

4 种常用消毒药物对棕点石斑鱼(♀)× 鞍带石斑鱼(♂)受精卵孵化的影响*

孔祥迪^{1,2} 陈超² 李炎璐² 贾瑞锦^{1,2} 于欢欢^{1,2}
胡鹏² 翟介明³ 马文辉³ 庞尊方³ 刘江春³

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 莱州明波水产有限公司 烟台 261418)

摘要 人工育苗中对受精卵进行消毒,可以很大程度上预防各种病原对受精卵的危害,防止病原体的垂直传播。但是,用化学药物消毒,总会对鱼的受精卵产生一定程度的毒害作用。因此,人工育苗中进行受精卵消毒时必须控制药物种类、药物浓度及消毒时间。本研究在(27.0±0.5)℃条件下,使用药物浸泡的方法,研究了 4 种常用水产消毒药物对珍珠龙胆石斑鱼受精卵[棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)]孵化效果的影响。聚维酮碘、甲醛和二氧化氯的处理时间均为 10 min,臭氧处理分 1 min、2 min 和 3 min 共 3 个梯度。使用 SPSS 17.0 软件对试验数据进行方差分析,结果表明,其受精卵的孵化率和畸形率与药物的浓度、处理时间呈负相关。甲醛和二氧化氯处理组与对照组的孵化率、畸形率差异显著;聚维酮碘处理组中 25 mg/L、50 mg/L 与 75 mg/L 各处理与对照组无差异,100 mg/L 处理出现显著差异;臭氧处理组,0.3 mg/L 处理中的各时间梯度间的孵化率和畸形率与对照组差异性不显著,0.5 mg/L、0.7 mg/L 及 1.0 mg/L 处理中各时间梯度间差异极显著,0.5 mg/L 处理 2 min 时,孵化率已极低,仅为 4.14%,畸形率为 50.00%。试验结果证明,在珍珠龙胆石斑鱼苗种生产中,其受精卵的适宜消毒药物、浓度范围及处理时间分别为:聚维酮碘 20–70 mg/L 处理 10 min,臭氧 0.3–0.5 mg/L 处理 1 min;二氧化氯、甲醛对受精卵刺激显著,而且对环境及人体有毒副作用,建议在生产中尽量不要使用。

关键词 棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂); 受精卵; 消毒剂; 孵化率; 畸形率

中图分类号 S948 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)05-0122-06

珍珠龙胆石斑鱼是以棕点石斑鱼(♀)与鞍带石斑鱼(♂)进行杂交培育的石斑鱼新品种,其肉质鲜嫩、生长快速、抗病力强,具有明显的杂交优势(符书源等, 2011)¹⁾。因其具有虎斑头、龙胆尾的外型,体侧花纹是两种亲本的杂合,也可作为观赏鱼;又因其具有较高的食用和观赏价值,养殖和消费前景非常广

阔。然而,珍珠龙胆石斑鱼作为杂交新品种,养殖历史短,苗种培育难度大,实现苗种规模化和养殖产业化难度较大。

石斑鱼亲本选育和鱼苗培育是制约其养殖发展的两大瓶颈,其中,育苗生产中细菌、霉菌及病毒等病原的侵袭,常会导致鱼苗大量死亡,最常见的为神

* 科技部国际合作项目(2012DFA30360)和国家科技支撑项目(2011BAD13B01)共同资助。孔祥迪, E-mail: xiangdikong@163.com

通讯作者: 陈超, 研究员, E-mail: ysfrichenchao@126.com

收稿日期: 2014-01-03, 收修改稿日期: 2014-03-20

1) 符书源, 王永波, 郑飞, 等. 珍珠龙胆石斑鱼室外水泥池大水体设施化人工育苗. 2011 年中国水产学会学术年会论文摘要集, 2011, 136

经性坏死症,一旦染病,死亡率高达 90%以上,严重制约石斑鱼种苗业的发展(林鑫等, 2005)。人工育苗中对受精卵进行消毒,可以在很大程度上阻断病原体的垂直传播途径。但是,化学药物消毒存在破坏受精卵渗透压、卵膜、卵质的危险,容易引发孵化率低,诱发围心腔和卵黄囊肿大、脊椎弯曲等畸形问题,因此进行其受精卵消毒处理时必须控制药物种类、药物浓度及消毒时间(吴建绍等, 2012)。

在常规生产中的受精卵消毒基础上,本研究采用聚维酮碘、甲醛、二氧化氯及臭氧等 4 种常用消毒剂对珍珠龙胆石斑鱼受精卵进行消毒,观察各种药物对受精卵孵化效果的不同影响,以期为宜消毒剂的选择及其剂量浓度、消毒时间等方面提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 受精卵的获取

实验于 2013 年 6 月山东省烟台市莱州明波水产有限公司进行。使用人绒毛膜促性腺激素(HCG)对亲鱼池中的亲鱼进行催产,剂量为 1000–2000 IU/kg,在背部肌肉一次性注射,雄鱼注射剂量为雌鱼的 1/2。48 h 后取成熟度较好的亲鱼,以雌雄 3:1 的比例获得精卵,进行人工授精。受精卵置于消过毒的塑料桶中,加入海水,5–10 min 后将上浮卵置于孵化桶中的圆柱形 80 目筛绢网中,水温 27–28℃、流水、微充气孵化。当胚胎发育至尾芽期,公司人员收集受精卵进行消毒、布池。根据企业的工作进度,此时取一定量的受精卵放入盐度为 35 的海水中,静置 5–10 min 后取上浮卵用于实验。

1.2 药物种类及消毒分组

聚维酮碘(浓度 10%,有效碘含量 10%,上海宇昂化工科技有限公司);甲醛(浓度 37%,宁安市兰华化工有限公司);二氧化氯消毒粉(有效氯 45%,哈尔滨市凯乐化学制品厂);臭氧发生器(广州启达臭氧设备有限公司)。试验前将药品配成一定浓度的母液,试验时根据试验要求配制成所需浓度的溶液,现配现用。臭氧发生器提前启动就绪,消毒时浓度由低向高依次调试。

根据企业的实际生产,结合已有的文献资料(吴建绍等, 2012; 陈超然等, 2001)和前期预实验的结果,设置各种药物浓度梯度(表 1)。聚维酮碘、甲醛和二氧化氯的处理时间为 10 min,臭氧组分为 1 min、2 min、3 min 共 3 个梯度。各组消毒处理后的受精卵迅速放入 1000 ml 烧杯中,每个烧杯 150 粒,每组 3

表 1 各消毒剂的浓度梯度
Tab.1 The concentration of each disinfectant

药物 Drug	浓度梯度 Concentration gradient (mg/L)			
	聚维酮碘 Povidone-iodine	25	50	75
甲醛 Formaldehyde	500	1000	1500	2000
二氧化氯 Chlorine dioxide	0.5	1.0	1.5	2.0
臭氧 Ozone	0.3	0.5	0.7	1.0

个平行,另设一组空白对照,智能恒温水浴,设定温度为 27℃。待孵出仔鱼后,统计各试验组的孵化情况(孵化数和脊椎弯曲、卵黄囊肿大等畸形仔鱼数)。

1.3 数据统计

孵化率=初孵仔鱼数/总卵数×100%

畸形率=畸形仔鱼数/孵化仔鱼总数×100%

实验结果为各组平均值。采用 SPSS 17.0 统计软件对孵化率、畸形率等实验数据进行方差分析和多重比较,统计值用字母标记平均值表示,相同字母间表示差异不显著,不同字母间表示差异显著。

2 结果与分析

实验前,莱州明波水产有限公司化验室对受精卵进行病毒检测,同时取同一批的少许受精卵,一部分在高倍显微镜下观察,一部分无菌干燥后匀浆,用无菌生理盐水稀释后,用画平板法涂布在培养基中,26℃培养 48 h,统计菌落数。结果均显示:该批受精卵质量较好,无明显病原感染。因此,本实验指标中不涉及消毒药物对病原的杀灭情况。

2.1 聚维酮碘对受精卵的孵化影响

珍珠龙胆石斑鱼受精卵经不同浓度的聚维酮碘溶液消毒处理 10 min,在孵化后,统计其孵化率和畸形率。结果发现,经聚维酮碘消毒后出现的畸形,其中很少一部分表现为脊椎弯曲、尾部未展开或弯曲,这与对照组中出现的畸形表现相一致,可能原因是人工操作时对卵的挤压、碰撞损害或先天遗传因素等造成的(Kowtal *et al*, 1985);另外的大部分畸形表现为卵黄囊和围心腔肿大(图 1)。

孵化率和畸形率的统计结果见表 2。由表 2 看出,随着聚维酮碘浓度增加,孵化率下降,畸形率升高;25 mg/L、50 mg/L 处理组的孵化率和畸形率与对照组相比差异性不显著;75 mg/L 与对照组相比,孵化率无差异,畸形率差异性显著;100 mg/L 与对照组相比,孵化率和畸形率均差异性显著。

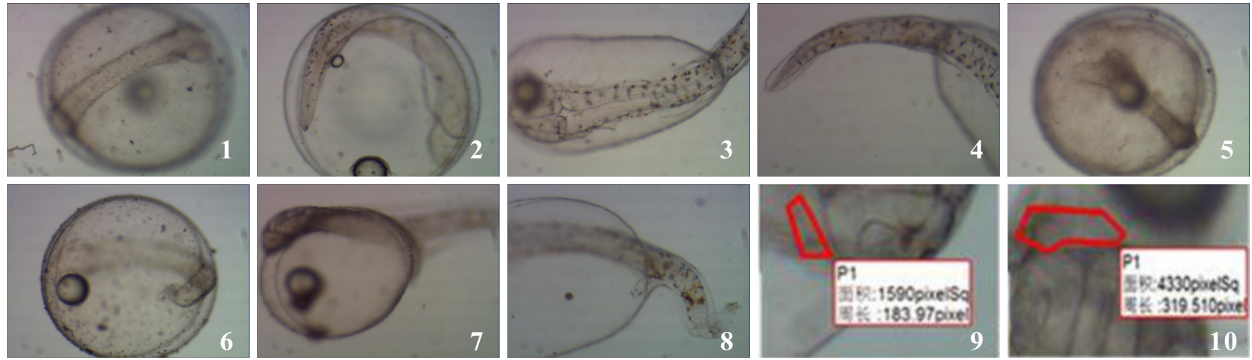


图 1 棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)正常与畸形的早期发育形态

Fig.1 Early normal and malformed developmental stage of *Epinephelus fuscoguttatus*(♀)×*E. lanceolatus*(♂)

1. 正常肌节期胚胎；2. 正常出膜前胚胎；3. 正常卵黄囊；4. 正常仔鱼脊椎；5. 胚胎发育畸形；6. 尾部扭曲；7. 卵黄囊肿大；8. 尾椎呈 S 型弯曲；9. 正常心脏；10. 心脏肿大
 1. Normal muscle burl stage; 2. Normal hatching embryo; 3. Normal yolk sac is; 4. Normal spine; 5. Deformed embryo body; 6. Caudal bending; 7. Enlarged yolk sac; 8. S-shaped curved spine; 9. Normal heart; 10. Enlarged heart

表 2 聚维酮碘的消毒效果
 Tab.2 Effects of povidone-iodine on disinfection

药物 Drug	消毒时间 Disinfection time (min)	药物浓度 Drug concentration (mg/L)	孵化率 Hatching rate (%)	畸形率 Abnormality rate (%)
对照组 Control	—	—	92.90±2.38 ^A	6.25±5.78 ^D
聚维酮碘 Povidone-iodine	10	25	91.72±3.64 ^A	7.27±1.32 ^{CD}
	10	50	89.80±1.72 ^A	8.56±1.21 ^{CD}
	10	75	86.42±1.53 ^{AB}	11.82±5.12 ^B
	10	100	80.26±0.86 ^B	15.57±3.95 ^A

注：不同浓度的各处理组与对照组多重比较，差异性用字母表示(P=0.05)

Note: Each experimental group was compared with the control, and the significant difference represented by the different letters (P=0.05)

2.2 甲醛和二氧化氯对受精卵的孵化影响

甲醛和二氧化氯两种消毒剂的消毒时间均为 10 min，

初孵仔鱼出现的畸形多为卵黄囊或围心腔肿大(图 1)，孵化率和畸形率的统计结果见表 3。结果显示，随着两种药物浓度的增加，孵化率均显著降低，畸形率均

表 3 甲醛和二氧化氯的消毒效果
 Tab.3 Effects of formaldehyde and chlorine dioxide disinfection

药物 Drug	消毒时间 Disinfection time(min)	药物浓度 Drug concentration(mg/L)	孵化率 Hatching rate(%)	畸形率 Abnormality rate(%)
对照组 Control	—	—	92.90±1.93 ^A	6.25±8.58 ^E
甲醛 Formaldehyde	10	500	90.38±1.99 ^A	13.49±3.48 ^D
	10	1000	85.03±2.12 ^B	17.60±2.96 ^C
	10	1500	75.00±3.56 ^C	25.40±4.68 ^B
	10	2000	64.23±2.35 ^D	32.91±4.55 ^A
二氧化氯 Chlorine dioxide	10	0.5	80.41±4.43 ^B	13.45±4.54 ^D
	10	1.0	72.22±3.45 ^C	16.24±8.84 ^C
	10	1.5	68.42±2.43 ^D	21.15±3.45 ^B
	10	2.0	58.00±1.24 ^E	34.48±5.23 ^A

注：甲醛和二氧化氯组分别与对照组多重比较，差异性用字母表示(P=0.05)

Note: Chlorine dioxide group and formaldehyde group were compared with the control, and the significant difference was represented by the different letters (P=0.05)

显著增加,除甲醛组 500 mg/L 处理的孵化率与对照组无差异外,其他各处理的孵化率和畸形率与对照组相比均差异性极显著,其中甲醛组的 2000 mg/L 处理和二氧化氯组的 2.0 mg/L 处理,孵化率分别为 64.23% 和 58.00%,畸形率分别为 32.91%和 34.48%,孵化效果非常差。

2.3 臭氧对受精卵的孵化影响

臭氧消毒后仔鱼畸形的表现情况与其他 3 种消毒剂基本相同,大部分为卵黄囊或围心腔肿大(图 1)。

孵化率和畸形率的统计结果见表 4。从表 4 看出,臭氧浓度、消毒时间与孵化率呈负相关,与仔鱼畸形率呈正相关;0.3 mg/L 的各时间处理组、0.5 mg/L 的 1 min 处理组和 0.7 mg/L 的 1 min 处理组的孵化率与对照组无显著差异,0.5 mg/L 的 2 min 处理组及 1.0 mg/L 的 1 min 处理组的孵化率都很低,分别为 4.14%和 10.42%;0.3 mg/L 的各时间处理组与 0.5 mg/L 的 1 min 处理组的畸形率与对照组差异不显著,0.5 mg/L 的 2 min 处理组及 1.0 mg/L 的 1 min 处理组的畸形率分别为 50.00%和 53.23%,与对照组差异极显著。

表 4 臭氧的消毒效果
Tab.4 Effects of ozone on disinfection

药物 Drug	消毒时间 Disinfection time (min)	药物浓度 Drug concentration (mg/L)	孵化率 Hatching rate (%)	畸形率 Abnormality rate (%)
对照组 Control	—	—	92.90±0.45 ^A	6.25±8.55 ^D
臭氧 Ozone	1	0.3	91.61±1.25 ^A	7.63±4.66 ^D
	2		89.86±2.14 ^A	9.77±8.18 ^D
	3		88.82±1.76 ^A	12.59±5.55 ^{CD}
	1	0.5	89.09±3.83 ^A	8.84±3.17 ^D
	2		4.14±8.88 ^C	50.00±6.57 ^A
	3		0.00±0.00 ^E	—
	1	0.7	86.14±2.76 ^A	20.28±6.68 ^B
	2		0.66±6.56 ^D	—
	3		0.00±0.00 ^E	—
	1	1.0	10.42±3.36 ^B	53.23±3.09 ^A
	2		0.00±0.00 ^E	—
	3		0.00±0.00 ^E	—

注:不同浓度的各处理组与对照组多重比较,差异性用字母表示($P < 0.05$)

Note: Each experimental group was compared with the control, and the significant difference represented by the different letters ($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 试验药物选择

受精卵的孵化率和仔鱼的畸形率是评价孵化效果的常用指标。人工育苗中对受精卵进行消毒,可以很大程度上预防各种病原对受精卵的危害,防止病原体的垂直传播。但是,化学药物消毒存在着破坏鱼类受精卵的渗透压、卵膜、卵质,诱发其孵化率低、围心腔和卵黄囊肿大等畸形问题(吴建绍等,2012),因此进行鱼类受精卵消毒处理必须控制药物种类、药物质量和浓度以及消毒时间。

聚维酮碘、甲醛、二氧化氯和臭氧等作为常用的消毒药物已在水产养殖中得到广泛使用。研究表明,浓度适宜的聚维酮碘和甲醛处理斜带石斑鱼受精卵,

其孵化效果明显优于二溴海因、次氯酸钠等其他 4 种化学药物(吴建绍等,2012);稳定性粉状二氧化氯(ClO_2)溶液分别浸泡草鱼、鲢和鳙等 3 种鱼类的受精卵,对受精卵上附着菌具有明显的清除作用(陈超然等,2002);臭氧水处理斑点叉尾鲷的受精卵和幼苗,可有效杀灭细菌,提高成活率(李宝华等,2000)。

鱼类因种类的不同,其受精卵的生态生理和对消毒剂的耐受力也不同,对外部环境的忍耐力会有很大差异。珍珠龙胆石斑鱼作为杂交新品种,研究相对粗浅,对其受精卵消毒中药物浓度、消毒时间的确定主要是依据生产育苗工作人员的经验,结合考虑药物的价格 and 安全性来设定不同梯度的药物浓度和消毒时间。如何做到有效用药、合理用药,将是今后的研究课题。

3.2 珍珠龙胆石斑鱼受精卵消毒剂的选择

用化学药物消毒总会对鱼的受精卵产生一定程度的毒害作用,其中,畸形的表现与对照组不同,大多为卵黄囊和围心腔的肿大,分析原因可能是化学药物破坏了受精卵的渗透压、卵膜、卵质造成的(穆景利等,2012)。与对照组相比,4种化学药物消毒都呈现孵化率降低、畸形率升高的趋势,这与9种药物对斜带石斑鱼受精卵孵化率的影响(吴建绍等,2012)和几种消毒剂对中国对虾受精卵和无节幼体的影响(潘鲁青,1997)的研究结果相一致。但是,孟思妤等(2011a、b)的“菌毒消”消毒对鱼类受精卵孵化率的影响研究显示,“菌毒消”能够提高实验鱼的孵化率,降低畸形率,除菌效果明显,这与本研究结果不同。本研究所用受精卵为无明显病原感染的优质卵,而细菌、病毒等病原对卵的孵化率、畸形率也会有很大影响,本试验未研究对感染病原的受精卵消毒后其孵化效果的变化,因此,对感染病原的珍珠龙胆石斑鱼受精卵进行药物消毒,研究对其孵化效果的影响,可进一步加强珍珠龙胆石斑鱼受精卵消毒环节的科学指导。

本研究中,甲醛和二氧化氯处理珍珠龙胆石斑鱼受精卵对其孵化效果的影响变化幅度较大,其孵化率、畸形率均与对照组差异显著。陈超然等(2002)采用10 mg/L以内浓度的二氧化氯对草鱼、鲢和鳙的受精卵消毒,孵化率和畸形率都没有显著变化,与本试验结果相差较大,可能因试剂有效氯含量不同。

甲醛对人体有致癌性,残留易危害人畜及水产动物、污染水体,故不建议使用上述两种药物对珍珠龙胆石斑鱼受精卵进行消毒。

聚维酮碘的处理效果较为稳定,25 mg/L、50 mg/L、75 mg/L处理组的孵化率都较高,与对照组也无显著差异,畸形率也不高,分别为7.27%、8.56%和11.82%,而且聚维酮碘低毒、高效,对细菌、真菌、病毒等病原均有良好杀灭效果,用后极易降解,因此,育苗生产中建议使用含量10%聚维酮碘20~70 mg/L浓度消毒10 min。

臭氧对细菌、霉菌有强烈杀灭作用,由此,在国内石斑鱼苗种繁育生产的企业使用臭氧对受精卵消毒的越来越多,但时常发生孵化率低、仔鱼活力状况不佳等不良现象。因此,本研究在常规生产中使用臭氧的基础上,对浓度和时间两个因素设计了不同梯度。试验结果显示,0.3 mg/L的各时间处理组和0.5 mg/L的1 min处理组的孵化率和畸形率均无显著差异,0.5 mg/L处理2 min时,孵化率已极低,仅为4.14%,畸形率为50.00%,因此,使用臭氧消毒只可选择0.3~0.5 mg/L范围消毒1 min。

参 考 文 献

- 李宝华,孙晓旺,杨建军,等. 臭氧水对斑点叉尾鲷(*Lctalurus punctatus*)受精卵孵化、幼苗培育的影响实验. 天津水产, 2000(1): 15-17
- 吴建绍,林克冰,何丽斌,等. 九种药物对斜带石斑鱼受精卵孵化率的影响. 水产科学, 2012, 31(12): 697-702
- 陈超然,孟长明,陈昌福. 稳定性粉状二氧化氯对鱼类受精卵上附着菌的清除作用. 华中农业大学学报, 2001, 20(6): 568-570
- 林彬,黄宗文,骆剑,等. 棕点石斑鱼胚胎发育的观察. 海南师范大学学报(自然科学版), 2010, 23(1): 87-92
- 林鑫,黄剑南,翁少萍,等. 赤点石斑鱼病毒性神经坏死症的组织病理和电镜观察. 水产学报, 2005, 29(4): 519-523
- 孟思妤,孟长明,陈昌福. “菌毒消”对鱼类受精卵上附着菌的清除作用. 渔业致富指南, 2011a(18): 75-76
- 孟思妤,孟长明,陈昌福. “菌毒消”消毒剂对鱼类受精卵孵化率的影响. 渔业致富指南, 2011b(19): 78-79
- 徐关金. 竹醋液对花鲈胚胎及仔鱼存活率的影响. 宁波大学学报, 2001, 10(4): 1-7
- 潘鲁青. 几种消毒剂对中国对虾受精卵和无节幼体的影响研究. 海洋科学, 1997, 22(1): 7-9
- 穆景利,王新红,靳非,等. 菲、芘、苯并(a)芘单一暴露及分别与 α -萘黄酮(ANF)联合暴露对海水青鳉(*Oryzias melastigma*)胚胎发育毒性效应的比较研究. 海洋学报, 2012, 34(6): 142-150
- Kowtal GV, Gupta SD. A note on the hybrid mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) \times common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) (Cyprinidae). Aquaculture, 1985, 49(2): 179-183

(编辑 冯小花)

Effects of Four Commonly-Used Disinfectants on the Hatching of Fertilized Eggs of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀)×*E. lanceolatus* (♂)

KONG Xiangdi^{1,2}, CHEN Chao², LI Yanlu², JIA Ruijin^{1,2}, YU Huanhuan^{1,2}, HU Peng²
ZHAI Jieming³, MA Wenhui³, PANG Zun-fang³, LIU Jiangchun³

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laizhou Mingbo Fisheries Limited Company, Yantai 261418)

Abstract Disinfection of fertilized egg may prevent many pathogens and their vertical transmission; however, the toxic effects of disinfectants also exist. Therefore, it is important to control the type of disinfectants, their concentrations, and disinfection time. The current study investigated four commonly-used disinfectants on the hatching effects of *Epinephelus fuscoguttatus*(♀) × *E. lanceolatus*(♂) by bath method at (27±0.5)°C. Povidone-iodine, formaldehyde and chlorine dioxide treated for 10 min while Ozone treated for 1, 2 and 3 minutes respectively. The results indicated that the fertilized egg hatching and malformation rate were negatively associated with the concentrations of disinfectants and disinfection time. Formaldehyde and chlorine dioxide remarkably affected the hatching and malformation rate compared to those in the control group. Povidone-iodine had no effects on the hatching and malformation rate at 25 mg/L, 50 mg/L and 75 mg/L, but had significant effects at 100 mg/L. Ozone did not affect the hatching ability and malformations at 0.3 mg/L compared to the control group at all time points; and it had various influences at 0.5 mg/L, 0.7 mg/L and 1.0 mg/L of each time point. The hatching rate was extremely low (4.14%) and the deformity rate was 50.00% at 0.5 mg/L with 2-minute infection. These results suggest that the best condition for disinfection is as follows: povidone-iodine, 20–70 mg/L for 10 min; ozone, 0.3–0.5 mg/L for 1 min. Chlorine dioxide and formaldehyde are not recommended because of the side effects to the environment and humans.

Key words *Epinephelus fuscoguttatus*(♀)×*E. lanceolatus*(♂); Fertilized egg; Disinfectant; Hatching rate; Malformation rate