

仿刺参肠道潜在益生菌对稚参生长、免疫及抗病力的影响

周慧慧, 马洪明*, 张文兵, 徐玮, 刘付志国, 麦康森

(中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:以稚参期仿刺参为研究对象,探讨了分离自仿刺参肠道的潜在益生菌在稚参养殖中的应用效果。采用16S rDNA序列分析法将3株潜在益生菌分别鉴定为*Bacillus* sp. (GSC-1)、*Bacillus* sp. (GSC-2)和*Enterococcus* sp. (GSC-3)。分别以 10^3 、 10^5 或 10^7 CFU/mL的GSC-1、GSC-2、GSC-3或灿烂弧菌浸浴稚参以检验潜在益生菌对稚参期仿刺参的安全性,7 d后各潜在益生菌浸浴组的稚参成活率均高于同浓度的灿烂弧菌处理组;GSC-1和GSC-3在实验浓度下对稚参成活率无显著影响($P > 0.05$),可作为稚参的潜在益生菌;而 10^7 CFU/mL GSC-2浸浴组稚参的成活率显著低于对照组($P < 0.05$),因此GSC-2不适合作为稚参的潜在益生菌。将潜在益生菌GSC-1和GSC-3以 10^9 CFU/g的比例与鼠尾藻粉混合后饲养稚参20 d,潜在益生菌处理组的稚参成活率、特定生长率和变色率均高于对照组,其中GSC-1处理组稚参的成活率和变色率显著提高($P < 0.05$),GSC-3处理组稚参的成活率和特定生长率显著提高($P < 0.05$);与对照组相比,潜在益生菌GSC-1和GSC-3均有效增加了稚参的总菌数($P < 0.05$),GSC-1还有效降低了稚参的弧菌数($P < 0.05$);潜在益生菌GSC-1和GSC-3均可显著提高稚参体组织中的酚氧化酶和溶菌酶活力($P < 0.05$),GSC-1亦显著提高了其酸性磷酸酶和超氧化物歧化酶活力($P < 0.05$);GSC-1和GSC-3处理组稚参的抗灿烂弧菌感染能力均高于对照组,其中GSC-3显著降低了灿烂弧菌攻毒后稚参的死亡率($P < 0.05$)。综上所述,潜在益生菌GSC-1和GSC-3对稚参期刺参安全无毒,能够促进稚参的健康生长并提高其抗病能力,因而GSC-1和GSC-3均可作为益生菌应用于稚参养殖中。

关键词:稚参;肠道益生菌;生长;免疫

中图分类号: S 963

文献标识码: A

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)俗称“刺参”,是我国20多种可食用海参中营养和药用价值最高的品种。近年来,随着刺参需求的急剧增加和野生刺参资源的日益减少,刺参养殖业迅速兴起,我国北方沿海形成了继海带、对虾、扇贝、海水鱼养殖之后的第五次海水养殖浪潮,产生了巨大的经济效益^[1]。人工育苗技术的完善对刺参养殖业的发展具有重大的意义,而变态附着后稚参的大量死亡仍是制约刺参苗种生产数量的瓶颈,尤其是5 mm以内的稚参,附着后一个月内的成活率仅为30%左右^[2-3]。

研究表明,造成稚参大规模死亡的主要原因是以弧菌(*Vibrio* spp.)为主要病原菌的多种病原感染引起的疾病,其中以细菌性溃烂病和化板症最为严重,均可在短期内导致全池稚参覆灭^[4-6]。传统的疾病防治方法以使用抗生素为主,容易产生抗药性病原菌,此抗性还可通过质粒和噬菌体对现有基因的改变或者细胞间遗传物质的传递转移给对人类健康有害的菌株^[7-8]。益生菌作为一种高效和安全的替代途径受到研究和产业界越来越多的关注^[9-14]。

Kozasa^[15]首次将益生菌应用到水产养殖中,

收稿日期:2010-01-19 修回日期:2010-03-24

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA100313)

通讯作者:马洪明, Tel:0532-82031943, E-mail:mahongm@ouc.edu.cn

此后这种绿色的添加剂迅速发展。大量的研究报告和生产实践证实,益生菌的确为水产养殖中传统化学药物的良好替代选择^[9,11,14,16-17]。本研究对分离自刺参肠道的潜在益生菌进行了菌种鉴定和毒性检验,并研究了其对稚参生长和免疫的影响,以期为利用益生菌防治稚参弧菌性疾病提供有价值的益生菌株。

1 材料与方法

1.1 潜在益生菌的鉴定

实验菌株由中国水产科学研究院黄海水产研究所海水鱼类养殖与设施渔业研究室分离提供,本实验室鉴定保存。3株潜在益生菌均分离自健康仿刺参肠道,在平板抑菌实验中产生明显的抑菌圈。采用16S rDNA序列分析法对3株潜在益生菌进行鉴定,并将其基因序列提交至GenBank核苷酸序列数据库。将菌株的16S rDNA基因序列与从GenBank数据库中获得的菌株16S rDNA基因序列用ClustalX(1.8)软件进行多序列比对(multiple alignments),并用系统发生分析软件包MEGA 4.0进行统计和聚类分析。用Kimura双参数模型计算各序列分化距离,邻接法(neighbor joining methods)获得分支系统树并通过自检分析(bootstrap)进行置信度检测,自检数据集为1 000次。

1.2 潜在益生菌的毒性检验

选取变色完全的健康稚参(均重0.05 g,体长1~1.5 cm)暂养在39个盛有5 L自然海水的玻璃缸内,每个缸内放20头稚参,投喂鼠尾藻粉暂养7 d。暂养结束后将39个玻璃缸随机分成13组,其中12个组分别加入不同浓度(10^3 、 10^5 或 10^7 CFU/mL)的潜在益生菌GSC-1、GSC-2、GSC-3或灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*),另外1组作空白对照,每组3个重复。每天换水1次,换水后添加新鲜的细菌悬液,浸浴7 d后分别统计各组稚参的成活率。实验用鼠尾藻粉由育苗场自制提供,采集自然海域的鼠尾藻,洗净烘干后粉碎,过100目筛备用。

1.3 潜在益生菌对稚参生长、免疫及抗病力的影响

以变态附着后尚未变色稚参(均重0.01 g,体长1~2 mm,俗称“小白点”)为研究对象,将筛选出的安全潜在益生菌株分别与鼠尾藻粉混合后

投喂稚参,研究潜在益生菌在生产条件下对稚参生长、变色、肠道菌群、疾病抵抗力以及免疫酶指标的影响。

实验饲料的制备 以添加0.1% NaCl的TSB(Tryptic Soy Broth)为培养基,摇床(200 r/min,28 ℃)过夜培养潜在益生菌,10 000 r/min离心10 min,0.85%生理盐水洗两次,制成较高浓度的菌悬液(20%甘油生理盐水)保存待用。稀释平板法计数待用菌液浓度。

天然鼠尾藻粉为附着稚参的开口饵料,投喂前1 h用100目网袋搓洗藻粉,然后将细菌菌悬液与藻粉溶液以 10^9 CFU/g比例混合投喂并充气搅拌。

实验设计 实验设置安全潜在益生菌处理组和对照处理组,每个处理6个重复,每个重复1 000头稚参。装有100 L自然海水的塑料桶(圆柱形,底面直径60 cm,高60 cm)内放置40 cm×30 cm的洁净波纹板4块。实验水温20~23 ℃,pH:7.9~8.4,充气。每天早7:00、晚19:00换水两次,换水后停气投喂,日投喂量为体重的10%,投喂1 h后再继续充气。每隔2天清底一次。

样品采集 经过20 d投喂,50%左右稚参变色完全时进行样品采集,取样前24 h停止投喂并清理残饵,肉眼透过稚参透明的体表判断稚参肠道内容物是否排空。记录每组存活稚参的总数(N_1)、体重(W_t)和变色稚参数目(N_2),实验中以稚参由白色完全变成褐色为变色完全。每组取10头稚参用于细菌学分析,20头稚参用于相关免疫酶指标的测定,剩余稚参每个桶各取40头用于攻毒实验。

$$\text{成活率}(\%) = (1\ 000 - N_1) / 1\ 000 \times 100$$

$$\text{变色率}(\%) = N_2 / N_1 \times 100$$

$$\text{特定生长率}(\text{SGR}, \%, \text{d}) = (\text{Ln } W_t - \text{Ln } W_0) \times 100 / t$$

式中, W_t :终末体重; W_0 :初始体重; t :养殖实验进行的天数

攻毒实验 攻毒使用灿烂弧菌,由中国水产科学研究院黄海研究所海水鱼类养殖与设施渔业研究室惠赠,为仿刺参“腐皮综合征”的主要致病菌^[18]。通过浸浴感染预实验确定灿烂弧菌对稚参的半致死浓度为 2.25×10^7 CFU/mL。

从每个实验桶内取40头稚参分别放养于装有1 L海水的容器内并准确标号,然后加入高浓

度菌悬液至水体中灿烂弧菌的浓度为 2.25×10^7 CFU/mL。浸泡 12 h 后换水,保持充气,7 d 后统计稚参的成活率,以此评估潜在益生菌对稚参抗灿烂弧菌感染的影响。

稚参细菌学分析 每组取 5 头稚参样品,无菌生理盐水冲洗稚参体表,然后将稚参放入灭菌的玻璃匀浆器中,加 1 mL 无菌生理盐水研磨破碎,按系列 10 倍稀释破碎液,每个稀释梯度分别取 200 μ L 涂布 TCBS 和 2216E 培养基计弧菌数和总菌数,每个稀释梯度做 3 个重复。

免疫酶指标的测定 随机取 5 头刺参,称重,按重量体积比 1:9 加生理盐水,VC130 超声波破碎仪 (Sonics, 美国) 破碎 (22 kHz, 15 ~ 20 s), 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用于酚氧化酶 (PO)、溶菌酶 (LSZ)、酸性磷酸酶 (ACP) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活力的测定。

各项免疫酶测定方法的具体描述 PO 的测定参考 Hernández-López 等^[19]的方法,取 50 μ L 的组织破碎液上清液与等体积的 0.1 mg/mL 胰蛋白酶 - CAC 缓冲液 (CAC 缓冲液: 10 mmol/L 二甲胍酸钠, 10 mmol/L CaCl₂, pH 7.0) 加入 96 孔板中,混匀,室温孵育 10 min, 然后加入 50 μ L L-3,4-二羟基苯丙氨酸溶液 (3 mg/mL CAC 缓冲液), 混匀,室温孵育 10 min 后,立刻放入全波长酶标仪 (Multiskan Spectrum, 美国) 中,在 492 nm 下测定酶活动动力学,以实验条件下每毫克组织蛋白每分钟 OD_{492 nm} 增加 0.001 定义为一个酶活力单位。参照 Ellis^[20] 和 Anderson 等^[21]的方法测定 LSZ 活力,取 0.5 mL 组织破碎液上清液与 1.5 mL 微球菌粉 (南京建成生物研究所) 悬浮液 (溶解在 0.1 mol/L PBS 缓冲液中,浓度为 0.2 mg/mL, pH 6.8) 混合,25 $^{\circ}$ C 水浴 8 min,紫外可见分光光度计 (UV-2401 PC, 日本) 0.5 cm 光径比色杯 540 nm 下测定酶活力动力学,以实验条件下每毫克组织蛋白每分钟 OD_{540 nm} 减少 0.001 定义为一个酶活力单位。ACP 和 SOD 活力均使用南京建成试剂盒测定,ACP 以每克组织蛋白在 37 $^{\circ}$ C 与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位 (U/g prot), SOD 以每毫克组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个活力单位 (U/mg prot)。参照 Bradford^[22] 方法测定样品蛋白含量,以小牛血清蛋白为标准蛋白,建立标准曲线,以考马斯亮蓝为显色剂,于 96 孔酶标

板中反应 10 min,用酶标仪测量各反应体系中的 OD_{595 nm} 值。

1.4 数据统计

实验数据采用 SPSS 13.0 进行单因素方差分析。在数据分析前,百分率数据先进行反正弦转换,总菌数和弧菌数进行以 10 为底的对数转化。当差异显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 时,用 Tukey 检验法进行均值间的多重比较。

2 结果

2.1 潜在益生菌的鉴定

16S rDNA 序列分析法鉴定了 3 株潜在益生菌,菌株 GSC-1 的 16S rDNA 基因序列全长为 1 514 bp,与芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 16S rDNA 序列同源性较高 (>99%),基因序列登录号码为 GQ144703;菌株 GSC-2 的 16S rDNA 基因序列全长为 1 515 bp,其中有 19 个碱基与 GSC-1 不同,亦属于芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.),基因序列登录号码为 GQ144705;GSC-3 的 16S rDNA 基因序列全长为 1 524 bp,与肠球菌属 (*Enterococcus* sp.) 16S rDNA 序列同源性较高 (>99%),基因序列登录号码为 GQ144704。将 3 株潜在益生菌的基因与从 GeneBank 中选取的已报道的同源性较高的 16S rDNA 序列进行系统发育分析,建立系统发育树 (图 1)。

2.2 潜在益生菌株的毒检验

用不同浓度的潜在益生菌浸浴稚参,各处理组的稚参成活率均高于等浓度的灿烂弧菌浸浴组。其中 GSC-1 和 GSC-3 浸浴组的稚参存活率与空白对照组差异不显著 ($P > 0.05$),但 GSC-2 浸浴组的稚参成活率随着浸浴浓度的升高逐步降低,10⁷ CFU/mL GSC-2 处理组的稚参成活率显著低于空白对照组 ($P < 0.05$)。灿烂弧菌浸浴组的成活率低于等浓度其他处理组,且随着浸浴浓度的升高显著降低 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 潜在益生菌对稚参生长、免疫及抗病力的影响

成活率、特定生长率和变色率 将安全的潜在益生菌与鼠尾藻粉混合后投喂稚参,两株潜在益生菌均可显著提高稚参的成活率 ($P < 0.05$) 并增加稚参的特定生长率及变色率,其中 GSC-3 处理组的稚参特定生长率显著升高 ($P < 0.05$),GSC-1 处理组的稚参变色率显著提高 ($P < 0.05$) (表 1)。

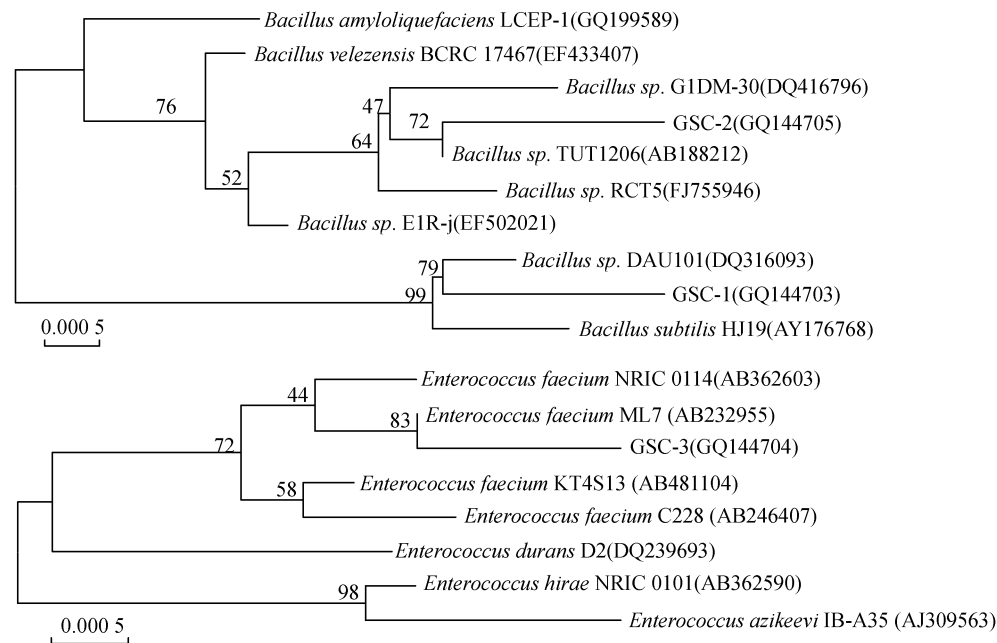


图1 基于16S rDNA序列的系统发育树(括号内为序列登录号)

Fig.1 Phylogenetic tree based on 16S ribosomal DNA sequences(access numbers in parentheses)

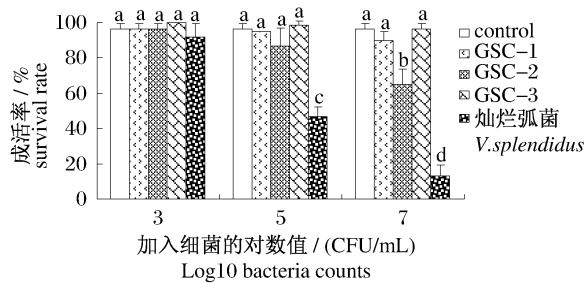


图2 潜在益生菌株对稚参存活率的影响

图中数据表示为平均值 \pm 标准差($n = 3$),具有不同上标字母的处理之间差异不显著($P < 0.05$)。

Fig.2 Effects of potential probiotics and *V. splendidus* on the survival rate of juvenile *A. japonicus*

Values are expressed as means $\bar{X} \pm SD$. ($n = 3$), values not sharing a common letter between column values differ significantly ($P < 0.05$).

灿烂弧菌攻毒后成活率以 2.25×10^7 CFU/mL 的灿烂弧菌浸泡稚参 7 d,与对照组(成活率为 35%)相比,潜在益生菌 GSC-3 处理(成活率为 61.7%)显著提高了稚参感染灿烂弧菌后的成活率($P < 0.05$),GSC-1 处理(成活率为 36.7%)对稚参抵抗灿烂弧菌的能力无显著影响($P > 0.05$)(图3)。

潜在益生菌对稚参总菌数和弧菌数的影响 实验稚参整体的细菌学分析表明,两株潜在益生菌均显著地影响了稚参菌群数目(表2)。GSC-1

处理组的稚参总菌数显著增多,同时弧菌数显著降低($P < 0.05$),GSC-3 处理组仅总菌数显著增多($P < 0.05$),弧菌数无明显变化($P > 0.05$)。

表1 潜在益生菌 GSC-1 和 GSC-3 对稚参生长指标的影响

Tab.1 Effects of potential probiotics on growth performance of the juvenile *A. japonicus*

处理 treatments	成活率 (%) survival rate	特定生长率 (%/d) specific growth rate	变色率 (%) discoloration rate
GSC-1	52.58 \pm 2.44 ^a	4.30 \pm 0.29 ^{ab}	51.08 \pm 2.61 ^a
GSC-3	50.75 \pm 1.32 ^a	4.79 \pm 0.42 ^a	49.22 \pm 2.40 ^{ab}
对照 control	47.94 \pm 1.05 ^b	4.09 \pm 0.24 ^b	46.01 \pm 1.80 ^b
ANOVA			
<i>P</i>	0.013	0.038	0.049
<i>F</i>	7.407	4.828	2.710

注:表中数据表示为平均值 \pm 标准差($n = 6$);同一列中具有不同字母上标的数值之间差异显著($P < 0.05$)。

Notes: Values are presented as means \pm S. D. ($n = 6$), values not sharing a common superscript letter between column values for each indexes differ significantly ($P < 0.05$).

潜在益生菌对稚参免疫酶指标的影响 如表3所示,两株潜在益生菌均对稚参的免疫酶指标有促进作用。与对照组相比,芽孢杆菌 GSC-1 极显著地提高了稚参组织的酚氧化酶、溶菌酶、酸性磷酸酶和超氧化物歧化酶活力($P < 0.01$); GSC-3 处理组稚参体组织中的酚氧化酶和溶菌酶

活力显著高于对照组 ($P < 0.05$), 低于 GSC-1 处理组但无显著性差异 ($P > 0.05$); GSC-3 处理组的

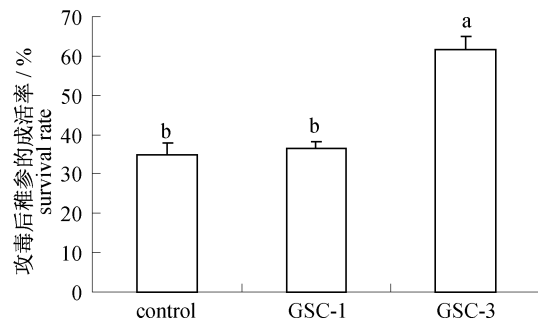


图3 潜在益生菌对稚参抗灿烂弧菌浸泡感染的影响
图中数据表示为平均值 \pm 标准差 ($n = 6$), 具有不同上标字母的处理之间差异不显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 Effects of potential probiotics GSC-1 and GSC-3 on the resistance of the juvenile *A. japonicus* to *V. splendidus*

Values are expressed as means \pm SD ($n = 6$), values not sharing a common letter between column values differ significantly ($P < 0.05$).

酸性磷酸酶和超氧化物歧化酶活力显著低于 GSC-1 处理组 ($P < 0.05$), 但与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。

表2 潜在益生菌 GSC-1 和 GSC-3 对稚参总菌数和弧菌数的影响

Tab. 2 Effects of potential probiotics GSC-1 and GSC-3 on the total bacteria and the *Vibrio* spp. of the juvenile *A. japonicus*

处理 treatments	总菌数 Log10 (CFU/sea cucumber) total bacteria counts	弧菌数 Log10 (CFU/sea cucumber) <i>Vibrio</i> spp. counts
GSC-1	6.32 \pm 0.28 ^a	2.56 \pm 0.24 ^b
GSC-3	6.55 \pm 0.13 ^a	3.82 \pm 0.21 ^a
对照 control	6.20 \pm 0.65 ^b	3.29 \pm 0.79 ^a
ANOVA		
<i>P</i>	0.000	0.000
<i>F</i>	68.201	38.284

注:表中数据表示为平均值 \pm 标准差 ($n = 6$); 同一列中具有不同字母上标的数值之间差异显著 ($P < 0.05$)。

Notes: Values are presented as means $\bar{X} \pm$ SD ($n = 6$), values not sharing a common superscript letter between column values for each indexes differ significantly ($P < 0.05$).

表3 潜在益生菌 GSC-1 和 GSC-3 对稚参免疫酶指标的影响

Tab. 3 Effects of potential probiotics GSC-1 and GSC-3 on the immune indices of the juvenile *A. japonicus*

处理 treatments	酚氧化酶 (U/mg prot) PO	溶菌酶 (U/mg prot) LSZ	酸性磷酸酶 (U/g prot) ACP	超氧化物歧化酶 (U/mg prot) SOD
GSC-1	19.40 \pm 1.29 ^a	3.79 \pm 0.27 ^a	327.21 \pm 11.84 ^a	181.11 \pm 15.84 ^a
GSC-3	16.77 \pm 0.79 ^a	3.18 \pm 0.16 ^a	221.58 \pm 3.85 ^b	132.23 \pm 10.99 ^b
对照 control	12.81 \pm 2.11 ^b	2.12 \pm 0.24 ^b	232.42 \pm 4.74 ^b	131.37 \pm 13.37 ^b
ANOVA				
<i>P</i>	0.001	0.000	0.000	0.001
<i>F</i>	19.596	18.049	228.315	17.674

注:表中数据表示为平均值 \pm 标准差 ($n = 6$); 同一列中具有不同字母上标的数值之间差异显著 ($P < 0.05$)。

Notes: Values are presented as means \pm SD ($n = 6$), values not sharing a common superscript letter between column values for each indexes differ significantly ($P < 0.05$).

3 讨论

益生菌作为抗生素的有效替代品,在农业和医药行业的应用早已十分普遍,其作用机理也得到了详细的解释^[23]。起初水产用益生菌主要来源于陆生动物益生菌制剂^[9],然而 Verschuere 等^[10]和 Ninawe 等^[24]学者认为从水产动物环境中分离的益生菌应用在水产养殖中效果会更好,大量的研究也证实了鱼虾贝类专用益生菌的益生效果^[16-17]。本实验 3 株潜在益生菌均分离自健康仿刺参肠道,有利于潜在益生菌在肠道内的黏附或定植,从而为仿刺参专用益生菌的开发提供科学依据。

体外抑菌效果实验筛选出的拮抗菌对养殖动物是否安全,是判断该菌株是否可以应用的主要依据,小规模浸浴实验是评价潜在益生菌对养殖动物幼体安全性的良好途径^[10]。本实验条件下潜在益生菌浸浴组的成活率均高于灿烂弧菌对照组,但随着水体中细菌浓度的升高,10⁷ CFU/mL GSC-2 处理组的成活率显著低于空白对照组,说明芽孢杆菌 GSC-2 对稚参有一定的毒性。目前水产养殖中使用的芽孢杆菌大部分直接来源于陆源益生菌且未经过安全性检验,鉴于同一细菌对不同生物的安全性差异,加强水产用益生菌的安全性检验是十分必要的。本实验中芽孢杆菌 GSC-1 和肠球菌 GSC-3 处理组与空白对照组的

成活率处于同一水平, 10^5 CFU/mL 和 10^7 CFU/mL 浸浴组的成活率显著高于灿烂弧菌对照组, 可被视为稚参的安全菌株。对稚参有毒性的芽孢杆菌 GSC-2 其致病机理有待于进一步研究。

芽孢杆菌作为一种常用益生菌, 在水产动物中的应用已经得到广泛的研究^[8,25], 并且由于其耐高温、耐盐碱、耐挤压等特性, 其商品制剂的开发应用十分普遍。Decamp 等^[14]报道了商品芽孢杆菌混合物在亚洲和拉丁美洲对虾(斑节对虾和凡纳滨对虾)育苗生产中替代抗菌药物的优良效果。芽孢杆菌虽然不属于海洋环境中的常量菌群, 但已经从甲壳动物和海水鱼肠道以及贝类分离获得^[26]。大量的研究结果表明芽孢杆菌在水产养殖中的应用可以增加养殖水体和养殖动物肠道中芽孢杆菌的比例, 通过营养和空间的竞争或者抗生素的产生抑制其它细菌尤其是有害菌的生长, 从而提高养殖动物的成活率^[8,10,26-28]。本实验中由于稚参个体较小, 无法解剖获取其肠道, 故以稚参整体作为细菌学分析对象, 结果表明芽孢杆菌 GSC-1 使稚参总菌数显著增加, 弧菌数显著降低, 而且稚参的成活率也显著提高。虽然 Rengpipat 等^[29]和 Gullian 等^[26]均认为芽孢杆菌可以促进养殖对虾的生长, 但实验条件下芽孢杆菌 GSC-1 并未明显促进稚参的生长, 可能与芽孢杆菌的投喂方式或稚参的养殖条件有关。变色是稚参发育的重要事件, 受光照及饵料等影响^[30-31], 变色后的稚参不仅生长迅速而且死亡率低, 芽孢杆菌 GSC-1 显著增加了实验稚参的变色率, 进一步体现了其益生效果。Rengpipat 等^[32]认为芽孢杆菌可以激活对虾的免疫反应并提高其对特定病原菌的抵抗力, 本实验条件下芽孢杆菌 GSC-1 极显著地提高了稚参组织中酚氧化酶、溶菌酶、酸性磷酸酶和超氧化物歧化酶活力, 但对稚参抵抗灿烂弧菌感染的能力并未显著提高, 具体原因有待于进一步研究。

肠球菌是一类常见的乳酸菌, 其中的一些无病原性的细菌如屎肠球菌, 可以分泌乳酸和抗菌素, 因此具有激活动物免疫系统和加强动物抵抗肠胃疾病的能力, 在猪和家禽的养殖中应用广泛^[33-34]。部分陆源肠球菌在水产动物中的应用效果已经得到研究^[35-36], Campos 等^[37]和 Swain 等^[38]亦从水产动物体内分离得到肠球菌并证明其益生效果显著。本实验中源于仿刺参肠道的肠

球菌 GSC-3 显著增加了稚参的特定生长率, 激活了体组织中的酚氧化酶和溶菌酶活性, 这与屎肠球菌 ZJ4 在罗非鱼中的应用效果相似, Wang 等^[36]将分离自小猪肠道的屎肠球菌 ZJ4 每 4 天以 10^7 CFU/mL 添加至罗非鱼养殖水体中, 养殖 40 d 后发现屎肠球菌 ZJ4 改善了罗非鱼的生长性能并提高了其免疫反应。Bogut 等^[35]将屎肠球菌 M74 添加至饲料饲养鲤鱼 6 周, 不仅其特定生长率和日增重率显著提高, 而且肠道内粪肠球菌、金黄色葡萄球菌和大肠球菌等有害菌的数目显著降低。本实验条件下肠球菌 GSC-3 显著增加了稚参总菌数目, 弧菌比例相对减少, 据此推测肠球菌可以抑制病原菌的生长并可能具有在水产动物体内定植的能力。肠球菌 GSC-3 亦显著提高了稚参抵御灿烂弧菌感染的能力, Chang 等^[39]发现婴儿消化道内分离得到的屎肠球菌 SF68 亦可提高欧洲鳗鲡抵御爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)的能力。已有研究表明肠球菌是鱼类肠道的正常菌群^[40], 综合本实验研究结果可得, 从水产动物肠道中分离无病原性的肠球菌作为水产用益生菌是十分有前景的。

4 结论

本实验通过细菌毒性检验, 筛选出对稚参无毒害的潜在益生菌株 *Bacillus* sp. GSC-1 和 *Enterococcus* sp. GSC-3, 并通过两株潜在益生菌在稚参养殖中的应用效果研究, 证明了 GSC-1 和 GSC-3 对稚参的益生效果, 为稚参弧菌病的防治提供了理论依据, 为益生菌在仿刺参养殖中的开发应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] 张春云, 王印庚, 荣小军, 等. 国内外海参自然资源、养殖状况及存在问题[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(3): 89-97.
- [2] Battaglene S. Culture of tropical sea cucumbers for stock restoration and enhancement[J]. Naga, 1999, 22(4): 4-11.
- [3] 刘锡胤, 顾本学. 刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 育苗中几个常见问题的分析与对策[J]. 现代渔业信息, 2002, 17(11): 26-28.
- [4] Becker P, Gillan D, Lanterbecq D, et al. The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata) [J]. Aquaculture, 2004, 242: 13-30.

- [5] 邓欢,隋锡林. 刺参育苗期常见流行病[J]. 水产科学,2004,23(3):40.
- [6] 王印庚,荣小军,张春云,等. 养殖海参主要疾病及防治技术[J]. 海洋科学,2005,29(3):1-7.
- [7] Moriarty D. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds [J]. Aquaculture, 1998, 164:351-358.
- [8] Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull J. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms [J]. Aquaculture, 2000, 191: 259-270.
- [9] Gatesoupe F. The use of probiotics in aquaculture [J]. Aquaculture, 1999, 180:147-165.
- [10] Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, *et al.* Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(4):655-671.
- [11] Irianto A, Austin B. Probiotics in aquaculture [J]. Journal of Fish Diseases, 2002, 25(11):633-642.
- [12] Vine N, Leukes W, Kaiser H. Probiotics in marine larviculture [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 30(3):404-427.
- [13] Palmer P J, Burke M J, Palmer C J, *et al.* Developments in controlled green-water larval culture technologies for estuarine fishes in Queensland, Australia and elsewhere [J]. Aquaculture, 2007, 272: 1-21.
- [14] Decamp O, Moriarty D, Lavens P. Probiotics for shrimp larviculture; review of field data from Asia and Latin America [J]. Aquaculture Research, 2008, 39:334-338.
- [15] Kozasa M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding [J]. Microbiologie Aliments Nutrition, 1986, 4(1):121-135.
- [16] Zhou X X, Wang Y B, Li W F. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities [J]. Aquaculture, 2009, 287:349-353.
- [17] Sharifuzzaman S, Austin B. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(3):440-445.
- [18] 张春云,王印庚,荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定 [J]. 水产学报, 2006, 30(1): 118-123.
- [19] Hernández-López J, Gollas-Galván T, Vargas-Albores F. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Comparative Pharmacology and Toxicology, 1996, 113(1):61-66.
- [20] Ellis A. Lysozyme assays [J]. Techniques in Fish Immunology, 1990, 1:101-103.
- [21] Anderson D, Bechtel W, Dahlquist F. pH-induced denaturation of proteins; a single salt bridge contributes 3-5 kcal/mol to the free energy of folding of T4 lysozyme [J]. Biochemistry, 1990, 29(9):2403-2408.
- [22] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72:248-254.
- [23] Fuller R. Probiotics in man and animals [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1989, 66(5):365-378.
- [24] Ninawe A, Selvin J. Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2009, 35(1):43-66.
- [25] Hong H, Duc L, Cutting S. The use of bacterial spore formers as probiotics [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(4):813-835.
- [26] 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.
- [27] Ziaei-Nejad S, Rezaei M, Takami G, *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.
- [28] Kennedy B, Tucker Jr J, Neidig C, *et al.* Bacterial management strategies for stock enhancement of warmwater marine fish; a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*) [J]. Bulletin of Marine Science, 1998, 62(2):573-588.
- [29] 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.
- [30] 陈远,隋锡林,胡庆明. 光强对稚参生长及变色的影响 [J]. 水产科学, 1987, 6(4):17-20.
- [31] 徐宗法,王在卿. 饵料对稚幼参生长变色的影响 [J]. 齐鲁渔业, 1999, 16(1):30-33.
- [32] Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, *et al.* Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11) [J]. Aquaculture, 2000, 191: 271-288.

- [33] Taras D, Vahjen W, Macha M, *et al.* Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets [J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84 (3): 608–617.
- [34] Vahjen W, Jadamus A, Simon O. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on selected bacterial groups in the small intestine of growing turkey poults [J]. *Archives of Animal Nutrition*, 2002, 56(6): 419–429.
- [35] Bogut I, Milakovic Z, Bukvic Z, *et al.* Influence of probiotic (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content of intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Czech Journal of Animal Science-UZPI (Czech Republic)*, 1998, 43(5): 231–235.
- [36] Wang Y, Tian Z, Yao J, *et al.* Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response [J]. *Aquaculture*, 2008, 277: 203–207.
- [37] Campos C, Rodríguez ó, Calo-Mata P, *et al.* Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*) [J]. *Food Research International*, 2006, 39(3): 356–364.
- [38] Swain S, Singh C, Arul V. Inhibitory activity of probiotics *Streptococcus phocae* PI80 and *Enterococcus faecium* MC13 against Vibriosis in shrimp *Penaeus monodon* [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(4): 697–703.
- [39] Chang C, Liu W. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla Anguilla* L. [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(5): 311–315.
- [40] Ringø E, Gatesoupe F J. Lactic acid bacteria in fish: a review [J]. *Aquaculture*, 1998, 160: 177–203.

**Effects of potential probiotics on growth performance and
immune response of the juvenile sea cucumber
(*Apostichopus japonicus*)**

ZHOU Hui-hui, MA Hong-ming*, ZHANG Wen-bing, XU Wei, LIUFU Zhi-guo, MAI Kang-sen
(The Key Laboratory of Mariculture, Education Ministry of China, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The objective of this work was to select probiotic bacterial strains for juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Three strains of potential probiotics isolated from the intestines of *A. japonicus* were identified by 16S rDNA sequence genotyping as *Bacillus* GSC-1, *Bacillus* GSC-2 and *Enterococcus* GSC-3. The safety of these potential probiotics was evaluated by immersing juvenile *A. japonicus* in sea water with GSC-1, GSC-2, GSC-3 or *Vibrio splendidus* at 10^0 , 10^3 , 10^5 or 10^7 CFU/mL respectively for 7 days. Results showed that GSC-1 and GSC-3 treatments were safe under the designed concentrations based on the mortality rates. However, GSC-2 caused significantly higher mortality at 10^7 CFU/mL than the blank control ($P < 0.05$). A 20-day feeding trial was conducted to investigate the effects of GSC-1 and GSC-3 on the growth performance and innate immune response of juvenile *A. japonicus*. Feeds were algae (*Sargassum thunbergii*) powder supplemented with GSC-1 or GSC-3 at 0 (control) and 10^9 CFU/g respectively. The specific growth rate and survival rate were significantly increased in treatment supplemented with GSC-1. Comparatively, survival rate and discoloration rate were remarkably improved in treatment of GSC-3 ($P < 0.05$). Moreover, GSC-1 increased total bacteria counts and decreased *Vibrio* spp. counts significantly ($P < 0.05$). Phenoloxidase and lysozyme activities in body tissue of the juvenile *A. japonicus* were significantly higher in the group treated with GSC-1 or GSC-3 than the control ($P < 0.05$) while acid phosphatase and superoxide dismutase activities were remarkably higher than control in GSC-1 group only ($P < 0.05$). Both GSC-1 and GSC-3 showed positive effects on disease resistance of juvenile *A. japonicus*, especially GSC-3 significantly improved disease resistance to *V. splendidus* exposure ($P < 0.05$). In conclusion, both *Bacillus* GSC-1 and *Enterococcus* GSC-3 show probiotic effects, therefore they can be used as probiotics in the farming of juvenile sea cucumber *A. japonicus*.

Key words: juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*); probiotics; growth; immune response

Corresponding author: MA Hong-ming. E-mail: mahongm@ouc.edu.cn