

DOI: 10.12264/JFSC2023-0054

中国鲎室内人工繁育和鲎卵、幼体常见病原鉴定及其防治

钟赞民, 翁朝红, 王志婷, 李佳怡, 谢仰杰

集美大学水产学院, 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021

摘要: 为了鉴定中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)人工繁育过程中感染受精卵和低龄幼体的细菌或真菌等病原, 同时探索防治措施, 本研究开展了中国鲎在自然受精条件下的育苗实验。采用 16S rDNA 和 ITS 测序技术分别对感染病原的中国鲎受精卵表面细菌和真菌进行鉴定和微生物群落组成分析, 同时选择溴氯海因溶液做为消毒剂开展不同浓度溴氯海因溶液对中国鲎 1 龄幼体的急性毒性研究, 并根据安全浓度探索和确定适用于鲎卵和幼体的有效消毒浓度。结果表明, 4 对亲鲎共产卵 16493 粒, 平均受精率 66.25%, 平均孵化率 52.25%, 病原感染率为 47.75%, 感染病菌的鲎卵死亡率 100%, 最终得到 5704 只 1 龄幼体。感染病原的中国鲎受精卵表面优势细菌为希瓦氏菌属(*Shewanella*)、海王星杆菌属(*Neptuniibacter*)、脱硫杆菌属(*Desulfobacter*)、寺崎菌属(*Terasakiella*)和哈拉科杆菌属(*Halarcobacter*), 相对丰度分别为 23.67%、7.21%、6.64%、5.41%和 5.16%; 优势真菌为肉座菌科(*Hypocreaceae*)的一未知种和曲霉菌属(*Aspergillus*), 相对丰度为 81.81%和 10.48%。溴氯海因对 1 龄幼鲎的 96 h 半致死浓度为 945.06 mg/L, 安全浓度为 94.51 mg/L, 在安全浓度下溴氯海因对鲎卵孵化和 1 龄幼鲎培育有效消毒浓度为 30~90 mg/L, 此浓度范围内能够显著提高鲎卵孵化率($P<0.05$), 并降低鲎卵和 1 龄幼鲎的死亡率($P<0.05$)。研究结果显示溴氯海因可有效降低受精卵和幼体被细菌、真菌等微生物感染的风险, 可用于中国鲎人工繁育过程中的日常消毒。

关键词: 中国鲎; 人工繁育; 病原鉴定; 溴氯海因; 受精卵; 幼体

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)06-0799-13

由于栖息地破坏和过度捕捞利用, 中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)已成为濒危海洋动物, 其自然资源已濒临枯竭, 人工繁育和增殖放流是增加其野外资源的重要途径^[1]。我国 20 世纪 80 年代曾通过杀鲎取卵方式开展中国鲎的人工繁育工作试验^[2-3], 但苗种培育相关报道较少。近年来开始采用模拟野外条件促亲鲎自然产卵方法进行人工繁殖^[4-5], 以降低对珍稀亲鲎的伤害, 但孵化率和成活率尚不稳定。

在室内有限人工空间条件下, 高密度养殖导致鲎卵和幼鲎生活空间急剧缩小, 因此容易受到各种细菌、真菌、病毒或寄生虫等病原侵染, 再加上漫长的发育周期, 更是给予这些病原体可乘之机^[6-8]。感染后的受精卵和幼鲎常常发育迟滞,

严重则腐烂死亡, 尤其在鲎卵发育期间较为常见, 是影响受精卵孵化率的主要原因^[9]。因此, 探究幼鲎发育过程中常见病原及其防治方法具有重要意义。

溴氯海因(1-Bromo-3-chloro-5,5-dimethylhydantoin, BCDMH)作为一种有机活性溴、氯杀菌剂, 其杀菌谱广, 对多种细菌、芽胞、病毒、真菌等有杀灭作用^[10]。其溶解在水中形成游离的 Br^- 和 Cl^- , 形成次溴酸(HBrO)和次氯酸(HClO)起主要杀菌消毒作用, 且对组织刺激性小, 适用于皮肤、黏膜消毒^[11]。溴氯海因作为已批准的水产养殖业安全兽药, 已广泛应用于水产养殖水体、环境或生物体的消毒, 治疗和预防细菌性和病毒性疾病^[12-13], 但尚未应用于中国鲎卵和幼体的消毒,

收稿日期: 2023-03-13; 修订日期: 2023-04-21.

基金项目: 深圳质兰公益基金项目(2021040121B, 2022070771B); 厦门市海洋与渔业研究所合作项目(S23013).

作者简介: 钟赞民(1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向为中国鲎人工繁育. E-mail: 202011908001@jmu.edu.cn

通信作者: 翁朝红, 博士, 教授, 研究方向为水生生物保护生物学. E-mail: wengzhaohong@jmu.edu.cn

其安全浓度和有效浓度未知。

本研究通过模拟野外产卵场条件、强化亲鲎营养促使其自然产卵和受精的方式进行人工繁育,获得受精卵进行人工孵化和鲎苗培育。并对感染病原的受精卵表面病原采用 16S rDNA 和 ITS 测序技术进行测序、鉴定和微生物群落组成分析;同时开展不同浓度溴氯海因溶液对中国鲎 1 龄幼体的急性毒性研究,并根据安全浓度确定适用于鲎卵和幼体的有效消毒浓度,探究其是否能提高幼体成活率,是否适合应用于中国鲎人工养殖过程环境消毒。

1 材料和方法

1.1 中国鲎人工繁育

中国鲎为厦门当地执法部门收缴所得,暂养在集美大学水产试验场。亲鲎开始养殖前用淡水或含 20 mg/L 次氯酸的淡水浸泡 3~10 min,然后用海水冲洗头胸甲表面和腹面,杀死并洗脱寄生动物。每只鲎测量形态参数后按雌雄配对放入养殖桶,每个养殖桶放置 1 对亲鲎。养殖桶规格为上底 1.65 m,下底 1.53 m,高 0.82 m,容量 1000 L,底下铺设 10 cm 底沙,用加热棒将水温控制在 28 ℃,养殖用水为经砂滤后的天然海水, pH 8.00±0.43,盐度 29.00±0.33,有过滤桶净化养殖桶内水体,再回流到养殖桶中,形成循环水养殖。每日傍晚投喂亲鲎总重 3%~5% 的新鲜菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)或近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)肉,并间隔 1 d 加双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)进行营养强化。待亲鲎摄食 0.5~1 h 后换水并清除残饵和粪便。强化约 1~2 月后亲鲎开始产卵,收集受精卵转移到孵化篮中进行孵化,孵化水温(30.00±0.5) ℃。每天观察和记录鲎卵孵化情况、病菌感染情况等,将被病菌感染的鲎卵及时挑出并单独培育,用于后续病原鉴定和微生物群落结构分析。鲎卵蜕壳孵出 1 龄幼体也及时捞出单独培育,部分用于后续溴氯海因毒理和消毒实验。

1.2 感染病原的鲎卵表面微生物鉴定和群落结构分析

取不同感染形态的鲎卵 50 个,混合浸泡于无菌海水中,轻轻震荡摇晃,吸取含洗脱物的无菌

海水 10 mL,均分置于 2 管 5 mL 的冻存管中,−80 ℃冰箱保存。样品由奥维森基因科技有限公司进行 DNA 提取、PCR 扩增和测序。细菌鉴定和群落结构组成分析数据来自 16S rDNA 基因序列的 V3-V4 区高通量测序结果,真菌鉴定和群落组成分析数据来自 ITS 测序结果。测序平台为 MiSeq PE300。

Miseq 测序得到 pair-end (PE)双端序列数据,对测得 Fastq 数据进行质控处理,最终得到优质的 Fasta 数据,然后进行有效数据统计,将下机数据(Raw PE)在去除 barcode 和 primer 并拼接后得到 raw tags,经进一步去除嵌合体、短序列后得到优质序列(clean tags),采用 QIIME1(V1.8.0)平台和 vsearch 软件将 clean tags 用聚类方式生成 OTUs^[14]。为了得到每个 OTU 对应的物种分类信息,在 Silva 和 Unite 等常用的细菌和真菌数据库采用 blast 或 RDP Classifier、uclust consensus taxonomy assigner 等方法对 OTU 代表序列进行比对分析,注释其群落的物种信息。

1.3 幼鲎(1 龄)溴氯海因急性毒性实验

挑选外观良好、无明显畸变、未被病菌感染的 1 龄幼鲎约 500 只,头胸甲宽为(5.69±0.28) mm,湿重为(0.0243±0.0045) g。纯度 30% 的溴氯海因粉(水产用),使用前用蒸馏水稀释,配制成各种实验浓度组,现配现用。实验养殖容器为上底直径 19.7 cm,下底直径 14 cm,高 15.5 cm 的塑料桶,容量 3 L。实验海水为砂滤所得, pH 8.00±0.43,盐度 29.00±0.33。实验温度为(26.0±0.5) ℃,实验前气石持续充氧,溶氧量≥5.0 mg/L。

急性毒性实验前预实验设置 7 个溴氯海因浓度梯度 200、500、800、1100、1400、1700 和 2000 mg/L 和空白对照组,每个浓度 10 只 1 龄幼鲎,观察 12、24、36、48、60、72、84 和 96 h 最大耐受浓度和完全死亡浓度。

根据预实验结果,设计静态急性毒性实验。以最大耐受浓度 1400 mg/L 为上限浓度,其对数值 X_k 为 3.15,下限浓度为 200 mg/L,其对数值 X_i 为 2.30, $N=6$,根据实验组间距公式 $d=(X_k-X_i)/(N-1)^{[15]}$ 得出 $d=0.17$ 。根据等对数间距设置 199.53、295.12、436.52、645.65、954.99 和 1412.54 mg/L

共 6 个梯度(表 1)及空白对照组;作用时长为 12、24、36、48、60、72、84 和 96 h。每组 10 只 1 龄幼体,3 个重复组。每隔 12 h 观察幼体存活状况,计录死亡个体、幼体活力状况等相关数据。肉眼下不动的幼体可移至显微镜下观察鳃部和附肢是否活动来判断是否死亡。整个实验过程中不换水、不打气、不投饵,死亡个体及时捞出,以避免水质恶化。

表 1 各组溴氯海因的对数浓度和药物量
Tab. 1 Logarithmic concentration and drug quantity of BCDMH in each group

组别 group	对数值 logarithmic value	对数剂量/(mg/L) logarithmic dose	药物量/g amount of drug
A	0	0	0
B	2.30	199.53	0.67
C	2.47	295.12	0.98
D	2.64	436.52	1.46
E	2.81	645.65	2.15
F	2.98	954.99	3.18
G	3.15	1412.54	4.71

1.4 急性毒性实验后恢复实验

急性毒性实验结束后,将剩余存活个体(共 52 只)立即置于无溴氯海因的干净海水中进行恢复实验,恢复实验时长为 12、24、36 和 48 h。观察并记录此期间 1 龄幼鲎死亡率。

1.5 鲎卵和幼体消毒有效浓度

在安全浓度范围内设置 10、30、60 和 90 mg/L 4 个梯度和空白对照组,进行溴氯海因对鲎卵孵化和 1 龄幼鲎培育影响实验。为防止药效减弱,每 3 d 更换一次海水并加入重新配置相应浓度溴氯海因溶液。幼鲎组每组 20 只,3 个重复。鲎卵组每组 20 枚外膜无破损、状况良好的受精卵,直径(3.12±0.25) mm,湿重(0.0051±0.0011) g,3 个重复。实验进行 60 d,每天记录鲎卵孵化、1 龄幼鲎发育情况、感染个体数和死亡个体数等。

1.6 统计分析

采用 SPSS 25.0 对各实验组数据进行单因素方差分析,验证数据正态性,方差齐性用 LSD 进行组间多重比较;非齐性则用非参数检验中的 Kruskal-Wallis H 检验进行分析。 $P<0.05$ 表示差异

显著, $P>0.05$ 表示差异不显著。在方差齐性下用 Probit 法求出对应时间的 95%置信区间,再通过寇式法计算出对应的溴氯海因半致死浓度(LC₅₀, mg/L)。然后根据得到的 LC₅₀ 利用公式^[16] $SC=LC_{(50-96\text{ h})}\times 0.1$ 计算得到安全浓度(SC, mg/L)。用 Origin 2021 对所得数据进行作图。

2 结果与分析

2.1 中国鲎人工繁育结果

4 对亲鲎在营养强化 1~2 个月后开始产卵,鲎卵埋在底沙中。收集时把亲鲎先转移,然后搅动水体,把鲎卵从沙层中分离并收集。于 2022 年 7 月 3 日获得第一批约 500 粒鲎卵,随后每天可收集到 100~1000 粒鲎卵,持续 25 d,共收集到 16493 粒鲎卵(表 2)。随后将这些鲎卵放置到孵化篮中进行孵化。孵化篮为长 32.5 cm,宽 24 cm,高 9 cm 的长方形网篮,每只网篮放 500 粒鲎卵,充分打气,每天换一次水,挑出被病菌感染的鲎卵单独继续培养并计数,孵化天数 40~60 d,得到共计约 5704 只 1 龄幼体。

本次人工繁育鲎卵的平均受精率为 66.25%,平均孵化率为 52.25%,平均孵化天数 50 d,平均感染病菌率为 47.75%,每组亲鲎平均产卵 4123.25 粒(表 2)。

2.2 感染病原的鲎卵和 1 龄幼鲎形态特征

孵化过程中发现感染病原的受精卵和幼体呈红色、黑色或白色 3 种体色(图 1)。红色卵(图 1a)一般在孵化前期最早出现,约占所有病菌感染鲎卵的 30%(图 2),特征为初始时为红色斑点,然后逐渐扩大至整个鲎卵或者幼体。感染后的鲎卵会逐渐变软,卵膜破裂损伤,卵黄流出,或逐渐发黑腐烂死亡;黑色卵(图 1b)一般在孵化中期开始出现,后期数量较多,约占所有病菌感染鲎卵的 40%(图 2),特征为表面有菌丝,会附着在其他鲎卵上,菌丝将多个鲎卵连接在一起,最后均发黑腐烂死亡;白色卵(图 1c)在孵化前、中和后期均有出现,传染速度最快,约占所有病菌感染鲎卵的 30%(图 2),特征为表面形成一层白色黏性膜,这种膜也会把其他卵粘连或覆盖,且有明显异味,最后导致鲎卵腐烂死亡。被这些细菌、真菌感染

后的鲎卵无一例外最后都会死亡。幼鲎也同样会受这些细菌、真菌的感染。养殖过程中最为常见的就是红色或粉红色的幼鲎(图 1d), 不过比起受精卵时期, 幼鲎的抵抗力和免疫能力明显增强, 且大部分 1 龄幼体蜕壳后进入 2 龄都能有效防御病菌侵袭, 少部分被病菌侵袭后死亡。

表 2 4 对亲鲎头胸甲宽、湿重、产卵量、孵化率等参数
Tab. 2 Measurement parameters of prosomal width, wet weight, total spawning and hatchability from 4 pairs of *Tachypleus tridentatus*

成对亲鲎编号 no.	性别 gender	头胸甲宽/cm carapace width	湿重/g wet weight	总产卵量 total spawning amount	受精率/% fertilization rate	孵化率/% hatchability	鲎卵感染率/% fertilized egg infection rate
1	雄 male	25.5	1519.4	3520	70	58	42
	雌 female	26.7	2728.7				
2	雄 male	25.8	1506.8	4247	62	53	47
	雌 female	19.8	3237.7				
3	雄 male	28.2	1660.7	4946	68	52	48
	雌 female	31.8	3141.2				
4	雄 male	32.3	1412.1	3780	65	46	54
	雌 female	30.5	2828.0				
均值 mean				4123.25	66.25	52.25	47.75

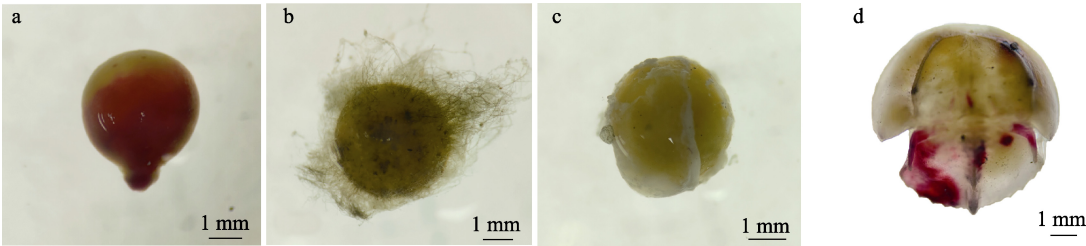


图 1 被细菌、真菌等病原体感染的鲎卵(a, b, c)和 1 龄幼鲎(d)
Fig. 1 *Tachypleus tridentatus* eggs (a, b, c) and 1st instar larvae (d) infected by pathogens such as bacteria and fungi

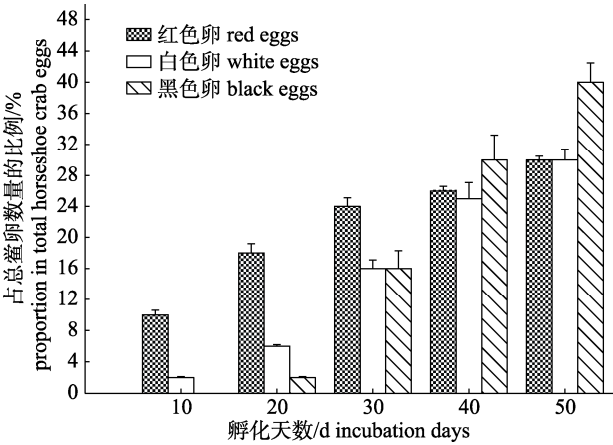


图 2 被病原感染的各色鲎卵随着孵化
天数出现的比例

Fig. 2 Proportion of *Tachypleus tridentatus* eggs in different colour infected by pathogens at different incubation days

2.3 感染病原的鲎卵表面细菌、真菌群落组成分析

对感染鲎卵表面的细菌进行分类, 在属的水平上可细分为 17 种, 优势菌(相对丰度>5%)为希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、海王星杆菌属 (*Neptuniibacter*)、脱硫杆菌属 (*Desulfobacter*)、寺崎菌属 (*Terasakiella*)和哈拉科杆菌属 (*Halarcobacter*), 相对丰度分别为 23.67%、7.21%、6.64%、5.41%和 5.16%。还有一些菌群丰度较低, 但也被检测出, 其中包括鲁杰氏菌属 (*Ruegeria*)、乳酸杆菌属 (*Malaciobacter*)、海洋螺旋藻属 (*Oceanospirillum*)、*Psychroserpens*、海杆菌属 (*Marinobacter*)、梭杆菌属 (*Fusibacter*)、噬甲基菌属 (*Methylophaga*)、假嗜杆菌属 (*Pseudophaeobacter*)、拉布伦齐亚属 (*Labrenzia*)、

尼奥埃拉属(*Nioella*)、含水杆菌属(*Aquibacter*)和维辛格属(*Vicingus*), 相对丰度分别为 4.69%、3.66%、3.19%、2.47%、2.46%、2.04%、1.55%、1.47%、1.41%、1.19%、1.06%和 1.04%。感染鲎卵表面的真菌共检测到 4 种, 在属水平上占据绝对优势的是肉座菌科(*Hypocreaceae*)的一属, 在 NCBI 基因库中未能与已知的属匹配, 但从上一级可以认定是肉座菌科, 相对丰度达到 81.81%;

其次是曲霉菌属(*Aspergillus*), 相对丰度为 10.48%; 其他为枝孢菌属(*Cladosporium*)和镰刀菌属(*Fusarium*), 分别为 2.71%和 1.24%。

2.4 溴氯海因对 1 龄幼鲎急性毒性实验结果

对表 1 数据用 SPSS 进行 Probit 分析, 得到了如表 3 所示的回归方程和 LC_{50} , $LC_{50(96h)}$ 的值为 945.06 mg/L, SC 为 94.51 mg/L。说明水体中溴氯海因浓度在 94.51 mg/L 内对中国鲎 1 龄幼体是安全的。

表 3 溴氯海因对中国鲎 1 龄幼体的半致死浓度(LC_{50})和安全浓度(SC)
Tab. 3 LC_{50} and SC of BCDMH in the 1st instar *Tachypleus tridentatus* larvae

时间/h time	$LC_{50}/(mg/L)$	95%置信区间/(mg/L) 95% confidence interval	回归方程 regression equation	P	SC/(mg/L)
72	1032.78	885.952–1239.710	$Y=-3.881+0.004x$	<0.01	94.51
84	984.00	824.523–1227.317	$Y=-2.848+0.003x$	<0.01	
96	945.06	790.753–1186.764	$Y=-2.753+0.003x$	<0.01	

溴氯海因不同浓度、不同作用时间组的组间多重比较和方差分析结果见图 3。当溴氯海因浓度在 295.12 mg/L 及以下时, 实验时长 96 h 之内 1 龄幼鲎的存活率均无显著差异($P>0.05$), 即存活率无明显变化, 均能存活。当溴氯海因浓度在 436.52 mg/L 时, 实验时长 96 h 之后各时间点 1 龄幼鲎存活率与 60 h 之前的所有时长组存在显著差异($P<0.05$), 且该浓度下作用时间达到 84 h 之后会开始出现 1 龄幼鲎的显著性死亡。当溴氯海因浓度达到 645.65 mg/L 时, 实验时长 72 h 之后各时间点 1 龄幼鲎存活率显著低于($P<0.05$) 72 h 之前的所有时长组, 特别是 96 h 组与其他组间出现显著差异($P<0.05$), 但 72~96 h 之间差异不显著($P>0.05$)。当溴氯海因浓度达到 954.99 mg/L 时, 实验时长 36 h 之后的 1 龄幼鲎存活率为 83%, 与前面实验时长组存在显著差异($P<0.05$)。随着作用时间增加, 存活率进一步降低, 60 h 时存活率为 70%, 之后直到 96 h 实验结束存活率无显著差异($P>0.05$)。当溴氯海因浓度达到 1412.54 mg/L 时, 在各时间点实验组与对照组间均存在显著的差异($P<0.05$), 12 h 后存活率仅为 57%, 24 h 后存活率仅为 3%, 最终全部死亡, 说明当溴氯海因浓度达到 1412.54 mg/L 及以上时, 幼鲎快速大量死亡, 严重威胁其生命。

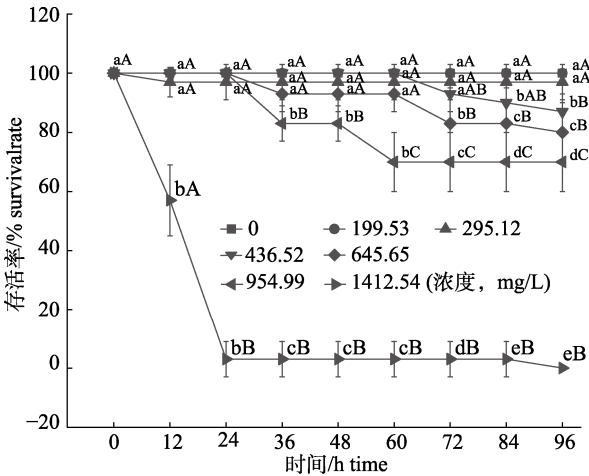


图 3 不同溴氯海因浓度对中国鲎 1 龄幼体存活率的影响
同一时间下凡含有一个相同小写字母表示不同浓度组间差异不显著($P>0.05$). 同一浓度下凡含有一个相同大写字母表示不同时间组间差异不显著($P>0.05$).

Fig. 3 Effects of different BCDMH concentrations on survival of 1st instar *Tachypleus tridentatus* larvae
The inclusion of the same lowercase letter at the same time indicates that the difference between different concentration groups is not significant ($P>0.05$). The same concentration contains the same uppercase letter indicates that the difference between different time groups is not significant ($P>0.05$).

2.5 溴氯海因恢复浓度和恢复时长对幼鲎存活率的影响

1 龄幼鲎在溴氯海因急性毒性实验结束后, 剩余个体立即放入无溴氯海因的干净海水中进行恢复实验。结果表明, 在恢复过程中幼鲎的死亡

率会随着急性毒性实验阶段溴氯海因浓度和恢复时间而发生显著性变化(图4)。436.52 mg/L 及低于该浓度的实验组,恢复期间(48 h)各时间点幼鲎存活率无明显差异($P>0.05$),且死亡率都较低,说明使用 436.52 mg/L 及以下浓度的溴氯海因溶液消毒 1 龄幼鲎是安全的。

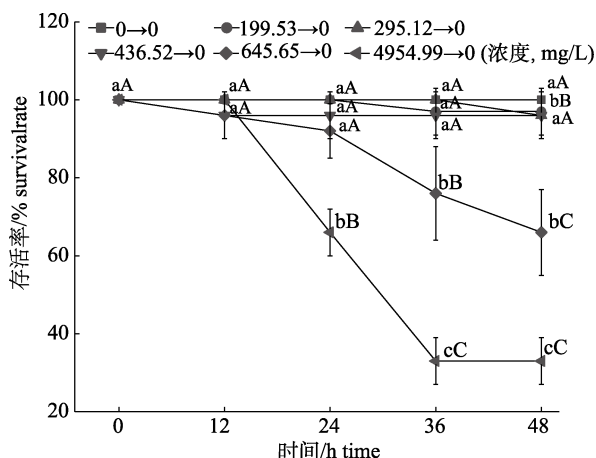


图4 溴氯海因作用后中国鲎 1 龄幼体恢复实验
同一时间下凡含有一个相同小写字母表示不同浓度组间差异不显著($P>0.05$). 同一浓度下凡含有一个相同大写字母表示不同时间组间差异不显著($P>0.05$).

Fig. 4 Recovery experiment of 1st instar *Tachypleus tridentatus* larvae after BCDMH treatment

The same lowercase letter indicates that the difference between different concentration groups is not significant at the same time ($P>0.05$). The same uppercase letter indicates that the difference between different time groups at the same concentration is not significant ($P>0.05$).

溴氯海因初始浓度为 645.65 mg/L 和 954.99 mg/L 的实验组随着恢复时间的增加,幼鲎的存活率逐渐降低。645.65 mg/L 实验组,恢复 36 h 后幼鲎的存活率显著地降低($P<0.05$),48 h 后进一步显著降低($P<0.05$);954.99 mg/L 实验组,恢复 36 h 后幼鲎的存活率(33%)显著地降低($P<0.05$),48 h 后存活率不变(33%)。

2.6 安全浓度范围内不同溴氯海因浓度对鲎卵孵化和 1 龄幼鲎培育效果

在安全浓度范围内设置 10、30、60 和 90 mg/L 这 4 个梯度和对照组,进行溴氯海因对鲎卵孵化和 1 龄幼鲎培育效果实验。鲎卵孵化结果如图 5 所示,得到的感染率与死亡率数据一致,说明感染病菌的鲎卵最终死亡,不能孵化。30 mg/L 及以

上浓度组间鲎卵孵化率、感染率和死亡率无显著差异($P>0.05$),说明 30、60 和 90 mg/L 溴氯海因浓度之间对鲎卵的孵化效果相近,在感染率和死亡率的控制也相近,差异不大。30 mg/L 及以上浓度组的孵化率显著高于 0~10 mg/L 浓度组($P<0.05$),说明在 30~90 mg/L 溴氯海因浓度孵化效果比 0~10 mg/L 浓度更好,而 30 mg/L 及以上浓度组的感染率和死亡率均显著低于 0~10 mg/L 浓度组($P<0.05$),可见 30~90 mg/L 溴氯海因浓度对鲎卵孵化效果更好,更能有效防止鲎卵感染病菌死亡,从而提高孵化率。

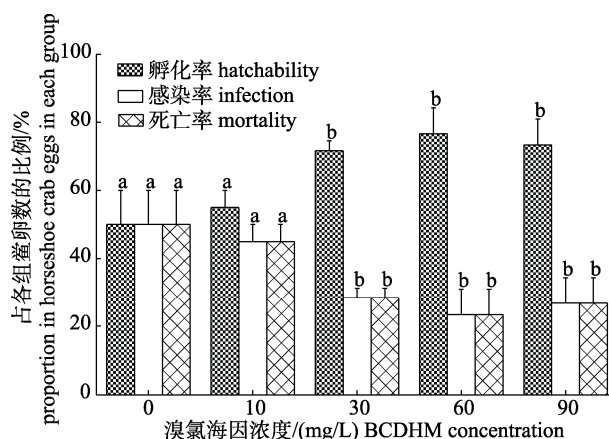


图5 不同浓度的溴氯海因对鲎卵孵化效果
同一参数下凡有相同小写字母表示两者之间差异不显著($P>0.05$).

Fig. 5 Effects of different concentrations of BCDMH on horseshoe crab egg hatching

The same lowercase letter indicates that the difference between different concentration groups at the same time is not significant ($P>0.05$).

溴氯海因消毒对 1 龄幼体培育影响结果表明(图 6),实验组和对照组相比,蜕壳率无显著差异($P>0.05$),说明溴氯海因浓度对 1 龄幼鲎蜕壳发育几乎无影响。30 mg/L 及以上浓度组在 1 龄和 2 龄幼体病原感染率和死亡率之间均无显著差异($P>0.05$),说明 30、60 和 90 mg/L 溴氯海因浓度对 1 龄和 2 龄幼体控制感染率和死亡率的效果相近,都能起到良好的防治效果。10 mg/L 浓度组与对照组在 1 龄幼体和 2 龄死亡率上有显著差异($P<0.05$),而在感染率上没有显著差异($P>0.05$),说明在低浓度下(10 mg/L)溴氯海因对幼体防治病

菌感染效果较差, 小部分幼鲎感染病菌后可以存活。30 mg/L 及以上浓度组除蜕壳率外其他参数都显著低于对照组 ($P<0.05$), 说明当溴氯海因浓度 30~90 mg/L 时能够显著降低病菌感染, 降低死亡率。

2.7 中国鲎 1 龄幼鲎中毒行为反应

将 1 龄幼鲎投放到含有溴氯海因溶液(浓度>199.53 mg/L)的海水中, 观察发现部分幼鲎会表

现较为兴奋, 并进行仰泳, 随后活力下降沉底, 随着药物浓度(>436.52 mg/L)和实验时长(>36 h)的增加, 幼鲎的书鳃能肉眼观察到有灰白色富集(图 7), 此时幼鲎活动减少, 显微镜下观察到书鳃鼓动频率变弱, 书鳃有灰白色富集的幼鲎随时间(>72 h)增长, 其附肢会弯曲收缩呈“抱拢”状态, 最后死亡。

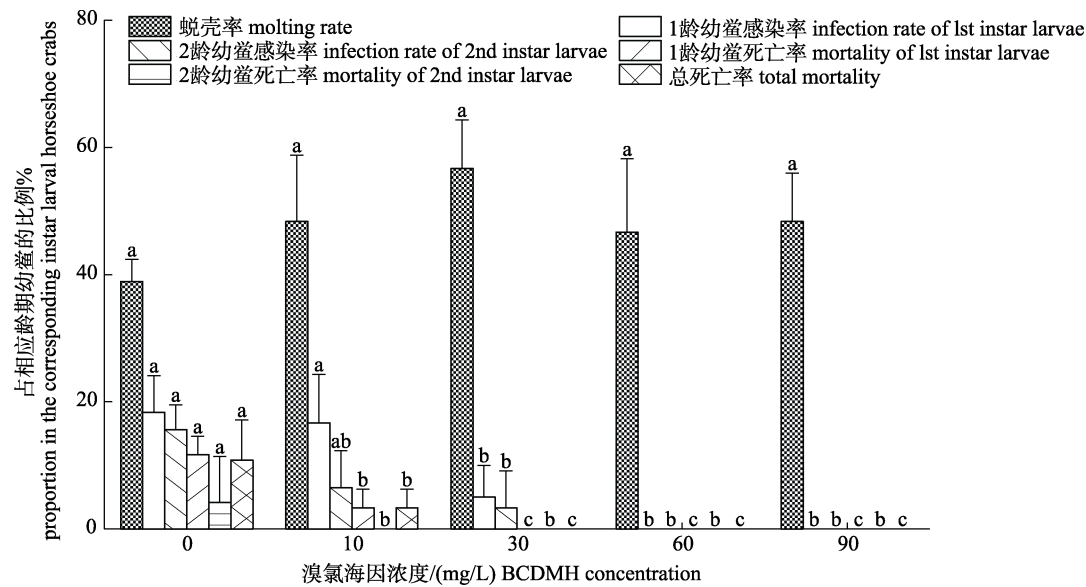


图 6 不同浓度的溴氯海因对幼鲎培育的消毒效果
同一参数下凡有相同小写字母表示两者之间差异不显著 ($P>0.05$).
Fig. 6 Disinfection effect of BCDMH in horseshoe crab larvae cultivating
The inclusion of the same lowercase letter at the same time indicates that the difference between different concentration groups is not significant ($P>0.05$).

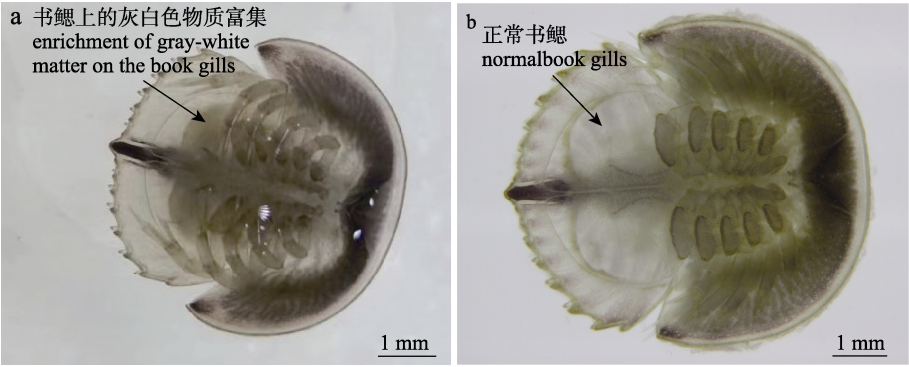


图 7 病原感染幼鲎(a)和正常个体(b)的书鳃
Fig. 7 The book gills of larvae infected by pathogens (a) and normal individuals (b)

3 讨论

3.1 中国鲎人工繁育技术

本次人工育苗收集到鲎卵 16493 粒, 平均受精率 66.25%, 平均孵化率 52.25%, 平均感染率

47.75%, 共计得到 5704 只 1 龄幼体。相较于以往的繁育实验(同一批亲鲎, 平均产卵量 2320 粒), 本次收获的鲎卵较多(平均每对亲鲎产卵 4123 粒), 原因在于合理的营养强化。研究表明, 中国鲎偏好摄食双壳类和多毛类^[9,17], 平时投喂的饵料种

类一般为菲律宾蛤仔和近江牡蛎^[18],当繁殖期开始时增加营养。厦门地区中国鲎的繁殖期一般在 4—8 月^[4],此阶段选择富含高蛋白的双齿围沙蚕与菲律宾蛤仔、牡蛎肉混合投喂,提供更加丰富的营养,在本研究中也得到了印证。中国鲎有昼伏夜出的习性,在夜晚和凌晨活动比较活跃^[19-20],投喂时间在傍晚或晚上较好,此时亲鲎较为活跃,能够及时摄食新鲜饵料,防止饵料泡水太久鲜味降低甚至腐败变质。投喂时要注意将饵料均匀撒落,保证每只鲎均能摄食到一定量的饵料。投喂量视亲鲎摄食量而定,一般为亲鲎总重的 3%~5%^[19],投喂 0.5~1 h 后未摄食的饵料和粪便要及时捞出清理,因为鲎粪便氨氮含量较高,残饵容易腐烂污染水质,长期留存会危害亲鲎健康。待亲鲎摄食完毕后全部换水,防止水质变差。可见,足够的营养是亲鲎产卵的关键^[18],特别是在繁殖期要注意合理的营养强化。

本次实验得到的鲎卵受精率和孵化率都较低,可能与所用的鲎活力较差有关,也可能与养殖环境有关。梁广耀^[3]用 2 m×1.75 m×1 m 的水泥池和 15 cm 厚的底沙下自然受精的方式获得的鲎卵平均受精率为 80%,认为产卵池的大小和底沙的厚度也会影响受精率,较薄的沙层包裹性差,雌鲎产的卵不能完全埋在沙中,有一部分会分散在沙面上,影响了受精率。这与本次试验养殖环境相似,本次养殖采用的是养殖桶,上底 1.65 m,下底 1.52 m,高 0.82 m,规格较小,沙层厚度仅 10 cm,造成了自然受精过程中有很多鲎卵分散在沙层表面,可能无法充分受精。研究表明人工授精得到的鲎卵受精率更高^[2,21],但需要剖开雌鲎取出卵子,会造成雌鲎的死亡,从保护鲎资源的角度建议采用自然受精,不适宜采用解剖的方法。

本次实验中也出现较高的病菌感染率,可能与亲鲎活力较差和本次实验采用的循环系统水交换不够有关。传统方法采用较厚的底沙容易造成缺氧,不利于亲鲎埋栖和受精卵孵化,双层水体养殖系统能够加强上、下流水交换,既增加了溶解氧也达到了清洗底沙的效果^[22]。后续实验将改进养殖桶的构造以取得更好的养殖效果。人工育

苗应当注意养殖空间和底沙厚度的问题,改变传统养殖系统,加大上、下层流水交换,并选用一些安全的消毒剂定期对海水和养殖系统进行消毒、清洁,从而达到更好的繁育效果。

3.2 中国鲎常见病原微生物感染病症和防治方法

中国鲎属于节肢动物,外被坚硬的几丁质外壳,通常病原不容易侵染。在受精卵和幼体阶段,由于外壳通透性较强,且活动力较弱,容易滋生各种病原,在中国鲎人工繁育过程中,受精卵低孵化率和低幼体成活率常与此有关。本实验在鲎卵孵化和 1 龄幼体培育过程中均出现了被细菌、真菌等病原感染后的群体,尤其是鲎卵平均感染率达到 47.75%,而且被感染的鲎卵死亡率达到 100%。这与感染后的鲎卵和 1 龄幼体形态特征与 Faizul 等^[6]的研究相似,主要有体色变红、变白和变黑 3 种形态。孵化过程中最先出现的是红色卵,占被病菌感染的鲎卵比例为 30%;其次是白色卵,其传播速度最快,占被病菌感染的鲎卵比例为 30%;黑色卵最多,一般在孵化中、后期出现,占比为 40%。不同颜色的鲎卵比例不等,早期孵化过程中红色和白色的卵占比更高。Faizul 等^[6]在圆尾鲎 (*Carcinoscorpius rotundicauda*) 和巨鲎 (*T. gigas*) 室内繁育过程中,发现受精卵和幼体容易感染有害细菌和真菌,通过微生物鉴定认为主要有腐败希瓦氏菌 (*S. putrefaciens*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp.) 和曲霉 (*Aspergillus* sp.)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、青曲霉 (*Penicillium* sp.) 和胶质瘤杆菌 (*Gliocladium* sp.), 其中感染最多的是腐败希瓦氏菌和黑霉菌。本研究对感染病原的鲎卵进行细菌和真菌生物组成分析得出细菌类病原主要有希瓦氏菌属、海王星杆菌属、脱硫杆菌属、寺崎菌属和哈拉科杆菌属,真菌类主要有肉座菌科和曲霉菌属,同 Faizul 等^[6]的研究相似,均存在希瓦氏菌和曲霉。

研究表明,希瓦氏菌属于非发酵菌群,是一种条件致病菌,在许多水产动物如牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[23]、异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)^[24]、鲢 (*Hypophthalmichthys Molitrix*)^[25]、

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)^[26]等鱼类疾病中都有报道。而水产动物希瓦氏菌的感染防治研究较少,主要是一些抗生素的药敏实验,研究表明氯霉素对希瓦氏菌的消毒效果较好^[26]。肉座菌科常见于腐烂的植物和肥料^[27]中,是一种分布较为广泛的真菌。Kawaroe 等^[28]报道了一种从海水中发现的肉座菌科的真菌可以产生琼脂酶,能分解大型海藻,目前暂无有关其引起水生动物病症的报道。曲霉菌是引起多种物质霉腐的主要微生物之一,多见于家禽类疾病的致病源,在水生动物^[29]中也有相关报道,对人体健康有害,防治措施有物理防治,如紫外灯照射^[29]等;药物防治,如用 2.5%福尔马林消毒^[30]等。

细菌、真菌感染病使得鲎卵和幼体发育过程出现较高死亡率,治疗方法也仍处在研究阶段。Shinn 等^[31]发现美洲鲎(*Limulus polyphemus*)幼体鳃部一种与掌状聚缩虫(*Zoothamnium duplicatum*)形态相似的原生动物,对幼体进行了淡水浴、次氯酸钠浴、福尔马林浴等一系列消毒处理,认为淡水浴 1 h (含 10 mg/L 氯)能够有效提高幼鲎存活率,抑制表面原生生物的生长。廖永岩等^[32-35]采用高锰酸钾、二氧化氯、敌百虫、氯氟氰菊酯等消毒液对中国鲎 1 龄幼体开展急性毒性实验研究,得出了相关消毒液的安全浓度。然而高锰酸钾属于易爆管制药品,敌百虫和氯氟氰菊酯需要凭借执业兽医处方才能购买使用,而且上述消毒液仅有对 1 龄幼鲎的半致死浓度和安全浓度,实际用于养殖的有效浓度尚未明确。因此需要寻找一种安全有效的消毒方法,用于杀灭鲎卵或幼体体表常见病原,以提高鲎人工繁殖生产过程中鲎卵孵化率和幼鲎存活率。

3.3 溴氯海因对鲎卵孵化效果和 1 龄幼鲎病菌防治的可行性

溴氯海因是一种安全有效的广谱杀菌剂,已广泛应用于水产养殖过程中各环节的环境和生物体消毒^[36-38],其常用于预防水产动物细菌性或真菌性疾病,可以治疗由弧菌、真菌等病原微生物引起的出血、烂鳃、腐皮、肠炎等^[36]。有学者研究了溴氯海因对水体中真菌孢子的消毒效果,发

现其能够有效杀灭黑曲霉和黑青霉(*P. polonicum*)^[39],而曲霉菌正是感染鲎卵的主要病原之一。本研究表明,溴氯海因对中国鲎 1 龄幼体作用 72 h、84 h 和 96 h 半致死浓度分别为 1032.78 mg/L、984.00 mg/L 和 945.06 mg/L,远高于溴氯海因对水产养殖甲壳类物种作用的半致死浓度^[40-41],例如罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) 24 h 的 LC_{50} 为 2.97~5.52 mg/L, 48 h 的 LC_{50} 为 2.76~5.31 mg/L^[40]。说明中国鲎 1 龄幼体对溴氯海因不敏感,该药剂比较安全。中国鲎对其他消毒剂耐受性也比较高,如廖永岩等^[32]研究了高锰酸钾对中国鲎 1 龄幼体的急性毒性实验,得到 96 h 的半致死浓度为 377.973 mg/L,而梁华芳等^[42]研究了高锰酸钾对中国龙虾(*Panulirus stimpsoni*)的 24、48、72 和 96 h 的 LC_{50} 分别是 4.49、4.44、4.39 和 4.22 mg/L。鲍虞园等^[43]研究了 Hg^{2+} 对中国鲎幼体的急性毒性效应及安全浓度,发现 Hg^{2+} 对中国鲎幼体的毒性类型为急性 II。可见中国鲎 1 龄幼体具有较强耐受特性,其具体机制有待进一步研究。

浓度过高的药物处理会对幼鲎造成危害。幼鲎会因为吸收过多的溴氯海因而导致鳃上有灰白色物质富集,与西杂鲟(♂*Acipenser baerii*×♀*Acipenser schrenckii*)幼鱼^[44]溴氯海因中毒后鱼体发白相似。本研究结果表明,溴氯海因浓度在 436.52 mg/L 及以下时,幼鲎均能存活,与对照组无显著差异。溴氯海因浓度高于 436.52 mg/L 时幼鲎存活率受到影响。在后续恢复过程中,当溴氯海因浓度高于 645.65 mg/L 时,幼鲎中毒不可逆,死亡率高。本研究通过实验确定了溴氯海因对中国鲎 1 龄幼体的安全浓度为 94.51 mg/L,在安全浓度范围内可以用于鲎卵孵化、幼鲎的培育等养殖环节。

安全浓度下溴氯海因对鲎卵和 1 龄幼鲎的实际消毒效果研究表明,在溴氯海因浓度为 30~90 mg/L 时,鲎卵孵化率显著提高,鲎卵和 1 龄幼鲎的死亡率(感染率)相较于对照组和低浓度组(10 mg/L)显著下降。因此确定 30~90 mg/L 的溴氯海因浓度为中国鲎卵和幼体消毒的安全有效消毒

浓度。从安全用药和防止滥用角度,建议溴氯海因在蜆卵孵化阶段的使用浓度为 30~60 mg/L,具体浓度可视蜆卵的感染情况而定,感染情况不严重时,可使用较低浓度消毒。孵化期间每两天消毒一次,浓度 30 mg/L;出现感染个体时及时挑出并换水,然后每天消毒换水,溴氯海因浓度提高到 60 mg/L。此外,在实际生产中,不同环境条件下渔药的毒性有所差异,用药时长和动物的体质差异等因素也可导致使用效果与预期不符^[45],因此在养殖过程中,应密切观察蜆卵和幼蜆的状态,根据具体情况合理调整溴氯海因浓度,合理用药。而且,消毒剂的混用是处理多种细菌、真菌感染病症比较有效的措施^[46],后续将结合各种消毒方式如淡水浴等,进一步研究不同消毒剂如高锰酸钾、聚维酮碘等常用水产消毒剂与溴氯海因混用对中国蜆蜆卵孵化和幼体培育的效果。

参考文献:

- [1] Weng Z H, Xie Y J, Xiao Z Q, et al. Distribution and resource of Chinese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) in Fujian and other coast water of China[J]. Chinese Journal of Zoology, 2012, 47(3): 40-48. [翁朝红, 谢仰杰, 肖志群, 等. 福建及中国其他沿岸海域中国蜆资源分布现状调查[J]. 动物学杂志, 2012, 47(3): 40-48]
- [2] Liao Y Y, Hong S G. Artificial insemination and artificial incubation of *Tachypleus tridentatus*[J]. Fisheries College of Zhanjiang Ocean University, 1997, 17(2): 23-26. [廖永岩, 洪水根. 中国蜆(*Tachypleus tridentatus*)人工授精育苗的初步研究[J]. 湛江海洋大学学报, 1997, 17(2): 23-26.]
- [3] Liang G Y. The research of artificial incubation of Chinese horseshoe crab[J]. Marine Sciences, 1987, (1): 40-47. [梁广耀. 中国蜆人工育苗的初步研究[J]. 海洋科学, 1987, (1): 40-47.]
- [4] Xie Y. Study on industrial seedling raising of Chinese horseshoe crab and its key ecology and tetrodotoxin[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University. [谢叶. 中国蜆工厂化育苗及关键生态与蜆河豚毒素研究[D]. 湛江: 广东海洋大学.]
- [5] Bao Y Y, Ye G L, Xie X Y. Effects of morphological characters on body weight of artificially bred the first instars of horseshoe crabs (*Tachypleus tridentatus*)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(4): 77-84. [鲍虞园, 叶国玲, 颜晓勇. 中国蜆人工繁育及 1 龄稚蜆形态性状对体质量的影响[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(4): 77-84.]
- [6] Faizul M I M, Eng H T, Christianus A, et al. Bacteria and fungi identified on horseshoe crabs, *Tachypleus gigas* and *Carcinoscorpius rotundicauda* in the laboratory[M]//Carmichael R, Botton M, Shin P, et al. Changing Global Perspectives on Horseshoe Crab Biology, Conservation and Management. Cham: Springer, 2015: 303-311.
- [7] Nolan M W, Smith S A. Clinical evaluation, common diseases, and veterinary care of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*[M]//Tanacredi J, Botton M, Smith D. Biology and Conservation of Horseshoe Crabs. Boston, MA: Springer, 2009: 479-499.
- [8] Smith S A, Berkson J. Laboratory culture and maintenance of the horseshoe crab (*Limulus polyphemus*)[J]. Lab Animal, 2005, 34(7): 27-34.
- [9] Xu P, Bai H W, Xie X Y, et al. Tri-spine horseshoe crab aquaculture, ranching and stock enhancement: Perspectives and challenges[J]. Frontiers in Marine Science, 2021, 8: 608155.
- [10] Chen S L, Xie G W. Research and application of bromine-containing disinfectants[J]. Chinese Journal of Disinfection, 2013, 30(9): 857-860. [陈素良, 谢国伟. 含溴消毒剂的研究与应用[J]. 中国消毒学杂志, 2013, 30(9): 857-860.]
- [11] Richardson S D, Plewa M J, Wagner E D, et al. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research[J]. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2007, 636(1-3): 178-242.
- [12] Chen Z, Li W P, Hu F X, et al. Acute toxic effects of four common disinfectants on *Ruditapes philippinarum*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2021, 60(6): 95-99. [陈志, 李伟鹏, 胡丰晓, 等. 四种消毒剂对菲律宾蛤仔的急性毒性研究[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(6): 95-99]
- [13] Li W F, Wei J F, Jin H T, et al. Study of the toxicity of 1-bromo-3-chloro-5, 5-dimethylhydantoin to zebrafish[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2011, 24(4): 383-390.
- [14] McDonald D, Price M N, Goodrich J, et al. An improved greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea[J]. The ISME Journal, 2012, 6(3): 610-618.
- [15] Xu Y, Yang Y J, Ge J C, et al. Acute Toxicity of Povidone-iodine (PVP-I) to the juvenile crab *Eriocheir sinensis* analyzed with probability regression method[J]. Hebei Fisheries, 2017(1): 2-6. [徐宇, 杨鸢劫, 葛家春, 等. 聚维酮碘对中华绒螯蟹幼体急性毒性实验和概率回归分析[J]. 河北渔业, 2017(1): 2-6.]
- [16] Zhou Y X, Zhang Z S. Test Methods for Toxicity of Aquatic Organisms[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1989. [周

- 永欣, 章宗涉. 水生生物毒性试验方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1989.]
- [17] Guo Q Y, Gu Y G, Bao Y Y, et al. Dietary composition and trophic position of *Tachypleus tridentatus*[J]. South China Fisheries Science, 2021, 17(4): 35-40. [郭清扬, 谷阳光, 鲍虞园, 等. 中华鲎的食物组成及营养位置分析[J]. 南方水产科学, 2021, 17(4): 35-40.]
- [18] Ying Z W, Bao Y Y, Li Y K, et al. Impact of different diets on adult tri-spine horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*[J]. Journal of Ocean University of China, 2022, 21(3): 541-548.
- [19] Xu Z, Wang Y J, Gul Y, et al. Effects of copper supplement on the immune function and blood-chemistry in adult Chinese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*[J]. Aquaculture, 2020, 515: 734576.
- [20] Ying Z W, Li Y K, Xie X Y. Behavior preference of juvenile *Tachypleus tridentatus* on different substrates[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2022, 53(5): 1242-1249. [中华鲎(*Tachypleus tridentatus*)稚鲎对不同比例泥沙类型选择行为特征[J]. 海洋与湖沼, 2022, 53(5): 1242-1249.]
- [21] Chen Y, Lau C W, Cheung S G, et al. Enhanced growth of juvenile *Tachypleus tridentatus* (Chelicerata: Xiphosura) in the laboratory: A step towards population restocking for conservation of the species[J]. Aquatic Biology, 2010, 11(1): 37-46.
- [22] Liao Y Y, Liu J X, Lei J, et al. Improve spawning pond of Chinese king crab embryonated egg survival rate: CN2051-24730U[P]. 2016-04-06. [廖永岩, 刘金霞, 雷娟, 等. 一种提高中国鲎受精卵存活率的产卵池: CN205124730U[P]. 2016-04-06.]
- [23] Xu Y F. Preparation of yolk antibody against main spoilage bacteria in *Paralichthys olivaceus* and its antibacterial activity[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011. [胥亚夫. 冷藏牙鲆中主要腐败菌卵黄抗体的制备及其抑菌性能研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.]
- [24] Qin L, Zhang X J, Bi K R. A new pathogen of gibel carp *Carassius auratus gibelio*-*Shewanella putrefaciens*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(5): 558-565. [秦蕾, 张晓君, 毕可然. 一种新的异育银鲫病原——腐败希瓦氏菌[J]. 微生物学报, 2012, 52(5): 558-565.]
- [25] Liu Q, Wang J, Liu T S, et al. 16S rRNA identification of *Shewanella putrefaciens* from the *Hypophthalmichthys molitrix* [J]. Journal of Aquaculture, 2021, 42(8): 21-25. [刘群, 王菁, 刘桐山, 等. 鲢腐败希瓦氏菌株的 16S rRNA 鉴定[J]. 水产养殖, 2021, 42(8): 21-25.]
- [26] Lin X J, Gao L, Yu Z C, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Shewanella colwelliana*, a pathogen of Yesso scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2022, 37(6): 933-940. [林雪洁, 高磊, 于子超, 等. 一株虾夷扇贝病原——科氏希瓦氏菌的分离鉴定及其致病性[J]. 大连海洋大学学报, 2022, 37(6): 933-940.]
- [27] Yi C, Zhang Y J, Long J M, et al. Effect of compost starter on microbial community composition of fermented pig manure[J]. Journal of Hunan Ecological Science, 2022, 9(2): 62-69. [易诚, 张叶瑾, 龙九妹, 等. 堆肥发酵剂对发酵猪粪微生物群落组成影响[J]. 湖南生态科学学报, 2022, 9(2): 62-69.]
- [28] Kawaroe M, Setyaningsih D, Negara B F S, et al. Potential marine fungi *Hypocreaceae* sp. as agarase enzyme to hydrolyze macroalgae *Gelidium latifolium*[J]. ILMU KELAUTAN: Indonesian Journal of Marine Sciences, 2015, 20(1): 45.
- [29] Mirza Alizadeh A, Mousavi Khaneghah A, Hosseini H. Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in aquaculture and seafood: A review and new perspective[J]. Toxin Reviews, 2022, 41(3): 1058-1065.
- [30] Liu P. Prevention and control of aspergillosis in waterfowl[J]. Poultry Husbandry and Disease Control, 2015(3): 35-36. [刘鹏. 水禽曲霉菌病的防治[J]. 养禽与禽病防治, 2015(3): 35-36.]
- [31] Shinn A P, Mühlhölzl A P, Coates C J, et al. Zoothamnium duplicatum infestation of cultured horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*)[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2015, 125: 81-86.
- [32] Liao Y Y, Liu J X, Guan J Y, et al. Method for increasing survival rate of larvae of *Tochypleus tridentatus* by controlling concentration of potassium permanganate: CN10749-4339A[P]. 2017-12-22. [廖永岩, 刘金霞, 关杰耀, 等. 一种通过控制高锰酸钾浓度提高中国鲎幼体存活率的方法: CN107494339A[P]. 2017-12-22.]
- [33] Liao Y Y, Guan J Y, Fang H Y, et al. Method for improving survival rate and hatching rate of *Tachypleus tridentatus* embryos by controlling chlorine dioxide concentration: CN107455299A[P]. 2017-12-12. [廖永岩, 关杰耀, 方怀义, 等. 通过控制二氧化氯浓度提高中国鲎胚胎存活率和孵化率的方法: CN107455299A[P]. 2017-12-12.]
- [34] Liao Y Y, Liu J X, Fang H Y, et al. Method for increasing survival rate of *Tachypleus tridentatus* larvae by controlling concentration of trichlorfon: CN107509665A[P]. 2017-12-26. [廖永岩, 刘金霞, 方怀义, 等. 一种通过控制敌百虫浓度提高中国鲎幼体存活率的方法: CN107509665A[P]. 2017-12-26.]
- [35] Liao Y Y, Wang P L, Guan J Y, et al. Method for increasing survival rate of larvae of *Tachypleus tridentatus* leaches by controlling concentration of cyhalothrin: CN107517905A[P].

- 2017-12-29. [廖永岩, 王鹏良, 关杰耀, 等. 一种通过控制氯氟氰菊酯浓度提高中国鲎幼体存活率的方法: CN107517905A[P]. 2017-12-29.]
- [36] Gong L J, Fu G B, Yang L S, et al. Technology for the use of 1-bromo-3-chloro-5, 5-dimethylhydantoin in aquatic products[J]. Fishery Guide to be Rich, 2007 (13): 52-53. [龚珞军, 付国斌, 杨兰松. 水产用溴氯海因的使用技术[J]. 渔业致富指南, 2007(13): 52-53.]
- [37] Carter R A A, Allard S, Croué J P, et al. Occurrence of disinfection by-products in swimming pools and the estimated resulting cytotoxicity[J]. Science of the Total Environment, 2019, 664: 851-864.
- [38] Li T, Wang T, Liu W, et al. Research progress in the active bromine biocides[J]. Industrial Water Treatment, 2019, 39(3): 1-5. [李涛, 王涛, 刘伟, 等. 活性溴杀菌剂的研究进展[J]. 工业水处理, 2019, 39(3): 1-5.]
- [39] Wen G, Tan L L, Cao R H, et al. Inactivation of waterborne fungal spores by 1-bromo-3-chloro-5, 5-dimethylhydantoin: Kinetics, influencing factors and mechanisms[J]. Chemosphere, 2021, 274: 129764.
- [40] Peng F, Xu B P, Shi W D, et al. Acute toxicity of bromochlorohydantoin to *Macrobrachium rosenbergii* larvae[J]. Scientific Fish Farming, 2021(1): 53-54. [彭菲, 徐宾朋, 施伟达, 等. 溴氯海因对罗氏沼虾幼体的急性毒性研究[J]. 科学养鱼, 2021(1): 53-54.]
- [41] Li F, Guo J L, Zhang Y F, et al. Study on the toxicity of four common aquaculture drugs on *Macrobrachium nipponense* postlarvae[J]. Journal of Biology, 2013, 30(6): 62-65. [李飞, 郭建林, 张宇飞, 等. 4种常用水产药物对青虾幼虾的毒性研究[J]. 生物学杂志, 2013, 30(6): 62-65.]
- [42] Liang H F, Du G P, Luo K L. Acute toxicity tests of three chemical disinfectants on *Panulirus stimpsoni*[J]. Journal of Aquaculture, 2011, 32(7): 1-4. [梁华芳, 杜国平, 罗开练. 3种消毒剂对中国龙虾的急性毒性试验[J]. 水产养殖, 2011, 32(7): 1-4.]
- [43] Bao Y Y, Ye G L, Zhong J X, et al. Acute toxicity of $Hg^{(2+)}$ to and associated metallothionein induction in *Tachypleus tridentatus* larvae[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(6): 300-307. [鲍虞园, 叶国玲, 钟金香, 等. $Hg^{(2+)}$ 对中国鲎幼体急性毒性及MT的诱导效应[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(6): 300-307.]
- [44] Zeng Z G, Wen X, Fang Y, et al. Acute toxicity of four conventional aquatic chemicals on juvenile hybrid sturgeon[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2021, 48(1): 51-56. [曾泽国, 温旭, 方园, 等. 4种常用水产药物对西杂鲟幼鱼的急性毒性试验[J]. 水产科技情报, 2021, 48(1): 51-56.]
- [45] Li Y H, Wang M J, Ma B H, et al. Acute toxicity of three conventional aquatic chemicals on juvenile *Anabas testudineus*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2021, 48(2): 94-98. [李燕华, 王梦杰, 马本贺, 等. 3种常用渔药对攀鲈幼鱼的急性毒性试验[J]. 水产科技情报, 2021, 48(2): 94-98.]
- [46] Huai W, Deng Z R, Lin W S, et al. Enhanced killing of *Escherichia coli* using a combination of polyhexamethylene biguanide hydrochloride and 1-bromo-3-chloro-5, 5-dimethylimidazolidine-2, 4-dione[J]. FEMS Microbiology Letters, 2017, 364(21): fnx210.

Artificial breeding of *Tachypleus tridentatus* indoors and the identification and control of common pathogens for fertilized egg and larvae

ZHONG Yunmin, WENG Zhaohong, WANG Zhiting, LI Jiayi, XIE Yangjie

Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China

Abstract: Chinese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) belongs to the Arthropoda, Chelicerata, and Merostomata taxonomic groups and is, specifically, a member of the horseshoe crab family (Limuroidea). *Tachypleus* amoebocyte lysate (TAL) reagent, prepared from the hemolytic solution of *T. tridentatus*, can quickly coagulate into a colloid with bacteria; therefore, TAL is a conventional reagent for the detection of endotoxins.

Due to habitat destruction and overfishing, *T. tridentatus* has become an endangered marine animal, with its resources on the verge of depletion. Artificial breeding and release are important ways to increase its population in the wild. Artificial breeding of *T. tridentatus* has been conducted as early as the 1980 s. However, artificial breeding strategies involve killing horseshoe crabs to obtain eggs, with few reports on larval cultivation; therefore, this breeding process still lacks detailed technical standards and specifications. In recent years, artificial breeding has been adopted to promote natural spawning of broodstock horseshoe crabs under simulated wild conditions to reduce the damage to these rare broodstock crabs; however, their corresponding hatchability and survival rates are relatively low. With limited artificial space indoors, high-density culture leads to an extremely small living space for fertilized eggs and larvae; therefore, these eggs and larvae become susceptible to infection by various bacteria, fungi, viruses, parasites, and other pathogens. Therefore, to improve the hatchability rate of fertilized eggs and the survival rate of larvae for large-scale artificial breeding, it is necessary to address these issues.

In this study, nutrient fortification of the broodstock horseshoe crabs was initially conducted, followed by natural fertilization to obtain fertilized eggs for hatching. Then, the eggs infected with bacteria were collected to study the characteristics of different colored eggs. Next, 16 s rDNA and ITS sequencing technology were used to identify bacteria and fungi on the surface of *T. tridentatus* fertilized eggs, and the composition of these microbial communities was analyzed. Then, acute toxicity testing of the 1st instar larvae with BCDHM solution was conducted, and disinfection concentrations for fertilized eggs and larvae were determined according to the safe concentration range. The results demonstrated that a total of 16493 eggs were laid by the four pairs of horseshoe crabs, with an average fertilization rate of 66.25%, an average hatchability rate of 52.25%, a bacterial infection rate of 47.75%, and a mortality rate of 100% for fertilized eggs that were infected with pathogens; this resulted in the final production of 5704 1st instar larvae. Compared to previous breeding studies, more horseshoe crab eggs were harvested, which was attributed to the use of nutritional fortification in this study. Nonetheless, both fertilization and hatchability were low, which may be related to the poor physique of the broodstock horseshoe crab and the breeding environment. The dominant bacteria observed were *Shewanella*, *Neptuniibacter*, *Desulfobacter*, *Terasakiella*, and *Halarcobacter*, with relative abundances of 23.67%, 7.21%, 6.64%, 5.41%, and 5.16%, respectively. The dominant fungi included an unknown genus of Hypocreaceae and *Aspergillus* species, with relative abundances of 81.81% and 10.48%, respectively. The $LC_{(50-96\text{ h})}$ of BCDHM for the 1st instar larvae was 945.06 mg/L; consequently, the safe concentration (SC) was determined to be 94.51 mg/L. The 1st instar larvae were observed to possess strong tolerance, but the specific mechanism of this tolerance requires further evaluation. The optimal BCDHM concentration (SC) for egg hatching and breeding of 1st instar larvae was determined to be 30–90 mg/L, which could significantly increase the hatchability of fertilized eggs ($P<0.05$) and reduce the mortality rate of 1st instar larvae ($P<0.05$). A recommended concentration of BCDHM for the hatching of fertilized eggs is 30–60 mg/L, with a specific value within that range being determined according to the infection of fertilized eggs; additionally, lower BCDHM concentrations could be used for disinfection when infection is not severe. In this study, eggs were disinfected every two days during incubation at a concentration of 30 mg/L. When infected eggs were observed, they were picked out and changed in time; they were then disinfected with an increased BCDHM concentration of 60 mg/L and daily water changes. Overall, BCDHM can be used to effectively reduce the risk of fertilized eggs and larvae being infected by bacteria, fungi, and other microorganisms, ultimately providing daily disinfection during the artificial breeding of *T. tridentatus*.

Key words: *Tachypleus tridentatus*; artificial breeding; pathogen identification; BCDHM; fertilized egg; larva

Corresponding author: WENG Zhaohong. E-mail: wengzhaohong@jmu.edu.cn