



水体中泼洒复合乳杆菌对尼罗罗非鱼养殖池塘环境、肠道和鳃健康的影响

王 淼, 卢迈新*, 衣萌萌, 李忠徽, 高风英,
刘志刚, 可小丽, 曹建萌

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部热带亚热带水产资源利用与
养殖重点实验室, 广东 广州 510380)

摘要: 研究在尼罗罗非鱼养殖池塘中添加复合乳杆菌对养殖池塘环境、尼罗罗非鱼肠道和鳃健康的影响, 为乳杆菌在尼罗罗非鱼健康养殖中的应用提供基础。在尼罗罗非鱼养殖池塘水体中泼洒复合乳杆菌(对照组: 0; 实验组: 1.0×10^4 CFU/mL), 实验周期为10周。复合乳杆菌的成分为干酪乳杆菌和酸鱼乳杆菌, 比例为1:2.2。监测池塘水质指标、罗非鱼肠道和鳃的免疫及抗氧化指标, 并运用高通量测序技术(Illumina MiSeq), 比较对照组和实验组水体、底泥、尼罗罗非鱼肠道和鳃黏膜共生菌群落结构差异。结果显示, 从第7周开始, 实验组水体中的硝酸盐含量始终低于对照组, 实验组比对照组降低了72.68%、72.00%、26.27%和21.46%; 实验组水体中的总氮含量在从第6周开始低于对照组, 分别降低了43.39%、44.64%、15.64%、37.57%和34.49%; 实验组水样中的总磷含量从第4周开始低于对照组, 分别降低了40.91%、33.33%、50.00%、33.33%、17.39%、39.29%和25.71%。与对照组相比, 实验组尼罗罗非鱼肠道的碱性磷酸酶(AKP)活性提高了45.04%, 实验组尼罗罗非鱼鳃的总超氧化物歧化酶(SOD)和AKP分别提高了58.26%和60.99%。复合乳杆菌的添加对尼罗罗非鱼养殖池塘水体菌群结构影响较大, 并未影响池塘底泥的菌群结构, 影响了尼罗罗非鱼肠道和鳃的菌群结构, 其中条件致病菌不动杆菌属、泛菌属细菌的相对丰度降低, 而有益细菌芽孢杆菌属的相对丰度增加。因此, 在养殖水体中泼洒适当浓度的复合乳杆菌可以改善池塘水质, 提高尼罗罗非鱼肠道和鳃的免疫力、抗氧化能力, 同时调节养殖水体、尼罗罗非鱼肠道和鳃的菌群结构。

关键词: 尼罗罗非鱼; 干酪乳杆菌; 酸鱼乳杆菌; 水质; 免疫力; 抗氧化能力; 菌群结构

中图分类号: S 965

文献标志码: A

鱼类能否保持健康状况是水产养殖的首要问题, 鱼类健康状况既取决于鱼体自身的免疫力, 又与机体内外环境的平衡状态相关。肠道和鳃是鱼类和外界环境交流的主要渠道, 也是鱼类抵御外界有害环境的第一道屏障, 分布在其上的共生菌群与其作用的发挥关系密切^[1]。当

鱼体健康状况良好时, 其共生菌结构维持相对稳定的动态平衡状态^[2], 刺激机体建立完善的免疫系统; 当这种平衡被打破时, 失衡的菌群结构则影响宿主的生理和免疫状态^[3]。而微生物与宿主以及所处的水生环境相互依赖、相互制约, 因此, 在水产养殖中, 对养殖水体及其菌

收稿日期: 2019-04-11 修回日期: 2019-08-08

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-46); 广东省促进经济发展专项(粤农2019B3); 广州市科技计划(201904010304)

通信作者: 卢迈新, E-mail: mx-lu@163.com

群结构的调节必然会对养殖鱼类的健康状况造成影响。

益生菌作为饲料添加剂在生产上较普遍使用,益生菌能够改善鱼肠道共生菌结构^[4],提高有益菌的比例,还能将因过量使用抗生素引发的鱼肠道菌群紊乱状态调整为健康状态^[5],进而提高鱼体的免疫力。益生菌可以调节养殖环境微生物群落结构,降解水中的氨氮。将益生菌泼洒到养殖水体中,同时作为水质调节剂和免疫调节剂使用,操作简单方便,应用前景广阔。研究表明,将枯草芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)拌料投喂或者泼洒到养殖水体中,均可提高罗非鱼的免疫力,改善罗非鱼肠道菌群结构^[6]。将凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)和光合细菌(*Rhodospseudomonas palustris*)定期泼洒到罗非鱼养殖池塘,可显著提高罗非鱼的生长率和免疫力^[7]。在草鱼养殖水体中添加枯草芽孢杆菌和光合细菌等组成的复合益生菌,可以有效提高水体的菌群多样性^[8]。而益生菌是如何通过调节池塘和鱼体的微生态环境来发挥作用的仍有待研究。因此,本实验向罗非鱼养殖池塘中定期泼洒复合乳杆菌,研究环境和鱼体菌群结构的变化特征,并研究其对养殖池塘水质环境和罗非鱼肠道和鳃免疫相关酶活的影响,进而研究复合乳杆菌对养殖水体及鱼体健康的影响,旨在为乳杆菌在生产中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验设计

本实验在中国水产科学研究院珠江水产研究所高要良种基地进行。本实验所用的复合益生菌,成分为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)和酸鱼乳杆菌(*L. acidipiscis*)(比例=1:2.2),由中国水产科学研究院珠江水产研究所提供。挑取单菌落接种至MRS液体培养基中,置于30℃、150 r/min恒温摇床中培养,根据每株菌的生长曲线培养至对数生长期,将菌液浓缩至 5×10^{10} CFU/mL,4℃保存备用。选取尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)鱼苗(体质量约为5 g)240尾,随机分配到6个方形水泥池(长×宽×高=1.96 m×1.96 m×1.00 m),每池有实验鱼40尾。其中实验组为复合乳杆菌泼洒组(E),复合乳杆菌的水体终浓度为 1.0×10^4 CFU/mL,另设PBS泼洒作为对照组(C),每组3个重复。每7天按照以上浓度向池塘中泼洒一次复合乳杆菌。每日16:00按照鱼体总质量

3%的投饵量进行投饵。实验周期为10周,实验期间不换水,每7天检测一次池塘水质。

1.2 泥样、水样采集与水质指标测定

每周在泼洒复合乳杆菌前,从各个水泥池取泥样、水样,水样一式两份,其中一份加浓硫酸(水样pH<2)保存。水质指标使用广州连华环保科技有限公司生产的总氮测定仪(LH-3BN),多参数水质测定仪[5B-3B(V8)]和智能多参数消解器[5B-1(V8)]测定。其中,水中 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的含量采用纳氏试剂法测定; $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的含量测定采用酚二磺酸法测定; $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的含量采用盐酸萘乙二胺分光光度法测定;TN的含量采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定;COD的含量采用重铬酸钾法测定;TP的含量采用钼锑抗分光光度计法测定。

1.3 鱼体样品采集

实验结束时,罗非鱼停喂24 h。从每个水泥池随机取3尾鱼,麻醉后用无菌生理盐水冲洗罗非鱼鳃部两次,以除去污物,去除鳃弓,剪下鱼鳃,将鳃丝置于1.5 mL离心管中。用消毒的手术剪剪去罗非鱼的中部肠道,挤出粪便,用生理盐水冲洗两次,分装到1.5 mL离心管中。样品于-80℃保存,用于酶活力测定和菌群高通量测序分析。

1.4 酶活力测定

测定组织中过氧化物酶(peroxidase, POD)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)和总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力。上述指标的测定均使用南京建成生物工程研究所的试剂盒,并按照说明书操作进行。

1.5 细菌总DNA的提取

用环境样本DNA纯化试剂盒(ZYMO Research公司)进行基因组DNA提取,0.8%琼脂糖凝胶电泳检测纯化的DNA。

1.6 高通量测序分析

16S引物:515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[9],以稀释后的基因组DNA为模板,根据测序区域的选择,使用带Barcode的特异引物进行PCR。每一个25 μL的体系包括1×PCR buffer、1.5 mmol/L MgCl_2 、0.4 μmol/L dNTPs、正向和反向引物各1.0 μmol/L、0.5 U KOD-Plus-Neo

酶(TOYOBO)和10 ng模板。PCR程序包括起始94 °C 1 min, 30循环(变性 94 °C 20 s, 退火 54 °C 30 s 和 延伸 72 °C 30 s), 72 °C 5 min。PCR产物与1/6体积的6×loading buffer混合, 使用2% 琼脂糖凝胶电泳检测。取目的条带, 回收使用QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), 使用Qubit@ 2.0 Fluorometer(Thermo Scientific)定量, 等摩尔量混合, 建库使用TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep Kit, 构建好的文库经过定量和文库检测合格后, 使用罗宁生物的Hiseq 2500平台PE250模式测序。

1.7 数据分析

使用FLASH接双端序列。基于Barcode从reads中拆分出各样品序列。截去Barcode序列得到原始数据, 使用Trimmomatic进行质控。嵌合体去除使用Uchime算法, 参考数据库为Gold (http://drive5.com/uchime/uchime_download.html)。基于Usearch(<http://drive5.com/uparse/>)软件, 使用UPARSE算法在97%的一致性水平上进行OTU聚类, 挑选每个OTU中出现频数最高的序列作为OTU的代表序列。使用UCLUST分类法与 SILVA 数据库(Rlease_123 <http://www.arb-silva.de/>)进行注释分析。使用PyNAST将代表性序列进行多重比对。使用FastTree构建进化树。对各样本做均一化处理, 以样品中数据量最少的为标准进行重抽样。测序结果数据统计和作图使用R完成。

水质和酶活性数据用SigmaPlot for Windows (v. 11.0, Systat Software, Inc., Germany)软件作图, 用IBM SPSS 18.0进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 比较不同处理组间的差异, 统计结果以 $P<0.05$ 定为具有显著性差异。数据采用平均值±标准误(mean±SE)表示。

2 结果

2.1 复合乳杆菌泼洒对罗非鱼养殖水体水质的影响

复合乳杆菌的泼洒可以有效改善罗非鱼养殖池塘水体水质, 从第7周开始, 实验组水样中的硝酸盐含量始终低于对照组, 实验组比对照组降低了72.68%、72.00%、26.27%和21.46%, 其中第7周差异显著($P<0.05$)。实验组水样中的总氮含量在从第6周开始低于对照组, 分别降低了43.39%、44.64%、15.64%、37.57%和34.49%。实验组水样中的总磷从第4周开始低于对照组, 分

别降低了40.91%、33.33%、50.00%、33.33%、17.39%、39.29%和25.71%, 其中第9周差异显著($P<0.05$)(图1)。

2.2 复合乳杆菌泼洒对罗非鱼肠道和鳃免疫与抗氧化功能的影响

养殖水体中泼洒复合乳杆菌可以提高罗非鱼的免疫和抗氧化功能(图2), 在实验结束时, 即养殖实验开始后的第10周采集罗非鱼的肠道和鳃样品, 进行免疫与抗氧化能力分析。结果显示, 与对照组相比, 实验组中罗非鱼肠道的碱性磷酸酶(AKP)活性提高了45.04%($P<0.05$), 实验组中罗非鱼鳃的总超氧化物歧化酶(SOD)和AKP分别提高了58.26%($P<0.05$)和60.99%($P<0.05$)。

2.3 复合乳杆菌泼洒对罗非鱼养殖水体菌群结构的影响

对照组罗非鱼养殖池塘水体细菌主要类群为: 变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)和酸杆菌门(Acidobacteria), 平均相对丰度分别为38.58%±3.58%、15.59%±1.69%、14.49%±3.92%、8.22%±1.30%、5.58%±1.3%、4.71%±0.7%、4.00%±0.4%、3.66%±0.5%和1.72%±0.49%, 合计占总细菌序列数的96.55%(表1)。对照组罗非鱼养殖池塘底泥细菌的主要类群为: 变形菌门、绿弯菌门、厚壁菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、放线菌门、疣微菌门、硝化刺菌门(Nitrospinae)、浮霉菌门、螺旋体门(Spirochaetes)、Latescibacteria、Kiritimatiellaeota和硝化螺旋菌门(Nitrospirae), 平均相对丰度分别为38.26%±1.61%、13.97%±0.18%、11.57%±0.56%、9.53%±0.05%、7.06%±0.71%、2.64%±0.20%、2.29%±0.15%、2.09%±0.10%、1.93%±0.33%、1.18%±0.20%、1.06%±0.08%、1.05%±0.05%和1.04%±0.30%, 合计占总细菌序列数的93.67%。对比发现, 对照组罗非鱼养殖池塘水体细菌类群中的放线菌门、蓝细菌门、浮霉菌门和疣微菌门的相对丰度显著高于底泥样品($P<0.05$), 而拟杆菌门、绿弯菌门、酸杆菌门、硝化刺菌门、螺旋体门、Kiritimatiellaeota、硝化螺旋菌门和Latescibacteria相对丰度显著低于底泥样品($P<0.05$)(表1)。

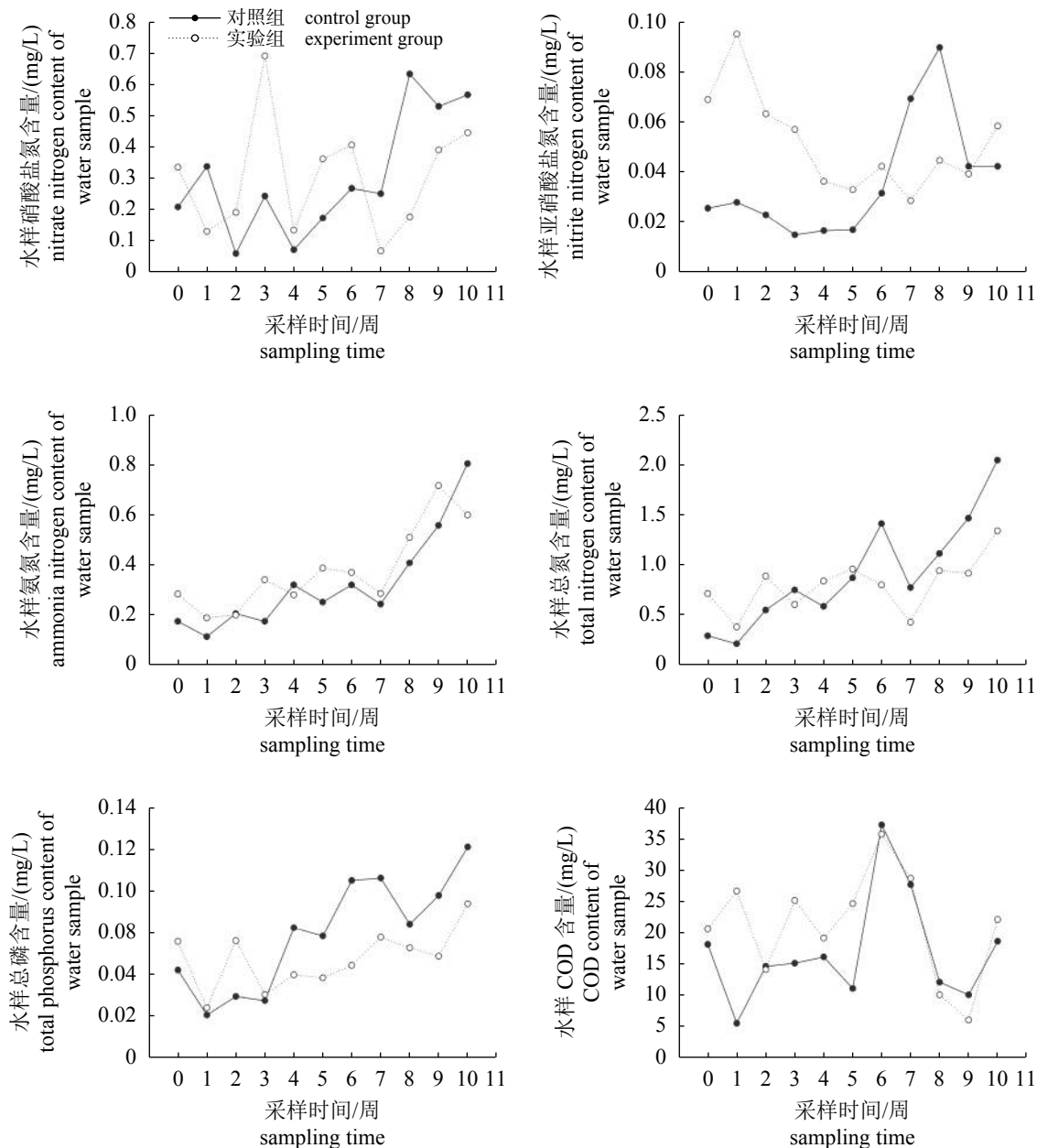


图1 水样中硝酸盐氮、亚硝酸盐氮、氨氮、总氮、总磷和COD含量随时间变化

Fig. 1 Temporal variation of nitrate, nitrite, ammonia nitrogen, total nitrogen, total phosphorus and COD of pond water

将水样菌群进一步细分到属,发现对照组罗非鱼养殖池塘水样菌群主要是鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、*Paenisporosarcina*、蓝菌属(*Cyanobium* PCC-6307)、FukuN18 freshwater group、埃希氏菌属-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、*Methyloparacoccus*、链球菌属(*Streptococcus*)、*Cyanophora paradoxa*、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)和瘤胃球菌属(*Ruminococcaceae* UCG-014)(平均相对丰度>1%),相对丰度分别为5.17%±0.30%、2.54%±2.28%、

2.50%±1.51%、2.40%±0.70%、2.13%±0.18%、1.53%±0.06%、1.52%±0.30%、1.51%±0.12%、1.36%±1.04%、1.35%±0.79%、1.16%±0.06%和1.03%±0.13%,实验组罗非鱼养殖池塘水样菌群主要是蓝菌属PCC-6307、鞘氨醇单胞菌属、埃希氏菌属-志贺氏菌属、红育菌属(*Rhodoferrax*)、*Limnohabitans*、球衣细菌属(*Sphaerotilus*)、不动杆菌属、*Polynucleobacter*、食酸菌属(*Acidovorax*)、链球菌属和台湾温单胞菌属(*Tepidimonas*)(平均相对丰度>1%),相对丰度分别为4.64%±1.30%、3.57%±0.17%、2.45%±0.09%、2.16%±0.69%、

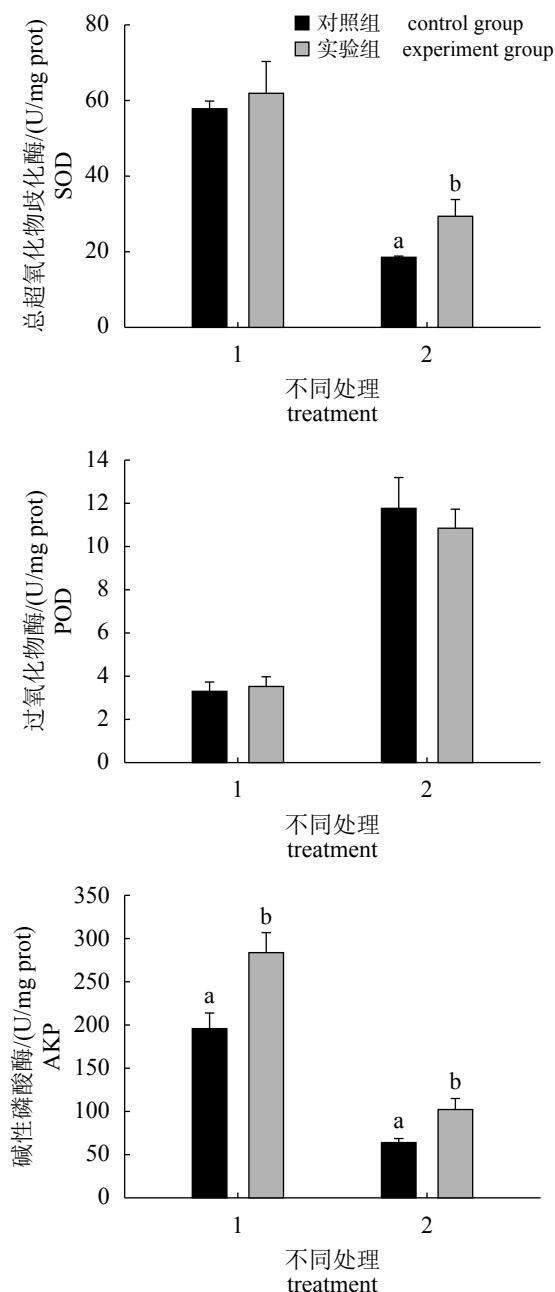


图2 复合乳杆菌泼洒对尼罗罗非鱼肠道和鳃SOD、POD、AKP活性的影响

1. 肠道; 2. 鳃。不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 下同

Fig. 2 Effect of mixed culture of *Lactobacillus* on SOD, POD and AKP activities of intestine and gill of *O. niloticus*

1. intestines; 2. gill. Different small letters mean significant difference ($P < 0.05$), the same below

2.10%±1.10%、1.95%±0.46%、1.78%±0.41%、1.71%±0.03%、1.43%±0.63%、1.36%±0.11%和1.14%±0.78%。对照组罗非鱼养殖池塘底泥菌群主要是鞘氨醇单胞菌属、埃希氏菌属-志贺氏菌

属、不动杆菌属、链球菌属、地杆菌属(*Geobacter*)和甲基杆菌属, 相对丰度分别为5.03%±0.03%、2.31%±0.13%、1.49%±0.13%、1.38%±0.05%、1.19%±0.17%和1.16%±0.07%, 实验组罗非鱼养殖池塘底泥菌群主要属别和对照组无显著差异(图3)。利用主坐标分析(PCoA)对菌群的β多样性进行评估, 结果显示, 底泥菌群和水体菌群结构组成上存在较大差异, 距离较远, 实验组水样菌群和对照组水样菌群结构组成上也存在差异, 实验组水样的样点有明显聚集(图4)。

与对照组相比, 实验组池塘水样中的鞘氨醇单胞菌属、甲基杆菌属、肠球菌属(*Enterococcus*)、*Alsobacter*、FukuN18 freshwater group、*Methyloparacoccus*和*Cyanobacterium* PCC-10605相对丰度显著降低($P < 0.05$), 实验组池塘水样中的球衣细菌属、甲基单胞菌属(*Methylomonas*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium* 1)、*Candidatus Aquirestis*、拟杆菌属(*Bacteroides*)、*Fluviicola*和*Ferruginibacter*相对丰度显著升高($P < 0.05$)。

2.4 复合乳杆菌泼洒对罗非鱼肠道和鳃菌群结构的影响

对照组罗非鱼肠道共生菌主要类群为: 变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、浮霉菌门和放线菌门, 平均相对丰度分别为82.63%±0.78%、7.68%±0.34%、2.21%±0.31%、1.48%±0.31%和1.35%±0.08%, 合计占总细菌序列数的95.35%。鳃共生菌主要类群为: 变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门和酸杆菌门, 平均相对丰度分别为79.26%±2.76%、11.10%±1.91%、2.71%±0.39%、1.64%±0.18%和1.07%±0.26%, 合计占总细菌序列数的95.78%(表1)。

将菌群进一步细分到属, 发现对照组罗非鱼肠道菌群主要包括: 鞘氨醇单胞菌属、甲基杆菌属、不动杆菌属、埃希氏菌属-志贺氏菌属和假单胞菌属(*Pseudomonas*)(平均相对丰度>1%), 平均相对丰度分别为57.91%±0.97%、6.46%±0.27%、2.81%±0.08%、2.32%±0.13%和1.45%±0.09%。对照组罗非鱼鳃菌群主要包括: 鞘氨醇单胞菌属、甲基杆菌属、不动杆菌属、埃希氏菌属-志贺氏菌属、链球菌属和假单胞菌属(平均相对丰度>1%), 平均相对丰度分别为56.86%±1.96%、6.64%±0.37%、2.38%±0.09%、2.22%±0.07%、2.06%±0.72%和1.44%±0.21%(图3)。实验组罗非鱼肠道和鳃共生菌主要属别和对照组无显著差异。

表 1 水体、底泥、肠道和鳃菌群结构(门水平)

Tab. 1 Community structure of microbiota of intestine and gill of tilapia, and pond water and sediment(Phylum level)

样品编号 sample ID	分类单元(门) taxon(phylum)													
	变形菌门 Proteobacteria	厚壁菌门 Firmicutes	拟杆菌门 Bacteroidetes	绿弯菌门 Chloroflexi	放线菌门 Actinobacteria	酸杆菌门 Acidobacteria	蓝细菌门 Cyanobacteria	浮霉菌门 Planctomycetes	疣微菌门 Verrucomicrobia	硝化细菌门 Nitrospirae	螺旋体门 Spirochaetes	Kiritimati Ilaeota	硝化螺旋 菌门 Nitrospirae	Latescibac- teria
IC	82.63±0.78	7.68±0.34	2.21±0.31	0.97±0.06	1.35±0.08	0.74±0.04	0.31±0.02	1.48±0.31	0.78±0.12	0.09±0.01	0.10±0.02	0.11±0.02	0.07±0.01	0.06±0.01
IE	81.18±1.49	9.00±0.77	2.26±0.41	0.88±0.06	1.69±0.19	0.82±0.06	0.78±0.18	1.08±0.58	0.40±0.03	0.11±0.01	0.13±0.02	0.09±0.01	0.09±0.01	0.05±0.01
GC	79.26±2.76	11.10±1.91	2.71±0.39	1.00±0.12	1.64±0.18	1.07±0.26	0.49±0.13	0.46±0.19	0.35±0.07	0.10±0.01	0.09±0.01	0.11±0.01	0.09±0.02	0.09±0.03
GE	83.84±0.52	8.24±0.36	1.77±0.11	0.87±0.04	1.34±0.10	0.76±0.03	0.42±0.04	0.45±0.08	0.27±0.03	0.10±0.01	0.10±0.01	0.12±0.02	0.07±0.01	0.07±0.01
WC	38.58±3.58	14.49±3.92	4.00±0.40	8.22±1.30	15.59±1.69	1.72±0.49	5.58±1.30	4.71±0.76	3.66±0.50	0.12±0.03	0.18±0.01	0.20±0.03	0.17±0.02	0.06±0.01
WE	45.98±3.03	9.95±1.61	11.82±1.51	2.78±0.20	15.22±0.17	1.97±0.17	5.55±1.54	1.83±0.96	1.87±0.49	0.05±0.01	0.15±0.02	0.22±0.05	0.08±0.02	0.06±0.02
SC	8.26±1.61	11.57±0.56	7.06±0.71	13.97±0.18	2.64±0.20	9.53±0.05	0.83±0.01	1.93±0.33	2.29±0.15	2.09±0.10	1.18±0.20	1.05±0.05	1.04±0.30	1.06±0.08
SE	38.66±0.58	10.81±0.22	6.16±0.23	15.86±0.60	2.74±0.15	9.17±0.28	0.85±0.13	2.08±0.52	2.61±0.50	1.44±0.18	0.92±0.12	0.91±0.10	1.15±0.18	0.91±0.13

注: I: 鱼肠道样品; G: 鱼鳃样品; W: 水样; S: 泥样; C: 对照组; E: 实验组, 下同
Notes: I: intestine; G: gill; W: water sample; S: sediment sample; C: control group; E: experiment group, the same below

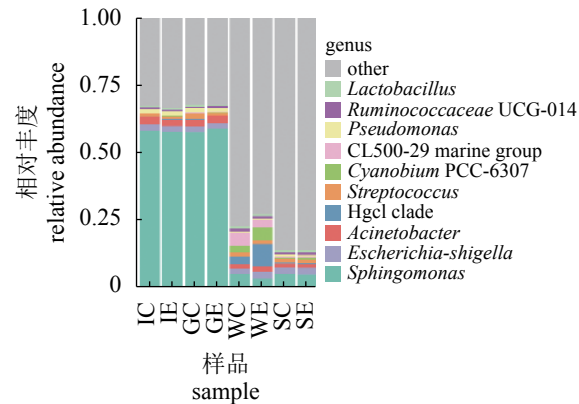


图 3 罗非鱼肠道和鳃样品、池塘水样和泥样中的主要细菌属的相对丰度

Fig. 3 Relative abundances of the dominant bacteria in tilapia intestine and gill samples, and water and sediment samples at genus level

与对照组相比, 实验组罗非鱼肠道中的不动杆菌属和FukuN18 freshwater group相对丰度显著降低($P<0.05$), 实验组罗非鱼肠道中的蓝菌属PCC-6307相对丰度显著升高($P<0.05$)。与对照组相比, 实验组罗非鱼鳃中的泛菌属(*Pantoea*)相对丰度较低, 蓝菌属PCC-6307和鲸杆菌属(*Cetobacterium*)相对丰度较高, 且差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

乳杆菌的应用主要体现在免疫调节、肠道健康、拮抗病原菌和产生天然抗生素等方面, 乳杆菌作为饲料添加剂使用受到广泛关注^[10-12]。

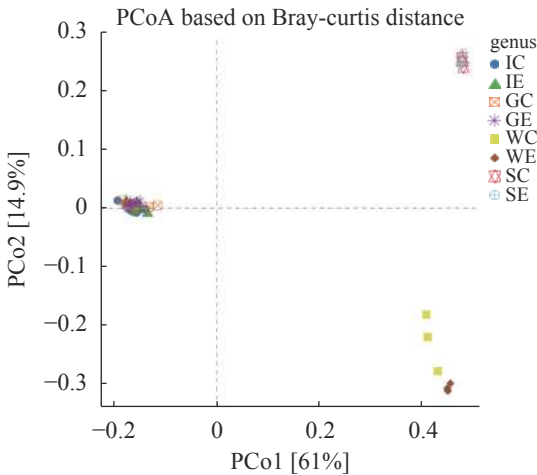


图 4 池塘水样、泥样和罗非鱼肠道、鳃样品细菌群落结构的主成分分析

Fig. 4 Principal coordinates analysis (PCoA) of the bacterial community from *O. niloticus* intestine and gill samples, and pond water and sediment samples

研究表明, 在金鲫(*Carassius auratus*)幼鱼饲料中添加含有嗜酸乳杆菌和枯草芽孢杆菌的复合益生菌, 可以降低金鲫肠道中的气单胞菌属的相对丰度, 提高微小杆菌属、柠檬酸杆菌属等的相对丰度^[13]。饲料中添加嗜酸乳杆菌能够促进军曹鱼(*Rachycentron canadum*)幼鱼的生长, 提高免疫酶和消化酶活性^[11]。在罗非鱼饲料中添加鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)可以改善罗非鱼的肠道结构, 提高黏膜免疫力^[14]。除在饲料中添加益生菌外, 水体中泼洒益生菌也是水产养殖中益生菌

的主要施用方式, 而乳杆菌对水环境的作用机理的研究还不足。对植物乳杆菌的研究发现, 其对亚硝酸盐具有去除作用, 作用机理包括直接化学反应作用和间接推动微生物的反硝化作用^[15]。干酪乳杆菌作为益生菌, 已广泛应用于养殖业和乳制品中^[16]。干酪乳杆菌可以调节养殖动物肠道菌群、增强养殖动物机体免疫力、促进养殖动物的生长发育, 同时可以净化动物的生长环境^[17-18]。研究发现, 干酪乳杆菌可以通过为反硝化微生物提供有机碳源来降低养殖水体中亚硝酸盐氮的含量^[19]。酸鱼乳杆菌由Tanasupawat等^[20]于2000年从发酵的鱼中分离获得, 其在养殖业尤其是水产养殖业中的应用还未见相关报道。本研究使用干酪乳杆菌和酸鱼乳杆菌为成分的复合益生菌, 通过泼洒施用, 显著降低了罗非鱼养殖池塘水体中总氮、硝酸盐氮和总磷的含量, 而水体中亚硝酸盐氮的含量并未受到显著影响, 可能由于实际养殖水体环境较为复杂, 而上述研究中干酪乳杆菌对亚硝酸盐氮的有效去除是需要特定的条件, 比如温度、碳源等。本研究中复合乳杆菌添加组的罗非鱼肠道中的AKP和鳃中的AKP、SOD酶活力也显著升高, 复合乳杆菌对罗非鱼具有一定的黏膜免疫和抗氧化调节能力。已有研究表明, 乳酸杆菌具有一定的自由基清除能力。如嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)具有较强的抗氧化能力^[21]。饲料中添加鼠李糖乳杆菌可以提高罗非鱼血清抗超氧阴离子自由基能力^[22]。饲料中添加 1×10^8 CFU/g的干酪乳杆菌能提高鲤(*Cyprinus carpio*)血清中LZM、SOD、AKP、POD酶活性, 增强鲤的非特异性免疫力^[23]。

复合乳杆菌对罗非鱼养殖池塘水体菌群结构影响较大, 并未影响池塘底泥的菌群结构。复合乳杆菌的泼洒降低了水体中的鞘氨醇单胞菌属、甲基杆菌属、肠球菌属、*Alsobacter*、FukuN18 freshwater group、*Methyloparacoccus*和*Cyanobacterium* PCC-10605的相对丰度, 提高了球衣细菌属、甲基单胞菌属、棒状杆菌属、*Candidatus*、*Aquirestis*、拟杆菌属、*Fluviicola*和*Ferruginibacter*的相对丰度。有研究表明, 拟杆菌门中的拟杆菌属在碳水化合物代谢, 营养吸收和肠道上皮细胞的成熟中扮演重要的作用^[24]。而上述菌属在水体中的功能还有待进一步的研究挖掘。复合乳杆菌的泼洒对水体菌群的影响

相对复杂, 也容易受到外界环境条件的限制。本研究中, 复合乳杆菌的泼洒影响了罗非鱼肠道和鳃的菌群结构, 其中条件致病菌不动杆菌属、泛菌属细菌含量降低^[25-26], 而有益细菌鲸杆菌属相对含量增加。梭杆菌门的鲸杆菌属在鱼体消化过程中有重要的作用, 可将蛋白胨等转化为醋酸等短链脂肪酸^[27]。而实验组罗非鱼肠道中的FukuN18 freshwater group相对丰度的降低, 可能是受水体中FukuN18 freshwater group降低的影响。陈营等^[12]研究表明, 在牙鲆稚鱼的饲料中添加鼠李糖乳杆菌, 提高了养殖水体和牙鲆肠道中的乳酸菌的数量, 降低了弧菌(*Vibrio*)的数量。饲料中添加嗜酸乳杆菌可以抑制吉富罗非鱼肠道中大肠杆菌(*Escherichia coli*)的生长^[28]。在罗非鱼饲料中添加鼠李糖乳杆菌, 降低了罗非鱼肠道中条件致病菌邻单胞菌属(*Plesiomonas*)的相对丰度, 提高了根瘤菌属(*Rhizobium*)和无色杆菌属(*Achromobacter*)的相对丰度^[29]。本研究中, 为接近实际生产状态, 简化乳杆菌的施用方式, 每周向水体中泼洒一次复合乳杆菌, 泼洒频率较低, 实验结果受外界环境影响较大, 乳杆菌的泼洒改善了罗非鱼肠道和鳃的菌群结构, 对养殖水体和底泥菌群结构的影响还有待进一步研究, 但本实验结果对于复合乳杆菌在实际生产中的应用具有较强的指导意义。

4 结论

综上所述, 在养殖池塘水体中泼洒复合乳杆菌, 可以降低水中总氮、硝酸盐氮和总磷的含量, 提高罗非鱼肠道和鳃的抗氧化能力和非特异性免疫力, 并调节水体、罗非鱼肠道和鳃的黏膜共生菌菌群结构。复合乳杆菌可以调节养殖池塘环境, 预防水产动物疾病, 是作为泼洒使用的益生菌的理想选择。

参考文献:

- [1] 姜红烨, 黄艳, 余新炳. 鱼的黏膜免疫研究进展[J]. 热带医学杂志, 2015, 15(8): 1150-1153.
Jiang H Y, Huang Y, Yu X B. Review of fish mucosal immunity research[J]. Journal of Tropical Medicine, 2015, 15(8): 1150-1153(in Chinese).
- [2] Littman D R, Pamer E G. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses[J]. Cell Host & Microbe, 2011, 10(4): 311-

- 323.
- [3] Musharrafieh R, Tacchi L, Trujeque J, *et al.* *Staphylococcus warneri*, a resident skin commensal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with pathobiont characteristics[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 169(1-2): 80-88.
- [4] Hao K, Wu Z Q, Li D L, *et al.* Effects of dietary administration of *Shewanella xiamenensis* A-1, *Aeromonas veronii* A-7, and *Bacillus subtilis*, single or combined, on the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) intestinal microbiota[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2017, 9(4): 386-396.
- [5] Gómez G D, Balcázar J L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2008, 52(2): 145-154.
- [6] Wang M, Liu G B, Lu M X, *et al.* Effect of *Bacillus cereus* as a water or feed additive on the gut microbiota and immunological parameters of Nile tilapia[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(6): 3163-3173.
- [7] Zhou X X, Tian Z Q, Wang Y B, *et al.* Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2010, 36(3): 501-509.
- [8] 张小平, 王一冰, 邓斌, 等. 添加不同益生菌对草鱼养殖水体菌群结构的影响[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(3): 459-466.
- Zhang X P, Wang Y B, Deng B, *et al.* Comparative analysis of microbial community from grass carp culture water supplementation with different probiotics[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(3): 459-466(in Chinese).
- [9] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(Suppl 1): 4516-4522.
- [10] 张羽, 盛洁, 李青, 等. 嗜酸乳杆菌对斑马鱼子代幼鱼免疫功能的影响[J]. *动物医学进展*, 2013, 34(11): 77-80.
- Zhang Y, Sheng J, Li Q, *et al.* Effect of *L. acidophilus* JCM 1132 on immune function of zebrafish (*Danio rerio*) offspring[J]. *Progress In Veterinary Medicine*, 2013, 34(11): 77-80(in Chinese).
- [11] 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).
- [12] 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).
- [13] 马小康, 吴小嫚, 胡乐琴. 2种活菌饲料对金鲫幼鱼肠道及水体微生态的影响[J]. *水产科学*, 2018, 37(3): 316-323.
- Ma X K, Wu X M, Hu Y Q. Effects of two species of dietary viable bacteria on microbiota in water and intestinal of juvenile red crucian carp *Carassius auratus*[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(3): 316-323(in Chinese).
- [14] Pirarat N, Pinpimai K, Endo M, *et al.* Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. *Research in Veterinary Science*, 2011, 91(3): e92-e97.
- [15] 谢凤行, 张峰峰, 周可, 等. 水质净化乳酸菌的分离鉴定及发酵参数优化[J]. *微生物学报*, 2017, 57(2): 304-314.
- Xie F X, Zhang F F, Zhou K, *et al.* Isolation, identification and fermentation optimization of lactic acid bacteria for aquaculture water purification[J]. *Acta microbiologica Sinica*, 2017, 57(2): 304-314(in Chinese).
- [16] 赵迪, 曾娟娟, 王蕾, 等. 干酪乳杆菌功能及应用的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2015(2): 56-58.
- Zhao D, Zeng J J, Wang L, *et al.* Research progress on function and application of *Lactobacillus casei*[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2015(2): 56-58(in Chinese).
- [17] 县怡涵, 赵秀英, 李晨博, 等. 植物乳杆菌和干酪乳杆菌对仔猪生长性能、器官指数及小肠形态的影响[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(12): 3805-3811.
- Xian Y H, Zhao X Y, Li C B, *et al.* Effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* on

- growth performance, organ index and intestinal morphology of piglets[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(12): 3805-3811(in Chinese).
- [18] 李阳, 常文环, 张姝, 等. 饲料添加壳寡糖和干酪乳杆菌对肉鸡生长性能、肌肉品质及抗氧化性能的影响[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(5): 1450-1461.
- Li Y, Chang W H, Zhang S, *et al.* Effects of dietary chitosan oligosaccharide and *Lactobacillus casei* on growth performance, meat quality and antioxidant function of broilers[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(5): 1450-1461(in Chinese).
- [19] 宋蓉, 许春苹, 梁运祥. 一株干酪乳杆菌对养殖水体亚硝酸盐去除机理的研究[J]. *淡水渔业*, 2013, 43(1): 3-8.
- Song R, Xu C P, Liang Y X. The study of nitrite degradation mechanism by a strain *Lactobacillus casei* in aquaculture water[J]. *Freshwater Fisheries*, 2013, 43(1): 3-8(in Chinese).
- [20] Tanasupawat S, Shida O, Okada S, *et al.* *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(4): 1479-1485.
- [21] 王琳珺, 潘道东, 杨媛, 等. 鱼类肠道嗜酸乳杆菌的分离及功能特性分析[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(5): 20-25.
- Wang L J, Pan D D, Yang Y, *et al.* Isolation and functional analysis of *Lactobacillus acidophilus* from fish intestine[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(5): 20-25(in Chinese).
- [22] 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. aureu*)[J]. *Fisheries Science*, 2014, 33(10): 601-605(in Chinese).
- [23] 张海朋, 谷巍, 鞠安琪, 等. 饲料中添加干酪乳杆菌对鲤鱼非特异性免疫力和抗病力的影响[J]. *中国兽医杂志*, 2017, 53(7): 85-88.
- Zhang H P, Gu W, Ju A Q, *et al.* Effects of non-specific immunity and disease resistance of feeding *Lactobacillus casei* on common carp[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2017, 53(7): 85-88(in Chinese).
- [24] Lyons P P, Turnbull J F, Dawson K A, *et al.* Exploring the microbial diversity of the distal intestinal lumen and mucosa of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) using next generation sequencing (NGS)[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(1): 77-91.
- [25] 李瑾年, 沈守琼, 余为一, 等. 正常鱼体内条件致病菌种类的调查研究[J]. *淡水渔业*, 1999, 29(2): 21-24.
- Li J N, Shen S Q, Yu W Y, *et al.* Investigation on varieties of opportunist pathogens existed in healthy freshwater fish[J]. *Freshwater Fisheries*, 1999, 29(2): 21-24(in Chinese).
- [26] 杨迟. 实验用斑马鱼常见病菌的分离检测及其致病性研究[D]. 上海: 东华大学, 2014.
- Yang C. Isolation and detection of common pathogenic bacteria and associated pathogenic research on laboratory zebrafish[D]. Shanghai: Donghua University, 2014(in Chinese).
- [27] Finegold S M, Vaisanen M L, Molitoris D R, *et al.* *Cetobacterium somerae* sp. nov. from human feces and emended description of the genus *Cetobacterium*[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, 26(2): 177-181.
- [28] 刘小玲, 曹俊明, 邝哲师, 等. 嗜酸乳酸菌对吉富罗非鱼生长、非特异性免疫酶活性和肠道菌群的影响[J]. *广东农业科学*, 2013, 40(1): 123-126.
- Liu X L, Cao J M, Kuang Z S, *et al.* Effect of dietary *Lactobacillus* on growth performance, non-specific immune enzymes activities and intestinal microflora of *Oreochromis niloticus*[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, 40(1): 123-126(in Chinese).
- [29] 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.

Effects of mixed culture of *Lactobacillus* as water additive on the environment of pond, and the health of intestine and gill of tilapia(*Oreochromis niloticus*)

WANG Miao, LU Maixin*, YI Mengmeng, LI Zhonghui, GAO Fengying,
LIU Zhigang, KE Xiaoli, CAO Jianmeng

(Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: To provide a basis for the application of *Lactobacillus* in the healthy aquaculture of tilapia, the effects of mixed culture of *Lactobacillus* as water additive on the environment of pond, and the health of intestine and gill of tilapia were studied. Mixed culture of *Lactobacillus* was added to the water of tilapia (*Oreochromis niloticus*) pond (control group: 0; experimental group: with a final concentration of 1.0×10^4 cfu/mL) for ten weeks. The components of mixed culture of *Lactobacillus* were *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, with a 1:2.2 ratio. The water quality of pond, immune and antioxidant indexes of the intestine and gill of tilapia were monitored. High throughput sequencing technique (Illumina Miq) was used to compare the community structure of microbiota in water, sediment, intestine and gill mucosa of tilapia between the control and the experimental group. The results showed that the nitrate content in the water samples of the experimental group was lower than that of the control group. From the seventh week, and the nitrate content in the water samples of the experimental group was 72.68% ($P < 0.05$), 72.00% ($P > 0.05$), 26.27% ($P > 0.05$) and 21.46% ($P > 0.05$) lower than that of the control group, respectively. The total nitrogen content in the water samples of the experimental group was 43.39% ($P > 0.05$), 44.64% ($P > 0.05$), 15.64% ($P > 0.05$), 37.57% ($P > 0.05$) and 34.49% ($P > 0.05$) lower than that of the control group from the sixth week, respectively. The total phosphorus content in the water samples of the experimental group was 40.91% ($P > 0.05$), 33.33% ($P > 0.05$), 50.00% ($P > 0.05$), 33.33% ($P > 0.05$), 17.39% ($P > 0.05$), 39.29% ($P < 0.05$) and 25.71% ($P > 0.05$) lower than that of the control group from the fourth week, respectively. Compared with the control group, the activity of alkaline phosphatase (AKP) in the intestine of tilapia in the experimental group increased by 45.04% ($P < 0.05$), and the total superoxide dismutase (SOD) and AKP in the gill of tilapia in the experimental group increased by 58.26% ($P < 0.05$) and 60.99% ($P < 0.05$), respectively. Mixed culture of *Lactobacillus* influenced the community structure of microbiota of pond water, but did not affect that of sediment. Microbiota of intestine and gill of tilapia were affected by the probiotics, among which, the conditional pathogens, *Acinetobacter* and *Pantoea* were decreased, while the beneficial bacteria, *Cetobacterium* was increased. Using mixed culture of *Lactobacillus* as water additive could improve water quality, the immunity and antioxidant capacity of intestine and gill of tilapia, and regulate the community structure of microbiota of intestine and gill of tilapia.

Key words: *Oreochromis niloticus*; *Lactobacillus casei*; *Lactobacillus acidophilus*; water quality; immunity capacity; antioxidant capacity; microbiota structure

Corresponding author: LU Maixin. E-mail: mx-lu@163.com

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-46), Special Funds for Promoting Economic Development in Guangdong Province (Yue Nong 2019B3); Science and Technology Program of Guangzhou, China (201904010304).