

固定化微藻对虾池弧菌数量动态的影响

黄翔鹄 李长玲 郑 莲 刘楚吾 王瑞旋

(湛江海洋大学水产学院, 湛江 524025)

摘要:引入固定化波吉卵囊藻(*Oocystis borei*)和微绿球藻(*Nannochloris oculata*)于凡纳对虾(*Litop Penaeus vannamei*)养殖环境中,检测水体、对虾胃和后肠中弧菌的数量变化,研究固定化微藻对虾池弧菌数量动态影响。结果表明:波吉卵囊藻培养液中 9d 后不能检测出弧菌,微绿球藻培养液中 15d 后不能检测出弧菌。引入固定化波吉卵囊藻和微绿球藻的褐藻胶藻珠能抑制弧菌的生长,实验组养殖水体、对虾胃和后肠中弧菌的数量都比对照组低;抑制效果是固定化波吉卵囊藻和微绿球藻混合>固定化波吉卵囊藻>固定化微绿球藻;试验后期实验组弧菌的数量明显低于试验前期。试验期间固定化波吉卵囊藻和微绿球藻的生物量分别增加了约 10 倍和 17 倍,证明它们的生理活性不会因固定化而受干扰。因此,固定化微藻可应用于虾池微生态调控防病。

关键词:固定化微藻;褐藻胶藻珠;细菌;微生态调控

中图分类号:S942.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2005)06-0684-05

微藻固定化技术在环境领域中的应用逐渐受到重视。固定化微藻细胞净化污水的研究刚刚起步,其研究包括对营养盐的去除^[1],对重金属的吸收^[2,3],及对污染水中烃类化合物的去除等,只有少数的研究报道有关应用固定化微藻于水产养殖方面,例如陈衍昌初步研究了固定化栅藻改善养殖水质^[4]。固定化微藻在虾池生态调控方面的研究,还未见报道。波吉卵囊藻(*Oocystis borei*)具有在虾池分布广、种群稳定和适应能力强的特点^[5],微绿球藻(*Nannochloris oculata*)是虾塘中广泛存在的优势藻种之一,这两种微藻能改善水质提高对虾的抗病力^[6]。本研究采用固定化微藻技术,引入这两种微藻于凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)养殖环境中,通过检测养殖水体中弧菌的数量变化,研究固定化微藻对养殖环境中弧菌数量动态的影响,旨在将固定化技术应用于养殖生态调控,以期今后养殖水域的微生态调控防病理论的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 实验用凡纳对虾(下称对虾)取材于湛江市硇洲岛宜人海珍养殖场,平均体长 9.7cm,健康无病。

1.2 微藻来源 波吉卵囊藻是 2000 年 5 月直接从

湛江东海岛恒兴对虾养殖试验场 1 号池分离驯化培养于实验室;微绿球藻是 2000 年 7 月从海南三亚湛泰对虾养殖场分离驯化培养于实验室。

1.3 海水与饵料 海水取自湛江东风码头海区,经沉淀和砂滤,相对密度为 1.015 ± 0.001 。对虾培养的饵料采用湛江粤海饲料有限公司对虾配合饲料。

1.4 微藻固定化方法 配制 3.5% (V/V) 的褐藻胶液(35.0g 海藻酸钠加入到 1000mL 蒸馏水中,并加入氯化钠 2g,搅拌约 4h 直至呈溶液状),然后置于 121℃高温灭菌锅中灭菌 20min,冷却后将微藻藻液和褐藻胶液按 1:4 均匀混合,波吉卵囊藻和微绿球藻藻液浓度分别为 1.66×10^6 个/mL 和 7.5×10^6 个/mL,将混合液以吸管吸取于室温下,滴于 3% 的 CaCl_2 溶液中以形成褐藻胶藻珠,每毫升制成直径约为 3.5—4.0mm 藻珠 10 粒,其细胞数分别为 0.33×10^7 个/粒和 1.5×10^7 个/粒。藻珠浸泡于 CaCl_2 溶液中约 30min 硬化,取出用灭菌海水冲洗,除去残余的 CaCl_2 溶液,然后装入 1000mL 的三角锥瓶,加入适量营养液,室温下保存备用。

1.5 方法 实验在水体为 0.5m³ 的水族箱中进行,设 1 个对照组,3 个实验组,每组均设置 2 个平行组,将褐藻胶藻珠装入筛绢网袋中,以吊挂的形式把藻珠引入对虾的养殖环境。实验 1 组为对照组,实

收稿日期:2004-08-02;修订日期:2005-04-28

基金项目:广东省科技攻关项目(编号:C20823)资助

作者简介:黄翔鹄(1962—),男,副教授,从事水生生态学研究。Tel:0759-2362166, E-mail: ybcl@.tom.com

验2组引入波吉卵囊藻藻珠40000粒, 实验3组引入微绿球藻藻珠40000粒, 实验4组为波吉卵囊藻珠20000粒和微绿球藻藻珠20000粒。光照强度为2000—10000lx, 水温为29±1℃, 并加入微藻生长所需的营养盐。每组放养对虾25尾, 各组通气量、温度、盐度和投饵等实验条件保持一致。

1.6 弧菌的数量测定 每2—4d测定一次水样和对虾胃肠中弧菌的数量, 用平板涂布法。每次取虾2尾, 每尾虾用电子天平分别称取胃和后肠样品各0.1g, 放入编号的匀浆器中, 加2mL 0.8%的无菌生理盐水, 人工将样品匀浆为溶液状, 再每个样品取出1mL放入装有9mL 无菌生理盐水的试管中, 依次进

行稀释至适当的浓度, 然后取0.1mL样品, 在弧菌TCBS培养基平板上, 用灭菌三角玻璃棒涂布。设置三个平行组, 置于30℃培养箱中培养72h, 采用平板菌落计数法^[7], 计算细菌数量。水样做法同上。

2 结 果

2.1 微藻培养液中弧菌的数量变化

从表1中可以看出, 培养开始, 实验组中弧菌数量有增加; 培养后期, 微藻培养液中不能检测出弧菌。波吉卵囊藻培养液中9d后不能检测出弧菌, 微绿球藻培养液中15d后不能检测出弧菌。试验过程中, 对照组中一直能检测出弧菌。

表1 藻液中弧菌的细胞数量
Tab.1 The number of vibrios in the culture system with microalgae

微藻种类	弧菌(×10 ⁵ 个/mL)							
	1d	3d	6d	9d	12d	15d	18d	21d
对照组	20.0	53.6	53.1	56.2	40.9	43.0	23.7	21.2
波吉卵囊藻	100.0	40.0	3.5	0	0	0	0	0
微绿球藻	22.0	18.0	19.0	15.0	11.5	0	0	0

2.2 褐藻胶藻珠中微藻生物量变化

将藻珠用筛绢袋装好放入水族箱, 第2d就能观察到袋内有气泡, 说明藻细胞已开始生长, 3~4d颜色明显加深, 呈鲜绿色, 袋内气泡增多, 筛绢袋浮于水面, 接近试验后期, 藻珠颜色呈深绿色。镜检结果显示: 波吉卵囊藻藻珠中细胞数从0.33×10⁷个/粒

增加到3.17×10⁷个/粒, 生物量从1.83×10⁻²mg/粒增加到17.46×10⁻²mg/粒, 增加了近10倍; 微绿球藻藻珠中细胞数从1.50×10⁷个/粒增加到25.47×10⁷个/粒, 生物量从0.51×10⁻²mg/粒增加到8.66×10⁻²mg/粒, 增加了约17倍(表2)。

表2 褐藻胶藻珠中微藻生物量的变化
Tab.2 The changes of micro-algal biomass in the algal alginate-beads

组别	种 类	藻珠中微藻生物量(×10 ⁻² mg/粒)					
		1d	4d	7d	11d	15d	19d
1	—	—	—	—	—	—	—
2	波吉卵囊藻	1.83	1.88	7.89	8.37	13.52	17.46
3	微绿球藻	0.51	0.73	3.37	8.18	8.55	8.66
4	波吉卵囊藻	1.83	1.85	9.76	10.59	15.70	15.62
	微绿球藻	0.51	0.70	2.36	6.64	7.14	8.05

2.3 水样中弧菌数量的变化情况

固定化微藻对弧菌的抑制效果明显, 试验进行到第7d后, 弧菌数量明显下降, 整个试验期内实验组弧菌的数量比对照组相对要低, 至末期, 实验2, 3, 4组弧菌的数量分别比对照组低了69.92%、

63.67%和72.07%, 试验后期弧菌的数量明显比前期要少。实验2, 3, 4组弧菌的平均数量分别为1.54×10⁵个/mL、1.86×10⁵个/mL和1.43×10⁵个/mL(表3), 显著性分析, F=13.00>F_{0.05}(2, 3)=9.55, 差异显著, 抑制效果是4组>2组>3组。

表 3 水样中弧菌细胞的数量变化
Tab. 3 The changes of Vibrio number in the water

组别	弧菌细胞数(× 10 ⁵ 个/ mL)						
	1d	4d	7d	11d	15d	17d	19d
1	5. 32	5. 60	4. 88	2. 20	6. 20	5. 60	6. 01
2	5. 32	3. 45	1. 10	0. 15	0. 28	0. 46	0. 03
3	5. 32	5. 07	1. 09	0. 80	0. 32	0. 40	0. 03
4	5. 32	2. 09	1. 75	0. 70	0. 07	0. 02	0. 11

2.4 对虾胃中弧菌的数量变化

结果显示, 实验组对虾的胃中弧菌的数量有所波动, 但都明显低于对照组, 试验进行到第 11d 后, 弧菌数量明显下降。实验 2, 3, 4 组在试验结束时, 弧菌的数量分别比对照组降低了 71. 76%、70. 79%

和 79. 30%。试验期间 2, 3, 4 组弧菌的平均数量分别为 $1. 46 \times 10^5$ 个/g、 $1. 51 \times 10^5$ 个/g 和 $1. 07 \times 10^5$ 个/g(表 4), 显著性分析, $F = 11. 68 > F_{0. 05}(2, 3) = 9. 55$, 有显著差异, 抑制效果是 4 组> 2 组> 3 组。

表 4 对虾胃中弧菌细胞的数量变化
Tab. 4 The changes of Vibrio number in stomach of shrimp

组别	弧菌细胞数(× 10 ⁵ 个/ g)						
	1d	4d	7d	11d	15d	17d	19d
1	1. 32	4. 38	5. 40	4. 69	1. 44	13. 50	5. 44
2	1. 32	3. 98	2. 60	0. 28	0. 88	1. 00	0. 15
3	1. 32	3. 03	5. 30	0. 40	0. 12	0. 30	0. 13
4	1. 32	1. 89	3. 20	0. 14	0. 66	0. 20	0. 10

2.5 对虾后肠中细菌数量变化

实验组对虾后肠中弧菌的数量明显低于对照组, 11d 后弧菌的数量明显降低。实验 2, 3, 4 组在试验结束时, 弧菌的数量相对于对照组分别降低了 80. 22%、79. 12% 和 81. 78%。试验期间 2, 3, 4 组弧

菌的平均数量分别为 $2. 15 \times 10^5$ 个/g、 $2. 27 \times 10^5$ 个/g 和 $1. 98 \times 10^5$ 个/g(表 5), 显著性分析, $F = 21. 97 > F_{0. 05}(2, 3) = 9. 55$, 有显著差异, 抑制效果是 4 组> 2 组> 3 组。

表 5 对虾后肠弧菌的数量变化
Tab. 5 The changes of Vibrio number in intestine posterior of shrimp

组别	弧菌细胞数(× 10 ⁵ 个/ g)						
	1d	4d	7d	11d	15d	17d	19d
1	5. 21	5. 49	7. 70	17. 05	16. 9	21. 20	2. 56
2	5. 21	2. 80	3. 01	0. 99	0. 66	1. 90	0. 51
3	5. 21	4. 31	3. 01	1. 06	0. 43	1. 10	0. 78
4	5. 21	3. 02	1. 26	1. 21	0. 56	1. 10	1. 47

3 讨 论

3.1 养殖环境中固定化微藻的生物学特性

实验组水环境中, 其微藻数量相当于, 波吉卵囊藻细胞数为 $0. 13 - 2. 54 \times 10^7$ 个/L, 生物量为 $0. 73 - 13. 97 \text{mg/L}$, 微绿球藻细胞数为 $0. 6 - 20. 38 \times 10^7$ 个/L, 生物量为 $0. 20 - 6. 93 \text{mg/L}$, 试验过程中各实验组

微藻种群细胞数处于相对稳定范围, 引入微藻量与多数对虾池养殖后期优势微藻种群数量相似, 基本可代表自然养殖池优势微藻种群特征(表 2)。微绿球藻的数量明显大于波吉卵囊藻, 这是由于微绿球藻细胞相对较小所致。在本研究中, 被固定于褐藻胶中的波吉卵囊藻和微绿球藻细胞把对虾养殖环境中的氨氮和亚硝酸氮当成营养盐而吸收, 可降低水

中氨氮和亚硝酸氮浓度外, 细胞还能正常地生长, 在本试验的 19d 培养期间, 固定化波吉卵囊藻和微绿球藻的数量分别增加了约 10 倍和 17 倍。这结果证明波吉卵囊藻和微绿球藻的生理活性, 不会因固定化而受干扰。由于固定化藻类的代谢活性在较长时间内保持稳定, 更为有效地发挥微藻生物学效应。

3.2 水环境中微藻与细菌间的关系

海洋环境中, 主要的水质因子和绝大多数的海洋细菌都与藻类有密切的关系^[8,9]。藻细胞所分泌的有机物质可被周围的细菌所摄取, 其中一部分可经细菌代谢释放, 为藻类生长提供营养及必须生长因子, 形成一种互利关系^[10]; Ohta 等^[11]指出, 藻菌间存在着拮抗关系, 产生抑制细菌生长的抗生素类物质。Imai 等^[12]指出, 细菌也能抑制藻, 甚至可以裂解藻细胞; 藻细胞在生长过程中不断地向周围释放许多代谢物质, 如脂、肽、碳水化合物、维生素和毒素, 以及生长抑制和促进因子等, 并可形成具有独特结构和功能的藻际细菌群落。因此, 藻菌相互关系的深入研究, 可以为生物防病技术在对虾养殖中的应用寻找新的途径。

3.3 固定化微藻技术与养殖环境的调控

小球藻的固定化增加了其生理代谢活性, 对水质的净化效率要比悬浮态相对要高^[13]; 固定化微藻可有效地吸收和富集污水中的重金属, 富集倍数可达几千倍。本实验中, 由于固定化微藻的生理活性在较长时间内保持稳定, 在一定程度上保证微藻种群优势, 在对虾养殖环境中更为有效地发挥其生物学特性; 固定化微藻技术用于人工调控微藻的群落结构, 可有效的控制微藻的种类组成和防止虾池中微藻数量过多, 从而维持整个养殖系统的动态平衡; 还能完全地从水中把微藻分离出来, 使微藻夜晚的呼吸作用不能在养殖环境中进行; 同时还能防止其他动物对它的捕食, 更为有效地保持微藻数量的相对稳定。作者认为, 固定化微藻具有微藻细胞密度高, 反应速度快, 运行稳定可靠, 还能克服传统的藻类净化水质时处理系统停留时间不长, 效率不稳定, 藻类数量难控制等缺点, 可作为一种生物技术广泛应用于水产养殖生态的调控。

3.4 固定化微藻与对虾疾病的防治

在对虾养殖环境中, 细菌是导致对虾疾病的主要病原。藻类能够产生抑制细菌生长的抗生素物质, 对海洋弧菌等有明显的抑制作用^[14]; 以微藻为基础的微小生物群落因优先占有生态空间而对弧菌菌群具有排他性, 当饵料微藻处于培养初期时, 排斥

弧菌能力较弱; 处于生长指数后期, 此时排斥能力很强; 何曙阳^[15]指出藻类在指数生长期释放的有机物含量很少, 进入稳定增长期后, 开始大量释放胞外产物。从结果可以看出, 实验后期微藻培养液中没有弧菌(表 1), 海洋环境中虽然有广泛的弧菌分布, 但在微藻培育系统中却很少检测到弧菌; 引入固定化微藻的养殖水体, 对虾胃和后肠中弧菌的数量后期比前期都有不同程度的减少, 这在一定程度上说明了这两种固定化微藻对对虾养殖环境中的弧菌具有一定的抑制作用, 与林伟等^[14]的研究结果一致; 水体、对虾胃和后肠中弧菌数量在 7—11d 时明显下降, 这与微藻达到一定的生长时期, 大量释放胞外产物和胞外产物的积累有密切关系, 与何曙阳^[15]研究结果相同; 引入固定化波吉卵囊藻和微绿球藻实验组对弧菌的抑制效果比固定化波吉卵囊藻组要好, 固定化波吉卵囊藻组对弧菌的抑制效果比微绿球藻要好(表 3, 4, 5), 说明不同固定化微藻群落结构和不同的固定化微藻对弧菌的抑制能力不同, 这与微藻的生理特性有关。因此, 利用固定化微藻来控制虾池藻相, 抑制弧菌的生长是防止对虾疾病的重要措施。

参考文献:

- [1] Garbisu C, Gil J M, Bazin M J, et al. Removal of nitrate from water by foam-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors[J]. *Appl. Phycol.* 1991., 3: 221—234
- [2] Wilkinson C S, Goulding K H, Robinson P K. Mercury removal by immobilized algae in batch culture systems[J]. *Appl. Phycol.* 1990, 2: 223—230
- [3] Barkley N P. Extraction of mercury from groundwater using immobilized algae[J]. *J Air Waste Manage Assoc.* 1991, 41(10): 1381—1387
- [4] Chen Y C. Immobilized microalga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta, Chlorellales) for long-term storage and for application for water quality control in fish culture[J]. *Aquaculture*, 2001, 195/1—2: 71—80[陈衍昌, 利用固定化技术作为微藻种原之保存及利用[J]. 水产养殖, 2001, 195(1—2): 71—80]
- [5] Huang X H, Wang Q H. Study on phytoplankton dominant species and cause of formation in prawn high level pond[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2002, 21(4): 36—44[黄翔鹄, 王庆恒. 对虾高位池优势浮游植物种群及成因的研究. 热带海洋学报, 2002, 21(4): 36—44]
- [6] Huang X H, Li C L, Liu C W, et al. Study on *Oocystis borgei* and *Nannochloris oculata* improving environment of shrimp pond and strengthening anti-disease ability of *Penaeus vannamei* [J]. *Acta Hydrobio. Sin.*, 2002, 26(4): 342—347[黄翔鹄, 李长玲, 刘楚吾, 等. 两种微藻改善虾池环境增强凡纳对虾抗病力的研究. 水生生物学报, 2002, 26(4): 342—347]

- [7] Fan S R, Li G B, Shen P. Microbiology laboratory manual(2nd ed) [M]. Beijing: Higher Education Press. 1989, 110—111 [范秀容, 李广斌, 沈萍. 微生物学实验(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1989, 110—111]
- [8] Ma R X, Li H, Chen Y. The research on bacteria aetiology of an explosive epidemic disease in *Penaeus chinensis* in 1993[J]. *J Dalian Fish Coll*, 1995, **10**(2): 1—8 [马悦欣, 李华, 陈营. 1993 年中国对虾爆发性流行病细菌病原学研究. 大连水产学院学报, 1995, **10**(2): 1—8]
- [9] Zhao YJ, Liu YD. Possible microbial control on the adverse impacts of algae——Current information about the relationship between algae and microbes[J]. *Acta Hydrobio. Sin.* 1996, **20**(2): 173—181 [赵以军, 刘永定. 有害藻类及其微生物防治的基础——藻菌关系的研究动态. 水生生物学报, 1996, **20**(2): 173—181]
- [10] Liu W, Chen D, Liu X Y. The antivibrio mechanism of microalgae cultivation system[J]. *Oceanologia Et Limnologia Sin.* 2001, **32** (1): 7—14, [林伟, 陈驊, 刘秀云. 海洋微藻培育系统抗弧菌作用机理[J]. 海洋与湖沼, 2001, **32**(1): 7—14]
- [11] Ohta S, Chang T, Ikegami N, *et al.* Antibiotic substance produce by a newly isolated marine microalga, *Chlorococcum* HS101[J]. *Bull Environ. Contem Toxicol.* 1993, **50**: 171—178
- [12] Imai I, Ishida Y, Hata Y. Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan[J]. *Mar Biol.* 1993, **116**: 527—523
- [13] Yan G A, Li Y J. Primary studies on sewage purification by immobilized *Chlorella*[J]. *Research of Environmental Sciences*, 1994, **7**(1): 39—42. [严国安, 李益健. 固定化小球藻净化污水的初步研究[J]. 环境科学研究, 1994, **7**(1): 39—42]
- [14] Lin W, Chen D. Significance of study on microalgae-bacterial relationship in mariculture[J]. *Marine Sciences*, 1998, **4**: 34—37 [林伟, 陈驊. 微藻与细菌相互关系研究在海水养殖中的重要意义[J]. 海洋科学, 1998, **4**: 34—37]
- [15] He SY, Wang KX. The changes of population and quantity of bacteria in shrimp tanks[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1999, **6**(1): 125—127 [何曙阳, 王克行. 中国对虾育苗池细菌种群数量变化研究[J]. 中国水产科学, 1999, **6**(1): 125—127]

EFFECTS OF THE IMMOBILIZED MICROALGAE ON THE QUANTITY DYNAMICS OF *VIBRIO* IN THE SHRIMP PONDS

HUANG Xiang-Hu, LI Chang-Ling, ZHENG Lian, LIU Chu-Wu and WANG Rui-Xuan

(Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025)

Abstract: There is close relationship between algae and microbes. The structure of bacterial community can be controlled by microalgae in the culture system of shrimp. The physiological capabilities of the microalgal cells are increased by the immobilization. After immobilized *Oocystis borgei* and *Nannochloris oculata* are artificially introduced into the culture system of *Litop Penaeus vannamei*, the numbers of *Vibrio* are inspected in the water, stomach and intestine posterior of shrimp to study the influence of immobilized microalgae over the quantity dynamics of *Vibrio*. The result shows that there is not detectable *Vibrio* in both the culture systems with *Oocystis borgei*, *Nannochloris oculata* after 9 days, 15 days culture in this experiment respectively. There is not *Vibrio* in the culture system with microalga in the late period of culture. Introducing the algal alginate beads of *Oocystis borgei* and *Nannochloris oculata* into cultural environment of shrimp can inhibit growth of *Vibrio*. The numbers of *Vibrio* in the water, stomach and intestine posterior of shrimp in the culture system with *Oocystis borgei*, *Nannochloris oculata*. *Oocystis borgei* mixing with Immobilized *Nannochloris oculata* are depressed 69.92%, 63.67%, 72.07%; 71.76%, 70.79%, 79.30% and 80.22%, 79.12%, 81.78% respectively in contrast to the control group. The inhibitory effect of immobilized *Oocystis borgei* mixing with immobilized *Nannochloris oculata* is better than immobilized *Oocystis borgei* and immobilized *Oocystis borgei* is better than immobilized *Nannochloris oculata*. The *Vibrio* numbers of the experiment group in the late period of the experiment are less than the early. The microalgas cell numbers in the algal beads begin to increase at second day of this experiment. The color of the algal alginate beads is bottle green in the late period of the experiment. The cell numbers of immobilized *Oocystis borgei* and *Nannochloris oculata* in the per bead increased from 0.33×10^7 to 3.17×10^7 cells and 1.50×10^7 to 25.47×10^7 cells respectively and the biomass is increased about 10 and 17 times respectively in 21 days of culture in this experiment. This proved that the physiological capabilities of the immobilized microalgal cells are not interrupted by the immobilization. Thus, the immobilized microalgae can be used to micro-ecology control to prevent shrimp disease in the shrimp pond.

Key words: Immobilized microalgae; Algal alginate-bead; Bacteria; Micro-ecology control