

用于水产养殖的微生物制剂的研究和应用进展*

陈谦^{1,2} 张新雄^{3**} 赵海¹ 官家发^{1**}

(¹中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

(²中国科学院研究生院 北京 100049)

(³东莞市保得生物工程有限公司 广东东莞 523087)

摘要 随着人们对水产养殖可持续发展的需求不断提高,微生物制剂在其中的应用也越来越广泛.本文综述了近年来国内外应用于水产养殖中的各种微生物制剂的研究及应用情况.从提高水产动物生长性能、改善免疫特性和改善养殖环境等方面总结了微生物制剂中主要益生菌、益生元及合生素等在水产养殖中的应用.同时概述了微生物制剂的安全性问题.对微生物制剂的生产与应用中存在的问题进行了讨论,提出选育优良生产菌株、优化改良生产工艺并加强对水产动物自身肠道菌群、添加剂和环境之间的关系研究有利于促进微生物制剂的生产和应用.参73

关键词 微生物制剂; 益生菌; 益生元; 合生素; 生物安全性; 水产养殖

CLC S963.4

Advance in Research and Application of Microbial Ecological Agent in Aquaculture*

CHEN Qian^{1,2}, ZHANG Xinxiong^{3**}, ZHAO Hai¹ & GUAN Jiafa^{1**}

(¹Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

(²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(³Dongguan Baode Biological Engineering Co., Ltd., Dongguan 523087, Guangdong, China)

Abstract The microbial ecological agent (MEA) is widely applied in aquaculture as the rising demand of sustainable development. The recent study and application of MEA in aquaculture are reviewed. There are three kinds of MEA: Probiotics, prebiotics and synbiotics. Probiotics, which is the mixture of microbes and their products, are applied in aquaculture for disease control and partially replacing antibiotics. Prebiotic is a non-digestible food ingredient and can stimulate the growth of aquatic animals, limit the number of bacteria in host and improve the health of host in aquaculture. Synbiotic contains both probiotics and prebiotics, which will improve the survival and implantation of selected microorganisms and benefit the host in aquaculture. Their effects on increasing the growth of aquatic animals, improving their immune characteristics and ecological environment are summarized. The bio-safety of MEA is discussed and should be paid much attention. The issues in the production and application of MEA are also discussed, and the future researches on MEA are proposed, including strain breeding, process improvement and ecological relationship between the intestinal microorganisms of aquatic animals, additives and environment. Ref 73

Keywords microbial ecological agent; probiotics; prebiotics; synbiotics; bio-safety; aquaculture

CLC S963.4

随着世界经济的迅速发展,水产养殖业的规模不断扩大.然而高密度的养殖模式和养殖品种单一等现状导致养殖生态环境失调,各种病害频发,造成巨大的经济损失^[1].

同时,长期、大量使用抗生素等化学药物不仅使病原菌产生抗药性,引起内源性感染及二重感染,还破坏了水产动物消化道内正常菌群生态环境,使其产生免疫抑制作用,抗生素在水产动物体内的积累对人类健康也是一种潜在威胁^[2].因此,水产养殖业必须走可持续发展道路.微生物制剂(Microbial ecological agent, MEA)是从天然环境中筛选出来的有益微生物菌种,经过培养后制成的活菌菌剂.广义上的微生物菌剂应包括细菌、真菌、藻类及其代谢产物在内,可改善动物肠道环境和水体环境的微生态平衡,增强动物

收稿日期: 2012-02-23 接受日期: 2012-03-09

*国家科技支撑项目(No. 2011BAD22B03)和东莞保得生物工程有限公司资助项目 Supported by the National Key Technology Research & Development Program of China and the Funds from Dongguan Baode Biological Engineering Co., Ltd., Guangdong, China

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhxxty168@126.com; guanjf00@cib.ac.cn)

的免疫防御能力,抑制病原菌生长的生物制剂^[3]。目前国际上已将微生态制剂分成3个类型,即益生菌(Probitics)、益生元(Prebitics)和合生素(Synbitics)。益生菌又称益生素,或活菌制剂;益生元是一类能够选择性地促进宿主肠道微生态平衡,促进机体健康的物质,如低聚糖类;合生素是指益生菌和益生元同时并存的制剂^[4]。近年来,微生态制剂在世界水产养殖业已得到广泛应用,创造了巨大的经济和环境效益,并受到越来越广泛的关注。本文对近年来各类微生态制剂及其功能以及微生态制剂在水产养殖中的作用等研究进行了综述。

1 水产养殖中主要益生菌及其对水产养殖的影响

我国农业部于1994年、1999年、2003年3次公布了可以直接在动物饲料中添加的微生物种类,2003年农业部第318号公告《饲料添加剂品种目录》中,允许使用的微生物有15种:地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、乳酸肠球菌(*Enterococcus lactis*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、乳酸乳杆菌(*Lactobacillus lactis*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、产朊假丝酵母(*Candida utilis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudanonas palustris*)。

1.1 光合细菌

光合细菌(Photosynthetic bacteria)是一群生理上不同的细菌,主要是水生细菌,革兰氏阴性,有硫颗粒,其细胞呈球状、杆状、弧状或者螺旋状。所有光合细菌均含有菌叶绿素和类胡萝卜素。这类菌的光合作用可在厌氧环境下进行,不产生氧;至今研究过的菌株都含有细胞色素、泛醌和铁氧化还原型的非血红素铁蛋白质,所有菌群的代表菌系都可以固定分子氮。光合细菌包括3个科:着色菌科(Chromatiaceae)、红螺菌科(Rhodospirillaceae)和绿菌科(Chlorobacteriaceae),共18个属^[5]。

光合细菌所含营养丰富,蛋白质含量达60%以上,同时还含有辅酶Q、维生素B、叶酸等,这些物质提高了水生生物的免疫能力,促进了水生生物的生长,并改善了水质。1998年,经农业部批准,光合细菌可作为新型微生物饲料添加剂使用。

郑东等通过全池泼撒或饲料添加的方式利用光合菌,在无棣县水产养殖公司进行实验,结果表明对照池平均亩产

对虾35.82 kg,推广池平均亩产对虾40.74 kg,增长了4.92 kg,取得了较好的经济效益;同时,添加光合细菌的水池水质得到改善,溶解氧升高,氨氮浓度下降,水色黄绿,增加了生产力^[6]。

Wang等人将鲤鱼塘中分离到的光合细菌和芽孢杆菌的混合物投加到虾池,28 d后发现3个不同浓度投加组明显增产,但3组增产没有明显区别;各种消化酶的活性,比如蛋白酶活性、淀粉酶活性、纤维素酶活性都比对照有较大提高,增产可能与各种消化酶酶活的提高有关^[7]。

黄钧、韦勇刚等人在鳊鱼饲料中添加5%的红螺菌科光合细菌,试验结果发现,鳊鱼平均体重增加9.31%,且饲料平均成本降低8.55%,与前人在草鱼、罗非鱼中的试验结果一致^[8]。

1.2 芽孢杆菌

芽孢杆菌(*Bacillus*)为革兰氏阳性菌,菌体杆状,多数运动,产芽孢,其中有几个种能产肽类抗生素^[9]。芽孢杆菌的这些特点决定了其可以作为益生菌被人类所利用。我国农业部公告可直接用于饲喂动物的15种益生菌中包含地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌^[10]。

Wang等人发现在投加了益生菌的养虾试验池中,某些益生菌,如芽孢杆菌、氨化细菌、光合细菌等数量有明显增加,致病弧菌数量比对照减少了近80%;同时,池塘中氮和磷的浓度降低,溶氧量增加,河虾明显增产^[11]。

丁贤等发现芽孢杆菌作为饲料添加剂可以提高凡纳对虾的消化酶活性和成活率,但是消化酶活性随活菌量的增加上升到一定程度时,便维持在一定水平,即菌量的添加对消化酶活性的提高是有一定限度的^[12],这一结果与Wang的发现相同。李卓佳运用BIOLOG方法还发现芽孢杆菌可以通过改善微生物群落结构来改善水质,从而提高虾的产量^[13]。

Aly等发现,枯草芽孢杆菌还可以抑制荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)的生长^[14],而此类菌会导致鱼类患细菌性鱼病,造成内脏败血性坏死而死亡^[15]。

张新雄等在专利CN201010615952、CN200710029252、CN201010615629和CN201010616015中,利用经过安全性毒性检测的侧孢芽孢杆菌WY9701和地衣芽孢杆菌生产水产型系列产品水产清道夫、强效利水素、生物肥水剂等,在水产养殖业上应用广泛,获得了良好经济和环境效益。

1.3 乳杆菌

乳杆菌(*Lactobacillus*)是不产芽孢的革兰氏阳性杆状细菌,很少有致病菌^[16],代谢产物主要是乳酸,其次是一些挥发性脂肪酸,可以降低肠道pH值从而抑制其它致病菌的生长繁殖^[17],是消化道中的常驻菌群。此类菌已被证实临床上能够预防和治疗人和动物的某些肠道疾病^[18]。

Suzer等发现当使用含有4种乳杆菌的商业益生菌剂和

饲料混合在一起投加时,对幼鱼影响较大,无论是各种消化酶的酶活性还是鱼的存活率、比生长速率都有显著的升高。但是,直接将益生菌剂投加到水中则没有效果^[19]。

Subhash等发现,将嗜酸乳杆菌和藻类毛壳色菌素钙三醇以1:1比例混合后投加,合浦珠母贝(*Pinctada fucata spat*)重量比只加了藻类毛壳色菌素钙三醇的对照提高了16.9%,背腹的长度提高了37.6%^[20]。链球菌病是农业部公告第1125号发布《一、二、三类动物疫病病种名录》中的三类疫病,该病将导致鱼类眼睛突出、内脏点状出血甚至死亡^[21]。Aly等在养殖尼罗罗非鱼时发现,嗜酸乳杆菌可以抑制链球菌的生长;同时,他们还发现,将枯草芽孢杆菌和嗜酸乳杆菌混合喂养罗非鱼后,该鱼体内的血清杀菌活性和体重大大提高^[14]。

刚出生的小鱼肠道菌群较少,投喂益生菌可改变肠道内优势菌群,形成良好的肠内环境^[22]。Ringø等的研究表明,在幼鱼时是否投喂乳酸菌,将会对乳酸菌的定殖有重要影响^[23]。

1.4 双歧杆菌

双歧杆菌(*Bifidobacteria*)属于放线菌目,是一类外观变化很大的杆状体细菌,它不产生孢子,不运动,厌氧,呈革兰氏阳性^[24]。双歧杆菌能有效发酵碳水化合物,主要产物为乳酸和乙酸。双歧杆菌是肠道内常住益生菌群之一,其中能用于制备生态制剂的双歧杆菌主要有两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)、青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)、婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*)、短双歧杆菌(*Bifidobacterium brevel*)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)^[25],其中两歧双歧杆菌在我国农业部公告的动物饲料添加剂品种目录之中。桂远明等的研究表明双歧杆菌制剂可以抑制病原菌生长,并减少内毒素进入鱼体内,对鲤鱼爆发型肝炎的治疗具有良好效果^[26]。

1.5 硝化细菌

硝化细菌(Nitrifying bacteria)是利用氨氮或亚硝酸盐作为氮源,从氨氧化过程中获得能量,CO₂作为碳源的化能自养菌,细胞形态多样,无芽孢,革兰氏阴性,专性好氧^[27]。一般来说,亚硝酸盐和氨氮会破坏水质,对水产养殖动植物产生毒害作用,是引起水产动植物病害的原因之一。而硝化细菌则可以氧化氨氮和亚硝酸盐为硝酸盐,形成可以被吸收的营养物质。

李长玲等研究发现,当投加硝化细菌浓度为100 cfu/L时,罗非鱼鱼苗养殖水环境中氨氮浓度降低25.05%,亚硝酸氮降低45.16%,COD降低12.33%,养殖水质得到改善,鱼苗体长增加了22.18%,体重增长了46.15%,幼鱼碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)活力、过氧化物酶(Peroxidase, POD)活力以及超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活力都有明显提高^[28]。碱性磷酸酶、过氧化物

酶、超氧化物歧化酶是水产动物代谢过程中参与调控的重要酶类,酶活力的高低可以表征上述鱼类免疫功能和抗病能力的强弱^[29]。

硝化菌是自养菌,生长缓慢,养殖时的频繁换水极易将其洗脱出系统,损害了它的潜在功能,Shan等发现经固定化的硝化细菌对去除对虾养殖废水中的氨氮效果较好^[30]。

1.6 酵母菌

酵母菌(Yeast)一般泛指一类能发酵糖类的各种单细胞真菌,它的细胞直径比细菌大得多,且形态多样,可以进行有性和无性生殖^[31]。酵母菌含有丰富的蛋白质和维生素,是水产饲料的优良添加剂^[32-33]。有的酵母菌还有净化水质的作用,谢航和邱宏瑞从海水中分离到一株具有高效降解养殖水体氨氮功能的假丝酵母菌,试验结果表明,当养殖水体氨氮浓度≤20 mg/L, pH值6~7, 温度25~30 ℃, 盐浓度0~1%, 溶氧2 mg/L以上时,氨氮降解率近80%^[34]。

2 水产养殖中主要益生元及其对水产养殖的影响

益生元(Prebiotics)被定义为一类由一些益生菌代谢所产生的不可消化的物质,它会引起肠道菌群微生物的变化^[35]。

2.1 低聚糖

低聚糖是由2~10个单糖通过糖苷键连接形成的直链或支链的一类寡糖。其中,功能性低聚糖不能被宿主直接吸收,但可特异性地增殖优势种群微生物,如双歧杆菌、乳酸菌等,同时也可抑制有害菌,提高机体免疫能力。这类寡糖包括果寡糖(Fructooligosaccharide, FOS)、甘露寡糖(Mannan oligosaccharides, MOS)、木寡糖(Xylo-oligosaccharide, XOS)和壳寡糖(Chitosan oligosaccharide, COS)等^[36-37]。据日本报道,实验研究已证明双歧杆菌活菌制剂中加入低聚糖后,其效果比对照提高10~100倍。

王艳等的研究表明,果寡糖在基础饲料中的添加浓度为1 g/kg时可以显著提高银鲫的非特异性免疫能力,表现为血清溶菌酶活力、白细胞吞噬活性、血清SOD酶活性和补体C3的含量显著高于对照组,且果寡糖只有在合适的用量范围内,才能产生正效果^[38]。卢明森等在对草鱼的投喂实验中也得到与王艳的类似结果^[39]。

蔡雪峰等在虹鳟饲料中添加壳寡糖后发现虹鳟肠道内的优势菌群发生了明显的变化,可利用壳寡糖作为唯一碳源的菌群增加了,但多样性有所降低。这与Holben和Trust等对鲑鱼的研究结果类似。菌群组成不但与养殖环境有关,还与寡糖的浓度有关,且抗感染实验结果表明,壳寡糖能够提高虹鳟幼鱼抗嗜水气单胞菌感染的能力^[40-42]。孙立威等对罗非鱼的研究结果与上述一致,他还发现添加质量分数0.50%壳寡糖时,幼鱼的增重率比对照提高了近30%^[43]。

除此以外,甘露寡糖、木寡糖也可显著提高鱼虾生长性能,改善肠道功能,提高营养物质消化率和机体非特异性免疫功能^[44~45]。但是,黄燕华等对凡纳滨对虾的研究却表明,添加低聚木糖对对虾增质量率和特定生长率均无显著影响,虽然能够一定程度地增加对虾消化道中的蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶的活性,但效果不明显,杨小林等的研究结果^[46~47]与之类似。

2.2 多糖

微生物非抗生素活性物质主要有脂多糖、肽聚糖、葡聚糖、真菌多糖等,这类复合糖化物可诱导水产动物提高自身免疫力,抵抗外侵^[48~49]。

康洁将提取纯化的大肠杆菌细胞壁脂多糖注射于草鱼体内,结果表明脂多糖能够引起受试鱼血液中白细胞的数量显著增加,提高了机体免疫能力^[50]。简纪常等利用弧菌脂多糖免疫石斑鱼后发现,脂多糖可刺激鱼体产生免疫应答,还可提高石斑鱼血清效价、POD及SOD活性,从而提高其免疫保护能力^[51]。Solem认为脂多糖可促进大西洋鲑(*Atlantic salmon*)巨噬细胞的分裂,从而提高机体抗感染能力^[52]。

王秀华等在6 hm²对虾养殖池进行肽聚糖抗病实验中试,发现肽聚糖增强了虾体的抗病能力,投喂组虾池的发病率为0~40%,而未投喂肽聚糖的虾池发病率高达80%~100%^[48]。宋晓玲等将双歧杆菌肽聚糖注射于日本对虾和牙鲆体内,发现肽聚糖可显著提高血清酚氧化酶及溶菌酶活性,可用于提高水产动物的非特异性免疫^[53]。

陈云波等在饲料中添加 β -葡聚糖投喂30 d后,发现南美白对虾的存活率有明显提高,体长没有显著影响^[54]。阳会军等在添加葡聚糖投喂斑节虾的实验中也有相似结果^[55]。

另外,许多研究均表明壳聚糖可以显著提高水产动物体内的溶菌酶活性和存活率,提高水生动物的非特异免疫能力^[56~59]。此外,虫草多糖作为一种胞外糖蛋白,对水产动物也有明显的免疫增强作用和调节作用^[60]。

3 抗菌肽

抗菌肽是具有抗菌活性的多肽,具有广谱杀菌作用,在水产养殖上具有较大的应用潜力。

王广军等发现,在饲料中添加抗菌蛋白后,南美对虾的生长速度、增重率、成活率和抗病力都优于对照组^[61]。黄沧海等在对罗非鱼的研究中发现,抗菌肽“中肽宝”在促进水动物生长和抗菌能力方面与抗生素“黄霉素”具有相同的效果^[62]。而黄自然的研究发现,投喂抗菌肽养殖对虾时收获率比投喂金霉素时效果更佳^[63]。因此,抗菌肽很有可能取代抗生素成为新型饲料添加剂。杨斌指出通过对用于水产动物的各种抗菌肽的筛选、结构和功能的研究,再经基因工程进行表达,可望实现抗菌肽的批量生产和应用^[64]。

4 水产养殖中主要合生素及其对水产养殖的影响

合生素(Synbiotics)又称合生元,是指益生菌(Probiotics)与益生元(Prebiotics)联合使用的生物制剂,其特点是可以同时发挥益生菌和益生元的作用^[65]。

肖世玖等利用3种合生素投喂团头鲂,结果表明,由低聚木糖和芽孢杆菌配制的合生素能提高团头鲂的生产性能约44.94%,改善血清抗氧化能力,还能改善肠道形态和其中微生物生态^[65]。温俊等发现,添加合生素可显著降低草鱼肠道弧菌总数,提高枯草芽孢杆菌总数,并提高草鱼的生长性能^[66]。王玲等研究表明,添加0.1%的含有枯草芽孢杆菌的合生素可显著提高罗非鱼的增重率,并降低饲料成本^[67]。刘波等研究发现0.01%低聚木糖和0.01%地衣芽孢杆菌配伍饲喂异育银鲫效果较好^[68]。

5 微生态制剂的安全性问题

随着水产养殖业的迅速发展,微生态制剂由于能够改善养殖环境,提高水产动物的免疫力而得到广泛运用^[69]。中国农业部制定了饲料添加剂品种目录,规定了多种可用于投喂的微生物种类。美国食品药品监督管理局(FDA)和美国饲料公定协会(AAFCO)也公布了40余种可用于饲料投喂的安全微生物^[70]。但是随着基因工程菌株或基因工程多肽等越来越多地运用于水产养殖中,其潜在威胁和安全性问题必须得到广泛关注和重视^[71]。有的益生菌的抗药因子可通过基因的转移作用使肠道中菌群产生耐药性。因此,需要加强基因工程相关基础研究的管理,完善和制定相关法律法规,建立公平有效的评价机制,保证水产微生态制剂的高效性和安全性^[72]。

6 存在问题及展望

目前用于微生态制剂的益生菌种主要有光合细菌、芽孢杆菌、乳杆菌、双歧杆菌、硝化细菌等。这些微生物可以单独使用,也可以联合使用。它们当中有些菌种不产芽孢,有些芽孢菌孢子形成率不高甚至有时不形成孢子,有些菌种生长缓慢,有些菌种培养条件苛刻,有些菌种培养过程出现“自溶”现象,有些菌种存在活菌计数问题,如此等等,给活菌制剂的加工、保存、运输和使用造成问题,阻碍了微生态制剂的生产和应用。因此,需要选育优良生产菌株,进一步优化改良生产工艺。此外在进行微生态制剂研究时,还需要结合水产动物自身肠道菌群、添加剂和环境之间的关系进行研究^[73]。

微生态制剂无毒副作用、无污染,可改善水质,可提高水产养殖动物的生产率和免疫能力,减少病害发生,具有良好的社会效益和经济效益,在水产养殖业中具有很好的发展前景。

References

- 1 Chen YQ (陈永青), Lin L (林亮), Yang YY (杨莺莺), Yang K (杨铿), Li ZJ (李卓佳), Lin XT (林小涛). Application of microbial preparation in aquaculture. *Ecol Sci* (生态科学), 2005, **24** (1): 80~83
- 2 Wang YM (王亚敏), Wang YG (王印庚). Advance in the mechanisms and application of microecologies in aquaculture. *Prog Veter Med* (动物医学进展), 2008, **29** (6): 72~75
- 3 Sun ZM (孙志明), Luan HN (栾会妮), Yao WZ (姚维志). 微生态制剂在水产养殖中的作用. *Reservoir Fish* (水利渔业), 2004, **24** (1): 1~3
- 4 Zhao ZF (赵宗蕃). Application and prospect of micro ecological preparation. *J NW Univ Nat Sci Ed* (西北民族大学学报自然科学版), 2003, **24** (4): 62~66
- 5 Buchanan RE, Gibbens NE. 伯杰氏细菌鉴定手册. 8th Ed. Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 1984. 16
- 6 Zheng D (郑东), Wang AZ (王爱珍), Li WB (李文波), Wu YF (吴云芳), Xu GJ (许高君). 光合细菌在对虾养殖中的大面积推广应用. *Mar Sci Bull* (海洋通报), 1994, **13** (5): 93~96
- 7 Wang YB. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2007, **269**: 259~264
- 8 Huang J (黄钧), Wei YG (韦勇刚), Zhou Y (周毅), Ke YE (柯永恩), Li ZW (李志文). 在饲料中添加光合细菌饲养月鳃鱼种的初步试验. *Guangxi J Anim Husbandry Vet Med* (广西畜牧兽医), 2000, **16** (1): 17~18
- 9 Buchanan RE, Gibbens NE. 伯杰氏细菌鉴定手册. 8th Ed. Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 1984. 729~730
- 10 Ministry of Agriculture of China (中华人民共和国农业部). 饲料添加剂品种目录. 农业部公告第318号
- 11 Wang YB, Xu ZR, Xia MS. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. *Fish Sci*, 2005, **71** (5): 1036~1041
- 12 Ding X (丁贤), Li ZJ (李卓佳), Chen YQ (陈永青), Lin HZ (林黑着), Yang YY (杨莺莺), Yang K (杨铿). Effects of probiotics on growth and activities of digestive enzymes of *Penaeus vannamei*. *J Fish Sci China* (中国水产科学), 2004, **11** (6): 580~583
- 13 Li ZJ (李卓佳), Lin L (林亮), Yang YY (杨莺莺), Lin XT (林小涛). Influence of bacillus on the microbial communities in shrimp ponds. *J Agro-Environ Sci* (农业环境科学学报), 2007, **26** (3): 1183~1189
- 14 Aly SM, Ahmed YG, Ghareeb AA, Mohamed MF. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infection. *Fish & Shellfish Immunol*, 2008, **25**: 128~136
- 15 Deng XW (邓显文), Xie ZX (谢芝勋), Liu JB (刘加波), Xie ZQ (谢志勤), Xie LJ (谢丽基), Pang YS (庞耀珊). Isolation and identification of *Pseudomonas fluorescens* in tilapia. *Guangxi Agric Sci* (广西农业科学), 2010, **41** (6): 612~614
- 16 Buchanan RE, Gibbens NE. 伯杰氏细菌鉴定手册. 8th Ed. Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 1984. 797
- 17 Chai J (柴俊), Que CX (御翠仙), Zhang YF (张以芳). 乳酸杆菌主要代谢产物种类及其特性. *Sci & Technol Food Ind* (食品工业科技), 2007, **28** (8): 257~264
- 18 Huang QS (黄庆生), Wang JQ (王加启). Probable mechanism and application of probiotic lactic acid bacteria. *Acta Zoo Sin* (动物营养学报), 2002, **14** (4): 12~17
- 19 Suzer C, Çoban D, Kamaci HO, Saka Ş, Firat K, Otcuoglu Ö, Suzer HK. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 2008, **280**: 140~145
- 20 Subhash SK, Lipton AP, Raj RP. Influence of probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* on the survival and growth of pearl oyster *Pinctada fucata* spat. *Fish*, 2007, **54** (2): 211~216
- 21 Feng DY (冯东岳). 罗非鱼链球菌病研究概况. *J Aquacult* (水产养殖), 2010 (11): 43~44
- 22 Pan XD (潘晓东), Wu TX (吴天星), Chen B (陈斌). Research progress on intestinal adhesion of probiotics in aquatic animals. *Fish Sci* (水产科学), 2005, **24** (11): 53~54
- 23 Ringø E. Does *Carnobacterium divergens* isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., colonize the gut of early developing turbot, *Scophthalmus maximus* L., larvae? *Aqua Res*, 1999, **30** (3): 229~232
- 24 Buchanan RE, Gibbens NE. 伯杰氏细菌鉴定手册. 8th Ed. Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 1984. 926
- 25 Requena T, Burton J, Matsuki T, Munro K, Simon MA, Tanaka R, Watanabe K, Tannock GW. Identification, detection, and enumeration of human bifidobacterium species by PCR targeting the Transaldolase gene. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (5): 2420~2427
- 26 GuiYM (桂远明), Wu Y (吴垠). 复方回春生对鲤爆发性肝炎治疗效果的初步研究报告. *Chin J Microecol* (中国微生态学杂志), 1992, **4** (2): 47~50
- 27 Buchanan RE, Gibbens NE. 伯杰氏细菌鉴定手册. 8th Ed. Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 1984. 622~623
- 28 Li CL (李长玲), Huang XH (黄翔鹤), Li RW (李瑞伟), Ou QH (区启鸿). Effects of nitrifying bacteria on culture environment and anti-disease ability of larval tilapia. *J Guangdong Ocean Univ* (广东海洋大学学报), 2008, **28** (6): 41~45
- 29 Zhang H (张辉), Zhang HL (张海莲). 碱性磷酸酶在水产动物中的作用. *Hebei Fish* (河北渔业), 2003 (5): 12~14
- 30 Shan H, Obbard JP. Ammonia removal from prawn aquaculture water

- using immobilized nitrifying bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 791~798
- 31 Zhou DQ (周德庆). 微生物学教程. 2nd Ed. Beijing: Higher Education Press (北京: 高等教育出版社), 2002. 47~48
 - 32 Wu XM (吴新民), Yang JX (杨金晓), Fan KH (范葵红). 酵母菌在对虾饵料中的应用. *Feed Res* (饲料研究), 1998 (10): 4~5
 - 33 Liu LH (刘立鹤), Yao J (姚娟), Li B (李彪), Cai XM (蔡学敏), Huang YX (黄炎鑫), Yang ZL (杨志龙). 酵母源生物饲料在水产养殖中的应用. *Anim Sci Abroad - Pigs & Poultry* (国外畜牧学 - 猪与禽), 2011, **31** (2): 98~100
 - 34 Xie H (谢航), Qiu HR (邱宏瑞), Lin J (林娟), Chen CY (陈朝洋). Characteristics of degrading NH₃-N in the fishery water by *Candida* sp. *Trans CSAE* (农业工程学报). 2005, **21** (8): 142~145
 - 35 Gibson GR, Probert, HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev*, 2004, **17**: 259~275
 - 36 Zheng JX (郑建仙), Geng LP (耿丽萍). 功能性低聚糖析论. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 1997, **23** (1): 39~46
 - 37 Ma YS (马原松). Research development and exploitation of oligosaccharide. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2006, **34** (16): 3886~3888
 - 38 Wang Y (王艳), Wu ZX (吴志新), Pang SF (庞素凤), Zhu DM (祝东梅), Feng X (冯雪), Chen XX (陈孝煊). Effect of fructooligosaccharides on non-specific immune function in *Carassius auratus*. *Acta Hydrobiol Sin* (水生生物学报), 2008, **32** (4): 488~492
 - 39 Lu MM (卢明森), Chen XX (陈孝煊), Wu ZX (吴志新), Yi CL (易春龙), Li XZ (李雪竹). Effect of fructooligosaccharides on non-specific immunity of *Ctenopharyngodon idellus*. *J Huazhong Agric Univ* (华中农业大学学报), 2010, **29** (2): 213~216
 - 40 Holben WE, Williams P, Saarinen M, Särkilahti LK, Apajalahti JA. Phylogeatic analysis of intestinal microflora indicates a novel mycoplasma phylotype in fanned and wild salmon. *Microbial Ecol*, 2002, **44** (2): 175~185
 - 41 Trust TJ, Sparrow RH. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonoid fishes. *Can J Microbiol*, 1974, **20** (9): 1219~1228
 - 42 Cai XF (蔡雪峰), Luo L (罗琳), Zhan WB (战文斌), Cao HN (曹海宁), Gao P (高鹏). Effects of chitooligosaccharides on intestinal bacterial flora of juvenile rainbow trout. *Periodical Ocean Univ China* (中国海洋大学学报), 2006, **36** (4): 606~610
 - 43 Sun LW (孙立威), Wen H (文华), Jiang M (蒋明), Wu F (吴凡), Liu W (刘伟), Tian J (田娟), Zhong WW (仲维玮), Zhang MM (张明明). Effect of dietary chitosan on growth performance, non-specific immunity and hematological parameters of juvenile GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J Guangdong Ocean Univ* (广东海洋大学学报), 2001, **31** (3): 43~48
 - 44 Liu AJ (刘爱君), Leng XJ (冷向军), Li XQ (李小勤), Wang LP (汪立平), Wan F (万虎). Effect of mannan oligosaccharides on growth performance, intestinal structure and nonspecific immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *J Zhejiang Univ Agric & Life Sci* (浙江大学学报农业与生命科学版), 2009, **35** (3): 329~336
 - 45 Pang LJ (庞丽姣), Wu ZX (吴志新), Xiong J (熊娟), Zhang P (张朋), Yu JM (余剑敏), Qu Y (曲艺), He CJ (何超军), Yang L (杨丽), Chen XX (陈孝煊). Effects of xylooligosaccharides on non-specific immune function of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Chin J Anim Nutr* (动物营养学报), 2010, **22** (6): 1687~1693
 - 46 Huang YH (黄燕华), Wang GX (王国霞), Liu XH (刘襄河), Zhou Y (周晔), Huang WQ (黄文庆). Effects of xylooligosaccharide on growth and activity of digestive enzyme in *Litopenaeus vannamei*. *J S China Agric Univ* (华南农业大学学报), 2010, **33** (3): 61~64
 - 47 Yang XL (杨小林), Qiu CB (邱春保). 酵母细胞壁、木寡糖及黄霉素对草鱼生长性能的影响. *Feed Res* (饲料研究), 2010 (5): 69~70
 - 48 Wang XH (王秀华), Huang J (黄健), Song XL (宋晓玲). The application of immunostimulants-Peptidoglycan to the culture of shrimp. *Marin Fish Res* (海洋水产研究), 2003, **24** (1): 69~74
 - 49 Sun CC (孙翠慈), Wang AL (王安利), Wang SF (王素芬), Zhang HT (张海涛), Hu JR (胡俊荣). Effects of polysaccharides on aquatic animals immune. *Mar Sci Bull* (海洋通报), 2003, **22** (3): 81~88
 - 50 Kang J (康洁). 大肠杆菌脂多糖对草鱼的免疫调节作用. *Jiangsu Agric Sci* (江苏农业科学), 2011, **39** (3): 295~297
 - 51 Jian JC (简纪常), Ye JM (叶剑敏), Wu ZH (吴灶和). Influence of lipopolysaccharide from *Vibrio alginolyticus* on immunological function of *Epinephelus skaara*. *Acta Hydrobiol Sin* (水生生物学报), 2004, **28** (1): 103~105
 - 52 Solem ST, Jørgensen JB, Robertsen B. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunol*, 1995, **5** (7): 475~491
 - 53 Song XL (宋晓玲), Yang XT (杨绪彤), Cai HW (偲瀚文), Wang XH (王秀华), Zhou J (周进), Chen GF (陈国福). Peptidoglycan isolation from *Bifidobacterium thermophilum* and its effect on immuno-enzymetic activity of *Penaus japonicus* and *Paralichthys olivaceus*. *J Fish China* (水产学报), 2005, **29** (3): 350~355
 - 54 Chen YB (陈云波), Zhou HQ (周洪琪), Hua XM (华雪铭), Huang XX (黄旭雄), Cai SL (蔡生力). 饲料中添加β-葡聚糖对南美白对虾的生长、存活及饲料系数的影响. *Freshwater Fish* (淡水渔业), 2002, **32** (5): 55~56
 - 55 Yang HJ (阳会军), Tan BP (谭北平), Fang HY (方怀义). 饲料中添加不同水平β-葡聚糖对斑节对虾生长、存活及其抗病力的影响. *Feed*

- Ind Mag* (饲料工业), 2001, **22** (9): 18~19
- 56 Wang SH, Chen JC. The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunol*, 2005, **19**: 191~204
- 57 Ayyaru G, Venkatesan A. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, 2006, **255**: 179~187
- 58 Hua XM (华雪铭), Zhou HQ (周洪琪), Zhang DQ (张冬青), Li NL (李宁丽). Effect of dietary chitosan and probiotics on disease resistance and immunity of obscure puffer (*Fugu obscurus*). *J Fish China* (水产学报), 2007, **31** (4): 115~160
- 59 Chang Q (常青), Liang MQ (梁萌青), Wang JL (王家林), Sun J (孙静). Influence of chitosan on the growth and non-specific immunity of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *Mar Fish Res* (海洋水产研究), 2006, **27** (5): 17~22
- 60 Chang MX (昌鸣先), Chen XX (陈孝煊), Wu ZX (吴志新), Hu XQ (胡先勤). The effect of cordyceps polysaccharide on macrobrachium nipponense immune function. *J Huazhong Agric Univ* (华中农业大学学报), 2001, **20** (3): 275~278
- 61 Wang GJ (王广军), Xie J (谢骏), Yu DG (余德光). 抗菌蛋白在南美对虾养殖中的应用试验. *Feed Ind Mag* (饲料工业), 2005, **26** (8): 33~34
- 62 Huang CH (黄沧海), Li B (李波), Wang DD (王冬冬), Liu M (刘明), Zhu FM (祝发明), Qiao SY (谯仕彦). 抗菌肽对罗非鱼幼鱼生长性能的影响. *营养饲料*, 2009, **45** (23): 53~56
- 63 Huang ZR (黄自然), Huang GQ (黄国庆), Zhang JJ (张敬炬), Huang YT (黄永彤). 新型饲料添加剂抗菌肽养殖对虾的效果. *Guangdong Sericult* (广东蚕业), 2006, **40** (3): 23~25
- 64 Yang R (杨绒), Chen SL (陈松林). Recent advances in antimicrobial peptide from aquatic animals. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2005, (2): 1~5
- 65 Xiao SJ (肖世玖), Chen YN (陈雁南), Sun YN (孙亚楠), Wang K (王恬), Liu WB (刘文斌), Zhou YM (周岩民). Effects of dietary synbiotics on performance, serum antioxidation, intestinal microflora and morphology of *Megalobrama amblycephala*. *J Chin Cereals & Oils Assoc* (中国粮油学报), 2010, **25** (5): 73~77
- 66 Wen J (温俊). 合生素对草鱼肠道菌群及生长性能的影响. *Feed Res* (饲料研究), 2009 (4): 62~63
- 67 Wang L (王玲), Gu WH (顾卫华), Zhang CX (张春晓), Wen J (温俊). 合生素对罗非鱼生长性能的影响. *Feed Res* (饲料研究), 2009 (11): 63~65
- 68 Liu B (刘波). Effects of probiotics on digestive enzyme activities, intestinal microflora and performance of allogynogenetic crucian carp: [Master Degree Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University (南京: 南京农业大学), 2004
- 69 Li HB (李海兵), Song XL (宋晓玲), Li Y (李赞), Wei S (韦嵩). Progress on probiotic bacteria in aquaculture. *Prog Vet Med* (动物医学进展), 2008, **29** (5): 94~99
- 70 Zhang RJ (张日俊). 微生物饲料添加剂的科学使用. *Anim Husbandry & Feed Sci* (饲料与畜牧), 2007 (6): 5~8
- 71 Chen Q (陈谦), Zhang XX (张新雄), Zhao H (赵海), Guan JF (官家发). Advance in research and application of some functional microbes in bio-organic fertilizer. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2010, **16** (2): 294~300
- 72 Yuan TZ (袁铁峥), Yao B (姚斌). Investigation of probiotics through molecular biology. *China Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2004, **24** (10): 27~33
- 73 Hou Y (侯颖), Sun JD (孙军德). Function of microbial ecological agent in aquaculture and common microbial species. *J Microbiol* (微生物学杂志), 2004, **24** (4): 47~52