

DOI: 10.12264/JFSC2023-0058

饲料中添加单株和多株乳酸乳球菌对鲤肠道健康、先天免疫和抗氧化能力的影响

刘小贝, 刘莎莎, 崔文姗, 袁逍, 常绪路, 张建新, 冯军厂

河南师范大学水产学院, 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南 新乡 453007

摘要: 为研究饲料中添加单株和多株乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)对鲤(*Cyprinus carpio*)肠道健康、先天免疫应答和抗氧化能力的影响, 将 480 尾健康鲤随机分为 8 组, CK (对照)组饲喂普通饲料, 处理组分别饲喂添加乳酸乳球菌的 7 种饲料: G1 组(*Lactococcus lactis* Q-8)、G2 组(*L. lactis* Q-9)、G3 组(*L. lactis* Z-2)、G4 组(*L. lactis* Q-8 + *L. lactis* Q-9)、G5 组(*Claudin* Q-8 + *L. lactis* Z-2)、G6 组(*L. lactis* Q-9 + *L. lactis* Z-2)、G7 组(*L. lactis* Q-8, + *L. lactis* Q-9 + *L. lactis* Z-2), 饲喂 60 d。结果显示, 饲料中添加乳酸乳球菌可显著提高鲤肠道蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性和紧密连接蛋白基因(*L.lactis*, *ZO-1*)表达量, 且多菌株处理组效果更显著($P<0.05$)。此外, 所有处理组均显著增加中肠绒毛长度($P<0.05$), 增加血清中促炎细胞因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α , G6 组除外)、白细胞介素 1β (IL- 1β)、IL-6、IL-12 和抗炎细胞因子 IL-10 (G6 组除外)和转化生长因子 β (TGF- β)的含量, 以及一氧化氮(NO)的水平($P<0.05$)。另外, 多菌株处理组可显著增加全肠肌层厚度($P<0.05$), 但对血清中碱性磷酸酶(AKP)活性影响不显著($P>0.05$)。处理组对肝脏抗氧化能力的调节作用显著高于对照组($P<0.05$), 其中 G7 组对谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)的调节作用更为显著($P<0.05$)。上述结果表明, 该 3 种乳酸乳球菌均能有效改善鲤的肠道健康、先天免疫应答和抗氧化能力, 并且联合使用的效果优于单一菌株。

关键词: 鲤; 乳酸菌; 肠道健康; 先天免疫; 抗氧化活性

中图分类号: S945

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)06-0711-12

水产养殖在提高全球渔业生产的可持续性方面发挥着越来越重要的作用。然而, 水产养殖业的集约化发展增加了水产养殖物种感染病原菌的风险^[1]。抗生素、杀菌剂和化学药物在预防及治疗疾病的同时也降低了肠道菌群中有益微生物的活性, 改变了水产生物物的微生态系统, 干扰了鱼类的营养、生理过程和免疫能力^[2-3], 并增加了病原体和有害化合物向消费者传播的风险^[4-5]。因此迫切需要替代的方法来应对水产养殖中病原体的威胁。

大量研究证明, 益生菌可以成为环境和消费者友好型的抗菌制剂, 解决防病治病及维持生态

环境稳定的问题。益生菌的作用通常包括通过改变水产养殖动物肠道的形态、微生物区系和消化能力来促进生长、提高饲料利用率、增强免疫力和抗病能力、改善肉品质等^[6-10]。作为非孢子益生菌, 乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是动物肠道中潜在的益生菌。LAB 可从养殖环境或健康动物肠道中分离获得, 因此, 它们是绿色、安全和环保的, 通常不会引起耐药性^[11]。研究已证明, LAB 可以被纳入鱼类的饲料中, 作为抗菌剂的潜在替代品, 以促进鱼类的生长并保护其免受各种致病性细菌的侵害^[12-13]。

目前, 越来越多的研究人员倾向于在水产养

收稿日期: 2023-04-06; 修订日期: 2023-05-09.

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(212102110106).

作者简介: 刘小贝(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产微生物工程与疾病预防. E-mail: 1963911296@qq.com

通信作者: 冯军厂, 讲师, 研究方向为水产微生物工程与疾病预防. E-mail: fjc15290022@126.com

殖中联合使用多种益生菌^[14-15], 主要原因是益生菌在联合使用时可发挥协同作用^[16]。例如, Li 等^[17]发现 5% 的复合益生菌(*Acetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., 和 *Lactobacillus* spp.) 可显著改善大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) 的肠道组织形态, 调节微生物区系并促进非特异性免疫反应和生长性能。Abasolo-Pacheco 等^[18]的研究得出相同结论, 即 3 种芽孢杆菌菌株(*Bacillus*) 在单一使用时, 对早期发育的扇贝(*Argopecten ventricosus*) 表现不佳, 而芽孢杆菌的混合物(MIX-B)在感染溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) 120 h 后, 显著增加了扇贝的存活率^[18]。另外, 与其他饲料组相比, 含有多菌株(*Bacillus subtilis*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*) 的饲料组可显著提高血清蛋白酶、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、髓过氧化物酶(MPO)和碱性磷酸酶(AKP)活性, 且多菌株处理组的免疫效率高于单菌株处理组^[19]。粪肠球菌(*Enterococcus faecium*) 和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) 联合使用时, 也能够抑制尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 肠道内潜在病原菌的生长^[16]。此外, 研究证明, 益生菌和益生元的联合使用也具有协同效应^[20]。例如, 饲料可发酵纤维 Vitacel® 和益生菌 PrimaLac® 的联合给药改善了拟鲤(*Rutilus frisii kutum*) 肠道微生物群和免疫黏液参数, 提高了肠道消化酶活性和生长性能^[21]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) FPTB13 和甲壳素单独使用显著提高了大多数免疫反应, 但在联合使用处理组中观察到最高的攻毒后存活率(63.33%)^[22]。这些结果共同表明, 应用复合益生菌可以有效地改善生长性能、免疫反应、抗氧化功能、肠道健康和抗病能力等, 进而获得更大的效益^[16-17, 23-26]。然而, 研究结果表明, 在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) 生长过程中, 加入单一的饲料益生菌, 特别是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 对免疫系统的积极影响比益生菌组合更大^[27]。这种不一致的结果可能与菌株的特异性和研究物种的差异性有关。此外, 复合益生菌在鲤养殖中的研究相对较少^[14]。

在前期的研究中, 本课题组从健康鲤肠道内容物中分离和筛选获得了 3 株乳酸乳球菌(*L.*

lactis Q-8、*L. lactis* Q-9、*L. lactis* Z-2), 并观察到它们对鲤的生长性能、抗病能力和先天免疫都有良好的作用^[11], 且联合使用对鲤的生长及糖类营养物质代谢具有协同作用^[14]。然而, 该 3 株乳酸菌的联合使用是否对鲤产生其他协同效应, 还有待进一步研究。因此, 本实验旨在研究该 3 株乳酸菌单株或联合使用对鲤肠道健康、先天免疫和抗氧化能力的影响, 为益生菌在水产养殖中的应用提供更多的参考。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

在本研究中使用的 3 株乳酸菌 *L. lactis* Q-8、*L. lactis* Q-9、*L. lactis* Z-2 是课题组前期从健康鲤肠道内容物中分离和筛选获取的^[11]。在实验过程中, 该 3 株乳酸菌在 MRS 培养基中 37 °C 条件下静置培养 20 h 以达到稳定生长期的初始阶段^[10]。

1.2 实验饲料

将达到稳定生长期初始阶段的 *L. lactis* Q-8、*L. lactis* Q-9 和 *L. lactis* Z-2 菌株培养液参考前期相关研究 8000 r/min 离心 10 min^[14], 菌体经无菌的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次后重悬浮。单一菌株直接喷洒在商业饲料上(碳水化合物 29.51%、粗蛋白 33.4%、脂质 6.8%、水分 9.4%、粗纤维 8.3%、灰分 8.23%), 而多菌株处理组以等比例混合(V/V)后进行喷洒, 各处理组的添加量均为 5×10^8 CFU/g (表 1)。将制备好的饲料在室温下干燥 2 h, 用单独的密封塑料容器分装后于 -20 °C 保存备用。此外, 在实验过程中对制备的饲料中 LAB 的活性和浸出率进行检查^[11], 并且饲料每周制备 1 次。

1.3 养殖实验

从附近的养殖场购买约 800 尾幼鲤, 并将其转移到河南师范大学的实验养殖基地。所有鲤在 5000 L 养殖桶中驯化 2 周, 并饲喂商业饲料。在驯化期间, 每天更换约 30% 的温度相近的新鲜脱氯水, 并持续曝气。水温控制在 (26.0 ± 0.5) °C、pH 为 6.5~7.1, 溶解氧 > 7.0 mg/L, 氨态氮 < 0.05 mg/L。驯化后, 选取 480 尾健康鲤, 体重 (44.79 ± 0.13) g, 随机分配到 24 个养殖桶(500 L, 装满 350 L 水)中,

分为 8 个实验组, 每组 3 个重复($n=20$), 分别投喂对照组饲料和添加乳酸乳球菌的 7 种饲料(表 1), 每天投喂 4 次(08:30、11:30、14:30 和 17:30), 持续 60 d, 饲养条件与驯化期一致。试验开始后, 每天以体重 3% 的量进行投喂, 并且每 2 周根据每个养殖桶中鱼的总重量调整 1 次投喂量。

1.4 样品收集

养殖实验进行至 60 d, 禁食 24 h 后, 从每个养殖桶中随机取 6 尾鱼进行麻醉, 尾静脉采血, 在 4 ℃ 放置过夜后, 离心(4 ℃, 3000 r/min, 30 min) 收集血清, 用于检测免疫指标。采血结束后, 解剖鱼体, 采集肝胰脏和肠道组织, 分别用于检测抗氧化指标、消化酶活性和肠道屏障等。另取 6 尾体重相近(120.0 ± 2.0) g 的鲤, 解剖分离前肠、中肠、后肠, 于 4.0% 多聚甲醛溶液(pH7.2~7.4)固定 24 h, 用于肠道组织学分析。除肠道组织学分析所用样品外, 其余样品均在液氮中快速冷冻, 并于

-80 ℃ 保存以待进一步分析。

1.5 肠道相关指标检测

1.5.1 消化酶活力 在养殖实验结束时测定肠道组织消化酶的活性。将整个消化道在低温条件下匀浆处理后, 低温离心 10 min (4 ℃, 4500 r/min)。将上清液作为粗酶提取液, 根据试剂盒说明书(南京建成, 中国)中描述的方法测定蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的活性^[28], 酶的活性均以 U/mg 蛋白表示。

1.5.2 实时定量 PCR (qRT-PCR) 使用 RNAiso Plus 试剂(TaKaRa, 中国)提取肠道总 RNA。经 1% 琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 分光光度计(Thermo, USA)分析 RNA 的完整性、纯度和浓度, 使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit (TaKaRa, 中国)将 RNA (500 ng)反转录为 cDNA。特异性引物列于表 2, β -actin 作为内参基因。qRT-PCR 的反应溶液包含 2.0 μ L cDNA 模板、10.0 μ L 2 $\times$ SYBR qPCR Mix (TaKaRa, 中国)、1.0 μ L PCR 引物(10 μ mol/L)

表 1 养殖实验分组
Tab. 1 The groups of the experiment

分组 group	饲料 fish food
对照组 control group	商业饲料 commercial fish food
G1 组 G1 group	商业饲料仅添加 <i>L. lactis</i> Q-8 commercial fish food containing <i>L. lactis</i> Q-8 only
G2 组 G2 group	商业饲料仅添加 <i>L. lactis</i> Q-9 commercial fish food containing <i>L. lactis</i> Q-9 only
G3 组 G3 group	商业饲料仅添加 <i>L. lactis</i> Z-2 commercial fish food containing <i>L. lactis</i> Z-2 only
G4 组 G4 group	商业饲料添加 <i>L. lactis</i> Q-8 和 <i>L. lactis</i> Q-9 (1 : 1, V/V) commercial fish food containing Q-8 and Q-9 (1 : 1, V/V)
G5 组 G5 group	商业饲料添加 <i>L. lactis</i> Q-8 和 <i>L. lactis</i> Z-2 (1 : 1, V/V) commercial fish food containing Q-8 and Z-2 (1 : 1, V/V)
G6 组 G6 group	商业饲料添加 <i>L. lactis</i> Q-9 和 <i>L. lactis</i> Z-2 (1 : 1, V/V) commercial fish food containing Q-9 and Z-2 (1 : 1, V/V)
G7 组 G7 group	商业饲料添加 <i>L. lactis</i> Q-8、 <i>L. lactis</i> Q-9 和 <i>L. lactis</i> Z-2 (1 : 1 : 1, V/V) commercial fish food containing Q-8, Q-9 and Z-2 (1 : 1 : 1, V/V)

注: *各处理组菌株添加量为 5×10^8 CFU/g.
Note: * The bacterium addition amount of each treatment group was 5×10^8 CFU/g feed.

表 2 实时定量 PCR 引物序列
Tab. 2 Real-time PCR primer sequences

基因 gene	引物序列 (5'-3') primer sequence (5'-3')	产物大小/bp product size	登录号 accession number
<i>ZO-1</i>	F: ACACCTTCACCCGCACCAT	105	XM_019089195
	R: CATCATCCTCCAAAGCACTCG		
<i>Claudin</i>	F: TCAATGGCACGCTGGGTC	121	XM_019063180
	R: CACTGCTGTGGCAAAGTAAAGG		
β -actin	F: TGTTACCACTTCACGCCGACT	118	M24113
	R: CACCTTCGCCGTTCCAGTT		

注: 所有引物的退火温度均为 60 ℃.
Note: The annealing temperature of all primers was 60 ℃.

和 7.0 μL 无核酸酶的水, 反应在 Lightcycler480II 实时系统(Roche, Switzerland)中进行, 程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 40 个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。监测溶解曲线以确保引物在所有 PCR 反应中的特异性。所有的引物扩增效率均接近 100%。最后通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法评估靶基因的表达。

1.5.3 肠道形态分析 在实验结束后, 将各个处理组的前肠、中肠和后肠组织于 4.0%多聚甲醛溶液中固定过夜, 然后经梯度蔗糖溶液(20%、30%、40%)脱水, 冷冻切片机切至厚度为 8 μm , 苏木精-伊红(HE)染色。在显微镜(ZEISS, Axio Scope A1)下观察肠道形态结构及肠道绒毛长度和肌层厚度。

1.6 免疫相关指数分析

使用酶联免疫吸附实验(ELISA)方法检测血清中促炎细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12)和抗炎细胞因子(IL-10、TGF- β)的表达量^[11,29], 以评估乳酸乳球菌在鲤体内的免疫调节活性。简言之, 将血清与 2 $\times$ 包被缓冲液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6)等体积(1:1)混匀后加入 96 孔 Immuno-Maxisorp 板(Nunc)中, 并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下包被过夜。清洗后加入 10%脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h, 随后清洗并加入 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-10 和 TGF- β 的多克隆抗体(1:1000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。然后再次洗涤, 加入山羊抗兔偶联的辣根过氧化物酶二抗(1:20000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。再次洗涤后用 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下显色反应 30 min。最后用 50 μL 2mol/L 的 H_2SO_4 终止反应, 并测量 OD_{450 nm} 处的吸光度, 通过相应的标准曲

线计算结果。结果以 pg/mL 表示。
此外, 根据试剂盒(南京建成中国)所描述的方法检测血清中一氧化氮(NO)水平和碱性磷酸酶(AKP)活性。

1.7 抗氧化相关指标测定

检测指标包括肝胰脏 MDA、GSH 和总抗氧化能力(T-AOC)水平以及过氧化氢酶(CAT)、GSH-Px 和超氧化物歧化酶(T-SOD)活性, 根据相关的试剂盒(南京建成, 中国)进行检测。

1.8 统计分析

实验中所有的数据均采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)的形式呈现($n=3$)。显著性分析采用 SPSS 25.0 软件(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)的 One-way ANOVA 中的 Tukey 指标, 显著性水平设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 饲料中添加乳酸乳球菌对肠道健康的影响

2.1.1 消化酶活性 饲料中添加乳酸乳球菌对肠道消化酶活性的影响见表 3。除 G5 组外, 其余各处理组对蛋白酶的促进作用均显著高于对照组($P<0.05$), 且单菌株处理组中, G3 组(*L. lactis* Z-2)的促进作用最大。虽然 G2 组(*L. lactis* Q-9)的效果不如 G1 组和 G3 组, 但与 *L. lactis* Q-8 菌株联合使用(G4 组)时作用更突出。尤其是 3 菌株联合使用的 G7 组, 蛋白酶活性显著高于其他处理组($P<0.05$)。对于脂肪酶, 在单菌株处理组中, G1 组和 G3 组的效果优于 G2 组($P<0.05$)。然而, 在联

表 3 饲料中添加乳酸乳球菌对鲤肠道消化酶活性的影响
Tab. 3 Effects of dietary *Lactococcus lactis* on the activities of intestinal enzymes of *Cyprinus carpio*

		<i>n=3; $\bar{x} \pm \text{SD}$; U/mg prot</i>		
分组 group		蛋白酶 protease	脂肪酶 lipase	淀粉酶 amylase
对照组 control group		8.73 $\pm$ 0.29 ^a	33.49 $\pm$ 3.42 ^a	6.52 $\pm$ 0.02 ^a
G1		12.68 $\pm$ 0.68 ^{bc}	58.70 $\pm$ 1.78 ^{de}	6.78 $\pm$ 0.09 ^{ab}
G2		11.98 $\pm$ 0.74 ^b	43.53 $\pm$ 3.35 ^b	7.68 $\pm$ 0.02 ^c
G3		14.91 $\pm$ 0.24 ^{cd}	57.86 $\pm$ 1.15 ^{de}	6.73 $\pm$ 0.03 ^a
G4		12.78 $\pm$ 0.19 ^{bc}	52.33 $\pm$ 3.30 ^c	6.69 $\pm$ 0.06 ^a
G5		8.47 $\pm$ 0.77 ^a	59.24 $\pm$ 2.13 ^{de}	8.47 $\pm$ 0.09 ^d
G6		14.56 $\pm$ 0.80 ^c	53.10 $\pm$ 3.28 ^{cd}	7.19 $\pm$ 0.08 ^b
G7		17.30 $\pm$ 0.40 ^d	62.42 $\pm$ 3.08 ^e	6.88 $\pm$ 0.23 ^{ab}

注: 同列数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$).
Note: Values in each column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

合菌株处理组中, G5 组与 G7 组效果优于 G4 组和 G6 组。对于淀粉酶, 除 G2、G5 和 G6 处理组淀粉酶的活性显著高于对照组($P<0.05$)外, 其余处理组与对照组差异不显著($P>0.05$)。

2.1.2 紧密连接蛋白相关基因表达水平 如图 1 所示, 饲料中添加乳酸乳球菌显著提高了肠道紧密连接蛋白 *Claudin* 和 *ZO-1* 基因的表达($P<0.05$), 且多菌株处理组的效果优于单菌株处理组。*Claudin* 表达在单菌株处理组间无显著差异($P>0.05$), 而 G3 组对 *ZO-1* 表达的影响显著优于其他两个单菌株处理组($P<0.05$)。在多菌株处理组中, G6 组的效果相对较好。

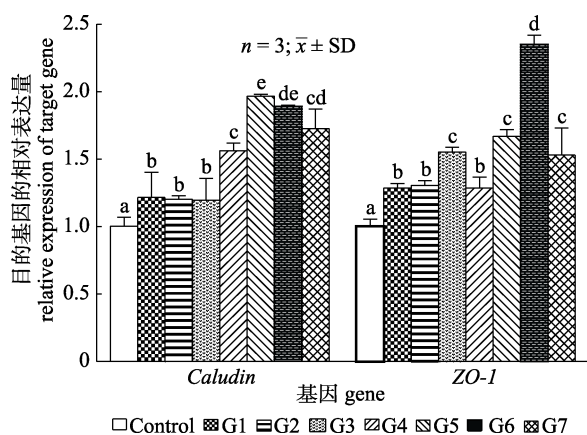


图 1 饲料乳球菌对鲤肠道紧密连接蛋白相关基因表达的影响

图中同一基因不同字母表示不同组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 1 Effects of dietary *Lactococcus lactis* on the expression of tight junction protein related genes in intestine of *Cyprinus carpio*

Different letters in the same gene denote significant differences between different treatment groups ($P<0.05$).

2.1.3 肠道组织形态 饲料中添加乳酸乳球菌对鲤肠道形态的影响见表 4。除 G4 组前肠外, 各处理组前肠和后肠绒毛长度与对照组相比均无显著差异($P>0.05$)。但各处理组均显著增加了中肠绒毛长度($P<0.05$), 其中 G4 组综合效果较好。仅多菌株处理组显著增加了中肠和后肠的肌层厚度($P<0.05$), 各处理组对前肠的影响均显著优于对照组($P<0.05$), 且多菌株处理组的效果更为显著。

2.2 免疫学参数

2.2.1 血清细胞因子的测定 饲料中添加乳酸乳球菌对鲤血清细胞因子的影响见表 5。首先, 除

G6 组的 $\text{TNF-}\alpha$ 和 G7 组的 IL-10 外, 各处理组血清中促炎细胞因子和抗炎细胞因子的含量均显著高于对照组($P<0.05$)。其次, 在养殖结束时, 虽然多菌株处理组对细胞因子的调节作用强于对照组, 但总体上弱于单菌株处理组。结果表明, 饲料中添加乳酸乳球菌可通过上调细胞因子的表达来增强鲤的免疫应答, 但多菌株处理组可使鲤的免疫应答相对稳定。

2.2.2 NO 含量 如图 2 所示, 饲料中添加乳酸乳球菌显著提高了鲤血清中 NO 含量($P<0.05$)。G3 组和 G6 组分别在单菌株处理组和多菌株处理组中作用更突出, 但该两个处理组之间无显著性差异($P>0.05$), 并且其他处理组间的差异性也不显著($P>0.05$)。

2.2.3 AKP 活性 饲料中添加乳酸乳球菌对鲤血清中 AKP 活性的影响如图 3 所示。在所有处理组中, 只有 G3 组、G6 组和 G7 组对 AKP 活性的影响显著高于对照组($P<0.05$), 而多菌株处理组的作用与单一菌株处理组差异不明显。

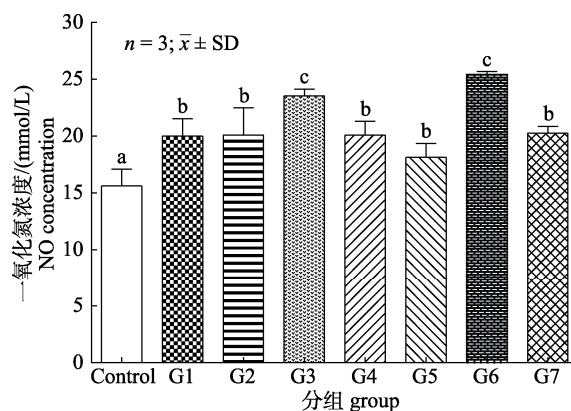


图 2 饲料中添加乳酸乳球菌对鲤血清 NO 含量的影响
图中不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 2 Effects of dietary *Lactococcus lactis* on the NO content in the serum of *Cyprinus carpio*

Different letters denote significant differences between different treatment groups ($P<0.05$).

2.3 抗氧化指数

如图 4 所示, 饲料中添加乳酸乳球菌对肝胰脏抗氧化能力的调节作用显著高于对照组($P<0.05$)。在单菌株处理组中, G3 组在提高 GSH-Px 和 T-SOD 活性及 GSH 含量、降低 MDA 等指标优于 G1 组和 G2 组($P<0.05$)。G1 组和 G2 组分别对 CAT 和

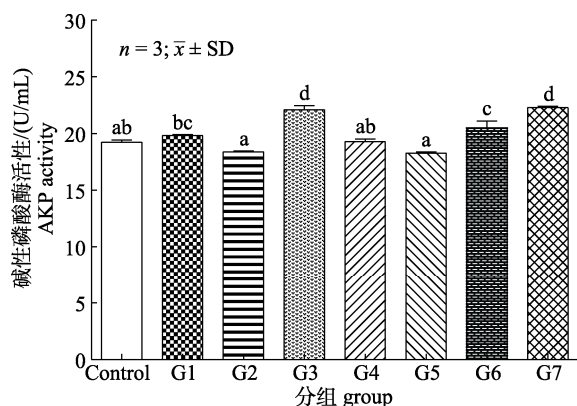


图3 饲料中添加乳酸乳球菌对鲤血清 AKP 活性的影响
图中不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 3 Effects of dietary *Lactococcus lactis* on AKP activity in the serum of *Cyprinus carpio*
Different letters denote significant differences between different treatment groups ($P<0.05$).

T-AOC 活性的影响显著(图 4a 和 4c)。与单菌株处理组相比,多菌株处理组的整体抗氧化作用不显著,甚至弱于单菌株处理组,但 G7 组对 GSH-Px、GSH 和 MDA 的作用较显著,优于对照组和其他处理组(图 4d, 4e, 4f)。

3 讨论

肠道是鱼类消化和吸收营养物质的主要场所,也是鱼类与外界环境接触表面积最大的器官^[30],其健康状况与鱼类的生长密切相关^[31]。除此之外,肠道易受饲料中营养和非营养因素、水质理化等因素的影响,容易发生器官和生理损伤^[32]。因此,在养殖过程中,除了确保鱼类摄食营养全面均衡、维持养殖水环境稳定外,还可以通过调节肠道生态系统、增强肠道功能或修复肠道损伤来促进鱼类肠道健康,促使养殖动物健康生长^[33]。研究证实,饲料中添加益生菌可以改善宿主的肠道健康状况。例如,饲料中的丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)可以提高斑节对虾(*Penaeus monodon*)肠道消化酶的活性^[34],并通过增强肠道内部微生物平衡来促进机体健康^[35]。在本研究中,笔者发现饲料中添加乳酸乳球菌在一定程度上显著提高了鲤肠道蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的活性,并且多菌株处理组的酶活性明显高于对照组和单菌株处理组^[17],这可能是益生菌自身分泌或刺激宿主

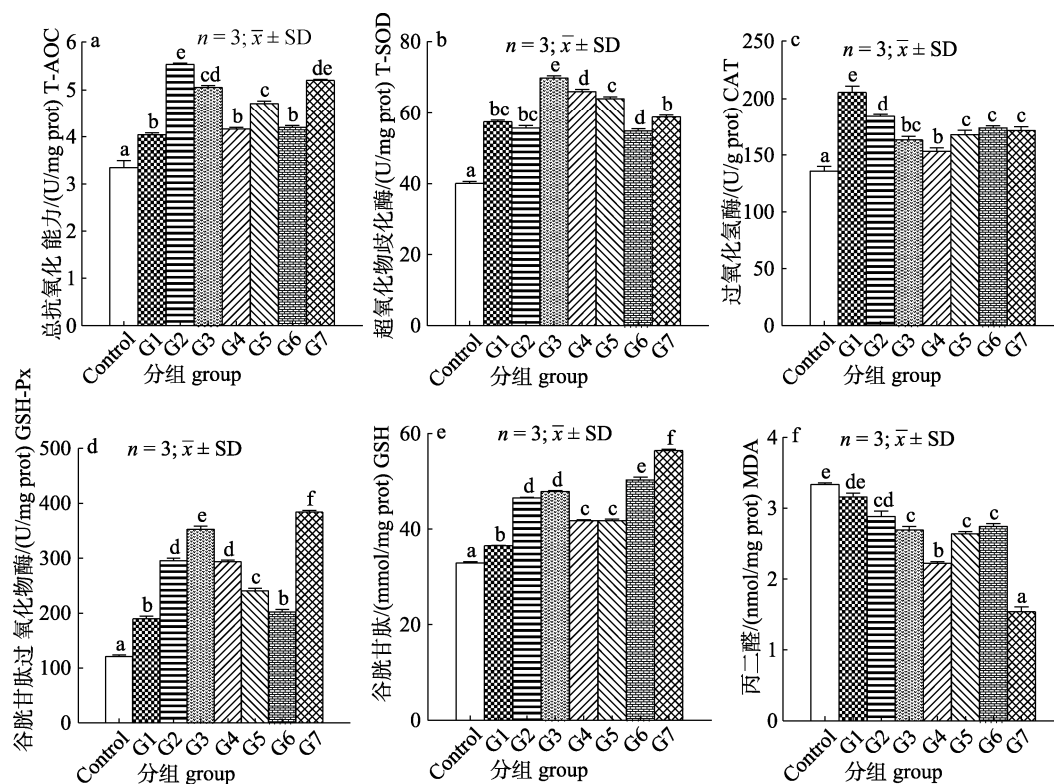


图4 饲料中添加乳酸乳球菌对鲤肝胰脏抗氧化能力的影响

图中不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 4 Effects of dietary *Lactococcus lactis* on the hepatopancreas antioxidant capacity of *Cyprinus carpio*
Different letters denote significant differences between different treatment groups ($P<0.05$).

表 4 饲料中添加乳酸乳球菌对鲤肠道绒毛长度和肌层厚度的影响

Tab. 4 Effects of dietary *Lactococcus lactis* on the villus length and muscle thickness in intestine of *Cyprinus carpio*

n=3; $\bar{x}\pm\text{SD}$

分组 group	绒毛长度/ μm villus length			肌层厚度/ μm muscle thickness		
	前肠 foregut	中肠 midgut	后肠 hindgut	前肠 foregut	中肠 midgut	后肠 hindgut
对照组 control group	1153.47 $\pm$ 43.86 ^a	859.49 $\pm$ 32.70 ^a	937.85 $\pm$ 54.41 ^{ab}	85.87 $\pm$ 4.85 ^a	77.82 $\pm$ 1.92 ^a	58.63 $\pm$ 5.35 ^a
G1	1175.24 $\pm$ 11.03 ^a	1158.07 $\pm$ 31.44 ^b	1056.27 $\pm$ 106.68 ^b	123.88 $\pm$ 1.90 ^b	84.65 $\pm$ 1.74 ^{abc}	54.96 $\pm$ 6.05 ^a
G2	1243.30 $\pm$ 81.91 ^{ab}	1251.27 $\pm$ 57.72 ^{bc}	859.00 $\pm$ 34.20 ^a	122.44 $\pm$ 5.52 ^b	86.27 $\pm$ 4.26 ^{abc}	55.81 $\pm$ 2.97 ^a
G3	1267.80 $\pm$ 109.69 ^{ab}	1351.45 $\pm$ 41.66 ^{cd}	913.82 $\pm$ 21.13 ^{ab}	130.42 $\pm$ 2.55 ^b	83.49 $\pm$ 5.94 ^a	61.08 $\pm$ 2.66 ^{ab}
G4	1446.51 $\pm$ 52.33 ^b	1433.59 $\pm$ 28.11 ^d	974.49 $\pm$ 70.57 ^{ab}	136.31 $\pm$ 9.09 ^b	95.98 $\pm$ 3.67 ^{bcd}	73.64 $\pm$ 2.49 ^c
G5	1190.77 $\pm$ 73.24 ^a	1345.95 $\pm$ 66.85 ^{cd}	876.93 $\pm$ 49.56 ^{ab}	138.82 $\pm$ 4.20 ^b	81.95 $\pm$ 6.17 ^a	66.39 $\pm$ 2.01 ^{ab}
G6	1083.71 $\pm$ 24.51 ^a	1200.72 $\pm$ 22.75 ^{bc}	882.64 $\pm$ 10.43 ^{ab}	170.98 $\pm$ 3.97 ^c	101.10 $\pm$ 2.81 ^d	96.20 $\pm$ 5.04 ^d
G7	1205.22 $\pm$ 53.34 ^a	1137.30 $\pm$ 57.43 ^b	887.06 $\pm$ 29.96 ^{ab}	125.77 $\pm$ 5.71 ^b	98.04 $\pm$ 2.61 ^{cd}	95.10 $\pm$ 5.15 ^d

注: 同列数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$).

Note: Values in each column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

表 5 饲料中添加乳酸乳球菌对鲤血清细胞因子分泌的影响

Tab. 5 Effects of dietary *Lactococcus lactis* on cytokines secretion in the serum of *Cyprinus carpio*

n=3; $\bar{x}\pm\text{SD}$; pg/mL

分组 group	促炎细胞因子 pro-inflammatory cytokine				抗炎细胞因子 anti-inflammatory cytokine	
	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-12	IL-10	TGF- β
对照组 control group	6.89 $\pm$ 0.30 ^a	70.61 $\pm$ 1.87 ^a	11.63 $\pm$ 0.30 ^a	305.33 $\pm$ 2.25 ^a	30.25 $\pm$ 0.28 ^a	74.41 $\pm$ 0.55 ^a
G1	8.40 $\pm$ 0.28 ^b	115.57 $\pm$ 2.13 ^{bc}	13.74 $\pm$ 0.66 ^b	448.94 $\pm$ 4.80 ^f	35.79 $\pm$ 1.05 ^c	105.63 $\pm$ 1.39 ^{de}
G2	10.70 $\pm$ 0.21 ^c	113.26 $\pm$ 4.58 ^b	16.94 $\pm$ 0.24 ^{cd}	420.16 $\pm$ 8.14 ^e	34.11 $\pm$ 0.96 ^{bc}	116.11 $\pm$ 1.28 ^e
G3	11.51 $\pm$ 0.26 ^c	134.85 $\pm$ 4.33 ^{cd}	20.46 $\pm$ 0.49 ^e	461.10 $\pm$ 5.63 ^f	40.19 $\pm$ 0.71 ^d	104.00 $\pm$ 0.91 ^{cd}
G4	12.52 $\pm$ 0.29 ^d	108.75 $\pm$ 7.70 ^b	20.39 $\pm$ 0.29 ^e	382.72 $\pm$ 0.98 ^{cd}	39.65 $\pm$ 0.67 ^d	107.37 $\pm$ 2.73 ^d
G5	8.45 $\pm$ 0.14 ^b	108.26 $\pm$ 5.51 ^b	13.99 $\pm$ 0.53 ^b	376.55 $\pm$ 2.93 ^{bc}	33.02 $\pm$ 0.46 ^{bc}	98.11 $\pm$ 1.72 ^b
G6	7.73 $\pm$ 0.15 ^{ab}	110.91 $\pm$ 4.45 ^b	18.50 $\pm$ 0.57 ^{de}	352.76 $\pm$ 10.96 ^b	34.48 $\pm$ 0.27 ^c	97.89 $\pm$ 0.09 ^b
G7	13.73 $\pm$ 0.11 ^e	147.95 $\pm$ 3.90 ^d	15.10 $\pm$ 0.42 ^{bc}	404.16 $\pm$ 5.19 ^{de}	31.35 $\pm$ 0.14 ^{ab}	107.67 $\pm$ 0.82 ^d

注: 同列数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$).

Note: Values in each column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

肠道分泌消化酶的结果^[36-37]。另外, 本研究饲料中的乳酸乳球菌可增加鲤的肠绒毛长度和肌层厚度。相同的研究结果发现, 饲料中添加酿酒酵母 YFI-SC2 和富硒枯草芽孢杆菌(Se-rich *Bacillus subtilis*)可改善克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)和鲤的肠道形态^[38-39]。复合菌株(*Pediococcus* sp.、*Bacillus* sp.、*Lactobacillus* sp.、*Enterococcus* sp.)可通过改善尼罗罗非鱼肠道形态而增加营养物质的吸收^[40]。上述作用表明, 肠道消化酶活性的升高可促进宿主肠道对营养物质的消化能力^[14], 绒毛长度的增加可以提供更多的吸收面积, 以增加对营养物质的吸收能力, 最终促进生长性能^[41]。另有研究表明, 肠屏障结构越完整, 越有助于预

防致病菌感染^[42]。当肠道结构的完整性被破坏后, 肠道通透性增加, 肠道内的病原体和有害物质可转运进入血液系统并传播至体内其他组织, 引起远端组织的病变, 甚至全身病理反应。饲料中的乳酸乳球菌 16-7 (*L. lactis* 16-7)可修复嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)破坏的鲫(*Carassius auratus*)肠道黏膜屏障^[43]。本研究所使用的乳酸菌可通过增加紧密连接蛋白(*Claudin*、*ZO-1*)基因的表达水平而增强鲤肠道屏障的完整性, 且多菌株处理组表现出明显的叠加作用。

细胞因子是由免疫细胞和一些非免疫细胞合成和分泌的具有调节先天和适应性免疫反应等广泛生物活性的小分子蛋白^[44-45]。此外, 当机体受

到外界刺激后,体内多种细胞产生的 NO 在杀死入侵的细菌、真菌等其他微生物和肿瘤细胞等方面发挥重要作用^[46-47]。AKP 是溶酶体完整性的标志酶,在机体的免疫过程中发挥关键作用^[48-49]。前期研究结果显示,不同处理方式的乳酸乳球菌 Z-2 (*L. lactis* Z-2)通过显著提高鲤血清细胞因子和 NO 水平及 AKP 活性而发挥免疫调节作用^[28]。饲料中添加枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) NZ86 和 O14VRQ 可显著提高血液中溶菌酶(LZM)活性和中性粒(白)细胞百分比,并上调肠道促炎细胞因子基因表达量,从而刺激罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)的局部和全身免疫反应^[50]。另一项研究表明,添加益生菌显著增加了鲤皮肤黏膜 LZM 和 AKP 的活性,并改变了血清细胞因子 *TNF- α* 、*IL-1 β* 和 *IL-10* 的表达^[51],且投喂复合益生菌的鱼对嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) 攻毒后的相对存活率(69.7%)显著高于对照组^[51]。其原因可能是饲料中的益生菌增强了宿主的免疫能力和抗病能力,从而提高了感染病原菌后的存活率。同样,在本研究中,通过检测血清中细胞因子和 NO 含量,能够评估鲤免疫系统的激活程度,结果显示添加乳球菌后,各个处理组的细胞因子水平明显升高,这可能是由于乳球菌的存在刺激了免疫细胞产生更多的细胞因子,从而增强了免疫反应。此外,还观察到添加乳球菌后,各处理组的血清 NO 含量也得到了提高。NO 是一种重要的免疫调节分子,它在免疫反应中发挥着关键作用^[48]。增加的 NO 含量表明乳球菌的添加促进了鲤的免疫系统活性。另外,在添加乳球菌后,各个处理组的 AKP 活性明显增强,这表明乳球菌的添加有助于提高鲤的免疫功能和抗病能力。需要注意的是,尽管多菌株处理组的效果与单一菌株组相比并不显著,但仍然可以得出结论,饲料中添加乳球菌对增强鲤的免疫反应具有积极的影响。进一步的研究可能需要探索不同乳球菌菌株的组合以及适当的剂量,以优化免疫增强效果。

肝胰脏是鱼类重要的抗氧化器官,其抗氧化能力可以反映机体的免疫能力^[52]。大量研究已经详细描述了抗氧化的作用^[28,53-56],抗氧化能力也是水产养殖实验中常见的检测指标。例如,添加

阿氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhatai*) TBRC8450 可调节南美白对虾(*Litopenaeus Vannamei*)体内的抗氧化活性,并显著上调肝胰脏中抗氧化酶基因的表达量^[57]。转录组分析表明,饲料中添加枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) E20 的对虾,抗氧化酶的表达比对照组更活跃^[58]。经过 8 周的养殖试验,饲喂多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*) ATCC 842 处理饲料显著增强了对虾的总抗氧化能力,并表现出协同效应^[59]。与对照组相比,丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*) CBG01 组对虾血清中的 POD、SOD 活性和 T-AOC 能力以及肝胰脏中 SOD 基因的相对表达量均显著增强^[60]。此外,在普通鲤中也观察到类似的结果^[28,61]。本研究中,饲料中添加乳酸乳球菌对肝胰脏抗氧化能力的调节作用显著高于对照组,其原因可能是饲料中添加的乳酸菌能通过促进细胞中抗氧化基因的表达来清除自由基和清除脂质过氧化物抑制脂质过氧化反应达到抗氧化作用,但具体作用机制还需要进一步研究。此外,多菌株联合使用的 G7 处理组对 GSH-Px、GSH 和 MDA 的影响较对照组和其他处理组更为突出。

4 结论

综上所述,饲料中添加乳酸乳球菌对鲤肠道健康、先天免疫和抗氧化活性均有显著影响,并且多菌株联合使用效果优于单一菌株。其作用可能与联合使用乳酸菌对肠道菌群的调节有关,值得进一步研究。以上结果表明,多菌株的联合使用可作为一种更有效的微生态制剂应用于水产养殖。

参考文献:

- [1] Das S, Mondal K, Haque S, et al. A review on application of probiotic, prebiotic and synbiotic for sustainable development of aquaculture[J]. Journal of Entomology and Zoology Studies, 2017, 5(2): 422-429.
- [2] Rekecki A, Dierckens K, Laureau S, et al. Effect of germ-free rearing environment on gut development of larval sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)[J]. Aquaculture, 2009, 293(1-2): 8-15.
- [3] Maynard C L, Elson C O, Hatton R D, et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system[J]. Nature, 2012, 489(7415): 231-241.

- [4] Cabello F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(7): 1137-1144.
- [5] Tanwar J, Das S, Fatima Z, et al. Multidrug resistance: An emerging crisis[J]. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014, 2014: 541340.
- [6] Hai N V. Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: A review[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 592-597.
- [7] Newaj-Fyzul A, Al-Harbi A H, Austin B. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2014, 431: 1-11.
- [8] Song S K, Beck B R, Kim D, et al. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 40-48.
- [9] Amenogbe E, Chen G, Wang Z L, et al. The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: Present study, limitations and future directions.: A review[J]. *Aquaculture International*, 2020, 28(3): 1017-1041.
- [10] Xia Y, Yi H X, Fan R B, et al. Effects of dietary lactic acid bacteria on the meat quality of juvenile *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(1): 74-82. [夏雨, 易华西, 范荣波, 等. 饲喂乳酸菌对凡纳滨对虾幼虾肉质的影响[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(1): 74-82.]
- [11] Feng J C, Chang X L, Zhang Y R, et al. Effects of *Lactococcus lactis* from *Cyprinus carpio* L. as probiotics on growth performance, innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 73-81.
- [12] Ringø E, Van Doan H, Lee S, et al. Lactic acid bacteria in shellfish: Possibilities and challenges[J]. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 2020, 28(2): 139-169.
- [13] Naiel M A E, Farag M R, Gewida A G A, et al. Using lactic acid bacteria as an immunostimulants in cultured shrimp with special reference to *Lactobacillus* spp.[J]. *Aquaculture International*, 2021, 29(1): 219-231.
- [14] Feng J C, Liu S S, Zhu C J, et al. The effects of dietary *Lactococcus* spp. on growth performance, glucose absorption and metabolism of common carp, *Cyprinus carpio* L.[J]. *Aquaculture*, 2022, 546: 737394.
- [15] Xia L, Zhao M J, Zhang H Y, et al. Effects of different proportions of a group of compound bacteria on growth, innate immunity, and ammonia nitrogen resistance in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(6): 1299-1307. [夏磊, 赵明军, 张洪玉, 等. 不同比例复合益生菌对凡纳滨对虾生长、免疫及抗氨氮能力的影响[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(6): 1299-1307.]
- [16] Dias J A R, Alves L L, Barros F A L, et al. Comparative effects of using a single strain probiotic and multi-strain probiotic on the productive performance and disease resistance in *Oreochromis niloticus*[J]. *Aquaculture*, 2022, 550: 737855.
- [17] Li Z Q, Bao N, Ren T J, et al. The effect of a multi-strain probiotic on growth performance, non-specific immune response, and intestinal health of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L.[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(4): 1393-1407.
- [18] Abasolo-Pacheco F, Campa-Córdova Á I, Mazón-Suástegui J M, et al. Enhancing growth and resistance to *Vibrio alginolyticus* disease in Catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) with *Bacillus* and *Lactobacillus* probiotic strains during early development[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(9): 4597-4607.
- [19] Mohammadi G, Rafiee G, Tavabe K R, et al. The enrichment of diet with beneficial bacteria (single- or multi- strain) in biofloc system enhanced the water quality, growth performance, immune responses, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 539: 736640.
- [20] Zhang C N, Pu C C, Yuan X Y, et al. Effect of dietary fructooligosaccharide and *Lactobacillus delbrueckii* on growth performance, blood index, and antioxidant activity in koi carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(8): 1001-1010. [张春暖, 普畅畅, 袁小玉, 等. 饲料中添加果寡糖和德式乳酸菌对锦鲤生长、血液指标和抗氧化指标的影响[J]. *中国水产科学*, 2021, 28(8): 1001-1010.]
- [21] Mirghaed A T, Yarahmadi P, Hosseiniifar S H, et al. The effects singular or combined administration of fermentable fiber and probiotic on mucosal immune parameters, digestive enzyme activity, gut microbiota and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii* Kutum) fingerlings[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 77: 194-199.
- [22] Sangma T, Kamilya D. Dietary *Bacillus subtilis* FPTB13 and chitin, single or combined, modulate systemic and cutaneous mucosal immunity and resistance of catla, *Catla catla* (Hamilton) against edwardsiellosis[J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2015, 43: 8-15.
- [23] Ren W, Wu H W, Guo C, et al. Multi-strain tropical *Bacillus* spp. as a potential probiotic biocontrol agent for large-scale

- enhancement of mariculture water quality[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 699378.
- [24] Rajasulochana P, Gummadi S N. A probiotic based product using multi-strain *Bacillus* species and predictive models for shrimp growth following probiotic intervention[J]. *Aquaculture*, 2022, 551: 737869.
- [25] Chen X Q, Xie J J, Liu Z L, et al. Modulation of growth performance, non-specific immunity, intestinal morphology, the response to hypoxia stress and resistance to *Aeromonas hydrophila* of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by dietary supplementation of a multi-strain probiotic[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology*: CBP, 2020, 231: 108724.
- [26] Chen X Q, Zhang Z H, Fernandes J M O, et al. Beneficial effects on growth, haematic indicators, immune status, antioxidant function and gut health in Juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of a multi-strain probiotic[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2020, 26(4): 1369-1382.
- [27] Vazirzadeh A, Roosta H, Masoumi H, et al. Long-term effects of three probiotics, singular or combined, on serum innate immune parameters and expressions of cytokine genes in rainbow trout during grow-out[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 748-757.
- [28] Wang J L, Feng J C, Liu S S, et al. The probiotic properties of different preparations using *Lactococcus lactis* Z-2 on intestinal tract, blood and hepatopancreas in *Cyprinus carpio*[J]. *Aquaculture*, 2021, 543: 736911.
- [29] Feng J C, Cai Z L, Chen Y Y, et al. Effects of an exopolysaccharide from *Lactococcus lactis* Z-2 on innate immune response, antioxidant activity, and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in *Cyprinus carpio* L.[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 324-333.
- [30] Dawood M A O. Nutritional immunity of fish intestines: Important insights for sustainable aquaculture[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, 13(1): 642-663.
- [31] Kaiser F, Harloff H J, Tressel R P, et al. Effects of supplemented anti-nutritive substances from rapeseed on growth and health performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 536: 736422.
- [32] Buddington R K, Krogdahl A, Bakke-Mckellep A M. The intestines of carnivorous fish: Structure and functions and the relations with diet[J]. *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum*, 1997, 638: 67-80.
- [33] Zhang J X, Huang M Y, Feng J C, et al. Effects of dietary *Bacillus licheniformis* on growth performance, intestinal morphology, intestinal microbiome, and disease resistance in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Aquaculture International*, 2021, 29(3): 1343-1358.
- [34] Duan Y F, Zhang J S, Huang J H, et al. Effects of dietary *Clostridium butyricum* on the growth, digestive enzyme activity, antioxidant capacity, and resistance to nitrite stress of *Penaeus monodon*[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2019, 11(3): 938-945.
- [35] El-Saadony M T, Alagawany M, Patra A K, et al. The functionality of probiotics in aquaculture: An overview[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 117: 36-52.
- [36] EL-Haroun E R, Goda A M A S, Kabir Chowdhury M A. 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.
- [37] Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(4): 655-671.
- [38] Xu Y, Li Y Q, Xue M Y, et al. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* YFI-SC2 on the growth performance, intestinal morphology, immune parameters, intestinal microbiota, and disease resistance of crayfish (*Procambarus clarkia*)[J]. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 2021, 11(7): 1963.
- [39] Shang X C, Yu P, Yin Y W, et al. Effect of selenium-rich *Bacillus subtilis* against mercury-induced intestinal damage repair and oxidative stress in common carp[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology & Pharmacology*, 2021, 239: 108851.
- [40] Ramos M A, Batista S, Pires M A, et al. Dietary probiotic supplementation improves growth and the intestinal morphology of Nile tilapia[J]. *Animal: an International Journal of Animal Bioscience*, 2017, 11(8): 1259-1269.
- [41] Reda R M, Selim K M. Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal morphology, hematology and body composition of Nile *Tilapia, Oreochromis niloticus*[J]. *Aquaculture International*, 2015, 23(1): 203-217.
- [42] Yu Q H, Yuan L X, Deng J, et al. *Lactobacillus* protects the integrity of intestinal epithelial barrier damaged by pathogenic bacteria[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015, 5: 26.
- [43] Dong Y H, Yang Y Y, Liu J, et al. Inhibition of *Aeromonas hydrophila*-induced intestinal inflammation and mucosal barrier function damage in crucian carp by oral administration of *Lactococcus lactis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 117: 36-52.

- nology, 2018, 83: 359-367.
- [44] Nayak S K. Probiotics and immunity: A fish perspective[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(1): 2-14.
- [45] Kazun B, Kazun K. Probiotics in aquaculture[J]. Medycyna Weterynaryjna, 2014, 70(1): 25-29.
- [46] Villamil L, Figueras A, Aranguren R, et al. Non-specific immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), experimentally infected with a pathogenic *Vibrio pelagius*[J]. Journal of Fish Diseases, 2003, 26(6): 321-329.
- [47] Gao S X, Liu C H, Qu S F, et al. Non-cell *Corynebacterium parvum* generated by nanotechnology: A promising immunomodulator with less side effects[J]. International Immunopharmacology, 2007, 7(10): 1334-1342.
- [48] Oner M, Atli G, Canli M. Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008, 27(2): 360-366.
- [49] 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.
- [50] Galagarza O A, Smith S A, Drahos D J, et al. Modulation of innate immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary supplementation of *Bacillus subtilis* endospores[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 83: 171-179.
- [51] Giri S S, Kim H J, Kim S G, et al. Effects of dietary *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* L7, alone or in combination with *Limosilactobacillus reuteri* P16, on growth, mucosal immune responses, and disease resistance of *Cyprinus carpio*[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2021, 13(6): 1747-1758.
- [52] Jin H M, Yan C, Xiao T F, et al. High fish oil diet promotes liver inflammation and activates the complement system[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(5): 6852-6858.
- [53] Li H T, Wu M, Wang J, et al. Protective role of *Angelica sinensis* extract on trichlorfon-induced oxidative damage and apoptosis in gills and erythrocytes of fish[J]. Aquaculture, 2020, 519: 734895.
- [54] Mukai K, Shimasaki Y, Qiu X C, et al. Effects of light and hydrogen peroxide on gene expression of newly identified antioxidant enzymes in the harmful algal bloom species *Chattonella marina*[J]. European Journal of Phycology, 2019, 54(3): 393-403.
- [55] Chen S J, Yu Y Y, Gao Y J, et al. Exposure to acute ammonia stress influences survival, immune response and antioxidant status of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) pretreated with diverse levels of inositol[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 89: 248-256.
- [56] Noorin Z, Mukhtar A K. Growth, feed utilization, mineralization and antioxidant response of stinging catfish *Heteropneustes fossilis* fed diets with different levels of manganese[J]. Aquaculture, 2019, 509: 120-128.
- [57] Tapaamorndech S, Chantarasakha K, Kingcha Y, et al. Effects of *Bacillus aryabhattai* TBRC8450 on vibriosis resistance and immune enhancement in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 86: 4-13.
- [58] Chien C C, Lin T Y, Chi C C, et al. Probiotic, *Bacillus subtilis* E20 alters the immunity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* via glutamine metabolism and hexosamine biosynthetic pathway[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 98: 176-185.
- [59] Amoah K, Huang Q C, Dong X H, et al. *Paenibacillus polymyxa* improves the growth, immune and antioxidant activity, intestinal health, and disease resistance in *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Aquaculture, 2020, 518: 734563.
- [60] Luo K, Tian X L, Wang B, et al. Evaluation of paraprobiotic applicability of *Clostridium butyricum* CBG01 in improving the growth performance, immune responses and disease resistance in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2021, 544: 737041.
- [61] Jahazi M A, Hoseinifar S H, Jafari V, et al. Dietary supplementation of polyphenols positively affects the innate immune response, oxidative status, and growth performance of common carp, *Cyprinus carpio* L.[J]. Aquaculture, 2020, 517: 734709.

The effects of dietary single strain or multistrain *Lactococcus lactis* on intestinal health, innate immunity, and antioxidant activity of common carp (*Cyprinus carpio*)

LIU Xiaobei, LIU Shasha, CUI Wenshan, YUAN Xiao, CHANG Xulu, ZHANG Jianxin, FENG Junchang

Engineering Technology Research Center for Aquatic Animal Cultivation of Henan Province; College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Abstract: In the present study, we evaluated the effects of dietary single strain or multistrain *Lactococcus lactis* on the intestinal health, innate immunity, and antioxidant activity of common carp. Common carp (44.79 ± 0.13 g) were fed a control diet or one of the seven diets with supplementary *Lactococcus lactis* [*Lactococcus lactis* Q-8 (G1); *L. lactis* Q-9 (G2); *L. lactis* Z-2 (G3); *L. lactis* Q-8 and *L. lactis* Q-9 (G4); *L. lactis* Q-8 and *L. lactis* Z-2 (G5); *L. lactis* Q-9 and *L. lactis* Z-2 (G6); *L. lactis* Q-8, *L. lactis* Q-9 and *L. lactis* Z-2 (G7)] for 60 days. The corresponding results showed that the activities of intestinal digestive enzymes (protease, amylase, and lipase) and the expression of tight junction protein [*Claudin*, *ZO-1*] genes were significantly increased by treatment with dietary *Lactococcus lactis*; further, the effects of the multi-strain treatment groups were significantly higher. In addition, all treatment groups exhibited significantly higher microvilli length in the midgut and enhanced levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α , except G6), interleukin-6 (IL-6), IL-12, IL-1 β , IL-10 (except G7), transforming growth factor- β (TGF- β), and nitric oxide (NO) production in the serum, compared to those of the control group. Multistrain treatment significantly increased the muscle thickness of the entire intestine; however, the effect on alkaline phosphatase (AKP) activity in the serum was not significant. Nonetheless, the regulatory effects of dietary *Lactococcus lactis* on the antioxidant capacity of the hepatopancreas were significantly higher than those of the control group, and the G7 group had a more prominent effect on glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) production. In conclusion, the three *Lactococcus lactis* strains evaluated in this study were effective in improving intestinal health, immune response, and antioxidant capacity in common carp and exhibited a synergistic effect when used as a combined dietary treatment. Overall, this study can provide an additional reference point for the application of probiotics in aquaculture.

Key words: *Cyprinus carpio*; *Lactococcus lactis*; intestinal health; innate immunity; antioxidant activity

Corresponding author: FENG Junchang. E-mail: fjc15290022@126.com