

Effects of Different Water Treatment Methods on Growth and Development of *Babylonia areolata* Larvae

Guofu Wang¹, Liyun Pu¹, Bingshun Li¹, Guoqing Zhang¹, Changbo Wang², Baojun Tang³

¹Hainan Academy of Ocean and Fisheries Science, Haikou Hainan

²Shandong Sci-Health Biotechnology Co., Ltd., Yantai Shandong

³East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai

Email: tangbj@ecsf.ac.cn

Received: Nov. 15th, 2019; accepted: Nov. 28th, 2019; published: Dec. 5th, 2019

Abstract

To compare the effects of different water treatment methods on the growth and metamorphosis of *Babylonia areolata* larvae, the larvae hatched from same batch of zygotes were cultured in seawater treated with polypeptide S100, bacillus, phage and lysozyme, and dichlororhydantoin, respectively. The content of vibrio and total bacteria in seawater was detected. The growth rate and metamorphosis rate of the larvae were measured. The results showed that the content of total bacteria and vibrio in the treated seawater was decreased, and the growth rates of larvae were higher than that of the control group. The larvae cultured in seawater treated with polypeptide S100 showed the lowest vibrio content, the fastest growth and maximum metamorphosis rate, indicating polypeptide S100 can effectively improve the survival rate of the larvae. This study can provide a reference for the rational selection of water treatment agents and methods in the artificial breeding of *B. areolata*.

Keywords

Babylonia areolata, Breeding, Water Treatment, Growth Rate, Metamorphosis Rate

不同水处理方式对方斑东风螺幼体生长发育的影响

王国福¹, 浦利云¹, 李丙顺¹, 张国庆¹, 王长波², 唐保军³

¹海南省海洋与渔业科学研究院, 海南 海口

²山东深海生物科技股份有限公司, 山东 烟台

文章引用: 王国福, 浦利云, 李丙顺, 张国庆, 王长波, 唐保军. 不同水处理方式对方斑东风螺幼体生长发育的影响[J]. 水产研究, 2019, 6(4): 156-162. DOI: [10.12677/ojfr.2019.64021](https://doi.org/10.12677/ojfr.2019.64021)

³中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海
Email: tangbj@ecsf.ac.cn

收稿日期: 2019年11月15日; 录用日期: 2019年11月28日; 发布日期: 2019年12月5日

摘要

本文为了比较不同水处理方式对方斑东风螺幼体生长发育的影响, 选择同一批卵囊孵化的幼体, 采用多肽菌素、芽孢杆菌、噬菌肽和溶菌酶、二氯海因等试剂处理育苗过程中的海水, 检测处理后海水中弧菌和总细菌含量, 并测定方斑东风螺幼体的生长率和变态率等指标。结果显示, 处理过的育苗海水中细菌和弧菌含量均有不同程度的下降, 幼体的生长速度较对照组显著提高。用多肽菌素处理后, 育苗用水中的弧菌量最低, 幼体生长速度最快, 变态率最高, 表明多肽菌素可有效提高方斑东风螺苗种成活率。本研究可为方斑东风螺人工育苗过程中合理选择水处理制剂和方式提供参考。

关键词

方斑东风螺, 育苗, 水处理, 生长率, 变态率

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

方斑东风螺(*Babylonia areolata*)隶属于软体动物门、腹足纲, 分布于中国东南沿岸, 是一种经济价值较高的海洋贝类。近年来, 对该种类过度捕捞已导致资源的明显衰退[1] [2]。为了满足市场需求和增养殖需要, 对方斑东风螺人工育苗技术已开展了大量研究[3] [4] [5]。

水是贝类幼虫的生存环境, 水质是决定育苗成败的关键因素[6]。在方斑东风螺的人工育苗过程中, 由于育苗水体中存在较多细菌、真菌、原生动物等, 极易引起方斑东风螺幼体的发病死亡[7]。因此, 有必要使用药物杀灭或控制水体中的有害菌。以前水产养殖中主要使用化学杀菌剂或抗生素处理海水, 常用的化学杀菌剂如二溴海因、二氯海因(DCDMH)、甲醛、高锰酸钾等[8] [9]。但是, 抗生素的大量使用使致病细菌的耐药性增加, 增加了养殖对象染病的机会; 抗生素可在生物体内残留, 最终对人体产生危害。

近年来, 人们越来越注意到有益微生物在水产养殖中的重要作用, 各种微生态制剂、益生菌和抗菌肽等逐步应用在水产养殖和育苗过程中[10] [11] [12]。研究表明, 益生菌可促进方斑东风螺幼体的生长, 提高变态率和存活率[13]。本研究选择多肽菌素、芽孢杆菌、噬菌肽、溶菌酶、二氯海因等不同试剂, 在方斑东风螺人工育苗过程中处理海水, 评估不同处理方式对方斑东风螺幼体生长和变态的影响, 并与传统人工育苗方法进行对比, 为方斑东风螺育苗过程中合理用药提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 方斑东风螺幼体

实验于2017年7月~8月在海南省省海洋与渔业科学院琼海科研基地开展。实验用方斑东风螺卵

囊采自海南琼海长坡椰林海达养殖场，采用同一批二代海南当地品系亲螺所产的卵囊。卵囊先用 2 ppm 的蛋氨酸碘处理 3 min。幼体孵化前分 6 个组提前 1~2 天处理育苗用水，处理期间曝气；育苗期间不换水，育苗用水开始微充气，3 天后逐渐加大充气量。实验水温 28℃~29.2℃，盐度 31~32，pH 7.8~8.1。育苗海水经沙滤后，再用 10 μm 网袋过滤。幼体孵化后，调整密度至 0.15 个/ml。

2.2. 水处理试剂

实验用多肽菌素为 S100 产品中的主要成分——APSH-07，由山东深海生物科技股份有限公司提供。该多肽由 44 个氨基酸组成，分子量为 4.4 KD。噬菌肽和溶菌酶为混合试剂，购自海南卓越生物有限公司，按使用说明添加。二氯海因(含量 20%)购自海口乐洋生化科技有限公司。芽孢杆菌(5×10^7 cfu/g)购自广东白鹤生物科技发展有限公司。

2.3. 实验处理与投喂管理

实验在 18 个规格为 3 m × 4 m × 1 m 室内育苗池内进行。实验分 6 组，每组设 3 个平行。各育苗组用水分别用不同的试剂处理(表 1)。第 1 组用 1.0 ppm 的二氯海因处理 12 小时；第 2 组用 1.0 ppm 的二氯海因和 0.5 ppm 的芽孢杆菌试剂各处理 12 小时；第 3 组用 5.0 ppm 的噬菌肽 + 溶菌酶处理，每 2 天添加一次，每次 2.5 ppm；第 4 组用 2.0 ppm 的芽孢杆菌试剂处理，每 5 天添加一次，每次 1.0 ppm；第 5 组用 0.2 ppm 的多肽菌素处理，每天添加 3 次。

幼体发育变态前期，投饵种类为螺旋藻粉、虾片。幼体开始变态时，投饵种类为螺旋藻粉、虾片、车元配合饲料，投喂量分别为每个池 1~2 克。幼体大部分开始变态时，投喂螺旋藻和虾片，每次投喂量各 10 克。每天早上根据幼体发育情况和摄食情况适当调节投饵量，以池底没有残饵为准；每天投喂 3 次，分别为 8:00、15:00 和 21:00。

Table 1. Water treatment methods for experimental groups

表 1. 实验各组水处理方式

组别	处理试剂	处理浓度(ppm)	处理时间(h)
1	二氯海因	1.0	12
2	二氯海因 + 芽孢杆菌	1.0 + 0.5	12 + 12
3	噬菌肽 + 溶菌酶	5.0	24
4	芽孢杆菌	2.0	24
5	多肽菌素	0.2	24
6	空白对照		

2.4. 弧菌含量和细菌总量检测

分别在幼体培育第 5、15 天取 200 ml 的育苗用水检测弧菌和细菌含量。弧菌数量测定用 TCBS 培养法[14]，现场取水样分别用无菌海水做梯度稀释至 1、 10^{-1} 、 10^{-2} ，各梯度取 100 μL 涂布 TCBS 琼脂平板，每个梯度做 3 个平行。接种后的平板 28℃恒温培养 48 h，选取平均菌落数在 30~300 以内为有效菌落，计数菌落形成单位(CFU)数目。细菌总数参照国家标准 GB 17378.7-2007《海洋监测规范》第 7 部分[15]，采用平板计数法，用 2216E 琼脂培养基，现场取水样梯度稀释至 1、 10^{-1} 、 10^{-2} ，各梯度取 100 μL 涂布平板，每个梯度做 3 个平行。接种后的平板 25℃恒温培养 7 d，以平均菌落数在 30~300 为有效菌落，计数

CFU 数目。

2.5. 幼体生长与变态测量

方斑东风螺幼体生长以壳高为指标, 以幼体外壳长轴的长度为壳高[16], 显微镜下用目镜测微尺测量。自第 4 天起, 每隔两天测量一次。测量前, 用筛网收集幼体, 每次随机测量 30 只, 计算日生长率。以面盘消失、不再浮游、栖息于池底或池壁为幼体变态指标。开始出现变态幼体后, 每日统计各实验组的变态数量, 直至全部变态。

2.6. 数据分析

实验数据以平均数 \pm 标准偏差(Mean \pm S.D.)表示。利用 Excel 进行数据处理并作图, 用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异显著水平。

3. 结果与分析

3.1. 弧菌和细菌总量的变化

幼体培育第 5 天, 空白对照组水体中弧菌和总细菌含量最高, 分别为 212 CFU/ml 和 2910 CFU/ml (表 2)。多肽菌素处理组弧菌含量最低, 仅为 20 CFU/ml, 其他各处理组也显著降低($P < 0.05$)。噬菌肽和溶菌酶处理的海水中总细菌数最低, 芽孢杆菌、多肽菌素、二氯海因处理的海水中总细菌数也显著降低($P < 0.05$)。二氯海因和芽孢杆菌处理过的海水中总细菌数无显著变化。

幼体培育第 15 天, 二氯海因处理的海水中弧菌含量最高(表 2), 二氯海因 + 芽孢杆菌、噬菌肽 + 溶菌酶处理过的海水中弧菌含量显著降低($P < 0.05$), 而多肽菌素处理组弧菌含量依然最低, 仅为 4 CFU/ml。空白对照组同芽孢杆菌处理组相差不大。

Table 2. Vibrio and total bacterial content in water after 5 days and 15 days of larval rearing
表 2. 幼体培育 5 天、15 天后水体弧菌和总细菌含量

实验时间(d)	含菌量 (CFU/ml)	处理组					
		1	2	3	4	5	6
5	弧菌	62 ^a	40 ^b	33 ^b	45 ^b	20 ^c	142 ^d
	总细菌	2055 ^a	2780 ^b	97 ^c	132 ^c	660 ^d	2910 ^b
15	弧菌	213 ^a	87 ^b	151 ^c	40 ^d	4 ^e	122 ^c
	总细菌	1455 ^a	1850 ^b	1250 ^a	212 ^e	2450 ^d	2400 ^d

3.2. 幼体生长发育

在相同孵化条件下, 经不同药物处理育苗用水后, 第 5 组添加多肽菌素的幼体生长速率最快(表 3), 日生长率达 $23.71 \mu\text{m}/\text{d}$ (图 1)。其次为芽孢杆菌处理组, 日生长率为 $21.43 \mu\text{m}/\text{d}$ 。二氯海因与二氯海因 + 芽孢杆菌处理组相差不大。空白对照组生长速率最慢, 仅为 $9.21 \mu\text{m}/\text{d}$ 。

3.3. 幼体变态率

由表 4 可知, 经多肽菌素处理后, 方斑东风螺的幼体成活率和变态率均大幅上升, 分别高达 86% 和 79.2%。芽孢杆菌、二氯海因 + 芽孢杆菌以及二氯海因处理海水后, 幼体的成活率和变态率也均有不同程度的升高。空白对照组幼体的变态率仅为 3.3%。

Table 3. Changes in shell height of *Babylonia areolata* larvae in each experimental group
表 3. 各实验组方斑东风螺幼体壳高变化

幼体发育时间(d)	幼体壳高(μm)					
	1	2	3	4	5	6
0	488 ± 22	-	-	-	-	-
4	537 ± 35	542 ± 19	533 ± 33	545 ± 26	556 ± 31	502 ± 29
6	572 ± 25	585 ± 41	560 ± 21	585 ± 21	601 ± 41	517 ± 27
8	610 ± 24	612 ± 36	599 ± 27	616 ± 31	617 ± 32	535 ± 17
10	625 ± 23	631 ± 34	610 ± 33	632 ± 25	667 ± 31	560 ± 38
12	661 ± 34	686 ± 23	633 ± 35	693 ± 28	725 ± 21	581 ± 29
14	719 ± 32	742 ± 37	669 ± 35	788 ± 37	820 ± 36	617 ± 36

Table 4. Metamorphosis of the *Babylonia areolata* larvae in each experimental group
表 4. 各实验组方斑东风螺幼体变态发育情况

各处理组培育情况	实验组					
	1	2	3	4	5	6
幼体初始数量(万个)	180.0	185.0	180.0	181.0	184.0	171.0
幼体变态前数量(万个)	148.5	153.7	126.2	154.6	158.2	107.4
幼体成活率(%)	82.5	83.1	70.1	85.4	86	62.8
稚螺变态数量(万个)	32.8	39.2	15.6	42.1	68.1	2.1
幼体变态率(%)	39.8	47.2	22.3	49.3	79.2	3.3

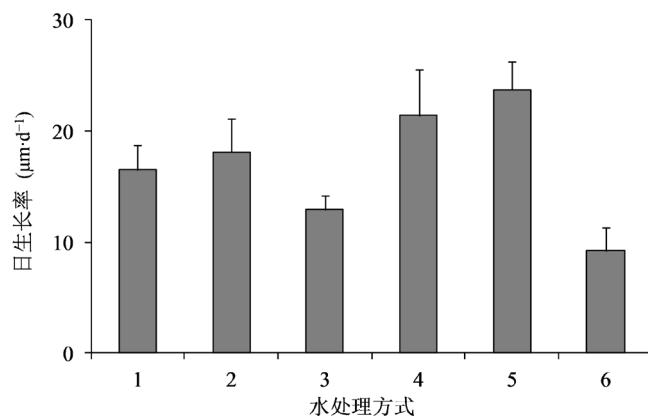


Figure 1. Effects of different water treatment methods on growth of *Babylonia areolata* larvae

图 1. 不同水处理方式对方斑东风螺幼体生长的影响

4. 讨论

水质是海水贝类高密度养殖和苗种生产的重要限制因子。如果育苗过程中水质控制不当, 极易导致水体环境恶化、有害细菌和寄生虫滋生[17]。细菌性疾病是水产动物养殖中最为常见、危害较大的一类疾病[18] [19], 尤其是弧菌属细菌, 因其具有很强的适应性和抗逆性, 易成为海水环境中的优势种群, 且发病率高, 经常导致养殖动物的大量死亡[20]。本实验中, 经处理 5 天后, 各处理组育苗水体中总细菌和弧

菌的含量均有显著下降,说明前期水处理抑制了细菌和弧菌繁殖;但至第15天,二氯海因和噬菌肽处理的育苗用水中弧菌含量却明显升高,甚至高于对照组,这可能与弧菌的耐药性以及不同化学药物在海水中的有效作用时间不同有关[21][22]。而多肽菌素处理过的育苗用水中弧菌含量下降了95%,芽孢杆菌处理过的海水中弧菌含量也有近70%的下降;说明多肽菌素和芽孢杆菌对弧菌有比较好的抑制效果。

在相同孵化条件下,经不同药物处理育苗用水后,各处理组的方斑东风螺幼体日生长率和变态率均有了大幅提升,说明了育苗过程中水处理的重要性。其中添加多肽菌素的幼体生长速率最快,变态率也最高。本实验培育出的稚贝出售到2个养殖户,通过8个月养殖,其生长速度较常规育出的稚贝没有明显差别,养殖中210个池仅有2个池发病,整个养殖过程成活率达95%以上。这说明人工育苗过程中选择合适的水处理制剂和处理方式,可提高苗种的质量,增加育苗和养殖收益。

二氯海因属有机氯胺类消毒剂,进入水体分解析出原子氧杀灭细菌,其灭菌能力随水中有机物浓度的增加而下降,当有机物浓度增加10%~20%时,其灭菌率降至55%[23],这可能是15天时弧菌含量升高的原因。噬菌体是感染细菌、真菌、放线菌等微生物病毒的总称,具有特异性强、见效快、无污染等优点,已应用于水产疾病的防治中[24][25]。但噬菌体也存在细菌抗性问题,且因为宿主谱窄,不能有效控制多发性细菌疾病[25]。本研究中处理过的育苗水体总细菌含量无明显变化,幼体日生长率和变态率的提升幅度相对较小,可能与此有关。

芽孢杆菌因为稳定性好、抗性强、复活率高等优势,已作为水产微生物饲料添加剂得到广泛应用,它可以拮抗水产动物病原菌,还能分解有机污染物,消除有毒物质,改善水质[26][27]。饲料中添加枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)可显著提高方斑东风螺稚螺的生长率和肝胰腺中超氧化物歧化酶、碱性磷酸酶和酸性磷酸酶的活力[28]。本研究中,用芽孢杆菌处理育苗用水,总细菌和弧菌含量均出现了显著下降,幼体的生长率和变态率也有了显著提高,表明芽孢杆菌也是一类较好的水处理制剂。

抗菌肽是普遍存在于动植物、细菌体内的一类小分子多肽,具有广谱抗菌活性,在提高机体免疫力的同时不易产生抗药性,且无污染[29][30]。多肽菌素具有分子量小、水溶性好、抗菌谱广、不易产生耐药性等特点,已在肉鸡、母猪、奶牛生产和繁殖中开展了应用[31]。多肽菌素S100产品中的主要成分——APSH-07,是在乳酸菌代谢过程中通过核糖体合成机制产生并胞外分泌到环境中的一类物质,对常见的革兰氏阴性菌(包括弧菌)和革兰氏阳性菌均具有明显抑菌、杀菌效果。已有研究报道,饲料中添加多肽菌素S100可提高白鮰(*Hypophthalmichthys molitrix*)的非特异性免疫力和抗病力[30]。本研究中,多肽菌素处理过的海水中弧菌含量一直呈显著下降,但总细菌含量却上升,说明多肽菌素在方斑东风螺幼体培育过程中不但有效抑制弧菌的繁殖,对有益菌的增殖也具有一定的促进作用。

抗生素、化学药物的大量使用带来的耐药性、药残等已经成为制约养殖业发展的重要问题,开发新的、无毒副作用的疾病防治、水质改良药物和生物制剂产品日趋重要。本研究发现多肽菌素、芽孢杆菌等可有效减少水体中弧菌含量,提高幼体生长性能,促进幼体发育,可作为抗生素替代品的良好候选资源。

基金项目

海南省海洋与渔业科学院研发专项。

参考文献

- [1] 吴进锋,陈素文,陈利雄,等.温度与盐度对方斑东风螺胚胎发育及幼虫生长的影响[J].中国水产科学,2005,12(5): 652-656.
- [2] Zhang, L.L., Zhou, Q.C. and Cheng, Y.Q. (2009) Effect of Dietary Carbohydrate Level on Growth Performance of Juvenile Spotted Babylon (*Babylonia areolata* Link 1807). *Aquaculture*, **295**, 238-242.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.045>

- [3] 张汉华, 吴进锋, 陈利雄, 等. 东风螺人工育苗、养殖及产业化发展前景[J]. 南方水产科学, 2004(11): 2-5.
- [4] 梁飞龙, 毛勇, 余祥勇, 等. 方斑东风螺人工育苗试验[J]. 海洋湖沼通报, 2005(1): 79-85.
- [5] 王国福, 曾关琼. 方斑东风螺人工育苗技术[J]. 河北渔业, 2006(11): 48-49.
- [6] 于瑞海, 王如才. 贝类育苗中几种水处理新方法应用的探讨[J]. 海洋科学进展, 1997(2): 42-46.
- [7] 李雷斌, 刘志刚. 5种药物对方斑东风螺幼虫的急性毒性[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(3): 34-38.
- [8] 朱国霞, 于刚, 白东清, 等. 4种常用杀菌消毒剂对养殖水体中硝化细菌生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(9): 5228-5230.
- [9] 孙博, 郑尧, 陈家长. 二溴海因在水产养殖中的应用及其毒理效应研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015(13): 173-175.
- [10] 叶星, 白俊杰. 抗菌肽的研究及其在水产上的应用前景[J]. 大连海洋大学学报, 2000, 15(4): 274-279.
- [11] 刘忠颖, 刘洋, 鲍相渤, 等. 水产养殖益生菌的研究进展[J]. 水产科学, 2016, 29(8): 500-504.
- [12] Gautam, A., Sharma, A., Jaiswal, S., Fatma, S., Arora, V., Iquebal, M.A., Nandi, S. and Sundaray, J.K. (2016) Development of Antimicrobial Peptide Prediction Tool for Aquaculture Industries. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **8**, 141-149. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9215-0>
- [13] 林楠, 闵志勇. 益生菌对方斑东风螺幼体生长与变态的影响[J]. 科技资讯, 2008(13): 245.
- [14] 李淑芳, 邱德全, 张继东, 等. 脱壳病和吻肿病东风螺体内致病菌及条件致病菌菌相研究[J]. 海洋科学进展, 2013, 31(2): 266-272.
- [15] 国家质量技术监督局. 海洋监测规范第7部分: 近海污染生态调查和生物监测: GB17378.7-2007[M]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [16] 杨章武. 几种微藻对方斑东风螺浮游幼虫生长和变态的影响[J]. 应用海洋学学报, 2007, 26(4): 134-140.
- [17] 黄瑜, 汪志文, 周维, 等. 徐闻方斑东风螺暴发性疾病病原分离鉴定以及防治手段探索[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(12): 202-210.
- [18] 吴后波, 潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1): 89-93.
- [19] 贾春红, 李淑芳, 林红英, 等. 8株方斑东风螺病原菌对17种中草药敏感性测定[J]. 中兽医学杂志, 2012(6): 6-9.
- [20] 李亚晨, 包永明, 吕建发, 等. 海洋水产动物弧菌病的生物防治[J]. 水产科学, 2004, 23(2): 35-38.
- [21] 写腊月, 胡琳琳, 房文红, 等. 海水养殖源弧菌耐药性调查与分析[J]. 海洋渔业, 2011, 33(4): 442-446.
- [22] 宋晓玲, 张岩, 李健. 常见水产药物对海洋弧菌的杀灭作用[J]. 海洋科学, 1996, 20(4): 9-11.
- [23] 郑宗林, 黄朝芳, 张彪, 等. 新型消毒剂二氯海因在水产养殖中的应用[J]. 水产科技情报, 2001, 28(6): 261-262.
- [24] Mateus, L., Costa, L., Silva, Y.J., Pereira, C., Cunha, A. and Almeida, A. (2014) Efficiency of Phage Cocktails in the Inactivation of *Vibrio* in Aquaculture. *Aquaculture*, **424-425**, 167-173. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.001>
- [25] 李新宇, 孜力汗, 张宝会, 等. 噬菌体在水产养殖中应用的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(5): 187-192.
- [26] 付天玺, 魏开建, 许国焕. 芽孢杆菌在水产养殖中的研究和应用概况[J]. 水生态学杂志, 2007, 27(3): 102-104.
- [27] 于明超, 李卓佳, 文国樑. 芽孢杆菌在水产养殖应用中的研究进展[J]. 广东农业科学, 2007(11): 78-81.
- [28] 洗健安, 陈江, 张秀霞, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对方斑东风螺稚螺生长、肌肉组成与免疫功能的影响[J]. 饲料工业, 2016, 37(4): 5-9.
- [29] Zasloff, M. (2002) Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms. *Nature*, **415**, 389-395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
- [30] 张晓宇, 石浦, 彭赛君, 等. 多肽菌素S100对白鲢非特异性免疫力和抗病力的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(18): 151-153.
- [31] 翟明, 李妍, 李岩. 多肽菌素对肉鸡血清生化指标、血清抗体水平及免疫器官指数的影响[J]. 中国家禽, 2018, 40(7): 23-26.