

文章编号: 1674-7054(2015)01-0018-07

1 株乳酸菌在凡纳滨对虾养殖中的应用效果

柯杨勇, 赖秋明, 苏树叶, 林治宇

(海南大学 海洋学院, 海南 海口, 570228)

摘要: 利用从对虾消化道分离出的 1 株乳酸菌优势菌株 HN3, 分别对哈维氏弧菌和副溶血弧菌进行体外拮抗实验, 同时通过乳酸菌拌料投喂的方式开展凡纳滨对虾的养殖试验。结果表明: 乳酸菌液及中和酸性后的胞外液均对 2 种弧菌有显著的抑制效果 ($P < 0.05$); 乳酸菌拌料投喂能显著提高对虾的养殖存活率、日增体质量和特定增长率 ($P < 0.05$); 对虾消化道和养殖水体中的乳酸菌和总细菌数量大幅增加, 弧菌数量显著降低 ($P < 0.05$), 其中, 以乳酸菌添加剂量 $4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cfu $\cdot$ g $^{-1}$ 的综合养殖效果最佳。此株乳酸菌适应对虾消化道的环境并能定植, 对抑制对虾消化道弧菌数量、优化体内菌群组成和改善养殖环境有重要的作用。

关键词: 乳酸菌; 凡纳滨对虾; 生长; 弧菌; 菌群组成

中图分类号: S 917.4 ; S 968.22

文献标志码: A

近几年, 随着对虾养殖业的迅速发展, 养殖病害的问题也日益突出。传统的疾病防治方法是使用抗生素, 它可以在一定程度上减少或延缓疾病的发生和蔓延, 但是, 影响了养殖环境和水体动物体内正常微生物菌群的生长和繁殖^[1], 导致病原微生物对水产动物的易感性, 甚至使得病原菌耐药性增强^[2]; 同时, 抗生素的经常性使用会导致其在水生动物体内的残留、富集, 危害人类的健康, 降低水产品的质量, 影响水产品的出口贸易^[3]。益生菌 (probiotic bacteria) 是一类从宿主体内分离得到的, 可通过调节和维持消化道内菌群平衡, 对生物体产生有益作用的细菌^[4]。益生菌能够很好地改善对虾养殖水的环境^[5]; 从鲑鱼体内分离到的气单胞菌 (*Aeromonas media*) 可以增强对虾对致病性塔氏弧菌 (*Vibrio tubiashii*) 和鳃弧菌 (*V. anguillaum*) 的免疫力^[6]; 用添加了芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 的混合饲料投喂斑节对虾 (*Penaeus monodon*), 可有效提高饵料的利用率, 并在促进生长和提高养殖成活率等方面也有显著的作用^[7-8]。2009 年, 凡纳滨对虾“早期死亡综合症” (Early Mortality Syndrome) 在我国南方首次出现, 其后迅速在亚洲主要的对虾养殖国家和地区传播蔓延, 给全球对虾养殖业带来了巨大的经济损失。副溶血弧菌是凡纳滨对虾“早期死亡综合症”主要的致病原, 大量的感染可导致对虾消化道菌群失衡, 其分泌的毒素可损伤对虾消化器官的组织, 最后造成对虾的大量死亡^[9-11]。笔者从健康凡纳滨对虾的消化道分离、筛选出 1 株乳酸菌优势菌株, 对哈维氏弧菌和副溶血性弧菌进行体外拮抗试验, 并通过拌料投喂方式对凡纳滨对虾开展安全性试验, 旨在通过调节和改善对虾消化道的微生态平衡, 抑制致病弧菌在对虾消化道的滋生、繁殖, 寻求一种安全、有效防治对虾“早期死亡综合症”的技术方法。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 乳酸菌 HN3 是分离自健康凡纳滨对虾消化道的 1 株乳酸菌优势菌株, 在对虾消化道中数量占总细菌数量的 29.5%, 经鉴定为芽孢乳杆菌属, 革兰氏阳性菌, 产芽孢率为 95% 以上, 兼性厌氧, 对头孢哌酮、大观霉素、头孢曲松、诺氟沙星、万古霉素、卡那霉素、左氟沙星、氯霉素等药品敏感。哈维氏弧菌和副溶血弧菌为本实验室从“早期死亡综合症”患病的对虾消化道中分离纯化获得^[12]。

收稿日期: 2014-04-17

基金项目: 美国 ACRSP 项目 (09BMA04UM); 海南省对虾产业联盟启动项目

作者简介: 柯杨勇 (1987-), 男, 海南大学海洋学院 2011 级硕士研究生. E-mail: keyangyong1987@gmail.com

通信作者: 赖秋明, 男, 教授. 研究方向: 虾蟹类繁育与养殖技术研发. E-mail: lqming815@163.com

1.2 实验虾苗 供试的凡纳滨对虾健康虾苗每只体质量为 (0.10 ± 0.01) g,体长为 $(1.8 \sim 2.0)$ cm。

1.3 实验试剂 MRS 合成培养基,TCBS 合成培养基,均由广东环凯微生物科技有限公司生产。

1.4 弧菌拮抗实验

1.4.1 菌液抑菌实验 采用牛津杯(最小半径为6 mm)双层平板法^[3]做抑菌试验。分别将活化培养好的乳酸菌、副溶血性弧菌和哈维氏弧菌的菌液密度调配到 1×10^7 cfu $\cdot$ mL⁻¹,上层为含有0.75%琼脂的培养基加1 mL致病性弧菌,下层为不含细菌的2%琼脂培养基。在牛津杯孔中加入50 μ L的乳酸菌液,并用生理盐水作空白对照,重复3次,以牛津杯孔透明圈直径大小来表示乳酸菌对致病性弧菌的拮抗作用。用游标卡尺测量乳酸菌液对2株致病性弧菌的抑菌圈直径。

1.4.2 胞外产物的抑菌实验 活化培养好的乳酸菌菌液经8 000 r $\cdot$ min⁻¹离心5 min,取上清液,用0.22 μ m的无菌滤膜反复过滤,然后将滤液分为2组,其中一组滤液(初始pH4.0)用1 mol $\cdot$ L⁻¹的NaOH将其pH值调至7.0,以生理盐水为空白对照,重复3次。按1.4.1的方法操作,测量抑菌圈的直径,并对实验数据进行统计分析。

1.5 对虾养殖安全实验 设置12个水族箱,规格为110 cm $\times$ 55 cm $\times$ 40 cm。其中,2个水族箱为空白对照组,试验过程只投喂基础饲料,不添加乳酸菌HN3;其余10个水族箱分成5组,以乳酸菌拌料投喂,乳酸菌的浓度梯度分别为: 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 cfu $\cdot$ g⁻¹。实验前,分别检测水体中的初始总菌密度、弧菌密度、乳酸菌密度及pH值、温度、溶解氧、氨氮、盐度、亚硝酸盐等指标。实验期间,每周测定各水族箱水体和对虾消化道总菌、乳酸菌和弧菌的数量。实验期间每天24 h连续充气增氧,每天7:00,12:00,17:00,22:00投喂饵料,日投饵量为虾苗体质量的8%,早晚各吸污换水1次,日换水率为30%,并检测水体的溶解氧浓度、温度、pH值、氨氮和亚硝酸氮浓度。

1.6 实验指标测定与计算

1.6.1 总菌、乳酸菌及弧菌数量的测定方法 参考李继秋^[4]的方法,测定养殖水体和消化道总细菌、乳酸菌和弧菌的数量。养殖实验结束后,采集对虾后肠粪便测定其中的乳酸菌、弧菌和总细菌数量^[4]。

1.6.2 生长指标 实验起始和实验结束时,分别对各水族箱的对虾进行记数、称重。对虾特定生长率(SGR)、存活率(SR)和日增体质量(DGR)的计算公式^[4]如下:

$$\text{特定生长率(SGR)} = [\ln W_f - \ln W_i] / T \times 100\% ;$$

$$\text{日增体质量(DGR)} = (W_f - W_i) / T ;$$

$$\text{成活率(SR)} = (N_i - N_f) / N_i ;$$

式中, W_f , W_i 分别表示实验后对虾平均体质量(g)和实验前对虾平均体质量(g); T 表示饲养时间(d); N_i , N_f 分别表示实验前和实验后的对虾数量(尾)。

1.7 数据统计分析 实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差表示,应用Excel 2007与SPSS20.0软件分别对弧菌抑菌圈直径、对虾生长指标、消化道不同菌群数量等实验结果进行统计分析,采用one-way ANOVA方法进行方差分析,利用Turkey's检验进行显著性检验,采用 $P < 0.05$ 作为差异性显著标准。图表采用Origin-pro8.0软件进行绘制。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌液及胞外物质对2株弧菌的体外拮抗效果 从表1可知,与对照组(生理盐水)相比,酸性的乳酸菌液(pH4.0)和中和酸性后的中性菌液(pH7.0)均对2株弧菌有明显的抑制作用($P < 0.05$);酸性乳酸菌液和中性乳酸菌液均对哈维氏弧菌有显著的抑制效果,两者之间差异不显著($P > 0.05$);酸性菌液对副溶血性弧菌的抑菌圈明显大于中性菌液的抑菌圈,两者的抑菌效果有显著性差异($P < 0.05$)。

在实验中笔者还发现,将乳酸菌过滤后得到的胞外物质同样对2株弧菌有很好的抑菌效果,抑菌圈的平均直径为12.26 ~ 14.40 mm,与乳酸菌液的抑菌效果无显著性差异($P > 0.05$),说明乳酸菌生长过程中分泌的胞外产物在抑制弧菌生长方面起主要的作用。实验结果还显示,酸性滤液对2种弧菌的抑菌圈的平均直径分别为14.40,14.04 mm,中性滤液对2种弧菌的抑菌圈的平均直径分别为12.81,12.26 mm,两者的抑菌效果差异显著($P < 0.05$),由此可见,乳酸菌生长过程中分泌的酸性物质在抑制弧菌生长方面有一定的辅助作用。

表 1 乳酸菌及滤液对 2 株弧菌抑菌圈直径的测量结果

Tab. 1 Inhibition diameter of two *Vibrio* species in the lactic acid bacteria and their filtrate

mm

	乳酸菌液		胞外物质		对照组
	Lactic acid bacteria liquid		Extracellular substances		Control
	乳酸菌液(pH4.0) Lactic acid bacteria liquid	乳酸菌液(pH7.0) Lactic acid bacteria liquid	乳酸菌滤液(pH4.0) Lactic acid bacteria filtrate	乳酸菌滤液(pH7.0) Lactic acid bacteria filtrate	生理盐水 Normal saline
哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	15.26 ± 0.23a	15.01 ± 1.18ab	14.40 ± 0.40a	12.81 ± 0.24bc	6.72 ± 0.41d
副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	14.40 ± 0.77a	12.05 ± 0.86b	14.04 ± 0.35ab	12.26 ± 0.23c	6.30 ± 0.38d

注: 同一列数据后, 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 下同Note: Values in each column with the same letters means no significant difference ($P > 0.05$), similarly hereinafter

2.2 乳酸菌拌料投喂对对虾生长的影响

2.2.1 对虾的日增体质量和成活率 从图 1 可知, 随着乳酸菌拌料剂量的增加, 对虾的日增体质量和成活率均呈现上升的趋势, 其中, 以 $5 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 剂量组的成活率最高, 为 $(95 \pm 0.85) \%$, 以 $4 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 剂量的日增体质量最大, 为 $(0.035 \pm 0.0020) \text{ g}$ 。虽然 $5 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 剂量组成活率高于 $4 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 剂量组, 但日增体质量却低于 $4 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 剂量组, 它们之间的成活率及日增体质量的差异不显著 ($P > 0.05$)。 $5 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 剂量组的日增体质量低于 $4 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 剂量组, 可能因为 $5 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 剂量组成活率较高, 导致养殖空间和营养方面的竞争加剧, 同时对虾产生粪便较多, 造成养殖环境较差, 从而影响对虾的生长。笔者认为, $4 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $5 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 是本株乳酸菌的最佳拌喂剂量, 与对照组相比, 其日增体质量和成活率均有显著的差异 ($P < 0.05$)。

2.2.2 对虾的特定增长率 (SGR) 特定增长率可以反映对虾的生长趋势。从图 2 可以看出, 在养殖试验期间, 随着乳酸菌拌料剂量的增加, 对虾的特定增长率呈直线上升, 当乳酸菌拌料剂量为 $4 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 时, 特定增长率 (SGR) 达到最大值 $(3.74 \pm 0.0171) \%$, 跟对照组相比, 差异显著 ($P < 0.05$), 而其他剂量组与对照组间的差异不显著。

2.3 乳酸菌拌料投喂对养殖水体和对虾消化道菌群组成的影响 从图 3 可知, 对照组对虾消化道的总菌和乳酸菌数量分别为 $1.496 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $1.445 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。不同乳酸菌添加剂量组对虾消化道的总菌和乳酸菌数量均有大幅度的提高, 总菌和乳酸菌数量的变动范围为 $1.775 \times 10^7 \sim 1.486 \times 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 与对照组有显著性差异 ($P < 0.05$)。在不同乳酸菌添加剂量组之间, 尽管乳酸菌添加剂量增

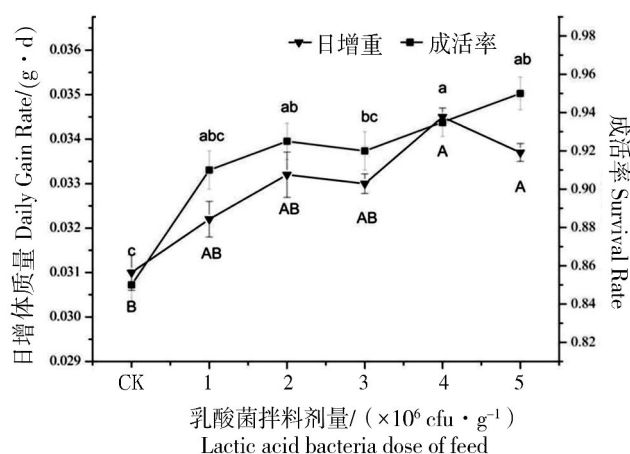


图 1 乳酸菌拌料投喂后对虾日增体质量和成活率

Fig. 1 Survival rate and daily gain rate of the shrimp fed the lactic acid bacteria

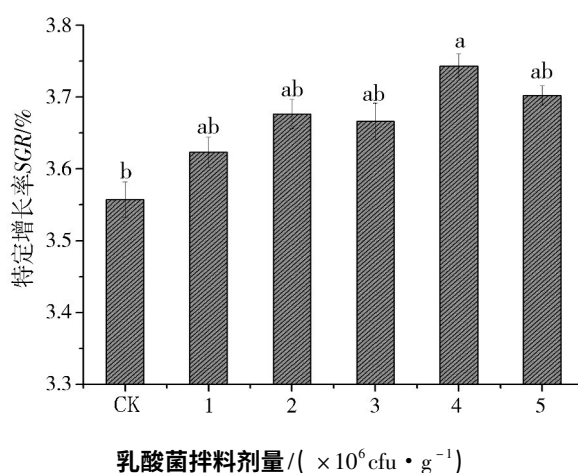


图 2 乳酸菌拌料投喂对虾的特定增长率 SGR

Fig. 2 The specific growth rate of the shrimps fed the lactic acid bacteria

大,但对虾消化道的总菌和乳酸菌数量基本维持在同一数量级水平,差异并不显著($P > 0.05$);不同乳酸菌添加剂量组对虾消化道的弧菌数量均小于 $1.752 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$,对照组对虾消化道的弧菌数量为 $1.559 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$,实验组对虾消化道的弧菌数量明显低于对照组。实验结果表明,通过拌料投喂的方式,乳酸菌可以适应对虾消化道的环境而定植下来,数量大幅度增加,通过营养和生活空间的竞争,从而抑制弧菌的生长繁殖,使对虾消化道的弧菌数量维持在较低的水平。

在本实验研究中,通过分别检测对照组和乳酸菌不同添加剂量组水体中的总菌、乳酸菌和弧菌的数量,发现养殖水体中的总菌和乳酸菌数量与饲料中乳酸菌的添加剂量呈正相关,水体中总菌和乳酸菌的数量随着饲料中乳酸菌添加剂量的增大而升高,说明添加到饲料中的部分乳酸菌会散落在水体中,并在其中生长繁殖,从而增加了水体中的乳酸菌和总菌的数量;但水体中弧菌数量与饲料中乳酸菌的添加剂量呈负相关,饲料中乳酸菌的添加剂量越大,养殖水体中弧菌的数量就越少,表明这株乳酸菌同样适应海水养殖环境,并通过营养生态位和空间生态位的竞争,使养殖水体中弧菌的生长繁殖受到限制。

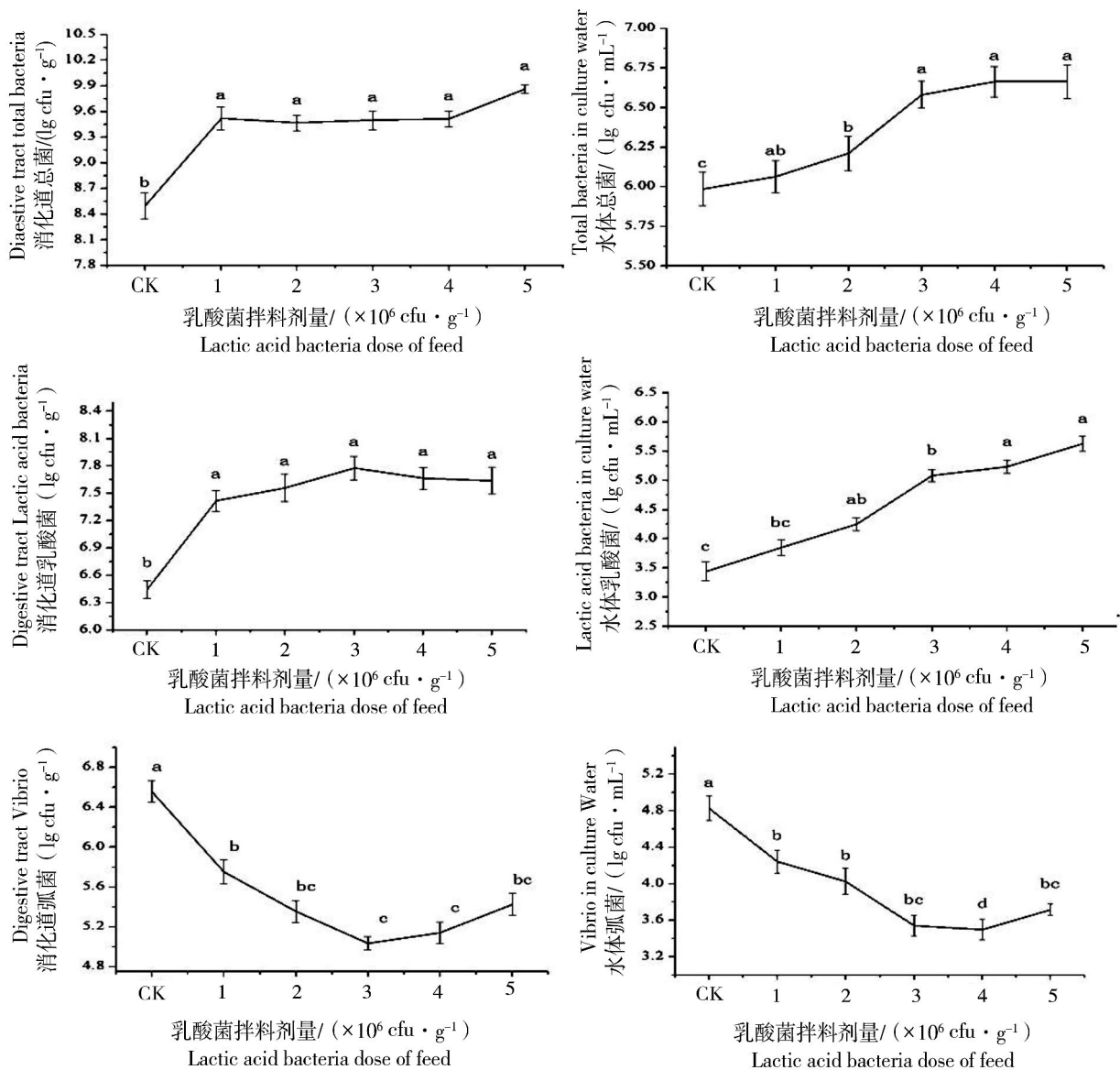


图3 乳酸菌拌料投喂后养殖水体和对虾消化道菌群组成的变化

Fig. 3 The changes of microflora composition in water and digestive tract of the shrimp fed the lactic acid bacteria

2.4 对虾消化道不同菌群的数量差异 从表2可知,用乳酸菌拌料投喂后,对虾中、后肠的乳酸菌和总菌数量均有大幅度的增加,其中,中肠的乳酸菌和总菌数量的增加幅度较大,乳酸菌的数量从 1.65×10^5

cfu · g⁻¹ 上升到 11.20×10^5 cfu · g⁻¹, 总菌数量从 23.32×10^7 cfu · g⁻¹ 上升到 37.34×10^7 cfu · g⁻¹; 后肠的乳酸菌和总菌数量也略有增加, 但增加的幅度远比中肠的小。使用乳酸菌拌料投喂对虾后, 无论是中肠还是后肠, 其乳酸菌和总菌数量的增加幅度是基本一致的, 说明总菌数量的增加主要是由乳酸菌数量的增加所致。本实验检测的后肠内含物取自后肠末端, 说明这株乳酸菌能够适应对虾消化道的环境, 仍有部分活性菌株随粪便排到养殖环境中, 对增加养殖环境的有益菌群数量和改善菌群组成有重要的作用。

表 2 拌料投喂乳酸菌前后对虾消化道乳酸菌和总菌数量的检测结果

Tab. 2 Counts of lactic acid bacteria and total bacteria in the digestive tract of shrimp before and after feeding the shrimps the lactic acid bacteria

	乳酸菌数量/($\times 10^5$ cfu · g ⁻¹)		总菌数量/($\times 10^7$ cfu · g ⁻¹)	
	Lactic acid bacteria counts		Total bacterial counts	
	拌料投喂前	拌料投喂后	拌料投喂前	拌料投喂后
	Before feeding	After feeding	Before feeding	After feeding
中肠 Mid gut	1.65	11.20	23.32	37.34
后肠 Hindgut	0.45	2.35	5.20	8.16

3 讨 论

3.1 乳酸菌 HN3 对 2 株致病性弧菌的抑制效果 本实验结果表明, 乳酸菌培养液、胞外液以及调整 pH 中性的胞外液均对 2 株弧菌有抑制作用, 说明抑制 2 株弧菌生长的物质很可能是乳酸菌的胞外代谢产物。胞外液调整 pH 值前后对抑制效果有明显的影响, pH 值较低时抑菌效果越明显, 这与乳酸菌对金黄色葡萄球菌的拮抗作用效果相似^[17], 可能是在较低的 pH 条件下, 酸性物质在抑制弧菌生长中起到协同作用。当然, 乳酸菌代谢产物的抑菌活性是多方面的, 主要由有机酸、细菌素等物质^[18]发挥作用。胞外物质的具体抑菌原理和特性仍有待于今后深入研究。

3.2 乳酸菌 HN3 对凡纳滨对虾生长的影响 益生菌在改良养殖环境、促进水生动物生长、增强机体免疫功能等方面均有很好效果, 在水产养殖中的应用越来越受到人们的关注和重视^[19-23]。蒋海峰等^[24]采用有益菌 *Vibrio* sp. 和 *Bacillus* sp. 饲喂皱纹盘鲍幼鲍 (*Halotis discus hannai*), 幼鲍的体质量增加率、日增壳长和成活率得到了显著提高; 沈文英等^[25]发现, 用芽孢菌饲喂草鱼后, 草鱼的生长性能和免疫功能也得到明显提高; 丁贤等^[26]报道, 在养殖对虾的池塘中使用芽孢杆菌可显著提高对虾的体质量增加率和降低饵料系数; 柴鹏程等^[27]利用添加芽孢杆菌 PC465 的饲料投喂凡纳滨对虾, 其生长率有显著的提高。笔者采用乳酸菌 HN3 拌料投喂凡纳滨对虾, 其养殖效果与前人的报道基本一致, 投喂乳酸菌后, 对虾摄食旺盛、肠道乌黑粗大, 与对照组相比, 实验组对虾的成活率、日增重均有显著提高, 其中, 以乳酸菌添加剂量 $4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cfu · g⁻¹ 的综合养殖效果最佳。

3.3 投喂乳酸菌 HN3 对消化道菌群数量和菌群组成的影响 有益菌在水产养殖中的应用已经十分普遍。B. Vaseeharan 等^[28]和 SUNG HungHung 等^[29]报道, 在饵料中添加芽孢杆菌可抑制斑节对虾和中国对虾体内弧菌的滋生, 降低对虾胃、肠道的弧菌数量; 宫魁等^[30]利用乳酸菌及其代谢产物饲养刺参, 有效减少了肠道有害菌的数量, 改善了消化道的菌群组成; 胡毅等^[31]的研究发现, 在饵料中添加芽孢杆菌饲养凡纳滨对虾, 可显著降低对虾肠道和粪便中的弧菌数量; M Mareková 等^[32]报道, 乳酸菌在代谢过程中通过产生大量的酸性物质或细菌素等物质, 可降低消化道内 pH 值和氧化还原电位 Eh, 抑制有害菌的滋生。起初水产养殖所用的益生菌大多源自陆生动物的益生菌或者以同样的思路开展产品研发和推广应用。动物消化道内的细菌数量和种类都很多, 包括有益菌、无益菌、有害菌和致病菌。但是在健康的动物体内, 有益菌多是优势菌并在体内起到主导作用, 所以, 有益菌通常来源于健康动物体内的优势菌株^[33]。因而, 从健康的动物体内或者养殖环境中筛选到的细菌作为有益菌更适应有益菌的定植和粘附^[36-37]。本实验所用的乳酸菌 HN3 分离自健康凡纳滨对虾消化道, 并且是消化道的优势菌株。该菌株可较好地适应对虾消化道的环境并定植下来, 能大幅度增加消化道的乳酸菌数量, 通过营养物质、生活环境的竞争和酸

性代谢产物的分泌,限制弧菌的生长繁殖,使对虾消化道的弧菌数量维持在较低的数量水平,从而达到优化对虾消化道的菌群组成的作用^[30-32]。笔者在对虾后肠的粪便中也检测到大量乳酸菌 HN3 的活性菌株,说明该乳酸菌株不仅能适应对虾消化道的环境,而且不会被对虾消化道的消化酶所破坏,在后肠中仍保持活性,这些菌株将随粪便排放到养殖环境中,能增加养殖水体的乳酸菌数量,对优化养殖环境的菌群组成和预防对虾细菌性疾病的发生有重要的作用。

参考文献:

- [1] AGUIRRE-GUZN N G, LARA-FLORES M, SÁ NCHEZ-MARTÍ NEZ J G, et al. The use of probiotics in aquatic organisms: A review [J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(23): 4845-4857.
- [2] VERSCHUERE L, ROMBAUT G, SORGELOOS P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(4): 655-671.
- [3] BALC ZAR J L, BLAS I D, RUIZ-ZARZUELA I, et al. The role of probiotics in aquaculture [J]. Veterinary Microbiology, 2006, 114(3): 173-186.
- [4] FULLER R. Probiotics in man and animals [J]. Journal of Applied Microbiology, 1989, 66(5): 365-378.
- [5] VASEEHARAN B, RAMASAMY P. Control of pathogenic *Vibrio spp.* by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36(2): 83-87.
- [6] AUSTIN B, STUCKE Y L F, ROBERTSON P A W, et al. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* [J]. Journal of Fish Diseases, 1995, 18(1): 93-96.
- [7] SILVA E, EMANUELL F, SOARES M A, et al. Effect of probiotic (*Bacillus spp.*) addition during larvae and postlarvae culture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Aquaculture Research, 2012, 44(1): 13-21.
- [8] RENGPIATS S, RUKPRATANPORN S, PIYATIRATI TIVORUKULS, et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus*) [J]. Aquaculture, 2000, 191(4): 271-288.
- [9] FLEGEL T W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2012, 110(2): 166-173.
- [10] LEAÑO E M, MOHAN C V. Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms [J]. Glob Aquacult Advocate, 2012(7/8): 38-39.
- [11] LIGHTNER D V, REDMAN R M, PANTOJA C R, et al. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia [J]. Global Aquaculture Advocate Magazine, 2012(1/2): 40.
- [12] 苏树叶, 赖秋明, 陈金玲, 等. 南美白对虾 EMS 发病特点及防控 [J]. 海洋与渔业, 2013(6): 85-88.
- [13] 谭君, 侯喜林, 余丽芸, 等. 重组干酪乳杆菌代谢产物抑菌效果的研究 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2012, 24(4): 29-32.
- [14] 李继秋. 对虾微生态制剂的研制与应用 [J]. 青岛: 中国海洋大学, 2003.
- [15] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学试验 [M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [16] ANAND P S, KOHLI M P S, ROY S D, et al. Effect of dietary supplementation of periphyton on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture, 2013, 392: 59-68.
- [17] 王小红, 谢笔钧, 史贤明, 等. 乳酸菌对金黄色葡萄球菌生物拮抗作用的初步研究 [J]. 食品工业科技, 2005, 26(1): 68-70.
- [18] 张艾青, 刘书亮, 敖灵. 产广谱细菌素乳酸菌的筛选和鉴定 [J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 753-756.
- [19] 王刚. 微生态制剂在水产养殖上的应用 [J]. 水产科学, 2002, 21(3): 34-36.
- [20] 黄庆生, 王加启. 饲料乳酸菌类益生菌的作用机制和应用 [J]. 动物营养学报, 2002, 14(4): 12-17.
- [21] 侯树宇, 张清敏, 多森, 等. 微生态复合菌制剂在对虾养殖中的应用研究 [J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(5): 904-907.
- [22] SON V M, CHANG C C, WU M C, et al. Dietary administration of the probiotic *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(5): 691-698.
- [23] GILDBERG A, MIKKELSEN H, SANDAKER E, et al. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*) [C] // Asia-Pacific Conference on Science and Management of Coastal Environment. Springer Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1997: 279-285.
- [24] SALINAS I, CUESTA A, ESTEBAN M, et al. Dietary administration of *Lactobacillus delbrückii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 19(1): 67-77.
- [25] 潘雷, 郭文, 高凤祥, 等. 饵料中添加益生菌对大菱鲆幼鱼肠道菌群及部分免疫指标的影响 [J]. 海洋科学, 2012, 36(2): 34-39.

- [26] 姜海峰. 皱纹盘鲍肠道益生菌的筛选与应用研究 [J]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [27] 沈文英, 李卫芬, 梁权, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对草鱼生长性能、免疫和抗氧化功能的影响 [J]. 动物营养学报, 2011, 23(5): 881–886.
- [28] 丁贤, 李卓佳, 陈永青, 等. 芽孢杆菌对凡纳对虾生长和消化酶活性的影响 [J]. 中国水产科学, 2004, 11(6): 580–584.
- [29] 柴鹏程, 宋晓玲. 饲料中添加芽孢杆菌 PC465 对凡纳滨对虾生长和 STAT 基因表达的影响 [J]. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 97–103.
- [30] VASEEHARAN B, RAMASAMY P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36(2): 83–87.
- [31] SUNG Hung-hung, HSU Shi-fang, CHEN Chih-kun, et al. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation [J]. Aquaculture, 2001, 192(2): 101–110.
- [32] 宫魁, 王宝杰, 刘梅, 等. 乳酸菌及其代谢产物对刺参幼体肠道菌群和非特异性免疫的影响 [J]. 海洋科学, 2013, 37(7): 7–12.
- [33] 胡毅, 谭北平, 麦康森, 等. 饲料中益生菌对凡纳滨对虾生长、肠道菌群及部分免疫指标的影响 [J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 244–251.
- [34] MAREKOVÁ M, LAUKOVÁ A, SKAUGEN M, et al. Isolation and characterization of a new bacteriocin, termed enterocin M, produced by environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41 [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2007, 34(8): 533–537.
- [35] GATESOUE F J. The use of probiotics in aquaculture [J]. Aquaculture, 1999, 180(1): 147–165.
- [36] VERSCHUERE L, ROMBAUT G, SORGELOOS P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(4): 655–671.
- [37] KESARCODI-WATSON A, KASPAR H, GIBSON L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes [J]. Aquaculture, 2008, 274(1): 1–14.

Application of Lactic Acid Bacteria in Shrimp Farming

KE Yangyong, LAI Qiuming, SU Shuye, LIN Zhiyu

(College of Ocean, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: A strain of lactic acid bacteria HN3 isolated from *Litopenaeus vannamei* digestive tract was used to conduct experiments to observe its antagonistic effect on two pathogenic vibrio species: *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* and its aquacultural effect on the growth of *L. vannamei*. The antagonism experiment showed that both the lactic acid bacteria HN3 and its extracellular fluid showed significantly different inhibitory effects against the growth of *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus*. The aquaculture experiment showed that the daily gain rate (DGR), survival rate (SR) and specific growth rate (SGR) of the shrimps fed the diet containing probiotic HN3 were significantly higher than those of the control ($P < 0.05$). Similarly, significantly higher population density of the lactic acid bacteria and total bacteria were noted in the shrimp digestive tract and culture water compared to the control, but the number of *Vibrio* bacteria was reduced greatly ($P < 0.05$). The diet supplemented with 4×10^6 – 5×10^6 cfu $\cdot$ g $^{-1}$ probiotic HN3 was the best to farm the shrimps, and the probiotic HN3 promoted the growth and improved the survival rate of the shrimps, which indicates that HN3 is adapted to the digestive tract environment, inhibits the growth of *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus* and plays an important role in improving the composition of flora in the farming environment.

Key words: Lactic acid bacteria; *Litopenaeus vannamei*; growth; *Vibrio* sp; microflora