

胶红酵母和短小芽孢杆菌对魁蚶苗种早期培育的影响研究

郑纪盟^{1,2}, 孙国祥¹, 刘志培³, 梁峻⁴, 赵学伟⁴, 刘鹰^{1*} (1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101; 4. 獐子岛集团股份有限公司, 辽宁大连 116001)

摘要 [目的] 为短小芽孢杆菌和胶红酵母菌在魁蚶育苗中的应用提供理论参考。[方法] 在饵料中添加短小芽孢杆菌 CGMCC 1004 菌株(0%、0.5%、1.0%)和胶红酵母菌 CGMCC 1013 菌株(0%、0.5%、1.0%)进行魁蚶育苗, 探讨 2 种益生菌对魁蚶幼虫生长、存活、附着变态以及水体中氨氮和亚硝酸氮浓度的影响。[结果] 单独添加酵母菌及同时添加芽孢杆菌和酵母菌对壳长有显著影响($P < 0.05$), 其中 0.5% 酵母菌和 0.5% 芽孢杆菌的添加组合效果最佳; 单独添加芽孢杆菌以及同时添加酵母菌和芽孢杆菌对壳高有显著影响($P < 0.05$), 其中单独添加 1.0% 芽孢杆菌的效果最为显著; 单独添加 0.5% 酵母菌及同时添加 0.5% 酵母菌和 0.5% 芽孢杆菌对魁蚶幼虫的附着变态作用效果较好; 在试验过程中水体中氨氮和亚硝酸氮(NO_2^- -N)浓度均低于 0.20 mg/L。[结论] 在魁蚶育苗过程中添加适量的芽孢杆菌和酵母菌是可行的, 能更好促进魁蚶幼虫的生长, 其中添加 0.5% 酵母菌和 0.5% 芽孢杆菌的育苗效果最好。

关键词 魁蚶; 短小芽孢杆菌 CGMCC 1004; 胶红酵母菌 CGMCC 1013; 育苗

中图分类号 S944.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)23-07773-03

Study on the Effects of *Bacillus pumilus* and *Rhodotorula mucilaginosa* on the Early Cultivation of *Scapharca broughtonii* Seedlings

ZHENG Ji-meng, LIU Ying et al (Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266071; University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract [Objective] The research aimed to provide theoretical references for the application of *Bacillus pumilus* and *Rhodotorula mucilaginosa* in the seedling cultivation of *Scapharca broughtonii*. [Method] *Bacillus pumilus* CGMCC 1004(0%, 0.5%, 1.0%) and *Rhodotorula mucilaginosa* CGMCC 1013(0%, 0.5%, 1.0%) were added in the water body to cultivate *S. broughtonii*. The effects of two kinds of probiotics on the growth, survival and attachment and metamorphosis of *S. broughtonii* larva and the concentration of ammonia nitrogen and nitrogen nitrite in water body were discussed. [Result] Supplementing *R. mucilaginosa* only and supplementing *R. mucilaginosa* and *B. pumilus* simultaneously had significant effects on the shell length of *S. broughtonii* ($P < 0.05$), and the effect of supplementing 0.5% *R. mucilaginosa* and 0.5% *B. pumilus* simultaneously was the best. Supplementing *B. pumilus* only and supplementing *R. mucilaginosa* and *B. pumilus* simultaneously had significant effects on the shell height ($P < 0.05$), and the effect of supplementing 1.0% *B. pumilus* only was the most significant. Supplementing *R. mucilaginosa* only and supplementing *R. mucilaginosa* and *B. pumilus* simultaneously had obvious effects on the attachment and metamorphosis of *S. broughtonii* larva. During the test process, the concentrations of ammonia nitrogen and nitrogen nitrite in water body were both less than 0.20 mg/L. [Conclusion] It was feasible to supplement appropriate amount of *R. mucilaginosa* and *B. pumilus* in the seedling cultivation of *S. broughtonii*, by which the growth of *S. broughtonii* larva could be promoted. The seedling cultivation effects of *S. broughtonii* with supplementing 0.5% *R. mucilaginosa* and 0.5% *B. pumilus* was the best.

Key words *Scapharca broughtonii*; *Bacillus pumilus* CGMCC 1004; *Rhodotorula mucilaginosa* CGMCC 1013; Seedling cultivation

魁蚶(*Scapharca broughtonii*), 俗称赤贝、血贝等, 隶属瓣鳃纲、蚌目、蚌科, 是一种产量高、经济价值较大的贝类。魁蚶成体较大, 肉质鲜嫩, 富含蛋白质和维生素 B₁₂, 是少数可以生食的贝类品种之一, 因而颇受消费者喜爱^[1]。魁蚶工厂化育苗始于 20 世纪 90 年代初, 育苗中大多采用扇贝或对虾育苗的设施^[2]。由于魁蚶育苗生产极易受到水质状况的影响^[3], 为了减少水质恶化和提高育苗成活率, 在传统育苗过程中需经常性换水和倒池, 这导致饵料利用率低、劳动时间长和工人劳动强度大等问题。因此, 如何改善水质, 解决传统育苗存在的问题, 成为魁蚶育苗成功与否的关键。

益生菌因具有改善水体环境、增强养殖生物免疫力和促进生长等优点, 已逐渐在养殖和育苗生产中得到应用^[4-6]。水产养殖中常用的益生菌主要有光合细菌、芽孢杆菌(枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌)、酵母菌和乳酸菌(嗜酸乳酸菌和双歧杆菌)^[7]。近年来, 益生菌在海淡水鱼、虾、蟹、贝(鲍、

太平洋牡蛎、西施舌等)的育苗和养成过程中的研究和应用较多^[8], 并获得很好的效果, 但有关益生菌在魁蚶育苗中的应用研究还未见报道。笔者利用自主筛选的益生菌——短小芽孢杆菌 CGMCC 1004 菌株(*Bacillus pumilus* CGMCC 1004)和胶红酵母菌 CGMCC 1013 菌株(*Rhodotorula mucilaginosa* CGMCC 1013), 进行魁蚶育苗应用的研究, 探讨 2 种益生菌对幼虫生长、存活和附着变态以及对水体中氨氮和亚硝酸氮浓度的影响, 以期 2 种益生菌在魁蚶育苗中的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料 以獐子岛集团股份有限公司贝类良种厂自行培育的魁蚶幼虫为材料, 幼虫初始壳长和壳高分别为(98.4 ± 7.5) μm 和(65.6 ± 4.3) μm。试验用菌剂为自行分离、培养的短小芽孢杆菌 CGMCC 1004 菌株和胶红酵母菌 CGMCC 1013 菌株, 菌液浓度分别为 5.5 × 10⁹ 和 3 × 10⁸ cfu/ml。试验期间饵料采用自行培养的湛江叉鞭金藻(约 80%)、小球藻和牟氏角毛藻(各约 10%)。

1.2 试验设计 采用两因素三水平的试验设计, 不同组合饵料中 2 种益生菌的添加量见表 1。A 代表胶红酵母菌(以下简称酵母菌), B 代表短小芽孢杆菌(以下简称芽孢杆菌)。添加量 0、0.5% 和 1.0% 分别用 1、2、3 表示, 每个处理设 3 个

基金项目 国家贝类产业技术体系项目(CARS-48); 国家科技支撑计划课题(2011BAD13B04); 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201003024)。

作者简介 郑纪盟(1988-), 男, 山东菏泽人, 硕士研究生, 研究方向: 养殖环境工程。* 通讯作者, 研究员, 从事水产工程及生态学研究。

收稿日期 2014-07-09

重复。

表1 不同试验组饵料中益生菌的添加量 %

组别	酵母菌	芽孢杆菌
A1B1	0	0
A1B2	0	0.5
A1B3	0	1.0
A2B1	0.5	0
A2B2	0.5	0.5
A2B3	0.5	1.0
A3B1	1.0	0
A3B2	1.0	0.5
A3B3	1.0	1.0

1.3 养殖管理 幼虫养殖于100 L(直径50 cm,高53 cm)聚乙烯塑料桶中,实际养殖水体为95 L。初始密度均为4个/ml。试验用海水从自然海区抽取并经沉淀和砂滤。试验期间海水温度为(23.6 ± 1.2) °C,盐度为(28‰ ~ 29‰),溶解氧为(7.50 ± 0.50) mg/L, pH为(8.30 ± 0.20),室内光照低于400 lux。培育过程中连续微量充气,附着后期加大充气。早晚各换水1次,每次换水量为试验水体的1/3,每3 d倒池1次,投放附着基后每次换水量改为试验水体的1/2。每天投喂4次,投喂量根据水色和幼虫摄食情况适当调整。每天在换水后按照试验设计添加益生菌,投喂前先将益生菌和饵料混合均匀后再投入到试验桶中。

1.4 测定与指标方法

1.4.1 生长指标。每周测定1次幼虫的壳长(SL)和壳高(SH)。取样时将水体轻轻搅匀后取10 ml,用碘液杀死幼虫,在显微镜下随机选取30个幼虫测定其壳长和壳高。

1.4.2 水质。隔天在换水前取水样测定水质指标(总氨氮TAN和亚硝氮NO₂⁻-N)。TAN的测定采用纳氏试剂分光光度法^[9],而NO₂⁻-N的测定采用萘乙二胺分光光度法^[10]。

1.4.3 附着率。试验桶中魁蚶眼点幼虫超过30%时,投放相同数量的棕色帘子的附着基,附着过程中每天监测试验桶中幼虫的密度。按照以下公式计算附着变态率: $R(\%) = (D_i - D_f) / D_i \times 100$ 。式中,R表示附着率,D_i代表开始投放附着基时的幼虫密度值(个/ml),D_f表示取样时的幼虫密度值(个/ml)。

1.5 数据处理与分析 试验数据采用SPSS19软件进行双因素方差分析(Two-way ANOVA),结果均以平均值 ± 标准差表示,采用LSD方法进行多重比较,P ≤ 0.05表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 益生菌对魁蚶幼虫生长的影响 从图1可以看出,单独添加酵母菌及同时添加芽孢杆菌和酵母菌对壳长的生长有显著影响(P < 0.05);单独添加芽孢杆菌对壳长的生长无显著影响(P > 0.05)。添加中、低比例的酵母菌和芽孢杆菌对魁蚶幼虫壳长的生长具有促进作用,其中以0.5%芽孢杆菌和0.5%酵母菌添加组合的效果最为显著(P < 0.05),比对照组提高了25.8 μm。与对照组(A1B1)相比,A3B2的投喂组合壳长的生长抑制了20.1 μm。

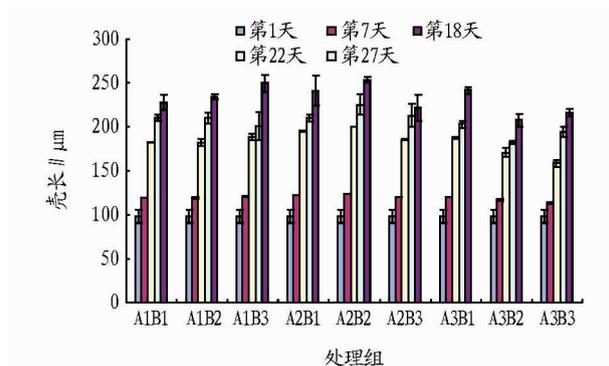


图1 不同益生菌处理对魁蚶幼虫壳长的影响

从图2可以看出,单独添加芽孢杆菌以及同时添加酵母菌和芽孢杆菌对壳高的生长有显著促进作用(P < 0.05),其中A1B3的添加组合效果最为显著(P < 0.05),与对照相比壳高的生长提高了14.6 μm。单独添加酵母菌对壳高的生长无显著影响(P > 0.05)。

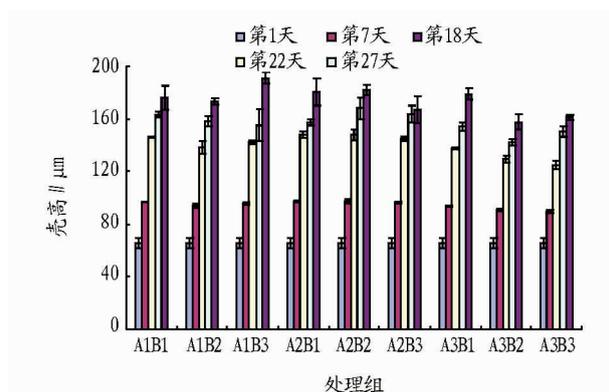


图2 不同益生菌处理对魁蚶幼虫壳高的影响

2.2 益生菌对魁蚶幼虫附着率的影响 从图3可以看出,处理组A3B3和对照组A1B1对魁蚶幼虫附着率无显著影响(P > 0.05);处理组A2B1和A2B2中魁蚶幼虫的附着率显著优于对照组A1B1(P < 0.05),提高了6.2%;处理组A2B1和A2B2的魁蚶幼虫附着率没有显著差异(P > 0.05)。

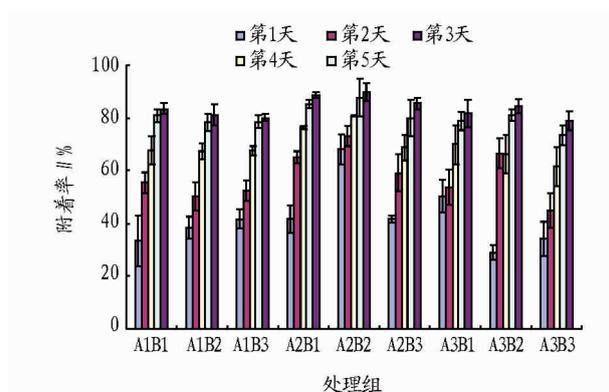


图3 不同益生菌处理对魁蚶幼虫附着率的影响

2.3 益生菌对育苗水质指标的影响 在36 d的试验过程中,总氨氮(TAN)浓度始终维持在较低水平,均低于国家渔业水质标准(TAN < 1.0 mg/L)。由于投放附着基后增加了换水量,因此在第31天以后水体TAN浓度下降。由于试验

过程中每 2 d 进行 1 次倒池,在倒池后水体中 TAN 浓度也有所下降(图 4)。

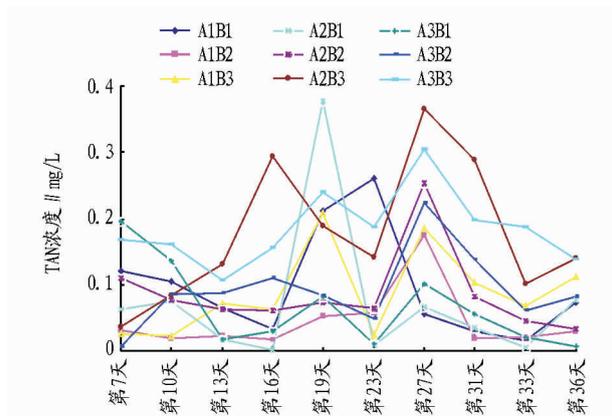


图 4 不同益生菌处理对养殖水体 TAN 浓度的影响

从图 5 可以看出,试验过程中水体中 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 的浓度始终处于较低水平,为 $(0.013 \pm 0.003) \text{ mg/L}$, 低于 0.02 mg/L 以下。试验过程中由于每 2 d 进行 1 次倒池,在倒池后水体中 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 浓度下降,在换水周期内亚硝酸氮的浓度基本维持不变,各处理组间无显著差异。

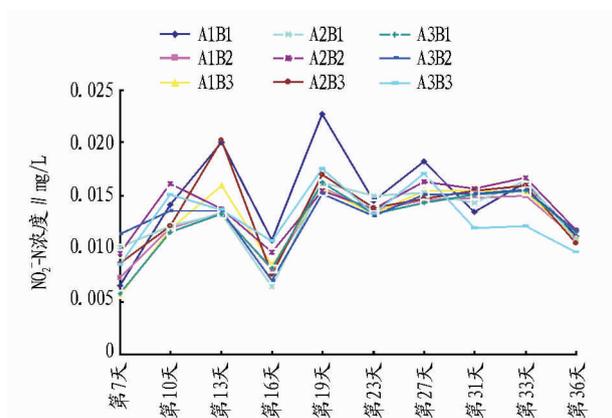


图 5 不同益生菌处理对养殖水体 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 浓度的影响

3 讨论与结论

芽孢杆菌属是一类好氧或兼性厌氧的革兰氏阳性、可以产生抗逆性内生孢子的杆状细菌,目前在水产养殖中常用的芽孢杆菌属细菌主要有蜡质芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌等。投入水体后可以迅速形成有益的微生物种群,与有害菌群竞争基本的营养物质,同时芽孢杆菌可以分泌胞外酶,产生营养物质,促进水产动物生长。芽孢杆菌大多应用于鱼、虾、蟹育苗和养成中,在贝类中的报道很少。刘建勇^[11]研究发现芽孢杆菌和酵母菌可以促进凡纳滨对虾幼虾的变态发育。常传刚^[12]等发现在日本对虾育苗过程中使用复合芽孢杆菌可以缩短幼体变态时间,促进幼体生长,提高幼苗成活率。严正凛^[13]发现在九孔鲍育苗过程中加入一定浓度的光合细菌,可以明显促进鲍苗的生长。该试验结果表明添加芽孢杆菌可以明显促进幼虫壳长的生长,0.5%的芽孢杆菌和0.5%的酵母菌组的生长速度为 $5.7 \mu\text{m/d}$,而生长速度最慢的 A2B3 组的生长速度为 $4 \mu\text{m/d}$ 。适宜浓度的芽孢杆菌和酵母菌在养殖水体中互生或共生,促进魁蚶的生长。

该试验结果表明添加中低比例的芽孢杆菌和酵母菌可以促进魁蚶幼虫的附着变态,添加高比例的芽孢杆菌和酵母菌会抑制魁蚶幼虫的附着变态。这表明在魁蚶育苗过程中添加适当的芽孢杆菌和酵母菌是可行的,并且能够更好地促进魁蚶幼虫的生长。

水体中影响幼虫生长的无机氮主要来自氨氮和亚硝酸氮,减少养殖水体中氨氮和亚硝酸氮的浓度将有助于改善水体环境^[14-15]。张克强等^[16]利用枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌和啤酒酵母菌进行养殖的模拟试验,发现 3 种菌剂的混合液能有效降低养殖水体中 TAN 和 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 。2 种菌剂对水质的影响与换水和倒池较小。在倒池过程中氨氮和亚硝酸氮都维持在较低水平。在试验过程中,每天换水量为养殖体积的 2/3,而正常养殖时每天为全量换水。若能将 2 种菌剂应用于生产,能够减少养殖成本,带来直接的经济效益和生态效益。

在水产育苗生产中,无论是单一使用还是复合使用芽孢杆菌和酵母菌都很普遍,但针对贝类育苗应用的报道很少。鉴于养殖对象自身的特点和养殖水体环境的不同,不同的养殖对象适用的益生菌也有很大差异。笔者将短小芽孢杆菌和胶红酵母菌应用于魁蚶育苗中,结果表明适量添加 2 种菌剂可以促进魁蚶幼虫的生长。单独添加胶红酵母菌和同时添加胶红酵母菌和短小芽孢杆菌可以促进幼虫壳长的生长,其中以中低浓度的效果较好。单独添加短小芽孢杆菌及同时添加胶红酵母菌和短小芽孢杆菌可以促进幼虫壳高的生长,以添加 1% 的短小芽孢杆菌效果最好。在使用过程中可以根据不同时期的生长需求添加不同的用量,添加 0.5% 的芽孢杆菌和 0.5% 的胶红酵母菌时对魁蚶生长的促进效果较好。建议在生产过程中添加 0.5% 短小芽孢杆菌和 0.5% 胶红酵母菌来促进幼虫生长,减少换水量,提高生产效率。

参考文献

- [1] 王如才,王昭萍,张建新. 海水贝类养殖学[M]. 青岛:青岛海洋大学出版社, 2002:297.
- [2] 邱显寅,郭学武,王俊. 魁蚶工厂化育苗技术[J]. 海洋水产研究,1994(15):71-78.
- [3] 郑国富,王晓波,付卓. 魁蚶人工育苗生产中几项技术探讨[J]. 河北渔业,2008(1):41-42.
- [4] 左振喜. 微生物在水产养殖中的应用[J]. 农村养殖技术,2012(12):34-35.
- [5] 丁彦文,艾红. 微生物在水产养殖中的应用[J]. 湛江海洋大学学报,2000,20(1):68-73.
- [6] 孙德文,詹勇,许梓荣. 微生态制剂在水产养殖中的应用[J]. 淡水渔业,2002,32(3):54-57.
- [7] 王玲,张春晓,孙鸣,等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌(CGMCC No. 3755)对凡纳滨对虾生长性能和非特异性免疫力的影响[J]. 饲料工业,2011,32(4):47-52.
- [8] 叶乐,杨莺莺,吴开畅,等. 益生菌在凡纳滨对虾育苗中的应用[J]. 南方水产,2006,2(4):13-18.
- [9] 闫修花,王桂珍,陈迪军. 纳氏试剂比色法直接测定海水中的氨氮[J]. 中国环境监测,2004,19(6):8-10.
- [10] 国家海洋环境监测中心. GB17378.7-2007. 海洋监测规范[S]. 北京:中国标准出版社,2008:113-114.
- [11] 刘建勇. 复合微生物制剂在凡纳滨对虾育苗中的应用[J]. 海洋科学,2005,29(4):36-40.
- [12] 严正凛. 微生态制剂对九孔鲍育苗效果的研究[J]. 水产学杂志,2008(1):21-25.

鸡肝、猪肝、鸡蛋等,为了提高食物的适口性,饲喂时很多主人还会在饭菜里加入味道较重的肉汤或鱼汤。

犬的饲料中含有大量的 P、K、Ca 和 Mg 等物质,蛋白质

和嘌呤含量也较多,这些物质的过量摄入容易导致尿液中的 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 、 Ca^{2+} 和 K^+ 增多,从而形成结石。

表 4 犬尿结石发病部位的分布

类别	肾结石数量		膀胱结石数量		尿道结石数量		总计	
	数量	比例//%	数量	比例//%	数量	比例//%	数量	比例//%
母犬	2	7.14	26	92.85	0	0	28	100
公犬	4	10.25	20	51.28	15	38.46	39	100

3 影响泰州地区犬尿结石的因素

3.1 饮食因素 泰州地区因宠物产业起步较晚,发展时间短,很多宠物主人的观念还比较传统,不习惯饲喂专业的犬粮,而是饲喂饭菜,同时为了增加适口性会大量使用盐、酱油和味精等调味品,这是与宠物的生理特征所不相符,不仅会造成结石,还会引起宠物脱毛、瘙痒、皮肤病等。因此,在结石病犬的治疗过程中,还应向宠物主人宣传科学的养犬知识,从日常的饮食习惯入手,降低犬结石的发病率。

3.2 饮水不足 经调查发现,泰州地区很多犬主人在饲养犬的过程中都是在给犬喂食的同时才会喂水,而不是使用自动饮水器或者提供充足的饮水让犬自由饮用,这就导致犬在进食时可能不想喝水,而想喝水时又没有水喝。还有一部分犬过于肥胖,运动量少,水的摄入量也偏少。

由于各种原因导致的饮水减少,机体摄入的水减少,尿液也会浓缩,尿液中的各类结晶处于过饱和状态,在体内就容易形成结晶沉淀,这就有可能导致结石的形成和发生。

3.3 尿路炎症 当犬的尿路发生炎症时,脱落的组织、细胞等有可能会成为结石的中心,从而可能导致结石的形成和发生。

3.4 尿路阻塞 当犬发生尿路阻塞或尿液滞留时,泌尿系统易发生结晶沉淀。同时,还会影响已有结石的排出,小结石会继续生长,形成较大的结石,另外还容易出现尿路感染,产生炎症,加速结石的形成和发生。

3.5 水质 泰州地区人患结石的病例很多,这是否与泰州地区的居民有一部分依旧习惯饮用井水等地下水以及自来水本身的水质原因有关,还有待考证。饮水中的矿物质、微量元素、酸碱度和硬度等是否会影响尿液的成分,是否会对结石的发生发展产生影响还有待进一步研究。

3.6 遗传因素 在泰州地区,某些犬种(如北京犬、西施犬、博美犬等)泌尿系统结石病的发病率很高,这一方面是因为泰州地区这些犬种的饲养比例较大,另一方面与这些犬种本身的遗传因素也有一定关系。

4 防治

4.1 调整饮食结构 对于泰州地区部分宠物主人的饲养观

念和错误的饲喂方法,要向其宣传科学的饲养方法,尽量喂犬食用含盐量极少、各类营养物质也比较均衡的专业犬粮,同时减少动物内脏如(鸡肝、猪肝)的摄入,以降低泌尿系统结石的风险^[3]。

4.2 提供充足洁净的饮水 应该全天给犬提供充足洁净的饮水,最好是煮沸过的自来水冷却后饮用,不要喝脏水或井水。

4.3 增加运动量 宠物主人可以利用玩具(如飞盘、球、毛绒玩具)或者任何犬感兴趣的物品,抛向远处,让犬进行衔取的游戏;或者在安全的空地让几只犬共同玩耍,以增加运动量。一方面,犬在运动后会大量饮水,增加机体对水的摄入;另一方面,运动的过程也会刺激结石的运动,有利于一些较小结石的排出。

4.4 关心犬的健康 对于犬的尿路感染,尿路炎症要及时发现并治疗,控制疾病的发展,防止产生结石;同时,平时要注意犬的健康与行为,如出现精神沉郁、食欲下降、排尿时弓背、尿频、尿血和腹围增大等情况要及时就医,检查结石。

5 小结

泰州地区犬泌尿系统结石病的的发病主要与犬的饮食结构和饲养管理方式有关,对患病宠物进行针对性饮食指导,饲喂犬尿结石专用处方粮,能够降低犬尿液中易形成结石物质的含量,能够缓解病情,在治愈后也能够降低复发的概率。同时,宠物从业人员要对宠物主人进行科学养犬的宣传,对于犬的生理特性和犬的日常饲喂方式都应该进行介绍。

参考文献

- [1] 沈向真,侯加法,王小龙,等.犬膀胱结石的化学成分分析研究[J].畜牧与兽医,2003,35(9):3-6.
- [2] 周秋平,金银姬,石益兵,等.56例犬尿结石的检验及成因分析[J].畜牧与兽医,2003,35(4):35-36.
- [3] 孙卫东,王金勇,刘永旺,等.南京地区犬尿结石的调查及尿结石成分的分析[J].中国兽医学报,2007,27(6):935-937.
- [15] 黄金臣,李全振.养殖水体中氨氮的存在、危害及控制[J].河北渔业,2006(2):38.
- [16] 张博.不同种类芽孢杆菌净化水质试验[J].饲料工业,2010,32(10):55-57.
- [13] 常传刚,张磊.芽孢杆菌在日本对虾育苗中的应用试验[J].齐鲁渔业,2010(9):16-17.
- [14] 张克强,李野,李军幸.芽孢杆菌菌剂在水产养殖中的应用初探[J].海洋科学,2006(30):88-91.

(上接第 7775 页)