

盐碱地养虾池塘养殖期间细菌组成分析

么宗利¹ 周凯¹ 罗璋² 来琦芳¹
王慧¹ 徐赞霞² 应成琦¹ 冯守明²

1. 中国水产科学研究院东海水产研究所/盐碱地渔业工程技术研究中心, 上海 200090;

2. 天津市水产养殖病害防治中心, 天津 300221

摘要 对天津地区盐碱地凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖池塘的细菌种类和垂直变化规律进行了研究。结果表明:池塘中细菌总数维持在 $2.4 \times 10^3 \sim 8.5 \times 10^5$ cfu/mL 之间,弧菌总数维持在 $1.75 \times 10^2 \sim 2.3 \times 10^5$ cfu/mL 之间,细菌总数和弧菌总数分别在8月份和9月份达到高峰。反硝化细菌总数维持在 $3.4 \times 10^4 \sim 2.8 \times 10^5$ cfu/mL 之间,硫酸盐还原菌总数维持在 $2.9 \times 10^2 \sim 7.5 \times 10^4$ cfu/mL 之间,氨化细菌总数维持在 $1.2 \times 10^2 \sim 7.0 \times 10^4$ cfu/mL 之间。养殖水体中共检测到13种细菌,养殖前期弧菌属、产碱菌属、棒杆菌属为优势菌群;养殖中期产碱菌属、弧菌属、气单胞菌属、肠杆菌科为优势菌群;养殖后期弧菌属、气单胞菌属、噬纤维菌属为优势菌群。通过多样性指数分析表明,7月份细菌多样性指数最高,9月份细菌多样性指数最低。

关键词 盐碱地; 养虾池塘; 细菌组成; 变化

中图分类号 S 917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)02-0225-04

我国有0.99亿hm²的盐碱地和0.31亿hm²的盐碱水域^[1],但是,因其碳酸盐碱度和pH值较高、离子比例失调、水化学组成复杂多变等因素,除极少部分低盐碱的水体开展了淡水鱼类养殖外,绝大部分长期处于闲置状态^[2-3]。20世纪90年代以来,中国水产科学研究院东海水产研究所利用水质改良技术在中国西北内陆咸水水域中养殖中国对虾获得成功^[4],开创了我国盐碱地对虾养殖的先河。盐碱水的排放,会造成周边土壤的次生盐碱化,因此盐碱地水产养殖通常采用封闭或半封闭模式。为了使盐碱地水产养殖可持续发展,有效维护盐碱地养殖水体健康的生态系统显得尤为重要。

利用盐碱地水体养殖凡纳滨对虾是合理利用有效水体的途径之一,目前已成为天津地区水产养殖的热点。随着凡纳滨对虾盐碱地养殖水体的不断老化,近几年病害频繁发生且日趋严重,给渔民造成了极大的经济损失,也严重制约了养虾业的持续健康发展。养殖池塘中细菌的群落组成对生态系的平衡和稳定起着关键作用^[5-6]。王文兴等^[7]、查广才等^[8]、吴建平^[9]分别对海水养虾水体、低盐度水养

虾水体、海水网箱养殖水体中细菌群落组成和数量动态变化进行过研究,但关于盐碱地养殖水体中细菌的动态变化至今未见报道。笔者以天津市大港区盐碱地养殖凡纳滨对虾池塘为代表,对盐碱地养虾水体细菌的数量分布和区系组成进行一个养殖周期的调查研究,旨在从细菌学角度正确评价盐碱地养虾池塘的水体环境,为盐碱地池塘养殖凡纳滨对虾的健康持续发展提供基础的理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

天津地区凡纳滨对虾的养殖期为5—10月,样品于2009年5—11月采集于天津大港区鱼苇管理所凡纳滨对虾养殖池塘,每月前往养殖池塘定点采样1次。设2个平行采样点,每个采样点分别取在离水面5、50、150 cm水样等体积混合,装入无菌三角瓶,2 h内带回实验室处理。

1.2 细菌培养及计数

取水样5 mL,置于装有45 mL无菌水的三角瓶中,充分震荡做成悬浮液,进行梯度稀释后接种于

收稿日期: 2010-04-30

基金项目: 国家级公益性科研院所基础科研基金(2007Z03)、公益性行业科研专项资金经费项目(200903001-0502)

么宗利,助理研究员,研究方向: 环境生物学。E-mail: zlyao@126.com

通讯作者: 来琦芳,研究员,研究方向: 养殖水环境的改良与调控。E-mail: qifanglai@163.com

相应的培养基中。异养细菌和弧菌的计数采用平板倾注法,28 ℃恒温培养 72 h 后计数,氨化细菌、反硝化细菌和硫酸还原菌等特殊生理类群采用 MPN 法计数,28 ℃恒温培养 5~7 d 后计数^[10]。

1.3 细菌分离和鉴定

以平板涂布法分离细菌,从平板培养基上随机挑选菌落,划线分纯后,参照文献[11-13]鉴定至属。同时,结合梅里埃细菌鉴定系统鉴定的结果综合判定。

1.4 细菌多样性分析

根据生态学原理,按属的水平来分析养虾池塘中细菌多样性,分别用 Shannon-Wiener 多样性指数(H)、丰度(D)和均匀度(J)^[14]的指数值表示。计算公式如下:

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \log_2 P_i$$

表 1 盐碱地养虾池塘中细菌群落组成

Table 1 Bacterial flora composition in shrimp-feeding saline-alkaline water

菌群 Bacteril flora	不同月份养殖水体菌群的比例/% The proportion of microflora in water at different time						
	5 月 May	6 月 June	7 月 July	8 月 Aug.	9 月 Sep.	10 月 Oct.	11 月 Nov.
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	—	—	2.33	—	—	—	—
弧菌属 <i>Vibrio</i>	9.52	19.51	14.00	19.57	37.84	17.39	2.17
肠杆菌科 <i>Enterobacteriaceae</i>	7.14	14.63	16.30	26.09	16.22	10.87	4.35
气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	14.30	4.88	11.60	4.35	2.70	19.57	13.00
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	9.52	4.88	6.98	10.87	5.41	8.70	8.70
黄单胞菌属 <i>Xanthomonas</i>	—	—	4.65	—	—	—	6.52
噬纤维菌属 <i>Cytophage</i>	—	—	2.33	4.35	10.81	21.74	17.40
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	7.14	4.88	4.65	2.17	—	—	—
产碱菌属 <i>Alcaligenes</i>	23.80	29.27	14.00	15.22	16.22	6.52	8.70
棒杆菌属 <i>Corynebacterium</i>	16.70	14.63	6.98	4.35	—	—	8.7
黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	—	—	—	—	—	—	13.00
微球菌属 <i>Micrococcus</i>	—	—	4.65	—	—	2.17	4.35
其他 Others	11.90	7.32	11.60	13.04	10.81	13.04	13.00

2.2 盐碱地养虾池细菌多样性的变化

从表 2 可以看出,随着时间的推移,细菌的多样性指数和丰度值呈现先升高后降低的趋势,到 7 月

$$D = (S-1)/ \log_2 N$$
$$J = H/\log_2 S$$

式中, P_i 为*i*种的个数与样品中总个数的比值, S 为采样点中样品的总种类数, N 为样品中细菌总数。

2 结果与分析

2.1 盐碱地养虾池塘细菌组成的变化

从盐碱地养虾池塘中共分离出 301 株细菌,经鉴定分别属于 1 个科和 12 个属。随着养殖季节的变化,水体中细菌组成发生较大的变化。养殖前期弧菌属、产碱菌属、棒杆菌属为优势菌群;养殖中期,产碱菌属、弧菌属、气单胞菌、肠杆菌科为优势菌群;养殖后期弧菌属、气单胞菌、噬纤维菌属为优势菌群,详见表 1。

份多样性指数和丰度值最高,多样性指数达到了 3.35,丰度达到了 2.03;9 月份多样性指数最低,为 2.44,说明 7 月份细菌群落的稳定性最高。

表 2 盐碱地养虾池塘不同月份细菌多样性参数

Table 2 Changes of bacteria diversity of shrimp-feeding saline-alkaline water from May to November

细菌多样性 Bacteria diversity	不同月份细菌多样性 Bacteria diversity in difference months						
	5 月 May	6 月 June	7 月 July	8 月 Aug.	9 月 Sep.	10 月 Oct.	11 月 Nov.
多样性指数 Diversity index	2.88	2.70	3.35	2.82	2.44	2.79	3.28
丰度 Abundance index	1.30	1.10	2.03	1.45	1.15	1.27	1.81
均匀度 Uniformity index	0.96	0.90	0.93	0.89	0.87	0.93	0.95

2.2 盐碱地养虾池塘细菌总数、弧菌总数的变化

盐碱地养虾池塘细菌总数、弧菌总数的变化如图 1 所示,整个养殖周期中细菌总数和弧菌总数都呈先升高后降低的趋势,异养细菌的数量波动在 $2.4 \times 10^3 \sim 8.5 \times 10^5$ cfu/mL 之间,弧菌总数的数量波动在 $1.75 \times 10^3 \sim 2.3 \times 10^5$ cfu/mL 之间,11 月份

异养细菌总数和弧菌总数分别达到最低值,8 月份异养细菌总数和弧菌总数分别达到最高。

2.3 盐碱地养虾池塘反硝化细菌、氨化细菌、硫酸盐还原菌的变化

盐碱地养虾池塘反硝化细菌、氨化细菌、硫酸盐还原菌的数量变化如图 2 所示,整个养殖周期中反

硝化细菌的数量波动较大,波动范围在 $3.4 \times 10^4 \sim 2.8 \times 10^5$ cfu/mL 之间,出现 2 个峰值,总数于 9 月份达到最高。氨化细菌、硫酸盐还原菌的数量变化呈现先升高后降低的趋势,氨化细菌的波动范围在 $1.2 \times 10^2 \sim 7.0 \times 10^4$ cfu/mL 之间,硫酸盐还原菌的波动范围在 $2.9 \times 10^2 \sim 7.5 \times 10^4$ cfu/mL 之间,都于 10 月份达到最高值。

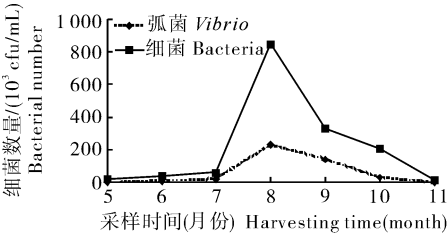


图 1 细菌总数、弧菌总数的周年变化

Fig. 1 Annual variation of the numbers of the amount of bacteria and *Vibrio*

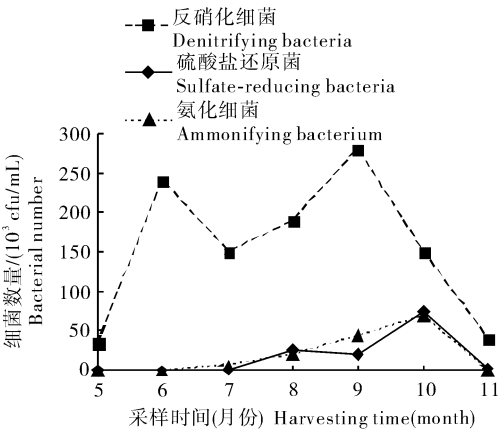


图 2 反硝化细菌、氨化细菌、硫酸盐还原菌总数的周年变化

Fig. 2 Annual variation of the numbers of the amount of denitrifying bacteria, sulfate-reducing bacteria, ammonifying bacterium

3 讨论

通过对异养细菌菌群组成的分析,发现在不同的养殖阶段弧菌属、产碱菌属、棒杆菌属、气单胞菌、肠杆菌科、噬纤维菌属都能成为盐碱地养虾池塘中的优势菌群。弧菌和气单胞菌是水产动物的条件致病菌,具有较强的利用能量能力,当水体富营养化后,弧菌和气单胞菌就会优先利用有机物进行繁殖,从而抑制其他细菌的繁殖,使水体中物质循环受到阻碍。这两者的大量出现,说明养殖动物存在暴发疾病的危险性。肠杆菌科是淡水水体中的常见菌群^[15-16],而噬纤维菌属是海洋中的重要细菌类群,可

占细菌总量的 10%~15%^[15-16],这两者都能成为盐碱地养虾池塘中的优势菌群,说明盐碱地养殖水体具有淡水、海水的双重特性。

养殖池塘是人工控制的小生态系统,各种理化因子、生物因子关系十分复杂,异养细菌与池塘中的理化因子有密切的联系,其数量分布和种类组成受水体中有机质含量、温度、营养盐浓度等多种因素的影响^[5,17-18]。本试验结果表明,随着养殖活动的进行,异养细菌总数和弧菌总数于 8 月份达到高峰,这是由于对虾排泄物、残饵在养殖池塘不断积累和水温升高共同影响的结果。结合表 1、表 2 可以看出,9 月份弧菌总数在异养细菌总数所占比例达到最高,为 37.84%,多样性指数达到最低,为 2.44,这说明在 9 月份养殖水体生态系统最不稳定,这也与生产实际中 9 月份常常暴发虾病相吻合。

反硝化细菌是一类兼性厌氧细菌,其主要生理功能是将硝酸盐还原为亚硝酸盐、氨(NH₃)或者氮气,所以反硝化细菌的浓度可指示盐碱地水中硝酸盐的浓度^[19]。氨化细菌和硫酸盐还原菌分别利用养殖水体中的含氮有机物质、硫酸盐释放出 NH₃和 H₂S,对凡纳滨对虾造成危害。本试验结果表明,随着养殖活动的进行,反硝化细菌、氨化细菌和硫酸盐还原菌的数量都有一定程度的升高,分别于 9 月份和 10 月份达到最高值(图 2),并且在 5 月、6 月、7 月、11 月,出现反硝化细菌总数超过异养细菌总数的情况,这可能是对 2 种菌所采用的计数方法不同而造成的系统误差,一般 MPN 法会比平板菌落计数法的结果高 1~2 个数量级^[20]。反硝化细菌、氨化细菌和硫酸盐还原菌的长期出现且随着养殖活动进行呈升高趋势的结果表明,在养殖期间养殖活动对水体造成的影响超出了水体的自净能力,养殖水体受污染情况逐渐加重。如何调整合理的养殖容量和对养殖环境重新布局,调节养殖水体生态平衡,创建切实可行的盐碱地池塘生态养殖模式还有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] JIA H X. Soil salinization control and sustainable agriculture in north-west endoland region of China[J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 2003, 23(6): 1063-1068.
[2] 申屠青春,董双林,赵文,等. 盐度、碱度对浮游生物和水化因子的影响[J]. 应用生态学报, 2000, 11(3): 449-454.
[3] 王慧,来琦芳,房文红. 沧州运东地区盐碱水资源对开展渔业的影响[J]. 河北渔业, 2003, 131(5): 16-18.

[4] 王慧,耿隆坤,房文红,等. 中国对虾往西北内陆咸水水域移植的生产性试养研究[J]. 海洋渔业,1997(1):9-12.

[5] 李烁寒,李卓佳,杨莺莺,等. 秋冬季凡纳滨对虾养殖池塘细菌的数量动态[J]. 暨南大学学报:自然科学版,2009,30(3):343-348.

[6] 李秋芬,曲克明,陈碧鹏,等. 老化虾池生态系中几类主要细菌的季节变化特征[J]. 海洋水产研究,2002,23(2):12-18.

[7] 王文兴. 青岛太平角和即墨丰城沿海对虾养殖场异养菌群和条件致病菌的研究[J]. 黄渤海海洋,1983,1(2):133-137.

[8] 查广才,周昌清,麦雄伟,等. 凡纳滨对虾低盐度高产虾池环境微生物生态研究[J]. 生态科学,2006,25(2):231-235.

[9] 吴建平,蔡创华,周毅频,等. 大亚湾网箱养殖水体弧菌种类组成及变化[J]. 湛江海洋大学学报,2006,26(4):42-48.

[10] 国家海洋局. 海洋调查规范[M]. 北京:海洋出版社,1991.

[11] OLIVER J D. Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria[J]. Deep-Sea Res,1982,29(6):795-798.

[12] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京:科学出版社,1978.

[13] KRIEG N R,HOIT J G. Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. 9th ed. Baltimore:Williansand Wilkins Company, 1994:516-548.

[14] WILHM J L. Use of biomass units in Shannon's formula[J]. Ecology,1968,49(1):153-156.

[15] 周金敏,吴志新,曾令兵,等. 黄颡鱼肠道及养殖水体中菌群的分析[J]. 华中农业大学学报,2010,20(5):613-617.

[16] 邱宏端,徐娜楠,朱航,等. 耐盐红螺菌科细菌对淡水鱼池水质及细菌类群的影响[J]. 水产学报,2002,26(3):231-236.

[17] BOWMAN J P,McCAMMON S A,BROWN M V,et al. Diversityand association of psychrophilic bacteria in Atlantic sea ice [J]. Appl Environ Microbiol,1997,63:3068-3078.

[18] RAVENSCHLG K,SAHM K,AMANN R. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine Arctic sediments (Svalbard)[J]. Appl Environ Microbiology,2001,65:387-395.

[19] 马继波,董巧香,黄长江. 粤东大规模海水增养殖区柘林湾浮游细菌的时空分布[J]. 生态学报,2007,27(2):477-485.

[20] 林小涛,晏荣军,黄长江. 粤东大规模养殖区柘林湾细菌的分布与环境因素关系[J]. 海洋学报,2006,28(3):167-172.

[21] 史君贤,陈忠元,胡锡钢. 浙江省海岛沿岸水域微生物生态分布[J]. 东海海洋,1996,14(2):35-43.

[22] 许兵. 水生细菌几种计数方法的比较[J]. 青岛海洋大学学报,1992,122(3):43-47.

Bacterial flora composition and its dynamics in shrimp pond during the culture period of *Litopenaeus vannamei*

YAO Zong-li¹ ZHOU Kai¹ LUO Zhang² LAI Qi-fang¹
WANG Hui¹ XU Yun-xia² YING Cheng-qi¹ FENG Shou-ming²

1. *East China Sea Fisheries Research Institute/Center of Engineering and Technique on Saline-alkaline District Fisheries,Shanghai 200090,China;*
2. *Tianjin Research Centers of Aquatic Animals Disease ,Tianjin 300221,China*

Abstract The species and vertical movement pattern of bacteria was studied in shrimp-cultured saline-alkaline pond in Tianjin. The results were as following:the amount of bacteria remained between 2.4×10^3 and 8.5×10^5 cfu/mL, the amount of *Vibrio* remained between 1.75×10^2 and 2.3×10^5 cfu/mL,the amount of bacteria and *Vibrio* got to the peak in August and September,respectively. The amount of denitrifying bacteria remained between 3.4×10^4 and 2.8×10^5 cfu/mL,the amount of sulfate-reducing bacteria remained between 2.9×10^2 and 7.5×10^4 cfu/mL,and the amount of ammonifying bacterium remained between 1.2×10^2 and 7.0×10^4 cfu/mL. There were 13 kinds of bacteria were examined in the shrimp-cultured pond. *Vibrio*, *Alcaligenes* and *Corynebacterium* were the mainly species in the earlier period,and *Alcaligenes*,*Vibrio*, *Aeromonas* and *Enterobacteriaceae* were the mainly species in the intermediate period,and *Vibrion*, *Aeromonas* and *Cytophaga* were the mainly species in the later period. The bacteria diversity index were highest in July and lowest in September.

Key words saline-alkaline area; shrimp-feeding pond; species of bacteria; change