

DOI: 10.12264/JFSC2023-0297

灭菌和添加益生菌对沉积物菌落数和营养盐通量的影响

张爽^{1,2}, 房景辉^{1,2}, 曾超^{1,2}, 吕富³, 杨明树¹, 罗坤¹, 梁博¹

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 中国海洋大学, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;
3. 盐城工学院, 江苏省海洋滩涂生物化学与生物技术重点实验室, 江苏省滩涂池塘养殖生态重点实验室, 江苏 盐城 224051

摘要: 通过对养殖环境灭菌,可以降低作为对虾亲虾的饵料沙蚕携带病原弧菌的风险。本研究采用实验生态学方法,基于病原弧菌的生物学特征,探究不同温度灭菌处理(65 °C处理 30 min, 100 °C处理 30 min 和 121 °C处理 20 min)对沉积物的灭菌效果及加入益生菌制剂对沉积物理化指标的影响。结果表明,各温度处理组在灭菌后立即采样,灭菌效果良好: 65 °C-30 min、100 °C-30 min 和 121 °C-20 min 处理组对沉积物中总菌落数量的灭菌率分别为 57.5%、99.45%、99.99%,表明随着灭菌处理温度的升高,灭菌率逐渐提高,对病原弧菌的灭菌率均达到 100%。对于沉积物的理化指标分析表明,随着取样时间增长,灭菌处理方式给沉积物-上覆水界面的氮磷扩散通量带来的影响逐渐减小,益生菌制剂的添加能够降低水体和沉积物中的 NO_3^- 浓度和 PO_4^{3-} 浓度,同一取样时间添加益生菌制剂处理组与未添加益生菌制剂处理组的 NO_3^- 扩散通量和 PO_4^{3-} 扩散通量有显著差异($P<0.05$)。结果表明,65 °C-30 min 处理即可杀灭沉积物中的全部弧菌且整个实验期间未检测到病原弧菌菌落,添加益生菌制剂能够优化沉积物菌落结构,抑制总菌落数量的增长,同时对沉积物-上覆水界面的氮磷扩散通量产生影响。本研究可为沉积物灭菌及益生菌制剂在养殖环境中的应用提供数据参考。

关键词: 温度处理; 灭菌; 益生菌; 沉积物

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)01-0082-13

南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国最主要的经济虾类养殖品种^[1],2021年我国海水养殖的南美白对虾产量高达 127.36 万 t,占全国海水养殖虾类的 81%^[2]。作为南美白对虾养殖大国,健康苗种是保障南美白对虾养殖产业健康发展的重要因素之一^[3],优良的苗种得益于对虾育种和苗种繁育技术的提高。但是,在对虾亲虾培育和苗种生产过程中,弧菌是重要威胁之一,这些弧菌可以从亲虾传递到后代仔虾,引起对虾苗种急性肝胰腺坏死病和菌血症等细菌性疾病。而在亲虾培育过程中,沙蚕是不可或缺的优质生物饵料,

特别是作为亲虾主要活体饵料的双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)具有较高的 EPA 和 DHA,有利于促进对虾性腺成熟^[4]。但有研究指出,双齿围沙蚕常携带致病弧菌导致对虾暴发大规模疾病^[5]。目前,市面上的沙蚕来源多样,品质不稳定,对对虾苗种培育质量形成严峻挑战,生产不携带弧菌的沙蚕是产业重要需求,可以为提升对虾苗种培育质量提供有力支撑。

目前,引发南美白对虾致病的主要弧菌有哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、霍乱弧菌(*V. cholera*)和副溶血弧菌(*V.*

收稿日期: 2023-11-10; 修订日期: 2023-11-27.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(42276123, 41876185); 泰山学者工程项目; 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费资助项目(2060302202020); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助项目(2020TD50).

作者简介: 张爽(2000-),女,硕士研究生,研究方向为水产养殖生态学. E-mail: sky20001210@163.com

通信作者: 房景辉,男,研究员,研究方向为水产养殖生态学. E-mail: hui861@163.com

parahemolyticus)等。哈维氏弧菌的生长温度为 25~28 °C, 溶藻弧菌的生长温度为 5~43 °C, 霍乱弧菌的生长温度为 16~44 °C, 副溶血弧菌的生长温度为 5.5~43 °C^[6]。因此, 通过高温灭菌可以杀灭病原弧菌。对沙蚕来讲, 其携带的弧菌往往来源于栖息的沉积物和水体, 通过对沙蚕养殖过程中的沉积物和水体灭菌, 有望有效控制环境中的致病菌数量, 从而降低沙蚕携带病原弧菌的风险。

微生物在沉积物氮磷迁移过程中发挥重要作用^[7], 能够维持海洋生态系统的氮磷平衡, 如果对沉积物进行灭菌减少微生物数量, 势必会影响养殖环境的生源要素循环, 可能对养殖效果和环境产生一定不利影响。研究表明, 益生菌制剂通过微生物体内酶的作用消除恶臭、分解有机质、解磷除氮, 降低养殖水体中的氨氮、亚硝酸盐浓度等, 能直接利用沉积物中的一些不溶有机物, 从而加速对有机污染物的降解^[8], 净化养殖环境。日本学者应用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)对海底沉积物、鱼池中的淤泥进行分解分化, 取得显著效果^[9]。蔡惠凤等^[10]发现微生物制剂能够修复池塘中的污染底泥, 其中的芽孢杆菌(*B. spp.*)能够通过氨化作用、硝化作用、反硝化作用以及固氮作用在氮循环中发挥重要作用^[11]。因此, 灭菌后添加益生菌有可能会改善灭菌的不利影响, 维持良好养殖环境。但是, 关于沉积物灭菌效果及灭菌后的环境影响等研究较为缺乏, 本研究将探讨不同温度对沉积物的灭菌效果及加入益生菌制剂后是否会影响沉积物的理化性质, 为沉积物灭菌及益生菌制剂在底质改良中的应用提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 沉积物及益生菌制剂来源

2022年12月, 在青岛市即墨区金口滩虾蟹养殖池(36°35'42"N, 120°46'59"E)采集实验用沉积物。益生菌选取青岛市益科达生物技术有限公司的复合制剂, 主要含枯草芽孢杆菌 7×10^9 CFU/g, 解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) 5×10^9 CFU/g, 粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) 2×10^8 CFU/g。

1.2 实验设计

本实验设计了 3 种灭菌方式: 65 °C 维持

30 min 灭菌(参考巴氏灭菌法, 标记为 65 °C-30 min)、100 °C 维持 30 min 灭菌(煮沸灭菌法, 标记为 100 °C-30 min)和 121 °C 维持 20 min 灭菌(高压灭菌法, 标记为 121 °C-20 min), 以未灭菌沉积物作为对照组(标记为 CK)。灭菌后, 将不同处理组平均分成两组, 一组保持不变, 另一组添加益生菌。因此, 本实验共 8 个处理, 每个处理设置 4 个重复。灭菌前, 每个重复称取 300 g 沉积物放入 5×7 cm 的塑料密封袋中, 共 32 袋。将其中 8 袋放入水浴锅加热到 65 °C, 维持 30 min 后取出; 再取 8 袋放入水浴锅加热到 100 °C, 维持 30 min 取出; 置于灭菌锅前, 取 8 袋沉积物倒入玻璃烧杯中, 设置 121 °C 灭菌 20 min。在超净工作台中, 将灭菌后的样品分别取样, 用于沉积物中的微生物菌落数量分析。取样后将沉积物倒入无菌的 1 L 塑料烧杯($75 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的紫外线灯照射 60 min), 并缓慢加入 800 mL 经高温灭菌(121 °C、30 min)恢复至常温的过滤海水, 添加过程中确保不对沉积物冲击造成扰动。为避免外界影响对营养盐通量造成干扰将两处理组均用保鲜膜封口, 其中添加益生菌制剂处理组中的有益菌在前期繁殖需要一定氧气, 所以封口后使用直径为 1.2 mm 的牙签扎 20 个孔便于空气流通。整个实验过程在独立房间的无菌操作台上进行, 实验期间使用紫外线强度为 $75 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的紫外线灯进行全程照射, 温度保持在 18~20 °C, 实验时间为 6 d。

1.3 样品采集

为检测沉积物中的总菌落及病原弧菌数量的变化将取样时间定于第 0 天(灭菌完成后立即取样)、第 2 天和第 6 天; 为检测上覆水理化性质及扩散通量的变化将取样时间定于第 2 天、第 4 天和第 6 天。上覆水取样时需将封口保鲜膜慢慢揭开, 用玻璃棒将上覆水轻轻搅匀后取 150 mL 水样; 取完水样后每个重复取 1 g 沉积物置于 15 mL 无菌离心管中, 加入 9 mL 灭菌后的生理盐水, 充分摇匀 20 min^[12], 静置 20~30 s 后得上清液用于涂平板, 检测微生物菌落数量及病原弧菌数量。上覆水样品经孔径为 0.45 μm 的醋酸纤维滤膜过滤后, 加入氯仿, 置于 -20 °C 冷冻保存, 用于测定营养盐浓度。

1.4 测定方法

采用稀释平板法估算沉积物内微生物菌落数量^[12],按照 10 倍法依次稀释上清液至 10^{-5} ,分别精确吸取每个稀释度的菌液 100 μL ,对号加在已凝固的平板上。沉积物中的总菌落数量以每克沉积物中含菌落总数的自然对数($\ln N$)表示。总菌落培养选用胰酪大豆胨琼脂培养基 TSA,病原弧菌培养选用 TCBS 琼脂培养基,将涂布好的平板置于 27 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中培养 48 h 后计数。上覆水中营养盐浓度根据《海洋调查规范 GB/T 12763.4-2007》测定,其中,活性磷酸盐($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)浓度采用钼蓝分光光度法,铵盐($\text{NH}_4^+\text{-N}$)浓度采用苯酚-次氯酸盐比色法,硝酸盐($\text{NO}_3^-\text{-N}$)浓度采用为铬柱还原法,亚硝酸盐($\text{NO}_2^-\text{-N}$)浓度采用萘乙二胺分光光度法测定。使用 pH 计(PB-10, 德国)测定水样的 pH。

1.5 数据计算与统计分析

营养盐通量计算公式^[13]如下:

$$F = \frac{\Delta C \cdot V}{A \cdot \Delta t}$$

式中, F 为营养盐通量 [$\text{mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$]; V 为上覆水的体积 (m^3); A 为容器的横截面积 (m^2); Δt 为培养时间 (d); ΔC 表示培养前后培养器营养盐浓度的变化。

营养盐扩散通量:正值表示营养盐由沉积物向上覆水方向扩散,负值代表营养盐由上覆水向沉积物方向扩散。

使用 SPSS27.0 进行数据统计分析,对每个数据集进行正态分布(Shapiro-Wilks)和方差齐性(Barlett)检验,采用单因素方差分析(ANOVA)检验第 0 天各温度处理组的灭菌效果。使用三因素方差分析(three-way ANOVA)检验益生菌是否添加、取样时间和灭菌处理方式对沉积物的微生物菌落数量、上覆水 pH、 NO_3^- 浓度、 NO_2^- 浓度、 NH_4^+ 浓度、 PO_4^{3-} 浓度及扩散通量的影响。当数据在正态性检验和方差齐性检验结果中显示不符合时,则用自然对数转换数据。使用 LSD 多重比较法进一步分析显著差异,以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平, $P < 0.01$ 作为差异极显著水平。使用 GraPhPad Prism 9.5.0 作图,实验数据均采用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm$

SD)表示。

2 结果与分析

2.1 微生物数量

2.1.1 益生菌添加、取样时间和灭菌处理方式对沉积物中总菌落数量的影响 在灭菌刚完成时,65 $^{\circ}\text{C}$ -30 min 处理组沉积物中的总菌落数量略有降低,与对照组差异不显著 ($P > 0.05$),灭菌率为 57.5%; 100 $^{\circ}\text{C}$ -30 min 处理组与 121 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 处理组的总菌落数量均显著减少 ($P < 0.05$),灭菌率达 99% 以上(表 1)。

三因素方差分析显示(表 2),益生菌是否添加、取样时间和灭菌处理方式都显著影响总菌落数量 ($P < 0.01$)。总菌落数量受益生菌是否添加、取样时间和灭菌处理方式三因素交互作用不显著 ($P > 0.05$),两因素交互作用中,益生菌是否添加 \times 取样时间的交互作用、益生菌是否添加 \times 灭菌处理方式、取样时间 \times 灭菌处理方式的交互作用影响均极显著 ($P < 0.01$)。在未添加益生菌组中,各灭菌处理方式随着取样时间增长并没有显著差异,说明沉积物中的总菌落数量随着取样时间增长不再受到灭菌处理方式的影响,均呈稳步增加趋势(图 1);在添加益生菌组中,各灭菌处理方式下的总菌落数量随着取样时间增长并没有显著变化 ($P > 0.05$),相较于未添加益生菌组,添加益生菌组能够显著抑制总菌落数量的增长 ($P < 0.05$)。

表 1 灭菌后沉积物中的总菌落数量和病原弧菌数量及灭菌率

Tab. 1 The number of total colonies and pathogenic vibrios and sterilization rate in the sediment after sterilization

| 灭菌方式 sterilization method | 总菌落 数量/ (CFU/g) number of total colonies | 灭菌率/% sterilization rate | 病原弧菌 数量/ (CFU/g) pathogenic vibrio number | 病原弧菌灭 菌率/% pathogenic vibrio sterilization rate |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 未灭菌 unsterilized | 210000 | — | 1500 | — |
| 65 $^{\circ}\text{C}$ -30 min | 89250 | 57.5 | 0 | 100 |
| 100 $^{\circ}\text{C}$ -30 min | 1145 | 99.45 | 0 | 100 |
| 121 $^{\circ}\text{C}$ -20 min | 25 | 99.99 | 0 | 100 |

表 2 益生菌添加、取样时间和灭菌处理方式对实验指标的三因素方差结果
Tab. 2 Three-factor variance results on experimental indicators for probiotics addition mode, sampling time and sterilization treatment method

| 实验指标 experimental indicator | A | B | C | A×B | A×C | B×C | A×B×C |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 沉积物中微生物菌落数量/CFU the number of microbial colonies in sediment | <0.01** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | 0.006** | <0.001*** | 0.093 |
| NO ₃ 浓度 NO ₃ concentration | 0.016* | 0.020* | <0.001*** | 0.090 | <0.001*** | 0.001** | 0.005** |
| NO ₂ 浓度 NO ₂ concentration | <0.001*** | 0.001** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** |
| NH ₄ 浓度 NH ₄ concentration | 0.726 | 0.050 | <0.001*** | 0.081 | 0.002** | 0.179 | 0.001** |
| PO ₄ 浓度 PO ₄ concentration | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** |
| NO ₃ 扩散通量 NO ₃ diffusion flux | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | 0.001** | 0.071 | 0.008** | 0.115 |
| NO ₂ 扩散通量 NO ₂ diffusion flux | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** |
| NH ₄ 扩散通量 NH ₄ diffusion flux | 0.099 | 0.199 | 0.081 | 0.201 | 0.022* | 0.719 | 0.020* |
| PO ₄ 扩散通量 PO ₄ diffusion flux | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** | <0.001*** |
| 上覆水 pH pH of overlying water | 0.137 | 0.000*** | 0.377 | 0.041* | 0.014* | 0.187 | 0.665 |

注: ***代表 $P < 0.001$, **代表 $0.001 < P < 0.01$, *代表 $0.01 < P < 0.05$. A 代表益生菌是否添加, B 代表取样时间, C 代表灭菌处理方式.

Note: *** represents $P < 0.001$, ** represents $0.001 < P < 0.01$, * represents $0.01 < P < 0.05$. A represents the probiotics addition mode, B represents the sampling time, C represents the sterilization treatment method.

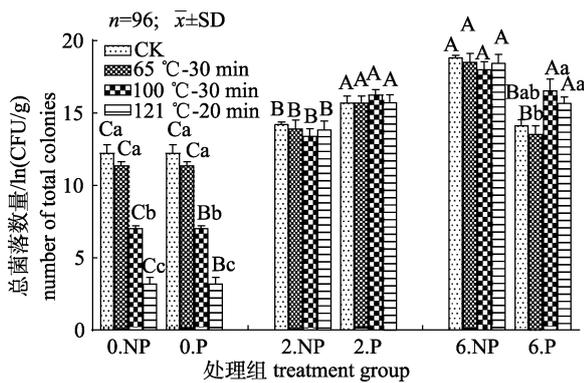


图 1 益生菌添加、取样时间和灭菌处理方式对沉积物中总菌落数量的影响

沉积物中的总菌落数量用自然对数 ln 表示, NP 组代表未添加益生菌组, P 组代表添加益生菌组, 数字表示天数. 大写字母不同表示在相同添加方式和灭菌处理方式下不同取样时间之间差异显著 ($P < 0.05$); 小写字母表示在相同添加方式和取样时间下不同灭菌处理方式之间差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 1 The effect of probiotics addition mode, sampling time and sterilization treatment method on total number of colonies in sediment

The total number of colonies in the sediment is expressed as the natural log ln, NP group represents the group without probiotic addition and P group represents the probiotic group. Figures indicate sampling days. Upper letters indicate significant differences in sampling times under the same addition mode and sterilization treatment method ($P < 0.05$); lower case letters indicates significant differences in sterilization treatment methods under the same addition mode and sampling time ($P < 0.05$).

2.1.2 益生菌添加、取样时间和灭菌处理方式对病原弧菌数量的影响 灭菌刚完成时, 添加益生菌处理组与未添加益生菌处理组在不同灭菌处理方式下, 沉积物中的病原弧菌灭菌率均达到 100% (表 1), 在第 2 天和第 6 天各灭菌处理方式下的病原弧菌数量均为 0。因此在 65 °C-30 min 处理方式下即可杀灭沉积物中的病原弧菌且不再生长(表 3)。

2.2 营养盐浓度及扩散通量

2.2.1 益生菌添加、取样时间和灭菌处理方式对上覆水中营养盐浓度的影响 三因素方差分析(表 2)显示, 上覆水中的 NO₃⁻浓度受益生菌是否添加、取样时间、灭菌处理方式及三者的交互作用影响显著 ($P < 0.05$), 两因素交互作用中除益生菌是否添加×取样时间的交互作用对上覆水中的 NO₃⁻浓度影响不显著 ($P > 0.05$), 其他两因素交互作用对上覆水中的 NO₃⁻浓度影响均极显著 ($P < 0.01$)。在未添加益生菌组中, 对照组中的上覆水 NO₃⁻浓度基本保持稳定(图 2), 121 °C-20 min、100 °C-30 min 和 65 °C-30 min 处理组上覆水的 NO₃⁻浓度呈现出随着取样时间的增长先下降后上升的规律。在添加益生菌组中, 各灭菌处理组中的上覆水 NO₃⁻浓度随着取样时间增长均呈下降趋势(图 3)。

表 3 取样时间、灭菌处理方式和益生菌添加对沉积物中病原弧菌数量的影响
 Tab. 3 The influence of sampling time, sterilization treatment method and probiotic addition mode on the number of pathogenic vibrio bacteria in the sediment

| 处理天数/d sampling time | 灭菌处理方式 sterilization treatment method | 病原弧菌数量/(CFU/g) number of pathogenic vibrio | |
|-------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------|
| | | 未添加益生菌组 group without probiotic addition | 添加益生菌组 group with probiotic addition |
| 第 0 天 Day 0 | CK | 1500.00±1467.42 | 1500.00±1467.42 |
| | 65 °C-30 min | 0 | 0 |
| | 100 °C-30 min | 0 | 0 |
| | 121 °C-20 min | 0 | 0 |
| 第 2 天 Day 2 | CK | 1175.00±629.15 | 350.00±300.00 |
| | 65 °C-30 min | 0 | 0 |
| | 100 °C-30 min | 0 | 0 |
| | 121 °C-20 min | 0 | 0 |
| 第 6 天 Day 6 | CK | 875.00±359.40 | 455.00±132.04 |
| | 65 °C-30 min | 0 | 0 |
| | 100 °C-30 min | 0 | 0 |
| | 121 °C-20 min | 0 | 0 |

三因素方差分析(表 2)显示, 上覆水中的 NO_2^- 浓度受益生菌是否添加、取样时间、灭菌处理方式及三者的交互作用影响均极显著($P<0.01$), 两因素交互作用对上覆水中的 NO_2^- 浓度影响也均极显著($P<0.01$)。在未添加益生菌组中, 各灭菌处理组中的上覆水 NO_2^- 浓度随取样时间增长没有显著变化(图 2); 添加益生菌组各灭菌处理组的上覆水 NO_2^- 浓度随取样时间增长呈下降趋势, 而对照组中的上覆水 NO_2^- 浓度呈现上升的趋势(图 3)。

三因素方差分析(表 2)显示, 上覆水中的 NH_4^+ 浓度受三者的交互作用影响极显著($P<0.01$), 两因素交互作用中除益生菌是否添加×灭菌处理方式的交互作用对上覆水中的 NH_4^+ 浓度影响极显著($P<0.01$), 其他两因素的交互作用对上覆水中的 NH_4^+ 浓度均无显著影响($P>0.05$)。单因素作用中只有益生菌是否添加这一因素影响极显著($P<0.01$)。在未添加益生菌组中, 除对照组以外, 各灭菌处理组中的上覆水 NH_4^+ 浓度随着取样时间增长有上升趋势(图 2), 而对照组中上覆水的 NH_4^+ 浓度随着取样时间增长呈现出下降趋势。

三因素方差分析(表 2)显示, 上覆水中的 PO_4^{3-} 浓度受益生菌是否添加, 灭菌处理方式及三者的交互作用影响均极显著($P<0.01$), 两因素交互作

用中各处理组对上覆水中的 PO_4^{3-} 浓度影响均极显著($P<0.01$), 未添加益生菌组上覆水中的 PO_4^{3-} 浓度有下降趋势; 添加益生菌组上覆水 PO_4^{3-} 浓度基本保持稳定(图 3)。

2.2.2 益生菌添加、取样时间和灭菌处理方式对营养盐扩散通量的影响

三因素方差分析显示(表 2), 益生菌是否添加、取样时间、灭菌处理方式 3 个因素对沉积物-上覆水界面中的 NO_3^- 扩散通量的交互作用影响不显著($P>0.05$), 两因素交互作用中除益生菌是否添加×灭菌处理方式的交互作用对沉积物-上覆水界面中的 NO_3^- 扩散通量的影响不显著外, 其他两因素交互作用均极显著($P<0.05$), 单因素方差分析中益生菌是否添加、取样时间及灭菌处理方式 3 个因素对沉积物-上覆水界面中的 NO_3^- 扩散通量的影响作用均极显著($P<0.01$)。在未添加益生菌组中, 各灭菌处理组中沉积物-上覆水界面的 NO_3^- 通量均由上覆水向沉积物中扩散且逐渐增大, 而对照组的 NO_3^- 扩散通量由沉积物向上覆水中扩散, 且扩散通量逐渐减小; 在添加益生菌组中, 各灭菌处理组沉积物-上覆水界面中的 NO_3^- 扩散通量随着取样时间增长由上覆水不断向沉积物中扩散, 在第 6 天达到最大值(图 4)。

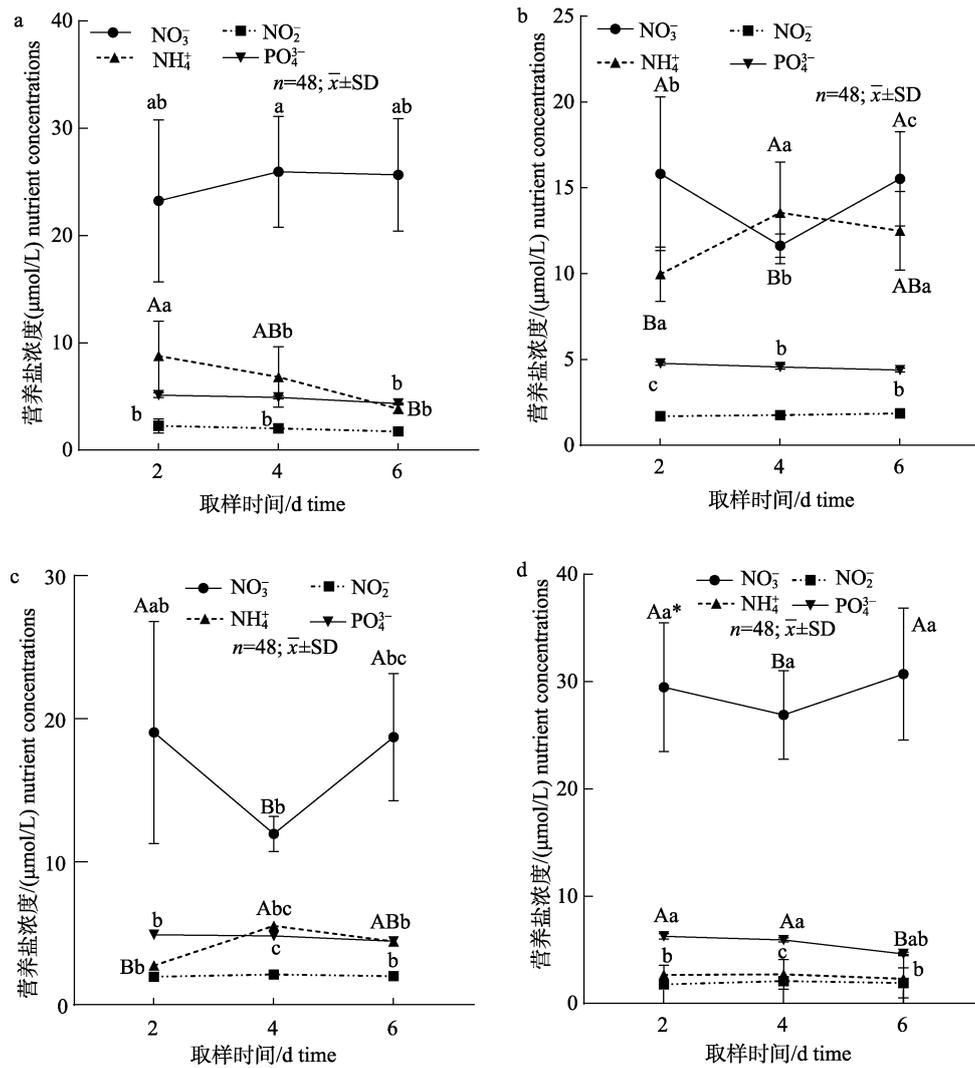


图 2 未添加益生菌组中上覆水中的营养盐浓度变化

a. 未添加益生菌组对照组; b. 未添加益生菌组 65 °C-30 min 处理组; c. 未添加益生菌组 100 °C-30 min 处理组; d. 未添加益生菌组 121 °C-20 min 处理组. 大写字母不同表示在相同添加方式和灭菌处理方式下不同取样时间之间差异显著 ($P < 0.05$); 小写字母不同表示在相同添加方式和取样时间下不同灭菌处理方式之间差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 2 Changes in nutrient concentrations in overlying water in the treatment groups without probiotics group

a. The control group without probiotics; b. The 65 °C-30 min treatment group without probiotics; c. The 100 °C-30 min treatment group without probiotics; d. The 121 °C-20 min treatment group without probiotics. Capital letters indicate significant differences in sampling time under the same addition mode and sterilization treatment method ($P < 0.05$); small letters indicates significant differences in sterilization treatment method under the same addition mode and sampling time ($P < 0.05$).

三因素方差分析显示(表 2)益生菌是否添加, 取样时间, 灭菌处理方式及三者的交互作用对沉积物-上覆水界面中的 NO₂扩散通量影响均极显著 ($P < 0.01$), 两因素交互作用中各处理组对沉积物-上覆水界面中的 NO₂扩散通量影响均极显著 ($P < 0.01$)。在未添加益生菌组中, 各处理组沉积物-上覆水界面中的 NO₂扩散通量随取样时间增长无

显著差异 ($P > 0.05$); 添加益生菌组中除对照组 NO₂的扩散通量由沉积物向上覆水中逐渐增大, 其他处理组的沉积物-上覆水界面中的 NO₂扩散通量无明显变化(图 5)。

三因素方差分析显示(表 2)三因素交互作用对沉积物-上覆水界面中的 NH₄⁺扩散通量影响显著 ($P < 0.05$), 两因素交互作用只有益生菌是否添

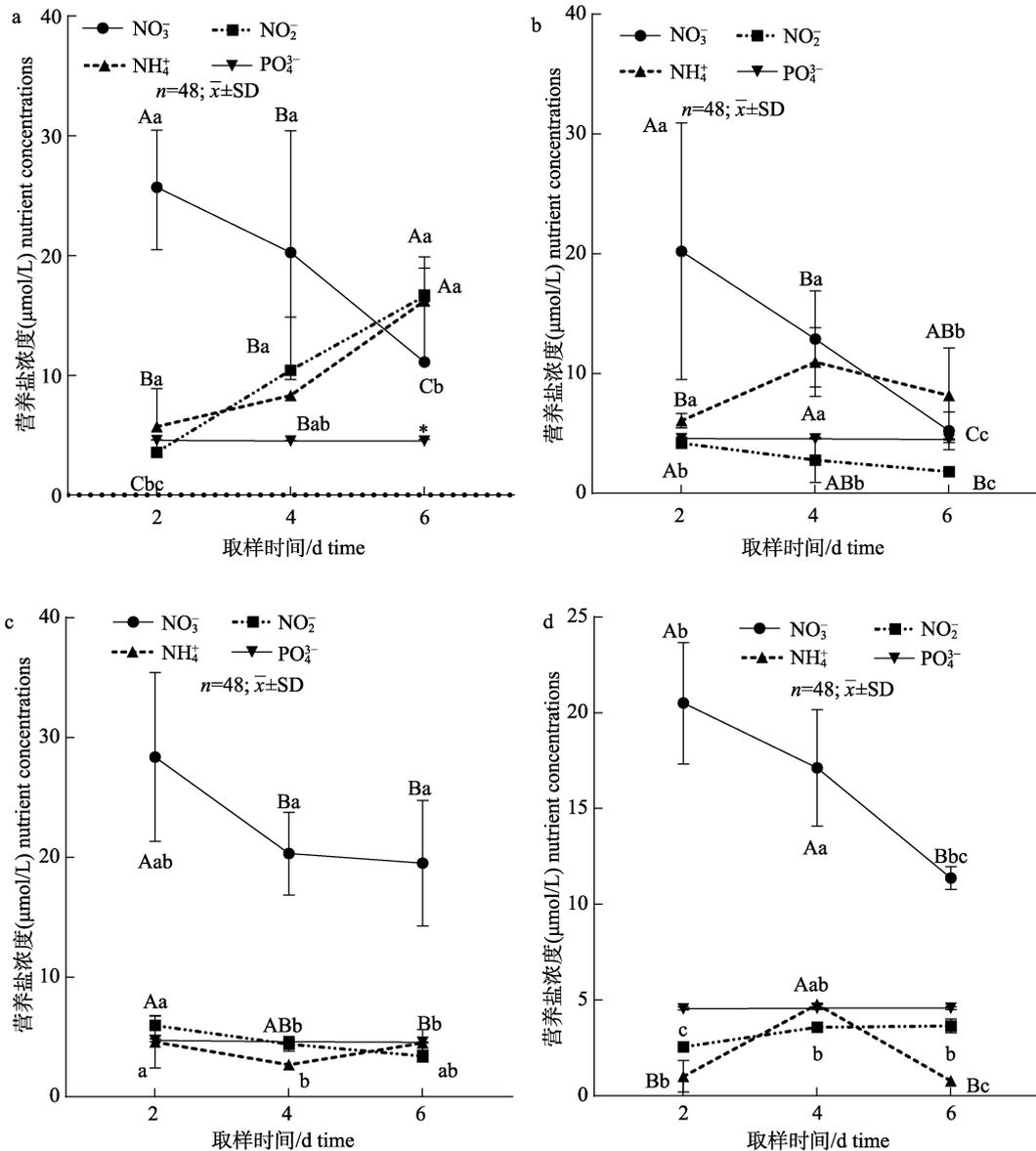


图 3 添加益生菌组中上覆水中的营养盐浓度变化

a. 添加益生菌组对照组; b. 添加益生菌组 65 °C-30 min 处理组; c. 添加益生菌组 100 °C-30 min 处理组; d. 添加益生菌组 121 °C-20 min 处理组。大写字母不同表示在相同添加方式和灭菌处理方式下不同取样时间之间差异显著 ($P < 0.05$); 小写字母表示在相同添加方式和取样时间下不同灭菌处理方式之间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 Changes in nutrient concentration in overlying water in the group with probiotic

a. The control group with probiotics addition; b. The 65 °C-30 min treatment group with probiotics addition; c. The 100 °C-30 min treatment group with probiotics addition; d. The 121 °C-20 min treatment group with probiotics. Capital letters indicate significant differences in sampling time under the same addition mode and sterilization treatment method ($P < 0.05$); small letters indicates significant differences in sterilization treatment method under the same addition mode and sampling time ($P < 0.05$).

加×灭菌处理方式的交互作用对沉积物-上覆水界面中的 NH_4^+ 扩散通量影响显著 ($P < 0.05$), 其他两因素的交互作用影响均不显著 ($P > 0.05$)。在未添加益生菌组中, 对照组的 NH_4^+ 扩散通量由上覆水向沉积物中扩散, 且差异显著 ($P < 0.05$), 在第 6 天达

到 $-3.09 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, 其他灭菌处理组沉积物-上覆水界面中的 NH_4^+ 扩散通量均由沉积物逐渐向上覆水扩散; 添加益生菌各组的 NH_4^+ 扩散通量均由沉积物向上覆水中扩散(图 6)。

三因素方差分析显示(表 2), 益生菌是否添加、

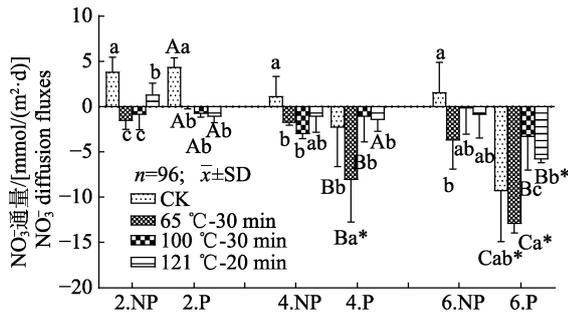


图 4 取样时间、灭菌处理方式和益生菌添加对沉积物-上覆水 NO₃⁻扩散通量的影响

Fig. 4 The influence of sampling time, sterilization treatment method and probiotic addition mode on the NO₃⁻ diffusion flux of sediment-overlying water

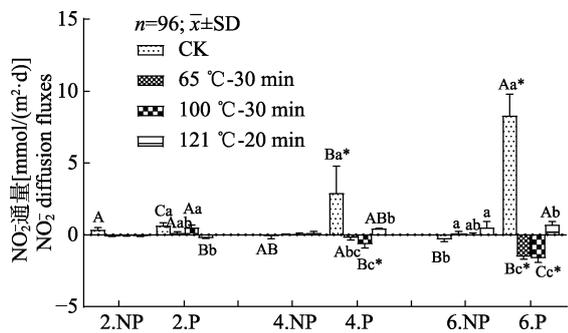


图 5 取样时间、灭菌处理方式和益生菌添加对沉积物-上覆水 NO₂⁻扩散通量的影响

Fig. 5 The influence of sampling time, sterilization treatment method and probiotic addition mode on the NO₂⁻ diffusion flux of sediment-overlying water

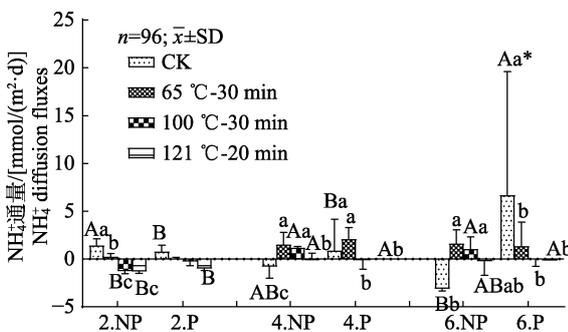


图 6 取样时间、灭菌处理方式和益生菌添加对沉积物-上覆水 NH₄⁺扩散通量的影响

Fig. 6 The influence of sampling time, sterilization treatment method and probiotic addition mode on the NH₄⁺ diffusion flux of sediment-overlying water

取样时间、灭菌处理方式及三者的交互作用对沉积物-上覆水界面中的 PO₄³⁻扩散通量影响均极显著($P < 0.01$), 两因素交互作用对各处理组沉积物-上覆水界面中的 PO₄³⁻扩散通量影响均极显著($P <$

0.01)。实验期间, 未添加益生菌组中各组 PO₄³⁻扩散通量由上覆水持续向沉积物中扩散; 添加益生菌组沉积物-上覆水界面中的 PO₄³⁻扩散通量基本保持稳定(图 7)。

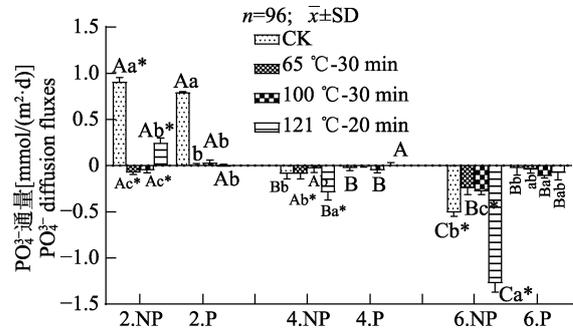


图 7 取样时间、灭菌处理方式和益生菌添加对沉积物-上覆水 PO₄³⁻扩散通量的影响

Fig. 7 The influence of sampling time, sterilization treatment method and probiotic addition mode on the PO₄³⁻ diffusion flux of sediment-overlying water

2.3 益生菌添加、取样时间和灭菌处理方式对上覆水 pH 的影响

三因素方差分析显示(表 2), 益生菌是否添加、取样时间和灭菌处理方式的三因素交互作用对上覆水的 pH 影响不显著($P > 0.05$), 在两因素交互作用中, 除取样时间×灭菌处理方式对上覆水 pH 的影响作用不显著($P > 0.05$), 其他两因素交互作用的影响均显著($P < 0.01$), 在单因素方差分析中, 只有取样时间对上覆水 pH 的影响作用极显著($P < 0.01$)。实验期间, 上覆水的 pH (表 4)随着取样时间的增长均显著下降($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 影响沉积物灭菌效果的因素

本实验研究发现 65 °C-30 min 处理即可杀灭沉积物中的全部病原弧菌, 其他各灭菌温度处理组的弧菌灭菌率也均可达到 100%, 且在实验后期没有检测到病原弧菌。这与病原弧菌自身的生物学特征有关, 研究表明, 大部分病原弧菌都生存在水生环境中, 且生存温度为 5~45 °C^[14], Andrews 等^[15]发现 60 °C 加热 15 min 足以杀灭牡蛎中的全部副溶血弧菌; 在汪雯^[16]的实验中发现 53 °C 温度处理能够显著减少弧菌数量。对于沉积物中的

表 4 上覆水的 pH 变化
Tab. 4 Changes in the pH of overlying water

$n=96; \bar{x} \pm SD$

| 是否添加益生菌 addition of probiotics | 取样时间 sampling time | 上覆水 pH pH of overlying water | | | |
|---------------------------------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | CK | 65 °C-30 min | 100 °C-30 min | 121 °C-20 min |
| 未添加益生菌组 group without probiotic addition | 第 2 天 | 7.88±0.15 ^{Ab} | 7.88±0.11 ^{Aab} | 7.92±0.02 ^{Aab} | 7.96±0.04 ^{Aa} |
| | 第 4 天 | 7.80±0.09 ^A | 7.86±0.16 ^{A*} | 7.84±0.02 ^{A*} | 7.80±0.05 ^B |
| | 第 6 天 | 7.69±0.10 ^{Bab} | 7.73±0.01 ^{Bab} | 7.77±0.01 ^{Ba} | 7.65±0.16 ^{Cb} |
| 添加益生菌组 group with probiotic addition | 第 2 天 | 7.93±0.03 ^{A*} | 7.84±0.06 ^A | 7.94±0.04 ^A | 7.92±0.05 ^A |
| | 第 4 天 | 7.77±0.04 ^B | 7.72±0.07 ^B | 7.72±0.02 ^B | 7.78±0.01 ^B |
| | 第 6 天 | 7.76±0.03 ^{Ba} | 7.64±0.04 ^{Bb} | 7.70±0.06 ^{Bab} | 7.69±0.04 ^{Bab} |

总菌落数量, 65 °C-30 min 处理组的灭菌率达到 57.5%, 100 °C-30 min 处理组和 121 °C-20 min 处理组总菌落数量的灭菌率可达到 99%以上, 这表明随着灭菌处理温度的升高, 灭菌率逐渐提高。而对于 65 °C-30 min 处理组, 其温度难以杀灭芽孢等处于休眠状态的微生物, 这些微生物休眠体在涂板后转为活性状态, 从而影响了总菌落数量的测定^[17]。在郑嘉慧等^[18]研究中发现, 多数土壤在采用高温高压蒸汽灭菌处理后, 间隔 3 d 再灭菌一次才能将绝大多数的微生物消除, 所以, 在使用巴氏灭菌法杀灭沉积物微生物时, 可以采取增加灭菌次数的方法以获得较好灭菌效果^[17]。

随着取样时间的增长, 灭菌后未添加益生菌的各处理组之间总菌落数量没有明显差异, 说明灭菌处理方式对总菌落数量带来的影响逐渐减小, 实验后期各处理组呈现出相同的生长趋势。灭菌后一段时间内, 总菌落数量出现持续增长现象的原因与很多因素有关: (1) 沉积物灭菌后加入海水进行实验, 这可能会使得沉积物中的休眠芽孢在进入适宜的海水环境后由休眠状态逐渐恢复活性^[19], 从而促进总菌落数量上升; (2) 研究表明, 适宜的温度刺激能够促使芽孢萌发, 在陈国华等^[20]研究中发现 65~100 °C 的温度预处理都会刺激苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)的芽孢, 促使其萌发, 所以经过灭菌处理后, 有可能让沉积物中的芽孢活化从而萌发; (3) 高温高压灭菌处理组虽然在灭菌即刻效果良好, 但高温高压也会使土壤中可利用的营养元素增多^[21], Staunton 等^[22]检测到高温高压灭菌后会令土壤中的可溶性有机碳增多, 微生物会利用土壤中的可溶性有机碳, 从而

获得数量增长。

添加益生菌组在实验后期总菌落数量保持稳定不再增长, 推测其原因可能是益生菌制剂中的有益菌群迅速繁殖^[23], 成为优势种群, 所以在实验前期添加益生菌组的总菌落数量显著高于未添加益生菌组。随着有益菌群的增多, 益生菌制剂逐渐抑制沉积物中的其他菌落生长。在 Devaraja 等^[24]的研究中, 投放以芽孢杆菌为主的益生菌制剂后, 发现沉积物中好氧菌的数量增加, 同时抑制了弧菌的增长。闫茂仓等^[23]的研究中也发现使用益生菌制剂后会使泥蚶(*Tegillarca granosa*)养殖池塘底泥中的弧菌数量显著降低, 黄洪辉等^[25]发现使用有益微生物对对虾海水养殖池塘水体中的异养菌总数和弧菌总数有明显的抑制效果, 这说明添加益生菌也可以优化沉积物中菌群结构, 抑制有害菌生长。

灭菌和添加益生菌可以控制沉积物等环境中的有害弧菌数量, 但是, 养殖环境复杂, 操作流程繁琐, 即使环境灭菌较为彻底, 操作过程稍有不慎, 有害微生物就会大量繁殖。因此, 养殖生产要控制沙蚕所携带的有害弧菌, 需要从源头消杀、流程管理、环境隔离、规范操作等不同方面进行生物安保工作。可以通过采取对沙蚕栖息的沉积物和水体进行病原微生物消杀、养殖车间消毒处理、沙蚕苗种消毒、投喂饵料灭菌等系列生物安保措施减少养殖过程中的有害弧菌, 才有望获得无病原携带的沙蚕。

3.2 影响沉积物氮磷扩散通量的因素

沉积物的生地化过程是水生态系统中氮、磷等生源要素循环的重要一环, 而沉积物中的微生物

物在氮、磷等生源要素的形态转化和迁移过程中起着重要作用^[7]。本研究发现, 随着实验的进行, 由灭菌处理方式给沉积物理化指标所带来的影响逐渐减小, 而是否添加益生菌制剂对沉积物理化指标的影响显著。研究表明, 益生菌制剂中的芽孢杆菌可以产生大量的蛋白酶、淀粉酶和半纤维素水解酶等, 这些酶类可以将水中及沉积物中的蛋白质、淀粉和脂肪等有机物分解、吸收^[8], 维持良好的养殖环境。曾巾等^[26]和 Pauer 等^[27]研究发现: 沉积物-上覆水界面在氧气充足时存在着强烈的硝化作用。在实验前期, 沉积物-上覆水界面的溶解氧浓度较高, 此界面的微生物通过硝化作用将其中的部分 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 转化为 $\text{NO}_3^-\text{-N}$, 随着硝化作用的进行, NO_3^- 浓度过高而与沉积物产生浓度差, 从而使 NO_3^- 向沉积物中的迁移增加。随着实验时间的延长, 灭菌后的沉积物中微生物数量逐渐增多, 耗氧速度加快^[28], 氧气减少氧化还原电位降低, 甚至形成厌氧环境^[29]。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 在厌氧条件下不能继续进行硝化反应生成 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ^[30], 从而在沉积物中积累并不断向上覆水释放。而在添加益生菌制剂后, 其中的芽孢杆菌逐渐形成优势种群, 由于其同时具有需氧与厌氧代谢机制的特性^[31-32], 在厌氧环境下可以进行强烈的反硝化作用将沉积物中的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 转化为 N_2 释放到大气中, 从而与上覆水界面形成浓度差, 使 NO_3^- 通量不断由上覆水向沉积物中扩散, 缓解了上覆水中硝态氮的增加, 减少沉积物和水体中积累的氨氮, 从而达到修复沉积物的效果。

研究表明, 沉积物中的磷由于于生地化过程能够释放到间隙水中, 再通过离子扩散作用释放到上覆水中^[33], 从而发生磷的迁移。在未添加益生菌组中, 实验期间上覆水中磷的浓度整体比较稳定, 所以磷的迁移可能集中在间隙水与沉积物中。铝铁氧化物与磷酸盐结合生成络合沉淀吸附在沉积物上^[33-34], 从而降低沉积物中 PO_4^{3-} 浓度, 浓度差使沉积物不断吸收间隙水中的 PO_4^{3-} , 阻碍 PO_4^{3-} 向上覆水中释放。随着 pH 逐渐降低(表 4), 间隙水向沉积物中扩散的通量逐渐增大, 在汪家权等^[35]对巢湖底泥磷的释放研究中发现, pH 越低, 底泥越容易从水体中吸附磷, 从而促使磷酸盐不

断由间隙水向沉积物中迁移, 造成磷酸盐在沉积物中的累积。而在添加益生菌制剂后, 上覆水向沉积物中的 PO_4^{3-} 扩散通量明显减少, 主要因为芽孢杆菌具有良好的解磷性能^[36-38], 能将不溶性磷转化成可溶性磷, 减少了上覆水与沉积物间隙水的磷浓度差, 使上覆水向沉积物中释放的磷酸盐减少。

4 结论

本研究表明, 65 °C-30 min 处理组即可杀灭沉积物中的全部弧菌且整个实验期间未检测到病原弧菌菌落, 但由于温度较低难以杀死处于休眠状态的微生物, 从而降低了总菌落数量的灭菌率。在实验后期, 由于沉积物中的休眠芽孢萌发、营养物质增多等原因, 总菌落数量有显著上升的现象, 而添加益生菌制剂后在一定程度上能够抑制沉积物中菌落数量的增长, 使总菌落数量保持相对稳定。益生菌制剂使沉积物的菌落结构发生改变, 进而对沉积物-上覆水界面的氮磷扩散通量产生影响。一方面, 益生菌制剂中反硝化细菌通过反硝化作用减少水体和沉积物中积累的氨氮; 另一方面, 其中的解磷微生物能将不溶性磷转化成可溶性磷, 从而降解沉积物中积累的磷酸盐。

参考文献:

- [1] Shao M T, Che B, Sun C, et al. Cost benefit analysis of industrialized culture of *Penaeus vannamei*: Take Shandong Province as an example[J]. Ocean Development and Management, 2021, 38(9): 15-23. [邵梦亭, 车斌, 孙琛, 等. 南美白对虾工厂化养殖成本收益分析——以山东省为例[J]. 海洋开发与管理, 2021, 38(9): 15-23.]
- [2] Lu D. Research on the development current situation and countermeasures of the aquaculture industry of *Litopenaeus vannamei* in Shandong Province[D]. Xiamen: Jimei University, 2022. [陆冬. 山东省南美白对虾养殖产业发展现状与对策研究[D]. 厦门: 集美大学, 2022.]
- [3] Zhong Z X. Optimization of water quality control and feeding techniques for *Litopenaeus vannamei*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2023. [仲昭旭. 凡纳滨对虾亲虾培育水质调控与投喂技术的优化[D]. 大连: 大连海洋大学, 2023.]
- [4] Du S B, Hu C Q, Shen Q, et al. A comparative study on biochemical composition of main natural diets for broodstock

- Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2005, 24(1): 50-59. [杜少波, 胡超群, 沈琪, 等. 凡纳滨对虾亲虾常用天然饵料营养成分的比较研究[J]. 热带海洋学报, 2005, 24(1): 50-59.]
- [5] Yan Z Y. Study of the flora in the alimentary tract of *Perinereis aibuhitensis* Grube and its bioactivity[D]. Qingdao: Qingdao University, 2007. [闫志勇. 双齿围沙蚕消化道菌群的分析 and 生物活性物质的研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2007.]
- [6] Li J Y, Wu Q P, Zhou J, et al. Research progress and prevention methods of *Litopenaeus vannamei* *Vibrio* disease [J]. Fisheries Science & Technology Information, 2022, 49(2): 106-111. [李君怡, 吴秋平, 周疆, 等. 凡纳滨对虾弧菌病及其防治方法研究进展[J]. 水产科技情报, 2022, 49(2): 106-111.]
- [7] Li G C, Liu Z G, Zhang M, et al. A preliminary study of effects of warming on the nutrients dynamic in sediment of hypereutrophic shallow lake[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(12): 4016-4025. [李庚辰, 刘足根, 张敏, 等. 升温对超富营养型浅水湖泊沉积物营养盐动态迁移的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(12): 4016-4025.]
- [8] Qiao P P. Study on microbial preparation reduce affect to nutrients of gulf sediments[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014. [乔培培. 微生物制剂对海湾沉积物营养盐削减试验研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.]
- [9] Li Z J, Zhang Q, Chen K D. Studies on improving the aquacultural environment by profitable microbe I. decomposing the mud of fish ponds and promoting the growth of fish[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 1998, 18(1): 5-8. [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.]
- [10] Cai H F, Lu K H, Jin C H, et al. Bioremediation of aquaculture sediment by several ecology methods in lab[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 140-145. [蔡惠凤, 陆开宏, 金春华, 等. 养殖池塘污染底泥生物修复的室内比较实验[J]. 中国水产科学, 2006, 13(1): 140-145.]
- [11] Iurchenko V, Tsytlshvili K, Malovany M. Wastewater treatment by conversion of nitrogen-containing pollution by immobilized microbiocenosis in a biodisk installation[J]. Ecological Questions, 2022, 33(2): 1-17.
- [12] Li K K, Cao W W, Wen C L, et al. Assessment of differences between high-throughput sequencing and plate-dilution method for microbial ecology study of soils under distinct land use scenarios[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(11): 4447-4464. [李凯凯, 曹伟伟, 文昌丽, 等. 基于高通量测序的稀释平板计数细菌群落变化研究[J]. 微生物学报, 2022, 62(11): 4447-4464.]
- [13] Wang H W, Wang S M, Zhang M, et al. Occurrence characteristics and transport fluxes of nitrogen and phosphorus at sediment-water interface of Panjiakou Reservoir in spring[J]. China Environmental Science, 2021, 41(9): 4284-4293. [王洪伟, 王少明, 张敏, 等. 春季潘家口水库沉积物-水界面氮磷赋存特征及迁移通量[J]. 中国环境科学, 2021, 41(9): 4284-4293.]
- [14] Li J Y. Molecular mechanism of *Vibrio alginolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* and study on bacteriophage control[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2020. [李君怡. 溶藻弧菌对凡纳滨对虾的致病机理及噬菌体防治研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2020.]
- [15] Andrews L S, DeBlanc S, Veal C D, et al. Response of *Vibrio parahaemolyticus* 03: K6 to a hot water/cold shock pasteurization process[J]. Food Additives and Contaminants, 2003, 20(4): 331-334.
- [16] Wang W. Microbial predictive model and quantitative risk analysis for evaluation of intervention technologies on reduction of *Vibrio parahaemolyticus* in peeled shrimp[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013. [汪雯. 虾仁中副溶血弧菌杀菌技术的微生物预测模型与定量风险评估[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.]
- [17] Bank T L, Kukkadapu R K, Madden A S, et al. Effects of gamma-sterilization on the physico-chemical properties of natural sediments[J]. Chemical Geology, 2008, 251(1-4): 1-7.
- [18] Zheng J H, Chen H Y, Li J Q, et al. The effects of different soil sterilization treatments on soil microbial activity[J]. Journal of Fudan University (Natural Science), 2017, 56(6): 681-691. [郑嘉慧, 陈鸿洋, 李金全, 等. 不同土壤灭菌方法对土壤微生物活性的影响[J]. 复旦学报(自然科学版), 2017, 56(6): 681-691.]
- [19] Wang Y X, Zhang H H, Zhang Z. Research progress on spore germination induced by physical and chemical factors[J]. Journal of Agricultural Sciences, 2016, 37(1): 58-64. [王一晓, 张海红, 章中. 理化因素诱导芽孢萌发研究进展[J]. 农业科学研究, 2016, 37(1): 58-64.]
- [20] Chen G H, Feng S L, Cao W P, et al. Effect of temperature on germination of *Bacillus thuringiensis* spores[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2004, 20(2): 127-130. [陈国华, 冯书亮, 曹伟平, 等. 温度预处理对苏云金杆菌芽孢萌发的影响[J]. 中国生物防治, 2004, 20(2): 127-130.]
- [21] Zhang H, Zhang J B, Zhao B Z, et al. Influence of autoclaving sterilization on properties of typical soils in China[J]. Acta Pedologica Sinica, 2011, 48(3): 540-548. [张辉, 张佳宝, 赵炳梓, 等. 高温高压间歇灭菌对中国典型土壤性质的影响[J]. 土壤学报, 2011, 48(3): 540-548.]

- [22] Staunton S, Barthès M, Leclerc- Cessac C, et al. Effect of sterilization and experimental conditions on the isotopic exchange of nickel in two contrasting soils[J]. *European Journal of Soil Science*, 2002, 53(4): 655-662.
- [23] Yan M C, Lin Z H, Liu L S, et al. Effect of *Bacillus subtilis* on total numbers of bacteria and *Vibrio* in sediment and *Tegillarca granosa*[J]. *Marine Sciences*, 2009, 33(10): 36-39. [闫茂仓, 林志华, 刘连生, 等. 枯草芽孢杆菌对泥蚶及养殖底泥中细菌总数和弧菌总数的影响[J]. *海洋科学*, 2009, 33(10): 36-39.]
- [24] Devaraja T N, Yusoff F M, Shariff M. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products[J]. *Aquaculture*, 2002, 206(3-4): 245-256.
- [25] Huang H H, Lin Q, Guo Z X, et al. Effects of probiotics on the dynamic of bacteria in marine shrimp pond[J]. *South China Fisheries Science*, 2007, 3(3): 14-19. [黄洪辉, 林钦, 郭志勋, 等. 有益微生物的应用对海水对虾养殖池塘中细菌数量动态变化的影响[J]. *南方水产*, 2007, 3(3): 14-19.]
- [26] Zeng J, Yang L Y, Xiao L, et al. Biogeochemical cycling of nitrogen in lakes and the role of microorganisms in conversion of nitrogen compounds[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2007, 19(4): 382-389. [曾巾, 杨柳燕, 肖琳, 等. 湖泊氮素生物地球化学循环及微生物的作用[J]. *湖泊科学*, 2007, 19(4): 382-389.]
- [27] Pauer J J, Auer M T. Nitrification in the water column and sediment of a hypereutrophic lake and adjoining river system[J]. *Water Research*, 2000, 34(4): 1247-1254.
- [28] Yan S. Study on biochemical processes of nitrogen transformation on the interface between water and sediment[D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2010. [延霜. 水体-沉积物界面氮迁移转化的生物化学过程[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2010.]
- [29] Beutel M W. Inhibition of ammonia release from anoxic profundal sediments in lakes using hypolimnetic oxygenation [J]. *Ecological Engineering*, 2006, 28(3): 271-279.
- [30] Sun J, Yang M, He S S, et al. Inhibitive effect test of nutrients release from sediments by zeolite and shale ceramicsite[J]. *Water Purification Technology*, 2023, 42(2): 140-146. [孙健, 杨明, 贺珊珊, 等. 沸石和页岩陶粒对沉积物营养盐释放的抑制效果试验[J]. *净水技术*, 2023, 42(2): 140-146.]
- [31] Zhang X J, Wei D H, Zhang H L, et al. Microbial composition in sediment of urban river channel and its potential to transform nitrogen and sulfur pollutants[J]. *Environmental Pollution and Control*, 2022, 44(4): 425-430. [张肖静, 位登辉, 张红丽, 等. 城市河道底泥中微生物组成及其转化氮、硫污染物的潜力[J]. *环境污染与防治*, 2022, 44(4): 425-430.]
- [32] Ge S J, Peng Y Z, Wang S Y, et al. Nitrite accumulation under constant temperature in anoxic denitrification process: The effects of carbon sources and COD/NO₃-N[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 114: 137-143.
- [33] Zhang H, Chen J A, Wang J F, et al. A simulation study on the release of phosphorus from sediments in lake Hongfeng, Guizhou Province, China[J]. *Earth and Environment*, 2015, 43(2): 243-251. [张红, 陈敬安, 王敬富, 等. 贵州红枫湖底泥磷释放的模拟实验研究[J]. *地球与环境*, 2015, 43(2): 243-251.]
- [34] Yang X Y, Wei R P, Yang L Y. Research on preparing ceramicsite from polluted river sediment and the potential of the ceramicsite on phosphorus removal[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2019, 35(3): 368-376. [杨欣妍, 魏儒平, 杨柳燕. 污染底泥制备陶粒及除磷潜力研究[J]. *生态与农村环境学报*, 2019, 35(3): 368-376.]
- [35] Wang J Q, Sun Y M, Qian J Z, et al. Simulated study on phosphorus release of Chao Lake sediment[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2002, 22(6): 738-742. [汪家权, 孙亚敏, 钱家忠, 等. 巢湖底泥磷的释放模拟实验研究[J]. *环境科学学报*, 2002, 22(6): 738-742.]
- [36] Chi J L, Hao M, Wang Z X, et al. Advances in research and application of phosphorus-solubilizing microorganism[J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 41(1): 1-7. [池景良, 郝敏, 王志学, 等. 解磷微生物研究及应用进展[J]. *微生物学杂志*, 2021, 41(1): 1-7.]
- [37] Sun X H, Zhang Y, Zhang B L, et al. Microbial effects on phosphorus release in Taihu Lake sediments[J]. *Environmental Chemistry*, 2006, 25(1): 24-27. [孙晓杭, 张昱, 张斌亮, 等. 微生物作用对太湖沉积物磷释放影响的模拟实验研究[J]. *环境化学*, 2006, 25(1): 24-27.]
- [38] Hu X J, Xu Y N, Hu B W, et al. Phosphate solubilizing effects of phosphate solubilizing bacteria PSBHY-3 on pond sediment[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2018, 49(10): 2096-2102. [胡晓娟, 许云娜, 胡百文, 等. 解磷菌 PSBHY-3 对池塘底泥的解磷效果[J]. *南方农业学报*, 2018, 49(10): 2096-2102.]

Effects of sterilization at different temperatures and addition of probiotics on the number of marine sediment colonies and nutrient diffusion flux

ZHANG Shuang^{1,2}, FANG Jinghui^{1,2}, ZENG Chao^{1,2}, LYU Fu³, YANG Mingshu¹, LUO Kun¹, LIANG Bo¹

1. National Key Laboratory of Mariculture Biological Breeding and Sustainable Output, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
3. Jiangsu Province Ocean Tidal Flat Biochemistry and Biotechnology Key Construction Laboratory; Jiangsu Provincial Key Laboratory of Tidal Flat Pond Breeding Ecology; Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224051, China

Abstract: In the cultivation of shrimp, the use of sandworms as high quality bait often carry pathogenic *Vibrio* and lead to outbreaks of shrimp disease; therefore, the risk of carrying pathogenic *Vibrio* is expected to be reduced by sterilizing the aquaculture environment of sandworms. Based on the biological characteristics of the pathogenic *Vibrio*, this study was conducted to explore the sterilization effects on sediment at different temperatures (65 °C for 30 min, 100 °C for 30 min, and 121 °C for 20 min) and the effects of adding probiotics on the physical and chemical indexes of sediment. The results showed that the immediate sterilization results of each temperature sterilization group were good. The sterilization rate of the total colonies in the sediment was 57.5% for 65 °C-30 min, 99.45% for 100 °C-30 min, and 99.99% for 121 °C-20 min, respectively. This showed that with an increase in sterilization temperature, the sterilization rate gradually increased, and the sterilization rate for the pathogen *Vibrio* reached 100%. Analysis of the physicochemical indexes of the sediment showed that with the increase in sampling time, the influence of the sterilization treatment on the nitrogen-phosphorus diffusion flux at the sediment-overlying interface decreased, and the addition of probiotics could reduce the NO₃⁻ and PO₄³⁻ concentrations in the water and sediment. There were significant differences in the NO₃⁻ and PO₄³⁻ diffusion flux between the probiotic and non-probiotic groups at the same sampling time ($P < 0.05$). The study showed that all *Vibrio* bacteria in the sediment could be killed at 65 °C for 30 min, and no pathogenic *Vibrio* colonies were detected during the whole experiment. The addition of probiotics could optimize the sediment colony structure, inhibit the increase in total colony number, and affect the nitrogen-phosphorus diffusion flux at the sediment-overlying interface. These findings provide a reference for the application of sediment sterilization and probiotic preparation in aquaculture.

Key words: temperature treatment; sterilization; probiotics; sedimentation

Corresponding author: FANG Jinghui. E-mail: hui861@163.com