

应用芽孢杆菌调控虾池微生态的初步研究

李卓佳, 郭志勋, 冯 娟, 张汉华, 杨莺莺

(中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要: 监测了施用芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 后的养虾池水体和底泥总异养细菌和弧菌数量以及水体浮游微藻数量的变化, 分析了应用芽孢杆菌对养殖环境微生态的影响。结果表明, 芽孢杆菌对虾池水体的异养细菌和弧菌生长和繁殖具有一定的抑制作用, 对底泥异养菌和弧菌具有一定的促进作用, 能促进浮游微藻的平稳繁殖。芽孢杆菌通过这些作用抑制了水体中条件致病菌的繁殖, 促进了虾池物质和能量的循环, 有利于虾池的自我净化。

关键词: 芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.); 异养细菌; 弧菌; 浮游微藻

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096 (2006) 11-0028-04

同自然生态系统相似, 半人工控制的虾池养殖生态系统也是由生产者、消费者和分解者组成。细菌尤其是异养细菌是生态系统中的分解者, 在物质和能量循环中起着关键的作用。由于生物种类性状的差异, 作为分解者的异养细菌在养殖环境中同时扮演着条件致病菌和有益菌的角色。无论是条件致病菌还是有益菌由于其位于同一生态龛, 相互之间关系是相互影响、相互制约。在虾病肆虐的今天, 控制条件致病菌的数量、改良水质是养虾成功的重要保证之一。传统的控制方法主要采取抗生素、化学物质等手段杀灭水中的细菌, 无选择地减少分解者生态位上的微生物种类和数量, 可能导致抗药性的细菌大量繁殖, 结果是使整个微生态系统变得脆弱和不稳定, 使整个生态系统处于崩溃的边缘。浮游微藻是养殖生态系统初级生产者, 浮游微藻的平稳繁殖生长为对虾的健康生长营造良好的生态环境。由于养殖过程水体营养水平变动及对虾食性转变等影响, 浮游微藻的繁殖往往呈现前期缓慢、数量少, 中后期快速、数量增多的趋势。养殖中后期一旦控制不妥, 浮游微藻细胞容易老化、死亡, 发生“倒藻”, 引起水质恶化。因此, 合理控制虾池生态系统中细菌和浮游微藻的生长, 对于维持虾池生态系统的稳定性和减少环境污染意义重大。

芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 能够快速降解、转化有机物^[1], 是目前常用于调节水质的一类有益微生物^[2-5], 但对其在养殖环境中的调控机制却鲜有研究。作者通

过对虾池水体和底泥的异养细菌和弧菌数量、水体浮游微藻数量的检测, 对应用芽孢杆菌调控虾池微生态的机制进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 虾塘管理

在放苗前两周, 池内注水 30~40 cm, 用 100 mg/L 漂白粉、300 mg/L 生石灰进行消毒, 放苗前 7~10 d, 水深加至 100 cm, 并用 1.5 mg/L 藻类生长素, 30 mg/L 茶麸肥水。放苗前 2~3 d, 3 号、4 号池作为试验池, 施用 1.5 mg/L 的芽孢杆菌 (中国水产科学研究院南海水产研究所产品), 5 号池作为对照池。虾苗投放密度为每亩 3.5 万尾。放苗后, 每隔 2~3 周, 试验池补充施放芽孢杆菌。其它管理措施与对照池相同。

1.2 细菌采样与计数

1.2.1 水体

用容量为 3 L 的有机玻璃采水器在虾塘的进水口

收稿日期: 2003-09-26; 修回日期: 2003-12-18

基金项目: 广东省科技创新百项工程项目 (2KBO555401N); 科技部公益性基础研究项目 (2001-183); 科技部科研院所开发研究专项资金项目 (2002-01); 中国水产科学研究院重点资助项目 (99-01-02)

作者简介: 李卓佳 (1956-), 女, 广东揭阳人, 研究员, 学士, 从事养殖技术、微生物应用技术、养殖生态环境改良与修复研究, 电话: 020-84184733, E-mail: zhuojiali609@163.com

和出水口处采水,然后用灭菌的三角烧瓶各收集水样 200 mL,加吐温 80 至终质量浓度 5 mg/L,摇床震荡 20~30 min,10 倍系列稀释,分别涂布普通海水培养基 2216E (5 g 蛋白胨、1 g 酵母粉、0.1 g 磷酸高铁、1000 mL 陈海水)和弧菌选择性培养基 TCBS (广东微生物研究所生产)平板,28 °C 培养 7 d 后计数,计算出每毫升水中的总异养菌数和弧菌数。采样间隔为 2 周。

1.2.2 底泥

用采泥器在虾塘定点采底泥,用无菌的药匙剥去表层约 5 mm,无菌收集底泥,带回实验室,采样时间与池水相同。准确称取 5 g 底泥,溶于装有 45 mL 无菌海水的三角瓶中,加吐温 80 至终质量浓度 5 mg/L,摇床震荡 20~30 min,10 倍系列稀释,分别涂布普通海水培养基 2216E 和弧菌选择性培养基 TCBS 平板,28 °C 培养 7 d 后计数,计算出每克水中的总异养菌数和弧菌数。采样间隔为 2 周。

1.3 浮游微藻的采样与检测

直接采集水样和浮游植物网拖网(垂直拖)采样,每池各采 1 个样。水样体积为 500~1 000 mL。样品现场用 5%甲醛固定,带回实验室,静止沉淀 24 h,收集浓缩液,用高倍数显微镜进行种类鉴定和数量分析。定量计数用计数框,整片分类和计数,取其平均生物量,以每毫升多少个植物细胞数表示 (个/mL)。采样间隔为 1 周。

2 结果与分析

2.1 虾池水体的总异养菌数和弧菌数

无论是对照池还是试验池,虾池水体中的总异养菌数和弧菌数随养殖时间的延长呈增高趋势(图 1)。2 个试验池的总异养菌数增长迅速,到第二周时分别由试验开始时的 3.1×10^3 CFU/mL 和 3.4×10^4 CFU/mL 增长到 1.4×10^5 CFU/mL 和 4.1×10^5 CFU/mL,在试验中后期最高值达到 5.8×10^5 CFU/mL 和 7.7×10^5 CFU/mL,但在试验结束时,却有下降的趋势。对照池总异养菌数表现出相似的增长趋势,其 3 个值分别为 5.3×10^4 , 1.5×10^5 和 8.1×10^5 CFU/mL,在试验的大部分时间里,对照池的总异养菌数高于试验池。

同总异养菌数的增长相比,弧菌数的增长相对较慢(图 1),进入 7 月后,2 个试验池的弧菌数才分别由最初的 2.5×10^2 CFU/mL 和 2×10^2 CFU/mL 增长一个数量级,达到 5.4×10^3 CFU/mL 和 1.8×10^3 CFU/mL;而对照池弧菌数的增长比试验池快,在 6

月中旬已由 1.5×10^2 CFU/mL 增长到 1.1×10^3 CFU/mL,到试验结束时已达到 1.4×10^4 CFU/mL,比试验池的弧菌数高出一个数量级。

2.2 虾池底泥的总异养菌数和弧菌数

如表 1 所示,对照池底泥总异养菌数最高值出现在养殖初期,为 42×10^6 CFU/g,随养殖时间的延长呈降低的趋势,在试验结束时比开始时低一个数量级,为 1.6×10^6 CFU/g;试验池的总异养菌数的变化趋势同对照池不同,呈现先增高而后降低、尔后再升高的趋势。3 号池最低值出现在养殖初期,为 0.74×10^6 CFU/g,最高值出现在试验结束时,为 14×10^6 CFU/g;4 号池总异养菌数的变化比 3 号池迟一个采样周期。

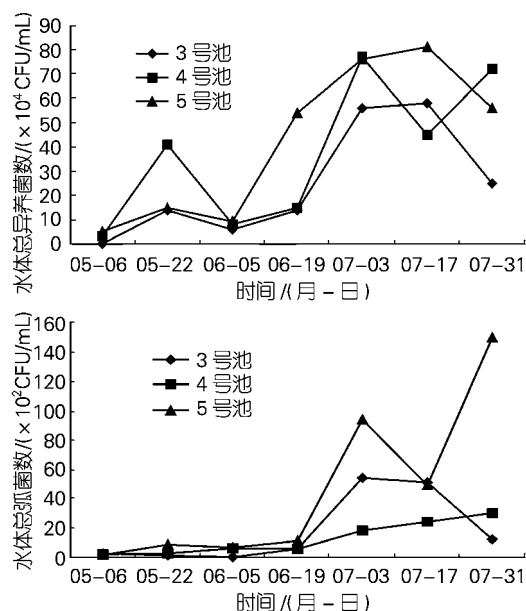


图 1 虾池水体总异养菌数和弧菌数

Fig.1 The densities of heterotrophic bacteria and *Vibrio* in the shrimp pond water

如表 1 所示,3 号池弧菌数量的变化趋势类似于总异养菌数,最高值为 97×10^3 CFU/g,4 号池则在开始和结束时高,中间低,最高值为 120×10^3 CFU/g;而对照池弧菌数量相对比较稳定,但试验结束时出现最低值,为 2.8×10^3 CFU/g;低于试验池一个到两个数量级。

2.3 虾池水体的浮游微藻数量

如图 2 所示,3 个池塘水体中的浮游微藻增长总趋势是相似的,在养殖前期的 1 个月内,浮游微藻细胞数基本维持较低的数量水平,40 d 以后快速增长。但施放芽孢杆菌的 3 号池和 4 号池的浮游微藻细胞量

基本呈现平稳、逐渐增长的趋势，而对照池（5 号池）减少。
的浮游微藻细胞量却呈现波浪式变动，养殖后期反而

表 1 虾池底泥总异养菌数和总弧菌数

Tab.1 The numbers of the heterotrophic bacteria and the *Vibrio* in the sediment of the shrimp pond

采样时间 (月-日)	总异养菌数 ($\times 10^6$ CFU/g)			总弧菌数 ($\times 10^3$ CFU/g)		
	3 号池	4 号池	5 号池	3 号池	4 号池	5 号池
05-06	0.74	7.8	42	0	25	20
05-22	12	6.8	4.9	97	7	20
06-05	7	13	8	7.5	1	50
06-19	2.8	19	12	1.4	71	22
07-03	3.5	15	1.5	/	/	/
07-17	3.4	4.5	3.9	44	120	22
07-31	14	9.5	1.6	72	100	2.8

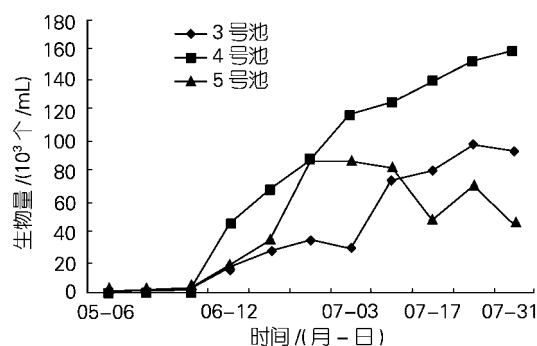


图 2 虾池水体浮游微藻细胞数变动状况

Fig.2 The changing trend of the phytoplankton number in the water of shrimp pond

3 讨论

芽孢杆菌是一类革兰氏阳性细菌，其中一些种类可分泌胞外杆菌肽、大环内脂、环肽、类噬菌体颗粒等十几种抗菌活性物质^[6]，抗菌谱广泛，对多种病原真菌、弧菌以及其它细菌的生长均有较强的抑制作用^[7]。在本试验中，施放了芽孢杆菌的 2 个试验虾池水体中总异养菌数在总体上都低于对照池，而弧菌数量在试验后期更是显著比对照池低。从弧菌与异养菌总数的比例来看，对照池由开始时的 0.28% 增加到结束时的 2.68%，呈增加趋势，实验池由开始时的 8.06% 和 0.59% 降低到结束时的 0.48% 和 0.42%，呈降低趋势（表 2）。这说明芽孢杆菌对虾池水中异养菌的生长有一定的抑制作用，对对虾养殖中最重要的细菌性

病原——弧菌^[8,9]的抑制作用更加显著。

从底泥总异养菌数和弧菌数的检测结果看，养殖后期试验池都高于对照池。这说明芽孢杆菌对底泥异养细菌和弧菌的影响与对水体的影响相反，具有促进其繁殖生长的作用，并且对弧菌的影响超过总异养菌（表 2）。这可能是由于泥样是从底泥表层以下 5mm 处所采集，此处的微生物的生长受底泥表层微生物的影响。养虾池的长年使用导致残饵和粪便在底泥表面不断积累，营养的增长促进了表层微生物的生长，从而消耗了大量的氧气，使底泥的下层供氧受限，影响了好氧的异养细菌和弧菌的繁殖生长。芽孢杆菌的使用使其在底泥表层形成优势，通过营养竞争和/或代谢物的分泌抑制了水体和底泥表层异养细菌的生长，改善了底质环境，使底泥下层的溶氧增高^[2, 3]，有利于底泥下层异养菌的生长。而由于表层底泥对芽孢杆菌代谢物的吸收、中和或稀释，缓解了芽孢杆菌对异养菌和弧菌生长的抑制作用。因此，芽孢杆菌的使用促进了底泥下层需氧异养细菌（包括弧菌）的生长，加快了底泥物质和能量的代谢和再循环，有利于养殖环境的自我净化。同时，有机物的降解、转化，促进了可被藻类利用的可溶性营养物质的释放，使养殖水体溶解有均衡、适宜的营养元素，使浮游微藻平稳繁殖，避免浮游微藻的爆发性繁殖及快速死亡，保持养殖水域良好微生态的稳定。

4 小结

在池塘养虾过程中使用芽孢杆菌，对水体异养细菌、底泥异养细菌、水体浮游微藻有不同的作用。对水体异养细菌的生长有一定抑制作用，尤其能够明显抑制弧菌类群的繁殖生长，在虾病预防中具有重要的

表 2 虾池水体和虾池底泥弧菌数与总异养菌数的比值

Tab.2 The ratio of the *Vibrio* to heterotrophic bacteria number in the shrimp pond water and sediment

采样时间 (月-日)	弧菌数与总异养菌数的比值 (%)					
	虾池水体			虾池底泥		
	3 号池	4 号池	5 号池	3 号池	4 号池	5 号池
05-06	8.06	0.59	0.28	0	0.32	0.05
05-22	0.07	0.06	0.57	0.81	0.10	0.41
06-05	0	0.72	0.69	0.11	0.01	0.63
06-19	0.4	0.37	0.20	0.05	0.37	0.18
07-03	0.96	0.23	1.24	/	/	/
07-17	0.88	0.53	0.61	1.29	2.67	0.56
07-31	0.48	0.42	2.68	0.51	1.05	0.18

应用价值；对底泥异养细菌的生长和繁殖具有促进作用，加速了虾池的物质和能量代谢与循环，有利于虾池环境的自我净化；对浮游微藻的平稳繁殖有促进作用，有助于营造和稳定虾池的良好微生态。

参考文献：

[1] 汪锦邦. 增菌素的开发应用[J]. 饲料研究, 1999, 5 :15-17.
 [2] 李卓佳, 张庆, 陈康德. 有益微生物改善养殖生态研究 I : 复合微生物分解有机底泥及对鱼类的促生长效应[J]. 湛江海洋大学学报, 1998, 18 (1) : 5-8.
 [3] 张庆, 李卓佳, 陈康德. 复合微生物对养殖水体生态因子的影响[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8 (1) : 43-47.
 [4] 吕军仪, 孙燕燕, 李秉记, 等. 有益微生物在大海马健康养殖中的应用研究[J]. 中国水产科学, 2003, 10 (1) : 46-50.

[5] 仇丽. 枯草芽孢杆菌在养殖中的应用[J]. 渔业现代化, 2002, 4 : 5.
 [6] 刘进元. 枯草芽孢杆菌 LCIIB 抗菌蛋白的纯化及性质[J]. 生物学通报, 1992, 8 (3) : 266-270.
 [7] 田黎, 李光友. 海洋生境芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) 的培养条件及产生的胞外抗菌蛋白[J]. 海洋学报, 2001, 23 (4) : 87-92.
 [8] 俞开康, 战文斌, 周丽, 等. 我国沿海养殖对虾的疾病及研究现状[J]. 中山大学学报, 2000(增刊) : 1-5.
 [9] Vandenberghe J, Li Y, Verdonck L, et al. *Vibrios* associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries [J]. *Aquaculture*, 1998, 169:121-132.

Primary study on mediating micro-ecological environment with *Bacillus* sp. in shrimp pond

LI Zhuo-jia, GUO Zhi-xun, FENG Juan, ZHANG Han-hua, YANG Ying-ying

(South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Received: Sep., 26, 2003

Key words: *Bacillus* sp.; heterotrophic bacteria; *Vibrio*; phytoplankton

Abstract : The influence of *Bacillus* sp. utilization on a micro-ecological environment in shrimp pond was studied primarily by detecting the changes of phytoplankton, heterotrophic bacteria and *Vibrio* in the pond water and sediment. The results showed that *Bacillus* sp. could inhibit the growths of heterotrophic bacteria and *Vibrio* in the pond water while it enhances those of the heterotrophic bacteria and *Vibrio* in the sediment to a certain extent, and promotes the consistent reproduction of the phytoplankton. So, the utilization of the *Bacillus* sp. could reduce the opportunistic pathogens and promote the cycles of the material and energy, which would be favorable to the self-cleaning of the shrimp pond. (本文编辑: 刘珊珊)