

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191111001

http://www.yykxjz.cn/

樊英, 王晓璐, 于晓清, 刘洪军, 叶海斌, 王淑娴, 刁菁, 胡发文, 菅玉霞. 地衣芽孢杆菌对大泷六线鱼生长、肠道消化酶、血清非特异性免疫及抗病力的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 63–73

Fan Y, Wang XL, Yu XQ, Liu HJ, Ye HB, Wang SX, Diao J, Hu FW, Jian YX. Effect of *Bacillus licheniformis* on growth, intestinal digestive enzymes, serum non-special immune and resistance against *Aeromonas salraonicida* in fat greenling, *Hexagrammos otakii*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(1): 63–73

地衣芽孢杆菌对大泷六线鱼生长、肠道消化酶、血清非特异性免疫及抗病力的影响*

樊 英 王晓璐 于晓清 刘洪军 叶海斌
王淑娴 刁 菁^① 胡发文 菅玉霞

(山东省海洋生物研究院 山东省海水养殖病害防治重点实验室 青岛 266104)

摘要 本研究探讨饲料中添加地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)对大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)生长、肠道消化酶、血清非特异性免疫及抗病力的影响。选取平均体重为(22.0±2.0) g的大泷六线鱼 270 尾, 随机分成 3 组(对照组和 2 个不同菌剂水平的实验组), 每组 3 个平行, 每个平行 30 尾鱼。对照组投喂仅有蛋白液包裹的基础饲料, 实验组投喂含活菌量达 5×10^7 CFU/g(0.5%)和 1×10^8 CFU/g(1.0%)地衣芽孢杆菌的实验饲料。投喂 50 d 后进行致病菌杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salraonicida*)攻毒感染, 测定 14 d 内累积死亡率。结果显示, 实验组饲料中地衣芽孢杆菌可显著提高大泷六线鱼的特定生长率(SGR) ($P < 0.05$)。与对照组比较, 0.5%和 1.0%地衣芽孢杆菌均可提高大泷六线鱼血清中 SOD、CAT 及 T-AOC 活性($P < 0.05$), 降低 MDA 含量($P < 0.05$); GSH-Px 活性在 1.0%实验组较对照组下降, 而 0.5%实验组较对照组提高。地衣芽孢杆菌实验组鱼血清 GS、MDH 和 HK 活性均得到提高($P < 0.05$), 0.5%和 1.0%不同剂量组的提高程度不同。地衣芽孢杆菌实验组鱼血清中 AST 和 ALT 活性较对照组均降低($P < 0.05$), CHE 和 ADA 活性较对照组有提高($P < 0.05$)。实验组鱼肠道胰蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性均有不同程度的提高, 且 1.0%实验组活性最强($P < 0.05$)。攻毒实验结果显示, 1.0%地衣芽孢杆菌组大泷六线鱼 14 d 内累积死亡率仅有 35.55% ($P < 0.05$)。由此可见, 饲料中添加地衣芽孢杆菌可促进大泷六线鱼生长, 提高其肠道消化酶活性及非特异性免疫酶活性, 增强其对杀鲑气单胞菌的抵抗能力。

关键词 地衣芽孢杆菌; 大泷六线鱼; 非特异性免疫; 抗病力

中图分类号 S963.73 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2021)01-0063-11

近年来, 随着养殖规模迅速发展、集约化程度不断提升, 养殖动物疾病频发, 而为控制病害暴发滥用

各种药物, 不仅破坏了养殖生态环境, 也带来了养殖产品的质量安全问题。然而, 益生菌制剂在保证生态

* 山东省重点研发计划(2018GHY115033; 2019GHY112062)资助 [This work was supported by Key Research and Development Project of Shandong Province (2018GHY115033; 2019GHY112062)]. 樊 英, E-mail: fy_fy123@126.com

① 通讯作者: 刁 菁, 副研究员, E-mail: doro530@sina.com

收稿日期: 2019-11-11, 收修改稿日期: 2020-01-03

环境平衡、食品安全的前提下,因其具有促生长、提免疫、保健康的良好优势,已成为当前水产养殖研究的热点。研究表明,益生菌的应用可明显促进养殖动物的生长(Madani *et al*, 2018; Azarin *et al*, 2015),提高溶菌酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶以及蛋白酶的活性,间接提升机体免疫力(刘淑兰等, 2017; Abarike *et al*, 2018),或调控养殖动物机体内免疫球蛋白、热休克蛋白等重要基因的表达水平,增强防御能力(Huang *et al*, 2015)。在众多已批准的饲料添加剂中,芽孢杆菌(*Bacillus*)是被研究最多的菌种之一,包括枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)等。本研究选用地衣芽孢杆菌,属于孢子形成菌,加工过程能够抵抗饲料颗粒化的热度,被摄食后在养殖动物体内能够存活,增殖过程中能够分泌各种酶类,提供丰富的营养物质(El-Haroun *et al*, 2006),对动物机体无明显的毒副作用,具有高效、绿色和安全等特点,市场发展潜力巨大。

大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*), 鲷形目(Scorpaeniformes)、六线鱼科(Hexagrammidate)、六线鱼属(*Hexagrammos*), 是一种生态习性、生长特点、养殖方法等独具特色的冷水性鱼类,因其肉质鲜美、营养价值高深受养殖者和消费者的喜爱,其养殖形式涉及网箱、工厂化以及渔业增殖放流等(成庆泰, 1962; 李莉等, 2019)。本研究以大泷六线鱼为研究对象,在基础饲料中添加地衣芽孢杆菌,探究对其生长、肠道消化酶活性、非特异性免疫力的影响及对致病菌杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salraonida*)的抵抗能力,以期研发出高效、绿色、无公害的饲料添加剂产品,同时为评估益生菌制剂的作用效果提供更多更可靠的数据参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用大泷六线鱼来自青岛鲁海水产技术发展公司,游动活泼,体色光亮正常,食欲旺盛,未发现病症,初始平均体重为(22.0±2.0) g。地衣芽孢杆菌购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC),通过营养肉汁培养基活化, -80℃保存备用。攻毒所用杀鲑气单胞菌为本实验室保存。基础配合饲料来自北京汉业科技有限公司,其营养水平为粗蛋白质 471 g/kg、粗脂肪 174 g/kg、粗灰分 96 g/kg、可溶性膳食纤维 5.91 g/kg、水解氨基酸之和 404.4 g/kg、Ca

1.52×10⁴ mg/kg、Fe 808 mg/kg、Zn 137 mg/kg、水分 75.3 g/kg。

地衣芽孢杆菌通过大豆蛋白胨肉汤培养基 30℃过夜培养,浓度达 10¹⁰ CFU/ml。按照 0.5%和 1.0%比例将活化的菌液均匀喷洒到基础饲料上,搅拌均匀,阴凉处晾干,再在其表面直接包裹一层鸡蛋稀蛋白液(水分为 85.5%,蛋白质为 2.8%,脂肪为 0.25%,碳水化合物为 0.77%),阴干后 4℃保存备用(活菌数分别为 5×10⁷和 1×10⁸ CFU/g)。对照组基础饲料同样包裹蛋白液,阴干后 4℃保存备用。每次制备实验饲料保存期限为 7 d。

1.2 实验设计及饲养条件

养殖实验于 2018 年 11 月 15 日~2019 年 1 月 25 日在山东省海洋生物研究院养殖实验室进行。选取大小均匀、健康正常的大泷六线鱼随机分成 3 组,每组 3 个平行,每个平行 30 尾,放养于循环水养殖系统(500 L)中,实验前用基础配合饲料暂养 10 d。对照组(Control)投喂仅有蛋白液包裹的基础配合饲料;实验组(*B. licheniformis*)分别投喂添加 0.5%和 1.0%地衣芽孢杆菌的实验饲料。

实验过程中每天排污、吸除残饵,每天分别在 10:00 和 18:00 投喂 2 次,日投喂量为鱼体重的 2%,根据摄食情况适当调整投喂量,达到饱食投喂,无残饵剩余,饲喂饵料在 1 h 内摄食完。实验期间水温为(11.5±1.0)℃,溶氧为(7.0±0.5) mg/L, pH 为 7.2±0.3,氨氮和亚硝酸氮含量<0.1 mg/L。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 生长指标检测 喂养实验结束后,将鱼饥饿 24 h,对每个平行组中的鱼进行计数和称重(终末体重),计算成活率(Survival rate, SR)和特定生长率(Specific growth rate, SGR)。计算公式为:

$$SR=(\text{终末活鱼尾数}/\text{初始活鱼尾数})\times 100\%$$

$$SGR=(\ln \text{末均重}-\ln \text{初均重})/\text{实验天数}\times 100\%$$

1.3.2 血清样品采集及免疫相关酶指标检测 喂养实验过程中,每 10 d 随机从每个平行组中抽取 3 尾实验鱼,用无菌注射器从尾静脉处采血,将血液迅速置入离心管后于 4℃下静置 6 h,以 3000 r/min 离心 10 min,取血清迅速置于液氮中, -80℃超低温保存、备测。

谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(Microscale malondialdehyde, MDA)、总抗氧化能力(Total antioxidant, T-AOC)以及过氧化

氢酶(Catalase, CAT)活性均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定, 反映机体抗氧化能力的变化。

谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase, GS)、苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenase, MDH)和己糖激酶(Hexokinase, HK)活性均采用南京建成生物工程研究所试剂盒的操作方法测定, 反映机体对营养物质代谢能力的变化。

谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、腺苷脱氨酶(ADA)和胆碱酯酶(CHE)活性均按照南京建成生物工程研究所试剂盒微板法测定, 从肝功能相关指标的变化间接反映机体免疫力。

1.3.3 肠道样品采集及消化酶活性检测 实验过程每 10 d 分别从每个平行组取 3 尾实验鱼, 冰上无菌操作取前中肠肠道样品, 按 1 : 9 (*m/v*)比例加入预冷的 0.85%生理盐水, 冰浴匀浆后 2500 r/min 离心 10 min, 取上清液备测。胰蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性均采用南京建成生物工程研究所试剂盒进行测定。

1.4 血清免疫指标间的相关性研究

经 SPSS 19.0 进行双变量相关性分析, 确定双侧检验显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

1.5 攻毒感染实验

本实验室保存的杀鲑气单胞菌经脑心浸液培养基(Brian Heart Infusion, BHI) 28℃培养 24 h, 预实验

确定半致死浓度(LD₅₀), 用无菌生理盐水调整浓度为 10⁸ CFU/ml。芽孢杆菌喂养实验结束后, 每组随机取 15 尾鱼进行攻毒实验, 经肌肉注射 100 μl 杀鲑气单胞菌稀释液, 对照组注射相同剂量的生理盐水。实验期间观察感染后大泷六线鱼的表征并及时记录日死亡情况, 及时取出死亡鱼体, 14 d 后结束感染实验并统计其累积死亡率。计算公式如下:

累积死亡率(Cumulative mortality rate, %)=累积死亡数量/初始数量×100。

1.6 数据统计分析

实验所得数据均表示为平均值±标准误(Mean±SE, $n=3$), 通过 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和柱状图绘制, 同时通过 Tukey's 检验方法对实验数据进行多重比较, 当 $P < 0.05$ 时, 表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 地衣芽孢杆菌对大泷六线鱼生长性能的影响

含地衣芽孢杆菌实验饲料喂养大泷六线鱼 50 d 后, 称重并统计各组实验鱼的存活率和 SGR。从表 1 中可见, 地衣芽孢杆菌可显著提高大泷六线鱼终末体重和 SGR($P < 0.05$), 但两实验组之间无显著差异($P > 0.05$), 对照组和实验组鱼的存活率均为 100%。

表 1 地衣芽孢杆菌对大泷六线鱼生长性能的影响(平均值±标准误)
Tab.1 Effect of *B. licheniformis* on growth performance of *H. otakii* (Mean±SE)

组别 Groups	初始体重 IBW(g)	终末体重 FBW(g)	成活率 SR(%)	特定生长率 SGR(%/d)
对照组 Control	22.90±0.42	39.82±4.30 ^a	100.00±0.00 ^a	1.08±0.19 ^a
0.5%地衣芽孢杆菌组 0.5% <i>B. licheniformis</i>	22.30±1.95	54.10±3.45 ^b	100.00±0.00 ^a	1.77±0.14 ^b
1.0%地衣芽孢杆菌组 1.0% <i>B. licheniformis</i>	22.87±0.67	56.33±2.22 ^b	100.00±0.00 ^a	1.80±0.08 ^b

注: 表中同列肩标相同小写字母或无小写字母表示差异不显著($P > 0.05$), 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: In the same row, values with the same small letter superscripts or no superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$), different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$)

2.2 地衣芽孢杆菌对大泷六线鱼血清中抗氧化指标的影响

含地衣芽孢杆菌实验饲料喂养大泷六线鱼 50 d 后, 各实验组和对照组大泷六线鱼血清的抗氧化相关酶活力测定结果见图 1。与对照组比较, 饲料中添加 0.5%和 1.0%地衣芽孢杆菌均可提高大泷六线鱼血清中 SOD、CAT 和 T-AOC 活性, 降低 MDA 含量。GSH-Px 活性在 1.0%实验组较对照组下降, 而 0.5%实验组较对照组提高, 且第 50 天最高, 但与对照组

差异不显著($P > 0.05$), 与 1.0%实验组差异显著($P < 0.05$)。SOD 和 CAT 活性在第 40 天较高, 两实验组差异不显著($P > 0.05$); MDA 含量第 40 天最低, 两实验组差异不显著($P > 0.05$); T-AOC 活性在第 50 天最高, 两实验组差异显著($P < 0.05$)。

2.3 地衣芽孢杆菌对大泷六线鱼血清中代谢相关酶的影响

含地衣芽孢杆菌实验饲料喂养大泷六线鱼 50 d 后, 各实验组和对照组大泷六线鱼血清中代谢相关酶

活力的测定结果见图 2。与对照组相比, 1.0%地衣芽孢杆菌组的鱼血清中代谢相关酶 GS、MDH 活性第 40 天最高($P<0.05$), 0.5%实验组第 50 天最高($P<0.05$),

且 1.0%实验组高于 0.5%实验组。HK 活性第 40 天最高, 0.5%实验组高于 1.0%实验组, 两实验组之间无显著差异($P>0.05$)。

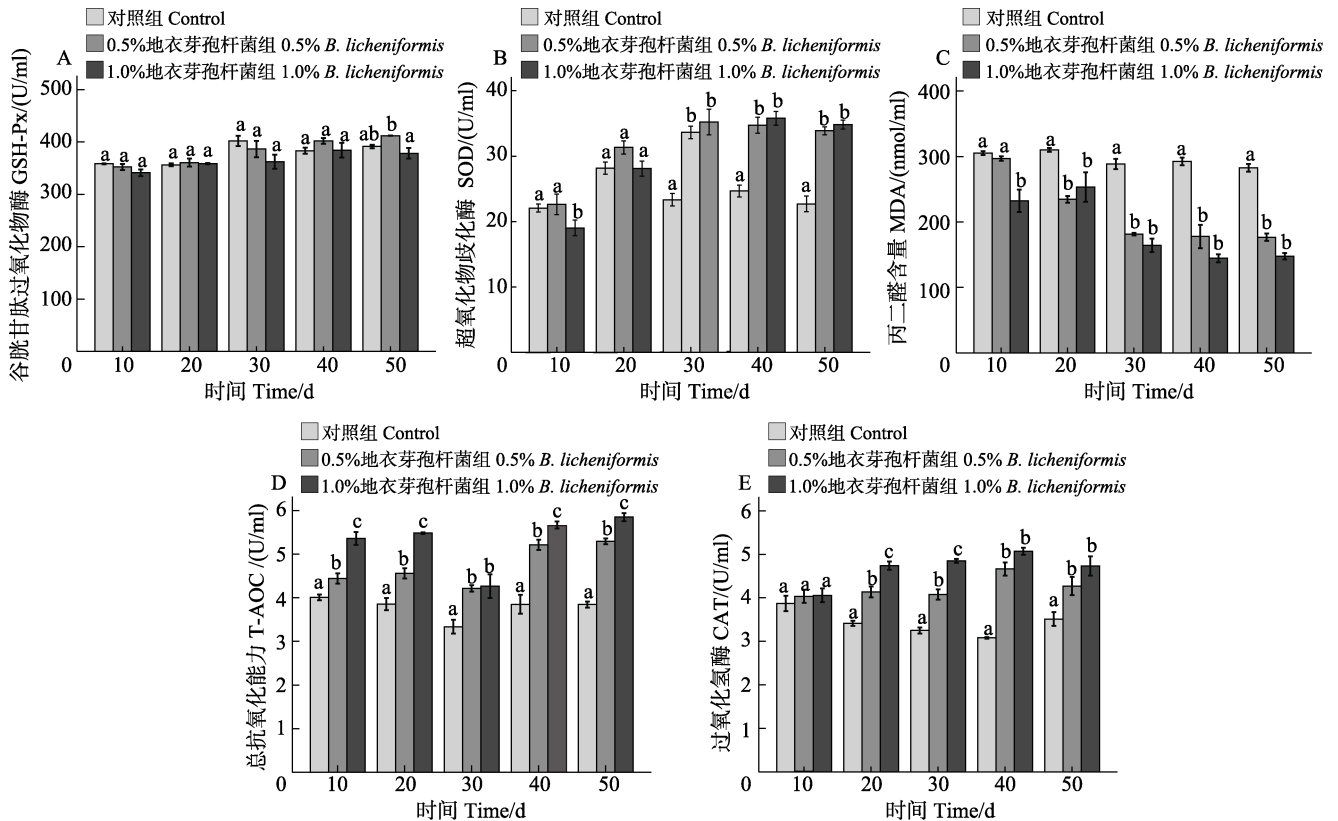


图 1 地衣芽孢杆菌对大泷六线鱼血清中抗氧化指标的影响

Fig.1 Effect of *B. licheniformis* on antioxidant indicators in serum of *H. otakii*

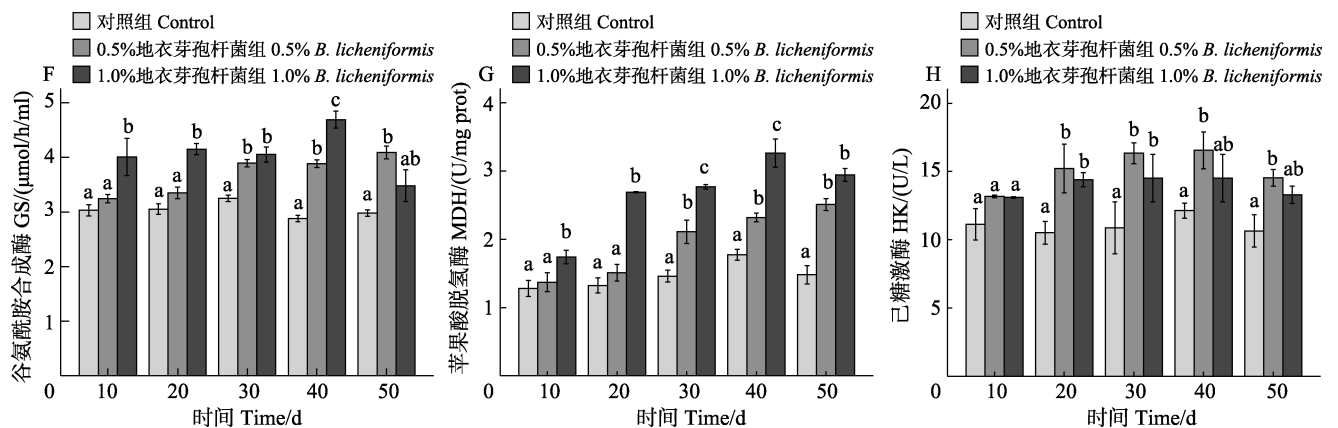


图 2 地衣芽孢杆菌对大泷六线鱼血清中代谢相关酶的影响

Fig.2 Effect of *B. licheniformis* on metabolic enzymes in serum of *H. otakii*

2.4 地衣芽孢杆菌对大泷六线鱼血清中肝功能相关酶的影响

含地衣芽孢杆菌实验饲料喂养大泷六线鱼 50 d

后, 各实验组和对照组大泷六线鱼血清中肝功能相关酶活力测定结果见图 3。与对照组比较, 地衣芽孢杆菌实验组鱼血清中 AST 活性降低, 且幅度较大, 第 50 天最低, 两实验组间差异显著($P<0.05$)。ALT 活性

在 0.5% 实验组持续降低, 第 40 天最低, 两实验组差异显著 ($P < 0.05$), 而 1.0% 实验组变化起伏, 第 20 天和第 50 天活性较低。1.0% 实验组 CHE 和 ADA 活性均比对照组有提高 ($P < 0.05$), CHE 活性在第 30 天最高, 与 0.5% 实验组差异不显著 ($P > 0.05$), 而 ADA 活性在第 40 天最高, 与 0.5% 实验组差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.5 地衣芽孢杆菌对大泷六线鱼肠道消化酶活性的影响

含地衣芽孢杆菌实验饲料喂养大泷六线鱼 50 d 后, 各实验组和对照组大泷六线鱼肠道消化酶活性变化见图 4。与对照组比较, 两实验组胰蛋白酶活性

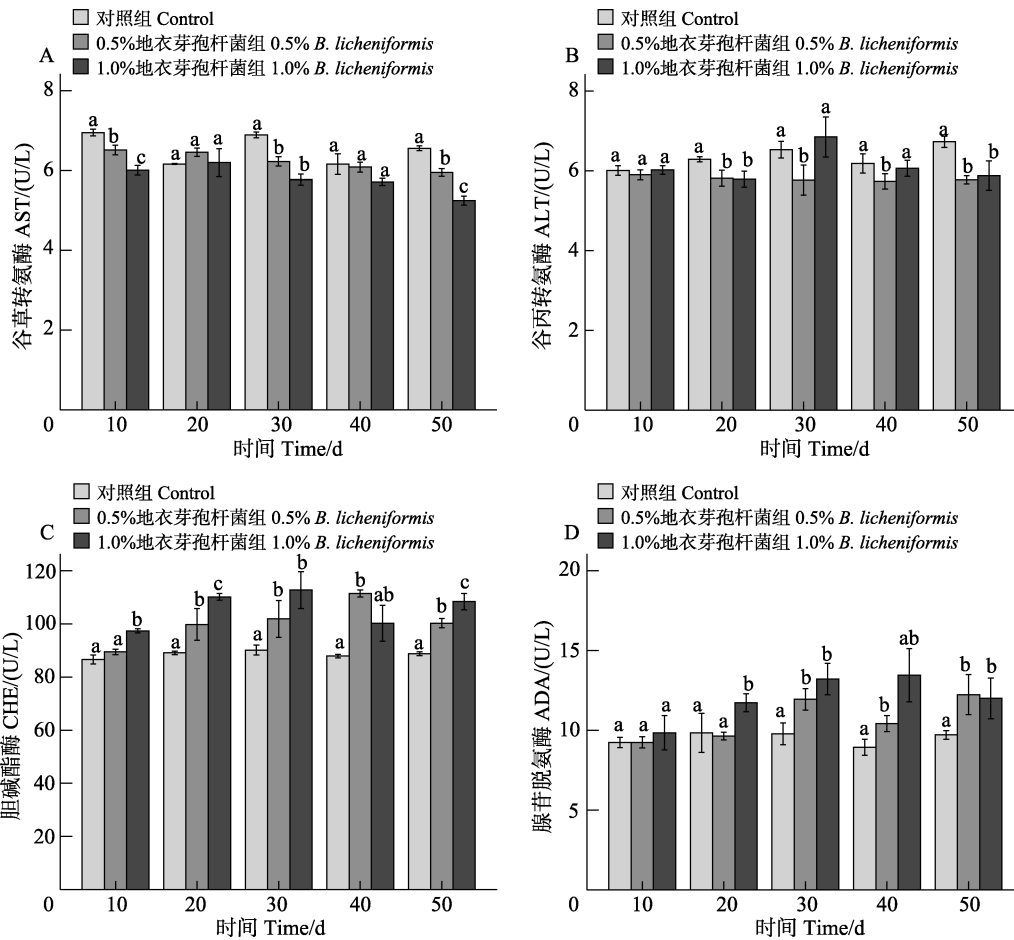


图 3 地衣芽孢杆菌对大泷六线鱼血清中肝功能相关酶的影响
Fig.3 Effect of *B. licheniformis* on liver enzymes in serum of *H. otaki*

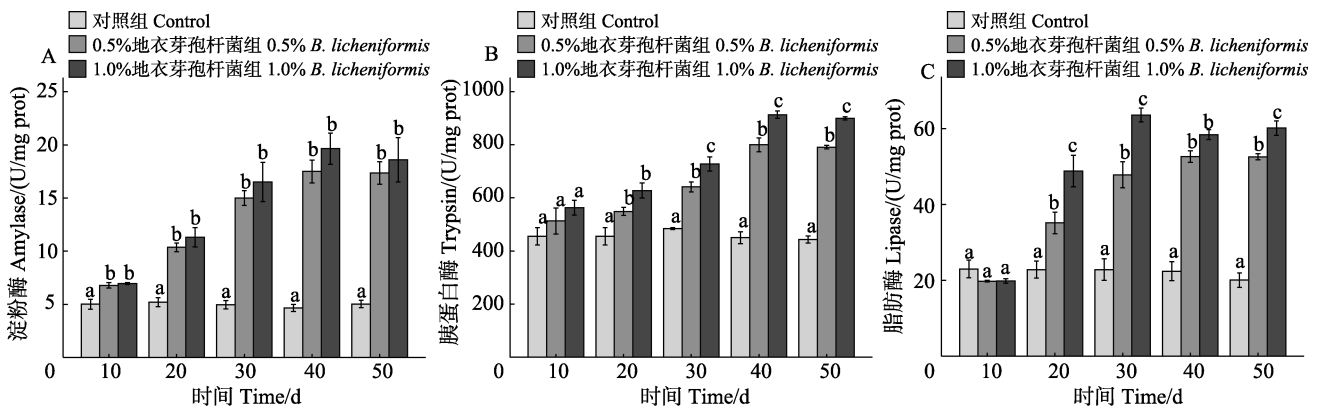


图 4 地衣芽孢杆菌对大泷六线鱼肠道消化酶活性的影响

Fig.4 Effect of *B. licheniformis* on activities of intestinal digestive enzymes in *H. otakii*

随时间延长呈递增趋势,第40天1.0%实验组酶活性达到最高,且两实验组之间差异显著($P<0.05$),第50天变化平稳。1.0%实验组第40天肠道淀粉酶活性达最高($P<0.05$),比对照组提高近3倍,两实验组之间无显著差异($P>0.05$)。脂肪酶活性在实验第30天以1.0%实验组最高($P<0.05$),而0.5%实验组在第40天最高($P<0.05$),与1.0%实验组无显著差异($P>0.05$)。

2.6 大泷六线鱼血清非特异性免疫指标相关性分析

相关性是一种动态化的特征,它表示各个因素在某个特定的时间点上的分析,本研究是通过第50天各免疫指标的活性值进行分析,不同指标之间交互检验双侧显著性系数不同。如表2所示,GSH-Px和GS相关性极显著,达到 $P<0.01$ 显著水平,说明二者之

间密切程度较高;T-AOC和GSH-Px、T-AOC和MDA、MDA和GS、GSH-Px和MDH之间存在一定的联系和概率,达到 $P<0.05$ 显著水平。

2.7 攻毒感染实验

含地衣芽孢杆菌实验饲料喂养大泷六线鱼50d后,进行杀鲑气单胞菌注射感染实验,感染期间各组累积死亡率的统计结果见图5。对照组感染后,第2天即出现死亡情况,6d内死亡率急剧增加,第8天减缓,第10天达到平稳期,14d内的累积死亡率达75.55%;而实验组在第4天出现死亡,与对照组差异性显著($P<0.05$);1.0%实验组第8天达到平稳期,14d内的累积死亡率仅有35.55% ($P<0.05$),而0.5%实验组第10天达到平稳期,累积死亡率为53.33% ($P<0.05$)。

表2 双变量方差分析大泷六线鱼血清非特异性免疫因子的相关性
Tab.2 Two-way ANOVA correction analysis of non-specific immune in serum of *H. otakii*

免疫指标 Immune index	GSH-Px	SOD	MDA	T-AOC	CAT	GS	MDH	HK	AST	ALT	CHE	ADA
GSH-Px	1											
SOD	0.678	1										
MDA	0.775	0.101	1									
T-AOC	0.978*	0.881	0.987*	1								
CAT	0.636	0.416	0.473	0.636	1							
GS	0.994**	0.918	0.953*	0.849	0.116	1						
MDH	0.978*	0.016	0.211	0.808	0.229	0.728	1					
HK	0.920	0.317	0.725	0.887	0.677	0.284	0.360	1				
AST	0.924	0.272	0.069	0.678	0.932	0.373	0.408	0.430	1			
ALT	0.013	0.582	0.529	0.026	0.916	0.795	0.916	0.858	0.936	1		
CHE	0.361	0.355	0.887	0.476	0.590	0.530	0.489	0.071	0.813	0.598	1	
ADA	0.585	0.017	0.185	0.719	0.242	0.529	0.029	0.572	0.556	0.460	0.466	1

**相关性极显著($P<0.01$); *相关性显著($P<0.05$)

** means highly significant correlation ($P<0.01$); * means significant correlation ($P<0.05$)

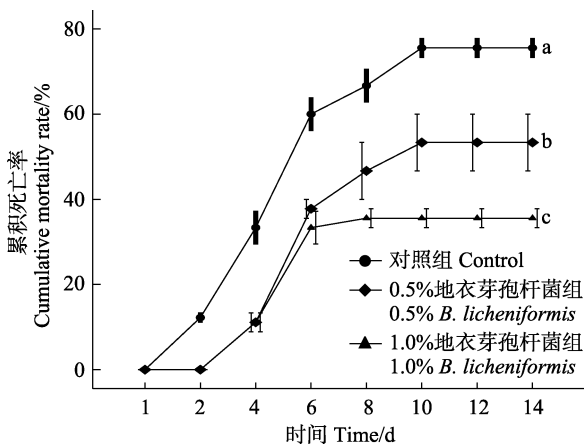


图5 杀鲑气单胞菌感染14d内大泷六线鱼累积死亡率

Fig.5 Cumulative mortality rate of *H. otakii* challenged with *A. salmonicida* in 14 days

3 讨论

益生菌是一类对养殖动物机体有益的活性微生物,可通过不同的作用机制为动物提供良好的营养和环境,提高养殖动物的生长和存活率,提高动物机体免疫力和抗病力等(韩卓然等,2016;何伟聪等,2015;叶海斌等,2018)。地衣芽孢杆菌是国家批准使用的一种益生菌添加剂。Abarike等(2018)研究含有地衣芽孢杆菌的商业益生菌制剂对罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的生长、免疫及抗病力的影响,不同剂量的益生菌制剂可提高鱼体重、SGR和饲料利用效率,提

高免疫酶活性和基因表达量,间接提高机体抵抗致病细菌乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)的能力。Gao 等(2018)研究表明, 10^5 CFU/ml 地衣芽孢杆菌的摄入可提高鲍鱼(*Haliotis discus hannai* Ino)的摄食性、生长能力和免疫功能,提高对副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的抵抗力。潘雷等(2012)研究也表明,地衣芽孢杆菌或含有地衣芽孢杆菌的复合益生菌均可降低大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)肠道弧菌数量,提高血清免疫酶活性。彭树锋等(2007)研究表明,向养殖水体中加入地衣芽孢杆菌可以有效改善养殖水环境,减少弧菌量,且提高石斑鱼(*Epinephelus* sp.)的摄食性和存活率。本研究也获得相似的结果,地衣芽孢杆菌可有效促进大泷六线鱼机体 SGR,可能原因是地衣芽孢杆菌在鱼体内繁殖代谢产生大量短链脂肪酸等营养物质,优化肠道菌群结构,提高消化酶活性,从而促进营养物质的降解、吸收、利用,最终发挥促生长的效果。有研究报道,外源营养物质对肠道消化酶活性可产生积极或消极的影响,消化酶活性变化与投喂饲料有直接的相关性(潘雷等, 2013; 陈飞等, 2016a)。而且,地衣芽孢杆菌在代谢过程中能够产生蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶等具有较强活性的酶类(Nazmi *et al*, 2008),间接促进鱼机体的健康和抗病力。本研究中,实验组消化酶活性与对照组相比均有提高,地衣芽孢杆菌的添加影响了鱼对蛋白质的消化吸收效率,从而提高胰蛋白酶活性;通过改变肠道内碳水化合物、脂类和糖类物质的含量,影响脂肪酶和淀粉酶活性的变化。因此,饲料中添加地衣芽孢杆菌能够适应大泷六线鱼机体的消化能力,从而提高鱼肠道消化功能。然而,消化酶活性与养殖动物种类差异、饲养环境及饲养方式等都存在相关性(刘颖等, 2009; 刘洋等, 2011; 陈飞等, 2016b),具体实验在进一步研究中。

在鱼类防御体系中抗氧化系统起到重要作用,其动态平衡是确保动物健康的重要因素之一。GSH-Px 参与血清过氧化物的分解,可将有害的过氧化物还原成羟基化合物(李国明等, 2019)。本研究中, 1.0%实验组鱼血清中 GSH-Px 活性较对照组降低,可能是由血清中该酶的作用底物谷胱甘肽的变化引起的,其具体原因有待进一步探究。然而,催化体内 H_2O_2 转化成无害的 H_2O 和 O_2 就由 CAT 完成,即 1.0%实验组呈现出较高的活性。SOD 可把有害的超氧自由基转化为 H_2O_2 , CAT 即会将其分解为完全无害的 H_2O , 二者的协同作用保护机体细胞免受氧自由基的损伤(Cavaletto *et al*, 2002)。本研究中, SOD 和 CAT 2 种酶活性的变化相似,均在实验第 40 天活性达最高,

SOD 活性升高导致 H_2O_2 浓度增加,而后,高活性的 CAT 便会及时将其清除,减少其对机体产生的伤害,增强机体的抗氧化能力,这与孙金辉等(2017)对鲤(*Cyprinus carpio*)幼鱼的研究结果一致。Kucukbay 等(2009)研究表明,当机体内氧自由基 ROS 过量且未及时清除时,将对细胞产生损伤并促进脂质的过氧化反应。脂质过氧化物 MDA 的浓度不仅可直接反映机体的脂质过氧化程度,而且可间接反映抗氧化能力的强弱,MDA 水平升高, SOD 活性降低,即可引发氧化应激反应,导致细胞损伤甚至死亡。本研究结果显示,MDA 含量随 SOD 活性的提高有所降低,且第 50 天又呈现升高,这可能是因为抗氧化系统酶 SOD 和 CAT 消除活性氧自由基的能力降低,刺激到脂质过氧化反应,导致鱼体内 MDA 含量增加,吴庆元等(2014)对鲮鱼(*Mugil cephalus*)幼鱼的研究也呈现类似结果。T-AOC 是反映血清中总抗氧化能力的重要指标,亦是评价益生菌应用效果的主要指标(Castex *et al*, 2009)。本研究发现, T-AOC 的活性在实验第 50 天达到最高,虽然达到最高活性的时间不同于 SOD 等其他酶,但发生趋势相似,然而,第 30 天活性下降,可能是由于环境差异或人为操作差异造成。这些结果均表明,地衣芽孢杆菌可有效提高大泷六线鱼机体的抗氧化防御能力,各种指标协同作用,进而提高鱼机体抗病力。

GSase 积极参与机体细胞氮原代谢以及谷氨酰胺合成,在养殖动物维持机体平衡中起到重要作用。孙武卫等(2012)研究 GSase 在对虾非特异性免疫方面的重要作用, Tok 等(2009)研究了低氧环境下 GSase 在调控机体平衡中的作用。本研究中,地衣芽孢杆菌的添加同样对大泷六线鱼血清 GSase 活性产生了增强作用,推测地衣芽孢杆菌在增殖过程中分泌较强的蛋白酶活性,促进鱼机体对蛋白质的代谢利用,从而提升 GSase 活性。HK 是参与糖代谢的关键酶之一,其活性大小与底物糖的种类和含量均有直接的关系(杨品贤等, 2019)。本研究中,地衣芽孢杆菌组 HK 活性比对照组明显提高,由于地衣芽孢杆菌在增殖代谢过程中促进营养物质的降解,增加分泌代谢物中底物糖的种类和含量,从而促进酶活性的提高。MDH 是参与脂肪代谢的重要标志酶之一(魏胜娟等, 2011),本研究中,地衣芽孢杆菌分泌的高消化酶活性使得鱼体对营养物质的吸收率提高,诱导增强脂肪合成力,促进脂肪代谢过程,提高了血清中 MDH 活性。

评价肝脏功能常用的血清转氨酶有 ALT 和 AST,是催化氨基酸与酮酸之间氨基转移的关键酶(王成强等, 2019)。当肝脏受到刺激损伤时,细胞中

的转氨酶便进入血液,血清中的酶活性会有不同程度的增加,因此推测,检测 ALT 和 AST 活性可揭示添加地衣芽孢杆菌是否对大泷六线鱼肝脏造成负担或损伤。ADA 是一种核酸代谢酶,与机体细胞免疫活性有重要关系,可作为反映外界刺激对肝损伤的敏感指标。CHE 是一种水解酶,作用于乙酰胆碱,其活性与肝损伤呈负相关,若外界刺激对肝脏造成负担或损伤,CHE 活性即会下降(Anderson *et al.*, 2000; 樊英等, 2019)。本研究中,AST 活性在实验过程中呈持续下降状态,说明饲料中地衣芽孢杆菌对鱼机体肝功能未造成负担或明显的损伤,而是起到一定的保护作用;ALT 活性变化与对照组相比时高时低,这可能表明开始给予地衣芽孢杆菌时对鱼机体的适应水平产生了压力,然而,在代谢过程中机体通过自我调节实现压力能量的转换,未发生明显的损伤,其具体调节机制还需后续进一步研究。CHE 和 ADA 活性在实验过程中逐渐升高,分别在第 30 天和第 40 天达到最高,随着时间的延长,酶活性在正常范围内发生浮动,但比对照组活性仍有所提升。故认为,本研究中地衣芽孢杆菌的添加对大泷六线鱼肝功能未造成明显的负影响,间接对机体非特异性免疫功能产生积极的作用。而且,适量的添加才会对养殖动物的肝脏起到保护作用,同时提高肝脏抵抗外界刺激的能力,过量或不正确的添加将会产生一定程度的损伤(何远法等, 2016; 王成强等, 2019),机理有待进一步探究。

在鱼类机体整个免疫防御体系中,血清抗氧化功能指标的变化与代谢功能、肝脏功能指标的变化之间存在着不可分割的联系,其中,血清转氨酶在氨基酸代谢和蛋白质、脂肪和糖三者相互转化的过程中起着重要作用,氧自由基含量直接影响着整个非特异性免疫及其代谢能力,三大营养物质在体内的吸收转化和机体器官的健康水平也存在着重要联系。鱼类消化酶活性的强弱也可影响着蛋白质、糖类和脂肪等物质的消化、吸收,进而影响鱼机体生长发育等生命活动,鱼体的健康水平又直接体现其抵抗病害的能力(刘波等, 2006; 刘淑兰等, 2017; 孙金辉等, 2017; 李国明等, 2019; 王成强等, 2019),这些联系和相关性在本研究中均得到了体现。攻毒感染方式是检验养殖动物抗病力和免疫功能的一种常用方法,杀鲑气单胞菌是冷水鱼细菌性疾病的代表性致病菌之一(刁菁等, 2018)。本研究中,地衣芽孢杆菌延长了实验鱼出现死亡的时间,14 d 累积死亡率比对照组降低了一倍多,可能因为地衣芽孢杆菌独特的生物夺氧机制抑制了致病菌的生长繁殖,调节肠道内微生态平衡,结合非特异性

免疫功能的增强,刺激体内免疫系统的发育,进而降低大泷六线鱼的累积死亡率。

参 考 文 献

- Abarike ED, Cai J, Lu YS, *et al.* Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 82: 229–238
- Anderson FH, Zeng LC, Rock NR, *et al.* An assessment of the clinical utility of serum ALT and AST in chronic hepatitis C. *Hepatology Research*, 2000, 18(1): 63–71
- Azarin H, Aramli MS, Imanpour MR, *et al.* Effect of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* and ferroin solution on growth performance, body composition and haematological parameters in kutum (*Rutilus frisii kutum*) fry. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2015, 7(1): 31–37
- Castex M, Lemaire P, Wabete N, *et al.* Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 2009, 294(3–4): 306–313
- Cavaletto M, Ghezzi A, Burlando B, *et al.* Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2002, 131(4): 447–455
- Chen F, Bao N, Si B, *et al.* Effects of pH values on main digestive enzyme activities on fat greenling (*Hexagrammos otakii*). *Feed Industry*, 2016b, 37(14): 16–21 [陈飞, 暴宁, 司滨, 等. pH 值对大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)主要消化酶活性的影响. *饲料工业*, 2016b, 37(14): 16–21]
- Chen F, Si B, Bao N, *et al.* Effects of dietary crude lipid levels on digestive enzyme activity in of fat greenling *Hexagrammos otakii*. *Chinese Journal of Fisheries*, 2016a, 29(5): 43–47 [陈飞, 司滨, 暴宁, 等. 饲料粗脂肪水平对大泷六线鱼 *Hexagrammos otakii* 消化酶活性的影响. *水产学杂志*, 2016a, 29(5): 43–47]
- Cheng QT. *Animal spirits in China (Marine fish)*. Beijing: Science Press, 1962, 135–137 [成庆泰. *中国经济动物志(海产鱼类)*. 北京: 科学出版社, 1962, 135–137]
- Diao J, Li L, Wang XL, *et al.* Isolation, identification and virulence factor detection of pathogenic *Aeromonas salmonicida* from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2018, 33(4): 25–33 [刁菁, 李乐, 王晓璐, 等. 虹鳟致病性杀鲑气单胞菌的分离鉴定及其毒力因子的检测. *大连海洋大学学报*, 2018, 33(4): 25–33]

- El-Haroun ER, Goda AS, Chowdhury MAK. Effect of dietary probiotic Biogen supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 2006, 37(14): 1473–1480
- Fan Y, Ye HB, Wang XL, *et al.* Effects of *Clostridium butyricum* and *Bacillus coagulans* on growth performance, hepatic function and intestinal microbiota in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(2): 198–203 [樊英, 叶海斌, 王晓璐, 等. 丁酸梭菌和凝结芽孢杆菌对虹鳟生长性能、肝功能及肠道菌群的影响. *大连海洋大学学报*, 2019, 34(2): 198–203]
- Gao XL, Zhang M, Li X, *et al.* Effects of a probiotic (*Bacillus licheniformis*) on the growth, immunity, and disease resistance of *Halotis discus hannai* Ino. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 76: 143–152
- Han ZR, Sun JF. Screening and application of probiotics in aquaculture. *Fisheries Science*, 2016, 35(1): 93–98 [韩卓然, 孙敬锋. 水产动物益生菌的筛选及应用. *水产科学*, 2016, 35(1): 93–98]
- He WC, Dong XH, Tan BP, *et al.* Effects of probiotics on growth performance, digestive enzyme and immune enzyme activities of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(12): 3821–3830 [何伟聪, 董晓慧, 谭北平, 等. 益生菌对军曹鱼幼鱼生长性能、消化酶和免疫酶活性的影响. *动物营养学报*, 2015, 27(12): 3821–3830]
- He YF, Yu HH, Chi SY, *et al.* Effects of yeast culture on growth performance, nonspecific immunity and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(12): 4063–4072 [何远法, 郁欢欢, 迟淑艳, 等. 酵母培养物对凡纳滨对虾生长性能、非特异性免疫力和抗病力的影响. *动物营养学报*, 2016, 28(12): 4063–4072]
- Huang L, Ran C, He SX, *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*). *Aquaculture*, 2015, 438: 33–38
- Kucukbay FZ, Yazlak H, Karaca L, *et al.* The effects of dietary organic or inorganic selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under crowding conditions. *Aquaculture Nutrition*, 2009, 15(6): 569–576
- Li GM, Sun YP, Wang GX, *et al.* Effects of dietary glutathione on growth performance, serum biochemical indices and antioxidant capacity of juvenile *Lateolabrax japonicus*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(7): 3207–3217 [李国明, 孙育平, 王国霞, 等. 饲料中添加谷胱甘肽对花鲈幼鱼生长性能、血清生化指标和抗氧化能力的影响. *动物营养学报*, 2019, 31(7): 3207–3217]
- Li L, Wang X, Jian YX, *et al.* Correlation and path analysis between morphological traits and body mass of *Hexagrammos otakii* at different months of age. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(1): 61–69 [李莉, 王雪, 菅玉霞, 等. 不同月龄大泷六线鱼形态性状与体质量的相关性及通径分析. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(1): 61–69]
- Liu B, Xie J, Liu WB, *et al.* Effects of *Bacillus licheniformis* and xylooligosaccharides on digestive enzyme activities, growth and microflora in intestine in allogenyetic crucian carp. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2006, 21(4): 336–340 [刘波, 谢骏, 刘文斌, 等. 地衣芽孢杆菌与低聚木糖对异育银鲫消化酶活性、肠道菌群及生长的影响. *大连水产学院学报*, 2006, 21(4): 336–340]
- Liu SL, Chen J, Li J, *et al.* Effects of complex-probiotic-preparation on the growth, digestive enzymes and the nonspecific immune indices of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Progress In Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 100–106 [刘淑兰, 陈娟, 李杰, 等. 复合益生菌制剂对大西洋鲑 (*Salmo salar*) 生长、消化酶和非特异性免疫指标的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 100–106]
- Liu Y, Mou ZB, Xu GF, *et al.* Effects of water temperature on activities of digestive enzymes in juvenile lenok *Brachymystax lenok*. *Chinese Journal of Fisheries*, 2011, 24(3): 6–9 [刘洋, 牟振波, 徐革锋, 等. 水温对细鳞鱼幼鱼消化酶活性的影响. *水产学杂志*, 2011, 24(3): 6–9]
- Liu Y, Wan JL. Effect of temperature on the activity of digestive enzyme in fat greenling (*Hexagrammos otakii*). *Modern Fisheries Information*, 2009, 24(10): 5–8 [刘颖, 万军利. 温度对大泷六线鱼 (*Hexagrammos otakii*) 消化酶活力的影响. *现代渔业信息*, 2009, 24(10): 5–8]
- Madani NSH, Adorian TJ, Farsani HG, *et al.* The effects of dietary probiotic Bacilli (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and immune parameters of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post larvae. *Aquaculture Research*, 2018, 49: 1926–1933
- Nazmi AR, Reinisch T, Hinz HJ. Calorimetric studies on renaturation by CaCl₂ addition of metal-free α -amylase from *Bacillus licheniformis* (BLA). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2008, 91(1): 141–149
- Pan L, Fang H, Zhang SC, *et al.* The variation of digestive enzymes in larval and juvenile *Hexagrammos otakii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 54–60 [潘雷, 房慧, 张少春, 等. 大泷六线鱼仔、稚、幼鱼期消化酶活力的变化. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 54–60]
- Pan L, Guo W, Gao FX, *et al.* Effects of dietary probiotic on intestinal bacteria and immunity of juvenile *Scophthalmus musmaximus*. *Marine Sciences*, 2012, 36(2): 34–39 [潘雷,

- 郭文, 高凤祥, 等. 饵料中添加益生菌对大菱鲆幼鱼肠道菌群及部分免疫指标的影响. 海洋科学, 2012, 36(2): 34–39]
- Peng SF, Wang YX, Ye FL, *et al.* Studies on the application of microbial feed additives (7) application of several beneficial microorganisms in healthy culture of *Epinephelus obliquus*. Feed and Husbandry: New Feed, 2007(4): 53–54 [彭树锋, 王云新, 叶富良, 等. 微生物饲料添加剂应用研究(七)-几种有益微生物在斜带石斑鱼健康养殖中的应用. 饲料与畜牧: 新饲料, 2007(4): 53–54]
- Sun JH, Fan Z, Zhang MJ, *et al.* Effect of dietary protein level on hepatic function and antioxidant capacity of juvenile common carps (*Cyprinus carpio*). South China Fisheries Science, 2017, 13(3): 113–119 [孙金辉, 范泽, 张美静, 等. 饲料蛋白水平对鲤幼鱼肝功能和抗氧化能力的影响. 南方水产科学, 2017, 13(3): 113–119]
- Sun WW. Construction of a SSH cDNA library, cDNA cloning and expression of glutamine synthetase in hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei*, boone induced by hypo-osmotic stress. Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2012 [孙武卫. 低盐胁迫下凡纳滨对虾消减 cDNA 文库构建及谷氨酰胺合成酶 cDNA 克隆和表达. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Tok CY, Chew TF, Peh WY, *et al.* Glutamine accumulation and up-regulation of glutamine synthetase activity in the swamp eel, *Monopterus albus* (Zuiew), exposed to brackish water. Journal of Experimental Biology, 2009, 212(9): 1248–1258
- Wang CQ, Li BS, Wang JY, *et al.* Effects of dietary *Bacillus subtilis* and yeast culture on growth, serum biochemical indices and antioxidant capacity of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*E. lanceolatus* ♂). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 47–56 [王成强, 李宝山, 王际英, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌和酵母培养物对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、血清生化指标及抗氧化能力的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 47–56]
- Wei SJ, Zan LS, Wang HB. Advances in the research of animal fatty acid transport protein 1. China Cattle Science, 2011, 37(4): 47–51 [魏胜娟, 咎林森, 王洪宝. 动物脂肪酸转运蛋白 1 的研究进展. 中国牛业科学, 2011, 37(4): 47–51]
- Wu QY, Jiang M, Li L, *et al.* Effects of chronic stress of lower salinity on activity of Na⁺-K⁺-ATPase and content of MDA in branchial filament, muscle, intestine of juvenile mullet (*Mugil cephalus*). Journal of Ecology and Rural Environment, 2014, 30(4): 481–487 [吴庆元, 蒋玫, 李磊, 等. 低盐度胁迫对鲮鱼(*Mugil cephalus*)幼鱼鳃丝、肌肉、肠 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性和 MDA 含量的影响. 生态与农村环境学报, 2014, 30(4): 481–487]
- Yang PX, Guo R, Li XH, *et al.* Effects of three kinds of carbohydrate sources on nutrient metabolism in *Litopenaeus vannamei* postlarvae during starvation and compensatory growth. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(4): 1138–1145 [杨品贤, 郭冉, 李雪鹤, 等. 三种糖源对凡纳滨对虾仔虾期饥饿和补偿生长后营养物质代谢的研究. 水产学报, 2019, 43(4): 1138–1145]
- Ye HB, Fan Y, Yan F, *et al.* Effects of dietary probiotics on serum biochemistry and immunity of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of South China Normal University (Natural Science), 2018, 50(3): 65–71 [叶海斌, 樊英, 严芳, 等. 益生菌制剂对虹鳟血清生化指标和免疫功能的影响. 华南师范大学学报(自然科学版), 2018, 50(3): 65–71]

(编辑 陈 辉)

Effect of *Bacillus licheniformis* on Growth, Intestinal Digestive Enzyme Activity, Non-Specific Immunity, and Resistance Against *Aeromonas salraonicida* in the Fat Greenling (*Hexagrammos otakii*)

FAN Ying, WANG Xiaolu, YU Xiaoqing, LIU Hongjun, YE Haibin,
WANG Shuxian, DIAO Jing^①, HU Fawen, JIAN Yuxia

(Marine Biology Institute of Shandong Province, Shandong Key Laboratory of Disease Control in Mariculture, Qingdao 266104)

Abstract The present study aimed to assess the effect of *Bacillus licheniformis* on the growth, intestinal digestive enzymes activity, non-specific immunity and resistance against *Aeromonas salraonicida* in the fat greenling (*Hexagrammos otakii*). A total of 270 *H. otakii* with an average initial body weight of (22.0±2.0) g/tail were randomly allocated to three groups (the control group and two experimental groups with different *B. licheniformis* levels) with three parallels per group and 30 fish per parallel. Fish in the control group were fed a basal diet consisting of albumen, and the ones in the two experimental groups were fed basal diets supplemented with 5×10^7 (0.5%) or 1×10^8 CFU/g (1.0%) *B. licheniformis*, respectively. After 50 days, fish were infected with *A. salraonicida*, and the cumulative mortality rate was determined within 14 days. The specific growth rate was found to be significantly higher in fish fed diets containing *B. licheniformis* when compared with the control group ($P < 0.05$). Furthermore, the activities of SOD, CAT, and T-AOC in the serum of *H. otakii* in the experimental groups were significantly increased compared with the control group ($P < 0.05$). Conversely, the MDA levels in the experimental groups were decreased compared with the control group ($P < 0.05$). The GSH-Px activity in the 1.0% *B. licheniformis* group was lower than that in the control group, but the activity in the 0.5% *B. licheniformis* group was higher than that in the control group. The activities of GS, MDH, and HK in the serum of fish in the experimental groups were increased compared with the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, AST and ALT activities in the serum of fish in the experimental groups were decreased ($P < 0.05$) and CHE and ADA activities were higher than those in the control group ($P < 0.05$). The activities of trypsin, amylase and lipase in the intestines of fish in the experimental groups were increased to different degrees, with the highest activity observed in the 1.0% *B. licheniformis* group ($P < 0.05$). The bacterial challenge test revealed that the 14 day cumulative mortality rate in the 1.0% *B. licheniformis* group was only 35.55% ($P < 0.05$). The results obtained in the present study revealed that *B. licheniformis* can increase growth, activities of intestinal digestive enzymes, and non-specific immunity, as well as enhance resistance against *A. salraonicida* in *H. otakii*.

Key words *Bacillus licheniformis*; *Hexagrammos otakii*; Non-specific immunity; Resistance

① Corresponding author: DIAO Jing, E-mail: doro530@sina.com