

刘 丽,蔡俊鹏.改善水体和生物肠道菌群结构的菌剂及其在罗非鱼养殖中的应用[J].江苏农业科学,2014,42(4):175-177.

改善水体和生物肠道菌群结构的菌剂及其在罗非鱼养殖中的应用

刘 丽¹,蔡俊鹏^{1,2}

(1. 华南理工大学轻工与食品学院,广东广州 510640; 2. 华南理工大学生物科学与工程学院,广东广州 530006)

摘要:以蛭弧菌、光合细菌、乳酸链球菌、保加利亚乳杆菌、水产生物肠道有益菌作为 1 种微生物制剂,以泼洒的方式应用于罗非鱼养殖水体中,探究其对水产养殖环境、养殖生物肠道菌群结构、罗非鱼生长的影响。结果表明:与对照相比,革兰氏阴性、阳性菌群以及本土革兰氏阴性、阳性菌群数量均明显减少;与对照相比,试验组保加利亚乳杆菌、乳酸链球菌、光合细菌、有益菌数量均增加,本土微生物留下的生态灶由有益菌填补,维持了菌群平衡。该微生物制剂具有改善水体和生物肠道菌群结构以及促进养殖动物生长的作用。

关键词:有益菌;蛭弧菌;罗非鱼;菌群结构

中图分类号: S965.125 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0175-03

目前,人类对动物性蛋白质的需求量急剧增加,水产养殖动物逐渐成为重要的动物蛋白来源^[1]。为了预防水产养殖疾病并促进养殖动物生长,滥用抗菌药物、杀虫剂、消毒剂的现象越来越普遍^[2]。为了促进水产养殖业的可持续发展,益生菌在水生动物养殖中的应用越来越多^[3-4]。益生菌是一种对人体及动物有益的微生物膳食补充剂,能提高饲料的营养价值、抑制病原微生物生长、促进动物生长、增强动物免疫力^[5]。Iebba 等首次证实蛭弧菌是存在于人体中的一种有益微生物^[6]。在水产养殖领域,与抗生素灭菌方法相比,利用蛭弧菌消除或者抑制致病菌更具有优越性^[7]。乳酸菌、保加利亚乳杆菌也是常见的被用于水产养殖的益生菌^[8]。光合细菌含有生物辅助因子,能提高鱼幼苗的存活率并促进鱼的生长^[9]。本研究提供了 1 种能改善水体、生物肠道菌落结构菌剂的制备方法,并探讨其在罗非鱼养殖中的应用。该菌剂包括蛭弧菌(*Bdellovibrio*)菌液与有益菌菌液,其中有益菌菌液由光合细菌、乳酸链球菌(*Streptococcus lactis*)、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)、水产生物肠道有益菌混合而成,水产生物肠道有益菌 3y621 是笔者所在实验室从罗非鱼肠道中分离出的蛋白酶高产菌株^[10]。

1 材料与方法

1.1 材料

蛭弧菌 BDF01 由笔者所在实验室从海水中分离纯化而来。红假单胞菌(*Rhodospseudomonas* sp.)菌株编号 1.2193,购于中国科学院微生物研究所。乳酸链球菌菌株编号 GIM1.156、保加利亚乳杆菌菌株编号 GIM1.8、嗜水气单胞菌

菌株编号 GIM1.172 均购于广东省微生物研究所菌种保藏中心。水产生物肠道有益菌 3y621 是笔者所在实验室从罗非鱼肠道中分离出的蛋白酶高产菌株。试验地点:广东省湛江市某罗非鱼养殖场。

1.2 培养基

优化的 RCVBN 培养基:3.0 g CH_3COONa 、1.0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2 g MgSO_4 、1.0 g NaCl 、0.3 g KH_2PO_4 、0.5 g K_2HPO_4 、0.05 g CaCl_2 、0.1 g 酵母膏、1 mL 微量元素溶液、1 000 mL 蒸馏水。微量元素溶液组成为:2 g $\text{EDTA}-2\text{Na}$ 、0.2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 g H_3BO_3 、0.1 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 g ZnCl_2 、0.02 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.02 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1 000 mL 蒸馏水,pH 值 7.0~7.2。DNB 液体培养基:营养肉汤 0.8 g、酪蛋白酸水解物 0.5 g、酵母提取物 0.1 g、 NaCl 30 g、1 000 mL 蒸馏水,pH 值 7.2~7.6。LB 液体培养基、营养肉汤(NB)、伊红美蓝琼脂(EMB)、甘露醇氯化钠琼脂培养基、MRS 肉汤、叠氮血琼脂(Azide Blood)均购于广东环凯微生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 蛭弧菌菌液的制备 采用高密度蛭弧菌游泳体发酵方法制备蛭弧菌菌液。制备的培养液于 6 000 r/min 4 ℃ 离心 20 min 后取上清,再将上清液于 16 000 r/min 4 ℃ 离心 20 min 后弃上清,加入 DNB 液体培养基重新悬浮蛭弧菌沉淀物,蛭弧菌浓度为 1×10^5 PFU/mL。

1.3.2 有益菌菌液的制备 将红假单胞菌按 1 g/L 接种到优化的 RCVBN 液体培养基中,于 30 ℃ 3 000 lx 下光照厌氧培养 48 h 后得到的菌液按体积比 10% 接种到优化的 RCVBN 液体培养基中,以同样的条件光照厌氧培养 48 h,适当搅拌,5 000 r/min 离心 15 min 得到菌体,往沉淀中加入无菌生理盐水,调节其终浓度为 1×10^5 CFU/mL。分别挑取菌株 3y621、乳酸链球菌、保加利亚乳杆菌单菌落接种到 NB 液体培养基中,30 ℃ 120 r/min 培养过夜后按体积比 1% 接种到 NB 液体发酵培养基中,30 ℃ 120 r/min 发酵 12~48 h 后 5 000 r/min 离心 15 min 获得菌体,往沉淀中加入无菌生理盐水,调节菌

收稿日期:2013-08-01

基金项目:国家自然科学基金(编号:40776091)。

作者简介:刘 丽(1988—),女,湖北武汉人,硕士研究生,主要从事海洋微生物研究。E-mail:liuliliuwei@gmail.com。

通信作者:蔡俊鹏,博士,教授,主要从事海洋微生物研究。Tel:(020)87113024;E-mail:febjpcai@scut.edu.cn。

液浓度为 1×10^5 CFU/mL。将以上各有益菌等比混合,得到益菌剂。将蛭弧菌浓缩液与有益菌按体积比 1:2 混合,用磁力搅拌器搅拌均匀,得到菌剂。

1.3.3 罗非鱼养殖试验 将 6 个罗非鱼养殖池(0.5 m × 0.5 m × 0.5 m)分为试验组、对照组,每组 3 个,在每个池中注入 100 L 淡水,投放 30 尾罗非鱼(平均体长 2.36 cm,均重 0.58 g),水温 25 ℃,在试验组各池中均匀泼洒按“1.3.2”的方法制得的菌剂,每 2 周泼洒 1 次。检测养殖水体与罗非鱼肠道的革兰氏阴性菌群、阳性菌群、有益菌的浓度,试验组与对照组每 10 d 随机抽取 50 尾罗非鱼测量其体重与体长。水池中菌群浓度检测方法为:施用有益菌后立即检测水体中菌群浓度,第 1 次记为 0 d,往后每 14 d 检测 1 次,共检测 5 次,采用涂布选择培养基平板法。罗非鱼肠道微生物菌群浓度检测方法为:施用菌剂后第 60 天,取罗非鱼肠道中食糜 0.2 g 置于无菌离心管中,加入 1.8 mL 0.85% 无菌生理盐水,制成原液,然后依次 10 倍稀释涂布选择培养基平板,使用 MPN 法进行检测。采用伊红美蓝琼脂培养基检测革兰氏阴性菌数量,采用甘露醇氯化钠琼脂培养基检测革兰氏阴性菌数量,采用 RCVBN 琼脂培养基检测光合菌数量,采用 MRS 琼脂培养

基检测保加利亚乳杆菌数量,采用叠氮血琼脂培养基检测乳链球菌数量。采用特异性荧光定量 PCR 方法检测有益菌 3y621 数量,上、下游引物分别为:5′ - AGGATGAAGAAGTC-CTGT - 3′和 5′ - TGATTTAATTGCTCGTATATTTACCCAGT - 3′,反应程序采用三步法。养殖水体与肠道中土生菌群数量的计算方法如下:本土革兰氏阴性菌群数量 = EMB 琼脂检测到的细菌数量;本土革兰氏阳性菌群数量 = 甘露醇氯化钠琼脂检测到的细菌数量 - 保加利亚乳杆菌数量 - 乳链球菌数量 - 有益菌 3y621 的数量。

1.4 数据分析
采用 Excel 软件分析数据。

2 结果与分析

2.1 菌剂对罗非鱼养殖水体微生物菌群结构的影响
由表 1 可知,与对照相比,革兰氏阴性、阳性菌群以及本土革兰氏阴性、阳性菌群数量均明显减少。由表 2 可以看出,与对照相比,试验组保加利亚乳杆菌、乳酸链球菌、光合细菌、有益菌数量均增加,本土微生物留下的生态灶由有益菌填补,维持了菌群平衡。

表 1 罗非鱼养殖水体中本土微生物菌群数量								
养殖时间 (d)	革兰氏阴性菌群(CFU/mL)		革兰氏阳性菌群(CFU/mL)		本土革兰氏阴性菌群(CFU/mL)		本土革兰氏阳性菌群(CFU/mL)	
	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组
0	6.5×10^4	7.3×10^4	8.8×10^3	9.7×10^3	6.5×10^4	7.3×10^4	7.7×10^3	8.8×10^3
14	3.0×10^3	9.7×10^4	9.5×10^3	5.6×10^3	3.0×10^3	9.7×10^4	8.4×10^2	4.3×10^3
28	1.0×10^3	2.3×10^4	8.0×10^3	4.4×10^3	1.0×10^3	2.3×10^4	9.6×10^2	3.6×10^3
42	5.0×10^3	5.0×10^4	6.1×10^3	4.8×10^3	5.0×10^3	5.0×10^4	5.1×10^2	4.1×10^3
56	2.0×10^3	3.9×10^4	8.4×10^3	2.6×10^3	2.0×10^3	3.9×10^4	1.0×10^3	1.3×10^3

表 2 罗非鱼养殖水体中有益微生物菌群数量								
养殖时间 (d)	保加利亚乳杆菌(CFU/mL)		乳酸链球菌(CFU/mL)		光合细菌(CFU/mL)		3y621(CFU/mL)	
	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组
0	1.3×10^2	1.9×10^2	5.0×10^2	1.5×10^2	3.7×10^2	5.5×10^2	96	42
14	4.4×10^2	50	4.8×10^3	2.4×10^2	3.0×10^3	4.9×10^2	4.2×10^2	83
28	5.4×10^2	66	2.0×10^3	3.8×10^2	2.2×10^3	2.9×10^2	2.3×10^3	77
42	3.9×10^2	95	1.5×10^3	3.4×10^2	2.4×10^3	2.7×10^2	1.3×10^3	69
56	8.3×10^2	1.0×10^2	9.7×10^2	3.0×10^2	2.6×10^3	8.8×10^2	3.0×10^3	38

2.2 菌剂对罗非鱼肠道微生物菌群结构的影响
由表 3 可以看出,罗非鱼肠道中的本土革兰氏阴性菌、阳性菌数量明显低于对照组。由表 4 可以看出,与对照相比,罗非鱼肠道中的有益菌数量明显增加,填补了本土菌群的空缺,形成了更合理的微生态系统。

表 3 罗非鱼肠道中本土微生物菌群数量								
养殖时间 (d)	革兰氏阴性菌群(CFU/mL)		革兰氏阳性菌群(CFU/mL)		本土革兰氏阴性菌群(CFU/mL)		本土革兰氏阳性菌群(CFU/mL)	
	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组
60	3.0×10^3	2.7×10^4	3.7×10^3	5.6×10^3	3.0×10^3	2.7×10^4	2.5×10^2	5.2×10^3

表 4 罗非鱼肠道中有益微生物菌群数量								
养殖时间 (d)	保加利亚乳杆菌(CFU/mL)		乳酸链球菌(CFU/mL)		光合细菌(CFU/mL)		3y621(CFU/mL)	
	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组
60	4.5×10^2	16	5.4×10^2	78	6.6×10^2	2	1.8×10^3	2.1×10^2

2.3 菌剂对罗非鱼体重、体长的影响
由图 1 可知,试验开始后 25 d 内,对照组与试验组罗非鱼体重无明显差异,25 d 后试验组罗非鱼体重均明显高于对照组。由图 2 可以看出,试验组罗非鱼体长均长于对照组,60 d 后,试验组罗非鱼比对照组体重多 15.16%,体长多 11.19%。

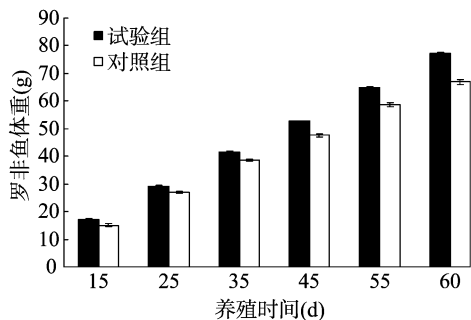


图1 不同养殖时间罗非鱼体重

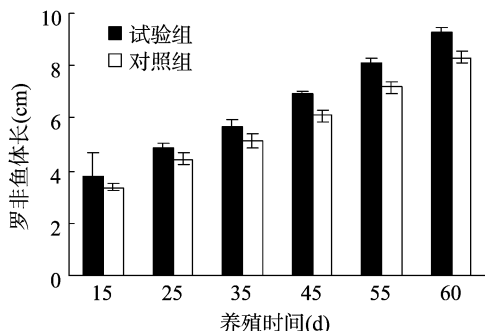


图2 不同养殖时间罗非鱼体长

3 结论与讨论

自益生菌首次在水产养殖中使用以来,已经被证实其具有控制养殖水体中病原体、提高水生动物存活率的作用,但很少有关于益生菌调节水生动物肠道菌群的研究^[11-16]。本研究首次将有益菌应用于罗非鱼的养殖水体,从而达到同时控制养殖水体、生物肠道内潜在致病菌的目的。本研究使用的有益菌剂由蛭弧菌菌液及有益菌菌液组成,蛭弧菌消除致病菌后留下的生态灶由有益菌来填补。研究表明,与对照相比,革兰氏阴性、阳性菌群以及本土革兰氏阴性、阳性菌群数量均减少;与对照相比,试验组保加利亚乳杆菌、乳酸链球菌、光合细菌、有益菌数量均增加,本土微生物留下的生态灶由有益菌填补,维持了菌群平衡。蛭弧菌具有裂解致病菌的特殊功效,可以用作生物净化因子^[17]。蔡俊鹏等认为,蛭弧菌作为生物消除剂对弧菌有裂解消除能力^[18]。因此,利用蛭弧菌去除养殖环境及肠道中的病原体逐渐成为一种相对于施用抗生素而言更好、更有效的办法^[19-20]。本研究所使用的有益菌液由光合细菌、保加利亚乳杆菌、乳酸链球菌、肠道有益菌 3y621 混合而成,每种有益菌在调节养殖水体与肠道微生态平衡方面各自发挥着独特的功效。其中,光合细菌产生的抗病毒物质与乳酸链球菌产生的嗜酸菌素对病原微生物有抑制作用^[21]。保加利亚乳杆菌以某种免疫调节因子刺激肠道局部型免疫反应,以提高机体抗体水平,增强其免疫力。有学者认为,分离自动物肠道的特有的益生菌更易定植于养殖动物的肠道,这可能是因为它们更容易适应肠道内特殊的环境。研究显示,高浓度的某些益生菌对养殖动物会产生毒害作用^[22],今后有必要进一步探讨不同浓度益生菌对养殖动物生长的影响。此外,益生菌不同施用方式是否也会影响益生菌的功效,应进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 蒋高中,张颖,赵永峰,等. 我国罗非鱼产品的药物残留问题及其对策[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):281-282.
- [2] 李震. 抑菌微生态制剂替代饲用抗生素技术研究[D]. 泰安: 山东农业大学,2012.
- [3] Qi Z Z, Zhang X H, Boon N, et al. Probiotics in aquaculture of China—Current state, problems and prospect[J]. Aquaculture, 2009,290(1/2):15-21.
- [4] Kesarcondi-Watson A, Kaspar H, Lategan M J, et al. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes[J]. Aquaculture, 2008,274(1):1-14.
- [5] Hong H A, Duc le H, Cutting S M. The use of bacterial spore formers as probiotics[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(4):813-835.
- [6] Iebba V, Santangelo F, Totino V, et al. Higher prevalence and abundance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the human gut of healthy subjects[J]. PLoS One, 2013, 8(4):e61608.
- [7] Cao H, He S, Wang H, et al. *Bdellovibrios*, potential biocontrol bacteria against pathogenic *Aeromonas hydrophila*[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 154(3/4):413-418.
- [8] Hagi T, Hoshino T. Screening and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from cultured common carp intestine[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2009, 73(7):1479-1483.
- [9] Azad S A, Chong V C, Vikineswary S. Phototrophic bacteria as feed supplement for rearing *Penaeus monodon* larvae[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2002, 33(2):158-168.
- [10] 陈惠源,蔡俊鹏. 罗非鱼肠道蛋白酶高产菌株及其适应力研究[J]. 水利渔业, 2005, 25(4):86-87.
- [11] Nikoskelainen S, Salminen S, Bylund G, et al. Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(6):2430-2435.
- [12] 罗文,杨立华,沈文英,等. 有效微生物对水产养殖水体的净化作用[J]. 绍兴文理学院学报:自然科学版, 2008, 28(9):34-37, 42.
- [13] 于明超,李卓佳,文国樑. 芽孢杆菌在水产养殖应用中的研究进展[J]. 广东农业科学, 2007(11):78-81.
- [14] Wang Y B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2007, 269(1/4):259-264.
- [15] 白卫东,赵文红,梁桂凤,等. 保加利亚乳杆菌的特性及其应用[J]. 中国酿造, 2009(8):10-14.
- [16] 刘丽,蔡俊鹏. 一种微生物制剂在皱纹盘鲍育苗生产中的应用[J]. 广东农业科学, 2012(17):125-127.
- [17] 宋志萍,蔡俊鹏,王志,等. 一种消除九孔鲍细菌性病原的无公害绿色生物方法的研究[J]. 海洋科学, 2006, 30(1):44-48.
- [18] 蔡俊鹏,王沛贤. 蛭弧菌的分离鉴定及其对非 O1 霍乱弧菌的消除作用研究[J]. 食品工业科技, 2010(4):78-79, 83.
- [19] 蔡俊鹏,韩韞,王志,等. 蛭弧菌消除海产品中潜在致病性弧菌的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(1):75-78.
- [20] Hargreaves J A. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture[J]. Aquacultural Engineering, 2006, 34(3):344-363.
- [21] 孟思好,孟长明,陈昌福. 微生态制剂及其在水产养殖中的应用问题(二)[J]. 科学养鱼, 2011(2):77.
- [22] Nayak S K. Probiotics and immunity: a fish perspective[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(1):2-14.