

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180529001

http://www.yykxjz.cn/

王成强, 李宝山, 王际英, 黄炳山, 孙永智, 郝甜甜, 马长兴, 周莹. 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

Wang CQ, Li BS, Wang JY, Huang BS, Sun YZ, Hao TT, Ma CX, Zhou Y. 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

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*

王成强¹ 李宝山^{1①} 王际英¹ 黄炳山¹
孙永智¹ 郝甜甜¹ 马长兴² 周莹²

(1. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306)

摘要 为探究饲料中添加枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和酵母培养物对珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂)幼鱼生长、血清生化指标、抗氧化能力和抗病力的影响,采用2×3双因子实验设计,在基础饲料中添加0(B0)、0.5%(B1)和1.0%(B2)的枯草芽孢杆菌制剂,同时每个枯草芽孢杆菌水平添加0(Y0)、0.5%(Y1)和1.0%(Y2)的酵母培养物,制作9组等氮、等脂的实验饲料,饲喂初始体重为(23.41±0.47)g珍珠龙胆石斑鱼幼鱼56d。结果显示,1)枯草芽孢杆菌和酵母培养物的交互作用对幼鱼存活率(SR)和增重率(WGR)均无显著影响($P>0.05$),幼鱼WGR在Y1B1和Y2B2组处于较高水平,显著高于对照组和Y2B2组($P<0.05$)。2)枯草芽孢杆菌和酵母培养物的交互作用对血清谷草转氨酶(AST)和碱性磷酸酶(AKP)影响显著($P<0.05$),血清ALT和AKP活力在Y1B1和Y1B2组处于较低水平,且显著低于对照组和Y2B2组($P<0.05$)。3)枯草芽孢杆菌和酵母培养物的交互作用对肠道超氧化物歧化酶(SOD)活力和丙二醛(MDA)含量影响显著($P<0.05$)。肠道SOD、过氧化氢酶(CAT)活力和总抗氧化能力(T-AOC)在Y1B1和Y1B2组处于较高水平,显著高于对照组和Y2B2组($P<0.05$),而MDA含量同SOD活力呈相反的变化趋势($P<0.05$)。4)枯草芽孢杆菌和酵母培养物的交互作用对鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)攻毒后幼鱼累积存活率无显著影响($P>0.05$)。鳃弧菌攻毒后幼鱼累积存活率在Y1B1组最高,显著高于对照组($P<0.05$)。

关键词 珍珠龙胆石斑鱼; 枯草芽孢杆菌; 酵母培养物; 生长; 抗氧化能力; 抗病力

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0047-10

* 烟台市科技计划项目(2016ZH068)、山东省重点研发计划(2016GSF115005)和山东省自然科学基金(ZR2015CQ023)共同资助[This work was supported by Science and Technology Development Plan of Yantai (2016ZH068), Key Research and Development Project of Shandong Province (2016GSF115005), and Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2015CQ023)]. 王成强, E-mail: chengqiangwang@126.com

① 通讯作者: 李宝山, E-mail: bsleeyt@126.com

收稿日期: 2018-05-29, 收修改稿日期: 2018-06-21

长期以来,人们多用抗生素来控制 and 预防水产疾病的发生,但由于抗生素类药物易残留,污染环境,破坏生态平衡,并能够通过食物链影响人类健康。同时,随着无抗养殖目标的提出,抗生素的使用已被严重限制。益生菌由于具有促进生长、提高饲料利用率、抵御病原体和改善水质等自身优势,且安全性好,已经被广泛应用于水产养殖中(Nayak, 2010)。其中,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)被公认为是一种具有优良作用的益生菌,能够在动物肠道内繁殖,分泌蛋白酶、淀粉酶等多种酶类,并且性能稳定,在金头鲷(*Sparus aurata* L.) (Cerezuela *et al*, 2013)、卡特拉鱼(*Catla catla*) (Sangma *et al*, 2015)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) (Liu *et al*, 2010)等水产动物的研究中均表明,其能够促进机体生长,增强免疫能力。

酵母培养物(Yeast culture)主要含有酵母细胞本身和细胞外代谢物,特别是其代谢物,能为消化道微生物提供丰富的营养,如:肽、有机酸、寡糖(β -葡聚糖及甘露寡糖)、氨基酸等(郁欢欢等, 2015),成为当前水产饲料中使用较为广泛的添加剂。在团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) (李高锋, 2009)、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*) (徐磊等, 2010)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) (粟雄高等, 2012)等水产动物的实验中均表明,酵母培养物不仅能促进生长和胃肠道的消化与吸收,还能够增强机体的抗氧化能力,提高抗病力。

近年来,随着珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂)养殖规模的不断扩大,弧菌感染等病害问题成为影响石斑鱼养殖业发展的主要问题。同时研究证实,水产动物原籍菌适应宿主内环境能力强,更易于在动物体内增殖和定植,作为微生态制剂效果更为显著(杨红玲等, 2012)。鉴于此,本研究拟从健康珍珠龙胆石斑鱼肠道中分离出能较好适应鱼体肠道环境、产酶能力强、可供饲用的芽孢杆菌菌株,并进行保种发酵,探讨饲料中添加原籍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、肠道抗氧化能力及抗弧菌感染能力的影响,以期对珍珠龙胆石斑鱼生物饲料的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 芽孢杆菌制剂的制备和饲料制作

实验从健康珍珠龙胆石斑鱼肠道细菌中分离和培养枯草芽孢杆菌菌种,进行发酵生产,制成枯草芽孢杆菌制剂,作为饲料添加剂。实验方法参考贺国龙等(2017)的方法,并稍作修改,步骤如下:无菌条件

下,取珍珠龙胆石斑鱼肠道,置于离心管中,将其剪碎匀浆,制成原液,将原液置于 70℃ 恒温水浴锅中水浴 30 min,之后将高温处理后的原液按照 1:10 稀释后,涂布于琼脂培养皿上,然后 37℃ 培养 24 h。之后挑选琼脂培养皿上单个灰白色、菌落边缘不规则、不整齐、表面粗糙而干燥的菌落进行纯化培养,并制作成斜面后做进一步鉴定。将斜面保存的菌种进行 16S rDNA 菌种鉴定,同时参考东秀珠等(2001)的方法进行生理生化鉴定,采用平板透明圈法,进行菌株产酶能力分析,筛选出产酶能力强的枯草芽孢杆菌菌株,最后将筛选的枯草芽孢杆菌菌株经发酵、干燥、混合,制成干菌粉(活菌数 2.0×10^9 CFU/g),玉米淀粉作为载体。

以鱼粉、酪蛋白和发酵豆粕为主要蛋白质源,鱼油和大豆卵磷脂为主要脂肪源,配制粗蛋白质含量 52%,粗脂肪含量 11% 的基础饲料。采用 2×3 双因子实验设计,分别在基础饲料中添加 0 (B0)、0.5% (B1) 和 1.0% (B2) 的枯草芽孢杆菌制剂,同时每个枯草芽孢杆菌水平添加 0 (Y0)、0.5% (Y1) 和 1.0% (Y2) 的酵母培养物(徐州赛博生物科技有限公司提供),共制成 9 组等氮、等脂的实验饲料,分别记为: Y0B0 (0)、Y0B1 (4.15×10^6 CFU/g)、Y0B2 (8.04×10^6 CFU/g)、Y1B0 (0)、Y1B1 (4.03×10^6 CFU/g)、Y1B2 (7.95×10^6 CFU/g)、Y2B0 (0)、Y2B1 (3.89×10^6 CFU/g) 和 Y2B2 (8.24×10^6 CFU/g), Y0B0 组为对照组,饲料配方及营养成分见表 1。制作饲料时,先将所有原料粉碎后过 80 目标准筛,按配比称重后混匀,加入鱼油与干粉充分混匀之后,加入适量的蒸馏水混合均匀,最后用小型颗粒饲料挤压机制成 2 种型号(直径分别为 2.5 mm 和 3.5 mm)的饲料颗粒,60℃ 烘干,饲料袋包装后,置于通风干燥处储存备用。

1.2 实验用鱼及实验管理

养殖实验在山东省海洋资源与环境研究院东营实验基地循环水养殖系统中进行,实验用鱼为该基地当年繁育的同一批珍珠龙胆石斑鱼幼鱼,实验周期为 56 d。养殖实验开始之前,先用对照组饲料暂养 15 d,使其充分适应养殖环境。正式实验前,将实验鱼饥饿 24 h,挑选大小均匀、体色健康的珍珠龙胆石斑鱼幼鱼[平均体重为 (23.41 ± 0.47) g],随机放养于 18 个养殖桶(70 cm×80 cm)中,每个桶内放 30 尾幼鱼,每个实验组 3 个重复。养殖期间,每天在 08:30 和 16:30 饱食投喂 2 次,投喂 30 min 后吸出残饵,并记录残饵数量。水温控制在 (28 ± 1) ℃,溶氧 > 6.3 mg/L,盐度为 23.5~26.5, pH 为 7.5~8.0,氨氮和亚硝酸氮含量均 < 0.1 mg/L。

表 1 实验饲料配方及营养成分(干物质, %)
Tab.1 Formulation and proximate composition of experimental diets (Dry matter, %)

原料 Ingredients	组别 Groups								
	Y0B0	Y0B1	Y0B2	Y1B0	Y1B1	Y1B2	Y2B0	Y2B1	Y2B2
鱼粉 Fish meal	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
发酵豆粕 Fermented soybean meal	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00
酪蛋白 Casein	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
维生素预混料 Vitamin premix ¹	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
矿物质预混料 Mineral premix ²	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
大豆卵磷脂 Soy lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
鱼油 Fish oil	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
其他成分 Other composition	37.00	36.50	36.00	36.50	36.00	35.50	36.00	35.50	35.00
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	0.00	0.50	1.00	0.00	0.50	1.00	0.00	0.50	1.00
酵母培养物 Yeast culture	0.00	0.00	0.00	0.50	0.50	0.50	1.00	1.00	1.00
总计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
成分分析 Proximate analysis									
粗蛋白 Crude protein	52.03	52.15	52.57	52.23	52.52	52.73	52.48	52.81	52.95
粗脂肪 Crude lipid	11.38	11.45	11.56	11.47	11.74	11.88	11.60	11.72	11.86
粗灰分 Crude ash	9.02	9.30	9.45	9.16	9.34	9.18	9.12	9.45	9.61

注: 1. 维生素混合料(mg/kg or IU/kg 饲料): 维生素 A, 7500.0 IU; 维生素 D, 1500.0 IU; 维生素 E, 60.0 mg; 维生素 K₃, 18.0 mg; 维生素 B₁, 12.0 mg; 维生素 B₂, 12.0 mg; 维生素 B₁₂, 0.1 mg; 泛酸, 48.0 mg; 烟酰胺: 90.0 mg; 叶酸, 3.7 mg; D-生物素: 0.2 mg; 肌醇, 60.0 mg; 维生素 C, 310.0 mg

2. 矿物质混合料(mg/kg 饲料): 锌, 35.0 mg; 锰, 21.0 mg; 铜, 8.3 mg; 铁, 23.0 mg; 钴, 1.2 mg; 碘, 1.0 mg; 硒, 0.3 mg

Note: 1. Vitamin premix (mg/kg or IU/kg diet): vitamin A 7500.0 IU, vitamin D 1500.0 IU, vitamin E 60.0 mg, vitamin K₃ 18.0 mg, vitamin B₁ 12.0 mg, vitamin B₂ 12.0 mg, vitamin B₁₂ 0.1 mg, pantothenate acid 48.0 mg, nicotinamide 90 mg, folic acid 3.7 mg, D-biotin 0.2 mg, inositolum 60.0 mg, vitamin C 310.0 mg

2. Mineral premix (mg/kg diet): Zn 35.0 mg, Mn 21.0 mg, Cu 8.3 mg, Fe 23.0 mg, Co 1.2 mg, I 1.0 mg, Se 0.3 mg

1.3 样品收集

养殖实验结束后, 将实验鱼饥饿 24 h, 从每个养殖桶内随机取 5 尾鱼进行解剖, 分离出肠道组织, 放入离心管中后迅速转移到液氮中速冻。之后再从每个养殖桶中随机取 5 尾鱼, 用无菌注射器, 采用尾部静脉取血法进行取血, 取出血液 4℃ 静置 4 h, 3000 r/min 离心 10 min, 小心将血清吸出后, 之后迅速放入液氮中。样品运回实验室后, 转移到-80℃超低温冰箱中保存, 用于后期实验分析。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 生长指标

存活率(Survival rate, SR, %)=100×终末尾数/初始尾数;

增重率(Weight gain rate, WGR, %)=100×(终末体

重-初始体重)/初始体重

1.4.2 血清生化指标 血清中的生化指标均采用日立自动生化分析仪(7020 型, Hitachi, 日本)测定, 测定指标主要包括: 谷丙转氨酶(Cereal third transaminase, ALT)、谷草转氨酶(Aspartate transaminase, AST)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)、白蛋白(Albumin, ALB)。

1.4.3 肠道抗氧化指标 肠道超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)以及总抗氧化能力(Total antioxidant capacity, T-AOC)均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定, 酶活定义及具体测定步骤参照试剂盒说明。

1.4.4 人工攻毒实验 用本实验室保存并经过鉴定的鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)菌株进行攻毒实验。

预实验确定半致死浓度,参照马爱军等(2014)方法略有修改。实验结束后,从每个养殖桶中取8尾鱼进行攻毒试验,腹腔注射半致死浓度(5×10^8 CFU/ml)菌液,按照50 g体重腹腔注射50 μ l生理盐水悬浮的鳗弧菌菌液,分别记录注射后1、24、48、72和96 h的死亡情况,并及时捞出死鱼,计算累积存活率。

1.5 数据统计分析

采用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),用平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)来表示所得实验数据,另外用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 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼生长的影响

由表2可知,幼鱼SR介于91.11%~98.89%,不同实验组间无显著差异($P > 0.05$),枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼存活率的影响没表现出显著的交互作用($P > 0.05$)。在每个酵母培养物添加水平,饲料中添加枯草芽孢杆菌后,幼鱼WGR显著高于未添加组($P < 0.05$),且在添加组间无显著差异($P > 0.05$)。在每个枯草芽孢杆菌添加水平,随着饲料中酵母培养物添加量的增加,幼鱼WGR先升高后降低,在0.5%添加组幼鱼的WGR最高,显著高于未添加组和1.0%

添加组($P < 0.05$)。实验结果显示,幼鱼WGR在Y1B1和Y2B2组处于较高水平,显著高于对照组和Y2B2组($P < 0.05$),而枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼WGR没有表现出显著的交互作用($P > 0.05$)。

2.2 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼血清生化指标的影响

由表3可知,在每个酵母培养物添加水平,随着饲料中枯草芽孢杆菌添加量的增加,幼鱼血清ALT活力先降低后升高($P < 0.05$),且在添加组间无显著性差异($P > 0.05$)。在每个枯草芽孢杆菌水平,饲料中添加酵母培养物,幼鱼血清ALT活力也呈先降低后升高趋势,但是仅在枯草芽孢杆菌为1.0%水平时,不同实验组血清ALT活力有显著性差异($P < 0.05$)。枯草芽孢杆菌和酵母培养物对血清中ALT活力没有表现出显著的交互作用($P > 0.05$)。血清ALT活力在Y1B1实验组达到最低值,显著低于对照组和Y2B2组($P < 0.05$)。幼鱼血清AST活力呈现同ALT相似的变化趋势,但枯草芽孢杆菌和酵母培养物对血清中AST活力的影响表现出显著的交互作用($P < 0.05$)。

枯草芽孢杆菌和酵母培养物对血清AKP活力的影响没表现出显著的交互作用($P > 0.05$),血清AKP活力在Y1B1实验组达到最低值,显著低于对照组和Y2B2组($P < 0.05$)。同时,实验结果显示,幼鱼血清ALB含量在不同实验组均无显著性差异($P > 0.05$)。

表2 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼生长指标的影响
Tab.2 Effects of dietary *B. subtilis* and yeast culture on the growth indices of juveniles

项目 Items	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)	酵母培养物 Yeast culture (%)	初始体重 IBW(g)	终末体重 FBW(g)	存活率 SR(%)	增重率 WGR(%)
Y0B0	0.0	0.0	23.42 \pm 0.09	77.85 \pm 0.49 ^c	94.44 \pm 2.94	232.38 \pm 1.35 ^c
Y0B1	0.5	0.0	23.38 \pm 0.14	80.60 \pm 0.24 ^{cd}	93.33 \pm 3.85	244.77 \pm 1.40 ^c
Y0B2	1.0	0.0	23.38 \pm 0.03	79.48 \pm 0.55 ^{cde}	98.89 \pm 1.11	239.97 \pm 2.56 ^{cde}
Y1B0	0.0	0.5	23.46 \pm 0.03	80.00 \pm 0.50 ^{cd}	92.22 \pm 1.11	241.07 \pm 1.83 ^{cd}
Y1B1	0.5	0.5	23.41 \pm 0.09	83.15 \pm 0.06 ^a	95.55 \pm 2.22	255.18 \pm 1.44 ^a
Y1B2	1.0	0.5	23.43 \pm 0.05	83.08 \pm 0.45 ^{ab}	95.55 \pm 2.22	254.54 \pm 2.13 ^{ab}
Y2B0	0.0	1.0	23.46 \pm 0.09	78.58 \pm 0.63 ^{de}	91.11 \pm 2.22	234.99 \pm 1.44 ^{de}
Y2B1	0.5	1.0	23.38 \pm 0.08	81.07 \pm 0.20 ^{bc}	94.45 \pm 2.22	246.76 \pm 0.60 ^{bc}
Y2B2	1.0	1.0	23.40 \pm 0.07	79.87 \pm 0.21 ^{cde}	94.45 \pm 2.22	241.30 \pm 0.11 ^{cd}

方差分析(P值) ANOVA (P-value)

枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)	0.189	0.000
酵母培养 Yeast culture (%)	0.530	0.000
交互作用 Interaction	0.727	0.242

注:表中同列肩标相同小写字母或无字母表示差异不显著($P > 0.05$),不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),下表同
Note: In the same row, values with same small letter superscripts or no letter superscripts mean no significant differences ($P > 0.05$), different small letter superscripts mean significant differences ($P < 0.05$), the same as the following

表 3 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼血清生化指标的影响
Tab.3 Effects of dietary *B. subtilis* and yeast culture on the serum biochemical indices of juveniles

项目 Items	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)	酵母培养物 Yeast culture (%)	谷丙转氨酶 ALT (U/L)	谷草转氨酶 AST (U/L)	白蛋白 ALB (g/L)	碱性磷酸酶 AKP (U/L)
Y0B0	0.0	0.0	234.50±1.86 ^a	46.44±0.65 ^a	7.55±0.03	108.11±1.67 ^a
Y0B1	0.5	0.0	219.12±0.92 ^{cd}	42.42±0.53 ^{cd}	7.47±0.09	93.55±0.39 ^{cde}
Y0B2	1.0	0.0	223.90±2.72 ^{bcd}	42.59±0.41 ^{bcd}	7.63±0.15	95.37±0.74 ^{bcd}
Y1B0	0.0	0.5	227.47±2.22 ^{abc}	45.09±0.39 ^{ab}	7.57±0.12	99.71±0.88 ^b
Y1B1	0.5	0.5	214.80±2.47 ^d	38.82±0.75 ^e	7.57±0.15	87.85±1.14 ^f
Y1B2	1.0	0.5	216.00±2.08 ^d	39.34±0.49 ^e	7.57±0.09	90.31±0.72 ^{ef}
Y2B0	0.0	1.0	232.20±1.60 ^{ab}	46.62±0.65 ^a	7.57±0.12	104.43±1.15 ^a
Y2B1	0.5	1.0	218.37±1.56 ^{cd}	40.98±0.47 ^{de}	7.43±0.18	91.88±0.60 ^{def}
Y2B2	1.0	1.0	226.71±2.34 ^{abc}	44.20±0.32 ^{abc}	7.53±0.09	97.10±0.44 ^{bc}

方差分析(P 值) ANOVA (P-value)

枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)	0.000	0.000	0.626	0.000
酵母培养物 Yeast culture (%)	0.001	0.000	0.840	0.000
交互作用 Interaction	0.434	0.017	0.947	0.090

2.3 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼肠道抗氧化能力的影响

表4显示, 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对肠道SOD活力的影响, 表现出显著交互作用($P < 0.05$)。在每个酵母培养物水平, 饲料中添加枯草芽孢杆菌提高了幼鱼肠道SOD活力, 在0.5%枯草芽孢杆菌实验组肠道SOD活力最高, 显著高于未添加组($P < 0.05$)。当枯

草芽孢杆菌添加水平为0.5%和1.0%时, 饲料中添加0.5%酵母培养物能够显著提高肠道SOD活力($P < 0.05$)。肠道SOD活力在Y1B1组达到最高值, 显著高于对照组和Y2B2组($P < 0.05$)。饲料中添加枯草芽孢杆菌和酵母培养物, 对幼鱼肠道CAT和T-AOC影响同SOD具有相似的变化趋势($P < 0.05$), 而枯草芽孢杆菌和酵母培养物对肠道CAT活力和T-AOC的影响无显著交互作用($P > 0.05$)。

表 4 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼肠道抗氧化能力的影响
Tab.4 Effects of dietary *B. subtilis* and yeast culture on the antioxidant capacity in intestine of juveniles

项目 Items	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)	酵母培养物 Yeast culture (%)	超氧化物歧化酶 SOD (U/mg prot)	总抗氧化能力 T-AOC (U/mg prot)	过氧化氢酶 CAT (U/mg prot)	丙二醛 MDA (nmol/mg prot)
Y0B0	0.0	0.0	51.95±0.89 ^e	0.43±0.01 ^c	12.31±0.48 ^d	6.21±0.09 ^a
Y0B1	0.5	0.0	57.10±0.98 ^{bcd}	0.46±0.01 ^{bc}	14.34±0.63 ^{bcd}	6.12±0.15 ^a
Y0B2	1.0	0.0	53.40±0.44 ^{de}	0.43±0.02 ^c	12.71±0.59 ^d	6.05±0.05 ^a
Y1B0	0.0	0.5	52.58±1.25 ^e	0.45±0.02 ^{bc}	13.92±0.40 ^{cd}	6.18±0.12 ^a
Y1B1	0.5	0.5	61.85±0.95 ^a	0.52±0.01 ^a	17.41±0.46 ^a	4.63±0.09 ^b
Y1B2	1.0	0.5	60.91±1.03 ^{ab}	0.51±0.01 ^{ab}	16.39±0.48 ^{abc}	4.50±0.04 ^b
Y2B0	0.0	1.0	53.39±0.79 ^{de}	0.42±0.01 ^c	12.58±0.65 ^d	6.23±0.18 ^a
Y2B1	0.5	1.0	59.94±0.49 ^{abc}	0.47±0.01 ^{ab}	17.09±0.86 ^{ab}	4.89±0.01 ^b
Y2B2	1.0	1.0	55.57±0.89 ^{cde}	0.44±0.01 ^c	14.05±0.35 ^{cd}	6.47±0.13 ^a

方差分析(P 值) ANOVA (P-value)

枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)	0.000	0.000	0.000	0.000
酵母培养物 Yeast culture (%)	0.000	0.000	0.000	0.000
交互作用 Interaction	0.010	0.292	0.148	0.000

当酵母培养物水平为 0.5%时, 饲料中添加枯草芽孢杆菌显著降低了肠道 MDA 含量($P<0.05$); 而当酵母培养物水平为 1.0%时, 0.5%枯草芽孢杆菌添加组幼鱼肠道 MDA 含量显著低于未添加组和 1.0%水平组($P<0.05$), 未添加组和 1.0%水平组无显著性差异($P<0.05$)。肠道 MDA 含量在 Y1B2 组达到最低值。枯草芽孢杆菌和酵母培养物对肠道 MDA 含量的影响表现出显著交互作用($P<0.05$)。

2.4 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对鳃弧菌攻毒后幼鱼累积存活率的影响

表 5 显示, 在每个酵母培养物水平, 饲料中添加枯草芽孢杆菌提高了鳃弧菌攻毒后幼鱼的存活率, 在枯草芽孢杆菌水平为 0.5%时, 累积存活率显著高于未添加组($P<0.05$)。在每个枯草芽孢杆菌水平, 饲料中添加酵母培养物的幼鱼累积存活率有一定增加, 但各处理组间无显著性影响($P>0.05$)。鳃弧菌攻毒后珍珠龙胆石斑鱼幼鱼累积存活率在 Y1B1 组最高, 显著高于对照组($P<0.05$)。枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼累积存活率的影响没有显著的交互作用($P>0.05$)。

表5 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对鳃弧菌攻毒后幼鱼累积存活率的影响

Tab.5 Effects of dietary *B. subtilis* and yeast culture on the cumulative survival rate of juveniles challenged with *V. anguillarum*

项目 Items	枯草芽孢 杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)	酵母培养物 Yeast culture (%)	累积存活率 Cumulative survival rate (%)
Y0B0	0.0	0.0	10.00±5.77 ^c
Y0B1	0.5	0.0	36.67±3.33 ^{ab}
Y0B2	1.0	0.0	23.33±3.33 ^{bc}
Y1B0	0.0	0.5	16.67±3.33 ^c
Y1B1	0.5	0.5	43.33±3.33 ^a
Y1B2	1.0	0.5	40.00±5.77 ^{ab}
Y2B0	0.0	1.0	16.67±3.33 ^c
Y2B1	0.5	1.0	36.67±3.33 ^{ab}
Y2B2	1.0	1.0	26.67±3.33 ^{abc}
方差分析(P 值) ANOVA (P-value)			
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)			0.000
酵母培养物 Yeast culture (%)			0.021
交互作用 Interaction			0.472

3 讨论

3.1 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼生长的影响

研究结果显示, 当饲料中添加0.5%酵母培养物、

0.5%或1.0%枯草芽孢杆菌时, 珍珠龙胆石斑鱼幼鱼能够获得较高的WGR, 表明饲料中添加适宜水平的酵母培养物和枯草芽孢杆菌, 能对鱼体生长产生显著地促进作用。Liu等(2012)在斜带石斑鱼、刘晓勇等(2011)在杂交鲟(*Acipenser baeri*♂×*Acipenser schrenkii*♀)、朱学芝等(2007)在凡纳滨对虾的研究中均表明, 适量枯草芽孢杆菌能够提高鱼体的生长性能。另外, 何远法等(2016)研究证实, 饲料中添加 0.30%~0.50%酵母培养物能够显著提高凡纳滨对虾的 WGR; 姚世彬等(2014)在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)研究中也表明, 酵母培养物在促进鱼体生长方面具有积极作用。产生这一结果的原因可能是, 酵母培养物中含有丰富的氨基酸、葡萄糖、维生素、有机酸等营养物质以及一些未知促生长因子, 可以为肠道内微生物菌群的生长和代谢提供营养物质, 促进有益菌群的代谢和活力, 抑制大肠杆菌等有害菌的繁殖, 从而优化肠道微生物结构, 增强了机体健康水平(郁欢欢等, 2015)。再加上本实验添加的是原籍枯草芽孢杆菌, 在酵母培养物的基础上, 能够更好地在肠道内定植和繁殖, 这也就暗示二者在功能上可能形成相互协同的作用, 从而能对幼鱼的生长产生积极效应。

然而, 本实验结果也显示, 当二者添加量较高(1.0%和 1.0%)时, 幼鱼 WGR 会受到抑制, 这可能是由于高剂量添加容易引起肠道微生态系统失衡, 肠道黏膜遭到破坏, 导致机体的免疫能力下降, 进而影响了幼鱼的生长(何远法等, 2016)。其相关原因在讨论中将作进一步论述。

3.2 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼血清生化指标的影响

研究表明, 枯草芽孢杆菌对水产动物免疫机能具有明显促进效果。程远等(2014)在饲料中添加 0.12%~0.18%, 即 2.82×10^{10} ~ 4.23×10^{10} CFU/kg 的枯草芽孢杆菌时, 吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)血清 AST、ALT 和 AKP 活力均有不同程度的下降, 机体免疫功能得到显著提高; 董春光等(2015)报道, 饲料中适量的枯草芽孢杆菌能够显著增强刺参(*Apostichopus japonicus*)的非特异性免疫酶(SOD、AKP、CAT)活力, 提高刺参的非特异性免疫能力。本研究中, 在每个酵母培养物水平上, 各实验组血清 AST、ALT 和 AKP 活力均在枯草芽孢杆菌添加量为 0.5%时最低, 且显著低于未添加组($P<0.05$)。这同上述研究结果一致, 说明饲料中适量的枯草芽孢杆菌能够对肝脏起到一定的保护作用, 增强机体免疫功能。产生这一结果的原因可能是, 添加进饲料中的原籍枯草芽孢杆菌进入

肠道中,更易在肠道内定植并迅速繁殖,从而能够在肠道内竞争性抑制其他有害菌的生存,改善肠道生态结构,从而能够间接增强机体的免疫功能(惠明等, 2008)。

研究报道,在饲料中添加适宜的酵母培养物能够维持异育银鲫血清 AST 和 ALT 活力水平,有益于鱼体正常肝功能运转(康学会等, 2017);同时,何远法等(2016)在凡纳滨对虾的研究中表明,饲料中添加 0.30%~0.50%酵母培养物,能够显著影响血清中溶菌酶、酚氧化酶和碱性磷酸酶活力,显著提高凡纳滨对虾的非特异性免疫力。本研究结果也表明,饲料中添加 0.5%酵母培养物能够显著降低血清 AST、ALT 和 AKP 活力,提高机体非特异性免疫能力。另外,本研究还发现,当酵母培养物添加量为 1.0%时,幼鱼血清中免疫指标活力受到了抑制,显著低于 0.5%添加组。这同在凡纳滨对虾的研究结果类似,当酵母培养物的添加量超过一定量时,凡纳滨对虾免疫能力并不能得到进一步的改善,而是产生了一定的负面影响(何远法等, 2016)。这可能是酵母培养物中含有非淀粉多糖的原因导致的,非淀粉多糖具有抗营养的作用,随着添加量的增加,饲料中非淀粉多糖含量也随之增高,从而影响了鱼体对饲料中营养成分的吸收,导致维持体内的营养素减少(邱燕, 2010),进而可能导致机体免疫能力降低,但其具体原因有待于进一步研究。

根据分析,本研究中枯草芽孢杆菌和酵母培养物在血清 AST 和 AKP 上表现出显著的交互作用($P < 0.05$)。研究结果表明,当饲料中枯草芽孢杆菌为 0.5%、酵母培养物为 0.5%或 1.0%时,与对照组相比,幼鱼血清中 AST、ALT 和 AKP 活力均处于较低水平,表现出较高的免疫能力,同时在这一添加量下,幼鱼 WGR 也处于较高水平。这也说明适宜水平的枯草芽孢杆菌同酵母培养物存在协同作用,能够在一定程度上维持血清中免疫指标的活力,提高鱼体的免疫能力和生长性能。

3.3 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼抗氧化能力的影响

机体抗氧化能力的强弱与机体健康程度存在密切的关系,SOD、CAT 和 T-AOC 是体内关键性的抗氧化酶。其中,SOD 能够清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损伤,T-AOC 可以反映机体对外来刺激的代偿能力以及机体自由基代谢的状态(张滕闲等, 2017; 刘玲等, 2018)。在斜带石斑鱼的实验中发现,投喂添加枯草芽孢杆菌饲料能够显著提高血清中

SOD、CAT 的活力(Liu *et al.*, 2012); 刘晓勇等(2011)在饲料中添加 0.25%枯草芽孢杆菌,杂交鲟血清中 SOD 活力和 T-AOC 水平得到显著提高。另外在黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)幼鱼(李盈锋等, 2014)、海参(Fan *et al.*, 2013)等研究中均证实,枯草芽孢杆菌对水产动物抗氧化能力具有一定的增强作用。本研究结果表明,当饲料中添加 0.5%枯草芽孢杆菌时,能够显著提高幼鱼肠道 SOD、CAT 活力和 T-AOC 水平,同时能有效降低肠道 MDA 含量,这可能是因为当枯草芽孢杆菌随饲料进入鱼体后,可通过自身分泌抗氧化酶或作为激活剂促进机体抗氧化酶分泌,从而增强了鱼体清除自由基的能力和降低脂质过氧化程度,提高了幼鱼的抗氧化能力,这同上述研究结果类似。

本研究表明,在添加枯草芽孢杆菌的基础上,添加 0.5%的酵母培养物能够显著提高 SOD、CAT 活力和 T-AOC 水平,增强机体抗氧化能力,同时能够降低 MDA 含量。这可能与酵母培养物中含有 β -葡聚糖和甘露寡糖(MOS)等有关,研究表明,二者在提高机体的抗氧化能力和抗病力方面均能显著作用(Meshram *et al.*, 2015)。 β -葡聚糖能够激活机体先天性免疫和获得性免疫过程,能够直接结合并激活巨噬细胞、中性粒细胞等白细胞,提高集体的免疫能力(Herre *et al.*, 2004); MOS 能够显著提高水产动物溶菌酶活力、头肾细胞吞噬活性及促进前列腺素的分泌等,进而增强机体的非特异性免疫能力(Staykov *et al.*, 2007)。徐磊等(2010)在异育银鲫、姚世彬等(2014)在草鱼等的研究中均表明,酵母培养物在增强机体抗氧化能力,提高非特异性免疫方面具有积极的作用。

本研究结果显示,幼鱼肠道 SOD 活力和 MDA 含量受枯草芽孢杆菌和酵母培养物的交互作用影响显著,当酵母培养物为 0.5%,枯草芽孢杆菌为 0.5%和 1.0%时,SOD 活力处于较高水平,显著高于对照组与 Y2B2 组,MDA 含量显著低于对照组与 Y2B2 组。这表明饲料中适宜的枯草芽孢杆菌和酵母培养物配比能够在提高珍珠龙胆石斑鱼幼鱼抗氧化水平,增强机体免疫能力方面具有一定的协同作用。

3.4 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼抗病力的影响

众多报道已证实,枯草芽孢杆菌和酵母培养物能够显著改善水产动物的抗病力。研究表明,当饲料中添加适量枯草芽孢杆菌时,斑节对虾对哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的抗感染能力增强(Sirirat *et al.*, 2000),凡纳滨对虾对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的抗感染能力增强(粟雄高等, 2012)。同时,在条纹鲈(*Morone saxatilis*) (Li *et al.*, 2004)、尼罗非鱼

(Mohsen *et al.*, 2008)等研究中均也表明, 枯草芽孢杆菌能够降低攻毒后水产动物的累积死亡率。另外, 张琴(2010)报道, 刺参摄食含有酵母培养物的饲料后, 可以显著降低其感染弧菌后的累积死亡率, 提高抗病力; 同时, 在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)(温俊, 2007)和凡纳滨对虾(Burgents *et al.*, 2004)中的实验中也表明, 酵母培养物能够提高二者在弧菌感染后的成活率。本研究中, 饲料中添加枯草芽孢杆菌和酵母培养物, 均能够提高鳗弧菌攻毒后珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的存活率, 这也同上述众多研究结果一致, 再次证实了枯草芽孢杆菌和酵母培养物能够提高鱼体的抗病力。这可能是因为枯草芽孢杆菌和酵母培养物能够调节肠道内微生态平衡, 对入侵微生物及病害具有很强的拮抗作用, 发挥出一定的免疫活性作用, 来刺激体内免疫系统的发育, 进而对机体抗氧化能力具有提高作用(曹海鹏, 2013)。

另外, 本研究还发现, 枯草芽孢杆菌和酵母培养物虽然在攻毒后幼鱼存活率上没有显著地交互作用, 但是当酵母培养物为 0.5%, 枯草芽孢杆菌为 0.5%或 1.0%时, 幼鱼存活率显著高于对照组和 Y2B2 组, 这说明在适当的添加量下, 二者功能上可能存在一定的协同作用, 共同提高机体免疫能力和抗病力, 这一观点在上述幼鱼生长、血清免疫指标及肠道抗氧化能力上也得到了类似的论述。

4 结 论

综上所述, 当饲料中添加适量的枯草芽孢杆菌(0.5%或 1.0%)和酵母培养物(0.5%)时, 能够提高幼鱼 WGR 和血清中部分免疫指标的活力, 增强机体抗氧化能力和降低鳗弧菌感染后幼鱼的死亡率, 提高鱼体的抗病力。同时也表明, 枯草芽孢杆菌和酵母培养物在提高幼鱼非特异性免疫方面可能存在一定的协同作用。

参 考 文 献

- Burgents JE, Burnett KG, Burnett LE, *et al.* Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture*, 2004, 231(1-4): 1-8
- Cao HP. Antibacterial mechanism study on *Bacillus amyloliquefaciens* antagonistic against *Aeromonas hydrophila* and safety evaluation on its microcapsules. Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2013, 48-51 [曹海鹏. 抗嗜水气单胞菌解淀粉芽孢杆菌的抗菌机理研究及其微胶囊制剂的安全性评价. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2013, 48-51]
- Cerezuela R, Meseguer J, Esteban M^A. Effects of dietary inulin, *Bacillus subtilis* and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(3): 843-848
- Cheng Y, Huang K, Huang XY, *et al.* Effects of dietary *Bacillus subtilis* on growth performance, immunity and anti-oxidation function of juvenile genetic improvement of farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(6): 1503-1512 [程远, 黄凯, 黄秀芸, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对吉富罗非鱼幼鱼生长性能、免疫力和抗氧化功能的影响. *动物营养学报*, 2014, 26(6): 1503-1512]
- Dong CG, Yang AG, Sun JX, *et al.* The health-promoting effects of *Bacillus subtilis* in the culture of sea cucumber. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 109-115 [董春光, 杨爱国, 孙俊秀, 等. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 在刺参养殖中的益生作用. *渔业科学进展*, 2015, 36(3): 109-115]
- Dong XZ, Cai MY, *et al.* Common bacterial system identification manual. Beijing: Science Press, 2001, 78-83 [东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 78-83]
- Fan Y, Yu XQ, Xu L, *et al.* Synergy of microcapsule polysaccharides and *Bacillus subtilis* on the growth, immunity and resistance of sea cucumber *Apostichopus japonicus* against *Vibrio splendidus* infection. *Fisheries Science*, 2013, 79(5): 807-814
- He GL, Liu LH, Zhang H. Study on bacillus from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) intestine and its zymogenicities. *Freshwater Fisheries*, 2017, 42(4): 3-8 [贺国龙, 刘立鹤, 张恒. 草鱼肠道芽孢杆菌的鉴定及产酶能力的分析. *淡水渔业*, 2017, 42(4): 3-8]
- 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]
- Herre J, Gordon S, Brown GD. Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. *Molecular Immunology*, 2004, 40(12): 869-876
- Hui M, Dou LN, Tian Q, *et al.* Advances in application research of *Bacillus subtilis*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(27): 11623-11627 [惠明, 窦丽娜, 田青, 等. 枯草芽孢杆菌的应用研究进展. *安徽农业科学*, 2008, 36(27): 11623-11627]
- Kang XH, Huo YW, Li YJ, *et al.* Effect of dietary addition of yeast cultures (Baihuikang) in replacement of fish meal on growth performance and blood index of *Carassius auratus gibelio*. *Feed Research*, 2017, 9(31): 31-36 [康学会, 霍雅文, 李永娟, 等. 饲料中添加酵母培养物(百惠康)替代鱼粉对异育银鲫生长性能及血液指标的影响. *饲料研究*, 2017, 9(31): 31-36]
- Li GF. Studies on application of yeast culture in artificial feed of *Megalobrama amblycephala*. Master's Thesis of Soochow University, 2009, 35-37 [李高锋. 酵母培养物在团头鲂饲料

- 料中的应用研究. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2009, 35-37]
- Li P, Gatlin DM III. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture*, 2004, 231(1-4): 445-456
- Li YF, Qi X, Hua Y, *et al.* Effect of *Bacillus subtilis* on growth, digestive enzyme activity and antioxidant function in juvenile of black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*). *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2014, 35(1): 37-42 [李盈锋, 齐鑫, 华颖, 等. 枯草芽孢杆菌对黑鲷幼鱼生长、消化酶活性及抗氧化功能的影响. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2014, 35(1): 37-42]
- Liu CH, Chui CH, Wang SW, *et al.* Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 33(4): 699-706
- Liu KF, Chiu CH, Shiu YL, *et al.* Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 28(5-6): 837-844
- Liu L, Chen C, Li YL, *et al.* Effects of short-term temperature stress on antioxidant and digestive physiology of hybrid progeny (*Cromileptes altivelis Valenciennes* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂). *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 59-66 [刘玲, 陈超, 李炎璐, 等. 短期温度胁迫对驼背鲈(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代幼鱼抗氧化及消化酶活性的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 59-66]
- Liu XY, Zhan 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. *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. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1315-1320]
- Ma AJ, Guo JL, Wang XA, *et al.* Family selection and estimation of disease resistance in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 484-493 [马爱军, 郭建丽, 王新安, 等. 大菱鲆选育家系抗鳃弧菌性能. 中国水产科学, 2014, 21(3): 484-493]
- Meshram SJ, Murthy HS, Ali H, *et al.* Effect of dietary β -glucan on immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture International*, 2015, 23(2): 439-447
- Mohsen AT, Azza M, Abdel R, *et al.* Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 2008, 280(1-4): 185-189
- Nayak SK. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 2-14
- Qiu Y. Effects of three microecological agents on growth performance, physiological function and intestinal mucosa of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Master's Thesis of Soochow University, 2010, 34-39 [邱燕. 三种微生态制剂对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)生长性能、生理机能及肠道黏膜的影响. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2010, 34-39]
- 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. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2015, 43(9): 8-15
- Sirirat R, Sombat R, Somkiat P, *et al.* Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 2000, 191(4-5): 271-288
- Staykov Y, Spring P, Denev S, *et al.* Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 2007, 15(2): 153-161
- Su XG, Li XQ, Leng XJ, *et al.* Effects of yeast culture and *Bacillus* on growth, protease activity and immunity of *Litopenaeus vannamei*. *Marine Fisheries*, 2012, 34(2): 168-176 [粟雄高, 李小勤, 冷向军, 等. 酵母培养物和芽孢杆菌对凡纳滨对虾生长、蛋白酶活性和免疫性能的影响. 海洋渔业, 2012, 34(2): 168-176]
- Wen J. Effects of dietary probiotics and yeast culture on growth, immune response and disease resistance of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2007, 40-45 [温俊. 复合益生菌与酵母培养物对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)生长、免疫及抗病力的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2007, 40-45]
- Xu L, Liu B, Xie J, *et al.* Effects of yeast cultures on growth, blood biochemistry and immunity of *Carassius auratus gibelio*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2010, 23(6): 371-374 [徐磊, 刘波, 谢骏, 等. 酵母培养物对异育银鲫生长、血液生化及免疫的影响. 江苏农业科学, 2010, 23(6): 371-374]
- Yao SB, Ye YT, Cai CF, *et al.* Protective effect of water soluble material of yeast culture on malondialdehyde damaged intestinal mucosal cells in *Vitro* of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(9): 2652-2663 [姚世彬, 叶元土, 蔡春芳, 等. 酵母培养物水溶物对丙二醛损伤的离体草鱼肠道黏膜细胞的保护作用. 动物营养学报, 2014, 26(9): 2652-2663]
- Yang HL, Ma RL, Sun YZ. Assessment of *Psychrobacter* sp. SE6 from the gut of grouper (*Epinephelus coioides*) as a novel probiont in vitro and in vivo. *Acta Oceanologica Sinica*, 2012, 34(2): 129-135 [杨红玲, 马如龙, 孙云章. 石斑鱼肠道原籍嗜冷杆菌(*Psychrobacter* sp.) SE6 作为益生菌的体内外评价. 海洋学报, 2012, 34(2): 129-135]
- Yu HH, Zhou WH, Zeng H, *et al.* Application and action mechanism of yeast culture in aquatic animals. *Feed Industry*, 2015, 20(18): 25-29 [郁欢欢, 周文豪, 曾虹, 等. 酵母培养物在水产动物中的应用及作用机理研究进展.

饲料工业, 2015, 20(18): 25–29]

Zhang Q. The selection and application of high-effective immunostimulants for sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010, 89–92 [张琴. 刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka) 高效免疫增强剂的筛选与应用. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 89–92]

Zhang TX, Chen Q, Zhang BL, *et al.* The effects of curcumin on the growth, digestion and antioxidant ability of yellow

catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(6): 56–63 [张滕闲, 陈钱, 张宝龙, 等. 姜黄素对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)生长、消化与抗氧化能力的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(6): 56–63]

Zhu XZ, Zheng SX, Pan QJ, *et al.* Effects of *Bacillus* on immunity and biochemical indexes of *Litopenaeus vannamei*. Feed Research, 2007(4): 56–59 [朱学芝, 郑石轩, 潘庆军, 等. 芽孢杆菌对凡纳滨对虾免疫和生化指标的影响. 饲料研究, 2007(4): 56–59]

(编辑 陈辉)

Effects of Dietary *Bacillus subtilis* and Yeast Culture on Growth, Serum Biochemical Indices and Antioxidant Capacity of Juvenile Hybrid Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)

WANG Chengqiang¹, LI Baoshan¹①, WANG Jiying¹, HUANG Bingshan¹,
SUN Yongzhi¹, HAO Tiantian¹, MA Changxing², ZHOU Ying²

(1. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Yantai 264006; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract A 2×3 two-factorial experiment was designed to investigate the effects of dietary administration of *Bacillus subtilis* and yeast culture on growth, serum biochemical indices, antioxidant capacity, and disease resistance of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) [initial weight: (23.41±0.47) g]. Nine isonitrogenous and isoenergetic diets were formulated with three levels of *B. subtilis* [0 (control), 0.5%, and 1.0%], and each *B. subtilis* level was formulated with three yeast culture levels [0 (control), 0.5%, and 1.0%]. Juvenile hybrid groupers were fed for 8 weeks. The results showed that the interaction between *B. subtilis* and yeast culture had no significant effects on the survival (SR) and weight gain rate (WGR) of grouper ($P>0.05$). The WGR of Y1B1 and Y1B2 groups was significantly higher than that of the control and Y2B2 groups ($P<0.05$). The interaction between *B. subtilis* and yeast culture had a significant effect on the aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (AKP) in the serum of grouper ($P<0.05$); the AST and AKP activities in the serum of Y1B1 and Y1B2 groups were significantly lower than those in the control and Y2B2 groups ($P<0.05$). The interaction between *B. subtilis* and yeast culture had a significant effect on the superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels in the intestinal tract of grouper ($P<0.05$), but no significant interaction with catalase (CAT) or total antioxidant capacity (T-AOC) in the intestinal tract ($P>0.05$). The activities of SOD, CAT, and T-AOC in the intestinal tract of the Y1B1 and Y1B2 groups were significantly higher than those in the control and Y2B2 groups ($P<0.05$), but the MDA content in the intestinal tract showed an opposite trend to SOD ($P<0.05$). There was no interaction between the effects of dietary *B. subtilis* and yeast culture on the cumulative survival rate of juveniles challenged with *Vibrio anguillarum* ($P>0.05$). The highest value of cumulative survival rate of juveniles was found in the Y1B1 group, which was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). In conclusion, supplementation of 0.5% or 1.0% *B. subtilis* and 0.5% yeast culture in diets could promote WGR, antioxidant capacity, and disease resistance in juvenile hybrid grouper.

Key words *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂; *Bacillus subtilis*; Yeast culture; Growth; Antioxidant capacity; Disease resistance

① Corresponding author: LI Baoshan, E-mail: bsleeyt@126.com