

益生菌在水产养殖中的应用

PROGRESS ON STUDIES OF PROBIOTICS IN AQUACULTURE

莫照兰 徐怀恕

(青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

1 益生菌的由来

20 世纪初人们开始利用细菌来治疗人类和动物肠道疾病,早为人知的是 Ellinger 1980 年、Sandine 1979 年用嗜酸乳杆菌和乳酸杆菌来防止大肠杆菌感染。Hidu 1963 年发现有益细菌可改善养殖水体环境,促进动物的生长。Parker 1974 年首次使用“Probiotic (s)”一词来描述给动物使用的有益微生物,其定义为:有助于肠道菌群平衡的微生物和物质。在 1994 年的德国汉堡研讨会上,学者们将 Probiotics 狭义地定义为“改善微生物和酶的平衡,或刺激特异性和非特异性免疫机制的活菌和(或)死菌(包括组分和产物)”^[1]。Austin 等用细菌、光合细菌、酵母菌和微藻来改善水产动物内外环境的微生物平衡,刺激特异性和非特异性免疫机制,促进生长,也将它们称为“Probiotics”^[5]。国内学者刘群等 1988 年将 Probiotics 称为“益生菌”。因此广义地说,用于水产养殖的益生菌应该包括细菌、真菌、藻类及其代谢产物在内,旨在改善动物的肠道环境和水环境的微生物平衡,增强免疫防御能力,抑制病原微生物,促进动物生长。

近 20 a 来水产养殖业迅速发展,工业化高密度养殖规模日益扩大,与此同时,未处理养殖废水和工业、生活污水的排放使近岸海水受到严重的污染,养殖生态环境遭到破坏,致使养殖病害频繁发生。目前主要使用广谱抗生素来控制病害的发生,而过度使用抗生素药物不仅使细菌耐药性增加,破坏和干扰养殖环境的正常微生物区系,导致微生物的生态失调,产生二重感染^[2],还使抗生素在生物体内残留,人长期摄入含有残留抗生素的食品,可导致慢性中毒等,对人体产生危害。益生菌无毒无副作用,无残留污染,不产生抗性,能有效地改善养殖生态环境,提高养殖动物的免疫能力,减少疾病的发生,维持养殖生态平衡。

2 益生菌在水产养殖中的作用

益生菌包括有益细菌、真菌、藻类和(或)其代谢

产物,其作用具体有三类。

2.1 竞争性排斥病原菌

有益细菌产生抗菌物质,和有害细菌竞争生态位,从而抑制病原微生物,改善动物的肠道内环境和水体外环境,保护动物免受病原菌的侵害。甲壳类动物是水产养殖的重要对象,其免疫系统与脊椎动物不同,没有淋巴组织,缺乏常规免疫球蛋白,防御机制主要依靠各种血细胞产生的非特异性物质(凝集素、溶菌酶、C 反应蛋白等)。益生菌除了竞争性排斥病原菌外,还可产生非特异性免疫调节因子,提高动物巨噬细胞的活性。因此用益生菌来刺激甲壳动物的免疫系统,增强其防病抗病能力,显得尤其重要。此外益生菌对鱼类作用方面也有不少研究工作。

Meada, Nogami 1992 年用分离得到的细菌竞争排斥水中的致病性弧菌及气单胞菌,提高虾蟹幼体成活率,促进生长。这些细菌是养殖水体的正常菌群,不危害养殖动物、正常水体中的微藻和其他生物,其机制是分泌抑菌性物质来竞争生态位,抑制病原菌。Nogami 分离到的细菌 PM-4,其许多生理生化性质与假单胞菌和得莱氏菌(Deleya)相似,但辅酶 Q 的成分很不相同,可能为新种。

弧菌属细菌在海水动物细菌区系中占主要地位,是主要的病原菌,但 Austin 等、Lee 等认为仅有少部分的弧菌是真正的致病菌^[6,8]。Daniels 1993 年在厄瓜多尔的养殖水体中发现溶藻胶弧菌(*Vibrio algolyticus*)可抑制万氏对虾的病原菌-副溶血弧菌,幼体的成活率和生长都有提高;此菌还可控制蚤状综合症的发生,作用效果与抗生素相同。作者认为溶藻胶弧菌比病原菌生长快,可优先占据对虾消化道,阻止病原菌的侵染。Austin 用其分离的溶藻胶弧菌注射或浸浴大西洋鲑鱼时,可抵抗致病性杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)和病海鱼弧菌(*V. ordalii*)等的感染,此菌在鲑鱼的消化道能存活 21 d 以上^[5],说明其在鲑鱼消化道有一个适

收稿日期:1998-03-30

合生长的小生境,占据了气单胞菌和弧菌的生态位,从而保护鲑鱼免受致病菌的侵害。

荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)能抑制杀鲑气单胞菌的生长。Smith 1993年在实验室条件下从鲑鱼的皮肤粘膜和鳃分离到3株对杀鲑气单胞菌有抑制作用的荧光假单胞菌,它们竞争性吸收铁离子,从而抑制杀鲑气单胞菌的生长。

Gatesoupe 1991年认为除了弧菌、假单胞菌等对病原菌有抑制作用外,芽孢杆菌属的细菌也有拮抗病原菌和促进动物生长的作用。

Porcile等1991年指出蓝细菌等原核生物藻类、真菌可产生多种活性物质,其中包括抗生素类物质,对陆地病原细菌和真菌、海洋细菌有拮抗作用。Austin 1992年发现微藻*Tetraselmis succica*能产生一种水溶性的抗菌物质,对常见的鱼类嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*)等7种病原菌有抑制作用。此藻用作饵料添加剂时,能抵抗病原菌对大西洋鲑鱼的感染,减少养殖水体细菌总数;用于治疗时,藻细胞及其提取液能抵抗病原菌的侵袭。进一步研究表明,一种葡聚糖和其他活性物质起到增强动物非特异性抗病能力的作用。

Okamoto 1988年、Prieur等1979年指出益生菌不仅能抗细菌病原,而且对病毒也有抗性。Okamoto 1988年发现一种红螺假单胞菌的粗提液可抗传染性肝坏死病毒和Yamane肿瘤病毒;Myouga 1995年等从海洋单胞菌中提取的一种大分子物质能杀死疱疹病毒、杆状病毒。一些弧菌、假单胞菌、荧光假单胞菌等均有不同程度的杀病毒作用^[9]。

2.2 促进动物生长

很多益生菌中的细菌、真菌、微藻及其产物含有丰富的蛋白质和氨基酸、维生素,是动物幼体和活饵料必需的营养;动物肠道有益菌群能促进消化道内多种氨基酸、维生素等一系列营养成分的有效合成和吸收利用,从而促进生长。

Imamura, Takahashi 1972年等发现养殖水体繁殖起来的自然微生物群落可提高虾蟹幼体的存活率。Maeda 1992年认为藻类光合作用产生的有机物、细菌、原生动物和其他微生物构成的微生物食物团在水产动物养殖食物链中起着重要的作用。作者用土壤浸液为营养物质制备微生物食物团进行斑节对虾幼体的养殖,未加入幼体前细菌、硅藻、鞭毛藻数目逐渐上升,加入幼体后数目相继减少,说明对虾利用微生物食物团作开口饵料。荧光染色证明蟹幼体消化道有吃

入的微生物食物团团块,因此微生物食物团在甲壳类动物的幼体成活率和产量中起了重要的作用^[10]。

Austin等1990, 1992, 1994年认为微藻和酵母菌可直接作养殖动物的食物。Andlid发现定植在鱼类肠道的酵母菌可被消化吸收利用。酵母菌细胞壁表面有一种磷脂酸,是鱼类肠道粘膜的特异性受体,因此能大量定植于消化道,同时对鱼没有副作用。此外酵母菌还能产生乙醇和酸,使pH下降,抑制杀鲑气单胞菌。

益生菌中的细菌对海洋动物活饵料——轮虫的生长和繁殖有重要影响。Gatesoupe 1991年、Borgaert 1993年认为乳酸杆菌(*Lactobacillus* spp.)、粪链球菌(*Enterococcus faecium*)、溶藻胶弧菌可使轮虫生长率大大提高,但并非所有的溶藻胶弧菌都能促进轮虫的生长。Yu等1989, 1990年认为有的会引起轮虫生长率下降。轮虫生长率提高的原因是能够捕食细菌,同时利用细菌分泌到培养基中的可溶性化合物,如V_{B12}, V_A, V_C等。但Shiri认为轮虫捕食细菌受自身生理和环境条件的影响。微藻质量低劣和浓度不够时,轮虫才捕食细菌获得营养^[10]。到目前为止,能促进轮虫生长的细菌有弧菌、假单胞菌、乳酸杆菌和粪链球菌。假单胞菌、莫拉氏菌、微球菌可提高轮虫的有性生殖,而只有产生维生素B₁₂的菌株才可提高轮虫的无性生殖,作用机制仍需进一步研究。Prieur等1979年认为双壳类动物的消化道细菌不仅能产生高浓度的胞外酶,直接将食物分解成较简单的成分,促进幼体对食物的消化吸收,而且本身可作为幼体的食物。Douillet 1991, 1993年指出肠道菌可提供幼体生长所必需的营养物质,促进动物生长,提高成活率。王祥红1997年报道中国对虾肠道菌能增加不同发育阶段幼体的变态率和成活率,抗病力和低盐耐受力有所提高,体重和体长显著增加;研究还发现肠道菌产生许多降解饵料的蛋白酶、淀粉酶、脂酶、纤维素酶。

2.3 改善水质

益生菌中的细菌、真菌和微藻是生物降解的主要成员,可清除有机废物,改善水体环境。

水中各种有机污染物在生物降解过程中,需氧有机污染物首先在细胞体外发生水解,分解为较简单的化合物,然后再透入细胞内部进一步分解,一部分被合成细胞材料,供分解者生长和繁殖,另一部分则在分解中释放能量,把最简单的生成物排除。整个过程菌属于分解者对有机物的代谢作用,使有机物从中得到降解。

细菌直接参与了水体环境的腐植质的裂解作用。

Mankaeva 1966 年, Jones 1982 年和 Marco 1990 年等发现弧菌和气单胞菌等对活的死的藻类有抑制和溶解作用, 这些细菌作用对象广泛, 有蓝藻、甲藻和硅藻。作用的途径有通过分泌活性物质如羟氨、蛋白质类物质、抗甲藻因子、吩嗪类色素物质等抑制藻类生长; 有的靠细胞表面的裂解酶。作用的机制各式各样, 有作用于生理过程如阻断呼吸链、抑制细胞壁合成, 有靠溶解酶裂解细胞。这些均使水环境直接得到了净化。Martin Alexander 1982 年利用异养细菌和真菌完成化学药物的降解和转化, 菊池弘太郎 1992 年利用硝化细菌去除鱼体排泄物和残饵, 清除氨。游锦华、崔竞进等用光合细菌作饵料添加剂和水质净化剂, 均取得显著的效果^[3, 4]。

3 益生菌的作用机理

3.1 抑制有害微生物

益生菌参与养殖环境和动物消化道有益菌群与致病菌之间生存和繁殖的空间、时间、定居部位以及营养素的竞争, 胁迫致病菌群的生存、繁殖、定居以及附着。有益菌与宿主粘膜上皮紧密结合生成致密性菌膜, 形成微生物屏障; 附着于动物的消化道、呼吸道及皮肤上的有益菌, 在代谢过程中产生挥发性脂肪酸和乳酸, 降低生境内的 pH 和 Eh, 产生过氧化氢, 抑制病原菌; 有的细菌产生抗生素和细菌素, 杀死病原菌。

3.2 改善机体代谢, 补充机体营养成分, 促进生长

有益细菌和真菌可作饵料添加剂, 随着它们在动物消化道内的繁衍, 产生动物生长过程中必需的营养物质, 如氨基酸、维生素、胆盐等。许多肠道有益菌具有活性较强的淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶等, 可提高饲料转化率, 促进动物生长和提高体重。

3.3 刺激机体免疫系统, 提高机体免疫力

益生菌中的有益菌是良好的免疫激活剂, 能有效提高抗干扰素和巨噬细胞的活性, 通过产生非特异性免疫调节因子等激发机体免疫, 增强机体免疫力和抗病力。

3.4 参与生物降解, 消除有机污染物

益生菌中有效地降解有机污染物的细菌有假单胞菌、枯草芽孢杆菌、多粘球菌、硝化细菌、肠道菌群等, 它们发挥氧化、氨化、硝化、反硝化、解磷、硫化、固氮等作用, 将动物的排泄物、残存饲料、浮游生物残体、化学药物等迅速分解为 CO₂、硝酸盐、磷酸盐、硫酸盐等, 是物质循环流动不可缺少的部分。

4 益生菌在水产养殖使用中应注意的问题

益生菌在水产养殖中的使用方法有: (1) 注射或浸浴生物体; (2) 作为饲料添加剂; (3) 直接加入水环境。

注射或浸浴的方法使益生菌与动物直接接触, 能尽快刺激动物的免疫系统, 增强抗病能力, 因此要注意剂量和浓度的使用, 才能最大刺激动物的免疫机制。另外, 注射适合于较大的动物, 并且注射造成的机械损伤提供了病原菌感染的条件, 使病原菌有机可乘。Austin 等 1995 年用溶藻胶弧菌抵抗杀鲑气单胞菌对鲑鱼的侵染实验表明, 注射浓度为 10⁶ 个/ml, 浸浴浓度为 10⁸ 个/ml 时, 杀鲑气单胞菌感染鲑鱼的机会大大减少。

益生菌作为饵料添加剂也受许多因素影响。益生菌的组成主要是活的微生物, 饵料制粒过程中微生物存活力和稳定性受破坏甚至死亡, 因此在实际应用中效果不佳或不稳定。运用基因工程的方法选择耐高温的菌株, 可根本上解决制粒过程中微生物受破坏的问题。

将益生菌直接加入养殖水体中可避免上述的不足, 但是要注意环境是否适合有益菌的生存和繁殖, 如水体加入了抗生素等化学物质, 就会降低益生菌的作用效果; 益生菌的加入量要求使有益菌成为优势, 在养殖水体才能发挥最大作用。

5 结论

目前在国内, 益生菌在畜禽日粮中应用较多, 在水产养殖中应用较多的益生菌是光合细菌, 其在改善养殖水质和作为饲料添加剂方面已取得良好的效果。但菌种单一, 不能满足多种养殖对象和养殖环境的要求, 应利用多菌株多功能的益生菌来适应水产养殖的需求, 这方面的工作仍需要进一步深入和细致的研究。

参考文献

- 1 郭杰炎等。今日微生物学信息, 1997, 2(1): 1~ 2
- 2 康白。微生物生态学。大连: 大连出版社, 1988。131~ 132, 171~ 173
- 3 游锦华等。水生生物学报, 1995, 19(1): 94~ 95

- 4 崔竞进等。青岛海洋大学学报,1997, **27**(2):191~ 194
- 5 Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P. A. W. *et al.*. *Journal of Fish Diseases*, 1995, 18: 93~ 96
- 6 Austin, B. . *Journal of Fish Disease*, 1992, 15: 55~ 61
- 7 Kulik. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 1995, **101**(6): 585~ 599
- 8 Lee-Kou-kau, Yu-Shu-Ru, Chen-Ferng-Ruey *et al.*. *Curr. Microbiol.*, 1996, **32**(4): 229~ 231
- 9 Myouga, H., Yoshimizu, M., Tajima K. *et al.*. *Fish Pathol.*, 1995, **30**(1):15~ 22
- 10 Shiri Harzevili, A. R., Van Duffel H., Defoort T. *et al.*. The influence of a selected strain *Vibrio anguillarum* TR27 on the growth rate of the rotifer, *Brachionus plicatilis* in two culture conditions. In: Lavens, P., Jaspers, E., and Roelants, I. Larv'95-Fish & Shellfish Larviculture Symposium. Special Publication No. 24, Gent. Belgium: European Aquaculture Society, 1995. 83 ~ 85