

## 杂色鲍幼苗大规模死亡与细菌数量的关系

王江勇<sup>1,2</sup>, 王瑞旋<sup>1</sup>, 刘广锋<sup>1</sup>, 陈毕生<sup>1</sup>, 潘金培<sup>2</sup>, 徐华森<sup>3</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300; 2. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301;  
3. 湛江市硇洲鲍鱼种苗试验场, 广东湛江 524073)

**摘要:**对杂色鲍育苗过程中养殖池、附着板上的细菌数量进行了监测, 当鲍苗出现大规模死亡前后, 池水及附着板上细菌数量比养殖初期高 2 个数量级, 利用臭氧处理养殖水后, 附着板上的细菌数量没有发生根本变化, 鲍苗同样出现死亡, 鲍苗剥离后 1 周左右也出现大规模死亡。在鲍苗大规模死亡前后分离的细菌经过鉴定为塔式弧菌及 *Vibrio* sp.

**关键词:**杂色鲍; 细菌; 大规模死亡

中图分类号: S944.4\*5

文献标识码: A

文章编号: 1673-2227-(2005)01-0057-05

## The relationship between extensive death of larvae of abalone *Haliotis diversicolor* Reeve and number of bacteria

WANG Jiang-yong<sup>1,2</sup>, WANG Rui-xuan, LIU Guang-feng<sup>1</sup>, CHEN Bi-sheng<sup>1</sup>, PAN Jin-pei<sup>2</sup>, XU Hua-sen<sup>3</sup>

(1. South China Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. South China Sea Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

3. Naozhou Abalone Seeding Farm, Zhanjiang 524073, China)

**Abstract:** The number of bacteria in the pool and on the attachment film were monitored. Before and after extensive death of larvae of abalone occurred, the number of bacteria in the pool and on the attachment film was 200 times higher than that in initial stage, the number of bacteria did not changed after the water was utilized by ozone, the death of abalone occurred either, the extensive death occurred about one week after the juvenile abalone detached. The bacteria separated before and after the extensive death of juvenile abalone were *Vibrio tubiashii* and *Vibrio* sp.

**Key words:** *Haliotis diversicolor* Reeve; abalone; bacteria; extensive death

鲍苗培育阶段有关鲍苗掉板及死亡的研究国内外已有许多报道, Elson & Lockwood<sup>[1]</sup>等研究了引起人工养殖红鲍变态幼虫至 1 cm 幼鲍大量死亡的弧菌, Anguiano-Beltran 等人<sup>[2]</sup>报道了溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 引起红鲍面盘幼虫及 4 d 龄的幼鲍大量死亡。1997 年至 1998 年初台湾东北角宜

兰地区许多养殖场发生附着苗大量死亡的情形, 吴萃慧等<sup>[3]</sup>发现大量死亡多发生在附苗后 1 个月当原有硅藻种群濒临被刮食殆尽之时, 认为是由于这段期间天气多阴雨, 附苗板上所受光照不足以造成硅藻种群大量生长, 导致幼鲍缺饵而死亡。Lee 等<sup>[4]</sup>报道了弧菌导致杂色鲍苗暴发性死亡, 温度越

收稿日期: 2005-03-01

资助项目: 广东省自然科学基金项目 (04001264); 中国水产科学研究院青年基金项目 (2003-青-8)

作者简介: 王江勇 (1971-), 男, 助研, 硕士, 现主要从事海洋生物病害防治研究工作。E-mail: wjy606@sohu.com

通讯作者: 陈毕生, E-mail: chenbs309@163.com

高,小鲍更容易受感染,沈士新<sup>[5]</sup>认为鲍幼苗死亡与底栖硅藻生长及细菌有关,李国浩等<sup>[6]</sup>报道九孔鲍幼苗的病害可能与弧菌有关。

2001年秋季,福建省东山、漳州等地许多鲍养殖场的杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve)鲍苗发生大规模掉板死亡事件,许多养殖场甚至颗粒无收。2002春季,该现象蔓延至广东、海南等地,而且有愈演愈烈之势。具体表现为:(1)鲍苗在浮游阶段就沉底死亡,根本不能附着。(2)在整个附着期内,鲍苗从采苗器上逐渐脱落,到最后基本全部死亡。(3)在附着期的某天或几天内,鲍苗突然大量脱落死亡,一般出现于附着后10~20 d左右。(4)鲍苗剥离后在苗池内突然死亡,一般发生于剥离后6~15 d。该文针对鲍育苗期间水中及附着板上细菌数量的变化进行了研究,以期分析鲍苗大规模掉板死亡提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 采样点

2004年,秋季育苗期的9~11月间,湛江市硇洲鲍鱼种苗试验场。

### 1.2 水质检测

每天对海水温度、pH、盐度进行测量。

### 1.3 细菌学监测

监测育苗周期细菌生态:包括育苗池水、附着板(薄膜)和鲍苗;在受精卵下池后第三天开始取样,隔天取样1次。育苗池水包括2类:(a)未经任何处理的常规池水,(b)经过臭氧处理的池水。

(1)用无菌广口瓶取用20 cm以下池水,加0.01%吐温,摇动30 min,然后分别稀释成最适合的3个浓度梯度。

(2)取10 cm×10 cm大小薄膜,用无菌剪刀剪碎,放入装有50 mL灭菌海水广口瓶中,加0.01%吐温,摇动30 min,稀释成最适合的3个浓度梯度。

(3)取5只幼苗,规格2~3 mm,用无菌海水冲洗3次,小型匀浆器进行匀浆,加入1 mL浓度为1%的生理盐水,稀释成最适合的3个浓度梯度。

上述每个浓度梯度分别涂布2216E及TCBS各3个平板,每组3个平行。28℃培养24~48 h,进行总细菌数和弧菌数的计数。

## 2.4 细菌的分离纯化与鉴定

当薄膜及池底的的鲍苗发生大规模死亡时,2216E及TCBS平板上出现的优势菌落种类非常明显,挑起优势单菌分离纯化,然后接入斜面培养基保种。用BIOLÓG细菌鉴定仪鉴定。

## 2 结果

### 2.1 养殖场水质因子结果

养殖池内基本水质在育苗前后未发生较大变化,海水比重在1.020~1.025之间,初期较低,后期有些升高,见图1;水温也相对稳定,在25~30℃之间,见图2;pH值也相对稳定,在8.1~8.4之间,见图3。

### 2.2 常规育苗过程中细菌数量的变化

受精卵下池后15 d池水中总细菌(2216E培养基)数量一般低于 $1 \times 10^3$  cfu·mL<sup>-1</sup>(图4),15 d后呈逐渐上升趋势,至30 d后达到最高 $6 \times 10^4$  cfu·mL<sup>-1</sup>;附着板上细菌数量也呈现类似的规律,在14 d内基本维持较低水平,低于 $6 \times 10^3$  cfu·cm<sup>-2</sup>,而14 d后逐渐上升,30 d后达到最高, $1.2 \times 10^5$  cfu·cm<sup>-2</sup>,此时鲍苗(0.1~0.3 mm)出现大量掉板死亡,严重的整池全部死亡,有些薄膜上的底栖硅藻出现大片掉落。在此之后水中及附着板上的细菌数量逐渐下降。

水中弧菌数量(TCBS培养基)一直处于较低水平(图5),都低于 $1 \times 10^4$  cfu·mL<sup>-1</sup>,而薄膜上弧菌数量与总细菌数量的变化很相似,30 d后达到最高, $2.5 \times 10^4$  cfu·cm<sup>-2</sup>。

### 2.3 臭氧处理水后细菌数量的变化

受精卵下池后20 d内池水中细菌(2216E培养基)数量一般低于 $7 \times 10^2$  cfu·mL<sup>-1</sup>(图6),20 d后呈逐渐上升趋势,至30 d后达到最高 $1.7 \times 10^4$  cfu·mL<sup>-1</sup>;附着板上细菌数量也呈现类似的规律(图7),在20 d内基本维持低于 $1.5 \times 10^4$  cfu·cm<sup>-2</sup>,而20 d后逐渐上升,30 d后达到最高, $3.3 \times 10^4$  cfu·cm<sup>-2</sup>,之后逐渐下降。

### 2.4 剥离后幼鲍体内细菌含量变化

幼鲍达到2~3 mm后,从附着板上剥离下来,进入中间培育阶段,一般投喂人工饵料。在10~15 d内也容易发生死亡。从图8可以看出在第9~10 d,鲍苗体内细菌含量达到最高峰, $6.5 \times 10^4$  cfu·

ind<sup>-1</sup>,当天鲍苗出现大量死亡,死亡率高达 50%,随即下药,以浓度为  $3 \times 10^{-6}$  的氟哌酸浸泡 6 h,连续 3 d。在随后的 1 周内,鲍苗体内细菌含量基本呈下降趋势,鲍苗的死亡也得到控制。

2.5 细菌的分离纯化与鉴定

当薄膜上的鲍苗出现大规模死亡时,从 TCBS

及 2216E 培养基上的菌落可看出基本只有 2 种细菌,且数量非常大;剥离后的幼鲍出现死亡时,TCBS 及 2216E 培养基上也只有 2 种细菌,从菌落形态与大小与上述 2 种细菌非常一致。经过初步感染后,又从体内分离到相同的细菌,用 BIOLOG 进行鉴定,为塔氏弧菌(*Vibrio tubiashii*)和 *Vibrio* sp.。

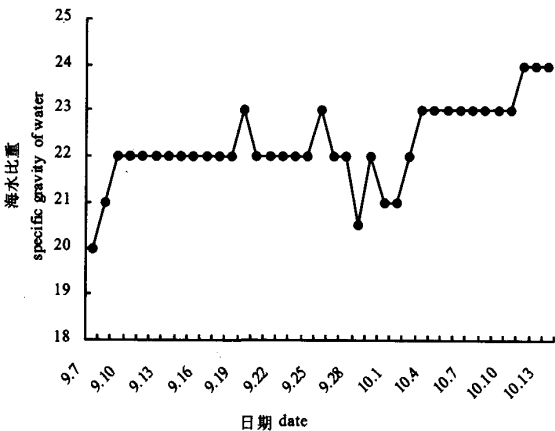


图 1 养殖池盐度的变化  
Fig. 1 The change of Salinsty

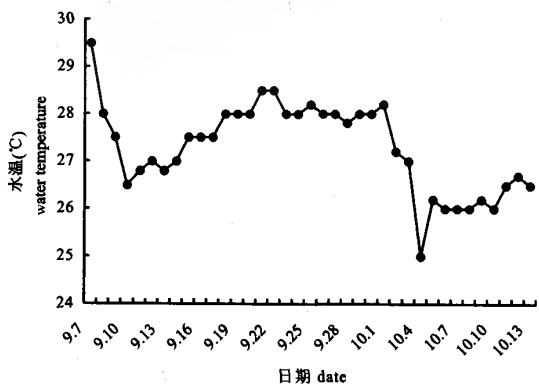


图 2 养殖池水温的变化  
Fig. 2 The change of temperature of water

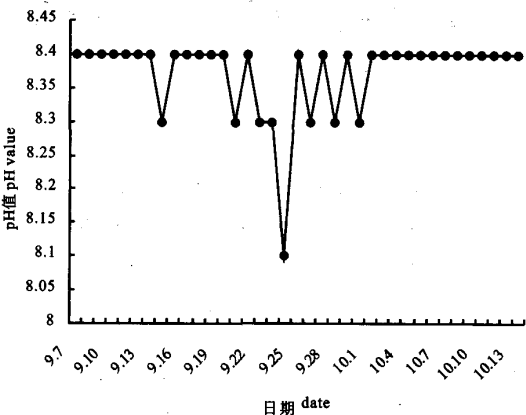


图 3 养殖池 pH 的变化  
Fig. 3 The change of pH value of water

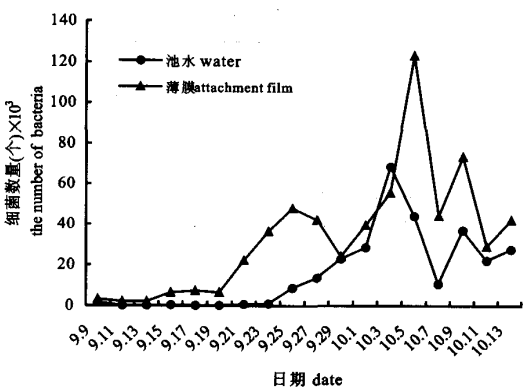


图 4 水中及薄膜上总细菌含量的变化  
Fig. 4 The change of number of general bacteria of water and attachment film

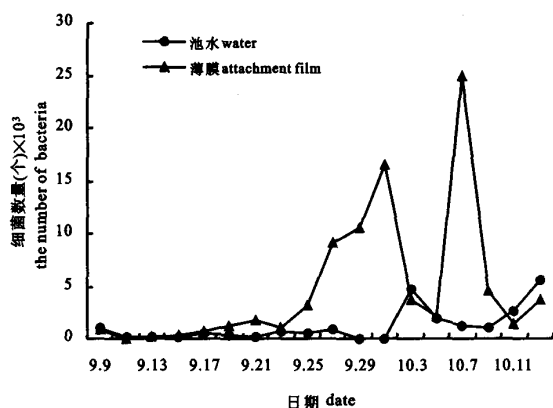


图5 水中及薄膜上弧菌数量的变化

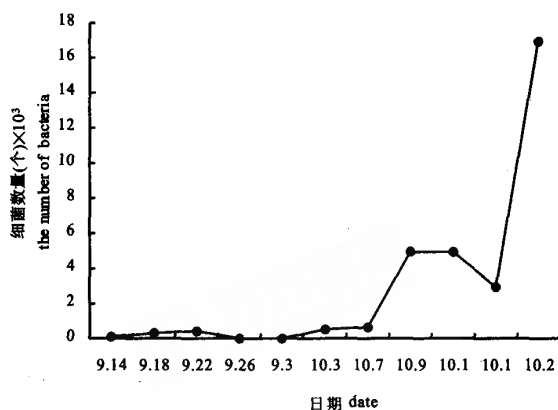
Fig. 5 The change of *Vibrio* in the water and attachment film

图6 臭氧处理后池水中细菌含量变化

Fig. 6 The change of number of bacteria of water after ozone treatment

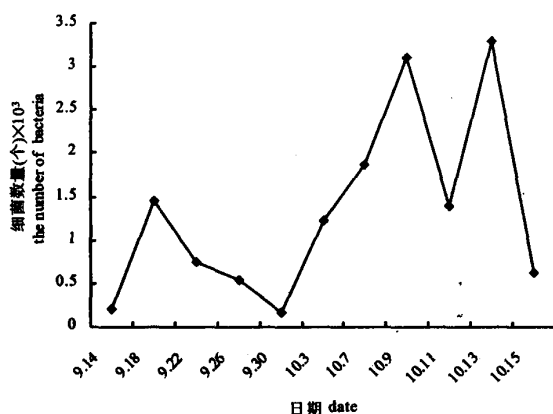


图7 臭氧处理后薄膜上细菌含量的变化

Fig. 7 The change of number of bacteria on the attachment film after ozone treatment

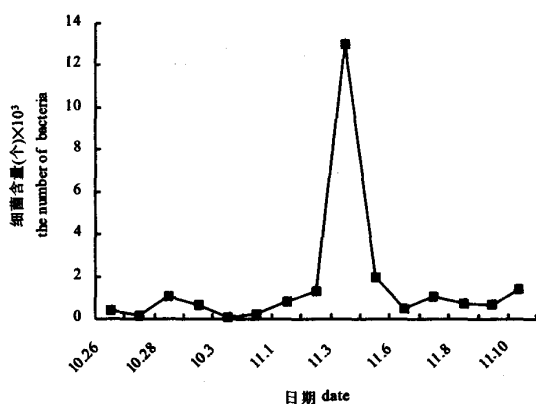


图8 幼鲍剥离后体内细菌含量变化

Fig. 8 The change of number of bacteria of the juvenile abalone, *Haliotis diversicolor* Reeve

### 3 讨论

在杂色鲍工厂化育苗刚刚兴起时,鲍苗匍匐幼体变态前后的培育过程中,部分水池饵料硅藻常会因突发的意外原因脱落消失,严重者采苗器表面几乎透明无藻类色泽;有时整池采苗器上的鲍苗部分脱落,甚至全部脱落死亡。而从2001年秋季发生的鲍苗脱落现象与以往的不一樣,有时鲍幼体在浮游阶段就沉底死亡,有时在附苗板上硅藻生长良好时,

鲍苗突然大量脱落死亡,大小仅为1~2 mm,一旦从附着板上掉下,即剩下一个空壳,空壳内充满细菌及原生动物。目前从台湾、福建、广东、海南情况来看,发生掉板死亡的情况基本一致,一般在孵化后10~30 d内出现掉板,发病期一般不超过3 d,有时死亡率达100%。鲍苗剥离后在池底也发生大量死亡,情况更为复杂,(1)当天剥离,第二天全池死亡;(2)剥离后5~20 d内,鲍苗已经摄食人工饵料,壳周缘长出了薄薄的绿边,没有任何征兆即发生大量死亡,

1 d 内死亡率高达 50% 以上。

在鲍苗附着初期,附着板上的藻类较少,其细菌数量也一直处于较低水平,随着藻类的生长,细菌数量不断增加,到鲍苗出现大规模死亡前后,其细菌数量比初期高 2 个数量级,此时藻类出现老化死亡,用手摸上去有滑腻感,肉眼可见苗池内薄膜上藻类出现大量脱落,池水中细菌含量随之升高。薄膜上藻类重新生长,其细菌浓度再次升高。

经过臭氧处理过的池水,水中的细菌数量比正常养殖水低 1 个数量级。而藻种接种过来之前未经任何处理,其上的细菌含量比较高,尤其在经过 30 d 后,薄膜上细菌数量达到  $1.7 \times 10^4$  cfu·mL<sup>-1</sup>。虽然低于未处理水池中薄膜细菌数量,从观察来看,而鲍苗生长速度也明显小于未处理水。

从试验结果看来,在幼体附着至剥离前这一段时间内,附着板上细菌数量的剧增是鲍苗大规模死亡的重要标志。鲍苗自附着开始,它所附着的薄膜是一个非常复杂的生活环境,有机微粒与微小生物沉积在它的表面,就开始形成所谓的生物膜<sup>[7]</sup>,其上的优势生物是硅藻与细菌,还有原生动物。池水在流动或充气翻滚时,用肉眼观看似乎全池水的理化因子都是相同的。实际上,越靠近薄膜表面,这些部位水的运动则越极微,其化学物质的浓度与大水体是极不同的,而且这些化学物质是通过溶液的扩散作用来输送,不是靠水团的交流。

剥离下来的鲍苗(2~3 mm)初期体内细菌含量较低,当其体内细菌数量剧增时,即出现大规模死亡,死亡率最高的达 50%,达到  $6.5 \times 10^4$  cfu·ind<sup>-1</sup>,用药物控制后,其细菌数量降低,该现象在 5~10 d 后又重复出现,再次出现大规模死亡,这与徐力文<sup>[8]</sup>的研究结果一致。

目前关于鲍苗的大规模死亡有多种说法。(1)种质退化说。经过十几年的工厂化高密度养殖,在选种、亲鲍培育时没有严格遵循操作规程,有些养殖场用本场亲鲍长期自交导致该品种迅速退化,理由是在出现掉苗的养殖场培育黑鲍苗,则不会出现掉板现象。(2)水质恶化说。有人认为养殖环境的迅速恶化,宜渔水域的减少,赤潮频繁发生,有毒藻类

及毒素的存在是导致鲍苗大规模掉板死亡的原因。(3)微生物说。有关病毒的报道只有宋振荣等<sup>[9]</sup>在电子显微镜下观察到了 28 d 鲍龄的幼苗体内有病毒颗粒,并以此推断该病毒为九孔鲍“脱板症”的病原体。我国台湾许多研究人员认为是溶藻弧菌引起的,Godoy<sup>[10]</sup>等人在红鲍 1 cm 幼苗上也分离到弧菌,经过感染试验确定为导致红鲍大量死亡的病原。

从我们的试验来看,细菌是导致鲍苗大规模死亡的主要原因,在未出现掉板死亡的养殖池内,其细菌数量一直处于较低水平;或者是病毒或立克次体等更小型的微生物导致鲍苗的病害,而后继发细菌感染,我们多次的电镜切片均未发现病毒粒子或其他可疑微生物,这个问题值得进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Elston R, Lockwood G S. Pathogenesis of vibriosis in cultured juvenile red abalone, *Haliotis rufescens* Swaison[J]. J Fish Dis, 1983, 6, 111-128.
- [2] Anguiano-Beltran C, Searcy-Bernal R, Lizárraga-Partida M L. Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*[J]. Dis Aquatic Org, 1998, 33(2):119-122.
- [3] 吴萃慧, 谢忠明, 沈士新, 等. 影响九孔附着苗存活率的藻相变化因子[J]. 上海水产大学学报, 1998, 7(增刊):417-420.
- [4] Lee K-K, Liu P-C, Chen Y-C, et al. The implication of ambient temperature with the outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke[J]. J Thermal Biol, 2001, 26: 585-587.
- [5] 李国诒, 黄之阳, 吴韦毅, 等. 九孔种苗培育过程之细菌学相关研究[J]. 水产种苗月刊(台), 2004, 第(72)期.
- [6] 沈士新. 附着板上附着性藻类对九孔幼苗附着及成长效应之探讨[J]. 水产种苗月刊(台), 2003, 第(68)期.
- [7] 聂宗庆, 王素平. 鲍育苗生物学研究新进展[J]. 湛江海洋大学学报, 2002, 22(3):78-82.
- [8] 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):41-45.
- [9] 宋振荣, 霍振华, 倪子棉. 九孔鲍苗“脱板症”病原的初步研究[J]. 福建水产, 2003, (4):1-3.
- [10] Godoy Marcos, Aviles Fabian, Augusto Labbe. Acute mortality syndrome in red abalone (*Haliotis rufescens*) seed cultivated in Chile, 5th international abalone symposium, 2003:152-153.