

刺参养殖池环境细菌群落对底质改良剂的响应*

李晓龙^{1,2} 李秋芬^{2①} 姜妮妮² 刘淮德² 王晓红³ 宋娴丽³ 安鑫龙^{1①}

(1. 河北农业大学海洋学院 秦皇岛 066003; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 山东省海洋生物研究院 青岛 266104)

摘要 运用平板培养计数法、最大或然数法和 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 指纹图谱技术, 分析发病刺参池塘环境中不同生理类群细菌数量及群落结构对底质改良剂的响应。结果显示, 加入底质改良剂后, 发病刺参池塘沉积环境中的总异养菌、硝化细菌、硫酸盐还原细菌等的数量在最初的 2-4 d 有所上升, 但升高幅度小于对照组, 且在之后的 2-4 d 内下降至加改良剂之前菌量; 在加入底质改良剂后第 2 天, 弧菌和硫化细菌数量便迅速下降, 明显低于对照组。PCR-DGGE 图谱及测序结果显示, 刺参养殖环境细菌优势菌分别属于绿弯菌门、变形菌门的莫拉菌科、柄杆菌科和气单胞菌科以及厚壁菌门的芽孢杆菌科和乳杆菌科的某种细菌, 多样性指数在 2.5-3.5 之间。实验组加入底质改良剂后, 气单胞菌属两种细菌数量逐渐下降。研究结果表明, 底质改良剂可改变沉积环境中不同细菌类群的数量, 降低致病菌的数量, 从而改善底质环境并对“刺参腐皮综合征”起到防治作用。

关键词 刺参; 养殖环境; 细菌群落; PCR-DGGE; 底质改良剂

中图分类号 S949 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0111-08

随着我国刺参(*Apostichopus japonicus*)人工养殖业的迅速发展, 养殖环境逐年恶化(关晓燕等, 2010; 张莹等, 2009; 邢红艳等, 2014)。2003 年开始, 刺参病害大规模暴发, 死亡率高达 80% 以上, 且传播速度快、波及范围广, 造成的经济损失巨大, 并呈逐年加重的趋势(孟庆国等, 2006)。为了防治刺参病害, 养殖池塘常用水体消毒剂, 单纯使用消毒剂效果不明显(邱兆星等, 2008), 且消毒类药物或固态沉底型底质改良剂接触刺参体表对刺参造成进一步的损害。近年来, 出现了以微生物制剂(朱学芝等, 2008; Vanbelle *et al*, 1990)和活性中草药成分(王印庚等, 2009)为主的底质改良剂, 在改善水质底质的同时, 通过分解有机物获得生长繁殖的能源, 具有不污染环境、成本低、无毒副作用的特点, 是目前养殖业首选的底质改良剂。但由于基础研究不够充分, 缺乏理论指导, 调控具有一定的盲目性。

只有在良好的环境条件下, 刺参才能健康生长, 刺参养殖环境的微生物群落作为养殖环境的重要组

成生物类群, 可以作为衡量养殖环境优劣的指标之一(王轶南等, 2010; Paerl *et al*, 2003), 因此, 有必要通过研究环境微生物对底质改良剂的响应, 来推断底质改良剂对养殖环境的调控效果。但据报道, 自然环境中能够获得纯培养的微生物仅有不到 1% (Amann *et al*, 1995), 因此仅仅依靠诸如显微镜、分离纯化培养等传统的微生物学方法并不能全面系统地分析某一环境微生物的多样性以及了解其在自然生态系统中发挥的作用, 而以 PCR 为基础的各种分子生物学方法得到越来越广泛的应用(Muyzer *et al*, 1993; 关晓燕等, 2010; 姜妮妮等, 2014)。本研究利用本课题组研制的含中草药成分底质改良剂对刺参发病的池塘养殖环境进行调控的同时, 利用平板培养计数法与 PCR、DGGE 等分子生物学方法相结合的技术, 对环境细菌群落结构变化进行分析, 以期掌握刺参养殖环境中细菌群落对底质改良剂的响应情况, 从而为通过人为调控养殖环境来防治刺参病害发生提供理论基础和技术依据。

* 国家自然科学基金(31170113)资助。李晓龙, E-mail: yesterday1987@126.com

① 通讯作者: 李秋芬, 研究员, E-mail: liqf@ysfri.ac.cn; 安鑫龙, 副教授, E-mail: axlqhd@126.com

收稿日期: 2014-01-18, 收修稿日期: 2014-04-28

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用底泥于 2013 年 7 月采集于山东省青岛市红岛区发生“腐皮综合征”的刺参养殖池塘。采样方法参照《国家海洋调查规范》海洋生物调查中规定的方法,使用德国 Hydro-Bios 公司 Van Veen 采泥器在池塘 4 个角和中间共 5 个点分别取泥,混合均匀后,低温条件下立即带回实验室进行室内试验,并从采样池内取得海水和患有“腐皮综合征”的病参,一同带回实验室。实验过程中使用的底质改良剂为本课题组自行研制的含中草药成分的底质改良剂(配方不宜在此公开)。

1.2 试验方法

实验在 30 cm×60 cm 的塑料箱中进行,每个箱底部平铺从发病的刺参池塘采集的底泥(厚 10 cm)。实验分为两组,每组设 3 个平行。A 组为对照组,不加底质改良剂;B 组为实验组,加入正常剂量(0.66 g/箱)的底质改良剂,分别编号为 A1、A2、A3、B1、B2、B3。最后在箱内加入 10 L 取自刺参养殖池的海水,并在每个箱中放入 4 头病参。之后分别在第 1、2、3、4、5、6、10、15 天的相同时间段采集箱内的底泥,采样方法同上,实验在室温 25℃、正常光照条件下进行。

1.3 培养计数

对沉积物中的总异养菌、弧菌、硝化细菌、硫化细菌,分别利用 2216E、TCBS、硝化细菌、硫化细菌固体培养基直接培养计数(李秋芬等, 2002; 李彬等, 2012),对样品进行稀释后取 0.1 ml 直接涂布于相应培养基上;而硫酸盐还原菌、硝酸盐还原菌采用最大或然数法计数(朱永艳等, 2006),对样品进行稀释后取 1 ml 样品接种至相应的液体培养基,于 28℃ 恒温培养箱中培养。异养菌和弧菌在接种 2 d 后计数菌落(30–300 CFU/板为有效范围),硫化菌和硝化菌在接种 7 d 后计数,硝酸盐还原菌在接种后 7 d 进行计数,硫酸盐还原菌在接种 14 d 后进行计数。最后查 MPN 表,并根据稀释倍数和接种量计算单位体积或单位质量的细菌数量。

1.4 DNA 的提取

将 A1、A2、A3 和 B1、B2、B3 分别混合,作为对照组和实验组相应采样时间的样品,参照傅莲英等(2006)报道的方法提取 DNA,并根据沉积物样品特性加以改进,将异丙醇室温沉淀 DNA 1 h 改为异丙醇 4℃ 过

夜沉淀 DNA,并使用 DNA Clean&Concentrator TM-25 试剂盒(Zymoclean 公司)对 DNA 提取产物进行纯化。

1.5 16S rDNA V3 区扩增

以上述提取的 DNA 为模板,采用细菌 16S rDNA V3 区通用引物 341F(5'-GCC TAC GGG AGG CAG CAG)和 758R(5'-CTA CCA GGG TAT CTA ATC C)进行扩增,并在 341F 5'端加入长为 40 bp 的富含 GC 的片段(Holben *et al*, 2004),以使 DNA 片段 DGGE 的检出率从 50%左右提高到几乎 100% (Muyzer *et al*, 1998)。反应条件:95℃ 预变性 5 min,然后 94℃ 变性 30 s,52℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 2 min,进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)对 PCR 产物进行纯化。

1.6 DGGE、克隆、测序、序列分析

纯化的 PCR 产物采用 Bio-Rad DCode™ 突变检测系统(Hercules, CA)进行分离。所用聚丙烯酰胺浓度为 8%,变性剂线性梯度范围为 45%–65%,60℃、60 V 下电泳 18 h。电泳结束后取下凝胶,在含有 300 ml 1× TAE 和 30 μl Gel Green 核酸染料的塑料盘中染色,室温下染色 30 min 左右,之后用凝胶成像分析系统(DNR, 以色列)观察照相。然后对代表性优势条带进行切胶、PCR、克隆,将克隆产物送往上海生工进行测序,测序结果在 NCBI 中进行同源性比较,从中选取与其相似性最高的细菌 16S rDNA 序列,使用软件 Quantity One 对序列进行分析。

2 结果与分析

2.1 底泥中不同生理类群细菌的数量变化

将异养菌的 3 组平行数据取平均值后作图(图 1)。加底质改良剂的实验组中,异养菌数量呈先上升后下降的趋势,在第 4 天开始缓慢下降,15 d 后恢复至加改良剂前的水平,波动范围为 $(1.27 \pm 0.66) \times 10^4$ – $(2.71 \pm 0.81) \times 10^5$ CFU/g;而不加改良剂的对照组,与实验组变化趋势相同,但变化幅度较大,且最高值出现在第 5 天,而后一直高于实验组,数量波动范围为 $(1.27 \pm 0.19) \times 10^4$ – $(8.07 \pm 0.40) \times 10^5$ CFU/g。

将弧菌的 3 组平行数据取平均值后作图(图 2),实验组在加入底质改良剂后,两天内弧菌数量急剧下降,之后维持在较低水平,且一直比对照组低,波动范围为 $(1.00 \pm 0) \times 10^2$ – $(5.80 \pm 1.20) \times 10^3$ CFU/g;对照组

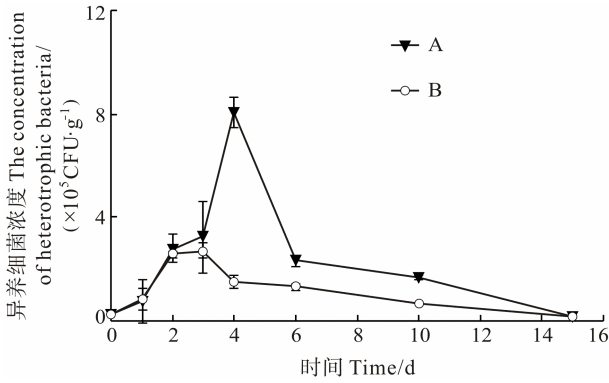


图 1 沉积物中异养细菌数量随时间的变化

Fig.1 Time-course of heterotrophic bacteria in sediment

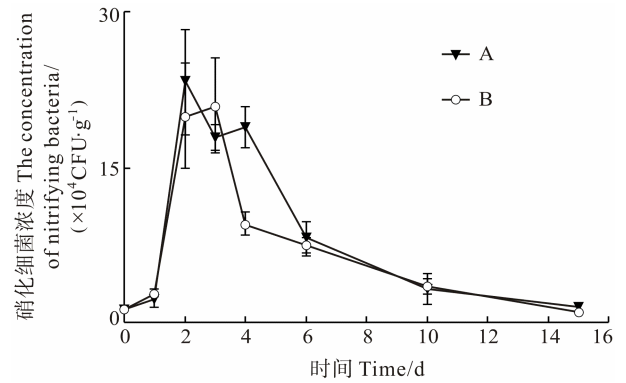


图 3 沉积物中硝化细菌数量随时间的变化

Fig.3 Time-course of nitrifying bacteria in sediment

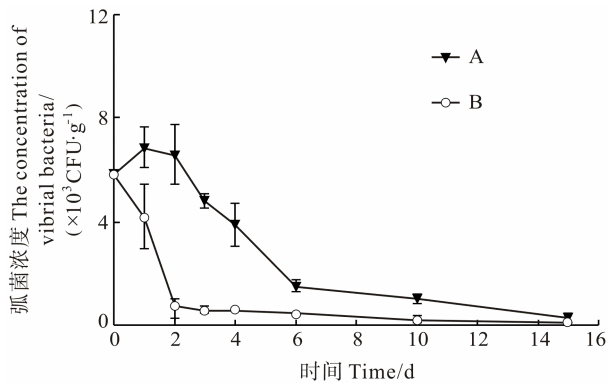


图 2 沉积物中弧菌数量随时间的变化

Fig.2 Time-course of *Vibrio* in sediment

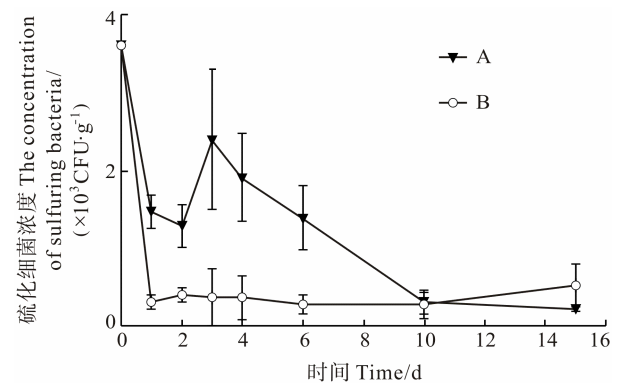


图 4 沉积物中硫化细菌数量随时间的变化规律

Fig.4 Time-course of sulfuring bacteria in sediment

弧菌数量则有一个缓慢升高过程, 第 3 天才开始下降, 下降趋势较实验组缓慢, 波动范围为 $(2.50 \pm 0.18) \times 10^2 - (6.87 \pm 0.83) \times 10^3$ CFU/g。

将硝化细菌的 3 组平行数据取平均值后作图(图 3), 实验组在加入底质改良剂后所呈现出的硝化菌量变化大体趋势为先升后降, 除第 3 天外, 数量均低于对照组, 波动范围为 $(9.14 \pm 2.35) \times 10^3 - (2.09 \pm 0.50) \times 10^5$ CFU/g; 对照组的菌量变化大体呈先升后降趋势, 中间稍有波动, 波动范围为 $(1.17 \pm 0.39) \times 10^4 - (2.32 \pm 0.51) \times 10^5$ CFU/g。

将硫化细菌的 3 组平行数据取平均值后作图(图 4), 实验组加入底质改良剂之后 1 d, 硫化细菌数量即出现明显下降, 之后一直较低, 波动范围为 $(2.83 \pm 0.76) \times 10^2 - (3.60 \pm 0.32) \times 10^3$ CFU/g; 对照组中硫化细菌数量下降趋势则较为缓慢, 甚至在第 3 天又有上升, 之后又缓慢下降, 波动范围为 $(2.10 \pm 0.36) \times 10^2 - (3.60 \pm 0.9) \times 10^3$ CFU/g。

将硝酸盐还原菌的 3 组平行数据取平均值后作图(图 5), 实验组和对照组硝酸盐还原菌菌量变化无明显差异, 均为先上升, 在第 4 天达到最大值, 之后数量下降, 10 d 后趋于平稳达到稳定值。实验组数量波动范

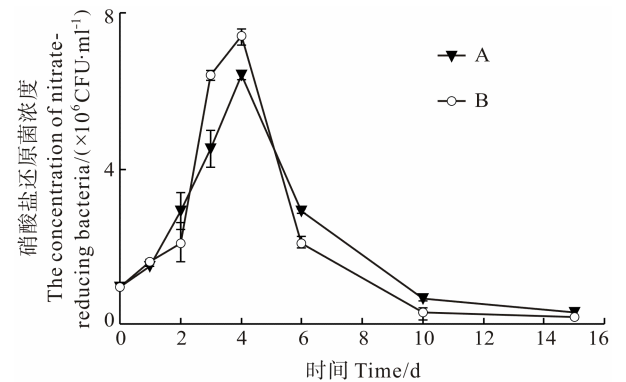


图 5 沉积物中硝酸盐还原菌数量随时间的变化

Fig.5 Time-course of nitrate-reducing bacteria in sediment

围为 $(1.50 \pm 0.24) \times 10^5 - (7.40 \pm 0.11) \times 10^6$ cells/ml, 对照组波动范围为 $(2.70 \pm 0.39) \times 10^5 - (6.40 \pm 0.59) \times 10^6$ cells/ml。

将硫酸盐还原菌的 3 组平行数据取平均值后作图(图 6), 两组数量变化趋势完全相同, 但实验组低于对照组, 且变化幅度较小, 实验组波动范围为 $(2.40 \pm 0) \times 10^0 - (2.70 \pm 0.97) \times 10^1$ cells/ml, 对照组波动范围为 $(3.60 \pm 0) \times 10^0 - (4.13 \pm 1.70) \times 10^1$ cells/ml。

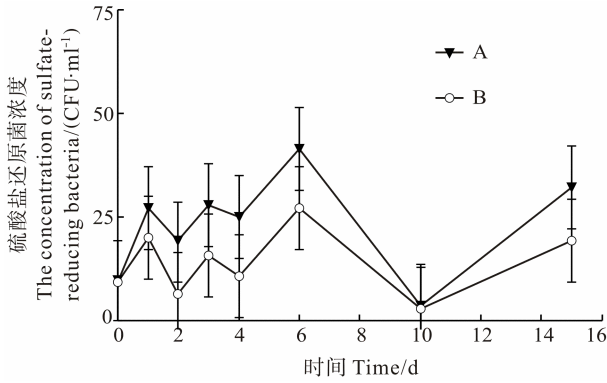


图6 沉积物中硫酸盐还原菌数量随时间的变化
Fig.6 Time-course of sulfate-reducing bacteria in sediment

2.2 DNA 的提取扩增与纯化

提取的 DNA 经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 发现条带较亮(图 7), 表明提取效果较好, DNA 数量较多, 大小在 20 kb 左右。扩增纯化后的 DNA 经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 条带明亮, 且无非特异性带(图 8), 说明引物 341FGC 和 758R 对细菌的 16S rDNA 基因的扩增效果较好。

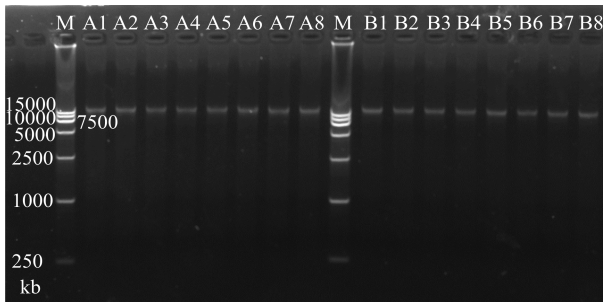


图7 沉积物中 DNA 的提取
Fig.7 Agarose gel electrophoresis of the extracted DNA from sediment

M: DNA marker; A1-A8 和 B1-B8: A、B 组样品分别在第 1、2、3、4、5、6、10、15 天时
M: DNA marker; A1-A8 and B1-B8: Mixed sediment of Group A and B at the day 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, and 15

2.3 底泥 DGGE 图谱结果

引物 341FGC 和 758R 对细菌的 16S rRNA 基因的扩增产物在 DGGE 图谱上得到较好的分离。由图 9 可以看出, 16 个不同样品中分别形成了 7-22 条亮带。随时间推移, 带谱特征有所变化; 相同时间段, 实验组和对照组有一定差异。其中条带 5、6、7、8、14、22、26 在所有样品中均有出现, 且较亮, 可能为共有优势菌。

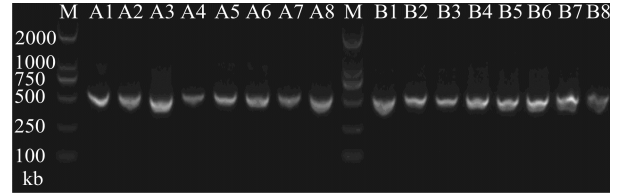


图8 16S rDNA-V3 区扩增
Fig.8 Agarose gel electrophoresis of PCR for the V3 region of 16S rDNA of the sediment bacteria

M: DNAmarker; A1-A8 和 B1-B8: A、B 组样品分别在第 1、2、3、4、5、6、10、15 天时
M: DNA marker; A1-A8 and B1-B8: Mixed sediment of Group A and B at the day 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, and 15

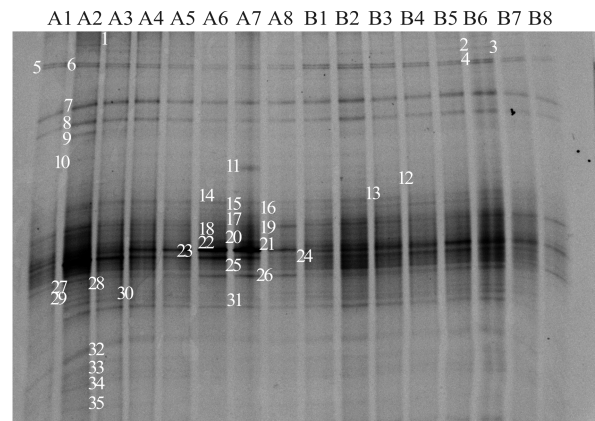


图9 沉积物中菌群 16S rDNA 的 DGGE 指纹图谱
Fig.9 DGGE fingerprint of the 16S rDNA of the bacteria from the different sediment samples

A1-A8 和 B1-B8: A、B 组样品分别在第 1、2、3、4、5、6、10、15 天时
A1-A8 and B1-B8: Mixed sediment of Group A and B at the day 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, and 15

样品的多样性指数如图 10 所示, 实验组呈升高下降、再升高下降的趋势; 对照组则呈升高、下降趋势, 但两组波动都不大, 多样性指数均集中在 2.5-3.5 之间。

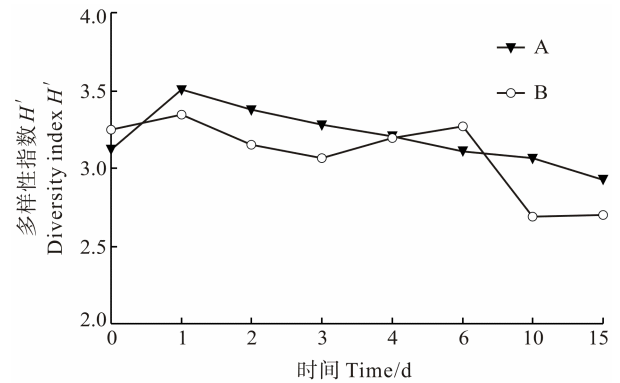


图10 沉积物中细菌的多样性指数
Fig.10 Diversity index of the bacteria from different sediment samples

DGGE 指纹图谱的聚类分析结果如图 11 所示, 从各簇情况可以看出, 同一时间段内, 实验组相邻时间样品的相似度高于实验组与对照组之间的相似度。

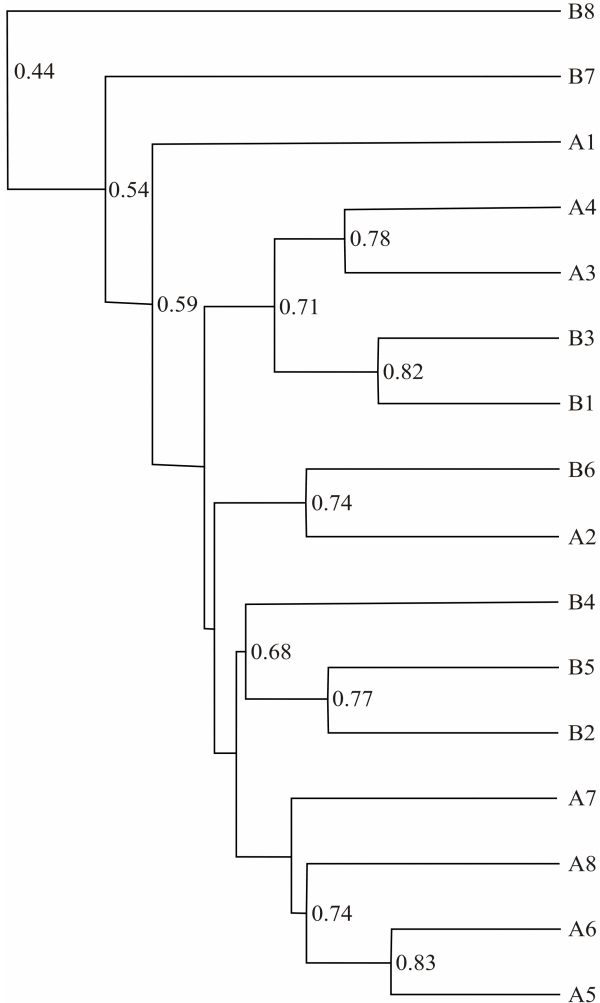


图 11 DGGE 指纹图谱的聚类分析
Fig.11 Dendrogram of the DGGE fingerprint

使用软件 Quantity One 生成相似性矩阵如图 12 所示, 表明相隔时间越长, 样品间相似系数越低。实验组与对照组的相似系数低于实验组内部各样品间的相似系数, 与聚类分析的结果一致。

2.4 优势细菌 16S rRNA 基因鉴定

对优势条带进行切胶测序的结果如表 1 所示。优势菌分别属于绿弯菌门、变形菌门的莫拉菌科、柄杆菌科和气单胞菌科及厚壁菌门的芽孢杆菌科和乳杆菌科等。结合图 10 可以看出, 在整个实验期间, 莫拉菌科不动杆菌属 *Acinetobacter* sp. PAO16 (条带 5)、芽孢杆菌科葡萄球菌属的 *Staphylococcus* sp. W-2(条带 6)和 *Staphylococcus* sp. B(2012) (条带 8)及柄杆菌科细菌 *Caulobacteraceae*(条带 7)在实验组和对照组中始终为优势菌。气单胞菌属细菌 *Aeromonas* sp. S5-13(条带 14)和 *Aeromonas* sp. REm-amp_229(条带 26)在实验组的优势度随时间一直下降, 最终下降到数量较低, 而在对照组中, 开始为优势菌, 维持几天后才开始下降。绿弯菌门细菌 *Uncultured Chloroflexi bacterium clone TK-SH18*(条带 22), 在实验组呈现优势度反复升降的波动状态, 在对照组中优势度持续较高。乳杆菌科细菌 *Lactobacillaceae*(条带 31)在实验组数量稍有波动, 总体呈下降趋势, 在对照组数量变化不大, 较为稳定。

3 讨论

随着海参养殖规模的不断扩大, 尤其是在集约化养殖模式下, 刺参疾病频频暴发, 导致刺参大规模死亡, 造成了巨大的经济损失。相关报道 (Wang *et al*, 2004; 王高学等, 2007; 张春云等, 2006; 王印庚等,

A1	100.0																		
A2	58.7	100.0																	
A3	58.0	63.3	100.0																
A4	61.8	66.8	78.3	100.0															
A5	61.4	69.3	64.9	70.6	100.0														
A6	53.8	67.2	60.5	71.0	83.0	100.0													
A7	53.6	63.7	55.7	67.1	72.6	71.8	100.0												
A8	66.0	66.0	60.2	71.7	73.5	75.3	74.4	100.0											
B1	55.9	58.9	70.6	71.1	65.8	62.9	59.0	65.8	100.0										
B2	63.0	63.6	65.4	63.7	66.8	63.2	58.6	66.7	64.5	100.0									
B3	59.2	56.1	71.1	72.1	65.7	64.7	59.1	66.8	81.6	66.7	100.0								
B4	59.1	58.4	56.2	62.5	72.0	71.2	57.6	68.1	61.2	67.4	72.1	100.0							
B5	64.7	65.0	67.6	68.8	75.1	69.4	67.1	73.1	66.8	76.6	69.2	69.2	100.0						
B6	51.3	74.4	59.4	65.8	68.6	68.3	65.9	59.2	61.2	63.9	63.6	64.1	69.5	100.0					
B7	48.7	55.9	52.9	51.6	52.7	53.2	56.0	56.5	52.5	47.7	55.9	56.3	56.8	62.5	100.0				
B8	35.6	39.2	40.5	41.2	43.3	45.4	47.1	55.6	56.0	51.6	42.3	43.1	46.4	41.9	36.4	100.0			
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8				

图 12 沉积物中菌群组成的相似性矩阵
Fig.12 Similarity matrix of the bacteria from different sediment samples

表 1 优势菌序列对比结果
Tab.1 Alignment results with the sequences of the closest relative of the dominant species

条带 No. of the band	GenBank 登录号 GenBank accession number	物种名 Species name	所属细菌门类 Bacterial categories	相似度 Similarity (%)
5	JN676117.1	<i>Acinetobacter</i> sp. PAO16	变形菌门莫拉菌科 <i>Acinetobacter</i> in proteobacteria	95
6	JX473725.1	<i>Staphylococcus</i> sp. W-2	厚壁菌门芽孢杆菌科 <i>Staphylococcus</i> in Firmicutes	100
7	AB682432.1	<i>Phenylobacterium composti</i> gene	变形菌门柄杆菌科 Caulobacteraceae in proteobacteria	99
8	KC107218.1	<i>Staphylococcus</i> sp. B(2012)	厚壁菌门芽孢杆菌科 <i>Staphylococcus</i> in Firmicutes	100
14	KC202268.1	<i>Aeromonas</i> sp. S5-13	变形菌门气单胞科 <i>Aeromonas</i> in proteobacteria	95
22	DQ463738.2	Uncultured Chloroflexi bacterium clone TK-SH18	Chloroflexi	99
23	JF987238.1	Uncultured bacterium clone Paddy_75_6536	Uncultured bacterium	99
26	JX899588.1	<i>Aeromonas</i> sp. REM-amp_229	变形菌门气单胞科 <i>Aeromonas</i> in proteobacteria	99
31	NR_036982.1	<i>Lactobacillus iners</i> strain DSM 13335	厚壁菌门芽孢杆菌科 <i>Staphylococcus</i> in Firmicutes	99
32	GQ412932.1	Uncultured bacterium clone 2FSeds_D04	Uncultured bacterium	99

2013)表明,气单胞菌、灿烂弧菌和副溶血弧菌是导致刺参“腐皮综合征”的主要致病菌,为此可以将养殖环境沉积物中的某些已知病原菌含量的变化作为指示刺参养殖环境优劣的标尺之一(陈文博等, 2012; 牛宇峰, 2009¹⁾)。抗生素及其他违禁药物被用于疾病防治,虽然起到一定的效果,但必将引起细菌抗药性及药物残留,严重阻碍刺参养殖业的健康良性发展,因此寻找健康环保的治病方法是目前的研究热点。近年来关于使用底质改良剂调节刺参养殖池塘的报道尚不多见,其中陈文博等(2012)研究了微生态制剂对养参池弧菌数量变化的影响;伏传永等(2008)²⁾报道,作为益生菌的枯草芽孢杆菌对条件性致病菌——弧菌有明显的抑制、拮抗作用,但益生菌在经历指数增长后会进入繁殖停滞的稳定期,对弧菌的抑制作用也会迅速减弱。微生态制剂还可作为水质调节剂,净化养殖环境,降低刺参养殖水体的 COD、亚硝酸盐和氨氮等,并且可以直接利用沉积物中的不溶性有机物,从而加速对这些污染物的降解(Rengpipat *et al.*, 2000);另外,王东梅等(2012)报道,复方中草药能够在某种程度上增强刺参体腔液中的免疫因子 AKP、

ACP、SOD 及 NOS 的活性;陈效儒等(2010)的研究表明,在饲料中甘草酸的添加量为 200 mg/kg 时,刺参的免疫力、抗病力和生长速度均得到显著提高。

本课题组经长期研究,研制出含中草药成分的底质改良剂,本次试验验证了其治疗刺参“腐皮综合征”的效果,也从环境微生物学角度揭示了其防治刺参疾病的机理。从细菌培养计数结果来看,加入底质改良剂的实验组多数可培养细菌的数量出现迅速下降,并维持在较低的水平,大多低于对照组,作为致病菌的弧菌变化尤为显著,同时可观察到该组发病刺参化皮面积逐渐减少,化皮症状逐渐消失,表明“腐皮综合征”基本痊愈。相比而言,未加入底质改良剂的对照组则在大部分时间细菌数量高于实验组,发病刺参化皮面积未见明显缩小,最后均死亡。由此可以看出本课题组的底质改良剂可降低“腐皮综合征”致病菌数量,对刺参“腐皮综合征”有一定的防治效果。而且,细菌 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 指纹图谱和切胶测序结果显示,莫拉菌科反硝化菌(*Acinetobacter* sp.)一直作为优势菌群存在,也可印证硝酸盐还原菌在培养过程中细菌数量持续较高。作为致病菌的气单胞菌

1) 牛宇峰. 刺参养殖池塘异养菌数量变动及区系组成的初步研究. 中国海洋大学硕士学位论文, 2009, 32-61

2) 伏传永. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)对刺参腐皮综合征致病菌的拮抗作用以及对水质的影响. 中国海洋大学硕士学位论文, 2008, 28-36

(*Aeromonas* sp.)(王高等, 2007)在实验组加入底质改良剂后条带明显变暗, 反映出细菌数量逐渐下降, 优势度降低, 也解释和印证了本课题组底质改良剂对刺参“腐皮综合征”有明显的治疗效果, 这为刺参腐皮综合征的防治提供了一个有效的方法和思路。同时, 在本次模拟试验中, 也发现实验组和对照组有时细菌数量没有表现出明显的差异, 可能与试验持续时间短、添加底质改良剂剂量偏小有关, 也可能是由于刺参发病与今年夏天我国北方持续高温且雨水偏多等物理因素有关, 需要进一步深入研究。

参 考 文 献

- 王轶南, 朱世伟, 常亚青. 刺参肠道及养殖池塘菌群组成的 PCR-DGGE 指纹图谱分析. 渔业科学进展, 2010, 31(3): 119-122
- 王东梅, 王维新. 复方中草药对刺参免疫的影响. 饲料研究, 2012(11): 63-65
- 王高等, 原居林, 赵云奎, 等. 刺参表皮溃烂病原菌的分离鉴定与药敏试验. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(8): 87-90, 96
- 王印庚, 冷敏, 陈霞, 等. 中草药对刺参腐皮综合征病原菌的体外抑菌试验. 渔业科学进展, 2009, 30(2): 1-7
- 王印庚, 荣小军, 张凤萍, 等. 养殖刺参“腐皮综合征”致病菌——灿烂弧菌的原位杂交检测方法的建立与应用. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 114-118
- 关晓燕, 周遵春, 陈仲, 等. 应用 PCR-DGGE 指纹技术分析高温季节仿刺参养殖水环境中菌群多样性. 海洋湖沼通报, 2010, 11(1): 82-88
- 朱学芝, 郑石轩, 潘庆军, 等. 微生态制剂对凡纳滨对虾生长及水质的影响. 中山大学学报(自然科学版), 2008, 47(Z1): 58-62
- 朱永艳, 郑传波, 李言涛, 等. 海泥中硫酸盐还原菌数量变化对主要腐蚀环境因子的影响. 海洋科学, 2006, 30(11): 37-40
- 李彬, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参肠道与养殖池塘环境中异养细菌和弧菌数量周年变化. 海洋科学, 2012, 36(4): 63-67
- 李秋芬, 曲克明, 陈碧鹃, 等. 老化虾池生态系中几类主要细菌的季节变化特征. 海洋水产研究, 2002, 23(2): 12-19
- 邢红艳, 马元庆, 李斌, 等. Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 对刺参幼参的急性毒性及其富集. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 91-96
- 邱兆星, 王晓红, 王宝庭, 等. 海参养殖发病的原因及对策. 齐鲁渔业, 2008, 25(3): 52-53
- 张莹, 姜国良, 刘云, 等. 仿刺参“腐皮综合征”病灶处优势菌的分离鉴定及 AHLs 信号分子的检测. 微生物学通报, 2009, 36(11): 1664-1669
- 张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 2006, 30(1): 118-123
- 陈文博, 王洪军, 李勃, 等. 养参池底泥弧菌数量变动及微生态制剂对其影响. 水产养殖, 2012, 33(10): 40-43
- 陈效儒, 张文兵, 麦康森, 等. 饲料中添加甘草酸对刺参生长、免疫及抗病力的影响. 水生生物学报, 2010, 34(4): 731-738
- 孟庆国, 吴刘记, 吴信忠, 等. 养殖刺参溃瘍病原学研究. 水产科学, 2006, 25(12): 635-639
- 姜妮妮, 李秋芬, 刘淮德, 等. 养殖沉积环境中气单胞菌属细菌的实时荧光定量 PCR 检测方法的建立. 渔业科学进展, 2014, 35(3): 126-133
- 傅莲英, 席峰, 袁建军, 等. 海水养殖沉积环境微生物总 DNA 的提取方法研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(6): 841-846
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev, 1995, 59(1): 143-169
- Holben WE, Feris KP, Kettunen A, et al. GC fractionation enhances microbial community diversity assessment and detection of minority populations of bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(4): 2263-2270
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695-700
- Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73(1): 127-141
- Paerl HW, Dyble J, Moisaner PH, et al. Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. FEMS Microbiol Ecol, 2003, 46(3): 233-246
- Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture, 2000, 191(4): 271-288
- Vanbelle M, Teller E, Focant M. Probiotics in animal nutrition: a review. Archives of Animal Nutrition, 1990, 40(7): 543-567
- Wang YG, Zhang CY, Rong XJ, et al. Diseases of cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in China. Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Report, 2004, 463: 297-310

(编辑 冯小花)

Responses of Bacterial Community to the Sediment Improver in the Environment of *Apostichopus japonicus* Culture Ponds

LI Xiaolong^{1,2}, LI Qiufen^{2①}, JIANG Weiwei², LIU Huaide², WANG Xiaohong³,
SONG Xianli³, AN Xinlong^{1①}

(1. Ocean College of Hebei Agricultural University, Qinhuangdao 066003; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104)

Abstract Sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) farming industry has been developing rapidly in North China, but at the meanwhile sea cucumber diseases has become a growing problem. The environmental deterioration was considered one of the main causes. A type of sediment improver studied by our research group has been proved to be effective in adjusting the sediment environment of the sea cucumber culture ponds. In order to detect the responses of the bacterial community to the sediment improver, we conducted experiments using the sediment from the disease-occurring sea cucumber culture ponds. The sample treated with the sediment improver was the trial group and that without the improver was the control group, and we set 3 parallels for each group. The plant counting method and the most probable number method were used to determine the change in the numbers of several bacterial groups in the sediment after the addition of the sediment improver. The bacterial diversity was analyzed using the 16S rRNA gene PCR-DGGE and the sequencing techniques. The results showed that in the trial group the numbers of the heterotrophic bacteria, the nitrifying bacteria and the sulfate-reducing bacteria in sea cucumber pond sediments increased in the first 2 to 4 days, followed by a decrease and then maintained at a low level, and the increase was significantly smaller than that in the control group. The numbers of Vibrionaceae and sulfurizing bacteria sharply declined 1 day after the addition of the sediment improver, which were significantly lower than those in the control group. The sequencing result of DGGE bands showed that the dominant bacteria in the sea cucumber culture environment belonged to Chloroflexi, Moraxellaceae, Caulobacteraceae, Aeromonadaceae in Proteobacteria, Bacillaceae, and Lactobacillaceae in Firmicutes. The bacterial diversity indexes varied between 2.5 and 3.5. The numbers of 2 species of *Aeromonas* were observed to decline after the addition of the sediment improver in the trial group. Therefore, we concluded that the sediment improver could adjust the numbers of different bacterial groups in the sediment environment and reduce the quantity of some pathogenic bacteria. The sediment improver may thus improve the quality of the pond sediment environment and protect *A. japonicus* from diseases.

Key words *Apostichopus japonicus*; Aquaculture environment; Bacterial community; PCR-DGGE; Sediment improver

① Corresponding author: LI Qiufen, E-mail: liqf@ysfri.ac.cn; AN Xinlong, E-mail: axlqhd@126.com