

# 杂色鲍苗大规模脱落死亡的初步研究

王瑞旋<sup>1</sup>, 刘广锋<sup>1</sup>, 徐力文<sup>1</sup>, 王江勇<sup>1</sup>, 黎伟坚<sup>2</sup>, 陈毕生<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 深圳市南澳海珍品养殖有限公司, 广东 深圳 518116)

**摘要:** 研究了杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve) 鲍苗脱落死亡周期中水质、硅藻和细菌变化情况。结果显示, 鲍苗脱落前各水质指标无明显变化, 脱落前硅藻数量大幅度增加, 以卵形藻(*Cocconeis* spp.) 和舟形藻(*Navicula* spp.) 为主要种类。同时发现一株可疑致病菌, 初步鉴定为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)。实验表明水质等相关因子与鲍苗脱落无直接关系, 而硅藻很可能是致病菌的“载体”, 整个附着膜微环境与鲍苗存亡息息相关。

**关键词:** 杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve); 水质; 底栖硅藻; 细菌

中图分类号: S944.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3906(2007)04-0053-05

杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve) 是中国南方沿海地区经济价值很高的贝类, 因其具有生长迅速、养殖周期短、适合高密度养殖等特点, 成为南方沿海工厂化养殖的主要品种之一。2002 年以来, 由于杂色鲍鲍苗培育过程中出现大规模脱落死亡现象, 主要症状表现为附着 10~20 d 鲍苗从附着基上大量脱落死亡, 由此造成台湾、福建、广东和海南的鲍苗产量大幅度下降, 初步估计 2004 年杂色鲍鲍苗缺乏已导致杂色鲍养殖业的滑坡, 许多养殖场停产, 杂色鲍养殖陷入困境。资料表明, 引起养殖鲍类大批死亡的病因有多种, 如细菌性感染<sup>[1]</sup>、寄生虫入侵<sup>[2]</sup>、病毒感染<sup>[3]</sup> 等, 对于引起杂色鲍苗大批脱落死亡的病原, 目前仍众说不一, 国内外并未有深入研究的报道, 因此作者于 2003 年 9~12 月份在深圳市南澳海珍品养殖有限公司就鲍苗脱落死亡原因进行研究, 分析了水质、藻相及菌相与鲍苗脱落死亡的关系, 以期通过较全面系统的研究, 找出主要病原及致病机理, 为采取有效措施控制鲍苗脱落提供参考依据。

## 1 材料与与方法

### 1.1 实验生物

#### 1.1.1 受精卵的获得

杂色鲍亲本购自广东潮阳养鲍厂, 平均壳长约 7 cm, 平均湿质量约 25~30 g/只, 健康正常。亲鲍经二氯异氰脲酸( $3 \times 10^{-6}$ ) 消毒后, 常规催产, 孵化得到受精卵约 800 万粒, 放入 4 个池中, 常规方法培育。

#### 1.1.2 鲍苗培育

鲍苗培育采用流水培育和静水培育两种模式, 育苗水池规格 7 m × 3 m × 1 m: 鲍苗附着后流水池以自然流水方式, 每天交换量为水体的 2~3 倍, 海水经二氯异氰脲酸( $3 \times 10^{-6}$ ) 消毒放置 2 d 后再经珊瑚碎石和活性炭过滤。投受精卵前 3 天接种底栖硅藻, 前 2 天投营养盐: 硝酸钠(约 3.6 g/m<sup>3</sup> 水体), 硅酸钠(约 0.36 g/m<sup>3</sup> 水体), 磷酸二氢钾(约 0.36 g/m<sup>3</sup> 水体)。静水池, 投受精卵之后一直不换水不加营养盐, 其他条件同流水池。育苗期间水温 25~28℃, 平均 26.3℃, 杂色鲍开始脱落时水温 26.8℃, pH 8.08~8.22, 盐度 1.024~1.026, 光照强度范围为 1 000~3 500 lx。

### 1.2 采样

取流水池(2 个), 静水池(2 个) 进行水质、藻相、菌相监测, 其中水质监测每个指标设两个平行组, 每 2 d 检测一次; 藻相监测每个样品计数、观察 2 次, 每 3 d 天检测一次; 菌相监测每个样品设 3 个平行组, 每 2~3 d 检测一次。同期采集进水口作本底调查。

### 1.3 水质理化因子监测

每个水样检测 5 个指标<sup>[5]</sup>: 活性磷酸盐检测采用

收稿日期: 2004 06 30; 修回日期: 2004 10 10

基金项目: 广东省重大招标项目(2KB05301N); 中国水产科学院青年项目基金项目(2003 青-8)

作者简介: 王瑞旋(1979), 女, 广东揭阳人, 学士, 从事渔业生物病害防治研究, E-mail: wxlxw@21cn.com; 陈毕生, 通讯作者, 电话: 020 84195177

磷钼蓝分光光度法; 亚硝酸盐氮检测用萘乙二胺分光光度法; 氨氮检测用次溴酸盐氧化法; 硝酸盐检测用锌镉还原法; 活性硅酸盐检测用钼蓝法。

### 1.4 藻相监测

每池采集 4 块 (5 cm × 5 cm) 附着膜, 分别从池的 4 个角落采集 (固定采样点附着膜位置约在水下 50 cm), 将薄膜上硅藻刮落于培养皿中, 海水冲洗并稀释至 50 mL, 计数观察, 确定藻的数量和种类。

### 1.5 细菌监测

水样按 10 倍稀释系列, 取其中 3 个梯度 (约 0.1 mL) 涂布于 2216E 海水培养基, 28℃ 培养, 24 h 后计算异养菌总量, 同样方法涂布 TCBS 琼脂培养基检测弧菌数量。

### 1.6 攻毒试验

取明显优势菌株 NA03 感染流水池附着 7 d 正常生长的鲍苗 (带膜), 于 1 000 mL 新鲜海水中进行, 水温 21.6~ 22.0℃。试验组加菌液 2 mL (密度  $10^6 \sim 10^7$  cfu/mL), 设对照。每 3 d 换水 1 次并加培养 24 h 菌液 2 mL (浓度同), 每天记录膜上鲍苗数, 并在解剖镜下检查苗的活力、摄食情况, 压片观察濒死苗。

## 2 结果

### 2.1 水体理化因子

流水池和静水池  $\text{NO}_2^- \text{N}$  及  $\text{NH}_4^+ \text{N}$  浓度在鲍苗脱落前一直处于低水平, 且波动小, 与海区进水口变化趋势相似。具体如下:  $\text{NO}_2^- \text{N}$  质量浓度: 流水池 0.009~ 0.02 mg/L, 静水池 0.02~ 0.04 mg/L, 海区进水口 0.025~ 0.05 mg/L;  $\text{NH}_4^+ \text{N}$  质量浓度: 流水池 0.006~ 0.01 mg/L, 静水池 0.02~ 0.05 mg/L, 进水口 0.008~ 0.03 mg/L。至鲍苗脱落高峰期则明显上升, 流水池:  $\text{NO}_2^- \text{N}$  达 0.06 mg/L,  $\text{NH}_4^+ \text{N}$  达 0.07 mg/L, 附着 14~ 15 d 大量脱落, 最后有少量存活; 静水池:  $\text{NO}_2^- \text{N}$  0.04 mg/L,  $\text{NH}_4^+ \text{N}$  0.06 mg/L, 附着 8~ 9 d 大量脱落, 最后基本全部脱落。脱落前静水池与海区进水口的  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$  和  $\text{PO}_3^-$  质量浓度接近, 而流水池明显较高 (投苗前添加营养盐), 但总体呈下降趋势, 至膜上藻类生长高峰期时其质量浓度达到最低 ( $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$  约 0.02 mg/L,  $\text{PO}_3^-$  约 0.15 mg/L)。

### 2.2 藻相监测结果

鲍苗池中主要以卵形藻 (*Cocconeis* spp.)、舟形藻 (*Navicula* spp.) 和菱形藻 (*Nitzschia* spp.) 为主<sup>[6,7]</sup> (图 1)。在鲍苗开始脱落前 3~ 5 d, 流水池和静水池的卵形藻、菱形藻数量迅速上升, 其它藻类数量也呈上升趋势。至附着 12 d 后, 数量达到高峰, 卵形藻约占总数的 40%, 舟形藻约 10%, 菱形藻约 17%; 静水池卵形藻约占 28%, 舟形藻约 50%, 菱形藻约 10%。继高峰期之后, 数量下降。脱落前膜上硅藻明显老化死亡, 且细菌及纤毛虫、聚缩虫属 (*Zoothamnium*) 等生物多, 硅藻色素体移位或消失。

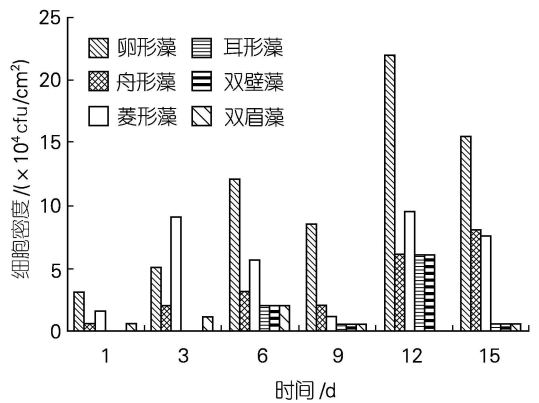


图 1 杂色鲍苗脱落前后流水池藻相变化

Fig. 1 Changes of diatom phase in tank with floating water during abalone larvae die off

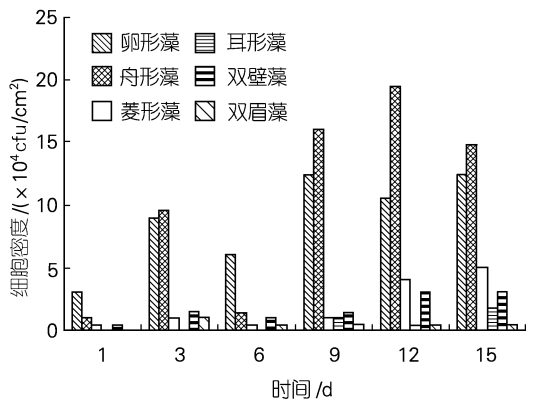


图 2 杂色鲍苗脱落前后静水池藻相变化

Fig. 2 Changes of diatom phase in tank with imobile water during abalone larvae die off

### 2.3 细菌监测结果

水体细菌监测初期未出现异常或优势种(表 1)。初期流水池未发现弧菌,静水池弧菌数量一直上升。至鲍苗脱落期间流水池水体弧菌数量增加明显,结合藻相看,藻细胞数与细菌数量存在动态平衡,而在

鲍苗脱落高峰后,藻及菌的数量均大幅度增加。此阶段从水体及附着膜上均分离到几株优势菌,其中尤为突出的一株编号为 NA03,该菌短杆状,迅速穿梭运动,经鉴定为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*),检测该菌对鲍苗的毒性结果见表 2。

表 1 杂色鲍苗脱落后水体细菌数量变化

Tab. 1 Changes of bacterium phase of water during abalone larvae die off

时间(d)	细菌密度(cfu/mL)					
	流水池		静水池		进水口	
	异养菌	弧菌	异养菌	弧菌	异养菌	弧菌
1	$0.18 \times 10^5$	0	$0.038 \times 10^5$	20	$3.2 \times 10^3$	10
3	$0.42 \times 10^5$	0	$0.027 \times 10^5$	35	$3.9 \times 10^3$	10
6	$0.25 \times 10^5$	0	$0.056 \times 10^5$	40	$1.4 \times 10^3$	20
8	$0.15 \times 10^5$	10	$0.21 \times 10^5$	50	$1 \times 10^3$	10
10	$0.02 \times 10^5$	10	$4 \times 10^5$	60	$0.5 \times 10^3$	40
12	$0.01 \times 10^5$	30	$0.24 \times 10^5$	65	$0.3 \times 10^3$	10
15	$0.02 \times 10^5$	50	$0.13 \times 10^5$	70	$0.5 \times 10^3$	10

表 2 NA03 菌株对杂色鲍苗的毒性测试

Tab. 2 Toxicity test for NA03 to abalone larvae

攻毒时间(d)	鲍苗存活数(粒)					平均累积死亡率(%)
	对照组 1	对照组 2	攻毒组 1	攻毒组 2	攻毒组 3	
1	18	16	12	18	16	-
2	18	16	11	16	14	11
3	18	14	4	12	12	34
4	16	14	0	0	0	100

表 2 显示 NA03 菌株对鲍苗有较强致病性,试验结果都是在攻毒 4 d 后全部脱落死亡,与对照组形成鲜明对比。3~ 4 d 后,鲍苗摄食能力明显下降,活力及附着力也不同程度的下降。镜检试验组濒死鲍苗,发现苗体内大量迅速运动的细菌,接种于 TCBS 培养基上,长出与 NA03 菌株同样的菌落。试验组附着膜上可见不少藻体空壳,空壳中央部位有迅速运动呈杆状的细菌,藻及苗体内均未见寄生虫。将膜上藻冲洗研磨涂布于 TCBS 培养基上,结果长出的菌落形态同 NA03 菌株。

## 3 讨论

### 3.1 水质及相关因子与鲍苗脱落的关系

监测结果显示流水池中  $\text{NO}_2\text{-N}$  质量浓度为

0.009~ 0.021 mg/L,  $\text{NH}_4\text{-N}$  质量浓度在 0.006~ 0.20 mg/L 范围,符合中国渔业用水非离子态氮最大允许指标。总体看,鲍苗脱落前各水质指标及相关因子未出现异常情况(与相关文献<sup>[8,9]</sup>比较),而静水池鲍苗比流水池提前脱落,且脱落情况相对严重,可见水质因子可能影响附着膜微生态环境,在一定程度上影响整个脱落进程,但不是引起鲍苗脱落的直接原因<sup>[10]</sup>。

### 3.2 藻相对鲍苗的影响

杂色鲍苗在附着期间主要摄食大小适口的卵形藻和舟形藻<sup>[11]</sup>,监测表明在鲍苗脱落期间,底栖硅藻的总数较大,是所监测硅藻生长周期中的最大值,适合鲍苗摄食的底栖硅藻数量并不缺乏,可见鲍苗脱落并非饵料不足引起。但作者发现脱落前 1~ 2 d,膜上

许多老化硅藻堆积形成粘滑厚层,老藻死藻比例明显增大,同期检测膜上的细菌,发现异养菌数量非常大。鲍苗脱落前、后水质因子变化不明显,可初步推断底栖硅藻是受到细菌或其它生物因素的影响导致质量下降。而硅藻质量涉及到鲍苗的营养供给,可能直接引起鲍苗自身免疫力及活力的下降。因此保证饵料底栖硅藻的质量与数量对鲍苗的健康成长尤其关键。硅藻的质量包括种类的变化和藻类本身生长情况,作者在实践中证明通过控制光照强度可防止硅藻老化死亡,保证其质量。

### 3.3 细菌与鲍苗脱落的关系

本次研究发现一株溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)对鲍苗具有强的毒性,可能与鲍苗的脱落死亡有关。取附着膜上摄食能力及活力明显下降的鲍苗镜检,发现在鲍苗肠道前端有大量短杆状菌(经证明为溶藻弧菌),该菌分布集中,活力强,运动速度快。此外,消化道内有许多硅藻碎屑。已有资料报道副溶血弧菌和溶藻弧菌对杂色鲍的毒性作用<sup>[12,13]</sup>。弧菌是养殖贝类流行病的主要病原菌,一旦条件合适便大量繁殖,引起贝类暴发性大面积死亡<sup>[14]</sup>。弧菌对九孔鲍具很强毒性,且病情传播速度快,病程短,危害严重<sup>[15]</sup>,通常壳长2~15 mm 幼鲍受感染后其体表有杆状菌,并侵入鲍苗体,迅速增殖使鲍苗死亡<sup>[16]</sup>。台湾有报道指出当水温逐渐升高时,鲍苗摄食量增加,环境中弧菌也随渐升的水温大量增殖形成优势菌相,导致鲍苗肠道弧菌数量偏高。而作者在进一步使用药物防治试验中,使用多种抗生素联合作用取得较理想的效果<sup>[17]</sup>,这也证明了细菌性疾病是造成鲍苗大量脱落死亡的主要原因之一。作者进一步试验结果也显示了细菌是导致鲍苗大规模死亡的主要原因<sup>[18]</sup>。

同步镜检发现硅藻表面及体内均有短杆状菌存在,且相当活跃,硅藻色素体大部分残缺或消失。附着硅藻表面有很多进行新陈代谢的排泄孔,细菌在硅藻壳上大量附着后必将堵塞这些排泄孔而使硅藻死亡<sup>[19]</sup>。本次研究初步认为致病很可能以饵料硅藻为“载体”,通过食物链传播,进入鲍苗体内,达到致病浓度即使鲍苗死亡。生产中也发现,同期个体越大的鲍苗更易脱落,且当藻类明显老化死亡并出现较多桡足类、纤毛类时,鲍苗脱落的可能性更大。在定期对附着膜的菌数检测中也发现同期附着膜上弧菌数远远比水体中的高。然而由于附着硅藻微环境的特殊性,微藻环境与鲍苗的栖息环境直接关系到鲍苗的健康。而溶藻弧菌是否为引起鲍苗脱落死亡的主要病原及其致病机理有待进一步深入研究确定。

### 3.4 鲍苗死亡脱落的预防

贝类微生物性疾病的暴发主要取决于病原、适合病原生存的环境和抵抗力差的养殖对象,病原生物致病力与养殖生物抗病力之间存在一个动态平衡。没有病原生物感染风险的养殖环境是不存在的<sup>[20]</sup>,而利用药物治疗养殖生态系统中的贝类微生物病害也是相当有限的。由于大多数养殖场的亲鲍经几代养殖后多数出现种质的严重退化,导致种苗抗病力的下降,因此应通过选择育种、生态调控等手段来提高鲍苗自身的抗病能力,综合防治杂色鲍鲍苗的异常大规模脱落死亡。

#### 参考文献:

- [1] Anguianobeltran R, Searcyberbal M L, Lizarragapartida, et al. Pathogenic of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone[J]. **Diseases of Aquatic Organisms**, 1998, **33**(2): 119-122.
- [2] Gardaner G R, Haaker J C, Togstad H A. Association of Prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone[J]. **Journal of Invertebrate Pathology**, 1995, **66**(2): 111-120.
- [3] 宋振荣,霍振华,倪子绵.九孔鲍苗“脱板症”病原的初步研究[J].福建水产,2003,4: F3.
- [4] GB11607-1989,渔业水质标准[S].
- [5] GB17378.4-1998,海水分析[S].
- [6] 金德祥.中国海洋底栖硅藻类(上、下卷)[M].北京:海洋出版社,1992.
- [7] 程兆弟,高亚辉,刘师成.福建沿岸微型硅藻[M].北京:海洋出版社,1993.
- [8] 甘居利,林钦,王小平,等.工厂化流水养鲍系统水质动态变化[J].中国水产科学,2003,10(4): 333-337.
- [9] 刘鹰,杨红生,张涛,等.封闭循环流水培育贝类苗种的初步实验[J].动物学杂志,2003,38(4): 72-75.
- [10] 李宏才,徐亚莉,袁又正.九孔养殖池之水质与九孔幼苗活存率间相互关系之研究[J].中国水产(中国台湾),2003,603:34-43.
- [11] 沈士新.附着板上附着性藻类对九孔幼苗附苗及成高效应之探讨[J].水产种苗(中国台湾),2003,68.
- [12] Liu P C, Chen Y C, Huang C Y, et al. Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, with withering syndrome[J]. **Lett Appl microbiol**, 2000, **31**(6): 433-437.
- [13] Liu P C, Chen Y C, Lee K K. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* [J]. **Microbios**, 2001, **104**(408): 71-77.
- [14] 邓欢,陈倅,周泓.海湾扇贝病原菌——黑美人弧菌

- 的分离与致病性[J]. 水产科学, 2003, 22(3):14-16.
- [15] 王军, 苏永全, 张蕉南, 等. 1999年春季东山九孔鲍暴发性病害研究[J]. 厦门大学学报(自科版), 1999, 38(5): 641-644.
- [16] 黄贵民. 鲍苗繁育应注意之问题与探讨[J]. 水产种苗(中国台湾), 2003, 60.
- [17] 徐力文, 刘广锋, 王江勇, 等. 杂色鲍育苗中“掉板症”的药物防治研究[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(4): 44-45.
- [18] 王江勇, 王瑞旋, 刘广锋, 等. 杂色鲍幼苗大规模死亡与细菌数量的关系[J]. 南方水产, 2005, 1(1): 57-61.
- [19] 纪尚伟, 许兵, 徐怀恕. 海洋细菌在生物表面和非生物表面附着的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1991, 21(2): 64-68.
- [20] 王斌, 王翔, 王莉明. 我国主要养殖贝类微生物性疾病研究进展[J]. 海洋环境科学, 2002, 21(3): 76-80.

## Studies on the stripping off and death of larvae of *Haliotis diversicolor* Reeve

WANG Rurxuan<sup>1</sup>, LIU Guang-feng<sup>1</sup>, XU Lirwen<sup>1</sup>, WANG jiang-yong<sup>1</sup>, LI Weirjian<sup>2</sup>, CHEN Bisheng<sup>1</sup>

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Nan'ao Sea Foot Aquiculture Company, Shenzhen 518116, China)

Received: Jun. , 30, 2004

Key words: *Haliotis diversicolor* Reeve; water quality; diatom; bacterium

**Abstract:** The water quality, growth of diatom and changes of bacterium during larvae of *Haliotis diversicolor* stripping off and death were studied to find the cause. Results showed that the water quality hadn't changed distinctly before the larvae stripped off. By the time of larvae of abalones stripping off, the amount of diatom increased significantly, and dominant species were *Navicula* spp. and *Cocconeis* spp. Meanwhile, we found a vibriion which might be the pathogenic bacteria which had caused stripping off and death of larvae, and was identified as *Vibrio alginolyticus*. It was showed that water quality had no directly relationship with the abalones stripping off of *H. diversicolor*, but it could impact diatom phase. We found that diatom was likely to be the carrier of pathogenic bacteria, and the microenvironment of plates was very important.

( 本文编辑:张培新)