

植物乳杆菌 *Saccharomyces cerevisiae* P13 对大黄鱼的促生长作用研究

廖志勇<sup>1</sup>, 缪雄伟<sup>2</sup>, 林利<sup>3</sup> (1. 温州大学生命与环境科学学院, 浙江温州 325035; 2. 浙江省平阳县科技局, 浙江温州 325400; 3. 浙江省平阳县碧海仙山海产品养殖有限公司, 浙江温州 325400)

**摘要** [目的] 研究植物乳杆菌 *Saccharomyces cerevisiae* P13 对大黄鱼生长和抗病能力的影响。[方法] 用含 0、10<sup>4</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>10</sup> cfu/kg 植物乳杆菌 *Saccharomyces cerevisiae* P13 含量的饲料喂养大黄鱼 4 周后, 测定大黄鱼的体重增长率、饲料转化率和感染病菌后的存活率。[结果] 大黄鱼后肠中的 *Saccharomyces cerevisiae* P13 菌数量在喂食过程中显著增加, 含 10<sup>6</sup> ~ 10<sup>10</sup> cfu/kg *Saccharomyces cerevisiae* P13 的配方饲料明显促进了大黄鱼的体重增长率和摄食率。喂食含 10<sup>6</sup> ~ 10<sup>10</sup> cfu/kg *Saccharomyces cerevisiae* P13 的配方饲料后大黄鱼对 *Streptococcus* sp. 的抵抗力明显增强。[结论] 植物乳杆菌 *Saccharomyces cerevisiae* P13 能促进大黄鱼生长, 并增强大黄鱼的抗病力。

**关键词** 益生菌; *Saccharomyces cerevisiae* P13; 大黄鱼; 生长

**中图分类号** S965.322 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611(2013)26 - 10650 - 03

Study on the Growth-promoting Effect of *Pseudosciaena crocea* with *Saccharomyces cerevisiae* P13

LIAO Zhi-yong et al ( College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou, Zhejiang 325035)

**Abstract** [Objective] The research aimed to study the effects of *Saccharomyces cerevisiae* P13 on the growth and disease resistance of *Pseudosciaena crocea*. [Method] *P. crocea* was fed with the diet containing 0, 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>8</sup> or 10<sup>10</sup> cfu/kg *Saccharomyces cerevisiae* P13 for four weeks. And the increase rate of weight gain, feed conversion rate and survival rate of *P. crocea* after infecting *Streptococcus* sp. were determined. [Result] The amount of *Saccharomyces cerevisiae* P13 in the hindgut of *P. crocea* obviously increased during the feeding process. The increase rate of weight gain and intake rate of *P. crocea* were obviously promoted after feeding with the formula diet containing 10<sup>6</sup> ~ 10<sup>10</sup> cfu/kg *Saccharomyces cerevisiae* P13. The resistance of *P. crocea* to *Streptococcus* sp. was significantly enhanced after *P. crocea* was fed with the formula diet containing 10<sup>6</sup> - 10<sup>10</sup> cfu/kg *Saccharomyces cerevisiae* P13. [Conclusion] *Saccharomyces cerevisiae* P13 could promote the growth of *P. crocea* and enhance its disease resistance.

**Key words** Probiotics; *Saccharomyces cerevisiae* P13; *Pseudosciaena crocea*; Growth

大黄鱼是我国独有的、具有较高经济价值的鱼类, 是我国海水鱼类养殖中最名贵的品种之一, 已被农业部确定为我国 6 种最具优势出口水产品之一。由于过度捕捞, 自然资源日益枯竭。近年来, 人工育苗取得成功以后, 大黄鱼的网箱规模迅速扩大。但是, 随着养殖面积和放养密度急剧加大, 养殖环境遭到破坏, 病害的种类也随之增多, 发病次数日趋频繁, 危害性迅速增大, 面临着许多与营养饲料有关的问题, 极大制约着大黄鱼养殖业的健康发展。例如, 大黄鱼养殖过程中经常发生与病毒和细菌相关的疫情, 造成严重的经济损失<sup>[1]</sup>。因此, 鱼类的健康和其免疫力的提高对养殖业而言就显得尤为重要。

益生菌是一类通过改善宿主动物肠道微生态而对其产生有益影响的微生物饲料添加成分, 对宿主动物健康存在有益影响的微生物。益生菌类产品对动物大都具有提高动物生产性能、增进健康、改善肠道微生态和提高免疫力等功效。

笔者研究了益生菌植物乳杆菌对大黄鱼生长的影响, 以期期为开发适用于大黄鱼养殖的系微生物饲料奠定理论基础, 促进大黄鱼等近海特色经济鱼类养殖业的健康发展。

## 1 材料与方法

**1.1 植物乳杆菌混合物饲料的制备** 植物乳杆菌 (*Saccharomyces cerevisiae* P13) 按照文献[2]方法从韩国腌白菜分离得到, 37 °C 下于含 MRS 肉汤的无菌烧瓶中培养。24 h 后, 15 400 × g 离心 5 min, 收集植物乳杆菌混合物。按照 1:4 比例与脱脂牛奶混合, 冷冻干燥。通过 MRS 琼脂平板记数测定植物乳杆菌混合物的生活力。依据植物乳杆菌含量配置 5 种大黄鱼喂养饲料(表 1)。其中, 基础饲料成分为: 粗蛋白 47.3%、粗脂 8.9%、灰分 10.2% 和水分 8.4%。1.0 × 10<sup>11</sup> cfu/kg 的植物乳杆菌混合物按照表中比例加入到基础饲料中, 使大黄鱼喂养饲料中 *S. cerevisiae* P13 植物乳杆菌的含量分别达到 0、10<sup>4</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>8</sup> 和 10<sup>10</sup> cfu/kg。

表 1 大黄鱼饲料成分

<i>S. cerevisiae</i> P13 含量//cfu/kg	kg										
	菌体	牛奶	鱼粉	淀粉	鱼膏	面筋	鱼油	虾壳粉	脱脂 豆粕	矿物混 合物	维生素 混合物
0	0	10	540	183	3	20	20	64	94	35	7
10 <sup>4</sup>	0.000 01	9.999 9	540	183	37	20	20	64	94	35	7
10 <sup>6</sup>	0.001 00	9.999 0	540	183	37	20	20	64	94	35	7
10 <sup>8</sup>	0.100 00	3.990 0	540	183	37	20	20	64	94	35	7
10 <sup>10</sup>	10.000 00	0	540	183	37	20	20	64	94	35	7

**基金项目** 浙江省科技厅社会公益项目(2012C33077); 浙江省平阳县科技局项目(AS201003Z2)。

**作者简介** 廖志勇(1975 - ), 男, 江西新余人, 副教授, 从事生物化学与分子生物学研究, E-mail: 785526341@qq.com。

**收稿日期** 2013-08-02

**1.2 大黄鱼饲养** 大黄鱼幼鱼购自温州某人工养殖场, 采用水缸流水(海水)饲养方式在室内进行饲养试验。试验过程中, 每天更换 25% ~ 35% 的海水以保证水的质量。水温

保持在  $(27.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ , 水的 pH 为 7.4~8.5, 水的盐度保持在  $(3.0 \pm 0.2)\%$ 。所有试验鱼每天用含植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 配方饲料喂养 2 次。每个配方饲料平行喂养 3 组试验鱼, 共 15 组, 每组 5 条大黄鱼幼鱼。

**1.3 大黄鱼生长性能的测定** 将大黄鱼幼苗随机分成 15 组, 每组于 40~60 L 体积玻璃水族箱中用含有植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 的饲料或对照饲料喂养。所有水族箱配备空气过滤器。在生长测定过程中, 大黄鱼每日喂食含植物乳杆菌  $0, 10^4, 10^6, 10^8$  和  $10^{10}$  cfu/kg 饲料 (表 1); 每星期称重 1 次直到测定试验结束。按照以下公式计算体重增加百分率 (PWG):  $\text{PWG} = [100\% \times (\text{最后体重} - \text{初始体重}) / (\text{初始体重})]$ ; 按照以下公式计算饲料转化效率 (FE):  $\text{FE} = (\text{最后重量} - \text{初始重量}) / (\text{摄食量})$ 。

**1.4 大黄鱼的抗病力分析** 大黄鱼喂食含  $0, 10^4, 10^6, 10^8$  和  $10^{10}$  cfu/kg 植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 的饲料 4 周后, 分别肌肉注射相应量的 *Streptococcus* sp. 菌体储存液 ( $5.0 \times 10^{10}$  cfu/ml), 以使每条试验鱼体内初始 *Streptococcus* sp. 的浓度为  $5.0 \times 10^5$  cfu/g 鱼体重。所有试验鱼均继续喂食含  $0, 10^4, 10^6, 10^8$  和  $10^{10}$  cfu/kg 植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 的饲料, 每天统计死鱼数。

**1.5 大黄鱼肠道内 *S. cerevisiae* P13 的存活率** 大黄鱼喂食试验用配方饲料 4 周后, 剪取小段新鲜肠子, 立即用 20 ml 肉汤粉碎,  $37^\circ\text{C}$  过夜培养。  $4^\circ\text{C}$ ,  $10\ 000 \times \text{g}$  离心 20 min。收集沉淀, 用购自碧云天的基因组抽提试剂盒分离纯化 *S. cerevisiae* P13 基因组 DNA。用 *S. cerevisiae* P13 特异的引物对 5'-TCTGTATATTCTGTATCTATGTTCTGTC-3' 和 5'-AAATGGCCTATTGTATTGTCAGGTC-3' 在 ABI 公司的 Perkin-Elmer 9700 核酸扩增仪上进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增。  $94^\circ\text{C}$  加热变性 10 min;  $95^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $55^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 45 s, 35 个循环; 最后,  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min。将 PCR 产物用 2.0% 琼脂糖电泳分离与鉴定。

## 2 结果与分析

**2.1 *S. cerevisiae* P13 对大黄鱼体重增长率的影响** 从图 1 可以看出, 喂食含植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 饲料后的大黄鱼, 从第 1 周起大黄鱼体重增长率明显高于喂食基础饲料 (对照饲料) 的大黄鱼体重增长率。4 周后, 喂食对照饲料和含  $1 \times 10^4, 1 \times 10^6, 1 \times 10^8$  和  $1 \times 10^{10}$  cfu/kg 植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 的大黄鱼体重增长率分别为 88.9%、101.1%、132.4%、140.8% 和 138.9%。

**2.2 *S. cerevisiae* P13 对大黄鱼饲料转化率的影响** 大黄鱼体重增长率的提高一方面可能来自于摄食量的增加, 另一方面可能来自于饲料转化率的提高, 而最终归结于大黄鱼体内蛋白质转化率的提高<sup>[3]</sup>。从图 2 可以看出, 喂食对照饲料和含  $1 \times 10^4, 1 \times 10^6, 1 \times 10^8$  和  $1 \times 10^{10}$  cfu/kg 植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 饲料的大黄鱼的饲料转化率分别是 0.81、0.98、1.10、1.29 和 1.31, 说明大黄鱼的饲料转化率随着饲料中植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 含量的增加而提高, 从而提高饲料的实际使用效率。

**2.3 *S. cerevisiae* P13 对大黄鱼感染 *Streptococcus* sp. 后的存活率** 据报道, 植物乳杆菌能增强石斑鱼对 *Streptococcus* sp. 感染的抵抗力<sup>[4]</sup>。由表 2 可知, 喂食对照饲料和含  $1 \times 10^4, 1 \times 10^6, 1 \times 10^8$  和  $1 \times 10^{10}$  cfu/kg 植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 的大黄鱼在受到病菌体 *Streptococcus* sp. 感染 4 周后的存活率分别为 35.7%、80.0%、76.7%、70.0% 和 70.0%, 说明含植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 的饲料不仅有利于大黄鱼的生长, 而且也有利于大黄鱼对病菌感染的抵抗力。

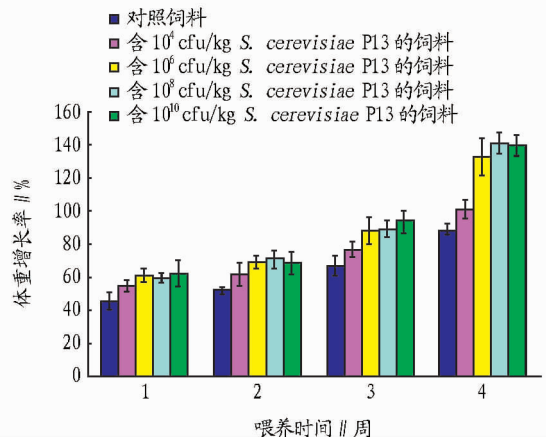


图 1 喂食含植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 饲料 1~4 周大黄鱼的体重增长率

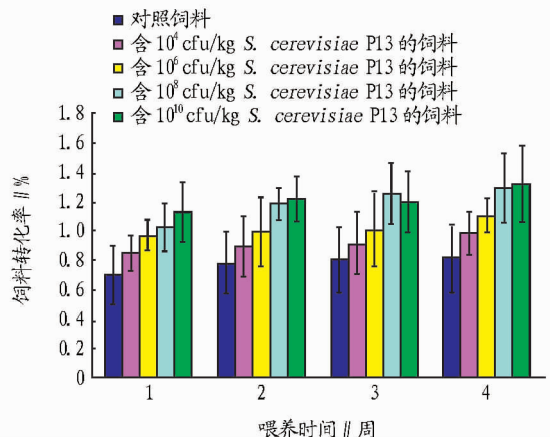


图 2 喂食含  $0, 1 \times 10^4, 1 \times 10^6, 1 \times 10^8$  和  $1 \times 10^{10}$  cfu/kg 植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 饲料 1~4 周大黄鱼的饲料转化率

表 2 喂食含 *S. cerevisiae* P13 饲料的大黄鱼感染 *Streptococcus* sp. 后的存活率

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> P13 含量 // cfu/kg	存活率 // %				
	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
0	100	75.0	45.7	35.7	35.7
$10^4$	100	83.3	80.0	80.0	80.0
$10^6$	100	83.3	80.0	76.7	76.7
$10^8$	100	100	70.0	70.0	70.0
$10^{10}$	100	100	70.0	70.0	70.0

**2.4 喂食含 *S. cerevisiae* P13 后其在大黄鱼体内的检测** 大黄鱼喂食含  $0, 10^4, 10^6, 10^8$  和  $10^{10}$  cfu/kg 植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 的饲料 4 周后, 通过 PCR 能特异性扩增 *S. cer-*

*visiae* P13 基因片段,并且 PCR 产物的量随着饲料中 *S. cerevisiae* P13 含量的增加而增加(图3)。



图3 大黄鱼喂食饲料4周后 *S. cerevisiae* P13 的 PCR 鉴定结果

### 3 小结

益生菌是一类通过改善宿主动物肠道微生态而对动物生长发育以及免疫产生有益影响的微生物饲料添加成分。研究表明,益生菌或益生菌发酵产物能够有效促进虹鳟、石斑鱼等的生长,并增强鱼类对常见病原体感染的抵抗<sup>[5]</sup>。

笔者通过测定大黄鱼的体重增长率、饲料转化率及其常

见病原菌的抗抵力,探讨了益生菌 *S. cerevisiae* P13 对大黄鱼生长的影响,结果表明喂食含 *S. cerevisiae* P13 饲料的大黄鱼体重增长率、饲料转化率及其对病原菌的低抗力都有明显提升,说明含 *S. cerevisiae* P13 的生物饲料在大黄鱼养殖中具有较大的潜在应用价值。

### 参考文献

- [1] 陈飞,吴常文.浙江省大黄鱼养殖产业现状及发展对策[J].浙江海洋学院学报:自然科学版,2011,30(3):259-263.
- [2] PAN T M, CHIU C H, GUU Y K. Characterization of Lactobacillus isolates from pickled vegetables for use as dietary or pickle adjuncts[J]. Foods Food Ingrid J Jpn, 2002, 206:45-51.
- [3] SON V M, CHANG C C, WU M, et al. Dietary administration of the probiotic, Lactobacillus plantarum, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26:691-698.
- [4] BALCÁZAR J L, DE BLAS I, RUIZ-ZARZUELA I, et al. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007, 51:185-193.
- [5] BARNES M E, DURBEN D J, REEVES S G, et al. Dietary yeast culture supplementation improves initial rearing of McCaughy strain rainbow trout[J]. Aquacult Nutr, 2006, 12:388-394.
- [6] ISABEL H, GABRIELA S W, PAUL M, et al. Influence of activated charcoal amendment to contaminated soil on dieldrin and nutrient uptake by cucumbers[J]. Environmental Pollution, 2008, 157(8/9):2224-2230.
- [7] LEHMANN J. A handful of carbon[J]. Nature, 2007, 447:143-144.
- [8] GLASER B, HAUMAIER L, GUGGENBERGER G, et al. The Terra Preta phenomenon: A model for sustainable agriculture in the humid tropics[J]. Naturwissenschaften, 2001, 88:37-41.
- [9] LEHMANN J, LIANG B, SOLOMON D, et al. Near-edge X-ray absorption fine structure (NEXAFS) spectroscopy for mapping nano-scale distribution of organic carbon forms in soil: Application to black carbon particles[J]. Global Biogeochemical Cycles, 2005, 19:1013-1025.
- [10] GLASER B, LEHMANN J, ZECH W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal: A review[J]. Biology and Fertility of Soils, 2002, 35:219-230.
- [11] LEHMAN J, DA SILVA JR J P, STEINER C, et al. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments[J]. Plant and Soil, 2003, 249(2):343-357.
- [12] YU X, YING G G, KOOKANA R S. Reduced plant uptake of pesticides with biochar additions to soil[J]. Chemosphere, 2009, 76(5):665-671.
- [13] YANG Y. N, SHENG G Y, HUANG M S. Bioavailability of diuron in soil containing wheat-straw-derived char[J]. Science Total Environment, 2006, 354(2/3):170-178.
- [14] CAO X D, MA L N, GAO B, et al. Dairy-manure derived biochar effectively sorbs lead and atrazine[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(9):3285-3291.
- [15] LU H L, ZHANG W H, YANG Y X, et al. Relative distribution of Pb<sup>2+</sup> sorption mechanisms by sludge-derived biochar[J]. Water Research, 2012, 46(3):854-862.
- [16] 卢欢亮. 污泥生物炭对重金属的吸附机理及其在矿山周边污染土壤修复中的应用[D]. 广州:中山大学, 2012.
- [17] 李清飞. 麻疯树对铅胁迫的生理耐性研究[J]. 生态与农村环境学报, 2012(1):72-76.

(上接第 10636 页)

- [18] 陈晴空. 铬污染土壤化学-植物联合修复技术研究机污染物-重金属复合污染土壤植物修复技术研究[D]. 重庆:重庆大学硕士论文, 2008.
- [19] 陈玉成,董珊珊,熊治廷. 表面活性剂与 EDTA 对雪菜吸收铬的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2004, 10(6):651-656.
- [20] 王德胜, 陈兰, 敬小兵, 等. 螯合剂和表面活性剂辅助金福菇修复重金属污染土壤[J]. 应用生态环境学报, 2012, 18(1):100-107.
- [21] 杨强. 机污染物-重金属复合污染土壤植物修复技术研究[D]. 杭州:浙江大学, 2004.
- [22] 黄化刚. 镉-锌/滴滴涕复合污染土壤植物修复的农艺强化过程及机理[D]. 杭州:浙江大学, 2012.
- [23] WALTON B T, ANDERSON T A. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56:1012-1016.
- [24] 徐莉,滕应,张雪莲,等. 多氯联苯污染土壤的植物-微生物联合田间原位修复[J]. 中国环境科学, 2008, 28(7):646-650.
- [25] ABOU-SHANAB R A I, ANGLE J S, CHANEY R L. Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alysummure* from low moderate and high Ni soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38:2882-2889.
- [26] 高宪雯. 微生物-植物在石油-重金属复合污染土壤修复中的作用研究[D]. 济南:山东师范大学, 2013.
- [27] 朱治强. Cd- DDT 复合污染土壤的植物与微生物联合修复及机理[D]. 杭州:浙江大学, 2012.
- [28] 彭桂香,蔡婧,林初夏. 超积累植物和化学改良剂联合修复锌镉污染土壤后的微生物特征[J]. 生态环境, 2005, 14(5):654-657.
- [29] 杜瑞英. 土壤改良剂和红麻联合修复对多金属污染土壤中微生物群落功能的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2013, 29(1):70-75.
- [30] 刘玉学,刘微,吴伟祥,等. 土壤生物炭环境行为与环境效应[J]. 应用生态学报, 2009, 20(4):977-982.
- [31] NOVAK J M, BUSSCHER W J, LAIRD D L, et al. Impact of biochar amendment on fertility of a Southeastern Coastal Plain[J]. Soil Soil Science, 2009, 174(2):105-112.