metamorphic rate of *Penaeus monodon* nauplii reared in or washed by chlorinated seawater pretreated with 24-hour aeration (Same letters indicate no significant difference, $p > 0.05$).

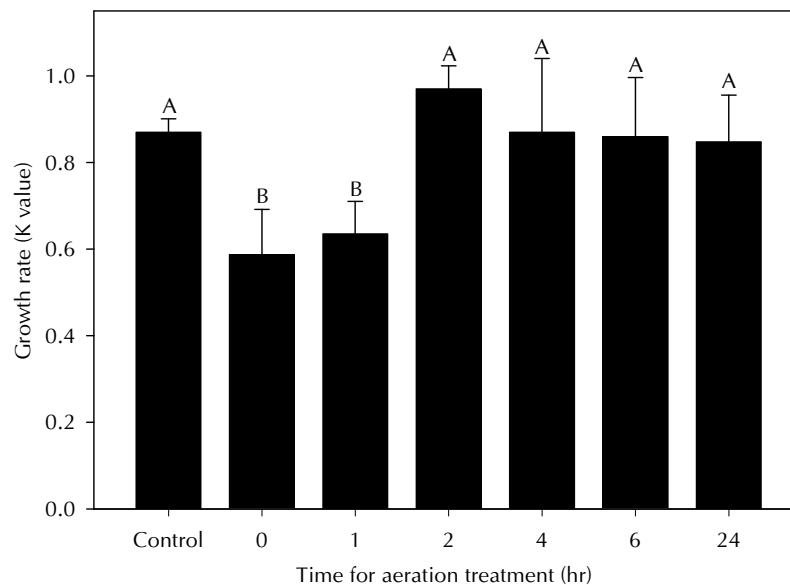


Fig. 7 Propagation of *Nannochloropsis oculata* cultured in chlorinated seawater pretreated with various aeration time (Different letters indicate significant difference, $p < 0.01$).

6 及 8 hr 組的增殖率與其餘各組有顯著差異 ($P < 0.01$)，即以 1.8 mg/L 的有效氯消毒培育水，需先曝氣 12 hr，使殘氯量低於 0.8 mg/L，方可培養骨藻 (Fig. 8)。劉等 (2002) 探討氯對新月菱型藻 (*Nitzschia clostrium*)、球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*)、湛江等鞭金藻 (*Isochrysis*

zhanjiangensis)、扁藻 (*Platymonas* sp.) 等四種單胞藻增殖之影響，結果發現，1 mg/L 以上的有效氯對藻類之增殖已具抑制作用，其耐受順序分別為等鞭金藻 > 扁藻 > 新月菱型藻。若與本試驗結果比較，則擬球藻對氯的忍受度最強，骨藻則介於等鞭金藻與扁藻之間。

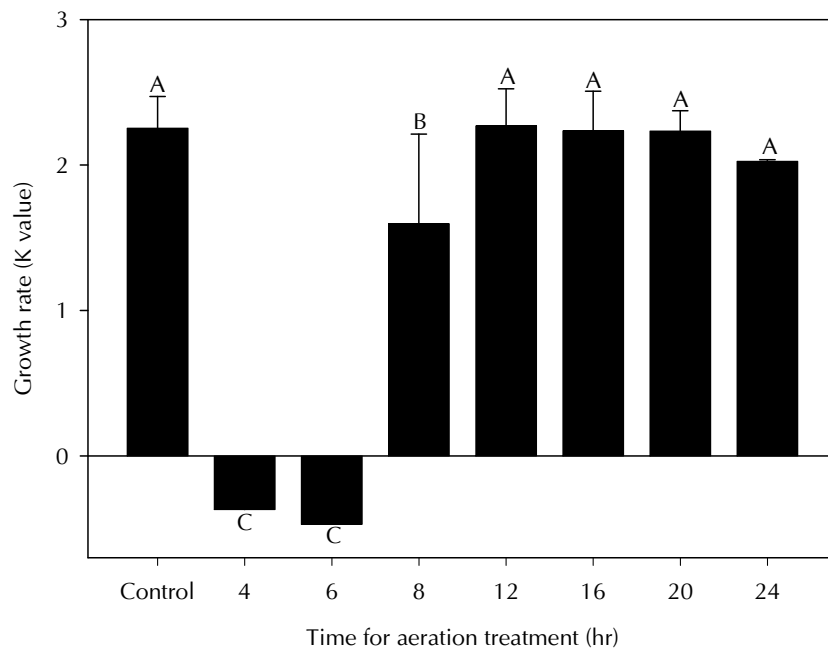


Fig. 8 Propagation of *Skeletonema costatum* cultured in chlorinated seawater pretreated with various aeration time (Different letters indicate significant difference, $p < 0.01$).

結 論

曝氣確可去除氯消毒海水中之殘氯，曝氣時間與殘氯量呈線性負相關；海水以 1.8 mg/L 有效氯消毒，經 24 hr 的大量曝氣處理，殘氯會低於 0.05 mg/L。且經曝氣處理的氯消毒海水，可用來培養藻類、清洗或培育蝦苗。又，各種生物對殘氯的忍受度具種間差異，因此，利用曝氣去除殘氯所需的時間不同。此外，要以 1.8 mg/L 的有效氯消毒海水培育草蝦苗，曝氣時間需高於 24 hr，使殘氯量低於 0.05 mg/L；而應用於骨藻及擬球藻之培育，則分別需高於 12 及 2 hr 的曝氣時間，即殘氯量各低於 0.8 及 1.5 mg/L。若要以有效氯 1.8 mg/L 直接消毒草蝦受精卵，則時間宜低於 20 分鐘，以免對蝦卵造成毒害。

參考文獻

- 陳秀男 (1994) 蝦病之管理對策. 農委會漁業特刊第 49 號, 行政院農業委員會編印, 9-47.
- 劉青、王玉善、趙文 (2002) 有效氯對 4 種單胞藻種群增長的影響. 大連水產學院學報, 17(2): 120-125.
- 蘇惠美 (1999) 餌料生物之培養與利用. 台灣省水產試驗所編印, 43-57.

蘇惠美, 雷淇祥, 廖一久 (1990) 溫度、光照度及鹽度對骨藻生長速率之影響. 台灣水產學會刊, 17(3): 213-222.

廖一久 (1983) 草蝦專輯. 台灣省水產試驗所編印, 6-16.

American Public Health Association (1989) Standard methods for the examination of water and wastewater. 17th ed., American Public Health Association, Washington, D.C., 8-4.

American Public Health Association (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed., American Public Health Association, Washington, D.C., 4-63-4-64.

Andrews, L. S., A. M. Key, R. L. Martin, R. Grodner and D. L. Park (2002) Chlorine dioxide wash of shrimp and crawfish an alternative to aqueous chlorine. Food Microbiol., 19: 261-267.

Atlas, R. M. (1995) Principles of microbiology. Mosby-Year Book, St. Louis, Missouri, 59-62.

Bamber, R. N. and R. M. H. Seaby (2004) The effects of power station entrainment passage on three species of marine planktonic crustacean, *Acartia tonsa* (Copepoda), *Crangon crangon* (Decapoda) and *Homarus gammarus* (Decapoda). Marine Environmental Research, 57(4): 281-294.

Boonyaratpalin, S. (1990) Shrimp larval diseases. In Technical and Economic Aspects of Shrimp Farming: Proceedings of the Aquatech '90

- Conference (M. B. New and H. de Saramand T. Singh eds.), Kuala Lumpur, Malaysia, 158-167.
- Brock, J. A. and B. LeaMaster (1992) A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. *In* 1992 Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming (J. Wyban ed.), World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA USA, 212-226.
- Chien, Y. H. and Y. H. Chou (1989a) Combined effects of temperature and salinity on chlorine decay in sea water--A modeling approach. *ACTA Oceanographica Taiwanica*, 22: 33-42.
- Chien, Y. H. and Y. H. Chou (1989b) The effects of residual chlorine, temperature and salinities on the mortality of larval milkfish *Chanos chanos*. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 16(4): 271-280.
- Hua, F., J. R. West, R. A. Barker and C. F. Forster (1999) Modelling of chlorine decay in municipal water supplies. *Water research*, 33(12): 2735-2746.
- Husnah and C. K. Lin. (2002) Toxicity of chlorine to different sizes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in low-salinity shrimp pond water. *Aquaculture research*, 33(14): 1129-1135.
- Lavilla-Pitogo, C. R., M. C. L. Baticados, E. R. Cruz-Lacierda and L. D. de la Pena (1990) Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 91: 1-13.
- Lightner, D. V. (1992) Shrimp virus diseases: diagnosis, distribution and management. *In* 1992 Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming (J. Wyban ed.), World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA USA, 238-253.
- Lin, C. K. (2001) Chlorine demand and bacteria of low salinity shrimp pond sediment treated with different chlorine doses. *Aquacult. Eng.*, 25: 165-174.
- Moreno, Y., P. Piqueres, J. L. Alonso, A. Jimenez, A. Gonzalez and M. A. Ferrus (2007) Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Res.*, 41: 3490-3496.
- Petrucchi, G. and M. Rosellini (2005) Chlorine dioxide in seawater for fouling control and post-disinfection in potable waterworks. *Desalination*, 182: 283-291.
- Renwick, A. G. (1995) The use of an additional safety or uncertainty factor for nature of toxicity in the estimation of acceptable daily intake and tolerable daily intake values. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 22: 250-261.
- Schnick, R. A. (1988) The impetus to register new therapeutants for aquaculture. *Prog. Fish-Cult.*, 50: 190-196.
- Wilkenfeld, J. S. (1992) Commercial hatchery status report: An industry panel viewpoint. *In* 1992 Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming (J. Wyban ed.), World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA USA, 71-86.
- Wong, G. T. F. and J. A. Davidson (1977) The fate of chlorine in sea-water. *Water Res.*, 14: 1263-1268.

Using Aeration to Remove Toxic Effect of Chlorine Residual on Algae, Shrimp Fertilized Eggs and Larvae

Jiin-Ju Guo^{*}, Kuan-Fu Liu, Yueh-O Hsu and Tzyy-Ing Chen

Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

This study aimed to remove residual chlorine in chlorinated seawater for rearing *Penaeus monodon* larvae and algae by aeration method. The results show that chlorine can be removed gradually by aeration. The residual chlorine level is negatively correlated with the aeration time. The residual chlorine added at 1.8 mg/L available chlorine to seawater can not be detected after 24-hour aeration. Therefore, chlorinated seawater can be used for culturing algae, washing eggs and rearing larval shrimp. However, different aeration time is needed due to various tolerances of organisms to residual chlorine. The 24-hour aeration, with resulting residual chlorine level <0.05 mg/L, of chlorinated seawater is necessary for rearing *P. monodon* larvae. For culturing *Nannochloropsis oculata* and *Skeletonema costatum*, aeration for 2 hours (residual chlorine level <1.5 mg/L) and 12 hours (residual chlorine level <0.8 mg/L), respectively, is adequate. In addition, fertilized eggs of *P. monodon* disinfected with 1.8 mg/L available chlorine for less than 20 minutes does not have any negative effect on the hatching.

Key words: chlorine, toxicity, *Penaeus monodon*, *Skeletonema costatum*, *Nannochloropsis oculata*

^{*}Correspondence: Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute, Tungkang, Pingtung 928, Taiwan. TEL: (08) 832-4121 ext. 209; FAX: (08) 832-0234; E-mail: jjguo@mail.tfrin.gov.tw