

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

胡毅¹, 谭北平¹, 麦康森¹, 艾庆辉¹, 郑石轩², 程开敏²

(1. 中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 湛江粤海饲料有限公司, 广东 湛江 524017)

摘要: 以初体质量为 (0.11 ± 0.00) g 的凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 为研究对象, 在室外水泥池进行 10 周饲喂实验, 研究饲料中添加单一益生菌和复合益生菌对凡纳滨对虾生长、消化酶、肠道和粪便菌群及部分免疫指标的影响。以基础饲料为对照组, 在基础饲料中分别添加地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、虾乐 333 (复合益生菌)、地衣芽孢杆菌 + 枯草芽孢杆菌 (1:1)、虾乐 333 + 地衣芽孢杆菌 + 枯草芽孢杆菌 (1:1:1) 各 1 g/kg, 配制 5 种实验饲料。实验结果显示, 复合益生菌饲喂组对虾的特定生长率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而单一益生菌饲喂组与对照组差异不显著 ($P < 0.05$)。饲料中添加益生菌能使凡纳滨对虾肠道蛋白酶和淀粉酶活力升高, 其中复合益生菌饲喂组淀粉酶活力显著高于对照组 ($P < 0.05$)。与对照组比, 饲料中添加益生菌显著降低了肠道及粪便弧菌数 ($P < 0.05$), 不同程度提高了凡纳滨对虾血清蛋白浓度、酚氧化酶活力、溶菌酶活力和总抗氧化力, 其中添加复合益生菌能使血清蛋白浓度及溶菌酶活力较对照组显著提高 ($P < 0.05$)。上述结果表明, 与饲喂单一益生菌相比, 复合益生菌对凡纳滨对虾的生长、免疫力具有更好的促进作用。[中国水产科学, 2008, 15(2): 244-251]

关键词: 凡纳滨对虾; 益生菌; 生长; 消化酶; 免疫

中图分类号: S963.21

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)02-0244-08

近年来, 中国的凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 养殖得到了快速发展。其年产量在 2005 年已达 40.76 万 t, 超过了中国对虾养殖总产量的 60%^[1]。但随着对虾集约化养殖的迅猛发展, 水环境恶化导致病害暴发, 大量抗生素及其他违禁药物被用于病害防治, 已引起细菌抗药性及药物残留等问题, 严重影响了对虾产业的健康持续发展。为了解决养殖病害和食品安全等诸多矛盾, 寻找新的绿色环保的抗生素替代品是目前的研究热点^[1-3]。

益生菌 (Probiotic) 是指在一定浓度范围内可以增进健康的活体微生物制剂, 作为抗生素的替代品, 其应用在近几年已得到迅速发展^[1]。其作用机制主要包括 5 方面: 一是通过提供营养物质或产生消化酶提高机体消化能力; 二是通过竞争营养附着位点或产生拮抗物质来抑制有害微生物繁殖; 三是改善水质; 四是通过增强机体免疫功能来提高抗病能力; 五是增强抗病毒能力^[1,3]。但由于对虾饲料生产中需经过高温和高压, 限制了饲料中微生物制剂的添加。目前微生物制剂在对虾养殖生

产中大多应用于水质调控^[4-5], 作为对虾饲料添加剂则以能耐高温高压的芽孢杆菌属为主^[6-8]。而有关对虾饲料中添加单一及复合益生菌对对虾生长、消化酶、肠道和粪便细菌及免疫功能影响的研究尚未见报道。本实验旨在探讨商品对虾饲料中直接添加单一及复合益生菌对凡纳滨对虾生长、消化酶、免疫功能和肠道菌群的影响, 以期益生菌在凡纳滨对虾配合饲料中的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

实验选用含鱼粉 34%、豆粕 14%、花生粕 8%、虾壳粉 6%、鱿鱼内脏粉 4%、高筋面粉 24%、次粉 4%、海带粉 2%、磷脂油 1%、优质海鱼油 1.5%、虾蟹脱壳素 0.1%、对虾多矿 0.5%、对虾多维 0.2%、胆碱 0.3%、诱食剂 0.1%、抗氧化剂 0.03%、维生素 C 磷酸酯 0.04%、磷酸二氢钙 0.5% 的基础饲料 (40% 粗蛋白, 6% 粗脂肪)。以基础饲料为对照组。在基础饲料中分别添加地衣芽孢杆菌 (*Bacillus*

收稿日期: 2007-05-17; 修订日期: 2007-10-12.

基金项目: 国家高技术研究发展 (863) 计划 (2003AA622060) 及教育部新世纪优秀人才支持计划 (NECT-05-0596) 资助。

作者简介: 胡毅 (1974-), 男, 博士, 现湖南农业大学工作; 研究方向为水产动物营养及营养与免疫学. E-mail: huyi740322@163.com

通讯作者: 谭北平 (1967-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为水产动物营养免疫学与环境营养学. Email: bptan@ouc.edu.cn

1) <http://www.shuichan.com>

licheniformis) (菌含量不小于 10^{10} CFU/g, 湛江粤海饲料有限公司提供)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (菌含量不小于 10^{10} CFU/g, 湛江粤海饲料有限公司提供)、虾乐 333 (xiale 333, 由芽孢杆菌、乳酸菌、节杆菌等 8 株菌组成的复合益生菌, 菌含量不小于 10^{10} CFU/g)、地衣芽孢杆菌 + 枯草芽孢杆菌 (质量比为 1:1)、虾乐 333 + 地衣芽孢杆菌 + 枯草芽孢杆菌 (质量比为 1:1:1) 各 1 g/kg, 配制菌含量不小于 10^7 CFU/g 饲料的 5 种实验饲料。饲料原料经粉碎过 60 目筛, 用双螺杆压条机挤压出直径分别为 1.0 mm 和 1.5 mm 两种粒径的饲料, 在 90 °C 熟化 30 min 后, 于阴凉处晾干, 剪切成 3 mm 长的颗粒贮存于 -20 °C 的冰柜中待用。

1.2 动物饲养与管理

实验虾来自东海岛育苗场同一批孵化的虾苗, 在室外水泥池中投喂虾片和丰年虫 (*Artemia nauplii*) 培育 25 d 后, 挑选个体大小均匀的健康对虾于室外水泥池 (2 m×2 m×1.5 m) 中进行养殖实验。实验虾初始体质量为 (0.11 ± 0.00) g, 随机分为 6 组, 每组 3 个重复, 每水泥池放养 300 尾虾, 养殖前期投喂 1.0 mm 粒径的饲料, 后期投喂 1.5 mm 粒径的饲料。投饵量为体质量的 5%~10%, 分 4 次投喂, 投喂时间分别为 06:00、10:30、18:00、22:00, 各时间点投喂量占日总投饵量的比值分别为 30%、20%、30%、20%。饲养期水温 (29 ± 3) °C, 盐度 26 ± 3 , 连续充气。前 15 d 不换水, 每天排污 1 次, 养殖水体深度从刚开始的 60 cm 逐渐加深到 120 cm。养殖后期 2~5 d 换水 1 次。每次换水量为 20%~30%, 严格控制每次换水的深度, 使每池换水量基本一致。养殖时间持续 10 周。

1.3 实验指标与计算

1.3.1 生长指标 实验起始和实验结束时分别对各水泥池虾进行计数、称质量。饲料常规成分分析参照 AOAC^[9] 的方法。

对虾特定生长率 (SGR) 和饲料效率 (FER) 计算公式如下:

$$SGR = [(\ln W_f - \ln W_i) / T] \times 100\%$$

$$FER = (W_f - W_i) / W_i$$

W_f 、 W_i 分别表示平均终体质量 (g)、平均初体质量 (g); T 表示饲养时间 (d); W_i 表示实验期间投入饲料量 (g)

1.3.2 肠道消化酶活力 养殖实验结束后, 每水泥池随机取 15 尾对虾, 取其肠道。去除肠道粪

便, 用去离子水冲洗后滤纸吸干, 称质量, 捣碎后移入电动匀浆器内冰水浴匀浆, 在 4 °C 下离心 30 min ($10\,000$ r/min), 取上清液备用, 24 h 分析完毕。

蛋白酶活性测定采用福林-酚试剂法^[10], 以每 mg 酶蛋白 37 °C 每分钟水解生成 1 μg 酪氨酸作为 1 个酶活性单位;

淀粉酶活性采用碘-淀粉比色法, 以每 mg 酶蛋白在 37 °C 与底物作用 30 min, 水解 10 mg 淀粉为 1 个酶活性单位。

肠道酶液蛋白含量以牛血清蛋白做标准, 用考马斯亮蓝法测定。

1.3.3 肠道和粪便菌群 养殖中期 (35 d) 和后期 (70d) 测定对虾肠道弧菌及细菌总数。测定方法参考李继秋^[11] 的方法, 从每水泥池中随机取 10 尾虾, 无菌操作将虾解剖, 去除肠道粪便, 置于灭菌的玻璃匀浆器中, 加入 10 mL 无菌生理盐水匀浆。再依次以 10 倍系列稀释, 选择合适的稀释度测弧菌以及细菌总数。养殖实验后期, 收集虾粪便测弧菌以及细菌总数, 测定方法同肠道细菌测定。细菌总数和弧菌数分别通过涂布 2216E 和 TCBS 培养基测定。

1.3.4 血液指标测定 实验结束后饥饿 24 h。用 1 mL 无菌注射器, 按照血淋巴与抗凝剂 (10 mmol/L EDTA·Na₂, 450 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L HEPES, pH7.3, 850 mOsm/kg) 体积比为 1:2 的比例, 由每个水泥中随机取 5 尾虾, 从心脏部位进行取血, 进行血细胞总数计数。用于其余血液指标测定的采样方法为: 用 1 mL 的无菌注射器自对虾心脏抽取血液, 每水泥池取 20 尾对虾血液合并置于无菌离心管中 4 °C 静置过夜后, $3\,000$ r/min 离心 10 min, 取上层血清置于 -80 °C 超低温冰箱保存待测。

酚氧化酶活性测定采用 Hernández-López 等^[12] 的方法。以实验条件下, 每 mL 血清每 min 吸光值增加 0.001, 定义为 1 个酶活性单位 (U)。

血清溶菌酶活性通过浊度比色法测定^[13]。以实验条件下, 每 mL 血清每 min 吸光值减少 0.001 为 1 个酶活性单位 (U)。

血清蛋白浓度、SOD 和总抗氧化力使用南京建成试剂盒测定。血清中 SOD 酶活性单位定义为每 mL 血清中 SOD 抑制率达到 50% 所对应的 SOD 量为 1 个酶活性单位。总抗氧化活性单位定义为 37 °C 时, 每 mL 血清每分钟吸光度增加 0.001 为 1 个酶活性单位。

1.4 数据统计分析

实验数据采用 SPSS12.0 软件进行单因素方差分析。当差异显著时,用 Duncan 检验法进行多重比较,差异显著度为 0.05。

2 结果

2.1 存活与生长

饲料中添加益生菌能不同程度地提高凡纳

滨对虾生长(表 1),其中饲喂复合益生菌能显著提高凡纳滨对虾的特定生长率 ($P<0.05$),但添加单一益生菌的特定生长率与对照组差异不显著 ($P>0.05$)。复合益生菌组有比对照组更高的饲料效率,其中地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的复合益生菌组与对照组差异显著 ($P<0.05$)。对虾成活率为 76.83%~85.67%,各处理间差异不显著。

表 1 凡纳滨对虾成活率、特定生长率及饲料效率

Tab.1 Survival rate (SR), special growth rate (SGR), feed efficiency ratio (FER) of *Litopenaeus vannamei* fed different diet
 $n=3$; $\bar{X} \pm SE$

饲料中益生菌 ^① Probiotic in the diet	初始体质量/g Initial body weight	末期体质量/g Final body weight	成活率/% Survival rate	特定生长率 (%/d) SGR	饲料效率 FER
对照 Control	0.11±0.00	9.87±0.04 ^a	85.50±4.95	6.36±0.01 ^a	0.73±0.02 ^{ab}
地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	0.11±0.00	10.51±0.04 ^{ab}	80.83±2.59	6.45±0.01 ^{abc}	0.68±0.00 ^a
枯草芽孢杆菌 <i>B.subtilis</i>	0.11±0.00	10.08±0.41 ^{ab}	78.33±2.36	6.40±0.15 ^{ab}	0.69±0.03 ^b
②虾乐 333 xiale 333	0.11±0.00	11.16±0.35 ^{bcd}	79.83±4.95	6.53±0.11 ^{bcd}	0.74±0.01 ^{ab}
地衣芽孢杆菌+枯草芽孢杆菌(1:1) <i>B.licheniformis</i> + <i>B. subtilis</i>	0.11±0.00	11.34±0.20 ^{cd}	85.67±1.27	6.59±0.06 ^{cd}	0.83±0.03 ^c
虾乐 333+地衣芽孢杆菌+枯草芽孢杆菌(1:1:1) xiale 333+ <i>B.licheniformis</i> + <i>B.subtilis</i>	0.11±0.00	12.07±0.22 ^d	76.83±2.12	6.65±0.05 ^d	0.80±0.02 ^{bc}

注:同一列数据右上角不同上标字母代表有显著差异 ($P<0.05$); ①饲料中益生菌含量为 1 g/kg; ②虾乐 333 (复合益生菌)。

Note: Values in the same column without a common superscript are significantly different ($P<0.05$); ① the content of probiotic is 1 g/kg diet; ② xiale 333 (compound probiotic)。

2.2 消化酶活力

饲料中添加益生菌能提高肠道蛋白酶和淀粉酶活力(表 2)。其中复合益生菌组有比单一益生菌组更高的肠道蛋白酶和淀粉酶活力。与对照组相比,添加复合益生菌虾乐 333 组能显著提高肠道

蛋白酶活力 ($P<0.05$),而添加复合益生菌均能显著提高肠道淀粉酶活力 ($P<0.05$),但各益生菌组肠道蛋白酶和淀粉酶活力差异不显著 ($P>0.05$)。各饲料组中肠腺蛋白酶和淀粉酶活力没有显著差异 ($P>0.05$)。

表 2 不同益生菌成分对凡纳滨对虾中肠腺和肠道蛋白酶、淀粉酶活力的影响

Tab.2 Effect of different dietary probiotics on the activity of proteases and amylase of midgut gland and intestine of juvenile *Litopenaeus vannamei*
 $n=3$; $\bar{X} \pm SE$; U/mg protein

饲料中益生菌 ^① Probiotic in the diet	中肠腺 Midgut gland		肠道 Intestine	
	蛋白酶 Proteases	淀粉酶 Amylase	蛋白酶 Proteases	淀粉酶 Amylase
对照 Control	39.43±3.76	18.33±1.11	19.17±0.68 ^a	4.79±1.13 ^a
地衣芽孢杆菌 <i>B.licheniformis</i>	41.48±0.60	19.71±1.28	24.11±0.77 ^{ab}	8.63±0.89 ^{ab}
枯草芽孢杆菌 <i>B.subtilis</i>	40.84±2.56	21.33±0.76	23.47±1.00 ^{ab}	7.97±2.10 ^{ab}
②虾乐 333 xiale 333	39.32±1.81	18.55±0.12	28.73±2.09 ^b	9.15±0.53 ^b
地衣+枯草(1:1) <i>B.licheniformis</i> + <i>B.subtilis</i>	40.20±4.89	19.01±0.53	24.53±0.84 ^{ab}	9.29±0.01 ^b
虾乐 333+地衣+枯草(1:1:1) xiale 333+ <i>B.licheniformis</i> + <i>B.subtilis</i>	43.10±2.26	19.64±0.87	24.47±2.34 ^{ab}	9.03±1.47 ^b

注:同一列数据右上角不同上标字母代表有显著差异 ($P<0.05$); ①饲料中益生菌含量为 1 g/kg; ②虾乐 333 (复合益生菌)。

Note: Values in the same column without a common superscript are significantly different ($P<0.05$); ① the content of probiotic is 1 g/kg diet; ② xiale 333 (compound probiotic)。

2.3 肠道和粪便细菌总数和弧菌总数

除枯草芽孢杆菌组在前期能显著增加肠道细菌总数外 ($P<0.05$), 其余益生菌组在前期与末期细菌总数与对照组均无显著差异 ($P>0.05$)。与对照组相比, 饲料中添加益生菌在前期和末期均显著降

低了凡纳滨对虾肠道弧菌数 ($P<0.05$)。对对虾粪便分析可知, 饲料中添加益生菌能显著降低粪便中细菌总数 ($P<0.05$), 除添加地衣芽孢杆菌组外, 添加益生菌均显著降低了粪便中弧菌数 ($P<0.05$), 详见表 3、表 4。

表 3 凡纳滨对虾养殖前期和后期肠道细菌总数和弧菌总数

Tab.3 Effect of different dietary probiotics on total bacterium counts (TBC) and *Vibrios* bacterium counts (VBC) in intestine tract of juvenile *Litopenaeus vannamei* $n=3$; $\bar{X} \pm SE$; lgCFU/ind

饲料中益生菌 ^① Probiotic in the diet	前期 First stage		后期 Second stage	
	细菌总数 TBC	弧菌总数 VBC	细菌总数 TBC	弧菌总数 VBC
对照 Control	7.44±0.12 ^{ab}	6.98±0.20 ^a	7.60±0.16	7.11±0.21 ^a
地衣芽孢杆菌 <i>B.licheniformis</i>	6.66±0.42 ^a	4.50±0.50 ^b	7.07±0.23	5.85±0.35 ^c
枯草芽孢杆菌 <i>B.subtilis</i>	7.87±0.03 ^b	4.24±0.24 ^b	7.47±0.01	6.67±0.07 ^{ab}
②虾乐 333 <i>xiale</i> 333	7.60±0.16 ^b	5.54±0.54 ^b	7.12±0.44	5.78±0.18 ^c
地衣 + 枯草 (1:1) <i>B.licheniformis</i> + <i>B.subtilis</i>	7.28±0.08 ^{ab}	4.56±0.56 ^b	6.77±0.22	5.89±0.11 ^c
虾乐 333+ 地衣 + 枯草 (1:1:1) <i>xiale</i> 333+ <i>B.licheniformis</i> + <i>B.subtilis</i>	7.35±0.36 ^{ab}	5.24±0.24 ^b	7.42±0.09	6.09±0.05 ^{bc}

注: 同一列数据右上角不同上标字母代表有显著差异 ($P<0.05$); ①饲料中益生菌含量为 1 g/kg; ②虾乐 333 (复合益生菌); 前期: 第 35 天; 后期: 第 70 天。

Note: Values in the same column without a common superscript are significantly different ($P<0.05$); ① the content of probiotic is 1 g/kg diet; ② *xiale* 333 (compound probiotic). First stage: the 35 th day; Second stage: the 70 th day.

表 4 养殖后期凡纳对虾粪便细菌总数和弧菌总数

Tab.4 Effect of different dietary probiotics on total bacterium counts (TBC) and *Vibrios* bacterium counts (VBC) in fecal of juvenile *Litopenaeus vannamei* at the second phase $n=3$; $\bar{X} \pm SE$; lgCFU/g

饲料中益生菌 ^① Probiotic in the diet	细菌总数 TBC	弧菌总数 VBC
对照 Control	8.81±0.03 ^a	6.54±0.06 ^a
地衣芽孢杆菌 <i>B.licheniformis</i>	7.97±0.59 ^{ab}	6.07±0.41 ^{ab}
枯草芽孢杆菌 <i>B.subtilis</i>	7.34±0.09 ^b	5.29±0.30 ^b
②虾乐 333 <i>xiale</i> 333	7.36±0.09 ^b	5.63±0.15 ^b
地衣 + 枯草 (1:1) <i>B.licheniformis</i> + <i>B.subtilis</i>	7.42±0.06 ^b	5.52±0.26 ^b
虾乐 333+ 地衣 + 枯草 (1:1:1) <i>xiale</i> 333+ <i>B.licheniformis</i> + <i>B.subtilis</i>	6.88±0.40 ^b	5.52±0.14 ^b

注: 同一列数据右上角不同上标字母代表有显著差异 ($P<0.05$); ①饲料中益生菌为 1 g/kg; ②虾乐 333 (复合益生菌)。

Note: Values in each column without a common superscript are significantly different ($P<0.05$); ① the content of probiotic is 1 g/kg diet; ② *xiale* 333 (compound probiotic).

2.4 免疫指标

与对照组相比, 添加益生菌能不同程度提高对虾血清蛋白浓度、酚氧化酶活力、溶菌酶、超氧化物歧化酶及总抗氧化力 (表 5)。其中地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的复合益生菌组显著提高了对虾血细胞数 ($P<0.05$); 复合益生菌能使血清蛋白浓度及溶菌酶活力显著提高 ($P<0.05$), 而投喂单一益生菌

组与对照组差异不显著; 除地衣芽孢杆菌 + 枯草芽孢杆菌 + 虾乐 333 (1:1:1) 组外, 饲料中添加益生菌能显著提高血清酚氧化酶活力 ($P<0.05$); 血清超氧化物歧化酶活力在各组间差异不显著; 枯草芽孢杆菌组、地衣芽孢杆菌 + 枯草芽孢杆菌 (1:1) 组及地衣芽孢杆菌 + 枯草芽孢杆菌 + 虾乐 333 (1:1:1) 组血清总抗氧化力显著高于对照组 ($P<0.05$)。

表5 饲料中益生菌对凡纳滨对虾免疫功能的影响
Tab.5 Effect of different dietary probiotics on immunity of juvenile *Litopenaeus vannamei*

$n=3; \bar{X} \pm SE$

饲料中益生菌 ^① Probiotic in the diet	血细胞数 ($10^7 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$) Total hemocyte counts	血清蛋白浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) Serum protein concentration	酚氧化酶 ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) PO	溶菌酶 ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) Lysozyme activity	超氧化物歧化酶 ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) SOD	总抗氧化力 ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) T-AOC
对照 Control	1.61 ± 0.12^a	218.58 ± 4.86^a	6.50 ± 0.70^a	16.25 ± 0.71^a	274.46 ± 1.11	5.83 ± 0.22^a
地衣芽孢杆菌 <i>B.licheniformis</i>	1.82 ± 0.11^a	225.00 ± 7.00^a	13.70 ± 4.50^b	20.00 ± 2.89^a	293.65 ± 3.32	7.87 ± 0.05^{abc}
枯草芽孢杆菌 <i>B.subtilis</i>	1.74 ± 0.16^a	229.08 ± 0.17^{ab}	14.10 ± 1.30^b	21.25 ± 3.60^a	283.26 ± 19.85	12.57 ± 0.68^{bc}
②虾乐 333 <i>xiale</i> 333	1.85 ± 0.06^a	241.69 ± 0.17^b	18.10 ± 3.50^b	31.25 ± 2.17^b	287.90 ± 17.71	6.78 ± 0.10^{ab}
地衣 + 枯草 (1:1) <i>B.licheniformis</i> + <i>B.subtilis</i>	2.26 ± 0.14^b	245.30 ± 0.87^b	16.40 ± 0.40^b	28.75 ± 2.17^b	281.82 ± 0.92	11.36 ± 3.87^{bc}
虾乐 333+ 地衣 + 枯草 (1:1:1) <i>xiale</i> 333+ <i>B.licheniformis</i> + <i>B.subtilis</i>	1.86 ± 0.09^a	269.02 ± 3.81^c	10.70 ± 1.10^{ab}	41.25 ± 0.72^c	302.77 ± 1.39	12.97 ± 0.53^c

注: 同一列数据右上角不同字母代表有显著差异 ($P < 0.05$); ①饲料中益生菌为 1 g/kg; ②虾乐 333 (复合益生菌)。

Note: Values in the same column without a common superscript are significantly different ($P < 0.05$); ① the content of probiotic is 1 g/kg diet; ② *xiale* 333 (compound probiotic).

3 讨论

在本研究中, 饲料中添加益生菌均能促进凡纳滨对虾生长, 与牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[14]、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[15]、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)^[16]、银鲫 (*Carassius auratus*)^[17] 及斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[18] 中的研究结果相似。益生菌对凡纳对虾的促生长机理可能与饲喂益生菌后对虾肠道消化酶活性的提高有关^[5]。本研究结果表明, 饲料中添加各种益生菌均能提高凡纳滨对虾肠道蛋白酶、淀粉酶活性, 其活性大小与生长表现为一定的相关性, 这与 Ziaei -Nejad 等^[5] 在印度明对虾 (*Fenneropenaeus indicus*), Moriarty 等^[18] 在斑节对虾及丁贤等^[19] 对凡纳滨对虾的研究结果相似。但中肠腺消化酶活性各饲料组差异不显著, 说明饲料益生菌不能刺激中肠腺消化酶的分泌, 益生菌组肠道消化酶活性的提高与益生菌在肠道中定植和分泌消化酶相关。在本实验中复合益生菌组有比单一益生菌更好的生长效果, 这一结果与 Salinas 等^[20] 在乌颊鱼 (*gilthead seabream*) 中发现芽孢杆菌和乳酸菌的复合菌比单一的芽孢杆菌和乳酸菌有更好的添加效果相似。这可能是由于不同细菌在肠道微生物区系中占有不同的生态位, 因而添加复合益生菌组有比添加单一益生菌更好的免疫及生长效果^[20]。

益生菌可以通过与有害微生物竞争营养物质及生存和繁殖空间, 抑制有害微生物生长, 从而维持机体微生态平衡^[1]。据报道芽孢杆菌能抑制斑节对虾哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) 的生长^[21-22], 降低肠道弧菌数^[6], 显著提高哈维氏弧菌浸染攻毒后的成活率^[7-6, 21-22]。本实验结果显示, 饲料中添加益生菌显著降低了肠道和粪便中的弧菌, 这与 Rengpipat 等^[6] 在土池中对斑节对虾的研究结果相似。但同样的实验, Rengpipat 等^[7] 在室内进行的研究结果显示, 饲喂益生菌对斑节对虾肠道弧菌影响不显著, 说明益生菌的添加效果与养殖环境有关, 这可能是因为室外环境容易受外界条件变化影响的缘故。有研究表明, 环境条件的改变可以导致条件性致病菌数目的增加, 以致肠道菌群失衡^[23-25]。一旦微生物菌群遭到破坏, 饲喂有益微生物, 有助于宿主建立正常的微生物区系^[26]。在本实验养殖期间暴雨频繁, 水体盐度变化较大, 对虾经常处于应激状态, 使肠道本身微生态平衡被破坏, 没添加益生菌的对照组弧菌数显著增加, 而添加益生菌能有效抑制弧菌的过度繁殖, 保持了对虾肠道细菌的平衡。

对虾和其他无脊椎动物一样, 免疫系统不完善, 主要依靠非特异性免疫来提高对疾病的抵抗力。血细胞数、溶菌酶及酚氧化酶是反映对虾免疫能力的一个重要指标, 在对虾防御反应中发挥重要

作用^[7,12]。血清蛋白可能与转氨途径的氨基酸合成及作为血蓝蛋白或其他功能小肽存在有关^[27]。血清超氧化物歧化酶和血清总抗氧化力是重要的抗氧化酶,可以反映对虾的抗应激能力^[7]。在本实验中,益生菌对凡纳滨对虾血细胞数、溶菌酶、血清蛋白浓度、血清酚氧化酶、血清超氧化物歧化酶和血清总抗氧化力都有不同程度的提高。说明饲料中添加益生菌可以提高对虾非特异性免疫能力。Gullian等^[28]从对虾中肠腺分离出3种益生菌弧菌P62、P63和芽孢杆菌P64,能显著提高对虾血清酚氧化酶活力;Rengpipat等^[7]用芽孢杆菌S11菌株喂养斑节对虾,提高了其血细胞数、血清酚氧化酶、抗菌活力;郭志勋等^[29]在饲料中添加芽孢杆菌能够促进对虾的生长及免疫力,这些研究结果均与本研究结果相似。复合益生菌组有比单一益生菌组更高的血清蛋白浓度及溶菌酶活力,与Salinas等^[20]在乌颊鱼(*Sporus aurata* L.)中发现的芽孢杆菌和乳酸菌的复合菌比单一的芽孢杆菌和乳酸菌有更好的免疫效果相似。可见益生菌可以作为良好的免疫激活剂,通过激发机体的体液免疫和细胞免疫来增强机体免疫机能。其作用机理可能是通过细菌本身或细胞壁成分刺激非特异性免疫系统使其发挥作用,从而提高动物免疫力^[7]。多种来自细菌细胞壁的成分可作为免疫增强剂已在甲壳动物中得到证实^[30-32]。

4 结论

在本实验条件下,饲料中添加益生菌可提高肠道消化酶活力,维持对虾肠道细菌平衡,增强对虾免疫能力,从而促进对虾生长。且复合益生菌的添加效果好于单一益生菌。这对于商品对虾饲料中益生菌的添加有重要的指导作用。对于不同养殖条件下,益生菌的添加效果还有待进一步研究。

致谢:衷心感谢何志刚师弟和湛江粤海饲料有限公司朱学芝博士、郑中轩厂长和董爱华先生在饲料制作和养殖过程中提供的帮助。

参考文献:

- [1] Balcázar J L, Blas I de, Ruiz-Zarzuela I, et al. Review: The role of probiotics in aquaculture [J]. Vet Microbiol, 2006, 114: 173-186.
- [2] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture [J]. Aquaculture, 1999, 180: 147-165.
- [3] Thompson F L, Abreu P C, Cavalli R. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae [J]. Aquaculture, 1999, 174: 139-153.
- [4] Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull J F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms [J]. Aquaculture, 2000, 191: 259-270.
- [5] Ziaei-Nejad S, Habibi Rezaei M, Takami G A, et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* [J]. Aquaculture, 2006, 252: 516-524.
- [6] Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, et al. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth [J]. Aquaculture, 1998, 167: 301-313.
- [7] Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, et al. Immunity enhancement on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11) [J]. Aquaculture, 2000, 191: 271-288.
- [8] Ochoa-Solano J L, Olmos-Soto J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds [J]. Food Microbiol, 2006, 23: 519-525.
- [9] AOAC, Official methods of analysis of official analytical chemists international [M]. 16th ed. Arlington, VA: Association of official chemists, 1995.
- [10] 刘玉梅, 朱谨刊. 对虾消化酶的研究 [J]. 海洋科学, 1984, 8(5): 144-159.
- [11] 李继秋. 对虾微生态制剂的研制与应用 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2003.
- [12] Hernández-López J, Gollas-Galvan T, Vargas-Albores F. Activation of the prophenoloxidase system of the brown *Penaeus californiensis* Holmes [J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 113C: 61-66.
- [13] Ellis A E. Lysozyme assays. [M] // Stolen J S, Fletcher T C, Anderson D P, et al. Techniques in Fish Immunology I. USA: SOS Publications, 1990: 101-103.
- [14] Gatesoupe F J, Arakawa T, Watanabe T. The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 1989, 83: 39-44.
- [15] Gatesoupe F J. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* [J]. Aquaculture, 1991, 96: 335-342.
- [16] 张锦华, 倪学勤, 何后军, 等. 不同益生菌对鲤鱼肠道蛋白酶、

- 淀粉酶活力的影响[J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(4): 297-310.
- [17] 沈锦玉, 沈智华, 尹文林, 等. 饲喂枯草芽孢杆菌对银鲫等水生动物肠道菌群及消化酶活性的影响[J]. 水产学报(增刊), 2004, 28: 297-310.
- [18] Moriarty D J W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. [J] Aquaculture, 1998, 164: 351-358.
- [19] 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, 11(6): 580-584.
- [20] Salinas I, Cuesta A, Esteban M. Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses [J]. Fish Shellfish Immunol, 2005, 19: 67-77.
- [21] Sung H H, Hsu S F, Chen, C K, et al. Relationship between disease outbreaks in cultured tigershrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation [J]. Aquaculture, 2001, 192: 101-110.
- [22] Vaseeharan B, Ramasamy P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Lett Appl Microbiol, 2003, 36: 83-87.
- [23] Atlas R M, Horowitz A, Krichevsky, M K, et al. Response of microbial populations to environmental disturbance [J]. Microbiol Ecol, 1991, 22: 249-256.
- [24] Dean-Ross D, Mills A L. Bacterial community structure and function along a heavy metal gradient [J]. Appl Environ Microbiol, 1989, 55: 2002-2009.
- [25] Geiselsbrecht A D, Herwig R P, Deming J W, et al. Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from puget sound sediments [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 3344-3349.
- [26] Tannock G W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics [J]. Int Dairy J, 1998, 8: 527-533.
- [27] Cristina P, Leticia A, Gerard C, et al. Effect of a size-based selection program on blood metabolites and immune response of *Litopenaeus vannamei* juveniles fed different dietary carbohydrate levels [J]. Aquaculture, 2004, 230: 405-416.
- [28] Gullian M, Thompson F, Rodriguez J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 2004, 233: 1-14.
- [29] 郭志勋, 李卓佳, 林黑着, 等. 芽孢杆菌对凡纳滨对虾生长及免疫的影响 [M]// 王衍亮. 可持续水产养殖—资源, 环境, 质量. 北京: 海洋出版社, 2004: 121-126.
- [30] 谭北平, 周歧存, 郑石轩, 等. β -1, 3/1, 6 葡聚糖制剂对凡纳滨对虾生长及免疫力的影响 [J]. 高技术通讯, 2003, 13(5): 73-77.
- [31] 王秀华, 宋晓玲, 黄健. 肽聚糖制剂对南美白对虾体液免疫因子的影响 [J]. 中国水产科学, 2004, 11(1): 26-30.
- [32] Chang C F, Su M S, Chen H Y, et al. Dietary β -1, 3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 15: 297-310.

Effects of dietary probiotic on growth, immunity and intestinal bacteria of juvenile *Litopenaeus vannamei*

HU Yi¹, TAN Bei-ping¹, MAI Kang-sen¹, AI Qing-hui¹, ZHENG Shi-xuan², CHENG Kai-min²

(1.The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2.Zhanjiang Yuehai Feed Co.Ltd., Zhanjiang 524017, China)

Abstract: A 10-week feeding experiment was conducted to evaluate the effects of single and compound probiotic on growth, digestive enzyme activities of intestine, bacteria of intestine and fecal, and immunity of juvenile *Litopenaeus vannamei* [initial body weight (0.11 ± 0.00)g]. Basic diet was made of fish meal and defatted soybean meal as main protein sources, menhaden fish oil and soybean lecithin oil as lipid source, wheat meal as the carbohydrate source. Shrimps were fed six different diets: control (nonsupplemented basic diet); or basic diet supplemented with 10^7 CFU/g *Bacillus licheniformis*; or with 10^7 CFU/g *B.subtilis*; or with 10^7 CFU/g compound probiotic xiale 333 (compound probiotic); or with 0.5×10^7 CFU/g *B.licheniformis* and 0.5×10^7 CFU/g *B.subtilis*; or with 0.33×10^7 CFU/g xiale 333 and 0.33×10^7 CFU/g *B.licheniformis* and 0.33×10^7 CFU/g *B.subtilis*, respectively. Each diet was randomly fed to triplicate groups of 300 shrimps reared in cement tank ($2.0 \text{ m} \times 2.0 \text{ m} \times 1.5 \text{ m}$). The water temperature was $(29 \pm 3)^\circ\text{C}$ and the salinity was 26 ± 3 during the experimental period. Results showed that shrimp fed compound probiotic showed relatively higher growth rate compared with those fed control diet ($P < 0.05$). However, no significant differences in growth were observed between single probiotic groups and the control group. The survival rates ranged from 76.83% to 85.67% and were not significantly different among dietary treatments ($P > 0.05$). Diet with supplementation of probiotic could improve the activities of protease and amylase in intestine, that is, the activities of amylase was significantly higher in shrimps fed the compound probiotic ($P < 0.05$) than those in shrimps fed control diet. The probiotic could significantly decrease the number of *Vibrio* bacteria in intestine and fecal and improve immune indicators of shrimp ($P < 0.05$) which were total hemocyte counts, serum protein concentration, serum lysozyme activity, serum phenoloxidase activity (PO), serum superoxide dismutase (SOD) and antioxidative capacity (T-AOC). The compound probiotic could significantly increase ($P < 0.05$) serum protein concentration and lysozyme activity compared with the control. However, no significant differences were observed between the single probiotic groups and the control group. The present results suggested that the diet supplemented with probiotic could improve growth and immunity of shrimp, and compound probiotic showed better effects than single one. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (2): 244-251]

Keywords: *Litopenaeus vannamei*; microbial additive; growth; digestive enzyme; immunity

Corresponding author: TAN Bei-ping. E-mail: bptan@ouc.edu.cn