

# 饲料中添加潜在益生菌对凡纳滨对虾肠道消化酶活性和菌群组成的影响

李桂英<sup>1,2</sup> 孙艳<sup>1</sup> 宋晓玲<sup>1\*</sup> 黄捷<sup>1</sup> 谢国驹<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup> 胶州市胶莱镇双韩小学, 266033)

**摘要** 在基础饲料中添加不同配伍的坚强芽孢杆菌 *Bacillus firmus* 活菌( $1.0 \times 10^8$  CFU/g)、美人鱼发光杆菌 *Photobacterium damsela* 灭活菌(1%)和溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus* 灭活菌(1%)作为实验饲料, 基础饲料为对照组。实验所用凡纳滨对虾初始质量为  $3.2 \pm 0.26$  g, 投喂 15d 后进行 WSSV 感染实验并继续观察 14d。实验期间定期取样测定对虾肠道胃蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的活性变化, 并分析可培养肠道细菌总数和优势菌数量。结果表明, 实验组对虾肠道中胃蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活性整体水平均显著高于对照组( $P < 0.05$ ), 肠道细菌数量较对照组有显著增加。其中, 坚强芽孢杆菌与美人鱼发光杆菌灭活菌复合菌组具有最高的淀粉酶活性, 坚强芽孢杆菌与溶藻弧菌灭活菌复合组具有最高的脂肪酶和胃蛋白酶活性, 而坚强芽孢杆菌单一组具有最大的肠道细菌总数和优势菌数。本研究表明, 饲料中添加潜在益生菌可以提高凡纳滨对虾肠道消化酶活性并调节肠道菌群变化, 利于养分的消化吸收。其中以坚强芽孢杆菌与美人鱼发光杆菌灭活菌复合组的整体效果较佳。

**关键词** 潜在益生菌 凡纳滨对虾 肠道消化酶 肠道菌群

**中图分类号** S963.7 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2013)04-0084-07

## Potential probiotics supplement may impact intestinal digestive enzyme and bacteria composition of *Litopenaeus vannamei*

LI Gui-ying<sup>1,2</sup> SUN Yan<sup>1</sup> SONG Xiao-ling<sup>1\*</sup>

HUANG Jie<sup>1</sup> XIE Guo-si<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup> Shuanghan Elementary School of Jiaolai Town, Jiaozhou 266033)

**ABSTRACT** In this study, the influence of three intestinal potential probiotics, *Bacillus firmus*, *Photobacterium damsela*, and *Vibrio alginolyticus* supplementation was investigated on digestive enzyme activities (pepsin, lipase and amylase) and intestinal bacteria of *Litopenaeus*

公益性行业(农业)科研专项(201103034)和国家重点基础研究发展计划(2012CB114405)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: songxl@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85823062-702

收稿日期: 2012-06-14; 接受日期: 2012-08-01

作者简介: 李桂英(1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物免疫学研究。E-mail: lgytaqf@163.com, Tel: 15966870429

*us vannamei*. Probiotic *B. firmus* (live,  $1.0 \times 10^8$  CFU/g) tandem 1% *P. damsela* (inactivated), probiotic *B. firmus* (live,  $1.0 \times 10^8$  CFU/g) only, or probiotic *B. firmus* (live,  $1.0 \times 10^8$  CFU/g) tandem 1% *V. alginolyticus* (inactivated) was added to the basic feed for the treatments. No probiotic was supplemented to the control. Mean digestive enzyme activities of all probiotic treatments were significantly different ( $P < 0.05$ ) from that of the control. Besides, total and dominant bacterial counts in probiotic-supplemented groups were different from that in the control. The *B. firmus* + *P. damsela* treatment demonstrated the highest amylase activity; the *B. firmus* + *V. alginolyticus* treatment demonstrated the highest lipase and pepsin activity; the *B. firmus* only treatment demonstrated the greatest numbers of total and dominant bacterial counts. It was found that supplementation of probiotics to the basic feed could significantly increased digestive enzyme activities and improve the shrimp's intestinal flora. The multi-species probiotics showed better effect.

**KEY WORDS** Potential probiotic *Litopenaeus vannamei* Intestinal digestive enzymes  
Intestinal flora

国内外水产养殖业正向高密度集约化方向发展,但水产养殖病害频发带来了严重的经济损失和一定的社会问题(Boyd *et al.* 1999);虽然病害防治手段不断推陈出新,但由于缺乏规范性和相应的理论指导,又引发了一定的环境和安全问题(Esiobu *et al.* 2002)。随着健康养殖的呼声日益高涨,使人们更迫切地寻求绿色、环保、安全的防治手段(Wang *et al.* 2008)。益生菌以其独特的优势备受青睐:改善水质,维护无污染的养殖水体(陆家昌等 2010;Zhou *et al.* 2009);改善肠道菌群,营造良好的消化环境(胡毅等 2008);提高养殖动物消化酶活性,促进饲料养分吸收(Gonzalez *et al.* 2009);增强机体免疫力和抗病力,避免药物残留和抗药菌株的产生(王国霞等 2010;Chiu *et al.* 2010)。随着人们研究的深入,益生菌的优越性日益突出,有望在今后取代抗生素等化学药物的使用,成为水产病害防控的主要手段。本研究将分离自健康对虾肠道的3株潜在益生菌进行不同配伍,加入到基础饲料中配制成实验饲料投喂凡纳滨对虾,观察其对对虾肠道消化酶活性和可培养菌群的影响,为3株潜在益生菌的推广应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

实验用凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei*,初始质量为  $3.2 \pm 0.26$  g,购买于山东青岛宝荣水产科技有限公司对虾养殖场,运回暂养于60L的整理箱中。暂养期间,每日上午在投喂饲料前换水1次,日换水量为1/3;每日投喂3次,投喂前吸出残饵和粪便,日投喂量为凡纳滨对虾体质量的10%~15%,水温23~28℃,盐度  $30 \pm 1$ ,pH  $8.0 \pm 0.2$ ,连续充气。

#### 1.1.2 实验用益生菌

实验用菌坚强芽孢杆菌 *Bacillus firmus*、美人鱼发光杆菌 *Photobacterium damsela* 和溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus* 分离自健康凡纳滨对虾和中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 肠道,并通过安全性实验验证对对虾无毒害作用并具有一定的益生作用(李海兵 2008)。菌株活化后经2216E液体培养基小规模培养后离心收集菌体,活菌涂布计数后保存于4℃。其中坚强芽孢杆菌活菌量达到  $1.0 \times 10^{11}$  CFU/ml,美人鱼发光杆菌和溶藻弧菌活菌量均达到  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml。采用超声破碎法制备美人鱼发光杆菌灭活菌和溶藻弧菌灭活菌,灭活菌添加量为其湿重占饲料重量的1%(即每g饲料中含有10mg的灭活菌)。

### 1.1.3 实验饲料制备

基础饲料配方为(李继秋 2003)含花生粉 250 g/kg、豆粉 250 g/kg、鱼粉 300 g/kg、虾粉 100 g/kg、面粉 30 g/kg、复合维生素 10 g/kg、维生素 C 2 g/kg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2 g/kg、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3 g/kg、褐藻酸钠 10 g/kg、植物油 20 g/kg,各种原料分别粉碎后过 80 目筛,准确称重后逐级充分混匀,以褐藻酸钠作为黏合剂,加适量水用小型绞肉机挤压制成颗粒饲料,在 37℃ 烘干,分袋包装后于 4℃ 冰箱中保存备用。实验饲料为在基础饲料配方中添加相应的益生菌活菌和灭活菌,最终达到饲料中含有坚强芽孢杆菌活菌为  $10^8$  CFU/g,美人鱼发光杆菌灭活菌和溶藻弧菌灭活菌达到 10mg/g 的水平。

## 1.2 实验分组及管理

暂养 7d 后,将 720 尾活力较强的凡纳滨对虾随机分配到水族箱中,共 4 组,每组 3 个重复,每个重复 60 尾对虾。4 个组分别投喂不同的饲料。A:基础饲料,为对照组;B:坚强芽孢杆菌活菌( $1.0 \times 10^8$  CFU/g)与美人鱼发光杆菌灭活菌(1%)的复合 1 组;C:坚强芽孢杆菌活菌( $1.0 \times 10^8$  CFU/g)单一组;D:坚强芽孢杆菌活菌( $1.0 \times 10^8$  CFU/g)与溶藻弧菌灭活菌(1%)的复合两组。

从生长和抗应激角度,并结合适用性、经济性以及养殖动物可能产生的“免疫疲劳”(Chang *et al.* 2000),B、C、D 组采用间隔投喂方式,即连续 4d 投喂实验饲料,3d 投喂基础饲料,7d 1 个循环,投喂实验进行 15d。实验期间管理同暂养期间。

## 1.3 样品采集与处理

养殖期间每 5d 从 A、B、C、D 组随机取 15 尾对虾,无菌条件下取其肠道。去除肠道粪便,用去离子水冲洗后滤纸吸干,称重捣碎后移入玻璃匀浆器内冰水浴匀浆,在 4℃ 下离心 30 min( $10\,000$  r/min),取上清液备用,24h 分析完毕。

## 1.4 指标测定

### 1.4.1 凡纳滨对虾消化酶活性的测定

脂肪酶活性测定采用南京建成生物工程研究所试剂盒。以 37℃ 条件下每 g 组织蛋白在反应体系中与底物反应 1min,每消耗  $1\mu\text{mol}$  底物为 1 个酶活力单位。

胃蛋白酶活性测定采用南京建成生物工程研究所试剂盒。以每 mg 组织蛋白 37℃ 每 min 水解生成  $1\mu\text{g}$  氨基酸作为 1 个酶活力单位(1 个酶活力单位 =  $1\mu\text{g}$  酪氨酸/min/mg 组织蛋白)。

淀粉酶活性采用碘-淀粉比色法,以组织中每 mg 蛋白在 37℃ 与底物作用 30min,水解 10mg 淀粉定义为 1 个淀粉酶活力单位。

对虾肠道消化酶液蛋白含量用考马斯亮蓝法以牛血清蛋白做标准进行测定。

### 1.4.2 凡纳滨对虾肠道细菌计数

实验期间第 5 天和第 15 天测定对虾肠道细菌总数及优势菌数。测定方法参考李继秋(2003)的方法:从每组随机取 15 尾虾,在无菌操作工作台内进行解剖,先去除肠道内粪便,再用无菌生理盐水冲洗干净后用滤纸吸干,放于灭菌玻璃匀浆器,加入 1ml 无菌生理盐水匀浆,再进行 10 倍梯度稀释,取 0.1 ml 涂布 2216E 固体平板,每个梯度涂布 3 个平板,28℃ 倒置培养 24h,统计菌落数,将数量最多菌作为优势菌,将典型菌落进行分离纯化鉴定并保种。每尾虾肠道细菌总数(TBC)按下述公式计算:

$$\text{TBC}(\text{CFU}/\text{ind.}) = \text{细菌克隆数目} \times \text{稀释倍数} \times \text{匀浆液稀释倍数} / \text{对虾尾数}$$

每尾虾肠道优势菌数(ABC)按下述公式计算:

$$\text{ABC}(\text{CFU}/\text{ind.}) = \text{优势菌克隆数目} \times \text{稀释倍数} \times \text{匀浆液稀释倍数} / \text{对虾尾数}$$

## 1.5 WSSV 感染实验

通过攻毒预实验确定本批对虾病料有效感染量为 0.09g/ind。在投喂饲料的第 16 天,从各组挑选出大小

一致的30尾对虾进行感染实验,每组3个重复。感染前1d停食,次日上午投喂-80℃保存的对虾病料进行感染实验。感染期间管理同养殖管理,及时检出死亡对虾并记录死亡时间和死亡数量,14d后感染实验结束。

## 1.6 数据分析

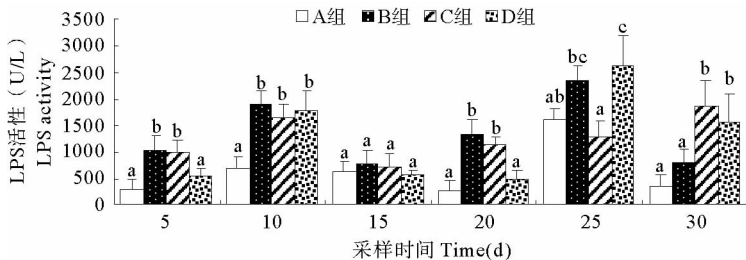
实验数据采用平均值±标准差表示,采用SPSS 16.0软件进行数据分析和统计,先对数据作单因素方差分析(One-Way ANOVA),若组间差异显著,再用Duncan's氏法进行多重比较, $P < 0.05$ 作为差异显著水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 益生菌对凡纳滨对虾肠道消化酶活性的影响

#### 2.1.1 益生菌对凡纳滨对虾肠道脂肪酶活性的影响

由图1可知,B组对虾肠道脂肪酶活性在投喂饲料的15d内和感染WSSV的14d内表现出同样的趋势,前10d升高至最大值且与A组差异显著( $P < 0.05$ ),之后降低至最低值且与A组无显著差异( $P > 0.05$ )。C组在投喂饲料阶段呈先升高且与A组显著差异( $P < 0.05$ ),投喂饲料15d时降至最低且与A组无显著差异( $P > 0.05$ );在感染阶段一直升高,但感染10d时与A组无显著差异( $P > 0.05$ ),感染开始和结束时与A组差异显著( $P < 0.05$ )。D组在投喂饲料阶段先升高后降低,且在投喂饲料10d时与A组差异显著( $P < 0.05$ ),其余阶段无显著差异( $P > 0.05$ );感染阶段先升高后降低,在感染初期与A组无显著差异( $P > 0.05$ ),之后与A组差异显著( $P < 0.05$ )。整体水平上D组最高,B组次之,C组较低,但均高于对照组。结果表明,饲喂添加益生菌的实验饲料对对虾脂肪酶的影响表现出一定的规律,且整体上与对照组有明显差异( $P < 0.05$ )。



图中误差线用标准误差表示,含有不同字母的组之间差异显著( $P < 0.05$ )。A:未添加益生菌制剂组,为空白对照组;B:坚强芽孢杆菌活菌( $1.0 \times 10^8$  CFU/g)与美人鱼发光杆菌灭活菌(1%)的免疫组;C:坚强芽孢杆菌活菌( $1.0 \times 10^8$  CFU/g)免疫组;D:坚强芽孢杆菌活菌( $1.0 \times 10^8$  CFU/g)与溶藻弧菌灭活菌(1%)的免疫组。下同

Error bars represent standard deviation (SD); significant difference between the groups is indicated by different letters. A: Control group feeding on basic diet, B: Treatment with diet supplement of live *B. firmus* ( $1.0 \times 10^8$  CFU/g) and 1% inactivated *P. damsela*, C: Treatment with diet supplement of live *B. firmus* ( $1.0 \times 10^8$  CFU/g), D: Treatment with diet supplement of live *B. firmus* ( $1.0 \times 10^8$  CFU/g) and 1% inactivated *V. alginolyticus*. Same in the following figures

图1 各实验组凡纳滨对虾肠道脂肪酶活性

Fig. 1 Lipase activity (LPS) of *Litopenaeus vannamei* during the experiment

#### 2.1.2 益生菌对凡纳滨对虾肠道胃蛋白酶活性的影响

由图2可知,B、C、D组对虾肠道胃蛋白酶活性在投喂饲料阶段和感染WSSV阶段都表现出先升高后降低的趋势,B组和D组均仅在感染后期与A组无显著差异( $P > 0.05$ ),其余阶段均与A组差异显著( $P < 0.05$ );C组仅在投喂初期与A组无显著差异( $P > 0.05$ ),其余阶段均显著高于A组( $P < 0.05$ )。整体水平上B组最高,D组次之,C组较低,但均高于A组。结果表明,在投喂阶段,B、C、D组胃蛋白酶活性均显著高于A组( $P < 0.05$ ),B、C、D组之间蛋白酶活性有一定差异。感染WSSV后又有所升高,B、C、D组均高于A组,B、C、D组间差异明显。研究表明,饲喂添加潜在益生菌的饲料有利于对虾胃蛋白酶活性的提高,且复合菌组的效果更佳。

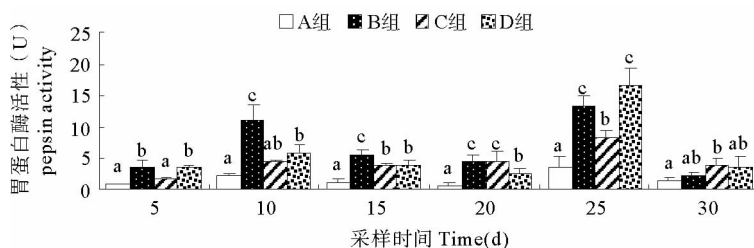


图2 各实验组凡纳滨对虾肠道胃蛋白酶活性

Fig. 2 Pepsin activity of *L. vannamei* during the experiment

### 2.1.3 益生菌对凡纳滨对虾肠道淀粉酶活性的影响

由图3可知,B、D组对虾肠道淀粉酶活性在投喂饲料阶段和感染 WSSV 期间都表现出先升高后降低的趋势,B组仅在感染后期与A组无显著差异( $P>0.05$ ),其余阶段均显著高于A组( $P<0.05$ );D组在整个实验阶段均显著高于A组( $P<0.05$ )。C组在投喂饲料阶段和感染 WSSV 的前10d处于升高阶段,且均显著高于A组( $P<0.05$ ),在感染末期明显下降且与A组无显著差异( $P>0.05$ )。整体水平上B组最佳,D组其次,C组差之。结果表明,饲喂添加益生菌的饲料在促进淀粉酶活性方面有显著效果,且复合菌组的效果较好。

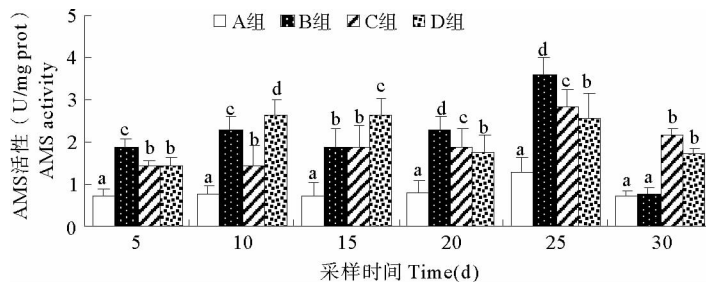


图3 各实验组凡纳滨对虾肠道淀粉酶活性

Fig. 3 Diastatic activity (AMS) of *L. vannamei* during the experiment

## 2.2 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾肠道细菌数目的影响

由表1可知,在投喂饲料第5天和投喂饲料第15天,各实验组对虾肠道细菌总数和优势菌数均高于对照组。在投喂饲料第5天,B组和C组的细菌总数均显著高于对照组( $P<0.05$ ),D组与对照组无显著差异( $P>0.05$ ),B组和C组无显著差异( $P>0.05$ );各实验组的优势菌总数均与对照组无显著差异( $P>0.05$ )。投喂饲料15d,在细菌总数和优势菌数目上,仅B组的细菌总数与对照组有显著差异( $P<0.05$ ),C、D组与对照组无显著差异,且C组与D组之间无显著差异( $P>0.05$ )。结果表明,饲喂添加潜在益生菌饲料的对虾肠道的细菌数量较对照组明显增加,且坚强芽孢杆菌和美人鱼发光杆菌灭活菌的复合菌组的效果最佳,在投喂后期均显著高于对照组( $P<0.05$ ),与其对消化酶的作用效果相一致。

表1 凡纳滨对虾投喂饲料5d和15d时肠道细菌总数和优势菌总数

Table 1 Effect of different dietary probiotics on total bacterium counts (TBC) and dominant bacterium counts (ABC) in intestine tract of *L. vannamei* feeding on diets at 5d and 15d ( $n=3; \bar{x} \pm SD$ )

组别 Treatment	投喂饲料 5d Fed with diets for 5 days		投喂饲料 15d Fed with diets for 15 days	
	细菌总数 TBC ( $\times 10^4$ CFU/ind.)	优势菌数 ABC ( $\times 10^4$ CFU/ind.)	细菌总数 TBC ( $\times 10^4$ CFU/ind.)	优势菌数 ABC ( $\times 10^4$ CFU/ind.)
A组 Treatment A	1.8 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	3.4 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	2.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
B组 Treatment B	6.0 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	5.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	188.0 $\pm$ 87.6 <sup>b</sup>	188.0 $\pm$ 87.6 <sup>b</sup>
C组 Treatment C	13.2 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	1.1 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	108.0 $\pm$ 25.4 <sup>ab</sup>	75.2 $\pm$ 20.8 <sup>ab</sup>
D组 Treatment D	10.0 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	9.8 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	5.5 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>

注:同一列数据右上角标不同字母的组有显著差异( $P<0.05$ )

Note: Significant difference is indicated by different letters ( $P<0.05$ )

## 3 讨论

### 3.1 肠道益生菌与肠道消化酶活性

水生动物主要是利用消化道内的消化酶对营养物质进行消化吸收,因而消化酶活性的高低可以作为衡量对虾消化水平的高低(唐黎等 2007)。随着益生菌作为抗生素替代品应用研究的广泛进行,其对水产动物消化酶活性的研究更加深入和清晰。Ziaei-Nejad 等(2006)研究表明,一定浓度的芽孢杆菌显著提高了印度明对虾 *Fenneropenaeus indicus* 肠道蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶等的活性。王国霞等(2010)验证了饲料中添加乳酸菌对凡纳滨对虾消化酶活性的积极影响。本研究结果表明,在投喂饲料的 15d 内,饲料中添加肠道潜在益生菌 B、C、D 组的凡纳滨对虾的脂肪酶、胃蛋白酶、淀粉酶活性均呈现先升高后降低的趋势,且均高于 A 组,与之前的研究结果较一致。

益生菌是通过在动物肠道定植和代谢发挥作用,其效果不但受自身影响,也受外界环境因素,如养殖水体微生态和水温、pH 值等水质指标等的影响(丁贤等 2004)。丁贤等(2004)在基础饲料中分别添加 0.5%、1.0%、3.0%、5.0% 芽孢杆菌,对凡纳滨对虾不同的生长阶段均表现出消化酶活的促进作用,但不同生长阶段效果不一致。Ziaei-Nejad 等(2006)的研究也表明,芽孢杆菌对印度明对虾不同生长阶段消化酶活性的影响,结果显示各实验组的淀粉酶活性、总蛋白含量和脂肪酶活性均高于对照组。本研究在投喂饲料的 15d 内消化酶活性表现出的变化趋势可能与间接投喂方式导致的细菌定植量和对虾不同的生长阶段有关。

在益生菌的应用研究中,众多学者青睐于研究复合益生菌的应用效果。如王彦波等(2010)研究证实,饲料中添加较高剂量复合益生菌的试验组 B 和 C 显著提高了凡纳滨对虾肠道蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶等的活性。宋奔奔等(2009)研究表明,在水体中添加不同浓度的短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* 和胶红酵母菌 *Rhodotorula mucilaginosa* 及其复合物对凡纳滨对虾消化酶有一定提高作用。Wang 等(2006)研究了将分离自鲤鱼 *Cyprinus carpio* 养殖池的光合细菌和芽孢杆菌加入基础饲料中使各实验组鲤鱼的消化酶活性均显著高于对照组,其中复合菌组的脂肪酶和淀粉酶活性要显著高于其他组。Moriarty(1998)验证了凝结芽孢杆菌 *Bacillus coagulans*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 以及地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* 等几株芽孢杆菌可以分泌多种胞外消化酶,这也在一定程度从肠道酶学特性解释了复合益生菌的作用机理。本研究结果也显示,复合菌组在最大值及其与对照组的差异显著性上均优于单一菌组。攻毒实验结果(李桂英等 2011)表明各实验组累积死亡率均显著低于对照组( $P < 0.05$ ),本研究在感染阶段中期(即感染病毒第 10 天)各实验组的脂肪酶活性、胃蛋白酶活性和淀粉酶活性均达到整个养殖阶段的最大值,其原因可能与对虾经病毒感染达到稳定后,机体代谢活动增强有关,是对虾自身的一种体质恢复机制。

### 3.2 肠道益生菌与肠道菌群变化

益生菌的作用机制之一就是通过与肠道内的有害病原菌争夺附着位点和营养成分,在肠道内达到一定数量成为优势菌,通过影响肠道微生态而起作用。B、C 组在投喂饲料的第 5 天和 15 天对虾肠道细菌总数和优势菌总数均显著增加,说明随着对虾的生长和对虾机体代谢活动的增强,体内细菌不断增加,但由于没有对对虾肠道菌群数量进行连续检测,不能确定对虾肠道细菌所能达到的阈值。其中坚强芽孢杆菌与美人鱼发光杆菌灭活菌的复合组对肠道菌群变化的影响最大,坚强芽孢杆菌单一菌组影响最小,但仍高于对照组。这与前面描述的各实验组对对虾消化酶活性的影响一致,说明饲料中添加益生菌单一菌、益生菌与其他潜在益生菌灭活菌的配伍均在一定程度上通过引起对虾肠道菌群变化而影响其消化,为探究益生菌的作用机理提供了一定的理论依据。然而益生菌的作用机制比较复杂,所添加的益生菌是否可在肠道内定植或仅为过路菌,在不同动物种类和不同菌种之间尚无确定结论。本研究没有对所添加的益生菌进行跟踪检测,也无法证明益生菌是否在肠道内定植,需要进一步研究。

Ziaei-Nejad 等(2006)在其研究中揭示了消化道中芽孢杆菌数目在各实验组中均显著高于对照组,各实验组间、各实验组和对照组之间的细菌总数无显著差异,与各实验组对消化酶活性的影响相一致。但是对虾肠道

菌群除受饲料中益生菌的影响,养殖水体中微生物的影响和间隔投喂引起的细菌定植变动也不可忽视。而饲料中添加的益生菌由于每天的换水操作一般不会对养殖水体中成为优势菌,若是在生产中使用益生菌,考虑到养殖成本换水频率小,饲料残饵中含有的益生菌长时间的积累可能会对池塘微生态环境有一定的影响,有待进一步研究。

综上所述,在饲料中添加复合益生菌和单一益生菌均可以显著提高对虾肠道脂肪酶、胃蛋白酶和淀粉酶等消化酶的活性,并且较对照组,各实验组肠道菌群总数和优势菌群数在整个实验阶段发生了显著增加,结合消化酶活性和肠道菌群两方面的变化,坚强芽孢杆菌和美人鱼发光杆菌灭活菌复合组效果最好,坚强芽孢杆菌和溶藻弧菌灭活菌组次之,即复合菌组的应用效果优于单一组。这为本实验室分离自对虾肠道的几株益生菌的复合应用提供了一定的指导。

## 参 考 文 献

- 丁 贤,李卓佳,陈永青,林黑着,杨莺莺,杨 铿. 2004. 芽孢杆菌对凡纳对虾生长和消化酶活性的影响. 中国水产科学, 11(6): 580-584
- 王国霞,黄燕华,周 晔. 2010. 乳酸菌对凡纳滨对虾幼虾生长性能、消化酶活性和非特异性免疫的影响. 动物营养学报, 22(1): 228-234
- 王彦波,傅玲琳. 2010. 益生菌对凡纳对虾生长性能和消化酶活性的影响研究. 饲料工业, 31(20): 12-14
- 宋奔奔,傅松哲,刘志培. 2009. 水体中添加两种菌剂对凡纳滨对虾存活、生长及消化酶活力的影响. 海洋科学, 33(4): 1-5
- 李桂英,宋晓玲,孙 艳,麦康森,谢国驷,黄 捷. 2011. 几株肠道益生菌对凡纳滨对虾非特异性免疫力和抗病力的影响. 中国水产科学, 18(3): 1358-1367
- 李海兵. 2008. 对虾肠道益生菌的筛选与免疫物质活性评价指标的建立. 见:中国海洋大学硕士学位论文
- 李继秋,谭北平,麦康森. 2006. 白斑综合征病毒与凡纳滨对虾肠道菌群区系之间关系的初步研究. 上海水产大学学报, 15(1): 109-113
- 李继秋. 2003. 对虾微生态制剂的研制与应用. 见:中国海洋大学士学位论文
- 陆家昌,李 活,黄翔鹤. 2010. 枯草芽孢杆菌对水质及凡纳滨对虾幼体免疫指标影响的研究. 南方水产, 6(1): 19-24
- 胡 毅,谭北平,麦康森,艾庆辉,郑石轩,程开敏. 2008. 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. 中国水产科学, 15(2): 244-251
- 唐 黎,王吉桥,程骏驰. 2007. 水产动物消化酶的研究. 饲料工业, 28(2): 28-31
- Boyd E, Massaui L. 1999. Risks associated with the use of chemical in pond aquaculture. Aqua Engin 20(2): 113-132
- Chang FC, Chen HY, Su MS, Liao IC. 2000. Immunomodulation by dietary  $\beta$ -1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish & Shellfish Immunology 10(6): 505-514
- Chiu CH, Cheng CH, Gua WR and 2 others. 2010. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. Fish & Shellfish Immunology 29(6): 1053-1059
- Esiobu N, Arments L, Ike J. 2002. Antibiotic resistance in soil and water environments. International Journal of Environmental Health Research 12(2): 133-144
- Gonzalez JP, Farnes OC, Gaxiola G and 2 others. 2010. The effects of microencapsulated bovine insulin given to *Litopenaeus vannamei* juveniles as a feed additive on growth, metabolism, and digestive enzyme activities. Aquaculture 306(1-4): 252-258
- Moriarty DJW. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164(1-4): 351-358
- Wang YB, Xu ZR. 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal Feed Science and Technology 127(3-4): 283-292
- Wang YB, Li JR, Lin JD. 2008. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. Aquaculture 281(1-4): 1-4
- Zhou XX, Wang YB, Li WF. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture 287(3-4): 349-353
- Ziaei-Nejad S, Rezaei MH, Takami GA and 3 others. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture 252(2-4): 516-524