

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16307

解淀粉芽孢杆菌和胶红酵母复合菌对虹鳟生长性能及胃黏膜、肠黏膜菌群结构的影响

王纯^{1,2}, 孙国祥¹, 刘志培³, 刘淑兰⁴, 王顺奎⁴, 刘鹰^{1,5}

1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071;
2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101;
4. 山东东方海洋科技股份有限公司, 山东 烟台 264000;
5. 大连海洋大学, 辽宁 大连 116000

摘要: 为研究饲料中添加不同水平的复合菌剂(解淀粉芽孢杆菌, *Bacillus amyloliquefaciens* V4 和胶红酵母, *Rhodotorula mucilaginosa*)对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)幼鱼生长及消化道黏膜微生物菌群结构的影响, 选用体重为(205.1±4.82) g 的虹鳟幼鱼 360 尾, 随机分为 4 组(每组 3 个重复, 每个重复 30 尾), 分别投喂基础饲料(C0)和 3 种添加水平为 $5 \times 10^6/5 \times 10^7$ CFU/g (T1), $1.5 \times 10^7/1.5 \times 10^8$ CFU/g (T3), $2.5 \times 10^7/2.5 \times 10^8$ CFU/g (T5)的复合菌剂(*B. amyloliquefaciens* V4/*R. mucilaginosa*), 实验周期 42 d。研究结果发现饲料中添加复合益生菌对虹鳟的生长及存活有一定的促进和提高, T1 比例的复合益生菌能够显著提高虹鳟的增重率和特定生长率、显著降低饲料系数($P < 0.05$), 同时 T1 和 T3 比例添加显著降低虹鳟的死亡率($P < 0.05$); 对其消化道黏膜细菌群落 16S rDNA 进行聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)指纹分析, 结果表明: 虹鳟胃黏膜和肠黏膜上微生物菌群种类存在差异; 胃黏膜菌群 DGGE 图谱中分别检测到 35.7±17.0(C0)、37.0±3.5(T1)、36.7±13.6(T3)、26.0±13.2(T5)条谱带, 各处理组间谱带数目无显著差异($F=0.500$, $P=0.692$), 肠黏膜菌群 DGGE 图谱显示分别检测到 23.3±5.8(C0)、22.3±3.2 (T1)、16.7±8.0 (T3)、24.7±7.4 (T5)条谱带, 各处理组间谱带数目也无显著差异($F=0.916$, $P=0.475$); 胃黏膜菌群多样性随着益生菌添加量增加, 菌群多样性有升高趋势, 但是在最高浓度组(T5)多样性降低, 肠黏膜菌群多样性随着复合菌剂的添加, 多样性指数持续降低, 中浓度添加组(T3)多样性最低, 但是随着添加浓度升高, 呈现恢复和升高趋势(T5); 基于所得 PCR-DGGE 指纹图谱中谱带丰度值数据的 UPGMA 聚类 and PCA 排序分析均显示胃黏膜微生物群落与肠黏膜微生物群落结构差异明显, 大致分为两个不同的分支, 胃黏膜和肠黏膜微生物菌群并没有按照不同处理组而有显著分化。以上结果表明解淀粉芽孢杆菌和胶红酵母复合添加能显著促进虹鳟的生长, 提高存活率, 外源益生菌添加对虹鳟消化道黏膜上优势菌群能产生一定影响, 但并未对胃黏膜及肠黏膜菌群多样性产生显著影响, 同时也未显著改变虹鳟肠黏膜微生物菌群结构, 高比例添加降低消化道黏膜细菌数量及多样性风险。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌; 胶红酵母; 虹鳟; 消化道黏膜菌群; PCR-DGGE

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)04-0746-11

虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*), 属鲑形目(Salmoniformes), 鲑科冷水肉食性鱼类, 原产于北美洲山区河流中, 后经人工驯化繁育在世界上普遍养

殖, 肉质鲜嫩, 刺少味美, 富含蛋白质和不饱和脂肪酸, 是我国较为高档养殖品种^[1]。然而疾病感染已经成为制约我国水产养殖发展的瓶颈, 虹鳟

收稿日期: 2016-09-26; 修订日期: 2016-12-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31472312; 41306152; 31402283); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-48); 国家科技支撑计划课题(2014BAD08B09).

作者简介: 王纯(1988-), 男, 博士, 主要从事微生物分子生态学研究. E-mail: chun_wang2007@163.com

通信作者: 刘鹰, 研究员, 主要从事水产养殖工程学及养殖生态工程学研究. E-mail: yingliu@dlou.edu.cn

养殖也受到以细菌和病毒感染为主的病害问题的困扰,给虹鳟养殖业带来巨大经济损失^[2-3]。在病害的预防和治疗中,抗生素一度作为首选,但随着病原菌耐药性增强、抗生素残留、致病菌交叉感染等诸多问题的出现,加之公众对水产品安全的要求提高,抗生素的使用正朝着减少、杜绝的方向发展^[4-5]。

近年来,益生菌因兼具促进生长、提高饲料转化、预防疾病、改善水环境等优点,已成为目前最有潜力的抗生素替代品^[6-8]。益生菌是一类对宿主有益的活性微生物,是能产生健康功效从而改善宿主微生态平衡、发挥有益作用的活性有益微生物的总称。目前针对广泛使用的芽孢杆菌、乳酸菌和酵母菌已有诸多报道^[9-12]。Rengpipat等^[9]在黑虎虾(*Penaeus monodon*)研究中发现,添加芽孢杆菌(*Bacillus* S11)显著促进黑虎虾生长和存活,同时改善外观色泽和肝胰腺及肠道畸形率,并提高黑虎虾在遭受病原菌(*Vibrio harveyi*)侵袭时的存活。李卫芬等^[10]在草鱼中研究发现,添加复合芽孢杆菌(枯草芽孢杆菌与解淀粉芽孢杆菌1:1)可有效改善养殖水质,显著促进草鱼生长、降低死亡,增强消化酶活性,机体免疫和肠黏膜抗氧化功能。Merrifield等^[11]将芽孢杆菌饲喂虹鳟研究发现添加芽孢杆菌实验组(枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌复合菌)虹鳟饲料转化率、特定生长率以及蛋白质效率比都有显著提升,而且在胃肠道末端发现了高浓度的益生菌株。宋奔奔等^[12]的研究同样发现短小芽孢杆菌和胶红酵母菌的复合菌剂能极显著的提高凡纳滨对虾胃蛋白酶活性,显著降低肝胰腺淀粉酶活力。

宿主消化道内生存着大量微生物,宿主为消化道微生物提供厌氧环境和营养物质的同时,消化道微生物则协助宿主分解自身无法分解的营养物质、诱导宿主消化道上皮细胞和免疫系统发育、维持体内生理生化平衡等。然而宿主消化道内微生物并不是一成不变的,它受到宿主生存环境、食性及食物组成、健康状况、宿主基因型等影响,其中宿主食物组成是重要的影响因素,而外源益生菌的添加就是食物因素的一种。大量研究表明益生菌株或者复合益生菌剂的添加能对鱼类生

长、存活、饲料利用、免疫应答等产生积极作用^[9,11],但少有研究关注外源菌剂的添加对鱼类消化道内土著微生物的微生态平衡产生的影响,尤其是对消化道黏膜微生物菌群的影响。

本研究分别发酵解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens* V4)和胶红酵母菌(*Rhodotorula mucilaginosa*)制备复合菌剂,添加投喂虹鳟,采用PCR-DGGE指纹技术分析复合菌剂对虹鳟胃及肠道黏膜微生物菌群影响,阐述外源菌株添加对消化道黏膜菌群生态的影响机制,以期深入阐述益生菌对鱼类消化道黏膜微生物菌群的影响机制提供有益参考,也为全面评估益生菌的作用效果提供全新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物与实验设计

实验用鱼为虹鳟,购于山东东方海洋科技股份有限公司,正式实验前在循环水养殖系统(一套系统配备3个水池,每个水池3 m³)中暂养2周,投喂基础饲料。正式实验前,所有实验鱼停饲24 h并麻醉称重(MS-222, 20 mg/L),随机挑选健康活泼、规格一致、体重为(205.1±4.82) g的虹鳟360尾,分配到12个实验用小型循环水养殖系统中(每个系统总体积0.8 m³,养殖缸体积0.4 m³),每个系统分配30尾,实验设计4个处理组,每个处理组3个重复。每天8:00、16:00、20:00分别饱食投喂,对照组饲喂基础饲料,处理组分别饲喂在基础饲料中添加不同比例复合菌株(*B. amyloliquefaciens* V4/*R. mucilaginosa*)的实验饲料,实验周期为6周。实验期间,循环水系统水温保持在(15.0±1.0)℃,pH 7.2~7.5,光照条件为12L:12D,实验过程中使用液氧增氧,溶解氧控制在(8.5±1.0) mg/L。

1.2 益生菌实验饲料制备

实验用基础饲料由北京汉业科技有限公司提供,其组成和营养水平见表1,粗蛋白和粗脂肪含量约为43%和19.5%。

实验所用解淀粉芽孢杆菌编号CGMCC 10149,胶红酵母菌编号CGMCC 1013,均由中国科学院微生物研究所微生物资源中心提供,其中解淀粉芽孢杆菌V4菌株分离自大西洋鲑循环水养殖水

表 1 虹鳟基础饲料组成及营养水平(风干基础)
Tab. 1 Composition and nutrient levels of the basal diet for rainbow trout (air-dry basis)

项目 item	含量 content %
原料 ingredients	
豆粕 soybean meal	6
发酵豆粕 fermented soybean meal	6
精面粉 patent flour	14
超级蒸汽鱼粉 steam fish meal	30
白鱼粉 white fish meal	7
鸡肉粉 chicken meal	5
磷虾粉 krill meal	8
鱼油 fish oil	15
玉米蛋白粉 corn gluten meal	6
维生素及矿物质预混料 ^a vitamin and mineral premix ^a	3
合计 total	100
营养水平 nutrient levels	
粗蛋白 crude protein	43.09
粗纤维 crude fibre	1.24
粗脂肪 crude lipid	19.51
粗灰分 crude ash	10.22
钙 Ca	2.56
磷 P	1.56
赖氨酸 lysine	2.95
蛋氨酸 methionine	1.25

注: ^a维生素及矿物质预混料参考 NRC, 1993^[13].
Note: ^aAdded to supply in excess of vitamin and mineral requirements for salmonids (NRC, 1993)^[13].

体。解淀粉芽孢杆菌经菌种活化和 LB 液体培养基小规模发酵后, 离心收集菌体, 活菌数量达到 1.0×10^9 CFU/mL。胶红酵母菌在酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(YPD)中发酵培养至 1.0×10^{10} CFU/mL。按照表 2 的设计添加比例, 在基础饲料中添加不同比例益生菌制剂, 均匀喷洒于饲料表面, 置于黑暗条件下自然阴干后分别配制成 3 种实验饲料, 分袋包装后用灭菌的黑色防潮塑料袋保存于 4℃ 冰箱备用。

1.3 生长指标测定及胃肠黏膜样品采集

实验结束后, 禁食 24 h, 对所有实验系统中的实验鱼进行称重, 按照以下公式计算增重率(WGR)、饲料系数(FCR)、特定生长率(SGR)、死亡率(mortality)等指标。

表 2 复合菌剂添加比例
Tab. 2 Adding proportion of compound probiotics in each treatment

菌株 bacterial strain	对照组 C0 group	T1 添加组 Diet T1	T3 添加组 Diet T3	T5 添加组 Diet T5
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> V4	—	5×10^6	1.5×10^7	2.5×10^7
胶红酵母菌 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	—	5×10^7	1.5×10^8	2.5×10^8

增重率 $WGR (\%) = 100 \times (W_f - W_i) / W_i$
饲料系数 $FCR = FI / (W_f - W_i)$
特定生长率 $SGR (\% \cdot d^{-1}) = 100 \times (\ln W_f - \ln W_i) / D_f$
死亡率 $mortality (\%) = 100 \times (N_i - N_f) / N_i$
 W_f 、 W_i 分别表示平均终体重(g)、平均初体重(g); FI 为摄食量; D_f 为实验天数; N_i 、 N_f 分别表示初始鱼数量和最终鱼数量。

同时从每个循环水实验系统中随机选取大小相近个体各 1 尾, 共 12 尾, 运回实验室进行无菌解剖, 剪开胃及后肠段, 无菌生理盐水冲净胃及肠内容物, 随后用无菌解剖刀轻轻刮取胃及肠道黏膜并收集于 2 mL 无菌离心管中。

1.4 肠道微生物总 DNA 提取及 16S rDNA V3 区扩增

虹鳟胃及肠道黏膜微生物总 DNA 提取采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒(PowerFecal, 美国), 实验操作参照说明进行, 提取后 DNA 用针对细菌 16S rRNA 基因的通用引物 GC-F357 和 R518^[14] 进行 PCR 扩增(表 3)。PCR 反应体系为 25 μL, 体系中包含: 1 × PCR buffer(Fermentas, 美国), 2.5 U *Taq* DNA 聚合酶(Fermentas, 美国), 80 μmol/L dNTP(Fermentas, 美国), 2 mmol/L MgCl₂ (Fermentas, 美国), 正反向引物各 0.2 μmol/L, 细菌 DNA 模版 2 μL。反应条件为: 94℃ 预变性 10 min; 进行 10 个循环的降落 PCR(94℃ 变性 45 s, 68~59℃ 退火 30 s, 每个循环降低 1℃, 72℃ 延伸 1 min); 再进行 25 个循环的常规 PCR 扩增(94℃ 变性 45 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min); 最后 72℃ 延伸 10 min, PCR 反应在 S1000TM 热循环仪(Bio-Rad, 美国)上进行。后取 5 μL PCR 产物经浓度为 1.2 %

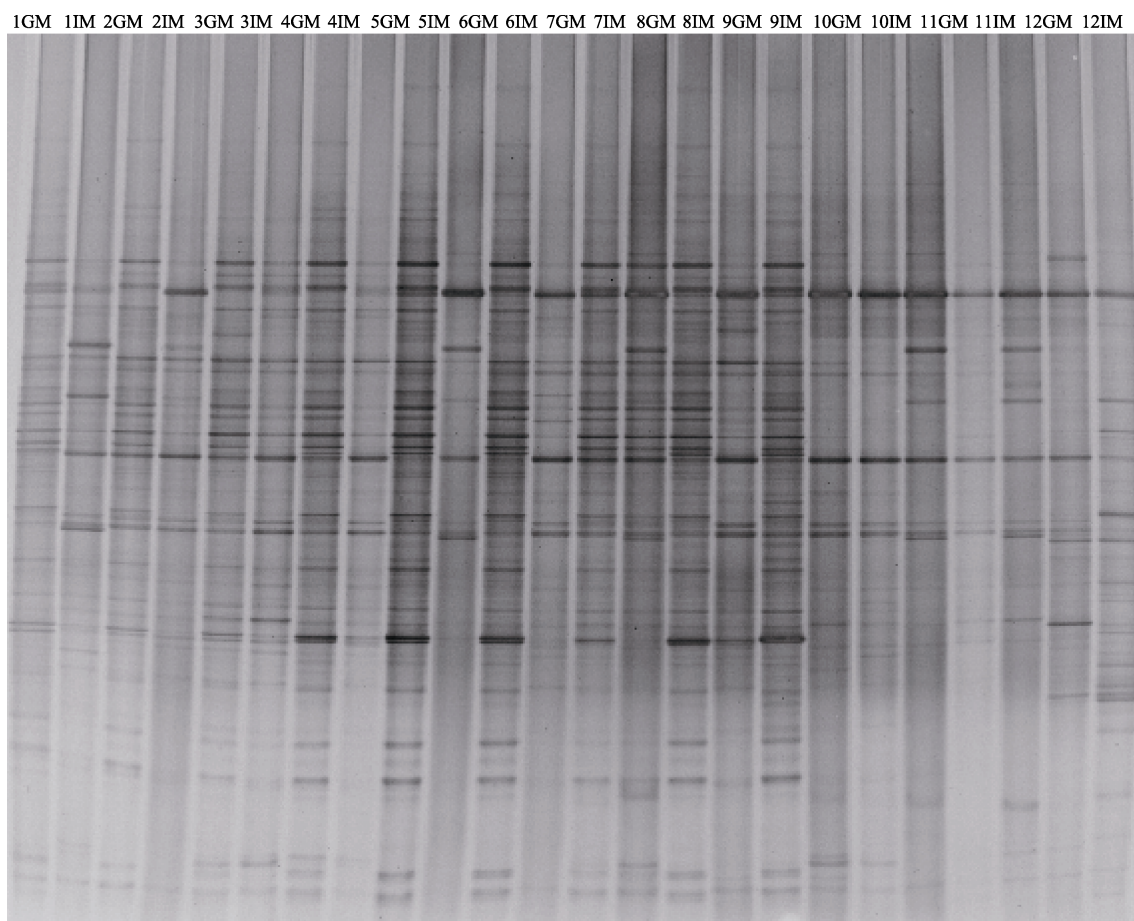


图 1 虹鳟胃黏膜及肠黏膜微生物群落变性梯度凝胶(DGGE)电泳图

图谱上方编号 1~12 表示取样对应的 12 套养殖系统, 其中 6、9、12 代表对照组, 2、4、7 代表 T1 组, 5、8、10 代表 T3 组, 1、3、11 代表 T5 组; GM 表示胃黏膜, IM 表示肠黏膜。

Fig. 1 DGGE profile of gastric mucosa and intestinal mucosa microbial communities of rainbow trout

The number above the gel represent as follows: 1-12 represent the samples collected from each aquaculture system, 6, 9, 12 represent the samples collected from control diet, 2, 4, 7 represent the samples collected from T1 diet, 5, 8, 10 represent the samples collected from T3 diet, 1, 3, 11 represent the samples collected from T5 diet; GM and IM represent gastric mucosa and intestinal mucosa.

7 条, 复合菌添加组特有带为 7 条。肠黏膜菌群 DGGE 图谱结果显示, 肠黏膜菌群条带数比胃黏膜少, 分别检测到 23.3 ± 5.8 (C0)、 22.3 ± 3.2 (T1)、 16.7 ± 8.0 (T3)、 24.7 ± 7.4 (T5) 条谱带, T3 添加组检测到最少的谱带数, 各实验组间谱带数目也无显著差异 ($F=0.916$, $P=0.475$), 共检测到共有带 21 条, 特有带 17 条, 其中对照组特有带为 9 条, 复合菌添加组特有带为 8 条。

为了探究不同比例益生菌添加对虹鳟胃黏膜和肠道黏膜上微生物菌群的影响, 分别对各实验组虹鳟胃及肠黏膜微生物群落进行差异性分析, 结果显示不同处理组虹鳟胃黏膜上微生物群落结构存在显著差异 ($F=3.060$, $P=0.029$), 而不同处理

组虹鳟肠黏膜微生物群落结构不存在显著性差异 ($F=0.964$, $P=0.410$)。

2.3 肠黏膜及胃黏膜微生物群落多样性分析

通过计算不同投喂处理条件下虹鳟胃黏膜及肠黏膜菌群的 DGGE 指纹图谱中条带的 H' 指数 (表 4~表 5), 发现胃黏膜菌群多样性指数均不存在显著差异 (Shannon Weiner, Simpson, Margalef, one-way ANOVA, $F=0.524$, $P=0.678$; $F=0.595$, $P=0.636$; $F=0.490$, $P=0.699$), 结果显示随着添加比例升高, 多样性有升高趋势, 但是在最高比例添加组 (T5) 多样性降低。肠黏膜菌群多样性在各实验组间也无显著差异 (one-way ANOVA, $F=1.217$, $P=0.365$; $F=1.398$, $P=0.312$; $F=1.035$, $P=0.428$),

表 4 虹鳟胃黏膜微生物群落结构多样性分析
Tab. 4 Analysis of gastric mucosa microbial community structure diversity of rainbow trout

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

组别 group	条带数 number of bands	Shannon-Wiener 多样性指数 Shannon-Wiener diversity index	Simpson 指数 Simpson index	Margalef 指数 Margalef index
C0	35.7±17.0	3.45±0.61	0.96±0.02	6.62±2.74
T1	37.0±3.50	3.59±0.09	0.97±0.01	6.94±0.51
T3	36.7±13.6	3.53±0.44	0.97±0.02	6.81±2.13
T5	26.0±13.2	3.13±0.65	0.95±0.04	5.13±2.25

表 5 虹鳟肠黏膜微生物群落结构多样性分析
Tab. 5 Analysis of intestinal mucosa microbial community structure diversity of rainbow trout

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

组别 group	条带数 number of bands	Shannon-Wiener 多样性指数 Shannon-Wiener diversity index	Simpson 指数 Simpson index	Margalef 指数 Margalef index
C0	23.3±5.80	3.12±0.23	0.95±0.01	4.73±1.01
T1	22.3±3.20	3.08±0.14	0.95±0.01	4.58±0.53
T3	16.7±8.01	2.71±0.52	0.93±0.04	3.49±1.44
T5	24.7±7.40	3.16±0.29	0.96±0.01	4.97±1.24

随着复合菌剂的添加,多样性指数呈现降低趋势,中浓度添加组(T3)多样性最低,但是随着添加浓度升高,呈现恢复和升高趋势(T5)。

2.4 肠黏膜及胃黏膜微生物群落相似性比较

依据投喂基础饵料及不同添加比例复合菌的虹鳟胃黏膜及肠黏膜细菌群落的 DGGE 指纹图谱生成的条带丰度值矩阵,对 12 个虹鳟个体胃黏膜及肠黏膜微生物群落结构相似性进行比较,基于 UPGMA 聚类分析结果显示胃黏膜微生物群落与肠黏膜微生物群落能够区分开,大致聚类为两个不同的分支,而针对胃黏膜和肠黏膜的分析发现,黏膜上微生物菌群并没有按照不同处理组而有显著分化(图 2a)。PCA 排序结果同样显示,虹鳟胃黏膜和肠黏膜微生物群落差异明显(图 2b)。综上所述,虹鳟胃黏膜及肠黏膜上菌群结构不同,复合菌剂添加对虹鳟胃黏膜及肠黏膜菌群多样性并未产生显著影响,同时也未显著改变虹鳟胃黏膜及肠黏膜微生物菌群结构。

3 讨论

外源菌剂添加投喂养殖鱼类已经得到广泛应用,且其对养殖对象生长、存活、饵料利用等方面的影响受到广泛关注^[17-18],在本实验得到相似的研究结果,饲料中添加复合益生菌对虹鳟的生

长及存活有一定的促进和提高,T1 比例的复合益生菌能够显著提高虹鳟的增重率和特定生长率、显著降低饲料系数($P<0.05$),同时在 T1 和 T3 比例添加组能够显著降低虹鳟的死亡率($P<0.05$)(表 4),而较高的 T5 比例组则没有表现出显著效果,由此可以得出,在本实验中,益生菌添加并非比例越高越好。

与此同时,外源菌剂添加作为重要的食物因素对鱼类消化道微生物菌群的影响则关注较少,鱼类消化道内生活着大量的微生物,在长期进化过程中与宿主形成了相互依赖、相互制约的微生态关系,并逐步形成了相对稳定的菌群结构。研究表明,鱼类孵化前鱼卵表面会附着大量的细菌^[19],孵化后的仔鱼初期主要通过卵黄来供给营养,此时的仔鱼已经开始大量饮水,水体中的细菌得以进入仔鱼的消化道,从而形成最初的菌群区系,随着卵黄囊逐渐被吸收、仔鱼消化道逐渐发育,仔鱼开始从外界水体摄取饵料等食物,仔鱼一旦开始摄食,多种细菌就开始在消化道上皮定植^[19-22]。仔鱼期形成了最初的不稳定微生物菌群,随后消化道逐渐发育成熟,从幼鱼期以后逐渐形成比较稳定的微生物区系,且这一复杂的定植过程大多与饵料营养及周围的水体环境等密切相关^[23]。自此覆盖在消化道黏膜上的大量微生物可以作为物

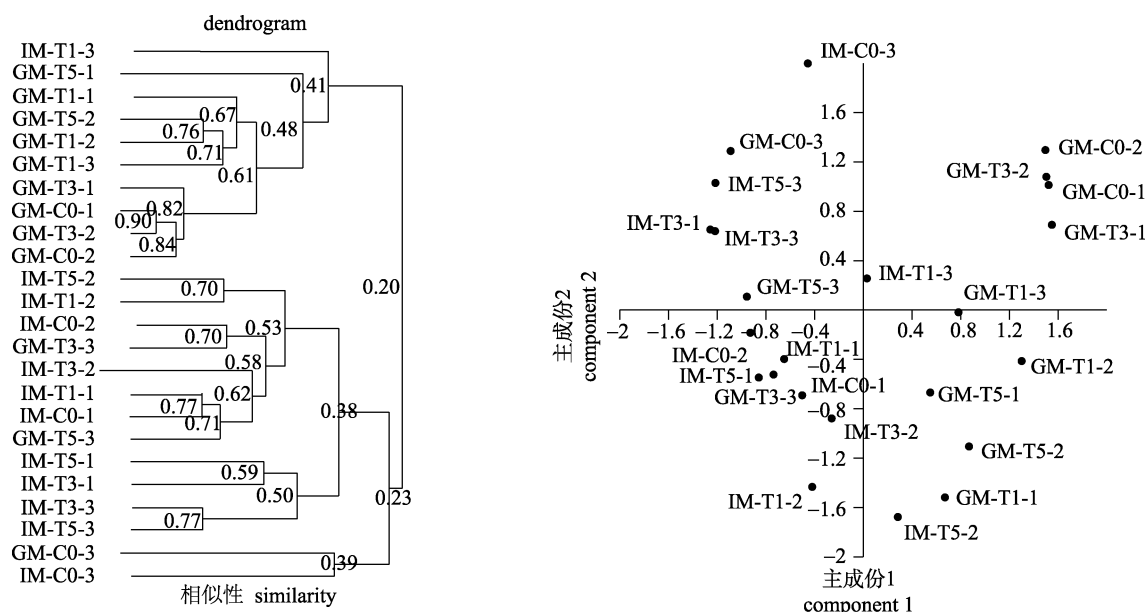


图 2 16S rDNA 指纹图谱的相似性分析

- a. 基于 16S rDNA 谱带的 UPGMA 聚类(采用邻接法 NJ 进行分析, 并进行 1000 次重复的 bootstrap 验证), 聚类枝节点上的数值表示相似性水平, 数值越大表示相似性越高; b. 基于 16S rDNA 谱带的 PCA 排序; IM, GM 表示肠黏膜和胃黏膜; C0, T1, T3, T5 分别表示对照组和 3 个处理组; 最后 1, 2, 3 表示 3 个样品。

Fig. 2 Similarity of 16S rDNA DGGE fingerprint

- a. UPGMA clustering on the basis of 16S rDNA bands (NJ tree with bootstrap analysis, 1000 replications). The Arabic numerals on the clustering branches indicated the similarity coefficients. Larger number indicates more similarity); b. PCA ordination on the basis of 16S rDNA bands; IM, GM represent intestinal mucosa and gastric mucosa; C0, T1, T3, T5 represent control diet and other probiotic-supplemented diets; the third numbers represent three individuals, respectively.

理屏障抵御病原菌等外来入侵; 同时, 这些微生物可以刺激机体产生特异性或者非特异性免疫反应加强机体自身保护。鱼类消化道黏膜上也寄居着大量的细菌, 它们聚集在一起形成菌丛, 从而防止病原菌定居和增殖^[24-25]。然而鱼类消化道内微生物菌群也易受生存环境、食物组成、健康状况等因素影响, 其中, 食物组成是影响鱼类消化道菌群的重要因素。Ringø 等^[26]对北极嘉鱼(*Salvelinus alpinus* L.)分别投喂等比例替代的糊精和菊粉饲料, 研究结果表明投喂两种食物的北极嘉鱼后肠微生物组成存在差异。同样, Ringø 等^[27]观察到喂养鱼粉时大西洋鳕(*Gadus morhua* L.)消化道中优势菌种类是属革兰氏阳性菌的环丝菌属(*Brochothrix*)和肉食杆菌属(*Carnobacterium*), 喂养标准大豆粉时其消化道内优势菌群为金黄杆菌属(*Chryseobacterium* spp.), 水栖嗜冷杆菌(*Psychrobacter glacincola*)及肉食杆菌属, 与上述结果相比较, 当用生物加工过的大豆粉饲喂大西洋鳕时发现其消化道内优势菌群为嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)。

hrobacter)。

Yang 等^[28]将克劳氏芽孢杆菌(*B. clausii*) 拌料投喂幼年点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*), 经过 60 d 的投喂实验后发现, 芽孢杆菌添加组和对照组表现出相似的 DGGE 谱带型, 谱带数目和 Shannon 多样性指数均无显著差异, 说明克劳氏芽孢杆菌并未对点带石斑鱼肠道菌群产生显著影响。研究还发现益生菌添加组鱼肠道内潜在益生菌如类肠球菌 (*Enterococcus* sp.-like)和类短小芽孢杆菌(*B. pumilus*-like)的数量有升高趋势, 而潜在有害菌类葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.-like)和类弧菌(*Vibrio ponticus*-like) 被有效遏制。在本研究中, 实验处理组虹鳟胃黏膜菌群 DGGE 图谱谱带数目虽无显著差异, 但对照组、T1、T3 添加组的谱带数差异很小, 而高比例添加组 T5 的谱带数急剧下降, 说明其胃黏膜上细菌种类显著减少, 同时研究发现不同处理组虹鳟胃黏膜上微生物群落结构存在显著差异($F=3.060$, $P=0.029$), 这可能是由于高浓度复合菌添加挤占了胃黏膜上土著菌

群的生态位,造成某些菌群的竞争性淘汰,造成胃黏膜细菌种类下降,不过此推论尚需后续实验验证。在针对肠黏膜菌群的 DGGE 扫描图谱中,中浓度添加组(T3)检测到最少的谱带数,而其他处理组与对照组相比差异很小,T3 组复合菌添加引起虹鳟肠黏膜菌群数量的减少同样值得后续深入探究。Ramos 等^[29]研究了多种复合益生菌株(*Bacillus* sp., *Pediococcus* sp., *E. sp.*, *Lactobacillus* sp.)和单一菌株(*P. acidilactici*)对虹鳟生长及消化道微生物的影响,通过 DGGE 扫描发现益生菌添加改变了虹鳟消化道微生物菌群,低浓度复合益生菌组 DGGE 谱带数显著多于对照组,但随着浓度升高,其谱带数目有降低趋势,这与本文的研究结果一致,然而究竟哪些种类菌群发生变化尚不得知,高浓度的益生菌添加减少消化道内菌群数量的机制值得深入探究,同时,消化道中黏膜菌群与内容物菌群也存在差异,其差异性及其形成原因有待进一步探讨。

本研究发现胃黏膜上优势细菌的种类比肠黏膜多,同时还发现胃黏膜微生物多样性要高于肠黏膜菌群。有报道表明消化道内可培养的细菌数量从胃到后肠有不断增加的趋势^[30-32],如 Molinari 等^[31]发现尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)前肠和后肠中的平均细菌数量都高于胃中,同时胃肠道各区段分离得到的特异性菌数量的百分比也存在差异。Navarrete 等^[32]发现大西洋鲑(*Salmo salar* L.)幼鱼胃、幽门盲囊、肠道中平均总细菌密度分别为 1×10^7 , 8×10^6 和 5×10^7 ,存在显著差异。由于可培养微生物占比不到消化道微生物总数的 1%,所以基于可培养方法与基于 16S rDNA 序列分析的研究方法得到的研究结果可能存在差异。目前研究的重点仅聚焦肠道微生物,且少有对胃及肠道内微生物菌群结构开展的比较研究,对胃内微生物的研究也相对薄弱,尤其对胃黏膜菌群,但幽门螺杆菌与胃溃疡、胃癌与胃内微生物菌群的关系等问题已经逐渐引起科研人员的重视,所以无论对于高等动物人类还是有胃鱼类,胃内微生物菌群研究同样值得关注。

益生菌对鱼类消化道微生物多样性的研究较少,且结论并无一致性,如 Ramos 等^[29]通过复合

益生菌剂和单一菌投喂虹鳟发现,复合菌剂添加影响了虹鳟消化道微生物多样性,除了高浓度复合益生菌添加组外,其他各添加组(高、低浓度单菌添加和低浓度复合菌组)Shannon 多样性都高于对照组。Yang 等^[28]对幼年点带石斑鱼拌料投喂劳氏芽孢杆菌,结果显示芽孢杆菌添加组和对对照组 Shannon 多样性指数无显著差异,说明克劳氏芽孢杆菌并未对点带石斑鱼肠道菌群产生显著影响。但深入研究发现益生菌投喂组鱼肠道内潜在益生菌数量有所升高,潜在有害菌得到有效遏制。Purwandari 等^[33]在橙色斑点石斑鱼的食物中添加投喂枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*),经过长达 6 个月的实验后,研究结果显示 0.1%和 1%(w/w)的枯草芽孢杆菌添加能显著促进鱼体增重及饵料转化,促进了类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)、乳杆菌 *oeni* 59 b (*Lactobacillus oeni* 59 b)和 *Methilacidophilum inferorum* V4 等有益菌群的增殖,进而增加橙色斑点石斑鱼肠道微生物菌群多样性。本研究发现不同比例复合菌剂投喂虹鳟幼鱼,并未显著改变其胃黏膜菌群多样性,实验结果显示随着添加比例升高,胃黏膜菌群多样性有升高趋势,但是在最高比例添加组(T5)多样性降低。肠黏膜菌群多样性在各实验组间也无显著差异,随着添加比例升高,多样性指数持续降低,中浓度添加组(T3)多样性最低,随后又出现恢复和升高趋势(T5)。高浓度的菌剂添加有可能会造成外源菌株的优势增殖,从而通过竞争抑制其他菌群生长,造成细菌种类的减少,从而降低菌群多样性。研究人员发现微生物多样性的降低会引起包括多种微生物参与的消化能力的减弱以及可能带来的宿主营养缺乏和抗病力减弱^[34]。生态学理论指出,更高物种多样性的种群比低多样性种群的抵抗力稳定性更强^[35],所以,综合死亡率数据分析可知,提升复合益生菌的添加比例,并未能显著降低虹鳟死亡率,而在中低比例添加组(T1、T3 组)中虹鳟表现出显著低的死亡率($P < 0.05$)。

综上所述,本研究发现低浓度的解淀粉芽孢杆菌和胶红酵母菌($(5 \times 10^6$ CFU/g)/(5×10^7 CFU/g))添加对虹鳟的生长及存活有显著改善,复合益生菌添加未显著改变虹鳟幼鱼胃及肠道黏膜菌群的

微生态平衡,但高比例添加会降低胃肠黏膜上的细菌数量及多样性,有引起胃肠道菌群紊乱风险。随着高通量测序技术的飞速发展,宏基因组测序将成为鱼类消化道微生物研究的重要手段,本实验所反映的虹鳟幼鱼胃黏膜和肠黏膜菌群差异及菌剂投喂后消化道微生物菌群动态变化将得到更深入解析,从而可以深入揭示消化道微生物与鱼源宿主的精密关系及外源菌剂添加对鱼类土著菌群的微生态平衡影响,也可以综合评价益生菌的作用效果及可能的潜在使用风险。

参考文献:

- [1] Naylor R, Hindar K, Fleming I A, et al. Fugitive salmon: assessing the risks of Escaped fish from net-pen aquaculture[J]. Bio Sci, 2005, 55(5): 427-37.
- [2] Brunt J, Newaj-Fyzul A, Austin B. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. J Fish Dis, 2007, 30(10): 573-579.
- [3] Salazar S, Oliver C, Yáñez A J, et al. Comparative analysis of innate immune responses to *Streptococcus phocae* strains in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Fish Shellf Immunol, 2016, 51: 97-103.
- [4] Baba E, Uluköy G, Öntaş C. Effects of feed supplemented with *Lentinula edodes* mushroom extract on the immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and disease resistance against *Lactococcus garvieae*[J]. Aquaculture, 2015, 448: 476-482.
- [5] Araújo C, Muñoz-Atienza E, Hernández P E, et al. Evaluation of *Enterococcus* spp. from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), feed, and rearing environment against fish pathogens[J]. Foodborne Pathogens Dis, 2015, 12(4): 311-322.
- [6] Gareau M G, Sherman P M, Walker W A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease[J]. Nat Rev Gastro Hepat, 2010, 7(9): 503-514.
- [7] Hai N V. The use of probiotics in aquaculture[J]. J Appl Microbiol, 2015, 119(4): 917-935.
- [8] Tuan T N, Duc P M, Hatai K. Overview of the use of probiotics in aquaculture[J]. Inter J Env Res Pub Heal, 2013, 3(3): 89-97.
- [9] Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, et al. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth[J]. Aquaculture, 1998, 167(3): 301-313.
- [10] Li W F, Deng B, Chen N N, et al. Effects of *Bacillus* on water quality, growth and antioxidant activity of intestinal mucosa of *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Journal of Hydroecology, 2012, 33(1): 65-70. [李卫芬, 邓斌, 陈南南, 等. 芽孢杆菌对草鱼生长和肠黏膜抗氧化功能及养殖水质的影响[J]. 水生态学杂志, 2012, 33(1): 65-70].
- [11] Merrifield D L, Bradley G, Baker R T M, et al. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment[J]. Aquacult Nutr, 2010, 16(5): 496-503.
- [12] Song B B, Fu S Z, Liu Z P, et al. Effect of adding two microbes to aquaculture water on shrimps' survival, growth and digestive enzyme activity[J]. Marine Sciences, 2009, 33(4): 1-5. [宋奔奔, 傅松哲, 刘志培, 等. 水体中添加两种菌剂对凡纳滨对虾存活、生长及消化酶活力的影响[J]. 海洋科学, 2009, 33(4): 1-5].
- [13] NRC (National Research Council). Nutrient Requirements of Fish[M]. Washington, DC: National Academy Press, 1993: 114.
- [14] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microb, 1993, 59(3): 695-700.
- [15] Chen T G, Zhang J T. A Comparison of fifteen species diversity indices[J]. Henan Science, 1996, 17: 55-58. [陈廷贵, 张金屯. 十五个物种多样性指数的比较研究[J]. 河南科学, 1996, 17: 55-58].
- [16] Pielou E C. Ecological Diversity[M]. Berlin: John Wiley, 2013.
- [17] Munir M B, Hashim R, Chai Y H, et al. Dietary prebiotics and probiotics influence growth performance, nutrient digestibility and the expression of immune regulatory genes in snakehead (*Channa striata*) fingerlings[J]. Aquaculture, 2016, 460: 59-68.
- [18] Huang L, Ran C, He S, et al. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* culture or live cells with *Bacillus amyloliquefaciens* spores on growth performance, gut mucosal morphology, hsp70 gene expression, and disease resistance of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Aquaculture, 2015, 438: 33-38.
- [19] Hansen G H, Olafsen J A. Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture[J]. Appl Environ Microb, 1989, 55(6): 1435-1446.
- [20] Hansen G H, Olafsen J A. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish[J]. Microb Ecol, 1999, 38(1):

- 1–26.
- [21] Cahill M M. Bacterial flora of fishes: a review[J]. Microb Ecol, 1990, 19(1): 21–41.
- [22] Olafsen J A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture[J]. Aquaculture, 2001, 200: 223–247.
- [23] Munro P O, Barbour A, Blrkbeck T H. Comparison of the gut bacterial flora of start-feeding larval turbot reared under different conditions[J]. J Appl Bacteriol, 1994, 77(5): 560–566.
- [24] Bergh Ø. Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp.[J]. J Fish Dis, 1995, 18(1): 31–40.
- [25] Austin B. The bacterial microflora of fish[J]. Scientific World J, 2002, 2: 558–572.
- [26] Ringø E, Sperstad S, Myklebust R, et al. The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.)[J]. Aquac Res, 2006, 37(9): 891–897.
- [27] Ringø E, Sperstad S, Myklebust R, et al. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal[J]. Aquaculture, 2006, 261(3): 829–841.
- [28] Yang H L, Sun Y Z, Ma R L, et al. PCR-DGGE analysis of the autochthonous gut microbiota of grouper *Epinephelus coioides* following probiotic *Bacillus clausii* administration[J]. Aquac Res, 2012, 43(4): 489–497.
- [29] Ramos M A, Weber B, Gonçalves J F, et al. Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Comp Biochem Physiol A, 2013, 166(2): 302–307.
- [30] Trust T J, Sparrow R A H. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes[J]. Can J Microbiol, 1974, 20(9): 1219–1228.
- [31] Molinari L M, Scoaris D O, Pedroso R B, et al. Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system[J]. Acta Scient Biol Sci, 2003, 25: 267–271.
- [32] Navarrete P, Espejo R T, Romero J. Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. Microb Ecol, 2009, 57(3): 550–561.
- [33] Purwandari A R, Chen H Y. Effects of probiotic *Bacillus subtilis* on intestinal microbial diversity and immunity of orange spotted grouper *Epinephelus coioides*[J]. J Appl Biotechnol, 2013, 1(1): 25.
- [34] Giongo A, Gano K A, Crabb D B, et al. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes[J]. ISME J, 2011, 5(1): 82–91.
- [35] Levine J M, D' Antonio C M. Elton revisited: a review of evidence linking diversity and invisibility[J]. Oikos, 1999: 15–26.

Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* V4 and *Rhodotorula mucilaginosa* on growth and microbiota of gastric mucosa and intestinal mucosa in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

WANG Chun^{1,2}, SUN Guoxiang¹, LIU Zhipei³, LIU Shulan⁴, WANG Shunkui⁴, LIU Ying^{1,5}

1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

4. Shandong Oriental Ocean Sci-Tech CO., LTD, Yantai 264000, China;

5. Dalian Ocean University, Dalian 116000, China

Abstract: Probiotic dietary supplementation has been widely used and has positive effects on the growth performance and host health of different fish species. Little attention is paid to its influence on fish gastrointestinal mucosal microbiota. A feeding trial was conducted to investigate the potential effects of probiotic compounds of *Bacillus amyloliquefaciens* V4 and *Rhodotorula mucilaginosa* on the growth performance and gastric and intestinal mucosal microbiota of rainbow trout. A total of 360 rainbow trout with average body weight of (205.1±4.82) g were distributed in four equal groups in three replicates, and received one of the following experimental diets for 42 days: basal diet, basal diet supplemented with $5\times10^6/5\times10^7$ CFU/g (T1, see tables 1 and 2), $1.5\times10^7/1.5\times10^8$ CFU/g (T3, see tables 1 and 2), and $2.5\times10^7/2.5\times10^8$ CFU/g (T5, see tables 1 and 2) of probiotic compounds. Significant improvement in weight gain ratio, feed conversion ratio, and the specific growth rate (SGR) was found in T1 diet supplemented with probiotic compounds. Significantly decreased mortality was found in T1 and T3 diets. Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) was applied to compare the gastrointestinal mucosal microbiota of different treatments. In gastric mucosa, 35.7±17.0 (C0), 37.0±3.5 (T1), 36.7±13.6 (T3), and 26.0±13.2 (T5) bands were found, with no significant differences ($F=0.500$, $P=0.692$). In intestinal mucosa, 23.3±5.8 (C0), 22.3±3.2 (T1), 16.7±8.0 (T3), and 24.7±7.4 (T5) bands were found, also with no significant differences ($F=0.916$, $P=0.475$). The bacterial diversity of gastric mucosa increased with increasing probiotic concentration, but it decreased in T5. However, the bacterial diversity of intestinal mucosa decreased with increasing probiotic concentration, which showed recovery in T5. Using both the unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) clustering and principal component analysis (PCA) ordination, we found that the microbial community structures of gastric mucosa and intestinal mucosa were different. No significant influences were found on bacterial diversity and microbial community structure of intestinal mucosa of rainbow trout with addition of probiotic compounds of *Bacillus amyloliquefaciens* V4 and *Rhodotorula mucilaginosa*. The potential risks of high concentrations of probiotics should be paid more attention.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; *Rhodotorula mucilaginosa*; *Oncorhynchus mykiss*; gastric and intestinal mucosal microbiota; PCR-DGGE

Corresponding author: LIU Ying. E-mail: yingliu@dlou.edu.cn