

國立臺灣大學生命科學院漁業科學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Fisheries Science

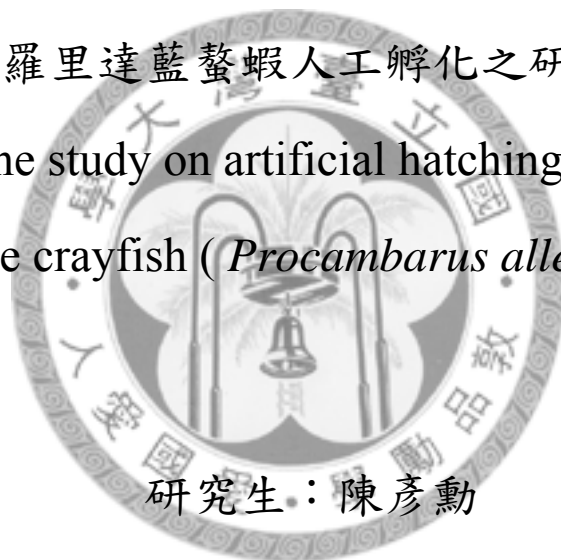
College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

佛羅里達藍螯蝦人工孵化之研究

The study on artificial hatching of
blue crayfish (*Procambarus alleni*)



研究生：陳彥勳

Yen-Hsun Chen

指導教授：陳秀男 博士

Advisor : Dr. Shiu-Nan Chen

中華民國 98 年 7 月

July, 2009

目錄

頁次：

目錄	I
圖次與表次	II
附錄次	III
中文摘要	IV
英文摘要	V
第一章 前言	1
第二章 文獻整理	3
第三章 材料方法	25
第四章 結果	30
第五章 討論	37
參考文獻	56



圖次

圖一、臭氧機產生之不同臭氧濃度輸入實驗水槽中的水中臭氧殘留濃度變化

圖二、臭氧毒性試驗(0.05 & 0.3ppm 對蝦苗持續浸泡)

圖三、臭氧毒性試驗(0.05 & 0.3ppm 對蝦苗浸泡 30 min)

圖四、臭氧毒性試驗(0.3ppm 對 stage II 即 1.5cm 蝦苗持續浸泡)

圖五、密度實驗：三組不同密度處理，Stage I→III 幼苗的平均活存率

圖六、溫度實驗：三組不同溫度處理，密度 50(顆/管)，Stage I→III 幼苗平均活存率

圖七、溫度實驗—胚胎發育時間：不同溫度組別之各期胚胎發育時間

圖八、臭氧實驗—不同臭氧濃度對受精卵的浸泡消毒

圖九、臭氧消毒—不同臭氧濃度對孵化水槽與受精卵的消毒

圖十、溫度與消毒實驗：二組不同溫度（24°C、30°C）與三種人工孵化消毒方式的比較

圖十一、自然孵化與人工孵化實驗

表次

表一、母蝦左右二側泳足抱卵數

附錄

附錄一、臭氧機濃度關係式：臭氧產生量 $\text{g/hr} = \text{g/m}^3 \times 0.3$

(氧氣流量：5L/Min)

附錄二、臭氧機濃度關係式：輸入原料：氧氣(90%-95%)；流量:5L/Min

附錄三、人工孵化系統水槽

附錄四、孵化單元

附錄五、胚胎發育照片

附錄六、水黴菌



中文摘要

本實驗主要研究目的為利用良好的孵化設備、水體環境控制、適當的臭氧消毒濃度與頻率以達到提高佛羅里達藍螯蝦卵人工孵化率。觀賞性淡水螯蝦具有高經濟價值，繁殖上常常受限於孵化時間過長及容易遭受水黴菌感染而失敗，因此希望藉由人工孵化方式來改善。螯蝦受精卵來自自然繁殖抱卵母蝦，將卵取下後，分為不同的處理組，並置入不同設定的人工孵化環境，控制其卵的密度或是水槽的溫度，以及嘗試使用臭氧水當做消毒劑來殺死水中的水黴菌，期許提高最後孵化率與幼苗活存率。

20°C 的處理組別幼苗的三個時期 (Stage I→III) 平均活存率顯著高於 24°C 及 28°C 二組。受精卵接受不同濃度臭氧浸泡處理並與甲醛控制組消毒做比較，實驗結果發現孵化活存率隨著臭氧濃度與處理時間的上升而降低 (stage III 53.8→60.6%)，四個臭氧處理組別與甲醛控制組間沒有顯著差異。臭氧 0.3 ppm 同時消毒孵化水體與受精卵及僅單獨對水體做消毒與未處理之控制組相比皆有顯著的提升效果。溫度與消毒結合探討下，24°C 的組別使用甲醛與臭氧消毒的各期幼苗孵化活存率顯著高於控制組。比較自然孵化與人工孵化，以臭氧 0.05ppm 同時處理水體與卵 30 分鐘/天，人工孵化組別的孵化活存率顯著高於自然孵化的組別。

總結以上，溫度 20°C、密度 40(顆/管)條件下有最佳孵化率；在臭氧或甲醛的運用於水體與卵的消毒上，可有效的提升孵化率，且顯著高於自然孵化的組別；由實驗結果得知，水中臭氧濃度 0.05ppm，每天消毒一次，即有效取代甲醛的使用。

關鍵詞：佛羅里達藍螯蝦、人工孵化、孵化活存率、臭氧、甲醛

Abstract

Freshwater crayfish have high economic worth in aquarium ornamental. During maternal incubation, eggs are usually invaded by fungi and cause production to reduce. The development of artificial incubation techniques for freshwater crayfish eggs would have numerous advantages that could improve the problem. The main research purpose of this study tried to artificial incubation of the blue crayfish (*Procambarus alleni*) eggs. In this study, we evaluated the efficacy included incubator, water environment, and appropriate ozone concentration and frequency for sterilizes, in order to achieve high hatching rate.

The data showed that the best survival rate at 20°C and with significant differences than 24°C and 28°C. The experiment different treated with concentrations of ozone is 0.05 and 0.3ppm (30 min) and formaldehy is 3000ppm(15 min) everyday and one as control without any disinfectants. All of the experiments which used ozone test to sterilize the incubation system water and egg at the same time or only deal with water, are better than control, and without significant differences with formaldehy experiments groups. Compared the survival rate between maternal incubation and artificial incubation, the artificial incubation for eggs treated with ozone 0.05 ppm in 30 min and formaldehy 3000ppm in 15 min and maternal incubation as control without any disinfectants. Overall survival rate of juvenile (stage III) in artificial incubation was significantly higher ($P<0.05$) than maternal incubation. There is the best hatching rate of 20°C of temperatures, 40 (eggs/tube) of densities, and the ozone and formaldehyde can improve the hatching rate effectively. The concentration of ozone 0.05ppm in water, sterilize once every day, could be successful replace use of formaldehyde effectively.

Key words:*Procambarus alleni* · artificial incubation · survival rate · ozone · formaldehyde

第一章 前言

淡水螯蝦種類豐富，在全世界約有540餘種，分佈廣泛，除了非洲和南極洲之外，其他地區均有自然分佈的情形。其中又以北美洲與大洋洲物種最多，其中北美洲就佔了70%，大洋洲約佔了20%(Hobbs, 1988)。近年來淡水螯蝦的消費需求呈現增長的趨勢，且其肉質鮮嫩、營養豐富為世界性的淡水水產生物，而不只在食用上，現今由於觀賞水族界蝦類飼養風氣的興起，淡水螯蝦是經濟價值頗高的觀賞水族生物之一，這些顏色變化多端，有著不同形態與習性，且易於飼養的螯蝦，也成了當紅暢銷的販售商品，但是關於螯蝦很多的繁殖條件及機制等，並未完全的涉入理解。

在現今淡水螯蝦的養殖上面臨的問題為繁殖率偏低，水溫水質的驟變常造成卵的壞死，或是因為胚胎發育時間長，孵化過程中受精卵易受到水黴菌的感染，為了克服水黴菌的感染和提高孵化活存率，藥物廣泛地被使用，但過多的藥物使用造成母蝦的緊迫，當受到驚嚇或是疾病的侵襲時，卵從母蝦泳足上剝離脫落等問題產生導致孵化失敗，藥物更是會造成環境破壞或是對生物產生不良影響。

淡水螯蝦人工孵化技術在歐美發展已行之有年，在學者及養殖業者的努力下，規模化應用上已略具雛形在歐美各國食用螯蝦上，人工孵化技術的發展有許多的優點，如：減少繁殖時對母蝦的依賴、解決母蝦自然孵化時卵的損失等。人工孵化藉由調控環境溫度來達到控制胚胎發育時間的長短(Celada *et al.*, 2001a; Celada *et al.*, 2001b; Perez *et al.*, 2003)，亦可以藉由使用抗生素或是其他化學藥劑的消毒，生產不受到螯蝦瘟疫Aphanomycois感染或是培養Specific Pathogen Free (SPF)的蝦苗，也就是利用人工孵化消毒的動作，來避免親蝦的垂直感染(Edgerton and Owens, 1997; Carral *et al.*, 2003)。孵化過程中可以透過人為操作精確的移除死卵，且孵化後的蝦苗收集容易，並且易於觀察判斷胚胎發育各期的時間(Carral *et al.*, 2003)。淡水螯蝦人工孵化技術的發展有許多優點，如：節省空間及養殖用水(Carral *et al.*, 1992; Evans *et al.*, 1993; Järvenpää, 1995; Celada *et al.*, 2001a)；孵化過程中可

以人為精確的移除死卵，且孵化後的蝦苗收集容易，並且易於觀察判斷胚胎發育各期的時間(Carral *et al.*, 2003)。因此，在本論文的實驗設計上，希望藉由各組不同實驗，一步一步找出實驗使用的孵化系統最適當的人工孵化條件，包含密度、溫度、臭氧消毒的濃度與頻率等因子，有助於達到成功的人工孵化效果，並希望藉由臭氧的使用來取代傳統化學藥劑的使用。



第二章 文獻整理

一、 觀賞魚產業發展概況

隨著經濟的成長與生活品質的提升，人類對於休閒與怡情活動的需求也與日俱增，寵物的飼養是現代人在忙碌緊張生活中用來舒解壓力、調解身心的最佳方式之一，而觀賞水族生物以其變化萬千的形態與繽紛的色彩，攫獲世人的目光成為鍾愛的對象。觀賞水族是一種極具發展潛力的水產養殖類別，具有單位價值高，耗用水資源較少等優點，現今觀賞魚(Ornamental Fish)的定義跟以往不同，隨著科技進步、水族館事業興起、觀賞領域不斷擴展、專業分工精細、飼養設備技術的進步等，在人工培育品種上日新月異，觀賞水族亦不再局限於特定的魚類，現今人們把養在水族箱內的魚類統稱為”Aquarium Fish”，消費者求新求變的心態，不再僅止於滿足魚類的飼養，於是各式各樣型態不同的生物，包含爬蟲類、甲殼綱的無脊椎動物蝦蟹類、軟體動物螺類甚至造景用的沉木、活石等，都有其觀賞飼育的價值或是功能性的作用而逐漸受到消費者的青睞。目前世界上的觀賞水族生物粗略估計有幾萬種，再加上大量人為改良變種以及新種的發現，可供飼養開發的實際物種數量很難有效統計。全球市場約有2000餘種觀賞魚，其中數量最大者為熱帶淡水魚種，佔全市場80-90%，淡水魚種其中90%為人工養殖，10%來自野外捕撈。熱帶海水及半鹹水魚種比例相對的低，而且海水觀賞魚95%是野外採捕，僅有5%為人工繁殖，但海水觀賞魚的豔麗的色彩表現與行為之特殊性漸漸受到重視，未來隨著新品種海水魚繁殖技術增進，海水魚觀賞魚養殖將持續成長，下列表格為觀賞水族物種各分類的比例(Cato and Brown, 2003)。

Ornamental Species	Approximate Number of Species	Principal Geographic Regions
Fresh-, Salt-, and Brackish- Water Fishes	1539	Southeast Asia, Americas, Africa, Indonesia
Corals (hard and soft)	102	Indo-Pacific, Caribbean, the Red Sea
Invertebrates, other (e.g., shrimps, crabs, snails, starfish)	293	Indo-Pacific, Caribbean, the Red Sea

Reference: various sources; principal, Cato, J.C., and C. L. Brown. 2003. *Marine Ornamental Species: Collection, Culture, and Conservation*.

二、 世界觀賞魚市場

世界主要的觀賞魚市場大致區分為：亞洲、歐盟、美洲地區三大地區，亞洲是全球觀賞魚市場最大出口地區，根據2006年資料統計顯示，亞洲區佔全球觀賞魚市場出口量之56.70%，出口值達1億5450萬美元，其中又以新加坡為最大的出口國，出口量為22.53%。其他重要的出口地區包括歐盟(佔全球出口量29.20%，出口值達7958萬美元)、美洲地區4國佔7.62%。亞洲地區觀賞魚出口國包括新加坡(佔亞洲供應量38.5%)，其餘依序為馬來西亞(13.3%)、印尼(12.7%)、中國大陸(包括香港及澳門10.2%)、日本(7.1%)、菲律賓(6.0%)、斯里蘭卡(5.5%)、泰國(3.1%)、台灣(1.6%)及印度(1.2%) (Kuala, 2003)。觀賞魚貿易世界各國在進口方面，2006年的總進口貿易額為3億1079萬美元，歐盟地區國家進口量為最大佔全世界的48.81%，進口值達1億5170萬美元，其次為亞洲地區佔21.90%，進口值為6806萬美元，美洲地區則佔19.53%，台灣進口額為119萬美元，由資料可看出台灣的消費市場小，進口量低，相對之下卻是觀賞魚的出口大國之一 (<http://www.tofa.org.tw/chinese/counter-01.asp>)。

以國際市場來看，每年全球觀賞魚貿易額呈現正成長，60年代以後，觀賞魚的需求平均以每年10-15%的速度增長，相當於3億5000萬尾的流通量，根據聯合國糧食及農業組織(Food and Agriculture Organization, FAO)的估計世界各國觀賞魚與無脊椎動物的市場貿易額年產值約為2億7800萬美元(FAO, 1996-2005)，而整個觀賞水族的相關產業貿易額評估約為10億美元(Cato and Brown., 2003)。臺灣的觀賞水族業的發展上，在亞洲地區具有舉足輕重的地位。近年來，水族企業家紛紛向外投資擴大市場，積極尋找新的出口路線，且隨著大陸經濟的快速發展，加入WTO後國際貿易量的增加，水族業的競爭相對激烈，觀賞用的熱帶魚將會與世界各地自由競爭，若沒有擁有的特殊品系很難脫穎而出。因此，積極開發新品種的人工繁養殖技術與品種改良，在產業的成長上具有關鍵性的影響。

三、 臺灣觀賞魚產業養殖面積與產業結構

觀賞魚產業相當適合目前人力成本與土地成本高漲、地下水資源有限的臺灣發展，且觀賞魚之價值遠高於食用魚，兩者單位利潤相差近100倍，而其中海水觀賞魚之單價又高於淡水觀賞魚。臺灣素有養殖王國的美稱，除食用魚類的繁殖技術獨步全球外，觀賞魚的繁、養殖技術亦不遑多讓。據統計，國內可以成功人工繁殖的觀賞魚已達370餘種，稱冠國際，有些產量及品質更勝過原產地，為臺灣發展觀賞魚產業奠定雄厚基礎。

臺灣屬亞熱帶氣候型，適合觀賞魚之繁養殖。目前在台灣主要繁殖魚種為非洲慈鯛（佔30%）、南美慈鯛（佔20%）、金魚錦鯉（佔10%）、血鸚鵡（17%）、燈科及其他（佔23%），較具規模之繁養殖場主要集中在高屏、臺南及宜蘭等三大地區，佔約七成，其他則零星散佈於中北部，繁養殖面積多在1公頃以下，每一家繁養殖魚池數則多在30口以上。觀賞魚養殖面積95.82公頃/全臺水產養殖面積57632.55公頃、觀賞魚養殖單位年產值500百萬/公頃(邱, 2004)。

四、 淡水螯蝦 (Freshwater crayfish)

隨著飼養技術提升與消費者對飼養物種的多樣需求後，有關觀賞水族生物的飼養種類，過去除了魚類外，鮮少有人會注意其他無脊椎動物，但在觀賞水族蓬勃發展的今日，凡舉相關的水族生物包含許多的無脊椎生物，如蝦、蟹、螺類也漸漸地被引入觀賞水族市場，其中不乏許多的品種因為”功能突顯”而備受市場愛戴。小型的匙指蝦是最具代表性的種類之一，其中以原產於香港的蜜蜂蝦 (*Neocaridina sp.*)所改良純化而成的紅色水晶蝦，更是近幾年最具代表性的例子。德國的虎紋蝦、臺灣自行培育改良的玫瑰蝦（極火蝦）等，在養殖業者不斷努力下，於外觀型態與顏色改良上，每年都有新品系的出現，也吹起市場上一股觀賞蝦的熱潮，陸續舉辦的觀賞蝦比賽，也有推波助瀾的效果，甚至在世界性的德國

漢諾威水族寵物博覽會上，2009 年新增了第一屆的觀賞蝦大賽，臺灣的水族玩家也在此項比賽中贏得多項冠、亞軍與最佳人氣獎，充分顯現出臺灣觀賞水族的實力，也讓臺灣在未來的國際水族市場佔有重要的一席之地。

觀賞性螯蝦的飼養風潮，則是隨著水晶蝦熱潮短暫冷卻後所興起。由日本、美國、德國所引進的特殊品系螯蝦，顏色型態變化多端，徹底改變國人對於螯蝦只是破壞生態而毫無價值的觀感。於一般人的認知中，所謂的淡水螯蝦不外乎市面上最常見的美國螯蝦，但是對於其它的螯蝦種類，許多人卻仍處於一知半解的狀態。最近有不少玩家自行引進或是從事繁殖研究及推廣，甚至成功的反銷其出口至國外，為現在的水族市場注入新的風潮與動力。臺灣的觀賞性螯蝦最早是由日本所引進的雪白螯蝦(*Procambarus clarkii* var. *white*)也就是俗稱的美國螯蝦的白化個體，因其稀有性與觀賞價值高，深受到國人的喜愛，其他相關物種也陸續引進。如六、七年前，原產於澳洲西部的藍魔蝦 (Marron; *Cherax tenuimanus*) 首度引進國內時，消費者也陸續驚覺色彩驚豔的淡水甲殼動物，不只為淡水螯蝦 (Freshwater crayfish) 打開了市場知名度，也將這群不同以往的觀賞魚類的物種帶入了觀賞水族圈之中。在水族市場上皆把這類生活於淡水水域中的螯蝦們，冠以「XX龍蝦」之名稱之，事實上，不論在生長背景、體型尺寸或學術分類上，生活在淡水水域中的螯蝦，都和一般棲息於海洋中供作食用的龍蝦有著一段相當大的差異性。

淡水螯蝦 (英名 Crayfish, Crawfish) 屬於動物界 Animalia、節肢動物門 Arthropoda、軟甲綱 Malacostraca、十足目 Decapoda、抱卵亞目 Pleocyemata，包括三個科：正螯蝦科(Astacidae) 12 種 10 亞種，螯蝦科 (或稱螯蛄科) (Cambaridae) 337 種 25 亞種，與擬螯蝦科 (Parastacidae) 129 種 16 亞種，共有 29 個屬，500 多種。正螯蝦科 (Astacidae) 體型中等，分布於北半球，主要產於歐洲和西亞以及北美洲西部(Taylor, 2002)；螯蝦科(Cambaridae)，形體較小分布於北美洲東部和遠及東亞及日本(Hobbs, 1988)，台灣並無原生淡水螯蝦的分布，中國東北三省、韓國、日本

則產有數種螯蝦科中螯蝦屬 (Cambaroides) 的種類。最後一科屬於擬螯蝦上科 (Parastacidae)，分布於南半球，包括紐西蘭、澳洲一帶、馬達加斯加、南美洲(Hobbs, 1988)。

淡水螯蝦的型態多變、種類繁多，有文獻記載的種類超過 540 種，除了南極洲與非洲之外，蹤跡分布世界各地，其中又以北美洲的 300 多種以及大洋洲的 100 多種數量最多(Hobbs, 1988)。北美洲的代表種，最耳熟能詳的大概就是體色鮮紅、生命力強韌的克氏原螯蝦 (*Procambarus clarkii*)，也就是臺灣俗稱的美國螯蝦，最初是以食用與觀賞的名義引進到本島，而在口感與份量表現未如預期受到歡迎的狀況下，遭業者大量隨意棄置於荒野。雜食偏肉食性的螯蝦，憑藉著強韌的生命力與繁殖能力，開始對本土物種造成威脅，造成生態破壞。不過相較之下，中國大陸與歐美民眾喜食淡水螯蝦，也因為有食用上的需求，反而大量投入生產，近年來淡水螯蝦的消費需求呈現增長的趨勢，以肉質鮮嫩、營養豐富的特色成為世界性的淡水水產食物。歐洲是世界上淡水螯蝦的主要養殖地區之一，並且與美國都是消費及進口的主要區域，隨著養殖業的發展，相關的加工技術也不斷的進步，形成系列的食物，其中如英國、法國、瑞典、義大利等地養殖起步較早，已形成完善的商品化養殖體系。淡水螯蝦於整個歐洲的年消耗量約為六千多噸，有超過一半的數量為克氏原螯蝦，包括中國進口與歐美當地所捕獲。美國生產量每年也達到五萬噸之多，中國大陸每年的生產量亦達到 4 萬噸以上(Verhoef and Austin, 1999)。在中國大陸，克氏原螯蝦亦是重要的經濟水產物種，但其對環境的負面影響則是近年來才開始被注意。其他原產地分布於大洋洲的大型淡水龍蝦，對於環境條件需求較為嚴苛。因此，不易在臺灣的自然環境中大量繁殖成為野外的優勢種。

正螯蝦科家族的淡水螯蝦，是歐洲及美洲主要的甲殼類養殖生物。主要物種有貴族螯蝦 (*Astacus astacus*)、通訊螯蝦 (*Pacifastacus leniusculus*)、白鉗螯蝦 (*Austropotamobius pallipes*)、*Astacus leptodactylus*等(Gonzalez et al., 2009)。淡水螯

蝦為陸封型的淡水甲殼類，具有抱卵與育幼的行為。自然情形下因季節變換而造成水溫的驟降及光週期的改變，會刺激其繁殖行為。淡水螯蝦在交配及產卵後，受精卵黏結在母蝦的腹部的泳足上約4-10個月(Reynolds, 2002)，受精卵孵化後，第一期幼苗仍然黏附在母蝦泳足上，經過二次脫殼，於第三期幼苗脫離母蝦，開始獨立生活。

五、 淡水螯蝦人工孵化

淡水螯蝦人工孵化技術在歐美發展已行之有年，以正螯蝦科為例，在學者及養殖業者的努力下，規模化應用上已略具雛形。最早的報告是德國的學者 Reichenbach 於 1886 年開始嘗試淡水螯蝦 *Astacus astacus* 的人工孵化 (Reichenbach, 1886)，之後相關的報告研究主要著重在人工孵化可行性及孵化設備的研究探討，Andrews 進行通訊螯蝦 *Pacifastacus leniusculus* 的人工孵化 (Andrews, 1904)；Hofmann 進行淡水螯蝦 *Astacus astacus* 的人工孵化 (Hofmann, 1978) 均是利用鯉魚魚卵的人工孵化系統進行試驗；Järvenpää 則開始利用半自動循環水系統應用在淡水螯蝦 *Austropotamobius pallipes* 蝦卵的人工孵化上 (Järvenpää, 1995)。上述這些報告，於初步的結果都可以順利孵化至第一期幼苗，但整體孵化率偏低，且都是在受精卵的胚胎發育後期，才開始進行人工孵化的步驟。因此，近年來的研究就著重在縮短母蝦自然孵化的時間，相對延長人工孵化的時間，亦即提前將卵從母蝦泳足移出，進行人工孵化，希望能提升孵化率。Carral 等最初設計了一套循環水系統作為正螯蝦科的通訊螯蝦的人工孵化設備的模式 (Carral *et al.*, 1988) 之後，於 1992 年將人工孵化開始的時間提前至母蝦產卵後的第 18 天（此蝦種平均孵化時間為六個月）(Carral *et al.*, 1992)，提早移出蝦卵來嘗試縮短母蝦孵化的時間，進而達到成功孵化的目的，在實驗結果中，藉由溫度與水流的調控，成功縮短孵化期至四個月且有效的孵化，此結果也顯示出，人工孵化的成功與否與卵的移除時間及胚胎發育期沒有絕對的關係，真正影響的因子為人工孵化設備的選擇與使用、孵化環

境的設定與控制、水質的好壞等。後續有學者亦使用相同的孵化系統應用在白鉗螯蝦上，比較溫度與卵移除時間對孵化率的影響，最後亦達到成功孵化的效果(Perez *et al.*, 1998a; Perez *et al.*, 1998b; Perez *et al.*, 1999)。

現今的人工孵化技術上除了正螯蝦科的淡水螯蝦外，螯蝦科(Cambaridae)與擬螯蝦科(Parastacoidea)也陸續有相關報告。俗稱Marron淡水螯蝦(*Cherax tenuimanus*)人工孵化(Evans *et al.*, 1993; Henryon and Purvis, 2000)；澳洲淡水龍蝦(*Cherax quadricarinatus*)人工孵化(King, 1993; Edgerton and Owens, 1997)；俗稱YABBY(*Cherax destructor*)人工孵化(Leonard *et al.*, 2001)，以上都是屬於澳洲地區擬螯蝦科的人工孵化方式也陸續被研究。Nakata等人則是利用不同以往的簡單的方式，去試驗日本原生種的淡水螯蝦*Cambaroides japonicus*之人工孵化，孵化設備為實驗室常見的well plate，並且比較不同規格的plate與溫度，以求得最佳的孵化條件(Nakata *et al.*, 2004)。

人工孵化技術的發展有許多的優點，如：節省空間與養殖用水(Carral *et al.*, 1992; Evans *et al.*, 1993; Järvenpää, 1995; Celada *et al.*, 2001a)，減少繁殖時對母蝦的依賴、解決母蝦自然孵化時卵的損失等。孵化損失原因，可能因為母蝦受到疾病感染或是死亡造成卵的壞死，或是母蝦受到攻擊或人工操作造成的驚擾而使卵脫落(Carral *et al.*, 2003; Nakata *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 1998a)。人工孵化藉由調控環境溫度來達到控制胚胎發育時間的長短(Perez *et al.*, 2003; Celada *et al.*, 2001a; Celada *et al.*, 2001b)，亦可以藉由使用抗生素或是其他化學藥劑的消毒，生產不受到螯蝦瘟疫Aphanomycosis感染或是培養Specific Pathogen Free (SPF)的蝦苗，也就是利用人工孵化消毒的動作，來避免親蝦的垂直感染(Edgerton and Owens, 1997; Carral *et al.*, 2003)。孵化過程中可以透過人為操作精確的移除死卵，且孵化後的蝦苗收集容易，並且易於觀察判斷胚胎發育各期的時間(Carral *et al.*, 2003)。

本實驗的實驗生物為螯蝦科、原螯蝦屬(Procambarus)的佛羅里達藍螯(Procambarus alleni)，原產地為北美洲佛羅里達地區，自然棲息地包括：沼澤、溪

流、緩慢流動的水體、水庫、灌溉系統，成體體長約 6-15 公分，壽命二到三年，野外原生種體色偏紅褐色，經過人工改良與選種後，目前可見呈藍色與白色表現的個體，在臺灣觀賞水族市場流通的，主要是藍色的表現，頭胸部粗大，長度約佔體長一半，頭胸甲下方具有五對胸足，腹部具有五對泳足，頭胸甲前三對胸足末端呈鉗狀，第一對十分粗大，稱為螯足，為挖洞、取食、防禦的工具，後二胸足末端呈爪狀，腹部的五對泳足不發達，雄性第一二對腹肢特化為交接器，雌性第一對退化呈細長狀。運動方式以頭胸甲的胸足爬行方式為主，也可用腹部和尾扇作用，使身體迅速向後退，以逃避敵害，會利用螯足挖洞，多棲息於洞穴內、石縫間，夜行性。為雜食性，植物性食物包括水草、植物碎屑、農作物等；動物性食物則有蚯蚓、魚蝦、蝌蚪、青蛙等，也會互相殘食。此種淡水螯蝦成長迅速，三至五個月就可成長至 6-7 公分。幼蝦約經半年即可達性成熟，自脫離母體後至成體時，可脫殼十一次。交配行為為雌雄腹部相對進行交配，交配時間約數十分鐘到幾小時不等，雄性將精莖送入雌蝦腹環溝後即完成交配並分開，交配後雌蝦則挖洞躲藏，於洞內排卵後，卵與精莖之精子行體外受精。受精卵黏附於雌性腹肢剛毛上，體長 7-8 公分的母蝦可抱 4 百粒左右，約經三到四周的時間孵化為幼蝦，此時母蝦仍將幼蝦抱於腹部保護，幼蝦獨立生活之前需脫殼兩次 (施, 2006)。

六、 真菌感染問題

淡水螯蝦在人工孵化最常碰到的問題，為卵受到的真菌的侵襲感染而導致死亡，相同的問題，也出現在各種魚卵的孵化上，其中最常見到的是水黴菌。水黴菌在淡水水域中廣泛存在(Rach *et al.*, 1997)，對溫度的適應範圍廣，5~26°C 下均可生長繁殖，對水產動物的種類沒有選擇性，是一種繼發性感染，養殖動物受傷或因細菌、病毒感染，造成水黴菌孢子粘附於傷口，因而受到水黴菌菌絲的侵襲，是感染的重要環節。魚卵受到水黴菌的感染相關因子如水質、水流量與流速、卵的密度等條件影響。高密度的孵化系統增加了卵與容器的接觸，容易因摩擦造成

機械性傷害，而密度過高亦助長卵與卵之間的水平感染機率。孵化系統中的水流速與流量過低時，卵的滾動情形不佳，容易使真菌的游動孢子黏附在卵的表面，甚至卵之間的彼此黏結死亡，於孵化過程中的死卵或其他的有機物質如果沒有適時移除，會提供水中真菌的營養基質，加速真菌的繁殖而造成卵的大量壞死。因此，在人工孵化上，不斷的剔除死卵這個工作非常的重要(Post, 1987; Rach *et al.*, 1998)。

Bruno and Wood (1994)發表水中常見的水黴菌 *Saprolegnia* 的分類學

Kingdom: Protoctista
Division: Oomycota
Phylum: Heterokonta
Class: Oomycotea
Order: Saprolegniales
Family: Saprolegniaceae
Genus: *Saprolegnia*

卵菌門(Oomycota)意指”卵真菌(Egg Fungi)”，大多數的水黴菌在生態上是分解者的角色，似棉絮狀的生長在已死亡的藻類或動物體上，能協助分解死亡的有機生物體，多出現於淡水水域中。此外也有寄生性的水黴菌，例如生長在淡水水塘或水族箱魚類的鰓或是皮膚上的種類，不過通常只攻擊受傷的組織，造成二次感染的情形。卵菌綱的*Saprolegnia*屬的水黴菌為伺機性的兼性寄生，具有腐生性營養型(Saprotrophic)及死體營養型(Necrotrophic)二種。

下列幾種真菌 Saprolegniaceae. *Saprolegnia parasitica*, *Achlya hoferi*, *Aphanomyces sp.* and *Dictyuchus sp.*為養殖上所常見的真菌(Post, 1987)，這些真菌普遍的散佈在水體中，引起魚類及卵的感染，造成生產上的大量損失，其中又以*Saprolegnia*這屬的水黴菌最具代表性。*Saprolegnia*為在淡水水體中廣泛存在的真菌，藉由可動性孢子群聚於死卵上來感染魚卵，當生物體被*Saprolegnia*屬的真菌感染的情形稱之為”saprolegniasis”(Beakes *et al.*, 1994)。當死卵被水黴菌侵襲並提供了

營養基質，會造成真菌在水體內大量孳生，加速水黴菌侵襲感染其他活卵，水黴菌的菌絲附著會穿透卵膜造成卵的窒息死亡。可根據菌絲的有無來判定是否遭受真菌感染。Saprolegnia菌絲通常呈絨毛、棉絮狀，肉眼觀察顏色可能為白灰或是灰褐色，黏附在生物體體表、鰓、鰭、眼球或是卵上，不同物種的水黴菌感染後的外部型態不同，有性生殖的結構亦不同，需要進一步精確的鑑定物種則要透過批次純化培養後，做各種生化鑑定(Rach, 2004)。

事實上，並非所有的水黴菌種皆具有致病性，具有致病性的水黴菌會感染在生物的傷口或是壞死的魚卵上，當受感染的死卵上真菌大量滋長時，死卵上的真菌會藉由散發化學訊息產生正趨化性，造成其他活卵快速的被感染而死亡，或是藉由散佈孢子的方式在水體中感染其他更多的卵(Lawrence, 2000)。致病性的水黴菌種具有對環境的適應性，其對溫度的容忍範圍會接近當地水生環境或是宿主生物的適合溫度。而大部分的水黴菌種的最適溫為 18-26°C，比如從冷水性魚類鮭魚身上所分離出來的水黴菌，在低溫的成長情況就明顯比高溫時來的好(Pickering and Willoughby, 1982)。水體受到真菌孢子污染的來源很多，可能是來自養殖親魚身上、野外引進的生物體、卵、水的供應來源、以及養殖設備的污染。真菌的孢子可以抵抗高溫、乾燥以及一些消毒劑，所以很難在水體中完全消滅或是在進水時有效的處理，過度的人工操作、不良的水質、水體流速過慢、水中溶氧過低、高濃度的亞硝酸氮的殘留、孵化密度過高、溫度不穩定尤其在驟降的情形下，都容易或是無法避免的造成真菌侵襲感染發生(Pickering and Willoughby, 1982)。在魚類魚卵的人工孵化上，過往的經驗顯示水黴菌的感染預防勝於治療。受精卵於孵化過程沒有事先處理的情形下，整體孵化率會下降 6-100%，造成生產上的重要損失(Rach, 2004)。淡水螯蝦的人工孵化上亦然，嚴重感染可能會造成卵的 100%死亡(Edgerton *et al.*, 2002)。

人工孵化時，不斷的剔除死卵這個工作非常重要，可有效減少水黴菌的感染情形，但在不同水生生物的孵化上，可能會面臨一些情形下不能移動卵或是不能

擾動水體的情形。在大規模的淡水螯蝦繁殖人工孵化情形下，孵化密度高、孵化時間長的情形，人工移除死卵雖然有效但是過度耗費人力與時間，過多的人工操作步驟，更容易造成卵的機械性傷害，反而加速水黴菌的二次感染。因此，藉由使用抗真菌的藥物，來抑制水中真菌及其他病原菌的感染及大量增生是必要的 (Celada *et al.*, 2004)。水黴菌會藉由菌絲接觸的直接感染與利用大量的動孢子在水體中傳染。孢子於孢囊內生產，當孢子成熟時，孢囊破裂放出具感染能力的動孢子於水中，再附著於受損的組織或是死卵上進行繁殖，除了發育中的卵易被傳染外，受到溫度震盪或是畸形的幼蝦苗也可能被水黴菌附著。Herbert 於 1987 年指出 Stage II 的蝦苗，倘若在環境溫度 25-27°C 的情形下被水黴菌感染，菌絲會在 48 小時內侵襲全身的組織，而健康狀況良好的蝦苗則通常不會被真菌所感染 (Edgerton *et al.*, 2002)。Saprolegniaceae 科不同種間的鑑定可以藉由不同的成長率及其他的生理特徵，甚至不同的宿主特異性來判別 (Diéguez-Uribeondo, 1996)。Wood (1988) 報告中指出，從鮭魚養殖所分離出來的菌株，可藉由不同的菌落型態以及成長在 25°C 的環境下來判斷其為 *S. diclina* 或 *S. parasitica*。

七、 殺真菌劑—孔雀綠

一旦爆發真菌的感染會非常難以根除及醫治，有效的預防水中真菌的爆發顯的更為重要。傳統養殖上，初步診斷出有水黴菌的感染時，最常使用且有效的化學藥劑為孔雀綠，由於對水生魚類或動物的黴菌、細菌、原蟲、寄生蟲感染，深具療效，用量少，每公升的水約 0.03 毫克 (0.03 ppm) 的孔雀石綠即可得到效果，加上價格便宜，因此自 1930 年代起即被廣泛的使用在水產養殖上。孔雀綠是一種工業染料，具有殺菌功能，因而廣泛應用在養殖上，且在淡水螯蝦卵的人工孵化上亦有相同效果 (Celada *et al.*, 2004; Edgerton *et al.*, 2002)。但是美國從 1991 年起禁止使用孔雀綠在食用動物上 (觀賞魚除外)，主要是因為相關報告指出孔雀綠會對生物體造成傷害，如後代畸形的影響 (Meyer and Jorgenson, 1983) 此外還發現孔雀綠

會變成還原型孔雀綠 (Leucomalachite Green)，還原型孔雀綠是魚類進行新陳代謝，在其代謝物中檢出的化合物，會長期殘留在生物體的組織上並且具有致癌的活性(Culp *et al.*, 1999)。此外，Meinertz等指出在魚卵或是魚苗時期使用孔雀綠當作殺真菌劑的使用，即使是達到上市標準的成魚，還是會有不易探測的還原型孔雀綠長期殘留在魚體上(Meinertz *et al.*, 1995)。根據這些相關的報告與發現，除了美國外世界各國亦紛紛跟進禁止使用孔雀綠，如歐盟各國於1997年公告禁止使用(Melendre *et al.*, 2006)。其他，如加拿大、日本、新加坡、臺灣、泰國、香港等國政府亦明言公告禁用，在臺灣，違規業者將會依食品衛生管理法，處以6~30萬元罰鍰，已受嚴重污染之養殖場底泥或水體，應設法處理或規勸養殖戶暫時休養。因此，為了找到替代的藥劑，學者與業者紛紛嘗試研究各式不同的化學藥劑，希望能有效的抑制跟殺滅水黴菌或其他具致病性的真菌，並且對環境及人體沒有傷害性的產品，如過氧化氫、甲醛、碘、氯化鈉、高錳酸鉀等(Rach, 1997; Rach, 2004; Rach *et al.*, 2004; Schreier *et al.*, 1996; Policar *et al.*, 2004; Policar *et al.*, 2006)。目前研究結果，在淡水螯蝦卵的孵化上，目前最有效抑制水黴菌成長的藥劑為甲醛(Formaldehyde)(Melendre *et al.*, 2006, Melendre *et al.*, 2007, Celada *et al.*, 2004)。

八、 殺真菌劑—甲醛

甲醛(Formaldehyde)為一易燃、易揮發具毒性之腐蝕性液體，其水溶液(37%~56%)稱為福馬林(Formalin)，福馬林為無色透明液體，具很強的刺鼻味，能完全溶解於水，常被用來防治水產動物的各種外寄生蟲性疾病，甚至有人稱其為萬能藥，但事實上並非如此，福馬林乃有其使用的限制與副作用，於不當的使用下，不但會延誤病情或傷害養殖生物，甚至對人體的健康也有不良的影響。

使用甲醛1000-2000ppm作為多種魚類魚卵在集約養殖孵化上的殺真菌藥劑，並且得到良好的效果(Rach *et al.*, 1997)。在虹鱒魚卵的孵化上，使用250, 500 and 1000 ppm 福馬林做為抗真菌劑有效對抗*Saprolegnia* (Marking *et al.*, 1994)。在鯉魚

魚卵的孵化上使用250, 500, 1000, 1500 and 2000 ppm 福馬林做為抗真菌劑，結果得到在2000 ppm 處理30分鐘的情形下效果最佳 (Soltani *et al.*, 2001)。將甲醛應用在淡水螯蝦的人工孵化上，得到的最佳的濃度為4500 ppm，處理頻率為每個禮拜使用3次，每次的藥浴時間為15分鐘 (Celada *et al.*, 2004)。雖然甲醛在美國及歐盟是被認可的，可合法應用在魚類的養殖上，許多報告也指出甲醛可有效的抑制水黴菌的生殖與傳染，但是操作上仍需要注意使用者的安全性，因為甲醛對人體健康有不良的影響，進入人體的甲醛能和蛋白質的氨基結合，使蛋白質變性，擾亂人體細胞的代謝，對細胞具有極大的破壞作用。甲醛被國際癌症研究機構 (IARC 1995) 確定為可疑致癌物，可經由呼吸道、皮膚或誤食而使人體中毒，早期中毒徵候為喉嚨刺激、咳嗽、暈眩、抑鬱，甚至昏迷。此外還可能對水生環境有潛在的不良影響。

九、 臭氣(Ozone)

(一)臭氣的理化性質

臭氣 (ozone) 分子由三個氧原子組成，分子式為 O_3 ，分子量為48，於1785 年由 Van Marum 所發現。利用空氣通過高壓放電設備，獲得特殊味道的氣體，Cruickshank於1801以純氧進行水的電解，於陽極上亦可獲得相同味道的氣體；此乃是電化學製造臭氣的開端。此種特殊味道的氣體，直到西元1840 年Schonbein 將它命名為“臭氣 (Ozone)”，乃起源於希臘字的“Ozein”，其涵義為“新鮮空氣”之意 (溫與張, 1994)。在一般室溫下，臭氣呈現氣體狀態，帶有刺激性臭味，臭氣氣體濃度高時成淺藍色，大約濃度在0.05ppm時人的鼻子可以聞出來(葉, 1992)。

(二)臭氣製造

臭氣在自然界中可以因為閃電激發或紫外線照射而自然產生，但在工業為大

量製備所需常使用方如電弧法、紫外線照射法和電解法，其中以電解法最為常見(溫與張, 1994)。尖端放電法產生器壽命長且經濟省電，臭氧產生機可以產生高達10% wt的臭氧氣體，而高濃度的臭氧氣體，與水接觸才可以產生具有足夠殺菌氧化能力的臭氧水，為最新一代臭氧產生裝置。影響臭氧機臭氧生成量的因子除了機器本身設備條件外，其進氣的原料為主要影響因子，可概分為以下幾點：(1)進氣中含氧濃度的多寡；(2)進氣氣體的溫度，溫度的提升會減少臭氧的產生；(3)氣體原料的流量。在固定條件下，流量減少，臭氧濃度會提高；(4)進氣氣體的水分；(5)進氣氣體的粉塵，不但阻礙電場，造成異常放電，且易附著於放電管，形成非完全誘導體，以致臭氧回收率降低，並增加清除及維護的工作(顧, 1996; Kim *et al.*, 1999)。臭氧測量方式目前有濕式碘滴定法、紫外光度計法和感測器法。使用碘滴定法會有操作不易且耗時缺點，因此現在多使用紫外光度計法或感測器法。紫外光度計法具有量測較精確之優點，可用於建立臭氧原級標準或臭氧之傳遞標準，但所使用之紫外光分析儀價格昂貴且體積大，判定所需臭氧進氣流量也很大，並不適合做機動性檢測。

(三) 臭氧之特性與消毒機制

臭氧因其強氧化的特性，所以常使用於飲水及污水的處理。作為消毒及氧化劑，其殺菌力為氯的3,000 倍，在世界各國淨水工程上應用臭氧消毒者有愈來愈多的趨勢。以國內為例，現有的淨水廠大多以加氯法消毒，然而加氯消毒之後水中檢驗出三鹵甲烷類之致癌性物質。所以在飲水品質日益嚴苛情況之下，以臭氧消毒是可行且有效的方法(葉, 1992)。使用臭氧與化學藥劑當做消毒劑的最大差別在於，臭氧對環境的傷害性極低，亦不會有藥物殘留或是對人體產生致癌、畸形等負面的影響。此外，臭氧還對於水質的改善有正面的效果，如有機物的去除、水色的改善、氮氮亞硝酸鹽類的去除等等。臭氧在高濃度時具有毒性，可使生物死亡、入侵菌類細胞膜而破壞DNA，DNA於受損後被破壞、RNA及溶霉菌等物質會

被臭氧分解、細胞內的蛋白及酵素會因此變性，使細菌或病毒死亡以及不活性化(陳, 2008)。

一般來說，細胞內具有重要功能而且易被臭氧分子攻擊的對象包含：(1)掌管物質進出的細胞膜，相關報告指出臭氧能氧化微生物細胞膜，其中細胞膜上可能與臭氧反應的物質，包含脂蛋白、不飽和脂肪酸以及革蘭氏陰性菌的脂多醣外膜 Lipopolysaccharide Layer(LPS)，當臭氧破壞細胞膜後可能影響其滲透性或是造成裂解，進而殺死細胞(Farooq *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999)。(2)細胞內部的蛋白與酵素，有別於氯氣選擇性的只與某些蛋白進行反應，臭氧可謂是通用的原生質氧化劑 (Protoplasmic Oxidant) (陳, 2008; Kim *et al.*, 1999)。(3)由核糖核酸所組成的遺傳物質，目前發現胸腺嘧啶(Thymine)比胞嘧啶(Cytosine)及尿嘧啶(Uracil)對臭氧更為敏感，如受到破壞會造成微生物死亡。臭氧對許多的細菌、病毒、原生生物有殺滅的效果是經過研究證實的，但在不同的實驗條件下，殺菌效果有個別差異，如 *Aeromonas salmonicida*、*Vibrio anguillarum*、*Vibrio salmonicida* and *Yersinia ruckeri* 有相關報告指出，臭氧對這些菌種的殺菌能力達到99%(Forneris *et al.*, 2003)。

對細菌族群而言，臭氧對革蘭氏陽性球菌的殺菌效果最好，次為革蘭氏陰性桿菌，再次為革蘭氏陽性桿菌，目前的研究成果發現，增加反應時間及臭氧濃度可提升臭氧對細胞型態細菌的殺菌功率，而孢子型態的細菌對臭氧耐受性遠高於細胞型態的細菌，在酸性環境下，可增加臭氧對內孢子的殺菌效率，細菌孢子對臭氧的抗性比營養細胞對臭氧的抗性強約10至15倍。如就微生物種類而言探討，臭氧易於殺死細菌，但不易殺死黴菌及酵母菌，而酵母菌又比黴菌對臭氧來的敏感；臭氧除了對細菌有殺菌效果外，對病毒亦有消毒效用，如Liltved 指出臭氧在不同魚種上表現的Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV)有消毒功效 (Liltved *et al.*, 1995)；Chang等研究報告中指出臭氧在蝦類的應用上可以殺死white spot syndrome baculovirus (WSBV) (Chang *et al.*, 1998)；McLoughlin等的報告指出使用

臭氣在大西洋鮭可有效殺死 Salmon Pancreas Disease Virus (SPDV) 病毒 (McLoughlin *et al.*, 1996)。

(四) 臭氣的應用

臭氣的應用如：水處理上的殺菌、硝化、沈澱金屬離子、降低水的濁度和COD，以及使水質澄清；去除水果上的有機物或降低農藥殘留；魚體表面殺菌。

使用臭氣為消毒劑之優點：

(1)不會形成三鹵甲烷 (Trihalomethanes)、鹵化醋酸 (Halogenated Acetic Acids) 或是其他的氯化消毒副產物 (Disinfection by Products) 的問題。

(2)不會殘留化學物質。

(3)高消毒力，臭氣對微生物 (細菌、病毒、孢囊) 之殺菌速率比氯快。

(4)臭氣受溫度與pH值的影響小。

(5)高氧化力，臭氣兼可去除水色及水質除臭除味用。

缺點為：

(1)臭氣生產設備費昂貴，且必須在現場製造。

(2)受水中有機物及無機物影響大。

(3)在水中分解快，不易保持殘餘濃度，易再污染。

(4)氧化力及消毒力強，缺乏指定作用上的選擇性。

(葉, 1992; 劉, 2001; 戴, 2002)

在水產養殖系統中，由於疾病的治療困難且成本昂貴，預防勝於治療為防治疾病的主要觀念，而有效防治危害養殖生物的有效方法是消毒。目前在水產養殖中所採取水體的消毒方法有很多如加熱法、紫外線輻射法、負氧離子氧化法、化學藥物、臭氣和光觸媒等。各種消毒方法分析結果，各有優缺點，如加熱法成本高，且不適合大規模養殖池的消毒；紫外線消毒雖然殺菌效果好、水中也無殘留

物、但其效果會隨UV燈管老化而變差，且不容易檢測老化程度；負氧離子氧化法因生產效率低價格高故不能普遍使用；化學藥物中常使用的有氯氣、漂白劑、次氯酸鈉、高錳酸鉀等，對養殖生物有毒性並不適合直接使用；而臭氧消毒有很好的效果，氧化能力約為氯氣的2倍，且達殺菌效果時所須劑量和接觸時間都比氯氣低，是一種較理想的消毒方法(杜, 1995)。室內循環水養殖系統中，無論是養殖水取樣或進行循環水養殖系統連線，實驗結果都顯示臭氧能將水中之亞硝酸及氨濃度予以降低，而且對水中總落菌數的減少亦非常明顯，此證明了臭氧本身為一良好之消毒劑。因而近年來已有部分業者採取臭氧殺菌方式，使用結果顯示臭氧具有高效率殺菌效果，可以確實將水體中菌體數降低。不過目前市面上臭氧產生機製造廠商，未能提供正確實臭氧產生濃度數據，以致進行對水質及魚體的影響與分析時，常因臭氧濃度過高，造成魚體的傷害(戴, 2002)。

(六) 臭氧的危險性

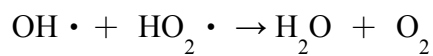
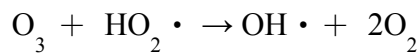
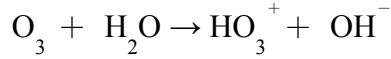
人體可以感覺的刺激性臭味之臭氧濃度在0.01-0.05ppm，20-30 ppm 的臭氧會刺激眼睛、鼻子及喉嚨，若高於1000ppm 會致死；當人處於1.5-2.0 ppm 的臭氧濃度下2小時，會出現口乾舌燥、胸部作痛、浮躁不安、思想組合困難、咳嗽等症狀，須1-14 天才能完全恢復正常。在1 ppm 的工作環境下，不能連續工作超過8個小時(陳, 2005)。

(七) 影響臭氧安定性之因素

臭氧在水中的溶解度符合亨利定律(Henry's Law)，其溶解度為氧氣的13倍，但是有許多因素會影響其溶解度，臭氧在水中之安定性概以臭氧初濃度、pH值、水溫、無機物及有機物之種類和含量多寡及曝露時間、氣體與水混合度等因素而異。

(1) pH值對臭氧反應之影響

當臭氧溶於水時，即迅速分解，並與水中的氫氧根離子形成一連串的鏈反應，Alder and Hill (1950) 指出臭氧在水中受到OH⁻離子的催化進行分解如下：



由以上可知OH⁻濃度對臭氧在水中的分解速度有催化的影響。

偏酸性溶液可提高臭氧之安定性，同時說明加少許乙酸於水中可顯著提高臭氧之濃度；早期的研究報告發現，在pH 3—11間以臭氧處理時，pH較低者偏酸性的水殺菌效果較佳。以pH 6.5、7.5、及8.5等值探討臭氧對霍亂弧菌之殺菌效果，亦以pH6.5時為佳(廖, 1994)，增加pH值可以使臭氧加速分解，臭氧本身的氧化能力會因此而提高，但臭氧的加速分解造成水中的殘留量降低，因此在提供充足的臭氧量的前提下，提高pH值，殺菌的比例會隨之提高(劉, 2001)。

(2) 溫度對臭氧反應之影響

臭氧在常溫下易被分解為氧，在水中溶氧量隨著臭氧量增加而升高。臭氧之殺菌力又與臭氧在水中還原為氧之時間有關，溫度愈低，臭氧被還原為氧氣之時間較長，故殺菌能力因而加強(Rebecca, 1998)。臭氧在常溫狀態下非常不穩定，高溫更會使水中氣體溶解量下降，在溫度超過了35 °C時臭氧容易分解成氧分子，使水中臭氧不穩定，當水溫越低，臭氧在水中的溶解度也越大，臭氧的半衰期則越長(Kusakabe *et al.*, 1991)。陳錫秋等人指出，臭氧的殺菌力和臭氧在水中還原為氧之時間有關(陳等, 1988)；溫度越低，臭氧被還原為氧氣的時間較長，故殺菌能力因而較強；若被還原速度較溶入速度快，則臭氧之殺菌力不但發揮不了作用，其所分解產生之氧氣反而有助於水中微生物之生長。Chen等指出在5°C及25°C的情況

下，5°C的臭氧溶解效率較佳，飽和臭氧濃度也較高(Chen *et al.*, 1994)。臭氧的密度約為氧氣的1.5倍，在20°C水中臭氧的溶解度為氧氣的11.5倍，但是水中的臭氧相當的不穩定。在20°C之純水中臭氧的半衰期約為3小時，但隨著pH值、溫度、催化劑的影響，半衰期將更短(劉, 2001)，Labatiuk等研究指出：高溫下會增加臭氧在水中的消耗速率，所以利用臭氧來降低*Giardia muriscysts*，在5°C下比在25°C下容易達成(Labatiuk *et al.*, 1992)。

(3) 溶液之有機成分

通常臭氧在水中以下列反應途徑與溶質反應：(1)臭氧直接與溶質反應（直接反應）；(2)臭氧分解成二次氧化劑(Secondary Oxidant)，形成反應性自由基(OH·或HO₂·)（間接反應）；(3)二次氧化劑與溶質發生後續反應。在臭氧氧化過程中，直接氧化與間接氧化的機制可能同時發生，然而隨著溶液狀態的不同，則只能一種作用機制較為明顯。另外臭氧直接氧化反應的速度慢，以分子態臭氧進行反應，這種反應具有高選擇性，分子態臭氧會很迅速的與活性芳香物質如苯的同系物—酚(Phenol)、間苯二酚(Resorcinol)、水楊酸鹽(Salicylate)、烯類(Olefins)及簡單的胺類(Amine)進行反應，間接氧化反應速度快，以臭氧分解後的自由基當氧化物進行反應，較無選擇性，如脂肪族(Aliphatic acid)、醛(Aldehyde)、酮(Ketone)以及活性不高的芳香族化合物，就以間接路線與臭氧反應(范姜, 2001; 鍾, 1994)。Nebel等認為，有機物造成起始之臭氧濃度需求，延緩消毒作用之進行，甚至使消毒完全停止，當以正常的臭氧濃度當作殺菌媒介時，其處理對象是微生物，如果水中含有高濃度的溶解有機碳，臭氧會先與有機物進行反應，此時消毒效率相當低，直到需求量被滿足後，臭氧才與微生物作用提高消毒效率，因此水中有機碳的濃度過高，會對臭氧殺菌的效果有抵銷的作用(Nebel, 1981)。

(4) 溶液中的無機離子

如果水中出現能夠被臭氧氧化的無機離子，則其分解速率會加速，促使水中

臭氧濃度的降低，阻礙了殺菌的功率。當以臭氧處理海水時，海水中的無機離子（如溴及氯）的濃度將會降低，後者尤其會產生有毒的物質(劉, 2001)

十、 卵質的探討

魚類的繁殖相關報告中，提到不管是野生族群或是養殖物種，其所產出的卵品質有相當大的差異，在人工孵化上卵的品質亦是影響成功大量孵化幼苗的限制因子。於一般的定義上，品質優良的受精卵通常會有較高的孵化活存率，從胚胎發育期直到幼苗孵化，可生產出健康以及快速生長的幼苗(Lahnsteiner *et al.*, 2001)。在鮭魚的養殖上，卵質的差異可能與種魚的卵母細胞老化有關，而卵母細胞的老化衰敗可能是數天或是數星期，這些因子與卵的活存率、卵的形狀及卵的生化組成有關。在這些相近的魚種上，成熟的卵母細胞分化成卵子後，會存在於腹腔中的卵巢內，直到受到環境或是族群繁殖行為的刺激，產生產卵行為將卵產出排出體外。而在人為控制的養殖環境下，這些行為或是溫度水質造成的環境因子影響較微弱，所以成熟的母魚的卵母細胞蓄積過久而未排出，造成卵母細胞老化，影響生產的卵的品質(Aegerter and Jalabert, 2004; Lahnsteiner *et al.*, 2001)。即使在不同的魚種上，陸續有相關報告指出許多與卵質相關的特徵，如母魚的體重、卵母細胞的濕重、卵巢液的pH值、滲透壓及蛋白質濃度等因子與卵質的相關性(Boulekbache *et al.*, 1989; Lahnsteiner *et al.*, 2001)，除了這些新的檢測因子外，可結合傳統的卵質評斷方法如各胚胎發育期的活存率、魚苗的畸形率等。

在淡水螯蝦人工孵化上，受精卵的品質亦取決於種蝦的繁殖環境與營養供給情形。因此卵質的好壞不是人工孵化可以克服的問題，良好的孵化設備、水體環境控制、適當的消毒濃度與頻率為本人工孵化上所探討研究的重點。

十一、水體溫度的探討

水溫是影響蝦類各項生理重要的環境因子，如代謝活性、氧氣消耗、攝食情形、成長、脫殼、存活及對毒性物質的容忍與代謝(Hewitt and Duncan, 2001)，水溫也會影響蝦類對疾病的抵抗能力，或是水體中病原菌的增殖。溫度對於蝦苗生長亦有重大影響，Verhoef等的報告中，試驗不同溫度（22°C、25°C、28°C）及不同密度對淡水螯蝦*Cherax destructor*蝦苗育成，結果得到22°C處理組活存率高達93%，顯著高於其他二組溫度組別，此結果與同蝦種的其他報告有類似的結果，當溫度升高時，生長速率會提升但是活存率會降低(Verhoef and Austin, 1999)。在Jones的報告中，探討淡水螯蝦*Cherax quadricarinatus*幼苗在不同溫度（24°C、28°C、32°C）下孵化跟活存率的關係，結果得到28°C為最適當的成長溫度，而活存率方面28°C組別為65%、32°C組別為87.5%(Jones, 1990)。Chen等在克氏原螯蝦的研究報告中，結果得到將溫度提高（15°C→30°C），會讓螯蝦的平均脫殼間期減少，持續的養殖觀察下，30°C組別的平均脫殼次數是20°C組別的三倍，不過相對的高溫也會增加死亡率(Chen *et al.*, 1995)。Hammond等人在淡水螯蝦*Paranephrops zealandicus*蝦苗培育實驗中，探討不同溫度（14°C、16°C、18°C、20°C、22°C）跟鈣離子對其生長與活存率的影響，實驗結果得到隨著水溫增加（14→22°C），蝦苗的活存率、各組總生物量、脫殼間期、生長率SGR各項參數都明顯的降低(Hammond *et al.*, 2006)。

在許多海水魚類孵化及幼苗的觀察中，發現卵及卵黃囊對溫度具有極高敏感性，且低溫會延遲胚胎吸收、消耗卵黃囊、導致飢餓的發生、降低組織代謝以及發育的速率 (Watanabe *et al.*, 1995; Yang and Chen, 2005; Polo *et al.*, 1991)。魚類孵化的相關報告指出，孵化時間會影響魚苗大小，時間與大小成倒數的關係(Peterson *et al.*, 1977)。影響的原因與卵黃囊的吸收轉換效率有關(Hamor and Garside, 1977)。近來的研究則著重在幼苗大小與溫度影響之間的

關係。Gracia-Lopez等指出*Mycteroperca rosacea*卵孵化中，在四組不同溫度（20°C、24°C、26°C及28°C）處理下，20°C處理組所生產出來的幼苗有最大的尺寸，作者指出在高溫下卵的油滴直徑較大，會縮短培育的時間（Gracia-Lopez *et al.*, 2004）。生物體器官形成與軀體生長，與酵素的活性影響有關，變溫動物的胚胎發育，主要依賴於某幾個不同基因的表現與溫度影響。在生物學的功能方面，環境的溫度是主要決定胚胎發育的速率(Ojanguren and Brana, 2003)。魚類孵化的報告中指出，提升水溫會增加胚胎代謝的活性，導致卵黃囊被快速的吸收與消化利用轉變成身體組織，縮短了胚胎發育的時間，但是當環境溫度接近物種的容忍範圍的上限時，卵黃囊的吸收與利用的效率就會降低。



第三章 材料與方法

一、 實驗生物蓄養與孵化系統架設

壹、實驗生物：實驗生物佛羅里達藍螯(*Procambarus alleni*)購自水族館，飼養 2-3 個月待體長達 6-7 公分後，開始繁殖配對，方法為挑選雙螯完整、健康狀況良好的個體，配對採隨機將一對公母放在水缸中，若無交配行為即分開避免爭鬥殘食。平日餵食市售斑節蝦飼料及冷凍赤蟲，一天餵食一餐，換水頻率為一周一次，光週期 8 小時，飼育水族缸之水體為 20 公升，單隻單缸飼養搭配氣動式海綿過濾，在水質參數部分，溫度隨氣候升降範圍 19-28°C，Total Disolved Substance (TDS) 維持在 100-150 ppm 左右，pH 值無特別調整。

貳、人工孵化裝置：人工孵化裝置參考 Henryon and Purvis(2000)，為了操作方便另外加以改良，主體魚缸水體 40L，內置氣動式海棉過濾器及裝設圓桶過濾器來維持水質穩定，並且藉由外接式低溫循環水浴槽來準確的監控及調節溫度。每一個孵化單元是由動物灌食針筒內置離心管組成，其中離心管尖端及蓋子鑿洞上下加上尼龍網，避免孵化過程中卵或是仔蝦的散逸，孵化單元由沉水馬達推動使水流不間斷的通過，讓卵懸浮並持續的滾動（附錄三、附錄四）。水質參數：孵化過程中氨氮、亞硝酸氮濃度低，pH 值 6-8，TDS 控制為 100-150 ppm，溫度根據實驗設計而改變。

二、 實驗處理與紀錄

壹、 卵的處理與胚胎發育定義：每日觀察蓄養配對的種蝦是否抱卵，發現抱卵後 3-5 天內，以小鑷子將泳足上的卵取下，分別計算紀錄左側與右側泳足的總卵數，將死卵及受真菌感染的卵剔除，並將健康的卵一一分離，避免人工孵化時黏結成一團，將所有數據收集後進行統計分析，觀察左右二側的總卵數有無差異。依照不同實驗設計將卵分別置入人工孵化裝置中，而每隻母蝦每次取下的卵，視為一個實驗組，實驗至少三重複，實驗過程中，每天移除死卵並且計算數目，胚胎發育後期分別紀錄仔蝦 Stage I → III 的發育時間及各自的存活率，實驗進行到 Stage III 階段即結束。胚胎發育則是各期幼苗使用光學顯微鏡及解剖顯微鏡 40 倍率下觀察並且定義參考國外文獻(Vogt and Tolley, 2004)，拍照細分 Stage I → III 各期的特徵。

貳、 存活率：人工孵化實驗期間，每日1次固定移除死卵、發霉卵及死亡的幼生胚胎，每天紀錄一次總卵數，在卵孵化後，則分別記錄Stage I → III的各期存活數以及進入各期的時間，活存數為起始總數扣除累積的死亡數，統計後推算各期的累積存活率來顯示人工孵化的結果。

參、 最佳的臭氧機使用效率：試驗使用之臭氧產生器產生臭氧經臭氧分析儀檢測，出口量濃度依照可調控的旋鈕不同範圍10-100%為0.84→3.45 g/m³，臭氧發生量則為252→993(mg/hr)。實驗時將臭氧機連接空氣管與氣泡石輸入40 L水箱中，每隔10分鐘利用臭氧檢測儀器檢測水箱中臭氧殘留濃度，得到時間與水中臭氧濃度的相關曲線，以利後續實驗參考應用，實驗水體使用自來水。

肆、 臭氧濃度對仔蝦的致死時間：將臭氧輸入40L水中，在臭氧殘留濃度達平衡濃度時，試驗臭氧殘留濃度0.05ppm及0.3 ppm分別對1.5公分幼苗之毒性，得到在不同濃度其致死時間的關係曲線。實驗生物20隻，實驗共三個重覆組。另一組毒性實驗為，試驗臭氧殘留濃度0.05ppm及0.3 ppm的臭氧分別浸泡1.5公分幼苗30分鐘，觀察浸泡後有無毒性效應。實驗生物20隻，實驗共四個重覆組。

三、 實驗設計

壹、 密度實驗：從抱卵母蝦身上取出卵後，將卵分為三個處理組別，數量依序為每組40、80、120顆卵，實際密度分別為0.8、1.6、2.4(卵數/毫升)，分別放置於獨立的孵化單元內，離心管體積50ml，每日移除死卵直到胚胎發育期到達stageIII的仔蝦，推算最後存活率。實驗過程中，水體與卵皆沒有進行消毒處理，溫度沒有控制隨氣候升降，每週換水一次。實驗中每組五個重複。

貳、 溫度實驗：從抱卵母蝦身上取出卵後，每一組的卵數為50顆/管，放入三組獨立的人工孵化裝置水槽中，藉由外接低溫循環水浴槽控制溫度，將實驗的3組水槽溫度分別設定為 $20\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、 $24\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、 $28\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 三個處理組，實驗過程中每日移除死卵直到胚胎發育期到達stageIII幼苗階段，紀錄仔蝦從stage I → III的各期胚胎發育時間及各期的存活率，期望得到適當的孵化溫度。實驗過程中，水體與卵皆未進行藥浴處理，實驗中每組四個重複。

參、 臭氧實驗—不同臭氧濃度對受精卵的浸泡消毒：人工孵化期間，使用臭氧水對卵進行消毒浸泡處理，孵化方式與前敘實驗相同，每天取出孵化單元出來浸泡臭氧水一次，觀察最後的孵化存活率。實驗處理共分為控制組及實驗

組四組，水中臭氧濃度調整為0.05 ppm與0.3 ppm 二個濃度並且分別浸泡10分鐘及30分鐘，控制組則為使用甲醛處理(濃度3000ppm浸泡15分鐘)的組別。實驗前先將臭氧機暖機，在浸泡實驗水槽中曝氣，當臭氧濃度達預設濃度的動態平衡後，將孵化單元取出浸泡，達設定時間完成消毒動作後再放回原先的人工孵化裝置。實驗密度、溫度參考實驗1-2的結果，將密度設定為40/組，溫度為 $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，實驗中每組四個重複。

肆、 臭氧實驗—不同臭氧濃度對孵化水槽與受精卵的消毒：在人工孵化期間，使用臭氧水對人工孵化裝置的水槽直接進行消毒處理，觀察最後的孵化存活率。實驗處理共分為五組水槽，正負對照組置於同一座水槽，與前敘實驗相法相同，每天取出孵化單元出來浸泡甲醛一次，正負對照組分別為沒有處理的空白控制組及甲醛處理的正控制組，而實驗組四組分為四座獨立水槽，每天一次直接將臭氧曝氣打到水槽中，藉由臭氧機的旋鈕調整臭氧水的濃度，而實驗組四組，分別為臭氧濃度0.05ppm與0.3ppm同時對孵化水槽與受精卵消毒二組以及臭氧濃度0.05ppm與0.3ppm僅對孵化水槽消毒二組，時間皆為處理30分鐘。實驗密度、溫度參考實驗1-2的結果，將密度設定為40顆/組，溫度為 $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，實驗中每組三個重複。

伍、 溫度與消毒處理實驗：此實驗參考實驗1-3的結果與步驟，設定密度為每組孵化單位40顆卵，實驗共分為二個溫度與三個消毒方式互相比較，溫度分別為 $24\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 及 $30\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，消毒處理分別為空白控制組、甲醛處理組、臭氧處理組，六個組別分別為 24°C 的空白控制組、 24°C 的甲醛組、 24°C 的臭氧組、 30°C 的空白控制組、 30°C 的甲醛組、 30°C 的臭氧組，甲醛處理濃度3000ppm浸泡15分鐘，臭氧水的處理濃度為0.05ppm浸泡30分鐘。實驗中每組三個重複。

陸、人工孵化與自然孵化對照實驗：此實驗參考實驗1-3的結果與步驟，設定密度提高為每組孵化單位100顆卵、溫度設定為 22 ± 0.5 °C，實驗共分為二組，人工孵化處理組與母蝦自然孵化組，在人工孵化的組別又分為二個處理，分別為臭氧水的處理，濃度為0.05ppm浸泡30分鐘，甲醛處理濃度3000ppm浸泡15分鐘。人工孵化的實驗組別為將抱卵母蝦一側泳足的卵剝離，依照上述的條件處理。而自然孵化的對照組別為同隻母蝦另一側卵任母蝦自行孵化，實驗過程紀錄二組的各期孵化率及孵化時間，實驗共四個重複。

柒、實驗設備：

- I. 培養箱 (SANYO incubator MIR-153)
- II. 恆溫循環水浴槽
- III. 臭氧機 (登氏企業有限公司，高效率套組式臭氧機 OWA-1000-C/T)
- IV. Ozone meter(環凱攜帶式臭氧比色計)

四、統計分析

統計分析方法分為三部份，實驗一（密度實驗）與實驗二（溫度實驗）之結果使用 SAS(Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., USA)統計軟體，使用 Least Significant Difference (LSD)法進行單因子變異分析 One-way ANOVA，設定 $P < 0.05$ 時為有顯著差異；實驗三、實驗四（臭氧消毒實驗）與實驗五（溫度與消毒實驗）之結果使用 Microsoft Office 2007 之 Excel 統計軟體，採用 Student' s t-test 統計法進行單因子變異 (One-way Analysis of Variance, ANOVA) 分析各項測值，設定 $P < 0.05$ 時為有顯著差異；實驗六的結果使用 Microsoft Office 2007 之 Excel 統計軟體，Chi-Square Test 統計法，設定 $P < 0.01$ 時為有顯著差異。

第四章 結果

一、 水中殘留臭氧濃度

先將臭氧機開啟 10 分鐘熱機後，將臭氧機產生之臭氧經曝氣管線輸入 40L 水箱中，水溫 22°C，水體為未經處理及過濾的自來水，水箱中沒有任何其他擾動水體的裝置與生物，藉此比較臭氧機在不同出氣濃度下水箱中臭氧殘留濃度之變化。由實驗結果得知，從開始輸入臭氧後，不同的臭氧輸入量都在第一次檢測點 10 分鐘時達到最高值，水中之臭氧殘留濃度穩定，代表臭氧溶入水中的量和臭氧自水中散去的量接近達到平衡，皆接近最高臭氧殘留濃度，且在 60 分鐘內維持動態平衡。在臭氧機的 10% 功率的臭氧量供給下，水中臭氧濃度最高為 0.34 ppm；在臭氧機的 30% 功率的臭氧供給下，水中臭氧濃度最高為 0.50 ppm；在臭氧機的 70% 功率的臭氧供給下，水中臭氧濃度最高為 0.56 ppm。而當在 60 分鐘後停止供給臭氧，水箱持續打氣曝氣，觀察水中的臭氧殘留濃度，結果當停止供應臭氧 10 分鐘後，殘留濃度皆降低為各組最高濃度的 1/2 以下，並且在 60 分鐘後殘留濃度皆變成 0 ppm(圖一)。由此初步的臭氧機功率與水中臭氧殘留濃度的實驗得到時間與濃度的相關數據後，方便後續實驗操作上調整水中臭氧的濃度。

二、 胚胎發育

胚胎發育的分期，在淡水螯蝦上並沒有一個統一劃分的方法，且各蝦種胚胎發育在不同的文獻中判定方式也不同(Kawai, 2002; 孟等人, 2000)。因此在本論文中參考前人文獻不同蝦種的定義，將胚胎發育分為二部分：(1) 受精卵胚胎發育期 (2) 各期幼苗幼體發育。佛羅里達藍螯蝦產下的受精卵為黑褐色，圓球形表現光滑，受精卵的卵膜厚卵黃比例大，健康受精卵彈性佳，不會因為輕微擠壓而導致破裂，卵直徑 1.0-2.0mm，隨著胚胎的發育，卵粒會呈現部份透明，透明區會隨時間不斷的擴大，頭胸甲部分卵黃比例則相對縮小。於孵化出膜前期，在顯微鏡下可清晰

觀察到透明部位內部呈現頭胸甲、複眼、胸肢、腹部的構造，頭胸甲此時約佔全身比例的 1/2，可看到些許色素沉澱，最後破卵膜孵化，不需經過浮游期或是變態期。本論文以持續觀察定義前三期幼苗的特徵為主要判定方式。

第一期幼苗 (Stage I)：頭胸部比例大，含卵黃囊，身體彎曲不能直立，整體外部型態呈現球狀，身體只能簡單的來回彎曲，沒有眼柄不能轉動，觸鬚極短，不再新增體節，腹肢發育尚未完整不能自由活動，尾扇尚未分化，缺乏剛毛，沒有移動及防禦的能力（附錄五—第一期幼苗）。

第二期幼苗 (Stage II)：第一期幼苗經過一次脫殼後進入第二期幼苗，因為卵黃囊大部分被吸收（卵黃囊呈現八字型的形狀），頭胸甲與第一期相比，顯得比較扁平，腹部與第一期幼苗相比已經可以伸直，具有些微地游泳能力，但仍無防禦能力，眼柄開始發育，同時腹肢和尾節的末端開始長出剛毛，具有較大的螯，較長的第一二觸鬚，且觸鬚開始伸直，色素明顯沉澱在腹甲、頭胸甲、肢體。在自然孵化的情形下，第一期幼苗與第二期幼苗如意外剝離母蝦的泳足，則無法重新回到泳足上，且無法存活（附錄五—第二期幼苗）。

第三期幼苗 (Stage III)：頭胸甲部位的卵黃囊幾乎吸收完畢，外部型態與成體相近無差異，眼柄發育完整，第一對步足的大螯可以自由張合活動，藉由腹部的彈跳在水中的移動能力增強，步足發育完整可以自由在底部活動，第一二對觸鬚更為明顯，外骨骼的色素沉澱，顏色開始加深，逐漸呈現藍色。尾節與尾足構成完整的尾扇構造且具有剛毛。第三期幼苗開始脫離母蝦且有攝食行為，同類間的殘食與爭鬥行為也會被觀察到（附錄五—第三期幼苗）。

三、 左右側泳足抱卵數

將八隻抱卵母蝦的受精卵取下，分別計算左右二側的泳足，其計算結果如下，
第一組：左 105 顆、右 91 顆，第二組：左 214 顆、右 220 顆，
第三組：左 83 顆、右 90 顆，第四組：左 194 顆、右 200 顆，

第五組：左 257 顆、右 237 顆，第六組：左 152 顆、右 156 顆，

第七組：左 251 顆、右 254 顆，第八組：左 212 顆、右 230 顆。

八組平均值：左 183.50 顆、右 184.75 顆，標準差 0.88 顆，左右兩側卵數沒有顯著差異（表一）。

四、 臭氣毒性實驗

在不同濃度連續浸泡的實驗，結果顯示高臭氣濃度 0.3ppm，第二期幼苗在 70 分鐘內全數死亡，1.5 公分的蝦苗在 80 分鐘內全數死亡。低臭氣濃度 0.05ppm 的組別，1.5 公分的蝦苗在連續浸泡 120 分鐘後開始緩慢死亡，實驗持續進行到 360 分鐘，平均的活存數尚餘 16.7 隻(圖二、圖四)。

在浸泡臭氣水 30 分鐘的結果上，在高臭氣濃度 0.3ppm，1.5 公分蝦苗於 90 分鐘內全數死亡，低臭氣濃度 0.05ppm，1.5 公分的蝦苗持續觀察 1 天無死亡情形(圖三)。

五、 密度實驗

密度實驗結果顯示，三個不同密度的組別，分別為低密度 40 顆/管、中密度 80 顆/管、高密度 120 顆/管（代號分別為 D40、D80、D120）實驗數據上沒有顯著差異，各期幼苗平均活存率分別為 Stage I 活存率 66.5-73%、Stage II 活存率 54.8-64.5%、Stage III 活存率 47.5-51%(圖五)。而整體平均來說，低密度組別（40 顆/管）的各期幼苗活存率（Stage I：73%、Stage II：64.5%、Stage III：51%）皆略高於中、高密度的組別。在統計上三個處理組之間的三個幼苗時期的活存率皆沒有顯著差異(圖五)。因此，為了操作上的方便、降低風險以及多增加實驗處理組別等原因，後續實驗會以較低的密度（40 顆/管）進行處理。

六、 溫度實驗

以三種不同溫度處理組包括 20°C、24°C 及 28°C 的實驗，希望能獲得較短孵化時間、較高孵化率以及降低水黴菌的感染情形。

20°C 處理組的結果為 Stage I 活存率 85.5%、Stage II 活存率 79.5%、Stage III 活存率 68%；24°C 處理組的結果為 Stage I 活存率 56.5%、Stage II 活存率 50%、Stage III 活存率 48%；28°C 處理組的結果為 Stage I 活存率 61.5%、Stage II 活存率 51%、Stage III 活存率 44.5% (圖六)。由結果中發現：20°C 的處理組其幼苗的三個時期 (Stage I->III)，幼苗之平均活存率皆顯著高於 24°C 及 28°C 的組別；24°C 及 28°C 二組之間則沒有顯著差異。

平均孵化時間上，20°C 的組別需要 23 天才能發育為 Stage III 幼苗，24°C 與 28°C 則分別為 18 天與 12.5 天即可達到 Stage III (圖七)。此階段的累積死亡率於統計上發現，三個溫度的 stage I 幼苗活存率分別為 20°C：85.5%、24°C：56.5%、28°C：61.5%。因此，在人工孵化期間，從卵的胚胎發育到 Stage I 時，這段時間最容易死亡或是受到水黴菌的感染，且在實驗結果上發現，20°C 的實驗組，受精卵發育到 stage I 這段時間的死亡率最低 (14.5%)，Stage II 到 Stage III 的死亡率與 24°C 與 28°C 處理組則沒有顯著差異。因此，判斷在發育到 Stage I 之前的受精卵胚胎發育時間是影響最後活存率關鍵時期。

七、 臭氧消毒實驗

以臭氧消毒的實驗中，水溫固定為 22°C，實驗孵化單元的密度為 40 (顆/管)，探討比較孵化系統水體中不同濃度臭氧的消毒處理效力差異，並且與正控制組用甲醛消毒做比較。

實驗結果：

正控制組平均活存率結果為 Stage I：86.3%、Stage II：75.4%、Stage III：68.8%。

臭氧處理組 A：0.05 ppm (10 分鐘) 的平均活存率結果分別為 Stage I：86.25%、

StageII : 72.5%、Stage III : 60.6%。

臭氧處理組 B : 0.05 ppm (30 分鐘)的平均活存率結果分別為 Stage I : 83.1%、StageII : 70%、Stage III : 59.4%。

臭氧處理組 C : 0.3 ppm (10 分鐘)的平均活存率結果分別為 Stage I : 78.8%、StageII : 68.8%、Stage III : 56.7%。

臭氧處理組 D : 0.3 ppm (30 分鐘)的平均活存率結果分別為 Stage I : 77.5%、StageII : 63.8%、Stage III : 53.8%。

實驗結果顯示，甲醛處理的控制組三期幼苗的平均活存率皆為最高，而臭氧處理的四組組別，活存率則隨著臭氧濃度與處理時間的上升而降低，臭氧處理組 A : 0.05 ppm (10 分鐘)的活存率最高，臭氧處理組 D : 0.3 ppm (30 分鐘)則最低，不過四個臭氧處理組別之間並沒有顯著差異。四個臭氧處理組別與控制組沒有顯著差異 (圖八)。

八、 臭氧消毒實驗—水體 VS.卵的處理

水溫為 22°C，實驗孵化單元密度為 40 (顆/管)，探討比較孵化系統水體與螯蝦卵單獨或是同時做臭氧消毒處理的差異，並且與未處理的 Control 組及用甲醛消毒的正控制組做比較。實驗結果：

Control 組平均活存率結果為 Stage I : 77%、StageII : 70%、Stage III : 62.5%。

正控制組平均活存率結果為 Stage I : 90%、StageII : 82.5%、Stage III : 77.5%。

臭氧處理組 A : 0.05 ppm(水+卵)的平均活存率結果分別為 Stage I : 80.8%、StageII : 75%、Stage III : 70%。

臭氧處理組 B : 0.05 ppm(水)的平均活存率結果分別為 Stage I : 86.7%、StageII : 75.8%、Stage III : 70.8%。

臭氧處理組 C : 0.3 ppm(水+卵)的平均活存率結果分別為 Stage I : 89.2%、StageII : 85%、Stage III : 78.3%。

臭氧處理組 D：0.3 ppm(水)的平均活存率結果分別為 Stage I：87.5%、Stage II：78.3%、Stage III：74.2%。

實驗結果顯示，水體與卵都沒有做消毒處理的空白控制組，其三期幼苗平均活存率均是最低，甲醛處理的正控制組三期幼苗與 Control 組相比，其活存率皆有顯著提升，臭氧處理組別中，臭氧處理組 A：0.05 ppm(水+卵) 與臭氧處理組 B：0.05 ppm(水)二組與空白組比較皆沒有顯著差異，臭氧處理組 C：0.3 ppm(水+卵) 在第二期與第三期幼苗的活存率上與空白組相比有顯著提升的效果，臭氧處理組 D：0.3 ppm(水)則在第一期與第三期幼苗的平均活存率上與空白組相比有顯著提升的效果（圖九）。

九、 溫度與消毒處理實驗

本實驗同時探討溫度與消毒處理對孵化率的影響，溫度設定為 24°C 及 30°C，消毒方式則分為空白組、甲醛處理組、臭氧處理組，實驗結果如下：

24°C 空白組:Stage I 活存率 41.6%、Stage II 活存率 27.5%、Stage III 活存率 25.8%

24°C 甲醛組:Stage I 活存率 80.8%、Stage II 活存率 64.1%、Stage III 活存率 59.1%

24°C 臭氧組:Stage I 活存率 80%、Stage II 活存率 71.6%、Stage III 活存率 64.1%

30°C 空白組:Stage I 活存率 26.6%、Stage II 活存率 5%、Stage III 活存率 3.3%

30°C 甲醛組:Stage I 活存率 30%、Stage II 活存率 6.6%、Stage III 活存率 3.3%

30°C 臭氧組:Stage I 活存率 37.5%、Stage II 活存率 10.8%、Stage III 活存率 10%

在實驗結果中，24°C 甲醛組與臭氧組各期幼苗(Stage I→III)孵化活存率皆顯著高於 24°C 空白組與 30°C（空白組、甲醛組、臭氧組）的三個組別。在 30°C 的組別中，30°C 甲醛組與臭氧組各期幼苗(Stage I→III)孵化活存率跟 30°C 空白組之間沒有顯著差異（圖十）。

十、 人工孵化與自然孵化實驗

在自然孵化 (Maternal Incubation; 簡寫 MI) 與人工孵化 (Artificial Incubation; 簡寫 AI) 的實驗中, 四個重複組的孵化結果分列如下, 其中甲醛為正控制組 (3000ppm; 15 分鐘/天), 臭氧浸泡處理組為 0.05ppm; 30 分鐘/天; 水體加卵一起使用臭氧處理 (圖十一)。

重複組 A: AI (甲醛 A) 與 AI (臭氧 A) 活存率顯著高於 MI (A)。

MI (A) 自然孵化的最後第三期幼苗的數目為 48 隻, 反推的活存率為 23%;

AI (甲醛 A) 組活存率分別為 Stage I: 90%、Stage II: 81%、Stage III: 74%;

AI (臭氧 A) 組活存率分別為 Stage I: 73%、Stage II: 66%、Stage III: 61%。

重複組 B: AI (甲醛 B) 與 AI (臭氧 B) 與 MI (B) 皆無顯著差異。

MI (B) 自然孵化的最後第三期幼苗的數目為 126 隻, 反推的活存率為 63%;

AI (甲醛 B) 組活存率分別為 Stage I: 72%、Stage II: 67%、Stage III: 57%;

AI (臭氧 B) 組活存率分別為 Stage I: 79%、Stage II: 74%、Stage III: 68%。

重複組 C: AI (甲醛 C) 與 AI (臭氧 C) 活存率顯著高於 MI (C)。

MI (C) 自然孵化的最後第三期幼苗的數目為 20 隻, 反推的活存率為 10%;

AI (甲醛 C) 組活存率分別為 Stage I: 73%、Stage II: 63%、Stage III: 60%;

AI (臭氧 C) 組活存率分別為 Stage I: 70%、Stage II: 65%、Stage III: 60%。

第五章 討論

在本論文密度實驗中結果顯示，三個密度處理組別之間沒有顯著差異，在沒有對水體及卵做任何的消毒情形下，實驗操作時，密度越高卵越容易受到真菌感染，而變成整團的卵黏結，使卵的缺氧而死亡，或容易受到水黴菌的感染。因此，需要不斷的注意觀察並且隨時挑掉死卵，否則死卵容易阻塞住進水口，造成整批卵大量受到水黴菌感染或是缺氧死亡，而低密度的組別則風險較低，密度低可以減少卵的彼此接觸的機會，降低藉由水黴菌絲的直接接觸傳染，結果與 Celada 等及 Henryon and Purvis 研究結果相似，在不同淡水螯蝦卵的人工孵化上，於沒有消毒的情形下，降低密度可有效提升整體孵化率(Celada *et al.*, 2004; Henryon and Purvis, 2003)。相關研究報告指出，如果在後續的實驗中加入以臭氧的處理方式，達到抑制水體中水黴菌或其他細菌的增長繁殖情形下，可望將孵化密度有效提高，並增加後期之孵化率及活存率(Celada *et al.*, 2004)。有報告探討人工孵化密度條件及消毒方式，比較二組不同密度 (2.2、6.6 eggs/cm²) 及有無使用甲醛處理 (1500、4500 ppm) 對孵化的影響。實驗結果顯示，相較於 Control 組沒有做消毒處理的情形下，密度高的處理組，其孵化率僅 22.6%，而在使用甲醛(4500 ppm)處理的二個密度組別 (2.2、6.6 eggs/cm²) 孵化率則無顯著差異 (61→64.3%) (Celada *et al.*, 2004)。Saez-Royuela 等的實驗結果中顯示，通訊螯蝦(*Pacifastacus leniusculus*) 的人工孵化過程中，使用甲醛對卵進行消毒處理，並且探討降低水流及提高密度對整體孵化率的影響，成功的將密度提高達 5.5 倍(7.6→42 eggs/cm²)，最後第二期幼苗孵化率達到 86.1% (Saez-Royuela *et al.*, 2009)。

不同孵化密度並不會影響胚胎的孵化時間以及蝦苗的重量，只有第二期幼苗活存率有差異，低密度組別 (0.35、0.70 eggs/ml) 於第二期幼苗的平均活存率略高於高密度 (2.80 eggs/ml) 組別 5.7→5.8%(Henryon and Purvis, 2003)。由本實驗結果顯示，第二、三期幼苗殘食造成的死亡率增加在本實驗中亦有觀察到。(Stage II 的活存率 D 40 : 65%、D 80 : 59%、D 120 : 55% ; Stage III 的活存率 D 40 : 51%、

D 80 : 46%、D 120 : 49%) 低密度的組別 D 40 的第二、三期幼苗活存率普遍高於另外中密度及高密度二組 5-10%，不過在統計上並沒有顯著差異（圖五）。

以往淡水螯蝦的報告中，人工孵化都只是持續紀錄觀察到第二期幼苗，但是在本論文所有的實驗都是持續記錄到第三期幼苗，雖然從第二期發育到第三期幼苗會因為殘食造成數量上的折損，但是在整體操作過程上，第二期幼苗因為尾扇尚未完全發育完成，個體移動能力不佳，所以不管是人工孵化或是自然孵化的情況，都會造成群體互抱成球狀，此狀態下，要詳細計算數量及存活率非常不易，需使用鑷子將幼苗一隻一隻剝離，極易造成幼苗受到機械性傷害，而且耗費時間與人力，而本實驗中觀察發現，幼苗在孵化單元內發育到第三期幼苗時，個體會互相分開隨著水流漂動。因此，較易計算數量且不會造成幼苗的機械性傷害。

根據以上文獻的結果，卵的孵化密度，並非人工孵化過程中最為主要的影響因子，實際上在自然孵化的情形下，母蝦泳足上的卵量非常高（不同物種差異大，可以達到 20→2000 顆），其密度遠大於人工孵化所使用之密度。雖然會因為物種或是成熟度不同而有差異，孵化率的好壞與母蝦所提供的卵黃囊營養，亦即卵的內生性營養物質及母蝦護卵行為有關。而人工孵化所要探討的重點，是如何營造最適當的孵化環境條件。因此，真正與人工孵化的密度因子有影響的相關條件，取決於孵化單元的空間限制、設備是否穩定供給水流量以及孵化設備的水質因子的掌控（氨氮、亞硝酸鹽類、溶氧、疾病等）有關。

在適當的消毒處理下，可降低或避免水黴菌的感染(Henryon and Purvis, 2003; Celada *et al.*, 2004; Saez-Royuela *et al.*, 2009)，而在本文後續人工孵化與自然孵化的實驗中，人工孵化的處理組將密度提高為 100 顆/管，每日使用甲醛或是臭氧消毒，此實驗對照密度實驗的結果，在第三期幼苗活存率有明顯提高的效果（圖五、十一）。因此，在適當消毒下，即使提高孵化密度，並不會影響最後的孵化活存率。在未來後續的研究上，於進行消毒處理的情形下可嘗試將卵的密度提昇，以減少器材及空間上的成本。

溫度是決定水生變溫動物胚胎發展與活存率的關鍵因子，胚胎發育是個複雜且精密的過程，細胞的分化與增殖是同時而不同速率的進行著，溫度亦會影響幼苗的尺寸、成長與存活、卵黃囊的吸收、能量保存與轉換效率等(Gracia-Lopez *et al.*, 2004)。因此，要達到成功的孵化操作與生產蝦苗，瞭解受精卵孵化對於溫度的容忍性與最適合的範圍是必要的。調控水體溫度的高低為人工孵化技術的優點之一，人工孵化時可藉由調控環境溫度來達到控制胚胎發育時間的長短(Celada *et al.*, 2001a; Celada *et al.*, 2001b; Perez *et al.*, 2003)。實驗處理的水溫設定基準為，在平常蓄養繁殖的觀察中，溫度於 20-30°C 時皆有母蝦抱卵之情形，但適當的孵化溫度則沒有文獻記載，因此希望藉由本實驗得到此蝦種最適當孵化溫度。於本論文中不同孵化溫度實驗結果發現，溫度升高可以縮短孵化時間並提升生產的速率，不過卻常常造成孵化率偏低，實驗結果顯示 20°C 的處理組其幼苗的三個時期 (Stage I → III)，幼苗之平均活存率皆顯著高於 24°C 及 28°C 的組別；24°C 及 28°C 二組之間則沒有顯著差異 (圖六)。另外，發現同樣的處理不同重複組的數據上，24°C 及 28°C 的平均活存率的標準差明顯大於 20°C 的處理組別，顯示 20°C 的溫度處理下，胚胎可以穩定的發育孵化，環境的其它變因影響較小，不像 24°C 及 28°C 處理組不同重複組之間的活存率高起伏大，造成標準差數值偏高。

在魚類孵化與淡水螯蝦的報告中提到，在不同物種容忍的適當需求溫度範圍內，提高溫度可有效的縮短孵化時間，一般來說孵化溫度與胚胎發育的時間呈現反比的關係式(Blaxter, 1992; Henryon and Purvis, 2003)。而在本實驗結果觀察到相同的趨勢，平均孵化時間上，20°C 的組別需要 23 天才能達到 Stage III 幼苗，24°C 與 28°C 則分別為 18 天與 12.5 天即可達到 Stage III (圖七)，胚胎發育達到 Stage III 幼苗的孵化時間，20°C 組別(23 天)與 28°C 組別(12.5 天)差異幾乎達二倍。在淡水螯蝦 *Astacus leptodactylus* 的人工孵化報告中亦有類似的結果，將實驗溫度分為 11.8°C、16±1°C 及 20±1°C 三組，最後的活存率與孵化時間分別為 Group I (11.8°C) : 22.4% & 120 天；Group II (16±1°C) : 46.9% & 92 天；Group III (20±1°C) :

32.5 & 71 天)(Aydın and Dilek, 2004); Henryon and Purvis 亦指出淡水螯蝦 *Cherax tenuimanus*，以四組不同溫度 16°C、20°C、24°C 及 28°C 進行人工孵化實驗並比較時間、活存率及各組幼苗體重上的差異，結果得到 16°C 處理組的孵化時間幾乎是 28°C 處理組的三倍，而 20°C 與 24°C 的處理組活存率最高，16°C 的處理組所生產出來的蝦苗平均體重最大，實驗結果也得到平均體重隨著溫度增高而降低的情形 (Henryon and Purvis, 2003)。在日本螯蝦 *Cambaroides japonicus* 的研究報告中，將孵化溫度分為 5°C、10°C、15°C、20°C，結果得到 15°C 有最佳的孵化率，另外三組溫度組別胚胎則幾乎死亡 (Nakata *et al.*, 2004)。綜合這三篇報告與本實驗結果可以驗證，不同蝦種的受精卵對溫度的容忍性不同，上述報告的蝦種適合的溫度與本實驗生物適合的生物略有出入，不過溫度與胚胎發育的趨勢則有相似的趨勢，當溫度升高時，胚胎發育的時間會縮短，但受精卵適合的溫度可能相當狹隘，在不同物種的孵化上需要分別找出其適當的溫度。雖然在人工孵化時提升溫度可以有效地縮短孵化時間，但高溫所造成的胚胎發育的速率提高只有在溫度的容忍範圍限制內才會發生，過高的溫度會造成胚胎的死亡 (Ojanguren and Brana, 2003)。如果只考慮活存率，根據本文溫度實驗結果顯示，實驗生物佛羅里達藍螯蝦卵的孵化上，將胚胎發育時間拉長到 23 天而得到最佳的孵化率 (Stage III: 68%)，以活存率為主要考量上來說，20°C 是最好孵化條件 (圖七)。

受精卵在胚胎發育初期對於環境的變動極為敏感，尤其是水溫的改變 (Henryon and Purvis, 2000)。除了水溫的震盪外，28°C 處理組別孵化率偏低的原因，可能是因為高溫導致胚胎發育時的重要的代謝機制被破壞而造成死亡 (如：細胞分化、卵膜蛋白質變性、蛋白質代謝、生化反應的平衡等相關因子) (Schmidt-Neilson, 1997)。有報告中指出，淡水長臂大蝦 (*Macrobrachium rosenbergii*) 的胚胎發育時間及幼苗大小與溫度有線性的關係，25°C 的條件下，孵化時間為 313 小時；29°C 的條件下，孵化時間為 289 小時；33°C 的條件下，孵化時間為 240 小時，而在此實驗中亦發現過高的溫度 (36°C) 造成胚胎發育早期的死亡。該作者推測可能是

溫度造成熱休克蛋白質 (Heat Shock Proteins) 的變性，熱休克蛋白質在溫度的影響下對早期的胚胎發育產生各種生理刺激如細胞分化、荷爾蒙刺激等，作者也說明此熱休克蛋白的機制在淡水長臂大蝦上並未完全的建立(Gething and Sambrook, 1992; Manush *et al.*, 2006)。在本論文溫度實驗中，24°C 與 28°C 處理組孵化率偏低，第三期幼苗的活存率僅 44.5→48%，推測可能原因為高溫或是溫度震盪所造成，但是本實驗只有計算各期幼苗的活存率與各自的胚胎發育時間，沒有去檢測上述相關的因子（如：細胞分化、卵膜蛋白質變性、蛋白質代謝、生化反應的平衡等相關因子），無法得知這二個溫度對胚胎造成的真正影響，僅能得到孵化率跟時間的結果。而上述這些相關報告的結果指出，卵的內生性質可能因為溫度而造成改變，導致卵的死亡影響孵化活存率。在溫度實驗剛開始人工孵化初期，於 1-2 天內將水溫改變到設定的實驗溫度是否過於激烈而造成胚胎的死亡亦不得而知。因此，在未來可多加研究探討卵本身的品質，以及相關的溫度震盪的實驗來研究此次溫度實驗孵化率偏低是否因為溫度改變過於激烈所導致。

在溫度與消毒的共同探討的實驗中，觀察到因為高溫引起的死亡情形，實驗結果顯示，24°C 甲醛組與臭氧組各期幼苗(Stage I→III)孵化活存率皆顯著高於 24°C 空白組，並且明顯高於 30°C 的各組別。在 30°C 的組別中，30°C 甲醛組與臭氧組各期幼苗(Stage I→III)孵化活存率跟 30°C 空白組之間沒有顯著差異（圖十）。此實驗結果與本論文實驗四類似，受精卵在適當溫度的下，使用臭氧或是甲醛的消毒可以有效的提升孵化活存率，甲醛與臭氧（0.05ppm；每天 30min）二組的孵化活存率分別高於空白控制組，甲醛與臭氧二組之間則沒有顯著差異（圖九）。相對的在 30°C 的三個組別，最後的孵化活存率僅 3.3→10%，顯示出在高溫的情形下，即使使用適當濃度跟頻率的消毒劑，依然無法有效的成功孵化。在空白控制組的探討上，對照本論文溫度實驗的結果顯示(圖六)，28°C 在溫度實驗的最後孵化率為 44%，而此部分實驗的 30°C 的最後孵化率為 3.3→10%，且從第一期幼苗到第三期幼苗之間亦大量死亡，由此推測 28°C 雖然會造成孵化率的降低，但未達到溫度的

最高容忍範圍，但是 30°C 的高溫不僅影響胚胎發育且長時間會造成幼苗直接的死亡。而此部份的實驗對照實驗四的結果得知，在 22°C 與 24°C 的條件下，使用臭氧與甲醛消毒跟空白控制組比較有顯著提升的效果。因此，在適當的溫度範圍內使用消毒劑，溫差的改變不影響整體孵化的結果。總結三個部份實驗（圖六、圖九、圖十）可以得知，人工孵化時溫度的控制比消毒劑的選用更為重要，過高的溫度直接導致受精卵胚胎的死亡，因此無法得知消毒劑應用的效果好壞，但是在適當的溫度範圍內，實驗結果得知，每天浸泡 30 分鐘 0.05ppm 的臭氧水與每天浸泡 15 分鐘的甲醛，皆可以有效的提升孵化率。

水溫是影響蝦類各項生理重要的環境因子，如代謝活性、氧氣消耗、攝食情形、成長、脫殼、存活及對毒性物質的容忍與代謝(Hewitt and Duncan, 2001)，水溫也會影響蝦類對疾病的抵抗能力，或是水體中病原菌的增殖。在淡水螯蝦人工孵化的技術上，可以有效的控制水體環境的溫度及水質，但在本論文第一階段的密度與溫度的實驗中，未對水體與卵進行消毒處理，水中的致病性病源體（細菌、真菌、病毒等）與水溫的關係更顯得重要。在密度的實驗操作中，密度越高越容易受到水黴菌的感染，在溫度的實驗觀察中，20°C 的孵化率不僅最高，且孵化期間受到水黴菌的侵襲感染亦最低，相對的 24°C 與 28°C 的組別，受到水黴菌侵襲的數量驟增，造成孵化率整體的降低。在本論文溫度實驗得到最佳的結果是 20°C 的組別，但在後續的實驗操作上，由於夏季正常水溫接近 30°C，實驗使用的設備無法有效的將人工孵化的水槽降至 20°C，因此後續實驗溫度設定為設備可達最低溫度 22°C。

Rhodes 指出，淡水螯蝦的人工孵化上，溫度是預防真菌感染的重要因子之一 (Rhodes, 1981)。Ghomi 等人的實驗報告提出，探討溫度與卵受到感染的二項因子中，並沒有明顯的溫度梯度的結果產生，但是作者亦提出可能是溫度的範圍 (18.5°C-20.5°C) 不夠大 (Ghomi *et al.*, 2007)。Koeypudsa 等人的報告中，分析了從挪威、蘇格蘭、智利分析採樣的 8 株水黴菌種，並且探討在不同溫度下 (5、10、

15、20、25、30、35、37、40°C) 各株水黴菌的菌絲生長情形，結果得到8株不同地方採樣的水黴菌在25°C的組別有最大的菌落平均生長半徑，從0.32→0.70(mm/h)，其次是20°C的組別，當溫度超過30°C沒有發現有菌絲的成長(Koeypudsa *et al.*, 2005)。此篇報告的結果與本實驗觀察的情形不盡相同，在本論文溫度實驗的24°C組別受到水黴菌感染的情形嚴重，與此篇結果相近，但是在本論文溫度實驗的20°C組別受到水黴菌的侵襲感染率極低，在該作者此篇報告中卻是所有溫度組別中成長半徑最佳的組別，推測原因可能與採集地點相關，作者所採集的地點皆是溫帶地區的國家，與台灣本島的氣候溫度上有差別，造成菌株對溫度的適應性不同。許多研究亦顯示，致病性的水黴菌種具有適應性，其對溫度的容忍範圍會接近當地環境或是宿主生物的適合溫度。例如：從冷水性魚類鮭魚身上所分離出來的水黴菌，在低溫的成長情況就明顯比高溫時來的好(Espeland and Hansen, 2004)。

人工孵化淡水螯蝦卵時可以藉由使用抗生素或是其他化學藥劑的消毒，生產不受到螯蝦瘟Aphanomycoisis感染或是生產無特定病原(Specific Pathogen-Free; SPF)蝦苗，也就是利用人工孵化消毒的動作，來避免親蝦帶病原的垂直感染(Edgerton and Owens, 1997; Carral *et al.*, 2003)。水中生物的受精卵常常是病原體垂直感染的目標，受精卵由於種親身上帶原或是環境而造成被病原體的感染，而受精卵對病原體並無抵抗能力，因此常常造成孵化的失敗與大量死亡。根據前人研究，臭氧可以將水中的病原細菌、真菌、病毒等殺滅，利用臭氧消毒的方式於三種不同的海水魚卵的孵化上進行消毒，水中臭氧濃度2ppm以下，處理時間2分鐘，可以有效的使水中病原體不活化，提高孵化活存率(Grotmol *et al.*, 2003)；在鱒魚卵的孵化上，水中臭氧濃度0.05、0.10、0.15ppm每天處理10分鐘與Control組(沒有使用臭氧)相比皆有顯著差異(Ghomi *et al.*, 2007)；褐鱒魚卵的孵化上，水中臭氧濃度0.1ppm有最高的孵化率(69.4%)，與Control組(沒有使用臭氧)相比有顯著差異(Forneris *et al.*, 2003)；在海水鯛魚*Sparus aurata*魚卵的孵化上，使用臭氧

做消毒處理，當CT值(臭氧濃度×曝露時間的值)為0.6時，孵化活存率即顯著高於control組(沒有使用臭氧)(Ben-Atia *et al.*, 2007)；在黑線鱒魚卵的孵化上，水中臭氧濃度CT值10-20可以有效的使NNV病毒不活化，並且不影響孵化活存率(Buchan *et al.*, 2006)。

本論文臭氧消毒實驗，主旨是探討藉由臭氧與甲醛(正控制組)的消毒，有效的殺滅水體環境中及卵上的病原體，以提升整體的孵化活存率。實驗四(以臭氧消毒水體與卵)各組別的孵化活存率(62.5%→78.3%)比實驗三各組別的孵化活存率高(53.8%→68.8%)，實驗三的結果中，四組臭氧處理組別，臭氧濃度與處理時間越高則孵化率越低，但是四組之間並沒有顯著差異。相反的結果，在實驗四的觀察中，高濃度的臭氧處理組別平均活存率顯著高於低濃度的組別。會造成如此的差異，推測與實驗生物受精卵的品質好壞有很大的影響(Sellars *et al.*, 2005)。如同魚類卵質探討的報告，在本論文研究中亦發現，母蝦每批生產出來的卵質有好有壞，而在卵質變異大的情形下，使用不同消毒劑甲醛與臭氧會產生不同的效果。但本論文重點在於去除受精卵質好壞的前提下，進行人工孵化取代母蝦的自然孵化，達到去除母蝦的生物因子影響後，藉由人為更精準的掌控環境條件來提升最後孵化率，而實驗三因為卵質差異大，造成數據的趨勢跟實驗四不同，但各組平均的孵化率仍達到高成數的53.8%。

在實驗四的結果上臭氧處理組A：0.05 ppm(水+卵)與臭氧處理組B：0.05 ppm(水)二組與空白控制組比較沒有顯著差異，臭氧處理組C：0.3 ppm(水+卵)與臭氧處理組D：0.3 ppm(水)二組在不同期的幼苗平均活存率分別顯著高於空白控制組，由此得到一個趨勢，在同樣的浸泡時間下，較高濃度的臭氧處理可得到較佳的消毒效果，而將甲醛的正控制組分別與四組臭氧處理組兩兩比較對照，發現四組臭氧處理組與甲醛的正控制組之間並沒有顯著差異。本實驗結果顯示，利用臭氧消毒可以有效的提升最後的孵化活存率，並且在實驗過程中發現，使用甲醛與臭氧消毒的處理組，受到水黴菌感染的數量有效的減低，而這些組別的胚胎死亡

主要是卵的壞死，而空白控制組胚胎死亡原因除了卵的壞死外，更可觀察到胚胎受到水黴菌的侵襲感染而死亡，且容易造成整團卵的黏結，導致水黴菌加速擴散，加速胚胎的壞死。

Forneris 等在鱒魚卵的人工孵化報告與本實驗有相近的結果，此篇報告中使用不同臭氧濃度(0.01ppm→0.3ppm)作為殺真菌的處理並且將甲醛(1-2ppm，每2天浸泡15分鐘)當作正控制組。二組實驗中甲醛的孵化率(58.6%、74.7%)皆最高，空白控制組的孵化率僅9%，作者提到如果在人工孵化剛開始即固定頻率使用臭氧殺菌，所得到的孵化率會比發現水黴菌感染後才使用來的好，因此臭氧殺菌適合作為預防的用途(Forneris *et al.*, 2003)。此現象與Komanapalli等人的結果類似，該篇報告中指出，已死亡的微生物殘骸，可能會遮蔽活著的微生物，導致殺菌效率降低。因此，推測水黴菌的菌絲受到臭氧的消毒，可能僅破壞到外層，或是不易消滅內孢子結構，造成無法有效的完全殺死水黴菌的菌絲(Komanapalli *et al.*, 1996)。Forneris等之研究結果中，臭氧濃度0.1ppm(每天或每2天浸泡10分鐘)所得到的最後孵化率(57.6→69.4%)與甲醛(74.7%)相比沒有顯著差異，可有效的取代甲醛(Forneris *et al.*, 2003)，與本實驗的最後孵化率有相近的結果。使用臭氧濃度0.3ppm每天消毒30分鐘，僅對卵處理與同時對卵及水體處理的組別，與甲醛的處理組相比沒有顯著的差異。因此可初步判定，臭氧可以有效的取代甲醛的使用，並且在最後的孵化活存率上沒有顯著差異，且高於沒有處理的空白控制組。

參考相關的報告指出，實驗組孵化率提高的結果，是臭氧將水中的病原細菌、真菌、病毒等殺滅。在實驗四得到類似的結果，利用0.3ppm的臭氧消毒30分鐘可以有效的提升孵化活存率，並且在實驗過程中發現，使用甲醛與臭氧消毒的處理組，受到水黴菌感染的數量有效的減低，而這些組別的胚胎死亡主要是卵的壞死。控制組的胚胎死亡除了卵的壞死外，更是不斷的觀察到胚胎受到水黴菌的侵襲感染而死亡，且容易造成整團卵的黏結。在實驗的觀察結果中，發現受精卵的胚胎發育死亡主要是人工孵化開始的前期，在胚胎發育中後期(孵化前期)時，

通常不會被真菌所感染，死亡率極低。在人工孵化的場所，除了對卵及水體的消毒外，其他可能造成疾病傳撥的途徑都要加以注意，如使用的器具設備、種蝦飼食的來源、操作人員的清潔消毒等(Grotmol *et al.*, 2003)

雖然上述報告指出臭氧可以有效的提升孵化率，在使用上仍然需要注意其毒性效應，如 Forneris 等在鱒魚卵的人工孵化報告指出，水中臭氧濃度 0.3 ppm(每 2 天浸泡 10 分鐘) 在實驗結果中孵化率偏低，此濃度與處理時間可能是鱒魚卵的關鍵毒性閥值，即超過可能會對孵化活存率有負面的影響(Forneris *et al.*, 2003)。在其他海水魚卵使用臭氧的孵化報告中，在顯微鏡下觀察時，發現當魚卵在高濃度的臭氧水浸泡處理下 (CT 值 30-50)，雖然保持存活的狀態，但是卻無法順利孵化出來，而這樣的情形會持續 3-4 天或是更久後即死亡。這些胚胎在卵膜內部正常發育，容易觀察到心臟跳動直到死亡，但是卻無法孵化(Buchan *et al.*, 2006)。有報告指出，其原因有可能為臭氧濃度過高會破壞卵殼蛋白聚合物的水解作用，或是抑制孵化腺的酵素酶分泌，造成胚胎死亡(Grotmol and Totland, 2000; Buchan *et al.*, 2006)。在本論文實驗臭氧孵化的結果，沒有觀察到持續的消毒操作造成生產的蝦苗畸形的結果，且在後續的飼養上，持續觀察並且發現人工孵化的幼苗生長存活情形與自然孵化的個體沒有差異，從外部型態與攝食行為來判斷皆正常，且人工孵化的幼苗即使使用甲醛或是臭氧浸泡消毒過，亦沒有畸形或是生長遲緩的現象發生。相關報告提到，臭氧作為消毒劑時需注意海水甲殼綱的物種對水中臭氧的容忍度，因海水甲殼綱的物種對水中臭氧的容忍度較低，且對於幼苗具有傷害性(Ritar *et al.*, 2006)。Ritar 等人在海水龍蝦 *Jasus edwardsii* 卵及幼苗培育實驗中，使用不同濃度臭氧濃度 (400→600 ORP) 來當做消毒劑，與本實驗有類似的結果。使用臭氧處理的海水來培育海水龍蝦的葉狀體幼苗到 Stage IX 的情形下，可有效地控制病原細菌並且增加幼苗活存率。但在此篇報告中亦有提到，如果臭氧濃度過高可能會導致幼苗的身體各部位畸形，造成脫殼不順，無法進食及正常活動，最終導致死亡。這部份的觀察是在過往關於甲殼綱動物孵化上的研究報告所未證

實。另外作者也提到幼苗對水中臭氧濃度的容忍耐受性，隨著胚胎發育至晚期而變的敏感(Ritar *et al.*, 2006)。

臭氧及甲醛對於蝦苗可能會造成傷害。在自然孵化的情形下，無法使用高濃度的化學藥劑或是臭氧對受精卵進行消毒，因為會造成抱卵母蝦的緊迫與死亡。換言之，淡水螯蝦的人工孵化的優勢之一，即可以使用相對高濃度的藥劑處理受精卵，受精卵由於卵膜的保護，對臭氧或是其他消毒劑的耐受性遠高於蝦苗或成蝦，適當的濃度可以有效殺死病原體，並且對卵及後續生產出來的幼苗沒有傷害。在本論文的臭氧對仔蝦毒性實驗的結果顯示，高濃度 0.3ppm 臭氧水對仔蝦有急性毒，浸泡 30 分鐘即對生物體產生傷害，在 90 分鐘內陸續死亡，而低濃度 0.05ppm 的臭氧水，30 分鐘的短期浸泡對蝦苗沒有傷害性，但如果再此濃度下連續浸泡超過 120 分鐘，虛弱的個體仍有死亡的情形產生（圖二、圖三、圖四）。因此，毒性實驗結果，得知在人工孵化的消毒操作上，孵化前使用高濃度 0.3ppm 的臭氧可有效達到消毒提升孵化率的結果，若未在胚胎發育至蝦苗階段停止消毒動作，當胚胎孵化後此濃度會對蝦苗產生立即的毒性效應。毒性實驗的結果，除提供正確的臭氧浸泡時間外，亦可與實驗三、四、五比較（圖八、九、十），得知受精卵在高濃度 0.3ppm 臭氧水下不會產生傷害，而此濃度卻對仔蝦有急性毒，浸泡 30 分鐘即對生物體產生傷害（圖二、圖三、圖四）。在本論文實驗設計時，參考其他螯蝦人工孵化的報告及本論文的臭氧毒性試驗結果，設定每日浸泡消毒處理僅持續操作到孵化前期（Pre-hatching Stage）(Celada *et al.*, 2004; Melendre *et al.*, 2006)，避免蝦苗受到臭氧的傷害。相關報告亦提及，如果水中臭氧濃度過高，浸泡時間過長，其氧化效果太激烈，可能會引起魚類卵膜的破壞而使胚胎壞死 (Grotmol *et al.*, 2003)。適當的消毒時間不僅可增加消毒效率且減少消毒劑或是臭氧的使用，亦可減少過多的人工操作步驟， Ghomi 等人的報告中提到伊朗鱒魚卵的孵化，使用臭氧與過氧化氫作為消毒劑，其最適當的時間為鱒魚卵受精後的 30 小時開始(Ghomi *et al.*, 2007)。在後續淡水螯蝦的人工孵化研究中，是否可以縮短使

用臭氧或其他消毒劑的持續時間，達到降低消毒的藥劑或臭氧設備成本，及有效減少人力成本的支出，有待日後的研究證實。

綜合以上的報告，臭氧在適當的濃度與處理時間下可以有效的殺死水中的病原體，但過高的濃度卻可能造成過強的氧化效果，導致毒性過高，造成受精卵或是發育中的胚胎受損死亡。雖然本實驗沒有產生無法順利孵化的結果，不過礙於無法有效提高水中臭氧濃度的因素，無法得知是否因為淡水螯蝦的卵對臭氧耐受性較高，而在後續研究上可探討如果CT值更高時是否會產生類似的情形。由於臭氧會產生毒性效果，因此在應用臭氧的後續實驗，需有更精確的檢測系統，並且對於不同物種與發育成長階段的臭氧濃度耐受性做更進一步的確立(Ritar *et al.*, 2006)。不同的魚種或是蝦種對不同化學藥劑、臭氧會有不同的耐受性，原因可能為受精卵的卵膜構造產生不同的保護作用，相關報告指出卵膜的構造與厚度可反應出魚卵對生態環境的適應，卵膜可保護魚卵，防止扭曲或變形，卵膜所分泌的物質可聚集魚卵成團狀，增加保護之用，及免於細菌、病毒的侵害。卵表的壁孔可提供魚卵營養物質以及代謝物的排除，此外亦提供呼吸作用。而圍卵腔所含的卵周液，亦提供保護胚胎之用(邵 等, 2003)。

實驗四的臭氧消毒實驗中，同樣臭氧濃度與同樣的浸泡時間的情形下，探討人工孵化時只取出卵做對水消毒（水的處理）對照整個孵化水槽同時進行卵與水體的消毒（水+卵的處理）的差異，結果得到低濃度的臭氧處理組 A（Stage III：70%）與臭氧處理組 B（Stage III：70.8%）彼此之間沒有顯著差異；高濃度的臭氧處理組 C（Stage III：78.3%）與臭氧處理組 D（Stage III：74.2%）二組之間亦沒有顯著差異，亦即在 0.05 及 0.3ppm 濃度浸泡三十分鐘的情形下，僅對水體及同時對水體與卵做消毒，二種處理在結果並沒有差異。因此在後續的應用使用上，需先瞭解使用的方便性來決定對水體或是對整缸水槽做消毒的選擇。而實驗三中僅對卵做消毒處理時，須先另外準備一個消毒用的水槽，將溫度與水質條件調整與孵化水槽相同後，將臭氧曝氣裝置置入，待達到設定的目標濃度且達到動態平

衡時，將卵連同孵化單元整個移入，消毒完畢後再移回孵化水槽。優點：可以先行調整臭氧濃度、可以分批消毒全部的卵省時省力、消毒的水槽機動性大；缺點：水質水溫要重新調整、孵化水槽的水體無法消毒，難免病源的再次感染。實驗四僅對水消毒處理或是同時對水體與卵消毒，只需要將臭氧機與曝氣裝置放入孵化水槽中即可，不過必須事先確定同樣的水體擾動與溫度等情形下，臭氧在水中的動態平衡濃度。優點：不必將孵化單元移動、水質水溫不會劇烈變動、水槽中的卵同時消毒；缺點：需事先確認如何調整到所需的平衡濃度、臭氧會氧化損耗水槽中的設備、一次只能進行一個水槽的消毒、機動性低移動不便。

本論文人工孵化與自然孵化的實驗設計方法參考先前的報告（Perez *et al.*,1999），作者實驗白鉗螯蝦 *Austropotamobius pallipes* 的人工孵化，作者分為二種方式探討，首先將實驗分為母蝦自然孵化與人工孵化二組，將母蝦一半泳足的卵取下做人工孵化，另外一半的卵讓母蝦自行孵化。人工孵化到達第二期幼苗的活存率為 72.5%，母蝦自然孵化組別為 52.8%，二者之間有顯著的差異；而另一部分的實驗為，完全取下做人工孵化的組別對照完全放任自然孵化的組別，結果人工孵化的平均活存率為 68.2%，相較於自然孵化的 56.2%有顯著的差異。在本實驗之前所採樣的 8 組保卵母蝦的左右泳足抱卵數，左邊泳足的抱卵平均數量為 183.5 顆，右邊泳足的抱卵平均數量為 184.75 顆，二組之間沒有顯著差異，這部份的結果與 Leonard 等人（2001）以及 Perez 等人（1999）的報告結果相似。

Leonard 等在淡水螯蝦 *Cherax destructor* 的人工孵化上，設計三套不同的孵化設備，利用水流使卵懸浮滾動的系統得到最佳的孵化效果。在該篇報告中，該作者計算分析多組抱卵母蝦的左右二側泳足的卵數，與本論文的結果相似，左右二側的卵數並沒有顯著差異。因此，參考這二篇報告與本論文的結果，在本論文人工孵化與自然孵化的對照實驗中，人工孵化的卵皆來自母蝦左側泳足，計算取下的卵可估算出自然孵化組別的起始卵數。此篇報告的人工孵化起始於母蝦抱卵後的第二天，原產於澳洲的淡水螯蝦 *Cherax destructor*，與本實驗的蝦種皆為暖水性

的蝦種，在孵化上的胚胎發育時間接近，因此本論文實驗的人工孵化剝離時間採用此篇報告的建議，在母蝦抱卵後的 3-4 天剝離受精卵進行人工孵化(Leonard *et al.*, 2001)。

在人工孵化與自然孵化的實驗結果顯示，重複組 A 與 C 的孵化上，甲醛(A)與臭氧(A)組的孵化率分別是 74%與 61%，皆顯著高於自然孵化 MI (A)組的 23%；重複組 C 的孵化上，甲醛(C)與臭氧(C)活存率皆為 60%，皆顯著高於 MI (C)組別的活存率 10%。此二組實驗結果顯示，人工孵化不管是甲醛或是臭氧的處理組別，皆顯著高於自然孵化的處理組別。在實驗設計中，相同重複組的卵來自相同母蝦，卵質好壞均等，而自然孵化的結果除了受到水質、溫度等環境條件的影響，母蝦的生物因子為與人工孵化處理的最大差別。母蝦的生物因子在 MI (A)與 MI (C)上有不同的觀察結果，在 MI(A)的孵化過程中，初期受精卵即受到水黴菌的感染造成大量的黏結與死亡，水黴菌的快速增殖造成母蝦沒有辦法自行將發霉的卵剔除掉，在實驗結束時，發現母蝦腹部黏附著大量受到水黴菌感染的死卵，最後的活存率僅 23%，但是在人工孵化的甲醛(A)與臭氧(A)組上，最後第三期幼苗活存率則達到 74%與 61%顯著高於 MI(A)。因此，可證實人工孵化確實可有效預防水黴菌的發展，並且達到成功孵化的目的。在重複組 C 的結果顯示，MI(C)的最後活存率雖僅 10%，但是在孵化過程中並沒有發現嚴重的水黴菌感染，且同樣重複組的同批卵進行人工孵化，其孵化率甲醛(C)與臭氧(C)皆達 60%，可見 MI(C)組別並非卵質不良而造成孵化率低。因此，推斷此結果是母蝦誤食剛孵化的幼苗，或是孵化過程中受到驚嚇導致幼苗脫落的情形，而剔除母蝦生產時的生物因子亦是人工孵化的優點。

自然孵化要達到高成數的孵化率，除了環境因子水質、溫度外，更要杜絕病原體的侵襲，並且與母蝦卵質好壞即抱卵育幼的行為息息相關。在自然孵化與人工孵化的實驗過程中發現，四組自然孵化的母蝦置於同一孵化水槽中，在環境因子相同，水體並未做消毒處理的條件下，MI(A)組大量感染水黴菌，MI(B、C)組卻

孵化順利，造成 MI (A)與 MI(B、C)的差異原因可能為卵質的好壞所影響，但 MI (B)與 MI (C)之間的差異則推測是母蝦育幼行為的影響所造成。人工孵化的優點之一為減少繁殖時對母蝦的依賴，相關報告提出的論點與本實驗結果互相映證：人工孵化可以解決母蝦自然孵化時卵的損失，其損失原因可能因為母蝦受到疾病感染或是死亡造成卵的壞死，或是母蝦受到攻擊及人工操作造成的驚擾而使卵脫落 (Perez *et al.*, 1998; Carral *et al.*, 2003; Nakata *et al.*, 2004)。而綜合本實驗三個重覆組的實驗結果顯示，人工孵化可以有效且穩定的得到高孵化率，相較於自然孵化可能受到水黴菌或是母蝦生物因子的干擾，造成生產率不穩定及偏低。其他報告提出人工孵化的優點包含母蝦食物的需求、控制水質水溫及防止掠食者，另外更可以減省空間、能量與人力的耗費 (Carral *et al.*, 1992; Evans *et al.*, 1993)。這幾點在本實驗操作上皆有相同的結果，當抱卵母蝦將卵剝離後，可以統一集中管理，等待脫殼後再次配對繁殖，而一個孵化水槽可以放置多組的人工孵化單元，集中管理節省空間與控溫的設備，如果是自然孵化的情形，抱卵母蝦需要單獨分離，安靜不受打擾的空間有助於母蝦順利將卵孵化，但會造成空間的浪費、設備的獨立使用、胚胎發育觀察不便、無法掌握數目等缺點。

Policar 等的研究報告指出，淡水螯蝦 *Astacus astacus* 的人工孵化上，作者比較有無移除死卵與藥浴的頻率對幼苗孵化活存率的影響，最後得到的結果為每日移除死卵及高頻率藥浴的組別有最佳的活存率 85%，每天移除死卵的組別皆顯著高於 Control 組 (73.3%)，作者也推論 Control 組的高孵化率是因為在人工孵化的情形下，有效的掌控水質與水溫。此篇報告結果與本論文實驗結果相符，在有做消毒處理的人工孵化組別皆顯著高於自然孵化的組別。而在這篇報告的實驗中結果顯示，高頻率藥浴為每三天藥浴 2 分鐘含碘 2ppm 的藥劑，低頻率藥浴則為每 5 天一次，最後依然得到高孵化率 (Policar *et al.*, 2006)。因此，對照此實驗的結果可推測在本實驗的藥浴頻率 (每天 30 分鐘) 上，在未來的研究上可嘗試降低，藉此節省臭氧與人力的成本支出。在日本螯蝦 *Cambaroides japonicus* 的研究報告中指

出，使用簡單的實驗耗材各式規格的微量多孔盤來做人工孵化測試，比較於不同溫度與水量下孵化率的高低，實驗結果顯示 15°C 的組別多種規格的微量多孔盤其孵化率都有 80%，但與本實驗設備方法相比，此種孵化方式在水的處理上必須達到無菌的處理，且在幼苗孵化後容易因為大量消耗水體中的氧氣而窒息死亡 (Nakata *et al.*, 2004)。在本論文實驗觀察中發現靜止不動的水體也容易造成幼苗孵化後的畸形。朱玉芳等人的報告中亦指出，人工孵化與自然孵化的情形相比，將受精卵移出置於直徑 19 公分的大培養皿中，每天換水並且定時搖動補充水中溶氧，結果最後的孵化率與生長情形皆低於自然孵化的組別(朱等, 2002)。與這二篇報告相比較，本論文的實驗設備設計上，採用簡單且有效的設備，運用小型沉水馬達與簡單的動物灌食針筒加工後即達到高孵化率的效果。

使用不同化學藥劑（甲醛、過氧化氫、氯化鈉、孔雀綠）來當作淡水螯蝦人工孵化的消毒劑，此報告實驗結果顯示，甲醛與孔雀綠的組別孵化活存率顯著高於 Control 組，過氧化氫與氯化鈉孵化率與 Control 組皆無顯著差異，甲醛與孔雀綠二組之間沒有顯著差異，由此結果得知僅有甲醛（4500ppm）可有效的取代孔雀綠的使用。在此濃度的甲醛（4500ppm）消毒操作上僅使用到孵化前，作者指出持續消毒處理到第二期幼苗，會造成幼苗全數死亡(Celada *et al.*, 2004)。因此，參考此篇報告的實驗結果，在本實驗中使用甲醛當正控制組的情形下，孵化消毒僅到胚胎的孵化前期便停止。在通訊螯蝦的人工孵化報告中，使用不同的抗真菌藥劑作為消毒劑（甲醛、孔雀綠、硫酸銅、高猛酸鉀、過氧化氫、異丙醇），並且同時探討不同濃度與頻率，希望取代孔雀綠的使用。實驗結果發現，3000ppm 與 3500ppm 的甲醛最後第二期幼苗的孵化率最高，與孔雀綠的組別沒有顯著差異 (Melendre *et al.*, 2006)。作者提到在使用甲醛的情形下第一期成長至第二期幼苗約有 30% 的死亡率，在本論文各個實驗中並未發現有此情形，且在本實驗結果中第一期幼苗成長至第二期幼苗的死亡率最高僅 10%。本實驗的甲醛浸泡頻率為每天 15 分鐘，相較於此篇報告來的更頻繁，因此初步推斷非甲醛的毒性效應，沒有相

關報告指出因蝦種不同，蝦卵的大小或是卵膜差異等原因造成此差異的結果。

在魚類繁殖的相關報告中，提到不管是野生族群或是養植物種，其生產出來卵的品質有相當大的差異。人工孵化上卵的品質也亦是個影響成功大量生產幼苗的限制因子。在一般的定義上，品質好的受精卵通常會有較高的孵化活存率，從胚胎發育期直到幼苗孵化，可生產出健康以及快速生長的幼苗(Lahnsteiner *et al.*, 2001)。不同魚種有相關報告指出許多與卵質相關的特徵，如母魚的體重、卵母細胞的濕重、卵巢液的pH值、滲透壓及蛋白質濃度等因子與卵質的相關性(Boulekbache *et al.*, 1989; Lahnsteiner *et al.*, 2001)，除了這些新的檢測因子外，可結合傳統的卵質評斷方法如各胚胎發育期的活存率、魚苗的畸形率等。

而在本論文研究中亦發現，每批母蝦生產出來的卵質有好有壞，而卵質變異大的情形下，使用不同消毒劑甲醛及臭氧會有不同的效果。卵質不好的情況下，可以觀察到受精卵特別容易在孵化初期就被水黴菌所感染，或是隨著胚胎發育而不斷死亡。在臭氧消毒實驗中發現，當卵質較差時，觀察臭氧對卵的消毒作用，作用時間越久，臭氧濃度越高反而會卵有傷害性。母蝦排卵時會從生殖孔中排出卵子，此時公蝦的精莖破裂釋放出精子與卵結合成為受精卵，完全受精的過程，卵體柔軟有彈性，卵膜明顯，內為卵黃膜或稱初級卵膜(Primary Oolemma)，在卵母細胞形成時由卵細胞本身所產生，其外為三級卵膜(Tertiary Oolemma)，由母體黏液線分泌而成(曲等, 1980)。實驗生物的繁殖中觀察到母蝦生產後數小時內，卵粒如果無法順利黏附在母蝦泳足上，推測其原因為母蝦在將glair包覆在受精卵表面時出了問題，導致受精卵沒有黏性且缺乏母體分泌的三級卵膜保護，卵黯淡無光澤，毫無彈性且受到擠壓及破碎，但沒有相關報告得以驗證確定原因。在實驗生物蓄養上，亦有觀察到整胎蝦苗在第三期幼苗脫離母蝦時，胸肢畸形無法順利行走攝食，導致整批蝦苗陸續死亡的情形。淡水螯蝦卵的品質影響因素可能跟親蝦的營養攝取、卵巢成熟度、環境刺激、疾病因子、水質條件等因子有關，過多的人工操作手續可能也是導致緊迫Stress的一個原因。不過本論文研究主要著重在人

工孵化技術的探討應用與消毒後的孵化效果，因此未多加探討此部分的變因，在未來後續的實驗研究中，可多加設計與討論。

卵質的好壞除了環境因子外，在飼料營養相關的報告亦指出，種蝦營養的攝取在繁殖孵化上為重要的因素，成功的受精卵孵化與幼苗生產飼育皆依賴於餌料的供給(García-Ulloa *et al.*, 2004)。飼料營養又以蛋白質的含量最為重要，除了因為營養價值外，蛋白質含量多寡也決定了飼料的主要成本價錢(Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2006)。為了達到種蝦成熟及卵的生產，種蝦飼料中的蛋白質需求量相對於成長飼料來的較高，因為在卵黃生成期間需要大量的蛋白質合成作用，來達到生殖腺的成熟的目的(Abdu *et al.*, 2000)。相關報告使用不同蛋白質含量(22、27、32、37%)的飼料，探討淡水螯蝦*Cherax quadricarinatus*產卵的量與品質的好壞，藉此得到作為種蝦繁殖飼料的最佳蛋白質比例。研究結果顯示，種蝦飼料粗蛋白最適含量為32%，可以得到較佳的卵質。作者判定卵質好壞的參數為平均卵徑、體積、面積、重量以及卵的化學組成份(蛋白質、脂質、碳水化合物)(Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2006)。而本實驗生物使用的飼料為市售的斑節蝦飼料，其飼料成分組成含粗蛋白53%，雖然不同物種之間的營養需求不同，但仍與此篇作者所建議的粗蛋白含量(32%)上差距甚大，在未來的蓄養上應嘗試使用不同的飼料以得到更佳的卵質。另外作者此篇報告中亦提到，要達到成功的繁殖孵化，建議投餵多種不同營養組成與來源的飼料，有助於卵的化學組成分的均衡(Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2006)。除了飼料中的蛋白質含量外，維他命E在魚蝦類的生殖生理學上已經有許多相關報告，可以生產更多更大的卵及促進更高的性腺成熟係數(Gonadosomatic Index,GSI)(Gupta *et al.*, 1987)。甲殼類的繁殖力與生長率的研究，一般在魚類與甲殼類的建議使用量為飼料中添加20–100 mg/kg的維他命E(Harlioğlu *et al.*, 2002)。Harlioğlu and Barım研究飼料中添加維他命E的含量多寡(66, 100, 150 and 200 mg/kg)影響種蝦的報卵數與第一期幼苗的孵化數目，實驗生物為淡水螯蝦*Astacus leptodactylus*，實驗結果得到100 mg/kg的組別，報卵數與卵徑大小與第一期幼苗的孵化數目皆顯著

大於其他組別。因此，根據以上數篇報告，在未來的種蝦蓄養上，除了選用蛋白質含量32%左右的飼料外，餵食的餌料方面可以適度的投餵生餌及水生植物，並且在飼料中添加適量的維他命E（100 mg/kg），以得到更佳的卵質與孵化率。

綜合本論文所有的實驗結果，建議在佛羅里達淡水螯蝦的人工孵化上，在取得品質良好的受精卵前提下，將溫度維持在 20-22℃，臭氧的消毒濃度與頻率為 0.05ppm 每天 30 分鐘，對水體與卵同時消毒，可有效的取代甲醛當做人工孵化的消毒劑使用，而在使用臭氧消毒的情形下，密度可提升至 100 顆/管亦有高孵化率的結果。未來亦可研究將此套簡易的系統與消毒的方式應用在不同的淡水螯蝦的人工孵化上。



文獻整理

- 曲漱惠、李永嘉、黃浙 (1980). *Animal embryology*. Beijing :People Education Press. 84 - 114.
- 朱玉芳、崔勇華、戈志強、許雅香 (2002). 克氏原螯蝦抱卵與非抱卵孵化比較研究. *水利漁業* 122, 22 卷第24期.
- 杜守恩 (1995). *水產養殖工程技術*. 水產出版社。基隆, 初版: 263-265.
- 孟凡麗、趙雲龍、陳立、顧志敏、徐谷星、劉啟文(2000). 紅螯螯蝦胚胎發育研究 I. 胚胎外部結構的形態發生. *動物學研究* Dec. 21 (6): 468-472.
- 邵廣昭、楊瑞森、陳康青、李源鑫 (2001). *台灣海域魚卵圖鑑*. 中研院動物所、台灣電力公司出版.台北.
- 邱俊諺 (2004). 金魚酪胺酸酶基因選殖及其對金魚 (*Carassius aruatus*) 與斑馬魚 (*Danio rerio*) 色素形成之影響. 國立台灣海洋大學: 水產養殖所碩士論文.
- 施習德 (2006). 認識外來種美國螯蝦. *農業世界雜誌* 278(10) 10-13.
- 范姜仁茂 (2001). 預臭氧程序提升綜合性工業廢水生物可分解性之研究. 國立中央大學: 環境工程研究所碩士論文
- 陳佳郁 (2005). 臭氧與氯對水中微生物殺菌效率之評估. 國立台灣大學: 公共衛生學院環境衛生研究所碩士論文.
- 陳啟炳 (2008). 臭氧應用於鯽魚養殖環境之研究. 高雄師範大學: 生物科技系碩士論文.
- 陳錫秋、張瑞璋、賴幸宜及劉天斌 (1988). 臭氧應用於水質處理之效果. *環境保護與生態保育研討會論文專集*. 181-195.
- 溫添進、張家欽 (1994). 臭氧之應用及其電解法製造. *中國化學工程學會會刊* 41 (3), 60-71.
- 葉欣誠 (1992). 臭氧消毒的基本現象與機制研究. 國立台灣大學: 環境工程學研究所碩士論文.

廖惠文 (1994). 應用臭氧處理生活污水之可行性研究. 國立台灣大學：水資源及環境工程學研究所碩士論文.

劉文御 (2001). 水產養殖環境學(水質、底質、循環用水、魚蝦病控制). 188-210.

戴正光 (2002). 臭氧處理養殖水殖之基礎研究. 國立中興大學：農業機械工程學研究所碩士論文.

鍾遠懷 (1994). 臭氧與水處理. 食品工業發展研究所專題報導, 食品工業：27-37.

顧洋 (1996). 臭氧處理在淨水工程上之應用. 自來水會刊 15, 32-33.

Abdu, U., Yehezkel, G. and Sagi, A., (2000). Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebrate Reproduction and Development* 37, 75–83.

Aegerter, S. and Jalabert B. (2004). Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 231 59-71.

Alder, M. G. and Hill, G. R.(1950) The Kinetics and Mechanism of Hydroxide Ion Catalyzed Ozone Decomposition in Aqueous Solution *Journal of the American Chemical Society* 72 (5), 1884–1886.

Andrews , E. A. (1904). Breeding habits of crayfish. *The American Naturalist* 38, 165-206

Aydin, H. and Dilek, M. K. (2004). Effects of different water temperatures on the hatching time and survival rates of the Freshwater Crayfish *Astacus leptodactylus* (Esch., 1823) Eggs. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 75-79.

Beakes, G. W., Wood, S.E., and Burr, A.W. (1994). Features which characterize *Saprolegnia* isolates from salmonid fish lesions – A review. In *Salmon Saprolegniasis* Edited by G. J. Mueller. U.S. Department of Energy, Bonneville Power Administration, Portland, Oregon, 33-66.

Ben-Atia, I., Lutzky, S., Barr, Y., Gamsiz, K., Shtupler, Y., Tandler, A., and Koven, W.

- (2007). Improved performance of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, larvae after ozone disinfection of the eggs. *Aquaculture Research* 38, 166-173.
- Blaxter , J. H. S. (1992). The effect of temperature on larval fishes. *Netherlands Journal of Zoology* 42, 336-357.
- Boulekbache, H., Bastin, J., Andriamihaja, M., Lefebvre, M. and Joly, C., (1989). Ageing of fish oocytes: effects on adenylic nucleotides content, energy charge and viability of carp embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology* 93, 471- 476.
- Buchan, K. A. H., Martin-Robichaud, D. J., Benfey, T. J., MacKinnon A. M. and Boston, L. (2006). The efficacy of ozonated seawater for surface disinfection of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) eggs against piscine nodavirus. *Aquacultural Engineering* 35, 102-107.
- Bruno, D.W., and Wood, B.P. 1994. Saprolegnia and other Oomycetes. In *Fish Diseases and Disorders, Volume 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Edited by P.T.K. Woo and D.W. Bruno. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, United Kingdom. pp. 599-659.
- Carral, J. M., Celada, J. D., Gonzalez, J., Gaudioso, V. R., Fernandez, R., and Lopezbaisson, C. (1992). Artificial Incubation of Crayfish Eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana) from Early Stages of Embryonic-Development. *Aquaculture* 104, 261-269.
- Carral, J. M., Celada, J. D., Gaudioso, V. R., Teminõ, C. and Fernández, R. (1988). Artificial incubation improvement of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana) under low temperatures during embryonic development. *Freshwater Crayfish* 7, 239–250.
- Carral, J. M., Saez-Royuela, M., Celada, J. D., Perez, J. R., Melendre, P. M., and Aguilera, A. (2003). Advantages of artificial reproduction techniques for white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet). *Bulletin Francais De La Peche Et De La Pisciculture*, 181-184.
- Cato, J. C., and Brown., C. L. (2003). *Marine Ornamental Species: Collection, Culture,*

and Conservation. Iowa State Press: Ames, IA (USA). ISBN 0-8138-2987. xxv, 395 pp.

- Celada, J. D., Carral, J. M., Perez, J. R., Saez-Royuela, M., and Munoz, C. (2001a). Successful storage and transport of eggs of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet). *Aquaculture International* 9, 269-276.
- Celada, J. D., Carral, J. M., Saez-Royuela, M., Melendre, P. M., and Aguilera, A. (2004). Effects of different antifungal treatments on artificial incubation of the astacid crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) eggs. *Aquaculture* 239, 249-259.
- Celada, J. D., Carral, J. M., Saez-Royuela, M., Munoz, C., and Perez, J. R. (2001b). Effects of different thermal treatments on the maternal incubation efficiency of the astacid crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) under controlled conditions. *Crustaceana* 74, 801-808.
- Chang, P. S., Chen, L. J., and Wang, Y. C. (1998). The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. *Aquaculture* 166, 1-17.
- Chen, S., Stechey, D., Malone, R. F. 1994, Suspended solids control in recirculating aquaculture systems. In: Timmons, M. B., Losordo, T. M. (Eds.). *Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering Design and Management*. Elsevier, New, York, NY, 61-100. ISSN 0167-9309.
- Chen, S. L., Wu, J. W., and Malone, R. F. (1995). Effects of temperature on mean molt interval, molting and mortality of red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*). *Aquaculture* 131, 205-217.
- Culp, S. J., Blankenship, L. R., Kusewitt, D. F., Doerge, D. R., Mulligan, L. T., and Beland, F. A. (1999). Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F(1) mice. *Chemico-Biological Interactions* 122, 153-170.
- Diéguez-Uribeondo, J., Cerenius, L. and Söderhäll, K. (1996). Physiological characterization of *Saprolegnia parastica* isolates from brown trout.

Aquaculture 140, 247-257.

Edgerton, B. F. and Owens, L. (1997). Age at first infection of *Cherax quadricarinatus* by *Cherax quadricarinatus* bacilliform virus and *Cherax Giardivirus*-like virus, and production of putative virus-free crayfish. *Aquaculture* 152, 1–12.

Edgerton, B. F., Evans, L. H., Stephens, F. J., and Overstreet, R. M. (2002). Synopsis of freshwater crayfish diseases and commensal organisms. *Aquaculture* 206, 57-135.

Espeland, S. and Hansen, P. E. (2004). Prevention of *Saprolegnia* on rainbow trout eggs. *Acta Neuropsychiatrica*. BSc Thesis, Biology, Faculty of science and technology university of the faroe islands, Denmark. pp. 50.

Evans, L.H., Tsvetnenko, E., Graham, T., Fan, A., Finn, S., Knott, B., Costa, N., 1993. Artificial reproduction experiments. Summary of the project improving commercial viability of crayfish farming. Department of commerce and trade, Western Australia, Australia, pp. 24–52.

Evans, L. H., Stephens, F. J. and Overstreet, R. M. (2002). Synopsis of freshwater crayfish diseases and commensal organisms. *Aquaculture* 206, 57–135.

Farooq, S., Engelbrecht, R. S. and Chian E. S. K. (1997). Influence of temperature and U.V. light on disinfection with ozone. *Water Research*. 11, 737-741.

Fornieris, G., Bellardi, S., Palmegiano, G. B., Saroglia, M., Sicuro, B., Gasco, L., and Zoccarato, I. (2003). The use of ozone in trout hatchery to reduce saprolegniasis incidence. *Aquaculture* 221, 157-166.

García-Ulloa, G. M., Rodríguez, H. and Ogura, T., (2004). Egg quality of two prawn species (Palemonidae) of the genus *Macrobrachium* (*M. rosenbergii*, De Man 1879, y *M. tenellum*, Smith, 1871) varying the brood stock diet: morphometric indexes. *Av. Investig. Agropecu* 8, 17–27.

Gething, M. J. and Sambrook, J., (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 35-45.

- Ghomi, M. R., Esmaili, A., Vossoughi, G., Keyvan, A. and Nazari, R. M. (2007). Comparison of ozone, hydrogen peroxide and removal of infected eggs for prevention of fungal infection in sturgeon hatchery. *Fisheries Science* 73, 1332-1337.
- Gonzalez, R., Celada, J. D., Garcia, V., Gonzalez, A., Carral, J. M., and Saez-Royuela, M. (2009). The artificial incubation of crayfish eggs: review and report from an experimental study concerning the effects of offspring origin (maternal or artificial incubation) on the survival and growth of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 19, 167-176.
- Gracia-Lopez, V., Kiewek-Martinez, M., and Maldonado-Garcia, M. (2004). Effects of temperature and salinity on artificially reproduced eggs and larvae of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea*. *Aquaculture* 237, 485-498.
- Grotmol, S., Dahl-Paulsen, E. and Totland, G. K. (2003). Hatchability of eggs from Atlantic cod, turbot and Atlantic halibut after disinfection with ozonated seawater. *Aquaculture* 221, 245-254.
- Grotmol, S., Totland, G.K., (2000). Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*. 39, 89-96.
- Gupta, S. D., Khan, H.A. and Bhowmick, R.M., (1987). Observations on the effect of vitamin E and growth hormone on the gonadal maturity of carps. *Inland Fisheries Society of India* 19 (2), 26- 31.
- Hammond, K. S., Hollows, J. W., Townsend, C. R., and Lokman, P. M. (2006). Effects of temperature and water calcium concentration on growth, survival and moulting of freshwater crayfish, *Paranephrops zealandicus*. *Aquaculture* 251, 271-279.
- Hamor, T. and Garside, E.T., (1977). Size relations and yolk utilization in embryonated ova and alevins of Atlantic salmon, *Salmo salar*, L., in various combinations of temperature and dissolved oxygen. *Canadian Journal of Zoology*. 55(11), 1892-1898.
- Harlioğlu, M. M., Köprücü, K. and Özdemir, Y., (2002). The effect of dietary vitamin E

on the pleopodal egg number of *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823).
Aquaculture International 10 (5), 391- 397.

Henryon, M., and Purvis, I. W. (2000). Eggs and hatchlings of the freshwater crayfish, marron (*Cherax tenuimanus*), can be successfully incubated artificially.
Aquaculture 184, 247-254.

Henryon, M., and Purvis, I. W. (2003). Eggs and hatchlings of the freshwater crayfish, marron (*Cherax tenuimanus* Smith), can be artificially incubated at high population densities, and are most successfully incubated at water temperatures between 20 degrees C and 24 degrees C. *Aquaculture Research* 34, 1311-1319.

Herbert, B. (1987). Notes on diseases and epibionts of *Cherax quadricarinatus* and *C. tenuimanus* (Decapoda: Parastacidae). *Aquaculture* 64, 165–173.

Hewitt, D. R., Duncan, P.F., (2001). Effect of high water temperature on the survival, molting and food consumption of *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate, 1888). *Aquaculture Research* 32, 305–313.

Hobbs , H. J. (1988). Crayfish distribution, adaptive radiation and evolution. In: Holdich DM, Lowery RS (eds) *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*. Croom Helm, London, pp 52–82.

Hofmann , J. (1978). *Cangrejos de río*. Compañía Editorial Continental, Barcelona.

Howard, K., and Inglis, T. J. (2003). The effect of free chlorine on *Burkholderia pseudomallei* in potable water. *Water Research* 37, 4425-4432.

Järvenpää, T. (1995). Artificial incubation of crayfish eggs on moving tray (abstract). *Freshw Crayfish* 8, 716.

Jones, C. M. (1990). The biology and aquaculture potential of the tropical freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. Queensland Department of Primary Industries, Information Series, No. Q190028.

Kim, J. G., Yousef, A. E., and Chism, G. W. (1999). Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. *Journal of Food Safety* 19, 17-34.

- King, C. R. (1993). Eggs development time and storage for redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* von Martens. *Aquaculture* 109, 275–280.
- Koeypudsa, W., Phadee, P., Tangtrongpiros, J. and Hatai, K. (2005). Influence of pH, Temperature and Sodium Chloride Concentration on Growth Rate of *Saprolegnia* sp. *J. Sci. Res. Chula. Univ* Vol. 30, No. 2.
- Komanapalli, I. R., Lau, B. H. S. (1996). Ozone-induced damage of *Escherichia coli* K-12 . *Applied Microbiology and Biotechnology* 46, 610-614.
- Kuala, L. (2003). Ornamental fish trade runs into billions. *Infotish International*, 32:55-60.
- Kusakabe, K., Aso, S., Wada, T., Hayashi, J. I., Morooka, S., and Isomura, K. (1991). Destruction rate of volatile organochlorine compounds in water by ozonation with ultraviolet-radiation. *Water Research* 25, 1199-1203.
- Labatiuk, C. W., Belosevic, M., and Finch, G. R. (1992). Factors influencing the infectivity of giardia-muris cysts following ozone inactivation in laboratory and natural-waters. *Water Research* 26, 733-743.
- Lahnsteiner, F., Urbanyi, B., Horvath, A. and Weismann, T. (2001). Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fish. *Aquaculture* 195, 331– 352.
- Lawrence , E. (2000). Henderson’s dictionary of biological terms. 12th edition Prentice Hall, Pearson education, pp. 91. ISBN: 0-582-06433-3
- Leonard, B. V., Lennard, W. A., and Kildea, D. G. (2001). A method for testing the effectiveness of artificial incubation of eggs vs. maternal brooding in the freshwater crayfish *Cherax destructor* (Decapoda : Parastacidae). *Aquaculture* 195, 299-309.
- Liltved, H., Hektoen, H., Efraimsen, H., (1995). Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquacultural Engineering*. 14,107– 122.
- Harlioğlu, M. M. and Barım, O. (2004). The effect of dietary vitamin E on the

pleopodal egg and stage-1 juvenile numbers of freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Aquaculture* 236, 267-276.

Marking, L. L., Rach, J. J. and Schreier, T. M. (1994). American fisheries society evaluation of antifungal agents for fish culture. *Progressive Fish-Culturist* 56(4), 225-231.

Manush, S. M., Pal, A. K., Das, T. and Mukherjee, S.C. (2006). The influence of temperatures ranging from 25 to 36°C on developmental rates, morphometrics and survival of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) embryos. *Aquaculture* 256, 529-536.

McLoughlin, M. F., Nelson, R. T., Rowley, H. M., Cox, D. I. and Grant, A. N. (1996). Experimental pancreas disease in Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolts induced by salmon pancreas disease virus (SPDV). *Diseases of aquatic organisms* 26, 117– 124.

Meinertz, J. R., Stehly, G. R., Gingerich, W. H., and Allen, J. L. (1995). Residues of [C-14] Malachite Green in Eggs and Fry of Rainbow-Trout, *Oncorhynchus-Mykiss* (Walbaum), after Treatment of Eggs. *Journal of Fish Diseases* 18, 239-247.

Melendre, P. M., Celada, J. D., Carral, J. M., Saez-Royuela, M., and Aguilera, A. (2006). Effectiveness of antifungal treatments during artificial incubation of the signal crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana. Astacidae). *Aquaculture* 257, 257-265.

Melendre, P. M., Celada, J. D., Carral, J. M., Saez-Royuela, M., and Aguilera, A. (2007). Effects of stage 2 juvenile removal frequency on final survival rates in artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana. Astacidae). *Journal of Shellfish Research* 26, 201-203.

Meyer, F. P., and Jorgenson, T. A. (1983). Teratological and Other Effects of Malachite Green on Development of Rainbow-Trout and Rabbits. *Transactions of the American Fisheries Society* 112, 818-824.

Nakata, K., Matsubara, H., and Goshima, S. (2004). Artificial incubation of Japanese

crayfish (*Cambaroides japonicus*) eggs by using a simple, easy method with a microplate. *Aquaculture* 230, 273-279.

Nebel, C. (1981). Ozone treatment of potable water-part 1 and part 2. *Public Works*.6: 86-90,7: 68-71.

Ojanguren, A. F. and Brana, F., (2003). Thermal dependence of embryonic growth and development in brown trout. *Journal of Fish Biology* 62, 580–590.

Perez, J. R., Carral, J. M., Celada, J. D., Munoz, C., Saez-Royuela, M., and Antolin, J. I. (1998a). Effects of stripping time on the success of the artificial incubation of white clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet), eggs. *Aquaculture Research* 29, 389-395.

Perez, J. R., Carral, J. M., Celada, J. D., Saez-Royuela, M., and Romero, M. P. (1998b). Effects of different thermal treatments during embryonic development on the artificial incubation efficiency of crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) eggs. Control of the embryogenetic duration and implications for commercial production. *Invertebrate Reproduction & Development* 34, 253-258.

Perez, J. R., Carral, J. M., Celada, J. D., Munoz, C., Saez-Royuela, M., and Antolin, J. I. (1999). The possibilities for artificial incubation of white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) eggs: comparison between maternal and artificial incubation. *Aquaculture* 170, 29-35.

Perez, J. R., Celada, J. D., Gonzalez, J., Carral, J. M., Saez-Royuela, M., and Fernandez, R. (2003). Duration of egg storage at different temperatures in the astacid crayfish *Pacifastacus leniusculus*: critical embryonic phase. *Aquaculture* 219, 347-354.

Peterson, R. H., Spinney, H.C.E., Sreedharan, A., (1977). Development of Atlantic salmon (*Salmo salar*) eggs and alevins under varied temperature regimes. *Fisheries Research Board of Canada* 34, 31- 43.

Pickering, A. D. and Willoughby, L. G. (1982). *Saprolegnia* infections of salmonid fish. *Freshwater Biological Association Annual Report* 50, 38–48.

- Policar, T., Simon, V., and Kozak, P. (2004). Egg incubation in the noble crayfish (*Astacus astacus* L.): The effect of controlled laboratory and outdoor ambient condition on hatching success, growth and survival rate of juveniles. Bulletin Francais De La Peche Et De La Pisciculture, 411-423.
- Policar, T., Kozak, P., and Martin, J. (2006). Effects of egg bath and daily removal of dead eggs on hatching success and production of stage 2 juveniles during artificial incubation in noble crayfish (*Astacus astacus* L.). Bulletin Francais De La Peche Et De La Pisciculture, 1197-1206.
- Post, G. W. (1987). Textbook of Fish Health. Neptune City, NJ, USA:T. F. H. Publications. pp.256.
- Polo, A., Yufera, M. and Pasual, E. (1991). Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. Aquaculture 92, 367-375.
- Rach, J. J., Howe, G. E. and Schreier, T. M. (1997). Safety of formalin treatments on warm- and coolwater fish eggs. Aquaculture 149, 183-191.
- Rach, J. J., Gaikowski, M. P., Schreier, T. M. and Howe, G. E. (1998). Evaluation of the toxicity and efficacy of hydrogen peroxide treatments on eggs of warm- and coolwater fishes. Aquaculture 165, 11-25
- Rach, J. J., Valentine, J. J., Schreier, T. M., Gaikowski, M. P., and Crawford, T. G. (2004). Efficacy of hydrogen peroxide to control saprolegniasis on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) eggs. Aquaculture 238, 135-142.
- Rebecca L, A. (1998). The advantages of ozone disinfection in water and bicarbonate distribution systems for dialysis centers. Contemporary Dialysis & Nephrology, 19:19-17.
- Reichenbach , H. (1886). Studien zur Entwicklungsgeschichte des Flusskrebses. Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft, 14:11–137.
- Reynolds, J. (2002). Growth and reproduction. Holdich DM (ed) Biology of freshwater crayfish School of Life and Environmental Sciences, University of Nottingham, Nottingham, pp 152–191.

- Ritar, A. J., Smith, G. G. and Thomas, C. W. (2006). Ozonation of seawater improves the survival of larval southern rock lobster, *Jasus edwardsii*, in culture from egg to juvenile. *Aquaculture* 261, 1014-1025.
- Rhodes, C. P. (1981). Artificial incubation of the eggs of the crayfish *Austropotamobius pallipes* (Iereboullet). *Aquaculture* 25 129-140.
- Rodriguez-Gonzalez, H., Garcia-Ulloa, M., Hernandez-Llamas, A., and Villarreal, H. (2006). Effect of dietary protein level on spawning and egg quality of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 257, 412-419.
- Saez-Royuela, M., Melendre, P. M., Celada, J. D., Carral, J. M., Gonzalez, A., Gonzalez, R., and Garcia, V. (2009). Possibilities of artificial incubation of signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) eggs at high densities and reduced flow rate using formaldehyde as antifungal treatment. *Aquaculture* 288, 65-68.
- Scholtz, G. and Kawai, T. (2002). Aspects of embryonic and postembryonic development of the Japanese freshwater crayfish *Cambaroides japonicus* (Crustacea, Decapoda) including a hypothesis on the evolution of maternal care in the Astacida. *Acta Zoologica (Stockholm)* 83:203 – 212.
- Schreier, T. M., Rach, J. J. and Howe, G. E. (1996). Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. *Aquaculture* 140, 323-333 I.
- Schmidt-Neilson , K. (1997). *Animal Physiology: Adaptation and Environment* (5th edn) Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Sellars, M. J., Coman, G. J. and Morehead D. T. (2005). Tolerance of *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* embryos to ozone disinfection. *Aquaculture* 245, 111 - 119.
- Soltani, M., Kalbasi, M., Nazari, R. M. and Mostafavi, H., (2001). Effect of formalin on common carp hatch rate in Shahid Rajaei aquaculture center. *J. Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran*, 69-71. (In Persian).
- Taylor, C. A. (2002). Taxonomy and conservation of native crayfish stocks. Holdich, D. M. (ed) *Biology of freshwater crayfish school of life and environmental sciences*,

university of nottingham, nottingham, pp 236–257. ISBN: 063205431X

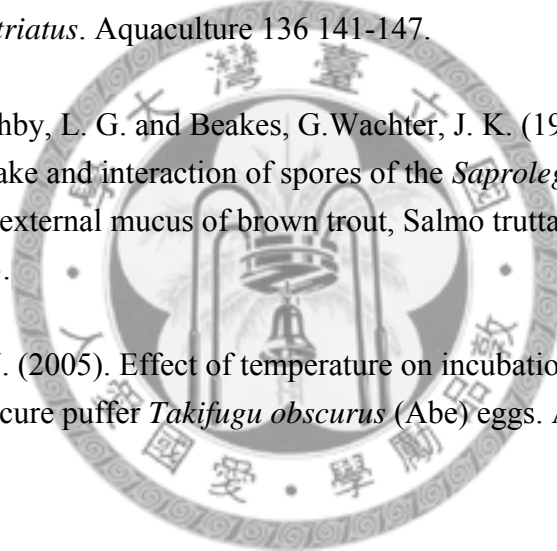
Verhoef, G. D. and Austin, C. M. (1999). Combined effects of temperature and density on the growth and survival of juveniles of the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark, Part 1. *Aquaculture* 170, 37-47.

Vogt, G. and Tolley, L. (2004). Brood care in freshwater crayfish and relationship with the offspring's sensory deficiencies. *Journal of Morphology* 262, 566-582.

Watanabe, W. O., Lee, C. S., Ellis, S. C. and Ellis, E. P. (1995). Hatchery study of the effects of temperature on eggs and yolk sac larvae of the Nassau grouper *Epinephelus striatus*. *Aquaculture* 136 141-147.

Wood, S. E., Willoughby, L. G. and Beakes, G. Wachter, J. K. (1988). Experimental studies on uptake and interaction of spores of the *Saprolegnia diclina-parastica* complex with external mucus of brown trout, *Salmo trutta* L. *Trans.Br. Mycol. Soc.* 90, 63-73.

Yang, Z. and Chen, Y. (2005). Effect of temperature on incubation period and hatching success of obscure puffer *Takifugu obscurus* (Abe) eggs. *Aquaculture* 246, 173-179.



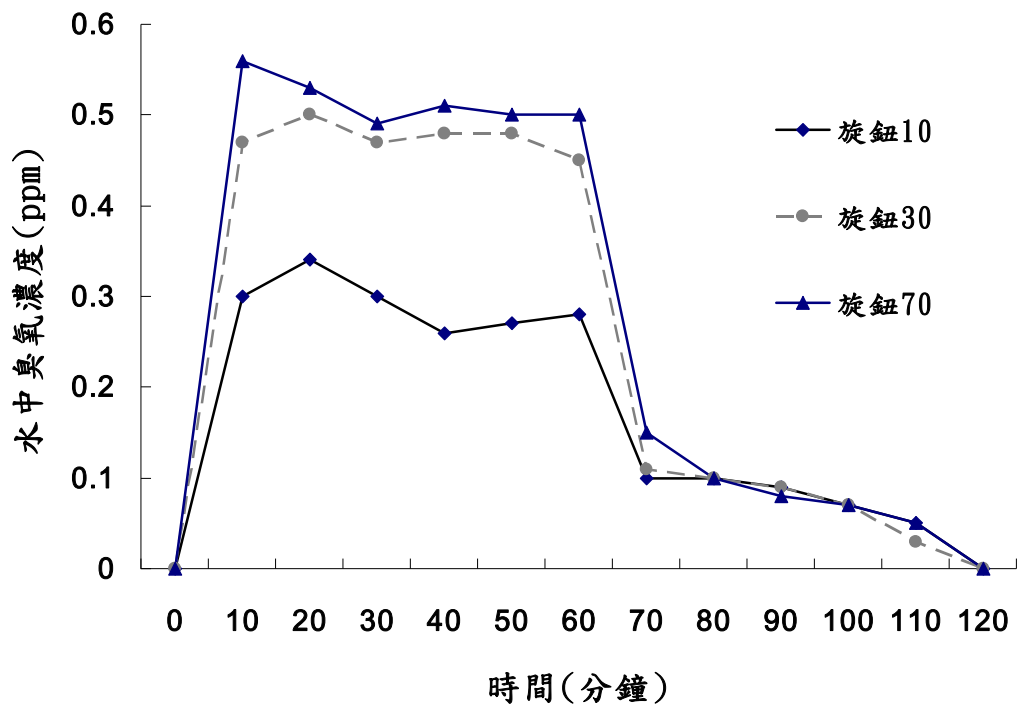
圖表

表一、母蝦左右二側泳足抱卵數

組別(母蝦編號)	1	2	3	4	5	6	7	8	平均數
左側泳足	105	214	83	194	257	152	251	212	183.5
右側泳足	91	220	90	200	237	156	254	230	184.75
SD	9.89	4.24	4.94	4.24	14.14	2.82	2.12	12.72	0.88

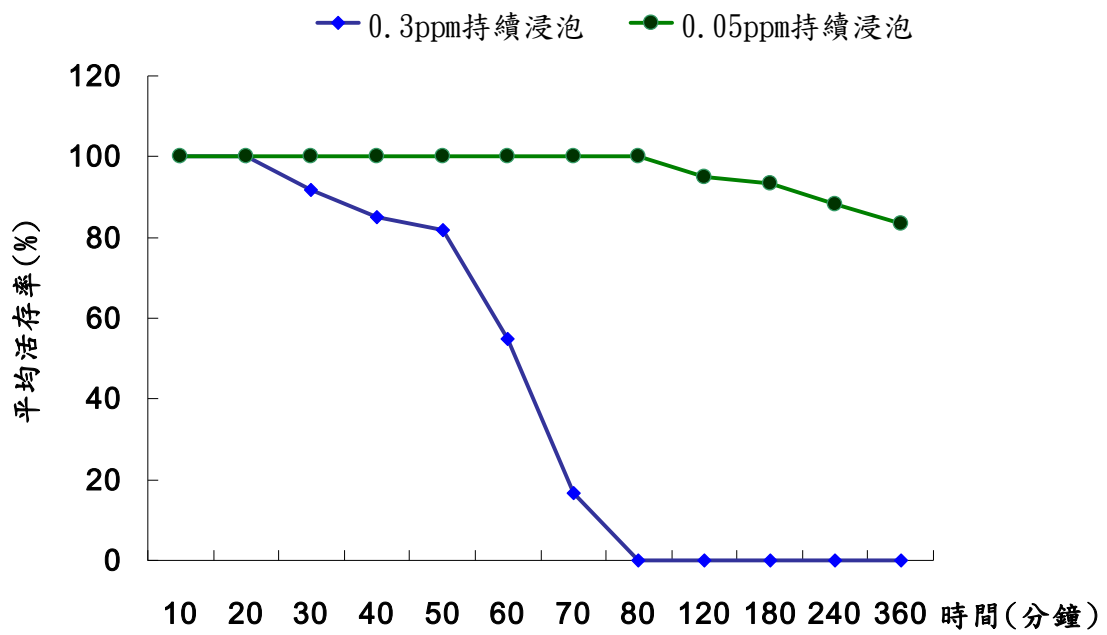
編號 1-8 組，不同母蝦的左右二側泳足總卵數結果，以 Student's Test 進行統計分析，當 $P < 0.05$ 有顯著差異。結果顯示左右二側泳足總卵數無顯著差異。





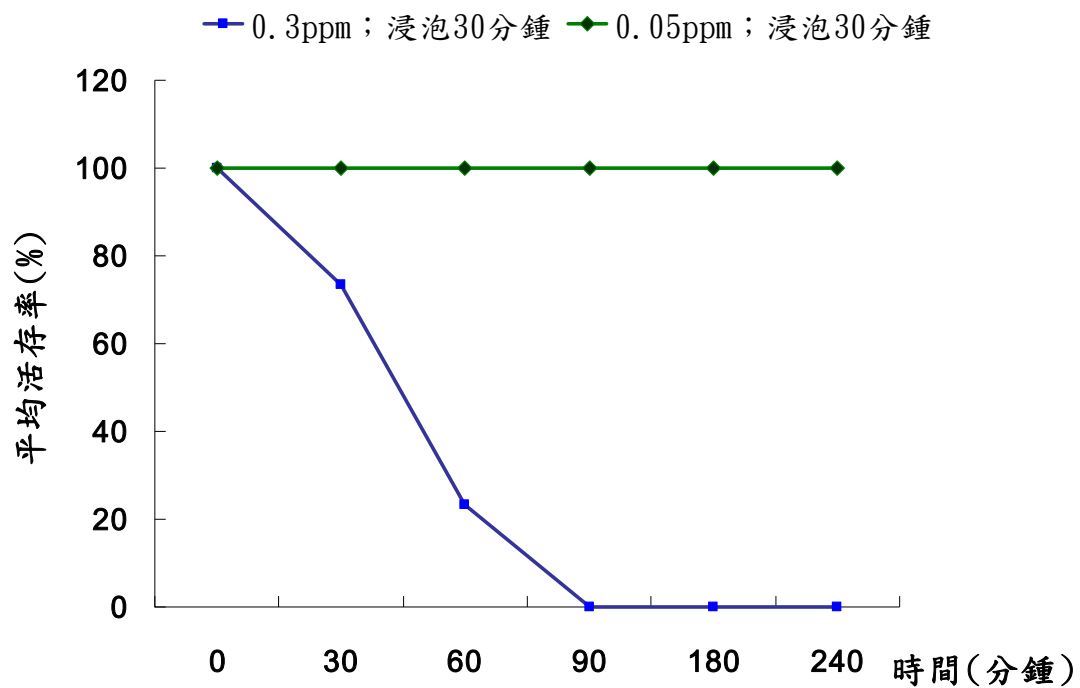
圖一、臭氧機產生之不同臭氧濃度輸入實驗水槽中的
水中臭氧殘留濃度之變化

臭氧機輸出功率為可調整式，三組不同組別，旋鈕 10、30、70 分別代表臭氧機不同的功率(10%、30%、70%)。實驗在第 60 分鐘即停止供應輸入臭氧，並持續供給打氣，觀察後續水中臭氧的殘留量。



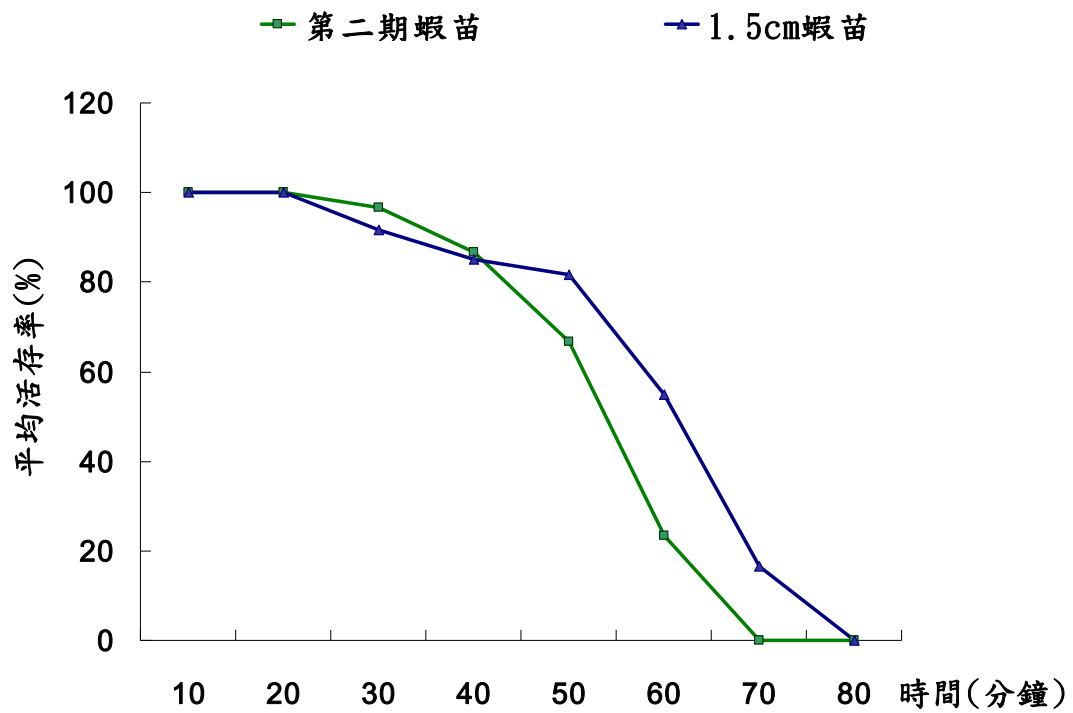
圖二、臭氧毒性試驗

水中臭氧殘留濃度 0.3 ppm 與 0.05ppm，持續對 1.5cm 蝦苗浸泡之毒性效應。平均活存率 = 蝦苗存活個體數 / 起使蝦苗總數 * 100。



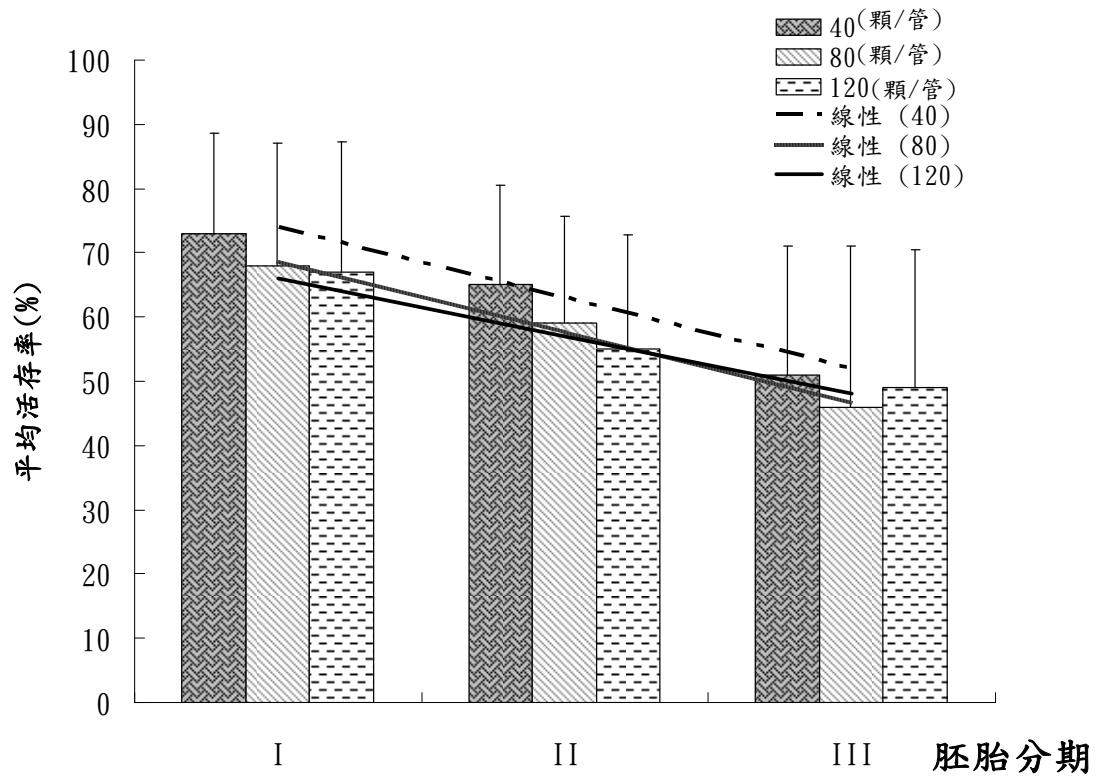
圖三、臭氧毒性試驗

水中臭氧殘留濃度 0.3 ppm 與 0.05ppm，對 1.5cm 蝦苗浸泡 30 分鐘之毒性效應，浸泡後移入清水中觀察。平均活存率 = 蝦苗存活個體數 / 起使蝦苗總數 * 100。



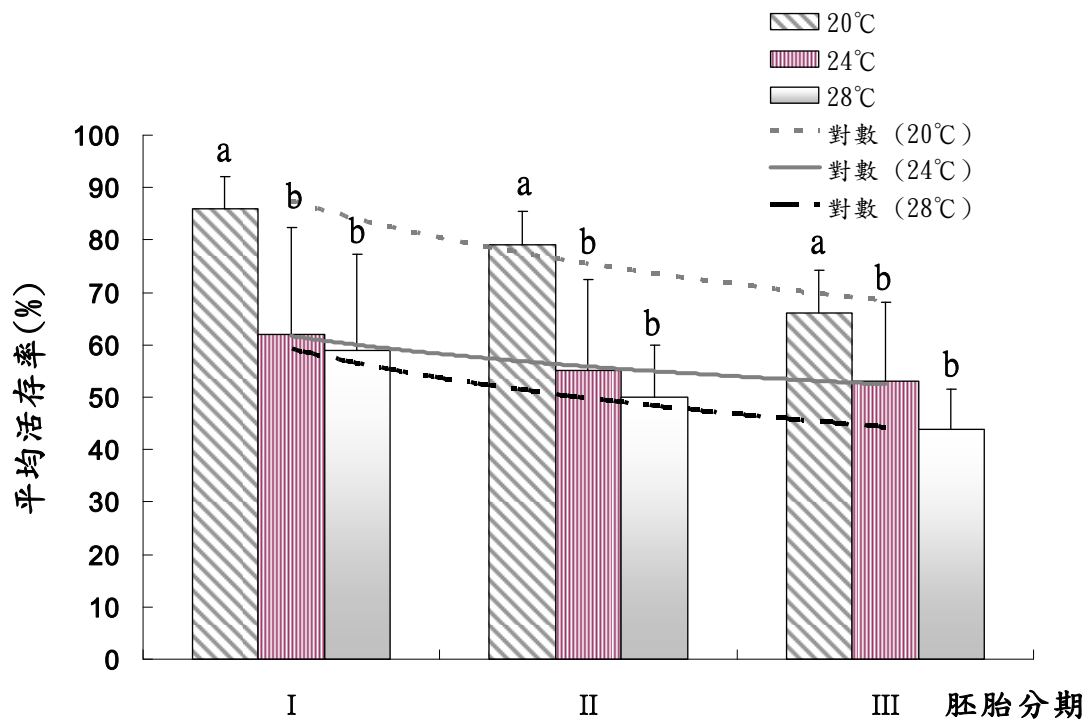
圖四、臭氧毒性試驗

水中臭氧殘留濃度 0.3 ppm，持續對第二期蝦苗與 1.5cm 蝦苗浸泡之毒性效應。平均活存率 = 蝦苗存活個體數 / 起使蝦苗總數 * 100。



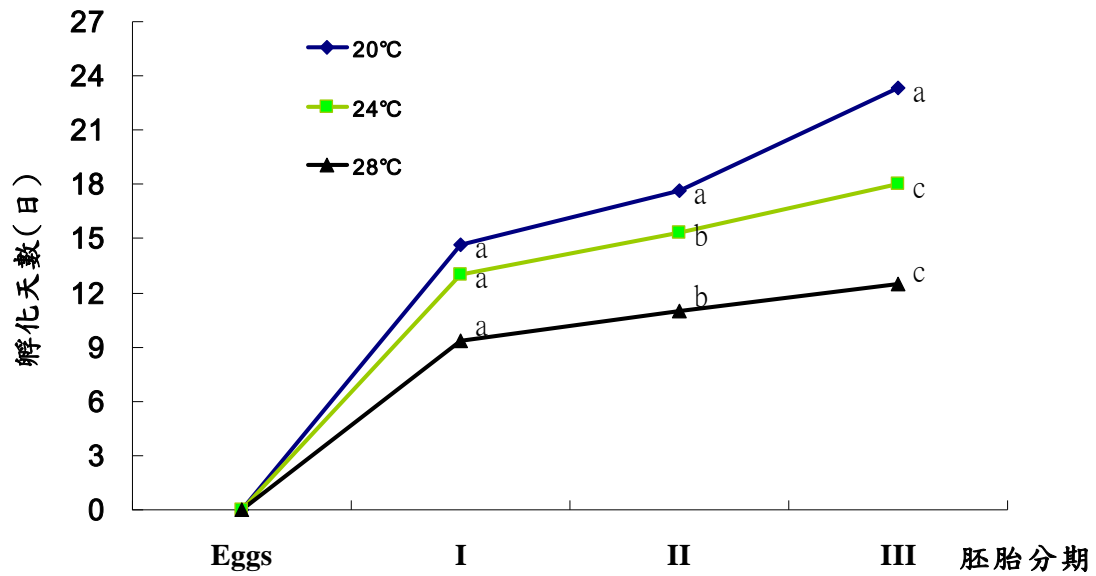
圖五、密度實驗

實驗組別分為三組不同密度處理，分別為 40、80、120(顆/管)，Stage I → III 幼苗的平均活存率， $\text{平均活存率} = \frac{\text{蝦苗存活個體數}}{\text{起使蝦苗總數}} \times 100$ 。以 Least Significant Difference Test (LSD) 進行統計分析，當 $P < 0.05$ 有顯著差異。結果顯示三組不同密度之間無顯著差異。



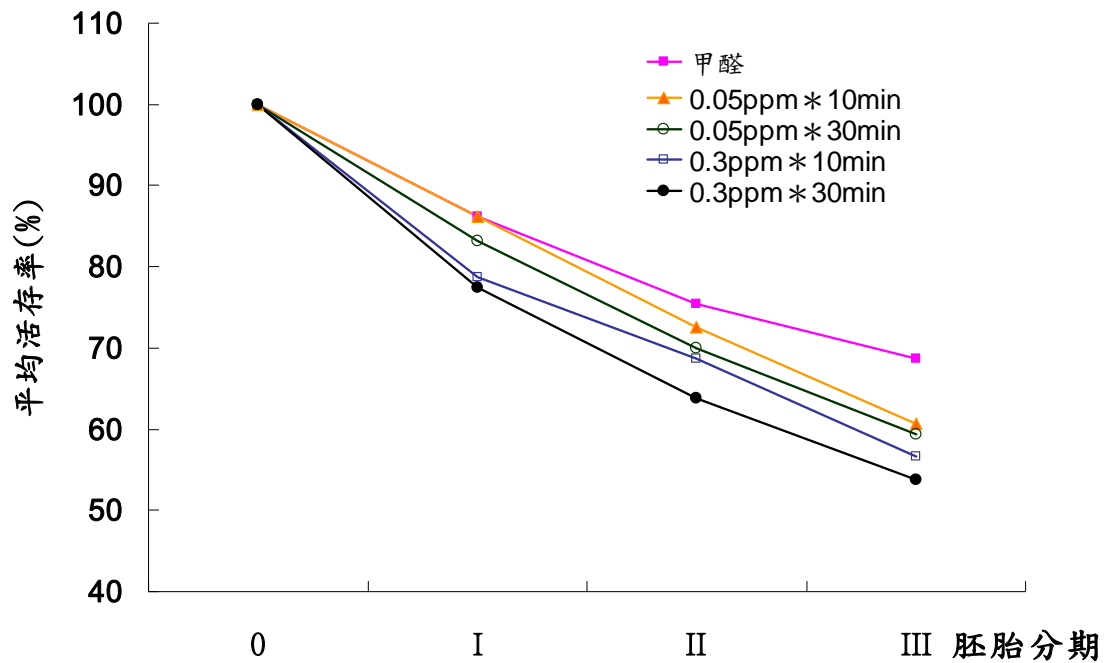
圖六、溫度實驗

實驗組別分為三組不同溫度處理，分別為 20°C、24°C、28°C，密度 50(顆/管)，Stage I→III 幼苗的平均活存率，平均活存率 = 蝦苗存活個體數 / 起使蝦苗總數 * 100。以 Least Significant Difference Test (LSD) 進行統計分析，當 $P < 0.05$ 有顯著差異。字母 a、b 表示各組間有顯著差異。



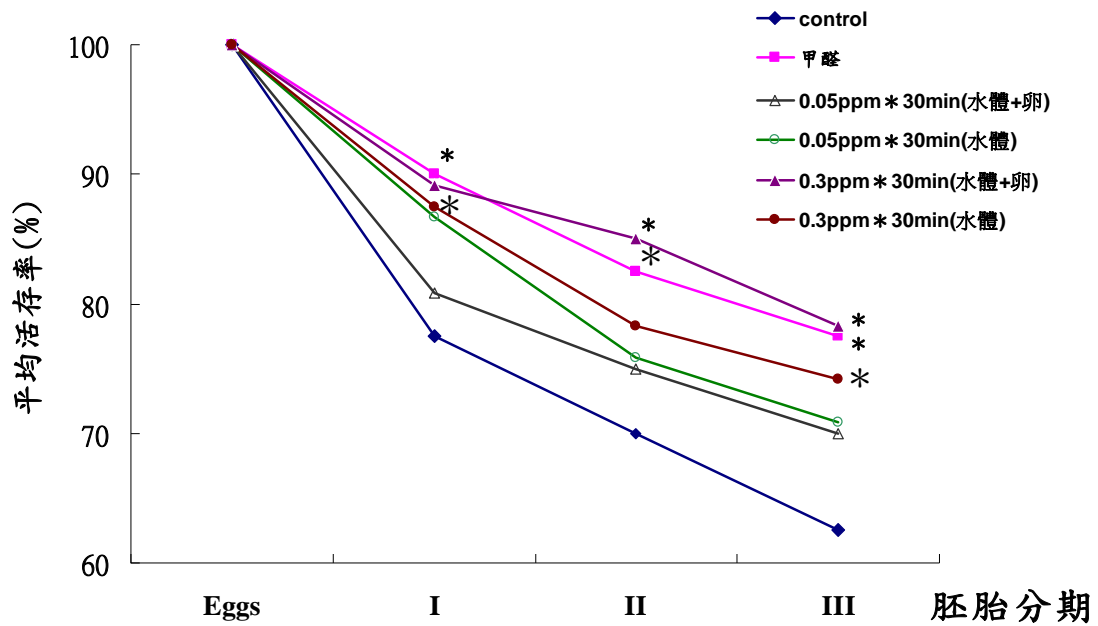
圖七、溫度實驗—胚胎發育時間

實驗組別分為三組不同溫度處理，分別為 20°C、24°C、28°C，密度 50(顆/管)，Stage I→III 幼苗的平均孵化天數。以 Least Significant Difference Test (LSD) 進行統計分析，當 $P < 0.05$ 有顯著差異。字母 a、b、c 表示各組間有顯著差異。



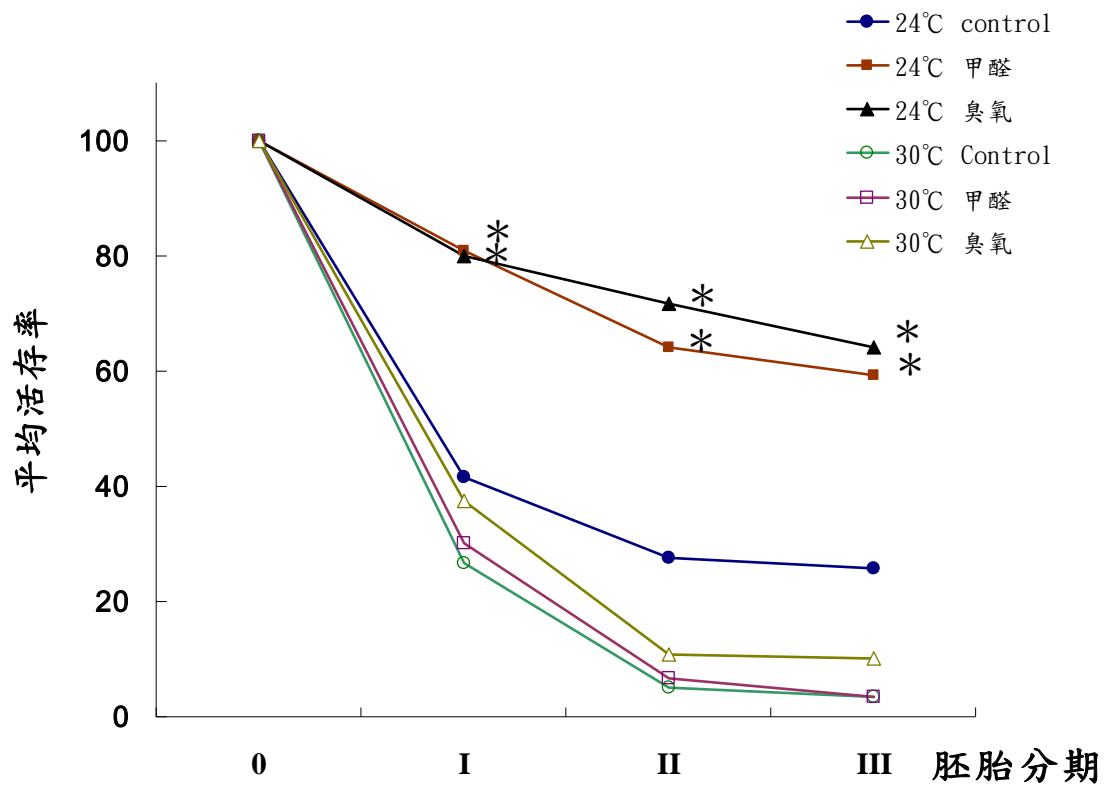
圖八、臭氧實驗—不同臭氧濃度對受精卵的浸泡消毒

實驗組別分為四組不同臭氧與甲醛處理，密度 40(顆/管)，溫度 22℃，Stage I→III 幼苗的平均活存率， $\text{平均活存率} = \frac{\text{蝦苗存活個體數}}{\text{起使蝦苗總數}} * 100$ 。以 Student's Test 進行統計分析，四個臭氧處理組分別與甲醛組對照，當 $P < 0.05$ 有顯著差異。結果顯示各組間皆無顯著差異。



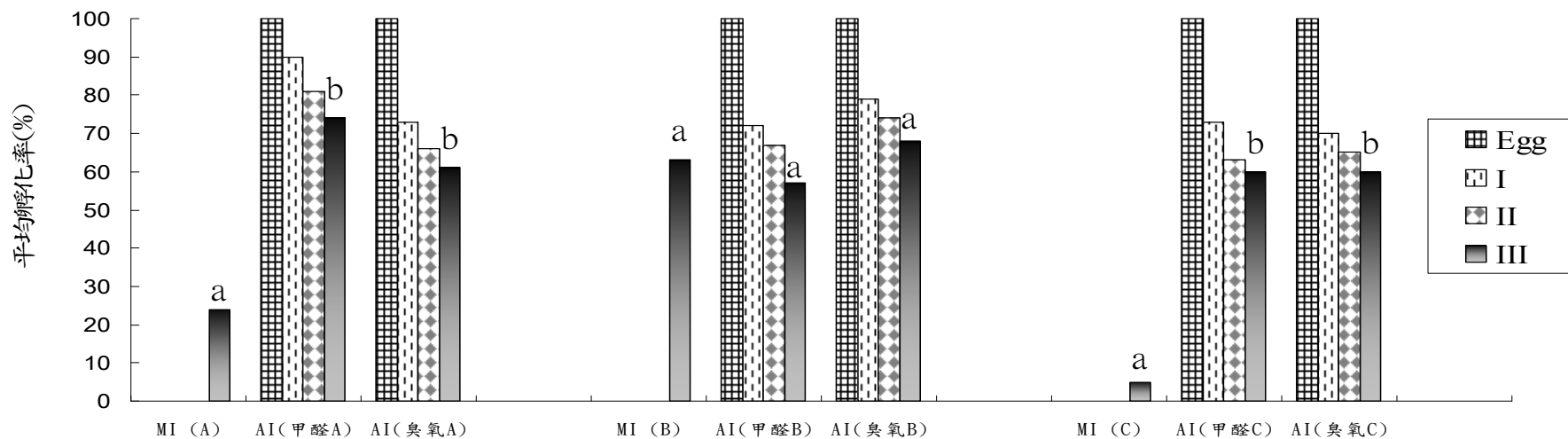
圖九、臭氧消毒—不同臭氧濃度對孵化水槽與受精卵的消毒

實驗組別分為四組不同臭氧、甲醛與空白控制組，密度 40(顆/管)，溫度 22°C，Stage I→III 幼苗的平均活存率，平均活存率 = 蝦苗存活個體數 / 起使蝦苗總數 * 100。以 Student's Test 進行統計分析，四個臭氧處理組與甲醛組分別對照空白控制組，當 $P < 0.05$ 有顯著差異。



圖十、溫度與消毒實驗

實驗組別分為二組不同溫度（24°C、30°C）與三種人工孵化消毒方式的比較（空白組、臭氧組、甲醛組），臭氧處理 0.05ppm 每天 30 分鐘，密度 40(顆/管)，溫度 22°C，Stage I→III 幼苗的平均活存率，平均活存率 = 蝦苗存活個體數 / 起使蝦苗總數 * 100。以 Student's Test 進行統計分析，相同溫度的臭氧與甲醛處理組分別對照空白控制組，當 $P < 0.05$ 有顯著差異。

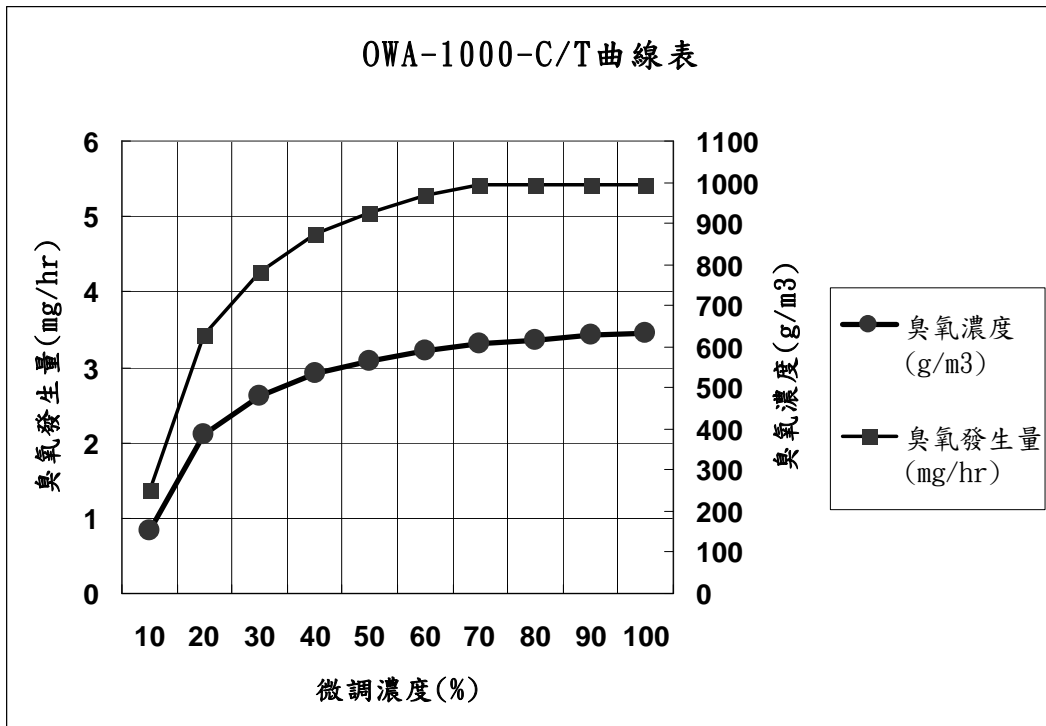


圖十一、自然孵化與人工孵化實驗

三組不同重複組，人工孵化密度 100(顆/管)，溫度 22 度，MI 為自然孵化組別，AI 為人工孵化組別，Stage I→III 幼苗的平均活存率，
 平均活存率 = 蝦苗存活個體數 / 起使蝦苗總數 * 100。以 Chi-square Test 進行統計分析，df=1，當 P<0.01 有顯著差異。

MI(A)	甲醛A	MI(A)	臭氧(A)	MI(C)	甲醛C	MI(C)	臭氧(C)
chi-square:40.98 P<0.01		chi-square:25.12 P<0.01		chi-square:0.39 p=0.53		chi-square:0.26 p=0.61	
MI(B)	甲醛B	MI(B)	臭氧(B)	MI(D)	甲醛D	MI(D)	臭氧(D)
chi-square:11.2 P<0.01		chi-square:0.75 p=0.38		chi-square:86.42 P<0.01		chi-square:86.42 P<0.01	

附錄



附錄一、臭氧機濃度關係式

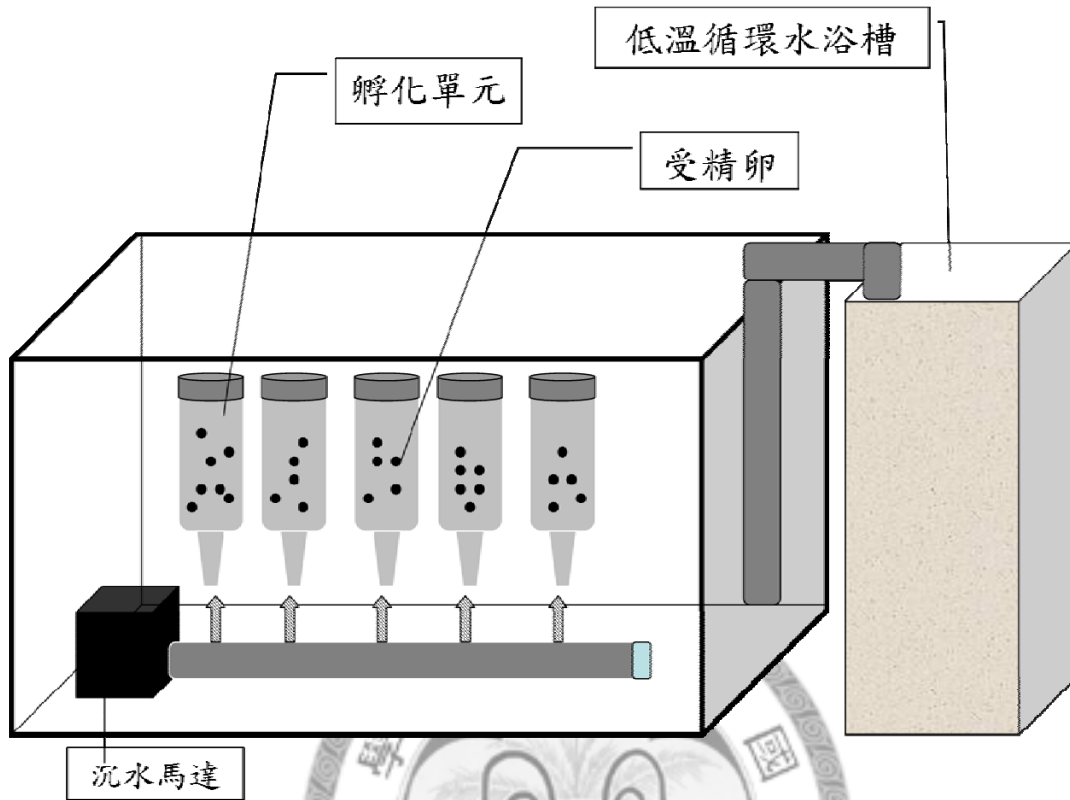
$$\text{臭氧產生量 g/hr} = \text{g/m}^3 \times 0.3 \text{ (氧氣流量：5L/Min)}$$

微調旋鈕刻度(%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
臭氧濃度(g/m ³)	0.84	2.1	2.61	2.92	3.08	3.23	3.31	3.37	3.42	3.45
臭氧發生量(mg/hr)	252	630	783	876	924	969	993	995	995	995

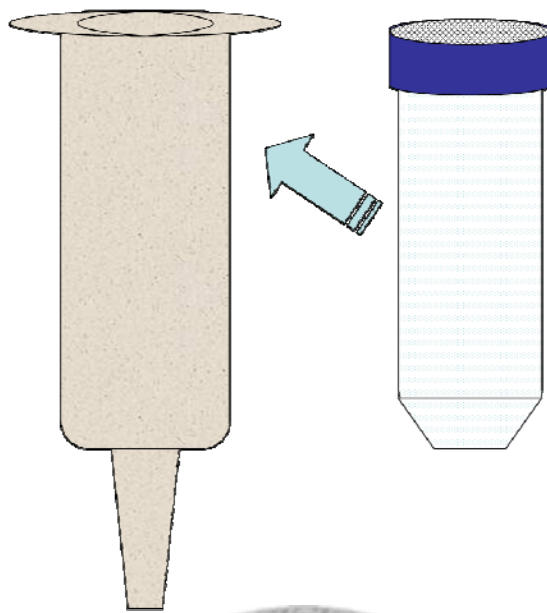
附錄二、臭氧機濃度關係式

輸入原料: 氧氣(90%-95%) ; 流量:5L/Min





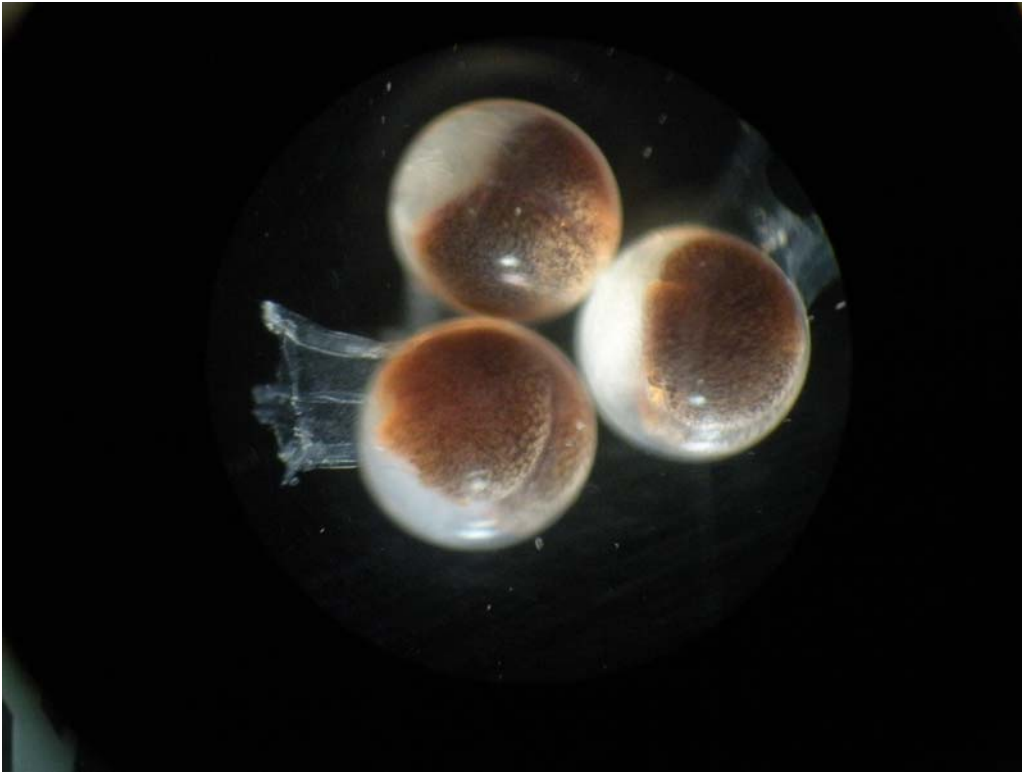
附錄三、人工孵化系統水槽



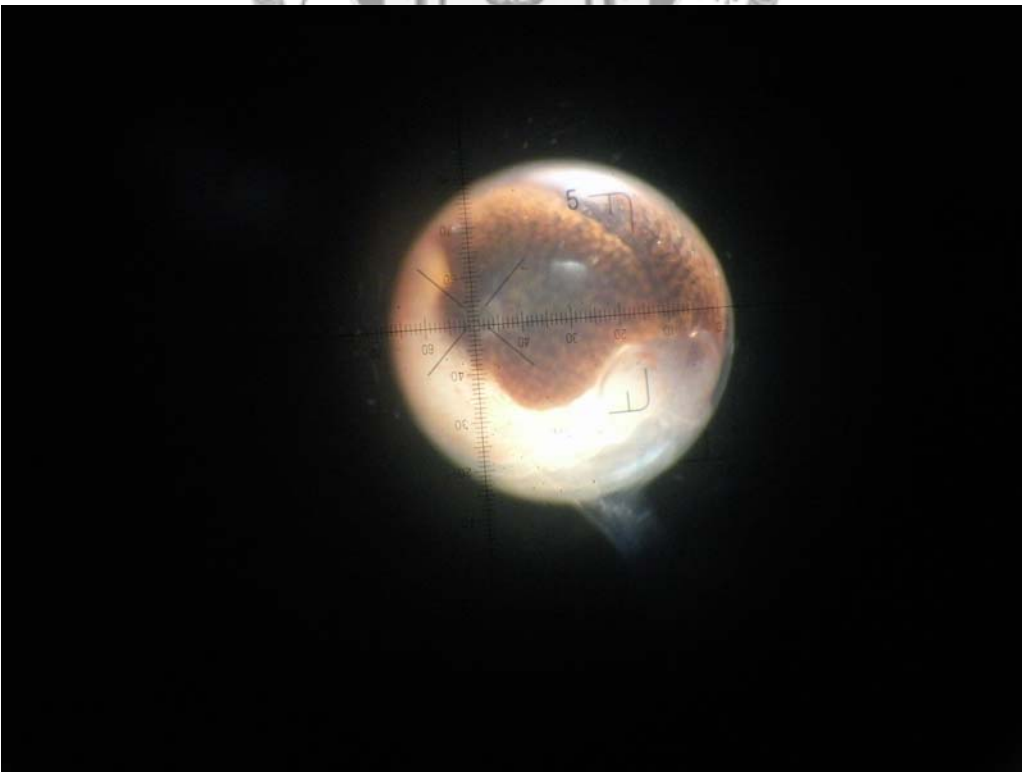
附錄四、孵化單元



附錄五、胚胎發育照片



胚胎照片：受精卵孵化前期（pre-hatching stage）（光學顯微鏡：40X）



胚胎照片：受精卵孵化前期（pre-hatching stage）（光學顯微鏡：40X）



胚胎照片：第一期幼苗（光學顯微鏡：40X）



胚胎照片：第二期幼苗（光學顯微鏡：40X）



胚胎照片：第二期幼苗(尾扇) (光學顯微鏡：40X)



胚胎照片：第一期幼苗與第二期幼苗 (光學顯微鏡：40X)



胚胎照片：第三期幼苗（光學顯微鏡：40X）



胚胎照片：第三期幼苗(尾扇)（光學顯微鏡：40X）

附錄六、水黴菌



水黴菌：發霉受精卵（光學顯微鏡：40X）



水黴菌：水黴菌體外培養（光學顯微鏡：40X）