

植物乳杆菌对大黄鱼非特异性免疫力的影响

廖志勇¹, 林利², 缪雄伟³ (1. 温州大学生命与环境科学学院, 浙江温州 325035; 2. 浙江省平阳县碧海仙山海产品养殖有限公司, 浙江平阳 325400; 3. 浙江省平阳县科技局, 浙江平阳 325400)

摘要 [目的]研究益生菌植物乳杆菌 P13 对大黄鱼先天免疫力的影响。[方法]用含植物乳杆菌 P13 的配方饲料喂养大黄鱼 4 周后,测定大黄鱼的非特异性免疫指标。[结果]含 $10^6 \sim 10^{10}$ cfu/kg *Saccharomyces cerevisiae* P13 的配方饲料可明显提高大黄鱼的补体活性、溶菌酶活性、吞噬活性和头肾白细胞呼吸性。[结论]植物乳杆菌 P13 能增强大黄鱼先天免疫能力。

关键词 益生菌; 植物乳杆菌 P13; 大黄鱼; 先天免疫

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)27-11050-02

Study on the Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on the Nonspecific Immunity of *Pseudosciaena crocea*

LIAO Zhi-yong et al (College of Life and Environmental Sciences, Wenzhou University, Wenzhou, Zhejiang 325035)

Abstract [Objective] The research aimed to study the effects of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* P13 on the non-specific immunity of *Pseudosciaena crocea*. [Method] After *Pseudosciaena crocea* was fed with the formula diet containing $0, 10^4, 10^6, 10^8$ and 10^{10} cfu/kg *S. cerevisiae* P13 for four weeks, the non-specific immunity indices of *P. crocea* were determined. [Result] The complement activity, lysozyme activity, phagocytic activity and head kidney leukocyte respiratory of *P. crocea* could be obviously increased by the formula diet containing $10^6 \sim 10^{10}$ cfu/kg *S. cerevisiae* P13. [Conclusion] *S. cerevisiae* P13 could enhance the non-specific immunity of *P. crocea*.

Key words Probiotics; *Saccharomyces cerevisiae* P13; *Pseudosciaena crocea*; Non-specific immunity

大黄鱼是我国独有的、具有较高经济价值的鱼类,是我国海水鱼类养殖中最名贵的品种之一。近年来,大黄鱼的养殖规模因人工育苗的成功而迅速扩大,网箱养殖的不合理规划导致养殖面积和放养密度急剧加大,使养殖水域的承载能力和水体交换自净能力遭到严重危害,鱼类病害的种类也随之增多,极大地制约着大黄鱼养殖业的健康发展。同时,由于目前使用的饵料系数较,转化为鱼类蛋白质的比例较低,导致饵料大量流失,对水质造成严重污染。尤其是部分养殖户违规使用禁用鱼药和劣质饲料,造成药物残留和水质大面积恶化,从而导致大黄鱼生长速度减缓、疾病频发以及成活率下降,并且大黄鱼品质下降,食品安全没有保障。

因此,鱼类的健康和免疫力的提高对养殖业而言就显得尤为重要。鉴于益生菌类产品对动物健康有益作用,包括提高动物生产性能、提高健康水平、改善肠道微生态和提高免疫力等功效。在分析益生菌对大黄鱼的生长促进作用

的基础上,笔者研究了益生菌植物乳杆菌对大黄鱼非特异性免疫活性的影响,以期开发适用于大黄鱼养殖的高效配合微生物饲料奠定理论基础,促进大黄鱼养殖业的健康发展。

1 材料与方法

1.1 大黄鱼饲养 大黄鱼幼鱼购自温州某人工养殖场,室内采用水缸流水(海水)饲养方式进行饲养试验。在试验过程中,每天更换 30% 的海水,以保证水质。水温保持在 $(28 \pm 0.2)^\circ\text{C}$, pH 为 7.5 ~ 8.4, 盐度保持在 $(2.0 \pm 0.1)\%$ 。参照文献[1]的方法从韩国腌白菜分离植物乳杆菌(*Saccharomyces cerevisiae*) P13, 37°C 下培养于含 MRS 肉汤的无菌烧瓶中。24 h 后, $15\ 400 \times g$ 离心 5 min, 收集植物乳杆菌混合物。按照 1:4 的比例与脱脂牛奶混合, 冷冻干燥。通过 MRS 琼脂平板计数法测定植物乳杆菌混合物的生活力。所有试验鱼每天用配制的配方饲料或基础饲料喂养 2 次。大黄鱼的饲料配方见表 1。每个饲料配方喂养 3 个平行组试验鱼, 每组 5

表 1 大黄鱼饲料成分

植物乳杆菌 P13 含量//cfu/kg	菌体	牛奶	鱼粉	淀粉	鱼膏	面筋	鱼油	虾壳粉	脱脂豆粕	矿物混 合物	维生素 混合物
0	0	10.000 0	540	183	37	20	20	64	94	35	7
10^4	0.000 01	9.999 9	540	183	37	20	20	64	94	35	7
10^6	0.001 00	9.999 0	540	183	37	20	20	64	94	35	7
10^8	0.100 00	9.990 0	540	183	37	20	20	64	94	35	7
10^{10}	10.000 00	0	540	183	37	20	20	64	94	35	7

条大黄鱼幼鱼。

1.2 试验方法 给大黄鱼喂食含乳酸菌 *Saccharomyces cerevisiae* P13 的饲料 4 周后,测定相关免疫指标。

1.2.1 补体活性(ACH_{50})的测定。按照文献[2]的方法测定大黄鱼补体活性。以绵羊红血细胞作为靶细胞,用 EGTA- Mg^{2+} -GVB 缓冲液按一定比例稀释大黄鱼的血液样本,各取 20 μl 作为补体来源,与 6 μl 绵羊红血细胞悬浮液混匀, 21°C pH 7.2 条件下孵育 2 h。加入 200 μl 含 EDTA 的 GVB 缓冲液,终止溶血反应。 4°C $1\ 600 \times g$ 离心 10 min。采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定上清液的 OD 值。溶血反应液中分别用 6 μl EDTA-GVB、20 μl EDTA-GVB 和 200 μl 去离子水

基金项目 浙江省科技厅社会公益项目(No. 2012C33077);浙江省平阳县科技局项目(AS201003Z2)。

作者简介 廖志勇(1975 -),男,江西新余人,副教授,硕士,从事生物化学与分子生物学研究, E-mail: 785526341@qq.com。

收稿日期 2013-08-19

取代绵羊红血细胞悬液、稀释大黄鱼血样本以及稀释血样本/EDTA-GVB,作为SRBC、血样本和100%溶血样本的空白对照。按照以下公式计算溶血度:

$$Y(\text{溶血度}) = \frac{OD_A - OD_B - OD_C}{OD_D - OD_C} \quad (1)$$

1.2.2 血清溶酶活性的测定。按照文献[3]的方法测定大黄鱼血清溶酶活性。将10 μl 血清样本和200 μl 溶解于pH6.2的PBS(0.05 mol/L)的 *Micrococcus luteus* 悬浮液混合。27 $^{\circ}\text{C}$ 温育6 min,用ELISA读板于波长530 nm处测定其OD值。每毫升血样每分钟降低0.001 OD值定义为1个单位溶酶活性。

1.2.3 爆发呼吸的测定。按照文献[2]的方法测定大黄鱼头肾白细胞爆发呼吸活性。用0.20%的聚L-lysine溶液预包埋微量板(100 μl /孔),随后每孔添加100 μl 白细胞悬液(1×10^6 个细胞/ml)。700 \times g 离心20 min,去除未贴壁的细胞,用HBSS液清洗微量板孔。每孔添加含0.1%酵母多糖的HBSS液,室温下反应30 min。单独添加100 μl HBSS液的孔位空白对照。用HBSS液洗细胞3次,加入100 μl 0.3% NBT液,室温下染色30 min。除去NBT液,并添加100 μl 甲醇终止染色反应。添加120 μl KOH(2.0 mol/L)和140 μl DMSO。使用ELISA读板仪测定每孔细胞裂解液的OD值。重复3次。

1.2.4 吞噬活性的测定。在12孔板中每孔添加500 μl 含 1×10^6 个头肾白细胞的L-15液,4 $^{\circ}\text{C}$ 下400 \times g 离心20 min。去除非贴壁细胞,并用L-15液清洗细胞。每孔加入1 μl 含 1×10^6 荧光乳胶珠的溶液,28 $^{\circ}\text{C}$ 下温育2 h。用PBS液冲洗细胞3次,以除去未被吸附的荧光乳胶珠,用10%福尔马林固定后,再用PBS缓冲液冲洗3次。用0.1%碘化丙啶染色10 min,再用PBS缓冲液冲洗3次。于荧光显微镜下挑选100个吞噬细胞,计算摄取有孔玻璃珠的吞噬细胞的百分比。

2 结果与分析

2.1 植物乳杆菌 P13 对大黄鱼补体活性 (ACH_{50}) 的影响 从图1可以看出,喂食含 1×10^6 、 1×10^8 和 1×10^{10} cfu/kg植物乳杆菌(*Saccharomyces cerevisiae*) P13 饲料的大黄

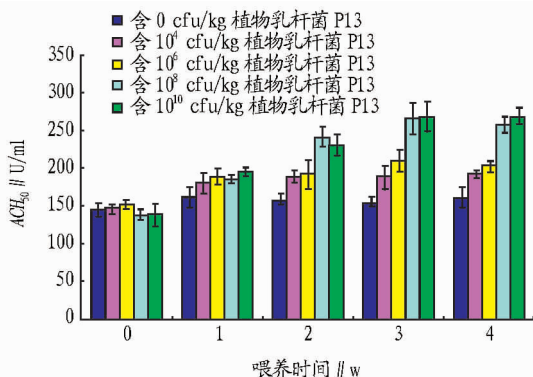


图1 喂食含植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 饲料1~4周后大黄鱼的补体活性(ACH_{50})

鱼补体活性(ACH_{50})明显高于喂食含 1×10^4 植物乳杆菌的饲料和对照饲料的大黄鱼,较对照组大黄鱼的 ACH_{50} 分别高

32%、103%、158%和168%。

2.2 植物乳杆菌对大黄鱼白细胞爆发性呼吸力和及吞噬能力的影响 爆发性呼吸是由吞噬细胞攻击入侵病原体时产生的,常用于评价机体对病原体的防疫能力。据报道,益生菌能够提高虹鳟鱼类血细胞爆发呼吸力以及头肾白细胞的吞噬性^[4]。从图2~3可以看出,喂食含植物乳杆菌(*Saccharomyces cerevisiae*) P13 的饲料4周后大黄鱼头肾白细胞爆发性呼吸力以及吞噬能力都明显高于喂食对照饲料的大黄鱼。

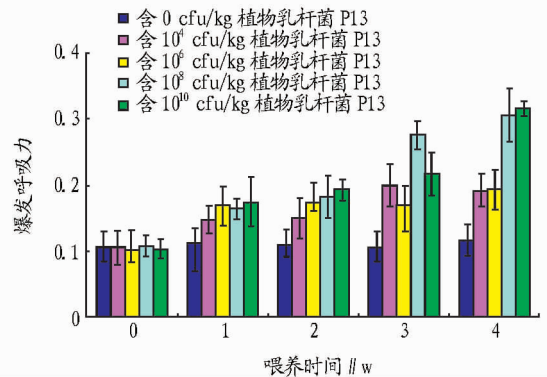


图2 喂食含植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 饲料1~4周后大黄鱼的头肾白细胞爆发呼吸力

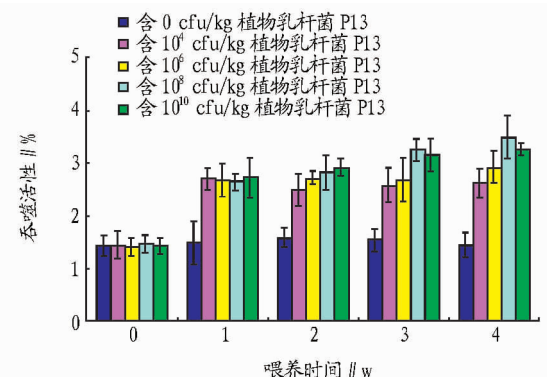


图3 喂食含植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 饲料1~4周后大黄鱼的头肾白细胞吞噬活性

2.3 植物乳杆菌对大黄鱼溶菌酶活性的影响 机体一方面通过免疫细胞抵抗外来异物的入侵,另一方面也借助不补提分子和系列溶菌酶来增强机体对病原体的防御。从图4可

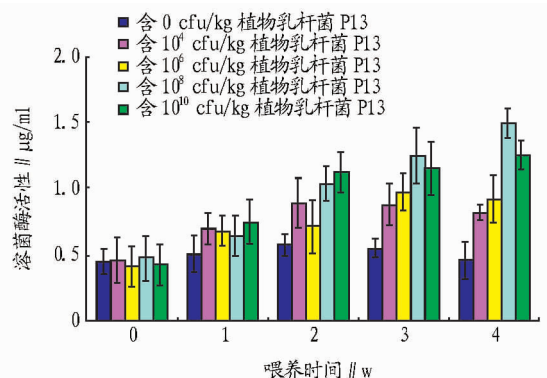


图4 大黄鱼喂食含植物乳杆菌 *S. cerevisiae* P13 饲料1~4周的血清溶菌酶活性

- [6] COOPER M S, HARDIN W R, PETERSEN T W, et al. Visualizing green oil in live algal cells[J]. *Biosci Bioeng*, 2010, 109: 198–201.
- [7] ELSEY D, JAMSOND, RALEIGH B, et al. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 68: 639–642.
- [8] HUANG G H, CHEN F, WEI D, et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology[J]. *Applied Energy*, 2010, 87: 38–46.
- [9] HSIEH H J, SU C H, CHIEN L J. Accumulation of lipid production in *Chlorella minutissima* by triacylglycerol biosynthesis-related genes cloned from *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica*[J]. *The Journal of Microbiology*, 2012, 50(3): 526–534.
- [10] HUANG G H, CHEN F, WEI D, et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology[J]. *Applied Energy*, 2010, 87(1): 38–46.
- [11] SHEEHAN J, DUNAHAY T, BENEMANN J, et al. A look back at the U. S. Department of Energy's Aquatic Species Program-Biodiesel from algae [D]. National Renewable Energy Laboratory, 1998: 1–294.
- [12] 黄英明, 王伟良, 李元广, 等. 微藻能源技术开发和产业化发展思路与策略[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(7): 907–913.
- [13] HUANG G H, CHEN F, WEI D, et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology[J]. *Appl Energy*, 2010, 87: 38–46.
- [14] RATLEDGE C, KANAGACHANDRAN K, ANDERSON A J, et al. Production of docosahexaenoic acid by *Cryptocodinium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source[J]. *Lipids*, 2001, 36: 12410–12416.
- [15] YEH K L, CHANG J S, CHEN Y M. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris*. *ESP* - 31[J]. *Eng Life Sci*, 2010, 10: 201–208.
- [16] LEE K, LEE C. Nitrogen removal from wastewaters by microalgae without consuming organic carbon sources[J]. *Microbiol Biotechnol*, 2002, 12: 979–985.
- [17] 胡文军, 罗玮, 李汉广, 等. 产油微藻筛选和鉴定及其产油性能的研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(12): 66–72.
- [18] 杨静, 蒋剑, 张宁. 不同培养方式下微藻产油能力的研究[J]. *生物质化学工程*, 2011, 45(2): 15–19.
- [19] FÁBREGAS J, MORALES E, GARCÍA D, et al. The soluble fraction of *Solanum tuberosum* enhances growth and pigmentation of the microalga *tetraselmis suecica* under photoheterotrophic conditions [J]. *Bioresource Technology*, 1997, 59(2/3): 263–266.
- [20] MIAO X L, WU Q Y. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil[J]. *Bioresou Technol*, 2006, 97: 841–846.
- [21] GE Y M, LIU J Z, TIAN G M. Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO₂ concentration in photobioreactor[J]. *Biore Technol*, 2011, 102(1): 130–134.
- [22] TANG D H, HAN W, LI P L, et al. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels[J]. *Biores Technol*, 2011, 102(3): 3071–3076.
- [23] 王丽艳. 微藻固定烟中 CO₂ 的发展及可行性探讨[J]. *绿色科技*, 2012(9): 182–183.
- [24] DOUCHA J, STRAKA F, LIVANSKY K. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae *Chlorella sp.* in an outdoor open thin-layer photobioreactor[J]. *Appl Phycol*, 2005, 17(5): 403–412.
- [25] 黄建忠, 施巧琴, 周晓兰, 等. 深黄被孢霉高产脂变株的选育及其发酵的研究[J]. *微生物学通报*, 1998, 25(4): 187–190.
- [26] RODOLFI L, ZITTELLI G C, BASSI N, et al. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photo-bioreactor [J]. *Biotechnol & Bioengin*, 2008, 10(2): 1002–1023.
- [27] LIANG Y N, SARKANY N, CUI Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions[J]. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(7): 1043–1049.
- [28] WIDJAJA A, CHIEN C C, JU Y H. Study of increasing lipid production from flesh water microalgae *Chlorella vulgaris*[J]. *Taiwan Inst Chem Eng*, 2009, 40: 13–20.
- [29] ZHILA N O, KALACHEVA G S, VOLOVA T G. Effect of nitrogen limitation on the growth and lipid composition of the green alga *Botryococcus braunii* Kutz IPPAS H-252[J]. *Russ J Plant Physiol*, 2005, 52: 357–365.
- [30] 孙漫, 袁娟, 袁维道, 等. 产油脂海洋微藻的筛选、鉴定及 Fe³⁺ 对其生长和油脂积累的影响[J]. *中国油脂*, 2012, 37(12): 70–73.
- [31] 张薇, 吴虹, 宗敬华. 蛋白核小球藻发酵产油脂的研究[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(6): 855–860.
- [32] 王菊芳, 梁世中, 陈峰. 环境条件对隐甲藻生长及 DHA 产量的影响[J]. *海洋科学*, 2002, 26(2): 62–65.
- [33] SATU N, MURATA N. Temperature shift-induced responses in lipids in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*; The central role of diacylmonolactosylglycerol in thermo-adaption[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1980, 619(2): 353–365.
- [34] 蒋汉明, 翟静, 张媛英, 等. 温度对海洋微藻生长及脂肪酸组成的影响[J]. *食品研究与开发*, 2005, 26(6): 9–12.
- [35] 于荣清, 刘义, 田思琪, 等. 产油脂微藻的分离鉴定及培养条件优化[J]. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(6): 897–900.
- [36] 伊廷强, 叶静, 何泽超. 海洋微藻培养及光生物反应器的研究进展[J]. *化工设计*, 2008, 18(3): 11–14.
- [37] 刘娟妮, 胡萍, 姚领, 等. 微藻培养中光生物反应器的研究进展[J]. *食品科学*, 2006, 27(12): 772–777.
- [38] CHISTI Y. Biodiesel from microalgae[J]. *Biotech Advances*, 2007, 25: 294–306.
- [39] ERIKSEN N T. The technology of microalgal culturing [J]. *Biotechnol Lett*, 2008, 30: 1525–1536.
- [40] CHISTI Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol [J]. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(3): 126–131.
- [41] WEI X, XIU F L, JIN Y X. High-density fermentation of microalgae *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78: 29–36.
- [42] SORGUVEN E, ÖZILGEN M. Thermodynamic assessment of algal biodiesel utilization[J]. *Renewable Energy*, 2010, 35(9): 1956–1966.

- [43] 杨勋, 刘平怀, 郝宗娣, 等. 富油微藻 *Monoraphidium sp.* 的分离及其油脂提取工艺研究[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(32): 19988–19990, 20124.
- [44] HE R, LIU J H, WANG S A, et al. Screening of the gene for *Chlorella* identification and identification of oil-producing microalgae[J]. *Agricultural Science & Technology*, 2011, 12(6): 795–798.

(上接第 11051 页)

可以看出, 喂食含 10⁴、10⁶、10⁸ 和 10¹⁰ cfu/kg 植物乳杆菌的大黄鱼溶菌酶活性比对照组显著提高。

3 小结

通过给大黄鱼饲喂含 0、1 × 10⁴、1 × 10⁶、1 × 10⁸ 和 1 × 10¹⁰ cfu/kg 植物乳杆菌的饲料 4 周后, 测定大黄鱼天然免疫活性的免疫参数。结果表明, 植物乳杆菌 *Saccharomyces cerevisiae* P13 可以改善大黄鱼的头肾细胞爆发呼吸力、吞噬活力、补体活力以及血清溶菌酶活性, 并增强大黄鱼的天然免疫系统。该研究可为大黄鱼养殖用生物饲料的研发提供理论依据, 促进大黄鱼养殖业的健康发展。

参考文献

- [1] PAN T M, CHIU C H, GUU Y K. Characterization of *Lactobacillus* isolates

from pickled vegetables for use as dietary or pickle adjuncts [J]. *Foods Food Ingrid J Jpn*, 2002, 206: 45–51.

- [2] SUNYER J O, TORT L. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are affected by the alternative complement pathway [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1995, 45: 333–345.
- [3] YEH S P, CHANG C A, CHANG C Y, et al. Dietary sodium alginate administration affects the fingerling growth and resistance to *Streptococcus sp.* and iridovirus, and juvenile non-specific immune responses of the orangespotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25: 19–27.
- [4] NIKOSKELAINEN S, OUWEHAND A C, BYLUND G, et al. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, 15: 44352.

- [5] 潘娟, 李利, 刘丽媛. 益生菌在水产养殖生产中的应用 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2012, 33(4): 90–92.