

文章编号: 1674 - 5566(2010)06 - 0792 - 06

凝结芽孢杆菌对尖吻鲈的生长、消化酶及非特异性免疫酶的影响

袁丰华^{1,2}, 林黑着¹, 李卓佳¹, 陆鑫^{1,3}, 陈旭¹, 杨其彬¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;

2. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;

3. 大连海洋大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 研究凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)对尖吻鲈(*Lates calcarifer*)生长、消化酶及血清非特异性免疫酶活性的影响。把初始菌浓度为 10×10^9 cfu/g的凝结芽孢杆菌的粉末制剂分别以0.0.1%、0.5%和1.0%的比例添加到饲料中,投喂初始体重为(18.95 ± 0.27) g的尖吻鲈,尖吻鲈养于0.5 m³的玻璃纤维桶中,每桶20尾,每组饲料3个平行,养殖时间50 d。尖吻鲈的生长在组间没有显著性差异($P > 0.05$),但增重率和特定增长率均在0.5%组最大,分别比对照组增加9.54%和4.01%。凝结芽孢杆菌对尖吻鲈的肠和幽门垂消化酶活性没有显著性影响,但胃淀粉酶在1.0%组显著高于对照组,肝蛋白酶在0.5%组显著低于对照组($P < 0.05$)。血清碱性磷酸酶、过氧化物酶及超氧化物歧化酶在组间均没有显著性差异($P > 0.05$)。本研究表明,凝结芽孢杆菌对尖吻鲈的生长有一定的促进作用,并可以影响其肝蛋白酶和胃淀粉酶的活性,而对其血清免疫酶的影响很小。

关键词: 尖吻鲈; 凝结芽孢杆菌; 消化酶; 生长特性; 非特异性免疫酶

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Effects of *Bacillus coagulans* on growth performance, digestive enzymes and nonspecific immune enzymes of sea bass (*Lates calcarifer*)

YUAN Feng-hua^{1,2}, LIN Hei-zhao¹, LI Zhuo-jia¹, LU Xin^{1,3}, CHEN Xu¹, YANG Qi-bin¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. Fishery Institute, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

3. School of Life Science and Technology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: The aim of this research was to evaluate the effects of *Bacillus coagulans* on growth performance, digestive enzymes and some serum nonspecific immune enzymes in cultured sea bass (*Lates calarifer*). Four levels of *B. coagulans* powder product was supplemented to a basal diet at 0 (the control group), 0.1% (group 1), 0.5% (group 2) and 1.0% (group 3) g/kg feed, respectively. Diets were fed to sea bass with initial body weight of (18.95 ± 0.27) g for 50 days. The sea bass was randomly distributed into 4 groups,

收稿日期: 2010-04-07

基金项目: 广东省科技计划项目(2005B20301012,2006A20301004); 农业科技成果转化资金项目(2007GB23260379)

作者简介: 袁丰华(1983-),女,硕士研究生,专业方向为水产动物营养与免疫。E-mail: yuanwind1983@126.com

通讯作者: 李卓佳,E-mail: zhuojial609@163.com

each group with 3 replicates in circular fiberglass reinforced plastic tanks with volume of 0.5 m³. The results showed that the weight gain and the specific growth rate were highest in group 2, and were 9.54% and 4.01% higher than that of the control, respectively, but there was no significant difference among the groups ($P > 0.05$). There was no significant difference in the digestive enzymes of the intestinal and pyloric caeca within groups. But the liver protease of the group 2 was significantly lower than that of the control, while the amylase of stomach of the group 3 was significantly higher than that of the control ($P < 0.05$). There was no significant difference in some serum immune enzymes (AKP, POD, SOD) among groups ($P > 0.05$). This research indicated that the *B. coagulans* could improve the growth of the sea bass slightly. It affected the liver protease and the stomach amylase, too. The serum was slightly affected.

Key words: *Lates calarifer*; *Bacillus coagulans*; digestive enzymes; growth performance; nonspecific immune enzyme

随着水产养殖业的快速发展,水体富营养化、农药残留、病原微生物抗药性等问题相继出现,益生菌作为一种环境友好型添加剂,具有改善养殖动物消化道有益菌群,抑制或杀死有害菌^[1],提高动物免疫力^[2],促进动物生长及消化^[3],提高动物的健康水平,已成为人们研究的热点。芽孢杆菌类益生菌既可以改善水质^[4],又可以产生多种酶类^[5],且能够产生芽孢,耐高温高压,在饲料加工过程很少失活。近年来已见报道应用于饲料的芽孢菌类有枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[6-7]、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)^[8-9]、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)^[10]等,而对凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)的研究还不多见。尖吻鲈 (*Lates calcarifer*) 属鲈形目 (Perciforme) 鲈亚目 (Percoidei) 鲈总科 (Percoidea) 锯盖鱼 (Centropomidae) 尖吻鲈属 (*Lates*)^[11],为肉食性温水鱼类,主要分布于西太平洋和印度洋的热带和亚热带河口地区^[12],因其肉质鲜美、营养丰富而深受消费者喜爱。本实验通过在尖吻鲈饲料中添加不同量的凝结芽孢杆菌,以研究其对尖吻鲈的生长、消化酶及血清非特异性免疫酶活性的影响,为凝结芽孢杆菌在实际生产中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

本实验所用的凝结芽孢杆菌粉状制剂由中国水产科学研究院南海水产研究所健康养殖中心提供,其菌含量为 10×10^9 cfu/g。

1.2 试验饲料

配制 4 种试验饲料,分别添加 0、0.1%、0.5% 和 1.0% 的凝结芽孢杆菌粉状制剂,将粉状制剂与基础料的其他成分混合均匀后制粒,直径为 2.5 mm,晒干,保存在 4 °C 备用。以纤维素替代凝结芽孢杆菌粉状制剂,分别按照纤维素:凝结芽孢杆菌制剂为 10:0,9:1,5:5,0:10 的比例混合后,再将混合物以 1% 的比例添加到基础饲料中。基础料的配方见表 1。

表 1 实验基础料配方

Tab. 1 Composition of the basal diet

成分	比例 (%)	营养水平	比例 (%)
鱼粉	50.99	水份	7.47
豆粕	25.5	蛋白	46.1
α -淀粉	10	脂肪	11.80
磷脂	1	灰分	9.74
Vc 磷酸脂	0.1		
氯化胆碱	1		
鱼油	6.1		
玉米油	2		
复合维生素 ¹	1.5		
复合矿物质 ²	1.5		
三氧化二钽	0.01		
粘合剂	0.3		

注:1. 复合维生素 (mg/kg)^[13]: V_A, 18 000 (IU/kg); V_{D2}, 2 000 (IU/kg); V_E, 35; V_{K3}, 10; V_{B1}, 15; V_{B2}, 25; V_{B5}, 50; V_{B3}, 200; V_{B6}, 5; V_B, 10; V_{B12}, 0.02; V_H, 1.5; V_C, 50; inositol, 400。
2. 复合矿物质 (mg/kg)^[13]: CoSO₄·7H₂O, 1.91; CuSO₄·5H₂O, 19.6; FeSO₄·7H₂O, 200; NaF, 2.21; KI, 0.78; MgO, 830; MnO, 26; Na₂SeO₃, 0.66; ZnO, 37.5; KCl, 1.15 (g/kg); NaCl, 0.40 (g/kg); CaHPO₄·2H₂O, 5.9 (g/kg)。

1.3 实验用鱼及饲料管理

实验在由中国水产科学研究院南海水产研究所热带水产研究开发中心(海南三亚)进行。试验鱼尖吻鲈购于当地养殖场,购回后进行为期

2 周的适应性驯养。挑选健康、均匀的个体随机分为 4 个组,初始体重为 (18.95 ± 0.27) g, 每组 3 个平行,每个平行 20 尾鱼放在容量为 500 L 的玻璃纤维桶内养殖 50 d。养殖系统为室外海水流水系统,海水流速为 6 ~ 8 L/min。实验用水是沙滤海水。每天饱食投喂两次,分别于 8:00 和 16:00 进行。溶解氧、氨氮、盐度和温度分别为 (6.86 ± 0.90) mg/L, (0.03 ± 0.02) mg/L, 28 ~ 31 和 29 ~ 31 °C。

1.4 取样及计算指标

试验结束前鱼体经 24 h 空腹,称总重,并统计每组鱼的数量。每桶随机取 3 尾鱼作为消化酶的样品。冰盘解剖活鱼,分别取出肝脏、胃、幽门垂和肠道,剥除多余的脂肪和结缔组织并称重。样品放置在 -20 °C 保存备用。每桶随机取 5 尾鱼,断尾取血,作为血清免疫酶分析样品。增重率(G_w)、特定生长率(R_{SG})、饲料系数(R_{FC})和存活率(R_s)的计算公式如下:

$$G_w = 100 \times (W_1 - W_0) / W_0 \times n_1 \quad (1)$$

$$R_{SG} = 100 \times [(\ln(W_1 - W_0) / n_1 - \ln W_0 / n_1)] / n_2 \quad (2)$$

$$R_{FC} = FT / (W_1 + W_s - W_0) \quad (3)$$

$$R_s = 100 \times n_3 / n_1 \quad (4)$$

式中: G_w 为增重率(%); W_0 为初始总重(g); W_1 为终末总重(g); n_1 为实验开始鱼尾数; R_{SG} 为特定生长率(%); n_2 为实验天数(d); R_{FC} 为饲料系数; F_T 为总投饲量(g); W_s 为试验期间死鱼总重(g); R_s 为成活率(%); n_3 为成活尾数。

1.5 消化酶的测定

1.5.1 样品制备

样品制备参照 Wang 等^[14]。将各个消化器官的组织在冷的磷酸缓冲液(0.02 mol/L, pH 7.5)(1 g per 5 mL)中用玻璃匀浆器冰浴匀浆,在 4 °C、10 000 r/min 冷冻离心 30 min,上清液作为消化酶分析样品,在 4 °C 保存,24 h 内分析完毕。酶液中可溶性蛋白浓度用 Brandford 法^[15]测定,用牛血清蛋白做标准曲线。酶的活力单位定义为在 37 °C,相应的 pH 的条件下,每分钟催化底物释放 1 μg 的产物所需要的酶量。特定的酶比活力定义为酶活力单位每毫克蛋白(U/mg)。其中胃消化酶在 pH 3.0 时测定,其各个组织消化酶在 pH 7.5 时测定。

1.5.2 酶活力的测定

蛋白酶的测定参照 Mongkoltharuk^[16]的方

法,用酪氨酸做标准曲线,以福林酚试剂作为显色剂,分别用 1.5% 的酪蛋白(sigma)和 1.5% 的牛血红蛋白(sigma)作为碱性蛋白酶和酸性蛋白酶的底物,在 680 nm 测定吸光度。淀粉酶的测定参照黎军胜等^[17]的方法,以 DNS 试剂为显色剂,用麦芽糖做标准曲线,以 1% 的可溶性淀粉做底物,在 520 nm 测定吸光度。

1.6 非特异性免疫酶活性的测定

实验结束时,血液样品在 4 °C 过夜,4 °C、3 000 r/min 冷冻离心 10 min 后,提取血清。使用南京建成试剂盒检测碱性磷酸酶(AKP)、过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD),24 h 内测定完毕。

1.7 数据的统计分析

采用 Excel 和 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析,先对数据作单因素方差分析(ANOVA),处理若有显著差异,再作 Duncan's 多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著,所有数值用平均数 ± 标准误差表示。

2 结果

2.1 生长

随着凝结芽孢杆菌在饲料中添加量的增加,增重率和特定生长率在组间没有显著性差异($P > 0.05$),但在 0.5% 和 1.0% 组时,实验组的增重率分别比对照组增加 9.54% 和 5.40%。实验组的存活率均比对照组低,但差异不显著,在养殖期间在 1.0% 的添加组曾经发病,造成死亡率下降;饲料系数在组间没有显著性差异($P > 0.05$,表 2)。

2.2 消化酶

尖吻鲈的肠道、幽门垂及胃的蛋白酶活性在组间均没有显著性差异,肝蛋白酶实验组均低于对照组,并在 0.5% 组显著低于对照组($P < 0.05$,表 3)。

表 4 中,肠道、幽门垂和肝淀粉酶在组间均没有显著性差异($P > 0.05$),但肝淀粉酶随着凝结芽孢杆菌在饲料中添加量的升高而逐渐降低;胃淀粉酶随凝结芽孢杆菌在饲料中添加量的升高而逐渐升高,并在 1.0% 组显著高于对照组($P < 0.05$)。

2.3 血清非特异性免疫酶

尖吻鲈的血清 AKP、POD 及 SOD 在组间均

没有显著性差异 ($P > 0.05$)。AKP 和 POD 实验组均比对照组底, SOD 实验组均比对照组高(表 5)。

表 2 饲料不同添加量的凝结芽孢杆菌对尖吻鲈的生长的影响

Tab.2 Growth performance of sea bass fed with different does of *B. coagulans* in feed

	饲料中凝结芽孢杆菌添加量			
	0	0.1%	0.5%	1.0%
增重率 (%)	415.65 ± 39.15	398.63 ± 36.12	455.29 ± 83.82	438.09 ± 36.49
特定增长率 (%)	3.04 ± 0.13	2.98 ± 0.13	3.16 ± 0.28	3.11 ± 0.12
成活率 (%)	92.50 ± 3.54	82.50 ± 10.61	91.67 ± 2.89	75.00 ± 10.00
饲料系数	1.07 ± 0.20	1.22 ± 0.27	1.13 ± 0.06	1.16 ± 0.06

注:同行数据(平均数 ± 标准误差)没有上标字母或上标字母相同的表示不存在显著差异 ($P > 0.05$)。

表 3 饲料中不同添加量的凝结芽孢杆菌对尖吻鲈各个器官的蛋白酶活性的影响

Tab.3 Protease of several tissues of sea bass fed with different does of *B. coagulans* in feed

	饲料中凝结芽孢杆菌添加量			
	0	0.1%	0.5%	1.0%
肠 (U/mg)	2.356 ± 0.312	2.497 ± 0.465	2.401 ± 0.145	2.579 ± 0.543
幽门垂 (U/mg)	4.096 ± 1.131	3.927 ± 1.401	3.375 ± 0.894	4.011 ± 0.844
肝 (U/mg)	0.600 ± 0.182 ^b	0.450 ± 0.097 ^{ab}	0.339 ± 0.015 ^a	0.425 ± 0.136 ^{ab}
胃 (U/mg)	4.205 ± 0.704	4.391 ± 0.749	4.115 ± 0.984	4.899 ± 0.684

注:同行数据(平均数 ± 标准误差)没有上标字母或上标字母相同的表示不存在显著差异 ($P > 0.05$)。

表 4 饲料中不同添加量的凝结芽孢杆菌对尖吻鲈各个器官的淀粉酶活性的影响

Tab.4 Amylase of several tissues of sea bass fed with different does of *B. coagulans* in feed

	饲料中凝结芽孢杆菌添加量			
	0	0.1%	0.5%	1.0%
肠 (U/mg)	19.487 ± 3.307	19.981 ± 2.400	19.543 ± 3.183	19.481 ± 3.637
幽门垂 (U/mg)	32.165 ± 12.034	32.690 ± 9.035	32.414 ± 4.517	37.033 ± 3.729
肝 (U/mg)	192.547 ± 32.030	159.064 ± 47.035	144.719 ± 18.934	125.855 ± 32.418
胃 (U/mg)	8.083 ± 2.674 ^a	9.044 ± 1.607 ^{ab}	9.376 ± 2.269 ^{ab}	10.992 ± 2.059 ^b

注:同行数据(平均数 ± 标准误差)没有上标字母或上标字母相同的表示不存在显著差异 ($P > 0.05$)。

表 5 饲料中不同添加量的凝结芽孢杆菌对尖吻鲈血清非特异性免疫酶活性的影响

Tab.5 Serum nonspecific immune enzymes of sea bass fed with different does of *B. coagulans* in feed

	饲料中凝结芽孢杆菌添加量			
	0	0.1%	0.5%	1.0%
碱性磷酸酶(金氏单位/100mL)	4.404 ± 1.366	3.188 ± 1.882	3.577 ± 2.465	3.552 ± 1.412
过氧化物酶(U/mL)	37.704 ± 16.102	28.444 ± 5.004	34.000 ± 11.566	33.482 ± 7.304
超氧化物歧化酶(U/mL)	139.334 ± 5.840	151.015 ± 11.037	149.903 ± 17.528	157.968 ± 16.463

注:同行数据(平均数 ± 标准误差)没有上标字母或上标字母相同的表示不存在显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)是一种既能产生孢子又能产乳酸的革兰氏阳性细菌^[18]。由于其特殊的生理特征(能产乳酸),曾经被误命名为芽孢乳杆菌(*Lactobacillus sporogenes*),在1939年被更正为凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)^[19]。已有研究表明它能抵抗 pH 3.0 的酸性环境,并能忍

受 0.3% (W/V) 的胆汁盐^[20],因而具有很强的在消化道中生存的能力。凝结芽孢杆菌能产芽孢,同时具有产乳酸的特性,可能兼具有乳酸菌的功能,其所分泌的乳酸具有抑制病原菌生长的能力。

由本实验的结果可以看出,凝结芽孢杆菌对尖吻鲈的生长没有明显的促进作用,而许多研究表明,芽孢杆菌在适宜的添加浓度时可以显著地

促进鱼类的生长^[21-23]。这可能是特定种类的鱼需要与之相对应的益生菌才能有效地发挥作用。江萍等^[24]对鲤(*Cyprinus carpio*)的研究也表明,微生态制剂需针对鲤特殊的微生态区系进行研制。一般土著菌比外源菌更容易粘附肠上皮细胞从而定居鱼类肠道^[25]。另外,鱼类的肠道微生态区系的组成会由于鱼类食性的差异而不同^[26],因而影响益生菌与鱼类的相互作用。在本实验中,尖吻鲈的成活率在组间虽然没有显著性差异,但是随着凝结芽孢杆菌在饲料中添加量的增加而降低的,这是因为在本实验的养殖过程中,在1.0%组的尖吻鲈曾经发病,造成成活率的降低。

本研究中尖吻鲈的肠及幽门垂的消化酶活性没有显著性变化,肝蛋白酶及淀粉酶活性降低,胃淀粉酶的活性升高。胃淀粉酶的升高可能由于凝结芽孢杆菌分泌的乳酸激活胃淀粉酶的缘故。本研究结果与付天玺等^[21]对奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)的研究不同,凝结芽孢杆菌可显著提高罗非鱼肠道及胰腺的蛋白酶活力,但对其淀粉酶及脂肪酶的活力却没有影响。这可能是与鱼类的食性有关。尖吻鲈是一种肉食性的鱼类,与杂食性的罗非鱼在生理消化结构及消化道的微生态区系上都有着显著的差异,可能会影响凝结芽孢杆菌的萌发、定植和代谢等。此外,由于本实验过程中发生过病害,故最终的结果是否是由凝结芽孢杆菌造成的还值得商酌。

许多研究表明,益生菌具有抗病毒^[27]、免疫调节^[28]等作用,但在本研究中尖吻鲈血清 AKP、POD 及 SOD 在组间均没有显著性差异,说明凝结芽孢杆菌对尖吻鲈的血清非特异性免疫酶类的影响很小。乳酸菌可以通过和病原菌竞争肠上皮细胞的粘附位点^[29-30], Sethuramalingam^[31]等将芽孢乳酸菌(*Lactobacillus sporogenes*)应用于鲤(*Cyprinus carpio* Linnaeus)的实验表明,芽孢乳杆菌即凝结芽孢杆菌可以有效地粘附鱼的肠上皮细胞,且粘附的数量越多,对饲料的利用率越高。本实验中的该株凝结芽孢杆菌是否能有效粘附发挥作用,有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Josie Lategan M, et al. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of

- action and screening processes [J]. *Aquaculture*, 2008, 274 (1): 1-14.
- [2] 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 Immunology*, 2003, 15(5): 443-452.
- [3] EL-Haroun E R, Goda A MA-S, Chowdhury M A K. Effect of dietary probiotic Biogen[®] supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) [J]. *Aquaculture Research*, 2006, 37(14): 1473-1480.
- [4] 郑虹,施巧琴,施碧红,等.芽孢杆菌对养殖水体净化作用的比较研究微生物学杂志[J].微生物学杂志,2005,25(6):41-44.
- [5] 曹煜成,李卓佳,冯娟,等.地衣芽孢杆菌胞外产物消化活性的研究[J].热带海洋学报,2005,24(6):6-12.
- [6] Wang Y B, Xu Z R. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2006, 127,(3-4): 283-292.
- [7] Aly S M, Ahmed Y A-G, Ghareeb A A-A, et al. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(1-2): 128-136.
- [8] 刘波,刘文斌,王恬.地衣芽孢杆菌对异育银鲫消化机能和生长的影响[J].南京农业大学学报,2005,28(4):80-84.
- [9] 刘波,谢骏,刘文斌,等.地衣芽孢杆菌与低聚木糖对异育银鲫消化酶活性、肠道菌群及生长的影响[J].大连水产学院学报,2006,21(4):336-340.
- [10] Aly S M, Mohamed M F, John G. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture research*, 2008, (6): 647-656.
- [11] 孟庆闻,苏锦祥,缪学祖.鱼类分类学[M].北京:中国农业出版社,1995:505-506.
- [12] Guiguen Y, Cauty C, Fostier A, et al. Reproductive cycle and sex inversion of the seabass, *Lates calcarifer*, reared in sea cages in French Polynesia: histological and morphometric description [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1994, 39(3): 231-247.
- [13] Peres H, Oliva-Teles A. Effect of the dietary essential amino acid pattern on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Aquaculture*, 2007, 267(1-4): 119-128.
- [14] Wang Y B, Xu Z R. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2006, 127(3-4): 283-292.
- [15] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

- protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248 - 254.
- [16] Mongkoltharuk W, Dharmstithi S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2002, 50 (2): 101 - 105.
- [17] 黎军胜,李建林,吴婷婷. 奥尼罗非鱼淀粉酶、脂肪酶的分布与特性 [J]. *中国水产科学*, 2004, 11(5): 473 - 477.
- [18] Endres J R, Clewell A, Jade K A, *et al.* Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47(6): 1231 - 1238.
- [19] Sanders M E, Morelli L., Tompkins T A. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus* [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2006, 2(3): 101 - 110.
- [20] Hyronimus B, Le Marrec C, Hadj Sassi A, *et al.* Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 61(2), 193 - 197.
- [21] 付天玺,许国焕,吴月嫦,等. 凝结芽孢杆菌对奥尼罗非鱼消化酶活性、消化率及生长性能的影响 [J]. *淡水渔业*, 2008, 138(14): 30 - 35.
- [22] 刘小刚,周洪琪,华雪铭. 微生态制剂对异育银鲫消化酶活性的影响 [J]. *水产学报*, 2002, 26(5): 448 - 452.
- [23] 华雪铭,周洪琪,邱小琼. 饲料中添加芽孢杆菌和硒酵母对异育银鲫的生长及抗病力的影响 [J]. *水产学报*, 2001, 25(5): 448 - 453.
- [24] 江萍,夏先林,周碧君. 两种微生态调节剂对网箱鲤鱼生产效果的影响 [J]. *中国微生态学杂志*, 1997, 9(3): 26 - 28.
- [25] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture [J]. *Aquaculture*, 1999, 180(1-2): 147 - 165.
- [26] 尹军霞,沈文英,张建龙,等. 不同食性鱼肠道壁菌群的研究 [J]. *水利渔业*, 2003, 23(5): 7 - 8.
- [27] Ivec M, Botic T, Koren S, *et al.* Interactions of macrophages with probiotic bacteria lead to increased antiviral response against vesicular stomatitis virus [J]. *Antiviral research*, 2007, 75(3): 266 - 74.
- [28] Baken K A, Ezendam J, Gremmer E R, *et al.* Evaluation of immunomodulation by *Lactobacillus casei* Shirota: Immune function, autoimmunity and gene expression [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 112(1): 8 - 18.
- [29] Luis B J, Daniel V, Blas I, *et al.* In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens [J]. *Veterinary microbiology*, 2007, 122(3-4): 373 - 380.
- [30] Johnson-Henry K C, Hagen K E, Gordonpour M, *et al.* Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibits enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 adhesion to epithelial cells [J]. *Cell Microbiology*, 2007, 9(2): 356 - 367.
- [31] Sethuramalingam T A, Ahila K A, Rajakumari K. Dietary Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus sporogenes* on Gut Adhesion Level, Transit Time and Nutrient Digestibility of *Cyprinus carpio* (Linnaeus) Fingerlings [J]. *Environment and Ecology*, 2008, 26(1A): 397 - 402.