

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在刺参 养殖中的益生作用*

董春光^{1,2} 杨爱国^{2①} 孙秀俊² 吴彪²
刘志鸿² 周丽青² 侯丫^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 201306;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 运用生化方法分析了不同浓度枯草芽孢杆菌制剂对养殖水质、刺参的生长、消化酶活性、非特异性免疫酶活性的影响。结果显示,与对照组相比,添加枯草芽孢杆菌制剂,能够显著降低养殖水体中的硝酸盐和亚硝酸盐,去除率最高可达42.28%和22.33%,对水体中氨氮含量和化学需氧量影响不显著;实验组刺参特定生长率显著提高,枯草芽孢杆菌添加量为 6×10^{-6} 时,SGR提高40.74%,添加量为 6×10^{-6} 时,淀粉酶活性提高30.27%,添加量为 5×10^{-6} 时,蛋白酶活性提高53.93%,达到显著水平差异,但脂肪酶活性无显著提高;非特异性免疫酶(过氧化物酶、碱性磷酸酶、溶菌酶、超氧化物歧化酶)活性均显著高于对照组,枯草芽孢杆菌添加 6×10^{-6} 效果最好,分别提高135%、27%、396%、192%。本研究表明,添加适当的枯草芽孢杆菌能够有效改善刺参养殖水体水质,提高机体消化酶和非特异性免疫酶活性,从而促进刺参生长。

关键词 刺参; 枯草芽孢杆菌; 特定生长率; 酶活性

中图分类号 S932.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)03-0109-07

仿刺参(*Apostichopus japonicus*), 俗称刺参, 属海参纲、楯手目、刺参科、仿刺参属, 具有极高的食用和药用价值, 被誉为“海产八珍”之首(李成林等, 2010; 廖玉麟, 1997; 李斌等, 2014)。近年来, 刺参的需求量一路攀升, 极大地促进了刺参养殖的发展。然而, 在工厂化高密度养殖过程中, 水质污染严重, 病害问题日趋突出, 2003年以来, 在刺参养殖中出现的细菌性疾病“腐皮综合症”给刺参养殖业造成了巨大的经济损失, 严重制约了该产业的健康发展(王印庚等, 2004)。有资料统计表明, 85%以上的病害是由水质条件恶化引起的(李成林等, 2010)。在传统的养殖中, 通过加大换水量、添加抗生素等化学药品来保持水质和预防病害, 这样不仅增加了养殖成本,

还会产生药物残留问题, 严重影响了水产品的食品安全。益生菌因具有净化水质, 促进养殖动物生长, 提高水产动物免疫力等优点而被广泛应用于水产养殖业(Gatesoupe, 1999)。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种在养殖水体中普遍存在的益生菌(方秀珍等, 1989; 张庆等, 1999; 李桂英等, 2013), 具有适应性强, 能在动物肠道中稳定定植的优点(Barbosa *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2006), 此外, 枯草芽孢杆菌还具有净化水质(熊伟等, 2003), 分泌消化酶促进消化(丁贤等, 2004), 提高动物机体免疫力等益生作用。Nayak等(2007)研究发现, 在饲料中添加枯草芽孢杆菌, 能显著提高南亚黑鲷(*Labeo rohita*)血清中的蛋白浓度。伏传永等(2008)¹⁾

* 青岛市市南区科技发展计划项目(2011-5-023-QT)资助。董春光, E-mail: dcg198704@163.com

① 通讯作者: 杨爱国, 研究员, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-05-14, 收修改稿日期: 2014-09-17

1) 伏传永. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)对刺参腐皮综合病致病菌的拮抗作用以及对水质的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2008, 1-64

在刺参养殖中添加枯草芽孢杆菌后,发现该杆菌对腐皮综合症致病菌有明显的拮抗作用,对水体中的氨氮、亚硝酸盐、化学需氧量(COD)的最高去除率可达94.5%、90.3%、68.3%。目前,刺参养殖业蓬勃发展,养殖过程中产生的问题较多,枯草芽孢杆菌作为一种应用价值较高的益生菌,在刺参养殖中的应用研究较少。在本研究中,将一定浓度的枯草芽孢杆菌制剂泼洒在刺参养殖水体中研究枯草芽孢杆菌对养殖水质、刺参生长、消化酶活性、非特异性免疫酶活性的影响,以期对刺参的健康养殖和枯草芽孢杆菌在水产中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用菌粉 实验用枯草芽孢杆菌菌粉购自苏柯汉(潍坊)生物工程有限公司,含菌量为 $20 \times 10^8/\text{g}$ 。

1.1.2 实验用刺参 挑选大小、重量相近的健康刺参进行实验,平均体重为 $(2.675 \pm 0.2368) \text{ g}$ 。实验用刺参饲料主要由马尾藻、稚参料、海泥、食母生和酵母粉组成,每天按照刺参总重的3%投喂,每天投喂1次。

1.2 方法

实验从2013年9月19日-11月7日,周期为50 d。实验刺参分为1个对照组和9个实验组,每组设3个平行,各养殖池放入刺参 $(4.916 \pm 0.4577) \text{ kg}$,养殖池容积为 $2.5 \text{ m} \times 5.0 \text{ m} \times 0.6 \text{ m}$,每个养殖池配置6个气石,连续充气,以保证充足的溶解氧。每天换水1/2,及时清理池底的淤泥残饵粪便等,保持池内清洁。换水后,对照组和实验组分别按照 0×10^{-6} 、 1×10^{-6} 、 2×10^{-6} 、 3×10^{-6} 、 4×10^{-6} 、 5×10^{-6} 、 6×10^{-6} 、 7×10^{-6} 、 8×10^{-6} 、 9×10^{-6} 添加枯草芽孢杆菌菌粉,投喂前,将菌粉用海水浸泡萌发0.5 h。

1.2.1 水质指标测量 在养殖过程中,每隔5 d,从养殖池不同位置取中层水混合,作为水样。测量化学需氧量(COD)用碱性高锰酸钾法、氨氮($\text{NH}_4^+ \text{-N}$)用次溴酸盐氧化法、亚硝酸盐($\text{NO}_2^- \text{-N}$)用萘乙二胺分光光度法、硝酸盐($\text{NO}_3^- \text{-N}$)用铈-镉还原法4种水质指标,测量方法均采用国家标准方法(GB 17378.4-2007)。每个水样测3次,结果取平均值。

1.2.2 生长指标 在实验开始及结束时,对每个养殖池刺参进行称量,每次随机取10头刺参,称量3次取平均值。特定生长率(SGR)计算公式为:

$$\text{SGR} = (\ln M_2 - \ln M_1) / t \times 100\%$$

式中, M_1 为实验开始时的平均体重, M_2 为实验结束时的平均体重, t 为养殖天数。

1.3 粗酶液制备

养殖实验结束时,每个养殖池中随机选取10头刺参,分别称取刺参肠道和体壁组织重量,按重量(g):体积(ml)=1:9,加入9倍体积的PBS,冰水浴条件下机械匀浆,制成10%的匀浆液,3000 r/min离心10 min,取上清液,4℃冰箱中保存,肠道上清液用于蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性的测定,体壁组织上清液用于过氧化物酶(POD)、碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶(LSZ)、超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定,酶活性的测定均采用南京建成生产的试剂盒。

1.4 数据处理与方差分析

实验数据用SPSS 17.0统计软件进行单因子方差分析(One-way ANOVA)。若差异显著,进行Duncan多重比较检验,显著性水平 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌对水质的影响

枯草芽孢杆菌对水体中 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、COD的影响见图1。由图1可知,养殖水体中添加枯草芽孢杆菌能够显著降低水体中的 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 含量($P < 0.05$),对 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和COD影响不显著($P > 0.05$)。

除 1×10^{-6} 、 2×10^{-6} 、 3×10^{-6} 组外,其余各实验组 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 含量显著低于对照组($P < 0.05$), 4×10^{-6} – 9×10^{-6} 组组间差异不显著($P > 0.05$),但与 1×10^{-6} – 3×10^{-6} 组相比差异显著($P < 0.05$)。 9×10^{-6} 和 6×10^{-6} 组 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 含量分别比对照组降低了30.43%和27.83%。

除 1×10^{-6} 组外,其余各实验组 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 含量显著低于对照组($P < 0.05$), 6×10^{-6} – 9×10^{-6} 组 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 含量最低,且实验组间差异不显著($P > 0.05$),但与其他各组之间有显著差异($P < 0.05$)。 6×10^{-6} – 9×10^{-6} 组 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 含量在0.0071–0.0079 mg/L之间,比对照组降低40.60%–46.62%。

2.2 枯草芽孢杆菌对刺参SGR的影响

在刺参养殖池中泼洒不同浓度的枯草芽孢杆菌制剂,刺参的SGR如表1所示。由表1可见,水体中添加枯草芽孢杆菌对刺参SGR有显著影响($P < 0.05$)。除 1×10^{-6} 、 2×10^{-6} 组外,其余各实验组刺参SGR显著高于对照组($P < 0.05$),各实验组之间也存在不同差异($P < 0.05$),其中 6×10^{-6} 、 7×10^{-6} 组的SGR最高,与对照组相比分别提高了40.74%和35.80%。

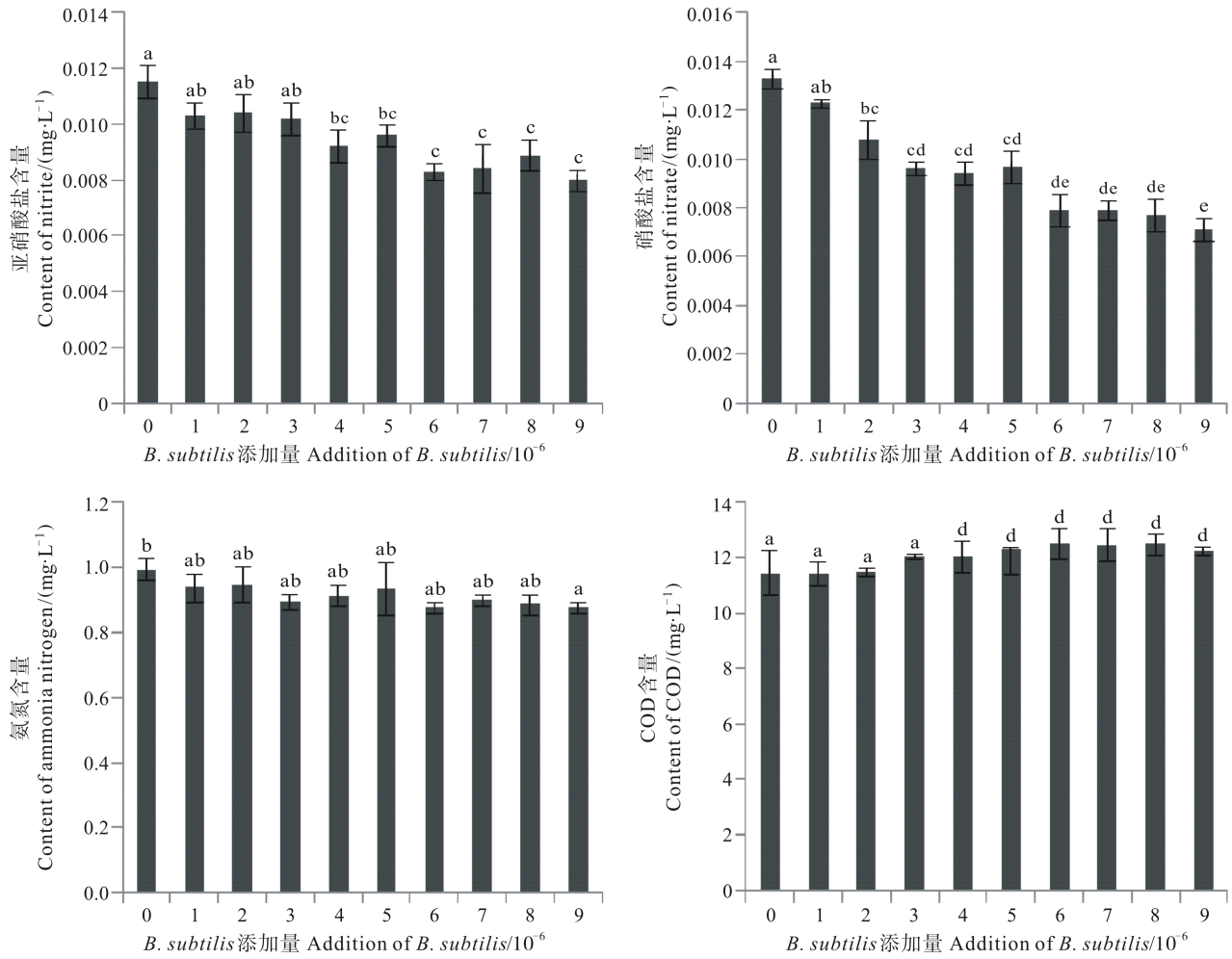


图 1 枯草芽孢杆菌对水质的影响
Fig.1 Effects of *B. subtilis* on water quality

注: 含有相同字母者差异不显著($P>0.05$), 含有不同字母者差异显著($P<0.05$), 下同
Note: The same letter denoted not significant difference ($P>0.05$), different letters denoted significant difference ($P<0.05$), similarly hereinafter

表 1 枯草芽孢杆菌对刺参 SGR 的影响
Tab.1 Effect of *B. subtilis* on SGR of sea cucumber

<i>B. subtilis</i> 添加量 Addition amount of <i>B. subtilis</i> (10 ⁻⁶)	M1(g)	M2(g)	日增重(g) Average daily gain	SGR
9	2.89±0.159	10.39±0.486	0.1500±0.0081	2.5580±0.0009 ^{cd}
8	2.87±0.210	10.90±0.499	0.1607±0.0058	2.6717±0.0005 ^{de}
7	2.81±0.151	12.64±0.336	0.1966±0.0095	3.0090±0.0016 ^f
6	2.94±0.151	13.97±0.222	0.2206±0.0014	3.1183±0.0007 ^f
5	2.92±0.181	11.57±1.301	0.1731±0.0225	2.7483±0.0011 ^e
4	2.72±0.127	10.00±0.403	0.1457±0.0058	2.6030±0.0003 ^{cd}
3	2.65±0.168	8.96±0.863	0.1262±0.0141	2.4347±0.0008 ^{bc}
2	2.41±0.040	7.79±0.297	0.1076±0.0051	2.3433±0.0044 ^{ab}
1	2.28±0.171	7.00±0.093	0.0944±0.0019	2.2477±0.0013 ^a
0	2.24±0.168	6.77±0.110	0.0906±0.0017	2.2157±0.0013 ^a

注: 表中数据为 2013-09-19–2013-11-07 刺参的特定生长率
Note: The SGR data of sea cucumber are in the period of 2013-09-19 to 11-07

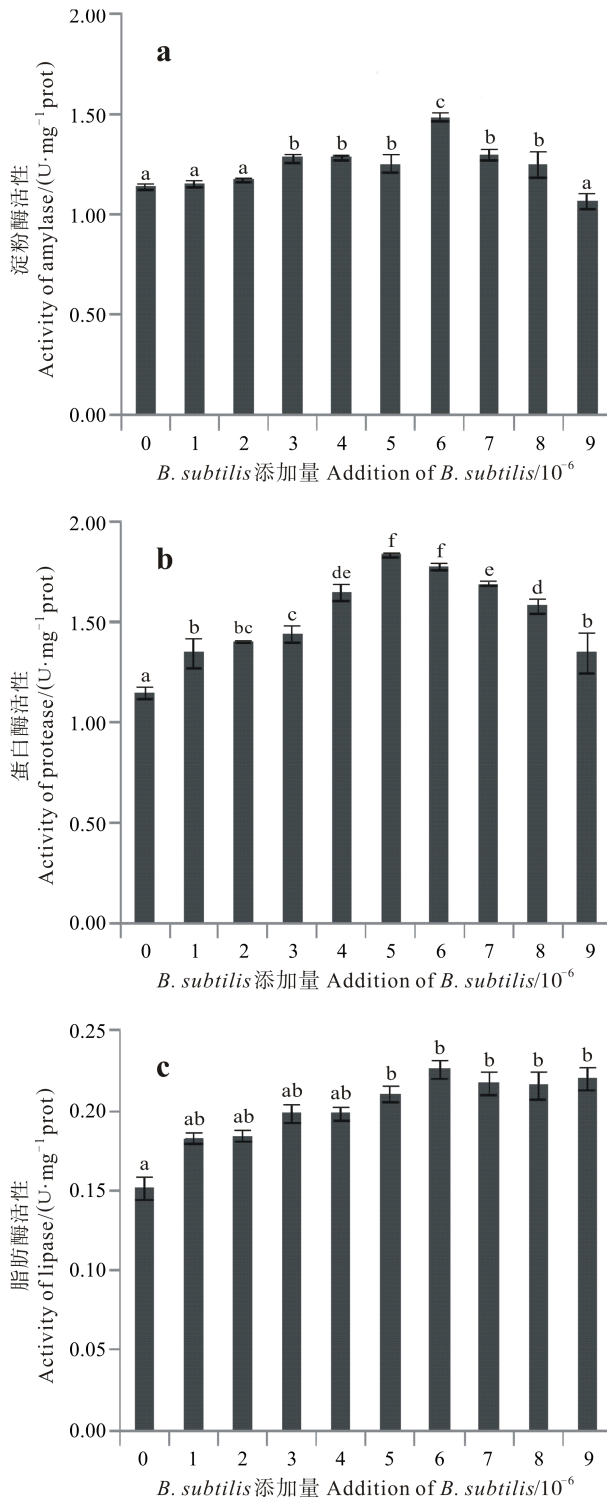


图2 枯草芽孢杆菌对刺参消化酶活性的影响

Fig.2 Effects of *B. subtilis* on the activities of digestive enzymes of sea cucumber

2.3 枯草芽孢杆菌对刺参消化酶活性的影响

由图 2(a)可看出, 1×10^{-6} 、 2×10^{-6} 、 9×10^{-6} 组淀粉酶活性与对照组差异不显著 ($P > 0.05$), 其余各组淀粉

酶活性显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其中 6×10^{-6} 组淀粉酶活性最高, 比对照组高 30.27%; 各组蛋白酶活性均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 5×10^{-6} 、 6×10^{-6} 组蛋白酶活性最高, 分别比对照组高 59.50% 和 53.93%, 各实验组之间酶活性存在显著差异 ($P < 0.05$), 结果见图 2(b)、图 2(c)。单因子方差分析表明, 不同浓度的枯草芽孢杆菌制剂对刺参肠道中脂肪酶活性影响不显著 ($P > 0.05$)。

2.4 枯草芽孢杆菌对刺参非特异性免疫酶活性的影响

在刺参养殖中添加不同浓度的枯草芽孢杆菌制剂, 研究刺参体壁中非特异性免疫酶活性的变化, 经单因子方差分析和 Duncan 多重比较检验表明, 实验组刺参体壁中非特异性免疫酶 (POD、SOD、AKP、LSZ) 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$), 各实验组之间也存在显著差异。添加量为 6×10^{-6} 时, POD、SOD、AKP、LSZ 活性分别比对照组高 1.35、0.27、4、1.92 倍, 各组酶活性水平见图 3。

3 讨论

3.1 枯草芽孢杆菌对水质的影响

一些学者研究发现枯草芽孢杆菌能够吸收利用养殖水体中的粪便有机物、亚硝酸盐、氨氮等物质, 具有降低化学需氧量, 净化水质的作用 (韩学易等, 2006; 陆家昌等, 2010)。在本研究中, 添加枯草芽孢杆菌制剂可以显著降低水体中的 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 含量, 但并没有降低水体中的 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 COD, 这可能与枯草芽孢杆菌制剂的添加量以及不同菌株有关。在本研究中, 养殖水体中的 COD 含量有升高的趋势, 其可能原因是在养殖水体中存在枯草芽孢杆菌不能利用的有机物, 其次, 添加高浓度的菌体也可能影响 COD 的测量值。

3.2 枯草芽孢杆菌对刺参消化酶活性和 SGR 的影响

Pan 等 (1997)、沈斌乾等 (2013) 等研究发现, 在饲料中添加枯草芽孢杆菌制剂, 能够提高水产动物肠道中蛋白酶和淀粉酶活性, 促进动物机体对营养物质的吸收利用, 进而促进动物的生长。在本研究中, 添加枯草芽孢杆菌的实验组消化酶活性和刺参 SGR 均呈现出先升高后降低的变化规律, 这说明提高消化酶活性能够促进刺参的生长, 出现这种变化趋势的原因可能是大量的枯草芽孢杆菌分泌过高的消化酶, 对刺参自身的消化酶产生抑制作用 (管越强等, 2010), 导致出现酶活性饱和现象 (Kaoma *et al*, 1996)。枯草芽孢杆菌能够提高刺参肠道消化酶活性, 其可能原因是, 该

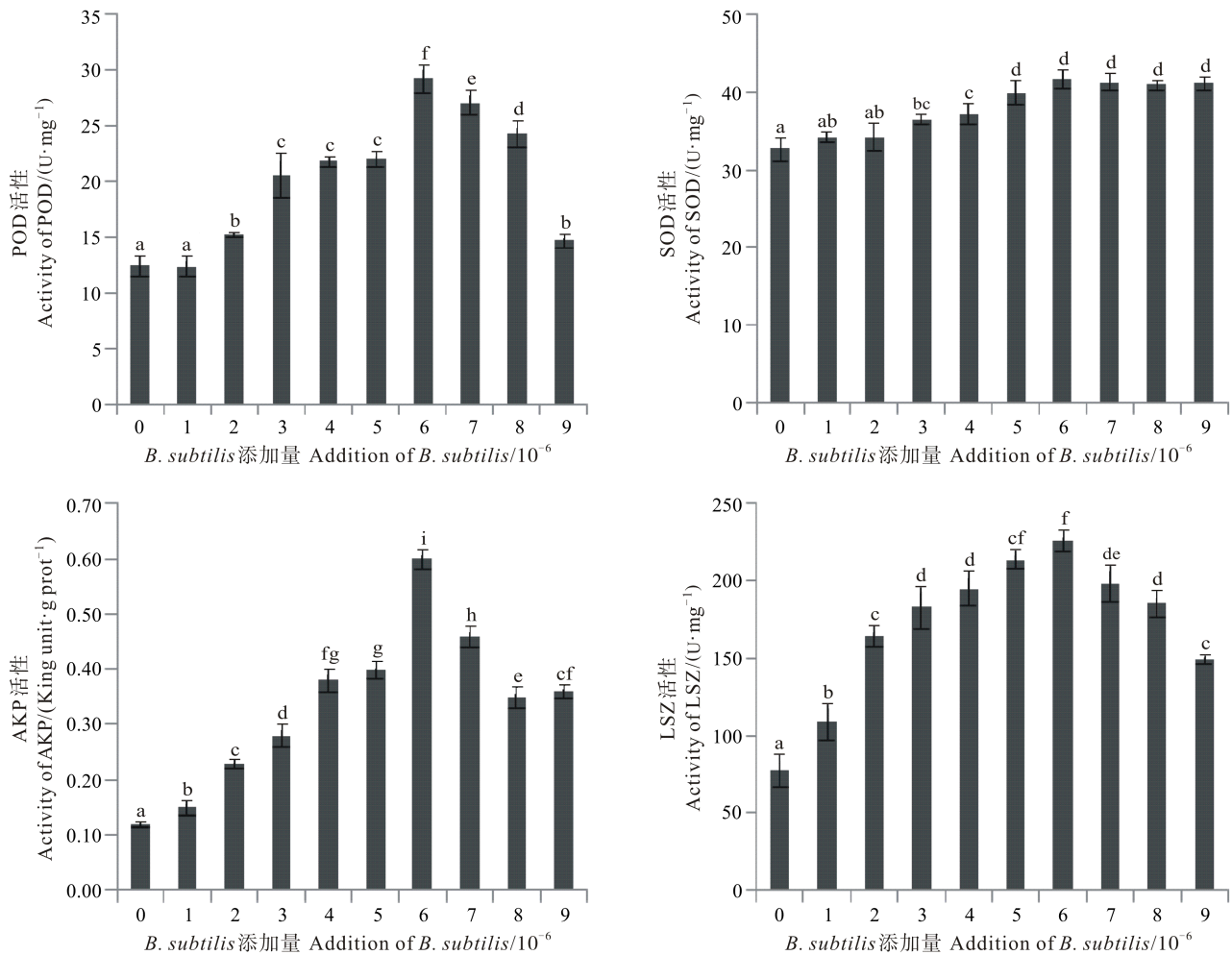


图3 枯草芽孢杆菌对刺参非特异性免疫酶活性的影响

Fig.3 Effects of *B. subtilis* on the activities of nonspecific immune enzymes of sea cucumber

制剂对刺参肠道中脂肪酶的活性影响不显著($P>0.05$), 这与丁贤等(2004)、王军等(2012)¹⁾研究的结果相似, 说明枯草芽孢杆菌分泌的消化酶种类或者对刺参肠道消化酶活性的影响具有一定的选择性, 这可能与刺参本身及益生菌的种类有关。

3.3 枯草芽孢杆菌对刺参非特异性免疫酶活性的影响

刺参是无脊椎动物, 其免疫系统是非特异性的, 体壁细胞分泌的非特异性免疫酶担负着刺参免疫的职责(Eliseikina *et al*, 2002)。有研究报道, POD 能够催化 H_2O_2 与氢供体之间的氧化反应, 促进细胞内呼吸爆发, 提高吞噬细胞对外源异物的吞噬能力(Chance *et al*, 1955)。SOD 是生物体内清除自由基的抗氧化酶, 可催化超氧阴离子自由基产生 H_2O_2 和 O_2 , 对生

物的生存起着至关重要的作用(王军, 2012¹⁾; Nichols *et al*, 2000)。AKP 是刺参体内一种重要的水解酶, 在刺参抵抗疾病, 参与免疫反应、细胞损伤与修复方面发挥重要作用(李继业, 2007)²⁾。LSZ 是吞噬细胞合成释放的, 能够水解革兰氏阳性菌细胞壁中的粘多糖, 破坏侵入体内的细菌, 达到防御的目的(Nichols *et al*, 2000; Zhang *et al*, 2000)。非特异性免疫酶活性的高低直接影响了刺参对病原菌及有害物质的抵抗力。有学者研究发现, 在养殖水体或饲料中添加枯草芽孢杆菌能够提高水产动物的非特异性免疫酶活性, 促进水产动物的健康养成(刘慧玲等, 2009; 刘晓勇等, 2012; 周慧慧等, 2010)。本研究结果显示, 通过向水体中添加枯草芽孢杆菌制剂, 可提高刺参体壁组织中非特异性免疫酶活性。其可能原因是枯草芽孢杆菌在刺参体

1) 王军. 两株益生菌的鉴定及其在刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖中应用的研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 1-70

2) 李继业. 养殖刺参免疫学特征与病害研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2007, 1-85

内能够分泌相关非特异性免疫酶或者通过诱导激发的形式提高机体分泌相关酶的能力,而达到清除自由基、提高抗氧化能力和刺参免疫能力的目的,在养殖过程中,减少病害的发生,这也是促进刺参生长的原因之一。

通过研究分析枯草芽孢杆菌在刺参养殖中对水质、刺参生长、消化酶和非特异性免疫酶活性的影响,作者认为, $20 \times 10^8/g$ 的枯草芽孢杆菌制剂在刺参养殖中的最适添加量为 6×10^{-6} 。

参 考 文 献

- 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.中国水产科学,2004,11(6):580-584
- 王印庚,荣小军,张春云,等.养殖刺参暴发性疾病——“腐皮综合症”的初步研究与防治.齐鲁渔业,2004,21(5):44-47
- 方秀珍,郭贤桢,王继坤,等.高产鱼池中异养细菌的初步研究.水产学报,1989,13(2):101-107,144
- 刘晓勇,张颖,齐茜,等.枯草芽孢杆菌对杂交鲟幼鱼生长性能、消化酶活性及非特异性免疫的影响.中国水产科学,2011,18(6):1315-1320
- 刘慧玲,黄翔鹄,李长玲,等.不同浓度的枯草芽孢杆菌对罗非鱼鱼苗的养殖水体水质及其抗病力的影响.水产养殖,2009,30(10):5-9
- 李成林,宋爱环,胡炜,等.山东省刺参养殖产业现状分析与可持续发展对策.渔业科学进展,2010,126-133
- 李斌,张秀珍,马元庆,等.生物絮团对水质的调控作用及仿刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参生长的影响.渔业科学进展,2014,35(4):85-90
- 李桂英,孙艳,宋晓玲,等.饲料中添加潜在益生菌对凡纳滨对虾肠道消化酶活性和菌群组成的影响.渔业科学进展,2013,34(4):84-90
- 沈斌乾,陈建明,郭建林,等.饲料中添加枯草芽孢杆菌对青鱼生长、消化酶活性和鱼体组成的影响.水生生物学报,2013,37(1):48-53
- 张庆,李卓佳,陈康德.复合微生物对养殖水体生态因子的影响.上海水产大学学报,1999,8(1):43-47
- 陆家昌,李活,黄翔鹄.枯草芽孢杆菌对水质及凡纳滨对虾幼体免疫指标影响的研究.南方水产科学,2010,6(1):19-24
- 周慧慧,马洪明,张文兵,等.仿刺参肠道潜在益生菌对稚参生长、免疫及抗病力的影响.水产学报,2010,(6):775-783
- 韩学易,陈惠,吴琦,等.产纤维素酶枯草芽孢杆菌 C-36 的产酶条件研究.四川农业大学学报,2006,24(2):178-181
- 管越强,周环,张磊,等.枯草芽孢杆菌对中华鳖生长性能、消化酶活性和血液生化指标的影响.动物营养学报,2010,22(1):235-240
- 廖玉麟.中国动物志:棘皮动物门.海参纲.北京:科学出版社,1997,1-334
- 熊伟,梁运祥,戴经元,等.枯草芽孢杆菌对斑节对虾饲养池水净化作用的初步研究.华中农业大学学报,2003,22(3):247-250
- Barbosa TM, Serra CR, La Ragione RM, et al. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(2): 968-978
- Chance B, Maehly AC. Assay of catalases and peroxidases. Methods Enzymol, 1955, 2: 764-775
- Eliseikina MG, Magarlamov TY. Coelomocyte morphology in the holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae). Rus J Mar Biol, 2002, 28(3): 197-202
- Gatesoupe FJ. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture, 1999, 180(1): 147-165
- Kaoma C, Blaha J, Heger J, et al. Estimation of the level of enzyme preparation required to obtain optimum nutrient utilization and growth performance in young broiler chicks fed on barley diets. Zivocisna Vyroba-UZPI, 1996, 41
- Nayak SK, Swain P, Mukherjee SC. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). Fish & Shellfish Immunol, 2007, 23(4): 892-896
- Nichols TL, Whitehouse CA, Austin FE. Transcriptional analysis of a superoxide dismutase gene of *Borrelia burgdorferi*. FEMS Microbiol Lett, 2000, 183(1): 37-42
- Pan KC, Yang HB. Progress in study of mechanism of *Bacillus*. Feed Industry, 1997, 18(9): 32-34
- Tam NKM, Uyen NQ, Hong HA, et al. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. J Bacteriol, 2006, 188(7): 2692-2700
- Zhang RQ, Chen QX, Zheng WZ, et al. Inhibition kinetics of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase activity by dithiothreitol or 2-mercaptoethanol. Int J Biochem & Cell Biol, 2000, 32(8): 865-872

(编辑 江润林)

The Health-Promoting Effects of *Bacillus subtilis* in the Culture of Sea Cucumber

DONG Chunguang^{1,2}, YANG Aiguo^{2①}, SUN Xiujun², WU Biao², LIU Zhihong²,
ZHOU Liqing², HOU Ya^{1,2}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries
Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract To study the impact of *Bacillus subtilis* on sea cucumber *Apostichopus japonicus*, the functions of the different densities of *B. subtilis* in the culture of sea cucumber were examined by focusing on various parameters, such as water quality, specific growth rate (SGR), activity of non-specific immune enzymes, and digestive enzymes. The results showed that *B. subtilis* significantly reduced the content of nitrate and nitrite in the culture water, and the highest removal rates of nitrate and nitrite were 42.28% and 22.33%, respectively. *B. subtilis* obviously improved the SGR of sea cucumber and the activity of non-specific immune enzymes. The density of *B. subtilis* did not impact on ammonia nitrogen and COD content in the culture water. At the density of 6×10^{-6} , the SGR and the activity of amylase in sea cucumber tissues compared with the control group were increased by 40.74% and 30.27%, respectively. Additionally, the increasing value of the activity of peroxidase, alkaline phosphatase, lysozyme, and superoxide dismutase were 135%, 27%, 396%, and 192%, respectively. When the density of *B. subtilis* was 5×10^{-6} , the activity of protease in sea cucumber was improved by 53.93%. These findings suggest that the appropriate density of *B. subtilis* in sea cucumber culture water not only improved the quality of water but also increased the activity of digestive enzymes and nonspecific immune enzymes, resulting in better growth of sea cucumber.

Key words *Apostichopus japonicus*; *Bacillus subtilis*; Specific growth rate; Enzymatic activity

① Corresponding author: YANG Ai-guo, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn