

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

宋奔奔^{1,3}, 傅松哲^{2,3}, 刘志培², 石芳永⁴, 刘 鹰¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 微生物研究所, 北京 100101; 3. 中国科学院 研究生院, 北京 100049; 4. 青岛理工大学, 山东 青岛 266033)

摘要:向水体中添加不同浓度的短小芽孢杆菌 CGMCC 1004(*Bacillus pumilus*)和胶红酵母菌 CGMCC 1013(*Rhodotorula mucilaginosa*)以研究凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)体长、体质量、存活率、胃蛋白酶、肝胰腺淀粉酶和肝胰腺脂肪酶的影响,以及需钠弧菌(*Vibrio natriegens*)的感染效果。结果表明:向水体中添加 10^4 CFU/mL 短小芽孢杆菌能提高对虾体长、存活率,但结果不显著,但对体质量增长率具有显著提高作用;水体中添加 10^4 CFU/mL 短小芽孢杆菌对提高需钠弧菌感染后对虾成活率有一定的提高作用;水体中添加 10^4 CFU/mL 短小芽孢杆菌能显著提高胃蛋白酶活性,但是对肝胰腺淀粉酶活性有一定抑制作用;添加复合菌剂比添加单一菌种的作用要好;亦证明了向水体中添加细菌的方式对凡纳滨对虾的体长、体质量、存活率以及水质指标影响比较小,但是对消化酶具有一定的提高作用。

关键词:凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*); 消化酶; 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*); 胶红酵母菌(*Rhodotorula mucilaginosa*); 需钠弧菌(*Vibrio natriegens*)

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)04-0001-05

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)具有生长迅速、抗病力强、广温广盐、适于高密度养殖等优良特点,是世界各国广泛养殖的对象,也是我国养殖范围最广、产量最高的对虾种类。微生态活菌制剂是一种新型绿色添加剂,不仅能改善虾体肠道微生态环境,提高饲料转化率,促进虾体生长,而且减少排泄物,减轻养殖对水体环境的污染。

芽孢杆菌作为一种益生菌,不但可作为水产动物的饲料添加剂,而且可作为改善水质的微生物调控剂应用于水产养殖中。芽孢杆菌可以提高凡纳滨对虾消化酶活性和成活率,利于养分的消化吸收,促进生长^[1]。在饲料中添加芽孢杆菌有利于改善凡纳滨对虾的生长性能和消化机能,对虾对饲料中各种营养物质的表观消化率均有显著的提高^[2]。开展微生态菌剂在提高对虾的存活率、促进对虾的生长、提高消化酶的活力等方面的研究,对于探讨微生态菌剂对养殖对虾的影响机理,促进对虾的健康养殖技术发展以及水产养殖业的可持续发展具有重要的意义。

本实验通过研究短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)和胶红酵母菌(*Rhodotorula mucilaginosa*)对凡

纳滨对虾养殖水质的改善情况,以及对凡纳滨对虾的存活、生长和消化酶的影响,探讨芽孢杆菌和异养胶红酵母菌对水质、对虾的影响以及作用机理,以期对虾健康养殖提供理论和实践指导作用。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用凡纳滨对虾取自青岛保荣公司养殖场,虾苗先暂养 7 d 然后移至实验缸中。实验对虾体长 $40.74 \text{ mm} \pm 5.40 \text{ mm}$,湿质量 $0.8052 \text{ g} \pm 0.2880 \text{ g}$ 。实验缸为灰色 PVC 板制成,其长 $\times$ 宽 $\times$ 高 $=49 \text{ cm} \times 49 \text{ cm} \times 48 \text{ cm}$,有效水体为 96 L,每个实验缸的对虾放养量为 40 尾。

收稿日期: 2008-11-18; 修回日期: 2009-02-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671620); 国家科技支撑计划项目(2006BAD09A03); 国家 863 计划项目(2006AA100305)

作者简介: 宋奔奔(1983-),男,山西临汾人,硕士研究生,研究方向: 养殖工程学与生态学,电话: 0532-82898705, E-mail: benpeak@126.com; 刘鹰,通信作者, E-mail: yinliuicac@gmail.com

短小芽孢杆菌和胶红酵母均由中国科学院微生物研究所自行分离、培养的菌株。实验所用饲料为“统一牌”凡纳滨对虾配合饲料(2号),主要营养成分如下:水分 12%、粗蛋白 42%、粗脂肪 4%、粗灰分 16%、粗纤维 5%、钙 3.5%、总磷 1%、赖氨酸 2%等。

1.2 实验设计

12 个实验缸,分为 4 组,每组设三个平行;实验组 A 不接种菌剂,作对照组;B 组接种质量比为 10 mg/kg 的短小芽孢杆菌菌剂;C 组接种质量比为 100 mg/kg 的短小芽孢杆菌菌剂;D 组接种 100 mg/kg 短小芽孢杆菌与 100 mg/kg 胶红酵母菌的混合菌剂。在加入芽孢杆菌后,在不换水的情况下,实验 15 d,检测水中 COD, NO_2^- -N 和 NH_4^+ -N 指标;第 15 天,接种 10^4 CFU/mL 需钠弧菌(*Vibrio natriegens*),在 LB broth 中 28℃ 培养 24 h,观察对虾的胃蛋白酶、肝胰腺脂肪酶和肝胰腺淀粉酶等消化能力指标的变化,统计对虾生长情况及死亡率。

1.3 实验管理

实验期间日投喂 2 次,其中 8:00 和 18:00 各一次,每次投喂量约为对虾体质量的 25%。实验期间不换水,温度保持 28~30℃,盐度 28,溶解氧(DO)为 5~7 mg/L, pH 为 7.62~7.85。

1.4 实验方法

1.4.1 测定方法

氨氮、亚硝酸盐氮、化学耗氧量(COD)等水质指标的测定根据《GB 17378.4-1998 海洋监测规范第 4 部分海水分析》测定;胃蛋白酶(Proteinase)、肝胰腺淀粉酶(Amylase)、胰腺脂肪酶(Lipase)的测定均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定。

1.4.2 数据处理与分析

采用 Excel 和 SPSS11.0 软件对数据进行统计分析,数据用单因素方差分析(ANOVA),并进行 LSD 多重比较, $P \leq 0.05$ 表示差异显著,所有数值用平均数±标准误差表示。

2 实验结果

2.1 水体中添加短小芽孢杆菌和胶红酵母菌对虾池水质指标的影响

测定各个对虾实验缸的 COD、氨氮和亚硝酸态氮等水质指标,统计分析结果表明各实验组间无显

著差异,如图 1 所示(因各实验组间差异不显著,故亚硝酸态氮、氨氮、COD 指标均为 12 个虾池的平均值)。

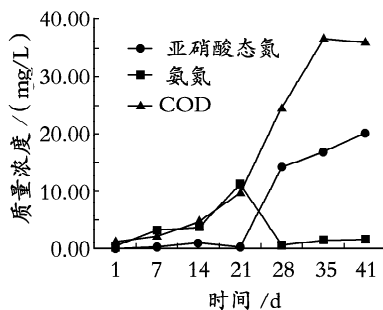


图 1 对虾养殖缸水质指标变化

Fig. 1 Changes of water quality in shrimp tank

图 1 显示 COD 质量浓度从 15 d 起, COD 出现急剧的上升,至 30 d 出现最高峰,这说明随着残饵、粪便的积累, COD 出现上升;随后异养细菌数量剧增, COD 产生与异养细菌对有机物的分解达到动态的平衡, COD 质量浓度出现峰值。氨氮在实验进行到 22 d 时达到最高值,随后出现下降。说明随着氨氮的升高,硝化细菌数量剧增,最后氨氧化细菌和硝化细菌将氨氮氧化为亚硝酸态氮,从而保持虾池较低的氨氮。亚硝酸氮的变化与氨氮的变化相对应,呈先低后高的趋势,最后稳定在 20 mg/L 的水平。亚硝酸盐的升高是由于硝化细菌将氨氮氧化的结果,当硝化细菌氧化氨氮的能力与氧化亚硝酸态氮的能力相当时,达到一个动态平衡,亚硝酸态氮达到峰值。该过程是实验养殖环境中硝化细菌的硝化动力学建立的过程,据此推断本实验虾池的硝化动力学过程建立需要 23 d,而 COD 的稳定需要 35 d 左右。

2.2 水体中添加短小芽孢杆菌和胶红酵母菌对虾体长、体质量和存活率的影响

实验结果表明,体长在各实验组间并无显著差异($P > 0.05$),如表 1 所示。其中 D 组的增长最快,但差异并不显著。体质量增长在整个实验期间,各实验组间并无显著差异($P > 0.05$),其中 D 组的增长最快。在正式实验阶段, C 实验组的体质量增长显著高于 A 对照组($P = 0.046 < 0.05$),其他各组间差异不显著。存活率在整个实验期间,各实验组间并无显著差异($P > 0.05$),其中 C 组的存活率最高。值得注意的是, C 组明显高于 B 组的存活率($P = 0.063 > 0.05$),差异接近显著。

表 1 不同菌剂对凡纳滨对虾体长、体质量及存活率的影响

Tab.1 Effect of different microbes treatments on body length, body weight and survival rate of *Litopenaeus vannamei*

处理	体长(mm)			体质量(g)			最终存活率 (%)
	初始	14 d	45 d	初始	14 d	45 d	
A	40.74±5.40	43.82±5.21	46.14±4.07	0.805±0.288	1.068±0.353	1.124±0.271	78.67
B	40.74±5.40	45.20±4.65	49.01±3.65	0.805±0.288	1.164±0.329	1.290±0.275	74.67
C	40.74±5.40	41.69±4.25	47.29±2.91	0.805±0.288	0.877±0.228	1.208±0.214	88.00
D	40.74±5.40	45.14±5.34	45.14±5.34	0.805±0.288	1.153±0.395	1.363±0.395	84.00

2.3 水体中添加短小芽孢杆菌和胶红酵母菌对凡纳滨对虾消化酶的影响

2.3.1 对胃蛋白酶活性的影响

预实验结果表明,C 组的胃蛋白酶活性最高,但

表 2 不同菌剂对凡纳滨对虾消化酶活力的影响

Tab.2 Effect of different microbes treatments on digestive enzyme of *Litopenaeus vannamei*

处理	肝胰腺淀粉酶活力(U)		肝胰腺脂肪酶活力(U)		胃蛋白酶活力(U)	
	15 d	45 d	15 d	45 d	15 d	45 d
A	0.22±0.06 ^a	0.26±0.01 ^c	25.14±13.27 ^b	15.72±10.65 ^a	17.93±12.47 ^a	13.99±12.38 ^a
B	0.24±0.05 ^a	0.25±0.02 ^{b^c}	14.94±7.26 ^a	22.91±9.82 ^a	28.53±20.03 ^a	27.13±11.49 ^{ab}
C	0.26±0.01 ^a	0.22±0.01 ^{ab}	36.74±5.48 ^c	20.01±7.50 ^a	79.13±40.03 ^a	35.73±19.36 ^b
D	0.24±0.04 ^a	0.22±0.03 ^a	25.38±4.07 ^b	19.94±10.96 ^a	65.69±50.90 ^a	48.61±26.36 ^b

注:同一行中,不同字母表示 LSD 多重比较检验差异显著($P\leq 0.05$)

C 组的胃蛋白酶活性显著高于 A 对照组($P\leq 0.05$),但与 B 组、D 组均无显著差异。

D 组的胃蛋白酶活性最高,显著高于 B 组($P\leq 0.05$),极其显著地高于 A 对照组($P\leq 0.01$)。说明添加 100 mg/kg 的短小芽孢杆菌和 100 mg/kg 的胶红酵母菌的混合菌剂能极其显著地提高对虾胃蛋白酶活性。

2.3.2 对肝胰腺淀粉酶活性的影响

预实验阶段,各组间的肝胰腺淀粉酶活性没有显著差异($P>0.05$)。

正式实验阶段,A 组与 B 组无显著差异,与 C 组、D 组具有极显著差异($P\leq 0.01$)。

B 组与 C 组具有极显著差异($P\leq 0.01$),与 D 组具有显著差异($P\leq 0.05$)。说明与添加 10 mg/kg 的短小芽孢杆菌相比,添加 100 mg/kg 的短小芽孢杆菌能极其显著地降低肝胰腺淀粉酶活性。

C 组与 A 组、B 组有极其显著差异($P\leq 0.01$),与 D 组无显著差异($P>0.05$),说明添加 100 mg/kg 的短小芽孢杆菌和添加 100 mg/kg 的短小芽孢杆菌与胶红酵母混合菌剂均能大大降低肝胰腺淀粉酶活

各实验组间无显著差异,见表 2。

正式实验阶段,A 组的蛋白酶活性与 B 组并无显著差异($P>0.05$)。说明添加 10 mg/kg 的短小芽孢杆菌对凡纳滨对虾的胃蛋白酶活性没有显著提高。

性,但二者并无显著性差异。

2.3.3 对肝胰腺脂肪酶活力的影响

在预实验阶段,A 组与 B 组具有极其显著差异($P\leq 0.01$)。说明添加 10 mg/kg 的短小芽孢杆菌能极其显著地降低肝胰腺脂肪酶活力。B 组与 C 组、D 组具有显著性差异($P\leq 0.05$)。说明短时间内添加 10 mg/kg 的短小芽孢杆菌能降低肝胰腺脂肪酶活力。

在正式实验阶段,各实验组间均无显著差异。

3 讨论

革兰氏阳性细菌,尤其是某些芽孢杆菌能分泌各种胞外酶,并耐受高温、干燥,被广泛用于益生菌添加到饲料中^[3,4]。影响对虾消化酶水解过程有多种因素,如饲料^[5]、个体发育生长^[6]、个体大小^[7]、生理节律、蜕皮阶段等,甚至虾池水质变化都能影响消化酶的活力^[8]。芽孢杆菌能通过与其他细菌竞争营养、空间,并能通过产生抗生素来抑制其他细菌的生长^[4]。添加杆菌能通过激活细胞和体液的免疫系统增强免疫力,从而提高对虾存活率^[9]。饲料中添加

杆菌实验组的饲料转换率、特定生长率以及对虾的最终产量显著高于对照组^[10]。本实验证明添加 100 mg/kg 质量比的短小芽孢杆菌能显著提高对虾体质量增长率,并对存活率有一定提高作用。

饲料中添加 2×10^7 个/g 的枯草芽孢杆菌 B11, 可使鱼体胃肠的蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活力高于对照组 10% 左右^[11]。本实验证明,水体中添加短小芽孢杆菌能显著提高胃蛋白酶活力,但是降低了肝胰腺淀粉酶活力,这可能是由于添加方式不同、消化酶不同所引起的。可以推断,水体中的芽孢杆菌可能通过胞外酶的途径影响消化酶活力,所以对胃蛋白酶有提高作用,而过量的胞外酶可能对肝胰腺淀粉酶作用有一定抑制作用。

芽孢杆菌能抑制斑节对虾哈维氏弧菌(*Vibrio harvey*)的生长,降低肠道弧菌数,显著提高哈维氏弧菌浸染攻毒后的成活率^[12, 13]。本实验亦证明水体中添加短小芽孢杆菌可使溶血弧菌感染后对虾成活率有一定提高作用。

本实验证明向养殖水体中添加 100 mg/kg 的短小芽孢杆菌或者添加 100 mg/kg 与胶红酵母菌混合菌剂能使对虾的肝胰腺淀粉酶活力显著降低。胡毅等通过向饲料中添加 1 g/kg 短小芽孢杆菌使肝胰腺蛋白酶、淀粉酶活力有相应提高,但是结果没有显著差异^[14]。这与本实验结果有所差异,主要是由于本实验采用活菌、并且添加方式不同所致。而短小芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌混合物对肠道淀粉酶活力具有显著的促进作用^[14],这与本实验结果相似,说明添加细菌混合物比单一细菌的效果要好。

研究表明短小芽孢杆菌胞外产物在一定程度上可提高对虾的淀粉酶活力,而当胞外产物活力高于 0.02 U/mg 蛋白质时,对虾淀粉酶活力将受到抑制^[15]。本实验也证明添加 10 mg/kg 短小芽孢杆菌对肝胰腺淀粉酶活力无显著影响,而添加 100 mg/kg 短小芽孢杆菌能显著降低对虾肝胰腺淀粉酶活力。益生菌的数量只是促进对虾生长的因素之一;所加菌种的活力、种类、肠道菌群的整体结构(包括致病菌的数量及种类)等均能影响消化酶活力和对虾生长^[16],这与本实验结果相似,说明添加提取的细菌胞外产物和添加活菌对凡纳滨对虾的影响机制一样,不同在于活菌的浓度较后者恒定。

实验结果表明,在养殖水体中添加一定浓度的菌剂,能改善养殖环境水质,提高对虾的蛋白酶活力,提高对虾的存活率、体质量增长率,增强疾病抵抗力,具有广阔的应用前景。

4 结论

综上所述,本实验证明向水体中添加 100 mg/kg 短小芽孢杆菌能提高对虾体长、体质量、存活率,但结果不显著;水体中添加 100 mg/kg 短小芽孢杆菌对提高溶血弧菌攻毒后对虾成活率有一定的提高作用。水体中添加 100 mg/kg 短小芽孢杆菌能显著提高胃蛋白酶活力,但是对肝胰腺淀粉酶活力有一定抑制作用。在短时间内,添加 10 mg/kg 短小芽孢杆菌对脂肪酶活力有一定抑制作用,但添加 100 mg/kg 短小芽孢杆菌却有一定促进作用;随着实验进行,各组间差异消失,这可能是溶血弧菌的作用导致。添加浓度不同对存活率有不同的影响,如果添加的浓度较低可能会导致实验组间存活率无显著差异。添加复合菌剂比添加单一菌种的作用要好。本实验证明向水体中添加细菌的方式,对凡纳滨对虾的体长、体质量、存活率以及水质指标影响比较小,但是对消化酶具有一定的提高作用。这提示我们,改进添加方式,例如添加到饲料中可能对凡纳滨对虾的生长具有更大的促进作用。

微生态菌剂在提高水产养殖动物的生长速率、存活率、免疫抵抗力,清洁养殖环境、避免水体富营养化和防止药物滥用等各方面均有积极的作用,开展微生态菌剂的研究,探讨微生态菌剂与养殖对象的相互作用机理,开发新型高效的微生态菌剂,对于促进水产养殖业的可持续发展具有重要意义。

参考文献:

- [1] 丁贤,李卓佳,陈永青,等. 芽孢杆菌对凡纳对虾生长和消化酶活力的影响 [J]. 中国水产科学, 2004, 11(6): 580-584.
- [2] Heizhao L, Zhixun G, Yingying Y, *et al.* Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) [J]. *Aquaculture research*, 2004, 35: 1 441-1 447.
- [3] Moriarty D J W. Microbial biotechnology: a key ingredient for sustainable aquaculture [J]. *Infofish Int*, 1996, 4: 29-33.
- [4] Moriarty D J W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds [J]. *Aquaculture*, 1998, 164: 351-358.
- [5] Le Moullac G, Klein B, Sellos D. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda) [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1997, 208: 107-125.
- [6] Lovett D L, Felder D L. Ontogenic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp

- Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) [J]. **Biological Bulletin**, 1990, 178: 144-159.
- [7] Lee P G, Lawrence A L. Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp *Penaeus setiferus* Linnaeus [J]. **Journal of the World Mariculture Society**, 1985, 16: 257-287.
- [8] Moss S M, Divakaran S, Kim B G. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) [J]. **Aquaculture Research**, 2001, 32: 125-131.
- [9] Sirirat R, Sombat R, Somkiat P, *et al.* Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11) [J]. **Aquaculture**, 2000, 191: 271-288.
- [10] Saeed Z N, Mehran H R, Ghobad A T, *et al.* The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicu* [J]. **Aquaculture**, 2006, 252: 516-524.
- [11] 沈锦玉, 沈智华, 尹文林, 等. 饲喂枯草芽孢杆菌对银鲫等水生动物肠道菌群及消化酶活性的影响 [J]. 水产学报, 2004, 28: 146-150.
- [12] Vaseeharan B, Ramasamy E. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2003, 36: 83-87.
- [13] SUNG Hung-hung, HSU Shi-Fang, CHEN Chih-Kun, *et al.* Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation [J]. **Aquaculture**, 2001, 192: 101-110.
- [14] 胡毅, 谭北平, 麦康森, 等. 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 [J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 244-251.
- [15] 曹煜成, 李卓佳, 冯娟, 等. 地衣芽孢杆菌 De 株之胞外产物对凡纳滨对虾淀粉酶活性影响的体外研究 [J]. 台湾海峡, 2007, 26(4): 536-542.
- [16] WANG Yan-Bo. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei* [J]. **Aquaculture**, 2007, 269: 259-264.

Effect of adding two microbes to aquaculture water on shrimps' survival, growth and digestive enzyme activity

SONG Ben-ben^{1,3}, FU Song-zhe^{2,3}, LIU Zhi-pei², SHI Fang-yong⁴, LIU Ying¹

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Institute of Microbiology, the Chinese Academy of sciences, Beijing 100101, China; 3. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Qingdao Technological University, Qingdao 266033, China)

Received: Nov. , 18, 2008

Key words: *Litopenaeus vannamei*; digestive enzyme; *Bacillus pumilus*; *Rhodotorula mucilaginosa*; *Vibrio natriegens*

Abstract: *Bacillus pumilus* and *Rhodotorula mucilaginosa* with different concentrations were added to aquaculture tanks for shrimp (*Litopenaeus vannamei*), and such parameters as body length, body weight, survival rate, stomach proteinase, hepatobiliary & pancreatic amylase, hepatobiliary & pancreatic lipase of shrimp, *et al.* were determined. An experimental infection of shrimp by *Vibrio natriegens* was also tested. The results showed that a treatment group with 100 mg/kg *Bacillus pumilus* could promote body length and livability, but there is no significant difference. And this group can significantly promote body weight. This group could improve shrimp livability after the infection of *Vibrio natriegens*, significantly enhanced a stomach proteinase activity, but inhibited the activity of the hepatobiliary & pancreatic amylase; the treatment group with two species is better than the group with one in inhibiting the activity of hepatobiliary. And the results showed that methodology of adding bacteria to waters has few effect on shrimp body length, bodyweight, livability and water quality, but can improve digestiveenzyme activities.

(本文编辑:刘珊珊)