

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15193

## 刺参苗期附着基更换频率对刺参生长及其养殖系统菌群结构的影响

王印庚<sup>1</sup>, 张文泽<sup>1,2</sup>, 廖梅杰<sup>1</sup>, 李彬<sup>1</sup>, 荣小军<sup>1</sup>, 张正<sup>1</sup>, 李华<sup>2</sup>, 范瑞用<sup>3</sup>, 宁鲁光<sup>4</sup>

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;

2. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;

3. 青岛瑞滋海珍品发展有限公司, 山东 青岛 266400

4. 东营海跃水产科技有限公司, 山东 东营 257500

**摘要:** 为了探究刺参(*Aposichopus japonicus*)育苗阶段(7–9 月)最佳的附着基更换频率(changing frequency, CF), 本实验在夏季育苗期设置 5 个附着基更换频率组, 即 CF<sub>10</sub>、CF<sub>20</sub>、CF<sub>30</sub>、CF<sub>40</sub> 和 CF<sub>50</sub>。采用实验生态学的方法, 并结合传统细菌培养法和 16S rDNA 细菌鉴定技术对上述不同实验组进行检测。结果表明: CF<sub>20</sub> 组刺参整池增重和个体增重幅度最大, CF<sub>30</sub> 次之, CF<sub>50</sub> 组由于死亡率高, 整池重量为负增长。CF<sub>20</sub> 组的特定生长率和存活率分别为(5.986±0.135)%/d 和(95.231±0.265)%, 且显著高于其他各组( $P<0.05$ ), CF<sub>30</sub> 次之, 而 CF<sub>50</sub> 组的特定生长率和存活率最低, 且显著低于其他各组( $P<0.05$ )。养殖用水中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 和 COD 随着附着基更换频率的降低而升高, 并在第 50 天时分别达到 0.53 mg/L、0.28 mg/L、0.18 mg/L。各实验组水体中异养细菌和弧菌数量随附着基更换频率变化不明显, 而附着基上的异养细菌和弧菌数量随附着基更换频率的降低而升高, CF<sub>50</sub> 组异养细菌总数在第 50 天时达到  $1.38\times 10^5$  cfu/cm<sup>2</sup>, 弧菌数量达到  $1.5\times 10^4$  cfu/cm<sup>2</sup>, 皆明显高于其他各组。附着基上优势菌为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、需钠弧菌(*V. natriegens*)、马胃葡萄球菌(*Staphylococcus equorum*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)和副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)。其中, 溶藻弧菌为刺参条件致病菌, 且一直存在于养殖系统中并逐步占据绝对优势。这与 CF<sub>50</sub> 组在实验进行到 43 d 时开始出现化皮, 50 d 时开始出现死亡现象有一定的关系。同时, 附着基长时间未更换, 会滋生大量玻璃海鞘、日本毛壶、内刺盘管虫等敌害生物, 争夺栖息空间和食物, 导致刺参苗种生长减慢。综上, 由实验结果显示, 在 7–9 月高温季节每 20 d 更换一次附着基最佳。考虑到生产成本, 附着基更换频率一般为 20 ~ 30 d 为宜。本研究结果为刺参苗种培育工艺的优化及刺参健康养殖提供了理论依据和参考。

**关键词:** 刺参; 育苗工艺; 附着基; 更换频率; 生长; 菌群结构; 弧菌

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2016)02–0359–11

随着水产养殖业的蓬勃发展, 各个经济品种的养殖工艺逐步成熟。在养殖过程, 养殖工艺中各养殖环节的合理性直接影响着该品种的成活率、产量和经济效益<sup>[1]</sup>。施永海等<sup>[2]</sup>研究了凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的两种养殖模式对其生长规律的影响, 发现采用湿地循环水模式养殖凡纳滨对虾能获得较好的养殖效果, 同时又具有节能和生态环保等特点。卢超超等<sup>[3]</sup>研究了刺参池塘

养殖中不同换水频率对底泥环境的影响, 发现每个月换水 10 d 能使其保持优良的养殖环境。黄海立等<sup>[4]</sup>研究了换水量和倒池培育对珠母贝浮游幼虫生长发育和存活的影响, 每天换水 40%能保证幼虫的生长和存活, 且倒池培育能促进浮游幼虫的生长发育和提高其存活率。吕军仪等<sup>[5]</sup>对通过对比其不同实验组的差异, 对鲍苗养殖海水前处理、补水倍数、倒池次数、投喂次数等工艺环节进行了

收稿日期: 2015-05-08; 修订日期: 2014-08-07.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31202016); 国家 863 计划项目(2012AA10A412-4); 山东省农业良种工程重大课题“速生、抗病、耐高温刺参良种选育”; 山东省自主创新成果转化专项(2013ZHZX2A0801).

作者简介: 王印庚, 男, 研究员, 主要从水产健康养殖与疾病防控. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

优化。目前,关于刺参育苗期换水、倒池、换板等工艺的优化还未见报道。

目前,随着我国刺参养殖业的迅猛发展,刺参养殖面积已达到 18 万  $\text{hm}^2$ , 每年直接经济产值约 300 亿元, 成为中国水产养殖业的支柱产业之一<sup>[6]</sup>。与此同时, 由于刺参养殖业的过快发展, 缺乏科学理论的指导, 致使刺参的养殖工艺粗糙、操作不规范<sup>[7]</sup>。尤其在刺参的育苗和保苗阶段, 附着基是刺参采食、生长的栖息载体, 其更换频率直接影响到刺参的生长和养殖成本等问题。更换附着基频率过高, 成本和劳动量加大, 随之养殖收益会降低; 而长时间不更换附着基, 附着基上的有机残留物增多, 水质恶化、滋生大量的细菌和霉菌, 导致刺参患病的几率加大, 直接影响其养殖效益<sup>[8]</sup>。

在刺参的育苗和保苗过程中, 换水、倒池和更换附着基是调控刺参育苗系统环境的重要手段<sup>[9]</sup>。本研究在保证换水和倒池频率不变的情况下, 通过测定刺参苗种在不同附着基更换频率的苗种增重和特定生长率, 以及刺参苗种培育系统中的异养细菌、弧菌、及水质理化指标的变化, 旨在揭示不同附着基更换频率对刺参苗种的生长和培育环境的影响, 为刺参苗期培育工艺的优化提供理论依据和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验在山东省青岛市黄岛区某刺参育苗场进行, 培育池 15 个, 每个培育池体积为 4  $\text{m}^3$ 。实验用参苗来源于该育苗场, 4 月龄, 摄食状态及活力良好, 体重 $(0.050\pm 0.003)$  g。

实验用附着基为常规育苗所用的聚乙烯波纹板, 每框插入 20 片波纹板作为 1 套附着基, 每个池子放置 15 套。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验设计与管理** 实验期为 7~9 月, 水质条件为温度 25.61~29.12℃、盐度 28.65~30.01、pH 值 7.65~8.15、溶解氧 5.23~6.17 mg/L。实验前, 将参苗暂养于育苗池中 5 d, 保证实验动物的适应和驯化。设置 5 个附着基更换频率组分别为: 10 d、

20 d、30 d、40 d、50 d 更换一次附着基, 各实验组分别用 CF<sub>10</sub>、CF<sub>20</sub>、CF<sub>30</sub>、CF<sub>40</sub> 和 CF<sub>50</sub> 表示。每组设 3 个平行, 每个平行放入 350 g(约 7000 头)参苗。实验进行 60 d, 实验期间每天换水 1 次, 换水量为 2/3, 控制换水前后水温差不超过 1℃, 换水后投饵; 每 5 d 倒池 1 次。实验过程中不使用任何药物。

**1.2.2 刺参特定生长率和存活率的测定** 在实验初始和终末时收集池内参苗, 测量整池重量  $w_0$  和  $w_1$ , 并随机抽取 30 头参苗测量刺参重量, 一共取 2 次, 计算初始和  $t$  天时苗种平均重量  $W_0$  和  $W_t$ , 推算出特定生长率(specific growth rate, SGR)和存活率(survival rate, SR)。参数计算公式如下:

$$\text{SGR} = (\ln W_1 - \ln W_0) / t \times 100\%$$

$$\text{SR} = (w_1 / W_1) / (w_0 / W_0) \times 100\%$$

其中  $w_0$  为开始时的整池重量,  $w_1$  为试验终末时的整池重量,  $W_0$  为开始时的平均体重,  $W_1$  为实验终末时的平均体重,  $t$  为试验时间。

**1.2.3 养殖系统内异养细菌和弧菌数量及水质理化指标的测定** 用 YSI 556 多参数水质检测仪测定水温、盐度、溶解氧、pH 值。并根据海洋监测规范 GB17378 测定样品中  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$  和 COD 的含量。分别在第 0 天、10 天、20 天、30 天、40 天、50 天和第 60 天时, 采集每组池中距离池底 20 cm 的水 100 mL 为待测水样, 并在每组中随机选取 2 片波纹板, 剪取 1  $\text{cm}^2$  的聚乙烯波纹板边角。然后, 将剪下的附着基边角在 10 mL 的无菌生理盐水里冲刷制备附着基沉积物样品; 将水样和附着基上的样品采用梯度稀释法利用 TSB 培养基和 TCBS 培养基培养计数用于统计水中的总异养菌含量和总弧菌含量, 根据菌落形态特征对所培养细菌进行分类并计算其优势度, 培养条件为 28℃ 培养 16~24 h。

**1.2.4 优势菌的 16S rDNA 鉴定** 实验进行 60 d, 对每个实验组优势度较大的 2~3 株优势菌进行纯化后, 用细菌基因组提取试剂盒(北京天根生物公司)提取 DNA, 利用 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 引物为 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'), 扩增产物送至测序公司进行序列测定, 测序结果进行 BLAST 比对分析。

**1.2.5 数据处理** 使用 Excel 2003 软件和 Hemi1.0 软件进行绘图分析, 运用 SPSS 17.0 软件进行数据处理和单因素方差分析, 以最小显著极差法 (LSD)比较数据间显著性。数值以平均值±标准差 ( $\bar{x}\pm SD$ )表示, 显著性水平设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 在不同的附着基更换频率下刺参的生长状况

CF<sub>20</sub>、CF<sub>30</sub> 在 60 d 中摄食良好, CF<sub>10</sub> 摄食一般, 且这 3 组均未出现死亡现象, 其中 CF<sub>40</sub> 在第 40 天后出现摄食量减少, 附着能力差等现象。CF<sub>50</sub> 组在第 43 天时开始出现化皮现象, 在第 50 天时出现大批量死亡现象,

2.2 不同附着基更换频率对刺参特定生长率和成活率的影响

在 60 d 的实验过程中, CF<sub>10</sub>、CF<sub>20</sub>、CF<sub>30</sub> 和

CF<sub>40</sub> 的整池刺参重量均有增长, CF<sub>20</sub> 组整池重量从(350.192±3.421) g 增加到(12097.320±10.236) g, 增重幅度最大。CF<sub>50</sub> 组整池重量从(348.153±0.954) g 减少到(42.781±2.368) g。同时, 各实验组刺参平均体重均有增长, CF<sub>20</sub> 组个体平均重量从(0.051±0.002) g 增加到(1.851±0.112) g 增重幅度最大, CF<sub>30</sub> 次之, CF<sub>10</sub> 组和 CF<sub>40</sub> 组比 CF<sub>20</sub> 组和 CF<sub>30</sub> 组增重幅度小, 且 CF<sub>10</sub> 和 CF<sub>40</sub> 差异不显著 ( $P>0.05$ ), CF<sub>50</sub> 组由于在第 43 天开始化皮, 增长最小。由表 1 可以看出, 刺参的特定生长率由高到低依次为: CF<sub>20</sub>、CF<sub>30</sub>、CF<sub>10</sub>、CF<sub>40</sub>、CF<sub>50</sub>, 其中 CF<sub>20</sub> 的特定生长率达到(5.986±0.135)%/d, 显著高于其他各组( $P<0.05$ )。刺参的成活率由高到低依次为: CF<sub>20</sub>、CF<sub>30</sub>、CF<sub>10</sub>、CF<sub>40</sub>、CF<sub>50</sub>, 其中 CF<sub>20</sub> 的成活率达到(95.231±0.265)%, 显著高于其他各组 ( $P<0.05$ )。

表 1 附着基更换频率对刺参特定生长率和成活率的影响  
Tab. 1 The effect of changing frequency of the substrates on the specific growth rate and survival rate

实验组 trial group	初始整池重量( $w_0$ ) /g initial weight of the whole tank	终末整池重量 ( $w_1$ )/g final weight of the whole tank	初始个体重量 ( $W_0$ )/g initial body weight	终末个体重量 ( $W_1$ )/g final body weight	特定生长率%/d specific growth rate	成活率/% survival rate	健康状况 state of health
CF <sub>10</sub>	346.043±2.350	8091.033±7.324 <sup>a</sup>	0.047±0.002	1.221±0.146 <sup>a</sup>	5.429±0.116 <sup>a</sup>	90.014±3.25 <sup>a</sup>	H
CF <sub>20</sub>	350.192±3.421	12097.320±10.236 <sup>b</sup>	0.051±0.002	1.851±0.112 <sup>b</sup>	5.986±0.135 <sup>b</sup>	95.231±0.265 <sup>b</sup>	H
CF <sub>30</sub>	349.234±1.267	10279.370±15.240 <sup>c</sup>	0.049±0.008	1.567±0.104 <sup>c</sup>	5.708±0.241 <sup>c</sup>	92.102±1.244 <sup>c</sup>	H
CF <sub>40</sub>	352.016±1.117	7641.733±13.250 <sup>d</sup>	0.048±0.006	1.168±0.150 <sup>a</sup>	5.317±0.170 <sup>a</sup>	89.217±1.278 <sup>d</sup>	H
CF <sub>50</sub>	348.153±0.954	42.781±2.368 <sup>e</sup>	0.049±0.002	0.532±0.100 <sup>d</sup>	3.974±0.131 <sup>d</sup>	1.1323±0.216 <sup>e</sup>	S

注: H 表示参苗健康, S 表示参苗患病。表中同一列数据上标不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。CF<sub>10</sub> 表示每 10 天更换一次附着基; CF<sub>20</sub> 表示每 20 天更换一次附着基; CF<sub>30</sub> 表示每 30 天更换一次附着基; CF<sub>40</sub> 表示每 40 天更换一次附着基; CF<sub>50</sub> 表示每 50 天更换一次附着基  
Note: H means healthy; S means diseased. Values with different superscripts are significantly different ( $P<0.05$ ). CF<sub>10</sub> means the substrates are changed every 10 days; CF<sub>20</sub> means the substrates are changed every 20 days; CF<sub>30</sub> means the substrates are changed every 30 days; CF<sub>40</sub> means the substrates are changed every 40 days; CF<sub>50</sub> means the substrates are changed every 50 days.

2.3 附着基更换频率对水质指标的影响

本研究采用 COD、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 3 个指标评判不同附着基更换频率对水质指标的影响, 结果表明, 不同更换频率组 3 个指标存在较大的差异。(1) COD 实验结果见图 1。各实验组的 COD 在更换附着基前随时间的延长有明显增高的趋势, CF<sub>40</sub> 组 COD 在第 40 天换附着基前达到了 0.18 mg/L, 明显高于其他各组, CF<sub>50</sub> 组 COD 在第 40 天时明显增高, 在第 50 天时达到了 0.17 mg/L。CF<sub>20</sub> 组

的变化趋势居于 CF<sub>40</sub> 组、CF<sub>50</sub> 组和 CF<sub>10</sub> 组、CF<sub>30</sub> 组之间, 且与 CF<sub>10</sub> 组、CF<sub>30</sub> 组的变化趋势相近, 其 COD 均能保持较低水平。特别指出的是, 更换附着基后各实验组的 COD 均明显降低。(2) NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 实验结果见图 2。各组水中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的含量在更换附着基之前均呈现上升趋势。第 30 天后没有更换附着基的 CF<sub>40</sub> 组和 CF<sub>50</sub> 组的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含量明显上升, CF<sub>40</sub> 组在第 40 天更换附着基之前达到了最高值 0.49 mg/L, 而 CF<sub>50</sub> 组在第 50 天时达到最

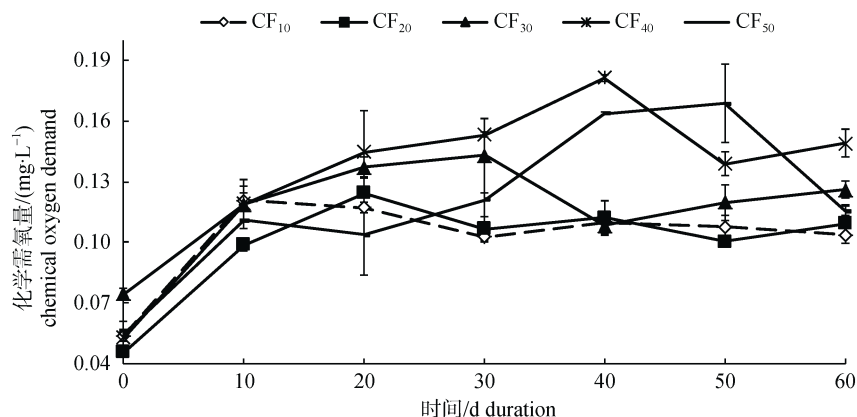


图 1 附着基更换频率对池水化学需氧量(COD)的影响

CF<sub>10</sub> 表示每 10 天更换一次附着基; CF<sub>20</sub> 表示每 20 天更换一次附着基; CF<sub>30</sub> 表示每 30 天更换一次附着基; CF<sub>40</sub> 表示每 40 天更换一次附着基; CF<sub>50</sub> 表示每 50 天更换一次附着基.

Fig. 1 Effect of changing frequency of the substrates on COD in culture tank

CF<sub>10</sub> means the substrates are changed every 10 days; CF<sub>20</sub> means the substrates are changed every 20 days; CF<sub>30</sub> means the substrates are changed every 30 days; CF<sub>40</sub> means the substrates are changed every 40 days; CF<sub>50</sub> means the substrates are changed every 50 days.

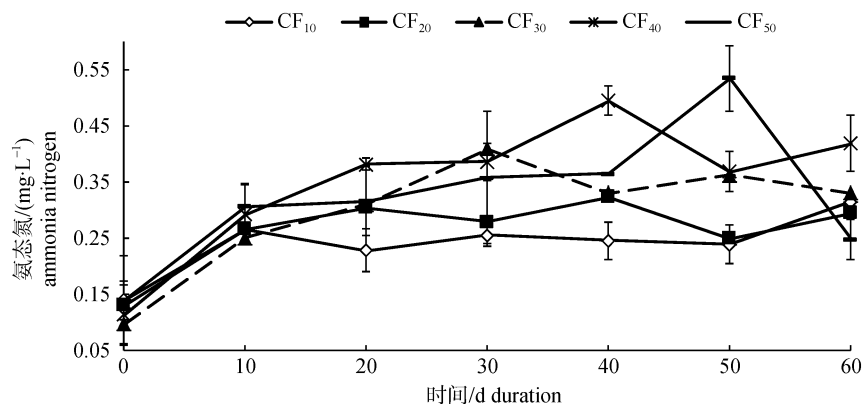


图 2 附着基更换频率对池水  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  含量的影响

CF<sub>10</sub> 表示每 10 天更换一次附着基; CF<sub>20</sub> 表示每 20 天更换一次附着基; CF<sub>30</sub> 表示每 30 天更换一次附着基; CF<sub>40</sub> 表示每 40 天更换一次附着基; CF<sub>50</sub> 表示每 50 天更换一次附着基.

Fig. 2 Effect of changing frequency of the substrates on  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  concentration in culture tank

CF<sub>10</sub> means the substrates are changed every 10 days; CF<sub>20</sub> means the substrates are changed every 20 days; CF<sub>30</sub> means the substrates are changed every 30 days; CF<sub>40</sub> means the substrates are changed every 40 days; CF<sub>50</sub> means the substrates are changed every 50 days.

高值 0.53 mg/L。CF<sub>20</sub> 组的变化趋势居于 CF<sub>40</sub> 组、CF<sub>50</sub> 组和 CF<sub>10</sub> 组、CF<sub>30</sub> 组之间, 且与 CF<sub>10</sub> 组、CF<sub>30</sub> 组的变化趋势相近, 其  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  均能保持较低水平。各组更换附着基后, 其  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  含量明显下降。(3)  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  实验结果见图 3: 各实验组池水中  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的含量变化趋势和 COD、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的变化趋势相似。CF<sub>50</sub> 组在第 50 天时达到了最高值 0.28 mg/L, 明显高于其他各组。CF<sub>20</sub> 组的变化趋势居于 CF<sub>40</sub> 组、CF<sub>50</sub> 组和 CF<sub>10</sub> 组、CF<sub>30</sub> 组之间, 且

与 CF<sub>10</sub> 组、CF<sub>30</sub> 组的变化趋势相近。

## 2.4 附着基更换频率对养殖系统菌群结构的影响

### 2.4.1 异养细菌和弧菌数量的变化

实验期间, 各实验组池水中异养细菌和弧菌数量变化不会随附着基更换频率不同而变化。弧菌变化范围为  $0.58 \times 10^2 \sim 2.91 \times 10^3$  cfu/mL。异养细菌变化范围为  $1.48 \times 10^2 \sim 3.83 \times 10^3$  cfu/mL(图 4, 图 5)。

各实验组附着基上的细菌量在更换附着基之前均呈上升趋势, 且弧菌与异养细菌的变化趋势

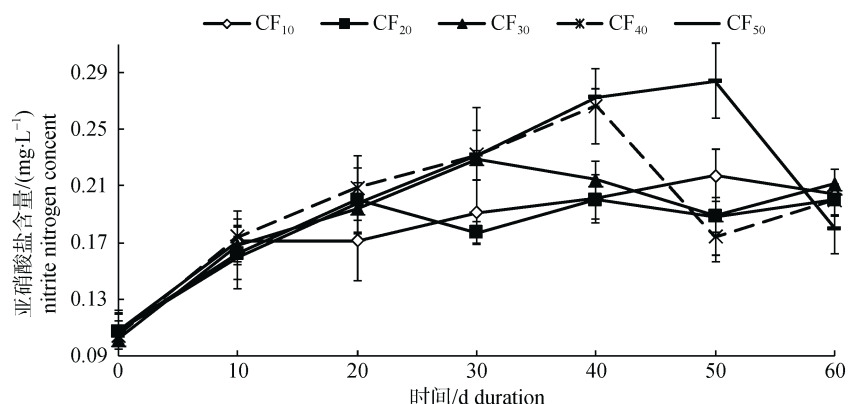


图 3 附着基更换频率对池水亚硝酸盐含量的影响

CF<sub>10</sub> 表示每 10 天更换一次附着基; CF<sub>20</sub> 表示每 20 天更换一次附着基; CF<sub>30</sub> 表示每 30 天更换一次附着基; CF<sub>40</sub> 表示每 40 天更换一次附着基; CF<sub>50</sub> 表示每 50 天更换一次附着基。

Fig. 3 Effect of changing frequency of the substrates on NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N concentration in culture tank

CF<sub>10</sub> means the substrates are changed every 10 days; CF<sub>20</sub> means the substrates are changed every 20 days; CF<sub>30</sub> means the substrates are changed every 30 days; CF<sub>40</sub> means the substrates are changed every 40 days; CF<sub>50</sub> means the substrates are changed every 50 days.

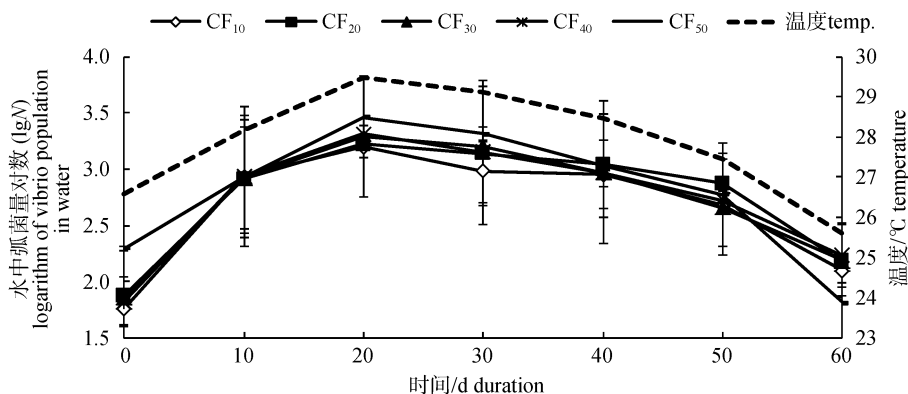


图 4 附着基更换频率对池水中弧菌量的变化影响

CF<sub>10</sub> 表示每 10 天更换一次附着基; CF<sub>20</sub> 表示每 20 天更换一次附着基; CF<sub>30</sub> 表示每 30 天更换一次附着基; CF<sub>40</sub> 表示每 40 天更换一次附着基; CF<sub>50</sub> 表示每 50 天更换一次附着基。

Fig. 4 Effect of changing frequency of substrates on variation of vibrio population in water

CF<sub>10</sub> means the substrates are changed every 10 days; CF<sub>20</sub> means the substrates are changed every 20 days; CF<sub>30</sub> means the substrates are changed every 30 days; CF<sub>40</sub> means the substrates are changed every 40 days; CF<sub>50</sub> means the substrates are changed every 50 days.

基本相同(图 6, 图 7)。CF<sub>40</sub> 组的异养细菌数量在第 40 天更换附着基之前达  $3.07 \times 10^4$  cfu/cm<sup>2</sup>, 弧菌数量达  $0.95 \times 10^4$  cfu/cm<sup>2</sup>; CF<sub>50</sub> 组异养细菌的数量在第 50 天时更换附着基之前达  $1.38 \times 10^5$  cfu/cm<sup>2</sup>, 弧菌的数量达到  $1.5 \times 10^4$  cfu/cm<sup>2</sup>, 皆高于其他各组。在更换附着基后, 各实验组的弧菌与异养细菌数量都随之大大降低。

**2.4.2 更换频率对附着基上优势菌丰度的影响** 实验期间共分离获得 6 种优势菌, 经 16S rDNA 测序鉴定表明, 这 6 株优势菌分别为: 溶藻弧菌

(*Vibrio alginolyticus*)、需钠弧菌(*Vibrio natriegens*)、马胃葡萄球菌(*Staphylococcus equorum*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)等。在不同更换频率下, 附着基上的优势菌种类和丰度存在差异。其中, 溶藻弧菌在各时期不同组别的附着基上均为优势菌之一, 而且其优势度随着更换频率的不同而存在明显差异。实验期间, CF<sub>10</sub> 组、CF<sub>20</sub> 组和 CF<sub>30</sub> 组附着基上溶藻弧菌的优势度均在 50% 以下; 而

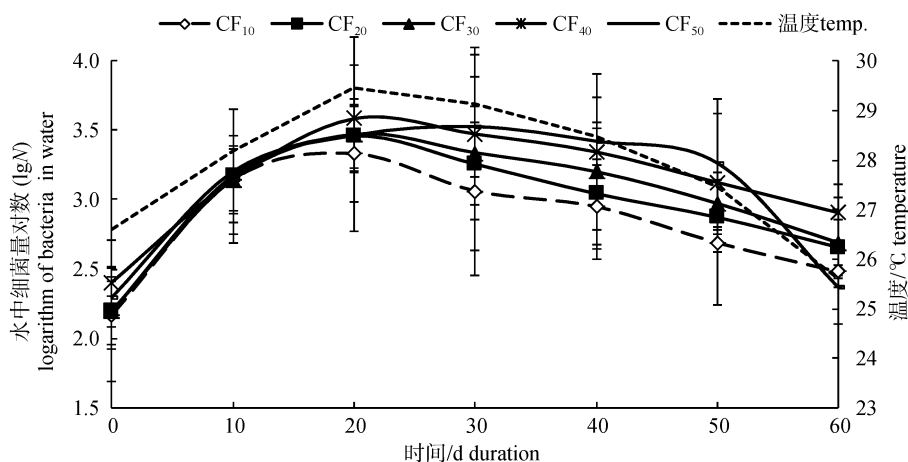


图 5 附着基更换频率对池水中异养细菌量的变化影响

CF<sub>10</sub> 表示每 10 天更换一次附着基; CF<sub>20</sub> 表示每 20 天更换一次附着基; CF<sub>30</sub> 表示每 30 天更换一次附着基; CF<sub>40</sub> 表示每 40 天更换一次附着基; CF<sub>50</sub> 表示每 50 天更换一次附着基。

Fig. 5 Effect of changing frequency of substrates on variation of heterotrophic bacteria in water

CF<sub>10</sub> means the substrates are changed every 10 days; CF<sub>20</sub> means the substrates are changed every 20 days; CF<sub>30</sub> means the substrates are changed every 30 days; CF<sub>40</sub> means the substrates are changed every 40 days; CF<sub>50</sub> means the substrates are changed every 50 days.

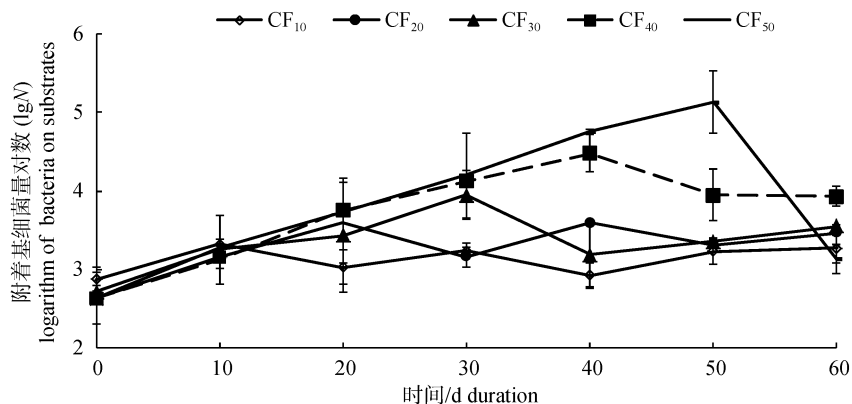


图 6 附着基更换频率对附着基上异养细菌量的影响

CF<sub>10</sub> 表示每 10 天更换一次附着基; CF<sub>20</sub> 表示每 20 天更换一次附着基; CF<sub>30</sub> 表示每 30 天更换一次附着基; CF<sub>40</sub> 表示每 40 天更换一次附着基; CF<sub>50</sub> 表示每 50 天更换一次附着基。

Fig. 6 Effect of changing frequency of the substrates on number of heterotrophic bacteria on substrates

CF<sub>10</sub> means the substrates are changed every 10 days; CF<sub>20</sub> means the substrates are changed every 20 days; CF<sub>30</sub> means the substrates are changed every 30 days; CF<sub>40</sub> means the substrates are changed every 40 days; CF<sub>50</sub> means the substrates are changed every 50 days.

CF<sub>40</sub> 组和 CF<sub>50</sub> 组附着基上溶藻弧菌的优势度在 30 d 后明显增高; 在第 50 天时, CF<sub>50</sub> 组附着基上溶藻弧菌的优势度上升到 88%(图 8)。

## 2.5 更换频率对附着基上附着生物的影响

实验在 10 d 后, CF<sub>20</sub> 组、CF<sub>30</sub> 组、CF<sub>40</sub> 组和 CF<sub>50</sub> 组附着基上均出现了少量玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*), 并随附着基更换频率的降低而大量繁殖。在 36 d 后, CF<sub>40</sub> 组和 CF<sub>50</sub> 组附着基上有大

量玻璃海鞘和日本毛壶(*Grantia nipponica*)等生物附着。50 d 后, CF<sub>50</sub> 组附着基上还出现了大量的污损生物内刺盘管虫(*Hydroides ezoensis*)。

## 3 讨论

### 3.1 附着基不同更换频率对养殖系统水质的影响

$\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$  和 COD 是评定养殖用水的重要理化指标<sup>[10]</sup>。本研究表明, 刺参育苗系统中

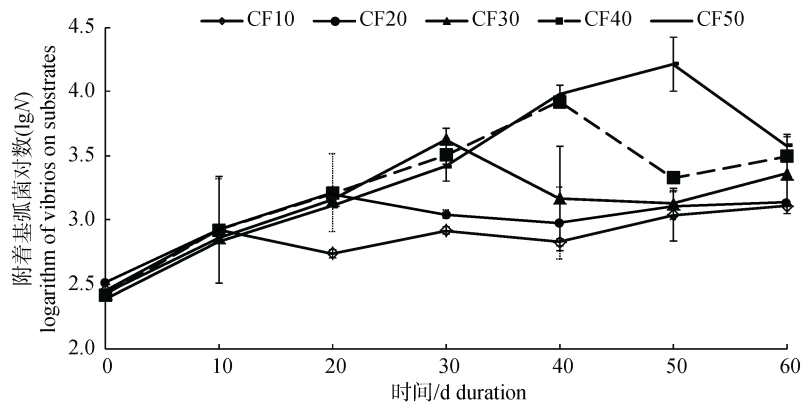


图 7 附着基更换频率对附着基上弧菌量的影响

CF<sub>10</sub>表示每 10 天更换一次附着基; CF<sub>20</sub>表示每 20 d 更换一次附着基; CF<sub>30</sub>表示每 30 d 更换一次附着基; CF<sub>40</sub>表示每 40 d 更换一次附着基; CF<sub>50</sub>表示每 50 d 更换一次附着基.

Fig. 7 Effect of changing frequency of the substrates on vibrio population on substrates

CF<sub>10</sub> means the substrates are changed every 10 days; CF<sub>20</sub> means the substrates are changed every 20 d; CF<sub>30</sub> means the substrates are changed every 30 d; CF<sub>40</sub> means the substrates are changed every 40 d; CF<sub>50</sub> means the substrates are changed every 50 d.

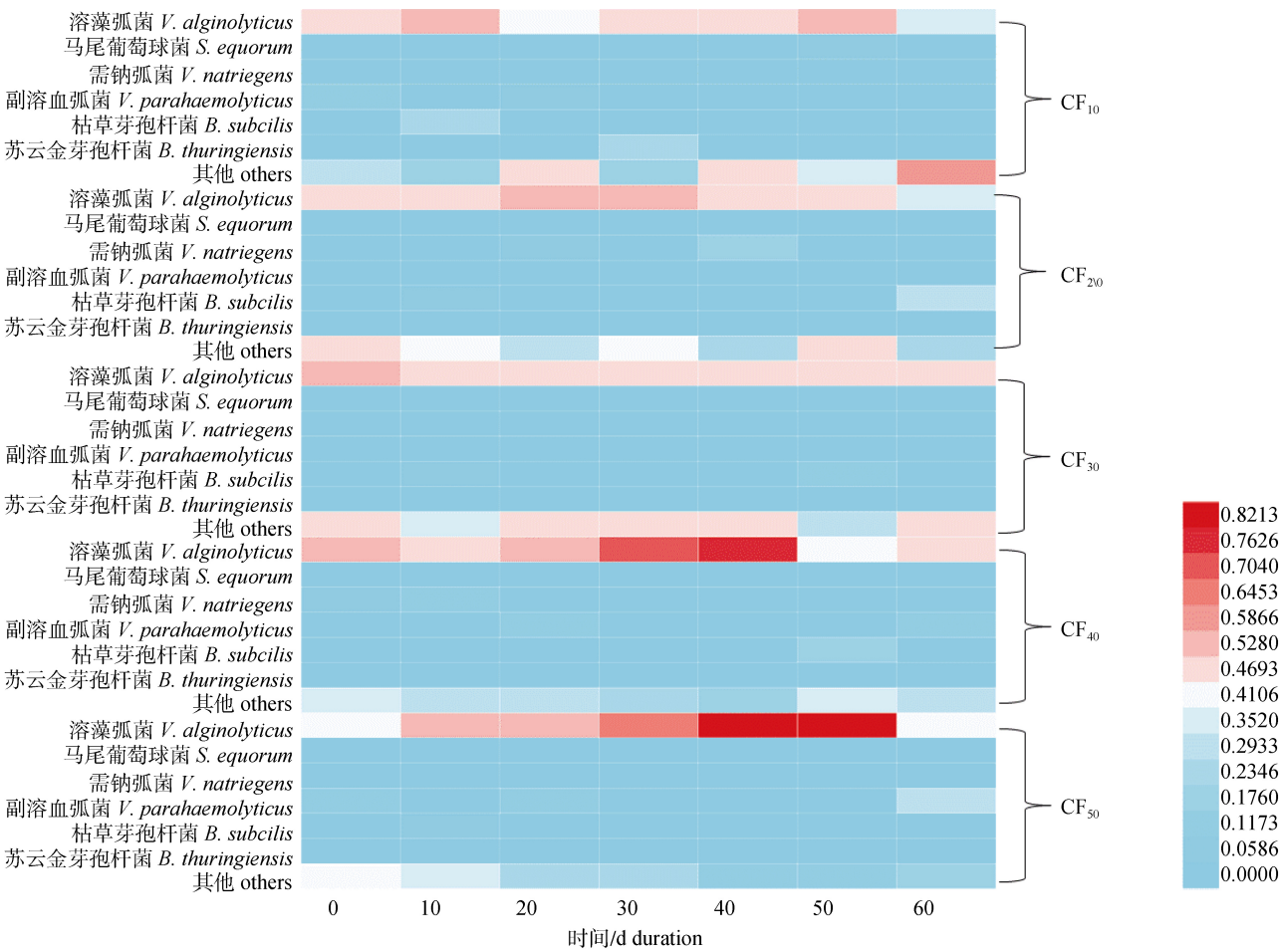


图 8 不同更换频率对附着基上优势菌变化的影响

CF<sub>10</sub>表示每 10 天更换一次附着基; CF<sub>20</sub>表示每 20 天更换一次附着基; CF<sub>30</sub>表示每 30 天更换一次附着基; CF<sub>40</sub>表示每 40 天更换一次附着基; CF<sub>50</sub>表示每 50 天更换一次附着基.

Fig. 8 Effect of changing frequency of the substrates on predominant bacteria on substrates

CF<sub>10</sub> means the substrates are changed every 10 days; CF<sub>20</sub> means the substrates are changed every 20 days; CF<sub>30</sub> means the substrates are changed every 30 days; CF<sub>40</sub> means the substrates are changed every 40 days; CF<sub>50</sub> means the substrates are changed every 50 days.



附着基的不同更换频率对池水温度、盐度、溶解氧、pH 值没有较大影响;而 COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  等指标却有较大的差异。附着基在不同更换频率下,随着时间的延长,池水中的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和 COD 不断积累,均呈现上升的趋势。后三者指标的上升可能是因为养殖水体中残饵、粪便、分泌物经微生物分解、脱氮作用产生  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ;在氧气充足时,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  又被亚硝化细菌转变为  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ <sup>[11]</sup>。祁真等<sup>[12]</sup>针对对虾养殖系统研究表明,池水水质变化与池中的残饵和粪便密切相关。为此,在实验过程中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和 COD 3 项指标基本上呈现  $\text{CF}_{50}>\text{CF}_{40}>\text{CF}_{30}>\text{CF}_{20}>\text{CF}_{10}$  的趋势,存在其合理性。在实验后期,  $\text{CF}_{50}$  组  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和 COD 的含量已接近或超过海水水质标准(GB 3079-1997);而刺参也出现严重化皮和死亡症状。有研究人员报道,随着  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  胁迫浓度升高及胁迫时间延长,刺参免疫酶会随之降低<sup>[13-14]</sup>,这些有害物质过高时会对水生动物产生毒害作用<sup>[15]</sup>。这可能是由于长期不更换附着基,附着基上累积的沉积物降解产生的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  溶解到池水中致使养殖池水中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  含量的升高,而池水和附着基周围  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  浓度的升高可导致刺参免疫力下降,从而诱发刺参的化皮和死亡现象。

从水质指标来讲,  $\text{CF}_{30}$  组的水体中的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和 COD 皆低于海水水质标准(GB 3079-1997),而  $\text{CF}_{10}$  组和  $\text{CF}_{20}$  组上述各项指标均比  $\text{CF}_{30}$  组更低,说明每 10 d、20 d 或 30 d 更换 1 次附着基均可以保证养殖系统的良好水质。

### 3.2 附着基不同更换频率对育苗系统菌群结构的影响

本研究表明,附着基的不同更换频率对水中异养细菌和弧菌数量的影响较小,这可能与实验中每天换水有关。表现不同的是:随着有机物的不断沉积和细菌繁殖,各实验组附着基上的异养菌数量、弧菌数量和优势菌群丰度差异较大;更换附着基前细菌数量一直保持上升趋势,在更换附着基之后又出现骤降趋势,即附着基上的异养细菌和弧菌的数量与附着基更换频率成负相关。

因此,刺参室内苗种培育池附着基上细菌数量变化与附着基更换频率密切相关;并且附着基上优势菌的优势度随着附着基的更换频率不同而存在一定的差异。

本研究发现,刺参附着基上共分离获得 6 种优势菌,优势菌分别为:溶藻弧菌、需钠弧菌、马胃葡萄球菌、副溶血弧菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌。其中,溶藻弧菌具有最高的优势度,在  $\text{CF}_{50}$  组中其优势度高达 88%。有研究学者报道,溶藻弧菌是水产养殖经济品种中常见致病菌<sup>[16-21]</sup>,并可导致糙海参(*Holothuria scabra*)幼体出现溃烂、死亡以及成体刺参的溃疡病<sup>[20-21]</sup>。其他菌株如副溶血弧菌、需钠弧菌、马胃葡萄球菌也是水产养殖动物的致病菌<sup>[22-23]</sup>。其中,马胃葡萄球菌可造成刺参吐肠、化皮,但其毒力较低<sup>[24]</sup>。由此看出,更换附着基频率过低(即时间间隔过长),容易形成溶藻弧菌等有害菌的丰度过高,易导致刺参疾病的发生。

此外,附着基更换频率超过 30 d 以上时,附着基上会有大量玻璃海鞘和日本毛壶等生物的附着。50 d 以上时还出现大量的内刺盘管虫。这些生物均视为刺参培育苗种的敌害生物,并与刺参苗种产生栖息空间、食物的竞争,导致刺参生长减慢、成活率低、经济效益下降等问题<sup>[6]</sup>。

### 3.3 附着基不同更换频率对刺参苗种生长的影响

本研究结果表明,  $\text{CF}_{10}$  组、 $\text{CF}_{20}$  组、 $\text{CF}_{30}$  组、 $\text{CF}_{40}$  组和  $\text{CF}_{50}$  组刺参苗种的个体重量均有增长,其中  $\text{CF}_{40}$  组和  $\text{CF}_{10}$  增长较慢,  $\text{CF}_{50}$  组在 43 d 后患病出现大量化皮并有死亡现象,成活率很低。说明附着基不同更换频率对刺参苗种生长有显著影响。这一现象可能是附着基更换频率与池水水质指标、致病菌丰度、有害附着生物呈负相关密切关联。从特定生长率和存活率来看,  $\text{CF}_{20}$  组即附着基每 20 d 更换一次的养殖方式可获得最佳的生长效益;  $\text{CF}_{30}$  组仅次之。若附着基更换频率太高,  $\text{CF}_{10}$  组参苗特定生长率和成活率显著低于  $\text{CF}_{20}$  组和  $\text{CF}_{30}$  组,这可能与更换附着基频率过高,应激次数多,摄食量降低有关<sup>[25]</sup>。若附着基更换频率太低,即  $\text{CF}_{50}$  组的特定生长率较低,生长受到抑



制。与此同时,附着基上将会出现大量玻璃海鞘、日本毛壶、内刺盘管虫等敌害生物<sup>[6, 26-28]</sup>。

综上所述,确定最佳的附着基更换频率,对保持苗种培育系统良好的水质条件、菌群结构、特定生长率和成活率,有效防控敌害生物附着,保障刺参的成活率和生长效益具有重要的现实意义。本研究发现,在7-9月高温季节,每20 d更换1次附着基效果为佳。另外,考虑到刺参育苗生产成本和其他低温季节的现实情况,笔者认为附着基更换频率一般为20~30 d为宜,具体时间可根据地理条件、水温、生产设施、养殖技术水平等因素进行综合调整。本研究从实验生态学、微生物学角度确定了附着基最佳更换频率,其研究结果为刺参苗种培育工艺的优化及刺参健康养殖提供了理论依据和参考。

#### 参考文献:

- [1] Li M Y. Culture and Enhancement of Aquatic Economic Animals[M]. Beijing: China Ocean Press, 2011: 11-32. [李明云. 水产经济动物增养殖学[M]. 北京: 海洋出版社, 2011: 11-32.]
- [2] Shi Y H, Zhang G Y, Liu J Z, et al. The rules and differences of *Litopenaeus vannamei* growth on two mode of breeding[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2011, 38(6): 284-290. [施永海, 张根玉, 刘建忠, 等. 两种养殖模式下凡纳滨对虾生长的规律及差异[J]. 水产科技情报, 2011, 38(6): 284-290.]
- [3] Lu C C, Sun Y J, Gao Q F, et al. Effects of different water exchange frequencies on the environments of the sediments in sea cucumber culture ponds[J]. Transaction of Oceanology and Limnology, 2014(4): 59-66. [卢超超, 孙永军, 高勤峰, 等. 不同换水频率对刺参养殖池塘底泥环境的影响[J]. 海洋湖沼通报, 2014(4): 59-66.]
- [4] Hang H L, Fu S, Deng C M, et al. Effects of different density, water changing rate and changing ponds on growth and survival rate for planktonic larvae of *Pinctada margaritifera* (Linne)[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2010, 30(1): 50-54. [黄海立, 符韶, 邓陈茂, 等. 培育密度、换水量和倒池培育对珠母贝浮游幼虫生长发育和存活的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2010, 30(1): 50-54.]
- [5] Lv J Y, Sun Y Y, Li B J, et al. Effects of different rearing modes on controlling out-breaking epidemic disease in *Haliotis diversicolor* under intensive culture[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(2): 147-151. [吕军仪, 孙燕燕, 李秉记, 等. 不同技术措施控制杂色鲍暴发性流行病的效果比较[J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 147-151.]
- [6] Wang Y G, Rong X J, Liao M J, et al. Sea Cucumber Culture and Disease Control Technology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014: 1-10. [王印庚, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参健康养殖与病害防控丛解[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014: 1-10.]
- [7] Chang Y Q, Sui X L, Li J, et al. The Current Situation, Problem and Prospect on the *Apostichopus japonicus* Aquaculture[J]. Fisheries Science, 2006, 25(4): 198-201. [常亚青, 隋锡林, 李俊, 等. 刺参增养殖业现状、存在问题与展望[J]. 水产科学, 2006, 25(4): 198-201.]
- [8] Huang H W, Wang Y G, Chen X, et al. The occurrence of low temperature period breeding trepang rotting skin syndrome and the relationship between environmental factors[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2011, 38(6): 292-297. [黄华伟, 王印庚, 陈霞, 等. 低温期养殖刺参腐皮综合征的发生与环境因子间的关系[J]. 水产科技情报, 2011, 38(6): 292-297.]
- [9] Yu, D X. The Sea Cucumber Healthy Breeding Technology[M]. Beijing: China Ocean Press, 2010: 32-41. [于东祥. 海参健康养殖技术[M]. 北京: 海洋出版社, 2010: 32-41.]
- [10] Lei Y Z. Chemical Water for Aquaculture Environment[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004: 116-117. [雷衍之. 养殖水环境化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 116-117.]
- [11] Gao B, Zhou X H. The cause of the prawn ammonia nitrogen in the breeding and the prevention and control[J]. Sea-lake Salt and Chemical Industry, 2001, 30(5): 27-29. [高波, 周秀华. 对虾养殖池中氨氮的成因及防治[J]. 海湖盐与化工, 2001, 30(5): 27-29.]
- [12] Qi Z, Yang J P, Liu Y, et al. Effects of feed remnants, excrement and dead shrimp bodies on water quality in aquaria[J]. Fisheries Science, 2004, 23(11): 5-8. [祁真, 杨京平, 刘鹰, 等. 对虾池残饵、粪便及死虾腐解对养殖水质影响的模拟试验[J]. 水产科学, 2004, 23(11): 5-8.]
- [13] Zang Y Q, Tian X L, Dong S L, et al. The activities of immunoenzymes and heat shock protein 70 content of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) to chronic stress of ammonical nitrogen[J]. Periodical of Ocean University of China, 2012, 42(Supplementary issue): 60-66. [臧元奇, 田相利, 董双林, 等. 氨氮慢性胁迫对刺参免疫酶活性及热休克蛋白表达的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2012, 42(增刊): 60-66.]
- [14] Chen Y Y, Tian X L, Yu X, et al. Effect of nitrite stress on the non-specific immune response and HSP70 expression of sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Periodical of

- Ocean University of China, 2013, 43(11): 35–42. [陈芸燕, 田相利, 于晓, 等. 亚硝酸氮胁迫对刺参体壁非特异性免疫能力及 HSP70 达的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2013, 43(11): 35–42.]
- [15] Pan K, Wang W M, Zhu D M, et al. Studies on acute toxicity of ammoniacal nitrogen, nitrite, and nitrate for *pseudorasbora parva*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(35): 96–101. [潘坤, 王卫民, 祝东梅, 等. 氨态氮、亚硝态氮、硝态氮对麦穗鱼的急性毒性研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(35): 96–101.]
- [16] Jin S, Wang G L, Zhao Q S, et al. Epidemiology of vibriosis in large Yellow croaker *Pseudosciaena crocea* (Richardson) in marine cage culture[J]. Fisheries Science, 2005, 24(1): 17–19. [金珊, 王国良, 赵青松, 等. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的病原菌[J]. 水产科学, 2005, 24(1): 17–19.]
- [17] Chen Y E, Jin S, Wang G L, et al. Study on blood physiological and biochemical indices of *Vibrio alginolyticus* disease of *Lateolabrax japonicus*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2005, 24(1): 104–108. [陈寅儿, 金珊, 王国良, 等. 鲈鱼溶藻弧菌病的血液生理生化指标研究[J]. 台湾海峡, 2005, 24(1): 104–108.]
- [18] Zhang Z H, Zhang Q Z, Li C Y, et al. Isolation and identification of pathogenic vibrios of oyster *Crassostrea ariakensis*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2008, 27(6): 49–56. [张占会, 张其中, 李春勇, 等. 养殖近江牡蛎致病弧菌的分离与鉴定[J]. 热带海洋学报, 2008, 27(6): 49–56.]
- [19] Wen C Q, Xue M, He H, et al. Isolation and Identification of Two Pathogenic Strains Associated with Vibriosis of Shrimp Larvae[J]. Microbiology China, 2015, 34(2): 190–196. [温崇庆, 薛明, 何红, 等. 两株对虾幼体弧菌病原的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2015, 34(2): 190–196.]
- [20] Becker P, Gillan D, Lanterbecq D, et al. The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothurioidea, Echinodermata)[J]. Aquaculture, 2004, 242(1–4): 13–30.
- [21] Yang J L, Zhou L, Sheng X Z, et al. Identification and biological characteristics of pathogen RH2 associated with skin ulceration of cultured *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(4): 504–511. [杨嘉龙, 周丽, 绳秀珍, 等. 养殖刺参病原菌 RH2 的鉴定及其生物学特性分析[J]. 水产学报, 2007, 31(4): 504–511.]
- [22] Jin P J, Wu B B, Wang S N, et al. Analysis of major virulence genes in *Vibrio Parahaemolyticus* isolates from coastal areas in Zhejiang Province[J]. Microbiology China, 2009, 36(7): 962–967. [金培婕, 吴蓓蓓, 王淑娜, 等. 浙江沿海地区海产品及环境中副溶血弧菌的分离与主要毒力基因分析[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 962–967.]
- [23] Li G, Yan M L, Sun X W, et al. Identification and biological characteristics of pathogen *Vibrio natriegen* from clam *Meretrix meretrix*[J]. Progress in Fishery Science, 2009, 30(6): 103–109. [李国, 闫茂孙, 孙杰文, 等. 蛤病原菌需钠弧菌的鉴定和生物学特性分析[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(6): 103–109.]
- [24] Deng H, He C B, Zhou Z C, et al. Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Aquaculture, 2009, 287(1–2): 18–27.
- [25] Luo Z Y. Study on stress mechanism and the anti-tress effect of vitamins C and E in *Apostichopus japonicus* (Selenka) Juveniles[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2014: 3–73. [洛作用. 仿刺参幼参对不同刺激的应激机制及维生素 C、E 抗应激作用研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2014: 3–73.]
- [26] Zhang J H, Fang J G, Dong S L, et al. Effect of temperature on feeding selectivity of *Styela clava* and *Ciona intestinalis*[J]. Marine Fisheries Research, 2001, 22(2): 47–51. [张继红, 方建光, 董双林, 等. 温度对柄海鞘和玻璃海鞘食物颗粒选择性的影响[J]. 海洋水产研究, 2001, 22(2): 47–51.]
- [27] Rong X J, Liao M J, Li B, et al. A new harmful organism found in *Apostichopus japonicus* indoor breeding seeding—*Grantia nipponica*[J]. Marine Sciences, 2014, 38(5): 60–65. [荣小军, 廖梅杰, 李彬, 等. 室内刺参育苗池中新发现的一种敌害生物—日本毛壶[J]. 海洋科学, 2014, 38(5): 60–65.]
- [28] Cao S M, Xu H, Liu P L, et al. Effects of temperatures on growth, development and metamorphosis of *Hydroides ezoensis* larvae[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2009, 24(6): 531–535. [曹善茂, 徐赫, 刘鹏亮, 等. 不同温度对内刺盘管虫幼虫生长发育及变态的影响[J]. 大连水产学院学报, 2009, 24(6): 531–535.]

## Effects of substrate change frequency on growth and variation of the microflora structure in a seedling cultivation system of sea cucumber *Apostichopus japonicus*

WANG Yingeng<sup>1</sup>, ZHANG Wenze<sup>1,2</sup>, LIAO Meijie<sup>1</sup>, LI Bin<sup>1</sup>, RONG Xiaojun<sup>1</sup>, ZHANG Zheng<sup>1</sup>, LI Hua<sup>2</sup>, FAN Ruiyong<sup>3</sup>, NING Luguang<sup>4</sup>

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
3. Qingdao Ruizi Seafood Development Co. Ltd., Qingdao 266400, China;
4. Dongying Haiyue Aquatic Technology Co. Ltd., Dongying 257500, China

**Abstract:** To determine the best change frequency of substrates in the sea cucumber seedling cultivation system in summer, the relationship between the substrate change frequency and growth of sea cucumbers, and the microflora structure on the substrate, was investigated using an experimental ecology method, a traditional bacterial culture method and 16S rDNA sequence analysis. Five different substrate change frequency groups (10 d, 20 d, 30 d, 40 d, 50 d) were set and termed CF<sub>10</sub>, CF<sub>20</sub>, CF<sub>30</sub>, CF<sub>40</sub> and CF<sub>50</sub>. Judged by the weight gain of the whole cultivation tank and the main body weight, the group achieved the best growth rate, followed by the CF<sub>30</sub> group. The CF<sub>50</sub> group achieved the highest death rate, which caused a decrease in the weight of the whole tank. The specific growth rate and the survival rate of the CF<sub>20</sub> group were (5.986±0.135)%/d and (95.231±0.265)%, respectively, which were significantly higher than the other groups ( $P<0.05$ ). The concentration of ammonia nitrogen ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ), nitrite ( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ) and chemical oxygen demand (COD) of the pond water increased along with the decrease in the change frequency of substrates, reaching 0.53 mg/L, 0.28 mg/L and 0.18 mg/L on the 50th day, respectively. In terms of the concentrations of heterotrophic bacteria and vibrios in the pond water and on the substrate, the concentrations of heterotrophic bacteria and vibrios in the pond water did not change significantly with the change frequency of substrates; however, the concentrations of heterotrophic bacteria and vibrios on the substrate increased with decreasing change frequency of substrates, reaching  $1.38\times 10^5$  cfu/cm<sup>2</sup> and  $1.5\times 10^4$  cfu/cm<sup>2</sup> on the 50th day in the CF<sub>50</sub> group, respectively. Bacterial identification showed that the dominant bacteria on the substrates were *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio natriegens*, *Staphylococcus equorum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* and *Vibrio parahaemolyticus*, of which *V. alginolyticus* was the dominant bacteria. *V. alginolyticus* is an etiological pathogen for *A. japonicus*; therefore, it might have a close relationship with the occurrence of skin ulcerative syndrome in the CF<sub>50</sub> group. Harmful animals, such as *Ciona intestinalis*, *Grantia nipponica*, and *Hydroides ezoensis*, compete for living space and food, causing slow growth of sea cucumbers. These animals emerged when the substrates had not been changed for a long time. The above results indicated that the optimal substrate change was once every 20 d in summer (July to September). Taking the production cost in consideration, it was suggested that the substrate should normally be changed once between 20 d and 30 d. These results will help to optimize breeding processes and health management for sea cucumbers.

**Key words:** *Apostichopus japonicus*; seedling technological process; substrate; change frequency; growth; microflora structure; vibrio

**Corresponding author:** WANG Yingeng. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn