

发酵海带对刺参生长和免疫及消化生理的影响

王世英^{1,2}, 陈政强^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

2. 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 对枯草芽孢杆菌发酵海带的条件进行优化, 并以此发酵海带饲养刺参, 结果表明, 枯草芽孢杆菌发酵海带的优化条件为发酵温度 30 ℃、适宜发酵时间 96 h、接种剂量 12%, 发酵后海带的粗蛋白含量为 14.65%, 相对提高了 15.17%。在 36 d 饲养时间内, 实验组在刺参的配合饲料中添加了 30% 的发酵海带, 刺参特定生长率、溶菌酶活性、超氧化物歧化酶活性、酸性磷酸酶活性、蛋白酶活性和淀粉酶活性皆有显著提高 ($P < 0.05$), 但是, 刺参体腔液细胞数量、纤维素酶活性皆无显著变化 ($P > 0.05$), 此外, 刺参摄食发酵海带还导致其消化道异养菌总数减少、弧菌相对数量降低、芽孢杆菌相对数量升高。由此可见, 投饲枯草芽孢杆菌发酵海带能够促进刺参生长, 提高消化酶活性和免疫力, 调节肠道菌群结构。

[关键词] 刺参; 枯草芽孢杆菌; 发酵海带; 特定生长率; 免疫因子; 消化酶活性

[中图分类号] S 963.7

The Effect of Fermented Seaweed *Laminaria japonica* on Growth, Immunity and Digestion Physiology of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*

WANG Shi-ying^{1,2}, CHEN Zheng-qiang^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety (Jimei University), Fujian Province, Xiamen 361021, China)

Abstract: In this paper, the fermentation conditions for seaweed *Laminaria japonica* using *Bacillus subtilis* were investigated, and the feeding influences of fermented seaweed on sea cucumbers *Apostichopus japonicus* were studied. The results showed that, the optimum fermentation condition sincluded 30 ℃, 96 hours of cultivation, and 12% inoculation amount of seaweed powder. After fermentation, the crude protein content of the seaweed increased 15.17%, reached up to 14.65%. Feeding with diets containing 30% of fermented seaweed has caused obvious effect on the experimental animals *Apostichopus japonicas*. After 36 days of feeding, the specific growth rate and the activities of hemolymph lysozyme, total superoxide dismutase (T-SOD), acid phosphatase (ACP), protease and amylase of sea cucumber, increased significantly ($P < 0.05$), while the total haemocyte count in the body cavity and the haemolymph cellulase activity did not change significantly ($P > 0.05$). Furthermore, after feeding with fermented seaweed, the total amount of heterotrophic bacteria and *Vibrio*

[收稿日期] 2015-04-14

[修回日期] 2015-05-13

[基金项目] 福建省海洋高新产业发展专项基金资助项目(闽海渔高科合同[2012]科20号); 福建省高校产学研合作科技重大项目(2010N5011)

[作者简介] 王世英(1990—), 男, 硕士生, 主要从事刺参健康养殖技术方面的研究. 通信作者: 陈政强(1967—), 男, 副教授, 从事水生生物增养殖及免疫学方向研究, E-mail: zqchen999@jmu.edu.cn.

sp. in the digestive tract decreased, while the *Bacillus* sp. increased, indicating that feeding with fermented seaweed *Laminaria japonica* could promote the growth of sea cucumbers *Apostichopus japonicus*, and improve the digestive enzyme activities and immunities, and regulate the intestinal bacteria composition.

Keywords: *Apostichopus japonicus*; *Bacillus subtilis*; fermented seaweed; specific growth rate; immune factor; digestive enzyme activity

0 引言

刺参 (*Apostichopus japonicus*) 是海参中的名贵种类, 自然分布于连云港坪山岛以北的黄渤海及日本海域, 具有重要的食用和经济价值。刺参人工养殖产业规模庞大, 由北向南延伸至福建南部沿海, 年生产总值高达 300 亿元, 在国内海洋水产业中具有举足轻重的地位^[1]。刺参食性杂, 在自然条件下嗜食大型藻类腐败后存留的腐殖质、有机碎屑, 以及底栖硅藻、浮游植物、原生动物、小型桡足类、螺类及双壳贝类的幼体和幼贝, 食物中常伴有大量泥沙、沙砾或贝壳碎片^[2]。有学者发现, 刺参消化道中的细菌数量比周围环境沉积物中大得多, 其能量 70% 来自细菌^[3]。据此, 通过投饲发酵饲料提高刺参养殖效果的做法备受学术界和产业界关注。虽然, 发酵饲料在刺参养殖中的应用已有一些报道, 但是, 迄今为止未见利用枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 发酵海带 (*Laminaria japonica*) 作为刺参饲料的相关研究报道^[4]。枯草芽孢杆菌是动物乃至人类常用的消化道益生菌, 也是我国农业部公布的安全菌种之一, 其在代谢过程中不仅可以产生大量的蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、糖化酶等增进食物消化与吸收的消化酶, 还能产生某些抑菌物质^[5], 应用在水产养殖生产中可发挥其改善养殖水环境、调节养殖动物肠道菌群、提高水产动物免疫力以及促进动物生长等的作用^[6-7]。本文探讨枯草芽孢杆菌发酵海带饲养刺参的效果, 目的是揭示枯草芽孢杆菌发酵海带对刺参消化与生长以及免疫机能的影响, 为发酵海带的开发利用积累有益资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用干海带购自于厦门水产品销售市场, 洗净后在 45 ℃ 烘箱中烘干至恒重, 粉碎并经 60 目筛网过筛, 4 ℃ 条件下密封保存, 备用; 实验用刺参选购自青岛润海水产品养殖有限公司, 实验开始之前暂养 2 周以恢复体能、适应环境, 期间环境水温波动于 15 ~ 20 ℃ 之间、盐度为 (24 ± 2), 每日 16: 00 投放饲料 1 次, 投饲量略大于饱食量, 翌日 8: 00 清理饲养环境并换水一次, 养殖水体日更新 100%。刺参配合饲料来自于大连升泰水产饲料有限公司, 其营养组成 (质量分数) 为: 水分 ≤ 12.0%, 粗蛋白 ≥ 13.5%, 粗脂肪 ≤ 4.0%, 粗纤维 ≤ 10.0%, 钙 ≤ 5.0%, 总磷 ≥ 0.7%, 灰分 ≤ 45.0%, 赖氨酸 ≥ 0.8%。

1.2 发酵微生物

选用枯草芽孢杆菌作为发酵海带的发酵微生物, 该菌种系本实验保藏的菌株。

1.3 发酵微生物菌种准备

将发酵微生物菌种接入斜面培养基, 30 ℃ 培养 24 h 后, 挑取一环菌苔接入 5 mL 液体培养基, 30 ℃、200 r/min 摇床培养 24 h (一级菌种), 取 1 mL 一级菌种接入 20 mL 液体培养基, 在 100 mL 三角烧瓶中 30 ℃、200 r/min 摇床培养 24 h (二级菌种培养液中发酵微生物数量达到 10⁸ CFU/mL) 作为发酵微生物菌种使用。

枯草芽孢杆菌扩大培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0 ~ 7.4。

1.4 海带发酵条件的优化

1.4.1 单因子实验

1) 海带发酵时间优化实验 取 50g 海带粉作为发酵原料, 按 m (海带粉) : V (发酵微生物) =

10% 的剂量接种发酵微生物菌种，添加 1 倍蒸馏水，控制发酵温度在 30 ℃，按发酵时间 0、24、48、72、96、120、144、168 h 设置 8 个实验组，每组设 3 个重复，发酵结束后分别移出样品并作蛋白质含量检测与分析。

2) 海带发酵温度优化实验 按发酵温度 26、28、30、32、34 ℃ 设置 5 个实验组，每组设 3 个重复，其他发酵条件与 1) 同。发酵 48h 后，移出样品进行蛋白质含量检测与分析。

3) 海带发酵微生物接种剂量比较实验 按接种剂量 6%、8%、10%、12%、14% 设置 5 个实验组，每组设 3 个重复，其他发酵条件与 1) 同。发酵 48 h 后，移出样品进行蛋白质含量检测与分析。

1.4.2 正交实验优化发酵条件

针对上述 3 项因子设计正交表（见表 1）进行海带发酵实验，通过蛋白质含量检测与分析优选海带发酵条件。

表 1 正交试验设计表
Tab. 1 The table of orthogonal experimental design

水 平 Level	因素 Factor		
	A:发酵温度 Fermentation temperature/℃	B:发酵时间 Fermentation time/h	C:接种剂量 Inoculation amount/%
1	30	48	10
2	32	72	12
3	34	96	14

1.5 刺参养殖试验

经 48 h 饥饿处理以排空消化道残食后，从暂养群体中挑选体色正常、体表无损伤、大小相对均匀的刺参 198 只((14.62 ± 2.03)g)，随机均分至 6 个室内水族箱中，水族箱体积为 30 L，并依投放饲料的差异划分为 3 组，每组 2 个重复，持续养殖 36 d。其中，K - II 实验组，按 70% 配合饲料 + 30% 发酵海带混合后每日投饲一次，K - I 对照组按 70% 配合饲料 + 30% 海带粉 + 10% 菌液 (10⁸cfu/mL) 混合后每日投饲一次，K - 0 对照组按 70% 配合饲料 + 30% 海带粉混合后每日投饲一次。各组投饲时间均为 16: 00，投喂量略大于饱食量，每日 8: 00 吸污并换水 1 次，换水率 100%。刺参饲养过程中不间断充气，环境水温波动于 15 ~ 20 ℃ 之间，pH 8.23，盐度 (24 ± 2)。

1.6 检测样品采集与处理

分别于实验开始后 0、12、24、36 d 在各养殖系统中随机获取 3 只刺参，每只刺参用灭菌海水冲洗后在冰浴条件下断尾取其体腔液，其中一部分注入等量抗凝剂用于刺参体腔细胞的计数，剩余部分经 3000 r/min、4 ℃ 离心 10 min，取上清液用于体腔液溶菌酶活性、超氧化物歧化酶和酸性磷酸酶的测定。取刺参完整消化道，剔除肠道粘膜，挤出内含物，称量，加入 9 倍体积预冷的 0.02 mol/L 的 PBS 缓冲液 (pH = 7.4) 后匀浆。匀浆液经 12 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min，取上清液作为粗酶液用于消化酶活性的测定^[8-9]。

肠道菌群样品的采集与处理：实验开始后 0、18、36 d 分别在各实验单元中提取 3 只刺参，饥饿 24 h 后，用体积分数为 75% 的酒精消毒体表并解剖取出完整消化道，经灭菌生理盐水冲洗数次后称量，加入 9 倍体积的预冷灭菌生理盐水（体积分数为 0.85%），匀浆并作刺参消化道微生物分析^[10]。

1.7 样品蛋白质含量测定

发酵海带粗蛋白含量采用凯氏定氮法，刺参体腔液蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定。酶活性均以比活力表示，即每毫克蛋白所显示的活力。

1.8 刺参生长率测定

特定生长率 (SGR) 计算公式: $SGR = (\ln W_2 - \ln W_1) / t \times 100\%$ ，其中 W_1 为初始刺参体重， W_2 为实验结束时体重， t 为实验时间。刺参体重的测量方法参照王印庚的方法^[11]。

1.9 免疫相关指标测定

体腔液细胞数采用血球计数板直接计数;溶菌酶活性参照 Zhou 等^[12]的方法测定;总超氧化物歧化酶活性和酸性磷酸酶活性采用相关检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定。

溶菌酶活性单位的定义:以每毫升反应液在 37 ℃ 时,1 min 内 OD₅₇₀降低 0.001 为 1 个酶活力单位(U)。总超氧化物歧化酶活性单位的定义:以每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个活力单位(U)。酸性磷酸酶活性单位的定义:以 100 mL 体腔液在 37 ℃ 时与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位。

1.10 消化酶活性测定方法

蛋白酶活性采用福林-酚试剂法进行测定;纤维素酶活性采用 3,5-二硝基水杨酸法测定;淀粉酶活性采用淀粉酶活性检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定。

蛋白酶活性单位的定义:组织中每毫克蛋白在 37 ℃、pH 7.5 的条件下每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸定义为一个酶活单位(U)。纤维素酶活性单位的定义:组织中每毫克蛋白经 40 ℃ 水浴保温 30 min,1min 内催化纤维素水解生成 1 μg 葡萄糖的酶量定义为 1 个活力单位(U)。淀粉酶活性单位的定义:组织中每毫克蛋白在 37 ℃ 时与底物作用 30 min,水解淀粉 10 mg 称为一个淀粉酶活力单位(U)。

1.11 刺参消化道主要菌群分析

刺参消化道主要菌群数量分析方法参照文献 [13],略有修改,即将文献 [13] 中的刺参消化道匀浆液用无菌生理盐水做 10 倍系列梯度稀释至 10⁻⁷。每样每次取 100 μL 在洁净环境下涂布于 2216E、TCBS 培养基中,设 3 个重复,于 30 ℃ 条件下培养 48 h,选择菌落清晰且菌落数在 30 ~ 300 CFU 之间的平板进行计数。

1.12 数据处理与分析

采用 SPSS17.0 软件进行数据处理和统计分析,各数值皆表示为平均值 ± 标准误差 (Means ± SE),组间数据采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),组内数据采用 LSD 多重比较, P < 0.05 为差异显著, P < 0.01 为差异极显著。

2 结果

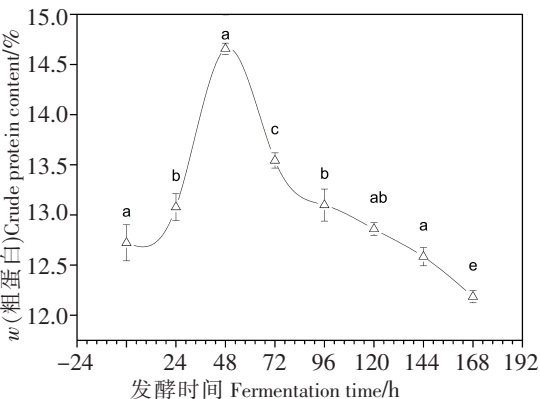
2.1 发酵条件对发酵海带的影响

2.1.1 发酵时间

实验结果表明,发酵时间对枯草芽孢杆菌发酵海带效果有显著影响,海带发酵产物中粗蛋白的质量分数随着发酵时间先升高而后又逐渐降低,48 h 后达最高值 14.66%,且显著高于其他各时段海带发酵产物中蛋白质的质量分数;120 h 后发酵海带中粗蛋白的质量分数回落至 12.86%,与初始值无显著差异;168 h 后海带发酵产物中粗蛋白的质量分数显著低于初始值(见图 1)。

2.1.2 发酵温度

实验结果显示,发酵温度对海带发酵产物中的粗蛋白的质量分数也有显著影响。在 26 ~ 30 ℃,随着发酵温度的升高,海带发酵产物中粗蛋白的质量分数由 13.8% 升至 14.50%,而在发酵温度 30 ~ 34 ℃ 范围内,随着温度的升高海带发酵产物中粗蛋白的质量分数虽有下降趋势,但差异不明显(见图 2)。

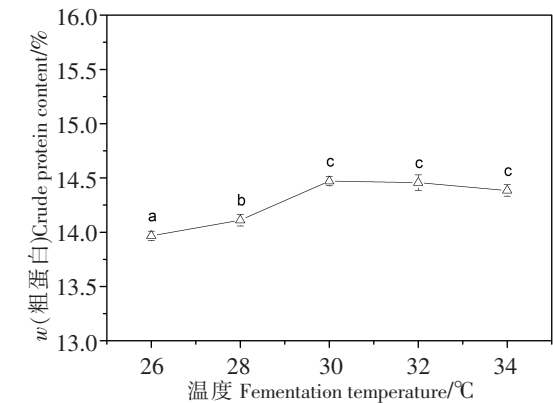


说明:不同字母间表示差异显著(P<0.05).
Note:Different letters indicate statistically significant differences (P<0.05).

图 1 发酵时间对海带粗蛋白含量的影响
Fig.1 The influence of fermentation time on the crude protein content of *Laminaria japonica*

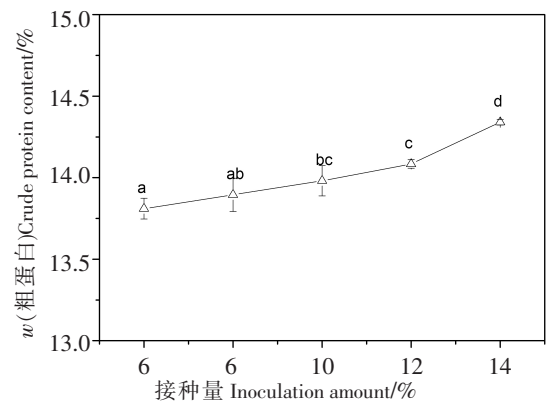
2.1.3 接种剂量

实验结果发现，微生物接种剂量的大小对发酵海带产物中粗蛋白的质量分数具有显著影响，二者呈正相关关系，即粗蛋白的质量分数随着枯草芽孢杆菌接种剂量的增加而升高，当接种剂量达到 14% 时，粗蛋白的质量分数高达 14.65%，显著高于其他实验组（见图 3）。



说明:不同字母间表示差异显著 ($P<0.05$).
Note:Different letters indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

图 2 发酵温度对海带粗蛋白含量的影响
Fig.2 The influence of fermentation temperature on the crude protein content of *Laminaria japonica*



说明:不同字母间表示差异显著 ($P<0.05$).
Note:Different letters indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

图 3 枯草芽孢杆菌接种剂量对海带粗蛋白含量的影响
Fig.3 The influence of inoculation amount dose on the crude protein content of *Laminaria japonica*

2.2 枯草芽孢杆菌发酵海带正交试验

统计分析结果表明，多因子实验中发酵温度、时长及菌种用量等各因子对海带发酵产物中粗蛋白含量的影响存在差异性，其程度依次为 $C < B < A$ ，即微生物接种剂量对发酵海带粗蛋白的含量影响最大，发酵时间次之，发酵温度影响最小（见表 2）。

表 2 正交试验结果统计分析
Tab.2 The statistical analysis of the orthogonal test

组别 Groups	水平 Level			w (粗蛋白) Crude protein content/%
	A	B	C	
1	1	1	1	13.69
2	1	2	2	14.59
3	1	3	3	14.15
4	2	1	2	14.21
5	2	2	3	14.08
6	2	3	1	14.07
7	3	1	3	13.99
8	3	2	1	13.74
9	3	3	2	14.26
K_1	14.14	13.96	13.83	
K_2	14.12	14.14	14.35	
K_3	14.00	14.16	14.07	
极差 Range	0.14	0.20	0.52	
优方案 Best	A_1	B_3	C_2	

根据上述结果推断，枯草芽孢杆菌发酵海带的最优发酵条件为： $A_1B_3C_2$ ，即发酵温度 30℃，发酵时间 96 h，微生物接种剂量 12%。

2.3 枯草芽孢杆菌发酵海带对刺参生长率的影响

在 36 d 的实验过程中各组刺参栖息正常, 摄食良好, 存活率均为 100%。实验结果表明, 无论是 K - II 组饲料还是 K - I 组饲料都能促进刺参生长, 其作用及各组之间的差异性从实验开始后第 12 天起日趋显著, 即, 在实验开始后的 12 d 时间内刺参的特定生长率在各处理组之间无显著差异 ($P > 0.05$); 24 d 后, K - II 组刺参特定生长率显著高于对照组, 而对照组中 K - I 组显著高于 K - 0 组 ($P < 0.05$) (见表 3)。

表 3 投饲枯草芽孢杆菌发酵海带对刺参生长的影响
Tab. 3 The influence of feeding fermented seaweed on the growth of the sea cucumber

组别 Groups	项目 Items	实验持续时间 t			
		0 d	12 d	24 d	36 d
K - 0	体重 Weight/g	14.53 ± 2.18	17.52 ± 4.08	21.46 ± 5.03	26.82 ± 3.43
	特定生长率 SGR/%		1.56 ± 0.17 ^a	1.69 ± 0.31 ^a	1.86 ± 0.46 ^a
K - I	体重 Weight/g	14.72 ± 1.19	17.71 ± 0.36	21.86 ± 4.44	27.40 ± 4.30
	特定生长率 SGR/%		1.54 ± 0.20 ^a	1.75 ± 0.28 ^b	1.88 ± 0.37 ^b
K - II	体重 Weight/g	14.65 ± 2.44	17.67 ± 3.20	22.02 ± 4.17	28.39 ± 6.67
	特定生长率 SGR/%		1.56 ± 0.14 ^a	1.83 ± 0.34 ^c	2.12 ± 0.45 ^c

说明: 同一列数据右上角不同字母代表有显著差异 ($P < 0.05$); 特定生长率按 $t = 12$ d 计算。
Notes: Values in the same column without a common superscript are significantly different ($P < 0.05$); specific growth rate is in 12 days.

2.4 枯草芽孢杆菌发酵海带对刺参免疫活性的影响

2.4.1 体腔液细胞数

在实验过程中, 各组刺参的体腔细胞数在 $1.530 \times 10^6 \sim 1.550 \times 10^6$ cells/mL 之间波动, 彼此之间无显著差异 ($P > 0.05$) (见表 4)。

表 4 枯草芽孢杆菌发酵海带对刺参体腔细胞数的影响

Tab. 4 The influence of feeding fermented seaweed on the body cavity cell number of the coelomocytes cucumber

组别 Groups	细胞数 Coelomocytes number/(10^6 cells · mL ⁻¹)			
	0 d	12 d	24 d	36 d
K - 0	1.531 ± 0.110	1.551 ± 0.091	1.543 ± 0.103	1.544 ± 0.123
K - I	1.531 ± 0.110	1.547 ± 0.122	1.534 ± 0.068	1.552 ± 0.076
K - II	1.531 ± 0.110	1.541 ± 0.088	1.550 ± 0.096	1.530 ± 0.082

2.4.2 溶菌酶活性

从实验结果看, 无论是投饲发酵海带还是在饲料中直接添加发酵微生物枯草芽孢杆菌皆能显著提高刺参体腔液溶菌酶活性, 并且, 投饲发酵海带使实验组优势更突出。由图 4a 可见, 受益生菌及其发酵产物影响, K - I 组、K - II 组刺参体腔液溶菌酶活性在实验开始后第 24 天达到峰值((82.68 ± 1.14)U · mg⁻¹)状态, 随后显著回落; K - 0 组则前后波动不大。

2.4.3 总超氧化物歧化酶活性

由实验结果发现, 投饲发酵海带和在饲料中直接添加发酵微生物枯草芽孢杆菌这 2 种方式皆能提高刺参体腔液总超氧化物歧化酶活性。从图 4b 不难看出, 投饲枯草芽孢杆菌发酵海带具有强势提升刺参体腔液超氧化物歧化酶活性的作用, 在饲料中添加发酵微生物枯草芽孢杆菌虽然也能显著提高刺参体腔液 T - SOD 活性, 但其提升幅度远不及前者。K - I、K - II 组刺参总超氧化物歧化酶活性峰值都出现在实验开始后第 12 天, K - II 组刺参 T - SOD 峰值为(70.25 ± 1.56)U · mg⁻¹; K - 0 组刺参在整个试验期间体腔液总超氧化物歧化酶活性总体稳定, 变化幅度很小。

2.4.4 酸性磷酸酶活性

实验结果表明, 投饲发酵海带和在饲料中直接添加发酵微生物枯草芽孢杆菌, 皆能显著提升刺参

体腔液中酸性磷酸酶活性，其作用类似于体腔液溶菌酶活性和 T-SOD 活性检测结果。在试验期间，K-I 组、K-II 组刺参的酸性磷酸酶活性先上升后下降，在第 24 天达到最高值，其中 K-II 组刺参体腔液 ACP 活性最大值为 $(48.86 \pm 11.75) \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ （见图 4c）。

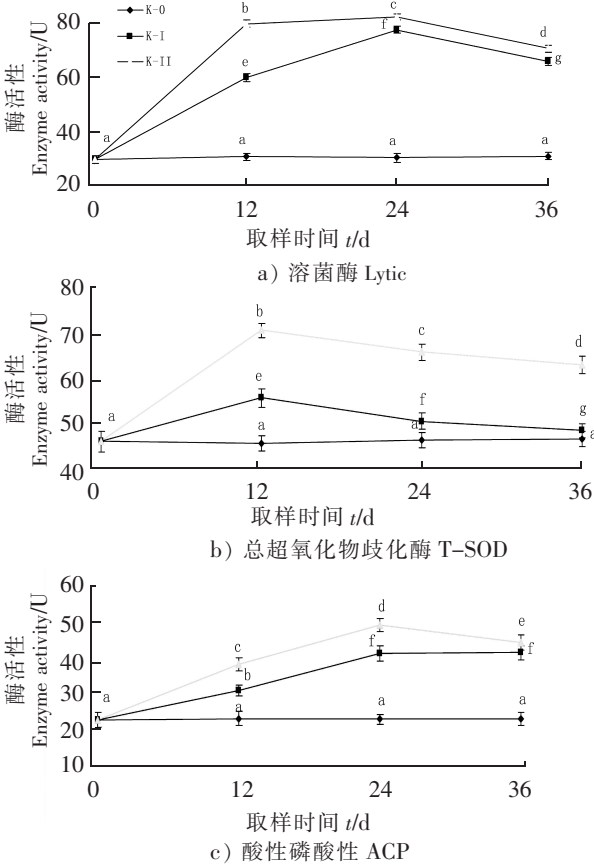
2.5 枯草芽孢杆菌发酵海带对刺参消化酶活性的影响

2.5.1 蛋白酶活性

实验结果表明，投饲发酵海带能够提高刺参消化道的蛋白酶活性，在实验开始后 36 d 内 K-0 组刺参消化道蛋白酶活性无显著差异；K-I 组和 K-II 组刺参蛋白酶活性则随着养殖时间的推移而逐渐升高并趋于稳定。相形之下，K-II 组刺参消化道蛋白酶活性显著高于对照组 K-0 组和 K-I 组，K-I 组也显著高于 K-0 组。实验开始后第 18 天起，K-I、K-II 组刺参消化道蛋白酶活性已无显著差异（见图 5a）。

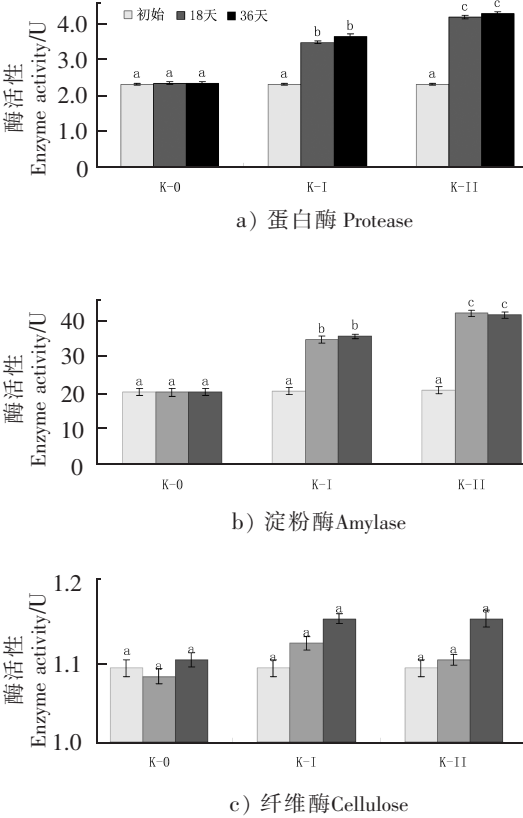
2.5.2 淀粉酶活性

枯草芽孢杆菌发酵海带对刺参消化道淀粉酶活性的影响如图 5b 所示。可见，在刺参饲料中添加枯草芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌发酵海带，皆能显著提高刺参消化道中淀粉酶活性，有利于刺参对海藻等饵料的消化吸收（ $P < 0.05$ ），不过，后者的影响显著高于前者，而且，它们对刺参消化道淀粉酶活性的影响几乎不存在时间的相关性。



说明：不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。
Note: Different letters indicate statistically significant differences($P < 0.05$).

图 4 枯草芽孢杆菌发酵海带对刺参免疫活性的影响



说明：不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。
Note: Different letters indicate statistically significant differences($P < 0.05$).

图 5 枯草芽孢杆菌发酵海带对刺参消化酶活性的影响

Fig.4 The influence of feeding fermented seaweed on immunoactivity of the sea cucumber

Fig.5 The influence of feeding fermented seaweed on the digestive enzyme activity of the sea cucumber

2.5.3 纤维素酶活性

实验结果 (见图 5c) 表明, 投饲枯草芽孢杆菌发酵海带或直接在饲料中添加该发酵微生物对刺参消化道内纤维素酶活性有一定影响, 但差异并不显著 ($P > 0.05$)。可见, 枯草芽孢杆菌对刺参食物中纤维素的消化降解能力有限。

2.6 枯草芽孢杆菌发酵海带对刺参肠道菌群的影响

实验结果 (见表 5) 发现: K-0 组中刺参肠道细菌总数维持在 $3.23 \times 10^6 \sim 3.36 \times 10^6$ CFU \cdot g⁻¹ 之间, 弧菌比例为 36.25% ~ 37.21%, 芽孢杆菌比例为 8.82% ~ 9.26%, 三者均无显著变化 ($P > 0.05$); K-I 和 K-II 组中刺参肠道中细菌总数和弧菌比例随着养殖时间先减少后趋于稳定, 而芽孢杆菌比例则先升高后趋于稳定。K-II 组细菌总数和弧菌比例最少, 显著低于 K-I 和 K-0 组 ($P < 0.05$), 且 K-I 组显著低于 K-0 组 ($P < 0.05$); 芽孢杆菌比例则 K-II 组最高, 显著高于 K-I 和 K-0 组 ($P < 0.05$), 而 K-I 组又显著高于 K-0 组 ($P < 0.05$), 实验开始后第 18 天起 K-I、K-II 组刺参肠道细菌总数、弧菌相对数量和芽孢杆菌相对数量无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 5 枯草芽孢杆菌发酵海带对刺参肠道菌群的影响

Tab.5 The influence of feeding fermented seaweed on the intestinal microflora of sea cucumber

实验时间 <i>t</i> /d	组别 Groups	异养菌总数 Total heterotrophic bacteria /10 ⁶ CFU \cdot g ⁻¹	在肠道菌群中的比例 Proportion of intestinal flora/%	
			弧菌 <i>Vibrio</i>	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>
0	K-0	3.23 \pm 0.16 ^a	36.68 \pm 1.36 ^a	8.92 \pm 0.16 ^a
	K-0	3.30 \pm 0.13 ^a	37.21 \pm 1.10 ^a	8.82 \pm 0.09 ^a
	K-I	3.04 \pm 0.09 ^b	30.12 \pm 0.96 ^b	10.36 \pm 0.06 ^b
	K-II	2.91 \pm 0.15 ^c	27.32 \pm 1.34 ^c	14.23 \pm 0.10 ^c
18	K-0	3.36 \pm 0.08 ^a	36.52 \pm 1.18 ^a	9.26 \pm 0.11 ^a
	K-I	3.10 \pm 0.05 ^b	28.86 \pm 1.34 ^b	11.23 \pm 0.16 ^b
	K-II	2.86 \pm 0.07 ^c	26.82 \pm 0.86 ^c	15.10 \pm 0.08 ^c
	K-II			

说明: 同一列数据右上角不同字母代表组间有显著差异 ($P < 0.05$)。
Note: Values in the same column without a common superscript are significantly different ($P < 0.05$).

3 讨论

海带是人工养殖刺参最重要的饲料来源之一, 利用枯草芽孢杆菌发酵海带进行刺参饲养实验可直接为刺参养殖生产提供有益指导, 意义重大。微生物发酵饲料能够提高饲料中的蛋白含量, 降解有机大分子和难以被消化利用的物质, 并且在饲料发酵过程中, 发酵微生物会产生大量消化酶、小肽、B 族维生素以及促生长因子等物质^[14-15]。本文结果与其他学者^[16]的实验结果相似: 利用枯草芽孢杆菌发酵海带也能够提高海带发酵产物的粗蛋白含量, 其变化受发酵温度、时长和微生物接种剂量等因素影响, 最佳发酵条件是——枯草芽孢杆菌接种剂量 12%、发酵时间 96 h、发酵温度 30 ℃。然而, 受限于实验设计, 发酵微生物接种剂量的单因子实验结果并不足以支持 14% 的枯草芽孢杆菌接种量是最佳剂量的观点, 实验中也尚未对海带发酵产物中其他营养成分的变化进行检测与分析, 这些有待进一步研究。

单因子实验中, 在发酵温度为 30 ℃, 接种剂量为 10% 的条件下, 48 h 海带中粗蛋白含量达到最高值, 随后急剧下降。出现这种现象的可能原因是, 48 h 内枯草芽孢杆菌利用海带中的蛋白质和糖类营养物质快速繁殖而产生大量菌体蛋白质, 其后达到极限, 并随着海带中的蛋白质等营养物质被利用和消耗而导致海带发酵产物中粗蛋白含量急剧下降。

枯草芽孢杆菌是多年来广泛使用的益生菌, 能在水产动物的肠道繁殖并产生维生素、氨基酸、有机酸、促生长因子等多种营养物质, 进而促进水产养殖动物生长^[5]。据报道, 枯草芽孢杆菌能提高大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[17]、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[18]、异育银鲫 (*Silver prussian*

carp)^[19]等养殖动物的存活率和增重率。本研究无论是利用枯草芽孢杆菌发酵海带饲养刺参,还是在刺参饲料中添加枯草芽孢杆菌制剂,皆可显著提高其特定生长率(见表4),也有益于提升其养殖存活率。虽然养殖对象有差异,但实验结果是一致的。显然,这与枯草芽孢杆菌能够在刺参消化道定植并抑制弧菌等病原微生物繁殖,提升机体免疫相关因子活性,分泌产生多种消化酶和促生长因子,提升饲料中蛋白质等营养成分的含量等有益作用直接相关。从本实验结果看,利用枯草芽孢杆菌发酵饲料饲养刺参效果显著好于直接在饲料中添加枯草芽孢杆菌制剂的做法,这可能与利用枯草芽孢杆菌发酵海带能提升饲料中蛋白质等营养成分的含量和益生菌的数量与活性有关,或许还与枯草芽孢杆菌降解海带中的抗营养成分有关,但有待深入探讨。与空白对照组相比较,在实验开始后12 d内投饲发酵海带和饲料中添加枯草芽孢杆菌,其特定生长率几乎没有优势,其后逐渐出现差异性变化,并在36 d后产生显著差异,这说明发酵海带对刺参的有益影响需要12 d以上的时间累积,二者呈正相关关系。

无脊椎动物缺乏特异性免疫,其免疫防御主要依赖非特异性免疫因子发挥作用^[20],刺参也不例外。刺参体腔液溶菌酶活性的提高往往是体腔液细胞和体液免疫因子综合作用的结果^[21]。超氧化物歧化酶(SOD)是一种抗氧化酶,可歧化超氧阴离子自由基产生 H_2O_2 和 O_2 ^[22];酸性磷酸酶(ACP)在刺参的免疫系统中起着调理素的作用,它可以诱导刺参体腔液中阿米巴细胞吞噬外来的物质^[23]。投饲发酵海带或直接在饲料中添加枯草芽孢杆菌的做法,虽然未能对刺参体腔液的细胞数量产生影响,但是,能够显著提升其溶菌酶、超氧化物歧化酶和酸性磷酸酶的活性,恰恰反映出刺参体腔液中血淋巴细胞吞噬活动诱发的呼吸爆发剧增,颗粒细胞脱颗粒现象加剧,当然,这还需要进一步实验验证。刺参接受枯草芽孢杆菌刺激之后,其体腔液溶菌酶活性、总超氧化物歧化酶和酸性磷酸酶活性均出现先升高后又逐渐降低的趋势,这可能是刺参具有以体内储存性物质消耗为特征的应激适应机制,机体通过自身调节以适应胁迫的结果^[24]。

动物对饲料的消化主要依靠消化酶的分解作用,消化酶活性的高低影响着动物对饲料的消化利用率^[25]。沈斌乾等^[26]、管越强等^[27]研究发现饲料中添加枯草芽孢杆菌能显著提高水产动物的消化酶活性。饲料中添加枯草芽孢杆菌或以枯草芽孢杆菌发酵海带投喂刺参皆能提高刺参消化道蛋白酶和淀粉酶活性,但对刺参消化道纤维素酶活性无显著影响,这可能是由枯草芽孢杆菌自身生物学特性决定的,抑或是海带等饲料特性使然,有待进一步揭示,也引发出多菌种协同发酵思考,留待后续研讨。

刺参肠道优势细菌主要为芽孢杆菌、弧菌和假单胞菌^[13]。健康刺参肠道中灿烂弧菌与芽孢杆菌处于一种平衡状态,当这个菌群平衡受到破坏时弧菌迅速繁殖从而引发疾病^[28]。胡毅等^[29]研究发现,饲料中添加芽孢杆菌显著降低了凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肠道和粪便中的弧菌。本研究也发现,投饲枯草芽孢杆菌发酵海带或在饲料中直接添加枯草芽孢杆菌皆能使刺参肠道细菌总数和弧菌比例显著降低、芽孢杆菌比例显著上升。消化道内枯草芽孢杆菌除了作为免疫激活剂,活化养殖动物机体的免疫系统,增强机体免疫机能之外,或许发挥如下作用:在代谢过程中能产生乙酸等挥发性脂肪酸,进而降低肠道pH值,抑制病原菌生长^[5];产生抗菌物质,抑制真菌、细菌、病毒和菌原体的生长^[30]。

4 结论

枯草芽孢杆菌是一种广泛使用、安全有效的益生菌,具有分泌消化酶、产生抑菌物质、调节动物消化道菌群结构、提高水产动物免疫力、促进水产动物生长等特点和功能。利用枯草芽孢杆菌发酵海带,可以显著提高海带发酵产物中的粗蛋白含量。投饲发酵海带或直接在饲料中添加枯草芽孢杆菌制剂皆能改善消化道菌群结构,提高消化酶活性,增强机体免疫机能,进而促进刺参的生存与生长。

[参考文献]

- [1] 苏来金,周朝生,胡利华,等. 南方刺参产业发展现状及可持续发展的思考. 水产科技情报, 2014, 41(2): 57-60.
- [2] 于东祥,孙慧玲,陈四清,等. 海参健康养殖技术. 北京:海洋出版社, 2010.

- [3] 隋锡林. 海参增养殖. 北京: 农业出版社, 1990.
- [4] 姜燕, 王印庚, 薛太山, 等. 刺参池塘养殖系统中发酵饲料的制作与投喂. 渔业科学进展, 2012, 33(1): 66-71.
- [5] 付天玺, 魏开建, 许国焕. 芽孢杆菌在水产养殖中的研究和应用概况. 水利渔业, 2007, 27(3): 102-104.
- [6] SIRIRAT R, SOMBAT R, SOMKIAT P, et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture, 2000, 191(4): 271-288.
- [7] 张庆, 李卓佳. 复合微生物对养殖水体生态因子的影响. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 43-47.
- [8] WANG T, SUN Y X, JIN L J, et al. Enhancement of non-specific immune response in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) by *Astragalus membranaceus* and its polysaccharides. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27: 757-762.
- [9] 白燕, 王维新. 刺参肠道蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶与纤维素酶活性的测定方法. 饲料工业, 2012, 33(20): 28-32.
- [10] 蔡雪峰, 罗琳, 战文斌, 等. 壳寡糖对虹鳟幼鱼肠道菌群影响的研究. 中国海洋大学学报, 2006, 36(4): 606-610.
- [11] 王印庚, 廖梅杰, 郝志凯, 等. 刺参体腔液穿刺抽取后细胞恢复过程的初步研究. 渔业科学进展, 2010, 31(5): 52-58.
- [12] ZHOU X Q, NIU C J, SUN R Y. The effects of vitamin E on antiacid stress ability in juvenile softshelled turtles (*Pelodiscus sinensis*). Comp Biochem Physiol C, 2004, 137(4): 299-305.
- [13] 李彬, 荣小军, 廖梅杰, 等. 冬季刺参养殖环境与肠道内细菌菌群的研究. 海洋科学, 2010, 34(4): 64-69.
- [14] 贾朋辉. 发酵饲料用乳酸菌培养条件及保存工艺的研究. 无锡: 江南大学, 2009.
- [15] 张超范, 寇玉红, 魏萍. 复合微生态制剂对肉仔鸡免疫功能的影响. 动物医学进展, 2004, 25(4): 101-103.
- [16] 朱军平. 多菌种固态生态料仿生发酵豆粕的研究. 合肥: 安徽农业大学, 2011.
- [17] RINGØ E, GATESOUE F J. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture, 1998, 160(3/4): 177-203.
- [18] RENGPIPAT S, PHIANPHAK W, PIYATIRATITIVORAKUL S. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture, 1998, 167(3/4): 301-313.
- [19] 华雪铭, 周洪琪, 刘小刚, 等. 饲料中添加芽孢杆菌和硒酵母对异育银鲫的生长及抗病力的影响. 水产学报, 2001, 25(5): 448-453.
- [20] ELISEIKINA M G, MAGARLAMOV T Y. Coelomocyte morphology in the Holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae). Marine Biology, 2002, 28(3): 197-202.
- [21] GU M, MA H, MAI K, et al. Immune response of sea cucumber *Apostichopus japonicus* coelomocytes to several immunostimulants *in vitro*. Aquaculture, 2010, 306(1/2/3/4): 49-56.
- [22] NICHOLS T L, WHITEHOUSE C A, AUSTIN F E. Transcriptional analysis of a superoxide dismutase gene of *Borrelia burgdorferi*. FEMS microbiology letters, 2000, 183(1): 37-42.
- [23] 张琴, 麦康森, 张文兵, 等. 饲料中添加硒酵母和维生素 E 对刺参生长、免疫力及抗病力的影响. 动物营养学报, 2011(10): 1745-1755.
- [24] 宫魁, 王宝杰, 刘梅, 等. 乳酸菌及其代谢产物对刺参幼体肠道菌群和非特异性免疫的影响. 海洋科学, 2013, 37(7): 7-12.
- [25] 姜燕. 刺参 (*Apostichopus japonicus*) 发酵饲料的制作工艺与应用效果研究. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- [26] 沈斌乾, 陈建明, 郭建林, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对青鱼生长消化酶活性和鱼体组成的影响. 水生生物学报, 2013, 37(1): 48-53.
- [27] 管越强, 周环, 张磊, 等. 枯草芽孢杆菌对中华鳖生长性能消化酶活性和血液生化指标的影响. 动物营养学报, 2010, 22(1): 235-240.
- [28] 李彬, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参肠道与养殖池塘环境中异养细菌和弧菌数量周年变化. 海洋科学, 2012, 36(4): 63-67.
- [29] 胡毅, 谭北平, 麦康森, 等. 饲料中益生菌对凡纳滨对虾生长、肠道菌群及部分免疫指标的影响. 中国水产科学, 2008, 15(2): 244-251.
- [30] TAMEHIRO N, OKAMOTO Y, OKAMOTO S, et al. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(2): 315-320.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 马 英)