

益生菌在水产养殖中的作用模式

郑君燕

(广州市水产研究所, 广州 510315)

最近十年发表了许多有关水产养殖中益生菌的研究文章,但其研究方法大体上都是凭经验进行的,而且关于益生菌作用模式的观点都是随环境改变而不同的。益生菌的准确作用模式很少得到详尽的阐述。在人类生活及农业应用中,益生菌研究历来都受到较大的关注,而且有几种作用模式已被一些实验所证实。这些作用模式主要有:产生抑制性化合物;对化学物质及可用能量的竞争;对附着点的竞争;加强免疫作用;提高养殖水质量;浮游生物的相互作用;营养素资源,以及酶对消化的贡献。最后两个作用不在本文中作论述。其它可能的作用模式详细表述如下。

1、抑制性化合物的作用:微生物群会释放多种对其它微生物群有杀菌或抑菌作用的化学物质,通过对化学成份的影响或可用能量竞争的结果来改变族群内部的关系。微生物在受体内部、表面或者培养介质中产生抑制细胞存在的物质被认为对病原体的扩散具有阻碍作用。

总的来说,细菌的抗菌作用基于以下几个因素,既有单独作用也有综合作用:产生抗生素、抗菌素、含铁细胞(随后讲述)、溶解酵素、蛋白酶、并/或过氧化物和有机酸的产生而导致的PH值的改变。*Mr Vandenberg*的研究表明氨和联乙醯的形成也有抗菌作用。

众所周知,乳酸菌能产生阻碍其它微生物生长的细菌素,有很多报道提到乳酸菌在其自身产生的抗菌素作用下对革兰氏阳性细菌有抑制作用。然而,*Ringo and Gatesoupe*对水产养殖中益生菌乳酸菌的作用做的研究表明,在水产养殖中几乎所有的病菌都是革兰氏阳性的,而正常情况下乳酸菌只占了鱼内脏细菌群的很少一部分,而且一般认为是非致病的(有些除外),因此由乳酸菌产生的抗菌素对其它物种的抑制作用是否能更有效地促进宿主健康状况还是个问号。已经有人提议用化合物代替抗菌素或抗生素来形容细菌种类中可能出现的偏害共生现象。*Nair*等人的研究表明大部分的水生细菌有针对副溶

血弧菌的杀菌酶;*Imada*等人从日本海域的近海海水中分离到一株菌株,经鉴定其属于交替单胞菌属,它能产生一种叫 *monastatin* 的碱性蛋白酶抑制物。在生物体外进行的实验中,经过纯化和浓缩的 *monastatin* 对亲水气单胞菌中蛋白酶和鳃弧菌中硫醇蛋白酶有抑制作用。这两种蛋白都对鱼类有致病性。

很多学者都把在生物体外所做的抗性试验中发现的抑制作用归咎于抗菌素或抗生素。也有人认为,所观察到的生长抑制,在很多情况下可以由初级代谢物或单纯的pH值的下降造成。在抑制性化合物的身份被确认之前,本文不妨先称为“抑制性化合物”,而不是抗菌素或抗生素。许多研究结果显示,细菌的存在对在水产养殖中出现的病原体有抑制作用。这表明,在水产养殖环境中的细菌对其它细菌有抑制能力并非少见。但是,还没有迹象表明这种抑制性化合物的产生出现在生物体内条件下,并且抑制性化合物产生的对其它细菌的生态关联性还不清楚。

在所研究的物种中,针对对已知病原体所产生的生物体外抑制性化合物经常被用来选择假定的益生菌菌株。但是,在这个阶段,偏害共生活动和生物体内益生菌活动之间的联系是非常脆弱和不稳定的。典型的情况是,益生菌抑制病原体的内在能力与培养的水中动物的内在保护之间建立了联系。但是,到目前为止,在所发表的研究结果中,没有一个能清楚地表明抑制性化合物的生成是益生菌在生物体内活动产生的。所以,未来还需要对此领域进行研究。在植物疾病控制中已对此做过类似的研究,由荧光假单胞菌生成的抑制性化合物已被认定为菌株疾病控制能力中的重要因素。

2、对化学物质及可用能量的竞争:对化学物质及可用能量的竞争可以决定不同的微生物族群怎样共存于同一生态系统中。理论上,对营养元素的竞争可能发生在哺乳动物体内,但却没有足够的证据证明其存在于人类及陆地生物中。理论

上对营养元素的竞争能在水族动物的肠道及周围环境的微生物的竞争中起到重要的作用,但到目前为止,仍然没有人对此做过全面的研究。

水产养殖环境中的微生态系统一般是由异养生物所统治的,这种异养生物将竞争有机酶的作用物作为碳和能量来源。*Ricomora* 等人选择了一个菌株,将其接种到一种硅藻属中,溶藻弧菌即不能生长。因为接种的菌株对溶藻弧菌没有生物体外抑制性作用,所以表明这种菌株能够利用硅藻属的分泌物从而在与溶藻弧菌的竞争中占据优势。

Verschurere 等研究者选择了几种对丰年虫幼体的生存和生长有积极作用的菌株。生物体外抗性测试和过滤试验表明丰年虫幼体受解蛋白弧菌侵害,这些菌株需要保护丰年虫免受病原体侵害。情况表明,这些选择的细菌通过与病原体竞争化学物质和存在的能量而施展它们的保护作用。

微生物的另一种竞争是竞争铁元素。几乎所有微生物的生长都需要铁,含铁细胞是低分子量的,是一种铁离子专有的螯合物,它能分解沉淀自有的铁,以用于微生物生长。含铁细胞的生态重要性主要在于其能够从所在环境中提取重要的营养并使其它竞争者得不到。有些成功的病原体能从组织的高铁环境中宿主的身体流质中争取到铁。土壤中的含铁细胞作为微生物和植物获取铁元素的重要工具,以及在抑制植物根部病原体的作用在生态系统上的重要意义已得到确认。从过早人工饲养的海鲈幼苗的饲料中释放出来的铁元素虽然对鱼的成活及成长率没有危害,但却大大地限制了幼苗的细菌接受量并增加了微生物的多样性。很多病原体例如鳃弧菌对铁元素的需求是很大的。在与这种细菌的抗性试验中,鲑鱼的寿命因食物中含铁而使寿命直线上升。两种观察结果表明了铁元素在建立与水产养殖的动物相联的微生物群中有重要意义及生物作用。病原体的致病性是由于其生成含铁细胞竞争铁元素并打败其它也需要铁元素的微生物,因此能够生成含铁细胞的无害细菌能用来作益生菌与病原体竞争。能生成含铁细胞的益生菌的作用在 *Gatesoupe* 的研究中有过阐明。研究中,在饵料(轮虫)中加入含铁元素增加了大比目鱼对病原体弧菌 P 株的抵抗力。而加入能生成铁元素的弧菌 E 株更能保护大比目鱼。

在延期抗性试验中,Pybus 等人测试了三十

株鳃弧菌,作为抵抗鲑鱼病原体病海鱼弧菌的潜在益生菌。只有一株细菌(鳃弧菌 VL4335)能在生物体外抑制病海鱼弧菌,而且当铁盐加到培养基时这种效果受到阻碍,表明这种生长抑制与缺铁有关。采用铬蓝硝酸盐化验测量含铁量的生成,鳃弧菌 VL4335 比其它鳃弧菌菌株能产生更高的量值。

Smith 和 Davey 证明荧光假单胞菌能抑制培养基中嗜水气单胞菌 F 19/3 的生长。而且这种抑制作用是从竞争游离铁中得到的。革兰氏检验了从冷冻的淡水鱼中分离出来的产铁荧光假单胞菌 AH2,这种菌株对革兰氏阳性和革兰氏阴性的细菌都有抑制作用,尤其是在铁元素有限的情况下。生物体外的测验揭示了鳃弧菌的生长受到在有限铁培养环境中的 AH2 的抑制而不是在足铁的培育环境中经过滤消毒的浮游生物。在共同培育中,当含铁细胞生成者的最初水平比鱼的病原体高 100 到 1000 倍时,AH2 菌株在没有铁浓缩的情况下抑制了鳃弧菌的生长。生物体外的测试结果得到生物体内抗性试验的证实。当彩虹鲑鱼幼苗的培育采用荧光假单胞菌时,因鳃弧菌感染而导致的死亡率减少了 46%。

土壤中的荧光假单胞菌的铁的吸收是受很多因素影响的。所以,生物体外观测到的铁的吸收并不一定意味着在生物体内有大量的铁的生成,并产生重要的生物控制效果。与抑制性化合物的生成相似的是,益生菌的作用模式即对化学物质及可用能量(更确切地说应是对游离铁或含铁细胞)的竞争的证据仍然是随环境而变的。

3、对附着点的竞争:避免病原体侵占的可能机制是对内脏及组织表面附着点的竞争。众所周知,细菌要在鱼肠内生殖必须有在肠粘液及肠外壁附着的能力。既然细菌附着组织表面是病原体感染的第一阶段,那么与病原体竞争附着点则是益生菌第一作用。在人类医学中,具有附着能力的细菌株是益生菌治疗的关键选择。

附着在物理化学因素的基础上,可以是非具体的;也可以是具体的,涉及到附着细菌表面上的附着分子和皮膜细胞上的接收分子。一些学者已展示了益生菌针对人类和其它哺乳动物的病原体附着作用的抑制。附着的先行侵占对后来者的竞争排斥在对鸡的盲肠内壁的试验中得到证实,即使盲肠内壁用生理盐水洗过四次后仍然保持效果。就目前所知,在水产物种中还没有进行过相似的研究,而作为益生菌作用模式之一的对

附着点的竞争还只是一个假设。

病原体在粘液的内部或外部的附着及生长能力已经在生物体外鱼的病原体如鳃弧菌和亲水气单胞菌中得到证实,还有候选益生菌如肉杆菌属及几个对鳃弧菌有抑制作用的隔离种群也得到证实。在这些研究当中,目的是检测一下在生物体外细菌株在鲑鱼内脏粘液的附着及生长能力,以便检查益生菌占领养殖的鲑鱼粘液的能力,以保护受体(鲑鱼)免受细菌鳃弧菌的感染。这些益生菌种群在受体内部粘膜、皮肤粘膜和不敏感的血清白蛋白上比鳃弧菌菌株强,表明它们在有粘液的肠表面能够与病原体有效地竞争附着点。

益生菌在内脏壁及其它组织的附着能力在益生菌效果上并不一定意味着就是作为唯一的作用模式。但可以想像得到,细菌可以侵占例如鱼的肠内壁,通过排出抑制性化合物而起到抵制病原体的保护作用。

4、免疫反应的加强:免疫刺激剂是一种化学物质,它能激活动物的免疫系统,使它们能抵抗病毒、细菌、真菌和寄生虫的感染。鱼幼苗、虾及其它无脊椎动物的免疫系统比大鱼低级,主要靠非专门的免疫反应抵制感染。在对恒温动物的试验观察结果中表明,通过口部喂入的益生菌(乳酸菌)能提高对肠道感染的抵抗力。很多报道说,菌类化合物在鱼和虾中起到免疫刺激剂的作用。但就象最近所提出的那样,这些研究只采用了一些特定的细胞化合物或非生细胞。还有情况表明,在鳕鱼和鲑鱼中,细菌的吸入和随后的内吞起到刺激免疫系统发育的作用。但是,目前还不清楚采用的益生菌是否有利于水产养殖物种的免疫反应。但理论上这种作用模式不应被排除。

5、水质量的改善:在几个研究中加入益生菌尤其是芽孢杆菌属时,记录了水的质量。这个理论基础是,革兰氏阳性的芽孢杆菌属一般来说比革兰氏阴性的细菌能更有效地把有机物质转换成二氧化碳,而后者则能把更多的有机碳转换成细菌物质或粘液。有研究认为,通过在养殖池塘中维持较高的革兰氏阳性细菌,养殖户可通过增加产生二氧化碳、促进浮游生物稳定成长的同时,最大限度地减少养殖周期中分解的有机污物的聚积。但是,在利用虾及鲑鱼养殖中一个或几个

细菌种属,如芽孢杆菌、硝化细菌、假单胞菌、肠杆菌、纤维单胞菌属和红假单胞菌属等细菌的研究中,结果却未能证实这种假设。由此表明已发表的水质量提高的证据是单薄的,除了氮化养殖以外。

现有的过滤器通过轮换培养基而启动生物过滤器在水产养殖中是一种常见的方法。但是,利用硝化细菌来加速硝化作用却不常见。在市场上能买到大量包含硝化细菌的益生菌来控制养殖水中氨的水平。这些主要是针对水族爱好者的。硝化菌负责氨的氧化并转换成亚硝酸盐以至硝酸盐。增加具有硝化作用的生物过滤器能有效地减少新生物过滤器的激活时间。*Perfettini* 和 *Bianchi* 利用冷冻菌种来加速调节新的封闭水产养殖系统,这使硝化的时间减少了 30%。普通的半封闭水循环系统中,通过接种非常活跃的液体消化细菌使氮化器的启动时间从 3-4 周减少到 10 天。(*I. Van Hautegehen, G. Rombaut, and W. Verstraete, Abstr. Int. Grf. AQUA 2000, p. 338, 2000*)。

在发现氨及亚硝酸盐陡然增加时也可将硝化菌加入到池塘或养殖箱中。除氨以外,在鱼养殖如鲑鱼池塘养殖中经常存在亚硝酸盐毒素。

6、浮游生物之间的相互作用:最近的报告表明,很多细菌对许多微藻类尤其是赤潮有很好的除藻效果。在测试的 41 种细菌株中,有 23 种在不同程度上抑制了非细菌藻类的生长。细菌在幼苗养殖中加入藻类的抗性并不令人满意,但当藻类在养殖池塘中生长后其抗性却是有优势的。

另一方面,细菌对一些微藻类的培养也有积极作用。不难理解,细菌通过对作为食物的微藻类及在绿水技术中施加作用而间接影响水产养殖动物的健康和畜牧学表现。在调查其作用模式时,如我们在包含藻类的养殖环境中加入选择的益生菌,则应考虑其与这些单细胞藻类的相互作用。

益生菌在水产养殖中的作用模式,不是单一的一种,是多种模式的统一,而且还会随具体情况的不同而有所差别。但研究其作用模式有利于我们开发更多更优良的益生菌品种,应用实际生产中,建立更有效的健康养殖模式。

参考文献:

1. 东祥、陈东江等. 2002 年. 有益微生物群在水产养殖中的应用及发展前景. 中山大学学报, 第 41 卷.
2. David J.W Moriarty. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. *Microbial Interactions in Aquaculture*.
3. Mark Percival. 1997. Choosing a Probiotic Supplement. *Clinical Nutrition Insights*. Vol .6 No.1.
4. Charles K. Rosenberg. M. S. 1999. Probiotics continuing education module. *Natural Healing Track*. August.