

文章编号: 1000-0615(2006)01-0097-06

养殖鳗鲡肠道益生菌的筛选

樊海平, 曾占壮, 林煜, 钟全福, 余培建, 翁祖桐
(福建省淡水水产研究所, 福建福州 350002)

摘要: 从正常养殖的鳗鲡肠道中分离得到 477 株细菌, 通过对常见病原菌的拮抗试验和产酶能力测试筛选出 47 株细菌。通过对鳗鲡饲料培养基的利用能力从中筛选出 19 株细菌, 鉴定分类后选择 7 株可能的益生菌进行鱼粉分解试验, 筛选得到 2 株细菌, 即 A40209CDC4 和 A31009NA。最后测定这 2 株细菌对欧洲鳗鲡的毒力和对鳗鲡饲料的表观消化率。结果显示, 在急性毒性试验中, 试验剂量的细菌对欧洲鳗鲡无毒力, 且能有效地提高对饲料的利用率, 表明筛选出的 2 株肠道益生菌 A40209CDC4 和 A31009NA 具有良好的开发和应用前景。

关键词: 养殖鳗鲡; 肠道菌群; 益生菌; 筛选

中图分类号: S941.4; S965.223 文献标识码: A

Selection of probiotics from intestinal tract of cultured eel

FAN Hai-ping, ZENG Zhan-zhuang, LIN Yu, ZHONG Quan-fu, YU Pei-jian, WENG Zitong
(Freshwater Fisheries Research Institute of Fujian Province, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The research of probiotics for aquatic animals is increasing with the demand for environment friendly aquaculture. The probiotics were defined as live microbial feed supplements that improve health of man and terrestrial livestock. Most attempts to propose probiotics have been undertaken by isolating and selecting strains from aquatic environment. These microbes were vibriaceae, pseudomonads, lactic acid bacteria, *Bacillus* spp. and yeasts. Some commercial products are referred to as probiotics used in eel culture, though they were commercial preparations devised for land animals. This paper focuses on selection of probiotics from bacterial strains which were isolated from intestinal tract of cultured healthy eels (*Anguilla anguilla* and *A. japonica*), then use the selected probiotics as supplement of eel feed. 477 bacterial strains of intestinal tract of cultured eel were used for testing the antagonistic against *Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum* Non O1 *Vibrio cholera*, *Acinetobacter lwffü*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* etc. commonly eight strains of pathogenic bacteria of cultured eel, and gelatinase, lipase, amylase, lecithinase, casease and chitinase production. 47 bacterial strains were selected as candidates. Then, by evaluating the BOD value of the 47 strains in the liquid eel-feed medium, 19 bacterial strains which could effectively using eel feed as their nutrients for growth were selected as candidates. After identification, 5 strains as *Pseudomonas cavie*, *P. stutzeri*, *P. fluorescens* (2 strains), *Staphylococcus lentus* were pathogenic bacteria to cultured eel, 5 strains were no identification, these isolations were abandoned. Selected one strain from two *Bacillus subtilis* isolations and two *Bacillus pumilus* isolations, combined with other isolations, 7 bacterial strains were selected as candidates. By tested the degrade fish meal and tested free amino acid of 7 candidates, strain A40209CDC4 and strain A31009NA were selected as probiotics for supplement of eel feed. By oral administration (A31009NA) and injection infection (A40209CDC4 and A31009NA) test, the results of acute toxicity to European eel showed that there were no toxicity to European eel in 7days at dosage 10^9 CFU \cdot mL⁻¹ concentration of strain A40209CDC4 and strain A31009NA. Strain A40209CDC4 and strain A31009NA used as supplement of formulated eel feed at dosage 10^6 CFU \cdot g⁻¹, the test eel was cultured at 22 ± 1 °C, 100% water changed daily for forty days, the digestibility of dry matter and crude protein increased 30.96 and 10.04 percentage of strain A40209CDC4 respectively, and

收稿日期: 2005-06-20

资助项目: 福建省农业科技攻关计划重点资助项目(2002N018)

作者简介: 樊海平(1967-), 男, 江苏武进人, 研究员, 主要从事水产养殖动物病害研究。Tel: 0591-83796968, E-mail: fanhaiqing@tom.

the digestibility of dry matter and crude protein increased 42.96 and 13.11 percentage of strain A31009NA respectively. From all of test items, the selected isolations were suitable used as probiotics for eel. The exploration and application of the selected isolations using as supplement of eel feed were significant.

Key words: cultured eel; intestinal tract bacteria; probiotics; selection

益生菌是由宿主体内分离出的正常成分制成的活菌制剂,通过适当的途径作用于养殖动物,具有抑制病原菌生长、提高苗种成活率和鱼类生长速度的功能^[1]。目前国内外报道的益生菌研究主要有 *Lactobacillus* sp. 于牙鲆^[2]、*Lactic acid bacteria* 在大西洋鲷^[3,4]、*Bacillus* S11 于日本对虾控制 *Vibrios*^[5]、*Carnobacterium divergens* 于大西洋鲑^[6]和 *Pseudomonas fluorescens* 控制 *Vibrio* 和 *Saprolegnia* 研究^[7,8]等。筛选益生菌的主要途径为对病原体的拮抗作用,本文报道通过对病原菌的拮抗试验、产酶能力测试、对鳗鲡饲料培养基的利用、对鱼粉分解能力由养殖鳗鲡肠道菌群筛选出益生菌和益生菌对欧洲鳗鲡毒力、对鳗鲡饲料表观消化率影响的研究结果。

1 材料与方法

1.1 对常见病原菌的拮抗作用

试验材料 供试菌液:2003-2004年由正常养殖日本鳗鲡、欧洲鳗鲡空腹状态下肠道分离到的477株细菌用于筛选,将供试菌接种牛肉膏蛋白胨培养液,230 r·min⁻¹ 30℃振荡培养过夜。**指示菌液:**迟钝爱德华氏菌(*Edwardsilla tarda*, E. T)、大肠杆菌(*Enterobacter coli*, E. C)、鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*, V. A)由福建省防疫站赠送。荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*, P. F)、非O1群霍乱弧菌(Non O1 *Vibrio cholera*, NO1V. C)、鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*, A. L)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, A. H)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*, A. S)由福建省淡水水产研究所分离保存。将指示菌接种牛肉膏蛋白胨培养液,230 r·min⁻¹ 30℃振荡培养4~5h,摇动后,呈轻微烟雾状混浊。

试验方法 按照莫照兰等方法进行^[9]。

结果判定 菌苔外周出现抑菌环、不规则或规则裂解环者,测量环直径。

1.2 产酶能力定性测定

试验材料 明胶液化试验培养基、脂酶试验培养基、淀粉琼脂、卵磷脂酶试验培养基、酪蛋

白琼脂、甲壳质琼脂;试验用菌液同1.1。

试验方法 参照文献[10]的方法进行。

1.3 利用鳗鲡饲料能力测定

试验材料 饲料培养基:成鳗饲料1.5g(粗蛋白48.4%、粗脂肪4.6%、粗纤维0.7%、水分4.5%、钙4.2%、总磷2.3%、粗灰分15.5%),用100mL蒸馏水煮沸,调整pH值7.5,121℃高压灭菌20min备用。**供试菌株:**通过对病原菌抑制、产酶测定筛选后得到的菌株,于饲料琼脂培养基(成鳗饲料1.8g,琼脂15g,用蒸馏水1000mL煮沸溶解,调整pH值7.5,高压灭菌后倒平板)筛选生长良好的肠道菌,共47株。

试验仪器 MODEL-①A型差压式BOD测定装置(广东韶关科力实验仪器有限公司生产)培养瓶编号为No.6。用自来水配置1000mg·L⁻¹的菌敌溶液(三氯异氰尿酸钠,含有效氯30%,广州精博动物药业有限公司生产),将培养瓶及搅拌子、吸收杯于菌敌溶液浸泡4h后,于超净工作台取出,用无菌自来水冲洗4遍,空干水后使用。

试验方法 菌种扩增,基本方法同莫照兰等^[11],从-20℃保存的液体保种管中取20μL菌液,接种到普通肉汤培养基12mL,30℃振荡培养24h;接种与培养,根据预备实验,选择量程为450mL的培养瓶。每个培养瓶接种扩增菌液8mL,接种饲料培养基72mL,按照仪器使用方法在生化培养箱中20℃培养,测试菌株对鳗鲡饲料的利用能力,于第2天和第5天读数(BOD₂和BOD₅);BOD的计算,按照说明书方法,本实验选择试验样不稀释,但需扣除接种实验样的BOD₅的测定方案,计算公式如下:

$$BOD = (R_1 \times K_1 - R_2 \times K_2 \times f_1) \times f_2$$

式中, R_1 为接种后培养液差压计读数; K_1 为接种后培养液所选测定量程系数; R_2 为接种培养液的差压计读数,刻度格; K_2 为接种培养液所选测定量程系数; f_1 为接种培养液的比例; f_2 为1- f_1 。

1.4 对鱼粉体外分解能力和欧洲鳗鲡饲料表观消化率测定

试验材料 细菌培养基:牛肉膏蛋白胨水和牛肉膏蛋白胨培养基。鱼粉:美国工船鱼粉(福

建省农业科学研究院饲料检测中心提供, 已完成对游离氨基酸的测试), 将鱼粉 70 °C 烘干 24 h 恒重后, 定量称取鱼粉 20.0 g, 于 250 mL 三角烧瓶中高压灭菌, 备用。饲料: 天马牌鳊成鳊饲料, 蛋白质 44.97% 水分 5.94%。鱼虾敌菌灵: 山西省运城申达化工有限公司制造, 含有效氯 30%。试验菌株: 经对鳊饲料利用能力筛选后得到的 7 株菌株, 用于鱼粉体外分解能力测试。经体外分解能力测试后筛选出菌株 A40209CDC4 和 A31009NA, 用于表观消化率测定。试验鳊: 二龄欧洲鳊(由长乐某养鳊场提供), 平均体重 37.0 g。降温充氧运回实验室后经暂养稳定 10 d 后, 随机分配至各水族箱, 每箱 18 尾, 水温恒定 (22 ± 1) °C, 充气、日换水 100%, 稳定 7 d 后开始驯化投饵。

试验仪器 BS-IE 振荡培养箱(常州国华电器有限公司); 日立 835 氨基酸自动分析仪; 岛津 AA-6800 原子吸收分光光度计。

试验方法 分解鱼粉: 无菌蒸馏水洗下 30 °C 培养 24 h 的试验菌株, 定容至 60 mL, 计数后加入装有鱼粉的三角烧瓶, 于 30 °C、250 r·min⁻¹ 震荡培养 12 h, 用 1 000 mg·L⁻¹ 的鱼虾敌菌灵 1.2 mL 终止发酵。于 4 °C 冰箱静置 24 h, 4 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上悬浊液以 1:50 比例稀释, 按照 GB/T 18246-2000 方法处理后, 测定游离氨基酸含量。鳊饲料表观消化率: 外源指示剂饲料制备参照陈平莺方法^[12]; 于外源指示剂饲料中添加培养后离心收集、玉米淀粉混合、40 °C 烘干 6 h 计数后的试验菌, 使三氧化二铬含量约为 1.0%, 试验菌含量达 10⁶ CFU·g⁻¹ 含菌饲料, 对照组不加试验菌; 每晚 21:00 投喂一次, 每箱投喂量 8~10 g, 正常投饵 7 d 后, 于每次投饵后 12 h, 用带玻璃管的吸球收集粪便, 随排随吸, 持续 4 h, 将包膜完整的粪便于 70 °C 烘干后-4 °C 冰箱保存, 连续收集 40 d; 饲料和粪便中的粗蛋白含量测定参照 GB/T 6432-1994 测定方法, 铬含量测定参照 GB/T 13088-1991 方法。表观消化率计算参照文献^[13]。

1.5 对欧洲鳊毒力测试

试验用鱼 鳊规格每尾 110~120 g, 已暂养 45 d, 塑料袋充氧打包后运回实验室暂养 3 d, 暂养期间不投饵, 连续充气, 日换水 1 次, 每次换水 50%。暂养及试验用水暴气 24 h 以上。试

验用自来水 pH 7.3 ± 0.3, NH₄⁺ - N 未检出, NO₂⁻ - N 为 0.005 mg·L⁻¹, 水温为 22~25 °C, 余氯未检出。暂养稳定后随机捞取试验用鱼, 分配入各水族箱, 每组随机放鱼 5 尾。

供试菌株 经体外分解能力测试后筛选出菌株 A40209CDC4 和 A31009NA。

试验方法 菌悬液 菌株于牛肉膏蛋白胨培养基 30 °C 培养 24 h, 再用 0.85% 无菌生理盐水洗下, 用无菌生理盐水做 10 倍稀释, 平板涂布法计数。

肌肉注射 试验鱼用 MS-222 麻醉后, 将不同稀释度的菌悬液用无菌注射器肌肉注射, 注射处用酒精棉球消毒, 注射剂量为每尾 0.5 mL^[14]。

口灌 A31009NA 菌株除肌肉注射外, 还进行了灌胃试验, 用无菌头皮针吸取鱼粉与菌悬液混合物插入胃中灌注。每 100 g 鱼体重灌鱼粉与菌悬液混合物 0.5 mL (鱼粉与菌悬液混合物: 10 g 鱼粉加 25 mL 无菌生理盐水, 取 4.5 mL 鱼粉悬液, 加菌悬液 4.5 mL)。

试验鳊暂养与观察 试验期间不换水, 不投饵, 连续充气, 水温为 23~25 °C, 每日观察记录鱼体死亡情况, 每日及时捡除死亡鱼体, 连续观察 172 h。

2 结果

2.1 对常见病原菌的拮抗

由肠道菌株对任何一株指示菌产生拮抗作用共筛选出 20 株, 详细结果见表 1。

2.2 产酶能力定性测定

由肠道菌株筛选出产生一种试验酶的菌株 225 株, 其中具明胶液化酶 139 株, 脂酶 52 株, 淀粉水解酶 67 株, 卵磷脂酶 66 株, 酪蛋白酶 99 株, 甲壳质酶 8 株, 纤维素水解酶 0 株。产生 2 种以上试验酶的菌株有 101 株; 产生 3 种以上试验酶的菌株有 58 株; 产生 4 种以上试验酶的菌株有 35 株。筛选出具有抑菌作用且产酶能力强的菌株 47 株进行鳊饲料利用能力测试(表 2)。

2.3 鳊饲料利用能力测定

由 BOD 测定结果共筛选出 19 株对饲料具有较好分解能力的菌株, 详细结果见表 2。19 株细菌经 Phoe-hix TM-100 全自动细菌鉴定/药敏分析系统(美国 BD 公司), 3 株芽孢菌的复核鉴定采

表1 点种法对拮抗菌的筛选
Tab.1 Selection of antagonistic bacteria by dot inoculating

菌株 strain	抑菌区直径(mm) diameter of inhibition							
	A. S	E. T	A. H	P. F	V. A	NO IV. C	A. L	E. C
A30429K2	11	-	7	-	-	-	-	-
A30429N2	10	-	-	-	-	-	-	-
A30429B2	9	-	7	-	-	-	-	-
A30927NA1	-	17	-	-	-	-	-	-
A30927BA1	-	17	-	-	-	-	-	-
A30927BA4	-	9	-	-	-	-	-	-
A30927KF1	-	8	-	-	-	-	-	-
A30927KF2	-	18	-	-	-	-	-	-
A30927KF3	-	16	-	-	-	-	-	-
J30927KF2	-	10	-	-	-	-	-	-
J40209Y1	-	14	-	-	-	-	-	-
A40209Y1	-	18	-	-	-	-	-	-
A40209NA3	-	18	-	-	-	-	-	-
J40209CDC4	13	-	-	-	-	-	-	-
A40209Camp	3	15	-	-	-	-	-	-
A40209CDC3	25	-	-	-	-	-	-	-
A40209CDC4	18	-	-	-	-	-	-	-
HH40226NA2	18	-	-	-	-	-	-	-
HH40226Camp1	19	-	-	-	-	-	-	-
A30617Y2	10	-	-	-	-	-	-	-

表2 试验菌株对鳊鲮饲料的 BOD 试验结果
Tab.2 The BOD value of isolated bacteria to eel feed

序号 order number	菌株 strain	BOD ₂ (2nd day BOD)	BOD ₅ (5h day BOD)	序号 order number	菌株 strain	BOD ₂ (2nd day BOD)	BOD ₅ (5h day BOD)
1	J40209Y1	16.6868	38.20689	24	A30927NA1	1.22715	1.22715
2	A40209Y1	16.4681	37.55079	25	A30927BA1	0	0.40905
3	A40209NA3	19.9673	40.83129	26	J30927CDC1	1.6362	1.6362
4	J40209CDC4	18.4364	41.26869	27	A30927BA4	0	0.40905
5	A40209Camp3	15.812	41.70609	28	A30927KF1	0	0
6	A40209CDC3	17.1242	37.76949	29	A31009CDC10	1.22715	6.5448
7	A40209CDC4	20.8421	40.61259	30	A31009CDC15	2.4543	7.3629
8	J40209CDC2	0.40905	3.2724	31	A31009NA	17.8755	21.14789
9	A40209BA3	16.362	31.49685	32	A31009CDC2	0	0.40905
10	J40209Camp2	0.40905	0.40905	33	J30117Y1	0.28634	12.96689
11	A40209Camp1	6.5448	20.4525	34	J30117N7	15.953	25.3611
12	A40209Camp2	1.22715	1.6362	35	J30206CDC4	12.9669	19.92074
13	HH40226Camp1	35.7137	48.04839	36	J30329N2	0	0
14	HH40226CDC3	36.2827	42.82754	37	J30329N3	1.22715	1.22715
15	A30617Y2	20.186	43.89309	38	J30409MYP1	7.3629	13.9077
16	J30617CDC2	0.40905	0.40905	39	A40106NA1	17.5892	22.0887
17	A30617CDC1	0.40905	0.40905	40	A40106BA1	29.4516	38.4507
18	J30617N1	1.6362	1.6362	41	A40106P	29.8607	39.67785
19	A30617N1	0.40905	0.40905	42	J40106Camp	20.4525	33.95115
20	A30927Y5	9.69449	12.96689	43	J30429M1	0	8.9991
21	A30927KF	0.8181	0.8181	44	J30801Camp2	1.22715	1.22715
22	A30927KF3	0.40905	0.40905	45	A40218Y	0	0
23	A30927CDC1	1.6362	16.362	46	A40218BA1	0.40905	0.40905
				47	A40218BA2	14.3168	18.40725

用 VITEK 32 型全自动微生物分析系统(法国梅里埃公司)BAC 测试卡测试后,除 2 株不能确定种属外,已知种属菌株中施氏假单胞菌、荧光假单胞菌、豚鼠气单胞菌、缓慢葡萄球菌为病原菌,共 5 株,剔除这些病原菌后将不同种类细菌选择 7 株(同种细菌选择对饲料 BOD 测试结果高的菌株)进行鱼粉分解试验(菌株号见表 3)。

2.4 对鱼粉体外分解能力和欧洲鳗鲡饲料表观消化率测定

对鱼粉体外分解能力 试验组与对照组方差分析结果表明: J40106Camp、A40106NA1、A30617Y2 分别与对照组无显著差异;而 J30117N7、A40106BA1、A40209CDC4、A31009NA 分别与对照组差异显著,详细结果见表 3。根据对鱼粉分解后氨基酸产量,筛选出 A40209CDC4、A31009NA 菌株作为测定鳗鲡饲料表观消化率及对鳗鲡毒力试验的菌株。

表 3 试验菌株对鱼粉分解后游离氨基酸含量(平均值)

Tab. 3 The content of amino acid in fish meal treated by the test stains (mean value)

氨基酸(g·L ⁻¹) amino acid	J40106Camp	J30117N7	A40106BA1	A40209CDC4	A31009NA	A40106NA1	A30617Y2	对照组 control
天冬氨酸 Asp	1.62	1.61	1.9	4.71	3.45	1.59	1.61	1.33
苏氨酸 Thr	0.68	0.64	0.75	2	1.58	0.62	0.62	0.55
丝氨酸 Ser	1.04	1.03	1.19	2.64	1.79	1.01	1.01	1
谷氨酸 Glu	2.39	2.37	2.76	7.95	6.39	2.33	2.34	2.23
甘氨酸 Gly	4.22	4.06	4.75	6.75	6.09	3.98	4.02	3.39
丙氨酸 Ala	1.63	1.69	1.8	3.96	4.01	1.5	1.49	1.33
胱氨酸 Cys	0.1	0.1	0.11	0.16	0.14	0.1	0.09	0.09
缬氨酸 Val	0.59	0.53	0.66	1.79	1.42	0.56	0.57	0.45
甲硫(蛋)氨酸 Met	0.43	0.44	0.47	1.19	1.11	0.39	0.38	0.39
异亮氨酸 Ile	0.41	0.37	0.46	1.33	0.96	0.39	0.39	0.37
亮氨酸 Leu	0.85	0.84	1.01	3.16	2.17	0.85	0.86	0.85
酪氨酸 Tyr	0.43	0.44	0.5	1.07	1.09	0.42	0.43	0.79
苯丙氨酸 Phe	0.38	0.55	0.6	1.32	1.11	0.5	0.5	0.51
赖氨酸 Lys	0.98	0.95	1.05	3.5	3.03	0.86	0.85	0.78
组氨酸 His	0.25	0.25	0.3	0.82	0.54	0.25	0.25	0.22
精氨酸 Arg	1.13	1.39	1.42	3.66	2.58	1.14	1.16	1.32
脯氨酸 Pro	0.54	0.97	0.55	1.04	0.59	0.51	0.53	0.73
色氨酸 Trp	/	/	/	/	/	/	/	/
总量 total	17.62	18.23	20.28	47.05	38.05	17	17.1	16.33
天冬氨酸 Asp	4.82	5.55	5.46	5.19	4.96	3.74	3.68	3.40

对欧洲鳗鲡饲料表观消化率的测定 添加菌株 A40209CDC4 试验组干物质表观消化率和蛋白质表观消化率比对照组分别提高 30.96% 和 10.04%; 添加菌株 A31009NA 试验组干物质表观

消化率和蛋白质表观消化率比对照组分别提高 42.96% 和 13.11%。方差分析结果显示干物质表观消化率、蛋白质表观消化率试验组较对照组差异显著($P < 0.05$),详细试验结果见表 4。

表 4 试验菌株对鳗鲡饲料表观消化率的影响(平均值)

Tab. 4 The effects of the digestibility to the eel formulated feed with test stains(mean value)

菌株号 strain	Cr ₂ O ₃ 含量(mg·kg ⁻¹) Cr ₂ O ₃ content		蛋白质含量(%) protein content		表观消化率(%) digestibility		表观消化率比对照组增加(%) digestibility increase	
	饲料 feed	粪便 fecal	饲料 feed	粪便 fecal	干物质 dry matter	蛋白质 crud protein	干物质 dry matter	蛋白质 crude protein
A40209CDC4	979	2040	41.50	13.92	52.01	83.90	30.96	10.04
A31009NA	979	2720	41.50	15.02	64.01	86.97	42.96	13.11
对照 control	979	1240	41.50	13.74	21.05	73.86	-	-

2.5 对欧洲鳗鲡毒力测试

试验结果显示,注射菌株 A40209CDC4 浓度由 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^9$ CFU \cdot mL⁻¹,注射菌株 A31009NA 浓度达 $1.2 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^9$ CFU \cdot mL⁻¹,灌胃 A31009NA 浓度达 $3.37 \times 10^5 \sim 3.37 \times 10^9$ CFU \cdot mL⁻¹时,172 h 内与对照组相比,鳗鲡未显示异常,说明选择菌株对欧洲鳗鲡毒力低。

3 讨论

试验结果发现,养殖鳗鲡肠道菌株对鳗鲡常见病原菌的抑制作用主要集中于对温和气单胞菌和爱德华氏菌的抑制,对嗜水气单胞菌具抑制作用仅发现 2 株,而对其它病原菌均无抑制作用。由此认为,通过对病原菌的拮抗筛选有益菌,指示菌株的选择是至关重要的,很难选择出对所有病原体具有抑制作用的有益菌。

BOD 反映水中有机物被微生物氧化分解过程中所消耗的氧的多少,氧消耗越多,微生物利用有机物越多。根据此原理,测定 BOD 值即能反映菌株对饲料培养基的利用能力。本试验利用鳗鲡养殖用饲料制作培养基作为二次筛选用培养基,用此方法可以排除大部分不能利用鳗鲡饲料或利用率低的菌株,使筛选出的菌株将对鳗鲡饲料具有良好的利用性能,有助于提高饲料的利用效率,加快鳗鲡的生长。虽然 2 株细菌对欧洲鳗鲡试验未显示毒性,但因本试验为急性毒性试验,因此长期使用是否会对鳗鲡产生毒性还未知。只有具备了合理的安全评价指标,才能通过试验评价这些菌株是否真正是安全的且可广泛应用于养殖生产^[15],这有待于在应用研究时进一步深入。

对鱼粉的分解结果显示试验用菌株能有效提高游离氨基酸含量,因鳗鲡饲料的蛋白质营养来源主要为鱼粉,说明试验菌株添加到鳗鲡饲料可能具有提高饲料效率的作用;通过对鳗鲡饲料表观消化率影响试验结果显示,试验菌株能有效提高鳗鲡饲料干物质和粗蛋白的表观消化率。

参考文献

- [1] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture[J]. *Aquac.*, 1999, 180(1-2): 147- 165.
- [2] Byun J W, Park S Ch, Berno Y, *et al.* Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS- 12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *J Gen Appl Microbiol*, 1997, 43(5):305- 308.
- [3] Gildberg A, Mikkelsen H, Sandaker E, *et al.* Probiotic effect of Lactic acid bacteria in feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. *Hydrobiologia*, 1997, 352(1-3): 279- 285.
- [4] Gildberg A, Mikkelsen H. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod(*Gadus morhua*) fry with Lactic acid bacteria and immune-stimulating peptide during a challenge trial with *Vibrio anguillarum* [J]. *Aquac.*, 1998, 167(1/2): 103- 113.
- [5] Rengpipat S, Hianphak W, Piyatiratitivorakul S, *et al.* Effect of a probiotic bacterium on Black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth[J]. *Aquac.*, 1998, 167(3-4): 301- 303.
- [6] Moriarty D J W. Control of *Luminous vibrio* species in penaeid aquaculture pond[J]. *Aquac.*, 1998, 164(1-4): 351- 358.
- [7] Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B, *et al.* Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(3): 969- 973.
- [8] Bly J E, Quinion S M A, Lawson L A, *et al.* Inhibition of *Saprolegnia pathogenic* for fish by *Pseudomonas fluorescens* [J]. *J Fish Dis*, 1997(20):35- 90.
- [9] 莫照兰,俞勇,李会荣,等. 弧菌拮抗菌的筛选[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(2):225- 231.
- [10] 赵斌,何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 141- 160.
- [11] 莫照兰,王祥红,于勇,等. 虾池有机污染物降解细菌的筛选[J]. 水产学报, 2000, 24(4): 334- 338.
- [12] 陈平莺. 以三氧化二铬作指标物质测定鳗鱼对几种配方饲料的消化率[J]. 福建水产, 1994, 3: 42- 45.
- [13] Fukawa A, Tsukahara H. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility in fish food[J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1966, 35: 502- 506.
- [14] 周永欣,章宗涉. 水生生物毒性试验方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1989. 75- 143.
- [15] 郭兴华. 益生菌基础与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 210- 240.