

[文章编号] 1007-7405(2017)02-0001-10

饲料中添加微生物制剂对仿刺参生长与免疫的影响

田 良^{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] 从仿刺参消化道微生物中分离、培育产酶益生菌, 解淀粉芽孢杆菌 X3-3、甲基营养型芽孢杆菌 X4-1 和巨大芽孢杆菌 X4-5, 并制成 1.0×10^9 cfu/mL 菌悬液, 按 1% (质量比) 剂量浸泡饲料进行仿刺参饲养实验, 并检测分析仿刺参的特定生长率和消化酶活性以及免疫相关因子, 以探讨微生物制剂的使用效果。实验结果表明: 解淀粉芽孢杆菌 X3-3 无论是单独使用还是与巨大芽孢杆菌 X4-5 或/和甲基营养型芽孢杆菌 X4-1 联合使用皆能显著 ($P < 0.05$) 提升仿刺参的 SGR 和消化酶活性, 但饲养 30 d 和 60 d 的检测结果差异不明显 ($P > 0.05$); 3 株菌制剂的联合使用在显著提升仿刺参体腔液 AKP、ACP、SOD、LSZ 和 POD 等体液免疫相关因子活性水平方面的效果优于任意两株菌的搭配使用 ($P < 0.05$), 而任意 2 株菌搭配使用的效果则优于除解淀粉芽孢杆菌 X3-3 之外的单一菌制剂 ($P < 0.05$)。综合分析表明, 3 株菌联合使用的复合菌制剂使用效果最好, 它能显著提升仿刺参特定生长率、消化酶活性和免疫相关因子水平, 具有较好的开发应用价值。

[关键词] 仿刺参; 微生物制剂; 特定生长率; 先天性免疫因子

[中图分类号] S 963.7

Effects of Dietary Probiotics on the Growth and Innate Immunity of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*

TIAN Liang^{1,2}, CHEN Zhengqiang^{1,2}

(1. Fisherise 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 effects of dietary probiotics *Bacillus amyloliquefaciens* X3-3, *Bacillus methylotrophicus* X4-1 and *Bacillus megaterium* X4-5 on the growth and innate immunities of sea cucumber *Apostichopus japonicus* were investigated. The probiotic bacteria were suspended to a density of 1.0×10^9 cfu/mL and the microbial preparation was added in the diets with a dose of 1% (*m/m*) for a cultural period of 60 days. The specific growth rates (SGR) and activities of digestive enzymes in digestive tract and non-specific immune effectors in coelomic fluid of the echinoderm subjects were detected and analysed. Results showed that digestive enzymes activities and the specific growth rate (SGR) values of the sea cucumber increased obviously ($P < 0.05$) no matter *Bacillus amyloliquefaciens* X3-3 was added alone or combined with strains *Bacillus megaterium* X4-5 and/or *Bacillus methylotrophicus* X4-1. However, the results were not significantly different ($P > 0.05$) on 30 d and 60 d. Compared with the combination of any two trains, the combination of

[收稿日期] 2015-04-18

[修回日期] 2015-06-08

[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] 田良 (1990—), 女, 硕士生, 从事海洋水产生物免疫学方向研究。通信作者: 陈政强 (1967—), 男, 副教授, 从事海洋水产生物增殖及免疫学方向研究。

three above strains used in the diets had significantly ($P < 0.05$) improved the levels of AKP, ACP, SOD, LSZ and POD involved in sea cucumber humoral immune effectors, and the combination of any two strains was better than the single preparation of either *Bacillus methylotrophicus* X4 - 1 or *Bacillus megaterium* X4 - 5. Comprehensive analysis indicated that the combination of above three strains used as feed supplement for sea cucumber could significantly increase the values of SGR, digestive enzymes activities and immune related factors of sea cucumbers, and would have potential application values.

Keywords: *Apostichopus japonicus*; probiotics; specific growth rate; innate immunity factor

0 引言

迄今为止,人们已从仿刺参 (*Apostichopus japonica*) 体内和表层分离出 300 多株细菌和 50 多株真菌^[1],这些微生物中包括益生菌、条件致病菌和致病菌三大类群^[2],它们通过相互作用构成了仿刺参特有的微生态环境,消化道中存在的益生菌既能促进食物在细胞外的消化作用从而增加饲料转化率,又是其食物组成中重要的能量来源。

Balcazar^[3]的研究指出,益生菌在肠道粘附过程中繁殖速度大于凋亡速度,能够在水产动物体内定植,并与宿主、环境之间形成动态平衡,有利于宿主的健康生长。益生菌的积极作用大致包含如下几个方面:通过生物学代谢功能产生有机酸和细菌素等参与机体生物防御,改善机体的信号通路,增强机体的免疫力;在一定范围内通过占位效应成为优势菌,抑制致病菌过度生长成为优势菌群,有效控制肠道内部的微生态平衡,即调节肠道菌群平衡;自身作为营养物质为宿主提供养分,改善动物机体的免疫机能;增加消化酶的活性,提高饲料利用率和消化率^[4-6]。

在传统的水产养殖过程中,出于病害防控的需要,滥用抗生素早已是普遍现象,而抗生素和一些以合成激素类为代表的化学添加剂的不当使用带来了诸多有害影响^[7]。抗生素的频繁使用不仅导致病原微生物的抗药性增加,消化道内益生菌的生长繁殖受到抑制,消化道内原来的微生物群之间的平衡遭受破坏,而且,水产动物自身的免疫力由此而削弱,水产动物肌肉组织中由此而出现大量化学物质积累^[8-10]。当前,通过施用益生菌制剂对养殖水体环境和水产养殖动物消化道内的微生物群体进行干预,进而增进水产养殖动物健康、改善水产养殖动物的养殖性状,这些已是水产生物健康养殖中广泛采用的重要举措,与此同时各类高效益生菌制剂也不断地被开发使用。

近几年,对于解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的研究表明部分胞外产物中的活性物质与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的近似^[11-12]。有研究^[13]发现解淀粉芽孢杆菌 FPTB16 最适添加量为 10^9 cfu/g,可以有效降低卡特拉鲈 (*Catle catle*) 发病率和死亡率,对于改善卡特拉鲈健康状况和提高其对疾病的抵抗力起到最佳作用。当解淀粉芽孢杆菌与其他芽孢杆菌以 1:1 (质量比) 比例混合饲喂草鱼时,可显著提高草鱼肠道芽孢杆菌数量,降低弧菌等致病菌比例,提高成活率,并增强消化酶活性、促进草鱼生长等^[14-15]。吕倩等^[16]首次从海洋中分离到 *Bacillus methylotrophicus* SHB114,从其活性物质中分离得到 3 个具有抑制病原真菌的脂肽类化合物。为防治真菌病害提供了理论基础。而巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 作为益生菌调节水体中磷平衡的同时,还可以降低氮含量^[17]解决水体污染,因此可以作为水质净化和养殖池池底改良的益生菌之一。本文探讨从仿刺参消化道中分离筛选的有益微生物作为饲料添加剂在仿刺参养殖中的使用效果,目的是为用于新型仿刺参饲料的微生物制剂的开发利用奠定基础,为其推广应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用仿刺参选购自青岛润海水产品养殖有限公司,实验开始前暂养 14 d 以恢复体能、适应环境。仿刺参饲养容器为 400 L 的玻璃钢水槽,海水盐度 26.3, pH (8.23 ± 1.47),海水温度 ($16 \pm$

1.0)℃。

实验仪器有 759 s 型紫外分光光度计 (上海精科仪器有限公司)、BioTek Synergy 多功能酶标仪、XMTD-8222 烘箱 (上海精宏实验设备有限公司) 等。采用试剂盒 (南京建成科技有限公司) 方法测定仿刺参的蛋白含量和各非特异性免疫指标。

仿刺参专用配合饲料来自大连升泰水产饲料有限公司, 主要成分为: 鼠尾藻、马尾藻、酵母、豆粕、蒸汽鱼粉、包膜复合多维等, 其营养组成见表 1。

表 1 配合饲料营养成分
Tab. 1 The nutrients of the compound feed

							%
w(水分 Water)	w(粗蛋白 Crude protein)	w(粗脂肪 Crude fat)	w(粗纤维 Crude fiber)	w(钙 Calcium)	w(总磷 Total phosphorus)	w(灰分 Ash content)	w(赖氨酸 Lysine)
≤10.0	≥18.0	2.0~5.0	≤15.0	≤5.0	≥0.6	≤45.0	≥1.5

1.2 微生物制剂

实验所用微生物——解淀粉芽孢杆菌 X3-3、甲基营养型芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*) X4-1 和巨大芽孢杆菌 X4-5 皆从生长旺盛、活泼健壮的另一仿刺参个体的消化道微生物中筛选而得, 混合共同培养, 未见相互之间存在拮抗效应。前期实验表明, 3 株芽孢杆菌均无致病性, 其中, 解淀粉芽孢杆菌 X3-3 和甲基营养型芽孢杆菌 X4-1 还能够分泌胞外淀粉酶和蛋白酶, 巨大芽孢杆菌 X4-5 能够有效降解水体中氨氮和亚硝酸盐氮, 并转化为无毒物质。用作饲料添加剂之前, 将各菌株接种于培养基, 然后挑取菌落发育良好的菌株, 用灭菌海水重悬, 菌悬液分别调整至 10⁹cfu/mL, 4℃ 储存。

1.3 实验设置

从上述仿刺参暂养群体中挑取对外界刺激反应灵敏, 体表无损伤、无粘液, 规格大小相对均匀 (平均体重 (9.0±0.5) g) 的健康 1 龄幼参个体用于实验观测, 实验周期为 60 d。

设置如下 8 个实验观测组, 分别标记为实验组 I、实验组 II、实验组 III、实验组 IV、实验组 V、实验组 VI、实验组 VII 和实验组 VIII (对照组), 每个实验观测组设 3 个平行饲养单元, 每个饲养单元有 1 个 50 L 循环水饲养槽 (大连汇新海洋科技有限公司), 内置 2 块塑料波纹瓦作为仿刺参附着基, 放养仿刺参 50 只, 以仿刺参专用配合饲料为基础饲料, 并按照如下方案添加微生物制剂, 实施饲养管理:

- 1) 实验组 I, 在基础饲料中添加 1% (质量比) 的解淀粉芽孢杆菌 X3-3 菌制剂;
- 2) 实验组 II, 在基础饲料中添加 1% (质量比) 的甲基营养型芽孢杆菌 X4-1 菌制剂;
- 3) 实验组 III, 在基础饲料中添加 1% (质量比) 的巨大芽孢杆菌 X4-5 菌制剂;
- 4) 实验组 IV, 在基础饲料中添加 1% (质量比) 的解淀粉芽孢杆菌 X3-3 与甲基营养型芽孢杆菌 X4-1 复合菌制剂 (等比配制);
- 5) 实验组 V, 在基础饲料中添加 1% (质量比) 的解淀粉芽孢杆菌 X3-3 与巨大芽孢杆菌 X4-5 复合菌制剂 (等比配制);
- 6) 实验组 VI, 在基础饲料中添加 1% (质量比) 的巨大芽孢杆菌 X4-5 与甲基营养型芽孢杆菌 X4-1 复合菌制剂 (等比配制);
- 7) 实验组 VII, 在基础饲料中添加 1% (质量比) 的解淀粉芽孢杆菌 X3-3 与甲基营养型芽孢杆菌 X4-1 及巨大芽孢杆菌 X4-5 复合菌制剂 (等比配制);
- 8) 实验组 VIII (对照组), 不添加微生物制剂, 只投饲基础饲料。

1.4 饲养管理

仿刺参饲养水槽内壁及附着基经 0.005 mol/L 高锰酸钾溶液浸泡消毒并清洗后注入新鲜海水, 投

入实验仿刺参, 控制水温为 $(16 \pm 1.5) ^\circ\text{C}$ 。各实验组的仿刺参饲料均拌以海泥, 并注入适量新鲜海水, 搅匀后静置浸泡 30 min, 然后将混合浆液泼洒进仿刺参饲养水槽中。

每日傍晚投喂饲料 1 次, 并根据饲养水槽中的残饵情况, 调整饲料投喂量; 每日清晨各饲养水槽换水 50%, 每隔 2 d 彻底清洗养殖槽 1 次 (包括附着基在内); 遮光并保持不间断通气以增氧。每日观察各饲养水槽内仿刺参的存活、活动、摄食及排粪情况, 并作详细记录。

1.5 仿刺参生长及其消化酶活性测定

依次在实验性饲养 30 d 和饲养 60 d 后取样测定仿刺参特定生长率, 又依次在实验性饲养 30 d (标注为 30 d) 和饲养 60 d (标注为 60 d) 以及饲养 60 d + 停食 3 d (标注为 60 d + 3 d) 取样测定仿刺参消化酶活性、机体非特异性免疫因子活性等指标。每次测定时各组随机取样 15 只, 即每个饲养单元随机取样 5 只。

1.5.1 仿刺参特定生长率

特定生长率 (specific growth rate, SGR) 指生长率与生长天数的比值, 是衡量动物生长状况的一个常用指标, SGR 值越大, 动物体重日增长率越高。

$$\text{仿刺参特定生长率}(\%) = 100\% \times (\ln W_t - \ln W_0)/t$$

其中: W_t —仿刺参阶段性养殖的终末体重 (g); W_0 —仿刺参阶段性养殖的初始体重 (g); t —仿刺参阶段性养殖的时间长度 (d)。

1.5.2 仿刺参消化道消化酶活性测定

从仿刺参躯体前端背部剖开, 取出消化道, 去除粘连的呼吸树和消化道内容物, 然后将取自同一饲养单元的 5 只仿刺参消化道组织混合在一起, 取样制备仿刺参消化酶检测样。重复取样 3 次。每次取样时称取 1 g 仿刺参消化道组织, 注入 2 mL 的灭菌生理盐水, 冰浴条件下匀浆处理, 匀浆液再经 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液并保存于 $-80 ^\circ\text{C}$ 冰箱中, 待用。

采用 3、5-二硝基水杨酸法测定仿刺参消化道淀粉酶活性, 单位用 U/g 表示, 界定 1 g 仿刺参消化道组织中的淀粉酶在单位时间内因水解淀粉底物而使 OD 值升高 0.001 为 1 个淀粉酶活性单位。

用福林酚法测定蛋白酶活性, 单位用 U/g 表示, 界定 1 g 仿刺参消化道组织中的蛋白酶在单位时间内因水解酪蛋白而使 OD 值升高 0.001 为 1 个蛋白酶活性单位。

1.6 仿刺参非特异性免疫因子活性测定

从仿刺参躯体前端背部剖开, 吸取体腔液。将取自同一饲养单元的 5 只仿刺参体腔液混合在一起, 重复取样 3 次, 每次取样皆与等体积的抗凝剂混合, 然后冰浴, 超声破碎, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, $-80 ^\circ\text{C}$ 保存。

选用南京建设生物试剂盒进行仿刺参体腔液免疫相关因子和检测样蛋白含量测定, 具体测定方法参照产品说明书。

将酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ACP) 活性定义为每克基质蛋白在 $25 ^\circ\text{C}$ 与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位 (U), 用 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示。

将碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 活性定义为每克基质蛋白在 $25 ^\circ\text{C}$ 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位 (U), 用 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示。

将溶菌酶 (lysozyme, LSZ) 活性定义为每毫升反应液 $25 ^\circ\text{C}$ 反应 1 min OD_{570} 降低 0.001 为 1 个酶活力单位 (U), 换算为比活力单位, 用 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示。

将超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性定义为, 在 $25 ^\circ\text{C}$ 条件下该反应体系中每克基质蛋白的 SOD 抑制率达到 50% 时所对应的酶量为 1 个 SOD 活力单位 (U), 用 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 表示。

将过氧化物酶 (peroxidase, POD) 活性定义为在 $25 ^\circ\text{C}$ 条件下每毫克基质蛋白每分钟催化 $1 \mu\text{g}$ 底物的酶量为 1 个酶活力单位 (U), 用 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 表示。

体腔液检测样蛋白含量测定采用双缩脲法。

1.7 数据统计分析

采用 SPSS19.0 统计软件对实验数据进行处理并作单因素方差分析, 显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 仿刺参特定生长率

与对照组相比较, 饲料中添加微生物制剂能够显著提高仿刺参的特定生长率 ($P < 0.05$), 并起到增加仿刺参体重效果的作用, 其中, 添加复合菌制剂的实验组效果较明显, 尤其是第Ⅶ组三菌合一复合菌制剂的使用效果最好, 用其饲养 60 d 后仿刺参平均体重达到 (36.71 ± 0.55) g。但是, 各组菌制剂对仿刺参特定生长率的影响似乎不存在时间的累积效应, 投喂 30 d 和 60 d 后的仿刺参特定生长率差异并不显著 (详见表 2)。

表 2 饲料中添加微生物制剂对仿刺参生长和存活率的影响(平均值 ± 标准误)
Tab.2 Effects of dietaryprobiotics on the growth and the survival rate of *A. japonicus*(Means ± SE)

实验组 Test group	特定生长率/(% · d ⁻¹) Specific growth rate,SGR		平均体重/g Mean body weight		存活率/% Survival rate	
	0 ~ 30 d	30 ~ 60 d	30 d	60 d	0 ~ 30 d	30 ~ 60 d
I	2.12 ± 0.21 ^b	2.09 ± 0.17 ^b	16.88 ± 0.22	31.59 ± 0.48	100 ± 0	100 ± 0
II	2.04 ± 0.12 ^{ab}	2.09 ± 0.03 ^{ab}	16.64 ± 0.13	31.09 ± 0.42	100 ± 0	100 ± 0
III	1.90 ± 0.06 ^a	1.93 ± 0.13 ^a	15.96 ± 0.08	28.47 ± 0.62	100 ± 0	100 ± 0
IV	2.27 ± 0.05 ^{bc}	2.21 ± 0.16 ^{bc}	17.83 ± 0.34	34.57 ± 0.21	100 ± 0	100 ± 0
V	2.15 ± 0.12 ^b	2.19 ± 0.08 ^b	17.13 ± 0.17	33.02 ± 0.72	100 ± 0	100 ± 0
VI	2.13 ± 0.06 ^b	2.14 ± 0.11 ^b	17.10 ± 0.29	32.43 ± 0.42	100 ± 0	100 ± 0
VII	2.38 ± 0.08 ^c	2.31 ± 0.05 ^c	18.43 ± 0.31	36.71 ± 0.55	100 ± 0	100 ± 0
VIII	1.85 ± 0.09 ^a	1.89 ± 0.14 ^a	15.64 ± 0.19	27.30 ± 0.27	100 ± 0	100 ± 0

说明: 30 d 为仿刺参在实验开始后 30 d 的采样检测结果, 60 d 为实验开始后 60 d 的采样检测结果。同列数据之间标注字母不同的代表差异显著 ($P < 0.05$)。

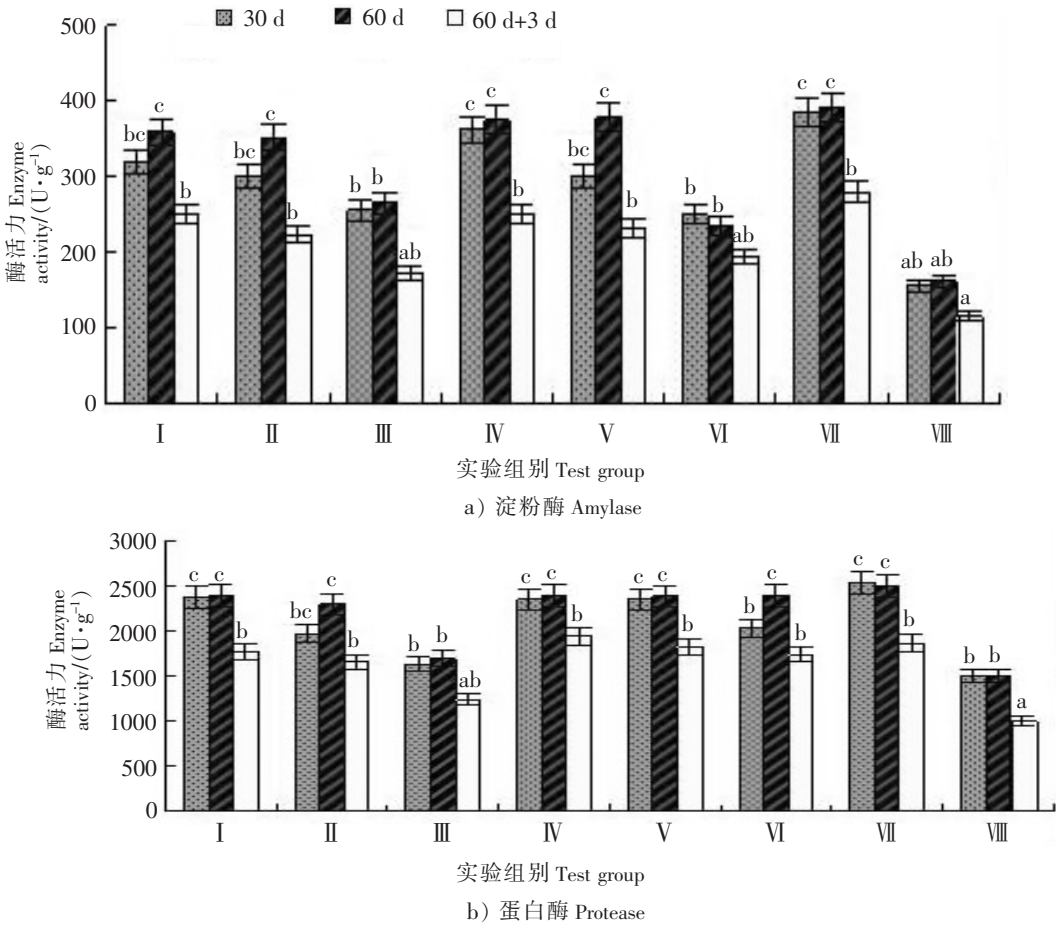
Notes: 30 d and 60 d refer to the SGR and survival rate and body weight detection outcomes of the experimental sea cucumber *A. japonicus* accomplished a rearing period of 30 days and 60 days respectively, while the different letters a and b and c labeled at top right corner of the numerical values indicates obviously discrepancy in values ($P < 0.05$) .

2.2 仿刺参消化酶活性

仿刺参消化酶活性检测结果由图 1 所示。从图 1a 中可见, 与空白对照组的实验结果相比较, 饲养 30 d 后, 饲料中添加芽孢杆菌制剂的实验组仿刺参消化道淀粉酶活性均有不同程度的提高, 其中, 实验组Ⅳ和实验组Ⅶ中仿刺参消化道淀粉酶活性显著提高 ($P < 0.05$); 饲养 60 d 后, 除了饲料中添加 1% 巨大芽孢杆菌 X4-5 菌制剂的实验组Ⅲ之外, 其余各实验观测组 (含对照组) 仿刺参消化道内淀粉酶活力都比较高 ($P < 0.05$); 饲养 60 d 后停食 3 d 接着进行淀粉酶活性检测, 各组仿刺参消化道淀粉酶活性皆有所下降, 并且实验组Ⅲ和实验组Ⅵ仿刺参淀粉酶活性已然与对照组差异性不明显 ($P > 0.05$)。

如图 1b 所示, 饲养 30 d 后, 除了实验组Ⅱ、实验组Ⅲ和实验组Ⅵ之外, 与对照组相比, 其余各实验组仿刺参消化道内蛋白酶活性皆获得显著提高 ($P < 0.05$); 饲养 60 d 后, 仅饲料中添加 1% 巨大芽孢杆菌 X4-5 制剂的实验组Ⅲ仿刺参消化道内蛋白酶活力与对照组差异不显著 ($P > 0.05$), 紧随其后停食 3 d, 趋势依旧, 只是所有仿刺参蛋白酶活性皆有所下降。

综上所述，饲料中添加解淀粉芽孢杆菌 X3 - 3 菌制剂、解淀粉芽孢杆菌 X3 - 3 和甲基营养型芽孢杆菌 X4 - 1 复合菌制剂、解淀粉芽孢杆菌 X3 - 3 和巨大芽孢杆菌 X4 - 5 及甲基营养型芽孢杆菌 X4 - 1 三菌合一复合菌制剂，既能够显著提升仿刺参的特定生长率，又能够显著提高仿刺参消化道消化酶活性水平。



注:30 d 为仿刺参在实验开始后 30 d 的采样检测结果,60 d 为实验开始后 60 d 的采样检测结果,60 d+3 d 为饲养 60 d 后停食 3 d 的采样结果;误差线标注字母不同的代表差异显著($P<0.05$)。

Notes: 30 d and 60 d refer to the digestive enzymes activities of the experimental sea cucumber *A. japonicus* accomplished a rearing period of 30 days and 60 days respectively, while that of “60 d+3 d”points to detection values of the animal subjects without feeding 3 days followed a rearing period of 60 days. The different letters a and b and c labeled at of the error bars indicates obviously discrepancy in values ($P<0.05$).

图 1 饲料中添加微生物制剂对仿刺参消化道蛋白酶活性的影响
Fig.1 Effects of dietary probiotics on the digestive enzyme activities of *A. japonicus*

2.3 仿刺参免疫相关酶活性

饲料中添加微生物制剂对仿刺参体腔液免疫相关因子的影响如图 2 所示。从图 2a 可以看出，饲料中添加不同的微生物制剂，对仿刺参体腔液中 ACP 产生的影响各不相同。与对照组相比较，除了添加巨大芽孢杆菌 X4 - 5 单一菌制剂的实验组Ⅲ，其仿刺参体腔液 ACP 活性差异不显著 ($P > 0.05$) 之外，其余各实验组中仿刺参 ACP 活性水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

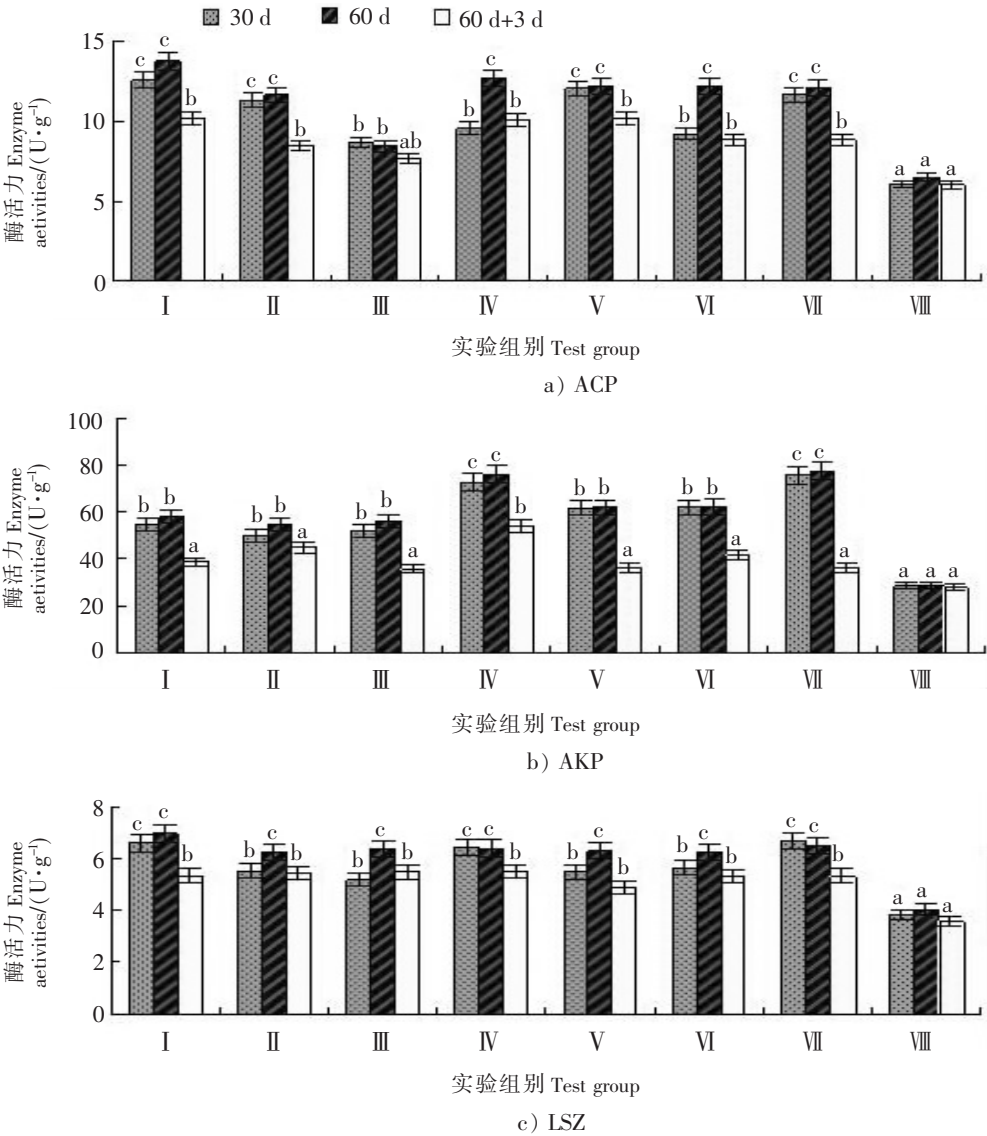
从图 2b 则能够看到，饲料中添加单一菌株微生物制剂的各实验组，其仿刺参体腔液中 AKP 活性与对照组相比出现显著变化 ($P < 0.05$)；2 种以上菌制剂复合使用的实验组Ⅳ，其仿刺参体腔液 AKP 活性水平则显著高于 ($P < 0.05$) 使用单一菌制剂的实验组Ⅰ和实验组Ⅱ；3 种菌制剂复合使用的实验组Ⅶ，其仿刺参 AKP 活性更高。停食处理 3 d 后，各实验观测组中仿刺参 AKP 活性均呈显著

下降趋势。

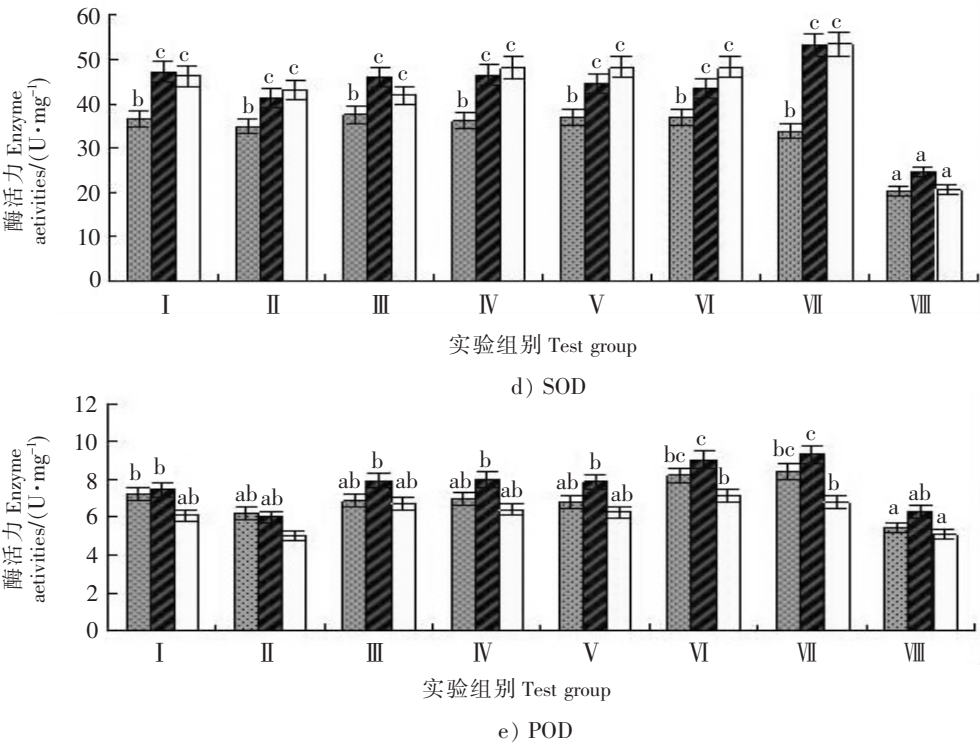
饲料中添加不同微生物制剂对仿刺参体腔液 LSZ 活性产生的影响各不相同。与对照组相比, 添加微生物制剂饲养 60 d 后各实验组仿刺参 LSZ 活性均有显著提高; 除了实验组 I、实验组 IV 以及实验组 VII 三个实验观测组中仿刺参 LSZ 活性与饲养 30 d 后的检测结果相比差异不显著 ($P > 0.05$) 外, 其余各实验组中仿刺参 LSZ 活性皆呈现 60 d 后检测数据显著高于 30 d 时的变化趋势 ($P < 0.05$); 除对照组之外, 停食处理 3 d 后各实验组中仿刺参 LSZ 活性均有显著下降, 详见图 2c。

饲料中添加 7 种微生物制剂均能显著 ($P < 0.05$) 提高仿刺参 SOD 活性, 并且各实验组仿刺参 SOD 活性水平皆是 60 d 显著高于 30 d, 停食处理 3 d 后仿刺参 SOD 活性未降低反而略有升高, 不过, 添加单一微生物制剂和复合微生物制剂这两者之间差异不显著 ($P > 0.05$), 详见图 2d。

饲养周期达 60 d 以上, 饲料中添加复合菌制剂的实验组 VI 和实验组 VII 仿刺参体腔液 POD 活性比对照组提高显著, 停食处理 3 d 后各实验组仿刺参体腔液 POD 活性水平有所回落, 各组之间回落幅度存在差异, 详见图 2e。



续图



说明:30 d 为仿刺参在实验开始后 30 d 的采样检测结果,60 d 为实验开始后 60 d 的采样检测结果,60 d+3 d 为饲养 60 d 后停食 3 d 的采样结果;误差线标注字母不同的代表差异显著($P<0.05$)。

Notes: 30 d and 60 d refer to the digestive enzymes activities of the experimental sea cucumber *A. japonicus* accomplished a rearing period of 30 days and 60 days respectively, while that of “60 d+3 d” points to detection values of the animal subjects without feeding 3 days followed a rearing period of 60 days. The different letters a and b and c labeled at of the error bars indicates obviously discrepancy in values ($P<0.05$).

图 2 饲料中添加微生物制剂对仿刺参体腔液非特异性免疫因子活性的影响
Fig.2 Effects of dietary probiotics on the innate immune factor activity of coelomic fluid of *A. japonicus*

3 讨论

芽孢杆菌是重要的益生菌类群,早已广泛应用于水产养殖中^[18-20]。实验结果显示,从仿刺参消化道微生物中分离、筛选出来的优势菌——解淀粉芽孢杆菌 X3-3、甲基营养型芽孢杆菌 X4-1 和巨大芽孢杆菌 X4-5 作为饲料添加剂使用,皆能对仿刺参生长和体液免疫相关因子活性产生显著而且积极的影响,这进一步证明,芽孢杆菌是仿刺参消化道中的优势菌群和有益微生物。虽然有报道指出,水生动物来源的益生菌制剂在水产养殖中的应用效果优于陆生动物来源的益生菌制剂^[21],但本文数据尚不支持这一观点。三种益生菌中,解淀粉芽孢杆菌 X3-3 无论是单独使用还是与甲基营养型芽孢杆菌 X4-1 或和巨大芽孢杆菌 X4-5 复配使用皆能显著提升仿刺参的特定生长率,显示出良好的开发应用价值。单一菌种作为饲料添加剂使用,解淀粉芽孢杆菌 X3-3 对仿刺参的促生长效果最明显,巨大芽孢杆菌 X4-5 使用效果次之,相形之下,甲基营养型芽孢杆菌 X4-1 单独使用则效果微乎其微(见表 2);多菌种复合使用的情况下,各益生菌的作用表现出叠加效应,解淀粉芽孢杆菌 X3-3 与其他 2 株益生菌的组合具有相对优势,3 株益生菌联合使用效果最佳,饲养 30 d 后仿刺参体重增长至 (18.43 ± 0.31) g,60 d 后更是成倍增长至 (36.71 ± 0.55) g。这些实验结果不仅与其他学者的报道相一致^[17,22-24],而且进一步强调了多种有益微生物联合使用的重要性。

有报道^[25]指出,益生菌通过营养和空间的竞争来影响仿刺参肠道细菌群落的生长,或抑制其他细菌的生长,改变肠道中细菌的群落结构,从而改善仿刺参的生长状况。从实验结果看,各实验观测

组仿刺参特定生长率的变化与其消化道中的消化酶活性变化高度趋同(见图1、图2),显而易见,与其他报道一致^[26],仿刺参消化道中消化酶活性升高进而促进食物的消化吸收与营养成分转化,是饲料中添加上述益生菌取得促进仿刺参生长效果的主要原因。除了受营养因素影响,仿刺参的生长还与其自身遗传因素、生态环境条件及种群社会等级行为等诸多因素有密切关系^[27-29]。这三种益生菌能否改变消化道菌群结构,乃至出现抑制有害微生物作用,尚需有直接实验依据加以确认。

在饲料中单独添加巨大芽孢杆菌 X4-5 菌制剂,虽然可使仿刺参体腔液中 ACP、AKP、LSZ、SOD 和 POD 等免疫相关因子活性皆显著提升(见图2),但是,仿刺参消化道中淀粉酶和蛋白酶活性几乎没有受影响,其对应的生长效果也没有得到很大改善,由此可见,单独开发利用巨大芽孢杆菌 X4-5 作为仿刺参益生菌促进生长效果有限,其在复合益生菌中发挥的叠加效应有待进一步探讨。有报道^[17]指出,在养殖水体中巨大芽孢杆菌具有较高氨氮降解能力,24 h 内可降解 95% 氨氮。据此可推测,巨大芽孢杆菌在仿刺参消化道中发挥消解氨氮等代谢废物的作用,进而有利于仿刺参消化道健康。

仿刺参体腔液中 ACP、AKP、LSZ、SOD 和 POD 活性常常用于评价仿刺参的体液免疫机能,其中 ACP 和 AKP 作为水解酶可分解外来异物,LSZ 能够破坏细胞壁中的 N-乙酰胞壁酸之间的 $\beta-1,4$ 糖苷键,使致病菌细胞壁肽聚糖分解成可溶性糖肽,从而引起致病菌水解,SOD 和 POD 是体内清除自由基的首要物质,可用来阻断体内生化反应后残留的各种活性氧自由基对细胞造成的损害并及时修复受损细胞^[30-31]。实验结果表明,饲料中无论是单独添加解淀粉芽孢杆菌 X3-3、甲基营养型芽孢杆菌 X4-1、巨大芽孢杆菌 X4-5 微生物制剂还是彼此复合使用,甚至三者联合使用皆能显著提升仿刺参体腔液中 ACP、ALP、LSZ、SOD 和 POD 活性,持续使用 60d 效果更为显著(见图2)。可见:这三种微生物在仿刺参消化道中定植,既促进了仿刺参食物的消化与吸收,又作为非致病性抗原直接诱发粘膜免疫应答,致敏相关免疫因子,提升仿刺参免疫防御机能,还通过自身或促进宿主合成分泌 SOD 和 POD 来拮抗胁迫状态下产生的自由基,提升仿刺参机体抗氧化和组织修复能力。

4 结论

解淀粉芽孢杆菌 X3-3 和甲基营养型芽孢杆菌 X4-1 作为饲料添加剂,能够显著提升仿刺参消化道内淀粉酶和蛋白酶活性,具有促进生长效果,还能明显提升仿刺参体腔液中 ACP、AKP、LSZ、SOD 和 POD 活性,具有提升仿刺参免疫抗病力作用。巨大芽孢杆菌 X4-5 作为饲料添加剂对仿刺参消化酶活性和个体生长影响不明显,但,具有显著提升上述免疫相关因子活性作用。上述3株益生菌以1:1:1比例配制的复合菌制剂作为仿刺参饲料添加剂,使用效果最佳。单一菌株作为饲料添加剂使用,解淀粉芽孢杆菌 X3-3 作用最为突出,巨大芽孢杆菌 X4-5 使用效果次之,甲基营养型芽孢杆菌 X4-1 或许在消除仿刺参消化道氨氮等代谢废物方面发挥作用。

[参考文献]

- [1] 田传远,梁英,李琪. 刺参安全生产指南 [M]. 北京:中国农业出版社,2012:3-10.
- [2] 赵文. 刺参池塘养殖生态学及健康养殖理论 [M]. 北京:科学出版社,2009:105-124.
- [3] BALCÁZAR J L, BLAS I D, RUIZ-Z I, et al. The role of probiotics in aquaculture [J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 114: 173-186.
- [4] WANG Y, LI J, LIN J. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook [J]. *Aquaculture*, 2006, 281: 1-4.
- [5] QI Z Z, ZHANG X H, BOON N, et al. Probiotics in aquaculture of China-current state, problems and prospect [J]. *Aquaculture*, 2009, 290: 15-21.
- [6] KESARCODI-WATSON A, KASPAR H, LATEGAN M J, et al. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes [J]. *Aquaculture*, 2008, 274: 1-14.
- [7] 张春云,王印庚,荣小军,等. 国内外海参自然资源及养殖状况及存在问题 [J]. *海洋水产研究*, 2004, 25(3): 89-97.

- [8] TEUBER M. Veterinary use and antibiotic resistance [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2001(4): 493-499.
- [9] EL-HAROON E R, GODA A M, CHOWDHURY M A. Effect of dietary probiotic biogen supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis iloticus*(L.) [J]. *Aquaculture Research*, 2006, 37: 1473-1480.
- [10] ROMERO J, FEIJOO C G, NAVARRETE P. Antibiotics in aquaculture use abuse and alternatives [J]. *Health and Environment in Aquaculture*, 2012, 44(20): 159-199.
- [11] MIKKOLA R, ANDERSSON M, GRIGORIEV P, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated from moisture damaged buildings produced surfactinanda substance toxic tomammalian cells [J]. *Archives of Microbiology*, 2004, 181(4): 314.
- [12] HIRADATE S, YOSHIDA S, SUGIE H, et al. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 [J]. *Phytochemistry*, 2002, 61(6): 693-698.
- [13] DAS A, NAKHRO K, CHOWDHURY S, et al. Effects of potential probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immunere sponses and disease resistance of catla (*Catla catla*) [J]. *Fish & Shellish Immunol*, 2013, 35(5): 1547-1550.
- [14] 沈涛, 邓斌, 陈南南, 等. 饲料中添加复合芽孢杆菌对草鱼消化道酶活性及肠道菌群的影响 [J]. *淡水渔业*, 2012, 42(1): 41-45.
- [15] 李卫芬, 邓斌, 陈南南, 等. 芽孢杆菌对草鱼生长和肠粘膜抗氧化功能及养殖水质的影响 [J]. *水生态学杂志*, 2012, 33(1): 65-70.
- [16] 吕倩, 胡江春, 王楠, 等. 南海深海甲基营养型芽孢杆菌 SHB114 抗真菌脂肽活性产物的研究 [J]. *中国生物防治学报*, 2014, 30(1): 113-120.
- [17] 侯颖, 孙军德, 徐建强. 巨大芽孢杆菌对养殖水体氨氮降解特性研究 [J]. *沈阳农业大学学报*, 2006: 37(4): 607-610.
- [18] 殷海成, 赵红月, 黄进, 等. 枯草芽孢杆菌对免疫和未免疫黄河鲤免疫功能和抗病力的影响 [J]. *动物营养学报*, 2013(7): 1559-1567.
- [19] 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(9): 88-91.
- [20] 田相利, 赵坤, 王军, 等. 泼洒和投喂芽孢杆菌对刺参生长以及消化和免疫相关酶活性的影响 [J]. *中国海洋大学学报*, 2015, 45(1): 18-26.
- [21] 阳刚, 田相利, 王军, 等. 应用 PCR-DGGE 技术分析复合芽孢杆菌制剂水体泼洒对刺参体内微生物群落结构的影响 [J]. *中国海洋大学学报 (自然科学版)*, 2012, 42(6): 310-316.
- [22] 胡毅, 谭北平. 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 [J]. *中国水产科学*, 2008, 15(2): 244-250.
- [23] 骆艺文. 刺参有益菌制剂的研制与应用研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009: 25-36.
- [24] 丁贤, 李卓佳, 陈永青, 等. 芽孢杆菌对凡纳滨对虾生长和消化酶活性的影响 [J]. *中国水产科学*, 2004, 6(11): 580-584.
- [25] 杨维军, 王华, 杨坚. 益生菌的功效及其在食品中的应用 [J]. *四川食品与发酵*, 2005, 41(1): 27-30.
- [26] SALINAS I, CUESTA A, ESTEBAN M. Dietary administration of *Lactobacillus delbrückii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2005, 19: 67-77.
- [27] DONG Y W. Effect of different thermal regimes on growth and physiological performance of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka [J]. *Aquaculture*, 2008, 275: 329-334.
- [28] DOU S Z, MASUDA R, TANAKA M, et al. Size hierarchies affecting the social interactions and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, 2004, 233: 237-249.
- [29] 裴素蕊, 董双林. 刺参个体生长差异的影响因素及其调控机制 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012: 19-111.
- [30] 王淑娴, 叶海斌, 于晓清. 海参的免疫机制研究 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(25): 12553-12555.
- [31] 刘莉, 王涛. 动物微生物及免疫 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 108-112.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 马 英)