



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101953315 B

(45) 授权公告日 2012. 08. 22

(21) 申请号 201010270836. 5

C12R 1/01 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 08. 31

审查员 赵蕾

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:M209172 2009. 08. 07

(73) 专利权人 华南理工大学

地址 510640 广东省广州市天河区五山路
381 号

(72) 发明人 蔡俊鹏 蒋小平

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

代理人 裴晖

(51) Int. Cl.

A01K 61/00 (2006. 01)

A23K 1/18 (2006. 01)

A23K 1/16 (2006. 01)

C12N 1/20 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 11 页

(54) 发明名称

稚鲍养殖方法

(57) 摘要

本发明公开了一种稚鲍养殖方法，养殖过程如下：(1) 在养殖池内铺砖，然后注入海水；(2) 稚鲍下池，同时开始曝气；(3) 定期投喂饵料，并在养殖水体中和 / 或投喂的饵料中添加蛭弧菌混合菌液；且每 5-30 天换水一次，每次换水量为一个量程；(4) 当稚鲍体长达到 1.0-1.6cm 时，即可收稚鲍；所述蛭弧菌菌株为蛭弧菌 (Bdellovibrio sp.) BDFM05，由中国典型培养物保藏中心保藏，保藏编号为 CCTCC NO :M209172，保藏日期为 2009 年 8 月 7 日。本发明的优点有：(1) 能节能减排，更环保；(2) 蛭弧菌混合菌液起效快、活力强且制备方便、杀菌时间久；(3) 能够明显改善稚鲍体质，增强免疫力。

1. 稚鲍养殖方法,其特征在于,养殖过程如下:

(1) 在养殖池内铺砖,然后注入海水;

(2) 稚鲍下池,同时开始曝气;

(3) 定期投喂饵料,并在养殖水体中和 / 或投喂的饵料中添加蛭弧菌游泳体和蛭质体的混合菌液;且每 5-30 天换水一次,每次全池换水;

(4) 当稚鲍体长到 1.0-1.6cm 时,即可采收稚鲍;

所述蛭弧菌菌株为蛭弧菌 (*Bdellovibrio* sp.) BDFM05,由中国典型培养物保藏中心保藏,其简称为 CCTCC,保藏编号为 CCTCC NO :M209172,保藏日期为 2009 年 8 月 7 日。

2. 根据权利要求 1 所述的养殖方法,其特征在于,所述铺砖是先将砖洗刷干净并用高锰酸钾溶液消毒,消毒后再采取骑叠式摆砖。

3. 根据权利要求 1 所述的养殖方法,其特征在于,所述海水在注入前经过砂滤和沉淀处理。

4. 根据权利要求 1 所述的养殖方法,其特征在于,所述投喂饵料时要先停止曝气,投饵 0.5-1h 后再开始曝气。

5. 根据权利要求 1 所述的养殖方法,其特征在于,所述稚鲍下池后,曝气量控制在 10-100L/h/m³,光照控制在 50-200lux,水温控制在 15-28℃。

6. 根据权利要求 1 所述的养殖方法,其特征在于,所述在投喂的饵料中添加蛭弧菌混合菌液是指用浓度为 10-10⁷pfu/mL 的蛭弧菌混合菌液浸泡饵料 20 ~ 40 分钟。

7. 根据权利要求 1 所述的养殖方法,其特征在于,所述在养殖水体中添加的蛭弧菌混合菌液,使蛭弧菌混合菌在水体中的浓度至少达到 10pfu/mL。

8. 根据权利要求 7 所述的养殖方法,其特征在于,所述每次换水后都立即添加蛭弧菌混合菌液,并使蛭弧菌混合菌在水体中的浓度至少达到 10pfu/mL。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的养殖方法,其特征在于,所述蛭弧菌混合菌在水体中的浓度为 10-10⁷pfu/mL。

10. 根据权利要求 1 ~ 8 任意一项所述的养殖方法,其特征在于,所述蛭弧菌混合菌液的制备方法为:

在含副溶血弧菌的 DNB 液体培养基中接入蛭弧菌 BDFM05,恒温摇床 150rpm ~ 300rpm、20 ~ 35℃ 培养 24 ~ 48h;培养液于 4℃ 6000 ~ 8000rpm 离心 15 ~ 20min,去除含蛭弧菌游泳体的上清,得到的沉淀即是蛭弧菌蛭质体;将含蛭弧菌游泳体的上清液经 16000 ~ 18000rpm 离心 15 ~ 20min 后,得到的沉淀即是蛭弧菌游泳体;

将上述得到的蛭弧菌蛭质体和游泳体分别用 DNB 液体培养基进行悬浮,得到两种菌液,两种菌液按游泳体和蛭质体细菌数 1 : 1 的比例混合,即得到蛭弧菌混合菌液。

稚鲍养殖方法

技术领域

[0001] 本发明涉及海水贝类养殖技术领域,特别涉及一种提高稚鲍养殖成活率、节水节能、绿色环保的养殖方法。

背景技术

[0002] 鲍作为海中八珍之一,历来备受市场青睐,鲍的肉质细嫩,味道鲜美,含有丰富的蛋白质,历来是水产养殖的佳品。我国的鲍养殖研究从 20 世纪 70 年代开始起步,经过近三十年的发展,取得了巨大的成绩和显著的经济效益,但是在养殖模式上始终没有大的突破。近年来,随着稚鲍人工养殖规模的扩大,技术上的缺陷也逐渐凸显出来,在养殖过程中,特别是在稚鲍剥离后,容易引发一些稚鲍疾病,2010 年在辽宁、山东等地继 2007 年以来再次爆发大规模的流行病,许多养殖场在稚鲍剥离后出现大批量的死亡,有些养殖场死亡率甚至高达 90%,给养殖户带来了巨大的经济损失。病原体感染是引起稚鲍死亡的主要原因,人工养殖环境下主要是细菌性疾病和病毒性疾病。常见的潜在致病菌有副溶血弧菌、河流弧菌、溶藻弧菌等。副溶血弧菌主要导致稚鲍肌肉萎缩病,死亡率可达 50% 左右,而河流弧菌和副溶藻弧菌引发的感染导致的死亡率高达 60-70%。

[0003] 目前常规的防治稚鲍掉板的方法主要是定期施用抗生素,抗生素虽然具有药物直接入水、浓度高、吸收快、疗效好的优点,但缺点是可能对稚鲍产生刺激性、引发新病症。如果长期大量使用抗生素不仅会使潜在致病菌耐药菌株增加,也会使一些鲍病例变得难以治愈。此外鲍体内抗生素残留会影响稚鲍品质,不利于销售,进而造成养殖者的经济损失。中草药防治稚鲍掉板也是一种常见的办法,具有无药物残留、经济效益高的优点,但也有见效慢的缺点,因而寻求一种更高效、经济的办法显得极为迫切。

[0004] 蝗弧菌为寄生性革兰氏阴性菌,具有寄生、进而裂解其它细菌的作用,是一种优良的微生物控菌液。蝗弧菌蛭质体是蝗弧菌在特定宿主细菌的周质空间内进行生长繁殖的形式;蝗弧菌游泳体是蝗弧菌侵入宿主细菌前的生长形式。“绿色养殖”成为近年来国家的重大需求,引起水产界的广泛关注。目前,用蝗弧菌混合菌液来进行稚鲍养殖的养殖方式在国内外尚未报道。

[0005] 已有的研究表明,作为一种有益微生物制剂,无论是在食品工业还是在(海洋)水产养殖等领域,蝗弧菌的应用均是安全的。例如:在国外,Lenz and Hespell (1978) 研究发现,蝗弧菌及对动物及人的细胞不具侵染性 [Lenz R. W., Hespell R. B. Attempts to grow bedeliovibrios micurgically-injected into animal cells. Archives of Microbiology, 1978, 119(3):245-248]。在国内,林茂等 (2006) 研究了蝗弧菌对鱼类细胞的作用,发现它对鱼类细菌没有侵染作用 [林茂, 杨先乐, 薛晖, 曹海鹏, 邱军强。蝗弧菌 BDH21 02 对鱼类细胞及病原菌的作用。微生物学通报, 2006, 33(1):7-11]。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术存在的不足,提供一种提高稚鲍免疫力、促进稚

鲍生长、提高稚鲍成活率的养殖方法。

[0007] 本发明的目的通过下述方案实现：

[0008] 稚鲍养殖方法，其特征在于，养殖过程如下：

[0009] (1) 在养殖池内铺砖，然后注入海水；

[0010] (2) 稚鲍下池，同时开始曝气；

[0011] (3) 定期投喂饵料，并在养殖水体中和 / 或投喂的饵料中添加蛭弧菌游泳体和蛭质体的混合菌液；且每 5-30 天换水一次，每次全池换；

[0012] (4) 当稚鲍体长达到 1.0-1.6cm 时，即可采收稚鲍；

[0013] 所述蛭弧菌菌株为蛭弧菌 (Bdellovibrio sp.) BDFM05，由中国典型培养物保藏中心保藏，其简称为 CCTCC，保藏编号为 CCTCC NO :M209172，保藏日期为 2009 年 8 月 7 日。BDFM05 呈单细胞，椭圆形，大小为 $1.43 \times 0.53 \mu\text{m}$ ，端生鞭毛，鞭毛长度至少 $2 \mu\text{m}$ ；所述蛭弧菌 (Bdellovibrio sp.) BDFM05 以双层平板法于 28°C 培养三天可形成直径 2 ~ 3mm 的透明圆形噬菌斑，将得到的圆形噬菌斑接种后，分别将蛭弧菌蛭质体和游泳体分开发酵，然后等浓度混合。

[0014] 优选地，所述铺砖是先将砖洗刷干净并用高锰酸钾溶液消毒，消毒后再采取骑叠式摆砖。

[0015] 优选地，所述海水在注入前经过砂滤和沉淀处理。

[0016] 所投喂的饵料为人工合成饵料，优选地，所述投喂饵料时要先停止曝气，投饵 0.5-1h 后再开始曝气。

[0017] 优选地，所述稚鲍下池后，曝气量 10-100L/h/m³，光照控制在 50-200lux，水温控制在 15-28°C。

[0018] 优选地，所述在投喂的饵料中添加蛭弧菌混合菌液是指用浓度为 $10-10^7 \text{pfu/mL}$ 的蛭弧菌混合菌液浸泡饵料 20 ~ 40 分钟。

[0019] 优选地，所述在养殖水体中添加的蛭弧菌混合菌液，使蛭弧菌混合菌在水体中的浓度至少达到 10pfu/mL 。

[0020] 优选地，所述每次换水后都立即添加蛭弧菌混合菌液，并使蛭弧菌混合菌在水体中的浓度至少达到 10pfu/mL 。

[0021] 优选地，所述蛭弧菌混合菌在水体中的浓度为 $10-10^7 \text{pfu/mL}$ 。

[0022] 优选地，所述蛭弧菌混合菌液的制备方法为：

[0023] 在含副溶血弧菌的 DNB 液体培养基中接入蛭弧菌 BDFM05 (CCTCC M209172)，恒温摇床 150rpm ~ 300rpm、20 ~ 35°C 培养 24 ~ 48h；培养液于 4°C 6000 ~ 8000rpm 离心 15 ~ 20min，去除含蛭弧菌游泳体的上清，得到的沉淀即是蛭弧菌蛭质体；将含蛭弧菌游泳体的上清液经 16000 ~ 18000rpm 离心 15 ~ 20min 后，得到的沉淀即是蛭弧菌游泳体；

[0024] 将上述得到的蛭弧菌蛭质体和游泳体分别用 DNB 液体培养基进行悬浮，得到两种菌液，两种菌液按游泳体和蛭质体细菌数 1 : 1 的比例混合，即得到蛭弧菌混合菌液。

[0025] 本发明相对于现有技术，具有如下的优点及效果：

[0026] 1、本发明所述的蛭弧菌混合菌液能显著提高稚鲍体质，增强免疫力。

[0027] 本发明中所述的蛭弧菌混合菌液在控制稚鲍养殖环境、饵料、水体中细菌的效果显著，能够明显改善稚鲍体质，增强免疫力。

[0028] 2、本发明所述的蛭弧菌混合菌液在控制和消除稚鲍潜在致病菌应用中安全性好。

[0029] 蛭弧菌混合菌液通过裂解潜在致病菌的方法是生物方法。用蛭弧菌游泳体和蛭质体制成的混合菌液作为控制稚鲍育稚鲍水体细菌的蛭弧菌混合菌液，兼具游泳体起效快，活力强和蛭质体制备、保存容易，杀菌时间久、环境耐受力强的双重优点。这些优点使得蛭弧菌混合菌液非常适合作为抑止或清除生物体及其环境中潜在致病菌的生物净化因子，且其在裂解完宿主细菌后，会因饥饿而自动消亡，从而克服了抗生素滥用带来的副作用和常规消毒剂对稚鲍的不利影响，同时已有研究证明蛭弧菌对人等无毒。

[0030] 3、所述的蛭弧菌混合菌液能净化水质并促进稚鲍生长。

[0031] 蛭弧菌混合菌液对水质有净化作用，能改善养殖生物肠道环境，增强食欲，促进生长。

[0032] 4、含有本发明所述的蛭弧菌混合菌液适合推广应用于鲍鱼养殖过程。

[0033] 蛭弧菌混合菌液对人和鲍鱼无毒副作用，适合于鲍鱼大规模工厂化养殖，可以为鲍鱼的绿色加工生产提供保障并且为控制和消除鲍鱼潜在致病菌提供了一种新方法。

具体实施方式

[0034] 下面结合具体实施例对本发明作进一步具体详细描述，但本发明的实施方式不限于此，对于未特别注明的工艺参数，可参照常规技术进行。本发明的实施地位于山东某养殖场，本发明的稚鲍为皱纹盘鲍，由该养殖场提供。

[0035] 实施例 1

[0036] 蛭弧菌混合菌液的制备

[0037] 蛭弧菌蛭质体的制备：所述蛭弧菌 (*Bdellovibrio sp.*) BDFM05 以双层平板法于 28℃ 培养三天可形成直径 2 ~ 3mm 的透明圆形噬菌斑，所用的蛭弧菌混合菌液通过以下方法发酵：在装有 100mL 营养肉汤 Nutrient Broth (蛋白胨 10g, 牛肉膏粉 3g, 氯化钠 5g, pH 7.4 ± 0.2) 的锥形瓶中接种 0.5mL 10⁷cfu/mL 副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, 购于美国典型微生物菌种保藏中心 American Type Culture Collection, 编号 :ATCC 17802)，200rpm、28℃ 摆床培养 18 小时，培养液于 4℃、5000rpm 离心 15min，弃上清。沉淀用 5mL 生理盐水悬浮后，加入到一个装有 100mL DNB (dilute nutrient broth) 液体培养基 (营养肉汤 0.8g, 酪蛋白酸水解物 0.5g, 酵母精提物 0.1g, 海水晶 28g, 溶于 1000mL 蒸馏水, pH 值为 7.2 ~ 7.6) 的锥形瓶中，再加入 1mL 含 10³pfu/mL 的蛭弧菌 BDFM05 (CCTCC M209172)。恒温摇床 250rpm、28℃ 培养 36h。培养液于 4℃ 6000rpm 离心 20min，得到上清液和沉淀，保留沉淀，加入 10mLDNB 液体培养基 (营养肉汤 0.8g, 酪蛋白酸水解物 0.5g, 酵母精提物 0.1g, 海水晶 28g, 溶于 1000mL 蒸馏水中, pH 值为 7.2 ~ 7.6) 重新悬浮沉淀物，得到浓度为 10⁹pfu/mL 的蛭弧菌蛭质体菌液。

[0038] 蛭弧菌游泳体的制备：将上述蛭弧菌蛭质体制备方法中的上清液于 4℃ 6000rpm 离心 20min 后的、含蛭弧菌游泳体上清液，16000rpm 离心 20min，得到的沉淀即是蛭弧菌游泳体。加入 10mL DNB 液体培养基 (营养肉汤 0.8g, 酪蛋白酸水解物 0.5g, 酵母精提物 0.1g, 溶于 1000mL 蒸馏水中, pH 值为 7.2 ~ 7.6) 悬浮蛭弧菌游泳体，得到浓度为 10⁹pfu/mL 蛭弧菌游泳体菌液。

[0039] 将同浓度的游泳体和蛭质体按 1 : 1 体积混合，得到 10⁹pfu/mL 的蛭弧菌混合菌

液。

[0040] 实施例 2

[0041] 1、蛭弧菌混合菌液在养殖中应用。

[0042] 本发明实施地的养殖池建在养殖大棚内，每个水池规格为 $2 \times 2 \times 0.75\text{m}$ ，水深为 0.45m 。每池放置曝气管 8 条。水池上方盖上遮光度为 60% 的遮光布，避免光照过强。光照强弱可以调节，光照强度一般控制在 (50–200) lux。

[0043] 实施地海域的具体水质条件为：水温 $15\text{--}28^\circ\text{C}$ ，盐度 $27\text{--}33\%$ ，pH $6.8\text{--}7.2$ ，海水经过砂滤、沉淀处理，并在进入养殖池前，在池进水管口包扎一个 200 目的网袋，防止细砂入池。水源水质符合中华人民共和国国家标准渔业水质标准 (GB11607-89) 要求，符合农业部《无公害食品海水养殖用水水质》(NY5052-2001) 要求。

[0044] 铺砖前，将四角水泥方砖洗刷干净并用高锰酸钾溶液消毒，消毒后再放入池底，池底共放 60 块四脚水泥砖，两侧对称、骑叠式放置，每列 6 块，每侧 5 列。放砖后各池均用高锰酸钾溶液消毒，反复冲洗干净，然后注入经过砂滤和沉淀处理的海水。稚鲍下池，所选取的附稚鲍波纹板附稚鲍量在 30–2000 粒 / 板，稚鲍体长在 $2.0\text{--}4.5\text{mm}$ ，稚鲍健康、活力好，每池稚鲍剥离量为 10000 粒，投鲍后即开始曝气，曝气量为 50L/h/m^3 ，本发明设置一个生产对照组 - 正常流水，日换水量为池水量的 2 倍，每天早上 6:00 用高压水冲洗池子，晚上 18:00 正常投饵，期间不加蛭弧菌混合菌液，完全的工厂养殖方式，将其编为 A 组。其他具体编排方案如下：

[0045] (1) 在养殖水体中蛭弧菌混合菌液，但饵料中不加。

[0046] 每次换水后立即在养殖水体中添加蛭弧菌混合制剂，所需 48 个水池分为 B-1、B-2、B-3、B-4，C-1、C-2、C-3、C-4，D-1、D-2、D-3、D-4，E-1、E-2、E-3、E-4，F-1、F-2、F-3、F-4，G-1、G-2、G-3、G-4，每组 2 个重复。各组的换水周期及加菌液浓度如下：

[0047] B 组 (B-1、B-2、B-3、B-4) :5 天换 (全池) 水一次；

[0048] C 组 (C-1、C-2、C-3、C-4) :10 天换 (全池) 一次；

[0049] D 组 (D-1、D-2、D-3、D-4) :15 天换 (全池) 一次水；

[0050] E 组 (E-1、E-2、E-3、E-4) :20 天换 (全池) 一次水；

[0051] F 组 (F-1、F-2、F-3、F-4) :25 天换 (全池) 一次水；

[0052] G 组 (G-1、G-2、G-3、G-4) :30 天换 (全池) 水一次；

[0053] B-1、C-1、D-1、E-1、F-1、G-1 组每次换水后立即往水池中泼洒蛭弧菌混合制剂，使水体中蛭弧菌混合制剂菌体浓度达到 10^1pfu/mL ；

[0054] B-2、C-2、D-2、E-2、F-2、G-2 组每次换水后立即往水池中泼洒蛭弧菌混合制剂，使水体中蛭弧菌混合制剂菌体浓度达到 10^3pfu/mL ；

[0055] B-3、C-3、D-3、E-3、F-3、G-3 组为每次换水后立即往水池中泼洒蛭弧菌混合制剂，使水体中蛭弧菌混合制剂菌体浓度达到 10^5pfu/mL ；

[0056] B-4、C-4、D-4、E-4、F-4、G-4 组为每次换水后立即往水池中泼洒蛭弧菌混合制剂，使水体中蛭弧菌混合制剂菌体浓度达到 10^7pfu/mL 。

[0057] (2) 在饵料中加蛭弧菌混合菌液，但在养殖水体中不加。

[0058] 每天投饵前用蛭弧菌混合菌液浸泡饵料半小时，而每次换水后养殖水体都不加蛭弧菌混合菌液。所需 48 个水池分为 b-1、b-2、b-3、b-4；c-1、c-2、c-3、c-4；d-1、d-2、d-3、

d-4 ;e-1、e-2、e-3、e-4 ;f-1、f-2、f-3、f-4 ;g-1、g-2、g-3、g-4 每组 2 个重复。各组的换水周期及加菌液浓度如下：

- [0059] b 组 (b-1、b-2、b-3、b-4) :5 天换 (全池) 水一次；
- [0060] c 组 (c-1、c-2、c-3、c-4) :10 天换 (全池) 水一次；
- [0061] d 组 (d-1、d-2、d-3、d-4) :15 天换 (全池) 水一次；
- [0062] e 组 (e-1、e-2、e-3、e-4) :20 天换 (全池) 水一次；
- [0063] f 组 (f-1、f-2、f-3、f-4) :25 天换 (全池) 水一次；
- [0064] g 组 (g-1、g-2、g-3、g-4) :30 天换 (全池) 水一次；
- [0065] b-1、c-1、d-1、e-1、f-1、g-1 组投的饵料经过浓度为 10^1 pfu/mL 的蛭弧菌混合制剂菌液浸泡过的饵料；每次换水不在水体加蛭弧菌混合制剂。
- [0066] b-2、c-2、d-2、e-2、f-2、g-2 组投的饵料经过浓度为 10^3 pfu/mL 的蛭弧菌混合制剂菌液浸泡过的饵料；每次换水不在水体加蛭弧菌混合制剂。
- [0067] b-3、c-3、d-3、e-3、f-3、g-3 组投的饵料经过浓度为 10^5 pfu/mL 的蛭弧菌混合制剂菌液浸泡过的饵料；每次换水不在水体加蛭弧菌混合制剂。
- [0068] b-4、c-4、d-4、e-4、f-4、g-4 组投的饵料经过浓度为 10^7 pfu/mL 的蛭弧菌混合制剂菌液浸泡过的饵料；每次换水不在水体加蛭弧菌混合制剂。
- [0069] (3) 在养殖水体和饵料中均添加蛭弧菌混合制剂
- [0070] 每次投饵前用蛭弧菌混合制剂浸泡饵料半小时，每次换水后养殖水体也添加蛭弧菌混合制剂。所需 48 个水池分为 Bb-1、Bb-2、Bb-3、Bb-4 ;Cc-1、Cc-2、Cc-3、Cc-4 ;Dd-1、Dd-2、Dd-3、Dd-4 ;Ee-1、Ee-2、Ee-3、Ee-4 ;Ff-1、Ff-2、Ff-3、Ff-4 ;Gg-1、Gg-2、Gg-3、Gg-4 每组 2 个重复。各组的换水周期及加菌液浓度如下：
 - [0071] Bb 组 (Bb-1、Bb-2、Bb-3、Bb-4) :5 天换 (全池) 水一次；
 - [0072] Cc 组 (Cc-1、Cc-2、Cc-3、Cc-4) :10 天换 (全池) 水一次；
 - [0073] Dd 组 (Dd-1、Dd-2、Dd-3、Dd-4) :15 天换 (全池) 水一次；
 - [0074] Ee 组 (Ee-1、Ee-2、Ee-3、Ee-4) :20 天换 (全池) 水一次；
 - [0075] Ff 组 (Ff-1、Ff-2、Ff-3、Ff-4) :25 天换 (全池) 水一次；
 - [0076] Gg 组 (Gg-1、Gg-2、Gg-3、Gg-4) :30 天换 (全池) 水一次；
 - [0077] Bb-0、Cc-0、Dd-0、Ee-0、Ff-0、Gg-0 组每次换水后，不添加混合制剂；
 - [0078] Bb-1、Cc-1、Dd-1、Ee-1、Ff-1、Gg-1 组为每次换水后立即往水池中泼洒蛭弧菌混合制剂，使水体中蛭弧菌混合制剂菌体浓度达到 10^1 pfu/mL；每次投饵的饵料用浓度为 10^1 pfu/mL 的蛭弧菌混合制剂浸泡半小时；
 - [0079] Bb-2、Cc-2、Dd-2、Ee-2、Ff-2、Gg-2 组为每次换水后立即往水池中泼洒蛭弧菌混合制剂，使水体中蛭弧菌混合制剂菌体浓度达到 10^3 pfu/mL；每次投饵的饵料用浓度为 10^3 pfu/mL 的蛭弧菌混合制剂浸泡半小时。
 - [0080] Bb-3、Cc-3、Dd-3、Ee-3、Ff-3、Gg-3 组为每次换水后立即往水池中泼洒蛭弧菌混合制剂，使水体中蛭弧菌混合制剂菌体浓度达到 10^5 pfu/mL；每次投饵的饵料用浓度为 10^5 pfu/mL 的蛭弧菌混合制剂浸泡半小时。
 - [0081] Bb-4、Cc-4、Dd-4、Ee-4、Ff-4、Gg-4 组为每次换水后立即往水池中泼洒蛭弧菌混合制剂，使水体中蛭弧菌混合制剂菌体浓度达到 10^7 pfu/mL；每次投饵的饵料用浓度为

10^7 pfu/mL 的蛭弧菌混合制剂浸泡半小时。

[0082] 本发明的各组池中,所投喂的饵料为人工合成饵料,饵料量随稚鲍大小而变化,当要投喂饵料时,要先停止曝气,投饵 0.5h 后再开始曝气。为了减少残饵对水质的破坏,需要每天对除 A 组外各组池底和四角方砖上的残饵进行虹吸,也可间隔 5 天对残饵进行虹吸。除此之外,每晚需要观察稚鲍活动情况,吃食状况等。

[0083] 从下板到统计,时间为 60 天,为了了解蛭弧菌混合菌液对稚鲍的成活率的影响与促生长能力,需要对活稚鲍进行计数,并按一定指标统计稚鲍。

[0084] (4) 养殖指标与测量

[0085] ①稚鲍初始量,每池 1 万稚鲍。

[0086] ②收稚鲍平均壳长,随机抽取 50 粒稚鲍,测量壳长,取平均值。

[0087] ③稚鲍平均重量,随机抽取 50 粒稚鲍,称其总重后取平均

[0088] ④收稚鲍总量,称取 10g 稚鲍,计算其粒数,将稚鲍称总重估算粒数。

[0089] ⑤成活率,某阶段结束时稚鲍量占该阶段投稚鲍量的百分率。

[0090] (5) 稚鲍免疫指标测定

[0091] 试验结束每组取样 18 个去壳,3 个 / 管放于 6 个分别盛有 1mLHank's 缓冲液 (pH 值 7~8) 的 2mL-Eppendorf 管中,贮于 -80℃ 以备抗免疫指标的测定。测定时取出样品,使其在冰上融化。进行匀浆,然后 6000r/min, -4℃ 离心 5min. 取上清用于免疫指标的测定。

[0092] ①酚氧化物酶的测定

[0093] 酚氧化物酶的活性测定是通过测定和左旋多巴胺反应生成的多巴胺的吸光值来计算的。把每个样品 100 μL 到 1.5mL 的 Eppendorf 管中,每个样品重复三次。再加入用 PBS 液配制的 0.5mg/mL 均海藻酸钠在 26~27℃ 下反应 30min。加入 50 μL 的用 PBS 液配制的 3mg/mL 的左旋多巴胺,10min 后,在 490nm 处读取吸光值。对照液用相应的 PBS 液代替海藻酸钠。

[0094] ②溶菌酶活力测定

[0095] 以溶壁微球菌冻干粉为底物。用 0.1mol/L, pH = 6.4 的磷酸盐缓冲液配成底物悬液 ($OD_{570nm} \approx 0.3$), 取 3.0mL 该悬液于试管内置冰浴中, 再加入 50 μL 待测血清, 混合, 测 A_0 值。然后将试液移入 37℃ 温浴中置 30min, 取出后再置于冰浴中 10min, 以终止反应, 测其 A 值。溶菌活力 U_L 按 $(A_0-A)/A$ 式计算。

[0096] ③感染实验

[0097] 感染试验于预先消毒的盛有 15L 砂滤海水 (盐度 29~30‰) 的透明水族箱中进行, 从 A, B-1、B-2.....Gg-4 各个组随机取稚鲍 200 颗, 设两个重复。向各组水体中添加副溶血弧菌液, 使水体中副溶血弧菌菌体浓度达到 10^8 cfu/mL。实验期间不流水养殖, 正常投饵, 以 5L/h/m³ 连续曝气, 水温为 22℃, pH 控制在 7.2。人工感染后, 连续观察 5 天, 最终计算成活率, 采用相对存活率 (Relative Percentage Survival, RPS) 计算式 :

[0098] $RPS(\%) = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$

[0099] 此种方法对稚鲍养殖的各项指标影响具体见下表 :

[0100] 表 15 天换水对稚鲍生长情况和免疫力的影响

[0101]

组别	稚鲍初始 壳长 (mm)	收稚鲍平 均壳长 (mm)	收稚鲍平 均重量 (mg)	收稚鲍 总量 (只)	存活率 (%)	酚氧化 酶(PO) 活性 (U/mL)	溶菌酶 活性 (U/mL)	RPS(%)
A	3.53	10.78	175.38	6246	62.46	0.715	0.356	0
B-1	3.54	11.86	233.55	8587	85.87	0.825	0.457	86.8
B-2	3.54	12.65	283.40	8652	86.52	0.936	0.556	89.4
B-3	3.55	13.04	310.43	8765	87.65	1.155	0.648	94.5
B-4	3.52	13.37	334.60	8993	89.93	1.365	0.768	100
b-1	3.54	10.88	180.31	8566	85.66	0.835	0.456	85.7
b-2	3.52	11.56	216.27	8685	86.85	0.938	0.554	88.4
b-3	3.53	12.45	270.17	8787	87.87	1.156	0.649	93.6
b-4	3.51	13.03	309.71	8995	89.95	1.267	0.756	100
Bb-1	3.54	12.37	264.99	8575	85.75	0.826	0.446	88.9
Bb-2	3.52	12.8	293.60	8658	86.58	0.939	0.557	92.4
Bb-3	3.52	13.65	356.06	8862	88.62	1.158	0.648	97.5
Bb-4	3.54	13.82	369.53	8997	89.97	1.267	0.776	100

[0102] 表 210 天换水对稚鲍生长情况和免疫力的影响

[0103]

组别	稚鲍初始 壳长 (mm)	收稚鲍平 均壳长 (mm)	收稚鲍平 均重量 (mg)	收稚鲍 总量 (只)	存活率 (%)	酚氧化 酶(PO) 活性 (U/mL)	溶菌酶 活性 (U/mL)	RPS(%)
A	3.53	10.78	175.38	6246	62.46	0.715	0.356	0
C-1	3.53	11.94	238.31	8468	84.68	0.825	0.465	87.8
C-2	3.53	12.65	283.40	8647	86.47	0.936	0.556	88.6

[0104]

C-3	3.53	13.03	309.71	8792	87.92	1.157	0.647	93.2
C-4	3.51	13.35	333.10	8966	89.66	1.265	0.765	100
c-1	3.54	10.88	180.31	8485	84.85	0.834	0.464	84.8
c-2	3.52	11.59	217.96	8672	86.72	0.933	0.554	87.6
c-3	3.55	12.48	272.13	8795	87.95	1.158	0.652	92.4
c-4	3.51	13.04	310.43	8984	89.84	1.267	0.758	100
Cc-1	3.55	12.36	264.35	8443	84.43	0.825	0.457	88.9
Cc-2	3.52	12.89	299.84	8648	86.48	0.945	0.556	92.2
Cc-3	3.53	13.65	356.06	8798	87.98	1.156	0.648	96.4
Cc-4	3.55	13.86	372.75	8975	89.75	1.267	0.779	100

[0105] 表 3 15 天换水对稚鲍生长情况和免疫力的影响

[0106]

组别	稚鲍初始	收稚鲍平	收稚鲍平	收稚鲍	存活率 (%)	酚氧化	溶菌酶 活性 (U/mL)	RPS(%)
	壳长	均壳长	均重量	总量		酶(PO)		
	(mm)	(mm)	(mg)	(只)		(U/mL)		
A	3.53	10.78	175.38	6246	62.46	0.715	0.356	0
D-1	3.53	11.75	227.11	8544	85.44	0.825	0.463	87.6
D-2	3.53	12.62	281.39	8635	86.35	0.939	0.559	88.4
D-3	3.54	13.14	317.62	8752	87.52	1.157	0.651	92.8
D-4	3.54	13.33	331.60	8956	89.56	1.268	0.765	100
d-1	3.54	10.75	173.92	8535	85.35	0.836	0.465	84.5
d-2	3.56	11.48	211.81	8646	86.46	0.939	0.554	87.3
d-3	3.55	12.32	261.79	8768	87.68	1.157	0.651	92.1
d-4	3.53	13.03	309.71	8949	89.49	1.268	0.763	100
Dd-1	3.54	12.36	264.35	8546	85.46	0.827	0.459	88.6
Dd-2	3.52	12.75	290.17	8653	86.53	0.942	0.556	92.0
Dd-3	3.53	13.51	345.22	8858	88.58	1.157	0.647	96.1
Dd-4	3.52	13.25	325.67	8997	89.97	1.266	0.776	100

[0107] 表 4 20 天换水对稚鲍生长情况和免疫力的影响

[0108]

组别	稚鲍初始壳长	收稚鲍平均壳长	收稚鲍平均重量	收稚鲍总量	存活率(%)	酚氧化酶(PO)活性(U/mL)	溶菌酶活性(U/mL)	RPS(%)
	(mm)	(mm)	(mg)	(只)				
A	3.53	10.78	175.38	6246	62.46	0.715	0.356	0
E-1	3.51	11.65	221.36	8445	84.45	0.825	0.463	87.4
E-2	3.55	12.55	276.73	8635	86.35	0.939	0.559	88.1
E-3	3.52	13.04	310.43	8784	87.84	1.157	0.651	92.5
E-4	3.53	13.28	327.89	8956	89.56	1.268	0.765	100
e-1	3.51	10.66	169.59	8474	84.74	0.836	0.465	84.3
e-2	3.55	11.44	209.61	8675	86.75	0.939	0.554	87.2
e-3	3.55	12.35	263.71	8782	87.82	1.157	0.651	91.0
e-4	3.54	13.07	312.58	8984	89.84	1.268	0.763	100
Ee-1	3.53	12.26	257.99	8436	84.36	0.827	0.459	88.5
Ee-2	3.55	12.75	290.17	8664	86.64	0.942	0.556	91.8
Ee-3	3.52	13.46	341.40	8727	87.27	1.157	0.647	95.4
Ee-4	3.52	13.17	319.81	8949	89.49	1.266	0.776	100

[0109] 表 5 25 天换水对稚鲍生长情况和免疫力的影响

[0110]

组别	稚鲍初始壳长	收稚鲍平均壳长	收稚鲍平均重量	收稚鲍总量	存活率(%)	酚氧化酶(PO)活性(U/mL)	溶菌酶活性(U/mL)	RPS(%)
	(mm)	(mm)	(mg)	(只)				
A	3.53	10.78	175.38	6246	62.46	0.715	0.356	0
F-1	3.55	11.58	217.40	8446	84.46	0.827	0.466	86.8
F-2	3.52	12.54	276.07	8635	86.35	0.938	0.565	87.6
F-3	3.54	13.04	310.43	8778	87.78	1.155	0.654	91.0
F-4	3.53	13.21	322.73	8956	89.56	1.273	0.765	100
f-1	3.54	10.53	163.46	8475	84.75	0.837	0.465	83.9
f-2	3.54	11.27	200.40	8668	86.68	0.937	0.558	86.4
f-3	3.53	12.96	304.75	8783	87.83	1.159	0.654	91.2

[0111]

f-4	3.55	13.26	326.41	8976	89.76	1.266	0.765	100
Ff-1	3.55	12.16	251.73	8502	85.02	0.833	0.458	87.8
Ff-2	3.52	12.67	284.75	8654	86.54	0.945	0.554	91.6
Ff-3	3.54	13.42	338.37	8736	87.36	1.158	0.647	94.9
Ff-4	3.55	13.16	319.08	8949	89.49	1.269	0.775	100

[0112] 表 6 30 天换水对稚鲍生长情况和免疫力的影响

[0113]

组别	稚鲍初	收稚鲍平	收稚鲍平	收稚鲍	存活率 (%)	酚氧化	溶菌酶	RPS(%)
	始壳长 (mm)	均壳长 (mm)	均重量 (mg)	总量 (只)		酶活性 (U/mL)	活性 (U/mL)	
A	3.53	10.78	175.38	6246	62.46	0.715	0.356	0
G-1	3.55	11.58	217.40	8434	84.34	0.828	0.465	86.4
G-2	3.53	12.47	271.47	8635	86.35	0.945	0.564	87.5
G-3	3.51	13.06	311.86	8764	87.64	1.157	0.656	90.8
G-4	3.53	13.14	317.62	8948	89.48	1.276	0.767	100
g-1	3.55	10.47	160.68	8475	84.75	0.838	0.467	83.6
g-2	3.52	11.34	204.16	8657	86.57	0.948	0.556	86.2
g-3	3.54	12.18	252.97	8778	87.78	1.156	0.654	90.7
g-4	3.55	12.86	297.75	8971	89.71	1.267	0.765	100
Gg-1	3.54	12.16	251.73	8505	85.05	0.836	0.457	87.6
Gg-2	3.53	12.65	283.40	8634	86.34	0.947	0.555	91.4
Gg-3	3.55	13.39	336.10	8734	87.34	1.166	0.653	94.6
Gg-4	3.54	13.24	324.93	8943	89.43	1.268	0.776	100

[0114] 从表 1-6 可以看出, 在相同的换水周期下, 随着蛭弧菌混合菌液的浓度升高, 稚鲍的成活率都有一定升高, 且都明显高于 A 组, 说明采用新型的添加蛭弧菌混合菌液的方法, 明显节约养殖成本, 以 $2 \times 2 \times 0.75\text{m}$ 的水池为例, 按每天两个交换量的流水方式, 水深 0.45m 来计算, 每天需要 3.6 吨海水, 以海水的成本 0.264 元 / 吨 (养殖场提供的数据), 这样一口水池每天的耗水费用达到 0.95 元, 而应用蛭弧菌混合菌液的日耗水费用只有 0.047 元, 两者相差 0.9 元。因此这种新方法不仅大大节约了用水量, 还节省了大量的人力, 物力资源, 节约了养殖成本, 提高了成活率。

[0115] 从不同换水周期来看, 相同浓度下的各组稚鲍成活率, 体长等都没有太大的变化, 说明采用新型养殖方法, 5-30 天不换水蛭弧菌混合菌液仍能促进稚鲍的生长。综合来看, 在 10pfu/mL 浓度下, 30 天不换水是比较经济的方式, 采用这样的方法, 效果较佳。

[0116] 免疫力方面,在不同的换水周期下,添加蛭弧菌混合菌液的各组免疫指标明显高于A组;感染实验结果表明,A组的存活率为0%,其他所有添加过蛭弧菌混合菌液的各组相对存活率为83.6-100%。说明蛭弧菌混合菌液能够显著提高稚鲍的免疫力。

[0117] 水质方面,氨态氮用次溴酸纳氧化法测定(GB12763.4-91);亚硝酸盐氮用重氮-偶氮光度法测定(GB12763.4-91)。应用试验结束时,对各组的水质进行了测定。结果表明,A组水池中的各项水质测定值均高于试验组B、C、D...G组。其中,A组氨态氮的检测结果为0.0356mg/L,B-1与Gg-4之间最低为0.0252mg/L、最高为0.0353mg/L;A组检测亚硝酸盐氮结果为0.052mg/L,B-1与Gg-4之间最低为0.044mg/L、最高为0.052mg/L。

[0118] 由以上结果分析可知,应用浓度为 $10^1\text{-}10^7\text{pfu/mL}$ 蛭弧菌混合菌液可有效改善养殖水体环境,调节水中氨态氮、亚硝酸盐氮的含量,从而提供有利于稚鲍生存的水体环境。弧菌数方面,采用涂布TCBS平板法检测,对照组A水体弧菌数在 $2.58\times10^2\text{cfu/mL}$ 左右,然而添加蛭弧菌混合菌液的各组弧菌总数一般在 $2.46\text{-}3.78\times10^1\text{cfu/mL}$,说明蛭弧菌混合菌能有效控制水体的弧菌数,并达到改善水质的目的,综合来看,无论是在水体,还是在饵料,抑或两者中都添加蛭弧菌混合菌液,都能明显的提高稚鲍的体质,增强稚鲍的免疫力,而且能够改善水质,达到节水节能、提高成活率的良好效果。

[0119] 从蛭弧菌混合菌液添加方式来看,不论在水体、饵料,或者是两者均使用蛭弧菌混合菌液,三种方法都能大大提高稚鲍的成活率、促进稚鲍的生长。但在养殖水体和饵料中均添加蛭弧菌混合菌液的方法效果最佳。

[0120] 上述各组实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受其的限制,其他任何未背离本发明的精神实质与原理所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。