

石斑鱼寄生鱼蛭特征分析和生态防控技术研究*

黄景军^{1,2,3}, 石和荣², 李素华¹, 刘 苏², 黄培卫², 张海发², 郭爱伟^{1**}, 周立斌^{3**}

(1. 西南林业大学 生命科学学院, 云南 昆明 650224;

2. 广东省海洋渔业试验中心, 广东 惠州 516081;

3. 惠州学院 生命科学学院, 广东 惠州 516007)

摘要:【目的】研究石斑鱼寄生鱼蛭的基本特征和生态防控。【方法】通过提取石斑鱼寄生鱼蛭遗传物质, 构建 *COI*、*NDI*、*18s rDNA* 基因的系统发生树; 在实验室条件下培养采自广东大亚湾的石斑鱼寄生鱼蛭, 研究其生长发育等特征, 从而确定该鱼蛭的分类地位、基本特征及其生活史; 通过凡纳滨对虾 (*Penaeus vannamei*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 和石斑鱼混养, 开展石斑鱼寄生鱼蛭生态防控技术研究。【结果】石斑鱼寄生鱼蛭与菲律宾蛭 (*Zeylanicobdella arugamensis*) 生物学特征一致, 可认定为同种。在实验室条件(温度 25~27 °C, 盐度 28.0‰, pH 7.5~8.0, 溶氧量 5.30~5.80 mg/L)下, 石斑鱼寄生鱼蛭卵从产出到孵化出幼虫所需时间为 10~11 d, 以虎龙杂交斑 (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) 为宿主, 从幼虫到成虫产卵所需时间为 9~11 d, 完成 1 个完整的生活史周期需要 19~22 d。石斑鱼寄生鱼蛭幼虫和成虫均不能在淡水长时间存活, 最长存活时间为 60 和 200 min。鱼蛭成虫在没有宿主的条件下, 水体温度 25~27 °C, 在盐度 40.0‰、30.0‰、20.0‰ 和 10.0‰ 下分别最长能存活 12、14、18 和 19 d。鱼虾混养时, 2 种对虾对石斑鱼寄生鱼蛭均有清除能力, 其中凡纳滨对虾对石斑鱼寄生鱼蛭的清除率最高, 在 24 h 内清除率可达 100%。【结论】本研究确定了广东大亚湾养殖石斑鱼的寄生鱼蛭为菲律宾蛭, 其完整生活史为 19~22 d; 本试验条件下, 菲律宾蛭幼虫和成虫在淡水中均不能存活超过 200 min, 故可以用淡水浸泡的方法清除该鱼蛭; 在缺乏宿主的条件下, 菲律宾蛭存活不超过 20 d, 故可以通过隔离宿主的办法使该鱼蛭自然消亡; 凡纳滨对虾或斑节对虾与石斑鱼混养能主动摄食菲律宾蛭, 将其清除。

关键词: 菲律宾蛭; 生活史; 凡纳滨对虾; 斑节对虾; 生态防控技术

中图分类号: S 965.334.629.2

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2021) 03-0456-09

Study on the Characteristics and Ecological Control Techniques of Leech (*Zeylanicobdella arugamensis*) Parasitic on Grouper

HUANG Jingjun^{1,2,3}, SHI Herong², LI Suhua¹, LIU Su², HUANG Peiwei²,
ZHANG Haifa², GUO Aiwei¹, ZHOU Libin³

(1. College of Life Sciences, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;

2. Marine Fisheries Development Center of Guangdong Province, Huizhou 516081, China;

3. College of Life Sciences, Huizhou University, Huizhou 516007, China)

Abstract: [Purpose] To study the basic characteristics and ecological control of the grouper parasitic fish leeches. [Method] The phylogenetic tree of *COI*, *NDI*, *18s rDNA* gene was constructed

收稿日期: 2020-05-26 修回日期: 2020-01-07 网络首发时间: 2021-04-12 17:13:04

*基金项目: 广东省海洋和渔业发展专项资金(鱼病防治)项目(粤财农[2017]43号); 惠州市引进科技创新团队专项(20170214023102296); 惠州学院重点学科培育项目(HZU201807)。

作者简介: 黄景军(1992—), 男, 广东惠州人, 在读硕士研究生, 主要从事鱼类生理学和分子生物学研究。E-mail: 247171262@qq.com

**通信作者 Corresponding authors: 郭爱伟(1975—), 男, 甘肃临夏人, 硕士, 副教授, 主要从事动物营养与生理研究。E-mail: g.aiwei.swfu@hotmail.com; 周立斌(1972—), 男, 江苏启东人, 博士, 教授, 主要从事鱼类生理学和分子生物学研究。E-mail: zlb2003@163.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20210412.0931.001.html>



by extracting genetic material from parasitic leeches. The grouper parasitic fish leeches were cultured under laboratory conditions. Its growth and development characteristics were studied, so also to determine the species, biological characteristics and life history of the leeches. In addition, through the grouper and *Penaeus vannamei* or *Penaeus monodon* polyculture, ecological control techniques of leech were studied. [Result] The leech was *Zeylanicobdella arugamensis*. Under laboratory conditions: temperature 25-27 °C, salinity 28.0‰, pH 7.5-8.0, dissolved oxygen 5.30-5.80 mg/L, it took 10 to 11 days from laying eggs to hatching larvae, and 9 to 11 days to lay eggs from larva to adult under the condition of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂) as host. It took 19 to 22 days to accomplish a complete life cycle. The longest survival time of leech larvae in fresh water was 60 min, and that of adult in fresh water was 200 min. Leech larvae and adult could not survive in fresh water for a long time. Adult leeches could survive up to 12 d at 40.0‰ salinity, up to 14 d at 30.0‰ salinity, up to 18 d at 20.0‰ salinity and up to 19 d at 10.0‰ salinity without host while the water temperature was 25-27 °C. Both species of shrimp have the ability to scavenge the *Z. arugamensis*, and the *P. vannamei* has the highest clearance rate to *Z. arugamensis*, and the clearance rate can reach 100% within 24 h. [Conclusion] In this study, leeches of parasitic fish breeding grouper in Daya Bay, Guangdong Province were identified as *Z. arugamensis* which took 19 to 22 days to accomplish a complete life cycle. The *Z. arugamensis* larvae and adult could not survive in fresh water for a long time, therefore freshwater immersion could be used to remove it. In the absence of a host, the *Z. arugamensis* survived for no more than 20 days, therefore, the natural extinction of the *Z. arugamensis* can be achieved by isolating the host. The polyculture of *P. vannamei* or *P. monodon* and grouper can also effectively clear the *Z. arugamensis*.

Keywords: *Zeylanicobdella arugamensis*; life history; *Penaeus vannamei*; *Penaeus monodon*; ecological control techniques

石斑鱼是鲈形目 (Perciformes) 石斑鱼亚科 (Epinephelinae) 各属鱼类的总称, 属暖水性岛礁鱼类, 在全世界亚热带和热带海区均有分布^[1]。虎龙杂交斑 (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂)^[2]自人工繁殖成功以来, 因其具有生长速率快、成活率高、体形美观和肉质鲜美等优良特性^[3], 其人工养殖得到快速发展, 于2017年获得中国水产原种良种审定委员会审定为水产新品种。2018年, 中国海水养殖鱼类中, 石斑鱼产量达15.95万t^[4], 其中虎龙杂交斑占80%以上^[5], 是中国石斑鱼的主要养殖对象^[6], 经济效益显著。

随着石斑鱼养殖规模的不断扩展, 养殖密度的增大, 养殖环境亦日趋恶化, 导致石斑鱼寄生鱼蛭病频发, 且有蔓延趋势, 严重影响了石斑鱼养殖产业的健康发展^[7]。鱼蛭俗称蚂蟥, 是石斑鱼养殖中较常见的体外寄生虫^[8]。根据海南省海洋与渔业科学院的文章报道, 目前常见的寄生在海南地区养殖石斑鱼上的鱼蛭鉴定为菲律宾蛭

(*Zeylanicobdella arugamensis*)^[9], 20世纪90年代以前, 海南地区并没有发现菲律宾蛭, 是最近十几年才陆续发现菲律宾蛭寄生在石斑鱼体表。随着海南地区石斑鱼育苗技术的发展、苗种的规模化生产和销售范围的扩大, 菲律宾蛭也随着海南地区的石斑鱼苗种传播到了海南地区全岛和华南沿海地区^[5]。菲律宾^[10]、马来西亚^[11]、印尼和日本等国也是在21世纪初才发现菲律宾蛭大量寄生在养殖海水鱼体上。该蛭不但会对养殖石斑鱼造成直接危害, 还因生长繁殖速率快和大量寄生易造成养殖石斑鱼溃疡、消瘦、营养不良和严重减产, 更是成为细菌^[12]、病毒^[13]和寄生虫^[14]等疾病传播的媒介, 是引发养殖石斑鱼大量发病的潜在威胁。石斑鱼寄生鱼蛭是外来入侵物种, 可能是通过石斑鱼活鱼海上贸易的方式传入中国, 国内对其研究不多, 急需对其进行相关基础研究。

盐度是影响水生生物生长和生存的主要环境因素之一, 研究石斑鱼寄生鱼蛭在不同盐度海水的生存情况, 有助于防控石斑鱼鱼蛭病。首先,

石斑鱼寄生鱼蛭能否在淡水存活,对于石斑鱼鱼蛭病的防控有着积极的意义。有研究表明:石斑鱼在淡水中浸泡(23.0 ± 2.8) min时会出现昏迷,浸泡2 h之内不会出现死亡^[8],但此研究没有给出淡水浸泡鱼蛭导致其死亡的确切时间数据。其次,国内外鲜有关于石斑鱼寄生鱼蛭在不同盐度海水中的生存情况研究。

在水产养殖产业中,化学药品被广泛应用于养殖鱼寄生虫病的治疗,但过度使用会导致水体污染,养殖的石斑鱼也不宜食用,使用生物防治寄生虫可以减少化学干预和药物残留,因此生物防治在水产养殖中被越来越多地用来替代药物防治^[15]。鱼对一些“寄生虫”很敏感,它们的生长繁殖会受到一定的制约。相比之下,对虾不容易受到石斑鱼的外寄生物的影响,可以和石斑鱼一起混合养殖。凡纳滨对虾和点带石斑鱼混养,不仅能改善水质和充分利用饵料,还能减少病害发生和降低养殖风险^[16]。但对虾在减少养殖鱼寄生虫方面的作用鲜有报道^[17],因此,有必要建立其他品种的对虾与石斑鱼的混养模式,制定一套环保、低成本的鱼蛭病防控方案。

1 材料与方法

1.1 试验动物及其预处理

石斑鱼寄生鱼蛭采自广东省大亚湾海区发病鱼体,试验用虎龙杂交斑、凡纳滨对虾和斑节对虾均由广东省海洋渔业试验中心提供。试验动物暂养于实验隔离区中的1 m³特制养殖桶。虎龙杂交斑分别于每日8:00和16:00各投喂1次饲料。

1.2 试验海水预处理

养殖用海水经过物理方法过滤除去海水中的杂质后,通过添加双蒸水或卤水精确调成不同盐度(10.0‰、20.0‰、30.0‰和40.0‰)的海水。海水的盐度、pH和溶氧采用便携式溶氧电导盐度温度测量仪(YSI85-D型)进行检测。

1.3 试验设计与试验管理

1.3.1 寄生鱼蛭形态观察

取石斑鱼寄生鱼蛭活体放于培养皿中,在Leica体视显微镜(MDG33/104501230)下观察并记录外部形态特征,利用双目显微镜(Leica DM-1000 LED)显微图像拍摄分析系统对鱼蛭拍照,观察虫体颜色和吸盘条带,并测量体长和体宽。

1.3.2 石斑鱼寄生鱼蛭基因组的提取、扩增及测序

取5条石斑鱼寄生鱼蛭成虫样品,采用海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒提取寄生鱼蛭基因组DNA。以获得的基因组DNA为模板进行PCR扩增COI、NDI和18s rDNA基因,COI、NDI和18s rDNA基因扩增引物^[18-19](表1)由上海生工生物工程公司合成。PCR扩增体系为:10×PCR buffer 2.5 μL、12.5 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL、10 mmol/L dNTPs 2 μL、10 μmol/L 正反向引物各1 μL、50 ng 模板DNA、TaqDNA聚合酶1 μL,加灭菌蒸馏水至25 μL。PCR反应程序:94 ℃预变性2 min,1个循环;94 ℃变性45 s,48 ℃退火1 min,72 ℃延伸1 min,共进行35个循环;最后72 ℃延伸5 min;4 ℃保存。PCR产物采用SanPrep柱式PCR产物纯化试剂盒纯化,并由上海生工生物工程公司完成序列测定工作。

表1 基因扩增引物序列

Tab. 1 List of primers used in genetic analyses

基因 gene	引物名称 primer name	引物序列(5'→3') primer sequence
COI	COI-F	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
	COI-R	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
NDI	NDI-F	TGGCAGAGTAGTGCATTAGG
	NDI-R	CCTCAGCAAATCAAATGG
18s rDNA	18s rDNA-F	CTTGGCAAATGCTTCGC
	18s rDNA-R	TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAG

1.3.3 构建基于基因序列的系统发生树

测定的序列经过拼接校对后,在NCBI中经BLAST进行同源性比对,下载得到具有同源性的9种鱼蛭的线粒体COI、NDI和18s rDNA序列^[18],其中包括在婆罗洲采集的菲律宾蛭(*Z. arugamensis*)^[19]。采用Mega 7软件与得到的鱼蛭样品基因序列选取邻接法(neighbor joining, NJ)构建基于COI、NDI和18s rDNA基因序列的系统发生树,用环节动物门寡毛纲正蚓科中的陆正蚓(*Lumbricus terrestris*)作为外群^[8]。在构建系统发生树时,用Bootsrap value法检验,1000次重复抽样得到节点的置信度以自引导值估计。

1.3.4 石斑鱼寄生鱼蛭生活史的研究

(1) 受精卵至孵出幼虫阶段

挑选15条健康、活力好的鱼蛭成虫于90 mm培养皿中,加入20 mL过滤海水,在实验室条件

(温度 25~27 °C, 盐度 28.0‰, pH 7.5~8.0, 溶氧量 5.30~5.80 mg/L) 下培养, 每隔 30 min 观察鱼蛭产卵情况, 并对刚产的卵进行标记。产卵总数量达到 20 颗以上时将成虫鱼蛭挑出, 每次挑选形态较好的 3 颗卵进行观察试验, 重复 3 次。每天定时更换海水, 在体视显微镜下观察并拍照记录鱼蛭受精卵的发育情况, 直到幼虫破壳而出。

(2) 幼虫至成虫阶段

选取 9 条刚孵化的幼虫进行试验(重复 3 次)。取 3 个 1000 mL 的烧杯, 每个烧杯加入 600~700 mL 海水(温度 25~27 °C, 盐度 28.0‰, pH 7.5~8.0, 溶氧量 5.30~5.80 mg/L) 并充氧, 分别饲养 2 尾虎龙杂交斑幼鱼[体长 (7.56±0.21) cm, 体质量 (8.98±0.96) g], 用虎龙杂交斑幼苗作为宿主培养鱼蛭幼虫。将刚孵化的鱼蛭幼虫转移到烧杯中, 每个烧杯培养 3 条鱼蛭幼虫, 分别感染虎龙杂交斑, 每天给虎龙杂交斑投喂饲料, 清除烧杯底部的废物, 更换海水, 每天定时观察鱼蛭幼虫的生长变化和产卵情况。

1.3.5 成虫和幼虫在淡水中的存活试验

准备 390 条石斑鱼寄生鱼蛭的成虫, 随机分成 13 组, 每组 3 个平行组, 每个平行组 10 条成虫, 在 90 mm 培养皿中培养。对照组为正常海水组(盐度 30.0‰), 试验组将海水换成淡水, 依次浸泡 10、20、30、40、60、80、100、120、140、160、180 和 200 min 后重新放回有海水的培养皿, 肉眼观察并用显微镜辅助判断每条鱼蛭成虫是否存活, 并统计数量。

准备 180 条石斑鱼寄生鱼蛭的幼虫, 随机分成 6 组, 每组 3 个平行组, 每个平行组 10 条幼虫, 在 90 mm 培养皿中培养。对照组为正常海水组(盐度 30.0‰), 试验组将海水换成淡水, 依次浸泡 10、20、30、40 和 60 min 后重新放回有海水的培养皿, 肉眼观察并用显微镜辅助判断每条鱼蛭幼虫是否存活, 并统计数量。

1.3.6 缺乏宿主条件下成虫在不同盐度海水的生存试验

准备 240 条石斑鱼寄生鱼蛭的成虫, 随机分成 4 组(3 个试验组和 1 个对照组), 每组设 3 个平行组, 每个平行组 20 条成虫, 在 90 mm 培养皿培养。试验期间海水温度为 25~27 °C, 3 个试验组分别设置海水盐度为 10.0‰、20.0‰ 和 40.0‰, 对照组海水盐度为 30.0‰(试验期间, 自然海水的盐度 30.0‰上下波动, 故选择该盐度为对照组的盐度), 每天统计每组寄生鱼蛭的存活情况, 并更换海水, 直到全部寄生鱼蛭死亡为止。肉眼观察并用显微镜辅助判断每条鱼蛭是否死亡, 并统计数量。

1.3.7 斑节对虾和凡纳滨对虾与石斑鱼混养时对石斑鱼寄生鱼蛭的清除试验

准备 90 尾虎龙杂交斑感染石斑鱼寄生鱼蛭, 随机分成 3 组, 编号为 A、B 和 C 组。每组有 3 个平行组, 每个平行组有 10 尾虎龙杂交斑, 在 12 L 的塑料养殖桶养殖, 试验海水盐度为 28.0‰, 温度为 28~29 °C。试验鱼虾规格为: 虎龙杂交斑平均体长 (7.61±0.82) cm、平均体质量 (9.42±2.92) g; 斑节对虾平均体长 (13.19±0.38) cm、平均体质量 (16.23±1.17) g; 凡纳滨对虾平均体长 (7.56±0.30) cm、平均体质量 (2.58±0.41) g。在 2 种对虾和石斑鱼混养前, 先让鱼蛭感染石斑鱼, 平均每尾石斑鱼身上感染 10 条以上鱼蛭, 感染后进行计数; 鱼和对虾混养时, 向 A 组的每个平行组分别加 10 尾斑节对虾, B 组每个平行组分别加 10 尾凡纳滨对虾, 即试验组 (A、B 组) 鱼和对虾的数量比为 1:1, 对照组 (C 组) 只有感染过鱼蛭的 10 尾石斑鱼。每间隔 12 h 对所有鱼身上吸附的石斑鱼寄生鱼蛭和水体上的鱼蛭进行计数。

1.4 数据处理和分析

试验数据采用 Excel 2016 软件进行处理, 并采用 Mega 7 软件构建系统发生树, 通过 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 所得数据结果用“平均值±标准差 (mean±SD)”表示。先对数据进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 再对有显著性差异的数据进行 Duncan 氏多重比较, $P<0.05$ 则表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 石斑鱼寄生鱼蛭的形态特征

从大亚湾海区采集到的石斑鱼寄生鱼蛭身体呈圆柱形, 成体体长 9.0~15.0 mm, 体宽 0.7~1.2 mm(图 1)。刚孵化出来的幼虫身体体色为白色呈透明状, 具有感染力, 寄生宿主体表吸血后呈血红色, 成虫身体体色多呈黑褐色或土黄色, 有排列规则的横列黑色或褐色斑点带。体表可见纵向的黑色斑点带。前端和末端各有 1 个吸盘,

均朝向腹面, 其中前吸盘呈椭圆形, 其头部背面近基部有1对椭圆形眼点, 口器位于前吸盘内杯的中心。尾吸盘大于前吸盘, 呈卵圆形, 无眼型斑点。身体柔软光滑, 体表无皮肤乳突, 未发现明显的搏动囊。该蛭雌雄同体, 异体交配, 试验期间记录到1条鱼蛭交配后产出52颗受精卵, 卵呈圆形, 直径约0.6 mm, 呈淡黄色, 分批多次产卵, 产卵阶段会再次吸附宿主。

2.2 石斑鱼寄生鱼蛭基于 *COI*、*NDI* 和 *18s rDNA* 基因序列的系统发生树

本试验克隆的石斑鱼寄生鱼蛭上述线粒体基

因序列与 *Z. arugamensis* 已公开的基因序列^[19]—一致性达99%。由线粒体基因 *COI*、*NDI* 和 *18s rDNA* 构建的 NJ 系统发生树 (图 2) 显示: 从广东大亚



图 1 石斑鱼寄生鱼蛭及卵

Fig. 1 The grouper parasitic fish leeches and its cocoons

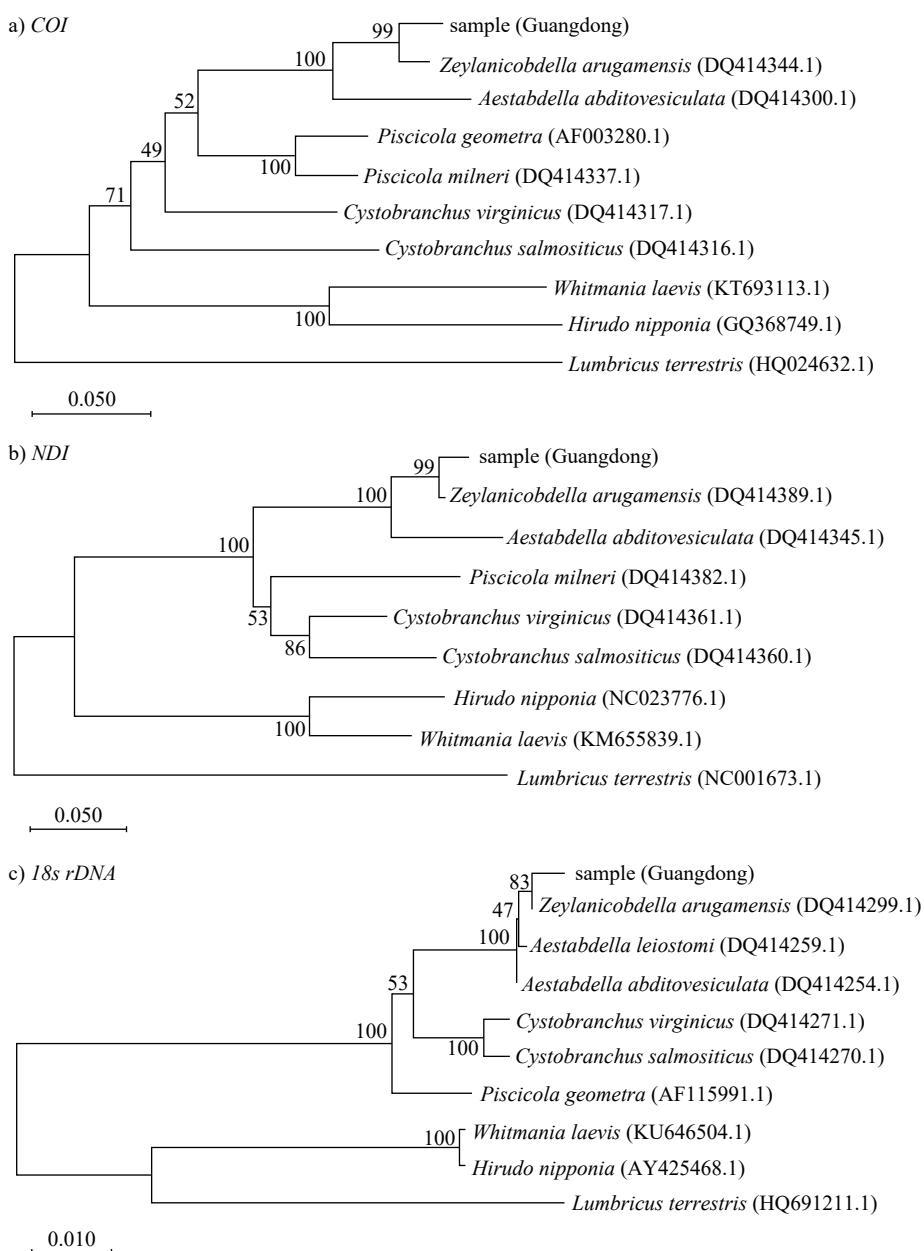


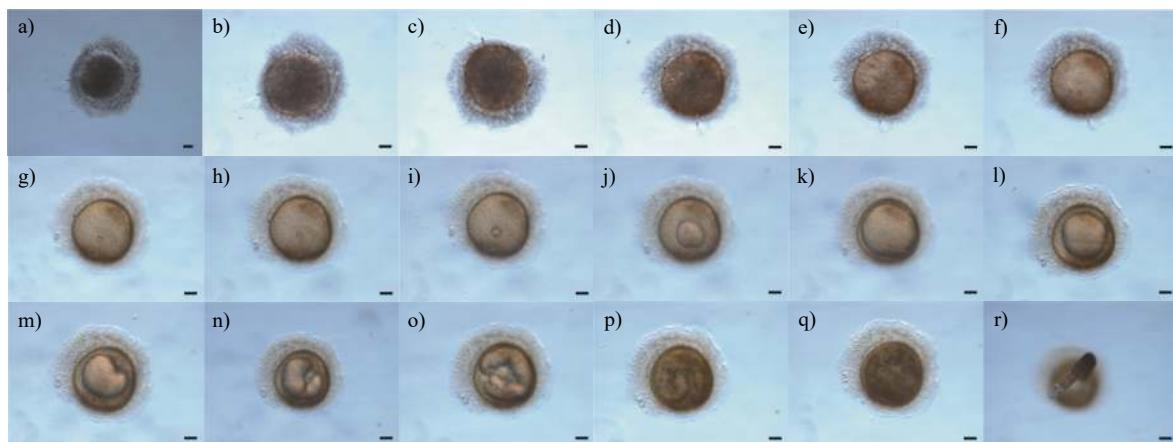
图 2 基于 *COI*、*NDI* 和 *18s rDNA* 序列的 NJ 系统发生树

Fig. 2 Neighbor-joining tree based on mtDNA *COI*, mtDNA *NDI* and *18s rDNA* genes

湾海区采集的石斑鱼寄生鱼蛭与课题组在婆罗洲采集的 *Z. arugamensis* 最先聚到一起, 二者同源关系的可信度高。从以上结果推断, 本试验的石斑鱼寄生鱼蛭为菲律宾蛭 (*Z. arugamensis*)。

2.3 菲律宾蛭的胚胎发育与生活史

菲律宾蛭受精卵的典型发育过程为: 受精卵刚产出就粘在培养皿底部, 卵不透明且浑浊 (图 3a); 产出 40 min 内受精卵里面像有无数的“小油滴”, 浑浊不透明, 这些“小油滴”快速聚拢体积变大, 性状各异 (图 3b~e); 随后受精卵形状变化不大 (图 3f); 产出 12 h 后, 胚胎形成过程中出现 1 个较浅的圆形凹孔 (图 3g); 产出 24 h 胚胎继续成长, 圆形凹孔明显 (图 3h); 产出后 2 d 可以明显观察到胚胎 (图 3i); 产出后 3 d 胚胎在 10 s 内有 6 s 持续不规则改变形状, 非常活跃 (图 3j); 产出后 4 d 胚胎充盈整个卵膜 (图 3k); 产出后 5~6 d 胚胎不停地运动并向内凹陷 (图 3l~m); 产出后 7 d 胚胎弯曲形成弧形 (图 3n); 产出后 8 d, 胚胎变成了圆柱形, 鱼蛭基本成型, 并伴有非常活跃的蠕动 (图 3o); 产出后 9 d, 卵膜随着胚胎的不断运动而变糙, 鱼蛭逐渐成型 (图 3p); 产出后 10 d, 鱼蛭成型, 眼点明显 (图 3q); 产出后 11 d 孵出鱼蛭幼虫 (图 3r)。鱼蛭受精卵从产生到孵出幼虫所需时间为 11 d。此外, 试验过程也观察到有些鱼蛭 10 d 就能完成从受精卵到孵出幼虫的变化。菲律宾蛭多次产卵, 每次产卵数量不一, 鱼蛭成虫离开宿主单独在培养皿培养, 产卵数最少 5 颗, 最多 52 颗。



注: 标尺=100 μm 。

Note: Scale bars=100 μm .

菲律宾蛭幼虫孵化出来后具备感染能力, 能吸附在宿主身上。将刚孵化的鱼蛭幼虫转移到大烧杯中, 鱼蛭幼虫很快就寄生在虎龙杂交斑身上, 吸血后鱼蛭身体呈血红色 (图 4a); 之后幼虫逐渐成长, 鱼蛭主要吸附在鱼腹部和鱼鳍上 (图 4b); 孵化后 9 d, 鱼蛭开始主动离开虎龙杂交斑身体, 吸附在烧杯底部或者烧杯壁上, 之后还会重新吸附在宿主身上, 是产卵的前兆; 在随后的几个小时内, 鱼蛭在烧杯壁上或烧杯底产卵, 所产的卵会粘在烧杯壁上 (图 4c~d)。

2.4 菲律宾蛭成虫与幼虫在淡水中的存活时间

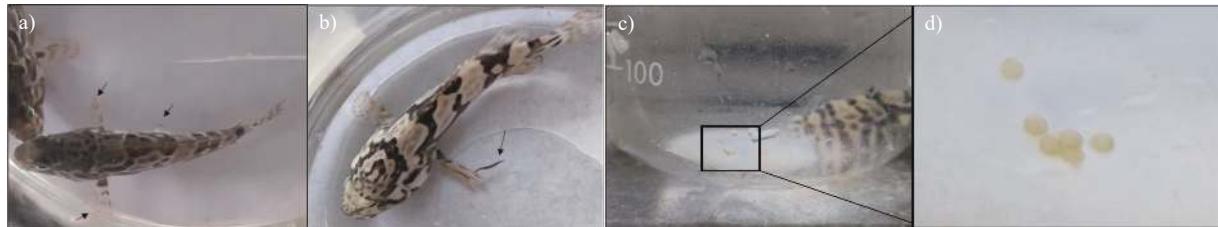
由图 5 可知: 淡水浸泡鱼蛭幼虫 30 min, 其存活率为 62%; 浸泡 30~40 min, 幼虫的存活率下降最快; 浸泡 60 min, 其存活率降为 0; 而对照组 (海水) 存活率为 100%。淡水浸泡鱼蛭成虫 140 min 后, 其存活率为 50%; 浸泡 200 min 其存活率降为 0; 浸泡 120~140 min, 成虫的存活率下降速度最快; 而对照组 (海水) 存活率为 100%。综上, 菲律宾蛭成虫和幼虫均不能在淡水中长时间生存, 且在淡水中成虫比幼虫存活时间长。

2.5 菲律宾蛭成虫缺乏宿主条件下在不同盐度海水的存活时间

菲律宾蛭在缺乏宿主条件下在不同盐度海水的耐受情况 (图 6) 显示: 海水温度为 25~27 $^{\circ}\text{C}$ 时, 在正常海水盐度 (30.0‰, 对照组) 条件下, 第 6 天其存活率下降到 55%, 到第 14 天存活率降为 0; 在高盐度组 (盐度为 40.0‰), 鱼蛭第 4 天存活率下降到 40%, 之后持续下降, 到第 12 天

图 3 菲律宾蛭胚胎发育

Fig. 3 The incubation phase of *Z. arugamensis*



注: a) 幼虫阶段; b) 成虫阶段; c) 和 d) 受精卵阶段; 箭头指向虫体。

Note: a) the larval stage; b) the adult stage; c) and d) the zygote stage; the arrows point to the parasite.

图4 菲律宾蛭生活史各阶段

Fig. 4 The growth phase of *Z. arugamensis*

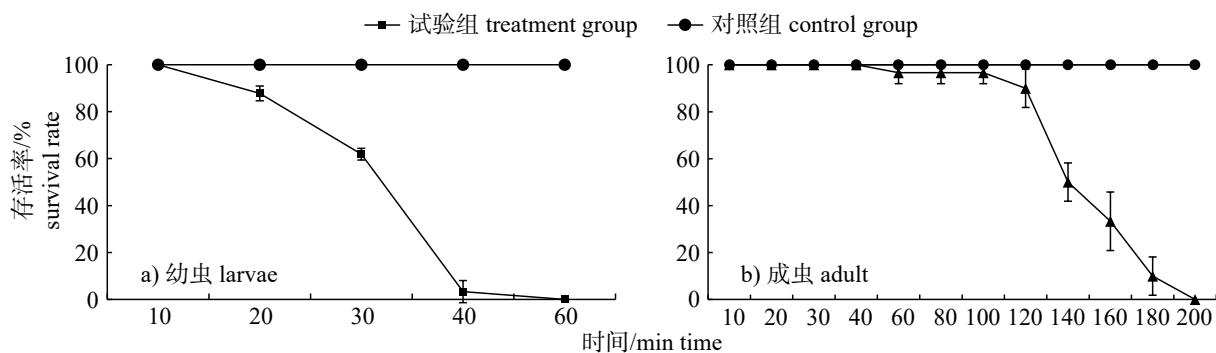


图5 菲律宾蛭幼虫和成虫在淡水中存活率

Fig. 5 The survival rate of *Z. arugamensis* larvae and adult in fresh water

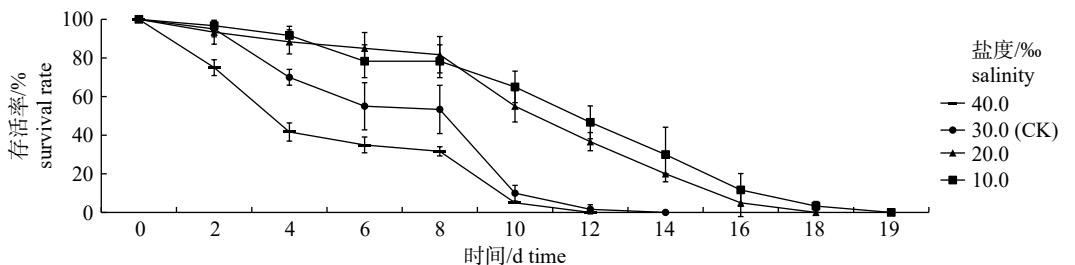


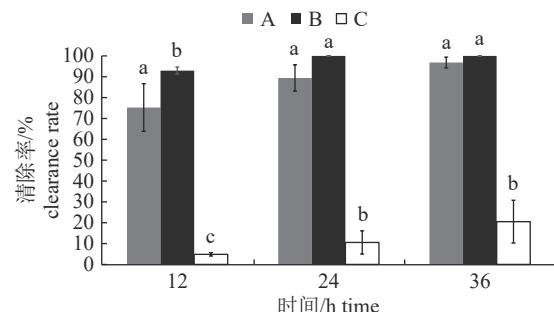
图6 菲律宾蛭在不同盐度海水中的存活率

Fig. 6 The survival rate of *Z. arugamensis* in different salinities of water

存活率降为0; 在低盐度组(盐度为20.0‰), 鱼蛭第10天存活率下降到55%, 到第18天降为0; 在更低盐度组(盐度为10.0‰), 鱼蛭在第12天存活率下降到47%, 到第19天存活率才降为0。由此可见, 本试验所用的菲律宾蛭对高盐度的海水耐受程度低, 对低盐度的海水耐受程度较高。

2.6 斑节对虾和凡纳滨对虾清除菲律宾蛭能力的测定

由图7可知: 对虾与石斑鱼混养12 h时, 凡纳滨对虾和斑节对虾对菲律宾蛭的清除率分别为92.96%和75.78%, 对照组鱼蛭的死亡率为4.84%; 混养24 h时, 2种对虾对菲律宾蛭的清除率分别为100%和89.42%, 对照组鱼蛭的死亡



注: A. 斑节对虾组; B. 凡纳滨对虾组; C. 对照组。同一时期数据上的不同字母表示数据间差异显著($P<0.05$)。

Note: A. the group of *P. monodon*; B. the group of *P. vannamei*; C. control group. The different letters on the data in the same period mean that there is significant difference between the datas ($P<0.05$).

图7 斑节对虾和凡纳滨对虾对菲律宾蛭的清除率

Fig. 7 Clearance rates of *Z. arugamensis* on grouper parasites by *P. monodon* and *P. vannamei*

率为 10.52%; 混养 36 h 内, 凡纳滨对虾清除率达到 100%, 斑节对虾组清除率达到 96.84%, 对照组鱼蛭的死亡率为 20.53%。不同时间的结果均显示试验组显著高于对照组 ($P<0.05$), 说明凡纳滨对虾或斑节对虾与石斑鱼混养均能有效清除寄生在石斑鱼体上的鱼蛭。

3 讨论

3.1 石斑鱼寄生鱼蛭的鉴定及基本特征

王永波等^[9]研究证实: 寄生在海南地区养殖石斑鱼体上的蛭类与 WILLIAMS^[19]在婆罗洲采集的鱼蛭均为菲律宾蛭 (*Z. arugamensis*)。经过对比发现, 作者在广东大亚湾海区采集的石斑鱼寄生鱼蛭与海南地区的形态一致, 同时基于线粒体 *COI*、*ND1* 和 *18s rDNA* 基因序列构建的系统发生树同源性分析, 可以推定本研究所发现的石斑鱼寄生的鱼蛭与王永波等^[9]在海南地区养殖石斑鱼体上发现的同为 *Z. arugamensis*。本研究所采集的菲律宾蛭确定是外来入侵物种, 其首先在海南地区被发现, 随后在广东沿海石斑鱼养殖地区也被发现, 说明该鱼蛭在中国沿海石斑鱼养殖已经扩散。中国研究人员对于菲律宾蛭的防治还处在初步认识阶段。本研究明确了菲律宾蛭的幼虫在水温 25~27 °C 时, 在淡水最长能存活 60 min, 成虫最长能存活 200 min, 据此, 可以用淡水浸泡的方法来消除该蛭, 这对于菲律宾蛭的防治具有重要的意义。KUA 等^[20]开展了盐度和温度等生态因子对菲律宾蛭孵化和生存的影响, 研究发现没有宿主的菲律宾蛭可以在盐度 10.0‰~40.0‰、温度 27 °C 的海水中平均存活 4~7 d; 在水温 25 °C、盐度为 28‰ 的条件下, 该蛭可以存活 11~16 d。本试验研究结果与其类似, 也发现该蛭对高盐度的海水耐受程度低, 对低盐度的海水耐受程度较高, 该发现有利于指导菲律宾蛭的防治工作。

3.2 菲律宾蛭的生活史

KUA 等^[15]对菲律宾蛭的生活史进行了研究, 发现该蛭在水温 27 °C 时, 受精卵孵化需要 7 d, 生长到产卵需要 9~10 d, 即菲律宾蛭 1 个完整的生活史大约 17 d。本研究表明: 在实验室条件下(温度 25~27 °C, 盐度 28.0‰, pH 7.5~8.0, 溶氧量 5.30~5.80 mg/L), 菲律宾蛭从产卵到孵出幼虫所需时间为 10~11 d, 在虎龙杂交斑作为宿主的条件下, 菲律宾蛭从幼虫到成虫产卵所需时间为

9~11 d, 完成 1 个完整的生活史需要 19~22 d。本研究中菲律宾蛭的产卵到孵化阶段的时间比 KUA 等^[15]的研究结果稍长, 推测是试验条件差异所致, 温度对石斑鱼寄生菲律宾蛭影响很大^[21], 不同温度下菲律宾蛭卵的孵化所需的时间不同。本研究结果丰富了对菲律宾蛭生活史的研究, 也填补了在中国发现的菲律宾蛭生活史研究的空白。

3.3 石斑鱼寄生鱼蛭的生物防治

中国水产养殖规模虽大, 但是大多数养殖户对病害的防治观念落后, 缺乏“无病先防、有病早治”的观念, 养殖过程中盲目用药, 不但使海产品抗生素药残超标^[22], 还使水质遭到污染, 病原耐药性增强^[23]。国外在大西洋鲑鱼的养殖中用清洁鱼来防控海虱, 但清洁鱼也会患上与养殖鱼同样的疾病, 再者清洁鱼要靠野外捕捞, 数量有限^[24]。VAUGHAN 等^[17]报道了 4 种清洁虾即白纹清洁虾 (*Lysmata amboinensis*)、薄荷虾 (*Lysmata vittata*)、美人虾 (*Stenopus hispidus*) 和透明虾 (*Urocaridella antonbruunii*) 对 3 种寄生虫或其卵即本尼登虫 (*Neobenedenia girellae*)、刺激隐核虫 (*Cryptocaryon irritans*) 和菲律宾蛭 (*Z. arugamensis*) 有清除效果。国外报道的清洁虾在中国并不常见, 难以在市场推广应用。本研究所用的凡纳滨对虾和斑节对虾是中国普遍养殖的品种, 研究结果表明: 这 2 种对虾对石斑鱼寄生鱼蛭均具有清除作用, 在合适的条件下可以大规模推广应用。

石斑鱼不仅容易感染鱼蛭病, 还容易引发刺激隐核虫病^[25]。凡纳滨对虾与石斑鱼混养^[16], 石斑鱼可以捕食较病弱的对虾个体, 从而切断疾病的传播, 降低凡纳滨对虾养殖风险, 最终增加凡纳滨对虾的产量, 增大收益; 另一方面, 对虾不仅可以采食游离在水体中的刺激隐核虫, 大大减少石斑鱼养殖过程中发生刺激隐核虫病的可能性, 也可以预防石斑鱼寄生菲律宾蛭病的爆发, 两者混养实现互利共赢的养殖目标^[26]。因此, 本研究也为混养对虾的品种规格、养殖密度、放养周期等后续的防治研究提供参考。

4 结论

本研究确定了广东大亚湾养殖石斑鱼的寄生鱼蛭为菲律宾蛭, 其完整生活史为 19~22 d。本试验条件下, 菲律宾蛭幼虫和成虫在淡水均不能存活超过 200 min, 故可以用淡水浸泡的方法清

除该鱼蛭；在缺乏宿主的条件下，菲律宾蛭存活不超过20 d，故可以通过隔离宿主的办法使该鱼蛭自然消亡；凡纳滨对虾或斑节对虾与石斑鱼混养能主动摄食菲律宾蛭，将其清除。本研究有助于养殖户实现不用任何药物清除菲律宾蛭生态防治目的，降低防控石斑鱼寄生菲律宾蛭的成本，为防治石斑鱼寄生鱼蛭提供新思路。

[参考文献]

- [1] 艾春香, 李少菁, 王桂忠, 等. 石斑鱼的营养需求及其饲料的研制[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(6): 86. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7075.2004.06.015.
- [2] 刘苏, 赵会宏, 张敏, 等. 不同养殖模式对虎龙杂交斑生长、消化酶活性及非特异性免疫的影响[J]. 渔业现代化, 2019, 46(4): 24. DOI: 10.3969/j.issn.1007-9580.2019.04.004.
- [3] 仇登高, 黄种持, 郑乐云, 等. 温度对不同规格珍珠龙胆石斑鱼(棕点石斑鱼♀×鞍带石斑鱼♂)呼吸和排泄的影响[J]. 中国水产科学, 2017, 24(2): 296. DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16179.
- [4] 农业农村部渔业渔政管理局. 2019中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019.
- [5] 沈铭辉, 王永波, 梁松, 等. 海南省热带水产苗种产业发展现状及对策[J]. 热带生物学报, 2016, 7(2): 171. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.02.006.
- [6] 黄灵, 李小梅, 舒琥, 等. 饲料中添加不同益生菌对虎龙斑生长、免疫力及抗氧化能力的影响[J]. 饲料工业, 2016, 37(22): 16. DOI: 10.13302/j.cnki.fi.2016.22.003.
- [7] 林浩然. 石斑鱼类养殖技术体系的创建和石斑鱼养殖产业持续发展的思考[J]. 福建水产, 2012, 34(1): 8. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5601.2012.01.001.
- [8] 王永波, 符书源, 李丙顺, 等. 池塘养殖石斑鱼鱼蛭病防治实验[J]. 热带生物学报, 2011, 2(1): 59. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7054.2011.01.012.
- [9] 王永波, 刘金叶, 陈傅晓, 等. 对海南地区石斑鱼养殖中鱼蛭病的初步研究[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2018, 36(3): 262. DOI: 10.15886/j.cnki.hdxzkb.2018.0036.
- [10] CRUZ-LACIERDA E R, TOLEDO J D, TAN-FERMIN J D, et al. Marine leech (*Zeylanicobdella arugamensis*) infestation in cultured orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. Aquaculture, 2000, 185(3/4): 191. DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00356-7.
- [11] RAVI R, ZARY S Y. *Zeylanicobdella arugamensis*, the marine leech from cultured crimson snapper (*Lutjanus erythropterus*), Jerejak Island, Penang, Malaysia[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2017, 7: 473. DOI: 10.1016/j.apjtb.2017.01.018.
- [12] AVENDAÑO-HERRERA R, BENAVIDES I, ESPINA J A, et al. Zebrafish (*Danio rerio*) as an animal model for bath infection by *Flavobacterium psychrophilum*[J]. Journal of Fish Diseases, 2020, 43(5): 561. DOI: 10.1111/jfd.13156.
- [13] LIU M Z, YU Q, XIAO H H, et al. Antiviral activity of *Illicium verum* Hook. f. extracts against grouper iridovirus infection[J]. Journal of Fish Diseases, 2020, 43(5): 532. DOI: 10.1111/jfd.13146.
- [14] HAYES P M, LAWTON S P, SMITH N J, et al. Morphological and molecular characterization of a marine fish trypanosome from South Africa, including its development in a leech vector[J]. Parasites & Vectors, 2014, 7(1): 50. DOI: 10.1186/1756-3305-7-50.
- [15] KUA B C, AZMI M A, HAMID N K A. Life cycle of the marine leech (*Zeylanicobdella arugamensis*) isolated from sea bass (*Lates calcarifer*) under laboratory conditions[J]. Aquaculture, 2010, 302(3): 153. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.02.029.
- [16] 张嘉晨, 刘建勇, 袁瑞鹏, 等. 凡纳滨对虾与点带石斑鱼的混养模式[J]. 广东海洋大学学报, 2015, 35(4): 46. DOI: 10.3969/j.issn.1673-9159.2015.04.007.
- [17] VAUGHAN D B, GRUTTER A S, HUTSON K S. Cleaner shrimp are a sustainable option to treat parasitic disease in farmed fish[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 13959. DOI: 10.1038/s41598-018-32293-6.
- [18] 徐云玲, 聂晶, 肖凌. 6种水蛭的COI、12S rRNA和16S rRNA基因及分子进化分析[J]. 生物学杂志, 2013, 30(6): 11. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1736.2013.06.010.
- [19] WILLIAMS J I, BURRESON E M. Phylogeny of the fish leeches (Oligochaeta, Hirudinida, Piscicolidae) based on nuclear and mitochondrial genes and morphology[J]. Zoologica Scripta, 2006, 35(6): 627. DOI: 10.1111/j.1463-6409.2006.00246.x.
- [20] KUA B C, CHOONG F C, LEAW Y Y. Effect of salinity and temperature on marine leech, *Zeylanicobdella arugamensis* (De Silva) under laboratory conditions[J]. Journal of Fish Diseases, 2014, 37(3): 201. DOI: 10.1111/jfd.12087.
- [21] 高明, 侯建华, 李双安. 温度对宽体金线蛭繁殖的影响研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(22): 11305. DOI: 10.3969/j.issn.0517-6611.2012.22.059.
- [22] 蒋艾青, 郑陶生. 水产养殖业中抗生素使用的风险及其控制研究[J]. 农业开发与装备, 2019(12): 147. DOI: 10.3969/j.issn.1673-9205.2019.12.106.
- [23] 李鹏飞, 余庆, 覃仙玲, 等. 广西北部湾海水养殖业现状与病害防控技术体系研究展望[J]. 广西科学, 2018, 25(1): 15. DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20180125.001.
- [24] POWELL A, TREASURER J W, POOLEY C L, et al. Use of lumpfish for sea-lice control in salmon farming: challenges and opportunities[J]. Reviews in Aquaculture, 2018, 10(3): 683. DOI: 10.1111/raq.12194.
- [25] LI Y W, LUO X C, DAN X M, et al. Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) TLR2, MyD88 and IL-1 β involved in anti-*Cryptocaryon irritans* response[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(6): 1232. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.04.012.
- [26] 雷从改, 邱名毅. 龙胆石斑鱼中间培育与南美白对虾混养试验[J]. 水产养殖, 2012, 33(8): 17. DOI: 10.3969/j.issn.1004-2091.2012.08.008.

责任编辑: 何馨成