

·研究简报·

芽孢杆菌对凡纳对虾生长和消化酶活性的影响

丁 贤, 李卓佳, 陈永青, 林黑着, 杨莺莺, 杨 铿

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要:选用豆粕、鱼粉、植物油、淀粉等原料配制基础料为对照组,在基础饲料中分别添加0.5%、1.0%、3.0%、5.0%芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)制剂为实验组。实验结果显示,凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)生长的2个阶段,实验组 γ_{SCR} 均大于对照组;生长第1阶段,组1与组2差异显著($P < 0.05$),与其余3组差异不显著($P > 0.05$),但各实验组之间差异均不明显($P > 0.05$);生长第2阶段,组1与组2之间 γ_{SCR} 差异极显著($P < 0.01$),与其余3组差异不明显($P > 0.05$),但各实验组间:组2与组4 γ_{SCR} 差异显著($P < 0.05$),而与组5 γ_{SCR} 差异极显著($P < 0.01$);对虾生长2个阶段的成活率实验组均略高于对照组,第1阶段的成活率明显高于第2阶段;芽孢杆菌对凡纳对虾2个生长阶段消化酶活性的影响表现出一定的相似性:实验组蛋白酶活性较淀粉酶、脂肪酶和纤维素酶高,且明显高于对照组,但各实验组间变化不明显。表明芽孢杆菌可以提高凡纳对虾消化酶活性和成活率,利于养分的消化吸收,促进生长。

关键词:芽孢杆菌;凡纳对虾;生长;消化酶

中图分类号:S945.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)06-0580-05

微生态活菌制剂是近几年迅速发展起来的新型绿色添加剂,不仅能改善虾体肠道微生态环境和分泌消化酶,提高饲料转化率,预防疾病,促进虾体生长^[1-2];而且可以降低水产品中胆固醇含量,减少排泄物和养殖环境中氮、有机磷含量,减少养殖生产对其周边环境的污染^[3]。目前,关于芽孢杆菌制剂对凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)消化酶活性的影响未见报道。本实验旨在探讨芽孢杆菌制剂对凡纳对虾生长及其消化酶活力的影响,为微生态制剂产品在水产健康养殖中的推广应用和对虾配合饲料提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

凡纳对虾取自中国水产科学研究院南海水产研究所热带水产研究开发中心(三亚)同一批孵化的虾苗,经过1个月的室内培育后,挑选个体大小均匀的健康对虾进行实验。凡纳对虾体重(0.67 ± 0.11) g,体长(3.9 ± 0.2) cm。

饲料选用豆粕、鱼粉、植物油、淀粉等主要原料,粉碎后加工成5组颗粒饲料。其中对照组不添加芽孢杆菌制剂,实验组分别添加0.5%、1.0%、3.0%和5.0%芽孢杆菌制剂。

芽孢杆菌制剂由中国水产科学研究院南海水产研究所自行分离、筛选的菌株培养研制而成,粉末状,芽孢杆菌活菌量为 1.2×10^9 CFU/g。

1.2 实验设计

实验对虾随机分为5组,每组3个重复,每重复60尾,置于70 cm × 70 cm × 100 cm水池中。对照组和实验组分别饲喂相应颗粒饲料。流水养殖58 d,每天饲喂3次,分别为8:00、17:00和22:00,吸污1次,流量1 L/min,盐度为33~35, pH 7.9~8.1,溶氧为6.9~7.1 mg/L, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 0.044 mg/L。

1.3 生长指标

在实验第29天(生长第1阶段末)和第58天(生长第2阶段末)分别对每组全部取样,分析电子天平(精确0.01 g)称重,计算其特殊生长率 $\gamma_{SCR} = (\ln m_2 - \ln m_1) / t \times 100\%$, m_1 为初始体质量, m_2 为实验结束时体质量, t 为实验时间。

1.4 消化酶测定

1.4.1 粗酶液制备 提取粗酶液:在实验第29天(生长第1阶段末)和第58天(生长第2阶段末)分别从每组中随机取样18尾对虾(6 × 3重复)。按文献[1]的方法分别将所取样本的胃和肠道游离,用去离子水冲洗后用滤纸吸干,迅速称重,捣碎后移入玻璃匀浆器内匀浆定容100 mL,在-4℃下离心20 min(4 000 r/min),取上清液备用。

1.4.2 消化酶测定 蛋白酶活性测定参照中山大学等的福林—酚法^[4]进行。肠蛋白酶活性测定缓冲液pH 7.2,胃蛋白酶活性测定缓冲液pH 3.0;在一定温度(37 ± 1)℃条件下,每分钟水解底物酪蛋白(5 mg/mL)产生1 μg酪氨酸为1个活性单位。

收稿日期:2004-01-12; 修订日期:2004-04-06。

基金项目:广东省重大科技专项课题(A3050304)。

作者简介:丁 贤(1972-),男,硕士,从事水产动物营养调控与健康养殖研究。E-mail: dxyb@hotmail.com

通讯作者:李卓佳。E-mail: zhuojial609@163.com

淀粉酶活性测定参照上海医学化验所《临床生化检验》^[5]中的淀粉—碘显色法进行。缓冲液为磷酸氢二钠—柠檬酸(pH 6.8)。在一定温度(37±1)℃条件下,100 mL 酶液在 30 min 内完全水解 10 mg 淀粉为 1 个活性单位。

脂肪酶活性测定采用聚乙烯醇橄榄油乳化液水解法^[4]。缓冲液 pH 7.5。在一定温度(37±1)℃下,每分钟产生 1 μmol 脂肪酸为一个活性单位。

纤维素酶活性测定采用羧甲基纤维素钠法^[4]。缓冲液 pH 4.8。在一定温度(40±1)℃下,每分钟催化纤维素生成 1 μg 葡萄糖为一个活性单位。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌对凡纳对虾 γ_{SCR} 的影响

芽孢杆菌对凡纳对虾 γ_{SCR} 的影响见表 1。以初始体质

量为协变量,对凡纳对虾的 γ_{SCR} 进行协方差分析和 LSD 多重比较。结果显示,芽孢杆菌对凡纳对虾的 γ_{SCR} 有明显影响。从表 1 可以看出,对虾生长两阶段中组 2 个体的 γ_{SCR} 均相对较高,组 1 的个体 γ_{SCR} 最低。随着活菌的添加,两阶段的个体 γ_{SCR} 和成活率趋势增加,实验组普遍高于对照组。第 1 阶段组 1 与组 2 两组之间 γ_{SCR} 差异显著($P < 0.05$),组 1 与其余 3 组以及各实验组间差异不明显($P > 0.05$);第二阶段中,组 2 与组 4 之间差异显著($P < 0.05$),且组 2 与组 1 和组 5 之间差异极显著($P < 0.01$)。对虾生长第 1 阶段的成活率明显高于第 2 阶段。 $\gamma_{\text{SCR1,2}}$ 显示,组 1 与组 3、组 5 之间差异显著($P < 0.05$),组 1 与组 2 之间差异极显著($P < 0.01$)。表明在对虾生长过程中,芽孢杆菌制剂可以增强机体免疫力和预防疾病,提高对虾成活率,促进对虾生长发育,降低生产成本。

表 1 活菌制剂对凡纳对虾 γ_{SCR} 的影响
Table 1 Effects of probiotics preparation on γ_{SCR} of *Penaeus vannamei*

$\bar{X} \pm \text{SE}$

生长第 1 阶段(3 月 20 日~4 月 17 日,水温 23~25℃) The first stage in growth (from 20 March to 17 April, temperature 23~25℃)							
组别 Groups	活菌/% Probiotics	<i>n</i>	<i>m</i> ₁ /g	<i>m</i> ₂ /g	$\gamma_{\text{scr}}(\% \text{d}^{-1})$	成活率 Survival rates	
1	0	162	0.68±0.00	1.54±0.03	2.82±0.07a	90.02±0.46	
2	0.5	166	0.67±0.01	1.74±0.12	3.29±0.02b	92.14±0.47	
3	1	170	0.66±0.01	1.54±0.08	2.92±0.16ab	94.17±0.91	
4	3	166	0.68±0.02	1.71±0.07	3.17±0.09ab	92.07±0.35	
5	5	164	0.66±0.04	1.64±0.04	3.14±0.25ab	91.21±0.12	
生长第 2 阶段(4 月 17 日~5 月 15 日,水温 26~28℃) The second stage in growth (from 17 April to 15 May, temperature 26~28℃)							
组别 Groups	活菌/% Probiotics	<i>n</i>	<i>m</i> ₁ /g	<i>m</i> ₂ /g	$\gamma_{\text{scr}}(\% \text{d}^{-1})$	成活率 Survival rates	$\gamma_{\text{scr1,2}}(\% \text{d}^{-1})$
1	0	114	1.53±0.05	4.55±0.09	3.74±0.07a *	70.08±0.27	3.08±0.05a *
2	0.5	122	1.74±0.02	5.54±0.19	4.00±0.02b *	73.57±0.44	3.23±0.01b *
3	1	125	1.54±0.03	4.77±0.13	3.90±0.04ab	73.44±0.38	3.20±0.02b
4	3	119	1.72±0.08	5.12±0.10	3.79±0.08a	71.83±0.91	3.14±0.04ab
5	5	115	1.64±0.01	4.86±0.04	3.75±0.03a *	70.02±1.03	3.22±0.01b

注:1)含有相同字母者差异不显著($P > 0.05$);含有不同字母者差异显著($P < 0.05$);含有不同字母且都带有“*”者差异极显著($P < 0.01$)。
2) $\gamma_{\text{SCR1,2}}$ 是第 1 和第 2 阶段的平均值。
3)表中生长第 1 阶段的 m_2 值与生长第 2 阶段的 m_1 值之间的差异是由于第 1 阶段末每组随机取样测定消化酶活性所造成的。
Note:1)The difference isn't significant with the same letters($P > 0.05$);the difference is significant with differnt letters($P < 0.05$);the difference is utmost significant with differnt letters and “*” simultaneously($P < 0.01$).
2) $\gamma_{\text{SCR1,2}}$ is average of γ_{SCR} for the first stage and the second stage.
3)The difference between m_2 in the first stage and m_1 in the second stage results from the random sampling to examine activity of digestive enzymes at end of the first stage for each group.

2.2 芽孢杆菌对凡纳对虾消化酶活性的影响

2.2.1 生长第 1 阶段对虾消化酶活性 不同活菌添加量对同种消化酶的影响与相同活菌添加量对不同消化酶的影响

见图 1。图 1 显示,饲喂芽孢杆菌的实验组消化酶活性比对照组都有不同程度的增加,蛋白酶增加较明显,淀粉酶和脂肪酶次之,纤维素酶最小。随着活菌量的梯度增加,肠蛋白

酶、胃蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶分别在 1.0%、0.5%、1.0% 和 0.5% 表现较高活性,实验组高于对照组,但各实验组间变化不大,维持在相当的酶活水平。表明芽孢杆菌可以提高

消化酶活性尤其是蛋白酶活性,增加机体对养分的消化利用,提高饲料转化率。这可能与芽孢杆菌促进肠道消化酶的分泌及其自身代谢产生部分消化酶有关。

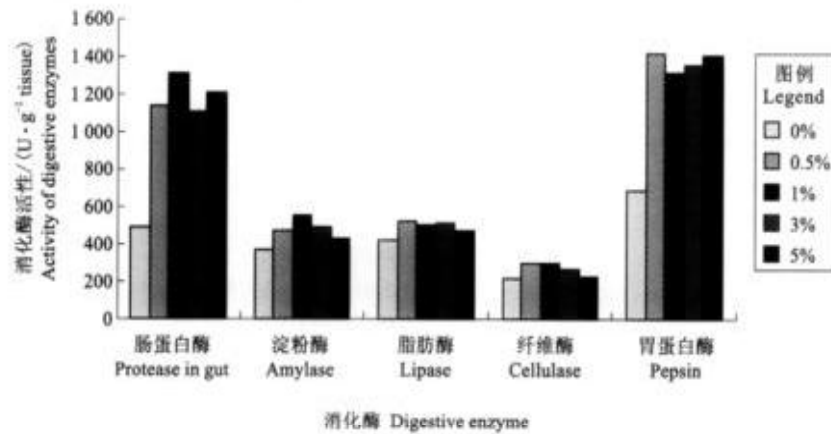


图1 凡纳对虾生长第1阶段活菌制剂对消化酶活性的影响

注:图例表示不同的活菌添加量。

Fig.1 Effects of probiotics preparation on activities of digestive enzymes of *Penaeus vannamei* in the first stage

Note: The proportions in Legend indicates the content of probiotics.

2.2.2 生长第2阶段对虾消化酶活性 图2显示,随着活菌制剂的添加,肠蛋白酶和胃蛋白酶活性变化较明显,分别在 3.0%、1.0% 获得较高酶活性,淀粉酶、脂肪酶分别在 1.0%、1.0% 获得较大酶活性,纤维素酶几乎没有变化。结合图1和图2可以看出,肠蛋白酶、胃蛋白酶和脂肪酶获得

最大活性的活菌添加量比第一阶段高,这可能是由于对虾的生长对蛋白质、脂类的需求增加,而活菌量的增加促进蛋白酶和脂肪酶的分泌。添加相同的活菌含量时,仍然是蛋白酶活性较高,和对照组相比变化明显,纤维素酶活性最低,两阶段消化酶活性的变化规律表现出相似性。

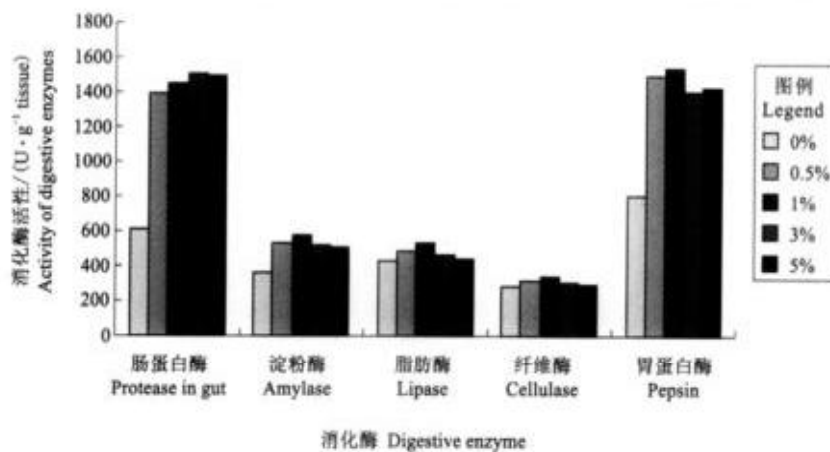


图2 凡纳对虾生长第2阶段活菌制剂对消化酶活性的影响

注:图例表示不同活菌添加量。

Fig.2 Effects of probiotics preparation on activities of digestive enzymes of *Penaeus vannamei* in the second stage

Note: The proportions in Legend indicate the content of probiotics.

3 讨论

本实验的个体较小(0.67 ± 0.11) g,蜕皮速度快,在正

式实验的 58 d 过程中,至少完成 3 次以上的蜕皮,加上实验个体有较长的驯化时间和较长的实验周期,所以可以较准确反映凡纳对虾的生理变化。

3.1 芽孢杆菌与对虾生长

从 Kozasa^[6]首次将微生态制剂应用于水产养殖业以来,有益活菌制剂开始被作为添加剂使用^[7],随着对有益活菌的研究日益深入,其应用日益广泛。实验结果显示:对虾生长的2个阶段中,实验组与对照组 γ_{SGH} 差异显著 ($P < 0.05$),或差异极显著 ($P < 0.01$);从两阶段实验组与对照组 γ_{SGH} 之差看,第1阶段芽孢杆菌对机体的促生长作用略大于第2阶段;在生长的每一阶段,实验组成活率比对照组都有不同程度的提高,且第1阶段成活率大于第2阶段。表明饲料中添加芽孢杆菌制剂可以提高机体免疫力和成活率,促进生长。

本实验所用活菌为芽孢杆菌,以休眠的内孢子形式进入对虾肠道后能够存活和萌发,调节机体肠道酸碱度和调节对虾肠道微生物菌群结构,争夺粘附位点,保护对虾肠道免受毒害^[8]。促进肠道适应性分泌消化酶,加强养分的消化利用。活菌本身作为饲料添加剂,也代谢产生对虾生长所需营养物质如菌体蛋白,还含有维生素和微量元素等,参与调节养分在机体内的代谢过程等^[9],构成促进动物生长的重要因素之一。当然,机体生长还与其生长特性、营养生理特点、机体本身状况、外界环境应激等因素有关。从促生长效果和经济效益的角度看,0.5%活菌添加量有利于促进对虾生长和降低生产成本。

3.2 芽孢杆菌与消化酶活性

自从 Sogarrd 等^[10]首次报道芽孢杆菌具有消化酶活性后,国内在20世纪90年代中后期开始研究微生态制剂消化酶活性及其在水产养殖业中的应用。本实验结果显示,对虾生长的两个阶段,活菌制剂对蛋白酶活性的影响较明显,对淀粉酶、脂肪酶活性影响相对较小,纤维素酶活性几乎没有变化。第1阶段消化酶活性普遍略小于第2阶段。表明芽孢杆菌可以提高机体消化酶活性,且对虾生长伴随消化酶活性和对营养物质需求的增加,反映出消化酶活性对饲料养分具有一定的适应性。Pan 等^[9]研究发现,添加芽孢杆菌制剂的鲤鱼实验组肠道蛋白酶、淀粉酶活性分别比对照组提高20.5%和61.9%;刘小刚等^[11]研究发现,饲喂微生态制剂的银鲫蛋白酶、淀粉酶活性分别比对照组提高466.2%和83.7%。这些研究结果证明:饲料中添加芽孢杆菌制剂,可以提高水产养殖动物消化酶活性,促进生长。但消化酶活性受芽孢杆菌对肠道的刺激及机体对含有芽孢杆菌制剂的饲料适应性和温度^[12]、机体发育阶段^[13]和饲料原料如蛋白源等因素影响^[14-16]。

本实验结果还表明,不同阶段表现最大消化酶活性的活菌添加量不同(图1、2)。且消化酶活性随活菌量的增加上升到一定程度时,便维持在相当水平,即使继续增加活菌量,酶活性变化也很小。这在一定程度上说明,作为外源添加的芽孢杆菌制剂对消化酶活性的提高有一定限度。本实验对芽孢杆菌制剂的适宜添加量进行了初步探讨,其与肠道固有微生物菌群之间的作用关系亟待进一步研究。

3.3 消化酶活力与生长的关系

从表1和图1、2可以看出,对虾生长与消化酶活力之间存在一定的正向作用关系,即消化酶活性在一定程度上反映出机体对饲料养分的消化利用程度,但其酶活高低与机体生长速度并不一定表现出线性关系;即生长速度随着酶活的增加而增大。消化酶活性对饲料养分有一定适应性,在某种条件下,这种适应可以作为饲料养分消化利用的重要参考指标之一;也可利用酶活性变化作为营养状态指标来指导对虾投饵^[17],改善饲养效果。

参考文献:

- [1] 于书坤,张树荣. 虾类及甲壳动物消化酶研究的现状[J]. 海洋科学, 1986, 10(2): 60-63.
- [2] 刘玉梅,朱谨钊,吴厚余,等. 中国对虾幼体和仔虾消化酶活力及氨基酸组成的研究[J]. 海洋与湖泊, 1991, 22(6): 571-575.
- [3] 隋大鹏,王 群,李 键. 微生态制剂在鱼虾养殖中的应用[J]. 齐鲁渔业, 2002, 19(11): 9-11.
- [4] 中山大学生物系. 生化技术导论[M]. 北京:人民教育出版社, 1979. 52-54.
- [5] 上海市医学化验所. 临床生化检验[M]. 上海:上海科技出版社, 1979. 366-368.
- [6] Kozasa M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promoter for animal feeding[J]. Microbiol Aliment Nutr, 1986, 4: 121-135.
- [7] Fuller R. Probiotics in man and animals[J]. J Appl Bacteriol, 1989, 66: 385-388.
- [8] 孟凡伦,马桂荣,孔 健. 益生菌制剂在中国对虾养殖中的应用研究[J]. 山东大学学报(自然科学版), 1998, 33(1): 101-105.
- [9] Pan K C, Yang H B. Progress in study of mechanism of *Bacillus* [J]. Feed Industry, 1997, 18(9): 32-34.
- [10] Sogarrd D H, Denmark T S. Microbials for feed beyond lactic acid bacterial[J]. Feed Inter, 1990, 11(4): 32-37.
- [11] 刘小刚,周洪琪,华雪铭,等. 微生态制剂对异育银鲫消化酶活性的影响[J]. 水产学报, 2002, 26(5): 448-451.
- [12] 潘鲁青,王克行. 温度对中国对虾幼体生长发育与消化酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 1997, 4(3): 17-22.
- [13] Kamarudin M S, DA Jones L, Le Vay, et al. Ontogenetic change in digestive enzyme activity during larval development of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Aquaculture, 1994, 123: 323-333.
- [14] 陆文清,李德发. 影响饲料酶活力测定的因素分析[J]. 饲料研究, 2002, 5: 15-18.
- [15] Maugle P D, Deshimaru O, Katayama T, et al. Characteristics of amylase and protease of the shrimp *Penaeus japonicus* [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1982, 48(12): 1753-1757.
- [16] Lee P G, Smith L L, Lawrence A L. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* boone: Relationship between enzyme activity, size and diet[J]. Aquaculture, 1984, 42: 225-239.
- [17] Biesiot P M, Capuzzo G M. Digestive protease, lipase and amylase activities in stage I Larvae of the American lobster, *Homarus americanus* [J]. Comp Biochem Physiol, 1990, 95A(1): 47-54.

Effects of probiotics on growth and activities of digestive enzymes of *Pennaus vannamei*

DING Xian, LI Zhuo-jia, CHEN Yong-qing, LIN Hei-zhao, YANG Ying-ying, YANG Keng
(South China Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: The basal diet that was made of fish meal, soybean meal-solvent, plant-oil and starch, et al. was regarded as control group without probiotics added in. The trial groups were designed with 4 added levels of probiotics which were mixed with the basal diet. The added levels of probiotics were 0.5%, 1.0%, 3.0% and 5.0%. The whole experiment period was 58 d, and the first 29 d was the first stage, and the latter 29 d was the second stage. γ_{SGR} and activity of digestive enzymes were examined at both stages by sampling at the end of each stage. The experimental results indicated that all the γ_{SGR} of trial groups were higher than that of control group in the first and second stage for *Pennaus vannamei*. In the first stage, the γ_{SGR} in the group of probiotics added level at 0.5% was higher than that in control group ($P < 0.05$), but there was no significant differences in γ_{SGR} between control group and the other 3 trial groups with added level of probiotics at 1.0%, 3.0% and 5.0% ($P > 0.05$), and among all the trial groups either ($P > 0.05$); in the second stage, the γ_{SGR} in the group with added level of probiotics at 0.5% was different from that in the group with added level of probiotics at 3.0% ($P < 0.05$), and significant different from the control and the with group added level of probiotics at 5.0% ($P < 0.01$); but no significant difference between the control group and the trial groups except the group with added level of probiotics at 0.5% ($P > 0.05$); survival rates of the trial groups were higher than those in control in both stages. The survival rates were higher in the first stage than in the second stage; the effects of probiotics on activities of digestive enzymes behaved similar trend in both stages; compared with the control group, the activities of digestive enzymes affected by probiotics changed clearly in protease, didn't change clearly in amylase, cellulase and lipase. The activities of several digestive enzymes didn't show any difference in all trial groups. All these results demonstrated that the activities of digestive enzymes and survival rates of *Pennaus vannamei* were enhanced by probiotics preparation, which promoted nutrients of diets to be digested, decomposed and absorbed so to accelerate *Pennaus vannamei* to grow better.

Key words: probiotics; *Pennaus vannamei*; growth; digestive enzymes

Corresponding author: LI Zhuo-jia. E-mail: zhujiali609@163.com