

doi: 10.3969/j.issn.1673-2227.2010.01.005

光合细菌 PS2 对尖吻鲈的生长、消化酶及非特异性免疫酶的影响

林黑着¹, 袁丰华^{1,2}, 李卓佳¹, 陆 鑫^{1,3}, 杨其彬¹, 陈 旭¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 广东海洋大学, 广东 湛江 524088;
3. 大连水产学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 研究了光合细菌对尖吻鲈 (*Lates calcarifer*) 的生长、消化酶及血清免疫酶活性的影响。把浓度为 8×10^8 cfu·mL⁻¹ 的荚膜红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas capsulate*) 的液体制剂分别以 0.0% (对照组)、0.5%、1.0% 和 1.5% 的比例添加到饲料中, 投喂初始体质量为 (10.95 ± 0.25) g 的尖吻鲈 50 d。鱼的增重率、特定生长率、成活率及饲料系数在组间均没有显著性差异 ($P > 0.05$)。肝蛋白酶、肠淀粉酶及胃淀粉酶在 1.0% 组显著高于对照组 ($P < 0.05$) ; 肠蛋白酶在 1.5% 组显著低于 1.0% 组 ($P < 0.05$), 但试验组与对照组间没有显著性差异 ($P > 0.05$) ; 幽门垂的消化酶在 1.5% 组显著高于其他各组 ($P < 0.05$)。血清碱性磷酸酶 (AKP)、过氧化物酶 (POD) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性在组间均没有显著性差异 ($P > 0.05$)。结果表明, 该株光合细菌对尖吻鲈的生长及非特异性免疫力没有显著影响, 但在 1.5% 组能显著促进其幽门垂消化酶的活性, 在 1.0% 组显著促进肝蛋白酶及肠和胃淀粉酶的活性。

关键词: 光合细菌; 尖吻鲈; 生长特性; 消化酶; 非特异性免疫酶

中图分类号: S 917.1 文献标志码: A 文章编号: 1673-2227-(2010)01-0025-05

Effects of dietary photosynthetic bacteria PS2 on growth performance, digestive enzymes and nonspecific immune enzymes of sea bass (*Lates calcarifer*)

LIN Heizhao¹, YUAN Fenghua^{1,2}, LI Zhuojia¹, LU Xin^{1,3}, YANG Qibin¹, CHEN Xu¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;
3. Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: The research evaluated the effects of photosynthetic bacterium PS2 on the growth performance, digestive enzymes and serum nonspecific immune enzymes of cultured sea bass (*Lates calcarifer*). Four levels of *Rhodopseudomonas capsulate* liquid product at concentration of 8×10^8 cfu·mL⁻¹ were supplemented to a basal diet at 0.0% (control group), 0.5% (group 1), 1.0% (group 2) and 1.5% (group 3), respectively. Diets were fed to the sea bass with initial body weight of (10.95 ± 0.25) g for 50 days. The results showed that there was no significant difference in the weight gain, specific growth rate, survival rate and feed conversion ratio among all experimental groups ($P > 0.05$). The liver protease, intestinal and stomach amylase of group 2 were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$). The intestinal protease of group 3 was significantly lower than that of group 2 ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the experimental group and the control group ($P > 0.05$). The pyloric caeca digestive enzymes of group 3 were significantly higher than those of the other groups ($P < 0.05$). There was no significant difference in serum AKP, POD and SOD among the groups ($P > 0.05$). The results indicated that photosynthetic bacterium PS2

收稿日期: 2009-07-27; 修回日期: 2009-10-13

资助项目: 广东省科技计划项目 (2005B20301012, 2006A20301004, 2006B36501005); 农业科技成果转化资金项目 (2007GB23260379)

作者简介: 林黑着 (1965-), 研究员, 博士, 从事水产动物营养与饲料研究。E-mail: linheizhao@163.com

had no significant effects on the growth performance and nonspecific immune ability of the sea bass, but it could significantly promote the activity of digestive enzymes of pyloric caeca in group 3 and improve that of the liver protease, intestinal amylase and stomach amylase in group 2 ($P < 0.05$).

Key words: photosynthetic bacterium; *Lates calcarifer*; growth performance; digestive enzyme; nonspecific immune enzyme

光合细菌是一大类能利用光能作为能源进行不放氧光合作用的原核生物的总称。光合细菌由于其显著的净化水质作用^[1]，其中的某些菌株能够拮抗病原菌^[2]、提高水产动物免疫力^[3]和成活率^[4]，且其丰富的菌体蛋白也可以为水产动物提供营养^[5-7]，在水产动物的育苗^[8]及生产^[9]中发挥了重要的作用。筴膜红假单胞菌（*Rhodopseudomonas capsulata*）PS2 菌株可适应的温度、盐度、pH 和光照度范围分别为（20~40）℃、0~40.0、6.0~9.0、（500~5 000）lx；该菌株具有良好的水质净化能力，生长范围广泛，是一种潜在的益生菌^[1]。赵卫红等^[10]研究了筴膜红假单胞菌对异育银鲫（*Allogynogenetie crucian*）鱼种非特异性免疫机能的影响。笔者将此株光合细菌添加到饲料中研究了其对尖吻鲈（*Lates calcarifer*）的生长、消化酶及血清非特异性免疫酶的影响，以为光合细菌在鱼类饲料中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

试验所用的光合细菌由中国水产科学研究院南海水产研究所分离保存，并培养成液体制剂，该光合细菌被鉴定为筴膜红假单胞菌，其菌含量为 $8 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2 试验饲料

投喂前将光合细菌液体制剂分别按照0.0%、0.5%、1.0%和1.5%的比例均匀喷洒在基础饲料表面，稍晾干后，在0.5 h内投喂完毕。基础饲料是恒兴牌海水鱼膨化饲料。

1.3 试验用鱼及饲料管理

试验在中国水产科学研究院南海水产研究所热带水产研究开发中心（海南三亚）进行。试验尖吻鲈购于当地养殖场，购回后在室内进行为期2周的驯养。挑选健康均匀的个体随机分为4个组，初始体质量为 $(10.95 \pm 0.25) \text{ g}$ ，每组3个平行，每个平行20尾鱼，在容量为 0.5 m^3 的圆形玻璃纤维桶内养殖50 d。采用流水养殖，海水

流速为 $2 \sim 3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。试验用水是沙滤海水。每天饱食投喂2次，分别于8:00和16:00进行。溶解氧、氨氮、盐度和温度分别为 $(6.84 \pm 0.90) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ， $(0.03 \pm 0.02) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ， $29 \sim 31$ 和 $26 \sim 31$ ℃。

1.4 取样及计算指标

试验结束前经24 h禁食，称总质量，并统计每组鱼的数量。每桶随机取3尾鱼作为消化酶的样品。冰盘解剖活鱼，分别取出肝脏、胃、幽门垂和肠道，剔除脏器的脂肪和结缔组织并称重。样品放置在-20℃保存备用。每桶取5尾鱼断尾取血，用以测定血清免疫酶活性。增重率（weight gain, WG）、特定生长率（specific growth rate, SGR）、饲料系数（feed conversion ratio, FCR）和成活率（survival rate, SR）的计算公式如下：

$$\text{增重率}(\%) = 100 \times [\text{终末均质量(g)} - \text{初始均质量(g)}] / \text{初始均质量(g)}$$

$$\text{特定生长率}(\%) = 100 \times [\ln \text{终末均质量(g)} - \ln \text{初始均质量(g)}] / \text{试验天数(d)}$$

$$\text{成活率}(\%) = 100 \times \text{试验结束鱼数} / \text{试验开始鱼数}$$

$$\text{饲料系数} = \text{投喂饲料干质量(g)} / \text{鱼增质量(g)}$$

1.5 消化酶的测定

1.5.1 样品制备 样品制备参照WANG和XU^[11]。将各个消化器官的组织在预冷的磷酸缓冲液 $(0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, \text{ pH } 7.5)$ [$1 \text{ g} \cdot (5 \text{ mL})^{-1}$] 中用玻璃匀浆器冰浴匀浆， 4°C 、 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 冷冻离心30 min，上清液作为消化酶分析样品， 4°C 保存，24 h内分析完毕。酶液中可溶性蛋白浓度用BRADFORD^[12]的方法测定，用牛血清蛋白做标准曲线。酶的活力单位定义为在 37°C ，相应的pH的条件下，每分钟催化底物释放 $1 \mu\text{g}$ 的产物所需要的酶量。酶比活力定义为单位每毫克蛋白的酶活力 $(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$ 。其中胃组织的测定pH 3.0，其他组织酶的活性均在pH 7.5时测定。

1.5.2 消化酶活力的测定 蛋白酶的测定参照ANSON^[13]的方法，用酪氨酸做标准曲线，以福林

酚试剂作为显色剂, 分别用 1.5% 的酪蛋白 (Sigma) 和 1.5% 的牛血红蛋白 (Sigma) 作为碱性蛋白酶和酸性蛋白酶的底物, 在 680 nm 测定吸光度。淀粉酶的测定参照 BERNFELD^[14] 的方法, 以 DNS 试剂为显色剂, 用麦芽糖做标准曲线, 以 1% 的可溶性淀粉做底物, 在 520 nm 测定吸光度。

1.6 非特异性免疫酶活力的测定

试验结束时, 血液样品在 4 ℃ 过夜, 5 000 r·min⁻¹ 冷冻离心 10 min 取上清液分别测定碱性磷酸酶 (AKP)、过氧化物酶 (POD) 和超氧化物歧化酶 (SOD)。均使用南京建成试剂盒测定。

1.7 数据的统计分析

采用 Excel 和 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析, 所有数值用平均数 ± 标准误差表示, 先对数据作单因素方差分 (ANOVA), 处理若有显著差异, 再作 Duncan's 多重比较, $P < 0.05$ 表示差异

显著。

2 结果与分析

2.1 对尖吻鲈生长的影响

在养殖过程中, 部分鱼出现寄生虫病, 影响了成活率和增重率, 导致标准偏差较大。尖吻鲈的增重率、特定生长率、成活率和饲料系数在组间均没有显著性差异 ($P > 0.05$), 试验组鱼的增重率和特定生长率比对照组略微降低 (表 1)。

2.2 对尖吻鲈消化酶活性的影响

尖吻鲈的肠和肝蛋白酶均在 1.0% 组达到最大值, 其中 1.0% 组鱼的肝蛋白酶显著高于对照组, 但 1.0% 组肠蛋白酶与对照组没有显著差异。幽门垂蛋白酶在 1.5% 组达到最大值, 并显著高于其他各组 ($P < 0.05$)。胃蛋白酶活性在组间没有显著性差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 1 饲料中不同添加量的光合细菌对尖吻鲈生长的影响

Tab. 1 Growth performance of sea bass fed with different doses of photosynthetic bacterium in feed

指标 index	饲料中光合细菌添加量 dietary <i>R. capsulata</i> levels			
	0.0%	0.5%	1.0%	1.5%
增重率 weight gain (WG)	427.05 ± 26.02	391.75 ± 116.52	404.28 ± 115.25	337.07 ± 41.05
特定生长率 specific growth rate (SGR)	3.32 ± 0.10	3.15 ± 0.46	3.20 ± 0.46	2.94 ± 0.19
成活率 survival rate (SR)	80.00 ± 13.23	81.67 ± 7.64	66.67 ± 15.28	68.33 ± 34.03
饲料系数 feed conversion ratio (FCR)	1.31 ± 0.14	1.33 ± 0.21	1.26 ± 0.06	1.36 ± 0.11

注: 数据以 3 个重复的平均值 ± 标准差表示, 上标字母不同者为存在显著差异 ($P < 0.05$)。后表同此

Note: Values are showed by Means ± SD of 3 replicates. Values within the same row with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). The same as below.

表 2 饲料中不同添加量的光合细菌对尖吻鲈各个器官蛋白酶活性的影响

Tab. 2 Protease of organs of sea bass fed with different doses of photosynthetic bacterium in feed

<i>w</i> (蛋白酶) / U·mg ⁻¹ 蛋白 protease	饲料中光合细菌添加量 dietary <i>R. capsulata</i> levels			
	0.0%	0.5%	1.0%	1.5%
肠 intestinal	9.567 ± 5.098 ^{ab}	9.478 ± 4.370 ^{ab}	11.959 ± 2.380 ^b	5.516 ± 1.214 ^a
幽门垂 pyloric caeca	4.798 ± 1.616 ^a	5.568 ± 1.355 ^a	4.992 ± 1.639 ^a	14.199 ± 2.377 ^b
肝 liver	0.408 ± 0.046 ^{ab}	0.359 ± 0.040 ^a	0.595 ± 0.125 ^c	0.509 ± 0.045 ^{bc}
胃 stomach	3.656 ± 0.731	3.521 ± 0.902	4.275 ± 0.770	3.777 ± 0.587

尖吻鲈的肠及胃淀粉酶均在 1.0% 组显著高于对照组 ($P < 0.05$); 幽门垂淀粉酶在 1.5% 组显著高于其他各组 ($P < 0.05$); 肝淀粉酶在组间没有显著性差异 ($P > 0.05$) (表 3)。

2.3 对尖吻鲈血清非特异性免疫酶活性的影响

尖吻鲈血清 AKP、POD 及 SOD 在组间均没有显著性差异 ($P > 0.05$)。但试验组的 AKP 均高于对照组, 随着饲料中光合细菌添加量的增加,

表3 饲料中不同添加量的光合细菌对尖吻鲈各个器官淀粉酶活性的影响

Tab. 3 Amylase of organs of sea bass fed with different doses of photosynthetic bacterium in feed

w (淀粉酶)/U·mg ⁻¹ 蛋白 amylase	饲料中光合细菌添加量 dietary <i>R. capsulate</i> levels			
	0.0%	0.5%	1.0%	1.5%
肠 intestinal	26.728 ± 3.693 ^a	33.433 ± 6.292 ^{ab}	38.633 ± 13.095 ^b	26.793 ± 5.679 ^a
幽门垂 pyloric caeca	43.497 ± 11.147 ^a	58.597 ± 24.210 ^a	51.357 ± 6.590 ^a	94.501 ± 18.328 ^b
肝 liver	137.029 ± 31.855	239.006 ± 79.602	230.824 ± 60.875	231.406 ± 22.863
胃 stomach	11.834 ± 3.767 ^a	13.002 ± 1.991 ^{ab}	15.628 ± 3.468 ^b	13.601 ± 1.740 ^{ab}

表4 饲料中不同添加量的光合细菌对尖吻鲈血清非特异性免疫酶活性的影响

Tab. 4 Serum nonspecific immune enzymes of sea bass fed with different doses of photosynthetic bacterium in feed

w (免疫酶)/U·mg ⁻¹ 蛋白 immune enzymes	饲料中光合细菌添加量 dietary <i>R. capsulate</i> levels			
	0.0%	0.5%	1.0%	1.5%
碱性磷酸酶 (AKP)	2.287 ± 0.654	2.677 ± 0.846	2.750 ± 0.567	2.604 ± 0.548
过氧化物酶 (POD)	34.741 ± 10.266	32.815 ± 4.491	28.815 ± 12.581	38.000 ± 2.189
超氧化物歧化酶 (SOD)	147.956 ± 18.588	159.358 ± 9.622	151.849 ± 13.350	147.121 ± 17.105

POD 先减小后增大, SOD 先增大后减小 (表4)。

3 讨论

在体外试验中, 沼泽红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas palustris*) 和混球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 对人工模仿的胃酸及肠液具有一定的抵抗力, 且对罗非鱼的小肠上皮细胞无害^[15]。说明光合细菌的某些种类具有在鱼类消化道中生存的能力。在该试验中, 饲料中添加光合细菌对尖吻鲈的生长及饲料系数均没有显著性影响。对草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)^[16]、西伯利亚鲟鱼 (*Acipenser baeri*)^[17]、罗非鱼 (*Tilapia sp.*)^[18]和月鳢 (*Channa asiatica*)^[19]等的研究则表明, 光合细菌以适宜的比例添加到饲料中可以显著地促进鱼类的生长。这可能与光合细菌的种类、鱼的食性以及养殖环境有关。不同种类的光合细菌在对酸及胆盐的耐受能力、对 pH 及盐度的适宜生长范围、对鱼类消化道的粘附能力等特性的影响会有很大差别。鱼类肠道菌群多样性与鱼类食性相关^[20], 尖吻鲈属于肉食性海水鱼类, 可能与上述草食性、杂食性或肉食性淡水鱼类的微生态区系的菌群组成存在差别, 因而也会影响光合细菌的作用。

此试验中, 光合细菌在 1.0% 组促进肠及胃蛋白酶和淀粉酶活性, 其中肠及胃的淀粉酶活性显著高于对照组; 在 1.5% 组幽门垂的蛋白酶及淀粉酶

都显著升高 ($P < 0.05$), 而此时肠及胃的消化酶却受到抑制。说明不同光合细菌添加量对各个消化器官的消化酶活性的影响不同。该研究的结果与陈鹏飞等^[17]的研究结果有所不同, 其结果显示, 随着饲料中光合细菌添加量的增加, 西伯利亚鲟鱼的胃、肠、肝及盲囊的消化酶变化趋势几乎一致。另外, 该研究还显示消化酶的升高并没有促进尖吻鲈的生长, 甚至有略微降低的趋势, 这可能是由于该株光合细菌对尖吻鲈的生长没有促进作用, 也可能养殖期间寄生虫病的发生对试验结果产生了影响。

张梁等^[16]将菌浓度为 1×10^8 cfu·mL⁻¹ 的球形红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas sphaeroides*) 分别按照 0.0%、0.5%、1.5%、2.5% 和 3.5% 的比例添加到草鱼饲料中, 发现其血清及肝脏的 SOD、ACP 和 AKP 在 2.5% 组达到最大值, 并显著高于对照组, 而在 3.5% 组则出现降低的趋势。鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 血清溶菌酶及白细胞吞噬活性随着养殖水体中沼泽红假单胞菌 (*R. palustris*) 的添加量增加及添加时间的延长而升高^[3]。赵卫红等^[10]报道添加到水体中 (5×10^8 、 5×10^9 、 5×10^{10} cfu·m⁻³) 的絮膜红假单胞菌可提高异育银鲫白细胞的免疫性能, 且其作用效果均随着添加量的增加而增加, 但并未增加其血清溶菌酶的活力。而在此次研究中光合细菌对尖吻鲈的血清 AKP、POD 及 SOD 均没有显著性差异。

尽管文献中报道光合细菌可以抑制病原菌的生长^[2,21], 提高水产动物的成活率^[22], 显著地促进鱼类的生长^[16-19], 但该研究结果中多项指标却无显著性差异。这可能与光合细菌的种类、菌株特性具有专一性以及添加量有关, 此外, 养殖期间寄生虫病的发生对试验的结果也有一定的影响。对于尖吻鲈饲料中此株光合细菌的添加量和肠道微生态区系的菌群组成, 以及两者之间的关系均有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 杨莺莺, 李卓佳, 贾晓平, 等. 水质净化作用菌光合细菌 PS2 的生物学特性及环境因子对其生长的影响 [J]. 上海水产大学学报, 2003, 12 (4): 293-297.
- [2] 张信娣, 金叶飞, 陈瑛. 光合细菌对鱼病原细菌生长的影响 [J]. 中国生态农业学报, 2008, 16 (3): 659-663.
- [3] 王有基, 胡梦红, 朱焕青, 等. 光合细菌对鲤鱼非特异性免疫功能的影响 [J]. 水利渔业, 2005, 25 (6): 38-39.
- [4] 陈素文, 陈利雄, 吴进锋. 光合细菌和复合微生物制剂在西施舌幼虫培育的应用 [J]. 南方水产, 2005, 1 (2): 26-30.
- [5] 王绍校, 杨惠芳, 黄志勇, 等. 嗜盐光合细菌的分离鉴定及其营养成分分析 [J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9 (3): 298-301.
- [6] 张满隆, 杨绍斌, 潘玉. 光合细菌及其在鱼类养殖中的应用 [J]. 水利渔业, 2002, 22 (3): 6-7.
- [7] 庄传东, 王述柏, 单虎, 等. 不同菌株光合细菌的营养成分分析 [J]. 中国饲料, 2007 (12): 33-35.
- [8] 朱建新, 曲克明, 刘慧, 等. 小球藻和光合细菌在大菱鲆育苗中对水质调节作用的研究 [J]. 海洋水产研究, 2008, 29 (6): 116-121.
- [9] 刘慧玲, 张战峰, 李长玲, 等. 光合细菌对罗非鱼鱼苗养殖水质及抗病力的影响 [J]. 渔业现代化, 2009, 36 (2): 47-51.
- [10] 赵卫红, 陈立侨, 刘晓利, 等. 地衣芽孢杆菌和粪膜红假单胞菌对异育银鲫鱼种非特异性免疫机能的影响 [J]. 上海水产学报, 2008, 17 (6): 757-760.
- [11] WANG Y B, XU Z R. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities [J]. Anim Feed Sci Technol, 2006, 27 (3/4): 283-292.
- [12] BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72 (7): 248-254.
- [13] ANSON M L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin [J]. J General Physiol, 1938, 22 (1): 79-89.
- [14] BERNFELD P. Amylases, α and β [J]. Methods in Enzymology, 1955, 1 (1): 149-158.
- [15] ZHOU X X, PAN Y J, WANG Y B, et al. In vitro assessment of gastrointestinal viability of two photosynthetic bacteria, *Rhodopseudomonas palustris* and *Rhodobacter sphaeroides* [J]. 浙江大学学报, 2007, 8 (9): 686-692.
- [16] 张梁, 张伟, 任小丽. 光合细菌对草鱼生长及免疫相关酶活性的影响 [J]. 粮食与饲料工业, 2007 (2): 37-38.
- [17] 陈鹏飞, 毛江, 黄剑飞, 等. 光合细菌 (PSB) 在西伯利亚鲟鱼饲料中的作用及其对主要消化酶活性的影响 [J]. 粮食与饲料工业, 2003 (11): 27-29.
- [18] 黄志勇, 王海胜, 蒋培霞, 等. 几株光合细菌的分离鉴定及在养殖罗非鱼中的应用 [J]. 微生物学通报, 2005, 32 (4): 72-78.
- [19] 黄钩, 韦勇刚, 周毅, 等. 在饲料中添加光合细菌饲养月鳢鱼种的初步试验 [J]. 广西畜牧兽医, 2000, 6 (1): 17-18; 34.
- [20] 李可俊, 管卫兵, 徐晋麟, 等. PCR-DGGE 对长江河口八种野生鱼类肠道菌群多样性的比较研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19 (3): 268-272.
- [21] 贺蓉, 罗伟, 吴金凤, 等. 光合细菌对团头鲂细菌性败血症的防治 [J]. 水产科学, 2005, 24 (11): 34-35.
- [22] 崔竞进, 丁美丽. 光合细菌在对虾育苗生产中的应用 [J]. 青岛海洋大学学报, 1997, 27 (2): 191-195.