

复合益生菌对刺参非特异性免疫和抗病力的影响

憨素连, 王福强*, 王晶, 刘晨敏 (大连海洋大学动物营养与饲料实验室, 辽宁大连 116023)

摘要 [目的]研究复合益生菌粉对刺参非特异性免疫和抗病力的影响。[方法]选择体重相近的450头刺参并随机分为5组,分别在基础日粮中添加含有0(A组)、0.2%(B组)、0.4%(C组)、0.6%(D组)、0.8%(E组)的复合益生菌粉(10^6 CFU/g),进行饲养试验,研究复合益生菌粉对刺参非特异性免疫和抗病力的影响。[结果]复合益生菌对刺参碱性磷酸酶(AKP)和超氧化物歧化酶(SOD)活性无显著影响;与其他试验组和对照组相比,0.6%的复合益生菌提高了刺参的酸性磷酸酶(ACP)活性,0.4%、0.6%和0.8%的复合益生菌显著提高了刺参过氧化氢酶(CAT)活性($P < 0.05$),而0.6%和0.8%的复合益生菌则显著提高了刺参溶菌酶(LSZ)活性($P < 0.05$)。在攻毒6d和攻毒10d后,各试验组的AKP、LSZ、SOD活性均与对照组没有显著差异。攻毒6d后,E组ACP活性显著低于对照组($P < 0.05$)。攻毒10d后,C、D、E组ACP活性均极显著低于对照组($P < 0.01$)。[结论]在基础饲料中添加复合益生菌能增强刺参的非特异性免疫能力,其添加量以0.6%为。

关键词 复合益生菌;刺参;生长;非特异性免疫;黄海希瓦氏菌

中图分类号 文献标识码 A **文章编号** 0517-6611(2015)36-094-03

Effects of Compound Probiotics on Nonspecific Immunity and Disease Resistance of Sea Cucumber

HAN Su-lian, WANG Fu-qiang*, WANG Jing et al (Laboratory for Animal Nutrition and Feed, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023)

Abstract [Objective] To study the effects of compound probiotics powder on nonspecific immunity and disease resistance of *Stichopus japonicus*. [Method] 450 sea cucumbers with similar weight of (1.07 ± 0.02) g were selected and divided into five groups randomly. 0, 0.2%, 0.4%, 0.6% and 0.8% compound probiotics (10^6 CFU/g) were supplemented in basal diet in A group, B group, C group, D group and E group respectively to conduct the feeding experiment. The effects of compound probiotics on the nonspecific immunity and disease resistance of sea cucumber were studied. [Result] Compound probiotics had no significant effect on alkaline phosphatase (AKP) and superoxide dismutase (SOD) activities of sea cucumber. Compared with control group and other experimental groups, acid phosphatase (ACP) activity of sea cucumber was significantly increased by supplementing 0.6% probiotics in the basal diet. Catalase (CAT) activity in sea cucumber was significantly increased by supplementing 0.4%, 0.6% and 0.8% compound probiotics ($P < 0.05$). Lysozyme (LSZ) activity in sea cucumber was significantly increased by supplementing 0.6% and 0.8% compound probiotics ($P < 0.05$). On the 6th day and 10th day after virus challenge test, AKP, LSZ and SOD activities in test groups had no significant difference with control group. On the 6th day, ACP activity in E group was significantly lower than that in control group ($P < 0.05$). On the 10th day, ACP activity in C, D, E groups were all extremely significantly lower than that in control group ($P < 0.01$). [Conclusion] The nonspecific immunity of sea cucumber can be strengthened by supplementing compound probiotics in the basal diet, and its optimum addition was 0.6%.

Key words Compound probiotics; Sea cucumber; Growth; Nonspecific immunity; *Shewanella smarislavi*

刺参是我国黄渤海海域最有经济价值的水产养殖品种之一。然而,大规模、高密度的刺参人工养殖、药物滥用常常会导致生态破坏、水质恶化、刺参的疾病和死亡大规模暴发等问题。研究表明,在饲料中添加益生菌,除了能增加饲料的适口性和提高养殖动物的增重率外,还可以增强养殖动物的免疫力,降低发病率,是实现生态养殖的重要途径。目前,研究应用的益生菌主要有芽孢杆菌、乳杆菌、双歧杆菌、酵母菌、霉菌、光合细菌、硝化细菌、反硝化细菌等。但是,复合益生菌对水产动物免疫和抗力方面的研究较少。胡毅等^[1]用复合益生菌和单一益生菌投喂凡纳滨对虾,结果发现复合组的特定生长率、饲料效率、溶菌酶活力、血清蛋白浓度等均优于单一菌组。笔者对复合益生菌对刺参免疫和抗病力的影响进行了研究,旨在为其在水产养殖中的应用提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 复合益生菌。试验所用的复合益生菌,由大连阳光

白奥科技有限公司生产,由枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, 10^6 CFU/g以上)、乳酸杆菌(*Lactobacilli acidophilus*, 10^6 CFU/g以上)、酵母菌(*Saccharomyces*, 10^6 CFU/g以上)组成。

1.1.2 试验动物。试验所用刺参来自大连水益生海洋生物科技有限公司的同一批次刺参苗,刺参购回后暂养驯化1周。挑取个体大小均匀的健康刺参随机分为5组,每组3个重复,每个重复30头刺参,试验刺参初始体重为(1.07 ± 0.02)g。

1.1.3 试验地点。养殖试验在大连海洋大学辽宁省水生生物学重点实验室进行。

1.2 方法

1.2.1 试验饲料。试验饲料配方和营养成分见表1~2。分别在基础饲料中添加0、0.2%、0.4%、0.6%和0.8%的复合益生菌,制成A、B、C、D、E 5种饲料。在低于20℃室内阴干后贮存于-20℃的冰箱中待用。

1.2.2 饲养管理。每天以刺参体重的3%投饵,根据摄食情况适当调整饲喂量,达到饱食投喂。每天17:20投喂1次,次日13:30吸除残饵和粪便,并补充暂存1d的沙虑海水。饲养期间连续充气,水温控制在(15 ± 3)℃。养殖试验持续8周。

1.2.3 攻毒试验。攻毒试验使用黄海希瓦氏菌(*Shewanella smarislavi*),为刺参“化皮病”的致病菌之一,菌液由大连海

基金项目 辽宁省科技厅计划项目(2008203002)。

作者简介 憨素连(1987-),女,山东菏泽人,硕士研究生,研究方向:水产动物营养与饲料科学。*通讯作者,副教授,博士,硕士生导师,从事水产动物营养与饲料科学方面的研究。

收稿日期 2015-12-04

洋大学病害实验室免费提供。用复合益生菌养殖刺参 8 周后,每头刺参腹腔注射 0.1 ml 6×10^8 CFU/ml 的菌液。

表 1 试验饲料组成

饲料种类	鱼粉	海带粉	马尾藻	裙带菜	米糠	豆粕	酵母粉	预混料	粘合剂	纤维素	益生菌粉	三氧化二铬
A	4	18	25	12	10	9	4	2	1	15.0	0	0.3
B	4	18	25	12	10	9	4	2	1	14.8	0.2	0.3
C	4	18	25	12	10	9	4	2	1	14.6	0.4	0.3
D	4	18	25	12	10	9	4	2	1	14.4	0.6	0.3
E	4	18	25	12	10	9	4	2	1	14.2	0.8	0.3

注:预混料含有维生素 A 0.6 mg/g、维生素 C 2.0 mg/g、维生素 D₃ 0.125 mg/g、维生素 E 20 mg/g、维生素 K₃ 4.0 mg/g、维生素 B₁ 10.0 mg/g、维生素 B₂ 10.0 mg/g、维生素 B₆ 12.0 mg/g、维生素 B₁₂ 0.02 mg/g、烟酸 6.0 mg/g、泛酸钙 6.0 mg/g、叶酸 0.4 mg/g、肌醇 15.0 mg/g、生物素 0.05 mg/g、铁 5.0 mg/g、铜 1.0 mg/g、锰 2.5 mg/g、锌 1.5 mg/g、硒 0.03 mg/g。

表 2 试验饲料的营养水平

饲料种类	粗蛋白	粗脂肪	粗灰分	水分
A	16.49	9.37	23.75	6.56
B	15.93	8.86	25.54	6.35
C	16.01	8.92	25.64	6.54
D	14.96	10.00	26.90	6.10
E	15.23	9.40	25.77	6.35

1.2.4 体腔液的采集。分别在攻毒第 6 天和第 10 天采集刺参体腔液。每个水槽中随机抽取刺参,用滤纸吸去体表水分后,用无菌、预冷的手术剪从刺参腹部近口 1/3 处剪开腹腔,将体腔液接收到预冷的离心管中,于 4 000 r/min 离心 15 min,移出上清,分装到无菌 Eppendorf 离心管中冻存于 -20 °C 冰箱中。每头刺参取 0.5~1.0 ml 体腔液,将 3~4 头刺参的体腔液混合于 1 支离心管以消除个体差异。

1.2.5 免疫指标的测定。体腔液中酸性磷酸酶 (ACP) 的活性采用磷酸苯二钠法^[2]测定。碱性磷酸酶 (AKP) 的活性采用磷酸苯二钠法测定^[2]。超氧化物歧化酶 (SOD) 活性采用邻苯三酚自氧化法^[2]测定。过氧化氢酶 (CAT) 的活性采用比色法测定^[2]。溶菌酶 (LSZ) 活性的测定参照 Dan 等^[3]的

方法并加以修改:将溶壁微球菌用 PBS 缓冲液 (pH 6.4) 溶解,调整浓度使其在 570 nm 波长下吸光值 0.2~0.3。测定组每 300 μ l 菌液加入 5 μ l 样液,对照组以等体积 PBS 缓冲液代替样品。混合后在室温 (18 °C) 孵育 30 min,然后冰浴 1 h,测定波长 570 nm 处的吸光值。LSZ 活性单位定义:在 37 °C 以每毫升刺参体腔液样品每分钟使吸光度降低 0.001 为一个酶活力单位 (U)。

1.2.6 数据处理。数据处理与统计分析用 SPSS 17.0 统计分析软件进行,通过 ANOVA 单因子方差分析和 Duncan's 多重检验分析平均值、标准差和组间差异显著性。结果均以平均值 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 表示差异显著性。

2 结果与分析

2.1 复合益生菌对刺参免疫酶活性的影响 由表 3 可知,不同添加量的复合益生菌对刺参的 AKP 和 SOD 活性无显著性 ($P > 0.05$) 影响;与其它试验组和对照组相比,0.6% 的复合益生菌显著提高了刺参的 ACP 活性 ($P < 0.05$),0.4%、0.6% 和 0.8% 的复合益生菌显著提高了刺参 CAT 活性 ($P < 0.05$),而 0.6% 和 0.8% 的复合益生菌则显著提高了刺参 LSZ 活性。

表 3 复合益生菌对刺参免疫酶活性的影响

组别	ACP 活性//U/ml	AKP 活性//金氏单位/ml	CAT 活性//U/ml	LSZ 活性//U/ml	SOD 活性//U/ml
A	0.29 \pm 0.03a	0.31 \pm 0.07	3766.61 \pm 435.48b	44.44 \pm 13.31a	1937.15 \pm 465.63
B	0.26 \pm 0.01a	0.56 \pm 0.25	4452.90 \pm 353.55bc	44.38 \pm 1.57a	2647.43 \pm 456.59
C	0.24 \pm 0.01a	0.64 \pm 0.33	5572.06 \pm 252.35d	55.69 \pm 11.67ab	2260.00 \pm 273.95
D	0.32 \pm 0.07b	0.78 \pm 0.39	4865.64 \pm 403.22cd	64.66 \pm 10.32b	2970.29 \pm 461.00
E	0.23 \pm 0.02a	0.65 \pm 0.35	2680.87 \pm 721.19a	72.53 \pm 8.72b	2389.15 \pm 821.86

注:同列不同小写字母表示显著差异 ($P < 0.05$)。

2.2 复合益生菌在感染黄海希瓦氏菌前后对刺参免疫酶活性的影响

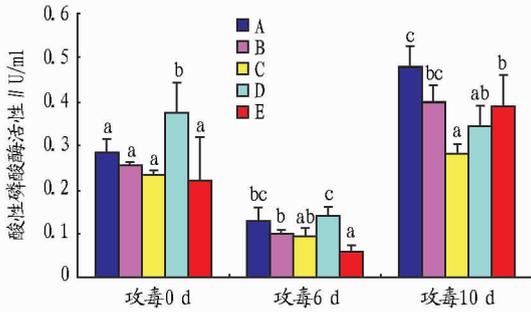
2.2.1 对刺参酸性磷酸酶 (ACP) 活性的影响。从图 1 可以看出,在攻毒前 (0 d),除 D 组的刺参 ACP 活性显著高于其他组外,其他组的 ACP 活性没有显著差异 ($P > 0.05$)。攻毒后各组 ACP 活性均呈现先下降后升高的趋势。攻毒 6 d 后, E 组 ACP 活性明显比对照组低 ($P < 0.05$)。攻毒 10 d 后, C、D、E 组 ACP 活性均极显著低于对照组 ($P < 0.01$)。

2.2.2 对刺参碱性磷酸酶 (AKP) 活性的影响。从图 2 可以看出,攻毒后的所有组的 AKP 活性均呈现增高趋势。在攻

毒前、攻毒 6 d 和攻毒 10 d 后, B、C、D、E 组 AKP 活性均有高于对照组,但组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2.3 对刺参超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响。从图 3 可以看出,在攻毒后各组的 SOD 活性随时间的延长呈降低的趋势。但在攻毒 6 d、10 d 后,各试验组的 SOD 活性的对照组没有显著差异 ($P > 0.05$),尽管前者较后者有降低的趋势。

2.2.4 对刺参过氧化氢酶 (CAT) 活性的影响。从图 4 可以看出,攻毒后各组刺参的 CAT 活性有随时间延长而提高的趋势。但攻毒前后, B、C、D 组 CAT 活性比对照组也有增高的趋势,但各组之间没有显著差异 ($P > 0.05$)。



注:同一时间不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图1 益生菌对刺参酸性磷酸酶(ACP)活性的影响

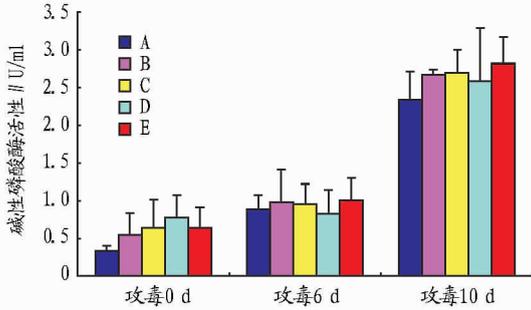


图2 益生菌对刺参碱性磷酸酶(AKP)活性的影响

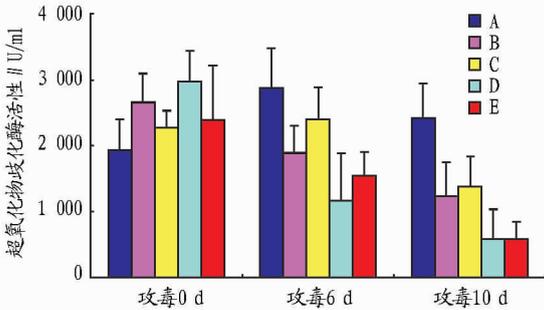


图3 益生菌对刺参超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

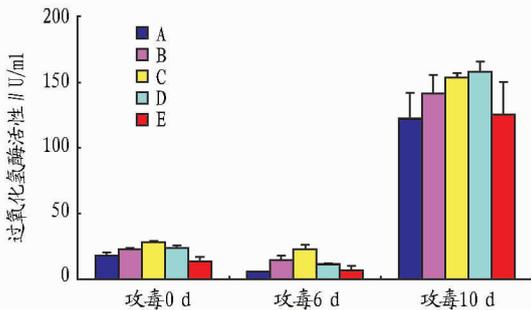
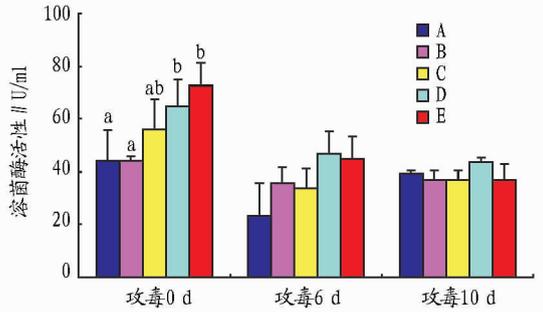


图4 益生菌对刺参过氧化氢酶(CAT)活性的影响

2.2.5 对刺参溶菌酶(LSZ)活性的影响。从图5可以看出,攻毒前各组LSZ活性随着益生菌添加量的增加而逐渐升高,其中D、E组LSZ活性显著高于A组($P < 0.05$)。攻毒6d后,各试验组的LSZ活性均比对照组增加,但组间差异不显著($P > 0.05$)。攻毒10d,各组的LSZ活性无显著差异($P > 0.05$)。

3 结论与讨论

该试验结果表明在基础饲料中添加复合益生菌可以提



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图5 益生菌对刺参溶菌酶(LSZ)活性的影响

高刺参的非特异性免疫能力,添加量以6 g/kg饲料为宜。该研究为这种复合益生菌制剂在水产养殖上的应用开辟了广阔的前景。

3.1 复合益生菌对刺参体腔液中免疫酶活性的影响 无脊椎动物的免疫系统并不健全,主要通过非特异性免疫反应提供抗感染能力^[4]。张艳婷^[5]发现在刺参饲料中添加灭活植物乳杆菌没有影响刺参的ACP的活性。该试验结果表明在刺参饲料中添加0.6%的复合益生菌显著提高了刺参体腔液的ACP活性,而其他添加量则对ACP活性没有显著影响。这可能与益生菌的种类以及添加量有关。

一些研究表明饲料中添加益生菌对水产动物的AKP活性的影响并不一致。袁丰华^[6]研究表明在饲料中添加 10^{10} CFU/kg凝结芽孢杆菌或 10^8 CFU/kg光合细菌对尖吻鲈血液中的AKP活性没有影响。张艳婷^[5]研究表明在饲料中添加高剂量的灭活乳杆菌能够提高刺参AKP的活性。该研究中添加复合益生菌没有显著增强刺参体腔液中AKP的活性。这表明益生菌对刺参等水产动物AKP的影响既与动物的种类有关,也与益生菌的添加量有关。

该试验中在饲料中添加复合益生菌对刺参体腔液中SOD活性没有显著影响。这与袁丰华^[6]在尖吻鲈以及张艳婷^[5]在刺参上的研究结果类似,而与王国霞等^[7]在凡纳滨对虾上的研究结果有所不同。这可能与益生菌的种类和添加量均有关,其具体原因有待进一步研究。

关于益生菌对水产动物过氧化氢酶(CAT)的影响鲜见报道。该试验中投喂复合益生菌组的刺参体腔液中过氧化氢酶活性与对照组没有显著差异。

大量研究表明,益生菌可以提高水生动物的溶菌酶水平^[5,8]。该研究中在刺参饲料中添加0.6%和0.8%的复合益生菌可以显著提高刺参体腔液中的LSZ活性,这与上述研究结果基本一致。

3.2 复合益生菌对希瓦氏菌攻毒的刺参体腔液中免疫酶活性的影响 “化皮病”是目前流行最严重的、常导致刺参大量死亡的疾病,而黄海希瓦氏菌是引起大连地区刺参化皮病的重要病原菌^[9],这也是该试验中采用希瓦氏菌对刺参攻毒的重要原因。

该试验中攻毒6d后,各组ACP活性均有所下降,添加
(下转第101页)

- [4] 徐桂平,王承香,田洪霞.食用昆虫的历史渊源与开发现状[J].潍坊高等职业教育,2012,8(1):62-64.
- [5] 梁大伟,朱萍,郑晓琼,等.黄粉虫酸奶的研制[J].山东食品发酵,2011(4):19-23.
- [6] 宋立,马勇,赵大军,等.黄粉虫蛋白营养饼干的工艺研究[J].粮油加工与食品机械,2005(5):75-76.
- [7] 彭燕,林华峰,岳霄霄,等.黄粉虫蛹蛋白面包的工艺配方研究[J].安徽农业大学学报,2013,40(5):790-794.
- [8] 陈荣,陈重光.浅析黄粉虫综合提取物的研究与应用[J].中国新技术新产品,2012(1):234-235.
- [9] 赵大军,马勇,吕长鑫,等.黄粉虫系列食品的开发应用研究[J].食品工业科技,2006,27(9):167-170.
- [10] 陈荣,陈彤彤.汉虾(黄粉虫)食品的研究[C]//第五届生物多样性保护与利用高新技术国际研讨会.暨昆虫保护,利用与产业化国际研讨会论文集.北京:中国生物多样性保护基金会,2005:179-182.
- [11] 王文亮,王鹏,祝清俊.超临界 CO₂ 萃取黄粉虫油脂的工艺研究[J].中国食物与营养,2010(7):48-50.
- [12] 张建新,张立佳,王临宾,等.黄粉虫油对高脂血症小鼠血脂水平及抗氧化能力的影响[J].食品科学,2011,32(5):263-266.
- [13] 王立新,乔兴柱,戴四发,等.黄粉虫幼虫抗真菌物质的诱导及其抗真菌活性研究[J].安徽农业科学,2008,36(34):15013-15015,15031.
- [14] 高妍.黄粉虫粪的营养价值分析[J].畜牧与兽医,2012,44(10):105-

106.

- [15] 刘利林,王帅,赵金香.黄粉虫粪常规营养成分分析及饲喂绵羊试验[J].饲料工业,2012,33(1):48-49.
- [16] 王金花,赵建国,王德化,等.日粮中添加黄粉虫粪对文昌鸡生长性能的影响[J].农技服务,2013,30(1):53-54.
- [17] 沈晓昆,姜哲,孙剑华,等.黄粉虫粪用处多[J].农业装备技术,2009,35(1):48-49.
- [18] 黄金丽.施肥处理对蔬菜营养品质及其产量影响的研究[D].泰安:山东农业大学,2001.
- [19] 刘怀如,杨兆芬,檀东飞,等.黄粉虫虫粪的肥效研究[J].泉州师范学院学报(自然科学版),2003,21(4):68-71.
- [20] 骆洪义,王虹,王琦.黄粉虫沙不同用量对油菜生长及品质的影响[J].山东农业科学,2011(8):75-78.
- [21] 叶榕村.黄粉虫粪代替麦麸栽培香菇试验[J].浙江食用菌,2008,16(4):34-35.
- [22] 蒙健宗,潘红平,韦珂.大麦虫沙栽培秀珍菇试验研究[J].中国食用菌,2011,30(3):32-33,47.
- [23] 孙彩云,刘淑.从叶片及虫沙中提取叶绿素的研究[J].唐山师范学院学报,2010,32(15):11-14.
- [24] 马群.不同发育阶段黄粉虫及虫沙蛋白质的利用效益评价[D].雅安:四川农业大学,2009.

(上接第96页)

0.8% 益生菌的处理组 ACP 活性比对照组低。在攻毒 10 d 后,ACP 活性恢复到攻毒前的水平,但添加高剂量益生菌组的刺参 ACP 水平也均比对照组显著降低。这表明高剂量益生菌会抑制刺参体腔液中 ACP 的活性。这与张艳婷^[5]的结果并不一致,其原因有待进一步探讨。

该试验中攻毒后刺参体腔液 AKP 活性也发生变化。攻毒后的所有组的 AKP 活性均呈现增高趋势。在攻毒前、攻毒 6 d 和攻毒 10 d 后,B、C、D、E 组 AKP 活性均有高于对照的组。刘洪展^[10]用假交替单胞菌感染仿刺参,在 5 d 内体腔液 AKP 活性逐渐降低,此后急剧上升,与该试验攻毒后的酶活性变化趋势相似。

该试验中在攻毒后各组的 SOD 活性随时间延长而呈降低的趋势。但在攻毒 6 d、10 d 后,各试验组的 SOD 活性较对照组没有显著差异,这与张艳婷^[5]的结果类似。张艳婷^[5]研究表明添加灭活植物乳杆菌对攻毒后的刺参 SOD 活性无影响。

该试验中人工感染黄海希瓦氏菌后,刺参体腔液 CAT 活性在第 6 天与攻毒前没有太大变化,而在第 10 天整体增强,且益生菌组有高于对照组的趋势。这说明致病细菌感染激发了刺参 CAT 的活性,且益生菌对刺参过氧化氢酶活性有促进作用。

该试验中投喂复合益生菌能显著刺参体腔液中 LSZ 的活力。攻毒 6 d、10 d 后,各试验组 LSZ 活性没有显著差异,且随着时间延长而呈降低的趋势。李明^[11]分别用梅奇酵母和芽孢杆菌投喂刺参,发现在第 3、4 周试验组的刺参体腔上清液溶菌酶活性显著高于对照组 ($P < 0.05$),与该试验结果

相似。在感染黄海希瓦氏菌后,溶菌酶活性较攻毒前整体下降。这说明体腔液中溶菌酶的活性比较容易受到致病细菌感染的抑制,免疫功能容易遭到破坏。攻毒 6 d 后,益生菌组的溶菌酶活性仍高于对照组,说明益生菌能够适当减少这种损害,使酶活性在相对较高的水平。刘洪展^[10]用假交替单胞菌感染仿刺参后,体腔液溶菌酶的活力在短暂升高后显著降低,与该试验结果相一致。

参考文献

- [1] 胡毅,谭北平,麦森森,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.
- [2] 桂远明.水产动物机能学实验[M].北京:中国农业出版社,2004.
- [3] DAN H, HAKAN S, TORGNY R, et al. Insect Immunity: Purification and Properties of Three Inducible Bactericidal Proteins from Hemolymph of Immunized Pupae of *Hyalophora cecropia*[J]. European journal of chemobiology, 1980, 106: 7-16.
- [4] SODERHALL K, CERENIUS L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity[J]. Current opinion in immunology, 1998, 10(1):23-28.
- [5] 张艳婷.热灭活乳酸杆菌(HKLP)对刺参(*Apostichopus japonicus*)生长性能、消化酶活性、免疫力以及人工感染灿烂弧菌后免疫反应的影响[D].大连:大连海洋大学,2012.
- [6] 袁丰华.饲喂益生菌对尖吻鲈生长、消化、免疫及血液生理生化影响的研究[D].湛江:广东海洋大学,2009.
- [7] 王国霞,黄燕华,周晔,等.乳酸菌对凡纳滨对虾生长性能、消化酶活性和非特异性免疫的影响[J].动物营养学报,2010,22(1):228-234.
- [8] 温俊.复合益生菌与酵母培养物对牙鲆(*Paralichthys solivaceus*)生长、免疫及抗病力的影响[D].青岛:中国海洋大学,2007.
- [9] LI H, QIAO G, LI Q, et al. Biological characteristics and pathogenicity of a highly pathogenic *Shewanella marisflavi* infected sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. J Fish Dis, 2010, 33: 865-877.
- [10] 刘洪展.养殖仿刺参对环境因子和病原的免疫应答及抗病分子机理[D].青岛:中国海洋大学,2012.
- [11] 李明.混合益生菌对刺参生长、免疫、消化和肠道菌群的影响[D].大连:大连海洋大学,2014.