

文章编号: 1000-0615(2001)05-0448-06

## 饲料中添加芽孢杆菌和硒酵母 对异育银鲫的生长及抗病力的影响

华雪铭, 周洪琪, 邱小琮, 刘小刚, 曹 丹, 张登沂

(上海水产大学渔业学院, 上海 200090)

**摘要:**在基础饲料中分别添加 0.1%、0.2%、0.4% 的芽孢杆菌, 0.3%、0.6%、1.2% 的硒酵母, 0.2% + 0.3%、0.2% + 0.6%、0.2% + 1.2% 的芽孢杆菌和硒酵母混合物, 投喂异育银鲫 2 个月。测定鱼体的生长和对病原菌嗜水气单胞菌的抗感染能力——LD<sub>50</sub>。结果表明, 添加不同浓度的芽孢杆菌对体重的增加有显著影响 ( $P < 0.05$ ), 其中添加 0.2% 的芽孢杆菌组相对增重率比对照组增加 33%。添加不同浓度的硒酵母均可不同程度地促进异育银鲫的生长 ( $P < 0.05$ ), 其相对增重率比对照组增加 16% ~ 31%。不同配比的芽孢杆菌和硒酵母混合物显著性提高鱼的相对增重率, 但增重效果与单一添加芽孢杆菌或硒酵母相似 ( $P > 0.05$ )。饲料中单一添加芽孢杆菌或硒酵母可以极显著地提高异育银鲫对嗜水气单胞菌的抵抗能力, 添加效果在各芽孢杆菌水平组间无显著差异, 随硒酵母添加量的增大而增大 ( $P < 0.01$ ), 但 0.6% 组和 1.2% 组无显著差异。混合添加芽孢杆菌和硒酵母也能极显著增强异育银鲫对嗜水气单胞菌的抗感染能力 ( $P < 0.01$ ), 但添加效果不及单一芽孢杆菌; 与单一硒酵母相比, 抗感染能力与硒酵母的添加量有关 ( $P < 0.01$ ), 添加量增大, 抗感染能力减弱 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

**关键词:** 异育银鲫; 生长; 抗病力; 芽孢杆菌; 硒酵母

**中图分类号:** S963.7      **文献标识码:** A

### Effects of dietary *Bacillus* sp. and selenoyeast on the growth and disease resistance of allogynogenetic crucian carp

HUA Xue-ming, ZHOU Hong-qi, QIU Xiao-cong, LIU Xiao-gang, CAO Dan, ZHANG Deng-li  
(Fisheries College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** Allogynogenetic crucian carp (average initial weight,  $4.2 \pm 0.3$ g) were fed with basal formulated diet supplemented with 0.1%, 0.2%, 0.4% *Bacillus* sp., 0.3%, 0.6%, 1.2% selenoyeast, 0.2% + 0.3%, 0.2% + 0.6%, 0.2% + 1.2% *Bacillus* sp. and selenoyeast complex respectively for two months. Triplicate groups were made for each diet. Data for weight gain and resistance to infection of *Aeromonas hydrophila* were determined and analysed. The results showed that relative growth rate responded drastically to the dietary *Bacillus* sp. and selenoyeast levels ( $P < 0.05$ ), which was 33% and 16% ~ 31% higher in the test groups than that of control group. The effect of *Bacillus* sp. and selenoyeast complex on the growth was similar to that of *Bacillus* sp. or selenoyeast alone. Disease resistance of tested fish was raised by *Bacillus* sp. or selenoyeast alone, changed among different selenoyeast levels and was stable among different *Bacillus* sp. levels compared with the

收稿日期: 2001-04-10

基金项目: 上海自然科学基金资助项目(编号 00ZC14054)

第一作者: 华雪铭(1974-), 女, 浙江慈溪人, 2000 级博士生, 专业方向为水产动物营养与饲料。E-mail: xnhua@citiz.net

control group. Although *Bacillus* sp. and selenoyeast complex could enhance disease resistance, the effect was worse than that of *Bacillus* sp. alone. There was relationship between disease resistance and selenoyeast levels in the *Bacillus* sp. and selenoyeast complex groups when compared with selenoyeast alone ( $P < 0.01$ ), and disease resistance was weakened by increased selenoyeast levels.

**Key words:** allogynogenetic crucian carp; growth; disease resistance; *Bacillus* sp.; selenoyeast

在众多的饲料添加剂中,微生态制剂具有促进水产动物的生长、提高抗病免疫力等特点,是国内外研究的一个热点,其中芽孢杆菌属和酵母是饲料中添加的主要菌种。至今为止,国内外对微生态制剂提高消化酶活力<sup>[1]</sup>、降低水中氨氮<sup>[2]</sup>、减少化学耗氧<sup>[3,4]</sup>,提高鱼虾类的存活率作过不少研究<sup>[5]</sup>,但这些研究大多在于应用效果的水平上,对微生态制剂真正的作用机制还不十分清楚。微量元素与水产动物的生长及生理机能密切相关,也是水产动物健康养殖研究的重要组成部分。硒是鱼类维持正常生长及生理功能的必需微量元素之一,研究鱼类对硒元素的需求量,对鱼类和人类健康的影响和营养作用具有重要的实际意义。Chinlu 和 Richard<sup>[6]</sup>用含适量硒酵母的饲料饲喂斑点叉尾鲷后,鱼体表现出明显的生长优势。国内水产界对硒的研究刚刚起步,仅有王安利等<sup>[7]</sup>,常仁亮等<sup>[8]</sup>、刘伟等<sup>[9]</sup>对中国对虾、鲤、虹鳟作过一些研究。

本试验旨在研究微生态制剂芽孢杆菌和硒酵母在促进异育银鲫生长、增强异育银鲫对病原菌嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)抵抗能力方面的作用,以期芽孢杆菌和硒酵母作为饲料添加剂在水产健康养殖上的应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

在基础饲料(表 1)中添加 0.1%、0.2%、0.4% 的芽孢杆菌,0.3%、0.6%、1.2% 的硒酵母,0.2% + 0.3%、0.2% + 0.6%、0.2% + 1.2% 的芽孢杆菌和硒酵母混合物,以基础饲料为对照。试验组和对照组各设三个平行组。

### 1.2 试验鱼

试验异育银鲫取自上海水产大学南汇养殖场,选择平均初始体重为  $4.2 \pm 0.3$ g 健康活泼的鱼放入室内  $4.5\text{m} \times 3.0\text{m} \times 1.4\text{m}$  的水泥池中,每池 60 尾。正式试验前用基础饲料驯养 2 周。

### 1.3 试验饵料及饲养管理

按试验设计加入芽孢杆菌和硒酵母后,以粉料做载体掺入  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ,用逐级扩大混合的方法将粉状原料混匀后,加工成直径为 1.5mm 的颗粒,晾干备用。

经驯养后的试验鱼,日投饵量按体重的 5% 投喂,上下午各投饵一次,使之饱食,并根据水温适当调节。饲养期间,水中  $\text{DO} > 5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{NH}_3 - \text{N} < 0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4 ~ 8.5, 水温  $21.6 \sim 32.0^\circ\text{C}$ 。饲养为期 2 个月。

### 1.4 测定

饲养 2 个月后,测定各组鱼的体重,并计算相对增重率。相对增重率(%) = (末重 - 初重) / 初重  $\times 100$ 。从各饲料组取鱼 20 尾,进行病原感染试验。将每组鱼平分 4 组,以  $4.5 \times 10^8\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的嗜水气单胞菌菌液,按  $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$  及  $10^{-3}$  四种稀释度注射,每尾鱼腹腔注射 0.2mL。每饲料组另取 5 尾按相同的剂量注射生理盐水作为对照。试验过程中水温保持在  $28^\circ\text{C}$ ,重复试验一次。观察记录 5d

表 1 基础饲料组成(%)

Tab.1 Main composition of basal diet (%)

| 组分   | 百分含量        | 组分                      | 百分含量 |
|------|-------------|-------------------------|------|
| 鱼粉   | 45          | 小麦粉                     | 24   |
| 豆粕   | 10          | 混合无机盐                   | 0.5  |
| 菜籽饼  | 20          | 混合维生素                   | 0.3  |
| 氯化胆碱 | 500mg/kg 饲料 | $\text{Cr}_2\text{O}_3$ | 0.2  |

注:混合无机盐、混合维生素市售。

内试验鱼的死亡情况,并计算半数致死量(LD<sub>50</sub>),计算方法参考 Reed-Muench 法<sup>[10]</sup>。

## 1.5 数据处理

采用方差分析及多重比较(q检验)

## 2 结果

### 2.1 异育银鲫的生长

异育银鲫摄食含芽孢杆菌饲料后,各组间的体重表现出显著性差异( $P < 0.05$ ,图1)。芽孢杆菌0.2%组的相对增重率为215.4%,显著性高于芽孢杆菌0.1%、0.4%组和对照组,比后3组高出30%以上。饲料中添加硒酵母同样可以显著地促进异育银鲫的生长( $P < 0.05$ )。由图2可知,饲料中添加0.3%、0.6%、1.2%的硒酵母使异育银鲫的相对增重率显著高于对照组,不同含量的硒酵母使相对增重率增加16.4%~31.4%。

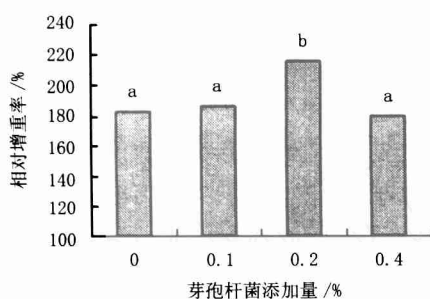


图1 鱼摄食含芽孢杆菌饲料后的生长

Fig.1 Growth of tested fish fed with dietary *Bacillus* sp.

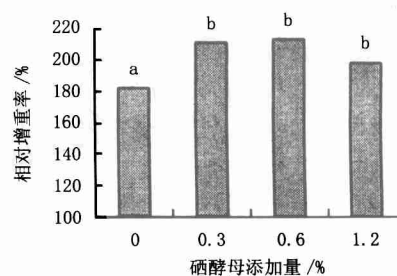


图2 鱼摄食含硒酵母饲料后的生长

Fig.2 Growth of tested fish fed with dietary seleno yeast

注:图中小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ ),大写字母不同表示差异极显著( $P < 0.01$ ),下同。

将芽孢杆菌和硒酵母同时添加到饲料中时,不同含量及配比的芽孢杆菌和硒酵母均能使异育银鲫的生长加快( $P < 0.05$ ,图3),相对增重率高于对照组20%以上,但在各含量配比组间变化很小( $P > 0.05$ )。图4表明在饲料中添加0.2%芽孢杆菌的基础上,再添加0.3%、0.6%、1.2%硒酵母后鱼体的生长情况。方差分析表明相对增重率受硒酵母含量的影响不显著( $P > 0.05$ )。同样,在添加特定量硒酵母的基础上,再添加0.2%的芽孢杆菌,也没有表现出相对增重率的差异( $P > 0.05$ ,图5)。

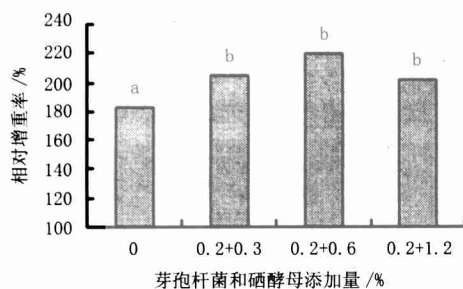


图3 鱼摄食含芽孢杆菌和硒酵母混合物后的生长

Fig.3 Growth of tested fish fed with dietary *Bacillus* sp. and seleno yeast complex

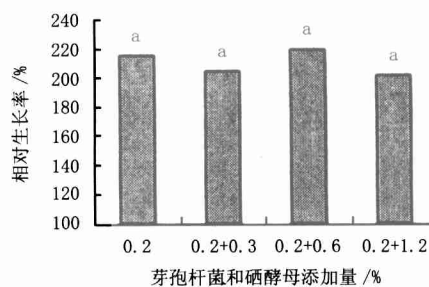


图4 鱼摄取含硒酵母和定量芽孢杆菌饲料后的生长

Fig.4 Growth of tested fish fed with different levels of seleno yeast and 0.2% *Bacillus* sp.

### 2.2 异育银鲫对嗜水气单胞菌的半数致死量(LD<sub>50</sub>)

异育银鲫注射嗜水气单胞菌后,在 5d 内陆续出现死亡,根据死亡数得到 LD<sub>50</sub>。由图 6 可知,异育银鲫摄取含芽孢杆菌饲料后,LD<sub>50</sub>极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ),但不随芽孢杆菌的添加量发生变化。饲料中添加不同水平的硒酵母均能使 LD<sub>50</sub>极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ,图 7),而且随着硒酵母添加量的增大而增大,但硒酵母 0.6% 与 1.2% 组间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。若在饲料中同时添加芽孢杆菌和硒酵母,同样 LD<sub>50</sub>极显著高于对照组,而且随着芽孢杆菌和硒酵母的配比发生变化(图 8),但添加效果不如单加芽孢杆菌明显(图 9)。混合添加芽孢杆菌和硒酵母与单加硒酵母相比,0.2% 的芽孢杆菌 + 0.3% 硒酵母组显著高于 0.3% 硒酵母组;0.2% 芽孢杆菌 + 0.6% 硒酵母与 0.6% 硒酵母组无显著差异;0.2% 芽孢杆菌 + 1.2% 硒酵母组极显著低于 1.2% 硒酵母组 ( $P < 0.01$ ,图 10)。

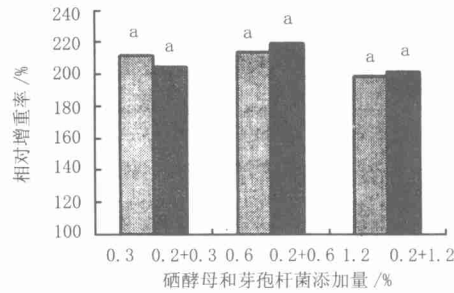


图 5 鱼摄食含单一硒酵母、芽孢杆菌和硒酵母混合物饲料后的生长比较

Fig.5 Growth comparison of selenoyeast group with *Bacillus* sp. and selenoyeast complex group

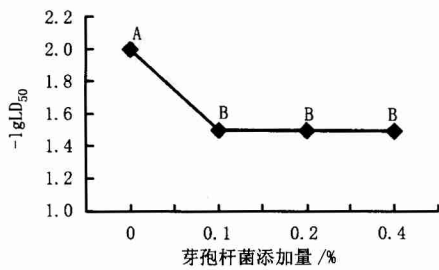


图 6 鱼摄食含芽孢杆菌饲料后的 LD<sub>50</sub>

Fig.6 LD<sub>50</sub> of tested fish fed with dietary *Bacillus* sp.

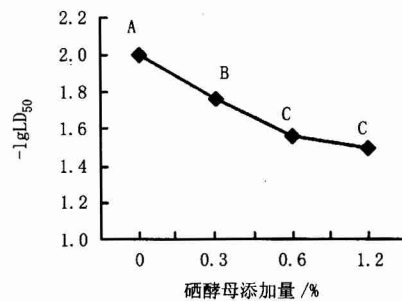


图 7 鱼摄食含硒酵母饲料后的 LD<sub>50</sub>

Fig.7 LD<sub>50</sub> of tested fish fed with dietary selenoyeast

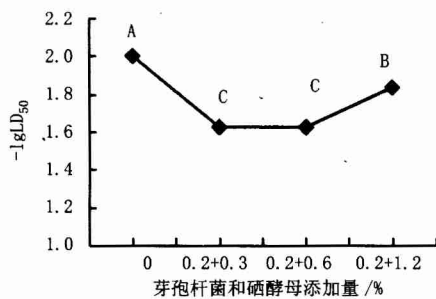


图 8 鱼摄食含芽孢杆菌和硒酵母混合物后的 LD<sub>50</sub>

Fig.8 LD<sub>50</sub> of tested fish fed with dietary *Bacillus* sp. and selenoyeast complex

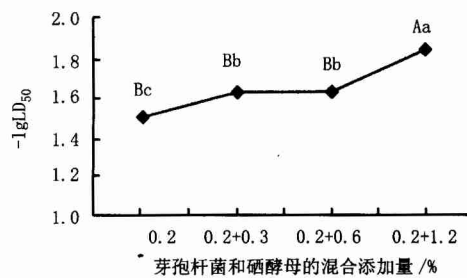


图 9 鱼摄食含硒酵母和定量芽孢杆菌饲料后的 LD<sub>50</sub>

Fig.9 LD<sub>50</sub> of tested fish fed with different levels of selenoyeast and 0.2% *Bacillus* sp.

### 3 讨论

#### 3.1 芽孢杆菌和硒酵母对生长的作用

饲用微生物种类繁多,在一些被研究的水产动物中具有明显的营养性功能。如芽孢杆菌能够提高黄尾笛鲷的生长率,乳酸菌能够提高大菱鲆仔鱼和日本比目鱼仔鱼的生长率,粪链球菌促进鲤的生长,并提高饲料利用效率<sup>[5]</sup>。潘康成等<sup>[1]</sup>在饲料中添加 0.1% 的芽孢杆菌对鲤具有明显的促生长作用,而江萍等<sup>[11]</sup>在对鲤的网箱养殖中发现,饲料中添加 0.2% 的芽孢杆菌,增重率和饵料利用率下降,生产成本提高。本试验结果表明饲料中添加 0.2% 的芽孢杆菌能显著促进异育银鲫的生长 ( $P < 0.05$ ),添加 0.1% 和 0.4% 的芽孢杆菌与对照组无显著差异 ( $P > 0.05$ )。以上研究说明,饲料中适量添加饲用微生物可以促进某些水产动物的生长,生长效果与饲用微生物种类、养殖对象有关。由于芽孢杆菌在动物肠道内零星存在<sup>[12]</sup>,推测饲料中添加过多或过少会造成肠道内有益菌群的生态平衡失调,对动物的生长产生不利的影响。

饲料中硒不足会抑制鱼的生长<sup>[13]</sup>,高水平的硒亦会产生毒害作用<sup>[14]</sup>。在以鱼粉为主要蛋白源的商用鲑科鱼类饲料中,含硒量都超过  $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>[15]</sup>,但由于消化率和生物利用率低<sup>[16,17]</sup>,饲料中必须适当补硒。鱼类对硒的最小需求量根据 VE 的含量而定,但一般在  $0.2\sim 0.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  范围内<sup>[18]</sup>。本研究表明,在饲料中添加 0.3% (硒  $0.075\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  饲料)、0.6%、1.2% 的硒酵母都能使异育银鲫生长加快,这一方面说明异育银鲫的基础饲料中硒不足,另外,三个水平的硒酵母均在异育银鲫正常生长的许可范围内,异育银鲫能够较好的利用酵母中的硒,且适量添加在一定程度上可以提高饲料利用率。作为有机硒的载体,酵母细胞含有丰富的维生素和营养成分,也可在消化道合成菌体蛋白尤其是 B 族维生素,对鱼类具有丰富的营养功能。这也是添加饲料酵母能促进异育银鲫生长的可能原因之一。

将 0.2% 芽孢杆菌与硒酵母同时加入饲料中,与基础饲料相比,异育银鲫的生长明显加快,但与单加芽孢杆菌、硒酵母相比,未表现出生长差异,说明 0.2% 芽孢杆菌与各水平的硒酵母对异育银鲫的生长没有协同或拮抗作用。至于其它含量的芽孢杆菌与硒酵母对异育银鲫或其它种类的鱼的生长有否协同或拮抗作用,需进一步研究。

#### 3.2 芽孢杆菌和硒酵母对抗病力的影响

本研究表明,饲料中添加不同浓度的芽孢杆菌对提高异育银鲫对嗜水气单胞菌侵袭时的抵抗力有极显著的效果 ( $P < 0.01$ )。由于芽孢杆菌是革兰氏阳性菌,其细胞壁主要成分葡聚糖能发挥免疫刺激物的作用<sup>[19]</sup>,故在一定程度上提高了异育银鲫的非特异性免疫功能。

硒缺乏会降低多种动物的免疫功能,适当补硒则可增强它们的免疫功能。硒增强动物对病原体感染的抵抗力与硒增强动物免疫功能密切相关。本实验在饲料中补充 0.3% ~ 1.2% 的硒酵母后异育银鲫对嗜水气单胞菌的  $\text{LD}_{50}$  滴度明显增大 ( $P < 0.01$ )。王鸿泰等<sup>[20]</sup>也证实硒制剂有抑制某些细菌的作用。大量研究证明,酵母细胞壁含有酵母多糖,其活性成分为葡聚糖、甘露寡糖、糖蛋白<sup>[21]</sup>, $\beta$ -葡聚糖可促进巨嗜细胞吞噬作用或通过补体途径激活体液免疫<sup>[22]</sup>;甘露寡糖与病原菌在肠壁上的受体非常相似,能竞争性地与病原菌结合,从而能够阻止病原菌在动物肠道细胞表面吸附<sup>[23]</sup>,病原菌得不到生长所必需的养分而失去致病力。因此,在饲料中添加硒酵母可以增强异育银鲫对嗜水气单胞菌的抗感染能力,本试验中添加 0.6% 的硒酵母即可达到最强的抗感染能力。

本试验首次尝试将芽孢杆菌和硒酵母同时添加到饲料中,使  $\text{LD}_{50}$  极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ),其中 0.2% 芽孢杆菌 + 0.3% 硒酵母组的抗感染能力最强,但显著低于 0.2% 芽孢杆菌组。与摄取单加硒

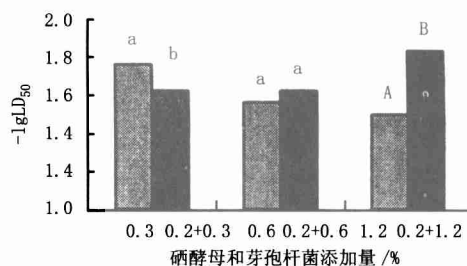


图 10 鱼摄食含单一硒酵母、芽孢杆菌和硒酵母混合物后的  $\text{LD}_{50}$

Fig. 10  $\text{LD}_{50}$  comparison of tested fish fed dietary selenoyeast to *Bacillus* sp. and selenoyeast complex

酵母的饲料组相比,LD<sub>50</sub>随硒酵母添加量的增大而减小( $P < 0.01$ ,图 10),因此,尽管混合添加芽孢杆菌和硒酵母可以提高异育银鲫对嗜水气单胞菌的抵抗力,但不能排除两者之间存在拮抗关系的可能性,或嗜水气单胞菌增殖需要硒,补硒反而增加病原体的作用<sup>[24]</sup>。鉴于此,在生产实际中应充分考虑饲用微生物与微量元素的配伍性及适宜的添加量,使其发挥最佳作用。

上海水产大学渔业学院陆宏达副教授为本次试验提供病原菌,谨此致谢。

#### 参考文献:

- [1] 潘康成,何浩,刘克琳.微生物添加剂对鲤鱼生长和消化酶活性的影响[J].饲料工业,1997,18(10):41-42.
- [2] 黄永春,王盛任,邓振川,等.有效微生物制剂(EM)对建鲤肠道菌群及其蛋白酶和肝胰脏蛋白酶活性的影响[J].福建水产,1999,1:24-28.
- [3] Porubcan R S. Reduction of ammonia nitrogen and nitrite in tanks of *Penaeus monodon* using floating biofilters containing processed diatomaceous earth media pre-inoculated with nitrifying bacteria[A]. World aquaculture Society: Program and Abstracts of the 22<sup>nd</sup> Annual Conference and Exposition[C]. 1991.
- [4] Porubcan R S. Reduction in chemical oxygen demand and improvement in *Penaeus monodon* yield in pond inoculated with aerobic Bacillus bacteria[A]. World aquaculture Society: Program and Abstracts of the 22<sup>nd</sup> Annual Conference and Exposition[C]. 1991.
- [5] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture[J]. Aquac,1999,180:147-165.
- [6] Chinlu W, Richard T L. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Aquac,1997,152:223-234.
- [7] 王安利,王维娜,刘存歧,等.饲料中硒对中国对虾生长及其体内含量的影响[J].水产学报,1994,18(3):245-248.
- [8] 常仁亮,韩保平,顾润润.硒酵母的培养及其养虾效果[J].水产学报,2000,24(5):458-462.
- [9] 刘伟,石连玉,卢玲,等.鲤、虹鳟组织硒含量及其外源硒对其影响探讨[J].上海水产大学学报,1998,7(增刊):136-139.
- [10] 张寿山,华鼎可.鱼类免疫学[M].北京:农业出版社,1984.110-113.
- [11] 江萍,夏先林,周碧君.两种微生态调节剂对网箱鲤鱼生产效果的影响[J].中国微生态学杂志,1997,9(3):26-28.
- [12] 刘学剑.饲用微生物在动物生产中的应用[J].国外畜牧学——饲料,1998,4:32-33,27.
- [13] Poston H A, Combs G F, Leibovitz L. Vitamin E and selenium interrelations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*): gross, histological and biochemical signs[J]. J Nutr, 1976, 106:892-904.
- [14] Gatlin D M, Wilson R P. Dietary selenium requirement of fingerling channel catfish[J]. J Nutr, 1984, 114:627-633.
- [15] Lunde G. Activation analysis of trace elements in fish meal[J]. Sci Food Agric, 1968,19:432-434.
- [16] Bell J G, Covery C B. Digestibility and bioavailability of dietary selenium from fish meal selenium, selenomethionone and selenocystine in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Aquac,1989,81:61-68.
- [17] Gabrielsen B O, Opstvedt J. Availability of selenium in fish meal in comparison with soybean meal, corn gluten meal and selenomethionine relative to sodium selenite for restoring glutathione peroxidase in seleniumdeleted chinooks[J]. J Nutr, 1980,110:1096-1100.
- [18] Watanabe T, Kiron W, Satoh S. Trace minerals in fish nutrition[J]. Aquac, 1997,151:185-207.
- [19] Anderson D P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture[J]. Annu Rev Fish Dis, 1992, 2: 281-307.
- [20] 王鸿泰,姚爱琴,何勤,等.鲤血液谷胱甘肽过氧化物酶的测定[J].湖北农学院学报,1999,19(1):28-30.
- [21] 崔立,谢爱纯.免疫刺激剂——酵母细胞壁[J].饲料工业,1999,20(9):44-46.
- [22] 郭亮,李德发.饲料免疫增强剂的研究进展[J].饲料研究,2000,12:7-9.
- [23] 胡兴东,潘康成.微生态制剂及其作用机制[J].中国饲料,2001,3:14-17.
- [24] 杜立芹.硒与免疫[J].国外医学(卫生学分册),1999,26(2):91-94.