

終期完成報告

項目編號：FEF2023003

專案負責人：蔡文龍

時間：2023 年 7 月-2024 年 12 月

一、行政摘要

石斑魚是香港地區重要的水產養殖經濟品種之一。然而，由於本地漁民進口魚苗後缺乏專業的隔離檢測設施與技術，所以漁民無法有效監測魚苗是否健康且不攜帶特定病原，因此經常受到魚苗品質不穩定和病害爆發等問題的限制和困擾。針對此問題，本項目旨在利用大學的技術優勢，構建了針對三種高致病性病原（刺激隱核蟲、神經壞死病毒（VNNV）和石斑魚虹彩病毒（GIV））的高靈敏度、特異性檢測方法，探索了無特定病原的石斑魚魚苗的培育體系，並通過舉辦工作坊講座和學生參觀的形式將無特定病原的育苗技術和知識分享給漁民等漁業界眾多持份者，以提升本地水產養殖業的專業化水準與抗風險能力。

二、項目名稱及概要：

項目名稱：香港特別行政區無特定病原的石斑魚魚苗培育構建與應用

項目概要：石斑魚因其高蛋白、低脂肪的營養特性及鮮美的肉質，被列為香港四大名魚之一，並廣泛應用於高檔筵席，市場經濟價值極高。然而，香港地區養殖的石斑魚苗長期依賴內地、臺灣、泰國、菲律賓及印尼等地的進口，不僅供應不穩定，魚苗是否攜帶特定病原體亦難以確保，對養殖產業構成潛在威脅。為解決此問題，本項目首先構建了三種石斑魚高致病性病原體（包括刺激隱核蟲、神經壞死病毒（VNNV）和石斑魚虹彩病毒（GIV））的高靈敏度和特異性檢測方法。項目團隊從內地大型水產育種公司購買受精卵，並用構建的檢測方法對三種石斑魚養殖中常見病原進行檢測，將未檢出三種特異性病原的受精卵引入進行孵化培育。在引入石斑魚前使用的各種器具都事先進行全面的清洗和消毒，同時在培育過程中投入的餌料，包括藻類、輪蟲、豐年蝦和飼料都提前進行三種特異性病原檢測，檢測結果為陰性的餌料才用於後續的石斑魚培育中。經過項目組的努力，成功培育出了近 2 萬尾 5-6 釐米長的無特定病原石斑魚苗，並將其分發給了

香港當地漁民；同時，本項目組織城大獸醫系的學生參觀了專案組的石斑魚培育系統，增強了學生對水產養殖的興趣和水產育苗的基本認知；同時舉辦“石斑魚孵化與無特定病原魚苗培育”專題工作坊，向漁民講解病原傳播途徑，餌料製備及魚苗健康培育等基本知識，促進香港水產養殖業的可持續性發展。

三 專案進度（與擬議的工作計畫比較）

擬議工作計畫	預計工作時間	實際進行時間	工作內容	備註	完成情況
招募人員，購買所需儀器，完成專案所需前期準備工作；合成三種特異性病原引物；孵化缸和育苗缸準備	2023 年 7 月-2023 年 8 月	2023 年 7 月-2024 年 1 月	1. 在內地 58 同城和香港本地 HKese 網站上發佈專案人員招聘資訊； 2. 購買三種餌料生物培養的相關設備設施和原材料； 3. 完成病原特異性引物、探針的設計與合成，建立了針對三種病原靈敏的檢測方法。	1. 招聘具體內容與要求詳見 附件一：人員招募 。 2. 引物、探針的設計與合成，以及詳細的檢測方法構建步驟見 附件二：病原檢測方法的建立 。	已完成
首批餌料製備，後續會持續養殖至項目結束	2023 年 8 月-2023 年 9 月	2023 年 9 月-2023 年 10 月	1. 選擇並購買三種餌料生物，並利用準備的相應設備設施開始製備三種餌料生物。明確了三種餌料生物的生長環境、條件以及培養週期，掌握三種餌料生物在實驗室條件下以及三種餌料在室外擴培的培養規律；	1. 餌料培育方法詳見 附件三：三種生物餌料的培養方法 。 2. 病原檢測結果詳見 附件四：生物餌料的病原檢測結果 。	如期完成

			2. 在餌料生物製備成功後，我們運用建立的檢測方法對三種病原進行定期檢測，結果均為陰性。		
第一次購入受精卵	2023 年 9 月	2024 年 5 月	1. 從海南藍糧科技有限公司購買了石斑魚卵，並進行了病原檢測，檢測結果為陰性後用於後續的孵化和石斑魚苗培育； 2. 通過條件優化，本項目總結出了石斑魚孵化和培育過程的技術要點； 3. 定期進行石斑魚苗的病原檢測，最後成功培育出近 2 萬尾 5-6 釐米無特定病原的石斑魚苗。 4. 將培育出的石斑魚苗分發給了香港本地漁民，並回訪魚苗養殖情況。	1. 石斑魚卵孵化以及魚苗培育方法詳見 附件五：石斑魚受精卵的孵化與魚苗的培育 。 2. 魚卵與環境的病原檢測詳見 附件六：定期病原檢測結果 。 3. 魚苗派發詳見 附件七：魚苗派發 。	延期完成：由於養殖中心選址變更，因此造成孵化耽擱。但後期項目組積極協調建設進展，並在申請延期的規定時間內及時購入石斑魚受精卵進行孵化以及魚苗培育。
第一次受精卵的孵化和育苗；每批受精卵會分成 3 個獨立系統養殖。	2023 年 9 月-2023 年 11 月	2024 年 5 月			
魚苗派發；第二次購入受精卵	2023 年 12 月	2024 年 6 月			
第二次受精卵的孵化和育苗	2023 年 12 月-2024 年 2 月	2024 年 6 月			
魚苗派發；第三次購入受精卵	2024 年 3 月	2024 年 7 月			
第三次受精卵的孵化和育苗	2024 年 3 月-2024 年 5 月	2024 年 7-10 月			
魚苗派發	2024 年 6 月	2024 年 10 月			
中期進度報告	2024 年 1 月	2024 年 4 月	整理前期專案進展，撰寫中期進度報告。		已完成

組織城大獸醫系第 2 年級的學生利用“水產養殖與水生動物健康”的課程校外考察的時間參觀學習魚苗培育活動。	2023 年 11 月	2024 年 11 月	帶領城大獸醫系學生參觀學習了本項目的石斑魚苗養殖培育系統。	詳見附件八：組織學生參觀學習石斑魚培育基地。	延期完成：由於養殖中心選址變更，導致進度耽擱。後期項目組積極組織城大學生進行參觀學習。
舉辦健康養殖和生物安保 (biosecurity) 工作坊講座	2024 年 2 月和 4 月	2024 年 8 月	開展了以“石斑魚孵化與無特定病原魚苗培育”為主題的工作坊講座，超過 30 名當地漁民參加了本次講座，獲得了一致好評。	工作坊講座詳見附件九：健康養殖和生物安保工作坊講座。	延期完成：由於養殖中心選址變更，導致進度耽擱。後期項目組進行了石斑魚卵孵化和魚苗培育後，及時總結經驗，並開展該工作坊將之分享給漁民。
匯總前期實驗全部資料，形成完成報告，完成項目結題	2024 年 6 月	2024 年 12 月	資料整理與完成報告		已完成

四、活動結果及概要，連同相片、短片、社交媒體平臺等資料

人員招聘：專案開始時，專案組撰寫了科研助理（RA）和石斑魚孵化場日常管理維護人員的招聘要求，並在香港本地招聘網站“HKese”和“58 同城”等招聘網站上進行了發佈（圖 1）（詳見附件一：人員招募）。兩周內科研助理和孵化場維護人員職位的流覽量分別達 40 和 70 餘次，共收到了兩份簡歷並對申請人組織了相關面試（詳見附件一：人員招募）。



圖 1：發佈在香港本地招聘網站 HKses 上的招聘資訊

病原檢測方法建立：由於刺激隱核蟲、神經壞死病毒和石斑魚虹彩病毒三種病原是本專案中重點關注並且要求培育出的石斑魚苗不攜帶該三種病原，專案組設計並合成了三種病原的引物與探針，並建立三種病原的有效檢測方法（圖 2）（詳見附件二：病原檢測方法的建立）。

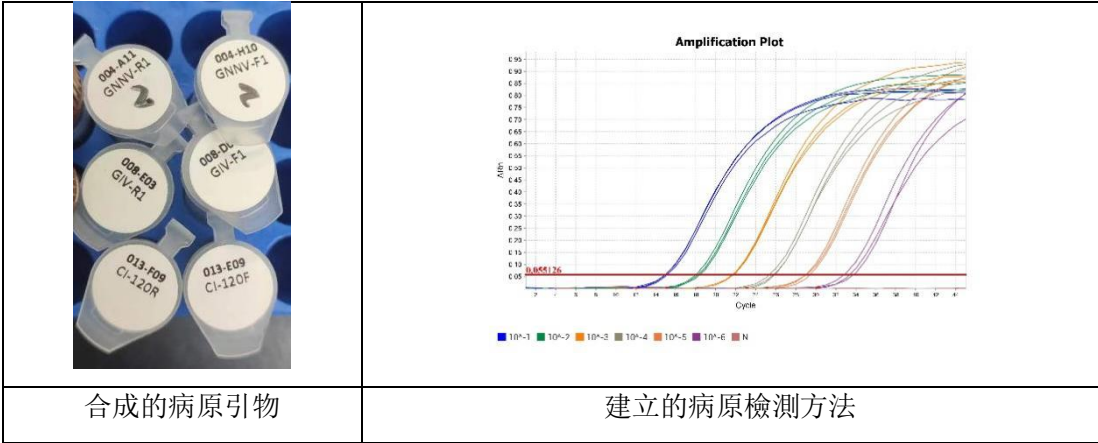






圖 2：三種病原的引物以及建立的檢測方法

餌料製備：為保證石斑魚苗孵化後就能有穩定的開口餌料供應，專案組在實驗室中建立了小球藻、輪蟲和豐年蝦的培養體系，優化了生物餌料的培養環境以及培養條件和培養時間，並進行了持續的培養（圖 3），同時專案組將實驗室培育得到的餌料也在室外進行了擴大培育（詳見附件三：三種生物餌料的培養方法）。

	
實驗室小球藻培養	實驗室小球藻擴大培養（第 3 天）
	
室外擴大培養的小球藻	輪蟲的培養（第 3 天）





	
室外擴大培養的 ss 級輪蟲	工作人員在顯微鏡下觀察輪蟲
	
豐年蝦的培養	孵化後的豐年蝦（第 2 天）

圖 3：三種餌料生物的培養

餌料及水體病原檢測：為保證提供給石斑魚苗的開口餌料不攜帶三種特定病原的，專案組用建立的檢測方法對培養的小球藻、輪蟲和豐年蝦以及培養用水進行了檢測，最終檢測結果均為陰性（圖 4）（詳見附件四：生物餌料的病原檢測結果）。這說明本專案所培養的餌料生物均為無這三種特定病原的。


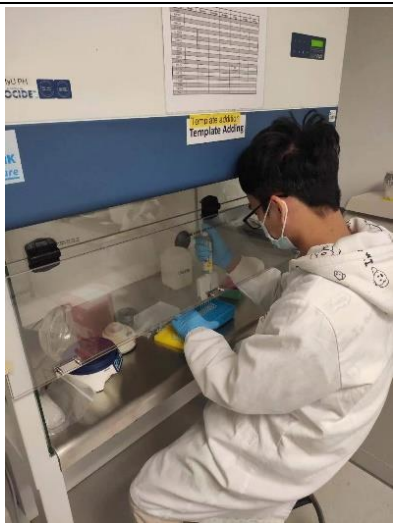

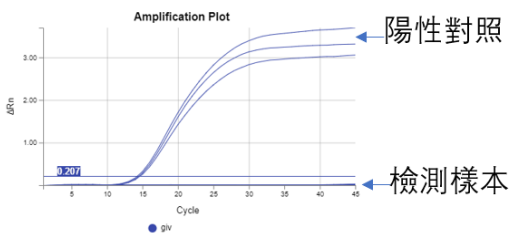
	
研磨樣品進行病原檢測	工作人員正在做病原檢測
	
定量檢測系統	病原檢測結果

圖 4：病原的檢測及檢測結果

三次購入受精卵：本專案從海南藍糧科技有限公司購買了所用的受精卵。在魚卵到達之前準備孵化桶和海水。受精卵到達後進行觀察，平衡溫度後打開卵袋將魚卵放入孵化桶中（圖 5）（詳見附件五：石斑魚受精卵的孵化與魚苗的培育）。



	
實驗室孵化環境	養殖場孵化環境

圖 5：孵化前的準備

第一次受精卵的孵化和育苗：在第一次成功購入受精卵後，本項目迅速構建了孵化和育苗系統。為了提高實驗的可靠性，將每批受精卵分成三個獨立的養殖系統進行管理。經過 24-26 小時的孵化，魚卵孵化率達 80%以上，但孵化後 1-2 天內魚苗陸續死亡，第 3 天后全部死亡。後續我們發現可能為購買的配置人工海水的海水晶成分和品質的差異，導致孵化所用的人工配置海水與天然海水的滲透壓差異較大，致使剛孵化出的脆弱的魚苗滲透壓失衡，進而導致大規模死亡（詳見附件五：石斑魚受精卵的孵化與魚苗的培育）。

第二次受精卵的孵化和育苗：在吸取第一次孵化失敗的經驗後，結合專案組去中山石斑魚養殖場參觀學習的經驗，項目組改善了魚苗孵化的養殖水體，通過添加碳酸氫鈉去調節人工配置海水的鹼度以及滲透壓，使其更加接近與石斑魚自然孵化的水質條件。經過調整後，魚卵孵化率仍在 80%以上，孵化後存活時間更長，但仍在第 5 天后全部死亡。專案組進一步總結經驗，發現原因可能仍然在於人工配置的海水問題，由於水質條件或者水中微量元素等與天然海水仍然存在明顯差異，導致魚苗死亡。

第三次受精卵的孵化和育苗：在經過了第一次和第二次的失敗後，專案組總結經驗教訓，第三次受精卵購入後，迅速開展準備工作，與第一次的孵化相似，我們搭建了全新的孵化系統，但將孵化用水替換成用 1 μ m 篩網過濾後臭氧消毒殺菌的天然海水，並嚴格監控水質和環境參數，通過 24-26 小時的孵化，孵化率達 80%以上。在育苗階段，專案組持續監測水溫、溶氧、pH 值、氨氮、亞硝酸鹽及魚苗的存活率和生長情況，及時投喂小球藻、輪蟲和豐年蝦等早期生物餌料，待魚苗長大後用人工配合飼料誘導轉食，最終獲得魚苗近 2 萬尾（圖 6）。通過總結石斑魚孵化的多次經驗，專案組認為石斑魚苗成功培育與否與孵化所用的水（必須使用天然海水，切忌使用人工配置的海水）、整個孵化過程中的水質管理、開口餌料的及時投放及環境調控有直接關係（詳見附件五：石斑魚受精卵的孵化與魚苗的培育）。


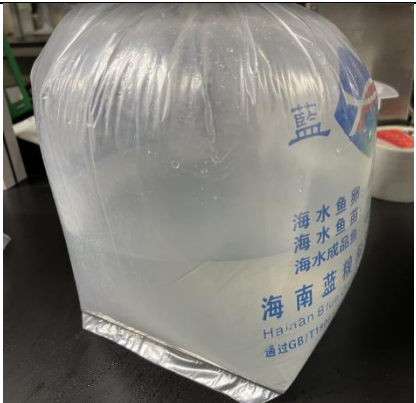
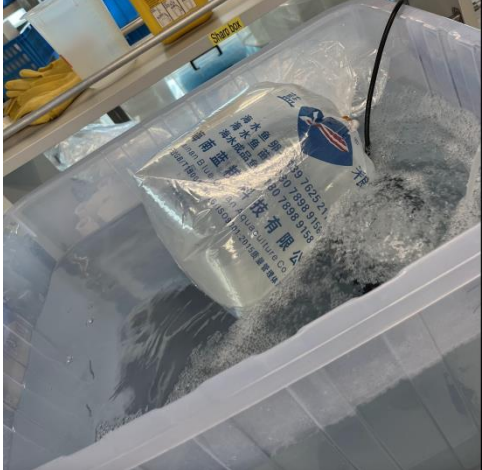
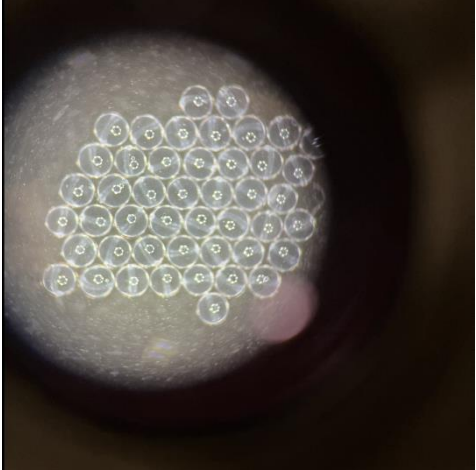
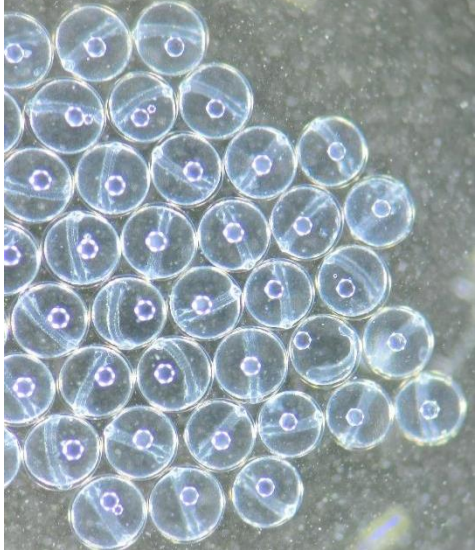

	
<p>收到魚卵開箱</p>	<p>收到魚卵後觀察魚卵漂浮狀態</p>
	
<p>取出魚卵，平衡水溫</p>	<p>第一批受精卵孵化</p>
	
<p>第二批受精卵孵化</p>	<p>顯微鏡下觀察魚卵狀態</p>

圖 6：石斑魚發育階段的觀察

定期進行特定病原檢測：為保證最終培育出的石斑魚苗不攜帶三種特定病原，

項目組對整個培養過程進行特定病原檢測。包括對石斑魚魚卵、石斑魚孵化和養殖的水體以及盛放魚卵的水體進行特定病原檢測，在後期的養殖過程中按照每月一次對養殖水體和石斑魚魚苗進行定期檢測。最終檢測結果均為陰性（圖 7）（詳見附件六：定期病原檢測結果）。這說明專案組培育出來的石斑魚苗均為無這三種特定病原的魚苗。

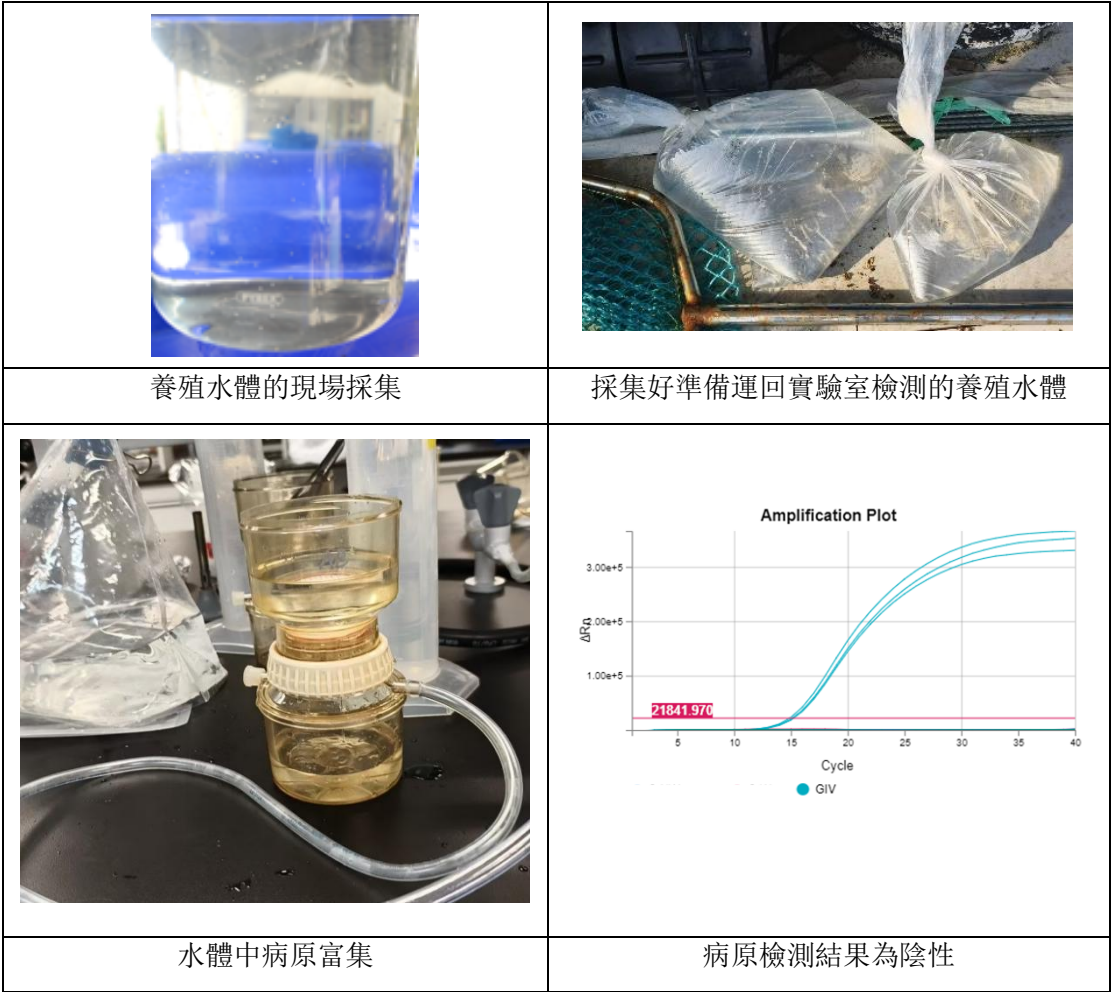


圖 7：病原的檢測

組織城大獸醫系第 2 年級的學生通過“水產養殖與水生動物健康”的課程校外考察的時間參觀學習魚苗培育活動：專案組組織了城大獸醫系 37 名二年級的學生，利用“水產養殖與水生動物健康”課程的實習機會，前往項目組的魚苗培育中心進行參觀學習。在參觀中，學生們觀察了魚苗的飼養和水質管理等關鍵環節，能夠將理論知識與實際操作結合，從而進一步加深對水生動物健康管理的認識（圖 8）（詳見附件八：組織學生參觀學習石斑魚培育基地）。

	
<p>專案負責人蔡文龍教授在課堂上講授石斑魚的孵化</p>	<p>學生正在參觀石斑魚培育基地</p>
	
<p>專案負責人蔡文龍教授與學生交流</p>	<p>學生在石斑魚養殖基地參與健康養殖相關討論學習</p>

圖 8：學生參觀石斑魚培育基地（2024 年 11 月 5 日）

舉辦健康養殖和生物安保工作坊講座 為了進一步提升香港本地漁民的水生病害安保意識與健康養殖知識，項目組於 2024 年 8 月 30 日舉辦“石斑魚孵化與無特定病原魚苗培育”主題的工作坊講座。項目組設計了相關海報進行了宣傳，最終有超過 30 人的當地漁民參加這次講座。為了促進交流與學習，講座結束後設置了互動討論環節，參與者們針對自身養殖過程中的困惑提出問題，專案組成員給予了專業的解答。同時，參與者們分享了各自的經驗，形成了良好的學習交流氛圍。參與者均表示收穫頗豐，並對所討論的主題給予了非常積極的反饋（圖 9）（詳見附件九：健康養殖和生物安保工作坊講座）。

	
<p>為工作坊講座設計的海報</p>	<p>工作坊講座簽到表</p>
	
<p>工作坊講座現場</p>	<p>工作坊講座全員合影</p>

圖 9：健康養殖和生物安保工作坊講座

魚苗派發：經過專案組的努力，本專案成功培育出近 2 萬尾 5-6 釐米無特定病原的石斑魚苗，並於 10 月 14 日將這些魚苗分發給 12 戶當地漁民（圖 10）（詳見附件七：魚苗派發）。

	
<p>魚苗運輸船</p>	<p>魚苗到達</p>



圖 10：魚苗派發給香港漁民

五、根據項目建議書內所擬定的項目目的及影響（效益）評估項目成果；

在本項目中，專案組首先成功構建了針對三種重要石斑魚病原的分子檢測方法。該方法靈敏度高，可以高效檢測餌料，水體和養殖器具中的痕量病原體的存在，為後續無特定病原石斑魚苗的培育建立了必要的基礎。另外，本專案通過刊登廣告吸納對水產養殖有興趣和基礎的人才，收到了包括加拿大在內的不同國家或地區的相關人士的諮詢和關注，提高了石斑魚無特定病原魚苗培育及檢測技術的傳播度。最後，本項目構建了無特定病原石斑魚苗的培育體系，並將技術以工作坊的形式分享給了漁民，增加了漁民對魚類疾病的預防意識，並提高了漁民健康養殖的觀念。

對項目預期結果的總結：本項目預計提供優質魚苗 10 萬餘尾，但最後實際完成石斑魚苗培育 2 萬尾。在本項目實施過程中，專案組發現為了提高育苗的整體存活率，除了無特定病原的要求外，其他因素如仔魚對人工海水的格外敏感，體質弱的仔稚魚的高自然淘汰率，以及稚魚的同類自食現象等各種因素比預期的影響嚴重，從而制約了整體存活率的提高。最後，專案組將該批魚苗免費分發給有意願的漁民 12 家（如預期完成）。通過舉辦以“石斑魚孵化與無特定病原魚苗培育”為主題的工作坊講座，培訓漁民 31 人次，顯著提高了漁民的健康養殖和疾病防控意識。專案組組織工作坊參與者對培訓進行了匿名評價，評價的參與率為 93.55%，對“本次活動讓我收穫豐富”的平均同意率為 89.66%，對培訓工作坊的整體滿意度為 89.86%。另外，專案組也組織了大學在校動物健康相關專業的學生（37 名）參觀了養殖中心和進行了石斑魚健康養殖相關的主題學習。

項目最終直接惠及超過 35 名漁業界相關人士（包括漁民和漁業類別的獸醫學生等），除魚苗產量外，其他各項指標均超額完成預期目標。本項目的實施為香港地區石斑魚健康養殖技術的推廣積累了寶貴經驗，同時也為後續研究指明了技術改進方向。

六、總結及願景

本專案前期雖然受到城大水產養殖中心選址變更的影響而需延期，但最終在得到了管理委員會的同意後而得以順利完成。研究發現，石斑魚的幼苗較其他魚類對水質要求和病害更為敏感。通過系統實驗，專案組發現傳統的人工海鹽配置方法並不適合石斑魚苗繁育及孵化，推薦採用消毒的天然海水作為最佳孵化介質。雖然魚苗實際成活率低於預期，但專案組通過該項目探索了無特定病原的石斑魚培育系統的具體可行性，並將魚苗培育和病原檢測方法與包括學生和漁民在內的眾多持份者分享，顯著提升了公眾對於可持續發展養殖理念的認同及育苗知識的更新。值得注意的是，後期回訪發現在放入海水養殖環境後，無特定病原的魚苗的存活率比常規育苗系統下的魚苗要低。推測由於該批魚苗投放時規格較小（5-6 釐米），免疫系統尚未完善，且由於前期未接觸過相關病原，在投入攜帶病原的自然海洋環境中，其適應性表現反而較差。專案組建議在今後的養殖實踐中，應該將無特定病原的魚苗配合疫苗免疫，並培育至相對較大規格（10 釐米左右）後投放。該策略有望提高育苗的整體存活率並降低產業育苗成本，從而進一步促進海水養殖業的健康可持續發展。

七、專案的財務報表（作為完成報告的附件），其建議的格式請參見 附錄二；

（按下文第 5.10.3 段所指，提交所有開支的收據副本及相關開支的招標或報價檔副本（作為完成報告的附件）

（基於資料保密原因，專案的財務報表不作公開）

八、所有項目資產（見下文第 5.15 段）的列表（連照片）作為完成報告的附件（見 附錄四）

（基於資料保密原因，項目資產不作公開）

九、專案員工的值勤監察計畫（見下文第 5.18 段）所指的所有在獲資助專案下聘請的專案員工值勤記錄（作為完成報告的附件）；

（基於資料保密原因，專案員工的值勤監察計畫不作公開）

十、專案員工的招聘計畫（見下文第 5.18 段）所指的所有在獲資助專案下聘請的專案員工招聘記錄（作為完成報告的附件）。

（基於資料保密原因，專案員工的招聘計畫不作公開）

聲明

- 本人特此向漁業提升基金管理委員會及包含增補基金在內的相關基金的督導委員會作出以下不可撤回的聲明：本完成報告已就涉及的所有由第三方擁有的數據及資料適當地列明了相關的資料來源，而本機構已就此等數據及資料獲得所需的授權。
- 本報告內所表達的任何意見、結果、結論或建議，不一定反映漁業提升基金或基金信託人的立場。

專案負責人：蔡文龍



簽字：_____

日期： 2025 年 4 月 25 日

附件一：人員招募

（基於資料保密原因，附件一：人員招募不作公開）

附件二：病原檢測方法的建立

1. 刺激隱核蟲檢測

在獲取檢測三種病原的引物時，本專案首先通過查閱文獻並對發表文獻的結果進行評估。對於刺激隱核蟲，專案組參考了 Akito Taniguchi 和 Mitsuru Eguchi 發表的研究論文中的引物（表 1，圖 3），該引物能夠特異性檢測刺激隱核蟲，且具有較高的靈敏度（ ≥ 10 個蟲體/L）。檢測體系為 10 μ L 體系，包含 5 μ L 2 \times SYBR Green Pro Taq HS Premix，1 μ L DNA 範本，上下游引物各 0.2 μ L 和 3.6 μ L 的 ddH₂O；反應條件為：95°C 變性 3min，40 個迴圈（95°C 下 3 s，64°C 下 35 s）。

表 1：檢測三種病原的引物資訊。

檢測物種	上游引物（5'-3'）	探針（5'-3'）
刺激隱核蟲	F: TGGCTCCCATAACGATGAAGA R: AACATGCCGTTGGGATATCC	——
神經壞死病毒	F: CAACTGACARCGAHCACAC R: CCCACCA YTTGGCVAC	FAM-TYCARGCRACTCGTGGTGCVG-BHQ1
石斑魚虹彩病毒	F: AAAGTGAGGTCGCTTCAGGA R: TACACGTAAGCTTCCACGGT	FAM-ACCGACATAGCCGGCGGGCT-TAMRA

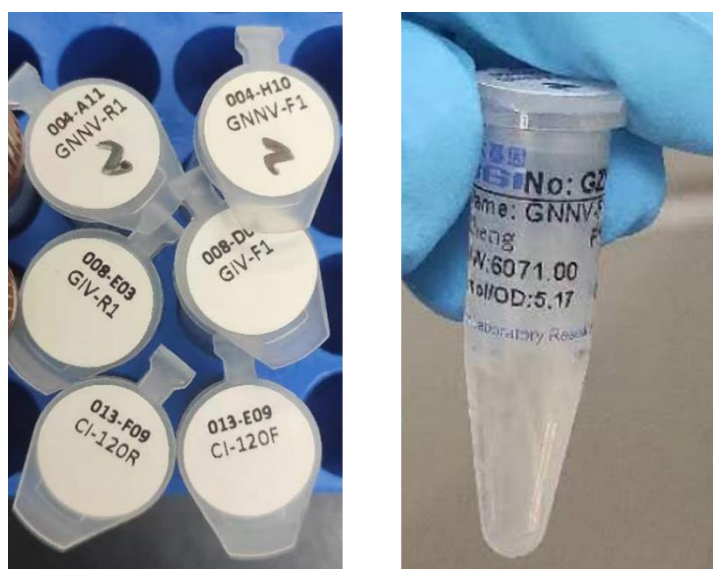


圖 3：合成的引物

2. 神經壞死病毒（VNNV）檢測

對於神經壞死病毒，本專案根據中國農業農村部於 2023 年發佈的水生動物疫病監測計畫中對該病毒的檢測方法構建了該病毒的檢測體系。選擇該病毒的外殼蛋白（Capsid protein, CP）（GenBank number: NC_008041）作為保守基因序列來進行檢測引物和探針的設計（表 1，圖 3）。同時根據該保守基因序列構建並合成了對應的質粒，並按照表 2 的原料和體積以及表 3 的反應程式建立了 VNNV 的檢測反應體系。

同時，專案組利用構建的 VNNV 質粒作為範本，通過稀釋成不同的濃度加入該反應體系，以確定該檢測方法的最低檢測線。我們將質粒稀釋成 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 加入反應體系中，結果發現都得到了較好的反應曲線，且得到了較好的擴增標準曲線，即反應閾值與質粒稀釋度的對數值呈現較好線性關係（ $Y=-3.392 \cdot X+11.37$ ， $R^2=0.9965$ ）（圖 4）。該方法具有較高的特異性和靈敏度，能檢測到較低含量的 VNNV，能較好的服務於專案組構建的無 VNNV 的石斑魚魚苗。

表 2：qPCR 檢測 VNNV 所需的試劑和體積。

原料與試劑	體積
2 × Taq Pro HS Universal Probe Master Mix	5 μL
Primer 1 (10 μM)	0.2 μL
Primer 2 (10 μM)	0.2 μL
TaqMan Probe (10 μM)	0.1 μL
Template DNA	1 μL
ddH ₂ O	3.5 μL

表 3：qPCR 檢測 VNNV 的反應程式。

反應階段	溫度	時間	迴圈數
Stage 1	95 °C	30 sec	1 cycle
Stage 2	95 °C	10 sec	40 cycles
	60 °C	30 sec	

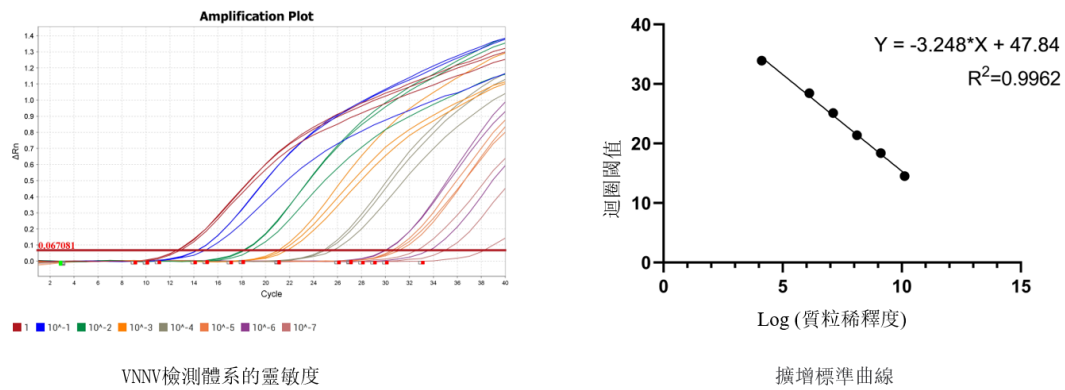


圖 4：VNNV 檢測體系的靈敏度測試。

3. 石斑魚虹彩病毒（GIV）檢測

對於石斑魚虹彩病毒，專案組自主設計了檢測 GIV 的引物，最後根據該病毒的保守基因-主要衣殼蛋白基因（major capsid protein gene, MCP）(GenBank number: MK107821.1)-設計並合成了探針和引物（表 1，圖 3）。

擁有合成引物和探針之後，首先對探針和引物的使用濃度進行了探索。在實驗過程中，加入不同濃度的引物（0.2、0.4、0.6、0.8、1 $\mu\text{mol/L}$ ）和不同濃度的探針（0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\mu\text{mol/L}$ ），通過 qPCR 反應後的 Cq 值確定最適的引物和探針濃度分別是 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。最終，本專案構建了表 5 及表 6 所示的反應體系和反應程式。

同樣，以構建的 GIV 質粒為範本，通過加入不同稀釋度的質粒（ 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} ），每個稀釋度都得到了較好的反應曲線和擴增標準曲線，即反應閾值與質粒稀釋度的對數值呈現較好線性關係（ $Y = -3.665 \cdot X + 10.99$ ， $R^2 = 0.9984$ ）（圖 5）。這表明構建的檢測 GIV 的反應體系具有較好的檢測效果，能很好的服務於本專案培育不攜帶 GIV 的石斑魚魚苗。

綜上所述，本專案建立了三種特異性病原高靈敏性的檢測方法，可有效用於本項目後續對這三種特異性病原進行檢測。

表 4：檢測石斑魚虹彩病毒（GIV）的不同引物和探針濃度的 Cq 值。

引物濃度 (μmol/L)	探針濃度 (μmol/L)				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
0.2	17.070	16.713	15.618	15.349	15.053
0.4	17.517	15.967	15.627	15.054	14.899 *
0.6	17.034	16.141	15.434	16.179	14.965
0.8	16.721	16.073	15.231	15.005	14.944
1	17.100	16.179	15.608	15.054	14.940

注：*表示選擇的最適引物和探針濃度

表 5：qPCR 檢測 GIV 所需的試劑和體積。

原料與試劑	體積
2 × Taq Pro HS Universal Probe Master Mix	5 μL
Primer 1 (10 μM)	0.2 μL
Primer 2 (10 μM)	0.2 μL
TaqMan Probe (10 μM)	0.1 μL
Template DNA	1 μL
ddH2O	3.5 μL

表 6：qPCR 檢測 GIV 的反應程式。

反應階段	溫度	時間	迴圈數
Stage 1	95 °C	30 sec	1 cycle
Stage 2	95 °C	10 sec	40 cycles
	60 °C	30 sec	

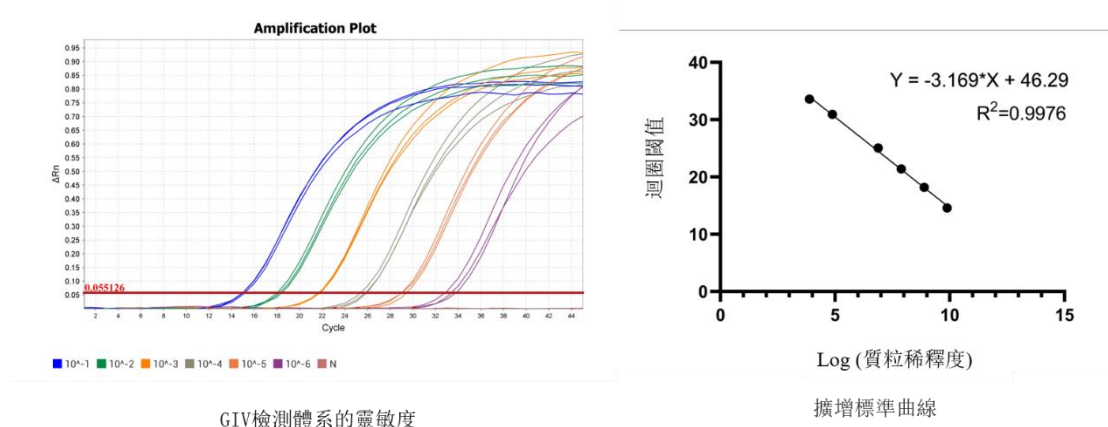


圖 5：GIV 檢測體系的靈敏度測試。

合成病原檢測引物和探針所用的保守基因序列

神經壞死病毒（VNNV）

Reference sequence of RGNNV by qRT-PCR (GenBank number: NC_008041)

Capsid protein (CP)

ACACTGGAGTTTGAAATTCAGCCAATGTGCCCCGCAAACACGGGCGGTGG
TTACGTTGCTGGCTTCCTGCCTGATC**CAACTGACAACGATCACA**CCTTCGA
CGCGC**TTCAAGCAACTCGTGGTGCAGTC****GTTGCCAAATGGTGGG**AAAGCA
GAACAGTCCGACCTCAGTACACCCGCACGCTCCTCTGGACCTCGTCGGGA
AAGGAGCAGCGTCTCACGTCACCTGGTCGGCTGATACTCCTGTGTGTTCGGC
AACAACACTGATGTGGTCAACGTGTCAGTGCTGTGTTCGCTGGAGTGTTCG
ACTGAGCGTTCCATCTCTTGAGACACCTGAAGAGACCACCGCTCCCATCAT
GACACAAGGTTCCCTGTACAACGATTCCCTTTCCACAAATGACTTCAAGTC
CATCCTCCTAGGATCCACACCACTGGACATTGCCCCTGATGGAGCAGTCTT
CCAGCTGGACCGTCCGCTGTCCATTGACTACAGCCTTGGAAGTGGAGATGT
TGACCGTGCTGTTTATTGGCACCTCAAGAAGTTTGCTGGAAATGCTGGCAC
ACCTGCAGGCTGGTTTCGCTGGGGCATCTGGGACAACCTTCAACAAGAC

石斑魚虹彩病毒（GIV）

Grouper iridovirus isolate GIV-GX major capsid protein gene, complete cds

(GenBank number: MK107821.1)

ATGACTTGTAACAACGGGTGCTGGCGTAACCAGTGGCTTCATAGATTTGGCC
ACGTACGACAATCTCGACAGAGCGTTATACGGCGGAAAGGACGCCACTAC
GTACTTTATCAAAGAGCATTATCCCGTAGGATGGTTCACCAAGCTTCCCACC
ATGGCCACCAGAGTGTCTGGAAACCCAGCGTTCGGGCAAGAGTTTTTCGGT
CGGGGTTCACAGGTCGGGCGATTACGTGCTCAACGCCTGGCTCACTCTTAA
AACCCCCGAAATTAACTGCTCGAAACAAATAGGCTCGGCGCAAACGGTA
CCGTGAGGTGGACCAAAAACCTAATGCACAACGCTGTAGAGCACGCTTCT
CTCACCTTCAACGACATTTGCGCGCAGCAGTTTAACACAGCGTATTTAGAC
GCTTGGACACAGTTTAACATGTGCGAAGGTAAACGCATAGGTTACGACAAC
ATGATCGGGAACACCAGCGACATGACCAACCCCACTCCCGCTCAGGGTCA
GGACGGCGCAAGGACACTACCTTCCAAAAATTTAGTGCTCCCGTTGCCGTT
CTTTTTCAGCAGAGACTGCGGATTGGCTCTGCCCACCGTAGTGTTGCCCTAT
AATGAAATCAGAATCAACATT**AAACTGAGGTCGCTTCAGGA**GCCTTTAGTG
TTTCAGAACAAAGACACCGGAAATGTGATTCTCTCTGCT**ACCGACATA**
GCCGGCGGGCTCGCCGAC**ACCGTGGAAGCTTACGTGTA**TATGACCGTGGGT
CTCGTTTCCAACGTGGAAAGGTGCGCCATGGCAGGGACCGTCAGGGATAT
GGTCGTAGAACAAATGCAGGCCGCCCCACACACATCGTTAACCTCAAA
ACACAAATAACGTCCACGTAGACATGAGGTTCTCGCACGCCGTGAAAGCC
CTCTTTTTCATGGTGCAAAACGTCACCTATAAATCTGTGGGTTCAAATTATA
CGTGTGTAACACCAGTTAACGGTCCGGGCAACACCGTGATGGAGCCCGCC
ATGTCCGTTGATCCCATCAAAAGCGCCAGCCTCACGTACGAAAATACGACC

AGGTTGGCAAATATGGGTGTAGAGTATTACTCTCTGGTACAACCTTGGTATT
TTTCAGCCTCCATTCCAGTGTACACCGGATACCACATGTATTCATACGCCCT
AAACGTGGGCAGCGTTCATCCTTCGGGGTCTACCAATTACGGAAGATTGAC
CAACGCTAGCATCACTGTAACAATGTCCCCCGAGTCTGTCGTCGCCGCAGC
AGGAGGAGGTAACAATAATTCTGGTTACAACGAACCTCAGAGGTTTCGCGTT
GGTAGTGATCGCCGCAAACCATAACGTCATCAGAATCATGAACGGTTCCAT
GGGGTTCCCTATCTTGTA

注黃色標注部分用於設計對應病原的檢測引物，綠色標注部分用於設計對應病原的檢測探針。

附件三：三種生物餌料的培養方法

1. 藻類培育

1.1. 藻種選擇

本項目完成了藻種的選擇和藻類的初培與擴培。項目初始，項目組購置海水小球藻（*Chlorella spp.*）作為本專案中應用的藻類。小球藻是綠藻門小球藻屬普生性單細胞綠藻，細胞呈球形或橢圓形，直徑 3~10 微米。小球藻含有豐富的蛋白質、維生素、礦物質、食物纖維、核酸及葉綠素等，具有極高的營養價值。在水產養殖中，小球藻也經常被用作石斑魚魚苗的開口餌料，其能夠促進水產動物生長、降低生產成本，並且提高石斑魚魚苗的成活率，同時小球藻也能作為輪蟲的食物來源，培養輪蟲。此外，小球藻光合效率高，繁殖速度快，也便於培養。因此本項目選擇小球藻來進行培養。

1.2 培養液的配置

在天然外界環境中，小球藻可以通過攝取環境中的營養元素供自己生長，但在人工培養條件下，需要配置營養液供藻類大量繁殖。培養小球藻的營養元素主要包括碳源、氮源、大量元素（鈉、鎂、矽酸鹽、硫酸鹽和磷酸鹽等），微量元素（鐵、銅、鈷、鋅、鉬等）以及維生素等。

本專案中，使用氯化銨作為小球藻的氮源，注入空氣作為碳源，以磷酸二氫鈉、矽酸鈉等提供大量元素；以氯化鐵、硫酸銅、鉬酸鈉、硫酸鋅、氯化鈷和氯化錳為小球藻提供必需的微量元素，同時補充部分大量元素；用 VB₁₂、VB₁ 和生物素提供必需的維生素（詳見表 7）。這些儲存液提前配置好之後，我們按照表 8 所示的比例配置小球藻生長所需的營養液。

表 7：培養小球藻的三種貯備液配方。

貯備液	原料	重量/體積
貯備液I	氯化銨 NH_4Cl	47.2 g
	磷酸二氫鈉 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5 g
	矽酸鈉 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	30 g
	蒸餾水	1000 ml
貯備液II	氯化鐵 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.15 g
	乙二銨四乙酸鈉 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.36 g
	硫酸銅 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (9.8 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
	鉬酸鈉 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6.3 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
	硫酸鋅 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (22.0 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
	六水氯化鈷 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10.0 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
	氯化錳 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (180.0 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
	蒸餾水	1000 ml
貯備液III	Vitamin B ₁₂ (1.0 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
	生物素 Biotin (0.1 g/L dH ₂ O)	10.0 ml
	Vitamin B ₁	200mg
	蒸餾水	1000 ml

表 8：培養小球藻的營養液配比。

營養液	體積
海水	1000 ml
貯備液I	1 ml
貯備液II	1 ml
貯備液III	0.5 ml

1.3 小球藻室內培養過程

本項目先在實驗室對小球藻進行了初培和擴培實驗。在實驗室內專案組用黑色塑膠薄膜進行了隔斷遮光處理，形成一個避光的小隔間。在這個小隔間內專案組安裝了兩根 LED 燈管（13W）為小球藻提供充足的光源，同時配備了一個充氧泵可持續輸入空氣提供碳源，搭建成一個小型培養室（圖 6）。



圖 6：小球藻小型培養室。

在實驗室中培養藻類時，所有的培養用具均提前進行高壓蒸汽滅菌，以保證能夠順利培養出無污染的小球藻。獲得小球藻藻種後，首先在 50 ml 離心管中加入 10 ml 提前用海鹽配置好並滅菌後的海水營養液（25 ppt，即 1 L 蒸餾水中加入 25 g 海鹽），再加入 1 ml 的藻種（即藻種與海水比為 1: 10），充分混勻後將其放入小型培養室中進行第一階段的初培，環境溫度為 20-25°C。第一次初培時，專案組培養了 50 管，以保證後續的擴培有充足的藻源。

培養 2 天后肉眼可見培養液變為淺綠色，7 天后培養液變為翠綠色（圖 7），此時開始進行第二階段的擴培。擴培在 500 ml 錐形瓶中完成，加入 400 ml 海水培養液和 50 ml 藻液，置於培養室中培養，並用充氣泵 24 小時不間斷充入空氣。剩餘的初培藻液將繼續按照初培階段的培養方法繼續培養，保證初培藻液的充足（圖 7）。

在 500 ml 錐形瓶中擴培兩天即可得到翠綠色的藻液，此時進行第三階段的擴培。在 2 L 錐形瓶中加入 1600 ml 海水營養液和 100 ml 藻液，置於培養室中 24 小時不間斷充入空氣。2-3 天后，藻液即可變成翠綠色（圖 7）。可用於後續在養殖場中的擴大培育。

1.4 小球藻室外擴培

專案組將在實驗室中培養的小球藻藻種按照藻種 海水為 8 : 75 的比例加入並加入 170 mL 的小球藻培養液在圓柱形水桶中進行小球藻的室外擴培。培養所

用的海水提前用 1 μm 的濾網過濾掉水中雜質，並用臭氧進行消毒殺菌後的天然海水。水溫保持在 20-25°C，白天利用自然光照，晚上人為提供光源，並用充氣泵 24 小時不間斷充入空氣，培養 5-7 天后即可得到翠綠色的藻液（圖 7），即可用於石斑魚培育。

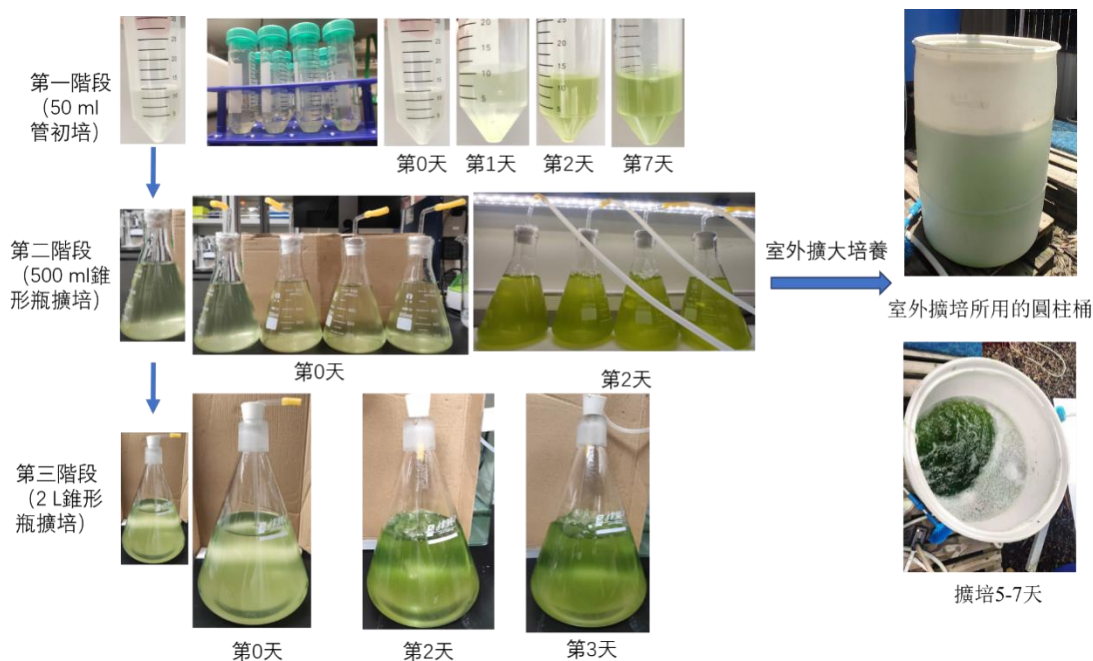


圖 7：小球藻培養過程。

2. 輪蟲培育

2.1 實驗室輪蟲培養

與小球藻實驗室培養相同，培養輪蟲所需的海水和用具均提前用高壓蒸汽滅菌鍋滅菌後使用。專案組用圖 8 所示的裝置來培養海水輪蟲，用小球藻來為輪蟲提供食物。在這個 5 L 的容器中加入 3.2 L 的小球藻培養液，加入 200 ml 藻液，同時按照 50 個/ml 的密度引入購買的海水輪蟲。培養水體的鹽度為 25 ppt，用加熱棒將溫度控制在 25-26°C，亮度為 2000-3000 lux，氨氮小於 1 ppm，pH 值為 7.5-8.5，同樣用充氣泵自下而上 24 小時不間斷的充入氧氣。

將小球藻和輪蟲放入培養桶後水體呈現小球藻的顏色，但是第二天時培養水體變得清澈，表明大量的小球藻被消耗，到第三天時培養水體變得完全清澈透明，呈現輪蟲培養後應有的淡黃色水體（圖 9）。專案組吸取了 200 μl 的輪蟲培養液通過血球計數板在顯微鏡下進行了數量和活力的觀察，結果發現培養第三天的輪蟲

數量增長了一倍，並且狀態良好（圖 8）。此外，專案組也在透明燒杯中觀察了輪蟲的活力，發現培養三天后出現大量白色的輪蟲蟲體在水中遊動。這表明輪蟲在培養桶中能夠很好的繁殖與生存。

2.2 輪蟲室外擴培

項目組選擇了實驗室所培養的 ss 級輪蟲，即輪蟲大小直徑小於 $110\ \mu\text{m}$ ，根據資料顯示，ss 級輪蟲是最適合石斑魚孵化後開始攝食外源性營養時的口徑，是石斑魚最適的開口餌料。培養時通過使用 $1\ \mu\text{m}$ 的濾網過濾掉水中雜質，並用臭氧進行消毒殺菌後的天然海水。其中，首次接種的數量保證 50 個/ml，溫度控制在 $25\text{-}26^{\circ}\text{C}$ ，自然光照，氨氮小於 1 ppm, pH 值為 7.5-8.5，並且使用充氣泵自下而上 24 小時不間斷的充入氧氣。同時在培養桶中置入一塊尼龍網，方便吸附與清除輪蟲排除的廢物。用小球藻作為輪蟲的食物來源，每天向輪蟲培養桶中加入 200-300 mL 高濃度的活小球藻藻液，為保證輪蟲有充足的食物來源，項目組也使用高濃縮的冷凍藻進行投喂，但培養效果顯示以活藻投喂最佳。

在培養 3~4 天后，輪蟲密度大約可達到 100 個/ ml，用 300 目密網採收約 1/3 的輪蟲，加入含有小球藻的藻水至原水位，再繼續培養後，可得到源源不斷的輪蟲（圖 8）。

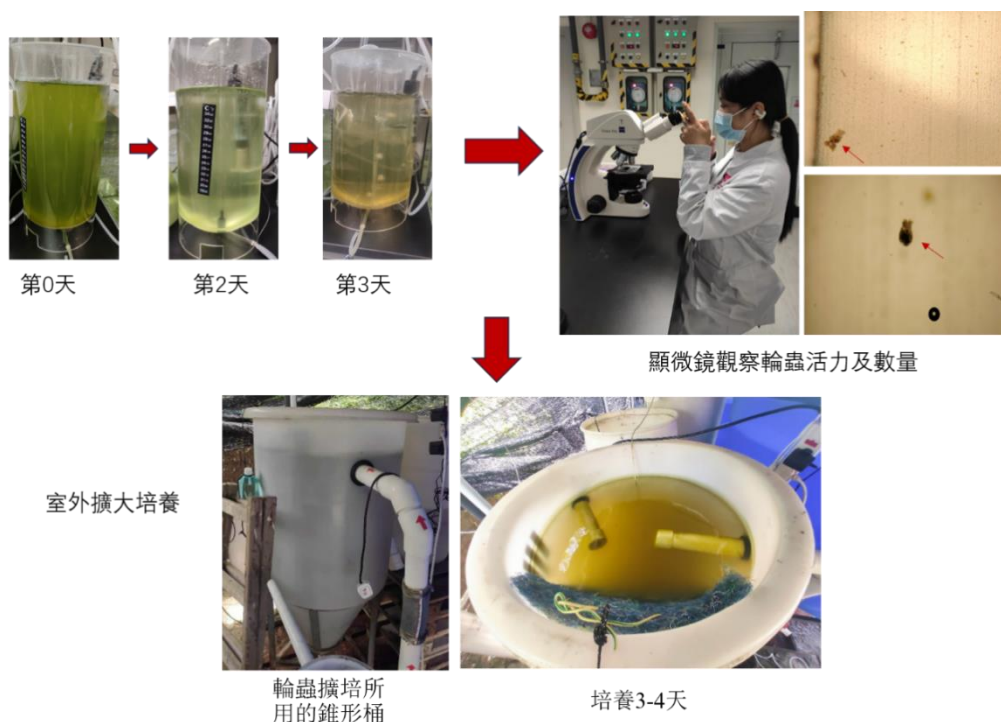


圖 8：輪蟲培養裝置與培養過程。

3. 豐年蟲的培育

豐年蟲培育所需海水與用具均提前進行高壓蒸汽滅菌。專案組購入的豐年蟲卵根據廠商的說明，按照 1 L 培養海水配比 3 g 豐年蟲卵的比例，加入到新鮮配置好的海水中，海水鹽度為 25-30 ppt，用加熱棒維持水溫至 26-28°C。整個孵化過程在圖 8 所示的孵化桶中完成，24 小時不間斷的向孵化桶中充入氧氣。2 日後豐年蟲卵即可孵化，此時豐年蟲卵的外殼會漂浮在水體的表面，而大多數豐年蟲會聚集於孵化桶的底部，通過底部的導管用密網收集孵化出的豐年蟲（圖 9）。剩餘未用完的豐年蟲卵放置於-20°C 冰箱中保存備用。

為保證後續能持續充足地供應豐年蝦給孵化後的魚苗，項目組又購入另一種孵化桶進行室外孵化。培育時，同樣使用 1 μm 的濾網過濾掉水中雜質，並用臭氧進行消毒殺菌後的天然海水。孵化桶中裝滿 1.7 L 水，加入 10 g 豐年蝦卵，環境溫度培育，24 小時不間斷的向孵化桶中充入氧氣，2 天后豐年蟲卵即可孵化出膜。由於豐年蝦中 n-3 高不飽和脂肪酸（n-3HUFA）含量不高，但其又是石斑魚仔稚魚期生長發育所必需的營養物質，因此在收集豐年蝦之前的 3 小時，向豐年蝦孵化桶中加入裂壺藻粉（含有豐富的 DHA）強化豐年蝦，使豐年蝦吸收裂壺藻粉中的 DHA 後，再投入到石斑魚養殖桶中供石斑魚攝食（圖 9）。



圖 9：豐年蟲的孵化裝置和孵化過程。

附件四：生物餌料的病原檢測結果

專案通過檢測在實驗室中培養的小球藻，輪蟲和豐年蟲以及培養用的水，獲得以下方法及結論。

1. 核酸提取

由於本專案需要檢測的病原包括兩種以 DNA 為遺傳物質的病原（刺激隱核蟲和 GIV）及一種以 RNA 為遺傳物質的病原（VNNV），因此，項目組將所有的檢測樣品先用液氮研磨後提取核酸。收集 100 ml 的小球藻培養液，12000 rpm 離心 10 分鐘後棄掉培養液，使沉澱後小球藻進行液氮研磨，以破除細胞壁，便於提取 DNA 和 RNA。同樣收集 1000 ml 的輪蟲培養液，以相同方式富集沉澱後進行液氮研磨以提取核酸。對於豐年蟲，本項目直接將購置的豐年蟲卵進行檢測（圖 10）。由於實驗室培養過程中所用的水均為滅菌後的 ddH₂O，因此選擇將 ddH₂O 作為防止污染的陰性對照。

使用 Takara 的通用試劑盒提取待測樣品中的 DNA 和 RNA。將研磨後的小球藻，輪蟲和豐年蟲卵樣品按照試劑盒說明書進行 DNA 和 RNA 的提取。提取好的核酸通過 NanoDrop（分光亮度計）檢測核酸的濃度和品質（圖 10）。

通過液氮研磨之後，更好地利用該試劑盒，從待測樣本中提取出高品質的 DNA 和 RNA 用於後續的檢測。

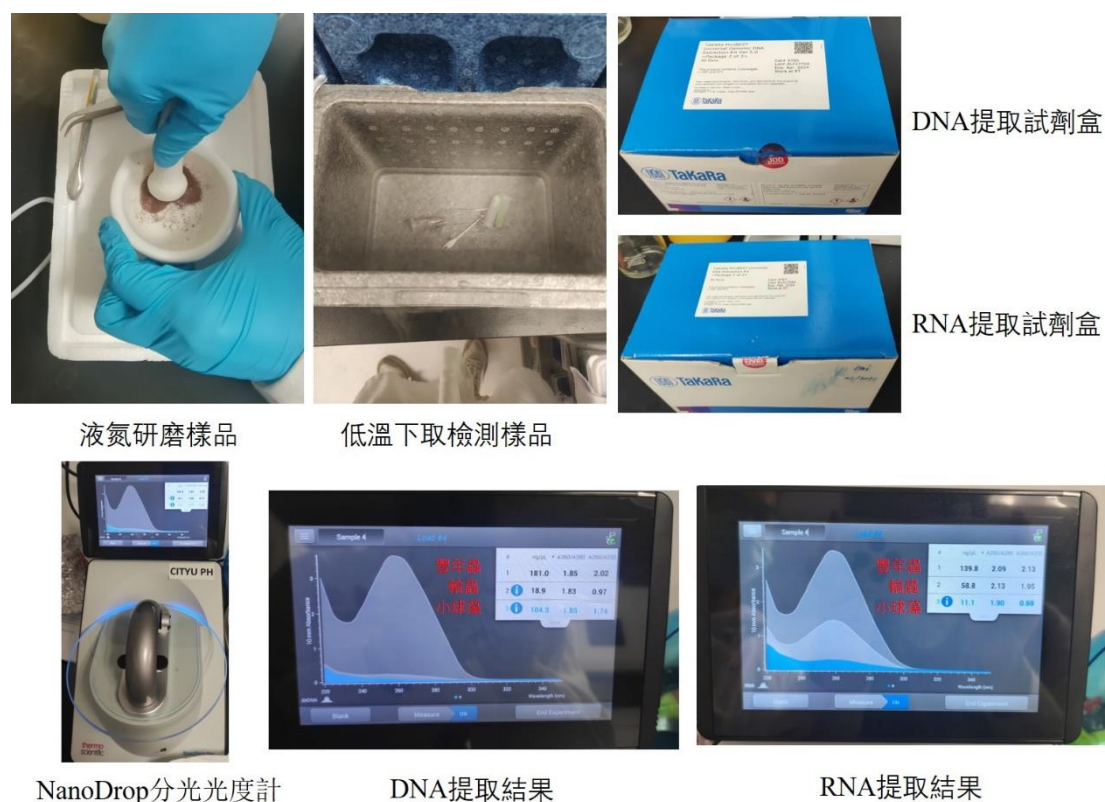


圖 10: 待測樣本的核酸提取過程及結果。

2. 病原檢測

2.1. RNA 反轉錄

由於 VNNV 是一種 RNA 病毒，因此在進行 qPCR 定量檢測之前需要通過反轉錄將提取的 RNA 反轉錄為 DNA。根據表 9 的反應體系與反應條件，在圖 11 所示的儀器中進行 RNA 的反轉錄過程，反應完成後，獲得了反轉錄後的 cDNA。

表 9: 反轉錄體系與條件。

試劑	用量
5xAll-in-one qRT SuperMix	4 μ l
Enzyme Mix	1 μ l
範本 RNA	1 μ g
ddH ₂ O	補足體系至 20 μ l

反應條件：50°C，15 min，85°C，5 s。將獲得的 cDNA 保存於-20°C，用於後續的 qPCR 實驗。



圖 11：反轉錄使用的儀器。

2.2. 病原定量檢測

本專案通過從小球藻、輪蟲和豐年蝦中提取得到的高品質 DNA 和反轉錄得到的 cDNA 按照第 2 部分（引物設計，合成及驗證）中所建立的反應體系添加檢測樣品和相應的試劑，每個樣品包含三個重複；除三種生物餌料外，項目組進一步對養殖用水進行了病原檢測，同時設置對應病原的陽性對照和陰性對照。添加好的反應體系充分混勻後，將其置入 qPCR 定量檢測儀器中，對置入的檢測樣品進行編板，以確保每個樣品的資訊準確性。待檢測完成後，即可獲得每個樣品的檢測結果（圖 12）。

檢測結果顯示，專案組使用的小球藻、輪蟲、豐年蝦以及實驗室養殖用水四種檢測樣品中三種病原的檢測結果均為陰性（表 10），表明專案組在實驗室中培養的餌料生物中均不含這三種病原。

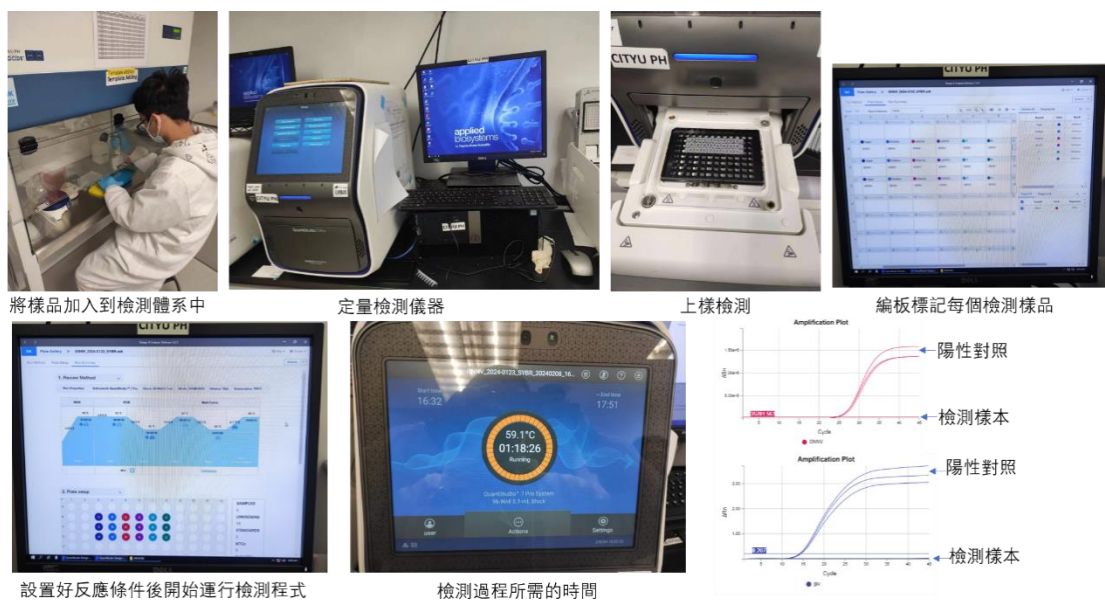


圖 12: qPCR 定量檢測使用的儀器以及檢測過程。

表 10: qPCR 定量檢測結果。

	小球藻	輪蟲	豐年蟲	養殖用水	陽性對照
刺激隱核蟲	—	—	—	—	+
神經壞死病毒（VNNV）	—	—	—	—	+
石斑魚虹彩病毒（GIV）	—	—	—	—	+

注：-：陰性；+：陽性

附件五：石斑魚受精卵的孵化與魚苗的培育

1. 石斑魚卵孵化前的準備工作

石斑魚受精卵從海南藍糧科技有限公司購入，前兩批魚卵採用人工配置的海水進行孵化。在魚卵抵達前，將所需使用的魚缸和孵化桶、漁網、加熱棒、氣石、氧氣管等用具，用 50 ppm 的漂白水浸泡消毒後充分清洗。將 6 個 100 L 的魚缸和 2 個 2000 L 的孵化桶注入由即溶海水晶配置的人工海水（圖 13），並且在計畫收到卵的 1 天前，測量養殖桶裡面水體的溫度、鹽度、pH 值、氨氮指標，以確保各項指標是否合適（表 11）。

鑒於實驗結果，本專案發現人工配置的海水與天然海水之間可能存在較大差異，不利於石斑魚孵化後存活基礎條件的保證。因此，第三批魚卵項目組選用天然海水進行孵化和培育。從海域中獲取到的天然海水先注入 1 μm 篩網進行過濾，去除掉水質的雜質和大部分的病菌，然後用臭氧進行殺菌，處理後的天然海水才用於後續石斑魚的孵化和培育（圖 13），水質條件如表 11 所示。為降低受精卵進入新的環境所帶來的應激反應，我們提前一天在孵化桶中加入濃度為 10 g/桶（1200 L）的潑灑維生素 C。

表 11：孵化水質條件

指標	要求
鹽度	28-30 ppt
水溫	28-31°C（設定 30°C 最優，有助於提高孵化率）
溶氧	$\geq 5 \text{ mg/L}$
酸鹼度	> 8.0
亞硝酸鹽	不檢出
氨氮	不檢出
光照	6000-8000 lux

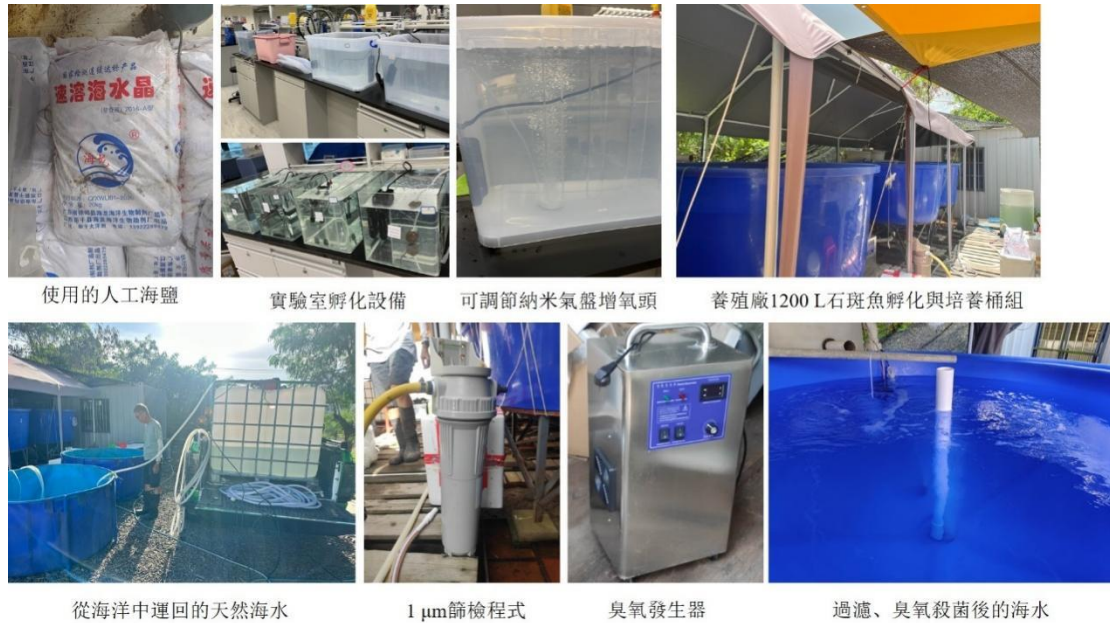


圖 13：實驗室、養殖場孵化設備以及天然海水的使用前處理。

2. 石斑魚卵孵化

由於前兩次使用人工配置海水進行石斑魚卵的孵化，雖然孵化率均能達到 80% 以上，但仔魚出膜後 2-4 內就全部死亡。鑒於實驗經驗，專案組後續的孵化工作均選用天然海水進行孵化和培育。

購買的魚卵通常前一天晚上進行人工授精，通過空運到深圳後，項目組立即從機場接收受精卵並運回香港進行孵化，此時魚卵大約受精 12 小時。待受精卵到達孵化場地後，先將外層魚卵袋去掉，防止從外層卵袋中引入病原到養殖系統中。然後將魚卵放在孵化桶中平衡水溫 20-30 分鐘，恆溫後打開卵袋，用 0.9% 鹽水清洗一遍受精卵，再將其放入濃度為 100 mg/L 的聚維酮碘中進行消毒 10-15 分鐘，溫度與孵化桶溫度保持一致。魚卵消毒完成後，再緩緩地將魚卵轉移至孵化桶中。在受精卵轉入魚缸時，應仔細辨別魚卵的好壞，晶瑩剔透，個頭飽滿，且漂浮在水面上的為好卵，而魚卵為白色且沉底的表明其已死亡，孵化時應僅將浮於水面的好卵轉移至孵化桶中進行孵化（圖 14）。

在仔魚還沒完全孵化之前，氣石需儘量開大使魚卵翻滾懸浮起來。同時，受精 24 小時後要仔細觀察和監測魚卵的發育情況，及時調整增氧的氣泡大小。待觀察到石斑魚的尾部已經出膜伸直後，則需要及時將充氣量減小，以免由於充氣過大導致水流過大，過度消耗早期仔魚的營養而導致仔魚死亡。石斑魚卵在 30°C

進行孵化，約經 24-26 小時即可孵出仔魚，剛孵出的仔魚全長 1.5-1.6 毫米。魚卵孵化率可達 80%以上（圖 14）。在孵化過程中，發現沉底死亡的魚卵應及時打撈，防止因魚卵死亡後分解而導致水質變壞。

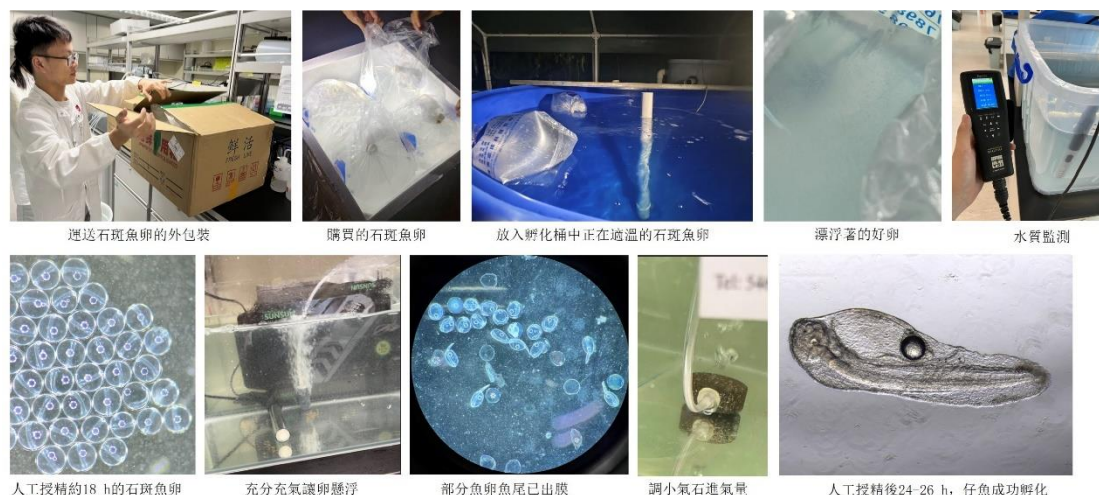


圖 14：石斑魚卵的孵化。

3. 石斑魚苗的培育

魚苗培育指將仔魚培育成全長 30 毫米以上稚魚的過程，育成大約需要 3 個月左右。在魚苗培育階段含有多個關鍵時期，關乎著石斑魚苗最終的成活率：

開口關：首先是石斑魚苗的開口階段。石斑魚苗孵化後可依靠自身攜帶的卵黃囊生存，這段時間暫不需要攝入外源性的營養。但在孵出後第 3-4 天，卵黃囊逐漸耗盡，此時會發現魚苗開眼、開肚，即魚苗出現 3 個黑點，這預示著魚苗開始進入外源性營養攝取階段（圖 15）。因此孵化後第 3 天，項目組開始密切進行觀察，發現魚苗逐漸開口後，馬上投喂藻類和 SS 級輪蟲（用 300 目篩絹網過濾）到孵化桶中，讓開口的魚苗及時攝食，訓練其自行覓食能力。水體中輪蟲的密度在 10 個/毫升，每天早晚各投喂一次。因此，該階段須保證充足的輪蟲來源，否則將嚴重制約魚苗成活率。

開翅關：這個時期是石斑魚生長發育的第二個重要時期。在孵化後 15~30 天左右，此時魚苗有延長的一條背鰭棘與左右各一條的腹鰭棘（圖 15），俗稱“開翅”，此時魚苗能夠攝食一些大型的浮游生物餌料。在這個階段，專案組仍然每天早晚投喂兩次輪蟲和藻類。光照以自然光照為主，由於此時魚苗怕強光，夜間不應使用額外的燈光照射。同時降低增氧泵的進氣量，因此階段魚苗的游泳能力

還較弱，避免太強的水流擾動。

收翅關：在孵化後 40~50 日左右，石斑魚苗將進入下一個關鍵時期——“收翅期”，此時魚苗的腹鰭和背鰭翅逐漸收起（圖 15）。隨著魚苗的生長，該階段魚苗口徑逐漸變大，開始攝食小型橈足類、大輪蟲、枝角類等生物餌料。因此專案組開始孵化豐年蝦並進行投喂，投喂的豐年蝦先通過餵食裂壺藻粉進行強化，以增強其體內的 DHA 含量，更好地為石斑魚苗提供所須營養。該階段應確保石斑魚所需餌料充足，因該階段魚苗的攝食能力增強，而互相殘食是石斑魚的特定習性，因此只有確保充足且適口的餌料，才能更好地減少石斑魚的殘食現象，增強石斑魚的存活率。同時，由於外源性餌料的持續投入，項目組持續檢測水體的氨氮、亞硝酸鹽、pH 值等各項指標，以確保其位於正常範圍內。

稚魚後期（白苗）：一般在孵化後 50-60 日左右，魚苗即將完成其幼年階段的變態發育成為能夠進入底棲生活的稚魚，此階段魚苗將進一步生長發育，身體各部位的色素完全沉積，外觀上已接近成年石斑魚，此時主要攝食枝角類、橈足類、豐年蟲等生物餌料。此階段，項目開始逐漸降低豐年蝦的投入，慢慢地使用商品飼料進行馴化養殖，讓石斑魚開始攝食人工配合飼料。馴化過程中，第一天人工飼料占比約為 7%~17%（逐次增加，每次投喂都會少量增加飼料占比，如 7%、12%、17%、19%）；第二天時，人工飼料占比約為 18%-25%；第三天時，人工飼料占比約為 25%-35%；第四天可到 50%。第五天可以轉至 100%；第六天開始只投喂人工飼料，以完成魚苗從生物餌料至人工配合飼料的轉換。待魚苗完全適應人工飼料之後，即可完全投喂人工配合飼料。

水質管理：在育苗階段，專案組對魚苗進行了精細化管理。從魚苗進入外源性營養攝取階段開始，即需向養殖桶中先後投喂輪蟲、豐年蝦以及後期的人工飼料，這些餌料的投入會導致養殖水體逐漸產生變化。因此，專案組定期監測水體中氨氮、亞硝酸鹽及 pH 值等各項指標。魚苗出膜後前一個星期，專案組減少換水頻率，因為這段時間魚苗脆弱，換水可能會增加魚苗的死亡概率。我們向養殖桶中加入小球藻，一方面為魚苗提供部分生物餌料，另一方面小球藻也能消耗水中的廢物，起淨化水質的作用。同時，專案組及時將養殖桶底部的死卵吸出。進入下一階段，即開翅和收翅期時，此時魚苗具有一定的運動能力，且該階段需要大量投入生物餌料以保證魚苗的生長。因此在加入小球藻進化水質的同時，每

兩天更換 1/3 的水，同時加入硝化細菌和芽孢桿菌，以進一步消除氨氮和亞鹽，起進化水質的作用。

經過專案組不斷的努力，最終成功培育出近 2 萬尾無特定病原的石斑魚魚苗，並分發給香港當地的漁民。雖孵化的石斑魚苗存活率低於預期，但本項目組的實驗已說明，無特定病毒魚苗孵化技術在香港地區執行的可行性。專案組通過工作坊的方式分享其技術經驗給當地漁民，相信在不久的將來，石斑魚的香港本地培育技術將更加成熟，以達到一個更高的存活率標準。



圖 15：石斑魚苗的培育

附件六：定期病原檢測結果

本項目對購買的石斑魚受精卵、運送受精卵的水體以及準備的孵化石斑魚的水體進行特定病原檢測，並在石斑魚培育成功後，在後期的養殖過程中按照每月一次的頻率對養殖水體和石斑魚進行定期檢測。

1. 樣品預處理

受精卵：從每次購買的每袋受精卵中隨機取 1 g 受精卵，混合後用組織研磨器或液氮將受精卵研磨碎，用於後續的核酸提取。

水體：取 500 mL 水體樣品經 8 μm 濾膜過濾後再經 1.2 μm 濾膜過濾，在水樣中加入 50 μL FeCl_2 ，在磁力攪拌器上攪拌 2 h 後將水樣通過 0.8 μm 濾膜，使病毒吸附在膜上，用 DNA 和 RNA 提取試劑盒中的裂解液進行病毒洗脫。

魚體：隨機挑選 10 尾石斑魚麻醉後，取全魚研磨後用 DNA 和 RNA 提取試劑盒中的裂解液進行裂解。

2. 核酸提取以及 cDNA 的合成

核酸提取方法同附件四 1, cDNA 的合成方法同附件四 2.1，產物保存於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱備用（圖 16）。

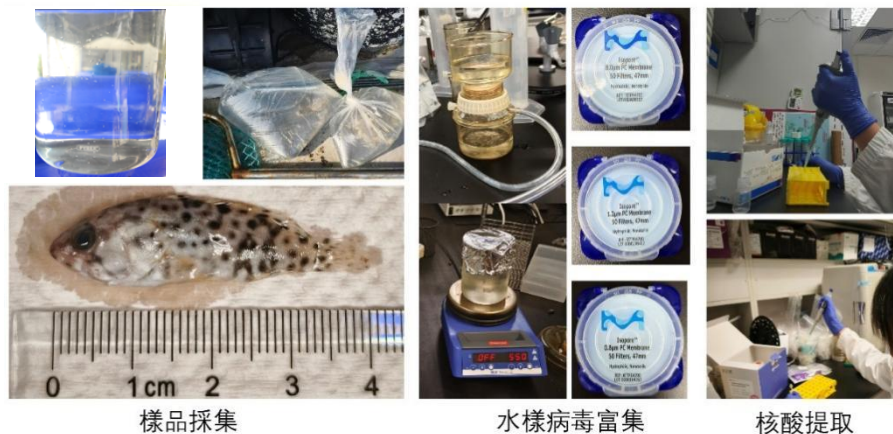


圖 16：待測樣本的核酸提取過程

3. 定量 PCR

使用 qRT-PCR 檢測 GIV、VNNV 和刺激隱核蟲的拷貝數。引物如附件二表 1 所示。以從受精卵、水樣和石斑魚中提取得到 DNA 和反轉錄得到的 cDNA 為範本，以合成的質粒作為陽性對照，根據 *Pro Taq HS* 預混型探針法 qPCR 試劑盒說明書檢測 GIV 和 VNNV, 根據 SYBR Green *Pro Taq HS* 預混型 qPCR 試劑

盒說明書檢測刺激隱核蟲。反應體系和反應條件同附件二。

檢測結果顯示，專案組從受精卵、石斑魚孵化水體和後期養殖過程中的定期採樣養殖水體和石斑魚檢測樣品中三種病原的檢測結果均為陰性（圖 17）（表 12），表明本項目培育的石斑魚從受精卵到出苗整個過程中均不攜帶這三種病原。

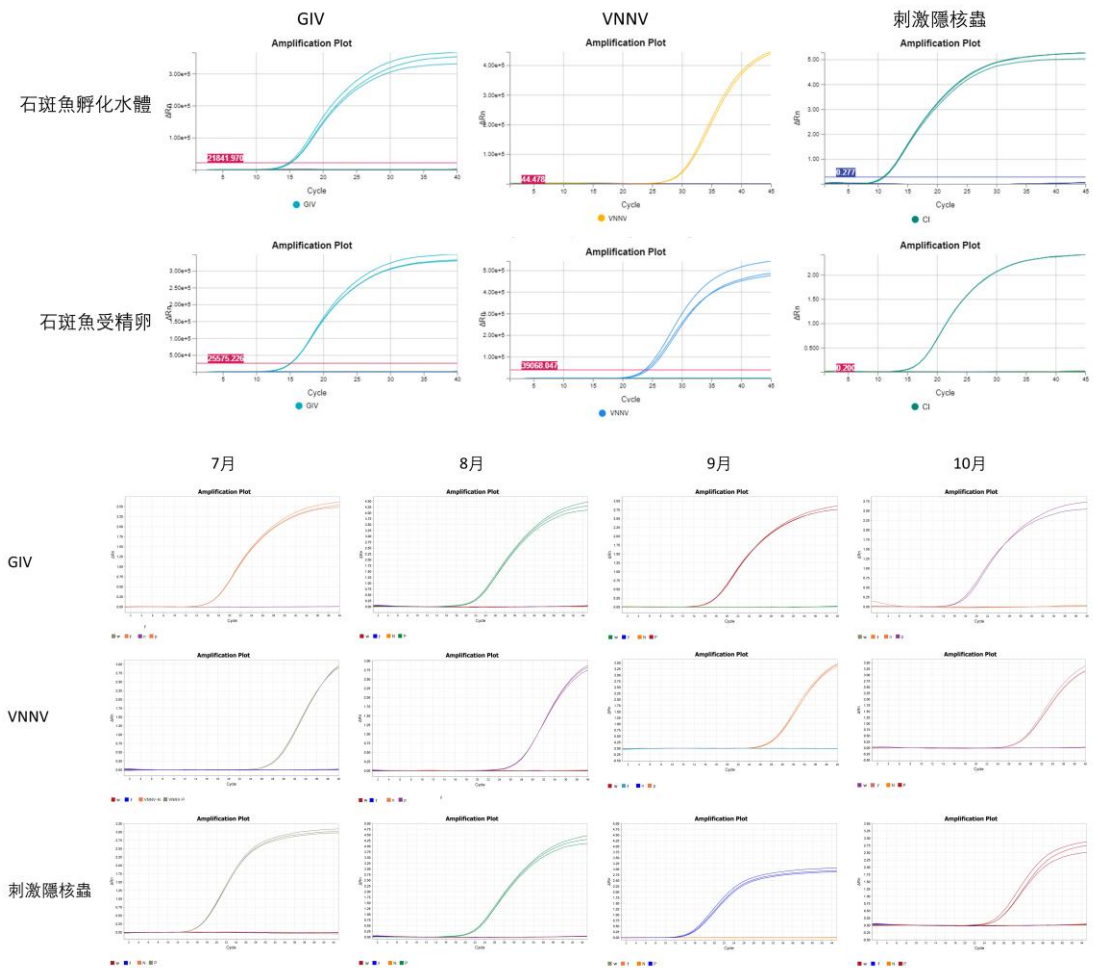


圖 17：部分 qPCR 定量檢測結果

表 12：受精卵階段及其魚苗培育階段病原檢測的 qPCR 定量檢測結果。

		石斑魚虹彩 病毒 (GIV)	神經壞死病毒 (VNNV)	刺 激 隱 核蟲	陽 性 對 照
受精卵、 運 送 水 體 及 其 孵 化 水 體 病 原 檢 測	第一批	受精卵	-	-	+
		運 送 受 精 卵 的 水 體	-	-	+
		受 精 卵 孵 化 水 體	-	-	+
		受 精 卵	-	-	+
	第二批	運 送 受 精 卵 的 水 體	-	-	+
		受 精 卵 孵 化 水 體	-	-	+
		受 精 卵	-	-	+
		運 送 受 精 卵 的 水 體	-	-	+
	第三批	受 精 卵 孵 化 水 體	-	-	+
		受 精 卵	-	-	+
		運 送 受 精 卵 的 水 體	-	-	+
		受 精 卵 孵 化 水 體	-	-	+
	7 月	石斑魚	-	-	+
		養殖水體	-	-	+
	8 月	石斑魚	-	-	+
		養殖水體	-	-	+
	9 月	石斑魚	-	-	+
		養殖水體	-	-	+
	10 月	石斑魚	-	-	+
		養殖水體	-	-	+

注：-：陰性；+：陽性

附件七：魚苗派發

項目組提前與 12 戶本地漁民聯繫好時間，於 10 月 14 日進行魚苗的派發，綜合各漁民的養殖場地點，將派發地點設為香港大浦鹽田仔漁安街碼頭。本次魚苗已提前打包分裝好，每包約為 300 尾魚苗，每戶 5-6 袋，每戶共計 1400-1600 尾。漁民收到魚苗後，立即帶回自己的養殖基地，經過適溫後放入自己的養殖系統中（圖 18）。



圖 18：魚苗派發以及漁民將魚苗放入自己養殖系統的過程

附件八：組織學生參觀學習石斑魚培育基地

本專案於 2024 年 11 月組織了城大獸醫系 37 名二年級的學生，利用“水產養殖與水生動物健康”課程時間，前往專案組的魚苗培育基地進行參觀學習。在參觀之前，專案負責人結合專案組石斑魚孵化和培育經驗總結，在課堂上先給學生們進行了講授，隨後帶領學生進行實地的培育基地進行參觀學習（圖 19）。在參觀中，學生們觀察了魚苗的飼養和水質管理等關鍵環節，參觀後學生們積極參與互動，這種交流不僅激發了學生們的求知欲，也提高了他們的思辨能力和實踐意識，同時也加強了他們對石斑魚培育技術的認識與瞭解。



校內課上的講授



學生正在參觀石斑魚培育基地



專案負責人在解答學生的相關問題



在養殖基地討論學習

圖 19：學生參觀石斑魚培育基地（2024 年 11 月 5 日）

附件九：健康養殖和生物安保工作坊講座

為了進一步提升行業從業人員和學生的生物安全意識與健康養殖知識水準，項目組成功舉辦了以“石斑魚孵化與無特定病原魚苗培育”為主題的工作坊講座。為提高效率，與漁民代表溝通後，專案組決定將原計劃的 2 次講座合併為一天內完成。該講座於 8 月 30 日在香港城市大學李達三樓進行，共有 30 多人參加了這次講座。為方便參與者前往會場，專案組為他們準備了一份地圖，並沿途放置了路標和指示牌，引導他們前往會場，同時也有會議工作者提供指引協助圖 20。

本次講座分為上下兩場（每場兩個部分）：第一部分分享了石斑魚生物學基礎並進行了項目介紹，詳細講解了生物安保以及石斑魚養殖期間病原監測等管理措施。第二部分重點介紹了石斑魚受精卵孵化和育苗培育期間的具體步驟以及關鍵技術點。中場休息後，第三部分詳細介紹石斑魚不同發育階段的餌料培育方法和過程。為了促進交流與學習，本講座第四部分設置了互動討論環節，參與者們針對自身養殖舉程中的困惑提出問題，專案組給予了專業的解答。同時，參與者們分享了各自的養殖經驗，形成了良好的學習氛圍（圖20）。

本次講座的參與者均表示收穫頗豐，並對所討論的主題給予了積極的反饋（整體滿意度89.8%）。他們一致認為生物安全和健康養殖在日常養殖中扮演著至關重要的角色，並希望未來能有更多這樣的學習提升機會。



圖 20：以“石斑魚孵化與無特定病原魚苗培育”為主題的工作坊講座

石斑魚孵化與無特定病原魚苗培育

日期：2024年8月30日

地點：香港城市大學



Marine Ecology & Fisheries Enhancement Funds Trustee Limited

改善海洋生態及漁業提升基金信託有限公司



香港城市大學
City University of Hong Kong



Content 目錄

01

石斑魚及項目簡介

02

石斑魚孵化與魚苗培育技術

03

餌料培育

04

答疑交流環節



Content 目錄

01

石斑魚及項目簡介

02

石斑魚孵化與魚苗培育技術

03

餌料培育

04

答疑交流環節

(1) 石斑魚簡介



有多少家已經在養石斑魚？

(1) 石斑魚簡介

珍珠龍膽石斑 (♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*)

- 俗稱**珍珠斑**、**龍虎斑**，是用龍躉石斑（公）與老虎斑（母）培育出來的雜交新種石斑魚。
- 其肉質細嫩、繼承了老虎斑**抗逆性強**和龍膽石斑**生長速度快**的優點，顯現雜交優勢，是目前國內人工育苗和**養殖量最大**的石斑魚品種，約占石斑魚產量的70%左右。
- **(35-45元/500g)**



龍躉石斑



老虎斑



(1) 石斑魚簡介

✓ 石斑魚的生活習性



- 石斑魚生長適溫為22 ~ 30°C，最適溫度為24 ~ 28°C。
- 石斑魚屬廣鹽性魚類，在鹽度11‰ ~ 41‰ 的海水中均可正常生活，最適鹽度為20 ‰ ~ 32 ‰ 。
- 石斑魚是典型的肉食性魚類。

(1) 石斑魚簡介

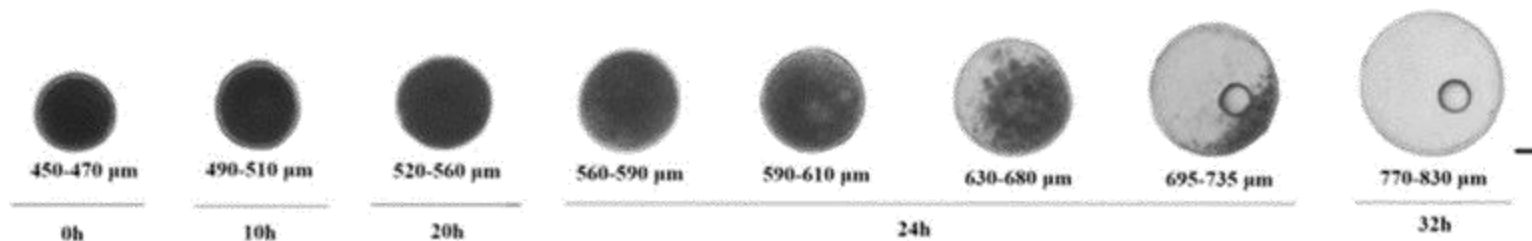
✓ 石斑魚的繁殖習性

1. 性轉變

- 大部分石斑魚是雌性先熟的雌雄同體魚類，即初次性成熟時為雌性，作為雌性參與繁殖後的一年至數年後，雌魚開始性逆轉成為雄魚。外源性雄性類固醇激素可誘導多種石斑魚的雌魚發生性逆轉。

2. 分批產卵

- 大部分石斑魚屬分批產卵類型，在卵巢內同時具有不同比相的卵母細胞，在一個繁殖週期內，卵子分批成熟。石斑魚類產卵期一般從每年的春末延續至初秋，主要受水溫影響，因而沿海各地石斑魚產卵時間隨緯度不同而變化，**香港為4~7月**。



石斑魚無特定病原魚苗培育

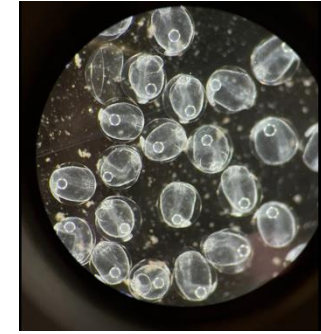
無特定病原（Specific Pathogen Free, SPF）魚苗

SPF魚苗是指無特定的病毒、微生物或寄生蟲存在的魚苗，本次培育的石斑魚魚苗是不攜帶石斑魚虹彩病毒、神經壞死病毒以及刺激隱核蟲三種石斑魚養殖中常見的病原。

SPF魚苗的優點：

- 1. 提高存活率：**由於SPF魚苗不攜帶特定病原體，因此在養殖過程中，魚苗的存活率通常較高，減少了因疾病引發的死亡。
- 2. 增強養殖效率：**SPF魚苗能夠更好地生長發育，提升整體養殖效率，縮短養殖週期，增加經濟收益。
- 3. 減少使用抗生素：**使用SPF魚苗可以減少對抗生素和其他藥物的需求，從而降低環境污染風險和藥物抗藥性問題。
- 4. 改善產品質量：**健康的SPF魚苗可以生產更高質量的魚類，提升市場價值，增加消費者信任。
- 5. 降低疫病傳播風險：**SPF魚苗的使用可以減少疾病在養殖場之間的傳播風險，有助於維護水產養殖的可持續發展。

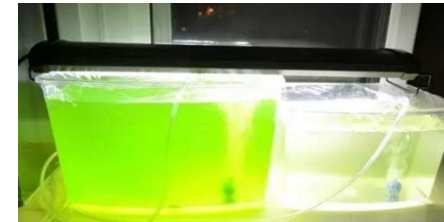
如何培養無特定病原（Specific Pathogen Free, SPF）魚苗？



魚卵



水源



餌料、飼料



漁網等工具

無特定病原魚苗是如何培養起來的？

操作管理

魚體檢測

- **受精卵檢測：**即使是健康的受精卵和苗種，亦難免帶有某些病原體，尤其是從外地購買的。因此，在受精卵孵化或苗種放養時，必須先進行消毒。受精卵到場後先用高錳酸鉀5g/m³消毒袋子表面，沖洗乾淨後，將魚卵緩慢倒出，用20 mg/L聚維酮碘溶液（PVP-I）消毒魚卵3分鐘，然後將魚卵放入孵化桶。如購入魚苗可用50 mg/L PVP-I，給苗種藥浴10~30min後放入養殖池。從源頭降低病原引入的風險。從購入受精卵中收集部分魚卵進行特定病原檢測，檢測結果為陰性才可用於後續的孵化；
- **仔魚檢測：**在每個孵化池桶採集不少於30尾仔魚，進行特定病原的檢測，保留檢測結果呈陰性的仔魚，並轉移至培育池進行苗種培育，淘汰檢測結果呈陽性的仔魚，並採取緊急無害處理；
- **魚苗檢測：**每個月隨機選取不少於30尾進行特定病原的檢測，檢測結果均為陰性，獲得SPF苗種。

無特定病原魚苗是如何培養起來的？

操作管理

養殖人員與使用工具殺菌消毒

- **養殖人員消毒：**有條件的養殖場應在養殖場入口處設置一個漂白粉濃度為50 ppm的足浴池，在養殖人員進入養殖場前進行消毒處理；
- **養殖海水消毒：**：使用的海水需經1微米過濾器過濾和紫外線/臭氧殺菌的新鮮天然海水（孵化不能使用人工配置的海水）；也可用氯對海水進行消毒，但之後需要用硫代硫酸鈉進行處理，防止氯含量過高影響孵化，殺滅從天然海水中引入的病原。
- **工具消毒：**養殖用的各種工具，如網具、塑膠和木製工具等，常是病原體傳播的媒介，特別是在疾病流行季節，因此日常生產操作中應做到各孵化桶分開使用，如果工具數量不足，可用200 mg/L漂白粉等浸泡5 min，然後用清水沖洗乾淨，再行使用；也可在每次使用完後，置於陽光下曬乾後再使用。這也是培養無特定病原石斑魚苗的關鍵一點。



無特定病原魚苗是如何培養起來的？

操作管理

定期進行特定病原檢測：對整個培養過程進行定期的特定病原檢測：

- **養殖水體檢測：**對石斑魚孵化和養殖的水體以及盛放魚卵的水體通過富集的方式進行特定病原檢測；
- **餌料檢測：**對於魚苗培育過程中使用的各種餌料，包括藻類、輪蟲、豐年蝦以及人工飼料等各種使用的餌料都需進行特定病原的檢測，防止從餌料端引入特定病原，檢測結果未陰性才可用於投餵；
- **定期檢測：**首次對以上目標進行特定病原檢測後，在後期的養殖過程中還應按照每月一次進行定期檢測，防止養殖過程中因為各種原因引入特定病原，一旦檢測結果為陽性，同樣需要全部銷毀，所有養殖器具消毒殺菌後再進行使用。

無特定病原魚苗是如何培養起來的？

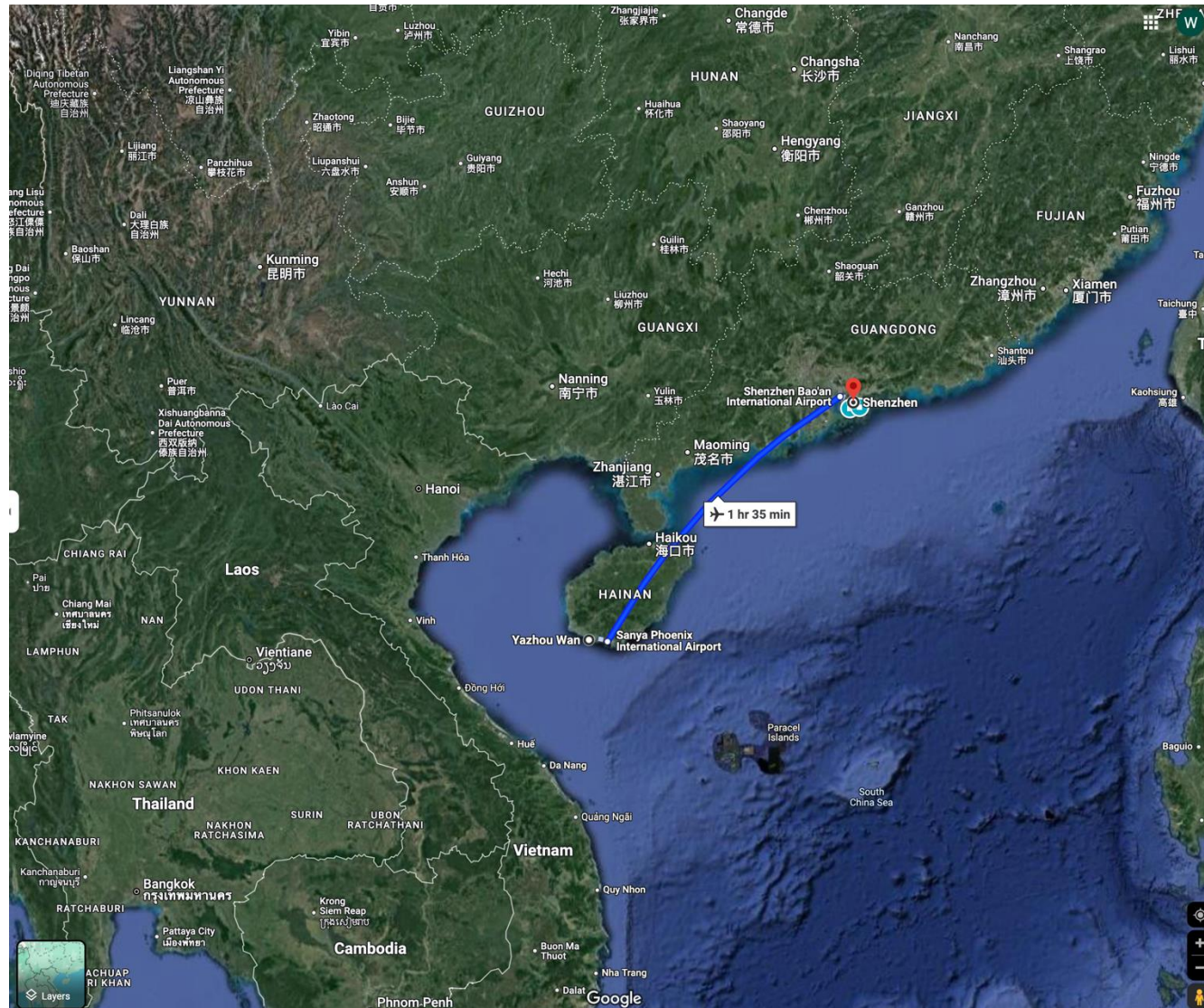
操作管理

建立隔離制度：採取嚴格的隔離措施，以防止疫病傳播、蔓延：

- ❑ 對已發病的池塘、養殖桶或地區首先進行封閉，池內的養殖動物在治癒以前不向其他池塘和地區轉移，不排放池水，工具應當用濃度較大的漂白粉或高錳酸鉀等溶液消毒，或在強烈的陽光下曬乾，然後才能繼續使用；
- ❑ 清除發病死亡的屍體，及時掩埋、銷毀，切勿丟棄在池塘岸邊或水源附近，以免被鳥獸或雨水帶入養殖水體中；
- ❑ 對發病養殖環境及其周圍包括進、排水管道，均應消毒處理，並對發病動物及時做出診斷，確定防治對策。

(2) 城大SPF 石斑魚苗培育項目簡介

(2) 城大SPF 石斑魚苗培育項目簡介



- 魚卵：海南藍糧科技有限公司
- 14 小時（受精卵從海南到香港）包括打包、陸運、接貨、運輸等所有時間
- 在水溫 30°C 下，大約20小時左右可以孵化出卵
- 孵化後幼苗非常脆弱，要在20小時之內到達養殖目的地。

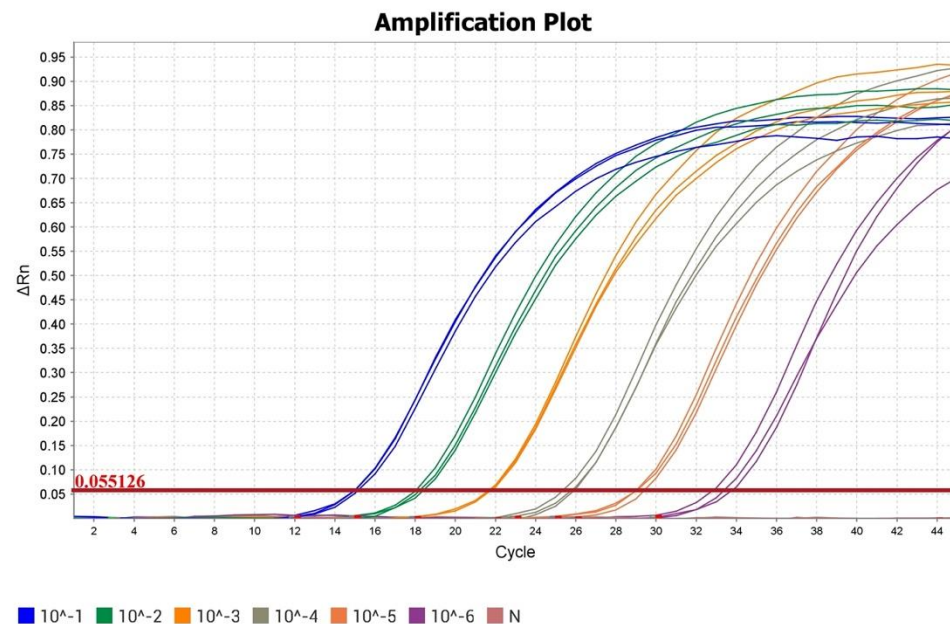
石斑魚魚卵、魚苗供應商

公司	售賣	地點	聯繫方式
廣東海元農業科技有限公司	魚苗	廣東陽江	
廣東港達水產有限公司	魚苗	廣東清遠	淘寶
陽江市漁鄉子水產科技實業有限公司	魚苗、魚卵	廣東陽江	淘寶
金源海洋生物科技有限公司	魚苗	廣東陽江	
廣州吉星水產有限公司	魚苗	廣東廣州	淘寶
海南海王星水產科技有限公司	魚苗	海南文昌	
海南晨海水產有限公司	魚卵、魚苗	海南三亞	898-8871-8366
海南藍糧科技有限公司	魚卵、魚苗	海南三亞	
萬寧林蘭水產養殖有限公司	魚苗	海南萬寧	
廈門小嶼水產科技有限公司	魚苗	福建廈門	592-2625228
香港亞洲水產養殖公司	魚苗	香港	

病原檢測方法建立： 由於刺激隱核蟲、神經壞死病毒和石斑魚虹彩病毒三種病原是本項目中關注並且要求不在石斑魚苗中攜帶的病原，我們設計並合成了三種病原的引物與探針，並建立三種病原的有效檢測方法。



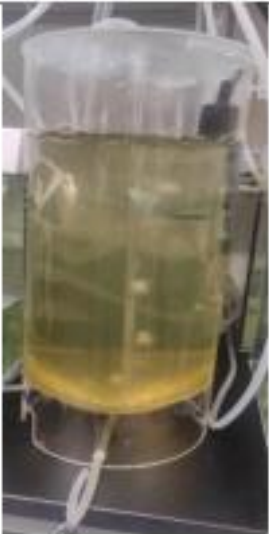





合成的檢測三種病原的引物



神經壞死病毒檢測方法構建

餌料制備：為保證石斑魚苗孵化後就能有穩定開口餌料的供應，我們在實驗室中建立了小球藻、輪蟲和豐年蝦的培養體系，優化了這些餌料生物的培養環境以及培養條件和培養時間，並進行了持續的培養。

	
實驗室小球藻培養	實驗室小球藻擴大培養（第3天）
	
輪蟲的培養（第3天）	工作人員在顯微鏡下觀察輪蟲

	
豐年蝦的培養	孵化後的豐年蝦（第2天）

漁場的餌料培養



硝化細菌培養






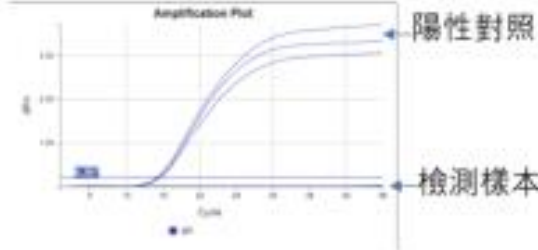
藻類培養



豐年蟲培養

餌料及水體病原檢測： 為保證提供給石斑魚苗的開口餌料是不包含三種特定病原的，我們用建立的檢測方法對培養的小球藻、輪蟲和豐年蝦以及培養用水進行了檢測，最終檢測結果均為陰性。這說明我們培養的餌料生物均為無這三種特定病原的，能為後期擴大培養提供充足的餌料源。

	
研磨樣品進行病原檢測	工作人員正在做病原檢測

	
定量檢測系統	病原檢測結果

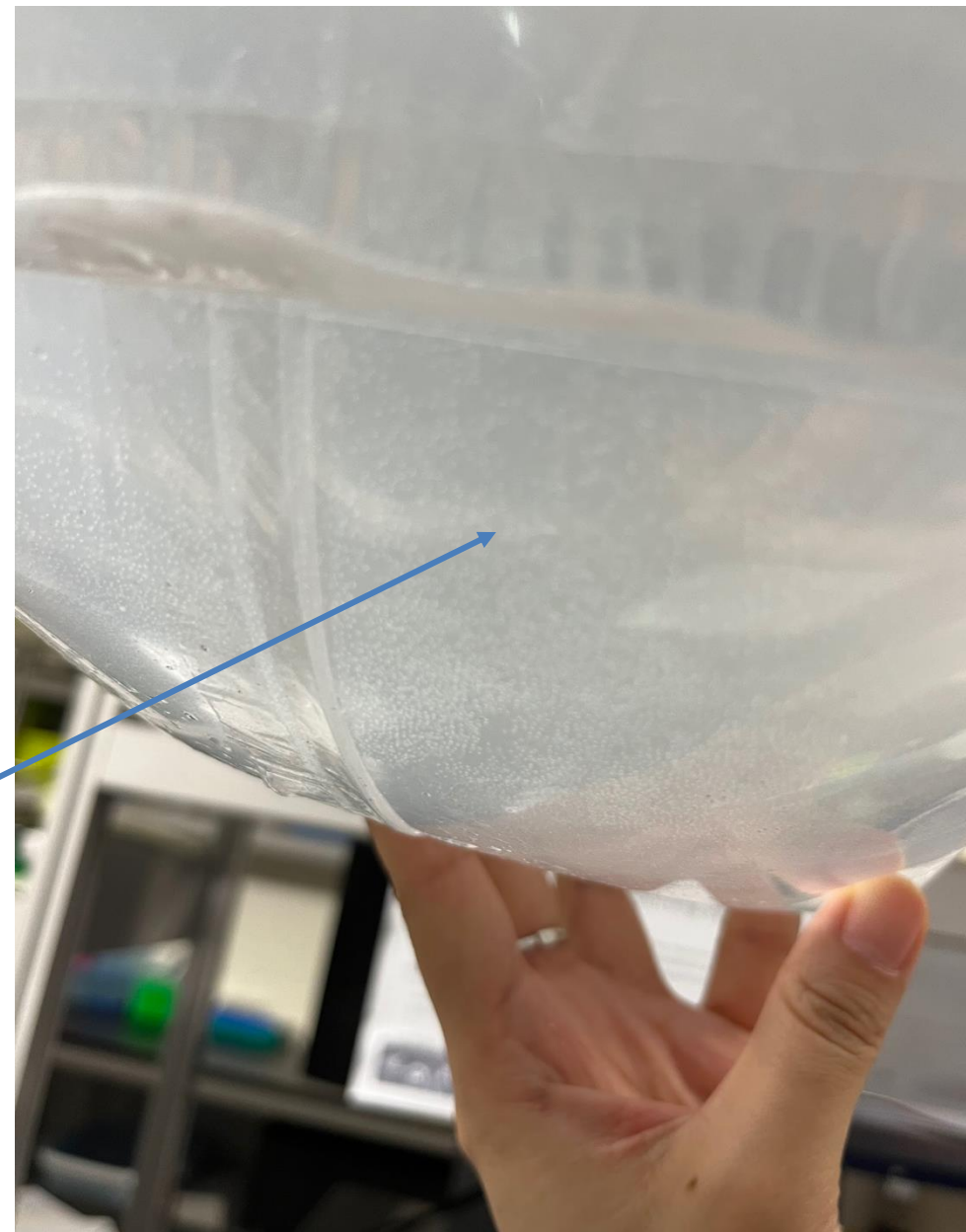
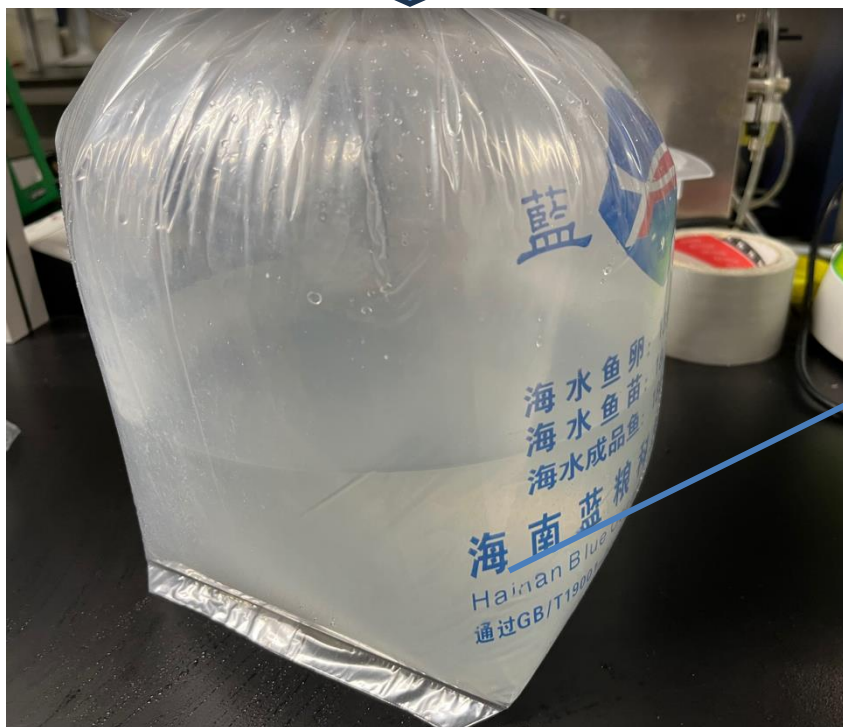


收貨:

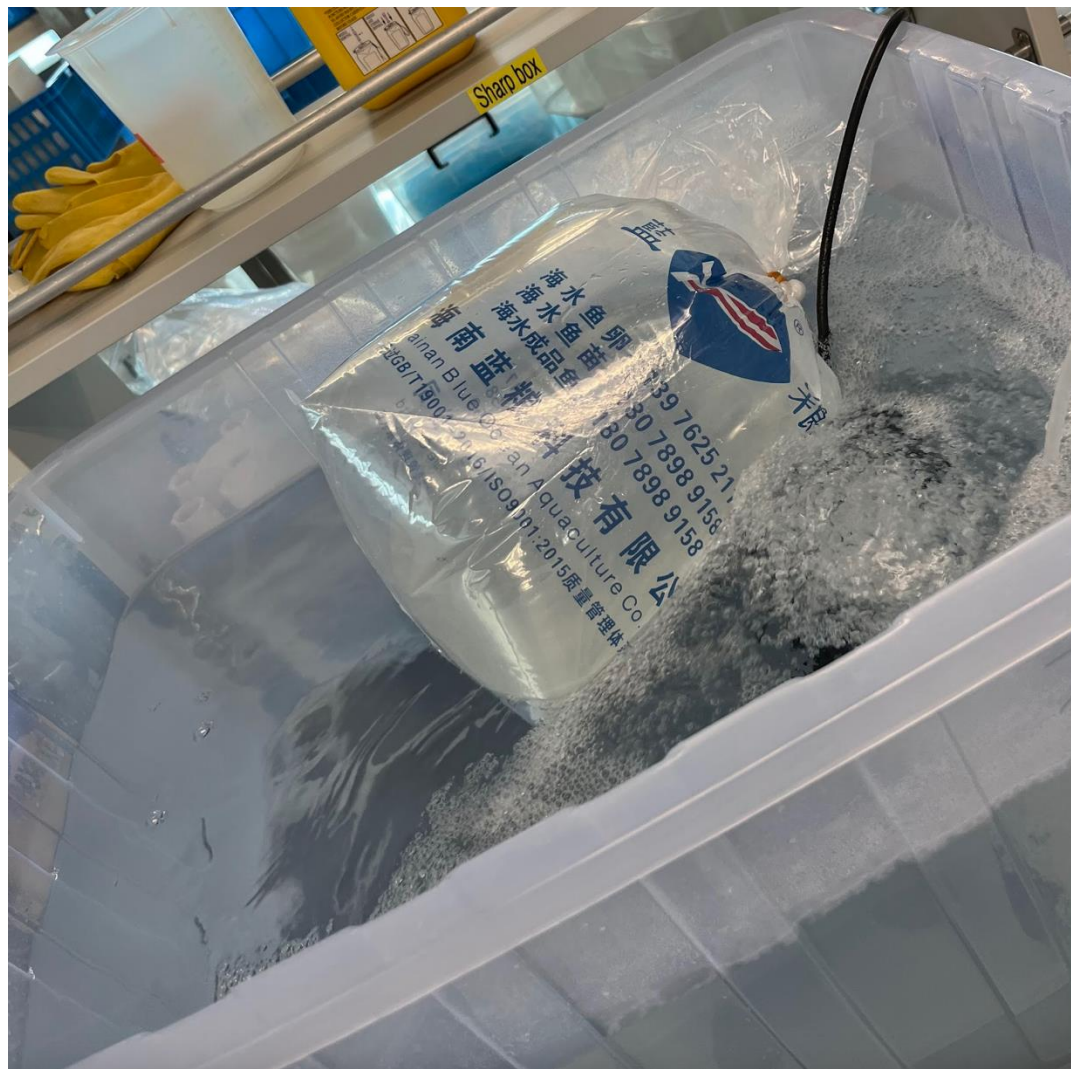
350 g珍珠石斑魚卵

30萬顆左右的卵

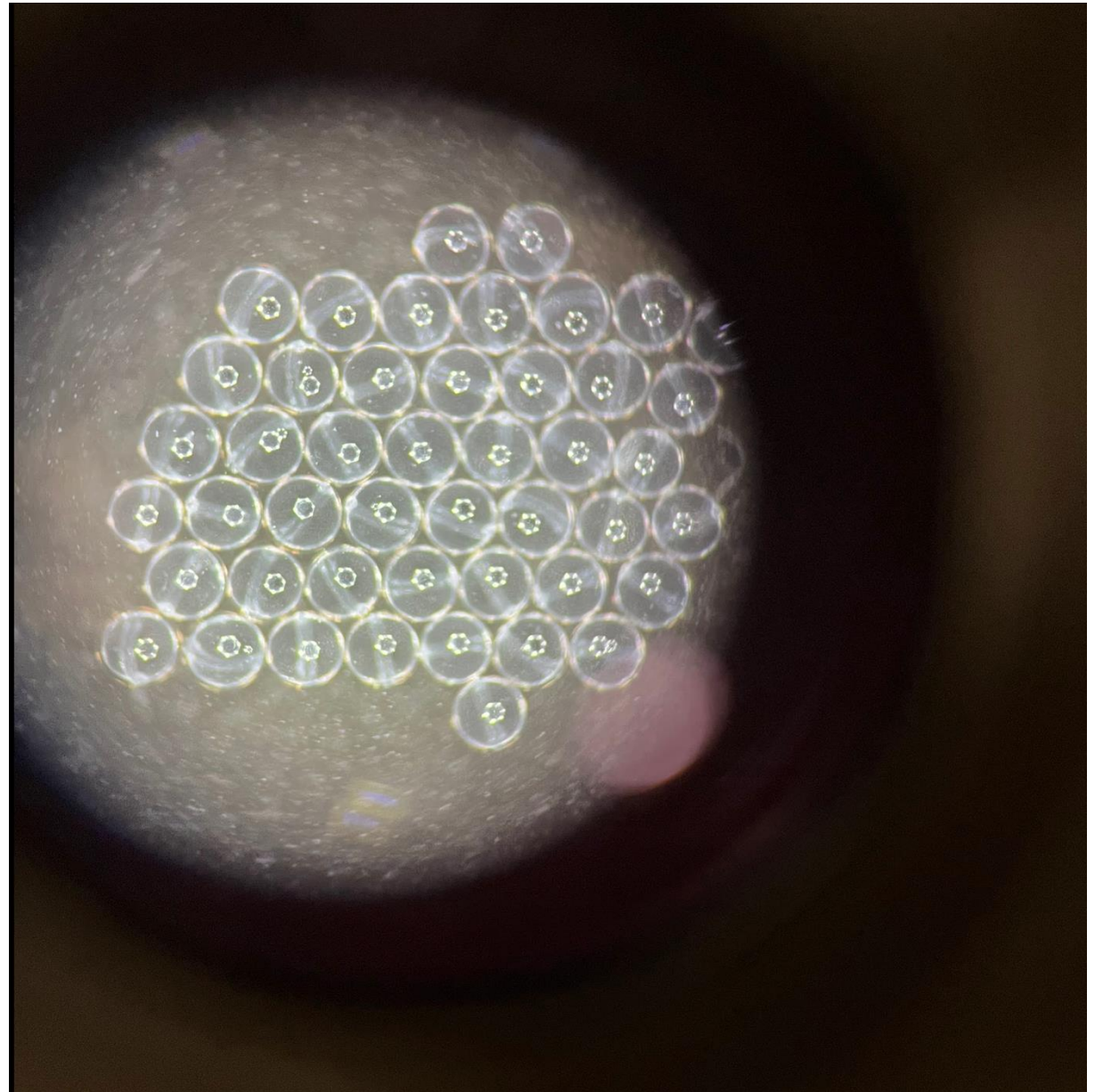
大約5000 HKD



魚卵透明，漂浮



平衡溫度



顯微鏡下觀察，記錄發育狀態



100 升 x6



1.2 噸 x2



購買的天然海水



1微米濾網過濾，臭氧消毒

發育階段



孵化出殼



1個月



1.5個月



2個月



Content 目錄

01

石斑魚及項目簡介

02

石斑魚孵化與魚苗培育技術

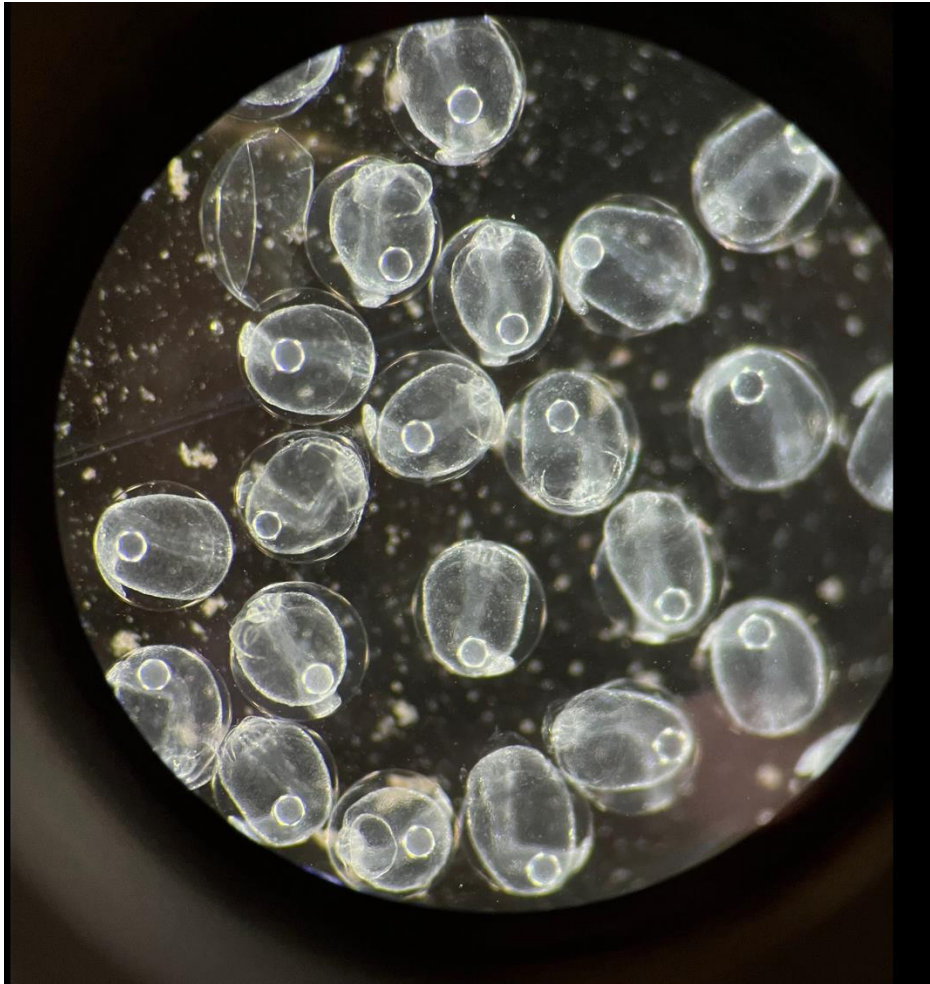
03

餌料培育

04

答疑交流環節

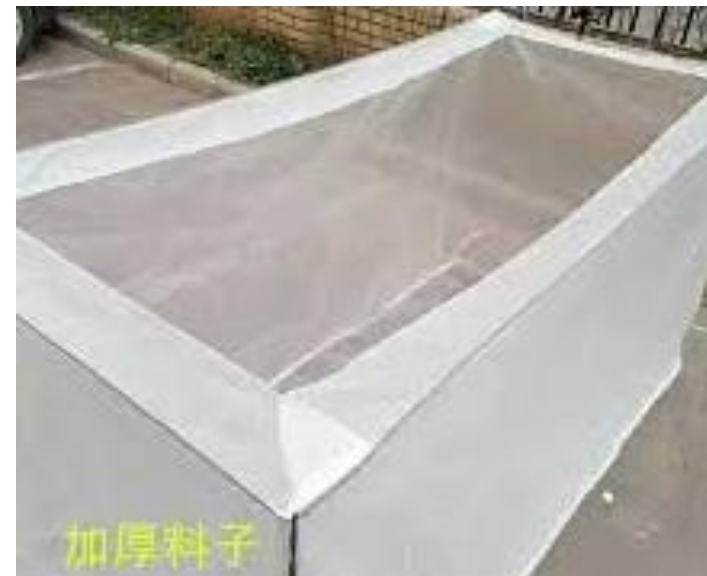
培養過程詳解



(1) 石斑魚受精卵孵化

➤ 網箱孵化

- 孵化網箱用60目篩絹製成，規格為70×40×50釐米，放置在預先注滿過濾海水的靜水池中，水深1米以上，箱底要鋪平，不留折皺，以防魚卵積聚死亡。放卵密度為3萬粒/米³，水溫25℃左右，鹽度25 ‰ -27 ‰，溶解氧5毫克/升以上，微量充氣，使胚胎能在水層中輕輕翻動。當胚胎出現心跳時，停止充氣，用60目網兜撈出胚胎，移入魚苗池。或待仔魚出膜後，用虹吸法除去箱底死卵，連苗帶水移入魚苗培育池中繼續培育。



(1) 石斑魚受精卵孵化

➤ 直接入池孵化

- 按常規方法將培育池洗淨消毒，按1-2米²設置一個氣石，注入經過濾和紫外線殺菌的新鮮海水，將受精卵直接放入培育池內，放卵密度為3-5萬粒/米³，水溫25℃左右，鹽度2.5%-2.7%，保持穩定，變化不能太大。
- 微量充氣，使水體產生緩流，以能使受精卵漂浮為度，溶解氧保持5毫克/升以上，充氣太大或太小都不好。孵化過程中，儘量清除死卵，以防水質變壞。待大部分仔魚已經出膜即減緩或停止充氣，以防初孵仔魚因水流的衝擊損傷而降低成活率。
- 受精率一般在胚胎發育至原腸中期時計算。

$$\text{受精率 (\%)} = \frac{\text{受精卵數 (好卵)}}{\text{總卵數 (好卵+壞卵)}} \times 100\%$$

(1) 石斑魚受精卵孵化

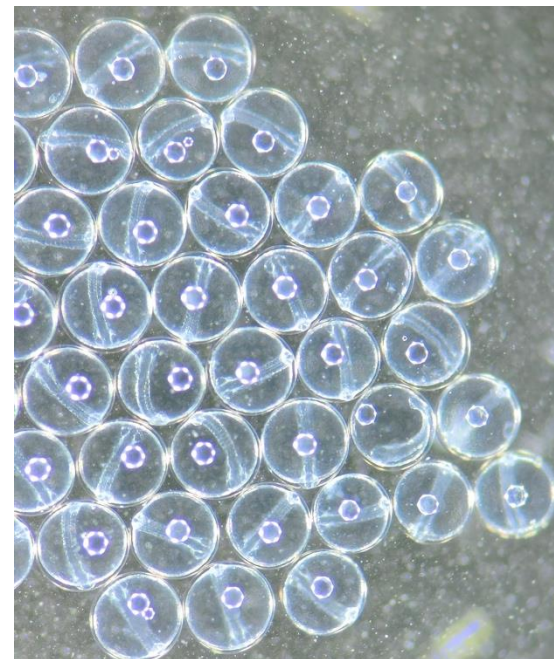
- 孵化桶孵化
 - 養殖桶準備：2-3個2000L的孵化桶，按常規方法將孵化桶洗淨消毒，如用50 ppm的漂白水消毒後洗淨，安裝氣石；
 - 養殖海水：注入經1微米篩檢程式過濾和紫外線/臭氧殺菌的新鮮天然海水（不能使用人工配置的海水用於石斑魚卵孵化）；也可用氯對海水進行消毒，但之後需要用硫代硫酸鈉進行中和處理，防止氯含量過高影響孵化。
 - 魚卵：要挑口碑好信譽好的正規卵場獲取魚卵，晶瑩剔透，個頭飽滿，且漂浮在水面上的為好卵。



(1) 石斑魚受精卵孵化

➤ 孵化桶孵化

- **放魚卵：**將魚卵放入孵化桶前不要著急開袋，先確定魚卵沒有應激死亡，把魚卵放在孵化桶中浸泡15分鐘左右，恒溫後才打開卵袋，將魚卵放入孵化桶中。將魚桶內的水分三次加入到魚卵袋，再緩慢將魚卵轉移至魚桶。（也可提前12-24 h 加入50-100 ppm的維生素C以降低石斑魚卵的應激）。
- **孵化：**在仔魚還沒孵化之前48 h前，氣石需開大使魚卵翻滾懸浮起來。（注：30 h後要多觀察魚卵狀態調節氣泡大小，開始時氣石都要打開，在魚的尾部沒有出來之前，氣石可以開大點，但出氣要均勻，防止魚卵下沉。一旦發現魚的尾部伸直之後，要及時把氣頭調小，以免水流過大，過度消耗魚苗營養）。



(1) 石斑魚受精卵孵化

➤ 孵化桶孵化

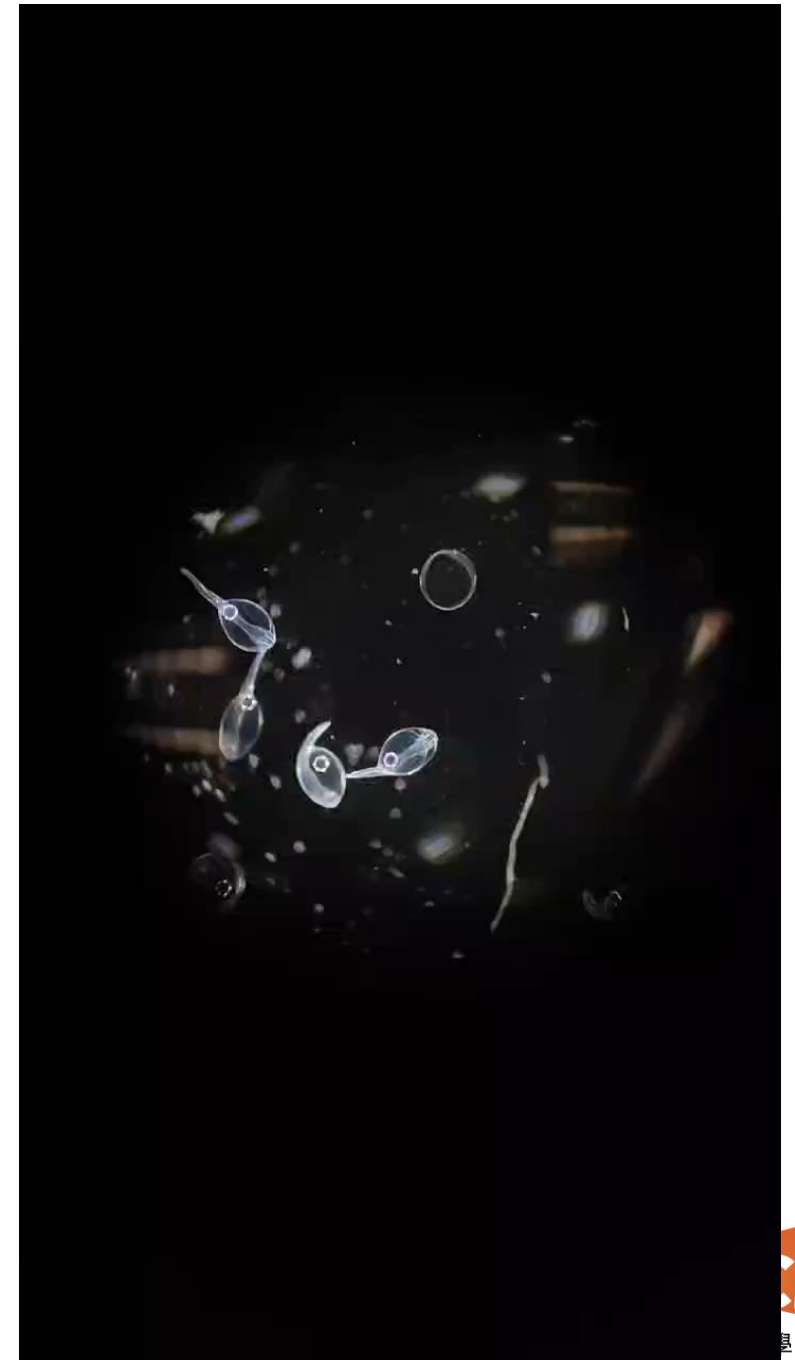
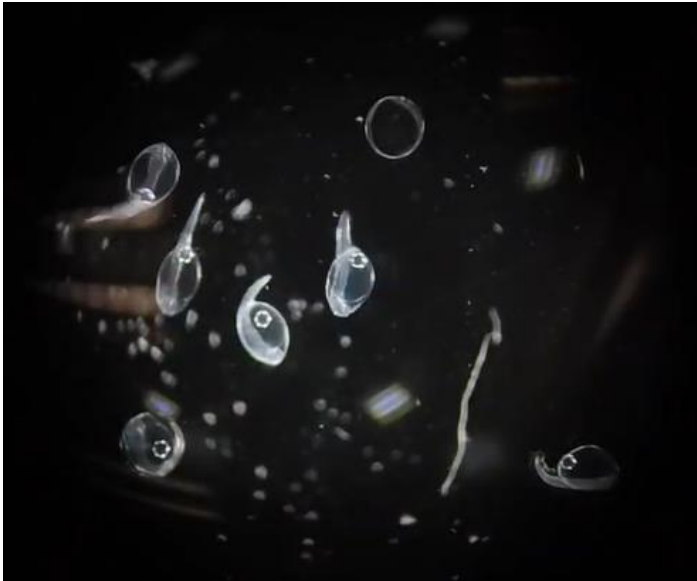
孵化時水質條件：

- ✓ 鹽度：28-30 ppt
- ✓ 水溫：28-31°C（設定30°C最優，有助於提高孵化率）
- ✓ 溶氧：≥ 5 mg/L
- ✓ 酸鹼度：> 8.0
- ✓ 亞硝酸鹽：不檢出
- ✓ 氨氮：不檢出
- ✓ 光照：6000-8000 lux



(1) 石斑魚受精卵孵化

- 胚胎發育
- 受精卵在30°C時，約經24-26小時即可孵出仔魚，剛孵出的仔魚全長1.5-1.6毫米。石斑魚的胚胎發育經過卵裂期、囊胚期、原腸期、神經胚期、心跳期等階段至仔魚孵出。



(2) 石斑魚的魚苗培育

➤ 石斑魚苗孵化基本資料

- 1kg珍珠龍膽石斑魚卵約等於100萬顆;
- 1kg石斑魚卵青斑3000-5000元，珍龍膽石斑5100-10000元，龍膽石斑7萬元;
- 孵化週期0-2.5釐米22-28天;
- 孵化率:
 - ✓ 傳統土池生態育苗法：孵化十次能有3-5次出苗，且孵化率波動巨大，但成本低，人工少，技術簡單
 - ✓ 室內育苗法：孵化十次能有5-7次出苗，且孵化率穩定在15%-30%（室內操作，人工控制溫度、濕度、各類水質指標，技術要求高，設施成本高，但穩定性強。）



(2) 石斑魚的魚苗培育

魚苗培育指將仔魚培育成全長30毫米以上稚魚的過程。

- 培育條件

培育環境可以是長方形、圓形池以及養殖桶等，面積10-20 平方米，水深1.0-1.5米，有獨立的進排水口，池底向排水孔以一定的坡度傾斜，以利於排水、清汙和集苗。池底每平方米佈置氣石1個，盡可能使氣泡均勻，無死角。

- 環境條件

育苗用水必須經室外池沉澱、砂濾池砂濾、再經300目篩絹和微粒過濾網雙層過濾，臭氧或紫外殺菌消毒後，進入水池備用。水溫要求25-31°C，以28-30°C為宜，要防止晝夜水溫劇變。鹽度2%-3.3%，以3%為宜。pH 7.8-8.4。溶解氧5 mg/L以上，避免陽光直射。氨氮 < 0.1 mg/L，亞硝酸鹽 < 0.1 mg/L，硝酸鹽 < 50 mg/L.

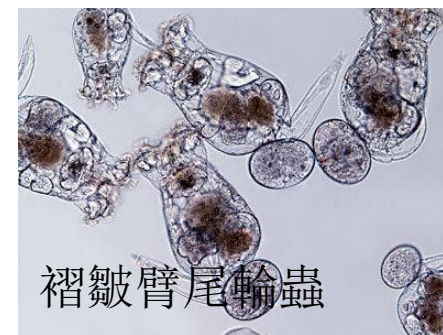
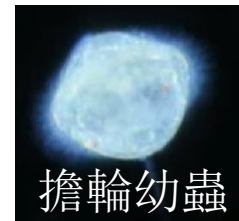
- 放苗密度

初孵仔魚放養密度一般控制在1.5-3萬尾/立方米水體，稚魚期0.1-0.5萬尾/立方米水體，幼魚為0.05萬尾/立方米水體。

(2) 石斑魚的魚苗培育

➤ 開口關

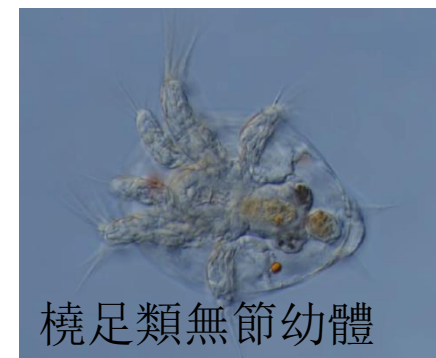
- 仔魚孵出後第3-4天，發現魚苗開眼、開肚，即魚苗出現3個黑點時，即可做好開箱準備。此時的魚苗由內源性營養轉為外源性營養。
- 關鍵技術要點：
 1. 發現個別魚苗開口後，應馬上投喂含藻類和小型SS級輪蟲（用300目篩絹網過濾）到孵化箱中，讓先開口的魚苗及時攝食，訓練魚苗的自行覓食能力。
 2. 開箱前1天檢測水體的各項指標是否正常，一旦發現水體指標出現異常，及時進行相應的處理。開箱前1h，每畝潑灑500g VC，緩解仔魚應激。
 3. 一般選在晴好，微風或無風的天氣開箱；開箱從孵化袋一邊開始，依次解開綁帶，最後從邊上拉起孵化袋，讓魚苗流入池塘中。
 4. 培育並維持水中有足量的輪蟲、藻類等生物餌料。維持水體中輪蟲密度10個/毫升。



(2) 石斑魚的魚苗培育

➤ 開翅關

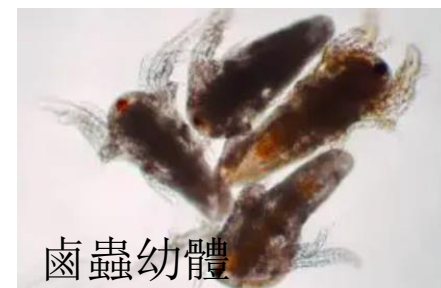
- 一般在孵化後12~15天左右。此時魚苗有延長的一條背鰭棘與左右各一條的腹鰭棘，魚苗攝食由小型浮游生物餌料轉向大型的浮游生物餌料。
- 關鍵技術要點：
 1. 確保適口的天然餌料能夠滿足魚苗的生長需要。此時增加大型輪蟲、小型橈足類等。
 2. 養水穩水。水體的透明度不宜過高（40~50cm），否則容易滋生青苔。及時清除池底和池邊的絲狀藻類，減少魚苗與青苔糾纏死亡。
 3. 避免強光照射。魚苗怕強光，夜間避免用燈光照射。
 4. 科學增氧：開翅前、中期階段，魚苗游泳能力較弱，水車式增氧機的葉輪不宜開得過大；開翅最後階段，要留意觀察魚苗活動情況，一旦發現有魚苗“聚群”現象，及時把增氧機的葉輪轉動頻率調得快些，讓水流沖散魚苗。



(2) 石斑魚的魚苗培育

➤ 收翅關

- 一般在孵化後16~25天左右。此時仔魚腹鰭和背鰭翅收起。魚苗主要攝食小型橈足類、大輪蟲、枝角類等生物餌料。
- 關鍵技術要點：
 1. 確保餌料充足：互相殘食是石斑魚的習性，只有確保充足，且適口的天然餌料，才能更好地減少石斑魚的殘食現象。
 2. 增強魚苗體質：不定期使用VC和果酸類抗應激產品潑酒。輪蟲和橈足類用小球藻+抗生素或氨基酸+多維進行營養藥物強化12h，投喂效果更好。
 3. 加強水質管理：堅持檢測水體的氨氮、亞硝酸鹽、pH值、弧菌等各項指標是否在正常範圍。根據天氣、水質和投喂情況，適當用水毒淨潑灑改善底質環境，並適量排換水。



(2) 石斑魚的魚苗培育

➤ 稚魚後期（白苗）

- 一般在孵化後第32天左右，魚苗即將變態為進入底棲生活的稚魚期(俗稱“白苗”)，魚苗主要攝食枝角類、橈足類、小豐年蟲等生物餌料。
- 關鍵技術要點：
 1. 養水先護底：根據投蟲量與水質情況，調大增氧機葉輪調大，促進池塘水迴圈流動。通過排換水排出部分汙物(用篩絹網，包住排污口)。
 2. 增強魚苗體質：確保充足的適口生物餌料供給，根據魚苗發育情況，酌情使用蝦青素、金多維、降解靈等潑酒，滿足魚苗的生長需要，提高活力，增強育苗體質。
 3. 魚苗馴化：此階段的魚苗可以通過定時固定頻率敲擊發聲馴化投喂，形成條件反射。



(2) 石斑魚的魚苗培育



➤ 出苗

- 當白苗長到2.5篩以上時，可出苗。
- 關鍵技術要點：
 1. 確保水質清爽：出魚前2~3天，可根據水質的透明度情況，每天排換適量水。
 2. 減少投喂量：在出苗前一天減少投蟲量，防止因攝食過飽，在捕撈和運輸過程中造成魚苗損耗。
 3. 增強抗應激能力：下網前3天，用降解靈、蝦青素、金多維潑灑，每天一次，提高魚苗活力，增強魚苗的抗應激能力。
 4. 排水：抓魚前1天，提前進行排水至1米水深，視魚苗數量拉網2~3次/塘。
 5. 捕撈：浮框固定在池塘一角，將網尾系在其上，兩側各站一人腳踩底鋼，手握上鋼確保收網不漏魚；圍網從浮框一側開始下放，繞塘一周與另一端匯合，合攏後將浮框連同魚苗移到塘邊。
 6. 點苗：根據魚苗預算數量，安排適量的人工使用撈篩一邊打氧一邊點苗。

(3) 石斑魚的魚種培育

魚種培育指將全長30毫米以上的稚魚培育至體重50克以上幼魚的過程。

- 培育條件

魚種培育池可以是長方形、方形或圓形，面積20-40平方米，水深1.2-1.8米，池底每平方米設置氣石一個並放置一些石塊、空心磚、水泥管等掩蔽物，供魚躲藏。

- 魚種品質要求

魚種大小規格整齊，全長30-35毫米以上，無病、無傷、無畸形，遊動活潑，反應敏捷。

- 放養密度

放養前要用 20×10^6 濃度的高錳酸鉀溶液對魚體進行浸浴消毒。全長30-35毫米的魚種，放養密度為400-500尾/立方米水體。

- 水質管理

水溫要求24-28°C，鹽度2.2%-2.8%，pH7.8-8.4，溶解氧5毫克/升以上，避免直射光照。

(3) 石斑魚的魚種培育

- 分選

幼魚轉入底棲生活，有時會出現群體過度集中現象。主要防止方法是儘量保持流水培育，水溫要適宜。如果培育時間較長，會出現個體大小差異。為防止互殘現象的發生，要根據魚種的生長情況，定期進行分選。





Content 目錄

01

石斑魚及項目簡介

02

石斑魚孵化與魚苗培育技術

03

餌料培育

04

答疑交流環節

餌料培養

- 餌料投喂

人工飼料

豐年蝦幼蟲：每毫升海水含 3 – 10 隻

輪蟲：每毫升海水含 5 – 10 隻

綠藻 (*Nannochloropsis*) $50-100 \times 10^3$

0 3 8 10 15 20 25 30 35 40 45 50

餌料培養

➤ 小球藻培養：

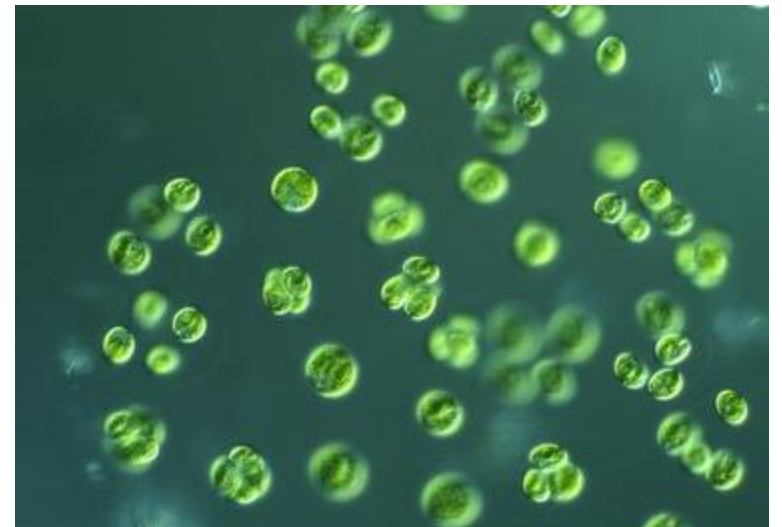
小球藻在魚苗培養中的作用：浮游動物（輪蟲）的餌料、幼魚的餌料、調節水質、調節亮度

小球藻作為活餌的優點：

- 其形態及尺寸適合魚苗/ 浮游動物 的口徑
- 營養：蛋白質及必需 氨基酸 (HUFA & PUFA)
- 早期的魚苗只有簡單的消化系統沒有消化酶
- 而浮游植物擁有多種消化酶

小球藻培養營養需求：

- 常量元素：包括硝酸鹽及磷酸鹽等主要營養為微藻提供生長所需的氮、磷
- 微量元素：包括鐵(Fe)、鉬(Mo)、銅(Cu)、鋅(Zn)、鈷(Co)及維生素B1、B12 及 生物素 (Biotin)等
- 配方：三種儲備液



餌料培養

➤ 小球藻培養:

小球藻培養營養需求: 儲備液

貯備液I

硝酸鈉 NaNO_3	75g
磷酸二氫鈉 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5g
硅酸鈉 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	30g
蒸餾水	1000ml

貯備液II

f/2 Trace Metal Solution:

氯化鐵 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.15g
乙二胺四乙酸鈉 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.36g
硫酸銅 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (9.8 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
鉬酸鈉 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6.3 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
硫酸鋅 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (22.0 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
六水氯化鈷 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10.0 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
氯化錳 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (180.0 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
蒸餾水	1000ml

貯備液III

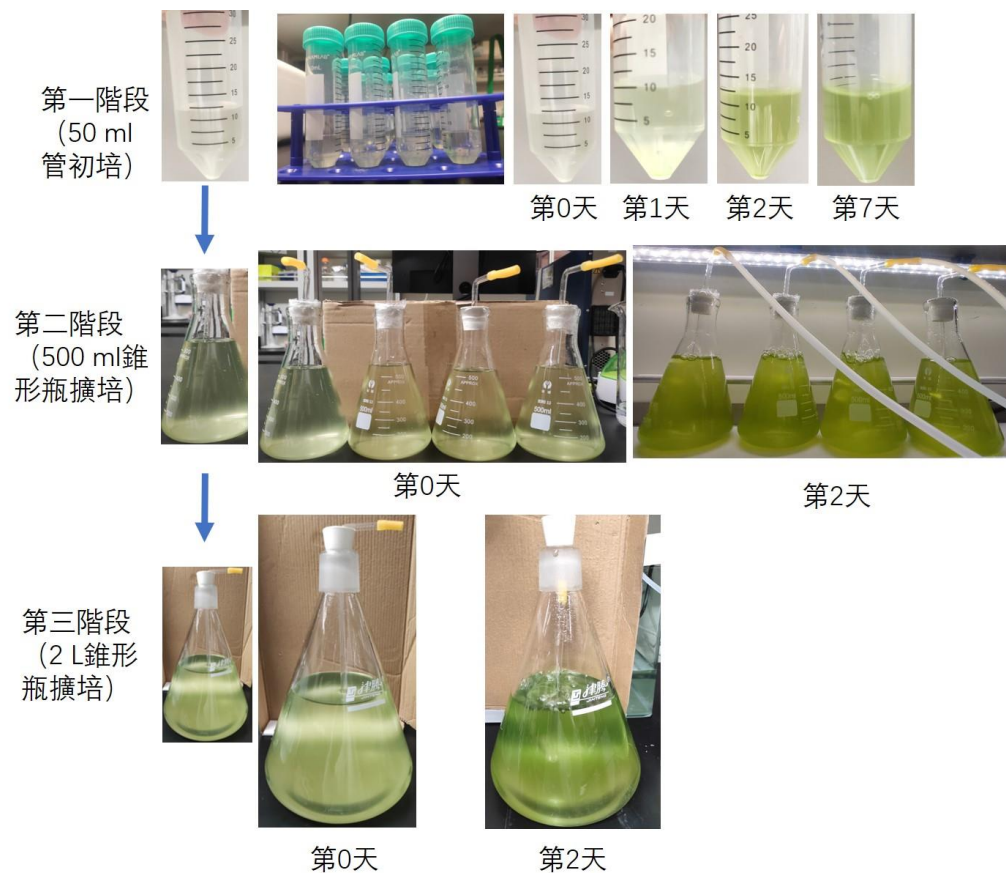
f/2 Vitamin Solution

Vitamin B12 (1.0 g/L dH ₂ O)	1.0ml
生物素 Biotin (0.1 g/L dH ₂ O)	10.0ml
Vitamin B1	200mg
蒸餾水	1000ml

餌料培養

➤ 小球藻培養:

• 小球藻培養方法:



漁場大規模培養

餌料培養

➤ 小球藻培養：

- 小球藻培養比例

容器	微藻 份量	海水 份量	總水體積	F2營養液 (1:1,000)	複本
試管	1ml	10ml	11ml	12μl	20
燒瓶 (500ml)	50ml	400ml	450ml	500μl	4
燒瓶 (2L)	100ml	1,600ml	1700L	2ml	4
圓柱缸 (250L)	16L	150L	166L	170ml	1
大圓缸 (500L)	100L	400L	500L	500ml	1

餌料培養

➤ 小球藻培養：

- 小球藻培養條件

- 溫度應控制在25-28 °C;

- 藻類須進行光合作用，應把氙氣光管/發光二極體(4000-6000lux, 6500K) 安裝於培養液上。

- 培養注意事項：

- 用已消毒淡水溶解F2營養粉末，貯藏於啡色玻璃瓶或普通玻璃瓶再以錫紙包裹，放於攝氏4度冰箱備用

- 用5um及 1 um 的篩檢程式過濾海水至玻璃容器

- 消毒海水、吸管尖、試管及燒瓶等培養用具，保證無菌

- 保持溫度及充氧，防止小球藻死亡。

餌料培養

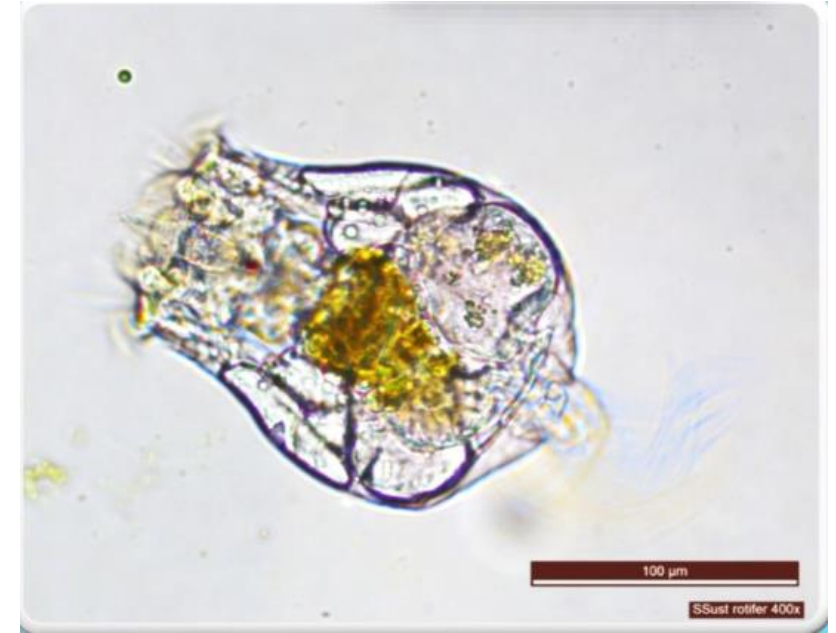
- 小球藻培養：
- 海水消毒及中和

	海水量 (噸)	消毒用漂水 (6.5%) 份量 (ml/毫升)	中和用 Sodium thiosulfate (硫代硫酸鈉/海波) 份量 (g/克)
轉換比例	1.00	150	12.00
例：10噸海水	10.00	1,500	120.00
例：1公升海水	0.001	0.150	0.012

餌料培養

➤ 輪蟲培養：

- 輪蟲作為活餌的優點：
 - 含有豐富的低分子量水溶性蛋白，較易被魚苗吸收。
 - 含有多種消化酵素如蛋白酶、肽酶、澱粉酶、脂肪酶及纖維素消化酶。（魚苗消化器官未成熟，缺乏製造消化酵素的能力，外來酵素可幫助消化）
 - 體形圓而細小，適口性佳；
 - 移動速度低及能于水中懸浮。
 - 可使用補充劑增加其本身營養。
 - 繁殖率高、培養密度高。



➤輪蟲培養：



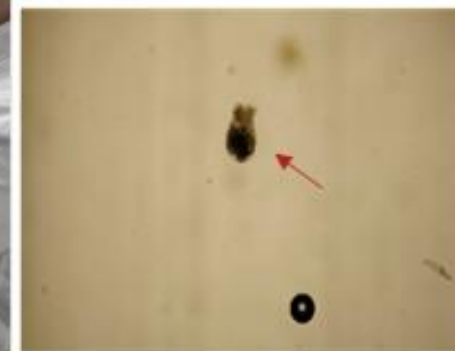
第0天



第2天



第3天



顯微鏡觀察輪蟲活力及數量

輪蟲培養裝置和培養過程

餌料培養

➤ 輪蟲培養：

- 室內培養： 4 L 玻璃樽中先注藻水及消毒海水，鹽度為25 ppt，接種約50個 /ml密度的輪蟲；適量充氣，增加亮度和溫度，培養 3~4 天後，密度大約可達到100個/ ml，可採收至較大容器再培養。
- 擴培：在擴培容器中加入藻液，同樣按照50個 /ml接種，培養 3~4 天後，密度大約可達到100個/ ml，每天採收約1/3的輪蟲，加藻水至原先水位，再繼續培養可得到源源不斷的輪蟲。

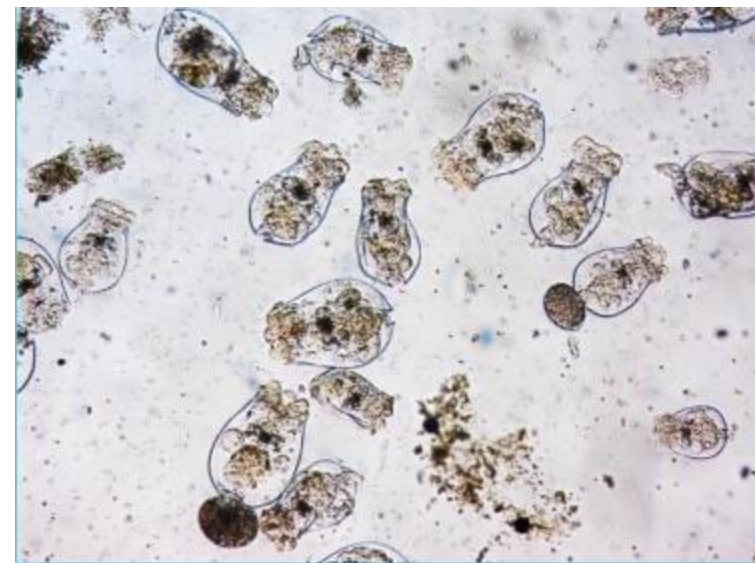


餌料培養

➤ 輪蟲培養：

- 輪蟲飼喂：

- ▣ 輪蟲食性：單胞藻、酵母、原生動物及微顆粒飼料；
- ▣ 食物顆粒大小：< 25 μm ，以< 15 μm 為理想；
- ▣ 捕食綠藻速度約每小時12000 細胞；
- ▣ 投喂量：1-1.2 g/ 100 萬隻，分多次投喂，視乎水的顏色，水清透明需補加綠藻；
- ▣ 混合使用酵母及綠藻 效果特佳。



餌料培養

➤ 輪蟲培養：

• 輪蟲培養條件：

□ 鹽度：適宜10 – 30 ppt，最適15 – 25 ppt

□ 溫度：適宜15 – 40 °C（5°C：停止活動和繁殖；10°C：低繁殖能力和緩慢活動；15-20°C：繁殖但增殖速度慢；40°C：臨界高溫）；最適溫度為25 – 35 °C（繁殖速度隨著溫度的升高而加快，SS 及S輪蟲 28~33 °C，L輪蟲 25~28 °C；

□ 光照強度：< 10000 lux，2000 – 3000 lux最適，

□ 氨氮：< 1ppm；3-5 ppm 時停止活動和繁殖，> 5 ppm 將會死亡

□ 酸鹼度：5-9都能存活，最適在7.5 – 8.5

□ 溶氧：需> 1.5 mg/L，最適為3 – 5 mg/L

餌料培養

➤ 輪蟲培養：

- 輪蟲培養注意事項：

- 輪蟲培養過程中增氧不應太大，以出小氣泡為宜，防止增氣太強導致輪蟲脫卵，影響輪蟲繁殖。
- 對培養用水和各種使用器具進行消毒，保證不引入病原。

餌料培養

➤ 豐年蝦培養：

- 豐年蝦作為活餌的優點：
 - 含有豐富的蛋白質和維生素，適宜喂飼多種水產動物的幼體或成體。豐年蟲卵含有豐富的蛋白質，氨基酸組成齊全，粗脂肪含量比較高，其中不飽和脂肪酸高於飽和脂肪酸，脫殼卵的不飽和脂肪酸為54.82%。
 - 豐年蟲卵的殼是一種含鐵脂蛋白，魚和蝦的幼體不能消化它。
 - 剛孵出的幼蟲體長約400微米，成蟲則約1～1.2公分，移動速度慢，孵化密度高。
 - 可配合使用補充劑進行營養強化，休眠蛋容易取得，儲藏方便
 - 作為餵食魚的餌料，在養殖漁業中有不可取代的地位。



豐年蟲的培養：

培養海水與用具也提前進行高壓蒸汽滅菌。購入的豐年蟲卵根據廠商的說明按照1L培養海水加入3g豐年蟲卵的比例加入到新鮮配置好的海水中，海水鹽度為25-30 ppt，用加熱棒維持水溫至26-28℃。整個孵化過程在圖所示的孵化桶中完成，24 小時不間斷的向孵化桶中充入氧氣。2天后豐年蟲卵即可孵化出此時豐年蟲卵的外殼會漂浮在水體的表面，而大多數豐年蟲會聚集在孵化桶的底部，我們通過底部的導管用密網收集孵化出的豐年蟲。剩餘未用完的豐年蟲卵放於4℃或-20℃中保存備用。我們現在有充足的豐年蟲卵，並且能夠在兩天時間內將其順利孵化出，能夠為石斑魚卵提供充足的供應。



豐年蝦的孵化裝置和孵化過程

餌料培養

➤ 豐年蝦培養：

- 豐年蝦休眠卵：

- 每克的豐年蟲卵可有250000至300000顆的數目（豐年蟲卵大小約為420至430 μm ）。
- 豐年蟲卵的品質，一般以蟲卵孵化率來決定。
- 可長期保存在乾燥的環境下，隨時可以根據需要孵化。
- 可在24-36小時內自然孵化，孵化溫度不可超過30°C。



餌料培養

➤ 豐年蝦培養：

• 豐年蝦孵化條件：

- ❑ 消毒殺菌後的水。
- ❑ 適當的打氣，並不是為了增加水中的溶氧，而是為了令卵不斷迴圈。不迴圈的卵是不能孵化的。太大幅度的打氣可能令卵沾在孵化缸邊上。
- ❑ 孵化缸最好使用能夠從底部打氣的透明漏斗成型的容器。
- ❑ 酸鹼度pH >7.5，適宜pH 7.5-8.5
- ❑ 豐年蟲對光的要求不高，培養期間以自然光為主，
- ❑ 溫度須在為24°C至30°C之間，建議為28°C。
- ❑ 豐年蟲卵的密度約為每公升水1至2克之間。
- ❑ 鹽度25～30 ppt，以28 ppt為佳

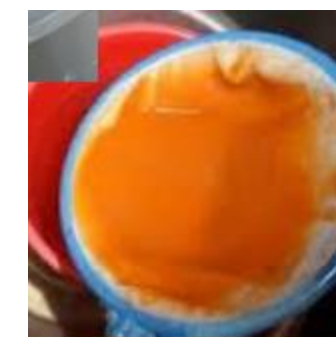


餌料培養

➤ 豐年蝦培養：

豐年蝦孵化方法：

- 直接孵化：將蟲卵浸於100 ppm氯水中消毒後，用100-150微米孔眼篩或網袋收集蟲卵，再用清水沖洗。加入消毒殺菌後的海水（密度約1.5-2克/1升水）及強烈打氣，孵化時間約18-36小時即可得到豐年蝦。
- 去卵囊：加入6%漂白水1份（NaClO）和2份NaOH溶液（30克/升）快速攪拌，凍水浸浴豐年蝦卵，卵的密度< 5克/升，打氣浸泡約1小時，其間留意蟲卵的顏色轉變（以顯微鏡檢查蟲卵的情況，乾燥蟲卵呈現凹陷狀，待蟲卵吸水鼓起呈球型）。當蟲卵轉為橙色，可停止攪拌，用篩或網袋（100-150微米）收集脫囊的蟲卵，並以大量清水沖洗。把收集的已脫囊的蟲卵轉移到孵化缸，加入消毒殺菌後的海水及適量硫代硫酸鈉中和殘氯，強烈打氣，待12-24小時內孵化，或用膠袋包好，儲存於冰箱中。儲存：2至3天，儲存在15至20°C；長期儲存：1至2星期，儲存在4°C)。



餌料培養

➤ 豐年蝦培養：

孵化後豐年蝦收集：

- 停止打氣；
- 剛孵化的幼蟲會聚集在孵化桶的底部，停止打氣後就會沉底；
- 卵殼及未孵化的卵會漂浮在水面；
- 捨棄底部的部分死掉的豐年蝦殘渣，然後用豐年蝦過濾網收集下層的豐年蟲喂飼魚苗。

注：可在收集前加入營養補充劑，待2小時或以上讓豐年蟲吸收，再收集餵食。



餌料培養

➤ 豐年蝦培養（视频）：



拿取購買的豐年蝦



Content 目錄

01

石斑魚及項目簡介

02

石斑魚孵化與魚苗培育技術

03

餌料培育

04

答疑交流環節

交流答疑環節 (30 min)



專業 創新 胸懷全球
Professional · Creative
For The World

Thank you for listening!



Marine Ecology & Fisheries Enhancement Funds Trustee Limited

改善海洋生態及漁業提升基金信託有限公司



香港城市大學
City University of Hong Kong