

張錦宜，徐崇仁

台灣省水產試驗所 水產養殖系

(1997年6月18日接受)



氨作為養殖系統中生物濾床之制菌劑的可行性探討

摘要

本試驗分別檢測氨對水產病原菌及硝化細菌的殺滅能力，並評估利用抗生素及氨分別處理養殖水體及生物濾床的二階段防治模式，以探討氨施用於生物濾床中作為有效制菌劑之可行性。實驗結果顯示，氨對引起鰻魚潰瘍症之 *Edwardsiella tarda* 及自循環水養鰻場生物濾床中分離出之 *Nitrobacter* sp. 與 *Nitrosomonas* sp. 的殺菌能力有顯著差異，其石炭酸係數分別為 1.79、0.04 及 <0.02。於小規模的循環水系統中試驗二階段防治模式，以人工接種致使養殖環境中 *E. tarda* 大量孳生後，養殖水體以 50 mg/l chloramphenicol 藥浴 24 小時，水中總生菌數及 *E. tarda* 的數量分別減少了 84.7% 及 91.5%；另一方面，生物濾床以 140 mg/l 氨水浸泡 24 小時，水中總生菌數及 *E. tarda* 的數量則分別減少了 91.0% 及 96.4%，而經上述處理後，過濾系統之硝化效率依然不受影響。

關鍵詞：氨，制菌劑，硝化細菌

集約式循環水養殖系統中，氨-氮是各種過濾設備欲自水中去除的主要目標，因為即使是微量濃度的氨都會對養殖生物產生毒害，甚至造成死亡⁽¹⁾。一般在循環水系統中常用以去除氨-氮的生物濾床有沈浸式⁽²⁾、滴流式⁽³⁾及旋轉式⁽⁴⁾等，不論哪一種方式，其原理均是在營造一個適合硝化細菌生長的环境，並藉其旺盛的硝化作用，在養殖廢水經過生物濾床時，將水中的氨-氮及亞硝酸-氮等劇毒性含氮廢物氧化為較不具毒性的硝酸鹽-氮。養殖密度愈高，循環水系統對生物濾床的倚賴也隨之愈重。

不過集約式循環水養殖罹患疾病的風險也較高⁽⁵⁾，針對細菌性魚病的防治，傳統養殖池多半以口服抗生素方式給藥^(6,7)，而封閉性的循環水養殖系統，除了口服之外，也可將抗生素添加於水中，採直接藥浴的治療方式^(8,9)，不論採用哪一種方式給藥，總會有部份藥劑逸散至水中⁽¹⁰⁾。用以防治魚病的抗生素，不僅會殺死病原菌，也會殺死生物濾床中的硝化細菌⁽¹¹⁻¹³⁾，使系統的硝化作用效率大幅降低，繼而水體中氨-氮及亞硝酸-氮的濃度開始急劇上升，根據 Spotte⁽¹⁴⁾ 的研究指出，生物濾床之硝化作用受藥物抑制所導致的水質惡化，其傷害性遠高於病原菌對養殖魚種所造成的侵

害。為了避免藥物對硝化細菌的傷害，目前的作法是施藥期間暫時關掉過濾系統，或僅使用部份的生物濾床，俾使生物濾床在施藥後可立即恢復正常功能，但這樣的作法是否導致生物濾床孳生大量病原菌，反而成為魚病防治的死角，有關這方面的評估研究還未曾見。

氨是一種毒性物質，對所有生物均有毒性，只是不同生物對氨的耐受程度不同。Khan 及 Mishra⁽¹⁵⁾ 的研究顯示，某些種類的固氮細菌所合成的氨，對包括革蘭氏陰性及陽性的九種病原菌均有毒性，但這樣濃度的氨並不會影響固氮細菌本身的生長。由此可見，水中氨-氮的濃度過高不僅對魚有害，對病原菌一樣具有毒性。雖然氨對高等生物的毒害作用機轉已大致清楚，但相對於低等生物，奠基於細胞或分子級的毒性研究仍未完全明瞭⁽¹⁶⁾；目前的研究認為氨對細胞的傷害主要在於改變細胞內 pH 值及阻斷檸檬酸循環 (Citric acid cycle) 的中間產物。而硝化細菌與目前已知的水產病原性細菌有兩點很大的差異，其一是目前已知的水產病原菌均是異營性細菌，以有機碳為碳源，以檸檬酸循環行使基本代謝；而硝化細菌是化學自營性細菌 (Chemolithotrophic bacteria)，以 CO₂ 或無機碳為碳源，以磷酸五碳糖循環 (Pentose phosphate cycle)

行使基本代謝⁽¹⁷⁾，其代謝中間產物不會被氨抑制。再者，氨及亞硝酸本來就是硝化細菌主要的能量來源⁽¹⁸⁾，因此，利用硝化細菌與水產病原菌對氨的耐受性有明顯差異的特性，當可建立一套新的細菌性疾病防治模式。

本研究擬先測試氨對硝化細菌及水產病原菌 *Edwardsiella tarda*⁽¹⁹⁾ 的殺滅能力，再依此試驗結果模擬循環水養殖系統病原菌大量爆發後的各種處理方式，並一一評估以不同方式處理後對系統生物濾床硝化效率的影響，及水中、濾材中殘留的生菌數與病原菌數，分別比較其優缺點，以探討氨做為養殖系統中生物濾床適用之制菌劑的可行性。

材料與方法

一、模擬循環水系統

本試驗以 60×30×30 cm 的玻璃水族箱模擬養殖循環水系統。水族箱於使用前均先以70%的酒精刷洗消毒後，再以滅菌蒸餾水洗去殘留的酒精。每缸注入50公升經高溫高壓 (121°C, 15 min) 滅菌的自來水 (pH 6.8±0.3, 硬度 27±5 mg/l as CaCO₃)，水經由馬達以 18 l/min 的流速自底部抽起，流經上部沈浸式過濾器 (內裝 40×10×2 cm 的人造過濾棉) 後，重複循環使用。不再另予打氣設備，過濾棉於使用前均以高溫高壓滅菌。

二、試驗菌株

(一)、硝化細菌

本試驗所使用的硝化細菌，係依據 Watson 等人⁽²⁰⁾ 所述的方法，自台灣省水產試驗所超集約養鰻系統⁽²¹⁾ 經年運轉的沈浸式生物濾床活性污泥中分離而得。分離及增殖硝化細菌使用兩種培養基，分別是適用於培養 *Nitrosomonas* spp. 的氨氧化細菌增殖培養基 (Ammonia-oxidizing bacterial enrichment medium)：於每 1 公升淡水中添加 1.0 g (NH₄)₂SO₄，0.5 g K₂HPO₄，2.0 g NaCl，0.2 g MgSO₄·7H₂O，0.05 g FeSO₄·7H₂O，6.0 g CaCO₃；及適用於培養 *Nitrobacter* spp. 的亞硝酸氧化細菌增殖培養基 (Nitrite-oxidizing bacterial enrichment medium)：於每 1 公升淡水中添加 2.0 g NaNO₂，0.5 g NaCl，0.05 g MgSO₄·7H₂O，0.15 g CaCO₃，0.05 mg (NH₄)₆

Mo₇O₂₄·4H₂O，0.15 mg FeSO₄·7H₂O。

(二)、水產病原菌

本試驗選用造成養殖鰻潰瘍症的 *Edwardsiella tarda* 為代表病原菌⁽¹⁹⁾，菌株來源係購自菌種保存及研究中心 (Culture Collection and Research Center, CCRC)，菌株編號 CCRC 10670。

三、生物濾床的建立與硝化效率的監測

取上述相同大小的人造過濾棉 20 塊，置於 50 公升水族箱中，再注入 25 公升氨氧化細菌增殖培養基及 25 公升亞硝酸氧化細菌增殖培養基。前述於平板培養基上純化之 *Nitrosomonas* sp. 及 *Nitrobacter* sp. 採用階段式增殖法依序於 100 ml 及 1000 ml 的液體培養基中增殖四星期後，再一起倒入上述水族箱裡。水族箱使用 1/16 馬力的蠕動幫浦充分給予曝氣，打氣管並裝置 0.2 μm 的過濾膜以隔絕可能的污染，整個增殖系統放置於黑暗中，恆溫 26°C，連續培養八週。

八週後將過濾棉取出，置於上述模擬循環水系統的沈浸式過濾器內。於 50 公升自來水中添加 0.5 ml 氨水 (純度 28%，Nacalai Tesque Inc. Japan)，使系統之初始總氨濃度約為 2.7 mg/l；另對照組則以一全新滅菌之人造過濾棉為濾材。每隔一天自系統採水並以 Spectroquant test kit 及 Spectrophotometer SQ118 (Merck, Germany) 檢測水中總氨、亞硝酸及硝酸的濃度變化，以確定生物濾床是否建立，同時監測不同濾棉的硝化效率是否均已達穩定平衡。

四、氨對硝化細菌及 *E. tarda* 的殺菌能力比較

依據 AOAC (Association of Official Analytical Chemists) 評估消毒劑效價的石炭酸係數法 (phenol-coefficient method)⁽²²⁻²⁴⁾，來比較氨對不同細菌的殺滅能力。先將氨及石炭酸各自於試管中調配出一系列依濃度連續稀釋的溶液，每管 5 ml，然後將培養 24 小時的 *Nitrosomonas* sp.、*Nitrobacter* sp. 及 *E. tarda* 菌液各 0.5 ml 滴入每一試管中，充分混合均勻，於 26°C 培養 5 及 10 分鐘後立即從試管中以接種環 (Loop transfer needle) 將菌轉植入另一只含適當培養基溶液的試管中，持續培養 1 個月，觀察並記錄轉植後的細菌是否存活，四重複試驗。以處理 10 分鐘能殺死但 5 分鐘尚不足以殺死供試菌株的消毒劑濃度

為最高有效稀釋濃度，將氨之最高有效稀釋濃度除以石炭酸之最高有效稀釋濃度即為氨對該供試菌株的石炭酸係數。

五、氨的最適選別性殺菌濃度

模擬現場使用狀況，以 24 小時為藥浴時程。將 *E. tarda*、*Nitrobacter* sp. 及 *Nitrosomonas* sp. 分別以滅菌生理食鹽水調整為 3×10^8 CFU/ml 菌液；各取 10 ml，添加氨水於試管中，使氨的濃度成一梯度變化，分別為 2800 mg/l、1400 mg/l、280 mg/l、140 mg/l、28 mg/l 及 14 mg/l。24 小時後，以接種環將菌液轉植入另一只含適當培養基溶液的試管中，持續培養 1 個月，觀察並記錄轉植後的細菌是否存活，四重複試驗。

六、模擬養殖環境病原菌的大量爆發及處理方式

模擬養殖環境病原菌大量爆發的方法，係將 *E. tarda* CCRC10670 以滅菌生理食鹽水調整成 $2.3 \pm 0.2 \times 10^8$ CFU/ml 的菌液，並於 50 公升之模擬循環水系統的四個角落各注入 20 ml 菌液，開啓過濾系統，使細菌自然分佈於濾床及水體中。針對病原菌大量爆發的模擬循環水系統，本實驗分別使用四種處理方式，處理方式 A 是將養殖水體以 50 mg/l chloramphenicol 藥浴 24 小時，過濾系統停機、殘留水排乾 24 小時；處理方式 B 是將養殖水體以 50 mg/l chloramphenicol 藥浴 24 小時，過濾系統停機、止水靜置 24 小時；處理方式 C 是將全系統以 50 mg/l chloramphenicol 藥浴 24 小時；處理方式 D 是將養殖水體以 50 mg/l chloramphenicol 藥浴 24 小時，過濾系統以 140 mg/l NH_4OH 浸泡 24 小時。四種不同處理方式之效益評估分兩方面進行：

(一)、對病原菌的影響

處理前後水體及過濾系統中總生菌數及 *E. tarda* 菌數的測定，係依據 Standard Method for The Examination of Water and Wastewater⁽²⁵⁾ 所採用的平板塗佈法 (Spread plate method)。水體部份於試驗缸中逢機採水 50 ml，以連續稀釋的方法計算每毫升水中菌落生成數 (CFU/ml)；過濾系統部份則逢機擷取 1 cm^3 大小之濾材，稱量溼重後，於 50 ml 滅菌生理食鹽水中以 Vortex (Scientific Industries, Inc.) 劇烈震盪 5 分鐘後，計算懸浮於生理食鹽水中的細菌量，再

換算每公克濾材中菌落生成數 (CFU/g) 表示之。檢測總生菌數時使用 Tryptic soy agar (以下簡稱 TSA 培養基, Difco) 為培養基，檢測 *E. tarda* 菌數時則使用 Rimler-Shotts^(26, 27) 培養基 (以下簡稱 R-S 培養基)。

(二)、對生物濾床的影響

處理前後對生物濾床的影響係以硝化效率為指標。硝化效率的監測與前述方法一樣，四種方式處理完畢後先將全系統的水排乾，注入新水，並添加 0.5 ml 氨水，使系統之初始總氨濃度約為 2.7 mg/l，每隔一天採水檢測水中總氨、亞硝酸及硝酸的濃度變化，以比較不同處理方式對生物濾床硝化效率的影響。

結果

一、模擬循環水系統之硝化效率

模擬養殖系統中過濾系統的硝化效率如 Table 1 所示，試驗組使用附著硝化細菌之過濾棉為濾材，系統於添加 0.5 ml 氨水後總氨的初始濃度為 2.72 ± 0.08 mg/l，在 10 天內持續下降到 0.1 mg/l 以下；亞硝酸在系統的初始濃度為 0.62 ± 0.05 mg/l，隨後因硝化細菌之氨氧化細菌作用而使其濃度持續上升，至第 5 天時達到 3.85 ± 0.18 mg/l，之後再經硝化細菌之亞硝酸氧化細菌作用而使其濃度持續下降，至第 10 天時下降到 0.01 ± 0.01 mg/l；系統中硝酸的濃度則由最初的 0.12 ± 0.08 mg/l 持續增加，尤其自第 5 天起增加速率更快，到第 10 天時達 4.58 ± 0.50 mg/l。對照組使用全新且經滅菌之過濾棉為濾材，系統於添加 0.5 ml 氨水後總氨、亞硝酸及硝酸的初始濃度依序為 2.78 ± 0.04 、 0.00 ± 0.00 及 0.08 ± 0.04 mg/l，經循環過濾 10 天後仍無顯著變化。

二、氨對硝化細菌及 *E. tarda* 的殺菌能力比較

石炭酸及氨對 *E. tarda* (CCRC 10670)、*Nitrobacter* sp. 及 *Nitrosomonas* sp. 的殺滅能力如 Table 2 所示；石炭酸對 *E. tarda*、*Nitrobacter* sp. 及 *Nitrosomonas* sp. 的最高有效稀釋濃度 (即處理 5 分鐘尚不足以殺死但 10 分鐘能殺死供試菌株的消毒劑稀釋濃度) 分別為 1:200、1:125 及 1:200，而氨對 *E. tarda*、*Nitrobacter* sp. 及 *Nitrosomonas* sp. 的最高有效稀釋濃度則分別為 1:357、1:5 及 $< 1:3.57$ (使

用純度 28% 之試藥級氨水處理 10 分鐘仍無法殺死 *Nitrosomonas* sp.)，因此氨對 *E. tarda*、*Nitrobacter* sp. 及 *Nitrosomonas* sp. 之石炭酸係數分別為 1.79、0.04 及 < 0.02。

Table 1. Daily variation of ammonia, nitrite and nitrate concentration in aquaria for filtrant with/without nitrifying bacteria inoculation.

Treatment of filtrant	Days				
	1	3	5	7	10
Nitrifying bact. inoculated*					
NH ₄ ⁺ (mg/l)	2.72±0.08	1.68±0.17	0.52±0.10	0.10±0.06	0.02±0.04
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0.62±0.05	1.86±0.09	3.85±0.18	1.32±0.05	0.01±0.01
NO ₃ ⁻ (mg/l)	0.12±0.08	0.43±0.12	1.77±0.23	2.93±0.51	4.58±0.50
None [†]					
NH ₄ ⁺ (mg/l)	2.78±0.04	2.77±0.05	2.75±0.05	2.73±0.05	2.72±0.04
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.00
NO ₃ ⁻ (mg/l)	0.08±0.04	0.08±0.04	0.10±0.06	0.12±0.04	0.15±0.05

* N=12

† N=3

Table 2. Results obtained in the phenol-coefficient method for testing bactericidal effect of ammonia by *Edwardsiella tarda*, *Nitrobacter* sp. and *Nitrosomonas* sp. (n=4).

Chemical	Dilution	<i>E. tarda</i>	<i>Nitrobacter</i> sp.	<i>Nitrosomonas</i> sp.
		5 min/10 min	5 min/10 min	5 min/10 min
	1 : 3.57	- / *	- / -	+ / +
	1 : 5.00	- / -	+ / -	+ / +
	1 : 7.14	- / -	+ / +	+ / +
	1 : 179	- / -	+ / +	+ / +
	1 : 357	+ / -	+ / +	+ / +
	1 : 714	+ / +	+ / +	+ / +
	1 : 50	- / -	- / -	- / -
	1 : 100	- / -	- / -	- / -
	1 : 125	- / -	+ / -	- / -
	1 : 200	+ / -	+ / +	+ / -
	1 : 500	+ / +	+ / +	+ / +
	1 : 1000	+ / +	+ / +	+ / +
Phenol coefficient of ammonia		1.79	0.04	<0.02

* = no growth; + = growth

三、氨的最適選別性殺菌濃度

不同濃度的氨 24 小時藥浴殺菌效果如 Table 3 所示，氨濃度為 280 mg/l 及 140 mg/l 時可達成只殺死 *E. tarda* 而不殺死 *Nitrobacter* sp. 及 *Nitrosomonas* sp. 的選別性殺菌效果。考量現場使用的安全性及用藥經濟因素，選用 140 mg/l 的濃度作為後續模擬循環水系統試驗的處理方式之一。

四、以四種不同方式處理循環水系統之成效

(一) 對病原菌的影響

模擬養殖系統病原菌大量爆發，再經四種方式處理後水體及濾床中細菌數的變化如 Table 4 所示。處理方式 A 在養殖水體部份採 50 mg/l Chloramphenicol 藥浴 24 小時，結果水中總生菌數及 *E. tarda* 菌數分別減少了 87.3% 及 94.7%；在過濾系統部份採停機、殘留水排乾 24 小時，結果濾材中總生菌數及 *E. tarda* 菌數分別增加了 709.5% 及 37.5%。處理方式 B 在養殖水體部份採 50 mg/l Chloramphenicol 藥浴 24 小時，結果水中總生菌數及 *E. tarda* 菌數分別減少 81.0% 及 92.1%；在過濾系統部份採停機、止水靜置 24 小時，結果濾材中總生菌數及 *E. tarda* 菌數分別增加了 2542.9% 及 885.5%。處理方式 C 將全系統以 50 mg/l chloramphenicol 藥浴 24 小時，結果

水中總生菌數及 *E. tarda* 菌數分別減少 82.3% 及 93.9%，濾材中總生菌數及 *E. tarda* 菌數則分別減少了 87.9% 及 92.5%。處理方式 D 以 50 mg/l chloramphenicol 藥浴養殖水體 24 小時，結果水中總生菌數及 *E. tarda* 菌數分別減少 84.7% 及 91.5%，過濾系統則以 140 mg/l NH₄OH 浸泡 24 小時，濾材中總生菌數及 *E. tarda* 菌數分別減少了 91.0% 及 96.4%。

(二) 對生物濾床的影響

四種不同處理方式對模擬循環水系統之硝化效率影響如 Table 5 所示。處理方式 A 與處理方式 B 對系統硝化效率沒有影響；循環系統運轉 4 天後水中總氨濃度大幅減少，至第 10 天時降到 0.1 mg/l 以下；亞硝酸的濃度則在第 5 天達到最高，但到第 10 天時亦降到 0.1 mg/l 以下；硝酸的濃度持續增加，至第 10 天時升高到 4 mg/l 以上；此變化與前述對照試驗結果一致。處理方式 C 並不能有效降低水中總氨的初始濃度，至第 10 天時水中總氨濃度仍維持在 2 mg/l 以上；亞硝酸的濃度亦高達 0.9 mg/l 以上，而硝酸的濃度則低於 1 mg/l，顯然處理方式 C 對生物濾床影響很大，卒使過濾系統硝化效率大幅減弱。以方式 D 處理後 5 天內水中總氨濃度亦大幅減少，減少的程度雖不如前述方式 A、B 兩者迅速，但至第 10 天時亦可將水中總氨濃度降到 0.1 mg/l 以下；亞硝酸的濃度變化亦符合前述對照試驗，在第 10 天時降至 0.1 mg/l 以下，顯然其生物濾床的硝化作用功能亦維持正常。

Table 3. The bactericidal effect of ammonia with different concentration to *E. tarda*, *Nitrobacter* sp. and *Nitrosomonas* sp. after bath administration for twenty-four hours (n=4).

Ammonia conc. (mg/l)	<i>E. tarda</i>	<i>Nitrobacter</i> sp.	<i>Nitrosomonas</i> sp.
2800	-	-	+
1400	-	-	+
280	-	+	+
140	-	+	+
28	+	+	+
14	+	+	+

- = no growth; + = growth

Table 4. Mean of bacterial counts (figures inside parenthesis are standard deviations) in aquaria before and after different treatments.

Treatment	Total viable count		E. tarda		Variation (%)	
	Before	After	Before	After	Total viable count	E. tarda
A A ₁ [†] filtrant(CFU/g)	2.1(0.2)*1	1.7(0.2)*10 ¹⁰	4.8(0.3)*10	6.6(0.5)*10 ⁶	+709.5%	+37.5%
A ₂ water(CFU/ml)	1.1(0.3)*1	1.4(0.1)*10 ⁶	1.6(0.2)*10 ⁴	8.5(0.5)*10 ²	-87.3%	-94.7%
B B ₁ filtrant(CFU/g)	1.4(0.3)*1	3.7(0.3)*10 ¹⁰	6.9(0.4)*10 ⁶	6.8(0.3)*10 ⁷	+2542.9%	+885.5%
B ₂ water(CFU/ml)	6.3(0.6)*1	1.2(0.7)*10 ⁶	1.4(0.3)*10 ⁴	1.1(0.2)*10 ³	-81.0%	-92.1%
C C ₁ filtrant(CFU/g)	1.4(0.4)*1	1.7(0.3)*10 ⁹	2.4(0.4)*10 ⁷	1.8(0.2)*10 ⁶	-87.9%	-92.5%
C ₂ water(CFU/ml)	3.0(0.4)*1	5.3(0.4)*10 ⁶	3.3(0.3)*10 ⁴	2.0(0.9)*10 ³	-82.3%	-93.9%
D D ₁ filtrant(CFU/g)	2.0(1.1)*1	1.8(0.3)*10 ⁸	6.7(0.7)*10 ⁶	2.4(0.5)*10 ⁵	-91.0%	-96.4%
D ₂ water(CFU/ml)	5.8(0.8)*1	8.9(0.9)*10 ⁵	9.4(0.5)*10 ³	8.0(0.6)*10 ²	-84.7%	-91.5%

A₁[†] : 24 h drain;A₂ : 24 h bath of 50 mg/l chloramphenicoB₁ : 24 h stopping circulation;B₂ : 24 h bath of 50 mg/l chloramphenicoC₁ : 24 h bath of 50 mg/l chloramphenicol; C₂ : 24 h bath of 50 mg/l chloramphenicoD₁ : 24 h bath of 50 mg/l chloramphenicol; D₂ : 24 h bath of 50 mg/l chloramphenico**Table 5.** Daily variation of ammonia, nitrite and nitrate concentration in aquaria after different treatments (n=3).

Treatment	Days				
	1	3	5	7	10
A*					
NH ₄ ⁺ (mg/l)	2.73±0.06	1.90±0.20	0.77±0.06	0.27±0.06	0.00±0.00
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0.66±0.04	0.97±0.02	2.48±0.10	1.03±0.06	0.03±0.01
NO ₃ ⁻ (mg/l)	0.11±0.01	1.20±0.20	2.32±0.20	2.61±0.16	4.62±0.30
B					
NH ₄ ⁺ (mg/l)	2.70±0.10	1.70±0.30	0.72±0.08	0.10±0.00	0.00±0.00
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0.73±0.03	1.65±0.06	3.34±0.23	1.91±0.80	0.04±0.01
NO ₃ ⁻ (mg/l)	0.10±0.01	0.65±0.17	1.21±0.18	2.00±0.29	4.34±0.50
C					
NH ₄ ⁺ (mg/l)	2.77±0.06	2.73±0.06	2.47±0.05	2.33±0.06	2.30±0.10
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0.22±0.04	0.20±0.03	0.31±0.04	0.89±0.07	0.92±0.02
NO ₃ ⁻ (mg/l)	0.00±0.00	0.23±0.06	0.68±0.14	0.90±0.16	0.89±0.03
D					
NH ₄ ⁺ (mg/l)	2.80±0.10	2.07±0.15	1.23±0.11	0.47±0.06	0.00±0.00
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0.86±0.05	1.16±0.13	1.78±0.12	1.25±0.07	0.03±0.00
NO ₃ ⁻ (mg/l)	0.37±0.12	1.31±0.08	1.99±0.36	2.39±0.37	4.52±0.36

*Treatment A, B, C, D refer to Table 4.

討論

近年來集約式循環水養殖愈來愈受重視⁽²⁸⁾，針對這種養殖型態的病害防治，在施用藥物時不可避免地將面臨愈來愈多的兩難抉擇⁽²⁹⁾。傳統的養殖方式對系統中生物濾床的倚賴不深，藥品種類的選擇及用藥方式較不受限制，但對循環水養殖而言，生物濾床無疑是系統的中樞，濾床的硝化效率決定系統的負荷量及水質的穩定度，因此施用藥物時除了要求對症下藥外，還要考慮選用的藥物或採取的用藥方式會不會傷害生物濾床中的硝化細菌，反而造成更大的損失⁽¹⁴⁾。根據 Collins 等⁽³⁰⁾的研究，大部份魚病寄生蟲用藥，以一般治療性的用量施加於循環水系統中，如 Formalin 25 mg/liter，Malachite green 0.1 mg/liter，Copper sulfate 1.0 mg/liter，Potassium permanganate 4 mg/liter 及 Sodium chloride 0.5% 對生物濾床的硝化效率均無顯著影響，Methylene blue 5 mg/liter 則會破壞生物濾床，使硝化作用停止。然而大部份的細菌性用藥卻對硝化細菌具有殺菌能力，如 Erythromycin 50 mg/liter⁽¹¹⁾，Neomycin 66.7 mg/liter，Chloramphenicol 13.3 mg/liter⁽¹²⁾，Oxytetracycline 50 mg/liter⁽¹³⁾；雖有少數幾種抗生素對某些種類的硝化細菌的影響較小，如 Gentamycin sulfate 5.3 mg/liter⁽¹²⁾，但由於魚病微生物普遍存有抗藥性⁽³¹⁾，若只侷限在幾種藥物可供選擇，將面臨無藥可用的窘境。依照傳統的魚病防治模式，一旦循環水養殖系統爆發全面性的細菌性疾病，養殖魚種又已停止進食時，對應手段不外兩種：一是暫時關閉循環水系統，只針對養殖水體選用適當藥物處理⁽³²⁾，此時過濾系統部份的處理則又有兩種選擇，一是將殘留在濾材內的水排乾（如本試驗模擬之處理方式 A）另一種是過濾系統內維持止水靜置（如本試驗模擬之處理方式 B）；這兩種方式的優點是對生物濾床幾乎沒有傷害，其硝化效率依然維持正常（如 Table 5），而缺點是如此一來，過濾系統反成為魚病防治的死角。根據本試驗的結果顯示，以方式 A 處理過後，養殖水體的總生菌數及 *E. tarda* 菌數分別減少了 87.3% 及 94.7%，但過濾系統中的總生菌數及 *E. tarda* 菌數反而增加了 709.5% 及 37.5%。以方式 B 處理後亦有相似的情形，養殖水體的總生菌數及 *E. tarda* 菌數分別減少了 81.0% 及 92.1%，但過濾系統中的總生菌數及 *E. tarda* 菌數反而增加了 2542.9% 及 885.5%。可見雖然養殖水體中的細菌受到藥物有效的

控制，但濾材表面附著之活性汙泥富含有機質，水產病原菌又均為異營性細菌，只要有足夠之有機碳源即可孳長，故方式 A 及 B 的處理無法有效去除過濾系統中的病原菌，其總生菌數及病原菌數不但未見減少反而大幅上升，其中又以過濾系統水未排乾僅維持止水靜置者細菌數增加最快，一旦系統連通，重新使用循環水裝置後，過濾系統中孳生的細菌會立即充斥於水體，隨時仍有疾病復發的可能。

相對於僅處理養殖水體，另一種方式就是全面性地（包括養殖水體及過濾系統）用藥⁽²⁹⁾，如本試驗模擬之方式 C，其優點是病害防治效果卓著，如本試驗的結果，處理後養殖水體的總生菌數及 *E. tarda* 菌數分別減少了 87.9% 及 92.5%，過濾系統中的總生菌數及 *E. tarda* 菌數分別減少了 82.3% 及 93.9%，但缺點是處理之後濾床的硝化作用功能會喪失或嚴重受損（如 Table 5），循環系統持續運轉 10 天只能將總氨初始濃度減少 18%，必須重新運轉一個月以上才能重建新的生物濾床。類似的結果如 Bower 及 Turner⁽¹²⁾ 以 Chloramphenicol 13.3 mg/l 持續藥浴養殖系統 7 天，結果水中氨測值升高為對照組的 6.25 倍，而亞硝酸測值則減為對照組的 0.38 倍。此外 Klaver 及 Matthews⁽¹³⁾ 以另一種魚病用藥 Oxytetracycline 進行試驗，其結果顯示持續以 12.5 – 75 mg/l 不同濃度的 Oxytetracycline 藥浴 7 天，均會對硝化作用產生不同程度的抑制作用，以 50 – 75 mg/l 藥浴幾乎使系統硝化效率完全停止，而 8.60 – 26.96 mg/l 則抑制系統 50% 的硝化效率。在生物濾床受損的期間為了排除氨廢物就必須大量換水，改採流水或半流水式養殖，這不僅造成水資源的浪費，生產成本增加，若養殖場設置地區本身即有水源不豐或水質不穩定的限制，則此法亦不可行。

本試驗首先針對氨對 *E. tarda*、*Nitrobacter* sp. 及 *Nitrosomonas* sp. 的殺菌能力進行比較，結果顯示硝化細菌對氨的耐受性遠高於 *E. tarda*，其石炭酸係數相差至少 40 倍（如 Table 1），雖然是完全不同的實驗，但 Khan 及 Mishra⁽¹⁵⁾ 的報告亦指出，固氮細菌代謝生產的氨對周圍環境中包括 *Staphylococcus aureus*，*S. citreus*，*Pseudomonas aeruginosa*，*Salmonella typhosa para A*，*S. typhosa para B*，*Shigella dysentery*，*Escherichia coli*，*Proteus vulgaris* 及 *Bacillus megaterium* 等病原菌均有相當程度之殺滅或抑制的毒性，可見不同菌種對氨的耐受程度有極大的差異，而且基礎代謝上需要氨氮參與的微生物

(如固氮細菌及硝化細菌等)，其對氨的耐受性似乎又顯著大於其他菌種。延續此一概念，本試驗乃針對循環水養殖系統設計一套「二階段防治法」，即養殖水體使用針對病原菌最適當的藥物藥浴，而循環系統則以140 mg/l NH₄OH 浸泡 24 小時。在模擬循環水系統中試驗的結果 (如處理方式 D)，水中總生菌數及 *E. tarda* 菌數分別減少了 84.7% 及 91.5%，過濾系統中總生菌數及 *E. tarda* 菌數則分別減少了 91.0% 及 96.4%。另一方面，在系統連通前先將養殖池及過濾系統的水分別排放後置換新水，再以前述相同的方法測試系統的確化效率，結果顯示其處理氨及亞硝酸的能力僅略受影響，前 5 天總氨的測值略高於對照組，而至第 10 天時已無差異。本試驗結果顯示，配合二階段防治模式，氨將可適用於循環水養殖系統中，為一具實用價值之制菌劑。

謝辭

本研究承所長廖一久博士的鼓勵與指導，省府預算 (87 水試-養-32) 之經費支持，及未具名審查者提供寶貴意見，謹此誌謝。

參考文獻

- Sadler, K. (1981) The toxicity of ammonia to the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Aquaculture*, **26**: 173-181.
- Simon, G. M. and D. L. Javier (1992) Aerobic submerged biofilm reactors for wastewater treatment. *Wat. Res.*, **26**: 825-833.
- Kruner, G. and H. Rosenthal (1983) Efficiency of nitrification in trickling filters using different substrates. *Aquacult. Eng.*, **2**: 49-67.
- Watanabe, Y., D. Y. Bang, K. Itoh and K. Matsui (1994) Nitrogen removal from wastewater by a bio-reactor with partially and fully submerged rotating biofilms. *Wat. Sci. Tech.*, **29**: 431-438.
- Shepherd, C. J. and N. R. Bromage (1988) *Intensive Fish Farming: Fish Health and Diseases*. BSP Professional Books, Oxford, 198-238.
- Herman, R. L. (1970) Chemotherapy of fish diseases: a review. *J. Wildl. Dis.*, **6**: 31-34.
- Bullock, G. L., D. A. Conroy and S. F. Snieszko (1971) *Bacterial Diseases of Fishes*. TFH Publications, Neptune City, NJ, 151pp.
- Herman, R. L. (1972) The principles of therapy in fish diseases. *In Diseases of Fish*, (L. E. Mawdesley-Thomas ed.). Symp. Zool. Soc. London. No. 30. Academic Press, London, 141-142.
- Piper, R. G., I. B. McElwain, L. E. Orme, J. P. McCraren, L. G. Fowler and J. R. Leonard (1983) *Fish Hatchery Management*. U. S. Dept. of Interior, Washington, D. C., 213pp.
- Fribourgh, J. H., F. P. Meyer and J. A. Robinson (1969) Oxytetracycline leaching from medicated fish feeds. *Bur. Sport Fish Wildl. Tech. Pap.*, **40**: 7.
- Collins, M. T., J. B. Gratzek, D. L. Dawe and T. G. Nemetz (1976) Effects of antibacterial agents on nitrification in an aquatic recirculating system. *J. Fish. Res. Board Can.*, **33**: 215-218.
- Bower, C. E. and D. T. Turner (1982) Effects of seven chemotherapeutic agents on nitrification in closed seawater culture systems. *Aquaculture*, **29**: 331-345.
- Klaver, A. L. and R. A. Matthews (1994) Effects of oxytetracycline on nitrification in a model aquatic system. *Aquaculture*, **123**: 237-247.
- Spotte, S. (1970) *Fish and Invertebrate Culture: Water Management in Closed Systems*. Wiley, New York, 145pp.
- Khan, M. M. T. and S. Mishra (1994) Antibacterial activity of the nitrogen fixers isolated from the Arabian sea. *J. Mar. Biol. Assoc. India*, **36**: 314-316.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson and M. M. Cox (1993) *Principles of Biochemistry: Amino Acid Oxidation and the Production of Urea*, 2nd edn. Worth Publishers, NY, 506-541.
- Watson, S. W., E. Bock, H. Harms, H. P. Koops and A. B. Hooper (1989) Aerobic Chemolithotrophic Bacteria and Associated Organisms. A. Nitrifying Bacteria. *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3, (J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig and J. G. Holt eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, 1807-1834.
- Stanier, R. Y., J. L. Ingraham, M. L. Wheelis and P. R. Painter (1986) *The Microbial World: The Chemoautotrophic and Methophilic Eubacteria*, 5th

- edn. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 383-401.
19. Wakabayashi, H. and S. Egusa (1973) *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel disease. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **39**: 931-936.
 20. Watson, S. W., F. W. Valois and J. B. Waterbury (1981) The family Nitrobacteraceae. *In* The Prokaryotes: a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Vol. 1. (M. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Baker and H. G. Schlegel eds), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 380-389.
 21. 徐崇仁, 周賢鏘, 黃美瑩, 周淑慧, 徐雅各 (1997) 自動化超集約循環水養鰻專輯. 台灣省水產試驗所.
 22. Horwitz, H. (1980) Disinfectant. *In* Official Methods of Analysis. 13th edn. AOAC, Washington D. C., U. S. A., 56-68.
 23. Kuehle, U. L. (1931) United States food and drug administration methods of testing antiseptics and disinfectants. United States Department of Agriculture. Washington D. C. Circular No. 198.
 24. Pelczar, M. J. Jr., E. C. S. Chan and N. R. Kring (1986) Microbiology: Control by Chemical Agents. McGRAW-HILL, NY, 488-509.
 25. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation (1985) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater: Microbiological Examination of Water, 16th edn. American Public Health Association, Washington, 866 pp.
 26. Atlas, R. M. (1993) Handbook of Microbiological Media, (L. C. Parks ed.). CRC Press, Florida, U.S.A., 776 pp.
 27. Liu, C-I. and S. S. Tsai (1987) Edwardsiellosis in pond-cultured eel in Taiwan. *COA Fish. Ser.*, **10**: 92-100.
 28. Wade, E. M., S. T. Summerfelt and J. A. Hankins (1996) Economics of scale in recycle systems. *In* Aquacultural Engineering Society Proceeding II : Successes and Failures in Commercial Recirculating Aquaculture, **2**: 575-588.
 29. Levine, G. and T. L. Meade (1976) The effects of disease treatment on nitrification in closed system aquaculture. *In* Proceeding of 7th Ann. Meet. World Maricult. Soc., (J. W. Avault Jr. ed), Louisiana State Univ., Baton Rouge, LA, 483-493.
 30. Collins, M. T., J. B. Gratzek, D. L. Dawe and T. G. Nemetz (1975) Effects of parasiticides on nitrification. *J. Fish. Res. Board Can.*, **11**: 2033-2037.
 31. Liu, C. K., Y. F. Liu and T. F. Kuo (1995) Detection of drug resistance and R plasmids in eel culture pond bacteria. *COA Fish. Ser.*, **53**: 61-65.
 32. Pillay, T. V. R. (1993) Health and disease. *In* Aquaculture: Principles and Practices. Fishing News Books, Oxford, 180pp.

Chin-I Chang and Chung-Zen Shyu
Department of Aquaculture, Taiwan Fisheries
Research Institute, 199 Hou-Ih Rd., Keelung
202, Taiwan.

(Accepted 18 June 1997)



A Study on the Feasibility of Ammonia as a Bactericide Used in the Biofilter of Aquaculture System

Abstract

To investigate the feasibility of ammonia as an antibacterial agent used in the biofilter of recirculating systems, the bactericidal effects of ammonia to aquatic pathogenic bacteria and nitrifying bacteria were examined, and a two-step curative model that means using antibiotics to the culturing water and using ammonia to the filter was established. The bactericidal effects of ammonia to *Edwardsiella tarda*, the typical pathogen causing the edwardsiellosis of eel, *Nitrobacter* sp. and *Nitrosomonas* sp., both the nitrifying bacteria isolated from the biofilter of recirculating eel-culture system, were manifestly different. The phenol coefficient is 1.79, 0.04 and <0.02 respectively. The two-step curative model was conducted in a small-scale recirculating system where *E. tarda* broke out after being artificially inoculated. Total viable bacterial counts and *E. tarda* numbers in the culturing water reduced 87.7% and 91.5% respectively, after twenty-four hours bath treatment by 50 mg/l chloramphenicol. On the other hand, total viable bacterial counts and *E. tarda* numbers in the filter system reduced 91.0% and 96.4% respectively, after twenty-four hours bath treatment by 140 mg/l ammonia. The nitrifying efficiency of the filter system was not affected by the treatments mentioned above.

Key words: Ammonia, Bactericide, Nitrifying bacterium