

秋、冬季节刺参养殖池塘浮游细菌数量变化规律的研究

李彬^{1,2} 荣小军¹ 姜卓^{1,2} 廖梅杰¹
王印庚^{1*} 薛太山³ 李华²

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 266071)

(²大连海洋大学, 116023)

(³青岛瑞滋海珍品发展有限公司, 266409)

摘要 应用平板稀释涂布培养计数法和荧光显微镜计数法, 对秋、冬季(2008年9月~2009年2月)刺参养殖池塘水体中的浮游细菌数量变化规律进行了分析。结果表明, 吖啶橙染色直接计数法(AODC)测得细菌总数的变化范围是 $1.0 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^7$ 个/ml, 活菌直接计数法(DVC)测得活菌总数的变化范围是 $4.0 \times 10^5 \sim 5.7 \times 10^6$ 个/ml。异养细菌平板计数法(HPC)测得异养细菌数量为 $0.6 \times 10^2 \sim 1.7 \times 10^5$ CFU/ml。TCBS 平板培养的弧菌数量在 6.6×10^3 CFU/ml 以下。从时间分布看, 刺参养殖池塘水体中浮游细菌数量最高值出现在10月份, 最低值出现在1月份, 秋季细菌数量显著高于冬季($P < 0.01$)。从空间分布看, 水体底层细菌数量显著高于表层($P < 0.05$)。利用SPSS13.0软件对所得到的数据进行统计分析表明, 同一样品不同计数方法获得的细菌总数数值之间存在显著的相关性($P < 0.01$)。

关键词 刺参 浮游细菌 AODC DVC HPC

中图分类号 S948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)03-0044-05

Study on spatial and temporal variations of planktobacteria quantity in *Apostichopus japonicus* culture ponds during autumn and winter

LI Bin^{1,2} RONG Xiao-jun¹ JIANG Zhuo^{1,2} LIAO Mei-jie¹
WANG Yin-geng^{1*} XUE Tai-shan³ LI Hua²

(¹Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, 266071)

(²Dalian Ocean University, 116023)

(³Qingdao Ruizi Precious Seafood Development Limited Company, 266409)

ABSTRACT The spatial and temporal variations of planktobacteria quantity in *Apostichopus japonicus* culture ponds during autumn and winter (from September, 2008 to February, 2009) were investigated by plate culture and fluorescence microscope techniques. The total number of planktobacteria estimated by acridine orange direct count (AODC) and Direct Viable Count

国家高技术研究发展计划项目(2006AA100313)、国家自然科学基金项目(30901120)、山东省科技发展计划项目(2004GG2205116)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2060302/2-201)共同资助

* 通讯作者。E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85841732

收稿日期: 2009-05-13; 接受日期: 2009-07-10

作者简介: 李彬(1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事养殖生态与疾病防控研究。E-mail: libin080808@hotmail.com

(DVC) ranged in $1.0 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^7$ cell/ml and $4.0 \times 10^5 \sim 5.7 \times 10^6$ cell/ml, respectively. The amount of heterotrophic bacteria detected by heterotrophic plate count (HPC) ranged from 0.6×10^2 to 1.66×10^5 CFU/ml. The amount of *Vibrio* was below 6.6×10^3 CFU/ml using TCBS selective medium cultivation. The number of planktobacteria varied in different season, which reached the maximum in October and the minimum in January. The number of bacteria in the ponds was significantly higher in autumn than in winter ($P < 0.01$). The total number of bacteria in different water layers was determined. The results showed that the total number of bacteria in the bottom water was significantly higher than that in the surface water ($P < 0.05$). There was significant correlation ($P < 0.01$) between data deduced by using different bacterial count methods.

KEY WORDS *Apostichopus japonicus* Planktobacteria AODC DVC HPC

刺参 *Apostichopus japonicus* 属于棘皮动物门 Echinodermata、海参纲 Holothuroidea, 具有较高的营养价值(樊绘曾 2001)。2006 年全国海参苗种年生产能力达 217.68 多亿头, 增养殖面积约 84 200 hm^2 , 年产量 10 万 t(农业部渔业局 2007), 取得了显著的经济效益和社会效益。随着刺参养殖规模的不断增加, 各种病害接踵而至, 严重制约了该产业的健康和持续发展(张春云等 2006)。

养殖水体是水生生物赖以生存的环境, 水环境中的细菌组成和数量直接影响着养殖水质、养殖生物生长、疾病发生和产量等。因此, 研究刺参栖息水环境中细菌数量变化对于健康养殖和疾病防治尤为重要(姜北等 2008)。迄今尚未见刺参池塘养殖水体细菌数量变化的报道。鉴于秋、冬季节是养殖刺参易发病的时期, 笔者通过不同细菌计数方法研究刺参养殖环境中秋、冬季细菌数量的变化, 以期对刺参的健康管理和病害防控提供有益参考。

1 材料和方法

1.1 调查地点及采样时间

2008 年 9 月~2009 年 1 月, 每个月初采样, 通过平板涂布计数和荧光显微镜(Nikon E800)计数的方法, 对青岛胶南市室外海参养殖池塘水体进行了调查, 采样坐标 $35^{\circ}39'N, 119^{\circ}50'E$, 采样选两个池塘, 池塘长 400 m、宽 100 m、水深 1.8 m。

1.2 样品的采集

利用调查船驶到池塘中预先标记好的采样点, 按照《国家海洋调查规范》海洋生物调查中规定的方法, 使用击开式采水器(2.5 L)采集水体表层(距水面约 5 cm)、水体底层(距底表 5 cm)水样, 样品采集后(4 $^{\circ}C$ 保存)在 12 h 内处理。

1.3 细菌计数方法

1.3.1 可培养异养细菌总数

对水样进行梯度稀释, 取 0.1 ml 直接涂布于 TSB 海水培养基上, 28 $^{\circ}C$ 培养 2 d 计数, 选取平均菌落数在 30~300 之间的平板计数, 计数菌落形成单位数(Colony forming units, CFU)。

1.3.2 弧菌总数

对水样进行梯度稀释, 取 0.1 ml 直接涂布于 TCBS 弧菌培养基上, 28 $^{\circ}C$ 培养 2 d 计数, 计数方法与异养细菌计数方法相同。

1.3.3 总菌数(AODC 法)

水样用 2% 甲醛固定, 取 1 ml 固定后水样加入 100 μl 1% 吖啶橙染色 3 min, 过滤到孔径为 0.22 μm 、直径

为 25 mm 的去荧光聚碳酸酯滤膜上,用荧光显微镜计数,视野中发橙色或绿色荧光为菌体,随机计数 10 个视野,每个视野细菌数一般在 30~100 个为宜。

1.3.4 活菌数(DVC法)

水样中加入 0.002% 萘啶酮酸和 0.025% 酵母膏,置于黑暗条件下,25 ℃ 培养 6~8 h,然后加入 2% 甲醛固定。取 1 ml 固定水样加入 100 μ l 1% 吡啶橙染色 3 min,过滤到孔径为 0.22 μ m、直径为 25 mm 的去荧光聚碳酸酯滤膜上,用荧光显微镜计数,视野中长大、变粗、发橙红色荧光的菌体是活菌。

1.4 相关性分析

用 SPSS 公司 SPSS 13.0 统计软件中 Correlate 程序进行相关性分析, $P>0.05$ 表示相关性不显著, $P<0.05$ 表示相关性显著, $P<0.01$ 表示相关性极显著。

2 结果与分析

2.1 细菌计数结果

秋季刺参养殖塘细菌计数结果如表 1。各养殖塘 AODC 值为 $3.4\times 10^6\sim 2.1\times 10^7$ 个/ml,平均值为 8.9×10^6 个/ml。

表 1 秋、冬季室外刺参养殖塘浮游细菌数量

Table 1 The number of planktobacteria in *A. japonicus* culture outdoor ponds in autumn and winter

采样池塘及水层 Sampling pond No. and water layer	采样时间(年-月) Sampling year and month	总菌数(个/ml) Total number of planktobacteria (Cell/ml)	活菌数(个/ml) Total number of viable bacteria (Cell/ml)	异养细菌数(CFU/ml) Amount of heterotrophic bacteria (CFU/ml)	弧菌数(CFU/ml) Amount of <i>Vibrio</i> (CFU/ml)	活菌占总菌数的比例(%) Percentage of viable bacteria in total bacteria (%)	弧菌数占异养细菌比例(%) Percentage of <i>Vibrio</i> in heterotrophic bacteria(%)	异养细菌占总菌比例(%) Percentage of heterotrophic bacteria in total bacteria(%)
1号养殖塘表层 Surface water of Pond 1	2008-09	4.0×10^6	1.6×10^6	2.1×10^4	1.0×10^3	40.0	4.72	0.530
	2008-10	4.6×10^6	2.1×10^6	4.1×10^4	2.4×10^3	45.7	5.83	0.806
	2008-11	3.9×10^6	1.3×10^6	4.6×10^3	2.1×10^2	33.3	4.57	0.12
	2008-12	2.2×10^6	1.0×10^6	90	—	45.5	—	0.004 1
	2008-01	1.5×10^6	7.0×10^5	90	—	46.7	—	0.006 0
1号养殖塘底层 Bottom water of Pond 1	2008-02	1.9×10^6	9.0×10^5	1.3×10^2	—	47.4	—	0.006 8
	2008-09	9.0×10^6	3.4×10^6	4.7×10^4	2.2×10^3	37.8	4.71	0.519
	2008-10	1.7×10^7	4.2×10^6	1.4×10^5	5.3×10^3	24.7	3.87	8.060
	2008-11	9.5×10^6	3.5×10^6	1.5×10^4	3.9×10^2	36.8	2.60	0.158
	2008-12	6.4×10^6	2.5×10^6	1.5×10^3	243	39.1	16.5	0.023 0
2号养殖塘表层 Surface water of Pond 2	2008-01	4.3×10^6	2.0×10^6	104	—	46.5	—	0.002 4
	2008-02	7.0×10^6	3.1×10^6	9.6×10^2	—	44.3	—	0.013 7
	2008-09	5.0×10^6	2.2×10^6	5.2×10^4	2.1×10^3	44.0	4.01	1.050
	2008-10	5.3×10^6	2.7×10^6	4.8×10^4	2.9×10^3	50.9	5.99	0.913
	2008-11	3.4×10^6	1.0×10^6	4.2×10^3	7.9×10^2	29.4	18.1	0.124
2号养殖塘底层 Bottom water of Pond 2	2008-12	1.5×10^6	6.0×10^5	70	—	40.0	—	0.004 6
	2008-01	1.0×10^6	4.0×10^5	60	—	40.0	—	0.006 0
	2008-02	2.1×10^6	5.4×10^5	1.2×10^2	—	25.7	—	0.005 7
	2008-09	1.7×10^7	5.0×10^6	8.4×10^4	6.6×10^3	29.4	7.89	0.492
	2008-10	2.1×10^7	5.7×10^6	1.7×10^5	6.1×10^3	27.1	3.67	0.790
秋季平均值 Average in Autumn	2008-11	7.9×10^6	2.7×10^6	1.3×10^4	1.2×10^3	34.2	9.23	0.165
	2008-12	4.8×10^6	1.5×10^6	9.2×10^2	2.2×10^2	31.3	23.9	0.019 2
	2008-01	2.9×10^6	1.0×10^6	90	—	34.5	—	0.003 1
冬季平均值 Average in Winter	2008-02	4.0×10^6	1.8×10^6	7.6×10^2	1.6×10^2	45.0	21.1	0.019 0
	秋季平均值 Average in Autumn	8.9×10^6	2.9×10^6	5.3×10^4	2.6×10^3	36.1	6.32	1.150
冬季平均值 Average in Winter		3.3×10^6	1.3×10^6	4.1×10^2		37.9		0.009 5

注:—为未能检测到细菌

10^6 个/ml, AODC 值时空分布:10 月份 AODC 值高于 9、11 月份,同一时期水体底层 AODC 值稍高于水体表层的 AODC 值, DVC 值为 $1.0 \times 10^6 \sim 5.7 \times 10^6$ 个/ml, 平均值为 2.9×10^6 个/ml, DVC 值时空分布和 AODC 值基本相同。异养细菌的数量为 $4.2 \times 10^3 \sim 1.7 \times 10^5$ CFU/ml, 平均值为 5.3×10^4 CFU/ml, 弧菌的数量为 $2.1 \times 10^2 \sim 6.6 \times 10^3$ CFU/ml, 平均值为 2.6×10^3 CFU/ml, 总体上异养细菌数量和弧菌数量时空分布与 AODC 值、DVC 值相同, 其中弧菌数量与异养细菌数量平均比例为 6.32%。

冬季刺参养殖塘细菌计数结果如表 1。各养殖塘 AODC 值为 $1.0 \times 10^6 \sim 4.8 \times 10^6$ 个/ml, 平均值为 3.3×10^6 个/ml, AODC 值时空分布:1 月份 AODC 值达到最低, 同一时期水体底层 AODC 值高于表层。DVC 值为 $4.0 \times 10^5 \sim 3.1 \times 10^6$ 个/ml, 平均值为 1.3×10^6 个/ml, DVC 值时空分布和 AODC 值相同。冬季异养细菌数量比较低, 数值为 $60 \sim 1.5 \times 10^3$ CFU/ml, 平均值为 4.1×10^2 CFU/ml, 冬季 1 月份异养细菌数量显著减少达到最低值, 同一时期表层细菌数量显著低于底层 ($P < 0.05$)。冬季海参池塘弧菌很少能检测出, 只有在 12 月份和 2 月份水体底层能检测到弧菌, 弧菌数量与异养细菌数量比例为 16.5%、23.9%、21.1%。

以上结果表明, 秋、冬季节刺参养殖池塘细菌数量表现出明显的季节变化和空间变化, 冬季细菌数量显著低于秋季, 10 月份细菌数量达到最高值, 最低值出现在 1 月份, 同一时期表层细菌数量低于底层。秋季弧菌数量所占异养细菌数量平均比例为 6.32%, 冬季 12、2 月份水体表层和 1 月份水体均未能检测到弧菌, 在检测到的弧菌数量与异养细菌数量平均比例为 20.5%, 冬季弧菌所占异养细菌比例明显高于秋季。

2.2 不同计数方法的比较

从不同计数方法结果可以看出, 秋、冬季节各月份浮游细菌数量的变化规律基本一致: AODC 值与 DVC 值在 10^6 个/ml 左右, 体现的细菌季节性变化不显著, 可培养异养细菌和弧菌季节性变化特别显著, 异养细菌冬季比秋季低 3 个数量级, 12 月份水表和 1 月份未能检测到弧菌。

本实验 DVC/AODC 为 24.7%~46.7%, 而异养细菌(HPC)与 AODC 的比例为 0.003 1%~8.06%, DVC/AODC 远高于 HPC/AODC 值, 其数值与许 兵等(1992)几种细菌计数方法比较研究中的结果一致。

表 2 细菌数量不同测量方法之间的相关性

Table 2 Correlations between data obtained by different bacterial count methods

	总菌数(AODC法) Total number of planktobacteria (Detected by AODC)	活菌数(DVC法) Total number of viable bacteria (Detected by DVC)	异养细菌数(HPC法) Amount of heterotrophic bacteria (Detected by HPC)
	1.000	0.826**	0.667**
相关系数 <i>r</i> Correlation coefficient	0.826**	1.000	0.885**
	0.667**	0.885**	1.000

注: ** 表示相关性极显著 ($P < 0.01$)

Note: ** means highly significant correlation

对不同细菌计数方法所得的数据进行相关性分析, 各种计数方法获得的结果之间存在着显著的相关性, 异养细菌与活菌数的相关系数最高, 达到 0.885 ($P < 0.01$)。

3 讨论

长期以来, 人们多用平板培养的方法来测定样品中活菌的数量, 但是由于受到培养基种类、浓度及培养条件的限制, 大多数细菌不能在同一种培养基上生长, 自然界中可培养细菌占细菌总数尚不足 1% (张晓华 2007)。20 世纪 70 年代后, 荧光显微技术逐渐成熟, AODC、DVC 技术先后应用在水体环境中总细菌和活菌计数, 提高了海洋细菌检测结果的准确性, 减少了监测过程中的大量劳动, 缩短了检测时间 (赵海萍等 2007)。AODC 和 DVC 利用吡啶橙与细菌核酸结合激发荧光, 直接用荧光显微镜在波长 488 nm 对水环境中的总细菌和活细菌进行计数, 这种方法快速、准确、样品易于保存 (晏荣军等 2005), 用于细菌数量的测定能够更好的反

映样品中细菌实际总量,因此在水体细菌数量的测定上得到了推广。应用 AODC、DVC、HPC 对刺参养殖水体总菌和活菌计数结果可以看出,AODC 值与 DVC 值远远高于 HPC,秋季高两个数量级,冬季高 4 个数量级,具体数值与鲁巍等(2004)研究的结果一致。

秋、冬两季 AODC 值与 DVC 值达 10^6 个/ml,与其他一些论文所得相关海域的数值一致(赵三军等 2003;Jiao *et al.* 1995),冬季 HPC 值在 $60 \sim 1.5 \times 10^3$ CFU/ml,与张喆等(2008)等青岛近岸水体夏、冬季浮游病毒细菌分布特征及其与环境因子的关系中冬季 HPC 值($59 \sim 72$ CFU/ml)有一定的差异,可能由于采样地点和时间的不同造成。秋、冬两季影响刺参池塘细菌的环境因素有水温、无机营养盐、水体中浮游生物及其刺参的摄食活动情况。细菌的变化趋势和水温的变化一致,温度对大多数异养细菌的新陈代谢能力产生一定影响,是造成细菌季节变化的主要因素(姚雪梅等 2007)。秋季 9 月份水温 20°C 左右,刺参结束夏蛰开始活动摄食,10 月份水温 18°C 左右,在这个月份海参摄食、排泄活动活跃,池塘沉积物中有大量的刺参排泄物,为细菌的增长提供了营养物质,此时期是投饵的主要时段,未被摄食的残饵也促进了细菌的增殖,11 月份水温较低,海参开始冬眠,细菌代谢活动、繁殖能力较弱。冬季 12 月份水温在 6°C 左右,海参处于冬眠时期,低温条件抑制了细菌的生长和有机物质的分解,细菌的含量显著低于 11 月,1 月份水温 -2°C ,细菌数量达到最低,2 月份温度回升,细菌数量增加。

刺参养殖池塘池底沉积物中的有机质积累丰富,为细菌增殖提供大量的营养物质,底层水中细菌总量受底泥表层细菌影响较大,因此秋、冬两季表层细菌数量显著低于底层,与冯振飞等(2008)锯缘青蟹养殖环境中细菌数量和类群变化的结果一致,冬季底层水温高于表层,也是底层细菌数量高于表层的重要原因之一。

通过各种方法对秋、冬两季刺参池塘浮游细菌数量变化的研究可以发现,刺参养殖池塘细菌数量呈现出季节变化,AODC 与 DVC 季节性变化不明显,可培养细菌季节变化非常显著,冬季异养细菌总数要比秋季低 1~2 个数量级,弧菌数量在冬季很少检测到。各种计数方法之间存在着显著相关性,特别是异养细菌和活菌相关性,相关性系数最高达到 0.885($P < 0.01$)。冬季弧菌数量与异养细菌数量比例显著高于秋季,说明冬季刺参池塘弧菌有较高的耐受低温能力,可以推测这些耐受低温的弧菌是造成冬季刺参疾病高发的原因(Becker *et al.* 2004)。因此,加强冬季刺参养殖池塘弧菌数量的监测,并在弧菌数量大幅度增加时,采取措施降低弧菌数量,将会有效预防冬季刺参细菌性疾病的发生。

参 考 文 献

- 冯振飞,王国良,钱冬,陈红琴,邱庆连,朱文渊. 2008. 锯缘青蟹养殖环境中细菌类群及其数量分布. 水产科学, 27(11):564~577
- 许兵,徐怀恕. 1992. 水生细菌几种计数方法比较. 中国海洋大学学报, 22(3):43~47
- 乔旭东,唐学玺,肖慧,杨震,冯蕾. 2007. 渤海湾近岸海域的细菌数量分析. 中国海洋大学学报, 37(2):273~276
- 农业部渔业局. 2007. 中国渔业年鉴 2007. 北京:中国农业出版社,123~125
- 张春云,王印庚,荣小军. 2006. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 30(1):118~123
- 张喆,孟祥红,肖慧,谭海丽,腾海波,唐学玺. 2008. 青岛近岸水体夏冬浮游病毒、细菌分布特征及其与环境因子的关系. 武汉大学学报, 54(2):209~214
- 张晓华. 2007. 海洋微生物学. 青岛:中国海洋大学出版社,181~182
- 赵三军,肖天,岳海东. 2003. 秋季东、黄海异养细菌的分布特点. 海洋与湖沼, 34(3):296~305
- 赵海萍,李清雪,陶建华. 2007. 海洋细菌荧光计数方法及其应用. 河北工程大学学报, 24(1):57~60
- 姚雪梅,王红勇,邢少雷,何晓阳. 2007. 不同水温和水质理化因子对糙海参摄食、生长影响研究. 水产科学, 26(5):292~295
- 姜北,周遵春,邓欢,陈仲,徐晓虹,谭克非. 2008. 刺参养殖池塘水体中浮游病毒的丰度. 生态学报, 28(11):5 506~5 512
- 晏荣军,尹平河,林小涛. 2005. 荧光显微镜细菌计数方法研究. 海洋技术, 24(1):65~66
- 鲁巍,王云,张晓健. 2004. 饮用水中几种细菌计数方法的比较. 环境科学, 25(4):167~169
- 樊绘曾. 2001. 海参:海中人参——关于海参及其成分保健医疗功能的研究与开发. 中国海洋药物, 4:37~44
- Becker, P., Gillan, D., Lanterbecq, D., Jangoux, M., Rasolofonirina, R., Rakotovo, J., and Eeckhaut, I. 2004. The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothurioidea, Echinodermata). Aquac. 242:13~30
- Jiao, N. Z., and Xiao, T. 1995. Bacterial secondary production in Jiaozhou Bay. Chin. Sci. Bull. 40(9):829~832