



饲用枯草芽孢杆菌 HGcc-1 对鲤肠肝健康、血清补体及肠道菌群的影响

胡娟¹, 高辰辰¹, 药园园¹, 郝强¹, 周伟¹,
冉超², 周志刚¹, 杨雅麟^{2*}, 张震^{2*}

(1. 中国农业科学院饲料研究所, 中国-挪威鱼类消化道微生物联合实验室, 北京 100081;

2. 中国农业科学院饲料研究所, 农业农村部饲料生物技术重点开放实验室, 北京 100081)

摘要: 为了研究枯草芽孢杆菌 HGcc-1 对鲤肠肝健康、血清补体和肠道菌群的影响, 实验选择体质量为 (13.10±0.39) g 健康鲤, 随机分为 HGcc-1 添加组和对照组, 养殖 20 周后测定生长指标, 用试剂盒检测了鲤血清内毒素 (LPS)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、总补体和溶菌酶, 并对肠道菌群进行了 16S *rRNA* 测序, 同时将添加组和对照组的肠道菌群转接至无菌斑马鱼, 然后检测无菌斑马鱼体内毒素结合蛋白 (LBP)、ALT、AST 的水平和 C3、C4 基因表达量; 最后还检测了 HGcc-1 直接作用于无菌斑马鱼时, 无菌斑马鱼的 ALT、AST 的水平和 C3、C4 基因表达量。结果显示, HGcc-1 对鲤的增重率无显著影响; 与对照组相比, 饲料中添加 HGcc-1 显著降低鲤血清内毒素、ALT 和 AST 水平; 同时 HGcc-1 添加组血清总补体水平显著升高。在门水平上, HGcc-1 添加组中梭杆菌门丰度比对照组增加了 47.1%; 变形菌门丰度比对照组减少了 70.7%; 在属水平上, HGcc-1 添加组中鲸杆菌属 (的丰度比对照组增加了 47.1%; 柠檬酸杆菌属和气单胞菌属 (的丰度比对照组分别减少了 56.6% 和 70.9%)。利用无菌斑马鱼模型进一步发现, HGcc-1 添加组鲤肠道菌群显著降低了无菌斑马鱼 LBP 含量和 AST 水平, 显著上调了无菌斑马鱼补体 C3 和 C4 基因表达; 与此同时, HGcc-1 与无菌斑马鱼直接互作也降低了鱼体 ALT 和 AST 水平。研究表明, 饲料中添加枯草芽孢杆菌 HGcc-1 能够改善鲤肠肝健康、血清补体以及肠道菌群稳态。本研究为枯草芽孢杆菌 HGcc-1 的下一步应用奠定了理论基础。

关键词: 鲤; 枯草芽孢杆菌 HGcc-1; 肠道菌群; 血清补体; 肝脏健康

中图分类号: S 963.7

文献标志码: A

鲤 (*Cyprinus carpio*) 是主要的淡水养殖有鳍鱼类之一, 占世界有鳍鱼类总产量的 8%^[1]。2019 年, 我国鲤总产量已超过 200 万 t^[2]。为了满足市场需求, 规模化和集约化养殖模式发展迅速,

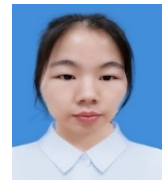
但同时也存在许多问题需要解决, 比如一些植物蛋白代替鱼粉不仅会降低鱼的生长性能, 而且导致血清谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 活性水平显著升高^[3], 造成鱼体肝脏损伤^[4]。不

收稿日期: 2021-03-19 修回日期: 2021-04-25

资助项目: 国家自然科学基金 (31925038, 31972807, 31872584, 31802315); 北京现代农业产业技术体系专项 (SCGWZJ20211104-4); 陕西省创新能力支撑计划项目 (2018TD-021)

第一作者: 胡娟 (照片), 从事水产土著益生菌的筛选与应用研究, E-mail: 1816651032@qq.com

通信作者: 杨雅麟, E-mail: yangyalin@caas.cn; 张震, E-mail: zhangzhen@caas.cn



合理的养殖方式和饲料配方结构也会导致水产动物肠道菌群失调^[5-6], 肠道菌群在营养代谢和维持健康过程中发挥着重要作用^[7], 肠道菌群的紊乱可导致宿主由革兰氏阴性细菌产生的内毒素(LPS)含量显著增加, 并且LPS的脂质A成分可能过度刺激巨噬细胞和内皮细胞产生促炎因子^[8]。简而言之, 不当的养殖方法和饲料会使养殖鱼类更易受到环境中病原菌的侵害^[9-11], 最终导致产量下降。

饲料中补充益生菌可能是解决上述问题的方法之一^[12], 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是水产养殖中极具潜力的益生菌菌种, 已经广泛应用在水产养殖中, 并且有相关研究证明枯草芽孢杆菌作为饲料添加剂时能够提高水产动物的生长性能、抗病能力、免疫功能和抗氧化能力, 同时还具有改善肠道菌群、调节脂肪代谢等功能^[13-16]。但是, 对于肠道菌群与宿主健康的联系关系方面的研究还较少, 对其进行深入研究有助于我们对其益生功能的全面理解, 从而使其更好地服务于水产养殖。无菌斑马鱼(*Danio rerio*)模型是研究肠道微生物与鱼类宿主互动的重要模型^[17]。一些研究已经使用无菌斑马鱼模型来研究饲料中添加益生菌或益生元诱导的肠道菌群对宿主生长性能、免疫能力和抗病性的影响^[18-19]。本研究结合无菌斑马鱼模型探讨了饲料中添加枯草芽孢杆菌HGcc-1对鲤肠肝健康、血清补体以及肠道菌群的影响, 为鲤可持续养殖提供指导。

1 材料与方法

1.1 菌株和饲料准备

枯草芽孢杆菌HGcc-1由本实验室前期保存(分离自罗非鱼肠道), 使用固体发酵: 40%麸皮, 60%豆粕, 加水使其含水量为60%, 浸泡2 h, 水中添加6%葡萄糖、4%酵母粉和0.1%硫酸锰, 调节pH值为7.5, 121 °C、高压蒸汽灭菌20 min。将种子菌液接种于固体发酵培养基, 接种量5% (体积百分数), 30 °C培养96 h。发酵物中HGcc-1含量大于等于 1×10^{10} CFU/g。

制备了基础饲料和添加HGcc-1的饲料, 基础饲料的成分如表1所示, 根据前期预实验, 添加量为0.3 g/kg的组比添加量为0.2 g/kg的增重率更高, 所以选择添加剂量为0.3 g/kg进行正式实验。

表1 饲料原料组成及化学成分

Tab. 1 Feed ingredient composition and chemical composition

项目 items	HGcc-1组 HGcc-1 group	对照组 control
成分/(g/kg) ingredient		
米糠 rice bran	100	100
面粉 wheat flour	200	200
豆粕 soybean meal	200	200
菜籽粕 rapeseed meal	130	130
国产鱼粉 domestic fish meal	80	80
鸡肉粉 Chicken powder	80	80
猪肉粉 pork powder	40	40
酒糟 DDGS	100	100
枯草芽孢杆菌 HGcc-1	0.3	0
膨润土 bentonite	4.7	5.0
赖氨酸盐酸盐 lysine	2	2
蛋氨酸 methionine	0.5	0.5
氯化胆碱(50%) choline chloride	2	2
磷酸二氢钙 monocalcium phosphate	20	20
豆油 bean oil	30	30
Vc磷酸酯 Vc lecithin	0.5	0.5
1%鱼预混料 1% fish premix feed ^[18-19]	10	10
总和 total	1 000	1 000
主要营养成分(干物质) main nutrients		
粗蛋白质/% crude protein	36.00	36.63
粗脂肪/% crude lipid	8.38	9.12
水分/% moisture	7.07	6.54
灰分/% ash	8.29	8.41

1.2 养殖实验

实验鲤购自河北省唐山市鲤鱼种场, 并置于90 L的水箱循环系统中。经暂养超过14 d以上, 选择体质量为(13.10±0.39) g健康鲤, 随机分为HGcc-1组和对照组。HGcc-1组以HGcc-1添加饲料投喂, 而对照组以基础饲料投喂, 投喂持续20周。每组随机分配3个重复缸, 第1周的喂食量为体质量的3%, 之后每周在原来的基础上增加2%, 每天投喂3次(早上8:00, 中午12:00, 下午18:00)。在饲养期间, 水温平均26.5 °C、

溶解氧含量>6.0 mg O/L、pH 7.0~7.2 及氨氮含量<0.02 mg/L。养殖实验在中国农业科学院国际农业高新技术产业园中国-挪鱼类消化道微生物联合实验室饲料与养殖评价基地进行。

1.3 生长指标测定

最后一次喂食结束后, 将鱼禁食 24 h, 测定其体质量, 生长指标计算方法:

存活率 (survival rate, SR, %)= $N_t/N_0 \times 100\%$

增重率 (weight gain rate, WGR, %)= $(W_t - W_0) / W_0 \times 100\%$

饲料系数 (feed conversion ratio, FCR)= $W_f / (W_t - W_0)$

日摄食率 (daily feeding rate, DFR, %)= $W_f / [t \times (W_t + W_0) / 2]$

式中, N_t 为终末尾数, N_0 为初始尾数, W_t 为终末质量 (g), W_0 为初始重量 (g), W_f 为总摄食量, t 为实验天数 (d)。

1.4 血清取样及相关指标测定

对禁食 24 h 的鱼进行尾静脉取血, 取出的血在 4 °C 下放置 10 min, 然后 4 000 r/min 离心 10 min, 收集上层血清。根据检测试剂盒 (南京建成生物科技有限公司) 的操作说明检测 LPS、ALT、AST、总补体及溶菌酶。

1.5 肠道菌群 16S rRNA 测序

通过 16S rRNA 测序评估肠道菌群结构, 在最后一次进食后 4 h 取样肠道内容物 ($n=6$), 16S rRNA 测序在上海美吉生物医药科技有限公司 (中国) 通过 Illumina MiSeq PE300 平台完成的, 所用引物为 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。使用 fastp 软件对原始测序序列进行质控, 使用 FLASH 软件进行拼接。使用 UPARSE 根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类。利用 RDP classifier 对每条序列进行物种分类注释, 比对

Silva 16S rRNA 数据库 (v138)^[18-19]。

1.6 无菌斑马鱼菌群间接作用和 HGcc-1 对无菌斑马鱼直接作用

无菌斑马鱼的准备按照 Rawls 等^[17]和 Guo 等^[20]的操作流程进行。菌群转接: 最后一次投喂结束 4 h 后, 取对照组和 HGcc-1 添加组鲤的肠道内容物, 每 3 尾鱼作为一个样本, 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 溶解, 均按照 10^6 CFU/mL 浓度转接无菌斑马鱼 ($n=6$), 并于 28 °C 培养 72 h 后取样。单菌直接作用: 将活化的 HGcc-1 菌液加到含有 30 尾无菌斑马鱼 (受精后第 4 天) 的 T25 细胞培养瓶中, 使其终浓度为 10^6 CFU/mL, 对照组不加菌, 在 28 °C 处理 48 h 后取样。

1.7 无菌斑马鱼取样和相关指标测定

从每个 T25 细胞培养瓶中收集 15 尾无菌斑马鱼作为一个样, 加入 400 μ L 生理盐水, 在冰浴中匀浆, 以 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 然后根据内毒素 (LPS)、体内毒素结合蛋白 (LBP)、ALT 及 AST 试剂盒 (南京建成生物技术有限公司) 的说明进行测定。

1.8 无菌斑马鱼荧光定量

用 TRIzol 试剂 (江苏康为世纪生物技术有限公司) 提取无菌斑马鱼全鱼 RNA, 使用 FastKing 一步法去除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂 [天根生化科技 (北京) 有限公司] 提取第一链互补 DNA (cDNA)。使用 SYBR Green Supermix [天根生化科技 (北京) 有限公司] 在 LightCycler 480 (Roche) 上进行荧光定量 PCR (qPCR 引) 反应, 引物列于表 2。

1.9 数据分析

所有统计数据均以均值 \pm 标准误 (mean \pm SE) 表示。所有结果作图均在 GraphPad Prism Version 8 软件中进行。T 检验用于比较 2 组数据之间的差异。差异显著水平为 $P < 0.05$, 考虑到巨大个体

表 2 qPCR 引物

Tab. 2 Primer sequences of qPCR

基因 gene	正向引物 (5'-3') forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') reverse primer (5'-3')
C3	ATGAAGGTGGAGAAGACGGTG	CTCACTCGGCAACTGGGAC
C4	CTGTTGGAGGAGGAGAGGATTC	GGTGCTCTCCTGACACGATTG
β -actin	GAAGTGTGGTGGACATCCGTAA	AGACTCATCGTACTCCTGCTTGCT

差异, 针对肠道菌群丰度差异显著水平设为 $P < 0.2$; 文中 *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$, ****表示 $P < 0.0001$ 。

2 结果

2.1 HGcc-1 对鲤生长性能影响

20 周养殖实验结束后, 统计了鲤的存活率、增重率、饲料系数和日摄食率。结果显示, 添加组和对照组的增重率和饲料系数没有显著差异, 同时 HGcc-1 对存活率没有影响 (表 3)。

2.2 HGcc-1 对鲤血清 LPS、ALT 及 AST 的影响

HGcc-1 添加组的 LPS、ALT、AST 分别为 (0.05 ± 0.01) EU/mL、 (10.25 ± 0.93) U/L 和 (28.97 ± 2.10) U/L, 对照组的 LPS、ALT、AST 分别为 (0.16 ± 0.04) EU/mL、 (12.60 ± 1.59) U/L 和 (72.52 ± 20.73) U/L; 与对照组相比, HGcc-1 添加组显著降低了鲤血清中 LPS、ALT 和 AST 水平 ($P < 0.05$) (图 1)。

2.3 HGcc-1 对鲤血清补体水平的影响

与对照组相比, HGcc-1 添加极显著提高了

鱼体血清总补体水平 ($P < 0.01$), 使总补体增加了 0.51 IU/mL (图 2-a)。对照组和 HGcc-1 添加组溶菌酶含量分别为 (5.45 ± 2.34) $\mu\text{g/mL}$ 和 (3.09 ± 2.92) $\mu\text{g/mL}$ (图 2-b), 但没有显著性差异。

2.4 HGcc-1 对鲤肠道菌群结构的影响

16S *rRNA* 测序结果显示 HGcc-1 添加显著改变了鲤肠道菌群结构。在门水平, 梭杆菌门 (*Fusobacteriota*)、变形菌门 (*Proteobacteria*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 在 2 个组中都为优势菌群。HGcc-1 添加组中梭杆菌门的丰度比对照组增加了 47.1% ($P < 0.20$); 变形菌门丰度比对照组减少了 70.7% (图 3, 表 4; $P < 0.20$)。在属水平, 鲸杆菌属 (*Cetobacterium*)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*) 和拟杆菌属 (*Bacteroides*) 在 2 个组中都为优势菌群, HGcc-1 添加组中鲸杆菌属的丰度比对照组增加了 47.1% ($P < 0.20$); 柠檬酸杆菌和气单胞菌属 (*Aeromonas*) 的丰度比对照组分别减少了 56.6% 和 70.9% (图 4, 表 5; $P < 0.20$), 拟杆菌属的丰度在 2 个组之间没有显著差异 (图 4)。后续对肠道菌群组成进行了 PCA 分析, 结果显示 2 组肠道菌群组成有显著差异 (图 5)。

表 3 鲤的生长性能和饲料利用率

Tab. 3 Growth performance and feed utilization of *C. carpio*

组别 groups	存活率/% survival rate	增重率/% weight gain rate	饲料系数 feed conversion ratio	日摄食率/(%/d) daily feeding rate
HGcc-1	100	954.31 ± 38.70	1.36 ± 0.04	1.61 ± 0.04
CK	100	992.54 ± 48.61	1.34 ± 0.05	1.59 ± 0.05

注: 值代表 6 次重复的平均值 (mean \pm SE), 下同

Notes: Data represents the means (mean \pm SE) of six replicates of each treatment; the same below

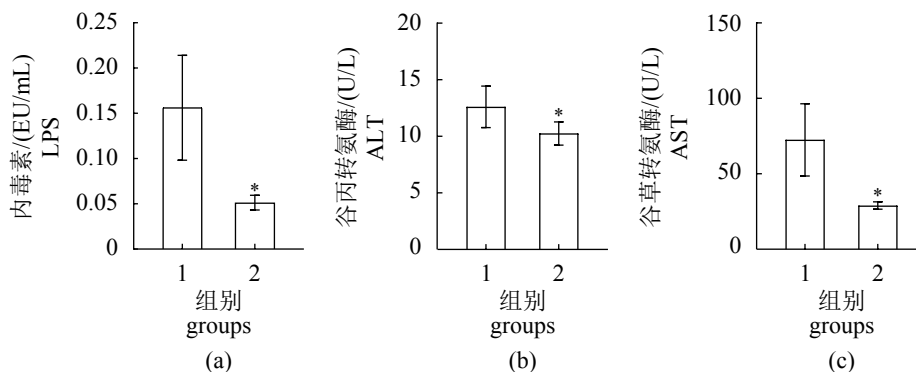


图 1 HGcc-1 对鲤血清 LPS (a)、ALT (b) 和 AST (c) 的影响

1. 基础饲料投喂组, 2. HGcc-1 添加组, 值代表 6 次重复的平均值 (mean \pm SE); $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) 和 $P < 0.001$ (***); 下同

Fig. 1 The effect of HGcc-1 on *C. carpio* serum LPS (a), ALT (b) and AST (c)

1. basic feed diet 2. HGcc-1 supplement diet, data represents the means (mean \pm SE) of six replicates of each treatment; $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***); the same below

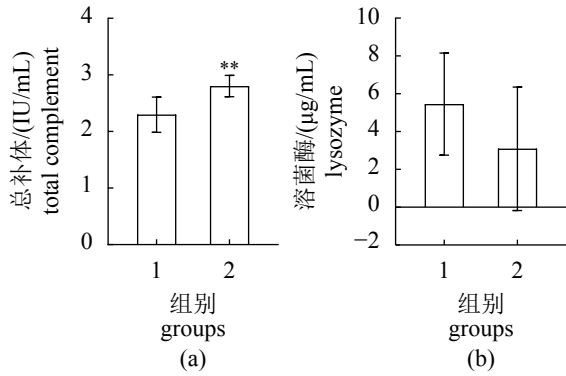


图 2 HGcc-1 对鲤血清总补体 (a) 和溶菌酶 (b) 的影响
 Fig. 2 The effect of HGcc-1 on total complement (a) and lysozyme (b) of *C. carpio* serum

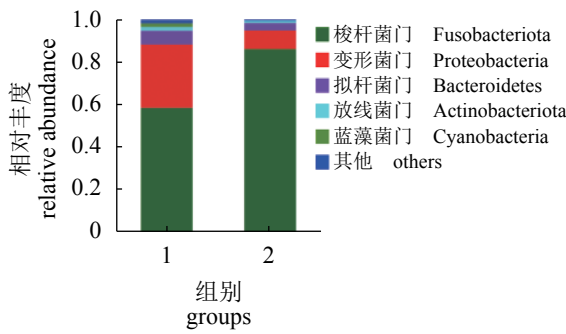


图 3 鲤肠道菌群在门水平上的相对丰度
 Fig. 3 The relative abundance of *C. carpio* gut microbiota at the phylum level

2.5 HGcc-1 诱导的肠道菌群改善了无菌斑马鱼肠肝健康及补体水平

LBP 是体内 LPS 的转运受体, LBP 含量是反应 LPS 水平的重要指标, 无菌斑马鱼实验中, 在无法采血的情况下, 检测了鱼体内 LBP 水平。对照组和 HGcc-1 添加组无菌斑马鱼的 LBP 含量分别为 (126.44±16.02) μmol/g pro 和 (99.77±6.24)

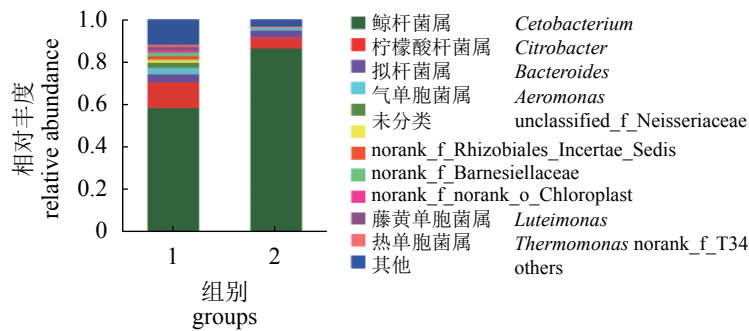


图 4 鲤肠道菌群在属水平上的相对丰度
 Fig. 4 The relative abundance of *C. carpio* gut microbiota at the genus level

表 4 不同饲料投喂鲤后肠道菌群中主要门的相对丰度

Tab. 4 The relative abundance of the main phyla in the intestinal microbiota of *C. carpio* fed with different diets

细菌门 bacterial phylum	对照组/% control	HGcc-1 添加组/% HGcc-1 diet
梭杆菌门 Fusobacteriota	58.6±29.7	86.2±13.6*
变形菌门 Proteobacteria	29.7±25.0	8.7±6.6*
拟杆菌门 Bacteroidetes	6.5±4.8	3.6±6.9
放线菌门 Actinobacteriota	1.8±2.1	1.0±1.3
厚壁菌门 Firmicutes	0.7±0.7	0.4±0.3

注: *. 差异显著 (P<0.05); 下同
 Notes: *. significant difference, the same below

μmol/g pro (图 6-a; P<0.05); 对照组无菌斑马鱼 ALT 和 AST 活性分别为 (7.05±3.46) U/g pro 和 (87.77±15.87) U/g prot, HGcc-1 添加组分别为 (4.22±2.96) U/g pro 和 (66.22±7.26) U/g pro (图 6-b,c), 其中 AST 存在显著性差异 (P<0.05)。C3 是补体经典激活途径和替代激活途径的重要中心环节, C3 激活后才能进行后续补体成分的连锁反应, C3 的高低与总补体高低相平行; 而 C4 是补体经典激活途径的重要组成部分, 其高表达才能保证补体的有效激活^[21]; 因为在鲤血清检测到总补体显著升高, 所以在无菌斑马鱼实验中检测了 C3 和 C4 的表达量, 本研究结果发现 HGcc-1 添加组的肠道菌群显著上调了无菌斑马鱼 C3 和 C4 的表达量 (图 6-d,e; P<0.05)。

2.6 HGcc-1 通过直接作用改善无菌斑马鱼 ALT、AST 和补体水平

单菌处理无菌斑马鱼时, 鱼体内没有产生 LPS 的革兰氏阴性菌, 因此此处不测 LPS 和 LBP, 结果显示, 对照组无菌斑马鱼 ALT 和 AST 活性

表 5 不同饲料投喂鲤后肠道菌群中主要属的相对丰度

Tab. 5 The relative abundance of the main genera in the intestinal microbiota of *C. carpio* fed with different diets

细菌属 bacterial genus	对照组/% control	HGcc-1添加组/% HGcc-1 diet
鲸杆菌属 <i>Cetobacterium</i>	58.6±29.7	86.2±13.6*
柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	12.2±11.4	5.3±4.5*
拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>	3.5±3.3	3.4±6.6
气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	3.1±3.3	0.9±1.6

分别为 (12.42±3.68) U/g pro 和 (74.54±4.18) U/g pro, HGcc-1 添加组分别为 (6.63±1.72) U/g pro 和 (52.77±5.72) U/g pro (图 7-a,b)。C3 和 C4 基因的表达量在 2 组间没有显著差异 (图 7-c,d)。该结果表明, HGcc-1 通过直接作用降低了无菌斑马鱼的 ALT 和 AST 水平, 但是对 C3 和 C4 基因的表达没有影响。

3 讨论

本研究结果表明, HGcc-1 虽然没有显著提高鲤的生长性能, 但提高血清补体水平和改善肠肝健康的作用较为显著。HGcc-1 添加组可显著增加血清中的总补体含量。补体在先天免疫和适应性免疫中发挥着重要作用^[22], 并且是机体抵御病原体的第一道防线, 能够识别外来病原体然后激活补体级联反应以清除病原体^[23]。补体是鱼类固有免疫力的重要组成部分^[24], 补体含量增加表明 HGcc-1 可增强鱼类抵抗病原体的能力。

ALT 和 AST 是肝脏健康的重要指标^[25], 在本实验的结果中, HGcc-1 添加组的血清 ALT 和 AST 水平显著降低, 显著改善鲤肝脏的健康状态。革兰氏阴性细菌产生的 LPS 会通过刺激巨噬细胞和内皮细胞产生促炎因子来造成肠道损伤^[8], 血清 LPS 的含量是判断肠道健康的重要指标^[26], 本研究的结果显示, HGcc-1 添加组的 LPS 含量显著下降, 表明 HGcc-1 的添加改善了鲤的肠道健康。

肠道菌群与鱼类的生长和免疫密切相关。对于水产动物, 变形菌门中的许多物种被认为是有害菌, 梭杆菌门被认为是鱼类有益菌^[27-28]。本研究结果显示, 在门水平, 梭杆菌门、变形菌门和拟杆菌门在 2 组中均为优势菌群; 在属水平, 鲸杆菌属、柠檬酸杆菌属和拟杆菌属在 2 组中均为优势菌群。这与已经报道的研究结果相似^[29]。HGcc-1 添加组增加了梭杆菌门的丰度, 鲸杆菌属是梭杆菌门的重要成员, 据报道, 从淡水鱼的肠道中分离出的鲸杆菌能够产生维生素 B-12^[30], 维生素 B12 对红细胞的发育和机体新陈代谢至关重要^[31], 本研究表明 HGcc-1 添加组中鲸杆菌的丰度增加了 47.1%。同时 HGcc-1 添加使变形菌门的丰度减少了 70.7%, 在属水平上, 来自变形菌门的柠檬酸杆菌属和气单胞菌属的丰度分别减少了 56.6% 和 70.9%。有研究表明, 变形杆菌门的增加是疾病的潜在诊断标志^[32]。变形杆菌门中的气单胞菌属是水产养殖中的常见病原体, 严重危害水产动物的健康^[33-34], 柠檬酸

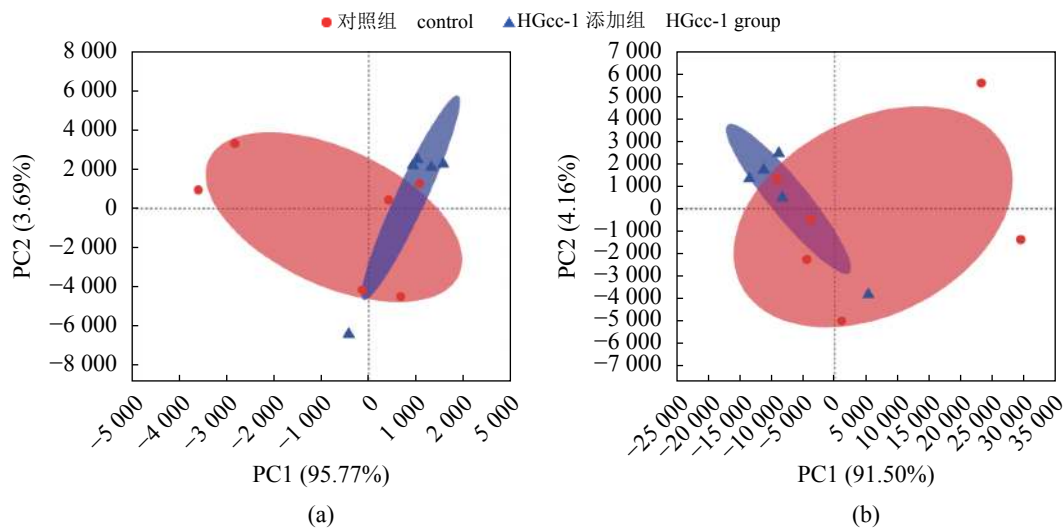


图 5 鲤肠道菌群在门水平 (a) 和属水平 (b) 上的 PCA 分析

Fig. 5 PCA analysis of common carp gut microbiota at the phylum level (a) and genus level (b)

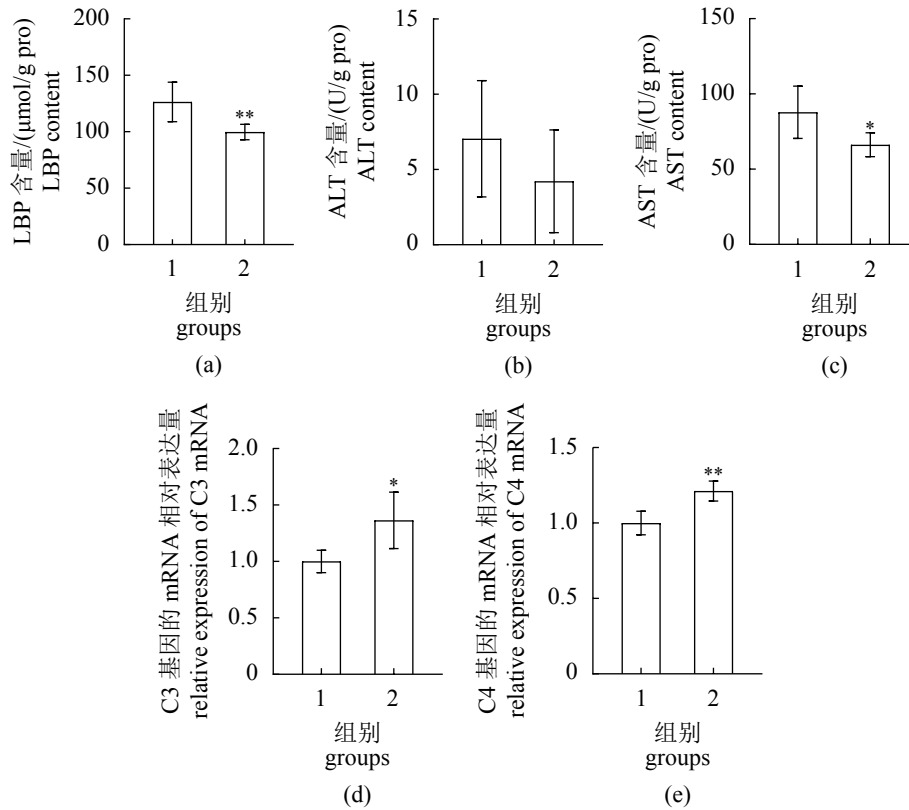


图 6 HGcc-1 添加饮食饲喂鲤所改变的肠道菌群对无菌斑马鱼 LBP (a)、ALT (b)、AST (c) 和补体 (d,e) 的影响
 1. 对照组肠道菌群处理无菌斑马鱼, 2. HGcc-1 添加组肠道菌群处理无菌斑马鱼; 值为 6 次重复的平均值 (mean±SE); $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) 和 $P < 0.001$ (***) ; 下同

Fig. 6 The effect of intestinal microbiota altered by feeding *C. carpio* with HGcc-1 supplement diet on LBP (a), ALT (b), AST (c) and complement (d,e) of GF *D. rerio*

1. the gut microbiota of the control group was treated with GF *D. rerio*, 2. gut microbiota of HGcc-1 added group treat with GF *D. rerio*; data was the (means ± SE) of six replicates of each treatment; $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***) ; the same below

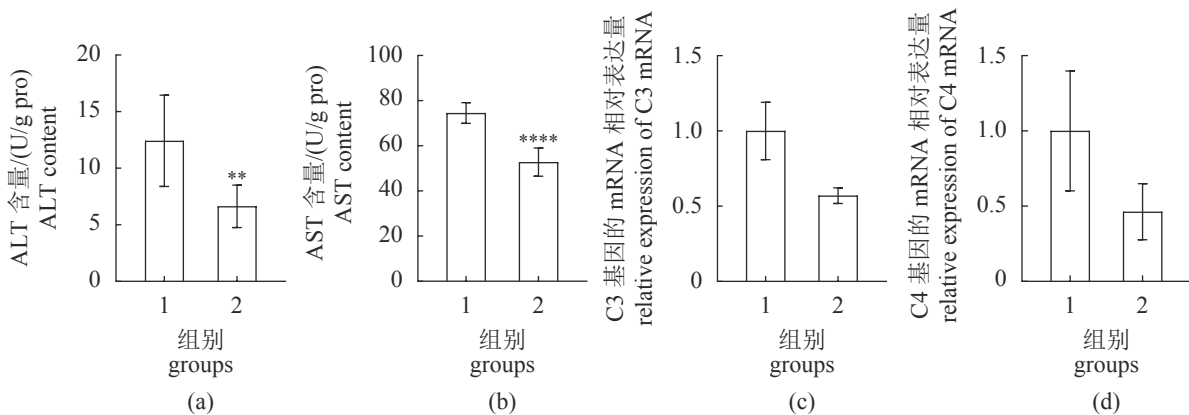


图 7 HGcc-1 直接作用对无菌斑马鱼 ALT (a)、AST (b) 和补体 (c-d) 影响

1. 对照组, 2.HGcc-1 直接作用无菌斑马鱼; 值为 6 次重复的平均值 (mean ± SE)

Fig. 7 The direct effect of HGcc-1 on GF *D. rerio* ALT (a), AST (b) and complement (c-d)

1. control group, 2. HGcc-1 direct treatment with GF *D. rerio*; data represents the mean ± SE of six replicates of each treatment

杆菌肠炎在中国的集约化水产养殖中已成为日益严重的问题^[35]。

利用菌群转接无菌斑马鱼, 本研究也揭示了非特异性免疫和肠肝健康指标的变化与添加

HGcc-1的饲料投喂鲤后肠道菌群的变化有关。LBP是激活LPS的关键因素,可以显著增强细胞对内毒素的应答^[36]。在本研究中,与对照组相比,HGcc-1添加组鲤的肠道菌群显著降低了无菌斑马鱼的LBP含量,表明肠道菌群的变化显著减弱了LPS对鲤肠道的损伤。肠道菌群的间接作用和HGcc-1的直接作用均会降低无菌斑马鱼的ALT和AST水平。有研究表明枯草芽孢杆菌提取物1-Deoxynojirimycin和生物表面活性剂可改善高脂饲料对小鼠(*Mus musculus*)和褐家鼠(*Rattus norvegicus*)肝脏的损伤^[37-38]。因此,HGcc-1可能还会分泌一种可以改善肝脏健康的物质。同时HGcc-1所改变的肠道菌群使得无菌斑马鱼C3和C4基因的表达量显著提高,这也证明了HGcc-1通过改变鲤的肠道菌群间接增强了鲤的免疫能力,在之前的报道中也有类似的结果^[18-19]。

本研究表明,HGcc-1的益生作用主要体现在几个方面:①HGcc-1对生长指标没有显著影响,也不影响鲤鱼种的存活率;②HGcc-1显著降低鲤血清中LPS含量、ALT和AST水平,显著改善肠肝健康;③HGcc-1通过激活补体系统增强鲤非特异性免疫;④调节肠道菌群方面,HGcc-1增加了梭杆菌门丰度并减少变形菌门丰度;⑤HGcc-1通过改变鲤的肠道菌群改善补体水平,同时使鲤的肝肠更加健康。综上所述,枯草芽孢杆菌HGcc-1对鲤具有益生作用,可以用于改善鲤肠肝健康及肠道菌群稳态,即有益菌丰度上升。

参考文献 (References):

- [1] Prchal M, Kause A, Vandeputte M, *et al.* The genetics of overwintering performance in two-year old common carp and its relation to performance until market size[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0191624.
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴-2020[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- Fishery Administration Bureau of Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Aquatic Technology Extension Station, China Fisheries Society. China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2020 (in Chinese).
- [3] Lin S M, Mai K, Tan B P, *et al.* Effects of four vegetable protein supplementation on growth, digestive enzyme activities, and liver functions of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2010, 41(4): 583-593.
- [4] 林仕梅, 麦康森, 谭北平. 菜粕、棉粕替代豆粕对奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)生长、体组成和免疫力的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2007, 38(2): 168-173.
- Lin S M, Mai K S, Tan B P. Effect of soybean meal replacement by rapeseed-cottonseed compound on growth, body composition and immunity of tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2007, 38(2): 168-173.
- [5] Landsman A, St-Pierre B, Rosales-Leija M, *et al.* Impact of aquaculture practices on intestinal bacterial profiles of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(4): 93.
- [6] Dehler C E, Secombes C J, Martin S A M. Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.)[J]. *Aquaculture*, 2017, 467: 149-157.
- [7] Yukgehnaish K, Kumar P, Sivachandran P, *et al.* Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(3): 1903-1927.
- [8] Tran A X, Whitfield C. Lipopolysaccharides (Endotoxins)[M]//Schaechter M. *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Inc., 2009: 513-528.
- [9] Krishnaveni G, Vignesh S, Vidhyalakshmi N, *et al.* Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus fermentum* URLP18 on growth, innate immunity and survival against *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 challenge in freshwater fish *Cyprinus carpio* (common carp)[J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(3): 1160-1176.
- [10] Carbone D, Faggio C. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 54: 172-178.
- [11] Fan Y, Liu L T, Zhao L H, *et al.* Influence of *Bacillus subtilis* ANSB060 on growth, digestive enzyme and aflatoxin residue in Yellow River carp fed diets contaminated with aflatoxin B₁[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 113: 108-114.

- [12] Haygood A M, Jha R. Strategies to modulate the intestinal microbiota of tilapia (*Oreochromis* sp.) in aquaculture: a review[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2018, 10(2): 320-333.
- [13] Shi F, Zi Y J, Lu Z J, et al. *Bacillus subtilis* H2 modulates immune response, fat metabolism and bacterial flora in the gut of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 8-20.
- [14] Shen W Y, Fu L L, Li W F, et al. Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(11): 1691-1698.
- [15] Zhao Y C, Zhang W B, Xu W, et al. Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* T13 on growth, immunity and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 750-755.
- [16] Zhang X P, Fu L Q, Deng B, et al. *Bacillus subtilis* SC02 supplementation causes alterations of the microbial diversity in grass carp water[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(9): 1645-1653.
- [17] Rawls J F, Samuel B S, Gordon J I. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(13): 4596-4601.
- [18] Teame T, Wu X X, Hao Q, et al. Dietary SWF[®] enhanced growth performance and disease resistance in hybrid sturgeon (*Acipenser baerii* × *Acipenser schrenckii*) mediated by the gut microbiota[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 17: 100346.
- [19] Wu X X, Teame T, Hao Q, et al. Use of a paraprobiotic and postbiotic feed supplement (HWF[™]) improves the growth performance, composition and function of gut microbiota in hybrid sturgeon (*Acipenser baerii* × *Acipenser schrenckii*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 104: 36-45.
- [20] Guo X Z, Ran C, Zhang Z, et al. The growth-promoting effect of dietary nucleotides in fish is associated with an intestinal microbiota-mediated reduction in energy expenditure[J]. *The Journal of Nutrition*, 2017, 147(5): 781-788.
- [21] 范天宝. 复方黄芪对肉鸡免疫功能及抗氧化功能的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
- Fan T B. Effects of Compound radix astragal on the immunity and antioxidant capacity of broiler chicken[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [22] Dunkelberger J R, Song W C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses[J]. *Cell Research*, 2010, 20(1): 34-50.
- [23] Chakraborty S, Karasu E, Huber-Lang M. Complement after trauma: suturing innate and adaptive immunity[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 2050.
- [24] Buchtíková S, Šimková A, Rohlenová K, et al. The seasonal changes in innate immunity of the common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Aquaculture*, 2011, 318(1-2): 169-175.
- [25] Xu R H, Xiu L, Zhang Y L, et al. Probiotic and hepatoprotective activity of lactobacillus isolated from mongolian camel milk products[J]. *Beneficial Microbes*, 2019, 10(6): 699-710.
- [26] Wu J F, Liu Y N, Dou Z S, et al. Black garlic melanoidins prevent obesity, reduce serum LPS levels and modulate the gut microbiota composition in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice[J]. *Food & Function*, 2020, 11(11): 9585-9598.
- [27] Acosta F, Montero D, Izquierdo M, et al. High-level biocidal products effectively eradicate pathogenic γ -proteobacteria biofilms from aquaculture facilities[J]. *Aquaculture*, 2021, 532: 736004.
- [28] Wu X X, Hao Q, Teame T et al. Gut microbiota induced by dietary GWF[®] contributes to growth promotion, immune regulation and disease resistance in hybrid sturgeon (*Acipenser baerii* × *Acipenser schrenckii*): insights from a germ-free zebrafish model[J]. *Aquaculture*, 2020, 520: 734966.
- [29] Zhang Y, Zhang P J, Shang X C, et al. Exposure of lead on intestinal structural integrity and the diversity of gut microbiota of common carp[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2021, 239: 108877.
- [30] Tsuchiya C, Sakata T, Sugita H. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in

- the intestinal tracts of freshwater fish[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 46(1): 43-48.
- [31] Lin Y H, Wu J Y, Shiau S Y. Dietary cobalt can promote gastrointestinal bacterial production of vitamin B₁₂ in sufficient amounts to supply growth requirements of grouper, *Epinephelus malabaricus*[J]. *Aquaculture*, 2010, 302(1-2): 89-93.
- [32] Shin N R, Whon T W, Bae J W. *Proteobacteria*: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota[J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(9): 496-503.
- [33] Igbinoso E O. Detection and antimicrobial resistance of *Vibrio* isolates in aquaculture environments: implications for public health[J]. *Microbial drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and disease*, 2016, 22(3): 238-245.
- [34] Fečkaninová A, Koščová J, Mudroňová D, *et al.* The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2017, 469: 1-8.
- [35] Lü A J, Hu X C, Zheng L, *et al.* Isolation and characterization of *Citrobacter* spp. From the intestine of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Aquaculture*, 2011, 313(1-4): 156-160.
- [36] Uesugi T, Froh M, Arteel G E, *et al.* Role of Lipopolysaccharide-binding protein in early alcohol-induced liver injury in Mice[J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 168(6): 2963-2969.
- [37] Zouari R, Hamden K, El Feki A, *et al.* Protective and curative effects of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant on high-fat-high-fructose diet induced hyperlipidemia, hypertriglyceridemia and deterioration of liver function in rats[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 84: 323-329.
- [38] Do H J, Chung J H, Hwang J W, *et al.* 1-Deoxynojirimycin isolated from *Bacillus subtilis* improves hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in high-fat-fed mice[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, 75: 1-7.

Effects of dietary *Bacillus subtilis* HGcc-1 on gut and liver health, serum complement and gut microbiota of common carp fingerlings (*Cyprinus carpio*)

HU Juan¹, GAO Chenchen¹, YAO Yuanyuan¹, HAO Qiang¹, ZHOU Wei¹,
RAN Chao², ZHOU Zhigang¹, YANG Yalin^{2*}, ZHANG Zhen^{2*}

(1. China-Norway Joint Lab on Fish Gastrointestinal Microbiota, Feed Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2. Key Laboratory for Feed Biotechnology of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Feed Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to study the effects of *Bacillus subtilis* HGcc-1 on the gut and liver health, serum complement and gut microbiota of *Cyprinus carpio* fingerlings, healthy *C. carpio* fingerlings with a body weight of (13.10±0.39) g were selected, and randomly divided into HGcc-1 supplementation group and control group, and after 20 weeks of feeding, the growth indicators were measured, and the *C. carpio* serum endotoxin (LPS), Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST), total complement and lysozyme were detected, and 16S *rRNA* sequencing of the gut microbiota was made. At the same time, the gut microbiota induced by HGcc-1 supplement group and the control group were transferred to germ free *Danio rerio*, and then the levels of endotoxin binding protein (LBP), ALT and AST and the expression levels of C3 and C4 genes of germ free *D. rerio* were measured; finally, the levels of ALT and AST and the expression levels of C3 and C4 genes in germ free *D. rerio* were tested when HGcc-1 directly acted on germ free *D. rerio*. The results showed that HGcc-1 had no effect on the weight gain rate of *C. carpio*, but adding HGcc-1 significantly reduced the level of serum endotoxin, ALT and AST. The serum total complement level of the HGcc-1 supplement group was significantly increased, compared with control group. The 16S *rRNA* sequencing results showed that at the phylum level, the HGcc-1 supplement diet group increased the abundance of Fusobacterium by 47.1% compared to control group; the abundance of Proteobacteria was decreased by 70.7% compared with the control group; at the genus level, the HGcc-1 supplement diet group increased the abundance of *Cetobacterium* by 47.1% compared with the control group; the abundances of *Citrobacter* and *Aeromonas* were reduced by 56.6% and 70.9% respectively, compared with the control group. And it was further observed that the intestinal microbiota of HGcc-1 addition group decreased the content of endotoxin binding protein (LBP) and level of AST of the germ free (GF) *D. rerio*, and significantly increased the gene expression of complement component 3 and the complement component 4 (C3 and C4) of the GF *D. rerio*. At the same time, the direct interaction between HGcc-1 and GF *D. rerio* also decreased the ALT and AST levels of the GF *D. rerio*. This study shows that dietary *B. subtilis* HGcc-1 can improve the gut and liver health, serum complement and intestinal microbiota homeostasis of *C. carpio* fingerlings. This study laid a theoretical foundation for the further application of *B. subtilis* HGcc-1.

Key words: *Cyprinus carpio*; *Bacillus subtilis* HGcc-1; intestinal microbiota; innate-immunity; liver health

Corresponding authors: YANG Yalin. E-mail: yangyalin@caas.cn;

ZHANG Zhen. E-mail: zhangzhen@caas.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31925038, 31972807, 31872584, 31802315); Beijing Earmarked Fund for the Modern Agro-industry Technology Research System (SCGWZJ20211104-4); the Innovation Capability Support Program of Shaanxi (2018TD-021)