

# 对虾池悬浮颗粒附着细菌的研究\*

刘国才 李德尚 徐怀恕 董双林

(青岛海洋大学水产学院, 青岛 266003)

**摘要** 用5个实验围隔研究了对虾池悬浮颗粒上的附着细菌, 结果表明: 附着细菌数量波动在 $0.65 \times 10^4 \sim 23.49 \times 10^4$ 个/ $\text{cm}^3$ 之间, 平均为 $(4.57 \pm 3.64) \times 10^4$ 个/ $\text{cm}^3$ , 占水体细菌总数的 $1.47\% \pm 1.41\%$  ( $0.28\% \sim 8.73\%$ )。附着细菌数为1、2、3、4个的附菌颗粒占总附菌颗粒的比数分别为40%、27%、15%及11%, 多于4个附着细菌的附菌颗粒数仅占总附菌颗粒数的7%; 总悬浮颗粒中的附菌颗粒所占比例为52%; 附着细菌数与水体总悬浮颗粒数关系最为密切, 与水温及总细菌数也具有显著相关性, 但与水层POC及DOC含量却未呈现显著的相关性。

**关键词** 对虾池 实验围隔 附着细菌 悬浮颗粒

## 1 引言

细菌在水域生态系食物网营养动力学及DOC和POC矿化中具有重要作用。大多数研究工作重点放在游离细菌作用上, 而关于颗粒物上的附着细菌的重要性则尚未明了。

与游离细菌相比较, 附着细菌的数量及生物量均很小, 以往的研究通过镜检显示许多颗粒并未有细菌附着<sup>[1]</sup>, 单位颗粒上附着细菌数常少于3个<sup>[2]</sup>, 附着细菌数占总细菌数比例多数不足10%<sup>[3]</sup>。此外, 附着细菌虽然具有较高的代谢活性——较大的细胞体积及对基质较高的吸收率<sup>[2,3]</sup>, 但由于吸收营养物质多用于胞外多聚物(用于附着)的生产, 因此附着细菌的生产速率并不高<sup>[1]</sup>。多数研究表明, 附着细菌对水层颗粒腐质的降解作用是不显著的<sup>[2,3]</sup>。

当前, 有关水域生态系统附着细菌的研究多数限于海洋、湖泊等自然水体, 池塘颗粒附着细菌的研究资料很少<sup>[2]</sup>, 而海水养虾池附着细菌的研究则尚未见报道。为查明虾池附着细菌状况、正确评价附着细菌在虾池养殖生态系中的作用, 于1997年5~9月在山东黄海水产集团养虾场进行了本研究。

本文于1997-12-19收到, 修改稿于1998-04-10收到。

\* 国家自然科学基金重点项目(编号: 39430102)、国家教委博士点专项基金(编号: 9542304)及国家攀登计划(PD-B6-7-3专题)资助项目部分成果。

第一作者简介: 刘国才, 男, 32岁, 副教授, 博士, 现从事水产养殖环境生态学研究。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验围隔, 放养搭配及养殖管理

本研究使用了对虾单养(Y4)及对虾-扇贝(Y5)、对虾-缢蛭(Y6)、对虾-罗非鱼(Y7)、对虾-罗非鱼-缢蛭混养(T5) 5个实验围隔. 各围隔面积均为 $25\text{ m}^2$  ( $5\text{ m}\times 5\text{ m}$ ), 对虾放养密度均为 $7.2\text{ 个}/\text{m}^2$ . 前4种养殖模式围隔中扇贝、罗非鱼及缢蛭的放养密度( $\text{个}/\text{m}^2$ )依次为1.54、0.24及20. 虾-罗非鱼-缢蛭混养围隔罗非鱼、缢蛭的放养密度( $\text{个}/\text{m}^2$ )为0.12及10. 罗非鱼都在设于围隔中的网箱中圈养. 养殖期间仅对对虾投喂人工饲料, 两个饵料台分别设在围隔两对角位置, 每天投喂4次, 混养生物不专门投喂, 仅以腐屑及浮游生物为食. 各围隔都在放养前施足基肥(鸡粪)培养饵料生物, 放养后据透明度、Chl a及营养盐情况适当追施化肥.

### 2.2 悬浮颗粒、附菌颗粒及附着细菌计数方法

#### 2.2.1 水样采集

1997年5月30日至8月25日对5个实验围隔悬浮颗粒、附菌颗粒及附着细菌数量进行测定, 每次测定取围隔中层( $0.5\text{ m}$ )水样, 现场用2%无颗粒甲醛(经 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤)固定.

#### 2.2.2 计数方法

采用吖啶橙染色荧光显微计数法(AODC法<sup>[4]</sup>). 取定量的已固定水样用0.01%吖啶橙(AO)染色3 min, 之后用低度真空( $<0.03\text{ MPa}$ )抽滤在直径 $25\text{ mm}$ 、孔径 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 的核孔滤膜(Nucleopore filter)上. 滤膜事先在以2%醋酸溶液配制的2.0% Irgalan black(美国Ciba-Geigy公司产品)溶液中浸泡24 h, 以消除滤膜的自发荧光. 将滤膜置于载玻片上, 滴1滴无菌水, 盖上盖玻片, 加低度荧光显微镜专用油, 在落射光荧光显微镜下计数视野中颗粒数(每个样品至少计数40个视野, 20个以上颗粒)、附菌颗粒数及附着细菌数<sup>[2]</sup>. 显微镜为XSJ-2型大型研究用显微镜, 光源为100 W汞灯, 激发光滤光片为 $450\sim 490\text{ nm}$ 、光束分离滤光片为 $510\text{ nm}$ 、阻挡滤光片为 $520\text{ nm}$ .

### 2.3 水体 POC、DOC 测定

#### 2.3.1 POC

取定量的各实验围隔水样分别过滤在两张直径为 $25\text{ mm}$ 的Whatman GF/F玻璃纤维滤膜(预先经 $450\text{ }^\circ\text{C}$ 灼烧2 h以去除滤膜中有机碳)上, 以在滤液里浸过的空白滤膜中所含的有机碳做为空白(校正过滤过程中滤膜上吸收的溶解有机碳). 将两样品一空白计3张滤膜置于含浓盐酸蒸汽的干燥器(干燥器底部放一培养皿, 内盛满浓盐酸)中熏蒸15 min, 以去除其中的无机碳. 之后取出滤膜,  $60\text{ }^\circ\text{C}$ 下烘干, 在PE240CHN元素分析仪上测定POC含量.

#### 2.3.2 DOC

用过硫酸钾氧化法<sup>[5]</sup>, 取POC测定中滤过液 $50\text{ cm}^3$ , 经酸化通氮气除去无机碳后, 用过硫酸钾将有机碳氧化成 $\text{CO}_2$ 气体, 用非色散红外二氧化碳气体分析仪测定.

## 3 结果

### 3.1 悬浮颗粒、附菌颗粒及附着细菌数

各实验围隔水体悬浮颗粒、附菌颗粒及附着细菌数测定结果见表1、2.

表 1 各实验围隔水体悬浮颗粒及附菌颗粒\*

日期	Y4			Y5			Y6			Y7			T5		
	P	BP	BP/P	P	BP	BP/P	P	BP	BP/P	B	BP	BP/P	P	BP	BP/P
05-30	3.77	2.26	0.60	2.61	0.52	0.20	3.12	1.71	0.55	1.86	0.56	0.30	2.66	0.93	0.35
06-10	3.28	2.36	0.70	3.28	1.01	0.30	2.79	1.82	0.65	2.70	1.62	0.60	2.66	1.33	0.50
06-20	4.38	3.06	0.70	3.89	1.59	0.41	2.61	0.78	0.30	2.61	1.05	0.40	3.52	2.11	0.60
06-29	3.52	2.47	0.70	3.86	1.93	0.50	5.23	2.09	0.40	4.76	2.62	0.55	4.15	1.66	0.40
07-14	2.13	0.64	0.30	5.23	3.92	0.75	2.42	1.21	0.50	3.45	2.24	0.65	2.25	1.58	0.70
07-24	1.62	0.49	0.30	5.40	3.78	0.70	1.98	1.09	0.55	3.68	2.21	0.60	2.19	1.31	0.60
08-05	4.05	2.23	0.55	2.45	0.74	0.30	3.16	0.93	0.29	2.31	0.81	0.35	3.52	1.41	0.40
08-15	16.20	9.72	0.60	4.05	2.63	0.65	2.38	1.43	0.60	2.84	1.56	0.55	5.40	2.79	0.55
08-25	10.13	4.05	0.40	6.23	2.18	0.35	4.05	2.03	0.50	4.05	2.23	0.55	4.26	2.56	0.60

\* P: 悬浮颗粒数 ( $\times 10^4$ 个/cm<sup>3</sup>); BP: 附菌颗粒数 ( $\times 10^4$ 个/cm<sup>3</sup>).

表 2 各实验围隔水体悬浮颗粒附着细菌数量\*

日期	Y4				Y5				Y6				Y7				T5			
	BB	TB	K1	K2	BB	TB	K1	K2	BB	TB	K1	K2	BB	TB	K1	K2	BB	TB	K1	K2
05-30	3.58	0.41	8.73	1.58	0.65	1.36	0.48	1.25	2.69	0.98	3.02	1.73	0.75	0.42	1.79	1.34	1.46	0.72	2.03	1.57
06-10	4.39	1.76	2.49	1.86	1.86	1.13	1.65	1.84	4.89	1.08	4.53	2.69	3.92	1.59	2.47	2.42	2.39	2.13	1.21	1.80
06-20	4.38	3.87	1.13	1.43	3.76	2.53	1.49	2.36	0.92	1.87	0.49	1.18	3.00	2.52	1.19	2.86	4.23	3.15	1.34	2.00
06-29	5.28	3.14	1.68	2.14	4.82	3.57	1.35	2.50	4.70	6.09	0.77	2.25	5.72	9.88	0.58	2.18	3.74	7.63	0.49	2.25
07-14	1.49	5.10	0.29	2.33	8.10	6.43	1.26	2.07	2.54	9.23	0.28	2.10	4.65	10.63	0.44	2.08	3.26	9.53	0.34	2.06
07-24	1.30	3.97	0.33	2.65	9.18	7.37	1.25	2.43	6.03	9.17	0.66	5.53	4.05	2.32	1.75	1.83	3.72	4.10	0.91	2.84
08-05	5.67	5.81	0.98	2.54	1.81	2.81	0.64	2.45	1.56	4.17	0.37	1.68	2.08	4.61	0.45	2.57	4.58	3.15	1.45	3.25
08-15	23.49	6.87	3.42	2.42	5.87	3.99	1.47	2.23	3.93	3.42	1.15	2.75	2.84	4.24	0.67	1.82	7.29	4.24	1.72	2.45
08-25	11.14	9.14	1.22	2.75	6.23	3.29	1.89	2.86	6.48	6.38	1.02	3.19	5.27	3.15	1.67	2.36	5.97	5.36	1.11	2.33

\* BB: 附着细菌数 ( $\times 10^4$ 个/cm<sup>3</sup>); TB: 总细菌数 ( $\times 10^6$ 个/cm<sup>3</sup>); K1: BB/TB (%); K2: BB/BP (%).

由表 1 可知, 各实验围隔水体悬浮颗粒数平均为  $(3.84 \pm 2.38) \times 10^4$  个/cm<sup>3</sup>, 其中附菌颗粒数为  $(1.99 \pm 1.47) \times 10^4$  个/cm<sup>3</sup>, 附菌颗粒数占总悬浮颗粒数的比例为 52%。

由表 2 可知各实验围隔附着细菌数量为  $(4.57 \pm 3.64) \times 10^4$  个/cm<sup>3</sup>, 附着细菌数占总细菌数的比例为  $1.47\% \pm 1.41\%$  (0.28%~8.73%)。

### 3.2 附菌颗粒上的附着细菌数

对各实验围隔单位附菌颗粒上的附菌数进行统计, 可知各围隔水体单位颗粒附菌数为 1、2、3、4 的附菌颗粒占总附菌颗粒比例分别为 40%、27%、15% 及 11%, 附菌数在 4 个以上的悬浮颗粒数占总附菌颗粒的比例仅为 7% (见图 1)。

### 3.3 附着细菌数与主要水质因子的关系

研究期间实验围隔的水温、POC 及 DOC 见图 2 及表 3。

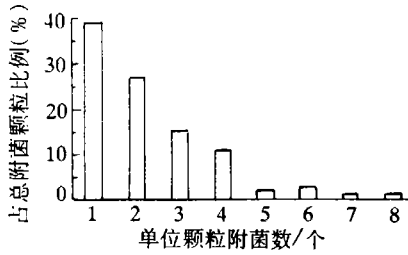


图1 附着不同数量细菌的颗粒数占总附菌颗粒的比例

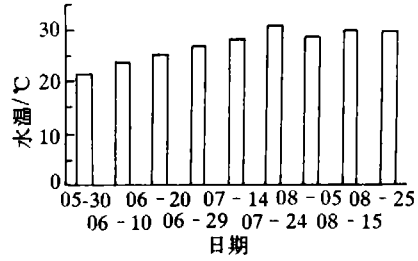


图2 实验围隔水温变化情况

将表2中附着细菌数与图2水温、表1悬浮颗粒数、总细菌数及表3中POC、DOC进行统计分析,可知附着细菌数与水温( $r=0.3824$ ,  $n=45$ )、总悬浮颗粒数( $r=0.9275$ ,  $n=45$ )及总细菌数( $r=0.4002$ ,  $n=45$ )均呈现显著正相关.但与水体POC及DOC却无显著相关性.

表3 各实验围隔水体POC、DOC及TOC变化情况(C) (单位:  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ )

日期	Y4			Y5			Y6			Y7			T5		
	POC	DOC	TOC	POC	DOC	TOC	POC	DOC	TOC	POC	DOC	TOC	POC	DOC	TOC
05-30	—	—	—	—	—	—	—	7.69	—	—	9.55	—	—	—	—
06-10	5.23	11.49	16.72	3.18	8.88	12.06	2.60	9.14	11.74	3.19	9.07	12.26	4.74	10.75	15.50
06-20	5.02	14.74	19.76	3.51	9.77	13.28	2.41	11.18	13.59	2.51	10.66	13.17	2.67	10.44	13.11
06-29	4.15	13.57	17.72	4.34	11.50	15.84	3.64	7.87	11.51	4.40	8.63	13.03	2.12	10.71	12.83
07-14	3.33	12.07	15.40	2.64	10.97	13.61	2.26	8.25	10.51	7.44	9.34	16.78	3.05	8.14	11.19
07-24	2.55	11.62	14.17	4.23	9.97	14.20	4.23	8.31	12.54	4.21	15.11	19.32	7.62	10.86	18.48
08-05	2.18	9.52	11.70	3.10	10.22	13.32	3.38	8.88	12.26	1.02	9.32	10.34	0.55	8.60	9.15
08-15	3.06	8.75	11.81	1.12	9.77	10.89	0.93	13.79	14.72	0.67	10.64	11.31	1.01	10.42	11.43
08-25	3.04	7.96	11.00	3.35	7.08	10.43	1.80	6.89	8.69	2.32	6.67	9.01	1.04	6.52	7.56

## 4 讨论

水体附着细菌与游离细菌比较,数量及生物量均很少. Kirchman等<sup>[2]</sup>对养鳃池及富营养淡水池塘附着细菌进行研究后发现,附着细菌数量及其占总细菌数的比例均很小,所研究池塘附着细菌数量平均为 $10.73 \times 10^4$ 个/ $\text{cm}^3$ ,占总细菌数的1.57%.本研究虾池附着细菌数量( $4.57 \times 10^4$ 个/ $\text{cm}^3$ )低于上述池塘报道,但附着细菌数占总细菌数的比例(1.47%)与上述报道相近.

颗粒物质的质量和数量是影响附着细菌数量的两个重要方面,相对而言,颗粒物质的质量可能对附着细菌影响较大,已发现湖泊中细菌附着程度和单位颗粒腐质碳含量之间具有弱的但却显著的相关性<sup>[1]</sup>.海水养虾池由于养殖对虾的搅泥、搅水作用强烈,水层悬浮颗粒物中无机成分比例很高(约50%)<sup>[1]</sup>.根据湖泊中的情况推断,虾池较多的无机颗粒应不利于细菌

附着及生长,然而本文实际测定结果证明附着细菌数与水层 POC 含量并无显著相关性,却与总悬浮颗粒数呈现极显著正相关,这说明虾池附着细菌数量主要取决于总悬浮颗粒数的多少,与 POC 含量关系不大. Cammen 等<sup>[6]</sup>也发现,附着细菌数与腐质颗粒碳含量间并未有显著相关性. 从本文测定的悬浮颗粒物附菌情况看,约一半的悬浮颗粒无任何细菌附着(见表 1),而附菌数在 4 个以上的附菌颗粒也仅占总附菌颗粒数的 7% (见图 1). Kirchmen 等<sup>[2]</sup>对一些淡水和河口系统的研究也发现 30%~80% 的颗粒附着细菌数少于 3 个,这都说明颗粒物的多数表面并未被细菌附着. 因此看来,较多数量的附着基与充足的营养供给对细菌附着可能同等重要. 无机颗粒虽然本身不能对附着细菌提供营养,但其表面的 DOM 可被附着细菌利用,仍能够维持其表面少量附着细菌的生长. 这一推论也为其他研究者的关于附着细菌数与悬浮颗粒数之间有极显著正相关<sup>[2,3,6~8]</sup>的结论所支持.

既然许多悬浮颗粒并无附着细菌,并且附菌颗粒的很多表面也无细菌附着,说明颗粒物的表面积并非附着细菌的限制因素,但为什么颗粒数目对附着细菌影响又如此重要呢?对此迄今尚无说明. Moriarty 等<sup>[3]</sup>认为,附着细菌数量与细菌碰到颗粒的机率有关,如果颗粒密度大,则碰到的机会就多. 另外,颗粒物并非所有表面均可被细菌利用,颗粒数目多可使可用性表面增加.

附着细菌数量与水层 DOC 无显著相关性,这可能在于附着细菌生长繁殖的营养来源主要在于腐质颗粒本身以及颗粒表面吸附的溶解有机质. Jannasch 等<sup>[9]</sup>的研究也发现,附着细菌的营养需求与水层溶解有机质关系不大.

附着细菌数与水温呈现显著正相关,说明随着水温升高,附着细菌的生长繁殖加快,附着细菌数量增加,与此同时,单位颗粒上的附着细菌数也有所增加(见表 2).

附着细菌数与总细菌数也呈现显著正相关,但研究期间附着细菌数占总细菌数比例在各实验围隔并未呈现一致的变化趋势,说明占总细菌比例很小的附着细菌的生长繁殖在营养物质的吸收上与游离细菌竞争不大,二者数量变动的一致性共同影响二者数量的环境因子的变化所致.

值得特别指出的是,目前有关附着细菌数量的研究方法可能造成测定结果偏低. 其原因在于水样过滤可能使附着细菌与颗粒物质分离. 另附着细菌计数时,位于颗粒底部及嵌入颗粒内部的细菌不被计数,据 Kirchman 等<sup>[2]</sup>推算,此影响可使附着细菌数量被低估 45%.

除上述方法问题外,一些因子可能限制附着细菌数目的增加,如浮游动物摄食作用. 研究发现,较大个体的附着细菌-腐质颗粒混合体更适合于浮游动物摄食<sup>[10]</sup>.

附着细菌数量及生物量很小,但却较游离细菌具有大的代谢活力,主要表现在附着细菌对营养物质吸收速率快<sup>[2]</sup>,且具有较大的细胞体积<sup>[11]</sup>. 但由于吸收营养物质很多用于胞外多聚物生产(用于附着),因而其生长效率反而低于游离细菌<sup>[1]</sup>,在自然水体中其生产量通常不及总细菌生产量的 20%<sup>[3]</sup>. 我们对虾池附着细菌的研究还表明,附着细菌体积虽然大于游离细菌,但却未呈现如自然水体(一些海水及淡水水体)相差几倍<sup>[3]</sup>的情况,这可能与虾池游离细菌营养条件较好有关.

1) 刘国才,李德尚,徐怀恕等. 对虾池综合养殖生态系悬浮颗粒物的研究(另文发表).

## 参考文献

- 1 Kirchman D. The production of bacteria attached to particle suspended in a freshwater pond. *Limnol. Oceanogr.*, 1983, **28**, 858~872
- 2 Kirchman D Mitchell R. Contribution of particle-bound bacteria to total microheterotrophic activity in five ponds and two marshes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, **43**, 200~209
- 3 Moriarty D J W, Ducklow H W. Trophic dynamics of particle-bound bacteria in pelagic ecosystems; a review. In: *Detritus and Microbial Ecology in Aquaculture*, Published by the International Center for Living Aquatic Resources Management, MC P. O. Box 1501, Makati, Metro Manila, Philippines, 1987, 54~82
- 4 Hobbie J E, Daley R J, Jasper S. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1977, **33**, 1 225~1 228
- 5 国家海洋局发布. 海洋监测规范 (中华人民共和国行业标准). 北京: 海洋出版社, 1991, 262~264
- 6 Cammen L M, Walker J A. Distribution and activity of attached and free-living suspended bacteria in the Bay of Fundy. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.*, 1982, **39**, 1 655~1 663
- 7 Bell C R, Albright L J. Attached and free-floating bacteria in a diverse selection of water bodies. *Appl. Environ. Microb.*, 1982, **43**, 1 227~1 237
- 8 Ducklow H W, Kirchman D L. Bacterial dynamics and distribution during a spring diatom bloom in the Hodson River plume. USA. *J. Plancton Res.*, 1983, **5**, 333~355
- 9 Jannasch H W, Pritchard P H. The role of inert particulate matter in the activity of aquatic microorganisms. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol. Suppl.*, 1972, **29**, 289~308
- 10 Ferguson R L, Rublee P. Contribution of bacteria to standing crop of coastal plankton. *Limnol. Oceanogr.*, 1976, **21**, 141~145
- 11 Larsson U, Hagstrom A. Fractioned phytoplankton primary production, exudate release and bacterial production in a Baltic eutrophication gradient. *Mar. Biol.*, 1982, **67**, 57~70

## A study on bacteria attached to suspended particles in shrimp ponds

Liu Guocai,<sup>1</sup> Li Deshang,<sup>1</sup> Xu Huaishu,<sup>1</sup> Dong Shuanglin<sup>1</sup>

1. Fisheries College of Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003

**Abstract**—Bacteria attached to suspended particles in shrimp ponds are studied with five experimental enclosures and several important results are obtained. The number of those bacteria fluctuated between  $0.65 \times 10^4$  and  $23.49 \times 10^4$  ind./cm<sup>3</sup>, averaged  $(4.57 \times 10^4 \pm 3.64 \times 10^4)$  ind./cm<sup>3</sup>, and is 1.47% (0.28%~8.73%) of the total bacteria. The number of particles which attached by 1, 2, 3 and 4 bacteria is 40%, 27%, 15% and 11% of the total particles attached by bacteria, respectively. The number of particles which attached more than 4 bacteria is only 7% of the total particles attached by bacteria. The percent of particles attached by bacteria is 52% to the numbers of total particles. There is an obvious correlation between the number of bacteria attached to particles and the number of total particles. The number of particle-bound bacteria is correlated positively with water temperature and the total number of bacteria, but is not correlated with POC and DOC.

**Key words** Shrimp pond, experimental enclosure, particle-bound bacteria, suspended particle