

DOI: 10.12264/JFSC2022-0435

两种潜在益生芽孢杆菌对大口黑鲈生长、消化、免疫及肠道菌群的影响

王世贵^{1,2}, 闫法军², 张明磊², 冒树泉², 朱永安², 付朝松¹, 宋理平², 刘峰²

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 山东省淡水渔业研究院, 山东省淡水水产遗传育种重点实验室, 山东 济南 250013

摘要: 选取热带芽孢杆菌(*Bacillus tropicus*)和传染病研究所副芽孢杆菌(*Metabacillus idriensis*)为潜在益生菌, 探讨它们对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)生长、消化、免疫及肠道菌群的影响。将初始体重为(92.95±2.36) g的大口黑鲈随机分为5组, 每组设3个重复, 分别饲喂基础饲料(对照组)和4种试验饲料[于基础饲料中分别添加 10^4 和 10^6 CFU/g的*B. tropicus* (标记为BT4、BT6)或*M. idriensis* (MI4、MI6)], 饲喂期为60 d。生长试验结果表明, 各菌处理组大口黑鲈的终末体重、增重率及特定生长率均高于对照组, 但差异不显著($P>0.05$), 而饲料系数均显著低于对照组且随菌株添加浓度增加呈显著降低变化($P<0.05$)。消化方面结果显示, 各菌处理组的肠道淀粉酶和蛋白酶活性均高于对照组, 其中BT6和MI6对肠道消化性能具有显著提高效果($P<0.05$)。免疫实验结果表明, 各菌处理组的血清酸性磷酸酶、碱性磷酸酶及溶菌酶以及肠道溶菌酶、超氧化物歧化酶活性均得到显著提升($P<0.05$), 说明菌株对血清和肠道免疫功能均有显著提高作用, 但比较发现, 总体以BT6与MI6的免疫增强效果最佳。肠道菌群高通量测序结果显示, 支原菌属(*Mycoplasma*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)和鲸杆菌属(*Cetobacterium*)为大口黑鲈肠道优势菌群; 各组比较发现, BT6、MI6与对照之间在OTU数量、多样性指数及菌群结构上差异最明显, BT6可降低主要优势菌支原菌属($P<0.05$)和多数劣势菌群的丰度来提高菌群均一性进而提高菌群多样性, 而MI6可促进多数劣势类群的生长来提高菌群丰富度和均一性进而提高菌群多样性, 这反映了不同菌株对肠道菌群作用方式的差异。研究表明, 热带芽孢杆菌和传染病研究所副芽孢杆菌皆可作为益生菌株应用于大口黑鲈养殖, 在本实验条件下最佳使用量均为 10^6 CFU/g, 它们具有促进大口黑鲈生长、增强消化和免疫力、促进肠道菌群平衡及提高肠道菌群多样性等作用。本研究为大口黑鲈的益生菌开发与应用提供理论支撑。

关键词: 热带芽孢杆菌; 传染病研究所副芽孢杆菌; 大口黑鲈; 生长; 消化; 免疫; 肠道菌群

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)04-0479-13

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*), 俗名加州鲈, 属鲈形目(Perciformes), 太阳鱼科(Centrarchidae), 黑鲈属(*Micropterus*), 原产于美国密西西比河水系, 是一种温水肉食性淡水鱼类, 其因具有肉质鲜美、易于饲养、抗逆性强、经济价值高等特点, 自20世纪80年代从美国引进养殖以来, 目前已发展成为我国重要的养殖品种之一^[1-2]。早

期大口黑鲈养殖地区主要集中在广东、浙江、江苏等省份, 但近十年来北方地区如山东、河南等养殖规模及产量亦逐年增大, 特别是目前大宗淡水鱼价格低迷情况下大口黑鲈价格维持在较高价位, 更加促进了全国各省的规模化养殖。据中国渔业统计年鉴可知, 2021年全国大口黑鲈养殖产量为702093 t, 较2019年增长46.94%, 年增幅在

收稿日期: 2022-12-28; 修订日期: 2023-02-17。

基金项目: 国家重点研发计划蓝色粮仓科技创新专项(2020YFD0900405); 山东省重点研发计划项目(2021CXGC010806); 山东省自然科学基金项目(ZR2019PC018)。

作者简介: 王世贵(1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产营养学及微生物学. E-mail: 1074886559@qq.com

通信作者: 闫法军, 副研究员, 研究方向为水产微生物学及养殖生态学. E-mail: yanfajun2007@163.com

统计的 25 个鱼类养殖品种中位居前列。

消化和免疫为鱼类机体重要的生理功能,在鱼类的生长过程中起着重要的作用,保障着鱼类机体健康和养殖效益的实现。此外,鱼类肠道内的微生物种类多、数量庞大,丰富、均衡且有益的肠道菌群同样对鱼类的生长、消化和健康起着重要的作用^[3]。然而在目前高密度集约化的养殖模式下,受环境、营养、病原感染和养殖条件等因素的影响,大口黑鲈的生长、消化和健康问题愈发突出,严重影响该产业的持续发展^[4]。传统上使用抗生素来促进水产动物生长和防治病害,但往往也导致了病原微生物的进化及药物残留等问题的出现。而众多研究表明,益生菌在机体微生态调控中发挥着重要的作用,具有促进养殖生物生长、提高对营养物质的消化吸收、增强免疫机能及改善肠道内环境平衡等作用,成为替代抗生素的重要选择之一^[5-6]。因此,益生菌作为一种新型环保饲料添加剂在水产养殖上一直得到广泛研究。

芽孢杆菌属细菌(*Bacillus* sp.)因产芽孢、耐高温、耐酸碱、具有良好的稳定性和抗逆性等优点,常作为益生菌用于水产养殖对象,且它们的有益作用已得到广泛认可。例如,在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[7]、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)^[8]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[9]、莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[10]以及大口黑鲈^[4]等养殖对象饲料中添加芽孢杆菌类细菌可在一定程度上促进养殖对象的生长、提高免疫力和消化力及改善肠道菌群等。但目前类似的研究多集中于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)等常见芽孢杆菌菌种,对于稀有类型的芽孢杆菌的益生作用研究甚少。为此,本研究拟选取在前期工作中分离筛选的两种不常见芽孢杆菌包括热带芽孢杆菌(*Bacillus tropicus*)和传染病研究所副芽孢杆菌(*Metabacillus idriensis*)为研究对象,探讨它们对水产养殖对象的益生效果。两株芽孢杆菌均为从草鱼养殖水体分离所得,经初步研究,两株菌均为环境友好型菌株,具有净化水体的作用,而它们对鱼类的益生作用影响

目前尚未知。因此本研究以大口黑鲈为实验对象,通过向饲料中添加不同浓度的热带芽孢杆菌和传染病研究所副芽孢杆菌来探讨其对大口黑鲈生长、消化、免疫及肠道菌群的影响,为该两种菌株作为大口黑鲈饲用益生菌的应用提供参考依据。同时,本研究将为大口黑鲈益生菌种资源开发及大口黑鲈养殖产业的环保可持续发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

实验所用菌株为两种芽孢杆菌,即热带芽孢杆菌和传染病研究所副芽孢杆菌,均为课题组在前期工作中从草鱼养殖水体分离筛选、保存的菌种(保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号分别为 CGMCC No.21730、No.25498)。

1.2 菌株致病性检测

采用体腔注射方法对热带芽孢杆菌和传染病研究所副芽孢杆菌的生物安全性进行检测^[11]。取 30 尾大口黑鲈,随机均分为 3 组,包括对照组和两菌处理组,对照组鱼腹腔注射 0.1 mL 无菌生理盐水,而菌处理组为鱼腹腔注射 0.1 mL、浓度为 10^9 CFU/mL 的相应菌生理盐水悬液,注射后所有鱼置于室内循环水养殖系统,采取正常的养殖管理(见 1.4),并投喂大口黑鲈基础饲料,连续观察一周记录鱼的疾病和死亡状况。结果发现所有鱼机体健康活泼,未发生疾病及死亡现象,表明热带芽孢杆菌和传染病研究所副芽孢杆菌对大口黑鲈均无致病性。

1.3 实验饲料制备

实验所用基础饲料为大口黑鲈 4 号商品饲料,购于福建天马科技集团股份有限公司,其原料组成及营养水平见表 1。

将不同菌株分别接种到 LB 液体培养基中,于 30 °C、100 r/min 恒温震荡活化培养 36 h(基本处于对数生长期),采用平板培养计数法进行菌株计数(各菌株活菌数 $\geq 10^8$ CFU/mL)。配制实验饲料时,首先将饲料粉碎、混合均匀后,取培养至对数期一定体积的菌培养液,10000 r/min、30 min 离心后,弃掉上清液,再加入相同体积的无菌生

表 1 基础饲料组成及营养水平(%干饲料)

Tab. 1 Composition and nutrient levels of basic diet (% dry diet)

原料组成 ingredient proportion		营养水平 nutrient level	
鱼粉 fish meal	34.58	粗蛋白质 crude protein	49.0
豆粕 soybean meal	22.87	粗脂肪 crude lipid	6.0
虾粉 krill meal	8.73	粗纤维 crude fiber	5.0
面粉 wheat flour	26.30	粗灰分 crude ash	16.0
鱼油 fish oil	1.03	钙 calcium	1.0
豆油 soybean oil	1.03	总磷 total phosphorus	1.0
磷脂油 phospholipid oil	2.11	L-赖氨酸 L-lysine	2.5
矿物元素 mineral elements	2.80		
维生素 C vitamin C	0.05		
氯化胆碱 choline chloride	0.50		

理盐水重悬制成菌悬液; 然后取不同体积的菌悬液(各菌株分别为 0.1、10 mL)用无菌生理盐水稀释至一定体积后, 分别均匀喷洒在 1 kg 已粉碎饲料表面[菌液体积(mL)和饲料质量(g)比例为 1:20, 保证配制后饲料原料不过湿, 并可在较短时间内烘干], 用无菌器具充分混匀, 再用饲料颗粒机挤压成型, 按照所需大小剪切成相应颗粒^[7], 制成各菌株添加量皆为 10^4 和 10^6 CFU/g 的 4 种实验饲料, 包括热带芽孢杆菌 10^4 CFU/g (标记为 BT4) 和 10^6 CFU/g (BT6)、传染病研究所副芽孢杆菌 10^4 CFU/g (MI4) 和 10^6 CFU/g (MI6), 而对照组 (Control) 饲料则添加等体积无菌生理盐水。将上述所有实验饲料于 55 °C 烘干后置于 4 °C 冷藏。为防止污染并保持菌株的活性, 实验饲料每 3 d 制备 1 次。

1.4 饲喂实验

实验用鱼购于山东泰丰鸿基农业科技开发有限公司, 正式实验之前进行为期两周的驯养, 期间投喂大口黑鲈基础饲料。实验于室内循环水养殖系统中进行。驯养后, 饥饿 24 h, 挑选 300 尾健壮无伤、大小均匀的鱼转移至循环水室, 并随机平均分配到 15 个水槽(直径 0.95 m, 深 1 m 的塑料圆桶)中。实验按照上述受试饲料不同共分为 5 个处理组, 每组 3 个重复, 每个重复 20 尾鱼, 鱼初始体重为 (92.95 ± 2.36) g。每天定时投喂两次(上午 8:00; 下午 5:00), 近饱食投喂, 每次投喂时采取少量多次投放, 尽可能使饵料沉底前即被大口

黑鲈抢食完毕, 饲喂结束后立即捞起残饵并进行计数。实验期间水温 26 °C 左右, pH 7.0~8.0, 循环水泵全程开启, 每个实验水槽水循环量 ≥ 3.2 L/min, 保持溶解氧浓度 ≥ 8 mg/L, 氨氮含量 < 0.03 mg/L。每周进行 1~2 次吸污排水并进行换水, 每次换水量为 1/4~1/3, 养殖周期为 60 d, 期间各处理组均未出现鱼死亡情况。

1.5 样品采集与指标测定

1.5.1 样品采集 养殖实验结束后停食 24 h, 将每个水槽中大口黑鲈全部捞出, 用丁香酚液 (1:10000) 麻醉后, 逐尾进行称重并统计摄食量, 测定鱼生长性能指标。然后于每个水槽随机捞取 10 尾鱼, 用 75% 乙醇擦拭鱼体, 用 1 mL 无菌注射器进行心脏抽血, 血样放入灭菌的 1.5 mL 离心管中, 4 °C 过夜, 然后在 4 °C、4 000 r/min 下离心 10 min, 收集上清血清, 分装后于 -80 °C 保存, 用于血清免疫酶活性检测; 解剖鱼体, 无菌操作取出前中肠, 剔除附着的脂肪组织, 用无菌生理盐水漂洗后, 称取所需重量的肠道组织, 加入适量的无菌生理盐水, 使用匀浆器充分研磨, 然后在 4 °C、2 500 r/min 下离心 10 min, 取上清液为组织匀浆液, 分装后置于 -80 °C 保存, 用于肠道免疫酶和消化酶活性检测。另于每个水槽随机取 6 尾鱼, 按照上述方法解剖取肠道, 用无菌生理盐水冲洗后收集于无菌离心管中, -80 °C 保存, 用于肠道微生物的检测。

1.5.2 生长指标测定 鱼生长性能指标计算公式如下^[12]:

$$\text{增重率}(\text{weight gain rate, WGR}) =$$

$$100\% \times (W_f - W_0) / W_0$$

$$\text{特定生长率}(\text{specific growth rate, SGR}) =$$

$$100\% \times (\ln W_f - \ln W_0) / t$$

饲料系数(feed coefficient ratio, FCR) = $I_t / (W_f - W_0)$
式中, W_f 为鱼终末体重(g); W_0 为鱼初始体重(g); t 为实验天数(d); I_t 为摄食饲料干重(g)。

1.5.3 相关酶活性指标测定 将 -80 °C 保存的血清和肠道组织匀浆液样品置于冰上解冻后, 采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒对样品相关酶活指标进行测定。其中, 血清免疫酶测定方法: 酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP) 和碱性磷

酸酶(alkaline phosphatase, AKP)活性均采用磷酸苯二钠法测定^[13]; 溶菌酶(lysozyme, LZM)活性采用比浊法测定^[14]; 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性采用黄嘌呤氧化酶法测定^[15]。肠道免疫酶测定方法同血清。肠道消化酶测定方法: 淀粉酶活性测定采用 DNS 还原糖法^[16]; 蛋白酶活性测定采用 Folin-酚试剂法^[17]; 肠道样品蛋白含量采用考马斯亮蓝法^[18]测定。

1.5.4 肠道菌群测定 采用 16S rDNA 法对肠道菌群多样性及组成进行测定^[19]。首先, 用试剂盒(E.Z.N.A. Soil DNA Kit, Omega, 美国)提取肠道微生物基因组 DNA, 然后用通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对 16S rRNA 基因的 V3-V4 区进行扩增, 基于 Illumina Miseq PE300 测序平台进行高通量测序(由上海美吉生物医药科技有限公司完成)。测序完成后先对原始序列进行处理, 查找并去除嵌合体; 然后用 UPARSE version 7.1 软件将所有序列按 97%相似性进行聚类, 得到操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)及每个 OTU 的丰度情况; 应用 RDP Classifier 贝叶斯算法将 OTU 与 GreenGenes 数据库(<http://greengenes.secondgenome.com>)进行比对, 比对阈

值设定为 0.7, 完成 OTU 的物种注释。

1.6 数据统计分析

生长及相关酶活数据分析采用 SPSS 26.0 软件进行, 使用 Excel 2010 绘图; 肠道菌群数据分析在美吉生物云平台(www.majorbio.com)上进行, 计算每组样品 OTUs 的多样性包括丰富度指数(Chao1)、香农指数(Shannon)及辛普森指数(Simpson), 并利用 R 语言(version 3.3.1)工具绘制 OTU 组成韦恩图(Venn)和物种组成(属水平)柱状图、heatmap 图及物种差异检验条形图。对相关数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 并采用 Duncan's 多重比较法进行组间差异显著性检验, 显著性水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 两种芽孢杆菌对大口黑鲈生长的影响

各菌处理组与对照组之间大口黑鲈的终末体重、增重率及特定生长率均无显著性差异($P>0.05$), 但比较来看, 鱼的生长在各菌处理组优于对照组, 特别是 BT6 和 MI6 (表 2)。对于饲料系数, 各菌处理组均显著低于对照($P<0.05$), 且 BT6 显著低于 BT4, MI6 显著低于 MI4 ($P<0.05$)。

表 2 各处理组大口黑鲈生长性能的变化

Tab. 2 Changes of growth performance of *Micropterus salmoides* in different groups

组别 group	初始体重/g initial weight	终末体重/g final weight	增重率/% WGR	特定生长率/(%/d) SGR	饲料系数 FCR
对照 control	92.95±2.36	206.75±12.06	122.43±12.97	1.33±0.09	1.37±0.03 ^{a/A}
BT4	92.95±2.36	214.44±12.67	130.71±13.63	1.39±0.09	1.29±0.02 ^b
BT6	92.95±2.36	219.14±9.86	135.76±10.61	1.43±0.07	1.18±0.05 ^c
MI4	92.95±2.36	213.17±15.48	129.33±16.65	1.38±0.12	1.31±0.04 ^B
MI6	92.95±2.36	216.03±11.62	132.42±12.50	1.41±0.09	1.22±0.03 ^C

注: 同列数据小写字母表示对照组与热带芽孢杆菌(BT)之间有显著差异($P<0.05$), 大写字母表示对照组与传染病研究所副芽孢杆菌(MI)之间的显著性差异($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference between control and *Bacillus tropicus* (BT) groups ($P<0.05$), and different uppercase indicate significant difference between control and *Metabacillus idriensis* (MI) groups ($P<0.05$).

2.2 两种芽孢杆菌对大口黑鲈消化力的影响

与对照相比, 大口黑鲈消化酶活性在各菌处理组均得到了不同程度的提高(图 1)。其中, 淀粉酶活性在 BT6 显著高于对照及 BT4, 在 MI6 显著高于对照(图 1a, $P<0.05$); 蛋白酶活性在不同菌处理组与对照之间具有相似的变化, 排序为 BT6>BT4>对

照、MI6>MI4>对照(图 1b, $P<0.05$)。总体来看, BT6 与 MI6 对大口黑鲈的消化力具有最佳提高效果。

2.3 两种芽孢杆菌对大口黑鲈免疫力的影响

血清 ACP 活性以 BT6>BT4>对照、MI6=MI4>对照(图 2a, $P<0.05$), 而肠道 ACP 活性在各组之间无显著差异(图 2a, $P>0.05$); 血清 AKP 活性以

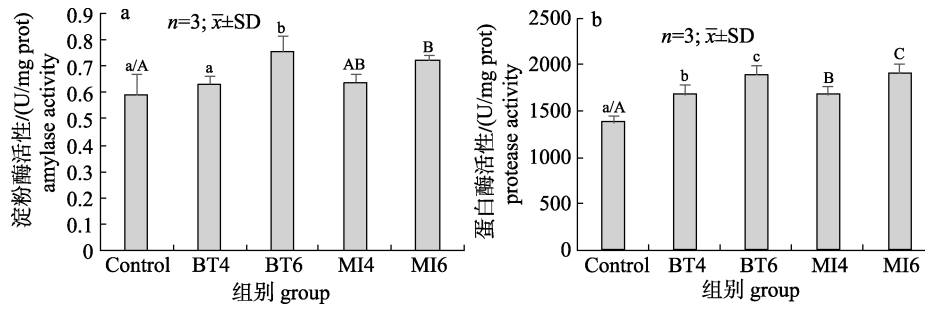


图 1 各处理组大口黑鲈消化酶活性的变化

a. 淀粉酶; b. 蛋白酶。小写字母表示对照组与热带芽孢杆菌(BT)之间有显著差异($P<0.05$), 大写字母表示对照组与传染病研究所副芽孢杆菌(MI)之间的显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 1 Changes of digestive enzyme activities of *Micropterus salmoides* in different groups

a. Amylase; b. Protease. Different lowercase letters indicate significant difference between control and *Bacillus tropicus* (BT) groups ($P<0.05$), and different uppercase indicate significant difference between control and *Metabacillus idriensis* (MI) groups ($P<0.05$).

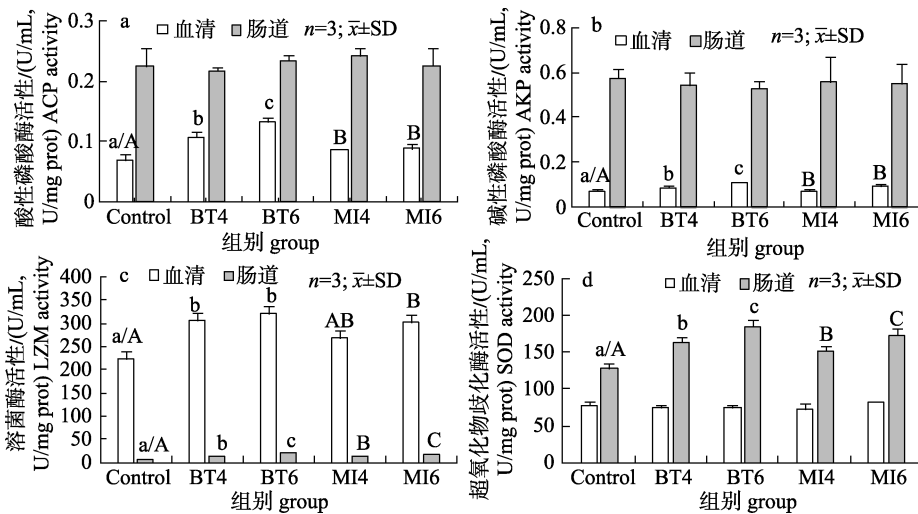


图 2 各处理组大口黑鲈血清与肠道免疫酶活性的变化

a. 酸性磷酸酶; b. 碱性磷酸酶; c. 溶菌酶; d. 超氧化物歧化酶($n=3$)。小写字母表示对照组与热带芽孢杆菌(BT)之间有显著差异($P<0.05$), 大写字母表示对照组与传染病研究所副芽孢杆菌(MI)之间的显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 2 Changes of serum and intestinal immune enzyme activities of *Micropterus salmoides* in different groups

a. Acid phosphatase; b. Alkaline phosphatase; c. Lysozyme; d. Superoxide dismutase. Different lowercase letters indicate significant difference between control and *Bacillus tropicus* (BT) groups ($P<0.05$), and different uppercase indicate significant difference between control and *Metabacillus idriensis* (MI) groups ($P<0.05$).

BT6>BT4>对照、MI6>MI4=对照(图 2b, $P<0.05$), 肠道 AKP 活性在各组间亦无显著差异(图 2b, $P>0.05$); 对于 LZM 活性(图 2c), 血清中以 BT6=BT4>对照、MI6>对照($P<0.05$), 肠道中以 BT6>BT4>对照、MI6>MI4>对照($P<0.05$); 而 SOD 活性(图 2d), 血清中各组间无显著差异($P>0.05$), 肠道中以 BT6>BT4>对照、MI6>MI4>对照($P<0.05$)。结果表明, 各菌株对大口黑鲈不同组织免疫功能均有显著提高作用, 总体来看, BT6 与 MI6 的免疫增强效果最佳。

2.4 两种芽孢杆菌对大口黑鲈肠道菌群的影响

2.4.1 肠道菌群 OTU 数量及多样性的变化

高通量测序结果揭示所有样品中一共发现 555 个 OTU。为直观展示各组样品中 OTU 的组成情况, 构建 Venn 图(图 3)。结果发现, 各组样品在 OTU 数量及构成上均存在明显差异(5 组样品中仅有 16 个共同 OTUs), 特别是在 BT6、MI6 与对照组之间($P<0.05$)。其中在 OTU 总数上, BT6 (60)明显低于对照组(192), 而 MI6 (347)则大大高于对照组; 在特有 OTU 数量上, BT6 (8)亦大大低于对照(34),

而 MI6 (196)则显著高于对照组。

根据各组样品的 OTU 数量, 采用 Chao 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数对肠道菌群多样性进行分析(表 3)。5 组样品测序覆盖度均在 99.9% 以上, 因而测序量足够, 可充分反映大口黑鲈肠道菌群真实状况。统计分析发现, 各多样性指数在各组之间差异均不显著($P>0.05$)。尽管如此, 与对照相比, Chao 指数(反映丰富度)在 BT6 明显降低而在 MI6 则明显升高(与 OTU 结果一致), Shannon 指数在 BT6、MI6 均明显增大, 而 Simpson 指数在 BT6、MI6 均有所降低(该指数值越低, 多样性越高)。研究结果表明, BT6 与 MI6 对肠道菌群多样性均产

生了一定程度的提高作用; 不同的是, BT6 会降低菌群丰富度, 而 MI6 则大大提高了菌群丰富度。

2.4.2 肠道菌群组成的变化 高通量测序发现所有样品一共有 321 个属的细菌。如图 4 所示, 共检测出支原菌属(*Mycoplasma*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)等优势菌群及其他低丰度的细菌。其中, 对照、BT4、MI6 组的优势菌基本相同, 为支原菌属(相对丰度分别为 79.21%, 91.30%和 69.77%)、邻单胞菌属(17.07%, 2.89%和 2.27%)、鲸杆菌属(3.09%, 4.10%和 23.92%); MI4 组的优势菌为支原菌属(75.05%)、邻单胞菌属(22.28%)及气单胞菌属(1.16%); BT6 的优势菌为支原菌属(39.92%)、邻单胞菌属(31.18%)、鲸杆菌属(22.33%)和气单胞菌属(6.33%)。样品主成分分析(principle component analysis, PCA)发现各处理组菌群结构组成差异不显著($P>0.05$)(数据未列出)。尽管如此, 将相对丰度为前 50 菌属在各组中绘制 heatmap 图, 揭示其分布状况(图 5), 结果发现, BT6 和 MI6 与对照组

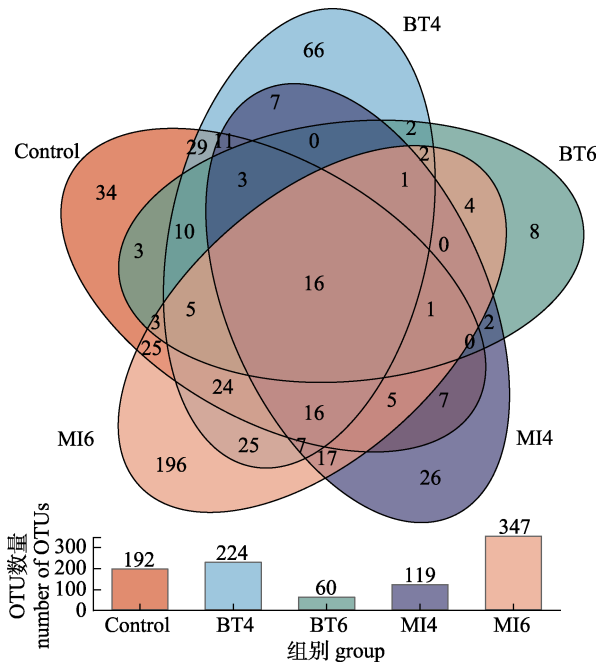


图 3 各处理组 OTU 数量对比韦恩图
Fig. 3 Venn diagram indicating shared and particular OTUs in different groups

表 3 基于 OTU 的各处理组的菌群多样性
Tab. 3 Bacterial diversity of different groups based on OTU data

组别 group	Chao 指数 Chao index	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	覆盖度/% coverage
对照 control	110.47±54.91	0.52±0.21	0.72±0.19	99.93±0.00
BT4	110.50±75.58	0.40±0.26	0.84±0.22	99.92±0.00
BT6	42.31±25.12	1.00±0.27	0.41±0.19	99.97±0.00
MI4	70.46±31.66	0.36±0.25	0.82±0.26	99.96±0.01
MI6	164.06±81.91	0.86±0.45	0.59±0.22	99.92±0.00

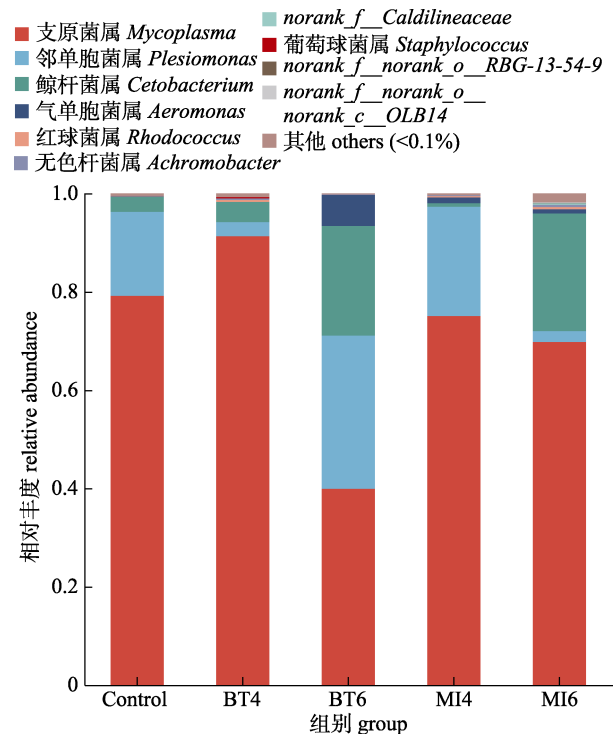


图 4 各处理组肠道菌群组成(属水平)
Fig. 4 Composition of intestinal microbial community in different groups (at genus level)

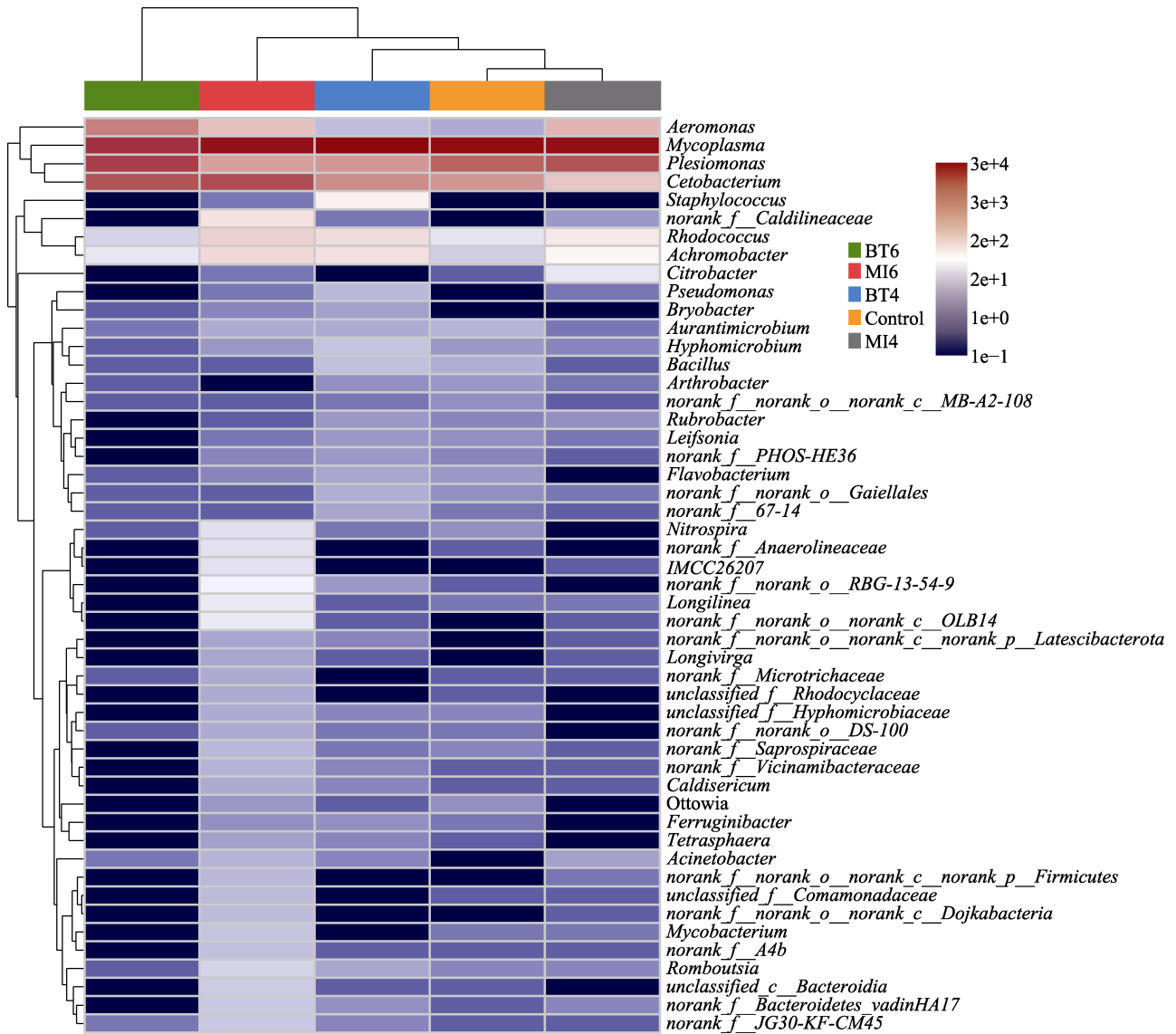


图 5 各处理组大口黑鲈肠道菌群组成的 heatmap 图

基于相对丰度为前 50 的菌属, 其中, *Citrobacter*: 柠檬酸杆菌属; *Pseudomonas*: 假单胞菌属; *Hyphomicrobium*: 生丝微菌属; *Bacillus*: 芽孢杆菌属; *Arthrobacter*: 节杆菌属; *Rubrobacter*: 红色杆菌属; *Leifsonia*: 雷夫松氏菌属; *Flavobacterium*: 黄杆菌属; *Nitrospira*: 硝化螺旋菌属; *Longilinea*: 长绳菌属; *Caldisericum*: 硫代硫酸盐还原菌属; *Acinetobacter*: 不动杆菌属; *Mycobacterium*: 分歧杆菌属; *Romboutsia*: 罗姆布茨菌属。

Fig. 5 Heatmap diagram of the intestinal microbial community in different groups of *Micropterus Salmoides* Based on top 50 most abundant genera.

之间菌群组成有明显不同, 其中, BT6 组大多数菌群丰度值低于对照组, 说明热带芽孢杆菌对它们有一定抑制作用; 而 MI6 则相反, 大多数菌群丰度值高于对照组, 说明传染病研究所副芽孢杆菌可促进低丰度类群的生长。这在很大程度上解释了各菌株对肠道菌群 OTU 数量及多样性(丰富度)的影响结果。

基于样品中所有菌属丰度数据, 采用单因素

方差分析查明各菌株作用下肠道菌群中有显著变化的类群(图 6)。结果表明, 对于热带芽孢杆菌(图 6a), 支原菌属、*Aurantimicrobium* 在各组间具有显著差异($P < 0.05$), 二者均表现为在 BT6 显著低于对照组; 对于传染病研究所副芽孢杆菌(图 6b), 仅见 *Aurantimicrobium* 在各组间具有显著差异($P < 0.05$), 表现为 MI4(而非 MI6)显著低于对照组。这说明, 热带芽孢杆菌可显著抑制主导优势

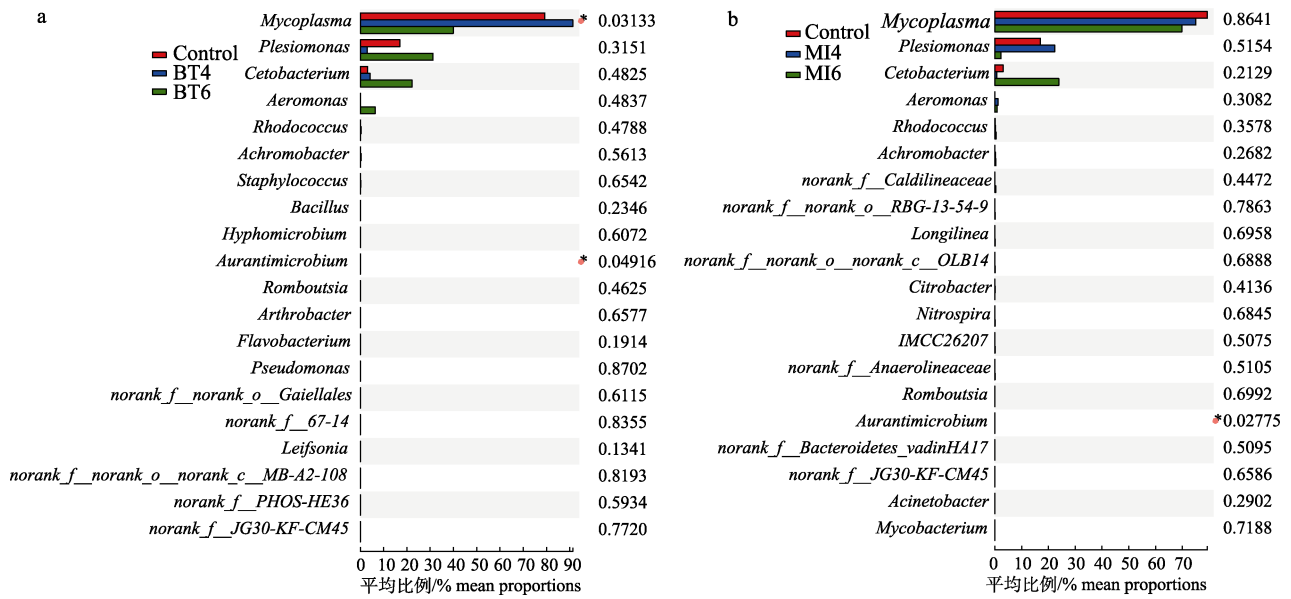


图 6 不同处理组肠道菌群组成的单因素方差分析条形图

a. 对照及热带芽孢杆菌处理组; b. 对照及传染病研究所副芽孢杆菌处理组. 各图仅显示相对丰度为前 20 的菌属.

Fig. 6 One-way ANOVA bar plots of the intestinal microbial community (at genus level) in different groups

a. Control and *B. tropicus* treatments; b. Control and *M. idriensis* treatments. Only top 20 most abundant taxa were shown.

菌的生长, 而传染病研究所副芽孢杆菌对优势菌及其他菌群的影响程度基本不显著($P > 0.05$)。综上所述, 研究结果总体上表明 BT6 和 MI6 对肠道菌群组成产生了较为明显的不同的影响, 但二者对菌群多样性均有一定程度的提高作用, 可能反映了不同菌株对肠道菌群的作用途径或方式的差异。

3 讨论

诸多研究表明, 当芽孢杆菌作为饲料添加剂应用于养殖鱼类时, 它们不仅可在鱼类肠道内代谢产生大量的可以被鱼类直接吸收利用的氨基酸、维生素类等营养物质, 还能刺激鱼类机体并显著提高其肠道淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶等消化酶活性^[20-22]。这些易吸收的营养成分及增强的消化能力将有利于提高鱼类对饲料的消化利用, 最终达到促进鱼类生长的效果^[23]。本研究发现, 饲料中添加热带芽孢杆菌或传染病研究所副芽孢杆菌皆可显著提升大口黑鲈肠道淀粉酶和蛋白酶活性, 且其提升效果随添加水平的增加而升高。类似的研究结果颇多, 如高凤祥等^[24]研究表明, 饲料中添加复合芽孢杆菌可显著提高大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)肠道消化酶活性。于道德等^[7]研

究表明, 饲料中添加枯草芽孢杆菌 HSP05 可显著提高凡纳滨对虾的蛋白酶、淀粉酶活性, 且 10^7 CFU/g 添加水平的提升效果显著优于 10^5 CFU/g。笔者推测, 芽孢杆菌作为益生菌可刺激养殖动物肠道中开放型细胞分泌激素, 进而调节消化酶的分泌^[25], 并且高水平添加的实验菌株对其刺激效果更强。另一方面, 众多研究表明, 芽孢杆菌等益生菌本身可产生多种胞外酶如淀粉酶、蛋白酶及脂肪酶等, 这些外源水解酶类可促使摄食饲料分解成小分子营养成分从而在一定程度上弥补动物肠道内源消化酶的不足^[23]。因此, 这些益生菌特性可使养殖对象消化吸收性能得到明显提升, 从而提高饲料消化率和利用效率, 最终达到促进养殖动物生长的效果。这便解释了本研究中热带芽孢杆菌和传染病研究所副芽孢杆菌均可促进大口黑鲈生长特别是可显著降低其饵料系数, 且以高添加水平下促生长效果最佳的结果。类似的, 刘晓勇等^[26]研究发现, 饲料中添加不同质量分数的枯草芽孢杆菌粉剂喂养杂交鲟(*Acipenser baeri* ♂ × *Acipenser schrenkii* ♀)幼鱼, 最终添加质量分数为 0.05%、0.1%、0.25% 的实验组饵料系数显著低于对照组, 且随添加水平的提高而不断降低。然而, 本研究

中各实验组大口黑鲈的增重率及特定生长率虽有所提高但未达到显著水平, 这与张冬梅等^[4]在枯草芽孢杆菌对大口黑鲈生长性能影响研究中的结果类似, 推测原因可能为本研究所选取的实验对象质量基数过大或者养殖时长较短所导致。

非特异性免疫是鱼类主要的免疫形式, 而 AKP、ACP、LZM 及 SOD 是反映鱼类非特异免疫力的重要指标^[27], 在养殖生产上有重要的指示作用。本研究发现, 添加不同浓度的热带芽孢杆菌和传染病研究所副芽孢杆菌均显著提高了大口黑鲈血清 ACP、AKP 及 LZM 活性以及肠道 LZM 和 SOD 的活性, 且总体来看以高添加水平免疫提升效果最佳。ACP 和 AKP 能够水解细菌表面的磷酸单酯, 提高吞噬细胞降解异物的速度, 是动物溶酶体的重要组成部分, 保护机体防御病原体入侵^[28]。刘梦等^[29]研究发现, 饲料中添加蜡样芽孢杆菌饲喂凡纳滨对虾后, 对虾血清中 ACP 和 AKP 活性得到显著提升。王俊等^[8]研究表明, 饲料中添加凝结芽孢杆菌可显著提升脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 血清中的 ACP 和 AKP 活性。LZM 可以通过裂解细菌细胞壁而杀灭细菌, 是吞噬细胞杀菌的物质基础^[30], 而 SOD 能够有效清除机体内的氧自由基, 是抗氧化酶防御系统的第一道防线^[31]。张冬梅等^[4]研究发现, 饲料中添加枯草芽孢杆菌显著提高了大口黑鲈肠道 LZM 和 SOD 活性。同样, 于道德等^[7]研究表明, 饲料中添加枯草芽孢杆菌对凡纳滨对虾 LZM 及 SOD 活性有显著提升作用, 且高添加水平下提升作用优于低添加水平。本实验结果与上述研究结果类似。这表明, 同蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌等常见益生芽孢杆菌一样, 热带芽孢杆菌和传染病研究所副芽孢杆菌亦可刺激鱼体非特异性免疫系统, 提高其血清和肠道免疫酶活性, 有效增强鱼体的免疫力。但不同组织之间比较发现, 两种菌株均对血清中免疫酶指标影响更加强烈(图 2), 这类类似于 Yan 等^[32]的研究, 他们发现刺参 (*Apostichopus japonicus*) 体腔液比肠道组织对益生菌的免疫酶活性响应更加强烈。这说明, 同其他养殖生物一样, 大口黑鲈的免疫响应具有一定的组织特异性,

而这种组织之间的免疫反应差异可能与它们在免疫防御中的不同功能有关^[33]。基于此, 本研究结果指示大口黑鲈血清在其机体免疫防御系统中具有重要作用。

鱼类肠道内丰富、均衡的微生物对机体的生长和健康起着重要的作用, 一旦菌群失调, 将有可能影响鱼类的消化和免疫系统, 导致疾病的发生^[34]。对于芽孢杆菌类细菌, 它们对鱼虾类肠道微生物的调控作用早已得到认可。例如, 李卫芬等^[35]研究表明, 投喂含 10^8 CFU/kg 的枯草芽孢杆菌饲料对草鱼肠道菌群有一定的改善作用; 孟宵鹏等^[36]研究发现, 类芽孢杆菌对凡纳滨对虾肠道菌群具有一定的调节作用。类似的, 本研究发现, 高浓度的热带芽孢杆菌(BT6)和传染病研究所副芽孢杆菌(MI6)对大口黑鲈肠道菌群多样性皆产生了一定程度的提高作用。微生物的多样性往往是其丰富度和均匀度的综合体现, 如 Shannon 指数。然而, 比较发现, BT6 会降低菌群丰富度, 而 MI6 则大大提高了菌群丰富度, 这说明 BT6 大大增加了菌群的均衡性, 不同于 MI6。在菌群组成方面, 本研究发现, 大口黑鲈肠道存在一个以支原菌属、邻单胞菌属和鲸杆菌属为主的微生物群落, 这与黄河等^[19]及 Larsen 等^[37]研究结果一致。同样, BT6 和 MI6 与对照组之间菌群组成差异最明显(图 5), BT6 会显著抑制主导优势菌支原菌属的生长, 同时对多数低丰度菌群亦产生一定的抑制, 从而提高某些次优势菌的丰度(如邻单胞菌属、鲸杆菌属和气单胞菌属等), 这促进了菌群的平衡(图 4); 而 MI6 则主要提高了多数低丰度菌群的丰度, 这也在一定程度上促进了菌群的平衡。综上所述, 本研究表明, 热带芽孢杆菌和传染病研究所副芽孢杆菌皆可促进大口黑鲈肠道菌群平衡、提高其肠道菌群多样性, 而这种有益作用也可能在一定程度上促进了养殖对象的生长。此外, 本研究结果明显指示两种芽孢杆菌对肠道菌群的作用方式或途径明显不同, 这可能与不同菌株之间的差异有关。特别是近年来随着研究的深入, 诸多芽孢杆菌类细菌因具有某些特异性而独归一支(如副芽孢杆菌属^[38]), 但本质上它们仍可被作为芽孢杆菌类细菌进行探讨。而关于本研究中

两种芽孢杆菌各自与大口黑鲈肠道土著微生物的相互作用机理机制有待于今后进一步研究。

4 结论

本研究发现, 饲料中添加热带芽孢杆菌或传染病研究所副芽孢杆菌皆可促进大口黑鲈生长、增强消化和免疫力、促进肠道菌群平衡及提高肠道微生物多样性, 且在该研究条件下, 最佳添加量均为 10^6 CFU/g。本研究揭示了两种稀有类型芽孢杆菌在大口黑鲈上的益生作用效果, 为大口黑鲈益生菌的开发与应用提供了参考依据。

参考文献:

- [1] Harimana Y, Tang X, Xu P, et al. Effect of long-term moderate exercise on muscle cellularity and texture, antioxidant activities, tissue composition, freshness indicators and flavor characteristics in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Aquaculture*, 2019, 510: 100-108.
- [2] Gui J F, Tang Q S, Li Z J, et al. *Aquaculture in China: success stories and modern trends*[M].
- [3] Meng X L, Wu S K, Hu W P, et al. *Clostridium butyricum* improves immune responses and remodels the intestinal microbiota of common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Aquaculture*, 2021, 530: 735753.
- [4] Zhang D M, Yan H X, Luo M L, et al. Effects of dietary *Bacillus subtilis* on growth, intestinal tissue structure, antioxidant capacity, immunity and enteritis of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(1): 575-588. [张冬梅, 颜浩骁, 罗茂林, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对大口黑鲈幼鱼生长、肠道组织结构、抗氧化能力、免疫能力和肠炎的影响[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(1): 575-588.]
- [5] Balcázar J L, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, et al. The role of probiotics in aquaculture[J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 114(3-4): 173-186.
- [6] Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan M J, et al. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes[J]. *Aquaculture*, 2008, 274(1): 1-14.
- [7] Yu D D, Chen S L, Guo S J, et al. Effects of adding *Bacillus subtilis* HSP05 to feed on growth performance, disease resistance and nonspecific immunity of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(10): 6634-6642. [于道德, 陈胜林, 郭少菁, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌 HSP05 对凡纳滨对虾生长性能、抗病力和非特异性免疫力的影响[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(10): 6634-6642.]
- [8] Wang J, Zhang X J, Lin X Y. Effects of *Bacillus coagulans* on growth performance, serum antioxidant and nonspecific immune indexes of white shrimp[J]. *Feed Research*, 2022, 45(14): 50-53. [王俊, 张娴静, 林旭吟. 凝结芽孢杆菌对白虾生长性能、血清抗氧化及非特异性免疫指标的影响[J]. *饲料研究*, 2022, 45(14): 50-53.]
- [9] Zhang X P. Effects of *Bacillus subtilis* SC02 and *Pseudomonas stutzeri* F1M on the water quality of grass carp culture and their mechanisms.[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014. [张小平. 枯草芽孢杆菌 SC02 和施氏假单胞菌 F1M 对草鱼养殖水体水质的影响及机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.]
- [10] Gobi N, Vaseeharan B, Chen J C, et al. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahbl improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 501-508.
- [11] Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2000, 64(4): 655-671.
- [12] Wang M H, Li G L, Huang W Q, et al. Effects of compound plant extracts on growth performance, serum biochemical indexes and liver and intestinal health of largemouth bass[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(10): 1892-1901. [王梦华, 李国立, 黄文庆, 等. 饲料中添加复合植物提取物对大口黑鲈生长性能、血清生化指标和肝脏、肠道健康的影响[J]. *水产学报*, 2022, 46(10): 1892-1901.]
- [13] Dingle J T. *Lysosomes: A laboratory handbook*[M]. North-Holland, Amsterdam, 1978: 46-135
- [14] Chen C F, Ji G L. Activities and characterization of bacteriolytic substances in serum, skin and intestine mucus of grass carp[J]. *Journal of Huazhong Agricultural*, 1992, 11(3): 276-279. [陈昌福, 纪国良. 草鱼的血清、体表和肠粘液中溶菌物质活性及其特性[J]. *华中农业大学学报*, 1992, 11(3): 276-279.]
- [15] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase. an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein)[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1969, 244(22): 6049-6055.
- [16] Li J S, Li J L, Wu T T. Distribution and properties of amylase and lipase in alimentary tract of tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(5): 473-477. [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.]
- [17] Huang F, Yan A S, Mu S, et al. The protease and amylase of *Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*[J]. *Journal*

- of Fishery Sciences of China, 1999, 6(2): 14-17. [黄峰, 严安生, 牟松, 等. 鲢、鳙蛋白酶、淀粉酶的研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 14-17.]
- [18] Sedmak J J, Grossberg S E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250[J]. *Analytical Biochemistry*, 1977, 79(1-2): 544-552.
- [19] Huang H, Tian X X, Huang X X, et al. Fermented soybean meal instead of fish meal on growth, lipid metabolism, serum non-specific immunity and intestinal flora of juvenile largemouth bass[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(4): 466-477. [黄河, 田鑫鑫, 黄旭雄, 等. 发酵豆粕替代鱼粉对大口黑鲈幼鱼生长、脂质代谢、血清非特异性免疫及肠道菌群的影响[J]. 水生生物学报, 2022, 46(4): 466-477.]
- [20] Fu T X, Wei K J, Xu G H. General situation of research and application of *Bacillus* in aquaculture[J]. *Journal of Hydroecology*, 2007, 28(3): 102-104. [付天玺, 魏开建, 许国焕. 芽孢杆菌在水产养殖中的研究和应用概况[J]. 水利渔业, 2007, 28(3): 102-104.]
- [21] Cheng W, Chiu C S, Guu Y, et al. Expression of recombinant phytase of *Bacillus subtilis* E20 in *Escherichia coli* HMS 174 and improving the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, juveniles by using phytase-pretreated soybean meal-containing diet[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2013, 19: 117-127.
- [22] Mi R, Guan X Y, Wang Q Z, et al. Health-promoting effects on yesso scallop *Patinopecten yessoensis* fed supplementary diets of *Bacillus licheniformis* and mulberry leaf extracts[J]. *Fisheries Science*, 2022, 41(5): 1-13. [米锐, 关晓燕, 王庆志, 等. 地衣芽孢杆菌复合桑叶提取物对虾夷扇贝的益生作用[J]. 水产科学, 2022, 41(5): 1-13.]
- [23] Xiao L. Effects of *Bacillus subtilis* JS01 and *Astragalus polysaccharide* on growth and immune function of Jian carp[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2012. [肖拉. 枯草芽孢杆菌 JS01 和黄芪多糖对建鲤生长及免疫功能的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.]
- [24] Gao F X, Guo W, Pan L, et al. Effects of dietary probiotics on growth and digestive enzyme activities of juvenile *Scophthal musmaximus*[J]. *Marine Sciences*, 2011, 35(1): 10-16. [高凤祥, 郭文, 潘雷, 等. 几种益生菌对大菱鲆幼鱼生长及消化酶活性的影响[J]. 海洋科学, 2011, 35(1): 10-16.]
- [25] Li J E, Wu S Q, Ou Y J, et al. Study on mucous and gastrin cells of digestive tract in Qinglong grouper (*Epinephelus coioides* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) juveniles[J]. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(3): 67-73. [李加儿, 吴水清, 区又君, 等. 斜带石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代幼鱼消化道粘液细胞和胃泌素细胞的研究[J]. 南方水产科学, 2015, 11(3): 67-73.]
- [26] Liu X Y, Zhang Y, Qi Q, et al. Effects of *Bacillus subtilis* on growth, digestive enzyme activity, and non-specific immunity in hybrid sturgeon (*Acipenser baeri* ♂ × *Acipenser schrenkii* ♀) juveniles[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(6): 1315-1320. [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[J]. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1315-1320.]
- [27] He W C. Effects of two probiotics on growth performance, immune enzyme and digestive enzyme activities, intestinal flora structure and TLR9 gene expression of juvenile cobia[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2015. [何伟聪. 二种益生菌对军曹鱼幼鱼生长性能、免疫酶和消化酶活性、肠道菌群结构及 TLR9 基因表达量的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2015.]
- [28] Yan F, Hu W, Li C L, et al. Effects of dietary active yeast products on growth, immunity and disease resistance of sea cucumber (*Apostichopus japonicas* Selenka)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(2): 583-589. [严芳, 胡炜, 李成林, 等. 饲料中添加活性酵母制剂对刺参生长、免疫力和抗病力的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29(2): 583-589.]
- [29] Liu M, Wang L, Tian X L, et al. Effects of three probiotics and their complexes on growth performance and serum non-specific immunity of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2017, 47(S1): 35-41. [刘梦, 王苓, 田相利, 等. 三种益生菌及其复合菌对凡纳滨对虾生长和血清非特异性免疫的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2017, 47(S1): 35-41.]
- [30] Roy S, Kumar V, Kumar V, et al. Acute phase proteins and their potential role as an indicator for fish health and in diagnosis of fish diseases[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2017, 24(1): 78-89.
- [31] Zhang C N, Li X F, Xu W N, et al. Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(5): 1380-1386.
- [32] Yan F J, Tian X L, Dong S L, et al. Growth performance, immune response, and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* fed a supplementary diet of the potential probiotic *Paracoccus marcusii* DB11[J]. *Aquaculture*, 2014, 420-421: 105-111.
- [33] Sun Y X, Dong H B, Wang W H, et al. Effects of temperature on antioxidant capacity and immune associated protein expression in different tissues and organs of juvenile *Micropterus salmoides*[J]. *Ecological Science*, 2019, 38(3): 18-25. [孙永旭, 董宏标, 王文豪, 等. 温度对大口黑鲈幼鱼不同组织抗氧化能力及免疫相关蛋白表达的影响[J]. 生态科

- 学, 2019, 38(3): 18-25.]
- [34] Sun Y Z, Yang H L. A review: Distribution and manipulation of fish gut microflora[J]. Fisheries Science, 2008, 27(5): 257-261. [孙云章, 杨红玲. 浅谈鱼类消化道微生物的分布及调控[J]. 水产科学, 2008, 27(5): 257-261.]
- [35] Li W F, Shen T, Chen N N, et al. Effects of dietary *Bacillus subtilis* on digestive enzyme activity and intestinal microflora in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(3): 221-225. [李卫芬, 沈涛, 陈南南, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对草鱼消化酶活性和肠道菌群的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(3): 221-225.]
- [36] Meng X P, Meng Y, Wang Y, et al. Effects of probiotics on immunologic functions and intestinal microflora in Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Fisheries Science, 2017, 36(1): 60-65. [孟霄鹏, 孟阳, 王悦, 等. 益生菌对凡纳滨对虾免疫功能及肠道菌群的影响[J]. 水产科学, 2017, 36(1): 60-65.]
- [37] Larsen A M, Mohammed H H, Arias C R. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warm-water fish species[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 116(6): 1396-1404.
- [38] Patel S, Gupta R S. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* Gen. nov., *Cytobacillus* Gen. nov., *Mesobacillus* Gen. nov., *Neobacillus* Gen. nov., *Metabacillus* Gen. nov. and *Alkalihalobacillus* Gen. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(1): 406-438.

Effects of two probiotics on growth, digestion, immunity, and intestinal microbial communities of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

WANG Shigui^{1,2}, YAN Fajun², ZHANG Minglei², MAO Shuquan², ZHU Yong'an², FU Chaosong¹, SONG Liping², LIU Feng²

1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Shandong Freshwater Fisheries Research Institute, Shandong Provincial Key Laboratory of Freshwater Genetics and Breeding, Jinan 250013, China

Abstract: In this study, the probiotic effects of *Bacillus tropicus* and *Metabacillus idriensis* on the growth, digestion, immunity, and intestinal microflora of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) were investigated by adding them separately at different concentrations to *M. salmoides* diets. The largemouth bass, with an initial body weight of (92.95±2.36) g, were randomly divided into five groups with three replicates each. The fish were fed a basal diet (labeled as the control group) or four experimental diets (supplemented in the basal diet with 10⁴ and 10⁶ CFU/g *B. tropicus* (BT4 and BT6, respectively) or *M. idriensis* (MI4 and MI6, respectively)) for 60 days. The results of growth performance showed that the final body weight, weight gain rate, and specific growth rate of largemouth bass in all bacterial groups were higher than those in the control group, but the differences were not significant ($P>0.05$). However, the feed conversion ratio was significantly lower in each bacterial group than in the control, which also significantly decreased with the increase in supplemented concentration for each strain ($P<0.05$). The digestion results showed that the activities of intestinal amylase and protease of each bacterial group were all significantly higher than those of the control group ($P<0.05$), and BT6 and MI6 generally exhibited optimum results for digestion improvement. The results of the immune response showed that all bacterial treatments significantly increased the activities of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and lysozyme (LZM) in the sera of the largemouth bass, as well as the activities of intestinal LZM and superoxide dismutase ($P<0.05$). In comparison, BT6 and MI6 both showed optimal immune enhancement results in general. The intestinal microbial results from high-throughput sequencing showed that *Mycoplasma*, *Plesiomonas*, and *Cetobacterium* were the dominant bacteria in the intestines of the largemouth bass. Compared with the control group, BT6 and MI6 exhibited distinct differences in the number of OTUs, diversity indices, and microflora structure. BT6 significantly

reduced the abundance of the predominant *Mycoplasma* ($P<0.05$) as well as that of most of the inferior populations to increase the homogeneity of microflora and thus increase microbial diversity. On the contrary, MI6 increased bacterial richness, homogeneity, and diversity by promoting the growth of most of the rare populations. This difference might reflect the different effects of distinct strains on the intestinal microflora. In general, the results of this study confirmed the potential beneficial effects of both *Bacillus tropicus* and *Metabacillus idriensis* as dietary probiotics in largemouth bass with an optimal dosage of 10^6 CFU/g each under the laboratory conditions in this study, which could increase the growth, digestion, and immunity as well as the intestinal microbial diversity of the fish. This study provides theoretical support for the development and application of probiotics for largemouth bass.

Key words: *Bacillus tropicus*; *Metabacillus idriensis*; *Micropterus salmoides*; growth; digestion; immune; intestinal flora

Corresponding author: YAN Fajun. E-mail: yanfajun2007@163.com