



### 3 种乳酸菌对乌鳢生长、抗氧化及免疫功能的影响

孔雨昕<sup>1,2,3,4</sup>, 田佳鑫<sup>1,2,3,4</sup>, 彭思博<sup>1,2,3,4</sup>, 王桂芹<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118;

2. 吉林农业大学, 动物生产及产品质量安全教育部重点实验室, 吉林 长春 130118;

3. 吉林农业大学, 现代农业技术教育部国际合作联合实验室, 吉林 长春 130118;

4. 吉林农业大学, 吉林省动物营养与饲料科学重点实验室, 吉林 长春 130118)

**摘要:** 为研究 3 种乳酸菌对乌鳢生长、抗氧化及免疫功能的影响, 实验选用初始体质量为  $(3.43 \pm 0.05)$  g 的乌鳢 360 尾, 随机分成 4 组, 每组设 3 个重复, 每个重复 30 尾鱼。分别投喂基础饲料和添加了  $10^8$  CFU/g 的乳酸乳球菌 L21(L21 组)、植物乳杆菌 W21(W21 组)、粪肠球菌 L2(L2 组) 的实验饲料, 8 周后, 采集乌鳢血清、肝脏、脾脏、肾脏和肠道, 以检测相关指标以及基因表达水平的变化。结果显示, 与对照组相比, 饲料中添加的 3 种乳酸菌均可显著提高乌鳢的平均增重率 (AWGR)、特定生长率 (SGR) 及饲料效率 (FER), 其中 L21 组显著高于其他各组。与对照组相比, L2 组超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽 (GSH) 及碱性磷酸酶 (AKP) 活性显著高于对照组, W21 和 L2 组溶菌酶 (LZM) 活性显著高于对照组, 各组免疫球蛋白 M(IgM) 活性均不显著。各组织中 *IL-1 $\beta$* 、*IL-8*、*IL-10* 和 *TNF- $\alpha$*  基因表达水平均有不同程度升高, 乳酸菌对肠道中免疫相关基因表达均有显著的促进作用。研究表明, 本实验条件下, 乳酸乳球菌 L21 对乌鳢的应用效果最好, 能够提高乌鳢的生长性能、饲料利用及免疫基因表达, 但对血清抗氧化能力并无显著影响。

**关键词:** 乌鳢; 乳酸菌; 生长; 抗氧化; 免疫

**中图分类号:** S 963.73

**文献标志码:** A

益生菌是一种活的微生物饲料补充剂, 可以改善肠道微生物平衡, 从而促进生长和免疫系统, 刺激酶活性, 增强抗病能力<sup>[1]</sup>。通过添加益生菌来提高鱼类的免疫功能, 促进营养吸收, 抑制有害微生物生长的方法受到很多研究者的关注, 已成为提高机体抗病能力的重要途径。乳酸菌 (lactic acid bacteria, LAB) 为革兰氏阳性, 可以分解糖类产生乳酸, 厌氧或兼性厌氧生长, 耐酸, 在 pH 3.0~4.5 时仍可生长, 适应于胃肠的酸性环境<sup>[2]</sup>, 且作为重要的益生菌已经广泛应用

于食品、医药、轻工业和畜牧业等领域。乳酸菌作为人和动物胃肠道中的优势菌群, 其发酵产生的有机酸、特殊酶系、细菌表面成分等物质具有一定生理功能, 可刺激组织发育, 对机体的营养状态、生理功能、细胞感染、药物效应、毒性反应、免疫反应、肿瘤发生、衰老过程和应激反应等产生作用, 使其在鱼类、虾蟹类及软体动物养殖中也得以广泛的应用<sup>[3-5]</sup>, 近年来乳酸菌在水产动物上的研究很多, 在对军曹鱼 (*Rachycentron canadum*)<sup>[6]</sup>、草鱼 (*Ctenopha-*

收稿日期: 2020-09-14 修回日期: 2021-04-01

资助项目: 现代农业产业技术体系专项 (CARS-46)

第一作者: 孔雨昕 (照片), 从事水生动物营养与免疫调控研究, E-mail: 675556235@qq.com

通信作者: 王桂芹, E-mail: wqjlau@aliyun.com



*ryngodon idella*)<sup>[7,8]</sup>、奥尼罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*×*O.aureus*)<sup>[9]</sup> 等的研究中均证实乳酸菌可提高鱼类的生长性能及免疫力。乌鳢 (*Channa argus*) 为肉食性鱼类, 是中国主要的鳢科鱼类养殖品种<sup>[10]</sup>, 因其生长快、生命力强、肉味鲜美, 且具有祛瘀活血、祛寒调养、生肌补血等多种药理功效, 从而具有较高的经济价值与营养价值, 被喻为高投入、高产出、高效益的养殖品种<sup>[11-13]</sup>。但是随着鱼类养殖业的发展, 在高密度养殖模式下, 投喂量的加大、投喂冰鲜杂鱼和高蛋白配合饲料造成的水质恶化导致乌鳢生长发育缓慢, 免疫力下降, 同时并发各种疾病, 饲料效率和水产品质量降低, 严重阻碍产业健康发展<sup>[14-16]</sup>, 因此, 寻求一种绿色安全高效的饲料添加剂已迫在眉睫。目前关于乳酸菌的研究多为单一添加的方式, 很难比较出不同种类乳酸菌间的差异, 因此本实验通过比较 3 种不同乳酸菌对乌鳢生长、抗氧化及免疫功能的影响, 筛选出适宜

乌鳢养殖的乳酸菌, 为乳酸菌在实际生产中的应用提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验选用 3 种乳酸菌, 乳酸乳球菌 L21 (*Lactococcus lactis* L21)、植物乳杆菌 W21 (*Lactobacillus plantarum* W21)、粪肠球菌 L2 (*Enterococcus faecalis* L2) 均为鱼源, 由吉林农业大学预防兽医实验室提供。

### 1.2 实验饲料

基础饲料组成及营养成分见表 1。以基础饲料作为对照组, 使用海藻酸钠将 *L. lactis* L21、*L. plantarum* W21、*E. faecalis* L2 包被配置成为乳酸菌数量为 10<sup>8</sup> CFU/g 的 3 种实验饲料, 37 °C 恒温箱烘干后, 置于 -20 °C 冰柜中保存备用。

表 1 基础饲料配方及营养成分

Tab. 1 Basic feed formula and nutrient content

项目 item	乳酸菌 LAB			
	对照组 control	L21组	W21组	L2组
<b>原料/% ingredient</b>				
鱼粉 fish meal	42.00	42.00	42.00	42.00
玉米蛋白粉 corn protein powder	26.00	26.00	26.00	26.00
麦麸 wheat bran	5.00	5.00	5.00	5.00
玉米油 corn oil	4.00	4.00	4.00	4.00
面粉 flour	14.00	14.00	14.00	14.00
糊精 dextrin	5.00	5.00	5.00	5.00
复合预混料 <sup>1,2</sup> compound premix	2.00	2.00	2.00	2.00
磷酸二氢钙 calcium phosphate	1.50	1.50	1.50	1.50
氯化胆碱 choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50
<b>营养成分 nutrient content</b>				
粗蛋白质/% crude protein	45.83	45.83	45.83	45.83
粗脂肪/% crude lipid	7.8	7.8	7.8	7.8
粗灰分/% crude Ash	11.07	11.07	11.07	11.07
<b>总能/(MJ/kg) total energy</b>	17.63	17.63	17.63	17.63

注: 1. 维生素预混料向每千克饲料提供为 VD<sub>3</sub> 2 000 IU、VE 50 IU、VK 1 mg、VB<sub>1</sub> 1 mg、VB<sub>2</sub> 6 mg、VB<sub>6</sub> (吡哆醇) 5 mg、胆碱 1 000 mg、VB<sub>12</sub> 0.02 mg、烟酸 10 mg、VA 2 500 IU、生物素 0.14 mg、D-泛酸钙 20 mg、叶酸 1 mg、VC 50 mg; 2. 矿物质预混料向每千克饲料提供为硫酸亚铁 13 mg、硫酸锌 60 mg、氯化钠 1 200 mg、硫酸锰 32 mg、硫酸铜 7 mg、碘化钾 8 mg

Notes: 1. Vitamin premix provided per kilogram of feed: VD<sub>3</sub> 2 000 IU, VE 50 IU, VK 1 mg, VB<sub>1</sub> 1 mg, VB<sub>2</sub> 6 mg, VB<sub>6</sub> (pyridoxine) 5 mg, choline 1 000 mg, VB<sub>12</sub> 0.02 mg, niacin 10 mg, VA 2 500 IU, biotin 0.14 mg, D-calcium pantothenate 20 mg, folic acid 1 mg, VC 50 mg; 2. mineral premix provides per kilogram of feed: FeSO<sub>4</sub> 13 mg, ZnSO<sub>4</sub> 60 mg, NaCl 1 200 mg, MnSO<sub>4</sub> 32 mg, CuSO<sub>4</sub> 7 mg, KI 8 mg

### 1.3 实验鱼及日常管理

实验所用乌鳢购买自辽宁刘二堡渔场。在吉林农业大学水产养殖基地控温单循环养殖系统中进行为期8周的饲养实验,在实验前于水族箱中暂养15 d,并进行驯化。挑选身体健康,体型及规格一致,体质量为 $(3.43 \pm 0.05)$  g的乌鳢360尾,并随机分配到12个水族箱内,随机分成4组,分别为对照组、L21组、W21组及L2组,每组3个重复,每个重复30尾。对照组饲喂基础饲料,另外3组分别投喂配置好的3种乳酸菌饲料。水族箱水温设定25~29 °C,溶解氧大于5 mg/L,氨氮小于0.02 mg/L, pH值 $7.1 \pm 0.1$ 。日投饵率为平均体质量的3%~4%,每日饱食投喂2次(9:00; 16:00),1 h后检查水族箱内残饵情况并用虹吸法吸出沉积的残饵,根据残饵情况调整投喂量。

### 1.4 样品收集与指标检测

**样品收集** 养殖实验结束后,将实验鱼停食24 h,称体质量、肝脏及内脏重,并测量体长,然后进行尾静脉取血,置于4 °C冰箱中静置2 h后,5 000 r/min离心10 min,取血清后进行分装置于-80 °C冰箱中保存,无菌采集肝脏、脾脏、肾脏以及肠道后置于-80 °C冰箱中保存待测。

**生长性能及饲料利用指标计算** 根据乌鳢初始体质量、终末体质量以及摄食量计算平均增重率、特定生长率、饲料效率、肥满度、肝体比、脏体比。计算公式如下:

$$\text{成活率 (survival rate, SR, \%)} = N_t/N_0 \times 100\%;$$

$$\text{平均增重率 (average weight gain rate, AWGR, \%)} = (W_t - W_0)/W_0 \times 100\%;$$

$$\text{特定生长率 (specific growth rate, SGR, \% / d)} = (\ln W_t - \ln W_0)/t \times 100\%;$$

$$\text{饲料效率 (feed efficiency rate, FER, \%)} = (W_t - W_0)/W_f \times 100\%;$$

$$\text{肥满度 (condition factor, CF, g/cm}^3) = W_t/L^3$$

$$\text{肝体比 (hepatosomatic index, HSI, \%)} = 100\% \times W_h/W_t$$

$$\text{脏体比 (viscerosomatic index, VSI, \%)} = 100\% \times W_v/W_t$$

式中,  $N_t$  为终末尾数,  $N_0$  为初始尾数,  $W_t$  为终末体质量(g),  $W_0$  为初始体质量(g),  $t$  为实验天数(d),  $W_f$  为摄入饲料量(g),  $W_h$  表示肝脏重(g/尾),  $W_v$  表示内脏重(g/尾),  $L$  为鱼体长(cm)。

**血清学指标检测** 血清溶菌酶(lysozyme, LZM)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)及免疫球蛋白M(immunoglobulin M, IgM)活性使用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行检测,检测方法依照试剂盒说明书进行操作。

**qPCR检测** 按照博日 Simply 总 RNA 提取试剂盒说明书操作,提取肝脏、脾脏、肾脏以及肠道的 RNA,按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书操作,将 RNA 反转录成 cDNA,使用 TB Green Premix Ex Taq II 在 ABI 7500 仪器中进行 qPCR 反应,分别检测 *IL-1β*、*IL-8*、*IL-10* 及 *TNF-α* 基因表达水平(表 2)。

表 2 引物信息

Tab. 2 Primer information

引物 primer	序列 sequence	长度/bp size
<i>IL-1β</i> -F	TCCGATGACACTGAAGAAT	172
<i>IL-1β</i> -R	GATGTACTGAGCCGAAGG	
<i>IL-8</i> -F	CTTCTCGGCTGTATCTGTG	160
<i>IL-8</i> -R	TTCCTCTGCGACTCTTC	
<i>IL-10</i> -F	TGGCAGTGAAGAAGACAT	182
<i>IL-10</i> -R	CTTTGAAGTGCTCAGGGA	
<i>TNF-α</i> -F	ACAATACCACCCAGGTCCCA	182
<i>TNF-α</i> -R	ACGCAGCATCCTCTCATCCAT	
<i>β-actin</i> -F	CACTGTGCCATCTACGAG	198
<i>β-actin</i> -R	CCATCTCCTGCTCGAAGTC	

### 1.5 数据统计

采用 SPSS 20.0 软件对乌鳢生长、抗氧化及免疫指标数据进行单因素方差分析,若方差分析显著,进一步进行 Duncan 氏多重比较,分析组间差异显著性,显著水平设定为 0.05,实验数据采用平均值±标准差(mean±SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 3种乳酸菌对乌鳢生长性能及饲料利用的影响

结果显示,饲料中添加的3种乳酸菌均可显著提高乌鳢的 AWGR、SGR 和 FER( $P < 0.05$ ),

其中 L21 组 AWGR、SGR 和 FER 最高, W21 组与 VSI 与对照组相比均无显著性差异 ( $P>0.05$ ) (表 3)。L2 组间差异不显著 ( $P>0.05$ )。各组间 CF、HSI、

表 3 3 种乳酸菌对乌鳢生长性能及饲料利用的影响

Tab. 3 Effects of three kinds of LAB on the growth performance and feed utilization of *C. argus*

项目 item	乳酸菌 LAB			
	对照组 control	L21组	W21组	L2组
初始体质量/g IBM	3.40±0.07	3.45±0.02	3.47±0.02	3.38±0.05
终末体质量/g FBM	10.82±0.02 <sup>a</sup>	16.28±0.54 <sup>d</sup>	14.30±0.22 <sup>c</sup>	13.13±0.61 <sup>b</sup>
平均增重率/% AWGR	216.47±8.62 <sup>a</sup>	371.32±13.44 <sup>c</sup>	312.26±8.14 <sup>b</sup>	288.57±12.42 <sup>b</sup>
特定增长率/(%/d) SGR	2.06±0.05 <sup>a</sup>	2.77±0.05 <sup>c</sup>	2.53±0.04 <sup>b</sup>	2.42±0.06 <sup>b</sup>
饲料效率/% FER	55.07±1.13 <sup>a</sup>	74.34±3.02 <sup>c</sup>	66.82±1.44 <sup>b</sup>	61.62±3.53 <sup>b</sup>
肥满度/(g/cm <sup>3</sup> ) CF	1.09±0.16	1.15±0.08	1.06±0.2	1.07±0.06
脏体比/% VSI	4.65±0.29	4.53±0.81	3.49±0.73	4.88±0.97
肝体比/% HSI	0.96±0.05	0.78±0.14	0.93±0.23	0.90±0.13
成活率/% survival rate	100	100	100	100

注: 同行数据肩标小写字母不同者表示组间差异显著 ( $P<0.05$ )

Notes: Different lowercase letters in the same line of data indicate significant differences between groups ( $P<0.05$ )

## 2.2 3 种乳酸菌对乌鳢血清抗氧化及免疫指标的影响

L2 组 SOD 活性显著高于对照组和 L21 组 ( $P<0.05$ ), W21 组与各组差异均不显著 ( $P>0.05$ )。L2 组 CAT 活性显著高于其他各组 ( $P<0.05$ ), 其他 3 组间无显著差异 ( $P>0.05$ )。3 种乳酸菌处理组 GSH 活性均有提升, 其中 L2 组 GSH 显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), L21 和 W21 组与对照组和 L2 组均无显著差异 ( $P>0.05$ ) (图 1)。W21 组和 L2 组 LZM 活性显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), 且 W21 和 L2 组间差异不显著 ( $P>0.05$ )。L2 组 AKP 活性显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), W21 组 AKP 活性有所上升但并不显著 ( $P>0.05$ )。3 种乳酸菌处理组 IgM 水平均有上升趋势, 但与对照组差异并不显著 ( $P>0.05$ ) (图 2)。

## 2.3 qPCR 检测结果

各组织免疫相关基因表达量均有上升, 肝脏中 W21 组 *IL-1 $\beta$* 、*IL-8* 和 *IL-10* 基因表达水平显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), 各组肝脏中 *TNF- $\alpha$*  基因表达水平均不显著 ( $P>0.05$ )。脾脏中 L2 组 *IL-1 $\beta$*  基因表达水平最高, 且显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), L2 和 L21 组 *IL-10* 基因表达水平显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), L21 及 L2 组 *IL-8* 基因表达水平显著高于

对照组 ( $P<0.05$ ), L2 组 *TNF- $\alpha$*  基因表达水平显著高于对照组 ( $P<0.05$ )。肾脏中各组 *IL-10* 和 *TNF- $\alpha$*  基因表达水平无显著差异 ( $P>0.05$ ), L2 组 *IL-1 $\beta$*  和 *IL-8* 基因表达水平显著高于对照组 ( $P>0.05$ )。肠道中各组基因表达水平均有提高, 肠道中乳酸菌处理组 *IL-1 $\beta$* 、*IL-10* 基因表达水平均显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), 且各组间并无显著差异 ( $P>0.05$ ); W21 与 L2 组 *IL-8* 基因表达水平显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), 且两组间差异不显著 ( $P>0.05$ ); L2 组 *TNF- $\alpha$*  基因表达水平显著高于对照组 ( $P<0.05$ ) (图 3)。

## 3 讨论

### 3.1 3 种乳酸菌对乌鳢生长性能及饲料利用的影响

乳酸菌作为饲料添加剂可缓冲营养成分的代谢平衡状态, 促使动物的生长发育。以往对点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)<sup>[17]</sup>、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[18-19]</sup>、大西洋鲷 (*Sparus aurata*)<sup>[20]</sup>、草鱼<sup>[7]</sup> 和鲫 (*Carassius auratus*)<sup>[21]</sup> 等的研究均发现乳酸菌能显著提鱼的生长性能及饲料利用。在本实验条件下, 与对照组相比, 饲料中添加 *L. lactis* L21, *L. plantarum* W21 和 *E. faecalis* L2 的乌鳢 AWGR、SGR 及 FER 显著升高, 其中效果最

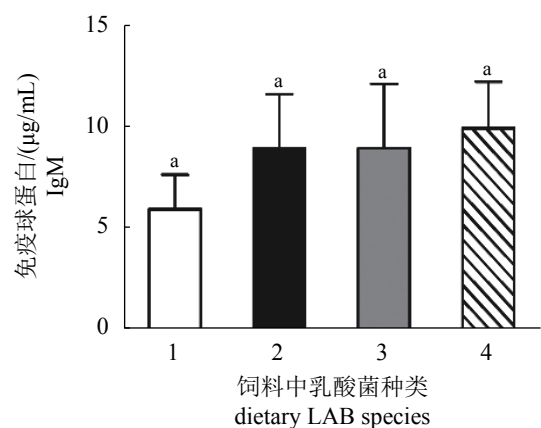
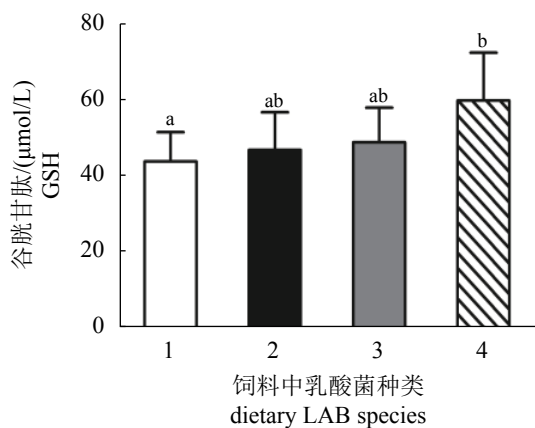
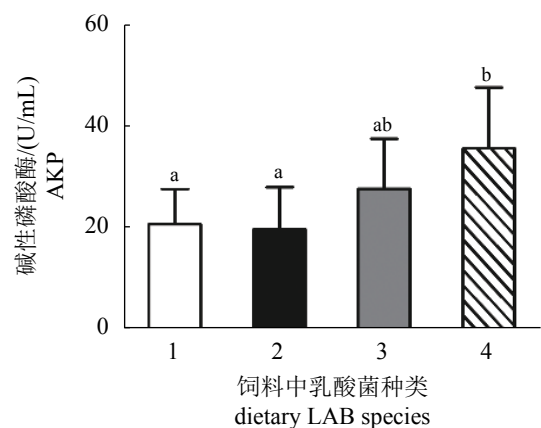
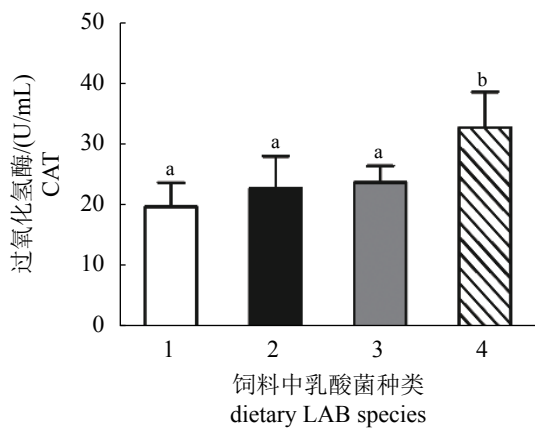
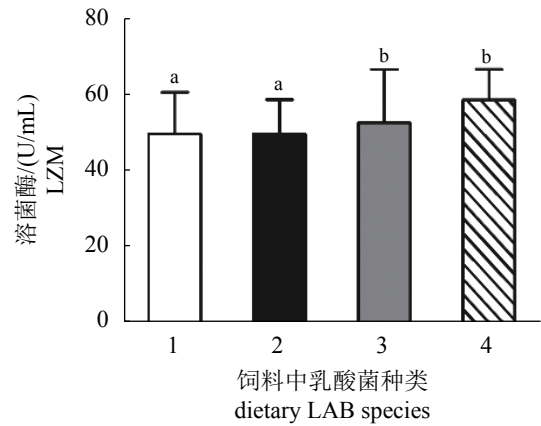
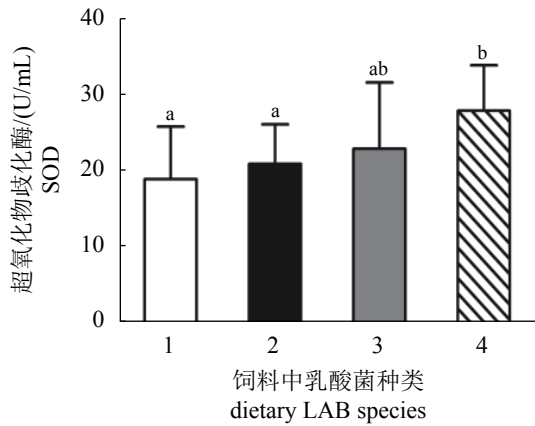


图 1 3 种乳酸菌对乌鳢血清抗氧化酶活性的影响

(a) 超氧化物歧化酶, (b) 过氧化氢酶, (c) 谷胱甘肽。1. 对照组, 2. L21 组, 3. W21 组, 4. L2 组, 下同

Fig. 1 Effect of three kinds of LAB on the serum antioxidant enzyme activity of *C. argus*

(a) SOD, (b) CAT, (c) GSH. 1. control group, 2. L21 group, 3. W21 group, 4. L2 group, the same below

好的是 *L. lactis* L21, *L. plantarum* W21 和 *E. faecalis* L2 效果相似。与本实验结果相似的是,

图 2 3 种乳酸菌对乌鳢血清免疫酶活性的影响

(a) 溶菌酶, (b) 碱性磷酸酶, (c) 免疫球蛋白 M

Fig. 2 Effects of three kinds of LAB on the serum immune enzyme activity of *C. argus*

(a) LZM, (b) AKP, (c) IgM

Dawood 等<sup>[22]</sup> 研究中发现与对照组相比鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 和 *L. lactis* 均显著提高了真鲷 (*Pagrus major*) 的 AWGR、SGR 及 FER,

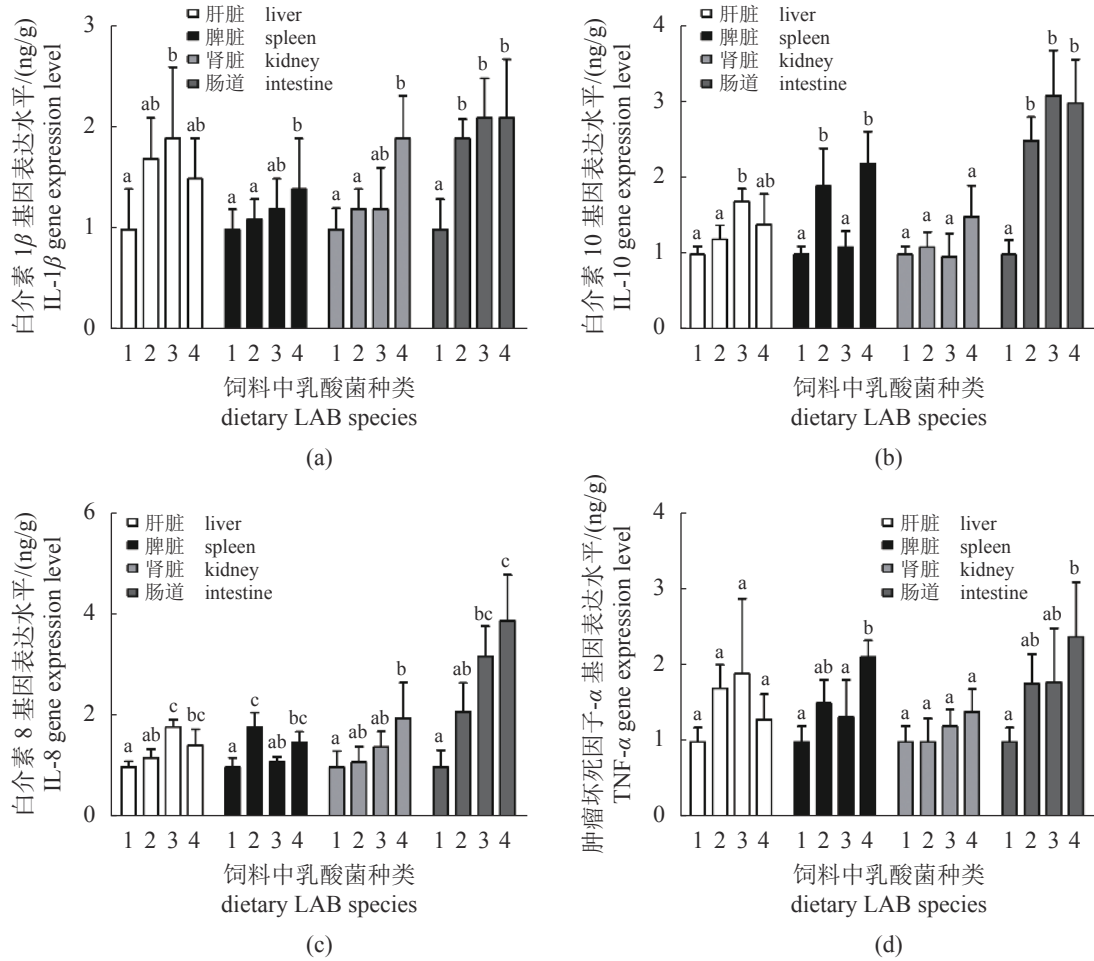


图3 3种乳酸菌对乌鳢 IL-1β (a)、IL-10 (b)、IL-8 (c) 和 TNF-α (d) 基因表达的影响

Fig. 3 Effect of three kinds of LAB on the genes expression of IL-1β (a), IL-10 (b), IL-8 (c) and TNF-α (d) of *C. argus*

但2组间差异不显著,且真鲷的VSI和HSI与对照物无显著差异。Beck等<sup>[23]</sup>发现 *L. lactis* 和 *L. plantarum* 可提高牙鲆的生长性能和饲料效率,其中 *L. lactis* 效果优于 *L. plantarum*。周晓波等<sup>[9]</sup>比较了5种乳酸菌对奥尼罗非鱼生长性能的影响,结果表明 *L. plantarum* 和 *E. faecalis* 有效提高了奥尼罗非鱼的AWGR和SGR,且2种乳酸菌效果无显著差异。Son等<sup>[17]</sup>研究了 *L. lactis* 和 *E. faecalis* 对石斑鱼生长性能的影响,发现2种乳酸菌均能提高石斑鱼的AWGR,降低了饲料系数,但2种益生菌间差异不显著。目前,关于不同乳酸菌对水产动物生长性能影响的结果并不统一,这可能与特定的乳酸菌株作用机制和功能以及投喂时间的长短不同有关。

### 3.2 3种乳酸菌对乌鳢血清抗氧化指标的影响

氧化应激是水产动物发生疾病的主要原因之一,SOD、CAT及GSH作为机体抗氧化酶,

其活性的高低可以直接反映出机体的抗氧化水平<sup>[24]</sup>,SOD酶活性水平对益生菌的抗氧化起主要作用<sup>[25]</sup>,可催化超氧自由基歧化为反应性较低的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,以缓解氧化应激,CAT则催化组织器官中的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分解为水H<sub>2</sub>O和O<sub>2</sub><sup>[26]</sup>,GSH通过巯基结合自由基将其还原,从而清除自由基发挥其抗氧化能力。有研究表明鱼类肠道定植的乳酸菌具有抗氧化活性<sup>[27]</sup>,黄燕华等<sup>[28]</sup>研究发现 *L. plantarum* 和 *E. faecalis* 可显著提高奥尼罗非鱼血清SOD活性。Dawood等<sup>[22]</sup>在真鲷饲料中添加 *L. rhamnosus* 和 *L. lactis*,结果表明血清SOD活性更高,对氧化应激的耐受力更强,可能是由于乳酸菌定植刺激了肠道黏膜免疫从而提高抗氧化能力。本实验中添加 *E. faecalis* L2的乌鳢血清SOD、CAT及GSH活性显著上升,而添加 *L. lactis* L21, *L. plantarum* W21的乌鳢血清抗氧化酶活性的变化并不显著,可能是因为乳酸菌的抗氧化能

力既具有种属特异性,又具有菌株特异性。

### 3.3 3种乳酸菌对乌鳢血清免疫指标的影响

体液免疫指标对于指示鱼的生理和一般健康状况非常重要,它反映了营养和环境的变化<sup>[29]</sup>。血清LZM和AKP在机体的非特异免疫防御中发挥着重要作用,它们是单核巨噬细胞的分泌酶,其活性反映着机体的非特异性免疫能力。IgM主要分布于血清中,具有强大的杀菌、激活补体、免疫调节作用。含乳酸菌的制剂可提高LZM及IgM活性<sup>[30-31]</sup>,本实验中添加*L. plantarum* W21和*E. faecalis* L2的乌鳢血清LZM和AKP活性有所升高,与本实验结果相似,Beck等<sup>[23]</sup>对比了*L. lactis*和*L. plantarum*对牙鲆免疫功能的影响,发现二者均可增加牙鲆黏液LZM活性。黄燕华等<sup>[27]</sup>研究发现奥尼罗非鱼除*E. faecalis*之外的乳酸菌处理组血清LZM活性均有提升,*L. plantarum*和戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*)提高了AKP活性。Dawood等<sup>[22]</sup>的实验发现*L. rhamnosus*和*L. lactis*可显著提高真鲷血清LZM活性。Aly等<sup>[30]</sup>将嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)添加在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)饲料中,经一段时间的喂养,尼罗罗非鱼的血清LZM活性有显著的提高。Jami等<sup>[32]</sup>对海鲈(*Salmo trutta caspius*)的研究中发现*L. plantarum*组LZM和IgM均显著提高。相反的是,本实验中各组IgM水平与对照组无显著差异,尼罗罗非鱼和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的血清LZM活性并不受*E. faecalis*的影响,欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)血清中AKP活性也未受*L. plantarum*的影响,可能是因为这些菌株的功能不同,也受到遗传、营养和环境因素以及益生菌菌株来源的影响<sup>[33-35]</sup>。

### 3.4 3种乳酸菌对乌鳢免疫基因表达的影响

*IL-1 $\beta$* 和*TNF- $\alpha$* 主要由活化的巨噬细胞分泌,是天然免疫系统的重要刺激因子,通常被用作免疫调节研究中的参考基因<sup>[36]</sup>; *IL-8*主要由巨噬细胞上皮细胞和内皮细胞产生,可诱导中性粒细胞和其他粒细胞迁移到感染部位发挥作用; *IL-10*是最重要的抗炎细胞因子之一,它不仅能减少促炎细胞因子的产生,而且能抑制它们的作用<sup>[37]</sup>。这些炎症因子不仅可以激活免疫细胞起到免疫调节作用,也可以刺激其他炎症介质产生而引发炎症或加剧炎症<sup>[38]</sup>。研究表明,服用益生

菌可导致免疫相关基因的上调<sup>[32]</sup>,本实验中各组织*IL-1 $\beta$* 、*IL-8*、*IL-10*和*TNF- $\alpha$* 基因表达水平均有不同程度升高,3种乳酸菌对肠道中免疫基因的表达均有促进效果,说明乳酸菌对乌鳢免疫功能的提高可能是通过促进肠道免疫基因的表达来实现。Beck等<sup>[23]</sup>对牙鲆的研究中发现*L. lactis*和*L. plantarum*均可诱导牙鲆*IL-8*及*TNF- $\alpha$* 的基因表达。在对尼罗罗非鱼的研究中表明*L. rhamnosus*、*L. lactis*和*L. plantarum*可诱导尼罗罗非鱼肠道*TNF- $\alpha$* 和*IL-1 $\beta$* 的表达<sup>[36,39]</sup>。饲料中添加枯草芽孢杆菌也可上调锦鲤(*Cyprinus carpio*)肠道*IL-1 $\beta$* 和*TNF- $\alpha$* 的基因表达<sup>[40]</sup>。Jami等<sup>[32]</sup>对海鲈的研究中发现单独添加*L. plantarum*上调了*IL-8*的基因表达。与此相反,饲料中的德氏乳杆菌下调了欧洲鲈肠道T细胞中*IL-1 $\beta$* 的表达,这些不同的结果可能与细菌对肠壁的黏附特性有关<sup>[41]</sup>。尽管目前乳酸菌给鱼类带来的免疫学优势已得到充分证明,但关于乳酸菌提高免疫力的分子机制还有待进一步研究。

## 4 结论

综上所述,本实验条件下,饲料中添加一定量的*L. lactis* L21对乌鳢的生长性能及饲料利用促进效果最佳,对免疫基因表达水平也有促进作用,但对血清抗氧化功能及非特异性免疫指标影响不大,可能是由于*L. lactis*、*L. plantarum*和*E. faecalis*间发挥作用的机制并不相同,具体还有待深入研究。

### 参考文献 (References):

- [1] Nayak S K. Probiotics and immunity: a fish perspective[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 2-14.
- [2] Alard J, Peucelle V, Boutillier D, et al. New probiotic strains for inflammatory bowel disease management identified by combining *in vitro* and *in vivo* approaches[J]. *Beneficial Microbes*, 2018, 9(2): 317-331.
- [3] Zuo Z H, Shang B J, Shao Y C, et al. Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the growth, immune, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 160-168.
- [4] 宫魁, 王宝杰, 刘梅, 等. 乳酸菌及其代谢产物对刺参

- 幼体肠道菌群和非特异性免疫的影响[J]. 海洋科学, 2013, 37(7): 7-12.
- Gong K, Wang B J, Liu M, *et al.* The influence of lactic acid bacteria and metabolites on intestinal microflora and nonspecific immunity of juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[J]. Marine Sciences, 2013, 37(7): 7-12(in Chinese).
- [ 5 ] 刘梦, 王苓, 田相利, 等. 三种益生菌及其复合菌对凡纳滨对虾生长和血清非特异性免疫的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2017, 47(S1): 35-41.
- Liu M, Wang L, Tian X L, *et al.* Effects of three probiotics and their complexes on growth performance and serum non-specific immunity of *Litopenaeus vannamei*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2017, 47(S1): 35-41(in Chinese).
- [ 6 ] 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[J]. 动物营养学报, 2015, 27(12): 3821-3830.
- He W C, Dong X H, Tan B P, *et al.* Effects of probiotics on growth performance, digestive enzyme and immune enzyme activities of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(12): 3821-3830(in Chinese).
- [ 7 ] 许褪森. 短乳酸杆菌对草鱼幼鱼养殖水体和肠道菌群的影响[J]. 德州学院学报, 2008, 24(2): 60-63.
- Xu T S. Effects of *Lactobacillus brevie* on the microflora in water and larvae guts of grass carp[J]. Journal of Dezhou University, 2008, 24(2): 60-63(in Chinese).
- [ 8 ] 赵倩, 赵凤梅, 陈玉春, 等. 乳酸菌对草鱼鱼种生长指标及免疫指标的影响[J]. 饲料与畜牧, 2012(12): 45-47.
- Zhao Q, Zhao F M, Chen Y C, *et al.* Effects of lactic acid bacteria on growth indicators and immune indexes of *Ctenopharyngodon idellus* fingerlings[J]. Feed and Animal Husbandry, 2012(12): 45-47(in Chinese).
- [ 9 ] 周晓波, 黄燕华, 曹俊明, 等. 5种乳酸菌对罗非鱼生长性能、体成分、血清生化指标及肠道菌群的影响[J]. 动物营养学报, 2014, 26(7): 2009-2017.
- Zhou X B, Huang Y H, Cao J M, *et al.* Effects of 5 kinds of *Lactobacillus* on growth performance, body composition, serum biochemical indices and intestinal microflora of tilapia (*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(7): 2009-2017(in Chinese).
- [10] 张新铖, 陈昆慈, 朱新平. 乌鳢、斑鳢及杂交种养殖研究现状[J]. 广东农业科学, 2011, 38(22): 132-134.
- Zhang X C, Chen K C, Zhu X P. Research progress on *Channa argus*, *Channa maculata* and hybrid aquaculture[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 38(22): 132-134(in Chinese).
- [11] Twibell R G, Wilson R P. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture[J]. Aquaculture, 2002, 214(1-4): 419-420.
- [12] Aliyu-Paiko M, Hashim R, Shu-Chien A C. Influence of dietary lipid/protein ratio on survival, growth, body indices and digestive lipase activity in snakehead (*Channa striatus*, Bloch 1793) fry reared in re-circulating water system[J]. Aquaculture Nutrition, 2010, 16(5): 466-474.
- [13] 杨四秀, 蒋艾青. 斑鳢的含肉率及肌肉营养成分分析[J]. 河北渔业, 2007(12): 10-12, 35.
- Yang S X, Jiang A Q. Analysis on muscle content and its nutrient components of *Channa maculata*[J]. Hebei Fisheries, 2007(12): 10-12, 35(in Chinese).
- [14] 邹礼根, 冯晓宇, 王宇希, 等. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)与乌鳢肌肉品质比较研究[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(2): 303-307.
- Zou L G, Feng X Y, Wang Y X, *et al.* Comparative study on flesh quality of hybrid snakehead (*Channa maculata*♀×*Channa argus*♂) and *Channa argus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(2): 303-307(in Chinese).
- [15] 罗青, 陈昆慈, 赵建, 等. 乌鳢、斑鳢及其杂交F<sub>1</sub>代肌肉营养成分和含肉率的比较分析[J]. 大连海洋大学学报, 2015, 30(2): 175-180.
- Luo Q, Chen K C, Zhao J, *et al.* Dressed rates and muscular nutrients in northern snakehead *Channa argus*, Taiwan snakehead *C. maculata* and their hybrids[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2015, 30(2): 175-180(in Chinese).
- [16] 单晓枫, 张冬星, 康元环, 等. 长春市售乌鳢携带嗜水气单胞菌情况调查[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(1): 95-97.
- Shan X F, Zhang D X, Kang Y H, *et al.* *Aeromonas hydrophila* in northern snakehead (*Channa argus*) commercially available from Changchun: a molecular epidemiological study[J]. Chinese Journal of Veterinary



- Medicine, 2018, 54(1): 95-97(in Chinese).
- [17] 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.
- [18] Byun J W, Park S C, Benno Y, *et al.* Probiotic effect of *Lactobacillus sp.* DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 1997, 43(5): 305-308.
- [19] 陈营, 王福强, 邵占涛, 等. 乳酸菌对牙鲆稚鱼养殖水体和肠道菌群的影响[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(3): 37-41.
- Chen Y, Wang F Q, Shao Z T, *et al.* Effects of lactic acid bacteria on the microflora in water and larvae guts of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(3): 37-41(in Chinese).
- [20] Suzer C, Coban D, Kamaci H O, *et al.* *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities[J]. Aquaculture, 2008, 280(1-4): 140-145.
- [21] 尹军霞, 陈瑛, 孟丽丽. 益生菌剂对鲫鱼肠道菌群影响的初步研究[J]. 水产科学, 2007, 26(11): 610-612.
- Yin J X, Chen Y, Meng L L. The influences of probiotics on intestinal microflora in crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. Fisheries Science, 2007, 26(11): 610-612(in Chinese).
- [22] Dawood M A O, Koshio S, Ishikawa M, *et al.* Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 49: 275-285.
- [23] Beck B R, Kim D, Jeon J, *et al.* The effects of combined dietary probiotics *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 on innate immunity and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 42(1): 177-183.
- [24] 孙全贵, 龙子, 张晓迪, 等. 抗氧化系统研究新进展[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(11): 2197-2200, 2190.
- Sun Q G, Long Z, Zhang X D, *et al.* Novel progress in antioxidant system[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(11): 2197-2200, 2190(in Chinese).
- [25] 白明, 孟祥晨. 益生菌抗氧化活性及菌体抗氧化相关成分的分析[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(5): 6-11.
- Bai M, Meng X C. Antioxidative activity of probiotics and their internal correlative antioxidative components[J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(5): 6-11(in Chinese).
- [26] Xie J, Liu B, Zhou Q L, *et al.* Effects of anthraquinone extract from rhubarb *Rheum officinale* Bail on the crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus carpio* var. *Jian*[J]. Aquaculture, 2008, 281(1-4): 5-11.
- [27] 丁丽丽, 吕欣然, 高永悦, 等. 鱼肠道中抗氧化活性乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 127-132.
- Ding L L, Lu X R, Gao Y Y, *et al.* Screening for and identification of lactic acid bacteria with antioxidant activity from the intestinal tract of fish[J]. Food Science, 2021, 42(10): 127-132(in Chinese).
- [28] 黄燕华, 周晓波, 王国霞, 等. 5种乳酸菌对奥尼罗非鱼免疫和抗病力的影响[J]. 水产科学, 2014, 33(10): 601-605.
- Huang Y H, Zhou X B, Wang G X, *et al.* Effects of *Lactobacillus* on immunity and disease resistance of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)[J]. Fisheries Science, 2014, 33(10): 601-605(in Chinese).
- [29] Kader M A, Bulbul M, Koshio S, *et al.* Effect of complete replacement of fishmeal by dehulled soybean meal with crude attractants supplementation in diets for red sea bream, *Pagrus major*[J]. Aquaculture, 2012, 350-353: 109-116.
- [30] Aly S M, Ahmed Y A G, Ghareeb A A A, *et al.* Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(1-2): 128-136.
- [31] Pourgholam M A, Khara H, Safari R, *et al.* Dietary administration of *Lactobacillus plantarum* enhanced growth performance and innate immune response of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*[J]. Probiotics & Antimicrobial Proteins, 2016, 8(1): 1-7.

- [32] Jami M J, Kenari A A, Paknejad H, *et al.* Effects of dietary  $\beta$ -glucan, mannan oligosaccharide, *Lactobacillus plantarum* and their combinations on growth performance, immunity and immune related gene expression of Caspian trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 91: 202-208.
- [33] Wang Y B, Tian Z Q, Yao J T, *et al.* Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response[J]. *Aquaculture*, 2008, 277(3-4): 203-207.
- [34] Merrifield D L, Dimitroglou A, Bradley G, *et al.* Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2010, 16(5): 504-510.
- [35] Piccolo G, Bovera F, Lombardi P, *et al.* Effect of *Lactobacillus plantarum* on growth performance and hematological traits of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Aquaculture International*, 2015, 23(4): 1025-1032.
- [36] Xia Y, Lu M X, Chen G, *et al.* Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 76: 368-379.
- [37] Moore K W, de Waal M R, Coffman R L, *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor[J]. *Annual Review of Immunology*, 2001, 19(1): 683-765.
- [38] Palócz O, Pászti-Gere E, Gálfi P, *et al.* Chlorogenic acid combined with *Lactobacillus plantarum* 2142 reduced LPS-Induced intestinal inflammation and oxidative stress in IPEC-J2 cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166642.
- [39] Ren P F, Xu L, Yang Y L, *et al.* *Lactobacillus planarum* subsp. *plantarum* JCM 1149 vs. *Aeromonas hydrophila* NJ-1 in the anterior intestine and posterior intestine of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus*♀×*Oreochromis aureus*♂: an *ex vivo* study[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(1): 146-153.
- [40] He S X, Liu W S, Zhou Z G, *et al.* Evaluation of probiotic strain *Bacillus subtilis* C-3102 as a feed supplement for koi carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 2011, S1: 005.
- [41] Picchiatti S, Fausto A M, Randelli E, *et al.* Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(3): 368-376.

## Effects of three kinds of lactic acid bacteria on growth, antioxidant and immune functions of *Channa argus*

KONG Yuxin<sup>1,2,3,4</sup>, TIAN Jiabin<sup>1,2,3,4</sup>, PENG Sibao<sup>1,2,3,4</sup>, WANG Guiqin<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Laboratory of Animal Production and Quality Security, Ministry of Education

Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

3. Joint Laboratory of Modern Agricultural Technology International Cooperation, Ministry of Education,

Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

4. Jilin Provincial Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science,

Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract:** In order to study the effects of lactic acid bacteria (LAB) on the growth, antioxidative status and immunity of *Channa argus*, 360 *C. argus* with an initial weight of  $(3.43 \pm 0.05)$  g were selected and randomly divided into 4 groups. Each group was set up with 3 replicates, each with 30 *C. argus*. They were fed with basic feed and test feed supplemented with  $10^8$  CFU *Lactococcus lactis* L21 (L21 group), *Lactobacillus plantarum* W21 (W21 group), and *Enterococcus faecalis* L2 (L2 group). After 8 weeks, we collected the serum, liver, spleen, kidney and intestinal tissues to determine related indicators and genes expression. The results showed that compared with the control group, the three LAB added to the feed could significantly increase the average weight gain rate (AWGR), specific growth rate (SGR) and feed efficiency rate (FER) of *C. argus*, and the L21 group was significantly higher than other groups. Compared with the control group, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH) and alkaline phosphatase (AKP) in the L2 group were significantly higher than control group, the lysozyme (LZM) activity of the W21 and L2 groups was significantly higher than that of the control and L21 groups, and the immunoglobulin M (IgM) activity of each group was not significant. The genes expression levels of *IL-1 $\beta$* , *IL-8*, *IL-10* and *TNF- $\alpha$*  in various tissues all increased to varying degrees, and LAB could significantly promote the expression of immune-related genes in the intestine. Research shows that under the experimental conditions, *L. lactis* L21 had the best application effect in *C. argus*, and it could improve the growth, and immune function of *C. argus*.

**Key words:** *Channa argus*; lactic acid bacteria; growth; antioxidative; immunity

**Corresponding author:** WANG Guiqin. E-mail: wgqjlau@aliyun.com

**Funding project:** China Agriculture Research System(CARS-46)