

文章编号: 1000-0615(2005)05-0682-06

杭州湾南岸滩涂贝类养殖环境中微生物数量分布及其类群

王美珍¹, 王国良², 薛超波³, 董志国⁴, 潘雪央¹

(1. 慈溪市水产技术推广中心, 浙江 慈溪 315300; 2. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211;
3. 舟山市疾病预防控制中心, 浙江 舟山 316000; 4. 淮海工学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 研究了杭州湾南岸慈溪滩涂贝类养殖区的微生物在水平、垂直及季节变化的分布规律。结果表明: 3 个采样区的异养细菌的数量变动在 $1.62 \times 10^3 \sim 6.62 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间, 平均值为 $4.28 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 细菌数量在春季和夏季的数量偏低, 10 月份异养细菌的数量开始上升, 并于 11 月份达到最高, 表层高于底层; 其中以革兰氏阳性菌比例最高, 为主要的优势种, 具有陆源性特点。各站位反硝化细菌、氨化细菌和硫酸还原菌的检出率均为 100%, 都维持在一个较高的水平, 整体上数量具有表层高于底层的特点, 3 种微生物在数量上的季节演替与异养细菌具有类似的结果, 均为 10-11 月达到最大。

关键词: 滩涂; 异养细菌; 反硝化细菌; 氨化细菌; 硫化细菌; 数量分布

中图分类号: S931 文献标识码: A

Microorganism population quantitative variation and its distribution in shellfish culture shoal of south bank in Hangzhou Bay

WANG Mei zhen¹, WANG Guo-liang², XUE Chao-bo³, DONG Zhi-guo⁴, PAN Xue-yang¹

(1. Cixi Fisheries Institute, Cixi 315300, China;
2. Faculty of Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;
3. Zhoushan Center for Disease and Prevention Control, Zhoushan 316004, China;
4. Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: In the paper, the quantitative variation and distribution of microorganism population in shellfish culture shoal of south bank in Hangzhou Bay was studied. The samples were collected from 3 different sites in Hangzhou Bay. The results indicate that heterotrophic bacteria variation is from 1.62×10^3 to $6.62 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, mean $4.28 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, and there is a low quantity in spring and summer, rising in October and reaching the peak in November in the sample sites. About bacteria populations, dominant species is gram positive bacteria, which is characterized with an obvious origin from land. Denitrifying bacteria, ammonifying bacteria and sulfate reduction bacteria all were found in these sites and maintain a high level although there was a difference in quantity between bottom and surface layers in the shoal, surface layer being higher than bottom.

Key words: shoal; heterotrophic bacteria; denitrifying bacteria; ammonifying bacteria; sulfate reduction bacteria; quantitative distribution

位于浙江省慈溪市境内的杭州湾南岸的滩涂, 是我国长江口以南最大的连片淤积型滩涂, 吴松高程零米以上面积约 $4.5 \times 10^4 \text{ hm}^2$, 岸线全长 82.3 km, 其涂质类型有较强的代表性。近年来,

已有 10% 的滩涂面积开发为贝类养殖, 发展势头强劲。养殖面积随着滩涂的淤积而不断扩大, 养殖产品如泥螺 (*Bullacta exarata*)、彩虹明樱蛤 (*Moerella iridescens*) 等在省内外市场及国外市场

收稿日期: 2004 12 20

资助项目: 宁波市科技攻关项目 (01N40100-74); 慈溪市科技攻关项目 (CN2003015); 宁波海洋与渔业科技项目 (200210)

作者简介: 王美珍 (1964-), 女, 浙江浦江人, 高级工程师, 主要从事水产养殖与应用生态学研究。Tel: 0574-63976772, E-mail: cxwmz

均有一定的知名度。但因该地区贝类养殖起步较晚, 养殖技术不规范, 不仅养殖效益低下, 有的产品质量达不到食品安全标准, 同时还不同程度地污染海洋环境, 破坏海洋生态结构, 造成滩涂底泥中氮磷平衡失调, 使养殖涂质迅速老化, 有的甚至失去养殖价值。为了合理开发与保护滩涂进而促进贝类养殖业的高效可持续发展, 我们于 2002 年起对杭州湾南岸滩涂贝类养殖环境进行了调查研究, 微生物数量分布及其类群研究是其中的主要内容之一。

1 材料与方 法

1.1 土壤样品的采集

在慈溪市三北镇、观海卫镇和新浦镇的滩涂, 自 2002 年 4 月到 2002 年 12 月, 每月一次, 采集土样, 它们分别代表杭州湾南岸东、中和西片滩涂区域(图 1)。其中观海卫和三北均为当地滩涂贝类养殖较为成熟的地区, 主要养殖品种为泥螺、彩虹明樱蛤和缢蛭(*Sinonovacula constricta*); 新浦主要以捕捞自然苗种为主, 或粗放粗养。在每个站位设置了两个平行位点, 刮去涂面 1 cm 后, 分别在表层(5 cm 处)和底层(20 cm 处)两个断面采集泥样。泥样放置于无菌培养皿中, 当天带回实验室处理。采样站点的分布如图 1。

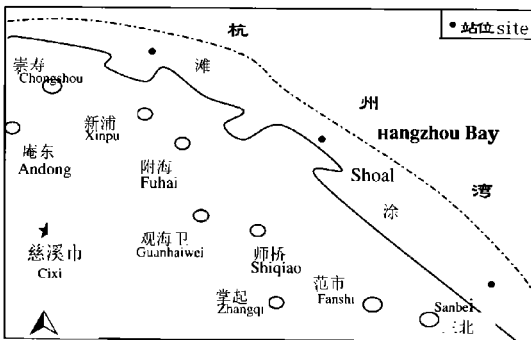


图 1 采样站点的地理分布

Fig. 1 Geographic distribution of sampling stations

1.2 研究方法

滩涂涂质分析 采用沉降法来分析底质的粒径组成, 进而确定底质的类型。按照 JTJ051-93 规范完成。粒度参数的计算采用矩法计算^[1]。

细菌培养及计数方法 准确称取泥样 5 g, 置于装有 45 mL 无菌陈海水的锥形瓶中, 并加入灭菌的 Tween-80 水溶液(终浓度为 5×10^{-6}), 充

分震荡做成悬浮液, 进行梯度稀释后接种于培养基中。其中异养细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的计数采用 MPN 法, 28℃ 恒温培养 5~7 d 后计数。

细菌分离和鉴定 每批样品以平板涂布法分离细菌, 从 2216E 固体平板培养基上随机挑选菌落, 划线分纯后, 按照 Oliver 提供的海洋细菌鉴定检索图^[2]、《一般细菌常用鉴定方法》^[3]和《海洋调查规范》^[4]提供的图式鉴定至属。

数据处理 应用 Excel 和 SPSS 统计软件对数据进行处理。在对细菌群落组成进行统计分析时, 按照 Anne E. Magauran 所阐述的方法, 以香农指数(Shannon index)作为指标计算各样品中细菌群落的多样性指数, 即 $H' = -\sum P_i \ln P_i$, 其中 P_i 为第 i 属细菌在群落中的相对丰度; 并采用 Pielou 的计算公式计算各群落的均匀度指数, 即 $E = H' / \ln S$, 其中 S 为群落中所含有的细菌属数。另外, 香农方差指数 VaH' 按下式计算:

$$VaH' = \frac{\sum P_i (\ln P_i)^2 - (\sum P_i \ln P_i)^2}{N} - \frac{S-1}{(2N)^2}$$

其中, P_i 为第 i 属细菌在群落中的相对丰度, N 为群落中的总菌株数, S 为群落中所含有的细菌属数。

2 结果与分析

2.1 滩涂涂质

对新浦上涂、新浦下涂上半年取样结果显示, 其底质为砂质(S), 颗粒 $r > 0.063$ mm 的百分含量在 42%~62%, 而两地下半年滩涂颗粒 $r > 0.063$ mm 的百分含量分别达了 78.165% 和 88.288%, 显示出明显的砂质; 观海卫滩涂的颗粒 $r > 0.063$ mm 的百分含量为 36%~41%, 且 0.032 mm $< r \leq 0.063$ mm 和 0.016 mm $< r \leq 0.032$ mm 的颗粒也占相当比例, 约分别为 30% 和 20% 左右, 为中粉砂-粗粉砂质(MT-CTS)。东片三北的底质性质为中粉砂质(MTS)。其中中片观海卫上涂、观海卫下涂、西片新浦上涂、新浦下涂、下半年底质类型不变。

2.2 滩涂贝类养殖环境的细菌组成与数量变动

异养细菌的数量变化 杭州湾南岸滩涂(简称慈溪滩涂)异养细菌的数量范围为 $1.59 \times$

$10^3 \sim 6.62 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ (湿重), 平均值为 $4.28 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ (湿重)。3个采样区的细菌数量在春季和夏季的数量偏低, 10月份异养细菌的数量开始上升, 并于11月份达到最高, 此后, 异养细菌的数量又迅速降低。这种现象的出现, 可能与滩涂开放于海洋大水体, 细菌的数量变化受潮汐、有机

质含量、温度和沉积物类型等多种因素的影响有关。3个样区中表层以新浦的数量变化最大, 而三北和观海卫相对较稳定。而观海卫的底层异养细菌数量较稳定。总体上, 表层(5 cm)的异养细菌数量略高于下层(20 cm) (图2和图3)。

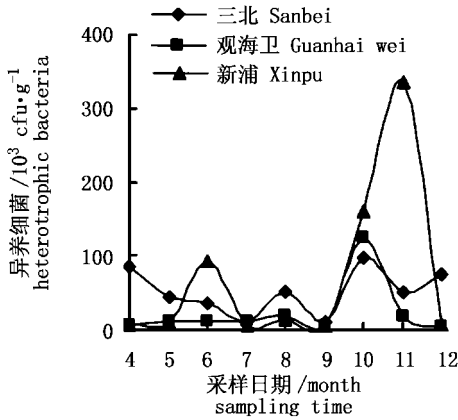


图2 慈溪滩涂表层中海洋异养细菌的数量变化

Fig.2 Heterotrophic bacteria variation in surface layer of Cixi shoal

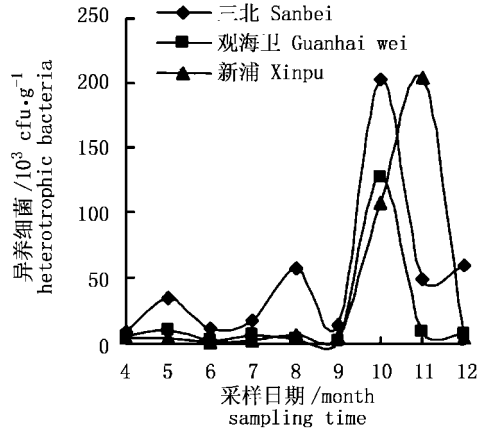


图3 慈溪滩涂下层中海洋异养细菌的数量变化

Fig.3 Heterotrophic bacteria variation in bottom of Cixi shoal

异养细菌的类群组成 杭州湾南岸慈溪滩涂贝类养殖区所分离到 2976 株细菌, 隶属 18 个属及另外的肠杆菌科的部分属(表 1)。养殖滩涂表层和下层的菌群组成大体一致, 只是在百分含量上略有差异, 其中革兰氏阳性菌比例较高, 除 4 月份革兰氏阴性菌占有绝对的优势外, 革兰氏阳性菌所占比例仅为 33.92%; 其它月份均为革兰氏阳性菌占优势, 其中 3 月份和 7 月份的比例最高, 分别为 73.67% 和 77.81%, 具有明显的陆源性特点。

表1 杭州湾南岸滩涂贝类养殖区所分离到的细菌

Tab.1 Bacteria flora in shellfish culture shoal of south bank in Hangzhou Bay

梭状芽孢杆菌属 <i>Clostridium</i> *	发光杆菌属 <i>Photobacterium</i> *
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> *	产碱菌属 <i>Alcaligenes</i>
弧菌属 <i>Vibrio</i>	屈挠杆菌属 <i>Flexi bacter</i>
黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i> *	色杆菌属 <i>Chromobacterium</i>
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> *	无色杆菌属 <i>Achromobacter</i>
微球菌属 <i>Micrococcus</i>	不动杆菌 <i>Acinetobacter</i>
肠杆菌科 <i>Enterobacteriaceae</i> 部分属*	棒状杆菌属 <i>Corynebacterium</i> *
葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	黄单胞杆菌属 <i>Xanthomonas</i>
乳杆菌属 <i>Lactobaillus</i>	单胞菌属 <i>Aeromonas</i>

注: 标有* 号的为优势菌属
Notes: * means dominant bacteria genus

反硝化细菌数量分布 慈溪滩涂贝类养殖环境中, 所有的站点均可以分离得到反硝化细菌。

全年反硝化细菌的数量波动在 $8.00 \times 10^4 \sim 5.00 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间, 平均值为 $1.38 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在地域分布上, 3 个站点反硝化细菌的数量存在很大的差异, 其中三北滩涂中反硝化细菌的数量最高, 平均值为 $3.61 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 而新浦和观城则相对较低, 为 $2.53 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $2.89 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在垂直分布上, 滩涂表层和底层中反硝化细菌的数量也有较大的差异, 三北和观海卫滩涂中反硝化细菌的数量均为表层高于底层, 但新浦滩涂中底层反硝化细菌的数量较高。同时三个地方反硝化细菌均存在着明显的季节变动规律, 而表层和底层则保持同步的变化趋势, 从图 4 与图 5 可以看出, 三北的硝化细菌在 11 月到 7 月前一直处于相对稳定的阶段, 而从 8 月份开始出现显著的增加, 一直到 11 月份达到最大数量(平均达 $2.52 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$)。而其余两地的则变化不大, 只在 9-10 月份的反硝化细菌数量达到最大。

氨化细菌数量分布 在慈溪滩涂中, 氨化细菌的检出率也为 100%。根据统计, 滩涂中氨

化细菌的数量波动相对较为平缓, 全年变动范围为 $5.00 \times 10^4 \sim 5.00 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间, 平均值为 $1.89 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在地域分布上, 3 个采样位点氨化细菌的数量相差不大, 处于同一个数量级上。在垂直分布上, 表层氨化细菌的数量多于底层, 其

中表层的平均值为 $2.17 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 而底层的平均值则为 $1.61 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。全年中在表层和底层均以 11 月份的氨化细菌最高, 其中又以新浦的最高为 $2.95 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ (表层) 和 $2.50 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ (底层), 见图 6 和图 7。

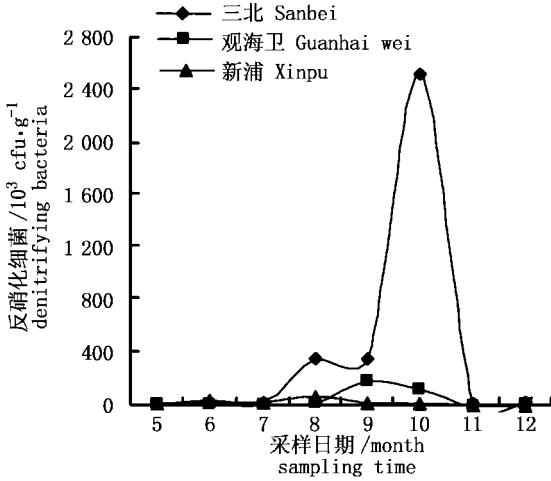


图 4 慈溪滩涂表层中海洋反硝化细菌的数量变化

Fig. 4 Denitrifying bacteria variation in surface layer of Cixi shoal

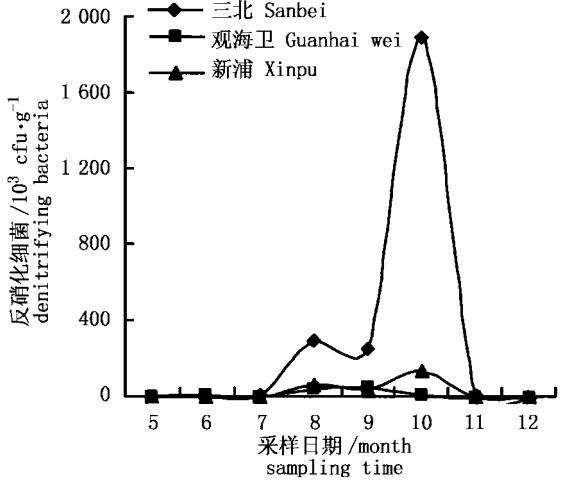


图 5 慈溪滩涂底层中海洋反硝化细菌的数量变化

Fig. 5 Denitrifying bacteria variation in bottom of Cixi shoal

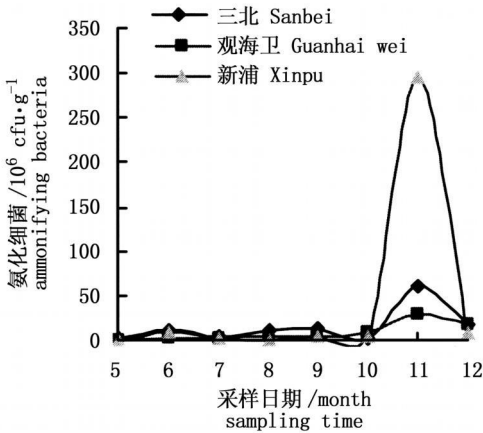


图 6 慈溪滩涂表层中海洋氨化细菌的数量变化

Fig. 6 Amonifying bacteria variation in surface layer of Cixi shoal

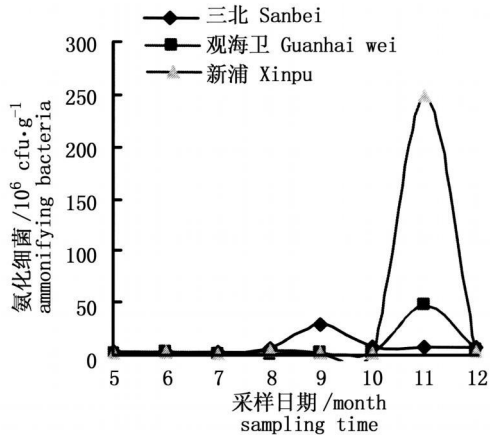


图 7 慈溪滩涂底层中海洋氨化细菌的数量变化

Fig. 7 Amonifying bacteria variation in bottom of Cixi shoal

硫酸还原菌数量分布 在滩涂养殖环境中, 硫酸还原菌的检出率是 100%, 其数量维持在较高的水平, 全年变化范围为 $9.00 \times 10^3 \sim 9.00 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 平均值为 $8.42 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。这说明经过常年不间断的养殖以后, 滩涂养殖环境已经开始恶化。在地域分布上, 3 个采样点中以三北

滩涂中硫酸还原菌的数量最高, 平均值为 $1.48 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 而新浦和观海卫滩涂中硫酸还原菌的数量相对较低, 平均值分别为 $4.61 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $5.90 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 这说明三北养殖区的环境条件较其余两片滩涂要差。

3 讨论与结论

3.1 底栖异养细菌的种类组成及数量变动

底栖异养细菌的种类组成及数量变动受多种因素的影响,如沉积物类型、基质中有机质含量、溶氧、温度、潮汐等,故底栖异养细菌的类群组成及数量变化可指示所在地环境状况。另一方面,底栖异养细菌的种类组成及数量变化可影响环境,如改变有机质、溶氧以及一些无机盐浓度等。

慈溪滩涂贝类养殖区为近岸开放性养殖滩

涂,底质类型基本上属于砂质,有机质含量较高,盐度偏低,并明显受到地表径流、潮汐等环境因素的影响。特殊的地理环境使滩涂中异养细菌的分布特征不同于虾池、池塘、湖泊等封闭性的养殖区域,具有一定的特点。

慈溪滩涂贝类养殖区中异养细菌的类群组成主要为陆源微生物如革兰氏阳性菌占绝对优势,反映滩涂贝类养殖环境受到大陆的明显影响。随着河川入海、人类频繁的活动,陆地土壤和淡水里大量的细菌被携带入滩涂,它们适应能力极强,能在海洋滩涂环境里存活、繁衍。

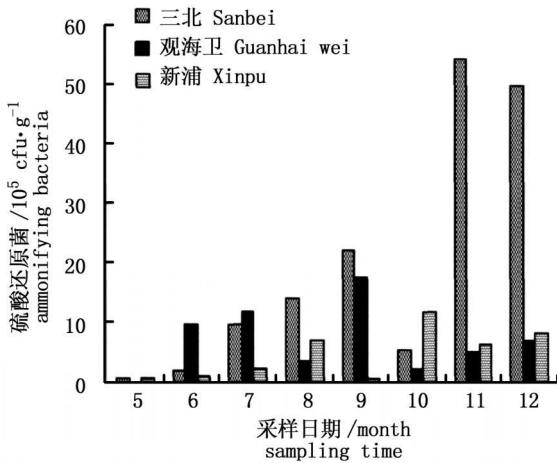


图8 慈溪滩涂表层中硫酸还原菌的数量变化

Fig. 8 Sulfate reduction bacteria variation in surface layer of Cixi shoal

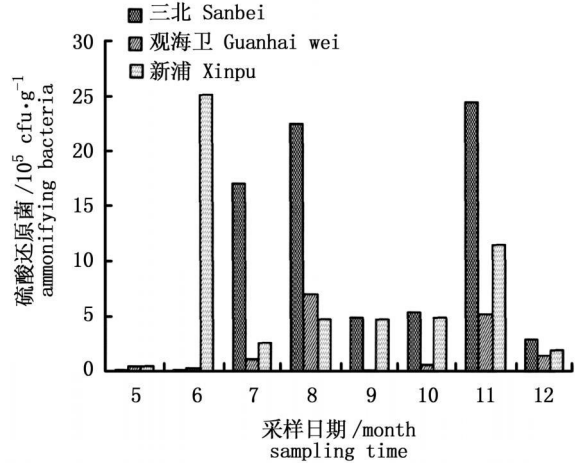


图9 慈溪滩涂底层中硫酸还原菌的数量变化

Fig. 9 Sulfate reduction bacteria variation in bottom of Cixi shoal

慈溪滩涂的异养细菌类群组成中,芽孢杆菌属、梭状芽孢杆菌属、假单胞菌属、肠杆菌科的部分属、棒状杆菌属、发光杆菌属和黄杆菌属是滩涂贝类养殖区中占优势的菌属。其中芽孢杆菌属、梭状芽孢杆菌属和假单胞菌属对蛋白质和多糖类均具有很强的分解能力,是滩涂中分解代谢活力旺盛的类群,对有机质的矿化,降低滩涂中有机质浓度有重要作用。但长期不间断的滩涂养殖,分解者、初级生产者、次级生产者的比量失调,使滩涂中能吸收、迁移、转化细菌代谢产物的初级生产者无机会或不能在该处生长、繁殖,削弱细菌代谢产物的迁移、转化、输出途径及输出量,仅主要靠潮汐带走一部分;而大量饲养动物的粪便、残骸留存滩涂上,促进分解者,异养细菌的繁殖增生及其代谢产物量的增加,使细菌的代谢产物大量

积聚,导致了滩涂养殖环境的“老化”或恶化。因此,应当加强和重视滩涂养殖环境的修复,并积极倡导歇滩轮养。

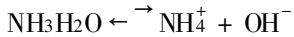
这三处异养细菌的季节变化是3月份和10月份数量高,11月份达到最高,而温度较高的夏季,数量偏低。这与菌落组成中主要是低温或中温菌(如反硝化细菌、氨化细菌等),而该处缺少高温菌(如放射菌等)有关。

它们的空间分布是3个样区中三北区的异养细菌数比其他两区的高些,反映三北区滩涂有机质浓度可能比新浦和观海卫内者要高。其垂直分布,总体上,表层(5 cm)的异养细菌数量略高于下层(20 cm),这反映输入和沉积于这几处的有机质的速率较快,表层沉积的有机质速率比下层的有机质分解速率大。

3.2 反硝化细菌、氨化细菌和硫酸还原菌的种类组成及数量变动

反硝化细菌、氨化细菌和硫酸还原菌均为厌氧性细菌,它们往往在缺氧的环境条件下,在含氮化合物(对反硝化细菌、氨化细菌)或含硫化合物(对硫酸还原)的基质中大量繁殖。在滩涂养殖环境各站位中反硝化细菌、氨化细菌和硫酸还原菌的检出率均为100%,且其密度都维持在一个较高的水平,反映杭州湾南岸滩涂底质环境中有机物的含量已达到了相当的水平,COD、BOD均较高,溶氧量低,不利于不耐缺氧的贝类的生活、生长和繁殖。

另外,这3类细菌的代谢中间产物是氨和硫化氢。分子氨对鱼类、贝类极毒,一般都按分子氨浓度 $0.05\sim 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为可允许的极限值。离子氨不仅无毒,而且是植物的主要营养盐。分子氨和离子铵在水中可互相转化,氨易溶于水,在水中生成分子复合物 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$,并有一部分解离成离子铵(NH_4^+),形成如下化学平衡:



其转化条件取决于所处水的pH值和水温。pH值越小,水温越低,分子氨向离子铵转化率越高,在总氨中离子铵的比例越多,分子氨的比例越少,毒性越低。pH值小于7时,总氨几乎都是以铵离子形式存在。反之,pH值越大,水温越高,分子氨向离子铵转化率越低,在总氨中离子铵的比例越少,分子氨的比例越大,毒性越高。如在不同pH值、水温条件下,分子氨浓度为 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时^[5],总氨氮可允许的极限值是不同的^[6]。故在夏季温度较高时,反硝化细菌、氨化细菌的代谢产物或中间产物的氨对养殖动物的威胁和危险就更大。

硫是构成蛋白质和酶的不可缺少的成分。在生物体内,几乎所有的蛋白质都含有硫。硫在生物体内,除一部分呈硫酸根(SO_4^{2-})形态外,大部分是硫氢基(-SH)或联硫基(-S-S)与许多有机物结合,这些含硫有机化合物参与生物体内氧化还原过程(如半胱氨酸、胱氨酸等)。生物体对硫的需求量不大,天然水体水中又普遍含有 SO_4^{2-} ,而 SO_4^{2-} 本身虽对水生生物无毒,但在经常缺氧,容易被硫酸盐还原细菌还原成有毒且有恶臭的 H_2S ,对动物有毒。

杭州湾南岸滩涂中反硝化细菌、氨化细菌及硫酸还原菌的大量出现和存在,虽有利有机质的矿化和浓度降低,但其中间产物氨的大量产生,将引发滩涂养殖贝类的发病和死亡,不利贝类养殖,特别是在温度较高的季节,氨的威胁就更大。其根源是输入的有机质量过大,COD、BOD均较高,溶氧量低。要控制这两类细菌的密度和在微生物中比量,降低 NH_3 和 H_2S 的浓度,应针对其根本原因,控制有机质的输入,特别是陆源性的有机物的输入。

参考文献

- [1] 杨正红. 如何判断和选择激光粒度分析仪[J]. 现代科学仪器, 2000, (1): 58-59.
- [2] Oliver J D. Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria[J]. *Deer Sea Res*, 1982, 29(6): 795-798.
- [3] 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.
- [4] 国家海洋局. 海洋调查规范[M]. 北京: 中国海洋出版社, 1975: 55-65.
- [5] 国家环保局. 水产养殖水质标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [6] 张杨宗, 谭玉钧, 欧阳海. 中国池塘养鱼学[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 55.