

## 第五部分

# 育苗场的运作：幼虫培育基本方法, 摄食和营养, 影响生长和存活的因子, 以及附着和变态

<b>5.1 基本方法</b> .....	77
5.1.1 概述 .....	77
5.1.2 胚胎和胚胎的培育 .....	78
5.1.2.1 胚胎和幼虫的培养池 .....	78
5.1.2.2 水处理 .....	78
5.1.2.3 胚胎的培育 .....	79
5.1.3 幼虫培育方法 .....	85
5.1.3.1 幼虫培育前准备 .....	86
5.1.3.2 幼虫培育管理 .....	87
5.1.4 幼虫高效培养 .....	89
5.1.4.1 高密度培养 .....	90
5.1.4.2 流水培养 .....	91
5.1.5 幼虫生长和存活 .....	92
<b>5.2 摄食和营养</b> .....	94
5.2.1 概述 .....	94
5.2.2 饵料的重要性 .....	95
5.2.3 饵料的组成和投放量 .....	96
5.2.3.1 投饵方法 .....	99
5.2.3.2 投饵量计算 .....	100
<b>5.3 影响生长和存活的因素</b> .....	102
5.3.1 概述 .....	102
5.3.2 温度和盐度的影响 .....	102
5.3.3 海水水质 .....	104
5.3.4 卵和幼虫质量 .....	107
5.3.5 病害 .....	110
<b>5.4 附着和变态</b> .....	111
5.4.1 概述 .....	111
5.4.2 幼虫的成熟 .....	112
5.4.3 幼虫的变态 .....	113
5.4.3.1 幼虫变态的诱导 .....	113
5.4.3.2 适宜附着基质 .....	113
<b>5.5 参考文献</b> .....	118

## 5.1 基本方法

### 5.1.1 概述

双壳贝类的孵育过程是一项专业技术。也就是说, 比起养殖场地、规模、场房和仪器设备来说, 管理者和技术人员的工作经验技能和直觉的“感悟”对育苗工作的成功显

得更为重要。各个育苗场的管理方式有所不同,培养过程中的各个细节和具体的操作也都存在着细微差异,所以育苗没有一个标准的方法可以遵循,但有一个共同点,就是必须根据不同的双壳贝类早期发育阶段的特点来满足其生物学的需要。

本章综合了常见的主要养殖种类从受精卵到附着的全过程中培育幼虫的各种操作方法。

## 5.1.2 胚胎和幼虫的培育

### 5.1.2.1 胚胎和幼虫的培养池

受精卵可以在不同类型的水槽或水池中发育到具有完整“D”型外壳的面盘幼虫(图50 - 52)。这个早期阶段因幼虫壳瓣呈“D”型(图51)而被叫做D形幼虫。人工养殖的不同的经济双壳类的D形幼虫在外形上极为相似。

培育双壳类的胚胎和幼虫可以在不同形状和不同材质的容器中进行。从形状上说有圆的和半方形(圆角方形)的(图52)。材质可以是(新的或回收的)聚乙烯或玻璃钢(或者玻璃强化塑料或玻璃钢)。未使用过的容器在使用前应该装满海水浸泡2 - 4个月,每周换一次水。浸泡可以去除从新塑料表面溶出的对幼虫有害的有毒物质。新的玻璃钢容器可以用蒸汽处理,这样做可大大缩短浸泡时间。

幼虫孵化通常采用平底桶或者是截头平底锥形桶,其壁陡峭而渐细(图52)。浅而细的圆锥形桶(如同冰激凌蛋卷)不太适合,因为胚胎在发育早期时静止不动,容易聚集于锥形桶底部。



图50: 不同种类的受精卵在不同水温条件下,在盛有过滤海水的不同类型水桶和水槽中孵化2-3天。

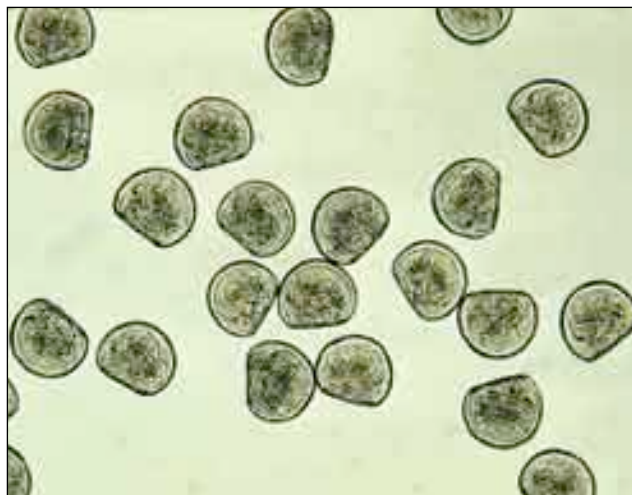
桶的底面积比水的深度更重要。通气所产生的机械振动会导致幼虫畸形发育,所以孵化早期一般不通气。

### 5.1.2.2 水处理

培育胚胎和幼虫用的海水都是通过1 - 2微米的微孔过滤器(图53A)过滤的海水,加热到所需的温度(通常18 - 24°C;冷水种需要的温度较低)。某些育苗场将海水充分过滤后还要经过紫外线照射进行灭菌(图53B),该处理方法还是存在疑问的,使用方法要得当,使用时要审慎。

紫外线剂量要根据生产厂家的说明介绍和灯管最大使用时限保持一致。当灯管达到规定的时限后必须更换,在使用期内,用来隔离海水与灯管接触的石英外壳需要经常用酒

精棉擦干净。还要说明的一点是,紫外线灯设计的剂量大小是依据淡水消毒用的,对海水进行消毒时,同样的剂量对海洋细菌和其他的微生物的效果就不一样。



**图51:** 太平洋牡蛎 D形幼虫(受精后48小时)显微照片(壳长平均75微米)。



**图52:** 胚胎(和幼虫)培育容器。(A) 200升下排水陡壁圆柱形玻璃钢桶; (B) 125升聚乙烯平底桶; (C) 1000升隔热聚乙烯圆角方形桶。

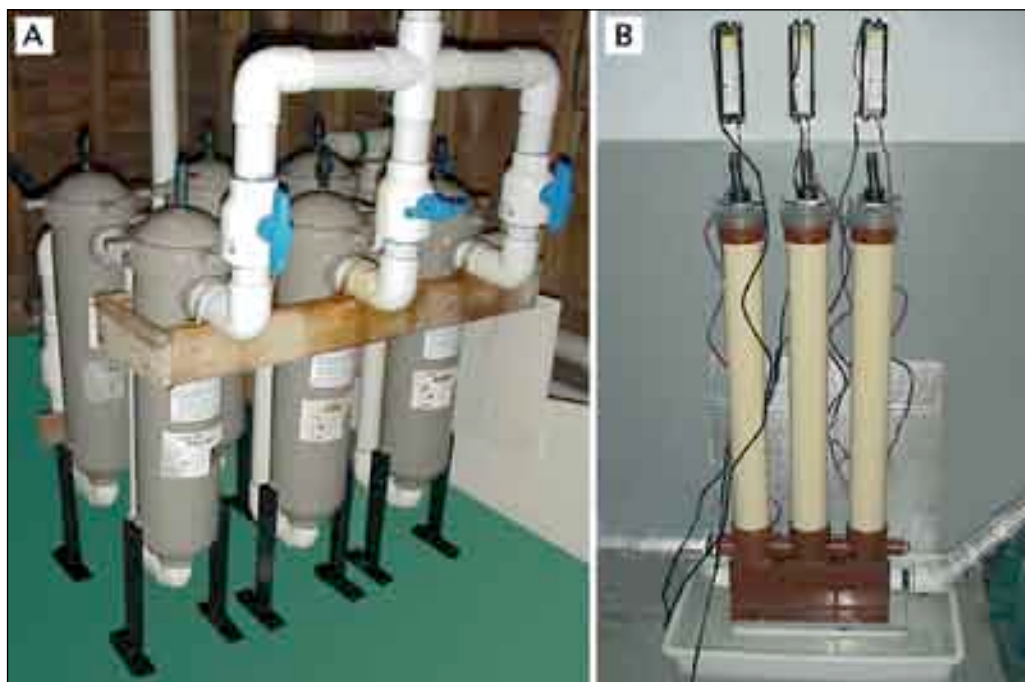
如果必须进行紫外线消毒的话,最好连续通过2-3个紫外线灯管(图53),通过单支灯管的水流量可以是推荐流量的一半。另外有一点需要记住,在胚胎和幼体培养过程中,当细菌的多样性被抑制后,有时会使得有害菌成为潜在的优势种群。现代的观点认为采用预防为主的前生命期(probiotic;原文如此称法)方法较好,这就要求小心谨慎地控制幼虫密度,按照技术要求投喂人工培养的最好的单细胞藻类,注意培育过程中的卫生和培养设备的清洁。

将过滤好的海水在贮水池内贮存24小时是有好处的。这一点对位于被工业和生活废水污染的区域,或是位于富含铁矿地质层(和矿场)区域的育苗场更为适用(因为这一区域含有大量的重金属元素)。在水中加入1毫克/升的EDTA钠盐(如同藻类培养基中所使用的)和20毫克/升的硅酸钠,大量通气24小时,可以螯合重金属,使得极易受到伤害的双壳类幼虫早期发育阶段不受到毒害作用。海水预处理后,不需要再次过滤,但在胚胎发育过程中,必须停止充气。

### 5.1.2.3 胚胎的培育

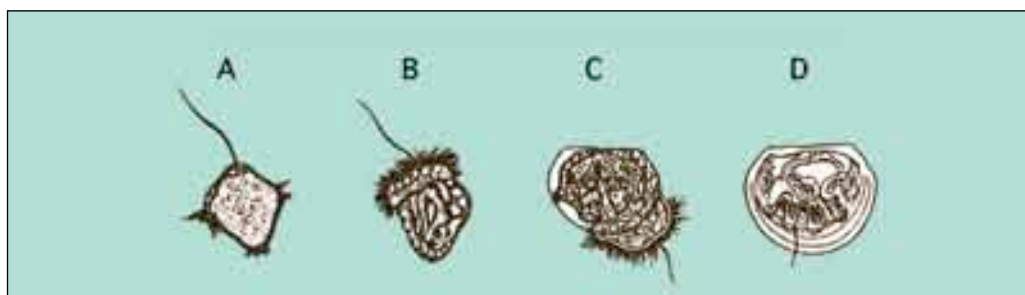
受精后2小时幼虫以适当的密度在水槽中孵化,根据养殖种类和水温的不同,发育到D形幼虫大约需要24-48小时(图54)。在胚胎发育过程中,必须停止或少量充气。

一般认为20 000枚/升的胚胎密度是安全培育的上限(表10),对多数卵生型牡蛎和蛤来说,培育密度也可高达50000 - 80000枚/升。但在培养扇贝幼虫的初始阶段,如果以如此高的密度培育会导致扇贝幼虫发育不正常。通常温水种扇贝受精卵的培育密度限制在10 000 - 15 000枚/升。冷水种扇贝卵的密度通常更多的是以水桶的底面积为单位而不是体积为单位进行计算,最大密度不应超过1 000枚/厘米<sup>2</sup>为宜(表10)。



**图53:** 水处理配套设备示例

(A) 多个袋式过滤装置组成的优质水过滤器。3个过滤器为一组;使用一组,另一组备用。过滤器内装有滤袋,滤袋分为3层,从10微米到2微米逐级减小的网孔。(B) 紫外消毒装置由3个灯管组成,串联后处理过滤海水,用该方法处理海水,比只用一个灯管处理的海水更可靠。



**图54:** 双壳贝类胚胎早期发育过程,从担轮幼虫(A)到早期面盘幼虫(D)。具有纤毛的游泳和摄食器官——面盘,在(B)和(C)中可以看到。暖水性种类的受精卵不到两天就可发育到面盘幼虫,而冷水性种类需要4天以上的时间。

大规模培养时,从卵的密度算起,大约有30 - 85%能正常发育到D形幼虫。未能完全形成D形幼虫的那些胚胎最后形成畸形壳,很少能进一步发育。

壳形完整的D形幼虫平均壳长因种而异,多数蛤类、扇贝和贻贝为90 - 100微米,卵生型牡蛎为55 - 75微米(表10),太平洋牡蛎D形幼虫壳长比美洲牡蛎和红树林牡蛎都要大些。

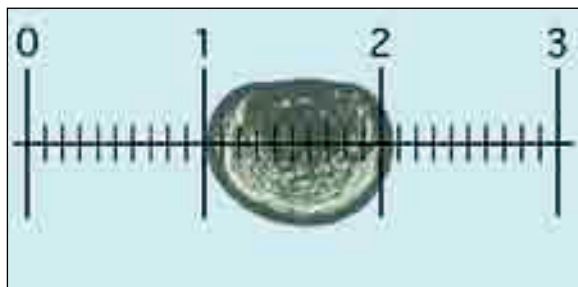
**表10:** 几种代表性双壳贝类胚胎和早期幼虫发育过程中培育密度(千枚/升)、最初D形幼虫大小(壳长, 微米)、D形幼虫密度(千枚/升)和培养条件包括温度( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ )和盐度( $\pm 5\text{PSU}$ )的数据

属/种	胚胎密度 (千枚/升)	D形幼虫大小 (微米)	D形幼虫密度 (千枚/升)	温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	盐度 (PSU)
牡蛎:					
<i>C. gigas</i>	15 – 20	75	10 – 20	25	28
<i>C. virginica</i>	15 – 20	65	10 – 20	25	28
<i>C. rhizophorae</i>	15 – 20	60	10 – 20	25	35
<i>O. edulis</i>	N/A	175	5 – 10	22	30
蛤:					
<i>T. philippinarum</i>	20 – 40	95	10 – 20	25	30
<i>M. mercenaria</i>	15 – 25	95	10 – 20	25	28
<i>M. arenaria</i>	15 – 25	95	10 – 20	19	30
扇贝:					
<i>P. yessoensis</i>	*	105	1 – 2	15	30
<i>P. magellanicus</i>	*	90	1 – 2	15	30
<i>P. maximus</i>	*	95	1 – 2	14	30
<i>P. ziczac</i>	10 – 15	95	2 – 5	25	32
<i>A. gibbus</i>	10 – 15	95	5 – 10	24	30
<i>A. irradians</i>	10 – 15	95	5 – 10	23	30
贻贝:					
<i>M. edulis</i>	15 – 25	95	10 – 20	16	30

**注意:** “N/A”表示不适用:平牡蛎的胚胎发育在外套腔内完成。“\*”表示冷水种胚胎密度是以桶底单位面积来计算而不是单位体积,受精卵(或胚胎)的最大密度不应该超过1000枚/厘米<sup>2</sup>。

*Ostrea*属和*Tiostrea*属的幼生型牡蛎比较特殊,其卵径大,幼虫发育到一定大小后才离开母体,到外界的水体中生活。平牡蛎产出的幼虫壳长为170 – 200微米(用90微米孔径的筛网可将其滤出),而*Tiostrea*种幼虫壳长平均值可高达490微米(见4. 2. 3)。*Tiostrea*的幼虫在匍匐幼虫阶段(预附着和变态阶段)离开母体,被释放到外界水体中,释放后短时间内即可附着(释放后不到1小时)。

壳长的测量最好用单孔配有校准的目镜测微尺的显微镜(100倍),而不要用物镜测微尺(图55)。



**图55:** 幼虫个体大小的测量

如图所示,幼虫要与目微尺平行,在尺子上所跨过的最小刻度数就等于壳长,做好记录。这里100倍是最终放大倍数(10倍目镜和10倍物镜),每一小格是10微米,该D形幼虫大约为105微米。

正常D形幼虫可以用45微米孔径尼龙筛网筛选(用于太平洋牡蛎D形幼虫的网目是35微米,美洲牡蛎和红树林牡蛎的为25微米),幼虫数量的估计将在5. 1. 2. 3节中详细叙述。

### D形幼虫的收集

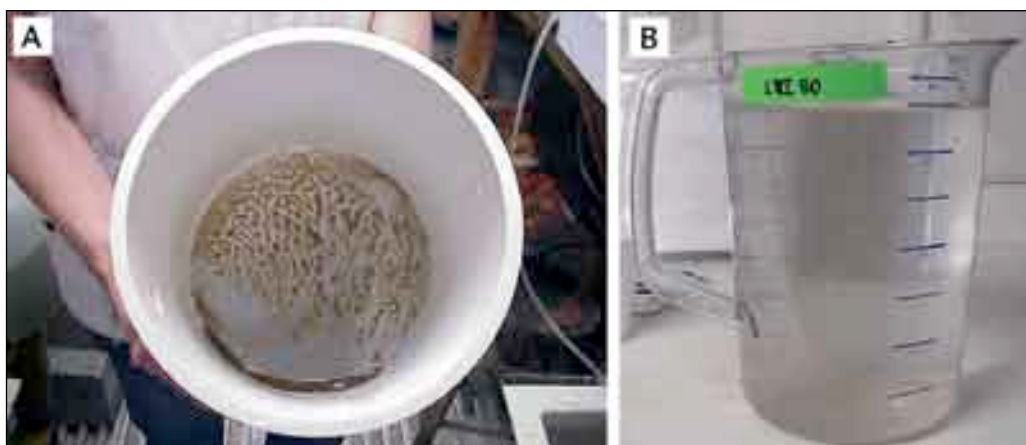
受精2天后,在孵化桶内刚发育到D形幼虫阶段的幼虫可通过排水收集起来。在排水前一天,也即在受精后24小时或36小时加入少量的饵料有利于幼虫发育。从胚胎发育到D形幼虫一直利用的是卵黄中的储备能量,一旦进入到D形幼虫阶段,幼虫就能摄取个体较小的微藻饵料并吸收可溶性的养分。

排水收集幼虫所用方法如图56所示。当培育桶中的水是满的时候,排水阀开的小一点,水缓慢流入放在浅水槽中的筛网或系列筛网中。该装置保证底层筛绢始终浸在海水中,这样做的目的是在排水过程中对稚嫩的D形幼虫外壳的损伤可减少到最小程度。随着桶内水量的减少,阀门可以再开大些,但要保证水流不能太剧烈而引起过多波动。没有排水阀的水槽可以用类似的筛网装置,用软管虹吸的办法排水收集。



**图56:** 收集D形幼虫用的筛网。孔径60微米筛网悬于孔径40微米的筛网上,40微米筛网浸在装有交换海水的浅水槽中。该装置可按幼虫大小分规格收集,同时确保幼虫不会暴露在空气中。

如图56所示那样,用小孔径筛网上悬吊大孔径筛网的装置排水,可以将D形幼虫按不同规格分开,有利于把发育好、个体大的D形幼虫同发育不完全和不正常的幼虫区分开(图57)。排水时,用过滤海水喷洒上层筛网,将较小的个体冲洗到下层筛网上。两层筛绢上的幼虫分别冲洗到带刻度的容器里计数、观察(下文叙述)。同时取小部分样品测量幼虫的壳长。



**图57:** (A)用直径20厘米的筛网收集到的大约500万枚杂色海湾扇贝幼虫;(B)上述的幼虫倾入4升带刻度的容器,准备估测数量。

### 卵、胚胎和幼虫数量的估算

处理卵和幼虫必须小心谨慎。当卵、胚胎和幼虫经筛网分选后,从一个容器转移到另一个容器时,一定要确保筛网始终浸在水面以下。转移过程和估算数量用到的所有器材应该预先彻底地清洗干净。

#### 1、所需器材

测幼虫数量所用的仪器大多需要特别制作。比如,筛子是由PVC管、园艺栽培用的耐高压硬质苯乙烯壶或容器制作(勿使用金属材质的筛子或筛网)。

制作合适的筛子,先去掉塑料容器的底,然后用合适的胶粘剂将单丝尼龙筛绢牢牢的固定在切口处。选用截面直径15厘米的PVC管比较适合(直径20 - 30厘米也较方便)。筛子还应该标记筛孔大小以便辨认,标记要不易抹掉。

培养胚胎、幼虫和幼苗需要准备20 - 250微米不同孔径的筛网,每一型号要多准备几个。用于蛤和扇贝幼虫培养的筛网孔径分别为40、60、80、120和150微米(表11)。培养各种牡蛎幼虫要用网孔在150微米以上的筛网。

**表11:** 筛网孔径及其滤出幼虫的最小尺寸

该资料仅供参考,因为幼虫形状存在种间差异。有经验的技术人员能根据幼虫在筛绢上的分布和过滤幼虫网目的大小就可估计出幼虫的平均大小

孔径 (微米)	滤出幼虫的最小尺寸壳长 (微米)
45	75
80	120
120	145
150	170
160	210
180	255
200	280
220	300

车间里需要用树脂玻璃或透明PVC管、薄板和塑料棒做成的带孔的如同活塞状的搅拌器和记数板。记数板也可从科学和水产器材厂商处购买(图58)。



**图58:** 估算幼虫数量的器材。

(A) 具孔搅拌器。记数前将容器中的悬浮幼虫搅拌均匀后取样；(B) 显微计数板。有一个可装1毫升样品的样品室。室底部分成若干小方格便于观察和计数。计数板也可用透明的塑料板来制作。

一些特殊器材需要购买,包括可调式自动移液器(常用0.1 - 1.0毫升和1.0 - 5.0毫升);从25毫升 - 2升不同规格的量筒和洗液瓶。

经费允许的话,颗粒电子记数仪可以完成后面介绍的工作并节省时间,而且在单细胞藻类细胞密度的测定和统计幼虫的饵料消耗量中均起到极大的作用(参阅图21)。

## 2、计数程序(图59)

a) 用筛网滤出卵、发育过程中的胚胎或幼虫,用过滤海水冲洗后转移到有刻度的量筒里(体积1或2升),如果估计数量超过了500万 - 1000万,可转移到带刻度的、体积在1品脱或1加仑的桶里或类似的大体积容器里。

备注:使用大体积容器计数,为了能做到更精确,可用标准量筒或量杯加水计量,水面距容器上缘8厘米处为止。记住所加入的体积数并在容器内壁水面处标上不易抹掉的刻度线。

b) 加过滤海水到刻度线处。



**图59:** 幼虫取样、估计数量的步骤。(A)边搅动容器中的幼虫边用自动取样器吸取样本;(B)样品转移到计数板里;(C)统计并记下样品中的幼虫数量;(D)和(E)展示了类似的方法。边搅动边用自动取样器吸取收集在2升带刻度量筒里的幼虫。



- c) 一边用直径适合的有孔搅拌器搅动量筒或其他容器中的海水, 一边用自动取样器取 0.5 毫升(后面可看到体积可以改变)小样本, 做3个重复。确保卵或幼虫均匀分布在小样本水体中(图59A)。

备注: 搅拌器直径应该比装样品的容器直径稍小, 但不要太小。搅动应该充分, 将卵或幼虫从容器底部充分搅动起来, 均匀地悬浮在水体中, 但不要太过剧烈以免伤及幼虫, 建议每4秒完成1个循环的缓慢频率, 有节奏的上下搅动。

- d) 将小样本放入计数板的计数室里(图59B)。计数室里刻有适当大小的格子。

备注: 幼虫数量较多时要么取较少体积的小样本, 要么用大体积量筒或带刻度的大容器稀释后取样, 也可以将两种方法结合使用。以十分脆弱的卵为例, 卵悬浮液很容易转移到大体积容器中, 如1升聚乙烯桶, 体积达到刻度线处, 用大直径、有孔的塑料搅拌器轻轻搅动桶中海水后吸取小样本。

- e) 显微镜下数卵或幼虫的个数(放大倍数40倍, 图59C)。

备注: 卵和刚受精的胚胎总数由每个小样本分别计数得到的, 未变圆的卵或不正常的计。同样计数过程也用来统计D形幼虫的数量, 即通过计数统计发育正常个体的百分率。用同样的方法可以统计后期幼虫的存活率, 这样就可以分别统计出存活率、死亡率, 以及濒临死亡的个数。

- f) 按下面例子计算总数

**例:**

3个重复小样本幼虫数为: 414; 389; 402

平均值 =  $(414 + 389 + 402) / 3 = 402$

小样本体积 = 0.5毫升

圆柱体总体积 = 2000毫升

幼虫总数 =  $(2000 / 0.5) \times 402 = 1\ 608\ 000$

卵和幼虫也可以用配有合适孔径的颗粒电子计数器(如Coulter Counter)计数。虽然该方法方便快捷, 但不能辨别幼虫是否发育正常和是否死亡。没有什么可以替代经验丰富的培育技术人员的眼睛的观察和辨别能力。

### 5.1.3 幼虫培育方法

D形幼虫按上述方法计数后进入幼体培养阶段。这个时期的幼虫需要摄取培养的单细胞藻类, 有较好营养价值的种类包括硅藻和鞭毛藻。

- 1) 硅藻:

*Chaetoceros calcitrans*,

*Chaetoceros muelleri*,

*Thalassiosira pseudonana* (3h)

## 2) 鞭毛藻:

*Isochrysis galbana* (或‘T-Iso’克隆品系),  
*Pavlova lutherii*,  
*Tetraselmis* sp. (仅适合大于120微米的幼虫)。

饵料微藻的用量和不同种类之间的搭配比例的计算将在5.2中详细介绍。

幼虫可以在培育胚胎时所用的平底桶或带有底阀的圆锥形底玻璃钢桶中继续培养(图52)。水槽的大小与培育目的有关。如果是实验性的,或者是小规模生产,可使用小体积(200-1000升)水桶,而商业性大规模生产性的培育池的数量和体积就要相应增加。可以采用静态换水操作模式,也可以采用流水模式。在静态换水模式下,必须周期性地换水;而在流水培养模式中海水不断地流入,交换和替代原有海水,体积保持不变。在5.1.4.2节中将予以进一步讨论。

培养对环境适应性强的双壳类贝类(包括*Crassostrea*和*Tapes*)的D形幼虫在15000-20000枚/升密度下能生长,但在较低密度的培养条件下,能改善生长状况和提高存活率(表10)。因此建议降低*Pecten*, *Patinopecten*, 和*Placopecten*属及*Chlamys*和*Argopecten*种扇贝幼虫培育密度,早期幼虫密度在5000-10000枚/升较合适。幼生型的平牡蛎的密度为2000-5000枚/升时通常可以正常生长,因为早期的D形幼虫个体较大。有些种类采用高密度培养技术能更顺利地进行生长和发育(见5.1.4.1)。

培育过程中需要通气,气石通常放在贴近桶底的中心部位。从早期D形幼虫开始到后期幼虫的全过程中,逐渐提高通气速率,由缓慢的小气泡增加到200升/小时的气流量。压缩气体内必须是无碳和无油。低压力、大气量的回旋式风机是最理想的。压缩空气经过不同孔径的筒状过滤器过滤,过滤器滤膜的孔径有0.22微米或者是0.45微米的。经过过滤的空气中含有的有害微生物数量将大大地降低。带有水气的气体在进入培养槽前如果经过一个封闭的桶式干燥器进行干燥也是可取的。这个干燥器里可以装上无水氯化钙或是硅胶。当干燥剂变色后需要更换。

### 5.1.3.1 幼虫培育前准备

幼虫培育池和所有使用的器具必须彻底清洗干净,然后用淡水或过滤海水冲洗。在热水中加入温和的液体洗涤剂,或者使用适当浓度的消毒剂(杀菌剂)消毒。如漂白液(次氯酸钠溶液)配制成20毫克游离氯/升的浓度可达到消毒、杀菌的目的。

幼虫培育过程如下:

- a) 将已经清洗干净的幼虫培育池加满由1-2微米滤过的海水,并调到适宜的温度和盐度。

**备注:**培养广盐性种类如美洲牡蛎,可以加入精过滤的无污染的淡水来降低海水盐度。因为它们的适宜盐度为20-25psu。

- b) 如果不久前发生过由细菌引起的幼虫不正常死亡。在此情况下,育苗用海水需要经紫外线照射处理,这样有助于预防再次感染。如果继续发生死亡现象,可在兽医的指导下,按每升海水加入2-5毫克剂量的广谱抗生素如氯霉素等处理。

- c) 按适宜的密度投放D形幼虫。

- d) 按照5.2.3.2节介绍的步骤计算出单细胞藻类的用量,按不同微藻饵料的配比加到培养槽中。
- e) 打开气阀开始通气,气体带动水体的翻动使藻类和幼虫混合均匀、悬浮在培育槽内。
- f) 这是第一天进入正常管理前的操作程序。

### 5.1.3.2 幼虫培育管理

幼虫培育过程重要的是日常管理。尽管有些养殖场采用流水培养模式(见5.1.4.2),但更为常见的是采用换水方式进行培养,也就是说不必连续进行水交换。将微藻饵料细胞浓度维持在一定的水平上,有利于提高幼虫摄取饵料的效率。

为了防止潜在的有害代谢物的积累,从D形幼虫开始,到变态初期整个发育过程中要有规律的彻底换水。换水频率依据幼虫培养密度和个体平均大小而定,每48小时更换一次或每周3次。

- 早期幼虫(< 120微米)的高密度是每升15 000个 - 20 000个
- 后期幼虫(150 - 200微米)的密度是每升小于5 000个
- 达到250 - 300微米时,每升密度减少为2 000个

**注释:**上文所给出的是对平均壳长幼虫可适用的密度概略值。如果以每微升少于200个细胞的等鞭金藻作为饵料计量单位,则可视是低密度培养,则会更精确些(参照5.2.3.1节)。在流水条件下进行水交换,每天需要添加较多的饵料,或者是其它代用品。

#### 1、不换水期间的管理

在换水前后的不换水期间,主要管理工作是加入充足、新鲜的藻液,补充在换水前的24小时内已被消耗掉的微藻。换水间期的投饵量可根据每日投饵量分批加入或一次将饵料全部加入。具体的投饵量,依据水体中的饵料残留量决定,即从培育槽中取水样,用血球计数板或者用计数仪和类似的颗粒计数仪在100倍显微镜视野下统计单位体积内剩余藻细胞数。

每日记录培养温度、剩余藻细胞数和补充饵料量,以维持最高微藻饵料细胞的密度。图60给出了一个记录实例。在5.2.3.2中将介绍添加藻液量的计算方法。

#### 2、换水日的管理

这与前面叙述和讲解的胚胎发育程序(图56)相似。用虹吸管或从底部排水口将水排尽,使水流通过筛网。筛网的网目以250微米为宜(图61),不让较大颗粒的杂质通过,只让幼虫流到下一层小孔径的筛网上。

程序如下:

- a) 将幼虫从培养槽虹吸到筛网上。
- b) 用海绵和清洁剂或漂白溶液擦洗培养槽,然后冲洗干净。
- c) 注满干净的海水,将温度和盐度调到所需的水平。

d) 用过滤海水冲洗幼虫, 并通过多层孔径递减的筛网, 将幼虫按不同规格分开。与不同幼虫壳长相匹配的适宜筛网可参考表11。

e) 取滞留在每个筛网上的幼虫样品进行镜检, 观察幼虫的形态和活动能力。舍弃死亡个体占多数的和生长缓慢的这一级别筛网上的幼虫。

**备注:**组织已经解体的幼虫和空壳占多数的这一级筛网上的幼虫要丢弃。健康的幼虫组织是易分辨的黄褐色, 消化腺是暗黑色。垂死的幼虫从外观上看有均匀的、暗黑色斑点。

### 双壳类幼虫: 日志

种类	菲律宾蛤仔			日期							
批号	培养天数	水槽容积(升)	温度°C	25.7							
02-9A	12	125	盐度(psu)	29.5							
平均壳长(微米)			211.4	眼点幼虫%							
大小等级	出现频率	测量个数	偏差	水处理							
160			-31	回答	√ 或 ×						
170	I	1	-4	1. 是否换水	<input checked="" type="checkbox"/>						
180	III	3	-9	如果 √ :-							
190	III	4	-8	2. 水是否过滤	<input checked="" type="checkbox"/>						
200	III	10	-10	3. 是否经紫外线处理	<input checked="" type="checkbox"/>						
210	III	24	-	4. 是否用EDTA 处理	<input checked="" type="checkbox"/>						
220	III	4	+4	5. 是否投抗生素	<input type="checkbox"/>						
230	III	3	+6	如果 √ 具体如何:							
240	I	1	+3	6. 是否进行其他处理?具体如何?							
250	测量个数 = 50		+13								
幼虫状态											
计算: 最高出现频率的大小等级 = 210			颜色								
级差 = 10 (微米)			正常								
因此, 中值 = 215			活动状态								
离差 = $\frac{(-31)+13}{2} \times \frac{100}{n} = -1.81 \times 12 = -3.6$			游动正常								
均值 = $215 - 3.6 = 211.4$ 微米			样品体积								
			0.5 ml / 2 升								
			样品幼虫数								
			183, 177, 180								
			幼虫总数								
			720,000								
稚贝数(牡蛎)											
饵料投喂			样品体积								
饵料残留量			毫升 升								
单种饵料的种类和日投喂量			样品幼虫数								
种类	细胞数/微升	种类	摄入细胞量	投喂的毫升数	收获的微藻密度(细胞/微升)						
Iso	15.6	Iso	100	954	13100						
Chaet		Chaet	100	236	53000						
Tet	1.2	Tet	10	521	2400						
筛网 微米											
幼虫等级	35	45	61	80	124	140	170	210	236	265	
近似值 %				5	10	45	40	很少			
保留	√			×	√	√	√	√			
丢弃	×										
注意: 出现大量匍匐面盘幼虫											

图60: 幼虫培育日志示例。它有利于跟踪每批幼虫的生长状况。计算稚贝平均壳长的步骤也在该图示中。

- f) 健康的幼虫冲洗到量筒里。
- g) 取小样本统计总存活数。测量50 - 100枚个体的大小, 计算平均壳长。

**备注:**滴几滴福尔马林固定幼虫 (10%的甲醛溶液里加过量的碳酸钙, 可以用石灰或大理石碎片作为碳酸钙使用)。计数后丢掉样本。

h) 幼虫放回培养池中, 恢复通气。

i) 每48小时重复上述过程。



**图61:** 静态幼虫培育池的换水情况。

#### 5.1.4 幼虫高效培养

高效培养幼虫的方法前面也提到, 包括流水培养或者用高密度静态水培养两种模式。将这两种方法结合使用, 在场地有限的育苗场更能有效地增加产量, 由于减少了劳动力和管理成本, 经济效益也相应地得到提高。

尽管一些育苗场开始转向流水培养, 但仍没有广泛推广。一种方法是在现有条件下, 通过提高密度的方式高效地利用现有设备来提高产量; 另一种方法是投资购买电子仪器来控制投喂量都可以在高密度条件下培养幼虫。通过仪器控制投喂量是根据培育槽中的幼虫密度和个体大小来确定的, 幼虫密度可比常规水平提高两倍或三倍; 而不是根据水体大小掌握单位水体的饵料量, 不掌握幼虫的密度和个体大小的变化状况是不行的。但如果幼虫密度继续增加, 监控投喂量更成为关键, 必须进行连续监控。该方法更适合培养抗性强的养殖种类, 一旦因某种原因引起幼虫死亡, 损失将十分严重, 所以多数养殖场宁愿选择更谨慎的方法。

### 5.1.4.1 高密度培养

掌握了培育的幼虫的摄食率,即是掌握双壳类幼虫个体在不同大小,或者在不同体重条件下所摄取的、可被消化掉的微藻饵料的细胞数。有关这一方面的资料列于表12(5.2.3.2节)。该表介绍了3种常见的养殖贝类的幼虫在水温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 条件下对微藻细胞摄取率。如果没有相关资料可供查询,可以通过实验来求得。

知道了幼虫个体大小与投饵量之间的关系,就很容易计算出24小时里个体大小已知的幼虫所需要的投饵量。详细计算的例子和说明见第5.2.3.2节。每天一早供给较高密度的饵料,也即大部分饵料是在早晨投喂,余下的部分,在随后的24小时内用滴加的方法或用计量泵以恒定的速度添加到培育池里,来补充被摄食掉的饵料。

幼虫培育密度在20 000枚/升以上时,特别是达到变态期时,投饵量显得更为关键。投饵过量比投饵不足对幼虫更有害。原因是粪便和其它代谢产物在培养水体中大量积累,细菌数量迅速增加,会使幼虫的摄食率降低。如果以恒定的速率添加饵料,投饵量就大于幼虫的摄食量,造成投饵量进一步加大的不良后果。现在可以通过使用电子传感器来解决这个问题,可以通过控制设备持续监控培养池中饵料细胞的密度和幼虫的密度(图62),随时调整投饵量。(详细解释见参考文献:Higgins等,1987)。



**图62:** 双壳类幼虫高密度培养条件下微藻细胞密度实验性自动控制装置。(AR)低温、通气的微藻储槽,供给幼虫每日所需的饵料;(P)蠕动泵。根据需求量来输送饵料。(C)控制装置,内有继电器,当传感器(S)探测到幼虫池(LT)中饵料细胞浓度减小到设定的某个值的下限时,继电器自动开启蠕动泵。该装置利用了红外线传感和接收器。如果利用现代电子技术,该设备的性能可以得到进一步改良。

欧洲平牡蛎和太平洋牡蛎幼虫的对比试验结果列于表12。

**表12:** 5个高密度组与正常密度组的平牡蛎幼虫和3个高密度组与正常密度组的太平洋牡蛎幼虫的对比试验。(N<sub>0</sub>):D形幼虫投放量;(N<sub>p</sub>):附着前平均数量

	幼虫数/升		进入附着期 的天数	附着率 (%)	幼牡蛎产量 (枚/升)
	N <sub>0</sub>	N <sub>p</sub>			
<i>O. edulis</i>					
高密度	9 954	5 942	9.8	40.5	512
正常密度	1 440	1 083	10.0	40.3	161
<i>C. gigas</i>					
高密度	56 667	24 900	20.7*	21.6	735
正常密度	5 333	2 766	19.0*	25.0	202

\* 附着天数:从D形幼虫开始直到到进入附着期后4天的这段时间

#### 5.1.4.2 流水培养

之所以采取流水方法培养幼虫出于多种目的。因为某些种类抗性差,使用通常的培养方法难以获得理想的结果,所得到幼虫数量若与抗性强的种类来比差得远。通常它们死亡率高,不能用换水的方法进行高密度培养。

有些育苗场正在试验流水培养技术,并使其更完善、更有效地利用现有资源的潜力。另有一些育苗场寄希望于通过流水培养能在有限的场地条件下,培育出更多的幼虫,以及希望通过这一方法来降低劳动力成本和所消耗的时间。流水高密度培育幼虫的优点是可以节省时间,也不必像静态换水培育方法那样每周换3—4次水。该方法尽管以较慢的速度持续交换海水,但比较浪费饵料,但是在整个生产过程中的这一环节所消耗掉的饵料量并不太大。

流水培养池的设计十分重要。所培养的幼虫不能随水流失。培养槽的体积要足够大,以确保饵料有足够长的停留时间供幼虫摄食。要有足够的水交换量,防止代谢废物和残渣聚集在培养槽内。还需要定期冲洗出粘附在内表面的污物。这个方法通常也用来培养海洋鱼类(如庸鲽)的稚鱼。培养池的设计要求是适应流水培育的特点。既要节省投资,又要操作方便、节省劳动力。这里使用的圆锥桶,不是双壳贝类胚胎孵化时使用的那种平底或下端稍细的圆锥桶,而是下端具有渐细陡坡的长圆锥形桶(图63)。

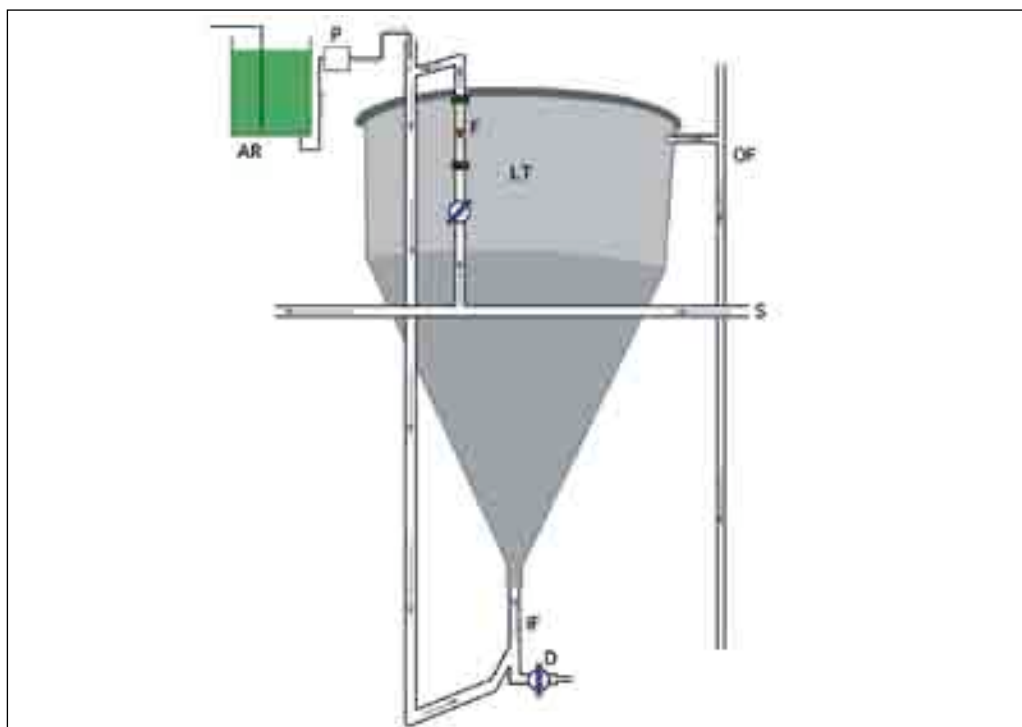


图63: 流水幼虫培育典型装置(描述见正文,箭头表示饵料和海水流动方向)。

经过处理的干净海水(来自水管S)的流水速率由隔膜阀和流量计(F)控制和调节。根据幼虫的密度,日总流量(IF-流入,OF-流出)不小于正常密度下培育这些幼虫需要的水体的体积(LT-流经幼虫培育桶)。例如,如果幼虫正常以5 000枚/升密度培养在500升桶里,相同体积的流水培育桶培育20 000枚/升幼虫每天需要最小流量为2 000升。为了防止幼虫随水流走,在排水时要用筛网孔径大小适合的“鼓式”过滤器(见图64详解)。



**图64:** 实验性流水培育槽以及附属装置的详细说明 (BF)滤鼓, (OF)与滤鼓相连的排水管, (CF)桶式过滤器, (GT)高位水槽, 给培养槽提供稳定的过滤海水, (AR)微藻贮罐, 为幼虫提供微藻饵料。“滤鼓”由直径20厘米的PVC管制成, 两面用胶粘剂固定上筛网, 网目为60微米。在滤鼓上焊接一根粗细相应的PVC管, 与培养槽相连。(SC)与滤鼓和排水管的活丝接头, 并与排水管形成90°夹角。这样可以向上转动滤鼓, 使得滤鼓离开水面便于清洗和更换。

培养槽要安装一排水阀(D), 它可以作为饱和盐溶液(盐栓)的入口。当断开进水阀后, 加入2-3升饱和盐溶液, 随重力作用下沉到槽底。活力强的幼虫为逃避高浓度盐溶液尽力游向水面, 而垂死的幼虫, 或已经死亡的幼虫则会沉到槽底的高浓度盐溶液中。几分钟后, 稍微打开排水阀, 排出饱和盐溶液所形成的“盐栓”和包含其中的已经死亡的幼虫。在海水鱼孵化中, 也是采用同样的方法来排出未孵化的死卵。

由蠕动泵(P)从低温、通气的微藻储槽(AR)按照预先确定的量泵入幼虫培养槽。根据幼虫的数量、大小和通过培育桶的流速决定配给的数量和速度(参考5.1.4.1和5.2.3.2)。平均壳长可以每日取样测定, 但测定存活率还存在一定问题。死亡率可以从收集到的饱和盐溶液的小样本中所含的死亡幼虫数来估算。可以每2-3天测定一次存活率。

流水培育桶内表面需要用软毛刷清洗。为了便于操作, 刷子上可以安装上一根适当长短的柄。每一批幼虫的培育期间, 培育桶至少清洗一次。在清洗过程中加大流速, 这样可以冲掉从槽壁上刷下来的残渣。

采用流水培育系统培养幼虫也有一定的缺点, 但利大于弊。由于流水培养幼虫不像静态培养那样将幼虫按规格分级, 幼虫个体大小差别很大, 延长了培育时间。而且, 当幼虫发育到匍匐期时必须移到附着池中。在许多育苗场里这是一种标准的操作方法。但也不是所有的育苗场都是这样做, 他们让匍匐幼虫直接附着在桶底和内壁上, 然后再将刚附着的幼虫剥离下来。在这样的流水培育槽内, 由于细而长的锥形底给剥离附着稚贝带来了困难。附着槽是必要的, 尤其是对于营固着生活的各种牡蛎幼虫来说更为必要(见5.4.3节)。

### 5.1.5 幼虫生长和存活

图65显示太平洋牡蛎幼虫的发育阶段和生长以及扇贝*Pecten ziczac*从D形幼虫到变态期的发育过程。



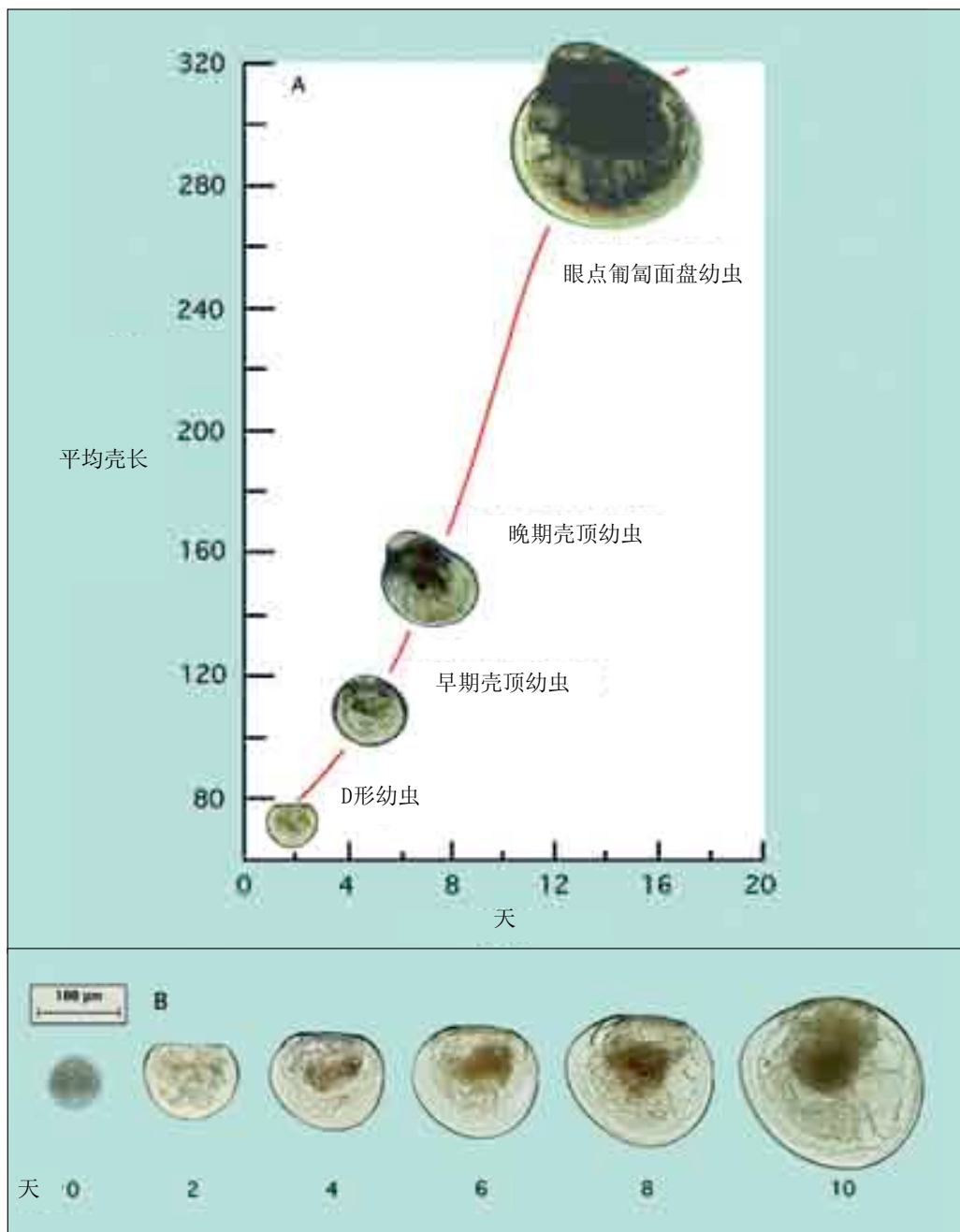
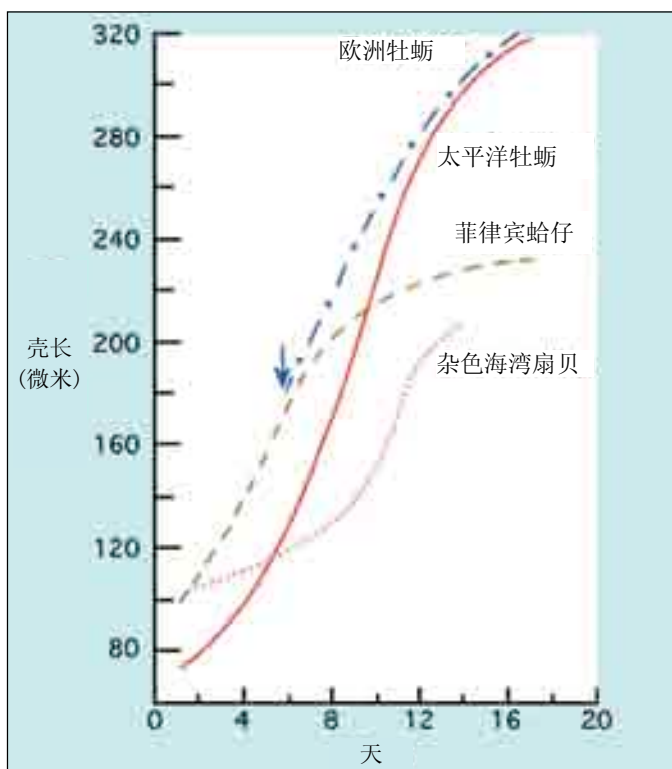


图65: (A) :太平洋牡蛎的发育和生长: (B) :扇贝*Pecten ziczac*幼虫显微照片。

双壳类不同种群幼虫生长率不同。扇贝和蛤的早期D形幼虫都较大,而附着和变态时壳长(210 - 230微米)与卵生型牡蛎幼虫壳长(320 - 340微米)相比小得多。图66比较了 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 温度条件下,不同种类的生长率。某些种类,包括杂色海湾扇贝,到达指数生长期前生长都较慢,这就是快速生长开始前的慢速生长阶段。其它种类像菲律宾蛤仔和太平洋牡蛎从早期D形幼虫开始生长就很快。所有种类到达附着阶段时生长都变慢。

同样,从D形幼虫到完成变态时的存活率也存在种间差异。某些牡蛎和蛤类存活率平均值可高达50 - 70%,而扇贝只有15 - 30%。在培育过程中,幼虫数量减少过程中的相当大一部分与剔除和舍弃生长缓慢的个体有关,而不是因幼虫死亡造成的。变态期幼虫死亡也与培养条件有关,包括饵料和饵料的配比、温度、盐度以及目前尚无法控制的因素,如水质和病害等(见5.3)。



**图66:** 几种暖水双壳类如欧洲平牡蛎、太平洋牡蛎、菲律宾蛤仔和杂色海湾扇贝在  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  水温条件下从D形幼虫到变态阶段的生长比较。第0天表示卵受精的日期。蓝色箭头表示成熟欧洲牡蛎群体产出幼虫时的天数。

## 5.2 摄食和营养

### 5.2.1 概述

幼虫的贝壳及消化系统发育完全后就开始摄食。在这之前,呼吸和发育所需的能量源于卵黄的储备(见5.3.4),发育过程中的胚胎也能从周围海水中吸收有机养分。但在幼虫发育到D形幼虫,能摄取外界食物前12小时添加一点培养的藻类饵料到幼虫培育桶里对幼虫发育十分有利。摄取的不是藻类细胞本身而是藻类培养液中微藻细胞分泌的、可溶性的有机养分。添加少量人工培养的、处于稳定期前的硅藻(如牟氏角毛藻10-20个细胞/微升)表现出明显的效果。

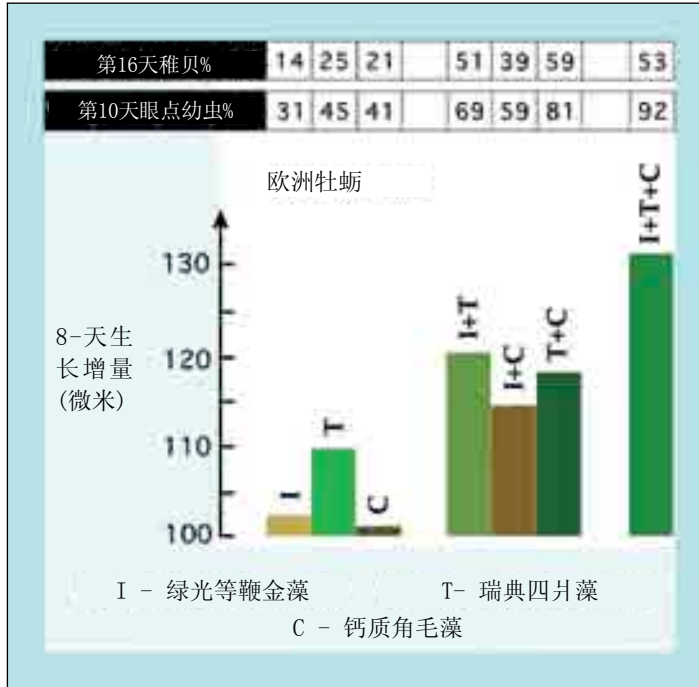
一旦发育到面盘幼虫阶段,壳形完整的幼虫就能游泳。面盘纤毛的摆动使水流顺着一定的方向流动,使饵料颗粒朝着口的方向运动(图67)。这里所谓的第0天,就是第一次加饵料那天,添加到培育桶中的饵料质量(组成)和数量(配比)就变得很重要。



**图67:** 发育至第8天的三个扇贝幼虫的游动和摄食的状态(游动器官面盘的纤毛有规律的摆动,使得食物颗粒移向口部,暗黑色消化腺清晰可见)。

### 5.2.2 饵料投喂的要点

将几种微藻混合在一起比单一一种饵料好。一般可以将两种或者三种营养价值高的、大小适当的硅藻和鞭毛藻混合在一起投喂比单一饵料更能提高幼虫生长率和促进发育(图68)。混合饵料也还可以提高稚贝产量并影响下一阶段生长和存活。



**图68:** 用三种不同种类的微藻和不同的配合方式饲喂平牡蛎, 结果显示8天的壳长增长量、第10天的眼点幼虫的出现率, 以及第16天的稚贝附着率有较明显的差异。

并不是所有大小适合、容易培养的微藻对幼虫都有较好的饵料价值。通常情况下, 对一种幼虫有较高营养价值的微藻饵料对其它种类也有相近的价值。当然也有些例外, 将在后面解释。某种微藻的饵料价值不仅仅由生化组成决定, 还要由它的“可摄食性”和消化性所决定。例如, 具有长的硅质刺的硅藻, 幼虫很难吃下去, 所以幼虫受到刺激后往往闭合壳瓣排出这类硅藻。褐指藻属的某些种类就是个很好的例子。其它的若干种类, 如*Chlamydomonas coccooides*细胞壁厚不易消化吸收。有一些种类包括*Dunaliella tertiolecta*虽然容易消耗, 但缺少幼虫发育必需的高不饱和脂肪酸, 几乎没有什么营养价值。

图例69提供了数种良好或不佳的幼体藻类饵料的高不饱和脂肪酸组成情况, 并提供了无灰干重的总脂含量值(%)。

与营养价值低的种类不同, 具有高营养价值的种类一般含有相当高的EPA(20:5n3)和DHA(22:6n3)。如果饵料中缺少这些成分, 多数双壳类幼虫不能合成, 或者只有有限的合成能力, 它们必须从少量的高不饱和脂肪酸前体开始合成。对许多饵料要求苛刻的种类, 投喂富含EPA或DHA(或两者都有)的饵料会得到很好的结果。蛤与牡蛎、扇贝的幼虫相比, 对高不饱和脂肪酸的需求相对要少些。

育苗场使用的不同的微藻, 高不饱和脂肪酸的相对含量和总脂肪含量随着微藻培养周期的不同阶段和培养条件的改变而变化。只要适当地多注意培养过程中的条件和操作细节, 在一个育苗场使用的营养价值高的微藻, 拿到另一家育苗场去培养也会得到相似的结果。

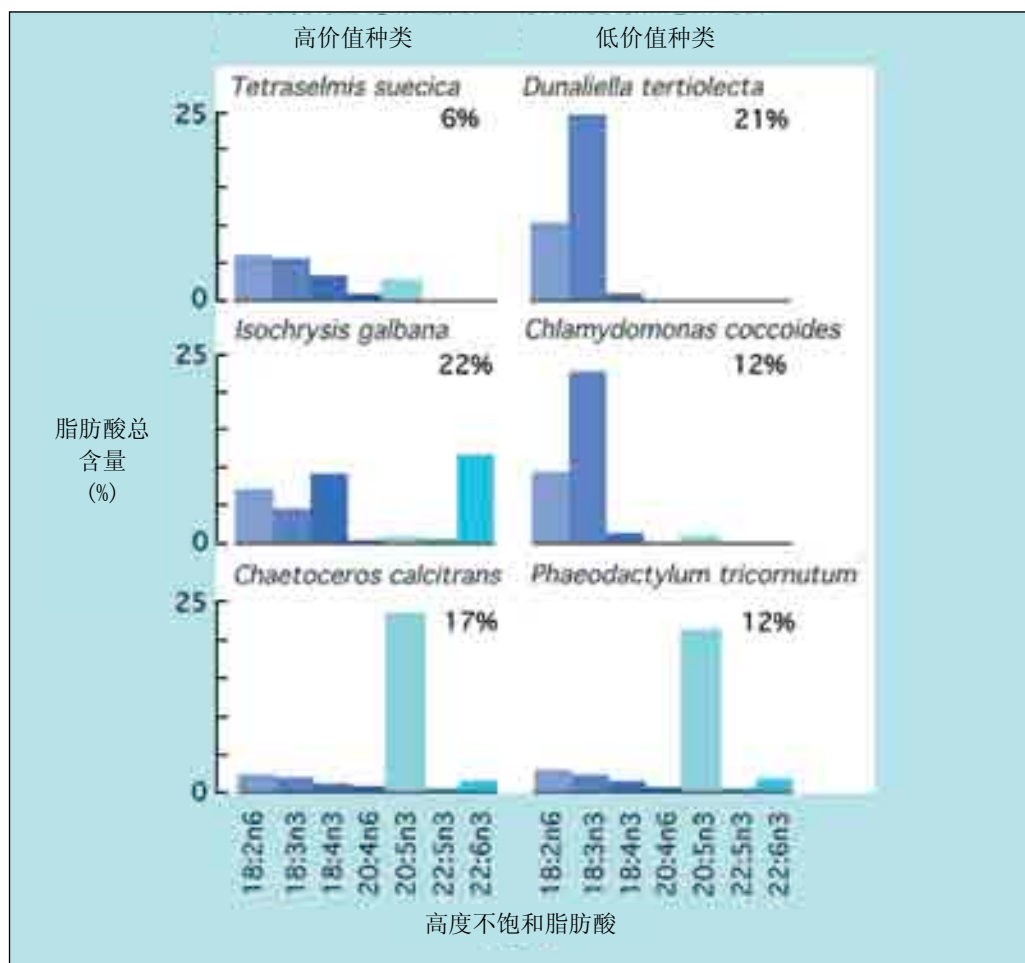


图69: 几种营养价值不同的微藻中高度不饱和脂肪酸的相对含量, 以及总脂肪酸占无灰干重的百分含量。

育苗场常规培养的硅藻都有相近的高不饱和脂肪酸的组成, 都富含EPA。不同的硅藻种类在特殊脂肪酸的总量稍有不同, 当培养的微藻进入稳定期后高不饱和脂肪酸的含量要比指数期间高。

细胞个体较小的褐色鞭毛藻 (*Pavlova lutherii*) 与球等鞭金藻都有类似的高不饱和脂肪酸的组成(图69), 但DHA含量更多些。相反, 球等鞭金藻的T-ISO克隆和球等鞭金藻在同样的光照和营养条件下培养, T-ISO品系的DHA含量只是球等鞭金藻的50-70%。许多育苗场之所以喜欢培养T-ISO, 因为它比其近缘种更耐高温, 更容易培养的缘故。塔胞藻(如*P. obovata*和*P. virginica*)可以用来代替四片藻。它们的高不饱和脂肪酸的含量居于四片藻和等鞭金藻的中间水平, 可是在一年中的某段时间较难培养。

### 5.2.3 饵料的组成和投喂量

在双壳类育苗场, D形幼虫合适的的开口饵料和早期幼虫(壳长<125微米)的饵料包括下面的硅藻和鞭毛藻, 使用时可将硅藻与鞭毛藻混合使用。

硅藻:

*Chaetoceros calcitrans* 或 *Thalassiosira pseudonana* (适合喂养的幼虫壳长>55微米) 或 *Chaetoceros muelleri* (适合喂养的幼虫壳长>90微米)。

### 鞭毛藻

球等鞭金藻和T-Iso品系或*Pavlova lutheri*。

幼虫壳长平均超过120微米时，饵料中添加细胞个体较大的鞭毛藻，如四片藻(*T. chunii*, *T. suecica*, *T. tetrabele*等)有利于幼虫的生长。

饵料投喂量通常按培育水体的体积计算，即每毫升(细胞数/毫升)或每微升(细胞数/微升)中的藻细胞数计算。注意100细胞/微升等于100 000细胞/毫升。

不同微藻细胞的平均大小，无论是体积，还是质量都有很大变化(见3.1节中的表1)，计数时必须考虑这一点。二种或三种微藻混合后的投喂量的计算是以配比中每一种藻类的、一个细胞体积为基本单位计算(近似值)：

1. 0个*Isochrysis*细胞，或T-Iso品系细胞或*Pavlova lutherii*细胞
  - = 0.1个*Tetraselmis*细胞 或者
  - = 1.0个*Thalassiosira pseudonana*细胞，或者
  - = 2.25个*Chaetoceros calcitrans*细胞，或者
  - = 0.75个*Chaetoceros muelleri*细胞。

如果以100细胞/微升的*Isochrysis*作为投喂的饵料细胞密度的基数，用上面介绍的三种微藻配合成混合饵料来培养牡蛎或者是蛤子(以及其它多种双壳类)的早期幼虫，可以按照比下三种配比混合投喂，一般会取得较好的结果：

- 125个/微升*C. calcitrans* + 50个/微升*I. galbana*，或者
- 37.5个/微升*C. muelleri* + 50个/微升*P. lutherii*，或者
- 50个/微升*T. pseudonana* + 50个/微升*P. lutherii*。

尽管饵料投喂量随着所培育的幼虫种类和密度不同有所变化，但是将几种微藻混合投喂对通常养殖的双壳类幼虫的培育都是有利的。按照前面所介绍的细胞密度来培育各种牡蛎(*Crassostrea* sp.、*Ostrea edulis*)、蛤类(*Tapes philippinarum*, *Tapes decussates*、*Mercenaria mercenaria*、*Mya arenaria*)，以及贻贝(*Mytilus edulis* 和 *Perna perna*)等幼虫(按照以前所介绍的幼虫培养密度，参考5.1.2.3中的表10)得到的结果都不错。在许多种扇贝幼虫的培养中，情况有所不同，投喂同样种类的饵料，投喂量少些，幼虫的生长情况较好。例如，培养扇贝*Pecten ziczac*和*Argopecten gibbus*，在D形幼虫阶段的饵料投喂密度是5个细胞/微升，逐渐增加投喂量，直到匍匐幼虫期前达到18个细胞/微升，幼虫的生长速度达到最大值。有些培育场的投喂量是上述投喂量的2-3倍，尽管如此，但很少高过对牡蛎、蛤和贻贝的投喂量。

可以注意到上面提到的混合饵料的例子中没有提到等鞭金藻的一个品系T-Iso。用T-Iso来培养牡蛎早期幼虫，以及蛤、贻贝和扇贝幼虫都是相当好的饵料(图70)。但是与球等鞭金藻，尤其是与巴夫藻相比，重要的高不饱和脂肪酸DHA的含量相当低。当用T-Iso作为单一饵料喂养不同种的牡蛎幼虫，当壳长超过110微米时，幼虫的生长发育就非常迟缓。由于这个原因，推荐育苗场应该使用已经证明培养效果较好的球等鞭金藻和巴夫藻(*Pavlova lutherii*)，而不要用T-Iso品系作为饵料。

幼虫摄取上面提到的两种藻的混合饵料,可以成功地从D形幼虫生长发育到变态期。然而,当幼虫平均壳长超过120微米后,添加第三种微藻有利于幼虫生长,选择个体较小的四片藻会取得更为明显的效果。实验表明,饵料中添加四片藻会提高幼虫的生长率和完成变态的比例(参考图68)。

四片藻可以直接替代微藻饵料中的等鞭金藻或巴夫藻。但是最可取的办法是将四片藻作为第三种饵料添加进去。然而,它不能替代饵料组成中的硅藻。前面介绍的三种硅藻都含有已经清楚知道的,对贝类幼虫发育起到关键作用的另一种重要的高不饱和脂肪酸——二十碳五烯酸。

当用四片藻替代等鞭金藻或巴夫藻来组成两种藻类混合饵料时,其用量(细胞密度)是小形鞭毛藻适合密度的10%。如:

37.5个细胞/微升 *C. muelleri* + 50 个细胞/微升 *P. lutherii* 的饵料组成应该改变成:

37.5个细胞/微升 *C. muelleri* + 5.0个细胞/微升 *T. suecica* (原文为0.5细胞/微升,可能有误,译者注)。

当 *Tetraselmis* 是作为第三种藻混合配制幼虫饵料时,其中的每一种藻的用量是总量的33.3%。正如前面所谈到的,不同种类的实际用量(单位水体内的细胞个数)要以 *Isochrysis* 为基数(100个细胞/微升)进行换算。例如:

两种藻混合饵料:

37.5个细胞/微升 *C. muelleri* + 50个细胞/微升 *P. lutherii* =  
100个细胞/微升 *Isochrysis*

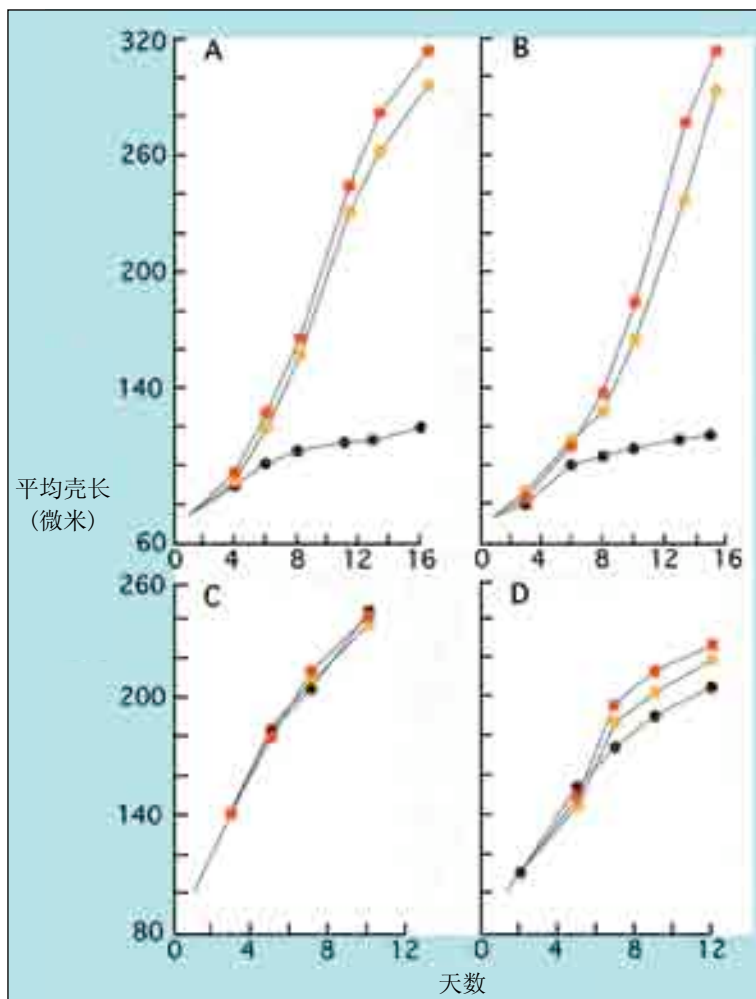
三种藻混合饵料:

25个细胞/微升 *C. muelleri* + 33.3个细胞/微升 *P. lutherii* + 3.33个细胞/微升  
*T. suecica* = 100个细胞/微升 *Isochrysis*。

所有投喂的藻种的单藻体积或生物量与这两个饵料例子基本相同,它们适合壳长大于120微米的幼虫。

该部分到现在为止关注的焦点一直是幼虫的饵料和投喂量的一般指导原则。在许多小型育苗场为了减少资金投入,经济的拮据使得他们较少关注藻类饵料收获时的密度,或者不按照这里详述的精确投喂方法去做。有经验的育苗人员在培育一种或更多种对环境不利因素抗性强的双壳类时,他们往往不去精确地计算投喂量,而是根据藻液的颜色判断微藻饵料是否长好,将藻液加入幼虫培育桶里后,也是根据水色来判断饵料量是否合适。

规模大的育苗场一方面将苗种供应自己的养殖场,另一方面将多余的苗种供应给同区域内其他的私有养殖者。生产的规模和投入的资金决定了对它的经营管理要予以更严格的控制。这里优先考虑的是苗种生产过程中实现低成本和高收益。接下来将讨论如何通过最有效地利用藻类饵料培养幼虫来达到这一目的。



**图70:** 四种双壳类投喂不同饵料的生长情况。(A)太平洋牡蛎, (B)红树林牡蛎, (C)硬壳蛤, (D)菲律宾蛤仔; 深褐色圆点: 等边金藻T-Iso品系, 黄色圆点: 钙质角毛藻, 橙黄色圆点: 两种藻的混合饵料。

### 5.2.3.1 投饵方法

养殖场有两种基本方法确保足够的饵料投喂给幼虫。第一种是添加藻类到幼虫培育桶的海水中, 增加饵料细胞密度维持幼虫最大生长率。第二方法是根据已知平均壳长不同的幼虫的摄食率, 主要针对在发育过程中生物量不断增加的幼虫进行投喂。后者在5.1.4.1幼虫高密度培养的详述中已经简要的提过。

#### 方法1

由于培养期间池水的体积一般不会变化, 所以该方法更容易被选择采用。当幼虫以较低密度培养时该方法较为适用。事实上, 每天只投喂一次饵料。24小时后饵料密度变低。在投喂后的24小时内, 最适的饵料细胞浓度只是维持一个很短暂的时期。对该方法进行改进的措施是在第一次投喂后的8-12小时再追加50%(或更多)的投喂量, 目的是为了每天保持饵料细胞密度接近最适宜浓度。在幼虫存活率高的情况下, 培育过程中要通过分池来降低幼虫数量, 可以分到2个或更多的池子里, 这样幼虫所消耗的微藻饵料就不会太快。

#### 方法2

该方法需要知道从D形幼虫开始直到完成变态时各个时期的幼虫壳长(或体重)、数量及其摄食率。知道了流水培育池中幼虫平均大小和数量, 育苗人员就能够计算出饵料的投喂量, 在维持此时幼虫生物量的前提下达到幼虫最大生长率。也就是说, 在一定体积下可以成功地将幼虫的培养密度保持在较高的水平上。

然而,投喂过量与投喂不足对幼虫的伤害是相当的。正如前述,对多数种类的幼虫在高密度培养条件下,有必要将所推荐的每天的最佳投喂量,如每微升100个等鞭金藻细胞,将这一投喂量分成两次投喂。如果每天单位水体的投喂量达到了正常投喂的一倍,饵料量超过了幼虫最有效摄食能力。投喂量过多会导致细菌性相关疾病的发生,幼虫受胁迫。既然如此,将所需的投喂量分两等份,一份直接添加到培育池中,另一半在随后的24小时里一次性投喂或连续滴加到培养槽里。

使用先进精密的光电子设备是确保适当的饵料投喂的必然趋势。监控过程的最基本原理是由光电子设备发出的红外线光柱通过培养水体,接受器所接受到的信号强弱与饵料细胞浓度引起的混浊度有关。假如确定一个基准值为饵料细胞的最佳密度,随着幼虫不断地摄食饵料,水的混浊度就降低。减低了的信号启动继电器,激活一个小的蠕动泵,从充气的贮藻罐中泵出较多的藻细胞添加到培育池中,直到恢复预设的混浊值,以此来保持培育槽中最佳的饵料密度。(参考5.1.4节,获得更多信息)。

### 5.2.3.2 投饵量的计算

**投喂方法1:** 使得幼虫培育槽中饵料细胞达到一定的密度,所需要的藻液的体积的计算公式如下:

$$\text{饵料投喂量(L)} = \frac{\text{需要的饵料细胞密度(个细胞/微升)} \times V}{\text{收获的藻类的密度(个细胞/微升)}}$$

$$V = \text{培育池幼虫的体积(升)}$$

例如下述的事例,

已知:

投喂的饵料和细胞密度:

37.5 细胞/微升 *C. muelleri* + 50 细胞/微升 *P. lutherii*

收获的藻液细胞密度:

*C. muelleri* 4800 细胞/微升;

*P. lutherii* 8 900 细胞/微升

幼虫培育槽体积:800升

计算:

*C. muelleri*的投喂量 =  $37.5 \times 800 / 4800 = 6.25$ 升

*P. lutherii*的投喂量 =  $50.0 \times 800 / 8900 = 4.49$ 升

**投喂方法2:** 计算方法包括两方面内容,一是初始的每日投喂的饵料细胞数,该数相当于75细胞/微升 *Isochrysis*;二是在投喂后的24小时里要维持这一细胞密度不变。下面以太平洋牡蛎幼虫的培育为例,详细介绍计算步骤。



**已知：**

幼虫培育池体积	— .1 000升；
太平洋牡蛎幼虫数量	— .2250万；
幼虫平均壳长	— .170微米；
提供的藻类饵料	— . <i>P. lutherii</i> , <i>C. muelleri</i> 和 <i>T. suecica</i>
藻类的收获密度	— . <i>P. lutherii</i> = 15 000 细胞/微升 <i>C. muelleri</i> = 7 400 细胞/微升 <i>T. suecica</i> = 1 200 细胞/微升

**计算：**

- 1) 按照上面所说的, 收获的三种微藻(*P. lutherii*, *C. muelleri*和*T. suecica*)的细胞密度分别是25细胞/微升、18.75细胞/微升和2.5细胞/微升;它们的初始投喂量分别为1.67升, 2.53升和2.08升(见投喂方法1的计算方法)。
- 2) 从表13中知道每个壳长170微米的太平洋牡蛎幼虫每天消耗的饵料细胞数量为30100(以等边金藻为当量的细胞数)。
- 3) 30100藻细胞被将要投喂的藻的种数(这里为三种藻)来除, 结果是: 10033细胞*P. lutherii*/微升(如果是*Tetraselmis*, 则是1003细胞, 或者是7525细胞的*C. muelleri*)
- 4) 计算1000升池中培育2250万幼虫需要保持最佳饵料细胞密度的每种藻的体积:

$$\begin{aligned}
 \text{Pavlova的体积} &= \frac{\text{每个幼虫所消耗的细胞数}(C) \times \text{幼虫数(百万)}}{\text{饵料藻细胞的密度(细胞/微升)}} \\
 &= 10\,033 \times 22.5 / 15\,000 = 15.04 \text{升}
 \end{aligned}$$

按照以上的计算方法:

$$\text{投喂 } C. \text{ muelleri} \text{ 的体积} = 7\,525 \times 22.5 / 7\,400 = 22.88 \text{升};$$

$$\text{投喂 } T. \text{ suecica} \text{ 的体积} = 1\,003 \times 22.5 / 1\,200 = 18.81 \text{升}。$$

- 5) 按照1)的计算值, 量取藻液直接加到幼虫培育池中。余下的部分(如果以*Pavlova*为例, 则是15.04升减去1.67升)装入保持低温、充气的微藻储罐中。这些藻液在随后的24小时里以恒定的速度供给幼虫。实践表明, 把藻液贮藏在存有过滤海水的储罐中, 由蠕动泵定量泵出来喂养幼虫是可行的。

**备注:**表13的数据是幼虫生长在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 条件下的情况。在固定的培育温度下, 幼虫的生长通常可以预测, 所以不必每日测量壳长。但每隔48小时测量一次仍是必要的, 中间那天的数值可以凭经验估计。

幼虫无论是在低密度下使用方法1投喂, 还是在高密度下使用方法2投喂生长率都没有很大差别。后者的优点在于运作的成本效益方面, 即节省劳动力和更好的利用养殖场空间。当使用光电子控制投饵时(见5.1.4.1), 使用投喂方法2需要对微藻饵料的体积进行估算。

**表13:** 三种常见双壳类每枚幼虫每天摄食藻细胞的数量与幼虫平均壳长的关系  
(显示的数值是相当于*Isochrysis galbana*的细胞数)

平均壳长 (mm)	每枚幼虫每天摄食藻细胞数(相当于 <i>Isochrysis</i> 的细胞数)		
	太平洋牡蛎	平牡蛎	菲律宾蛤子
100	2 800		4 400
110	6 700		6 000
120	10 600		8 000
130	14 500		10 200
140	18 400		12 800
150	22 300		15 700
160	26 200		18 900
170	30 100	19 200	22 300
180	34 000	28 200	26 000
190	37 900	37 300	29 900
200	41 900	46 300	29 100
210	45 800	55 400	21 900
220	49 700	64 500	14 900
230	53 600	73 500	
240	57 500	82 600	
250	61 400	91 600	
260	65 300	100 600	
270	69 200	109 800	
280	73 100	118 800	

### 5.3 影响生长和存活的因素

#### 5.3.1 概述

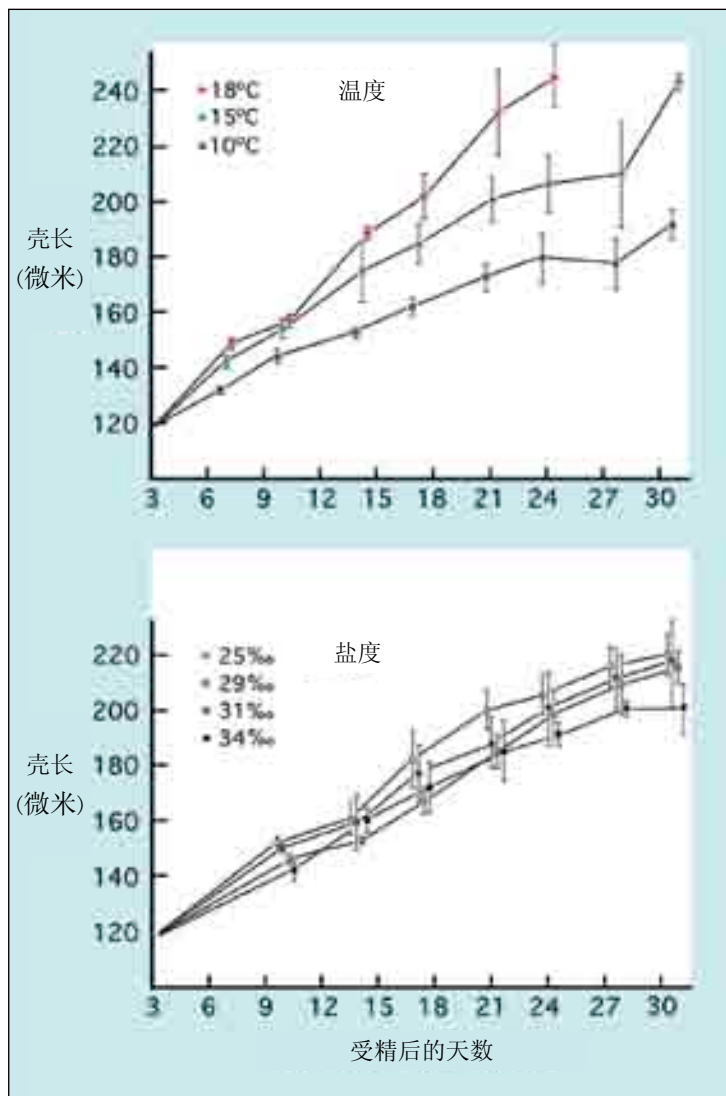
前面对饵料的效果和投喂量的计算已作了详细的叙述。这一部分将介绍其它有关的培养条件, 以及这些因素是怎样影响胚胎和幼虫的发育和变态的背景知识。主要包括温度和盐度、海水水质、卵和幼虫质量及病害等。本节包括了许多未曾发表的内容。与本手册其他章节相反, 本文引用的参考资料有助于读者对感兴趣的论题进行深入了解。

#### 5.3.2 温度和盐度的影响

幼虫培养过程中影响其生长、发育和存活的众多因素中, 温度是最重要的因素之一, 因为幼虫的代谢率由其所处的环境水温决定。许多常见的养殖的双壳类幼虫具有较广的温度和盐度的耐受力, 即使它们所处的环境条件超越了它们原有的自然环境条件, 常常也能很好地生长。一些生活在较寒冷地区的外海的种类, 不能认为野生种所处的自然环境温度范围是幼虫生长发育的最佳条件。根据一般的规律, 培育幼虫的水温略高于它们所处的自然温度, 幼虫会生长得更好些。同样, 幼虫对盐度的耐受限度也比我们估计的要大得多。比如扇贝(*Argopecten gibbus*)的亲本适应了百慕大海区几乎不变的36PSU的盐度, 但是其幼虫在20PSU盐度下能够生长并发育到附着。虽然生长和发育较慢, 但到达附着期的存活率比在较高盐度下培养的几乎没有差别。

图71是不同的盐度和温度对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)幼虫生长的影响。该种幼虫在不同温度条件下的生长率是相当典型的, 这样的生长率在其它的冷水性扇贝中, 如*Placopecten magellanicus*和*Pecten maximus*也具有, 它们正常生长水温是14 - 16°C。高温将给生长, 发育和存活率带来不利的影响。栖息在外海的*Placopecten*

*magellanicus*和*Pecten maximus*扇贝需要生活高盐度海区(>30PSU)。与此相反,海湾扇贝属的扇贝,如*Argopecten gibbus*和*Argopecten irradians concentricus*能在26 - 28°C高温下顺利生长。

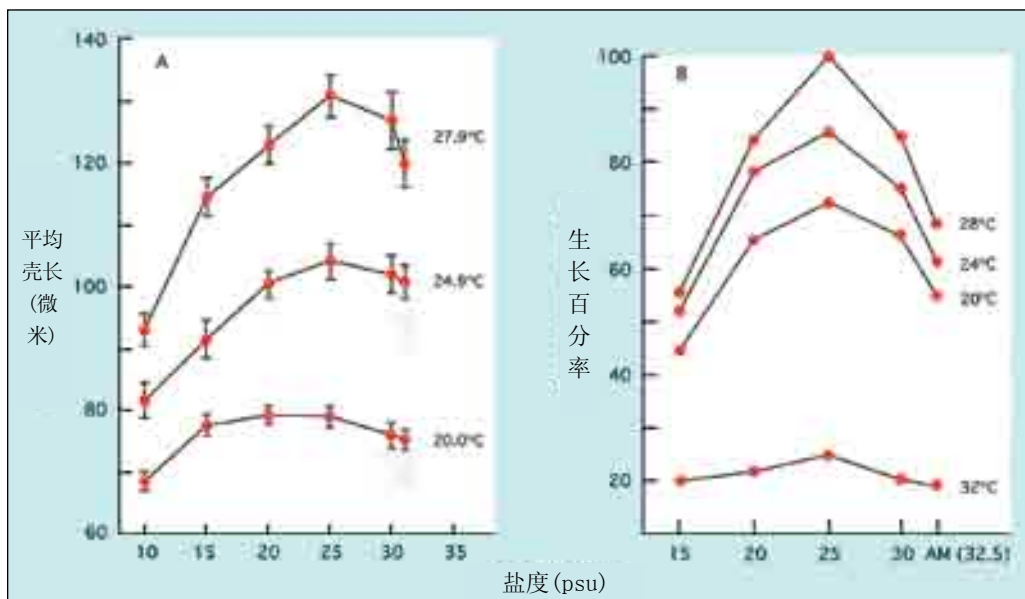


**图71:** 温度、盐度对虾夷扇贝幼虫生长的影响。温度实验是在29PSU盐度条件下做的,而盐度实验是在15°C水温条件下进行的。(选自 Bourne等, 1989)。

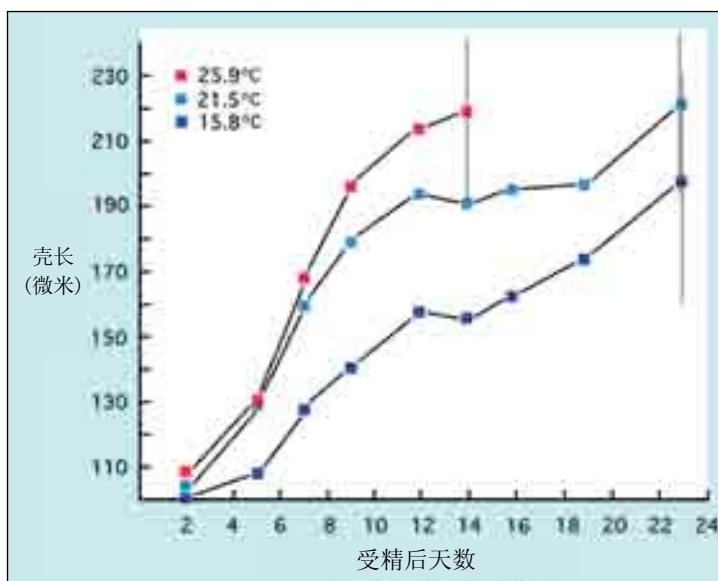
*Crassostrea*属的牡蛎在培养条件下对温度和盐度都有极高的耐受性。图72说明了这两种因素对生长的交互作用。温度28°C、盐度25PSU接近红树林牡蛎和太平洋牡蛎生长、发育和存活的最佳条件,美洲牡蛎也同样如此。幼虫忍受的盐度可低到10PSU,但存活的下限是5PSU。前两种牡蛎实验期间所有处理组的存活率均超过80%。

欧洲平牡蛎幼虫的温度耐受力与卵生性牡蛎属的幼虫相同,但对较低盐度下的耐盐性差,它们处在20PSU盐度下能短暂的存活,28 - 32PSU盐度接近最佳生长和发育条件。

栖息于沿岸和河口地区的经济种类,如蛤类中的菲律宾蛤仔、美洲硬壳蛤和软壳蛤,其幼虫的生长对温度和盐度的适应性也较广。除了软壳蛤的正常培养温度在18 - 20°C外,其它几种双壳类的幼虫的适宜生长温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,盐度为25 - 34PSU(图73:温度对菲律宾蛤仔幼虫生长的影响)。



**图72:** 在不同温度和盐度条件下, 红树林牡蛎(A)初始平均壳长65微米)和太平洋牡蛎(B)的D形幼虫分别在7天和10天的试验期内的生长情况。结果显示了太平洋牡蛎幼虫最好的生长百分率是在28°C和25PSU条件下。B中的AM表示周围环境的盐度32.5PSU。



**图73:** 三种不同温度条件下菲律宾蛤仔D形幼虫到变态期的生长曲线(垂线表示幼虫刚进入匍匐期时的壳长(微米)分布范围, A. Lovatelli, 硕士论文)。

### 5.3.3 海水水质

一般说, 要求育苗场全年都以稳定的生产率进行生产通常是不可行的。一年四季周期性的自然变化所产生的环境因素的变化要完全控制它难以做到, 所以在一年中某段时间幼虫的生长率和存活率比其它时期低。这不只是技术上的问题, 例如培养用水过滤不好或设备受到侵蚀也是导致幼虫生长率和存活率降低的因素。也有可能使用了已被污染的、质量较差的微藻饵料, 或是管理过失(人为错误), 海水水质可能也有问题。

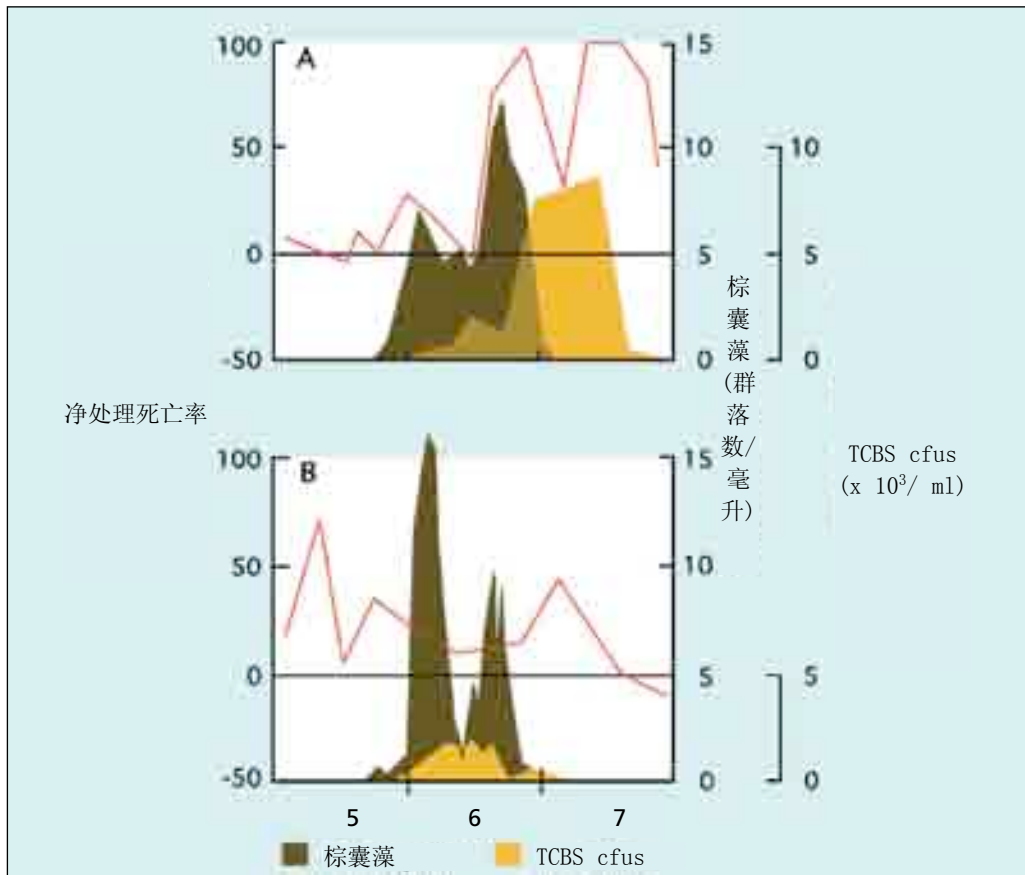
长久以来, 已经知道海水质量的季节性变化对幼虫胚胎的生长和存活是密切相关的。这不一定是全球性的现象, 但确实是在大西洋两岸会不时地产生不利于幼虫培育的环境条件, 尤其是春天海水开始变暖, 或者是在春季和初秋浮游植物大量繁殖的时期。

这些时期海水水质变坏的确切原因还没有完全清楚,而且也不是每年都会发生,好坏有年际变化。

运用标准的生物学测定技术判断天然海水水质变化的具体做法是用正常处理的育苗海水和人工配制的海水来培育胚胎和幼虫,比较它们每周的发育和生长状况。Utting和Helm在1985年详细介绍了双壳类胚胎生物测定方法。该方法可以在大的烧杯中或是在桶里进行,观察海水的变化是否影响到幼虫的生长和存活。人工海水可以根据配方,用分析纯的化学药品配制,或者从实验室或水族商店等处购买。人工海水必须始终如一地以同样的方式配制,因为它是试验的参照物,必须确保质量。

图74 是某养殖场海水水质变化影响太平洋牡蛎胚胎发育的一个例子。受精卵发育到D形幼虫的存活状况由净处理死亡率 (NTM) 表示,

$$MNT = 1 - \left\{ \frac{2 \text{ ml 正常处理海水中D形幼虫的平均产量}}{2 \text{ ml 人造海水中D形幼虫的平均产量}} \right\} - 100$$



**图74:** 1977年和1978年5月 (A) 到7月 (B) 使用生物测定法比较人工海水和正常处理海水中太平洋牡蛎受精卵发育到D形幼虫时的相对存活率(以净处理死亡率表示—红线)。水平黑线是零净处理死亡率,表示在实验海水和空白培养海水中的存活率相同。附近沿海水样中群体鞭毛藻棕囊藻(以群体数/毫升表示)的菌落数和生长在TCBS琼脂培养基上的细菌菌落(cfus—菌落数,千/毫升)出现的时期重叠。根据Utting和Helm(1985)年改写,包括未出版的数据。

净处理死亡率的值为0时,表示在两种培养液中的受精卵发育到D形幼虫阶段的存活率都很好,NTM等于100时,表示试验组的幼虫发育全部失败。负值说明养殖场的水好于人造海水。

大西洋北温带地区年初水温低,昼短夜长,海水水质相对稳定。随着沿岸海水变暖,白昼渐渐变长,春季和初夏海水水质不断变化。NTM值开始不可预测的升高。在某些年份里,有些时期显然是正常的优质的卵,却很难发育到D形幼虫。在人工配制的水中正常发育的卵,在养殖场处理过海水中却不能正常发育,这一现象不仅仅是发生在太平洋牡蛎的育苗中,其他多数双壳类的育苗中也有类似的情况。

不稳定的海水水质通常与春季有利于沿海浮游植物大量繁殖的条件相一致。还没有证据证明是浮游植物的代谢物和分解物引起的水质败坏。更可能是细菌的繁殖和代谢物包括细菌产生的外毒素共同引起的。

图74说明了一个养殖场海区出现的这种情况。在春末,那里的海水中大量繁殖的优势藻类是群体鞭毛藻棕囊藻(*Phaeocystis pouchetti*)。比较了不同年份NTM值发现,在TCBS琼脂培养基上形成的细菌菌落数最多时,养殖场海水的水质最差。在琼脂上形成菌落的细菌包括弧菌(*Vibrio*)属种类,还有已知条件致病菌,如鳃弧菌(*V. anguillarum*)是经常报道的同时期养殖系统中多数优势菌的一种,经常预示着疾病的产生。鳃弧菌能产生外毒素,包括一个低分子量的纤毛静止毒素,能抑制幼虫面盘的纤毛和稚贝腮纤毛的摆动。

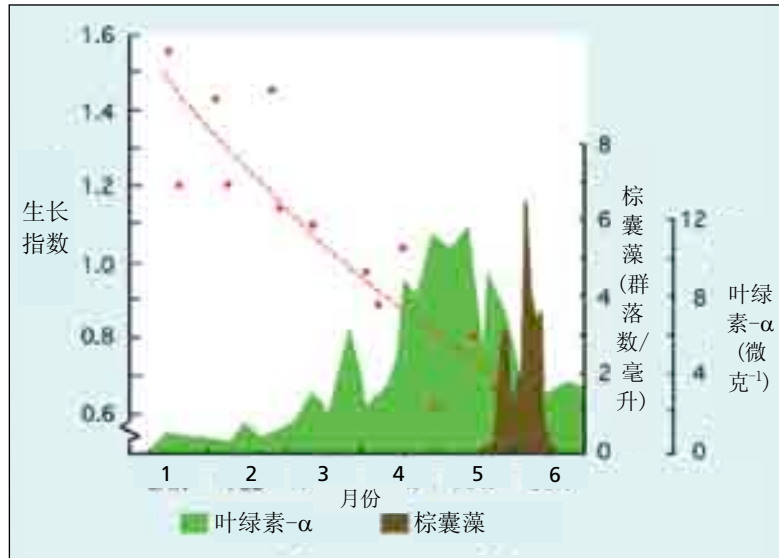
用于胚胎发育的海水使用前用不同的化学方法预处理24小时,水质能够得到改善。除了通常过滤和紫外消毒的方法外,经常有效的处理方法是按照1毫克/升 EDTA和20毫克/升硅酸钠( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )的剂量,加到过滤海水的水池中,然后剧烈充气24小时后再使用。经过这样处理可以明显提高从受精卵发育到D形幼虫的百分率。例如,在整个养殖季节(3月到9月)太平洋牡蛎可每周产一次卵,一共进行了28次实验,发育到D形幼虫阶段的平均值由36.6%提高到52.9%。进行化学药品预处理后的海水的提高值是以人工海水培育的D形幼虫存活率的平均值54.6%作参照的。

D形幼虫的生长率也同样受这类水质变化的影响,原因与胚胎发育的情况相同。影响生长的试验在所有的双壳类试验中均得到证实。图75比较了在25°C条件下,培养在大烧杯中的太平洋牡蛎D形幼虫在正常处理的海水和人工配制海水(Lyman Fleming公式, Sverdrup等1942)中6天的生长情况。生长率的变化用生长指数(GI)来表示:

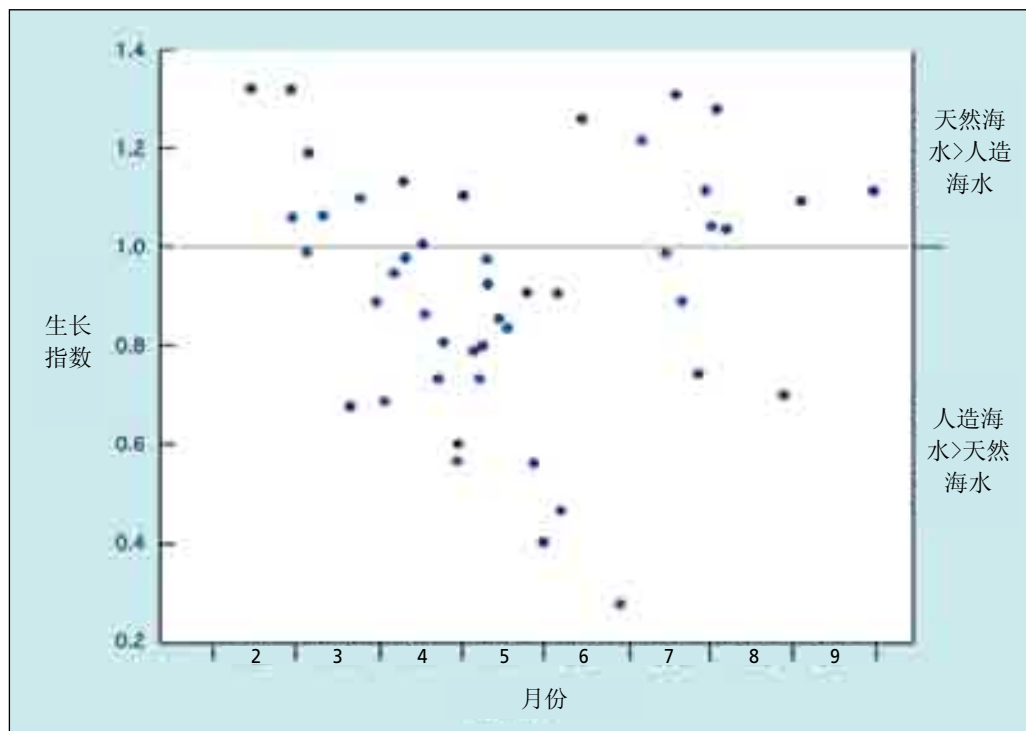
$$GI = \frac{\text{幼虫在养殖海水中6天的生长增加量(微米)}}{\text{在人造海水中6天的生长增加量(微米)}}$$

生长指数大于1.0说明该时期在养殖海水中生长较好,等于1.0说明在两种培养基生长一样,小于1.0表示该时期与人工海水相比在养殖海水中的生长率较低。

图75结果显示从1月养殖季节开始到5月底实验结束,海水水质逐渐衰败。大概持续了六周的时间,6天的实验中幼虫在两种培养海水中不能存活。直到4月末培育的几批幼虫可以在养殖海水中正常发育到附着期变成稚贝,稚贝的产量也较好。过了这个时期,大规模育苗存在一定的问题,因为幼虫存活率低,最终不能发育到附着时期。欧洲平牡蛎在5、6月份也出现同样的现象,幼虫的生长不好(图76),由于疾病的原因,幼虫的总死亡率达到最高值。另外,海水的水质在某些年份与其他年份相比可变性较大。



**图75:** 太平洋牡蛎幼虫在25°C正常养殖海水和人工海水条件下,6天的生长比较。以生长指数计算(见正文)。显示出叶绿素 $\alpha$ 和棕囊藻的数量作为养殖场附近海岸海水浮游植物量的指标。(M. M. Helm, 未发表)。



**图76:** 欧洲平牡蛎幼虫离开母体后,培养在盛有人工海水(24±1°C)的烧杯里,每4天一个周期直到育苗季节结束所观察到的生长指数。这是两年的数据,用色泽的深浅区分开(M. M. Helm 1971, 未发表资料)。

#### 5.3.4 卵和幼虫质量

卵子质的概念包含卵子的数量及其内在的生化成分,这些指标涉及到幼虫今后的表现。研究的重点是卵子所含有的脂类物质,尤其是高不饱和脂肪酸(HUFAs)的重要性和功能。HUFAs一方面在母体卵子发生期由亲本供给,另一方面是从卵子开始成熟直到产卵前,直接从饵料中获得。

从卵子发生到卵子成熟,蓄养种贝的环境条件对种贝的繁殖力和卵的质量影响极大。亲本无论是在自然环境条件下的性成熟,还是在人工蓄养条件下促熟,都与饵料的成分和丰富程度有关。刚产出的、卵内的HUFAs的组成因促熟期间投喂饵料的不同而变

化(图77)。但没有证据显示,源于卵子的HUFA含量的变化影响到幼虫的发育能力和活力。尽管野生的欧洲平牡蛎幼虫和促熟条件下的亲本产出的幼虫在HUFA的含量上差异很大(图78),但是也没有充分的根据表明前者就比后者好或者是坏。这种微妙的差异在育苗场的环境下不能显现出来,说明育苗场可以为幼虫提供接近最佳的培育条件。

对欧洲平牡蛎来说,更重要的是刚排放的卵或刚释放的幼虫的脂肪总含量。以无灰(有机)干重的百分含量表示太平洋牡蛎卵的总脂肪含量,总脂肪的含量的高低关系到发育到D形幼虫阶段的比例(图79)。即使使用标准的亲本促熟方法,一年中的不同时期和不同年份脂肪含量变化也很大(图80A),这可以在投喂饵料之前,促熟池中未过滤海水里存在的微藻数量、种类和营养价值的差异可被用来解释(图80B)这一现象,也可以用来解释为什么育苗场某些年份产量高,而有些年份几乎一无收获。

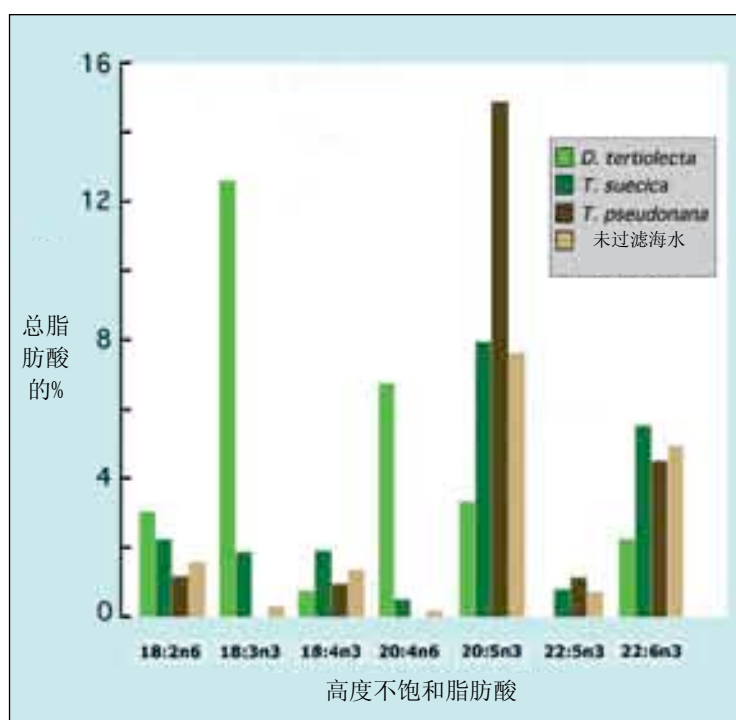


图77: 菲律宾蛤仔的高不饱和脂肪酸组成。在促熟期间供给亲贝不同的饵料。对照组养在未经过滤的海水中,另一组则用经过2微米过滤器过滤的海水。后者投喂3%的微藻(杜氏藻、四片藻或海链藻)(I. Laing, A. R Child and M. M. Helm, 未发表资料)。

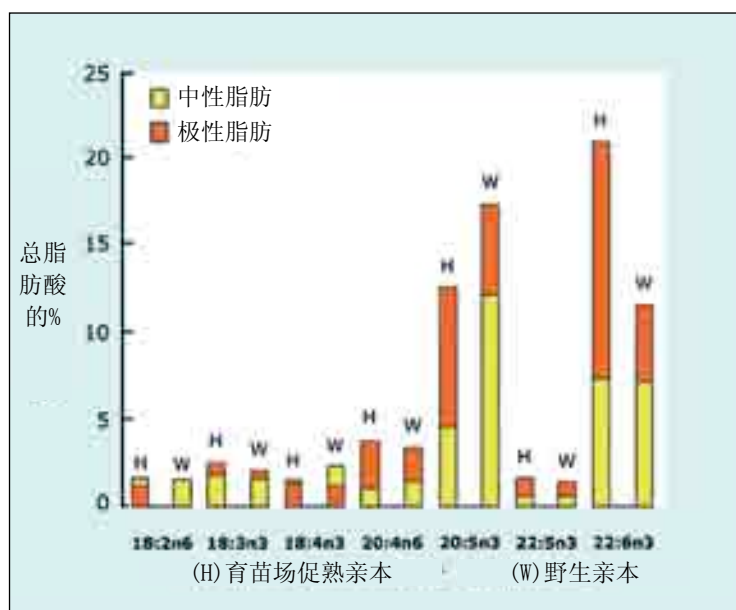
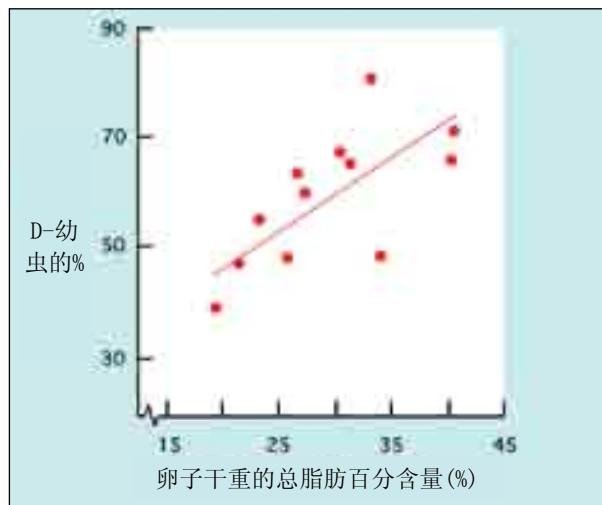


图78: 人工促熟的和野生成熟的欧洲平牡蛎亲本所产的幼虫体内高不饱和脂肪酸组成的比较。中性脂肪酸(三酰甘油)和极性脂肪酸含量不同。改自M. M. Helm等(1991)。

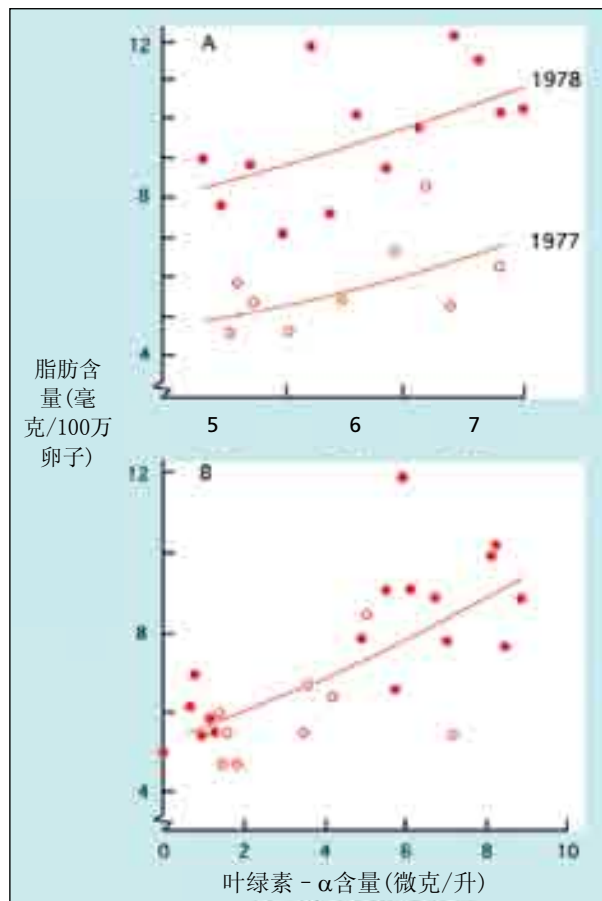


在幼生型牡蛎中的欧洲平牡蛎, 幼虫从成体产出后的4天里生长速度与脂肪含量密切相关, 说明早期幼虫的发育与母本提供的储备脂肪有关(图81)。而且存在季节性和年份差异。然而, 当每天投喂的饵料成为最重要的因素时, 母体的影响随着幼虫的发育而变得不甚明显。

通常多数双壳类育苗中, 除了幼生型牡蛎外, 如平牡蛎在接近各自最佳生长条件下, 幼虫壳长和无灰干重都有相似的关系(图82A)。幼生型牡蛎的幼虫后阶段的壳长与无灰干重的关系与卵生型牡蛎相比, 两者的分歧愈来愈大。幼虫发育到变态期脂肪累积的速率至少相差3倍(图82B), 这可以说明这种差异的原因。研究表明, 脂肪作为能源对平牡蛎幼虫变态时期的影响比对卵生型牡蛎更重要。

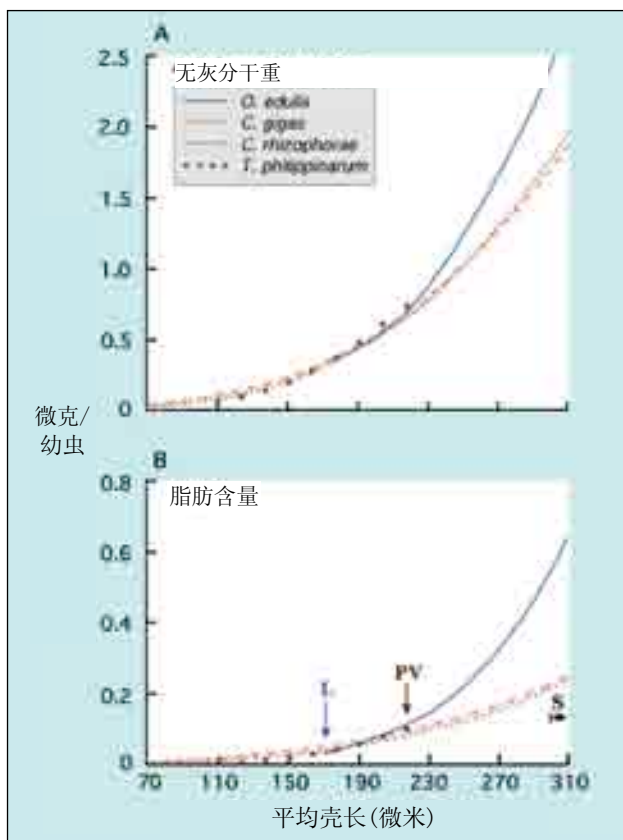
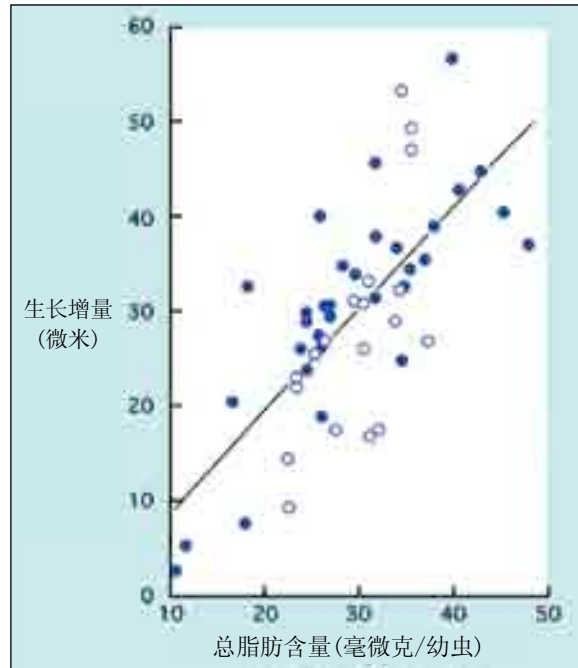


**图79:** 太平洋牡蛎脂肪总含量和发育到D形幼虫阶段的百分率的关系。脂肪总量是以无灰干重表示。引自S. D. Utting 和M. M. Helm(1985), 未发表资料。



**图80:** 刚排放的太平洋牡蛎卵的脂肪总含量(毫克/100万卵)和两年内不同月份海水中叶绿素含量的变化。(A)在两个不同年份内月间的变化和(B)在标准条件下供给育苗场内亲贝的未过滤海水中的叶绿素- $\alpha$ 含量。引自Utting 和Helm(1985)和以前未发表的资料。

**图81:** 欧洲平牡蛎幼虫从离开母体后的4天时间里壳的增长量和幼虫体内的脂肪含量的关系。图中的每一点代表一批幼虫, 不同年份的数据点用颜色的深浅区分开。在整个实验过程中幼虫被养在烧杯内, 按标准条件进行管理, 用的是人造海水和相同的饵料和相同的投喂量。引自M. M. Helm (1971) 和尚未发表的资料。



**图82:** 双壳类幼虫壳长增长与幼虫的无灰重量 (A) 和脂肪 (B) 含量的关系。(L) 刚离开母体的欧洲平牡蛎, (PV) 菲律宾蛤子匍匐期幼虫, (S) 进入附着期的三种牡蛎幼虫。

### 5.3.5 病害

在第5.3.3部分曾经提到过, 在运转得很好的养殖场里有时突然发生由弧菌暴发而引起的幼虫大量死亡现象。但弧菌不总是引起不正常死亡率的直接原因, 它们也不是引起育苗水体污染的唯一致病菌或者是唯一的专性致病菌。潜在的致病菌在育苗场里一年四季都会存在, 但在大部分时间里, 它们只是处于一种不碍大局的小菌群。可是有些时候, 正如第5.3.3部分中所叙述的, 它们在一定的时候可以增殖扩散, 成为优势菌落, 对育苗构成严重威胁。

倘若幼虫大量死亡发生在细菌暴发之前,需要调查其它潜在原因。例如,管道是否需要清洗,过滤器是否存在问题。同样,水泵和鼓风机等设备是否有腐蚀或漏油现象,都需要彻底检查。藻类培养液可能已经严重污染,或者由于技术工人判断或估计错误而过量投喂,或者忘记打开一个或多个池子的充气装置,或者漂白后没有清洗池子。只有调查了每一个环节,并排除其他因素后,才能确定是细菌引起的可能性。

与稚、幼鱼的疾病不同,双壳类幼虫疾病的暴发迅速而严重。幼虫很少表现出延缓的征兆后才大量死亡。有时幼虫在晚间检查时,其色泽和行为都相当正常,但到次日清晨就沉底、死亡,壳内充满了纤毛虫类原生动物。幼虫经常有不摄食的先兆,一直维持到大量死亡之前。这说明写培育记录的重要性。

幼虫一旦沉底,育苗人员只能向池子里加入强消毒剂如漂白粉等进行彻底消毒。尽管有一小部分幼虫可能仍然很活跃,表现正常,但如果病菌侵入,它们在到达变态前迟早是要死亡。这就要求控制住疾病的蔓延,消除感染源。这就是说要关闭养殖场彻底地进行熏蒸消毒,确保所有的设备的干净和灭菌处理。然后养殖场休息1或2周,再重新生产。在疾病暴发期间使用抗生素是不可取的,抗生素几乎不会改变状况,而且有增加病菌抗药性的危险。

很多育苗场都集中精力在一年中没有疾病严重暴发的季节进行生产。温带地区,冬季和初春,也就是在浮游植物大量繁殖前是最好的育苗时期。6月末到9月底也是适合连续生产的季节。

进一步了解双壳类疾病方面的知识参见第5部分的结尾。

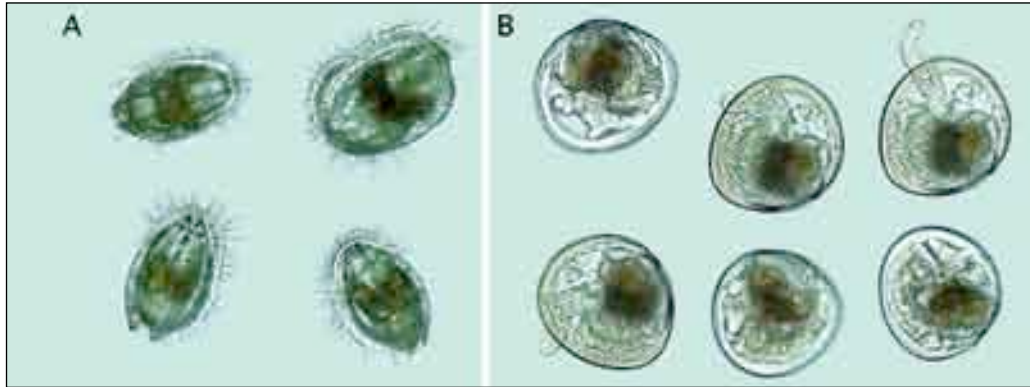
## 5.4 附着和变态

### 5.4.1 概述

幼虫可以在水体中以多种形态自由自在地游动(图83A)。通常,它们都游向水体表面,然后缩回运动器官——面盘,关闭它们的外壳,缓慢地沉向水底,随后又重复开始以上的活动。当它们发展到幼虫末期时,摄食活动减慢,消耗较少的食物,幼虫要花费愈来愈多的时间向池底游动和滞留在池底。这些都标志着幼虫即将开始变态,对幼虫发育而言是一个关键时刻,大量的死亡就可能发生在这一时刻。在变态过程中,要发生相当多的解剖学上的变化。一个成功的变态,也即发育到稚贝,取决于很多因素,决不只是在幼虫阶段积累的可利用的能量一个因素。过分强调储存能量对生产健康幼虫的重要性还说明不了问题。

变态可以分为两个阶段,附着是可逆的(除了牡蛎以外),变态是不可逆的。

附着是变态的开始阶段。幼虫开始从水体下落到附着基质上,用它们的幼虫足在附着基上缓缓的爬动,搜寻可供附着的表面(图83)。如果表面质地不适合附着,它们就会移动,或者游开这里去寻找一个更适合的地方。这个过程如果重复几次,合适的地方没有找到,变态的时间就会向后延迟。



**图83:** (A) 杂色海湾扇贝幼虫的游泳和摄食器官一面盘, 和(B) 匍匐期的眼点幼虫。可以看到伸出壳外的足和眼点, 消化腺下可看到小的黑色的眼点, B图中左上方的幼虫最为明显。

变态是第二个阶段, 它是不可逆的。虽然引起变态的多种因素至今还不甚清楚, 但是附着基的类型, 及其物理的、化学的和生物学性质无疑是重要的。当它从一个游泳的幼虫变态成一个稚贝时, 在动物体内发生着一系列的形态上和生理上的变化, 变态会很快完成, 如果必要的条件没有得到满足, 变态就要延迟。在孵化过程中如果降低水温, 完成变态的时间就会延期。

#### 5.4.2 幼虫的成熟

幼虫开始寻找附着基质的行为标志着幼虫准备开始营附着或固着生活。在许多双壳类中, 在幼虫壳的两侧、消化腺的表面出现眼点(图83)意味着变态已经开始或即将开始。眼点的真正作用尚不清楚, 但是眼点出现是和幼虫大小和发育程度相关。在换水时把它们从筛网上转移到水桶里的时候, 幼虫用它们自己分泌的黏液聚集成“线状”或“漏斗”状(图84), 这些现象与幼虫的变态相吻合。这些明显的现象表明幼虫准备营附着或固着生活。



**图84:** 幼虫附着前, 大量的幼虫聚集在一起, 形成“线状”或“漏斗”状的团块。图中黑色的部分是大量的幼虫聚集在一起, 漂浮在水表面。

在这个时候, 或者一两天后, 我们可以在两瓣幼虫壳间看到一个正在伸出的新发育成的足(图83B), 足的尖端有无数纤毛和大量的感觉器。幼虫用足在基质上寻找适合于它们附着或者固着的场所; 一旦找到适合的地方, 它们用形成的足丝或粘合剂附着在那里。幼虫足是给它们沿着表面爬行提供动力, 在某些物种中, 幼虫足也有摄食的作用。足丝腺和粘液腺的位置因种而异。牡蛎用它们自己分泌的粘合剂将自己固定在基质表面, 而其它的双壳类则用足丝来固定自己, 这个阶段的幼虫就是所谓的匍匐期幼虫。

对于双壳类和其它无脊椎幼虫的附着和变态是否存在一种严密的程序或者它们在附着开始前是否选择一种独特的基质,并且需要一种特殊的诱因才能启动附着程序存在着相当大的争议。目前总的观点是环境因子影响着附着和变态,在这两个过程开始前幼虫需要特殊的化学刺激,研究表明这些物质是一种被称作为神经传递素的化学因子。只有它们的存在才能开始附着和变态。

### 5.4.3 幼虫的变态

#### 5.4.3.1 幼虫附着的刺激剂

促进匍匐期幼虫附着的方法根据物种的不同和用来培育早期稚贝的方法不同而不同,常规方法基本上都能促进幼虫生长到稚贝期。育苗场的技术人员需要幼虫附着在合适的基质上并且尽可能快的开始变态(参见5.4.3.2)。研究表明几种方法包括物理的和化学的刺激都可以诱导幼虫开始变态。过去常用的最普遍的物理方法是温度突变,即急剧冷却成熟的幼虫(有时在冰箱里),然后把它们放在温和的水里。不同批的处理结果不同,但都表明这种方法可以使变态的成功率大大提高。

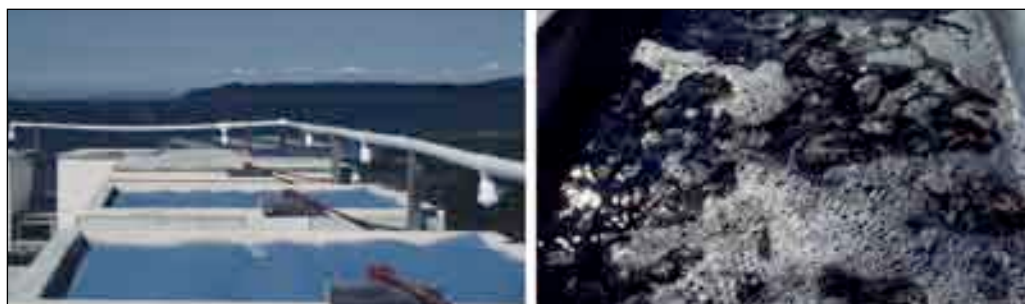
一种普遍用来刺激和增加幼虫变态率的方法是使用化学方法,包括氨水和一大批含有神经传递素的化学试剂(包括L-3-4-二羟基苯丙氨酸、肾上腺素、去甲肾上腺素和育亨宾)现在已经使用。

许多育苗技术人员怀疑这种化学刺激的应用是否能刺激和增加变态的成功率,他们没有把这种技术应用在生产上。技术人员认为无论是在育苗场里,还是在异地附着只要幼虫有高质量的营养储备,以及采用正确的处理方法,就能获得成功率较高的变态。他们认为用神经传递素来处理幼虫,在早期变态率要比没有处理的幼虫高,但是长到5-10毫米时,两者的稚贝数量几乎没有差别。神经传递素可以使得一些本来不能完成变态的幼虫完成变态,但是他们没有足够的储备,最终不能发育成稚贝。

#### 5.4.3.2 适宜附着基质

幼虫不管是在育苗场内附着或者在异地附着,所用的基质称之为附着基。附着基的材质是多种多样的。附着基的标准有两个,一是要有适合幼虫附着的表面;二是容易加工处理。

在北美西海岸的牡蛎育苗场不总是育苗场完成匍匐期幼虫的变态,而是将眼点浮游幼虫运到临近牡蛎养殖场去完成(图85),在第6.2节中将介绍这种处理方法。



**图85:** 位于加拿大BC省温哥华岛的牡蛎变态附着池。太平洋牡蛎眼点幼虫从西海岸育苗场运来,放养到水泥池内,池里预先安放好附着基。附着基是装在网袋里的清洗干净的陈年的牡蛎壳,几天后壳上的附苗量达到要求,附有稚贝的附着基转移到养殖场的苗种暂养地进行暂养。

下面将概要地介绍普遍适用的方法,供不同种类的双壳类的成熟眼点幼虫附着用。

### 1) 牡蛎

附着基可以安放在亲本培育池里直接供幼虫附着,如*Tiostrea*牡蛎,或者安放在专用的附苗槽里附着。投放附着基的时机是掌握在50%以上的幼虫进入眼点期。这一点无论是对卵生型的还是对幼生型的牡蛎都适用。育苗场常常用240微米的筛网将壳长达300 - 340微米的幼虫筛选出来供附着用,剩下的小个体幼虫再让它们继续生长。尽管附着面积是更为重要的标准,如果用单位体积来计算最适的牡蛎幼虫的密度应该是每升在2 000-5 000个的范围内。常用的供幼虫附着的材料包括以下几个类型:

- 1) 稍经打毛处理的聚氯乙烯板,成捆地或单个地垂直竖立在水体中,如果扎成捆,在板间用隔片分开(有时也可以将聚氯乙烯板弯曲成半圆瓦片状)。
- 2) 将陈年的洗涤干净的牡蛎壳粉碎成颗粒状,平铺在附苗池的附苗盘里或者直接铺在附苗槽的底部。这些微粒材料的颗粒大小在250 - 500微米之间。
- 3) 将陈年的洗涤干净的牡蛎壳或是扎成捆、或是穿成串、或是装在网袋内安放在水槽里,通常是安放在附苗池里。
- 4) 涂上水泥的各种塑料或陶瓷材料。例如:在附苗池里成捆地安放上,做成中国式的“帽子”形状的涂有水泥的塑料附苗器,当稚贝长到一定大小可以通过弯曲附着基使附着在水泥涂层上的稚贝脱落下来。

培养在浅水槽里的幼虫大多喜欢附着在阴暗处的附着基表面,一个低强度的60W的钨丝灯安装在水较深的附苗槽的上方,促进幼虫附着到水底更阴暗的地方(图86A和B)。为了提高较大表面积附苗器对幼虫附着的吸引力,可以将牡蛎肉汁涂抹在附着基的表面,放在空气中风干后,再放回到附苗槽里。因为牡蛎幼虫有群居行为,喜欢附着在别的牡蛎曾经附着过的地方。聚氯乙烯附苗器使用的时间愈长,愈容易吸引幼虫附着。所以“陈化”到一定程度的附苗器就不需要涂抹牡蛎汁来吸引幼虫附着。

上述方法1)和2)所介绍的附苗器可用来生产众所周知的“单体”牡蛎苗。“单体”牡蛎苗(幼虫不附着基质上,而附着到壳粒上)可以一直长到市场需要规格,以半壳牡蛎的形式销售。相比而言,那些附着在完整的壳上的苗随着个体的生长,彼此的贝壳会融合在一起,形成一个整体,收割后只能用来加工成蛎肉。

当使用聚氯乙烯板附苗器生产“单体”稚贝时,刚固着的稚贝要在24小时内用刀片将它们从附着基表面上刮下来。需要将附苗器浸在盛有海水的浅碟子里,刀片上安装上一个合适的把手,一面轻轻的刮,一面将海水喷到刀片上。可使用5.1.2.3节介绍的估算幼虫的方法来估算稚贝数量,然后送到育苗场内部的早期稚贝培育系统中去培养。

前面已经介绍过,为了促使牡蛎眼点幼虫完成变态,又不使用附着基,可以使用神经传递素——肾上腺素。溶解0.1832克肾上腺素在10%的盐酸里,然后用过滤海水稀释到10升,这些量足以满足200万个眼点幼虫变态之需。达到附着规格的幼虫在此溶液中处理大约60-90分钟,然后再放回养殖槽中。在下次换水时,已经变态为稚贝的幼体可以用270微米筛网将它们与尚未变态的幼虫分离开来。只有即将准备附着的幼虫对

这个处理有反应,很快就完成变态过程而无须固着过程。对处理没有反应的幼虫一两天后可再次处理。这种处理方法可在有或没有附着表面(通常有)时均可使用。

变态后的牡蛎幼苗长到2毫米时的成活率一般可达到50-70%。



**图86:** (A) 和 (B) 聚氯乙烯板作为牡蛎幼虫的附着基, 安放在附苗槽内 (A), 附苗槽顶部有一钨丝灯照明, 有助于加快牡蛎幼虫附着, 附苗器每天需要检查数次 (B), 当附着密度足够时, 用剃须刀片将刚附着的稚贝轻轻地刮下来; (C) 和 (D): 古巴的牡蛎育苗场工人将红树林牡蛎壳用尼龙绳穿成串 (C), 这些蛎绳放在事先投放有足够数量眼点幼虫的水槽中 (D), 图 D 中可以看到附苗池后面的大水体幼虫培育池。

## 2) 扇贝

与牡蛎幼虫变态不同, 扇贝眼点幼虫变态时通过分泌的足丝附着在附着基的表面, 有时会附着在丝状红藻、水螅虫、苔藓虫和环节动物的管壁上, 或其它适宜附着的有生命和无生命的基质上。在育苗场里常用的附着器材有聚乙烯网、尼龙网和其它多种多样的类似的丝状材料。眼点幼虫既可在幼虫培育槽内附着, 也可在事先准备好的附着槽完成, 附着过程可以在静水中进行也可在流水状态下进行。如果是在流水池中进行附着, 需要用网目合适的尼龙筛滤水, 防止幼虫流失。扇贝幼虫、匍匐幼虫和早期的稚贝都很娇嫩、碎弱, 所以应该在眼点幼虫时期就将它们从幼虫培育槽移到附着槽。这一时期的牡蛎幼虫壳长可达300 - 400微米, 而扇贝幼虫的壳长显著的小, 只有220 - 240微米。适合扇贝幼虫附着的附着池的类型和附着基的材质见图87和88。



**图87:** 匍匐期扇贝幼体可以在放满附着基的静水水槽中以2000个/升以上的密度进行附着。附着后使水循环流动, 在百慕大群岛生物调查站该系统用于*Argopecten gibbus* 和 *Pecten ziczac*的培养, 见下一节的操作步骤。

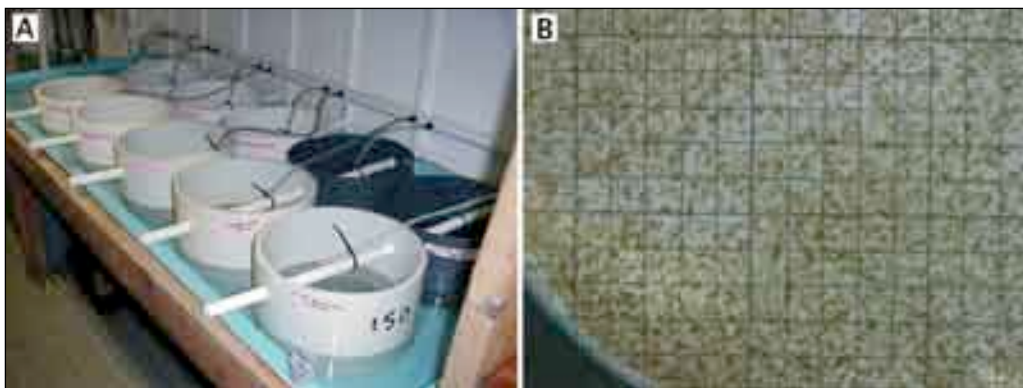
匍匐期扇贝幼体的附着密度可以在1000-2000个/升的范围内, 在附苗池内安放好附着基, 静水、循环或流水状态下附苗都可以。在图87中显示的是容积为450升玻璃钢附着槽 (A) 槽底有排水阀, 槽内有直立的竖管。束状的塑料网(B)松散地放在槽中 (C) 或者把密封的网袋悬浮在水槽中(D)。幼虫主要附着在黑网上(E)。照片D上露出水面的塑料管是气升式上升流系统的一部分。每根垂直的竖管的底部都固定有一根气管, 打开气泵, 水就会从槽的底部提升到水面, 由横管的管孔中喷淋在水面上, 然后重新返回到槽里。在运转过程中, 分配管有一半是在水槽的水位以下。

匍匐期幼虫放入附着槽, 在前6 - 8天里也作幼虫培育槽用。在此期间要换3次水, 换水时用网筛过滤, 防止尚未附着的浮游幼虫流失(图87)。为防止换水时附着的幼虫暴露在空气中, 故需要在排水时以相同的流速向附着槽内添加过滤海水, 保持平衡的水位。水交换时间大约持续30 - 40分钟。在网筛中滤出的幼虫再重新放回到附着槽内, 在放回水槽前估计出它们的存活率和已经变态尚未附牢的个体数量。在此期间需要缓慢地通气, 与培育幼虫的方法完全一样给幼体投喂饵料。



一周后, 打开气升式流动系统, 并且逐渐将槽中的水温降到自然海水的温度。采用流水培养, 换水量每天3 - 4倍, 水温为自然海域海水的温度。一直采用气升式流动系统, 并不断添加食物。三星期后附着的稚贝壳长可长到2毫米(图87E)。

实际上, 上述的过程只不过是将海上采集天然苗所用的“洋葱”塑料网袋稍加变化用在育苗场而已。另一种不同的方法就是将附着后的匍匐幼虫放在网目大小在120 - 150微米之间的碟盘式或圆筒式培育器内, 碟盘式培育器安放在浅水池中, 饵料添加到循环水里, 或是流动水中为幼体提供食物(图88)。



**图88:** 图(A)表示的是在百慕大生物研究站, 采用安装有尼龙网的圆筒形的碟盘式培育器培育扇贝幼虫, 培育器有一部分浸在跑道式水池内, 海水可以循环利用, 也可以直接排放。每个培育器都可以通过下降流的供水系统得到食物的补给。图(B)表示的是三周的 *Argopecten gibbus* 稚贝在培育器里生长, 每一格的面积是1厘米<sup>2</sup>, 可以准确估计附着的数目。

在培育器中的匍匐幼虫密度不超过100个/厘米<sup>2</sup>。例如: 圆筒内径25厘米、底网面积大约是500厘米<sup>2</sup>的培育器就能喂养50000个匍匐幼虫。决定投放匍匐幼虫密度的关键因素是幼体附着所需要的空间和附着后稚贝的生长。变态后的幼虫尚可活动, 过度拥挤时它们可以断开足丝去寻找一个不太拥挤的地方再次附着。如果幼虫碰到它们的同类, 并互相钳着对方的贝壳, 它们的软体部将会受到伤害, 并导致死亡。

各种形式的碟盘式培育器在欧洲广泛用来培养 *Pecten maximus* 的稚贝。

从匍匐幼虫生长到壳长2微米稚贝的存活率通常只有15% - 30%。使用碟盘式培育器来培育, 稚贝的存活率较高 (图88), 但是生长速率低于附着在捆式或者网袋式网片上的幼虫 (图87), 这可能与附着稚贝的空间分布不同有关, 因为碟盘式培育器的表面积低于网片的表面积。

### 3) 蛤和贻贝

蛤的幼虫开始寻找基质的个体大小基本上与扇贝幼虫的大小相近, 大约在220 - 240微米, 它们也用足丝附着在附着基表面。在这个阶段的主要操作程序是把它们转移到附着槽中直到变态完成, 例如图88的例子; 否则, 它们就会在幼虫培养槽中变态。由于它们同扇贝匍匐幼虫有着相同的大小和行为, 单位体积内投放幼虫进行附着的密度可以与扇贝匍匐幼虫相同。尽管成蛤在自然状况下有埋栖的习性, 但是在壳长7毫米前, 没有必要给它们提供基质。附着的稚贝可以用水从附着的表面上冲洗下来。

贻贝也是利用它们的足丝附着, 但是比扇贝和蛤更坚固, 而且它们在整个生命过程中

都保持这种能力。由于贻贝的经济价值低于牡蛎、扇贝和大多数经济蛤类,所以贻贝养殖不很普及。美国东海岸和新西兰的调查结果表明,采集的天然贻贝苗比人工培育的苗更好。供贻贝苗附着用的器材很广泛,供贻贝苗附着用的器材很广泛,如绳索、塑料网片和塑料板等都可以用。图87显示的用于扇贝采苗的、水体较深的水槽也适合贻贝幼虫的附着。

幼虫附着后怎样培养将在第六部分介绍。

## 5.5 参考文献

**Bayne, B.L.** 1969. The gregarious behaviour of the larvae of *Ostrea edulis* L. at settlement. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **49**: 327–356

**Bourne, N., Hodgson, C.A. & Whyte, J.N.C.** 1989. A Manual for Scallop Culture in British Columbia. Canadian Tech. Rep. Fish and Aquatic Sciences, No. **1694**: 215 pp.

**Breese, W.P. & Malouf, R.E.** 1975. Hatchery manual for the Pacific oyster. Sea Grant Program Publ., No. ORESU-H-75-002. Oregon State Univ., Corvallis, Oregon, USA: 22 pp.

**Brown, C. & Roland, A.** 1984. Characterization of exotoxin produced by a shellfish pathogenic *Vibrio* sp. *J. Fish Diseases*, **7**: 1–10

**Brown, C. & Russo, D.J.** 1979. Ultraviolet light disinfection of shellfish hatchery sea water: (1) elimination of five pathogenic bacteria. *Aquaculture*, **17**: 17–23

**Calabrese, A. & Davis, H.C.** 1970. Tolerances and requirements of embryos and larvae of bivalve molluscs. *Helgol. Wiss. Meeresunters.*, **20**: 553–564

**Castagna, M. & Manzi, J.J.** 1989. Clam culture in North America: hatchery production of nursery stock clams. p 111–125. In: Manzi, J.J. & Castagna, M. (eds) *Clam Mariculture in North America. Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, **19**. Elsevier, Amsterdam, Oxford and New York.

**Chu, F.-L.E., Webb, K.L., Hepworth, D., Barrett, D.B. & Roberts, M.** 1983. Growth and fatty acid composition of oyster larvae. In: (eds: Pruder, G.D., Langdon, C. & Conklin, D.) *Proceedings of the 2nd International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*, October 1981, Rehoboth Beach, Delaware. Louisiana State University Press, Baton Rouge: 426 (abstract)

**Coon, S.L., Fitt, W.K. & Bonar, D.B.** 1990. Competency and delay of metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Mar Biol.*, **106**: 379–387

**Coon, S.L. & Weiner, R.M.** 1985. Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) by L-DOPA and catecholamines. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **94**: 211–221

**Couturier, C., Dabinett, P. & Lanteigne, M.** 1995. Scallop culture in Atlantic Canada. p 297–340. In: Boghen, A.D. (ed) *Cold-Water Aquaculture in Atlantic Canada*. The Canadian Institute for Research on Regional Development, Moncton, Canada: 672 pp.

**Crisp, D.J., Yule, A.B. & White, K.N.** 1985. Feeding of oyster larvae: The functional response, energy budget and a comparison with mussel larvae. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **65**: 759–783

**DiSalvo, L.H., Bleoka, J. & Zebal, R.** 1978. *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**: 219–221

**Elston, R. & Leibovitz, L.** 1980. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**: 964–978

**Elston, R., Leibovitz, L., Relyea, D. & Zatila, J.** 1981. Diagnosis of vibriosis in a commercial oyster hatchery epizootic: diagnostic tools and management features. *Aquaculture*, **24**: 53–62

**Gabbott, P.A. & Holland, D.L.** 1973. Growth and metabolism of *Ostrea edulis* larvae. *Nature, London*, **241**: 475–476

**Gallager, S.M., Mann, R. & Sasaki, G.C.** 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture*, **56**: 81–103

**Helm, M.M.** 1971. The effect of sea water quality on the laboratory culture of *Ostrea edulis* L. larvae. International Council for the Exploration of the Sea. ICES. CM 1971/K:28: 11 pp.

**Helm, M.M.** 1977. Mixed algal feeding of *Ostrea edulis* larvae with *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **57**: 1019–1029

**Helm, M.M.** 1986. Effects of nutrition on larval production in the European oyster, *Ostrea edulis*. Proceedings 14th Meeting on Environment and Resources: Applications and Perspectives in Aquaculture, Albarella (RO), Italy, 20-28 September 1986: 12 pp.

**Helm, M.M.** 1990a. Moderna progettazione e gestione di schiuditoi per molluschi bivalvi e nuovi sviluppi (Hatchery design and general principles of operation and development). p 65-87. In: Alessandra, G. (ed) *Tapes philippinarum*: Biologia e Sperimentazione. Ente Svuillupo Agricolo Veneto, Venice, Italy: 299 pp. (Italian and English text)

**Helm, M.M.**, 1990b. Managing Production Costs - Molluscan Shellfish Culture. p 143-149. Congress Proceedings, Aquaculture International, September 4-7, 1990, Vancouver, BC, Canada: 480 pp.

**Helm, M.M.** 1991. Development of industrial scale hatchery production of seed of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in Cuba. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO: TCP/CUB/8958: 46 pp.

**Helm, M.M.** 1994. Towards reliable bivalve seed supply in Nova Scotia. *Bull. Aquacul. Assoc. Canada* **94** (4): 9–14

**Helm, M.M. & Laing, I.** 1987. Preliminary observations on the nutritional value of Tahiti *Isochrysis* to bivalve larvae. *Aquaculture* **62**: 281–288

**Helm, M.M., Holland, D.L. & Stephenson, R.R.** 1973. The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* L. on larval vigour. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **53**: 673–684

- Helm, M.M., Holland, D.L., Utting, S.D. & East, J. 1991. Fatty acid composition of early non-feeding larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis* L. J. Mar. Biol. Assoc. UK, 71: 691–705
- Helm, M.M. & Millican, P.F. 1977. Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). Aquaculture, 11: 1–12
- Holland, D.L. & Spencer, B.E. 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L., during larval development, metamorphosis and early spat growth. J. Mar. Biol. Assoc. UK, 53: 287–298
- Huggins, W.L., Helm, M.M. & Williams, D.R. 1987. Automatic control of food supply in the culture of filter feeding organisms. Aquacultural Engineering, 6: 259–275.
- Inamura, H., Nakai, T. & Muroga, K. 1985. An extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 51: 1915–1920
- Jeffries, V.E. 1983. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Aquaculture, 29: 201–226
- Jespersen, H. & Olsen, K. 1982. Bioenergetics in veliger larvae of *Mytilus edulis* L. Ophelia, 21: 101–113
- Jia, J. & Chen, J. 2001. Sea farming and sea ranching in China. FAO Fisheries Tech. Paper, No 418, Food and Agriculture Organization, UN, Rome: 71 pp.
- Knottage, A.S. & Birkbeck, T.H. 1986. Toxicity to marine bivalves of culture supernatant fluids of the bivalve-pathogenic *Vibrio* strain NCMB 1338 and other marine vibrios. J. Fish Diseases, 9
- Lewis, T.E., Garland, C.D. & McMeekin, T.A. 1986. Manual of hygiene for shellfish hatcheries. Department of Agricultural Science, University of Tasmania. University of Tasmania Printing Dept., Hobart, Tasmania: 45 pp.
- Loosanoff, V.L. & Davis, H.C. 1963. Rearing of bivalve mollusks. Advances in Marine Biology, 1, Academic Press Ltd, London: 1–136
- Lovatelli, A. 1985. Conditions for the culture of clam larvae with particular reference to *Tapes semidecussatus* (Reeve). M.Sc. Thesis. Plymouth Polytechnic, UK: 179 pp.
- Malouf, R.E. & Breese, W.P. 1977. Food consumption and growth of larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in a constant flow rearing system. Proc. Nat. Shellfish Assoc., 67: 7–16
- Manahan, D.T. & Crisp, D.J. 1982. The role of dissolved organic material in the nutrition of pelagic larvae: amino acid uptake in bivalve veligers. Amer. Zool., 22: 635–646
- Moreno, J.E.A., Moreno, V.J. & Brenner, R.R. 1976. Lipid metabolism of the yellow clam, *Mesoderma mactroides*: 2 – polyunsaturated fatty acid metabolism. Lipids, 11, 561–566
- Munn, C.B. 1978. Haemolysin production by *Vibrio anguillarum*. FEMS Microbiol. Letters, 3: 265–268

- Roland, W.G. & Broadley, T.A.** 1990. A manual for producing oyster seed by remote setting. Province of British Columbia, Ministry of Agriculture and Fisheries, Victoria, BC, Canada: 58 pp.
- Strickland, J.D.H. & Parsons, T.R.** 1968. A practical handbook of seawater analysis. Bull. Fish. Res. Board of Canada. **167**: 1–311
- Sverdrup, H.U., Johnson, M.W. & Fleming, R.H.** 1942. The Oceans: their Physics, Chemistry and General Biology. Prentice-Hall, New York: 1087 pp.
- Tubiash, H.S., Chanley, P.E. & Leifson, E.** 1965. Bacillary Necrosis: A Disease of Larval and Juvenile Bivalve Mollusks: 1. Etiology and Epizootiology. J. Bacteriol., **90**: 1036–1044
- Utting, S.D. & Helm, M.M.** 1985. Improvement of seawater quality by physical and chemical pre-treatment in a bivalve hatchery. Aquaculture. **44**: 133–144
- Utting, S.D. & Spencer, B.E.** 1991. The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. Lab. Leaflet, MAFF Fish. Res., Lowestoft, No. 68: 31 pp.
- Waldock, M.J. & Holland, D.L.** 1984. Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: polyunsaturated fatty acids. Lipids, **19**: 332–336
- Waldock, M.J. & Nascimento, I.A.** 1979. The triacylglycerol composition of *Crassostrea gigas* larvae fed on different diets. Marine Biology Letters, **1**: 77–86
- Walne, P.R.** 1974. Culture of Bivalve Molluscs. Fishing News (Books) Ltd, Surrey, England: 189 pp.
- Webb, K.L. & Chu, F.-L.E.** 1983. Phytoplankton as a source of food for bivalve larvae. In: (eds: Pruder, G.D., Langdon, C. & Conklin, D.) Proceedings of the 2nd International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition, October 1981, Rehoboth Beach, Delaware. Louisiana State University Press, Baton Rouge: 272–291
- Wilson, J.H.** 1979. Observations on the grazing rates and growth of *Ostrea edulis* L. larvae when fed algal cultures of different ages. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., **38**: 187–199
- Whyte, J.N.C.** 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquaculture, **60**: 231–241
- Whyte, J.N.C., Bourne, N. & Hodgson, C.A.** 1987. Assessment of biochemical composition and energy reserves in larvae of the scallop *Patinopecten yessoensis*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., **113**: 113–124
- Zarogian, G.E., Pesche, G. & Morrison, G.** 1969. Formulation of an artificial sea water media suitable for oyster larvae development. Amer. Zool., **9**: 1144
- Zimmer-Faust, R.K. & Tamburri, M.N.** 1994. Chemical identity and ecological implications of a waterborne larval settlement cue. Limnol. Oceanogr., **39**: 1075–1087

