

## 活性和热灭活原籍嗜冷杆菌 SE6 对斜带石斑鱼幼鱼生长性能和免疫功能的影响

夏汉钦<sup>1</sup>, 杨红玲<sup>2</sup>, 叶继丹<sup>1,2</sup>, 黄坤鹏<sup>1</sup>, 邹文超<sup>1</sup>, 孙云章<sup>1,2\*</sup>

(1. 集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 集美大学水产学院, 厦门市饲料检测与安全评价重点实验室, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 为探讨灭活益生菌在海水鱼养殖中的应用前景, 研究了饲料中添加活性和热灭活原籍嗜冷杆菌 SE6 对斜带石斑鱼幼鱼生长性能和血清免疫指标的影响。225 尾斜带石斑鱼幼鱼 [(14.6 ± 0.2) g] 被随机分成 3 组, 每组 3 个重复。对照组 T0 投喂基础饲料, 实验组 T1 和 T2 分别投喂添加 1.0 × 10<sup>8</sup> cfu/g 活性和热灭活嗜冷杆菌 SE6 的基础饲料, 饲喂期为 60 d。结果表明, 实验前期(0 ~ 30 d), 实验组 T1 和 T2 特定生长率和增重率均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 饵料系数均低于对照组, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 实验全期(0 ~ 60 d), 实验组 T1 和 T2 特定生长率和增重率均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 实验组饵料系数均下降, 其中实验组 T1 显著低于对照组 T0 ( $P < 0.05$ )。实验 30 d 时, 实验组 T1 和 T2 血清 IgM 和补体 C3 含量均高于对照组, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 60 d 时, 实验组 T1 的补体 C3 水平、总超氧化物歧化酶活力和 IgM 含量均显著高于对照组 T0 ( $P < 0.05$ ), 实验组 T2 的补体 C3 水平、T-SOD 活力、IgM 含量和溶菌酶活力也高于对照组, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。总之, 活性和热灭活嗜冷杆菌均可不同程度地促进石斑鱼生长, 降低饵料系数, 并能提高石斑鱼特异性和非特异性免疫功能。热灭活嗜冷杆菌的应用效果略低于活性菌, 但其具有安全性高、质量稳定、生产储藏容易等优势, 在海水鱼养殖中的应用值得深入研究。

**关键词:** 斜带石斑鱼; 嗜冷杆菌; 热灭活; 生长性能; 免疫功能

**中图分类号:** S 917.1

**文献标志码:** A

石斑鱼 (*Epinephelus* spp.) 是肉食性的海水经济鱼类, 其肉质鲜美, 营养丰富, 素有“海鸡肉”之称。近年来高密度集约化人工养殖导致石斑鱼病害频发, 其中链球菌 (*Streptococcus* sp.)<sup>[1-2]</sup>、假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)<sup>[2]</sup>、弧菌 (*Vibrio* sp.)<sup>[2-3]</sup> 等引起的细菌性疾病尤为突出, 造成了巨大的经济损失。目前, 生产上主要依靠大量使用抗生素和合成抗菌药物来预防和治疗鱼类细菌性疾病, 但由此引起的耐药菌株、药物残留和菌群失调等问题受到日益关注。益生菌制剂因其效果明显、绿色环保, 被视为抗菌药物的有效替代品, 已广泛应用于水产养殖业。目前, 针对石斑鱼的

益生菌已有一些报道, 如乳酸杆菌 (*Lactobacillus* sp.)<sup>[4-5]</sup>、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[6]</sup>、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)<sup>[7]</sup> 和光合细菌 (*Photosynthetic bacteria*)<sup>[8]</sup> 等。这些益生菌均是以活菌的形式添加到饵料或养殖水体中, 但是活菌制剂存在一些潜在安全隐患, 且生产保存困难, 质量稳定性不高。研究表明, 某些灭活益生菌不仅克服了上述不利因素, 同时也具有活性益生菌所具有的功能, 如: 抑制动物肠道病原菌<sup>[9]</sup>、激活机体的免疫应答<sup>[10]</sup> 以及提高动物生长性能<sup>[11]</sup> 等。但是, 灭活益生菌在水产养殖方面的应用研究较少, 在石斑鱼养殖中的应用目前尚未见报道。

收稿日期: 2012-07-07 修回日期: 2012-10-23

资助项目: 国家自然科学基金项目(30600461); 福建省高校杰出青年科研人才计划项目(JA10183); 集美大学李尚大基金资助项目(ZC2011010); 集美大学创新团队基金项目(2011A001)

通信作者: 孙云章, E-mail: sunyunzhang@yahoo.com.cn

本实验室前期研究表明,嗜冷杆菌 (*Psychrobacter* sp.) SE6 是斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 幼鱼肠道的优势菌,能抑制多株病原菌的生长<sup>[12]</sup>。将活菌添加到饵料中可以显著提高斜带石斑鱼幼鱼的饵料利用率,增强动物的免疫功能<sup>[13]</sup>。本研究比较了活性和热灭活嗜冷杆菌 SE6 对斜带石斑鱼幼鱼生长性能和免疫功能的影响,旨在为灭活嗜冷杆菌 SE6 作为益生菌在海水鱼养殖中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细菌培养

嗜冷杆菌 SE6 分离自健康斜带石斑鱼幼鱼肠道,革兰氏染色呈阴性。按照 5% 的接种量接种于已灭菌的普通营养肉汤培养基,28 ℃ 摇床培养 24 h (130 r/min)。培养好的菌液于 5 000 r/min 离心 10 min,弃去上清,用 PBS 洗涤沉淀 3 次,调整菌液浓度为  $1.0 \times 10^{10}$  cfu/mL,4 ℃ 下保存。细菌热灭活的方法参照 Salinas 等<sup>[14]</sup>的方法,在 95 ℃ 下水浴 1 h,并用平板菌落计数法检测灭活效果。

### 1.2 饲料配制

以鱼粉、豆粕、鱼油和面粉为主要原料,配制蛋白含量为 50.63%,粗脂肪为 10.32% 的基础饲料。实验原料(预混料、鱼油除外)用锤式粉碎机粉碎,过 60 目网筛,105 ℃ 下加热 1 h 以杀灭病原菌。基础饲料配方及营养水平见表 1。实验组 T1 和 T2 在基础饲料的基础上分别添加  $1.0 \times 10^8$  cfu/g 活性或热灭活嗜冷杆菌 SE6。将 SE6 的浓缩菌液分别加入适量的无菌水混匀,然后将菌液喷洒在已混匀的饲料原料中,喷洒过程中不停搅拌饲料,使菌液混合均匀。用 CD4 × 1TS 多功能催化剂成型机制成直径为 2.5 mm 的颗粒饲料,室温下风干,装入自封袋,-20 ℃ 保存备用。

### 1.3 实验设计

225 尾健康斜带石斑鱼幼鱼购于漳浦某海水鱼育苗场,经甲醛溶液(200 mg/L)消毒 30 min 后,暂养于集美大学海水养殖场室内 2 m × 1 m × 1.5 m 的水缸中。实验鱼暂养期间投喂基础饲料,暂养 15 d 后分缸。分缸前,禁食 24 h,从暂养缸中随机挑选规格相近的石斑鱼幼鱼,按每缸 25 尾鱼(平均体质量为 14.6 g)随机分配到 9 个 75 cm × 45 cm × 50 cm 的玻璃缸中,3 个玻璃缸为

一个处理,共 1 个对照组(T0)和 2 个实验组(T1 和 T2)。对照组饲喂不含益生菌的基础饲料,实验组 T1 和 T2 分别饲喂添加活性或热灭活嗜冷杆菌 SE6 的饲料。每天饱食投喂两次(8:30 和 18:30),投料 30 min 后收集各个网箱中的剩余饲料,60 ℃ 烘干称重,以确定饲料摄入量。收集完剩余饲料后,吸去残饵和粪便。每天换水 2 次,换水量约为养殖水体的 3/5,观察鱼体摄食情况和健康状况,记录死亡鱼的数目和重量。养殖周期为 60 d。

表 1 基础饲料配方以及营养组成(风干基础料)

Tab.1 Ingredients and proximate nutrient composition of basal diet(air-dry basis) %

原料 ingredients	含量 content
鱼粉 fish meal	63
豆粕 soybean meal	14
虾粉 shrimp head meal	2
面粉 wheat meal	11.5
鱼油 fish oil	4
卵磷脂 lecithin	2
多维 vitamin premix	1
多矿 mineral premix	1
氯化胆碱 choline chloride	0.5
Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1
合计 total	100
营养水平 nutrients level	
干物质 dry matter	94.49
粗蛋白 crude protein	50.63
粗脂肪 crude fat	10.32
粗灰分 ash	9.86

注:多维和多矿均有厦门百穗行科技股份有限公司提供。

Notes: Vitamin and mineral premix were provided by Xiamen Baisuihang Science and Technology Company Limited.

### 1.4 生长指标分析

分别于实验第 30 天和第 60 天对每缸斜带石斑鱼进行称重,计算增重率(weight gain rate, WGR)、特定生长率(specific growth rate, SGR)、饵料系数(feed conversion rate, FCR)、肝体指数(hepatosomatic index, HSI)、肥满度(condition factor, CF)。公式如下:

$$\text{增重率}(WGR, \%) = 100 \times (W_t - W_o) / W_o;$$

$$\text{特定生长率}(SGR, \%) = (\ln W_t - \ln W_o) / T \times 100;$$

$$\text{饵料系数}(FCR) = W_f / (W_t - W_o);$$

肝体指数( $HSI, \%$ ) =  $100 \times W_g / W_s$ ;

肥满度( $CF, \%$ ) =  $100 \times W_f / L^3$

式中,  $W_f$  为平均终末体质量(g);  $W_o$  为平均初始体质量(g);  $W_f$  为平均每尾鱼饲料摄入总量(g);  $W_g$  为样品鱼肝脏重(g);  $W_s$  为样品鱼体质量(g);  $T$  为饲养天数(d);  $L$  为样品鱼全长(cm)。

### 1.5 血清免疫指标的测定

实验 30 d 和 60 d 分别从每个鱼缸中随机捞取 2 尾鱼(每组 6 尾), 丁香酚麻醉后, 用一次性无菌注射器从石斑鱼尾部静脉抽血, 每尾鱼血液单独放于 1.5 mL 离心管, 4 °C 冰箱静置 24 h 后, 于 4 °C 温度下以 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上层血清, 保存在 -80 °C 冰箱中, 用于测定溶菌酶(LZM)活力、T-SOD 活力、补体 C3 和 IgM 含量, 上述指标的测定均按照南京建成试剂盒说明书进行。

### 1.6 数据统计分析

实验数据采用 Microsoft Excel 2003 作初步处理, 用 SPSS 17.0 软件分析处理, 各组实验的差异进行(One-Way ANOVA)方差分析和 Duncan 氏多重比较。实验结果用平均值 ± 标准差

(mean ± SD)表示,  $P < 0.05$  时表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 活性和灭活嗜冷杆菌 SE6 斜带对石斑鱼生长性能的影响

如表 2 所示, 实验全期各组存活率均为 100%, 活性和热灭活嗜冷杆菌 SE6 对斜带石斑鱼幼鱼生长性能有一定促进作用。实验前期(0~30 d), 实验组 T1 和 T2 的平均增重与对照组相比分别提高 16.18% 和 9.39%, 但差异不显著( $P > 0.05$ ); 实验组 T1 和 T2 特定生长率均显著高于对照组, 分别提高 10.07% 和 6.72% ( $P < 0.05$ ); 就增重率而言, 实验组均显著高于对照组, T1 组和 T2 组分别增加 10.93% 和 10.02% ( $P < 0.05$ ); 与对照组 T0 相比, 实验组 T1 和 T2 饵料系数分别降低了 10.68% 和 4.85%, 但差异不显著( $P > 0.05$ )。实验 30 d 时 T1 组的肝体指数显著低于对照组 T0 和实验组 T2 ( $P < 0.05$ ), 肥满度分别提高 6.07% 和 5.91%, 但差异不显著( $P > 0.05$ )。

表 2 活性和热灭活嗜冷杆菌对斜带石斑鱼生长性能的影响

Tab. 2 Effect of alive and heat-inactivated *Psychrobacter* sp. on growth performance of grouper *E. coioides*

时间/d period	项目 items	T0	T1	T2
0~30	平均增重/g AWG	17.99 ± 1.06	20.24 ± 1.56	19.68 ± 2.08
	特定生长率/% SGR	2.68 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.95 ± 0.07 <sup>b</sup>	2.86 ± 0.21 <sup>b</sup>
	增重率/% WGR	123.50 ± 7.23 <sup>a</sup>	137.79 ± 4.21 <sup>b</sup>	135.88 ± 6.30 <sup>b</sup>
	饵料系数 FCR	1.03 ± 0.07	0.92 ± 0.07	0.98 ± 0.08
	存活率/% SR	100	100	100
	肝体指数/% HSI	2.65 ± 0.18 <sup>b</sup>	2.22 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.79 ± 0.15 <sup>b</sup>
	肥满度/% CF	2.47 ± 0.22	2.54 ± 0.25	2.62 ± 0.25
0~60	平均增重/g AWG	28.65 ± 0.83 <sup>a</sup>	31.92 ± 1.24 <sup>b</sup>	31.57 ± 2.26 <sup>b</sup>
	特定生长率/% SGR	2.34 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.38 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.39 ± 0.03 <sup>b</sup>
	增重率/% WGR	194.92 ± 8.20 <sup>a</sup>	227.47 ± 1.70 <sup>b</sup>	217.42 ± 9.72 <sup>b</sup>
	饵料系数 FCR	1.23 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.18 ± 0.04 <sup>ab</sup>
	存活率/% SR	100	100	100
	肝体指数/% HSI	1.57 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.31 ± 0.21 <sup>b</sup>	1.56 ± 0.19 <sup>a</sup>
	肥满度/% CF	2.40 ± 0.25	2.45 ± 0.19	2.44 ± 0.14

注: 同行标注不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Notes: Values with different superscripts in the same row denoting significant difference ( $P < 0.05$ ).

实验全期(0~60 d), 实验组 T1 和 T2 的平均增重均显著性高于对照组 T0 ( $P < 0.05$ ), 分别提高了 11.41% 和 10.19%; 实验组 T1 和 T2 的特定生长率显著高于 T0 对照组 ( $P < 0.05$ ),

分别提高 17.09% 和 21.37%; 实验组 T1 和 T2 的增重率也显著高于对照组, 分别提高 16.69% 和 11.54% ( $P < 0.05$ ); 实验组饵料系数均低于对照组, 其中, T1 组显著降低 9.76% ( $P <$

0.05), T2 降低了 4.07%, 但无显著差异 ( $P > 0.05$ )。实验组的肝体指数和对照组相比均有所降低, 实验组 T1 显著低于对照组 T0 ( $P < 0.05$ )。实验组 T1 和 T2 的肥满度和对照组相比有所增加, 但差异不显著。

## 2.2 活性和热灭活嗜冷杆菌 SE6 对斜带石斑鱼血清补体 C3 的影响

由图 1 所示, 实验 30 d 时, 实验组 T1 和 T2 血清 C3 水平与对照组相比分别提高了 10.68% 和 14.47%, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。实验 60 d 时, 与对照组相比, T1 组血清 C3 水平显著提高了 31.65% ( $P < 0.05$ ), T2 组提高了 10.52%, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。说明活性和热灭活嗜冷杆菌均能提高石斑鱼血清中补体 C3 水平含量, 但热灭活嗜冷杆菌没有活性嗜冷杆菌效果明显。

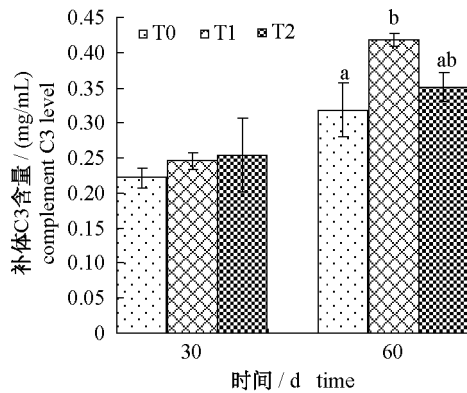


图 1 斜带石斑鱼血清补体 C3 水平

柱状图上方标注不同小写字母表示各组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

Fig. 1 Complement C3 levels in the serum of grouper *E. coioides*

Values with different superscripts above the histogram denoting significant difference ( $P < 0.05$ ), the same as below.

## 2.3 活性和热灭活嗜冷杆菌 SE6 对斜带石斑鱼血清 T-SOD 活力的影响

由图 2 可知, 实验 30 d 时, 实验组 T1 血清 T-SOD 活力比对照组 T0 下降了 10.47%, 实验组 T2 比对照组 T0 提高了 10.26%; 在第 60 天时, 实验组血清 T-SOD 活力均高于对照组 T0, T1 和 T2 组分别提高了 62.65% 和 33.33%, 其中 T1 显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

## 2.4 活性和热灭活嗜冷杆菌 SE6 对斜带石斑鱼血清溶菌酶活力的影响

由图 3 可知, 饵料中添加活性和热灭活嗜

冷杆菌对石斑鱼幼鱼血清溶菌酶活力有一定的影响。30 d 时, 实验组 T1 和 T2 血清溶菌酶活力与对照组 T0 相比差异不显著, 和 T0 组相比, T1 组略低于 T0 组, T2 组提高了 13.76%; 60 d 时, 实验组 T1 和 T2 血清溶菌酶活力分别比对照组 T0 提高了 35.48% 和 12.90%, 但差异不显著。

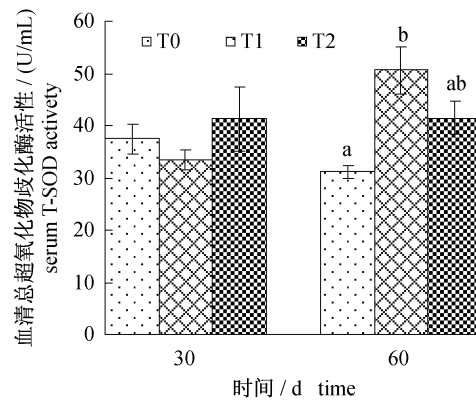


图 2 斜带石斑鱼血清 T-SOD 活力

Fig. 2 Total SOD activities in the serum of grouper *E. coioides*

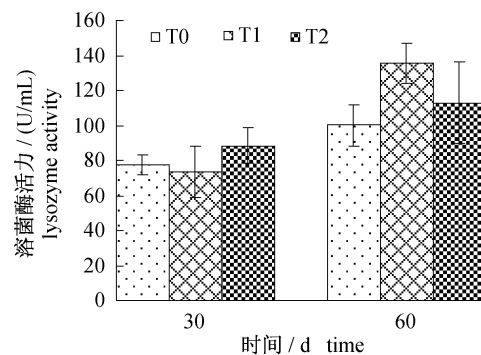


图 3 斜带石斑鱼血清溶菌酶活力

Fig. 3 Lysozyme activities in the serum of grouper *E. coioides*

## 2.5 活性和热灭活嗜冷杆菌 SE6 对斜带石斑鱼血清 IgM 水平的影响

从图 4 可以看出, 在第 30 天时, 实验组 T1 和 T2 血清 IgM 含量与对照组相比分别提高了 17.39% 和 26.09%, 但差异不显著。实验 60 d 时, T1 组和 T2 组血清 IgM 含量显著高于 T0 组 ( $P < 0.05$ ), 分别提高 53.84% 和 46.15%, 提示饵料中添加活性和热灭活嗜冷杆菌能显著提高石斑鱼血清 IgM 含量。

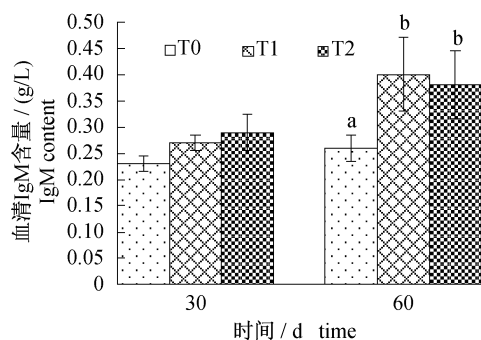


图4 斜带石斑鱼血清 IgM 免疫球蛋白含量

Fig. 4 The IgM content in the serum of grouper *E. coioides*

### 3 讨论

#### 3.1 活性和热灭活嗜冷杆菌对斜带石斑鱼生长性能的影响

Merrifield 等<sup>[15]</sup>指出,水产养殖中应用的益生菌为活菌、死菌或微生物细胞成分,通过添加于饵料或水体发挥功效,提高宿主的抗病力和生长性能。目前,活性益生菌提高水产动物生产性能的报道有很多。例如,芽孢杆菌能提高斑节对虾 (*Penaeus monodon*)<sup>[16]</sup>、河鲈 (*Perca fluviatilis*)<sup>[17]</sup> 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)<sup>[18]</sup> 等的增重率;乳酸杆菌能够提高尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 仔鱼<sup>[19]</sup> 和日本比目鱼 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[20]</sup> 的生长。但是,有关灭活益生菌提高鱼类生长性能的研究报道极少。Hoseinifar 等<sup>[21]</sup> 发现热灭活酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 可促进欧洲鳇 (*Huso huso*) 幼鱼的生长,并提高饲料利用效率。本研究中,实验全期 (0~60 d) 两实验组的增重率和特定生长率均显著高于对照组,而饵料系数均低于对照组,提示活性和热灭活嗜冷杆菌均能促进斜带石斑鱼幼鱼的生长,提高饲料利用效率。

研究表明,活性益生菌能提高鱼类消化酶,如蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶的活性,有利于肠道内营养物质的消化吸收,进而促进鱼类生长<sup>[8,22-23]</sup>。Sun 等<sup>[13]</sup> 研究发现,嗜冷杆菌 SE6 体外实验不产生蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶等外源性消化酶类,但可以诱导斜带石斑鱼幼鱼肠道蛋白酶和淀粉酶的分泌,进而促进石斑鱼的生长,显著降低饵料系数。因此,我们推断本实验中活性嗜冷杆菌提高石斑鱼生长可能与其酶活诱导作用有关。但是,

灭活益生菌促进石斑鱼生长的机制目前尚不清楚。究其原因,可能有两点:首先,嗜冷杆菌经热处理后,其菌体细胞内的糖类和蛋白质等营养物质被石斑鱼所消化利用。其次,灭活嗜冷杆菌可以改善石斑鱼的健康状况,也有利于其生长。但是,灭活嗜冷杆菌能否诱导鱼类消化酶的分泌,尚有待进一步的研究。

#### 3.2 活性和热灭活嗜冷杆菌对斜带石斑鱼免疫功能的影响

研究表明,活性和灭活益生菌均可增强鱼类的非特异性免疫功能,但活菌效果通常优于灭活菌<sup>[24-26]</sup>。Panigrahi 等<sup>[24]</sup> 报道,饲喂添加活性和灭活鼠李糖乳酸杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 的饵料 20 d 时,虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 血浆中碱性磷酸酶活力均显著提高,且活菌组高于灭活菌组。Taoka 等<sup>[25]</sup> 发现饵料中添加活性和灭活益生菌制剂 (含枯草芽孢杆菌、乳酸菌嗜酸乳杆菌、酪酸梭菌和酿酒酵母等) 均能提高尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 血浆溶菌酶活性、嗜中性粒细胞迁移率和血浆的杀菌活性,且活菌作用效果更佳。Pan 等<sup>[26]</sup> 发现饲料中添加活性和热灭活的酪酸梭菌 (*Clostridium butyricum*) CB2 均可以显著提高鳊 (*Miichthys miui*) 血清和肠粘膜中溶菌酶活力,并且活菌组具有更强的效果。与前人研究结果一致,本实验中,饲喂活性嗜冷杆菌 60 d 时显著提高了斜带石斑鱼血清中补体 C3 水平和 T-SOD 活性,灭活菌组中补体 C3 和溶菌酶活力与对照组相比也有所增加,但差异不显著。Lazado 等<sup>[27]</sup> 体外实验也得到类似结果:活性和热灭活嗜冷杆菌 GP12 均能在体外培养条件下诱导大西洋鲑 (*Gadus morhua*) 头肾吞噬细胞 g 型溶菌酶、非特异性细胞毒性细胞受体蛋白-1 和促炎性细胞因子的表达,且活菌的诱导效果优于灭活菌。

研究表明,活性和灭活益生菌除能增强鱼类的非特异性免疫功能外,也能提高鱼类特异性免疫功能<sup>[28]</sup>。在硬骨鱼类中,IgM 由 B 细胞分泌,存在于血液、胆汁和其它体液中,是特异性免疫最重要的免疫介质<sup>[29]</sup>。Sun 等<sup>[13]</sup> 发现,饲喂活性嗜冷杆菌 30 d 和 60 d 后斜带石斑鱼幼鱼血清中 IgM 水平均上升。Pan 等<sup>[26]</sup> 也发现活性和灭活酪酸梭菌 CB2 均能提高鳊的血清和肠粘膜中总免疫球蛋白水平,但活性益生菌组高于热灭活益

生菌组。与上述报道一致,本研究结果显示饲喂活性和热灭活嗜冷杆菌 60 d 均能显著提高石斑鱼幼鱼血清 IgM 水平,且活菌组作用效果略强于灭活菌组。总之,热灭活嗜冷杆菌对石斑鱼特异性和非特异性免疫功能的促进效果均低于活性嗜冷杆菌,产生这种差异的具体机制目前尚不清楚,但可能与各自的免疫调节介导途径不同有关<sup>[30]</sup>。

综上所述,热灭活嗜冷杆菌能在一定程度上促进斜带石斑鱼幼鱼的生长,提高饲料利用率,增强石斑鱼免疫功能。虽然总体应用效果略低于活性菌,但鉴于灭活菌具有安全性高、生产储藏容易和质量稳定等优势,在海水鱼养殖中的应用值得深入研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Harikrishnan R, Kim M C, Kim J S, *et al.* Immunomodulatory effect of sodium alginate enriched diet in kelp grouper, *Epinephelus bruneus*, against *Streptococcus iniae* [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(2) : 543 – 549.
- [ 2 ] Punitha S M J, Babu M M, Sivaram V, *et al.* Immunostimulating influence of herbal biomedicines on nonspecific immunity in grouper, *Epinephelus tauvina*, juvenile against *Vibrio harveyi* infection [ J ]. *Aquaculture International*, 2008, 16(6) : 511 – 523.
- [ 3 ] Cui M, Zhang Q, Yao Z, *et al.* Immunoglobulin M gene expression analysis of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, following heat shock and *Vibrio alginolyticus* challenge [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(6) : 1060 – 1065.
- [ 4 ] Son V M, Chang C C, Wu M C, *et al.* Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides* [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(5) : 691 – 698.
- [ 5 ] Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo M S. *Lactobacillus sakei* BK19 enriched diet enhances the immunity status and disease resistance to streptococcosis infection in kelp grouper, *Epinephelus bruneus* [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(6) : 1037 – 1043.
- [ 6 ] Chiu C H, Cheng C H, Gua W R, *et al.* Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides* [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(6) : 1053 – 1059.
- [ 7 ] Sun Y Z, Yang H L, Ma R L, *et al.* Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides* [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(5) : 803 – 809.
- [ 8 ] Chang F I, Pan C H. Effect of probiotics on growth, survival and digestive enzyme performance of grouper, *Epinephelus coioides* [ J ]. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*, 2009, 36(1) : 142 – 143.
- [ 9 ] Irianto A, Austin B. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [ J ]. *Journal of Fish Diseases*, 2003, 26(1) : 59 – 62.
- [ 10 ] Díaz-Rosales P, Salinas I, Rodríguez A, *et al.* Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(4) : 482 – 492.
- [ 11 ] Tung H T, Koshio S, Traifalgar R F, *et al.* Effects of dietary heat-killed *Lactobacillus plantarum* on larval and post-larval kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Bate [ J ]. *Journal of the world aquaculture society*, 2010, 41(1) : 16 – 27.
- [ 12 ] Sun Y Z, Yang H L, Ling Z C, *et al.* Gut microbiota of fast and slow growing grouper, *Epinephelus coioides* [ J ]. *African Journal of Microbiology Research*, 2009, 3(11) : 713 – 720.
- [ 13 ] Sun Y Z, Yang H L, Ma R L, *et al.* Effect of dietary administration of *Psychrobacter* sp. on the growth, feed utilization, digestive enzymes and immune responses of grouper, *Epinephelus coioides* [ J ]. *Aquaculture Nutrition*, 2011, 17(3) : e733 – e740.
- [ 14 ] Salinas I, Díaz-Rosales P, Cuesta A, *et al.* Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish, *Sparus aurata* L [ J ]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 111(3–4) : 279 – 286.
- [ 15 ] Merrifield D L, Dimitroglou A, Foey A, *et al.* The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids [ J ]. *Aquaculture*, 2010, 302(1–2) : 1 – 18.
- [ 16 ] Sirirat R, Aroon T, Fast A W, *et al.* Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp, *Penaeus monodon* fed a *Bacillus*

- probiotic[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 55(2):169-173.
- [17] Mandiki S N M, Milla S, Wang N, *et al.* Effects of probiotic bacteria on growth parameters and immune defence in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*, larvae under intensive culture conditions [J]. Aquaculture Research, 2011, 42(5):693-703.
- [18] 沈文英, 李卫芬, 梁权, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对草鱼生长性能、免疫和抗氧化功能的影响 [J]. 动物营养学报, 2011, 23(5):881-886.
- [19] Goncalves A T, Maita M, Futami K, *et al.* Effects of a probiotic bacterial *Lactobacillus rhamnosus* dietary supplement on the crowding stress response of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Fisheries Science, 2011, 77(4):633-642.
- [20] Kim M S, Moon S W, Lee Y D, *et al.* Effect of citrus fermented by *Lactococcus lactis* W-44 Isolated from Kimchi on growth of cultured flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. The Korean Journal of Microbiology, 2007, 43(2):124-129.
- [21] Hoseinifar S H, Mirvaghefi A, Merrifield D L. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga, *Huso huso* [J]. Aquaculture, 2011, 318(1-2):90-94.
- [22] ZiaeiNejad S, Rezaei M H, 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(2-4):516-524.
- [23] Suzer C, Coban D, Kamaci H O, *et al.* *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae; Effects on growth performance and digestive enzyme activities [J]. Aquaculture, 2008, 280(1-4):140-145.
- [24] Panigrahi A, Kiron V, Satoh S, *et al.* Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. Fish Physiology Biochemistry, 2010, 36(4):969-977.
- [25] Taoka Y, Maeda H, Jo J Y, *et al.* Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. Fisheries Science, 2006, 72:755-766.
- [26] Pan X, Wu T, Song Z, *et al.* Immune responses and enhanced disease resistance in Chinese drum, *Miichthys miiuy* (Basilewsky), after oral administration of live or dead cells of *Clostridium butyrium* CB2 [J]. Journal of Fish Diseases, 2008, 31(9):679-686.
- [27] Lazado C C, Caipang C M A, Gallage S, *et al.* Expression profiles of genes associated with immune response and oxidative stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* head kidney leukocytes modulated by live and heat-inactivated intestinal bacteria [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 155(3):249-255.
- [28] Salinas I, Abelli L, Bertoni F, *et al.* Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(1-2):114-123.
- [29] Rathore G, Swaminathan T R, Sood N, *et al.* Affinity purification and partial characterization of IgM-like immunoglobulins of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2006, 44(12):1018-1021.
- [30] Nayak S K. Probiotics and immunity: A fish perspective [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(1):2-14.

## Effect of viable and heat-inactivated *Psychrobacter* sp. SE6 on growth performance and immune function of juvenile grouper (*Epinephelus coioides*)

XIA Hanqin<sup>1</sup>, YANG Hongling<sup>2</sup>, YE Jidan<sup>1,2</sup>, HUANG Kunpeng<sup>1</sup>, ZOU Wenchao<sup>1</sup>, SUN Yunzhang<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture,

Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Xiamen Key Laboratory of Feed Detection and Safety Evaluation, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** To illustrate the application prospect of nonviable probiotics in marine fish aquaculture, the present study evaluated the effect of dietary administration of viable and heat-inactivated autochthonous probiotic *Psychrobacter* sp. SE6 on the growth performance and serum immune parameters of grouper (*Epinephelus coioides*). 225 juvenile fish with an initial weight of  $(14.6 \pm 0.2)$  g were randomly divided into 3 groups (groups T0, T1 and T2) with 3 replicates per group and 25 fish per replicate. The fish were fed for 60 d with basal diet containing 0 cfu/g (control group T0),  $1 \times 10^8$  cfu/g viable *Psychrobacter* sp. SE6 (group T1) and  $1 \times 10^8$  cfu/g heat-inactivated *Psychrobacter* sp. SE6 (group T2), respectively. The results showed that, in the early period (0–30 d), the weight gain rate (WGR) and specific growth ratio (SGR) of the two probiotic groups were significantly higher than the control group ( $P < 0.05$ ), and the feed conversion ratios (FCR) of two probiotic groups were lower than those of the control group. During the whole experimental period (0–60 d), the WGR and SGR of the two experimental groups were significantly higher than those of the control group ( $P < 0.05$ ), the FCR of the two experimental groups was lower than that of the control group, and the FCR of group T1 was significantly lower than that of the control ( $P < 0.05$ ). At day 30, the serum immunoglobulin M (IgM) and complement C3 contents in the experimental groups were higher than the control group, but not significantly ( $P > 0.05$ ). At day 60, the serum T-SOD activity, complement C3 and IgM contents in the group T1 were significantly higher than those of the control ( $P < 0.05$ ), while the activities of T-SOD and lysozyme, complement C3 and IgM contents in the group T2 were higher than those of the control, but not significantly ( $P > 0.05$ ). In conclusion, both the viable and heat-inactivated *Psychrobacter* sp. SE6 played positive roles in promoting the growth performance and feed utilization, improving specific and nonspecific immune functions in *E. coioides*. Although better effect was observed in the viable probiotic group, the heat-inactivated probiotics have several advantages, such as high safety, stable quality and convenient processing and storage. Therefore, further study is needed to evaluate the application of heat-inactivated probiotics in marine fish aquaculture.

**Key words:** *Epinephelus coioides*; *Psychrobacter* sp.; heat-inactivated probiotic; growth performance; immune function

**Corresponding author:** SUN Yunzhang. E-mail: sunyunzhang@yahoo.com.cn