

蒋祥宇,吕依诺,张永安,等.大口黑鲈肠道益生菌的筛选及其对大口黑鲈生长、免疫基因表达及抗LMBV的影响[J].华中农业大学学报,2025,44(6):273-282.DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.06.027

大口黑鲈肠道益生菌的筛选及其对大口黑鲈生长、免疫基因表达及抗LMBV的影响

蒋祥宇,吕依诺,张永安,涂加钢

华中农业大学水产学院/农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室,武汉 430070

摘要 为获得能够促进大口黑鲈生长并提高其抗大口黑鲈虹彩病毒(largemouth bass ranavirus, LMBV)能力的益生菌,从大口黑鲈肠道中分离芽孢杆菌和乳酸菌,通过溶血试验、药敏试验、产酶和产酸试验以及在大口黑鲈肠道的定殖试验对其进行筛选,最终选取5株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, BS04、BS49、BS58、BS66 和 BS74)、2株解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*, BA04 和 BA12)、1株粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, Efa01)和5株乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, LL01、LL05、LL09、LL13 和 LL22),分别拌饲料投喂大口黑鲈30 d,研究其对大口黑鲈生长性能、抗LMBV能力的影响。结果显示,BS04、BS49、BS66、BS74、BA04、BA12、LL01、LL05、LL09、LL13 和 LL22 均可以显著提高大口黑鲈的增重率和特定生长率,显著降低饲料转化效率。投喂带菌饲料后 BS04、BS49 和 LL01 组大口黑鲈脾脏和头肾中4种免疫因子 $IFN-\gamma$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-8$ 和 $TNF-\alpha$ 表达均显著升高。LMBV 攻毒后各试验组脾脏及头肾中的病毒载量均显著降低,且相对保护率均高于 20%,其中 BS04 组相对保护率最高,可达 55.1%。综合分析,本研究分离的枯草芽孢杆菌 BS04 可有效提高大口黑鲈的生长性能、免疫应答和抗 LMBV 能力,具有制备饲料添加剂的潜力。

关键词 大口黑鲈;芽孢杆菌;乳酸菌;促生长;抗LMBV

中图分类号 S965.211 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)06-0273-10

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)是我国重要的淡水养殖经济鱼类^[1]。2024中国渔业统计年鉴数据显示,2023年我国大口黑鲈年产量达到888 030 t。然而,由大口黑鲈虹彩病毒(largemouth bass ranavirus, LMBV)引起的病毒性疾病导致大口黑鲈大量死亡,给我国大口黑鲈养殖业造成了巨大经济损失^[2]。LMBV 属于虹彩病毒科(Iridoviridae),蛙病毒属(*Ranavirus*),感染大口黑鲈的典型症状为鱼体溃疡和肌肉坏死^[3]。因此,寻找预防和治疗LMBV 感染的有效方法成为当务之急。

益生菌是一类能够在体内定殖,且对宿主有益的活性微生物^[4]。在水产养殖中,常用的益生菌有芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌等^[5],益生菌可以通过提高鱼体免疫力、促进鱼体生长、调节水质等实现对鱼体的益生作用^[6-7]。芽孢杆菌可以形成芽孢,能够抵抗多种不良环境,因而得到广泛应用^[8]。乳酸菌因其种类

较多并且能够产生有机酸促进肠道消化吸收,也在水产养殖中得到广泛应用^[9]。据报道,饲料中添加枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)可显著促进石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、日本鳗鱼(*Anguilla japonica*)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)和大口黑鲈的生长^[10-14]。饲料中添加粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)可提高虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和鲤(*Cyprinus carpio*)的增重率和特定生长率,添加乳酸杆菌(*Lactobacillus*)也能促进草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的生长^[15-16]。此外,越来越多的证据表明在饲料中添加芽孢杆菌和乳酸菌可以提高水生动物的抗病毒能力。Liu 等^[12]指出,饲料中添加枯草芽孢杆菌可提高石斑鱼虹彩病毒(grouper iridovirus, GIV)感染石斑鱼的存活率。将含有枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)和短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)的

收稿日期: 2025-01-13

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32173014);中央高校基本科研业务费专项(2662024SCPY004)

蒋祥宇,E-mail: JiangXY@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 涂加钢,E-mail: tujiagang@mail.hzau.edu.cn

混合物添加到罗非鱼饲料中,可以降低罗非鱼湖病毒(tilapia lake virus, TiLV)感染罗非鱼的死亡率和病毒载量^[17]。用添加乳酸菌的饲料饲养牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)可提高其抗淋巴囊肿病毒(lymphocystis disease virus, LCDV)的能力^[18]。在饲料中添加植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)可以增强石斑鱼抗虹彩病毒的能力^[19]。然而,大口黑鲈饲料中添加芽孢杆菌和乳酸菌是否能提高大口黑鲈抗LMBV的能力还未见报道。由于非鱼源的益生菌可能会对鱼体肠道造成潜在危害,而从鱼类肠道分离的益生菌可能会更适应鱼类肠道环境^[20],因此,本研究从大口黑鲈肠道分离芽孢杆菌和乳酸菌,研究该菌作为饲料添加剂促进大口黑鲈生长并提高大口黑鲈抗LMBV能力的潜力,以期为大口黑鲈养殖业健康发展提供支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

分离芽孢杆菌和乳酸菌所用的大口黑鲈于2023年2—4月购自武汉市19个不同的农贸市场、超市和养殖场。菌株投喂试验所用的大口黑鲈购自武汉市某大口黑鲈养殖场,大口黑鲈的初始质量为(10.06±0.72)g。所用的培养基,包括胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)、MRS培养基(MRS)、Mueller-Hinton琼脂、酪蛋白琼脂、淀粉水解培养基购自海博生物,羧甲基纤维素钠培养基(CMC)购自山东拓普生物工程有限公司,哥伦比亚血平板购自广东环凯微生物科技有限公司。药敏片购自杭州微生物试剂有限公司。反转录及定量试剂购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 菌株分离及溶血性试验

1)菌株的分离。大口黑鲈用MS-222麻醉以及75%乙醇体表消毒后,在无菌条件下解剖取其肠道,并用PBS冲洗肠道表面的血液,将肠道置于装有1mL PBS的EP管中,在匀浆器中匀浆处理。取部分匀浆液接种于MRS培养板,再将培养板置于厌氧袋在37℃培养箱培养24 h。剩余匀浆液在80℃下处理20 min,接种于TSA培养板,并在37℃培养箱培养24 h^[20]。单菌落经过3次划线纯化,随后使用引物27F (AGAGTTGATCCTGGCTCA) 和 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) 进行 16S rDNA测序^[21]。最后在NCBI上进行比对,确定菌株的种类。

2)溶血性试验。挑取分离得到的芽孢杆菌和乳酸菌单菌落接种于哥伦比亚血琼脂平板上,并以PBS为阴性对照,Triton X-100为阳性对照,在37℃下培养24 h。通过观察血琼脂平板上的透明圈来判定溶血情况^[20]。

1.3 抗生素敏感性试验

采用Kirby-Bauer纸片扩散法测定芽孢杆菌和乳酸菌对20种常见抗生素的敏感性。将芽孢杆菌和乳酸菌液涂布于Mueller-Hinton琼脂平板上。用镊子将药敏片贴于琼脂平板表面,于37℃培养24 h。测量药敏片周围抑菌圈的直径,将敏感性水平分为高度敏感(S)、中度敏感(I)和耐药(R)^[22]。

1.4 芽孢杆菌产酶试验

用接种环取芽孢杆菌单菌落分别接种于酪蛋白琼脂、羧甲基纤维素钠培养基和淀粉水解培养基上,分别测定芽孢杆菌产蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶的能力。每个培养板上重复接种3次,再将培养板置于28℃培养48 h。观察菌落周围透明圈的产生并测量透明圈直径(hydrolysis circle diameter, D_h)和菌落直径(colony diameter, D_c),计算 D_h 与 D_c 的比值,比值越大表明其产酶能力越强。对于产蛋白酶的平板可直接测量透明圈的直径;对于产纤维素酶的平板则需用1 g/L的刚果红溶液染色1 h,再用1 mol/L的NaCl脱色1 h后再测量透明圈的直径;对于产淀粉酶的平板需要用适量浓度的碘液对平板进行显色后测量透明圈直径的大小^[23]。

1.5 乳酸菌产酸试验

将乳酸菌以1%的比例接种于MRS培养基中,对照组为MRS培养基,置于37℃摇床进行培养,分别在接种后0、4、8、12、16、20和24 h测量菌液的pH值,每组设置3个重复。

1.6 芽孢杆菌和乳酸菌的肠道定殖试验

1)饲料制备。将7株芽孢杆菌(BS04、BS49、BS58、BS66、BS74、BA04和BA12)分别接种于DSM培养基,在37℃培养72 h制备芽孢杆菌的芽孢;将6株乳酸菌(Efa01、LL01、LL05、LL09、LL13和LL22)分别接种于MRS培养基,在37℃培养24 h。将培养后的芽孢杆菌的芽孢和乳酸菌浓度分别调整为10¹¹ CFU/mL 和 10⁹ CFU/mL,在4 500 r/min 离心10 min,弃上清,用PBS重悬菌液后均匀添加至饲料,制成10¹¹ CFU/g的芽孢杆菌饲料和10⁹ CFU/g的乳酸菌饲料。

2)定殖试验。大口黑鲈被随机分为7个芽孢杆

菌试验组、6个乳酸菌试验组和1个对照组,每组18尾鱼,试验开始前所有大口黑鲈禁食3 d。7个芽孢杆菌试验组分别用含有 10^{11} CFU/g芽孢杆菌孢子的商业饲料投喂1次;6个乳酸菌试验组分别用含有 10^9 CFU/g乳酸菌的商业饲料投喂1次;对照组则用含有等量PBS的商业饲料投喂1次,投喂量为鱼体质量的2%。在喂食后1、6、24、72、120和168 h,每组各取3尾鱼,收集其肠道进行匀浆处理。7个芽孢杆菌组的匀浆液在80 °C下处理20 min,经过梯度稀释后接种到TSA培养板上;6个乳酸菌组的匀浆液直接经过梯度稀释后接种到MRS培养板上;对照组的匀浆液直接涂布与TSA和MRS培养板上,在37 °C下培养12 h后统计菌落数量^[20]。

1.7 投喂芽孢杆菌和乳酸菌后大口黑鲈生长性能及免疫因子的表达变化

大口黑鲈被随机分为7个芽孢杆菌试验组、6个乳酸菌试验组和2个对照组,每组36尾鱼。芽孢杆菌试验组分别用含有 10^{11} CFU/g芽孢杆菌孢子的商业饲料喂养;乳酸菌试验组分别用含有 10^9 CFU/g乳酸菌的商业饲料喂养;对照组则用含有等量PBS的商业饲料喂养。每3 d投喂1次带菌饲料,其余时间投喂普通商业饲料,投喂量为鱼体质量的2%,投喂周期为30 d。在投喂的第1天和第30天,称取鱼的初始质量和最终质量,并计算质量增长百分比(percentage weight gain, PWG)、特定生长率(specific growth rate, SGR)和饲料转化率(feed conversion ratio, FCR),计算公式参见文献[11]。在投喂30 d后,每组随机取3尾鱼,取其脾脏和头肾用Trizol提取RNA后反转录成cDNA,用于后续定量检测各种免疫因子的表达水平,所用定量引物如表1所示。

1.8 LMBV攻毒试验

将投喂30 d后的大口黑鲈腹腔注射100 μL 5×10^4 TCID₅₀的LMBV,阴性对照组注射等量的M199培养基。在攻毒5 d后,13个试验组和阳性对照组各随机取3尾鱼,取其脾脏和头肾用Trizol提取RNA后反转录成cDNA,定量检测LMBV抗原基因MCP的表达水平,所用引物如表1所示。剩余的30尾鱼观察LMBV攻毒后14 d的死亡情况并计算存活率。

1.9 统计学分析

所有数据均采用GraphPad Prism软件进行分析,并以均值±标准差的形式表示。差异显著性分析采用t检验。 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 分别被视为具有

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物 Primers	序列 Sequences
IL-8-FW	GAGTTTGAGGAGCCTGGGTGT
IL-8-BW	GGGTCCAGGCAAACCTCTTG
IL-1 β -FW	TGGTGGAAAACAGCATGGAGC
IL-1 β -BW	AGGGTGCACGTAGTCGACA
IFN- γ -FW	ATCCCTCTGAAGATGAACAA
IFN- γ -BW	AAACGCCACCCATAAACAA
TNF- α -FW	CTAGTGAAGAACCAAGATTGT
TNF- α -BW	AGGAGACTCTGAACGATG
MCP-FW	TGTTGTTGGAGCGGGTAA
MCP-BW	GGCGTAAGAGTAGAGGTGG
β -actin-FW	CAGGATGCAGAAGGAGATCACA
β -actin-BW	CTCCTGCTTGCTGATCCACAT

显著和极显著差异。

2 结果与分析

2.1 大口黑鲈肠道芽孢杆菌和乳酸菌的分离及溶血结果

菌株的16S rDNA测序结果显示,从大口黑鲈肠道中分离并鉴定出87株芽孢杆菌和41株乳酸菌。87株芽孢杆菌包括74株枯草芽孢杆菌(BS01~BS74)和13株解淀粉芽孢杆菌(BA01~BA13);41株乳酸菌包括1株粪肠球菌(Efa01)、3株戊糖片球菌(PP01~PP03)、4株屎肠球菌(Efi01~Efi04)和33株乳酸乳球菌(LL01~LL33)(表2)。溶血试验结果显示,共有51株枯草芽孢杆菌、9株解淀粉芽孢杆菌和41株乳酸菌不发生溶血(表2)。

2.2 芽孢杆菌和乳酸菌的敏感性

为了评估芽孢杆菌和乳酸菌对抗生素的敏感性,本研究检测了不具有溶血性的60株芽孢杆菌和41株乳酸菌对20种常见抗生素的敏感性,结果显示55株芽孢杆菌(BS56、BS27、BS49、BS47、BS41、BS45、BS08、BS07、BS04、BS03、BS63、BS60、BS48、BS46、BS39、BS36、BS74、BS68、BS53、BS69、BS66、BS61、BS11、BS18、BA05、BA08、BS55、BA07、BA03、BS01、BS02、BS06、BS09、BS10、BS12、BS13、BS16、BS17、BS20、BS26、BS50、BS57、BS58、BS59、BS64、BS67、BS70、BS71、BS72、BS73、BA04、BA06、BA11、BA12、BA13)对20种常见抗生素耐药的种类少于5种(见网络版,附表1)、10株乳酸菌(Efa01、Efi01、LL01、LL05、LL09、LL13、LL14、LL22、LL23、LL24)对20种常见抗生素耐药的种类少于10种(见网络版,附表2)。以上结果可知,芽孢

表2 大口黑鲈肠道芽孢杆菌和乳酸菌分离及溶血结果

Table 2 Isolation and hemolysis assay of *Bacillus* and *Lactobacillus* in largemouth bass intestines

菌株 Strain	数量 Number	命名 Name	溶血结果 Hemolytic result	
			+	-
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	74	BS01-BS74	BS21-BS25, BS28-BS35, BS37-BS38, BS40, BS42-BS44, BS51-BS52, BS54, BS62	BS01-BS20, BS26-BS27, BS36, BS39, BS41, BS45-BS50, BS53, BS55-BS61, BS63-BS74
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	13	BA01-BA13	BA01-BA02, BA09-BA10	BA03-BA08, BA11-BA13
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	1	Efa01	/	Efa01
戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	3	PP01-PP03	/	PP01-PP03
屎肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	4	Efi01-Efi04	/	Efi01-Efi04
乳酸乳球菌 <i>Lactococcus lactis</i>	33	LL01-LL33	/	LL01-LL33

注：“+”代表溶血；“-”代表不溶血；“/”代表没有菌株溶血。Note: “+”means haemolysis; “-”means no haemolysis; “/” means no strain haemolysis.

杆菌对大多数常见的抗生素敏感,而乳酸菌则对大部分抗生素耐受。

2.3 芽孢杆菌的产蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶能力评估

通过计算 D_h 和 D_c 的比值,本研究对 60 株不发生溶血的芽孢杆菌进行产酶能力评估,包括蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶。结果显示,有 34 株枯草芽孢杆菌 (BS68、BS55、BS58、BS17、BS07、BS73、BS66、BS04、BS45、BS50、BS41、BS69、BS65、BS13、BS48、BS49、BS60、BS63、BS74、BS59、BS57、BS64、BS39、BS18、BS12、BS70、BS20、BS67、BS26、BS08、BS36、BS01、BS27、BS11) 和 7 株解淀粉芽孢杆菌 (BA11、BA06、BA04、BA05、BA13、BA08、BA12) 产蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶 3 种酶,3 株枯草芽孢杆菌 (BS71、BS56、BS19) 和 2 株解淀粉芽孢杆菌 (BA07、BA03) 只产蛋白酶和淀粉酶,9 株枯草芽孢杆菌 (BS53、BS47、BS72、BS61、BS02、BS03、BS46、BS06、BS16) 只产蛋白酶和纤维素酶,2 株枯草芽孢杆菌 (BS09、BS10) 只产纤维素酶,3 株枯草芽孢杆菌 (BS15、BS14、BS05) 只产蛋白酶(见网络版,附表 3)。此外,芽孢杆菌产蛋白酶的能力强于产纤维素酶和淀粉酶,有 10 株芽孢杆菌 (BS68、BS55、BS58、BS17、BS07、BS73、BS66、BS04、BA11、BA06) 的蛋白酶活性比值超过 3.00,33 株超过 2.00(见网络版,附表 3)。

2.4 乳酸菌的产酸能力

本研究通过检测乳酸菌培养过程中菌液的 pH

评估了 10 株乳酸菌的产酸能力,结果显示,在培养 24 h 后 10 株乳酸菌的 pH 都降低到 5 以下,远低于对照组,其中 LL01 组的 pH 最低 (4.73),这些结果表明 10 株乳酸菌具有较好的产酸能力(图 1)。

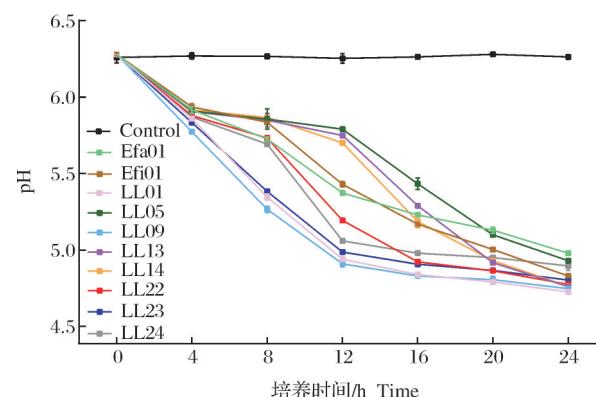


图 1 乳酸菌的产酸特性

Fig. 1 Ability to produce acid of *Lactobacillus*

2.5 芽孢杆菌和乳酸菌在大口黑鲈肠道的定殖能力

根据产酶和产酸试验结果,选择 7 株芽孢杆菌,包括 5 株枯草芽孢杆菌 (BS04、BS49、BS58、BS66 和 BS74) 和 2 株解淀粉芽孢杆菌 (BA04 和 BA12) 以及 6 株乳酸菌,包括 1 株粪肠球菌 (Efa01) 和 5 株乳酸乳球菌 (LL01、LL05、LL09、LL13 和 LL22),将带菌饲料投喂大口黑鲈 1 次后检测肠道中菌的数量来评价益生菌在大口黑鲈肠道中的定殖能力。结果显示,芽孢杆菌组大口黑鲈肠道中的芽孢杆菌数量在投喂后

24 h 达到峰值(高于 10^8 CFU/尾),即使在投喂后 72 h,大口黑鲈肠道中的芽孢杆菌数量仍显著高于对照组(图 2A)。乳酸菌组在投喂 24 h 后肠道乳酸菌的

数量都超过 10^7 CFU/尾,并且在 72 h 后仍然高于对照组(图 2B)。综上表明,芽孢杆菌和乳酸菌能够在大口黑鲈肠道中定殖至少 72 h。

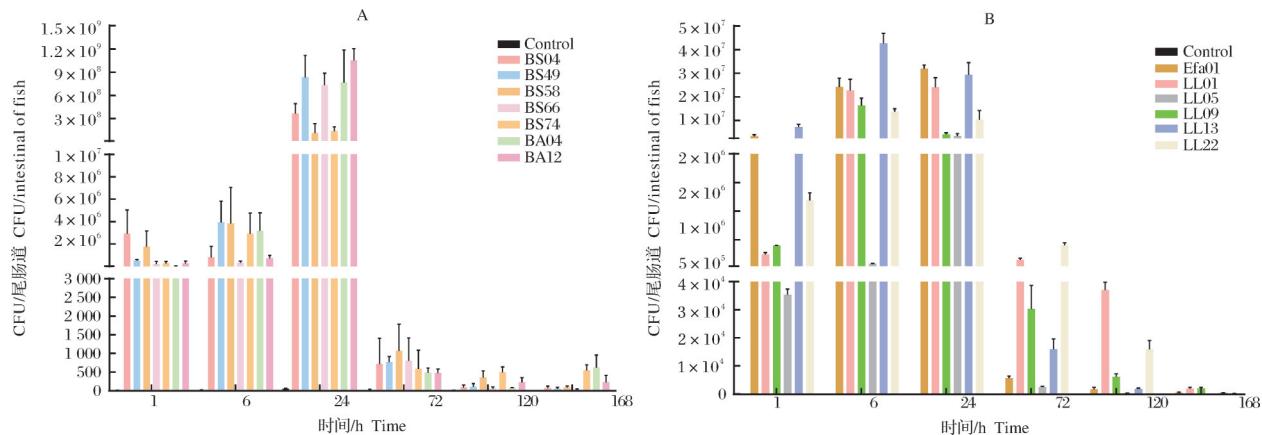


图 2 芽孢杆菌(A)和乳酸菌(B)在大口黑鲈肠道的定殖能力

Fig. 2 The colonizing ability of *Bacillus* (A) and *Lactobacillus* (B) in the intestines of largemouth bass

2.6 投喂芽孢杆菌和乳酸菌后大口黑鲈的生长性能

将分别含有 7 株芽孢杆菌的芽孢和 6 株乳酸菌的商业饲料或等量的 PBS(对照组)投喂大口黑鲈 30 d 后检测 PWG、SGR 和 FCR。如表 3 和表 4 所示,芽孢杆菌组中 BS04、BS49、BS66、BS74、BA04 和 BA12 组的 PWG 和 SGR 显著高于对照组($P<0.05$)。

0.05),而 FCR 显著低于对照组($P<0.05$);乳酸菌组中 LL01、LL05、LL09、LL13 和 LL22 组的 PWG 和 SGR 显著高于对照组($P<0.05$),而 FCR 显著低于对照组($P<0.05$)。综上所述,6 株芽孢杆菌(BS04、BS49、BS66、BS74、BA04 和 BA12)以及 5 株乳酸菌(LL01、LL05、LL09、LL13 和 LL22)显著促进了大口黑鲈的生长。

表 3 芽孢杆菌投喂后大口黑鲈的质量增长率、特定生长率、饲料转化率

Table 3 The percentage weight gain, specific growth rate, and feed conversion ratio of largemouth

bass after feeding with *Bacillus*

指标 Index	对照 Control	BS04	BS49	BS58	BS66	BS74	BA04	BA12
PWG/%	69.23±3.88a	85.81±7.5b	99.06±0.55b	73.96±2.84a	88.47±3.99b	85.44±2.73b	84.28±3.23b	90.81±3.05b
SGR/(d/%)	1.75±0.08a	2.06±0.14b	2.33±0.06b	1.85±0.05a	2.11±0.07b	2.06±0.05b	2.04±0.06b	2.15±0.05b
FCR	0.87±0.05a	0.70±0.02b	0.59±0.02b	0.81±0.02a	0.68±0.02b	0.70±0.02b	0.71±0.03b	0.66±0.02b

注:同行数据后字母不同表示差异显著。下同。Note: Different letters after the same data indicate significant differences. The same as below.

表 4 乳酸菌投喂后大口黑鲈的质量增长率、特定生长率、饲料转化率

Table 4 The percentage weight gain, specific growth rate, and feed conversion ratio of largemouth

bass after feeding with *Lactobacillus*

指标 Index	对照 Control	Efa01	LL01	LL05	LL09	LL13	LL22
PWG/%	69.23±3.88a	81.17±7.33a	95.23±6.61b	88.37±5.56b	88.00±4.39b	82.19±6.45b	90.79±6.94b
SGR/(d/%)	1.75±0.08a	1.98±0.13a	2.23±0.11b	2.11±0.10b	2.10±0.08b	2.00±0.12b	2.15±0.12b
FCR	0.87±0.05a	0.74±0.06a	0.63±0.04b	0.68±0.04b	0.68±0.03b	0.73±0.06b	0.66±0.05b

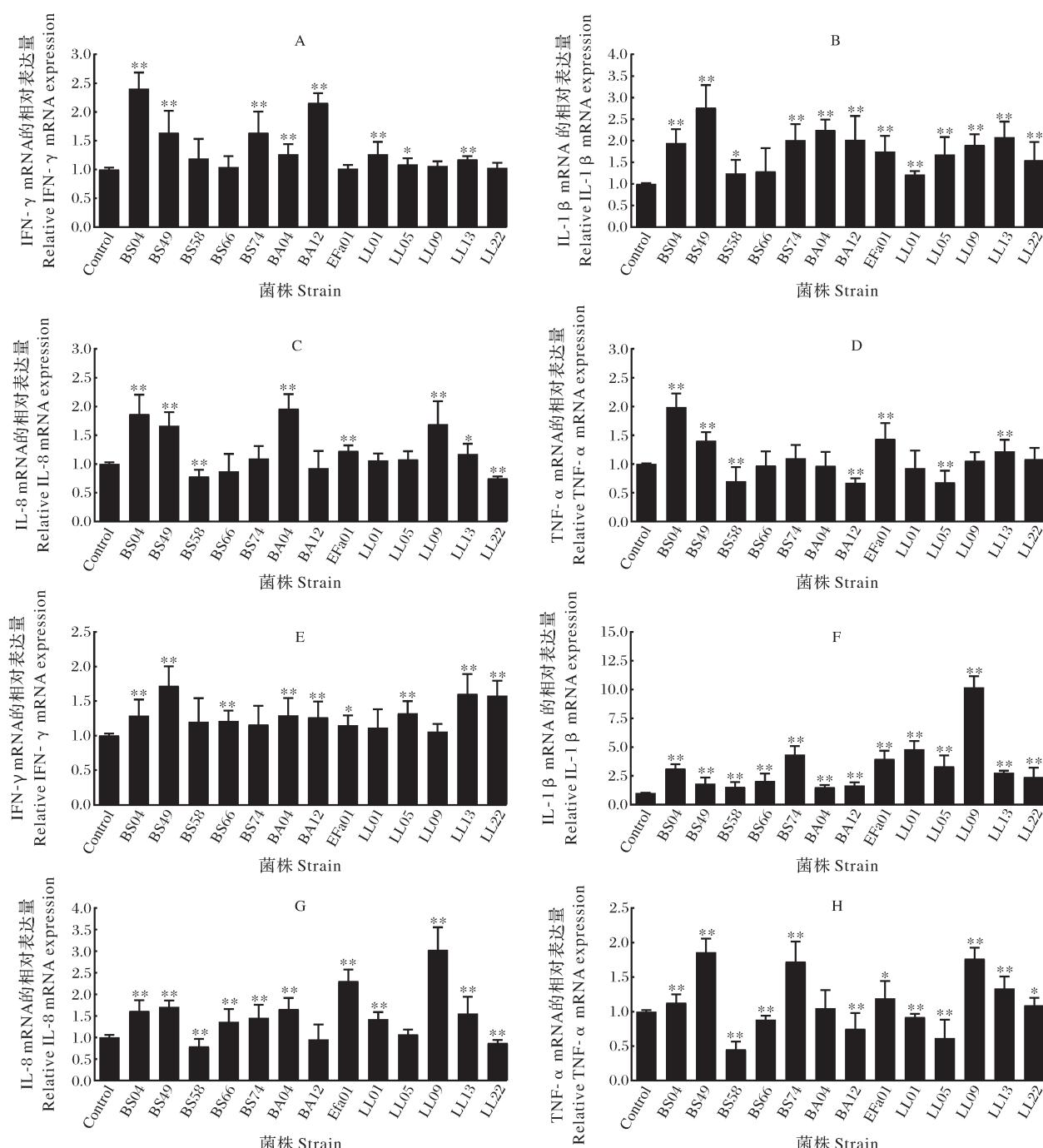
2.7 投喂芽孢杆菌和乳酸菌后大口黑鲈脾脏和头肾免疫因子表达情况

在投喂 30 d 后,每组取 3 尾鱼的脾脏和头肾,提取 RNA 并反转录后,通过 RT-qPCR 检测 4 种免疫相关基因 *IFN-γ*、*IL-1β*、*IL-8* 和 *TNF-α* 的表达水平。如图 3 所示,与对照组相比,BS04、BS49 和 LL13 组的

脾脏和头肾中 4 种基因的表达均显著上调($P<0.05$)。此外,所有试验组的脾脏和头肾中 *IFN-γ* 和 *IL-1β* 的表达量都上调(图 3A~B,3E~F)。

2.8 投喂芽孢杆菌和乳酸菌的饲料对大口黑鲈抗 LMBV 能力的影响

在芽孢杆菌和乳酸菌饲料投喂 30 d 后,用 LM-



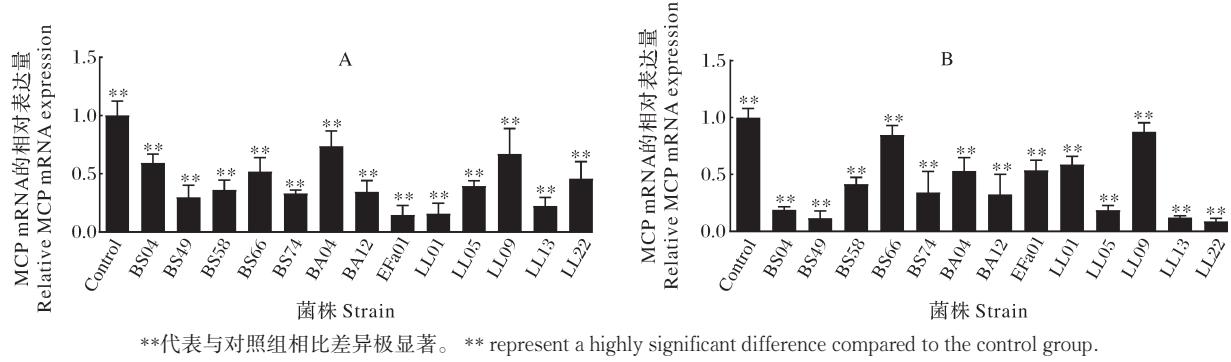
A, E: IFN- γ ; B, F: IL-1 β ; C, G: IL-8; D, H: TNF- α . *代表与对照组相比差异显著；**代表与对照组相比差异极显著。* represents a significant difference compared to the control group; ** represent a highly significant difference compared to the control group.

图3 芽孢杆菌和乳酸菌投喂后大口黑鲈脾脏(A~D)和头肾(E~H)免疫因子表达情况

Fig. 3 The expression of immune factors in the spleen (A-D) and head kidney (E-H) of largemouth bass after feeding with *Bacillus* and *Lactobacillus*

BV对大口黑鲈进行攻毒。在感染后第5天,检测脾脏和头肾中LMBV抗原基因MCP的表达水平。结果显示,饲喂7株芽孢杆菌和6株乳酸菌的大口黑鲈脾脏和头肾中的病毒载量显著低于对照组($P < 0.01$) (图4A和4B)。如图5所示,饲喂芽孢杆菌和

乳酸菌显著提高了大口黑鲈被LMBV感染后的存活率,各组的相对保护率都高于20%,其中BS04组相对保护率达到55.1%。以上数据表明,投喂芽孢杆菌和乳酸菌饲料可以抑制大口黑鲈组织中LMBV的复制,并提高大口黑鲈被LMBV感染后的存活率。



**代表与对照组相比差异极显著。 ** represent a highly significant difference compared to the control group.

图4 LMBV 攻毒后大口黑鲈脾脏(A)和头肾(B)中 MCP 基因的表达量

Fig. 4 Expression of MCP gene in the spleen (A) and head kidney (B) of largemouth bass after LMBV challenge

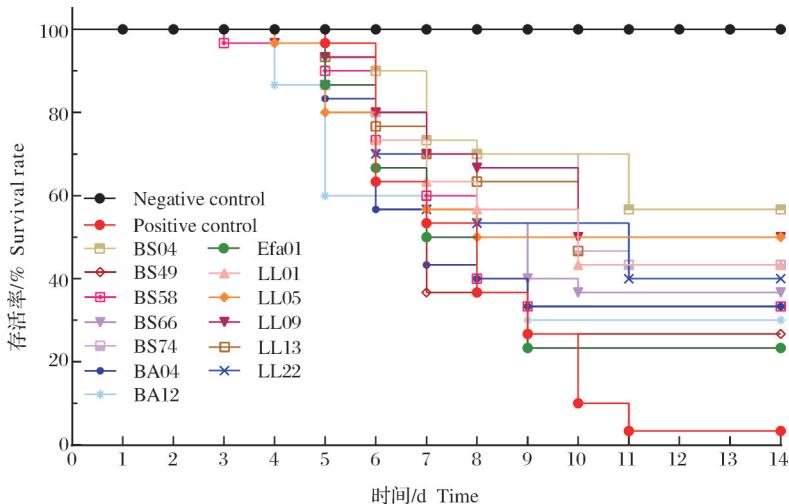


图5 LMBV 攻毒后大口黑鲈的存活率

Fig. 5 The survival rate of largemouth bass after LMBV challenge

3 讨 论

芽孢杆菌和乳酸菌都具有促进水生动物生长和抗病毒能力^[10-19],但从大口黑鲈肠道中分离具有抗LMBV能力的芽孢杆菌和乳酸菌未见报道。本研究从大口黑鲈的肠道中分离芽孢杆菌和乳酸菌,通过溶血试验、药敏试验、产酶和产酸试验以及肠道定殖试验对其进行筛选,再将筛选得到的菌株添加到饲料中投喂大口黑鲈,得到促进大口黑鲈生长、增强免疫应答并提高其抗LMBV能力的菌株。

由于益生菌中耐药基因具有传播潜力,使用前需评估益生菌对抗生素的敏感性,以保障其在水产养殖过程中安全使用。有研究指出从克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)肠道分离的枯草芽孢杆菌A23对青霉素、卡那霉素、头孢噻肟、头孢拉定、庆大霉素、强力霉素、四环素等多种抗生素均敏感^[24]。类似地,从罗非鱼肠道分离的热带芽孢杆菌A2对卡那霉素、链霉素、四环素和氯霉素敏感,但对青霉素耐药^[25]。本研究的抗生素敏感性试验结果显示大多数

芽孢杆菌对卡那霉素、庆大霉素、氯霉素和四环素等多种抗生素敏感,表明鱼源芽孢杆菌可能携带较少的耐药基因。相比之下,乳酸菌对更多的抗生素耐药,这一现象与伍元植等^[26]的研究发现一致,该研究从石斑鱼肠道分离的粪肠球菌和乳酸乳球菌同样对庆大霉素、卡那霉素、氧氟沙星和链霉素等多种抗生素耐药,另外,由于大部分乳酸菌缺乏β-内酰胺酶编码基因,导致其对头孢类抗生素敏感,本研究也证实了这一结论。

芽孢杆菌能够产多种消化酶,当其作为饲料添加剂使用时,能够促进鱼类的生长。在本研究中,34株枯草芽孢杆菌和7株解淀粉芽孢杆菌能够产蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶。朱静静等^[20]鉴定了从大口黑鲈肠道分离的21株芽孢杆菌的产酶能力,与本研究的结果类似,大部分菌株产蛋白酶能力要强于产淀粉酶能力。Xu等^[24]研究了7株芽孢杆菌的产蛋白酶和淀粉酶能力,也得到了类似的结论。枯草芽孢杆菌能够产生消化酶并增强尼罗罗非鱼和黄颡鱼的

生长性能^[10,13],因此本研究选取了5株枯草芽孢杆菌和2株解淀粉芽孢杆菌来评估它们对大口黑鲈生长的影响,结果显示4株枯草芽孢杆菌和2株解淀粉芽孢杆菌显著提高大口黑鲈的生长性能。Xia等^[23]也鉴定出一种能够产多种消化酶的枯草芽孢杆菌BSG-2,与本研究的菌株相比,其产蛋白酶能力较弱,但产淀粉酶和纤维素酶能力较强,这种差异可能是由于来源于不同环境的芽孢杆菌所进化出的环境适应性不同导致。得益于BSG-2强大的产淀粉酶和纤维素酶能力,将其添加到饲料中投喂大口黑鲈后也起到了促进生长的作用。上述结果表明,芽孢杆菌通过其产酶功能显著促进了鱼类的生长,这可能是其益生作用的关键机制之一。

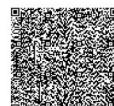
乳酸菌能够产生多种有机酸发挥其益生作用。王楠等^[27]筛选的草鱼源植物乳杆菌在培养24 h后菌液pH可达到3.5左右,低于本研究中乳酸菌培养24 h后的pH,这是由于与其他乳酸菌相比植物乳杆菌的活菌数较高,分解葡萄糖除了产生乳酸外,还可以产生大量的乙酸及其他有机酸^[28]。乳酸菌代谢产生的有机酸能够激活胃肠道消化酶活性,促进食物消化吸收^[9]。已有报道在饲料中添加乳酸菌可以提高虹鳟、鲤和草鱼的生长^[15-16]。本研究选取6株具备产酸能力的乳酸菌添加到饲料中,结果显示5株乳酸乳球菌可以显著促进大口黑鲈的生长,与上述研究结果一致。同时也有报道称乳酸菌进入肠道,还可以通过调节肠道菌群,产生维生素、氨基酸、生长激素等代谢物,改善鱼类肠道结构等促进鱼体生长^[29],因此,乳酸菌的促生长作用不仅限于产酸,可能是多种机制共同作用的结果。

IFN- γ 具有抑制病毒复制的功能,IL-1 β 、IL-8和TNF- α 作为促炎因子能够诱导炎症发生以及抵抗病原菌和病毒的入侵^[20]。本研究对投喂芽孢杆菌和乳酸菌饲料的大口黑鲈脾脏和头肾中IFN- γ 、IL-1 β 、IL-8和TNF- α 进行检测,发现BS04、BS49和LL13显著上调了这4种免疫相关基因在脾脏和头肾中的表达。与本研究的结果类似,Zhu等^[30]研究发现投喂解淀粉芽孢杆菌T-5显著上调了金鱼(*Carassius auratus*)脾脏中IL-1 β 、TNF- α 和IFN- γ 的表达,并提高了其抗维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)的能力。同样,有研究也发现在饲料中添加乳酸乳球菌可以显著上调乌鳢(*Channa argus*)脾脏和头肾中IL-1 β 、TNF- α 和IFN- γ 的表达,增强了其抵御病原菌感染的能力^[31]。由此推测,芽孢杆菌和乳酸菌投喂后可

以激活鱼体免疫因子的表达,增强鱼体的免疫力和抗病力。然而,本研究仅检测了免疫因子的转录水平,未来需进一步评估这些免疫因子的蛋白表达及免疫细胞活性。

在饲喂含有芽孢杆菌和乳酸菌的饲料30 d后,用LMBV对大口黑鲈进行攻毒,所有试验组的相对保护率均超过20%,并且显著降低了大口黑鲈脾脏和头肾中的病毒载量。本研究中分离获得的BS04显著上调了大口黑鲈脾脏和头肾中关键抗病毒免疫因子IFN- γ 和IL-1 β 的表达,并且显著抑制了组织中LMBV的复制,表明BS04通过激活先天免疫反应和抑制病毒复制,发挥出高效的抗病毒作用,并获得了最高的相对保护率。该菌株具有安全性高、产酶能力强、能促进大口黑鲈生长、增强其免疫力和抗LMBV能力的特性,具备开发成为水产饲料添加剂的潜力。

本文的附加材料见网络版



参考文献 References

- [1] DONG J J, ZHANG H T, WANG Z Y, et al. High temperature exposure causes sexual dimorphism in immune responses against largemouth bass ranavirus (LMBV) in *Micropterus salmoides* [J/OL]. Aquaculture, 2024, 592: 741239 [2025-01-13].<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741239>.
- [2] ZHU C K, LIU D, WANG W J, et al. Pathogenicity characterization, immune response mechanisms, and antiviral strategies analysis underlying a LMBV strain in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J/OL]. Aquaculture reports, 2024, 36: 102133 [2025-01-13].<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102133>.
- [3] ZHAO L N, ZHONG Y, LUO M J, et al. Largemouth bass ranavirus: current status and research progression [J/OL]. Aquaculture reports, 2023, 32: 101706 [2025-01-13].<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101706>.
- [4] CASELLI M. Actual concept of “probiotics”: is it more functional to science or business? [J/OL]. World journal of gastroenterology, 2013, 19(10): 1527 [2025-01-13].<https://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i10.1527>.
- [5] DARGAHI N, JOHNSON J, DONKOR O, et al. Immuno-modulatory effects of probiotics: can they be used to treat allergies and autoimmune diseases? [J]. Maturitas, 2019, 119: 25-38.
- [6] EVANGELISTA A G, CORRÊA J A F, PINTO A C M S, et al. Recent advances in the use of bacterial probiotics in animal production [J]. Animal health research reviews, 2023, 24(2): 41-53.
- [7] KE X L, LIU Z G, ZHANG M Y, et al. A *Bacillus cereus* NY5

- strain from *Tilapia* intestine antagonizes pathogenic *Streptococcus agalactiae* growth and adhesion *in vitro* and *in vivo* [J/OL]. Aquaculture, 2022, 561: 738729 [2025-01-13]. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738729>.
- [8] JEBUR H A, AUDA J. Evaluation of antimicrobial activity of partial purified bacteriocin from local isolate of *Bacillus licheniformis* hJ2020 Mt192715.1 [J]. Iraqi journal of agricultural sciences, 2020, 51(6): 1644-1652.
- [9] CHIZHAYEVA A, AMANGELDI A, OLENIKOVA Y, et al. Lactic acid bacteria as probiotics in sustainable development of aquaculture [J/OL]. Aquatic living resources, 2022, 35: 10 [2025-01-13]. <https://doi.org/10.1051/alr/2022011>.
- [10] HOU T L, TANG Z X, WANG Z B, et al. Evaluation of the potential probiotic *Bacillus subtilis* isolated from darkbarbel catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) on growth performance, serum immunity, and disease resistance of *Aeromonas hydrophila* [J]. Journal of fish biology, 2025, 106(2): 114-124.
- [11] LIN Y T, HUNG Y C, CHEN L H, et al. Effects of adding *Bacillus subtilis* natto NTU-18 in paste feed on growth, intestinal morphology, gastrointestinal microbiota diversity, immunity, and disease resistance of *Anguilla japonica* glass eels [J/OL]. Fish & shellfish immunology, 2024, 149: 109556 [2025-01-13]. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109556>.
- [12] LIU C H, CHIU C H, WANG S W, et al. Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides* [J]. Fish & shellfish immunology, 2012, 33(4): 699-706.
- [13] LIU H T, WANG S F, CAI Y, et al. Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Fish & shellfish immunology, 2017, 60: 326-333.
- [14] WANG C, HU X D, TANG H J, et al. Multiple effects of dietary supplementation with *Lactobacillus reuteri* and *Bacillus subtilis* on the growth, immunity, and metabolism of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J/OL]. Developmental & comparative immunology, 2024, 160: 105241 [2025-01-13]. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2024.105241>.
- [15] GHASEMPOUR DEHAGHANI P, JAVAHERI BABOLI M, TAGHAVI MOGHADAM A, et al. Effect of symbiotic dietary supplementation on survival, growth performance, and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings [J]. Czech journal of animal science, 2015, 60(5): 224-232.
- [16] 李瑞, 王劲松, 高梦祥. 乳酸菌对鱼类生长影响研究进展 [J]. 水产学杂志, 2022, 35(1): 97-106. LI R, WANG J S, GAO M X. Advances in effects of *Lactobacillus* on growth of fish: a review [J]. Chinese journal of fisheries, 2022, 35(1): 97-106 (in Chinese with English abstract).
- [17] WAIYAMITRA P, ZORAL M A, SAENGTIENCHAI A, et al. Probiotics modulate *Tilapia* resistance and immune response against tilapia lake virus infection [J/OL]. Pathogens, 2020, 9 (11) : 919 [2025-01-13]. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110919>.
- [18] HARIKRISHNAN R, BALASUNDARAM C, HEO M S. Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV) [J]. Fish & shellfish immunology, 2010, 29(5): 868-874.
- [19] SON V M, CHANG C C, WU M C, et al. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides* [J]. Fish & shellfish immunology, 2009, 26(5): 691-698.
- [20] 朱静静, 张永安, 涂加钢. 加州鲈肠道芽孢杆菌的筛选及其功能研究 [J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(5): 213-223. ZHU J J, ZHANG Y A, TU J G. Screening and functional study of *Bacillus* from intestines of largemouth bass [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2024, 43(5) : 213-223 (in Chinese with English abstract).
- [21] ZHU Y T, LI W, ZHANG M Q, et al. Screening of host gut-derived probiotics and effects of feeding probiotics on growth, immunity, and antioxidant enzyme activity of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) [J/OL]. Fish & shellfish immunology, 2023, 136: 108700 [2025-01-13]. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108700>.
- [22] AMOAH K, DONG X H, TAN B P, et al. *In vitro* assessment of the safety and potential probiotic characteristics of three *Bacillus* strains isolated from the intestine of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) [J/OL]. Frontiers in veterinary science, 2021, 8: 675962 [2025-01-13]. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.675962>.
- [23] XIA L, CHENG G F, WANG P, et al. Screening and identification of probiotics from the intestinal tract of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) for use as a feed additive and bacterial infection control [J/OL]. Aquaculture, 2024, 584: 740661 [2025-01-13]. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740661>.
- [24] XU L L, YUAN J F, CHEN X X, et al. Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the digestive enzyme activity, immune, intestinal flora and WSSV resistance of *Procambarus clarkii* [J/OL]. Aquaculture, 2021, 540: 736748 [2025-01-13]. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736748>.
- [25] ATHULYA P A, CHANDRASEKARAN N, THOMAS J. *Bacillus* spp. isolated from intestine of *Oreochromis mossambicus*: identifying a potential probiotic for tilapia culture [J/OL]. Aquaculture reports, 2024, 36: 102067 [2025-01-13]. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102067>.
- [26] 伍元植, 韦光本, 简纪常, 等. 斜带石斑鱼肠道乳酸菌的分离、鉴定及特性分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(10): 4447-4455. WU Y Z, WEI G B, JIAN J C, et al. Isolation, iden-

- tification and characteristics of lactic acid bacteria from intestine of *Epinephelus coioides* [J]. Genomics and applied biology, 2019, 38(10): 4447-4455 (in Chinese with English abstract).
- [27] 王楠, 尹纪元, 王英英, 等. 草鱼源乳酸菌的分离鉴定及其生物学特性研究 [J]. 南方水产科学, 2021, 17(6): 74-84.
- WANG N, YIN J Y, WANG Y Y, et al. Isolation, identification and biological characteristics of *Lactobacillus* from grass carp [J]. South China fisheries science, 2021, 17(6): 74-84 (in Chinese with English abstract).
- [28] 肖仔君, 钟瑞敏, 陈惠音, 等. 植物乳杆菌的生理功能与应用 [J]. 中国食品添加剂, 2005, 16(2): 87-89. XIAO Z J, ZHONG R M, CHEN H Y, et al. Application and physiological function of *L. plantarum* [J]. China food additives, 2005, 16(2): 87-89 (in Chinese with English abstract).
- [29] 孟晓林, 李文均, 聂国兴. 鱼类肠道菌群影响因子研究进展 [J]. 水产学报, 2019, 43(1): 143-155. MENG X L, LI W J, NIE G X. Effect of different factors on the fish intestinal microbiota [J]. Journal of fisheries of China, 2019, 43(1): 143-155 (in Chinese with English abstract).
- [30] ZHU X K, YANG B T, HAO Z P, et al. Dietary supplementation with *Weissella cibaria* C-10 and *Bacillus amyloliquefaciens* T-5 enhance immunity against *Aeromonas veronii* infection in crucian carp (*Carassius auratus*) [J/OL]. Microbial pathogenesis, 2022, 167: 105559 [2025-01-13]. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105559>.
- [31] KONG Y D, GAO C S, DU X Y, et al. Effects of single or conjoint administration of lactic acid bacteria as potential probiotics on growth, immune response and disease resistance of snakehead fish (*Channa argus*) [J]. Fish & shellfish immunology, 2020, 102: 412-421.

Screening of intestinal probiotics and effects on host growth performance, immune, and LMBV resistance in largemouth bass

JIANG Xiangyu, LÜ Yinuo, ZHANG Yongan, TU Jiagang

*State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Fisheries,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract To identify probiotics that promote the growth of largemouth bass and enhance their resistance to largemouth bass ranavirus (LMBV), this study isolated *Bacillus* and *Lactobacillus* strains from the intestines of largemouth bass. The strains were selected based on hemolysis tests, antimicrobial susceptibility tests, enzyme production, acid production experiments, as well as colonization experiments in the largemouth bass intestine. Finally, 5 strains of *Bacillus subtilis* (BS04, BS49, BS58, BS66, and BS74), 2 strains of *Bacillus amyloliquefaciens* (BA04 and BA12), 1 strain of *Enterococcus faecalis* (Efa01), and 5 strains of *Lactococcus lactis* (LL01, LL05, LL09, LL13, and LL22) were incorporated into feed respectively and administered to largemouth bass for 30 days to evaluate their effects on growth performance and resistance to LMBV. The results showed that BS04, BS49, BS66, BS74, BA04, BA12, LL01, LL05, LL09, LL13, and LL22 significantly increased the percentage weight gain and specific growth rate of largemouth bass, while significantly reducing their feed conversion ratio. The expression of 4 immune factors (*IFN-γ*, *IL-1β*, *IL-8*, and *TNF-α*) in the spleen and head kidney of largemouth bass in the BS04, BS49, and LL01 groups was significantly increased. The viral load in the spleen and head kidney of each experimental group was significantly reduced after the LMBV challenge, and the relative protection rate was higher than 20%, with the highest relative protection rate observed in the BS04 group at 55.1%. In conclusion, *Bacillus subtilis* BS04 isolated in this study can effectively improve the growth performance, immune response, and resistance to LMBV in largemouth bass, demonstrating its potential as a feed additive.

Keywords largemouth bass; *Bacillus*; *Lactobacillus*; growth promotion; anti-LMBV

(责任编辑:边书京)