

饵料中添加益生菌对大菱鲆幼鱼肠道菌群及部分免疫指标的影响

潘 雷, 郭 文, 高凤祥, 胡发文, 菅玉霞, 张少春, 王 雪

(山东省海水养殖研究所, 山东 青岛, 266071)

摘要: 作者以初体质量为 (4.80 ± 0.11) g的大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)为研究对象, 在循环水水族箱中进行 60 d 饲喂实验, 研究饲料中添加单一益生菌和复合益生菌对大菱鲆肠道菌群及部分血液免疫指标的影响。以基础饲料为对照组, 在基础饲料中分别添加枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌 + 地衣芽孢杆菌(1:1)、嗜酸乳酸菌(*Lactobacillus acidophilus*)、双歧杆菌(*Bifidobacterium inopinatum*)、嗜酸乳酸菌 + 双歧杆菌(1:1)、枯草芽孢杆菌 + 地衣芽孢杆菌 + 嗜酸乳酸菌 + 双歧杆菌(1:1:1:1), 每克饲料约含菌 3.0×10^9 个/g 干质量, 共配制 7 种实验饲料。实验结果显示, 饲料中添加益生菌对肠道中总菌数无显著影响, 但显著降低了肠道弧菌数($P < 0.05$), 显著提高了大菱鲆酚氧化酶活力、溶菌酶活性和总抗氧化力。添加不同的益生菌对血细胞数、血清蛋白浓度及超氧化物歧化酶的影响不同, 例如添加的益生菌中含有乳酸菌能显著提高大菱鲆血清蛋白浓度($P < 0.05$), 而添加芽孢杆菌无此效果。上述实验结果表明, 与添加单一益生菌相比, 在饲料中添加复合益生菌对降低大菱鲆肠道弧菌总数, 提高机体免疫力具有更好的促进作用。

关键词: 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*); 益生菌; 肠道菌群; 免疫

中图分类号: S963.21+1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)02-0034-06

抗生素的发现促进了人类医学的巨大进步, 大量的抗生素的广泛应用, 使动物养殖业, 尤其是水产养殖业不断受益。从生产实践来看, 使用传统的消毒剂和抗生素并不能有效地防止疾病的发生^[1], 而且还可能导致抗药性菌株的出现^[2], 其抗药性基因还可转移给从未暴露于抗生素的其他菌株, 因此迫切需要减少抗微生物药物的使用^[3-4]。

益生菌是一种活的微生物, 能维持肠道平衡而有效地影响宿主动物, 目前也称为微生态调节剂(Microecological modulator)、EM 菌制剂(Efficient microbe agent)等^[5], 现代的定义倾向为: 在微生态理论指导下, 调整微生态失调, 保持微生态平衡, 增强新陈代谢, 促进生长发育, 从而提高宿主的健康水平或增进健康状态的微生物及其代谢产物和生长促进物质^[6]。益生菌菌种主要有芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)、乳酸菌属(*Lactobacillus* spp.)、弧菌属(*Vibrio* spp.)、和酵母(*Saccharomyces* spp.)等。

Kozasa 首次将微生态制剂应用于水产养殖, 采用 1 株从土壤中分离的芽孢杆菌(*Bacillus toyoi*)处理日本鳗鲡(*Anguilla japonica*), 降低了由爱得华氏菌

引起的死亡, 之后微生态制剂的研究便得到迅速发展^[7]; Gatesoupe^[8]加乳酸细菌于轮虫的培养基中, 并用该轮虫作为大菱鲆仔鱼的饵料, 当仔鱼被病原弧菌感染时, 能有效降低其死亡率; Moriarty^[9]在印度尼西亚虾场的研究表明, 在没有使用芽孢杆菌的虾池中, 80 d 之内虾因发光弧菌病而死亡, 而使用几株芽孢杆菌培养物的虾池, 160 d 之后虾没有任何问题; Rengpipat 等^[10]以添加芽孢杆菌 S11 的饵料饲育斑节对虾后期幼体 100 d 之后, 以病原菌哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)浸浴感染, 10 d 之后所有芽孢杆菌 S11 处理组的对虾 100% 存活, 而对照组的成活率只有 26%。Gildberg^[11]等从大西洋鳕(*Gaids morhua*)肠道中分离到的一株乳酸杆菌并制成冻干粉添加到该鳕鱼的饲料中喂食鱼苗, 结果发现乳酸杆菌可以提高对鳗弧菌产生疾病的抵抗力。

作者以大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)幼鱼为研

收稿日期: 2010-07-26; 修回日期: 2011-01-17

基金项目: 国家海洋局公益性专项(200705023)

作者简介: 潘雷(1979-), 男, 山东青岛人, 硕士, 工程师, 主要从事海洋生物学研究; 电话: 0532-86513001, E-mail: panlei7799@126.com

研究对象,旨在探讨大菱鲆苗种培育养殖生产实践中,在饲料中直接添加单一及复合种类的常见益生菌对大菱鲆幼鱼消化道酶活力和肠道菌群的变化,从而为益生菌在大菱鲆养殖中的直接应用提供理论依据。本次实验选用的芽孢杆菌种类为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),选用的乳酸菌种类为嗜酸乳酸菌(*Lactobacillus acidophilus*)和双歧杆菌(*Bifidobacterium inopinatum*)。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼及分组

实验于2008年4月15日~6月15日在山东省海水养殖研究所中试基地实验室进行,实验用大菱鲆体质健康,体长5~6 cm。在海水良种繁育中心实验室暂养一周后随机分为8组:对照组、枯草芽孢杆菌组、地衣芽孢杆菌组、地衣芽孢杆菌+枯草芽孢杆菌(质量比为1:1)、嗜酸乳酸菌组、双歧杆菌组、嗜酸乳酸菌+双歧杆菌(质量比为1:1)组、地衣芽孢杆菌+枯草芽孢杆菌+嗜酸乳酸菌+双歧杆菌(质量比为1:1:1:1)组。每组3个重复,每个重复100尾鱼,养殖在容积1 m³循环水水族箱中,养殖密度100尾/m³。

1.2 实验用饲料

基础饲料以鱼粉、豆粕为主要原料配制饲料,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2 mm和3 mm两种粒径的饲料,在90℃熟化30 min后,于阴凉处晾干,剪切成3 mm长的颗粒贮存于-20℃的冰柜中待用。

8组实验组除分别添加了不同菌种及比例的菌液外,各种营养成分均相同(实验中枯草芽孢杆菌及地衣芽孢杆菌单菌菌液购自山东济南大吉饲料有限公司,菌含量不小于10¹⁰ CFU/mL;嗜酸乳酸杆菌及双歧杆菌干粉购自江苏沃尔德实业有限公司,菌含量不小于10¹⁰ CFU/g)。芽孢杆菌属能耐高温高压^[12],而乳酸菌属在50℃可以保持100%的存活率^[13],所以实验组采用搅拌法,把菌液直接加入饲料中,制成湿颗粒,于40℃烘至半干,然后在-20℃冰箱保存,以备投喂。每克饲料约含菌3.0×10⁹个/g干质量。

日投喂量为体质量的5%~10%,分2次投喂。

1.3 饲养管理

分组后的实验用鱼养殖在循环水水族箱中,每天换水2次,每次换水1/2。每天投喂两次,分别为7:30~8:30,16:30~17:30,投喂量以饱食为标准。每箱鱼投喂的饲料于投喂前和投喂后称质量。每次投喂前先吸取粪便,投喂后吸取残饵,将残饵过滤烘干保存,以备计算摄食量。饲养条件恒定(水温17±1℃,盐度32±0.2),实验共进行60 d。

1.4 肠道菌群检测

养殖中期(第30天)和后期(第60天)测定大菱鲆肠道弧菌及细菌总数。测定方法参考李继秋^[14]的方法,从每水族箱中随机取10尾大菱鲆,用1/10000的MS222麻醉后,无菌操作将大菱鲆解剖,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,收集鱼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,用*N*表示,单位为cfu/ind肠道,并用lg*N*处理。

1.5 血液免疫指标测定

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,每个养殖箱随机取3尾鱼,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的无菌注射器自对鱼心脏抽取血液,每个养殖箱随机取20尾鱼血液合并置于无菌离心管中4℃静置过夜后,3 000 r/min离心10 min,取上层血清置于-80℃超低温冰箱保存待测。

酚氧化酶活性测定:采用Hernández-López等^[15]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。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

时, 每 mL 血清每分钟吸光度增加 0.001 为 1 个酶活性单位。

1.6 数据分析

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 P 为 0.05。

2 实验结果

2.1 肠道内细菌总数和弧菌总数

各实验组及对照级养殖中期(30 d)和养殖后期(60 d)肠道细菌总数和弧菌总数见表 1。

与对照组相比, 整个实验过程中, 添加了益生菌的各实验组对大菱鲂幼鱼肠道中的总菌数均无显

表 1 大菱鲂养殖中期和后期肠道细菌总数和弧菌总数

Tab. 1 Effects of different dietary probiotics on total bacterium counts (TBC) and Vibrios bacterium counts (VBC) in intestine tract of *Scophthal musmaximus* $n=3; X \pm SE; \lg CFU/ind$

饲料中益生菌	中期		后期	
	细菌总数 (TBC)	弧菌总数 (VBC)	细菌总数 (TBC)	弧菌总数 (VBC)
对照组	7.44 ± 0.08	6.98 ± 0.21	7.58 ± 0.18	7.11 ± 0.13
枯草芽孢杆菌(<i>B.subtilis</i>)	7.76 ± 0.16	4.75 ± 0.45	7.60 ± 0.21	5.67 ± 0.26
地衣芽孢杆菌(<i>B.licheniformis</i>)	7.12 ± 0.11	4.62 ± 0.23	7.22 ± 0.31	5.13 ± 0.19
地衣芽孢杆菌+枯草芽孢杆菌(1:1)(<i>B.licheniformis</i> + <i>B.subtilis</i>)	7.22 ± 0.26	4.42 ± 0.37	6.97 ± 0.25	4.96 ± 0.23
嗜酸乳酸菌(<i>Bifidobacterium inopinatum</i>)	7.39 ± 0.41	4.40 ± 0.41	7.13 ± 0.29	5.22 ± 0.17
双歧杆菌(<i>Lactobacillus acidophilus</i>)	7.28 ± 0.33	4.62 ± 0.17	7.22 ± 0.36	4.9 ± 0.11
嗜酸乳酸菌+双歧杆菌(1:1) (<i>Bifidobacterium inopinatum</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i>)	7.60 ± 0.29	4.57 ± 0.22	7.34 ± 0.38	4.87 ± 0.20
地衣芽孢杆菌+枯草芽孢杆菌+嗜酸乳酸菌+双歧杆菌(1:1:1:1) (<i>B.licheniformis</i> + <i>B.subtilis</i> + <i>Bifidobacterium inopinatum</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i>)	7.41 ± 0.30	4.37 ± 0.18	7.39 ± 0.27	4.66 ± 0.14

著影响($P > 0.05$), 但在中期和后期均显著降低了大菱鲂幼鱼肠道弧菌数($P < 0.05$); 但实验后期大菱鲂幼鱼肠道弧菌数与中期相比没有显著变化($P < 0.05$)。

2.2 对大菱鲂幼鱼免疫力的影响

免疫指标与对照组相比, 添加益生菌能不同程度提高大菱鲂幼鱼的血细胞数、血清蛋白浓度、酚

氧化酶活力(表 2)及溶菌酶、超氧化物歧化酶及总抗氧化力(表 3)。

实验数据表明, 添加益生菌的实验组均能使大菱鲂幼鱼的血细胞数显著增加($P < 0.05$)。复合益生菌能使大菱鲂幼鱼的血清蛋白浓度显著提高($P < 0.05$), 其中, 添加单一及复合乳酸菌的 3 个实验组和添加地衣芽孢杆菌+枯草芽孢杆菌+嗜酸乳酸菌+双

表 2 饲料中益生菌对大菱鲂免疫功能的影响 I

Tab. 2 Effects of different dietary probiotics on immunity of *Scophthal musmaximus* $n=3; X \pm SE$

饲料中益生菌	血细胞数 (10^7 个/mL)	血清蛋白浓度 (g/L)	酚氧化酶 (U/mL)
对照组	1.88 ± 0.97	220.62 ± 4.27	6.84 ± 0.65
枯草芽孢杆菌(<i>B.subtilis</i>)	1.99 ± 1.01	226.36 ± 3.47	14.32 ± 0.93
地衣芽孢杆菌(<i>B.licheniformis</i>)	2.02 ± 0.88	231.07 ± 3.11	13.82 ± 1.01
地衣芽孢杆菌+枯草芽孢杆菌(1:1)(<i>B.licheniformis</i> + <i>B.subtilis</i>)	1.99 ± 0.67	233.54 ± 2.86	14.99 ± 0.87
嗜酸乳酸菌(<i>Bifidobacterium inopinatum</i>)	1.91 ± 0.58	248.63 ± 3.61	16.32 ± 1.27
双歧杆菌(<i>Lactobacillus acidophilus</i>)	1.93 ± 0.74	250.69 ± 2.97	17.36 ± 1.45
嗜酸乳酸菌+双歧杆菌(1:1) (<i>Bifidobacterium inopinatum</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i>)	1.95 ± 0.63	249.32 ± 2.83	17.20 ± 1.09
地衣芽孢杆菌+枯草芽孢杆菌+嗜酸乳酸菌+双歧杆菌(1:1:1:1) (<i>B.licheniformis</i> + <i>B.subtilis</i> + <i>Bifidobacterium inopinatum</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i>)	2.10 ± 0.37	252.10 ± 3.95	18.90 ± 1.57

歧杆菌的实验组与对照组相比血清蛋白浓度显著提高($P < 0.05$), 添加单一及复合芽孢杆菌的 3 个实验组与对照组相比血清蛋白浓度略有提高, 但差异不显著($P > 0.05$), 说明单一及复合乳酸菌在提高大菱鲆幼鱼血清蛋白浓度方面起主要作用。

各实验组均能显著提高大菱鲆血清中酚氧化酶活力($P < 0.05$), 其中添加单一及复合乳酸菌的 3 个实验组和添加地衣芽孢杆菌+枯草芽孢杆菌+嗜酸乳酸菌+双歧杆菌的实验组与对照组相比, 差异更为明显。

各实验组均能显著提高大菱鲆幼鱼血清中溶菌酶活力($P < 0.05$), 其中添加复合芽孢杆菌和复合乳

酸菌的实验组在提高大菱鲆幼鱼血清中溶菌酶活力方面比添加单一菌种效果更为明显, 添加地衣芽孢杆菌+枯草芽孢杆菌+嗜酸乳酸菌+双歧杆菌复合益生菌的实验组, 效果非常显著, 比对照组提高了 126.7%。

添加了嗜酸乳酸菌+双歧杆菌的实验组和添加了地衣芽孢杆菌+枯草芽孢杆菌+嗜酸乳酸菌+双歧杆菌复合益生菌的实验在提高大菱鲆幼鱼血清中超氧化物歧化酶活力方面与对照组相比差异更为显著($P < 0.05$)。

各实验组均能显著提高大菱鲆幼鱼血清的总抗氧化力($P < 0.05$), 各实验组之间差异不显著($P > 0.05$)。

表 3 饲料中益生菌对大菱鲆免疫功能的影响 II

Tab. 3 Effects of different dietary probiotics on immunity of *Scophthal musmaximus*

$n=3; X \pm SE$

饲料中益生菌	溶菌酶 (U/mL)	超氧化物歧化酶 (U/mL)	总抗氧化力 (U/mL)
对照组	17.98 ± 0.81	286.86 ± 2.31	6.01 ± 0.22
枯草芽孢杆菌(<i>B.subtilis</i>)	23.08 ± 1.31	295.64 ± 1.67	13.69 ± 0.49
地衣芽孢杆菌(<i>B.licheniformis</i>)	21.25 ± 0.79	285.62 ± 1.93	12.86 ± 0.35
地衣芽孢杆菌+枯草芽孢杆菌(1 : 1)(<i>B.licheniformis</i> + <i>B.subtilis</i>)	29.50 ± 1.03	292.63 ± 1.48	12.48 ± 0.09
嗜酸乳酸菌(<i>Bifidobacterium inopinatum</i>)	22.84 ± 2.01	299.36 ± 2.02	13.60 ± 0.88
双歧杆菌(<i>Lactobacillus acidophilus</i>)	24.78 ± 1.68	302.87 ± 3.01	14.22 ± 0.69
嗜酸乳酸菌+双歧杆菌(1 : 1) (<i>Bifidobacterium inopinatum</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i>)	30.06 ± 2.31	310.15 ± 2.96	14.15 ± 0.78
地衣芽孢杆菌+枯草芽孢杆菌+嗜酸乳酸菌+双歧杆菌(1 : 1 : 1 : 1) (<i>B.licheniformis</i> + <i>B.subtilis</i> + <i>Bifidobacterium inopinatum</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i>)	40.76 ± 1.98	325.82 ± 3.29	13.99 ± 0.55

3 讨论

本实验中选用的芽孢杆菌菌种为枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌。芽孢杆菌可用作饲料添加剂, 是一种需氧的非致病菌, 以内孢子的形式存在于肠道微生物群落中, 能使肠内的 pH 下降, 氨浓度降低, 促进淀粉、纤维素等分解。芽孢杆菌耐酸、耐盐、耐高温(100)和挤压, 是一种比较稳定的益生菌。本实验中选取中的乳酸菌菌种为嗜酸乳酸菌和双歧杆菌。乳酸菌能分解糖类产生乳酸, 通过酸化作用提高动物对饲料的消化效果, 厌氧或兼性厌氧, 不能形成芽孢, 稳定性较低。双歧杆菌制剂可抑制革兰氏阴性菌, 减少肠杆菌细胞壁内毒素进入鱼体, 保护肝脏。

本实验中, 与对照组相比, 添加了益生菌的各实验组对大菱鲆幼鱼肠道中的总菌数均无显著影响, 但都显著降低了大菱鲆幼鱼肠道中的弧菌总数。分

析其作用机制, 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。郭志勋^[16]等在饲料中添加芽孢杆菌能够促进凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的生长及免疫力, 这些研究结果均与本研究结果相似。

刘克林等^[17]采用有益芽孢杆菌制成的微生态添加剂饲喂鲤鱼苗 100 d 后发现, 实验组免疫器官胸腺、脾脏生长发育较对照组迅速、成熟快, 电镜观察免疫器官内 T、B 淋巴细胞较对照组成熟快、数量增多, 产生抗体增多, 免疫功能增强。

在本实验中, 益生菌对大菱鲆血细胞数、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大菱鲆非特异性免疫能力。

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^[18]在乌颊鱼 (*Sparus 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功能。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^[19]。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^[20-22]

本实验发现添加单一及复合乳酸菌的 3 个实验组和添加地衣芽孢杆菌+枯草芽孢杆菌+嗜酸乳酸菌+双歧杆菌的实验组与对照组相比血清蛋白浓度显著提高($P < 0.05$),添加单一及复合芽孢杆菌的 3 个实验组与对照组相比血清蛋白浓度略有提高,但差异不显著($P > 0.05$),说明饲料中添加乳酸菌在提高大菱鲂幼鱼血清蛋白浓度方面起主要作用。具体作用机理有待于进一步实验研究。

4 结论

在本实验条件下,饲料中添加益生菌,可通过竞争作用机制,维持大菱鲂幼鱼肠道细菌平衡,显著降低大菱鲂幼鱼肠道中的弧菌总数;饲料中添加了益生菌的实验组与对照组相比,各项免疫指标均显著提高,且复合益生菌的添加效果好于单一益生菌。这对于大菱鲂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,益生菌的添加比例及效果还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Balcázar J L, Blas I de, Ruiz-Zarzuola 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] Bruno G G, Ana R, James F T. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms[J]. *Aquac*, 2000, 191 (1/3): 259-270.
- [4] Rosalie A S. International harmonization of antimicrobial sensitivity determination for aquaculture drugs[J]. *Aquac*, 2001, 196(3/4): 277-288.
- [5] 沈德中. 污染环境的生物修复[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 1-356.
- [6] Otles S, Cagindi O, Akcicek E. Probiotics and health[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2003, 4 (4): 369-372.
- [7] Kozasa M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promoter for animal feeding[J]. *Microbiol Aliment Nutr*, 1986, 4: 121-135.
- [8] Gatesoupe F J. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae(*Scophthalmus maximus*) against pathogenic *Vibrio*[J]. *Aquat Living Resour*, 1994, 7: 277-282.
- [9] Moriarty D. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds[J]. *Aquaculture*, 1998, 164: 351-358.
- [10] Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, et al. Effect of a probiotic bacterium on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) survival and growth[J]. *Aquaculture*, 1998, 167: 301-313.
- [11] Gildberg A, Mikkelsen H, Sandarker E, et al. Probiotic effect of latic acid bacterial in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. *Hydrobiologia*, 1997, 352: 279-285.
- [12] 王福强. 牙鲆肠道益生菌的分离鉴定及其应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004, 81-86.
- [13] 周东明, 程林春. 益生菌中菌株对温度、pH 值及抗生素的耐受性试验[J]. *饲料工业*, 1995, 16(11): 34-36.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 刘克林, 何明清. 益生菌对鲤鱼免疫功能影响的研究[J]. *饲料工业*, 2000, 6: 13-14.
- [18] Salinas I, Cuesta A, Esteban M. Dietary administration of *Lactobacillus delbrückii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2005, 19: 67-77.
- [19] Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, et

- al. Immunity enhancement on black tiger shrimp(*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium[J]. Aquaculture, 2000, 191: 271-288.
- [20] 谭北平, 周歧存, 郑石轩, 等. -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.
- [21] 王秀华, 宋晓玲, 黄捷. 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.
- [22] 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 intestinal bacteria and immunity of juvenile *Scophthalmus maximus*

PAN Lei, GUO Wen, GAO Feng-xiang, HU Fa-wen, JIAN Yu-xia, ZHANG Shao-chun, WANG Xue

(Mariculture Institute of Shandong Province, Qingdao 266071, China)

Received: Jul., 26, 2010

Key words: *Scophthal musmaximus*; probiotics; intestinal bacteria; immunity

Abstract: A 60-day experiment was conducted to determine the effect of different dietary probiotics on bacteria of intestine and fecal, and immunity of *Scophthalmus maximus* [initial body weight(4.80 ± 0.11)g]. Basic diet was made of fish meal and defatted soybean meal. These juveniles were fed with eight different diets: basic diet as control, and basic diet supplemented with 3.0×10^9 CFU/g single probiotics (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacterium inopinatum*) or 3.0×10^9 CFU/g compound probiotics (*B.licheniformis* + *B.subilis* 1:1; *B. inopinatum* + *L. acidophilus* 1:1; *B.licheniformis* + *B.subilis* + *B. inopinatum* + *L. acidophilus* 1:1:1:1). Each diet was randomly fed to triplicate groups of 300 turbot reared in circulating water aquarium. The water temperature was 17 ± 1 and the salinity was 32 ± 0.2 during the experimental period.

Results showed that turbot fed compound probiotic decreased highly *Vibrio bacteria* counts (VBC) in intestine compared with those fed with control diet ($P < 0.05$), while the total bacterium counts (TBC) showed no significant changes ($P > 0.05$).

The probiotic also significantly improved immune indicators of turbot ($P < 0.05$), including total hemocyte counts, serum protein concentration, serum phenoloxidase activity (PO), serum lysozyme activity, serum superoxide dismutase (SOD), and total antioxidative capacity (T-AOC). The present results suggested that the diet supplemented with probiotic could improve growth and immunity of turbot, and compound probiotic showed better effects than a single one.

(本文编辑: 谭雪静)